

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

丸木記念特別賞受賞

ゲノム編集法を利用した破骨細胞分化における *Nfatc1* アイソフォームの機能解析

研究代表者 佐藤 浩二郎 (大学病院 リウマチ膠原病科)

研究分担者 立花 秀介\*, 柳澤 麻依子\*

## 緒言

関節リウマチ (RA) は原因不明の炎症性多発関節炎であり、発症には自己免疫の関与が想定されている。炎症の主座は関節滑膜にあり、炎症が持続する結果として骨の破壊と関節の変形をもたらされる。骨の破壊において、破骨細胞と呼ばれる単球/マクロファージ系の多核細胞が重要な役割を果たすと考えられている。骨基質を吸収する破骨細胞と骨を形成する骨芽細胞の機能は通常バランスを保っており、正常な骨格系を保つが、破骨細胞の機能が亢進する場合にRAにおける骨破壊や、骨粗鬆症に見られる骨密度の低下を引き起こす。従って、破骨細胞の分化や機能の亢進のメカニズムを理解することは医学的に重要な課題である。1998年に破骨細胞分化因子としてのサイトカインRANKLが同定された後、破骨細胞研究は飛躍的に進歩した。生存因子であるM-CSFと組み合わせることにより *in vitro* で破骨細胞を分化させることが可能となり、破骨細胞分化のマスターレギュレーター転写因子として nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 1 (*Nfatc1*) が同定された<sup>1)</sup>。破骨細胞分化の過程で *NFATc1* の発現量はmRNA、タンパクレベルのいずれにおいても著増する。また *Nfatc1* の欠損マウスは胎生致死であるがキメラマウスを用いた検討により *Nfatc1* 欠損細胞は破骨細胞に分化できないことが *in vitro*、*in vivo* で証明された<sup>2)</sup>。 *Nfatc1* を含む *NFAT* ファミリー転写因子は元々 T 細胞の分化・機能に重要な役割を果たすことが知られており、その核移行を抑制するサイクロスポリンAやタクロリムスは免疫抑制薬として臓器移植の際の拒絶の抑制や自己免疫疾患の治療に用いられる重要な薬剤である。タクロリムスは本邦では関節リウマチにも保険適応がある。ただし各 *NFAT* メンバーに特異的な阻害薬ではない。 *Nfatc1* には5種類のアイソフォームが存在することが報告されている。2002年にSerflingらによってT細胞においては *Nfatc1* short form がアポトーシスの阻害に働くことが提唱された<sup>3)</sup>。しかしその具体的な標的遺伝子は明らかになっていない。 *short form* は利用するプロモーター (P1) が他のアイソ

フォーム (P2) と異なっている<sup>3)</sup>。破骨細胞分化の過程で発現が確認できるアイソフォームは3種類であり、更に発現が著増するアイソフォームは *short form* のみである。 *short form* は exon 1 を他のアイソフォームと異にするため、N末側のアミノ酸配列がユニークであり、basalに発現している他のアイソフォームとはリン酸化などの制御が異なることが予測される。また、 *short form* のみが特異的に著増する現象の意義は明らかではない。本研究の目的は

- (i) 破骨細胞分化の過程で発現が誘導される *Nfatc1* *short form* 特異的ノックアウト (KO) マウスを作出し、破骨細胞分化における同分子の機能を *in vivo* および *in vitro* の両面から明らかにすること
  - (ii) GFP融合タンパクの強制発現実験によって *Nfatc1* アイソフォームの核移行の詳細を明らかにすること
- である。本研究は2016年5月の時点で完結してないため、今回はこれまでの途中経過について解説する。

## 材料と方法

破骨細胞分化過程における *Nfatc1* アイソフォームの同定と定量

マウス大腿骨より骨髓細胞を採取した。10%ウシ胎仔血清添加  $\alpha$ MEM 培地で培養したが、2日間は10 nM M-CSF 存在下で培養し破骨細胞前駆細胞を得た。その後3日間10 nM M-CSF および50 nM RANKL 存在下で培養した。培地交換は2日おきに行った。TRAP染色を行いTRAP陽性多核細胞を破骨細胞と定義した。 *Nfatc1* 各アイソフォーム特異的なプライマーを用いたRT-PCRおよびサイバークリーン法による定量RT-PCRを行った。用いたプライマーは下記の通りである。

[5' 側プライマー]

- ① *Nfatc1*Sense P1 GGA TGC CAA GTA CCA GCT TTC  
あるいは
- ② *Nfatc1*Sense P2 GAC ATG ACG GGG CTG GAG CAと
- ③ *Nfatc1*Antisense GAA CAG CTG AGA TAC CCG GG  
の組み合わせ

[3' 側プライマー]

- ④ *Nfatc1*Sense ver3 CCT TTC CGC AAC CAG AGG ATと

\* 大学病院 リウマチ膠原病科

- ⑤ Nfatc1Antisense short CTC AGT AAA AAC CTC CTC TCA G  
 ⑥ Nfatc1Antisense long only GCT ACT GTT CAG ATG TGG AC  
 ⑦ Nfatc1Antisense long+middle TTA GGA GTG GGG GAT CGT GCの組み合わせ

short全長の増幅には①と⑤の組み合わせmiddleおよびlong全長の増幅には②と⑦の組み合わせを用いた。

### Nfatc1 アイソフォームのクローニングおよびレトロウイルスベクターの構築

3種類のNfatc1アイソフォームのcDNAをpMD20-Tvector (Takara) にTAクローニングした。ShortおよびmiddleについてはインサートをHindIII (切断後平滑化)、EcoRIで切り出した後にPMX-IRES-GFPベクター (EcoRI, StuIで切断) にligationすることでレトロウイルスベクターを構築した。LongについてはインサートをHindIII (切断後平滑化)、EcoRIで切り出した後にBamHI (切断後平滑化)、EcoRIで切断したベクターにligationした。

### レトロウイルスベクターの感染実験

PlatE細胞をパッケージング細胞として上記レトロウイルスベクターをトランスフェクションした。FuGENE HD (プロメガ) をプロメガ社のプロトコール通りに用いた。2日後に培養上清を回収し、polybren 10 ng/mL, ウシ胎仔血清5%, M-CSF 10 ng/mL (いずれも最終濃度) を添加し培養2日目、3日目の破骨細胞前駆細胞に4時間ずつ感染させた。4日目よりM-CSF, RANKL添加培養液に切り替えた (すなわち通常の破骨細胞培養よりもRANKLを添加するタイミングが1日遅れる)。

### Nfatc1-GFP融合タンパク発現ベクターの構築

クローニングされた3種類のNfatc1アイソフォームをtemplateとしてPCRによりインサートを調整した。プライマーは下記の通りである。

[5' 側プライマー]

⑧ aaaEcoShortSense:  
AAAGAATTCGGATGCCAAGTACCAGCTTTC

⑨ aaaEcoLongSense:  
AAAGAATTCGACATGACGGGGCTGGAGCA

[3' 側プライマー]

⑩ aaaSalShortAnti:  
AAAGTCGACAAACCTCCTCTCAGCTCACTC

⑪ aaaSalMiddleAnti:  
AAAGTCGACTGCGGCTGTAGCCTGGCGG

⑫ aaaSalLongAnti:  
AAAGTCGACTGGGGATCGTGCTGGAGAG

shortの増幅には⑧⑩, middleには⑨⑪, longには⑨⑫の組み合わせでKOD-plus-Ver. 2 (TOYOBO) を用いて増幅した。EcoRI, SalIで切断し精製したインサートをEcoRI,

SalIで切断したpRetroQ-AcGFP1-N1 Vector (Takara) にligationした。

### Nfatc1 short form特異的ノックアウトマウスの作出

ノックアウトマウスの作出はMashikoらの方法に倣った<sup>4)</sup>。まずOptimized CRISPR design tool (<http://crispr.mit.edu/>) を用いてguide RNAの候補を4種類選択した。その配列を用いて4種類のpX330ベクターを構築した。ゲノム編集の効率を確認するため、CAS9のターゲット配列を含むNfatc1ゲノム断片をGFP遺伝子の間に挿入することで蛍光を発しない発現ベクター (pDGXXFP-Nfatc1) を構築し、各pX330-Nfatc1ベクターと共にHEK293T細胞に導入した。ターゲット配列が切断され、生じた末端がhomology-directed repairにより修復されるとGFP遺伝子が再構築され、発現したタンパク質が蛍光を発する。蛍光を発する細胞の割合が高いことはすなわちCAS9のNfatc1 short form切断活性が高いことを意味する。そのようなベクターを選んでマウス受精卵前核に顕微注入し、得られた仔マウスの遺伝子をダイレクトシーケンシ、Nfatc1遺伝子改変の有無を確認した。変異の波形が十分に高い個体 (すなわちキメラ率が高いと考えられる個体) を3種類選んでF1作製に供した。ヘテロ変異マウスの交配によりホモ変異マウスを得た。

### 結果

既報の通り3種類のアイソフォームが存在すること、最も短い塩基配列を持つアイソフォーム (short form) のmRNAが分化の過程で数百倍のオーダーで増加すること、残りの2種類は分化過程で増加しないことを見いだした (図1A)。タンパクレベルでも破骨細胞分化後に3本の独立したバンドが確認された (図1B)。

構築したレトロウイルスベクターをHEK293T細胞に導入すると、破骨細胞で認められる3種類のバンドに相当するバンドがそれぞれ認められた (図1B)。同様にGFP融合タンパクも発現が確認された (図1C)。

3種類のウイルスをそれぞれ感染させた場合、RANKL非存在下では破骨細胞 (TRAP陽性多核細胞) の誘導は認められなかったが、RANKL存在下ではshort formの強制発現の場合にのみTRAP陽性多核細胞がRANKL添加2日目より認められた (図2)。

guide RNAの候補を図3に示す。pDGXXFP-Nfatc1と各pX330-Nfatc1ベクターと共にHEK293T細胞に導入したときに蛍光を発する細胞が多いと判断されたものはpX330-Nfatc1-1, pX330-Nfatc1-4の2種類であった。pX330-Nfatc1-1, pX330-Nfatc1-4をマウス受精卵前核に顕微注入し、得られたキメラマウスを野生型マウスと交配した。目的のヘテロ変異マウスを選び交配することで予定通り3系統のノックアウトマウスを樹立した。ノックアウトマウスはメンデル則に従い誕生し、明らかな外見的異常を認めなかった。更にin vitroにおける破骨細胞分化

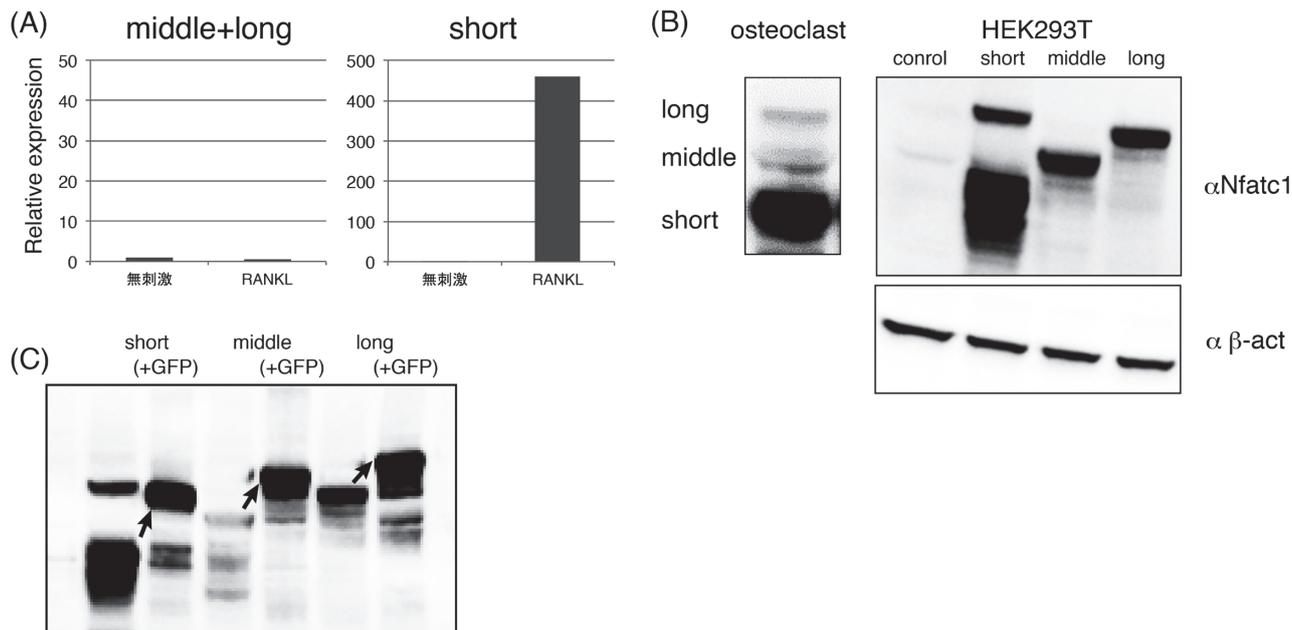


図 1. (A) 破骨細胞前駆細胞をRANKLあり/なしの条件で培養3日後に回収, Nfatc1のshort特異的プライマーおよびmiddle, longに共通のプライマーを用いてqRT-PCRに供した. Gapdhをコントロールとし, RANKLなしのサンプルの発現を1とした場合の発現レベルを示す. (B) 破骨細胞 (前駆細胞をRANKL存在下で3日培養したもの)とHEK293T細胞にNfatc1各アイソフォームの発現ベクターをトランスフェクションして2日目の細胞のNfatc1のタンパクレベルの発現. 対応するバンドが観察されている. (C) Nfatc1各アイソフォームの発現ベクターおよび, それぞれのアイソフォームにGFPを融合させたタンパクの発現ベクターをトランスフェクションして2日目のHEK293T細胞を用いたウェスタンブロットティング. 各アイソフォームのシフトが観察される.

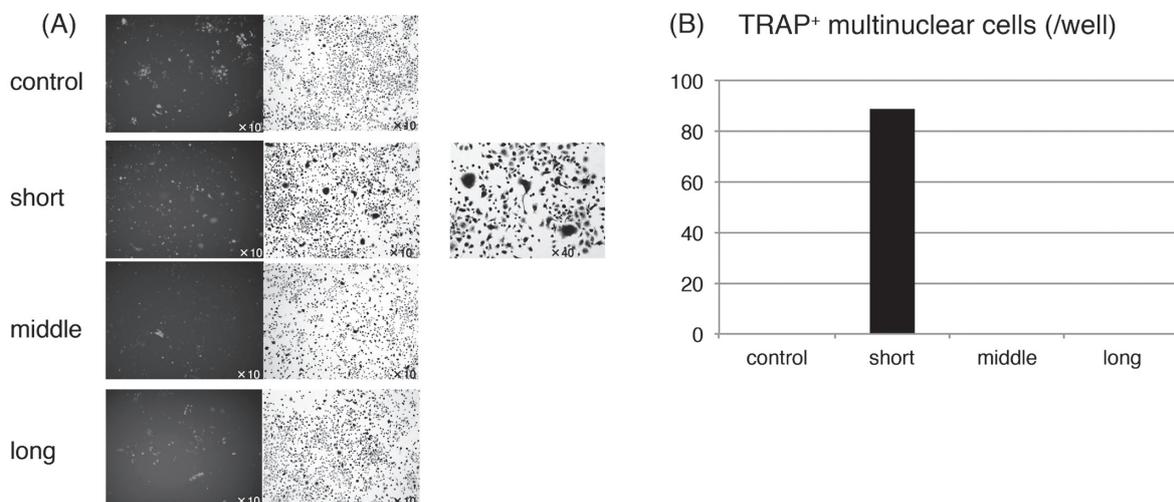


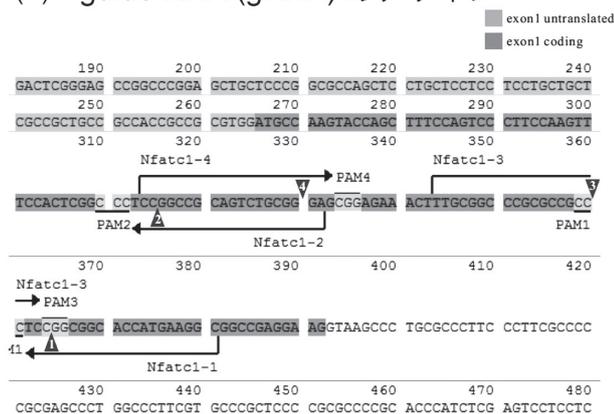
図 2. (A) 破骨細胞前駆細胞にレトロウイルスを用いてNfatc1各アイソフォームを強制発現した. 感染細胞はGFPを発現するため蛍光顕微鏡で蛍光が観察される. RANKL刺激後2日目でshort formを強制発現した細胞のみTRAP陽性多核細胞が観察された. RANKL刺激後3日目ではコントロールを含む全てのwellで破骨細胞が観察された (data not shown). またRANKL刺激無しでは破骨細胞は観察されなかった (data not shown) (B) (A)の定量化.

の程度は同腹の対照マウス (野生型) と比べて差異を認めなかった (図4). 意外なことにWestern blot解析ではshort formに相当するバンドが対照サンプルと同程度に認められた (図4).

## 考 察

RANKLの非存在下ではどのNfatc1のアイソフォームを強制発現しても破骨細胞の分化は認めなかった. このことはNfatc1単独では破骨細胞分化を誘導することが

## (A) guide RNA (gRNA) のデザイン



## (B) Nfatc1 gRNA の評価

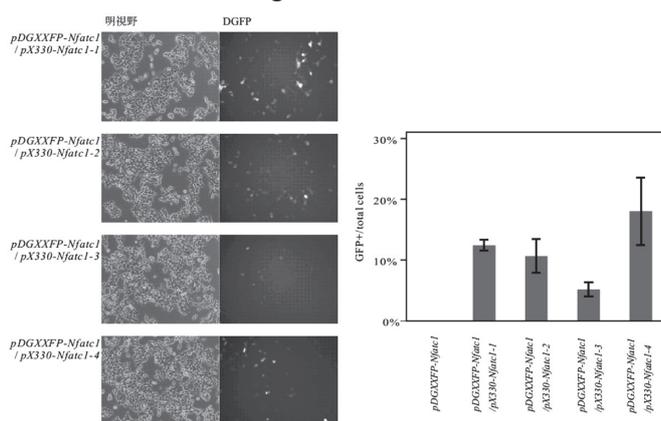
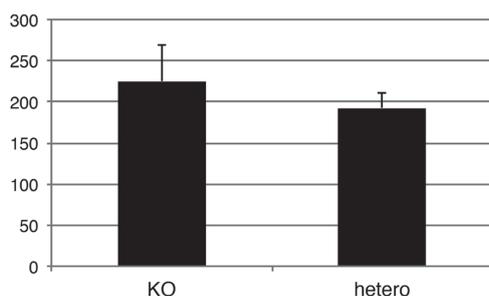


図 3. (A) guide RNA (gRNA) のデザインNfatc1のshort formを特異的にノックアウトするようにexon 1をターゲットとして4種類設計した。(B) Nfatc1 exon 1を導入したpDGXXFP-Nfatc1と各gRNAを導入したpX330-Nfatc1-1~4をco-transfectionした。切断および組み替えが起こった細胞ではGFPが発現するようになり蛍光を発することを利用して切断効率を評価できる。

## (A) TRAP+ multinuclear cells (/well)



## (B) KO hetero

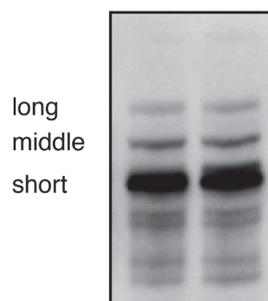


図 4. (A) Nfatc1欠損マウス (樹立した3種類の内のクローンNo3) 由来の骨髄細胞からin vitroで破骨細胞を誘導した。ヘテロ欠損マウスをコントロールとして用いた。(B) 同じサンプルを用いてNfatc1のタンパクレベルの発現を評価した。ホモ欠損マウスでもshort formが強く誘導されていることが確認された。他のクローンでも同様の結果であった (data not shown)。

できないことを意味する。今回のNfatc1は恒常活性化型ではないため、Caシグナルの不足から十分に核移行できず、破骨細胞分化を誘導する程度の転写活性を示すことができない可能性も考えられる。

一方で、RANKL存在下ではshort formの強制発現の場合のみ破骨細胞分化のタイミングが早まることが観察された。このことからshort formはmiddle, longの各アイソフォームとは異なる機能を果たしていることが示唆される。今後GFP融合Nfatc1の強制発現実験により各アイソフォームの細胞内局在や、各種キナーゼやホスファターゼの阻害薬添加の影響を評価する予定である。

今回、最近実用化された遺伝子編集技術 (CRISPR/Cas) を用いて遺伝子改変マウスを作出した。Nfatc1のノックアウトマウスは胎性致死であることが知られているため今回のshort form特異的ノックアウトマウスでも同様の表現型を示す可能性はあったが、実際にはホモ遺伝子改変マウスは生まれてきており、予想外に

外見上の異常を全く示さなかった。in vitroの破骨細胞分化にも著変が無く、更に意外なことにshort formに相当するバンドがWestern blot解析で認められた。このことからshort formがノックアウトされていない可能性が示唆される。この原因として、報告されていた翻訳開始点の次のATGが翻訳開始点として機能していることも考えられる。そのため今後はペプチドシーケンスなどを用いてshort formの先頭部分のアミノ酸配列を同定することを計画している。実際に2番目のATGが翻訳開始点になっている場合はそもそも従来の翻訳開始点が誤っている可能性もある。同部位の配列はヒトとマウスで保存されているため、ヒトのサンプルでも同様にshort formの翻訳開始点を解析する必要が出てくるかもしれない。

## 謝辞

本研究は平成27年度学内グラント (丸木記念特別賞) の助成を受けて行われたものであり、ここに深謝致します。

## 参考文献

- 1) Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 2002 Dec; 3(6): 889-901.
- 2) Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med* 2005 Nov 7; 202(9): 1261-9.
- 3) Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D, Akimzhanov A, Moroz D, Jha MK, et al. Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* 2002 Jun; 16(6): 881-95.
- 4) Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep* 2013 Nov 27; 3: 3355.

## 研究成果リスト

## 論文

- 1) Miyoshi F, Sato K and Mimura T. Changes in the pattern of cytokine production from peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and their relation to plasma arginase activity. Version of Record online: 12 MAY 2016, DOI: 10.1111/1756-185X.12864

## 学会発表

- 1) 柳澤麻依子, 立花秀介, 相崎良美, 佐藤浩二郎, 三村俊英. キメラ培養系を用いたヒト破骨細胞の共存培養系確立の試み, 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016年4月21日, パシフィコ横浜
- 2) 立花秀介, 相崎良美, 柳澤麻依子, 佐藤浩二郎, 三村俊英. 破骨細胞分化におけるNFATc1 isoformによる機能的差異の検討, 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016年4月21日, パシフィコ横浜

## 特許出願等

なし

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

## NKT細胞および制御性T細胞の敗血症における役割の解明と臨床応用の探索

研究代表者 樽本 憲人 (大学病院 感染症科・感染制御科)

## 緒言

敗血症とは、感染症に対する制御不能な宿主反応に起因した生命を脅かす臓器障害と定義される<sup>1)</sup>。感染により惹起された過剰なサイトカインにより、臓器の循環障害をおこし、多臓器不全におちいり、不良な転帰をたどる<sup>2,3)</sup>。特に、敗血症性ショックに陥った場合には、死亡率は45%にもほるため<sup>2)</sup>、さらなる病態の解明や治療法の探索は重要である。

C5aは、敗血症における主要なメディエーターの一つであることが知られている。好中球からの活性酸素や炎症性サイトカインの産生を誘導するなど、多彩な炎症反応惹起するほか、近年の報告では、C5aはリンパ球のアポトーシスとその減少に関与するとされる<sup>4)</sup>。これらの反応の結果、免疫機能低下、多臓器不全、凝固異常などが引き起こされる<sup>5)</sup>。C5aの受容体として、C5aRとC5L2の存在が知られており、免疫細胞において発現する<sup>6)</sup>。マウスでは、感染によりNKT細胞における発現が増強することが知られているが<sup>7)</sup>、ヒトにおける報告は少ない。また、近年regulatory T cell (Treg) が敗血症の早期に影響すること知られているが<sup>8)</sup>、C5aRが発現するかどうかは知られていない。今回、感染症患者におけるリンパ球にこれらが発現するかどうかを確認した。

## 材料と方法

入院中の患者で、臨床的に敗血症が疑われたヒト症例を感染症群とし、ボランティアの健常人(4名)を対象群とした。説明と同意を得たのちに、30 ccのフローサイトメトリー用の末梢血をヘパリン管に、5 ccの血漿中サイトカイン測定用の末梢血をEDTA-2K管に採取して以下の手順で保存および解析を行った。感染症群においては、後日、診療録から、血液検査や血液培養結果を含む臨床情報も収集した。

保存は、血液をHistopaque (SIGMA) を用いて、室温、400 xg, 25 minでプレーキなしで遠心してリンパ球を分離した。FACS buffer (BD Diagnostic Systems) で2回洗い(室温、400 xg, 5 min)、5  $\mu$ LのsampleをTurk液で希釈し、細胞をカウント後、セルバンカー1 (日本全薬工業) で $1.0 \times 10^6$ /mL

に調整し、緩徐に-80°Cにして、使用するまで保存した。

また、解析までは、以下の手順で行った。37°Cに調節したwater bathで解凍後、FACS bufferで2回washし、5  $\mu$ LのsampleをTurk液で希釈し、細胞をカウント後、 $2.5 \times 10^7$ /mLに調整した。このsampleに10%量のHuman TruStain FcX™ (Biolegend) を混和して、冷所で10 min静置、フローサイト用の各抗体を混ぜた試薬に、sampleを混ぜて、冷所で30 min暗所で静置した。2回洗い、FACS bufferで300  $\mu$ Lに調整した。フローサイトメトリーの直前に、3  $\mu$ Lの7-AAD (Biolegend) を添加し、室温で10 min静置して、FACS canto II (BD Diagnostic Systems) で測定した。

解析用の抗体として、anti-CD3 (SK7, APC conjugated)、anti-CD19 (HIB19, PerCP conjugated)、anti-CD4 (OKT4, APC-Cy7 conjugated) anti-C5aR (S5/1, PE-Cy7 conjugated)、anti-CD25 (BC96, AL488 conjugated) を使用した。以上はBiolegendから入手した。また、invariant NKT (iNKT) 細胞の検出抗体として、PEでラベルされたCD1d tetramer with  $\alpha$ -galactosylceramide (ProImmune) を用いた。compensationには、OneComp Beads (eBioscience) を用いた。

サイトカインの測定用に、上清を遠心し、-20°Cで保存した。解析時には室温で解凍し、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN $\gamma$ 、IL-10をBD CBA Flex set™ (BD Diagnostic Systems) を用いたbead-based immunoassayで測定した。

フローサイトメトリーの解析には、FlowJo™ v10 (FlowJo) を用いて行った。また、統計解析における有意差検定には、studentのt検定を用いた。本研究は、関越病院の院内倫理委員会です承されたのちに開始された。

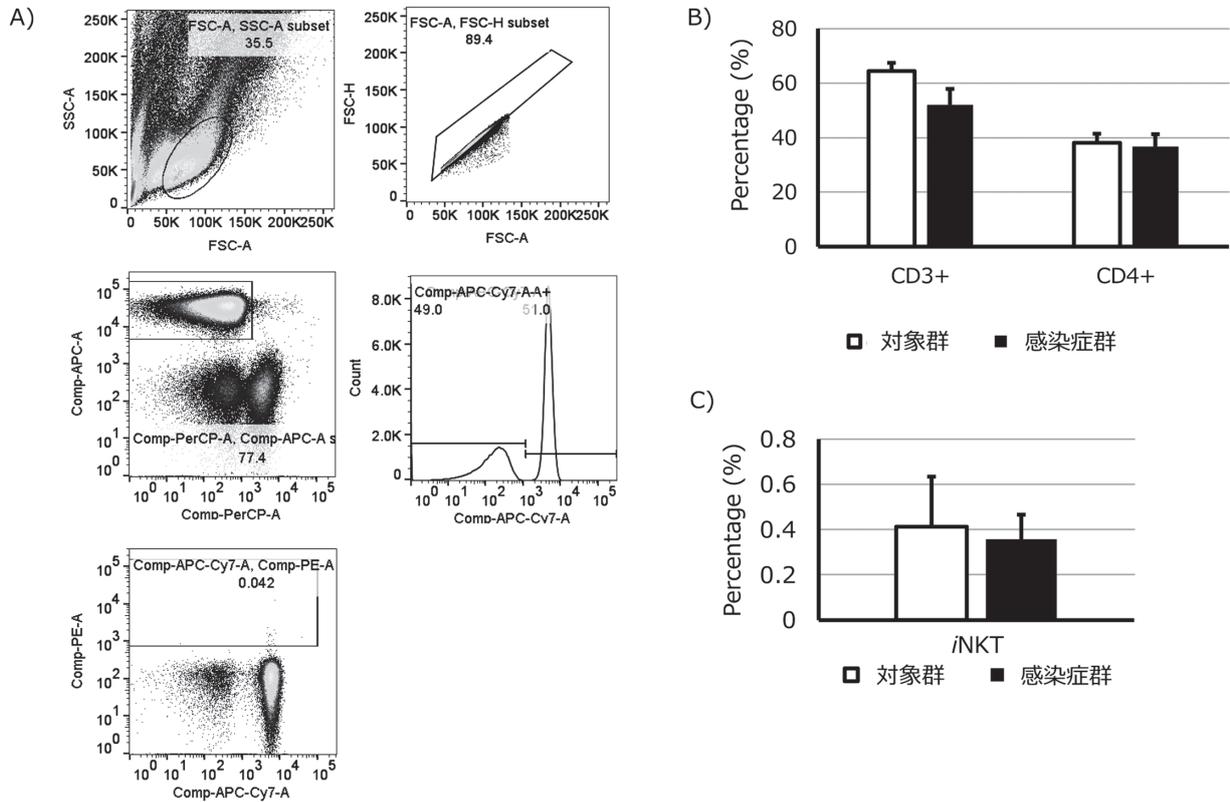
## 結果

敗血症が疑われた感染症群は5例とした。感染症群の平均年齢は81.8歳で、全員女性であった。感染症のフォーカスとしては、尿路感染症が3例、肺炎が1例、感染部位不明が1例であった。血液培養結果陽性であったのは2例(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、大腸菌、各1例)であり、PCTは5例中4例陽性(平均23.2 ng/mL)であった。

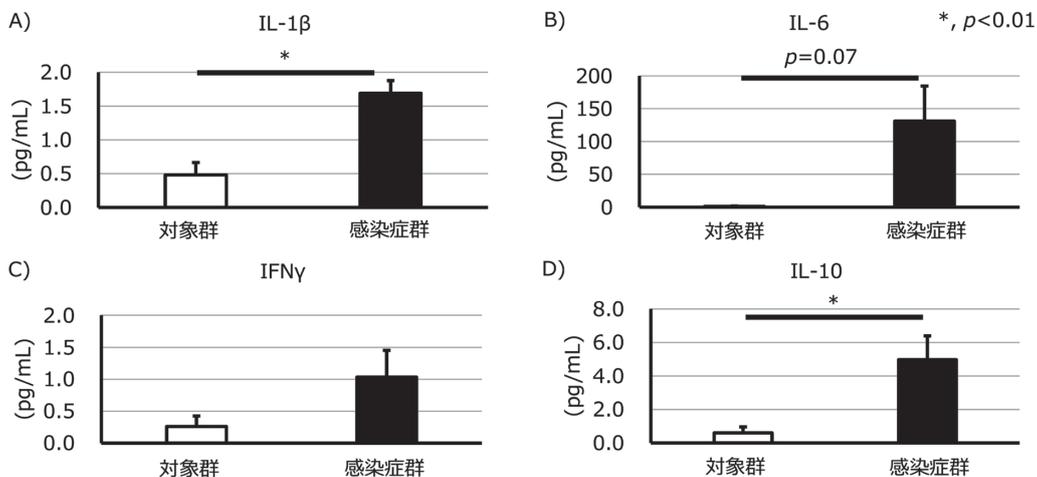
リンパ球の解析として、CD3<sup>+</sup>細胞(T細胞)、およびCD3<sup>+</sup>PerCR<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>細胞(CD4陽性T細胞)を確認した(Fig. 1)。

これらは、感染症群と対象群において、差を認めなかった。また、 $\alpha$ -galactosylceramide-loaded CD1d tetramerで検出される、iNKT細胞の検出を試みたが、これも有意な差はみられなかった。また、活性化マーカーとして知られるCD25も確認したが、有意差はないものの、T細胞、CD4陽性T細胞、iNKT細胞において、感染症群で活性化している

傾向が見られた。これらの細胞は炎症性サイトカインを産生するため、サイトカインを測定したが、炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN $\gamma$ などは感染症群において増加傾向がみられ、あわせて測定した抑制性サイトカインであるIL-10も感染症群で有意な増加を認めていた (Fig. 2)。



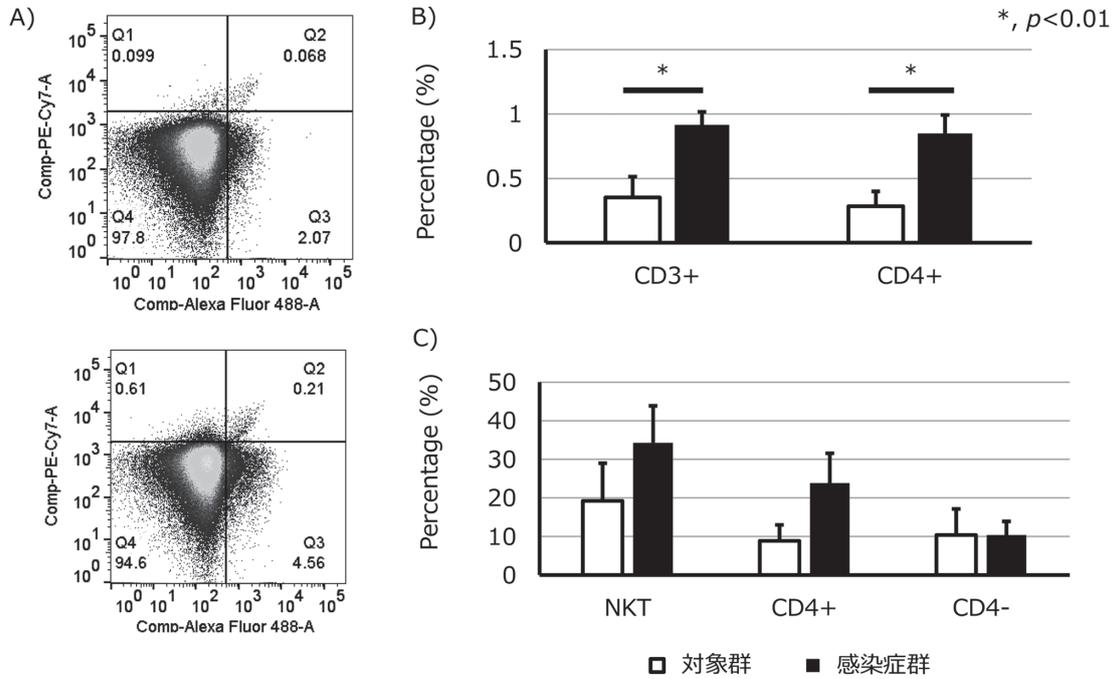
**Fig. 1.** リンパ球に占めるT細胞、CD4陽性T細胞、iNKT細胞の割合を確認した。A) フローサイトメトリーによる各リンパ球のサブセット。左上段のゲート内がリンパ球、左中段のゲート内がCD3<sup>+</sup> (T細胞)、右中段の右のゲート内がCD4<sup>+</sup>、下段のゲート内がiNKT細胞を示す。B) 対象群と比較して、T細胞、CD4陽性T細胞との差はみられなかった。C) 対象群と比較して、感染症群におけるiNKT細胞の割合は、変わらなかった。



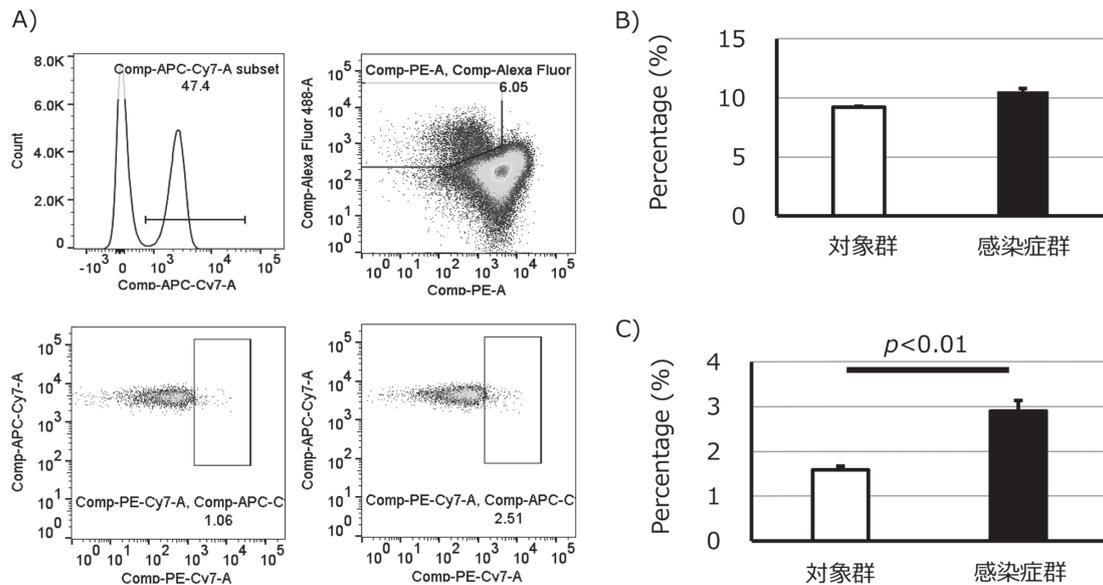
**Fig. 2.** 炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), IFN $\gamma$  (C), および炎症抑制性サイトカインであるIL-10 (D)が、感染症群で有意に上昇していた。

また、各リンパ球におけるC5aの受容体の1つであるC5aRの発現について検討した (Fig. 3). T細胞およびCD4陽性T細胞に占めるC5aR陽性率の平均は、それぞれ0.91%、0.84%で、健常人の0.35%、0.28%と比較して、C5aRの発現が有意に増えていた。また、iNKT細胞においても、有意差はないものの同様の傾向がみられた。また、

細胞マーカーとして、CD4<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>CD25<sup>+</sup>であらわされるリンパ球がFoxP3<sup>+</sup>Tregであるとされる。リンパ球に占めるFoxP3<sup>+</sup>Tregの割合を確認したところ、対象群との差はみられなかったが、C5aRの発現について確認したところ、感染群において、有意な増加がみられた (Fig. 4).



**Fig. 3.** C5aRの発現率を確認した. A) PE-Cy7陽性のゲート (Q1+Q2) は、C5aRが発現しているサブセットを示す. 対象群 (上段) と感染症群 (下段). B) CD3<sup>+</sup>細胞 (T細胞), CD4<sup>+</sup>細胞における、C5aR陽性率に関する対象群と感染症群を比較したところ、感染症群とので有意な増加がみられた. C) iNKTと、iNKT細胞中のCD4<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>のサブセットのそれぞれにおけるC5aR陽性率を確認したところ、感染症群でC5aRの発現は増加していた.



**Fig. 4.** FoxP3<sup>+</sup>Tregの割合とC5aR発現率を確認した. A) 左上はCD4<sup>+</sup>のサブセット、右上のゲート内はCD127<sup>lo</sup>CD25<sup>+</sup>のサブセット (FoxP3<sup>+</sup>Treg). 下段はC5aR<sup>+</sup>のサブセット. 左下が対象群、右下が感染症群. B) Treg細胞は対象群と感染症群との比較で増加がみられなかった. C) Treg細胞において、感染症群でC5aRの発現は有意に増加していた.

## 考察

今回、敗血症を疑う感染症患者の末梢血中のリンパ球を用いて、フローサイトメトリーにより、CD3<sup>+</sup>サブセットのT細胞、CD19<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>サブセットのCD4陽性T細胞、CD4<sup>+</sup>CD129<sup>lo</sup>CD25<sup>+</sup>のサブセットのFoxP3<sup>+</sup>Treg細胞を検出、解析した。また、 $\alpha$ -galactosylceramideを結合させたCD1d tetramerを用いて*i*NKT細胞を検出、解析した。リンパ球に占める、各細胞の割合が減少しているかどうか確認したが、感染群と対象群との間に差はみられなかった。特に、従来の報告では、敗血症症例において、末梢血中の*i*NKT細胞は減少し、FoxP3<sup>+</sup>Treg細胞は増加することが報告されている<sup>9,10)</sup>。差が見られなかった理由としては、検討した症例数が少なかったこと、細胞の保存状態が解析に適さなかった可能性があること、などが原因として考えられた。よって、改善点として、保存についての条件を見直したり、検体採取後に保存を行わず、直接解析すること、そのほか症例を増やすこと、などが考えられた。

また、C5a受容体の一つであるC5aRの発現について、各細胞群における解析を行った。T細胞、CD4陽性T細胞、FoxP3<sup>+</sup>Treg細胞などにおいて、感染群で有意にC5aRが増加していた。特に、マウスにおいては、感染により、NKT細胞に占めるC5aRが増加するとの報告があるが、残念ながら、NKT細胞においては、有意な差をもった増加は認められなかった。これは、検出されたNKT細胞数が少なかったことも、原因の一つと考えられた。NKT細胞は、C5aRを介してTRLや炎症性サイトカインの産生を制御するとされる<sup>7)</sup>。そのほか、FoxP3<sup>+</sup>Tregをはじめとした免疫細胞における、C5aRの役割も解明していくことも必要と考えられた。

炎症性および抑制性のサイトカインをbead-based immunoassayにより測定したところ、感染において、IL-6群が高い傾向がみられた。NKT細胞を含めた各免疫細胞においてIFN $\gamma$ が産生されるが、血清中の濃度としてあまり上昇がみられなかった。そのほかの炎症性サイトカインおよび抑制性サイトカインにおいても、数 pg/mLと、かなり濃度が低かったが、感染群で上昇がみられ、これは従来の報告と同様と考えられた。

以上のまとめとして、NKT細胞やTreg細胞など、敗血症において重要な役割を果たす細胞において、C5aRを解析したところ、T細胞やCD4細胞だけではなく、Treg細胞もC5aRの発現が上昇していた。今後、各種免疫細胞の敗血症の病態に果たす役割を解析していくことが重要であると考えられた。

## 参考文献

- 1) Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801-10.
- 2) Wenzel RP. Treating sepsis. *N Engl J Med* 2002; 347: 966-7.
- 3) Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138-50.
- 4) Grailer JJ, Fattahi F, Dick RS, Zetoune FS, Ward PA. Cutting edge: critical role for C5aRs in the development of septic lymphopenia in mice. *J Immunol* 2015; 194: 868-72.
- 5) Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 776-87.
- 6) Sarma JV, Ward PA. New developments in C5a receptor signaling. *Cell Health Cytoskeleton* 2012; 4: 73-82.
- 7) Fusakio ME, Mohammed JP, Laumonier Y, Hoebe K, Kohl J, Mattner J. C5a regulates NKT and NK cell functions in sepsis. *J Immunol* 2011; 187: 5805-12.
- 8) Tatura R, Zeschning M, Hansen W, Steinmann J, Vidigal PG, Hutzler M, et al. Relevance of Foxp3(+) regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. *Immunology* 2015; 146: 144-56.
- 9) Gogos C, Kotsaki A, Pelekanou A, Giannikopoulos G, Vaki I, Maravitsa P, et al. Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection. *Crit Care* 2010; 14: R96.
- 10) Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, et al. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 2004; 32: 2329-31.

## 研究成果リスト

### 学会発表

- 1) 樽本憲人, 酒井 純, 石 良介, 筋野恵介, 山口敏行, 前崎繁文. 敗血症患者のリンパ球におけるC5a受容体の発現に関する解析, 第90回日本感染症学会総会・学術講演会, 平成28年4月, 仙台

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

3次元気流解析による頭頸部手術の術後機能予測

研究代表者 野村 務 (総合医療センター 耳鼻咽喉科)

緒言

鼻腔, 咽頭等の上気道の疾患は, 気道に及ぼす影響が強く, 気道狭窄, 無呼吸等の障害を及ぼす可能性がある。これらの疾患で, 治療前後の気流の状態を解析し, 機能を評価することは重要なことであり, 術前の資料から術後機能を予測することが理想である。

今回, 睡眠時無呼吸症候群(OSAS)にて口蓋垂軟口蓋咽頭形成術(UPPP)を行った症例, 中咽頭癌にて化学放射線治療を行った症例について, 治療前後のCTからcomputational fluid dynamics(CFD)を行い, その効果を検討した。

対象と方法

患者は簡易睡眠検査にてOSASと診断された2例および中咽頭癌(軟口蓋 T4aN2cM0)の1例である。OSAS患者は2例とも男性で, 副鼻腔炎を認めず, 扁桃肥大は2度にてUPPPを施行し, 術後3月にアプノモニターによる再評価, CT撮影を行った。中咽頭癌患者は, 導入化学療法後に化学放射線治療を施行し, 治療前後にCT撮影を行った。

CFDの方法は, CT画像をDICOMデータで出力し, 3次元ボリュームデータ処理ソフトであるMimics(マテリアライズジャパン)にて, 鼻副鼻腔, 口腔, 咽頭, 喉頭を再構築し, ボリュームデータを作成し, STL

フォーマットで出力する。出力されたデータをANSYS ICEM CFD(アンシスジャパン)を用いて, ボリュームデータを修正し, さらにメッシュ化を行い, ANSYS CFX(アンシスジャパン)にて気流解析を行った<sup>1)</sup>。

設定条件は, 入口部は大気圧とし, 声門下部にて2 m/sの流速を与えた。壁条件はno slipとした。解析モデルは乱流を考慮し, shear stress transport(Menterのk- $\omega$ モデル)を用いた。気流解析において, 気流の速度, 咽頭壁の圧力の解析を行った。

結果

①OSAS症例

1) 症例1では, 術前に中咽頭部, 声門上部に高流速, 高度の陰圧を認めた(図1)。

術後は中咽頭部の流速, 陰圧は著明に改善した。声門上部では, 流速, 圧の上昇を認めた(図2)。

2) 症例2では, 中咽頭部に著明な流速, 陰圧を認めた。術後は声門上部に陰圧の上昇を認めた。

②中咽頭癌

CTでは右中咽頭全体に腫瘍の浸潤を認め, 咽頭腔はほぼ消失していた。

中咽頭から声門上部にかけて, 著明な狭窄を認め, 流量はほぼ消失していた。治療後は狭窄は消失し, 声門上部の陰圧も軽度であった(表1)。

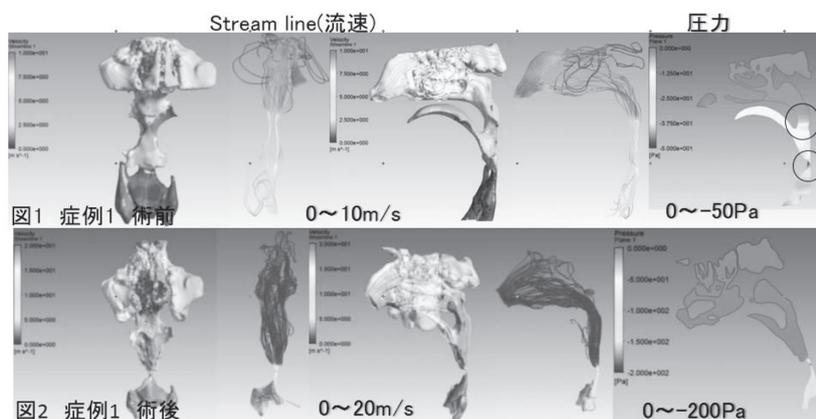


図 1, 2.

表 1.

		集積部位 (流速, 圧力)				AHI
		中咽頭		声門上部		
症例 1	術前	6m/s,	-20Pa	10m/s,	-50Pa	53
	術後	0.5m/s,	-0.2Pa	20m/s,	-200Pa	12
症例 2	術前	20m/s,	-200Pa	10m/s,	-120Pa	13
	術後	6m/s,	-30Pa	17m/s,	-200Pa	1.2
		中咽頭から声門上部				
症例 3	前	150m/s,	-20000Pa			
	治療後	10m/s,	-20Pa			

## 考 察

- ・中咽頭疾患患者の術前後の気流の状態をCFDにて解析した。
- ・手術前後の画像から気流解析を行った報告は、小児に対するアデノイド口蓋扁桃摘出術の2報告のみであり<sup>2,3)</sup>、成人のUPPP前後の比較検討は初めてである。
- ・OSAS患者では、術前に中咽頭、声門上部の2カ所に流速、陰圧の上昇を認める部位があった。術後には中咽頭部では流速、陰圧の低下を認めたが、声門上部では逆に増加を認めた。
- ・OSAS患者では声門上部に流速の増加を認めたが、AHIは低下しており、OSASは改善していた。この部位については、無呼吸への影響は少ないものと思われた。
- ・中咽頭癌患者では、治療により腫瘍は著明に縮小し、気流は正常化していた。
- ・今回の結果は実際の臨床効果と一致しており、術前に術後の機能を評価する上で3次元気流解析が非常に有効な方法であると思われた。

## 参考文献

- 1) Nomura T, Ushio M, Kondo K, Yamasoba T. Effects of nasal septum perforation repair surgery on three-dimensional airflow: an evaluation using computational fluid dynamics. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015; 272: 3327-33.
- 2) Luo H, Sin S, McDonough JM, Isasi CR, Arens R, Wootton DM. Computational fluid dynamics endpoints for assessment of adenotonsillectomy outcome in obese children with obstructive sleep apnea syndrome. *J Biomech* 2014; 47: 2498-503.
- 3) Mihaescu M, Murugappan S, Gutmark E, Donnelly LF, Kalra M. Computational modeling of upper airway before and after adenotonsillectomy for obstructive sleep apnea. *Laryngoscope* 2008; 118: 360-2.

