

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

丸木記念特別賞受賞

臨床試験に向けた慢性C型肝炎治療ワクチン研究と
インフルエンザワクチンへの応用

研究代表者 赤塚 俊隆 (医学部 微生物学)

研究分担者 内田 哲也¹⁾, 持田 智²⁾, 小林 信春¹⁾,
堀内 大¹⁾, 高木 徹¹⁾

緒言

毎年ワクチン研究の論文が数多く発表されるが、そこから臨床試験まで進むケースはごく一握りにすぎない。マウス実験で効力が認められても、ヒトに応用するためには有効性、安全性、経済性全てを兼ね備え、かつ国と製薬メーカーの興味をひきつける必要がある。研究分担者・内田と我々の教室との連携で開発を進めてきた抗原表面結合型リポソームワクチンは、細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導効率が極めて高く、他のワクチンと比べてウイルス感染防御効果、がん治療効果など様々な利点があることが明らかとなり^{1,2)}、次世代ワクチンとして注目されるようになった。臨床応用を目指して開発が先行しているインフルエンザワクチンは、4年前「万能インフルエンザワクチン」としてマスコミが大きく取り上げ、ロイター通信が海外にも発信した。そして現在臨床試験に向け、国内外のワクチンメーカーと契約交渉を行う段階となっている。同時に並行して開発を進めたC型肝炎ウイルス(HCV)ワクチンも、感染予防効果のみならず、慢性感染者の治療ワクチンとしての効果がモデルマウスを用いた実験で確認され、患者の治療に向けた研究に進める段階を迎えた。

本研究では慢性C型肝炎治療ワクチンの完成に向け、3つの課題を検討した。すなわち、1) 非細胞障害メカニズムによる抗ウイルス作用機序の解明、2) 抗原をペプチドからタンパクに替え、ユニバーサルに使用可能なものにする、3) 治療効果発現のために遮断する免疫抑制経路として、PD-1/PD-L1経路に加え、Galectin-9/Tim-3経路を検討する、である。

材料と方法

HLA-A2トランスジェニックマウス

マウスMHCクラスIと β 2-microglobulin(β 2-m)をノックアウトしたマウス(C57BL/6 background)に、ヒトMHCクラスIの一つであるHLA-A*0201(HLA-A2)とヒト β 2-m遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(HHDマウス)³⁾を使用した。HHDマウスはフランス・パスツール研究所・Lemonnier博士より供与された。

免疫方法

3つの免疫方法で実験した。①抗原ペプチド50 μ gをヘルパーT細胞エピトープペプチドHBVcore128-140(NH₂-TPPAYRPPNAPIL-COOH)⁴⁾100 μ gと共にフロイント不完全アジュバントと混合し、その懸濁液を皮下に注射した。②ペプチドを表面結合したリポソーム50 μ l(ペプチドを<35 μ g含む)をCpG5 μ gと共にfootpadに注射した。③HCV構造タンパクCore, E1, E2を発現する増殖欠損型組換えアデノウイルス(Adex1SR3ST)による免疫と、免疫マウスのCTL活性およびIFN- γ 産生反応の測定(Intracellular cytokine staining)については既に報告した⁵⁾。

組換えワクシニアウイルスによるチャレンジ実験

HCV Core, Core-E1, E2, NS3, NS4を発現する組換えワクシニアウイルスの作成は既に報告した^{5,6)}。免疫マウス♀にウイルスを 2×10^6 PFU i.p.でチャレンジし、5日後に卵巣を採取、そのホモジネートのウイルス量をBS-C-1細胞を用いたプラーク形成法により定量した。

IFN- γ ELISPOT assay

抗原ペプチドに特異的に反応してIFN- γ を産生する細胞の定量は、IFN- γ ELISPOT set(BD Pharmingen, San Diego, CA)を用いて行った。

1) 医学部 微生物学

2) 大学病院 消化器内科・肝臓内科

結 果

非細胞障害メカニズムによる抗ウイルス作用機序の解明

抗原表面結合型リポソームワクチンの抗ウイルス効果を, lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) エピトープペプチドを用いて検討した際, リポソーム表面結合により抗原ペプチドが従来²⁾の報告とは異なる免疫原性を示すことが観察された²⁾. そこでHCVワクチンの開発研究にあたり, 14種類の既知のHCV CTL epitope (A2-1~14, 表1)について, ①フロイント不完全アジュバントを用いた免疫, ②リポソームワクチン, ③組換えアデノウイルス感染による免疫, の3つ免疫法におけるA) CTL活性誘導, とB) IFN- γ 産生誘導, の2つの免疫誘導効果を比較した. 結果を図1に示すが, ①と②の結果はそれぞれグレーと黒の棒グラフで, A: ⁵¹Cr-release assay, B: ELISPOT (IFN- γ) について示してある. ③は既に報告済⁵⁾の結果で, 各エピトープ部分を含むHCVタンパクを発現する組換えアデノウイルスを感染させたマウスにおけるA), B) の反応を, その強さの組み合わせによりI~Vの5種類(表1の注に説明)に分けて表示している.

それらをまとめて見てみると, 同じエピトープでも①, ②, ③の免疫法で反応が大きく異なることが分かる. 例えばA2-5は①と③の免疫法ではA, B共に反応が見られるのに対し, ②(リポソーム免疫)ではAのみが強く見られる. A2-7も①と③の免疫法でA, B共に反応が見られるが, こちらは②(リポソーム免疫)ではA, Bのいずれにおいても殆ど反応が認められなかった. A2-8は②と③が共通でA, B共に反応が見られるのに対し, ①ではAのみが強く認められた. 一方A2-11とA2-12は③の免疫法でA, B共に反応が見られるが, ①ではAのみが, そして②ではBのみが強く認められている.

以上の結果を図1Cの結果と比べると興味深い. 図1CではA2-1~14の全てのペプチドについて②の方法, すなわちリポソーム免疫を行ったマウスに対し, それぞれのエピトープを発現する組換えワクシニアウイルスでチャレンジ実験を行った. 図ではそのうち, A2-5~A2-7, A2-8, A2-11, A2-12の5つの結果のみ示してある(他の9つのリポソームワクチンは, いずれも有意な防御効果が認められなかった). リポソーム結合したA2-8, A2-11, A2-12

表 1.

HCV-derived peptides used in this study.

Name	Restriction	Derivation	Residues	Sequence (Ref.)	Type ^a
A2-1	HLA-A*0201	Core	35-44	YLLPRRGPRLL	IV
A2-2	HLA-A*0201	Core	132-140	DLMGYIPLV	I
A2-3	HLA-A*0201	Core	178-187	LLALLSCLTV	V
A2-4	HLA-A*0201	E1	257-266	QLRRHIDLLV	III
A2-5	HLA-A*0201	E2	686-694	ALSTGLIHL	I
A2-6	HLA-A*0201	E2	726-734	LLFLLLADA	III
A2-7	HLA-A*0201	NS3	1073-1081	CINGVCWTV	I
A2-8	HLA-A*0201	NS3	1406-1415	KLVALGINAV	II
A2-9	HLA-A*0201	NS3	1585-1593	YLVAYQATV	II
A2-10	HLA-A*0201	NS4A	1671-1680	VLAALAAYCL	I
A2-11	HLA-A*0201	NS4B	1807-1816	LLFNILGGWV	II
A2-12	HLA-A*0201	NS4B	1851-1859	ILAGYGAGV	II
A2-13	HLA-A*0201	NS4B	1920-1928	WMNRLIAFA	I
A2-14	HLA-A*0201	NS5A	1992-2000	VLSDFKTWL	IV

^aClassification of HCV-derived CTL epitopes determined in our previous study [5]. Type I: High or medium in the affinity, high or medium in the lysis, and high or medium in the intracellular cytokine staining (ICS) for IFN- γ . Type II: High or medium in the affinity, high or medium in the lysis, and low or ND in the ICS. Type III: Low in the affinity, and high in the lysis. Type IV: High in the affinity, low or ND in the lysis, and medium in the ICS. Type V: High or medium in the affinity, low or ND in the lysis, and low or ND in the ICS. Type VI: Low in the affinity, ND in the lysis and ICS. ND, not detected.

の3種できれいな完全防御が認められたが、いずれも共通して強いIFN- γ 産生誘導が認められており、CTL活性誘導が非常に低いA2-11, A2-12でも防御していることから、これらのリポソームワクチンの感染防御効果は細胞傷害活性誘導ではなく、IFN- γ 産生誘導などのNon-cytolytic mechanismによるものではないかと推測された。

この推測を確認するため、L-A2-12免疫マウス脾細胞をin vitroでA2-12ペプチドによる刺激を5回繰り返しcell lineを樹立した。この細胞株はペプチド

パルス標的細胞に対し、E/T ratio = 30 : 1で10.1%の傷害活性を有していたが、フローサイトメリーでCD8陽性細胞が99.4%を占め、その91.5%が抗原ペプチドに反応してIFN- γ を産生していた。そしてこの細胞株をTranswell plateに入れ、フィルターで隔てられた標的細胞に抗原ペプチド部分を発現する組換えワクシニアウイルスを感染させると、ウイルス増殖を2 log以上低下させることが認められた。すなわち直接の細胞障害作用なしに、標的細胞におけるウイルス増殖を押さえることが証明された(図2)。

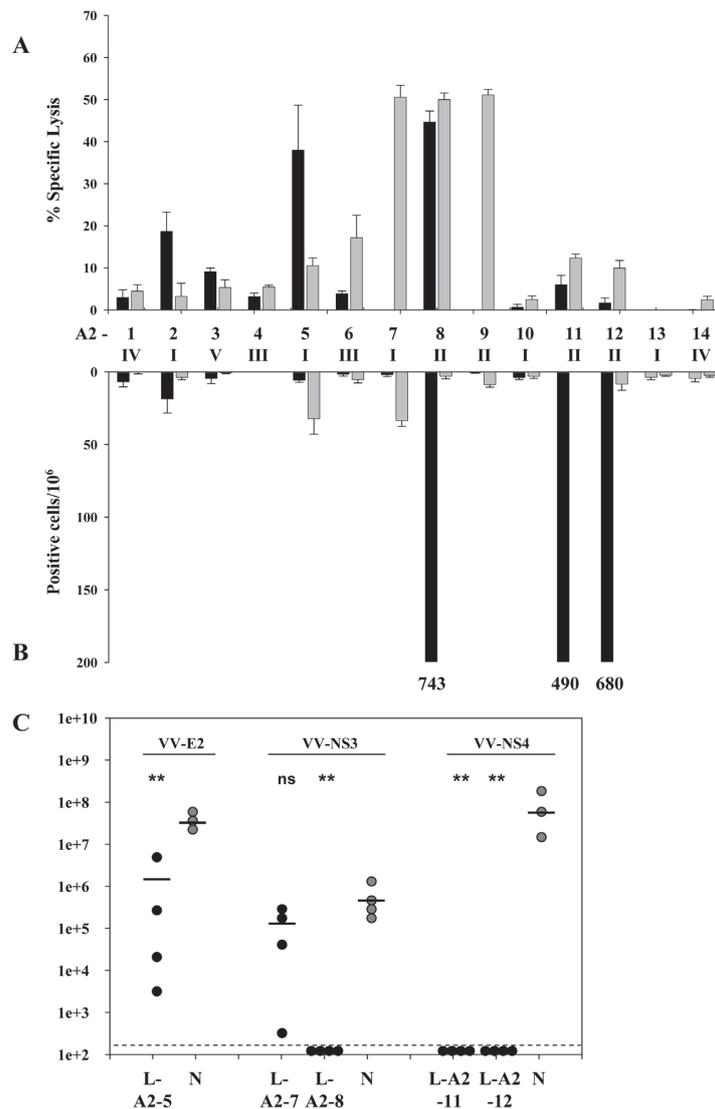


図1. 14種のHCV CTL epitope ペプチドのそれぞれについて、2種類の免疫法(①ペプチドをフロイント不完全アジュバントと混合して皮下注：灰色のバー；②ペプチドをリポソーム表面結合し、CpGと共に皮下注：黒色のバー)でHHDマウスを免疫し、反応を比較した。(A) ⁵¹Cr-release assay. E/T ratio = 50, (B) ELISPOT (IFN- γ) assay. 3番目の免疫法(③HCVタンパク発現組換えアデノウイルス感染)におけるCTL誘導とIFN- γ 誘導の結果の組み合わせはI~Vの5種類に分類して(A)と(B)の間に示してある(表1参照)。(C) ②のリポソーム免疫を行ったHHDマウスに、免疫したエпитープを含むHCVタンパクを発現する組換えワクシニアウイルスでチャレンジし、感染5日後の卵巣中のウイルス量を測定した。A2-5, 7, 8, 11, 12の5種類についてのみ示してある。点線は検出限界(200 PFU/ovary)を示している。

HCV NS3 タンパクの発現・精製

ワクチン成分としてエピトープペプチドを用いることは、その効力と特性を確実に発揮させるためには大きな利点となるが、ヒトへの応用を考えると、特定のHLAクラスIタイプにしか適用できず、他種類のペプチドを選定してワクチンを作製し、それを混合しなければ、ユニバーサルなものとはならない。それに対し抗原としてタンパク分子全体あるいはその一部を用いれば、そこに有効なエピトープが含まれていれば、それらが抗原提示経路でプロセスされてHLAクラスI分子に提示される可能性がある。実際抗原表面結合型リポソームワクチンは、Cross-presentationというメカニズムにより、通常はクラスII抗原提示経路に向かうタンパク分子を、クラスI経路へ送ってCD8⁺T細胞を誘導することが証明されている^{1,7)}。そこでHCVの非構造タンパクであるNS3 (aa. 1027-1658)のうちのhelicase domain (aa 1193-1658)からaa. 1243-1458の部分の完全長HCV cDNAを鋳型としてPCRで増幅し、発現プラスミドpBEn-SBP-SET1aのクローニング部位に組み込んだ。大腸菌BL21を形質転換し、IPTGを加え発現誘導を行うと、誘導後1時間から抗体と反応する~30 Kバンドの出現が認められた(図3A, B)。この発現タンパクはStreptavidin binding peptideが融合しているので、Streptavidin-beadsと結合させて精製することができる。予備試験の結果、NS3タンパクは超音波処理により大腸菌から可溶性タンパクとして抽出可能で、Streptavidin-beadsと結合後、biotinを含む低塩濃度のバッファーで溶出されることが確認できた(図3C)。現在これを大量

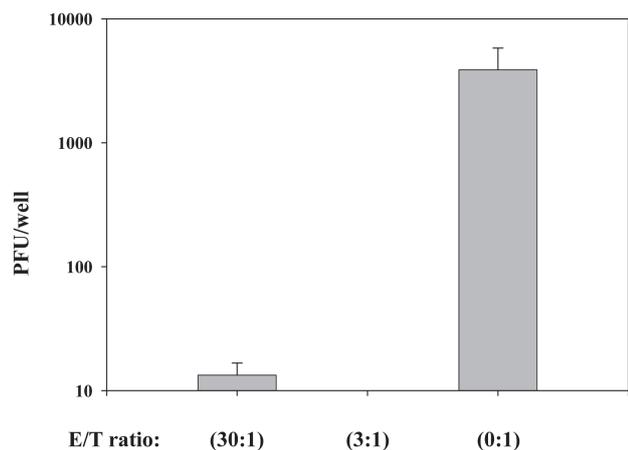


図2. リポソーム結合A2-12免疫マウス脾細胞由来A2-12特異的T細胞株によるVV-NS4増殖抑制効果。トランスウェルプレート上の各ウェルでHHD由来線維芽細胞株 1×10^5 個にVV-NS4を200 PFU感染させ、フィルターの上には抗原ペプチドで刺激したT細胞株 1×10^5 個を加え2日間培養し、線維芽細胞株のホモジネートのウイルス量をBS-C-1細胞を用いたプラーク形成法で測定した。

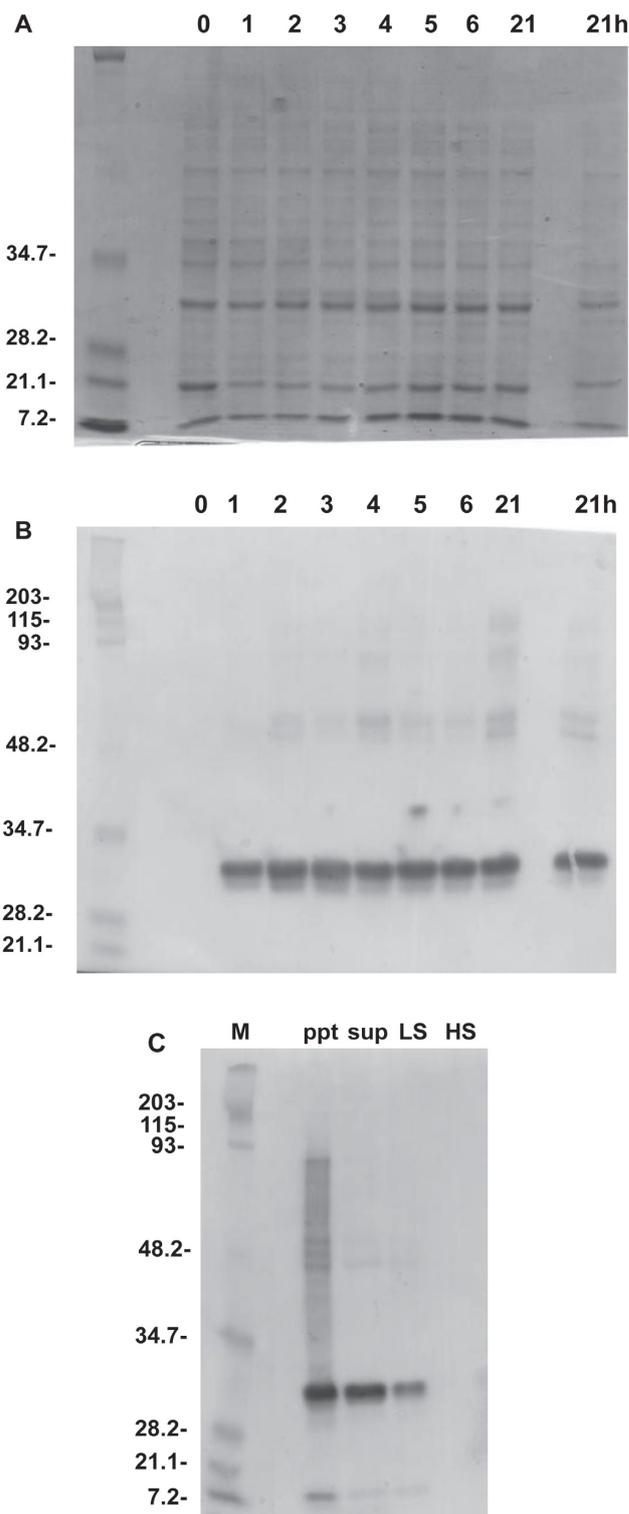


図3. HCV NS3 aa.1243-1458を組み込んだプラスミドで形質転換した大腸菌抽出液のSDS-PSGE (A) とWestern blotting (B)。上の数字はIPTG添加後の時間数。検出抗体は抗HCV NS3モノクローナル抗体, MAB8691を使用した。(C) 形質転換した大腸菌の遠心後の沈渣(ppt), 上清(suo), Streptavidin beadsへ結合後低塩濃度ビオチンバッファーで処理した溶出液(LS), 次に高塩濃度バッファーで処理した溶出液(HS)のWestern blotting。

調整し、リポソームに結合してそのワクチン効果の判定を行う準備を進めている。

Tim-3-hIlgの発現・精製

モデルマウスでの治療効果を示したC型慢性肝炎治療ワクチンは、リポソーム表面に抗原ペプチドと共に、免疫抑制経路の1つであるPD-1とPD-L1の相互作用をブロックする抗PD-L1抗体を結合することで効果をあげることができた。C型慢性肝炎を始めとする慢性ウイルス感染症ではこの経路の他にGalectin-9/Tim-3経路も関与していることが知られている^{8,9}。この経路を遮断するための因子として、Tim-3をヒトIgGタンパクのFc領域部分と融合した形でリンパ球細胞株に発現させ、Protein-Gで精製し、それをリポソームに結合させることにした。マウスTim-3 cDNAをPCRで増幅し、発現プラスミドpFUSE-hIgG1e3-Fc1のクローニング部位に組み込んだ。現在複数の組換えプラスミドをB細胞株NS-1にトランスフェクションしてTim-3-hIlgの発現を試みている。

考 察

CTL誘導型ワクチンは、ウイルスによってコードされるタンパク質であれば、ウイルス粒子の表面抗原のみならず、内部タンパクでも非構造タンパクでも抗原として認識してそこに免疫効果を及ぼし、感染防御あるいは感染細胞の排除を行うことが可能である。しかもその認識部位(エピトープ)は8-10個のアミノ酸から成るペプチドであることももうひとつの要因として、これが抗原変異の激しいインフルエンザウイルス、HIV、HCV、HBVなどにも有効に作用することができる。しかしその作用機序の1つが感染細胞を認識し攻撃するという細胞傷害活性であることから、ワクチンにより組織・臓器障害という副作用が生じるのではないかという懸念がつきまとっている。感染防御効果のもう1つの作用機序として抗原特異的T細胞から産生されるIFN- γ やTNF- α などのサイトカインによるウイルス増殖抑制(非細胞障害メカニズム: Non-cytolytic mechanism)も存在することが、LCMV、HBV、HCVなどの感染についてデータが示されている^{10,11}。しかしそのような非細胞障害メカニズムを主として誘導し、ウイルス感染を防御するようなワクチンはこれまでに報告がない。本研究では同じ抗原ペプチドでも、リポソーム表面結合により、他の免疫法とは異なるユニークな免疫原性が発揮されることを示したが、その1つとして、抗原ペプチドによっては非細胞障害メカニズムを主として誘導して抗ウイルス効果を発揮するものがあることが示唆された。現在この可能性を確認するため、抗IFN- γ 抗体を用いてワクチン効果をブロックする試験を、in vitro、in vivoの両面から行なっている。この

方法が確立されれば、特に慢性感染症の治療に応用する場合に大きな利点となることは間違いないと思われる。

本ワクチンを臨床応用に近づけるもう1つのステップとして取り組んだHCVタンパクの発現・精製は、リポソーム表面に結合させるという最終段階のステップで、界面活性剤の存在が阻害要因となるので、目的タンパクを界面活性剤の非存在下で抽出するか、精製後に除去しかつ可溶性を確保する必要がある。抗原成分として選んだHCV NS3タンパクは可溶性タンパクとして発現・精製することが非常に難しい。そこで本研究では、これまでも可溶性タンパクとして発現・精製の報告がある部分(aa.1243-1458)を選び、発現ベクターとしても可溶性発現に工夫が加えられているpBEn-SBP-SET1aを選んだ。その結果、発現大腸菌を超音波処理するのみで可溶性画分に目的タンパクが回収されることが確認できた(図3C)。今後精製を進めタンパク結合リポソームワクチンの効果判定を行うと共に、他のHCVタンパクの発現・精製を進めて行きたい。

参考文献

- 1) Taneichi M, Ishida H, Kajino K, et al. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8⁺ T cells and induce potent antitumor immunity. *J Immunol* 2006;177(4):2324-30.
- 2) Takagi A, Matsui M, Ohno S, et al. Highly efficient antiviral CD8⁺ T-cell induction by peptides coupled to the surfaces of liposomes. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16(10):1383-92.
- 3) Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta 2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta 2m double knockout mice. *J Exp Med* 1997;185(12):2043-51.
- 4) Milich DR, Hughes JL, McLachlan A, Thornton GB, Moriarty A. Hepatitis B synthetic immunogen comprised of nucleocapsid T-cell sites and an envelope B-cell epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(5):1610-4.
- 5) Ohno S, Moriya O, Yoshimoto T, Hayashi H, Akatsuka T, Matsui M. Immunogenic variation between multiple HLA-A*0201-restricted, Hepatitis C Virus-derived epitopes for cytotoxic T lymphocytes. *Viral Immunol* 2006;19(3):458-67.
- 6) Moriya O, Matsui M, Osorio M, et al. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes

in mice by immunization with dendritic cells treated with an anthrax toxin fusion protein. *Vaccine* 2001;20(5-6):789-96.

- 7) Tanaka Y, Taneichi M, Kasai M, Kakiuchi T, Uchida T. Liposome-coupled antigens are internalized by antigen-presenting cells via pinocytosis and cross-presented to CD8⁺ T cells. *PLoS One* 2010;5(12):e15225.
- 8) Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Virol* 2009;83(18):9122-30.
- 9) McMahan RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, et al. Tim-3 expression on PD-1⁺ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J Clin Invest* 2010;120(12):4546-57.
- 10) Jo J, Aichele U, Kersting N, et al. Analysis of CD8(+) T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology* 2009;136(4):1391-401.
- 11) Guidotti LG, Borrow P, Hobbs MV, et al. Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(10):4589-94.

研究成果リスト

論文

- 1) Takagi A, Kobayashi N, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Coupling to the surface of liposomes alters the immunogenicity of hepatitis C virus-derived peptides and confers sterile immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;430(1):183-9.
- 2) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Tsutsumi T, Moriya K, Koike K, Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells. Submitted for *Hepatology Research*.

学会発表

- 1) Takagi A, Kobayashi N, Horiuchi Y, Moriya O, Akatsuka T, Tsutsumi T, Koike K, Taneichi M, Uchida T. Successful immunotherapy of chronic HCV infection model mice with liposomes coupled with a non-immunogenic HCV peptide and anti-PD-L1 antibody, 19th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Oct 5-9, 2012, Venice, Italy
- 2) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Tsutsumi T, Koike K and Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cell, 19th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Oct 5-9, 2012, Venice, Italy
- 3) 高木徹, 堀内大, 小林信春, 守屋修, 赤塚俊隆, 堤武也, 小池和彦, 種市麻衣子, 内田哲也. 非免疫原性HCV由来ペプチドと抗PD-L1抗体結合リポソームワクチンによる慢性C型肝炎モデルマウスの免疫治療, 第60回日本ウイルス学会学術集会, 2012年11月13-15日, 大阪
- 4) 高木徹, 堀内大, 小林信春, 守屋修, 赤塚俊隆, 堤武也, 小池和彦, 種市麻衣子, 内田哲也. 低免疫原性HCV由来ペプチドと抗PD-L1抗体結合リポソームワクチンによる慢性C型肝炎モデルマウスの治療効果, 第16回日本ワクチン学会学術集会, 2012年11月17-18日, 横浜
- 5) Takagi A, Kobayashi N, Horiuchi Y, Moriya O, Akatsuka T, Tsutsumi T, Koike K, Taneichi M, Uchida T. Successful immunotherapy of chronic HCV infection model mice with liposomes coupled with a non-immunogenic HCV peptide and anti-PD-L1 antibody, 第41回日本免疫学会, 2012年12月5-7日, 神戸
- 6) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Tsutsumi T, Koike K and Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cell, 第41回日本免疫学会, 2012年12月5-7日, 神戸

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

脂肪細胞分化・骨芽細胞分化の2方向性分化で機能する アンチセンスRNAの解析

研究代表者 仲地 豊 (ゲノム医学研究センター)

緒言

アンチセンスRNAは非コードRNAの一種であり、蛋白質をコードする遺伝子の相補鎖側から転写されるRNAである(図1)。GenBankに登録されているデータの解析から、約2割のマウス遺伝子で相補鎖側からRNAが転写していることがわかっている。このようなアンチセンスRNAの一部が機能分子として働くことは以前から報告されており、Xist 遺伝子およびそのアンチセンスRNAであるTsixのバランスによるX染色体不活化機構が知られている¹⁾。がん化やES細胞分化などの様々な生命現象の中でも、アンチセンスRNAがその相補鎖遺伝子(センス遺伝子)の発現を調節していることが近年明らかになってきた²⁾。そのため骨量減少と脂肪細胞の蓄積が同時におこる老年性骨粗鬆症^{3,4)}など、間葉系幹細胞から脂肪細胞・骨芽細胞への適切な分化が鍵となる多因子疾患でもアンチセンスRNAによる発現制御が重要だと考えられる(図2)。しかし間葉系幹細胞から脂肪細胞・骨芽細胞への分化時に発現するアンチセンスRNAの役割はこれまで解明されていない。これはマイクロアレイのような既存の方法では既知遺伝子の発現しか検出できず、間葉系幹細胞分化特異的なアンチセンスRNAの発現がこれまで検出できなかったことに起因する。

著者はこれまで文部科学省ゲノムネットワークプロジェクトにおいて、間葉系幹細胞から脂肪細胞・骨芽細胞に分化する際の遺伝子転写調節ネットワークについて研究をおこなってきた^{5,6)}。なかでもmRNAの5'側配列決定による発現解析法(CAGE法:図3)^{7,8)}をもちいた発現プロファイル解析により、非常に多くのアンチセンスRNAが脂肪細胞・骨芽細胞分化過程で特異的に発現変化していることがこれまでわかっている。実際に骨芽細胞分化に影響を与えるセンス遺伝子とアンチセンスRNAのペアも同定している(data not shown, 論文準備中)。しかしさらに多くのアンチ

センスRNAが老年性骨粗鬆症のような多因子疾患に深く関わっていることが容易に想像でき、それらは生活習慣病発症のあらたな機序解明と創薬標的の開発に重要な役割を担うと考えられる。そこで本研究では超並列高速シーケンサー(次世代シーケンサー)によるCAGE解析により、脂肪細胞分化および骨芽細胞分化で機能するアンチセンスRNAの網羅的な探索をおこなった。

材料と方法

細胞と分化条件

本研究では材料にはマウス骨髄由来間葉系細胞であるST2細胞を用いた。この細胞は培地交換により脂肪細胞分化も骨芽細胞分化も効率良く誘導することができる。本研究で用いたST2の脂肪細胞分化誘導は0.5 mM イソブチルメチルキサンチン, 0.25 mM デキサメタゾン, 5 mg/ml インスリン, 1 mM ロシグリタゾン含有培地によりおこなった。また骨芽細胞分化誘導は100 ng/ml BMP4含有培地にておこなった。

シーケンシングデータ解析

本研究では理化学研究所オミックス研究基盤との共同研究により、DNA増幅工程が不要で測定ダイナミックレンジが広い超並列高速シーケンサー(ヘリコス社 Heliscope)とCAGE法による遺伝子発現解析を組み合わせた手法(Heliscop-CAGE)^{9,10)}によるST2細胞分化過程の時系列発現データを利用した。これは両分化方向各15点および未分化対照細胞2点による計94サンプル分の低バイアスかつ高精細なRNA転写プロファイルデータである(図4:それぞれ反復実験3回分のデータ)。この時系列発現データを各サンプル・各領域の発現量を100 bpごとの小領域に分割して集計・視覚化し、その発現の増減を全時系列で統計的に比較^{11,12)}する手法(CAGE Loci Oriented Heatmap; CAGELOH, 論文準備中)をあらたに開発し、全ゲノム領域から分化過程特異的な発現変化を示すRNAを同定した。分化過程特異的な発現変化をしめしたRNAの中から

公共データベース (GenBank¹³) および Ensembl¹⁴) の遺伝子領域情報をもちいてアンチセンスRNAを抽出した。またアンチセンスRNAと対になるセンス遺伝子に関しては Gene Ontology¹⁵ や KEGG¹⁶ などの公共データベースを利用してその機能情報を考察した。

結果

本研究では、脂肪細胞分化および骨芽細胞分化にて発現変化のあったアンチセンスRNAを同定して機能解析をおこない、アンチセンスRNAを介した2方向性の分化制御モデルの構築を最終的な目的としている。そのため超並列高速シーケンサーをもちいたCAGE解析による時系列発現データから、脂肪細胞および骨芽細胞分化時期に特異的に発現変化するアンチセンスRNA群を多数同定した。

間葉系幹細胞から脂肪細胞・骨芽細胞への分化過程において、CAGE解析により全ゲノム中418,187領域においてN=3の反復実験すべてでのRNAの発現が観測された。その中の11,185領域においてアンチセンスRNAが分化過程で有意に発現変動していることがわ

かった (FDR < 0.05)。このうち分化特異的な発現亢進または発現減少を示すアンチセンスRNAの発現領域は脂肪細胞分化・骨芽細胞分化でそれぞれ2,066領域 (センス鎖には1,445遺伝子)、680領域 (センス鎖には531遺伝子) であった。

これらのうち35領域 (29遺伝子) のアンチセンスRNAは脂肪細胞分化で発現亢進かつ骨芽細胞分化で発現減少していた。逆に脂肪細胞分化で発現減少し、骨芽細胞分化で発現亢進するアンチセンスRNAが40領域 (33遺伝子) で同定された。またこれらのアンチセンスRNAとそのセンス鎖遺伝子について Gene Ontology データおよび KEGG データをもちいた解析をおこなったところ、脂肪細胞分化で発現亢進かつ骨芽細胞分化で発現減少したアンチセンスRNAのセンス鎖遺伝子群には osteoclast differentiation (p-value = 0.007) や G-protein coupled receptor protein signaling pathway (p = 0.01) に関わる遺伝子が顕著に含まれていることがわかった。逆に脂肪細胞分化で発現減少し骨芽細胞分化で発現亢進するアンチセンスRNAのセンス鎖遺伝子群には phosphatidylinositol

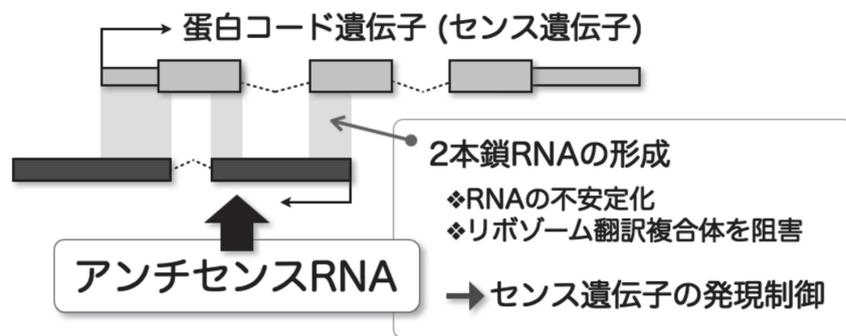


図1. アンチセンスRNA.

