

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

リン酸化タウレベルの増減と認知機能との関連性の解明

研究代表者 柳下 聡介 (医学部 薬理学)

緒言

タウは微小管結合タンパク質の一つであり、多くのリン酸化部位をもつ。記憶障害を呈するアルツハイマー病では、過剰なリン酸化を受けたタウが神経細胞内に凝集した神経原線維変化が見られる。これまでタウ過剰発現マウスが多く作製され、リン酸化タウの蓄積が認知機能障害を惹起することが示されてきた^{1,2)}。また、近年では、シナプスにもタウが存在し、グルタミン酸受容体の取り込み制御に関わっている可能性も示唆されている^{3,4)}。

長期的に見れば、認知症を予防もしくは治療する手だてを講じるためには、まずアルツハイマー病をはじめとする認知症の発症過程や進行過程を理解することが必要であろう。その中には、所謂「記憶・学習」において、タウがどのような役割を果たしているかを理解することも含まれる、と私は考えている。そこで本研究では、その点についてアプローチするべく、予備的な検討を行うこととした。

従来のタウ研究では、タウを過剰発現させたマウス、および欠損させたマウスが用いられ、多くの知見が得られてきた。上記で示した知見も、その一部である。しかし、一方で、多くのデータが世に溢れてくる中で、遺伝子操作に依る影響が皆無とは言えず、それぞれのモデルで、何処までが生理的に意味があるデータなのか、どの部分がartifactなのか、ということが問題になってきた。もし、遺伝子操作を伴わず、リン酸化タウのレベルを増加、ないしは減少させることが出来れば、従来の過剰発現モデルと欠損モデルとの間を繋ぐものであり、生理的意義のあるデータの抽出に貢献できるものと思われる。

そこで、私はこれまでに野生型マウスを用いて、内在性タウのリン酸化が変動する条件を探索してきた。その過程で、タウのリン酸化を亢進させる条件として間歇的低酸素負荷 (Intermittent hypoxia treatment; IHT)を見出した⁵⁾。また、タウのリン酸化を減少させる条件も新たに見出した。ここでは、それらのモデルを用いた検討の一部を報告する。

材料と方法

1) 実験動物

C57BL/6Jマウス(オス, 9週齢)を購入し、1週間後から

実験に使用した。動物の取り扱いに際しては、埼玉医科大学実験動物部門の定める規定を厳守した。

2) 間歇的低酸素負荷 (Intermittent Hypoxia Treatment; IHT)

マウスに間歇的低酸素負荷 (IHT)を施した⁵⁾。マウスをチャンバーに入れ、そこに窒素ガスを約 16 L/minで1分間注入し、マウスケージ内の酸素濃度を5%まで低下させた。その後、酸素濃度21%の室内空気を約 14 L/minで2分間注入し、マウスケージ内の酸素濃度を21%まで回復させた。この3分間の操作を1日8時間(9時~17時)、28日間行った。

3) Y字迷路

行動試験はY字迷路装置を用いた。三本のアームをそれぞれA, B, Cとし、三本のアームの延長線が交わる正三角形内にマウスを置き、10分間、迷路内を自由に探索させた。マウスが進入したアームを順に記録した。異なるアームに3回連続で進入した場合を「コレクト」、それ以外の場合を「エラー」とした。そして、評価は総進入回数及び交替行動(コレクトの数)を総進入回数-2で割って100をかけた値(交替行動率)を求めることによって行った。

4) 新奇物体探索試験

まず試験ケージ内に、同一の物体Aを2つ置き、自由にマウスに10分間探索させた。その後、ホームケージに戻し、5分間置いた。その後、試験ケージの方は、片方の物体を新たな物体Bと取り替えておき、マウスに5分間探索させた。このときのA, Bそれぞれの物体を探索する時間を T_A, T_B とし、 $(T_B - T_A) / (T_A + T_B)$ で定義されるIndexを算出した。

5) サンプルの調整

脳組織は、タンパク質分解酵素阻害剤を含むTris-buffered saline (TBS)中で破碎し、超遠心に供し、TBS-soluble画分(上清)を得た。ここに含まれるタウについて、一般的なWestern blotting法に依る解析を行った。

結果

1) 長期IHTによるY-maze試験への影響

これまでに私は、28日間のIHTが、顕著なタウのリン酸化亢進を引き起こすことを見出している。本研究では、これがY-maze試験の遂行に与える影響を調べた。マウスを対照群

及びIHT群に分け、処置前及び処置後にY-maze試験を実施した。

総進入回数は、IHT群においてやや高い傾向が認められたものの、特に有意な差は検出されなかった (Fig.1 A)。また、交替行動率にも差は認められなかった (Fig.1 B)。よって、長期IHTによって引き起こされるリン酸化タウの増加は、作業記憶には大きな影響を与えないと考えられた。

2) リン酸化タウが減少する条件の発見

すでに、IHTが内在性のタウのリン酸化を亢進させることを確認している。このモデルに対して、タウのリン酸化が減少するモデルがあれば、タウの生理機能解明を進める

ことが出来る。そこで私は、タウのリン酸化が下がる条件を探索した。その結果、ある処置 (特許申請等を鑑みて、以下、処置Aと略する) に着目した。処置Aを行うと、タウの総量自体には影響がないが、AT8という抗体で標識されるリン酸化タウは、顕著に減少することが分かった (Fig.2)。今後、IHT群と比較を進めていきたい。

3) タウのリン酸化減少が、新奇物体探索試験に与える影響

処置Aを行ってリン酸化タウが減少したマウスの認知機能を評価する目的で、新奇物体探索試験を実施した。これは、マウスが新しい物体を好んで探索する傾向を利用した試験である。その結果、処置Aの有無にかかわらず、新奇物体を見分ける能力には差がないことが分かった。

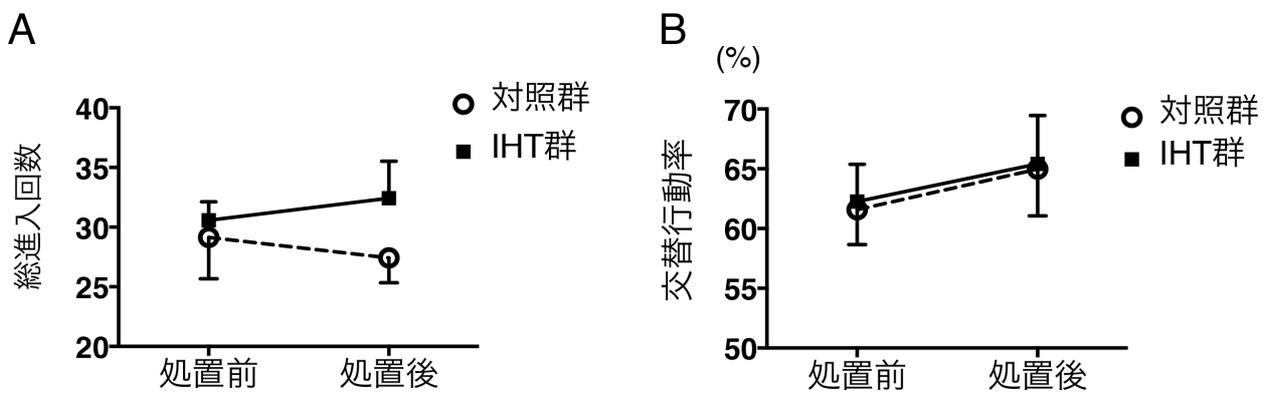


Fig. 1. IHT28日間がY-maze試験の結果に与える影響 (A) 総進入回数の結果を示す。対照群は、平均 - SEM (n = 7)、IHT群は平均 + SEM (n = 7) を示す。(B) 交替行動率の結果を示す。対照群は、平均 - SEM (n = 7)、IHT群は平均 + SEM (n = 7) を示す。

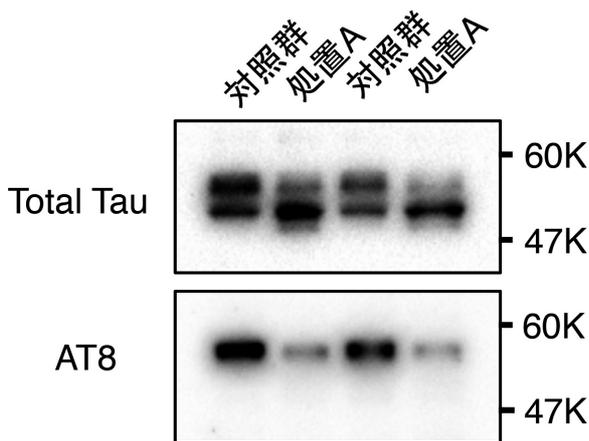


Fig. 2. 処置Aがタウのリン酸化に与える影響 対照群および処置Aを施されたマウスの脳組織からTBS可溶性画分を調整し、総タウ及びAT8陽性のリン酸化タウを検出した。

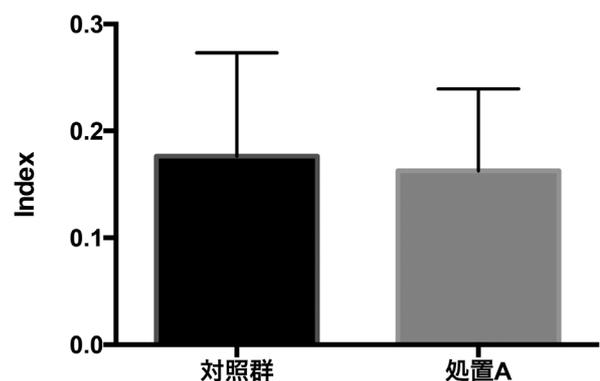


Fig. 3. 処置Aが新奇物体探索試験に与える影響 新奇物体を探索する程度を評価するIndexを示す。

考 察

本研究内では、まずタウのリン酸化が亢進した状態での Y-maze の評価を行ったが、有意な差は認められなかった。IHT という実験系は睡眠時無呼吸症候群のモデルであり、認知機能障害が認められることが報告されている。別の種類の記憶には影響がある可能性、または IHT を施す期間を長くすることで影響がある可能性が考えられるため、今後の検討課題としたい。一方で、顕著な認知機能低下を示さないことから、比較的、認知症初期のモデルであるとの解釈も成り立つ。

また、内在性タウのリン酸化が減少する処置を発見した。特許申請等の関係上、詳細は割愛するが、IHT と同様、比較的生理的な処置であり、タウの生理機能解明に踏み込める新たなモデルであると考えている。新奇物体探索試験では、特に差はなかったが、今後、別の種類の記憶に対する影響や、認知症モデルに対する処置 A が及ぼす影響等を検討していきたい。

謝 辞

薬理学教室、動物施設、中央機器施設関係者各位と助成をしていただいた埼玉医科大学に感謝します。また、行動試験のビデオ解析を一手に担ってくれた小林滯さんには、特に謝意を表します。

参考文献

- 1) Roberson ED, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 2007; 316: 750-4.
- 2) Kimura T, et al. Hyperphosphorylated tau in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human tau. *EMBO J* 2007; 26: 5143-52.
- 3) Kimura T, et al. Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B* 2014; 369: 20130144.
- 4) Yagishita S, et al. Glycogen Synthase Kinase 3beta-mediated Phosphorylation in the Most C-terminal Region of Protein Interacting with C Kinase 1 (PICK1) Regulates the Binding of PICK1 to Glutamate Receptor Subunit GluA2. *J Biol Chem* 2015; 290: 29438-48.
- 5) 鈴木正彦, 平成 26 年, 神経変性疾患モデルマウスを用いた新規行動解析法の構築と認知機能改善薬の探索, 埼玉医科大学雑誌, 第 41 巻, 第 1 号 2014; 66-70

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

MYCのタンパク発現量を基軸とした高悪性度B細胞性リンパ腫の臨床病態の解明

研究代表者 菊地 淳(埼玉医科大学総合医療センター 病理部)

研究分担者 百瀬 修二¹⁾, 田丸 淳一¹⁾, 得平 道英²⁾

緒言

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)は悪性リンパ腫の中で最も多い疾患単位で, その実態は組織像, 分子遺伝学ならびに臨床病理学的にきわめて多様である¹⁾. 今日まで, この多様なDLBCLの亜分類が多くなされ, とりわけ遺伝子発現プロファイルを用いたGerminal center B-cell (GCB)とActivated B-cell (ABC)を正常対応細胞とする2つ亜型からなる分類は, 現在では免疫組織化学染色(IHC)に応用され, 広く用いられている^{2,3)}. 一方, MYCが関与する転座はBurkittリンパ腫で古くから知られていたが, DLBCLの一部にもそうした症例が存在することが近年明らかとなってきた. さらに臨床病理学的解析からMYC転座を有する症例は, 予後不良であるとする報告がある一方, そうでないとの報告もあり, 今後の検討課題となっている⁴⁾. さらにMYC転座に加えてBCL2やBCL6転座を付加的に持ついわゆる“double hit lymphoma/triple hit lymphoma (DHL/THL)”と呼ばれる一群が存在し, 既存の治療法に奏功せず, 予後不良群としての認識が高まっている⁵⁾. MYCの発現に関しては, 転座を基軸とするのか, あるいはタンパク発現を基軸とするのか, さらにタンパク発現を基軸とした場合, その陽性率のcut off値をどうするかといった問題が新たに生じ, より客観性のある定量法が求められている. タンパク発現の評価法として, 現在, 病理組織検体において3, 3'-diaminobenzidine (DAB)発色を用いたIHCが主流であるが, 反応時間, 温度, 基質濃度などに酵素活性が影響され, 染色結果のバラツキの原因となっており, ひいては観察者内あるいは観察者間の再現性など客観性の問題の原因ともなっている.

