

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

関口記念特別賞受賞

メラノーマの新規治療法に関する基礎的研究

研究代表者 高木 理英 (医学部 免疫学)

緒言

美白剤に含まれる白樺樹皮由来のフェノール化合物であるロドデノール(英語表記: rhododendrol)が皮膚の白斑症を誘発するため社会的問題になった事は記憶に新しい¹⁾. 我々は既に美白剤ロドデノールで誘発される白斑が自己免疫病であり, HLA-DR4が遺伝要因であること, さらにその発症機序についてはロドデノールの結合を受けたチロシナーゼ蛋白から「隠蔽自己抗原ペプチド(cryptic-self peptides)」が産生され, これを非自己と誤認したT細胞によってメラノサイトが傷害されるという事を解明している.

この隠蔽自己ペプチド分子機構の基礎的見地となる発見は我々の研究で, 自己のインスリン分子に反応するT細胞によって引き起こされる自己免疫病(インスリン自己免疫症候群)からであった. インスリン分子はS-S結合が3箇所存在するペプチドダイマーだが, ここにバセドウ病の治療に用いられるメチマゾールのような還元剤が作用すると一部のS-S結合が切断されてα鎖のモノマーが出現する. この分子はHLA-DRB1*04:06に高親和性に結合する構造モチーフを持っているため生理的には存在しないHLA-ペ

プチド複合体が多数出現する事となる. 生体はこれを「免疫学的非自己」と勘違いしてT細胞を活性化し, インスリンに対する抗体が産生されて低血糖のような症状を引き起す²⁾.

このような分子機構がロドデノールによって引き起こされる機序についてはFig.1に示すとおりである. チロシナーゼにロドデノールやその代謝産物が結合する事によってアロステリック効果にみられるような酵素の高次構造変化がおこり, 通常では切断されないような部分でプロテアーゼによる切断がされ生理的には存在しない抗原ペプチド(これが隠蔽自己抗原)が出現する事が考えられる. この抗原が患者のMHCの抗原収容溝に結合すると抗原提示・免疫応答がおこりメラノサイトが傷害される. このような免疫応答がロドデノールで誘発されるのであれば, この隠蔽自己抗原ペプチドという概念を用いる事によってロドデノールは「抗腫瘍免疫応答」を誘導できるはずであると考え, メラノーマの新規治療への応用を試みる研究を開始した. C57BL/6由来のメラノーマ細胞であるB16を用いて行ったマウス実験においては, 予想通り腫瘍抑制効果を確認している. ロドデノール処理したB16細胞で免疫されたマウスは免疫されなかったマウスに比べて体内にお

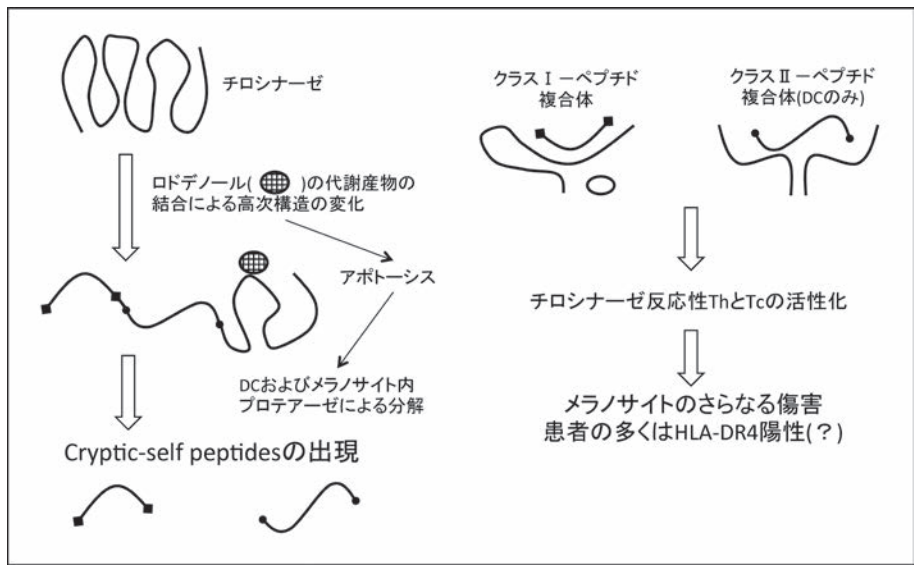


Fig. 1. 白斑症と隠ぺい自己抗原 (仮説).

ける腫瘍の成長抑制を有意に示し、ロドデノール処理群は全身性の白斑症を発症した。注目すべきはマウスにはロドデノールを直接注射したり塗ったりしたわけではないという点である。既存の実験系においてはロドデノールによる直接的な細胞障害は考えられず、自己の免疫系を介して起こった事象であると思われるが、今回の研究においてはロドデノールが腫瘍細胞に与える直接的な作用(障害)についても観察を進めた。またロドデノール以外(熱処理など)も高次構造を変化させ、隠ぺい自己抗原を発現しうる可能性についても検討した。さらに皮膚科学会が発表した疫学調査報告においては、ロドデノール誘発性白斑症に合併して尋常性白斑が確認された例が14%あったとされている。白皮症の中でも最も頻度が高い疾患であり治療抵抗性で再発頻度も高い難治性疾患として知られている尋常性白斑についても検討した。本症の病因についてはまだはっきりと解明されていない点が多く、単一疾患ではなくおそらく多種の原因によって惹起される色素脱色症であろうと考えられている。現在知られているだけでも(1)HLA型との関連ではDR4を有するものが高頻度である事(遺伝要因)、(2)血清中の色素細胞抗原に反応する抗色素細胞抗体の存在が報告されており抗体依存性細胞障害(ADCC)を介して色素細胞を傷害する事、(3)HLA-A*0201に拘束されたCD8⁺T細胞が末梢血中に存在するという報告がある。既に構築されている我々の系を用いて、ロドデノール誘発性白斑症と同様の原理が尋常性白斑にもあてはまるのかも解析した。

材料と方法

ペプチド合成

ヒトメラノーマ関連T細胞エピトープの各種報告に基づいてペプチドを合成、精製した^{3,4)}。

末梢血単核細胞(PBMCs)

埼玉医科大学病院IRBの承認を得て研究を開始した。

同意を得られた尋常性白斑の患者2名(V01~V02)より

静脈血の提供を受け、Ficoll-Paqueを用いた勾配遠心分離を用いて調製した。PBMCはペプチドと共培養し、残りの細胞は凍結保存した。顆粒白血球から得られたDNAはHLA研究所(京都)でHLAタイピングを行った。

T細胞ラインの樹立

PBMCは10% HS(human serum)/PRMI1640培地を用いて培養した。96穴プレート(平底)60 wellの1 well当たり 1.5×10^5 の細胞とTable Iに示したチロシナーゼ由来のペプチドで共培養を開始し、8-10日後には自己PBMC(1.5×10^5 /well)にペプチドパルスとX線照射(30 Gy)処理を行った細胞をプラスト化したT細胞へ添加した。さらに7日間培養を維持した後にペプチドに対する反応性を決定した。

熱処理が高次構造を変化させ隠ぺい自己抗原を発現しうる可能性

動物実験は実験動物委員会の承認を得て研究を開始した。

6~8週令の雌マウス(C57/BL6・チャールズリバー)に(1)免疫なし、(2)ロドデノール処理B16細胞、(3)熱処理B16細胞、(4)X線照射B16細胞、(5)熱処理+X線照射B16細胞の条件下において、7日おきにPBSで調整した 2×10^6 個の細胞を3回免疫した後、X線照射していない(増殖可能)B16細胞 2×10^6 個を投与して腫瘍長径を観察した。

メラノーマに対するロドデノールを用いた免疫療法とペプチドを用いた免疫療法の比較

6~8週令の雌マウス(C57/BL6・チャールズリバー)にX線照射していない(増殖可能)B16細胞 1×10^4 個をPBSで調整後マウスの両背側に注射した。その2日後より7日おきに成長抑制効果を観察すべく(1)コントロール群:10% EtOH、(2)ロドデノール処理細胞投与群:ロドデノール処理(20 μ g/mlで18時間共培養ののち洗浄)とX線処理(60 Gy)をしてPBSで調整したB16細胞 2×10^6 、(3)ロドデノール単独投与群:ロドデノール(1 mg/100 μ l)の3条件についてマウス右背側のみに注射し両背側の腫瘍長径を観察した。

Table I. Tyrosinase-derived synthetic peptides

Peptide #	Sequence (position)	Restriction
1	CLLWSFQTSA (p8-17)	HLA-A2
2	MLLAVLYCL (p1-9)	A2
3	YMDGTMSQV (p369-377)	A2
4	DAEKCDICTDEY (p240-251)	A1
5	SEIWRDIDF (p192-200)	B44
6	AFLPWHRLF (p206-214)	A24
7	QNILLSNAPLGPQFP (p56-70)	DRB1*04:01
8	YSYLQDSDPDSFQD (p448-462)	DRB1*04:01
9	NCTERRLLVRRNIFDLSAPEK (p111-131)	DRB1*04:05
10	FLLHHAFVDSIFEQWLRHRP (p386-406)	DRB1*15:01
11	LLGGSEIWRDIDFAHEAPAFL (p188-208)	DRB1*04:05

HLA restriction shown in the table indicates a typical antigen-presenting molecule.

結 果

ロドデノール以外にも高次構造を変化させ隠ぺい自己抗原を発現しうる可能性として検討した熱処理についての結果は、確かに熱処理でも効果はみられたがロドデノール処理の方がより効果的であった。患者検体(採血)から得られたHLA-DRB1の結果は、Table IIに示したとおりロドデノール誘発性白斑患者(R01~8)では8名中7名がHLA-DR4陽性。尋常性白斑患者(V01~02)では2名中2名がHLA-DR4陽性(日本人集団でのHLA-DR4の陽性率は30-40%)という結果であった。しかし、チロシナーゼ由来の自己ペプチドに反応するT細胞を観察すると尋常性白斑患者(V01~02)においては2名ともチロシナーゼペプチド特異性T細胞クローンを樹立する事は出来なかった。

またマウスを用いた実験では、コントロール群に比べてロドデノール単独皮下投与群共に腫瘍の成長抑制効果を確認する事は出来なかった(データ未提示)。

考 察

がん抗原の高次構造を変化させるだけであれば、熱処理などでも達成される。そこでチロシナーゼをロドデノール処理した場合と、熱処理した場合とで抗メラノーマ免疫の誘導能を比較したがロドデノール処理のほうがはるかに効果的であった。これはおそらくロドデノール処理のほうが特定の高次構造の変化を誘導し、特定のペプチド断片が高濃度で出現するためであろうと推測される。

尋常性白斑の患者はロドデノール誘発性白斑の患者同様HLA-DR4陽性であるもののMHCが認識するペプチドは一致していない可能性が高く、その病因も自己免疫機構そのものが関与していない可能性が示唆される。

現在メラノーマに対する抗原特異的免疫応答誘導による免疫療法の主流はペプチド療法である。特定のペプチドを

投与することにより、そのペプチドに特異的な免疫応答を誘導することができるが、同時にこれは抗原提示分子を限定する(HLA対立遺伝子産物を限定することになる。それに対してロドデノールを用いたメラノーマの免疫療法においては特定のペプチドに限定されることはなく、抗原提示分子のスペクトルが広がる。今後は、メラノーマに限定せず様々な腫瘍における既知の腫瘍抗原蛋白に結合する低分子のスクリーニングシステム(チロシナーゼとロドデノールのような関係をハイスループットで同定するシステム)の有用性の証明に注力したい。

謝 辞

本研究は平成28年度学内グラント関口記念特別賞の助成を受けて行われたものであり、ここに深謝いたします。

引用文献

- 1) Nishigori C, Aoyama Y, Ito A, Suzuki K, Suzuki T, et al. Guide for medical professionals (i.e., dermatologists) for the management of Rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol* 2015; 42: 113-28.
- 2) Matsushita S, Takahashi K, Motoki M, Komoriya K, Ikagawa S, et al. Allele specificity of structural requirement for peptides bound to HLA-DRB1*0405 and-DRB1*0406 complexes: Implication for the HLA-associated susceptibility to methimazole-induced insulin autoimmune syndrome. *J Exp Med* 1994;180: 873-83.
- 3) Topalian SL, Gonzales MI, Parkhurst M, Li YF, Southwood S, et al. Melanoma-specific CD4+T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J Exp Med* 1996; 183: 1965-71.
- 4) Michaeli Y, Sinik K, Haus-Cohen M, Reiter Y. Melanoma cells present high levels of HLA-A2-tyrosinase in

Table II. The HLA-DRB1 types and the peptide specificity of T-cell lines

Patient #	HLA-A*	B*	C*	DRB1*	Peptide Specificity	T cell subset
R01	02:01/11:01	15:01/35:01	04:01/08:01	<u>04:03/09:01</u>	2, 5, 9	-
R02	24:02/24:02	07:02/15:01	03:03/07:02	01:01/08:02	5	Tc17
R03	24:02/31:01	40:02/40:02	03:03/03:04	<u>04:10/11:01</u>	-	-
R04	11:01/11:01	54:01/54:01	01:02/01:02	<u>04:05/04:05</u>	-	-
R05	03:01/26:02	15:01/59:01	01:02/03:03	<u>04:05/14:06</u>	-	-
R06	24:02/24:02	40:02/40:02	03:04/03:04	<u>04:10/04:10</u>	-	-
R07	24:02/26:03	35:01/59:01	01:02/03:03	<u>04:05/04:10</u>	10	Th0
R08	24:02/24:02	15:01/54:01	01:02/08:01	<u>04:05/11:01</u>	10	Th0
V01				<u>04:03/13:02</u>		
V02				<u>04:10/14:05</u>		

HLA-DR4-associated alleles are underlined.

Increased frequency of DR4 for R01~R08 : $p=0.0015$

association with instability and aberrant intracellular processing of tyrosinase. *Eur J Immunol* 2012; 42: 842-50.

研究成果リスト

論文

- 1) 土田哲也, 中村晃一郎, 高木理英, 松下祥. ロドデノール誘発性脱色素斑は自己免疫機序により生じる
What's New in 皮膚科学 2018-2019.
- 2) 高木理英, 松下祥. ロドデノール誘発性白斑症は自己免疫病である *臨床皮膚科* 2017; 71: 42-5.
- 3) Takagi R, Kawano M, Nakamura K, Tsuchida T and Matsushita S. T-cell responses to tyrosinase-derived self-peptides in patients with leukoderma induced by rhododendrol: Implications for immunotherapy targeting

melanoma. *Dermatology* 2016; 232: 44-9.

学会発表

- 1) 高木理英, 川野雅章, 中村晃一郎, 土田哲也, 松下祥. ロドデノール誘発性白斑症は自己免疫病である. 第115回日本皮膚科学会総会 2016年6月4日, 京都
- 2) 高木理英, 川野雅章, 中村晃一郎, 土田哲也, 松下祥. ロドデノール誘発性白斑症は自己免疫病である. 第65回日本アレルギー学会学術大会 2016年6月18日, 東京
- 3) 高木理英, 川野雅章, 中村晃一郎, 土田哲也, 松下祥. ロドデノール誘発性白斑症は自己免疫病である. 第32回自己免疫病研究会(優秀賞(第3位)受賞)2017年7月15日, 東京

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

活性型第X因子直接阻害薬の *in vitro* 実験系における臓器特異性, 安全性の検証

研究代表者 関 要 (国際医療センター 心臓内科)

緒 言

心房細動(Atrial fibrillation; AF)や急性冠症候群(Acute coronary syndrome; ACS)は心臓内もしくは冠動脈内血栓形成による臓器破綻を来す循環器疾患の主要な病態である。高齢化社会に伴い患者人口は増加の一途を辿り、重篤な転帰を来す症例も少なくはなく、血栓加療は循環器加療の主要項目の1つである。動脈血栓と静脈血栓では病態メカニズムは異なるものの、いずれも抗凝固療法もしくは抗血小板療法が中心的な役割を担うことになる。これまで経口抗凝固薬はビタミンK拮抗薬であるwarfarinが唯一の選択肢で、その他点滴静注薬であるヘパリンしかないのが現状であった。Warfarinは食事や多剤併用の影響を受けやすく、頻回なモニタリングが必要で、ヘパリンも点滴投与を行うための入院管理が必要である。

21世紀に入り非ビタミンK阻害経口抗凝固薬(non-vitamin K antagonist oral anticoagulants; NOACs)が登場した。そのターゲットは活性化第X因子(Factor Xa: FXa)あるいはその下流のトロンビンである。ACS発症後の再発予防には、動脈を主体とした血栓形成であるが故、アスピリンとチエノピリジン系抗血小板薬(clopidogrel等)のdual antiplatelet therapyがスタンダードであるが、AFに関しては、NOACsを用いた臨床治験が数多く行われており、いくつかwarfarinに比較して優れている点が、臨床治験上存在する。それは、前述したようにwarfarinは治療域が狭く、頻回のモニタリングが必要な上、作用の発現が遅く、他の薬剤や食餌と相互に影響したり頭蓋内出血を起こしたりすること、そしてNOACsがワーファリンより優れる点として、(1)作用出現が早い(2~3時間)、(2)作用持続時間が短い、(3)薬剤や食餌との相互作用および頭蓋内出血のリスクが少ない、(4)ルーチンのモニタリングの必要がない、などが挙げられており、NOACsを服用する抗凝固療法による治療成績の向上の可能性が期待されている¹⁾。

Rivaroxabanは選択的 direct 作用型FXa阻害薬である。肝代謝が約2/3、腎排泄が約1/3であり、投与にあたり腎機能に応じた用量調節は必要だが、投与後のモニタリングは必要ない。そのターゲットであるFXaは凝固カスケードにおいて内因系と外因系の合流地点に位置し、活性化第V因子(Factor Va: FVa)、Ca²⁺、リン脂質とプロトロンビナーゼ複合体の形成にセグメントトロンビンに作用しトロンビンを産

生する。最近、FXaが凝固系だけでなくProtease-activated receptors(PARs)やeffector cell protease-1(ERP-1)を活性化して炎症を惹起させる論文が発表された²⁾。すなわち、FXaが凝固系mediatorとしてではなく、炎症性mediatorとして作用する病態形成において極めて重要なligandのひとつであることが判明している。

PARsは血管内皮など様々な細胞に発現しており、そのうちPAR-1,2のligandとしてFXaが作用している。従ってRivaroxabanの抗炎症作用を示す論文もいくつか散見されており³⁾、FXa抑制が、抗凝固、抗炎症の両側面から極めて重要であることは容易に理解される。しかし、FXaがligandとして凝固系、炎症系受容体へどのように結合するかを示す論文は存在しない。そこでFXaと受け皿がどのような結合様式を示し、その結果どのような抗炎症作用を示すか、またFXa非活性時の安全性を遺伝子活性変化の視点から検討した。

材料と方法

細胞はLonza社から購入したヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC)を用いた。メーカー推奨の細胞培養液を使用し、メーカープロトコールに準拠した培養法を用いて実験に足る細胞数を得た。実験の均一性を整えるため、すべての実験はpassage2-4の細胞で行った。Φ10 cm dishに播種し、37℃、5% CO²で培養。細胞が80% confluencyに達した段階で各種濃度(10, 50, 100, 500, 1000, 2000 nM)のRivaroxabanを添加し、血清飢餓、ヘパリンなしの条件で24時間刺激を行った。

さらに、50もしくは100 nMのFXaを添加し、Rivaroxaban(1000もしくは2000 nM)を加える群、加えない群にして4時間、10時間、24時間の刺激を行った。後の実験のため細胞および上清を回収した。

回収した細胞からRNAを抽出し、cDNAを作製した。定量的PCR(qPCR)はLightCycler 480を用いて行った。HUVECsの全ゲノム解析にはAffymetrix社のGeneChip Human Gene 2.0 ST Arrayを使用しDNA microarrayを施行した。

細胞上清中のmonocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)濃度は市販のELISA kit(RayBiotech社)を使用し測定した。

統計解析における有意差検定には、studentのt検定を用い、P値<0.05を有意とした。DNA microarray結果の評価はfold change > 2あるいは< -2を有意とした。

結果

HUVECsにおけるPARsの発現

HUVECsにおいてPAR-1, -2, -3 および-4 は発現を認めていた。100 nMのFXa刺激によりPAR-4を除くPAR-1, -2, -3で有意に発現が上昇した。2000 nMのRivaroxabanを加えるとPAR-1, -2の発現の上昇は抑えられたが、PAR-3では抑えられなかった。しかし、Rivaroxaban 2000 nMによる単独刺激ではPARsの発現のいかなる変化も認めず、1000 nM刺激も同様の結果だった。

DNA microarray

*in vitro*において500 nMのRivaroxabanは臨床で経口摂取した場合の血中濃度Cmaxに相当する。10から2000 nMまでの各種濃度での24時間刺激は慢性期のRivaroxabanの影響を想定し、設定した。2000 nMのRivaroxabanによる24時間刺激では324の遺伝子が2 fold change以上の発現の変化を示したが、そこに炎症性サイトカインは含まれなかった。これはその他の濃度(10, 50, 100, 500, 1000 nM)も同様だった。この結果はRivaroxabanの安全性の証左となるのではないかと考えた。

FXaによる刺激

100 nMのFXaによる24時間刺激では405の遺伝子が2 fold change以上の発現の変化を示した。その中に含まれた炎症性サイトカインはintracellular adhesion molecule-1(ICAM-1)のみで、その変化も最低限にとどまり、Rivaroxabanを加えると抑制された。そこで、FXa刺激とRivaroxabanの関係をさらに確かめるべく、FXaで4時間刺激した際の遺伝子発現の変化も見ることとした。497の遺伝子発現が変化し、その中でもMCP-1, ICAM-1, interleukin-8(IL-8)が大きく変化していた。Rivaroxabanを加えるとその変化はなくなった。Rivaroxaban 2000 nM単独刺激では有意な遺伝子発現の変化は認めなかった。

MCP-1 活性

さらにFXa刺激によるHUVECsの遺伝子発現の影響を確かめるためMCP-1のqPCRを施行した。MCP-1の発現は4時間の刺激で最も高くなり、10時間、24時間でも有意差を持って上昇していたもののその上昇幅は下がっていった。Rivaroxabanはいずれの時間でも抑制効果を示した。

細胞上清中のMCP-1をELISAで測定したところ、4時間よりも24時間でMCP-1の活性が最大となったが、Rivaroxabanはいずれの時間でも抑制効果を示した。

考察

Rivaroxaban長期使用の安全性は不明である。今回の結果でRivaroxabanはFXaが存在しない場合には炎症性サイトカインを含む遺伝子転写産物の発現を惹起しなかった。一方でFXa存在下では遺伝子発現レベル、たんぱく質レベルでFXaによるMCP-1のような炎症性サイトカインの上昇を抑制した。がん患者では凝固系が常に活性化されているというevidenceがあるものの⁴⁾、心血管疾患ではそういったevidenceは存在しない^{5, 6)}。Rivaroxabanは必要な患者にとって基本的に毎日服用する必要がある薬剤であるため、凝固系が活性化されていない状態で遺伝子発現に影響を及ぼさないというのはメリットだと考える(図1)。そして、凝固系が活性化された状態ではFXa抑制を通じて抗炎症、抗凝固の両面から有効であるため内皮傷害の進展抑制に寄与すると思われる(図1)。

今後は今回の結果を基にヒト心臓微小血管内皮細胞(Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells; HCMEC)、ヒト冠状動脈内皮細胞(Human Coronary Artery Endothelial Cells; HCAEC)、ヒト大動脈内皮細胞(Human Aortic Endothelial Cells; HAoEC)を使いFXaをligandとする受容体の発現差異、Rivaroxaban作用の差異を検証していく予定である。

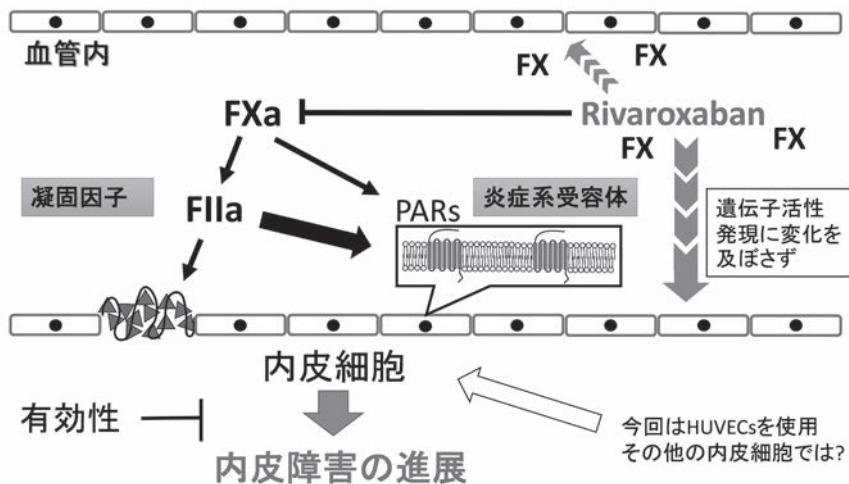


図1. Rivaroxabanの有効性 Rivaroxabanは抗凝固、抗炎症の両面から内皮傷害の進展抑制に有効である一方、凝固系非活性時には炎症性サイトカインの遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。現在HUVECs以外の内皮細胞 (HCAECs, HCMECs, HAoECs) で差異を検証中である。

引用文献

- 1) Cheng JW, Barillari G. Non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in cardiovascular disease management: evidence and unanswered questions. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2014; 39: 118-35.
- 2) Esmon CT. Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond. *Thromb Haemost.* 2014 Apr 1; 111(4): 625-33.
- 3) Bukowska A, Zacharias I, Weinert S, Skopp K, Hartmann C, et al. Coagulation factor Xa induces an inflammatory signalling by activation of protease-activated receptors in human atrial tissue. *Eur J Pharmacol.* 2013; 718: 114-23.
- 4) Tesselaar ME, Romijn FP, van der Linden IK, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 1421-3.
- 5) Mobarrez F, He S, Brøijers A, Wiklund B, Antovic A, et al. Atorvastatin reduces thrombin generation and expression of tissue factor, P-selectin and GPIIIa on platelet-derived microparticles in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Thromb Haemost.* 2011; 106: 344-52.
- 6) Piorkowski M, Fischer S, Stellbaum C, Jaster M, Martus P, et al. Treatment with ezetimibe plus low-dose atorvastatin compared with higher-dose atorvastatin alone: is sufficient cholesterol-lowering enough to inhibit platelets? *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49: 1035-42.

研究成果リスト

論 文

- 1) Seki K, Mizuno Y, Sakashita T, Nakano S, Tanno J, et al. Demeanor of rivaroxaban in activated/inactivated FXa. *J Pharmacol Sci.* 2017 Mar; 133(3): 156-61.

学会発表

- 1) Seki K, et al. Poster session: Efficacy and safety of rivaroxaban *in vitro* experiments with the endothelial cells. American Heart Association Basic Cardiovascular Sciences 2016 Scientific Sessions July, 2016, Phoenix

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

リウマチ性疾患におけるヒストン修飾の解析

研究代表者 相崎 良美 (医学部 大学病院 リウマチ膠原病科)

緒言

ベーチェット病, 成人スティル病, 全身性エリテマトーデスなどの自己免疫性炎症性疾患は, 寛解に至ることもあるが, 一般的には活動期と非活動期を繰り返す慢性再発性の全身性炎症性疾患である. ベーチェット病の原因は未だ不明だが, HLA-B51抗原陽性率が高い事, 一塩基多型との関連(IL10, IL-23R/IL-12RB2, IL-1)などの遺伝的要因が指摘されている. しかしながら, 発生時期が中年である事, HLA-B51抗原陽性者のうち発症はわずかであることなどから, 遺伝的要因だけではベーチェット病の発症や疾患活動性の惹起は考え難く, 外因性因子(細菌・ウイルス感染, 環境)によって誘発される事が示唆されている(Pineton de Chambrun M, et al. Autoimmun Rev 2012). これらのことから, ベーチェット病患者の病態にエピジェネティクスな変化が関与している可能性があると考え, 本研究においては末梢血白血球分画におけるヒストンメチル化の解析を行った.

近年, ヒストン修飾などのエピジェネティクス変化によりT細胞の活性化が起きることや(Wei G, et al. Immunity 2009), 関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどのリウマチ性疾患においてエピジェネティクス変化が見られることが報告されている(Ballestar E. Nat Rev Rheumatol 2011). ベーチェット病や成人スティル病などの疾患では好中球機能亢進, マクロファージ活性化が知られているため, 活性化T細胞分画のみならず好中球分画や単球・マクロファージ分画においてもエピジェネティクス異常が起きている可能性がある. 病態解明や新たな治療標的同定には, 末梢血白血球全体ではなく細胞亜群に分画した上でエピジェネティクス解析を行うことが重要と考えられる.

本研究では, フローサイトメトリー法による末梢血白血球分画におけるヒストン修飾の解析系を確立し, リウマチ性疾患の代表としてベーチェット病患者における末梢血白血球の各分画におけるヒストン修飾を解析する. ヒストンメチル化などのヒストン修飾は, 遺伝子転写を活性もしくは抑制することが知られている. その代表的な修飾に対する抗体を用いて, 細胞を染色しフローサイトメトリー法にて細胞亜群毎のヒストン修飾に関して解析を行うこととした(Dispirito JR, et al. Immunol 2010, Obier N, et al. Cells Tissues Organs 2010).

材料と方法

末梢血有核細胞の調整

埼玉医科大学倫理委員会および埼玉医科大学病院IRBの承認下にて, ベーチェット病患者28例(活動期7例, 非活動期21例), その他の膠原病患者11例(活動期11例)および陰性対照である健常人16例から, 書面にて同意を得た後, 末梢血20 mLの採血を行った. モノ・ポリ分離液(DSPHARMA社, BNDSBN100)にて末梢血単核細胞と好中球の分画を回収し, 実験に用いた.

フローサイトメトリー法によるヒストン修飾の解析

細胞表面を白血球亜分画に分類する特異抗体にて染色後, 細胞を固定し細胞膜の透過処理を行い, 細胞核内部をAPC標識抗H3K4me3抗体(Cell Signaling Technology社, 12064S)およびFITC標識抗H3K27me3抗体(Cell Signaling Technology社, 5499S)で染色し, それぞれの細胞分画内のヒストンメチル化の割合を平均蛍光強度(MFI)として, フローサイトメーター(BD社製, FACS Canto II フローサイトメーター)により測定した. 内在性コントロールとして, APC標識抗rabbit IgG抗体(Cell Signaling Technology社, 2985S)およびFITC標識抗rabbit IgG抗体(Cell Signaling Technology社, 2975S)を使用した. H3K27me3抗体のMFI値は, 内在性コントロールのrabbit IgGのMFIで除して補正して算出し, H3K4me3抗体についても同様に行った.

統計

Mann-WhitneyのU-testにてP値<0.05を有意差ありと判断した.

結果

自己免疫性炎症性疾患であるベーチェット病患者の疾患活動性にエピジェネティクス制御の異常が関与しているのではないかと仮定し, その変化をフローサイトメトリー法にて検出できるか, 本研究で検証を行った. ベーチェット病および健常人から末梢血白血球を分離し, CD4陽性T細胞, CD8陽性T細胞, 好中球, $\gamma\delta$ T細胞, 制御性T細胞, B細胞の6つの分画におけるヒストンメチル化を比較した. H3K4me3は緩んだクロマチン構造(euchromatin)部に見られるヒストン修飾であり, 遺伝子転写を正に制御すると考えられている. 一方, H3K27me3は凝縮したクロ

マチン構造(heterochromatin)に存在し、遺伝子転写を負に制御すると考えられている。健康人と比較してベーチェット病では、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞におけるH3K27me3のMFIが有意に低値を示し、好中球においては有意に高値であった。一方、H3K4me3のMFIはCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、制御性T細胞の分画において、ベーチェット病で有意に低値であり、H3K4me3/H3K27me3のMFI比は、好中球と制御性T細胞の分画においては有意に低下し $\gamma\delta$ T細胞の分画においては有意に上昇していた。さらに、眼病変、粘膜病変、皮膚病変などのベーチェット病特有症状のいずれかが認められ、炎症徴候が明らかな活動期と診断されたベーチェット病患者と非活動期のベーチェット病患者で比較したところ、活動期のベーチェット病患者では $\gamma\delta$ T細胞のH3K27me3のMFIが有意に低下し、H3K4me3/H3K27me3のMFI比が有意に高値であった。同様の結果が、同一患者における活動期と非活動期の比較でも得られた。さらに、ベーチェット病以外の膠原病患者と比較した結果、 $\gamma\delta$ T細胞におけるヒストンメチル化の変化はベーチェット病患者特異的であった。

考察

ベーチェット病患者の末梢血白血球におけるヒストンメチル化の変化をフローサイトメトリー法にて検出が可能であることが示された。ヒストン修飾の変化は、一般的にクロマチン免疫沈降後に目的遺伝子の領域におけるレベルをリアルタイムPCRで解析しているが、フローサイトメトリー法の利点は、末梢血からモノ・ポリ分離液で遠心分離後、生細胞のまま解析ができ、迅速かつ一度に複数のヒストン修飾と表面抗原を組み合わせて末梢血白血球分画におけるヒストン修飾を網羅的に解析できることである。機能的亜分画毎の変化を検出することが可能となる。健康人と比較してベーチェット病においては $\gamma\delta$ T細胞のヒストンメチル化に変化が見られ、この変化が疾患活動性と関連する可能性が示唆された。さらに、ベーチェット病以外の膠原病患者と比較した結果、 $\gamma\delta$ T細胞におけるヒストンメチル化の変化はベーチェット病患者特異的であった。ベーチェット病患者では、 $\gamma\delta$ T細胞から産生されるIL-17Aによって好中球が活性化されていると報告がされており、今回の結果よりIL-17A産生の機序にヒストン修飾が関与しているのではないかと推測している。実際に $\gamma\delta$ T細胞におけるIL-17A産生を測定した結果、ベーチェット病患者は健康人より多い傾向が得られた。現在、ベーチェット病の診断は臨床所見に基づいており、特異的な検査がないため、診断に苦慮する機会が多い事が臨床上的問題の一つである。また、ベーチェット病において炎症反応が一般的に疾患活動性の指標に用いられているが、ベーチェット病でみられる白血球機能異常(好中球やリンパ球の活性化)の病態を反映していない。今回の結果より、末梢血白血球のヒストン修飾の変化がベーチェット病患者の

疾患活動性と関連していることから、エピゲノム異常が病態に関与している可能性があり、本研究を基にして診断の補助や治療の開発が発展すると期待される。

今後、ヒストン修飾変化によって制御されている細胞分画の機能解析を行い標的分子が明らかにされることで、さらに病態が解明されると予想出来る。

謝辞

本研究の実施にあたり、埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科の三村俊英教授と荒木靖人講師には多大なご指導を賜り、深く感謝申し上げます。同意や臨床所見の取得など本研究の実施にあたり様々なご協力を頂きました。埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科の先生方にも深謝いたします。

研究成果リスト

論文

- 1) Araki Y, Tsuzuki Wada T, Aizaki Y, Sato K, Yokota K, et al. Histone methylation and STAT3 differentially regulate IL-6-induced MMP gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatol* 2016; 68: 1111-23.
- 2) Wada TT, Araki Y, Sato K, Aizaki Y, Yokota K, et al. Aberrant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 444: 682-6.

