

学内グラント 報告書

平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

## 生理活性物質をリード化合物とする構造展開による 多発性骨髄腫の新規分子標的薬の開発

研究代表者 佐川 森彦（総合医療センター 血液内科）

研究分担者 木崎 昌弘<sup>\*</sup>，得平 道英<sup>\*</sup>，根本 朋恵<sup>\*</sup>，富川 武樹<sup>\*</sup>

### 緒言

多発性骨髄腫は、高齢者に多いB細胞性リンパ系腫瘍の一つであり、現状では治癒の期待出来ない難治性の予後不良の造血器腫瘍である。高齢化社会を迎え、今後ますます患者数は増加することが予測され、治癒を目指した治療法の確立が望まれている。多発性骨髄腫の標準的治療は化学療法であるが、現状では一時的に病勢の沈静化がもたらされるものの、治癒に至る患者は稀である。進行は緩徐であるが10年以上の長期生存は極めて稀で、多くの患者は寛解と再発・再燃を繰り返しながら、最終的には治療抵抗性となって死亡する。加えて、貧血、腎障害、骨病変などの合併症を高頻度に併発するため、高齢の患者では生活の質(QOL)が著しく損なわれる事も大きな問題である。近年、自家及び同種造血幹細胞移植による治療が施行されてはいるものの、対象患者が高齢であることや、適切なドナーが存在しないことなどにより、実際には造血幹細胞移植の適応にならないことが多く、更に同種造血幹細胞移植は、現状ではまだ実験的治療の域を出ていない。最近、多発性骨髄腫の分子病態に基づいて、血管新生阻害作用を有するとされるサリドマイド、プロテアソーム阻害作用を有するとされるボルテゾミブ、更にはサリドマイド誘導體であるレナリドマイドなど新規薬剤による治療法が導入され、治療成績は向上しているが、治療効果は一過性であり、これらの新しい治療薬を用いても、未だに生存率を延長し、治癒を望むことは困難である。したがって、高齢化社会の到来ともあわせて、多発性骨髄腫の患者が増加している現在、高齢者にも適応可能な、生体への侵襲が少なく、抗がん剤治療、移植治療に変わる全く新しい概念の治療法の新規開発が切望されている。

われわれは東京大学分子生物学研究所有機化学

<sup>\*</sup>総合医療センター 血液内科

研究部門 橋本祐一博士の協力のもと、これまでにサリドマイドの薬理作用から多くの薬物標的を仮想して構造展開することにより、当該の薬物標的に対する特異的な医薬リード化合物を多数創製できる可能性を検証し、新規微小管重合阻害薬2-(2,6-Diisopropylphenyl)-5-hydroxy-1H-isoindole-1,3-dione (5HPP-33)が多発性骨髄腫の新規治療薬となりうることを明らかにした(Iguchi T, et al. Int J Mol Med 2008;21:163-8/ Noguchi T, et al. Bioorg Med Chem Lett 2005;15:321-5)。

このような背景の中で、京都大学大学院農学研究科 村上明博士より供与された生理活性物質1'-Acetoxychavicol acetate (ACA)は、東南アジアに自生するショウガ科植物 *Languas galanga*に由来する成分であり、われわれはこれまでACAが急性骨髄性白血病に対し、ミトコンドリア経路及びFas経路を介してアポトーシスを誘導すること(Ito K, et al. Clin Cancer Res 2004;10:2120-30)、多発性骨髄腫に対し*in vitro*および*in vivo*でNF- $\kappa$ Bの核内移動を抑制することでアポトーシスを誘導すること(Ito K, et al. Cancer Res 2005;65:4417-24)、及びTRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)の活性化を介してアポトーシスを誘導すること(Ito K, et al. Biochem Biophys Res Commun 2005;338:1702-10)などを明らかにしてきた。

