

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

丸木記念特別賞受賞

エストロゲン受容体と関連因子による代謝調節の解明と  
がん増殖における役割

研究代表者 池田 和博 (ゲノム医学研究センター)

研究分担者 井上 聡\*

ステロイドホルモンであるエストロゲンは転写因子として機能するエストロゲン受容体(ER)を介して標的遺伝子の発現を調節することにより生理的ならびに病態生理的な作用を発揮している<sup>1)</sup>。エストロゲンは脂質および骨の代謝と関連しており、エストロゲン欠乏が閉経後女性の動脈硬化、肥満ならびに骨粗鬆症を促進することが知られているがメカニズムの解明は十分ではなく、その他のエネルギー代謝、糖代謝などの各種代謝との相互作用も想定される。また、エストロゲンは乳癌の増殖・進展に深く関与しており、抗エストロゲン製剤であるタモキシフェンやアロマターゼ阻害剤が乳がんの内分泌療法として臨床応用されており、治療にも関係している<sup>2)</sup>。がん細胞における代謝調節に関しては、解糖系の亢進が以前より知られていたのに加え、近年、アミノ酸代謝、脂質代謝、ペントースリン酸経路などのがん特異的な調節の存在が示唆され始めている<sup>3)</sup>。しかしながら、がん細胞における代謝の制御とエストロゲンの関係に関しては、ほとんど明らかになっていない。一方、核内受容体のなかでERと最も高い保存性を有するエストロゲン関連受容体(ERR)が、ミトコンドリアの生合成、エネルギー代謝、骨形成、乳癌、前立腺癌に関わることが明らかになり注目されている<sup>4)</sup>。ERRは、ERと同様にエストロゲン応答配列(ERE)に結合できることから、ERとERRの相互作用が生理的・病態生理的機能を媒介すると想定されるが、その詳細は未解明であり、これら核内受容体の転写制御機構とその標的遺伝子の機能解明が不可欠である。

我々は、エストロゲンの生理作用ならびに病態における役割の解明を目指し、独自にエストロゲン標的遺伝子を複数同定し、発現制御・機能解析を行ってきた<sup>5-7)</sup>。なかでも、COX7RP(cytochrome c oxidase subunit. 7a related polypeptide)は、アミノ酸配列がミトコンドリア内膜に局在するシトクロムcオキシダーゼ(COX: 複合体IV)のCOX7Aサブユニットと高い相同性を有している<sup>5)</sup>。COXは、ミトコンドリア電子伝達系の最終的な電子受容

体として酸素を還元して水分子を生成する反応に関わる酵素であり、細胞のエネルギー産生に重要な役割を担っている。我々はCOX7RPが複合体IVの機能と関連する可能性を想定し解析を進めた。

はじめに、COX7RPの生体における作用を解明するため、*Cox7rp*ノックアウト(KO)マウスを作製した<sup>8)</sup>。作製した*Cox7rp*KOならびに野生型(WT)のマウスから胎児繊維芽細胞(MEF)を初代培養し、ミトコンドリアを分離してCOX活性とATP産生量を測定したところ、*Cox7rp*KO MEFで有意に低下していることが明らかになった。また、これらMEFにおいて、リンゴ酸+ピルビン酸、コハク酸、人工的な電子供与体をそれぞれ電子伝達系の複合体I、複合体II、複合体IVの基質として添加し、酸素消費量を測定して呼吸活性を定量したところ、*Cox7rp*KO MEFでいずれの呼吸基質を利用したときも呼吸活性が低下していることが判明した。さらに、細胞増殖能を解析したところ、*Cox7rp*KO MEFはWT MEFと比較して増殖能が低下していた。COX7RPの過剰発現による影響を個体レベルで解析するため、COX7RPを過剰発現するトランスジェニックマウス(COX7RP-Tg)を作製し、同様にMEFの初代培養を用いて細胞増殖能を解析したところ、COX7RP-Tg MEFはWT MEFよりも細胞増殖能が亢進していた。これらの結果から、COX7RPはミトコンドリアの呼吸活性とエネルギー産生を促進する作用を有し、細胞増殖を亢進することが明らかになった。

続いて、エネルギー産生が重要な機能を有する骨格筋の表現型について*Cox7rp*KOならびにCOX7RP-Tgマウスを用いて解析した。これら遺伝子改変マウスの大腿四頭筋におけるCOX活性を細胞化学的手法により検討したところ、*Cox7rp*KOマウスで減少し、COX7RP-Tgマウスで増強していることが示された。また、トレッドミルを用いて強制的に運動させ、疲労を呈するまでの運動持続時間の解析を行ったところ、*Cox7rp*KOマウスは運動持続時間が減少し、反対に、COX7RP-Tgマウスでは増加することが判明した。従って、COX7RPは骨格筋のエネルギー代謝を

\*ゲノム医学研究センター

制御し、運動持続能に関与していることが示された。

さらに、体温調節に必要な熱産生組織である褐色脂肪細胞における表現型について解析を行った。褐色脂肪組織のミトコンドリアでは、脱共役タンパク質であるUCP1が発現しており、ミトコンドリア内膜での酸化的リン酸化反応を脱共役させ、エネルギーを熱として放出する作用を有している。*Cox7rp*KOマウスの褐色脂肪組織を解析したところ、組織全体の肥大化とともに、脂肪細胞内に蓄積されている油滴が大きいことが明らかとなり、機能不全の状態であることが示唆された。そこで、*Cox7rp*KOマウスを寒冷に暴露したところ、低体温症を呈しやすことが判明した。従って、COX7RPは褐色脂肪組織において、熱産生に関与することが明らかになり、脂質代謝における影響が示唆された。

次に、ミトコンドリア呼吸鎖のスーパー複合体形成におけるCOX7RPの役割をBlue native-polyacrylamide electrophoresis (BN-PAGE) の後にSDS-PAGEを行う2次元電気泳動を用いて解析した。マウス骨格筋から調整したミトコンドリアをジギトニンで可溶化し、2次元電気泳動を行った後、複合体I, III, IVのサブユニットに対する抗体とともにCox7rpに対する抗体などを用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、Cox7rpはI/III<sub>2</sub>/IV<sub>n</sub>スーパー複合体に存在することが示された。一方、*Cox7rp*KOマウスの骨格筋には、I/III<sub>2</sub>/IV<sub>n</sub>スーパー複合体が減少し、Cox4のスーパー複合体への取り込みも減少していることが判明した。従って、COX7RPの作用分子メカニズムとして、ミトコンドリア呼吸鎖のスーパー複合体形成を促進する機能を有することが明らかになった。

*Cox7rp*KOおよびCOX7RP-Tgマウスの解析は、エストロゲン応答遺伝子COX7RPによるミトコンドリア呼吸鎖スーパー複合体制御の生体における機能を明らかにするために有用であり、これら遺伝子改変マウスを駆使することにより、エストロゲン作用の疾患・がんにおける意義を明らかにできると考えられた。特に、各種代謝調節(糖代謝、脂質代謝、骨代謝など)におけるエストロゲンの作用とミトコンドリアの機能との関連を解明する研究は今後の課題であり、COX7RPの機能解明が有用であると考えられた。

エストロゲンの骨における作用として、エストロゲンは骨芽細胞および破骨細胞を標的としていることが従来の研究から示されている。エストロゲンは、骨芽細胞に対して直接的に作用し分化や増殖を促進することや、RANKLのデコイ受容体として作用するOsteoprotegerin (OPG) の発現を促進し、破骨細胞の分化・活性を抑制することが報告されている。一方、破骨細胞においては、エストロゲンはHIF1 $\alpha$ を抑制することによって骨吸収を抑制することや、骨吸収に関与するサイトカイン(IL-6やTNF $\alpha$ など)の発現を抑制することなどが我々の含むグループより報告されている。これらのメカニズムは、閉経後のエストロゲン欠乏による骨粗鬆症の病因と考えられ

ている。また、エストロゲンは生活習慣病との関係が注目されている。特に、閉経後のエストロゲン低下はメタボリック症候群と関連し、インスリン抵抗性、肥満、脂肪組織の増大、高脂血症、動脈硬化などの原因となり、エストロゲンシグナルがそれら生活習慣病の治療に役立つ可能性が想定されている。COX7RPは骨芽細胞、脂肪細胞をはじめ各組織での発現が認められることから、このようなエストロゲンの多彩な機能を媒介する可能性が考えられた。

エストロゲンはエストロゲン受容体(ER)陽性の乳がんや子宮がんの増殖・進展に関与している。特に、乳癌では抗エストロゲン剤やアロマターゼ阻害剤を用いた内分泌療法が臨床で広く行われている。しかしながら、内分泌治療薬の長期投与によって耐性を獲得するがんが生じることが問題となっており、このような癌に対しては有効な治療方法が存在しない。加えて、乳癌の中にはもともとERを発現していないものが存在していることや、子宮がんでは内分泌療法が奏効する例が少ないなど、ホルモン依存性と抵抗性のメカニズムは、ホルモン依存性がんの解明すべき問題である。ERは細胞核内に存在するリガンド依存性の転写因子であり、ゲノム中のエストロゲン応答配列(ERE)に結合してその近傍の標的遺伝子の発現量を直接制御することによりエストロゲンの作用を媒介している。ERと相同性が最も高い核内受容体であるエストロゲン関連受容体(ERR $\alpha$ )は、EREと結合して転写を調節することが知られている。ERRはエネルギー代謝に関わるミトコンドリア生成や脂肪酸 $\beta$ 酸化などを促進する転写因子として知られている一方で、乳癌の半数以上で発現しており、予後不良のバイオマーカーとして報告されている。我々は、COX7RP遺伝子に存在するEREを同定しており、ERによる転写制御を受けていることを確認している。従って、COX7RPはERとERRの両者の核内受容体によって制御される可能性が考えられ、エネルギー代謝・脂質代謝・糖代謝ならびにがんとの関連を明らかにする標的として期待された。

## 参考文献

- 1) Muramatsu M, Inoue S. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:1-10.
- 2) Huang WY, Newman B, Millikan RC, Schell MJ, Hulka BS, Moorman PG. Hormone-related factors and risk of breast cancer in relation to estrogen receptor and progesterone receptor status. *Am J Epidemiol* 2000;151:703-14.
- 3) Chen JQ, Russo J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826:370-84.
- 4) Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Shimada N, Ishida T, Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H. Estrogen-related

receptor alpha in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Res* 2004;64:4670-6.

- 5) Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M. Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol* 1998;18:442-9.
- 6) Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 2002;417:871-5.
- 7) Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*. 2007;446:916-20.
- 8) Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, Shimokata K, Inoue S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat Commun* 2013;4:2147.

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) 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-1 deficient mice display bleeding diathesis and short life span. *PLoS ONE* 2014;9:e88643.
- 2) Yamaga R, Ikeda K, Boele J, Horie-Inoue K, Takayama K, Urano T, Kaida K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Ouchi Y, de Hoon M, Inoue S. Systemic identification of estrogen-regulated genes in breast cancer cells through cap analysis of gene expression mapping. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;447:531-6.
- 3) Boele J, Persson H, Shin JW, Ishizu Y, Newie I, Søkilde R, Hawkins SM, Coarfa C, Ikeda K, Takayama K, Horie-Inoue K, Ando Y, Burroughs AM, Sasaki C, Suzuki C, Sakai M, Aoki S, Ogawa A, Hasegawa A, Lizio M, Kaida K, Teusink B, Carninci P, Suzuki H, Inoue S, Gunaratne P, Rovira C, Hayashizaki Y, de Hoon M. PAPD5-mediated 3'adenylation and subsequent degradation of oncomiR miR-21 is disrupted in proliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:11467-72.
- 4) Maruyama Y, Miyazaki T, Ikeda K, Okumura T, Sato W, Horie-Inoue K, Okamoto K, Takeda S, Inoue S. Short hairpin RNA library-based functional screening identified ribosomal protein L31 that modulates prostate cancer cell growth via p53 pathway. *PLoS ONE* 2014;9:e108743.
- 5) Miyazaki T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Amyloid precursor protein regulates migration and metalloproteinase gene expression in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;452:828-33.

- 6) Miyazaki T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Kondo T, Takahashi S, Inoue S. EBAG9 modulates host immune defense against tumor formation and metastasis by regulating cytotoxic activity of T lymphocytes. *Oncogenesis* 2014;3:e126.
- 7) 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.
- 8) Azuma K, Shiba S, Hasegawa T, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Amizuka N, Inoue S. Osteoblast-specific  $\gamma$ -glutamyl carboxylase-deficient mice display enhanced bone formation with aberrant mineralization. *J Bone Miner Res* (in press).
- 9) Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Analysis of TFRNs associated with steroid hormone-related cancers. *Methods Mol Biol* 2014;1164:197-209.
- 10) Ujihira T, Ikeda K, Suzuki T, Yamaga R, Sato W, Horie-Inoue K, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T, Okamoto K, Takeda S, Inoue S. MicroRNA-574-3p, identified by microRNA library-based functional screening, modulates tamoxifen response in breast cancer. *Sci Rep* 2015;5:7641.
- 11) Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Identification of estrogen-responsive genes based on the DNA binding properties of estrogen receptors using high-throughput sequencing technology. *Acta Pharmacol Sin* 2015;36:24-31.

### 学会発表

- 1) 池田和博, 氏平崇文, 丸山洋二郎, 堀江公仁子, 井上 聡. 乳がん細胞ならびに前立腺がん細胞の内分泌療法耐性に関わるシグナル経路の解析, 第6回日本RNAi研究会, 2014年8月28-30日, 広島市
- 2) Shiba S, Azuma K, Hasegawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Amizuka N, Inoue S. Vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase regulates bone formation and glucose metabolism. 24th NZBMS Annual Scientific Meeting, September 7-10 2014, Queenstown, New Zealand.
- 3) 鈴木佐和子, 池田和博, 井上 聡, 鈴木 稊, 菅野純夫, 横手幸太郎, 田中知明. ミトコンドリア分子GLS2のヒトES/iPS細胞におけるグルタミン代謝を介した幹細胞制御機構, 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25-27日, 横浜市
- 4) 柴祥子, 池田和博, 堀江公仁子, 井上 聡. COX7RPは動物個体レベルで糖・脂質代謝を調節する, 第87回日本生化学会大会, 2014年10月15-18日, 京都市
- 5) 堀江公仁子, 池田和博, 井上 聡. 乳がんの病態進行にかかわるアンチセンス長鎖非コードRNAの同定と

- 機能解析, 第 22 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 2014 年 11 月 3 日, 東京都
- 6) 池田和博, 堀江公仁子, 井上 聡. エストロゲン応答遺伝子 COX7RP の骨における生体機能, 第 22 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 2014 年 11 月 3 日, 東京都
- 7) 池田和博, 堀江公仁子, 井上 聡. 乳がん細胞の内分泌療法耐性に関わるマイクロ RNA とその標的の探索ならびに機能解析, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25-27 日, 横浜市
- 8) 奥村俊之, 丸山洋二郎, 宮崎利明, 池田和博, 佐藤 航, 堀江公仁子, 岡本康司, 竹田 省, 井上 聡. RPL31 は p53 タンパク質の分解を制御することによってビカルタミド耐性前立腺がん細胞の増殖に関与する, 第 15 回関東ホルモンと癌研究会, 2015 年 1 月 31 日, 東京都
- 9) 池田和博. 生体ならびに乳癌におけるエストロゲン応答因子の探索と機能解析, 埼玉医科大学国際医療センター包括的がんセンター教育カンファレンス, 2015 年 2 月 23 日, 日高市

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

関口記念特別賞受賞

## 新生児慢性肺疾患の感受性遺伝子解析に関する研究

研究代表者 小川 亮（総合医療センター 小児科）

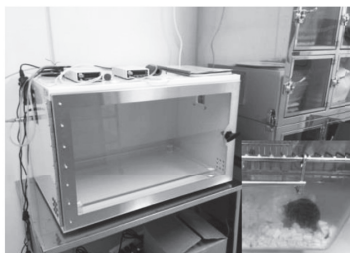
## 緒 言

新生児慢性肺疾患 (chronic lung disease, 以下CLD) は「先天奇形を除く肺の異常により酸素投与を必要とするような呼吸窮迫症状が新生児期に始まり日齢28を超えて続くもの」である。CLDは未熟児の合併症の中でも最も重篤なもののひとつであり、しばしば退院後も長期間にわたって呼吸機能に問題を残す。めざましい周産期医療の進歩に関わらず、CLDの発症率には変化がなく、また有効な治療法はない。CLDは未熟性・高濃度酸素暴露・胎内感染・機械的人工呼吸管理等の多因子による疾患であるが、近年双生児研究により、遺伝の関与も示唆されている。今回われわれは、①高濃度酸素暴露CLDマウスモデル肺の網羅的遺伝子発現解析を行いCLD疾患関連遺伝子候補を同定することと、②CLDの発症・重症化に関連する遺伝子の遺伝子多型解析を行うことを目的とした。

## 対象と方法

## 1. 遺伝子発現解析

マウスはC57BL/6 マウスを用いた。生後12時間以内の新生仔マウスに95%酸素を96時間(4日間)動物チャンバー内で暴露し、CLDマウスモデルを作製した(図1)。3日間ルームエアで回復させた日齢7のマウスから肺を摘出し、mRNAを抽出した。microarrayを用いて網羅的に遺伝子発現解析を行った。コントロールはルームエアで飼育した日齢7マウスとした。同定した遺伝子の発現量はqPCRを用いて確認した。



Animal chamber  
O<sub>2</sub> controller  
CO<sub>2</sub> controller

図1. 動物チャンバー。動物チャンバー内で新生仔マウスに対して95%酸素を96時間暴露する。

## 2. 遺伝子多型解析

両親へのインフォームドコンセント後、在胎期間32週未満かつ出生体重1250g未満の早産・低出生体重児から末梢血2mLを採取した。採血はEDTA入り採血管に行い冷蔵庫保存した。Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いてDNAを抽出し、注目する遺伝子 hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (以下Hapln1) の遺伝子多型をTaqMan® SNP Genotyping Assaysを利用して解析した。

## 結 果

## 1. 遺伝子発現解析

生後12時間以内の新生仔マウスに95%酸素を96時間暴露し、CLD動物モデルを作製した。96時間以降はルームエアで飼育した。新生仔期高濃度酸素暴露後、ルームエア下でリカバリーさせた日齢7のマウス肺を用いて遺伝子発現解析を行った。ルームエア下で7日間飼育したマウス肺をコントロールとした。コントロールと比較して肺で2倍以上有意に発現量の異なる遺伝子をスクリーニングし、5つの遺伝子を同定した(図2, 図3)。同定した5つの候補遺伝子の中から、細胞外基質で重要な役割を果たし、その欠損マウスは生後すぐ呼吸不全で死亡し、日本人の遺伝子多型が報告されているHapln1 遺伝子に注目し、以降の解析を行った。まず、microarrayの結果の妥当性を確認するため、Hapln1 の発現量をqPCRを用いて確認した。microarrayの結果と同様に高濃度酸素暴露群ではコントロール群と比較して、Hapln1 遺伝子の発現量が2倍以上有意に増加していた(図4)。次にHapln1 遺伝子の発現量を同様にqPCRで時系列に定量したところ、Hapln1 遺伝子発現量は高濃度酸素暴露後の回復期にコントロールと比較して有意に上昇し、この有意差は成獣期まで持続した(図5)。

## 2. 遺伝子多型解析

埼玉医科大学総合医療センターおよび埼玉医科大学の倫理委員会の承認を得て、研究を開始した。対象患児の両親の同意を得た後、患児18人から末梢血2mLを採取した。末梢血全血からキット(Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega)を用いてゲノムDNAを抽出し、

Hapln1 の遺伝子多型をタイピングした (図 6, 図 7). 現在, 症例数を増やして, Hapln1 遺伝子多型と CLD の発症・

重症度との関係を解析中である.

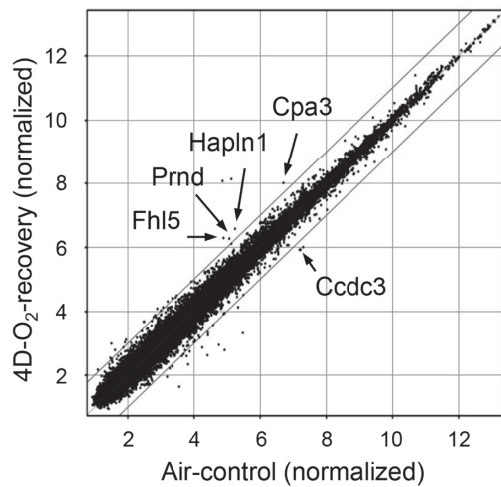


図 2. 遺伝子発現解析 (マウス肺). 両群間 (O<sub>2</sub> 対 Air) で有意に 2 倍以上発現量の異なる遺伝子 5 つを同定した.

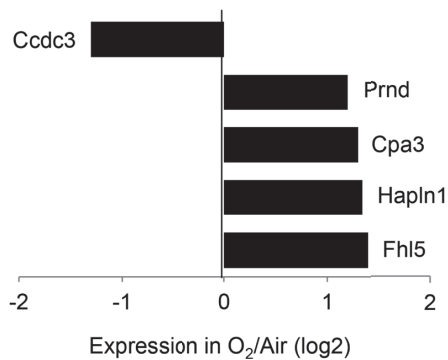


図 3. 候補遺伝子. 候補遺伝子の発現量の比 (O<sub>2</sub>/Air).

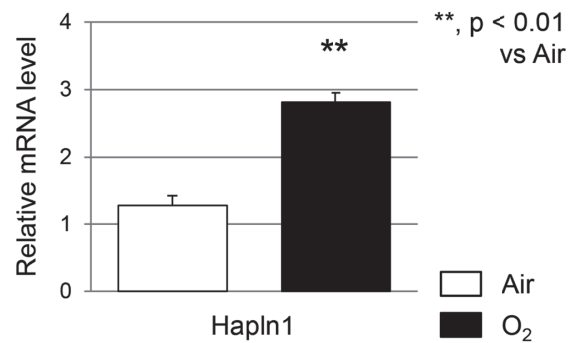


図 4. Hapln1 遺伝子発現量の比較. 高濃度酸素暴露群では Hapln1 遺伝子発現量がコントロール群と比較して有意に増加した.

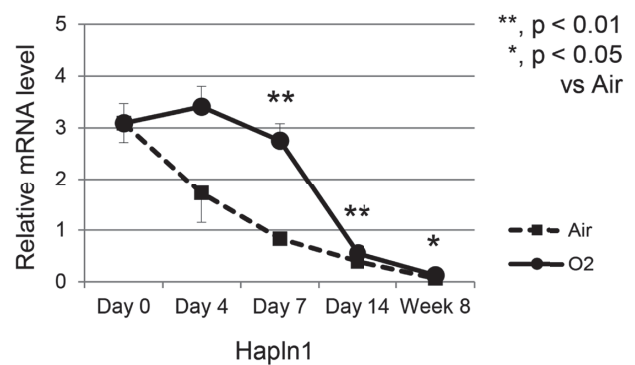


図 5. Hapln1 遺伝子発現の時間的推移. コントロール群と比較して, 高濃度酸素暴露群では暴露後回復期に Hapln1 遺伝子の発現量が増加し, その増加は成獣期まで続く.

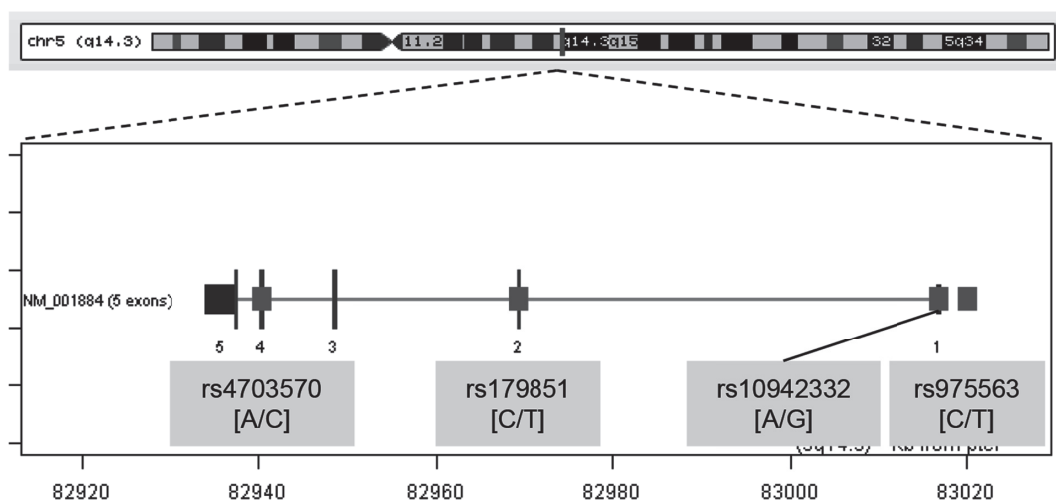


図 6. Hapln1 遺伝子と同遺伝子内 SNP 遺伝子座.

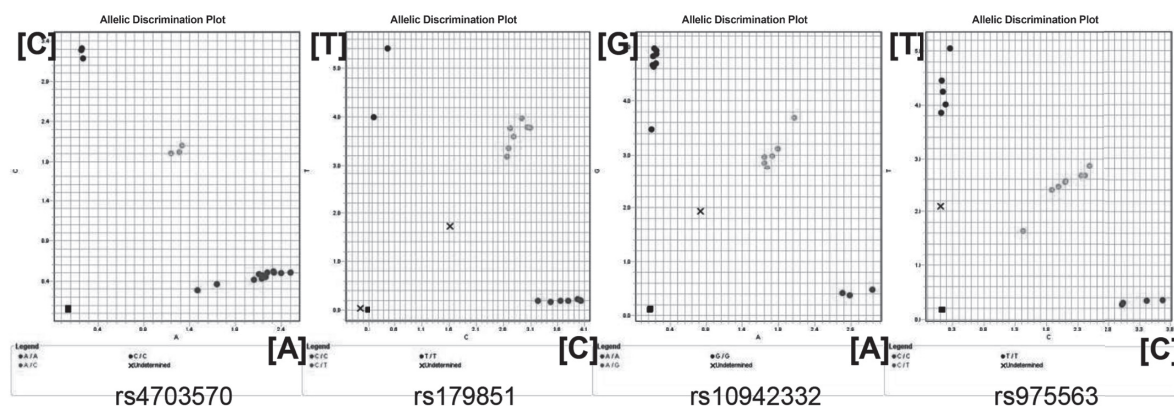


図 7. Hapln1 遺伝子多型タイピング.

## 考 察

CLDは、めざましい新生児医療の発展にもかかわらず、未だ早産・低出生体重児にとって高頻度で重篤な合併症の一つであり、神経学的後遺症を残す。出生体重 1000 g未満の超低出生体重児に限っては50%以上が罹患する。中でも近年、新生児期のみならず、幼・小児期にも呼吸器合併症が引き続くことが問題となっており、呼吸器感染症や喘息様疾患で頻回の再入院を必要とする。この症状は思春期・青年期でも引き続き、長期の薬剤によるコントロールを必要とすることもあり、医療経済学上大きな問題となっている。

CLDの予後判定や治療法の開発のためには新規バイオマーカーの同定が必須である。今回われわれは、CLDマウスモデルの回復期肺を用いた遺伝子発現解析を行い、マウス肺でコントロールと比較して有意に発現量が増加・低下する遺伝子を5つ同定した。その中から、CLDの病態に重要である細胞外基質蛋白であり、その遺伝子欠損マウスは生直後呼吸不全で死亡し、日本人の遺伝子多型も報告されているHapln1に注目し、以降の解析を行った。microarrayを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果と同様、qPCRによりHapln1遺伝子発現はCLDマウスモデルの回復期に増加し、その増加は成獣期まで持続した。

さらに、CLDは多因子疾患であり、過去の双生児研究等により遺伝もCLDの病因の一つとして報告されている。現在、多施設共同研究を開始し、患者血液よりgenomic DNAを収集中である。CLD動物モデルで候補遺伝子として同定され、日本人での遺伝子多型もすでに報告されているHapln1を最初の候補遺伝子として遺伝子多型解析を行っている。

## 結 論

• CLD動物モデルを用いて、CLD回復期に重要な遺伝子Hapln1を同定した。

• 遺伝子多型解析のため患者血液よりgenomic DNAを収集し、Hapln1遺伝子多型を解析中である。

## 研究成果リスト

### 論文発表

- 1) Ogawa R, Mori R, Namba F, et al. Drug therapies in bronchopulmonary dysplasia in Japan: questionnaire survey. *Pediatr Int* 2015;57:189-92.

### 学会発表

- 1) Ogawa R, Mori R, Sako M, et al. Drug therapies for bronchopulmonary dysplasia in Japan: A questionnaire survey, Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting, May 2014, Vancouver, Canada
- 2) Ito M, Arai Y, Ogawa R, et al. Genetic ablation of the Bach1 gene upregulates HO-1 and IL-6 expression in the newborn lung exposed to hyperoxia, Pediatric Academic Societies Annual Meeting, May 2015, San Diego
- 3) Namba F, Ito M, Ogawa R, et al. Long-term effects on lung function and identification of a novel biomarker, HAPLN-1, in neonatal hyperoxic lung injury in mice, Pediatric Academic Societies Annual Meeting, May 2015, San Diego
- 4) 小川 亮, 森臨太郎, 佐古まゆみ, 他. わが国における新生児慢性肺疾患薬物療法: アンケート調査から, 第50回日本周産期・新生児医学会, 2014年7月, 浦安
- 5) 難波文彦, 小川 亮, 伊藤誠人, 他. 動物モデルを用いた新生仔期高濃度酸素暴露の長期的影響と肺傷害修復過程における重要分子の同定, 第59回日本未熟児新生児学会, 2014年11月, 松山
- 6) 小川 亮, 伊藤誠人, 飯田浩一, 他. 新生児慢性肺疾患に対するシベレスタットナトリウム投与の有効性: 後方視的多施設共同研究, 第51回日本周産期・新生児医学会, 2015年7月, 博多

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

関口記念特別賞受賞

## 特発性脳内出血の血腫増大に対する臨床的予測モデルの作成

研究代表者 竹田 理々子 (国際医療センター 脳神経外科)

## 緒 言

脳内出血患者において急性期の血腫増大がmorbidityやmortalityの原因であることは良く知られている<sup>1)</sup>。急性期の血腫増大は主に脳内出血発症後6時間以内に起こり<sup>2-5)</sup>、その予見や予防は脳内出血の超急性期治療における重要な課題である。これまでに血腫増大に関連する種々の予測因子、即ち、血腫量<sup>6)</sup>、CT angiography上の“spot sign”の存在<sup>7)</sup>、血腫densityがheterogeneity<sup>8)</sup>、血腫形状が不整<sup>5)</sup>、発症から初回CTまでが短時間<sup>5,6)</sup>、大酒家<sup>5)</sup>、抗凝固薬内服<sup>9,10)</sup>、血小板活性の低下<sup>11)</sup>、interleukin-6の上昇<sup>12)</sup>などが報告されてきた。しかし文献ごとに有意となる予測因子が異なり一定しない<sup>13)</sup>。加えて、脳内出血急性期の積極的な降圧についても意見が分かれるところである。高血圧治療ガイドライン2014 (JSH2014)は、2010年版米国脳卒中協会のガイドラインに準じて、超急性期、急性期の脳内出血においては収縮期血圧180 mmHgまたは平均血圧130 mmHgを超える場合を降圧対象としているが、近年では脳出血急性期に収縮期血圧を140 mmHg未満に低下させた群で180 mmHg未満の群と比較して機能転帰が良好であることが報告された<sup>14)</sup>。しかし、急性期血腫増大の予測因子としての収縮期血圧のカットオフ値や血圧コントロールについては未だ議論中である<sup>13)</sup>。このような背景から本研究の目的は、脳内出血の超急性期における、臨床的な血腫増大予測因子を明らかにすることである。

## 症例, 方法

埼玉医科大学国際医療センターに発症6時間以内に搬送された、脳基底核部出血患者連続201例を対象としretrospectiveに検討した。発症後6時間以上経過している症例、来院時深昏迷 (Glasgow Coma Scale (GCS)=3)、二次性脳内出血 (破裂脳動脈瘤、血管奇形、もやもや病など)、来院直後に血腫除去術施行例、24時間以内のfollow up画像のない症例は除外した。初回CTと発症24時間以内に施行された2回目のCTを比較し、33%または12.5 ml以上の血腫量増大を血腫増大群とした。14個の臨床的・画像的評価項目 (年齢、性、来院時Glasgow Coma Scale (GCS)、高血圧既往、糖尿病既往、脳梗塞既往、脳

出血既往、抗血小板剤内服有無、抗凝固剤内服有無、血腫のdensity (heterogeneityか否か)、血腫形状 (irregularityか否か)、血腫量、脳室内出血の有無) に、2つ (来院時と来院1.5時間後) の収縮期血圧 (systolic blood pressure: SBP) を加えた16項目について、血腫増大群と血腫非増大群で統計学的に比較・検討した。血腫量は5 mm厚スライスで撮影したCT上でABC/2 method<sup>16)</sup>を用いて計測した。また初回CT上の血腫がheterogeneity, irregularityかの判断は既知の報告に従って行った<sup>8)</sup>。

統計学的解析ではThe unpaired t-test, the Mann-Whitney's U test, the chi-square testを用いて16因子の比較を行った。P<0.05を統計学的有意差ありとした。またReceiver operating characteristic (ROC) 分析を行い、もっとも高いYouden index<sup>15)</sup>の得られる値をカットオフ値と決定した。更にステップワイズ変数選択法を用いて多重ロジスティック回帰分析を行い、血腫増大を予測するlogistic regression modelを作成した。

全ての統計学的解析はSAS JMP 9.0.3 (SAS Institute Inc., NC, USA) とMedcalc for Windows 12.1.4 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) を用いて行われた。

尚、本研究は埼玉医科大学国際医療センター IRBにて承認を得ているものである。(承認番号: 12-038)

## 結 果

201例中、血腫増大群は15例であった (7.0%)。血腫増大群、非増大群の2群間で16個の因子で単変量解析を行った結果では、5つの因子 (来院時GCS、血腫heterogeneity、血腫irregularity、血腫量 (hematoma volume: HV)、1.5時間後収縮期血圧 (1.5h-SBP)) で有意差を認めた (Table 1)。HVと1.5h-SBPの値を二値化すべく、血腫増大に対するカットオフ値をそれぞれ算出したところ、HVで16 ml、1.5h-SBPで160 mmHgであった (HV: AUC (the area under the curve) = 0.75, 1.5h-SBP: AUC=0.79)。これらのカットオフ値としたときの感度、特異度は、hematoma volume カットオフ値16 mlのとき、感度66.7%、特異度82.8%、1.5h-SBPカットオフ値160 mmHgのとき感度80.0%、特異度63.9%であった。単変量解析で示した16個の因子のうち、信頼できる次の8個の因子

(年齢, 性, 高血圧,  $HV > 16$ ,  $1.5h\text{-SBP} > 160$ , 脳室内穿 破, hematoma heterogeneity, hematoma irregularity) をロジスティック回帰モデルに用いる説明変数の候補とした. これらの粗オッズ比および強制投入時の調整オッズ比を求め, さらにステップワイズ変数選択法を行った. その結果, 血腫増大のoutcomeに対して最終的に① $HV > 16$  ([OR]=5.052, 95%CI 1.325-21.356,  $p=0.0181$ ), ② $1.5h\text{-SBP} > 160$  ([OR]=8.765, 95%CI 2.328-44.564,  $p=0.0009$ ), ③hematoma heterogeneity (HH) ([OR]=7.810, 95%CI 1.906-40.230,  $p=0.0039$ ) の3因子がロジスティック回帰モデルに用いる説明変数として残った (Table2). これら3つの説明変数から成る logistic regression model を作成すると, 陽性を+1, 陰性を-1として全ての因子が陽性的場合, 即ち3変数モデル ( $HV > 16$ , HH,  $1.5h\text{-SBP} > 160$ ) = (1,1,1) のとき,  $\log(p/1-p) = -2.545 + 0.810 \times [HV > 16] + 1.028 \times [HH] + 0.185 \times [1.5h\text{-SBP} > 160]$   $p=0.59$  となった. この時の陽性反応的中度は  $6/12=0.5$  であった. また  $HV > 16$ , HH の2因子が陽性的場合, 即ち同様に陽性を+1, 陰性を-1として2変数モデル ( $HV > 16$ , HH) = (1,1) のとき,  $\log(p/1-p) = -2.393 + 0.694 \times [HV > 16] + 1.072 \times [HH]$ ,  $p=0.35$  となった.

同様にこの時の陽性反応的中度は  $9/26=0.35$  であった. この2つのロジスティック回帰モデルに対してROC分析を行うと, 3変数 ( $HV > 16$ , HH,  $1.5h\text{-SBP} > 160$ ) モデルのAUC=0.91, 2変数 ( $HV > 16$ , HH) モデルのAUC=0.84 であった (Fig. 1).

## 考 察

脳内出血は神経救急疾患であり, 救急外来を含めた臨床現場で迅速に, 判断・治療がなされる必要がある. 今回得られた血腫増大予測のためのロジスティック回帰モデルは, 血腫量 (HV), 血腫性状 (HH), 来院後1.5時間後の収縮期血圧 ( $1.5h\text{-SBP}$ ) という, 神経救急の現場で簡便に得られ, かつ必ず評価される3つの変数からなっている. また救急外来の現場で連続変数を用いてロジスティック回帰モデルから確率を算出するのは煩雑であるが, HVと $1.5h\text{-SBP}$ の二値化を行うことにより, 用いる指標が二値となりすべて陽性かどうかを短時間で容易に判断可能となっている.

今回のこの2つのロジスティック回帰モデルを臨床現場にあてはめると, まず来院時の頭部CT所見から2変数モ

**Table 1.** Clinical characteristics of patients with and without hematoma expansion.

| Variable                                         | Patients with<br>hematoma expansion<br>(N=15) | Patients without<br>hematoma expansion<br>(N=186) | P value          |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------|
| Age (years), mean, SD                            | 62.3+/-10.0                                   | 65.2+/-11.1                                       | 0.331            |
| Gender, male, n (%)                              | 5(33)                                         | 67(36)                                            | 0.835            |
| GCS at admission, median (IQR)                   | 11 (10-14)                                    | 14 (13-15)                                        | <b>0.005</b>     |
| Hypertension, n (%)                              | 9 (60)                                        | 124 (66)                                          | 0.599            |
| Diabetes mellitus, n (%)                         | 1(6.7)                                        | 21 (11.3)                                         | 0.581            |
| Kidney disease, n (%)                            | 2 (13)                                        | 7 (3.8)                                           | 0.085            |
| Stroke, n (%)                                    | 1 (6.7)                                       | 23(12)                                            | 0.513            |
| Hemorrhagic, n (%)                               | 3 (20)                                        | 9 (4.8)                                           | 0.069            |
| Antiplatelet use, n (%)                          | 3(20)                                         | 26(14)                                            | 0.798            |
| Anticoagulant use, n (%)                         | 1 (6.7)                                       | 7 (3.8)                                           | 0.894            |
| Hematoma heterogeneity, n (%)                    | 12 (80)                                       | 39(21)                                            | <b>&lt;0.001</b> |
| Hematoma irregularity, n (%)                     | 13(87)                                        | 96 (52)                                           | <b>0.018</b>     |
| Hematoma volume (cm <sup>3</sup> ), median (IQR) | 25.0 (11.0-38.0)                              | 8.0(4.0-15.0)                                     | <b>0.002</b>     |
| Presence of IVH, n (%)                           | 9 (60)                                        | 70 (38)                                           | 0.088            |
| Initial SBP (mmHg), mean, SD                     | 204±37                                        | 201±33                                            | 0.792            |
| 1.5h-SBP (mmHg), mean, SD                        | 182±38                                        | 154±23                                            | <b>0.001</b>     |

GCS, Glasgow Coma Scale; SBP, systolic blood pressure; IQR, interquartile range.