学会発表

- 1) Sato K, Aizaki Y, Araki Y, Mimura T. A novel hierarchical relationship between interleukin-17A and interferon-alpha is indicated by analysis of multiple cytokines in the serum of Adult-Onset Still's disease and Behçet's disease. *EULAR* 2017, 2017年6月16日, Madrid, Spain
- 2) 相崎良美, 荒木靖人, 佐藤浩二郎, 横田和浩, 三村俊英. ベーチェット病患者 $\gamma\delta$ T細胞におけるヒストンメチル化の解析. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2017年4月20日, 福岡
- 3) 荒木靖人, 相崎良美, 横田和浩, 梶山浩, 舟久保ゆう, 他. 関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるヒストンH3リシン4メチル基転移酵素によるケモカイン遺伝子転写制御. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会, 福岡, 2017年4月21日, 福岡
- 4) Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, Yokota K, Kajiyama H, Asanuma FY, Sato K, Oda H, Mimura T. Histone lysine methylation and STAT3 differentially regulate constitutive and IL-6-induced MMPs gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *2016 ACR/ARHP Annual Meeting*, 2016年11月14日, Washington, DC, USA
- 5) Aizaki Y, Araki Y, Sato K, Yokota K, Mimura T. Histone methylation in $\gamma\delta$ T cells as a biomarker of Behçet's disease activity. *2016 ACR/ARHP Annual Meeting*, 2016年11月

- 13 日, Washington, DC, USA
- 6) Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, Kajiya H, Yokota K, Sato K, Asanuma FY, Kim Y, Oda H, Mimura T. Altered profiles of histone lysine methylation affect MMP gene transcription in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. EULAR 2016, 2016 年 6 月 10 日, London, UK
- 7) 相崎良美, 荒木靖人, 三村俊英. ベーチェット病患者末梢血白血球におけるヒストンメチル化の解析. 第60回
- 日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016年4月21日, 横浜
- 8) Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, Kajiya H, Yokota K, Sato K, Asanuma FY, Yoon-Taek Kim Y, Oda H, Mimura T. The epigenetic mechanism of constitutive and IL-6-induced MMP gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016年4月22日, 横浜

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

脱髄性疾患の新規治療薬候補・環状ホスファチジン酸誘導体

研究代表者 吉川 圭介 (医学部 薬理学)

緒言

多発性硬化症(MS)は、自己免疫反応や炎症などの要因により神経軸索を取り巻くミエリンが破壊される脱髄が生じ、様々な神経症状が再発と寛解を繰り返し病態が進行する中枢神経系の神経変性疾患である。患者数は全国に約12000人おり、欧米では若年成人を侵す神経疾患の中で最も多く、近年、我が国での患者数も増加傾向にある原因不明の難病指定疾患である。

環状ホスファチジン酸(cPA)は、真性粘菌Physarum polycephalumのミクソアメーバより単離された独特な環状リン酸構造を持つ脂質メディエーターである¹⁾。cPAは、海馬初代培養細胞培養系において、神経成長因子NGFと同様に顕著な神経細胞生存促進作用と、神経突起伸長促進作用を示し、さらには一過性脳虚血による海馬遅発性神経細胞死を抑制することが報告されている^{2,3)}。我々はMS実験モデルマウスの1つであるCuprizone(CPZ)誘導脱髄モデルマウスの脱髄・運動障害をcPA投与により改善することを明らかとしている⁴⁾。また、より高い生体内安定性をもつ化学合成されたcPA誘導体である2-carba-cPA(2ccPA)も開発されている。本研究は、自己免疫性及び非自己免疫性のMSモデルマウスに2ccPAを投与し病態解析を行い、2ccPAの脱髄抑制効果を評価した。

材料と方法

CPZ誘導非自己免疫性脱髄モデルマウス

10週齢雄C57BL/6マウスを0.2% CPZ含有粉末飼料による自由摂取で、最も脱髄が進行する5週間後まで飼育し、オリゴデンドロサイト特異的細胞死による脱髄モデルマウスを作製した。化学合成された2ccPAはCPZ投与と同時に5週間後まで連日腹腔内投与(1.6 mg/kg/day)、CPZ含有餌飼育3週間後から2週間、連日腹腔内投与(1.6 mg/kg/day)した。コントロールマウスは生理食塩水を連日腹腔内投与した。マウス用ローターロッドトレッドミルを用い、CPZ投与実験後のマウス運動機能を測定した。ロッド上で300秒間マウスを運動させ、回転するロッドから最初に落下するまでの運動継続可能時間を評価した⁵⁾。マウスを4%PFAで灌流固定、クライオスタットにより組織染

色用切片を作成した。ミエリン量はBlack Gold染色を用い染色の濃度により脱髄レベルを測定した⁶⁾。

EAE自己免疫性脱髄モデルマウス

10週齢雄C57BL/6マウスにMyelin oligodendrocyte glycoprotein: MOG35-55を皮下注射、百日咳毒素の腹腔内投与により血液脳関門を破壊、免疫細胞を中枢神経系に侵入させ、30日間飼育し、自己抗体反応による自己免疫性脱髄モデルを作製した(Hooke Kit, EK-2110)。2ccPAはEAE開始から30日間連日腹腔内投与(16 mg/kg/day)した。コントロールマウスは生理食塩水を連日腹腔内投与した。EAEによる脱髄病態を免疫後より連日観察し、以下に示すEAEスコアに従って評価した。0: 正常, 1: 尾のトーン低下, 2: 尾の完全下垂, 後肢麻痺, 3: 後肢完全麻痺, 4: 前肢麻痺, 5: 瀕死

結果

2ccPAは脳梁における脱髄を抑制した

コントロールマウスは脳梁のミエリン構造が高濃度に染色されるが、CPZ投与マウスは脱髄によりミエリン構造が破壊される為、ミエリン染色濃度が低い。5週間2ccPA投与マウスはミエリン量が保持され、脱髄を抑制する効果が得られた(図1A)。CPZモデルは開始3週間後から脱髄、脱髄に伴う運動障害が起こることが知られている。CPZ投与3週間後から2ccPAを2週間投与することにより、有意な脱髄抑制効果が得られた(図1B)。

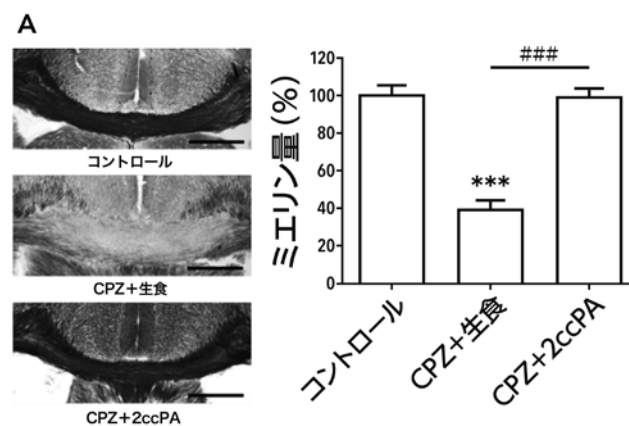


図1A. 脳梁における2ccPAの脱髄抑制効果。

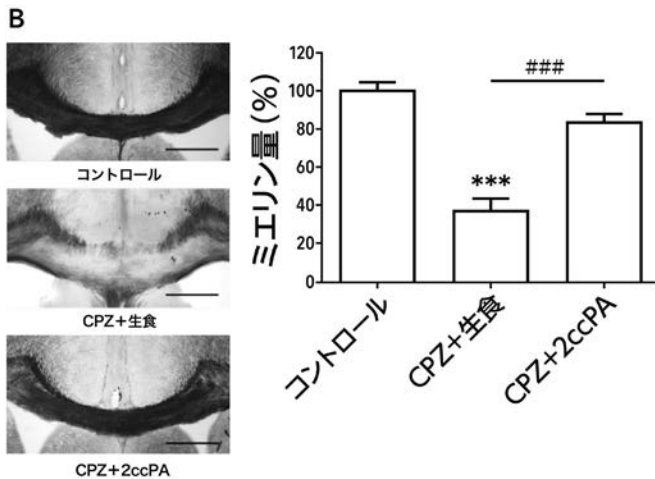


図 1B. 脳梁における2ccPAの脱髄抑制効果.

2ccPAは運動機能障害を改善した

5週間の2ccPA投与は運動継続可能時間を回復させ、有意な運動機能改善効果が得られた。(図 2A).

CPZ投与3週間後から2ccPA投与も有意な運動機能改善効果が得られた。(図 2B).

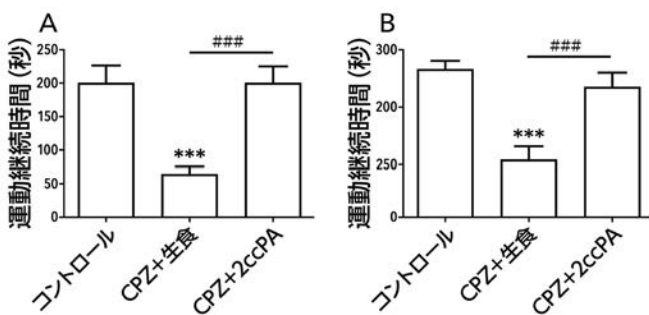


図 2. 2ccPAの運動機能改善効果

2ccPAはEAE病態の進行を抑制する

EAEマウスは病態が進行し、後肢完全麻痺、前肢麻痺を呈する。2ccPA投与は脱髄病態の進行を抑制した。

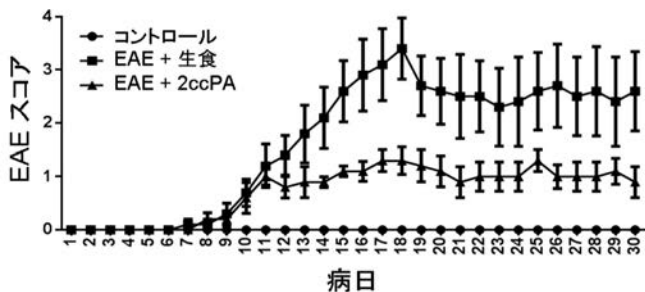


図 3. EAEにおける2ccPAの病態進行抑制効果

考 察

本研究において、2ccPAが自己免疫性及び非自己免疫性のMSモデルマウスの脱髄を抑制し、運動機能障害を改

善させることを見出した。

CPZ誘導脱髄モデルはオリゴデンドロサイト特異的細胞死による非自己免疫性脱髄モデルである。2ccPAはCPZ誘導脱髄の進行抑制、脱髄病態発現後からの改善効果を示した。2ccPAは脱髄進行に関与するミクログリアマーカー Iba1, NLRP3インフラマソーム遺伝子の過剰発現を抑制することを明らかにしている⁷⁾。ミクログリアは脱髄、神経炎症などの刺激により活性型ミクログリアへ形態を変え、脱髄病変に集積し、Iba1発現が増加する。活性型ミクログリアは炎症性サイトカインを放出しオリゴデンドロサイト毒性、軸索障害を生じる。NLRP3インフラマソームは脱髄疾患を含め、様々な炎症性疾患の発症、進行に中心的役割を果たす。これら神経炎症関連遺伝子の2ccPAによる発現抑制が、MS病態における脱髄抑制に有効であったと考えられる。

EAEはT細胞、B細胞の中枢神経系への浸潤により自己免疫性に神経炎症を誘導する自己免疫性脱髄モデルである。2ccPAはEAE病態の進行を抑制し、優位な治療効果が得られた。

本研究において2ccPAは自己免疫性、非自己免疫性の両モデルに顕著な薬効を示し、2ccPAがMSの新規治療薬としての応用の可能性が示唆された⁷⁾。

謝 辞

本研究の実験を遂行しました薬理学大学院生(日本学術振興会特別研究員)山本梓司氏に深く感謝いたします。環状ホスファチジン酸及び誘導体の開発者であり、化合物を供与くださいましたお茶の水女子大学室伏さきみ子学長、後藤真里准教授、清水嘉文研究員に感謝を申し上げます。実験実施に協力いただきました薬理学教室の岩佐健介助手、石川将己特任研究員、医学部5年生橋本真歩(研究医養成コース)に感謝いたします。常に適切な御助言・ご指導を頂いています薬理学丸山敬教授、総合医療センター神経内科野村恭一教授、深浦彦彰准教授に感謝申し上げます。電子顕微鏡技術、病理切片作製のご指導をいただきました教養教育川村勇樹講師、中央研究施設小松久美子実験助手に感謝を申し上げます。実験補助を担当してくれた保健医療学部前田和希君、古川泳玉さん、増子七海さん、曾我健斗君に感謝いたします。実験動物管理にご尽力いただきました実験動物施設の皆様に深謝申し上げます。

参考文献

- 1) Murakami-Murofushi K, Uchiyama A, Fujiwara Y, Kobayashi T, Kobayashi S, et al. Biological functions of a novel lipid mediator, cyclic phosphatidic acid. *Biochimica et biophysica acta* 2002; 1582: 1-7.
- 2) Gotoh M, Hotta H, Murakami-Murofushi K. Effects of cyclic phosphatidic acid on delayed neuronal death following transient ischemia in rat hippocampal CA1. *Eur*

- J Pharmacol 2010; 649: 206-9.
- 3) Gotoh M, Sano-Maeda K, Murofushi H, Murakami-Murofushi K. Protection of neuroblastoma Neuro2A cells from hypoxia-induced apoptosis by cyclic phosphatidic acid (cPA). PLoS One 2012; 7: e51093.
 - 4) Yamamoto S, Gotoh M, Kawamura Y, Yamashina K, Yagishita S, et al. Cyclic phosphatidic acid treatment suppress cuprizone-induced demyelination and motor dysfunction in mice. Eur J Pharmacol 2014; 741: 17-24.
 - 5) Yoshikawa K, Palumbo S, Toscano CD, Bosetti F. Inhibition of 5-lipoxygenase activity in mice during cuprizone-induced demyelination attenuates neuroinflammation, motor dysfunction and axonal damage. PLEFA 2011; 85(1): 43-52.
 - 6) Iwasa K, Yamamoto S, Takahashi M, Suzuki S, Yagishita S, et al. Prostaglandin F_{2α} FP receptor inhibitor reduces demyelination and motor dysfunction in a cuprizone-induced multiple sclerosis mouse model. PLEFA 2014; 91: 175-82.
 - 7) Yamamoto S, Yamashina K, Ishikawa M, Gotoh M, Iwasa K, et al. Protective and therapeutic role of 2-carba-cyclic phosphatidic acid in demyelinating disease. Journal of Neuroinflammation 2017; 14: 142.

研究成果リスト

論文

- 1) Yamamoto S, Yamashina K, Ishikawa M, Gotoh M, Iwasa K, Yagishita S, Maruyama K, Murakami-Murofushi K, Yoshikawa K. Protective and therapeutic role of 2-carba-cyclic phosphatidic acid in demyelinating disease. Journal of Neuroinflammation 2017; 14: 142.
- 2) Iwasa K, Yamamoto S, Yagishita S, Maruyama K, Yoshikawa K. Excitotoxicity-induced immediate prostaglandin D2 production induces sustained microglial activation and delayed neuronal death. Journal of lipid research 2017; 58: 649-55.
- 3) Hashimoto M, Yamamoto S, Iwasa K, Yamashina K, Ishikawa M, Maruyama K, Bosetti F, Yoshikawa K. The flavonoid Baicalein attenuates cuprizone-induced demyelination via suppression of neuroinflammation. Brain Research Bulletin 2017; 135: 47-52.
- 4) Yagishita S, Suzuki S, Yoshikawa K, Iida K, Hirata A, et al. Treatment of intermittent hypoxia increases phosphorylated tau in the hippocampus via biological processes common to aging. Molecular Brain 2017; 10: 2

獲得研究費

- 1) 日本医療研究開発機構 (A-MED) 創薬支援ネットワーク (DNW-16010) 2016年度～ 環状ホスファチジン酸類縁体による多発性硬化症治療薬の開発(研究代表者)

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

ヒト子宮内膜における NSBP1 の着床メカニズムへの関与についての検討

研究代表者 木村 真智子 (医学部 大学病院 産科・婦人科)

研究分担者 梶原 健

緒言

ヒトやげっ歯類において、トロホプラスト細胞が子宮内膜へと浸潤する際、着床部位の子宮内膜間質細胞がプロゲステロン依存的に特殊な分化を遂げる。分化した子宮内膜間質細胞は、妊娠初期は胚を取り囲むように存在し、胎盤が形成された後は胎盤と子宮筋層との間に存在する。この間質細胞は分娩時に胎盤に付着して娩出されることから脱落膜と呼ばれ、着床時の子宮内膜間質細胞の分化は脱落膜化と言う。脱落膜化は妊娠の成立において重要な過程であり、脱落膜化の異常は不妊だけでなく早産や妊娠高血圧症候群など妊娠中の様々な病態にも関与している¹⁻⁴⁾。

NSBP1はHMGNに属する構造的クロマチン因子の一種として多くの遺伝子の転写調節に関与する。HMGNはスクレオソーム内に特異的に結合する唯一の非ヒストンタンパクであり、多くの遺伝子の転写調節に関与すると考えられている。生体内での機能の多くは未解明である。HMGN5であるNSBP1は、マウス初期胚の分化に重要であるとの報告⁵⁾やマウス子宮内膜において脱落膜化に関与するとの報告⁶⁾がなされている。

目的

ヒト子宮内膜間質細胞における脱落膜化への影響について検討を行った。

方法

当院IRB承認を得て、子宮筋腫の手術時に同意を得た正所性子宮内膜を採取し、子宮内膜間質細胞を分離・培養した。子宮内膜間質細胞はcAMP + MPA添加による脱落膜化刺激を行い、脱落膜化群と非脱落膜化群(control群)におけるNSBP1の発現をreal-time PCRおよび蛍光免疫染色にて検討した。また、NSBP1をsiRNAにて発現抑制させた後に脱落膜化刺激を行なった群と発現抑制を行わない脱落膜化群(control群)での脱落膜化マーカー(IGFBP1, PRL, WNT4)の発現量をreal-time PCRにて比較した。

また、我々は脱落膜化マーカーであるIGFBP-1を特異的に制御するmicro RNAであるmiR542-3pを同定しており、NSBP1をsiRNAにて発現抑制させた

後のmiR542-3pの発現変化ならびにmiR542-3p過剰発現後のNSBP1の発現量の変化について検討を行った。

結果

子宮内膜間質細胞の脱落膜化群はcontrol群と比較し、脱落膜化後早期(12時間後, 24時間)にNSBP1発現は有意に低下した。NSBP1蛍光免疫染色では、脱落膜化群において発現が有意に低下していた。siRNAによるNSBP1発現抑制後の脱落膜化群ではcontrol群と比較しIGFBP1とPRL発現が有意に上昇した。miR542-3pの発現量は、NSBP1発現抑制により著明に低下した。また、miR542-3pを過剰発現させ、NSBP1の発現量の変化を検討したところ発現量に変化は認めなかった(data not shown)。

結語

ヒト子宮内膜間質細胞において、脱落膜化早期にNSBPが発現低下することでmiR542-3p発現低下を介しヒト子宮内膜脱落膜化に関与することが示唆された。

参考文献

- 1) Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives, *Semin Reprod Med* 2007; 25: 445-53.
- 2) Pringle KG, Kind KL, Sferruzzi-Perri AN et al. Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Hum Reprod Update* 2010; 16: 415-31.
- 3) Schneider H. Oxygenation of the placental-fetal unit in humans. *Respir Physiol Neurobiol* 2011; 178: 51-8.
- 4) Li DD, Zhao SY, Yang ZQ et al. Hmgn5 functions downstream of Hoxa10 to regulate uterine decidualization in mice. *Cell Cycle* 2016; 15: 2792-805.
- 5) Shirakawa H, Rochman M, Furusawa T et al. The nucleosomal binding protein NSBP1 is highly expressed in the placenta and modulates the expression of differentiation markers in placental Rcho-1 cells. *J Cell*

Biochem 2009; 106: 651-8.

- 6) Tochigi H, Kajihara T, Mizuno Y et al. Loss of miR-542-3p enhances IGFBP-1 expression in decidualizing human endometrial stromal cells. Sci Rep 2017; 7: 40001.

学会発表

- 1) 木村真智子, 梶原健, 水野由美, 難波聡, 瀬戸さち恵, 岡垣竜吾, 石原理. ヒト子宮内膜におけるNSBP1の着床メカニズムへの関与についての検討. 日本生殖医学会第61回学術集会, 2016年11月3日, 横浜

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

子ども達の将来と次世代の健康を見据えた生活習慣病予防方法の確立

研究代表者 菊池 透 (医学部 大学病院 小児科)

研究分担者 大竹 明*, 赤塚 淳弥*, 武者 育麻*

緒言

肥満症や糖尿病, 高血圧, 脂質異常症をはじめとする生活習慣病, さらにそれらに起因する動脈硬化性疾患は, わが国をはじめ先進諸国において, 悪性腫瘍と並んで最も大きな健康問題である。成人の生活習慣病は, 妊娠前の母体の肥満, 糖尿病や妊娠中の高血糖, 高栄養などに関連する高出生体重, あるいは妊娠前の母体のやせや妊娠中の低栄養などに関連する低出生体重とも関連すると考えられている。その後の小児期の成長とも密接な関連がある。また, 生活習慣病は小児期からの成人にかけてトラッキング現象がある。このように, 成人の生活習慣病の起源は母体の妊娠前, 胎児期から小児期にあると考えられる。したがって, 成人の生活習慣病を予防するためには, 小児期からの有効な対策が必要である。本研究は, 小児の生活習慣病の現状を把握し, その病態を解明することによって, 子ども達の将来と次世代の健康を見えた生活習慣病予防方法の確立することを目的として行った。

材料と方法

新潟県見附市小児生活習慣病予防健診(平成11年~平成25年)を受診した小学校4年生約3000名, 中学校1年生約2,500名の健診結果, 見附市小児血圧健診(平成11年~平成25年)を受診した小中学生約12,000名の健診結果, 新潟県五泉市および新潟県三市中蒲原地区小児生活習慣病健診(平成10年~平成25年)を受診した小中学生約2,500名の健診結果のデータベースを後方視的に検討した。本研究は, 埼玉医科大学倫理審査委員会の承認得て行った(申請番号840)。

結果

1. 小児の生活習慣病の現状

見附市の小児生活習慣病健診では, 肥満, 脂質異常症, 高血圧の内, どれか一つでも有する小児は, 小学校4年生約30%, 中学校1年生約25%であった。肥満, 高血圧, 脂質異常症は, 小児期から成人までトラッキングする。したがって, 小児の20~30%は, 成人の生活習慣病の予備群と考えられ, 早急な予防対策の必要である。

2. 小児肥満の病態に関する検討

1) 小児肥満の病態

肥満検診を受診した肥満度40%以上の肥満男子698名, 女子330名を対象にした検討で, 小児肥満症の診断基準にある合併症の頻度は, 男女それぞれ, 高ALT血症は, 43.4%, 23.3%, 高HDL-C血症は, 5.6%, 6.1%, 高LDL-C血症, 18.1%, 14.8%, 高TG血症, 30.4%, 30.0%, 耐糖能異常, 0.9%, 1.2%, 高血圧, 8.0%, 7.3%, 高インスリン血症, 42.0%, 55.5%であった。小児といえども, 高度肥満者の約70%は何らかの合併症を有していた¹⁾。

小児肥満の病態を明らかにするために, 腹部エコーで測定した最大腹膜前脂肪厚(Pmax; 内臓脂肪蓄積の指標), 腹囲, 空腹時インスリン, アディポネクチン, レプチン, TG, HDL-C, GPT, リポ蛋白リパーゼ, 収縮期血圧, 脈拍などの相互の関連を検討した。その結果, Pmaxと腹囲は, これらの因子と関連していること。また, インスリン, アディポネクチン, レプチンは, TG, HDL-C, リポ蛋白リパーゼ, 収縮期血圧, 脈拍と関連していることを明らかにした²⁻⁷⁾。小児肥満でも, 成人と同様に内臓脂肪蓄積の基づくアディポサイトカインの異常, 高インスリン血症を上流とした代謝異常の病態が存在すると考えられる。また, 小児肥満でも, 酸化LDLの一つであるMDA-LDLが増加しており, 小児期から酸化ストレスを受けていることを明らかにした⁸⁾。さらに, 高感度CRPと尿中アルブミンが増加していることも報告した^{9,10)}。小児期から慢性炎症, 血管内皮障害などの臓器障害がおこっていることを示唆するものである。

成長期の問題として, 骨年齢, 骨密度に関して検討した。一般に小学校低学年以前からの肥満小児では, 思春期前は身長が高いが, 思春期が早期に発来し, 身長のスパートが小さいため, 最終身長はあまり高くない。肥満小児の骨年齢の検討で骨年齢の促進を報告した¹¹⁾。これは, 思春期前であっても高インスリン血症による副腎アンドロゲンの増加がおこり, 骨年齢が促進するため, 肥満小児に特徴的な成長パターンが生じると考えられる。10歳の肥満小児63名を対象に, 暦年齢に比した骨年齢の促進年数と, 幼児期のBMIの増加との関連を解析したところ, 3歳から6歳までのBMI増加が, 10歳時の骨年齢の促進と最

*埼玉医科大学 医学部 小児科

も関連していた。3歳から6歳までのBMIが2以上増加すると、10歳時の骨年齢が2歳促進するオッズ比は1.99倍であった。幼児期の急激な体重増加が、学童期の骨年齢の促進に関連していることがわかった¹²⁾。一方、中手骨の骨密度(DIP法)は、思春期以前では高いが、思春期以降では、低いことを報告した¹¹⁾。これには運動量が少ないことが関連していると推測している。

2)小児肥満症のスクリーニング

小児肥満を有効な介入をするためには、有効なスクリーニングが必要である。肥満度、体脂肪率、腹囲、Pmaxの4つの計測値のスクリーニングの基準値を受動者動作特性曲線(ROC)を用いて設定し、肥満症のスクリーニングとしての有用性を比較検討した。男女とも、肥満症のスクリーニング方法として腹囲が最も優れていた。男女とも腹囲80 cm以上は、肥満合併症を疑い、腹囲、男子88 cm以上、女子85 cm以上は肥満による複数の合併症を持つメタボリックシンドロームを疑い介入するべきであろう^{11,13)}。

3. Developmental origins of health and disease (DOHaD)

DOHaDとは、胎児期から小児期の環境が成人後の健康状態に影響を与えるという概念である。つまり、胎児期から小児期の環境を整え、健全な成長を支援することが、成人後の疾病予防に繋がるということであり、予防医学的にインパクトがある理論である。日本人の肥満小児(6~15歳、男子650名、女子317名)を対象に、出生体重およびそのSDスコアを4分法で4群に分け、血清インスリン、HOMA-Rを比較検討した。男子での出生体重およびSDスコアでの4分法、女子での出生スコアでの4分法において、出生体重およびSDスコアが小さい群のインスリン、HOMA-Rは高いという結果を得た¹⁴⁾。また、日本人の肥満小児(10~12歳、男子261名、女子125名)を対象に、出生体重SDスコアと腹囲をそれぞれ3分法で分類し9群に分け、メタボリックシンドローム診断基準を満たす例数とインスリン値を比較検討した。男女とも、出生体重SDスコアが小さく、腹囲が大きい群がメタボリックシンドロームの例数および空腹時インスリンが最も高かった¹⁵⁾。また、メタボリックシンドローム群および非メタボリックシンドローム群の間での現在の体重/出生体重比の比較では、男で、それぞれ、19.9対17.0、女で21.8対17.2とメタボリックシンドローム群が有意に高かった¹⁶⁾。

以上より、日本人小児思春期の肥満の合併症は、出生体重およびその後の体重増加と関連することを明らかにした。成人後の生活習慣病予防のためには、母親が妊娠する前からの健康教育と、妊娠出産育児への適切な支援が必要と考えられる。

4. 小児の血圧に関する研究

小児の血圧に関するエビデンスを構築するために、見附市小児血圧健診の結果を解析した。

1)高血圧の頻度と現行の基準値の問題

我々は、見附スタディで、小学生4375名(男2156名、女2219名)中学生1905名(男903名、女1002名)の血圧測定を行い、高血圧治療ガイドライン2000年版の日本人小児の高血圧判定基準をもとに判定し、高血圧、正常高値血圧の頻度を求めた。男子で収縮期高血圧と判定された頻度は、小低、高、中の順に0.2%、0.1%、2.7%、正常高値血圧は0.8%、1.8%、6.2%、拡張期高血圧は0.4%、0%、0.2%、正常高値血圧は、0.9%、1.0%、3.9%であった。女子の収縮期高血圧は0%、0.6%、2.2%、正常高値血圧は0.4%、2.0%、7.1%、拡張期高血圧は0%、0%、0.8%、正常高値血圧は0%、1.6%、6.5%であった¹⁷⁾。中学生の収縮期高血圧の頻度を除けば、いずれも少なかった。現在の小児の高血圧判定基準には種々の課題があると考えられる。今後、日本人小児の血圧に関するエビデンスを集積し、高血圧判定基準の基準値に関して再検討する必要があると考えられた。

2)健常小児の血圧のエビデンスの構築

見附スタディでは、1999年から2008年までの10年間に、小学校1年生から中学校3年生の男5805名、女5970名の血圧データを蓄積した。性別学年別血圧の男子で小1から中3まで90パーセントイル値は、103/58, 105/59, 106/59, 111/60, 112/60, 115/60, 125/66, 126/66, 129/67, 95パーセントイル値は、107/61, 108/61, 110/61, 115/63, 116/63, 119/63, 129/66, 130/66, 133/67, 女子の90パーセントイル値は、103/58, 104/58, 106/57, 112/61, 113/61, 115/61, 124/68, 122/67, 124/69, 95パーセントイル値は、107/61, 107/60, 109/60, 116/63, 117/63, 118/63, 128/71, 126/70, 128/72であった。この結果は、現在の血圧基準値に比し低めであり、90と95パーセントイル値の差が5mmHg程度と小さい¹⁸⁾。この結果が、日本人小児を代表するかどうかは議論のあることではあるが、小中学生の各学年の血圧を、一定の方法で多数を測定した報告は、他にはない。

3)血圧のトラッキング

小学校1年生から中学校3年生まで血圧測定をした男89名、女89名を対象に中学校3年生時の血圧と小学校1年生の血圧、体格との関連を検討した結果、収縮期および拡張期血圧ともに小学校1年生時の血圧が最も関連していた¹⁹⁾。これは、血圧が小学校入学時から思春期にかけてトラッキングすることを示している。小学校低学年で血圧測定を行い、高めの血圧の小児に対して予防的介入することが高血圧予防として有効と考えられる。

5. 小児の生活習慣病(特に肥満)への効果的な指導介入

肥満の改善のための行動変容を起こすためには、肥満を改善したいという意思、正しい知識、自己効力感が必要である。肥満小児では、養育の問題や、QOLの低下のため自己効力感が少ない場合が多い、したがって、肥満改善のためには、まず自己効力感の育成が必須である。その方法として親を強化子とする行動療法が有効である。具体的に

は、家庭での毎日の自己体重測定と日常生活チェックリストである。親子で取り組むことで、自己肯定感が育成され、家庭全体の生活習慣の改善と共に、子どもの肥満が改善していく^{20,21)}。小児肥満への行動療法は、本人のみならず、親、家族、そして次世代へ生活習慣の改善につながる予防戦略である。

考 察

小児期からの生活習慣病予防対策の意義を述べる。小児期からの本人のQOLや健康寿命を延ばすだけでなく、本人が健全な妊娠出産育児を実践することによって次世代以降に健康を伝えることができる。これこそが、成人に対する生活習慣病対策との大きな違いであり、小児期ならではの意義である^{22,23)}。また、小児への生活指導は、その親や家庭に対しても効果があると推測される。さらに、小児期からの健全な生活習慣を身につけることは、生涯にわたり無駄な消費を減らすことに繋がり、地球環境にも優しい。医療経済的にも費用対効果が優れていると推測される。

小児期からの生活習慣病予防対策は、言い換えれば子育て支援の一環である。日本の社会が、子ども達は各家庭だけでなく社会全体で育てるべきであるという認識を持つことが必要である。そして、子ども達が子どもらしい生活ができるような社会の実現に一步でも近づけていくことが、生活習慣病の予防であり、少子化対策でもある。本研究が、日本の子ども達の健康が増進するような社会の実現に寄与できれば幸甚である。

参考文献

- 1) 菊池透, 長崎啓祐, 樋浦誠, 小川洋平, 田中幸恵, 他. 小児肥満の疫学的アプローチ. 肥満研究 2004;10: 12-7.
- 2) Nishina M, Kikuchi T, Yamazaki H, Kameda K, Hiura M, et al. Relationship among systolic blood pressure, serum insulin and leptin, and visceral fat accumulation in obese children. *Hypertens Res* 2003; 26: 281-8.
- 3) Ogawa Y, Kikuchi T, Nagasaki K, Hiura M, Tanaka Y, et al. Usefulness of serum adiponectin level as a diagnostic marker of metabolic syndrome in obese Japanese children. *Hypertens Res* 2005; 28: 51-7.
- 4) Abe Y, Kikuchi T, Nagasaki K, Hiura M, Tanaka Y, et al. Usefulness of GPT for diagnosis of metabolic Syndrome in obese Japanese children. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2009; 16: 902-9.
- 5) Abe Y, Kikuchi T, Nagasaki K, Hiura M, Tanaka Y, et al. The Relationship between Preheparin Lipoprotein Lipase and Metabolic Derangements in Obese Japanese Children. *Clin Pediatr Endocrinol* 2011; 20: 13-20.
- 6) Sato H, Kikuchi T, Harada W, Yoshida H, Ito S, et al. Relation between Delayed Superfluous Insulin Secretion during An Oral Glucose Tolerance Test and Metabolic Disorders in Obese Japanese Children. *Clin Pediatr Endocrinol* 2011; 20: 25-32.
- 7) 菊池透, 長崎啓祐, 樋浦誠, 田中幸恵, 阿部裕樹, 他. 小児期メタボリックシンドロームの血圧と脈拍の検討. 小児高血圧研究会誌 2008; 5: 53-7.
- 8) Kameda K, Kikuchi T, Yamazaki H, Hiura M, Uchiyama M. The relationship of serum levels of Malondialdehyde-modified low density lipoprotein to serum lipid and anthropometric measurements in school children. *Acta Medica et Biologica* 2003; 51: 67-73.
- 9) Hiura M, Kikuchi T, Nagasaki K, Uchiyama M. Elevation of serum C-reactive protein levels is associated with obesity in boys. *Hypertens Res* 2003; 26: 541-6.
- 10) 菊池透, 長崎啓祐, 樋浦誠, 田中幸恵, 阿部裕樹, 他. 小児肥満における血圧と尿中アルブミンとの関連. 小児高血圧研究会誌 2008; 5: 58-60.
- 11) Nagasaki K, Kikuchi T, Hiura M, Uchiyama M. Obese Japanese children have low bone mineral density after puberty. *J Bone Miner Metab* 2004; 22: 376-81.
- 12) 菊池透, 長崎啓祐, 小川洋平, 阿部裕樹, 樋浦誠, 他. 幼児期後半のBMI増加は、学童期の骨年齢を促進させる. 第51回日本小児内分泌学会学術集会抄録集 2017; 55
- 13) 菊池透, 内山聖. 小児肥満合併症および代謝異常のスクリーニングには、どの身体計測値が有用か. *ホルモンと臨床* 2001; 49: 1183-8.
- 14) Tanaka Y, Kikuchi T, Nagasaki K, Hiura M, Ogawa Y, et al. Lower birth weight and visceral fat accumulation are related to hyperinsulinemia and insulin resistance in obese Japanese children. *Hypertens Res* 2005; 28: 529-36.
- 15) Kikuchi T, Uchiyama M. Epidemiological studies of the developmental origins of adult health and disease in Japan: A pediatric perspective in present day Japan. *Clinical Pediatric Endocrinology* 2010; 19: 83-90.
- 16) Abe Y, Kikuchi T, Nagasaki K, Hiura M, Tanaka Y, et al. Lower birth weight associated with current overweight status is related with the metabolic syndrome in obese Japanese children. *Hypertens Res* 2007; 30: 627-34.
- 17) 菊池透, 長崎啓祐, 樋浦誠, 小川洋平, 田中幸恵, 他. 高血圧治療ガイドライン 2000年版にもとづいた小児の高血圧の頻度に関する検討. 小児高血圧研究会誌 2007; 4: 28-30.
- 18) 菊池透, 長崎啓祐, 小川洋平, 阿部裕樹, 樋浦誠, 他. 日本人小児の性別学年別血圧基準値の検討. 小児高血圧研究会誌 2011; 8: 21-5.
- 19) 菊池透, 長崎啓祐, 小川洋平, 阿部裕樹, 樋浦誠, 他. 小学校1年生時から中学校3年生時までの血圧のトラッキング現象および体格との関連～見附スタディより～. 小児高血圧研究会誌 2010; 7: 10-6.
- 20) 菊池透. 小児期に発見される metabolic syndrome への警告具体的な生活指導と自立の支援. *糖尿病診療マ*

ター 2005; 3: 395-9.