そこで我々は, コニカミノルタ株式会社によって開発された新規タンパク定量法である蛍光ナノ粒子を用いたPID (Phosphor Integrated Dot)法に着目した. PID法では, 既存の蛍光色素と比較して10000倍の輝度を有し, また耐光性も10倍以上で, 高輝度・高耐光性を有するという点が大きな特徴である⁶⁾. さらに既存のDAB発色では低発現群における定量的な問題が存在するが, 本システムでは広い

ダイナミックレンジを示すため, 低発現から高発現までの検出が可能となっている. こうした特性を踏まえると, 既存のIHCでは検出されえなかった範囲を含め, タンパク発現をより定量的に測定できることが期待される.

材料と方法

1) 症例の抽出およびMYCに対する免疫組織化学染色

総合医療センター病理部で2002-2015年までに診断され保管しているR-CHOPが施行されたDLBCL症例を抽出し, 年齢・予後などの臨床病理学的事項を踏まえたリストを作成し, その患者検体症例の初発時ホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)ブロックから組織マイクロアレイ(TMA)を作製した. このTMA検体を用いて, MYC(clone Y69, Rabbit monoclonal, Epitomics, Inc.)に対するIHCを行った. MYCのIHC-DAB発色による発現解析を独立した3人の病理医によって行い, 乖離が生じた際にはマルチヘッド顕微鏡による討議と同意の後に, 結果を算出した. 現在標準となっているDAB発色によるMYCタンパク発現のカットオフ値は40%であるので, 40%以上を陽性と判断した. その際, 核内での強度は問わない. 今回, 40例のDLBCL症例にて臨床病理学的検討を行った. 統計的解析には関してはEZRを用いて行った.

2) PID法を用いたMYCタンパク検出法の確立

MYCタンパクを強発現すると考えられる5つの異なるBurkittリンパ腫細胞株のタンパク発現をウェスタンブロットにて検討し, MYCの定量化を行った. 次にこれらの細胞株を用いたCell blockを作成し, MYCのIHCのDAB発色(MYC-DAB)による結果とPID法(MYC-PID)による定量結果を解析した. さらに実際の組織検体としてヒト扁桃について検討し, あわせて当院のDLBCL40例についても検討を行った.

結果

1) PID法によるMYCタンパク発現定量系の確立

Burkittリンパ腫培養細胞株を用いてウェスタンブロットと同時にDAB発色によるIHC-DABにてMYCの発現について検討した. 結果, MYCの発現はウェスタンブロットとIHC-DABで正の発現相関が認められた. さらに

1) 埼玉医科大学総合医療センター 病理部

2) 埼玉医科大学総合医療センター 血液内科

MYC-PIDの検討で、MYC-PIDの粒子数とウェスタンブロットの発現量に正の相関が認められた。

次にヒト扁桃でのMYC-DABとMYC-PIDの結果、ヒト組織においてもMYC-PIDはMYC-DABでの染色結果と良好な相関が認められた(図1)。以上、我々は蛍光ナノ粒子を用いたMYC-PIDの系を確立した。

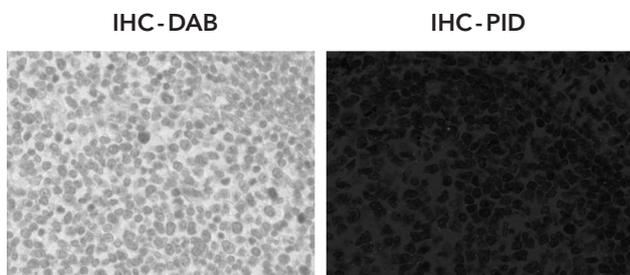


図 1.

2) DLBCLのMYC-PID法によるMYCタンパク定量化の結果

DLBCLにおけるMYC-DAB法とMYC-PID法におけるタンパク発現の定量法と予後に対する影響について検討した。

現在標準となっているIHCにおけるMYC-DABのカットオフ値は40%で、これを基準に当院のDLBCL40例について検討した。その結果、DLBCLにおいてMYC-DABでの陽性と陰性群において予後に有意な相関はみられなかった。一方、同症例においてPIDによるMYCの定量結果では、カットオフ値を3.4とした場合、その3.4以上の群は3.4未満の群と比べて有意に予後不良であった($p < 0.05$)。

考 察

DAB発色を用いたIHCはタンパク発現の評価法として主流である一方、酵素反応によって色素沈着を検出するため、反応時間や温度、基質濃度などに染色性が依存し、定量性や再現性などの問題がある。

悪性リンパ腫の中でもっとも頻度の高い疾患単位であるDLBCLはヘテロな疾患群であり、今日まで種々のバイオマーカーの検索がなされてきた。2000年以降、遺伝子発現プロファイルから見出されたGCBとABCの亜型は分子病態、遺伝子異常などの違いがみられ、今日でも予後階層化の分類の一つとして定着している。この分類はさらにIHCでも一般化されCD10, BCL6, MUM1の3つの抗体を用いたGCB, non-GCBの亜分類がなされている。しかしながらGCBとnon-GCBでの分類は必ずしも予後と相関しないとの指摘もなされ⁷⁾、治療層別化をするまでには至っていない。

FISHの普及はDLBCLにおけるMYC転座症例群の抽出を可能にし、それらが予後不良であることを示す報告が相次いでなされた⁸⁾。WHO分類の次版ではMYCおよびBCL2とBCL6の両方かいずれかに転座を有する症例がHigh grade B-cell lymphoma, with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangementとなり、MYC単独陽性例などを含めた

高悪性度B細胞リンパ腫がHigh grade B-cell lymphoma, NOSに分類されることが予想されるが⁹⁾、MYCを基軸としたDLBCLを含むB細胞リンパ腫の分類においてMYCの発現を再現的に定量することは、病理診断はもとより臨床病態ならびに治療層別化等を鑑みた際に重要である。

今回われわれは蛍光ナノ粒子を用いたPID法によるMYCのタンパク発現の客観的定量法を構築し、さらに本院でDLBCLと診断されR-CHOP療法で治療された40例に対してPID法によるMYCの発現と予後に対する影響を検討した。その結果、既存のDAB発色では見出しえなかった予後不良群をPID法で抽出できた意義は大きいものと考えられる。

MYCはもともと転写因子であり、MYCのタンパク発現量が下流の応答遺伝子群の制御に大きく関わり、とりわけMYCが増殖などのがん遺伝子として機能することを想定した場合にMYCタンパク量をその腫瘍の一定領域で定量することは重要であると考えられる。このことを踏まえ、MYCを基軸とした腫瘍の生物活性をみるには、その発現をある一定量域での平均値として測定することがより理に適っている。従って今回のPIDによる結果も、標本上の病変部における一定領域のMYCタンパクの定量を行うが腫瘍の悪性を反映することを示す結果と考えられた。今後より多くの症例かつ多施設での検討を行い、再現性をみる必要はあるが、今回の結果はMYCの発現量を定量することで治療の階層化を含めた臨床病理学的意義を見出したものと考えられた。

引用文献

- 1) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon France: IARC; 2008: 233-44.
- 2) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-11.
- 3) Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004 103: 275-82.
- 4) Cai Q, Medeiros LJ, Xu X, Young KH. MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: biology, entity, differential diagnosis and clinical management. *Oncotarget* 2015 Nov 17; 6(36): 38591-616.
- 5) Abramson JS. The Spectrum of Double Hit Lymphomas. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2016 Dec; 30(6): 1239-49.
- 6) KONICA MINOLTA TECHNOLOGY REPORT, 2014(11): 68-72.
- 7) Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al.

Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 2011; 117(18): 4836-43.

- 8) Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, Briere J, Delarue R, Canioni D, Salles G, Parrens M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* 2015 Nov 26; 126(22): 2466-74.
- 9) Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H,

Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016 May 19; 127(20): 2375-90.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 百瀬修二, 菊地 淳, 高柳奈津子, 田丸淳二, 蛍光ナノ粒子を用いたMYCタンパク発現検出系の構築とその臨床病理学的意義, シンポジウム: ナノ科学が拓く病理の明るい未来, 第105回日本病理学会総会, 平成28年5月, 仙台

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

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)

研究分担者 川野 雅章 *

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)は皮膚の白斑症を誘発するため、近年社会的問題になっている¹⁾。当初ロドデノールはチロシナーゼと結合しその働きを抑制するだけでなくヒドロキシロドデノール(ロドデノール自体より有毒)に変化しメラノサイトのアポトーシスを誘発するという報告がされたが²⁾、このアポトーシス誘導に必要なロドデノールの濃度は実際の皮膚局所で生じうる濃度の100倍以上と推測されている。さらに化粧品利用者のわずか2%しか影響を受けていない事や、免疫抑制剤(例えばタクロリムス)がロドデノール誘発性白斑に効果がある事など³⁾、当初考えられていた機序だけでは白斑症発症を説明することは難しい。アロステリック効果にみられるように、結合する基質の構造によっては酵素のコンフォメーションが変化することがあり、これによってプロテアーゼのアクセシビリティも変化し得る。そこで今回我々は、ロドデノールはチロシナーゼと結合する事により生理的には存在しないチロシナーゼ由来ペプチド断片(免疫学的非自己)を産生させ、T細胞の活性化が起こったという作業仮説のもと、研究を行う事にした。

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不全症(インスリン自己免疫症候群)からだった。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に高親和性で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。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⁴⁾。

何らかの環境要因が引き金となり、生理的には存在しない自己抗原(隠蔽自己ペプチド)を出現させ、自己免疫病を発症させる可能性が示唆される。我々は、ロドデノール誘発

性白斑症がインスリン自己免疫症候群と同様「隠蔽自己ペプチド(cryptic-self peptides)」を介した自己免疫病であること.HLA-DR4が遺伝要因であること。さらに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、ロドデノールはメラノーマに対する抗腫瘍免疫応答を誘導できるはずであると考え、メラノーマ動物モデルの治療の有効性を明らかにすることを本研究の目的とした。

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^{5,6)}。

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。同意を得られたロドデノール誘発性白斑の患者8名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、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)60wellの1well当たり 1.5×10^5 の細胞とTable 1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。

T細胞ラインのペプチド誘発性増殖反応

チロシナーゼペプチド($0.1 \mu\text{M}$ 当量)とX線照射(30 Gy)処理を行った自己PBMC(1.5×10^5)を96穴プレート(平底)を用いてT細胞(3×10^4)と共培養した。72時間培養後に $1 \mu\text{Ci/well}$ 濃度の $^3\text{H-thymidine}$ で16時間処理し、液体シンチレーションによって放射活性を測定した。

*医学部 免疫学

サイトカイン解析

患者R02, R07, R08 から得られたT細胞ラインは、ペプチド5 または 10 の存在下でX線照射した自己PBMC (4.5×10^5 /well) と共に 48 穴プレートを用いて共培養した。培養開始から2日後、培養上清を集め、IFN γ , IL-4, IL-5, IL-17, TNF α とGM-CSFをELISA測定法を用いて測定した。(R&Dシステム)。

ロドデノールによるB16メラノーマ(黒色腫)の治療

C57/BL6 由来のB16 黒色腫細胞を 10 %FCS/RPMIで培養し、ロドデノールと 20 μ g/mlで 18 時間共培養のち洗浄し、完全にロドデノールを除去した後に使用した。

メラノーマに対するロドデノール処理B16細胞免疫化の効果

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)を用い、ロドデノール処理したB16細胞とコントロールと

してmock処理したB16細胞をX線照射(60 Gy)し、PBSで調整後 2×10^6 個をマウスの背部皮下に免疫した。10日の間隔をあけて3回マウスに免疫し、最終接種から10日後、 2×10^6 個のX線照射無しのB16細胞を皮下接種し、腫瘍の長軸の長さを観察し続けた。

組織学的分析

ロドデノールとX線照射処理のB16細胞によって免疫され、腫瘍細胞を移植されたマウスより白斑・メラノーマ組織を採取し、10%の中性ホルマリンに固定しHE染色を行った。

結果

患者8名中7名がHLA-DR4陽性であった(Table 2)。(日本人集団でのHLA-DR4の陽性率は30-40%)そして、Table 2に示したように、チロシナーゼ由来の自己ペプチドに反応するT細胞を観察するとペプチド2, 5, 9, そし

Table 1. 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	FLLHHAFFVDSIFEQWLRHRP (p386-406)	DRB1*15:01
11	LLGGSEIWRDIDFAHEAPAFL (p188-208)	DRB1*04:05

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

Table 2. 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

HLA-DR4-associated alleles are underlined.