## 研究成果リスト

### 学会発表

- 1) 野村 務, 西郷大宣, 近藤健二, 越智 篤, 菊地 茂. 3次元気流解析による上気道疾患に対する術後機能予測, 第117回日本耳鼻咽喉科学会総会, 2016年5月21日, 名古屋国際会議場

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

ハイリスク新生児の脳幹機能異常の発達論的解明  
— 霊長類モデルの開発と分析法の検証 —

研究代表者 山内 秀雄 (大学病院 小児科)

研究分担者 國方 徹也<sup>1)</sup>, 小柴 満美子<sup>2)</sup>, 笥 紘子<sup>1)</sup>,  
櫻井 隼人<sup>1)</sup>, 狩野 源太<sup>2)</sup>

## 緒言

胎生期から乳児期早期までの間に認められその後消失してゆく「原始反射」と、一定の時期を過ぎてから出現し継続して認められる「発達に伴って出現する反射」の2種類はdevelopmental reflexと呼ばれる。ヒトでは原始反射のほとんどは乳児期前半に消失し、その後に発達に伴って出現する反射が出現してくる。脳性麻痺は胎児期から周産期までの障害に基づく運動発達障害と定義されるが、developmental reflexのoff/onスイッチが胎児期からoffになっていたり、onになるべき時期が著しく遅延したりしていることが判明している。即ちMoro反射、Galant反射、非対称性緊張性頸反射(ATNR)などの新生時期に認められるべき原始反射が出現せず乳児期に遅れて出現したり、また特にアテトーゼ型脳性麻痺などこれらの原始反射が消失すべき乳児期をすぎても継続して認められることは既知の事実である。脳性麻痺はこのoff/onスイッチの異常に関連して随意運動出現障害に陥っていると解釈しうる。自閉症スペクトラム(ASD)の場合でも乳児期における姿勢反射の異常が現れるとされるが(Teitelbaum, PNAS 2004)、この事実はASD発症においてもこのoff/onスイッチの異常が関与することを示唆する。

Developmental reflexのoff/onの異常について、胎児新生児期にたとえば大脳に広範な梗塞性病変があるなど大脳の破壊性病変が認められても新生児期乳児期にはその徴候が乏しく、幼児期になってはじめて顕著化したり、その程度も軽微であったりする。また、新生児のMRI画像で一見軽微な脳の変化のみでも重篤な脳性麻痺をきたす場合もある。これらの事実は胎児新生児脳の可塑性とoff/onスイッチの脳発達メカニズムに最も影響をあたえる臨界期の存在を示唆し、その部位は大脳皮質下構造、とくに脳幹・小脳を含む下位中枢組織であると推察しうる。

そこで、我々は、developmental reflexのoff/onメカニズムの理解、胎児から乳児期早期における運動の随意性・不随意性についての理解、そして、新生児期の機能的寄与率が大きいと考えられる、脳幹・小脳の関わりへの理解を図ることを目的とし、胎児期に出生したハイリスク新生児と小型霊長類コモンマーモセットを対象に研究を行ってきた。

最初に、後方視的に新生児集中治療室の入院理履歴を有す児を対象とする臨床および予後の発達情報の分析検討を行うことで、神経学的な機能的行動の発達に関わる因子を探索した。その結果、退院時にリハビリテーションなどの医療的介入を要する群が、介入を要さない健常群に対して、随意的な機能的行動として神経学的発達マイルストーンとみなされ一般に生後4-6か月齢に順に出現することが知られている「定頸」および「寝返り」に関する遅れがあることが認められた<sup>2)</sup>。この行動は、抗重力性に身体局所を随意的に動かし、主体の意図を達成する運動と考えられる。これらの背景基盤の下、より早期発達段階にある胎児期新生児に、同様な随意的行動の素因子が存在するならば、その発達を可視化することで、原初的な神経機能の発達基盤を推定し、その遅れを可塑的と見込める年齢に把握することで、効果的な治療介入プログラムを開発できるかもしれない、と仮説を置いた。そこで、保育器内の胎児期新生児の行動を計測し、関節点や上下肢・胸・腰・頭部などの各部位の角度などの変量を利用した多変量解析を行い、重力に逆らう随意性運動を原始反射から判別するアルゴリズムの開発の試み(Koshiba, et al. OA Autism 2013)を利用して、本研究ではその妥当性を前臨床的検討に資する霊長類モデル研究に展開しヒトと繋ぐことで学術的な評価を調査した。その結果、重力環境における中枢として、前庭神経系の機能的発達に焦点を当てることとなった。内耳にある前庭器官、三半規管における内リンパ液、有毛細胞によって頭部の動きを検知した信号は前庭神経を介して、脳幹・前庭神経核による処理により、動眼神経核、動眼筋の反射行動を

1) 大学病院 新生児科

2) 大学病院 小児科

支配する。本研究期間においては、前庭神経系が支配するこれらの機能を表現しうる計測・分析器の試作を行い、新生児に適用する検証を進める途上にあるが、その発表については例数を重ねた後に別機に改めることとする。

本報告では、霊長類・前臨床モデルの開発と検証にフォーカスを当てる。小型霊長類コモン・マーモセット新生時期から認められている抗重力的反射「climb-up behavior」の発達に伴う消失およびその消失直後から出現してくる重力方向に高位から低位へと降り、より広い範囲で水平方向を伴い移動するための前段階の運動「jump-down behavior」の経時的観察結果から、発達に伴いoff/onを示すこれらの“behavior”がヒトのdevelopmental reflexのモデルになりうる可能性に着目している<sup>3)</sup>。この報告において、検討対象個体のうち、この抗重力運動の「climb-up」から「jump-down」への推移が曖昧、かつ、遅れを示した個体は、児童相同期に体重抑制を伴う家族内社会性機能の障害を来したことがわかった。発達初期の神経学的遅れが、より後期の社会性情動機能の形成に関わる可能性について、仮説を抱ききっかけを与えたので、本研究においては、例数の少なかった同仮説の検証に重きを置き、特に、抗重力的反射と推定される「climb-up behavior」の行動パターンが、新生極初期に、原始反射様の行動として個体を超越認められるかどうかについて、評価・検証を行った。

## 材料と方法

埼玉医科大学実験動物委員会の倫理審議を経て承認された内容を遵守し、学内の同じ繁殖ペアを選定することで、同ペアから得る遺伝的にも環境的にも限定的な条件が確保される6頭の新生仔を対象とした。個体・性別の識別後、体重が30 g以上であること、健常仔であることを確認した。性別配分は、雌雄各3頭であった。

確認できる生後の数～時間以内の早期に、先行研究で開発した抗重力運動試験<sup>3)</sup>を一頭ずつ、実施した。その方法を簡略に説明すると、ビデオカメラ記録の下、直径65 mm長さ125 mmの円柱を、表面の摩擦係数が異なる二種用意し、長さ方向に平行して新生仔を底部湾曲面に掴らせる状態を初期条件とした。クッション材から高さ200 mm上部の定位位置において、上下肢により円柱表面に掴り、自身の身体を円柱底部に維持することができる覚醒度・筋力レベルを初期状態とした。同状態の確認以降、試験を開始し、2分間の試験時間内に、個体が示す行動を記録し、ビデオデータから視線方向と躯体の移動に関する行動パターンを定量した。行動パターンは初期状態の底部掴り維持、「climb-up behavior」, 「jump-down behavior」, 「その他」の定義を用意した。

この抗重力運動試験に伴い、ヒト新生児の原始反射行動として知られる、吸啜反射、手掌把握反射、足底把握反射を行った。いずれも、シリンジ・カテーテルを5 mm長さで切断した治具を利用した。

加え、クッション材床上において、仰臥位を初期状態とする立位反射の有無の確認を行い、これらの行動試験の

ビデオ録画を行った。

## 結果

各6個体は、全頭、抗重力試験<sup>3)</sup>の初期状態を確認した後、試験開始後2分未満に、抗重力的行動「climb-up behavior」を示し、「jump-down behavior」を示す個体は存在しなかった。各個体の「climb-up behavior」中の視線は垂直上位を向いていた。

吸啜反射は、シリンジ・カテーテル治具を口角各側傍に近づけると、その直後に新生仔がカテーテル先端に吸い付く行動を示した。手掌把握反射、足底把握反射は、被験個体の各左右側の手掌部または足底部を解放する体勢を初期状態に設定し、シリンジ・カテーテル治具をその近傍に置くと、新生仔が自ら把握する行動を表出した。吸啜反射、手掌把握反射、足底把握反射についても、いずれの個体も、初期状態設定直後に対象の行動を顕著に表現した。

立位反射は、クッション材上において、仰臥位の初期状態を設定後、直後に基本的な姿勢である腹臥位に戻る行動を表出した。この立位反射においても、全頭が本行動を顕著に示すことを確認した。

本研究で実施した全ての行動試験におけるパターンは、健常な新生初日齢のコモン・マーモセットにおいて、個体を超えて再現的に認める運動であることが確認された。

## 考察

乳幼児期の疾患に対する治療の介入法は、内科的および外科的治療と共に、環境適応性、学習性、その可塑性と高感受性期の基盤を理解し、これに基づく複合的な療育プログラムを開発することにより新しい可能性が広がる。効果的な治療介入術の開発のためには、神経学的発達の客観的な診断術を用意する必要がある。また、長期を要するこれらの発達診断と介入術の有効性、安全性を、前臨床的に検証するためには、神経系基盤の相同性が多く見込める霊長類モデルを用意することが期待される。

我々が開発して来た抗重力運動試験<sup>3)</sup>は、通常診療として正期産期に実施している神経学的発達診断法を参考にしながら、霊長類コモン・マーモセットの種の発達特性を考慮したうえで投影を試みた試験法である。ヒト新生児の健常・異常の鑑別は、国際的な新生児行動評価法 Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale や Dubowitz Neurological Assessment of the Pre-Term and Full-Term Newborn Infant, NICU Network Neurobehavioral Scale and the Fetal Neurobehavior Coding Scale (NNNS Lester, et al. 2004) などを参考にし実施している。本研究においては、先行研究で生後数日以降にしか出現を確認できていなかった定型的な抗重力運動について、より早期の正期産出生極初期から、全頭に認めることができたことは、コモン・マーモセットの神経学的機能的発達の理解、および、その発達診断行動マーカーとしての検証ができたことを意味する。

我々のコモン・マーモセットの抗重力運動試験に

においては、上下肢を含む全身の骨格筋を使って円柱をよじ登る行動は、被験個体の体位を円柱底部にぶら下がる状態に設定すると再現的に個体から表出される抗重力運動であるが、円柱にしがみつくと体位の維持においては、底部にぶら下がる体位に対し、頭部を円柱上位に置き胴部・下肢を重力方向下位におく体位の方が筋力の消費エネルギーを低くできると考えられる。上下肢の把握力の機能と共に、重力環境における自身の体位を捉え処理する中枢、前庭神経系の機能が、視聴覚などの感覚機能と運動機能共に複合的に働く、しかし定型化した原始反射様の運動であることが推定される。

コモン・マーマセットの新生仔においては、この抗重力行動機能を新生極初期に有することは、父母の体幹に筋力の省エネルギー消費状況の下にしがみつくと、保熱および哺乳・栄養摂取を可能とする、生存維持に必須の発達機能と考えられた。親から離れた新生仔が生存できる飼育条件において、代替となる体表温度のインキュベーター設定が必須である (Koshiba, Sci Rep 2013)。

この抗重力運動を司る要素的行動と推定される、上下肢末梢で表現される手掌把握反射および足底把握反射運動、および、前庭神経系が支配すると考えられる立位反射様の仰臥位から腹臥位に即時に戻る行動は、それぞれ全個体で表出が確認された。ヒト新生児においては、立位反射に近い、「寝返り」行動が、正期産後半年齢に主に出現することが知られ、随意的な運動制御機能とみなされている。いっぽう、我々の胎児期新生児の行動分析において、「寝返り」が達成することはなくともその素養とみなされるような、一秒以内の短潜時に生じる反射レベルとは質的に異なる「仰臥位に返した後に出現する背屈」が数十秒単位のより長い継続時間で出現し、随意性を推定できる運動として、複雑系解析を介した識別法を提案した (Koshiba, et al. 2013)。同じ霊長類の本コモン・マーマセット・モデルの様に、ヒト新生児の「仰臥位に返した後に出現する背屈」については、胎児期に立位反射の機能的要素を潜在的に有しつつ、骨格筋の機能的限界から反射レベルでは同行動に達せず、随意的な運動制御を伴い腹臥位の体位を嗜好する原初的な高次行動を表現した、という仮説を立てることができるかもしれない。

早産児の生存率が世界一高い先端的周産期医療水準を誇るわが国では、いっぽうで、基礎疾患を伴わない早期産児の人口比率が高く (OECD Library 2013)、早産と自閉症スペクトラムなどの発達障がいとの相関性が示唆されている (Teitelbaum, PNAS 2004)。本報告が提示する、重力環境に留意しながら、環境相互作用の神経学的な発達基盤を考察するとき、自閉症スペクトラムとの関わりが深い小脳や脳幹において、前庭系や視聴覚、体性感覚と生体リズム機能、反射や随意性の運動機能が連合する高次な神経回路の発達に問題が生じることを仮説すると<sup>1-4)</sup>、その発達過程が周産期に開始されている可能性を本報告は示唆する。原始反射および随意性行動のそれぞれ、および、

複合的行動の診断法、および、その霊長類モデルの研究を今後深めることにより、分子基盤や環境の介入などの包括的療育プログラムの開発が進むことが期待される<sup>5,6)</sup>。

## 謝 辞

埼玉医科大学大学病院新生児科、小児科、および、実験動物部門の皆様、本研究を支えて頂きましたことを、深く感謝を申し上げます。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Koshiba M, Senoo A, Karino G, Ozawa S, Tanaka I, Honda Y, Usui S, Kodama T, Mimura K, Nakamura S, Kunikata T, Yamanouchi H, Tokuno H. Susceptible period of socio-emotional development affected by constant exposure to daylight. *Neurosci Res* 2015 Apr; 93: 91-8.
- 2) Koshiba M, Takei H, Honda M, Karino G, Niitsu M, Miyaji T, Kishino H, Nakamura S, Kunikata T, Yamanouchi H. Early-infant diagnostic predictors of the neuro-behavioral development after neonatal care. *Behav Brain Res* 2015 Jan 1; 276: 143-50.
- 3) Karino G, Murakoshi T, Nakamura S, Kunikata T, Yamanouchi H, Koshiba M. Timing of changes from a primitive reflex to a voluntary behavior in infancy as a potential predictor of socio-psychological and physical development during juvenile stages among common marmosets. *JKSUS* 2015; 27: 260-70.
- 4) Koshiba M, Karino G, Mimura K, Nakamura S, Yui K, Kunikata T, Yamanouchi H. Psycho-Cognitive Intervention for ASD from Cross-Species Behavioral Analyses of Infants, Chicks and Common Marmosets. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2016; 15(5): 578-86.
- 5) Homberg JR, Kyzar EJ, Nguyen M, Norton WH, Pittman J, Poudel MK, Gaikwad S, Nakamura S, Koshiba M, Yamanouchi H, Scattoni ML, Ullmann JF, Diamond DM, Kaluyeva AA, Parker MO, Klimenko VM, Apryatin SA, Brown RE, Song C, Gainetdinov RR, Gottesman II, Kalueff AV. Understanding autism and other neurodevelopmental disorders through experimental translational neurobehavioral models. *Neurosci Biobehav Rev* 2016 Jun; 65: 292-312.
- 6) Homberg JR, Kyzar EJ, Stewart AM, Nguyen M, Poudel MK, Echevarria DJ, Collier AD, Gaikwad S, Klimenko VM, Norton W, Pittman J, Nakamura S, Koshiba M, Yamanouchi H, Apryatin SA, Scattoni ML, Diamond DM, Ullmann JF, Parker MO, Brown RE, Song C, Kalueff AV. Improving treatment of neurodevelopmental disorders: recommendations based on preclinical studies. *Expert Opin Drug Discov* 2016; 11(1): 11-25.

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 悪性グリオーマに対する放射線増感による新規治療法の開発

研究代表者 三島 一彦 (国際医療センター 脳神経外科)

研究分担者 深田 淳一\*

## 研究背景

悪性神経膠腫(グリオーマ)は脳腫瘍の中で、最も治療困難かつ予後不良な腫瘍である。悪性グリオーマの中でも膠芽腫は特に予後不良であり、放射線治療と化学療法剤テモゾロミドの併用による標準治療を行なっても、生存期間中央値が1.5年程度、5年生存割合は10%以下であり、腫瘍再発を免れない。悪性グリオーマが予後不良である理由として、治療の中心的役割を果たす放射線治療に対して腫瘍が抵抗性を示すことが挙げられる。グリオーマは様々な遺伝子異常の蓄積により悪性化することが知られている。なかでも頻度の高い遺伝子異常が上皮増殖因子受容体: Epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子の変異であり、EGFR蛋白の量的質的な発現異常が生じ、EGFR細胞外ドメインを欠失したmutant EGFR (EGFRvIII) が悪性グリオーマの約40%で高発現している。このEGFRvIIIはグリオーマで恒常的に活性化しており腫瘍形成や浸潤に関与しているほか、放射線治療抵抗性にも関係していることが示唆されている。すなわちEGFRvIIIを発現するグリオーマ細胞は、これを発現しないグリオーマ細胞に比べ放射線治療抵抗性であることが報告されている。また悪性グリオーマ細胞の中で自己複製能と多分化能、そして強い腫瘍形成能を有するグリオーマ幹細胞の存在が注目されているが、このグリオーマ幹細胞が放射線治療抵抗性を示すことも示唆されている。グリオーマ細胞の中にはこのように放射線治療抵抗性を示す複数の細胞群が存在するため、再発・治療抵抗性の原因となることが考えられる。

一方、腫瘍細胞に対する放射線の効果はDNA損傷により引き起こされ、DNA損傷が修復されないと細胞死が誘導される。放射線によるDNAの2重鎖切断(DSB)に対して修復の反応する経路の中で、MRE11-RAD50-NBS1(MRN)は複合体を作り、DNAの損傷を最初に認識するセンサーとして機能すると考えられている。MRN複合体はDNAの2重鎖切断部位へ最初に集積されると同時に、毛細血管拡張性運動失調症(AT)の原因遺伝子産物である

\*慶應義塾大学医学部 放射線科学教室

ATMをDSB部位へ誘導する。ATMはMRN複合体依存的に活性化され、活性化したATMは下流に位置する様々な分子をリン酸化することによって生体のDNA損傷に対応する細胞周期チェックポイント機構が働き始める。従ってMRN-ATM系の働きを抑制することによりDNA損傷の修復を阻害し、放射線治療感受性を増強する効果が期待される。最近ATMを阻害する低分子化合物が膠芽腫細胞に対して放射線効果を増強し、さらに腫瘍浸潤能を抑制する効果もあることが報告された。そこで放射線治療に抵抗性を示す悪性グリオーマ細胞に対してATMより上流に位置するMRN複合体の機能を阻害することで、より強い放射線治療増感効果が期待される。さらに放射線増感作用を持つ薬剤をいかに腫瘍細胞特異的に導入するかが放射線治療抵抗性克服への重要な課題である。

## 研究目的

悪性グリオーマが治療困難である理由として悪性グリオーマ細胞が放射線照射に抵抗性を示すことがあげられ、予後の改善には、放射線抵抗性の克服が必須である。本研究では放射線照射によるDNAの2重鎖切断(DSB)を修復する経路の中で最初に機能するMRNを抑制することでDNA損傷の修復を阻害し放射線治療増感効果がみられるかを検討した。またグリオーマ摘出術に蛍光診断薬として用いられる光感受性物質: 5アミノレブリン酸(5-ALA)の代謝物であるプロトポルフィリンIX(PpIX)が悪性グリオーマ細胞内に特異的に蓄積することを利用し、「PpIXが放射線増感作用をもてば悪性グリオーマ細胞を標的とした治療が可能である」という仮説のもと、悪性グリオーマ細胞の放射線増感を目指した新たな治療法の開発を目的とした。

## 材料と方法

## 1) 細胞株、培養

ヒト悪性グリオーマ細胞株: U251, LN229, LN428は10% FBS添加DMEM培養液で、ヒト線維芽細胞AG1522は15% FBS添加EME培養液で37℃、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。MirinはSigma社(St. Louis, MO)より入手した。

細胞への照射はMBR-1520R照射装置 (Hitachi Medical) を用い2 Gy/分で行った。

2) 細胞生存アッセイ

96 wellのプレートを用い各wellに5000個の細胞を培養し, Mirinを10, 25, 50あるいは100 μM濃度で3時間処理後, CCK-8 assayキット (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて行った。

3) Clonogenic survival assay

悪性グリオーマ細胞を10 cm dishに24時間培養後, Mirinをそれぞれ10, 25, 50あるいは100 μMで投与し3時間培養後, Mirinを除去して細胞を14日間培養した。コントロールはMirinの代わりにDMSOを添加し同様の処理を行った。

4) 細胞周期

10 cm dishに悪性グリオーマ細胞を培養し, Mirin (25 μM) を投与し3時間後に4 Gyで照射し48時間後に細胞を集め70%エタノールで固定した。Propidium iodide (PI) で染色した細胞をGallios™ (Beckman Coulter, Brea CA, USA) FACScanで測定し, Kaluza v1.3 (Beckman Coulter, Brea CA, USA) で解析した。

5) Annexin V-PIアポトーシス アッセイ

10 cm dishに悪性グリオーマ細胞を培養し, Mirin (25 μM) を投与し3時間後に4 Gy照射し48時間後に接着細胞と浮遊細胞を集めPBSで洗浄後binding bufferに浮遊させ, Annexin V-FITC (BioVision, Milpitas, CA) とPIを15分反応させ, FACScanでAnnexin V FITC陽性細胞を測定した。

6) Mitotic catastropheの検出

悪性グリオーマ細胞をLab-Tek Chamberスライド上に培養し, Mirin (25 μM) の投与3時間後, 4 Gyで照射し72時間後に細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した後, DAPI染色を行い, 蛍光顕微鏡下で2核以上の多核細胞数を計測した。

結果

1) MRN阻害剤: Mirinによるグリオーマ細胞増殖抑制効果

3種類のヒト悪性グリオーマ細胞株: U251, LN229, LN428と正常ヒト線維芽細胞株: AG1522にMirinを0~100 μMで添加し各細胞の生存率をみた。Mirin: 25 μMで線維芽細胞の生存は抑制されず, 一方Mirin: 25 μMですべての悪性グリオーマ細胞株において生存率は82-84%と有意に抑制された(図1)。

2) グリオーマ細胞に対するMirinの放射線増感作用

1)の実験結果をもとに, 25 μM濃度のMirinを各悪性グリオーマ細胞に3時間作用させ, その後放射線を照射しコロニー形成能を検討した。その結果, Mirinで処理し放射線照射を行なうと, 照射単独に比べいずれの悪性グリオーマ細胞株においてもコロニー形成能が有意に抑制された(図2)。

3) 悪性グリオーマ細胞に対するMirinと照射によるアポトーシスの誘導

いずれの悪性グリオーマ細胞株に対しても, Mirin単独投与, 照射単独に比較し, Mirinと照射の併用によりアポトーシスが有意に誘導された(図3)。

4) 悪性グリオーマ細胞に対するMirinと照射による細胞周期の検討, mitotic catastropheの誘導

いずれの悪性グリオーマ細胞株においても, Mirinと照射併用により, Mirin単独, 照射単独に比較し, G2/M期に細胞が集積した(図4)。

またMitotic catastropheに陥った細胞がMirinや照射単独に比べMirinと照射併用により有意に増加した(図5)。

考察

MRNを阻害する低分子化合物(Mirin)は悪性グリオーマ細胞に対して有効な放射線増感剤となることが確認された。その機序として, 細胞周期の停止, アポトーシスの誘導, Mitotic catastropheの誘導が考えられた。以上よりMRNは悪性グリオーマの放射線治療抵抗性克服につながる新たな治療標的分子となる可能性が示唆された。腫瘍細胞特異的に放射線増感作用を持つ薬剤をいかに導入するかが次なる課題であり, 我々は光感受性物質:

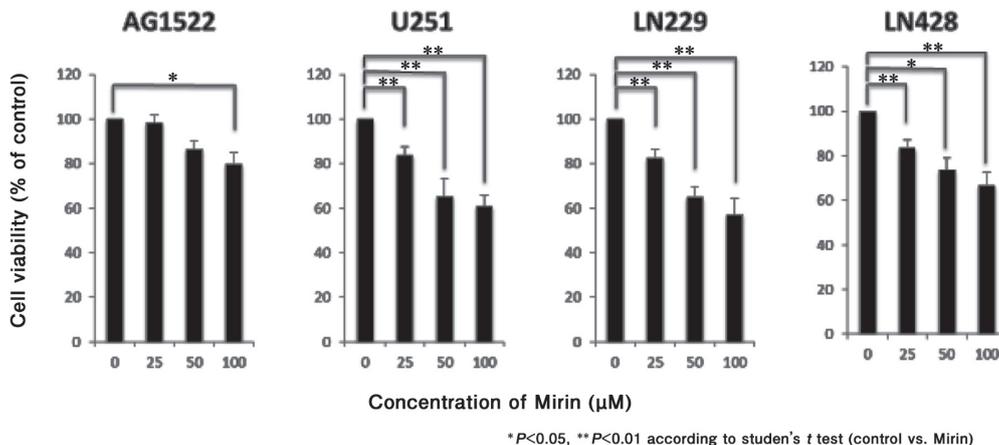


図 1.

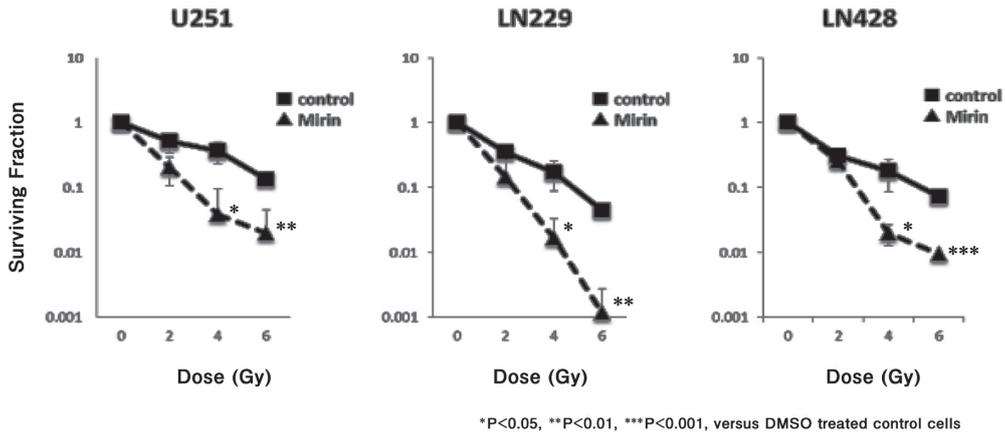


図 2.

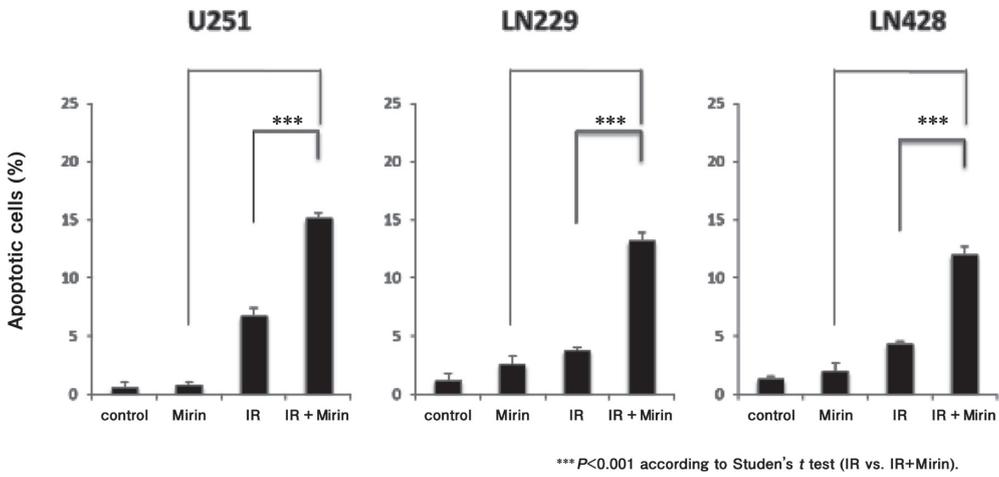


図 3.

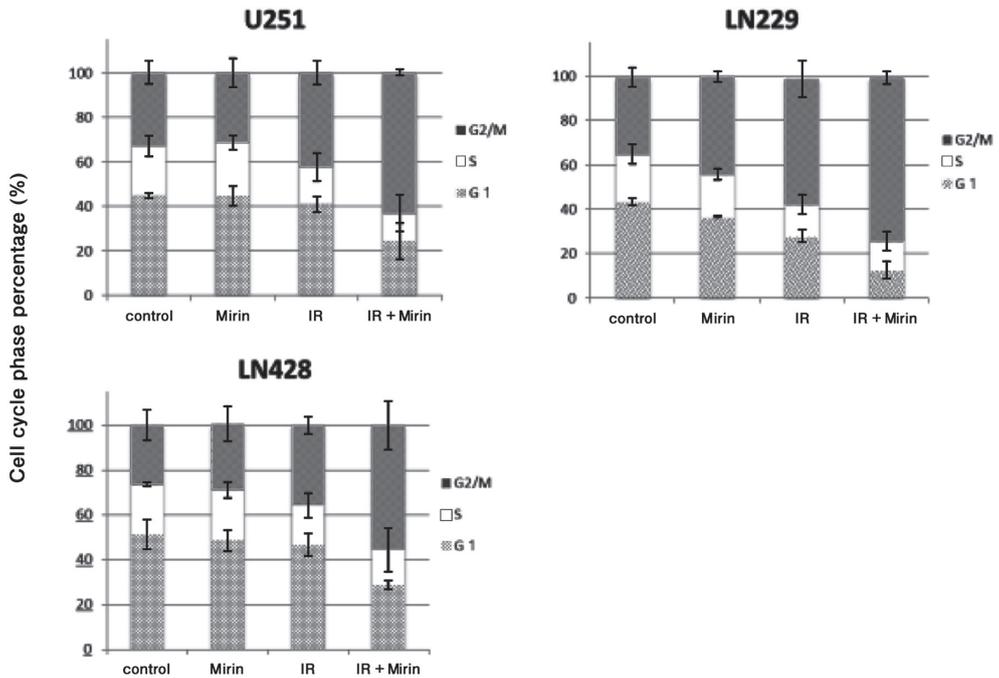


図 4.

5-ALAに注目した。悪性グリオーマ摘出術に蛍光診断薬として用いられる5-ALAは、その代謝物であるPpIXが悪性グリオーマ細胞内に特異的に蓄積することを利用している。PpIXが放射線増感作用をもてば、正常脳組織への障害を少なく、かつ悪性グリオーマ細胞を標的とした治療が可能であると考えられる。そこで5-ALAによる悪性グリオーマ細胞を標的とした放射線治療効果の増強を目指した新たな治療法の開発に着手している。Preliminaryな結果ではあるが、5-ALAをグリオーマ培養細胞株に

投与した後に照射を行うと、照射単独に比べコロニー形成能が強く抑制されることが示され、5-ALAは放射線増感作用をもつことが確認された(図6)。今後はさらに5-ALAの放射線増感作用のメカニズムについて検討する予定である。

謝 辞

本研究は平成27年度埼玉医科大学学内グラントにより行われた。

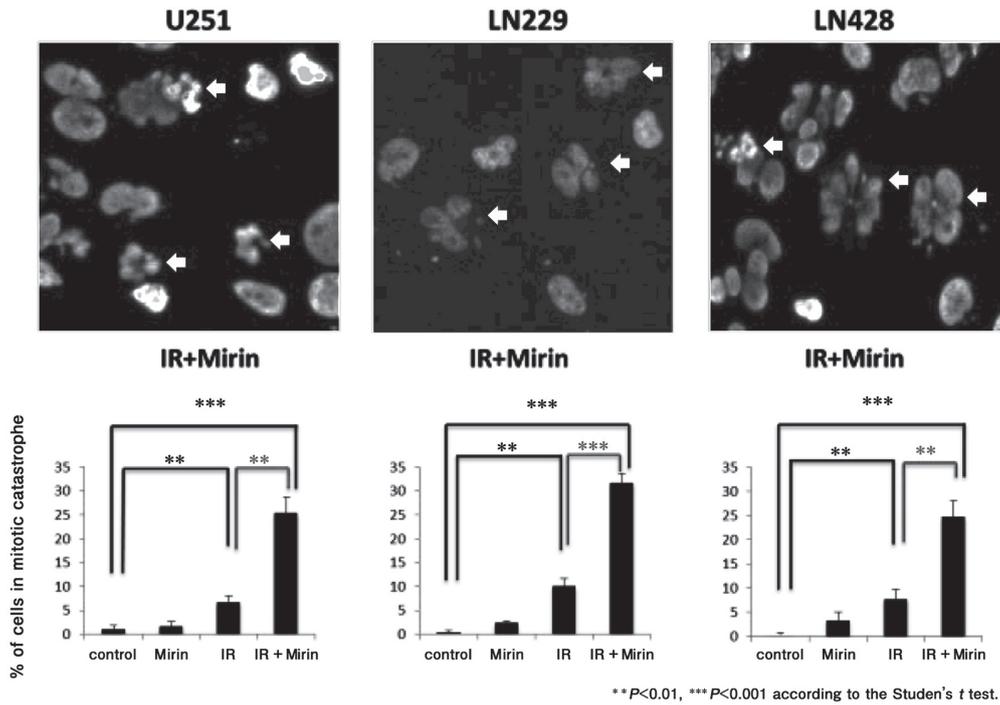


図 5.

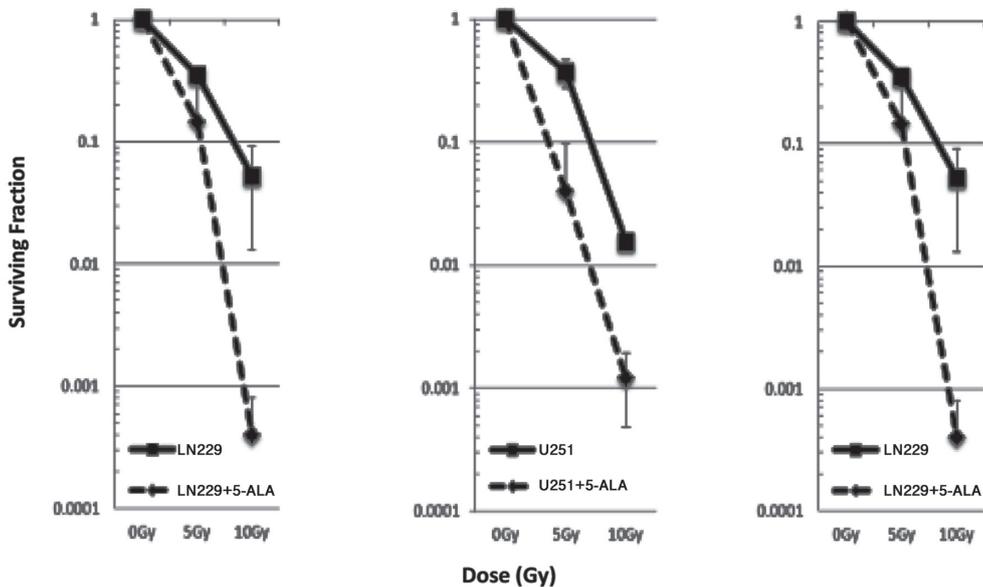


図 6.

## 研究成果リスト

## 論文

- 1) 三島一彦. 中枢神経系原発悪性リンパ腫, リンパ腫学, 日本臨床 2015; 73: 585-96.
- 2) Fukuoka K, Yanagisawa T, Watanabe Y, Suzuki T, Shirahata M, Adachi J, Mishima K, Fujimaki T, Matsutani M, Wada S, Sasaki A, Nishikawa R. Brainstem oligodendroglial tumors in children: two case reports and review of literatures. Childs Nerv Syst 2015; 31(3): 449-55.
- 3) Fukuoka K, Yanagisawa T, Suzuki T, Shirahata M, Adachi JI, Mishima K, Fujimaki T, Matsutani M, Nishikawa R. Malignant transformation of germinoma 14 years after onset: Favorable efficacy of oral etoposide. Pediatr Int 2015; 57: 483-6.
- 4) Ishihara H, Ishihara S, Niimi J, Neki H, Kakehi Y, Yemiya N, Kohyama S, Yamane F, Kato H, Suzuki T, Adachi JI, Mishima K, Nishikawa R. The safety and efficacy of preoperative embolization of meningioma with N-butyl cyanoacrylate. Interv Neuroradiol 2015; 5: 624-30.
- 5) Sutani S, Ohashi T, Sakayori M, Kaneda T, Yamashita S, Momma T, Hanada T, Shiraishi Y, Fukada J, Oya M,

Shigematsu N. Comparison of genitourinary and gastrointestinal toxicity among four radiotherapy modalities for prostate cancer: Conventional radiotherapy, intensity-modulated radiotherapy, and permanent iodine-125 implantation with or without external beam radiotherapy. Radiother Oncol 2015; 117: 270-6.

## 学会発表

- 1) 三島一彦. 悪性神経膠腫手術時のBCNU wafers留置における留置点と使用経験, 第10回脳腫瘍の基礎シンポジウム, 特別講演, 2015年4月25日, 東京
- 2) 三島一彦, 鈴木智成, 安達淳一, 佐藤大樹, 塚越瑛介, 内田栄太, 藤巻高光, 西川 亮. 高齢者中枢神経悪性リンパ腫に対する導入免疫化学療法と維持化学療法による照射を回避した治療戦略と課題, 日本脳神経外科学会第74回学術集会, シンポジウム, 2015年10月14日, 札幌
- 3) 三島一彦, 安達淳一, 鈴木智成, 内田栄太, 石田譲治, 佐藤大樹, 塚越瑛介, 藤巻高光, 西川 亮. 高齢者中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する照射を回避した治療戦略, 第33回日本脳腫瘍学会学術集会, 口演, 2015年12月8日, 京都

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

染色体微細構造異常に着目したミトコンドリア呼吸鎖異常症の新規原因遺伝子同定

研究代表者 平田 智子 (ゲノム医学研究センター)

緒言

ミトコンドリア呼吸鎖異常症 (以下ミトコンドリア病) は劣性遺伝形式が中心と考えられている難病であり、200を超える既知遺伝子が知られているが、いまだ患者の60%が病因診断に至っていない。遺伝的な原因の大部分はミトコンドリアゲノムではなく、核にコードされた遺伝子の異常と考えられている。

我々はこれまで140例を超える希少疾患の網羅的ゲノム解析を行ってきた。特に難病であるミトコンドリア病の中でも重篤なケースが多い小児例を中心に解析をし、この集団からこれまで6つの新規原因遺伝子を明らかにしてきた (Kohda, Hirata, et al. PLOS Genet 2015)。小児ミトコンドリア病のゲノム解析では世界でもっとも多検体での成果であり、35%と高い原因同定率を達成した。また国内の東北メディカルメガバンクを始め、国外のミトコンドリア病研究グループともコラボレーションしつつ成果を生み出すことに成功してきた。新規データを含めたこれらの成果は申請者およびコアメンバーにより学会でも報告した (Hirata, et al. 日本ミトコンドリア学会年会 2015)。

近年、国外においても高速シーケンサーを用いた同様の試みが報告されつつある。このような国際的な動向の中で、本プロジェクトでこれまでに報告のない発見が幾つかあった。その中の1つが、ミトコンドリア病患者における染色体の微細構造異常である。我々は通常の染色体検査よりも高解像度に染色体の微細構造異常を捉えられるSNPマイクロアレイを適用し、ミトコンドリア病で今までに報告例のない染色体微細構造異常を全検体の約10%から同定した。

本研究の目的は、ミトコンドリア呼吸鎖異常症の患者から新規に同定された染色体微細構造異常に注目して新規の原因遺伝子を明らかにすることである。現在までに蓄積した検体由来細胞リソース、ミトコンドリア呼吸鎖活性の測定技術に加え、遺伝子ノックアウトによる解析を行う。これにより微細構造異常領域に含まれるどの遺伝子が直接的に疾患を引き起こしている原因であるのかを明らかにする。さらに、新規に同定した遺伝子がこれまで知られていないミトコンドリア関連の機能を持つことを新たに

解明していく。これらの結果は、劣性遺伝形式で発症すると考えられてきたミトコンドリア病がハプロ不全によっても引き起こされることを新たに証明することにつながる。

材料と方法

Affymetrix社製のマイクロアレイ (SNP Array 6.0) を用いて染色体微細構造異常の検出を行った。解析ソフトはAffymetrix社製のGenotyping Consoleを用いた。Genotypingを行った後にCNV解析を実施し、染色体全域に渡ってコピー数を算出した。データベース (リファレンスデータ) と照らし合わせ、健常者にも見られる (疾患とは関連しない) バリエントを取り除き、病因となりうるコピー数変異領域の探索を合計163名のミトコンドリア病症例で実施した。検出された染色体微細構造異常については、OMIMやDECIPHERなどのデータベースに登録がないかについても検証した。

結果

ミトコンドリア呼吸鎖異常症の163症例中、28症例で微細な染色体構造異常が検出された。その中で、血縁関係のない独立した患者2名において同じ6q24.3-25.1領域に1.7 Mbの欠失 (コピー数1) の染色体微細構造異常が見つかった (図1)。欠失領域に含まれる遺伝子もすべて同一であった。この6q24.3-25.1領域を両親についてもマイクロアレイ解析を行い、その結果いずれの両親にもこの欠失は

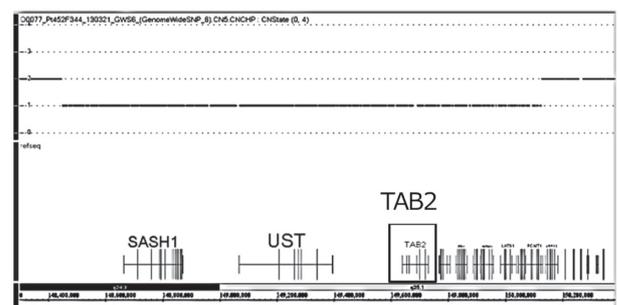


図1. 欠失している6q24.3-q25.1領域に含まれる遺伝子。TAB2 (先天性心疾患に関与) など11個の遺伝子を含んでいる。

見られなかったことから、患者2人ともに突然変異で欠失していることが判明した(図2)。この1.7 Mbの6q24.3-25.1領域内にはTAB2など11個の遺伝子が含まれていたが、そのいずれもミトコンドリア関連としては知られていない遺伝子であった。

## 考察

同じ領域の突然変異による染色体微細構造異常が、疾患とは関係なく独立した2人のミトコンドリア病患者に偶然に存在する可能性は極めて低く、この6q24.3-25.1領域の染色体微細構造異常がミトコンドリア病の発症に関与している可能性が高いと考えられる。この領域に含まれる11個の遺伝子は現在までにミトコンドリア関連として知られておらず、新規のミトコンドリア病原因遺伝子を同定できると考えている。さらに、これまで関連が知られていないミトコンドリア病と先天性心疾患(6q24.3-25.1は先天性心疾患の責任領域の1つ)の関係が分子レベルで明らかにできると期待される。どの遺伝子が発症に関与しているかを特定するための方法として、患者で欠失を受けている領域に含まれる遺伝子をCRISPR/Cas9システムを用いて1個ずつノックアウトし、SDS-PAGEによる呼吸鎖複合体の測定を行い、患者において量の減少が見られる呼吸鎖複合体への影響を検証する。このとき、ヘテロ欠失、ホモ欠失クローンを個別に検証し、ヘテロ欠失クローンでも呼吸鎖複合体の異常

が見られるかを確認してハプロ不全での発症の可能性についても検証することができると期待される。

重篤なミトコンドリア病小児患者のほとんどが劣性遺伝による発症と考えられている。しかし、我々が同定した患者らは、片側の染色体欠失によるハプロ不全が原因による発症であると考えられ、このことが証明できれば本疾患の研究領域においてこれまでに報告例がない原因遺伝子のハプロ不全によるミトコンドリア病の発症という重要な発見になる。劣性遺伝が多いとされる本疾患において、優性遺伝形式が原因として有り得る事実を示すことは、疾患の発症頻度の高さに直結してくるため、大変重要で意義のあることであると言える。さらに、染色体微細構造異常がミトコンドリア病を引き起こすという新しい機序を証明することもできる。また、染色体微細構造異常からゲノム編集技術によるノックアウト法によって原因遺伝子を同定するアプローチ法を確立できる。

本研究によって染色体微細構造異常の領域に含まれる遺伝子の中から疾患に直接関わる新規の原因遺伝子を見出すアプローチが正しいことを証明できれば、今まで染色体微細構造異常と疾患との関連性が考えられていなかったミトコンドリア病以外の数多くの原因遺伝子未解明な疾患においてもその検討の重要性を示すことができ、遺伝性疾患研究に新たな知見をもたらすことが期待できる。

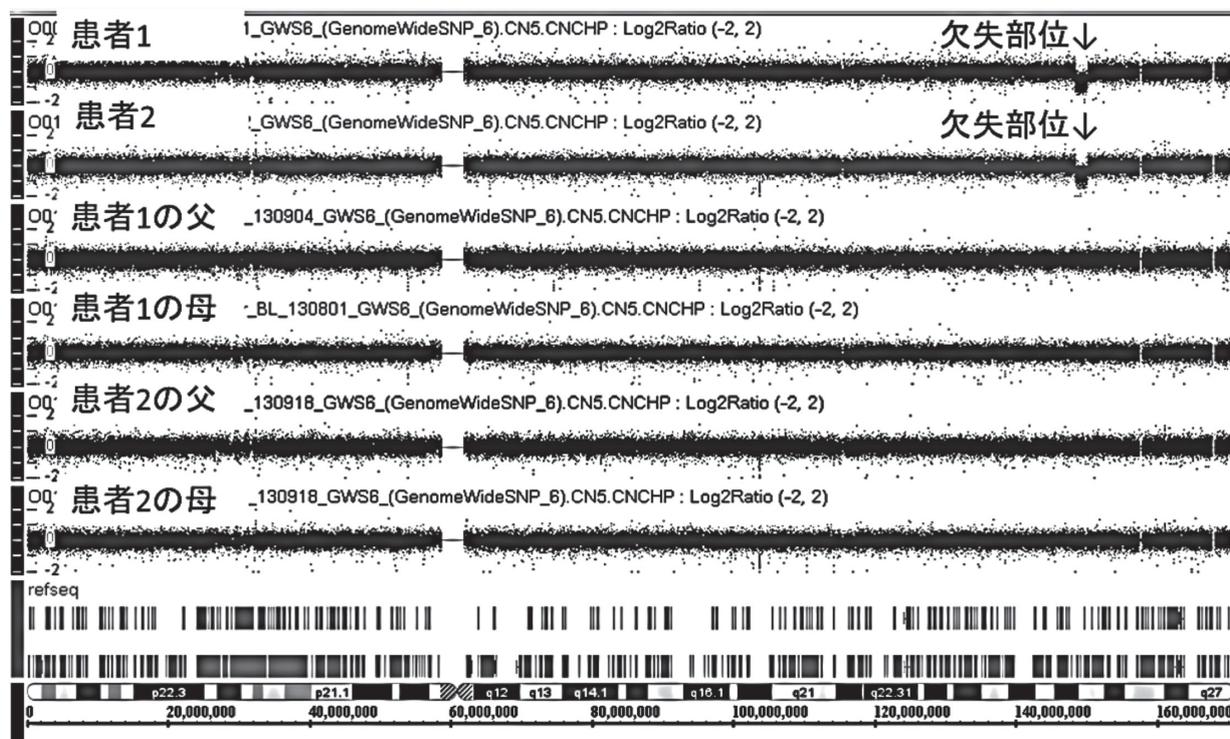


図2. マイクロアレイによるトリオ解析。患者1と2に見つかった6q24.3-q25.1欠失はともに、両親には見られない (de novo) ことを確認できた。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、ゲノム医学研究センターゲノム科学部門の岡崎康司教授、トランスレーショナルリサーチ部門の神田将和助教に多大なご協力を頂きました。深く感謝申し上げます。

## 研究成果リスト

### 学会発表

- 1) Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Yamashita-Sugahara Y, Mizuno Y, Nakachi Y, Moriyama Y, Hirata T, et al. A comprehensive genomic analysis for mitochondrial respiratory chain disorder, 米国人類遺伝学会年会, 2015

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 癌間質・脈管内組織の生物学的特性に基づく癌悪性度評価

研究代表者 長谷部 孝裕 (国際医療センター 病理診断科)

研究分担者 杉山 迪子\*, 島田 浩子\*

## 緒言

近年腫瘍間質の性状が癌の悪性度を規定し、腫瘍間質における腫瘍遺伝子発現が重要な役割を担うことが報告された (Patocs A, et al. *New Engl J Med* 2007; 20: 2543-51. Lim KP, et al. *J Pathol* 2011; 223: 459-69. Torres S, et al. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 6006-19. Augsten M, et al. *Cancer Res* 2014; 74: 2999-3010.).