- 21) 菊池透. 小児・思春期の肥満, 2型糖尿病への行動療法. *Diabetes Frontier* 2006; 17: 642-6.
- 22) 菊池透. 小児科医としてメタボリックシンドロームを考える. *小児保健研究* 2009; 68: 168-72.
- 23) 菊池透, 山崎恒, 亀田一博, 樋浦誠, 内山聖. 全校児童生徒を対象にした血圧健診の健康教育に対する有用性. *小児保健研究* 2001; 60: 57-61.

研究成果リスト

- 1) 菊池透. 小児のメタボリックシンドロームの診断と介入. *プラクティス* 2017; 34: 132-6.
- 2) 菊池透. 1型糖尿病と2型糖尿病の子ども達の自立のために学校と医療機関がすべきこと. *思春期学* 2017; 35: 64-6.
- 3) 菊池透. 肥満・肥満症・メタボリックシンドローム. *小児科診療* 2017; 80: 731-6.
- 4) 菊池透. 小児科医からみた生活習慣病への予防対策. *産科と婦人科* 2017; 84: 1161-6.
- 5) 菊池透. 保護者の疑問・相談にこたえるために発育・発達肥満予防. *小児科* 2017; 58: 1161-6.
- 6) 菊池透. DOHaD説の観点から小児科医からみた小児期の栄養・食の課題と対応. *糖尿病と妊娠* 2017; 17: S-33-S-34.

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

胚と子宮内膜の相互シグナルに着目した着床メカニズムの解明

研究代表者 梶原 健 (医学部 大学病院 産科・婦人科)

研究分担者 石原 理, 水野 由美 (医学部 大学病院 産科・婦人科)

緒言

不妊治療として体外受精胚移植を受ける際に、形態学的に良好な胚を複数回移植しても、着床・妊娠に至らない、子宮内膜側の胚を受容する能力の異常(着床不全)と考えられるケースが多数存在する。しかし着床不全に対して明確にエビデンスのある治療法は現在の所、確立されていない。着床現象には胚と子宮内膜のそれぞれ調和のとれた成熟・分化が必要であり、また子宮内膜と正常に発育する胚の密接な相互作用も重要である。着床の過程のメカニズムに関しては、ノックアウトマウスなどを用い多くの知見が得られているが、動物種間に大きな相違があること、またヒトの材料を用いて研究を行うことに倫理的な障害があるため、ヒトの着床現象に関する研究は立ち後れ、未解明な部分が数多くある。

我々は、これまでに胚が着床する子宮内膜に着目し継続的に研究を行ってきた。子宮内膜は、胚が着床するときに脱落膜化という分化過程を経て胚を受け入れる体制を整える。これまでに私たちは、子宮内膜の分化(脱落膜化)をヒト初代培養細胞で安定的に誘導する系を確立した。この誘導系で分化させた子宮内膜脱落膜化細胞を用い、脱落膜化を制御する因子として、転写因子であるFOXO1やmicroRNA542-3pが脱落膜化を制御する重要な因子であることを明らかとした。これらの研究で子宮内膜の機能については有用なデータが得られたが、子宮内膜と胚の相互作用についての分子メカニズムに関しては不明な点が多く、また、子宮内膜の機能の破綻がヒトの病態とどのように関連しているのかについても詳しくは分かっていない。

最近報告された研究で、胚の正常な発育には、中鎖脂肪酸のひとつであるオクタン酸がエネルギー源として重要であることが明らかとされた。しかし、このオクタン酸の供給がどこからどの様に行なわれているかは明らかではなかった。そこで我々は胚(絨毛細胞)と直接接触する子宮内膜脱落膜細胞がオクタン酸の供給源になっていると推察し、以下の研究を行った。

材料と方法

1. ヒト子宮内膜間質細胞の分離・培養

手術で得られた標本から子宮内膜を採取し、間質細胞(HESCs)を分離・培養に用いた。既報の方法に従い、酵素処理後、子宮内膜組織を腺細胞と間質細胞に分離し、間質細胞をチャコール処理した10%FBS(DCC-FBS)、グルタミン、抗生物質を含んだDMEM/F12を用い、37℃、95%air、5%CO₂の条件下にて培養した。Confluentに達したHESCsは0.5mM 8-bromo-cAMP(8-bro-cAMP)と10⁻⁶M medroxyprogesterone acetate(MPA)の両者にて脱落膜化刺激を行い、4日間培養を行った。なお培養液は2%DCC-FBS、グルタミン、抗生物質を含んだDMEM/F12を用いた。

2. mRNAの抽出と定量的RT-PCR

脱落膜化刺激を施行した群(脱落膜化群)と施行しない群(control群)からtotal RNAを抽出し、β酸化を行なう代謝酵素の発現について、定量的RT-PCR法でその変化を検討した。

3. 中鎖脂肪酸の同定

同時に培養上清を回収し、細胞培養上清液中に分泌される遊離脂肪酸量をLC-FTMSにて網羅的に解析した。

4. 超形態学的観察

脱落膜化群とcontrol群の超微形態学的変化をTEM法にて観察し、比較検討した。

結果

1. 培養上清中に分泌される中鎖脂肪酸

細胞培養上清液中に分泌される遊離脂肪酸量を網羅的に解析した所、検出された26種類の遊離脂肪酸のうち、コントロール群に比較して脱落膜化群で増加したものはオクタン酸(C8:0)のみであった。

2. 脱落膜による変化する超微形態

電子顕微鏡による観察では、脱落膜化細胞では、control群と比較して脂肪酸の代謝を行なうミトコンドリアの増加がしていた。

3. 脱落膜化により発現が変化する代謝酵素

ミトコンドリアの代謝に関連する遺伝子の発現量を定量的RT-PCR法にて解析した所, 脂肪酸の β 酸化を行なう代謝酵素であるacyl-Coenzyme A dehydrogenaseの発現量が上昇していた.

考 察

脱落膜化子宮内膜間質細胞ではオクタン酸が産生されおり, 着床現象に何らかの役割を果たしている可能性がある.

研究成果リスト

学会発表

- 1) Mizuno Y, Kajihara T, Kimura M, Ishihara O. Important fatty acid molecular species for implantation XVth RCGM international Symposium of Academic Frontier 2016. 11. 11 ~ 11. 12
- 2) 水野由美, 梶原健, 木村真智子, 石原理. ヒト脱落膜化子宮内膜細胞を用いた着床に重要な脂肪酸の同定 第39回日本分子生物学会 2016. 11. 30 ~ 12. 2

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

気分障害と時計遺伝子の概日リズム発現における振幅減衰化の機構解明と治療応用

研究代表者 池田 正明 (医学部 生理学)

研究分担者 熊谷 恵

緒言

気分障害には症状の日内変動やデキサメサゾン抑制試験非抑制などの内分泌系の異常、睡眠障害など概日リズムと関連した症状のあることが知られており、概日リズムの不全が病因や症状の発現に関連していることが以前から指摘されてきていたが、最近、死後脳研究により大うつ病と深く関係するとされる背外側前頭前野(DLPFC)や前帯状皮質(ACC)などの脳部位において、時計遺伝子を始めとするリズム発現する遺伝子の概日リズム性の発現が減弱化していたとの報告¹⁾があり、うつ病に脳レベルで概日リズムの不全のあることが明らかにされたことの意義は今後の疾患研究の方向性を決める上で極めて大きい。

私たちはうつ病の病因には概日リズム不全があるとの考えから、概日リズムを作り出す遺伝子を見出すことを目指したプロジェクトを開始し、新規のbHLH-PAS型転写因子であるBMAL1遺伝子を発見、命名²⁾した。現在、時計遺伝子はBMAL1を始め同じbHLH-PAS型の促進系転写因子群であるCLOCK, NPAS2, 抑制系の転写因子であるPER1-3, CRY1-2が同定されており、促進系の転写因子であるBMAL1/CLOCKが二量体を形成し、これが抑制系因子のプロモーター領域にあるE-boxに結合して転写を促進、産生された抑制因子PER, CRYが、BMAL1/CLOCKによる転写を抑制する転写・翻訳のフィードバックループが約24時間の概日リズムの発振を生み出していると考えられている。これらの時計遺伝子は、概日リズムの中核である視交叉上核(SCN)において、抑制系のPer, Cryは昼間³⁾、促進系のBmal1は夜間に発現の増大⁴⁾があり、その昼夜の発現変動はそれぞれの時計遺伝子固有のプロモーター⁵⁻⁷⁾配列と時計遺伝子によって制御されている。

時計遺伝子の気分障害との関連については、すでにアソシエーションスタディが実施されており、Cry1とNpas2, Clock遺伝子のポリモルフィズムがうつ病あるいは躁うつ病と関連していると報告⁸⁾されている。しかし、これらの時計遺伝子のポリモルフィズムが、どのような形でヒトの概日リズム発現や気分障害の病態に影響を及ぼしているのかについては明らかではない。この約24時間のリズムを生み出す機構の中で、これらの転写因子系の時計遺伝子

以外で、周期の長短に関わる因子の解析が進み、リン酸化酵素(CK1 ϵ/δ , CK2, GSK3 β)、脱リン酸化酵素(PP1, PP2A, PP4/5)などが同定された。また位相の調節については転写レベルでの調節⁷⁾機構やユビキチン化を調整する酵素(FBXL3/21)の同定が行われ⁹⁾解明が進んでいる。

本研究では、概日リズムの振幅減衰のメカニズムを明らかにするとともに、振幅を強化する因子の検索を目指す。

方法と材料

1)ベクターコンストラクト

時計遺伝子(*Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *ROR α* , *ROR β* , *ROR γ*), p160の哺乳類細胞発現用コンストラクトはCMVプロモーター発現プラスミドに挿入したものを使用した。時計遺伝子プロモーターレポーターは、時計遺伝子(*Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Rev-Erb β*)プロモーターをルシフェラーゼレポーター(プロメガ)上流に挿入したものを使用した。*Bmal1*プロモーター(Bp/527-luc)に2箇所存在するROR-RE(ROR結合配列)に変異を起こしたレポーター(527-ROR2, 527-ROR3, 527-ROR2/3)を作成した。

2)相互作用の解析

哺乳動物細胞を用いた、Two-hybrid法により相互作用を解析した。ベクターはpFR-luc trans-reporterおよびpCMV-BD(Stratagene)を使用した。pCMV-BDベクターに時計遺伝子cDNAを挿入した。同時に時計遺伝子およびp160はCMVプロモーターベクターに挿入したコンストラクトを使用した。相互作用の解析は、pFR-luc trans-reporterおよび時計遺伝子、p160発現プラスミドをNIH3T3細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を指標に行った。

3)ルシフェラーゼアッセイ

レポーターとして、*Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Rev-Erb β* のプロモーター領域をルシフェラーゼレポーターベクターに挿入したものを使用した。ルシフェラーゼアッセイはデュアルルシフェラーゼアッセイキット(プロメガ)を用いて、メーカーの指示書に従って測定した。

4)リアルタイム時計遺伝子発現解析

時計遺伝子プロモーター活性の変動をリアルタイムで測

定可能な実験系を確立している. 35 mmディッシュで培養したNIH3T3細胞に, *Bmal1*, *Per2*プロモーター下流にルシフェラーゼレポーター遺伝子を連結したレポーターコンストラクト (*Bmal1*-dluc, *Per2*-dluc)を, リポフェクタミンを用いて導入し, 16~20時間後にデキサメサゾン刺激を行い, クロノス(アトー社)を使用してプロモーター活性の変化を, 発光量の変化として継時的に計測した.

5)CRISPR/Cas9 法を用いた遺伝子ノックアウト

標的遺伝子の配列に基づいてgRNAを設計し合成した. Cas9はタンパク質としてgRNAと同時にlipofectamine CRISPRMAX CAS9 Reagent(Thermo-Fisher)を用いてNIH3T3細胞に導入した.

結果

時計遺伝子プロモーターリズムの振幅を増大する因子の検索の結果, p160が*Bmal1*, *Per2*, *Cry2*のプロモーターリズムの振幅を増大させることが明らかとなった. この作用機序を解明するため, p160と時計遺伝子産物との相互作用

を用two-hybrid systemを用いて解析したところ, BMAL1とSRC-2が相互作用を示すことが示された(図1). また, *Bmal1*などの時計遺伝子の中で, 促進系転写因子であるROR α , ROR β , ROR γ は, 相互作用の解析から, SRC-2と結合することも示された. さらに, ルシフェラーゼアッセイを用いて*Bmal1*のROR α , ROR β , ROR γ による活性化がp160で増強されるか検討したところ, SRC-2がROR α による活性化を有意に増加させることが示された(図2).

このSRC-2による*Bmal1*転写活性の増加が, ROR α とその結合配列であるROR-REを介して惹起されているか検討するため, *Bmal1*プロモーターのROR-REに変異を導入したレポーターコンストラクトを作成し解析した. このプロモーター領域に2箇所存在するROR-REを2箇所とも破壊したところ, SRC-2による*Bmal1*プロモーターの転写活性化は消失した(図3).

CRISPR/Cas9法を用いて, p160遺伝子ノックアウト細胞を作成し, 時計遺伝子リズムの振幅の解析を開始した. 現在, ノックアウト細胞をスクリーニング中である.

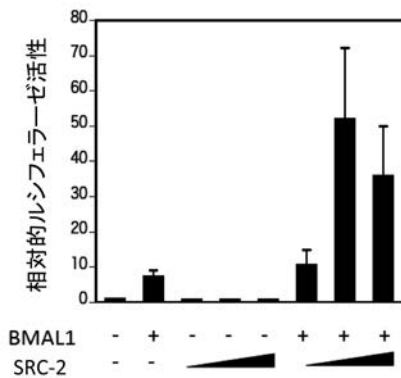


図1. two-hybrid assay による相互作用の解析.

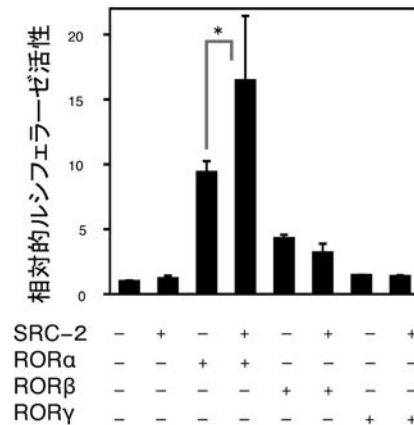


図2. *Bmal1*プロモーターのROR活性化に対するp160の作用.

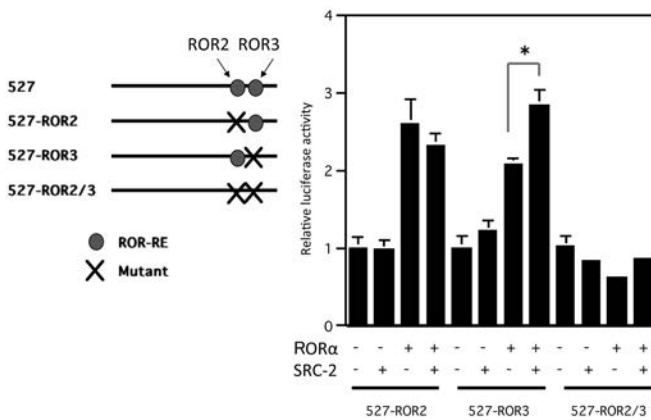


図3. SRC-2による*Bmal1*プロモーターの活性化はROR α とその結合部位 (ROR-RE) を介している. 左図はプロモーターの模式図で, *Bmal1*プロモーター (Bp/527-luc) に2箇所存在するROR-RE (ROR結合配列) の部位と, 527-ROR2, 527-ROR3, 527-ROR2/3の変異導入部位を模式的に示している. 右図は*Bmal1*プロモーターを使用したルシフェラーゼアッセイ.

考察

概日リズムの不全は躁うつ病や大うつ病など精神神経疾患に認められ、特に大うつ病では、内分泌系の異常、睡眠覚醒の障害、症状の日内変動、レム睡眠潜時の短縮など、概日リズムと直接関連した病態や症状が多く認められる。最近、死後脳研究により大うつ病と深く関係するとされる脳部位において、時計遺伝子を始めリズム発現する遺伝子の概日リズム性の発現が減弱化していると報告¹⁾され、大うつ病の脳における概日リズム不全の存在が明確になってきている。本研究はリズム性発現の減弱化と密接に関連する概日リズムの振幅に注目し、時計遺伝子の振幅発現調節機構を明らかにすることを目的に実施した。

私たちが共同研究グループは、概日リズム発現の分子機構を解明するため、*Bmal1*プロモーターを世界に先駆けて同定⁵⁾し、この*Bmal1*プロモーター配列を利用した*Bmal1*-promoter-lucレポーターを樹立し、このレポーターを用いてオーファン核内受容体ROR α によって*Bmal1*が転写活性化されることを初めて報告¹⁰⁾している。しかし、ROR α を過剰発現した系では*Bmal1*リズムの振幅は逆に減衰化し(未発表データ)、時計遺伝子の発現を増加させる因子が必ずしも単純に振幅を増大させるのではないことも明らかになった。産総研で開発された赤色、橙色のルシフェラーゼを利用して、これを多色レポーターとして、*Bmal1*と*Per2*のリズムを同時に同じ培養ディッシュや臓器で計測可能な系を樹立し、両レポーターを発現させたトランスジェニックマウスの開発を成功させている¹¹⁾が、このマウスの解析から、臓器によって*Bmal1*と*Per2*リズムのピーク位相、振幅は異なるものの、促進系と抑制系の時計遺伝子がまるでシーソーのように規則正しく約12時間交代で増減していることが明らかにされた。また、SCNにBMAL1のC末端を欠失させたものを過剰発現させると、Ca²⁺濃度リズムが減弱化すること¹²⁾から、BMAL1に概日リズムの減弱化と関連する因子が作用する可能性が示唆されたため、BMAL1と相互作用する候補因子をスクリーニングしたところ、SRC-2がBMAL1と相互作用することが示された(図1)。RORにはアミノ酸配列で相同性の高い、ROR α 、ROR β 、ROR γ の3つの因子がある。SRC-2の*Bmal1*プロモーター活性増強に対する作用は、この中でどの因子を介して惹起されているか検討したところ、ROR α を介して増強していることが示された。さらに、この反応が、ROR α とその結合部位を介しているのか検討するため、*Bmal1*のプロモーターにあるROR-REを欠失させた配列を用いて解析したところ、SRC-2による転写活性化は消失した。以上から、SRC-2による*Bmal1*転写活性の増大はROR α とその結合部位を介して惹起されていることが明らかになった。

本研究から、時計の*Per1*、*Per2*などの抑制系因子と*Bmal1*は、SRC-2によってプロモーターレベルで転写活

性化が起きていること、SRC-2はBMAL1、ROR α と相互作用することが示され、これが時計遺伝子振幅の増高に関与している可能性が示唆された。

謝辞

p160発現コンストラクトは埼玉医科大学ゲノム医学研究センター黒川理樹博士より供与を受けた。*Per2*プロモーターレポーターコンストラクトは産業総合研究所の中島芳浩博士より供与を受けた。

参考文献

- 1) Li JZ, Bunney BG, Meng F, Hagenauer MH, Walsh DM, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110: 9950-5.
- 2) Ikeda M, Nomura M. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. Biochem Biophys Res Commun 1997; 233: 258-64.
- 3) Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, et al. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. Nature 1997; 389(6650): 512-6.
- 4) Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K et al. Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. Biochem Biophys Res Commun 1998;250:83-7.
- 5) Yu W, Nomura M, Ikeda M. Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. Biochem Biophys Res Commun 2002 ; 290: 933-41.
- 6) Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. Science 1998; 280: 1564-9.
- 7) Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, et al. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. Nat Genet 2005; 37: 187-92.
- 8) Kishi T, Yoshimura R, Fukuo Y, Kitajima T, Okochi T, et al. The CLOCK gene and mood disorders: a case-control study and meta-analysis. Chronobiol Int 2011; 28: 825-33.
- 9) Hirano A, Yumimoto K, Tsunematsu R, Matsumoto M, Oyama M, et al. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. Cell 2013; 152: 1106-18
- 10) Nakajima Y, Ikeda M, Kimura T, Honma S, Ohmiya Y, et al. Bidirectional role of orphan nuclear receptor RORalpha in clock gene transcriptions demonstrated by a novel

reporter assay system. FEBS Lett 2004; 565: 122-6.

- 11) Noguchi T, Michihata T, Nakamura W, Takumi T, Shimizu R, et al. Dual-color luciferase mouse directly demonstrates coupled expression of two clock genes. *Biochemistry* 2010; 49: 8053-61.
- 12) Ikeda M, Ikeda M. *Bmal1* is an essential regulator for circadian cytosolic Ca²⁺ rhythms in suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci* 2014; 34: 12029-38.

研究成果リスト

論文

- 1) Ikarashi R, Akechi H, Kanda Y, Ahmad A, Takeuchi K, et al. Regulation of molecular clock oscillations and phagocytic activity via muscarinic Ca²⁺ signaling in human retinal pigment epithelial cells. *Scientific Reports* 2017 7: 44175.

学会発表

- 1) 熊谷恵, 千葉康, 中島芳浩, 池田正明. 時計遺伝子の概日リズム性発現の振幅とコアクティベーターの関与 第 23 回日本時間生物学会学術大会, 2016 年 11 月 12 日 (名古屋)
- 2) 池田正明, 熊谷恵. 時計遺伝子発見と進歩 - 発見 20 年を振り返って 第 94 回日本生理学会大会, 2017 年 3 月 30 日 (浜松) 招待講演
- 3) 池田正明, 熊谷恵, 中島芳浩. 概日時計の分子機構シンポジウム「時間毒性学」～古くて新しい毒性学～第 44 回日本毒性学会学術年会, 2017 年 7 月 10 日 (横浜) 招待講演
- 4) Kumagai M, Nakajima Y, Ikeda M. Role for p160 coactivators in amplitude of circadian oscillation. European Biological Rhythms Society XV Congress, July 30-August 3, 2017, Amsterdam

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

精神疾患の病態と治療に關与する受容体とG蛋白の機能的共役

研究代表者 小田垣 雄二 (医学部 大学病院 神経精神科・心療内科)

緒言

精神疾患、特に統合失調症あるいは(躁)うつ病などの内因性精神病の病態生理に關しては、近年の神経科学的研究の急速な発展により有力な仮説が提唱されているが、なお不明な点が多く残されている。また、これらの疾患に対する治療薬の効能も、現時点では不十分といわざるを得ない状況であり、さらなる改良や新規な作用機序の向精神薬の開発が希求されている。

精神疾患のモノアミン仮説や向精神薬の作用機序に關わる神経伝達は、ほとんど全て三量体G蛋白結合型受容体(G-protein-coupled receptor; GPCR)を介している。GPCRを介するG蛋白の活性化については、G蛋白の機能的特性を利用したいくつかの方法があるが、そのなかでも $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S結合実験は、簡便で検出感度が高く、近年の神経科学的研究でよく利用されている。筆者は、以前よりこの方法をラットの脳膜標品に適用し、様々な受容体とG蛋白の機能的共役に關する検討¹⁻¹²⁾を行ってきた。その後、ヒト死後脳の入手が可能になったことに伴い、ヒト死後脳においてもこの方法を適用し、同様に様々な受容体刺激によるG蛋白活性化反応が検出可能であることを確認している。さらに、最近では、従来の濾過法による $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S結合実験に加え、 $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S結合実験と各G蛋白 α サブユニット(G α)に対する特異抗体による免疫反応を組み合わせた新たな方法を開発し、いくつかの受容体刺激による反応の検出について報告した¹³⁻¹⁶⁾。

これらの方法を用いたその後の一連の研究は、平成26年度の学内グラント(26-B-1-12)のおかげでさらに進展し、その結果については2編の原著論文^{17, 18)}として報告することができた。今回の学内グラント(16-B-1-11)による研究では、主にヒト死後脳を用いてさらに検討を重ね、以下のようない結果を得た。

材料と方法

200~250 gのSprague-Dawley系雄性ラットを断頭後、氷上で速やかに脳を切り出し、既報に従って大脳皮質、海馬、線条体各部位の膜標品を調整した。

一方、ヒト死後脳(背外側前頭前野)については、バスク大学薬理学教室の運営するヒト脳バンクより提供を受けた。脳切片をホモジナイズした後、同様の方法で膜標品

を調整した。今回の研究結果は、神経精神疾患のない対照群の40サンプルを用いたものである。

$[^{35}\text{S}]$ GTP γ S結合実験は、従来の吸引濾過法による方法(以下、方法①)と、抗G α 抗体をコートした帯磁気ビーズによる免疫沈降法を組み合わせた方法¹⁶⁻¹⁸⁾(以下、方法②)のいずれかを用いて行った。

結果

1) ヒト死後脳における5-HT_{2A}受容体およびムスカリン性M₁アセチルコリン受容体を介するG α_q の活性化反応(方法②)

この反応については、以前ラットの脳膜標品を用いた検討結果を報告している¹⁶⁾。本研究では、これをヒト死後脳に適用し、その測定に關する基礎的検討を行うとともに、40サンプルでの濃度反応曲線を解析することによって、年齢や性、postmortem delay(死後、脳の切り出しまでに要した時間)などの影響について検討した。その結果、M₁受容体を介したG α_q の活性化反応が年齢とともに低下することを明らかにした。また、5-HT_{2A}受容体を介する反応とM₁受容体を介する反応が相関する傾向のあることも示した。これらの結果については、すでに原著論文(論文1)として発表済みである。

2) ラット脳およびヒト死後脳におけるアデノシンA₁受容体を介するG $\alpha_{i/o}$ またはG α_{i-3} の活性化反応(方法①および②)

ヒト死後脳における方法②に關しては、その基礎的な検討結果についてすでに報告している¹⁷⁾。本研究では、さらなる薬理学的検討を行うとともに、adenosine deaminaseやアデノシン受容体拮抗薬の基礎値に対する影響を検討することで、内在性アデノシンの残余による影響の可能性についても考察した。また、1)と同じ40サンプルについて①および②の方法を用いた濃度反応曲線を解析し、年齢、性、postmortem delayなどの影響や相互の關係などについて検討を加えた。得られた結果については原著論文(論文2)として印刷中である。

3) ヒト死後脳における各種受容体を介するG $\alpha_{i/o}$ の活性化反応(方法①)

上記と同じ40サンプルを用い、各種受容体刺激による

G $\alpha_{i/o}$ に対する $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合に関して薬理的検討を加えた。現在までのところ、 α_2 -アドレナリン性受容体、5-HT $_{1A}$ 受容体、アデノシンA $_1$ 受容体、GABA $_B$ 受容体、ムスカリン性M $_2$ /M $_4$ 受容体、group II代謝型グルタミン酸受容体、ヒスタミンH $_3$ 受容体、 μ -オピオイド受容体、 δ -オピオイド受容体、およびノシセプチン受容体(NOP)を介した反応の検出が可能となっている。年齢や性、postmortem delayとの関係や、反応相互の相関などについても検討を重ねている。以上の結果は、国際学会(学会発表1および2)にて発表し、今後原著論文としてまとめる予定になっている。

考 察

本研究においては、方法①および②による $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合実験を用い、主に神経精神疾患のないヒト死後脳より得た背外側前頭前野における各種受容体を介するG蛋白の活性化反応を検討している。これらの実験は、対照群と精神疾患罹患者群とで反応の差を見出し、精神疾患の病態生理の本質に迫ることを最終目的とした一連の研究の途上に位置づけられるものであるが、すでにこれまでも多くの成果を得ることができた(論文1および2, 学会発表1および2)。

前述した通り、方法①は従来より広く施行されているが、方法②は筆者が新規に開発したもので、海外の研究者からも高い関心を集めている。Springer Nature社より刊行されているNeuroMethods seriesというシリーズ本の総編集者の目にも留まり、同シリーズの一冊の編者を依頼されることとなった。現在、Co-Immunoprecipitation Methods for Brain Tissueというタイトルで、方法②の詳細な紹介を含めた十数章からなる本の編集にあたっている。

以上のように、筆者の研究は最終的には精神医学に対する寄与を目的としているが、その過程において、神経科学領域の基礎医学に対しても貢献する内容を含んでいる。本研究がさらに順調に進展し、精神疾患の病態生理の本質が明らかになることを期待したい。

参考文献

- 1) Odagaki Y, Yamauchi T. γ -Hydroxybutyric acid, unlike γ -aminobutyric acid, does not stimulate G $_i$ /G $_o$ proteins in rat brain membranes. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004; 94: 89-98.
- 2) Odagaki Y, Toyoshima R, Yamauchi T. Lack of G protein-coupled sigma receptors in rat brain membranes: receptor-mediated high-affinity GTPase activity and $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding studies. J Neural Transm 2005; 112: 873-83.
- 3) Odagaki Y, Toyoshima R, Yamauchi T. Trazodone and its active metabolite *m*-chlorophenylpiperazine as partial agonists at 5-HT $_{1A}$ receptors assessed by $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding. J Psychopharmacol 2005; 19: 235-41.
- 4) Odagaki Y, Toyoshima R. Detailed pharmacological characterization of 5-HT $_{1A}$ receptor-mediated $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding in rat hippocampal membranes. J Pharmacol Sci 2005; 98: 66-76.
- 5) Odagaki Y, Toyoshima R. 5-HT $_{1A}$ receptor-mediated G protein activation assessed by $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding in rat cerebral cortex. Eur J Pharmacol 2005; 521: 49-58.
- 6) Odagaki Y, Toyoshima R. 5-HT-stimulated $[^{35}\text{S}]\text{guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate}$ binding as an assay for functional activation of G proteins coupled with 5-HT $_{1B}$ receptors in rat striatal membranes. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 2006; 372: 335-45.
- 7) Odagaki Y, Toyoshima R. Dopamine D $_2$ receptor-mediated G protein activation assessed by agonist-stimulated $[^{35}\text{S}]\text{guanosine 5'-O-(}\gamma\text{-thiotriphosphate)}$ binding in rat striatal membranes. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat 2006; 30: 1304-12.
- 8) Odagaki Y, Toyoshima R. 5-HT $_{1A}$ receptor agonist properties of antipsychotics determined by $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding in rat hippocampal membranes. Clin Exp Pharmacol Physiol 2007; 34: 462-6.
- 9) Odagaki Y, Toyoshima R. Pharmacological characterization of α_{2D} -adrenergic receptor-mediated $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding in rat cerebral cortical membranes. Pharmacol Res 2008; 57: 435-44.
- 10) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Functional coupling between metabotropic glutamate receptors and G-proteins in rat cerebral cortex assessed by guanosine-5'-O-(3- $[^{35}\text{S}]\text{thio)triphosphate}$ binding assay. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2011; 109: 175-85.
- 11) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Group II metabotropic glutamate receptor-mediated activation of G-proteins in rat hippocampal and striatal membranes. Neurosci Lett 2013; 539: 22-6.
- 12) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Functional activation of G-proteins coupled with muscarinic acetylcholine receptors in rat brain membranes. J Pharmacol Sci 2014; 125: 157-68.
- 13) Odagaki Y, Toyoshima R. Muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of Gq in rat brain membranes determined by guanosine-5'-O-(3- $[^{35}\text{S}]\text{thio)triphosphate}$ ($[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$) binding using an anti-G protein scintillation proximity assay. J Neural Transm 2012; 119: 525-32.
- 14) Odagaki Y, Toyoshima R. Activation of Gq proteins coupled with 5-HT $_2$ receptors in rat cerebral cortical membranes assessed by antibody-capture scintillation proximity assay (SPA)/ $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding. Pharmacology 2013; 92: 2-10.
- 15) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Pharmacological characterization of M $_1$ muscarinic acetylcholine receptor-mediated Gq activation in rat cerebral cortical and

hippocampal membranes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2013; 386: 937-47.