IVH:intraventricular hemorrhage

デル(HV>16, HH)を評価する。2変数とも陽性の場合には、この時点での血腫増大の確率は35%となり、血圧管理に留意したintensive careがすすめられる。さらにこの症例の1.5時間後の収縮期血圧が160以上の場合、3変数モデル(HV>16, HH, 1.5h-SBP>160)で全ての変数が陽性となり、この時点での血腫増大確率は59%となるため、緊急follow up CT撮影を検討すべきとおもわれる。

しかし本研究は主要なlimitationを含んでいる。まず本研究はretrospective studyである。また症例数が少なく、特に血腫増大例が少ない中での結果となっている。また

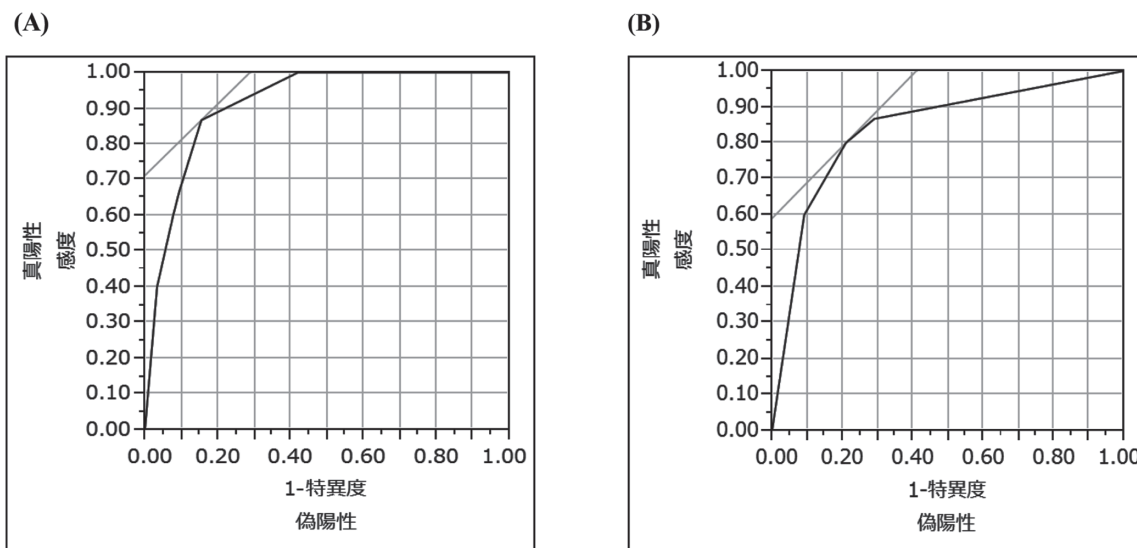
血腫量を含んだneuro-imaging variablesの測定errorの可能性が考えられる。更には発症時間からCT検査までの時間の検討が行われていない。

このような多くのlimitationがあるが、臨床的には救急外来の現場において必ず得られる因子を用いた、簡便なモデルが得られたと考える。しかし本研究はまだ上述のような多くのlimitationを含んでおり、今後は本結果を発展させてより正確、確実な予測モデルを検討していく必要がある。

**Table 2.** Crude odds ratio and adjusted odds ratio according to logistic regression analysis.

|                      | Crude OR | 95% CI       | Adjusted OR<br>(enter) | 95% CI        | Adjusted OR<br>(selected variables) | 95% CI         | P value       |
|----------------------|----------|--------------|------------------------|---------------|-------------------------------------|----------------|---------------|
| Age(/year)           | 0.977    | 0.931-1.025  | 1.014                  | 0.952-1.081   |                                     |                |               |
| Gender,male          | 0.885    | 0.266-2.603  | 0.873                  | 0.198-3.396   |                                     |                |               |
| hypertension         | 0.750    | 0.259-2.325  | 1.068                  | 0.271-4.532   |                                     |                |               |
| heterogeneity        | 14.984   | 4.484-68.074 | 8.576                  | 1.643-61.931* | 7.810                               | 1.906 - 40.230 | <b>0.0039</b> |
| irregularity         | 6.081    | 1.619-39.588 | 0.873                  | 0.115-7.660   |                                     |                |               |
| HV>16cm3             | 9.250    | 3.073-31.437 | 4.825                  | 1.145-22.217* | 5.052                               | 1.315 - 21.356 | <b>0.0181</b> |
| Presence of IVH      | 2.530    | 0.873-7.843  | 1.928                  | 0.478-8.076   |                                     |                |               |
| 1.5h-SBP>160<br>mmHg | 7.250    | 2.207-32.67  | 9.569                  | 2.306-53.921* | 8.765                               | 2.328 - 44.564 | <b>0.0009</b> |

HV:hematoma volume, IVH:intraventricular hemorrhage, SBP;systolic blood pressure



(A) (HV>16, HH, 1.5h-SBP>160) logistic regression model

(B) (HV>16, HH) logistic regression model

**Fig. 1.** ROC analyses estimated as the probability based on logistic regression model. (HV>16, HH, 1.5h-SBP>160) logistic regression model resulted in AUC=0.91(A). In case of (HV>16, HH) logistic regression model, AUC=0.84 was obtained (B).

## 結 論

脳内出血超急性期における血腫増大を予測するロジスティック回帰モデルを作成した。

## 文 献

- 1) Davis SM, Broderick J, Hennerici M, Brun NC, Dringer MN, Mayer SA, et al. Hematoma growth is a determinant of mortality and poor outcome after intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2006;66:1175-81.
- 2) Fujii Y, Tanaka R, Takeuchi S, Minakawa T, Sasaki O. Hematoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 1994;80:51-7.
- 3) Kazui S, Naritomi H, Yamamoto H, Sawada T, Yamaguchi T. Enlargement of spontaneous intracerebral hemorrhage: incidence and time course. *Stroke* 1996;27:1783-7.
- 4) Kazui S, Minematsu K, Yamamoto H, Sawada T, Yamaguchi T. Predisposing factors to enlargement of spontaneous intracerebral hematoma. *Stroke* 1997;28:2370-5.
- 5) Fujii Y, Takeuchi S, Sasaki O, Minakawa T, Tanaka R. Multivariate analysis of predictors of hematoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998;29:1160-6.
- 6) Broderick JP, Diringer MN, Hill MD, Brun NC, Mayer SA, Steiner T, et al. Determinants of intracerebral hemorrhage growth: an exploratory analysis. *Stroke* 2007;38:1072-5.
- 7) Wada R, Aviv RI, Fox AJ, Sahlas DJ, Gladstone DJ, Tomlinson G, et al. CT angiography "spot sign" predicts hematoma expansion in acute intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2007;38:1257-62.
- 8) Barras CD, Tress BM, Christensen S, MacGregor L, Collins M, Desmond PM, et al. Density and shape as CT predictors of intracerebral hemorrhage growth. *Stroke* 2009;40:1325-31.
- 9) Cucchiara B, Messe S, Sansing L, Kasner S, Lyden P. Hematoma growth in oral anticoagulant related intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2008;39:2993-6.
- 10) Sorimachi T, Fujii Y, Morita K, Tanaka R. Predictors of hematoma enlargement in patients with intracerebral hemorrhage treated with rapid administration of antifibrinolytic agents and strict blood pressure control. *J.Neurosurg* 2007;106:250-4.
- 11) Naidech AM, Jovanovic B, Liebling S, Garg RK, Bassin SL, Bendok BR, et al. Reduced platelet activity is associated with early clot growth and worse 3-month outcome after intracerebral hemorrhage: relationship to clinical and radiological outcome. *Stroke* 2004;35:1316-22.
- 12) Silva Y, Leira R, Tejada J, Lainez JM, Castillo J, Davalos A. Molecular signatures of vascular injury are associated with early growth of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2005;36:86-91.
- 13) Steiner T, Bosel J. Options to restrict hematoma expansion after spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2010;41:402-9.
- 14) Anderson CS, Heely E, Huang Y, Wang J, Stapf C, Delcourt C, et al. Rapid blood pressure lowering in patients with acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2013;368:2355-65.
- 15) Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950;3:32-5.
- 16) Kothari RU, Brott T, Broderick JP, Barsan WG, Sauerbeck LR, Zuccarello M, et al. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volume. *Stroke* 1996;27:1304-5.
- 17) Koga M, Toyoda K, Yamagami H, Okuda S, Okada Y, Kimura K, et al. Systolic blood pressure lowering to 160 mmHg or less using nicardipine in acute intracerebral hemorrhage : a prospective, multicenter, observational study ( the Stroke Acute Management with Urgent Risk-factor Assessment and improvement-Intracerebral Hemorrhage study). *J Hypertens* 2012;30:2357-64.
- 18) Sakamoto Y, Koga M, Yamagami H, Okuda S, Okada Y, Kimura K, et al. Systolic blood pressure after intravenous antihypertensive treatment and clinical outcomes in hyperacute intracerebral hemorrhage : the stroke acute management with urgent risk factor assessment and improvement-Intracerebral Hemorrhage study. *Stroke* 2013;44:1846-51.

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

## 子宮内膜機能異常関連疾患に関する基礎的研究とその臨床応用

研究代表者 梶原 健 (大学病院 産科婦人科)

研究分担者 石原 理<sup>1)</sup>, 藤田 恵子<sup>2)</sup>

## 緒言

体外受精・胚移植周期においては排卵誘発・胚培養技術を含めた様々な部分で工夫がなされそれに伴い妊娠率も上昇してきたが、ここ数年間の妊娠率にはほぼ変化がなく、また形態良好胚を移植しても妊娠に至らない症例が散見される。この原因の大きな一つは着床期周辺の子宮内膜機能のメカニズムに関し未だ不明な点が多く、その部分に関する工夫がほとんどなされていないためである。そのため着床期周辺の子宮内膜機能のメカニズム一端を明らかとし、その知見より適切な治療法を開発することは不妊症治療における着床率改善、しいては妊娠率上昇のためには重要なポイントである。

microRNA (miRNA) は、遺伝子発現の転写後調節を司る機能性低分子RNAである。miRNAは子宮内膜を含めた女性生殖組織にも発現が認められ、様々な生理的・病理学的機能を担っていると考えられている。またmiRNAは多くの病態診断のバイオマーカーとして有望であるのみならず、標的遺伝子が同定されその発現を制御するmiRNAの機能が明らかとなれば、そのmiRNAは新規治療薬のターゲットとなり得る。そこで本研究では脱落膜化過程を制御する転写因子の発現を制御しているmiRNAをMicro array解析により同定し、その機能を解析する事を目的とした。

## 材料と方法

良性疾患により子宮摘出を行った患者から同意を得て、常法にて子宮内膜間質細胞を分離・培養した。脱落膜化刺激は8-br-cAMPとMPAで行った。脱落膜化刺激を施行した群(脱落膜化群)と施行しない群(control群)からmiRNAを含む全RNAを抽出しmiRNA発現アレイを施行した。また上記2群間でmRNA発現アレイを行い、脱落膜化前後で発現変動するmiRNAとその標的遺伝子であるmRNAの組み合わせを、解析ソフトを用いて照合した。その結果から、有意な発現変動を認めたmiRNAの中で、

脱落膜化過程に関連するmRNAを標的遺伝子とするものを抽出した。

## 結果

## ■ 脱落膜化前後で変動するmiRNAの同定

良性疾患により子宮内膜組織を採取し、ヒト子宮内膜間質細胞(HESCs)を単離した。単離したHESCsを非脱落膜化群と、8-br-cAMPとMPAで脱落膜化刺激を加えた脱落膜化群に分け6日間培養した。脱落膜化の確認は、位相差顕微鏡による形態学的変化や、リアルタイムPCR法を用いて脱落膜化マーカーとして広く知られているPRL、IGFBP1のmRNAの発現を確認した。HESCsは、脱落膜化刺激を加え6日間培養すると、1つ1つの細胞が大型化し敷石状の変化を示した。更に、mRNAレベルでは、PRLの発現が脱落膜化群では有意に上昇した(\* $p < 0.05$ )。また、IGFBP1に関しても同様の結果であった。

次に、各3検体を非脱落膜化群と脱落膜化群の2群にわけ、合計6枚のmiRNA発現アレイを施行した。計6枚のアレイ全ての結果から、脱落膜化前後で発現シグナルが2倍以上上昇するもの、また1/2以下に低下しているmiRNAのみを抽出した。その結果、1368個のmiRNAの中で脱落膜化前後で有意差を持って変動したmiRNAは、9種類であった。抽出した9種類のmiRNAの内訳は、8種類は脱落膜化後に2倍以上に上昇し、1種類は1/2以下に低下していた。

## ■ 脱落膜化前後で変動するmiRNAに対応する標的遺伝子の同定

miRNA発現アレイとmRNA発現アレイの結果を、解析ソフトであるIngenuity Pathways Analysis (IPA)を使用し、9種類のmiRNAとそれらに対応する脱落膜化に関連する標的mRNAの組み合わせを抽出した。

最終的に、脱落膜化過程に関連する遺伝子を標的とするmiRNAはmiR-542-3p, miR-424, miR-503, miR-155の4種類であった。この中から、脱落膜化マーカーであるIGFBP1を標的遺伝子とするmiR-542-3pについてさらに実験をすすめた。

1) 大学病院 産科婦人科

2) 医学部 解剖学

### ■ miR-542-3pは脱落膜化マーカーである*IGFBP1*を標的とする

発現アレイでの結果を他のサンプルを用いたリアルタイムPCR法で確認した。miRNA発現アレイの結果同様、miR-542-3pは脱落膜化刺激後に有意差を持って低下した(\* $p < 0.05$ )。また、*IGFBP1*も同様に有意差を持って発現の上昇を認めた(\* $p < 0.05$ )。

### ■ HESCsにmiR-542-3pを強制発現すると、脱落膜化は抑制される

HESCsにmimic Negative Controlを強制発現させ、同時に脱落膜化刺激を加えると、細胞は大型で敷石状の配列を示し、脱落膜化変化を認めた。しかし、miR-542-3pを強制発現させ、同時に脱落膜化刺激を加えると、形態学的に脱落膜化変化を示さなかった。HESCsにmiR-542-3pを強制発現させた細胞では、標的遺伝子である*IGFBP1*のmRNAの発現は有意に低下した(\*\* $p < 0.001$ )。また、もう1つの脱落膜化マーカーである*PRL*のmRNAの発現も有意に低下した(\*\* $p < 0.01$ )。miR-542-3pを強制発現させたHESCsの培養上清中のIGFBP-1の蛋白濃度も低下していた(\*\* $p < 0.001$ )。

これらのデータから、miR-542-3pは、タンパクレベルやmRNAレベル、更には形態学的にも、脱落膜化を*IGFBP1*の発現を介して制御していることが明らかとなった。

### ■ miR-542-3pは*IGFBP1*の発現を直接的に制御する

最後に、miR-542-3pと*IGFBP1*の直接的な制御関係を確認するため、Luciferase reporter assayを行った。ルシフェラーゼ遺伝子の下流に*IGFBP1*の標的候補部位の配列を組み込みレポーターベクター(*IGFBP1* 3'UTR wt)を作成した。また、*IGFBP1*の標的候補部位の配列に変異を加えたレポーターベクター(*IGFBP1* 3'UTR mut)も作成した。

前述した両ベクターをcos7細胞に導入し、Luciferase reporter assayを行った。その結果、*IGFBP1* 3'UTR wtでは、転写活性が有意に30%低下したが(\*\* $p < 0.01$ )、*IGFBP1* 3'UTR mutでは転写活性に差は見られなかった。

以上のことから、miR-542-3pは*IGFBP1*の非翻訳領域の標的配列を直接的に制御している事が明らかとなった。

## 考 察

miR-542-3pはIGFBP-1の発現を制御することにより、形態学的にも生理学的にも子宮内膜間質細胞の分化過程である脱落膜化に対して重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

## 研究成果リスト

### 学会発表

- 1) 栃木秀乃, 梶原 健, 田丸俊輔, 亀井良政, 石原 理. 脱落膜化過程で発現するmicroRNAとその標的遺伝子の探索, 第66回日本産科婦人科学会学術講演会, 平成26年4月18-20日, 東京
- 2) 栃木秀乃, 梶原 健, 水野洋介, 田丸俊輔, 亀井良政, 岡崎康司, 石原 理. miR542-3pはIGFBP1の発現制御を介して脱落膜化過程を制御する, 第22回日本胎盤学会学術集会, 平成26年10月3-4日, 京都
- 3) 栃木秀乃, 梶原 健, 石原 理. 脱落膜化過程で発現変動するmicroRNAとその標的遺伝子の探索, 第59回日本生殖医学会学術講演会, 平成26年12月4-5日, 東京
- 4) Tochigi H, Kajihara T, Yosuke M, Tamaru S, Kamei Y, Okazaki Y, Ishihara O. MicroRNAs and their target genes related to endometrial decidualization, ASRM2014 Annual Meeting, 2014/10/18-22, Hawaii

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

## リツキシマブ細胞傷害における LR11 の分子機構の解明

研究代表者 東 守洋 (医学部 病理部)

## 緒 言

びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL) は悪性リンパ腫で最も頻度が高い亜型である。DLBCLはheterogeneousな病変であることが知られており、網羅的遺伝子発現解析から胚中心B細胞型 (Germinal center B-cell type; GCB type)、活性型B細胞型 (Activated B-cell type; ABC type) に大別され、その腫瘍起源を反映していると考えられている。GCB typeはABC typeに比べてCHOP療法下で予後が良い。現在の標準治療である抗CD20抗体 (リツキシマブ) 併用CHOP療法下では主にABC typeの予後が改善されてきた。一方、GCB typeではリツキシマブ導入後もその予後の改善はみられていない。その結果、両者の予後に差が見出されなくなっている。DLBCLはリツキシマブ療法導入により予後が改善したとはいえ、依然3割程度の症例が治療抵抗性であり、DLBCLの分子メカニズム解明に伴う新たな治療法開発が必要と考えられる。LR11はlow density lipoprotein (LDL) レセプターとして同定されたI型膜貫通分子であり、LDLの他、アミロイドβタンパクの細胞内取り込み、分子輸送に関与している。われわれはこれまでに免疫組織化学的解析により、濾胞性リンパ腫の一部とDLBCLの約半数、特にGCB typeにおいてLR11の発現が見られることを見出した。LR11発現症例ではその古典的治療法であるCHOP療法下でのoverall survivalが高かったが、リツキシマブ併用CHOP療法下ではその予後に差を見いだせなかった (第3回日本血液学会国際シンポジウムにて発表)。さらにin vitroでの研究において、LR11発現B細胞株 (Raji細胞) でLR11発現をshRNAにより抑制したところ、リツキシマブによる補体依存性細胞障害 (Complement dependent cytotoxicity; CDC) が増強していることを見出した。このことはLR11がリツキシマブによるCDCを負に制御している可能性を示唆している。本研究では、LR11によるリツキシマブCDCに対する抑制効果をin vitroで検討し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

## 1) リツキシマブCDCアッセイ

B細胞リンパ腫細胞株Raji細胞から樹立したLR11ノックダウン細胞株を用いてCDCアッセイを行った。細胞培養液中にリツキシマブ (中外製薬, 東京) と補体ソースとしてウサギ血清を加え 37℃ 1時間インキュベーションのち、CCK-8 kit (同仁化学研究所, 熊本) を用いプレートリーダで生存細胞数を検討した。

## 2) プラスミド, 抗体, 試薬:

LR11のcDNAは新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター遺伝子機能解析学分野 池内健博士より供与いただいた。pmCherry-C1 vector (Invitrogen) にin-frameで組み換えLR11-mCherryを融合タンパクとして発現するベクターを作製した。Raji細胞への遺伝子導入はNucleofector (Lonza Japan) を用いて導入した。GST-LR11-C1/3はLR11 cDNAを制限酵素で消化し、pGEM vectorとin-frameでGST-LR11が融合タンパクをつくるように組み換えた。抗LR11抗体は東邦大学医療センター佐倉病院検査部・研究開発部の武城英明先生に供与頂いた。抗CD20抗体はDako社クローンL26を用いた。

## 3) タイムラプスイメージング:

細胞は35 mmガラスボトムディッシュに血清1%の条件でplatingし翌日観察した。観察には倒立顕微鏡 (TE2000-S Eclipse, Nikon), CCDカメラ (CoolSNAP HQTM; Roper Scientific) とImagePro Plus Software (Mediacybernetics, Roper Scientific), 光源はPrecentered Fiber illuminator (Intensilight C-HGFI, Nikon) を使用した。GFPを観察するために、FF01-485/20-25 excitation filter, FF-436/514/604-25x36 dichroic mirror, FF01-536-40-25 emission filterを使用し、mCherryを観察するためにFF01-586/20-25 excitation filter, FF-436/514/604-25x36 dichroic mirror, FF01-628/32-25 (すべてSemrock社製, New York, USA) を使用した。対物レンズは×100を使用した。intensity correlation analysis (ICA) はimagej Softwareを用いて解析した。ICAによりProduct of Difference from Mean (PDM) 値が求められる。蛍光タンパクAとBについてそれらの蛍光強度をAi, Bi, ROIにおける平均蛍光強度

をAm, Bmとした場合, (Ai-Am) x (Bi-Bm)として求められる。共局在した場合正の値をとり, 共局在が見られない場合負の値をとる。

#### 4) プルダウンアッセイおよび共免疫沈降:

300 µgのGST-LR11-C1/3 タンパクとは補体ソースとしてのRabbit serumあるいはHuman serum(いずれもSigma), グルタチオンセファロースを4℃で2時間混和し, 遠心後, 沈降物をWestern blotで検出した。共免疫沈降はCD20抗体で沈降しSDS-PAGE後, LR11抗体でプロットした。

### 結 果

#### 1) LR11 ノックダウン細胞株におけるリツキシマブCDC効果の増強

LR11をノックダウンしたRaji細胞において, リツキシマブCDCが増強することを確認した(図1)。CDCはリツキシマブおよび補体の量依存的に増強することも確認された。

#### 2) LR11の細胞内局在

リツキシマブの添加によりCD20はlipid raftに移動することが知られている。そこでわれわれはLR11がlipid raftへ移動するかどうかについて検討した。まず, 生細胞において, lipid raftのマーカーとしてGFP-Caveolin-1αとのLR11-mCherryとの局在を蛍光顕微鏡を用いてタイムラプスイメージングを行った(図2A)。共局在については両者

のIntensity correlation analysis (ICA)を行った。Rituximab添加後, PDM値は徐々に上昇した(図2B)。これはGFP-Caveolin-1αとLR11-mCherryが, リツキシマブ刺激により共局在することを意味していると考えられる。次に実際にLR11がlipid raftへ移動するか, 培養細胞のタンパクをTriton-X 100可溶性分画と不溶性分画にわけWestern blotで検討したところ, LR11はリツキシマブ添加によりTriton-X 100不溶分画に移動することが見出された。これらのことからLR11は, リツキシマブ添加によりCD20と同様にlipid raftに移動していると考えられる。

#### 3) LR11とCD20, 補体との会合

LR11とCD20がタンパク-タンパク会合している可能性を考え, 共免疫沈降を行った。Raji細胞のタンパク抽出物をLR11抗体で免疫沈降後, CD20抗体でプロットしたところ, LR11とCD20との会合が確認された。さらにLR11と補体との会合をGST-pulldown assayで検討した。LR11の細胞外ドメインC末端側1/3とGSTを融合したタンパクとヒト血清とをインキュベーションしたのち, GSTでプルダウンしたタンパクをSDS-PAGEし, 各種補体に対する抗体でプロットした。C8, C9に対する抗体でバンドを認め, LR11とC8, C9が会合しうることが示された(図3)。これらの結果から, LR11-CD20-補体がタンパク複合体を形成している可能性が考えられた。

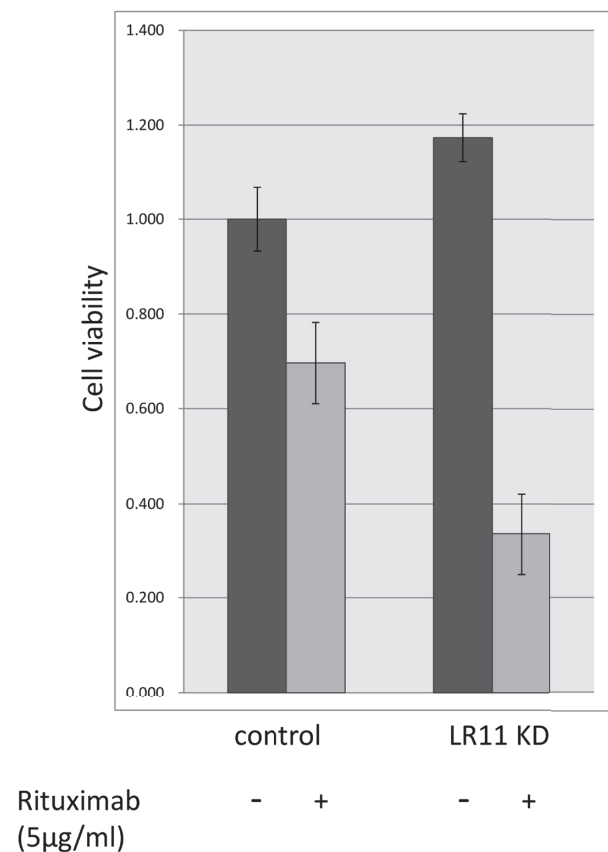


図 1.

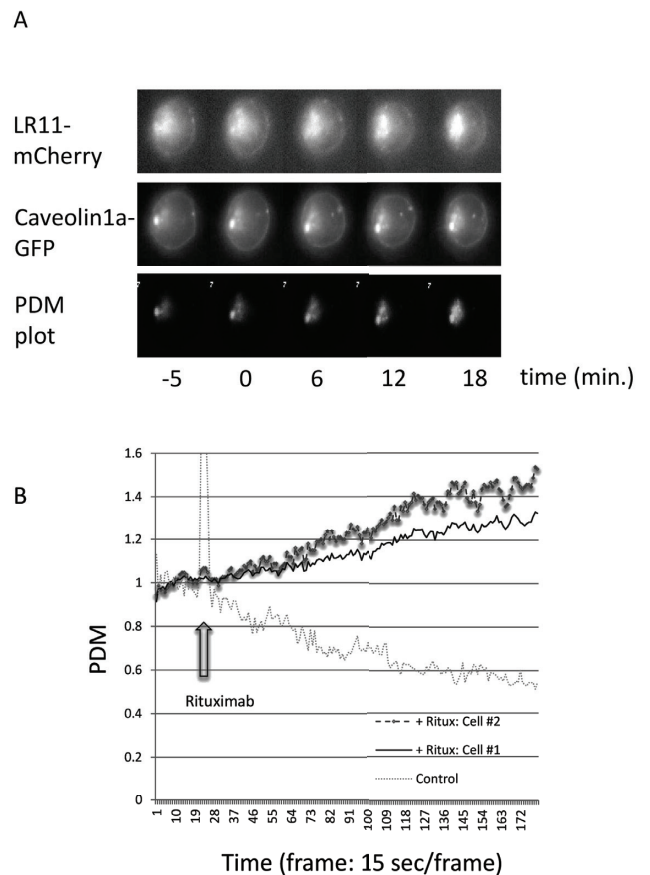


図 2.

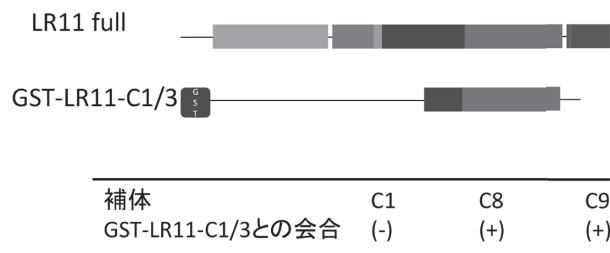


図 3.

## 考 察

DLBCLにおいてはGCB type, ABC typeといったサブグループ分類が日常診断でも行われているものの、その生物学的意義については分子発現レベルおよび腫瘍起源推定といったレベルを越えた理解は未だなされていない。GCB typeにおいてLR11の発現が高い、LR11ノックダウンによりリツキシマブのCDC効果が増強するというわれわれのこれまでの結果を考え合わせると、GCBにおいてはLR11の関与によりリツキシマブが有効に作用していないことが推定される。この意味において、本研究はこれらサブグループ分類の分子レベルでの生物学的意義の一端を明らかにするものであると考える。さらにリツキシマブ開発以降、著明な予後改善がなされていないDLBCLの治療法を進展させる研究であると考えられる。LR11はこれまでLDL、アミロイドβのレセプターとしての動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病やアルツハイマー病での役割が解析されてきた。細胞外でプロセッシングを受けた可溶性LR11はこれら疾患群のバイオマーカーとして有望視されている。われわれはこれまで千葉大学血液内科中世古知明らとの共同研究から可溶性LR11がリンパ腫を含めた血液腫瘍においても有用なバイオマーカーであることを見出し、さらに腫瘍細胞自体がその発現ソースであることを見出した。しかしながら腫瘍におけるその分子機構についてはほとんど解明されていない。本研究は悪性リンパ腫のみならず、悪性腫瘍におけるLR11の分子メカニズムを解明する初の研究であると考えられる。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Higashi M, Tokuhira M, Fujino S, Yamashita T, Abe K, Arai E, Kizaki M, Tamaru J I. Loss of HLA-DR expression is related to tumor microenvironment and predicts adverse outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* (in print 2015).
- 2) Ohwada C, Yamazaki A, Kawaguchi T, Sugita Y, Takeuchi M, Shimizu N, Sakaida E, Takeda Y,

Tsukamoto S, Muto T, Jiang M, Higashi M, Yokote K, Tamaru J I, Bujo H, Nakaseko C. Serum soluble LR11, a novel tumor derived biomarker associated with the outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 2015;1-4.

- 3) Tomikawa T, Tabayashi T, Tokuhira M, Watanabe R, Sagawa M, Nemoto T, Kimura Y, Takahashi Y, Mori S, Higashi M, Tamaru J, Kizaki M. Cardiac and breast diffuse large B-cell lymphoma with pericardial effusion and AV-block. [*Rinsho ketsueki*] *The Japanese journal of clinical hematology* 2015;56(1):9-15.
- 4) Kawaguchi T, Ohwada C, Takeuchi M, Shimizu N, Sakaida E, Takeda Y, Sakai S, Tsukamoto S, Yamazaki A, Sugita Y, Higashi M, Fujikawa K, Matsue K, Yokote K, Tamaru J, Bujo H, Nakaseko C. Potential utility of serum soluble LR11 as a diagnostic biomarker for intravascular large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 2014;55(10):2391-4.
- 5) Shimizu N, Nakaseko C, Jiang M, Nishii K, Yokote K, Iseki T, Higashi M, Tamaru J, Schneider W J, Bujo H. G-CSF induces the release of the soluble form of LR11, a regulator of myeloid cell mobilization in bone marrow. *Annals of hematology* 2014;93(7):1111-22.
- 6) Tokuhira M, Kimura Y, Nemoto T, Sagawa M, Tomikawa T, Sakai R, Okuyama A, Amano K, Higashi M, Tamaru J, Mori S, Tabayashi T, Watanabe R, Kizaki M. Therapy-related myeloid neoplasm in methotrexate-associated lymphoproliferative disease in a rheumatoid arthritis patient. *Journal of clinical and experimental hematopathology* 2014;54(2):137-41.

### 学会発表

- 1) 東 守洋, 得平道英, 木崎昌弘, 田丸淳一. びまん性大細胞型B細胞リンパ腫におけるHLA-DR発現ロスはT細胞環境と関連し予後不良因子である. 第104回日本病理学会総会, 平成27年, 名古屋
- 2) 東 守洋, 得平道英, 川口岳晴, 武内正博, 大和田千佳子, 中世古知昭, 武城英明, Michael Hummel, 木崎昌弘, 田丸淳一. LR11は細胞膜上のLipid raftでCD20と複合体を形成しRituximab CDCを阻害する. 第30回悪性リンパ腫治療研究会, 平成27年4月, 千葉.
- 3) 東 守洋. シンポジウムIII. Hodgkinリンパ腫の分子機構の解明と新たな治療戦略. Hodgkinリンパ腫におけるNF-κB細胞内シグナル伝達系. 第54回日本リンパ網内系学会総会, 平成26年6月, 山形.

### 特許出願等

なし

## 学内グラント 報告書

### 平成26年度 学内グラント終了時報告書

## 進行・再発がん患者の精神的健康状態の改善を目的とした 治療法の確立と普及

研究代表者 石田 真弓（国際医療センター 精神腫瘍科）

### 緒言

がん患者の50～60%は進行・再発によって治療不能となり、死の転帰をたどる。そのため、「治療不能」を意味する「進行・再発」の精神的なストレスは、初発時よりも大きい<sup>1)</sup>。全身状態の確実な悪化が予測される中、精神状態を改善・維持することは患者の生活の質（QOL）を保つために重要かつ不可欠である<sup>2)</sup>。

当院ではがん患者に生じるさまざまな精神的問題に対し、専門的治療を行う精神腫瘍科を設置している。そこでは「進行・再発がん」の診断後、日常生活に支障をきたすような精神的問題が生じ、受診に至るケースが少なくない<sup>3)</sup>。こうした患者から「他の進行・再発がん患者との共感」を求める声が多く認められたため、当科ではその精神的ニーズへの対応として、がん種を問わない、進行・再発がん患者対象の集団精神療法を実施している。

これまでの研究では、がん種を限定した研究が中心に実施され、得られた知見を他のがん種へ適応させるには限界があった。また、がん種を限定した集団精神療法では、頻度の低いがん種の集団を臨床場面で成立させることが難しい。よって、進行・再発がん患者に特徴的な身体・精神的問題、ニーズや現状を踏まえた治療として、集団精神療法プログラムを開発する必要があると考えられた。よって本研究では、治療法の開発に向けた基礎的研究として進行・再発がん患者を対象とした集団精神療法への参加状況の調査・分析から、現状に即した治療プログラムの原案を作成することとした。

### 方法（材料）

2007年5月から2015年3月までに集団精神療法に参加した患者の年齢・性別・がん種・参加開始日と参加最終日、一定期間の参加継続・中断の有無、欠席理由、中断時はその理由について転帰を含めて後方視的に調査し、臨床的に実施可能なプログラムの構成を検討した。

#### ※集団精神療法

月1回の単回プログラムとし、臨床心理士がファシリテート、精神腫瘍医が同席する形態で行われる。集団精神

療法治療適応ありと判断された患者が対象となり、抗がん剤などの治療、体調を優先し、欠席・遅刻・早退自由としている。

### 結果

#### 1) 参加者背景（Table 1）

集団精神療法は2007年5月から2015年3月までに、月1回計95回開催され、34人の進行・再発がん患者が参加した。参加者は平均年齢59.5歳で、男性7名（20.6%）、女性27名（79.4%）であった。原発は乳がん（N=10, 29.4%）が最も多く、大腸がん（N=7, 20.6%）、膵がん（N=5, 14.7%）と続き、参加者の原発部位は9つに及んだ。

Table 1. Background characteristics (N=34)

|                     |          | subjects    |      |
|---------------------|----------|-------------|------|
|                     |          | No.         | %    |
| Age, years          |          |             |      |
|                     | Range    | 39-75       |      |
|                     | Mean±SD  | 59.5 ± 8.82 |      |
| Sex                 |          |             |      |
|                     | Male     | 7           | 20.6 |
|                     | Female   | 27          | 79.4 |
| Primary tumor sites |          |             |      |
|                     | Breast   | 10          | 29.4 |
|                     | Colon    | 7           | 20.6 |
|                     | Pancreas | 5           | 14.7 |
|                     | Lung     | 3           | 8.8  |
|                     | Stomach  | 3           | 8.8  |
|                     | Rectum   | 2           | 5.9  |
|                     | uterus   | 2           | 5.9  |
|                     | Prostate | 1           | 2.9  |
|                     | Brain    | 1           | 2.9  |

## 2) 参加継続の有無 (Table 2)

集団精神療法への参加条件は①集団精神療法の治療適応, ②参加希望が必須であり, これらを満たした患者が各回への参加を自由意思で決定している. 調査期間中, 集団精神療法に複数回参加した者は 25 名 (73.5%), 1 回のみの参加はその理由を問わず 9 名 (26.5%) であった.

**Table 2.** Frequency of participation (N=34)

|                 | subjects |      |
|-----------------|----------|------|
|                 | No.      | %    |
| More than twice | 25       | 73.5 |
| Once            | 9        | 26.5 |

## 3) 継続的な参加が困難になった理由 (Table 3)

集団精神療法は, 自由意思によって各回の参加を決定できるため, 体調不良や治療の都合, 自己都合等で欠席しても, 翌月の参加が可能である. 調査期間中, 集団精神療法に「欠席」ではなく, 参加継続困難となった理由 (その後の集団精神療法へは参加していない理由) について調査した. なお, 本調査では, 現在も継続的に参加している 6 名を除いた分析を行った. 最も多かった中断理由は体調不良 (N=19, 55.9%), 続いて治療のため (N=5, 14.7%) であった. 患者自身の意思で継続的な参加を希望しなかった 2 例では, 「自分には合わないと思った」「『死』について話し合いたくない」とその理由を述べた.

**Table 3.** Reason for termination (N=34)

|                                           | subjects |      |
|-------------------------------------------|----------|------|
|                                           | No.      | %    |
| Poor physical condition                   | 19       | 55.9 |
| Treatment-related<br>scheduling conflicts | 5        | 14.7 |
| His/Her decision                          | 2        | 5.9  |
| Unknown                                   | 2        | 5.9  |
| *Be going on                              | 6        | 17.6 |

## 4) 最終参加前 3 ヶ月間の参加状況について (Table 4)

最終参加前の 3 ヶ月間の参加状況について調査したところ, 毎月の参加が可能であった患者は 13 名 (65%) であり, 3 回全てに出席出来なかった患者の欠席理由は「治療のため」が最も多かった.

**Table 4.** Frequency of participation for three months (N=20)

|                 | subjects |    |
|-----------------|----------|----|
|                 | No.      | %  |
| all the session | 13       | 65 |
| 2/3 session     | 5        | 25 |
| 1/3 session     | 2        | 10 |

## 5) 最終参加前 6 ヶ月間の参加状況について (Table 5)

最終参加前の 6 ヶ月間の参加状況について調査したところ, 毎月の参加が可能であった患者は 6 名 (37.5%) であり, 半数以上に出席出来た患者は 15 名 (93.7%) であったが, 全てへの出席は難しいことが明らかになった. 6 回全てに出席出来なかった患者の欠席理由は「治療のため」が最も多かった.

**Table 5.** Frequency of participation for six months (N=16)

|                 | subjects |      |
|-----------------|----------|------|
|                 | No.      | %    |
| all the session | 6        | 37.5 |
| 5/6 session     | 5        | 31.3 |
| 4/6 session     | 2        | 12.5 |
| 3/6 session     | 2        | 12.5 |
| 2/6 session     | 0        | 0.0  |
| 1/6 session     | 1        | 6.3  |

## 考 察

当科で実施している進行・再発がん患者を対象とした単回プログラムの集団精神療法は, 抗がん剤などの治療を継続しながらも, 継続的に参加出来る集団精神療法であり, 長期的に観察すると脱落が少ないことが明らかになった. これまでに研究されてきたがん患者を対象とした集団精神療法では, 2 週間, 3 ヶ月や 6 ヶ月間など一定期間の継続的なプログラムへの参加を前提とし, 「原発が同じがん患者」の集団で, 「不安や抑うつ軽減」を治療対象としていた. よって, 治療や体調不良で継続的な参加が困難になるとプログラムからの脱落となり, その効果が得られにくいと考えられていた. しかし, 本研究から単回プログラムでは継続的な参加が可能であり, 集団精神療法による治療効果を継続的に得られる可能性が示唆された. 継続的な参加の中断理由で最も多かったものは「体調不良」

であり、本調査で転帰が確認できた患者では、その後体調が改善せず死亡に至るケースも少なくなかった。よって、身体的な問題で参加が困難になる直前までの参加継続を見込むことができ、身体症状に応じた精神症状の変化など、状況に応じた治療を継続できる可能性があると考えられた。

進行・再発がん患者を対象とした集団精神療法プログラムでは、月1回の単回プログラムとすることで継続的な参加が見込まれ、治療効果を継続的に得られる可能性が示唆された。本研究結果を基礎的資料とし、今後は集団精神療法プログラムのニーズを検討し、プログラムの構成内容について更なる研究を進める予定である。

#### 引用文献

- 1) Okamura, et al. Psychological distress following first recurrence of disease in patients with breast cancer: prevalence and risk factors. *Breast Cancer Res Treat* 2000;61(2):131-7.
- 2) Temel JS, et al. Early palliative care for patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363(8):733-42.
- 3) Tada Y, et al. Psychiatric Disorders in Cancer Patients at a University Hospital in Japan: Descriptive Analysis of 765 Psychiatric Referrals. *Jpn J Clin Oncol* 2012;42(6):548-51.

#### 研究成果リスト

##### 論文

- 1) 石田真弓, 大西秀樹, 医療者の違和感から考える防衛機制－がん患者の家族と遺族のケース－. *緩和ケア* 2014;24:190-4.
- 2) 石田真弓. 患者さんと一緒に心配事を整理する方法. *エキスパートナース* 2014;30(7):93-6.