以前より、我々は腫瘍間質の生物学的性状が癌の増殖・伸展に深く係わることを乳癌、大腸癌、膵癌等で報告してきた (Hasebe T, et al. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 385-94. Hasebe T, et al. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49: 195-208. Hasebe T, et al. *Hum Pathol* 2001; 32: 401-9. Watanabe I, Hasebe T, et al. *Pancreas* 2003; 26: 326-33.). 殊に浸潤性乳管癌 (以下 invasive ductal carcinoma, IDC) における Fibrotic focus (FF) は、乳管癌患者転帰及び腫瘍内血管新生亢進と有意に相関することを報告した (Hasebe T, et al. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49: 195-208. Hasebe T, et al. *Mod Pathol* 2002; 15: 502-16. Hasebe T, et al. *Hum Pathol* 2008; 39: 681-93. Jitsuiki Y, Hasebe T, et al. *Mod Pathol* 1999; 12: 492-8.). その後、FFの予後因子としての有用性及び血管新生亢進との相関は、欧米施設においても確証された (Colpaert C, et al. *Histopathology* 2001; 39: 416-25. Colpaert C, et al. *J Pathol* 2001; 193: 442-9. Colpaert C, et al. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 81: 137-47. Baak JPA, et al. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2093-101. Van den Eynden GG, et al. *Br J Cancer* 2005; 93: 1128-36. Maiorano E, et al. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121: 211-8.). さらにcDNAマイクロアレイ解析により、FFの存在は低酸素・リンパ管・血管新生関連遺伝子、予後不良規定遺伝子等の発現と有意に相関することも明らかとなった (Van den Eynden GG, et al. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2944-52.). 我々も原発腫瘍組織だけでなく、リンパ節転移腫瘍組織間質性状も予後の有意な指標となることを、術前薬物療法陽性例を含む異なるIDC母集団において確証した (Tamura N, Hasebe T, et al. *Cancer Sci* 2009; 100: 2101-8. Hasebe T, et al. *Hum*

*Pathol* 2011; 42: 998-1006.). また、p53蛋白核陽性腫瘍間質線維芽細胞、殊にFF内p53蛋白核陽性腫瘍間質線維芽細胞の存在が極めて重要であることを報告した (Hasebe T, et al. *Cancer Sci* 2009; 100: 2101-8. Hasebe T, et al. *Hum Pathol* 2010; 41: 262-70. Hasebe T, et al. *Mod Pathol* 2010; 23: 662-72.). さらに、p53蛋白核陽性腫瘍間質線維芽細胞の中には、奇怪な核を有する異型腫瘍間質線維芽細胞 (atypical tumor stromal fibroblast, ATSF) が有意に多く、その存在は、術前薬物療法の有無に係わりなくIDC例の重要な病理組織学的予後因子となることを報告した (Hasebe T, et al. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 325-36. Hasebe T, et al. *Hum Pathol* 2011; 42: 998-1006.).

次に、我々はリンパ管腫瘍塞栓異型度 (Ly-Grade) が、極めて有用な乳管癌の組織学的予後因子となることを術前薬物療法施行例も含む異なる3群のIDC母集団で証明した (Hasebe T, et al. *Hum Pathol* 2008; 39: 427-36. Hasebe T, et al. *Hum Pathol* 2010; 41: 706-15. Hasebe T, et al. *Mod Pathol* 2010; 23: 581-92.).

以上の腫瘍間質、Ly-Grade関連の研究成果を基に、我々はIDCにおける重要な病理組織学的予後因子を総括し報告し (Hasebe T, et al. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 1484-97.), Ly-Grade, ATSFの存在は、IDCの局所再発と密接に関係することを解明した (Hasebe T, et al. *Cancer Sci* 2013; 104: 1252-61.).

以上の研究は、主に国立がん研究センター中央・東病院で手術されたIDC症例を対象に行った研究であった。今後の研究は、埼玉医科大学国際医療センターで手術切除されたIDC症例を対象とするものであり、我々が提唱してきた組織学的悪性度評価の普遍性を示すと共に、組織形態像に基づく癌悪性度評価に科学的根拠を与え、癌の生物学的特性も踏まえた、新たな病理組織学的悪性度評価法を確立することを目標とする。今回は、1) 静脈内腫瘍塞栓、2) FFと腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage, TAM) の浸潤に焦点をあてた研究を行い、IDCの増殖・伸展における静脈内腫瘍組織および原発腫瘍間質の重要性を解明する。

\* 国際医療センター 乳腺腫瘍科

材料および方法

1) 静脈腫瘍塞栓に関する研究—静脈腫瘍塞栓組織異型度 (Grading system for blood vessel tumor emboli, BV-Grade)

263例のIDCを対象とした。症例は術前薬物療法陰性症例であり、2007年2月から2009年12月の期間において、国際医療センターで手術・切除された症例である。263例中248例は術後薬物療法が施行され、すべての症例はUICC pTNM分類により病期分類された。

BV-gradeは、静脈内腫瘍塞栓を形成する腫瘍細胞の核分裂像およびアポトーシス像により分類される(表1)。

加えて、Ki-67およびcaspase 3による免疫染色により、静脈内腫瘍塞栓形成腫瘍細胞の増殖能およびアポトーシス率も計測した。

静脈腫瘍塞栓の核分裂像とMIB-1腫瘍細胞増殖能標識率およびアポトーシス像とcaspase 3発現率間の相関は、ANOVAにより検討した。患者転帰との関係については、単変量・多変量解析共に、Cox proportional hazard

regression modelにより行い、静脈腫瘍塞栓異型度と既知臨床病理学的因子の中から、腫瘍再発に有意に相関する因子を求めた。

2) FFとTAMに関する研究

258例のIDCを対象とした。症例は術前薬物療法陰性症例であり、2007年2月から2009年12月の期間において、国際医療センターで手術・切除された症例である。258例中244例は術後薬物療法が施行され、すべての症例はUICC pTNM分類により病期分類された。

免疫染色により、TAMの細胞表面マーカー (CD68, CD163, CD204) を染色し、腫瘍内に浸潤する3種のTAMの細胞数の計測を試みた。細胞数は弱-中拡大で、TAMが最も多く浸潤している領域を同定し、強拡大(x40)1視野における、CD68陽性TAM数、CD163陽性TAM数、CD204陽性TAM数を計測した。

FFおよび既知臨床病理学的因子とTAM浸潤の相関は、ANOVA (単変量) および重回帰分析 (多変量) により解析した。TAM, FF, および既知臨床病理学的因子と患者転帰との相関 (単変量・多変量) は、Cox proportional hazard regression modelにより行った。

表 1.

静脈腫瘍塞栓異型度		
異型度 0	静脈侵襲像陰性	
異型度 1, 2	静脈侵襲像陽性	
	静脈腫瘍塞栓	
	核分裂数	アポトーシス数
異型度 1	低細胞周期型	
1a	0	いかなる数
1b	1	0, 1, 2
異型度 2	高細胞周期型	
2a	1	3個以上
2b	2個以上	1個以上

結果

1) 静脈腫瘍塞栓に関する研究—静脈腫瘍塞栓組織異型度 (Grading system for blood vessel tumor emboli, BV-Grade)

静脈腫瘍塞栓核分裂数と静脈腫瘍塞栓MIB-1標識率との間には有意な相関を認めた ( $p < 0.001$ )。静脈腫瘍塞栓アポトーシス数とcaspase 3陽性細胞数との間にも有意な相関を認めた ( $p = 0.001$ )。BV-Gradeと静脈内腫瘍塞栓MIB-1標識率およびcaspase 3陽性細胞数の間にも有意な相関を認めた(図1)。

多変量解析による予後検討の結果、BV-Grade 2症例は、全症例、リンパ節転移陰性・陽性症例、病期I/II症例、病期III症例、ホルモン受容体陽性症例、HER2陰性症例に

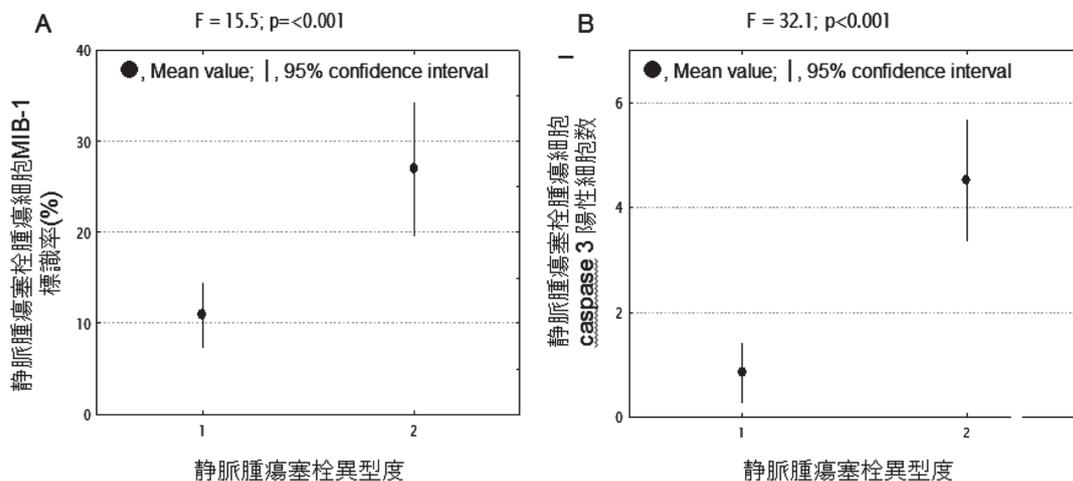


図 1.

において、有意な腫瘍再発の予後因子となることが明らかとなった。また、BV-Grade 1症例は、BV-Grade 0症例（静脈侵襲陰性例）とほぼ同様の腫瘍再発・死亡率を示し、BV-Grade 1症例とBV-Grade 0症例との間には、有意な差を認めないことが明らかとなった。

## 2) FFとTAMに関する研究

3種TAM浸潤と有意な相関を示した因子は、FFのみであり、FF陽性症例において、3種TAM浸潤が有意に多く、かつ、FF径が大きくなるに従い、TAM浸潤数も高値となることが判明した(表2)。

表 2.

TAM 浸潤					
CD68-陽性 TAM		CD163-陽性 TAM		CD204-陽性 TAM	
$\beta$	p-value	$\beta$	p-value	$\beta$	p-value
SE		SE		SE	
Fibrotic focus (mm) : absent, $\leq 8$ , $> 8$					
0.245	<0.001	0.147	0.019	0.254	<0.001
0.060		0.062		0.059	

単変量解析による予後検討では、3種のTAMでは、CD204陽性TAM数が腫瘍再発と密接に関係していることが明らかとなった。CD204陽性TAM数、FFを含む既知臨床病理学的因子との多変量解析では、FFは全例、病期I/II例、病期III例、リンパ節転移陽性例において腫瘍再発と有意な相関を示し、CD204陽性TAM数は全例、リンパ節転移陽性例、MIB-1増殖能高値例において、腫瘍再発と有意な相関を示した。

FFとCD204陽性TAMとを組み合わせた分類を作成し、検討した結果、FF/CD204陽性TAM分類は、全例、病期I/II例、病期III例、リンパ節転移陰性例、リンパ節転移陽性例、HER2陰性例、MIB-1増殖能高値例、すべてのsubgroupにおいて、腫瘍再発と有意に相関することが判明した。

## 考 察

### 1) 静脈腫瘍塞栓に関する研究—静脈腫瘍塞栓組織異型度 (Grading system for blood vessel tumor emboli, BV-Grade)

BV-Gradeで評価することにより、静脈侵襲陽性症例の中から、予後良好群(BV-Grade 1)と予後不良群(BV-Grade 2)を選別可能であり、静脈侵襲の有無、静脈侵襲数での評価に比べ、より詳細な予後検討ができることが明らかとなった。BV-Gradeは、腫瘍塞栓腫瘍細胞の核分裂像、アポトーシス像により評価しており、腫瘍塞栓腫瘍細胞の細胞周期を調節する因子の遺伝子および蛋白発現の重要性が示唆される。また、腫瘍塞栓内における腫瘍間質成分の存在および役割、腫瘍細胞—腫瘍間質細胞

相互作用、上皮—間葉移行などの腫瘍塞栓内微小環境及び高細胞周期を示す腫瘍塞栓細胞が産生・分泌する因子の解明が標的治療等を考慮する上で、今後必要になると考えられる。

### 2) FFとTAMに関する研究

IDCの組織像を検討するにあたり、FFの存在はTAM浸潤の多寡を正確に推測する上で、極めて重要な組織学的指標となりえることが明らかとなった。また、FFの存在およびCD204陽性TAM浸潤の程度は、それぞれ単独でも、IDC患者の転帰を推測する上で有用な因子であったが、両因子を組み合わせて評価する、FF/CD204分類は、より正確にIDC患者の転帰を評価できることを解明した。TAMは腫瘍内において、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、増殖因子受容体などを産生し、IDCの増殖・浸潤に密接に係わることが明らかとなっている。よって、IDCにおけるFFの存在は、TAM浸潤を標的とした治療を行う上で、症例選択に有用であり、TAM標的治療を行うことにより、FF陽性IDC症例の予後改善に寄与できるものと示唆される。今後は、FF陽性IDC内に浸潤するTAMsが、どのような種類のサイトカイン、ケモカイン、増殖因子、増殖因子受容体因子等を産生しているのか解明することが肝要と考えられる。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Sugiyama M, Hasebe T, Shimada H, Takeuchi H, Shimizu K, Shimizu M, Yasuda M, Ueda S, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T. Grading system for blood vessel tumor emboli of invasive ductal carcinoma of the breast. *Hum Pathol* 2015;46:906-16.
- 2) Shimada H, Hasebe T, Sugiyama M, Shibasaki S, Ueda S, Sugitani I, Shimizu K, Gotoh Y, Yasuda M, Arai E, Takeuchi H, Osaki A, Saeki T. Fibrotic focus and tumor-associated macrophage in invasive ductal carcinoma of the breast. (投稿中)

### 学会発表

- 1) 杉山 迪子, 長谷部 孝裕, 島田 浩子, 清水 京子, 清水 道生, 安田 政実, 大崎 昭彦, 佐伯 俊昭. 静脈腫瘍塞栓異型度—浸潤性乳管癌の有用な予後因子, 第104回日本病理学会総会, 平成27年4月, 名古屋
- 2) 島田 浩子, 長谷部 孝裕, 杉山 迪子, 清水 京子, 安田 政実, 新井 栄一, 大崎 昭彦, 佐伯 俊昭. Fibrotic focus—腫瘍関連マクロファージ浸潤と最も有意な相関を示す乳癌組織形態因子, 第105回日本病理学会総会, 平成28年5月, 仙台(発表予定)

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 喫煙の気管支喘息の病態に与える影響

研究代表者 山崎 進 (大学病院 呼吸器内科)

研究分担者 中込 一之<sup>1)</sup>, 内田 義孝<sup>1)</sup>, 宮内 幸子<sup>1)</sup>,柚 知行<sup>1)</sup>, 野口 哲<sup>2)</sup>, 小林 威仁<sup>2)</sup>, 永田 眞<sup>1)</sup>

## 緒言

気管支喘息は、吸入ステロイドを中心とした抗炎症療法の普及により、以前と比べコントロール良好な疾患となったが、現在もなお年間約2000人の喘息死があり、重症喘息の病態解明は急務である。重症喘息の気道では、好中球性炎症及び好酸球性炎症が同時に発動し<sup>1)</sup>、両者が互いに関係することによって、治療抵抗性を獲得することが想定されている。我々は、難治性喘息患者では、喀痰中好酸球数と好中球数が相関し<sup>2)</sup>、好中球遊走因子であるinterleukin (IL)-8の気道での産生が亢進していることを明らかにした<sup>3)</sup>。またin vitroの検討では、好中球と好酸球の共存下でIL-8により好中球の基底膜通過遊走反応を誘導させると、好酸球刺激因子が存在しない状況でも、好酸球の基底膜通過遊走が同時に亢進し<sup>4)</sup>、好中球が好酸球の組織集積を先導する可能性が強く示唆された。従って、好中球性炎症は重症喘息の重要な治療標的の一つと考えられる。好中球性気道炎症を誘導する因子の一つとして、喫煙があげられる。喫煙は、直接気道や肺に刺激し悪影響を与えるだけでなく、ヒストン脱アセチル酵素(histone deacetylase; HDAC)活性を低下させ、吸入ステロイドの効果を減弱させることが知られている<sup>5)</sup>。またButlandらは、アレルギー素因だけでなく喫煙も、喘息再発に関与することを報告している<sup>6)</sup>。近年、気管支喘息と慢性閉塞性肺疾患(COPD)との合併、オーバーラップ症候群(ACOS; Asthma-COPD overlap syndrome)が注目されている<sup>7)</sup>。喘息は、ダニなどのアレルゲンの曝露で誘導され、気道可逆性と気道過敏性が特徴である。一方、COPDは、タバコ煙などの有害物質の曝露で誘導され、呼吸機能検査で正常に復すことのない気流閉塞を示すと定義されている。ACOSは、気道可逆性と過敏性はあるが一秒量は正常化しないなど、喘息とCOPDの両方の特徴を持つ疾患群と定義されるが、喘息単独またはCOPD単独

患者と比べて、予後が悪いと考えられている<sup>7-10)</sup>。元来喘息では、気管支拡張薬を吸入すれば、気流閉塞は改善して、一秒量が正常化する。気管支拡張薬を吸入しても、一秒量が正常化しない(70%以下)症例では、喫煙が重要な役割を果たす可能性が示唆されている。Jamesらは、喘息における喫煙が呼吸機能に及ぼす影響を観察したところ、喘息喫煙者が、喘息非喫煙者や健常喫煙者と比較して、有意に呼吸機能が低下することを報告し<sup>11)</sup>、喘息と喫煙が相互に作用してACOSの病態を形成する可能性が示唆された。我が国での喘息死症例の大部分は高齢者であり、この中にはACOSも相当含まれていると推測される。重症喘息の病態形成において、好中球性炎症が重要な役割を果たすことが知られている。喫煙は、好中球性炎症を誘導する因子の一つであり、直接気道や肺に刺激し悪影響を与えるだけでなく、吸入ステロイドの効果を減弱させることが知られている。しかしながら、喘息の臨床研究において、喫煙者は除外されていることが多く、喫煙の、喘息の気道炎症や重症度などに与える影響については、わかっていないことも多い。本研究は、喫煙の気管支喘息に与える影響について、①誘発喀痰・呼気凝縮液の解析を含む臨床プロファイル②好酸球(+好中球)の組織浸潤・活性化実験システム③マウスモデルを使用し、多面的に解析することを目的とする。喫煙が気管支喘息の増悪因子であることは知られているが、COPDにおける喫煙の役割ほど明確にはされていない。当科での喘息患者の診療は、アレルギー診療に特化したアレルギー喘息センターで行われている。その中で、誘発喀痰及び呼気凝縮液を採取し、解析するシステムはすでに確立している。モストグラフの測定、呼気NOの測定も日常的に行われており、これらとの相関の有無も検討できる状態にある。また当科では年余にわたり好酸球を研究標的とし、好酸球及び好中球の組織浸潤・活性化のin vitroの実験系を日常的に運用してきた。論文として多数報告しており<sup>4, 12-14)</sup>、今回の研究を十分に遂行できる準備状況である。またマウスを用いた実験的研究も、以前より行わ

1) 大学病院 呼吸器内科

2) 大学病院 総合診療内科

れており、現在までに論文として多数報告している<sup>15-20)</sup>。本研究は①ACOSにおける気道炎症の病態を含む臨床プロファイル②タバコ (cigarette smoking extract) の好酸球・好中球の組織浸潤及び活性化の過程における直接的影響③喫煙曝露の好酸球性気道炎症の誘導における影響などが検証・解明される。これら新規情報の最大の意義として、喫煙歴のある重症喘息の新規の治療標的が推定できる可能性が考えられる。

## 材料と方法

### ① 気管支喘息患者における閉塞性換気障害合併例 (ACOS群) と非合併例 (非ACOS群) における臨床プロファイルの検討

埼玉医科大学呼吸器内科及びアレルギー喘息センターに通院している20歳以上の治療ステップ4 (喘息予防・管理ガイドライン2015) 気管支喘息を対象とした。呼吸機能検査で閉塞性換気障害を合併している例をACOS群、合併していない例を非ACOS群として2群の臨床プロファイルを検討した。初めに年齢、性別、身長、体重、BMI (body mass index)、喘息歴、COPD歴、アレルギー合併歴、喫煙歴などのデータを記録した。また血液検査 (好酸球数、総IgE (immunoglobulin E)、IgE RAST (radioallergosorbent test)、TARC (thymus and activation-regulated chemokine)、抗核抗体、リウマチ因子、抗CCP (cyclic citrullinated peptide) 抗体など)、呼吸機能検査、モストグラフ検査、呼気NO検査を行った。呼気NOの測定は、NIOX MINO (Aerocrine社) を用い、呼出流速50 mL/s、口腔内圧5~20 cmH<sub>2</sub>Oで行った。さらに、喘息コントロールテスト (ACT) や、COPDアセスメントテスト (CAT)、修正MRC (Medical Research Council) 質問表も検討した。またCOPD stageを評価し、これらの臨床プロファイルを2群で比較検討した。

### ② タバコ (cigarette smoking extract) の好酸球または好中球活性化に対する影響

タバコはマルボロ<sup>®</sup>を用い、本学研究室で抽出を行った。好酸球や好中球は、今まで当科で行ってきたプロトコルに準じて、デキストラン、Percoll液、及びimmunomagnetic beadsによるnegative selectionにて分離する。

#### (1) タバコの好酸球接着・遊走・活性酸素産生に対する直接的な影響

好酸球をcigarette smoking extractで刺激した後、①抗ICAM-1またはVCAM-1抗体をcoatしたplateとincubateし、残存好酸球ペルオキシダーゼ測定法で接着反応を測定②Boyden chamber変法を用い、遊走因子として下層にIL-5を用い、残存好酸球ペルオキシダーゼ測定法で遊走反応を測定③チトクロームC還元法を用い、活性酸素産生能を測定し、タバコの好酸球のeffector機能に対する直接的効果を検討する。

#### (2) タバコの好中球活性酸素産生に対する直接的な影響

好中球をcigarette smoking extractで刺激した後、活性酸素産生能を測定する。

### ③ マウスアレルギー性気道炎症モデルにおける喫煙の影響

BALB/cマウス (6-8週) を用いる。喫煙曝露は、群馬大学との共同研究で行う。Kentucky Research Cigaretteを用いマウスに吸入させる。タバコ量及び曝露頻度は、肺気腫モデル (1日2本・週6日・6カ月) より減量する。実際には予備実験を行ったうえで決定する。卵白アルブミン (OVA) の感作及び吸入は、当院で行ってきたプロトコルに準じて行う。2 µgのOVAと2 mgの水酸化アルミニウムを混合し、第0日と第11日に腹腔内注射を行い全身感作する。吸入感作は、第18日から20日にかけて、3% OVA/PBSで10分間行う。コントロールマウスは、第0日と第11日に生理食塩水を腹腔内投与し、第18日から20日にかけてPBSを吸入させる。OVA最終吸入の24時間後に、(1) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の細胞分画 (2) 病理組織 (3) BALFサイトカイン (4) 肺抽出液サイトカイン (5) 血清IgEの評価を行う。

## 結果

### ① 気管支喘息患者における閉塞性換気障害合併例 (ACOS群) と非合併例 (非ACOS群) における臨床プロファイルの検討

80例の成人重症気管支喘息患者が診療録より抽出され、そのうちACOS群が42例、非ACOS群が38例であった。患者背景ではACOS群において有意に高齢 ( $p<0.01$ ) で、男性に多く ( $p=0.02$ )、喘息歴が長かった ( $p=0.01$ )。また、喫煙指数 ( $p=0.01$ ) や呼気NO ( $p=0.03$ ) はACOS群で高値であった。呼吸機能検査では閉塞性換気障害を認めるものの拡散能の低下を伴う症例は少数であり、ACOSの有無による差は確認されなかった。臨床検査ではSP-AがACOS群において有意に高値であった ( $p=0.03$ )。モストグラフ検査ではACOS群においてR5-R20が有意に高値であった ( $p=0.02$ )。

### ② タバコ (cigarette smoking extract) の好酸球または好中球活性化に対する影響

本年度はタバコの抽出を行った。マルボロ<sup>®</sup>を用い、タバコ煙を生理食塩水に溶解させた。今後、in vitroにおける、タバコ抽出液の好酸球及び好中球機能に対する直接的影響を検討する予定である。

### ③ マウスアレルギー性気道炎症モデルにおける喫煙の影響

本研究は群馬大学との共同研究であり、本年度は書類の作成、実験環境の整備にとどまった。今後、in vivoにおける、タバコ曝露のアレルギー性気道炎症に対する影響を検討する予定である。

## 考 察

臨床プロフィール検討においてACOS群は非ACOS群と比較して有意に喫煙指数が高値であった。これは喫煙が気管支喘息を基礎疾患とする閉塞性換気障害の発症に寄与することを示唆するものと推測された。また、呼吸機能検査では閉塞性換気障害を認めるものの拡散能の低下を伴う症例は少数であり、ACOSの有無による差は確認されず、気道障害の部位には差があることが示唆された。特徴的な身体所見を伴わない膠原病関連自己抗体陽性者を認めたがACOSの有無による差は確認されず、重傷気管支喘息における閉塞性換気障害の発症において自己免疫の要素はあるにせよ有意なものではないことが示唆された。実際にタバコがアレルギー性気道炎症をどのように悪化させるかのメカニズムはよくわかっていない。今後①タバコ抽出液の好酸球及び好中球機能に与える直接的影響 (in vitro) ②タバコ曝露のマウスアレルギー性気道炎症に与える影響 (in vivo) を検討する予定である。

## 参考文献

- 1) The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma. *Eur Respir J* 2003; 22: 470-7.
- 2) Kikuchi S, Nagata M, Kikuchi I, Hagiwara K, Kanazawa M. Association between neutrophilic and eosinophilic inflammation in patients with severe persistent asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137 Suppl 1: 7-11.
- 3) Kikuchi S, Kikuchi I, Takaku Y, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, et al. Neutrophilic inflammation and CXC chemokines in patients with refractory asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149 Suppl 1: 87-93.
- 4) Kikuchi I, Kikuchi S, Kobayashi T, Hagiwara K, Sakamoto Y, Kanazawa M, et al. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006 Jun; 34: 760-5.
- 5) Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J* 2001 Apr; 15: 1110-2.
- 6) Butland BK, Strachan DP. Asthma onset and relapse in adult life: the British 1958 birth cohort study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007 Apr; 98: 337-43.
- 7) Gibson PG, Simpson JL. The overlap syndrome of asthma and COPD: what are its features and how important is it? *Thorax* 2009 Aug; 64: 728-35.
- 8) Silva GE, Sherrill DL, Guerra S, Barbee RA. Asthma as a risk factor for COPD in a longitudinal study. *Chest* 2004; 126: 59-65.
- 9) Hespers JJ, Postma DS, Rijcken B, Weiss ST, Schouten JP. Histamine airway hyper-responsiveness and mortality from chronic obstructive pulmonary disease: a cohort study. *Lancet* 2000; 356: 1313-7.
- 10) Hardin M, Silverman EK, Barr RG, Hansel NN, Schroeder JD, Make BJ, et al. The clinical features of the overlap between COPD and asthma. *Respir Res* 2011; 12: 127.
- 11) James AL, Palmer LJ, Kicic E, Maxwell PS, Lagan SE, Ryan GF, et al. Decline in lung function in the Busselton Health Study: the effects of asthma and cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 109-14.
- 12) Takaku Y, Nakagome K, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. IFN- $\gamma$ -inducible protein of 10 kDa upregulates the effector functions of eosinophils through  $\beta$ 2 integrin and CXCR3. *Respir Res* 2011; 12: 138.
- 13) Kobayashi T, Takaku Y, Yokote A, Miyazawa H, Soma T, Hagiwara K, et al. Interferon-beta augments eosinophil adhesion-inducing activity of endothelial cells. *Eur Respir J* 2008; 32: 1540-7.
- 14) Kobayashi T, Kouzaki H, Kita H. Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP. *J Immunol* 2010; 184: 6350-8.
- 15) Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, To Y, Sato A, Komagata Y, et al. Antigen-sensitized CD4+CD62Llow memory/effector T helper 2 cells can induce airway hyperresponsiveness in an antigen free setting. *Respir Res* 2005; 6: 46.
- 16) Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Komagata Y, Nagatani K, Tanaka R, et al. In vivo IL-10 gene delivery suppresses airway eosinophilia and hyperreactivity by down-regulating APC functions and migration without impairing the antigen-specific systemic immune response in a mouse model of allergic airway inflammation. *J Immunol* 2005; 174: 6955-66.
- 17) Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Tanaka R, Kouro T, Kano MR, et al. IL-5-induced hypereosinophilia suppresses the antigen-induced immune response via a TGF- $\beta$ -dependent mechanism. *J Immunol* 2007; 179: 284-94.
- 18) Nakagome K, Okunishi K, Imamura M, Harada H, Matsumoto T, Tanaka R, et al. IFN- $\gamma$  attenuates antigen-induced overall immune response in the airway as a Th1-type immune regulatory cytokine. *J Immunol* 2009 Jul 1; 183(1): 209-20.
- 19) Nakagome K, Imamura M, Okada H, Kawahata K,

Inoue T, Hashimoto K, et al. Dopamine D1-like receptor antagonist attenuates Th17-mediated immune response and ovalbumin antigen-induced neutrophilic airway inflammation. J Immunol 2011; 186: 5975-82.

- 20) Nakagome K, Imamura M, Kawahata K, Harada H, Okunishi K, Matsumoto T, et al. High expression of IL-22 suppresses antigen-induced immune responses and eosinophilic airway inflammation via an IL-10-associated mechanism. J Immunol 2011; 187: 5077-89.

#### 研究成果リスト

論文  
なし

#### 学会発表

- 1) 山崎 進, 中込一之, 内田義孝, 宮内幸子, 柚 知行, 野口 哲, 小林威仁, 永田 眞. 重症喘息における呼吸機能と関連因子の臨床的検討, 第55回日本呼吸器学会学術講演会, 平成27年4月, 東京
- 2) 山崎 進, 中込一之, 内田義孝, 宮内幸子, 柚 知行, 野口 哲, 小林威仁, 永田 眞. 成人重症気管支喘息における呼吸機能と関連因子の臨床的検討, 第56回日本呼吸器学会学術講演会, 平成28年4月, 京都

#### 特許出願等

なし

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

日本人悪性黒色腫における体細胞遺伝子変異ならびに  
バイオマーカー候補と臨床料理学的因子との関連に関する研究

研究代表者 寺本 由紀子 (国際医療センター 皮膚腫瘍科)

## 緒言

## 研究の背景

## 1) 悪性黒色腫の治療

進行期悪性黒色腫に対する治療は、ダカルバジンしかない状態が半世紀間続いたがこの数年で劇的に変化した。2011年以降に進行期悪性黒色腫の治療薬として米国FDAによって承認された新薬は以下の6つである。

Ipilimumab (2011年) 抗CTLA-4抗体 (免疫療法)

2015年日本承認

Vemurafenib (2011年) BRAF阻害剤 (分子標的療法)

2015年日本承認

Dabrafenib (2013年) BRAF阻害剤 (分子標的療法)

2016年日本承認

Trametinib (2013年) MEK阻害剤 (分子標的療法)

2016年日本承認

Nivolumab (2015年) 抗PD-1抗体 (免疫療法)

2014年日本承認

Pembrolizumab (2015年) 抗PD-1抗体 (免疫療法)

(日本承認予定)

進行期悪性黒色腫に対する治療は、免疫療法と分子標的療法が主流となった。さらに新規開発中の薬剤や上記薬剤の組み合わせによる併用療法について、現在世界中で多くの臨床試験が進行しており、標準治療の確立が進められている。

分子標的治療のみならず抗CTLA-4抗体 (Ipilimumab) による免疫療法において腫瘍の体細胞遺伝子変異数<sup>1)</sup>がその臨床効果に影響を及ぼすとする報告<sup>1)</sup>が出ており、これからの悪性黒色腫の治療は、各個人の遺伝子プロファイル<sup>1)</sup>を明らかにした上で治療を選択するオーダーメイド治療となっていくことは明らかである。

## 2) 日本人悪性黒色腫の特徴

これまでの免疫療法や分子標的療法の開発は欧米人を対象とした研究から生まれてきた。

日本人では末端黒子型 (ALM) が全体の約45%を占めているが、欧米では2-10%とされ、研究対象のごく一部を占めるのみである。また、欧米人ではALMはその他の病型

よりも予後が悪いとされるが、日本人の予後データは欧米と比較して劣っておらず、ALMを日常診療している中でALMがとりたてて予後不良であると感じたことはない。この一因として裸足の生活習慣がある日本人のALMとそうではない欧米人のALMでは同じ病型でも遺伝子学的特徴が異なっている可能性がある。同様に、欧米人の表在拡大型 (SSM) が紫外線に起因していることは知られているが、日本人では日光浴などの生活習慣もないため、同じSSMでも日本人では紫外線による原因は考えにくい。よって、日本人悪性黒色腫におけるmolecular signature (分子的特徴) を明らかにすることで、日本人により効果のある治療方法が得られ、今後日本人における治療指針を決定する基盤となるのではないかと考えた。

## 材料と方法

## 対象症例

埼玉医大国際医療センター皮膚腫瘍科・皮膚科で2007年4月～2014年8月の間に手術 (病巣切除) をうけており、かつ下記患者選択基準を満たす症例を対象とした。

患者登録基準は以下の通り。

- 1) 組織学的に皮膚原発悪性黒色腫の診断が得られていること
  - 2) 日本人を主とする東アジア人であること
  - 3) 切除時の組織標本がパラフィン包埋として保存してあること
  - 4) 原発巣の腫瘍のtumor thickness 2 mm以上であること\*
- \* DNA, RNA抽出に際し腫瘍細胞量を確保するため、原発巣のtumor thicknessを2 mm以上とした。tumor thicknessが2 mmより小さい症例のほとんどがStage Iで5年生存率は90%以上であるため、tumor thicknessが2 mmより小さい症例を除いても予後との相関には影響を与えないと考えた。

## 遺伝子解析

- 1) 登録症例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ブロック標本の薄切スライド (10 μm厚) を作成し、Leica LMD-7000を用いたレーザーマイクロダイセク

ションあるいはマニュアルダイセクションにより腫瘍部のみを選択的に回収する。

- 2) マイクロダイセクションにより回収した腫瘍細胞より QIAGEN 社の QIAamp® DNA FFPE Tissue キットを用いてゲノム DNA を抽出し、Promega 社の Quantus™ Fluorometer および QuantiFluor® dsDNA System を用いて 2 本鎖 DNA の濃度測定を行う。
- 3) 抽出した DNA をコントロールとなる DNA 断片の PCR 増幅および同産物の Agilent 2100 Bioanalyzer の泳動により、抽出 DNA の品質確認を行う。
- 4) 研究対象遺伝子 (KIT, BRAF, MEK, NRAS, PTEN, ERBB4, GRIN2A, KEAP1, RAC1, PPP6C, PREX2, TRRAP, FBXW7, MTOR 遺伝子) について、FFPE 由来 DNA に対応するように設計したカスタムメイド HaloPlex HS でターゲットエンリッチメントを行い、Illumina 社の MiSeq を用いた次世代シーケンスにて塩基配列を決定する。
- 5) 得られた塩基配列結果 (fastq ファイル) より、種々のバイオインフォマティクスツールを使用して、体細胞変異を抽出する。
- 6) 変異が同定された場合は、必要に応じてサンガーシーケンスにより変異の確認を行う。

#### 統計学的解析

- 7) 欧米で報告された変異頻度との比較を行う。
- 8) 遺伝子変異と臨床病理学的因子との相関解析を行う。

#### 結果

- 1) 59 症例を登録し、計 78 検体 (原発巣 56 検体, in-transit 1 検体, リンパ節 21 検体) の病理組織標本ブロックの薄切スライドの作成を行った。この薄切スライドを脱

パラフィン処理後、トルイジンブルー染色を行ったのち、レーザーマイクロ/マニュアルダイセクションにより腫瘍組織を選択的に回収し、これより DNA の抽出を行った。このうち 2 検体はパラフィン包埋時に脱灰処理がされており、DNA 抽出が不可能であった。抽出した DNA の濃度の中央値は 26 ng/μL (範囲 0.0051-170 ng/μL) であった。

- 2) 抽出した DNA の品質確認のため、アジレント社のプロトコルに従い、コントロール実験用の *GAPDH* 遺伝子 PCR 用プライマー 4 本を合成し、準備を行った。
- 3) DNA のキャプチャには DNA ライブラリに分子バーコードを導入し、従来の方法に比して低頻度の変異を高い信頼性で検出することを可能とした HaloPlex HS を選択した。Agilent 社の SureDesign v1.1 より HaloPlex Advanced Design Wizard を用い、FFPE 抽出サンプル用に最適化したアルゴリズムで、標的とする 14 遺伝子をキャプチャするカスタムデザインを行った (図 1)。ターゲットリージョンのサイズは 55.928 kbp、総アンプリコン数 5153、ターゲットのカバー率は 99.9% であった。1 サンプルあたりに必要とされる最小シーケンスは、37.249 MBp であり、MiSeq シーケンサーの泳動で十分に賄えるデータ量であった。
- 4) 症例の情報を診療録より抽出し、データベース化した。評価項目は年齢、性別、原発巣の部位、病型、tumor thickness、潰瘍の有無、所属リンパ節転移の有無、病期、化学療法の施行の有無とそのレジメン、術後再発の有無、無病生存期間 (disease-free survival: DFS)、全生存期間 (overall survival: OS)。登録症例は 59 例で平均年齢は 66.8 (33-97) 歳。性別は男性 35 例 (59.3%)、女性 24 例 (40.7%)。病型は ALM25

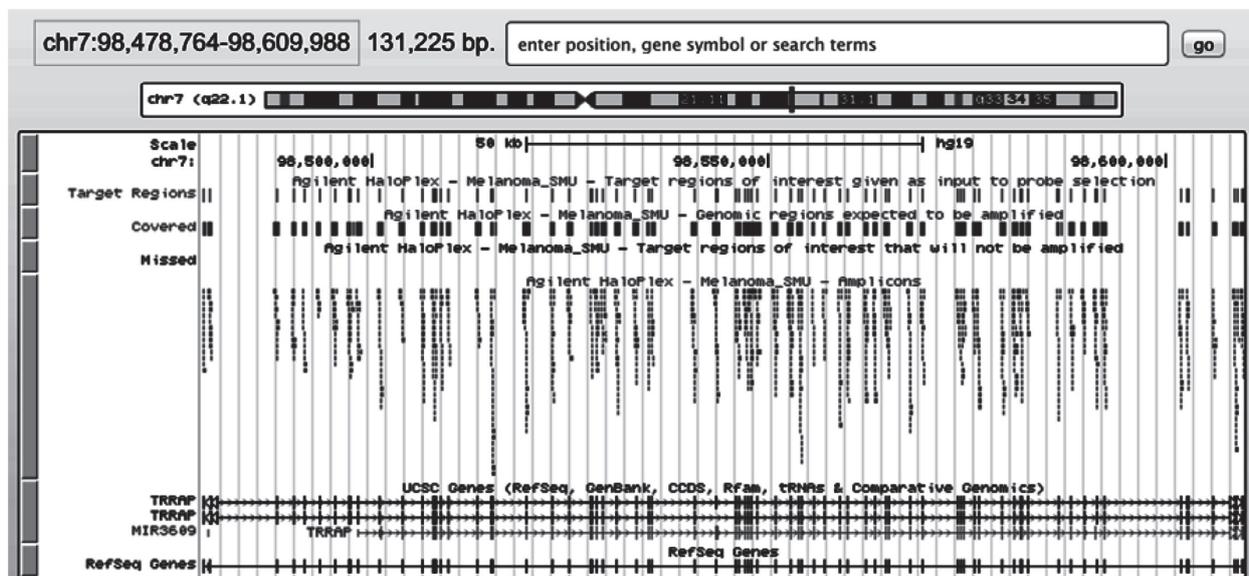


図 1. Agilent 社の SureDesign v1.1 HaloPlex Advanced Design Wizard を用いた遺伝子のキャプチャ領域の例。TRRAP 遺伝子。

例 (42.4%), SSM20例 (33.9%), NM6例 (10.2%), LMM8例 (13.5%)。病期はIB期1例, IIA期9例, IIB期14例, IIC期8例, IIIA期6例, IIIB期7例, IIIC期12, IV期2例であった。

- 5) 抽出したDNAが微量なものについては, Whole genome amplificationを行う可能性があるため, Sigma社のGenomePlex<sup>®</sup> Optimized kit with enzyme for amplifying a variety of DNA including FFPE tissueを購入し, 予備的にFFPE組織から抽出したコントロールDNAの増幅を行い, PCRにて増幅の確認を行った。

## 考 察

今回DNA抽出を行った試料のうち, メラニン色素に富む組織の中には抽出効率が他に比して低いものが僅かながら存在し, このような試料の場合のより良いDNA抽出法を検討する必要性が考えられた。現段階では未だ抽出したDNAの品質チェックを終えていないが, 例えかなりの分解が進んでいる場合 (Average Yield Ratio <5%) だとしても, 半数以上の検体でDNAの増幅を行うこと無く, 次世代シーケンサー解析に必要な量のDNAが得られている事が確認出来た。DNAの品質チェック後, 必要なDNA量を計算し, HaloPlex HSによるキャプチャ, MiSeqシーケンサーによる塩基配列情報の取得, バイオインフマティクス解析による, 体細胞変異の同定へと進む予定である。また, 体細胞変異を選択的に検出するためには, 対象となる健常者のDNAの変異データが必要となるが, ごく最近東北メディカル・メガバンク機構より, Integrative Japanese Genome Variation Databaseが公開され, 1,070名の東北地方在住日本人健常者の遺伝子情報が入手され, 今後フィルタリングを行う際に使用することが可能となった。

悪性黒色腫は人種間で発生頻度や発生部位, 病型に差がある。欧米人での悪性黒色腫においては, 病型別に遺伝子変異の頻度も異なることが報告されている。BRAF遺伝子変異は欧米人の悪性黒色腫の40~50%に認められ, NRAS遺伝子変異は15~20%の頻度でみられるとされる<sup>2,3)</sup>。さらに, BRAF遺伝子変異はSSMや紫外線ダメージの少ない部位に多く, NRAS遺伝子変異はNMや紫外線ダメージを受けた部位に多く認めると報告されている<sup>4)</sup>。また, KIT遺伝子の変異頻度は全体では2%と低い<sup>5)</sup>が, 粘膜やALMではそれぞれ18%, 21%と報告されている<sup>5)</sup>。しかし, これらの報告は欧米人のデータによるものであり, 日本人の悪性黒色腫における遺伝子情報は現時点でほとんど得られていない。日本人の悪性黒色腫における遺伝子変異率はBRAF遺伝子26.7%, KIT遺伝子5.0%, NRAS遺伝子7.1%との報告はあるが一施設のデータであり<sup>6,7)</sup>。日本人全体で同じような頻度で生じているか, そのほかの遺伝子についてはどうかをはじめ日本人の悪性黒色腫病型の約半数を占めるALMが欧米人のALMと同様の遺伝子変異パターンをもつか否かについては明らかでは

ない。このような遺伝子情報を探索することは, 今後日本人の悪性黒色腫における治療指針を考えるうえで基盤となり, 非常に重要である。

悪性黒色腫に対する分子標的治療薬の先駆けとなったのは, BRAF阻害薬のVemurafenibである。Vemurafenibは, 治療歴のないBRAFF600遺伝子変異陽性の切除不能または転移性悪性黒色腫の患者に対し, 第III相試験 (BRIM-3試験) が行われた<sup>8)</sup>。全生存期間と無増悪生存期間についてダカルバジンと比較されたが, Vemurafenibの死亡ハザード比は0.44 ( $p < 0.0001$ ) で死亡または増悪のハザード比は0.26 ( $p < 0.0001$ ) であった。無増悪生存期間中央値は, Vemurafenib群が5.3か月, ダカルバジン群が1.6か月であった。このような生存期間の延長が示されたことは半世紀の間ダカルバジン以上の治療がなく, また, 生存期間の延長が得られる治療が存在しなかった悪性黒色腫の分野では非常に画期的なことであった。この試験結果をもとに, 2011年Vemurafenibは米国FDAに承認され, さらに, 2013年にはBRAF阻害薬2剤目となるDabrafenibとMEK阻害薬であるTrametinibがFDAの承認を受けた。この2剤の併用療法は, Vemurafenib単剤投与と全生存期間について第III相試験 (COMBI-v試験)<sup>9)</sup>が行われ, 全生存期間中央値がDabrafenib / Trametinib併用群で25.6か月, Vemurafenib単剤群で18.0か月, ハザード比0.66 [95 % CI 0.53 ~ 0.81],  $p < 0.001$ ) であり, 2年後の全生存率はDabrafenib / Trametinib併用群で51%, Vemurafenib単剤群で38%, さらに, 全奏効率の中央値はDabrafenib / Trametinib併用投与の患者さんで65.6%, Vemurafenib単剤投与では52.8%とDabrafenib / Trametinib併用群で統計学的にも優れた結果が得られた。日本では, 2015年にVemurafenibが保険承認を取得し, 2016年5月にDabrafenibとTrametinibが承認された。

また, 腫瘍の体細胞遺伝子変異の重要性は分子標的治療に対するだけでなく, 悪性黒色腫における治療の主流となった免疫療法の治療効果に対しても関係することが示唆されている。抗CTLA-4抗体の臨床効果と腫瘍の体細胞遺伝子変異数が影響を及ぼすとする報告<sup>1)</sup>やNRAS変異とIpilimumab, IL2, 抗PD-1/PD-L1抗体を用いた免疫療法の臨床効果が相関するという報告<sup>10)</sup>がある。このように腫瘍の変異を調べることは分子標的治療薬の対象となるか否かのみならず, 免疫療法に対する効果にも影響を与える可能性がある。

本研究では, 以下の14遺伝子の変異について解析を行う予定である。上記に述べた現在すでに阻害薬が使用されているBRAF遺伝子, MEK遺伝子のほか, 臨床試験が進行中のKIT<sup>5,11)</sup>, NRAS<sup>12)</sup>, MTOR<sup>13,14)</sup>遺伝子について変異の検索を行う。また, 近年悪性黒色腫において変異が報告されている遺伝子 (PTEN<sup>15,16)</sup>, ERBB4<sup>17-19)</sup>, GRIN2A<sup>20-22)</sup>, KEAP1<sup>23)</sup>, RAC1<sup>24-27)</sup>, PPP6C<sup>27)</sup>, PPEX2<sup>28)</sup>, TRRAP<sup>20)</sup>, FBXW7<sup>29)</sup>遺伝子) は今後治療対象遺伝子となる可能性があるため, これら9遺伝子について

も変異の検索を行う。本研究では次世代シーケンス技術を用いることにより、これまでの報告よりも多くの遺伝子変異を網羅的に調べることができる。

皮膚悪性腫瘍学会皮膚がん予後統計委員会によれば、日本の総登録症例は3278症例あり、平均63.4歳で性別は男性1531例(47%)・女性1744例(53%)、病型内訳はALM45%、SSM23%、NM11%、LMM9%、粘膜その他12%である。また、これと本研究の登録症例の分布を比較したところ、ALMが約半数を占めているなどの点で概ね一致していた。このことから、本研究の登録症例について遺伝子情報と臨床病理学的因子、特に治療に示す効果や予後との相関をさらに解析することにより日本人における悪性黒色腫における体細胞変異等の分子腫瘍学的ならびに臨床病理学的特徴を明らかにすることが可能であると思われる。このような大規模な解析は本邦で初めてであり、難治である悪性黒色腫の分子標的治療の基盤を形成するものと期待される。今後も実験を進め、遺伝子解析および分析を進めていく予定である。

#### 引用文献

- Snyder A, Makarov V, Merghoub T, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2014; 371: 2189-99.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353: 2135-47.
- Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 2010; 29: 5545-55.
- Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol* 2011; 164: 776-84.
- Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* 2011; 305: 2327-34.
- Uhara H, Ashida A, Koga H, et al. NRAS mutations in primary and metastatic melanomas of Japanese patients. *Int J Clin Oncol* 2014; 19: 544-8.
- Ashida A, Uhara H, Kuniwa Y, et al. Assessment of BRAF and KIT mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci* 2012; 66: 240-2.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 364: 2507-16.
- Robert C. Two year estimate of overall survival in COMBI-v, a randomized, open-label, phase III study comparing the combination of dabrafenib(D) and trametinib(T) with vemurafenib(vem) as first-line therapy in patients(pts) with unresectable or metastatic BRAF V600E/K mutation positive cutaneous melanoma. Abstract #3301 18th ECCO-40th ESMO European Cancer Congress, September 2015, Vienna, Austria.
- Johnson DB, Lovly CM, Flavin M, et al. Impact of NRAS mutations for patients with advanced melanoma treated with immune therapies. *Cancer Immunol Res* 2015; 3: 288-95.
- Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A, et al. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013; 31: 3182-90.
- Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013; 14: 249-56.
- Margolin KA, Moon J, Flaherty LE, et al. Randomized phase II trial of sorafenib with temsirolimus or tipifarnib in untreated metastatic melanoma (S0438). *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012; 18: 1129-37.
- Dronca RS, Allred JB, Perez DG, et al. Phase II study of temozolomide (TMZ) and everolimus (RAD001) therapy for metastatic melanoma: a North Central Cancer Treatment Group study, N0675. *Am J Clin Oncol* 2014; 37: 369-76.
- Jeck WR, Parker J, Carson CC, et al. Targeted next generation sequencing identifies clinically actionable mutations in patients with melanoma. *Pigment cell Melanoma Res* 2014; 27: 653-63.
- Zebary A, Omholt K, Vassilaki I, et al. KIT, NRAS, BRAF and PTEN mutations in a sample of Swedish patients with acral lentiginous melanoma. *J Dermatol Sci* 2013; 72: 284-9.
- Rudloff U, Samuels Y. A growing family: adding mutated Erbb4 as a novel cancer target. *Cell Cycle* 2010; 9: 1487-503.
- Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet* 2009; 41: 1127-32.
- Manca A, Lissia A, Cossu A, et al. Mutations in ERBB4 may have a minor role in melanoma pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 1685-7.
- Wei X, Walia V, Lin JC, et al. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet* 2011; 43: 442-6.
- D'mello SA, Flanagan JU, Green TN, et al. Evidence That GRIN2A Mutations in Melanoma Correlate with Decreased Survival. *Front Oncol* 2014; 3: 333.