- 16) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Functional activation of $G\alpha_q$ via serotonin_{2A} (5-HT_{2A}) and muscarinic acetylcholine M₁ receptors assessed by guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate ([³⁵S]GTP γ S) binding/immunoprecipitation in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol* 2014; 726: 109-15.
- 17) Odagaki Y, Kinoshita M, Ota T, Meana JJ, Callod LF, et al. Adenosine A₁ receptors are selectively coupled to $G\alpha_{i3}$ in postmortem human brains cortex: Guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate ([³⁵S]GTP γ S) binding/immunoprecipitation study. *Eur J Pharmacol* 2015; 764: 592-8.
- 18) Odagaki Y, Kinoshita M, Ota T. Comparative analysis of pharmacological properties of xanomeline and N-desmethylozapine in rat brain membranes. *J Psychopharmacol* 2016; 30: 896-912.

研究成果リスト

論文

- 1) Odagaki Y, Kinoshita M, Ota T, Meana JJ, Callod LF, et al. Functional activation of $G\alpha_q$ coupled to 5-HT_{2A} receptor and M₁ muscarinic acetylcholine receptor in postmortem human cortical membranes. *J Neural Transm* 2017; 124: 1123-33.

- 2) Odagaki Y, Kinoshita M, Ota T, Meana JJ, Callado LF, et al. Functional coupling between adenosine A₁ receptors and G-proteins in rat and postmortem human brain membranes determined with conventional guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate ([³⁵S]GTP γ S) binding or [³⁵S]GTP γ S/immunoprecipitation assay. (*Purinergic Signal*, in press)

学会発表

- 1) 小田垣雄二, 木下雅一, 太田敏男, Meana JJ, Callado LF, 他. 加齢によるヒト死後脳におけるオピオイド受容体を介するG蛋白活性化の亢進, 第90回日本薬理学会, 平成29年3月, 長崎
- 2) Odagaki Y, Kinoshita M, Ota T, Meana JJ, Callado LF, et al. Pharmacological characterization of receptor-mediated Gi/o activation in postmortem human prefrontal cortical membranes. 13th World Congress of Biological Psychiatry, June 2017, Copenhagen
- 3) Odagaki Y, Kinoshita M, Ota T, Meana JJ, Callod LF, et al. Functional activation of G_{i/o} proteins coupled to multiple neurotransmitter receptors in postmortem human prefrontal cortical membranes. 30th European College of Neuropsychopharmacology Congress, Sept. 2017, Paris

特許出願

なし

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

歯の形成と維持におけるTGF-βファミリーの役割の解明

研究代表者 片桐 岳信 (医学部 ゲノム医学研究センター)

緒言

Transforming growth factor-β(TGF-β)ファミリーは、個体発生や組織の維持・再生の過程で、さまざまな細胞の増殖、分化、死を調節する30以上から成る成長因子群である^{1,2)}。TGF-βファミリーの因子は、標的細胞で活性化する細胞内情報伝達系の違いにより2群に大別できる。1つは、受容体によって転写因子Smad1, Smad5, Smad9(別名Smad8)をリン酸化してシグナルを伝達する群で、他方は転写因子Smad2とSmad3を活性化する^{1,2)}。前者は、Bone morphogenetic protein (BMP)に代表される筋組織などで異所性骨誘導活性を持つ因子であるのに対し、後者はTGF-βやActivin Aなどに代表され異所性骨誘導活性は示さない^{1,2)}。

いずれの群の細胞内シグナルも、受容体によってリン酸化された転写因子Smad分子と共役因子であるSmad4の三量体によって核内へ伝達される^{1,2)}。Smadの三量体複合体は、ゲノムDNAの標的配列を認識して結合し、遺伝子の発現を制御すると考えられている。Smad1やSmad5はGGCGCCを含む標的配列に結合するのに対し、Smad3はCAGA配列に結合する^{1,2)}。このように、それぞれの標的遺伝子が異なることが、TGF-βファミリーの生物活性の違いの原因と考えられている^{1,2)}。

歯は、主に胎生期に上皮細胞と間葉系細胞の相互作用によって形成される器官の1つである³⁻⁵⁾。一連の歯の形成過程は、さまざまな液性因子や細胞接着因子などによって制御される。主に胎生期の歯胚形成の解析から、TGF-βファミリーの成長因子は、歯の形成を制御する重要な因子であることが明らかとなりつつある³⁾。

マウスを含む齧歯類の切歯は、出生後も持続的に形成される。これは、齧歯類の切歯には、出生後も幹細胞が存在し、持続的な増殖とエナメル芽細胞を始めとする上皮系細胞と、象牙芽細胞を含む間葉系細胞への分化が制御されていることを示す³⁻⁵⁾。このため、齧歯類の切歯は、胎生期のみならず、出生後の歯の形成過程やその調節機構を解析するための優れた実験モデルである。

本研究では、出生後の歯の形成におけるTGF-βファミリーの役割を解析する目的で、タモキシフェン投与依存的に転写共役因子Smad4遺伝子を欠失させることができる遺伝子改変マウス(Smad4 cKO)の切歯を組織学的に解析した。その結果、Smad4 cKOマウスは、エナメル芽細胞を

含む上皮細胞の分化と機能発現に異常を呈することが判明した。

材料と方法

本研究計画は、埼玉医科大学実験動物委員会によって承認を受けた(承認番号2046)。生後10週令のSmad4^{fl/fl}; CAG-CreERT^{Tg}マウスに、タモキシフェンを腹腔内投与(40 mg/kg/日、5日間連続投与)した。初回投与から23日後にマウスを安楽死させ、下顎、および切歯を摘出して以下の実験に用いた。

下顎の石灰化度と形態は、μCT装置(CosmoScan GX, RIGAKU社)で解析した。下顎を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、常法に従って4 mm厚のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、アザン染色、またはベルリン・ブルー染色を施した。また、Smadの局在は、それぞれ、抗Smad4抗体(ウサギモノクローナル抗体, Abcam社)、抗リン酸化Smad1/5/9抗体(ウサギポリクローナル抗体, Cell Signaling社)、抗リン酸化Smad2/3抗体(ウサギポリクローナル抗体, SantaCruz社)と、抗ウサギ抗体(ニチレイバイオ社)を用いた免疫染色を行い、DAB基質キット(Vector Laboratories社)を用いて可視化した。染色した切片は、顕微鏡BioRevo BZ-9000(キーエンス社)を用いて観察した。

結果

コントロール群の切歯では、HE染色とアザン染色で、未分化な幹細胞を含むと考えられるcervical loopから切歯の先端に向かい、一列に並ぶ極性化したエナメル芽細胞と、その外側の上皮細胞層が観察された。エナメル芽細胞は、エナメル質形成に伴い徐々に極性化しながら分泌期から成熟期へと分化し、さらに成熟過期へと移行した。一方、Smad4 cKOマウスの切歯は、特に成熟期以降のエナメル細胞を含む上皮細胞層の扁平や低形成を認めた。

Smadタンパク質の免疫染色を行うと、Smad4はCervical loopの幹細胞だけでなく、エナメル芽細胞や象牙芽細胞、歯髓等に広く認められた。Smad4 cKOマウスでは、抗Smad4抗体による染色性が低下しており、Smad4の欠失を確認した。しかし、Smad4 cKOマウスにおいても、リン酸化Smad1/59やリン酸化Smad2/3の局在に顕著な変化は認められなかった。

考 察

本研究では、出生後の歯の形成におけるTGF-βファミリーの細胞内シグナルの役割を解明する目的で、マウスでタモキシフェン投与依存的にSmad4 遺伝子を欠失させて切歯を解析した。Smad4 cKOマウスの切歯では、特に成熟期以降のエナメル芽細胞とその外側に位置する上皮細胞層の扁平と低形成が認められた。Smad4と複合体を形成する転写因子であるリン酸化Smad1/5/9やリン酸化Smad2/3の量や局在は変化しておらず、歯の上皮細胞における表現形質は、TGF-βファミリー受容体によるSmadのリン酸化ではなく、その下流で起こるSmad複合体による標的遺伝子の転写機能の低下に起因すると考えられた。

分泌期のエナメル芽細胞は、主にエナメル質の有機質成分(アメロゲンやエナメルリンなど)を分泌するのに対し、成熟期以降のエナメル芽細胞と上皮細胞層は、エナメル質の石灰化を制御すると考えられている^{6,7)}。Smad4 cKOマウスの成熟後期以降のエナメル芽細胞と上皮細胞層は、極性を失い扁平であったことから、エナメル質の石灰化に異常を呈している可能性が考えられる。この点を検証するために、今後、エナメル質の石灰化に重要な有機質の分解に関わるプロテアーゼや、リン酸カルシウム結晶の生成に重要なアルカリホスファターゼ等の発現量の解析や、細胞のイオン輸送能等を詳細に解析する必要がある。

出生後のマウスでSmad4 遺伝子を欠失させたところ、分化後期のエナメル芽細胞と周囲の上皮細胞の扁平化と低形成を認めた。これは、Smad4を介したTGF-βファミリーの細胞内シグナルが、持続的な切歯の形成に重要な可能性を示唆する。

謝 辞

本研究は平成28年度埼玉医科大学学内グラント(16-B-1-12)の助成を受けて行われた。本研究の研究協力者各位(町谷亜位子氏、塚本翔氏、関根典子氏、大手聡氏、倉谷麻衣氏:埼玉医科大学ゲノム医学研究センター病態生理部門、須田直人博士:明海大学大学院歯学研究科、自見英治郎氏:九州大学大学院歯学研究院)に深謝する。

参考文献

- 1) Katagiri T, Tsukamoto S, Kuratani M. Heterotopic bone induction via BMP signaling: Potential therapeutic targets for fibrodysplasia ossificans progressiva. *Bone* 2017; S8756-3282(17): 30259-4.
- 2) Katagiri T, Watabe T. Bone morphogenetic proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016; 8(6) a021899.
- 3) Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signaling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 2003; 116: 1647-8.
- 4) Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA et

al. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with notch and Fgf signaling. *J Cell Biol* 1999; 147: 105-20.

- 5) Harada H, Ohshima H. New perspectives on tooth development and the dental stem cell niche. *Arch Histol Cytol* 2004; 67: 1-11.
- 6) Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, et al. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem* 2008; 389: 695-700.
- 7) Josephsen K, Takano Y, Frische S, Praetorius J, Nielsen S, et al. Ion transporters in secretory and cyclically modulating ameloblasts: a new hypothesis for cellular control of preeruptive enamel maturation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299(6): C1299-307.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 町谷亜位子, 自見英治郎, 須田直人, 片桐岳信. 成体マウスの歯牙形成におけるTGF-βファミリーの関与, 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016年8月25日, 北海道札幌市
- 2) Machiya A, Ohte S, Tsukamoto S, Sekine N, Jimi E, Suda N, Katagiri T. The TGF-β family signaling is involved in regulation of incisor formation of adult mice. The 14th RCGM International Symposium of Academic Frontier, 2016年11月11日, 埼玉県日高市
- 3) 町谷亜位子, 自見英治郎, 片桐岳信, 須田直人, 生後のマウス切歯形成におけるSmad4の関与, 第75回日本矯正歯科学会大会, 2016年11月7日, 徳島県徳島市
- 4) Machiya A, Ohte S, Tsukamoto S, Sekine N, Jimi E, Suda N, Katagiri T. Role of TGF-β super family signaling in the mechanism of tooth formation in adult mice, International Symposium 2016 Oral and Craniofacial Development and Diseases, 2016年12月12日, 大阪府大阪市
- 5) 町谷亜位子, 藤本舞, 大手聡, 塚本翔, 倉谷麻衣, 須田直人, 片桐岳信. 進行性骨化性線維異形成症(FOP)の異所性骨化におけるFKBP12の役割, 一般財団法人岩垂育英会平成28年度育英会賞受賞者講演・奨学生研究成果報告会, 2017年3月18日, 大阪府大阪市
- 6) 町谷亜位子, 自見英治郎, 須田直人, 片桐岳信. 成体マウスの切歯形成におけるBMPシグナルの役割, 第59回歯科基礎医学会学術大会, 2017年9月18日~20日, 長野県塩尻市
- 7) 町谷亜位子, 自見英治郎, 須田直人, 片桐岳信. 転写共役因子Smad4の欠失は歯の上皮細胞の運命決定を制御し異所性毛様組織を誘導する, 第76回日本矯正歯科学会学術大会, 2017年10月19日~21日, 北海道札幌市

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

ALCLにおけるMAX発現抑制機構の解明と予後解析

研究代表者 山下 高久 (医学部 総合医療センター 病理部)

緒言

近年の分子生物学的研究により、悪性腫瘍のさまざまな分子機構が解明されつつある。その中で多岐にわたる機能を誘導するkey moleculeであるMYCに関わる研究は、現在脚光を浴びている。

MYCは増殖シグナルが入るとMYC関連分子であるMAX (MYC-associated factor X)と互いのbHLHLZ(base helix-loop-helix leucine zipper)ドメイン同士を介して結合し、MYC-MAX複合体として標的遺伝子の制御領域上のE-box (CANNTG)に結合し、転写因子として働く¹⁾(Fig. 1)。この

際通常、MYCの発現とMAXの発現は相関することが知られている。

我々は悪性リンパ腫の一亜型である、未分化大細胞型リンパ腫(ALCL: anaplastic large cell lymphoma)の一部において、MYCの発現があるのにも関わらず、MAXの発現がみられないことを見出した(Fig. 2)。さらにIn vitroにおいてALCLの細胞株でのMYC、MAXの発現を検討したところ、症例と同様にMYCの発現があるにも関わらず、MAXの発現が抑制されていた。このことから、一部のALCLにおいてMAXの発現抑制が恒常的に起きていることが示唆される。

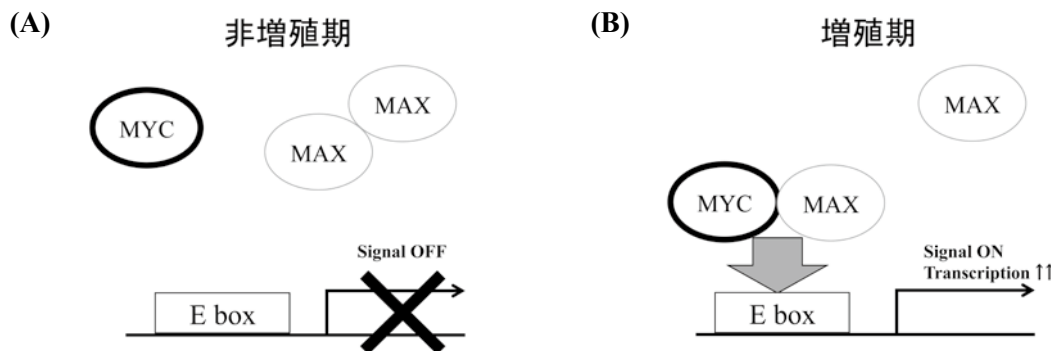


Fig. 1. (A)非増殖期ではMAXはhomodimerを形成し、MYCの働きを抑制する。(B)増殖期ではMYCはMAXとheterodimerを形成し、標的遺伝子のpromotor領域にあるE-Boxに接合し、転写をONにする。

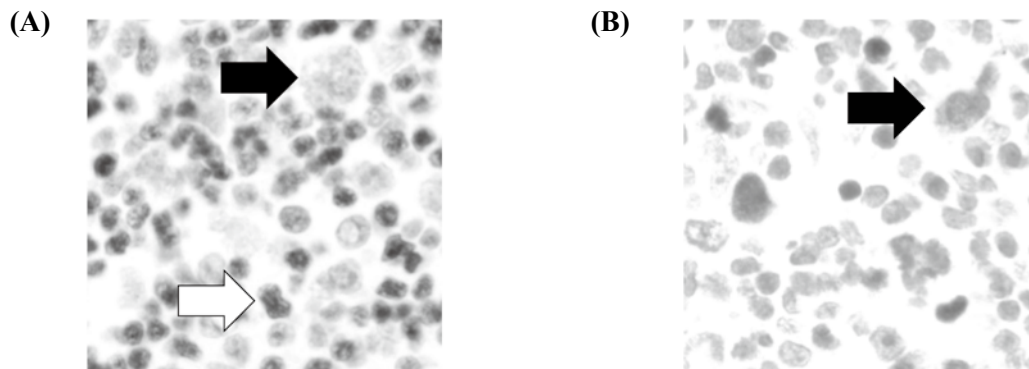


Fig. 2. (A)MAXの免疫染色。MAXは非腫瘍性のリンパ球(白矢印)で発現がみられるが、腫瘍細胞では発現をみとめない(黒矢印)。(B)MYCの免疫染色。MYCの発現は腫瘍細胞、非腫瘍リンパ球ともにみられる。

公共のデータベース (TCGA) を用いて多数の癌サンプルでのMYC, MAXの発現を解析すると, その多くでMYCの発現とほぼ相関するようにMAXの発現を認めており, MAXの発現抑制はほとんどみられなかった. 以上のことからALCLでのMAXの発現抑制所見は疾患特異的な変化であることが示唆される. そのため, MAXの発現抑制の機序を明らかにすることは, ALCLの病態メカニズムの一端を解明するものと期待される.

他の悪性腫瘍ではMAXの遺伝子変異によるMAXの発現抑制やその予後との関連について報告があるものの^{2,3)}, 悪性腫瘍におけるMAXの発現の調節機構はいまだ不明である.

本研究では, ①ALCLにおけるMAXの発現抑制機構を解明することを目的とし, さらに②ALCL症例においてMAXの発現の有無が予後予測マーカーとなりうるかを検討する.

材料と方法

In vitroの研究では, 主にALCL細胞株を使用し, MAXの発現抑制機構の解明を, In vivoでの研究では, ALCL症例におけるMAXの発現の有無とその予後との関連について検討した.

①ALCLにおけるMAXの発現抑制機構の解析.

2種類のALCLの細胞株(K299, SUDHL-1)を用いて以下の解析を行った.

A. Sanger sequence

他の悪性腫瘍での検索では, MAXのエクソン領域の遺伝子変異によってMAXの発現が消失しているという報告がある. そこでALCLでも同様の機序によってMAXの発現抑制している可能性を考え, 2種類のALCLの細胞株の細胞のDNA抽出を行い, MAXのエクソン領域のDNA sequenceを行った.

B. DNA脱メチル化剤の投与

多くの悪性腫瘍ではDNAのメチル化やヒストン修飾によって遺伝子の発現が調節されることが知られている. そこでALCLでのMAXの発現抑制がDNAのメチル化によるものかどうかを調べるために, ALCLの細胞株へDNA脱メチル化剤を投与後にタンパクを抽出し, Western blot法にてMAXの発現回復の有無の検討を行った.

②ALCL症例におけるMAXの発現の有無と予後との関連.

ALCL症例におけるMAXの発現の有無を調べ, その発現の有無と予後との関連について検討し, MAXの発現の有無が予後予測マーカーとなりうるかを解析する. 対象症例は埼玉医科大学総合医療センターにて1990年から2016年までにALCLと診断された17症例. すでに採取済みの生検ならびに切除検体に対しMAXの免疫染色を行った. 症例をMAXの有発現群と無発現群に分け, その発現の有無と予後との関連を統計解析ソフト(JMP®12.0.1)を用いて検討した. 本研究は埼玉医科大学総合医療センターの倫理委員会にて承認済みである(No. 1267).

結果

①ALCLにおけるMAXの発現抑制機構の解析.

2種類のALCLの細胞株に対し, MAXのエクソン領域のDNA sequenceを行ったが, 遺伝子変異は認めなかった. 公共のデータベース (TCGA) におけるDNA sequenceの結果も同じであり, 遺伝子変異によるMAXの発現低下, 消失は否定的と考えられた. つぎに, DNA脱メチル化薬によるMAXの発現の回復の有無を検討したが, 明らかな発現の回復は認められなかった. In vitroでの解析は上述の解析にとどまっており, 研究期間内にMAXの発現抑制機構の解明には至らなかった.

②ALCL症例におけるMAXの発現の有無と予後との関連.

ALCL17症例の患者背景は年齢の中央値は50歳, 性別は男性7名, 女性10名, ALK陽性5例, 陰性12例, 腫瘍部位は皮膚7例, リンパ節4例, 肺3例, 消化管1例, 骨髄1例, 不明7例であった. 血清IL-2Rは平均3810 U/ml (365-11700)で, LDHの平均は240 IU/L (143-493)であった. 予後解析を行ったところ, 全ALCL症例の5年生存率は約40%であった. またMAXの発現の有無の2群間に分けて予後解析したところ, 5年生存率はMAX有発現群, 無発現群がそれぞれ42%, 36% (p=0.77)であった. 両群間で統計学的な有意差は認めなかったものの若干MAXの無発現群のほうが予後は悪かった.

考察

ALCLにおけるMAXの発現抑制機構の解析を行ったが, 研究期間中にMAXの発現低下の原因の解明には至らなかった. MAXの発現抑制の原因としてほかにMAXの発現を調整する分子やmiRNAを介した発現抑制の文献報告があり^{2,5)}, それらの文献を参考に今後もMAXの発現抑制機構の解明にむけて研究継続予定である.

またALCL症例におけるMAXの発現の有無と予後解析を行ったところ, 統計学的な有意差は得られなかったものの, MAX無発現群のほうがやや予後が悪かった. このことから, ALCLではMAXは他の報告と同様に癌抑制遺伝子としての働く可能性があることや²⁾, その発現の有無が予後予測マーカーとなりうる可能性が示唆された. 今後も症例を増やして検討していく予定である.

謝辞

本研究は, 平成28年度埼玉医科大学学内 Grant (16-B-1-13, 受賞者代表: 山下高久) の助成を受けて行った. ここに感謝の意を表する.

参考文献

- 1) Diolaiti D, McFerrin L, Carroll PA, Eisenman RN. Functional interactions among members of the MAX and MLX transcriptional network during oncogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1849(5): 484-500.

- 2) Romero OA, Torres-Diz M, Pros E, Savola S, Gomez A, et al. MAX inactivation in small cell lung cancer disrupts MYC-SWI/SNF programs and is synthetic lethal with BRG1. *Cancer Discov* 2014; 4(3): 292-303.
- 3) Yuza Y, Kawakami M, Takagi K, Yamazaki Y, Urashima M. Max protein expression is associated with survival of children with lymphoblastic lymphoma. *Pediatr Int* 1999; 41(6): 637-40.
- 4) Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F, Landa I, Leandro-García LJ, et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary

pheochromocytoma. *Nat Genet* 2011; 43(7): 663-7.

- 5) Ting Y, Medina DJ, Strair RK, Schaar DG. Differentiation-associated miR-22 represses Max expression and inhibits cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3): 606-11.

研究成果リスト

- 1) 山下高久. ALCLにおけるMAX発現抑制機構の解明と予後解析第15回学内グラント発表会(2017年7月21日, 3病院合同)

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

腫瘍幹細胞を標的とした多発性骨髄腫に対する治療構築のための基盤研究

研究代表者 多林 孝之 (医学部 総合医療センター 血液内科)

研究分担者 高橋 康之, 田中 佑加, 木村 勇太, 富川 武樹, 阿南 朋恵,

佐川 森彦, 渡部 玲子, 得平 道英, 木崎 昌弘

緒言

プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブなどの分子標的薬の登場によって多発性骨髄腫骨髄腫の治療成績は飛躍的に改善したがいまだ根治に結びついておらず、一旦ボルテゾミブに対して耐性を獲得すると種々の治療も無効であり予後は著しく不良である。他の腫瘍の同様に多発性骨髄腫においても多発性骨髄腫幹細胞(MMSCs)の存在がいわれており多発性骨髄腫根治のためにはこのMMSCを駆逐する新たな治療戦略の構築が必要と考えられる。しかし、多発性骨髄腫の腫瘍幹細胞の細胞表面マーカーは定まっておらず腫瘍幹細胞の分離は容易ではない。以前、我々は正常造血幹細胞の増殖に重要であるアダプター分子のLnkに着目し、慢性骨髄性白血病(CML)に対するLnkの役割に着目し研究を進めてきた。この研究のなかでわれわれはLnkがCMLの増殖を抑制し、その機序としてBcr/Abl蛋白を標的としていないことを見いだした(Tabayashi T, et al. Blood 2010;116:3406)。CMLの腫瘍幹細胞の生存はBcr/Abl蛋白に依存していない可能性が言われていることから、Lnkが腫瘍幹細胞の駆逐に有望である可能性が示唆された。また、我々は様々な正常幹細胞や腫瘍幹細胞の恒常性の維持に重要な役割を果たしているWnt/ β -catenin経路に着目し、この経路の多発性骨髄腫細胞に対する働きを検討した。多発性骨髄腫細胞においてもWnt/ β -catenin経路が活性化しておりこの経路の阻害によって多発性骨髄腫細胞の増殖を抑制しアポトーシスが誘導されることを見いだした(Tabayashi T, et al. 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco)。このように多発性骨髄腫のMMSCsに対する治療戦略構築において正常組織の幹細胞や腫瘍幹細胞で重要な役割を果たしている分子に着目することが重要と考えられる。そこで、我々は種々の腫瘍幹細胞の増殖において重要な役割を果たしているTOPK(T-lymphokine-activated killer cell-Originated Protein Kinase)に着目し、多発性骨髄腫細胞に対する効果を検討した。

材料と方法

1. 多発性骨髄腫細胞株(U266, RPMI8226, MM1S, KMS-11,

OPM-2)を用いて、TOPK阻害薬であるHI-TOPK-032を添加し細胞増殖に対する効果をMTS assayを用いて調べた。また、ボルテゾミブ耐性の細胞株であるKMS-11/BTZ, OPM-2/BTZに対する効果も同様に検討した。

2. HI-TOPK-032の多発性骨髄腫細胞に対する作用機序の解析をアポトーシスアッセイ法、ウェスタンブロット法を用いて検討した。

結果

1. 多発性骨髄腫細胞株においてHI-TOPK-032はいずれの細胞増殖を抑制し、その効果は用量依存性、時間依存性であった。さらに、HI-TOPK-032はボルテゾミブ耐性多発性骨髄腫細胞の細胞増殖も用量依存性、時間依存性に抑制した。
2. アポトーシスアッセイではHI-TOPK-032によって、ボルテゾミブ耐性か否かに関わらず多発性骨髄腫細胞にアポトーシスの誘導が認められた。
3. HI-TOPK-032の多発性骨髄腫細胞に対する作用機序の解析において、HI-TOPK-032はTOPKの標的蛋白であるErkのリン酸化を抑制し、c-Myc蛋白の発現を抑制した。

考察

TOPK阻害によってボルテゾミブ感受性の多発性骨髄腫細胞だけではなく、ボルテゾミブ耐性の多発性骨髄腫細胞の増殖が抑制された。TOPKは多発性骨髄腫に対する治療の有望な標的となりうる。

研究成果リスト

論文

- 1) Tokuhira M, Tabayashi T, Tanaka Y, Takahashi Y, Kimura Y, et al. The aggressive clinical courses of Hodgkin lymphoma primarily diagnosed as methotrexate-induced non-specific lymphoproliferative disorder in patients with rheumatoid arthritis. J Clin Exp Hematop. 2017; 56: 165-9.
- 2) Watanabe R, Tabayashi T, Tomikawa T, Sagawa M, Anan-Nemoto T, et al. Successful early romiplostim use in a case of severe immune thrombocytopenia with critical

- carotid arterial injury. *Int J Hematol.* 2017; 105: 100-3.
- 3) Kizaki M, Tabayashi T. The Role of Intracellular Signaling Pathways in the Pathogenesis of Multiple Myeloma and Novel Therapeutic Approaches. *J Clin Exp Hematop.* 2016; 56: 20-7.

学会発表

- 1) Tabayashi T, Takahashi Y, Kimura Y, Tomikawa T, Anan-Nemoto T, et al. New Therapeutic Approach to Overcome Bortezomib-Resistant Multiple Myeloma By Targeting TOPK/PBK. 第57回 米国血液学会年次集会 2015年12月, Orland, FL, USA
- 2) Tabayashi T, Takahashi Y, Kimura Y, Tomikawa T, Anan-Nemoto T, et al. Inhibition of WEE1 induces cell death of both bortezomib- and lenalidomide-resistant multiple myeloma cells: a novel therapeutic approach targeting cell-cycle checkpoint kinase. 第58回 米国血液学会年次集会 2015年12月, SanDiego, CA, USA

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

婦人科がんにおけるHDAC inhibitorの有用性に関する基礎的研究

研究代表者 黒崎 亮 (医学部 国際医療センター 婦人科腫瘍科)

研究分担者 藤原 恵一, 長谷川 幸清 (医学部 国際医療センター 婦人科腫瘍科)

緒言

悪性腫瘍の治療は、手術療法、化学療法、放射線療法の3つを中心に発展を遂げてきた。中でも化学療法は、分子標的治療薬の出現、免疫チェックポイント阻害薬の開発など目覚ましい発展を遂げている。

これらとは異なる機構のひとつとしてエピジェネティクスに関連する機構が注目されているが、その主たる機構はメチル化とヒストン修飾である。ヒストン修飾において、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(Histone Deacetylase (HDAC) inhibitor)はその代表である。

ヒストンは、DNAの3次元構造を司るタンパク質であり、アセチル化および脱アセチル化によりDNAの転写を制御している。癌細胞ではしばしば過剰な脱アセチル化が起こっており、がん抑制遺伝子など、そのものに異常がなくとも作用が妨げられている状態にあることが分かってきた。HDACは単なる脱アセチル化酵素としてだけでなく、細胞内で転写調節に関わるタンパク質と複合体を形成することにより、遺伝子発現調節に深く関わっている。ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬は、この点に注目した分子であり、発現抑制された遺伝子の発現を促進させる作用を持っている。

HDAC inhibitorは4つClassに分類することが可能である。1つ目はヒドロキサム酸(Hydroxamate)であり、自然界でHDAC阻害作用をもつ物質として最初に発見されたTrichostatin A(TSA)や、その構造アナログであるSAHA(Suberoyl anilide hydroxamic acid, Vorinostat)がこの群に含まれる。SAHAは、HDAC inhibitorとして初めてT細胞リンパ腫に臨床応用された。日本でも2011年に承認申請され現在に至っている。2つ目はCyclic peptideで、Depsipeptide(FK228)が該当する。大腸がん、乳がんなどの固形癌だけでなく、慢性リンパ性白血病や急性骨髄性白血病に対して第I相試験が行われ、腎細胞がん、肺がんに対しては第II相試験が行われている。3つ目は脂肪酸であり、その代表はバルプロ酸である。主としてATRAやエピルビンなどとの併用による第I相試験が行われている。そして4つ目は、benzamideである。この後も、次々に新薬が開発され、代表的なものを挙げれば、RomidepsinやBelinostatが皮膚T細胞リンパ腫や末梢性T細胞リンパ腫に

対する治療薬として臨床応用されている。

Brunettoらは、HDAC inhibitorの一つであるResminostatの第I相試験について報告した¹⁾。固形がん患者19名に対して100 mgから800 mgまでの5段階で投与を行ったところ、800 mgでは、Grade3の嘔気・嘔吐、Grade2の肝酵素上昇が1人にみられたため、第II相試験の推奨用量は600 mgであると結論付けている。日本人患者におけるデータは、Kitazonoらが報告しているが²⁾、疾患は大腸がん、膵がん、肺がんなどの固形がん患者であり、400, 600, 800 mgの3段階での投与を行った。リンパ球減少、血小板減少、好中球減少などが見られたものの、dose limiting toxicitiesの発生はなく、日本人での推奨用量は800 mgであると結論付けている。

HDAC inhibitorを用いた臨床試験は、第I相試験も含めればすでに200を超えている。しかし、婦人科がん領域に限定した研究はなく、基礎的な研究を行い、第II相試験に発展させることは大いに意義があると考えられる。

本研究では子宮体がん、および卵巣がん細胞株に対して、HDAC Inhibitorでどの程度の用量で細胞死が誘導できるかを検討する。とくに卵巣がん細胞株では、異なる組織型の細胞株を利用して、効果に違いがあるかどうかを検討する。HDAC inhibitorに対する卵巣癌細胞株のviabilityを測定する。また、患者から得られた手術摘出検体、腹水などの細胞から初代培養細胞を利用し³⁾、それらに対してHDAC Inhibitorがどの程度効果を表すかを検討する。その検討を通して、初代培養細胞を用いた婦人科がんにおけるHDAC阻害剤の効果予測因子の探索を行う。さらに抗原賦活効果や抗原提示作用などについても検討し、免疫療法との併用の可能性を探る。

材料と方法

1) 細胞株を用いたHDAC Inhibitorの効果判定

培養細胞を用いた基礎実験においては、複数の細胞株に対して、それぞれ異なる用量のHDAC Inhibitor(vorinostat)を作用させ、用量反応曲線を用いて、至適用量を決定する。細胞死の判定については、吸光度を用いたMTS assayもしくはMTT assayにより行う。

2) 初代培養細胞を用いたHDAC inhibitorの効果判定

文書によって同意の得られた患者から、手術摘出検体

もしくは腹水などの細胞から初代培養細胞を利用し, HDAC inhibitor(vorinostat)を作用させ, 細胞障害効果を測定する¹⁾. と同様細胞死の判定についてはMTS assayもしくはMTT assayを行う.