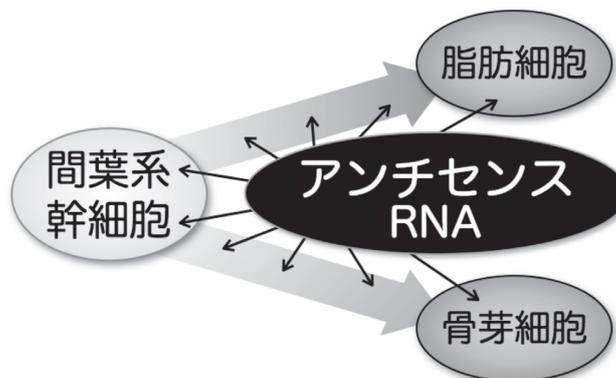


図2. アンチセンスRNAによる2方向性間葉系幹細胞分化制御.

3-kinase cascade ($p = 0.00005$), sphingolipid metabolic process ($p = 0.001$), membrane lipid metabolic process ($p = 0.002$), ceramide metabolic process ($p = 0.004$) などの機能をもつ遺伝子が顕著に含まれていた。これらのような2方向性の細胞分化でそれぞれ排他的

な発現プロファイルをもつアンチセンスRNAはそのセンス鎖遺伝子とともに2方向分化の鍵因子として機能している可能性があり、現在これらセンス鎖遺伝子-アンチセンスRNAペアの機能解析を進めている (data not shown)。

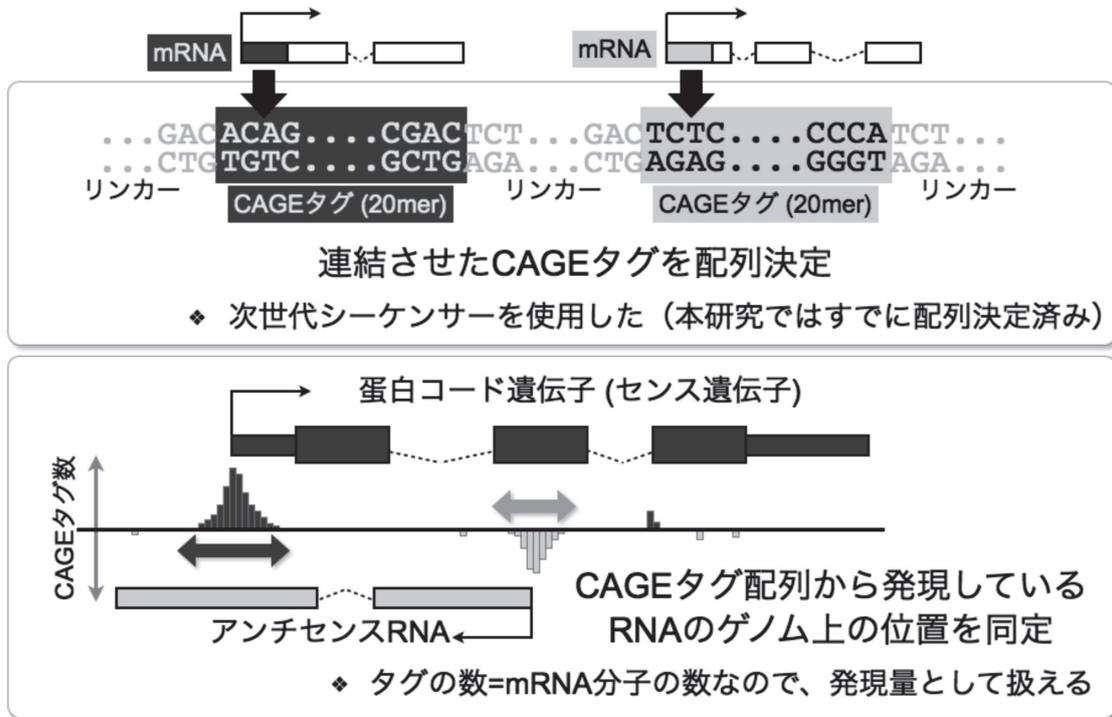


図3. CAGE解析によるアンチセンスRNA同定.

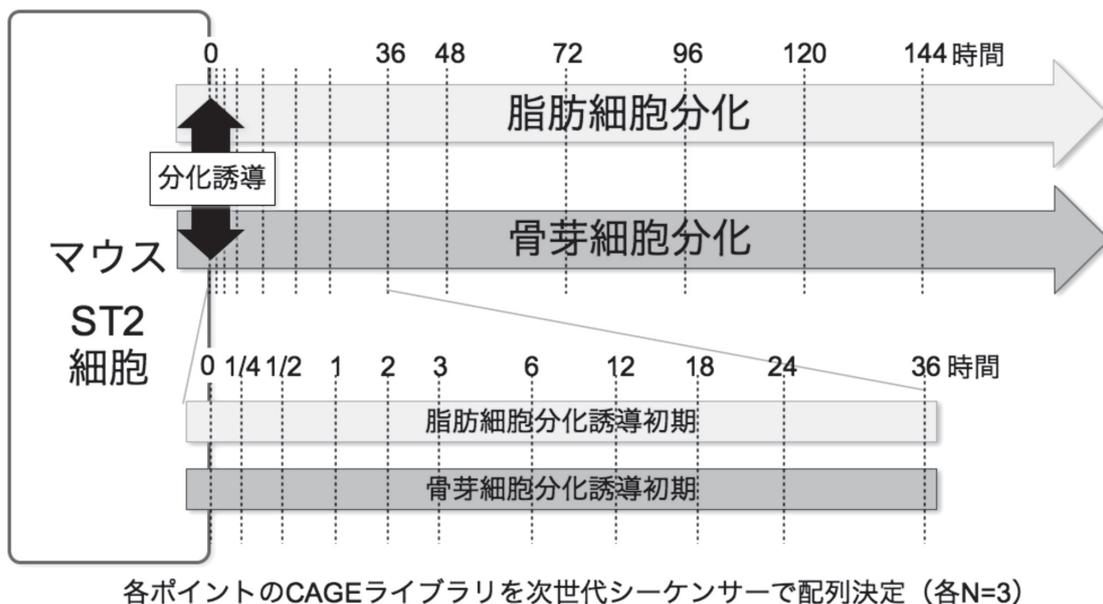


図4. CAGE解析でもちいた時系列発現サンプルの概要.

考 察

本研究では超並列高速シーケンサーをもちいることで、マウスST2細胞から脂肪細胞および骨芽細胞へと分化する過程で時期特異的に発現するアンチセンスRNA群を同定した。数千におよぶ領域で分化特異的に有意な発現変化を示すことが判った。また2方向性の細胞分化でそれぞれ排他的な発現変化をしめすアンチセンスRNAも約60領域で同定することができた。これらの結果から間葉系幹細胞から脂肪細胞・骨芽細胞への分化の過程におけるアンチセンスRNAの役割の大きさが推測される。間葉系幹細胞の発現調節ネットワーク解析に今回のような高精細な時系列データを利用した例は類がなく、同定されたセンス鎖遺伝子-アンチセンスRNAペアの機能解析から老人性骨粗鬆症の新規かつ詳細な発症機序を描出できると考えられる。今後はこれらのセンス鎖遺伝子-アンチセンスRNAペアが2方向性の細胞分化におよぼす影響を解析し、老人性骨粗鬆症および周辺疾患の作用機序モデル構築することで、新たな診断マーカーや創薬標的の開発を目指す予定である。また本研究におけるCAGEデータと解析結果、各種データベース情報の閲覧・解析・公開の統合プラットフォームとしてCAGE Loci Oriented Heatmap (CAGELOH)の公開も現在準備中である。

謝 辞

本研究はゲノム医学研究センタートランスレーショナルリサーチ部門およびゲノム科学部門において実施され、両部門の方々には多くのご助言やご助力をいただいた。この場をお借りして深謝申し上げます。またCAGEデータは理化学研究所横浜研究所オミックス研究基盤およびFANTOMコンソーシアムとの共同研究におこなわれた。今回の学内グラントによる助成および成果発表の機会を得られたことを別所正美学長、医学研究センター 松下祥教授に御礼申し上げます。

研究成果リスト

学会発表

- 1) Nakachi Y, Mizuno Y, Tokuzawa Y, Yamashita Y, Kanesaki-Yatsuka Y and Okazaki Y. Integrated analysis of non-coding RNAs expression during bi-directional differentiation from mouse mesenchymal stem cells to adipocytes/osteoblasts, 生命医薬情報学連合大会 C18_165, 2012年11月10日, 東京都江戸川区
- 2) Nakachi Y, Mizuno Y, Tokuzawa Y, Yamashita Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Okazaki Y. CAGELOH: CAGE Loci Oriented Heatmap platform to analyze and visualize the integrated transcriptome data during

adipocytes/osteoblasts differentiation from mouse mesenchymal stem cells. P31, 第10回RCGMフロンティア国際シンポジウム, 2012年11月3日, 埼玉県日高市

引用文献

- 1) Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet* 1999 Apr 1;21(4):400-4.
- 2) Faghihi MA, Wahlestedt C. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009 Sep 1;10(9):637-43.
- 3) Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 1992 Jun;102(Pt 2):341-51.
- 4) Kajkenova O, Lecka-Czernik B, Gubrij I, Hauser SP, Takahashi K, Parfitt AM, et al. Increased adipogenesis and myelopoiesis in the bone marrow of SAMP6, a murine model of defective osteoblastogenesis and low turnover osteopenia. *J Bone Miner Res* 1997 Nov;12(11):1772-9.
- 5) Nakachi Y, Yagi K, Nikaido I, Bono H, Tonouchi M, Schönbach C, et al. Identification of novel PPARgamma target genes by integrated analysis of ChIP-on-chip and microarray expression data during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Jul 25;372(2):362-6.
- 6) Tokuzawa Y, Yagi K, Yamashita Y, Nakachi Y, Nikaido I, Bono H, et al. Id4, a New Candidate Gene for Senile Osteoporosis, Acts as a Molecular Switch Promoting Osteoblast Differentiation. *PLoS Genet* 2010 Jul 8;6(7):e1001019.
- 7) Shiraki T, Kondo S, Katayama S, Waki K, Kasukawa T, Kawaji H, et al. Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 Dec 23;100(26):15776-81.
- 8) The FANTOM Consortium. The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science* 2005 Sep 2;309(5740):1559-63.
- 9) Kanamori-Katayama M, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Katayama S, Kojima M, et al. Unamplified cap analysis of gene expression on a single-molecule sequencer. *Genome Res* 2011 Jul 1;21(7):1150-9.
- 10) Itoh M, Kojima M, Nagao-Sato S, Saijo E, Lassmann T, Kanamori-Katayama M, et al.

- Automated workflow for preparation of cDNA for cap analysis of gene expression on a single molecule sequencer. *PLoS ONE* 2012;7(1):e30809.
- 11) Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004;5(10):R80.
- 12) Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;3:Article3.
- 13) Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res* 2013 Jan;41(Database issue):D36-42.
- 14) Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, et al. Ensembl 2012. *Nucleic Acids Res* 2012 Jan;40(Database issue):D84-90.
- 15) Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000 May 1;25(1):25-9.
- 16) Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res* 2012 Jan;40(Database issue):D109-14.

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

シミュレーションによる関節リウマチ末梢血の
サイトカイン抑制機構の理解

研究代表者 三由 文彦 (大学病院 リウマチ膠原病科)

諸言

関節リウマチ (RA) は免疫システムが過剰に反応し、自己を攻撃してしまう病気である。その病態には、ヘルパー T 細胞 (Th 細胞) が重要な役割を果たしており、Th 細胞が放出するサイトカインと呼ばれるタンパク質によって免疫が調節されている。Th 細胞には細胞性免疫に関与する Th1 細胞と、液性免疫に関与する Th2 細胞があり、このバランスの破綻が病気の原因だと言われて来た¹⁾。しかし、近年、RA が Th1 型疾患ではないことを示唆するデータが報告され、更に、Th17 細胞と呼ばれる新しいサブセットが RA の病態形成に重要な役割を果たすことが示された²⁾。

我々は RA 患者の生物学的製剤 (サイトカインを抗体によって直接抑える新しい薬) による治療前の末梢血をサンプルとし、Th1/Th2/Th17 細胞サブセットが産生する代表的なサイトカイン IFN- γ 、IL-4、IL-17 を定量した。これらのサイトカインは刺激がない状態では測定できず、RA に特異的な抗原も発見されていないことから、類似研究でも数多く用いられている抗原非特異的な刺激 (PMA + Ionomycin) を用いた。その結果、意外なことに RA 患者の末梢血では IL-17 はむしろ抑制されており、他の Th 性のサイトカイン産生も強く抑制されていた^{3,4)}。さらに治療に効果がなかった患者群のサイトカイン産生は、効果があった患者群に比べて有意に抑制されていた (Miyoshi, et al. unpublished data)。

一方で、投与前に抑制されていたサイトカイン産生は、生物学的製剤の投与後にいずれも有意に上昇し、健常人と同じレベルまで回復する。よって末梢血においてサイトカイン産生が抑制されることが、RA の病態や治療効果と深く関連があると示唆される。しかし、慢性的な炎症によって本来 Th 細胞が活性化している RA 患者において、サイトカイン産生が増加するのではなく、むしろ減少

している結果は、既存の概念では説明が困難である。従って、この結果を説明するには、例えば、“RA 患者において、抗原特異的な Th 細胞による免疫応答が強まっており、一方で抗原非特異的な Th 細胞による免疫応答は抑制されているため、結果として非特異的な刺激によるサイトカイン産生が減少している”といった新しい理論が必要である。

RA において Th 細胞が炎症性サイトカインを産生するようになるには、Th 細胞が抗原提示される必要がある。この反応が起こる場所はリンパ節が中心であり、末梢血で見られている現象は、この結果に過ぎない。そのため、この仮説を検証するには末梢血だけではなく、炎症局所 (関節やリンパ節) の解析が必須である。しかしヒトは倫理的な面から末梢血以外の経時的なサンプリング測定が困難であり、この仮説をヒトで検証することは難しい。よって本研究では、RA のモデル動物マウスであるコラーゲン誘導性関節炎モデルを用いることにした。一方で、今回の仮説を理論的に説明するためには、炎症局所と末梢という2つの場、Th 細胞と Th 細胞を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) という2つの細胞集団、抗原特異的と抗原非特異的な細胞集団という2つの分類、これらの細胞集団の移動、最低限以上の点を考慮したモデルを考える必要があり、仮説を説明するための最も合理的な方法としてシミュレーションを用いたモデル構築に取り組むことにした。

材料と方法

再現性の高いシミュレーションモデルを作成するには、反応速度式のパラメーターや、細胞数などの初期値パラメーターが必要である。しかし、前述のようにヒトでは倫理的な問題点から末梢血以外の経時的なサンプルの取得は困難である。よって今回は、RA のモデル動物であるコラーゲン誘導性関節炎のマウスを用いて、関節炎を発症させてシミュレーションモデル

構築に必要なパラメーターを測定することにした。

モデルの構築

モデル化する対象は、末梢(末梢血 or 脾臓)と炎症局所(鼠径リンパ節)の2部位とする。そして、それぞれの部位において抗原特異的・非特異的Th細胞の2種類とTregの2種類の細胞集団、計4種類の細胞集団を定義する(図1参照)。モデル化するサイトカインは、Th細胞とTregから算出・消費される代表的なサイトカインであるIL-2, Th細胞から産生されるIL-17(予備としてIFN- γ , IL-4)とする。

反応速度式の作成

詳細はパラメーターの測定の部分に後述するが、今回は測定した実験データを元に反応速度式のパラメーターを逆算して決定する必要がある。よって必要最低限のパラメーター数にし、8つの連立一次微分方程式で記述した。ただしモデルの再現性を見て、測定結果が再現できなければ、IL-2やIL-17といったサイトカイン産生の部分に関しては、汎用的な転写発現式⁵⁾に置き換える予定である。

パラメーターの測定

2回コラーゲン免疫し、関節炎を発症させた後のマウスとコントロールマウスから必要なパラメーターの取得を行った。末梢血は採取が難しく、細胞数が少ないため、今回は脾臓(末梢)と鼠径リンパ節(炎症局所)を採取し、フローサイトメトリー法を用いて、Tregと活性化されたT細胞であるEffector memory T細胞(CD44^{high} CD62L^{low} CD4 T細胞)の細胞比と絶対数を測定した。またIL-2, IL-17(予備としてIFN- γ , IL-4)の産生に関しては、*in vitro*において、それぞれサンプルを調整した後、RAの末梢血におけるサイトカイン産生を測定した際と同様の抗原非特異的な刺激(PMA + Ionomycin)を行い、産生量をELISA法

を用いて測定した。抗原特異的な細胞と、それ以外の抗原非特異的な細胞の比に関しては、RAにおいて現在、区別する方法がない。よって上記で測定したそれぞれの細胞の全体数とそれぞれのサイトカイン産生量から、結果に最も合うように細胞比をパラメーター推定法を用いて予測した。モデルの構築、パラメーター推定、シミュレーションに関しては、細胞シミュレーションソフトウェアE-Cell 3⁶⁾を用いて行った。

結果

シミュレーションモデルの作成に必要なパラメーターを得るために、コラーゲン誘導性関節炎モデルのマウスを用いて、TregとEffector memory T細胞の比率、及び*in vitro*におけるIL-17のサイトカイン産生量の測定を行った(図2)。

末梢(脾臓, Sp)における培養上清中のサイトカイン産生量の結果は、ヒトの末梢血と同様の結果であり、IL-17産生量は関節炎を発症したマウス(day28)でコントロールマウス(control)に比べて有意に低かった。一方で炎症局所(鼠径リンパ節, LNs)においては、予想に反してIL-17産生量に有意差はなかった。Tregに関しては、末梢と炎症局所の両方でday28で有意に割合が多く、Effector memory T細胞に関しては炎症局所でのみ有意に割合が多かった。

シミュレーションモデルに関しては、まだ途中段階であるが、末梢と炎症局所のIL-17のサイトカイン産生は再現できている(図3)。今後は、2部位間の細胞移動などの部分に関して、T細胞の移動に関する論文⁷⁾を参考にしてパラメータチューニングを行なっていく予定である。

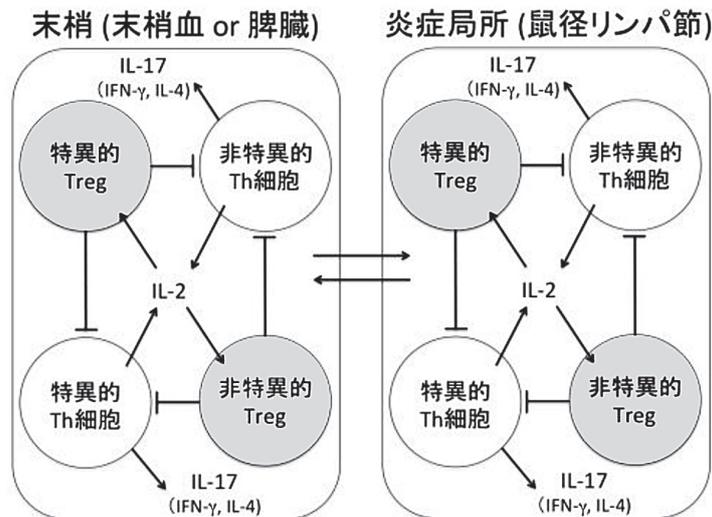


図1. シミュレーションのモデル図。

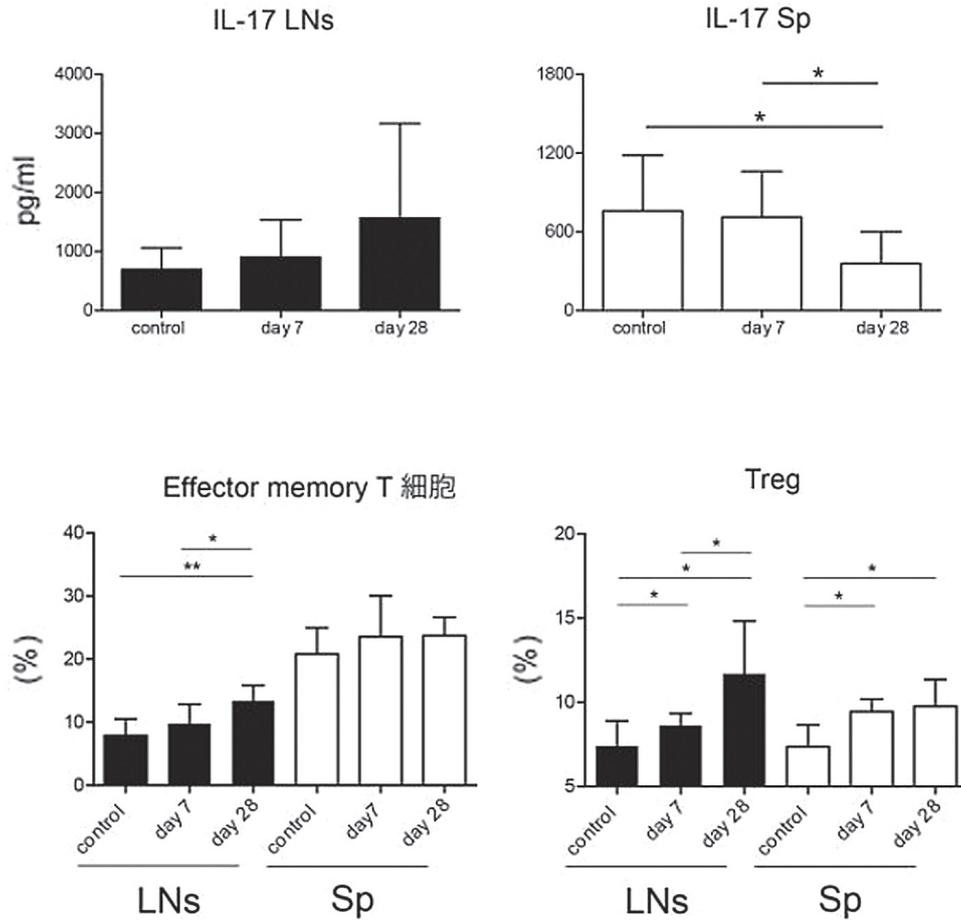


図2. シミュレーションのために必要なパラメーターの測定. LNsは鼠径リンパ節, Spは脾臓, controlはコラーゲンで免疫をしていないコントロールマウス, day7はコラーゲンを1回だけ免疫したマウス, day28はコラーゲンを2回免疫し, 関節炎を起こしたマウス. 細胞培養時間は24h. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (Mann-WhitneyのU-test).

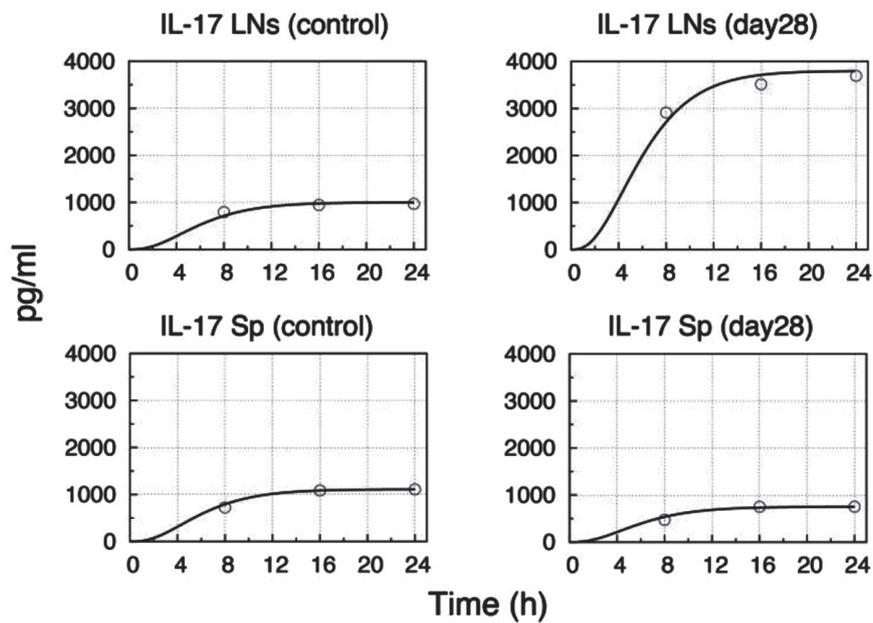


図3. IL-17のシミュレーションの結果. 実験結果(8h, 16h, 24h)は丸でプロットしてある.

考 察

シミュレーションモデルは構築するまでは手間がかかるが、一度構築すれば、*in silico* 実験によって、モデル化した細胞やサイトカイン濃度などの能動的な変化を網羅的に取得できること、そして倫理的な問題点が存在しないことから、薬剤の効果や影響を考察するのに大きな効力を発揮する手法である。

今回作成しているシミュレーションモデルは、末梢と炎症局所という2つの部位におけるTregとEffector memory T細胞の相互作用を考慮したシンプルな関節炎のモデルに過ぎないが、RAが全身性の炎症疾患であることを踏まえると、複数部位の相互作用を考慮することは病態を理解する上で非常に重要である。このような取り組みがまだ原因が不明であるRAの病因や治療効果の予測に繋がっていくと期待される。

謝 辞

本研究施行にあたり、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佐藤浩二郎講師には多大なご指導を頂き、感謝申し上げます。埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科の方々や実験助手の皆様には本研究の施行にあたり様々ご協力を頂き、感謝致します。

引用文献

- 1) Smolen JS, Tohidast-Akrad M, Gal A, Kunaver M, Eberl G, Zenz P, et al. The role of T-lymphocytes and cytokines in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1996;25:1-4.
- 2) Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links

T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203:2673-82.