- 22) Prickett TD, Zerlanko BJ, Hill VK, et al. Somatic mutation of GRIN2A in malignant melanoma results in loss of tumor suppressor activity via aberrant NMDAR complex formation. *J Invest Dermatol* 2014; 134: 2390-8.
- 23) Miura S, Shibasaki M, Kasai S, et al. A somatic mutation of the KEAP1 gene in malignant melanoma is involved in aberrant NRF2 activation and an increase in intrinsic drug resistance. *J Invest Dermatol* 2014; 134: 553-6.
- 24) Mar VJ, Wong SQ, Logan A, et al. Clinical and pathological associations of the activating RAC1 P29S mutation in primary cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014.
- 25) Watson IR, Li L, Cabeceiras PK, et al. The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. *Cancer Res* 2014; 74: 4845-52.
- 26) Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012; 44: 1006-14.
- 27) Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; 150: 251-63.
- 28) Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 2012; 485: 502-6.
- 29) Aydin IT, Melamed RD, Adams SJ, et al. FBXW7 mutations in melanoma and a new therapeutic paradigm. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106: dju107.
- Sato S, Fujisawa Y, Fujimoto M, Otsuka F, Hayashi N, Yamazaki N, Yamamoto A. Effect of non-amputative wide local excision on the local control and prognosis of in situ and invasive subungual melanoma. *J Dermatol* 2015; 42(9): 861-6.
- 3) Imamura T, Nakamura Y, Teramoto Y, Sato S, Asami Y, Arai E, Yamamoto A. A case of giant primary Dermal melanoma with BRAF V600E mutation. *Acta Derm Venerol* 2016 [Epub ahead of print].
- 4) Tsutsumida A, Takahashi A, Namikawa K, Yamazaki N, Uhara H, Teramoto Y, et al. Frequency of level II and III axillary nodes metastases in patients with positive sentinel lymph nodes in melanoma: a multi-institutional study in Japan. *Int J Clin Oncol* 2016 [Epub ahead of print].
- 5) 中村泰大, 寺本由紀子, 佐藤さゆり, 山田勝裕, 山本明史, 関根小弓, 藤澤康弘. 浸潤性爪甲下悪性黒色腫における腫瘍-末節骨間最短距離の計測. *日本皮膚外科学会雑誌* 2015; 19(2): 114-5.

#### 学会発表

#### 研究成果リスト

##### 論文

- 1) Teramoto Y, Nakamura Y, Sato S, Yamamoto A. Low probability of lymphatic drainage to Cloquet's node is of limited value as indicator for pelvic lymph node dissection in patients with lower limb melanoma. *Lymphat Res Biol* 2015 [Epub ahead of print].
- 2) Nakamura Y, Ohara K, Kishi A, Teramoto Y,  
1) 寺本由紀子, 中村泰大, 佐藤さゆり, 山本明史. 下肢原発悪性黒色腫における骨盤内リンパ節郭清術の指標としてのCloquet's nodeへのリンパ流の検討, 第31回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2015年7月, 大阪
- 2) Teramoto Y, Nakamura Y, Sato S, Yamamoto A. Low probability of lymphatic drainage to Cloquet's node is of limited value as indicator for pelvic lymph node dissection in patients with lower limb melanoma. 11<sup>th</sup> European Association of Dermato Oncology and 8<sup>th</sup> world Meeting of Interdisciplinary Melanoma/Skin Cancer Centers, Oct 2015, France
- 3) 今村太一, 浅見友梨, 寺本由紀子, 中村泰大, 山本明史. Vemurafenib半量投与でPRを得た悪性黒色腫多発転移の1例, 第79回日本皮膚科学会東京・東部支部合同学術大会, 2016年2月, 新宿

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

## c-Mycによるアポトーシス誘導とそれに対する抑制因子としてのNanogの役割

研究代表者 奥田 晶彦 (ゲノム医学研究センター)

## 緒言

c-Myc転写因子は、cyclin Dなどの細胞増殖に関わる遺伝子からの転写を促進していることを介して細胞増殖を促進する。また、c-Myc遺伝子は、がんにおける機能獲得型の変異を示す遺伝子の中で最も高頻度に変異が存在する遺伝子である。しかしながら、c-Mycをマウス線維芽細胞な正常細胞に過剰発現させると細胞は、顕著なアポトーシスのフェノタイプを示す。但し、このc-Mycによるアポトーシス誘導の分子メカニズムに関しては全くわかっていない。但し、c-Mycの転写因子としての機能にはそのc-Mycに対するパートナー因子であるMaxとの相互作用が必須なのに対して、c-Mycによるアポトーシス誘導活性はMaxタンパク質とは無関係に起こることが証明されている。それは、遺伝子の変異により、機能的なMaxタンパク質を発現していない褐色細胞腫にc-Mycタンパク質を過剰発現させても、アポトーシスが起ることが示されているからである<sup>1)</sup>。なお、興味深いことには、c-Mycは上記に記載したように、正常細胞に過剰発現させると顕著な細胞死のフェノタイプを呈するが、がん細胞やES細胞では過剰発現させてもほとんどアポトーシスのフェノタイプは見られない。私は、以前、Maxホモ欠失ES細胞が激しいアポトーシスを示し、また、典型的なES細胞マーカーの一つであるNanogの過剰発現により、その細胞死のフェノタイプが消失していることを報告している<sup>2)</sup>。但し、その論文では、Nanogによるc-Myc依存的なアポトーシスに対する抑制活性の分子メカニズムに関しては解明できていない。但し、その後、Nanogタンパク質がc-Mycと物理的に結合するという発見をすることができた。このような状況から、私はMaxタンパク質はc-Mycに対する転写補助因子として機能するのみならず、c-Mycタンパク質が本質的に持つアポトーシス誘導活性を抑える機能を有しており、それ故、Maxホモ欠失ES細胞では、c-Mycタンパク質がそのMaxからの制御から解放された為に激しいアポトーシス活性を呈しており、一方、Nanogは、Maxのようにc-Mycに対する転写補助因子としての機能は持たないが、c-Mycと結合することで、Maxと同様に、c-Mycのアポトーシス促進活性は抑制することができるので、

Maxホモ欠失ES細胞のviabilityを保っているのではないかという仮説を持った。本学内グラント研究は、その仮説について分子レベルでの裏付けができるか否かを検討することを主な目的として研究をおこなった。

## 材料

本研究で用いたES細胞、及びマウス線維芽細胞(MEF)は、私が所属している研究室で以前樹立したものをを用いた<sup>2)</sup>。また、レトロウイルスの作製は、Moritaらの方法を用いて行った<sup>3)</sup>。

## 結果

私たちは以前、Max遺伝子ホモ欠失ES細胞が激しいアポトーシスを呈することを発表しているが、その論文では、アポトーシスの原因については明らかにすることはできていない。その後、このアポトーシスは、当初は、Maxタンパク質非存在下ではなんら生化学的・生物学的機能を有さないと考えていた遊離c-Myc、N-Mycタンパク質は転写に対しては機能を持たないものの、アポトーシス活性に関してはむしろ、Maxタンパク質と結合したものよりも遊離の状態が存在する方が、むしろ、高い活性を持っており、それ故、Maxホモ欠失ES細胞は激しいアポトーシスのフェノタイプを呈するのではないかという仮説を持った。その仮説を検討する為、まずDoxycycline (Dox) 誘導型Max knockout (KO) ES細胞(このES細胞は、本来のMax遺伝子はノックアウトされており、かつ、Rosa26遺伝子座にはtetracycline offシステムと共に、Max cDNAが導入されており、それ故、この細胞は、Dox非存在下ではRosa26遺伝子座からの発現により十分な量のMaxの発現を確保できるが、培地にDoxを加えることで、ほぼ完全にMax遺伝子の発現を消失させることができる)にc-, N-, L-の3種類のMyc発現ベクターを別々に導入し、その後、Doxを加えることにより、Maxの発現をシャットオフさせた。その結果、以前の報告通り、空ベクターを導入したコントロールでもゲノムDNAの2本鎖切断のマーカーであるヒストンH2A.Xの顕著なリン酸化の上昇が見られたが、c-MycもしくはN-Myc発現ベクターを導入することで、遊離Mycタンパ

ク質の量を強制的に増加させるとそれに伴って $\gamma$ H2AXのリン酸化の更なる上昇が確認された。一方、c-MycやN-Mycと比べて、転写促進活性及び形質転換の活性が極めて低いことが知られているL-Mycの過剰発現では、コントロールと比べH2A.Xのリン酸化レベルに変化は見られなかった(図1)。次の実験として、Stephen Daltonらが樹立したc-Myc/N-Myc double conditional ノックアウトマウスES細胞(c-MycとN-Mycの両方の遺伝子についてホモで遺伝子がコンディショナルにノックアウトできるようにそれぞれの遺伝子がloxP配列で挟まれており、Creリコンビナーゼの発現によりc-MycとN-Mycの両方についてホモでノックアウトすることが可能なES細胞)<sup>4)</sup>にCreリコンビナーゼとエストロゲンレセプターのホルモン結合領域の融合タンパク質(CreER)発現ベクターを導入し、タモキシフェンの添加によりc-Myc/N-Myc double ノックアウトを行うと同時にMax遺伝子の発現をノックダウンした。その結果、タモキシフェンを加えていないコントロールと比べ、タモキシフェンを加えることにより、c-Myc/N-Myc double KOを誘導した場合にはリン酸化ヒストンH2A.Xのレベルが顕著に低くなることがわかった(図2)。この結果は、図1に示した結果と同様に、c-Myc及びN-Mycの

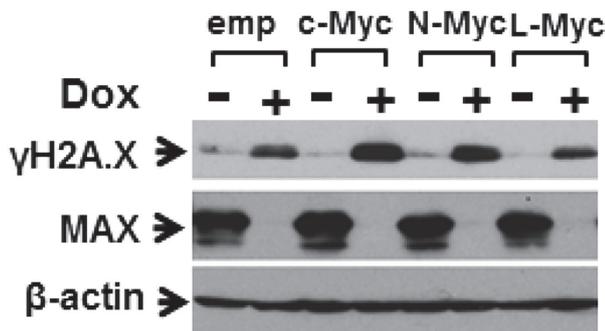


図1. Maxホモ欠失ES細胞が呈するアポトーシスレベルのMyc過剰発現による影響。Emp: empty; Dox: doxycycline.

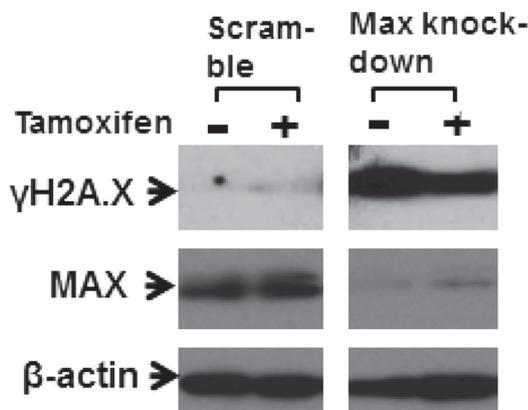


図2. CRE-ERを発現するc-Myc/N-Myc double conditional KO ES細胞でのMyc遺伝子の有無のMaxノックダウンにより誘導されるアポトーシスのレベルに対する影響。

アポトーシスに対する活性は、Maxタンパク質非存在下でより顕著であり、Maxタンパク質は、これらMycタンパク質を中和する能力を有することを示唆する結果である。次にES細胞以外でも同様な法則が成り立つかを検討する為、マウス線維芽細胞(MEF)を用いた実験を行った。また、MEF細胞にはNanogが発現しないので、Nanogの発現のc-Mycが持つアポトーシス誘導活性に対する抑制効果についても検討した。その目的を達成する為、Dox添加により、発現が誘導可能なレトロウイルスベクター(pMXs DsRed T4 TRE)に2Aペプチド<sup>5)</sup>をコードする配列でc-MycとNanog(c-Myc/2A-Nanog)もしくはc-MycとNeomycin耐性遺伝子(c-Myc/2A-Neo)を繋いだものをサブクローニングし、常法に従ってレトロウイルスを作製した。なお、その際に、tTA応答配列プロモーターを活性化させる為のrtTAを発現するレトロウイルスも並行して作製し、それらのウイルスをmixし、MEF細胞に感染させた。そして、48時間後に、アポトーシスのレベルをCellEvent Caspase-3/7 Green Detection 試薬を用いて検討した。その結果、Doxを加えていない場合は、アポトーシスを起こしている細胞はほとんど見当たらなかった(図3A)が、Doxを加えた場合は、アポトーシスを示唆するシグナルが顕著に見られた(図3B)。なお、上記2つのパネルは、いずれもNeomycin耐性遺伝子を持つウイルスについてのデータであるが、Neomycin耐性遺伝子の代わりにNanog遺伝子を初発現するウイルスでは、Dox存在下においても、Nanog遺伝子を発現していない場合と比べてアポトーシスを示唆するシグナルが顕著に低いという結果がえられた。

### 考察

c-Myc転写因子のがん細胞のホメオスタシスの為の重要性は、バーキットリンパ腫の場合を筆頭に多くの種類のがん細胞で証明されている<sup>6)</sup>。そのc-Mycのがん原遺伝子としての機能を根底から刺させているのは同タンパク質の細胞増殖促進活性である。但し、c-Mycタンパク質は、単に、Maxと共に転写複合体を形成し、細胞増殖に関わる遺伝子からの転写を促進することで、細胞の増殖速度を早めるのみならず、過剰に発現すると、細胞に対してアポトーシ

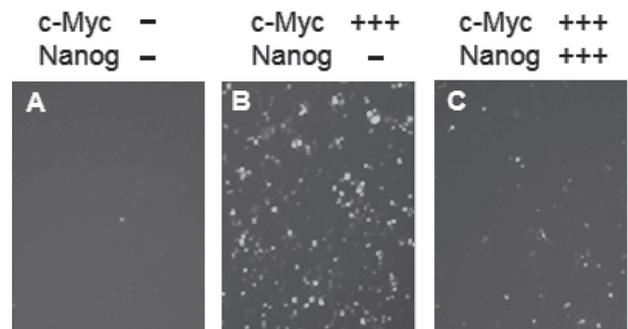


図3. MEF細胞へのc-Mycの過剰発現によるアポトーシス誘導とそのアポトーシスに対するNanogによる抑制効果。

スを惹起する。そのc-Myc依存的なアポトーシスを規定している分子メカニズムに関しては全くわかっていないが、このc-Myc依存的なアポトーシスのフェノタイプは、正常細胞に発現した場合に顕著に現れるものの、がん細胞やES細胞ではその活性はほとんど現れない。換言すれば、c-Mycはがん細胞とES細胞では、アポトーシス活性をほとんど発揮することがなく、専ら、細胞増殖促進因子として機能することで、無限の増殖能等のこれらの細胞が持つ重要な特質を根底から支えていると言える。このことは、がん細胞やES細胞にとって明らかに都合の良いことではあるが、私は、長年、どのようにしてこれらの細胞が、c-Mycのアポトーシス活性を排除し、細胞増殖促進因子としての機能のみを活用できるかを知りたいと考えていた。

そして、それについての解明の糸口は、図らずも、Maxホモ欠失ES細胞の樹立から得られた。もともと、このMaxホモ欠失ES細胞は、ES細胞における全ての機能を奪うことを目的として樹立した。この細胞の樹立を試み始めたのは、2008年頃であるが、その当時は、c-Mycはあらゆる機能発揮においてパートナー因子であるMaxを必要とすると信じられていたからである。しかしながら、私たちが樹立したMaxホモ欠失ES細胞とはほぼ同時期に米国のStephen Daltonらによって樹立されたc-Myc/N-Myc double KO ES細胞では、c-Mycの転写因子の活性を失ったことに伴うフェノタイプに関しては十分な共通点はみられたものの、アポトーシスに関しては真逆な結果が得られたことから、Maxと結合していないc-Mycタンパク質は全くの無機能タンパク質ではなくて、アポトーシス活性に関してはむしろMaxタンパク質と相互作用していない方がむしろ強い活性を示すのではないかという仮説を持つようになった。そして、その仮説の是非を検討することが本研究の主な目的であった。

本研究では、まず、誘導型Maxホモ欠失ES細胞にDoxを添加することでMaxの発現を消失させる際に、c-MycもしくはN-Mycを過剰発現させるとアポトーシスのレベルが更に顕著になることや、逆にc-Myc/N-Myc doubleノックアウトのバックグラウンドでは、Max遺伝子の低下に伴ったアポトーシスのレベルが減弱することを示すことで、Maxとは結合していない遊離c-Myc及びN-Mycにはアポトーシスを引き起こす活性を持つことを証明した。また、マウス線維芽細胞を用いた実験でも、遊離c-Mycタンパク質がアポトーシス誘導活性を発揮できることを証明した。かつ、その遊離c-Mycタンパク質依存的なアポトーシスは、Nanogを同時に発現させることにより、かなり緩和されることもしめした。

本研究により、遊離c-Mycタンパク質がMaxホモ欠失ES細胞が呈するアポトーシスの主な原因であり、また、Nanogがその遊離c-Mycタンパク質によるアポトーシスを直接抑制することがわかった。この発見は、がん細胞とES細胞ではc-Mycが高発現することで、量比において

Maxタンパク質を大きく上回ったとしても、アポトーシスを引き起こさない理由が解明できたのではないかと考えている。そしてこの発見が、ES/iPS細胞を用いた場合の最も大きな問題点となっている、分化誘導シグナルに応答せず、分化誘導後においても未分化な状態で残ってしまっているES/iPS細胞を移植細胞から除去する方法の確立であるとか、いままでになかった全く新しい角度からのがん治療法の確立へとつなげていきたいと考えている。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、同部門の平崎正孝助教及び鈴木歩助教からの多大なご協力に深く感謝致します。

## 参考文献

- 1) Wert M, Kennedy S, Palfrey HC, Hay N. Myc drives apoptosis in PC12 cells in the absence of Max. *Oncogene* 2001; 20: 3746-50.
- 2) Hishida T, et al. Indefinite self-renewal of ESCs through Myc/Max transcriptional complex-independent mechanisms. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 37-49.
- 3) Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 2000; 7: 1063-6.
- 4) Smith KN, Singh AM, Dalton S. Myc represses primitive endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 343-54.
- 5) Szymczak-Workman AL, Vignali KM, Vignali DA. Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harb Protoc* 2012; 2012: 199-204.
- 6) Sander S, et al. Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2012; 22: 167-79.

## 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。

## 論文

なし

## 学会発表

- 1) Okuda A, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A. Max known as a Myc indispensable partner protein functions as a molecular blockade of meiotic entry, 第38回日本分子生物学会/第88回日本生化学会大会, 合同大会ワークショップ口頭発表, 2015年12月1日, 兵庫県神戸市

## 特許出願

なし

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

## RNA結合蛋白質 PABPN1によるポリA選択制御と 眼咽頭筋ジストロフィーの病理

研究代表者 中尾 啓子 (医学部 生理学)

### 緒言

眼咽頭筋ジストロフィー (OPMD) は、遅発性の眼瞼下垂と嚥下障害と主症状とする優性の遺伝性疾患で、日本では稀少疾患であるが、50代女性が本大学病院・神経内科を受診され遺伝子解析によってOPMDヘテロ変異を有すると診断された<sup>1)</sup>。OPMDの原因遺伝子産物は、RNA結合型タンパク質PABPN1 (poly (A) -Binding Protein Nuclear I) で、標的遺伝子のmRNAのポリAサイトに結合し発現レベルの調節を行っていると考えられている。PABPN1のN末近傍のアラニンGCGの半複製配列が正常では6~7回繰り返されるのに対し、OPMD疾患型では9~13回に伸長している。2012年にJenalらによって、PABPN1がポリA鎖の近位のサイトに結合すると、そこでのポリA鎖の切断・ポリアデニル化を阻害するため、結果としてPABPN1の結合しない遠位のサイトが切断・ポリアデニル化され長いポリA鎖をもつmRNAが多く生成される (選択的ポリアデニル化 alternative polyadenylation : APA) のに対し、疾患型PABPN1では近位のサイトの切断・ポリアデニル化を阻害しないため結果として短いポリA鎖を持つmRNAが生成されること (選択的ポリアデニル化の異常) によって、標的遺伝子の発現を変えようというモデルが提唱された<sup>2)</sup>。ポリA鎖の長さが変化すると、そこに結合するmicro RNAの結合状況が変わり、結果として標的遺伝子の発現レベルを調節していると考えられているが、実際にどのような標的遺伝子の選択的ポリアデニル化の異常がOPMDの疾患病理の原因であるかについては殆どわかっていない。

また、PABPN1は、発生初期からずっと普遍的に発現していることから、患者の生検サンプルでは、変異型PABPN1の発現による直接的な原因を推定し難いので、OPMD発症機序の解明のためには、それぞれの疾患型PABPN1の発現をコンディショナルに誘導できるモデルマウスを作成し、疾患型のPABPN1がどのような分子・細胞レベルの異常を導入直後の亜急性期に起こすかを解析することで因果関係を明確にする必要がある。

我々は、自身で開発した成体筋組織への高効率in vivo

電気穿孔法 (特許出願準備中) を用いて、PABPN1の疾患変異型遺伝子をマウス筋組織へと導入することにより持続性に発現させ、時間経過と共に進行性にOPMD疾患と同様な筋力低下を含む筋病変や細胞死がみられることを免疫組織学的解析等により確認した。導入された筋肉組織では、疾患変異型を発現する筋繊維の直径は正常型の筋繊維と異なり一定でなく、縁取り空胞の形成、核の増加が認められ、核の位置の異常が観察された。さらに、ECMの増加による顕著な線維化の亢進も認められ、両側性に変異型PABPN1を導入・発現させたマウスにおいては顕著な運動性の異常も認められる (data not shown) など、OPMDの疾患病態をかなり良く再現できている<sup>3,4)</sup> (論文投稿中)。

本研究では、我々は、それらのOPMD疾患モデルマウスにおいて導入された変異型PABPN1の発現開始直後に蛋白質の発現レベルが変化する複数の標的候補遺伝子に焦点を絞り、それらがPABPN1による標的遺伝子の選択的ポリアデニル化による発現調節の結果として起こっているかどうかをまずはC2C12細胞株を用いた生化学的解析によって解析し、少なくともC2C12において選択的ポリアデニル化が起こっている事が明らかになった標的遺伝子については、再びin vivo電気穿孔法で正常型及び疾患型PABPN1遺伝子をマウス大腿筋に導入しmRNAの3'端を解析し、最終的に正常型及び疾患型PABPN1がそれら標的遺伝子産物の発現レベルを変えようという事が確認できたら、それを真にOPMDの病理に関与するPABPN1のターゲット転写産物と考え、それらの発現調節を介した疾患病理を解明し治療法の開発をめざす。

### 方法

- 1) C2C12細胞にPABPN1の正常型および患者型をLipofectamine LTXを用いたtransient transfection法によって導入し、一過性の発現による細胞の増殖・生存、形態変化に及ぼす影響を解析した。
- 2) C2C12細胞にPABPN1の正常型および患者型をDoxycycline (Dox) 依存的に誘導性に発現させられるベクター PB110を用いて導入し、細胞株をそれぞれ5株ずつ樹立。Doxycyclineによる発現誘導後の細胞の

増殖・生存、形態変化に及ぼす影響を解析し、また、それらの細胞株よりmRNAを抽出し、標的mRNAのポリA選択が変化しているかどうかについて、RT-PCRおよび3'RACE法、Northern blot, exon array, RNA-seqを用いて調べる。

- 3) ヒトiPS細胞、ヒトES細胞にゲノム編集によってPABPN1の疾患型の変異を導入した細胞株を樹立し、筋細胞に分化させる過程でどのような表現型が見られるかを組織化学的(筋組織の免疫染色, 化学染色等)、電子顕微鏡的(サルコメア構造やZ-lineの乱れ, 異常封入体)に解析する(慶應義塾大学・今井貴雄先生)。

**結果**

- 1) マウス大腿筋にPABPN1の正常型(6k), 疾患型(9k, 616k)を導入マーカーのCAG-EGFPベクターと共にin vivoエレクトロポレーション法によって導入し、1ヶ月後にsacrificeし、薄切した凍結切片を4% PFAで固定後、抗PABPN1抗体, 抗GFP抗体を用いて、免疫組織化学法及び蛍光抗体法を行って、疾患型の筋繊維

の直径は正常型の筋繊維と異なり一定でなく、縁取り空胞の形成、核の増加が認められ、核の位置の異常が観察された(図1)。さらに、ECMの増加による顕著な線維化の亢進も確認できた(data not shown)。

- 2) C2C12細胞及びヒトiPS細胞、ヒトES細胞に正常型及び疾患型PABPN1遺伝子(C末端にFLAGタグを導入)の発現ベクターを導入し、stable cell linesを確立し、Doxycyclinで誘導後にPABPN1 variantsとの発現をFLAG抗体で確認した(図2)。C2C12細胞の免疫染色によっても確認した(data not shown)。現在、得られたstable cell linesからmRNAを抽出した後3'RACE法で選択的ポリアダニル化(APA)によって調節されている候補遺伝子のクローニングを行い、Northern blotting等で確認中である。

C2C12細胞にPABPN1の正常型及び疾患型をtransientに導入し細胞の生存に及ぼす影響を解析した。図3に示す通りPABPN1-616kを発現した場合に著しく生存・増殖が低下した。細胞の形態にも異常が見られ、細胞接着性も低下していた(data not shown)。

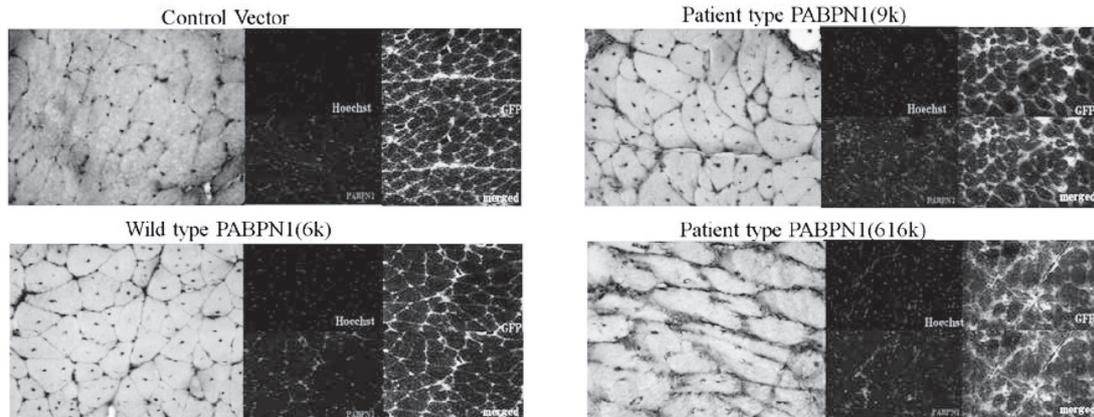


図 1.

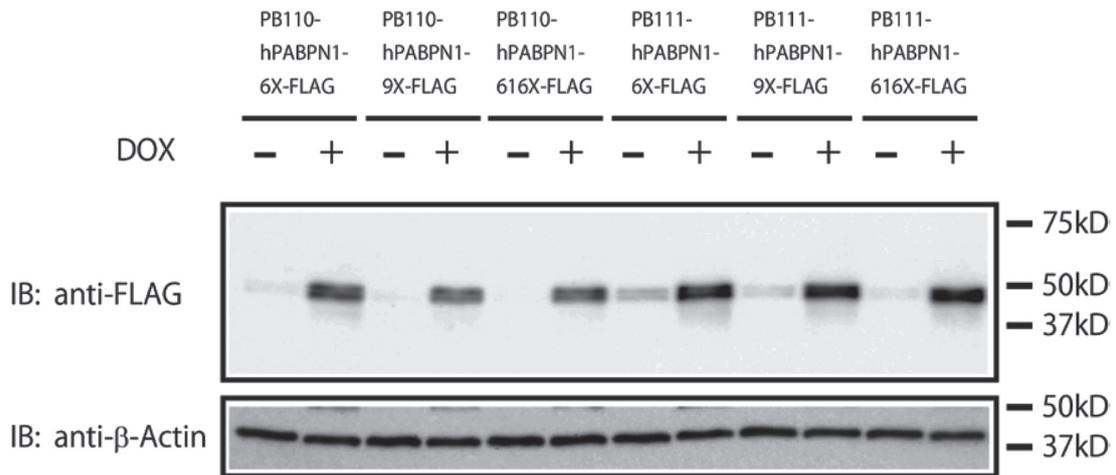


図 2.

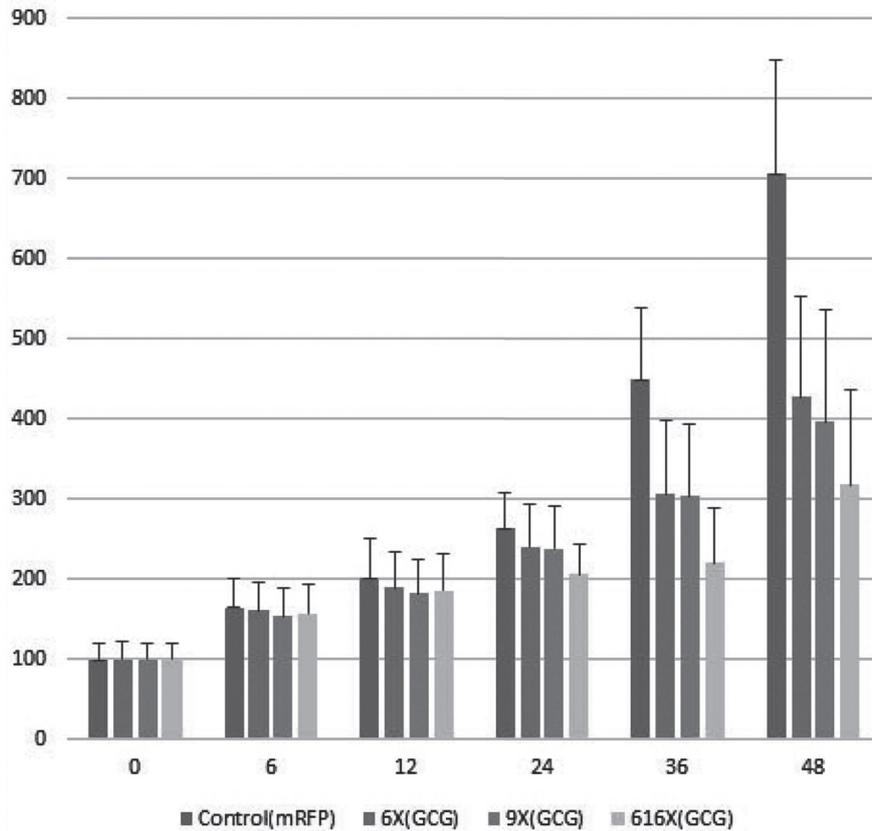


図 3.

## 考 察

我々の開発した高効率なin vivo電気穿孔法を用いて作成したモデルマウスにおいてPABPN1の疾患型を発現するとOPMDの病態を再現できることから最終的なOPMDの疾患病理を明らかにするためには、このモデルマウスにおいてPABPN1による選択的ポリAデニル化によって実際に発現が制御され、タンパクレベルでも発現が上昇または低下している標的遺伝子を同定する事が重要であると考えている。

しかしながら、現段階では少なくともC2C12あるいはヒトiPS細胞、ヒトES細胞において、PABPN1によって選択的ポリAデニル化で調節されていると考えられる標的遺伝子を確実に絞りこんでいる段階であるため、残念ながらモデルマウスで検証するに至っていない。

最近、PABPN1が結合することでTDP-43と言う家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子の一つと考えられている蛋白質の核移行を調節しているという報告がなされた<sup>5)</sup>。前述のように、PABPN1のN末近傍のアラニンGCGの半復配列が正常では6~7回繰り返されるのに対し、OPMD疾患型では9~13回に伸長しているが、アラニン鎖の伸長度だけが症状の重篤度を決めているわけではないようである。実際、本大学病院を受診された女性は、ヘテロ変異にも関わらず、本来はホモ変異にしか

見られない認知機能にも異常がみられた。つまり、運動神経においては、アラニン鎖の伸長度以外の要因も関与している可能性もあり、異なる細胞における疾患型PABPN1の関与についても別途調べる必要があると考えている。

## 謝 辞

本研究は、埼玉医科大学生理学教室において、課外プログラムに参加してくれた医学部学生松本恵さん、池田正明教授、熊谷恵助手との現在論文投稿中の共同研究「in vivo電気穿孔法を用いて作成した眼咽頭筋ジストロフィー疾患モデルの開発」が土台となっており、その後、共同研究者である慶應義塾大学医学部生理学教室助教(本学非常勤講師)の今井貴雄先生の全面的な御協力の下で実施されました。ここに深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Mizoi Y, Yamamoto T, Minami N, Ohkuma A, Nonaka I, Nishino I, Tamura N, Amano T, Araki N. Oculopharyngeal muscular dystrophy associated with dementia. *Intern Med* 2011; 50(20): 2409-12.
- 2) Jenal M, Elkon R, Loayza-Puch F, van Haften G, Kuhn U, Menzies FM, Oude Vrielink JA, Bos AJ, Drost J, Rooijers K, Rubinsztein DC, Agami R. The poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage

- and polyadenylation sites. *Cell* 2012; 149(3): 538-53.
- 3) Abu-Baker A, Rouleau GA. Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(2): 173-85.
  - 4) Gidaro T, Negroni E, Perie S, Mirabella M, Laine J, Lacau St Guily J, Butler-Browne G, Mouly V, Trollet C. Atrophy, fibrosis, and increased PAX7-positive cells in pharyngeal muscles of oculopharyngeal muscular dystrophy patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013; 72(3): 234-43.
  - 5) Chou CC, Alexeeva OM, Yamada S, Pribadi A, Zhang Y, Mo B, Williams KR, Zarnescu DC, Rossoll W. PABPN1 suppresses TDP-43 toxicity in ALS disease models. *Hum Mol Genet* 2015; 24(18): 5154-73.

## 研究成果リスト

### 学会発表

- 1) Nakao K, Matsumoto M, Kumagai M, Mizoi R, Araki N, Ikeda M, Imai T. Functional and pathological analysis of PABPN1, a responsible gene for oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD), which is introduced in to mouse skeletal muscles by in vivo electroporation. 第38回日本分子生物学会年会／第88回日本生化学会大会合同大会, 平成27年12月, 神戸ポートアイランド
- 2) 中尾啓子, 松本恵, 熊谷恵, 池田正明, 今井貴雄. in vivo電気穿孔法を用いて作成した眼咽頭筋ジストロフィー疾患モデルにおける原因遺伝子PABPN1の機能解析, 第39回日本神経科学大会, 平成28年7月, パシフィコ横浜

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

肝細胞癌における新規癌抗原 KK-LC-1 の発現と  
発癌因子および腫瘍環境との関連性

研究代表者 合川 公康 (国際医療センター 消化器病センター 消化器外科)

研究分担者 宮澤 光男\*, 岡田 克也\*, 渡邊 幸博\*, 岡本 光順\*,  
秋元 尚枝\*, 小山 勇\*

## 緒言

癌/精巣抗原(Cancer/testis antigens, CTAs)は、あらゆる組織癌で発現し、免疫原性を有しているタンパク質であり、癌特異的な発現パターンから癌の治療・診断・予防の効果的な標的物質である。さらに、CTAsは特定の発癌物質で誘導されることが分かっており、将来CTAsの発現プロファイリングにより発癌の原因を特定することが可能となる。我々は新たなCTAs候補としてKitakyushu lung cancer antigen-1 (KK-LC-1)に注目している。本研究では、未だ実施されていない肝癌(肝臓悪性腫瘍)におけるKK-LC-1の発現解析を実施する。また、KK-LC-1を主体としてCTAsの発現と発癌因子であるB型肝炎ウイルス(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)、さらには、それらに關与する免疫関連物質との関連性を各発癌因子におけるepigenetic alterationを加味したうえで解析する。最終的に、臨床病理学的な背景との関連(特に予後)、各ウイルスの免疫におよぼす影響と免疫原であるKK-LC-1を有する癌細胞がなぜ生き残れるかについて考察する。

## 材料と方法

手術摘出検体、および患者血清を用いて以下の検討を行う。

- 1) 肝癌でのCTAsを計測、KK-LC-1の発現についてRT-PCTを用いて確認しKK-LC-1発現が癌の性状(分化

\*国際医療センター 消化器病センター 消化器外科

度、原発巣)によってどのように違うかを検討する。

- 2) KK-LC-1の発現とHBVおよびHCV感染との関連性を精査し、各ウイルスがKK-LC-1の発現誘導体であるか否かを明らかにする。
- 3) KK-LC-1発現と予後を含めた臨床病理学的因子とどのように関連するかを検討する。

## 結果・考察

HCC(肝細胞癌)におけるCTAs発現のプロフィールは以下のごとくであった(図1)。検体は、現在、60例採取できているが、当初、RNA抽出に難渋し、測定が進まなかった。RNA抽出が難渋した原因として、検体採取時に腫瘍への剖面を入れてから腫瘍採取までに時間がかかってしまい、RNase混入、および細胞の乾燥をきたしてしまった。検体処理時にもRNase混入が原因となり、十分な量を確保できなかった。以上のことを留意してPCRでの測定に十分なRNAを抽出できるようになり、現在測定を進めている。

現状の測定結果としては、MAGE-A1、SSX4の発現は認められたが、KK-LC-1の発現を認めなかった。今後、検体を蓄積して各CTAs発現プロフィールと臨床病理学的因子やウイルス感染との関連を検討していく予定である。

## 研究成果リスト

論文・発表  
なし。

Disease		HCC	HCC	HCC	HCC	HCC	HCC
KK-LC-1	Tumor site						
	Normal site						
MAGE-A1	Tumor site						
	Normal site						
NY-ESO-1	Tumor site						
	Normal site						
MAGE-A3	Tumor site						
	Normal site						
SSX4	Tumor site						
	Normal site						
MAGE-A4	Tumor site						
	Normal site						

※ MAGE-A Melanoma-associated Antigen 1  
 NY-ESO New York Esophageal squamous cell carcinoma  
 SSX Synovial sarcoma X

図 1.

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 脂肪細胞と骨芽細胞の分化を制御する 非コードRNAネットワークの分子基盤の解明

研究代表者 水野 洋介 (ゲノム医学研究センター)

### 緒言

髄間葉系幹細胞は、骨芽細胞や脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞などへの分化能力を持ち、骨、脂肪、筋組織などの生体を形作る基本的な組織の構成バランスを保つために非常に重要な役割を持つ。骨髄間葉系幹細胞の分化方向性を決定付ける遺伝子としては、転写因子PPAR $\gamma$ が脂肪細胞分化において重要である事が知られている。近年では $\beta$ カテニンをはじめとするWntシグナルが骨芽細胞分化と脂肪細胞分化の振り分けに重要な役割を持つ事が報告されている。申請者らは近年、マウスの骨髄間葉系幹細胞において、転写因子Id4が骨芽細胞分化を促進、脂肪細胞分化を抑制する遺伝子であることを突き止めた<sup>1)</sup>。またマイクロRNA (miRNA) のmiR-210とmiR-125bが骨芽細胞分化をそれぞれ促進、抑制することを明らかにした<sup>2,3)</sup>。他にも様々な遺伝子やmiRNAが2方向の分化制御に関与する事を明らかにしてきた。タンパクをコードしない非コードRNAの中でもmiRNAについては、上記の例のように、様々な生命現象を調節していることが具体的なメカニズムと共に多く明らかになってきている。現在データベースに登録されているmiRNAの数はヒト、マウスでそれぞれ高々約2,600種、約2,000種類であり、また個々のmiRNAが制御する対象となる標的遺伝子は比較的容易に推定できることもあり、特定のmiRNAとその標的遺伝子の制御関係を含んだ個々の生命現象における制御メカニズムを解明する作業は、一連のワークフローとして既にほぼ一般化している。一方、miRNAよりも長い塩基長を持つ長鎖非コードRNA (lncRNA) については、マウスでは約10万種類が、NCBIやEnsembl, lncRNA database等の公共データベースに個別の転写物として登録されている。lncRNAの中には、標的遺伝子やそのゲノム領域に対するクロマチン修飾やメチル化修飾などを介して、様々な重要な生命現象に関与していることが明らかとなっており<sup>4,5)</sup>、がんや心筋症などの特定の病態との関与も少しずつ明らかになってきている。しかし、個々の生命現象を制御することが解明された具体的なlncRNAの数は現時点でまだ約10万種類

のうちの数百種類程度とごく限られている。特に、骨芽細胞分化、脂肪細胞分化を制御する具体的なlncRNAはまだほとんど同定されていない。骨芽細胞分化に影響を与えることが報告されているlncRNAのごく限られた例として、lncRNA-ANCRがある<sup>6)</sup>。lncRNA-ANCRはヒト骨芽細胞前駆細胞の一種であるhFOB1.19において骨芽細胞分化時に発現が減少する。またこのRNAを細胞内で強制発現させると骨芽細胞分化が抑制される事が示されており、EZH2とRunx2に対する何らかの抑制的な制御機構が存在することが示唆されている。約10万種類のlncRNAの中には、骨芽細胞分化や脂肪細胞分化をより積極的に制御するものが存在する事が考えられるが、まだその同定にはほとんど至っていないのが現状であり、ましてやその具体的な制御メカニズムが明らかにされているものは皆無である。そこで本研究では、マウス間葉系幹細胞が骨芽細胞分化、脂肪細胞分化する際に発現変動するlncRNAを検出し、両方向への分化に影響を与えるlncRNAの候補を抽出することを目的として実験・解析を実施した。

### 材料と方法

#### 1) 間葉系幹細胞サンプルの調整

10%ウシ胎児血清を添加したPRMI1640培地でマウス間葉系幹細胞ST2を培養し、脂肪細胞分化誘導および骨芽細胞分化誘導を行った。脂肪細胞分化誘導では、インスリン、デキサメタゾン、ロシグリタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを基本培地に添加した誘導用培地を用いた。2日後に誘導用培地を除去し、基本培地に交換して培養を継続した。骨芽細胞分化誘導では、培養の全期間において、基本培地にBMP-4 (R&D社) を200 ng/mlの濃度で添加した培地を用いた。分化誘導を行わない対照サンプルとして基本培地のみでの培養も併せて行った。分化誘導開始直前(0時間)、開始1時間後、12時間後、2日後、4日後、6日後、10日後の細胞を回収し、miRNeasy mini kit (Qiagen社) によりsmall RNAを含む全RNAを抽出した。サンプルからDNAを除去するため、RNA抽出作業時にDNase処理を行った。

## 2) 脂肪・骨芽細胞分化の確認

分化誘導サンプルの分化を確認するため、脂肪細胞、骨芽細胞分化の遺伝子マーカーの発現を逆転写定量PCR (qRT-PCR) 法を用いて定量した。まず、前項で得られたRNAを用いて、逆転写酵素 (Bioscript, Bioline社) を用いてcDNAを合成した。得られたcDNA産物を鋳型として、各遺伝子特異的プライマー (脂肪細胞分化マーカーとしてPPAR $\gamma$ , 骨芽細胞分化マーカーとしてオステオカルシン) を用いて、Power SYBR Green (ライフテクノロジーズ社) による定量的PCRを行った。更に、脂肪細胞分化誘導処理、骨芽細胞分化誘導処理したサンプルについてそれぞれナイルレッド染色、アルカリフォスファターゼ染色を行い、脂肪細胞と骨芽細胞への分化を確認した。

## 3) トランスクリプトームアレイ解析

各サンプルRNA 100 ngを用いて、アフィメトリクス社 Mouse Transcriptome Array 1.0による発現アレイ解析実験を行った。アフィメトリクス社のプロトコルに従い、逆転写反応、二本鎖cDNA合成、インビトロ転写反応、一本鎖cDNA再合成、cDNA断片化反応・標識反応を行って、ハイブリダイゼーション用のサンプルを調整した。調整したサンプルをアレイに充填し、45°Cで16時間回転させながらインキュベーションし、アレイへのハイブリダイゼーションを行った。その後、Fluidics Station (アフィメトリクス社) を用いてアレイを洗浄・染色し、専用スキャナにて各プローブスポットの蛍光強度を定量した。得られたデータ (CELファイル) から Expression Consoleアプリケーション (アフィメトリクス社) を用いて数値化と遺伝子対応付けを行い、Transcriptome Analysis Console3.0アプリケーション (TAC, アフィメトリクス社) を用いて各遺伝子のエクソン毎の発現量とその変動量を可視化した。

## 結果

### 1) 脂肪・骨芽細胞分化の確認

#### a) 脂肪細胞分化の確認

脂肪細胞分化誘導後6日目のサンプルを用いて、PPAR $\gamma$  遺伝子発現量を定量的PCR法にて定量した結果、未分化の細胞と比較してPPAR $\gamma$ 発現量が約1800倍まで上昇していることが分かった。またナイルレッド染色により、実際に油滴の蓄積を確認した (data not shown)。

#### b) 骨芽細胞分化の確認

骨芽細胞分化誘導後6日目のサンプルを用いて、オステオカルシン遺伝子発現量を定量的PCR法にて定量した結果、未分化の細胞と比較してオステオカルシン発現量が約300倍まで上昇していることが分かった。またアルカリフォスファターゼ染色により、アルカリフォスファターゼ活性陽性の細胞を確認した (data not shown)。

### 2) lncRNAの発現変動解析

前項の解析により脂肪細胞分化、骨芽細胞分化の誘導

ができた細胞検体より抽出したRNAを用いて、発現アレイ解析を行った。TACアプリケーションのGene level expression analysisモードを用いて視覚化した例を図1と図2に示す。図1では、分化誘導を行わずに10日間培養した細胞サンプルの発現データをコントロールとして、

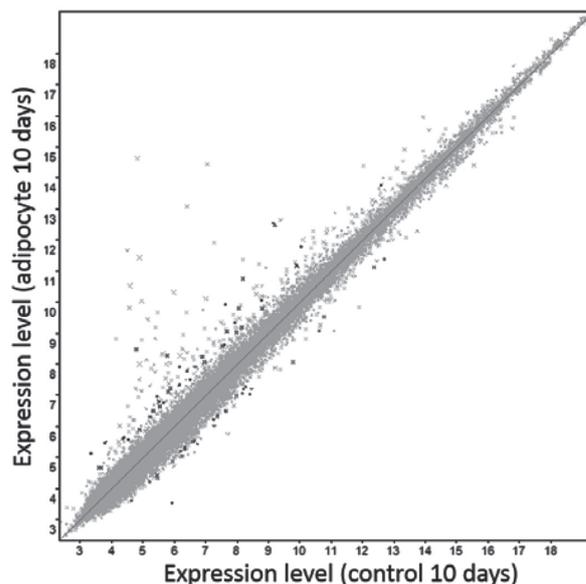


図1. 脂肪細胞分化10日目の網羅的遺伝子発現変動パターン。各転写物の発現量について、脂肪細胞分化誘導10日目のサンプルをY軸、分化誘導を行わないコントロールサンプルをX軸においた散布図。発現が2倍以上変動したlncRNAを濃いドットで示している。

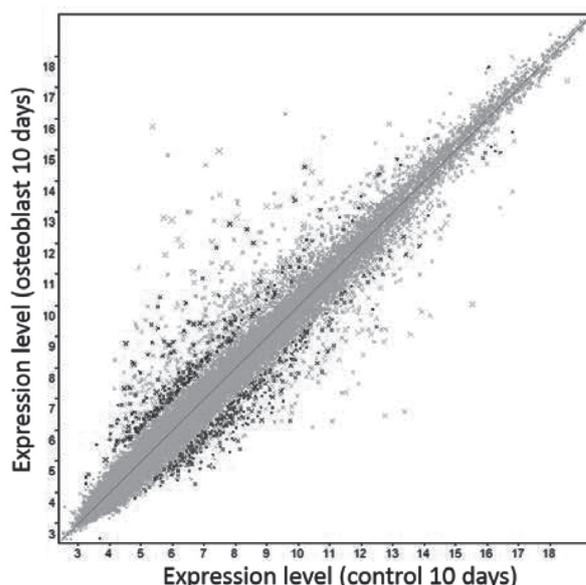


図2. 骨芽細胞分化10日目の網羅的遺伝子発現変動パターン。各転写物の発現量について、骨芽細胞分化誘導10日目のサンプルをY軸、分化誘導を行わないコントロールサンプルをX軸においた散布図。発現が2倍以上変動したlncRNAを濃いドットで示している。

脂肪細胞分化誘導後10日目の細胞の発現データを用いた、各遺伝子の発現量の散布図を示している。TACアプリケーションでnoncodingRNAと定義されている転写物をlncRNAとみなし、それをフィルタリングにより抽出したところ、約90種類のlncRNAが2倍以上発現変動していることが分かった。最も発現変動の大きかったlncRNAでは、脂肪細胞分化誘導により約13倍の発現上昇が見られた。同様の解析を骨芽細胞分化誘導サンプルでも実施した。図2では、分化誘導を行わずに10日間培養した細胞サンプルの発現データをコントロールとして、骨芽細胞分化誘導後10日目の細胞の発現データを用いた、各遺伝子の発現量の散布図を示している。骨芽細胞分化誘導時では発現変動した遺伝子の種類数が脂肪細胞分化時よりも多く、lncRNAに関しては約600種類が2倍以上発現変動していることが分かった。発現変動の幅も脂肪細胞分化時よりも大きく、最も発現変動の大きかったlncRNAでは、骨芽細胞分化誘導により約27倍の発現上昇が見られた。

## 考 察

今回の解析により、脂肪細胞分化、あるいは骨芽細胞分化を誘導したマウス間葉系幹細胞において、発現量が発動するlncRNA群を新規に検出することができた。これらのlncRNAには、実際に脂肪細胞分化や骨芽細胞分化に影響を及ぼしているものが含まれていると推測される。今回使用したマウストランスクリプトームアレイでは、2013年までに公共データベースに登録されている非コードRNAの多くがプローブとして搭載されていることから、既知の非コードRNAの発現量を解析するという観点においては本アレイは簡便で有効なツールであると考えられる。今回検出されたlncRNAについては、それぞれどのような遺伝子に作用を及ぼしているのか、またそれを介して細胞分化にどのように影響を与えるのかを今後解明していく必要がある。これにより、骨粗鬆症や生活習慣病に対する創薬や診断・治療等の臨床へ展開していく事が期待される。

## 謝 辞

この研究はゲノム科学部門の岡崎康司教授の助言、監督の下に遂行されました。また、細胞サンプルの調整には

ゲノム科学部門の八塚由紀子助手に多大なご協力を頂き、発現解析に関してはトランスレーショナル・リサーチ部門の仲地豊助教に助言を頂きました。深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Tokuzawa Y, Nakachi Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Mizuno Y, Okazaki Y, et al. Id4, a new candidate gene for senile osteoporosis, acts as a molecular switch promoting osteoblast differentiation. PLoS Genet 2010; 6(7): e1001019.
- 2) Mizuno Y, Tokuzawa Y, Yatsuka-Kanesaki Y, Okazaki Y. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. FEBS Lett 2009; 583(13): 2263-8.
- 3) Mizuno Y, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Okazaki Y, et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. Biochem Biophys Res Commu 2008; 368(2): 267-72.
- 4) Kornfeld JW, Brüning JC. Regulation of metabolism by long, non-coding RNAs. Front Genet 2014; 5(57): eCollection.
- 5) Guan D, Zhang W, Zhang W, Liu GH, Belmonte JC. Switching cell fate, ncRNAs coming to play. Cell Death Dis 2013; 4: e464.
- 6) Zhu L, Xu PC. Downregulated LncRNA-ANCR promotes osteoblast differentiation by targeting EZH2 and regulating Runx2 expression. Biochem Biophys Res Commun 2013; 432: 612-7.