##### 学会発表

- 1) Ishida M, Onishi H, Kawada S, Toyama H, Uchitomi Y. Group psychotherapy for patients with advanced or recurrent cancer: Preliminary study. *International College of Psychosomatic Medicine (ICPM), 22nd World Congress on Psychosomatic Medicine, September 2013, Lisbon, Portugal.*
- 2) Ishida M, Toyama H, Kawada S, Onishi H. Group Psychotherapy For Patients With Advanced Or Recurrent Cancer: Preliminary Study On Their Participative Condition. *11th American Psychosocial Oncology Society, 2014, Tampa, USA.*

##### 特許出願

なし

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

ヒト新規インプリント遺伝子の同定,  
および遺伝性疾患とのミッシングリンクの検討

研究代表者 神田 将和 (ゲノム医学研究センター)

## 緒 言

本研究ではアレル特異的発現を呈する遺伝子候補を同定し、さらに難病のミトコンドリア呼吸鎖異常症との関連を調べ、遺伝性疾患の解明に寄与する基盤を確立していくことを最終的な目標として考えだされた。このために(1)アレル特異的な発現パターンを呈する遺伝子の解析環境の構築と実際の同定を行い(2)ミトコンドリア関連遺伝子とインプリント遺伝子の関わりを明らかにしていくことを進めた部分において報告する。一般にインプリント遺伝子の異常による疾患はプラダーウィリー症候群など特徴的なものだけが知られており、既存の遺伝性疾患との関わりは明らかでない。アレル特異的発現 (Allele-Specific Expression; ASE) の遺伝子についても同様である。インプリント遺伝子のみならず、遺伝子発現を制御するメカニズムの異常が疾患原因変異と密接に関わっているケースが存在することは想像に難くないが、これを明らかにすることを阻んでいる問題は、少なくとも以下のものが存在する: (I) ヒトとマウスの種間でインプリント遺伝子の違いが存在する (そのためヒトの研究が必要) (II) しかしヒト試料による実験では、マウスのように自由な系統交配ができないため、エクソン上の多型マーカーが乏しいという物理的な制約が存在する (III) シークエンス解析における高率の擬陽性の存在。今後、ヒトでも大規模な解析による進展が見込める部分はあるが、疾患との関わりをどう探していくかについてはそれぞれで体制を整える必要があるのは明らかであり、本研究についても最終的な目標として設定した。

## 材料と方法

本研究では、まずヒトで普遍的にインプリントを受けている遺伝子の新規同定を行い、さらに新規インプリント遺伝子と難病の1つであるミトコンドリア呼吸鎖異常症との関わりを調べていく、というフェイズに分けて計画していた。

## サンプルの準備と候補遺伝子の同定

ヒト皮膚由来線維芽細胞の20株分のDNA/RNAの両

シーケンスデータを取得した。これを用いてDNAではヘテロ塩基多型を示すが、RNAでは片アレル発現を呈する遺伝子を候補として同定することとした。また多型マーカーが少ない点については、サンプル数を20まで拡大することで、これまで現在知られている84のヒトインプリント遺伝子のうち、71遺伝子で、最低5サンプルが解析に有効なヘテロな多型マーカーを持っていることに基いて、この問題に対応した。

## 結 果

今回用意できたシーケンスデータから転写産物のバリエーションを読み取り、特定のアレルが発現制御を受けている遺伝子の候補を集めた (図1)。候補遺伝子群 (2797バリエーションサイト, 930遺伝子) の一部を目視でシーケンスデータのキュレーションをしたところ、多くはASE (Allele-Specific Expression) と考えられる、発現アレルに偏りがあるデータであった。この中からERAP2遺伝子 (図1の6段目) で見られたアレル特異的発現を図2に示す。この遺伝子のメカニズムは明らかになっていないがアレル特異的発現を示すことが報告されている (Bjornsson et al. 2008)。また別の候補遺伝子について独立したDNA解析から一部のエクソンを欠失している例が見つかった (図3)。単体データではヘテロな欠失のみのため、特に劣性遺伝形式の疾患に関わるとは考えられなかったが、今回の解析でASEであることがシーケンスデータから確認できた。

## 考 察

本研究は基礎的な遺伝子発現制御をテーマにしつつ、最終的に疾患との関連を見出すことを目標に据えている。この観点からは imprinting のみならず、ASE (Allele Specific Expression) を示す遺伝子、またはRME (Random Mono-allelic Expression) を示す遺伝子も対象に含めても良いと考えている。

この領域での進展については、これまでの見聞から予測していたが幾つかは当たり、幾つかは外れた。結果としては予想に反し、大規模なプロジェクト (GTEx, Geuvadas)



図 1. アレル特異的発現を示すと考えられる候補遺伝子と含まれていた既知のインプリント遺伝子 (一部). 今回の解析データで見つかった, DNAとRNAで異なるパターンを示すバリエーションの数, および遺伝子名のリスト.

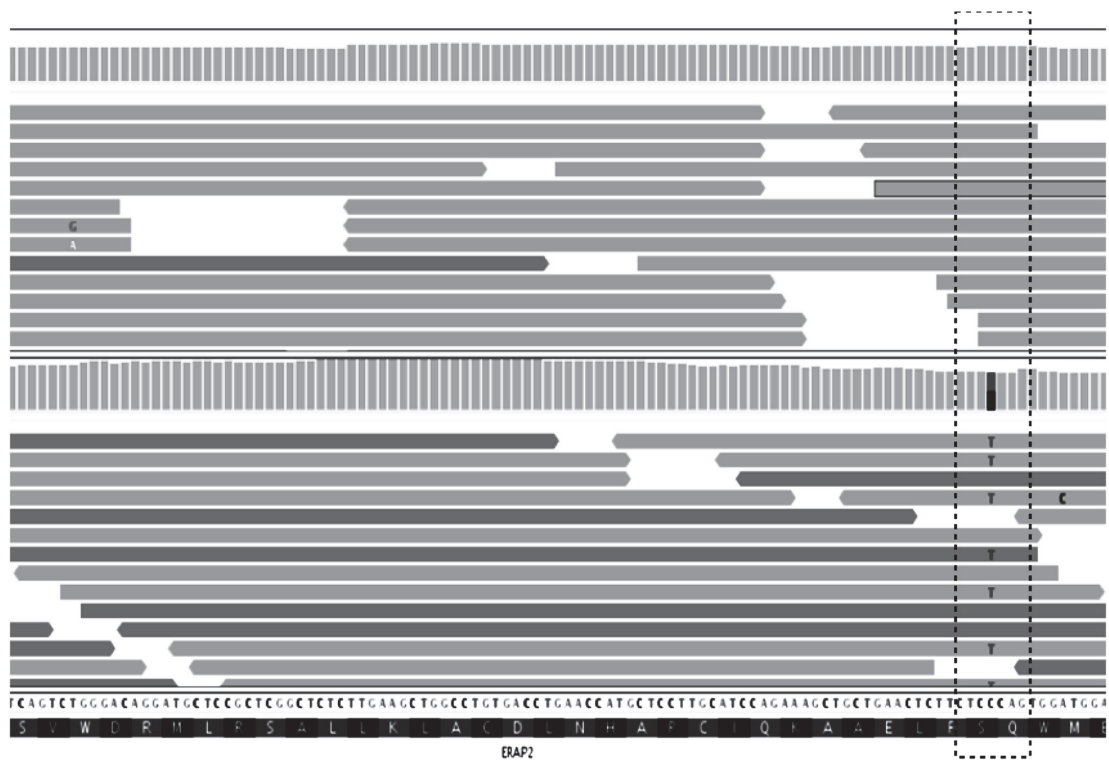


図 2. ERAP2 遺伝子で見られたアレル特異的発現. 上段: RNA シークエンス, 下段: DNA シークエンスを並べて可視化すると T アレル側の転写産物が見られないことが分かる.

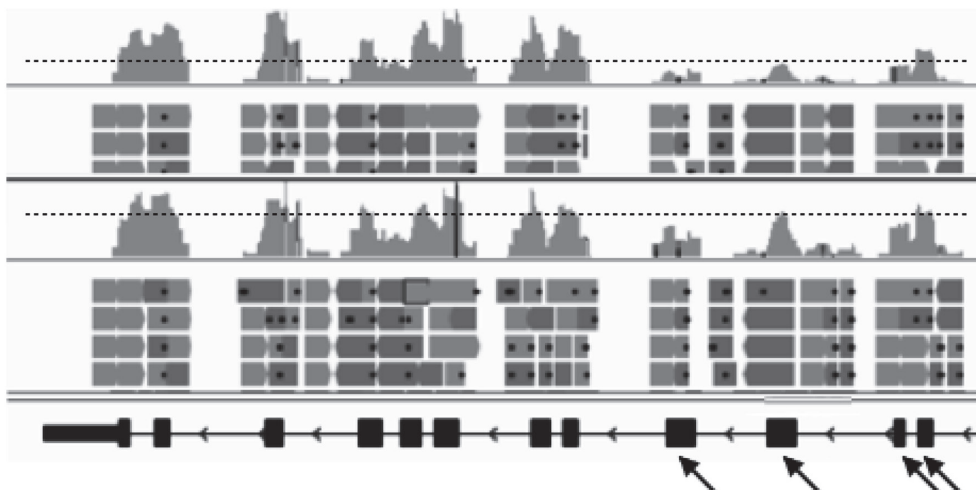


図 3. DNA シークエンスデータ解析によるエクソン欠失の検出。上段：遺伝子のエクソン欠失がある検体，下段：コントロール。欠失エクソンのある領域では物理的にDNA量が半分になるため，高速シーケンサーで読まれる回数が少なくなり，カバレッジ（読まれた回数）に反映されていることがわかる。

の解析により大きな変化はもたらされなかった。当然そこから新しい知見も複数報告されているが，初めて大規模解析のデータが整備されたことが重要視されている状況である。また解析法（特に false positive の除去）については様々な段階での問題が残されたままになっている。実際に最も基本的なはずのシーケンズデータのマッピング，そこからのバリエーションコールについても開発が続いている状況があまり変わっていない。

今回見つけた候補遺伝子群は1) (known/novel) imprinting 2) ASE 3) false positive のいずれかと考えられる。3を除き，候補遺伝子たちは少なくとも特定の細胞において，片側アレルに偏って発現していると考えられる。一方で独立したゲノムデータの解析により，今回含まれたある候補遺伝子でエクソンを片側欠損している検体を同定した。このケースでは片側アレルは欠損による一部エクソンの消失，反対側のアレルは発現が消失したことで疾患の可能性が考えられるため，引き続き調べていく。

今後の研究の進め方として，前述した大規模プロジェクトによる発現データを取り込んだ上で，よりシステムティックにゲノムデータの解析と結びつけていく必要がある。しかし現在のシーケンズ技術（エクソーム）では一部エクソンの欠失は同定することが容易ではない。そのためコストを無視すれば候補遺伝子群の領域のみをゲノムシーケンズするなど，何らかの改善が必要な部分がある。

#### 研究成果リスト（論文，学会発表，特許出願等）

\* 本研究における研究成果の学会や出版物への発表はまだなされていない。

#### 謝 辞

本研究を行うにあたり，同部門 平田智子助手・岡崎康司教授に多大な協力を頂きました。深く感謝いたします。

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

## Nucleostemin による幹細胞の未分化性維持と エネルギー代謝制御の解析

研究代表者 片野 幸（ゲノム医学研究センター）

### 緒 言

一般的に、幹細胞は同系譜の分化した細胞とは異なるエネルギー代謝の特徴を有し、それにより細胞の「未分化性」を担保している<sup>1)</sup>。例えば、ES細胞やiPS細胞は好気的な条件で培養しているにもかかわらず主に解糖を用いてATPを産生し、心筋などの分化細胞はTCA回路を用いている。このエネルギー代謝の違いを利用して、ES細胞から分化誘導した心筋細胞を純化する報告もなされた<sup>2)</sup>。主に解糖を用いるグルコース代謝は、ガン細胞におけるWarburg効果として観察され臨床検査に利用されており、ES細胞とガン細胞にはエネルギー産生という側面での共通点が伺える<sup>3)</sup>。さらに、乳ガン幹細胞や悪性度の高い様々なガンでは、ES細胞と共通性の高い遺伝子発現プロファイルを示すことが報告されている<sup>4)</sup>。これらの報告から、ES細胞の特徴的な遺伝子発現やエネルギー代謝について、ガン細胞と共通する部分があると想定される。

我々は、様々な種類の幹細胞やガン細胞で高い発現を示す核小体タンパク質であるNucleostemin（以下NS）のES細胞における機能を明らかにすることを目的に研究を進めてきた。リボソーム生合成の場である核小体は、細胞のエネルギー状態を感知し、様々な細胞内反応のトリガーとなっていることが報告されている<sup>5)</sup>。本研究では、NSのES細胞、またES細胞よりも分化の進んだ多能性幹細胞であるエピプラスト幹細胞（Epiblast Stem Cell, EpiSC）において、その未分化性にNSがどのように関与しているのか明らかにした。本研究を元に、今後はES細胞のエネルギー代謝におけるNSの役割を解析していきたい。

### 材料と方法

NSのES細胞での未分化性に対する機能を明らかにするために、本研究室ではテトラサイクリン（Tet）の誘導体であるドキシサイクリン（Dox）を培養液に添加することによりNSをノックアウトできるNS-Tet-off マウスES細胞を樹立した<sup>6)</sup>。また、このNS Tet-off ES細胞を桑実胚にインジェクションし仮親の子宮に戻して胎生 6.5 日まで発生させ、胚性外胚葉を解剖にて取り出し、NS Tet-offエ

ピプラスト幹細胞（EpiSC）を樹立した。

NS Tet-off ES細胞、NS Tet-off EpiSCにDoxを添加することで、NSをノックアウトし、未分化性に関する表現型を様々な種類のマーカー因子のreal-time PCR、ウエスタンブロットティング、細胞免疫染色、またアルカリホスファターゼ染色を行い評価した。

またNS Tet-off ES細胞に関しては、NSノックアウトによる表現型を打ち消す因子を探索し、その因子を強制発現させた株からRNAを回収し、マイクロアレイ解析を行って評価した。

NSは神経幹細胞において、DNA修復因子Rad51と結合してDNA損傷部位にリクルートし、ゲノム修復を促進させるという報告があった<sup>7)</sup>。このNSの機能について、ES細胞でも同様に見られるか否か、ハイドロキシウレアを添加しDNA損傷を起こした際に見られる $\gamma$ -H2A.Xのfociを計数することにより評価した。

### 結 果

#### ①NSはES細胞の未分化性維持のために必要である

NS Tet-off ES細胞にDoxを加えると、Nanog, Oct3/4, Esrrbなど多く未分化マーカーが減少することが明らかとなった。また、NSをノックアウトしたES細胞は、未分化な状態を保てず死滅することも、アルカリホスファターゼ染色で示された。

#### ②NanogもしくはEsrrbを強制発現することによりNSノックアウトES細胞の表現型を回避できる

強制発現することによってNSノックアウトES細胞の表現型を回避できる因子を探索した。候補としては、NSノックアウトにより発現量が減少する様々な未分化マーカー、ES細胞の未分化性を維持するために必要な細胞内シグナル因子を考え、それぞれ強制発現株を作製し、NSをノックアウトしてアルカリホスファターゼ染色を行った。その結果、NanogとEsrrbを強制発現させた細胞株では顕著な表現型の回避が見られ、ほぼ完全に未分化を保ったまま継代維持が可能であった。マイクロアレイ解析を用いて検討したところ、NSノックアウトにより発現変動する遺伝子のほとんどが、NanogもしくはEsrrb強制

発現によって変動しなくなった。

### ③核小体におけるNSがES細胞の未分化性維持に関与する

NSは主に核小体に局在するが、核質にも存在し、核小体と核質の間をシャトリングしていることが報告されている。またDNA修復促進の機能は、核質におけるNSによるとの報告があったが、核小体に局在できなくしたNS変異体を強制発現させてもNSノックアウトによる表現型を回避できなかった。このことから、ES細胞においては核小体に局在するNSが未分化性維持のために必要であると考えられる。また、ES細胞においてもNSにはDNA修復促進機能があることを明らかにした。

### ④EpiSCにおいてもNSは細胞生存と未分化性維持のために必要である

NS Tet-off EpiSCを用いてNSをノックアウトしたところ、EpiSCの主要な未分化マーカーであるOct3/4タンパク質の顕著な減少と細胞死が見られた。このことから、NSはEpiSCにおいても細胞生存と未分化性維持のために必要であることが明らかとなった。しかし、ES細胞とは異なり、NanogやEsrrbを強制発現させてもその表現型が回避されなかった。

## 考 察

本研究により、NSはマウスES細胞の未分化性維持のために必須のタンパク質であることが明らかとなった。また、未分化マーカーの中でも中心的な役割を果たすNanog、Esrrbの強制発現により、NSノックアウトによる表現型が回避できたことから、NSがこれらの因子を介して未分化性維持に中心的な役割を果たしていることが示唆された。更に、NSノックアウトにより、通常のES細胞の分化では見られない栄養外胚葉マーカーの上昇が明らかとなった。この結果より、NSはES細胞の未分化性維持のみならず、分化過程においても重要な役割を担うのではないかと予想し、現在解析を進めている。

核小体に局在しないNS変異体ではNSノックアウトの表現型を回避できなかったことから、ES細胞においては核小体に局在するNSが未分化性維持に寄与していると考えられる。

EpiSCにおいてもNSは細胞生存と未分化性維持に必須であることが明らかとなった。ES細胞との相違点として、NanogやEsrrbの強制発現によってレスキュー出来ないことが挙げられるが、これはEpiSCにおいては両因子の発現量が少なく、未分化性維持への寄与が低いためと考えられる。

## 参考文献

- 1) Rafalski VA and Brunet A. Energy metabolism in adult neural stem cell fate. *Prog Neurobiol* 2011 Feb;93(2):182-203.

- 2) Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, and Fukuda K. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 2013 Jan;12(1):127-37.
- 3) Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar;144(5):646-74.
- 4) Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, and Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 2008 May;40(5):499-507.
- 5) Nishimura K, Kumazawa T, Kuroda T, Katagiri N, Tsuchiya M, Goto N, Furumai R, Murayama A, Yanagisawa J, and Kimura K. Perturbation of ribosome biogenesis drives cells into senescence through 5S RNP-mediated p53 activation. *Cell Rep* 2015;10(8):1310-23.
- 6) Nomura J, Maruyama M, Katano M, Kato H, Zhang J, Masui S, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, and Okuda A. Differential requirement for nucleostemin in embryonic stem cell and neural stem cell viability. *Stem Cells* 2009 May;27(5):1066-76.
- 7) Meng L, Lin T, Peng G, Hsu JK, Lee S, Lin SY, and Tsai RYL. Nucleostemin deletion reveals an essential mechanism that maintains the genomic stability of stem and progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 Jul;110(28):11415-20.

## 研究成果リスト

### 原著論文

- 1) Katano M, Ema M, Nakachi Y, Mizuno Y, Hirasaki M, Suzuki A, Ueda A, Nishimoto M, Takahashi S, Okazaki Y, and Okuda A. Forced expression of Nanog or Esrrb preserves the ESC status in the absence of nucleostemin expression. *Stem Cells* 2015 Apr;33(4):1089-101.

### 学会発表

- 1) 片野 幸, 水野 洋介, 仲地 豊, 平崎 正孝, 鈴木 歩, 西本正純, 岡崎康司, 奥田晶彦. 「マウスES細胞においてNucleosteminノックアウトによる未分化性の消失はNanogもしくはEsrrbタンパク質強制発現により回避される」, 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日, 横浜市, ポスター発表

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

## 自己免疫性炎症性疾患におけるエピジェネティクス制御の解明

研究代表者 相崎 良美 (医学部 リウマチ膠原病科)

## 緒 言

ベーチェット病, 成人スティル病, 全身性エリテマトーデスなどの自己免疫性炎症性疾患は, 寛解に至ることもあるが, 一般的には活動期と非活動期を繰り返す慢性再発性の全身性炎症性疾患である。ベーチェット病の原因は未だ不明だが, HLA-B51 抗原陽性率が高い事, 一塩基多型との関連 (IL-10, IL-23R/IL-12RB2) などの遺伝的要因が指摘されている。しかしながら, 発生時期が中年である事, HLA-B51 抗原陽性者のうち発症はわずかなことなどから, 遺伝的要因だけではベーチェット病の発症や疾患活動性の惹起は考え難く, 外因性因子 (細菌・ウイルス感染, 環境) によって誘発されるとされている (Pineton de Chambrun M, et al. Autoimmun Rev 2012)。

近年, ヒストン修飾などのエピジェネティクス変化によりT細胞の活性化が起きることや (Wei G, et al. Immunity 2009), 関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどのリウマチ性疾患におけるエピジェネティクス変化が報告されている (Ballestar E. Nat Rev Rheumatol 2011)。ベーチェット病や成人スティル病などの疾患では好中球機能亢進, マクロファージ活性化が知られているため, 活性化T細胞分画のみならず好中球分画や単球・マクロファージ分画においてもエピジェネティクス異常が起きている可能性があり, 病態解明や新たな指標確立に末梢血白血球におけるエピジェネティクス解析が重要と考えられる。

本研究では, フローサイトメトリー法による末梢血有核細胞亜分画における網羅的ヒストン修飾の解析系を確立し, ベーチェット病患者における末梢血単核細胞と好中球の各分画におけるヒストン修飾の解析を行った。ヒストンアセチル化やヒストンメチル化のヒストン修飾は, 遺伝子転写を活性もしくは抑制する修飾が知られている。その代表的な修飾に対する抗体を用いて, 細胞を染色しフローサイトメトリー解析を行う (Dispirito JR, et al. Immunol 2010, Obier N, et al. Cells Tissues Organs 2010)。ベーチェット病患者の $\gamma\delta$ T細胞においてH3K4me3の平均蛍光強度 (MFI) 値が健常人に比して有意に上昇し, 好中

球においてH3K4me3/H3K27me3のMFI比が有意に低下し,  $\gamma\delta$ T細胞においては有意に上昇していた。また活動期のベーチェット病患者では非活動期のベーチェット病患者と比較して,  $\gamma\delta$ T細胞におけるH3K4me3のMFI値とH3K4me3/H3K27me3のMFI比がともに有意に上昇していた。以上の結果から, 末梢血白血球におけるヒストン修飾をフローサイトメトリー法にて検出することが可能となり, ベーチェット病の疾患活動性と関係していることが示唆された。本研究の結果を基に, 自己免疫性炎症性疾患の病態解明が進むとともに, 新しい検査・診断法の開発につながる事が期待される。

## 材料と方法

## 末梢血有核細胞の調整

埼玉医科大学倫理委員会および埼玉医科大学病院IRBの承認下にて, ベーチェット病患者 (活動期N=6, 非活動期N=7) および陰性対照である健常人 (N=12) から, 書面にて同意を得た後, 末梢血 20 mLの採血を行った。モノ・ポリ分離液 (DS PHARMA社, BNDSBN100) にて末梢血単核細胞と好中球の分画を回収し, 実験に用いた。

## フローサイトメトリー法によるヒストン修飾の解析

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

## 統計

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

## 結 果

自己免疫性炎症性疾患であるベーチェット病患者の疾患活動性にエピジェネティクス制御の異常が関与しているのではないかと仮定し、その変化をフローサイトメトリー法にて検出できるか、本研究で検証を行った。ベーチェット病および健常人から末梢白血球を分離し、CD4 陽性T細胞、CD8 陽性T細胞、好中球、 $\gamma\delta$ T細胞の4つの分画におけるヒストンメチル化を比較した。H3K4me3は緩んだクロマチン構造部に見られるヒストン修飾であり、遺伝子転写を正に制御すると考えられている。一方、H3K27me3は凝縮したクロマチン構造に存在し、遺伝子転写を負に制御すると考えられている。健常人と比較してベーチェット病においては、H3K27me3のMFIに有意差は見られなかった(図1)。しかしながら、H3K4me3のMFIは $\gamma\delta$ T細胞の分画において、ベーチェット病で有意に高値であり(図2)、H3K4me3/H3K27me3のMFI比は、好中球においては有意に低下し $\gamma\delta$ T細胞の分画においては有意に上昇していた(図3)。

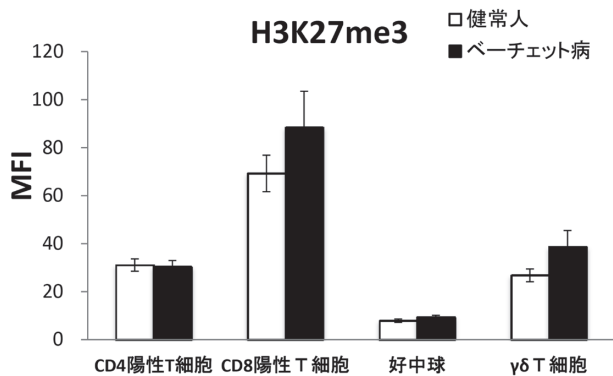


図1. ベーチェット病患者におけるH3K27me3のMFI。(健常人 N=12, ベーチェット病 N=13)

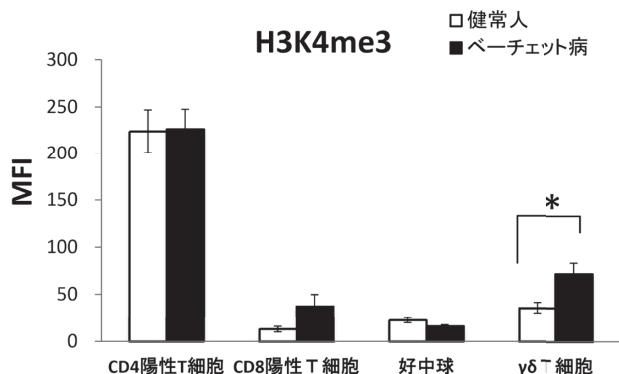


図2. ベーチェット病患者におけるH3K4me3のMFI。(健常人 N=12, ベーチェット病 N=13; \* $P<0.05$ )  $\gamma\delta$ T細胞においてベーチェット病患者では有意に高い。

さらに、眼病変、粘膜病変、皮膚病変などのベーチェット病特有症状のいずれかが認められ、炎症徴候が明らかな活動期と診断されたベーチェット病患者と非活動期のベーチェット病患者で比較したところ、 $\gamma\delta$ T細胞のH3K4me3のMFIおよびH3K4me3/H3K27me3のMFI比がともに有意に上昇していた(図4)。

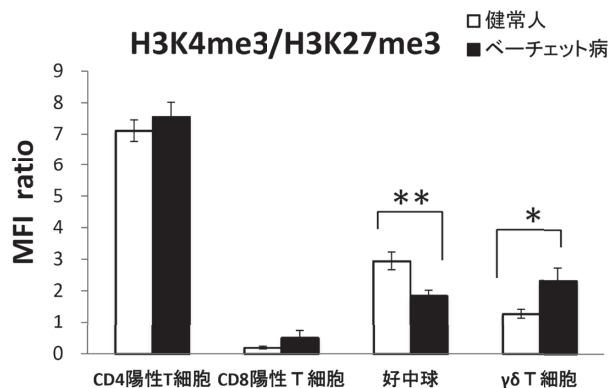


図3. ベーチェット病患者におけるH3K4me3/H3K27me3のMFI ratio。(健常人 N=12, ベーチェット病 N=13; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )

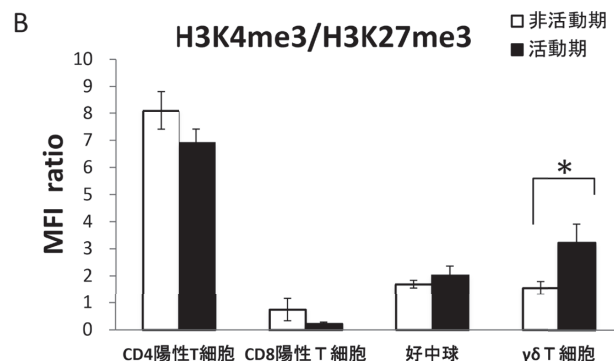
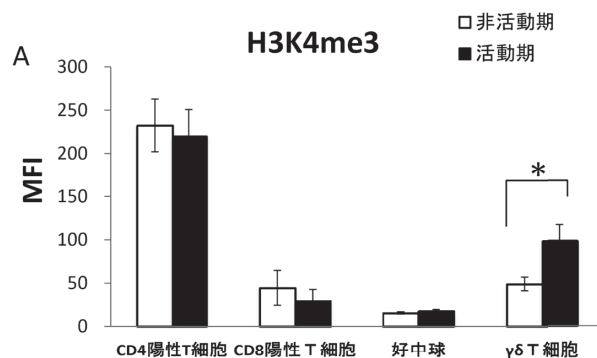


図4. ベーチェット病活動期におけるヒストンメチル化の変化。(活動期 N=6, 非活動期 N=7; \* $P<0.05$ ) A)H3K4me3のMFI.  $\gamma\delta$ T細胞においてベーチェット病活動期で有意に高値。B)H3K4me3/H3K27me3のMFI ratio.  $\gamma\delta$ T細胞においてベーチェット病活動期で有意に高値。

## 考 察

ベーチェット病患者の末梢血白血球におけるヒストン修飾の変化をフローサイトメトリー法にて検出が可能であることが示された。ヒストン修飾の変化は、一般的にクロマチン免疫沈降後に標的遺伝子の発現レベルをリアルタイムPCRで見ているが、フローサイトメトリー法の利点は、末梢血からモノ・ポリ分離液で遠心分離後、生細胞のまま解析ができ、迅速かつ一度に複数のヒストン修飾と表面抗原を組み合わせることで末梢血有核細胞重分画におけるヒストン修飾を網羅的に解析できるところであり、機能的重分画毎の変化を検出することが可能となる。健常人と比較してベーチェット病においては好中球と $\gamma\delta$ T細胞のヒストン修飾に変化が見られ、この変化が疾患活動性と関連する可能性が示唆された。さらにベーチェット病患者では、 $\gamma\delta$ T細胞から産生されるIL-17によって好中球が活性化されていると報告がされており、今回の結果よりこれらの機序にヒストン修飾が関与しているのではないかと推測している。現在、ベーチェット病の診断は臨床所見に基づいており、特異的な検査がないため、診断に苦慮する機会が多い事が临床上の問題の一つである。また、ベーチェット病において炎症反応が一般的に疾患活動性の指標に用いられているが、ベーチェット病でみられる白血球機能異常（好中球やリンパ球の活性化）の病態を反映していない。今回の結果より、末梢血白血球のヒストン修飾の変化がベーチェット病患者の疾患活動性と関連していると考え、診断の補助や治療の開発につながる事が期待される。

今後、ベーチェット病以外の疾患でも特異的に検出可能か検討し、このヒストン修飾変化によって制御されている標的分子を明らかにすることで、より病態との関係の解明につながる事が予想される。

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科の三村俊英教授と荒木靖人講師には多大なご指導を賜り、深く感謝申し上げます。同意や臨床所見の

取得など本研究の実施にあたり様々なご協力を頂きました。埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科の先生方にも深謝いたします。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Wada TT, Araki Y, Sato K, Aizaki Y, Yokota K, Kim YT, Oda H, Kurokawa R, Mimura T. Abberant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;444:682-6.

### 学会発表

- 1) 荒木 靖人, 和田 琢, 相崎良美, 黒澤奈津子, 佐藤浩二郎, 横田和浩, 藤本健太, 鈴木志穂, 米田竜馬, 金 潤澤, 織田弘美, 黒川理樹, 三村俊英. 関節リウマチの病態におけるヒストンリシンメチル基転移酵素の役割. 第12回RCGMフロンティア国際シンポジウム, 2014年11月1日, 埼玉県日高市
- 2) Yokota K, Sato K, Aizaki Y, Akiyama Y, Mimura T. Human CD14+ Monocytes Stimulated with a Combination of TNF $\alpha$  and IL-6 Differentiate into Osteoclast-like Cells with Bone-Resorption Activity. 2014 ACR/ARHP Annual Meeting, 2014年11月16日, Boston, USA
- 3) 荒木靖人, 和田 琢, 相崎良美, 黒川理樹, 三村俊英. 関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるヒストンリシンメチル基転移酵素の異常, 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月27日, パシフィコ横浜

### 特許出願

特許番号 : 特願 2014-200824

出願日 : 2014年9月30日

発明の名称: ベーチェット病の判定を補助する方法, 及びベーチェット病の活動性の評価を補助する方法

発明者 : 三村俊英, 荒木靖人, 相崎良美

権利者 : 学校法人埼玉医科大学

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

## PICK1 を介した長期抑制制御機構の解明

研究代表者 柳下 聡介 (医学部 薬理学)

## 緒 言

PICK1 (Protein Interacting with C Kinase 1) はシナプスに存在するタンパク質である<sup>1)</sup>。様々なタンパク質と結合するが、それらの中でも特に重要なのが、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットの一つGluA2である。GluA2とPICK1とが結合すると、GluA2がシナプス膜から除去されることが知られている<sup>2)</sup>。

シナプスにおいては、常に受容体がシナプス膜に挿入されたり除去されたりしており、このバランスが様々な影響を及ぼしていると考えられている。特に、アルツハイマー病においては、GluA2の除去が亢進しているのではないかと考えられており<sup>3,4)</sup>、受容体除去のメカニズムを理解することは、神経変性疾患の根本的な理解に繋がる。

GluA2とPICK1との結合については、その結合ドメインが同定されているものの、実際の結合・乖離の調節機構の詳細は不明であった。

そこで、私は、GluA2-PICK1間の結合制御機構を明らかにすべく研究に着手した。本学に着任する以前の時点で、以下のことを明らかにしていた。

- PICK1はあるリン酸化酵素に依ってリン酸化される。
- PICK1のリン酸化部位の候補を同定した。
- PICK1のリン酸化は、GluA2との結合を促進し、脱リン酸化は乖離を促す。

しかし、PICK1のリン酸化状態がGluA2との結合状態を決定する仕組みは不明であった。私は本学に着任後、そのメカニズム解明に取り組み、その一端を解き明かした。なお、本研究成果は、現在、論文投稿中である。

## 材料と方法

## (1) DNAコンストラクト

培養細胞内でGluA2およびPICK1を発現するコンストラクトを用いた。PICK1については、生細胞イメージング用にAcGFP1と融合したPICK1を発現するコンストラクトや、mycタグ、flagタグと融合したPICK1を発現するコンストラクトも作製した。また、大腸菌でGST融合GluA2タンパク質を発現するコンストラクトを用いた。これは、Bristol大学Jonathan G. Hanley博士から供与いただいたも

のであり、GluA2のC末端側50アミノ酸残基とGSTとが融合したタンパク質を発現するものである。

実験に用いたコンストラクトとしては、リン酸化部位であるSerをAlaに置換したもの(以下、PICK1 SAと記載)、リン酸化部位であるSerをGluに置換したもの(以下、PICK1 SEと記載)を用いた。

## (2) 培養細胞と遺伝子導入

COS7細胞を用いた。遺伝子導入はlipofectamine 2000を用いて実施した。

## (3) 共免疫沈降 (Co-immunoprecipitation; Co-IP)

GluA2とPICK1との結合を調べるCo-IPについては、両者を共発現させたCOS7を破碎し、抗PICK1抗体にて免疫沈降した後、抗GluA2抗体によるウェスタンブロッティングにより検出した。Myc-PICK1とflag-PICK1との結合を調べるCo-IPについては、両者を共発現させたCOS7を破碎し、抗myc抗体にて免疫沈降した後、抗flag抗体によるウェスタンブロッティングにより検出した。

## (4) ウェスタンブロッティング

Wako社製SuperSep Aceを用いてウェスタンブロッティングを行った。シグナルの検出は、本学共通機器室のChemi-Docを用いた。

## (5) 生細胞イメージング

COS7細胞にAcGFP1融合PICK1を発現させた。遺伝子導入の二日後に、本学共通機器室のBIREVO KEYENCE BZ-9000で、生きたまま細胞の観察を行った。

## 結 果

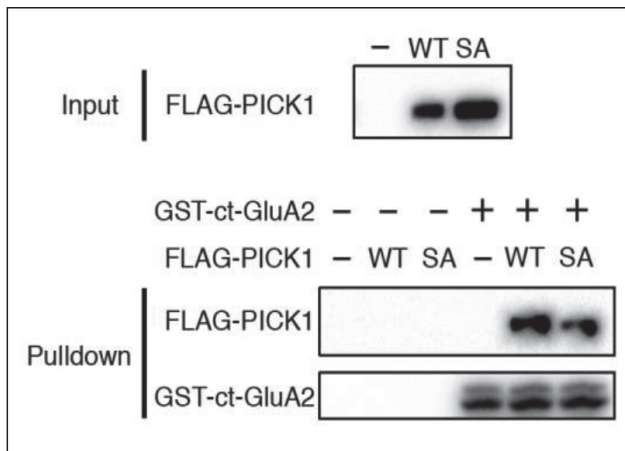
## (1) 直接的なGluA2との結合の確認

これまではCOS7細胞にGluA2およびPICK1の両者を発現させ、共免疫沈降法により、結合強度を評価してきた。しかし、それだけでは細胞内に存在する膜などのcompartmentの関与が除去しきれない。そこで、大腸菌で発現させたGST融合GluA2を用いたPull down assayを実施した。PICK1としては、flag-PICK1 WTおよびflag-

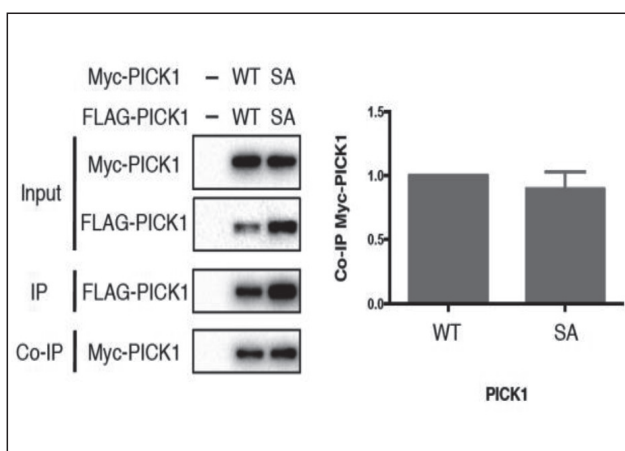
PICK1 SA の 2 種類を検討した。その結果、両者に GST-GluA2 との結合に関しては違いがなかった (Fig. 1)。

## (2) PICK1-PICK1 間の結合に与える影響

次に、PICK1 どうしの結合に与える影響を解析するため、myc-PICK1 と flag-PICK1 との間の結合を評価した。これに関しても、Fig. 2 に示すように WT, SA の間に違いは見られなかった。(1)(2)の検討結果から、PICK1 における SA 変異は、GluA2 との結合や PICK1 との結合に影響を及ぼすのではないと考えられる。



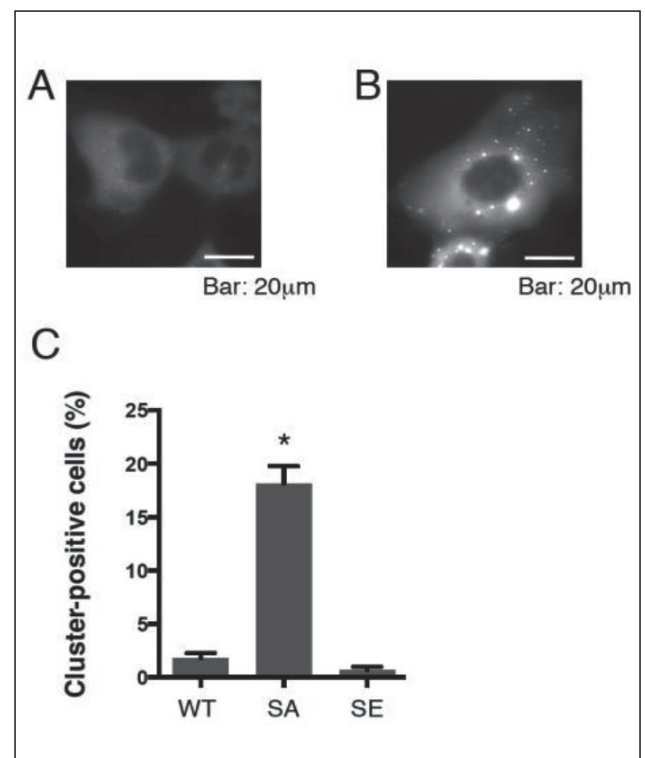
**Fig. 1.** Pull-down assay による GluA2 と PICK1 との結合。大腸菌由来の GluA2 と COS7 細胞由来の flag-PICK1 とを用いて、両者の直接的な結合の有無を評価した。代表的なプロットを示す。Pull-down の「-」は大腸菌由来のタンパク質なし、「+」は有りを示す。



**Fig. 2.** PICK1 どうしの結合の評価。PICK1 どうしの結合を、2 種類のタグ (myc, flag) を用いて評価した。具体的には、flag-PICK1 と共沈降されてくる myc-PICK1 を評価した。グラフは定量結果を示す (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=6$ )。

## (3) 細胞内の膜との結合

PICK1 には BAR ドメインと呼ばれる領域があり、これが脂質二重膜との結合を担っていると考えられている。本研究で着目しているリン酸化部位 (Ser) は BAR ドメインから一次構造ではかなり離れた位置にある。しかし、最近の研究では、BAR ドメインよりも C 末端にある領域が BAR ドメインの機能を抑制していることが示唆されている<sup>5)</sup>。そのため、本研究で着目している Ser 残基が BAR ドメインに影響を与えて、細胞内局在を変化させている可能性が考えられた。そこで、AcGFP1 融合 PICK1 を COS7 細胞に発現させ、生細胞イメージングによってその細胞内局在を評価した。PICK1 WT, SE を発現させたものでは、Fig. 3A に示すように diffuse なシグナルが見られた。しかし、PICK1 SA を発現させた細胞でのみ、Fig. 3B に示すような、多くのクラスターを有する細胞が出現した。この結果は、SA 変異によって、PICK1 がより膜と結合し易くなったものと考えられる。また、この変異によって、C 末端領域の BAR ドメイン抑制効果が解除されたとも考えられた。



**Fig. 3.** PICK1 の細胞内クラスター形成解析。PICK1 の N 末端側に AcGFP1 を付加したコンストラクトを発現させ、細胞内でのクラスター形成を評価した。(A) 多くの細胞ではこのような diffuse なシグナルが観察された。(B) PICK1 SA を発現させた細胞では細胞内に多数のクラスターを有する細胞を認めた。(C) 細胞内に 5 つ以上クラスターを有する細胞の割合を定量した。グラフは各視野における割合を示す。Mean  $\pm$  S.E.M. (WT,  $n=48$ ; SA,  $n=54$ ; SE,  $n=52$ ), \* $p<0.05$

## 結 語

GluA2 と PICK1 との結合では、PICK1 のリン酸化状態が重要な役割を担っている。PICK1 がリン酸化されると GluA2 と結合する一方、脱リン酸化されると膜との結合が強くなり、GluA2 と乖離する。本成果は、受容体取り込みの機序解明に繋がる。

## 参考文献

- 1) Staudinger J, Zhou J, Burgess R, Elledge SJ, and Olson EN. PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *J Cell Biol* 1995;128:263-71.
- 2) Hanley JG. PICK1: a multi-talented modulator of AMPA receptor trafficking. *Pharmacol Ther* 2008;118:152-60.
- 3) Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM,

Sabatini BL, and Selkoe DJ. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008;14:837-42.