- 3) Miyoshi F, Sato K, Mimura T. A Novel approach to the classification of collagen diseases utilizing Th1/Th2/Th17 Cytokine profile in the peripheral blood mononuclear cells and analysis of the profile before and after administration of infliximab. *Ann Rheum Dis* 2008;67:453.
- 4) Yamamoto A, Sato K, Miyoshi F, Shindo Y, Yoshida Y, Yokota K, et al. Analysis of cytokine production patterns of peripheral blood mononuclear cells from a rheumatoid arthritis patient successfully treated with rituximab. *Mod Rheumatol* 2010;20:183-7.
- 5) Miyoshi F, Nakayama Y, Kaizu K, Iwasaki H, Tomita M. A mathematical model for the Kai-protein-based chemical oscillator and clock gene expression rhythms in cyanobacteria. *J Biol Rhythms* 2007;22:69-80.
- 6) Takahashi K, Kaizu K, Hu B, Tomita M. A multi-algorithm, multi-timescale method for cell simulation. *Bioinformatics* 2004;20:538-46.
- 7) Tomura M, Yoshida N, Tanaka J, Karasawa S, Miwa Y, Miyawaki A, et al. Monitoring cellular movement *in vivo* with photoconvertible fluorescence protein “Kaede” transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10871-6.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 三由文彦, 本根杏子, 簗田清次, 三村俊英. infliximab投与前RA患者の臨床検査データを用いた新規効果判定予測法の開発, 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会/第22回国際リウマチシンポジウム, 2013年4月18日, 京都

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

3 テスラ磁気共鳴装置を用いたテンソル画像による
糖尿病性腎症の早期診断の研究

研究代表者 小澤 栄人 (国際医療センター 画像診断科)

研究分担者 井上 勉¹⁾, 田中 淳司²⁾

緒言

糖尿病性腎症は、蛋白尿の出現と腎機能の低下を引き起こす糖尿病の合併症であり、その診断は、病歴、蛋白尿、腎機能検査などで行われる。その病態把握には生検が行われることもあるが、侵襲を伴うため、Magnetic resonance imaging (MRI) を利用した早期発見や進行度評価、予後予測等が期待される¹⁾。MRIを利用した慢性腎臓病の評価方法として、BOLD (Blood oxygenation level dependent) 画像および拡散強調画像を利用した Apparent diffusion coefficient map (ADC map) 画像の量的評価の方法がある。申請者らは以前から糖尿病性腎症患者を含めた慢性腎臓病に対するMRIの発表報告を行ってきた^{2,3)}。ADC値はMPGパルスに3方向にかけた拡散強調画像の方向性のない平均した拡散のみかけの係数であるが、拡散テンソル画像 (Diffusion tensor imaging: DTI) は6方向以上のMPGパルスを印加することにより拡散の異方性を示すことができるものである⁴⁾。腎臓は尿細管、集合管、血管などが腎盂から皮質に向かう構造をそなえており、異方性をもった臓器であるにもかかわらず、DTIへの応用はまだほとんど行われていない^{1,5,6)}。本研究の結果は、生検や糸球体濾過量 (estimate glomerular filtration rate: eGFR) の測定に置き換わる量的評価の可能性にとどまらず、糖尿病性腎症の早期発見やトラクトグラフィ画像を利用した視覚的評価による臨床応用にも寄与することが可能であると考えている。

現在は、正常健常者および慢性腎臓病の患者において評価検討を行っている。当初の計画ではシーケンスの確立および正常健常者の評価検討までを

初年度の進行予定としており、ほぼ予定通りである。今後は慢性腎臓病患者 (糖尿病性腎症患者含め) 症例を増やして検討していく予定である。

対象および方法

臨床的にその原因にかかわらず慢性腎臓病と診断された9症例 (男性7名、女性2名; 平均57.8歳 (24-81)) および正常ボランティア6名を対象とした。MR装置は、シーメンス社製のSkyra 3テスラで18チャンネルbody coilおよびspine coilを使用して撮像した。DTIのパラメータは、TR/TE = 2100/72 msec, b value = 0.800 sec/mm², sense factor = 2, 6軸で呼吸同期を用い、撮像時間は平均3分30秒である。以上の撮像より上腹部冠状断のfractional anisotropy map (FA map) およびADC mapを作成し、左右の腎臓に3カ所ずつ皮質・髄質に関心領域を設けて測定を行った。腎機能が悪くなると通常のT1強調画像で皮質および髄質の区別が困難となるため、今回Dixon法の水成分画像を参照画像としそれと同じ部位に関心領域を設けて測定を行った (Fig. 1)。以上の測定より、腎臓の髄質および皮質のFA値およびADC値の平均値と標準偏差を求め、Mann-Whitney testを用いて危険率5%で患者群と正常群での有意差の有無を評価した。

結果

皮質FA値は慢性腎臓病患者: 0.17 ± 0.02, 正常健常者: 0.19 ± 0.02, 髄質FA値は慢性腎臓病患者: 0.22 ± 0.04, 正常健常者: 0.29 ± 0.03であった。皮質ADC値は慢性腎臓病患者: 1.91 ± 0.11 × 10⁵ mm²/sec, 正常健常者: 1.83 ± 0.08 × 10⁵ mm²/sec, 髄質ADC値は慢性腎臓病患者: 1.91 ± 0.12 × 10⁵ mm²/sec, 正常健常者: 1.83 ± 0.81 × 10⁵ mm²/secであった。髄質FA値がP = 0.0048と最も小さなp値を呈していた。

1) 大学病院 腎臓内科

2) 大学病院 放射線科

考 察

拡散強調画像は、水分子のブラウン運動の拡散の抑制されている場所を高信号とし描出する画像として広く臨床に応用されている¹⁾。水分子の拡散は3次元的にランダムで特定の方向性を持たないが、拡散を妨げるような構造があると方向性をもった拡散が生じることになる。DTIはこの異方性拡散を画像化する方法で、しかも定量的にFA値を用いて評価する事が可能である⁴⁾。拡散の異方性を反映する指標であるFA値は、等方性拡散(拡散制限の無い完全にランダムな拡散)からどれだけ強い方向性をもつかという指標であり、等方性拡散の場合は0、異方性が極めて大きい場合は1に近づく値となる。腎臓は、尿細管や血管の走行に規則性がある構造が知られており、異方性拡散が生じている可能性が高いと考えられており、慢性腎臓病および糖尿病性腎症への応用のための研究が期待されているが、正常健常者において腎髄質が腎皮質に比較してFA値が高値を呈しているのは、まだ少数での検討であるがその腎髄質の異方性拡散の結果であると考えられる。

慢性腎臓病のMRIの評価においては腎髄質および腎皮質を比較しその有用性を検討することが一般的である^{5,6)}。しかし、慢性腎臓病が進行していくと通常の画像では腎髄質と腎皮質を分離するのが困難になり、以前の我々の報告では腎皮質を対象とすることで評価検討を行っていた²⁾。今回は、腎の髄質と皮質がDixon法の水成分画像にて明瞭化することに着目し、腎髄質と腎皮質の分離を行いその画像に関心領域を設け、同じ部位をADC map, FA mapで測定するという方法で、正確な測定を行えるように考慮している(Fig. 1)。

本研究は現在、糖尿病性腎症の研究の前段階として慢性腎臓病患者を対象として評価検討を行っている。FA値の腎髄質は慢性腎臓病と正常健常者に対して良好な有意差を認めていた。この結果から、腎髄質のFA値は、解剖学的に尿細管の良好な方向性の変化を反映している可能性があり、腎障害および糖尿病性腎症に対して鋭敏なランドマークとなる可能性がある。今後さらに継続して研究を行い評価を行っていく予定である。

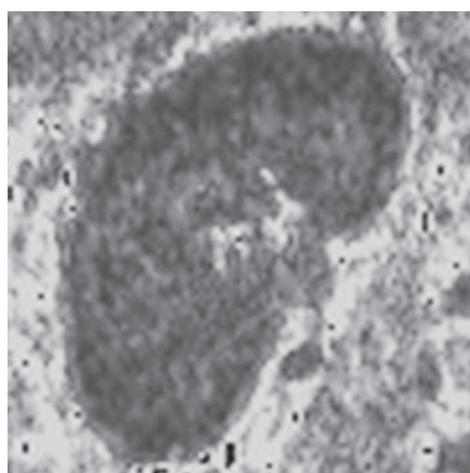
本研究では、糖尿病性腎症の研究の前段階として慢性腎臓病患者を対象として評価検討を行った。現段階で対象患者数が少数での評価であるが、FA値の腎髄質は腎機能に対して良好な有意差を認めていた。この結果から、腎髄質のFA値は解剖学的に尿細管の良好な方向性の変化を反映している可能性があり、腎障害および腎疾患に対して鋭敏なランドマークとなる可能性がある。今後さらに継続して研究を行い評価を行っていく予定である。



(a)



(b)



(c)

Fig 1. 34歳男性, 慢性腎臓病 eGFR = 22.5 ml/min/1.73 m². (a) Dixon法水成分画像. (b) ADC map画像. (c) FA map画像.

研究成果リスト

- 1) 高橋正洋, 井上勉, 渡部進一, 田中淳司, 小澤栄人. 3テスラMR装置によるDiffusion Tensor Imagingを用いた正常健常者および慢性腎臓病患者の評価検討. 第41回日本磁気共鳴医学会大会発表予定

参考文献

- 1) Hueper K, Hartung D, Gutberlet M, Gueler F, Sann H, Husen B, et al. Magnetic resonance diffusion tensor imaging for evaluation of histopathological changes in a rat model of diabetic nephropathy. *Invest Radiol* 2012;47:430-7.
- 2) Inoue T, Kozawa E, Okada H, Inukai K, Watanabe S, Kikuta T, et al. Noninvasive evaluation of kidney

- hypoxia and fibrosis using magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1429-34.
- 3) Inoue T, Kozawa E, Okada H, Suzuki H. Is there no future for renal BOLD-MRI? *Kidney Int* 2012;82:934.
- 4) Mori S, Zhang J. Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuron* 2006;51:527-39.
- 5) Hueper K, Gutberlet M, Rodt T, Gwinner W, Lehner F, Wacker F, et al. Diffusion tensor imaging and tractography for assessment of renal allograft dysfunction-initial results. *Eur Radiol* 2011;21:2427-33.
- 6) Wu M, Lin Y, Shieh C, Wan Y, Yen TH, Ng K, et al. Measuring anisotropic diffusion in kidney using MRI. *Acad Radiol* 2011;18:1168-74.

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

食道扁平上皮癌の拡大，超拡大内視鏡観察と分子生物学との関連

研究代表者 熊谷 洋一（総合医療センター 消化管・一般外科）

緒言

食道領域の拡大内視鏡観察は1) 約100倍程度での微細血管形態の検討と2) 400-1000倍での細胞の観察に大きく分けられる。100倍での観察では、正常重層扁平上皮で観察される終末毛細血管である上皮乳頭内ループ状毛細血管 (Intra-papillary capillary loop (IPCL)) が、癌の深達度により特徴的に変化することが報告された。すなわち、M1, M2癌のIPCLは健常部に比較して拡張と延長が観察され、M3癌 (粘膜筋板浸潤) 以深では、腫瘍表層に錯綜する新生血管が観察されるようになる (図1)。拡大内視鏡観察による血管形態の変化は現在食道癌深達度診断の重要なツールとなっているがこの変化は食道癌の発癌初期の血管新生そのものを観察するものである。我々はこの点に注目し、組織像と血管新生因子との相関を文献的に考察し報告してきた。

また、我々はオリンパスメディカルシステムズとの共同研究により細胞形態の観察が可能なEndocytoscopy system (以下ECS) を開発した。現在までに、プローブタイプ (XEC300F: 450倍, XEC120U: 1125倍), 2眼式一体型 (Y0001: 450倍), 連続拡大 (Y0002: 380倍) と3種類のプロトタイプがオリンパス社により開発されている。プローブタイプ, 2眼式一体型では主に食道癌症例で検討を行った。食道癌部で正常部と比較して著明な核密度の上昇と核異型 (核の大小不同, 色素での染色性の不同, N/C比の上昇) が観察された (図2)。病理医は、1125倍のECS観察で84%の症例で生検省略可能と診断した。現在の連続拡大ECSは、スコープの細径化がはかられスクリーニング内視鏡として使用可能となった。

方法

血管新生の研究には2005年1月から2012年8月の間に埼玉医科大学総合医療センター消化管・一般外科, 消化器・肝臓内科を受診し食道を切除された症例 (手術, 内視鏡治療), 内視鏡検査中に生検病理診断を

行った症例を対象とした。正常食道9例, 食道炎10例, Low grade intraepithelial neoplasia (LGIN) 7病変, M1食道癌12病変, M2 7病変, M3 7病変, SM1 5病変, SM2 3病変, SM3 12病変をCD105抗体を用い免疫染色を行いMicrovessel densityを測定した。CD105抗体はabcam社 ab66947を40倍に希釈し, ニチレイを用いAC121度15分, EDTA buffer pH8.0抗体反応時間15分で行った。病理医1名, 外科医1名が同一視屋を鏡見し, それぞれ微細血管数を計測した。低倍率でCD105陽性血管の密な部分を特定し200倍, 400倍で血管数を計測した。非腫瘍 (正常, 食道炎), 境界病変 (LGIN), M1, M2癌, M3以深癌の4群にわけて検討した。

生体内細胞観察にはオリンパス社試作のECSであるGIF-Y0002 (380倍) を使用した。これに内視鏡本体内蔵のデジタルズーム機能を用い約600倍で観察を行った。対象は2012年5月より2012年10月まで埼玉医科大学総合医療センター消化管・一般外科にて内視鏡検査を受けた22例 (食道癌9例, 食道炎12例 (GERD: 7例, 放射線性食道炎: 5例), 正常1例) を対象とした。細胞の観察には生体内染色生体染色が必要であり, 2%トルイジンブルーを使用し5 ml程を散布し観察した。1名の内視鏡医がECS観察を行い, ECS画像をType 0: ヨードで染色される。核密度の多寡は問わない。Type 1: ヨードで不染もしくは淡染, ECSでは正常細胞 (N/C比低く核異型なし), Type 2: ヨードで不染もしくは淡染, ECSで核密度は高いが核異型がない。Type 3: ヨード不染であり, ECSで核密度が高く核異型ありに分類した。内視鏡医はECS画像をタイプ分類し, 1名の病理医に通常内視鏡像をブラインドとしECS画像のみで“良悪性”が判定可能かコンサルトした。

結果

CD105免疫染色

正常食道粘膜ではCD105陽性血管はほぼ認めず, 食道炎, LGIN, M1M2食道癌では粘膜固有層, 上皮

乳頭内にCD105陽性血管をみとめた。粘膜筋板以深に浸潤した癌では癌胞巣を取り囲むように間質内にCD105陽性血管を多数認めた。表1に200倍、400倍にての各群でのMicrovessel densityを示す。CD105陽性血管のMicrovessel densityは非腫瘍において200倍にて中央値1.0、400倍においても1.0であった。境界病変では7.0、3.0、M1、M2癌では19.0、7.0、M3以深癌

では20.0、10.0であり悪性度、深達度が進行するに伴い有意に増加していた。

生体内細胞観察

正常食道粘膜では表層から2-3層までの舟形の扁平上皮細胞が敷石状に整然と配列し、淡染する細胞質と濃染する核が描出される。描出される核は色素による染色性、形状は均一でありN/C比は低かった。

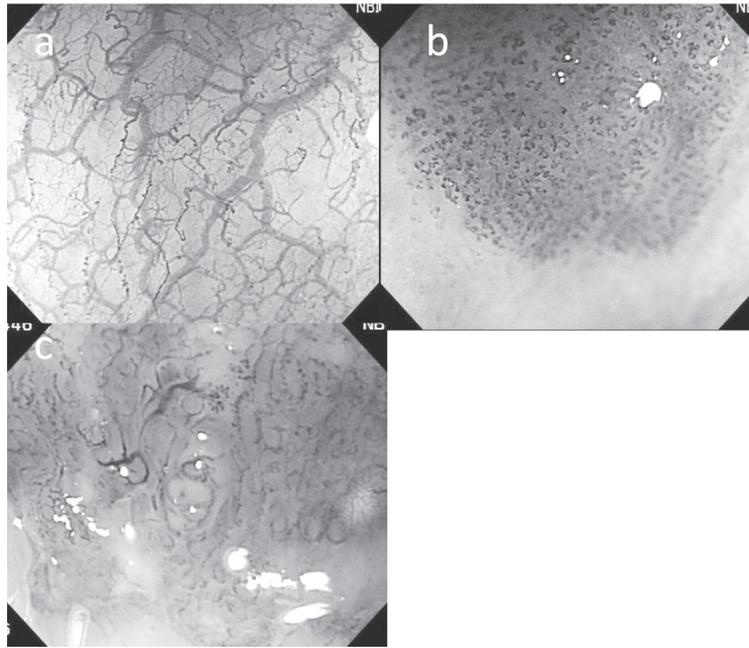


図 1-1. 100倍拡大内視鏡による食道の観察。a：正常食道粘膜。樹枝血管網とIPCLが観察される。b：M2食道癌。正常のIPCLと比較し拡張したIPCL様血管の増生を認める。c：SM食道癌。IPCL様血管は消失し新生血管で置換されている。

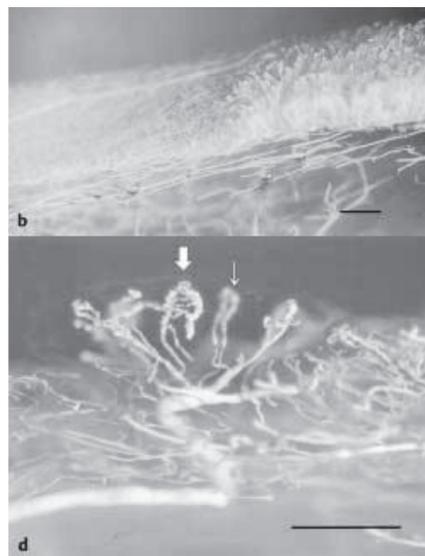


図 1-2. MICROFIL注入後の食道癌の血管像。上：M2癌(断面像)。下：M3癌(断面像)太い矢印が新生血管。

食道癌症例では全例で正常食道粘膜と比べ核密度の上昇が確認された. 核の形状, 色素での染色性は不同であり核異型が観察された(図3). 食道癌では内視鏡医は, Type3: 88.9% (8/9), Type2-3: 11.1% (1/9)と判定し, 感度100%であった. 良性病変の検討ではType1もしくは2と診断したものが12/13(特異度92.3%)であった. 病理医の判定では, 食道癌では9/9(感度100%)で悪性と判定し, 良性病変の9/13(特異度69.2%)をECS画像より良性と診断した.

放射線性食道炎の1例は内視鏡医, 病理医ともに悪性を示唆した. また病理医はほかに放射線性食道炎2例, GradeDのGERD1例を悪性と診断した.

考 察

食道の100倍での拡大内視鏡観察はその微細血管網

に着目し, 組織学的悪性度や癌の深達度と血管形態が良く相関することが示されてきた. しかし, 現在の拡大内視鏡観察は深達度診断にのみ使用されており, 腫瘍の発育進展や発癌早期の血管新生の観点から議論されることはなかった. 今回我々はCD105抗体を用い免疫染色することで腫瘍血管の血管密度を計測した. Endoglin/CD105は上皮細胞増殖の最も信用できるマーカーであり腫瘍血管で強発現することが知られている.

これまで, 正常食道で観察されるIPCLに注目しM1, M2癌で観察される表層の微細血管は既存のIPCLが拡張し延長したものであると考えられてきた. しかし, 詳細に拡大内視鏡観察を行うと食道癌部ではIPCLの密度が増えている. 上皮乳頭は正常食道の既存の構造であるからIPCLの密度が増えるのであれば,

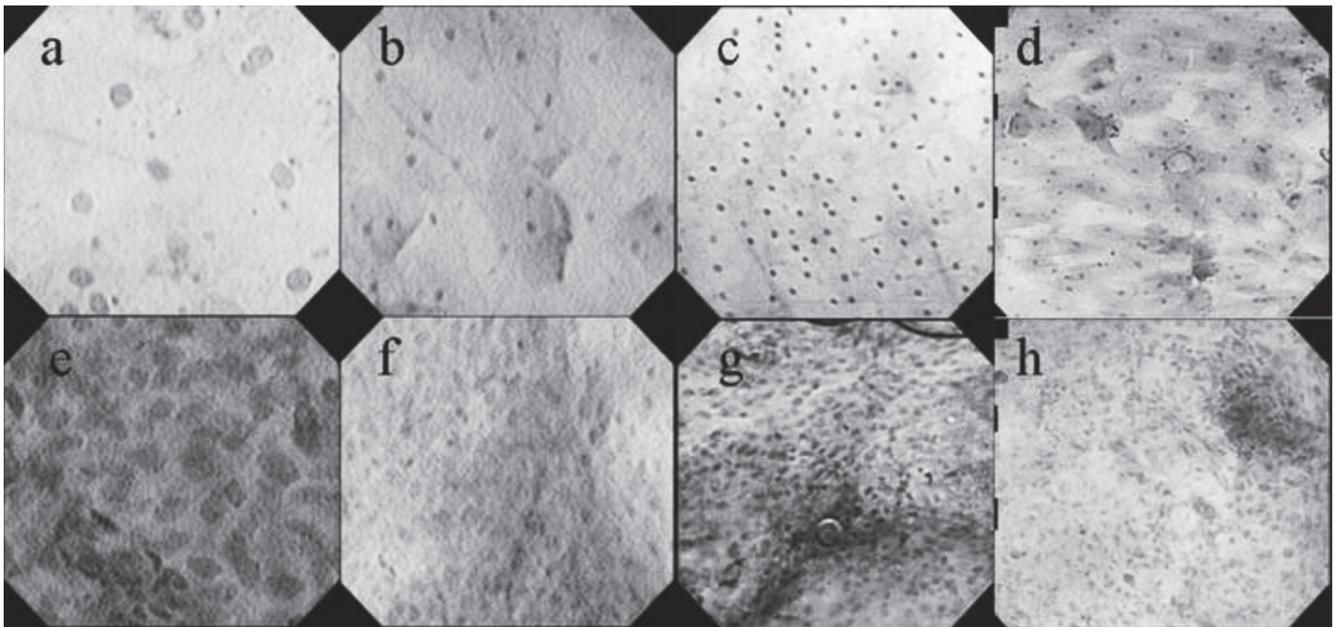


図2. 生体内での正常食道, 食道癌のECS像. a~d: 正常食道粘膜, e~h: 食道癌. a, e: XEC120U (1125倍), b, f: XEC300F (450倍), c, g: Y0001 (450倍), d, h: Y0002 (380倍).

表1. CD105抗体を用いたMicrovessel density (MV)

	n	X200		X400	
		MV(Median(range))	P	MV(Median(range))	P
非腫瘍	22	1.0 (0-15)		1.0 (0-6)	
境界病変	7	7.0 (0-16)	0.05	3.0 (0-9)	0.04
M1M2癌	19	13.0(3-19)	0.03	7.0 (2-13)	0.02
M3以深癌	27	20.0(4-65)	<0.01	10.0(3-33)	<0.01

それは正常食道のIPCLが変化したものの他に新たな血管が誘導されていると考えなくてはならない。Kubotaらは、CD105抗体で正常食道、細胞異型のないヨード不染帯(≒食道炎)、low grade intraepithelial neoplasia (LGIN), high grade intraepithelial neoplasia (HGIN)を染色し、特に上皮乳頭内に存在する微細血管についてmicrovessel density (MVD)を計測した。それによると、CD105陽性血管(腫瘍血管)は食道炎から出現しており、LGIN, HGINと異型度が増すにつれCD105陽性血管のMVDは上昇するとしている。今回の我々の検討でも同様に食道癌の拡大内視鏡で観察される上皮乳頭内に存在する多くの微細血管は既存のIPCLの変化したもののだけではなくCD105陽性の新たに誘導された血管が存在することが判明した。この各深達度におけるCD105陽性血管のプロファイルは未だ報告はない。我々は文献的考察より「食道癌の多段階血管新生」という概念を提唱してきた。すなわち、血管新生のスイッチは前癌病変もしくは炎症の段階でONになっており、粘膜癌までは程度の差はあれおおむね同様の炎症性の血管新生因子で血管が誘導されている。粘膜下層に癌が浸潤して初めてVEGFを中心とする血管新生因子が誘導され、新生血管(いわゆる腫瘍血管)が出現する。よってこの段階にも第2のスイッチがあると思われる。

今回の検討はCD105抗体のみの検討であるが、腫瘍の悪性度深達度がますますつれてCD105陽性血管(腫瘍血管)は有意に増加することが判明した。今後さらに

第Ⅷ因子陽性血管との関係、また各種血管新生因子発現との関係を免疫染色にて検討していくことで前癌病変、発癌早期の血管新生のプロファイルを作成し我々の提唱する概念の裏付け作業を行う予定である。

ECSによる生体内細胞観察の目的は生検組織診断の省略である。我々は研究協力者の田久保らと生体内でのECS画像を検討し、第1世代ECSである1125倍での食道癌症例の観察で84%の症例でECS画像のみで生検組織診断を省略できるとの結論に達した。このECS観察は表層1~2層の細胞の情報しか得られないために従来の病理組織学とは全く異なる新しい組織学を構築する必要がある。

連続拡大ECSでは380倍と従来モデルより低倍率ではあるが細径化され、簡便に超拡大が行えるようになりスクリーニングに使用可能で非癌病変の観察にも使用できる。今回の検討では内視鏡医による癌、非癌の判別能はSensitivity: 100%, Specificity: 92.3%と良好であったが、通常内視鏡観察所見をblindにした病理医の判定ではsensitivity: 100%, specificity: 69.2%であり食道炎、LGINの約1/3を悪性と判定していた(表2, 3)。非癌病変であっても著明な核密度の上昇を示す症例が存在し、核異型の診断が必須となる。現在の380倍ECSではデジタルズーム機能を用い600倍まで拡大しても画質の問題から核密度の情報は良好に得られるが核異型の情報が少ないためと判断される。核異型を診断できる倍率の設定と機器の改良が今後の課題である。

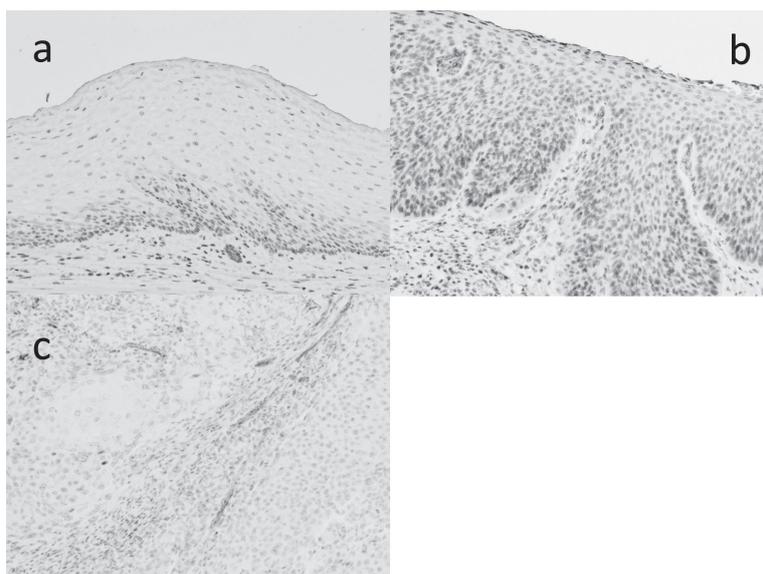


図3. CD105抗体での免疫染色像(x200). a: 正常食道粘膜. CD105陽性血管は認めない. b: M2食道癌. 上皮乳頭内にCD105陽性血管が侵入している. c: SM食道癌. 癌間質に腫瘍胞巣を取り巻くようにCD105陽性血管が分布している.

表 2. x600 GIF-Y0002を用いた食道病変のECS診断(内視鏡医診断)

Type classification	Normal	Esophagitis	SCC	Total
Type 0				0
Type 1	1	4		5
Type 2		7		7
Type 2 or 3			1	1
Type 3		1	8	9
Total	1	12	9	

SCC: squamous cell carcinoma

Sensitivity: 100%, Specificity: 92.3%

表 3. x600 GIF-Y0002を用いた食道病変のECS診断(病理医診断)

ECS diagnosis	Normal	Esophagitis	SCC	Total
Non-neoplastic	1	8		9
Neoplastic		4	9	13
Total	1	12	9	22

SCC: squamous cell carcinoma

Sensitivity: 100%, Specificity: 69.2%

分担執筆

- 1) 熊谷洋一, 川田研郎, 山崎繁, 飯田道夫, 河野辰幸, 田久保海誉. 田久保海誉, 大橋健一編. 第4部臨床との連携 新しい技術について—Endocytoscopy system (in vivo 内視鏡病理診断)の可能性—. 腫瘍病理鑑別診断アトラス食道癌, 東京: 文光堂; 2012. p. 190-7.

原著

- 1) Kumagai Y, Kawada K, Yamazaki S, Iida M, Odajima H, Ochiai T, Kawano T, Takubo K. Current status and limitations of the newly developed endocytoscope GIF-Y0002 with reference to its diagnostic performance for common esophageal lesions. J Dig Dis 2012;13:393-400.
- 2) 熊谷洋一, 戸井雅和, 石畝亨, 川田研郎, 石田秀行, 河野辰幸. 【食道癌の発育進展—初期浸潤の病態と診断】血管新生の見地からみた食道癌の発育進展. 胃と腸 2012;47:1428-34.
- 3) 熊谷洋一, 戸井雅和, 川田研郎, 河野辰幸. 表在食道癌の血管新生: 拡大内視鏡観察と分子生物学との関連. 日本消化器内視鏡学会雑誌 2012;54:2062-72.

学会発表

- 1) 熊谷洋一, 川田研郎, 石田秀行, 河野辰幸, 田久保海誉. エンドサイトスコープシステム開発の経緯と現状, 第83回日本消化器内視鏡学会総会, 2012年5月14日, 東京, ビデオシンポ
- 2) 熊谷洋一, 川田研郎, 芳賀紀裕, 石畝亨, 石橋敬一郎, 隈元謙介, 山崎繁, 石田秀行, 河野辰幸, 田久保海誉. エンドサイトスコープシステム(GIF-Y0002)による食道病変の観察, 第66回日本食道学会総会, 2012年6月21日, 長野
- 3) 熊谷洋一, 戸井雅和, 石畝亨, 芳賀紀裕, 隈元謙介, 石橋敬一郎, 桑原公亀, 大澤智徳, 岡田典倫, 石田秀行. 食道癌発癌早期の多段階血管新生(拡大内視鏡と分子生物学との関連), 第67回日本消化器外科学会総会, 2012年7月20日, 富山
- 4) 熊谷洋一, 川田研郎, 石畝亨, 芳賀紀洋, 石橋敬一郎, 馬場裕之, 隈元謙介, 河野辰幸, 田久保海誉. デジタルズーム機能を用いたエンドサイトスコープシステム(GIF-Y0002)による食道病変の観察, 第85回日本消化器内視鏡学会総会, 2013年5月10日, 京都

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

抗原表面結合リポソームを用いた抗腫瘍ワクチン開発の基礎研究

研究代表者 堀内 大 (医学部 微生物学)

研究分担者 赤塚 俊隆*, 小林 信春*

緒言

近年、腫瘍抗原に対して細胞傷害性Tリンパ球(CTL)反応を誘導し、活性化したCTLが腫瘍細胞を排除することを期待した免疫療法の開発研究が盛んに行われている。現在、腫瘍抗原ペプチドによるCTL誘導型ワクチンが開発の中心となっているが、現時点では、そのCTL誘導効率は十分ではない。

我々の教室では、リポソーム表面に抗原を化学結合させた抗原表面結合リポソームワクチンが、感染症において強力にCTLを誘導することを見いだした¹⁾。この研究において、リポソーム表面結合により抗原ペプチドの免疫原性が変化し、ペプチド免疫では免疫原性が非常に低い抗原ペプチドでもリポソーム表面に結合することで十分なCTL反応を誘導できることがわかった。さらに、C型肝炎ウイルスの抗原ペプチドを表面に結合したリポソームをHLA-A2トランスジェニックマウス(HHDマウス)に免疫し、その免疫学的な反応を詳細に解析することで、リポソーム表面に結合すると高い細胞性免疫誘導能が得られる全く新しい抗原ペプチドを同定し、この抗原を用いた抗原表面結合リポソームワクチンとリンパ球抑制経路遮断法との併用でウイルス持続感染マウスモデルの治療に成功した。この新規抗原は、ウイルス感染では免疫系にほとんど認識されておらず、抗原表面結合リポソームの投与によってのみ強い免疫反応が誘導される特徴を持っていることもわかった。

抗原表面結合リポソームワクチンの腫瘍性疾患に対する応用については、本研究連携研究者の内田らが報告しており²⁾、卵白アルブミン抗原を遺伝子導入した腫瘍細胞を用いたマウス移植腫瘍モデルの治療実験の検討により、その有効性が示されているが、腫瘍抗原を用いた実用化に向けての検討はまだなされていない。

腫瘍抗原の多くは自己抗原由来でありMHCと高いアフィニティをもち宿主免疫系に認識されやすいエピ

トープは、腫瘍の生育過程で免疫寛容が誘導され、その結果十分な抗腫瘍効果を発揮するCTL誘導が難しいことが予想される。この免疫寛容を打破する方策として、本研究では、上で示した慢性ウイルス感染症での研究成果を応用した。すなわち、上で述べたHCV新規抗原のような、生体内では免疫系に認識されていないため免疫寛容に陥っておらず、リポソーム表面に結合することによって初めて免疫原性を発揮する腫瘍抗原ペプチドを探索/同定し、この抗原ペプチドを利用した抗原表面結合リポソームワクチンを用いて抗腫瘍CTL反応の誘導を試みた。

材料と方法

1. HLA-A2トランスジェニックマウス

マウスMHCクラスIと β 2-ミクログロブリン(β 2-m)をノックアウトしたマウスに、ヒトMHCクラスIの一つであるHLA-A*0201(HLA-A2)とヒト β 2-m遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(HHDマウス)³⁾を使用した。HHDマウスはフランス・パスツール研究所・Lemonnier博士より供与された。

2. コンピュータによるCTLエピトープの予測

今回の研究では腫瘍の無限の増殖に大きく拘る、あるタンパク質を標的腫瘍抗原として免疫実験を行った。今後の特許申請の可能性をふまえて抗原タンパク名を伏せ、Xとする。

ヒトXとマウスXのアミノ酸配列を、コンピュータプログラム「BIMAS」を用いてHLA-A2結合ペプチドモチーフを解析し、9個のアミノ酸からなるCTLを予測し、ヒトXとマウスXで共通のアミノ酸配列を持つエピトープから、BIMAS scoreの高い10種類を選定した。これらのエピトープに相当するペプチドはオペロン社により人工合成された。

3. プールペプチド表面結合リポソームワクチンによるCTL誘導エピトープの絞り込み

合成した10種類のペプチドを5種類ずつ2つのグループにプールし、それぞれのプールペプチド

*医学部 微生物学

グループをリポソーム表面に結合させて2種類の抗原表面結合リポソームを作成した。これをCpGと混和してHHDマウス皮下に免疫した。初回免疫の7日後に同様の方法で追加免疫を行い、その5日後にX抗原特異的抗腫瘍CTLが誘導できるかどうかを検討した。

追加免疫5日後に脾細胞を分離し、FITC標識抗CD107a抗体存在下で各々のペプチドで抗原刺激した。その後、細胞表面をPerCP標識抗CD8抗体で染色し、細胞を固定、細胞膜の透過処理を行った後、細胞内部をPE標識抗IFN- γ 抗体で染色し、それぞれのエピトープに特異的に反応するCD107a⁺IFN- γ ⁺CD8⁺リンパ球の割合をフローサイトメトリーにより測定した。

4. 抗原結合リポソームによるCTLの誘導

3.でCD107a⁺IFN- γ ⁺CD8⁺リンパ球を誘導したエピトープペプチドを単独結合した抗原表面結合リポソームを作製した。このリポソームでマウスを免疫し、追加免疫5日後に脾細胞を分離し、以下の方法でX抗原に反応するCTLが誘導されているかどうかを以下のa, bの方法で検討した。

a) X抗原陽性腫瘍細胞を標的としたCTLのIFN- γ 産生の測定

3.でCD107a⁺IFN- γ ⁺CD8⁺リンパ球を誘導した抗原表面結合リポソームでマウスを免疫し、追加免疫5日後に脾細胞を分離した。別のナイーブなマウスの脾細胞に各々のペプチドをパルスし放射線照射をした細胞を抗原提示(APC)細胞とした。免疫マウスの脾細胞とAPC細胞を混和し7日間培養した後、X抗原陽性HLA-A2陽性腫瘍細胞であるRMAHHD細胞にペプチドをパルスしたもの、ペプチドをパルスしていないRMAHHD細胞、X抗原陽性HLA-A2陰性腫瘍細胞であるRMA細胞の三種類の標的細胞と免疫脾細胞をそれぞれ5時間培養し、3.と同様の方法でIFN- γ ⁺CD8⁺リンパ球の割合を測定した。ペプチドパルスRMAHHD細胞またはRMAHHD細胞に反応してIFN- γ を産生する細胞の割合からRMA細胞に反応してIFN- γ を産生する細胞の割合を減じたものを抗原特異的な反応とした。

b) X抗原陽性腫瘍細胞を標的としたCTLの細胞傷害活性の測定

3.でCD107a⁺IFN- γ ⁺CD8⁺リンパ球を誘導した抗原表面結合リポソームでマウスを免疫し、追加免疫5日後に脾細胞を分離した。免疫マウスの脾細胞とAPC細胞を混和し7日間培養した後、RMAHHD細胞にペプチドをパルスしたもの、ペプチドをパルスしていないRMAHHD細胞、RMA細胞の三種類の標的細胞をDiOCで染色し、免疫脾細胞と混和してPropidium Iodide (PI)存在下で4時間培養し、細胞死を引き起こされた標的細胞(DiOC⁺PI⁺細胞)の割合をフローサイトメトリーで測定した。ペプチドパルスRMAHHD細胞またはRMAHHD細胞の死細胞の割合からRMA細胞の死細胞

の割合を減じたものを抗原特異的な反応とした。

(倫理面への配慮)

マウスは、埼玉医科大学実験動物管理運営規定に基づき飼育され、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。

結果

1. 抗原表面結合リポソームによるIFN- γ ⁺CD8⁺リンパ球の誘導

今回検討した10種類のエピトープのうち、#7, #11, #13の3種類のエピトープで明らかなCD107aの脱顆粒とIFN- γ の産生を認めた(Fig. 1)。この3種類のエピトープは、過去のペプチドワクチンやウイルスベクターを用いたX抗原ワクチンの検討では報告されていない新規エピトープであった。一方、ペプチドやウイルスベクターを用いたワクチン研究で既に報告されたエピトープである#1, #3, #19に対しては、抗原表面結合リポソームによる免疫では明らかなCD8リンパ球の反応誘導は認めなかった(Fig. 1)。

2. 抗原表面結合リポソームによるX抗原陽性腫瘍細胞に対するCTLの活性化

次に、CD8リンパ球の活性化を強く誘導した#7, #11, #13の3種類のエピトープと既報のエピトープの#1を各々単独結合したりポソームでマウスを免疫後、脾細胞を分離し、X抗原陽性腫瘍細胞に対するCD8リンパ球の反応を検討した。その結果、各々のペプチドをパルスした細胞に対しては、4つのエピトープ全てでIFN- γ 産生CD8リンパ球が認められた。一方ペプチドパルスを行わなかった標的細胞に対する反応、すなわち内因性X抗原に対する反応は、#7と#13のみに認められた(Fig. 2)。

3. 抗原表面結合リポソームによるX抗原陽性腫瘍細胞に対するCTL killing活性の誘導

次に、#1, #7, #11, #13のエピトープを各々単独結合したりポソームでマウスを免疫後、脾細胞を分離し、X抗原陽性腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を検討した。その結果、各々のペプチドをパルスした細胞に対しては、#1, #7で比較的強い細胞傷害活性が認められた(Fig. 3)。一方ペプチドパルスを行わなかった標的細胞に対する細胞傷害活性、すなわち内因性X抗原に反応したTumor killingの検討では、#7のみ強い細胞傷害活性を認めた(Fig. 3)。

考察

X抗原を構成するタンパク質からリポソーム表面結合に適した新しいエピトープ#7を同定した。このエピトープペプチドを結合した抗原表面結合リポソームはX抗原陽性腫瘍細胞に対するCD8リンパ球のIFN- γ 産生を誘導し、X抗原陽性腫瘍細胞に対して強いKilling

活性を示した. 今回検討したX抗原は様々なヒト腫瘍の8割以上で発現が認められていることから, #7エプトープを結合した抗原表面結合リポソームは汎腫瘍ワクチンになりうる可能性がある.