Increased frequency of DR4 : $p=0.0015$

て10に特異的だった。ペプチド2, 5はクラスI拘束性でTc17のサイトカイン産生パターンを示し、ペプチド9, 10はクラスII拘束性でTh0のパターンを示している。対象としてHLA-DR4陽性の健康人ボランティア3人から採血を行い同様の実験を行ったが、ペプチド選択性を示さなかった。これらの結果は、感受性にはHLAが遺伝要因として関与しており、患者PBMC中には自己チロシナーゼペプチドに特異的な自己反応性ヘルパーT(Th)細胞およびキラーT(Tc)細胞が存在することを示唆している。

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、ロドデノールはメラノーマに対する抗腫瘍免疫応答を誘導できるはずである。マウスを用いた実験では以下のような腫瘍抑制効果を認めた。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ける腫瘍の成長抑制を有意に示し、25日目の時点ではロドデノール処理群では0mm、対象群では10mmという大きな差が見られた(Fig. 1)。そして、予想通りロドデノール処理群は全身性の白斑症を発症した。同じ実験を4回繰り返したが、同様の結果を得る事が出来た(Fig. 2)。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ので、ロドデノールによる直接的な細胞障害は考えられない。自己の免疫系を介して起こった事象であると思われる。また、その組織像は腫瘍内への炎症細胞浸潤のみならず、真皮への細胞浸潤とその表皮内への浸潤が観察出来た。炎症細胞は単核球と、多核球からなっており、後者には少量の好酸球も含まれていた。

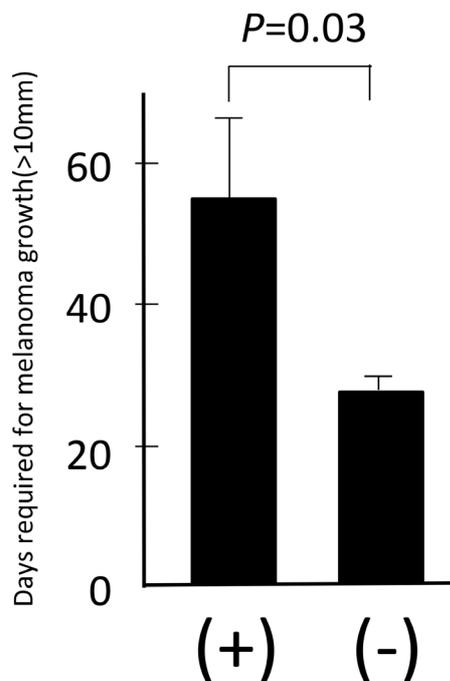


Fig. 1. Tx with rhododendrol.

考 察

チロシナーゼは抗体依存的細胞媒介細胞障害(ADCC)のためのターゲット分子になりえる⁷⁾。なぜならばGERLシステム(ゴルジ体Golgi apparatus→小胞体endoplasmic reticulum→リソソームlysosome)と関連した膜タンパク質であるからである⁸⁾。そして、それはエンドサイトーシスに関連しているだけではなくエキトサイトーシスも関連している。立体構造的に正常なチロシナーゼタンパク分子(ADCCに至ることができる)とIgG抗体が反応する場合、全身性の白斑症がロドデノールによって誘発され得る。しかし、患者におけるロドデノール誘発性白斑の発症は主に繰り返し化学物質と接触した部分に制限されている。患者Th細胞は主にTh1細胞で、ロドデノールの暴露に反応して、IgG反応よりもむしろTc細胞の生成を助けているように考えられるが、実際、患者とマウスメラノーマモデルの間には免疫活性のメカニズムは格段に違いがある。これは、マウスはロドデノール処理し照射したB16細胞を皮下に免疫された間、患者の免疫細胞は本来の場所である表皮のみでロドデノール処理された皮膚メラノサイトにさらされていることが考えられる。

結 論

- ロドデノール誘発性白斑症はHLA-DR4を遺伝要因とする自己免疫病である。
- ロドデノールはメラノーマの免疫療法に応用可能である。

謝 辞

本研究は平成27年度研究マインド支援 Grant(若手限定)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。

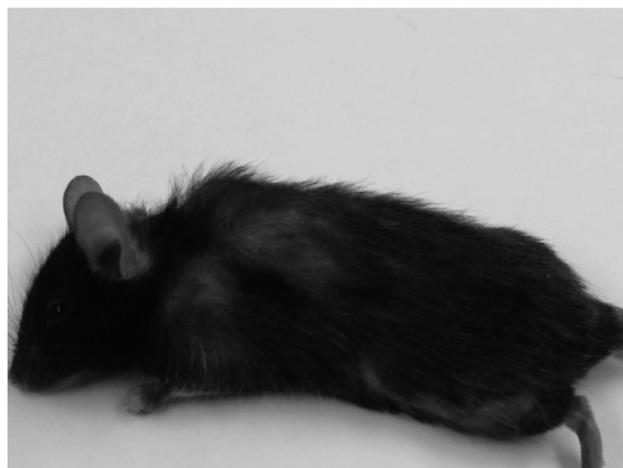


Fig. 2. Generalized vitiligo induced by immunization with rhododendrol-treated and irradiated B16 cells.

引用文献

- 1) Nishigori C, Aoyama Y, Ito A, Suzuki K, Suzuki T, Tanemura A, Ito M, et al. Guide for medical professionals (i.e. dermatologists) for the management of Rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol* 2015; 42: 113-28.
- 2) Sasaki M, Kondo M, Sato K, Umeda M, Kawabata K, Takahashi Y, et al. Rhododendrol, a depigmentation-inducing phenolic compound, exerts melanocyte cytotoxicity via a tyrosinase-dependent mechanism. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014; 27: 754-63.
- 3) Suzuki K, Aoyama Y, Ito A, Suzuki T, Tanemura A, Nishigori C, Ito M, et al. The Second Epidemiology Report of Rhododendrol-induced Leukoderma in Japan Based on a Nationwide Survey. *Jpn J Dermatol* 2014; 124: 3125-42.
- 4) Matsushita S, Takahashi K, Motoki M, Komoriya K, Ikagawa S, Nishimura Y. 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.
- 5) Topalian SL, Gonzales MI, Parkhurst M, Li YF, Southwood S, Sette A, et al. Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J Exp Med* 1996; 183: 1965-71.
- 6) Michaeli Y, Sinik K, Haus-Cohen M, Reiter Y. Melanoma cells present high levels of HLA-A2-tyrosinase in association with instability and aberrant intracellular processing of tyrosinase. *Eur J Immunol* 2012; 42: 842-50.
- 7) Imokawa G, Mishima Y. Isolation and biochemical characterization of tyrosinase-rich GERL and coated vesicle in melanin synthesizing cells. *Brit J Dermatol* 1981; 104: 169-78.
- 8) Broadwell RD, Oliver C. Golgi apparatus, GERL, and secretory granule formation within neurons of the hypothalamo-neurohypophysial system of control and hyperosmotically stressed mice. *J Cell Biol* 1981; 90: 474-84.

研究成果リスト

論文

- 1) Takagi R, Kawano M, Nakamura K, Tsuchida T, 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. 査読有

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

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

RNA 結合タンパク質と RNA との結合における RNA メチル化の意義

研究代表者 米田 竜馬 (医学部 ゲノム医学研究センター)

緒言

RNAもDNAやヒストンと同様にメチル化やアセチル化といった化学修飾を受ける。しかし、その生理的な意義については未解明な部分が多い。最近の研究によりRNAのメチル化がRNAとタンパク質との結合に影響を与え、mRNAの安定性に関与していることが報告された。この考えはRNAエピジェネティクスと呼ばれ、「RNAもDNAやヒストンと同様に、アセチル化やメチル化修飾を受け、これらの修飾が重要な機能を持つ」という概念である¹⁾。

RNAは、5' capとして知られる7-メチルグアノシン(m⁷G)の他に、5-メチルシトシン(m⁵C)やN6-メチルアデノシン(m⁶A)などのメチル化を受けることが知られている。しかし、その機能に関してはようやく報告が増えてきたばかりであり、m⁵C修飾とm⁶A修飾は、RNA-タンパク質間の結合を変化させることが示されている^{2,3)}。そこで、本研究ではRNAの中でもタンパク質をコードしないlong noncoding RNA (lncRNA)に注目し、そのメチル化/非メチル化により、RNA結合タンパク質との結合がどのように変化するのかを明らかにすることを目的とした。

Cyclin D1 (CCND1) 上流領域から転写されるlncRNAに注目して、RNAメチル化がRNA結合タンパク質との結合に及ぼす影響を調べた。CCND1は、細胞周期のG1/S期チェックポイントを制御しており、B細胞リンパ腫、乳がん、肺がん等で過剰発現が報告されている。その上流領域からは、DNA損傷によって誘導されるいくつかのlncRNAが発現している。これらのlncRNAがRNA結合タンパク質Translocated in Liposarcoma (TLS, またはFused in Sarcoma (FUS))と結合し、ヒストンアセチル基転移酵素(HAT)であるCBPのHAT活性を阻害することで、DNA損傷によるCCND1遺伝子の発現を抑制すると考えられている⁴⁾。今回は、発現しているlncRNAの中で最も発現量が高いlncRNA (promoter associated noncoding RNA-D (pncRNA-D))に着目して、pncRNA-DとTLSとの結合におけるRNAメチル化の効果を検証した。

材料・方法

本研究では主にヒト子宮頸がん由来のHeLa細胞を

用いた。HeLa細胞のRNAを抽出し、m⁵Cおよびm⁶A修飾を認識する抗体を用いたRNA免疫沈降法(RIPアッセイ)により、pncRNA-Dのメチル化部位を同定した。また、放射線の代わりに0.4 MのソルビトールをHeLa細胞に処理することで、pncRNA-Dの発現を誘導し、m⁶Aとm⁵Cという二つのRNAメチル化レベルがどのように変化するか観察した。またm⁶A修飾については認識するタンパク質を同定するため、YTHDF1 および 2, そしてYTHDC1 に対する抗体を用いたRIPアッセイを行った。

結果

1) pncRNA-Dのメチル化部位の同定

まず、pncRNA-Dのm⁵Cおよびm⁶Aの修飾部位の同定を行った。m⁵C修飾については、DNAのメチル化部位を同定するときに使用されるbisulfite法を用いた。その結果、m⁵C修飾はpncRNA-Dの72番目と277番目のシトシンに起こる事がわかった(図1)。m⁶A修飾に関しては、RRACH (R: A/G, H: G以外) 配列のアデノシンに起こりやすいことが分かっており、中でもGGACU配列のアデノシンに修飾が入ることが多い。pncRNA-Dには467番目のアデノシンがその配列にあたり、抗m⁶A抗体を用いたRIP後の次世代シーケンサー解析の結果でも、この配列が含まれる断片が多く検出されることから、467番目のアデノシンがm⁶A修飾を受けていると判断した。

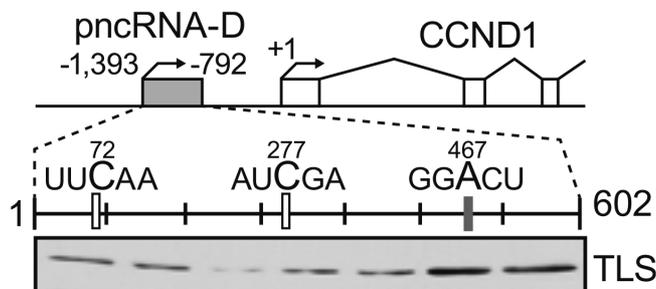


図1. 白いボックスはm⁵C修飾を受けるCを、黒いボックスはm⁶A修飾を受けるAの位置を示している。下にはpncRNA-Dの各断片とTLSとの結合をRNA pull down assay後のwestern blotの結果により検出した。

2) *in vitro* RNAメチル化系の確立

RNAメチル化が実際にpncRNA-DとTLSとの結合に影響を及ぼすかを検証するため、*in vitro* RNAメチル化系の立ち上げを試みた。m⁵C, m⁶Aのメチル化酵素としてそれぞれNSun2と、METTL3および14, WTAPが知られているため、これらのリコンビナントタンパク質を、大腸菌を用いて作製した。メチル化基質であるSAMを加え、RNAのメチル化を試みたが、メチル化を検出できなかった。原因として上記の酵素単体ではなく、複合体として機能していることが予想されたため、現在は細胞にFLAGタグをつけたNSun2とWTAPを発現させ、FLAGタグで複合体そのものを取ってきて、メチル化を試みている。

3) RNAメチル化によるTLSとの結合の変化

in vitro RNAメチル化系がうまく機能しなかったため、TLSとpncRNA-Dとの結合にRNAのメチル化が関与しているのかを間接的に調べた。初めにpncRNA-DとTLSとの相互作用におけるソルビトール処理による影響を見るため、TLS抗体を用いたRIPアッセイを行った。その結果、ソルビトール未処理の状態に比べ約2倍、結合が強まることを明らかにした(図2左)。一方で、m⁶A修飾レベルを調べた結果、ソルビトール処理後に著しく低下することが分かった(図2右)。さらに、pncRNA-DとTLSとの結合を詳しく検証した。具体的には、pncRNA-Dを7つの断片に分け、それぞれの断片をビオチン化し、どの断片がTLSと強い相互作用を示すかを検討した。その結果、m⁵Cとm⁶A修飾が起こる配列がTLSと強く結合することを明らかにした⁵⁾(図1下)。*in vitro*で合成したビオチン化pncRNA-D断片はメチル化を受けていないため、m⁵Cとm⁶A修飾はpncRNA-DとTLSとの結合を阻害している可能性が考えられる。