- 4) Kimura T, Whitcomb DJ, Jo J, Regan P, Piers T, Heo S, Brown C, Hashikawa T, Murayama M, Seok H, Sotiropoulos I, Kim E, Collingridge GL, Takashima A, and Cho K. Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013;369:20130144.
- 5) Madasu Y, Yang C, Boczkowska M, Bethoney KA, Zwolak A, Rebowski G, Svitkina T, Dominguez R. PICK1 is implicated in organelle motility in an Arp2/3 complex-independent manner. *Mol Biol Cell* 2015;26:1308-22.

## 研究成果リスト

## 論文発表

投稿済み. 現在, 追加実験及び修正中である.

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

精神疾患の病態における G 蛋白を介する情報伝達  
— ラット脳およびヒト死後脳を用いて —

研究代表者 小田垣 雄二 (大学病院 神経精神科・心療内科)

## 緒 言

精神医学における生物学的研究は最近の科学技術の急速な発展にともなって飛躍的に進歩し、多くの有益な知見が蓄積されてきた。特に、この数十年の間、中枢神経における細胞間および細胞内情報伝達系の分子機構の詳細が明らかにされるに従い、抗精神病薬や抗うつ薬の作用機序も分子レベルで説明されるようになってきている。しかし、このような精神薬理学の進歩にもかかわらず、精神疾患の病態についてはなお明らかでない点が多い。また、現在の向精神薬は副作用や効能の面でなお不十分と言わざるを得ない。

筆者は、精神疾患のモノアミン仮説や向精神薬の作用機序に関わる神経伝達が、ほとんど全て三量体G蛋白結合型受容体 (G-protein-coupled receptor; GPCR) を介するものであることに着目し、GPCRによるG蛋白の機能的活性化機構に関する研究を行ってきた。当初は受容体刺激によるhigh-affinity GTPase活性<sup>1)</sup>を指標に検討を重ねていたが、方法論的な制約のため、最近では実験手技としてはもっぱら $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合実験を用い、主にラットの脳膜標品における様々な受容体とG蛋白との共役に関する検討<sup>2-13)</sup>を行ってきた。

この方法は、三量体G蛋白が受容体刺激により活性化され、GTP結合部位に非水解性の $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ が結合する反応を利用したもので、簡便で応用範囲が広いことから現在広く用いられているが、 $G_{i/o}$ 以外の $G_s$ や $G_{q/11}$ の反応を検出することは困難であった。そこで、最近では $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合実験に抗 $G\alpha$ 抗体による免疫反応を組み合わせた新たな方法を試み、ラット脳膜標品における5-HT<sub>2A</sub>受容体およびM<sub>1</sub>ムスカリン性アセチルコリン受容体と $G\alpha_q$ との機能的共役の検出に成功している<sup>14-17)</sup>。本研究においては、これまでの研究をさらに発展させ、精神疾患の病態解明や治療薬の開発に資するべく、ラットおよびヒト死後脳より調整した膜標品を用い、各種受容体とG蛋白の機能的共役について一連の検討を行った。

## 材料と方法

200~250 gのSprague-Dawley系雄性ラットを断頭後、氷上で速やかに脳を切り出し、既報に従って大脳皮質、海馬、線条体各部位の膜標品を調整した。一方、ヒト死後脳に関しては、共同研究者であるJ. Javier Meana教授 (バスク大学薬理学教室)より提供を受けた背外側前頭前野を用い、ラット脳の場合とほぼ同様の手順で膜標品を調整した。現時点では、神経精神疾患のない対照群の40サンプルを入手し検討を続けている。

$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合実験は、従来の吸引濾過法による方法 (以下、方法①) と、抗 $G\alpha$ 抗体をコートした帯磁気ビーズによる免疫沈降法を組み合わせた方法<sup>17)</sup> (以下、方法②) のいずれかを用いて行った。

## 結 果

1) ラット脳膜標品における xanomeline および N-desmethylozapine による  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  結合に関する薬理学的検討

方法①を用いた従来の検討<sup>13)</sup>のなかで、両薬物がラット脳膜標品における $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合を濃度依存的に増加させることをすでに報告した。いずれの薬物も、従来の抗精神病薬では効果のない統合失調症の陰性症状や認知障害などに対する効果が期待されており、その薬理作用を詳細に検討することは、新たな作用機序に基づく向精神薬の開発に資するものと思われる。現在までの検討では、両薬物による反応には5-HT<sub>1A</sub>受容体が関与していることが明らかとなっている。さらに方法②を用いた検討により、xanomelineがM<sub>1</sub>タイプのムスカリン性アセチルコリン受容体の部分作動薬であることも示されている。また、N-desmethylozapineの反応の一部にオピオイド受容体、特に $\delta$ -オピオイド受容体が関与している可能性を示す結果を得ており、これについては現在さらに検討を進めている。現時点でのこれらの結果については、学会にて発表した (学会発表1 および4)。

## 2) ラット脳膜標品における方法②を用いた検討

ラット脳膜標品における5-HT<sub>2A</sub>受容体およびM<sub>1</sub>ムスカ

リン性アセチルコリン受容体を介した $G\alpha_q$ の活性化反応についてはすでに報告した<sup>17)</sup>。現在、他の受容体とG蛋白各サブタイプとの機能的共役についての探索的研究を継続している。

### 3) ヒト死後脳膜標品における方法①を用いた検討

ヒト死後脳膜標品を用いた従来の濾過法による $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合については、実験条件の至適化をほぼ終了し、複数の作動薬による反応について現在データを集積中である。現時点までの結果については、すでに国際学会で報告した(学会発表3)。

### 4) ヒト死後脳膜標品における方法②を用いた検討

ヒト死後脳膜標品においても、ラットでの結果と同様、5-HT<sub>2A</sub>受容体およびM<sub>1</sub>ムスカリン性アセチルコリン受容体を介した $G\alpha_q$ の活性化反応が検出可能であることを確認した(学会発表3)。すでに40サンプルでの測定も終了したが、その結果、M<sub>1</sub>ムスカリン性アセチルコリン受容体を介した $G\alpha_q$ の活性化の程度が年齢と負の相関関係にあることが明らかとなった。また、アデノシンA<sub>1</sub>受容体との機能的共役が、G<sub>i/o</sub>に属する各Gαサブタイプのうち、 $G\alpha_{i-3}$ に選択的に認められることを発見し(学会発表2)、これについては現在、論文を投稿中である(論文1)。

## 考 察

複雑な精神現象を単一の神経伝達物質の働きだけで説明することは困難であるが、これまでの精神薬理学における膨大な知見から、ある種の精神機能と特に関連の深い神経伝達系が明らかにされている。また、それらの多くは、同時に精神疾患の治療薬の作用機序にも関与していることが知られている。本研究で示されたxanomelineおよびN-desmethyloclozapineの5-HT<sub>1A</sub>受容体の部分作動薬としての作用は、多くの非定型抗精神病薬に共通して認める作用であり<sup>9)</sup>、今後の抗精神病薬の開発においてひとつのターゲットになるものと思われる。また、xanomelineのM<sub>1</sub>ムスカリン性アセチルコリン受容体の作動薬としての作用、およびN-desmethyloclozapineのオピオイド受容体の作動薬としての作用も、それぞれの薬物の臨床効果との関連を考えるうえで興味深い知見である。精神科治療薬の今後の開発を考えるうえでは、各種受容体に対する(部分)作動薬やallosteric modulatorの有効性について検討していくことが必要である<sup>18)</sup>。

ラットの脳膜標品における方法②による検討では、検出が可能な受容体とG蛋白サブタイプの組み合わせをさらに探究することにより、これまでの濾過法による $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合実験では検出し得なかった情報伝達系に関する新たな情報を提供できるものと期待される。

ヒト死後脳におけるM<sub>1</sub>ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する $G\alpha_q$ の活性化反応が年齢に伴い低下する現象は、加齢に伴う認知機能の低下を反映したものと考え

られる。また、この結果からは、今後の精神疾患と対照群との比較検討では、年齢についてのマッチングに特段の注意が必要になると考えている。現在すでに入手している40サンプルでの測定を終了後には、いよいよ対照群と精神疾患罹患患者群との比較検討のプロジェクトを開始する予定であり、精神疾患の病態生理にせまる結果を得ることができると期待している。

## 参考文献

- 1) Odagaki Y, Fuxe K. Agonist-induced high-affinity GTP hydrolysis as an index of receptor-mediated G protein activation in mammalian brain membranes. In: Challis RAJ, editor. Methods in molecular biology, vol. 83, Receptor signal transduction protocols. Totowa: Humana Press; 1997. p. 133-41.
- 2) Odagaki Y, Yamauchi T.  $\gamma$ -Hydroxybutyric acid, unlike  $\gamma$ -aminobutyric acid, does not stimulate G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> proteins in rat brain membranes. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004;94:89-94.
- 3) Odagaki Y, Toyoshima R, Yamauchi T. Lack of G protein-coupled sigma receptors in rat brain membranes: receptor-mediated high-affinity GTPase activity and  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  binding studies. J Neural Transm 2005;112:873-83.
- 4) Odagaki Y, Toyoshima R, Yamauchi T. Trazodone and its active metabolite *m*-chlorophenylpiperazine as partial agonists at 5-HT<sub>1A</sub> receptors assessed by  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  binding. J Psychopharmacol 2005;19:235-41.
- 5) Odagaki Y, Toyoshima R. Detailed pharmacological characterization of 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  binding in rat hippocampal membranes. J Pharmacol Sci 2005;98:66-76.
- 6) Odagaki Y, Toyoshima R. 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated G protein activation assessed by  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  binding in rat cerebral cortex. Eur J Pharmacol 2005;521:49-58.
- 7) Odagaki Y, Toyoshima R. 5-HT-stimulated  $[^{35}\text{S}]\text{guanosin-5'-O-(3-thio)triphosphate}$  binding as an assay for functional activation of G proteins coupled with 5-HT<sub>1B</sub> receptors in rat striatal membranes. Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol 2006;372:335-45.
- 8) Odagaki Y, Toyoshima R. Dopamine D<sub>2</sub> receptor-mediated G protein activation assessed by agonist-stimulated  $[^{35}\text{S}]\text{guanosine 5'-O-(}\gamma\text{-thiotriphosphate)}$  binding in rat striatal membranes. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat 2006;30:1304-12.
- 9) Odagaki Y, Toyoshima R. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist properties of antipsychotics determined by  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  binding in rat hippocampal membranes. Clin Exp Pharmacol Physiol 2007;34:462-6.
- 10) Odagaki Y, Toyoshima R. Pharmacological characterization of  $\alpha_{2B}$ -adrenergic receptor-mediated

- [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in rat cerebral cortical membranes. *Pharmacol Res* 2008;57:435-44.
- 11) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Functional coupling between metabotropic glutamate receptors and G-proteins in rat cerebral cortex assessed by guanosine-5'-O-(3-[<sup>35</sup>S]thio)triphosphate ([<sup>35</sup>S]GTPγS) binding assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011;109:175-85.
  - 12) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Group II metabotropic glutamate receptor-mediated activation of G-proteins in rat hippocampal and striatal membranes. *Neurosci Lett* 2013;539:22-6.
  - 13) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Functional activation of G-proteins coupled with muscarinic acetylcholine receptors in rat brain membranes. *J Pharmacol Sci* 2014;125:157-68.
  - 14) Odagaki Y, Toyoshima R. Muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of Gq in rat brain membranes determined by guanosine-5'-O-(3-[<sup>35</sup>S]thio)triphosphate ([<sup>35</sup>S]GTPγS) binding using an anti-G protein scintillation proximity assay. *J Neural Transm* 2012;119:525-32.
  - 15) Odagaki Y, Toyoshima R. Activation of Gq proteins coupled with 5-HT<sub>2</sub> receptors in rat cerebral cortical membranes assessed by antibody-capture scintillation proximity assay (SPA)/[<sup>35</sup>S]GTPγS binding. *Pharmacology* 2013;92:2-10.
  - 16) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Pharmacological characterization of M<sub>1</sub> muscarinic acetylcholine receptor-mediated Gq activation in rat cerebral cortical and hippocampal membranes. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2013;386:937-47.
  - 17) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Functional activation of Gα<sub>q</sub> via serotonin<sub>2A</sub> (5-HT<sub>2A</sub>) and muscarinic acetylcholine M<sub>1</sub> receptors assessed by guanosine-5'-O-(3-[<sup>35</sup>S]thio)triphosphate ([<sup>35</sup>S]GTPγS) binding/immunoprecipitation in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol* 2014;726:109-15.
  - 18) Odagaki Y. Agonists and allosteric modulators of G protein-coupled receptors as promising psychotropic drugs. In: Atta-ur-Rahman, editor. *Frontiers in clinical drug research-central nervous system*, vol. 1. Bentham Science; 2013. p. 3-43.
- 研究成果リスト (論文, 学会発表, 特許出願等)**
- 論文**
- 1) Odagaki Y, Kinoshita M, Ota T, Meana JJ, Callod LF, García-Sevilla JA. Adenosine A<sub>1</sub> receptors are selectively coupled to Gα<sub>i,3</sub> in human brains: guanosine-5'-O-(3-[<sup>35</sup>S]thio)triphosphate [<sup>35</sup>S]GTPγS binding/immunoprecipitation study. *Eur J Pharmacol* (in press)
- 学会発表**
- 1) 小田垣雄二, 木下雅一, 豊嶋良一. ラット大脳各部位における xanomeline による G 蛋白活性化の薬理学的検討, 第 43 回日本神経精神薬理学会年会, 平成 25 年 10 月, 沖縄
  - 2) 小田垣雄二, 木下雅一, 太田敏男, Meana JJ, Callod LF, García-Sevilla JA. ヒト死後脳膜標品においてアデノシン受容体は G<sub>i/o</sub> 蛋白のうち G<sub>i-3</sub> と選択的に共役する, 第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会, 平成 26 年 11 月, 名古屋
  - 3) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R, Meana JJ, Callod LF, García-Sevilla JA. Receptor-mediated [<sup>35</sup>S]GTPγS binding in postmortem human brain membranes: optimization of assay conditions for future studies. 27th ECNP Congress, Oct. 2014, Berlin
  - 4) 小田垣雄二, 木下雅一, 太田敏男. ラット脳膜標品における xanomeline および N-desmethylozapine による [<sup>35</sup>S]GTPγS 結合の薬理学的性質, 第 88 回日本薬理学会年会, 平成 27 年 3 月, 名古屋
- 特許出願**
- なし

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

肺癌における2重エネルギー造影CTを応用した  
悪性度規定領域の描出

研究代表者 泉 陽太郎（総合医療センター 呼吸器外科）

研究分担者 阿部 佳子<sup>2)</sup>, 柳田 ひさみ<sup>3)</sup>, 青木 耕平<sup>1)</sup>, 井上 慶明<sup>1)</sup>,  
福田 裕樹<sup>1)</sup>, 儀賀 理暁<sup>1)</sup>, 渡部 渉<sup>3)</sup>, 清水 裕次<sup>3)</sup>,  
田丸 淳一<sup>2)</sup>, 本田 憲業<sup>3)</sup>, 中山 光男<sup>1)</sup>

## 緒 言

固形癌は固有の腫瘍血管によって栄養されているが、その腫瘍血管は無秩序に構築され、その血流は不規則で血管構造は脆弱である。このため固形癌においては局所的な血流量の低下や血管透過性の亢進による組織圧の上昇がみられるとされ、このような領域が腫瘍の悪性化を誘導する領域である可能性が考えられる。以上の観点から固形癌における血流描出は重要とされる。肺癌における腫瘍血流の描出は臨床的には近年dynamic造影CTを用いて検討がなされてきたが<sup>1)</sup>、同一部位を経時的に何度も撮影するため実臨床でルーチンに施行するにはハードルが高い。

2重エネルギーCTは現在急速に普及しているCT装置である。2重エネルギーCTとは2つの異なる管電圧を用いて同部位を同時に撮影できるCT装置であり、得られたCTデータから特定の組成を抽出し画像化することができる。データは目的とする物質のX線減弱特性の違いを利用してthree-material decomposition法による画像化手法を用いて再構成され、目的とする物質をtemporalおよびspatialに高解像度で分離描出することができる<sup>2,3)</sup>。代表的造影剤のヨードは2重エネルギーCTにより分離が可能である。これにより経時的撮影を行わなくても腫瘍内のヨード分布として腫瘍血流を描出できる可能性がある。

本研究の目的は肺癌切除症例を対象に術前に2重エネルギー造影CTとdynamic CTを同時に行い、腫瘍の造影領域を比較検討すること、そしてこれらの所見を病理組織所見と比較することである。2重エネルギーCT、dynamic造影CTで描出される領域と病理組織学的所見との対比を行った報告は少なく<sup>4)</sup>固形癌の悪性度を規定する領域の

臨床的イメージングに関する新たな知見が期待される。

今回の報告では従来の造影CTと病理組織所見の比較に関する後方視的比較検討と、2重エネルギーCTを用いたdynamicCT撮影の方法について報告する。

## 材料と方法

## 従来の造影CTと病理組織所見の比較に関する後方視的比較検討

今回はCT所見と病理所見との対比方法を検討するために過去3年の肺癌切除症例のなかから、造影CTにて原発巣にある程度造影剤によるコントラストが見られると思われる症例を10例（腺癌7例、扁平上皮癌3例）選び、造影効果が高い領域と低い領域を病理組織学的に比較できるか否かを検討した。CT所見と病理のマクロ所見、切りだし図とを対比させて適切な切片を選択し、その切片上で境界を推定した。染色はHematoxylin and eosin (HE), Elastica-Masson Goldner (EMG), Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha (HIF1alpha), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Glucose transporter 1 (Glut1)を行った。本研究は申請番号1138として当施設倫理委員会に承認された。

## 2重エネルギーCTを用いたdynamic CT撮影の方法に関する検討

CT装置はSomatom Definition Flash（シーメンス社）を用いた。造影剤はイオパミロン300（バイエル社）を用いた。投与量は0.2 ml/kgとし投与速度は5 ml/secとした。生食による後押しを5 ml/secで20 ml行った。原則的には腫瘍のaxial断面での最大断面を中心にスキャンを行うこととした。十分な呼吸練習のあと造影剤投与開始時から30秒間吸気位で息止めを行い、この間に関心領域のスキャンを15回行った。その後40, 50, 60, 90, 120秒後にスキャンを行った<sup>1)</sup>。2重エネルギーCT画像として

1) 総合医療センター 呼吸器外科

2) 総合医療センター 放射線科

3) 総合医療センター 病理部

80 kVと140 kVで撮像を行い、また120 kV相当の画像をdynamic CT画像としてこれらのデータから作成した。得られたデータから腫瘍のperfusionの解析と2重エネルギー画像の作成を行った。解析はdeconvolution法を用い、CT装置に付属したソフトを用いて行った。まず腫瘍の最大断面を基準にmotion correctionを行い、続いてnoise reductionを行った。肺動脈および大動脈にROIを置き腫瘍における肺動脈相と大動脈相(気管支動脈相)のtime density curveを作成した。解析の範囲は肺実質を除くため-50 から150HUに設定した。本研究は申請番号1096として当施設倫理委員会に承認された。

## 結果

### 従来の造影CTと病理組織所見の比較に関する後方視的比較検討

**症例1:** 右中葉の肺腺癌症例。腫瘍の縦隔側に相対的に造影効果の高い領域が見られた(図1A-B)。EMG染色では、造影効果が相対的に高い領域では肺胞構築が保たれた中に癌の増殖が見られたのに対し造影効果が相対的に低い領域では肺胞の弾性線維が消失していた。造影効果が相対的に高い領域は癌の浸潤が進行しつつある領域である可能性が考えられた(図2A)。HE染色ではこのような所見の確認は困難であった(図2B)。なお同領域ではHIF1alpha染色が相対的に低く、VEGF染色が相対的に高い傾向がみられた(図3A-D)。

**症例2:** 左上葉の肺腺癌症例。この症例では造影効果が相対的に低い領域は壊死領域であり、気管支に癌が浸潤したその末梢領域が壊死になったと考えられた。

**症例3:** 左下葉肺腺癌症例。造影効果による病理組織学的所見の違いははっきりしなかった。

**症例4:** 右下葉の肺腺癌症例。腫瘍の中枢側に造影効果が相対的に高い領域がみられる(図4A, B)。造影効果が相対的に高い領域ではEMG染色で薄い青色の間質が存在し膠原線維の介在が目立った。(図5A, B)。癌のより早期の浸潤領域である可能性が考えられた。同領域ではHIF1alpha染色が相対的に低く、VEGF染色が相対的に高い傾向がみられた(図6A-D)。

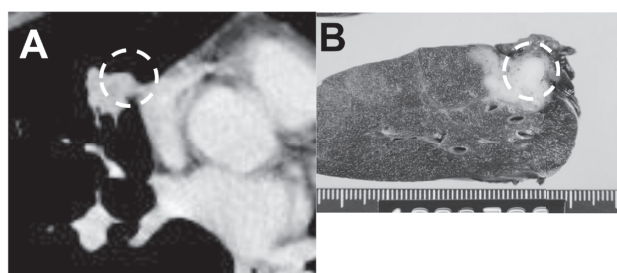


図1. 症例1. 右中葉の肺癌の造影CT画像。(A)点線で囲われた領域に造影効果が相対的に高い。(B)CT上造影効果の相対的に高い領域を切り出された切片に示す。

**症例5:** 右上葉肺腺癌症例。造影効果が相対的に高い領域ではEMG染色では黒色に染色される肺胞の弾性線維の凝集がみられ、相対的に低い領域では青色に染色される膠原線維の介在が目立った。HIF1alphaとVEGF染色に明らかな違いは見られなかった。

**症例6:** 右上葉肺腺癌症例。造影効果が相対的に高い領域ではEMG染色では黒色に染色される肺胞弾性線維の凝集がみられ、相対的に低い領域では青色の膠原線維の介在がより多くみられた。HIF1alphaとVEGF染色の所見に明らかな違いは見られなかった。

**症例7-9:** 扁平上皮癌の症例はいずれも既存の肺胞構造が消失しており壊死が目立った。腺癌に準ずるような既存の肺胞構造との関係や介在する間質の特徴の評価はできなかった。

**症例10:** 右中葉肺腺癌症例。黒色の肺胞基底膜の凝集がより顕著な領域がみられたが、CTから推定した境界とは一致しなかった。

### 2重エネルギーCTを用いたdynamicCT撮影の方法

肺癌症例2例について撮像を行った。撮像中に何も問題はなく、息止めも練習後に問題なく施行可能であった。CT装置には0.6 mmの素子が64個あるため理論的には直径38 mm以内の腫瘍であれば全体をスキャンできると考えられた。肺動脈相のピークは造影剤注入後約30秒、気管支動脈相のピークは造影剤注入後40秒以降にみられた。これは従来の報告と一致していたが<sup>5,6)</sup>、大動脈および肺動脈におけるROIの置き方によって微妙に変化する可能性があった。腫瘍の血流は気管支動脈相が主であるとされており<sup>5,6)</sup>この時相でblood flow (BF), blood volume (BV), mean transition time (MTT) と permeability

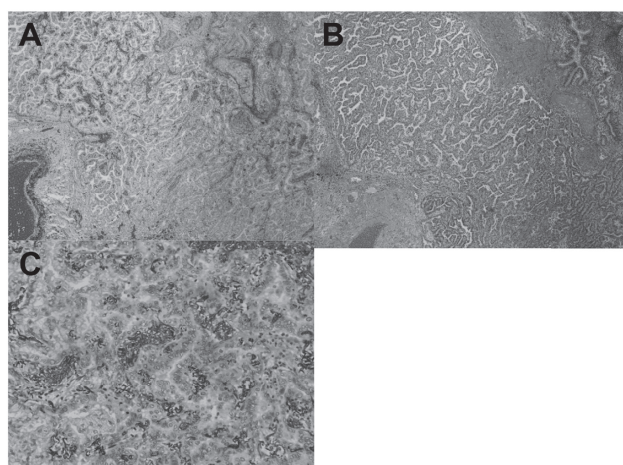


図2. 症例1。(A)画面左上には肺胞構築を残した癌の増殖が見られ、画面左下では肺胞の弾性線維が消失している。画面左上はCT上造影効果が相対的に高いと考えられる領域である(EMG染色X40)。(B)HE染色では(A)の所見確認は困難である。(HE染色X40)。(C)(A)の拡大像(EMG染色X100)。

(P)を算出した。一方、ノイズレベルの関係から解析に耐えうる2重エネルギー撮像画像を得るためには、X線量を通常のCT撮像に比べ増やす必要がある。すべての撮像タイミングでこの線量で撮像することは、被曝量の観点から望ましくないと考えられたため、今回の2重エネルギーCTからのヨードマップ作成は造影剤注入開始後60秒の画像を用いて行った。

**症例1:** 右中葉腺癌。Axial断面では腫瘍の外背側にdynamic CTで相対的に造影効果が高い領域が見られた。撮像範囲の腫瘍全体の2重エネルギーCTから作成したヨードマップ画像においても同じ領域にヨード濃度が高く描出されている可能性が示唆された(図7)。

**症例2:** 右上葉腺癌。Axial断面では腫瘍の縦隔側腹側にdynamic CTで相対的に造影効果が高い領域が見られた。

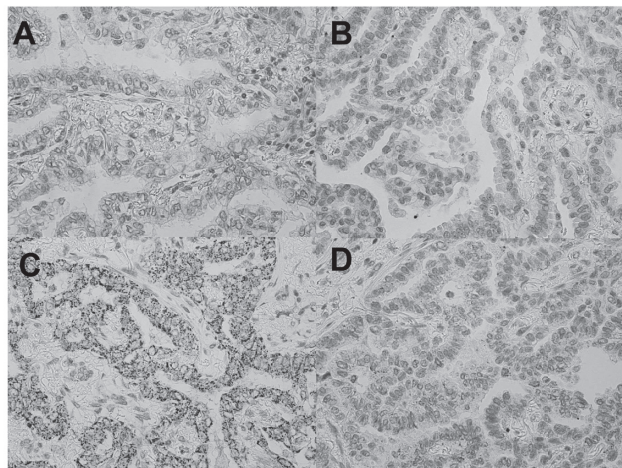


図3. 症例1. HIF1 $\alpha$ の発現はCT上造影効果の高い領域では相対的に低く(A), 造影効果の低い領域では相対的に高い(B)可能性が示唆された。VEGFの発現はCT上造影効果の高い領域では相対的に高く(C), 造影効果の低い領域では相対的に低い(D)可能性が示唆された。(A)と(B) HIF1 $\alpha$ 染色X200, (C)と(D) VEGF染色X200。

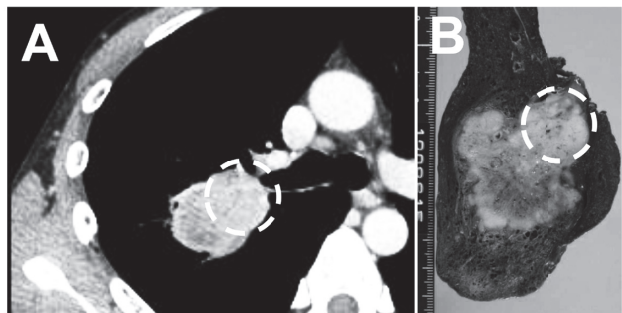


図4. 症例4. (A) 右下葉の肺腺癌の造影CT画像。点線で囲われた領域に造影効果が相対的に高い。(B) CT上造影効果の相対的に高い領域を切り出された切片に示す。

全体的に造影効果は低かった。撮像範囲の腫瘍全体の2重エネルギーCTから作成したヨードマップ画像においても同じ領域にヨード濃度が高く描出されている可能性が示唆された(図8)。

## 考察

### 従来の造影CTと病理組織所見の比較に関する後方視的比較検討

CT画像と病理組織学的所見の対比は現在の方法である程度可能と考えられた。造影効果の違いには肺胞の虚脱、間質線維化の状況、壊死領域の有無、気道や脈管の途絶の有無などが影響すると考えられ、これらの病理組織学的所見は腫瘍の低酸素状態などを介して悪性度と相関する可能性はあると思われた。HIF1 $\alpha$ とVEGF染色については、造影効果が相対的に低い領域ではlow perfusionすなわち低酸素を反映しHIF1の発現が高く、VEGFの

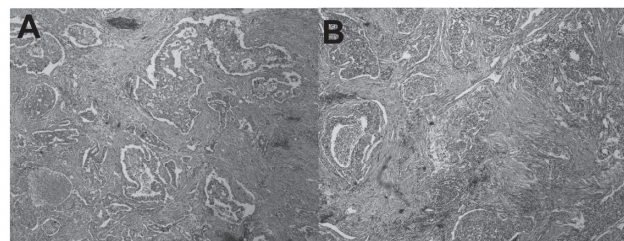


図5. 症例4. (A) 造影効果が相対的に高いと考えられる領域では介在する膠原線維の増生が目立たないのに対し、(B) CT上造影効果が相対的に低いと考えられる領域では膠原線維の増生が目立つ(EMG染色X100)。

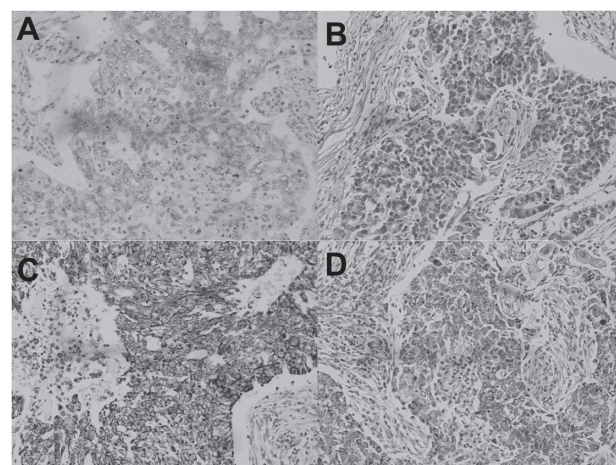


図6. 症例4. HIF1 $\alpha$ の発現はCT上造影効果の高い領域では相対的に弱く(A), 造影効果の低い領域では相対的に強い(B)可能性が示唆された。VEGFの発現はCT上造影効果の高い領域では相対的に強く(C), 造影効果の低い領域では相対的に弱い(D)可能性が示唆された。(A)と(B) HIF1 $\alpha$ 染色X200, (C)と(D) VEGF染色X200。

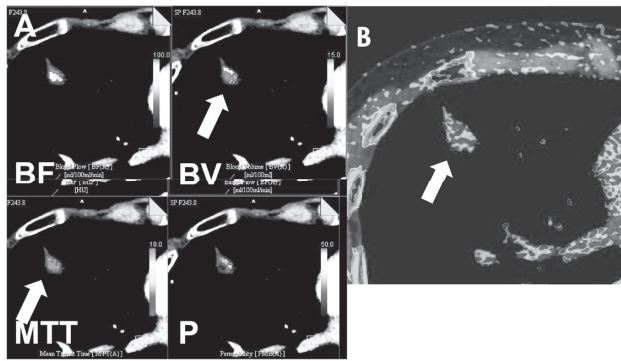


図 7. 右中葉腺癌症例. (A) dynamicCT画像では腫瘍の外背側にperfusionが高い可能性がある領域が描出された(矢印). blood flow (BF), blood volume (BV), mean transition time (MTT), permeability (P) (B) 2重エネルギーCTから作成したヨードマップ画像においても同じ領域にヨード濃度が高く描出されている可能性が示唆された(矢印).

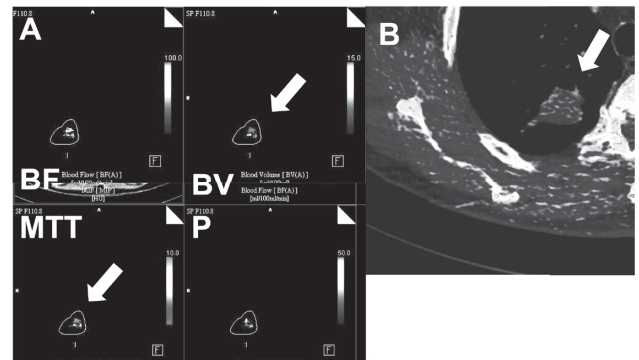


図 8. 右上葉腺癌症例. 全体に造影効果は低い. (A) dynamicCT画像では腫瘍の縦隔側腹側にperfusionが高い可能性がある領域が描出された(矢印). blood flow (BF), blood volume (BV), mean transition time (MTT), permeability (P) (B) 2重エネルギーCTから作成したヨードマップ画像においても同じ領域にヨード濃度が高く描出されている可能性が示唆された(矢印).

発現はまだ低いといったことが示唆される症例が幾つかあったが追加検討が必要と思われた. Glut1 の発現は今回検討した症例ではいずれも明らかではなかった. なお選択した症例においても, 主として縦隔構造の評価などを目的として撮影されたCT画像においては, 腫瘍病変の造影効果は明瞭とは言えず, より明瞭な画像の取得が本研究の前提となると考えられた.

## 2重エネルギーCTを用いたdynamic CT撮影の方法

dynamic CT画像では腫瘍内部の局所血流が従来の造影CTに比べより明瞭に視覚化された. 病理組織学的所見との対比もより正確になる可能性が示唆された. また2重エネルギーCTから作成したヨードマップ画像においてはBVとMTTについては同じ領域にヨード濃度が高く描出されている可能性があり, dynamic CTを施行せずに同等の画像を得られる可能性が考えられた. Dynamic CTのどのパラメータを採択するか, ヨードマップ画像の解析方法の最適化をどのように決定するか, そして実際の病理所見との対比が今後の課題と思われた.

## 参考文献

- 1) Ohno Y, Koyama H, Matsumoto K, Onishi Y, Takenaka D, Fujisawa Y, Yoshikawa T, Konishi M, Maniwa Y, Nishimura Y, Ito T, Sugimura K. Differentiation of malignant and benign pulmonary nodules with quantitative first-pass 320-detector row perfusion CT versus FDG PET/CT. *Radiology* 2011;258(2):599-609.

- 2) Yanagita H, Honda N, Nakayama M, Watanabe W, Shimizu Y, Osada H, Nakada K, Okada T, Ohno H, Takahashi T, Otani K. Prediction of postoperative pulmonary function: preliminary comparison of single-breath dual-energy xenon CT with three conventional methods. *Jpn J Radiol* 2013;31(6):377-85.
- 3) Chae EJ, Song JW, Krauss B, Song KS, Lee CW, Lee HJ, Seo JB. Dual-energy computed tomography characterization of solitary pulmonary nodules. *J Thorac Imaging* 2010;25(4):301-10.
- 4) Tacelli N1, Remy-Jardin M, Copin MC, Scherpereel A, Mensier E, Jaillard S, Lafitte JJ, Klotz E, Duhamel A, Remy J. Assessment of non-small cell lung cancer perfusion: pathologic-CT correlation in 15 patients. *Radiology* 2010;257(3):863-71.
- 5) Yuan X, Zhang J, Ao G, Quan C, Tian Y, Li H. Lung cancer perfusion: can we measure pulmonary and bronchial circulation simultaneously? *Eur Radiol* 2012;22(8):1665-71.
- 6) Nguyen-Kim TD, Frauenfelder T, Strobel K, Veit-Haibach P, Huellner MW. Assessment of bronchial and pulmonary blood supply in non-small cell lung cancer subtypes using computed tomography perfusion. *Invest Radiol* 2015;50(3):179-86.