今後はX抗原陽性腫瘍細胞をマウスに移植した担癌

モデルを用いて, #7結合リポソームの抗腫瘍効果を検討するとともに, 担癌状態での#7エプトープに対する免疫寛容誘導についても検討し, 免疫寛容が誘導されるのであれば免疫チェックポイントの遮断の併用なども視野に入れて研究を進める予定である.

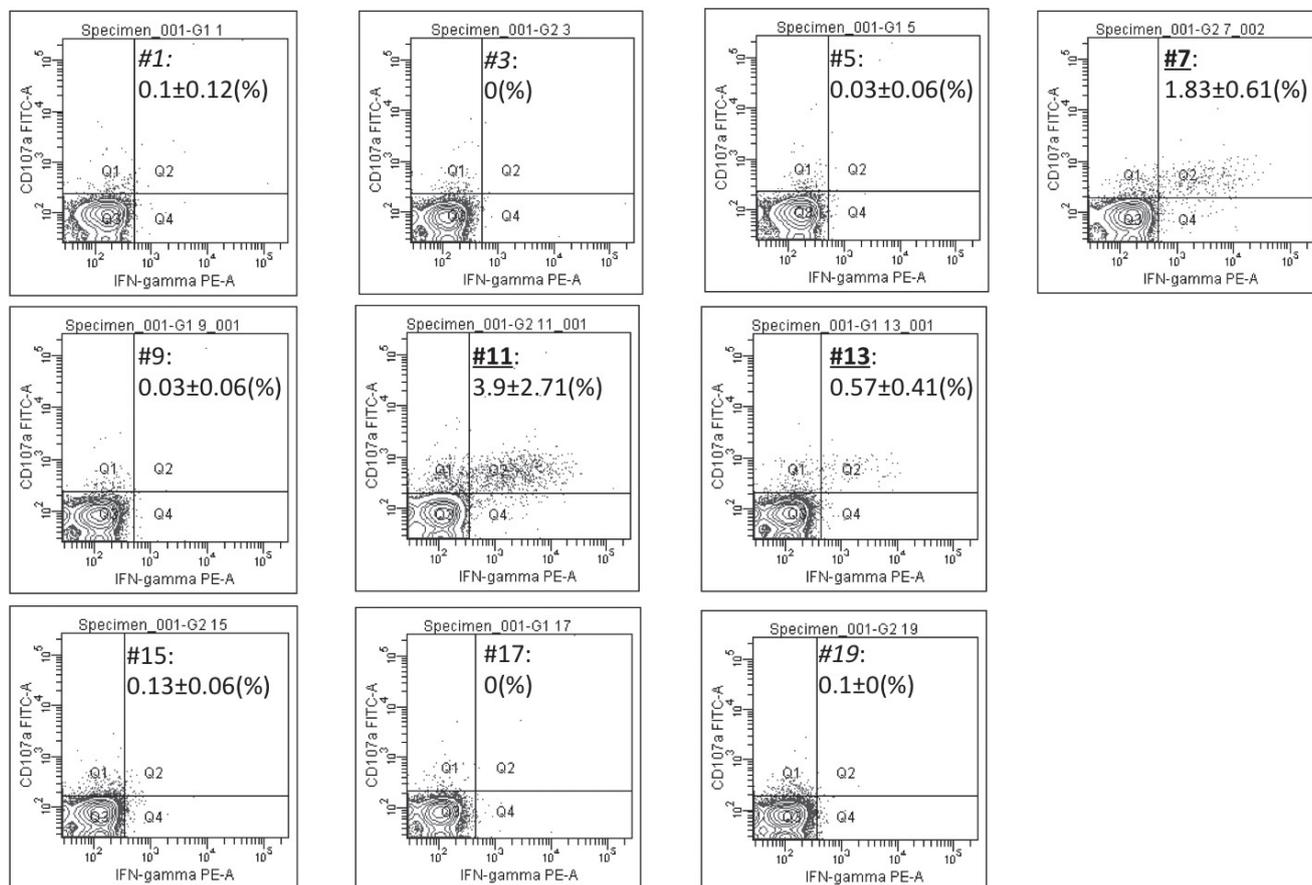


Fig 1. CD107a and intracellular IFN- γ staining of CD8⁺ lymphocytes specific for peptide derived from antigen X in mice immunized with surface-linked liposomal peptides. The numbers shown indicate the percentages of CD107a⁺ IFN- γ ⁺ cells within CD8⁺ lymphocytes.

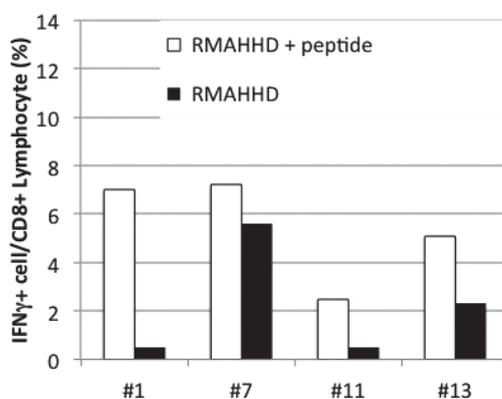


Fig 2. Recognition of antigen X positive tumor cells by CTLs raised against surface-linked liposomal peptides. CTL_{#1}, CTL_{#7}, CTL_{#11} and CTL_{#13} were tested against RMAHHD loaded with a cognate peptide (open bars) or RMAHHD (filled bars).

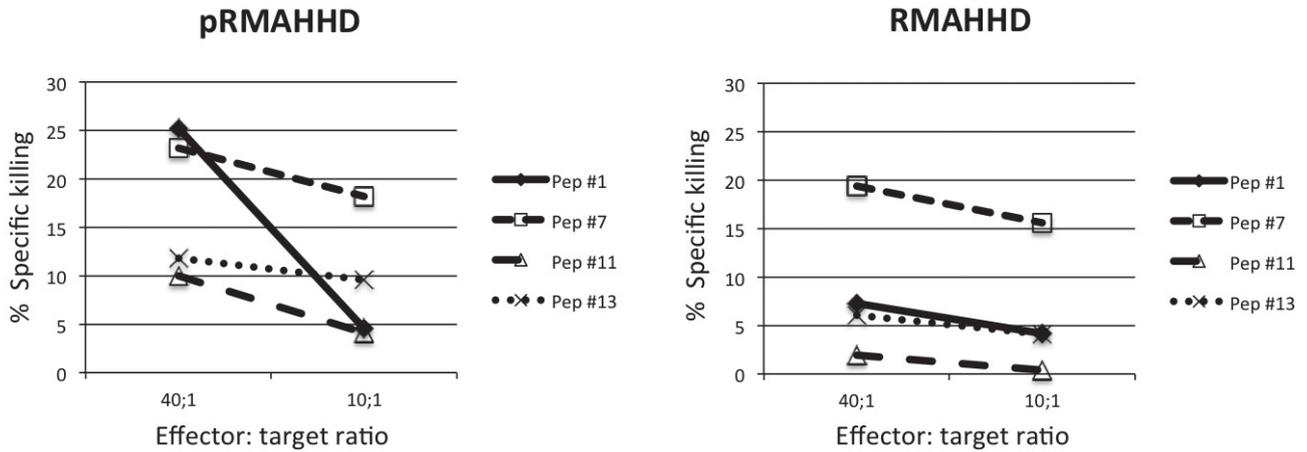


Fig 3. The ex vivo cytotoxicity of CTLs raised against surface-linked liposomal peptides was tested against RMAHHD loaded with a cognate peptide (pRMAHHD) or RMAHHD.

引用文献

- 1) Takagi A, Matsui M, Ohno S, Duan H, Moriya M, Kobayashi N, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Highly efficient antiviral CD8+ T-cell induction by peptides coupled to the surfaces of liposomes. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1383-92.
- 2) Taneichi M, Ishida H, Kajino K, Ogasawara K, Tanaka Y, Kasai M, Mori M, Nishida M, Yamamura H, Mizuguchi J, Uchida T. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8+ T cells and induce potent antitumor immunity. *J Immunol* 2006;177:2324-30.
- 3) Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* 1997;185:2043-51.

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

関節リウマチにおける TNF・IL-6 により誘導される
破骨細胞様細胞の機能解析

研究代表者 横田 和浩 (大学病院 リウマチ膠原病科)

緒言

関節リウマチ (RA) は関節滑膜を主座とする炎症性滑膜炎であるが、それに続発された進行性の高度の骨・軟骨破壊が日常生活動作や生活の質を著しく損ない、生命予後の短縮に繋がることが臨床、または社会上大きな問題となっている。

RAの病態は未だ不明であるが、腫瘍壊死因子 (TNF) やインターロイキン-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインが慢性炎症性滑膜炎に重要な役割を演じていると考えられている。

TNF 阻害療法は、活動性の高い RA 患者の約 60～70% において、臨床症状を改善することが示されている。さらに、骨破壊 (骨びらん) の進行が抑制されただけでなく、骨破壊が修復された例も報告されており、炎症性滑膜炎の制御だけでなく、骨破壊にも関与していると考えられる。しかしながら、TNF 阻害療法による骨破壊抑制・修復作用のメカニズムは十分に解明されていない。実際には TNF が破骨細胞の分化・活性化を誘導しており、その過程を TNF 阻害療法が遮断するために骨破壊が抑制されるという仮説が存在するが、*in vitro* において単球/マクロファージへの TNF 単独刺激では破骨細胞を分化・活性化できない。

そこで我々は、TNF と他の液性因子との共刺激が単球/マクロファージから破骨細胞へ分化・活性化を誘導していると仮定のもと、マウス破骨細胞前駆細胞を TNF α ・IL-6 で共刺激したところ、TNF α 、IL-6 それぞれ単独刺激と比し、破骨細胞の特徴である酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色陽性の多核巨細胞が確認された。また、象牙質上で培養すると破骨細胞のように骨吸収能を有していた。さらにマウス頭部皮下への TNF α 、IL-6 の注射投与においても、頭蓋骨に TRAP 染色陽性細胞の増加と骨吸収の促進が確認された。このことから TNF α と IL-6 刺激で誘導された新規破骨細胞様細胞は炎症性骨破壊に関与し、TNF

阻害療法がその分化誘導を制御することで関節破壊の一部を抑制している可能性が示唆された。

材料と方法

in vitro における破骨細胞様細胞の誘導

7～9 週齢の C57BL/6J 雌マウスの大腿骨から骨髓単球を取り出し、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) により破骨細胞前駆細胞へ誘導し、TNF α 、IL-6 単独刺激、または共刺激で培養し、培養4日目に TRAP 染色を行った。従来の破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) で誘導される破骨細胞とは分化メカニズムが異なることを確認するために、RANKL の decoy receptor である osteoprotegerin (OPG) を RANKL 刺激群、TNF α ・IL-6 共刺激群に同時添加した。そして、顕微鏡下で TRAP 陽性多核巨細胞数をカウントした。骨吸収能評価のために象牙質上で2週間培養し、骨吸収窩を電子顕微鏡で観察した。

in vivo における破骨細胞様細胞の誘導

in vitro の結果に基づき、*in vivo* の破骨細胞分化を評価するために、マウス頭部に TNF α ・IL-6 を連日皮下注射投与した。6日後に頭蓋冠を取り出し、脱灰薄切し、TRAP 染色を行い TRAP 染色陽性細胞 (破骨細胞様細胞) と骨吸収の程度を評価した。

TNF α ・IL-6 で誘導される破骨細胞様細胞の分化誘導メカニズムの解析

破骨細胞の分化に重要な転写因子 NFATc1 については ELISA (DNA 結合活性測定キット)、ウエスタンブロット法で解析した。

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

マウス破骨細胞前駆細胞を TNF α と IL-6 で共刺激すると TNF α 、IL-6 それぞれ単独刺激と比し、巨大な

TRAP染色陽性多核細胞が確認された (Fig. 1). OPGをRANKL刺激群, TNF α ・IL-6共刺激群に同時添加すると, RANKL刺激群では破骨細胞はほとんど誘導されないが, TNF α ・IL-6共刺激群では破骨細胞様細胞が確認されたことからRANKL非依存的な誘導であることが示された (Fig. 2). また, 象牙質上で培養すると, TNF α ・IL-6共刺激群はそれぞれの単独刺激群と比し, 骨吸収窩が多数認められ, 誘導された破骨細胞様細胞は骨吸収能を有していることが確認された (Fig. 3). 以上のことからTNF α ・IL-6で誘導された多核巨細胞はTRAP染色陽性, 骨吸収能を有していたことから破骨細胞の特徴を呈していた.

この破骨細胞様細胞の分化誘導メカニズムを明らか

にするために, ELISAとウエスタンブロット法でNFATc1の活性と発現を確認したところ, TNF α ・IL-6共刺激72時間後において, それぞれの単独刺激に比し, NFATc1の活性と発現が有意に増加していた (Fig. 4). このことからTNF α ・IL-6共刺激はNFATc1の活性化と発現を誘導することにより破骨細胞様細胞へ分化させることが示唆された.

*in vivo*における検討では, マウス頭部への5日間のTNF α ・IL-6の皮下注射投与により, 頭蓋骨におけるTRAP染色陽性細胞の増加と骨吸収の促進が確認された (Fig. 5). このことから生体内においても, TNF α ・IL-6共刺激により破骨細胞様細胞が誘導され, 骨吸収に関与している可能性が示唆された.

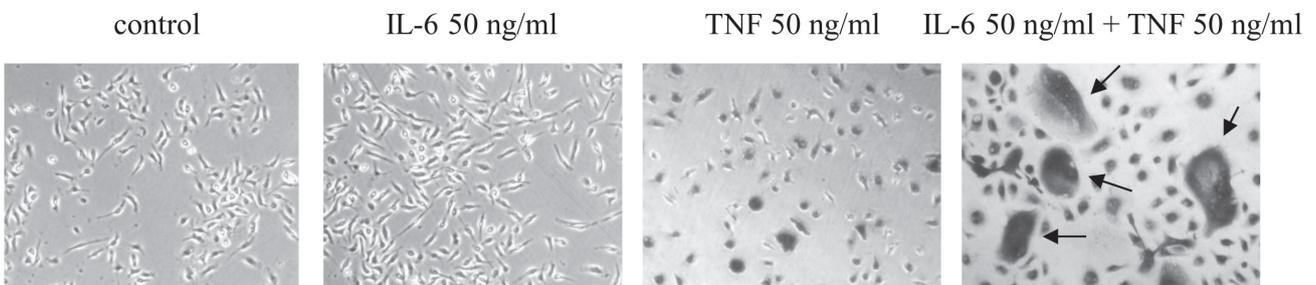


Fig. 1. The combination of TNF α and IL-6 induced TRAP positive osteoclast-like cells.

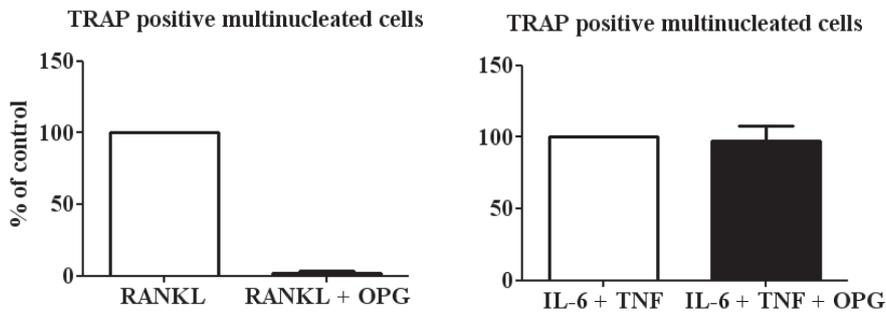


Fig. 2. TNF α and IL-6 induced osteoclast-like cells in a RANKL-independent manner.

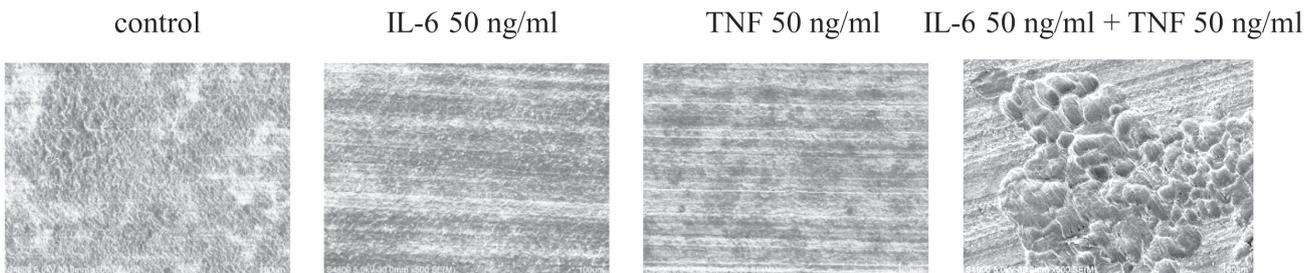


Fig. 3. Resorption pits on dentin slices were formed by the osteoclast-like cells.

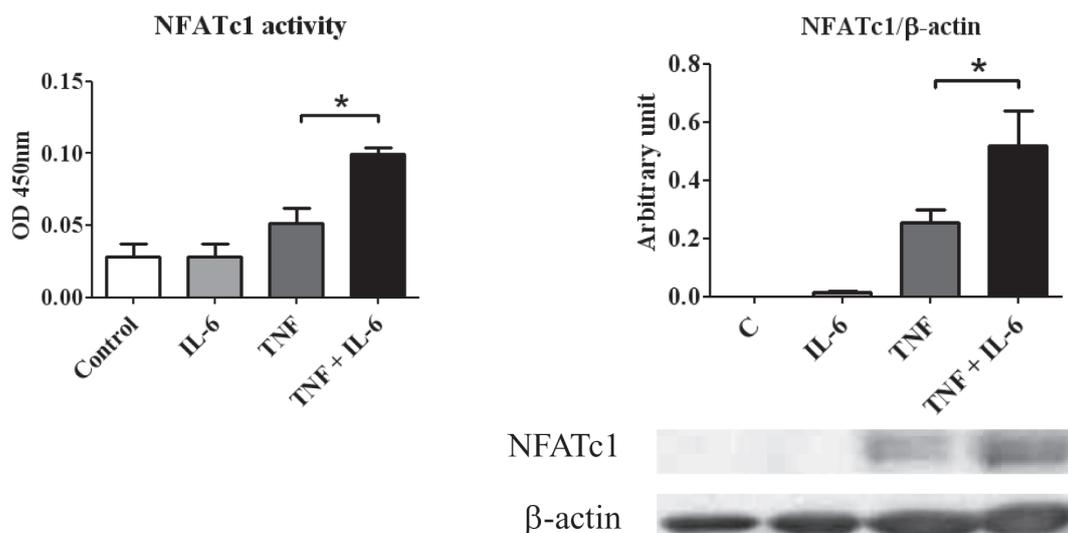


Fig. 4. Stimulation with TNF α and IL-6 significantly up-regulates the activities and expression level of NFATc1.

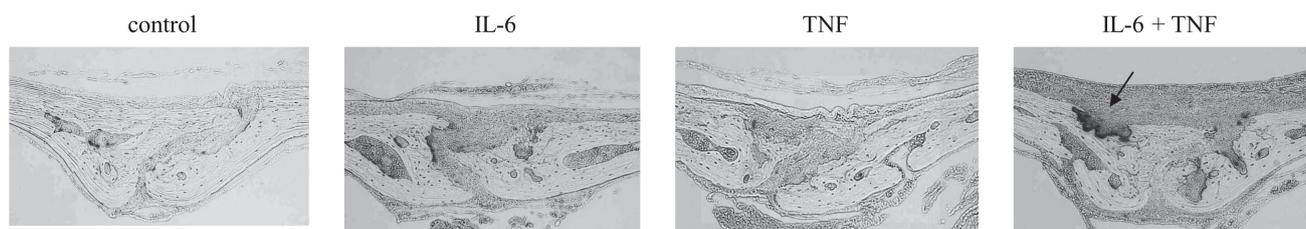


Fig. 5. TRAP positive cells and bone erosions on the calvariae in mice was significantly increased by the combination of TNF α and IL-6.

考 察

我々はマウス骨髄単球を従来のRANKL刺激ではなく、炎症性サイトカイン(TNF α ・IL-6)刺激によりTRAP陽性の多核巨細胞を誘導することに成功した。

現在、RAの治療はTreat to Target (T2T)という概念が提唱され、早期に疾患活動性を抑えて、関節破壊の進行を抑制することが重要であると推奨されている。しかしながら、関節破壊に重要である破骨細胞をターゲットとした治療法は確立していない。実際、RAに対する抗RANKL抗体の臨床試験において、抗RANKL抗体治療群でも半年間で関節裂隙の狭小化が進行してしまうことから、通常の破骨細胞を標的とした治療は何らかの理由によりRAには不向きなのかもしれない。それにもかかわらず、RA関節において破骨細胞の機能亢進がみられることは間違いないことで、通常の破骨細胞に対する治療には反応しない破骨細胞機能とい

うこのギャップを説明する何らかの機序があると以前から我々は考えていた。

今回、我々が見出した、従来の破骨細胞ではなく、独創的なアイデアで見出された炎症性サイトカインにより誘導される破骨細胞様細胞は、「inflammatory osteoclast」として、RA治療の標的細胞となる可能性を秘めており、炎症を抑えるだけでなく、骨破壊を抑制する治療へと進展していくことが予想される。

謝 辞

本研究の施行にあたり、埼玉医科大学リウマチ膠原病科の三村俊英教授、佐藤浩二郎講師には多大なご指導をいただき、心より感謝申し上げます。また、埼玉医科大学リウマチ膠原病科の医局員および実験助手の方々には様々なご協力をいただき、感謝致します。

研究成果リスト**論文**

- 1) Yokota K, Miyazaki T, Hemmatzad H, Gay RE, Kolling C, Fearon U, Suzuki H, Mimura T, Gay S, Ospelt C. The pattern-recognition receptor NOD1 promotes production of inflammatory mediators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2012;64(5):1329-37.
- 2) 横田和浩. 破骨細胞分化における転写因子 ATF4 の役割. *リウマチ科* 2011;45:629-37.

学会発表

- 1) 横田和浩, 佐藤浩二郎, 三由文彦, 荒木靖人,

梶山浩, 舟久保ゆう, 秋山雄次, 三村俊英. TNF α と液性因子 X により誘導される破骨細胞様細胞の分化・機能の解析, 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会, 第22回国際リウマチシンポジウム, 2013年4月18日, 京都

- 2) 横田和浩, 佐藤浩二郎, 三由文彦, 梶山浩, 秋山雄次, 三村俊英. 炎症性サイトカインにより誘導される新規破骨細胞様細胞分化メカニズムの解析, 第3回彩の国骨フォーラム, 2012年6月29日, 埼玉

特許出願

該当なし

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

術中迅速変異型 IDH1 遺伝子検出のグリオーマ手術への応用

研究代表者 安達 淳一 (国際医療センター 脳神経外科/脳脊髄腫瘍科)

研究分担者 西川 亮*

緒言

IDH1 (染色体2q34上)はイソクエン酸脱水素酵素 (IDH: Isocitrate Dehydrogenase)に属して, NADPを補酵素としてイソクエン酸を α -ケトグルタル酸に変換するという細胞のエネルギー代謝, クエン酸回路に関わる機能を持っている。2009年に, WHO grade2及びgrade3の星細胞腫, 乏突起膠腫, さらに続発性膠芽腫 (secondary glioblastoma)を含めたグリオーマの50-70%以上に IDH1の点突然変異がみられることが明らかになった¹⁻³⁾。そして, 点突然変異の起こるアミノ酸はグリオーマではIDH1遺伝子のR132変異 (アミノ酸残基132番目のアルギニンが他のアミノ酸に置換)にほぼ限られていることが判明した¹⁾。このIDH1遺伝子の点突然変異は正常細胞やグリオーマ以外の固形癌では観察されないことが報告されており¹⁾, また, この変異はグリア細胞が低悪性度グリオーマから高悪性度グリオーマへと進展する過程の比較的初期の段階で出現することもわかっている^{1,4)}。従って, このIDH1遺伝子変異が検出されればグリオーマであることは間違いなく, グリオーマの遺伝子診断への応用が可能になると考え, これをグリオーマ手術時の迅速診断に応用させるべく本研究を行った。

材料と方法

画像診断でグリオーマが疑われた患者を対象とした。手術時に採取した腫瘍組織を, UltraClean Tissue & Cell DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories社)を用いてDNAを採取した。必要な腫瘍組織は径約2ミリ (10-15 mg相当)であった。DNA抽出から精製に要する時間は約15分を要した。精製DNAをLightCycler480システム (ロシュ・ダイアグノスティクス)を用いて高解像能融解曲線分析法にてIDH1遺伝子のR132点突然変異の有無を解析した。

*国際医療センター 脳神経外科/脳脊髄腫瘍科

高解像能融解曲線分析法は以下の様に行った。まず, 目的のIDH1遺伝子R132を挟んでPCRで増幅した。PCRのプライマーはPardanani⁵⁾らの報告に基づいてデザインした (表1)。DNAインターカレート色素を含むLightCycler HRM マスターミックス (ロシュ社)を使用し, 総反応液量20 μ lとしてPCR反応を進めた。PCRサイクルの条件は以下の通りである。

DNA変成: 95°C, 3分。

PCRサイクル: 94°C, 30秒 (DNA変成) / 57°C, 30秒 (アニーリング) / 72°C, 40秒 (DNA伸長) の条件で30回のサイクル後に72°C, 40秒 (最終伸長)。

この後に融解曲線へのステップとして95°C 1分, 50°C 1分, 72°C 5秒の後, 95°Cへ向かって1°Cにつき30回連続して蛍光を取得した。以上, 全経過約50~60分で解析結果が得られた。IDH1遺伝子に変異があると, 変異の無い野生型と比べて2本鎖DNAにミスマッチが生じてDNA融解温度が上昇した。この融解温度の違いをLightCycler480システムで解析しIDH1遺伝子変異が検出された (図1)。以上設定した迅速診断用プロトコルで得られた結果と, 通常の解析 (アニーリング時間とDNA伸長時間が上記の2倍) で得られた結果と比較した。

結果

6例のグリオーマ症例 (びまん性星細胞腫2例, 乏突起膠腫2例, 退形成性星細胞腫1例, 膠芽腫1例)で, IDH1変異について通常の解析と迅速診断用の解析の両者を行ったところ, 全ての症例で通常法と迅速法いずれでも同じ結果が得られた (表2, 図2)。

考察

IDH1変異の同定には, 我々の用いた方法以外に直接DNAシーケンス法, 免疫染色法がある。前者では

解析に数時間を要するため迅速診断には使えない。後者では、現在の市販の抗体が R132H 変異タンパク質のみの検出のため、R132 変異の全てを網羅できない。我々の方法では、組織採取から約 50-60 分で全ての

IDH1R132 変異陽性グリオーマを判定できた。また、本法は IDH1 変異陽性低悪性度グリオーマとグリオシスなどの非腫瘍性組織との鑑別において、術中病理診断の補助として有用と考えられた。

表 1.