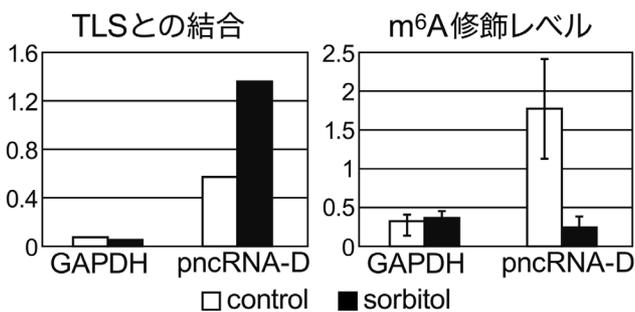


図2. ソルビトール処理後のpncRNA-DとTLSとの結合とm⁶A修飾レベル。

4) m⁶A修飾を認識するタンパク質の同定

m⁶A修飾は認識するタンパク質の違いにより、RNAに及ぼす影響が変わる。現在、認識タンパク質としてYTHDF1, YTHDF2, hnRNP-A2/B1, そしてYTHDC1が知られており、それぞれ翻訳促進, RNA分解, miRNA生成, そしてRNAスプライシングに関与しているとされる。これらのタンパク質のうち、hnRNAP-A2/B1を除

く抗体を用いたRIPアッセイを行った結果、pncRNA-Dは主にYTHDC1と結合していることが分かった。しかし、pncRNA-Dはスプライシングを受けていないので、YTHDC1との結合がどのような影響を及ぼしているのかを今後、明らかにしていく。

考察

上記の結果から間接的にはあるが、RNAメチル化がpncRNA-DとTLSとの結合を阻害している可能性が示唆された。もう一つの可能性として、pncRNA-Dの分解を促進する事によってTLSとの結合を阻害している事も考えられる(図3上)。しかし、ソルビトールや放射線による外部刺激により、pncRNA-Dの発現が強く誘導されると、RNAメチル化レベルは減少し、TLSとpncRNA-Dとの相互作用が強まり、最終的にCCND1の発現が抑制されると予想される(図3下)。

RNAメチル化とがんとの関連については、肺がんの細胞株を用いた研究により、転移の際に起きる上皮間葉転換に置いてMEG3というlncRNAのメチル化が関与していることが報告されている⁶⁾。CCND1も肺がんや乳がんを含む多くのがんで、その過剰発現が報告されていることから、pncRNA-Dのメチル化とがんとの関連も今後明らかに

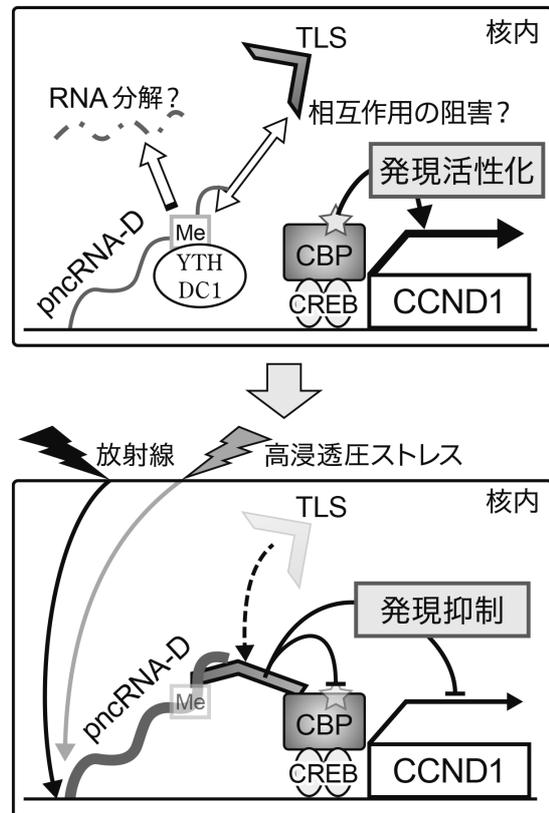


図3. pncRNA-DによるCCND1の発現抑制モデル図。通常時、pncRNA-Dは転写量が低くRNAメチル化レベルも高い(上)。しかし、放射線などによるストレスを受けると、pncRNA-Dの発現が誘導され、メチル化レベルが減少し、最終的にCCND1の発現を抑制する(下)。

していく。CCND1 の過剰発現はがん細胞の増殖異常を介して、予後の悪化につながる事が多く、CCND1 の発現を特異的に低下させる事で、上記のがんにおける治療へと本研究を進展させていく。

謝 辞

この研究は当部門・黒川理樹教授のアドバイスの下に遂行されました。また、HeLa細胞の培養には当部門の上田奈緒美助手にご協力頂き、次世代シーケンサー解析に関してはトランスレーショナルリサーチ部門の平田智子助手、並びに神田将和助教に多大なご協力を頂き、深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) He C. Grand challenge commentary: RNA epigenetics? *Nat Chem Biol* 2010; 6(12): 863-5
- 2) Amort T, Soulière MF, Wille A, Jia XY, Fiegl H, Wörle H, et al. Long non-coding RNAs as targets for cytosine methylation. *RNA Biol* 2013; 10(6): 1003-8
- 3) Wang Y, Li Y, Toth JI, Petroski MD, Zhang Z, Zhao JC. N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2014; 16(2): 191-8
- 4) Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G, et al. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* 2008; 454(7200): 126-30
- 5) Yoneda R, Suzuki S, Mashima T, Kondo K, Nagata T, Katahira M, Kurokawa R. The binding specificity of Translocated in LipoSarcoma/FUsed in Sarcoma with lncRNA transcribed from the promoter region of cyclin

D1. *Cell Biosci* 2016; 6: 4

- 6) Terashima M, Tange S, Ishimura A, Suzuki T. MEG3 long noncoding RNA contributes to the epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines. *J Biol Chem* 2016; [Epub ahead of print]

研究成果リスト

論 文

- 1) Yoneda R, Sato Y, Yoshida I, Kawamura S, Kotani T, Kimura AP. A genomic region transcribed into a long noncoding RNA interacts with the Prss42 / Tessp-2 in spermatocytes during mouse spermatogenesis, and its flanking sequences can function as enhancers. *Mol Reprod Dev* 2016, 83(6): 541-57
- 2) Yoneda R, Suzuki S, Mashima T, Kondo K, Nagata T, Katahira M, Kurokawa R. The binding specificity of Translocated in LipoSarcoma/FUsed in Sarcoma with lncRNA transcribed from the promoter region of cyclin D1. *Cell Biosci* 2016; 6: 4

学会発表

- 1) 米田竜馬, 鈴木志穂, 黒川理樹. The binding between lncRNA transcribed from CCND1 promoter and RNA binding protein TLS, 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月, 神戸

著 書

- 1) 米田竜馬, 黒川理樹. ポストゲノム時代に同定された転写活性型lncRNA群-eRNAによる転写活性化のメカニズム. *実験医学増刊* vol.33 No.20: 3274-5, (2015)

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

多重ストレス誘発性精神病態モデルにおける前部帯状回オシレーション異常の解明

研究代表者 篠崎 吏那 (医学部 生化学)

緒言

前部帯状回 (ACC) は前頭前皮質 (mPFC) に含まれ、扁桃体や海馬とも相互の神経連絡をもち、情動機能への統合的な役割がある。その背景として、mPFCの興奮が扁桃体の抑制をもたらし、いずれもが中脳腹側皮蓋野 (VTA) からのドーパミンの影響を受けることが解明されている。また、前部帯状回における神経回路オシレーション (特に速い周波数) は、覚醒時や注意時に頻繁に観察され、知覚等高次機能の基盤となることが推定されている。その際、異なる領野の脳機能を連合、統合し、局所回路内ではシナプス可塑性を調節することが重要である。また、GABA作動性ニューロンがオシレーションのリズミクな活動を起こすために重要な役割を担っている。

一方、精神疾患、特に統合失調症脳ではこのGABA作動性ニューロン機能が減弱していることがわかっている。殊に、カルシウム結合タンパク質のバルブアルブミン (Pv) 陽性GABAニューロンが本質的な役割を担っており、その機能の減弱が知られている¹⁾。

さらには、統合失調症等の精神疾患の増悪因子として、遺伝子背景とともに生後環境によるストレスが考えられ、ストレスによる直接的影響の一つとしてGABAニューロン機能減弱が予想されている。そこから考えられる結果としては、複数のストレスが加わるほど、前部帯状回におけるオシレーションの異常が強くなり、加えてアミン系の作用にも正常と異なるプロファイルが見られると予想される。それと並行してGABAニューロンおよびドーパミン受容体の数的質的变化が観察されることが期待される。

以上より、統合失調症を基本とした認知情動機能異常の病態の一面を理解するうえで各種ストレス負荷とGABA機能、オシレーション活動との相互関係を解析することは重要な意義をもつと考えた。そこで、methylazoxymethanol acetate (MAM, 細胞増殖阻害剤) 投与による統合失調症様モデルマウスの作製とそのオシレーション活動を解析し、それに加えて、生後直後の母子分離によるストレス、慢性拘束ストレスによる若年期のストレス、さらにそれらの組み合わせによる多重ストレスによるオシレーション活動の変化をGABAニューロン異常とアミン性修飾との関係に焦点を

あてて解析することを最終課題とし、本研究期間においてはその中の若年期の拘束によるストレスとオシレーション活動について解析を試みた。

材料と方法

本実験は埼玉医科大学動物実験規定に即し、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になるよう努めた。

慢性拘束ストレス

マウス (C57BL/6J) 雄に対し生後4週齢から7日間連日、1日にあたり2時間の身体的拘束を行った。具体的にはチューブにマウスを閉じ込め、動けないようにし、2時間後もとのケージへ戻した。コントロール群に関しては、そのままケージで飼育した。実験は最終日の翌日より行った。

強制水泳試験

拘束の最終日に行動学的な変化を調べるため、強制水泳試験 (24 ~ 26 °C の水中に6分間放った際に泳ぎを諦めて不動となる時間を測定) を行った。

電気生理

In vitro 電気生理学的実験としてマウスをイソフルラン吸入深麻酔下により断頭による安楽死後、脳を取り出してスライス切片を作製した。スライスは人工脳脊髄液 (ACSF : artificial cerebrospinal fluid; 組成: 120 mM NaCl, 3 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 15 mM glucose, 2.5 mM CaCO₃, 1.3 mM MgCl₂) を回復液として95% O₂-5% CO₂ 混合ガスで満たされたチャンバー内にて室温で1時間以上静置した。その後、前部帯状回領域の浅層から細胞外電極を用いてフィールド記録を行った。細胞内液には0.5 M NaClを使用した。スライス標本では自家発火が起きにくいいため、カイニン酸 (KA; グルタミン受容体作動薬) を使用し、オシレーションを誘発した。1枚のスライスに対してACSF灌流下で、カイニン酸を1分間暴露し誘発されたオシレーション (1st KA) と次にドーパミン (DA; 10 μM) またはノルアドレナリン (NA; 10 μM) をそれぞれ10分間

灌流させ、それら薬剤存在下でのカイニン酸を暴露し誘発されたオシレーション(2nd KA)とを比較した(図1)。データは、pClampにより解析し、power spectrum density (PSD)を θ (4-7Hz), α (7-12Hz), β (12-30Hz), γ (30-80 Hz)の周波数帯域に分けて積分し、powerの値を算出した。

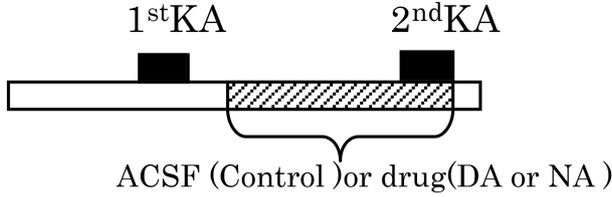


図1. カイニン酸(KA)暴露の手順。

結果

拘束をかけたことにより、CRS群はコントロール群に比べるとマウスの体重増加が少なく、胸線も委縮していた。副腎重量に関しては、やや増加傾向を示した(表1)。行動学的実験として、強制水泳試験を行った結果、拘束をかけると不動時間がやや短くなった(図2)。

表1. コントロール群とCRS群の体重, 胸線, 副腎重量

	コントロール群 (n=23)	CRS群 (n=18)	p
体重(g)	21.1	19.0	p<0.001
胸線(mg)	69.1	36.9	p<0.001
副腎(mg)	3.3	3.6	p<0.01

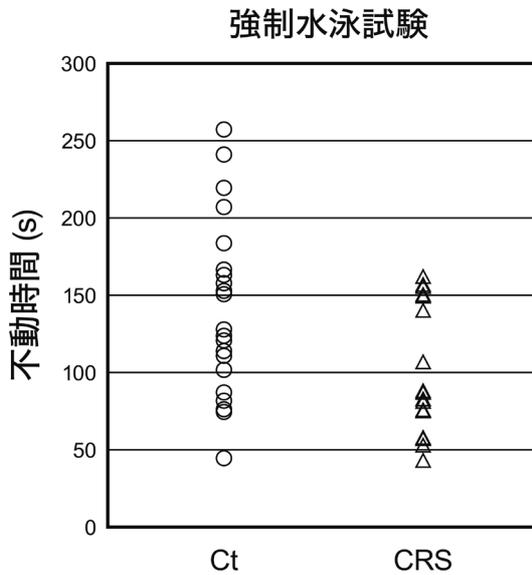


図2. 強制水泳試験の不動時間(s).