これらの研究結果に基づき、橋本祐一博士の協力のもと、われわれはACAをリード化合物として構造展開することで得られた、種々の化合物の構造と生物学的活性の相関を検証し、造血器腫瘍の新規治療薬として用いることを検討している。すでに、急性白血病に対しては、我々はACAを展開して得られた化合物の数種が増殖抑制効果を示すことを明らかにした(Misawa T, et al. Chem Pharm Bull 2008;56:1490-5)。本研究は、これまでに得られた豊富な科学的研究成果を基に、ACAを骨格に構造展開し得られた化合物を用い、

多発性骨髄腫の分子病態に即した新規治療薬を開発し、実際の臨床応用を目指した基礎検討を目的とする。

## 材料と方法

### 1. 候補化合物の作製, 調整

ACAをリード化合物として構造展開し得られた種々の化合物は、東京大学分子生物学研究所有機化学研究部門 橋本祐一博士より、すでに同研究室で報告された候補物質 (Misawa T, et al. Chem Pharm Bull 2008;56:1490-5) より、白血病細胞 HL-60においてより低濃度での抗腫瘍効果が認められた TM-233 を選択した。

### 2. 骨髄腫細胞の調整

U266, RPMI8226, OPM2, MM-1S などの骨髄腫細胞株は ATCC から入手し、10% FCS 添加 RPMI1640 培地にて培養した。更に、ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞株である KMS-11/BTZ, OPM-2/BTZ を名古屋市立大学大学院医学研究科腫瘍・免疫内科学分野及び協和発酵キリン株式会社との共同研究により入手し (Ri M, et al. Leukemia 2010;24:1506-12), 同様の条件下で培養を行った。

### 3. 候補化合物の *in vitro* における効果, 体内動態の解析

ACA を構造展開して得られた化合物の骨髄腫細胞に対する効果を検討した。MTS アッセイ, 細胞周期解析に加え, Annexin-V 法, Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) などを用いて, アポトーシス誘導について詳細に検討した。さらに, アポトーシス誘導機構を分子生物学的に解析し, 骨髄腫細胞に対する増殖抑制におけるシグナル伝達機構, 特に候補化合物の NF- $\kappa$ B や IL-6 (JAK/STAT) など骨髄腫の増殖制御に関係する種々のシグナルに対する作用を ELISA 法や Western blot 法を用いて検討した。

また, ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞株に対する解析も同様に行い, 特に耐性株に特異的なシグナル伝達機構について解析を行い, 耐性克服のメカニズムについ

での検討を行った。

## 結果

### 1. 各種骨髄腫細胞に対する抗腫瘍効果の検討

U266, RPMI8226, OPM2, MM-1S 細胞における TM-233 の抗腫瘍効果を図 1 に示す。各細胞にて ACA と比較して, TM-233 はより低濃度でより細胞増殖抑制を認めた。続いて, 増殖抑制がアポトーシスであるか否かについて検討し, Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH), Giemsa 染色による形態, Western blot 法において, アポトーシスの像が認められた。

### 2. 抗腫瘍メカニズムの解析

多発性骨髄腫の増殖・分化において重要なメカニズムとされる JAK/STAT 経路が, TM-233 による抗腫瘍メカニズムに関連しているか否かを解析した。図 2 の通り, Western blot 法による解析にて, JAK2 及び STAT3 の蛋白発現低下を認めた。興味深いことに JAK2/STAT3 下流の分子のうち, *mcl-1* の発現が低下したものの, 同様の分子である *bcl-2* 及び *bcl-xL* は発現の変化が認められなかった。免疫沈降法などによる更なる解析が必要であるものの, JAK2/STAT3 に加え下流の *mcl-1* の関与が考えられた。

また, NF- $\kappa$ B の関連について ELISA 法を用いて解析し, TM-233 は ACA と比較しても, 少なくとも同等なレベルで NF- $\kappa$ B の活性を抑制した。