5'-CGGTCTTCAGAGAAGCCATT-3' (sense)
5'-CACATTATTGCCAACATGAC-3' (anti-sense)

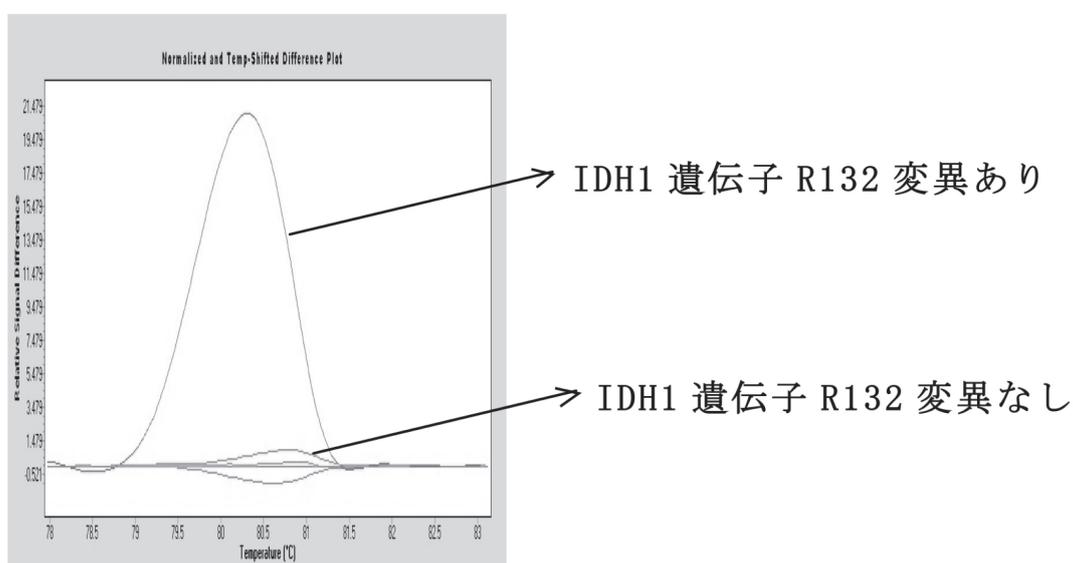


図 1.

表 2.

Cases	Age	Location	Histology	IDH1R132 mutation	
				通常法	迅速法
1	32	Lt. frontal	Diffuse astrocytoma	あり	あり
2	30	Lt. frontal	Diffuse astrocytoma	あり	あり
3	33	Lt. frontal	Oligodendroglioma	あり	あり
4	25	Lt. frontal	Oligodendroglioma	あり	あり
5	59	Lt. parietal	Anaplastic astrocytoma	なし	なし
6	53	Lt. parietal	Glioblastoma	なし	なし

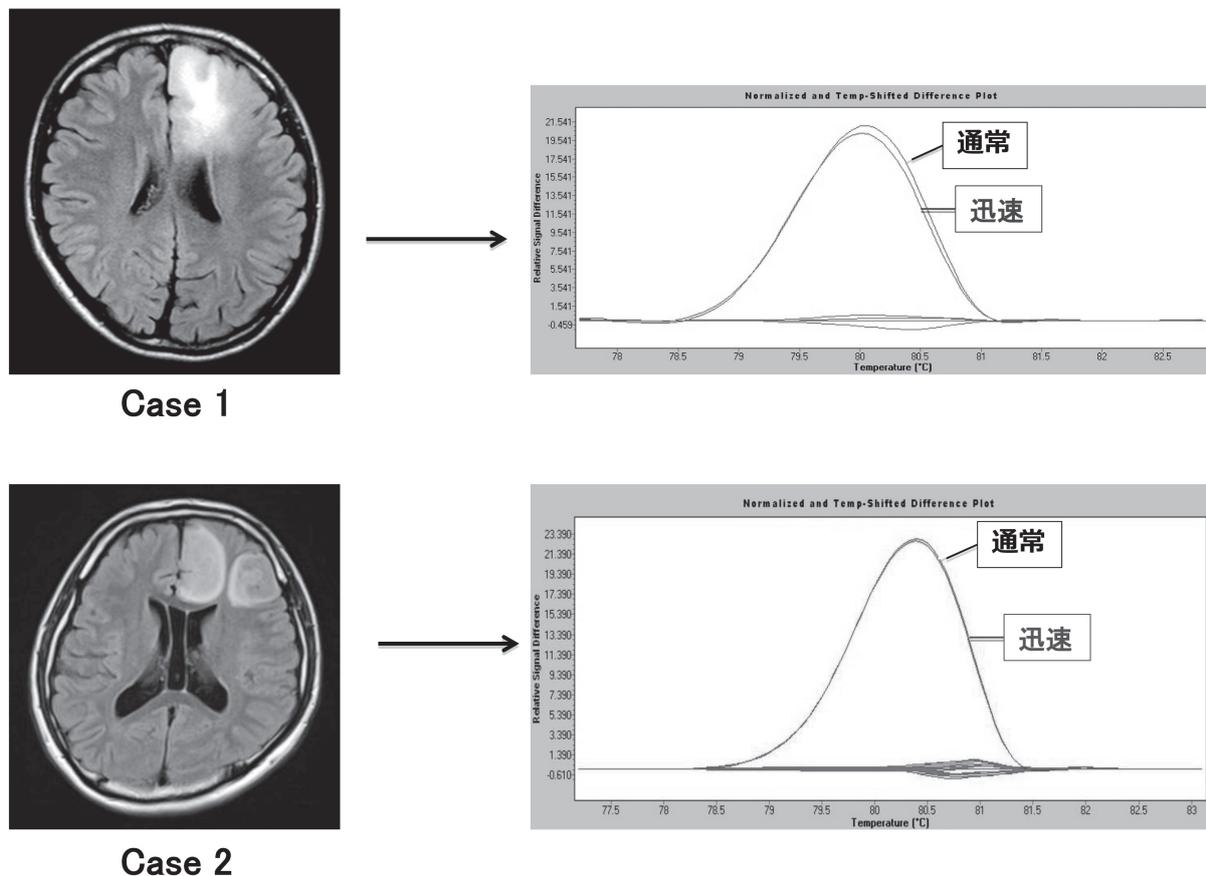


図 2.

文 献

- 1) Yan H, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N Engl J Med 2009;360:765-73.
- 2) Parsons DW, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science 2009;321:1807-12.
- 3) Ichimura K, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. Neuro Oncol 2009;11:341-7.
- 4) Sonoda Y, et al. Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients. Cancer Sci 2009;100:1996-8.
- 5) Pardanani A, et al. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic-and blast-phase myeloproliferative neoplasmas. Leukemia 2010;24:1146-51.

研究成果リスト

論文

- 1) Adachi J, Mishima K, Wakiya K, Suzuki T, Fukuoka K, Yanagisawa T, Matsutani M, Sasaki A, Nishikawa R. *O*⁶-methylguanine-DNA

methyltransferase promoter methylation in 45 primary central nervous system lymphomas: quantitative assessment of methylation and response to temozolomide treatment. J Neurooncol 2012;107:147-53.

- 2) Adachi J, Yanagisawa T, Suzuki T, Fukuoka K, Koga T, Shirahata M, Mishima K, Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT methylation in 23 pediatric glioma patients. J Cancer Res Ther 2013;9:S30.

学会発表

- 1) 安達淳一, 三島一彦, 甲賀智之, 鈴木智成, 柳澤隆昭, 福岡講平, 佐々木惇, 西川亮. グリオーマ手術における術中迅速変異型 IDH1 遺伝子検出の試み, 第30回日本脳腫瘍病理学会, 2012年5月, 東京
- 2) 安達淳一, 甲賀智之, 三島一彦, 白畑充章, 鈴木智成, 柳澤隆昭, 福岡講平, 佐々木惇, 西川亮. 変異型 IDH1 遺伝子解析の術中迅速診断への応用, 日本脳神経外科学会, 第71回学術総会, 2012年10月, 大阪

- 3) Adachi J, Mishima K, Yanagisawa T, Fujimaki T, Matsutani M, Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT methylation in pediatric glioma, The 19th International Brain Tumor Research and Therapy Conference, June 2012, Niagara Falls, Canada
- 4) Adachi J, Suzuki T, Fukuoka K, Yanagisawa T, Mishima K, Koga T, Matsutani M, Nishikawa R. IDH1 mutation analysis in pediatric glioma patients, 15th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology, June 2012, Toronto, Canada
- 5) Adachi J, Suzuki T, Yanagisawa T, Mishima K, Fukuoka K, Koga T, Matsutani M, Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT methylation in pediatric glioma patients, 10th Congress of European Association of NeuroOncology, September 2012, Marseille, France
- 6) Adachi J, Yanagisawa T, Suzuki T, Fukuoka K, Koga T, Shirahata M, Mishima K, Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT methylation in 23 pediatric glioma patients, 10th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology, March 2013, Mumbai, India
- <特許出願>
なし

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

体幹筋機能が膝前十字靭帯損傷メカニズムに及ぼす影響

研究代表者 大久保 雄 (保健医療学部 理学療法学科)

緒言

スポーツ傷害の中で膝前十字靭帯 (ACL) 損傷は重篤な外傷であり、受傷後は長期離脱を余儀なくされるため、その予防法が注目されている。受傷機転は、ジャンプの着地や切り返し動作での接地局面が多い。発症要因には膝外反角度の増大 (knee-in & toe-out)、過回内足、股関節外転筋力の低下、性ホルモン動態などが影響していることが明らかにされている¹⁾が、近年では体幹安定性の重要性が報告されている。Zazulak, et al.²⁾は、277名の大学アスリートを対象に前向き調査を行った結果、ACL損傷など膝関節外傷を受傷した者は受傷しなかった者よりも体幹安定性が低かったことを報告している。また、ACL損傷の受傷機転に多いジャンプ着地動作では、足部の接地前に腹横筋が活動し体幹安定性を高めるfeedforward作用が働くことが報告されている³⁾。これらの先行研究から、スポーツ現場ではACL損傷予防に対して体幹安定性を高めるためのトレーニングが盛んに行われている。特に、体幹安定性の制御には体幹深部筋 (腹横筋や多裂筋など) を含めた体幹筋の共同収縮が重要であることが明らかにされていることから⁴⁾、体幹筋群の共同収縮を促進させるエクササイズが推奨されている。以上から、体幹筋機能が高い者はACL損傷の主な受傷肢位でなるknee-in & toe-outを回避できると予測されるが、着地時の下肢バイオメカニクスと体幹筋機能との関連を検討した研究はない。そこで本研究では、片脚着地時の下肢キネマティクスと体幹筋活動との関連を調査し、ACL予防に対する体幹筋機能の関係性を検討することとした。

対象と方法

被験者

対象は5年以上の競技経験を有する大学生女子バスケットボール選手5名 (年齢: 24 ± 5.1 歳, 身長: 161.7 ± 3.5 cm, 体重: 53.8 ± 1.5 kg, mean \pm SD) と

した。下肢に手術歴のある者は除外した。被験者には実験内容を説明し、同意を得た後実験を開始した。

実験試技

40 cm 台から、前方 30 cm の位置に右下肢片脚着地した際の筋電図および動画データを収集した。筋電図および動画データは同期スイッチ (原田電子工業社製) を用いて同期させた。試技は台から飛び上がらないように着地させ、着地後は片脚立位姿勢を保持するよう指示した。上肢の影響を除去するため、腕の前で上肢を組ませて試技を行った。試技条件は、自然と着地させる「通常着地」とDraw-in (腹部引き込み動作) を行わせながら着地する「Draw-in 着地」の2種類とした。Draw-inは、下腹部の筋収縮を意識させながら腹部を引き込み、腹横筋の選択的収縮を図った手法であり、体幹安定性トレーニングの基本手技として臨床現場で盛んに用いられている⁵⁾。被験者には息を吐きながら下腹部を引き込ませるよう指示し、試技開始直前から着地終了までDraw-inを継続させた。試技を行う前に、Draw-in時の筋電図をモニタリングしながら十分な練習を行い、正しい筋活動様式を覚えさせた後、試技を行った。

筋電図

筋電図測定には表面筋電位測定装置 (EMG-025, 原田電子工業社) を用いた。皮膚処理として、皮膚研磨剤 (スキンピュア, 日本光電社製) およびアルコールを用いて皮膚抵抗が $2 \text{ k}\Omega$ 以下になるまで角質除去を行った。被検筋は右側の腹直筋, 外腹斜筋, 内腹斜筋 / 腹横筋, 脊柱起立筋とし、各筋の筋線維方向と平行に表面電極 (ブルーセンサー N-00-S, メッツ社製) を貼付した。筋電位導出部位は、腹直筋は臍から約 3 cm 外側, 外腹斜筋は臍から 15 cm 外側, 内腹斜筋 / 腹横筋は上前腸骨棘から 2 横指内側, 脊柱起立筋は第 3 腰椎棘突起から 3 cm 外側とした。

画像データ

試技位置の正面および左側に2台のハイスピードカメラ (EXILIM EX-FH20, CASIO 社製) を設置し、frame rateを 210 Hz で撮影した。2台のカメラはLED

ランプ(LED型シンクロナイザPH-105型, ディエイチケイ社製)を画像で撮影することにより同期させた. 反射マーカーを両側の上前腸骨棘, 膝蓋骨中央, 足関節中心, 第1趾足尖に貼付し, 試技を行った.

左側カメラの画像を画像解析ソフトImage-Jに取り込み, 試技のphase分けを行った. 左足部が台から離れてから右足部が床面に接地するまでをfloating phase, 右足部接地後300 msecまでを100 msec毎に区分したstance phase1-3の4相にphase分けした(Fig. 1).

筋電データ解析

得られた筋電位を解析ソフトBIMUTUS-Video(KISSEI COMTEC社製)に取り込み, 筋電データを解析した. 20-500 Hzでバンドパスフィルターをかけ, 全波整流を行った後, 各phaseにおけるRoot Mean Square (RMS)を算出した. さらに各筋のRMSを最大随意収縮(MVC)時のRMSで除した筋活動量(% MVC)を求めた. 各筋のMVC筋電位は, ダニエルの徒手筋力測定法MMT5の手法に基づき実施した等尺性最大随意収縮の中で, 0.2秒間の振幅位が最大となる区画を特定し, その区間のRMSを算出した.

動作解析

前方のカメラから得られた画像を画像解析ソフトImage-Jに取り込み, 離地から試技終了までの前額面股関節角度および膝関節角度を算出した. 股関節は両側上前腸骨棘を結んだ線と右上前腸骨棘と右膝蓋骨

中心を結んだ線のなす角とし, 股関節外転方向の回転を正とした(Fig. 2A). 膝関節は右上前腸骨棘, 右膝蓋骨, 右足関節中心の3点のなす角とし, 膝関節内反方向の回転を正とした(Fig. 2B). 離地時の股関節・膝関節角度を基準に, 離地後の股関節内転角度および膝関節外反角度の変化量を算出した(Fig. 3).

統計処理

各phaseにおける筋活動量および股関節・膝関節の角度変化量を試技条件間(通常着地 vs. Draw-in 着地)で対応のあるt検定により比較した. また, 各筋の筋活動量と股関節・膝関節角度変化量との関係をPearsonの積率相関係数により検討した. 統計処理にはJMP10 for Windows(SAS Institute Japan)を用い, 有意水準は5%とした.

結果

外腹斜筋の筋活動量はfloating phase(通常試技: $72.6 \pm 45.9\%$ MVC, draw-in 試技: $144.0 \pm 83.3\%$ MVC, mean \pm SD, 以下同順)およびstance phase 2($40.0 \pm 31.3\%$ MVC, $105.4 \pm 65.0\%$ MVC)で, draw-in 試技の方が通常試技よりも有意に大きかった($p < 0.05$). 内腹斜筋の活動量はstance phase 1($45.4 \pm 38.0\%$ MVC, $82.6 \pm 46.2\%$ MVC)およびstance phase 2($29.2 \pm 14.9\%$ MVC, $81.8 \pm 54.4\%$ MVC)でdraw-in 試技の方が通常試技よりも大きい傾向を示した($p < 0.1$) (Fig. 4).

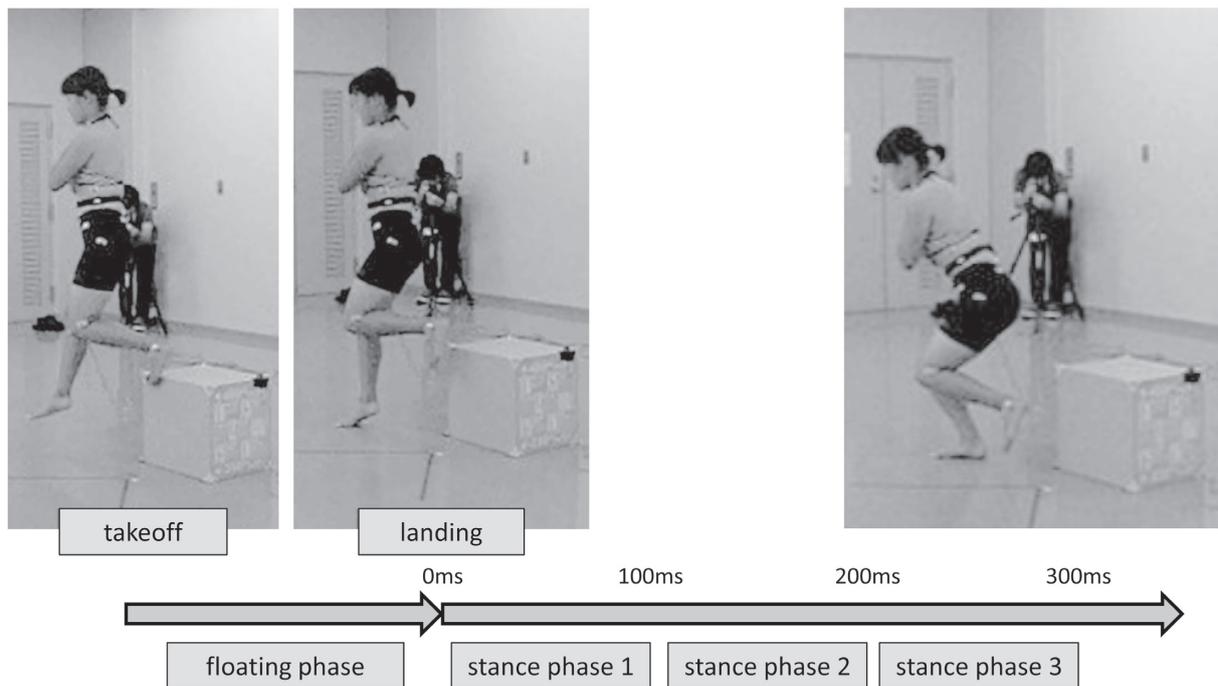


Fig. 1. Phase division of experimental task.

キネマティクスデータでは、股関節内転・膝関節外反角度変化量ともに試技間で有意な差を認めなかった (Fig.5).

筋活動量と角度変化量との関係では、stance phase 3における外腹斜筋の活動量が股関節内転角度変化量 ($r = 0.68, p < 0.05$), 膝関節外反角度変化量 ($r = 0.71, p < 0.05$) との間に有意な正の相関関係を認めた (Fig. 6). 他の項目に有意な相関関係は認めなかった.

考 察

本研究では、draw-in着地が筋活動量および股関節・膝関節キネマティクスデータに及ぼす影響を検討した。draw-in 試技では外腹斜筋および内腹斜筋の活動量が通常試技よりも有意に大きかったが、股関節・膝関節の角度変化量では有意差を認めなかった。腹筋群の共同収縮は脊椎の安定性を高めることが示唆されている⁴⁾が、本結果では下肢の運動様式を変化させる

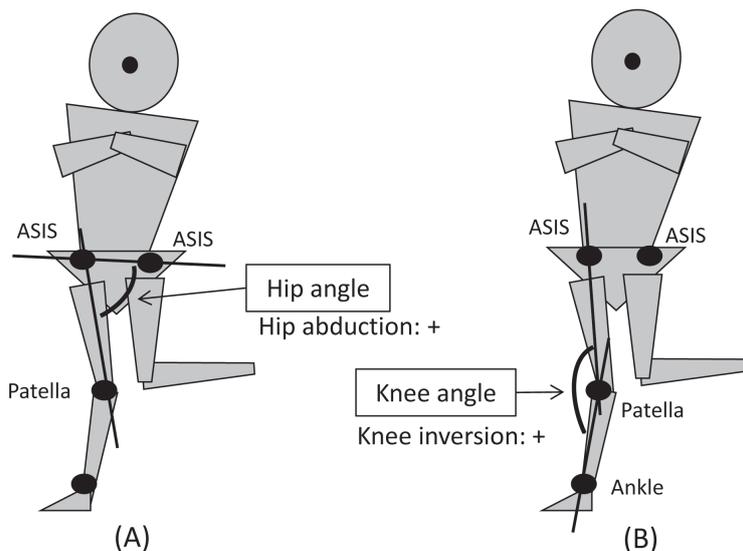


Fig. 2. The calculation of hip (A) and knee (B) angle on the frontal plane.

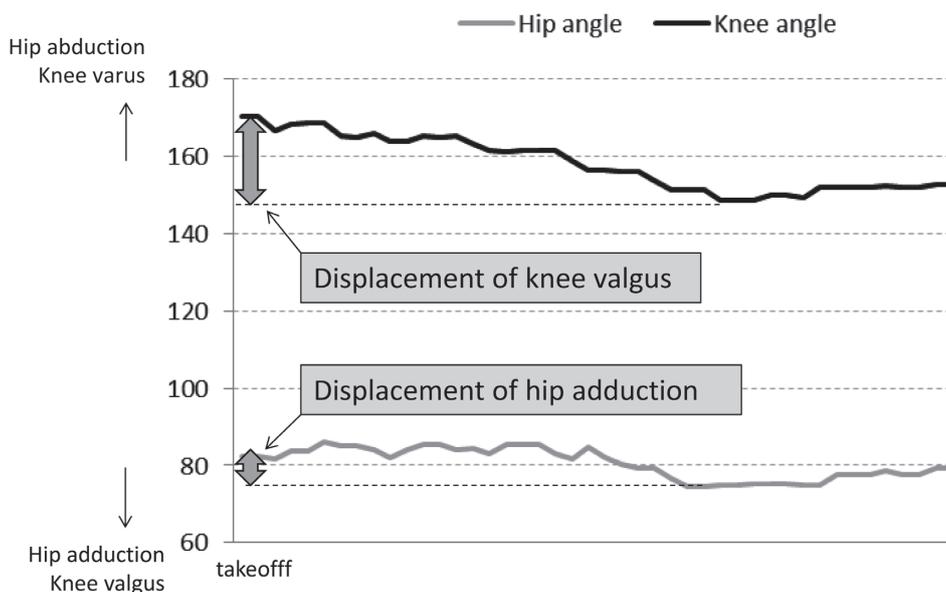


Fig. 3. The calculation for angular displacement of hip adduction and knee valgus on the frontal plane.

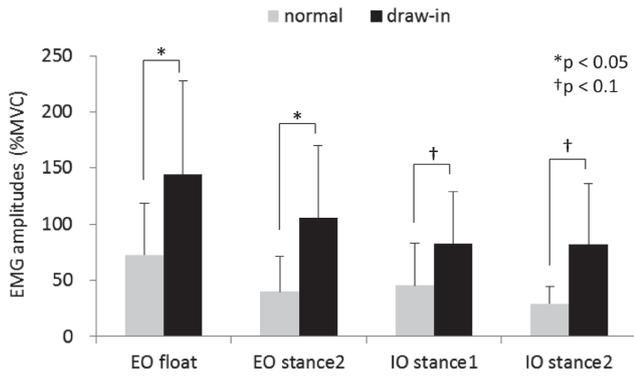


Fig. 4. Comparison of EMG amplitudes between experimental tasks. EO: external oblique, IO: internal oblique. float: floating phase, stance1: stance phase 1, stance2: stance phase 2.

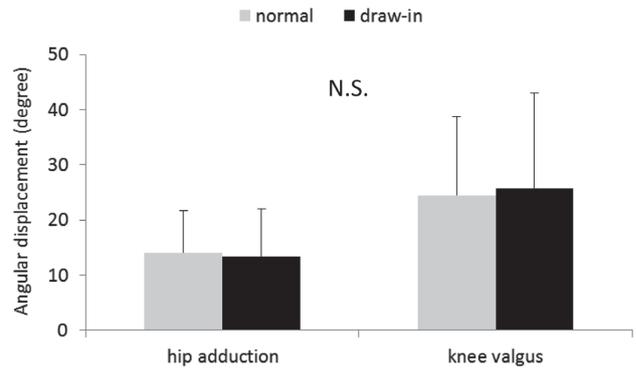


Fig. 5. Comparison of kinematics data between experimental tasks.

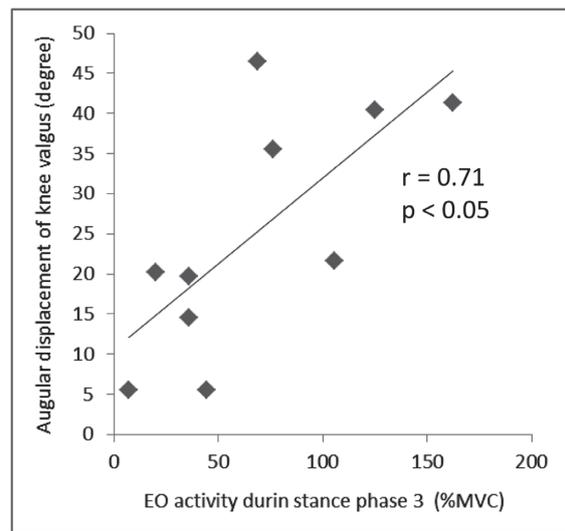
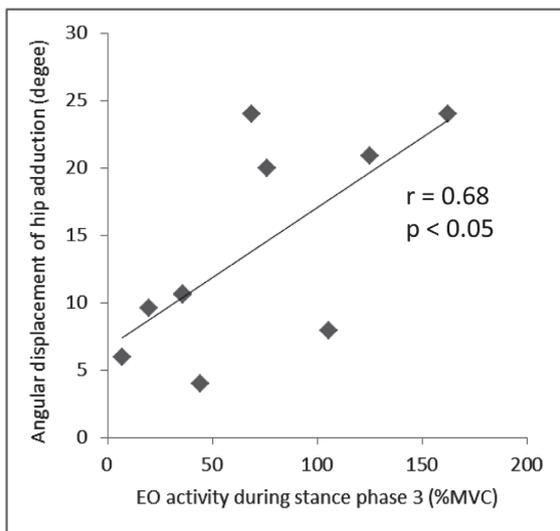


Fig. 6. Correlation between EMG amplitudes and angular displacement. EO: external oblique.

には至らなかった。先行研究において、draw-in exerciseや体幹安定化トレーニングを導入することにより、バランス能力や体幹筋反応時間を改善させることが示されている^{6,7)}。本実験では意識的にdraw-inを行わせながらの試技を検討したが、今後は一定期間体幹安定化トレーニングを導入した下肢キネマティクスへの効果を検証する必要があると考える。

筋活動量と角度変化量との関係では、stance phase 3における外腹斜筋の活動量が大きいほど、股関節内転・膝関節外反の角度変化量が大きかった。片脚立位などの姿勢制御には、支持下肢の内転筋および非支持側の外腹斜筋の作用が重要であることが報告されている⁵⁾。

本研究において、外腹斜筋は支持側のみの測定であり、非支持側の外腹斜筋活動は測定していないが、下肢の角度変化量が少ない者は非支持側の外腹斜筋の活動が高まり、支持側の外腹斜筋活動は低くなったため、外腹斜筋の活動量と股関節内転・膝関節外反の角度変化量に正の相関を認めた可能性がある。今後は、左右の体幹筋活動を測定する中で、下肢の運動様式と筋活動量の関係を検討する必要がある。

本研究から、体幹筋活動様式の変化がACL損傷の主な受傷肢位であるknee-in & toe-outに及ぼす影響を明らかにすることはできなかった。今後は実験手法を再考し、本研究を継続していく予定である。

文 献

- 1) 小笠原一生, 白木仁, 向井直樹, 竹村雅裕, 宮川俊平. 前十字靭帯損傷リスクの簡便なスクリーニング指標としての前額面膝関節偏位指標の提案. 体力科学 2008;57;553-62.
- 2) Zazulak BT, Hewett TE, Reeves NP, Goldberg B, Cholewicki J. Deficits in neuromuscular control of the trunk predict knee injury risk: a prospective biomechanical-epidemiologic study. *Am J Sports Med* 2007;35;1123-30.
- 3) Kulas AS, Schmitz RJ, Shultz SJ, Henning JM, Perrin DH. Sex-specific abdominal activation strategies during landing. *J Athl Train* 2006;41;381-6.
- 4) Stanton T, Kawchuk G. The effect of abdominal stabilization contractions on posteroanterior spinal stiffness. *Spine* 2008;33;694-701.
- 5) 小泉圭介. コアスタビリティトレーニングの意義と基本プログラム. 理学療法 2009;26;1195-202.
- 6) 今井厚, 金岡恒治, 大久保雄, 白木仁. 異なるエクササイズが静的バランスに及ぼす即時効果. 臨床スポーツ医学会誌 2012;20;469-74.
- 7) Tsao H, Hodges PW. Persistence of improvements in postural strategies following motor control training in people with recurrent low back pain. *J Electromyogr Kinesiol* 2008;18;559-67.