## 研究成果リスト

該当なし

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

3Dプリンターを用いた一体系管状型気道用足場による  
一期的気道再生の研究

研究代表者 古村 眞 (医学部 小児外科)

## 緒 言

我々は、気管狭窄症の治療を再生医療で治療するための研究を行っている。気道再生の研究は、1994年 Vacanti Cらが、牛軟骨の細胞から管状の再生軟骨チューブを無胸腺ラットの頸部気管へ移植したのが最初である<sup>1)</sup>。気道の最も重要な機能は、呼吸する為の開存性である、そこで我々は気道のフレームとなる軟骨再生の研究を中心に行ってきた。軟骨細胞を足場に播種し、生体へ移植して再生した軟骨は、6週で気管軟骨と同じ力学的強度になることを証明した<sup>2)</sup>。この基礎的研究から、ステント系足場を開発し、家兎の気管前壁欠損モデルで、軟骨細胞増殖因子を徐放化し再生軟骨パッチが実現することを実証した<sup>4)</sup>。また、粘膜上皮は、足場内面をコラーゲンコートすることで、自律再生することを確認している<sup>4)</sup>。

2012年には、既に気管狭窄症の患児に、死体気管由来のマトリックスと骨髄細胞を用いた臨床応用例が報告されている<sup>2)</sup>。また、Macchiarini Pらが14例の円柱状の人工再生気管を移植しているが、半数の症例が3か月以内に死亡しており、長期生存例にはステント挿入が必要と報告されている<sup>5)</sup>。我々は、より生体に近い材料で分化・成熟の可能性の高いシリンダー型の再生気道であるBIO-AIR-TUBEを共同研究者らと開発した(特願2013-1773289)。膜様部と輪状靱帯に相当する部分は、BIO-TUBEによって再生させ、軟骨輪は足場材料に軟骨細胞を播種させて軟骨輪を再生させている。このBIO-AIR-TUBEには、再生軟骨輪の形状の足場を使用する必要がある。本研究の最終的な目標は、3Dプリンターで造形したポリ乳酸多孔体による足場を用いて再生軟骨輪を得ることである。このポリ乳酸の足場は、共同研究者らが鼻尖部軟骨の臨床研究で使用した材料であり生体への安全性が確認されている。従来、ポリ乳酸多孔体の足場材料は金型をつくり造形されている。この造型法では、時間を要し複雑な形状を造形することが技術的に困難である。しかし、3Dプリンターを用いて、ポリ乳酸による足場を造形でできれば、複雑な形状の足場を立体的に造形することが容易となる。本研究では、まず、3Dプリンターで造形したポリ乳

酸の足場によって、軟骨再生が可能であるか検討することを目的とした。

## 材料と方法

以前、報告した方法<sup>3,4,6)</sup>に準拠して、豚耳介軟骨から軟骨細胞を分離・培養した。耳介軟骨組織の周囲線維性組織を鈍的鋭的に除去し軟骨の小片を1 mm<sup>3</sup> サイズまで細切した。細切した軟骨小片は、50 ml コニカル型遠沈管内の0.3% コラゲナーゼタイプ2 (Worthington, Freehold, NJ) 内に入れ、37℃ 恒温槽内で強振盪40分間反応させた。酵素処理後の懸濁液を100 μmのナイロン製セル・ストレーナー (BD Falcon, Bedford, MA) にて濾過し、430G 5分4℃で遠心分離した。遠心後のPelletをPBS (phosphate-buffered saline) (和光製薬、大阪) で洗浄し単離した細胞は、1型コラーゲンコーティングされた培養皿 (アサヒ硝子、船橋) に、細胞密度6400 cells/cm<sup>2</sup> で単層培養した。培地はDMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle medium/f12) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) に5%FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma)、濃度100 ng/mlのFGF-2 (fibroblast growth factor-2) (科研製薬株式会社、東京)、5 μg/ml インスリン (Sigma) を加えたもので行った。培養液は、週に2回交換した。1継代した軟骨細胞を足場材料に播種した。

生分解性ポリ乳酸による足場は、SCOVO C170 (アビー株式会社、横浜) によって作成した。ポリ乳酸による0.5x0.5x0.5 mmの柱を0.5 mm間隔に配置した格子を作成した。これを2層に重ねて足場材料とした(図1)。

軟骨細胞の播種は、1% アテロコラーゲングル (株式会社高研、東京) 300 μL中に1.5x10<sup>7</sup>個の細胞を懸濁させたものを3Dプリンターで造形した足場に播種して37℃で2時間インキュベートした(図2)。

この移植片を無胸腺マウス (n=4) の皮下に移植し、移植4週後に移植片を摘出した。

## 結 果

移植4週後に摘出した移植片は、乳白色の組織が再生されていた(図3)。足場材料は、再生組織内に透見され

ており、残存していた。足場材料の周囲には、軟骨様の組織が認められており、軟骨と同等の弾性硬の硬さを有していた。

## 考 察

本研究によって、3Dプリンターで作成された立方体のポリ乳酸による足場材料で軟骨再生が確認された。

組織は、足場材料、細胞、そして成長因子の3因子を用いて再生される<sup>7)</sup>。必要な組織の大きさと形状は、足場の造形によって調整することが可能である。今回の研究で、3Dプリンターで再生された足場材料によって、足場とほぼ同じ大きさで形状の軟骨が再生されたことから、再生組織の大きさと形状を3Dプリンターによる足場で自由に調整できると考えている。

最終的には、軟骨輪様組織、膜様部・輪状靱帯様組織の足場を3Dプリンターで造形し、それぞれの細胞をリク

ルートあるいは播種することで気管を再生することが可能と考えている。CTあるいはMRI検査から得られた患者3D画像データから、3Dプリンターを使用して個々の症例に必要な気道長・径をオーダーメイドで作製することが可能となる。つまり、必要な気道を病態にあわせて再生することができる。また、足場材料を造型するための金型を作成する必要がなくなり、短期間の造型が可能となり、再生医療の問題点であるコストの削減という観点からも有用と思われる。治療が必要となった場合、短期間で足場材料が造型されるということは、臨床応用する上では重要なことである。

生分解性のプラスチックとともに組織学的検討をさらに追加する必要があるが、肉眼所見、触診所見は軟骨組織であった。3Dプリンターの性能あるいは樹脂の改良に

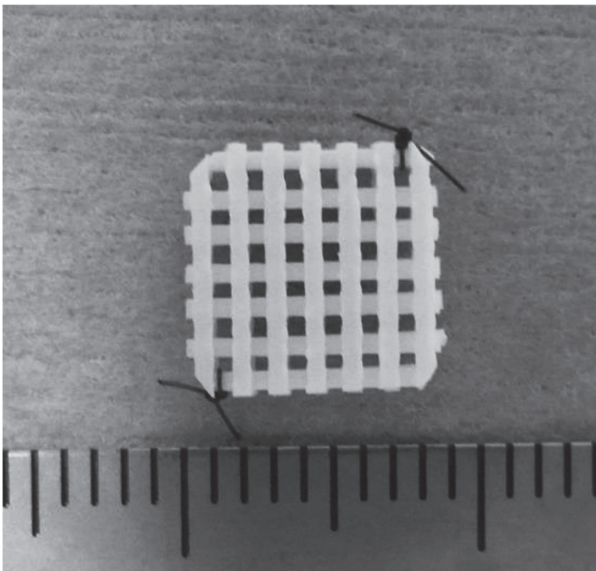


図 1.

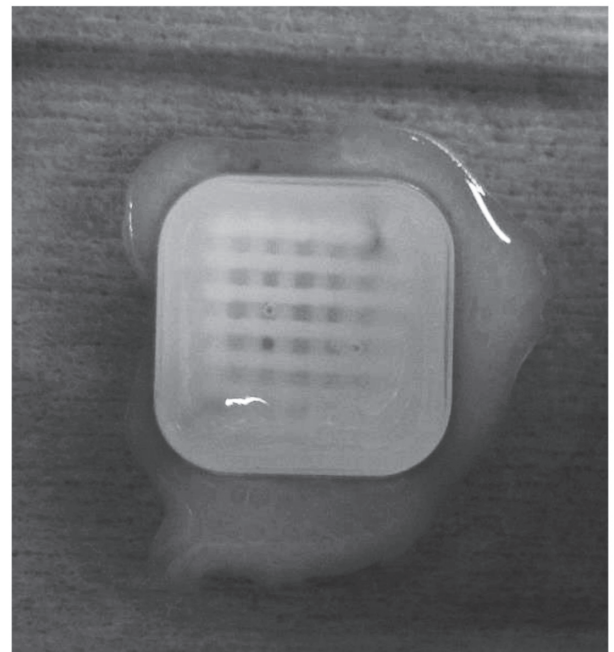


図 2.

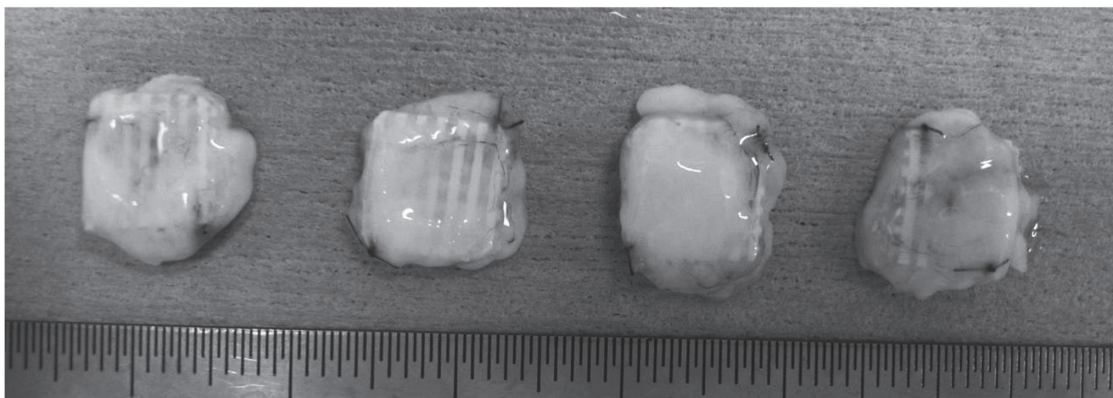


図 3.

よって、さらに微細構造の造型が可能となれば、海綿状の足場が造形されることで軟骨組織の再生が促進され、軟骨基質の産生効率も向上するものと考えられる。また、本研究では、ポリ乳酸による足場造型を行ったが、その他の生分解性ポリマー、コラーゲンなどの材料を用いてプリントアウトが可能となれば、再生組織の種類によって有用なそれぞれの足場造型が可能となる。

本研究によって、3Dプリンターによって造型した生分解性の足場材料を用いて、軟骨様組織の再生を得ることが可能であった。3Dプリンターによる足場の造型は、組織工学的手法を用いた再生医療を臨床応用するうえで基盤技術となり得るものと考えている。3Dプリンターの性能改善が、今後さらに期待される。また、組織再生を行う上で、その他の生分解性材料による造型技術が、次世代の組織再生技術になり得るものと考えられる。

#### 参考文献

- 1) Vacanti CA, Paige KT, Kim WS, Sakata J, Upton J, Vacanti JP. Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage. *J Pediatr Surg* 1994; 29:201-4 [discussion 204-205].
- 2) Elliott MJ(1), De Coppi P, Spegginorin S, Roebuck D, Butler CR, Samuel E, Crowley C, McLaren C, Fierens A, Vondrys D, Cochrane L, Jephson C, Janes S, Beaumont NJ, Cogan T, Bader A, Seifalian AM, Hsuan JJ, Lowdell MW, Birchall MA. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study. *Lancet* 2012 Sep 15;380(9846):994-1000. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60737-5. Epub 2012 Jul 26.
- 3) Komura M, Komura H, Kanamori Y, Tanaka Y, Ohtani Y, Ishimaru T, Sugiyama M, Hoshi K, Iwanaka T. Study of mechanical properties of engineered cartilage in an in vivo culture for design of a biodegradable scaffold. *Int J Artif Organs* 2010 Nov;33(11):775-81.
- 4) Komura M, Komura H, Kanamori Y, Tanaka Y, Suzuki K, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Hatanaka A, Hoshi K, Ikada Y, Tabata Y, Iwanaka T. An animal model study for tissue-engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis. *J Pediatr Surg* 2008 Dec;43(12):2141-6.
- 5) Delaere PR, Van Raemdonck D. The trachea: the first tissue-engineered organ? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Apr;147(4):1128-32. doi:10.1016/j.jtcvs.2013.12.024. Epub 2014 Jan 2.
- 6) Komura M, Komura H, Tanaka Y, Kanamori Y, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Suzuki K, Hoshi K, Iwanaka T. Human tracheal chondrocytes as a cell source for augmenting stenotic tracheal segments: the first feasibility study in an in vivo culture system. *Pediatr Surg Int* 2008 Oct;24(10):1117-21.
- 7) Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg* 1988 Jan;23(1 Pt 2):3-9.

研究成果リスト (論文, 学会発表, 特許出願等)

特になし

## 学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

MRCD疾患モデル細胞を用いたミトコンドリア呼吸鎖複合体の  
選択的制御機構の解明

研究代表者 徳澤 佳美 (ゲノム医学研究センター)

## 緒言

ミトコンドリア電子伝達系と酸化リン酸化は真核生物にとって必須の生体内反応である。細胞内のATPは主にミトコンドリアで生産されるため、この過程における異常はATP産生量の低下に引き続き細胞の生体反応に重篤なダメージを引き起こす。

ミトコンドリア呼吸鎖異常症 (Mitochondrial respiratory chain disorder, 以下MRCDと略) は、5000人に1人の割合で発症する難治性疾患であり、ミトコンドリアDNAの変異、あるいは核DNAの変異により、ミトコンドリアのエネルギー産生経路の異常が引き起こされる。電子伝達系のいずれかもしくは複数の呼吸鎖複合体の酵素活性が維持できなくなることによりMRCD患者の臓器や線維芽細胞ではATP産生量の低下、活性酸素種の増加を引き起こす。また、ミトコンドリアはどの細胞にも存在する細胞小器官であるため、MRCDの症状は全身、特にミトコンドリアが豊富な神経系、心臓、肝臓、骨格筋等の臓器で様々な症状を呈し、ひいては個体レベルでの生命維持に影響を及ぼす。MRCD患者の皮膚線維芽細胞や組織では、呼吸鎖酵素複合体の酵素活性の低下に加え、複合体の量そのものの減少が起きている。

5-アミノレブリン酸 (ALA) はALA合成酵素によりグリシンとスクシニルCoA から合成されるヘムの前駆体であり、最終的にプロトポルフィリンIXへ合成されたあとに鉄イオンを配位してヘムになる<sup>1)</sup>。ヘムはヘモグロビン、ミオグロビン、シトクロム類のようなヘムタンパク質の補欠分子族として機能する。特にミトコンドリアのヘムタンパク質は呼吸鎖複合体I、Vを除くII、III、IVのサブユニットの酸化還元反応の活性中心として重要な役割を果たす<sup>2)</sup>。2011年にマウスに5-ALAと鉄を同時に経口投与することで、肝臓の呼吸鎖複合体IVサブユニットのタンパク質量とATP量が増加したという報告がなされた<sup>3)</sup>。そこで、我々は、MRCD患者由来皮膚線維芽細胞に5-ALAと二価鉄を同時に投与することで、細胞内ATP産生量が増加するか検討した。その結果、5-ALAと二価鉄の同時投与は、呼吸鎖複合体IからIVまでの複合体量を

激しく変動させることが明らかとなった。しかし、この複合体量の変動の詳しいメカニズムはまだ解明されていない。一方、ミトコンドリアにおいて、鉄はヘム以外に鉄・硫黄クラスターを形成して存在するが、5-ALA/鉄投与時における鉄硫黄タンパク質への影響についても、明らかになっていない。本研究では5-ALAと二価鉄を同時投与した時のミトコンドリアでの鉄硫黄タンパク質の量をSDS-PAGE/ウエスタンブロッティングを用いて解析した。また、CRISPR/Cas9システムを用いてMRCDの原因遺伝子をノックアウトした疾患モデル細胞の作出も試みた。

## 材料と方法

## 1. 鉄硫黄タンパク質の発現変動の解析

MRCD患者由来皮膚線維芽細胞を15 cm培養ディッシュに $2 \times 10^6$ 細胞ずつ播種し、翌日、100  $\mu$ M第一クエン酸ナトリウムと0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ Mの各濃度の5-ALAを添加した培地に交換し、10日間培養した。コントロールとして、健康人由来の皮膚線維芽細胞 (NHDF-Neo) も同時に処理した。これらの細胞から常法に従って、ミトコンドリア画分を単離し、SDS-PAGE/ウエスタンブロッティングにて、ミトコンドリアに局在する鉄硫黄タンパク質 (NDUFS1, NDUFS8, ACO2) の発現量を解析した。また、ヘムタンパク質であるCYC1のタンパク質量の変化も検討した。

## 2. MRCD疾患モデル細胞の作製

当初はTAL effector nuclease (TALEN) を用いる予定であったが、より簡便なことからCRISPR/Cas9を用いている。標的遺伝子は既知の病因遺伝子であるSURF1、及び文部科学省革新的細胞解析研究プログラムで、同定した新規病因遺伝子の内の一つとした。gRNAを設計して、Addgeneより購入したpSpCas9 (BB) -2A-Puro (pX459) にクローニングした。

## 結果

MRCD患者由来皮膚線維芽細胞とNHDF-Neoと合わせて12検体に5-ALAと鉄を同時に投与し、ミトコンドリア

に局在する鉄硫黄タンパク質の発現量を解析した。この内、ミトコンドリア量が不足し評価できない検体が5検体あった。残りの7検体全てにおいて、5-ALAを添加した時にNDUFS1の発現量が減少していた。またNDUFS8は5検体で発現量の減少が認められた。ACO2は4検体で発現量が減少していた。他の検体では濃度依存的な変化を示さなかった(data not shown)。一方、ヘムタンパク質であるCYC1の発現量は、NHDF-Neoで増加傾向を示したものの、MRCDC患者検体では、顕著な傾向が認められなかった。今回、MRCDC患者由来線維芽細胞から単離できたミトコンドリア量が少なく、充分な解析が実施できなかった検体もあるため、今後も引き続きサンプリングと解析を行う必要がある。また、MRCDC患者由来線維芽細胞の中には増殖が遅い検体もあり、解析に必要な細胞数を取得するのに限界があるため、293FT細胞を使ってMRCDC疾患モデル細胞を作製し、それらを用いて5-ALA/鉄投与の影響を調べる予定であった。しかし上記の解析に時間がかかり、現在作製を進行中である。

## 考 察

今回の解析により鉄硫黄タンパク質の発現量は、5-ALA/鉄の投与時に減少する傾向が認められた。この結果は、ヘムの合成量の増加が鉄・硫黄クラスター形成に少なからず影響を与えていることを示唆している。NDUFS1、NDUFS8は呼吸鎖複合体Iの構成因子をコードしており、呼吸鎖複合体Iの活性の低下や複合体のアッセムブリ量の低下を示す患者において、これらの遺伝子の変異が報告されている<sup>4,5)</sup>。実際5-ALAと鉄を投与すると呼吸鎖複合体Iのアッセムブリ量が低下する傾向があった(data not shown)が、その原因としてNDUFS1、NDUFS8の発現量の減少にあることが示唆された。今後は他の鉄硫黄タンパク質の発現量についても影響を受けているのかどうか調べる必要がある。また今回、サンプル量が少ないため評価できなかった検体については今後の解析が待たれる。一方、5-ALAと鉄の同時投与によりヘムタンパク質であるCYC1の顕著な増加は認められなかったが、5-ALAと鉄の同時投与により細胞内のヘムが増加していることを示すため、CYC1以外の呼吸鎖複合

体を構成するヘムタンパク質について引き続き検討する必要がある。また、本実験で用いたMRCDC患者検体は元々呼吸鎖複合体Iの酵素活性が低下した検体を中心に選んでいるが、今後は呼吸鎖複合体I以外の酵素活性が低下した検体における5-ALA/鉄の投与の影響も検討していく必要がある。

## 謝 辞

本研究はゲノム医学研究センターゲノム科学部門において実施されました。本研究を実施するにあたり、多大な御協力を頂いた岡崎康司教授、清水千春技術員さん、大久保桃絵技術員さん、八塚由紀子助手に深く感謝致します。

## 参考文献

- 1) Hagiya Y, Adachi T, Ogura S, An R, Tamura A, Nakagawa H, et al. Nrf2-dependent induction of human ABC transporter ABCG2 and heme oxygenase-1 in HepG2 cells by photoactivation of porphyrins: biochemical implications for cancer cell response to photodynamic therapy. *J Exp Ther Oncol* 2008;7:153-67.
- 2) Xu W1, Barrientos T, Andrews NC. Iron and copper in mitochondrial diseases. *Cell Metab* 2013;17:319-28.
- 3) Ogura S1, Maruyama K, Hagiya Y, Sugiyama Y, Tsuchiya K, Takahashi K, et al. The effect of 5-aminolevulinic acid on cytochrome c oxidase activity in mouse liver. *BMC Res Notes* 2011;4:66.
- 4) Hoefs SJ, Skjeldal OH, Rodenburg RJ, Nedregaard B, van Kaauwen EP, Spiekorkotter U, et al. Novel mutations in the NDUFS1 gene cause low residual activities in human complex I deficiencies. *Mol Genet Metab* 2010;100: 251-6.
- 5) Procaccio V, Wallace DC. Late-onset Leigh syndrome in a patient with mitochondrial complex I NDUFS8 mutations. *Neurology* 2004;62:1899-901.

## 研究成果リスト

なし

## 学内グラント 報告書

### 平成26年度 学内グラント終了時報告書

## 子宮内膜における NSBP1 のメカニズム解明と臨床応用

研究代表者 木村 真智子 (医学部 産婦人科)

### 緒 言

HMGNは構造的クロマチン因子の一種として組織特異的遺伝子発現誘導により各種シグナルに応じて、クロマチンの緩和・凝縮などの構造変化を変化させ、遺伝情報のオンオフを制御する。しかしその分子メカニズムや生体内での機能については未だ不明である。

ヒトでのNSBP1発現組織は既に確認されており、ヒトでは腎癌や前立腺がんなど泌尿器系臓器の発がんとの関連が報告されている。マウス実験において、胎生期のエストロゲン(E2)暴露によりNSBP1遺伝子のプロモーター領域の低メチル化が起こり、成熟マウス子宮内膜においてNSBP1過剰発現が引き起こされ、子宮体癌(高分化型類内膜腺癌G1に相当)が発症することが報告された。

本研究では、新たなエピジェネティクス因子であるHMGN5(NSBP1)の子宮内膜における周期的変化および癌に進展する際の遺伝子発現制御への関与について明らかにすることを目的とする。

### 材料と方法

子宮体癌細胞株であるIshikawa細胞(G1)、HEC265(G1)、HEC59(G2)、HEC50B(G3)(すべてJCRB細胞バンクより分譲)を用いて組織培養を行った。月経周期における増殖期、増殖期後期、分泌期、分泌期後期それぞれの正常子宮内膜および子宮体癌(G1, G2, G3)および閉経後子宮内膜についてNSBP1の局在を免疫組織染色法で調べた。免疫組織染色法は、NSBP1抗体(Sigma Life Science, HPA000511)を用いて行った。

さらに、培養細胞からTrizol(Ambion)を用いてRNAを抽出した後、Go Script™逆転写酵素(Promega)によるcDNA合成後、NSBP1遺伝子のRT-PCRを行った。

### 結 果

#### 免疫組織染色法

正常子宮内膜の増殖期後期から分泌期にかけて、腺上皮細胞ならびのその周囲の間質細胞において発現を認めた。閉経後子宮内膜ならびに子宮体癌組織標本では発現は認められなかった(図1)。

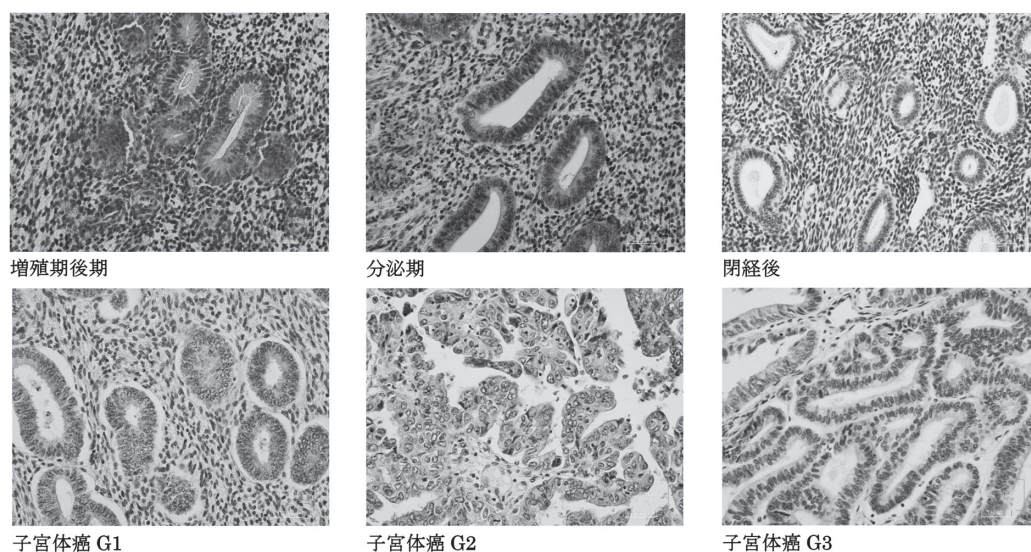


図 1.

## RT-PCR

子宮体癌細胞株Ishikawa細胞, HEC265 および HEC50Bはコントロールの正常子宮内膜と比較し, 発現の亢進は認められなかった. HEC59 は細胞培養途中のため現時点でデータは未である.

## 考 察

子宮体癌組織ならびに閉経後ではNSBP1 の発現は免疫組織染色にて確認できなかった. また, RT-PCRでも子宮体癌細胞での発現の亢進は認められず, 子宮体癌発癌との関連は示されなかった. しかし, 正常子宮内膜において,

エストロゲン分泌が最大になる増殖期後期から分泌期にかけてNSBP1 の発現の亢進が見られた. このことは, NSBP1 が染色体構造調節因子としてエストロゲン濃度依存性に核内の転写調節に関与するものと考えられた.

今後は, 培養子宮内膜腺上皮ならびに内膜間質細胞をもちいて, エストロゲン濃度依存性の発現の有無の確認を行っていく予定である.

## 研究成果リスト

本研究における研究成果の学会や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26年度 学内グラント終了時報告書

医学教育におけるデジタル教材システムの開発と  
その効果的な活用法の検討

研究代表者 猪股 玲子 (医学部 解剖学)

研究分担者 亀澤 一\*, 駒崎 伸二\*

## 緒言

グローバル社会において、これから我が国が発展していくためには国際競争に負けない教育への質的な転換を図ることが、国家戦略上の重要な課題の1つとして提言されている。その中では、従来のような知識の一方的な伝達型の授業から、生徒や学生たちが自ら学習に参加して問題を発見し、その解を見いだしていくアクティブ・ラーニング形式の授業や、反転授業と呼ばれる新たな教育方法への転換が急務であると指摘されている。そして、その基盤作りとして、教材や授業のデジタル化、そして、デジタル教材を効果的に活用した教育改革の必要性が求められている。

現在、その一環として全国的に進められているのが、タブレット端末を活用した新たな教育方法の展開である。その方法では、従来の紙の教科書では不可能なムービーやコンピューターグラフィックスなどを多用したインタラクティブな教材を利用することができる。そのために、今までにない教育効果が期待できると考えられている。しかしながら、タブレット端末を用いた教育が小学校から大学に至るまで急速に普及しつつある一方で、それに必要なデジタル教材の作成や、その教材を用いた効果的な教育方法の開発が、欧米諸国に比べて遙かに立ち遅れた状態にある。重要なのは、その遅れを速やかに取り戻して、教育の質的な転換を早急に成し遂げることである。そのためには、教員自らがデジタル教材の作成に参加し、その教材を用いた効果的な教育方法を実施できるような環境作りが急務であると我々は考えている。

現実的な問題として、教育に携わっている多くの教員がすぐにでもデジタル教材の作成や、その教材を効果的に用いた授業を実施できるような状況ではない。それは、デジタル教材を作製しようとしても、経済的な問題や技術的な問題が障害となっているだけでなく、それらの教材を用いた効果的な教育方法がまだ開発されていないからである。残念なのは、それらの理由で教員が自らの手に

よるデジタル教材の作成を諦めて、欧米諸国で開発された市販のデジタル教材に頼るようでは、国際競争に負けない教育の質的転換を達成することはとうてい無理である。

そこで、本研究では、教員の誰もが実用的なデジタル教材を簡単に作成することができるようにするために、その障害となっている経済と技術的な問題を解決することを目的とした。さらに、教員自らが作成したデジタル教材を用いた教育方法の開発と、その実践も行った。

## 目的と方法

デジタル教材の作成と、その教材を用いた新たな教育方法を普及させるためには、誰もが簡単にできる教材の作成方法を考案し、それを幅広い教育分野の人たちに紹介することが必要であると考えた。そこで、我々は既存の設備とフリーソフトだけを用いた経済的で実用的なデジタル教材の作成方法を考案し、それを解説した単行本を出版する計画を立てた。それと同時に、デジタル教材を用いた効果的な授業方法の開発や、デジタル教材を活用した新たな教科書の出版についても計画した。

## 結果と考察

## デジタル教材作成に関する解説書の出版

ここでは、我々が関わっている生命科学教育に必要なデジタル教材の作製方法の開発を中心に行った。その目標は、実用的なデジタル教材を誰もが簡単に作製することのできる経済的な方法の開発である。その際の1つの方法として、世界中で公開されている高機能なフリーソフトを組み合わせ、実用的なデジタル教材の作製方法を開発することである。つまり、この方法ならば、誰もが経済的と技術的な問題を心配することなく、デジタル教材の作製を容易に行うことができると考えたからである。

その結果、国内外で数多く公開されている高機能なフリーソフトを組み合わせることにより、生命科学の教育に役立つさまざまなデジタル教材(バーチャル顕微鏡や、胚・組織・分子などの立体モデル)の作製方法を開発することができた。それら研究成果は、出版社の裳華房(株)か

\*医学部 解剖学

ら単行本(電子書籍のKindle版も同時販売)として出版した(図1)。

### デジタル教材を用いた効果的な教育方法の実践

デジタル教材はこれまでのような紙の媒体と比べて遙かに多くの可能性を秘めている。たとえば、インタラクティブ

な教材観察やムービーなどを容易に扱うことが可能である。それゆえ、その効果的な活用しだいでは、従来の教育方法をしのぐ質的な転換が可能である。さらに、飛躍的に増加しつつある最近の科学情報を、限られた教育時間内で学生たちに理解させるための手段としても、デジタル教材を活用した教育方法は非常に有効なものになると考えられる。

以上のような観点から、我々は医学部の授業において、バーチャル顕微鏡を用いた組織学の実習(図2)と、さまざまなデジタル教材を用いた発生学の授業(図3)を実施した。その際に問題となったのは、デジタル教材を用いた教育用のインフラが学内の教育環境としてまだ整っていないことであった。そこで、我々は、学生が所有するノートブック型コンピューターを用いた授業を実施した。そして、その際に必要なソフトやデータは、CD-ROMやUSBメモリーなどで学生に提供した。この方法ならば、場所を選ばず、どこでもデジタル教材を用いた効果的な授業の実施が可能である。

デジタル教材を用いた授業について学生からのアンケート結果をみると、バーチャル顕微鏡は、従来の顕微鏡を用いた実習と比べて非常に分かりやすいと好評であった。このバーチャル顕微鏡の有効性については既に数多くの研究結果から実証されており、病理診断の分野ではいち早くこの技術が実用化されている。しかしながら、他の分野(たとえば、組織学実習など)では、依然として、この技術の活用が遅れている。その大きな原因の1つは経済的な問題にあると思われる。今回の我々の研究により、経済的な問題が解消されたので、これから、さまざまな教育分野でこの技術の普及が期待される。

また、バーチャル顕微鏡、3Dモデル、ムービーなどを活用した発生学の授業も、学生からのアンケート結果では、従来の紙の教科書よりも分かりやすいと好評

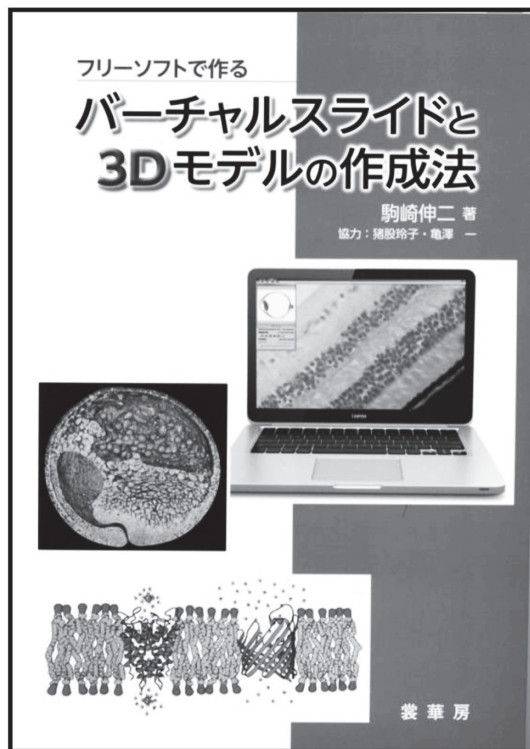


図1. 2015年9月に裳華房から出版された解説書。この単行本では、誰もが実用的なデジタル教材を簡単に作成できる方法が解説されている。



図2. バーチャル顕微鏡を用いた医学部2年生の組織学実習の風景。学生が各自のノートブック型パソコンを用いて組織学実習を行っている。その際に必要なソフトやデータはCDやUSBメモリーにより提供された。



図 3. デジタル教材を使った医学部 1 年生の選択必修科目の授業風景. ヒトを含めたさまざまな動物の胚の三次元CGモデルの観察や、バーチャル顕微鏡による組織観察を行っている。

であった。しかしながら、このような試みは今までに無かったものなので、これから、より効果的な教育方法へと発展させるためには、さらなる改良の余地があると思われる。また、デジタル教材を用いた次の実践として、MRI 画像による 3D モデルの作成技術と、そのモデルを用いた人体構造の学習の授業を実施する計画である。その他に、デジタル教材を活用した発生学の教科書（裳華房より出版予定）の作成も、現在進行中である。

これからの展望として、全国の教員により作成されたデジタル教材をデータベース化し、それらをインターネットを介して共同利用できるようにすれば、全国的なレベルで教育の質の向上に繋がることが期待される。それだけでなく、教員にも大きな発想の転換（アクティブ・ティーチングへの発想の転換）がもたらされるであろう。そのような目標に向かって、さらに準備を進めたいと考えている。

## 謝 辞

本研究の一部は、公益財団法人の医学教育振興財団（平成 25 年度）と公益財団法人の文教協会（平成 26 年度）からの研究助成により行われた。ここに謝意を表する。

## 研究成果リスト

### 単行本

- 1) 駒崎伸二（著）、猪股玲子、亀澤 一（協力）。フリーソフトで作るバーチャルスライドと 3D モデルの作成法。東京：裳華房；2014。

### 学会発表

- 1) Inomata R, Kamezawa H, Komazaki S. Creating electronic materials for the effective teaching of anatomy courses. The joint meeting of the 120<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, March 2015, Kobe, Japan

### 研究助成金

- 1) 駒崎伸二（代表）、猪股玲子、亀澤 一（共同研究者）。理科教育や生命科学教育における経済的な電子教材の作成法の開発と、それらの教材をアクティブ・ラーニングで効果的に活用する方法の確立。文教協会；2014。82 万。

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

## 扁桃体オシレーション活動の発生原理と生理的意義

研究代表者 橋爪 幹 (医学部 生化学)

## 緒 言

扁桃体は動物の情動を司る脳部位であり、特に恐怖・不安やストレスなどの負の情動との関わりについて多くの研究が行われてきた。古典的な恐怖条件付け実験では、ネズミに音を聴かせながら電気ショックを与えると、翌日には音を聴かせるだけで硬直状態に陥ることが確認されている。その時間を計測することで恐怖記憶獲得の程度を測る指標としてきた。またこの操作は扁桃体基底外側核の錐体細胞と、聴覚情報を伝える視床由来の入力線維との間に長期増強を引き起こすことが知られており、恐怖記憶獲得の細胞モデルであると考えられている。また、動物は電気ショックを与えられた場所のことを強く記憶しており、電気ショック負荷の翌日に同じ実験用ケージに入れると、やはり長い時間硬直する様子が観察される。この現象には扁桃体だけでなく空間記憶を司る海馬も関係していることが知られている。

扁桃体と海馬はともに大脳辺縁系に属しており、また相互に神経軸索を送り合っている。それゆえ、恐怖条件付け記憶の想起時にこの2つの部位から細胞外記録を行うと、 $\theta$ 帯域(4-8 Hz)のオシレーション活動の同期が上昇していることが知られている。一方、個々の扁桃体基底外側核の錐体細胞は周囲の抑制性介在ニューロンから周期的な入力を受け取っている。この自発性の抑制性オシレーション活動(0.1-3 Hz)は複数の錐体細胞間で同期していて、発生・維持には外部ではなく内部の興奮性入力を必要としているが、抑制性入力の振幅や周波数は様々な神経修飾因子によって影響を受けることが解明されている。この現象が扁桃体機能にどのような生理的意義をもたらしているかはいまだ解明されていないが、海馬との関わりから記憶の固定などに影響を与えているのではないかと予想される。

本研究ではラットに恐怖条件付け記憶を成立させ、その場合に扁桃体基底外側核の錐体細胞において抑制性オシレーション活動がどのように変化するかを電気生理学的に解析し、その生理的意義について考察することを試みる。

## 材料と方法

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

生後2-3週齢のラットをFear Condition実験用ケージに入れ、3分間自由に行動しているときの様子をビデオカメラで撮影した。その後卓上型ショッカースクランブラーを使って1 mA、1秒間の電気ショックを与え、それを10秒間隔で10回繰り返した。電気ショック終了後、ラットを再び3分間自由に行動させた後で飼育ケージに戻した。それから24時間後、ラットを再びFear Condition実験用ケージに入れて3分間自由行動させ、その様子をビデオカメラで撮影し、電気ショック負荷前と負荷一日後の動画から動物の硬直時間を計測した。そして3分の自由行動時間に対する硬直時間の割合を算出して比較した。

その後ラットにイソフルラン麻酔を吸引させ、断頭後に脳を摘出し、95%  $O_2$  / 5%  $CO_2$  の混合ガスを飽和させた氷冷Na-Choline Chloride置換液の中に入れた。この脳から扁桃体基底外側核を含む冠状スライス(厚さ400  $\mu m$ )を、マイクロスライサーを用いて作成した。スライスにはさらに左右に分断し、人工脳脊髄液(組成: 120 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM  $NaHCO_3$ , 1.25 mM  $NaH_2PO_4$ , 15 mM glucose, 2.5 mM  $CaCl_2$ , 1.3 mM  $MgCl_2$ )を回復液として、95%  $O_2$  / 5%  $CO_2$  の混合ガスで満たされたチャンバー内にて室温1時間以上静置した。その後、スライスを正立型顕微鏡のステージ上にあるチャンバーに移し、IR-CCDカメラを通じて扁桃体基底外側核にある錐体細胞を確認しながら、ホールセルパッチ記録を行った。記録中は95%  $O_2$  / 5%  $CO_2$  の混合ガスを飽和させた人工脳脊髄液を31-32度に保って灌流した。記録電極はガラスキャピラリーを電極ブラーで加熱して作成し、その電極抵抗は3-5 M $\Omega$ 程度になるようにした。そして電極内液はカリウムベースの組成(150 mM K-methanesulfonate, 5 mM KCl, 0.1 mM K-EGTA, 5 mM Na-HEPES, 3 mM Mg-ATP, 0.4 mM Na-GTP, pH = 7.4)のものを使用した。

電極内液を充填した記録電極を錐体細胞に接触させ、細胞膜を破ることでホールセル記録状態を成立させた後、

パッチクランプアンプ (Axopatch 200B: Axon Instruments) を用いて細胞膜電位や膜電流を測定した。得られたデータはADコンバータ (Digidata 1322A: Axon Instruments) を介してコンピュータへ送信しソフトウェアを用いて取り込んだ。

錐体細胞の同定は形態的特徴 (大きな細胞体, 錐体様の形状) や電気生理学的性質 (脱分極電流を流した時, 発生する活動電位が時間とともに出現しにくくなる) などから判断して行った。その後電流固定モードから電位固定モードに切り替え, 固定電位を  $-40$  mV に設定した状態でイオンチャネル型グルタミン酸受容体を介した興奮性シナプス後電流 (EPSC) や GABA<sub>A</sub> 受容体を介した抑制性シナプス後電流 (IPSC) を測定した。この自発的なシナプス入力を 2 分程度記録し, 0.1-3 Hz の帯域についてパワースペクトル解析を行うことでオシレーション活動の大きさを定量化した。

## 結 果

ラットを Fear Condition 実験用ケージに入れて 3 分間自由に行動させると, 新規の環境に対して盛んに探索行動を行っていた。具体的にはケージの壁に沿って歩行・走行し, ケージの隅に鼻先を突き込みながらヒゲを盛んに動かして空間を認知し, 後肢で立ち上がって垂直方向を探索し, あるいは移動を停止してグルーミング (毛づくろい行動) を行っていた。一方, 電気ショック刺激による恐怖条件付け操作を行った後のラットでは, その 24 時間後に実験用ケージに入れたときにこのような行動をしている時間が著しく減少し, 身体をまったく動かさない硬直時間が 1 日目と比較して有意に上昇した (図 1)。

一方, 上述した実験操作によって恐怖記憶を獲得したラットから扁桃体基底外側核を含むスライスを作成し, その錐体細胞において抑制性オシレーション活動をホールセル電位固定法によって測定した。固定電位  $-40$  mV の状態では GABA<sub>A</sub> 受容体を介した IPSC は外向きの電流として記録され, 0.1-3 Hz の周波数で発生するものは特に大きな振幅と持続時間を持っており (図 2), これは複数の抑制性介在ニューロンの入力時間が時間的に同期して送られているものであると考えられる。この抑制性オシレーションを 2 分程度記録し (図 3), その時系列データのパワースペク

トル解析を行い (図 4), 0.1-3 Hz の周波数帯内におけるパワーを積分した。なお, Fear Condition 実験用ケージに入れて 3 分間自由に行動させたが電気ショックを与えなかった対照群ラットに対しても同様の解析を行った。すると恐怖記憶を獲得したラットでは周期的な IPSC の振幅が減少している傾向が観察され, そのパワーの値も対照群と比べて小さくなっていた (図 3・4, 右側)。