### 3. Bortezomib 耐性細胞株への効果

名古屋市立大学腫瘍免疫内科 飯田真介先生, 李政樹先生らが樹立した bortezomib 耐性骨髄腫細胞株 KMS-11/BTZ 及び OPM2/BTZ をご供与頂き, TM-233 の耐性株への効果を検討した。

図 3 の通り, 耐性株では TM-233 に対する抗腫瘍効果が得られただけでなく, Bortezomib との併用で, 相加効果が得られ, bortezomib 耐性を回避出来る可能性が示唆された。

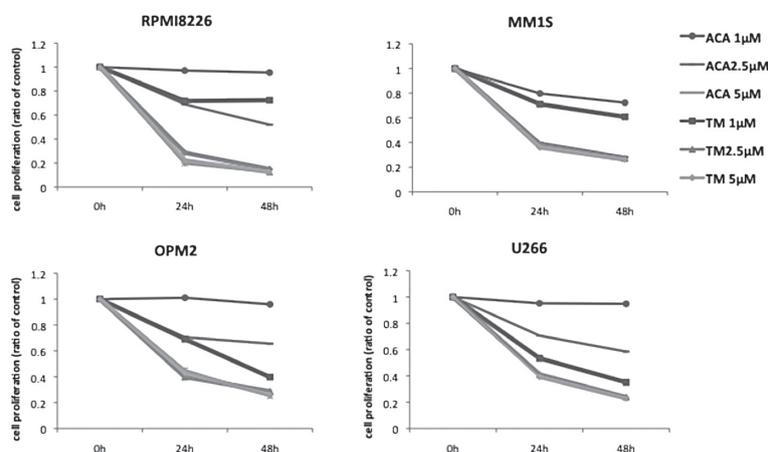


図 1.

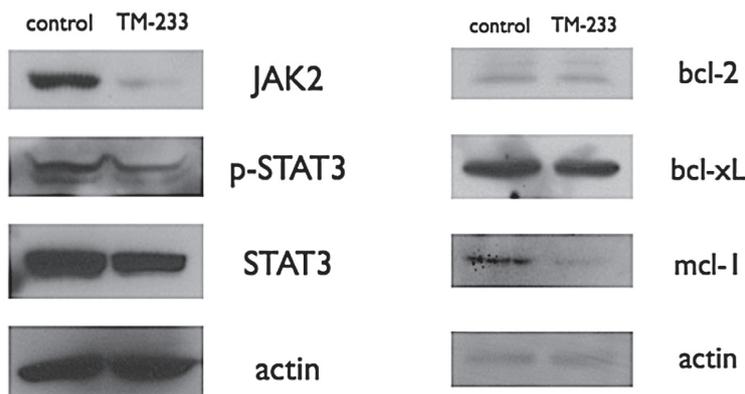


図 2.

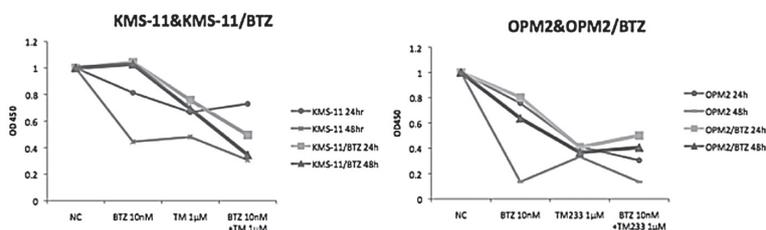


図 3.