3) HDAC阻害剤の免疫活性作用の検討

患者由来細胞にvorinostatを作用し, 24時間後に細胞を回収し, total RNAを抽出する. qRT-PCR法にてHLA-class I/IIなどの抗原提示能,IDO(Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase), PD-L1などの抑制性の免疫やNKG2DなどのNK細胞活性に関連する分子について遺伝子発現の変動を検討し, HDAC阻害剤の免疫原性, 免疫抑制解除および自然免疫増強を評価し, 免疫治療との併用についての基礎的な検討を行う.

結果

1) 婦人科癌細胞株におけるHDAC阻害剤の細胞障害性

卵巣癌細胞株SKOV-3, KOC-7C, OVCAR-3及び子宮体癌細胞株HEC-1-Aを用いてvorinostatを種々濃度で添加し, 72時間後の細胞障害性をMTS法にて評価した. 図1に示すように, いずれに細胞株において

のvorinostatによる細胞障害性を認めたが, SKOV-3, KOC-7C, HEC-1-AのIC50が5 μ M以下なのに対して, OVCAR-3ではIC50が20 μ M以上であった. このことからvorinostatに対して感受性の高い婦人科がん細胞株と低い婦人科がん細胞株が存在することが明らかになった.

2) 婦人科癌患者由来初代細胞におけるHDAC阻害剤の細胞障害性

6例の卵巣癌患者及び2例の子宮体癌患者手術検体をメスで細切しディスペーゼ及びDNase Iを添加し, 100, 70, 40 μ mのセルストレーナーに順に通した後に, EpCAM陽性細胞をマグネットビーズを利用して分離し, コラーゲンIでコーティングしたプレートで培養し, 種々の濃度のvorinostatを添加し72時間後にMTS法にて細胞障害性を評価した. 図2に示すように, 卵巣癌ではvorinostatに感受性の症例から, ほとんど細胞障害性を示さない抵抗性の症例まで幅の広い反応性が確認できた. 一方子宮体癌は2例のみの検討であるが, いずれもvorinostatに対しては感受性が比較的低かった.

3) HDAC阻害剤による免疫関連遺伝子の変動

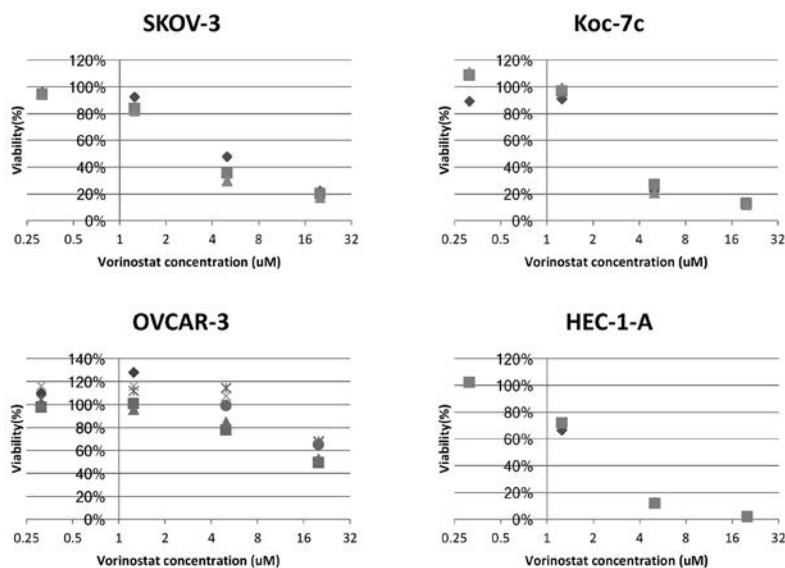


図1. 細胞株における vorinostat の細胞障害性.

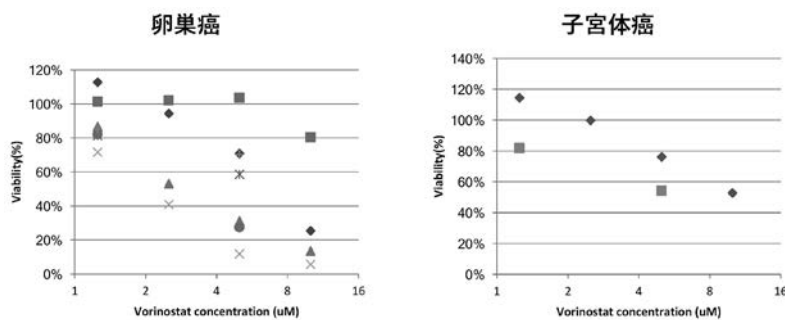


図2. 患者由来初代培養がん細胞における vorinostat の細胞障害性.

5例の患者由来の初代卵巣癌細胞に vorinostat を作用させ、24時間後に遺伝子発現の変動を検討した。図3に示すように、MICA/B, HLA-class II分子, CD40, OX40Lの発現を上昇させることが明らかになった。このことはHDAC阻害剤添加により、腫瘍細胞がMICA/B, ULBPを介してNK細胞を活性化させるだけでなく、HLA-class II, CD40, OX40Lの発現増強により、腫瘍に存在する腫瘍抗原の提示能を強化する可能性が示された。

Sample Name	IDO-1	HLA-A	HLA-B	HLA-C	MICA	MICB	PD-L1
case1	→	→	→	→	↑	↑ (N.D.)	↓
case2	↓	→	→	→	↑	↑ (N.D.)	→
case3	↓	→	→	→	↑	↓	→
case4	↓	→	→	→	↑	→	↑
case5	→	→	→	→	↑	→	↑

Sample Name	ULBP-2	ULBP-3	HLA-DOA	HLA-DPA1	HLA-DQA1	CD40	OX40L
case1	↓	→	N.D. (N.D.)	→	N.D. (N.D.)	↑ (N.D.)	↑ (N.D.)
case2	↑	→	↑ (N.D.)	↑	↑	↑ (N.D.)	↑ (N.D.)
case3	↑ (N.D.)	↑ (N.D.)	N.D. (N.D.)	→	→	↓	↑ (N.D.)
case4	↑	↑	↑	↑	↑	→	↑
case5	↑	↑	↑	↑	→	↑	N.D. (N.D.)

図3. 患者由来初代培養がん細胞における vorinostat による免疫関連遺伝子の変動。

考察

卵巣癌及び子宮体癌の細胞株及び患者由来初代培養がん細胞を用いて、HDAC阻害剤である vorinostat の細胞障害性及び免疫関連の遺伝子変動を検討した。Vorinostat は単剤で婦人科がん細胞に細胞障害性を示すことが、細胞株及び患者由来初代細胞で確認できたが、その感受性にはかなり幅があることが明らかになった。症例をさらに追加する必要があるが、その原因は現時点では明らかでない。今後は感受性株及び抵抗性株の遺伝子発現を網羅的に比較し

て、細胞障害性を予測できるようなバイオマーカーの確立が必要となると考えられた。症例数は少ないが今回の検討からは子宮体癌よりは卵巣癌が vorinostat の良いターゲットになる可能性が示唆された。

Vorinostat を作用させることにより、種々の免疫関連の遺伝子変動が確認できた。今回のデータからは、vorinostat により腫瘍がプロフェッショナルな抗原提示細胞と類似した分子を発現し、NK細胞を及びT細胞の両方を活性化することが示唆された。つまりT細胞がエフェクターと考えられる免疫チェックポイント阻害剤との併用に大きな力を発揮する可能性がある。HDAC阻害剤は単剤での抗腫瘍効果に加え、免疫療法との相乗効果が期待でき、今後の婦人科癌治療に非常に重要な役割を示す可能性が示された。さらなるデータを積み重ね、婦人科がん治療への応用が待たれる。

参考文献

- 1) Brunetto AT, Ang JE, Lal R, et al. First-in-human, pharmacokinetic and pharmacodynamic phase I study of Resminostat, an oral histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res 2013; 19: 5494-504.
- 2) Kitazono S, Fujiwara Y, Nakamichi S, et al. A phase I study of resminostat in Japanese patients with advanced solid tumors. Cancer Chemother Pharmacol. 2015; 75: 1155-61.
- 3) Ikeda Y, Park JH, Miyamoto T, et al. T-LAK cell-originated protein kinase (TOPK) as a prognostic factor and a potential therapeutic target in ovarian cancer. Clin. Cancer Res 2016; 22: 6110-7.

研究成果リスト

なし

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

ミトコンドリア代謝調節を介する腫瘍増殖メカニズムの解明とその臨床応用

研究代表者 池田 和博 (医学部 ゲノム医学研究センター 遺伝子情報制御部門)

エストロゲン受容体(ER)陽性の乳がん、子宮体がんは、ホルモン依存性の増殖を示すことが知られている。近年、がんの増殖やエストロゲン作用と代謝との関連が注目されている¹⁾。なかでも、ミトコンドリアは細胞の呼吸反応によってエネルギー(ATP)を産生する重要な細胞内小器官である。一方、低酸素状態では、細胞は細胞質で行われる嫌氣的解糖系(グルコースから乳酸を生成)によってATPを産生している。しかしながら、がん細胞では、酸素の存在する状態においても、嫌氣的解糖系が増加していること(Warburg効果)が知られている²⁾。がん細胞は増殖や細胞活動に大量のエネルギーを必要とするが、なぜ効率的なエネルギー産生系であるミトコンドリアの酸化リン酸化を使わずに、解糖系を使用するのは完全には解明されていない。しかしながら、その理由としてがん細胞の増殖に伴う虚血による低酸素の環境に抵抗するため、もしくは、TCA回路ならびに酸化リン酸化に参与する遺伝子の変異などにより、ミトコンドリアの機能が低下していることなどが考えられている。近年の標識グルコースの取り込みをイメージングするPET検査により生体でもがん細胞はWarburg効果を示すことが有力視されている。一方で、PET検査で検出されない腫瘍も存在し、がんのミトコンドリアにおける呼吸機能障害は稀でがんの産生するATPの多くの部分はミトコンドリア由来であることも報告されており³⁾、がん細胞においてもミトコンドリア機能の重要性が見直されつつある。また、解糖系が亢進するのは腫瘍細胞というよりむしろその周囲の間質細胞であり、それに由来する代謝産物が腫瘍細胞に取り込まれ栄養素になるという、リバースWarburg効果の仮説もあり⁴⁾、がんと代謝制御については未解明の問題が多い。

我々は女性ホルモンであるエストロゲンの乳がん、子宮体がんにおける役割の解明と診断・治療への応用を目指し、ERならびにエストロゲン応答遺伝子の発現機能解析を進めている。特に、エストロゲン応答遺伝子について、独自に複数同定してきている⁵⁻⁷⁾。なかでも、COX7RPはミトコンドリアに存在する呼吸鎖スーパー複合体形成を促進する因子であることを世界に先駆けて発見した⁸⁾。

ミトコンドリア内膜における呼吸鎖複合体の存在様式と作用モデルに関しては、これまでは、それぞれの複合体が内膜上で個別に拡散するように存在した流動モデル

が考えられており、電子は複合体間を偶発的に行き来し、電子伝達に伴って最終的にATPの合成を行うことが想定されていた。

しかしながら、近年の膜タンパク質の立体構造解析技術の向上により、I//III/IV複合体同士が結合して大きな超複合体を形成していることが提唱され、レスピラソームモデルと呼ばれている⁹⁾。これらの中間的なモデルとして、単体で存在する複合体と中間的に複数の複合体が結合して超複合体(I/III/IV, I/III, III/IV)を形成するものが共存し、環境に応答して超複合体の結合、解体などが行われているという仮説が注目されていたが、超複合体の形成、制御因子は長く明らかにされてこなかった。このメカニズムはエネルギー代謝制御と密接に関連すると想定され、申請者らはCOX7RPが、未解明であった超複合体形成因子であることを世界に先駆けて発見し、報告した。COX7RPはこのメカニズムにより呼吸活性を高め、ATP産生量を増加させることを見出した。

また、COX7RP遺伝子改変マウスを作製解析し、COX7RPは生体では筋肉におけるエネルギー産生ならびに褐色脂肪組織(BAT)での熱産生に重要な役割を担っていることを明らかにした。

一方で、*Cox7rp*ノックアウト(*Cox7rpKO*)マウスは糖負荷試験において、野生型(WT)マウスと比較して血糖値が低く抑えられていることが明らかになった。また、ビルビン酸注射後に糖新生によって上昇する血糖値が*Cox7rpKO*マウスでは低下することが認められた。さらに、*Cox7rpKO*マウスの肝臓において、ミトコンドリア呼吸鎖スーパーコンプレックス(I+III+IV)の形成に参与する複合体IIIのサブユニットであるRISPおよび複合体IVのサブユニットであるCOX1の割合が減少するとともに、ミトコンドリアにおけるATP合成速度が低下していることが明らかになった。これらの結果は、COX7RPが関与するミトコンドリア呼吸反応がグルコースの生体内恒常性に重要な役割を果たし、その障害が代謝性疾患の病態につながることを示唆している。

以上の知見より、COX7RPが関与するミトコンドリア呼吸鎖スーパー複合体の制御が代謝制御と密接に関連していることを示唆しており、ホルモン依存性がんにおいても代謝制御に関わる新しいメカニズムを担っている可能性が想定された。

参考文献

- 1) Budczies J, Brockmüller SF, Müller BM, Barupal DK, Richter-Ehrenstein C, et al. Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism. *J Proteomics* 2013; 94: 279-88.
- 2) Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 85-95.
- 3) Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 459-65.
- 4) Pavlides S1, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 2009; 8: 3984-4001.
- 5) Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, et al. Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 442-9.
- 6) Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, et al. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 2002; 417: 871-5.
- 7) Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 2007; 446: 916-20.
- 8) Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, Shimokata K, Inoue S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat Commun* 2013; 4: 2147.
- 9) Schon EA, Dencher NA. Heavy breathing: energy conversion by mitochondrial respiratory supercomplexes. *Cell Metab* 2009; 9: 1-3.

研究成果リスト

論文

- 1) Shiba S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Nakayama A, Tanaka T, et al. Deficiency of COX7RP, a mitochondrial supercomplex assembly promoting factor, lowers blood glucose level in mice. *Sci Rep* 2017; 7: 7606.
- 2) Nakazawa H, Ikeda K, Shinozaki S, Kobayashi M, Ikegami Y, et al. Burn-induced muscle metabolic derangements and mitochondrial dysfunction are associated with activation of HIF-1 α and mTORC1: Role of protein farnesylation. *Sci Rep* 2017; 7: 6618.
- 3) Okumura T, Ikeda K, Ujihira T, Okamoto K, Horie-Inoue K, et al. Proteasome 26S subunit PSMD1 regulates breast cancer cell growth through p53 protein degradation. *J Biochem* 2017; 10: 1093.

学会発表

- 1) 柴祥子, 池田和博, 堀江公仁子, 中山哲俊, 田中知明, 他. ミトコンドリア呼吸鎖複合体の形成促進因子であるCOX7RPは糖新生を調節する. 第89日本生化学会大会 2016年9月25~27日, 仙台市
- 2) Nagai S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shiba S, Nagasawa S, et al. Estrogen modulates gene expression and physiological activity of skeletal muscles in female mice. 第14回RCGMフロンティア国際シンポジウム 2016年11月11~12日, 日高市
- 3) Kawabata H, Ikeda K, Azuma K, Sugitani I, Kinowaki K, et al. TRIM44 in breast cancer as a novel prognostic factor associated with cellular proliferation. 第14回RCGMフロンティア国際シンポジウム 2016年11月11~12日, 日高市
- 4) Mitobe Y, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Identification of an estrogen-induced lncRNA that is critical for cell viability of breast cancer. 第14回RCGMフロンティア国際シンポジウム, 2016年11月11~12日, 日高市
- 5) Okumura T, Ikeda K, Sato W, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. shRNA-based functional screening identified PSMD1 as a gene involved in tamoxifen-resistant breast cancer. 第14回RCGMフロンティア国際シンポジウム 2016年11月11~12日, 日高市
- 6) Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Estrogen responsive gene COX7RP facilitates tumor growth in breast and endometrial cancers. 第14回RCGMフロンティア国際シンポジウム 2016年11月11~12日, 日高市
- 7) Shiba S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. A mitochondrial supercomplex assembly promoting factor COX7RP regulates glucose homeostasis. 第14回RCGMフロンティア国際シンポジウム 2016年11月11~12日, 日高市
- 8) Nagasawa S, Ikeda K, Hasegawa K, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Gene profiling of epithelial ovarian carcinoma based on RNA-sequencing. 第14回RCGMフロンティア国際シンポジウム 2016年11月11~12日, 日高市
- 9) Sato W, Yayoi A, Nakasato N, Ikeda K, Urano T, et al. Efp as a therapeutic target for endometrial cancer. 第14回RCGMフロンティア国際シンポジウム 2016年11月11~12日, 日高市
- 10) 堀江公仁子, 池田和博, 井上聡. shRNAスクリーニングとシーケンス技術によるホルモン不応性がん関連のコード・非コードRNAの同定. 横浜市 第39回日本分子生物学会 2016年11月30~12月2日, 横浜市
- 11) 池田和博, 長井咲樹, 堀江公仁子, 長澤さや, 竹田省, 他. エストロゲンは骨格筋におけるエネルギー代謝関連遺伝子の発現を調節し生体での運動持続能を向上さ

- せる. 第24回日本ステロイドホルモン学会 2016年12月3日, 大分市
- 12) 水戸部悠一, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡. エストロゲンによって誘導され乳がん細胞の増殖・生存を制御する長鎖非コードRNAの同定. 第17回関東ホルモンと癌研究会 2017年1月28日, 東京
- 13) Okumura T, Ikeda K, Sato W, Okamoto K, Horie-Inoue K, et al. Proteasome subunit PSMD1 participates in p53 degradation and regulates proliferation of breast cancer cells. AACR Annual Meeting 2017 April 1-5 2017, Washington, D.C.
- 14) 長澤さや, 池田和博, 堀江公仁子, 長谷川幸清, 竹田省, 他. RNAシーケンスにより明らかにされた卵巣がん臨床検体のサブタイプ特異的遺伝子プロファイル. 第18回ホルモンとがん研究会 2017年6月23~24日, 前橋市
- 15) Ikeda K, Mitobe Y, Horie K, Inoue S. The 44th Naito Conference "Noncoding RNA: Biology, Chemistry, & Diseases" 2017. 6.27-30, Sapporo, Japan
- 16) 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡. 呼吸鎖超複合体形成はがん増殖能・低酸素抵抗性を促進させる. 第5回がんと代謝研究会 【優秀ポスター発表賞】2017年7月13~14日, 札幌市

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

新規シナピン酸誘導体による虚血性脳障害の予防作用：分子メカニズムの解明

研究代表者 廣澤 成美 (医学部 中央研究施設 機能部門)

研究分担者 坂本 安¹⁾, 坂本 武史²⁾, 岡崎 真理²⁾

緒言

脳卒中(脳虚血)は高齢者の寝たきりになる主要原因となっている。脳において虚血性の障害が生じた場合、短期間ではその後に起きると考えられる重篤な虚血性傷害に対する保護作用が誘導される。これはプレコンディショニング(PC)により誘導される神経虚血耐性として知られている。この耐性因子の候補としてVinay K. Dhoddaらは、プロテオミクス解析によりラット脳において虚血耐性前処理により誘導される内因性メディエーターを推測した。この研究結果において、HSP70, HSP27, HSP90, グアニル酸シクラーゼ, muskelin, 血小板活性化因子受容体, および β -Actinの発現増加が認められたとされている¹⁾。また、Patrick Geleらは、脳虚血処置の前にPeroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) アゴニスト(Atorvastatin, Fenofibrate)投与による神経保護療法を行い、虚血処置後の脳のプロテオーム解析を行い、結果として、14-3-3 protein, TUC-4 protein, Protein Disulfide Isomerase A3 (PDI), HSP70がPPARアゴニストAtorvastatinの投与により発現量が増大したことに注目した。特にPDIの過発現がPPARアゴニストであり前投与により顕著に抑制されたことから治療のターゲット因子として重視した²⁾。

ヒドロキシ桂皮酸誘導体の1つであるフェルラ酸(FA)は、抗認知症作用を持つ物質として報告されており³⁾、血管保護作用も期待されている。岡崎、坂本らは、ヒドロキシ桂皮酸類であるシナピン酸(SA)の誘導体を数種類設計・合成し、その1つであるFAD012の連続投与が、両側総頸動脈結紮をした低灌流脳虚血モデルラットの生存率を上昇させ、脳障害を軽減させる作用があることを見出した。今回我々は、これらの脳虚血モデルラットを用いFA投与群、FAD012投与群、非投与群に関して、脳の海馬、大脳皮質、血管等の部位を主としたプロテオーム解析を遂行することにより、将来的に治療目的の基盤となることを目指し

て脳障害の軽減作用の根底にある分子メカニズムを検討した。

プロテオーム解析の結果、FAD012を投与した群に、リン酸化を受けていない可能性のある蛋白質スポットがみとめられ、Glyal fibrillary acidic protein (GFAP)であると同定された。また、FA群、FAD012群におけるHSP70, β -Actin, Actin cytoplasmic 2量の増加がみられ、これは報告されている結果^{1, 2)}と一致していた。

材料と方法

10週齢の雄SDラットを用いて脳虚血実験を行った。ラットはSham群(擬似手術)、2VO群(両側総頸動脈を永久結紮)、FA群(10 mg/kg FA投与)、FAD012群(10 mg/kg FAD012投与)の4群とした。FA、及びFAD012は、0.5% Carboxymethylcellulose (CMC)で溶解し経口投与した。24時間後、イソフルラン麻酔下でラットの両側総頸動脈を永久結紮し、2VOモデルを作製した。Sham群は、総頸動脈結紮以外を同様に処置した。処置後、ラットを解剖し、海馬・皮質を摘出し、液体窒素で凍結後、 -80°C の冷凍庫で保存した。

プロテオーム解析は、各サンプルより可溶性蛋白質を抽出し、二次元電気泳動を行った。二次元電気泳動装置は、Auto-2D (SHARP社製BM-100)を用いた。1次元目のIEFチップはpH勾配3~10、2次元目のSDS-PAGEチップはゲル濃度12.5% (ゲルサイズ70×45mm)を使用した。泳動条件は装置に設定されている推奨プロトコルを使用した。蛋白発現量の解析にはPDQuest (BIO-RAD社製)を用いた。蛋白スポットの発現差異がみとめられた蛋白スポットについてゲルから切り出し、トリプシンによるインゲル消化を行った。インゲル消化法は、近藤ら(国立がんセンター)のプロトコルを用いた。蛋白スポットの消化物は、飛行時間型質量分析装置(MALDI-TOF-MS, 島津社製:AXIMA-CFR)を用いて分析し、Mascot SearchによりPMF (Peptide Mass Fingerprint) 検索を行って目的スポットの蛋白質の同定を行った。

1) 埼玉医科大学 医学部 中央研究施設 機能部門

2) 城西大学 薬学部

結果

各群より抽出した海馬の可溶性蛋白質の2次元電気泳動画像(図1)により、蛋白質のPIが塩基性側にシフトしたSpot 5が見られた。Spot 5について蛋白質の同定解析を行った結果、Glial fibrillary acidic protein(GFAP)と同定された。今回の実験結果ではFAD012を投与した群(図1. E)のSpot 5は4群のゲルで最も塩基性側に位置し、リン酸化を受けていない可能性がある。また、Sham群、2VO群と比較し、FA群、FAD012群は、HSP70(Spot 1)、 β -Actin(Spot 6)、Actin

cytoplasmic 2 (Spot 4)の量的増加がみとめられた(図1. B, C, D, E)。同定した蛋白スポットの結果は、表1に示した。量的変動が見られなかった蛋白スポットも含め、21スポット(17種)の蛋白質を同定した。

いくつかのスポットは泳動ゲル上と、データーベース検索によりハイスコアで同定された蛋白質の分子量とPI値に差がみられたが、同定されたアミノ酸の全配列を調べると、蛋白質の一部が欠落しており、そのため分子量やPI値が変動したと考えられた。

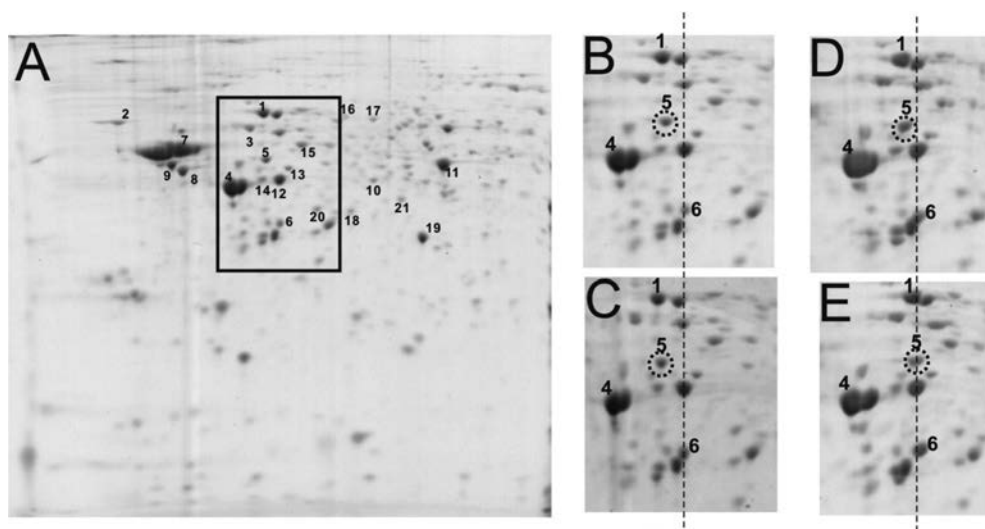


図1. 海馬より抽出されたタンパクの2D-PAGE画像 A: Sham群, pI3-10, 12.5%ゲルの全体像 B~E: Aの四角に相当する部分の各群の拡大 B: Sham群 C: VO2投与群 D: FA投与群 E: FAD012投与群.

表1. 海馬より抽出された2D-PAGEゲルより同定された蛋白

Spot.No	Identity	Mr	PI
1	Heat shock cognate 71 kDa protein	71055	5.37
2	Nurofilament light polypeptide	61355	4.63
3	Alpha-internexin	56253	5.17
4	Actin cytoplasmic 2	420525	5.29
5	Glial fibrillary acidic protein	49970	5.35
6	Beta-actin	39446	5.24
7	Enolase 1	46830	6.16
8	Gamma-enolase	47510	5.03
9	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	56318	4.92
10	Mbip protein, partial	38524	7.27
11	alpha-enolase isoform X1	47627	7.90
12	Creatine kinase-B, partial	40883	5.32
13	Guanine deaminase, isoform CRA a	42638	5.32
14	Serine/threonine-protein kinase N3 isoform X1	99545	9.08
15	V-type proton ATPase subunit B	56857	5.57
16~19	Highly divergent homebox isoform X1	87424	5.98
20, 21	Highly divergent homebox isoform 1	77669	5.42

考 察

今回の結果により, Spot 5 として同定された, GFAP はグリア細胞にMajorに発現し, アレキサンダー病等の神経系の病気の原因蛋白であることが知られている。また, 低酸素による脳障害時にGFAPのリン酸化が生じ細胞死に至るとの報告が近年されているが, そのメカニズムは不明である⁴⁾。今回, 血管保護作用が期待されているFA群よりも, さらに, FAD012 群はリン酸化を受けていないことから, 脳障害時の細胞死を防いでいる可能性が見いだされた。これは, 岡崎, 坂本らが見出した脳障害を軽減させる作用のメカニズムの解明につながるものと期待された。同様に, FA群, FAD012 群におけるHSP70, β -Actin, Actin cytoplasmic 2 の量的増加がみとめられ, これまでに研究報告^{1, 2)}と同様の結果が得られた。

従来のプロテオーム解析は, ラージゲル (240 × 180 mm) を用い, ゲル 1 枚あたり, 1 mg の蛋白を用い, 泳動には数日を要していたが, 本研究で使用した 2 次元電気泳動装置 Auto-2D (SHARP 社製 BM-100) は, ミニゲルに対応しており, 従来の 1/20 ~ 1/10 と少ない蛋白量で検出でき, 泳動時間は 2 時間 30 分である。また, CBB 染色 (蛋白量: 100 μ g/gel) で識別可能な蛋白スポットに関しては, 通常のサンプルプレートを用いた PMF 解析による蛋白同定が可能であった。

今回 CBB 染色に用いたサンプルを, より微量の蛋白量で染色可能な蛍光染色 (SYPRO Ruby) を行い, ディフュゼンシャル解析を行ったところ, より多くの蛋白スポットが検出され, 量的変動のみられるスポットも確認された。しかし, 蛍光染色 (蛋白量: 10 μ g/gel) のゲルスポットは, 1 スポットあたりの蛋白も微量であるために, MALDI-TOF-MS 解析を行うためには, 濃縮サンプルプレート使用や, 高感度検出に利用可能な, マトリックス物質 (CHCA-Cl)⁵⁾ の選択などの分析手法の検討が必要と思われ, 現在, 複数のマトリックス物質についても検討を加えている。今後, さらに発現差異のみられた微量蛋白の解析を遂行し, FAD012 投与による脳障害の軽減作用の分子メカニズムの解明を進める。

謝 辞

本研究は平成 28 年度学内グラントの助成を受けて行われたものであり, ここに深謝いたします。

参考文献

- 1) Dhodda VK, Sailor KA, Bowen KK, Vemuganti R. Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis. *J Neurochem* 2004 Apr; 89(1): 73-89.
- 2) Gelé P, Vingtdoux V, Potey C, Drobecq H, Ghestem A, et al. Recovery of brain biomarkers following peroxisome proliferator-activated receptor agonist neuroprotective treatment before ischemic stroke. *Proteome Sci* 2014 May 6; 12: 24.
- 3) Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, et al. Protection against beta-amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *Br J Pharmacol* 2001 May; 133(1): 89-96.
- 4) Sullivan SM, Sullivan RK, Miller SM, Ireland Z, Björkman ST, et al. Phosphorylation of GFAP is associated with injury in the neonatal pig hypoxic-ischemic brain. *Neurochem Res* 2012 Nov; 37(11): 2364-78.
- 5) Leszyk JD. Evaluation of the new MALDI matrix 4-chloro-alpha-cyanocinnamic acid. *Journal of Biomolecular Techniques* 2010; 21: 81-91.