オシレーションに関しては、コントロール群と比べてCRS群のオシレーション活動は小さくなった。周波数帯域を解析してみると、特に β 帯域での統計学的に有意な減少がみられた(図3, 4)。

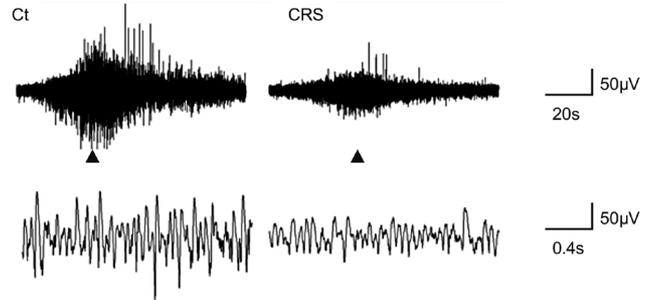


図3. 3 μ Mカイニン酸を暴露したときのオシレーションと拡大図: 左図がコントロール群(Ct), 右図が拘束をかけたマウス(CRS)。

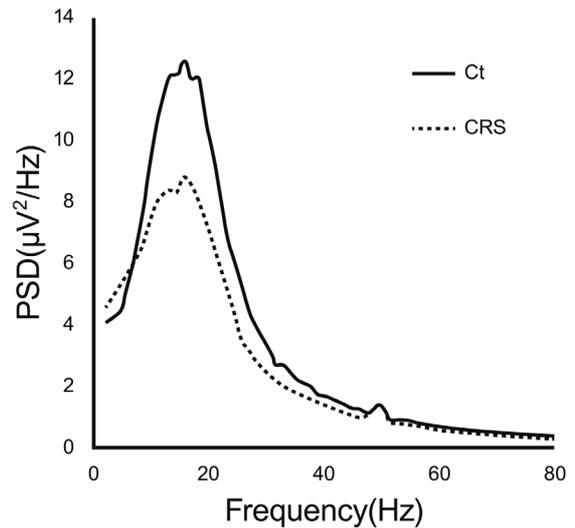


図4A. 3 μ Mカイニン酸を暴露したときのオシレーションのパワースペクトルの平均(実線がCt, 点線がCRS) Ct recording: n=85, CRS recording n=92.

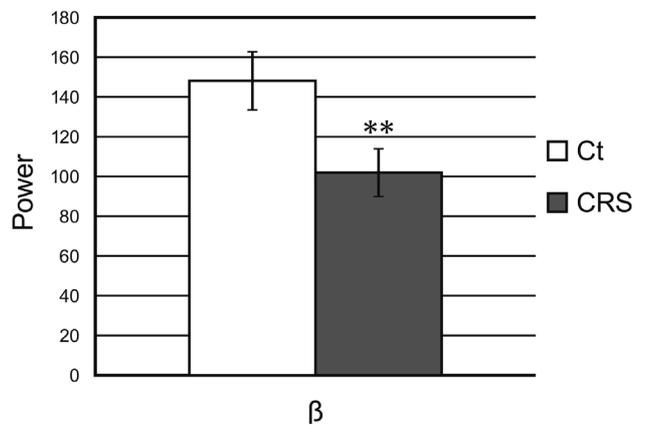


図4B. オシレーションパワー β 帯域(13-30 Hz)のCtとCRSの比較 ** p < 0.01 (Mann-Whiney U-test).

また、同じスライス上で 1st KA と 2nd KA のオシレーションパワーの比率をコントロール群と CRS 群で比較することで DA および NA の修飾作用を解析したところ、CRS 群では DA の増強が非常に強く、特に θ 領域において有意に大きかった。これに対し、NA はコントロール群と CRS 群の間で差がなかった。

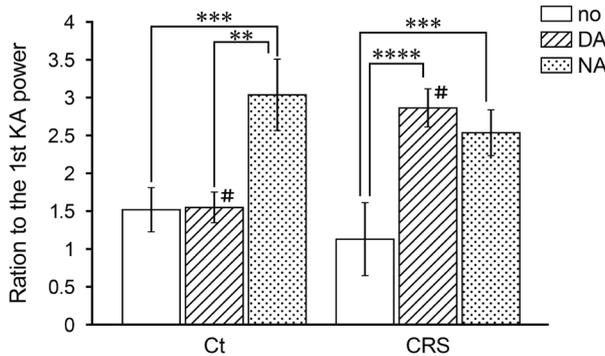


図 5. θ 領域 (3-8Hz) での 2nd KA / 1st KA 比率
 ** p<0.01, *** p<0.005, **** p<0.001
 #; Ct (DA) と CRS (DA) で p<0.01 (2要因分散分析).

考 察

拘束をかけたマウスの胸線が萎縮していたことや、副腎重量がやや増加していたため、ストレスをうけた効果が表れたと思われる。また、強制水泳テストで不動時間が短くなったことから、行動量が増加したと考えられる。

電気生理学的実験では、拘束をかけたマウスの KA 誘導によるオシレーションパワーの減弱がみられた。先行研究よりストレスを受けると GABA 機能の減弱が起こることが分かっている²⁾。このことから、GABA ニューロンの数

の減少もしくは GABA シナプス機能の抑制が考えられる。

θ 領域では、拘束をかけたマウスでは DA 存在下でオシレーションパワーの比率が増加した。この結果から、アミン系の修飾作用の少なくとも一部に影響を与えていることが示唆された。

参考文献

- 1) Cunningham MO, Hunt J, Middleton S, LeBeau FE, Gillies MJ, Davies CH, et al. Region-specific reduction in entorhinal gamma oscillations and parvalbumin-immunoreactive neurons in animal models of psychiatric illness. *J. Neurosci* 2006; 26: 2767-76.
- 2) Ito H, Nagano M, Suzuki H, Murakoshi T. Chronic stress enhances synaptic plasticity due to disinhibition in the anterior cingulate cortex and induces hyper-locomotion in mice. *Neuropharmacology* 2010; 58: 746-57.

研究成果リスト

論 文

- 1) Shinozaki R, Hojo Y, Mukai H, Hashizume M, Murakoshi T. Kainate-induced network activity in the anterior cingulate cortex *Neuroscience*. 2016.06. 325: 20-9.

学会発表

- 1) 篠崎吏那, 北條泰嗣, 向井秀夫, 橋爪幹, 村越隆之. カイニン酸誘導性前帯状回神経回路オシレーションの特性と慢性エタノール投与の作用, 第 39 回日本神経科学学会大会, 平成 28 年 7 月, 横浜

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

扁桃体依存的な恐怖条件付け記憶に対する断眠ストレスの影響に関する研究

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基底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を引き起こすことが知られており、恐怖記憶獲得の細胞モデルであると考えられている。また、動物は電気ショックを与えられた場所のことを強く記憶しており、電気ショック負荷の翌日に同じ実験用ケージに入れると、やはり長い時間硬直する様子が観察される。この現象には扁桃体だけでなく空間記憶を司る海馬も関係していることが知られている。

扁桃体と海馬はともに大脳辺縁系に属しており、また相互に神経軸索を送り合っている。それゆえ、恐怖条件付け記憶の想起時にこの2つの部位から細胞外記録を行うと、 θ 帯域(4-8 Hz)のオシレーション活動の同期が上昇していることが知られている。一方、個々の扁桃体基底外側核の錐体細胞は周辺の抑制性介在ニューロンから周期的な入力を受け取っている。この自発性の抑制性オシレーション活動(0.1-3 Hz)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が必要としている。最近、我々の研究室ではこのオシレーション活動が断眠ストレス負荷によって減弱することを示してきた。この現象が扁桃体機能にどのような生理的意義をもたらしているかはいまだ解明されていないが、海馬との関わりから記憶の固定などに影響を与えているのではないかと予想される。

本研究ではラットの恐怖条件付け学習が、条件付け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が誘発された場合に、どのような影響を受けるのかを解析する。それによってオシレーション活動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。

生後2-3週齢のラットをFear Condition実験用ケージに入れ、3分間自由に行動しているときの様子をビデオカメラで撮影した。その後卓上型ショッカースクランブラーを使って1mA、1秒間の電気ショックを与え、それを7-15秒間隔で10回繰り返した。電気ショック終了後、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。それから24時間後、ラットを再びFear Condition実験用ケージに入れて3分間自由行動させ、その様子をビデオカメラで撮影し、電気ショック負荷前と負荷1日後の動画から動物の硬直時間を計測した。そして3分の自由行動時間に対する硬直時間の割合を算出して比較した。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断眠ストレスを負荷した。断眠ストレスは水深2-3cmの水と、同じ高さの小型プラットフォーム(直径4cm程度)を設置した飼育ケージにラットを3時間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実験を行う場合は、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。

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・走行し、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し、後肢で立ち上がって垂直方向を探索し、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。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後のラットでは、その24時間後に実験用ケージに入れたときにこのような行動をしている時間が著しく減少し、身体をまったく動かさない硬直時間が1日目と比較して有意に上昇した(図1)。

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、学習を行ってから断眠したラットは恐怖記憶が正常に形成されていた一方、断眠を行ってから学習を経験したラットでは記憶の形成が充分ではなく、硬直時間が有意に減少していた。

考 察

本研究の結果、ラットの文脈依存的な恐怖条件付け記憶は、その直前に断眠ストレスを受けていた場合にのみ、定着しにくくなることが明らかとなった。一方で学習後に断眠ストレスを負荷した場合には記憶の定着に影響が

なかったことから、扁桃体基底外側核の抑制性オシレーションは記憶の獲得時において、正常な活動レベルが保たれている必要があると考えられる。

また恐怖記憶の獲得と抑制性オシレーションの関係について、現時点では記憶の獲得とパワーの減少は関連のある要素なのか、まったく独立の現象であるのかは区別できない。今後は記憶獲得の程度(硬直時間の長さ)とパワーの大きさとの間に相関関係があるかどうかを詳細に分析していく予定である。

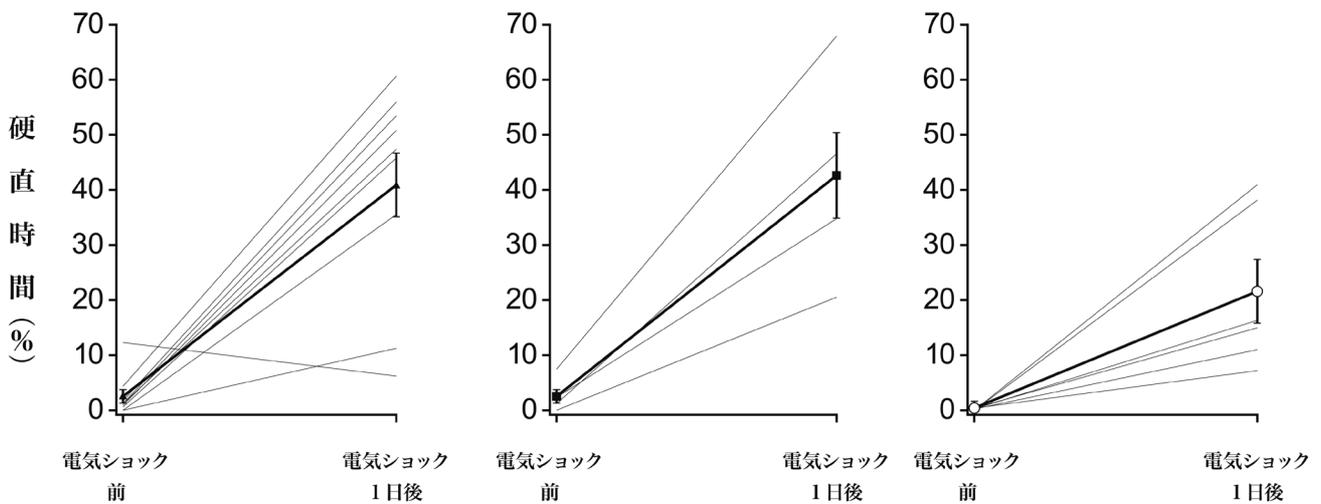


図 1. 電気ショック負荷前後の硬直時間。硬直時間は180秒間の全撮影時間あたりのラットの停止時間で表示した。それぞれ恐怖条件付け学習のみを行った9匹(左)、学習後に3時間断眠を行った5匹(中央)、学習前に3時間断眠を行った6匹(右)のデータと、その平均値をグラフに示している。

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

急性ストレス時に帯状回で起こるシナプス変化とその分子メカニズムの解明

研究代表者 北條 泰嗣 (医学部 生化学)

緒言

長期間にわたる慢性ストレスは、神経細胞を萎縮させ、樹状突起の分岐を減らす。重篤化すると神経細胞の脱落も生じる。このような慢性ストレスの作用メカニズムは、以下のようによく知られている。すなわち、ストレスホルモン(ヒトではコルチゾール、げっ歯類ではコルチコステロン)が受容体(GR: glucocorticoid receptor)に結合し、GRが核に移行してDNAに結合し、遺伝子転写を制御するというメカニズムである¹⁾。

これに対して、一時間程度の急性ストレスでは、樹状突起の分岐の減少などの劇的な変化は起こらない。海馬を用いた先行研究において、コルチコステロン(corticosterone, 以下CORT) 1 μ Mを1時間作用させると、頭部の大きなスパイン(シナプス後部)が増加する現象を我々は発見した²⁾。これは遺伝子転写を伴わない、ステロイドの新しい分子メカニズムに基づくものであることも我々は証明した^{3,4)}。