## 研究成果リスト

### 学会発表

- 1) 水野洋介, 仲地豊, 八塚由紀子, 徳澤佳美, 岡崎康司. トランスクリプトーム情報を活用した、骨芽細胞と脂肪細胞の分化機構の統合的解析, 第17回日本RNA学会年会, 2015年7月16日, 札幌
- 2) 水野洋介, 仲地豊, 徳澤佳美, 八塚由紀子, 岡崎康司. 骨芽細胞と脂肪細胞の分化を制御する転写物バリエーション, マイクロRNA, 非コードRNAの探索, 第38回日本分子生物学会年会 (BMB2015), 2015年12月2日, 神戸

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

## iPS細胞における Bivalent クロマチン構造構築の分子メカニズムの解明

研究代表者 上田 篤 (ゲノム医学研究センター)

## 緒言

転写に関わるエピジェネティックな変化として、ヒストンH3のアミノ末端から4番目のリジン残基と27番目のリジン残基のメチル化は、それぞれ、転写促進と抑制に密接に関わっていることが知られており、通常、これら2種類のアミノ酸修飾は一つのタンパク質分子の中に共存することはない。但し、例外として、ES細胞及び人工多能性幹細胞(iPS細胞)では、Pax6であるとか、Pdx1遺伝子など発生・分化に関わっている遺伝子の多くがこれら2種類のヒストン修飾の両方を同時に持つことが知られている<sup>2)</sup>。従って、ES細胞やiPS細胞では、発生・分化に関わる遺伝子の発現に関しては、車で例えるとアクセルとブレーキが同時に施されるといった状況になる。もちろん、これらの細胞は、未分化性を保つ為、発生・分化に関わる遺伝子の発現を極力抑えることが必要であるが、にもかかわらず、発生・分化に関わる遺伝子に対して、転写抑制に関わるヒストン修飾のみならず転写促進に関わるヒストン修飾も同時に導入していることの生理的な意義は、これらの細胞がレチノイン酸などの細胞分化シグナルを受けた際にそれに対して速やかに呼応することを可能にする為であると考えられている。この特殊なクロマチン構造はBivalentクロマチン構造と命名されており、ES・iPS細胞のみならず造血幹細胞・神経幹細胞等の組織幹細胞でも同定されている。但し、ES・iPS細胞においてこのBivalentクロマチン構造を構築している遺伝子の数は、組織幹細胞のそれと比べて遥かに凌駕しており、それ故、このBivalentクロマチン構造はES・iPS細胞が有する特殊な特徴の一つとして認知されている。但し、このBivalentクロマチン構造がどのような分子メカニズムで持って構築されるかに関しては全くわかっていないので、本研究ではそれを解明することを目的に研究を行った。

## 材料

本研究で用いたES細胞、及びpartial iPS細胞は、私が所属している研究室で以前樹立したものをを用いた<sup>3)</sup>。Bivalentクロマチン構造の検出は、Hattoriらの報告<sup>1)</sup>に記載されている方法に従って行った。

## 結果

iPS細胞は、体を構成するあらゆる種類の細胞へと変換できる分化多能性等、ES細胞が持つ特筆すべき性質を維持する上で重要な働きをする4つの因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を皮膚細胞などの分化細胞に対して強制発現することで、ES細胞と同等の性質を有する細胞へと人工的に変換した細胞であるが、その分化細胞からiPS細胞への変換には通常2週間以上の日数を要し、また、partial iPS細胞と異なり、リプログラミングが不十分な状態で安定的に留まり、それ以降のリプログラミングができない、いわゆる、不完全なiPS細胞も多く登場してしまう<sup>4)</sup>。但し、マウス細胞由来のpartial iPS細胞に関してはMAPKとGSK3βに対する阻害剤を用いる培養条件(2i培養条件)に曝すと速やかに真のiPS細胞へと変換することが知られている<sup>5)</sup>。本研究では、まず、このpartial iPS細胞では真のiPS細胞と比べ既に十分にBivalentクロマチン構造が構築されているかを検討することにした。その為、細胞内の特定の場所で2種類の異なる抗原が近接している場合、それを検出することができるDuolink in situ PLA法<sup>6)</sup>を用いて検討することにした。但し、真のiPS細胞は、*Nanog*-GFPトランスジーンを持つ為、緑色蛍光は発し、それ故、Duolink in situ PLA法からのシグナルと区別できない為、iPS細胞の代わりにES細胞を用いた。その結果を図1Aに示すが、ES細胞では、ヒストンH3 lysine 4とlysine 27のトリメチル化の修飾が近接している為に見られると思われるシグナルを数多く検出することができた(図1A)。但し、同じ操作を当研究で樹立したpartial iPS細胞<sup>3)</sup>に施したところ、ES細胞の場合と同様なシグナルはいくつか検出することはできたがその数はES細胞と比べ遥かに少ないことがわかった(図1B)。partial iPS細胞は、ES細胞やiPS細胞が有する分化多能性の維持に必須なOct3/4遺伝子などの内在性の発現が見られないであるとか、レトロウイルスに対する感染防御機構が完成されていないであるとかES細胞やiPS細胞と比べていくつか重要な違いがあることが指摘されていたが、今回の研究から、partial iPS細胞はBivalentクロマチン構造の構築の度合いに関しても、ES細胞と比べて大きく劣っていることが明らかになった。

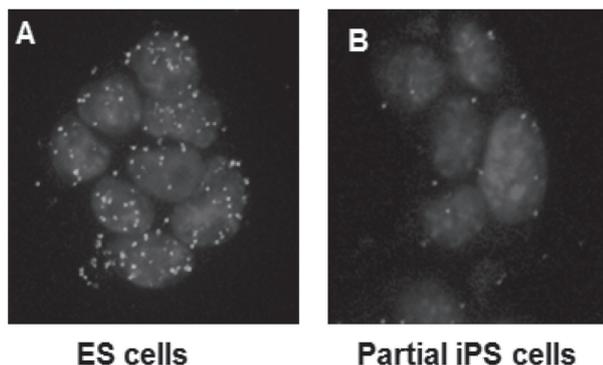


図 1. Duolink *in situ* PLA法によるES細胞 (A) 及びpartial iPS細胞 (B) におけるHistone H3K4とH3K27が近接している部分の可視化。

## 考 察

遺伝子の発現に対して促進と抑制という相反する現象に関わるヒストン修飾が同一箇所を導入されている Bivalent クロマチン構造は、ES細胞・iPS細胞の体を構成するあらゆる種類の細胞へと分化できるという特質を根底から支える重要な構造であると考えられるが、その構造の構築の為に分子メカニズムに関しては全くわかっていない。私たちは本研究において、リプログラミングが不十分な partial iPS細胞は、Bivalent クロマチン構造の構築に関してほとんど構築されていないことを示した。なお、partial iPS細胞は、2i培養条件というマウスES細胞を培養する為に新しく開発された培養条件に曝すことにより速やかに真のiPS細胞に変換することが知られているので、私たちの発見は、Bivalent クロマチン構造の構築を解析する為のプラットフォームを提供したことになると考えている。すなわち、Bivalent クロマチン構造構築に関わる可能性がある候補遺伝子を partial iPS細胞においてノックアウトもしくはノックダウンし、その後、それらの操作を施した partial iPS細胞を2i培養条件に曝し、それに伴って Bivalent クロマチン構造が構築されなければ、その遺伝子は、このクロマチン構造の構築に関わっていると結論できるといったスクリーニングが行えると考えられる。実際、私たちは、*Mbd3* 遺伝子が Bivalent クロマチン構造の構築に関わる可能性があると考え、同遺伝子をノックアウトし、2i培養条件下に曝した。しかしながら、その結果、*Mbd3* 遺伝子が無くてもこのクロマチン構造の構築は影響されないことがわかった(data not shown)。このように最初の trialからはネガティブな結果しか得られな

かったが、今後、その他の候補遺伝子についても同様な解析を行い、最終的に Bivalent クロマチン構造の構築に関わる遺伝子を同定し、ひいてはこのクロマチン構造構築の分子基盤の全容を解明したいと考えている。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、同部門の平崎正孝助教・鈴木歩助教・奥田晶彦教授からの多大なご協力に深く感謝致します。

## 参考文献

- 1) Hattori N, Niwa T, Kimura K, Helin K, Ushijima T. Visualization of multivalent histone modification in a single cell reveals highly concerted epigenetic changes on differentiation of embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: 7231-9.
- 2) Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagshal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125: 315-26.
- 3) Kamon M, Katano M, Hiraki-Kamon K, Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A, Nishimoto M, Kato H, Okuda A. Identification of Ccr4-not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2014; 23: 2170-9.
- 4) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
- 5) Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* 2008; 6: e253.
- 6) Sundqvist A, Zieba A, Vasilali E, Herrera Hidalgo C, Soderberberg O, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH, Landegren U, Ten Dijke P, van Dam H. Specific interactions between Smad proteins and AP-1 components determine TGFbeta-induced breast cancer cell invasion. *Oncogene* 2013; 32: 3606-15.

## 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。

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

## Myc-Nanog 複合体による Max 欠損 ES 細胞の多能性維持とアポトーシス抑制

研究代表者 平崎 正孝 (ゲノム医学研究センター)

## 諸言

ES (Embryonic Stem, 胚性幹) 細胞は、着床前の胚盤胞の内部細胞塊から樹立された細胞株であり、体を構成する全ての種類の細胞へと変換できる分化多能性と無限の自己増殖性という2つの特筆すべき性質を持った細胞株である。我々は、ES細胞が持つ特筆すべき性質がいかなる分子メカニズムで規定されているかの研究を、特に Myc タンパク質の機能解析を中心に行ってきた。Myc タンパク質は、アミノ酸配列が極めて似通った3つのタンパク質 (c-Myc, N-Myc と L-Myc) によりファミリーを形成している。これら全 Myc タンパク質は、少なくとも RNA polymerase II 依存的な転写促進において、パートナー因子である Max との相互作用が必要である。Myc タンパク質が、ES細胞の未分化性維持において重要な役割をしていることを初めて示したのは、米国の Dalton S. らであるが<sup>1)</sup>、同グループは、2010年には c-Myc と N-Myc の二重欠損マウス ES細胞を樹立し、その ES細胞は、胚体外内胚葉へと分化すると報告した<sup>2)</sup>。一方我々は、2011年に Myc のパートナー因子である Max の遺伝子発現が、Doxycycline の培地への添加の有無で100%コントロールできる Max ホモ欠損 ES細胞を樹立し、この ES細胞を用いて、ES細胞における Myc の役割を検討した。その結果、ES細胞における Max の遺伝子発現の消失は、外胚葉への選択的な分化とアポトーシスを引き起こすことを報告した<sup>3)</sup>。

Orkin S. らのグループは、各種転写因子に対する ChIP-sequence と網羅的な遺伝子発現解析から、Core, PRC, Myc モジュールと呼ばれる3つの転写サブネットワークの絶妙なバランスが、マウス ES細胞の特性を維持する上で中心的な働きをしていることが提唱された<sup>4)</sup>。Core モジュールは、Oct3/4, Sox2, Nanog など、ES細胞の多能性維持において極めて重要な役割を果たしていることが証明されている転写因子によりサポートされる転写サブネットワークである。一方、Myc モジュールはその名の通り Myc を中心とした遺伝子やタンパク質のネットワークで、このモジュールも、Core モジュールと同様に ES細胞の多能性を維持するための転写ネットワーク

として機能するが、Core モジュールとは独立して機能するとされている。これらの研究結果から、Myc-Max 転写複合体は、ES細胞状態の維持に極めて重要な役割を果たしているという概念が定着した。

我々は、同論文で、Max 欠損 ES細胞が呈する外胚葉への分化とアポトーシスは、Nanog の強制発現によってレスキューされ、Nanog 強制発現 Max 欠損 ES細胞は持続的に継代できる事を報告している<sup>3)</sup>。但し、強制発現 Nanog がどのような機構で Max 欠損 ES細胞の ES細胞状態を維持しているかに関しては現在も全く解明されていない。

そこで、私は、Nanog がどのような分子メカニズムで、Max 欠損 ES細胞が示す外胚葉への分化とアポトーシスという表現型を抑圧し、ES状態の維持に寄与しているかを明らかにすることを目的に研究を行ってきた。その結果、① LC-MS/MS 解析によって Nanog が、c-Myc 及び N-Myc と結合することを見出した。なお、この結果は、ES細胞の核抽出液を用いた共免疫沈降でも確認することができた。② Nanog は、c-Myc の N 末端に結合している事を見出した。なお、Max は、c-Myc の C 末端に結合する為、Nanog と c-Myc との相互作用に対して Max は競合しない事が示唆された。③ Max 欠損 ES細胞において発現レベルが低下している Myc モジュール遺伝子群が、Nanog の強制発現により、通常の ES細胞でのレベルまで回復することを見出した。

この様な更なる研究によって得た研究成果、特に Myc と Nanog が複合体を形成するという発見を土台に、Nanog 強制発現による Max 欠損 ES細胞のレスキュー機構の分子メカニズムの全容の解明を目指した。

## 結果・考察

## 1, Max 欠損 ES細胞における c-Myc の染色体への結合

c-Myc-Max 転写複合体は、標的遺伝子のプロモーター中の特異的配列 (E-box: CACGTG) に結合し、主に転写の促進を司る。しかし、c-Myc タンパクは、全ての機能発揮において Max を必要とする訳ではなく、tRNA 遺伝子の発現など、RNA polymerase III 依存的な転写では、Max 非依存的に作用することが知られている。また、c-Myc は Max タンパク質とは無関係に、Miz-1 (Myc-interacting

zinc-finger protein-1) との相互作用を介して, p21 や p15 の cdk inhibitor をコードする遺伝子の転写を抑制することで細胞の増殖を促進することも知られている。

これまでに多くの研究室において, マウス ES 細胞における c-Myc の標的遺伝子を調べる為に, ゲノムワイドなクロマチン免疫沈降解析 (ChIP-on-Chip, ChIP-Seq) が行われてきたが, Max 欠損型 ES 細胞における c-Myc のプロモーターへの結合を調べた例は今まで存在しない。そこで, 私は Max の欠損によって ES 細胞の自己増殖性および分化多能性の維持が損なわれる理由を探ることを目的に, Max 欠損 ES 細胞における c-Myc に対する Chip-seq を行う事を計画した。Dox を添加していない, Max を発現している状態の ES 細胞の c-Myc での chip-seq のデータと比較する事で, Max に完全に依存している c-Myc のゲノムでの結合部位を明確にすることが出来ると考えた。

そこでまず, c-Myc の chip の条件検討を行った。抗体は, Kim et al. らの論文で使用されていた, Santa Cruz 社の sc-764 を選択した。細胞の調整から染色体の切断までは, Covaris 社の truChIP Chromatin Shearing Reagent Kit を用い, Chip 部分は, ニッポンジーン社の OneDay Chip Kit を使用した。結果は, ネガティブコントロールである IgG のサンプルと比較して, 約 2 倍程度はであったが, c-Myc の Chip サンプルを調整した。

次に, このサンプルを用い, illumina 社の TruSeq ChIP Sample Preparation で Chip-Seq 用のサンプルを調整した。調整した Chip-Seq 用サンプルを illumina 社の HiSeq 2500 で Chip-Seq を行った。その結果, Max 存在下 (Dox-) で過去に報告されていた箇所にピークは見られず, テロメアなどのリピート配列が大量にデータとして抽出された。この事は, Chip 部分で使用した, ニッポンジーン社の OneDay Chip Kit が, アガロースビーズを用いている為, 不特定の染色体断片 (特にリピート配列であるテロメア部位) を濃縮させてしまった可能性が考えられた。

## 2, Max 欠失による ES 細胞の Bivalent クロマチン構造におけるヒストン修飾の変化

Bivalent クロマチン構造は, 転写に対して正に相関するヒストン修飾 (H3K4me3) と負に相関するヒストン修飾 (H3K27me3) が共存する特殊なクロマチン構造で, このクロマチン構造をプロモーターに持つ遺伝子からの発現は極めて低いレベルに抑えられている。但し, H3K27me3 により, 単に発現が抑制されている遺伝子とは異なり, 細胞内外からの発現促進のシグナルがインプットされると, 予め H3K4me3 の修飾を持つという理由から, そのシグナルに速やかに応答することができる。それ故, このクロマチン構造は, ES 細胞において, Pdx-1 遺伝子のような細胞の分化の方向性を決定するような遺伝子のプロモーター上によく見られる構造である。Eisenman RN. らのグループは, ES 細胞で chip-on-chip 解析を行ったところ, c-Myc は外胚葉分化マーカー (Fgf5 等) のプロモーター

にかなり選択的に結合すると報告した<sup>5)</sup>。かつ, c-Myc を強制発現させると Fgf5 遺伝子等の分化マーカーの発現が増加し, 逆に c-Myc を破壊すると遺伝子発現は減少することも示している。さらには, これら c-Myc 強制発現による外胚葉マーカー遺伝子の発現上昇は, c-Myc を介した Bivalent クロマチン構造における H3K4me3 のヒストン修飾の維持と H3K27me3 の減少によるものであると結論している。我々は, Max 欠損 ES 細胞において, 外胚葉系のマーカー遺伝子の発現が, 分化マーカー遺伝子の中で選択的に上昇することを見出しているが, Eisenman 等の報告と併せて考えると, ES 細胞において発現が押さえ込まれている外胚葉系マーカー遺伝子の発現を, Max とは相互作用していない遊離 c-Myc が活性化させる可能性が考えられた。外胚葉マーカー遺伝子の発現上昇は, c-Myc の機能による Bivalent クロマチン構造で見られるヒストン修飾の変化を介したのものであると仮定し, Max 欠損 ES 細胞に対して, H3K4me3 及び H3K27me3 に対する ChIP-seq 解析を行う計画を立てた。

H3K4me3 の抗体は, abcam 社の ab8580 を, また H3K27me3 は, Millipore 社の ChIPAb+ を用いた。その他の工程は, 上記の c-Myc と同様である。Chip-Seq の結果は, H3K4me3, または H3K27me3 も c-Myc と同様にテロメアなどのリピート配列が大量にデータとして抽出された。c-Myc の場合は Chip の時点で IgG と比較して 2 倍強と chip の効率が悪いと言う懸念はあったが, H3K4me3, または H3K27me3 は, 10 倍以上と十分な濃縮が行われていたにも関わらず, 同様な傾向が見られた。

以上の結果より, 今後アガロースビーズではなく不特定の染色体の結合が少ないと考えられている磁気ビーズで chip を検討する。また, c-Myc の chip の効率が良くないので, Flag-tag などの融合タンパク質での chip も検討する事にする。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり, 同部門の鈴木歩助教・上田篤ポストドクター・奥田晶彦教授からの多大なご協力に深く感謝致します。

## 参考文献

- 1) Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 2005; 132: 885-96.
- 2) Smith KN, Singh AM, Dalton S. Myc represses primitive endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 343-54.
- 3) Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Ema M, Takahashi S, Nishimoto M, Okuda A. Indefinite self-renewal of ESCs through Myc/Max transcriptional complex-independent mechanisms. *Cell Stem Cell* 2011;

9: 37-49.

- 4) Kim J, Woo AJ, Chu J, Snow JW, Fujiwara Y, Kim CG, Cantor AB, Orkin SH. A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs. *Cell* 2010; 143: 313-24.
- 5) Lin CH, Lin C, Tanaka H, Fero ML, Eisenman RN.

Gene regulation and epigenetic remodeling in murine embryonic stem cells by c-Myc. *PLoS One* 2009: e7839.

#### 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。

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 網膜ドーパミン作動性アマクリン細胞の自発活動に関わるイオンチャネルの解明

研究代表者 金子 優子 (保健医療学部 看護学科)

研究分担者 青葉 香代\*, 菅 理江\*

## 緒言

網膜は、色素上皮細胞、ミュラーグリア細胞と、5種類の神経細胞(視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞)からなり、各神経細胞にはさらにいくつかのサブタイプがある。これらの網膜細胞すべてにドーパミン受容体が存在している<sup>1)</sup>。ドーパミンは暗順応-明順応の切り替えに重要であり、日周期にも関与している<sup>2,3)</sup>。一方、網膜においてドーパミンを産生・放出しているニューロンはドーパミン作動性アマクリン細胞(DA細胞)だけである。DA細胞は、広い出力範囲を持つが、無髄神経線維のみを持つ。近年の電気生理学的研究により、DA細胞には自発的な電位依存性Na活動電位発生があり、ドーパミン放出は、この活動電位頻度で調節されていることが明らかにされた<sup>4-6)</sup>。電位依存性Naチャンネル( $Na_v$ )は、 $\alpha$ ( $Na_v\alpha$ )、及び $\beta$ ( $Na_v\beta$ )サブユニットからなり、 $Na_v$ の電気的特性は主に $Na_v\alpha$ により決定され、 $Na_v\beta$ により機能及び発現が修飾される。また、各サブユニットは、それぞれサブタイプ( $Na_v\alpha$ :  $Na_v1.1-1.9$ ,  $Na_v\beta$ :  $\beta1-\beta4$ )がある<sup>7)</sup>。抗体染色法を用いた $Na_v\alpha$ タンパクの発現検出と*in situ* hybridization法(ISH法)やRT-PCR法を用いたmRNAの発現検出により、哺乳類網膜には、7種(TTX感受性 $Na_v\alpha$ :  $Na_v1.1-1.3$ ,  $Na_v1.6-1.7$ ; TTX抵抗性 $Na_v\alpha$ :  $Na_v1.8-1.9$ )の $Na_v\alpha$ サブタイプと、2種の $Na_v\beta$ ( $\beta1$ ,  $\beta2$ )の発現が報告されている<sup>8-10)</sup>。TTX感受性の $Na_v$ 活動電位を発生する網膜神経細胞には、神経節細胞(RGC)と、AIIアマクリン細胞、DA細胞がある。20種類以上に分類されているRGCの全てが同じ組み合わせの $Na_v\alpha$ と $Na_v\beta$ を発現しているのかどうかは明らかでないが、ISH法によりRGC層に4種類の $Na_v\alpha$ ( $Na_v1.1-1.3$ ,  $Na_v1.6$ )と2種類の $Na_v\beta$ ( $\beta1$ ,  $\beta2$ )の発現が確認されている<sup>8,9)</sup>。ISH法と抗体染色法を組み合わせた我々の研究によって、ラット網膜AIIアマクリン細胞については、主に $Na_v1.1$ が発現していることが明らかとなった<sup>9)</sup>。一方、DA細胞にどのような電位依存性Naチャンネルが、どのような分布で発現しているのかについては明らかになっていない。我々は予備実験で、一部

のラットDA細胞に $Na_v1.2$ 発現がみられるという結果を得ている<sup>11)</sup>。この結果はDA細胞では、RGCともAIIアマクリン細胞とも異なる組み合わせの $Na_v\alpha$ が発現していることを示唆するだけでなく、DA細胞間で発現する $Na_v\alpha$ サブタイプが異なる、あるいは、 $Na_v$ 活動電位を発生しないDA細胞が存在する、という可能性を示唆している。マウス及びラットDA細胞においては一部の細胞は網膜外網状層(OPL)に突起を伸ばしていないという報告<sup>12)</sup>や、マウスではDA細胞の一部にメラノプシン含有型RGCから入力を受けているものがあるという報告<sup>2)</sup>があり、さらに、DA細胞の自発的活動頻度は細胞間で大きく異なることが報告されている<sup>13)</sup>。これらのことから、我々はDA細胞には興奮性の違いにおいてsubpopulationが存在するであろうと考えている。そこで本研究では、DA細胞の自発的な活動電位発生を支える電位依存性Naチャンネル分子を詳述するため、ラット網膜DA細胞における $Na_v\alpha$ の発現を調べた。

## 材料と方法

本研究は埼玉医科大学動物実験委員会によって承認され(27M078-1649, 27H18-1543)、埼玉医科大学動物実験指針に基づいて実施された。実験動物は成体の正常ラット(WistarまたはLong Evans, 4-8週齢)を用いた。実験動物は、エーテルで軽麻酔後、ペントバルビタールナトリウムによる深麻酔下で心臓灌流固定後、眼球摘出、または、過剰量のペントバルビタールナトリウム投与で安楽死後、眼球を摘出した。

**ISH法と抗体染色法を用いた二重染色:**心臓灌流固定後、眼球を摘出・固定し、凍結切片を作製した<sup>9)</sup>。ISH法で用いるプローブは、 $Na_v\alpha$  subunit type I ( $Na_v1.1$ ), type II ( $Na_v1.2$ ), type III ( $Na_v1.3$ ), NaCh6 ( $Na_v1.6$ )とPN1 ( $Na_v1.7$ )に対するDIG標識RNAプローブを作製した<sup>8,9)</sup>。凍結切片を用いてISH法にてmRNAの発現検出をおこなった後、DA細胞のマーカー抗体(anti-tyrosine hydroxylase antibody(抗TH抗体), ABR)と蛍光標識二次抗体(Alexa 488, Molecular Probes)を用いて抗体染色をおこなった。観察・撮影後、カバーガラスを剥離し、

改めて抗TH抗体とビオチン化二次抗体, ABC Kit, DAB Substrate Kit (Vector) を用いて抗体染色をおこない, DA細胞の見落としがないかの確認をおこなった。

**抗体染色法による二重染色:** ラットを安楽死後, 眼球を摘出し, 氷上で2時間固定し, 凍結切片を作製した。切片を洗浄・ブロッキング後, 抗Na<sub>v</sub>1抗体 (Na<sub>v</sub>1.1-1.9の共通抗体, PAN, clone K58/35, Sigma) と抗TH抗体, および蛍光標識二次抗体 (Alexa 488およびAlexa 546; Molecular Probes) を用いて二重染色をおこなった。

**単一細胞RT-PCR法:** ラットを安楽死後, 眼球を摘出し, 網膜を取り出し, パパイン (Worthington) で酵素処理をおこない網膜神経細胞を単離し, スライドガラス上に撒いた。固定後, 抗TH抗体とアルカリフォスファターゼ標識二次抗体 (メルクミリポア) を用いて抗体染色をおこなった。抗TH抗体標識DA細胞を微小電極で吸引し, 単一細胞RT-PCR法を試みた。PCRでは, Na<sub>v</sub>α特異的であり且つNa<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.6, Na<sub>v</sub>1.7に共通な部分を増幅し, さらに各サブタイプに特異的なPCRプライマーを用いて増幅するnested-PCR法をもちいた<sup>14)</sup>。

## 結果

ラット網膜神経細胞の多くは直径8-10 μm程度である。そのため, 通常, 我々はISHに使用する網膜切片は12 μmの厚さで作製する。ラット網膜AIIアマクリン細胞にNa<sub>v</sub>1.1が発現していることを発見した我々の研究<sup>9)</sup>においても, 12 μmの厚さの網膜切片を使用した。12 μm網膜切片に対し, TTX感受性Na<sub>v</sub>α (Na<sub>v</sub>1.1-1.3, Na<sub>v</sub>1.6-1.7) に対するDIG標識RNAプローブを用いたISHの結果, 内顆粒層 (INL) に顕著な発現が見られたのはNa<sub>v</sub>1.1だけであった。非常にまれだが, Na<sub>v</sub>1.2とNa<sub>v</sub>1.6の発現も見られた。そこで, Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.6をDA細胞が発現するNa<sub>v</sub>αの候補としてISHと抗TH抗体染色との二重染色をおこなった。INLにおけるNa<sub>v</sub>1.1発現は, INLと内網状層 (IPL) の境界にある細胞で検出されたが<sup>9)</sup>, 抗TH抗体染色と二重染色された細胞はなかった (INLで抗TH抗体染色された細胞数 = 278 cells / INLでISHシグナルが見られた細胞数 = 20,000 cells以上 / 抗TH抗体と二重染色された細胞数 = 0 cells / 試した切片数 = 72 sections)。また, INLにおけるNa<sub>v</sub>1.1を発現している細胞のほとんどは, 抗TH抗体でラベルされるDA細胞 (長径約20 μm, 短径約15 μm) に比べて小さかった。INLでNa<sub>v</sub>1.2とNa<sub>v</sub>1.6を発現している細胞は比較的大きく, そのうちのごく一部の細胞で抗TH抗体染色も検出されたが非常に数が少なかった (INLで抗TH抗体染色された細胞数 / INLでISHシグナルが見られた細胞数 / 抗TH抗体と二重染色された細胞数 / 試した切片数は, それぞれ, Na<sub>v</sub>1.2 : 288 cells / 28 cells / 2 cells / 86 sections, Na<sub>v</sub>1.6 : 349 cells / 13 cells / 1 cells / 96 sections, であった)。

ISHのシグナルは核付近に存在する。我々は, 核を含まない部分の切片で抗TH抗体染色のみが検出

されるために二重染色される細胞が少ない可能性を考え, 厚み18 μmの切片を作成し, 同様の実験をおこなった。その結果, 約10%のラットDA細胞にNa<sub>v</sub>1.2発現がみられるという結果が得られ, Na<sub>v</sub>1.6やNa<sub>v</sub>1.3においても二重染色された細胞がみられた (INLで抗TH抗体染色された細胞数 / INLでISHシグナルが見られた細胞数 / 抗TH抗体と二重染色された細胞数 / 試した切片数は, それぞれ, Na<sub>v</sub>1.2 : 287 cells / 75 cells / 27 cells / 64 sections, Na<sub>v</sub>1.6 : 97 cells / 25 cells / 4 cells / 21 sections, Na<sub>v</sub>1.3 : 24 cells / 8 cells / 4 cells / 4 sections, であった)。

上記の結果から, ラットDA細胞に発現している可能性のあるNa<sub>v</sub>αは, Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.6の3種類であることがわかった。これらのNa<sub>v</sub>αがそれぞれ単独で発現しているのか, あるいは, 組み合わせて発現しているのかを, 数種のプローブを用いたISH法と抗体染色法を用いた多重染色で調べることは非常に困難である。そこで我々は, 網膜細胞を単離し, 単一のDA細胞に対してRT-PCR法を試みる実験を計画した。単離DA細胞への単一細胞RT-PCR法の試みはすでに報告があるが, DA細胞を特異的に標識したトランスジェニックマウスで行われている<sup>4,5)</sup>。この方法では, 目的細胞ごとに変異動物を作成する必要がある。本研究では, より汎用性の高い手法を確立したいと考え, 単離細胞を抗体染色で標識して同定した後, 標識細胞を微小電極により吸引し, 単一細胞RT-PCR法を試みた。しかし, 現在のところこの試みは成功していない。

次に我々は, Na<sub>v</sub>αを発現するDA細胞において, Na<sub>v</sub>αタンパクがどのように分布しているのかをNa<sub>v</sub>1.1-1.9の共通抗体と抗TH抗体を用いた二重染色で調べた。各DA細胞からは多くの抗TH抗体ラベルされた神経突起 (TH-ir process) が出ており, そのほとんどがIPLにINLに沿う様に伸びていた。抗Na<sub>v</sub>1抗体の染色は主にRGC層に見られたが, IPLにも点在, あるいは~20 μmの突起様 (PAN-ir process) の染色像がみられた。PAN-ir processのほとんどはTH-ir processと重ならず, おそらくはAIIアマクリン細胞の神経突起と考えられる<sup>15)</sup>。4例のみ二重染色された突起 (TH-PAN-ir process) がみられた。二重染色された突起はいずれも1つのDA細胞に1本で, 細胞体の付け根から~20 μmの部分までが二重染色されていた。4例のうち1例のDA細胞については, OPLに突起を伸ばしている1本のTH-ir processが見られ, これはTH-PAN-ir processとは異なる突起であった。この結果と, 他の3例のコンフォーカル画像の3次元構築像から, TH-PAN-ir processは, IPLにINLに沿う様に伸びていることが示唆された。

## 考察

本研究では, DA細胞の自発的な活動電位発生を支える電位依存性Naチャンネル分子を詳述するため, ラット網膜DA細胞におけるNa<sub>v</sub>αの発現を調べた。Na<sub>v</sub>αタンパクは神経突起に発現しているため, 多くの網膜神経細胞の突起が存在する網状層における発現で網膜神経細胞の

種類を特定するのは難しい。そこで我々は核付近に存在するmRNA発現を検出するISH法を中心に研究を進めてきた。本研究で、 $Na_v1.1$ はDA細胞が発現する主要な $Na_v\alpha$ ではないことは明らかであり、DA細胞に発現している可能性のある $Na_v\alpha$ は、 $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.3$ 、 $Na_v1.6$ の3種類であることがわかった。また、これらの $Na_v\alpha$ は、DA細胞からIPLに伸びる神経突起の1本に発現し、細胞体に近い部分に局在していることがわかった。このような局在からは、RGCのAxon initial segment (AIS)部に $Na_v1.1$ 、 $Na_v1.6$ 発現が局在している<sup>16)</sup>ことが想起される。DA細胞におけるAIS様構造の報告はこれまでないが、検証が必要であろう。今回の研究では、 $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.3$ 、 $Na_v1.6$ がそれぞれ単独で発現しているのか、あるいは、組み合わせで発現しているのかについては明らかにすることが出来なかった。本研究期間では成功しなかったが、今後も酵素処理時間、増幅条件などを検討し、単離DA細胞への単一細胞RT-PCR法の試みをしていきたい。

近年、パーキンソン病における視覚への影響<sup>17)</sup>や、糖尿病性網膜症におけるドーパミン作動性アマクリン細胞の欠失<sup>18)</sup>についての報告がなされている。DA細胞の興奮性の違いにおけるsubpopulationが明らかになれば、網膜情報処理における暗順応-明順応の切り替えや、日周期の形成や調節についての新たな知見が得られるだけでなく、疾病の治療に役立つ基礎的知見が得られると期待される。

### 引用文献

- 1) Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol* 2004; 108: 17-40.
- 2) Zhang DQ, Wong KY, Sollars PJ, Berson DM, Pickard GE, McMahon DG. Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 14181-6.
- 3) Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC. The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron* 2008; 59: 790-801.
- 4) Gustincich S, Feigenspan A, Wu DK, Koopman LJ, Raviola E. Control of dopamine release in the retina: a transgenic approach to neural networks. *Neuron* 1997; 18: 723-36.
- 5) Feigenspan A, Gustincich S, Bean BP, Raviola E. Spontaneous activity of solitary dopaminergic cells of the retina. *J Neurosci* 1998; 18: 6776-89.
- 6) Puopolo M, Hochstetler SE, Gustincich S, Wightman RM, Raviola E. Extrasynaptic release of dopamine in a retinal neuron: activity dependence and transmitter modulation. *Neuron* 2001; 30: 211-25.
- 7) Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 397-409.
- 8) Fjell J, Dib-Hajj S, Fried K, Black JA, Waxman SG. Differential expression of sodium channel genes in retinal ganglion cells. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 50: 197-204.
- 9) Kaneko Y, Watanabe S. Expression of Nav1.1 in rat retinal AII amacrine cells. *Neurosci Lett*. 2007; 424: 83-8.
- 10) O'Brien BJ, Caldwell JH, Ehring GR, Bumsted O'Brien KM, Luo S, Levinson SR. Tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channels  $Na(v)1.8$  and  $Na(v)1.9$  are expressed in the retina. *J Comp Neurol* 2008; 508: 940-51.
- 11) Kaneko Y, Watanabe S. Voltage-gated sodium channel expressed in the rat retina. *J Physiol Sci* 2013; 63(Suppl): S141.
- 12) Witkovsky P, Schütte M. The organization of dopaminergic neurons in vertebrate retinas. *Vis Neurosci* 1991; 7: 113-24.
- 13) Newkirk GS, Hoon M, Wong RO, Detwiler PB. Inhibitory inputs tune the light response properties of dopaminergic amacrine cells in mouse retina. *J Neurophysiol* 2013; 110: 536-52.
- 14) Chabbert C, Mechaly I, Sieso V, Giraud P, Brugeaud A, Lehouelleur J, Couraud F, Valmier J, Sans A. Voltage-gated  $Na^+$  channel activation induces both action potentials in utricular hair cells and brain-derived neurotrophic factor release in the rat utricle during a restricted period of development. *J Physiol* 2003; 553: 113-23.
- 15) Wu C, Ivanova E, Cui J, Lu Q, Pan ZH. Action potential generation at an axon initial segment-like process in the axonless retinal AII amacrine cell. *J Neurosci* 2011; 31: 14654-9.
- 16) Van Wart A, Trimmer JS, Matthews G. Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol* 2007; 500: 339-52.
- 17) Bodis-Wollner I, Miri S, Glazman S. Venturing into the no-man's land of the retina in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2014; 29: 15-22.
- 18) Gastinger MJ, Singh RS, Barber AJ. Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 3143-50.

### 研究成果リスト

#### 学会発表

- 1) 金子優子, 青葉-藤牧香代, 渡辺修一. ラット網膜のドーパミン作動性アマクリン細胞における電位依存性Naチャンネルの発現パターン, 第93回日本生理学会大会, 平成28年3月, 札幌

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 血中可溶性メソテリンの卵巣がんバイオマーカーとしての有用性

研究代表者 佐藤 翔 (国際医療センター 婦人科腫瘍科)

研究分担者 黒崎 亮\*, 長谷川 幸清\*, 藤原 恵一\*

## 緒言

卵巣がんはもっとも死亡率の高い婦人科がんである。特に進行期ではプラチナ製剤、タキサン製剤の登場により生存率の改善はある程認められるようになったが、やがては化学療法耐性となるため、予後はきわめて不良である。そのため新しい治療法の開発や、有用なバイオマーカーの発見、さらには新規治療標的の同定が急務と考えられる。本研究では悪性中皮腫のバイオマーカーあるいは治療標的として注目されているメソテリンに着目を行った。その理由としては、すでに血中の可溶性メソテリン (SMRP: soluble mesothelin related peptides) を測定する方法が確立していること。また、複数のメソテリンを標的として治療法の開発が進んでいるため、容易に卵巣がんへ応用できる可能性があるためである。

メソテリンは正常組織では中皮細胞に認められ、腫瘍組織では悪性中皮腫だけでなく、卵巣癌や肺癌等の一部でもその発現が確認されている。メソテリンの生物学的な機能に関しては、細胞接着因子または細胞間認識や信号伝達に関係があると推測されているが、詳細は明らかになっていない。メソテリンはその前駆体から生成され、ホスファチジルイノシトールによって細胞膜に結合しており、細胞膜に結合しているメソテリンの一部は種々の酵素により血中へ可溶性メソテリンとして放出される。血中の可溶性メソテリンは、悪性中皮腫患者において高濃度に検出されるが、健常者で検出率は低いため、悪性中皮腫のマーカーとして有用性を期待されている。一方、メソテリンに対する種々の標的治療が計画されており、現在 MORAb009 (Amatuximab) が悪性中皮腫に対する第II相、メソテリン強発現腫瘍に対する第I相試験として行われている。これ以外にも抗メソセリン抗体とジフテリア毒素を結合した新規抗体療法や、メソテリン標的化したキメラ抗原受容体発現T細胞などの治療法の開発が進んでいる。卵巣がん組織におけるメソテリンの発現はすでに報告されているが、その頻度や血中のメソテリンについての詳細な報告はない。卵巣がんにおけるメソテリンあるいはSMRP

\*国際医療センター 婦人科腫瘍科

の発現頻度及び臨床病理学的因子との比較を行いバイオマーカーとしての有用性を明らかにすることは、今後の卵巣がんに対する治療戦略を構築する上で非常に有用であると考えられる。

## 材料と方法

埼玉医科大学国際医療センター IRB承認の下、文書で同意を得られた卵巣腫瘍患者からの手術検体で免疫組織化学染色を行い、メソテリン発現の半定量を行った。術前採血時の血液検体の一部を血清分離しELISA法でSMRPの定量を行った。組織発現と血中メソテリンの関連性について検討を行った。卵巣腫瘍218例を対象に検討した。内訳は良性腫瘍43例、境界悪性腫瘍41例、悪性腫瘍(上皮性卵巣癌: EOC) 128例、その他の悪性腫瘍6例であった。このうちEOCに関しては以下の通りである。病期別 (FIGO1988) の内訳はI期39例、II期22例、III期54例、IV期13例であった。組織型別の内訳は漿液性癌61例、粘液性癌5例、類内膜性癌23例、明細胞癌34例、その他5例であった。また、同様にIRB承認の下、文章で同意を得られた45例のEOC初回再発患者の血清SMRP値も測定した。

## 結果

まず、SMRPを悪性腫瘍群、境界悪性腫瘍群、良性群とにわけて比較検討した。悪性群は平均値3.527 nM (標準偏差5.714)、境界悪性群は平均値0.8707 nM (標準偏差0.3737)、良性群は平均値0.9860 nM (標準偏差0.4039)であった。SMRPは悪性群(上皮性卵巣癌)で有意に高値を示した。(p値0.0003, 1-way ANOVA検定)

次に、SMRPを上皮性卵巣癌の病期分類別に比較検討した。I・II期およびIII・IV期で2群に分けて比較検討した。I・II期群は平均値1.612 nM (標準偏差2.703)、III・IV期群は平均値3.723 nM (標準偏差7.171)であり、III・IV期で有意に高値を示した。(p値0.001, t検定)

また、SMRPを上皮性卵巣癌の組織型別にも比較検討した。組織型別の内訳は漿液性癌61例、粘液性癌5例、類内膜性癌23例、明細胞癌34例、その他5例であった。これらを漿液性癌と漿液性癌以外で比較検討した。漿液性

癌群は平均値3.723 nM (標準偏差7.171), 漿液性癌以外の群は平均値2.655 nM (標準偏差5.603)であり, 漿液性癌群で有意に高値を示した.

続いてROC曲線を作成し, 感度, 特異度, それらの値から Youden Index を求めCut off値を決定した. 同時に対症症例において既存の卵巣癌の腫瘍マーカーの1つであるCA125も測定し比較した.

SMRPではAUCは0.77であり, Youden Index から求めたCut Off値は1.35 nMであった. 同様にCA125ではAUCは0.78であり, Youden Index から求めたCut Off値は160 U/mLであった. SMRPの感度は54%, 特異度は92%, 陽性的中率は90%であった. 同様にCA125では感度64%, 特異度84%, 陽性的中率86%であった.

対象症例のうち162例の実際の手術検体を用いて免疫組織化学染色を行い, メソテリン発現の定量を行った. 全体の1%未満の発現をNegative, 1-25%の発現をscore1, 25-75%の発現をscore2, 75%以上の発現をscore3と定義し, 手術検体のメソテリン発現を確認した. Negativeは31例, score1は36例, score2は41例, score3は54例であった.

それぞれの群のSMRPとメソテリン発現の相関を比較した. score3の85%でROC曲線で求めたcut off値1.35 nMを示した. また, Negative, score1, score2, score3ではscore3でのSMRPが有意に高値であった. ( $p < 0.0001$  1way Anova検定)

## 考 察

本研究よりSMRPは悪性卵巣腫瘍(上皮性卵巣癌), 進行卵巣癌, 漿液性癌で高値となる傾向を示した.

また, SMRPは上皮性卵巣癌の既存の腫瘍マーカーであるCA125と比較し特異度, 陽性的中率で高い値を示した.

そして, 卵巣癌組織によるメソテリンの発現とSMRPはほぼ相関することが示唆された.

しかしながら, SMRPが既存の腫瘍マーカーと同等またはそれ以上に有用なものであるかはさらに検討が必要であると考えられる. 具体的には, SMRPと予後の関連性である. SMRP値とPFS (progression-free survival) やOS (overall survival) がどう関連するかまたはしないかの検討が望まれる. また, 同様に組織のメソテリン発現との予後の関連性である.

その他には既存の腫瘍マーカーが再発時に高値であるように初発時と再発時の比較や腫瘍の大きさとSMRPの関連性である. 同様に組織のメソテリンの発現の関連性も必要であると考えられる.

これらを今後の検討の課題としさらに研究を進めていきたい.

## 研究成果リスト

Hanaoka T, Hasegawa K, Kato T, Sato S, Kurosaki A, Miyara A, Nagao S, Seki H, Yasuda M, Fujiwara K. Correlation between tumor mesothelin expression and serum soluble mesothelin related peptides in patients with epithelial ovarian carcinoma: a potential non-invasive biomarker for mesothelin-targeted therapy. として論文を作成しJournalに投稿中.