研究成果リスト

学会発表

(国際学会)

- 1) Kato Y, Hirosawa N, Takayama J, Xuan M, Okazaki M, et al. Use of halogenated derivatives of the ferulic acid as matrices in proteomic analysis with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. *Protein Society 31nd Annual Symposium 2017 Montreal, Canada*

(国内学会)

- 2) 加藤洋介, 廣澤成美, 坂本武史, 松田千代子, 辻村和博, 他. 新規フェルラ酸誘導体: PMF 解析用 Matrix としての性能の違い及びプロテオーム解析への応用 日本プロテオーム学会 2016 年会 東京
- 3) 加藤洋介, 松田千代子, 辻村和博, 玄美燕, 廣澤成美, 他. 新規フェルラ酸誘導体の MALDI マトリックスとしての評価とプロテオーム解析への応用 日本薬学会第 136 年会 2016 横浜

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書
概日リズムの振幅を制御する分子機構の解明

研究代表者 熊谷 恵 (医学部 生理学)

緒言

地球の自転によって作り出される24時間周期は、地球上の殆どすべての生物の体内に概日リズム機構として取り込まれ、哺乳動物では行動、睡眠覚醒、ホルモン分泌、循環機能、代謝などの24時間周期で繰り返される様々な生体機能のプログラムの元になっている。概日リズムは、臓器や細胞レベルでも発現していることが時計遺伝子の24時間の発現を解析することで明らかになってきた。時計遺伝子である*Cry1*, *Cry2*のダブルノックアウトマウスにおいては、行動リズムや、視交叉上核を分散培養した細胞リズムは消失するものの、視交叉上核の細胞リズムは維持されていることから、リズム発現は、個々の細胞レベルにおけるリズム発現ばかりでなく、視交叉上核細胞間にみられるような細胞間ネットワークが、概日リズムの出現と安定化に重要であることが明らかになってきている。実際、*Cry1*, *Cry2*のダブルノックアウトマウスを用いた細胞間ネットワークの研究でも、視交叉上核の時計遺伝子のリズム発現の振幅は、他の組織より高いことがわかっており、細胞間ネットワークに加えて、時計遺伝子のリズム発現の振幅の両者が、時計の安定化に必要と考えられるようになってきている。細胞間ネットワークについては研究が進んでいるが、リズム安定化の要素である概日リズムの振幅を決定している因子やその分子機構、増強を起こす因子等の解明は十分に進展していないのが現状である。

概日リズムの振幅と密接に関係があることが古くから知られている疾患に気分障害がある。気分障害の中で単極性うつ病では、抑うつ感などの症状の日内変動、早朝覚醒などを特徴とした睡眠障害、デキサメサゾン抑制試験の反応性消失、深部体温リズムの振幅低下など、概日リズムと関連すると考えられる症状・病態が多く見られる。これらは抗うつ薬による治療やECT(通電療法)によって改善することが知られており、治療効果の発現と強く関係していることが示唆される。また、高度光照射療法や断眠療法なども概日リズムと関連する治療法で気分障害に効果があることが確認されている。抗うつ薬やECTの治療効果発現までには10日前後の日数を要することから、速効性のある治療法の開発が求められている。これに対して高度照射療法(光療法)や断眠療法は、効果発現までの期間が短いことが知られており、概日リズムの調節を標的にした治療法

が、有効かつ速効性のある治療薬の開発に繋がるものと期待される。特に光療法は、網膜の光受容体からのシグナルが概日リズム中枢の視交叉上核神経細胞にあるグルタミン酸受容体を直接刺激して時計遺伝子のリズム周期をリセットして同調させる分子機構が解明されており、光療法の気分障害に対する有効性の分子機構を解明する事は新しい気分障害の治療法を見出す糸口になる可能性を秘めている。また、気分障害の患者(躁うつ病)より採取した線維芽細胞に時計遺伝子を発現させたところ、そのリズム発現の振幅が低下していたとの報告があり¹⁾、さらに、大うつ病の患者死後脳の*Bmal1*などの時計遺伝子の発現リズムが低下していたとの報告もあり²⁾、概日リズム機能の不全を直接示唆する知見として大変興味深くこの方面からのアプローチを一刻も早く開始することが必要である。

材料と方法

1) リアルタイム時計遺伝子発現解析

プロモーター活性の変化をリアルタイムで測定可能な実験系を確立している。35 mmディッシュで培養したNIH3T3細胞に、*Bmal1*プロモーター下流にルシフェラーゼレポーター遺伝子を連結したレポーターコンストラクト(*Bmal1-dluc*, *Cry1-dluc*)を、リポフェクタミンを用いて導入し、16~20時間後にデキサメサゾン刺激を行い、クロノス(アトー社)を使用してプロモーター活性の変化を、発光量の変化として継時的に計測した。

2) ルシフェラーゼアッセイ

レポーターとして、*Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Rev-Erbβ*のプロモーター領域をルシフェラーゼレポーターベクターに挿入したものを使用した。ルシフェラーゼアッセイはデュアルルシフェラーゼアッセイキット(Promega)を用いて、メーカーの指示書に従って測定した。

3) ベクターコンストラクト

時計遺伝子(*Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *RORα*, *RORβ*, *RORγ*), p160の哺乳類細胞発現用コンストラクトはCMVプロモーター発現プラスミドに挿入したものを使用した。時計遺伝子プロモーターレポーターは、時計遺伝子(*Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*)プロモーターをルシフェラーゼレポーター(Promega)上流に挿入したものを使用した。

結 果

1) 時計遺伝子プロモーターに対するp160の作用

*Bmal1*プロモーターに対するp160の作用をルシフェラーゼアッセイにより解析したところ、3種類のp160を一過性にトランスフェクションするとプラスミド量依存的に転写活性が増加した。(図1)

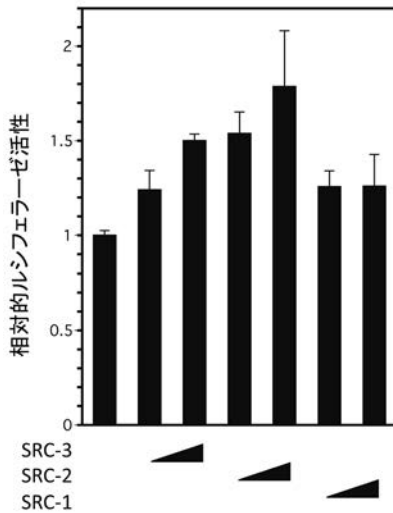


図1. *Bmal1*プロモーターに対するp160の転写活性化作用。

2) 時計遺伝子プロモーターリズムに対するp160の作用

*Bmal1*プロモーターレポーターおよび*Cry1*プロモーターレポーターを、p160発現コンストラクトともにNIH3T3細胞にトランスフェクションし、クロノスを用いて継時的にプロモーターリズムを計測した。p160の3因子は、*Bmal1*、*Cry1*プロモーターリズムの振幅を増大させた(図2)。この振幅がトランスフェクションしたプラスミド量に依存するか確認したところ、トランスフェクション量に依存して*Cry1*リズムの振幅が増大した。(図3)

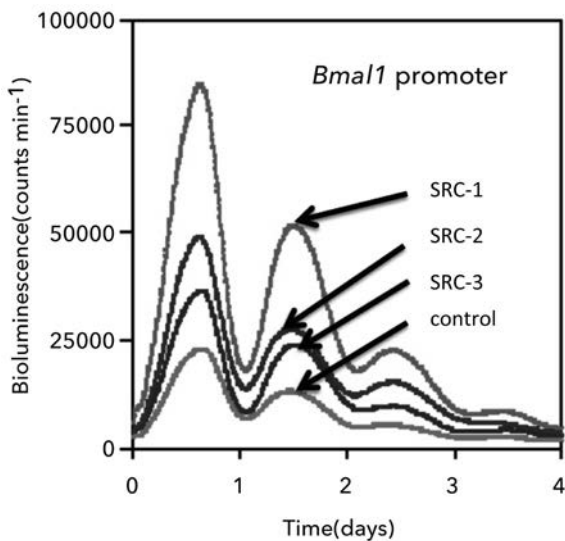


図2. p160の*Bmal1*プロモーターリズムの振幅増大作用。

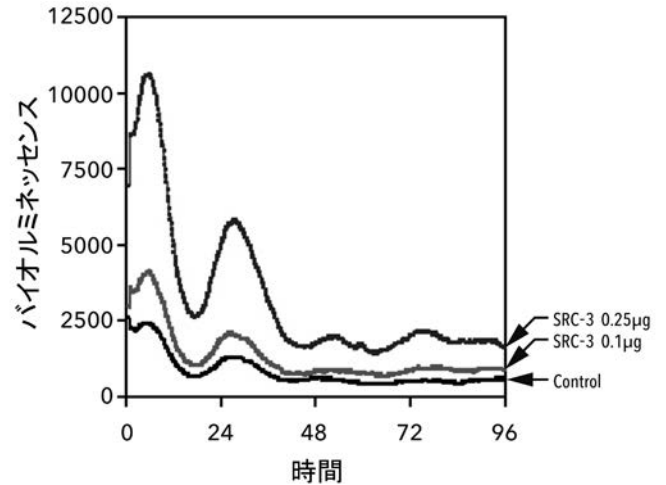


図3. *Cry1*プロモーターリズムに対するSRC-3の作用。

考 察

主要な哺乳類の時計遺伝子には*Per1*、*Per2*、*Cry1*、*Cry2*、*Bmal1*³⁾、*Clock*があり、これらの転写因子が作る転写・翻訳のネガティブフィードバックが、約24時間周期の概日リズムを生み出している。この約24時間の転写・翻訳機構は、概日リズム性発現を示す、いわゆるアウトプットに当たる遺伝子の転写も同時に行っており、これらの遺伝子は時計制御遺伝子(clock-controlled genes: CCG)と呼ばれている。*Clock*遺伝子を除く時計遺伝子は、発現臓器にもよるが、概日リズム性の発現を示すことが多く、その遺伝子は転写レベルで概日リズム性の発現制御を受けている。抑制系の時計遺伝子である*Per1*、*Per2*、*Cry1*、*Cry2*のプロモーター領域にはE-boxと呼ばれる転写因子結合領域があり、この配列にBMAL1とCLOCKがヘテロ二量体となって結合し、これら抑制因子の転写を活性化している。一方、促進系の転写因子である*Bmal1*のプロモーター⁴⁻⁶⁾にはROR-REがあり、ROR α などの核内受容体が結合する。抑制系と促進系の時計遺伝子は、このような転写調節機構によって、1日の内で12時間毎の交互に転写が活性化される制御を受けている。

概日リズムを発振するシステムは哺乳類の細胞に存在し、細胞に概日リズム周期を生み出しているとともに、多くの概日リズム性発現をする遺伝子の発現制御を行っている。そのため、時計遺伝子リズムが失われ、あるいは減衰することは、概日リズム発振が失われるばかりでなく、CCGのリズム発現にも大きく影響を受けるものと考えられ、リズム発振やとりわけリズムの振幅を制御している分子メカニズムやその制御に関わる分子を解明することが重要な課題となっている。

本研究では、リズムの振幅の制御機構の解明を目指して、振幅制御因子の探索を行い、候補因子について機能解析をおこなった。リアルタイムで時計遺伝子リズムを解析可能なクロノスで解析したところ、p160因子3種類は

時計遺伝子プロモーターに対していずれも振幅増強傾向を示すことが明らかになった。ルシフェラーゼアッセイによっても、これらの因子は時計遺伝子プロモーターに対して、転写活性を増加させる傾向がみられた。今回の結果から、p160は時計遺伝子転写リズムの振幅増大に関連する因子であることが明らかになった。現時点でのp160の時計遺伝子転写リズムの振幅増大のメカニズムのモデルは、図4に示している。少なくともp160は*Bmal1*プロモーターの転写活性化を行い、それがルシフェラーゼアッセイの結果から、*RORα*を一部介している作用である可能性が示唆された。*RORα*などの時計遺伝子とp160が核内で結合してp160のアセチル化酵素が作用して時計遺伝子による転写を活性化し、しかもそれがリズム周期と連動して起こって振幅の増大を起している可能性がある。また、p160の中には時計遺伝子のBMAL1と直接結合する可能性もあり、これが抑制系の転写リズムの振幅を増大させていることも考えられ、検討を要する事項である。

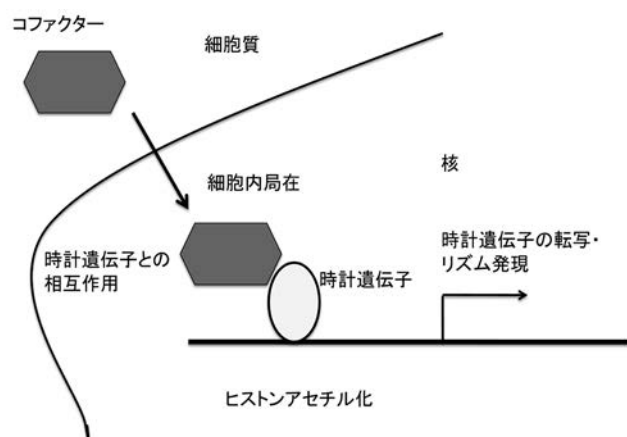


図4. p160による時計遺伝子プロモーター振幅増大のメカニズムモデル。

謝辞

p160発現コンストラクトは埼玉医科大学ゲノム医学研究センター黒川理樹博士より供与を受けた。*Per2*プロモーターレポーターコンストラクトは産業総合研究所の中島芳浩博士より供与を受けた。

参考文献

- 1) Yang S, Van Dongen HP, Wang K, Berrettini W, Bućan M. Assessment of circadian function in fibroblasts of patients with bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 2009; 14: 143-55
- 2) Li JZ, Bunney BG, Meng F, Hagenauer MH, Walsh DM, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 9950-5.
- 3) Ikeda M, Nomura M. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233: 258-64.
- 4) Hida A, Koike N, Hirose M, Hattori M, Sakaki Y, et al. The human and mouse *Period1* genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of mPer1 transcription. *Genomics* 2000; 65: 224-33.
- 5) Noguchi T, Michihata T, Nakamura W, Takumi T, Shimizu R, et al. Dual-color luciferase mouse directly demonstrates coupled expression of two clock genes. *Biochemistry* 2010; 49: 8053-61.
- 6) Yu W, Nomura M, Ikeda M. Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 933-41.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 熊谷恵, 千葉康, 中島芳浩, 池田正明. 時計遺伝子の概日リズム性発現の振幅とコアクティベーターの関与. 第23回日本時間生物学会学術大会 2016年11月12日 名古屋
- 2) 池田正明, 熊谷恵. 時計遺伝子発見と進歩 - 発見20年を振り返って. 第94回日本生理学会大会 2017年3月30日 浜松 招待講演
- 3) 池田正明, 熊谷恵, 中島芳浩. 概日時計の分子機構シンポジウム「時間毒性学」～古くて新しい毒性学～ 第44回日本毒性学会学術年会 2017年7月10日 横浜 招待講演
- 4) Kumagai M, Nakajima Y, Ikeda M. Role for p160 coactivators in amplitude of circadian oscillation. *European Biological Rhythms Society XV Congress* July 30 ~ August 3, 2017, Amsterdam

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

遅い抑制性オシレーションと断眠ストレスが扁桃体依存的な記憶に与える影響

研究代表者 橋爪 幹 (医学部 生化学)

緒言

扁桃体は動物の情動を司る脳部位であり、特に恐怖・不安やストレスなどの負の情動との関わりについて多くの研究が行われてきた。古典的な恐怖条件付け実験では、ネズミに音を聴かせながら電気ショックを与えると、翌日には音を聴かせるだけで硬直状態に陥ることが確認されている。そして硬直時間を計測することで恐怖記憶獲得の程度を測る指標としてきた。またこの操作は扁桃体外側核の錐体細胞と、聴覚情報を伝える視床由来の入力線維との間に長期増強現象を引き起こすことが知られており、この現象は恐怖記憶獲得の細胞モデルであると考えられている。

一般に記憶は獲得して以降に自由に想起できるようにするために、記憶を脳内に固定する必要がある。その際に睡眠時における低周波の律動的活動(オシレーション)が重要であることが示唆されている。実際、ノンレム睡眠中の人間・動物の脳に1 Hz程度の周期的な電気刺激を与えることによって海馬依存的な陳述記憶が向上した、視床と皮質間で長期増強様の変化が生じたなどの報告がなされている。一方、扁桃体では電気刺激による記憶の増強の例はないが、錐体細胞がノンレム睡眠中でのみ1 Hz程度の頻度で発火している、個々の扁桃体基底外側核の錐体細胞が周辺の抑制性介在ニューロンから0.1-3 Hzの周期的な入力を受け取っているなどの報告がある。これらのうち、スライス標本上で観察された抑制性入力のオシレーションは複数の錐体細胞間で同期していて、発生・維持には外部ではなく内部の興奮性入力を必要としている。最近、我々の研究室ではこのオシレーションが急性の断眠ストレス負荷によって減弱することを示してきた。この現象はin vitroのスライス標本で確認されたものであるが、ストレス負荷直後のラットから得た脳を使っているため、生体内でも同様の変化が起きていたと予想される。

本研究ではラットの恐怖条件付け学習が、その前後において断眠ストレス負荷による扁桃体の抑制性オシレーション減弱を起こしていた場合に、どのような影響を受けるのかを解析する。それによって扁桃体における遅いオシレーションの生理的意義について考察することを試みる。

材料と方法

全ての実験は埼玉医科大学動物実験指針に従い、埼玉医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた。実験動物の使用数は必要最小限となるように努めた。

恐怖条件付け記憶学習の実験は3日間にわたって行われる。まず初日、生後3~4週齢のラットをFear Condition実験用ケージに入れ、3分間その環境に慣れさせた。その直後に1 kHz・65 dB・10秒間の音を鳴らし、それを70~100秒間隔で5回聴かせているときの様子をビデオカメラで撮影した。2日目、ラットを再び実験用ケージに入れ、3分間自由に行動させた後に前日と同じ音を鳴らし、その9秒後に卓上型ショッカースクランブラーを使って1 mA・1秒間の電気ショックを与えた。この音と電気ショックの組み合わせを70~100秒間隔で5回繰り返した後、ラットを再び3分間自由に行動させた後で本来の飼育ケージに戻した(図1)。それから24時間後、実験用ケージとは異なる形・色・材質のケージにラットを入れて3分間自由行動させ、その直後に10秒間の音を聴かせ、それを70~100秒間隔で5回繰り返した。この音を聴かせている時の様子、特に10秒間のうち硬直している時間は何秒かをビデオカメラで解析し、5回分の合計硬直時間を恐怖記憶の獲得・固着率として定義した。

また一部のラットは恐怖条件付け実験を行う前、あるいは行った後のいずれかの時間に急性断眠ストレスを負荷した。断眠ストレスは水深2~3 cmの水と、同じ高さの小型プラットフォーム(直径4 cm程度)を設置した飼育ケージにラットを午前中3時間(8:30~11:30)居住させることによって行った。なお断眠の後に恐怖条件付け学習を行う際には、ラットを乾かすために本来の飼育ケージに10分間居住させ、それからFear Condition実験用ケージに入れた。



図1. 恐怖条件付け学習プロトコル。実験2日目にラットをFear Condition実験用ケージに入れてからの時間の流れを図に示す。音が鳴っている時間は灰色の長方形、電気ショックが起きている時間は黒枠の長方形で示す。音の間隔は70~100秒の中から無作為に決定される。初日、3日目はこのプロトコルから電気ショックが除かれたものを使った。

結 果

ラットをFear Condition実験用ケージに入れて3分間自由に行動させると、新規の環境に対して盛んに探索行動を行っていた。具体的にはケージの壁に沿って歩行・走行する・ケージの隅に鼻先を突き込みながらヒゲを盛んに動かして空間を認知する・後肢で立ち上がって垂直方向を探索する・あるいは移動を停止してグルーミング(毛づくろい行動)を行っていた。この行動傾向は10秒間の音を聴かせている時にも変わらず観察された。一部の動物は音の鳴り始めや鳴り終わった後に1秒程度の硬直を示した。一方、電気ショック刺激による恐怖条件付け操作を行った24時間後のラットを実験用ケージとは異なるケージに入れると、やはり新規の環境に対する探索行動が観察された。しかし3分後に条件付けに用いた音を聴かせると、それまでの行動を止めて硬直する傾向を示した。この硬直傾向は2回目以降の音を聴くことによってその時間が上昇し、全体を通してみるとそこで頭打ちとなった。そして5回分の合計硬直時間を算出し、初日に音を5回聴かせた時の合計硬直時間と比較すると、有意に長くなっていた。

次に恐怖条件付け学習と断眠ストレス負荷を同時に行ったグループを解析すると、断眠を行ってから学習を経験したラットでは有意差はないものの硬直時間が減少していた。同様に、学習を行ってから断眠したラットも、硬

直時間が断眠を行っていないグループと比較して短くなる傾向を示した。

考 察

本研究の結果、扁桃体依存的な学習が急性の断眠ストレス負荷によって妨げられる結果が得られた。また、断眠を行うタイミングが学習の前でも後でも効果が同じだった。このことから、断眠による扁桃体の抑制性オシレーション減弱は記憶の獲得・固着を阻害する効果があると予想される。あらかじめ断眠を行っていたラットではオシレーションがすでに減弱しており、その直後に学習を行うと記憶は固着しない傾向を示した。一方、学習の後に断眠によるオシレーションの減弱が起きた場合でも記憶の固着が起きにくい傾向を示した。これは記憶の固着に重要な時間帯において、オシレーションの大きさが充分とはいえないまでに減弱したことが原因であると考察される。いずれにせよ、記憶の獲得・固着過程において扁桃体の遅いオシレーションが正常な大きさである必要があることが窺える。

今後は恐怖条件付け学習を受けたラットや、学習と断眠を受けたラットの扁桃体スライス標本を作成し、錐体細胞や抑制性介在ニューロンの電気活動をパッチクランプ法によって測定することを目指す。それを通して抑制性オシレーションの変化、抑制性入力を送っている介在ニューロンの神経活動を詳細に調べる。

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

メトトレキサート惹起リンパ増殖性疾患発症のメカニズムの解明

研究代表者 得平 道英 (医学部 総合医療センター血液内科)

Introduction

Methotrexate-induced lymphoproliferative disorders (MTX-LPDs) are categorized as iatrogenic diseases and belong to the group of other iatrogenic immunodeficiency-associated (OIIA) LPDs, as defined in the revised 4th edition of the World Health Organization's classification manual for immunodeficiency-associated LPD¹⁾. Although the regression phenomenon is one of the specific features, suggesting a direct influence of MTX in LPD development²⁾, the underlying mechanism has not been clearly demonstrated. To investigate the clinopathogenesis of MTX-LPD, we analyzed data from 62 patients with MTX-LPD. In this study,

Methods**Patients**

Data were collected from 62 patients with autoimmune diseases (ADs) who developed LPD and were treated at our institutions between 1995 and 2015.

Immunohistochemistry and in situ hybridization

All diagnoses were confirmed by immunohistochemistry performed on paraffin-embedded tissue sections, using selected members of a panel of monoclonal antibodies, as we previously documented³⁾. Tissue sections were tested for the presence of EBV by in situ hybridization, and for EBV early RNAs (EBERs), using the REMBRANDT Detection Kit (Zymed, San Francisco, CA).

Typing of HLA-A, B, C, DRB1, and DQB1

Among 62 patients with MTX-LPD, we analyzed 25 patients by the PCR-Luminex method. The frequency of each HLA allele and each combination was determined by referring to the database of an HLA laboratory that has studied HLA alleles from over 30,000 Japanese individuals⁴⁾.

Statistical analysis

The duration of underlying ADs was defined from the day of diagnosis with an underlying AD to the time of MTX withdrawal. Overall survival (OS) was defined as the interval

between the time of MTX withdrawal and death from any cause or the last follow-up. Comparisons of HLA and histological data were made by performing Fisher's exact test with EZR software (Tokyo, Japan)⁵⁾. Survival analysis and comparisons between groups were performed by the Kaplan-Meier procedure, and the t-test was performed using EZR software.

Results**Clinical background of MTX-LPD**

Over the course of 20 years, 62 cases of LPD were recorded among patients with ADs at our institutions, all of which had been treated with MTX. The clinical features of all patients. The median age of patients at the time of LPD diagnosis was 65.8 (range 39-88) years. Twenty-one males and 41 females were included in this study. The basal ADs were RA (N = 59), psoriasis vulgaris (PV, N = 1), systemic lupus erythematosus (SLE, N = 1), and dermatomyositis (DM, N = 1).

EBV influence**Table 1. EBV influence toward MTX-LPD.**

EBV, Epstein-Barr Virus; MTX, methotrexate; sIL-2, soluble interleukin-2 receptor; OS, overall survival.

We investigated the relationship between the clinical background and EBV infection (Table 1). Although age, the basal disease duration, and the median MTX dose administered at the time of LPD development were not related to EBV infection, a strong association between EBV infection and the median MTX duration was observed. In addition, male dominance, the involvement of the spleen, and CRP were also significantly positive in EBV+ patients. Other clinical indicators such as the clinical stage (I / II or III / IV), lung invasion, serum LDH, and sIL-2 showed no significant differences.

To analyze the influence of EBV on LPD regression, we studied 21 EBV+ patients and 18 EBV- patients (Table 1). A strong, significant association between EBV+ patients and MTX duration was indicated. Other positive data obtained from all patients were also observed in the regressive (Reg) group, although CRP was not significant. Among the stage-IV

patients in the Reg group, a tendency between EBV infection and lung invasion was observed. Among patients in the Non-Reg group, CRP was significantly higher in EBV+ patients; however, other factors did not show a significant association. Regarding the relationship between EBV infection and the three clinical patterns, no significance difference was observed between the Reg and Non-Reg groups

Influence of HLA alleles on MTX-LPD development (Table 2)

To investigate genetic factors underlying MTX-LPD, we analyzed HLA alleles in 25 patients. We analyzed samples from 10 patients with DLBCL (8 who were EBV+ and 2 with NOS), 4 with HL, 4 with LPD, 4 with other LPDs, 1 with FL, and 1 with MALT. Twenty-three patients had RA, one had SLE, and one had PV. Among 23 patients analyzed

Table 1. Major alleles of HLA A, B, C, DRB1 and DQB1 loci. DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; EBV, Epstein-Barr Virus; nos, not otherwise specified; HL, Hodgkin lymphoma; LPD, lymphoproliferative diseases; MALT, extranodal marginal zone lymphoma of mucosal-associated lymphoid tissue; FL, follicular lymphoma; other LPD, other unclassified LPD. * GF, General frequency. 95% CI, 95% confidence interval.

Parameters	All patients			Regressive group			Npn-Regressive group		
	EBV+ (N=28)	EBV- (N=30)	p value	EBV+ (N=21)	EBV- (N=18)	p value	EBV+ (N=7)	EBV- (N=12)	p value
age (y)	68.2	63.5	0.108	67.1	61.3	0.091	71.5	66.8	0.412
sex (M:F)	14:14	5:25	0.0112	11:10	3:15	0.0428	3:4	2:10	0.305
disease duration (y)	15.3	11.9	0.126	15.5	12.1	0.267	14.8	11.5	0.324
MTX dose (mg/w)	7.7	7.3	0.643	7.9	8.1	0.841	6.9	6.0	0.405
MTX duration (y)	7.7	4.4	1.31E-03	7.7	4.1	8.83E-03	7.8	4.8	0.0792
stage I, II vs III, IV	5:23	9:21	0.363	5:16	7:11	0.488	0:7	2:10	0.509
spleen (+)	14	6	0.0264	9	0	1.62E-03	5	6	0.633
lung (+)	14	12	0.598	10	3	0.0508	4	9	0.617
Regressive vs Non-Regressive	18	21	0.271	-	-	-	-	-	-
LDH (IU/L)	358.0	351.2	0.927	255.8	277.2	0.522	715.7	462.1	0.235
CRP (mg/dL)	8.6	5.0	0.0397	7.3	4.2	0.111	14.0	6.0	0.0219
sIL-2 (U/mL)	4073.5	6080.7	0.447	3498.0	3382.6	0.937	6490	10005	0.692
OS (y)	4.3	4.4	0.937	4.5	5.5	0.356	3.8	2.8	0.618

Table 2. Major alleles of HLA, EBV, and regressive phenomenon. Data indicated the p value compared to the general population of Japanese as described in Method. EBV, Epstein-Barr Virus.

category	EBV		Regressive	Non-Regressive	
	+	-			
N	17	6	18	5	
A	2402	1.28E-04	2.22E-03	5.49E-05	6.14E-03
	3101	0.0122	0.0883	4.81E-03	1
	1101	0.0146	1	0.0188	1
B	5101	0.0144	0.0843	3.76E-03	1
	5201	0.0326	0.136	2.14E-03	1
	1501	0.14	0.383	0.646	0.332
C	0102	4.87E-03	1	0.112	0.214
	1202	0.0364	0.138	2.74E-03	1
	0303	0.0619	0.0332	0.722	3.9E-05
DRB1	0405	1.56E-06	3.39E-03	3.16E-03	0.138
	1502	0.028	0.127	1.67E-03	1
	0901	0.7	0.0419	0.313	0.538
DQB1	0401	1.43E-03	0.176	1.73E-04	0.128
	0601	0.0305	0.0886	6.55E-04	0.591
	0303	0.739	0.237	0.183	1

for EBERs, 18 and 5 patients were in the Reg and Non-Reg groups, respectively. In addition, 17 were positive and 6 were negative for EBER. The frequencies of the major alleles of each locus (A, B, C, DRB1, and DQB1) are summarized in Table 2 and are compared with GF of these alleles observed in Japan⁷⁾. Eleven alleles were significantly positive.

Conclusion and Discussion

In this study, we analyzed 62 patients with MTX-LPD under MTX administration.

Although the occurrence of the Reg group is suggestive of an MTX influence, no direct evidence exists. Several reports from Japan suggest a relationship between MTX and LPD development. We investigated the influence of MTX and found that the MTX treatment duration was related to EBV infection (Table 1). The MTX treatment duration might relate to regressive LPD development.

Regarding the HLA, we detected 11 significant alleles in MTX-LPD, 9 of which (A*3101, A*1101, B*5101, B*5201, C*0102, C*1202, DRB1*1502, DQB1*0401, and DQB1*0601) were present in EBV+ patients at significantly higher frequencies. Furthermore, these nine alleles were also detected in the Reg group, but not the Non-Reg group (Table 2). Considering that a relation between EBV infection and the clinical patterns was not found, these HLA alleles might impact MTX-LPD development. The A*2404 allele is the most common allele in Japanese, and DRB1*0405 may be linked to the pathogenesis of ADs including RA⁶⁾, so that these alleles might be fundamental factors underlying MTX-LPD in Japan.

Because this study is a retrospective and a small number study, the further investigation is required to better understand various issues, including the mechanism in the

Non-Reg group, the influence of EBV infection, and the precise reasons causing different MTX-LPD incidences among races. This report was based on our article⁷⁾.

Reference

- 1) Gaulard P, Swerdlow SH, Harris NL, Sundstrom C, Jaffe ES. Other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues Vol., 4th edn. IARC: Lyon, 2016; p. 462-3.
- 2) Ichikawa A, Arakawa F, Kiyasu J, Sato K, Miyoshi H, et al. Methotrexate/iatrogenic lymphoproliferative disorders in rheumatoid arthritis: histology, Epstein-Barr virus, and clonality are important predictors of disease progression and regression. *Eur J Haematol* 2013; 91(1): 20-8.
- 3) Tokuhira M, Watanabe R, Nemoto T, Sagawa M, Tomikawa T, et al. Clinicopathological analyses in patients with other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative diseases and rheumatoid arthritis. *Leuk Lymphoma* 2012; 53(4): 616-23.
- 4) <http://hla.or.jp>
- 5) Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013; 48(3): 452-8.
- 6) Oka S, Furukawa H, Kawasaki A, Shimada K, Sugii S, et al. Protective effect of the HLA-DRB1*13:02 allele in Japanese rheumatoid arthritis patients. *PLoS One*. 2014; 9(6); e99453.
- 7) Tokuhira M, Saito S, Okuyama A, Suzuki K, Higashi M, et al. Clinicopathologic investigation of methotrexate-induced lymphoproliferative disorders, with a focus on regression. *Leuk Lymphoma*. 2017 Sep 7: 1-10.

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

呼吸器悪性腫瘍におけるHSP70を介した腫瘍増殖・抑制のメカニズム解析

研究代表者 坂井 浩佑 (医学部 総合医療センター 呼吸器内科)

緒言

胸膜中皮腫は石綿の暴露から40年以上を経て発生するため、本邦における患者数は今後も増加が予想される。その罹患者数は2025年にピークを迎え、2050年までに死亡者数は100万人以上になると試算されている。今後患者数が増加することが予想される一方で、胸膜中皮腫は現在でも有効な治療法に乏しい難治性疾患であり、進行した胸膜中皮腫の治療法を早急に確立することが求められている。

Wntシグナルは大腸癌をはじめとした様々な悪性腫瘍の発症、増殖、維持に関与するとされている¹⁾。当研究室ではこれまで胸膜中皮腫の増殖、維持におけるWntシグナルの意義を検討してきた。胸膜中皮腫や非小細胞肺癌ではWntシグナル経路のDishevelled-3(Dvl-3)の高発現が認められ、Dvl-3の抑制によるWntシグナルの遮断が胸膜中皮腫および非小細胞肺癌細胞株の増殖を抑制することを報告してきた²⁾。Wntシグナル経路では、Dvlが活性化されると、β-Cateninのユビキチン化が阻害され、β-Cateninは細胞質で安定的に存在可能となる。さらにβ-Cateninは核内に移行し転写活性を示し、がん発症または増殖の維持に関与するとされる。β-Cateninを欠損している胸膜中皮腫細胞株においても同様に、Dvl-3の発現抑制により腫瘍増殖が抑制されることを示した³⁾。

Dvl-3の下流に新たな経路を探すために、Dvl-3の抑制により細胞増殖が抑制された胸膜中皮腫細胞株を用いて、Dvl-3発現抑制の前後での各細胞株のタンパク発現を網羅的に解析した。その結果はいずれの株でも共通してHeat Shock Protein 70 (HSP70)の発現低下を認めた。

HSP70は分子シャペロンとして作用し、細胞内タンパク質の高次構造の維持に寄与することが主な作用である。その他に、アポトーシスを阻害するBagタンパクファミリーのBag3と共にシグナル伝達系として腫瘍の増殖に寄与し⁴⁾、ヒトの大腸癌の細胞株ではshort hairpin RNAを用いてHSP70を抑制することで細胞周期をG1期で停止させ細胞増殖を抑制するなどの多面的作用が指摘されている⁵⁾(Fig. 1)。HSP70の過剰発現は大腸癌、乳癌、悪性黒色腫、膀胱癌では腫瘍の進行期にあることを示し、予後不良であることが示されている⁶⁾。

胸膜中皮腫においてWntシグナル経路のDvl-3を抑制することによりHSP70の低下が認められたことから、HSP70も胸膜中皮腫の腫瘍増殖に寄与している可能性を考えた。本研究期間中にDvl-3の抑制と上皮成長因子受容体(EGFR)阻害薬であるgefitinibを併用することで、胸膜中皮腫の腫瘍増殖を相率的に抑制することを示した。胸膜中皮腫ではEGFRが高発現しているが、gefitinibを細胞株に投与しても高用量の投与によって細胞増殖が抑制されるに留まり、胸膜中皮腫に対するgefitinibの投与は臨床上の有効性は示されていない。HSP70は胸膜中皮腫の腫瘍増殖においてDvl-3の下流にあると予想されるが、その胸膜中皮腫における役割

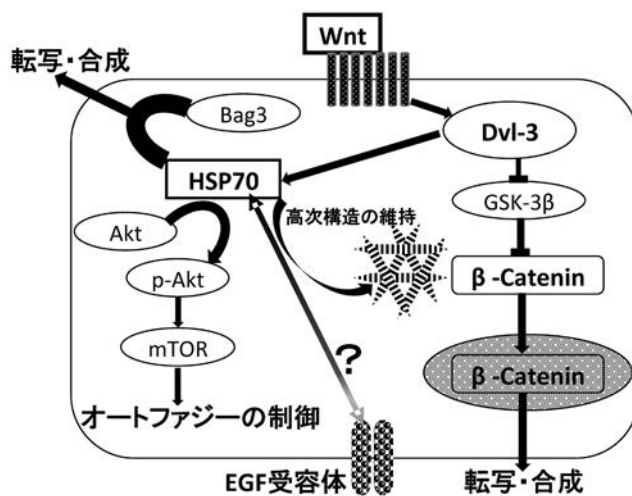


Fig. 1. およびDvl-3で示されたEGFRシグナルへの関与を検討した。

材料と方法

1) 対象

胸膜中皮腫細胞株211H, H2452, H28を対象として実験を行った。H28はβ-catenin欠損株である。

2) タンパク発現抑制

細胞株にsmall interfering RNA (siRNA)をリポフェクション法により導入することで細胞株のHSP70の発現抑制を行った。トランスフェクション後の細胞株からタンパクを抽出し、ウェスタンブロットを行うことで各々のタンパク発現が抑制されていることを確認した。

3) 細胞増殖の解析

siRNAを導入した細胞株を96穴プレートの各レーンに211Hは500ヶずつ、その他は1000ヶずつ蒔きなおした。翌日に培養液を0.5 μ M～10 μ Mのgefitinib溶液へと交換し培養を継続した。培養液をgefitinibに交換してから48時間後、72時間後、96時間後の細胞増殖をCell Counting Kit-8[®]を用いた酸化還元反応により吸光度分析を行い定量した。

4) コロニー形成能の解析

siRNAを導入した細胞株を径35 mmプレートに211Hは500ヶずつ、その他は1000ヶずつ蒔きなおした。翌日に培養液を0.5 μ M～5.0 μ Mのgefitinib溶液へと交換し培養を継続した。1週間程度を目安にgefitinib溶液を交換し培養を継続した。コロニーの形成が得られた時点で回収し、コロニー数を目視にて計測した。

5) 細胞周期解析

各細胞株を6穴プレートに蒔きなおし、siRNAの導入を行った。翌日に培養液を0.5 μ M～5.0 μ Mのgefitinib溶液へと交換し、48時間培養を継続した。回収した細胞をBD Cycletest[™] Plus DNA Reagent Kitを用いて染色した。BD FACSVerse[™]; version 1.0.3.2942を用いてフローサイトメトリーにて解析を行った。

結果

1) タンパク発現の抑制

胸膜中皮腫の3細胞株にsiRNAを導入し、ウェスタンブロットを行ってHSP70の発現の抑制を確認した。211H, H2452細胞株ではHSP70の発現は抑制されたが、H28ではHSP70は抑制されなかった。

2) HSP70の抑制のみで得られる影響

siRNAを導入してHSP70を抑制した211H細胞株は48～96時間の培養にて経時的に細胞増殖は強く抑制されていた。またコロニー形成能も低下させ、細胞周期はG1期で停止していた。

HSP70を抑制したH2452細胞株では48～96時間後の細胞増殖は抑制されなかった。コロニー形成も抑制されず、細胞周期での変化も認めなかった。

HSP70が抑制されなかったH28細胞株ではいずれの実験でも変化を認めなかった。

3) HSP70の抑制とgefitinibの併用による影響

211H細胞株ではHSP70の抑制のみで細胞増殖は強く抑制されており、gefitinibを併用しても相乗的な効果は得られなかった (Fig. 2)。

H2452細胞株では0.5 μ M～5.0 μ MのgefitinibをHSP70の抑制と併用することで細胞増殖の抑制を得ることができた (Fig. 2)。また、コロニー形成についても同様にHSP70の抑制と0.5 μ M gefitinibの併用による相乗的な抑制効果を認め、細胞周期もG1期で停止していた。

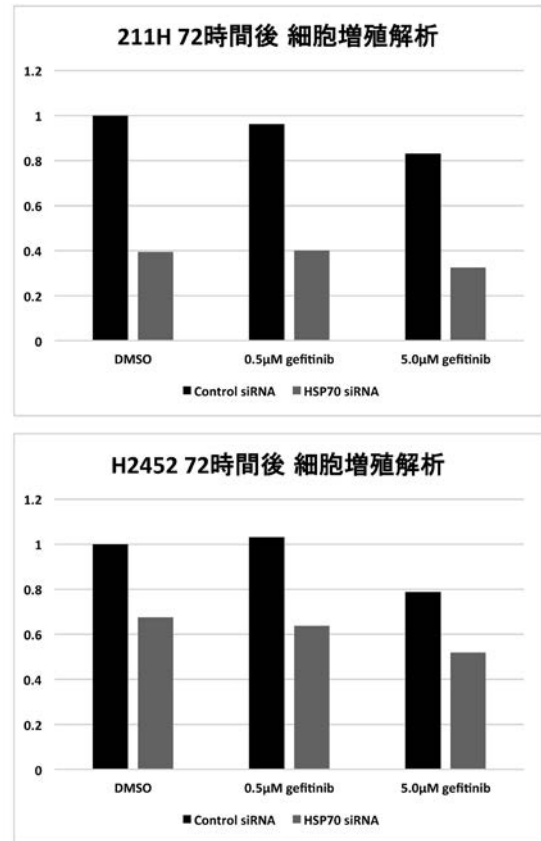


Fig. 2.