## 考 察

TM-233は多発性骨髄腫細胞株に対し、比較的低濃度で抗腫瘍効果を得ることの出来る有効な薬剤と考えられ、その抗腫瘍分子メカニズムについても、精査の余地はあるものの、JAK2/STAT3/mcl-1経路の阻害並びにNF-κB活性阻害が関連していることが示唆された。また、bortezomib耐性機構の克服も期待される。

今後、多発性骨髄腫患者検体を用いて、TM-233の抗腫瘍効果並びに抗腫瘍メカニズムの検討を行い、検討する必要があると考えられた(埼玉医科大学倫理

委員会 申請番号 627)。更に、多発性骨髄腫の*in vivo*モデルは構築が困難な系であるが、TM-233の抗腫瘍効果を検討していきたい。

## 研究成果リスト

- 1) Sagawa M, Tomikawa T, Nemoto T, Tabayashi T, Watanabe R, Tokuhira M, Misawa T, Ri M, Hashimoto Y, Iida S, Mori S, and Kizaki M. A novel analog of ACA, TM-233, induced cell death on bortezomib-resistant myeloma cells, 日本血液学会学術集会, 2012年10月21日, 京都(予定)

## 学内グラント 報告書

## 平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

## 関節リウマチにおけるエピジェネティクス制御の異常の解明

研究代表者 荒木 靖人 (大学病院 リウマチ膠原病科)

## 緒言

関節リウマチは、全身の関節に慢性炎症を来す難治性の自己免疫疾患である。関節内の滑膜組織が増生し、進行性に軟骨と骨が破壊される。関節リウマチの多発家系の存在、関節リウマチ患者のHLA-DR4陽性率が高い事、一塩基多型との関連(*PADI4*, *PTPN22*, *CCR6* 遺伝子)が指摘されており、遺伝的要因の関与は明らかである。一方、それだけでは関節リウマチの発症は説明できず、環境的要因(ウイルス感染症, 喫煙)などの非遺伝的要因が関与していると推測されている。また、関節リウマチの発症機序を考えると、リウマチ因子や抗CCP抗体などの自己抗体、活性化マクロファージやCD4陽性T細胞の滑膜への浸潤、炎症関節における炎症性サイトカイン産生などの免疫異常が存在しており、これにより関節破壊や滑膜増殖につながっている。このような自己免疫反応と同時に、自然免疫反応(Toll-like receptorを介する反応など)も関与して、関節局所にて炎症が誘導されている。関節リウマチの滑膜線維芽細胞はマクロファージやリンパ球により刺激( $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ などの炎症性サイトカイン)されて活性化している。活性化した滑膜線維芽細胞は、炎症性サイトカイン・ケモカイン産生、基質分解酵素分泌により関節破壊を起こす一方、増殖能亢進、アポトーシス感受性低下などの癌細胞と似た形質も持つ。しかしながら、滑膜線維芽細胞の活性化がどのように起こり、維持されているのかは不明である。

エピジェネティクスの機構がクロマチンの構造および遺伝子転写と関連している事から、我々はエピジェネティクス制御の異常が関節リウマチの滑膜炎の病態に関わっているのではないかと考えた。エピジェネティクスとは、遺伝子配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御する機構を意味し、主な機序としてDNAメチル化、ヒストン修飾、クロマチンリモデリング、非コードRNA(micro RNAなど)が挙げられる。エピジェネティクス制御の異常が癌細胞におい

て多数報告されており、腎慢性線維化、統合失調症、神経変性疾患、糖尿病などの様々な後天的疾患においても同様な異常が報告されている。上記に述べたように、関節リウマチの滑膜線維芽細胞は活性化しており、(1)炎症性サイトカイン・ケモカイン産生( $IL-6$ ,  $IL-8$ ), (2)骨・軟骨破壊(matrix metalloproteinase: MMP, cathepsin) (3)細胞増殖(cyclin D1,  $TGF\beta 1$ , VEGF), などの特異的遺伝子発現が報告されている。我々は、これらの遺伝子発現の原因の一つに、エピジェネティクス制御の異常があるのではないかと考えた。