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

ビタミンK依存性 $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼの新たな役割の解明

研究代表者 柴 祥子 (ゲノム医学研究センター)

ビタミンKは、1929年にHenrick Damらが脂質を含まない食餌でヒヨコを飼育していた際に出血しやすい現象を見出したことで発見された脂溶性ビタミンである。今日では、ビタミンKは、血液凝固や骨折予防<sup>1)</sup>に深く関与することが判明しており、本邦では、厚生労働省が2015年度版食事摂取基準の中で目安量を定めている。ビタミンKの構造的特徴は、2-メチル-1,4-ナフトキノンをも基本骨格としており、側鎖構造の違いにより、自然界では、ビタミンK<sub>1</sub>(フィロキノン)とビタミンK<sub>2</sub>(メナキノン類)の2つのビタミンKが存在し、合成化合物として、ビタミンK<sub>3</sub>(メナジオン)が知られている。ビタミンK<sub>1</sub>は、緑黄色野菜・海藻類・緑茶・植物油などに多く含まれ、ビタミンK<sub>2</sub>は微生物や腸内細菌によって合成され、発酵食品の納豆に多く含まれる。

1970年代から、ビタミンKの主要な作用メカニズムの一つとして、ビタミンK依存性 $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼ( $\gamma$ -glutamyl carboxylase; GGCX)の補因子として働くことが知られてきた<sup>2-4)</sup>。GGCXは、ビタミンK依存性に標的タンパク質中のグルタミン酸(Glu)残基を $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸(Gla)残基へと変換する酵素であり、タンパク質のGla化( $\gamma$ -カルボキシル化)翻訳後修飾をもたらすことで、生理的な活性をもつGlaタンパク質として成熟させる重要な役割を担っている。

GGCXの基質として知られる代表的なビタミンK依存性Gla化タンパク質としては、これまでに、肝臓に存在する第II, VII, IX, X血液凝固因子やプロテインC, プロテインS, プロテインZ<sup>5)</sup>、骨組織に存在する骨基質タンパク質のオステオカルシン(Osteocalcin; OC, 別名Bone Gla protein; BGP)<sup>6)</sup>やマトリックスマグ化タンパク(Matrix Gla protein; MGP)<sup>7)</sup>などが知られている。オステオカルシンは骨芽細胞から産生され、ビタミンK依存性GGCXにより、Gla化オステオカルシン(Carboxylated osteocalcin; cOC, Gla-OC)へと修飾されることによってカルシウムが結合するようになり、骨基質中に蓄積され、骨形成に重要な役割を果たしている。一方、低カルボキシル化オステオカルシン(Undercarboxylated osteocalcin; ucOC, Glu-OC)は骨のビタミンK不足を反映すると考えられており、その血中濃度は骨粗鬆症患者で高く、大腿骨頸部骨折のリスク

と相関していることから、骨粗鬆症におけるビタミンK<sub>2</sub>治療薬の効果モニターとしてucOCが用いられている。最近、KarsentyらのグループはucOCが、インスリン感受性の亢進に関与することを報告しており<sup>8)</sup>、骨代謝のみならず糖代謝との関連が注目されている。

一方で、GGCXおよびGla化タンパク質は、肝臓、軟骨、生殖腺、膵臓、脾臓、肺、胸腺、胎盤、甲状腺、子宮などにおいても発現が認められていることから、多様な組織において作用していると想定される。しかしながら、血液凝固系と骨組織以外におけるビタミンKの作用については未だ解明されておらず、新たなビタミンK依存性Gla化タンパク質の存在と上記の組織における新たな機能が想定される。GGCXの生体における機能を解明する目的で、全身性にGGCXを欠損するマウスが作製されたが、このGGCXノックアウトマウスは出血を起こして出生前後に致死となることが報告されており<sup>9)</sup>、生体の各組織における特異的な作用については解析がなされていない。

そこで我々は、組織特異的にGGCXを欠損させたコンディショナルノックアウトマウス(Conditional knockout; cKO)を作製し、GGCXの生体における機能解析モデルマウスを作製した。組織特異的cKOマウスの作製には、各組織で特異的に発現する遺伝子のプロモーターの下流にCre組換え酵素を挿入したCre発現トランスジェニック(Transgenic; Tg)マウスと、*Ggcx*遺伝子の前後にCreによって切断されるloxP配列を挿入した遺伝子型をホモに有する*Ggcx*<sup>flx/flx</sup>マウスとを交配して作製した。当研究室では、肝細胞特異的に発現するアルブミン(Albmin; *Alb*)のプロモーター支配下にCre組換え酵素を挿入したTgマウス(*Alb-Cre*)を*Ggcx*<sup>flx/flx</sup>マウスと交配することにより、肝臓特異的にGGCXの酵素機能を低下させたマウス(肝臓cKO)を作製し、この肝臓cKOマウスに認められた止血時間と血液凝固時間の延長は、二次止血機構の著しい障害によることを見出した。さらに、生存期間は、雌雄とも肝臓cKOマウスにおいて短命であり、特に肝臓cKO雄性マウスは雌性マウスよりも短命であることが判明した。死亡したマウスでは、皮下組織に著名な出血が観察されたことから、出血が直接的な死因であると推測され、生命維持に

において肝臓中のGGCXが必須であることが認められた<sup>10)</sup>。

続いて、我々はGGCXによる骨代謝と糖代謝の関連性を解明する目的で、*Ggcx*<sup>flx/flx</sup>マウスと骨芽細胞に発現するコラーゲンtype 1 (*Coll1*)のプロモーター支配下に*Cre*組換え酵素を挿入した*Coll1-Tg*マウスとを交配させ、骨芽細胞でGGCXを欠損するコンディショナルノックアウトマウス(骨芽細胞cKO)を作出した。このことにより、骨組織における特異的なGGCXの機能に焦点を絞ることができ、近年注目される骨代謝と糖代謝との関連性の解析を可能とした。

我々は、独自に作製した骨芽細胞cKOマウスの大腿骨において、GGCX抗体を用いた免疫組織化学的解析にて*Ggcx*のタンパク質の発現が消失していることを認めた。また、GGCXの基質でGla化タンパク質であるオステオカルシンは、骨芽細胞の*Ggcx*が欠損していることから、Gla化修飾が起これないと予測できる。そこで、血清ucOCとcOC濃度を調べると、コントロールマウスに比べて*Ggcx* cKOマウスでは、ucOC濃度が上昇し、cOC濃度が低値を示したことから、骨芽細胞特異的に*Ggcx*を欠損していることを認めた。

この骨芽細胞cKOマウスを用いて、糖代謝解析を行った。経口糖負荷試験を実施して血糖値を測定し、各時点において採取した血液から血漿インスリン濃度を測定した。その結果、骨芽細胞cKOマウスにおいて、少ないインスリン量で血糖値を低く維持できることを見出した。加えて興味深いことに、骨芽細胞cKOマウスは体重の推移では差は認められなかったが、白色脂肪組織重量が低下することを発見した。マイクロアレイを用いた白色脂肪組織の遺伝子発現解析から、脂質分解関連遺伝子およびインスリンシグナル経路関連遺伝子が骨芽細胞cKOマウスにおいて増加したことが認められた。これらの結果から、骨芽細胞においてGGCXがオステオカルシンのカルボキシル化調節を担っているばかりでなく、糖代謝においても重要な役割を果たしていることを見出した<sup>11)</sup>。

次に、骨芽細胞cKOマウスの骨代謝解析を行った。Dual energy X-ray absorptiometry (DXA) 法にて骨密度を測定した結果、この骨芽細胞cKOマウスは、コントロールマウスに比べて大腿骨の骨密度が増加していた。そこで、骨形態計測を行ったところ、類骨の形成が増大していることが観察された。さらに、皮質骨を調べると、骨芽細胞cKOマウスにおいて皮質骨の幅の増加を認めた。骨芽細胞においてGGCXを欠失させた時の骨芽細胞への影響を調べるために、生後1~2日の仔マウス頭蓋より初代骨芽細胞を採取して培養し、骨形成マーカーであるアルカリホスファターゼの産生を調べたところ、コントロールマウスに比べ、骨芽細胞cKOマウスで上昇していることを認めた。骨芽細胞における*Ggcx*の機能を詳細に調べるため、透過型電子顕微鏡を用いた微細構造解析を行うと、興味深いことに、コントロールマウスでは典型的な石灰芽球が形成されていたのに対し、骨芽細胞cKO

マウスにおいては石灰芽球を構成するリン酸カルシウム結晶の密度が低下し、典型的な石灰芽球への成長が妨げられていることが観察された。加えて、骨芽細胞cKOマウスでは、石灰芽球の形成が不完全のまま、コラーゲン線維へ直接沈着しており、骨形成の異常を認めた。骨強度への影響を調べるため、大腿骨の3点曲げ試験を行ったところ、コントロールマウスと比較して骨芽細胞cKOマウスで骨強度が増していることが示された。これらのことから、骨芽細胞cKOマウスで見られた異常な石灰化は骨強度の増加に寄与していることが示唆された。

以上の解析により、骨芽細胞特異的に*Ggcx*を欠損させると異常な骨形成が認められ、一方で糖代謝では、インスリン感受性が良好になることが示され、Karsentyらの報告したメカニズムと矛盾しないことが示された<sup>8, 12-14)</sup>。骨芽細胞におけるGGCXは、生体内で正常な骨代謝と代謝調節に重要であり、骨代謝と糖代謝の相互作用における新しいメカニズムの解明のためにも、GGCXとその補因子となるビタミンKを介する新規分子とそのシグナル経路を明らかにすることが課題であると考えられた。近年のオステオカルシンに関する上記の新知見などから、オステオカルシンは骨由来の内分泌ホルモンとして、骨代謝、エネルギー代謝、生殖機能などを制御する多臓器連関に関与する可能性が示唆される<sup>15)</sup>。

本研究により、ビタミンK依存性GGCXは、糖代謝と骨代謝を制御する重要な役割を担っていることが示された。糖代謝は、糖尿病をはじめとする生活習慣病と密接に関わっている。糖尿病は予防医学の観点から特に留意すべき疾患であり、遺伝的な要因を除けばエネルギーの摂取過多、身体活動量の低下など食習慣や生活習慣の乱れが危険因子であり、また発症は加齢に伴って増加していく。一方で、加齢に伴って骨粗鬆症を罹患する割合も増加しており、骨粗鬆症患者は生活習慣病罹患率も高いことから、骨代謝と糖代謝の連関が想定される。本研究をさらに進展させ、GGCXとビタミンK作用に基づいた生活習慣病や骨粗鬆症などの予防法や治療、創薬開発が可能になると期待された。

## 参考文献

- 1) Bouckaert JH, Said AH. Fracture healing by vitamin K. *Nature* 1960; 185: 849.
- 2) Plaza SM, Lamson DW. Vitamin K2 in bone metabolism and osteoporosis. *Altern Med Rev* 2005; 10: 24-35.
- 3) Nelsestuen GL, Zytkevich TH, Howard JB. The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J Biol Chem* 1974; 249: 6347-50.
- 4) Stenflo J, Fernlund P, Egan W, Roepstorff P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71: 2730-3.
- 5) Rezaie AR, Bae JS, Manithody C, Qureshi SH, Yang L.

- Protein Z-dependent protease inhibitor binds to the C-terminal domain of proteinZ. *J Biol Chem* 2008; 283: 19922-6.
- 6) Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73: 1447-51.
- 7) Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386: 78-81.
- 8) Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 2010; 142: 296-308.
- 9) Zhu A, Sun H, Raymond RM Jr, Furie BC, Furie B, Bronstein M, Kaufman RJ, Westrick R, Ginsburg D. Fatal hemorrhage in mice lacking gamma-glutamyl carboxylase. *Blood* 2007; 109: 5270-5.
- 10) Azuma K, Tsukui T, Ikeda K, Shiba S, Nakagawa K, Okano T, Urano T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Ikawa M, Inoue S. Liver-specific  $\gamma$ -glutamyl carboxylase-deficient mice display bleeding diathesis and short life span. *PLoS One* 2014; 9: e88643.
- 11) Shiba S, Ikeda K, Azuma K, Hasegawa T, Amizuka N, Horie-Inoue K, Inoue S.  $\gamma$ -Glutamyl carboxylase in osteoblasts regulates glucose metabolism in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 453: 350-5.
- 12) Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130: 456-69.
- 13) Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5266-70.
- 14) Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, Cao X, Wan C, Chen D, Faugere MC, Aja S, Hussain MA, Brüning JC, Clemens TL. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell* 2010; 142: 309-19.
- 15) Oury F, Ferron M, Huizhen W, Confavreux C, Xu L, Lacombe J, Srinivas P, Chamouni A, Lugani F, Lejeune H, Kumar TR, Plotton I, Karsenty G. Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *J Clin Invest* 2013; 123: 2421-33.

#### 研究成果リスト

#### 原著論文

- 1) Azuma K, Shiba S, Hasegawa T, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Amizuka N, Inoue S. Osteoblastspecific  $\gamma$ -glutamyl carboxylase-deficient mice display enhanced bone formation with aberrant mineralization. *J Bone Miner Res* 2015; 30: 1245-54.

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 簡便な在宅和温療法は、Fontan術後遠隔期の循環と酸化ストレスを改善するか？

研究代表者 谷川 祥陽（総合医療センター 小児科）

研究分担者 増谷 聡<sup>\*</sup>，岩本 洋一<sup>\*</sup>，石戸 博隆<sup>\*</sup>，先崎 秀明<sup>\*</sup>

## 緒言

単心室に対する機能的修復術であるFontan手術は、単心室患者の予後改善に貢献してきた。しかし、肺循環へのポンプ心室を持たないFontan循環は課題・制約が多く、遠隔期の合併症が問題となっている。これに対する科学的根拠のある合併症予防・治療法は確立されていない。

低温サウナを用いた和温療法は、心不全進展の各経路に作用して心不全を改善することが知られ、成人心不全治療ガイドラインでクラスIで推奨される標準的非薬物治療法となっている。しかし、心不全に対する和温療法の有効性の検討は、主として成人でのみで、小児の知見はみられない。さらに、通常の和温療法は頻回の通院を要し、本療法に特化した高額なサウナ器具を完備した施設でしか施行することができず、小児、特に学童での施行は実現不可能に近い。そこで、折り畳みと持ち運びが容易で、在宅で施行可能な遠赤外線ドーム型サウナを用いることにより小児の和温療法を可能とし、患者・家族の負担は軽減可能である。

Fontan術後には、成人心不全病態と共通する多くの異常を有するため、和温療法はFontan術後患者の心不全進展抑制と重大全身合併症予防にも大きく貢献し、新しい治療法となる可能性がある。本研究の目的は、在宅和温療法がFontan術後患者の血行動態・酸化ストレス・運動耐用能を急性、および慢性的に改善する、という仮説を多角的に検討することである。

## 方法

フォンタン手術後最低一年以上が経過した幼児期以降で和温療法を希望する6歳以上の患者を対象とした。重度心不全、和温療法が不適切と主治医が判断する症例は除外した。和温療法は、持ち運びが容易で在宅で施行する遠赤外線ドーム型サウナを用いて施行した(図1)。各人初回は、外来での急性効果と安全性を確認した。その後、在宅で週2-3回の和温療法を施行した。和温療法開始6か月後の非侵襲的心血管機能・血行動態・心拍変動解析・運動耐用能・運動量・酸化ストレス・神経液性因子を開始前と比較した。

<sup>\*</sup>総合医療センター 小児科

## 結果

全員で安全に施行でき、血液検査上も有害事象を認めなかった。悪心等の不調を来した症例はいなかった。サウナ温度は平均38℃で施行した。初回の急性効果としては、心機能の改善と、心拍出量増加にも関わらず血管床が広がり、肺動脈圧・血圧の適度な低下が観察された。

和温療法開始6か月後、心拍数は減少傾向、一回拍出量は増加傾向で、心拍出量は有意な傾向を示さなかった。収縮期血圧・肺動脈圧と相関する末梢静脈圧は減少傾向を認め、肺血管抵抗も減少傾向であった。下行大動脈の反射分画が有意に減少し、心室弛緩と関連する組織ドプラ<sup>e</sup>が有意に上昇した。これらの良好な血行動態の変化は、自律神経調節の改善を伴い、心拍変動(RR-SD)や副交感神経活動を表すHFが増加傾向を示した。1名で房室弁逆流の有意な減少がみられた。

## 考察

対象の全員で在宅和温療法が安全に施行でき、心血行動態に対する有効性が確認できた。急性効果としては、心機能の改善と、心拍出量増加にも関わらず、肺動脈圧・血圧の適度な低下が観察された。さらに、半年間の在宅和温療法により、反射の少ない体循環、抵抗の減少した肺循環からなる、スムーズな血行動態へ移行した。末梢静脈圧低下から、中心静脈圧の低下を示唆する今回の結果からは、臓器うっ血と関連したFontan術後遠隔期合併症予防に対する有効性が期待される。現在、他の因子の変化の検証を含め、解析を継続中である。

成人の和温療法では、60℃が推奨されている。しかし、この温度では小児は不快を示す児が多く、平均38℃の低温にすることにより、快適さが確保でき、患児の協力が得ることができた。小児での施行では、実際に施行可能で、かつ有効性を確保するために、成人プロトコルからの変更が適宜必要と思われた。

今回は限られた人数のpreliminaryな研究である。今後、在宅和温療法の長期の有効性を明らかにするために、比較対象群を有する多数例で長期間の比較検討が必要である。



図 1.

## 研究成果リスト

## 論文

- 1) Inuzuka R, Kuwata S, Kurishima C, Liang F, Sugimoto K, [Senzaki H](#). Influence of Cardiac Function and Loading Conditions on the Myocardial Performance Index - Theoretical Analysis Based on a Mathematical Model. *Circ J* 2015; 80: 148-56.
- 2) [Ishido H](#), [Masutani S](#), Hishitani T, Taketadu M, [Senzaki H](#). Re: 'Post-LA space index' as a potential novel marker for the prenatal diagnosis of isolated total anomalous pulmonary venous connection. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 46: 747-8.
- 3) Kurishima C, Inuzuka R, Kuwata S, [Iwamoto Y](#), Sugimoto M, Saiki H, et al. Influence of Left Ventricular Stiffness on Hemodynamics in Patients With Untreated Atrial Septal Defects. *Circ J* 2015; 79: 1823-7.
- 4) Kurishima C, [Masutani S](#), Kuwata S, [Iwamoto Y](#), Saiki H, [Ishido H](#), et al. Cystatin C and body surface area are major determinants of the ratio of N-terminal pro-brain natriuretic peptide to brain natriuretic peptide levels in children. *J Cardiol* 2015; 66: 175-80.
- 5) Kurishima C, Saiki H, [Masutani S](#), [Senzaki H](#). Tailored therapy for aggressive dilatation of systemic veins and arteries may result in improved long-term Fontan circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015; 150: 1367-70.
- 6) Kuwata S, Kurishima C, Kim J, [Iwamoto Y](#), Saiki H, [Ishido H](#), et al. Clinical Evaluation of the Hemodynamic Effects of the High-Flow Nasal Cannula Therapy on the Fontan Circulation. *Clin Med Insights Cardiol* 2015; 9: 109-11.
- 7) Nakagawa R, Kuwata S, Kurishima C, Saiki H, [Iwamoto Y](#), Sugimoto M, et al. Arterial stiffness in patients after Kawasaki disease without coronary artery involvement: Assessment by performing brachial ankle pulse wave velocity and cardio-ankle vascular index. *J Cardiol* 2015; 66: 130-4.
- 8) Saiki H, Kuwata S, Kurishima C, [Iwamoto Y](#), [Ishido H](#), [Masutani S](#), et al. Prevalence, implication, and determinants of worsening renal function after surgery for congenital heart disease. *Heart Vessels* 2015.
- 9) Sakazaki S, [Masutani S](#), Sugimoto M, Tamura M, Kuwata S, Kurishima C, et al. Oxygen supply to the fetal cerebral circulation in hypoplastic left heart syndrome: a simulation study based on the theoretical models of fetal circulation. *Pediatr Cardiol* 2015; 36: 677-84.
- 10) Sugimoto M, Kurishima C, [Masutani S](#), Tamura M, [Senzaki H](#). Congenital Brain Tumor within the First 2 Months of Life. *Pediatr Neonatol* 2015; 56: 369-75.
- 11) Sugimoto M, Kuwata S, Kurishima C, Kim JH, [Iwamoto Y](#), [Senzaki H](#). Cardiac biomarkers in children with congenital heart disease. *World J Pediatr* 2015; 11: 309-15.
- 12) Sugimoto M, Oka H, Kajihama A, Nakau K, Kuwata S, Kurishima C, et al. Ratio between fms-like tyrosine kinase 1 and placental growth factor in children with congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* 2015; 36: 591-9.
- 13) 岩本洋一. 【小児の画像診断の進歩】MRIにおける先天性心臓病評価 小児を中心に. *循環器内科* 2015; 77: 226-30.
- 14) 栗嶋クララ, 桑田聖子, [先崎秀明](#). ACHDにおける右室の重要性 ACHDにおける右心不全の特徴, 診断, 治療 体血管を支える右室型単心室の機能特性 左室型との比較. *循環器専門医* 2015; 23: 251-4.

- 15) 増谷 聡. 【周産期救急の初期対応：そのポイントとピットフォール 胎児・新生児編】新生児編 治療投与時の注意点ならびに副作用 インドメタシン. 周産期医学 2015; 45: 996-8.
- 16) 増谷 聡. 先天性心疾患児の診断と治療戦略の今後 新生児科とともにチームを組む小児循環器科医が, 新生児科の先生方とともに考えたい先天性心疾患の診断・治療のポイント. 日本周産期・新生児医学会雑誌 2015; 51: 86-8.

#### 学会発表

- 1) 増谷 聡, 金 晶恵, 桑田聖子, 栗嶋クララ, 岩本洋一, 石戸博隆, et al. Fontan術後遠隔期予後改善に向けた簡便な在宅和温療法 急性効果と安全性検証. 日本小児循環器学会雑誌 2015; 31: s1-164. 第51回日本小児循環器学会総会, 平成27年7月, 東京
- 2) 栗嶋クララ, 桑田聖子, 金 晶恵, 岩本洋一, 石戸博隆, 増谷 聡, et al. Fontan患者における運動時血行動態変化と静脈特性の重要性. 日本成人先天性心疾患学会雑誌 2015; 4: 105. 第17回日本成人先天性心疾患学会総会, 平成27年1月, 東京
- 3) 栗嶋クララ, 桑田聖子, 金 晶恵, 梁 明子, 岩本洋一, 石戸博隆, et al. Fontan循環における適切なfenestration抵抗. 日本小児循環器学会雑誌 2015; 31: s1-366. 第51回日本小児循環器学会総会, 平成27年7月, 東京
- 4) 栗嶋クララ, 桑田聖子, 金 晶恵, 梁 明子, 岩本洋一, 石戸博隆, et al. Fontan循環における運動時中心静脈圧と静脈キャパシタンス. 日本小児循環器学会雑誌 2015; 31: s1-192. 第51回日本小児循環器学会総会, 平成27年7月, 東京
- 5) 栗嶋クララ, 桑田聖子, 梁 明子, 金 晶恵, 岩本洋一, 石戸博隆, et al. Fontan循環におけるfenestrationの長期的意義. 日本小児循環器学会雑誌 2015; 31: s1-164. 第51回日本小児循環器学会総会, 平成27年7月, 東京
- 6) 栗嶋クララ, 桑田聖子, 梁 明子, 金 晶恵, 岩本洋一, 石戸博隆, et al. 症例から学ぶFontan循環病態 Fontan循環への選択からその破綻への対応 病態からみたFontan術後の至適管理法は? 生活管理と新しい管理への取り組み. 日本小児循環器学会雑誌 2015; 31: s1-125. 第51回日本小児循環器学会総会, 平成27年7月, 東京
- 7) 桑田聖子, 栗嶋クララ, 岩本洋一, 齋木宏文, 石戸博隆, 増谷 聡, et al. Fontan術後神経発達と治療歴, 血行動態, 脳循環の関係. 日本小児循環器学会雑誌. 2015; 31: s1-364. 第51回日本小児循環器学会総会, 平成27年7月, 東京
- 8) 桑田聖子, 栗嶋クララ, 梁 明子, 金 晶恵, 岩本洋一, 齋木宏文, et al. Fontan術後患者における酸素療法の意義. 日本小児循環器学会雑誌 2015; 31: s1-312. 第51回日本小児循環器学会総会, 平成27年7月, 東京
- 9) 桑田聖子, 栗嶋クララ, 梁 明子, 金 晶恵, 岩本洋一, 齋木宏文, et al. Fontan循環と脳血管のインピーダンス, 脳循環制御. 日本小児循環器学会雑誌 2015; 31: s1-194. 第51回日本小児循環器学会総会, 平成27年7月, 東京
- 10) 梁 明子, 石戸博隆, 桑田聖子, 栗嶋クララ, 岩本洋一, 増谷 聡, et al. Fontan患者の日常における活動性の特徴. 日本小児循環器学会雑誌 2015; 31: s1-363. 第51回日本小児循環器学会総会, 平成27年7月, 東京

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 上皮細胞極性の異常と遺伝性大腸がん発症機構の関連の解明

研究代表者 田彦 祐喜 (ゲノム医学研究センター)

## 緒言

大腸がんのおよそ70%は遺伝性を示さない散発性大腸がんであるが、一方で、遺伝的要因が関与するとされる大腸がんもおよそ30%あると推測されている<sup>1)</sup>。遺伝性大腸がんは、家族性大腸腺腫症 (FAP) に代表されるようなポリポーシスを背景に発症するがんと、リンチ症候群 (LS) に代表されるような非ポリポーシス性に発症する大腸がんに大別される。前者は、さらに組織学的に腺腫性、過誤腫性などに区分される。過誤腫性にはPeutz-Jeghers症候群 (PJS) や若年性ポリポーシス症候群 (JPS) などがある。後者には、LS以外に家族性大腸がんタイプXが挙げられる<sup>2)</sup>。

これらの疾患では相互に表現型が複雑に重複しており、臨床所見や家族歴からのみでは、臨床的な診断そのものが困難な場合がある。そのため、すでに1つ以上の原因遺伝子が特定されている疾患については、遺伝子検査による確定診断が重要となってくる。また、家族歴や発症時年齢等から遺伝性大腸がん疑いとされても、既知原因遺伝子の異常が検出されないことがあり、その他の原因遺伝子の存在が想定されている。

例えば、若年性ポリポーシス症候群 (JPS) は過誤腫である若年性ポリープが胃・小腸・結腸・直腸を主とする消化管に多発する常染色体優性遺伝性疾患である。JPS家系では大腸がん発症リスクの高いこと、また、胃や上部消化管・膵臓でもがん発症例が知られている。これまでJPSの原因遺伝子として、骨形成因子 (BMP) が結合する受容体である *BMPRIA* (Bone Morphogenetic Protein Receptor, type IA) 遺伝子、ならびに、細胞の増殖や分化等に関与することが知られているトランスフォーミング増殖因子 (TGFβ) のシグナルを伝達する *SMAD4* (SMAD family member 4) 遺伝子の生殖細胞変異がすでに確定している。しかしながら、約50%のJPS症例ではこれら既知原因遺伝子の変異が検出されおらず、未知の原因遺伝子の存在を想起させる。

このような問題を解決するために、まず、遺伝性大腸がんの既知原因遺伝子変異を安価で迅速に検出できるシステムを確立することを目的とした。さらに、既知原因

遺伝子では病的変異を認めない遺伝性大腸癌の新たな原因遺伝子を探索・同定することを目的として研究を進めた。

## 方法と研究対象者

## 研究対象者

研究対象者は、「遺伝性消化管腫瘍症候群 (ポリポーシス及び関連癌を含む) における原因遺伝子の同定と新たな原因候補遺伝子の探索 - 次世代シーケンシング技術を利用して -」(埼玉医科大学倫理委員会承認 747-IV) に書面で同意した患者およびその血縁者。

## ターゲットリシーケンス法

申請者らは先行研究として、これまでのサンガー法などによる遺伝子変異の同定法に比べて安価で迅速・正確な次世代シーケンサーによる遺伝子検査法の開発について学術雑誌 *Familial Cancer* で報告している<sup>3)</sup>。アジレント社の *HaloPlex* を使用して、標的とした20遺伝子をキャプチャし、その後、イルミナ社の高速シーケンサーである *MiSeq* により配列を取得する。事前に病的変異を確定したこれらの検体を使用して、開発したシステムを評価した。さらに、SNVやIndelだけでなくコピー数多型 (CNV) の解析も行い、CNVの病的変異が検出できることを確認した。

## 全エクソームシーケンス解析

JPSの発端者(母)、その子供2名(いずれもJPS患者)、および発端者の配偶者(健常者)の4名の末梢血リンパ球DNAの全エクソーム解析 (WES) を行った。発端者は生殖細胞系列における既知原因遺伝子 *SMAD4* と *BMPRIA* の異常が検出されないことがすでに確認されている<sup>4-7)</sup>。WESによって得られた結果を、公共のデータベースにあるエクソーム配列 (1000人ゲノムプロジェクト等) と比較検討を行い、各遺伝子に稀な欠失やフレームシフト変異、ナンセンス変異等の異常があるか探索した。さらに3人のJPS患者で共通した遺伝子変異を絞り込み、健常者にはないものを選別し新規原因遺伝子候補を選定した。サンガー法により、見出された変異の確認をした。

## 結 果

まず我々が開発した方法を用いて、原因遺伝子未同定の遺伝性消化管腫瘍症候群疑い症例31検体を用いた前向き解析を行った結果、FAP、LS疑い、ならびにPJSの9検体において既知遺伝子(*APC*, *MLH1*, *MSH2*, *STK11*)の病的変異を同定した。さらにLS疑いであった2検体においては、LS関連の既知原因遺伝子に異常を認めなかったものの、*STK11* 遺伝子を含む19p13.3領域で(0.3~10Mb長)、コピー数の増加が認められ、生殖細胞系列ではこのようなコピー数の異常の報告は無いことから、新規の原因となる可能性が示された。鋸歯状ポリポーシス症例1検体で*POLD1*の病的変異候補となるミスセンス変異が検出された。2013年に新たな遺伝性大腸がん症候群の原因遺伝子として同定されたDNA polymerase  $\delta$  (*POLD1*) 遺伝子では、これまでに世界で見てもまだ5個所のミスセンス変異しか報告されておらず、今回新たに同遺伝子産物のブルーフリーディング活性に重要なエクソヌクレアーゼドメイン内で、病的であることが複数の構造予測ツールにより予測される新規のミスセンス変異候補を日本人としては初めて見つけた。またMUTYH関連ポリポーシス疑い症例1例でメチル化CpG結合タンパク質遺伝子の一つでナンセンス変異が検出された。これまでマウスの実験や遺伝子の機能から、同遺伝子は遺伝性大腸がんの原因候補とされながら、実際には原因遺伝子となる症例は報告されてこなかった。我々は世界で初めて生殖細胞系列で同遺伝子にナンセンス変異を有する症例を発見した。新たに見出した病的変異候補については、腫瘍組織における体細胞変異解析等を行う予定である。

さらに、JPSの1家系[母(発端者)、父(健常者)、娘(発症者)、息子(発症者)]における全エクソームシーケンズ解析により、JPS 3症例間で共通なナンセンス変異が存在する3つの新規原因候補遺伝子(遺伝子A、遺伝子B、遺伝子C)を同定した。遺伝子Aは、その産物が遺伝性乳がんの原因遺伝子として知られているがん抑制遺伝子BRCA1タンパク質と直接結合し、DNA二重鎖切断の修復に関与することがすでに実験的に示されている。また、この遺伝子Aの一部の遺伝子多型が乳がんの発症リスクと関連することが報告されている。また、BRCA1がSMAD3を介してTGF $\beta$ シグナルを制御することが報告されている。さらに、遺伝子Aのノックアウトマウスではリンパ腫の自然発生ならびに発がん剤であるDMBA誘発乳がんの発症頻度が上昇することが報告されているが、腸管への影響については未だ報じられていない。今回解析を行った家系中では、発端者の母(異時両側性)および姉の2名が乳がんを発症しており、またこの姉は悪性リンパ腫も発症していた。以上から遺伝子Aの不活化が同家系におけるがんの発症に関与する事が推察される。これまで遺伝子Aの生殖細胞系列におけるナンセンス変異によるがん多発家系は知られていない。

遺伝子B産物の機能については、最近のノックアウトマウスを用いた解析結果等から、メチル化ヒストンを認識し、転写コアクチベーターとして機能し、染色体の安定性にも関与することが報告されているが、TGF $\beta$ シグナル系への影響や、腸管における働き等は不明であり、また遺伝子Bの生殖細胞系列ナンセンス変異によるがん多発家系も報告されていない。一方、遺伝子Cは、両アレルに病的変異があるとミトコンドリア病を発症することが分かっているが、大腸がん発症に結びつくような知見は得られていない。

計画を進めていくうえで、申請者は以下に示したような予備的な研究結果を得ている。

### 予備的な研究結果

- (1) 全エクソーム解析に使用したJPS 3症例において一連の過誤腫症候群の既知原因遺伝子(候補含む)*SMAD4*, *BMPRIA*, *ENG*, *PTEN*, *STK11*において病的変異が検出されないことを確認した。また、既知原因遺伝子のコピー数多型(CNV)が検出されないこともMLPA法で確認した。
- (2) 予備的な免疫染色解析の結果により、JPS患者の若年性ポリープでは、遺伝子A・Bいずれの産物も発現が極めて減弱あるいは完全に消失していた。詳細な追加解析によりこの予備的知見を検証する必要があるが、この結果が事実であるとすれば、両遺伝子の生殖細胞系列変異と併せて、体細胞変異(エピゲノム的変化を含む)により、両遺伝子が発現不活性化されたものと推定された。
- (3) 原因候補遺伝子A・Bの機能解析を進めるため、遺伝子A・Bに対するsiRNAを3種類使用し、TGF $\beta$ シグナル研究で使用されているHeLa細胞におけるsiRNAの効果を調べた。構築した絶対定量系qPCR法(内部標準:*ACTB*)により、すべてのsiRNAは各々の遺伝子A、Bに対して導入後24/72時間後に遺伝子発現量が20%程度にまで抑制することが予備的にではあるが確認されている。
- (4) 遺伝子産物Bのプロモーター領域にはCpGアイランドが存在しており、遺伝子発現不活性化に寄与する可能性が示唆されたため、メチル化解析用のプライマーの準備を行った。

今後以下の点について見出した遺伝子Aと遺伝子Bについて解析を進める予定である。

### BMP経路によるがん発症機構の解明

JPSの原因遺伝子である*SMAD4*と*BMPRIA*は骨形成タンパク質(BMP)経路で働く。そのため、新規原因遺伝子候補とBMP経路の関連に着目して、大腸がん発症メカニズムの研究を行う。

### 細胞極性の破綻によるがん発症機構の解明

大腸がんを含むヒトのがんの多くは上皮由来である。がん細胞の特徴の1つとして、上皮としての細胞極性の破綻が共通に観察されている。それは異常な増殖能の獲得に寄与する。Peutz-Jeghers症候群の原因遺伝子として知られている*STK11*は細胞極性とエネルギー代謝をつなげる分子であり、腫瘍形成に関与していることが報告されている。また、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である*APC*も細胞極性に関与していることが知られている<sup>8)</sup>。さらに、BMP経路もまた細胞極性を制御していることが報告された<sup>9)</sup>。これらのことから、家族性大腸がんの原因遺伝子が細胞極性に関与していることが示唆される。今後新たに病的変異候補として見つかった各遺伝子が細胞極性に関与するかを解析することで、遺伝性大腸がん発症との関連を調べる予定である。

### 考 察

本研究で複数の遺伝子が家族性大腸がんの原因であることを証明することにより、稀な疾患であっても確定診断が可能となる。さらに、遺伝性のがんの原因遺伝子は、これまでの研究から散発性大腸がんにおいても重要な働きをもつことが期待され、新規原因遺伝子の発見は大腸がん発症機構を解明するうえで非常に有用な知見になると思われる。

### 謝 辞

本研究を行うにあたり多大なるご支援・ご協力をいただいたトランスレーショナルリサーチ部門平田智子助手、神田将和助教、江口英孝准教授、岡崎康司教授に深謝いたします。臨床検体や患者情報等をご提供いただいた本学総合医療センター消化管一般外科石田秀行教授に深く感謝致します。埼玉医科大学総合医療センター消化管一般外科非常勤講師・立川哲彦先生には病理学的解析の支援を行っていただき、深く感謝申し上げます。臨床検体や患者情報等をご提供いただいた独立行政法人国立病院機構岩国医療センター外科医長統括診療部長田中屋宏爾先生に深く感謝致します。臨床検体や患者情報等をご提供いただいた、がん・感染症センター都立駒込病院外科山口達郎先生に深謝致します。

### 参考文献

1) Lynch HT, et al. *Fam. Cancer* 2008.

- 2) Elena MS and Fay K. *Clin. Gastroenterol. Hepatol* 2014.
- 3) Kohda M, Kumamoto K, Eguchi H, Hirata T, Tada Y, Tanakaya K, Akagi K, Takenoshita S, Iwama T, Ishida H, Okazaki Y. Rapid detection of germline mutations for hereditary gastrointestinal polyposis/cancers using HaloPlex target enrichment and high-throughput sequencing technologies. *Fam Cancer* 2016 Feb 2. [Epub ahead of print]
- 4) 樋口, 他. 胃と腸 35巻 第3号 2000年 増刊号
- 5) 石田, 他. 小児外科 29巻 1997年
- 6) 石田, 他. 消化器内視鏡の進歩 34巻 1989年
- 7) 市川, 他. 胃と腸 17巻 9号 1982年
- 8) Fernando MB and Mirna PM. *Nature Rev. Cancer* 2012.
- 9) Saitoh M, et al. *PLoS One* 2013.

### 研究成果リスト

#### 論文

- 1) Kohda M, Kumamoto K, Eguchi H, Hirata T, Tada Y, Tanakaya K, Akagi K, Takenoshita S, Iwama T, Ishida H, Okazaki Y. Rapid detection of germline mutations for hereditary gastrointestinal polyposis/cancers using HaloPlex target enrichment and high-throughput sequencing technologies. *Fam Cancer* 2016 Feb 2. [Epub ahead of print]
- 2) Eguchi H, Kumamoto K, Suzuki O, Kohda M, Tada Y, Okazaki Y, Ishida H. Identification of a Japanese Lynch syndrome patient with large deletion in the 3' region of the EPCAM gene, *Jpn J Clin Oncol* 2016 Feb; 46(2): 178-84. doi: 10.1093/jjco/hyv172. Epub 2015 Nov 27.

#### 学会発表

- 1) 田彗祐喜, 隈元謙介, 神田将和, 鈴木興秀, 赤木 究, 田中屋宏爾, 江口英孝, 岡崎康司, 竹之下誠一, 石田秀行. 次世代シーケンサーを用いた遺伝性大腸癌の遺伝学的検査の確立に向けて, 第21回日本家族性腫瘍学会学術集会, 2015年6月5-6日, さいたま市
- 2) 鈴木興秀, 江口英孝, 隈元謙介, 近 範泰, 田彗祐喜, 石橋敬一郎, 持木彫人, 岡崎康司, 石田秀行. EPCAM 病的変異を原因とするリンチ症候群の1例, 第70回日本大腸肛門病学会学術集会, 2015年11月13-14日, 名古屋市

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

胃型形質を持つ胃の低悪性度上皮性腫瘍の発生と  
プロトンポンプ阻害薬との関連性の解明

研究代表者 藤野 節 (国際医療センター 病理診断科)

研究分担者 新井 晋\*

## 背景

強力な胃酸分泌抑制作用を有するプロトンポンプ阻害薬 (proton pump inhibitor: PPI) は、1990年代以降、H2受容体拮抗薬に取って代わる形で臨床に供され、瞬く間に広く普及していった消化性潰瘍治療薬である。PPIの普及に伴い、PPIの服用に特徴的な胃粘膜の変化が知られるようになった。代表的なものには、壁細胞の過形成と内腔への鋸歯状の突出 (parietal cell protrusion: PCP)、いわゆる胃底腺ポリープの増大・新規発生が知られている<sup>1,2)</sup>。

PPIの服用で胃酸分泌が低下すると、代償性の高ガストリン血症を来すことから、このような胃粘膜の変化は、ガストリンの栄養効果 (trophic effect) によるものと考えられている<sup>3,4)</sup>。

一方、胃型形質を有する胃の低悪性度上皮性腫瘍 (腺腫および超高分化腺癌) は近年増加傾向にあるといわれており、消化器内視鏡と病理組織診断の両分野で、改めて注目を集めている病変である。しかしながら、その成因についての詳細な報告は見当たらない。胃型形質を有する胃の低悪性度上皮性腫瘍は、腸型形質を有する低悪性度上皮性腫瘍より数が少ないことが知られている。そこで、胃の低悪性度腫瘍が改めて注目されるようになったのは、PPIの普及に伴い、症例数の増加しているためではないかと考え、PPIの服用や、これに伴う代償性の高ガストリン血症が、胃型形質を有する胃の低悪性度上皮性腫瘍の発生に、直接的あるいは間接的に影響しているのではないかと考えた。

胃でガストリン受容体を発現する細胞は、壁細胞とECL細胞であるが、胃底腺頸部の前駆細胞においても発現がみられることが示されている<sup>5,6)</sup>。申請者は、胃固有の腺上皮の幹細胞 (stem cell) から、腺頸部粘液細胞 (副細胞)、および各成熟上皮 (腺窩上皮細胞、壁細胞、主細胞、幽門腺細胞) への分化途上にある細胞が腫瘍化したものが、いわゆる胃の胃型形質を有する低悪性度

腫瘍 (腫瘍細胞の細胞分化が高度な癌=超高分化腺癌) であると考えている。PPIは長い間安全な薬剤と考えられ、広く普及している一方で、長期のPPIの投与により、胃癌の発生頻度が増加するとの報告がある<sup>7,8)</sup>が、そのような研究報告の数は非常に限られたものであり、長期のPPIの投与と腫瘍発生との関連性については十分に解明されていない現状にある。そこで、PPI投与と胃型の細胞形質を有する胃の上皮性腫瘍の発生との関連性について、当院の症例で検討したいと考えた。

## 方法

当院で切除された粘膜癌 (壁深達度pT1a (M)) の中で、HE標本上、腫瘍細胞に胃型形質が窺える症例を対象とし、10症例を抽出した (平均年齢69.3±5.2 (標準偏差)、男性8例、女性2例)。各症例につき、(1) PPIの投与歴の有無 (電子カルテの記載に基づく)、(2) 腫瘍の大きさ、(3) 免疫染色による腫瘍上皮の胃型上皮マーカーの発現状態を検討した。胃型形質の発現を以下の蛋白を発現する腫瘍細胞の有無で確認した。

(1) TFF2 (腺頸部粘液細胞の分化マーカー)、(2) MUC6 (腺頸部粘液細胞、幼弱な主細胞、および幽門腺のマーカー)、(3) プロトンポンプ ( $H^+/K^+-ATPase$ 、壁細胞のマーカー)、(4) Mist1 (主細胞のマーカーとなる核蛋白で、形質細胞のマーカーでもある)。なお、Mist-1については背景の胃底腺主細胞、ないしは形質細胞と同様の染色強度を示す場合を陽性と判断することにした。胃型形質は、MUC5ACを発現するものを腺窩上皮型、MUC6を発現するものを幽門線型、プロトンポンプ、ないしはMist1を発現するものを胃底腺型と分類した。ただし、MUC6とMist1を共発現するものは胃底腺型とした。さらに、単一の胃型形質を示すものを純粋型、複数の胃型形質を示すものを混合型に分類することにした。

## 結果

年齢は平均69.3歳 (59-75) 歳、腫瘍の大きさは平均

\*国際医療センター 消化器内視鏡科

16.9 mmで、10例中8例にPPIの投与歴があった(80%)。表1に10例の概要を示す。10例の胃型形質は全例が混合型であり、純粋型は認められなかった。表2に、症例の胃型形質の概要を、図1, 2に代表的な組織写真を示す。

## 考 察

本研究では、10例中8例にPPIの投与歴が認められたが、うち6例は投与期間が2年未満と短いこと、残り2例は当院受診前医の投与歴が不明なため、PPIの投与と胃の低悪性度上皮性腫瘍の発症について有意な関連性があるということできない。

免疫組織化学的には、10例全例が混合型であった。この要因として、腫瘍の起源となった細胞が、胃の各固有上皮への多分化能を有している可能性や、腫瘍細胞が、同時に複数の胃型形質を示している可能性が考えられた。また、腺頸部粘液細胞のマーカーであるTFF2陽性の腫瘍細胞が10例中9例で認められたことは、腺頸部粘液細胞への細胞分化と同時に、腫瘍細胞の細胞分化の幼弱性の傍証と考え

られた。

一方、Ueyamaらの報告により、腫瘍細胞が胃底腺の構成上皮への分化を示す癌、すなわち胃底腺型胃癌の存在が広く知られるようになった<sup>9)</sup>。症例報告もまだ限られたものであるが、HE標本上、腫瘍細胞に胃底腺上皮への分化が窺える癌のようである。本研究では、症例4では、腫瘍上皮に胃底腺上皮の分化が窺え、免疫組織化学的にも裏付けられた(図2右上)が、HE標本上、腫瘍細胞に胃底腺上皮への分化を捉えることが困難な症例でも、免疫組織化学的には胃底腺分化を示す症例も存在した(図3)。したがって、日常の病理診断時に、胃の低悪性度上皮性腫瘍に遭遇した場合には、プロトンポンプ、Mist-1の免疫染色による検討を加えることで、潜在的な胃底腺型胃癌の発見に役立つと考えられた。

今後は、報告時に腫瘍細胞の細胞形質にまで言及されていない低悪性度上皮性腫瘍についても、本研究で行った一連の免疫染色で、胃型形質の有する症例を拾いあげ、症例数を蓄積して検討を重ねたい。

表 1. 症例の概要

症例	年齢 平均69.3	性 M:F=8:2	PPIの投与歴	腫瘍の大きさ (mm) 平均16.9
1	73	M	切除の12か月前から	24
2	69	F	切除の約2年前から	10
3	73	M	切除の約1年8か月前から	18
4	75	M	切除の約1年前から	8
5	59	F	なし	13
6	63	M	切除の約1年9か月前から	6
7	70	M	切除の約1か月前～	31
8	73	M	なし	27
9	64	M	当院受診前から(詳細不明)	17
10	74	M	当院受診前から(詳細不明)	15

表 2. 症例の胃型形質

症例	陽性腫瘍細胞					形質
	TFF2	MUC5AC	MUC6	プロトンポンプ	Mist1	
1	あり	あり	あり	なし	なし	混合型(腺窩上皮型+幽門線型)
2	あり	あり	あり	なし	なし	混合型(腺窩上皮型+幽門線型)
3	あり	あり	あり	なし	なし	混合型(腺窩上皮型+幽門線型)
4	あり	あり	あり	あり	あり	混合型(胃底腺型+腺窩上皮型)
5	あり	あり	あり	あり	なし	混合型(腺窩上皮型+幽門線型+胃底腺型)
6	あり	あり	あり	あり	なし	混合型(腺窩上皮型+幽門線型+胃底腺型)
7	あり	あり	あり	なし	なし	混合型(腺窩上皮型+幽門線型)
8	あり	あり	あり	なし	なし	混合型(腺窩上皮型+幽門線型)
9	あり	あり	あり	なし	あり	混合型(腺窩上皮型+幽門線型+胃底腺型)
10	なし	あり	あり	あり	なし	混合型(腺窩上皮型+幽門線型+胃底腺型)

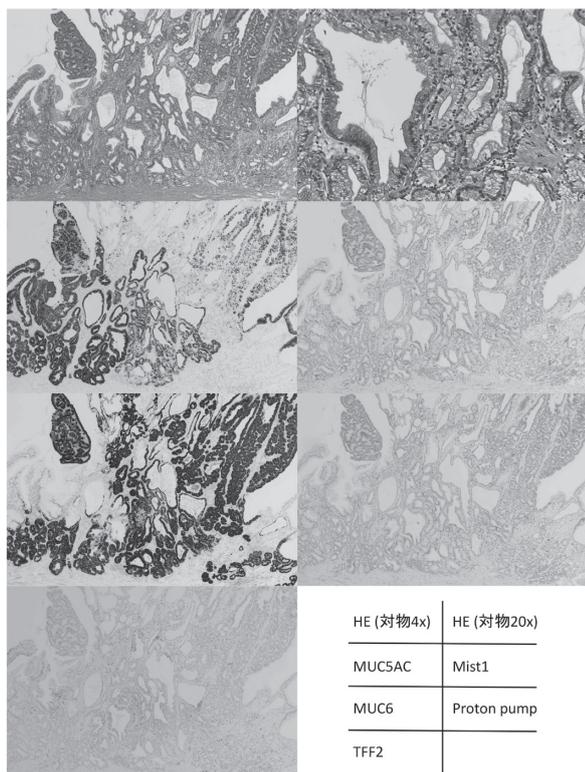


図 1. 胃型形質を持つ胃の低悪性度上皮性腫瘍の組織所見-腺窩上皮型+幽門線型 (症例1).

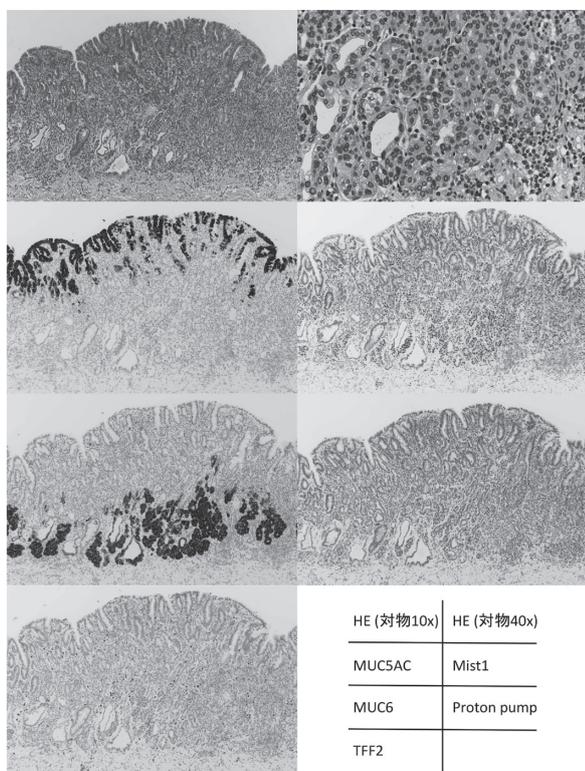


図 2. 胃型形質を持つ胃の低悪性度上皮性腫瘍の組織所見-胃底腺型+腺窩上皮型 (症例4).