前部帯状回(anterior cingulate cortex: ACC)は、注意・共感・意思決定といった高次の機能を司り、海馬と並んでストレスに対して脆弱な部位である^{5,6)}。しかし、この部位に対する急性ストレス作用については全く分かっていない。そこで、本研究では、ストレスホルモンであるCORTが前部帯状回に急性的に作用したときに、どのように応答するのか、(1)神経回路レベル(2)細胞・シナプスレベルで解析することを試みた。神経回路レベルでは前部帯状回が活動する時に発する、神経回路の発振現象(oscillation)に着目し、これがCORT作用時にどう変化するかを解析した。次に、そのような発振現象に必要な神経回路の構成要素のうち、どこにCORTが作用するのか、その作用サイトの特定を、GRに対する免疫組織染色を用いて解析した。

材料と方法

すべ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たうえで行われた。実験動物の使用数を減らすように努めた。実験動物にはC57/BL6J系統のマウス(両性)またはWistar系統のラット(両性)を用いた。

(1) 電気生理学的測定

スライス標本作成およびグルココルチコイド処理

イソフルランを気化させた麻酔によりマウスを深麻酔した後、断頭して脳を取り出した。取り出した脳は直ちに95% O₂/5% CO₂混合ガスで飽和した氷冷Na-Choline Chloride置換液(組成: 120 mM 塩化コリン, 3 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 28 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 22 mM グルコース)中で冷却したのち、ろ紙上に移して小脳よりも後ろの部分を冠状断で除いた。続いてスライサー(Leica VT1000S, Germany)のチャンバー上に脳を固定し、チャンバー内を95% O₂/5% CO₂混合ガスにて飽和した氷冷Na-Choline Chloride置換液で満たし、前部帯状回を含む冠状断脳スライス(厚さ450 μ m)標本作成した。脳スライス標本は人工脳脊髄液(aCSF: artificial cerebrospinal fluid; 組成: 120 mM NaCl, 3 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 15 mM glucose, 2.5 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂)を回復液として、95% O₂/5% CO₂混合ガスで満たされたチャンバー内にて室温で1時間以上静置した。

急性ストレスを再現するために、脳スライス標本に1 μ MのCORT溶液を作用させ、さらに1時間静置した。対照群として、CORT溶液の代わりにaCSFを作用させ、1時間静置した脳スライス標本を用いた。

細胞外集合電位の記録

作成したスライス標本を、正立型顕微鏡ステージ上の記録用サブマージ型チャンバーに移し、前部帯状回のCg1領域における皮質表層(II/III層)を確認しながら記録を行った。記録中、スライス標本は、95% O₂/5% CO₂混合ガスで飽和したaCSF(32~33 $^{\circ}$ C)を灌流し(流速6 mL/分)、十分に酸素を供給した。記録電極はホウケイ酸ガラスキャピラリーを電極ブラーで加熱して作成し、電極内部は0.5 M NaClで満たした。電極は抵抗が2~4 M Ω のものを使用した。

前部帯状回の神経回路が発する発振現象(network oscillation)を再現するために、3 μ Mカイニン酸(kainite: KA)/aCSF溶液を1分間灌流し、前部帯状回の神経細胞を興奮させ、神経ネットワークを活動させた。ここからアンブ(WPI, DAM80, USA)を用いて細胞外集合電位を測定し、ADコンバータとソフトウェア(Axon Instruments,

Digidata1440A, USA) を介してコンピュータに取り込んだ。
データ解析

解析領域(60秒間)は、KA投与による細胞外集合電位が最大となる点を含むように設定した。本研究では、通常、KA灌流開始から40~60秒後にこの最大点が現れた。記録した細胞外集合電位は高速フーリエ変換(Fast Fourier Transform: FFT)を用いて、パワースペクトル密度(power spectral density: PSD)を計算し、各周波数帯域(θ : 3-8 Hz, α : 8-12 Hz, β : 13-30 Hz, low γ : 30-50 Hz, high γ : 50-80 Hz)のパワーをCORT投与群と対照群で比較した。

(2) 免疫組織染色

灌流固定から凍結切片作成

実験動物(マウスまたはラット)を深麻酔し、胸部を開いて心臓を露出させた。血液中に含まれるペルオキシダーゼを除去するために、ペリスタポンプを用いて心臓からPBS(組成: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 , 0.02% EDTA \cdot 4Na (w/v))を血管内に送り込んだ(灌流)。灌流液は、全て水冷した状態で送り込んだ。実験動物体内の血液がPBSに置き換わった時点で、灌流液をPBSから4%パラホルムアルデヒド/PBS溶液に切り替えて、約30分間灌流し、臓器を固定した。固定が終了した実験動物から脳を取り出し、4%パラホルムアルデヒド/PBS溶液に浸し、4℃で24から48時間、後固定(postfixation)した。後固定した脳を、凍結による組織の破壊を防ぐために、30%ショ糖溶液(30% sucrose in PBS (w/v))に浸し、脳が完全にショ糖溶液に沈むまで4℃で静置した(cryoprotection)。cryoprotection処理した脳の前部帯状回を含む領域を、冠状(coronal)に約2mmの厚さに切断し、コルク板の上に置き、水性包埋液(O.C.T. Compound; SAKURA, Japan)を用いて包埋した後、液体窒素で冷やしたイソペンタンに浸して急速凍結した。凍結・包埋した前部帯状回を含む脳組織は、使用直前まで-80℃で保存し、使用時にクリオスタット(CM1900; Leica, Germany)を用いて、-15℃において20~30 μm の厚さに切断し前部帯状回を含む脳切片を作成した。

免疫組織染色: ABC (Avidin-Biotin Complex) 法

前部帯状回切片を過酸化水素-メタノール溶液(0.3% H_2O_2 , in absolute methanol)に30分間浸し、切片内の内因性ペルオキシダーゼを失活させた。切片をPBSで洗浄した後、非特異的な抗体結合を防ぐために、ブロッキング溶液(5%正常ヤギ血清, 3%スキムミルク, 0.5% Triton X-100 in PBS)中に移し、室温で2時間浸透させた。

一次抗体溶液(anti-glucocorticoid receptor antibody - ChIP grade ab3579, abcam, USA)に脳切片を浸して4℃で抗原抗体反応させた。希釈率は1:1000、反応時間は18時間とした。

一次抗体との抗原抗体反応後、脳切片をPBST(0.5% Tween 20 in PBS)に5分間浸し、余分な一次抗体を洗浄した。洗浄は3回行なった。次にビオチン標識抗ウサギ

IgG抗体(Vector Lab.)を0.5%スキムミルク(0.5% skim milk in PBS)で希釈し(希釈率1:200)、ここに洗浄済みの脳切片を移して、ビオチン標識抗ウサギIgG抗体を一次抗体に結合させた。反応は、室温で30分間行なった。

ビオチン標識抗ウサギIgG抗体との反応後、PBSTを用いて脳切片を5分間3回洗浄した。次に、アビジン・西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体(Vector Lab., USA)を0.5%スキムミルクで希釈し(希釈率1:100)、ここに洗浄済みの脳切片を移して、アビジン・西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体をビオチンに結合させた。反応は、室温で30分間行なった。

アビジン・西洋わさびペルオキシダーゼ複合体との反応後、PBSTを用いて脳切片を5分間3回洗浄した。洗浄後の切片を発色液(0.05% diaminobenzidine: DAB, 0.1% H_2O_2 , 0.3% ammonium nickel sulfate in Tris-HCl buffer (pH 7.2))に2~20分浸し、GRを検出した。

発色した脳切片は、エタノール希釈列(20%, 40%, 80%, 100%のエタノール溶液)に5分間ずつ順次浸した後、キシレンに5分間浸して、脱水・透徹を行った。脱水・透徹した脳切片は、キシレン系封入剤(エンテランニュー)を用いてカバーガラス内に封入し、顕微鏡で観察した。

免疫組織染色: 蛍光二重染色法

ABC法で用いた抗GR抗体と、パルブアルブミン(parvalbumin: PV)に対する抗体を一次抗体として用いて、二重染色を行った。希釈率は抗GR抗体が1:500、抗PV抗体が1:1000とし、反応時間は18時間とした。

染色はABC法に述べた方法と同じ手順で行った。ただし、一次抗体処理ののち、ビオチン標識抗ウサギIgG抗体処理の代わりにAlexa Fluor[®] 488 標識抗ウサギIgG抗体(ThermoFisher Scientific, USA)を用いてGRの一次抗体に結合させて蛍光標識した。PVはAlexa Fluor[®] 555 標識抗マウスIgG抗体(ThermoFisher Scientific, USA)を一次抗体に結合させて蛍光標識した。二次抗体の希釈率はともに1:1000であり、反応時間は1時間である。蛍光標識した脳切片は、FluorSaveを用いてカバーガラス内に封入した。Alexa Fluor[®] 488およびAlexa Fluor[®] 555から発する蛍光は、蛍光顕微鏡(BZ 9000 またはBZ X710, Keyence, Japan)を用いて観察した。

結果

(1) 電気生理学的手法による前部帯状回神経回路発振

3 μM KAを1分間灌流し、前部帯状回の神経回路に発振を誘導したところ、対照群、CORT処理群ともに細胞外集合電位の発振活動が記録された(図1)。FFTを用いて、図1で記録された信号のパワースペクトル密度(PSD)を計算したところ、CORT処理群ではパワーが減少する傾向が観察された(図2)。各周波数帯域(θ : 3-8 Hz, α : 8-12 Hz, β : 13-30 Hz, low γ : 30-50 Hz, high γ : 50-80 Hz)に分割して解析した結果、ピークを示す帯域は対照群、CORT処理群ともに13-30 Hzの β 帯域で変わらなかった。パワーの減

少は β 帯域が最も大きかった。

(2) 前部帯状回におけるGRの局在解析

方法に述べたABC法に従い、ラット、マウスの前部帯状回を含む脳切片でGRの局在を検討した(図3)。DABを用いて発色させた結果、ラット、マウスともに前部帯状回に染色が確認された(図3左、マウスのみ)。染色された細

胞種を特定するために、抗PV抗体と抗GR抗体を用いて、蛍光二重染色を行った。その結果、ラットの前部帯状回において、PVを発現する細胞とGRを発現する細胞の一部が重なった(図3右)。マウスに関しては、この方法ではGRが染色されなかった。

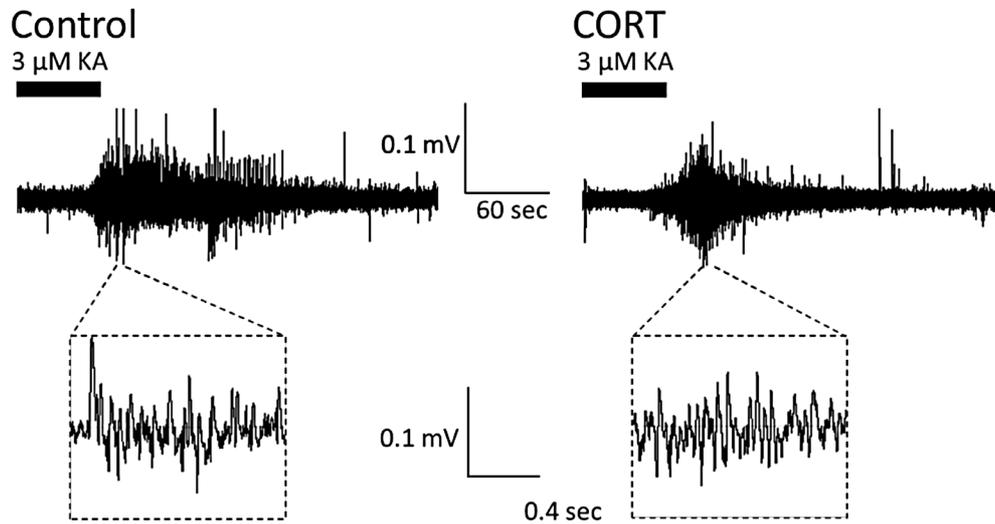


図1. 前部帯状回における細胞外集合電位の発振活動の例。前部帯状回スライスに $3 \mu\text{M}$ KAを1分間灌流し(黒横棒)、誘発される発振活動を解析した。Control: 対照群, CORT: CORT処理群。

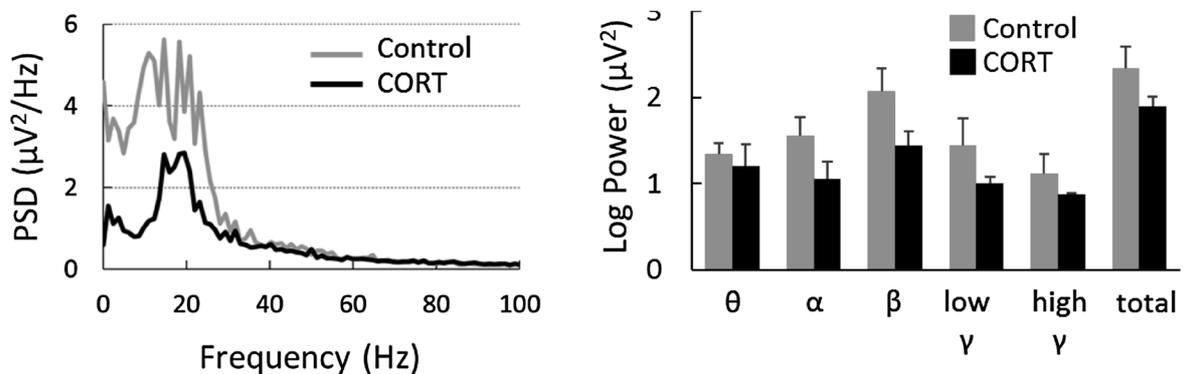


図2. (左) 前部帯状回細胞外集合電位の発振活動のパワースペクトル密度(PSD)の例。(右) 各周波数帯域におけるパワーの比較(対照群, CORT処理群ともに $n=3$)。CORT処理群でパワーの減少傾向がみられるが、有意差はなかった。