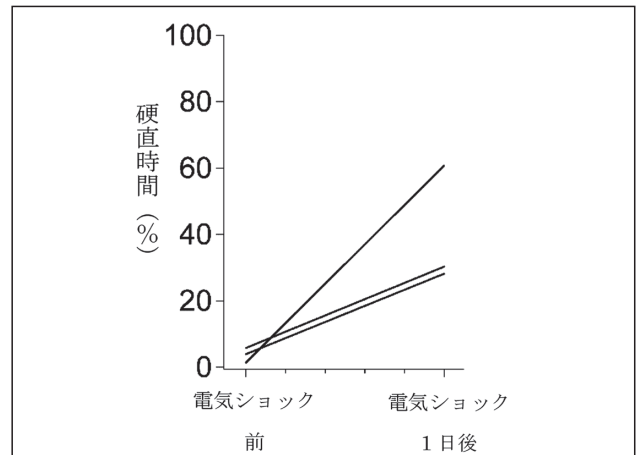


図 1. 電気ショック負荷前後の硬直時間。硬直時間は 180 秒間の全撮影時間あたりのラットの停止時間で表示した。ラット 3 匹使用。

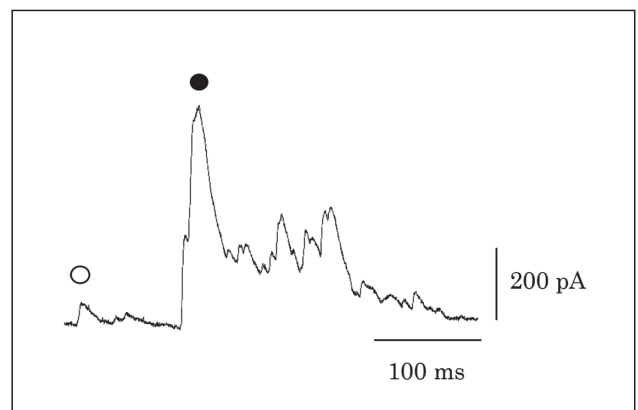


図 2. 周期性を示す巨大な IPSC (黒丸) と, その近傍にある小さな IPSC (白丸)。

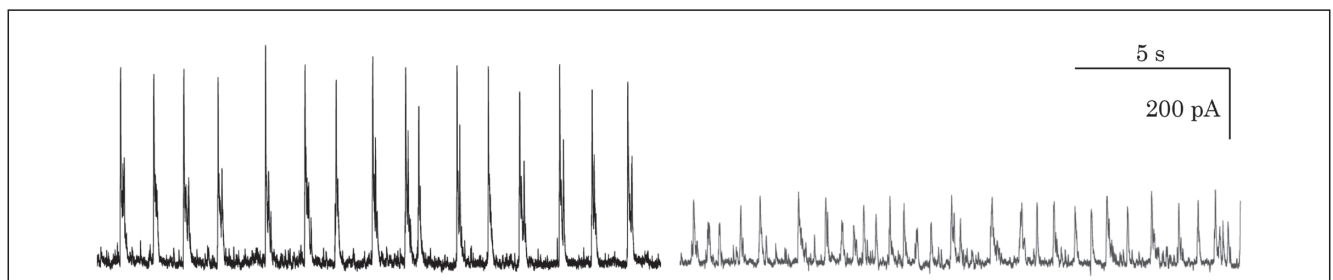


図 3. 対照群 (左側) と条件付け群 (右側) の示す抑制性オシレーション活動。

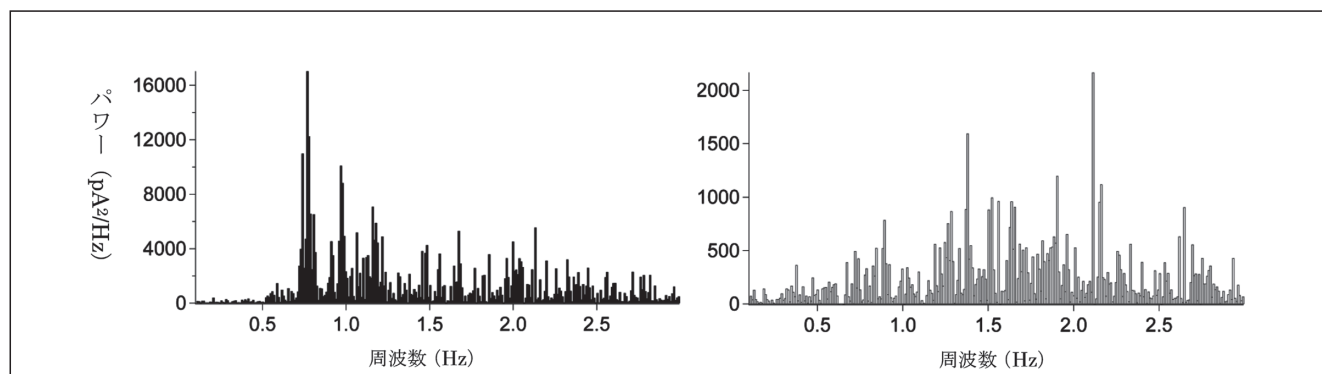


図 4. 対照群 (左側) と条件付け群 (右側) の示す抑制性オシレーション活動のパワースペクトル。

## 考 察

本研究の結果、恐怖記憶を獲得したラットでは扁桃体基底外側核の抑制性オシレーション活動が減弱していることが明らかとなった。先行研究で、恐怖条件付け刺激を行った動物では扁桃体錐体細胞に対する興奮性伝達が長期増強 (LTP) を引き起こしていることが解明されている。抑制性オシレーション活動には基底外側核内部の興奮性入力が必要不可欠となっているので、長期増強によって

変化した錐体細胞の活動が周辺の抑制性介在ニューロンの活動に影響を与えた結果、抑制性オシレーション活動のパワーが減少した可能性が考えられる。

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

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

AT II 受容体欠損マウス一過性脳虚血における  
脳軟膜血管での血小板動態の観察

研究代表者 福岡 卓也 (国際医療センター 脳卒中内科)

研究分担者 平山 真紀子\*, 丸山 元\*, 林 健\*, 高尾 昌樹\*, 棚橋 紀夫\*

## 緒言

アンジオテンシンIIは血管収縮・拡張, 細胞増殖促進・抑制, 血管内皮細胞や血管平滑筋細胞のアポトーシスの抑制・誘導, 炎症反応の促進・抑制に関与していることが知られている。アンジオテンシンII受容体遺伝子欠損マウスのin vivoにおける脳微小血管での血管内皮細胞と血小板, 白血球の相互作用についての報告されていない。我々はマウス脳軟膜動静脈での血小板 (rolling/adhesion) を生体用蛍光顕微鏡を用いて検討する方法を確立した。そしてこの方法を用いてアンジオテンシンII受容体遺伝子欠損マウスでの脳虚血再灌流時の微小血管における血小板動態を観察する。

## 材料と方法

C57BL/6Jマウス, AT1 遺伝子欠損マウス, AT2 遺伝子欠損マウスの両側総頸動脈閉塞モデルでの虚血再灌流後の脳微小循環障害を血小板動態に注目して観察する。

## Animal preparations

実験動物として20-28 gのC57BL/6Jを使用する。抱水クロラル (0.3 mg/kg) を腹腔内投与し麻酔導入する。大腿動脈にポリエチレンカテーテル (PE10, Intramedic; Clay Adams) を挿入し動脈血圧と血液ガス分析を行う。体温測定用プローブを直腸内に挿入し体温をモニタリングし保温用カイロにて体温を37度前後に維持する。頭皮を切開し頭蓋骨を露出し, 工作用ドリルを用いて約3 mmの頭窓を作成する。

## Common carotid artery occlusion and brain preparation

頸部正中に皮切をおき両側総頸動脈を露出させ顕微鏡下に血管クリップを用いて両側総頸動脈を遮断。15分間の虚血後に遮断解除し血流を再開させる。虚血解除後にマウスをear barにより, 腹臥位でプラスチックフレームに固定し頭皮を切開する。右頭頂骨を露出させ工作用ドリルを用いて頭頂骨を直径約2 mmの円形に削り骨を

剥離し頭窓を作成する。頭窓から観察することができと血管との相互作用を観察する。本方法は観察用の頭窓を作成するために, 頭蓋骨, 硬膜を除去するのみでクモ膜は切除しない状態で脳表血管が観察することが特徴である。したがって髄液の漏出がなく生理的状态での実験が可能であった。

## Blood Sampling and Platelet Preparation

実験動物 C57 BL/6J マウスを放水クロラルを腹腔内投与し麻酔する。大腿動脈にポリエチレンカテーテル (PE10, Intramedic; Clay Adams) を挿入し血液 0.9 ml を採取。遠心機で血小板のみを分離し採取する。血小板染色として CFSE を加えて血小板 (50  $\mu$ l) を準備する。

Intravital Fluorescence Microscopy and Video Analysis 水銀ランプ (Nikon, Super high pressure mercury lamp power supply) による直立型顕微鏡 (Japan Tokyo Sankei-Co Ltd, SO-SM) を用いて脳表血管の観察を行う。対物レンズ 20 倍, 接眼レンズ 10 倍とし 200 倍の倍率でビデオ撮像する。カラービデオカメラ (Japan Tokyo Toshiba, JK-TU52H) で画像をビデオ録画 (Sony) する。30 から 40  $\mu$ m の太さで 100  $\mu$ m の長さの動脈静脈をランダムに選択し rolling と adhesion を観察する。血小板の rolling の定義は血管中心部を流れる血小板の速度と比較して明らかに遅く, 血管壁に密着して転がるように流れる血小板とし, adhesion は血管壁に 2 秒以上 30 秒以内同じ場所にとどまっている血小板とした。Rolling and adherent の数を動脈, 静脈とも 1 mm<sup>2</sup> あたりで測定し, 生体用蛍光顕微鏡を用いてマウス脳軟膜血管の動態を観察する。

## Experimental Protocols

野生型マウス, AT1 遺伝子欠損マウス, AT2 遺伝子欠損マウスで虚血再灌流後 3 時間, 6 時間での血小板の rolling と adhesion の数を比較する。

## 結果

結果を図に示す。AT2 欠損マウスの脳虚血再灌流

\*国際医療センター 脳卒中内科

後3時間後, 6時間後の脳軟膜動静脈への血小板のrolling/adhesion数はシャム群と比較して有意に増加していた ( $P<0.05$ ).

## 考 察

Ishikawa, et al. はAT1 ブロッカーを投与したマウスにおいてマウス脳虚血再灌流時に血小板, 白血球のrolling/adhesionが増加することを報告した (Ishikawa, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007).

AT2R KOマウスの脳虚血再灌流時に血小板のrolling/adhesionが増加したことより, AT2Rが血小板のrolling/adhesionに抑制的に働いている可能性が示された.

虚血再灌流時に血漿中のレニン/アンギオテンシンが

増加し, アンギオテンシンのAT1Rとの結合が相対的に増加したためと考えた.

## 研究成果リスト

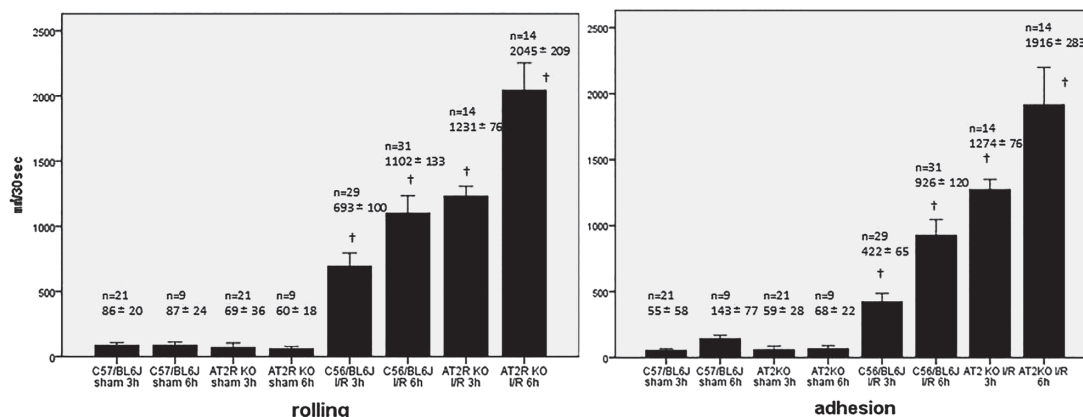
### 論文

- 1) J thrombosis and thrombolysis (in press).

### 学会発表

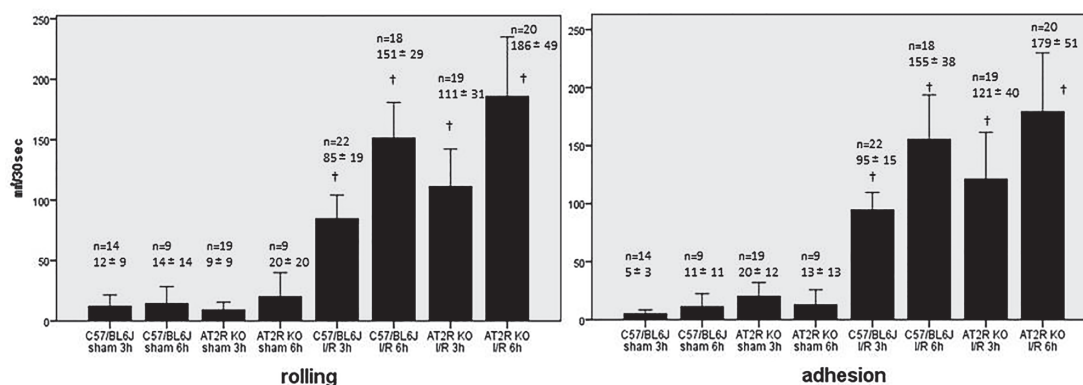
- 1) 福岡卓也, 林 健, 平山真紀子, 丸山 元, 棚橋紀夫. アンギオテンシンII type 2 レセプター欠損マウスにおける脳虚血再灌流後の脳軟膜血管での血小板動態の検討. 第55回日本神経学会学術大会, 平成25年5月, 福岡

## 虚血再灌流後の脳軟膜静脈への血小板のrolling/adhesionのまとめ



† $P<0.05$  relative to the corresponding C57/BL6J and AT2R KO Sham group at 3 and 6 h, respectively.  
n=number of vessel

## 虚血再灌流後の脳軟膜動脈への血小板のrolling/adhesionのまとめ



† $P<0.05$  relative to the corresponding C57/BL6J and AT2R KO Sham group at 3 and 6 h, respectively.  
n=number of vessel

図.

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

## 胚性幹細胞特異的遺伝子の異所性発現による形質転換の分子機構解明

研究代表者 西本 正純 (ゲノム医学研究センター)

## 諸 言

胚性幹細胞 (ES細胞) は、正常な胎児である胚盤胞の内部細胞塊に由来した細胞株であり、多能性幹細胞として知られている。しかし、他の特徴として腫瘍細胞としての性質を持っている。すなわちES細胞は、正常なゲノム構造を持っており、例えばマウスES細胞の場合、キメラマウスの作製ができるにもかかわらず、一方ES細胞をヌードマウスの皮下に接種すると奇形種と呼ばれる腫瘍を形成する能力をも持っている。このことは、ES細胞で特異的に発現している遺伝子の中には、多能性に寄与しているのみならず、腫瘍性へ寄与しているものがある可能性を示唆している。腫瘍性への寄与が考えられている遺伝子として、多能性維持に必須な転写因子として知られているOct4 (POU5f1 と呼ばれる) やNanogがあげられる。このことは、germ cell tumorなどで、Oct4、Nanogの遺伝子が発現していることが報告されており<sup>1)</sup>、さらに直接的な証明として、Oct4をSwiss3T3細胞に、またNanogをNIH3T3細胞に異所的に発現させたところ、形質転換が生じたことで示されている<sup>3,4)</sup>。しかしいずれの遺伝子も転写因子であり、どのような遺伝子の発現を制御することで、腫瘍性へ寄与しているかの分子機構は明らかとされていない。そこで私は、自身によりES細胞より核タンパク質としてクローン化し、Oct4の制御下にあることを示した遺伝子UTF1に着目した<sup>4,5)</sup>。その理由は、間接的な方法ではあるが、UTF1の発現レベルに応じてES細胞の腫瘍性に変化が生じることを私自身示したことによる<sup>6)</sup>。さらに近年UTF1がgerm cell tumorや子宮頸部癌に発現していることが報告され、UTF1が腫瘍マーカーとして考えられるようになってきた。しかしこれらの報告では、実際にUTF1が形質転換に関与しているのか示されておらず、また上記の自分自身の報告も間接的な証明であり、UTF1と腫瘍性との関係についての直接的な証明が必要であると考えた。そこでまずUTF1ノックアウトES細胞を樹立したが、腫瘍性は維持されたままであり、ES細胞では他の遺伝子も寄与していることが示唆された<sup>7)</sup>。

そこで今回の報告では、不死化はされているが、本来腫瘍形成能を持たないNIH3T3細胞株を材料とし

て、ここにUTF1を過剰発現させ、即ちUTF1のgain of functionの状態において、UTF1が形質転換をさせる機能を持つかどうかについて検討を行ったところ、実際にUTF1には形質転換を引き起こす機能があることが示された。さらにその分子メカニズム解明についての足掛かりとして、形質転換の一つの重要な指標である、細胞接触増殖阻害の解除の分子メカニズムの解明を試みた。その際miRNA29aがYapによるAktの活性化に重要であることが報告されておりこの点について詳細に検討を加えた<sup>8)</sup>。その結果この系においてはYapからmiRNA29aを介したAktの活性化は認められず、腫瘍の種類により細胞接触阻害の解除における分子メカニズムには違いが存在することが明らかとなった。

## 方法・材料

## プラスミド構築

pMCsベクターをベースにし、ここにGateway cassette およびIRES-puro耐性遺伝子を連結したベクターに (pMCs-Gateway-IRES-Puro<sup>r</sup>)、cDNAを挿入した pENTR1AからL-R反応により (Invitrogen) それぞれのcDNAを挿入した。

## レトロウイルスの作製およびNIH3T3への感染

pMCs-cDNA-IRES-Puro<sup>r</sup>をFugene (Roche) により、PlatEにトランスフェクションし、ウイルスを作製する。このウイルスをNIH3T3に感染させ、puromycinにより選択し、stable株をえる。

## miRNAの定量

miRNAは、miRNeasy (Qiagen) により調整した。RT反応は、Taq-Man MicroRNA Reverse Transcriptase set (Life Technologies) により行った。qPCRは、TaqMan MicroRNA assay (has-miR-29a) を用いStepOnePlus Real Time PCR System (Life Technologies) により行った。

## 腫瘍形成実験

BALB/cA-nu/nuマウス皮下に、 $1 \times 10^6$ 細胞を接種し、1か月後に腫瘍形成を観察する。なお動物実験に関しては、埼玉医科大学動物実験規定において決められた倫理指針に従って行った。

## 結 果

UTF1 過剰発現NIH3T3 細胞の増殖速度は、コントロールNIH3T3 細胞と差は見いだされなかった。一方ポジティブコントロールとしたERas過剰発現NIH3T3 細胞では、すでに報告があるように増殖速度の亢進が認められた<sup>9)</sup>。そこでUTF1 過剰発現NIH3T3 が実際に形質転換を起こしているか否かについて直接証明するためにヌードマウスに接種したところ顕著な腫瘍形成を認めた。なおコントロールNIH3T3 細胞では腫瘍形成は認められなかった。そこでUTF1 による形質転換の分子機構を探る手がかりとして、Hippo経路に着目し、なかでもproto-oncogeneであるYapに着目した。Yapは細胞分裂を促進する転写因子として知られている。正常な状況では、細胞接触時にHippo経路が活性化されることで112番目のセリンが(ヒトでは129番目)がリン酸化されることで、Yapタンパク質の分解が促進され、結果細胞分裂が停止する。しかし、このセリンがアラニンに変異することで、Yapタンパク質の分解が阻害され、結果細胞接触阻害が生じなくなることで、継続して細胞分裂が生じ形質転換が生じることが知られている。一方、Aktも形質転換を考えるうえで重要な遺伝子であることが知られている。Aktがリン酸化され活性化することで細胞分裂が促進されるが、その一方で例えば、細胞接触により細胞分裂が停止する場合には、Aktの脱リン酸化酵素であるPTENが機能することで、Aktの活性が抑制される。ERasはES細胞特異的に発現するRasであり、ES細胞においてERasによりAktが恒常的に活性化されることが、ES細胞の腫瘍化の一因と考えられている。さらにNIH3T3 細胞にERasを異所性に発現させることで、形質転換が生じることも報告されている<sup>9)</sup>。しかし転写因子であるYapがいかなる遺伝子の発現を亢進することで細胞分裂が促進されるのかはこれまで明らかとなっていなかった。近年YapがmiRNA-29aの発現を亢進させ、このmiRNA-29aがPTENの翻訳阻害を起こすことで、結果Aktの活性化が維持され、結果細胞分裂が維持されているという報告がなされた<sup>8)</sup>。NIH3T3 でのUTF1 の過剰発現により形質転換が生じることは上に記したが、この分子メカニズムの解明にあたり、まずNIH3T3 細胞においても先に述べたmiRNA-29aを介した、YapとAktとの直接的な関連が見られるのかについて検討を加えることとした。そこで安定型Yap、即ち112番セリンをアラニンに変異させたYapを、NIH3T3 に強制発現させた。細胞がconfluentになった状態において、抗Yap抗体により免疫染色で確認したところ、この変異Yapを導入したNIH3T3 細胞において、コントロールNIH3T3 に比べ、Yapタンパク質の顕著な貯留が認められた。そこでこれら2種のNIH3T3 細胞におけるmiRNA-29aの定量を行ったところ、変異Yapを導入した細胞においてもその存在量の増加は認められなかった。さらにPTENのタンパク量、リン酸化AktのレベルについてWestern blotにより定量を行った

が、やはり変異Yapを導入した細胞においてもその存在量の変化は認められなかった。以上のことより既に報告されているYapとAktとのmiRNA-29aを介した関連は、NIH3T3 細胞においては認められず、NIH3T3 の形質転換を考えるうえで、YapとAktの活性化とは別の事象として考える必要があると考えられた。

## 考 察

形質転換の指標として、(1)細胞接触阻害の解除(2)低栄養条件下での細胞増殖(3)足場非依存的増殖が挙げられる<sup>10)</sup>。今回の研究では、NIH3T3 細胞を材料として形質転換が生じるうえで、特に細胞接触阻害の解除について着目し分子メカニズムの解明を試みた。その際Hippo経路の下流に位置するYapと、Rasの下流に位置するAktについて、特に注目した。すでに報告にあるようにある種の細胞において、YapとAktの間にはmiRNA-29aを介した関連がある<sup>8)</sup>。しかし今回の報告においてNIH3T3 においては、この関連は存在していないにも関わらず形質転換が生じることから、細胞により形質転換が生じる分子メカニズムには差異があることが示された。今後はこのことを手がかりとしてUTF1 による形質転換の分子メカニズムの解明へと進んでいきたいと考えている。

## 謝 辞

本研究において多大なる御支援、御協力を頂いた奥田晶彦教授を始めとしたゲノム医学研究センター発生・分化・再生部門の先生方に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) Liu A, Cheng L, Du J, Peng Y, Allan RW, Wei L, et al. Diagnostic utility of novel stem cell markers Sall4, Oct4, Nanog, Sox2, UTF1, and Tcf1 in primary mediastinal germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* 2010;34:697-706.
- 2) Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, and Pikarsky E. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 2003;4:361-70.
- 3) Piestun D, Kochupurakkal BS, Jacob-Hirsch J, Zeligson S, Koudritsky M, Domany E, et al. Nanog transforms NIH3T3 cells and targets cell-type restricted genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:279-85.
- 4) Okuda A, Fukushima A, Nishimoto M, Orimo A, Yamagishi T, Nabeshima Y, et al. UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO J* 1998;17:2019-32.
- 5) Nishimoto M, Fukushima A, Okuda A, and Muramatsu M. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol* 1999;19:5453-65.

- 6) Nishimoto M, Miyagi S, Yamagishi T, Sakaguchi T, Niwa H, Muramatsu M, et al. Oct-3/4 maintains the proliferative embryonic stem cell state via specific binding to a variant octamer sequence in the regulatory region of the UTF1 locus. *Mol Cell Biol* 2005;25:5084-94.
- 7) Nishimoto M, Katano M, Yamagishi T, Hishida T, Kamon M, Suzuki A, et al. In vivo function and evolution of the eutherian-specific pluripotency marker UTF1. *PLoS One* 2013;8:e68119.
- 8) Tumaneng K, Schlegelmilch K, Russel RC, Yimlamai D, Basnet H, Mahadevan N, et al. Yap mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nat Cell Biol* 2012;14:1322-9.
- 9) Takahashi K, Mitsui K, and Yamanaka S. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* 2003;423:541-5.
- 10) Guerrero S, Casanova I, Farre L, Mazo A, Capelia G, and Mangués R. K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res* 2000;60:6750-6.

# 研究成果

- 1) Kamon M, Katano M, Hiraki-Kamon K, Hishido T, Nakachi Y, Nishimoto M, et al. Identification of Ccr4-not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent cells. *Stem Cell Dev* 2014;23:2170-9.
- 2) Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Katano M, Okazaki Y, Nishimoto M, et al. Functional compensation between Myc and PI3K signaling supports self-renewal of embryonic stem cells. *Stem Cells* 2015;33:713-25.

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

亜鉛欠乏に伴う糖代謝と脂肪酸合成による  
内臓脂肪蓄積の細胞内分子機構の解明

研究代表者 宮崎 孝（地域医学・医療センター）

## 緒 言

必須微量栄養素の一つである亜鉛は、生体内で300以上の酵素の活性中心元素としてその活性を調節するとともに、1000種以上のタンパク質の安定性に寄与していることがゲノム解析により予想される。亜鉛は栄養摂取の低下、ストレス、アルコールの摂取等により欠乏することが知られている。その欠乏は脱毛、味覚異常、創傷治癒の遅延、免疫能の低下、インスリンの合成・分泌の低下等、種々の症状・症候を引き起こすことが知られている。倉澤ら<sup>1)</sup>は住民の健診で、血清亜鉛濃度の測定を行い、亜鉛欠乏者は健診受診者の20%以上であると報告した。このことは多くの日本人が亜鉛欠乏あるいは亜鉛欠乏状態にあり、高齢者の褥瘡、舌痛やうつ状態等、種々の症状発現に亜鉛欠乏が関与している可能性があることを報告している。日本の高齢化率の上昇、若年女性の瘦身願望による栄養不良、ストレスを抱え生活習慣病予備軍の中高年齢者、これらの因子を持つ者は亜鉛欠乏症に注意する必要があることを示している。

2009年より糖尿病や高血圧症、脂質異常症等の生活習慣病、いわゆる代謝症候群の発見を目的に特定健康診査・特定保健指導が行われている。この健診で要支援に該当した者は、生活習慣病予備軍として生活習慣改善のための特定健康指導を受けることになっている。要支援該当者は、保健指導のために地域の保健センターに来訪し特定保健指導を受ける。我々は、要支援と判定された住民の承諾書の得られた希望者の血清亜鉛濃度と血清インスリン濃度を測定したところ、明らかな相関を認めた<sup>2)</sup>。このことは亜鉛摂取量が低下すると膵臓からのインスリン分泌量が低下することを示唆している。膵臓β細胞から分泌されたインスリンは、肝臓での糖新生を抑制しグリコーゲン合成を促進することで血糖値を調節している。肝細胞内でのグリコーゲン量はインスリンリセプターを介し、インスリンシグナル下流のGSK3β (glycogen synthase kinase 3β) の活性低下→GS (glycogen synthase) のリン酸化を抑制することで、グリコーゲン合成を亢進させ血糖値を低下させる。反対にGS酵素の

リン酸化により、その酵素活性が低下する結果、グルコースからのグリコーゲン合成量が低下することで、血糖値を上昇させる。以上のことから、血糖値の調節にインスリン分泌を介して、肝臓がグルコース代謝の一部を担っていることから、亜鉛欠乏状態ラットでの肝臓グリコーゲン代謝を明らかにすることを目的に研究を行った。

## 材料と方法

体重約100gのSprague Dawley系ラット18匹を使用した。1週間馴化後、各群の体重が均一になるように亜鉛欠乏群 (ZnD: zinc deficiency n=6)、ZnD群は餌摂取量の低下が認められることから、ZnD群と同一カロリーで飼育した対照群 (Pf: pair fed n=6) の3群に分け個別ケージで飼育した。亜鉛添加餌を自由に摂取した場合、各パラメーターの参考のために亜鉛添加餌を自由摂取Free群も行った。亜鉛欠乏餌 (タンパク質20%、炭水化物65.7%、脂質10%、ビタミン1.17%、ミネラル3.13% (亜鉛5μg/100g以下)) による飼育開始4週間後には亜鉛欠乏症の特徴の一つである脱毛が約50%に認められることから、飼育開始から4週間後、イソフルレン麻酔下に血清インスリン濃度と亜鉛濃度を測定するために血液を、インスリン遺伝子の発現量測定のために膵臓を、糖代謝の測定のために肝臓を採取した。採取した血液、臓器は遠心分離した血清と臓器は測定時まで-80度のフリーザーで凍結保存した。試料採取時のPBSによる臓器灌流、および下記に示した試料からのTotal RNAの抽出、cDNAの合成およびPCR反応試薬の調整操作は4℃下で行った。

血清亜鉛濃度は原子吸光法で、血清インスリン濃度は化学発光免疫測定法で測定した。また、膵臓でのインスリン遺伝子の発現量と、肝臓でのGSK3βおよびGSの遺伝子発現をreal-time PCR (iCycler, Bio-Rad Laboratories Inc. Cal USA) で測定した。Total RNAの抽出方法は約50mgの組織と0.5mlのISOGEN (ニッポン・ジーン(株)、東京) でホモジナイズして定法にしたがってクロロホルムとイソプロピルアルコールで抽出、抽出したTotal RNAを70%エタノールで3回洗浄後、遠心濃縮器 (MV-100, トミーメディコ(株)、東京) で乾燥、100μlの超純水に

溶解した。1  $\mu$ gのTotal RNAを使ってcDNAを合成 (iQ<sup>TM</sup> cDNA Synthesis kit, Bio-Rad Lab. CA, USA) し、合成した 50 ngのcDNA, プライマーおよびPCR反応試薬 (iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix, Bio-Rad Lab.) を使用してPCR反応を行った。インスリン遺伝子発現量測定のパライマーはF: 5'-TCATAGACCATCAGCAAGCAG-3', R: 5'-CTTGGGCTCCCAGAGGAC-3'を、GSK3 $\beta$ およびGSのパライマーはF: 5'-ATCAAGGCACATCCTT-3', R: 5'-ACGGCTACACAGTGCG-3'とF: 5'-CGTCAGAAAAGCTGTGGATG-3', R: 5'-AGCCATCTTCCAAAATGCAC-3'をそれぞれ使用した。内部標準としてGAPDH'のパライマー F: 5'-AAACCCATCACCATCTTCCA-3', R: 5'-GTGGTTCACACCCATCACAA-3'を使用しPCR反応を行った。PCR反応の温度条件は 94 $^{\circ}$ C 30sec, 60 $^{\circ}$ C 30sec, 74 $^{\circ}$ C 60secで 40 サイクル行った。得られた結果はGAPDHの遺伝子発現量との相対発現量で示した。

## 統計

統計処理は統計ソフトのKaleida Graphを使用して、分散分析後、Scheffeの検定を行いp値が 0.05 以下を有意差ありとした。

## 結果

亜鉛欠乏餌投与前および 4 週後の体重の変化を Table 1 に示した。亜鉛欠乏餌で飼育した ZnD 群の体重は亜鉛添加餌投与の Pf 群と同一カロリーで飼育したにもかかわらず有意に低下していた。亜鉛欠乏餌投与 4 週後には、Fig. 1A に示したように、亜鉛欠乏ラットに特徴的な艶のない体毛と脱毛が認められた。

Fig. 2 に示したように血清亜鉛濃度は ZnD 群 (34.5 $\pm$ 4.3  $\mu$ g/dl, n=6) で F 群 (104.0 $\pm$ 5.0  $\mu$ g/dl), Pf 群 (102.8 $\pm$ 3.6  $\mu$ g/dl) と比較して有意に低下した。Fig. 3 に示したように血清中グルコース濃度は ZnD 群で F 群, Pf 群に

比較して有意に上昇していた。

亜鉛がインスリンの合成・分泌に働いていることから血清中濃度を測定したところ、ZnD 群 (n=4) と Pf 群 (n=4) の血清亜鉛濃度は F 群 (n=4) に比較して有意差は認められないが F 群に比較してそれぞれ 35.4%, 33.3% に低下した (Fig. 4)。

膵臓でのインスリン mRNA 発現量は ZnD 群で F 群, Pf 群と比較して有意に低下していた (Fig. 5)。

肝臓での糖代謝を明らかにするために、インスリンシグナルの下流にある GSK3 $\beta$  の mRNA 発現量を測定したところ、ZnD 群で Pf 群と比較して有意に低下していた (Fig. 6)。同時に GSK3 $\beta$  の下流にある GS の遺伝子発現量は ZnD 群で有意に低下していた (Fig. 7)。

## 考察

ヒトにおける亜鉛欠乏症の報告は Prasad が報告<sup>3)</sup>して 50 年以上経過した。亜鉛欠乏症の特徴は下痢や脱毛、皮膚炎等様々な症状が出現することが知られている。亜鉛欠乏症は遺伝子異常による先天的なものと、栄養障害などによる後天的なものがあり、遺伝子異常の発生頻度は約 1/50 万人であるのに対し、栄養障害によるものは、世界に約 20 億人いると推定されている。日本では高木ら<sup>4)</sup>が高カロリー輸液による亜鉛欠乏症を報告している。亜鉛が添加されていない高カロリー輸液を行うと、血清亜鉛値は数週間で正常の 1/2 に低下する。手術、火傷や低栄養では血清亜鉛値の低下速度は高まることから、臨床的に

Table 1. Changes of rat body weight

| Groups | 実験前(g)          | 4週後(g)           |
|--------|-----------------|------------------|
| Free   | 171.2 $\pm$ 4.0 | 300.0 $\pm$ 11.5 |
| Pf     | 171.2 $\pm$ 4.5 | 225.0 $\pm$ 5.9  |
| ZnD    | 172.7 $\pm$ 4.6 | 169.7 $\pm$ 4.8  |



Fig. 1. The ZnD rat (A) and Pf rat (B) at 4 weeks after zinc deficient diet intake or zinc contained diet intake were indicated. The arrow was indicated typical alopecia area on of zinc-deficient rat rump.

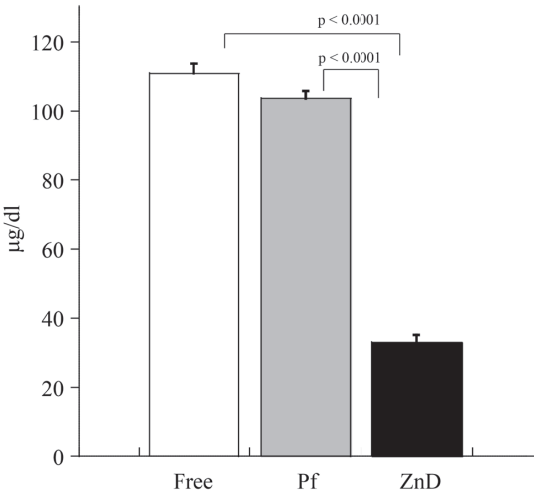


Fig. 2. Serum zinc levels are expressed.

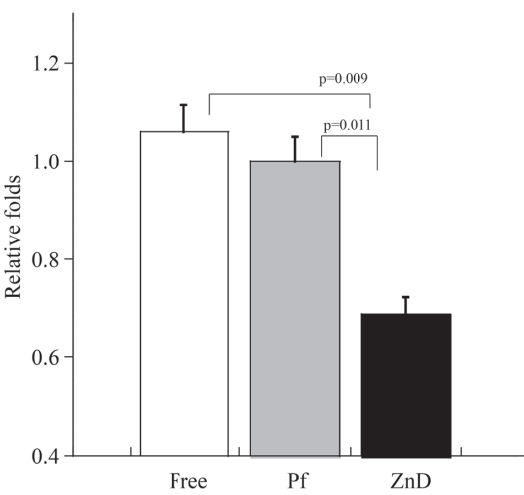


Fig. 5. Expression of insulin mRNA in the rat pancreas.

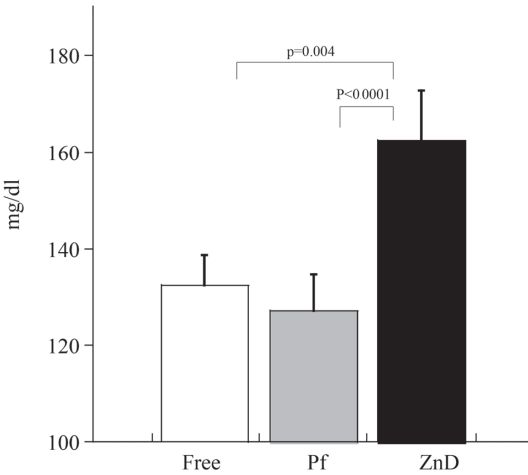


Fig. 3. Serum glucose levels.

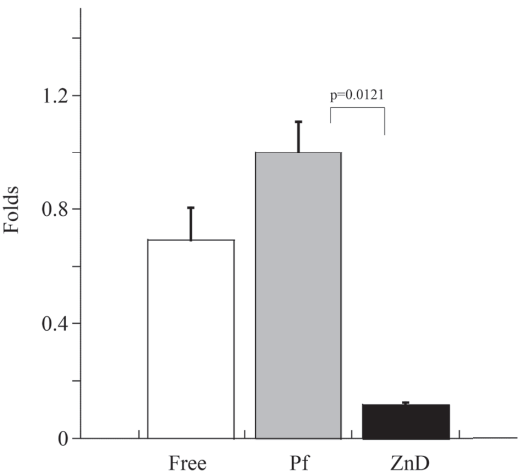


Fig. 6. Expression of GSK3β mRNA in the rat liver.

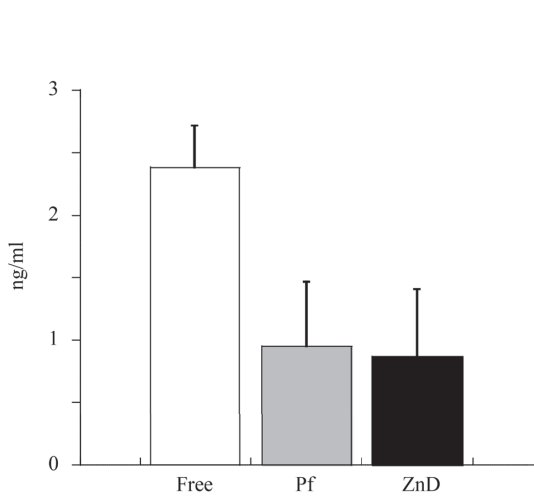


Fig. 4. Serum insulin levels.

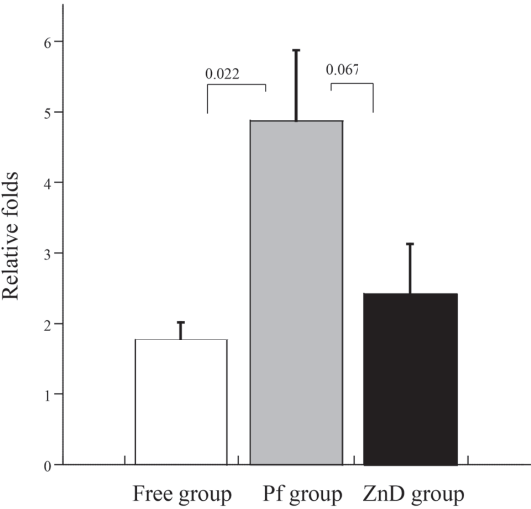


Fig. 7. Expression of GS gene in the rat liver.