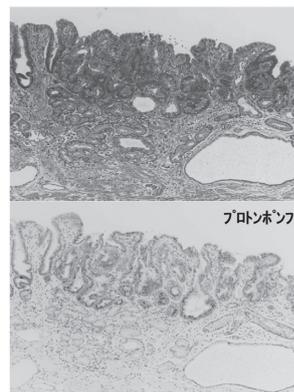


図 3. HE標本からは胃底腺分化を窺うのが難しい例 (症例6).

### 参考文献

- 1) Parfitt JR, Driman DK. Pathological effects of drugs on the gastrointestinal tract: a review. *Hum Pathol* 2007; 38(4): 527-36.
- 2) Hongo M, Fujimoto K; Gastric Polyps Study Group. Incidence and risk factor of fundic gland polyp and hyperplastic polyp in long-term proton pump inhibitor therapy: a prospective study in Japan. *J Gastroenterol* 2010; 45(6): 618-24.
- 3) Dockray G, Dimaline R, Varro A. Gastrin: old hormone, new functions. *Pflugers Arch* 2005; 449: 344-55.
- 4) Klöppel G. Overlapping but also distinct conditions in the gastroenteropancreatic neuroendocrine system: from hyperplasia to tumor and carcinoma. *USCAP* 2012.
- 5) Jain RN, Samuelson LC. Differentiation of the gastric mucosa. II. Role of gastrin in gastric epithelial cell proliferation and maturation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291(5): G762-5.
- 6) Kazumori H, Ishihara S, Kawashima K, et al. Analysis of gastrin receptor gene expression in proliferating cells in the neck zone of gastric fundic glands using laser capture microdissection. *FEBS Lett* 2001; 489(2-3): 208-14.
- 7) Poulsen AH, Christensen S, McLaughlin JK, et al. Proton pump inhibitors and risk of gastric cancer: a population-based cohort study. *Br J Cancer* 2009; 100: 1503-7.
- 8) Hagiwara T, Mukaisho K, Nakayama T, Sugihara H, Hattori T. Long-term proton pump inhibitor administration worsens atrophic corpus gastritis and promotes adenocarcinoma development in mongolian gerbils infected with helicobacter pylori. *Gut* 2011; 60: 624-30.
- 9) Ueyama H, Yao T, Nakashima Y, et al. Gastric adenocarcinoma of fundic gland type (chief cell predominant type): proposal for new entity of gastric adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 609-19.

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 細胞外 LRRCT ドメイン変異体をもちいたマウス TLR5 活性化機序の解明

研究代表者 魚住 尚紀 (医学部 生化学)

## 緒言

Toll-like receptor (TLR) は、病原体由来の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) の認識に携わり、炎症反応の惹起、獲得免疫系の活性化に重要な役割を果たす自然免疫受容体である<sup>1)</sup>。自然免疫系は緻密な調節のもと、病原体からの防御、自己に対する攻撃の回避をつかさどり、生体の恒常性維持に重要な役割を担っている。TLR作動薬・拮抗薬は、免疫機能の賦活・抑制を通じて、病態・生理的状態の改善に有用と考えられている。

TLRについては広汎な研究がなされてきたが、TLR活性化の分子機序には重大な未解明点が残されている。リガンドと会合したTLRの細胞外ドメインは、一般に点対称2量体を形成すると理解されている<sup>2-5)</sup>。その一方で、TLRの細胞内情報伝達経路において受容体直下に位置するMyddosomeは、12分子のデスドメインタンパク質によって形成される螺旋構造が報告されている<sup>6)</sup>。受容体細胞外ドメインの点対称構造が、細胞内情報伝達複合体の螺旋構造に変換される分子機序は明らかでなく、TLR活性化機序のブラックボックスである<sup>7)</sup>。

このような状況を背景に、細胞生物学的な手法によりTLR4、TLR5それぞれの一次構造と機能の相関を解析し、受容体活性化機構の解明をすすめてきた<sup>8)</sup>。我々が採用している変異体発現細胞のリガンドに対する転写を介した応答を定量化する手法は、タンパク質複合体の構造生物学的解析 (X線結晶構造解析、核磁気共鳴解析) や1分子イメージングなどによって得られるような立体構造の直接的情報を与えないが、細胞の応答を読み取っている点で、受容体機能と対応のある情報を得られる利点がある。

本研究では、特にマウスTLR5細胞外LRRCTドメインに注目して解析を進めた。LRRCTドメインは、マウスTLR3の結晶構造解析により、2量体形成した2分子のTLR3の分子間会合に関与することが示され、アミノ酸残基レベルで2分子のTLR3の分子間会合点が明らかにされている<sup>2)</sup>。

## 材料と方法

HEK293細胞を用いたTLR発現系は、TLR研究において

広く用いられている実験系に目的に合わせた改変を加え、本研究に適した手法が整えてある<sup>8,9)</sup>。

簡潔に示すと、マウスTLR5の発現ベクターはプラスミドpcDNA3.1 hygro (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を骨格とし、inverse PCR法で定法に従い変異体を作製した<sup>10)</sup>。陰イオン交換カラム (Nucleobond Extamidi EF, Takara, Otsu, Japan) で精製したエンドトキシンフリーのプラスミド溶液をトランスフェクションに用いた。これらの組換え遺伝子の使用に関しては、埼玉医科大学第二種使用等拡散防止措置承認 (1217号) を得ている。

HEK293細胞は10% FCS添加DMEM (Sigma, St. Lewis, MO, USA) 中で培養し、6穴プレート上でLipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いたりポフェクション法にてトランスフェクションした。トランスフェクション翌日、96穴プレートに細胞数をそろえて播種 ( $4 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ , 5% FCS添加DMEM)、2倍濃度のリガンド溶液を100  $\mu\text{L}$  添加して刺激した。刺激24時間後、培養上清を回収して、HEK293細胞が産生したヒトIL-8濃度をBD OptEIA Set Human IL-8 (BD biosciences, San Diego, CA, USA) にて定量した。

リガンドは、フラジェリンFLA-ST Ultrapure (cat. #tlrl-pstfla, Invivogen, San Diego, CA, USA) を生理食塩水 (Otsuka, Tokushima, Japan) に溶解し、5% FCS添加DMEMで希釈して使用した。

## 結果

TLRは1回膜貫通型受容体の構造を持ち、N末端側を細胞外、C末端側を細胞内の配向で発現する<sup>1)</sup>。細胞外構造の大部分を占めるロイシンリッチリピート (LRR) ドメインがリガンド認識の主要な部分を担っている。LRRドメインと膜貫通部位との間には約50アミノ酸残基で形成されるLRRCTドメインがあり、マウスTLR3においては、2量体形成した2分子のTLR3の分子間会合点 (D649, T680) を構成している<sup>2)</sup>。LRRCTドメインに共通して保存された特徴的な4つのシステイン残基を手がかりにアラインメントを作成し、マウスTLR3のD649, T680残基と対応するマウスTLR5アミノ酸残基V597, Y627を特定した。これらの残基のアラニン変異体V597A、

Y627AはマウスTLR5のリガンドであるフラジェリンに対する反応性が低下していた (Fig. 1). V597, Y627の近傍にあるN599, M626のアラニン変異体では, 野性型と比してほとんどリガンドに対する反応性に違いはなく, EC50の値の変化を認めなかった. 過去の報告においてリガンド認識に寄与する可能性が示唆されているLRRドメイン中のアミノ酸残基D293, E365のアラニン変異体はV597, Y627の変異体と同様の表現型を示し, LRRCTドメインが受容体機能において重要な役割を果たしていることが示唆された<sup>11)</sup>.

マウスTLR5 LRRCTドメイン中のV597, Y627残基の役割をさらに検討するため, アラニン以外の残基への変異導入をおこなった. Y627D変異体がりガンド用量反応曲線の最も強い右方変異を示した (Fig. 2A). Y627NはY627DとY627Aの中間的な表現型を示し, Y627HはY627Aと同様のリガンド応答性を示した. V597D変異をこれらのY627変異体に追加して導入したところ, V597D Y627D変異体はフラジェリンに対してほとんど反応を示さなかった (Fig. 2B). V597D Y627AはV597Dとほとんど違いが認められず, V597D Y627H変異体はむしろリガンド応答が改善して観察された.

マウスTLR5 P751H変異体は細胞内情報伝達を媒介する細胞内TIRドメイン中の変異体で, マウスTLR4 P712H変異体と1次構造で相同である. マウスTLR4 P712H変異体は, 情報伝達機能を欠いている<sup>12,13)</sup>. マウスTLR5 P751Hもリガンドに対する応答を失っていることを確認した. TLRの野性型と変異体を共発現させると, 野性型単独発現の場合と比較して細胞応答が抑制されて観察される (ドミナントネガティブ効果) ことがあり, TLRが2量体 (多量体)

を形成してはたらくと考える根拠の一つとなっている. マウスTLR5野性型と変異体の共発現実験 (発現量比 野性型:変異体=1:3) において, V597D Y627D変異体はP751H変異体とほぼ同等の抑制効果を示した (Fig. 3). 3重変異体 V597D Y627D P751Hを用いた場合には, V597D Y627D変異体やP751H変異体のいずれかを共発現させた場合に比べて, 野性型マウスTLR5に対するより強い抑制を示した.

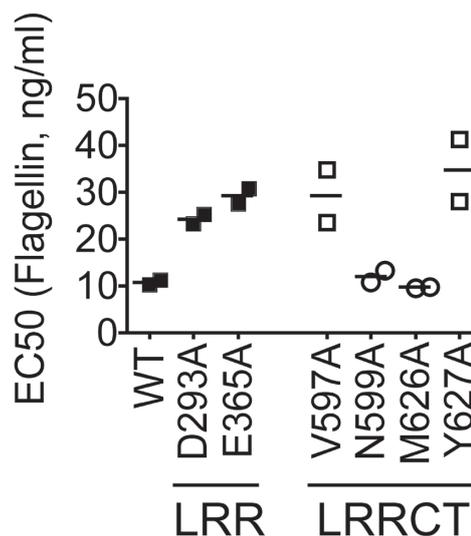


Fig. 1. マウスTLR5細胞外ドメイン アラニン変異体のフラジェリンに対する反応性. IL-8産生に対するリガンドEC50値で示した. D293, E365残基はLRRドメイン, V597からY627残基はLRRCTドメインに含まれるアミノ酸残基である. トランスフェクションベクター重量比, TLR5カセット:空ベクター=1:9 (総プラスミド量1  $\mu$ g/well).

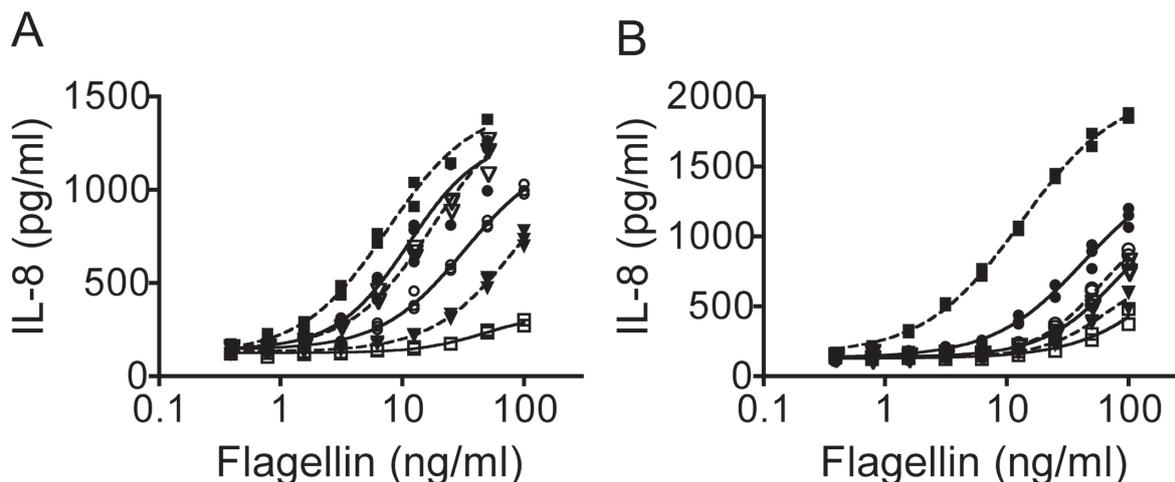
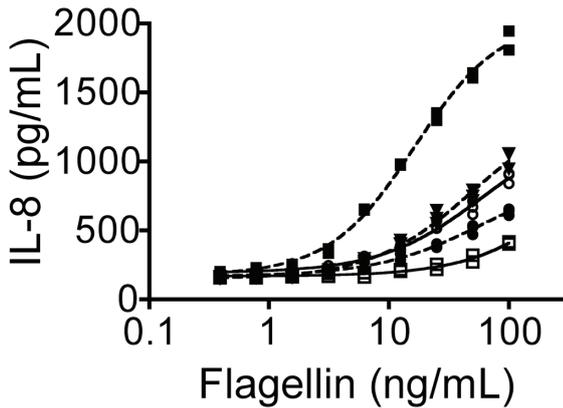


Fig. 2. マウスTLR5細胞外LRRCTドメインのV597, Y627変異体のフラジェリンに対する反応性. リガンド用量応答曲線で示した. トランスフェクションベクター重量比, TLR5カセット:空ベクター=1:32 (総プラスミド量1  $\mu$ g/well). A, Y627アミノ酸残基変異体.  $\square$ : 空ベクター導入細胞,  $\blacksquare$ : 野生型マウスTLR5,  $\bullet$ : Y627H変異体,  $\nabla$ : Y627A変異体,  $\circ$ : Y627N変異体,  $\blacktriangledown$ : Y627D変異体. B, V597D Y627アミノ酸残基複合変異体.  $\square$ : 空ベクター導入細胞,  $\blacksquare$ : 野生型マウスTLR5,  $\bullet$ : V597D Y627H変異体,  $\nabla$ : V597D Y627A変異体,  $\circ$ : V597D Y627N変異体,  $\blacktriangledown$ : V597D Y627D変異体. V597D Y627A変異体 ( $\nabla$ ) と V597D Y627N変異体 ( $\circ$ ) のプロットは重なり合いが大きい.



**Fig. 3.** 共発現したマウスTLR5細胞外LRRCTドメイン変異体による野生型マウスTLR5機能の抑制. リガンド用量応答曲線で示した. トランスフェクションベクター重量比, TLR5野生型カセット:TLR5変異体カセット:空ベクター=1:3:16 (総プラスミド量1  $\mu$ g/well). □: 空ベクター導入細胞, ■: 野生型マウスTLR5のみ, ▼: 野生型マウスTLR5とV597D Y627D変異体の共発現, ○: 野生型マウスTLR5とP751H変異体の共発現, ●: 野生型マウスTLR5とV597D Y627D P751H変異体の共発現.

## 考 察

LRRCTドメインは細胞外でLRRドメインと膜貫通部位に挟まれた領域を占める. マウスTLR3の結晶構造解析の結果では, 2本鎖RNAリガンド存在時に形成されるリガンド・受容体複合体において, LRRCTドメインが2分子のTLR3細胞外構造間の唯一の直接接触点を形成することが明らかになっている<sup>2)</sup>. このような接触点は, TLR4やTLR5の細胞外ドメインの立体構造解析では示されておらず<sup>3,4)</sup>, また, TLR3のLRRCTドメインの役割について機能面から解析した結果も知られていない. 本研究の結果は, マウスTLR5 LRRCTドメイン中の2つのアミノ酸残基 (V597, Y627) が受容体機能において重要な役割を果たしていることを示している. これらのアミノ酸残基はそれぞれ, マウスTLR3のD648, T679残基と一次構造上対応する位置にある. マウスTLR3の場合と同様に2分子のTLR間の会合点を形成するかどうかについては, 今後の検討が必要である. ごく近傍のアミノ酸残基の変異は受容体機能に影響を与えないことが示されており, 部位特異的な役割を果たしていると考えられる.

アラニン置換体以外の変異体を解析した結果からは, マウスTLR5 V597D Y627D変異体がフラジェリン受容体としての機能をほとんど失っていることが明らかになった. 疎水性, 芳香族のアミノ酸残基を酸性アミノ酸に置換したことによる, 分子内構造の変化による影響と, 分子間相互作用に対する影響 (会合面の形状, 相互作用の強さなどの変化による) が原因になっていると考えられる.

野生型TLR5との共発現実験では, V597D Y627D変異体は野生型TLR5によるリガンド応答を抑制することが

示された. 3重変異体V597D Y627D P751Hの野生型TLR5との共発現実験の結果は, V597D Y627D変異とP751H変異の野生型TLR5に対する抑制効果は相乗的であることを示している. 受容体が持つ2つの機能, すなわち1) 受容体・リガンド複合体の形成 (細胞外構造: LRRドメイン, LRRCTドメインが媒介) と2) 胞内情報伝達経路の活性化 (細胞内構造: TIRドメインが媒介) に分割して, これらの結果を解釈すると次のようになる. P751残基はTIRドメイン中にあり, P751H変異は細胞内情報伝達の機能を持たず, 共発現実験において受容体・リガンド複合体の形成を阻害しないものの, 野生型TLR5の細胞内情報伝達機能を抑制する. 一方, V597D Y627D変異はLRRCTドメインの変異であり, 受容体・リガンド複合体の形成に異常をきたしていると考えられる. V597D Y627D変異体を野生型TLR5と共発現させたときに野生型TLR5の機能を抑制した実験結果からは, V597D Y627D変異体が野生型受容体と複合体を形成できることが推測される. ここで野生型・V597D Y627D変異体のリガンド会合複合体が細胞情報伝達を媒介できるか否か2通りの可能性が考えられる. 3重変異体V597D Y627D P751Hを共発現させた場合に抑制の相乗効果が認められることは, 野生型・V597D Y627D変異体のリガンド会合複合体が, 弱いながらも細胞情報伝達機能を有することを示唆する. さらに, V597D Y627D変異体の野生型TLR5に対する抑制能が, P751H変異体のそれと同等であったことは, 野生型・変異体複合体の形成という点で, V597D Y627D変異体がより効率的に野生型TLR5と会合できることを推測させる. こうした解釈は, タンパク質レベルでの発現量が同水準であることを前提としており, 慎重に議論を進める必要がある.

マウスTLR5は2量体を形成して細胞内情報伝達をおこなうと考えられるが, 活性化状態にある2量体化したTLR5・リガンド複合体の構造を, 直接的に観測することは困難である. 細胞内情報伝達タンパク質複合体Myddosomeの螺旋構造を勘案すると, TLR5の2量体は点対称構造ではなく, 非対称構造である方がよりよく適合すると考えられる. 本研究プロジェクトでは, マウスTLR5の全長にわたるアミノ酸変異体を作成し解析を進めてきた. 細胞内TIRドメイン中のD718, P834残基がP751残基と同様にTLR5の機能に重要であることは, 以前報告したとおりである<sup>8)</sup>. これらを含め, マウスTLR5の機能欠損変異体が細胞外, 細胞膜貫通部位, 細胞内のそれぞれの領域で見いだされている. 現在, これらの機能欠損変異体の共発現実験を進めており, 機能相補性を示す組み合わせを探している. 機能相補するヘテロ2量体は, 構造上非対称であり, どのようにして情報伝達複合体を形成するかを解析する上で重要なツールとなると思われる. V597D Y627D変異体は野生型マウスTLR5との共発現で情報伝達能力を持つヘテロ複合体を形成できることが示唆されており, 機能相補性を持つ変異体ペアの一方

として有力な候補と考えている。

マウスTLR4に対しても同様の実験を計画し、準備を進めている。マウスTLR4 P712H変異体が、野性型マウスTLR4の機能を抑制する効果が、マウスTLR5の場合ほど顕著ではないことを示す予備実験結果を得ている。マウスTLR4変異体の表現型がマウスTLR5の対応する変異体のそれと顕著な対比を示すことが多く、一次構造上や機能面での類似性からの予測に反して、マウスTLR4とTLR5が異なる分子機序によって活性化されることが示唆されている<sup>8)</sup>。「マウスTLR4は単量体で細胞内情報伝達経路を活性化する」可能性についての検証をおこなう計画を立てている。

TLRの受容体活性化機序は、2量体モデルが広く受け入れられ、免疫学は言うに及ばず、一般的な細胞生物学教科書にも掲載されている。しかしながら、分子レベルでの活性化機序の詳細は未解明である。TLRの細胞内情報伝達を担うTIRドメインが、増殖因子、サイトカインの受容体でよくみられるような酵素活性を持たず、複合体形成の足場 (scaffold) であることが解析を困難にしている原因の1つであろうと思われる。本プロジェクトで解析の対象としている細胞レベルでの応答は、分子レベルの空間解像度を持たない反面、受容体細胞内ドメインから細胞内情報伝達複合体に至るシグナルの時間・空間的な積算を反映している。受容体の情報伝達能力を総合的に読み取っているという点で、本研究からは受容体機能についての情報を多く得ることができ、構造生物学が得意とする形の情報と両輪をなすと考えている。

TLRは自然免疫における主要な受容体群であり、炎症・免疫反応の調節を試みる上で、創薬ターゲットとして魅力的な存在である。本研究を通して、TLR活性化機構の分子機序が明らかになり、分子内のよりよい創薬ターゲットの選択につながることを期待される。

#### 引用文献

- 1) Kawai T and Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-84.
- 2) Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, et al. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 2008; 320: 379-81.
- 3) Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H and Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009; 458: 1191-5.
- 4) Yoon SI, Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL, et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science* 2012; 335: 859-64.
- 5) Tanji H, Ohto U, Shibata T, Miyake K and Shimizu T. Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science* 2013; 339: 1426-9.
- 6) Lin SC, Lo YC and Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 2010; 465: 885-90.
- 7) Gay NJ, Gangloff M and O'Neill LA. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol* 2011; 32: 104-9.
- 8) 魚住尚紀. 単量型マウスTLR4による細胞内情報伝達の分子機序と意義の解明. *埼玉医科大学雑誌* 2013; 40: 48-51.
- 9) Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol* 2005; 6: 571-8.
- 10) Martin A, Toselli E, Rosier MF, Auffray C and Devignes MD. Rapid and high efficiency site-directed mutagenesis by improvement of the homologous recombination technique. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 1642-3.
- 11) Andersen-Nissen E, Smith KD, Bonneau R, Strong RK and Aderem A. A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. *J Exp Med* 2007; 204: 393-403.
- 12) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-8.
- 13) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162: 3749-52.

#### 研究成果リスト

##### 学会発表

- 1) 魚住尚紀, 村越隆之. マウスTLR 5細胞外LRRCTドメイン変異体の機能解析, BMB2015 (第38日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会), 平成27年12月, 神戸

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 角膜クロスリンキング後の角膜混濁と境界線発生メカニズム

研究代表者 加藤 直子 (大学病院 眼科)

## 緒言

円錐角膜は、先天性進行性の角膜疾患であり、角膜の脆弱性を特徴とする。その多くは、思春期から青年期に発症し、角膜中心から傍中心部が眼圧に圧されて前方突出、菲薄化する。角膜形状が円錐状に突出し対称性が失われることにより、近視性乱視の増加と不正乱視の増加が生じ、裸眼視力、矯正視力が低下する。視力矯正は、初期には眼鏡により可能であるが、疾患が進行すると不正乱視の増加により眼鏡では矯正不可能になり、ハードコンタクトレンズによる矯正が必要になる。さらに進行すると、ハードコンタクトレンズの装用が困難になり、角膜移植の適応となる。

円錐角膜の原因は不明で、長らくコンタクトレンズと角膜移植以外の治療法はないとされていた。しかし、2003年にWollensakらにより角膜クロスリンキングが報告された<sup>1)</sup>。角膜クロスリンキングは、リボフラビンと長波長紫外線を用いて角膜実質のコラーゲン線維間の架橋結合を増加させ角膜全体の剛性を上げることにより眼圧により角膜が前方突出するのを防ぐ効果があり、円錐角膜の進行を停止させる治療である<sup>1-3)</sup>。角膜クロスリンキングは安全性の高い手術だが、術後1~6ヶ月頃にかけて施術を行った角膜実質に淡いびまん性の混濁が生じることが知られている<sup>4,5)</sup>。また、びまん性混濁の最も深い層に、混濁していない実質との境界線がみられることが報告されている<sup>6)</sup>。この境界線の病態については未だ明らかにはされていないが、角膜実質のコラーゲンが架橋されている部位とされていない部位の目安として用いられることが多い。びまん性混濁と境界線は、多くの症例では視機能には影響を与えず、術後半年以降になると自然に消退して行くことが多い。しかし、時にこの境界線が際立ったような角膜実質深層の強い混濁を生じることもある<sup>7,8)</sup>。

角膜クロスリンキング後のびまん性実質混濁、境界線、そして強い実質深層混濁の病態、発生機序については、未だ明らかにされていない。本研究では、角膜クロスリンキング後の角膜実質の混濁について、特に、境界線の深さについて、紫外線照射の強度を変えた2種類の角膜クロスリンキングの間で比較検討を行った。

## 対象と方法

対象は、進行性の円錐角膜53例70眼で、円錐角膜が進行しているという判断は、間を空けて2回以上の検査を行い、直前の2年以内に自覚視力検査における等価球面度数が1.0 D以上増加、自覚乱視同数が1.0 D以上増加、角膜形状解析検査における強主経線上の角膜屈折力が1.0 D以上増加のいずれかを満たすものとした。また、角膜クロスリンキングでの紫外線照射開始時に、角膜厚が400  $\mu\text{m}$ 以上確保できることも条件にした。

角膜クロスリンキングは、連携研究施設である東京歯科大学市川総合病院にて、倫理委員会の承認を受けてから、以下の手技にて行った。点眼麻酔の後、角膜中央部の上皮を約7.5 mm径で搔爬し、0.1%リボフラビン点眼液 (Medio-cross isotonic, Peschke, Gemary または, VibeX rapid, Avedro, USA) を2分置きに10~15回点眼した。点眼終了後に超音波角膜厚測定装置 (SP-100, Tomey, Japan) を用いて角膜中央部から最薄部付近の角膜厚を測定し、400  $\mu\text{m}$ に達していない場合には0.1%リボフラビン低浸透圧液 (Medi-cross, hypotonic, Peschke) または注射用蒸留水を点眼して角膜実質を膨化させた。再度角膜厚を測定し、400  $\mu\text{m}$ に達したことを確認した後<sup>9,10)</sup>、370 nmの長波長紫外線を3.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$ で30分間、または18.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$ で5分間照射した (CCL Vario, Peschke または KXL System Avedro)。照射後は、ソフトコンタクトレンズを装用し手術を終了した。

術後、3~5日で上皮欠損が治癒した時点でソフトコンタクトレンズ装用は中止した。ベタメタゾンリン酸エステルナトリウム0.1%、レボフロキサシン点眼1日4回を1~2週間処方し、その後は、フルオロメトロン0.1%点眼を1日4回で処方し、約1ヶ月で漸減中止した。術後診察は、1週間、1か月、3か月、6か月、1年目に、通常の眼科学的検査に加えて、角膜内皮細胞数検査、角膜形状解析検査 (CASIA, Tomey, Japan) を行った。

境界線の有無、深さについては、角膜形状解析検査に撮影された断層像を用いて検討し、角膜上皮表面から境界線までの距離を深さとした。

## 結果

紫外線照射の条件により、 $3.0 \text{ mW/cm}^2$ で30分間紫外線照射したものを通常照射群、 $18.0 \text{ mW/cm}^2$ で5分間照射したものを高速照射群とした。通常照射群は16眼、高速照射群は54眼だった。術前の各群の症例のプロファイルは表1に示す。

術後は、視力、屈折度数、強主経線上の角膜屈折力、内皮細胞密度、角膜厚には、両群とも術前と有意差はなく、また群間にも有意差はみられなかった(図1-5)。術後1か月で、通常照射群では全例で境界線が観察されたが、高速照射群では観察されなかった症例が3眼みられた( $p=0.3112$ )。また、境界線の深さについては、通常照射群が $324.7 \pm 40.2 \mu\text{m}$ であったのに対して、高速照射群では $269.4 \pm 56.4 \mu\text{m}$ で、高速照射群で有意に浅かった(図6:  $p < 0.0001$ )。

## 考察

角膜クロスリンキングでは、リボフラビンが長波長紫外線照射により励起されて、周辺の酸素分子から発生した

一重項酸素の作用でコラーゲン線維が架橋されると考えられている。紫外線のエネルギー量は、強度と照射時間の積で表されるため、理論上は強度を強くすれば照射時間を短縮しても同じ効果が得られるはずである。実際に、ドレスデン法と呼ばれる通常照射( $3.0 \text{ mW/cm}^2 \times 30$ 分)と $9.0 \text{ mW/cm}^2 \times 10$ 分の高速照射で同等の結果が得られたとする報告がある<sup>11)</sup>。

著者らは、先に、 $18.0 \text{ mW/cm}^2 \times 5$ 分の照射で術後1年までの円錐角膜の進行抑制効果を検討したことがあるが、その際には、視力、屈折度数、角膜屈折力、角膜内皮細胞数、角膜厚などには有意な変化はみられず、進行予防効果は通常照射と同等であり、さらに、通常照射と比べて実質のびまん性混濁が有意に少ないという結果が得られた<sup>12)</sup>。今回の研究結果で、短時間照射群で通常群に比べて境界線の深さが浅かったことは、先行研究での、実質のびまん性混濁が少なかった結果とも関連する可能性が考えられる。

角膜クロスリンキング後の実質混濁と境界線の発生メカニズムについては、未だに明らかにされていない。角膜実質の共焦点顕微鏡観察では、角膜クロスリンキングの後は角膜実質細胞が一時的にアポトーシスに陥って

表 1. 角膜クロスリンキングを受けた症例の内訳

	通常照射群 ( $3.0 \text{ mW/cm}^2 \times 30$ 分)	高速照射群 ( $18.0 \text{ mW/cm}^2 \times 5$ 分)	P値
眼数	16眼	54眼	
年齢	$18.1 \pm 4.3$ (歳)	$23.1 \pm 6.7$ (歳)	
性別	男性 : 女性	男性 : 女性	
アトピー性皮膚炎の有無	8眼(38%)	11眼(20%)	
術前最高矯正視力(LogMAR)	$0.28 \pm 0.28$	$0.33 \pm 0.38$	
術前自覚屈折度数	$-6.2 \pm 4.6 \text{ D}$	$-6.6 \pm 5.5 \text{ D}$	
術前強主経線上角膜屈折力	$57.5 \pm 5.9 \text{ D}$	$56.6 \pm 7.9 \text{ D}$	
術前角膜厚	$419.1 \pm 47.5 \mu\text{m}$	$399.5 \pm 55.6 \mu\text{m}$	
術前角膜内皮細胞数	$2940.9 \pm 332.9 \text{ 個/mm}^2$	$2832.0 \pm 361.6 \text{ 個/mm}^2$	

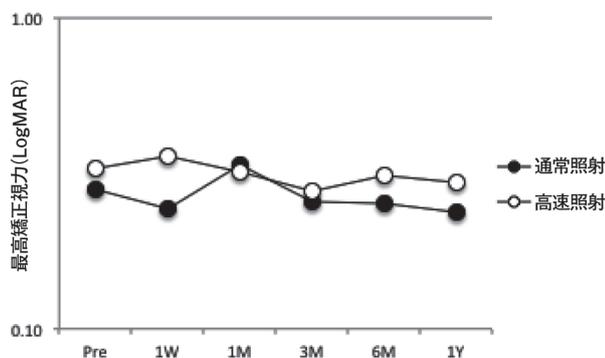


図 1. 角膜クロスリンキング後の最高矯正視力の変化。角膜クロスリンキング後の矯正視力は、通常照射群、高速照射群共に有意な変化はなく、また両群間に有意差もみられなかった。

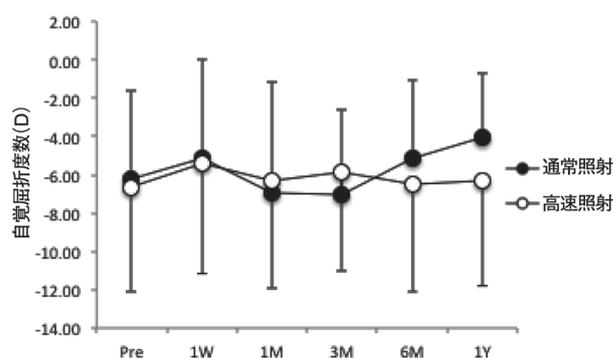


図 2. 角膜クロスリンキング後の自覚屈折度数の変化。角膜クロスリンキング後の自覚屈折度数(等価球面度数)は、通常照射群、高速照射群共に有意な変化はなく、また両群間に有意差もみられなかった。

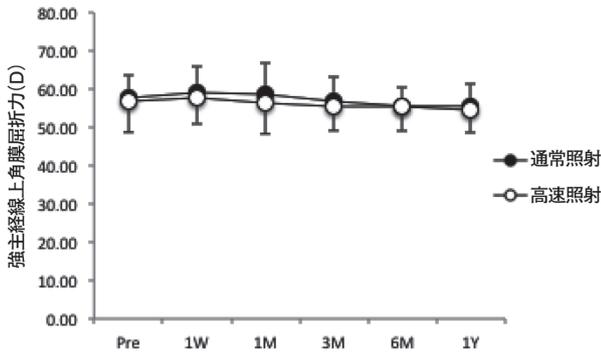


図 3. 角膜クロスリンキング後の強主経線上の角膜屈折力の変化. 角膜クロスリンキング後の強主経線上の角膜屈折力は、通常照射群、高速照射群共に有意な変化はなく、また両群間に有意差もみられなかった。

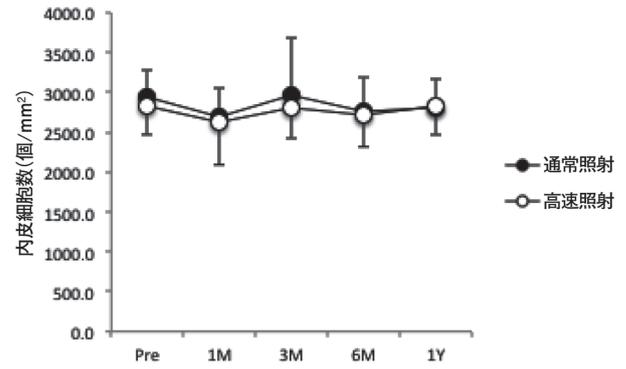


図 4. 角膜クロスリンキング後の内皮細胞数の変化. 角膜クロスリンキング後の内皮細胞数は、通常照射群、高速照射群共に有意な変化はなく、また両群間に有意差もみられなかった。

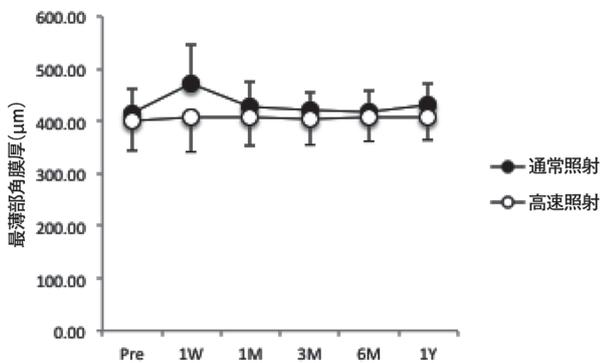


図 5. 角膜クロスリンキング後の最薄部角膜厚の変化. 角膜クロスリンキング後の最薄部角膜厚は、通常照射群、高速照射群共に有意な変化はなく、また両群間に有意差もみられなかった。

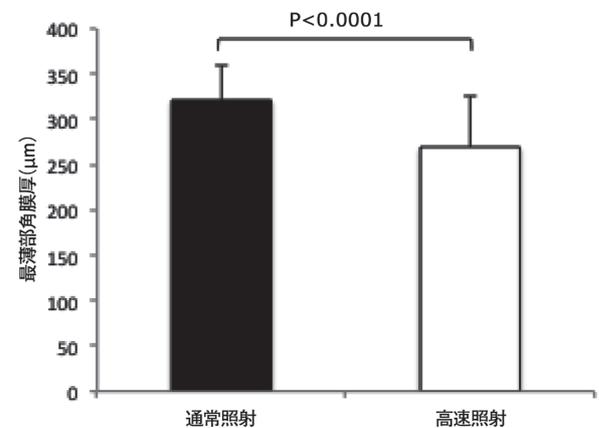


図 6. 角膜クロスリンキング後の境界線の深さ. 角膜クロスリンキング1か月後に境界線がみられた症例での境界線の深さは、通常照射群に比べて高速照射群共に有意に浅かった ( $p < 0.0001$ ).

消失し、術後3～6か月かけて再生することが報告されている。実質混濁や境界線が出現する時期は、実質細胞が消失している時期にほぼ一致し、角膜実質細胞が再増殖する時期に一致して消退する。この時、実質細胞が完全に消失する実質浅層から中層にかけて混濁が現れ、架橋効果が現弱する深層に境界線が現れることは興味深い。これについて、著者らは、角膜実質細胞は実質の細胞外基質のターンオーバーに寄与しており、実質細胞が消失する時期には古い細胞外基質が分解されずに残るために浅層から中層にかけてはびまん性の混濁が生じ、深層では紫外線強度が弱まるためアポトーシスに陥るには不十分なエネルギーを照射されることにより、逆に何らかのシグナル伝達系が活性化され、細胞外基質の異常産生が起きるのではないかと考えている。

これを検証するために、今後、動物実験等を行い、境界線付近の細胞外基質の質的な変化や、培養角膜実質細胞に対して紫外線照射を行った際の細胞外基質産生の変化について検討することが今後の課題である。

### 参考文献

- 1) Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003; 135(5): 620-7.
- 2) Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34(5): 796-801.
- 3) Wittig-Silva C, Whiting M, Lamoureux E, Lindsay RG, Sullivan LJ, Snibson GR. A randomized controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: preliminary results. *J Refract Surg* 2008; 24(7): S720-5.
- 4) Dhawan S, Rao K, and Natrajan S. Complications of corneal collagen cross-linking. *J Ophthalmol* 2011; 1-5.
- 5) Greenstein SA, Fry KL, Bhatt J, Hersh PS. Natural history of corneal haze after collagen crosslinking

- for keratoconus and corneal ectasia: Scheimpflug and biomicroscopic analysis. *J Cataract Refract Surg* 2010; 36(12): 2105-14.
- 6) Seiler T, Hafezi F. Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line. *Cornea* 2006; 25(9): 1057-9.
- 7) Vinciguerra P, Albè E, Romano MR, Sabato L, Trazza S. Stromal Opacity After Cross-linking. *J Refract Surg* 2012; 28(3): 165.
- 8) Kato N, Konomi K, Saiki M, Negishi K, Takeuchi M, Shimazaki J, Tsubota K. Deep stromal opacity after corneal cross-linking. *Cornea* 2013; 32 (7): 895-8.
- 9) Hafezi F, Mrochen M, Iseli HP, Seiler T. Collagen crosslinking with ultraviolet-A and hypoosmolar riboflavin solution in thin corneas. *J Cataract Refract Surg* 2009; 35(4): 621-4.
- 10) Spoerl E, Hoyer A, Pillunat LE, Raiskup F. Corneal cross-linking and safety issues. *Open Ophthalmol J* 2011 Feb 11; 5: 14-6.
- 11) Kymionisa, GD, Tsoulnarasa KI, Grentzelosa MA, Liakopoulou DA, Tsakalisa NG, Blazakia SV, Paraskevopoulou TA, Tsilimbarisa MK. Evaluation of corneal stromal demarcation line depth following standard and a modified-accelerated collagen cross-linking protocol. *Am J Ophthalmol* 2014; 158 (4): 671-5.
- 12) Kato N, Negishi K, Kawakita T, Saiki M, Takeuchi M, Tsubota K. Comparison of the results of accelerated corneal crosslinking and conventional crosslinking; Preliminary results. IX International Congress of Corneal Crosslinking 12/6-7/2-14, Ireland

#### 研究成果リスト

##### 学会発表

- 1) 加藤直子, 新澤 恵, 葛西 梢, 許斐健二, 島崎 潤. 角膜クロスリンキング後の内皮細胞減少率, 2016角膜カンファレンス, 平成28年2月18-20日, 長野
- 2) Kato N, Shinzawa M, Kasai K, Konomi K, Shimazaki J. Corneal endothelial loss after corneal crosslinking for keratoconus, ARVO meeting 2016, 2016/05/1-5, Seattle, USA

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

自然老化モデル *O. degus* を用いたアルツハイマー病病変形成メカニズムの解明

研究代表者 丸山 敬 (医学部 薬理学)

## 緒言

代表的な認知症であるアルツハイマー病 (Alzheimer disease; AD) は、老年性認知症を起こす疾患の一つであり、脳における細胞外の老人斑 (アミロイドβタンパク質Aβの凝集物) および神経細胞内のタンゲル (リン酸化されたタウの凝集物) の出現を特徴とする。しかし、これらの病理的变化がADの原因なのか結果なのか、発症メカニズムの根本的な理解、それに基づいた予防・治療薬開発には至っていない。その現状を打破するためには、ADの最重要危険因子である老化との関連性を明らかにすることが必要である。ADの発症の根底では通常老化で起きる現象が増幅されていると提唱されているが<sup>1)</sup>、通常老化の範囲とは何か、どの段階を越えたら認知症に至る (異常) 老化になるのか、その詳細は分かっていない。そのため、現在のAD研究においては、ヒトの老化や病態をより反映したモデルの創出が求められている<sup>2)</sup>。

新しいモデルに求められる条件として以下が必要と考えられる。

- ① 遺伝子改変 (例えば、マウスにヒト遺伝子の導入) に依らない、自然なものである。
- ② Aβやタウの蓄積が見られる。
- ③ 認知機能障害を起こす (観察できる)。

例えば、野生型のマウスやラットでは、加齢に伴った認知機能障害こそ起こるが、老人斑やタンゲルの形成は認められず (Aβやタウの配列の違いや短い寿命が関与していると考えられている)、病理像がヒトと乖離している。非ヒト霊長類に関しては、分類学的にヒトに近い、ということでの利点はあるものの、寿命が長いことから、実験室レベルでの飼育・解析には限界があると考えられる (研究者のほうが先に認知症になる)。そこで、我々は *Octodon degus* (*O. degus*, 右写真参照) を新しいADモデルとして提唱すべく、基礎的なデータの集約を行うこととした。

*O. degus* は、チリ原産の齧歯類で、平均寿命は8年ほど、3年程度でタンゲルや老人斑が形成されることが報告されている<sup>3)</sup>。また、認知機能障害も呈する。それだけでなく、下記のような観点から、非常にヒトに近い齧歯類で

あることが知られている。

- 夜行性のマウスとは異なり、*O. degus* はヒトと同じ昼行性である。
- 社会性が高く、単独で飼育することによりストレス反応が増強される。
- 夜間の睡眠妨害によって記憶障害が生じる。この記憶障害にADの対症療法として臨床的に汎用されているメマンチンが有効である<sup>4)</sup>。
- 道具を使って餌をとることを覚えられる。このことから、かなり高次脳機能が発達していることが知られている<sup>5)</sup>。

欠点としては、近交系が確立していないこと、研究者が少ないためにその生態が十分に解明されていないことがある。本研究ではADモデルとして確立するための準備を主目的とした。

## 材料と方法

## (1)材料

京都橋大学・上北朋子准教授の飼育していた *O. degus* の脳サンプルを用いた。年齢としては、10ヶ月齢および60ヶ月齢のものを用いた。

## (2)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、低速遠心 (1000 x g,



5 min, 4°C) で未破碎細胞の除去および脱核を行った. その上清を超遠心に供し, TBS-soluble画分(上清)を得た. 沈殿を, 1% TritonX-100を含むTBS中で破碎し, 超遠心を行ってTx-soluble画分(上清)を得た. 沈殿は, 超音波破碎し, Tx-insoluble画分とした. これらの画分は, SDS, 2-メルカプトエタノール存在下で96°Cにて煮沸し, 電気泳動のサンプルとした.

### (3) ウェスタンブロッティング

タウについては, 一般的なウェスタンブロッティングによって解析した. A $\beta$ については, Tris/Tricine系の電気泳動システムもしくは8M尿素を含むTris/Tricine系の電気泳動システムを利用した<sup>6)</sup>. シグナルの検出は, 本学共通機器室のChemi-Docを用いて行った.

## 結果

### (1) A $\beta$ の解析

脳内のA $\beta$ を検出できるかどうかを調べた. A $\beta$ は40数残基のタンパク質であるが, *O. degus*とヒトとでは, アミノ酸配列が1カ所異なることが分かっている. ヒトA $\beta$ に対する抗体は多く作られているが, それらが正しく*O. degus*のA $\beta$ を認識するかは不明である.

A $\beta$ には長さの違ういくつかの分子種のあることが知られている. そこでまず, C末端側に対する抗体(A $\beta$ 40およびA $\beta$ 42)が使えるか検討したが, 検出できなかった(data not shown). 次に, A $\beta$ のN末端側を認識する抗体82E1が使えるかどうかを検討した. その結果, Tx-soluble画分においてA $\beta$ を検出することができた(Fig. 1A, Monomer). やや高分子側にもバンドを認められた(Fig. 1A, 2-3 mer, 4 mer). 年齢によるA $\beta$ 量に特に差はなかった. またTx-insoluble画分でもわずかにA $\beta$ を認めたものの, 大部分はTx-soluble画分に存在するものと考えられた.

なお, 82E1はA $\beta$ のN末端側から5残基目までを認識する抗体である. この部分はヒトと*O. degus*とで共通の配列であるため, 82E1で同定できたことは妥当な結果である.

次に, ヒトA $\beta$ を一残基毎に分離できる電気泳動システムを用いた検討を行った(Fig. 1B). ヒトのA $\beta$ 40およびA $\beta$ 42と移動度が一致するバンドは認められなかった(Fig. 1B, 矢印). これには2つの理由が考えられる. 1つは, ヒトA $\beta$ と配列が異なるために移動度が異なるということ, もう1つはC末端側の抗体の検討より, A $\beta$ 40およびA $\beta$ 42とは異なる長さのものが産生されている可能性がある, ということである.

### (2) タウタンパク質の解析

次に, タウについても同様に検出できるか調べた. タウのリン酸化状態に依存しない抗体(Total tau)や個々のリン酸化部位に対する抗体を複数種検討したが, これらはヒト, ラット, マウスをまたいで使用できる抗体である. Fig. 2に示すように, *O. degus*においても使用できることが確かめられた.

まず, TBS-soluble画分に含まれるタウについて解析した(Fig. 2A, B). まずTotal tauを見てみると, 10ヶ月齢と60ヶ月齢とでパターンの違うことが分かった. 10ヶ月齢では47kDa付近の低分子側にもタウが見られるが, 60ヶ月齢ではその量が減少し, 60kDa付近のタウが増加する傾向が見られた(Fig. 2A, Total Tauを参照). この違いは, リン酸化に伴う移動度の違いだけではなく, 発現しているアイソフォームの違いも含まれている可能性があり, 年齢依存的なスプライシング制御が行われている可能性が示唆された. 次に, リン酸化タウの違いを見るため, 5種類のリン酸化タウ抗体を用いて解析をした. Total tauの量で補正した結果, 60ヶ月齢において, いずれのリン酸化タウも増加する傾向が確認できた(Fig. 2A, B). 更に, Tx-soluble, Tx-insoluble画分にタウが含まれるかを確認した(Fig. 2C). 60ヶ月齢の方が多いと考えられた. 10ヶ月齢でも60ヶ月齢でもTx-soluble画分にタウを認めた. バンドのパターンもTBS-soluble画分の結果を踏襲するものであった. Tx-insoluble画分については, 60ヶ月齢で顕著なタウの存在を認めた. これらの結果から, *O. degus*では, 年齢依存的なリン酸化タウの増加, 界面活性剤不溶性タウの増加が起きていると考えられた.