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

下咽頭癌三剤併用導入化学療法の効果予測因子の探索と
多因子に基づくテイラード療法

研究代表者 中平 光彦 (国際医療センター 耳鼻咽喉科(頭頸部腫瘍科))

研究分担者 西山 正彦¹⁾, 江口 英孝¹⁾, 和田 智²⁾, 菅澤 正³⁾

緒言

下咽頭癌は頭頸部癌の約10%を占め、本邦における下咽頭癌の年間罹患率は100万人比約8人と推測される。診断時には進行癌が約80%を占め、5年生存率は30%前後と頭頸部癌の中で最も予後不良な疾患の一つである。進行下咽頭癌切除不能症例や臓器温存希望症例に対しては非外科的治療として放射線治療・化学療法が適応となっている。局所制御率や臓器温存の改善を目的として、放射線治療や手術前に行う導入化学療法が以前から用いられている。その標準的レジメンは白金製剤である cisplatin (CDDP) とピリミジン系代謝拮抗薬 5-fluorouracil (5-FU) の併用療法 (PF療法) であったが、近年、PF療法にタキサン系抗癌剤 docetaxel (TXT) を加えた TPF 3剤併用療法が注目されている。局所進行頭頸部扁平上皮癌を対象に放射線療法前の導入化学療法として TPF療法とPF療法を比較検討した第3相試験 (TAX323試験: Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1695-704.) ならびに、局所進行頭頸部扁平上皮癌を対象に白金製剤である carboplatin 併用化学放射線療法前の導入化学療法としての TPF療法とPF療法を比較検討した第3相試験 (TAX324試験: Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1705-15.) の結果が報告され、いずれも TPF療法はPF療法と比較して全生存期間が有意に長いことが示された。これらの試験結果を鑑み、本院でも2008年9月より TPF療法を開始し、2010年7月までに17例の下咽頭扁平上皮癌症例

に導入化学療法を行ない、原発巣で82%、頸部リンパ節で59%の奏効率が得られている。しかしながら、このレジメンでは CTCAE Grade3-4の重篤な有害事象、特に白血球減少13例、好中球減少13例、好中球減少性発熱11例が認められており、治療効果ならびに副作用を予測するシステムの確立が急務となっている。

腫瘍組織を用いた効果予測マーカー遺伝子が、同じ薬剤であっても臓器によって必ずしも同一でないことを考慮すると、頭頸部癌のうち下咽頭癌に限定したこうした研究はほとんどなされていない。そこで本研究では咽頭癌由来細胞株を用いて、TPF療法の治療効果予測候補因子の探索を試みた。

材料・方法

1) 薬剤

CDDPはシグマ アルドリッチ社より、TXTはトロントリサーチケミカル社、5-FUは和光純薬より購入した。

2) 細胞株

FaDu, Detroit 562はATCCから、BICR 6はECACCより入手した。HPC-921Y, MPC-881T, MPC-882Yは横浜市立大学 矢野間俊介博士より、UMB-SCC-745はUniversity Hospital Giessen and Marburg, Dept. of Otolaryngology, Head & Neck Surgery Robert Mandic博士より供与いただいた。また、UT-SCC-4, UT-SCC-26A, UT-SCC-26B, UT-SCC-62, UT-SCC-66, UT-SCC-70, UT-SCC-89, UT-SCC-94はUniversity of Turku and Turku University Hospital, Dept. of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery Reidar Grénman教授より入手した。各細胞は、推奨された培地に10% FBSを加え、37℃、5%二酸化炭素濃度下で培養した。

3) 細胞毒性試験

咽頭癌由来細胞株15株を用いてMTTアッセイを行い、TXT, CDDP, 5-FU各種薬剤に対するIC₅₀ (50%

1) ゲノム医学研究センター トランスレーショナルリサーチ部門
2) 国際医療センター 乳腺腫瘍科
3) 国際医療センター 耳鼻咽喉科(頭頸部腫瘍科)

阻害濃度)を決定した。MTT アッセイは従来法の3-(4,5-ジ-メチルチアゾール-2-イリド)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (MTT) 色素減少分析法で評価した。96ウェルプレートに1ウェルあたり $4 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^4$ 個で播種した。各濃度の薬剤を加え、72時間インキュベーションした。各ウェルにPBS 100 μ lを加え上清吸引したのち、0.4% MTT 10 μ l, 0.1 mol/l コハク酸ナトリウム 10 μ lを加えた。1~3時間インキュベーションした後、ジメチルスルホキシド (DMSO) 150 μ lを加えホルマザン色素を溶解した。得られた着色溶液の570 nmと650 nmの波長の吸光度を分光光度計で測定し定量化を行った。データはコントロール群に対する薬剤暴露群における生存細胞の割合で数値化し、細胞毒性は IC_{50} で評価した。

4) 網羅的遺伝子発現解析

各細胞株からNucleoSpin RNA 抽出キット (Macherey-Nagel)を用いてtotal RNAを抽出・精製し、Quick Amp Labeling Kit (Agilent) でcRNA合成によるラベリングを行い、SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキット 8 \times 60 K (Agilent)によりmRNAおよびnon-coding RNAの網羅的遺伝子発現解析を行った。Agilent社の推奨する方法により、解析環境言語Rを用いて標準化を行った。

5) 定量的遺伝子発現解析

相関解析から選ばれた遺伝子について、Real-time RT-PCR法により遺伝子発現量の測定を行った。Total RNAをReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (東洋紡)を用いて逆転写し、ロシュ社のUniversal Probe Libraryアッセイデザインセンターにて設計したプライマーならびにプローブを用いて、LightCycler480 (ロシュ)にて測定を行った。ACTBおよびGAPDH遺伝子については、インビトロジェン社のEndogenous Control (VIC[®]/MGB Probe, Primer Limited)により測定した。各遺伝子の発現量は、ACTB, GAPDHならびにHPRT1遺伝子の相乗平均値を用いて標準化を行った。

6) 統計学的解析

各細胞株におけるマイクロアレイで得られた遺伝子発現レベルと IC_{50} 値との相関解析を行い、各種抗癌剤の感受性/耐性関連候補遺伝子を抽出した。

上記により選出された候補遺伝子をReal-time RT-PCR法により各細胞株での遺伝子発現量を定量的に測定し、 IC_{50} 値との相関について線形回帰分析により確認を行った。

結果

各細胞における3剤の IC_{50} 値を決定した (Table 1)。マイクロアレイで得られた遺伝子発現レベルと抗癌剤感受性の相関解析により、16種の薬剤感受性/耐性関連候補遺伝子を抽出した (Table 2)。Real-time RT-PCRによる定量的遺伝子発現レベルと IC_{50} 値の相関解析

により、これらのうち10遺伝子 (5FU: AGR2, RCAN3, SEPWI, PBX3, CDC25B. TXT: AGR2, PED4D, RAB15; CDDP: PED4D, PTGS1, NINJ2, KLK11, 重複含む)が有意に IC_{50} 値と相関することが確認された (Table 3)。

考察

今回同定された感受性/耐性関連候補遺伝子には、喉頭癌の予後との関連が報告されているKLK11や、卵巣癌の予後との関連が認められているAGR2などの遺伝子が含まれており、これらの候補遺伝子が下咽頭癌 TPF 療法のバイオマーカーとなる可能性を示唆している。今後は、これらの遺伝子が単なるバイオマーカーでなく、感受性/耐性規定因子となり得るかについて、siRNAを用いたノックダウンや安定発現形質転換株を用いた実験より検討を進める。

一方、現在進行中である下咽頭癌に対する TPF 療法の第2相臨床試験にて、種々の臨床情報の集積を行うとともに、術前内視鏡切除組織ならびに末梢血リンパ球DNAを収集している。検体数が解析に耐える症例数まで到達した際には、今回の研究で示唆された遺伝子についてその発現量を定量化し、腫瘍縮小効果や再発あるいは全生存期間の効果予測モデルが構築できるかについて検討する。咽頭癌由来細胞株ならびに組織検体を用い、miRNAも含む網羅的遺伝子発現、パスウェイ解析、定量的遺伝子発現、遺伝子多型、遺伝子再構成を含む体細胞変異解析により、下咽頭癌導入 TPF 化学療法の治療効果や副作用を予測する新規バイオマーカーを探索し、既存の知見により得られている因子との比較検討を行ない、さらにこれらの因子を有機的に結びつけた多因子による効果予測式の策定を行う。

Table 1. 各種細胞株における、5-FU, TXT, CDDPの IC_{50} 値

Cells	IC50		
	5-FU (μ g/ml)	TXT (pg/ml)	CDDP (μ g/ml)
UT-SCC-26A	0.821	47.909	8.386
UT-SCC-26B	0.056	0.169	0.283
UT-SCC-4	39.887	8898.846	0.944
UT-SCC-62	1.158	6.206	1.615
UT-SCC-66	0.121	207.924	1.604
UT-SCC-70	0.208	9191.086	2.357
UMB-SCC-745	0.308	0.094	0.974
UT-SCC-89	0.044	0.403	0.549
UT-SCC-94	0.077	0.781	1.370
BICR6	0.481	0.104	0.212
Detroit562	2.124	3.362	1.513
FaDu	2.240	3798.933	1.090
HPC921Y	1.151	9980.447	2.867
MPC881T	0.055	0.042	0.349
MPC882Y	0.959	22607.490	0.360

Table 2. 各種薬剤に対するIC₅₀値とマイクロアレイによる発現レベルが相関した候補遺伝子リスト

	probe_id	SYMBOL	GENE_NAME	R	R for Cat
5FU	A_23_P414964	<i>ZNF584</i>	zinc finger protein 584	-0.834	
	A_23_P35205	<i>RCAN3</i>	RCAN family member 3	-0.806	
	A_23_P391275	<i>RCAN3</i>	RCAN family member 3	-0.801	
	A_32_P2392	<i>GOLGA8A</i>	golgin A8 family, member A	0.786	
	A_23_P117582	<i>JDP2</i>	Jun dimerization protein 2	0.766	
	A_33_P3326432	<i>SEPW1</i>	selenoprotein W, 1	-0.765	
	A_23_P71821	<i>PBX3</i>	pre-B-cell leukemia homeobox 3	-0.760	
	A_23_P210726	<i>CDC25B</i>	cell division cycle 25 homolog B	-0.753	
	A_24_P201171	<i>STXBP1</i>	syntaxin binding protein 1	-0.750	
CDDP	A_23_P101505	<i>KLK11</i>	kallikrein-related peptidase 11	-0.753	
	A_23_P48109	<i>NINJ2</i>	ninjurin 2	-0.818	
	A_33_P3212640	<i>NOTCH2NL</i>	notch 2 N-terminal like	0.757	
	A_23_P216966	<i>PTGS1</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	-0.831	
TXT	A_23_P31407	<i>AGR2</i>	anterior gradient 2 homolog	0.701	0.802
	A_33_P3389653	<i>PDE4D</i>	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific	0.588	0.753
	A_24_P193295	<i>RAB15</i>	RAB15, member RAS oncogene family	0.530	0.780
	A_33_P3379091	<i>SYNGR1</i>	synaptogyrin 1	0.626	0.799

Table 3. Real-time RT-PCRによる遺伝子発現レベルと各種薬剤IC₅₀値の相関

Drug	Gene	Linear Regression	
		R ²	P
5FU	<i>RCAN3</i>	0.406	0.0106
	<i>SEPW1</i>	0.498	0.0033
	<i>PBX3</i>	0.298	0.0354
	<i>CDC25B</i>	0.414	0.0097
	<i>AGR2</i>	0.346	0.021
CDDP	<i>PTGS1</i>	0.596	0.0007
	<i>NINJ2</i>	0.728	<0.0001
	<i>KLK11</i>	0.449	0.0063
	<i>PED4D</i>	0.275	0.0449
TXT	<i>AGR2</i>	0.486	0.0038
	<i>SYNGR1</i>	0.391	0.0223
	<i>PDE4D</i>	0.556	0.0014
	<i>RAB15</i>	0.405	0.0107

研究成果リスト

論文

- 1) Nakahira M, Sugasawa M, Morita K. Monophasic synovial sarcoma of the nasopharynx. Auris Nasus Larynx 2013;40:413-6.

学会発表

- 1) 松村聡子, 井上準, 久場潔実, 小村豪, 高城文彦, 盛田恵, 中平光彦, 菅澤正. 当科における進行下咽頭癌に対するTPF(TXT/CDDP/5-FU)療法の検討, 第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2012年5月10-12日, 新潟
- 2) 久場潔実, 井上準, 松村聡子, 高城文彦, 盛田恵, 中平光彦, 菅澤正. 下咽頭癌放射線化学療法後に化膿性脊椎炎から硬膜外膿瘍を発症した一例, 第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2012年5月10-12日, 新潟
- 3) 久場潔実, 井上準, 野島淳也, 松村聡子, 高城文彦, 盛田恵, 横川秀樹, 中平光彦, 菅澤正. 当科における中咽頭癌症例の臨床的検討, 第36回日本頭頸部癌学会, 2012年6月6-8日, 松江

- 4) 井上準, 久場潔実, 松村聡子, 高城文彦, 盛田恵, 中平光彦, 菅澤正. 当院における喉頭癌の臨床的検討, 第112回日本耳鼻咽喉科学会埼玉県地方部会, 2012年10月14日, 浦和
- 5) 井上準, 久場潔実, 松村聡子, 高城文彦, 盛田恵, 中平光彦, 菅澤正. 当院における喉頭癌の臨床的検討, 第64回日本気管食道科学会, 2012年11月8-9日, 東京
- 6) 中平光彦, 菅澤正, 盛田恵, 高城文彦, 南和彦, 久場潔実, 井上準. 上咽頭癌の治療成績, 第114回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2013年5月16-18日, 札幌
- 7) 中平光彦. TPF療法 studyについて, 第2回埼玉県頭頸部腫瘍セミナー, 2013年4月4日, 大宮

学会発表予定

- 1) 嶋村由美子, 江口英孝, 和田智, 中平光彦, 岡崎康司, Reidar Grénman, 依田哲也, 菅澤正, 西山正彦. 下咽頭がんTPF療法の新規感受性/耐性予測遺伝子の探索, 第51回日本癌治療学会学術集会, 2013年10月24-26日, 京都

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

新生児領域における臓器血流量分布に着目した
次世代循環モニタリングシステムの開発

研究代表者 石黒 秋生（総合医療センター 新生児科）

はじめに

本研究成果については他誌に掲載済みであるため、著作権の問題から図表は省略させていただくことをお断りさせていただきます。

緒言

極低出生体重児の救命率は年々上昇し、新生児医療の対象はより未熟かつ病的な児に広がりつつある。しかしこのような重症児への対象の広がりとともに、脳室内出血などの中枢神経系合併症の発症により重篤な神経学的後遺症を残す児が増加し、小児期における脳性麻痺、発達遅延の主要な部分を占めるようになってきている事も事実である。

早産、極低出生体重児においては、脳室内出血を中心とした中枢神経系合併症発症と生後早期の循環不全との関連性が指摘されている。それゆえ新生児集中治療室においてはその発症を防ぐべく厳重な循環管理が行われ、出生体重1000g未満の超低出生体重児では、16-98%が循環サポートを受けると報告されている。これまでの主要な循環管理目標は昇圧及び血圧の維持であることは新生児領域に限らないが、近年、血圧のみを指標とした循環管理は必ずしも予後改善に寄与しないことが明らかになってきている。

循環不全とは全身的な血流分布不全と定義される。従って、臓器への血流および酸素供給を維持し、臓器間の血流分布を正常化する事が究極的な循環管理目標となるが、この目標は血圧をある一定以上に保つだけでは必ずしも達成されない。例えば血圧が保たれていても後負荷（体血管抵抗）が異常に増加している場合には、“循環血流量＝血圧／血管抵抗”の式から導かれるように、臓器血流は十分に保たれない。これが昇圧のみを目的とした治療が予後改善につながらない原因であると考えられる。

近年、新生児領域においても、臓器血流が

保たれていると判断された場合は、低血圧を許容する“permissive hypotension”が提唱され、血圧管理のみによらない新たな循環管理法確立に発展しうる概念として注目されている。今後このような概念を発展させていくためには、客観的な臓器血流指標が必須であり、現在、ベッドサイドで評価可能な様々な臓器血流測定機器が開発され、新生児循環に関する研究のフォーカスは臓器血流評価に向けられつつある（Cayabyab J. Perinatol 2009）が、臨床的に確立されたものはない。

我々は、従来の循環指標に“血流量”を加えた新たな循環管理システムの構築を目指し、とくに末梢循環に着目した研究をすすめている。末梢臓器循環は循環不全発症早期に変動するため、循環動態の異常を早期に発見し治療介入を行う点で重要である。しかし、従来の末梢循環指標である尿量、皮膚色、毛細血管最充填期間などは非連続的、主観的、半定量的パラメータであり、その臨床的意義は限定的であった。我々はレーザードップラー血流量計を用いて末梢循環の客観的な評価法確立のための研究を進めている。

今回はその成果の一つとして、病的新生児を対象に、新たに開発されたレーザードップラー血流量測定装置を用いて末梢循環パラメータの一つである皮膚血流量を連続測定し、その変化と脳室内出血（IVH, intraventricular hemorrhage）との関連について検討したので報告する。

材料と方法

本研究は当院の倫理委員会の承認を受けて行われた。

2008年から2012年12月までに埼玉医大総合医療センター新生児集中治療室に入院された極低出生体重児のうち、両親に同意が得られ、生後6時間以内にレーザードップラー血流量計を装着し、皮膚血流量測定を開始しえた83名を対象とした。両親の同意が

得られなかった症例、循環動態に影響を与えうる先天性心疾患の合併例、染色体異常例、重度新生児仮死により出生時に胸骨圧迫やアドレナリン投与を受けた症例は研究から除外した。

皮膚血流量測定

レーザードップラー血流量計(LDF-2000, ネクスス, 福岡)のプロブを前額部, 足背にテープ固定し, 各部位における前額部皮膚血流量(FBF), 足背皮膚血流量(LBF)を測定した。レーザードップラー計により, プロブ装着部の半球上の範囲における毛細血管, 細動脈, 細静脈の血流が測定される。データはコンピューター上に記録, 表示され, 測定終了後, 10秒単位でデータを抽出した。生後6-48時間までの6時間間隔の時点において, 前後30分計1時間のデータを平均しその時点の測定値とした。

血圧測定

血圧は, 観血的測定では1時間ごと, 非観血的測定では3時間ごとに看護スタッフにより記録された。上記時点における血圧データを抽出し, 統計学的解析を行った。

頭部超音波検査

IVH発症の有無を頭部エコー検査により確認した。頭部エコー検査は生後0, 12, 24, 48時間および生後7日に行った。また, この間, 全身状態の変化や検査値の変化によりIVHが疑われた場合には, 主治医の判断により追加の超音波検査が行われた。パパイル分類II度以上のものをIVH例とした。

データ解析及び統計

対象を脳室内出血群(IVH群)と非出血群(非IVH群)に分類した。各群における皮膚血流量及び血圧の変化を二因子分散分析法により統計学的に検討した。また, 各時点における群間の違いについてはt-testにより検定した後, ボンフェローニ補正を行い統計学的相違について検討した。IVHの危険因子を検討するため, 在胎週数, 出生体重, Apgar Score(1分値, 5分値), 出生前ステロイド投与の有無, 皮膚血流量, 平均血圧について単変量ロジスティック回帰分析を行い, さらに有意確率<0.15の項目および皮膚血流量, 平均血圧について多変量ロジスティック回帰分析を行った。

また, ROC曲線から, 平均血圧, 足背, 前額血流量の感度, 特異度, 陰性, 陽性的中率を求めた。

結果

対象83例のうち, 9症例がIVHを発症した。1例は生後24時間以内に, 4例は24-48時間以内に, 4例は生後48時間から生後7日までの間に発症した。

IVH群, 非IVH群間における血圧, 皮膚血流量の違い

LBFは生後18および24時間においてIVH群で有意に低下していた(18h: $p = 0.0004$; 24h: $p = 0.0005$;

Bonferroni correction p -value criteria < $0.05/8 = 0.006$)。一方, FBFはいずれの時点でも両群間に有意な差は認められなかった。

血圧は18, 24, 30時間でIVH群において有意に低下していた(18h: $p < 0.001$; 24h: $p = 0.004$; 30h: $p < 0.001$; Bonferroni correction p -value criteria < $0.05/8 = 0.006$)。

血圧, 皮膚血流量の経時変化

LBFはIVH群では生後18時間までは減少し, その後48時間まで増加傾向となり, 非IVH群と同レベルまで増加した。一方, 非IVH群では12時間から30時間まで増加し, 以降一定となった。

FBFはIVH群においては有意な経時変化を示さなかった。一方, 非IVH群では生後12時間から30時間にかけて増加した。

脳室内出血のリスク因子

単変量ロジスティック回帰分析では, 低在胎週数, 出生前ステロイド投与の非投与, ドパミン最大投与量, 低平均血圧, 低LBFがリスク因子となった。

生後18時間における多変量ロジスティック回帰ではLBFのみがIVHのリスク因子($p = 0.04$)となった。

ROC曲線から生後18時間におけるLBFのカットオフ値を13.6 mL/100 g/分とした場合, 脳室内出血発症に対する感度88%, 特異度93%, 陰性的中率99%であった。

考察

生後6時間から日齢7までにIVHを発症した極低出生体重児では, 生後24時間までの足背皮膚血流量が有意に低下していることが明らかとなった。24時間以降, 脳室内出血症例の足背血流量は徐々に増加し, 48時間には非出血例と同レベルとなったが, 脳室内出血例9例のうち8例では出血はこの血流増加の時期の発症であった。これは, 新生児脳室内出血発症における虚血再灌流障害の概念に矛盾しない結果であると考えられる。

足背血流量と脳室内出血との直接的な関連は不明である。我々のこれまでの研究成果では, 新生児領域において脳血流量とある程度相関すると考えられている上大静脈血流量と足背血流量との間に正の相関を認めており, 足背血流量の変化はある程度脳血流量の変化を反映する可能性もある。しかしながら, さらに脳室内出血の発症メカニズムを解明するには今後脳血流量, 体循環血流量(心拍出量), 末梢(皮膚)血流量を同時に測定しその関連性を検討する必要があるだろう。

単変量ロジスティック回帰分析では様々な因子が脳室内出血の危険因子となったが, 多変量ロジスティック回帰分析にてこれらの因子を補正すると足背血流量のみが脳室内出血の危険因子となった。これは, これまで血圧を循環管理目標としてきた従来の循環管

理から、皮膚血流量を指標に加えた新たな循環管理法を検討する根拠となりうる。

また、ROC 曲線からえられた足背血流量の感度、特異度から足背血流量は脳室内出血のよい予測因子となることが明らかとなった。さらに、足背血流量のみならず、前額部血流量、平均血圧の陰性的中率は高く、これらのパラメータから脳室内出血のハイリスク児を絞り込むことが可能であると思われる。

結 論

本研究では、極低出生体重児において、足背血流量の低下とそれに引き続く血流増加により脳室内出血の発症を予測しうることを明らかにした。これらの

成果は、脳室内出血発症に関する虚血再灌流理論に合致するものと思われる。今後、皮膚血流のみならず、近赤外線分光法を用いた脳循環評価、心エコー法等を用いた体循環評価を組み合わせ、より大規模な研究を行う必要があると考えられる。

研究成果リスト

- 1) Ishiguro A, Suzuki K, Sekine T, Sudo Y, Kawasaki H, Itoh K, Kanai M, Kato I, Sobajima S, and Tamura M. Skin blood flow as a predictor of intraventricular hemorrhage in very low birth weight infants. *Pediatric Research* (in press).

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

単量型マウス TLR4 による細胞内情報伝達の分子機序と意義の解明

研究代表者 魚住 尚紀 (医学部 生化学)

諸言

Toll-like receptor (TLR) は、自然免疫受容体の主要な分子群の一つであり、生体防御の第一線で病原体由来の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) の認識に携わっている¹⁾。TLRは宿主体外に由来するPAMPsのみならず、宿主体内に起源を持つ内在リガンドも認識して活性化される。近年は、自然炎症 (homeostatic inflammation または physiological inflammation) の概念が提唱され、TLRを含めた自然免疫受容体が生体恒常性の維持においても重要な役割を果たしていると考えられている。

TLRの研究は、多岐にわたって精力的に進められてきたが、受容体活性化の分子レベルでの解明は未だ途上にある。TLR細胞外ドメイン・リガンド共結晶のX線構造解析結果が、細胞膜に直交する点对称軸をもつ受容体の2量体構造を指し示しているのに対し、TLRの主要な細胞内情報伝達経路であるMyD88経路における細胞膜直下の細胞内情報伝達コンプレックスMyddosomeの結晶X線構造解析結果では、14個のドメインタンパク質が形成するらせん構造が報告されている²⁻⁴⁾。細胞外ドメインの点对称構造と細胞内情報伝達コンプレックスのらせん構造を機能的に連結させる機構は分子的に知られていない。また、PAMPsと内在リガンドが化学構造上の類似点に乏しいにもかかわらず同一のTLRを活性化できる、分子レベルでの説明も十分なものとはいえない状況にある。

このような状況を背景に、われわれは細胞生物学的な手法によりTLR4、TLR5それぞれの一次構造と機能の相関を解析し、受容体活性化機構を解明しようとしている。

材料と方法

HEK293細胞TLR発現系の刺激に対する応答解析は、TLR研究において広く用いられている実験系である⁵⁾。われわれは、マウスTLR4、TLR5の発現プラスミドとその点変異体を調製し、それぞれをHEK293細胞に一過性発現させたときのリガンドに対する応答

を解析した。

マウスTLR4、TLR5の発現プラスミドは、pcDNA3.1 hygro (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を骨格として用い、それぞれのcDNAを挿入して構築した。変異体は校正機能の高いKOD-plus DNA合成酵素 (Toyobo, Osaka, Japan) を使用し、inverse PCR法にて、定法に従い作製した⁶⁾。DNA塩基配列を発現カセット部分全長にわたって確認の上、プラスミドを大腸菌内で増幅、陰イオン交換カラム (Nucleobond Exta midi EF, Takara, Otsu, Japan) を用いて精製し、得られたエンドトキシンプリーの溶液をトランスフェクショングレードのベクターとして調製した。マウスMD2、CD14の発現カセットは、pDUO2-mMD2/CD14 (Invivogen, San Diego, CA, USA) を使用した。これらの発現プラスミドの使用に関しては、埼玉医科大学第二種使用等拡散防止措置承認(1055号)を得ている。

HEK293細胞は10%FCS添加DMEM (Sigma, St. Lewis, MO, USA) 中で培養し、トランスフェクション前日に、1ウェルあたり 9×10^5 個を2mlの用量で6穴プレートに播種した。トランスフェクションは、総量1 μ gのプラスミドを2 μ lのLipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と混合して、Opti-MEM I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中にて実施した。トランスフェクション後、4-6時間後に培地を10% FCS添加DMEMに交換し、引き続いて一晩、培養した。翌日、5% FCS添加DMEMで懸濁した細胞を密度 4×10^5 /mlに調製して、96穴プレートに1ウェルあたり100 μ lずつ播種した。5-7時間後に100 μ lの5% FCS添加DMEMで調製した2倍濃度のリガンド溶液を添加し、さらに24時間培養した。175 μ lの培地を回収、1000xgで10分間遠心して150 μ lの上清を得た。この培養上清に含まれるHEK293細胞由来のヒトIL-8濃度をBD OptEIA Set Human IL-8 (BD biosciences, San Diego, CA, USA) にて定量した。

リガンドは、LPS-EB Ultrapure (cat. #tlrl-pelps, Invivogen, San Diego, CA, USA)、フラジェリン FLA-ST Ultrapure (cat. #tlrl-pstfla, Invivogen, San Diego,

CA, USA) を生理食塩水 (Otsuka, Tokushima, Japan) に溶解し, 5% FCS 添加 DMEM で希釈して使用した。

結果

TLR は 1 回膜貫通型受容体の構造を持ち, N 末端側を細胞外に配置してリガンドを認識し, C 末端側にある細胞内 TIR ドメインを介して情報を細胞内に伝達する¹⁾。膜貫通部位は疎水性アミノ酸を多く含む 20 残基程度の領域で, 2 次構造として α ヘリックス構造を取っていると考えられている。細胞外ドメインと細胞内ドメインの相対的位置関係に影響を与える目的で, 膜貫通部位の C 末端側に疎水性アミノ酸残基を追加した変異体を構築し, リガンドに対する反応性を野生型受容体と比較した。マウス TLR4 の細胞膜貫通部位変異体は, LPS に対する反応性が野生型と全く同様であった (Fig. 1A)。マウス TLR5 の細胞膜貫通部位変異体は, フラジェリンに対する反応性を失っていた (Fig. 1B)。膜貫通部位 N 末端側にアラニンを追加した場合でも, マウス TLR4 変異体の LPS に対する反応性に変化が認められなかった (Fig. 1C)。このように, マウス TLR4 の LPS に対する反応性は膜貫通疎水性部位の長さに依存しないことが明らかになった。それに対して, TLR5 は膜貫通部位の長さに関して, 自由度をもたないことが示された。TLR4 と TLR5 は構造上の相同性が認められることから, 活性化機構にも類似性を仮定していたが, 細胞膜貫通部位変異体のリガンド反応性は全く異なっており, 活性化機構に大きな違い

がある可能性が考えられた。

細胞内 TIR ドメインのアラインメントを, マウス TLR 分子種間・各 TLR での動物種間で作製したところ, ほぼすべての分子種, 動物種で保存されたアミノ酸残基が見いだされる一方で, 種間での保存性と TLR 分子間で保存性に相違が認められるアミノ酸残基も見いだされた。前者には, マウス TLR4 の細胞内情報伝達に重要な P712 残基が含まれ, ヒスチジン点変異 P712H を保有する C3H/HeJ マウスが LPS に非感受性であることはよく知られている^{7,8)}。後者の例として, マウス TLR4 の N682, E796 残基が挙げられ, マウス TLR5 では相同位置のアミノ酸残基はそれぞれ D718, P834 となっている。こうしたアミノ酸残基の中に TLR 活性化に関与するものが含まれる可能性が考えられるため, アミノ酸を交換した点変異体を構築し, リガンドに対する反応性を解析した。その結果, マウス TLR4 の N682D, E796P 変異体では, 野生型とほぼ同様の LPS 反応性を示したのに対して, マウス TLR5 の D718N, P834E は, 100 ng/ml フラジェリンに対しても反応を示さなかった (Fig. 2A, B)。また, マウス TLR4 の R729 残基は, マウス TLR5 では R767 残基に対応し, TLR4 と TLR5 の比較においては動物種を越えて保存されている。他の TLR 分子種との比較においては, TLR2 ではいくつか動物種でアルギニンへの塩基性アミノ酸間での置換が認められ, TLR1, TLR6 では疎水性のチロシン残基となっている。マウス TLR4 R729Y 点変異体は, LPS に対する応答性を失っていたが,

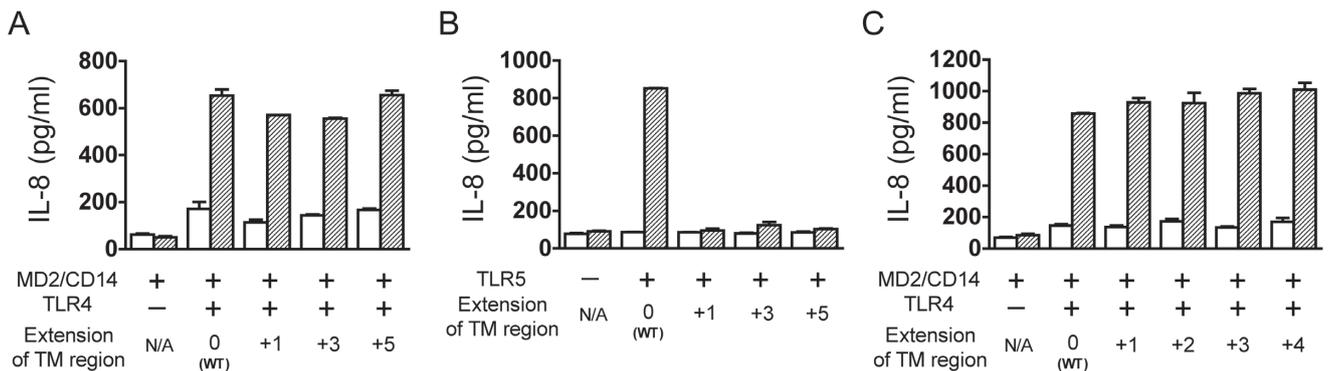


Fig. 1. 膜貫通部位延長変異体のリガンドに対する反応。A: マウス TLR4, 膜貫通部位 C 末端側の延長変異体。0 (WT): 野生型 (延長なし), +1: 1 残基 (V) 挿入, +3: 3 残基 (VLV) 挿入, +5: 5 残基 (VIFLV) 挿入。トランスフェクションベクター重量比, TLR4 カセット: MD2/CD14 カセット: 空ベクター = 1:1:8 (総プラスミド量 1 μ g/well)。白抜き: 無刺激, 斜線: 12.5 ng/ml LPS 刺激。B: マウス TLR5, 膜貫通部位 C 末端側の延長変異体。0 (WT): 野生型 (延長なし), +1: 1 残基 (V) 挿入, +3: 3 残基 (VLV) 挿入, +5: 5 残基 (VIFLV) 挿入。トランスフェクションベクター重量比, TLR5 カセット: 空ベクター = 1:9 (総プラスミド量 1 μ g/well)。白抜き: 無刺激, 斜線: 100 ng/ml フラジェリン刺激。C: マウス TLR4, 膜貫通部位 N 末端側の延長変異体。0 (WT): 野生型 (延長なし), +1: 1 残基 (A) 挿入, +2: 2 残基 (AA) 挿入, +3: 3 残基 (AAA) 挿入, +4: 4 残基 (AAAA) 挿入。トランスフェクションベクター重量比, TLR4 カセット: MD2/CD14 カセット: 空ベクター = 1:4:15 (総プラスミド量 1 μ g/well)。白抜き: 無刺激, 斜線: 12.5 ng/ml LPS 刺激。

LPS非依存的に認められる恒常的な活性化能は保たれていた (Fig. 2C). TLR5に関して、現在、実験の準備を進めている。

考察

本プロジェクトは、一次構造や機能が類似するマウスTLR4とTLR5は、同様の活性化機構を利用しているとの仮説をもって開始した。マウスTLR5をモデル受容体として解析し、細胞膜に分布するTLR一般の活性化機序を分子レベルで解明するのが当初計画であった。TLR4は、細胞外ドメインの補助タンパク質因子としてMD2やCD14を利用していることが知られ、解析を進めるためにはこうした分子の共発現系を構築する必要がある。また、TLR4は形質膜に発現するだけでなく、エンドソーム膜にも分布することができ、細胞内での場所によって、細胞内情報伝達経路を使い分けていることも知られている。これに対して、マウスTLR5は形質膜に分布する受容体で、補助タンパク質因子を要求しない。このため、実験系の単純化を考え、マウスTLR5を研究対象に採用した。HEK293細胞はマウスTLR5を単独で遺伝子導入することによって、リガンドであるフラジェリンに反応するようになる。これまでの実験結果は、予想に反し、マウスTLR4とTLR5の違いを顕著とするものであった。現在では、マウスTLR4とTLR5の異なる分子機序による活性化を念頭において実験を進めている。