本研究では、関節リウマチの滑膜炎にエピジェネティクス制御の異常が関連しているかを明らかにするために、基質分解酵素であるMMP遺伝子に焦点を当ててヒストン修飾の役割を検討した。ヒストン修飾にはヒストンアセチル化やメチル化など多数の修飾があり、正もしくは負に遺伝子転写を制御する修飾がそれぞれ知られている。関節リウマチの滑膜線維芽細胞とその陰性対照である変形性関節症の滑膜線維芽細胞において、MMP遺伝子の発現とヒストン修飾を調べた。MMP1, 3, 9, 13遺伝子発現は、関節リウマチの滑膜線維芽細胞において変形性関節症に比べて有意に高値であった。関節リウマチの滑膜線維芽細胞において、MMP遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾は、遺伝子発現の亢進を説明できる変化を示していた。さらに、関節リウマチの滑膜線維芽細胞において、MMP1, 3, 13遺伝子発現はIL-6反応性であった。以上の結果から、ヒストン修飾は関節リウマチの滑膜線維芽細胞におけるMMP遺伝子発現と相関しており、関節リウマチの滑膜線維芽細胞の活性化に重要な役割を果たしている事が示唆された。本研究の結果を基に、関節リウマチの新しい検査・診断法及びエピジェネティクスを制御する新しい治療の開発につながる事が期待される。

材料と方法

【抗体と試薬】

抗 H3K4me3 抗体 (07-473), 抗 H3K27me3 抗体 (17-622) は Millipore 社より購入した. ヒトリコンビナント IL-6, ヒトリコンビナント可溶性 IL-6R $\alpha$  (sIL-6R $\alpha$ ) は PeproTech 社より購入した.

【滑膜線維芽細胞の調製および刺激培養】

埼玉医科大学倫理委員会の承認下に, 関節リウマチおよび陰性対照である変形性関節症の患者から, 書面によりインフォームド・コンセントを得た後, 当院整形外科における人工関節置換術時に滑膜組織を採取した. 滑膜組織を細切後, 1.5 mg/ml collagenase と 0.04% hyaluronidase を添加した DMEM 溶液に懸濁して, 37°C にて 2 時間震盪した. ナイロンメッシュを通過させた後, 10% FBS と 1% Penicillin/Streptomycin を添加した DMEM 溶液中にて, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下において培養した. 0.25% Trypsin-EDTA 溶液を用いて, 培養細胞の継代を行った. 4-8 回継代した細胞を, 滑膜線維芽細胞として実験に用いた.

100 ng/ $\mu$ l ヒトリコンビナント IL-6, 100 ng/ $\mu$ l ヒトリコンビナント sIL-6R $\alpha$  の存在下あるいは非存在下にて滑膜線維芽細胞を 4, 24 時間刺激培養した後, 細胞を回収して実験に用いた.

【逆転写反応と定量的 PCR】

培養細胞を TRIzol (Invitrogen 社) に懸濁した後, 付属のプロトコールに従い, mRNA を分離した. SuperScript III (Invitrogen 社) と Oligo (dT) 12-18 primer (Invitrogen 社) を用いて逆転写反応を行い, cDNA を作成した. 各遺伝子特異的なプライマーを用いて, リアルタイム PCR (Applied Biosystems 社の StepOnePlus システム) を行い,  $\beta$ -actin を internal control として各遺伝子発現を数値化して比較検討を行った.

【クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法と定量的 PCR】

培養細胞を 0.2% Triton X-100 にて溶解し, 0.2 U

micrococcal nuclease (Sigma 社) 処理をする事によりモノヌクレオソームとゲノム DNA の複合体の状態にした. 各ヒストン修飾特異的の抗体を用いて免疫沈降反応を行った後, 回収された複合体を洗浄し, 1 mg/ml proteinase K および 0.3% SDS にて処理を行い, 複合体から DNA を分離した. フェノール・クロロホルムにて DNA を抽出し, エタノール沈殿により DNA を精製した. 各遺伝子特異的なプライマーを用いて, リアルタイム PCR を行い, 免疫沈降していない DNA (input) に対する免疫沈降にて回収された DNA の割合を計算して比較検討を行った.