低栄養、ストレス、非経口的な栄養管理を長期間行わなければならない場合、医師、看護師や医療関係者は十分注意する必要がある。

今回の結果から、亜鉛欠乏餌投与4週後にラットの脱毛が認められ、この脱毛の原因は亜鉛欠乏状態の指標と考えられること、血清亜鉛値が34 µg/dlまで低下していることから、今回使用したラットは亜鉛欠乏状態にあると推定される。また、ZnD群の体重増加の停止の原因には、Pf群と同一カロリーで飼育したにも関わらず成長停止が認められ、IGF等の成長因子低下と関連する報告<sup>5)</sup>もある。亜鉛欠乏ラットで認められた成長停止はヒトの亜鉛欠乏症を初めて報告<sup>3)</sup>したPrasadヒトの亜鉛欠乏症の症状とも一致する。また、実験中のラットの観察から、活動性の低下も認められ亜鉛が鬱などの精神症状の発症とも関連する可能性が示唆された。このような種々の症状や症候は生体内での亜鉛の多様な役割を反映しているものと考えられる。

インスリンと亜鉛との関連はインスリン発見当初から知られており、膵臓のβ細胞から分泌されるインスリン顆粒は6分子のインスリンと2原子の亜鉛で構成されており、亜鉛の欠乏はインスリン顆粒の生成に必須である。また、顆粒内への亜鉛の輸送に関連する亜鉛輸送タンパクの異常でもインスリン合成が低下するとの報告<sup>6)</sup>もあり、インスリン顆粒の生成に亜鉛が強く関連していることが示唆されている。

この実験結果で亜鉛欠乏ラットでの膵臓でのインスリン遺伝子発現量の低下が明らかになったことから、亜鉛欠乏状態ではインスリン顆粒の生成低下と、インスリン顆粒に取り込まれるインスリンタンパクも低下していることを示唆する結果となった。亜鉛は種々の酵素や転写因子にも関与することから、インスリン遺伝子の上流に亜鉛含有転写因子が存在している可能性も否定できないことから、また、亜鉛転写因子のSLC30A8/ZnT8を介した膵臓でのインスリン分解とも関連するのかもしれない。いずれにしても亜鉛輸送タンパクや亜鉛含有転写因子の役割を解明することで、生活習慣病の糖尿病などの予防に繋がる可能性がある。

血糖値はインスリン分泌量で調節されるが、血清中インスリンの濃度はZnD群とPf群の間で差がほとんど認められないことから (Fig. 5)、Fig. 3に示したZnD群の血清中グルコース濃度の増加は、インスリンリセプター下流のシグナルが関与している可能性があると推測できる。そのことから、膵臓におけるグリコーゲン代謝に注目し、グリコーゲン代謝を介したグリコーゲン合成酵素活性を調節しているGSK3βとGSの遺伝子発現量を測定した。ZnD群でGSK3βの遺伝子発現量はPf群の約20%以下に低下していたことから、GSK3βの下流にあるGSのリン酸化が抑制される結果、GS活性が亢進していることが明らかとなった。従って、亜鉛欠乏状態ではグリコーゲン合成が刺激されているにもかかわらず血糖値が増加し

ている可能性が示唆している。このことは亜鉛の欠乏は膵細胞内のグリコーゲンの過剰な蓄積を引き起こす可能性を示している。亜鉛欠乏とグリコーゲン代謝についての報告は少ないことから、正確なことは不明であるが、今後これらシグナル分子のタンパク質の検出を行う予定である。

最後に、亜鉛の種々の働きの中で、膵臓インスリン遺伝子発現と膵臓グリコーゲン代謝関連酵素の遺伝子発現量について研究を行った。その結果、亜鉛の欠乏状態ではインスリン、GSK3βおよびGSの遺伝子発現量が低下することで膵臓でのインスリン合成の低下や膵臓でのグリコーゲン合成の亢進が明らかになった。今回の研究で、生体における亜鉛の多彩な作用の一部としての亜鉛と糖代謝についてその一部が明らかになったが、今後は亜鉛転写因子や亜鉛タンパクを介した内臓脂肪蓄積症候群である生活習慣病の糖尿病、脳血管疾患や癌の成長・転移における亜鉛の役割についての解明を進めてゆく予定である。

## 謝 辞

本研究は地域医学・医療センター内で実施した。実施に当たり当センター内の大野洋一助教授に多くの助言を頂いた。この場をお借りして感謝申し上げます。今回の学内グラント助成および成果発表の機会が得られたことに別所正美学長、医学研究センター長 松下祥教授に感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) 倉澤隆平, 久堀周治郎, 奥泉博康. 亜鉛基礎研究の最前線と亜鉛欠乏症の臨床. *Biomed Res Trace Elements* 2010;21:1-12.
- 2) 宮崎 孝, 大野洋一, 佐藤真喜子, 柴崎智美, 荒木隆一郎, 鈴木洋通. 特定健康診査・特定保健指導の要積極的支援者の血清亜鉛とインスリンについて. *埼玉医科大学雑誌* 2013;39:146-8.
- 3) Prasad AS. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J Trace Elem Med Biol* 2014;28(4):357-63.
- 4) Takagi Y, Okada A, Itakura T, Satani M, Manabe H, Kasahara N. Zinc deficiency during intravenous hyperalimentation. A clinical analysis of eleven cases. *Med J Osaka Univ* 1977;28:67-76.
- 5) Alves CX, Vale SH, Dantas MM, Maia AA, Franca MC, Marchini JS, Leite LD, Brandao-Neto J. Positive effects of zinc supplementation on growth, GH, IGF1, and IGFBP3 in eutrophic children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012;25(9-10):881-7.
- 6) Lefebvre B, Vandewalle B, Balavoine AS, Queniat G, Moerman E, Vantghem MC, Le Bacquer O, Gmyr V, Pawlowski V, Kerr-Conte J, Pattou F. Regulation and functional effects of ZNT8 in human pancreatic islets. *J Endocrinol* 2012 Aug;214(2):225-32.

## 研究成果リスト

## 学会発表

- 1) 宮崎 孝, 木戸遵將, 大野洋一, 佐藤真喜子, 高橋幸子, 野寺 誠, 荒木隆一郎, 柴崎智美, 鈴木洋通. 特定健診における積極的指導対象者の 75 g 経口糖負荷試験 (OGTT) 時の血清亜鉛と同一について, 第 85 回日本衛生学会総会, 2015 年 3 月 28 日, 和歌山
- 2) 宮崎 孝, 大野洋一, 佐藤真喜子, 高橋幸子, 荒木隆一郎, 柴崎智美, 鈴木洋通. 特定検診・特定保健指導対象者の OGTT 前後の血中亜鉛とインスリン濃度について, 第 73 回日本公衆衛生学会総会, 2014 年 11 月 7 日, 宇都宮
- 3) 下垣里河, 宮崎 孝, 佐藤真喜子, 高橋幸子, 荒木隆一郎, 宮嶋由佳, 野寺 誠, 柴崎智美, 大野洋一, 竹中恒夫, 鈴木洋通. 亜鉛欠乏ラット肝臓で

の p-GS と p-GSK3 $\beta$  のタンパク発現について, 第 31 回日本微量栄養素学会, 2014 年 6 月 大阪

- 4) 宮崎 孝, 下垣里河, 野寺 誠, 大野洋一, 竹中恒夫, 佐藤真喜子, 高橋幸子, 荒木隆一郎, 柴崎智美, 鈴木洋通. 亜鉛欠乏ラットの血清インスリン濃度と GSK3 $\beta$  と GS を介した血糖値の上昇について, 第 84 回日本衛生学会学術総会, 2014 年 5 月, 岡山
- 5) 宮崎 孝, 大野洋一, 野寺 誠, 木戸尊將, 柳澤裕之, 竹中恒夫, 佐藤真喜子, 高橋幸子, 柴崎智美, 鈴木洋通. 亜鉛欠乏ラットにおける活動性の低下と海馬でのセロトニン合成酵素の遺伝子発現, 第 87 回日本産業衛生学会, 2014 年 5 月, 岡山

## 特許出願等

該当しない

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

## キセノン吸入および造影剤投与後の2重エネルギーCT (Xenon- and contrast-enhanced dual energy CT(Xe-Ce-De-CT)) を 用いた肺切除術前後における肺形態ならびに肺換気血流比率の評価

研究代表者 青木 耕平 (総合医療センター 呼吸器外科)

研究分担者 柳田 ひさみ<sup>2)</sup>, 泉 陽太郎<sup>1)</sup>, 井上 慶明<sup>1)</sup>,

福田 裕樹<sup>1)</sup>, 儀賀 理暁<sup>1)</sup>, 渡部 渉<sup>2)</sup>,

清水 裕次<sup>2)</sup>, 本田 憲業<sup>2)</sup>, 中山 光男<sup>1)</sup>

### 緒言

近年人口の高齢化にともない肺切除術を要する疾患、原発性肺癌・転移性肺腫瘍・炎症性肺疾患・嚢胞性肺疾患などの頻度はいずれも増加傾向にある。また、同一患者が複数回に及ぶ肺切除術を必要とする頻度も増えつつある。このような状況において、肺切除術前後の肺機能変化の正確な評価は重要である。しかし、肺切除術前後における肺の形態的および機能的変化を画像上観察した報告は未だ少ない。肺における有効なガス交換には換気と血流が一致している必要がある。現在肺換気血流分布の評価は肺シンチグラフィで行われているが、アイソトープを用いるため煩雑な検査であり、実臨床でこの検査を手術前後に行うことのハードルは高い。また空間分解能はCTに比し低く、肺内の領域別評価は容易ではない。

一方我々はキセノン吸入2重エネルギーCTを用いるとCT撮像で肺換気が描出でき、かつCTと完全に重なった高解像度の画像を得られる可能性があることを示した<sup>1)</sup>。また造影剤急速静注2重エネルギーCTを用いれば肺ヨード濃度画像すなわち肺血流機能画像が得られることはすでに報告されている<sup>2,3)</sup>。従って、これらの検査を連続して行うことにより、通常のCTと同様の空間分解能を有する肺の領域別換気血流の評価を正確に行うことができる可能性がある。

本研究の目的は肺切除術前後でキセノン吸入2重エネルギーCTと造影剤急速静注2重エネルギーCTを行い肺領域別の換気血流を画像を作成し評価すること、そしてその結果を肺換気血流シンチグラフィと比較評価することである。さらに、これらの結果をスパイロメトリーによる肺機能、動脈血酸素飽和度、血液ガス、DLCOといった

生理学的検査と比較検討することである。

今回は術前のキセノン吸入2重エネルギーCTと造影剤急速静注2重エネルギーCTについて得られた肺領域別の換気血流画像と同じく術前の肺換気血流シンチグラフィ画像の比較検討について報告する。

### 材料と方法

#### 対象

年齢20歳以上、当センターにおいて肺区域切除術以上を行う症例、造影剤使用可能な症例、撮影時呼吸停止可能な症例、文書による同意が得られた症例。

#### 非放射性キセノン吸入単純2重エネルギーCTおよび造影剤急速静注2重エネルギーCT撮像

まずキセノン吸入単純2重エネルギーCTを撮影した(VDCT)。CT装置はSiemens社Somatom Definition Flashを用いた。被験者の顔面に酸素吸入用フェースマスクを口、鼻が完全にマスクに入る様にしてストラップで固定した。マスクからの漏れのないことを確認した。キセノンガスコントロールシステム(Anzai AV-726)にて35%Xe-65%O<sub>2</sub>混合気を調整し、最大呼気を被験者に行わせ、最大呼気位に達する少し前に、キセノンガスコントロールシステムから35%Xe-65%O<sub>2</sub>混合気を流しはじめた。最大呼気位に達したら吸気を指示し、35%Xe-65%O<sub>2</sub>混合気を吸入させ最大吸気位で呼吸停止させ、2重エネルギー(140, 80kVp)のヘリカルCT撮影を行った。引き続き造影剤急速静注による2重エネルギー(140, 80kVp)の造影ヘリカルCT撮影を行った(PDCT)。

#### 肺換気・血流シンチグラフィ撮像

シンチグラフィは島津社PRISM AXIS two-detector SPECT systemを用いて行った。撮影は息止めSPECTルーチンの通りに行った。換気シンチは仰臥位でテクネガスの肺活量呼吸の吸入で行った(VSc)。血流シンチグラフィ

1) 総合医療センター 呼吸器外科

2) 総合医療センター 放射線科

は  $^{99}\text{mTc}$ -MAA を静注して行った (QSc)。

### 画像評価方法

2 重エネルギー CT 画像はスライス間隔 10 mm の axial 画像で視覚的に評価を行った。画像評価方法は以前の報告<sup>2,3)</sup>に準じて肺区域ごとに減衰箇所の有無を視覚的に評価した。シンチグラフィーは SPECT データならびに 12 方向からの planar 像をもとに視覚的に減衰箇所の有無を評価した。それぞれのモダリティーで換気あるいは血流の減衰がみられる肺区域を集計した。肺野条件の CT も同様に肺区域ごとに病変の有無を評価した。造影 CT からは縦隔構造や肺血管の異常の有無を評価した。

### 結 果

2013 年 5 月から 2014 年 8 月までに試験が行われた 31 例の術前画像を検討した。原病は全例原発性肺癌であった。

#### 結節 (腫瘍)

胸部 CT 肺野条件、10 mm スライス厚で検出された結節 (腫瘍) 性病変は 37 個であった。肺癌と診断されたもの 30 個、未確診結節が 7 個であった。これらのうち、換気シンチグラフィー (VSc) では 15 個 (41%)、血流シンチグラフィー (QSc) では 22 個 (59%) が減衰として検出された。不一致例はすべて VSc で検出されず、QSc で検出であった。一方換気 2 重エネルギー CT (VDCT) では 35 個 (95%)、血流 2 重エネルギー CT (PDCT) では 35 (95%) 個が減衰として検出された。VDCT と PDCT の所見は完全に一致していた。VDCT および PDCT で検出されなかった病変は 2 個あり、径 8 mm の充実性結節 (肺癌) と径 7 mm のスリガラス状陰影 (未確診) であった。これらの病変は VSc、QSc でも検出されなかった。図 1 に右中葉の肺癌症例を示す。右中葉結節はすべての検査で減衰として描出された。

#### 気腫性および囊胞性変化

胸部 CT では 31 か所の気腫性および囊胞性変化が検出された。これらのうち、VSc では 7 か所 (23%)、QSc で

は 7 か所 (23%) が減衰として検出された。局在は不明瞭だが全体的に不均一な所見まで含めると VSc では 21 か所 (68%)、QSc では 22 か所 (71%) が減衰として検出された。不一致例はすべて VSc で検出されず、QSc で検出であった。一方 VDCT では 1 か所 (3%)、PDCT では 28 箇所 (90%) が減衰として検出された。図 2 に左上葉の肺囊胞の症例を示す。PDCT では減衰として描出されているが、他の検査では明らかではない。

#### 間質性変化

胸部 CT では 4 か所の間質性変化が検出された。これらは VSc および QSc では検出されなかった。一方 VDCT および PDCT では 3 箇所 (75%) が減衰として検出された。VDCT および PDCT 所見は一致していた。図 4 に左下葉の間質性変化の症例を示す。VDCT、PDCT ともに減衰として描出されている。VSc と VQc は全体的に不均一であるが、減衰の局在が明らかとはいえない。

#### 無気肺

胸部 CT では 7 か所の無気肺が検出された。これらのうち、VSc では 4 か所 (57%)、QSc では 4 か所 (57%) が減衰として検出された。VSc と QSc の所見は一致していた。一方 VDCT では 7 か所 (100%)、PDCT では 7 か所 (100%) が減衰として検出された。VDCT と PDCT の所見は一致していた。図 5 に肺癌に伴う左上葉の無気肺の症例を示す。全検査で減衰として描出されている。

#### 肺動脈の閉塞

CT 上腫瘍の浸潤により肺動脈の閉塞が疑われた症例が 1 例あった。QSc および PDCT は減衰としてみられ、VSc と VDCT では異常は見られなかった。図 6 に本症例を示す。左下葉 S8 と S9 への肺動脈血流が腫瘍により障害されている。PDCT と QSc では欠損として描出されている。

#### 偽陽性について

CT 画像上は異常が見られなかったか所にいずれかのモダリティーで減衰が見られることはなかった。

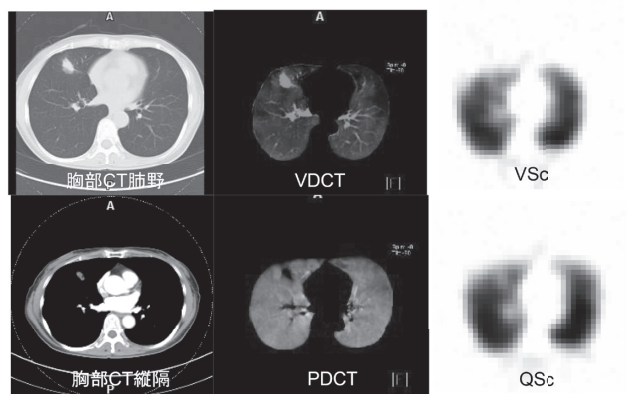


図 1. 右中葉の肺癌症例。右中葉結節はすべての検査で減衰として描出されている。

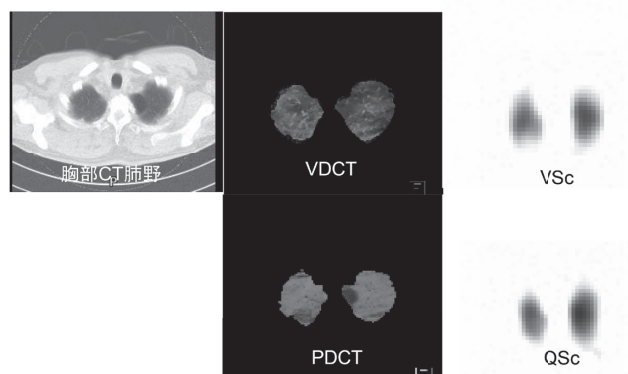


図 2. 左上葉の肺囊胞。PDCT では減衰として描出されているが、他の検査では明らかではない。

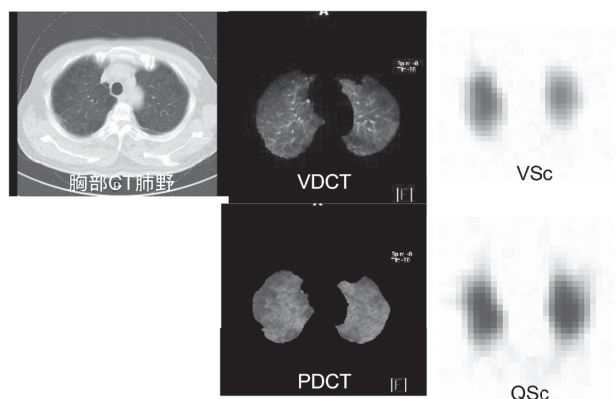


図 3. 右上葉の気腫性変化. PDCTでは減衰として描出されているが、他の検査では明らかではない。

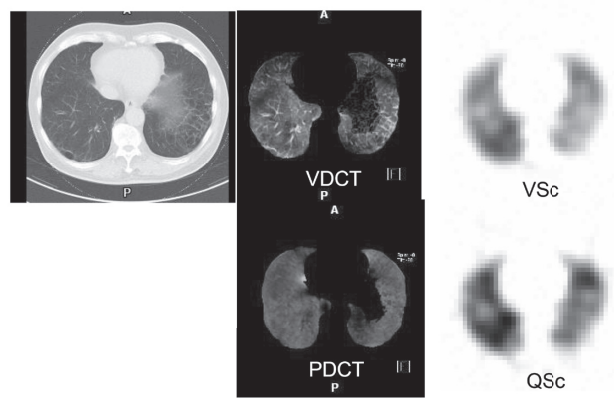


図 4. 左下葉の間質性変化. VDCT, PDCTともに減衰として描出されている. VScとVQcは全体的に不均一であるが、減衰の局在が明らかとはいえない。

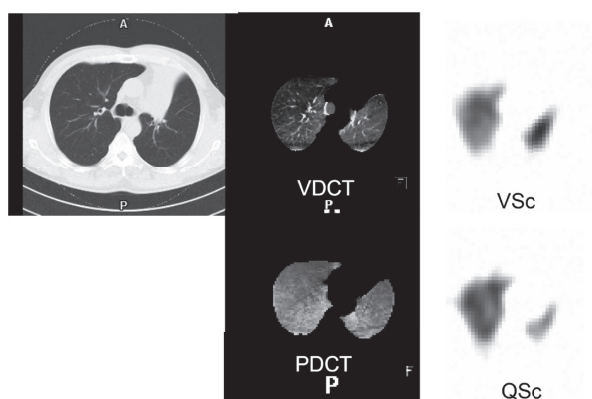


図 5. 左上葉の無気肺. 全検査で減衰として描出されている。

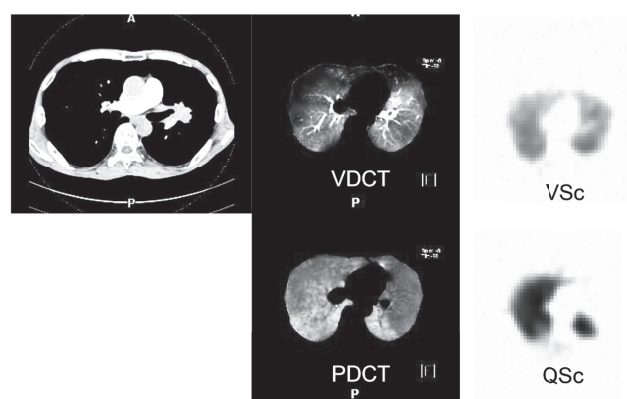


図 6. 左下葉S8とS9への肺動脈血流が腫瘍により障害されている. PDCTとQScでは減衰として描出されている。

## 考 察

シンチグラフィーと2重エネルギーCTの所見比較は肺血流、特に肺血栓塞栓症症例の検出において報告が複数見られるが<sup>4-6)</sup>、定量的な比較方法は我々の検索した範囲では見当たらず、いずれも画像所見を定性的に見比べて評価していた。また2重エネルギーCTによる換気と血流の比較も少数散見されるが<sup>3)</sup>、いずれも読影による定性的な比較である。なお換気血流2重エネルギーCTと換気血流シンチグラフィーを比較検討した報告は検索した範囲では見つからなかった。

2重エネルギーCTの解像度は明らかにシンチグラフィーよりは高く、CTにおいて検出される病変の検出率もシンチグラフィーより高かった。このため換気および血流評価における有用性はシンチグラフィーより高い可能性が想定された。しかし、キセノンは気腫性ならびに嚢胞性病変にはシンチグラフィーより高率に取り込まれるため減衰にはならない可能性が示唆された。この意味ではVDCTより

PDCTの方が有効な肺容量を反映する可能性も考えられた。

血管造影とPDCTを比較した従来の報告(Thieme SF AJR 2009)では偽陽性率6%と報告がある。原因としては造影時間が短いため偶然血流が途絶えていた可能性があるとして説明されているが、今回の検討では偽陽性は見られなかった。

今回換気および血流の2重エネルギーCT画像は同時に全身検索にも用いることが可能であった。しかし、撮影は2回になるため被曝量は増加する。今後の検討課題としては胸部CT、VSc、QSc、VDCTおよびPDCT画像から最も効率的な肺容量の算出方法を検討することが挙げられる。どのような減衰cut off値を用いるかなど、有効換気肺野領域の抽出を最適化方法の検索が課題である。それが可能となれば肺機能検査値との相関、術前と術後における当該データの比較を行いたいと考えている。

## 参考文献

- 1) Yanagita H, Honda N, Nakayama M, Watanabe W, Shimizu Y, Osada H, Nakada K, Okada T, Ohno H,

- Takahashi T, Otani K. Prediction of postoperative pulmonary function: preliminary comparison of single-breath dual-energy xenon CT with three conventional methods. *Jpn J Radiol* 2013 Jun;31(6):377-85.
- 2) Kunihiro Y, Okada M, Matsunaga N, Sano Y, Kudomi S, Suga K, Kido S. Dual-energy perfusion CT of non-diseased lung segments using dual-source CT: correlation with perfusion SPECT. *Jpn J Radiol* 2013 Feb;31(2):99-104.
- 3) Thieme SF, Hoegl S, Nikolaou K, Fisahn J, Irlbeck M, Maxien D, Reiser MF, Becker CR, Johnson TR. Pulmonary ventilation and perfusion imaging with dual-energy CT. *Eur Radiol* 2010 Dec;20(12):2882-9.
- 4) Devaraj A, Sayer C, Sheard S, Grubnic S, Nair A, Vlahos I. Diagnosing acute pulmonary embolism with computed tomography: imaging update. *J Thorac Imaging* 2015 May;30(3):176-92.
- 5) Okada M, Kunihiro Y, Nakashima Y, Nomura T, Kudomi S, Yonezawa T, Suga K, Matsunaga N. Added value of lung perfused blood volume images using dual-energy CT for assessment of acute pulmonary embolism. *Eur J Radiol* 2015 Jan;84(1):172-7.
- 6) Ohana M, Jeung MY, Labani A, El Ghannudi S, Roy C. Thoracic dual energy CT: acquisition protocols, current applications and future developments. *Diagn Interv Imaging* 2014 Nov;95(11):1017-26.

#### 研究成果リスト

該当なし

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

## 新規肥満治療薬開発を目指した不飽和脂肪酸シグナル系の網羅的解析

研究代表者 淡路 健雄 (医学部 薬理学教室)

## 緒 言

食餌の西洋化, 魚食より肉食へのシフトに伴いメタボリックシンドロームを含む肥満が公衆衛生上の問題点としてクローズアップされてきている。肥満は脳・心血管障害の重大なリスクファクターであり, 他の成人病発症ともリンクしている。

我々がクローニングし, その天然リガンドを同定した新規オーファン受容体GPR120<sup>1)</sup>はG-protein coupled receptor (GPCR) に含まれる。このGPR120 受容体 (現在FFAR4 と名称が決定されている) は $\omega$ 3 長鎖不飽和遊離脂肪酸 ( $\alpha$ リノレン酸・DHA・EPA など) をリガンドとする受容体であり, 細胞内シグナル伝達機構を活性化し, 更にグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) を分泌することを明らかにした<sup>1)</sup>。GLP-1 は現在知られている最も強力なインクレチン (消化管由来のインスリン分泌促進作用を持つ因子) の一つであり, またFFAR4 は腸管に局在する遊離不飽和脂肪酸受容体であることから, このFFAR4-GLP-1 分泌連関は摂食行動, 脂質代謝, 食欲中枢制御, インスリン分泌等の生体代謝・内分泌において重要な生理的役割を担う事が認められている。近年, 共同研究者の平澤らは, 2011 年にNatureにFFAR4 受容体の変異が食餌性の肥満の原因になりうることをヒトとノックアウトマウスで証明し, FFAR4 受容体作用薬は肥満治療薬開発の重要なターゲットの一つであると考えられている<sup>2)</sup>。

一方, FFAR4 はこれまで知られていた三量体G蛋白を介する細胞内情報伝達と異なる $\beta$ -アレスチンを介する細胞内情報伝達機構を活性化し, 抗炎症作用を示しこれが新しいインスリン抵抗性改善に関わるという報告がなされている<sup>3-6)</sup>。特にFFAR4 は, そのヒトにおけるスプライシングバリエーションの一部が三量体G蛋白を介する細胞内情報伝達と共役しないことが報告されている<sup>6)</sup>。このことは, FFAR4 の生理機能・病態における $\beta$ -アレスチンを介する細胞内情報伝達機構の重要性を示唆しているものと考えられる。しかしながらFFAR4- $\beta$ -アレスチンのシグナル系を検討する有効な手段は現在まで報告されていない。本研究者は, FFAR4 を含む不飽和脂肪酸受容体の新規刺激薬や薬理特性について報告してきた<sup>1, 7, 8)</sup>。また, 刺激薬の

候補と考えられる一部が特異な特性を持つことを見出している。これはこのこれまで知られていた三量体G蛋白を介する細胞内情報伝達と異なる細胞内情報伝達機構を活性化し, 薬物においては偏った比率で情報伝達機構活性化を起こす一連の薬物を示す「バイアスドリガンド」という概念と一致していることが想定された。

本年度は, 新規抗糖尿病薬として期待されているFFAR4 関連薬開発の基盤となる, 受容体刺激薬-受容体共役の分子メカニズムについて検討を行ない, 新しい創薬候補ならびにFFAR4 の生理機能の解明に有用な薬物を見出したので報告する。

## 材料と方法

## 1) DNAコンストラクト

HEK293/Flip-In培養細胞内でマウスFFAR4 及びFFAR4/venusを発現するコンストラクトを作成した。それぞれのコンストラクトにはTet-on発現システムを用い任意に発現可能ように設計を行なった。

## 2) 培養細胞と遺伝子導入

HEK293/Flip-In細胞を用いた。この細胞は, Tet (ドキシサイクリン) によりプロモーターが発現できるように設計されており, また導入サイトにはシングルコピーで導入できるように設計されている。それぞれマウスFFAR4 及びFFAR4/venus遺伝子発現ベクターとOG41 ベクターの共導入を行ない, ハイグロマイシン存在下で選択を行ない, それぞれの安定発現細胞を確立した。

## 3) ERKリン酸化の検討

HEK293-FFAR4 を35 mmシャーレで培養を行ない, ドキシサイクリン投与48時間目に $\alpha$ リノレン酸 (FFAR4 の生体内刺激薬) およびバイアスドリガンド候補 (Compound-A) を投与し, ウェスタンブロット法を用い $\beta$ -アレスチンの下流にあるERKのリン酸化の時間経過を観察した。

## 4) 細胞内カルシウム濃度の測定

HEK293-FFAR4 をガラスボトム35 mmシャーレで培養を行ない, ドキシサイクリン投与48時間目にFura2-AMのローディングを行ない, 顕微蛍光測定装置で $\alpha$ リノレン酸 (FFAR4 の生体内刺激薬) およびCompound-Aの投与に

よる細胞内カルシウム濃度の変化を記録した。

### 5) 受容体細胞内移行の可視化検討

HEK293-FFAR4/Venusをガラスボトム 35 mmシャーレにて培養を行ない、ドキシサイクリン投与 48 時間目に顕微蛍光測定装置で $\alpha$ リノレン酸およびCompound-Aの投与によるFFAR4の細胞内移行の評価を行なった。

## 結 果

### ERKリン酸化

ERKのリン酸化は $\beta$ -アレスチンシグナルの下流に存在するため、 $\alpha$ リノレン酸およびCompound-Aの投与による $\beta$ -アレスチンの活性化の指標と考えられるためERKリン酸化の時間経過を測定した。ドキシサイクリン非投与群(FFAR4発現非誘導群)において両薬剤共に有意なERKリン酸化は観察されなかった。一方ドキシサイクリン投与によるFFAR4発現を誘導群に於いては、 $\alpha$ リノレン酸およびCompound-Aの投与により直ちにERKのリン酸化が認められた。その最大反応はベースの5倍程度と試薬の違いによる差は認められなかった。 $\alpha$ リノレン酸投与群においては、活性化は一時的であった。投与後20分においてほぼ、刺激前の値に戻っていた。一方、Compound-A投与群においてはERKのリン酸化は20分目まで継続し、60分値においてもベースの4倍であった。これらの反応は、ドキシサイクリン投与によるFFAR4発現を誘導することに生じており、FFAR4に依存したリン酸化であると考えられた。

### 受容体細胞内移行の可視化検討

このERKのリン酸化が受容体・細胞機能に生理的に共役しているか確認するためにカルシウムシグナル非依存的・ $\beta$ -アレスチン依存的な受容体の細胞内移行を検討した。受容体の可視化を行なうためHEK293-FFAR4/Venus細胞を実験に用いた。ドキシサイクリン非投与群において細胞表面に有意な蛍光を認めず、ドキシサイクリン負荷により細胞表面に蛍光を認めFFAR4/Venus由来の蛍光であると考えられた。この蛍光は、 $\alpha$ リノレン酸およびCompound-Aの投与により細胞表面から細胞質への移行を認め、観察した投与後30分に於いて両群間に有意な差は認められなかった(図1)。

### 細胞内カルシウム濃度の変化

FFAR4はGqと共役しておりPLCの活性化を介してIP<sub>3</sub>の産生、細胞内カルシウムの上昇を引き起こすことが知られている。ドキシサイクリン非投与群においては、 $\alpha$ リノレン酸およびCompound-Aの投与において有意なカルシウム濃度の上昇を認めなかった。内因性のGqと共役しているATP受容体のATPの刺激においては細胞内カルシウムの上昇を引き起こした。ドキシサイクリン負荷により $\alpha$ リノレン酸の投与は細胞内カルシウムの上昇を認めた。一方我々が見出したCompound-Aの投与においてはどの濃度においても有意なカルシウム濃度の上昇は観察されなかった(図2)。

## 結 語

我々が見出したCompound-AはFFAR4に対して三量体Gタンパク質 $\alpha$ サブユニットを介するカルシウムシグナルを生じないが、 $\beta$ -アレスチンを介するERK活性化を起こすことを見出した。これはGPCRで報告されているバイアスドリガンドの特性と一致すると考えられた。FFAR4を介するERKのシグナル系はTNFを介するインスリン抵抗性の改善を選択に発揮し、新しい糖尿病の治療戦略に有用である可能性が示された(図3)。

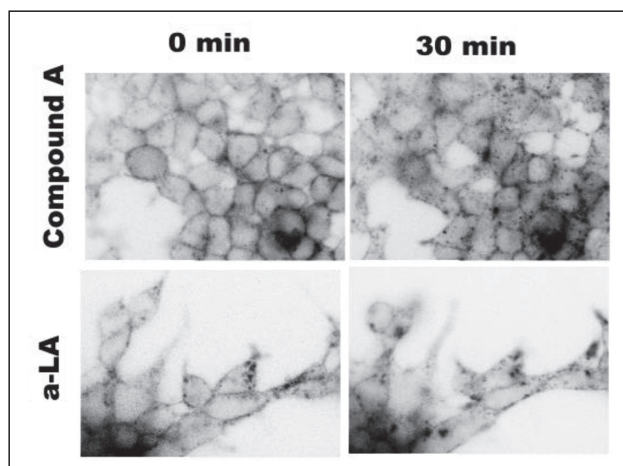


図 1.

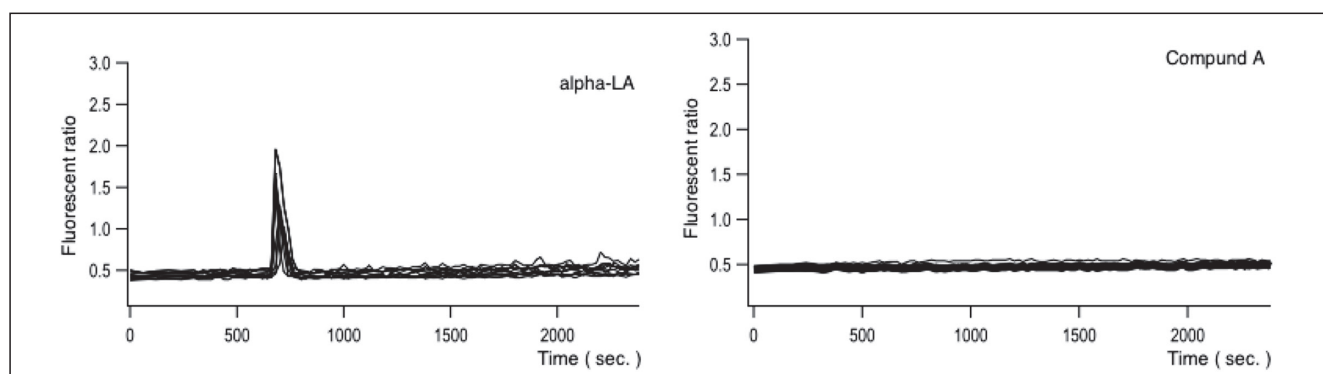


図 2.

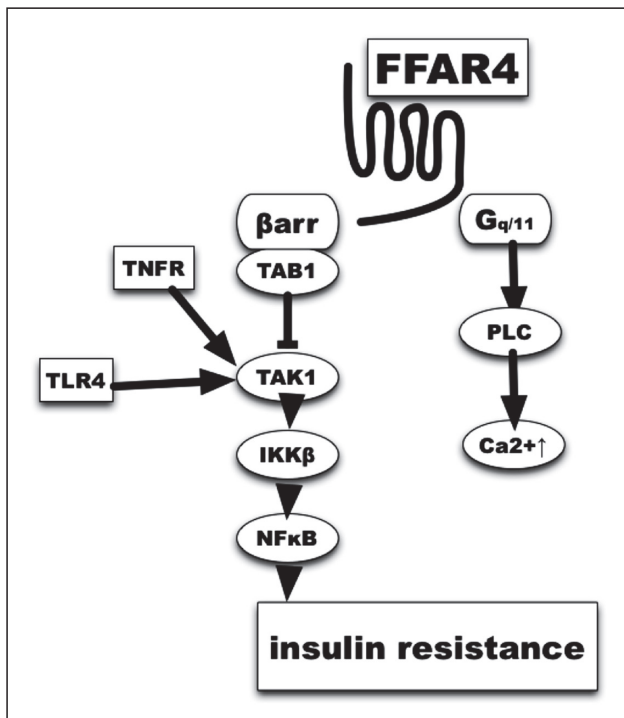


図 3.

## 参考文献

- 1) Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 2005 Jan;11(1):90-4.
- 2) Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* 2012 Feb 19;483(7389):350-4.
- 3) Yore MM, Syed I, Moraes-Vieira PM, Zhang T, Herman MA, Homan EA, et al. Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects. *Cell* 2014 Oct 9;159(2):318-32.
- 4) Oh da Y, Walenta E, Akiyama TE, Lagakos WS, Lackey D, Pessentheiner AR, et al. AGpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat Med* 2014 Aug;20(8):942-7.
- 5) Butcher AJ, Hudson BD, Shimpukade B, Alvarez-Curto E, Prihandoko R, Ulven T, et al. Concomitant action of structural elements and receptor phosphorylation determines arrestin-3 interaction with the free fatty acid receptor FFA4. *J Biol Chem* 2014 Jun 27;289(26):18451-65.
- 6) Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 2010 Sep 3;142(5):687-98.
- 7) Takeuchi M, Hirasawa A, Hara T, Kimura I, Hirano T, Suzuki T, et al. FFA1-selective agonistic activity based on docking simulation using FFA1 and GPR120 homology models. *Br J Pharmacol* 2013 Apr;168(7):1570-83.
- 8) Sun Q, Hirasawa A, Hara T, Kimura I, Adachi T, Awaji T, Ishiguro M, et al. Structure-activity relationships of GPR120 agonists based on a docking simulation. *Mol Pharmacol* 2010 Nov;78(5):804-10.