一般に、リガンドと会合したTLRは受容体の2量体を形成し、細胞内情報伝達を開始すると考えられている。TLR細胞外ドメインは600アミノ酸残基以上

から構成され、ロイシンリッチリピート (LRR) の繰り返しによって、単量体で馬蹄形の立体構造を取っている²⁾。これまで知られているTLR細胞外ドメインの結晶構造解析の結果から、1分子のリガンドが2分子のTLR細胞外ドメインと相互作用し、2つのTLR細胞外ドメインが点对称の配置をとるリガンド受容体複合体モデルが提唱されている。このモデルでは、TLR細胞外ドメインのC末端、すなわち、細胞膜貫通部位との接合部の位置は2つのサブユニット間で相対的に固定されている。その結果、1回膜貫通部位によって連結された2分子の細胞内情報伝達TIRドメイン (200アミノ酸残基程度) の相対的位置も細胞外ドメインの複合体形成によって固定されると考えるのが妥当で、その位置が細胞内情報伝達複合体の形成にとって重要であると想像されている。現時点では、TLRと細胞内情報伝達複合体すべてを含む構造体としての立体構造は実験的には報告されていない。このため、2つのTIRドメインが1つの細胞内情報伝達複合体に含まれるのか、各々が1つの複合体を形成させるのかも含め、実証的な議論は困難である。マウスTLR4の膜貫通部位の長さを改変した変異体が野生型と同様のLPS反応性を示したことは、1) 2分子の細胞内TIRドメインの相対的位置は細胞内情報伝達機構の活性化に重要ではない、あるいは、2) マウスTLR4細胞内の高次構造に自由度があり膜貫通部位長さの変異による位置変化を相殺できる、可能性を示している。2)は、仮定されている高次構造の自由度が、野生型受容体での活性制御を困難にさせると考えられる。1)の方が高適合度と考えているが、この場合、1つのTIRドメイン

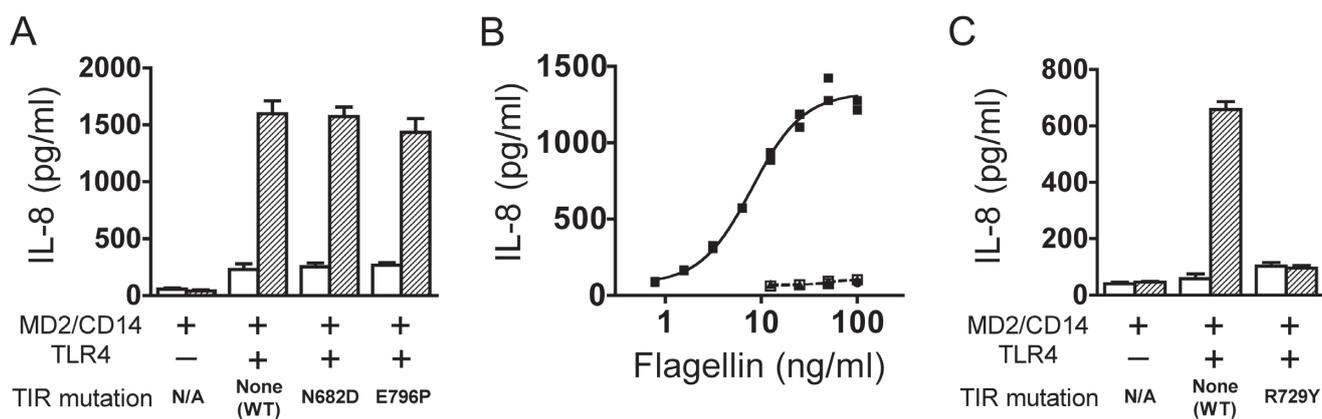


Fig. 2. 細胞内情報伝達 TIR ドメイン変異体のリガンドに対する反応。A: マウスTLR4。トランスフェクションベクター重量比, TLR4カセット: MD2/CD14カセット: 空ベクター = 1:4:15 (総プラスミド量 1 μ g/well)。白抜き: 無刺激, 斜線: 12.5 ng/ml LPS 刺激。B: マウスTLR5。トランスフェクションベクター重量比, TLR5カセット: 空ベクター = 1:9 (総プラスミド量 1 μ g/well)。野生型マウスTLR5 (■) 以外はフラジェリンに対する反応を認めなかった。D718N (●), P834E (▲) 変異体のプロットは、空ベクター導入細胞 (□) のデータ点と重なっている。C: マウスTLR4。トランスフェクションベクター重量比, TLR4カセット: MD2/CD14カセット: 空ベクター = 1:10:89 (総プラスミド量 1 μ g/well)。白抜き: 無刺激, 斜線: 10 ng/ml LPS 刺激。

が1つの細胞内情報伝達複合体に含まれるモデルが示唆される。今後の実験による検証が必要である。対照的に、マウスTLR5では、膜貫通部位の長さに対する変異がリガンドに対する応答性を失わせるため、これまでのところ、従来の活性化機序モデルと整合性をもって解釈可能である。

細胞内情報伝達TIRドメイン中のアミノ酸残基の点変異によっても、マウスTLR4とTLR5の違いが浮き彫りとなった。それぞれが一次構造上相同の位置にあるマウスTLR4のN682, E796残基、マウスTLR5のD718, P834残基の交換変異体は、マウスTLR4ではリガンド応答性が野生型と違いを認めなかったのに対して、TLR5ではリガンドに反応しなくなっていた。MyD88, Malなど、他のTIRドメインをもつ細胞内タンパク質と会合体を形成することが、細胞内情報伝達の第一段階であると考えられている。TLR4とTLR5は、細胞内TIRドメインの異なる部位を使って、他のTIRドメインタンパク質と会合し、情報伝達をおこなっている可能性がある。マウスTLR4とTLR5で細胞内情報伝達複合体の形成過程が異なっていることを示唆するものと考えられる。

マウスTLR4はリガンド非依存的に細胞内情報伝達系を活性化することが知られている。この構成的な情報伝達機能は、細胞外ドメインを削り込んだ変異体で増強されることも知られている^{9,10}。こうした構成的な情報伝達機能は、TLR4のTIRドメイン固有の作用であり、単量体での細胞内情報伝達機能を示唆している。マウスTLR4のR729残基の点変異体が、構成的情報伝達機能を保持したままLPS感受性を失っていることは、LPS刺激時と構成的、2つの情報伝達機能が、異なった機序でおこなわれている可能性も考えさせる。現在、マウスTLR5の対応する変異体の構築や、マウスTLR4の構成的情報伝達機能のみを欠失した変異体をスクリーニングするための変異体の構築など、さらなる変異体の調製を進めている。

マウスTLR4とTLR5の類似性を利用して解析を進める当初の計画は、マウスTLR4とTLR5の相違点を際立たせる方向へ変化した。TLR4は、グラム陰性菌の細胞壁成分である内毒素LPSをリガンドとするのみならず、宿主由来の数多くの内在リガンドによっても活性化されることが知られている。タンパク質、リポ多糖、ムコ多糖、リン脂質、脂肪酸など、多様な化学型と分子量をもつ物質を認識し、細胞内情報伝達系を活性化する機序は分子レベルで未解明である^{1,11}。本プロジェクトで構築した多様なマウスTLR4変異体は、リガンドごとの活性化機構の違いを見いだすためにも利用可能である。こうした実験結果の蓄積により、TLR活性化機構分子モデルが構築でき、

TLRの生理的役割、病態における機能の解明に有用な情報を提供できると考えている。

引用文献

- 1) Kawai T and Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-84.
- 2) Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H and Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009;458:1191-5.
- 3) Lin SC, Lo YC and Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 2010;465:885-90.
- 4) Gay NJ, Gangloff M and O'Neill LA. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol* 2011;32:104-9.
- 5) Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol* 2005;6:571-8.
- 6) Martin A, Toselli E, Rosier MF, Auffray C and Devignes MD. Rapid and high efficiency site-directed mutagenesis by improvement of the homologous recombination technique. *Nucleic Acids Res* 1995;23:1642-3.
- 7) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-8.
- 8) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999;162:3749-52.
- 9) Rhee SH and Hwang D. Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase. *J Biol Chem* 2000;275:34035-40.
- 10) Panter G and Jerala R. The ectodomain of the Toll-like receptor 4 prevents constitutive receptor activation. *J Biol Chem* 2011;286:23334-44.
- 11) O'Neill LA, Golenbock D and Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13:453-60.

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

連続切片を用いた立体モデルの作製技術とそのデータベース化

研究代表者 猪股 玲子 (医学部 基礎医学部門 解剖学)

研究分担者 駒崎 伸二*, 高野 和敬*

緒言

生命科学の教育や研究において、人体、胚、器官、組織、細胞、分子などの構造を立体的に示してわかりやすく説明する技術が以前から求められてきた。最近になり、コンピューターの性能の向上や立体構築用のソフトの開発により、人体から分子に至るまで、正確な立体モデルを容易に作製することが可能になった。しかしながら、現状では、それらの技術を用いた教材の作成や、研究における利用は遅れている。その原因の1つが、それらの技術を個人レベルで扱うには、経済的な面と技術的な面に障害があるからである。たとえば、どんなに便利な技術であっても、それらが教育や研究に広く用いられるようにならなければ、その価値は低いと言わざるを得ない。そこで、本研究では、経済的な面と技術的な面の障害を取り除いて、誰もが容易に胚、器官、組織などの3Dモデルを作製できる方法を開発し、解剖学をはじめとした医学教育の教材作成や研究などに利用できるようにすることを目的とした。

材料と方法

ここでは、胚、器官、組織などの立体モデルを作製するために医用のボリュームレンダリングソフトを利用した。医用のボリュームレンダリングソフトはMRIやX線CTの連続画像から人体の構造を立体構築するために用いられているソフトである。つまり、MRIやX線CTの連続画像をプレパラートの連続写真に置き換えて、胚、器官、組織などの立体構造を作製する方法を試みた。その際に用いたソフトは全てフリーで公開されているものを用いた。たとえば、画像処理ソフトのImageJ¹⁾、ボリュームレンダリングソフトのOsirix²⁾ (Mac用)や、MRicroGL³⁾ (Windows用)などである。今回の作業に用いたのはImageJ、

*医学部 基礎医学部門 解剖学

ボリュームレンダリングソフトのRealia (サイバネット社のフリー版、現在は未公開)とOsirix (32ビット版はフリーで64ビット版は一定額の寄付が必要)である。

標本はエポン包埋したものを0.3~1 μmの厚さで連続切片にし、トルイジンブルーで染色した後、1200万画素の一眼レフデジタルカメラで撮影した。顕微鏡撮影された連続切片の写真は、ImageJを用いて正確に整列させた後、ボリュームレンダリングソフトに取り込んで立体モデルを作製した。

結果

我々の方法で作製した胚や組織の立体モデルは、走査型電子顕微鏡による観察像に匹敵するほどの高精細な像であった(図1, 2)。たとえば、ミクロン単位の構造である細胞の突起まで詳細に観察することが可能であった。作製された立体モデルの解像度は、用いた切片の厚さと、撮影された写真の解像度に依存する。そこで、我々は光学顕微鏡で観察可能な0.3 μmの厚さのエポン切片を作製し、対物100倍の油浸レンズ(UPlanSApo, Olympus)で撮影した腎臓の糸球体の3Dモデルを作製した。その結果、毛細血管にまわりついた足細胞の終足(直径が約0.2 μmの細胞突起)まで確認することができた(ここでは写真は示されていない)。つまり、光学顕微鏡の物理的な分解能の限界までの立体モデルの作製が可能であることがわかった。

さらに、今回の方法で作製された立体モデルで特筆すべき点は、今までの光顕や走査型電子顕微鏡などでは不可能なさまざまな観察方法や標本の操作が可能になったことである。たとえば、任意の断面の構造の観察(図3)や、コンピューター上で微小解剖し、邪魔な構造を削除することにより目的の構造を表出(図4, 5)することが簡単にできるようになった。また、色づけも自由にできるので、擬似カラー化した構造により目的の構造を強調して示すことも可能である。

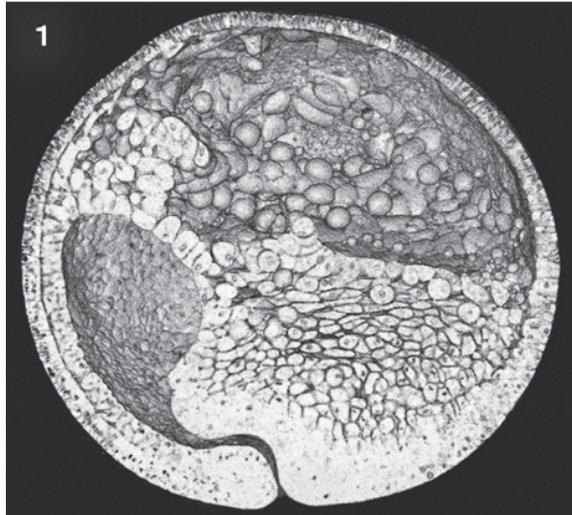


図1. 両生類（アカハライモリ, *Cynops pyrrhogaster*）の原腸胚の断面. 原腸が陥入している時期を示す. 予定中胚葉細胞の活発な移動が見られる.



図2. ニワトリの神経胚の断面.

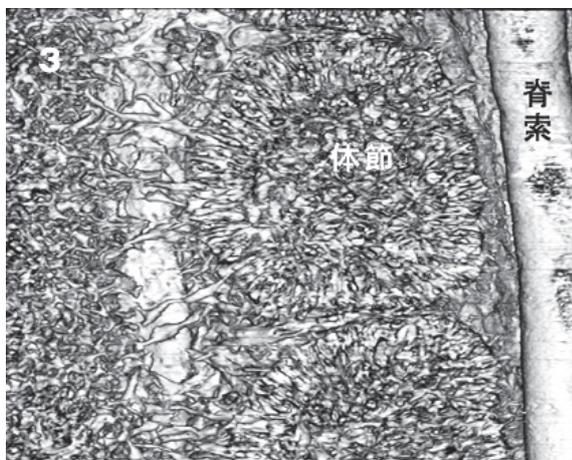


図3. 図2に示したニワトリの胚の点線で示した部分の断面. 断面を背側から見たもので、体節を構成する細胞の詳細な構造が分かる.

考 察

今回の方法で作製された立体構造には連続切片から得られる全ての情報が含まれているので、工夫しだいでは、多様な方法による観察が可能である. たとえば、胚の内部構造を透かして見たり、特定の構造物を強調して示したりすることができる. それと同時に、コンピュータの内部で胚や組織の微小解剖をバーチャルで行うことも可能である. それにより、今までの走査型電子顕微鏡ではできなかった、内部構造の詳細な観察や、見たい内部構造を取り出してみることもできるようになった. このような利点をうまく活用すれば、さまざまな医学教材の作成や研究における応用の発展性が広がると考えられる.

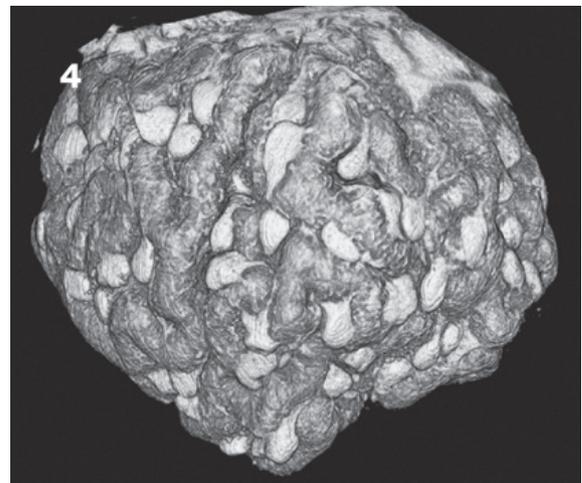


図4. マウスの腎臓の糸球体. 糸球体の周囲の尿細管とボウマン嚢をバーチャル微小解剖で取り除いたもの.

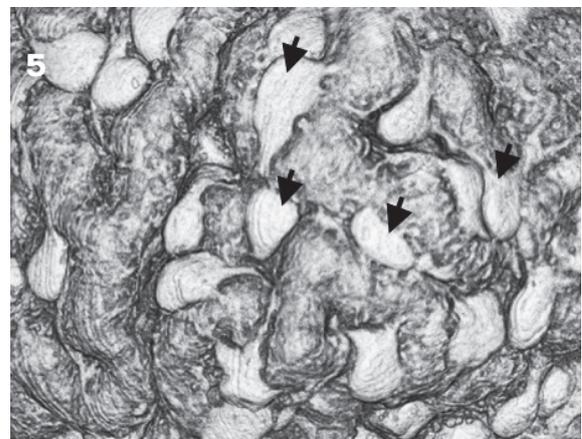


図5. 図4で示した糸球体の拡大図. 突起を伸ばした足細胞（矢印）が毛細血管の周囲ににまわり付いているのが分かる.

また, いったんデジタル化された連続切片のデータは保存と管理が容易になるとともに, 複製によりいくらかでも同じものを増やすことが可能になる. その結果, 標本のデータを世界的な共有財産として教育や研究に幅広く活用することも可能である. しかも, 世界中の教育者や研究者により作製された多くの種類の3Dモデルを1ヶ所に集めてデータベース化し, それらをインターネットで公開すれば, 世界中の教育者や研究者が膨大なデータを自由に利用することができるようになり, それらの教材の利用価値が無限に広がることが期待される.

謝 辞

本研究を進めるにあたり, 立体モデルの作製作業に終始ご協力を頂いた亀澤一助手(解剖学)に感謝いたします.

引 用

- 1) <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- 2) <http://www.osirix-viewer.com/>
- 3) <http://www.mccauslandcenter.sc.edu/microgl/>

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

光操作による情動行動を担う脳リズム回路の解明

研究代表者 向井 秀夫 (医学部 生化学)

緒言

情動はコミュニケーションの基礎であり、情動障害は人が『よく生きる』のに必要なコミュニケーションに重大な問題をもたらす。情動を司る脳部位は、主として大脳皮質下のより古い領域であると考えられている。皮質下の領域は重要であるにも関わらず、回路実体も機能的構造についても解明は著しく立ち遅れている。

脳の神経回路の状態に応じて変化し、回路内あるいは回路間の神経細胞同士の有効な連絡を組織するメカニズムとしてリズム活動が挙げられる。脳においてリズム活動は、マクロレベルでは脳波活動、ミクロレベルでは個々の神経細胞においても観察される。リズム活動の生理的な機能として、シナプスにおける可塑的な変化の促進が挙げられる。本研究課題は、扁桃体の情動神経リズム回路の実体的解明を光遺伝学という新たな操作技術を用いることを長期的ゴールを目指したものであるが、本研究期間においては、そのための基礎づくりとして、扁桃体のリズム生成機構に着目し解析を行った。研究代表者らはこれまでに、情動の中心である扁桃体においてロバストナリズム (0.5 ~ 1 Hz) を見出し、これがドーパミンにより制御されることを示している (Oshiro, et al. *Neuropharmacology* 2011)。

扁桃体は側頭葉の内側に位置し、アーモンド (扁桃) のような形状をした脳部位である (図1)。扁桃体は恐怖や不安に関する記憶の傷害であるパニック障害やPTSD、負の情動記憶の影響が考えられるうつ病といった精神疾患の発生メカニズムに関与している可能性が考えられている。負の情動と扁桃体との関連について多くの研究が行われているが、正の情動にも関わっていることも明らかとなっている。

扁桃体が情動的記憶や学習に対して影響を及ぼすよく知られた例としては、恐怖条件付け学習がある。動物に対し、単独で恐怖反応をひき起すショック (無条件刺激) を、音のような直接的に情動に影響を

与えない中立な刺激 (条件刺激) と組み合わせて与え続けると、中立的な刺激であった条件刺激単独に対しても恐怖反応 (血圧の上昇・頻脈など) を示すようになる。恐怖条件付けの成立に伴い扁桃体神経細胞シナプスで長期増強 (Long Term Potentiation: LTP) が形成される。恐怖条件付け学習は動物だけでなくヒトにおいても成立することが示されている。

別の有名な例としてKlüver-Bucy症候群が挙げられる。扁桃体を含む側頭葉に両側性に障害を与えられたサルは、精神盲情動反応の低下・性行動の亢進といった情動状態の変調を示すことが知られている。

以上のように扁桃体は情動的学習・記憶に深く関与しているということ、脳のリズム活動はシナプスの可塑的な変化の促進に関わっていることから、扁桃体におけるリズム活動の生理学的な機能として情動による記憶の固定や促進が強く示唆されている。

扁桃体をさらに詳しく解剖学的に見ると多くの核が存在する。本研究で着目した基底外側核 (BLA) の細胞種は大脳皮質に似た二種類に大別され、大多数 (~ 80%) を占めるグルタミン酸作動性の錐体神経細胞と、残りの (~ 20%) GABA作動性の介在神経細胞

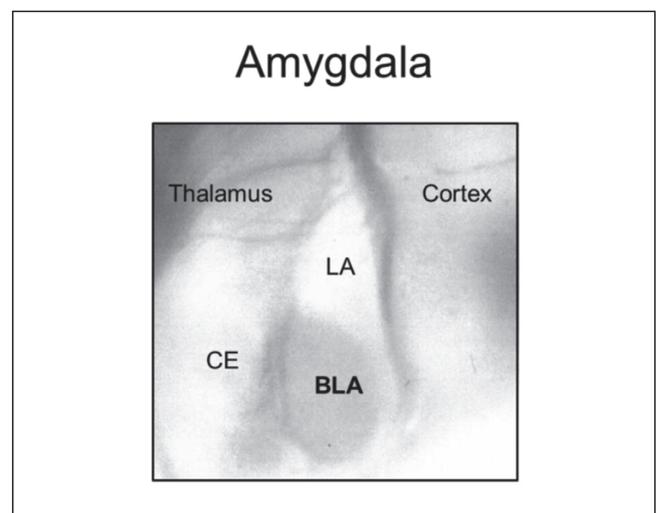


図1.

胞に分類される。錐体神経細胞の軸索はBLA内外の神経細胞に対して投射が見られる一方、GABA作動性の介在神経細胞は局所神経回路の制御において重要な役割を果たしている。

ラット扁桃体基底外側核の錐体神経細胞よりホールセルパッチ記録を行うと、自発的、周期的(0.5～1 Hz程度)振幅の大きい抑制性シナプス後電位/電流(inhibitory postsynaptic potentials/currents; IPSP/Cs)が観察される(抑制性ネットワークリズム)。

このような扁桃体リズムは上述のように生理学的に重要な機能が想定され、かつ疾患との関連も考えられる重要性にも関わらず、その生成機構や神経伝達物質による調節機構については(一部が解明されつつあるものの)、依然として多くの点が不明である。

扁桃体におけるリズム生成メカニズムを明らかにするためには、シナプスレベルでの解析が容易な*in vitro*脳スライス標本を用いたパッチクランプ記録法を用いることが将来の光操作における基礎的な知見の蓄積にとっても有効であると考えられる。

そこで本研究は、扁桃体を含む脳スライス標本においてリズム神経活動が報告されている基底外側核(BLA)錐体神経細胞よりホールセルパッチクランプ法を用いて記録を行い、神経修飾物質によるリズム調節作用、またリズム生成に関与すると思われるイオンチャンネルの作用をシナプスレベルで明らかにすることを目的とした。さらに、リズムの制御において重要な役割を果たすと考えられる介在神経細胞の種類を明らかにするため、介在神経細胞を蛍光タンパク質を用いて可視化した遺伝子改変動物を用い、介在神経細胞からの直接記録を試みた。

材料と方法

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

実験動物には10～19日齢の両性VGAT-Venusラット(群馬大学大学院・医学系研究科・遺伝発達行動学教室の柳川右千夫教授より供与)を用いた。このVGAT-Venusラットは、介在神経細胞に黄色蛍光タンパク質の一種であるVenusを発現させ可視化し、介在神経細胞より選択的に記録を行うことを容易にした遺伝子改変ラットである。

ラットの麻酔はイソフルランを気化させた麻酔ガスにより行った。反射の消失を確認したのちに断頭を行い、脳を損傷しないようできる限り素早く脳を摘出した。脳は直ちに95% O₂ / 5% CO₂混合ガスで飽和した氷冷Na-Choline Chloride置換液中で冷却したのち、ろ紙上に移し中脳よりも前の部分を冠状断で除いた。続いてスライサーのチャンバー上に脳を固定し、チャンバー内を95% O₂ / 5% CO₂混合ガスに

て飽和した氷冷Na-Choline Chloride置換液で満たし、扁桃体を含む冠状断脳スライス(厚さ400 μm)標本を作成した。スライスはさらに左右に切断し、人工脳脊髄液(aCSF: artificial cerebrospinal fluid; 組成: 120 mM NaCl, 3 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 15 mM glucose, 2.5 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂)を回復液として、95% O₂ / 5% CO₂混合ガスで満たされたチャンバー内にて室温で1時間以上静置した。その後スライスを正立型顕微鏡のステージ上のチャンバーへ移し、IR-CCDカメラを通じて細胞体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% O₂ / 5% CO₂混合ガスで飽和した人工脳脊髄液を34～35℃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プラーで加熱して作成、電極抵抗は3～5 MΩ程度とした。電極内液の組成は以下の通り: 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)。

神経細胞からの記録は基底外側核(BLA)より行った。パッチクランプアンプ(Axon Instruments: Axopatch 200B)を用いて膜電位および膜電流を測定し、データはADコンバータ(Axon Instruments: Digidata 1322A)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、大きな細胞体、錐体様の形状、電気生理学的性質によって行った。実際にBL錐体神経細胞で観察された脱分極パルス刺激により生じる特徴的な発火パターン(時間経過と共に発火頻度が低下するパターン)は、先行研究によって示されている特徴とよく一致した。本研究に用いた灌流液・電極内液の条件において、電位を-45 mVに固定することで、イオンチャン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: excitatory post-synaptic current)は内向き電流として、GABA_A受容体を介した抑制性シナプス後電流(IPSC: inhibitory post-synaptic current)は外向き電流として測定されるようにした。

GABA作動性介在神経細胞は、軸索終末から神経伝達物質としてGABA(ガンマ-アミノ酪酸)を放出し出力先の細胞に対して抑制性の伝達を行う。扁桃体においてVenusによる蛍光を持つ細胞がGABA作動性介在神経細胞であることは以前に確認されている。介在神経細胞の同定は、Venusによる蛍光および錐体神経細胞の場合と同様に、脱分極パルス刺激(240 pA, 700 ms)によって生じる発火パターン(Burst/Stutter/Regular/Fast firing)を用いて行った。

結果

扁桃体基底外側核錐体神経細胞からホールセルパッチクランプ法を用いて記録を行うと、複数のIPSCが同期して入力し、積み重なった“Composite IPSC”が

見られた(図2, 図3左). この巨大複合 IPSCは自発的かつ周期的に生じており, 記録時間中を通して(約1~2時間) 0.5~1 Hz程度の頻度で安定して記録された.

記録を行った錐体神経細胞に対するカルバコール(CA)の直接作用を観察したところ, 固定電位(-45 mV)においてCA(10 μM)を灌流することによって, 巨大複合 IPSCが非同期状態に分解することが見出された(図3右). さらにこの後CAの入っていない灌流液で10分間程度CAを洗い流すことによってほぼ完全に巨大複合 IPSCが回復することが判明した.

次に, T型Ca²⁺チャンネルの阻害剤であるmibefradil(20 μM)(図4)とNNC55-396(50 μM)を用いて, 錐体神経細胞のIPSCリズムにおける影響を見た. 2つの阻害剤はリズムの振幅には大きな影響を与えない一方, 振動数を減少させた.

最後に, GABA作動性介在神経細胞の種類を直接ホールセルパッチクランプを行って同定した. 脱分極パルス(240 pA, 700 ms)を加えた時の応答(図5)によって分類を行うと, 12細胞中Regular-firing細胞7個,

Burst-firing, Stutter-firing, Fast-firingが各1個, いずれにも当てはまらない細胞が2個であった(表1).

考 察

我々の研究を含む知見から, 扁桃体の抑制性リズムの発生機構の候補としては, まずGABA作動性の介在神経細胞に対してグルタミン酸作動性の興奮性入力 がされ, 介在神経細胞において周期的な活動電位が生じることで抑制性の神経伝達物質であるGABAの周期的な放出が生じ, それが錐体神経細胞へと伝達

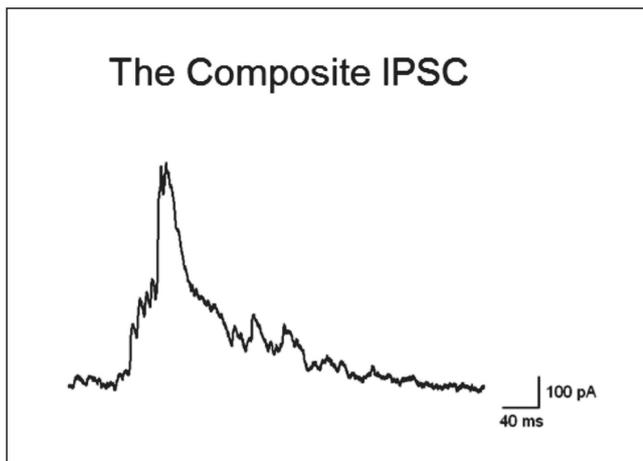


図 2.

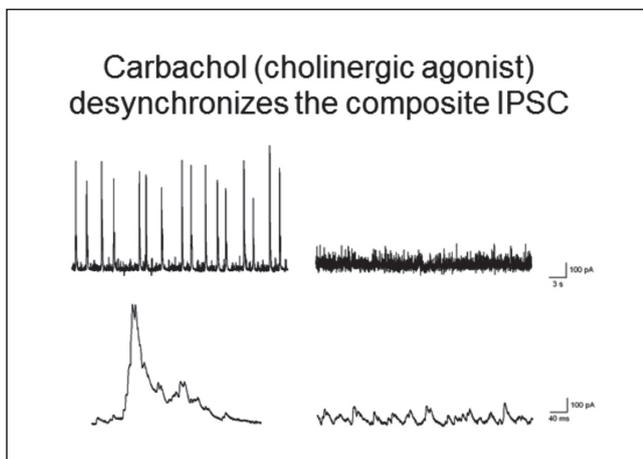


図 3.

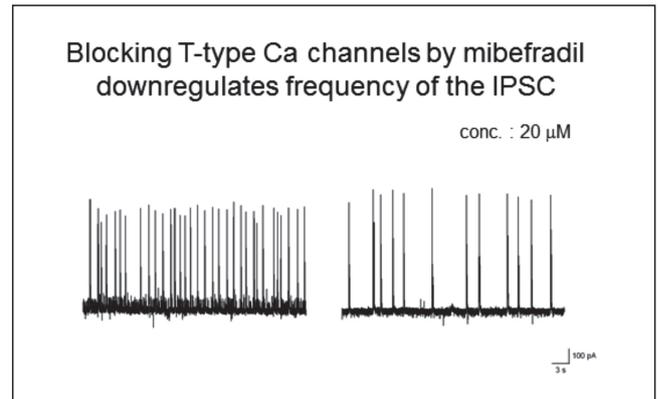


図 4.

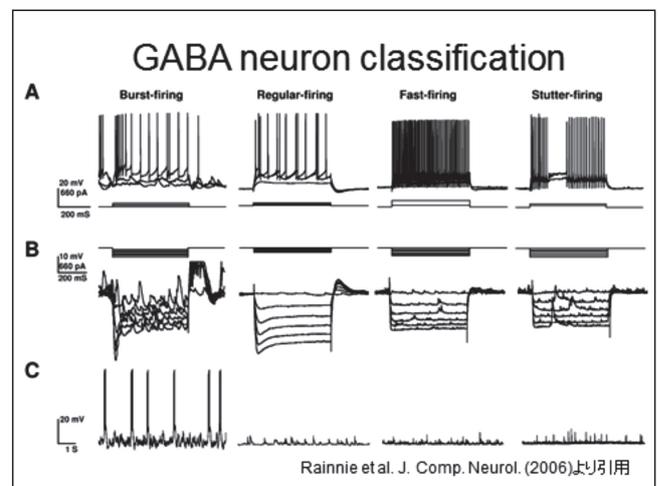


図 5.