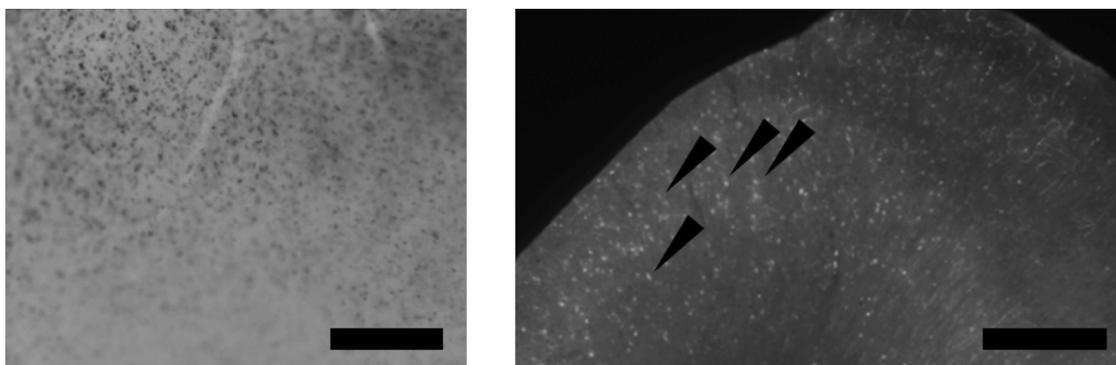


図3. (左) マウス前部帯状回凍結切片におけるGRの局在。DAB発色。前部帯状回にはGRが存在する。Scale bar, $300 \mu\text{m}$ 。(右) 抗GR抗体と抗PV抗体を用いた、ラット前部帯状回凍結切片の傾向二重染色像。GRとPVがともに発現する細胞が観察された(矢印)。Scale bar, $600 \mu\text{m}$ 。

考 察

本研究により, CORTは1時間程度の短時間で前部帯状回の神経回路の発振 (oscillation) を抑える傾向があることがわかった. このことから, 急性ストレスによって前部帯状回の神経回路活動が抑制されると示唆される. 前部帯状回の神経活動の発振は, この部位の機能と密接に関連しているという研究が報告されている⁷⁾. 本研究は, その機能を急性ストレスが弱めることを示唆するものである. 有意差は出していないが, これは実験の例数が未だ少ない (対照群, CORT処理群ともに3例ずつ) ためと考えられ, 今後, 実験を追加することで, 前部帯状回に対する急性ストレス効果を明らかにすることができると期待している.

前部帯状回の発振を生じさせる神経回路は, 興奮性のグルタミン酸作動神経と抑制性のGABA (gamma-aminobutyric acid) 作動性神経から構成される⁷⁾. 本研究では, 急性ストレスの作用サイトとしてGRを想定し, GRが神経回路のどの構成要素に局在しているかを解明することを試みた. その結果, PV陽性のGABA作動性神経にGRが局在していることがわかった. PV陽性のGABA作動性神経は, 別名fast-spiking neuronとも呼ばれ, 神経細胞の集団が同期して活動するタイミングを制御している⁸⁾. 本研究の結果から, CORTはPVに存在するGRを通じて神経細胞集団の活動の同期を弱め, 発振のパワーを減少させたと考えられる. ただし, DABによる発色では確認されたマウスのGRが, 蛍光染色においては観察できなかったことから, 蛍光染色の感度を向上させることが今後の課題である. また, 前部帯状回の神経活動の発振に関わる, 別の構成要素, 例えば, グルタミン酸作動神経やPV陽性以外のGABA作動性神経にGRが局在することの解明も必要であると考えられる. さらに, より微細なシナプスレベルの変化も観察したい (現在, 準備中).

謝 辞

本研究の遂行にお力添えいただきました, 埼玉医科大学研究マインド支援グラントに深く感謝申し上げます. また, 研究代表者の実験など様々な面でご支援くださいました, 埼玉医科大学化学教室の皆様がこの場を借りて厚く御礼申し上げます.

引用文献

1) McEwen BS, Morrison JH. The brain on stress:

vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron* 2013; 79(1): 16-29.

- 2) Komatsuzaki Y, Hatanaka Y, Murakami G, Mukai H, Hojo Y, Saito M, et al. Corticosterone induces rapid spinogenesis via synaptic glucocorticoid receptors and kinase networks in hippocampus. *PLoS One* 2012; 7(4): e34124.
- 3) Hojo Y, Munetomo A, Mukai H, Ikeda M, Sato R, Hatanaka Y, et al. Estradiol rapidly modulates spinogenesis in hippocampal dentate gyrus: Involvement of kinase networks. *Horm Behav* 2015; 74: 149-56.
- 4) Ikeda M, Hojo Y, Komatsuzaki Y, Okamoto M, Kato A, Takeda T, et al. Hippocampal spine changes across the sleep-wake cycle: corticosterone and kinases. *J Endocrinol* 2015; 226(2): M13-M27.
- 5) Jeon D, Kim S, Chetana M, Jo D, Ruley HE, Lin SY, et al. Observational fear learning involves affective pain system and CaV1.2 Ca²⁺ channels in ACC. *Nat Neurosci* 2010; 13: 482-8.
- 6) Singer T, Seymour B, O'Doherty J, Kaube H, Dolan R, Frith CD. Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. *Science* 2004; 303: 1157-62.
- 7) Uehara T, Sumiyoshi T, Kurachi M. New Pharmacotherapy Targeting Cognitive Dysfunction of Schizophrenia via Modulation of GABA Neuronal Function. *Curr Neuropharmacol* 2015; 13(6): 793-801.
- 8) Hu H, Gan J, Jonas P. Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science* 2014; 345(6196): 1255263.

研究成果リスト

論 文

- 1) Shinozaki R, Hojo Y, Mukai H, Hashizume M, Murakoshi T. Kainate-induced network activity in the anterior cingulate cortex. *Neuroscience* 2016; 325: 20-9.

学会発表

- 1) 北條泰嗣, 篠崎吏那, 橋爪幹, 村越隆之. 前部帯状回の神経回路発振に及ぼすストレスホルモンの影響. 第39回日本神経科学大会, 2016年7月, 神奈川県横浜市

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

乳がん・子宮がんにおける性ホルモン応答遺伝子の機能解明と治療標的への応用

研究代表者 佐藤 航 (ゲノム医学研究センター遺伝子情報制御部門)

乳がん、子宮内膜がんは共に女性ホルモンであるエストロゲンがその増殖に関与するホルモン依存性のがんであり、両者ともにエストロゲン受容体 α (ER α)を発現しているものが多い。エストロゲン受容体は、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性の転写因子として機能し、応答遺伝子の発現量を制御することによってがん増殖、進展に関わっている¹⁾。臨床においては、乳がんでは、ER α の機能阻害を目的としてアンタゴニスト(タモキシフェンなど)や、エストロゲン産生の阻害を目的としたアロマトラーゼ阻害剤などを用いたホルモン療法が行なわれている。しかし、治療過程においてホルモン療法に対して耐性を獲得するがんが生じることが問題になっており、このようながんに対しては有効な治療方法が存在しない。また、ホルモン療法に対して抵抗性を獲得した後もERが陽性のままであることが多く、その分子機構は不明である。子宮がんでは、ホルモン療法としてプロゲステロン療法が行われている。しかしながら、術後補助療法としてのホルモン療法による生存率の改善効果が乏しいことから、子宮がんではホルモン療法の使用は限定的である。これらの状況を克服するには、乳がんと子宮がんにおけるエストロゲン応答性の特異性、ホルモン療法に対する反応性、ならびにエストロゲン依存性から非依存性の増殖機構を獲得する過程におけるスイッチングのメカニズムなどを明らかにする必要があると考えられる。

我々は、エストロゲンシグナルの解明を目的に、エストロゲン応答遺伝子の同定、機能解析を進めている。Efpは乳がん細胞においてエストロゲン応答遺伝子として単離したものであり、Efp遺伝子の3'非翻訳領域にER α の結合配列が存在し、エストロゲンによって転写が活性化されることを見出した²⁾。Efpの生体における機能解明を目的にEfp遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作製したところ、子宮の低形成が認められるとともに、Efpのエストロゲン誘発性発現が消失しており、Efpは子宮の生理的機能に重要な役割を担うことが明らかになった³⁾。Efpの乳がんにおける作用に関しては、乳がん細胞MCF-7において、エストロゲン誘導性にEfpの発現が誘導されることが認められた。また、乳がんの臨床病理学的解析により、Efp免疫反応性がリンパ節転移、ER α の発現と正の相関があり、

組織学的グレードと負の相関があることが認められている⁴⁾。さらに、乳がん患者の無再発生存率および全生存率の多変量解析により、Efp免疫反応性は予後不良と相関することが示された⁴⁾。Efpを介する乳がんの増殖に関わるメカニズムとしては、Efpがユビキチンリガーゼとして、細胞周期チェックポイントとして機能する14-3-3 σ のユビキチン修飾を行い、プロテアソームによる分解を促進することを明らかにした⁵⁾。これらのことより、Efpがエストロゲン依存性のがん増殖に重要な因子であり、新たな治療標的となることが考えられた。

一方、近年、二本鎖RNAと相補的な塩基配列を持つmRNAが分解される現象を利用したRNA干渉(RNAi)の技術が、基礎研究のみならず、臨床応用を目指して開発されている。特に、21-23塩基の二本鎖低分子RNAであるsmall interfering RNA (siRNA)は、がん関連遺伝子の発現抑制を可能にする治療法への応用が注目されている。しかし、siRNAはしばしば標的遺伝子以外の遺伝子をノックダウンする(オフターゲット効果)ことが知られており、望ましくない副作用を引き起こす可能性が指摘されている。加えて、二本鎖RNAは、炎症性サイトカインおよびI型インターフェロンの産生を誘導することが知られており、副作用の要因の1つになりうる。最近、siRNA配列とRNAi活性との相関関係について系統的研究が行われ、オフターゲット効果が低く、且つ、遺伝子発現抑制有効に優れたsiRNA配列を検索するための新しいアルゴリズムが開発された⁶⁾。さらに、siRNAの一部の配列をDNAで置換したDNA修飾siRNA(キメラsiRNA)は、オフターゲット効果が少なく、免疫応答誘導性が低いことが明らかにされ、臨床での応用に好都合な性質をもつsiRNAとして期待されている。

そこで我々は、Efpを標的とする有効なsiRNAを設計するため、上記のアルゴリズムを用いて、有力な候補配列を複数得た。これらのEfpに対するsiRNA (siEfp)をMCF-7細胞に導入し、Efp遺伝子の発現抑制効率を評価し、最も発現抑制効果の高い配列を選別した⁷⁾。また、キメラsiEfpは、siEfpと同様に効率的にMCF-7細胞におけるEfp発現を抑制することが確かめられた。さらに、14-3-3 σ タンパク質の発現に対するsiEfpおよびキメラsiEfpの効果

を解析したところ、siEfpおよびキメラsiEfpは、MCF-7細胞における14-3-3σタンパク質の発現を増加させることが判明した。また、これらのsiRNAおよびキメラsiRNAをMCF-7細胞に導入したところ細胞増殖を抑制することが確かめられた。

MCF-7細胞の細胞周期進行に対するこれらsiRNAの影響を解析したところ、エストロゲン存在下ならびに非存在下においても、siEfpおよびキメラsiEfpはS期の細胞の割合を減少させ、反対にG0/G1期の細胞の割合を増加させることが確かめられた。

乳がん細胞の*in vivo*増殖に対するsiRNAおよびキメラsiEfpの効果を評価するため、MCF-7細胞を免疫不全マウスの皮下に注射し異種移植モデルを作製した。この形成された腫瘍にsiEfpを投与することにより、コントロールのsiRNA (siControl) と比較して有意に腫瘍増殖が抑制された。また、形成された腫瘍組織におけるEfpおよび14-3-3σタンパク質の発現レベルは、siControl処置マウスと比較して、Efpタンパク質の発現量は減少し、14-3-3σタンパク質の発現量は増加していた。また、同一の*in vivo*モデルを用いて、MCF-7細胞の腫瘍形成に対するキメラsiEfpの効果を調べたところ、キメラsiEfpはキメラsiControlと比較して、腫瘍の増殖を有意に抑制することが示された。キメラsiEfpを投与した腫瘍において、Efpタンパク質の発現が有意に抑制され、14-3-3σの発現が上昇することが認められた。これらの結果より、siEfpおよびキメラsiEfpが、乳がん細胞におけるEfp発現を特異的に抑制することにより、生体において腫瘍増殖を効果的に抑制することが示された。

加えて、Efpは子宮内膜がんにおいても発現しており、がん増殖に関与している可能性が考えられている。Efpは乳がんの約70%で発現しており、さらに、ERαの発現に関わらず、乳がんの独立した予後因子となることが示されている⁴⁾。従って、Efpは、ERα陽性の乳がん、子宮がんのみにとどまらず、ERαを発現していない内分泌抵抗性の乳がん、子宮がんにおいても新しい治療標的となりうる可能性が示唆された。

参考文献

- Muramatsu M, Inoue S. Estrogen Receptors: How Do They Control Reproductive and Nonreproductive Functions? *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 1-10.
- Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Kondo S, Toyoshima H, Kondo T, Ikegami A, Ouchi Y, Orimo H, Muramatsu M. Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11117-21.
- Orimo A, Inoue S, Minowa O, Tominaga N, Tomioka Y, Sato M, Kuno J, Hiroi H, Shimizu Y, et al. Underdeveloped uterus and reduced estrogen responsiveness in mice with disruption of the estrogen-responsive finger protein gene, which is a direct target of estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12027-32.
- Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, et al. Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6148-54.
- Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 2002; 417: 871-5.
- Ui-Tei K, Naito Y, Zenno S, Nishi K, Yamato K, Takahashi F, Juni A, Saigo K. Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 2136-51.
- Ueyama K, Ikeda K, Sato W, Nakasato N, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Knockdown of Efp by DNA-modified small interfering RNA inhibits Breast cancer cell proliferation and *in vivo* tumor growth. *Cancer Gene Ther* 2010; 17: 624-32.