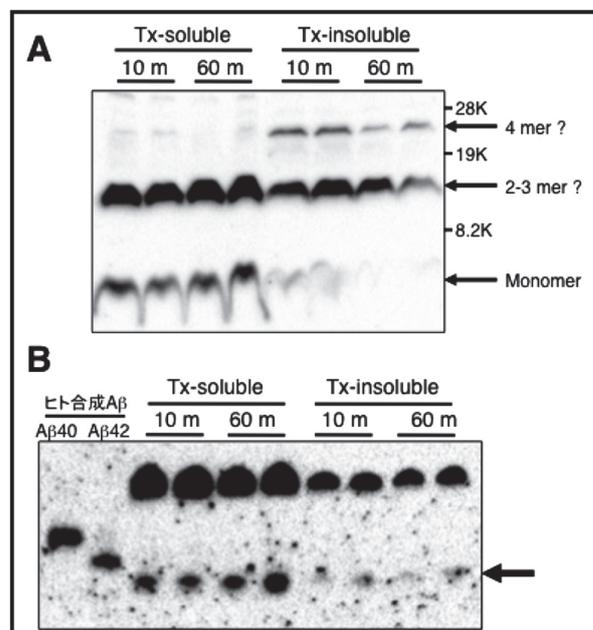
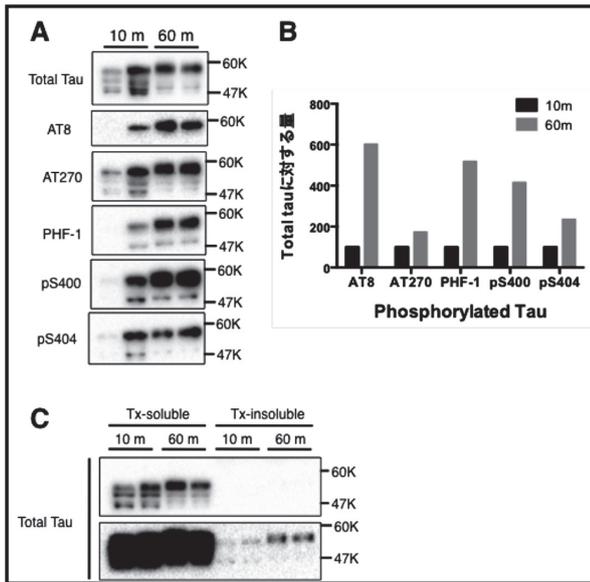


Fig. 1. *O. degus* 脳の A $\beta$  の解析. (A) Tx-soluble, Tx-insoluble 各画分に含まれる A $\beta$  を 16.5% Tris/Tricine ゲルを用いて泳動し, 抗 A $\beta$  抗体 82E1 によって検出した. 矢印は A $\beta$  を示す. (B) Tx-soluble, Tx-insoluble 各画分に含まれる A $\beta$  を, 8M 尿素を含む 11% Tris/Tricine ゲルを用いて泳動し, 抗 A $\beta$  抗体 82E1 によって検出した. 左側にはヒト合成 A $\beta$ 40 および A $\beta$ 42 を泳動マーカーとして流した (各々 20 pg). 矢印は A $\beta$  を示す.



**Fig. 2.** *O. degus* 脳のタウの解析. (A) TBS-soluble画分に含まれるタウの解析. Total tauはリン酸化状態に依存しない抗体. 他はタウのリン酸化に依存した抗体を用いた結果である. AT8はpS199, pS202, pT205のリン酸化を認識, AT270はpT1810のリン酸化を認識, PHF-1はpS396, pS404のリン酸化を認識する抗体である. (B) (A)のプロット結果の測定結果. グラフはTotal tauで補正した各リン酸化タウの量の平均値を表す. (C) Tx-soluble, Tx-insoluble画分に含まれるタウの解析結果. 下のパネルは長時間露光したもの.

**考 察**

ヒトに近い加齢過程を示すと考えられる齧歯類 *O. degus* において, アルツハイマー病のマーカータンパク質とも言えるAβおよびタウの解析を実施した. なお, まだ標本数が十分ではなく, 今回は2個体ずつでの検討結果を示した.

本研究により, 従来の研究で使用されてきた抗体が *O. degus* にも適用できることが確認できた. また, Aβに関しては特に加齢に依る変化は認められなかったが, タウについては年齢依存的な発現アイソフォームの変化, リン酸化の変化, 可溶性の変化を示唆する結果となった. 近年,

加齢に依存したタウの蓄積を中心に据えた認知症の定義も提案されており<sup>7)</sup>, *O. degus*での検討結果は, ヒトの老化に伴って起きる脳内の変化を考える上で重要な示唆を提供するものとなろう. これらの研究をもとに公的資金を獲得して, 近交系を確立して, 埼玉医大に *O. degus* コロニーを構築して, 各研究者に提供できるようにしていきたい.

**謝 辞**

*O. degus* をご提供していただいた京都橘大学・上北先生に深く感謝します. 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.

**参考文献**

- 1) Mattson MP & Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(4): 278-94.
- 2) Medina M & Avila J. The need for better AD animal models. *Front Pharmacol* 2014; 5: 227.
- 3) Inestrosa NC, et al. Human-like rodent amyloid-beta-peptide determines Alzheimer pathology in aged wild-type *Octodon degu*. *Neurobiol Aging* 2005; 26(7): 1023-8.
- 4) Tarragon E, et al. Memantine prevents reference and working memory impairment caused by sleep deprivation in both young and aged *Octodon degus*. *Neuropharmacology* 2014; 85: 206-14.
- 5) Okanoya K, Tokimoto N, Kumazawa N, Hihara S, & Iriki A. Tool-use training in a species of rodent: the emergence of an optimal motor strategy and functional understanding. *PLoS One* 2008; 3(3): e1860.
- 6) Yagishita S, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Ishiura S, & Ihara Y. DAPT-induced intracellular accumulations of longer amyloid beta-proteins: further implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *Biochemistry* 2006; 45(12): 3952-60.
- 7) Crary JF, et al. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol* 2014; 128(6): 755-66.

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 肺扁平上皮癌に対するエストロゲン療法の可能性

研究代表者 阿部 佳子 (総合医療センター 病理部)

研究分担者 田丸 淳一\*

## 緒言

エストロゲンは、乳癌のみならず前立腺癌、卵巣癌、直腸癌などの癌化や増殖に関与することが知られている。肺癌とエストロゲンの関係については、非喫煙女性の肺腺癌が多く研究されてきたが、扁平上皮癌に焦点をあてたものは乏しい。閉経後女性における喫煙が、血中エストロゲンの上昇と相関するという疫学的報告があり、喫煙がリスクファクターである肺扁平上皮癌の発症や進行にもエストロゲンが影響する可能性は十分に考えられる。

エストロゲンはエストロゲン受容体(ER)に結合して、その標的遺伝子の発現を調整するものであり、ERには、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ という2つのサブセットがある。ER $\alpha$ は乳癌治療の標的とされるサブセットで、主に腫瘍の増殖に関与することが知られている。これに対し、ER $\beta$ は腫瘍の増殖抑制やアポトーシスに関与すると言われている。肺の非小細胞癌では主にER $\beta$ の発現が認められ、ER $\alpha$ の発現は少ないことが報告されてきた。近年、ER $\beta$ に対する選択性が高い刺激剤が開発されたことを背景として、前立腺癌や一部の乳癌に対するER $\beta$ 選択的刺激治療が提案されている(*Oncogene Sep 30. doi: 10.1038/onc.2013.384. Breast Cancer Research 2014; 16: R21. BMC Cancer 2014; 14: 749.*)。肺癌でもER $\beta$ が治療標的となる可能性が考えられる。

そこで、我々は肺扁平上皮癌とER(ER $\beta$ を中心として)との関係について研究した。

(当研究は埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会の承認を得ている(申請番号472-II))

## 材料と方法

## 1. 肺扁平上皮癌症例に対する免疫組織化学染色

**研究対象:** 埼玉医科大学総合医療センターで外科的に切除された肺扁平上皮癌109症例(平成25年度学内グラントにおいて用いた76症例を含む)。臨床病理学的背景は以下の通りである。男性:女性94:15(症例数)、年齢 $69.3 \pm 7.4$  (44-86)歳、組織型高分化:中分化:低分化

\* 総合医療センター 病理部

26:69:11(症例数)、病変部位central type: intermediate type: peripheral type 34:7:62(症例数, 6症例不明)、最大腫瘍径 $3.7 \pm 2.3$  cm、静脈侵襲陽性:陰性71:38(症例数)、胸膜浸潤p0: p1: p2: p3 64:26:1:15(症例数, 3症例不明)、肺内転移あり:なし5:97(症例数, 7症例不明)、リンパ節転移あり:なし36:70(症例数, 3症例不明)。

## 方法:

免疫染色の結果について以下の項目について検討した。

- (1) 各ホルモン受容体とaromataseの発現の関係
- (2) ER $\beta$ の発現と臨床病理学的事項との関係
- (3) p53蛋白の発現と臨床病理学的事項との関係

免疫組織化学染色は従来の方法で行い、用いた抗体およびその前処理は表に示す。

## 免疫染色標本の評価方法:

- ・ エストロゲン受容体(ER $\alpha$ , ER $\beta$ , ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2), プログステロン受容体(PgR)およびアンドロゲン受容体(AR), Ki-67, p53の発現率については、癌細胞500個あたりの陽性率を算定した。
- ・ aromataseについては、癌の細胞質陽性所見が10%以上占めるものを陽性、それ未満を陰性とした。
- ・ CD31については、陽性となる脈管の癌胞巣に対する分布の粗密をtentativeにスコア化した。Score 0: 脈管の介在なし, Score 1: 癌胞巣周囲に非連続性に分布, Score 2: 癌胞巣周囲にほぼ連続性に分布, Score 1.5: Score 1とScore 2の混合とした。

なお、結果に示すごとくER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2という2つのsplicing variantに対する免疫組織化学染色は109症例中33症例に行いpilot studyとした(稀少抗体入手困難のため、現時点で全症例について行えていない)。

## 統計学的検討:

- ・ 109症例に対する免疫染色標本の評価結果(ER $\beta$ , p53陽性率)と上記に示した臨床病理学的事項およびCD31陽性パターンとの関係について統計学的解析を行った。
- ・ 33症例におけるER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2の発現頻度について統計学的解析を行った。

なお、統計ソフトはSTATA version 13.1 (USA, Texas)を用いた。

## 2. 培養細胞実験

**研究対象:** 肺扁平上皮癌由来の培養細胞3種 (RERF-LC, EBC-1, CK2)

**方法:** 3種の肺扁平上皮癌培養細胞に estradiol (E2), ER $\alpha$  選択的刺激剤 (PPT), ER $\beta$  選択的刺激剤 (DPN) を投与24時間後に各々の培養細胞から蛋白を抽出し, p53蛋白 (clone: DO7) 発現の差異を Western blotting法により, 対象 (刺激なし) と比較した.

## 結果

### 1. 肺扁平上皮癌症例に対する免疫組織化学染色

#### (1) 各ホルモン受容体とaromataseの発現

ER $\alpha$ 陽性症例は6例 (陽性率10.91-81.03%), PgR陽性症例は11例 (陽性率3.15-48.18%), AR陽性症例は6例 (いずれもごく一部に陽性となるのみ) であったのに対し, ER $\beta$ は2症例を除く107症例に陽性となり, 平均53.32  $\pm$  27.25%と多くの症例が高い陽性率を示した. aromataseに対する染色では, 陽性90症例 (弱陽性53症例

を含む), 陰性19症例であった. aromatase陰性例におけるER $\beta$ 陽性率は49.46  $\pm$  28.52%, 陽性例では54.14  $\pm$  27.07%であった. aromatase陽性症例では, aromatase陽性箇所にてER $\beta$ が陽性となる傾向が見られた (図1) が, aromataseの発現の有無によるER $\beta$ 陽性率に有意差は見られなかった.

#### (2) ER $\beta$ の発現と臨床病理学的事項との関係

ER $\beta$ の陽性率はKi-67 LIと正の相関を示し, 癌の最大径と負の相関を示した. なお, 腫瘍の最大径とKi-67 LIとの間に相関関係は見られなかった. ER $\beta$ の陽性率について, 性別, 癌の分化度, 癌が気管支に占める部位, 静脈侵襲の有無, 胸膜浸潤の程度, 肺内転移の有無, リンパ節転移の有無, CD31による癌に介在する脈管の分布パターンとの関係を統計的に検討したが, いずれも有意な関係は認められなかった.

#### (3) p53蛋白の発現と臨床病理学的事項との関係

p53に対する免疫組織化学染色は, ubiquitousな蛋白発現がうかがわれるか, または全く発現しない結果となった. p53蛋白発現の比率とCD31を用いて行った癌病変部に

表.

抗体	クローン	前処理	希釈	提供
ER $\alpha$	SP1	heat	x1	Roche
ER $\beta$	14C8	autoclave	x1000	Gene Tex Inc
PgR	1E2	heat	x1	Roche
AR	QR441	autoclave	x1000	DAKO Cytomation
aromatase	#677/H7	-	x6000	Dr.Evans DB. Novaritis (contribution)
Ki67	MIB1	heat	x40	DAKO Cytomation
ER $\beta$ 1	ab187291	autoclave	x400	Abcam
ER $\beta$ 2	57/3	autoclave	x250	Gene Tex Inc
p53	DO-7	heat	x40	DAKO Cytomation
CD31	JC70A	heat	x100	DAKO Cytomation

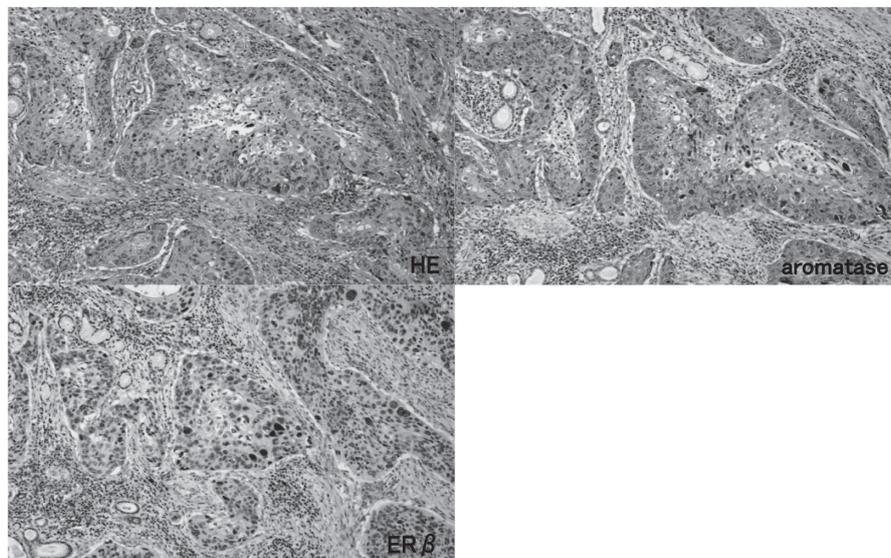


図 1. 免疫組織化学染.

おける脈管分布のパターンとの間に, “p53蛋白発現が低い癌は脈管の介在に富む”ことが, また, “p53蛋白発現が高い癌に静脈侵襲像が見られる”ことが示された. なお, CD31による脈管分布パターンと静脈侵襲の有無との間に関連性は見られなかった. p53蛋白陽性率について, 性別, 癌の分化度, 癌の最大径, 癌が気管支に占める部位, 胸膜浸潤の程度, 肺内転移の有無, リンパ節転移の有無, Ki67 LIとの関係を統計学的に検討したが, いずれも有意な関係は認められなかった.

なお, p53蛋白発現とER $\beta$ の発現の間に何等かの相関関係はうかがわれなかった(図2).

## 2. 培養細胞実験(図3)

平成25年度学内グラントの研究報告に示したごとく, 3種類の肺扁平上皮癌細胞はそれぞれ異なるホルモン受容

体の発現パターンを示した(RERF-LC-AIはER $\alpha$ +/ER $\beta$ +/  
PgR+/aromatase+, LK-2はER $\alpha$ -/ER $\beta$ +/  
PgR-/aromatase+, EBC-1はER $\alpha$ -/ER $\beta$ -/  
PgR-/aromatase+)ことをふまえ, エストロゲンおよびER $\alpha$ , ER $\beta$ に対する選択刺激剤が, p53蛋白の発現に影響するか検討を試みたが, RERF-LC-AI, およびEBC-1ではp53蛋白の発現は認められなかった. その結果, LK-2のみで検討し, エストロゲン(estradiol), ER $\alpha$ 選択刺激剤(PPT), ER $\beta$ 選択刺激剤(DPN)のいずれを投与しても, p53蛋白の発現量に変化は見られなかった.

## 3. ER $\beta$ のsplicing variantについてpilot study(図4)

33症例におけるER $\beta$ 1およびER $\beta$ 2の陽性率は, それぞれ $12.81 \pm 23.98\%$ ,  $60.30 \pm 31.09\%$ であり, ER $\beta$ 2の陽性率が有意に高かった. 両者の染色性の組み合わせとしては, “ER $\beta$ 1 Low/ER $\beta$ 2 High”の群が最も多かった.

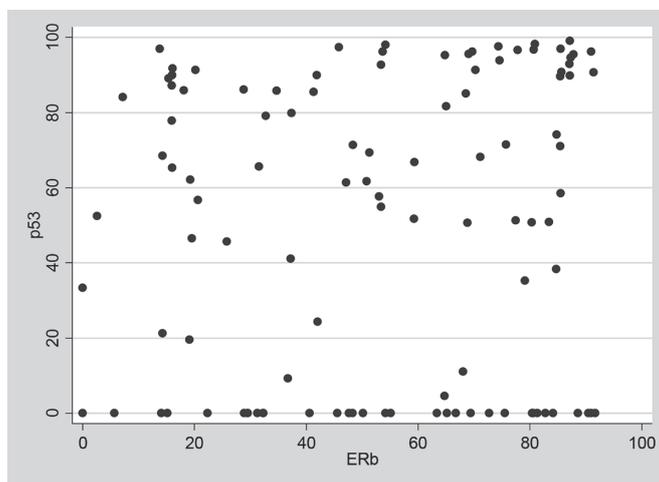


図2. 肺扁平上皮癌109症例におけるER $\beta$ とp53蛋白の発現の関係.

### p53 (DO-7)

53kDa

DAKO M7001

(clone: DO-7)

Mouse Monoclonal

X200

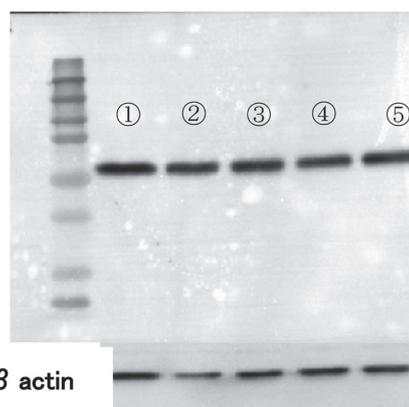
Ab 10 $\mu$ l/全量 2000 $\mu$ l

10% SDS-PAGE

Lumi-lightにて発光

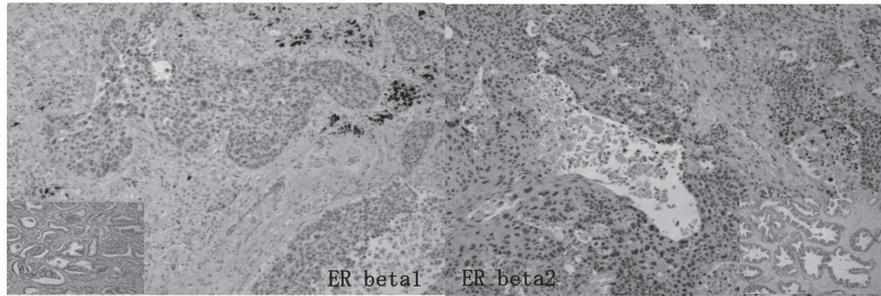
30 $\mu$ g相当量 apply

- ① LK-2
- ② LK-2 control (24h)
- ③ LK-2  
10nME2(24h)
- ④ LK-2  
PPT10nM(24h)
- ⑤ LK-2  
DPN10nM(24h)



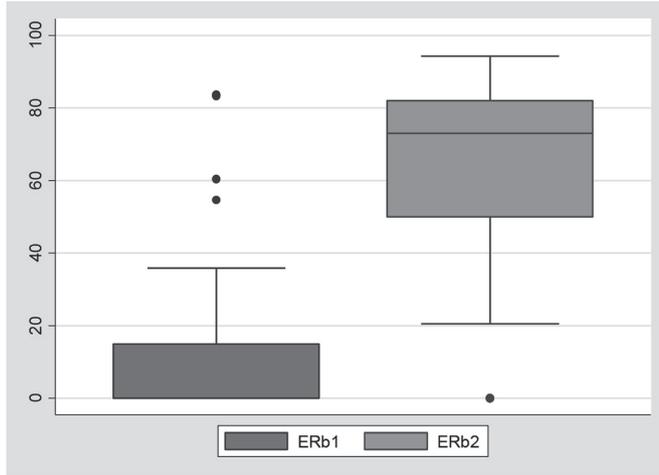
LK-2 ER $\alpha$ (-), ER $\beta$ (++), PgR(-), aromatase(+)

図3. 培養細胞実験の結果(Western blotting).



\*insertion は陽性コントロール(前立腺組織)

(a) 肺扁平上皮癌 33 症例における ERβ 1 および ERβ 2 の陽性率



(b) 肺扁平上皮癌 33 症例における ERβ 1/ERβ 2 陽性パターンの分布

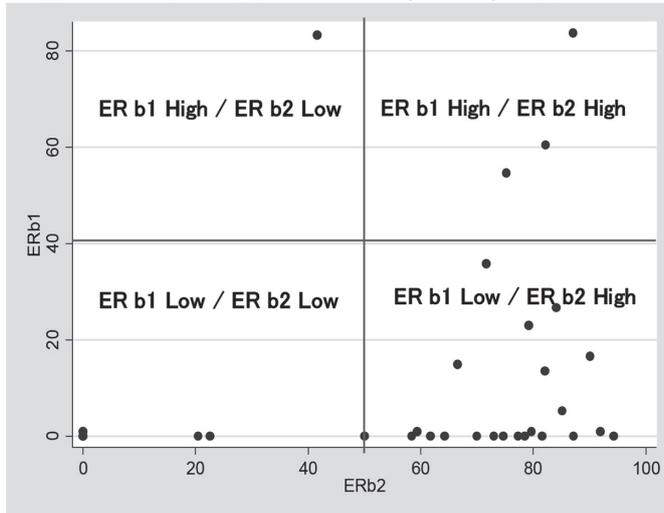


図 4. 肺扁平上皮癌33症例におけるERβ1, ERβ2発現の検討 (pilot study).

### 考 察

肺扁平上皮癌は、気管支の中枢側に好発するため切除困難な症例が多く、効果的なadjuvant therapyが必要とされる。一方で、アバスタチン投与による重篤な副作用が報告され、扁平上皮癌に対する治療法の選択肢は多いとは言えない。肺扁平上皮癌に高頻度に発現するERβと、多くの症例に見られるp53蛋白の発現異常の臨床病理学的事項

に対する関与、および両者の関係を検討することにより、ERβ刺激剤による新たな治療の可能性をさぐることを考えた。

本研究では、肺扁平上皮癌でERβが高率に発現し、癌の増殖に関与する可能性が示唆された。一方p53蛋白発現は癌の脈管構築や静脈侵襲に関与する可能性が示された。肺扁平上皮癌の81%に変異が見られるというp53遺伝子変異とER発現の関係について、ER (主にERβ) の活性が、p53

を介して生じる細胞のapoptosisや血管新生の調整に関与することを示す複数の報告 (*Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(4): 1500-5. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 127(2): 417-27. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012; 128(3-5): 113-20. *Cell Cycle* 2013; 12(8): 1211-24.) が見られ, 肺扁平上皮癌の血管新生や静脈侵襲に, p53蛋白とER $\beta$ の相互発現が関係する可能性を期待したが, 免疫染色実験と培養細胞実験の結果は, ともにER $\beta$ の発現とp53蛋白発現の間に関連性がない, または薄いことを示唆するものであった. 文献的には, ER $\beta$ の発現がmutant p53の発現を促進し, wild type p53の発現を抑制する (*Cancer Res* 2009; 69(15): 6100.), ER $\beta$ の過剰発現がp53により誘導されるアポトーシスを促進する (*Clin J Physiol* 2006; 49(2): 110.), ER $\beta$ の発現がp53の核への移行を阻害する (*Oncogene* 2005; 24(39): 4789.) など, 腫瘍に由来する培養細胞を用いたin vitroの実験報告がある. 我々の現時点でのin vitro実験は, p53蛋

白の発現とER $\beta$ 発現の関係を検討するものとして十分なものとは言い難いく, 今後さらに詳細な検討が必要であると考える.

また, ER $\beta$ は従来増殖を抑制するとされてきたが, そのほたらきは臓器特異性のあることが知られている. これは, ER $\beta$ のsplicing variantが臓器ごとに特徴があることに関係すると考えられている. ER $\beta$ には5種類のsplicing variantがあり, 正常肺組織に多く発現するER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2について, 一部の症例で検討を行ったところ, ER $\beta$ 2が多く発現することが示唆された. 今後, 抗体を入手できれば, すべての症例について検討を行い, ER $\beta$ , ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2の発現様式と, 腫瘍の増殖能や腫瘍径との関係を統計学的に解析したいと思う.

#### 研究成果リスト (論文, 学会発表, 特許出願等)

なし

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

## モデルマウスのエピジェネティクス解析による性同一性障害機序の解明

研究代表者 仲地 豊 (ゲノム医学研究センター)

## 緒言

われわれはゲノム科学および遺伝学の視点から、モデル動物による解析と当事者ゲノムによる解析の2つの手法をもちいて性同一性障害(性別違和, 以下GID)関連遺伝子の探索を進めている。本グラント研究では、性ホルモンに暴露させた新生仔マウス脳をもちいたアプローチによる解析をおこなったので報告する。

GID当事者は心と身体性の性別が一致しない状態にある<sup>1,2)</sup>。GID当事者の多くは就学前から自身の性別への強い違和感を抱え、希死念慮は7割以上に及ぶ<sup>3)</sup>。GID診断には複数の専門医による長期的問診を要し、第2次性徴期にある若年当事者への医療的介入の遅れはその後の著しいQOL低下を招く。しかし若年GID当事者の一部は将来的に性別違和が緩解することがあり、また性ホルモン投与は体への不可逆的变化をもたらすことから、投与開始には慎重な判断が必要となる。疫学研究からGID当事者は1~3万人に1人の割合でいることから<sup>4)</sup>、そのため早期の確定診断やホルモン療法のリスク評価に利用できる診断基準の発見は急務であるものの、GIDバイオマーカーの開発に資するGID機序解明には至っていない。

近年の研究から、ヒトを含む哺乳類の性分化機構は進化的に保存されていることがわかってきている。性分化の臨界期である胎生期または新生仔期の脳が性ホルモンに曝露することで脳の性分化が誘導され、脳における性差や思春期後の性行動に影響を与える<sup>5)</sup>。組織学的な性差がみられる性的二型核とよばれる領域が脳では複数存在し、たとえばヒトやマウスの脳の分界条床核では特定の神経細胞の数に性差がある。このような分界条床核の特徴はGID当事者では身体より心の性別と一致することが報告されている<sup>6)</sup>。そのためGIDには性ホルモンを介した生物学的機序が予想されている<sup>7)</sup>。性ホルモン受容体やステロイド合成経路に着目した関連解析がこれまで複数の研究グループによりおこなわれてきたものの、GIDに強く関連する変異・多型はいまだ同定されていない<sup>8-17)</sup>。性腺発達や血中ホルモン濃度など、GID当事者の身体的な性分化は正常な場合が多い。特に性ホルモン受容体や性ホルモン代謝酵素の変異・多型は全身に影響し性分化

疾患の原因となるため、性ホルモン受容体や性ホルモン代謝酵素のみではGID機序は説明がつかないと考えられる。家族内集積性や双生児解析・同胞解析からGIDの遺伝的背景が示唆されているにも関わらず<sup>17-20)</sup>、その遺伝率や遺伝様式も不明であり、依然としてGIDの生物学的機序は未解明なままである。

われわれの最近の研究<sup>21)</sup>で、男性ホルモンであるテストステロン投与した新生仔マウス脳をもちいた発現解析から、神経発生・神経分化や軸索誘導に関わる遺伝子群が脳の性分化期に有意に発現変化するだけでなく、300以上の未知遺伝子の発現変化が誘導されていた。この知見から、性ホルモン受容体やホルモン代謝酵素の変異がGID機序の主な原因ではなく、脳の性分化期特異的に性ホルモン受容体標的遺伝子やその下流経路の遺伝子に、脳の性分化関連遺伝子群が多数存在し、脳の性分化に生じた脳の性分化関連遺伝子群の発現変化やそれに伴う下流遺伝子の発現制御の変化がエピジェネティックな機構により維持されるという仮説を立てるに至った。

以上の仮説をふまえ、われわれはマウスをもちいて新生仔期から成獣期までの脳における遺伝子発現プロファイルおよびDNAメチル化動態プロファイルを時系列データとして採取し、網羅的に統合解析をおこなうことで、脳の性分化関連遺伝子群が担うGID機序の分子基盤を明らかにすることを目指している。本グラント研究ではその予備解析として、DNAメチル化動態の時系列プロファイルの取得条件を検討するゲノム領域の選定をおこなった。

## 材料と方法

われわれはこれまでに、性ステロイドホルモンであるプロピオン酸テストステロンを腹腔内投与した新生仔期の野生型マウス(C57BL/6J)の脳由来RNA(2日齢投与, 6日齢採取)をもちいた発現解析から、性ホルモン曝露により発現変化する遺伝子群を同定している<sup>21)</sup>。これらの遺伝子群が位置するゲノム上の周辺領域について配列解析をおこない、ヒト-マウス間で配列が保存されている領域およびCpG島の位置を探索することで、DNAメチル化動態の時系列プロファイルの取得条件を検討するゲノム領域を選定した。ゲノム配列情報と遺伝子情報はUCSC

Genome Browser<sup>22)</sup>およびEnsembl<sup>23)</sup>のデータを利用した。

## 結 果

われわれが同定した、性ホルモン暴露により脳の性分化期に発現変動する遺伝子のひとつであるマウス *Ott* (Ovary testis transcribed) 遺伝子は、成獣マウスの脳では発現しておらず、脳の性分化期である新生仔期の脳で発現している<sup>21)</sup>。マウス *Ott* 遺伝子周辺について配列解析をおこなったところ、周辺には *Ott* 遺伝子のマルチコピーがクラスターとして存在し、また近傍にはDNAメチル化の標的となるCpG領域も複数存在することがわかった。マウス *Ott* 遺伝子には配列全長にわたって高い類似性を示すようなヒト相同遺伝子は見つかっていないが、ヒトX染色体上のマウス *Ott* 遺伝子周辺の相同領域(シンテニー領域)を検索したところ、マウス *Ott* 遺伝子と同様の機能ドメインをもち、精巣特異的な発現プロファイルを示す遺伝子があらたに同定できたことから、マウス *Ott* 遺伝子周辺をDNAメチル化動態の時系列プロファイルの取得条件を検討するゲノム領域として選定した。

## 考 察

マウス *Ott* 遺伝子はX連鎖性の遺伝子だが、主に精巣で発現して精原細胞における重要な機能をもつことが知られている<sup>24, 25)</sup>。成獣マウスでは性腺特異的な発現を示し中枢神経系では発現がみられないにも関わらず、脳の性分化期である新生仔期には脳で発現しており、かつその発現には性差がみられる<sup>21)</sup>。これまでヒト相同遺伝子は見つかっていなかったが、今回同定したヒト遺伝子はマウス *Ott* 遺伝子と機能的な相同性をもつことが予想される。今後はマウス *Ott* 遺伝子とその近傍領域をもちいてメチル化動態を検出するための条件検討をおこない、遺伝子発現とエピジェネティクスの時系列プロファイルを解析するとともに、今回同定したヒト遺伝子の機能解析も並行して進める予定である。

## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、埼玉医科大学ゲノム医学研究センタートランスレーショナルリサーチ部門・実験動物施設・ゲノム科学部門の皆様からの多大なご協力をいただきました。この場を借りまして感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.
- 2) Coleman E, Bockting W, Botzer M, Cohen-Kettenis P, DeCuypere G, Feldman J, et al. Standards of care for the health of transsexual, transgender, and gender-nonconforming people, version 7. *Int J Transgend* 2014; 13: 165-232.
- 3) Suicidal ideation among patients with gender identity disorder. *Psychiatry Res* 2011; 190(1): 159-62.
- 4) Bakker A, van Kesteren PJ, Gooren LJ, Bezemer PD. The prevalence of transsexualism in The Netherlands. *Acta Psychiatr Scand* 1993; 87(4): 237-8.
- 5) Wu MV, Manoli DS, Fraser EJ, Coats JK, Tollkuhn J, Honda S, et al. Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors. *Cell* 2009; 139(1): 61-72.
- 6) Zhou JN, Hofman MA, Gooren LJ, Swaab DF. A sex difference in the human brain and its relation to transsexualism. *Nature* 1995; 378(6552): 68-70.
- 7) Bao AM, Swaab DF. Sexual differentiation of the human brain: relation to gender identity, sexual orientation and neuropsychiatric disorders. *Front Neuroendocrinol* 2011; 32(2): 214-26.
- 8) Henningsson S, Westberg L, Nilsson S, Lundström B, Ekselius L, Bodlund O, et al. Sex steroid-related genes and male-to-female transsexualism. *Psychoneuroendocrinol* 2005; 30(7): 657-64.
- 9) Bentz EK, Schneeberger C, Hefler LA, van Trotsenburg M, Kaufmann U, Huber JC, et al. A common polymorphism of the SRD5A2 gene and transsexualism. *Reprod Sci* 2007; 14(7): 705-9.
- 10) Bentz EK, Hefler LA, Kaufmann U, Huber JC, Kolbus A, Tempfer CB. A polymorphism of the CYP17 gene related to sex steroid metabolism is associated with female-to-male but not male-to-female transsexualism. *Fertil Steril* 2008; 90(1): 56-59.
- 11) Hare L, Bernard P, Sánchez FJ, Baird PN, Vilain E, Kennedy T, et al. Androgen receptor repeat length polymorphism associated with male-to-female transsexualism. *Biol Psychiatry* 2009; 65(1): 93-6.
- 12) Ujike H, Otani K, Nakatsuka M, Ishii K, Sasaki A, Oishi T, et al. Association study of gender identity disorder and sex hormone-related genes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009; 33(7): 1241-4.
- 13) Fernández R, Esteva I, Gómez-Gil E, Rumbo T, Almaraz MC, Roda E, et al. The (CA)<sub>n</sub> polymorphism of ERβ gene is associated with FtM transsexualism. *J Sex Med* 2014; 11(3): 720-8.
- 14) Fernández R, Esteva I, Gómez-Gil E, Rumbo T, Almaraz MC, Roda E, et al. Association study of ERβ, AR, and CYP19A1 genes and MtF transsexualism. *J Sex Med* 2014; 11(12): 2986-94.
- 15) Fernández R, Cortés-Cortés J, Esteva I, Gómez-Gil E, Almaraz MC, Lema E, et al. The CYP17 MspA1 Polymorphism and the Gender Dysphoria. *J Sex Med* 2015; 12(6): 1329-33.
- 16) Shabir I, Khurana ML, Joseph AA, Eunice M, Mehta M,

- Ammini AC. Phenotype, genotype and gender identity in a large cohort of patients from India with 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *Andrology* 2015; 3(6): 1132-9.
- 17) Green R. Family cooccurrence of “gender dysphoria”: ten sibling or parent-child pairs. *Arch Sex Behav* 2000; 29(5): 499-507.
- 18) Coolidge FL, Thede LL, Young SE. The heritability of gender identity disorder in a child and adolescent twin sample. *Behav Genet* 2002; 32(4): 251-7.
- 19) Gómez-Gil E, Esteva I, Almaraz MC, Pasaro E, Segovia S, Guillamon A. Familiality of gender identity disorder in non-twin siblings. *Arch Sex Behav* 2010; 39(2): 546-52.
- 20) Heylens G, De Cuypere G, Zucker KJ, Schelfaut C, Elaut E, Vanden Bossche H, et al. Gender identity disorder in twins: a review of the case report literature. *J Sex Med* 2012; 9(3): 751-7.
- 21) Nakachi Y, Iseki M, Yokoo T, Mizuno Y, Okazaki Y. Gene expression profile of the neonatal female mouse brain after administration of testosterone propionate. *J Sex Med* 2015; 12(4): 887-96.
- 22) Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002; 12(6): 996-1006.
- 23) Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. *Ensembl* 2015. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(Database issue): D662-9.
- 24) Kerr SM, Taggart MH, Lee M, Cooke HJ. Ott, a mouse X-linked multigene family expressed specifically during meiosis. *Hum Mol Genet* 1996; 5(8): 1139-48.
- 25) Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet* 2001; 27(4): 422-6.

#### 研究成果リスト

#### 学会発表

- 1) 仲地 豊. 超列高速シーケンサーによる性同一性障害当事者ゲノムDNAをもちいた全エクソーム解析. *GID (性同一性障害) 学会第18回研究大会*, 2015年3月, 東京都千代田区
- 2) 仲地 豊, 金沢徹文, 伊関美緒子, 横尾友隆, 水野洋介, 康純, 米田 博, 岡崎康司. 性別違和(性同一性障害)関連遺伝子の探索: マウス発現解析とヒトエクソーム解析によるアプローチ. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015), 2015年12月, 兵庫県神戸市
- 3) 仲地 豊, 伊関美緒子, 横尾友隆, 水野洋介, 岡崎康司. 新生仔雌マウス脳での遺伝子発現解析による性別違和(性同一性障害)関連遺伝子の探索. 第35回日本性科学学会学術講演, 2015年10月, 埼玉県さいたま市

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 視蓋におけるセロトニン輸送体の機能解析と薬物スクリーニング系の確立

研究代表者 佐藤 智美 (医学部 解剖学・産婦人科)

## 緒言

脳の発生過程において、セロトニン(5-HT)は、神経伝達物質としてだけでなく、細胞増殖、神経細胞の分化、神経突起伸長、シナプス形成などの過程において重要な役割を果たすことが報告されている<sup>1)</sup>。セロトニンは、後生動物の主な系統群に広く存在することが知られている、進化的に非常に古くから保存されているモノアミンである<sup>2)</sup>。ヒト成体では、セロトニンの異常が、鬱病や不安障害、統合失調症などの精神疾患に関与することから、セロトニンの細胞外分泌量を制御するセロトニン輸送体(serotonin transporter, SERT)を標的とした選択的セロトニン再取り込み阻害剤(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)は、汎用性の高い向精神薬の一つとなっている。発生過程においても、セロトニン量の恒常性不全が、ヒト精神疾患の病理生理学に関与する可能性が示唆されている<sup>1)</sup>。しかし、脳の発生過程におけるセロトニンの役割と精神疾患発症との関係は、未だ明らかにされていない<sup>3)</sup>。

本研究は、硬骨魚類ゼブラフィッシュを用いて、発生過程の脳におけるSERTの機能を*in vivo*で明らかにし、脳の発生と機能への影響を個体レベルで解析するための新たなモデル系を確立することを目的とする。硬骨魚類は、分岐分類上、四肢動物の起源であり、哺乳類脳の中脳辺縁系以下の領域は、その構造と機能が保存されていることが報告されている。我々はこれまでに、UV感受性蛍光タンパク質Kaedeを全神経細胞で発現するトランスジェニック系統Tg(*huC:Kaede*)を作成することで、特定の神経回路や神経発生を可視化する実験系を確立し<sup>4,5)</sup>、網膜と視蓋の興奮性神経細胞が可視化されたTg(*brn3a-hsp70:GFP*)トランスジェニック系統と単一神経細胞標識システムを用いて、視蓋神経回路の投射パターンの形成と分子機構を明らかにしてきた<sup>6)</sup>。また、視蓋の脳室下帯において、神経前駆細胞から神経細胞の産生を制御する過程に、統合失調症の原因遺伝子の一つであるニューレグリン1とErbB4が関与することを明らかにした<sup>7)</sup>。本研究では、これまでに確立したゼブラフィッシュ視蓋における実験系を活用し、神経細胞の産生

と回路形成の両方で重要な役割を果たすセロトニン系に着目し、個体発生を通して統合的に解析可能な実験系を確立することで、セロトニン系を標的とした新たな薬物スクリーニング系を確立することを最終的な目的とする。

## 材料と方法

## 1. トランスジェニック系統の飼育・維持

ゼブラフィッシュは、28℃で、14時間/10時間の明暗周期で飼育した。トランスジェニック系統Tg(*brn3a-hsp70:GFP*)<sup>5)</sup>は、網膜と視蓋の神経細胞の発生を可視化するために使用し、Tg(*brn3c:Gal4;UAS:mCherry*)<sup>8)</sup>は、網膜神経節細胞の発生を可視化するために使用し、Tg(*huC:Kaede*)<sup>4)</sup>は、全神経細胞の発生を可視化するために使用した。

## 2. モルフォリーノオリゴヌクレオチドのインジェクション

ゼブラフィッシュ *sert* mRNA に対するアンチセンスモルフォリーノオリゴヌクレオチド(*slc6a4a* AMO)とコントロールの5-base mismatch MO(*slc6a4a* 5mis)は、1×Danieau buffer (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.6 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 5.0 mM HEPES pH 7.6)で0.5 mMに希釈し、1-4細胞期の胚にインジェクションを行った。

## 3. セロトニン輸送体阻害剤の処理

5 mMセロトニン輸送体阻害剤(SERT阻害剤)のストック溶液は、E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>)で50, 100, 200 μMに希釈した。授精後9時間胚はProtease (SIGMA P5147, 20 mg/ml E3 medium)に浸けて卵膜を除去後、0.1% DMSO溶液に、授精後30時間以降の胚はピンセットで卵膜除去後、2% DMSO溶液にそれぞれSERT阻害剤を加えたE3 medium中で飼育し、SERT阻害剤溶液は1日毎に新鮮な溶液と交換した。

## 結果

## 1. セロトニン輸送体の発現抑制

脳の発生過程において、SERTがどのような役割を担っているのかを明らかにするために、まず、全神経細胞でKaedeを発現するTg(*huC:Kaede*)

トランスジェニックシステムを用いて、アンチセンスモルフォリーノオリゴ (slc6a4a AMO) のインジェクションによる SERT の発現抑制を行った。Slc6a4a AMO をインジェクションした胚の視蓋では、放射状グリア細胞の自己増殖が起こっている授精後 24 時間で、胚全体の形態に大きな変化は見られなかったが、頭部が僅かに縮小しているのが観察された。

## 2. セロトニン輸送体阻害剤の処理

Slc6a4a AMO のインジェクションによる表現型が、SERT の発現抑制によるものであるかを検証するため、SERT 阻害剤による処理を行った。SERT の機能的阻害が、視蓋の神経回路形成にどのように影響するのかを検証するため、網膜と視蓋の神経細胞で GFP を発現する Tg (*brn3a-hsp70:GFP*) トランスジェニック胚を用いた。まず、授精後 6 時間からの原腸陥入後、頭部原基が顕著となる授精後 9 時間から 100  $\mu$ M SERT 阻害剤で処理すると、視蓋神経細胞が十分に発生する授精後 54 時間で、頭部が僅かに縮小し、視蓋で GFP を発現する神経細胞領域も僅かに減少しているのが観察された。50  $\mu$ M SERT 阻害剤処理においても、同様の傾向が見られた。一方、視蓋の脳室帯において放射状グリア細胞の増殖と神経前駆細胞の産生が盛んに行われている授精後 30 時間から、100  $\mu$ M SERT 阻害剤で処理すると、授精後 9 時間からの処理で観察された頭部の縮小と視蓋 GFP 陽性領域の減少は認められなかった。次に、授精後 30 時間から 200  $\mu$ M SERT 阻害剤で処理し、網膜軸索の投射と視蓋樹状突起の発達が盛んに行われている授精後 80 時間で観察すると、視蓋の GFP 陽性神経細胞領域が僅かに縮小する傾向が観察された。さらに、授精後 54 時間から 500  $\mu$ M SERT 阻害剤で処理すると、授精後 80 時間以降に致死となることが判明した。

## 3. 網膜視蓋神経回路における網膜軸索と視蓋樹状突起の選択的可視化

SERT の機能阻害による神経回路形成への影響をより詳細に解析するため、網膜軸索と視蓋樹状突起をそれぞれ区別して、同時に可視化可能なトリプルトランスジェニックシステム Tg (*brn3c:Gal4;UAS:mCherry;brn3a-hsp70:GFP*) を作成した。これまで用いていた Tg (*brn3a-hsp70:GFP*) システムは、網膜軸索と視蓋樹状突起の両方で GFP を発現するため、両者を区別することが難しかった。一方、Tg (*brn3c:Gal4;UAS:mCherry*) は、網膜神経節細胞でのみ転写活性化因子 Gal4 を発現するため、UAS 認識配列の下流で、網膜軸索を特異的に mCherry で標識することができ、同様に網膜神経節細胞選択的に任意の分子を発現させることも可能である。Tg (*brn3c:Gal4;UAS:mCherry;brn3a-hsp70:GFP*) を用いることで、網膜神経節細胞特異的に発現させた分子の、網膜軸索と視蓋神経細胞に対する影響を同時に解析することが可能となった。

## 考 察

本研究では、ゼブラフィッシュ胚を用いて、脳の発生における SERT の発現抑制と機能阻害による影響を解析した。SERT の発現抑制により、授精後 24 時間で頭部が僅かに縮小することから、SERT は、発生初期において、放射状グリア細胞の増殖に関与する可能性が示唆された。授精後 9 時間からの SERT 阻害剤処理によっても、SERT 発現阻害と同様の頭部の僅かな縮小が認められた。一方、授精後 30 時間からの阻害剤処理では、同様の表現型は認められなかったことから、SERT は、放射状グリア細胞から神経前駆細胞の産生ではなく、神経幹細胞を含む放射状グリア細胞の増殖に関与する可能性が示唆された。また、授精後 30 時間から SERT 阻害剤で処理すると、視蓋の神経細胞領域が僅かに縮小していたことから、SERT は、発生後期においては、神経前駆細胞から神経細胞の産生、または網膜視蓋神経回路の発達、或はその両方に関与している可能性が示唆された。発生過程において、ゼブラフィッシュ *sert* は、授精後 3 日目で視蓋前野間脳群 (pretectal diencephalic cluster) と、哺乳類脳と同様に縫線核に局所的に発現していることが報告されている<sup>9)</sup>。このような局所的発現を示す SERT が、どのように放射状グリア細胞の増殖や、視蓋神経細胞の産生、神経回路形成に関与し得るのか、セロトニンを分泌するセロトニン神経系の発達やセロトニン受容体の発現、分布なども考慮しながら、さらに詳細に解析する必要がある。

網膜視蓋神経回路では、網膜からのトポグラフィックな軸索投射パターンと視蓋神経細胞の樹状突起の発達が、視覚入力依存的に変化することが知られている。これまで、網膜軸索や視蓋樹状突起の発達を個別に解析した報告は多いが、網膜軸索と視蓋樹状突起の両方を同時に観察した例はあまりない。統合失調症などの精神疾患や自閉症などの発達障害では、機能的神経回路の入力と出力のバランスを表す感覚運動ゲーティング (sensorimotor gating) に異常を示すことが報告されており<sup>10)</sup>、神経回路の正常な機能を司る構造的基盤である回路形成における影響を検証する上で、網膜視蓋神経回路は、その規則的な投射パターンと詳細に解析された回路形成機構から、非常に優れたモデル系である。今後は、本研究で確立したトリプルトランスジェニックシステム Tg (*brn3c:Gal4;UAS:mCherry;brn3a-hsp70:GFP*) などを用いて、SERT 阻害剤の神経回路形成における影響とその作用機序を解析して行きたい。

## 引用文献

- 1) Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 1002-12.
- 2) Lillesaar C. The serotonergic system in fish. *J Chemical Neuroanat* 2011; 41: 294-308.

- 3) Homberg JR, Schubert D, Gaspar P. New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 60-5.
- 4) Sato T, Takahoko M, Okamoto H. HuC:Kaede, a useful tool to label neural morphologies in networks in vivo. *Genesis* 2006; 44: 136-42.
- 5) Aizawa H, Goto M, Sato T, Okamoto H. Temporally regulated asymmetric neurogenesis causes left-right difference in the zebrafish habenular structures. *Dev Cell* 2007; 12: 87-98.
- 6) Sato T, Hamaoka T, Aizawa H, Hosoya T, Okamoto H. Genetic single-cell mosaic analysis implicates ephrinB2 reverse signaling in projections from the posterior tectum to the hindbrain in zebrafish. *J Neurosci* 2007; 27: 5271-9.
- 7) Sato T, Sato F, Kamezaki A, Sakaguchi K, Tanigome R, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A. Neuregulin 1 Type II-ErbB Signaling Promotes Cell Divisions Generating Neurons from Neural Progenitor Cells in the Developing Zebrafish Brain. *PLoS One* 2015; 10: e0127360.
- 8) Xiao T, Baier H. Lamina-specific axonal projections in the zebrafish tectum require the type IV collagen Draqnet. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1529-37.
- 9) Norton WH, Folchert A, Bally-Cuif L. Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain. *J Comp Neurol* 2008; 511: 521-42.
- 10) Geyer MA. The family of sensorimotor gating disorders: comorbidities or diagnostic overlaps? *Neurotox Res* 2006; 10: 211-20.

#### 研究成果リスト

#### 学会発表

- 1) Sato T, Sato F, Kamezaki A, Sakaguchi K, Tanigome R, Kawakami K, Sehara A. NRG1-ErbB4 signaling promotes generation of neurons from neural progenitor cells in the developing brain. 第58回日本神経化学会大会, 平成27年9月, 大宮
- 2) 佐藤智美, 佐藤文規, 亀崎青沙, 坂口和弥, 谷米竜馬, 梶原 健, 永島雅文, 川上浩一, 瀬原淳子. ニューレグリン-ErbBシグナルは脳室下帯において基底前駆細胞から神経細胞を生み出す分裂を促進する, 第38回日本分子生物学会年会 (BMB2015), 平成27年12月, 神戸