表 1.

		GABA neuron summary					
		Burst-firing	Regular-firing	Fast	Stutter	Others	
Periodic AP burst	(+)	1	5	1	1	1	
	(-)		1			1	
	(±)		1				
total		1	7	1	1	2	12

されることによって周期的なIPSC活動が生じているというものが考えられている。

本研究においても複数のIPSCが同期して入力し、積み重なった“Composite IPSC”が見られた。この巨大複合IPSCは生成には複数のIPSC入力が同期して生じると考えられる。アセチルコリン性の刺激物質であるカルバコールの直接作用によって、巨大複合IPSCが非同期状態に分解され、巨大複合IPSCは比較的小さい振幅の個々のIPSCから成ることが改めて確かめられた。この過程は可逆であり、洗い流しによってほぼ完全に巨大複合IPSCが回復することから、行動下でも何らかの要因でアセチルコリンなどの扁桃体内での増加が起きて同期状態が非同期状態に遷移することで、情動学習に影響が及ぶ『窓』のような状態が現出するという機構の存在が推測される。

T型Ca²⁺チャンネルの阻害剤であるmibefradilとNNC55-396は両者共にリズムの振幅には大きな影響を与えない一方、振動数を減少させるという結果を与えたが、振幅と振動数が独立に影響を受ける状況というのは今まで知られておらず、新しい結果と言える。今後他の濃度やチャンネル阻害剤を試すなどで解明が進

むことが期待される。

GABA作動性介在神経細胞の種類はRegular-firing細胞が12個中7個と比較的多数を占めたので、今後神経化学的な同定を併用することでリズム発生機構に迫ることができる可能性がある。また、持続的にバースト発火するBurst-firing細胞が数は少ないものが見いだされたことで、少数の抑制性入力リズムを生成する可能性も残っている。これらの追究には光遺伝学が適しているので、今後必要な整備が行われればより深い結果が得られるであろう。

以上のことから、本研究によって扁桃体抑制性リズムの解明に一步近づくことができたと考えられる。さらに研究が進むことでリズム機構の詳細と行動との因果関係が明らかになることを期待したい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導頂きました医学部生化学・村越隆之教授に厚く御礼申し上げます。また研究代表者の生化学在籍中、様々な面でサポートして下さいました教室の皆様に深く感謝申し上げます。

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

プロスタグランジン類の生理活性調節による神経変性疾患の治療

研究代表者 吉川 圭介 (医学部 薬理学)

諸言

生体のリン脂質膜由来生理活性脂質であるプロスタグランジン (PG) は神経細胞死や神経保護の重要な因子として注目されている。本研究は興奮毒性と多発性硬化症 (MS) における PG 生理活性の解明とそれを基軸とした治療戦略の提唱を目的とした。

興奮毒性における PG 生理活性

脳虚血・てんかん・アルツハイマー病など種々の神経変性疾患に興奮毒性による神経細胞死が関与している。我々はこれまでに、グルタミン酸アゴニストで興奮毒性を引き起こすカイニン酸 (KA) を用い、ラット海馬における脂質メディエーター産生を LC-ESI-MS/MS を用いた網羅的解析により詳細にプロファイルした。脂質メディエーターの中で特に $PGF_{2\alpha}$ 、 PGE_2 、 PGD_2 の産生量が多く、すべてが KA 投与後 1 時間以内に産生の極大を示した¹⁾。さらに非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) を用いた PG 産生阻害試験により、KA 投与後 1 時間以内に産生される PG が 30 日以上も続く持続性神経細胞死に関与し、NSAID の PG 産生抑制により神経細胞死が抑制されることを見出した²⁾。しかし NSAID は律速酵素シクロオキシゲナーゼを阻害し、多種類の PG 産生を同時に抑制するため、各種 PG の種類別な生理活性はいまだ不明なままである。そこで本研究は主要な PG である $PGF_{2\alpha}$ 、 PGE_2 、 PGD_2 が持続性神経細胞死に与える影響を解析した。

多発性硬化症における PG 生理活性

MS は神経軸索を取り巻くミエリンが破壊される脱髄を特徴とした疾患であり、運動麻痺、視力障害、感覚障害などの神経症状が再発と寛解を繰り返す指定難病である。 $PGF_{2\alpha}$ は分娩誘発、平滑筋収縮などの生理活性を持つが中枢神経系における役割は未だ不明な点が多い。我々は $PGF_{2\alpha}$ 産生酵素の脳内発現解析により、髄鞘における局在、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトにおける特異的発現を明らかとした³⁾。本研究は MS における $PGF_{2\alpha}$

生理活性の解明を目的として、FP ($PGF_{2\alpha}$ 受容体) の作動薬・拮抗薬を MS モデルマウスに投与し病態を解析した。

材料と方法

興奮毒性モデルラット

NS-398 は PG 産生の律速酵素 Cyclooxygenase-2 の阻害剤であり、ラット海馬における KA 誘導 PG 産生を阻害する¹⁾。3 週齢雄性ラットに NS-398 (10 mg/kg, 20% DMSO に溶解) を腹腔内投与し、30 分後に KA (10 mg/kg, 生理食塩水に溶解) を腹腔内投与した。さらに 30 分後に $PGF_{2\alpha}$ 、 PGE_2 、 PGD_2 を脳室内投与 (500 ng/5 μ l を両側に投与、溶媒は 0.1% EtOH の生理食塩水) を行った。コントロールラットにはそれぞれ溶媒を腹腔内、脳室内に同様に投与した (Table 1)。30 日まで飼育後、4% パラホルムアルデヒド (PFA) で還流固定後、パラフィン切片 (6 μ m) を作製し、HE 染色により海馬神経細胞死を観察した。

多発性硬化症モデルマウス

8 週齢雄 C57BL/6 マウスを 0.2% クプリゾン (CPZ) を含んだ餌で飼育し、オリゴデンドロサイト特異的細胞死による MS モデルマウスを作製した。 $PGF_{2\alpha}$ 受容体作動薬 (travoprost 脳室内投与, latanoprost 経口投与)、拮抗薬 (AL-8810 脳室内投与) を CPZ 投与開始から 3 週間後に単回投与し、最も顕著な脱髄が起こる 5 週間まで飼育した。マウスを 4% PFA で灌流固定、クライオスタットにより組織染色用切片を作製した。

Table 1. 興奮毒性ラットの投薬プロトコール

	0分	30分後	60分後
V+V+V	20%DMSO/Saline (i.p.)	Saline (i.p.)	0.1%EtOH/Saline (i.c.v.)
V+KA+V	20%DMSO/Saline (i.p.)	KA (i.p.)	0.1%EtOH/Saline (i.c.v.)
NS+KA+V	NS398 (i.p.)	KA (i.p.)	0.1%EtOH/Saline (i.c.v.)
NS+KA+PGE2	NS398 (i.p.)	KA (i.p.)	PGE2 (i.c.v.)
NS+KA+PGF2 α	NS398 (i.p.)	KA (i.p.)	PGF2 α (i.c.v.)
NS+KA+PGD2	NS398 (i.p.)	KA (i.p.)	PGD2 (i.c.v.)

ミエリン量はBlack Gold染色を用い染色の濃度により脱髄レベルを測定した⁴⁾。

結果

PGF_{2α}, PGD₂が持続性神経細胞死に重要

KA投与によりラット海馬においてCA1, CA3において神経細胞死が引き起こされる (Fig. 1). 3週齢ラットにおいて特に神経細胞死が顕著なCA1に着目した。

KA投与の1, 3, 10, 30日後の海馬をHE染色により観察した (Fig. 2). 1日後は空胞変性を主体とした神経変性が見られ, その後の時間では核凝縮を起こした神経細胞死が見られた. KA単回投与後30日以上もCA1で神経細胞死が観察された (持続的神経細胞死)。

KA, NS398, 各種PG投薬30日後の海馬CA1をHE染色により観察した (Fig.3 A: V+V+V, B: V+KA+V, C: NS+KA+V, D: NS+KA+PGE₂, E: NS+KA+PGF_{2α}, F: NS+KA+PGD₂). 溶媒のみを投与した場合は神経細胞死が起こらず, 正常なCA1錐体細胞層が見られる (Fig. 3A). KA単回投与により30日後においても神経細胞死が見られた (Fig. 3B 黒矢印). NS398によりPG産生を抑制した場合は神経細胞死の抑制が見られた (Fig.3C). PGE₂脳室内投与は神経細胞死への影響は見られなかった (Fig. 3D). PGF_{2α}, PGD₂脳室内投与はKA単独投与と同レベルの神経細胞死が見られた (Fig. 3E, F)。

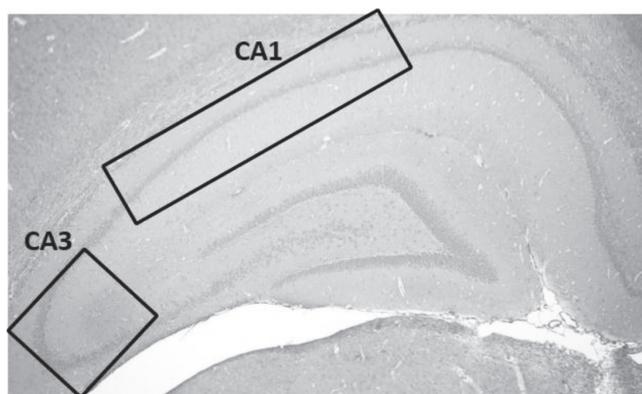


Fig. 1. ラット海馬のHA染色 (V+V+V).

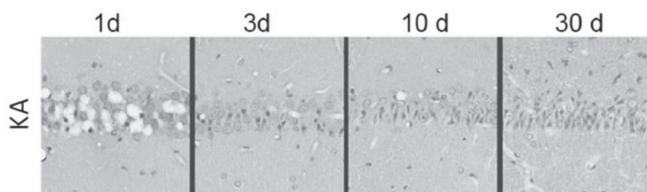


Fig. 2. KA投与後のCA1における神経細胞死.

FP拮抗薬が脱髄を抑制

FP拮抗薬AL8810の脳室内投与によりCPZ誘導脱髄を抑制した (Fig. 4, 5).

FP作用薬であるtravoprost, latanoprostは脱髄レベルに影響しなかった (Fig.6).

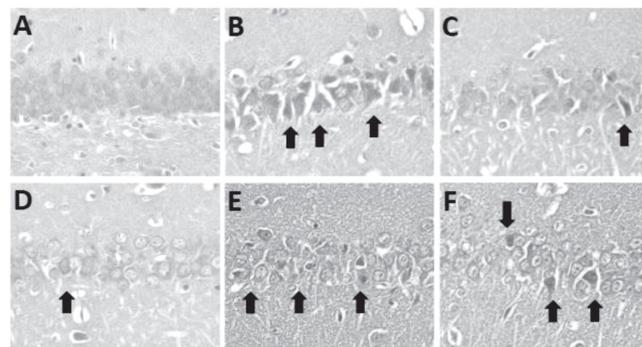


Fig. 3. 投薬30日後の海馬CA1 (HE染色).

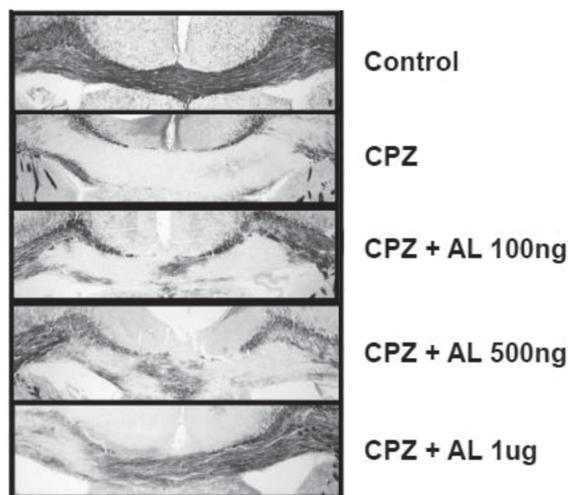


Fig. 4. FP拮抗薬投与後の脳梁のミエリン染色.

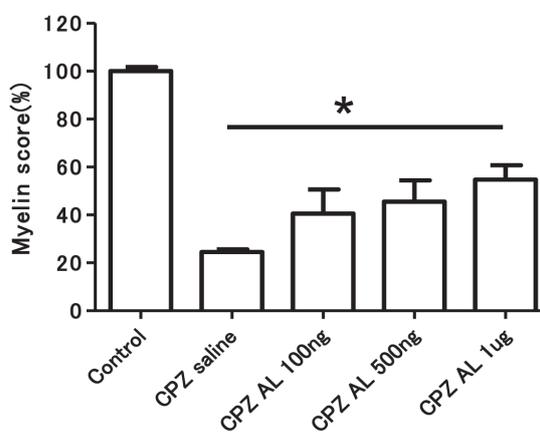


Fig. 5. FP拮抗薬投与後のミエリンレベル.

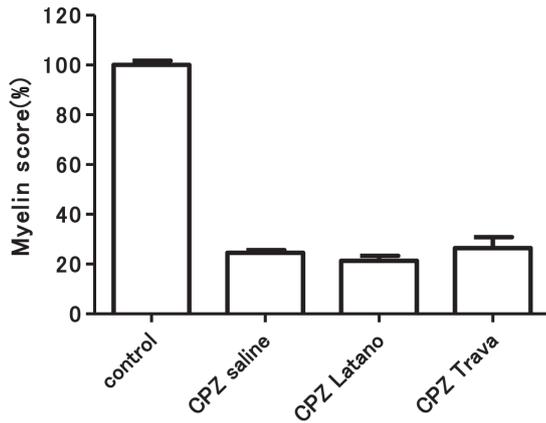


Fig. 6. FP作動薬投与後のミエリンレベル.

考察

KA投与後30日後のラット海馬における持続的神経細胞死において、PGF_{2α}、PGD₂が重要であることが示された。興奮毒性時に産生されるPGがミクログリアを長期間活性化させ持続的神経細胞死を引き起こし、NSAIDによりミクログリア活性化、持続的神経細胞死は抑制される²⁾。ミクログリアは神経毒性・神経保護の両面に働くことが知られているが、PGF_{2α}、PGD₂により活性化されたミクログリアが神経毒性的に働くと考えられる。PGF_{2α}、PGD₂生理活性抑制が興奮毒性誘発神経細胞死の治療に有効であることが示された。

PGF_{2α}受容体の拮抗薬AL8810投与によりCPZ誘導MSモデルマウスの脱髄を抑制した。詳細なメカニズムは不明であるが、オリゴデンドロサイトに発現しているPGF_{2α}合成酵素³⁾により過剰に産生されたPGF_{2α}がオリゴデンドロサイト細胞死に働いていると

考えられる。PGF_{2α}生理活性抑制がMS治療に有効である可能性が示された。

謝辞

本研究の実験実施に協力いただきました薬理学教室の岩佐健介実験助手、特別協力研究員高橋茉莉香博士、大学院生山本梓司君に感謝いたします。実験動物管理にご尽力いただきました実験動物施設の皆様に深謝申し上げます。

参考文献

- 1) Yoshikawa K, Kita Y, Kishimoto K, Shimizu T. Profiling of eicosanoid production in the rat hippocampus during kainate-induced seizure: Dual-phase regulation and differential involvement of COX-1 and COX-2. *J Biol Chem* 2006;281:14663-9.
- 2) Yoshikawa K, Kita Y, Furukawa A, Kawamura N, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, et al. Excitotoxicity-induced immediate surge in hippocampal prostanoid production has latent effects that promote chronic progressive neuronal death. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013;88:373-81.
- 3) Yoshikawa K, Takei S, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Furukawa A, Kawamura N, et al. Preferential localization of prostamide/prostaglandin F synthase in myelin sheaths of the central nervous system. *Brain Res* 2011 Jan 7;1367:22-32.
- 4) Yoshikawa K, Palumbo S, Toscano CD, Bosetti F. Inhibition of 5-lipoxygenase activity in mice during cuprizone-induced demyelination attenuates neuroinflammation, motor dysfunction and axonal damage. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;85(1):43-52.

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

発達期体性感覚野スパイクタイミング可塑性におけるBDNFの役割

研究代表者 伊丹 千晶 (医学部 生理学)

緒言

神経の活動(入力)依存的変化(可塑性)は、神経回路形成、学習、記憶の基本メカニズムに重要な役割を果たすと考えられている。出生直後の神経回路には、過剰な投射が存在するが、これらは発達過程において活動依存的に、必要な投射の強化と不要な投射の除去により成熟した神経回路が形成される。発達期の可塑的な時期を臨界期と呼ぶが、臨界期の可塑性は、臨界期以後の脳機能に多大な影響を与える。たとえば、遺伝性の脆弱性X染色体連鎖症候群、また自閉症、ADHD(注意欠陥多動性障害)などの発達障害は、投射の刈り込みの異常に起因する可能性が推定されている。本研究では、発達期の神経投射の刈り込みのメカニズムを調べた。

材料と方法

投射刈り込みの仕組みを調べるために、定量的な解析が可能なマウスの大脳皮質体性感覚野を用いて、皮質2/3層細胞(L2/3)への、4層細胞(L4)と視床からの投射を調べた。齧歯類体性感覚野では、生後第2週(生後7日~)から3週にかけて、L4細胞はL2/3細胞へと投射を伸長するが、この時、皮質に特徴的なカラムを無視して、隣接カラムへの投射も見られる(過剰投射)。ところが、生後3週目(生後14日)以降、神経活動依存的に、隣接カラムへの投射は刈り込まれ、成熟したカラム状投射の形成が導かれる事が知られている。私たちは、どのようなメカニズムによって、過剰なL4細胞の投射がカラム状投射に編成されるのか、電気生理学および解剖学的手法を駆使して調べた。

実験は、生後7日から25日目のC57BL/6マウスより作製した視床(後内側腹側核)―第1次体性感覚野皮質間連絡線維を保持した急性切片標本(thalamocortical slice)を用いて行った¹⁾。刺激電極を入力線維(視床または皮質4層)に置き、皮質第2/3層の興奮性細胞(錐体細胞)からパッチクランプ法を用いて、刺激

により誘発されるシナプス電位を電流固定下で記録した。まず細胞内通電による発火特性を調べ、興奮性細胞であることを確認した。実験後、記録細胞を形態学的に解析する目的で、電極内にはニューロビオチンを封入した。

結果および考察

スパイクタイミング依存性可塑性

体性感覚野の可塑性発現には、皮質第4層から皮質第2/3層への投射(L4→L2/3)が重要な役割を果たすと考えられているが、この投射は、生後2週目において過剰な投射が形成され、臨界期(生後12日目~14日以降)には、活動依存的な「投射の刈り込み」がおこる。一方で、長期増強(LTP)や長期抑圧(LTD)等の可塑的变化が軸索投射の編成をもたらすことは広く知られているが、このL4→L2/3投射の刈り込みには、可塑性の方向と程度がシナプス前細胞(L4細胞)とシナプス後細胞(L2/3細胞)の正確な発火タイミングに依存する、スパイクタイミング依存性可塑性(STDP: spike timing-dependent plasticity)のうち、ポスト-プレタイミング刺激による長期抑圧LTDが重要であると考えられている²⁾。以前、我々は、生後2週目のL4→L2/3において、従来のSTDPとは異なり、発火順序に無関係にLTPだけが誘導されるSTDP-LTPであり、このような可塑性の下では過剰な軸索形成が起こる可能性を示した³⁾。

スパイクタイミング依存性長期抑圧STDP-LTDにはCB1Rが必要である

大麻の有効成分であるカンナビノイドCBは、近年、脳内に広範に分布する逆行性の神経伝達物質として注目を受けた⁴⁾。一方、4層から2/3層間(L4→L2/3)におけるSTDP-LTDは、CB依存性であることが知られていた⁵⁾。上述のように、生後2週目の動物ではL4→L2/3間投射には従来とは異なるSTDPが発現し、LTDが見られないことを明らかにしたが、STDP-LTDの欠落は、L4→L2/3投射におけるカンナビノイド受容体CB1が発現していないことによるものであることを

電気生理実験, および組織免疫実験により示した。これらの結果は, P14以降にL4神経終末が「CB感受性を獲得することによってLTDを発現し, これによりカラムを超えた投射の刈り込みがおこる」ことを示した。

視床からL2/3への投射線維のスパイクタイミング依存性長期抑圧STDP-LTD

視床からの投射線維は皮質第4層に投射されるが, 生後初期では皮質2/3層まで広がっており, その後の刈り込みによりL4に次第に限局されてくることを見出した。また, この時期(P9-12)にはL4→L2/3におけるSTDPとは逆向きのSTDPが視床-2/3層間シナプスに誘導されることを見出した。これはタイミング依存的にLTDだけが誘導され, さらにプレ, ポストの時間差が近いほどLTDの程度が強いものであった。またこのSTDP-LTDもCB依存性であった。従って, 前述の視床→L2/3への過剰投射も, CB依存性にLTDを介して刈り込まれる可能性が推定され, STDP-LTDが, L4→L2/3投射の形成に重要な役割を果たすと考えられる。

以上より神経回路形成には複数の可塑性が関与しており, 可塑性の障害は回路形成に混乱をもたらす可能性が高い。従って, そのメカニズムを明らかにし, 制御することが可能となれば, 学習, 記憶を制御する薬物の開発等も視野に入ることが期待され, さらにハビリテーション時の効果的投薬の開発などにも発展すれば, 社会的貢献が期待できる。

引用文献

- 1) Itami C, Samejima K, Nakamura S. Improved data processing for optical imaging of developing neuronal connectivity in the neonatal mouse barrel cortex. *Brain Res Brain Res Protoc* 2001;7:103-14.
- 2) Feldman DE. Timing-based LTP and LTD at vertical inputs to layer II/III pyramidal cells in rat barrel cortex. *Neuron* 2000;27:45-56.
- 3) Itami C, Kimura F. Developmental switch in the spike timing-dependent plasticity at layers 4-2/3 in the rodent barrel cortex. *J Neurosci* 2012;32:15000-11.
- 4) Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Ogata H, Emoto K, Maejima T, Araishi K, Shin HS, Kano M. Phospholipase Cbeta serves as a coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron* 2005;45:257-68.
- 5) Bender VA, Bender KJ, Brasier DJ, Feldman DE. Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J Neurosci* 2006;26:4166-77.

研究成果リスト

論文

- 1) Adachi N, Numakawa T, Kumamaru E, Itami C, Chiba S, Iijima Y, Richards M, Katoh-Semba R, Kunugi H. Phencyclidine-induced decrease of synaptic connectivity via inhibition of BDNF secretion in cultured cortical neurons. *Cerebral Cortex* 2013;23:847-58.
- 2) Itami C, Kimura F. Developmental switch in the spike timing-dependent plasticity at layers 4-2/3 in the rodent barrel cortex. *J Neurosci* 2012;32:15000-11.

学会発表

- 1) Itami C, Kimura F. Cooperative heterosynaptic interaction of spike timing-dependent plasticity in the developing barrel cortex, 42th Annual meeting of society for Neuroscience, October 2012, USA
- 2) 中尾啓子, 伊丹千晶, 山田真弓, 木村文隆. 子宮内電気穿孔法により遺伝子導入された大脳皮質体性感覚野抑制性神経細胞の電気生理学的・神経化学的解析, 第35回日本神経科学大会, 平成24年9月, 名古屋
- 3) 木村文隆, 伊丹千晶. 発達期バレル皮質2/3層錐体細胞への2つの異なるスパイクタイミング依存性可塑性とその相互, 第35回日本神経科学大会, 平成24年9月, 名古屋
- 4) Kimura F, Itami C. Developmental switch in the spike-timing dependent plasticity contributes to the initiation of the critical period in the barrel cortex, The 8th FENS Forum of Neuroscience, July 2012, Spain

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

TRPM1 チャンネルを介した網膜内シナプス伝達は
体温で最適化されているのか？

研究代表者 田丸 文信 (医学部 生理学)

緒言

ほ乳類の網膜では、桿体視細胞からの光情報は桿体入力型双極細胞へ伝達され、その後AIIアマクリン細胞を介して、網膜出力細胞である神経節細胞に送られ脳へ伝達される。桿体視細胞が光を受容しグルタミン酸を放出するまでの細胞内カスケードは詳しく調べられているが、桿体入力型双極細胞に関しては不明な点が多い。桿体入力型双極細胞の樹状突起には代謝型グルタミン酸受容体であるmGluR6が発現しており、光刺激によってG蛋白系のカスケードを介して下流の非選択性陽イオンチャンネルが開くことはわかっていたが、主要なセカンドメッセンジャーや非選択性陽イオンチャンネルそのものが何であるかは不明であった。

しかし近年、TRPチャンネルの1つであるTRPM1が桿体入力型双極細胞の樹状突起に発現していること、および、TRPM1を欠損させたマウスでは暗所視における網膜電図のb波(桿体入力型双極細胞由来)が消失してしまうことから、TRPM1チャンネルが桿体入力型双極細胞の非選択性陽イオンチャンネルであることが報告された^{1,2)}。一部のTRPファミリーには温度感受性があり、チャンネル単体で温度感受性があるものとリガンドと共に温度感受性を示すものが知られているが、TRPM1はチャンネル単体では温度感受性を示さないことがわかっている³⁾。

我々は予備実験で桿体入力型双極細胞のシナプス後細胞であるAIIアマクリン細胞からEPSCを記録し、温度との関係を調べた。その結果、室温付近ではEPSCはあまり観察されなかったが、体温付近ではEPSCの振幅と頻度が有意に増大した。ほ乳類から網膜電図を記録する際、体温付近でないとはb波が観察できないことは古くから知られており、これは我々の予備実験の結果と合致する。すなわち、少なくともほ乳類の桿体入力型双極細胞では、体温がシナプス伝達における重要な因子の1つであることが考えられる。

TRPM1だけをembryoに過剰発現させても温度依存的な開口確率の増大が見られないこと⁴⁾、および、我々の行った2つの予備実験「桿体入力型双極細胞の温度依存性内向き電流の非定常状態におけるノイズ解析では34℃をピークにした凸型のグラフが描けた」と「細胞内蛋白をwash outする記録法(ホールセル・パッチクランプ法)では桿体入力型双極細胞の温度依存性の脱分極が消失した」ことから、温度上昇による代謝の亢進だけでAIIアマクリン細胞のEPSCの振幅と頻度の劇的な増大が起こるとは考えにくく、何らかのTRPM1の細胞内リガンドが存在している可能性が高い。実際に、TRPファミリーの中にはカンナビノイドやアラキドン酸代謝物などの細胞内外の内在性リガンドによって温度感受性が相乗的に増大することが知られている⁵⁾。

以上の先行研究と予備実験の結果から、我々は「桿体入力型双極細胞に発現しているTRPM1チャンネルが細胞内リガンドを必要とする温度依存性チャンネルであり、それに起因して桿体入力型双極細胞が温度的にグルタミン酸を放出することができる」という仮説を立て、検証した。

材料と方法

マウス(野生型とTRPM1欠損マウス)をエーテル麻酔した後、眼球を摘出し、網膜を取り出して厚さ200 μmのスライス標本を作製した。灌流液の温度を変えて、網膜スライス中のAIIアマクリン細胞および桿体入力型双極細胞からホールセル・パッチクランプ法(voltage-clampおよびcurrent-clamp mode)を用いて記録し解析をおこなった。桿体入力型双極細胞からはAmphotericin Bを使用した穿孔パッチクランプ法でも記録をした。実験は全てroom lightの下でおこなった。実験に用いたブロッカー類は以下の濃度で投与した: 20-40 L-AP4; 20-50 CNQX; 100 bicuculline; 1 strychnine; 200 meclofenamic acid (in μM)。

結 果

灌流液の温度を18℃から36℃付近へ上げると、杆体入力型双極細胞の膜電位は約22 mV/10℃の割合で脱分極した(17～18℃で-98～-42 mV→29～36℃で-62～-24 mV)⁶⁾。このとき、AIIアマクリン細胞(holding potential = -63 mV)ではEPSCの頻度と振幅が劇的に増大し、流入してくる電荷量が3倍以上になった(98→305 pC)⁶⁾。このEPSCはCNQXで消失することと逆転電位が約0 mVであることから、グルタミン酸入力であることが推測できる⁶⁾。ON型の双極細胞に特異的に発現しているmGluR6のagonistであるL-AP4を投与したところ、AIIアマクリン細胞のEPSCが温度にかかわらずほぼ完全に消失したが、bicucullineやstrychnine, meclofenamic acidの存在下ではほとんど抑制されなかった⁶⁾。これらのことから、実験条件下で見られたAIIアマクリン細胞の温度依存性EPSCは杆体入力型双極細胞由来であると考えられる。

L-AP4の存在下で灌流液の温度を20℃から35℃に上げながら、杆体入力型双極細胞から膜電位の変化を記録した時、ホールセル・パッチクランプ法ではコントロールとほとんど変わらなかったが、穿孔パッチクランプ法では温度を35℃に上げて10 mVほどしか脱分極しなかった⁶⁾。この結果は、杆体入力型双極細胞内にはTRPM1チャンネルを閉じさせるためのリガンドが存在している可能性を示唆している。また、TRPM1欠損マウスのAIIアマクリン細胞からEPSCを記録しても、温度によって頻度や振幅は変わらなかった⁶⁾。

以上の結果から、1) AIIアマクリン細胞の温度依存性EPSCは杆体入力型双極細胞由来であること、2) 杆体入力型双極細胞内のmGluR6-TRPM1チャンネルのカスケードが温度依存性であり、室温よりも体温付近のほうが神経伝達物質放出量のダイナミックレンジが広いこと、3) TRPM1チャンネルの開口確率が細胞内リガンドと温度によって制御されている可能性が高いことがわかった。

考 察

ほ乳類は恒温動物なのでヒトやマウスではTRPM1チャンネルの開口確率が大きく変化しているとは考えにくく、杆体入力型双極細胞-AIIアマクリン細胞間のシナプス伝達は体温によって常に最適な状態で働く

ようになっていると思われる。TRPファミリーの中には細胞内リガンドを必要とする温度依存性チャンネルが複数存在すること、および本研究結果から、TRPM1チャンネルもその1つである可能性が極めて高いことが考えられるが、今回は細胞内リガンドの特定までには至らなかった。TRPM1チャンネルについては温度依存性を含め不明な点が多いため、今後は候補となる細胞内リガンド(Gタンパクなど)の特定、および、そのリガンドが温度依存性に及ぼす効果を検証し、杆体入力型双極細胞における温度依存性グルタミン酸放出のメカニズムを解明して、その生理的意義を明らかにしたい。

論文投稿前のため、データの掲載を控えさせて頂きました。

研究成果リスト

- 1) 田丸文信, 戸塚博子, 渡辺修一. 杆体入力型双極細胞からAIIアマクリン細胞へのグルタミン酸放出の制御: 温度依存性TRPM1チャンネルの関与?, 第16回視覚科学フォーラム研究会, 2012年8月, 埼玉

引用文献

- 1) Shen Y, Heimel JA, Kamermans M, Peachey NS, Gregg RG, Nawy S. A transient receptor potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells. *J Neurosci* 2009;29(19):6088-93.
- 2) Koike C, Obara T, Uriu Y, Numata T, Sanuki R, Miyata K, et al. TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(1):332-7.
- 3) Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003;426:517-24.
- 4) 小池千恵子, 瓜生幸嗣, 宮田健太郎, 子安俊行, 谷昭子, 他. 網膜ON型双極細胞におけるTRPM1の機能, 第31回日本神経科学大会, 2008年, 東京
- 5) Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001;413:203-10.
- 6) 田丸文信, 戸塚博子, 渡辺修一. 杆体入力型双極細胞からAIIアマクリン細胞へのグルタミン酸放出の制御: 温度依存性TRPM1チャンネルの関与?, 第16回視覚科学フォーラム研究会, 2012年8月, 埼玉