研究成果リスト

論文

- Miyazaki T, Ikeda K, Sato W, Horie-Inoue K, Okamoto K, Inoue S. MicroRNA Library-Based Functional Screening Identified Androgen-Sensitive miR-216a as a Player in Bicalutamide Resistance in Prostate Cancer. *J Clin Med* 2015; 4: 1853.

学会発表

- 佐藤航, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡. エストロゲン応答遺伝子Efpを標的とする小分子核酸の子宮内膜がんモデルにおける治療効果. 第13回RCGMフロンティアシンポジウム, 2015年10月30日, 日高市
- Sato W, Abe Y, Nakasato N, Ikeda K, Urano T, Takeda S, Horie-Inoue K, Inoue S. Efp as a therapeutic target for endometrial cancer. The 14th RCGM International Symposium of Academic Frontier, November 11, 2016, Hidaka-shi, Japan.
- 池田和博, 佐藤航, 堀江公仁子, 井上聡. エストロゲン応答遺伝子Efpは子宮内膜がんの治療標的となる, 第23回日本ステロイドホルモン学術集会, 2016年1月15日, 倉敷市

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

網膜電図法による網膜における新規神経調節因子の機能の解明

研究代表者 平沢 統 (医学部 生理学)

緒言

脊椎動物網膜は、その構造(神経回路網の構造や神経細胞の形態など)が比較的規則的であり、かつ、入力(光刺激)と出力(神経細胞の応答)の関係を定量的に解析できるユニークな神経系である。

多くの網膜細胞間の神経伝達は、傍分泌性神経調節因子であるドーパミンによって調節され、その結果として光応答の明順応(光のまぶしさに眼が慣れる現象)が引き起こされる¹⁾。そのドーパミンは、網膜の介在ニューロンのひとつであるドーパミン作動性アマクリン細胞(DA細胞)によって傍分泌様に放出される。そして、そのDA細胞は一般的に抑制性神経伝達物質として知られているγ-アミノ酪酸(GABA)をも合成し²⁾、そのGABAはドーパミンと共に共放出される³⁾。一方、代謝型GABA_B受容体(GABA_B-R)がさまざまな網膜細胞のシナプス外領域に発現しており、これらは傍分泌様に作用するGABAの標的と考えられている⁴⁾。したがって、網膜においてGABAはドーパミンと同様に傍分泌性神経調節因子としても役割を果たしていると考えられる⁵⁾。しかしながら、それが網膜組織の光応答においてどのような役割を果たすのかについては不明である。

網膜電図法は、光刺激によって誘発された網膜電位の変化を記録することにより、網膜の機能(2次ニューロンの機能や順応状態など)を大まかに評価するものである。網膜の光応答には、光の明るさを伝える応答(ON応答)と光の暗さを伝える応答(OFF応答)があり、それぞれ網膜電図上ではb波、d波としてあらわれる⁶⁾。

b波(ON応答)に関してはほとんどの動物から記録できるが、d波(OFF応答)に関しては霊長類および冷血脊椎動物などといった錐体系OFF経路が発達している動物に限られる⁷⁾。一方、網膜電図の研究において広く使われているマウスなどではd波は観測できない(錐体系OFF経路が発達していないため)。このため、b波と比べるとd波の詳細な成り立ちの理解は不十分である。このため、さまざまな視覚情報処理に関与するON経路とOFF経路間の相互抑制(Crossover inhibition)⁸⁾の効果が、どのようにして網膜電図のON・OFF応答の変化として現れるのかについ

ては十分に検討されていない⁹⁾。

本研究は、網膜組織の光応答に対するGABA_B-Rの役割について網膜電図法で検討し、新規神経調節因子としてのGABAの役割を明らかにすることを目指すものである。当年度においては、その基盤研究として、錐体系経路が発達しているイモリの網膜電図がどの神経回路由来で成り立っているのかについて明らかにするための研究を行った。当研究の結果を踏まえ、今後は、網膜の光応答に対するGABA_B-Rの役割、すなわち、GABA_B-Rに作用する新規神経調節因子としてのGABAの役割を明らかにすることを目指す。

材料と方法

本研究は埼玉医科大学実験動物委員会によって承認され、埼玉医科大学動物実験指針に基づいて実施された。

眼杯標本と薬物投与: 氷冷麻酔したアカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)を断頭・脊髄穿刺した後に眼球を摘出し、角膜とレンズを取り除いて眼杯標本を作製した。そして、酵素処理(ヒアルローニダーゼ: 15 U/ml)によって網膜を覆っている硝子体を取り除き、灌流液から投与する薬物が網膜組織に到達するようにした。投与する薬物として、ON経路神経伝達の阻害剤(L-APB: Tocris)、OFF経路神経伝達の阻害剤(CNQX: Sigma)およびGABA_A受容体の阻害剤(Bicuculline: Sigma)を使用した。

網膜電図測定法: アクリル板を加工し、専用の記録用チェンバーを自作した。眼杯標本をチェンバーにセットし、網膜側が灌流液に浸るようにした。眼杯標本の網膜側と強膜側は硬質塩化ビニール板とシリコングリースによって電氣的に絶縁し、光刺激によってそこに発生する電位差を網膜電図として計測した。

光刺激法: ハロゲンランプ光をバンドパスフィルター(620 nm: 緑色)に透過し、刺激光とした。その刺激光は正立顕微鏡(オリンパスBX50-WI)の投光管から標本に照射した。光強度(明視野レベル: $1 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-7}$ W/mm²)はハロゲンランプの出力とNDフィルターを変えることにより制御した。光刺激のタイミングと照射時間はPCコントロール下の電磁シャッターで制御した。

結果

1. 網膜回路の神経伝達を阻害する薬物の効果

灌流液から投与した薬物が網膜組織に到達しているか確認するため、神経伝達の阻害剤の効果を検討した。コントロール時では光照射直後にON応答 (b波), 照射後にOFF応答 (d波) が現れた。神経伝達の阻害薬 (コバルト) を投与すると, その効果は網膜電図波形の大きな減衰として現れた (未発表データ)。この結果から, 外部から投与した薬物が網膜組織に到達していることが確認できた。

2. 特定の網膜回路に選択的に作用する薬物の効果

錐体系ON・OFF経路由来の光応答 (それぞれb波・d波) を計測し, それぞれの経路に特異的に作用する薬物の効果を確認した (図1)。ON経路神経伝達の阻害薬 (L-APB) を投与すると, その効果はON応答 (b波) の選択的な消失として現れた (図1A, B)。さらにOFF経路神経伝達の阻害薬 (CNQX) を加えると, その効果はOFF応答の減少として現れたが完全には消失しなかった (図1C)。この残った応答は視細胞由来のものと考えられる。

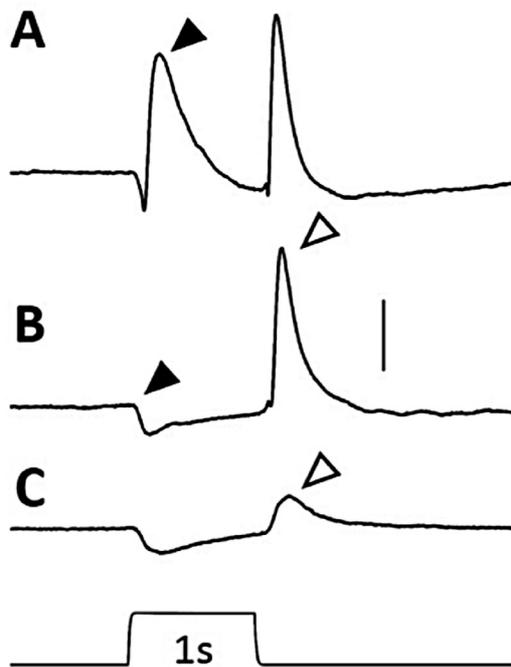


図1. 網膜電図上でのON・OFF経路阻害薬の効果 A: コントロール時では光照射直後にON応答 (b波: 黒矢印), 照射後にOFF応答 (d波) が現れた。B: ON経路神経伝達の阻害薬 (L-APB) を投与すると, その効果はON応答の選択的な消失として現れた (黒矢印)。C: さらにOFF経路神経伝達の阻害薬 (CNQX) を投与すると, その効果はOFF応答の減少として現れた (白矢印)。残った応答は視細胞由来のものと考えられる。最下段は光刺激 (1秒) のタイミング。スケール: 20 μ V。

つぎに網膜における抑制性経路の作用が網膜電図上でどのようにして現れるのかについて検討を行った。抑制性経路阻害薬 (Bicuculline: GABA_A受容体の阻害薬) を投与したところ, その効果は主にON応答の増大として現れた

(図2 灰色線上の矢印)。このことから, GABA_A受容体依存性の抑制性経路は主にON経路を持続的に抑制していると考えられる。

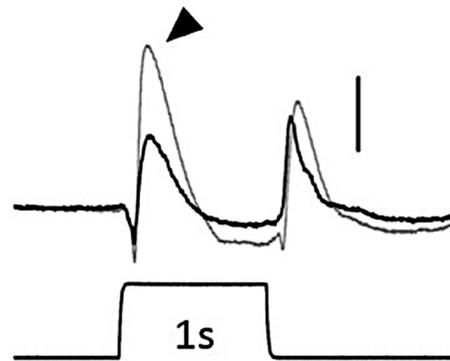


図2. 網膜電図上での抑制性経路阻害薬の効果 コントロール (黒線) と比べ, 抑制性経路阻害薬 (Bicuculline: GABA_A受容体の阻害薬) を投与すると, その効果は主にON応答の増大として現れた (灰色線上の矢印)。下段は光刺激 (1秒) のタイミング。スケール: 20 μ V。

考察

当研究において, これまで未報告であったイモリの網膜電図はON・OFF経路, および視細胞由来の応答からなり, とくにON経路がGABA_A受容体依存性の抑制性経路によって制御を受けていることが分かった。次のステップとして, ON・OFF経路および抑制性経路に作用する薬物を組み合わせて投与することにより, ON・OFF経路間の相互抑制 (crossover inhibition)⁸⁾の効果が, どのようにして網膜電図の変化として現れるのかについて検討を行う。これら一連の実験により, イモリ網膜電図のON・OFF応答の成り立ちのしくみを体系的に理解する。さらに以上の結果を踏まえた上で, 網膜の光応答に対するGABA_B-Rの役割, すなわち, GABA_B-Rに作用する新規神経調節因子としてのGABAの役割を網膜電図法で明らかにすることを目指す。具体的には, GABA_B-Rの抑制剤や増強剤の作用を網膜電図上で評価し, GABA_B-Rに作用する内在性GABAの役割を検討する。将来的にはよりヒトに近い哺乳類を用いた研究に発展させていきたい。

引用文献

- 1) Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol* 2004; 108: 17-40. Review
- 2) Kosaka T, Kosaka K, Hataguchi Y, Nagatsu I, Wu JY, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Hama K. Catecholaminergic neurons containing GABA-like and/or glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivities in various brain regions of the rat. *Exp Brain Res* 1987; 66: 191-210.
- 3) Hirasawa H, Betensky RA, Raviola E. Corelease of dopamine and GABA by a retinal dopaminergic neuron.

- J Neurosci 2012; 32: 13281-91.
- 4) Koulen P, Malitschek B, Kuhn R, Bettler B, Wässle H, Brandstätter JH. Presynaptic and postsynaptic localization of GABA(B) receptors in neurons of the rat retina. Eur J Neurosci 1998; 10: 1446-56.
 - 5) Hirasawa H, Contini M, Raviola E. Extrasynaptic release of GABA and dopamine by retinal dopaminergic neurons. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2015; 370. Review
 - 6) Dowling JE. The Retina: Cambridge (Massachusetts) The Belknap Press of Harvard University Press; 2012.
 - 7) Frishman IJ. Origins of the electroretinogram. In: Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision. Heckenlively JR, Arden GB, editors; London: MIT press, 2006, pp. 139-183.
 - 8) Werblin FS. Six different roles for crossover inhibition in the retina: correcting the nonlinearities of synaptic transmission. Vis Neurosci 2010; 27: 1-8. Review
 - 9) Popova E. ON-OFF Interactions in the Retina: Role of Glycine and GABA. Current Neuropharm 2014; 12: 509-26. Review

研究成果リスト

本研究における研究成果の学会・出版物への発表はまだなされていない。