## 研究成果リスト

## 論文発表

投稿準備中

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

遠隔医療を可能とする次世代 VOG の開発と  
新たなめまい診断技術に関する研究

研究代表者 井上 智恵（医学部 耳鼻咽喉科）

## 緒 言

めまいは自宅など病院外で生じることが大半であり、耳鼻咽喉科外来受診時にはめまい発作が治っていることが多い。このような場合、所見が乏しいために正確な診断が下せず、適切な治療が行われていないことがある。この課題を克服すべく、1980年代から90年代にかけて携帯型ENGに関する論文がいくつか報告された。しかしいずれの装置も、センサー（電極）の装着を患者自身が行えないことに加え、発作時に備え長時間装着したまま記録を行う必要があること、記録中は顔面に複数のセンサーを装着したまま生活しなければならないこと、ENGでは眼振における回旋成分の計測ができないことなど問題点が多かった。ほぼ同じ頃から、VNGによる眼球運動記録法が開発された。VNGはENGと異なり、眼球の動きをCCD/CMOSなどの撮像素子を通して、ビデオ画像としてディスプレイ上に投影させて、ハードディスクに記録して解析を行う方法である。VNGは映像をそのまま患者に見せたり、回旋成分の解析により眼球運動の3次元解析が可能となるなど、大きなインパクトをもたらした。但し、当時のVNGは最先端の技術であり、装置が大きく、また構成機器が高価であったことなどの理由から、装置はすべて据え置き型であり、患者ひとりで操作可能な携帯型VNGは存在しない。我々は、患者自身が自宅にいながめまい発作時の眼振を記録する携帯型眼振記録装置（portable Video Nystagmography、以下pVNG）の研究を継続しており、平成24年度の本学内グラントにおいて、pVNGの試作1号機（pVNG-1）についての研究報告をした。pVNG-1は操作性に優れ、実際に患者がめまい発作時の記録を行うことが可能であったが、実用化のためには開発コストがかかりすぎる点、発作時の記録をそのまま送受信することができないため、その場での対応ができない点などが課題となっていた。今回我々は、pVNG-1の課題であった開発コストや情報通信の機能を持たせた試作2号機（pVNG-2）の研究を行ったので報告する。

## 材料と方法

## 携帯型VNG2号機（pVNG-2）の試作

pVNGの開発コストの大部分は電源、モニタ、記録装置、情報通信機能にあり、コストがかかることが想定された。そこで一般市民の普及率が極めて高く、かつこれらの機能を併せ持ったスマートホンを利用して、外部カメラの環境設定を行った（図1）。

## 専用カメラおよびゴーグルの試作

pVNG-2の専用カメラとして、ロジクール社のUSBカメラを利用した。眼振は注視できる明所下より暗所下で飛躍的に眼振の検出頻度が増加することから、USBカメラに赤外線LEDを4個設置した。またゴーグルはヘッドマウントディスプレイ用に開発された民生用の専用ゴーグルを利用した。

## 結 果

眼球運動を解析するためには24～30fps（frame per second）が必要とされている。まず画質を640×480pixelに設定して動作確認を行った所、リアルタイムでは5～10fps程度しかスマートホン側に画像情報が転送されないことが判明した。そこで画質を320×240pixelに設定変更したところ、30fpsのリアルタイム転送が可能となった。また赤外線LEDにより暗所撮影を試みたが、抵抗値の関係でLEDの照度が足りないことが判明した。この点については赤外線LEDに付けている抵抗を変えることで対応する予定である。

## 考 察

眼振検査は得られた眼球運動によりめまいの病巣を推定することが可能となることから、問診と並んでめまいの診療において欠かすことができない。眼振検査には色々な種類があるが、特に頭位眼振検査および頭位変換眼振検査は、めまいの原因で最も多い前庭性由来のめまい発作時に出現する異常な眼球運動を検出しやすいことから重要である。めまい発作時もしくは発作直後には異常所

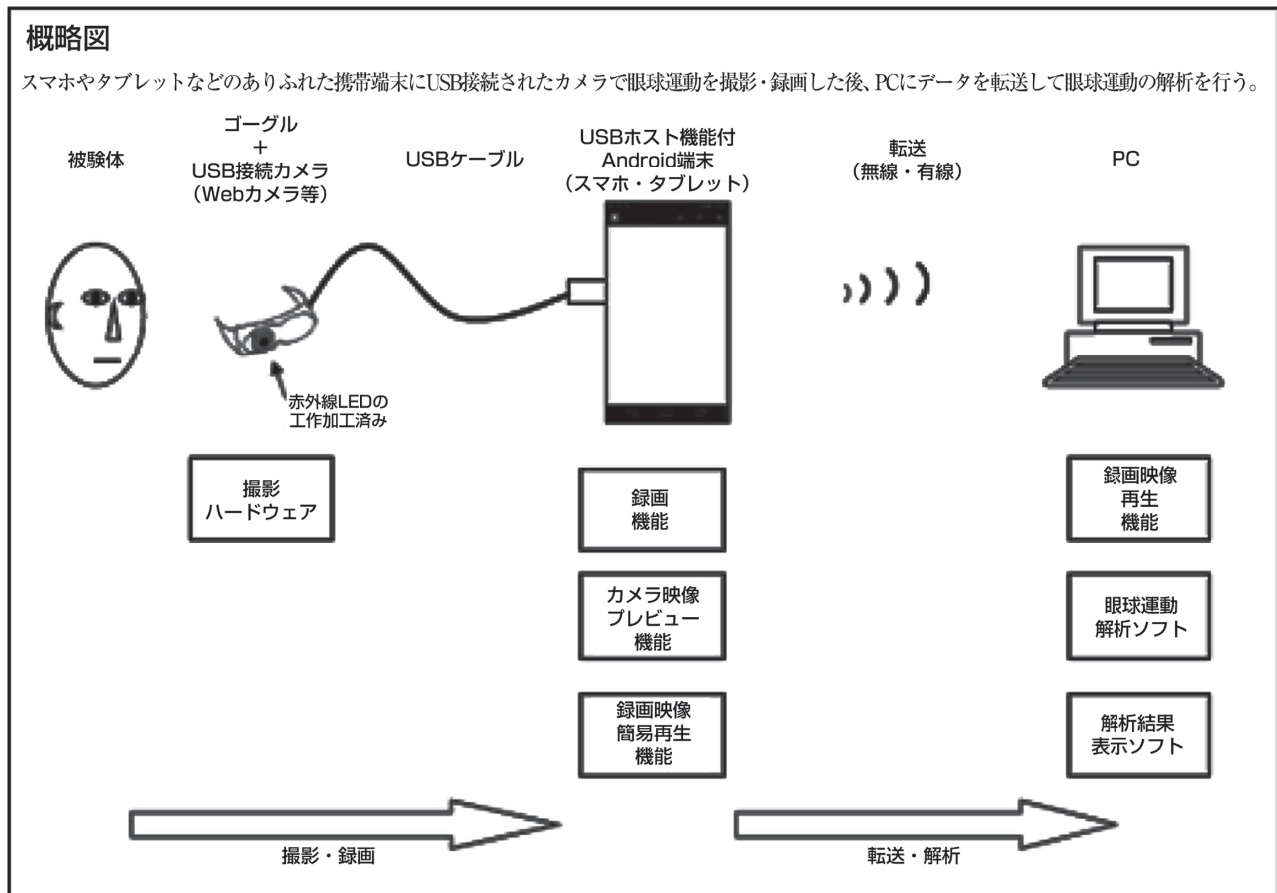


図 1. pVNG-2 の概略図。

見が高頻度で認められるが、検査を受けるまでの間にはめまいが治癒もしくは軽快し、眼振が認められなくなる症例が多い。めまいの専門機関において、めまいを主訴に受診された患者の中で自発性眼振が認められる頻度は、注視眼振検査で 19%，フレンツェル眼鏡を使用した眼振検査で 20%，赤外線カメラを用いた眼振検査でも 48% であり，例え赤外線カメラを使用しても，半数以上の患者で眼振が認められなかったとの報告がある。以上の背景から，めまい発作時の眼振を記録することができる携帯型眼振記録計の必要性が認識されるようになった。日本を中心に携帯型 ENG の論文がいくつか報告されたが，渡辺ら，西川らはそれぞれ携帯型心電計やホルター心電計を使用もしくは応用した携帯型 ENG を報告している。これらはいずれも睡眠時など長時間の記録に向いているが，顔面に 5 つの電極を装着する必要がある。発作時に 5 つの電極を患者自身が速やかに装着することは不可能であり，また装着したまま生活することも困難であることから，普及することはなかった。我々は日常診療における携帯型眼振記録計の必要性から，携帯型 VNG の研究を進めてきた。pVNG-1 は，長径 14 cm 重量 380 g と軽量・小型で，起動から記録開始まで最短 6 秒で，解像度，サンプリン

グレートとも，現在汎用されている据え置き型 VNG とほぼ同等の性能を有しており，携帯型の VNG として良好な性能を有していると考えられた。しかし pVNG-1 は，記録装置の本体に中国製のデジタルビデオレコーダーを使用している。中国製のこれらの機器は一度に大量生産したあとは追加生産しないことがほとんどであり，実用化に向けて利用するには不向きである。仮にこれらの機器を国内の企業に試作してもらうとなると数千万単位の費用が掛かる。また，pVNG を遠隔医療で利用することを想定した場合，記録した情報を医療機関に送信するためには一度 PC を経由する必要がある。めまい患者がそこまで行うことは難しい。そこで記録装置から直接医療機関等で情報を送信できるシステムの構築が望ましいと考え，スマートフォンを利用することを思い立った。図 2 に示す通り，スマートフォンは PC と異なり USB カメラを接続すればそのまま利用できるわけではなく，スマートフォンがカメラを認識するか，通信速度は充分か等，数々の課題を克服する必要がある。本研究では，ようやくその足掛かりが得られた程度に過ぎない。今まで，携帯型眼振記録装置についての研究があまり進んでおらず，渉猟し得る限りで患者自身が操作・記録できる携帯型 VOG/VNG は報告されていない。

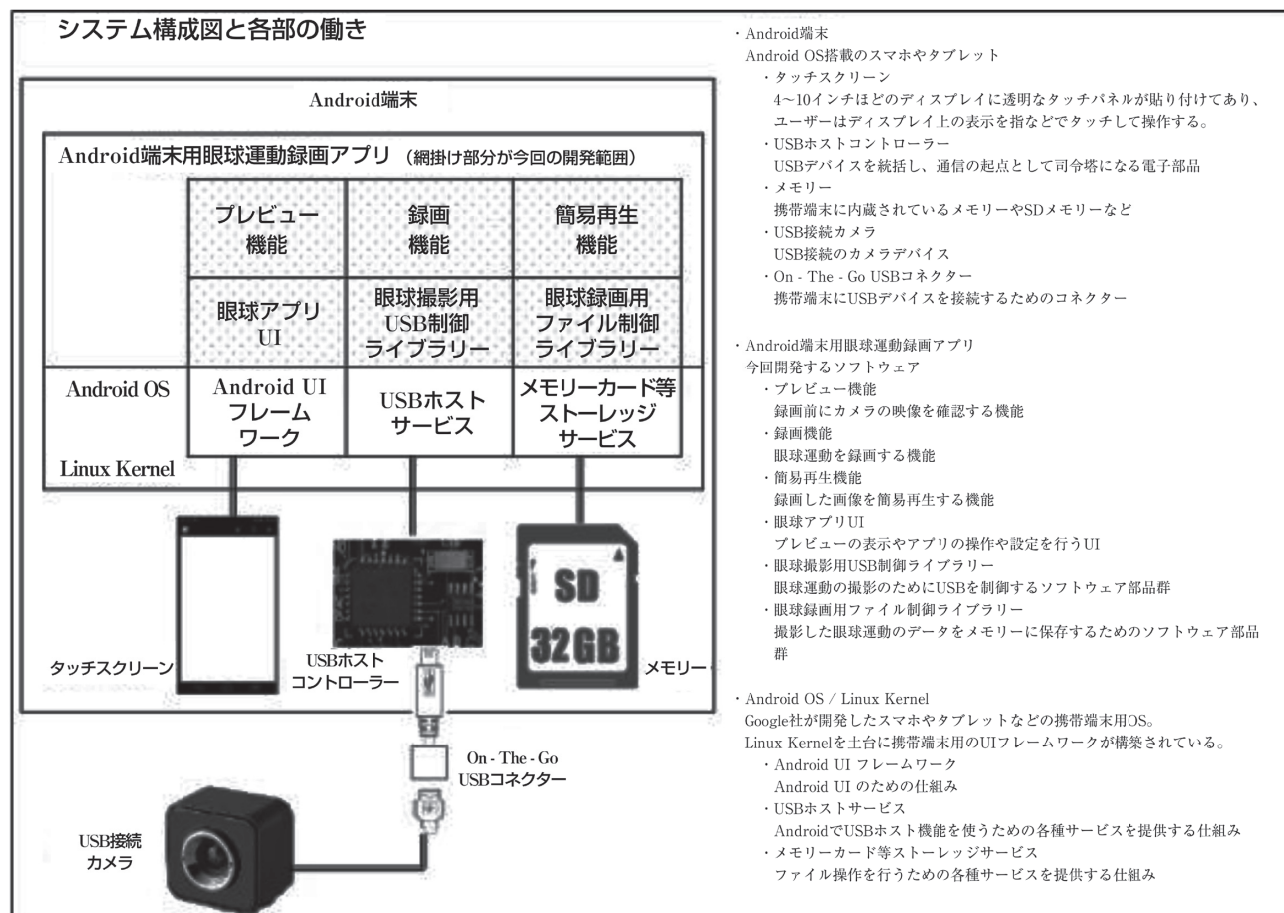


図 2. pVNG-2 のシステム構成図と各部の働き。

携帯型VNGの適応はメニエール病や前庭神経炎、BPPVだけでなく、小児良性発作性めまいや偏頭痛関連めまい、さらには恐怖性めまいなど病院外での眼振記録が望ましい反復性めまいすべてである。携帯型VNGを適用することにより、自宅など病院外で生じためまいについて、実際眼振が認められるか、また認められた場合の眼振の強さ、方向、頻度等を確認することによって、より正確な診断、治療が

可能となることから、今後さらなる発展が期待される領域である。今後、機器を改良し症例数を蓄積することで、より良い携帯型VNGシステムを構築していきたいと考えている。

#### 研究成果リスト（論文、学会発表、特許出願）

なし

## 学内グラント 報告書

## 平成25年度 学内グラント終了時報告書

多発性骨髄腫に対するレナリドミドの  
効果予測バイオマーカーとしてのセレブロンの意義

研究代表者 富川 武樹（総合医療センター 血液内科）

## 緒 言

多発性骨髄腫は治療の難しい難治性造血器腫瘍である。高齢者に発症するために、強力な化学療法や自家末梢血幹細胞移植を伴った大量メルファラン療法は、一部の若年患者を除いて適応にはならないことが多い。しかしながら、近年、多発性骨髄腫の発症メカニズムが分子レベルで解明されるようになり、分子基盤に基づくボルテゾミブ、サリドマイド、レナリドミドなどの新たな治療薬が開発され臨床に応用されるようになった。本邦においても多発性骨髄腫に対する治療薬として保険承認され日常臨床で使用され、治療成績の向上に寄与している。サリドマイドは催奇形性を有することから妊娠可能年齢の患者には適応が厳しく制限されることに加え、末梢神経障害や血栓症などの有害事象の頻度が高い。サリドマイド誘導体であるレナリドミドはこれらの有害事象の頻度が低く、ボルテゾミブなど、他の新規治療薬と比較しても有害事象が少なく、経口剤であることから外来通院による投薬が行いやすいことから、多発性骨髄腫の多数を占める高齢患者に対する応用が期待されている。しかしながら、レナリドミドを含む新規治療薬の多発性骨髄腫に対する治療効果を予測するバイオマーカーに関しては、全くと言っていいほど明らかとはなっていない。

セレブロンはサリドマイドの結合因子として同定された分子で、催奇形性を惹起する原因分子として同定された。セレブロンが多発性骨髄腫細胞に対するサリドマイドの結合因子である可能性も示され、増殖に関与するとの報告も認められるようになり注目されているが、サリドマイド誘導体であるレナリドミドの多発性骨髄腫に対する分子作用機構は依然、明らかでない点が多く、治療効果を予測するようなバイオマーカーは全く明らかとはなっていないことから、レナリドミドの有効な投与量、投与方法、他の薬剤との併用療法などが未だ明確となっていない。サリドマイド誘導体であるレナリドミドの骨髄腫への作用に関してもセレブロンが関与すると考え、臨床的な治療効果を予測するマーカー分子としての機能があるのではないかと考え、臨床検体、特に患者末梢血を用いて解析するこ

とを目標とし、簡便にレナリドミドの治療効果を予測する実用化を目指した本研究を着想するに至った。

## 材料と方法

種々のヒト骨髄腫細胞株(U266, RPMI8226, MS-1 など)を用いて、濃度、時間依存性にレナリドミドを添加し、細胞死を誘導した際のセレブロンのmRNAおよび蛋白発現をRT-PCR法、Western Blot法を用いて検討した。骨髄細胞は骨髄単核球を分離し、FACSにてCD138 陽性分画についてRT-PCR法にて発現を検討した。

## 結 果

細胞株における検討では、セレブロンの発現量依存性にレナリドミドの治療効果が相関することが示唆する結果を得た。

## 考 察

今回、細胞株実験において、セレブロンの発現とレナリドミドの治療効果が相関することが示されたことから、治療効果のバイオマーカーとなる可能性が考えられる。今後、倫理委員会に申請のうえ、患者検体における検討を進めていく予定である。これまで学内グラントで得られた研究成果については、学会発表、雑誌への投稿に向けて現在準備を進めている段階である。

## 参考文献

- 1) Palumbo A, Hajek R, Delforge M, Kropff M, et al. Continuous lenalidomide treatment for newly diagnosed multiple myeloma. N Eng J Med 2012;366:1759-69.
- 2) Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, et al. Identification of primary target of thalidomide teratogenicity. Science 2010;327:1345-50.
- 3) Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Bruins LA, et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. Blood 2011;118:4771-9.
- 4) Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Kortuem KM, et al.

- Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood* 2014;124:536-45.
- 5) Huang SY, Lin CW, Lin HH, Yao M, et al. Expression of cereblon protein assessed by immunohistochemical staining in myeloma cells associated with superior response of thalidomide- and lenalidomide-based treatment, but not bortezomib-based treatment, in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 2014;93:1371-80.
- 6) Schuster SR, Kortuem KM, Zhu YX, Braggio E, et al. The clinical significance of cereblon expression in multiple myeloma. *Leukemia Research* 2014;38:23-8.
- 7) Heintel D, Rocci A, Ludwig H, Bolonsky A, et al. High expression of cereblon (CRBN) is associated with improved clinical response in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone. *British J of Haematology* 2013;161:695-700.

## 学内グラント 報告書

## 平成25年度 学内グラント終了時報告書

## メトトレキサート惹起リンパ増殖性疾患発症のメカニズムの解明

研究代表者 得平 道英 (総合医療センター 血液内科)

## はじめに

メトトレキサート (methotrexate: MTX) を使用した患者にリンパ増殖性疾患 (MTX related lymphoproliferative disorders; MTX-LPD) が好発することが知られているが、自己免疫性疾患からの報告が主である。そのほとんどが関節リウマチ患者 (rheumatoid arthritis: RA) による症例である。WHO分類ではMTX-LPDは一つの亜群としては認定されておらず、＜免疫不全に伴うLPD＞の4つの亜群の1つであるother iatrogenic immunodeficiency-associated LPDs (OIHA-LPDs) の中に収納されている。埼玉医科大学総合医療センターにおける23症例の解析を論文として報告したが<sup>1)</sup>、今回の研究ではさらに症例を増やして検討を行った。

## 対象

MTXを投与され、LPDを発症したRA患者で解析可能な36症例の臨床、病理像の解析を行った。全症例RA疾患であった。

## 結果・考案

36症例においても、以前我々が報告したようにOIHA-LPDsは3つのパターン、すなわち、MTX投与中に発症しMTX中止で消退した群 (MTX-Regressive-LPDs: Regressive群)、MTX投与中に発症しMTX中止でLPDが消退せず化学療法を必要とした群 (MTX-Persistent-LPDs: Persistent群)、MTX投与歴があり他の抗リウマチ薬剤投与中にLPDが発症した (MTX-Other-LPDs: Other群) の3群に分けることが可能であった。今回の検討では、OIHA-LPDsとEpstein-Barr virus (EBV) の関連、EBVとLPD消退との関連、LDP発症後の抗RA剤に伴う再燃との因果関係、全体の予後、予後不良因子の検討を行っている。その中で、明らかとなったことを2つの学会にて報告を行った。The 5th JSH International Symposiumで行った報告は、一端MTX中止後LPDが消失したが部分寛解に留まった3症例の検討である。いずれもEBV陽性のHodgkin lymphoma (HL)、もしくはHL-like lesionであり、通常であれば抗がん剤を用いるところを増悪するまで経過を見た

ものである。1症例は部分寛解のまま1年が過ぎたところで、途中増悪したが消退し、患者希望により1年半で治療を開始した。他の2症例は部分寛解のまま無治療で経過を見ることが可能であった。このことはMTXにより一端抗LPD免疫が抑制されるが、MTX中止により免疫が回復すること、一方で完全にLPDを消滅できないことから、stable diseaseを維持する免疫能が存在することが明らかとなった。

今回の研究を踏まえ、血清サイトカイン、末梢血リンパ球のフローサイトメトリー、遺伝子などLPD発症時および中止後の変化を見ることにより、本病態の解明に向かって多施設におけるOIHA-LPDsの研究を計画中である。

## 文献

- 1) Tokuhira M, Watanabe R, Nemoto T, et al. Clinicopathological analyses in patients with other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative diseases and rheumatoid arthritis. Leuk Lymphoma 2012;53:616-23.

## 研究成果リスト

## 学会発表

- 1) Tokuhira M, Kimura Y, Tomikawa T, Sagawa M, Anan T, Higashi M, Itoyama S, Tamaru J, Okuyama A, Amano K, Tabayashi T, Watanabe R, Mori S, Kizaki M. Impact of epstein-barr viral infection in the regression of methotrexate-induced lymphoproliferative diseases in patients with rheumatoid arthritis #3006, 第55回 American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 平成25年12月6-9日, 米国New Orleans
- 2) Tokuhira M, Kimura Y, Takahashi Y, Nemoto T, Sagawa M, Tomikawa T, Mori S, Tabayashi T, Watanabe R, Kizaki M. The impact in terms of complete cytogenetic response after 3 months of second tyrosine kinase inhibitor administration in chronic phase chronic myeloid leukemia patients, The 5th JSH International Symposium, 平成26年5月24-25日, 浜松

## 学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

多発性骨髄腫に対する次世代シーケンサーを用いた  
遺伝子発現解析及び新規治療薬の開発

研究代表者 佐川 森彦（総合医療センター 血液内科）

研究分担者 木崎 昌弘\*, 得平 道英\*, 多林 孝之\*,  
根本 朋恵\*, 富川 武樹\*

## 緒 言

近年のシーケンシング技術は驚くべき進化を遂げ、DNA塩基配列の解析では従来のキャピラリーシーケンサーの100倍以上のスループットをもつシーケンサーがいくつも出現している。これらシーケンサーは次世代シーケンサーと呼ばれ、現在このシーケンサーを用いて多数の生物のde novoゲノム配列が決定されている。また、転写産物の配列解析(RNA-seq)も盛んに行われており、解析可能な試料数の多さを利用して遺伝子発現解析にも広く利用されている。

これまでのマイクロアレイでは、遺伝子配列情報が判明している場合には発現の計測が可能であったが、未知の遺伝子発現については計測が原理的に不可能であり、造血器腫瘍に多く認められる遺伝子転座に伴う融合遺伝子における解析も非常に困難であった。RNA-seqは、既知の遺伝子の発現解析をこれまで以上にhigh-throughputに容易にすると共に、マイクロアレイでは不可能とされていた新規の生物種、新規の遺伝子発現の計測、及び融合遺伝子の解析が可能となり、結果としてトランスクリプトームの全体像を理解することが可能となる。このような技術的背景より、RNA-seqは徐々に腫瘍学の分野に適用されるようになり(Maher CA, et al. Nature 2009;458:97)、既にヒトがん由来細胞株において新たな変異遺伝子や融合遺伝子が発見され、同時に発現量の計測が行われている。RNA-seqは腫瘍学の分野において、今後種々のがんに応用されていくことが考えられる。多発性骨髄腫における次世代シーケンサーを用いた解析の報告としては、Chapman MA, et al. (Nature 2011;471(7339):467)によるものが代表的であるが、その報告は限定的であり、それ以外のグループからの報告は未だに認められていない。したがって、今回の申請者らの検討は非常に新しく独創的で意欲的な研究になると考えられる。

多発性骨髄腫は、ボルテゾミブ、レナリドミドなどの新規治療薬、造血幹細胞移植の進歩にも関わらず、現状では未だ治癒の期待出来ない難治性の造血器腫瘍である。発症年齢は、65-70歳がピークと高齢者に多く、高齢化社会を迎え、今後ますます患者数が増加することが予測され、高齢者にも適応可能な、生体への侵襲が少なく、抗がん剤治療、移植治療に変わる全く新しい概念の治療法の開発が切望されている。

申請者らは、これまで多発性骨髄腫に対する新規分子標的薬の開発を行ってきた。東京大学分子生物学研究所有機化学研究部門 橋本祐一博士の協力のもとで、サリドマイドの薬理作用から多くの薬物標的を仮想して構造展開することにより、当該の薬物標的に対する特異的な医薬リード化合物を多数創製できる可能性を検証し、新規微小管重合阻害薬 2-(2,6-Diisopropylphenyl)-5-hydroxy-1H-indole-1,3-dione (5HPP-33) が骨髄腫の新規治療薬となりうることを明らかにした(Iguchi, et al. Int J Mol Med 2008;21:163, Noguchi, et al. Bioorg Med Chem Lett 2005;15:321)。

更に、我々は東南アジアに自生するショウガ科植物 *Languas galanga* に由来する成分 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) が、骨髄腫に対し *in vitro* および *in vivo* で NF- $\kappa$ B の核内移動を抑制することでアポトーシスを誘導すること(Ito K, et al. Cancer Res 2005;65:4417)、及び TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) の活性化を介してアポトーシスを誘導すること(Ito K, et al. Biochem Biophys Res Commun 2005;338:1702)を見出した。現在、橋本祐一博士らの協力のもとでACAをリード化合物とする構造展開による多発性骨髄腫の新規分子標的薬の開発を行い、多発性骨髄腫の増殖・分化の分子学的メカニズムの解明にも努めている。

今回、次世代シーケンサーを用いた数々のプロジェクトに参加してきた(Ninomiya M, et al. J Clin Microbiol 2012;508:57, Okae H, et al. Hum Mol Genet 2012;21:548,

\* 総合医療センター 血液内科

Renfree MB, et al. Genome Biol 2011;12:R81), 独立行政法人理化学研究所基幹研究所長田抗生物質研究室の客員研究員である西田有一郎博士らの協力が得られることとなり、本研究を着想するに至った。

## 材料と方法

### 1. 骨髄腫細胞株を用いたcDNAライブラリーの作製

多発性骨髄腫細胞株 (U266, RPMI8226) 等に対し、申請者らがこれまで開発を行ってきた新規治療薬 ACA, TM-233 など投与し、投与群・非投与群それぞれで mRNA の抽出を行った上で、cDNA ライブラリーの作製を行う。

### 2. 骨髄腫細胞株由来のcDNAライブラリーを用いた RNA-Seq

作製された cDNA ライブラリーを、理化学研究所にて次世代シーケンサー GAIIx (Illumina 社)、あるいはさらに高性能な次世代シーケンサー MiSeq (Illumina 社) を用いて RNA-Seq を行い、遺伝子発現解析を行う。解析の過程では、①非投与群 (control) において、骨髄腫で既知の遺伝子の発現を確認すると共に、未知の遺伝子発現 (これまで未知であった新規の遺伝子群の発現、骨髄腫との関連が薄いとされてきた遺伝子群の発現) を見出し、新規分子標的の候補となりうる遺伝子か否かを分析する。②投与群・非投与群の比較により、発現の変化のあった遺伝子群を見出す。

### 3. RNA-Seqの結果の精査

RNA-Seqの結果を踏まえて以下を行う。

①非投与群 (control) において見出された遺伝子群の中で、未知の遺伝子群の発現の可否を RT-PCR 法や Western blot 法などにて検証を行う。

②次に、骨髄腫に対し臨床的に用いられている治療薬 (デキサメタゾン、メルファラン、ドキシソルビシンなどの古典的な治療薬、及びボルテゾミブ、レナリドミドなど新規治療薬) 投与前後において、①で見出された遺伝子の発現を RT-PCR 法、real-time PCR 法、更には Western blot 法を用いて検証を行う。更に、検証の結果、有効と考えられた場合には、その上流・下流のシグナル分子に対しても同様に検討する。

③投与群・非投与群での比較により見出された遺伝子群に対しても、①と同様な検証を行う。

### 4. 骨髄腫患者検体を用いたcDNAライブラリーの作製

骨髄腫細胞を用いて実験系が確立出来れば、多発性骨髄腫患者検体 (初発時、再発時など、可能であれば 1 患者について複数検体を) 数検体に対して、1. と同様に新規治療薬投与群・非投与群それぞれで RNA の抽出、続いて cDNA ライブラリー作成を行う。

### 5. 骨髄腫患者検体由来のcDNAライブラリーを用いた RNA-Seq

作成された cDNA ライブラリーを、2. と同様に、次世代シーケンサーを用いて RNA-Seq を行い、遺伝子発現解析を行う。

初発時、再発時など複数回、検体が採取出来た患者の場合には、それぞれにおける遺伝子発現の違いについても解析することで、治療抵抗性、薬剤感受性を含めた解析が可能となると考えられる。

### 6. 骨髄腫患者検体のRNA-Seqの結果の精査

患者検体の RNA-Seq の結果を踏まえて、以下を行う。

①非投与群 (control) において見出された遺伝子群の中で、未知の遺伝子群の発現の可否を RT-PCR 法や Western blot 法などにて検証を行う。

②次に、投与群・非投与群での比較により見出された遺伝子群に対しても、①と同様な検証を行う。

③同一患者において、初発・再発時の複数回の検体が採取出来た場合には、その 2 群間において生じた遺伝子発現の変化について、RT-PCR 法、real-time PCR 法、Western blot 法などによる検証を行い、耐性メカニズム等の検証に役立てる。

## 結 果

骨髄腫細胞株 U266 および RPMI8226 を用いて cDNA ライブラリーを作成し、その上で RNA-Seq を試みた。しかし検体不良が原因と思われるノイズが膨大に出てしまい、検証に値するデータが得られなかった。原因を精査し、改めて cDNA ライブラリーの作製を行っている段階である。近日中に改めてデータの検証を行う予定である。

骨髄腫検体については既に 3 症例程の細胞が集積出来ており、骨髄腫細胞を用いた系でうまく RNA-Seq の結果が得られるようであれば、1 症例ずつ cDNA ライブラリー作製の上で RNA-Seq を行うようにしていきたい。

尚、申請者らが研究を進めて来た多発性骨髄腫の新規治療薬の候補である ACA およびその誘導体である TM-233 については、骨髄腫細胞に対して、NF- $\kappa$ B 経路等を介した細胞死を誘導することを報告した。

## 考 察

本研究はこれまで申請者らが集積してきた ACA の白血病や骨髄腫に対する分子作用機構に関する研究成果をもとに、さらに ACA をリード化合物として種々の化合物を構造展開することで、従来の作用基盤に加えて新たな生物活性を有する新規化合物による新規骨髄腫治療薬を開発する独創的な研究である。更に、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq により、多発性骨髄腫の増殖・分化に関する分子学的メカニズムを high-throughput に明らかにすることで、これまで未知であった多発性骨髄腫の発症や

進展に関する分子学的メカニズムを解明すること、耐性症例を用いて耐性メカニズムを解明することが目的である。

本研究により、多発性骨髄腫の増殖や進展に関わる真の分子が同定できれば、生体への侵襲の少ない多発性骨髄腫に対する新たな治療薬が開発される可能性があり、その臨床的意義は極めて大きい。前述の通り、多発性骨髄腫では、特に高齢化社会の到来に伴い、治療を期待できる

有効な治療法が存在しない患者の数が急増している。したがって、本研究に基づく成果が臨床応用されれば、多発性骨髄腫の治療成績の著明な向上、さらにはこれまで期待できなかった骨髄腫の治療にも大きく寄与するものと考えられ、臨床的にも非常に意義が大きな研究と考えられる。今後の展開が非常に重要である。

## 学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

## 多発性骨髄腫における血栓形成機序の解明と NF- $\kappa$ B 阻害による治療法の確立

研究代表者 渡部 玲子（総合医療センター 血液内科）

### 緒 言

多発性骨髄腫患者は、血栓症の合併が多いがそのメカニズムには、未だに明らかではない。近年サリドマイドおよびその誘導体であるレナリドミドが臨床応用され、優れた治療成績が示されているが、これらの薬剤は血栓症が高頻度に合併することが問題である。一方、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブに関しては、臨床的に血栓症合併はきわめて稀である。近年、多発性骨髄腫と微小環境に関する検討が進み、新薬の開発が進められているが、この微小環境の主な構成成分である血管内皮細胞は血栓形成にも重要な役割をはたすことが知られている。本研究は、これら新規治療薬の有害事象出現プロファイルの差異により、骨髄腫治療における血管内皮細胞を介する血栓形成予防の可能性とその分子機構について検討することを目的とする。

筆者らはこれまでに、骨髄腫患者における、血液凝固異常のメカニズムに関連して、日常臨床の中で患者の血液凝固線溶マーカーを測定してきた。しかし、通常測定可能なこれらのマーカーによって、患者の血栓形成などの病態を推し量ることができないことが明らかになっている。そのため、多発性骨髄腫患者の骨髄微小環境変化についてはまず、*in vitro*の系において、血栓形成に関与するマーカーとなりうる因子が存在するかを明らかにし、さらにその後それらが末梢血検査など簡便な方法により測定可能な因子となり得るかを検討することを着想した。骨髄腫患者に対しては、NF- $\kappa$ B阻害剤、免疫調節剤などの新たな薬剤の開発により今後、治癒の可能性が望まれ、抗腫瘍効果の検討は進んでいる。しかしながら一方、多発性骨髄腫の治療時に問題となる血栓症発症については、様々に検討されているが、いまだにその発症メカニズムが明らかではない。血栓止血に関連した因子として、PSGL-1は骨髄腫細胞での発現がみられ、P-セレクトリンを介し、血管内皮細胞との相互作用により骨髄微小環境の変化を生じ、骨髄腫細胞のホーミングや増殖との関連が注目されている。しかし、血管内皮細胞の本来有する強力な抗血栓作用に鑑みると、血栓症の制御、

あるいはその発症にも関与している可能性も存在する。しかし血栓症との関連も想定されるものの、詳細が不明である。

本研究は、臨床的な観察事項に基づき、サリドマイド、レナリドミドの使用時には血栓症の発症が多いが、ボルテゾミブ使用時には認められないという有害事象プロファイルの差異により、ボルテゾミブによる血管内皮細胞に対するNF- $\kappa$ B阻害が血栓発症を予防するという仮説を立てた点に学術的特色を有する。同時に、これまでに明らかにされていないNF- $\kappa$ B阻害剤の血栓形成に及ぼす影響を明らかにする点に学術的特色を有し、申請者の豊富な臨床的経験をもとに研究を構築するという独創的な研究である。一方、本研究によりNF- $\kappa$ B阻害剤による血栓形成抑制機構が明らかになれば、多発性骨髄腫治療においてしばしば問題となる血栓形成の予防が可能となり臨床的にも意義の大きな研究と考えられる。

### 研究の内容

#### 新規治療薬添加による多発性骨髄腫の細胞株におけるTF、血管内皮細胞におけるP-セレクトリン発現量の検討

培養細胞：多発性骨髄腫由来培養株細胞株(U-266)、正常ヒトさい帯血静脈血管内皮細胞(C-0031: GIBCO社)を20% FBS添加RPMI培地(GIBCO社)を用いて培養した。培地にBortezomibおよびLenalidomideを添加し、U-266におけるTF、C-0031におけるP-セレクトリン発現量の変化をそれぞれ検討した。

Western blot法により細胞中のP-セレクトリン蛋白発現量を測定した。

RT-PCRにより培養細胞よりmRNAを抽出し、RT-PCRを用いたP-セレクトリンおよびTFのmRNAの定量測定を行った。

### 結 果

U-266におけるTFに関して、Bortezomib、Lenalidomide添加による有意な変化は認められなかった。またRT-PCR法によるmRNA定量に関してもBortezomib、Lenalidomide添加前後の差は認められなかった。またC-0031における

P-セレクトイン発現量も Bortezomib, Lenalidomide 添加後に有意な変化が観察されなかった。

## 考 察

今回、我々は、新規治療薬添加による骨髓腫細胞株 U-266 における TF の発現の変化、および、血管内皮細胞 C-0031 における P-セレクトインの変化を検討した。我々の開発した *in vitro* 条件下で、これらの増加は明らかではなく、NF- $\kappa$  阻害薬による血栓予防のメカニズムには、他の因子が関与する可能性が示唆された。複雑な血液凝固線溶系の中で、血栓止血制御機構の中心と考えられている TF、P-セレクトインのみではなく、von Willebrand 因子、Thrombomodulin、Plasminogen activator inhibitor-1 などに他の因子関しても検討することで、骨髓腫の治療における、血栓性合併症とその予防効果について新たな知見が得られることが期待される。また、今後より *in vivo* に近い条件として腫瘍細胞、血管内皮細胞の共培養などあらたな実験系の検討も必要と考えている。これまでに

学内グラントで得られた研究成果については、学会発表、雑誌の投稿にむけて準備している段階である。

## 参考文献

- 1) Rosovsky R, Hong F, Tocco D, et al. Endothelial stress products and coagulation markers in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone: an observational study. *Br J Haematol* 2013;160(3):351-8.
- 2) van den Berg YW, Osanto S, Reitsma PH, et al. The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench to bedside. *Blood* 2012;119(4):924-32.
- 3) Ay C, Simanek R, Vormittag R, et al. High plasma levels of soluble P-selection are predictive of venous thromboembolism in cancer patients: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS). *Blood* 2008;112(7):2703-8.

## 学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

造血器腫瘍発症におけるアダプター分子 Lnk の機能解析と  
新たな治療標的の探索

研究代表者 多林 孝之(総合医療センター 血液内科)

研究分担者 木崎 昌弘\*, 得平 道英\*, 渡部 玲子\*, 阿南 朋恵\*,  
佐川 森彦\*, 富川 武樹\*, 木村 勇太\*, 高橋 康之\*

## 緒 言

Lnkは主に造血器細胞に発現するアダプター分子であり、それ自体酵素活性を持たないもののレセプターチロシンキナーゼと結合しサイトカインシグナルを抑制的に制御している。Lnkのノックアウトマウスでは野生型のマウスに比べて造血幹細胞が著しく増加し骨髄増殖性腫瘍(MPN)様の病態を呈することが分かっている(Velazquez L, et al. J Exp Med 2002;195:1599)。また、近年、骨髄増殖性腫瘍において高頻度で認められるJAK2V617F変異を持たないMPN例でLnkの変異が認められたという報告がなされている(Oh ST, et al. Blood 2010;116:988. Lasho TL, et al. N Engl J Med 2010;363:1189)。ことからLnkが造血幹細胞や造血器腫瘍の増殖を抑え、それらの産生と維持に非常に重要な役割を果たしていることが示唆される。慢性骨髄性白血病(CML)では染色体の転座によってBcr/Abl融合遺伝子が作られ、その融合遺伝子産物の強力なチロシンキナーゼ活性によってJAK/Stat経路, PI3K/Akt経路, MAPK経路などの細胞の増殖や不死化に促進的に働くさまざまな細胞内伝達経路が恒常的に活性化され、このことがCMLの病態と強く関連している。近年、Bcr/Ablチロシンキナーゼに対する特異的な阻害剤であるイマチニブの登場によってその予後は飛躍的に改善したが分子遺伝学的完全寛解後にイマチニブを中止すると高率に再発することが報告されている。また、CML加療中にイマチニブに耐性を持つ遺伝子変異を生じ治療抵抗性になる例も報告されている。このような遺伝子変異のうちT315I変異をもったCML細胞はイマチニブのみならずBcr/Abl以外のチロシンキナーゼを抑制する薬剤に対しても耐性をもつことが分かっている。これらのことからCMLの治療にはチロシンキナーゼ阻害剤の他に新たな治療法の開発が急務となっている。造血器腫瘍細胞株と臨床検体を使用した研究からLnkが

正常造血細胞のみならず、CMLを初めとしたさまざまな造血器腫瘍細胞において、正常造血幹細胞より、造血器腫瘍細胞においてより多く発現していることが報告されている(Gery S, et al. Exp Hematol 2009;37:e2)。また、申請者らは予後不良の急性骨髄性白血病細胞にて発現が認められる変異Flt3にもLnkは会合しその増殖を抑制することを見出した(Lin DC, Tabayashi T, et al. Blood 2012;120:3310)。更に、Lnkはレセプター型チロシンキナーゼのみならずJAK2など非レセプターチロシンキナーゼに対しても抑制的に働くことが分かっている(Bersenev A, et al. J Clin Invest 2008;118:2832)。このようにLnkは種々の造血器腫瘍において重要な役割を果たしていることが報告されており、造血器腫瘍の病態を明らかにし治療を開発するためにLnkの抗白血病効果の機序を解明することは重要と考えられる。

## 材料と方法

- 1) 造血器腫瘍細胞株のK562細胞と、ヒトBcr/Abl遺伝子を強制発現させたマウスの造血細胞株であるBa/F3細胞に遺伝子導入によってLnkを強制発現させ、trypan blue dye exclusion assayとコロニーアッセイ法を用いLnkによる増殖抑制の効果を調べた。
- 2) Lnkを強制発現させたK562細胞より蛋白を抽出しレセプター蛋白やチロシンキナーゼについてLnkとの会合の有無をImmunoprecipitation法を用いて検討した。

## 結 果

- 1) Lnkの造血器細胞に対する細胞増殖抑制作用と機序についてCML細胞株を用いて検討を行った。Lnkを強制発現させたK562細胞と、LnkとBcr/Abl遺伝子を共発現させたBa/F3細胞ににおいてLnkはいずれの細胞増殖を抑制した。また、FACSによるアポトーシスアッセイを行ったところLnkによっていずれの細胞に

\* 総合医療センター 血液内科

においてもアポトーシスの誘導が認められた。

- 2) Lnkを強制発現させたK562細胞においてBcr/Abl細胞内からのシグナル伝達経路のリン酸化の状態を調べたところLnkはStat5のリン酸化を強力に抑制したがBcr/Abl, MAPK経路, PI3K経路のリン酸化には影響を及ぼさなかった。更にCML細胞においてはLnkは直接Stat5と会合し, 下流のシグナルを抑制した。

## 考 察

Lnkを強発現しているヒトCML細胞株と, Lnkを強制発現させたマウスCML細胞を用いた実験にてLnkはStat5を直接的に脱リン酸化しCML細胞のアポトーシスを誘導することによってその増殖を抑制することが示された。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Sagawa M, Tabayashi T, Kimura Y, Tomikawa T, Nemoto T, Watanabe R, Tokuhira M, Ri M, Hashimoto Y, Iida S, Kizaki M. TM-233, a novel analog of ACA,

induces cell death in myeloma cells by inhibiting both JAK/STAT and proteasome activities. Cancer Sci 2015 Jan 23. doi: 10.1111/cas.12616.

- 2) Tokuhira M, Kimura Y, Nemoto T, Sagawa M, Tomikawa T, Sakai R, Okuyama A, Amano K, Higashi M, Tamaru J, Mori S, Tabayashi T, Watanabe R, Kizaki M. Therapy-related myeloid neoplasm in methotrexate-associated lymphoproliferative disease in a rheumatoid arthritis patient. Clin Exp Hematop 2014;54(2):137-41.

### 学会発表

- 1) Tabayashi T, Sagawa M, Kimura Y, Tomikawa T, Nemoto T, Watanabe R, Tokuhira M, Kizaki M. Targeting the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in Multiple Myeloma: A Possible New Therapeutic Approach to Overcome Bortezomib Resistance (56th ASH Annual Meeting and Exposition (December 6-9, 2014) in San Francisco, CA)