考察

HSP70の抑制では211H細胞株は増殖が抑制されるものの、H2452細胞株では抑制を認めなかった。しかし、gefitinibとの併用によりH2452細胞株の増殖抑制が認められた。H28細胞株ではsiRNAの導入によりHSP70の抑制は得られなかった。以上のように細胞株によりHSP70抑制の効果は異なっていた。

胸膜中皮腫ではEGFRが高発現しているが、gefitinibの投与による临床上の効果は過去に示されていない。本研究中に我々は、Wntシグナル中のDvl-3の抑制をgefitinibに併用することで、細胞株の増殖は相乗的に抑制することを示した。このことから、腫瘍細胞増殖の過程におけるEGFR経路とWntシグナル経路の相補的な関連が予想される。HSP70もまたEGFR経路とWntシグナルの両経路が調節に関わっている可能性を考えている (Fig. 1)。

siRNAによるタンパク発現の効果は一時的なものであるため、今後は小分子化合物の投与によるHSP70の抑制など実験の方法を新たに検討する必要がある。その上でHSP70がWntシグナル経路および細胞増殖の過程において担う役割を更に明らかにする予定である。

参考文献

- 1) Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and

- beta-catenin signaling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 691-701.
- 2) Uematsu K, Kanazawa S, You L, He B, Xu Z, et al. Wnt pathway activation in mesothelioma: evidence of Dishevelled overexpression and transcriptional activity of beta-catenin. *Cancer Res* 2003; 63: 4547-51.
 - 3) Uematsu K, Seki N, Seto T, Isoe C, Tsukamoto H, et al. Targeting the Wnt signaling pathway with dishevelled and cisplatin synergistically suppresses mesothelioma cell growth. *Anticancer Res* 2007; 27: 4239-42.
 - 4) Sherman MY, Gabai VL. Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene* 2015; 34: 4153-61.
 - 5) Zhong MA, Zhang H, Qi XY, Lu AG, You TG, et al. ShRNA-mediated gene silencing of heat shock protein 70 inhibits human colon cancer growth. *Mol Med Rep* 2011; 4: 805-10.
 - 6) Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis* 2013; 34: 1181-8.

研究成果リスト

論文

- 1) Moriyama G, Tanigawa M, Sakai K, Hirata Y, Kikuchi S, et al. Synergistic effect of targeting dishevelled-3 and the epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor on mesothelioma cells in vitro. *Oncol Lett* 2018; 15: 833-8

学会発表

- 1) 坂井浩佐, 井上麻耶, 桑原由樹, 小島章歳, 戸田麻衣子, 他. 胸膜中皮腫細胞における70kDa熱ショックタンパク質の発現抑制とゲフィチニブの作用による抗腫瘍効果の検討. 第57回日本肺癌学会学術集会 2016年12月9日, 福岡
- 2) 坂井浩佐, 井上麻耶, 桑原由樹, 小島章歳, 戸田麻衣子, 他. 胸膜中皮腫の細胞増殖におけるHeat Shock Protein 70(HSP70)の役割の検討. 第57回日本呼吸器学会学術講演会 2017年4月21日, 東京

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

汎用性の高い高原子番号物質周辺の線量分布評価システムの開発

研究代表者 畑中 星吾 (医学部 総合医療センター 放射線科)

緒言

近年の放射線治療では、治療計画のほとんどはComputed Tomography(CT)画像を基に立案される。従来の治療計画法では腫瘍近傍に金属インプラントなどの高原子番号物質が存在する場合、金属アーチファクトの発生により腫瘍の同定が困難になる。また、正確な不均質領域の線量計算が困難だったため、不均質補正なし、もしくはアーチファクトの存在する領域を水に置き換えて線量計算を行う必要がある。さらに、金属による放射線の減弱は非常に大きく、照射野内にインプラントを含めると腫瘍内の線量均一性が低下してしまうため、照射野からインプラントを外す必要性がある。したがって、腫瘍近傍に金属インプラントが存在する症例における治療計画では、良好な線量分布を達成することが困難であった。金属アーチファクトを低減し、かつ金属インプラント通過後の正確な線量計算が可能であれば、ビーム方向の制限なく不均質補正ありでの線量計算を行い、金属インプラントが腫瘍近傍に存在する症例であってもVolumetric Modulated Arc Therapy (VMAT)¹⁾などの高精度放射線治療を適用できると考えられる。金属アーチファクトを低減する方法として、近年では2種類のエネルギーのX線により取得したCT画像より仮想単色X線CT画像を作成する方法²⁻⁴⁾や、金属アーチファクト低減処理フィルタを利用する方法^{5,6)}などがある。しかし、金属周辺の線量計算を正確に行うためには金属アーチファクトを低減するだけでなく、該当物質の形状およびビームに対する減弱特性を把握する必要があるが、それらを正確に取得し、治療計画に適用する方法について検討した報告はない。また、CT画像を線量計算に利用する場合、商用の治療計画装置の多くはCT値[Hounsfield unit, HU]を電子密度や物理密度に変換するための対応表(変換テーブル)が必要となる。金属インプラントの(電子)密度は人体を構成する物質と比較して非常に大きい。一般的な治療計画装置の変換される密度の階調数は決まっているため、登録する値の最小~最大幅が大きくなると分解能が粗くなってしまい、線量計算に影響する可能性があるが、それらについても検討した報告はない。さらに、臨床画像において金属アーチファクト低減処理がCT値に与える

影響もよくわかっていない。そこで本研究では腫瘍近傍に金属インプラントが存在する症例において、金属アーチファクト低減機能や高精度放射線治療技術の有用性、物質情報の取得方法、線量分布の計算精度、およびセットアップ位置誤差が線量分布に与える影響などを包括的に評価し、従来と比較して良好な線量分布を作成することができるシステムを確立することを目的とした。今回は、現在行っている研究の中から金属アーチファクト低減処理したCT画像を線量計算に利用する際の変換テーブルの取り扱いについて検討した結果を報告する。

方法

治療計画装置にはElekta社製XiO ver 5.00、線量計算アルゴリズムはSuperposition^{7,8)}、リニアックモデルには2台のVarian社製Clinac 21EXの4, 10 MVのX線および6, 10 MVのX線を使用した。CT装置にはGE社製Optimaを使用した。水に対する相対電子密度が0.27~1.69の16種類の物質および相対電子密度3.79のチタンロッド、6.58のステンレスロッドを挿入したGAMMEX社製RMI-467ファントムを撮影した。撮影したCT画像において、金属アーチファクト低減処理前後でのロッド内のCT値の変化を計測した。また、取得したCT画像から各ロッドのCT値を算出し、16種類のロッドから作成した変換テーブルをテーブルA、テーブルAにチタンの値を追加したものをテーブルB、さらにテーブルBにステンレスの値を追加したものをテーブルCとした。また、すべてにおいてCT値-990に対して相対電子密度0.01を最小値として登録した。当院で治療を行った患者23例36プラン159ビームについて、それぞれのテーブルを適用して治療計画装置上で線量計算を行い、テーブルAを使用した場合に対するモニターユニット値(MU)の変化量を算出した。グリッドサイズは2, 3, および5 mmの場合でそれぞれ確認した。

結果

相対電子密度が1.69の物質、3.79のチタン、および6.58のステンレスロッドにおいて、相対電子密度が高くなるほどCT値も高くなる傾向がみられた。

すべてのロッド内における金属アーチファクト低減処理前後でのCT値の変化量の平均値±標準偏差は 0.1 ± 3.2 であり、処理によるCT値への影響はほとんどないことがわかった。

Figure 1にグリッドサイズ3 mmにおける変換テーブルAを使用した場合に対する変換テーブルBおよびCを使用した場合のMUの変化量を示す。チタンの情報を登録した変換テーブルBと比較して、チタンよりCT値および相対電子密度の高い物質であるステンレスの情報を追加した変換テーブルCではMUの変化量が大きくなった。しかし、その変化量はすべてのビームで1%以内であり、チタンやステンレスの情報を変換テーブルに登録することによる影響はほとんどないことがわかった。グリッドサイズ2 mmおよび5 mmの場合も同様の傾向であり、すべてMUの変化量は1%以内であった。

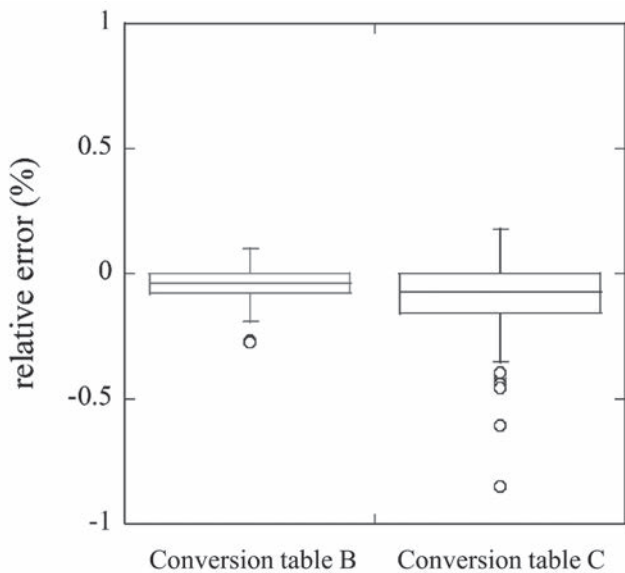


Fig. 1. Left side: The relative errors between the MUs acquired using CT to relative electron density conversion table (CT-rED table) B and the MUs acquired using CT-rED table A (grid size: 3 mm). Right side: The relative errors between the MUs acquired using CT-rED table C and the MUs acquired using CT-rED table A. (grid size: 3 mm). The larger the maximum CT number and rED input to the CT-rED table, the greater was the absolute value of relative errors. Nevertheless, all relative errors were within 1%.

考 察

金属アーチファクト低減処理前後でのCT値の変化はほとんどなかった。また、金属アーチファクト低減処理したCT画像を線量計算に用いる際、多くの場合は変換テーブルに金属相当の高密度物質を登録すると考えられる。一般的な治療計画装置の変換される密度の階調数は決まっているため、登録する値の最小～最大幅が大きくなると分解能が粗くなってしまい、線量計算に影響

する可能性がある。しかし、本研究の結果より変換テーブルにチタンやステンレス相当の高密度物質を登録しても線量結果への影響はほとんどないことや、グリッドサイズの違いによる変化はわずかであることが明らかになった。したがって、通常使用する変換テーブルに高密度物質相当のデータを登録しても影響は少なく、それを金属アーチファクト低減処理したCT画像で線量計算を行う場合にも利用可能であると考えられるため、変換テーブルを別々に取得する必要がないことが示唆された。

今回の報告書では、金属アーチファクト低減処理したCT画像を線量計算に利用する際の変換テーブルの取り扱いについてまとめただけにとどまった。今後は腫瘍近傍に金属インプラントが存在する症例について、金属アーチファクト低減機能や高精度放射線治療技術の有用性、物質情報の取得方法、線量分布の計算精度、およびセットアップ位置誤差が線量分布に与える影響などを包括的に評価し、従来と比較して良好な線量分布を作成することができるシステムを確立していく予定である。

引用文献

- 1) Otto K. Volumetric modulated arc therapy: IMRT in a single gantry arc. *Med Phys* 2008; 35(1): 310-7.
- 2) 畑中星吾, 大友哲也, 保坂勝仁, 渡邊哲也, 轟圭介, 他. 仮想単色X線CT画像を利用した前立腺高線量率組織内照射の治療計画における最適なエネルギー選択に関する検討. *断層映像研究会雑誌* 2016; 43(1): 1-7.
- 3) Wang Y, Qian B, Li B, Qin G, Zhou Z, et al. Metal artifacts reduction using monochromatic images from spectral CT: evaluation of pedicle screws in patients with scoliosis. *Eur J Radiol* 2013; 82: e360-6.
- 4) Yu L, Leng S, McCollough CH. Dual-energy CT-based monochromatic imaging. *AJR Am J Roentgenol* 2012; 199: S9-S15.
- 5) Gondim TPA, Meyer JB, Baumann C, Raymond A, Sirveaux F, et al. Total hip prosthesis CT with single-energy projection-based metallic artifact reduction: impact on the visualization of specific periprosthetic soft tissue structures. *Skeletal Radiol* 2014; 43: 1237-46.
- 6) Jeong S, Kim SH, Hwang EJ, Shin CI, Han JK, et al. Usefulness of a metal artifact reduction algorithm for orthopedic implants in abdominal CT: phantom and clinical study results. *AJR Am J Roentgenol* 2015; 204: 307-17.
- 7) Miften M, Wiesmeyer M, Monthofer S, Krippner K. Implementation of FFT convolution and multigrad superposition models in the FOCUS RTP system. *Phys Med Biol* 2000; 45: 817-33.
- 8) Miften M, Wiesmeyer M, Kapur A, Ma CM. Comparison

of RTP dose distributions in heterogeneous phantoms with the BEAM Monte Carlo simulation system. J Appl Clin Med Phys 2001; 2: 21-31.

研究成果リスト

論文

現在投稿中

学会発表

- 1) 畑中星吾, 小玉和寿, 渡邊哲也, 保坂勝仁, 轟圭介, 他. CT値-電子密度変換テーブルへの高密度物質登録が計算線量に与える影響. 日本放射線技術学会第63回関東支部研究発表大会. 平成29年1月, 栃木

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

精巣捻転症の外気温と自律神経の影響と新規診断法の研究

研究代表者 竹下 英毅 (医学部 総合医療センター 泌尿器科)

緒言

精巣捻転症は、診断治療が遅れると精巣を喪失するため、臨床的にも社会的にも重要な救急疾患である。しかしながら、その重要性は一般市民だけではなく臨床医にも、認知されているとは言いがたく、受診の遅れや診断の遅れにより、精巣を喪失する患児・患者が後を絶たない。実際に、申請者の施設で2004年から2014年で105例の患者が精巣捻転症が疑われて手術を受けたが、12例(11%)の患者が精巣を喪失した。この疾患の特徴は思春期に好発すること以外はあまり知られておらず、陰嚢痛ではなく腹痛で発症し本疾患が疑われない場合もあり、受診や診断が遅れ精巣喪失につながるものが少なくない。思春期男性の急性腹痛の鑑別疾患として本疾患があることを念頭に置くことが重要だが、一般市民だけでなく急性腹痛の初療にあたる一般内科・外科・小児科医でも本疾患についての理解は進んでおらず、本疾患についてのこれまで知られていない特徴や成り立ちについて研究し情報発信し理解を深めることは重要な課題である。

近年、精巣捻転症と季節や外気温との関連が世界各地から報告されてきている。外気温が低いと捻転が多かったというアイルランド・米国からの報告^{1,2)}、乾季に捻転が多いというナイジェリアからの報告³⁾などが見られる。本邦からは、神奈川県で39例の捻転症症例を解析し外気温15℃以下で精巣捻転症が多かったと報告がされている⁴⁾。申請者らは最近、埼玉県内の自施設で過去に急性陰嚢症で手術を行った患者105例を検討し、外気温15℃未満で精巣捻転症が多く、15℃以上であっても日内変動が10℃以上の場合には精巣捻転症が有意に多くなることを見出した⁵⁾。そして急性陰嚢症の中から精巣捻転症を鑑別するのに、外気温が有力な因子となる可能性を見出した。簡便で世界中どこでも使用可能な外気温という指標が、本疾患の診断の一助になる可能性があることがわかった。

申請者らはさらに、最近4年間に127例の急性陰嚢症で受診した30歳以下男性の中で、低外気温に加えて、夜間から早朝起床時に陰嚢痛の発生があったものが高率に精巣捻転症であったことを確認した(夜間から早朝起床時の70%、それ以外の時間の37%)⁶⁾。この精巣捻転症の発症が低外気温および早朝起床時に多いという点から、同じく

低外気温および早朝起床時に多いとされる心血管イベントを引き起こす原因と考えられている自律神経活動の変動^{7,8)}が、捻転の増加にも影響を与えているのではないかと仮説するに至った。交感神経系は夏季より冬季に優位となって、1日の中では早朝起床時に活発となることが知られ^{9,10)}、精巣捻転の発生の動きと類似している。

上記の知見をもとに、本研究では外気温と自律神経活動、精巣捻転症との関連を明らかにし、その成り立ちの理解を深め、新しい診断法、そして可能であれば予防法を提案することを目標とした。

材料と方法

1. 精巣捻転診断ノモグラムの開発

対象は2015年から2017年6月までに急性陰嚢痛を主訴に当センターを受診した30歳以下の男性115例。年齢、鼠径陰嚢疾患・陰嚢外傷・陰嚢痛発作の既往の有無、発症時の外気温、発症時刻、患側、陰嚢腫脹・発赤の有無、精巣位置の異常の有無、精巣挙筋反射の有無、発熱の有無、嘔気の有無、血液検査・尿検査結果、ドプラエコーでの血流低下の有無、について前向きに記載した。記録のみで診断治療に介入はしなかった。精巣捻転症には不全捻転も含めた。急性陰嚢症から精巣捻転症を予測する複数の因子をロジスティック回帰分析を用いて絞り込んで予測モデルを作成し、ノモグラムを作成した。本研究は埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会による承認を受けて行われた(申請番号1123 ②)。

2. 自律神経活動と精巣挙筋運動の関係の解明

健康成人ボランティアによる心電計での自律神経活動測定と挙筋筋電図での挙筋活動の評価を計画した。

結果

年齢の中央値は13歳であった。全115症例で、41例(36%)が精巣捻転症と診断、74例(74%)が非捻転症と診断された。年齢、鼠径陰嚢疾患・陰嚢外傷・陰嚢痛発作の既往の有無、発症時の外気温、発症時刻、といった患者背景・外的因子に限定したモデルでは、鼠径陰嚢疾患の既往($p=0.014$, オッズ比[OR]5.36, 95%信頼区間[CI]1.39–24.0)、発症時外気温15℃未満($p=0.015$, OR 3.11, 95%CI 1.24–8.06)、午前0–6時の発症($p=0.009$, OR 5.05, 95%CI 1.49–20.4)、が独立した予測因子であった。身体

所見・検査所見を含めた全ての因子を用いたモデルでは、ドプラエコー所見 ($p < 0.001$, OR 31.1, 8.37–159.5), 午前0–6時の発症 ($p = 0.035$, OR 5.16, 95%CI 1.12–26.8), 患側左 ($p = 0.036$, OR 4.02, 95%CI 1.09–17.8)が予測因子であった。それぞれのモデルについて、急性陰嚢症の中から精巣捻転症を予測するノモグラムの作成を行った。それぞれ図1, 2に示す。

また、自律神経活動測定のための、オムロンHEM 7252G-HPを購入した。自律神経活動と精巣挙筋運動の研究については、本研究期間中には施行することができなかった。

考 察

外気温は臨床・検査所見を含めないモデルで、精巣捻転を予測するのに有用であることを示した。この結果は、一般医家でのスクリーニングや、精巣捻転が起りやすい時期の一般医科や一般市民への啓発に有用と思われた。しかしながら、ノモグラムの実際の使用の前には、他集団での検証(validation)が必須である。今後は他集団での検証を行い、ノモグラムをより良いものに改善し、さらにノモグラムを実臨床で利用してみて、その臨床的效果まで見ることができれば理想的と思われる。

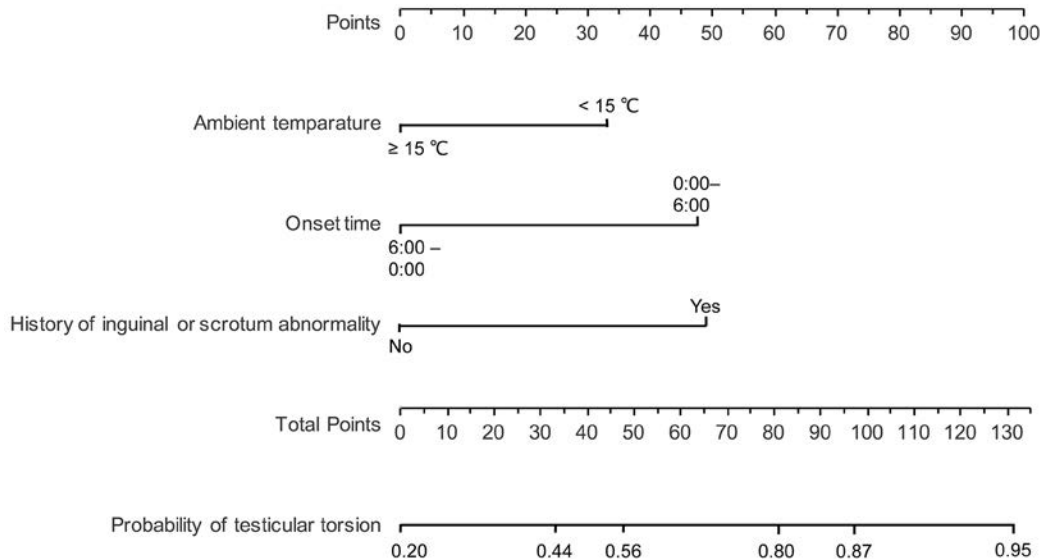


図 1. 外的要因によるノモグラム.

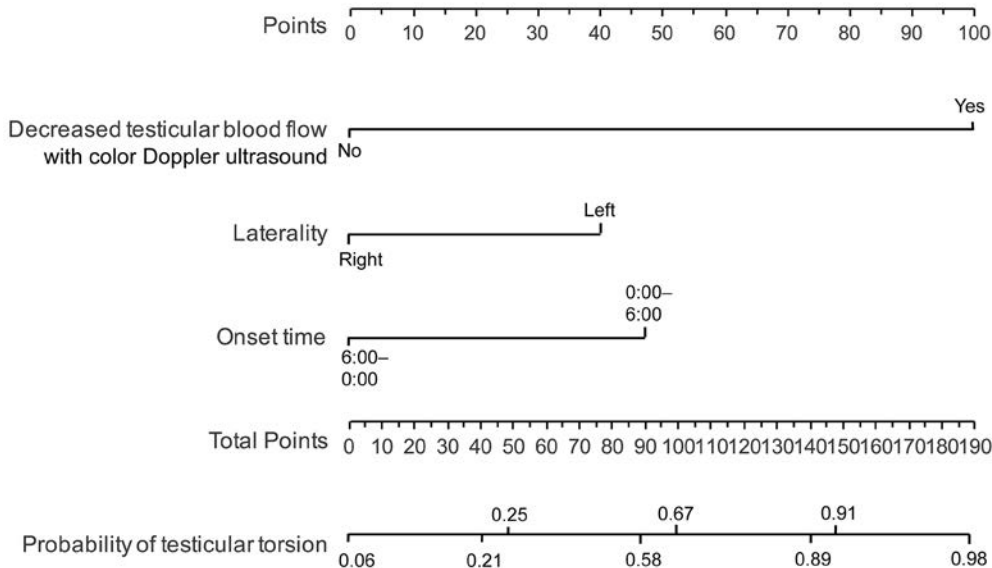


図 2. 身体所見・臨床検査によるノモグラム.

参考文献

- 1) Shukla RB, Kelly DG, Daly L, Guiney EJ. Association of cold weather with testicular torsion. *Br Med J* 1982; 285: 1459-60.
- 2) Srinivasan AK, Freyle J, Gitlin JS, Palmer LS. Climatic conditions and the risk of testicular torsion in adolescent males. *J Urol* 2007; 178: 2585-8.
- 3) Mabogunje OA. Testicular torsion and low relative humidity in a tropical country. *Br Med J* 1986; 292: 363-4.
- 4) 星野英章, 阿部貴之, 渡辺聡, 勝岡洋治, 河村信夫. 精巣捻転症の発症と気温との相関についての検討. *泌尿紀要* 1993; 39: 1031-4.
- 5) Takeshita H, Kawakami S, Sugiyama H, Cho E, Yano A, et al. Low Ambient Temperature Predicts Testicular Torsion in Patients with Acute Scrotum Requiring Surgical Exploration: A Cohort Study of a Consecutive 105 Patients in Japan. *World J Urol* 2015; 33(Suppl 1): 69.
- 6) Takeshita H, Kawakami S, Tachibana K, Hiranuma S, Sugiyama H, et al. Low ambient temperature and midnight to early morning period onset highly predict testicular torsion among acute scrotums in Japanese male patients younger than 30. *Eur Urol Suppl* 2016; 15: e594.
- 7) Cooke-Ariel H. Circadian variations in cardiovascular function and their relation to the occurrence and timing of cardiac events. *Am J Health Syst Pharm* 1998; 15 (55Suppl 3): S5-11.
- 8) 西山信一郎. 【特集 早朝高血圧と夜間血圧 モーニングサージと non-dipper】 早朝の心血管イベント 急性心筋梗塞, 狭心症. *血圧* 2001, 8, 119-23.
- 9) Kruse HJ, Wieczorek I, Hecker H, Creutzig A, Schellong SM. Seasonal variation of endothelin-1, angiotensin II, and plasma catecholamines and their relation to outside temperature. *J Lab Clin Med.* 2002; 140: 236-41.
- 10) Izzo JL Jr, Larrabee PS, Sander E, Lillis LM. Hemodynamics of seasonal adaptation. *Am J Hypertens.* 1990; 3: 405-7.
- 11) Anderson JB, Williamson RC. Testicular torsion in Bristol: a 25-year review. *Br J Surg* 1998; 75: 988-92.

研究成果リスト

論文

- 1) 竹下英毅, 川上理, 立花康次郎, 平沼俊亮, 杉山博紀, 他. 急性陰囊症における精巣捻転症のリスクと発症日外気温および日内気温差の関係. *日本泌尿器科学会雑誌*. 2016; 107: 233-8.

学会発表

- 1) 竹下英毅, 川上理, 立花康次郎, 平沼俊亮, 杉山博紀, 他. 低外気温と深夜から早朝にかけての発症は急性陰囊症から精巣捻転症を鑑別する因子である - 前向き非介入研究. 第106回日本泌尿器科学会総会 平成30年4月発表予定 京都

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

新生児慢性肺疾患に対する臍帯血由来幹細胞を用いた再生医療に関する研究

研究代表者 渡邊 貴明 (医学部 総合医療センター 小児科)

研究分担者 難波 文彦 (医学部 総合医療センター 小児科)

緒言

新生児慢性肺疾患(chronic lung disease, 以下CLD)は未熟児にとって重篤な合併症である。新生児期のみならず、幼・小児期にも呼吸器合併症が持続し、感染症や喘息等で頻回の再入院を必要とする。現在、CLDに有効な治療法はない。

新生仔マウスに高濃度酸素を暴露するCLD動物モデルは、肺胞発達遅延を呈し、申請者らは72時間の高濃度酸素暴露がいかに新生仔肺に対して影響するかを病理学的、分子生物学的に検討してきた¹⁾。

ラットの骨髄由来間葉系幹細胞は高濃度酸素性肺傷害を軽減する。ヒト臍帯血から幹細胞は利用可能であり、低酸素性虚血性脳症やCLDなど新生児疾患の治療にとって魅力的である。臍帯血由来幹細胞、特に臍帯血CD34陽性細胞のCLDに対する治療効果と安全性、臨床応用への展開に関しては検討されていない。申請者らの施設は国内最大の総合周産期母子医療センターで、臍帯血の確保は両親の同意が得られた際には容易であり、またセパックスを用いて、臍帯血から間葉系幹細胞を自動分離するシステムはすでに構築されている。また、臍帯血CD34陽性細胞はLONZAから購入可能である。さらに海外でCLDに対する臨床試験に使用されている臍帯血由来間葉系幹細胞(PNEUMOSTEM, MEDIPOST社)を輸入予定である。

本研究ではCLDマウスモデルに対するヒト臍帯血由来幹細胞の効果・安全性を解析し、最終的には臨床応用を目指すことを目的とした。

材料と方法

(1)CLDマウスモデルの確立と再現性の確認

生後12時間以内の新生仔マウスに高濃度酸素(95%酸素)を96時間暴露する。暴露後、両側肺を摘出し4%パラホルムアルデヒドで定圧固定し、パラフィン包埋する。申請者らは、高濃度酸素暴露は新生仔マウスの肺胞発達遅延を引き起こすことを示してきた¹⁾。本研究ではまず、本モデルの再現性を確認する。HE染色にて肺胞の発達段階(mean linear intercept, 以下Lm)と肺胞壁の厚さを評価する。

(2)新生仔期高濃度酸素暴露によるマウス肺内CD34抗原量の変化

コントロールとして日齢0, 1, 2, 3, 4の高濃度酸素非暴露新生仔マウスをそれぞれ5匹ずつ、高濃度酸素暴露新生仔マウス(CLDマウスモデル)の日齢1, 2, 3, 4をそれぞれ5匹ずつ用意し、肺組織を採取し、蛋白を抽出後、ウエスタンブロットを施行して、CD34抗原の発現量を定量する。1次抗体にはAnti-CD34抗体[MEC 14.7] (ab8158, abcam)、内在性コントロールにはβアクチンを使用し、1次抗体にはbeta Actin antibody[AC-15] (GTX26276, GeneTex)を使用した。

結果

(1)再現性の高いCLD動物モデルを作製した

生後96時間の新生仔期高濃度酸素暴露によりマウス肺は、肺胞発達の遅延・停止を示す、肺胞の単純化(大きく数の少ない肺胞)を示し、同病理像は少なくとも日齢14まで持続した(図1a)。肺胞の大きさを定量化したLmもルームエア群と比較して、高濃度酸素暴露群で日齢4, 14ともに有意に高値を示した(図1b)。抗酸化物質HO-1及び細胞周期停止因子p21のmRNA発現レベルは過去の報告の通り、ルームエア群と比較して、高濃度酸素暴露により有意に上昇した(図1c)。以上より、当研究室においても再現性の高いCLD動物モデルを作製した。

(2)新生仔期高濃度酸素暴露期間中、マウス肺内CD34抗原量は低下傾向を示した

ウエスタンブロットにて新生仔期高濃度酸素暴露期間中のマウス肺内CD34抗原量は低下傾向を示したが、統計学的な有意差は認めなかった。(図2a, 2b)

考察

新生仔期高濃度酸素暴露を用いたCLD動物モデルは一般的に再現性の高い動物モデルとして最も頻用されるモデルである。当研究室でも出生後12時間以内から96時間、95%の高濃度酸素暴露することにより、既報通り再現性の高いCLDマウスモデルを作製することができた。同モデルを用いて、今後は新規再生医療・細胞療法や新規薬物療法開発のための前臨床試験を行うことが可能になるであろう。

新生仔期高濃度酸素暴露のマウス肺内CD34抗原量に対する影響は、統計学的有意差はないものの、高濃度酸素暴露により暴露期間中、低下する傾向にあることが分

かった。このことから、高濃度酸素暴露期間中にCD34陽性細胞を投与することは、新生仔期の高濃度酸素性肺傷害、つまりCLD動物モデルにおける肺傷害を軽減する可能性がある。現在、検体数を増やしてこの高濃度酸素暴露による肺内CD34抗原低下の再現性を確認中であり、もし確認されれば、実際に購入済みの臍帯血CD34陽性細胞(LONZA)投与の安全性及び有効性を確認する予定である。

まとめると、本研究において、①再現性の高いCLDマ

ウスモデルを確立し、②新生仔期高濃度酸素暴露により、暴露期間中のマウス肺内CD34抗原量が低下することを示した。

参考文献

1) Namba F, Ogawa R, Ito M, Watanabe T, Dennery PA, et al. Sex-related differences in long-term pulmonary outcomes of neonatal hyperoxia in mice. *Exp Lung Res* 2016; 42(2): 57-65.

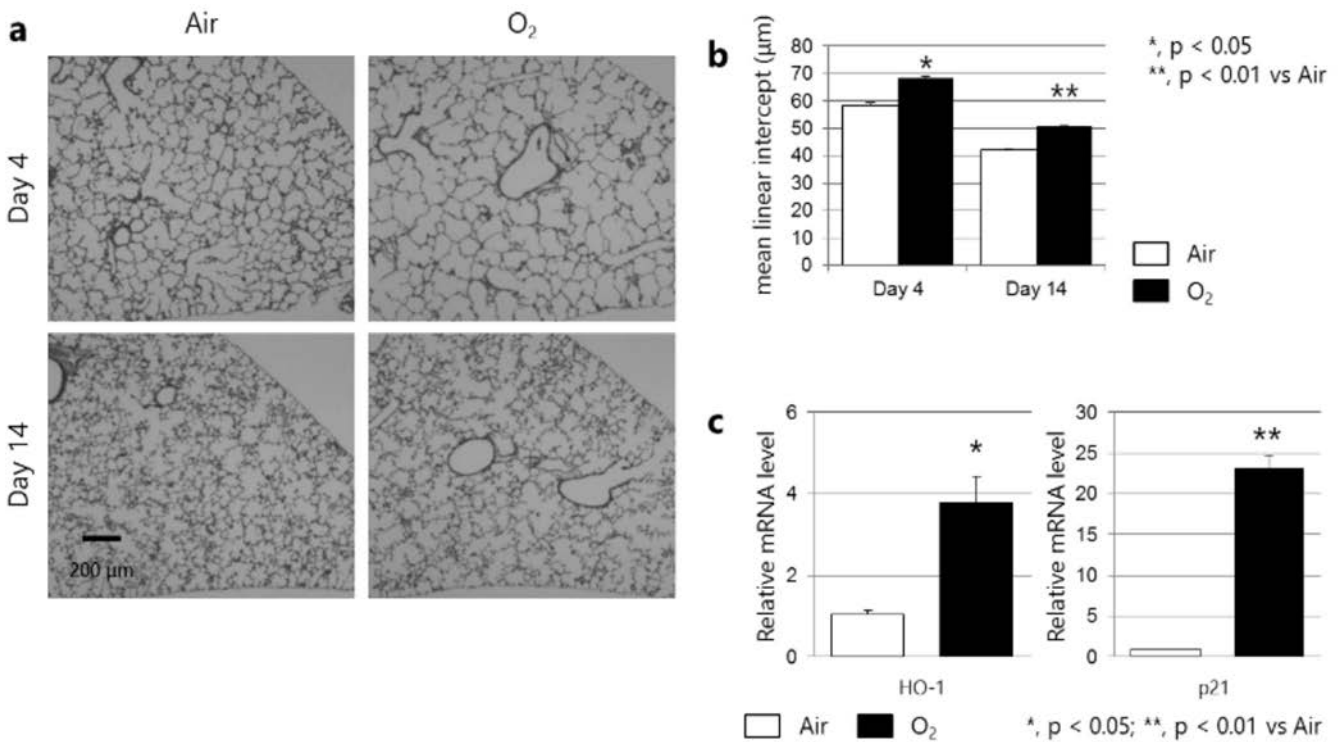


図 1. 高濃度酸素性肺傷害(CLD)モデル作製.

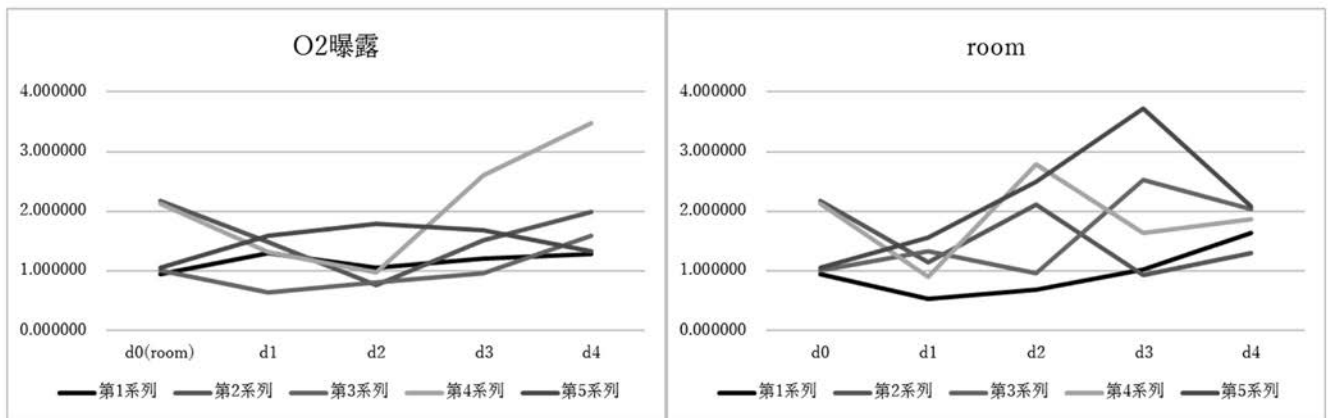


図 2a. CLDマウスモデル.

図 2b. 正常新生仔マウス.

研究成果リスト

論文

- 1) Ito M, Nagano N, Arai Y, Ogawa R, Kobayashi S, Motojima Y, Go H, Tamura M, Igarashi K, Dennery PA, Namba F. Genetic ablation of Bach1 gene enhances recovery from hyperoxic lung injury in newborn mice via transient upregulation of inflammatory genes. *Pediatr Res* 2017; 81(6): 926-31.
- 2) Go H, La P, Namba F, Ito M, Yang G, et al. MiR-196a regulates heme oxygenase-1 by silencing Bach1 in the neonatal mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016; 311(2): L400-11.
- 3) Namba F, Ogawa R, Ito M, Watanabe T, Dennery PA, et al. Sex-related differences in long-term pulmonary outcomes of neonatal hyperoxia in mice. *Exp Lung Res* 2016; 42(2): 57-65.
- 4) 難波文彦. 慢性肺疾患のトランスレーショナル研究. 新生児医療 最新トピックNext!, *Journal in Journal for Neonatologist*, ネオネイタルケア, 2017年7月号, 2017. メディカ出版.

学会発表

- 1) Namba F, Nagano N, Ito M, Ozawa J, Watanabe T, et al. Identification and importance of hyaluronan and proteoglycan link protein 1 in the developing mouse lung. *Pediatric Academic Societies Annual Meeting*, 2017.5: San Francisco, poster presentation
- 2) Namba F, Ito M, Nagano N, Ozawa J, Watanabe T, et al. A metabolomics approach for studying the effects of hyperoxia on the lungs of neonatal and adult mice using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry.

- Pediatric Academic Societies Annual Meeting*, 2017. 5: San Francisco, poster presentation
- 3) Nagano N, Arai Y, Watanabe T, Miyake F, Matsumura S, Tamura M, Namba F. Human thioredoxin-1 attenuates neonatal hyperoxic lung injury in mice by modulating interleukin-6 gene expression. *Pediatric Academic Societies Annual Meeting*, 2017. 5: San Francisco, poster presentation
- 4) Ito M, Arai Y, Ogawa R, Go H, Tamura M, Dennery PA, Namba F. Genetic ablation of the Bach1 gene upregulates HO-1 and IL-6 expression in the newborn lung exposed to hyperoxia. *Pediatric Academic Societies Annual Meeting*, 2016. 4: Baltimore, poster presentation
- 5) 渡邊貴明, 田中広輔, 伊藤誠人, 長野伸彦, 小澤純一, 新井幸男, 三宅美由, 松村峻, 難波文彦. 新生仔および成獣マウス肺の高濃度酸素暴露に対する感受性の相違—メタボローム解析を用いて—. 第62回日本新生児教育医学会, 2017. 10: 大宮, 一般口演
- 6) 長野伸彦, 新井幸男, 渡邊貴明, 三宅美由, 松村峻, 田村正徳, 難波文彦. 新生児慢性肺疾患マウスモデルにおける細胞内抗酸化物質チオレドキシンの重要性. 第53回日本周産期・新生児医学会, 2017. 7: 横浜, 一般口演
- 7) 難波文彦, 伊藤誠人, 小川亮, 新井幸男, 渡邊貴明, 他. 新生仔および成獣マウス肺に対する高濃度酸素暴露の影響—キャピラリー電気泳動—質量分析法を用いたメタボローム解析—. 第52回日本周産期・新生児医学会, 2016. 7: 富山, 一般口演
- 8) 郷勇人, 難波文彦, 前田創, 佐藤真紀, 桃井伸緒. 重症気管支肺異形成症モデルマウス肺におけるマイクロRNAプロファイリング. 第52回日本周産期・新生児医学会, 2016. 7: 富山, 一般口演

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

新しいプレカットDMEKドナーにおける角膜内皮細胞の生存率の検討

研究代表者 石川 聖 (医学部 大学病院 眼科)

緒言

日本国内の角膜ドナーは慢性的に不足しており、角膜移植待機患者は一向に減らない状態である。一方、角膜移植は角膜すべての層を移植する全層移植から、必要な層のみを移植するパーツ移植が増えてきている。そのため、理論的には1つ角膜を2つの層に分けて2人に移植することができるようになっており、それが実現すればドナー角膜不足解消の1つの解決策になる。特に角膜上皮～実質と、デスメ膜～内皮の2つの層に分けた場合、深層角膜移植と角膜内皮移植(Desmet membrane endothelial keratoplasty : DMEK)を行うことができる。その場合、角膜を2つに分離し、保存することになるが、特に角膜内皮細胞は再生することがないため、いかに細胞の生存率を保ちながら保存するかが重要になってくる。

角膜移植に際し、ドナー角膜における角膜内皮細胞の生存率が、移植後における角膜の透明性の維持、視力の確保において重要であるが、移植に際しては、化学的及び機械的なストレスが伴うこともあり、そのストレスが生存率の低下を招くことが懸念される。角膜内皮移植の際、視認性向上と手術時間短縮のため角膜染色剤としてトリパンブルーを使用した報告があるが^{1,2)}、分離された角膜内皮への影響についてはまだ報告がない。

そこで本研究においては、既知の処置方法に伴う角膜内皮細胞の生存率へ影響を調査するため、移植時におけるドナー角膜の視認性向上として用いられるブリリアントブルーG(以下BBG)染色の、角膜内皮細胞に与える影響を検討することを目的とした。

本研究に先立ち、角膜内皮細胞の分子生物学的評価及び形態学的評価として、組織切片染色及び走査型電子顕微鏡(以下SEM)による試験方法の探索を試みたので、その結果を報告する。

材料と方法

角膜組織は、海外より輸入した角膜ドナー(SightLife Surgical[®])を使用した。また、16%/wパラホルムアルデヒド溶液(和光純薬)をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(和光純薬)(以下PBS(-))で希釈して4%パラホルムアルデヒド溶液を調製し、ろ過滅菌したものを組織固定液とした(以下固定液)。

角膜組織を、ミクロトーム用刃(Leica)を用いて等分した。1.5 mlチューブに固定液及び組織片を入れ、回転ローターで回転させながら固定した(30 min, R.T.)。

固定後、免疫染色およびSEM観察を下記の手順で実施した。なお、免疫染色においては、角膜の透明性の維持に寄与する角膜内皮細胞のポンプ機能の維持を評価するため、Na⁺/K⁺-ATPaseについて評価した。また、免疫染色とSEM観察ではそれぞれ異なる角膜組織を使用し、入手から観察まで、免疫染色用は約半年間、SEM観察用は約3週間の期間が空いていた。

1. Whole mount免疫染色

固定後、組織片をPBS(-)に移し替え、振盪させながら洗浄した(10 min×3, 4℃)。1.5 mlチューブに2%スキムミルク(和光純薬)/PBST(PBST: PBS(-)に0.1%の濃度でTriton X-100(SIGMA)を添加)及び組織片を入れ、回転ローターで回転させた(60 min, 4℃)。再度洗浄操作を行った後、1.5 mlチューブにPBS(-)で希釈した一次抗体Na⁺/K⁺-ATPase(SANTA CRUZ: 1/200)及び組織片を入れ、回転ローターで回転させた(O/N, 4℃)。再度、PBS(-)で洗浄操作を行った後、1.5 mlチューブにPBS(-)で希釈した二次抗体(Alexa Fluor 488(Thermo Fisher): 1/400 Thermo Fisher)及び組織片を入れ、回転ローターで回転させた後(60 min, R.T.)、PBS(-)での洗浄操作を行い、Mounting Medium DAPI(Funakoshi)で封入した。

観察には蛍光生物顕微鏡(BX53, オリンパス, 東京)を用いて200倍で観察し、Na⁺/K⁺-ATPaseによる組織学的評価の可否を確認した。

2. SEM観察

固定後、組織片の表面の水分をろ紙で除去し、角膜内皮側が上向きになるように組織片を試料台に貼り付け、自然乾燥させた(60 min, R.T.)。SEM(ProX, Phenom-World, Eindhoven)を用いて、500倍および2000倍にて観察し、細胞形状の評価可否を確認した。

結果

1. whole mount免疫染色

図1にNa⁺/K⁺-ATPaseによる染色像を示す。細胞の脱落が認められる部分、Na⁺/K⁺-ATPaseの発現が認められない部分も存在するが、無処置である角膜内皮細胞における大部分において、Na⁺/K⁺-ATPaseによるポンプ機能

が正常に機能していることを評価することが可能であり、本免疫染色により、角膜内皮細胞におけるポンプ機能の評価が可能であることが確認された。

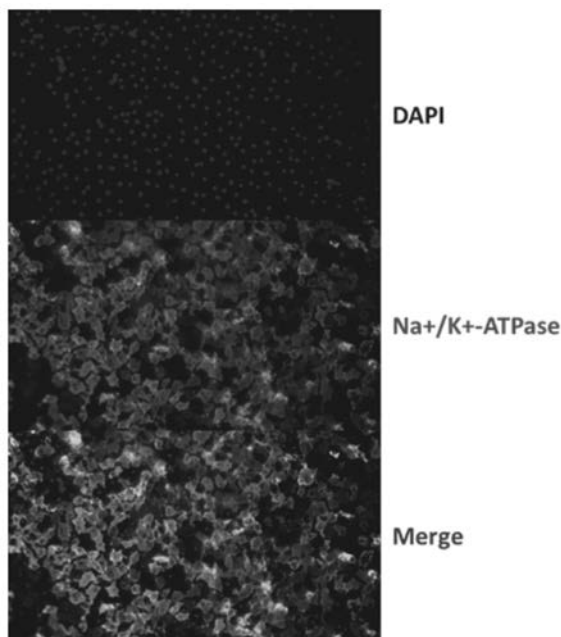


図 1. 角膜内皮細胞の免疫染色像(200倍) 無処置の角膜内皮細胞において、DAPI染色陽性細胞を多数認め、角膜内皮細胞の核を確認できる。また、 Na^+/K^+ -ATPase陽性細胞を多数認め、角膜内皮細胞のポンプ機能が働いていることが確認される。

2. SEM観察

SEM観察にて得られた画像を図2～3に示す。500倍観察、2000倍観察ともに、乾燥した真空条件下における観察であることから、組織の歪み及び細胞形状の不均一性が認められる結果ではあったが、角膜内皮細胞の密度の評価に際しては、角膜内皮細胞及びその細胞間接着の観察が可能であることから、その評価が可能である結果が得られた。

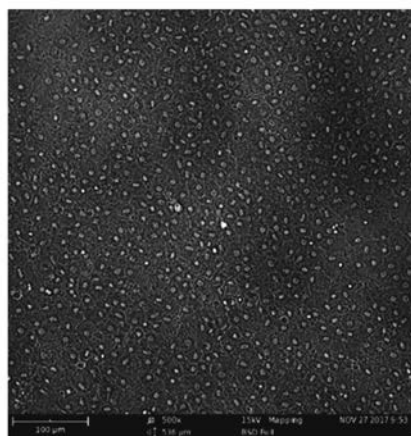


図 2. 内皮細胞のSEM観察像(500倍) ほぼ、核の脱落もなく内皮細胞の形態が確認できる。

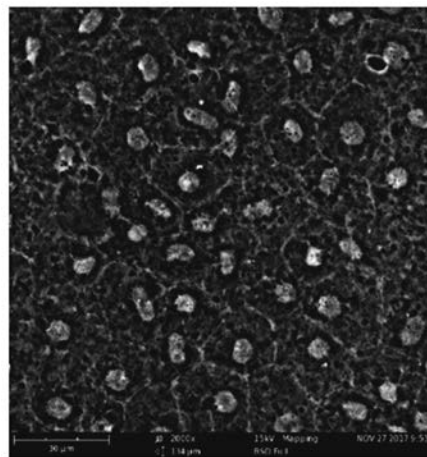


図 3. 内皮細胞のSEM観察像(2000倍、図1の点線枠内を拡大) 組織の歪み及び細胞形状の不均一性が一部認められるが、角膜内皮細胞の形態を確認することができる。

考 察

今回使用した角膜組織において、無処置の角膜組織における角膜内皮細胞の免疫染色及びSEM観察による評価を行ったが、いずれの評価方法においても、角膜内皮細胞の評価が可能であることが確認されたことから、角膜内皮細胞の生存率への影響を調査する上で、有用な評価方法であることが示唆される結果が得られた。BBGは水晶体嚢を染色するのにも用いられており、その安全性に関しては報告されている³⁾が、シート状にした角膜内皮の場合はまだ安全性は確立されていないため、今後は、今回の評価方法に基づき、角膜内皮細胞におけるもう一つの重要な機能である、細胞間接着によるバリア機能の評価も加え、異なるBBG処理時間および処理濃度における角膜内皮細胞の形態を比較し、BBG染色が角膜内皮細胞へ与える影響を今後検討していく。

参考文献

- 1) Farah ME, Maia M, Rodrigues EB. Dyes in ocular surgery: principles for use in chromovitrectomy. *Am J Ophthalmol* 2009; 148(3): 332-40.
- 2) Kobayashi A, Murata N, Yokogawa H, Yamazaki N, Masaki T, et al. Evaluation of internationally shipped prestripped donor tissue for descemet membrane endothelial keratoplasty by vital dye staining. *Cornea* 2015; 34(2): 225-7.
- 3) Hisatomi T, Enaida H, Matsumoto H, Kagimoto T, Ueno A, et al. Staining ability and biocompatibility of brilliant blue G: preclinical study of brilliant blue G as an adjunct for capsular staining. *Arch Ophthalmol* 2006; 124(4): 514-9.

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

アダルト型オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化タイミング決定機構の解析

研究代表者 徳元 康人 (アドミッションセンター)

緒言

アダルト型オリゴデンドロサイト前駆細胞 (Adult oligodendrocyte precursor cell, アダルト OPC) は中枢神経系の体性幹細胞 (somatic stem cell) である¹⁾。中枢神経系の軸索を被覆するミエリン鞘が損傷を受けた時、アダルト OPC はオリゴデンドロサイトに分化して損傷部位を修復する。多くの体性幹細胞と同じく、アダルト OPC は通常ほとんど増殖せず動物の一生を通じて未分化状態のまま維持される²⁾。こうした休眠状態にあるアダルト OPC は胎児期の、活発に自己増殖する増殖期型 OPC から時間依存的に分化してくる。出生直後のラットやマウスの中枢神経系では、ほぼ全ての OPC が増殖期型 OPC であるが生後2週目からアダルト OPC が出現し、その後は時を追うごとにアダルト OPC の存在比率が増してゆき、生後6週目以降になると全ての OPC はアダルト OPC となる。増殖期型 OPC からアダルト OPC への分化がどのようにして起こるのかは謎であったが、研究代表者らはラットやマウスから採取した増殖期型 OPC を低酸素環境下で培養し、同時に甲状腺ホルモンやレチノイン酸などのホルモンで刺激することによりアダルト OPC へ誘導分化させることに成功した³⁾。このとき、単細胞レベルまでバラバラにされた無血清培地中の希薄密度培養という条件にありながら、培養ディッシュ平面上の個々の OPC は生体内と同じ時間タイミングでアダルト OPC に分化する。同じような時間依存的な現象は OPC からオリゴデンドロサイトへの分化でも観察されていて、個々の OPC には適切な分化タイミングを感知する何らかの細胞内在性分子タイマーが存在するのではないかと考えられてきた⁴⁾。研究代表者らは網羅的なトランスクリプトーム解析を行い、増殖期型 OPC からアダルト OPC への分化に関わる6種類の転写因子を同定した (Runx1, Klf9, Hif2a, Csrp1, Nkx6.2, Rev-erbA)。これらのうち最も重要な転写因子は Runx1 である。Runx1 を増殖期型 OPC に過剰発現させると、低酸素環境も、経過時間も、ホルモン刺激さえも関係なくアダルト OPC へ強制的に分化誘導することが出来る³⁾。Klf9 は甲状腺ホルモンのシグナル伝達に、Hif2a は低酸素応答にそれぞれ関わり Runx1 遺伝子の発現を誘導するが、どちらの遺伝子発現も培養時間に影響されることはない³⁾。のこり3種類の転写因子、Csrp1, Nkx6.2, Rev-erbA は、酸素濃度に関わりなく増殖期型 OPC

の培養開始時から時間依存的に遺伝子発現量が増大するが Runx1 遺伝子発現との関係は定かではなかった。もしこれらの時間依存的な発現量の増大を示す転写因子が Runx1 の遺伝子発現コントロールに関与しているのならば、それこそがアダルト OPC の分化タイミングを決定している因子である。そこで、この3種の転写因子の内のどれが Runx1 の遺伝子発現に関わるのか調べた。

材料と方法

生後7日齢の Sprague Dawley ラットの視神経より採取した増殖期型 OPC を、甲状腺ホルモンを含まない無血清培地中で通常酸素濃度条件下で培養した。5日後、Csrp1, Nkx6.2, Rev-erbA それぞれの遺伝子発現を阻害する siRNA (コントロールは non-target siRNA, NT) を GFP 発現レポータープラスミド pMaxGFP と一緒に OPC へ導入した後に、甲状腺ホルモンを含有する無血清培地に移し低酸素環境 (培養気層酸素濃度 1.5%) で更に培養した。4日後 (培養開始後9日目)、FACS を用いて GFP 陽性 OPC を精製し total RNA を抽出して cDNA を作成した。これらをサンプルとしてリアルタイム PCR を行い Csrp1, Nkx6.2, Rev-erbA それぞれの遺伝子発現を阻害した場合における Runx1 遺伝子の発現量を比較した。

結果

図1に示すように、転写因子 Csrp1, Nkx6.2, Rev-erbA の遺伝子発現を阻害した全ての場合において Runx1 遺伝子の発現が抑制されることが分かった。

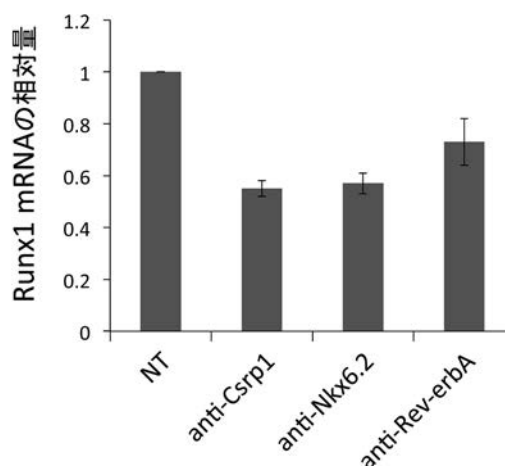


図1.

考 察

酸素濃度に関わりなく時間依存的に発現量が増大する転写因子Csrp1, Nkx6.2, Rev-erbAは全てRunx1遺伝子の発現上昇に関わる事が証明された。つまり増殖期型OPCからアダルトOPCへの変換に関与する6種類の転写因子のうち、Runx1こそがOPCの休眠を決定するマスター因子であり、他の5種類の転写因子はすべてRunx1の遺伝子発現に関わることで間接的にアダルトOPCの分化に寄与するということが明らかとなった。それぞれの関係を図2に示す。アダルトOPCの分化タイミングを決めている3種類の転写因子のうち特に注目すべきはRev-erbAである。Rev-erbAは核内小分子受容体型転写因子であり、そのリガンドはヘムである。またRev-erbAはBmal1の遺伝子発現を直接コントロールすることにより概日時計の補助ループを形成する時計遺伝子でもある⁵⁾。本研究で得られた結果は、数週間にわたる哺乳類の個体発生の分化タイミングの決定に概日時計が寄与する可能性を示唆する。

甲状腺ホルモン+低酸素+時間＝アダルトOPC

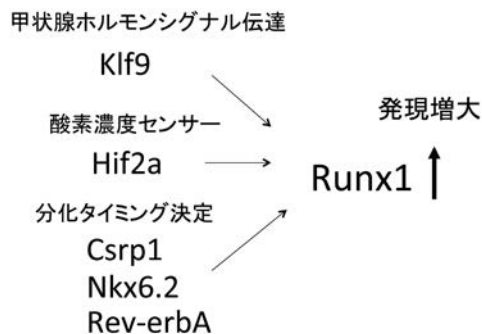


図 2.

謝 辞

研究の実施にあたり実験機器を借用させて頂いた末松誠先生に篤く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Richardson WD, Young KM, Tripathi RB, McKenzie I. NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? *Neuron* 2011; 70: 661-73.
- 2) ffrench-Constant C, Raff MC. Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve. *Nature* 1986; 319: 499-502.
- 3) Tokumoto Y, Tamaki S, Kabe Y, Takubo K, Suematsu M. Quiescence of adult oligodendrocyte precursor cells requires thyroid hormone and hypoxia to activate Runx1. *Scientific Reports* 2017; 7: 1019.
- 4) Raff M. Intracellular developmental timers. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2007; 72: 431-5.
- 5) Butler AA, Burris TP. Segregation of Clock and Non-Clock Regulatory Functions of REV-ERB. *Cell Metab* 2015; 22: 197-8.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 徳元康人, 玉置親平, 加部泰明, 田久保圭誉, 末松誠. 低酸素環境下で甲状腺ホルモン依存的に発現する転写因子Runx1はオリゴデンドロサイト前駆細胞のアダルト型体性幹細胞化を誘導する, 第69回日本細胞生物学会大会, 平成29年6月13～15日, 仙台
- 2) 徳元康人, 玉置親平, 加部泰明, 田久保圭誉, 末松誠. The somatic stemness of oligodendrocyte precursor cells requires thyroid hormone and hypoxia to activate Runx1, 第60回日本神経化学学会大会, 平成29年9月7～9日, 仙台
- 3) 徳元康人, 玉置親平, 加部泰明, 田久保圭誉, 末松誠. 低酸素環境下で甲状腺ホルモン刺激によって発現誘導される転写因子Runx1はオリゴデンドロサイト前駆細胞を体性幹細胞化させる, ConBio 2017 (2017年度 生命科学系学会合同年次大会), 平成29年12月6～9日, 神戸

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

アセトアミノフェンの脊髄内投与における鎮痛機序の解明

研究代表者 星島 宏 (大学病院 麻酔科)

研究分担者 長坂 浩, 井手 康雄, 竹内 梨紗, 西澤 秀哉

緒言

アセトアミノフェンは、1980年代に主に小児に対する解熱性鎮痛薬として実用化が開始された。近年、日本でも静脈注射用のアセトアミノフェン製剤（アセリオ[®]）が発売され、その効果や作用機序が再び注目を集めている。アセトアミノフェンの特徴は、従来の解熱性鎮痛薬（NSAIDs）と比較して、抗血小板作用が無い、喘息を引き起こしにくい、腎機能を悪化させない、消化管粘膜疾患がほとんどおこらないなど副作用が少ないという利点があげられている¹⁾。現在、アミノフェン製剤は、身近な存在で、臨床応用されてからの歴史は約40年と長いにも関わらず、その作用機序は未だに解明されていない。

アセトアミノフェン製剤の薬理活性発現メカニズムについては未だに不明な点が多い。アセトアミノフェンは、NSAIDsよりも脳液脳関門を透過することから、脳内での薬理活性に注目している研究者が多い²⁾。また、末梢組織でもアセトアミノフェンは鎮痛効果を発現すると言われており、それらの研究では、ペロキシダーゼ阻害³⁾が主な薬理作用ではないかと考えられている。

一方、脊髄レベルでもアセトアミノフェンの鎮痛効果が示されている。2002年の研究で、炎症性モデルのラットの髄腔内にアセトアミノフェンを投与し、その鎮痛効果が確認された。同研究の中で、脊髄レベルにおける鎮痛効果は、下行性抑制系伝導路の1つであるセロトニン神経が大きな役割を担っていると示唆されている⁴⁾。しかし、脊髄レベルでのアセトアミノフェンの鎮痛効果の研究はこれ以降ほとんど進んでいない。

術後痛は、患者にとって最大の不安・恐怖であり、医学・社会的な問題の1つとなっている。術後痛は、直接的な神経損傷に加え炎症性サイトカイン、また、近年では神経成長因子やフリーラジカルなどが神経障害性疼痛成分を惹起すると言われている。このように、種々の複雑なメカニズムで発生する術後痛を沈静化させる事は困難で、未だに完全な鎮痛方法が確立されていない。

本研究では、アセトアミノフェンが、脊髄レベルにおいて、

抗侵害作用を発現するかを、術後痛モデルラットを用いて検討した。

材料と方法

実験には、雄性Sprague-Dawleyラット(200~250g)を使用し、セボフルラン麻酔下にてYakshらの方法により薬剤投与用に脊髄腔内カテーテル留置を行った⁵⁾。カテーテル留置6日後、Brennanらの方法により足底切開を行い、術後痛ラットモデルを作成した⁶⁾。疼痛行動評価は足底テスト装置(HTC-390G, ニューロサイエンス)を用いて熱刺激に対する逃避時間を計測比較した。測定時期は、足底切開前、足底切開24時間後、その後は、アセトアミノフェン(100または300 μ g)脊髄腔内投与後、10, 20, 30, 60分後に計測を行った。コントロール薬剤は、生理食塩水を用いた。結果は平均値 \pm 標準誤差で表し、一元配置分散分析法(1 way ANOVA)により検定した。1 way ANOVAにて有意な場合には、さらにBonferroni post-hoc testを用いて検定した。

結果

アセトアミノフェン300 μ gの脊髄腔内投与は、コントロール群と比較(4.9 \pm 0.7秒, $p=0.13$)して、アセトアミノフェン投与後10分後(7.9 \pm 1.3秒, $p<0.004$)、20分後(5.8 \pm 0.5秒, $p<0.007$)に有意に熱刺激逃避時間が延長した。

考察

アセトアミノフェン300 μ gの脊髄腔内投与は、コントロール群と比較して、アセトアミノフェン投与後10分後、20分後に有意に熱刺激逃避時間が延長した。しかし、アセトアミノフェン100 μ gの脊髄腔内投与では有意な熱刺激逃避時間の延長は認められなかった。

2002年、Allouiらは、カラギナンを後足底に投与し、アセトアミノフェン50 μ g, 100 μ g, 200 μ gの脊髄腔内投与を行い、Von Freyテストで術後鎮痛を計測した⁴⁾。その結果、アセトアミノフェン100 μ gの脊髄腔内投与で約60分間、200 μ gの投与で約75分間の鎮痛効果を示したと報告

している。しかし、我々の研究では、アセトアミノフェン 100 μg の脊髄腔内投与では有意な鎮痛効果を示さず、アセトアミノフェン 300 μg の脊髄腔内投与においても、投与後約 20 分間の鎮痛効果しか示さなかった。

この研究結果の差には、研究系の違いが関与していると考えられる。我々の研究では、Alloui らの炎症性(カラギナン)モデルと異なり、術後急性痛モデル(Brennan らの方法)を研究に用いている⁶⁾。術後急性痛モデルでは、炎症に加え神経や組織損傷などの二重の痛みを抱えるため、炎症性モデルよりも痛みが増大する。本研究では、Alloui らの研究よりも痛みの程度が大きかった為に、より多くのアセトアミノフェンの投与量が必要であり、作用時間も短かったと考えられる。実際、歯科の小手術を受けた患者に、アセトアミノフェンとフルルピプロフェンを投与した、ランダム化比較試験では、フルルピプロフェンの方が鎮痛効果が高かったと報告されている。アセトアミノフェンは、術後の急性痛に使用するには鎮痛効果が弱い可能性がある。

結 論

アセトアミノフェンは、300 μg の脊髄腔内投与において、術後痛ラットモデルへの鎮痛効果を示す。しかし、アセトアミノフェン 100 μg の脊髄腔内投与では鎮痛効果を示さない。

参考文献

1) Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings.

Inflammopharmacology 2013; 21: 201-32

- 2) Courade JP, Caussade F, Martin K, et al. Effects of acetaminophen on monoaminergic systems in the rat central nervous system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 364: 534-7
- 3) Potter DW, Hinson JA. The 1- and 2- electron oxidation of acetaminophen catalyzed by prostaglandin H synthase. *J Biol Chem* 1987; 262: 974-80
- 4) Alloui A, Chassaing C, Schmidt J, et al. Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 443: 71-7
- 5) Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 1976; 17: 1031-6
- 6) Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* 1996; 64: 493-501

研究成果リスト

学会発表

- 1) 星島宏, 長坂浩, 井手康雄, 松本延幸, 三枝勉, 水上智, 岩瀬良範, 中山英人, 前山昭彦, 竹内梨紗, 西澤秀哉, 伊藤直樹, 臣永麻子, 堀越雄太, 中村智奈, 高橋正人, 野木武洋. アセトアミノフェンの脊髄腔内投与は術後痛ラットモデルで抗侵害作用を示す, 第63回埼玉麻酔専門医会. 平成29年5月, 埼玉
- 2) 星島宏, 井手康雄, 三枝勉, 松本延幸, 長坂浩. アセトアミノフェンの脊髄腔内投与における抗侵害作用～術後痛ラットモデルでの検討, 第51回日本ペインクリニック学会. 平成29年7月, 岐阜