【統計】

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

結果

我々は, 関節リウマチの滑膜線維芽細胞の活性化にエピジェネティクス制御の異常が関与しているのではないかと仮定し, 本研究で検証を行った. *MMP1, 3, 9, 13* は, 関節リウマチの病態に関与している事が報告されており, これらの *MMP* 遺伝子を対象に, エピジェネティクス制御としてヒストン修飾の程度を調べる事とした. 関節リウマチ及びその陰性対照としての変形性関節症の患者から滑膜線維芽細胞を分離し, *MMP1, 3, 9, 13* の 4 つの遺伝子に関して遺伝子発現を比較した (図 1). 予想された通り, これらの 4 つの *MMP* 遺伝子は, 関節リウマチの滑膜線維芽細胞において高発現していた. 次に, 各 *MMP* 遺伝子のプロモーター領域におけるヒストンメチル化 (H3K4me3, H3K27me3) を ChIP 法及びリアルタイム PCR 法にて比較検討した. H3K4me3 は緩んだクロマチン構造部に見られるヒストン修飾であり, 遺伝子転写を正に制御するヒストン活性化マーカーと考えられている. 一方, H3K27me3 は凝縮したクロマチン構造部に存在し, 遺伝子転写を負に制御するヒストン抑制性マーカーと考えられている. 関節リウマチの滑膜線

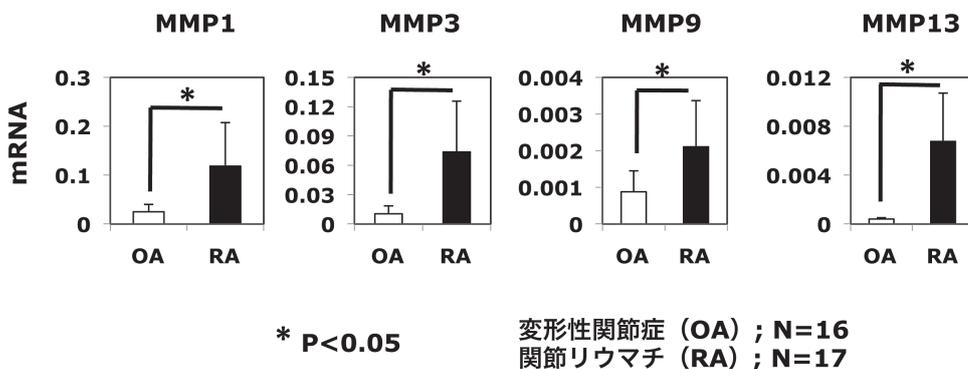


図 1. 関節リウマチ滑膜線維芽細胞における *MMP* 遺伝子発現.

維芽細胞では, *MMP1*, *3*, *9*, *13* 遺伝子のプロモーター領域において, H3K4me3は有意に高値を示した(図2). H3K27me3は*MMP1*, *9* 遺伝子において有意に低値であったが, *MMP3*, *13* 遺伝子においては低値である傾向はあるものの有意差は認められなかった(図3). これらの結果から, 関節リウマチの滑膜線維芽細胞において, *MMP1*, *3*, *9*, *13* 遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造は緩んだ状態であると考えられた. そのために遺伝子転写が亢進していると考えられたが, さらに関節リウマチにおいて炎症性サイトカインなどの刺激に対する反応性が亢進しているのではないかと予想された. IL-6は関節リウマチの病態に関与する炎症性サイトカインの一つであり, ヒト化抗sIL-6Rモノクローナル抗体は関節リウマチの治療にも用いられている. IL-6受容体はgp130分子と膜結合型IL-6R $\alpha$ から構成されるが, IL-6R $\alpha$ は可溶性蛋白としても存在しており, gp130分子にIL-6とsIL-6R $\alpha$ の両者が結合する事によりIL-6刺激が入る経路も存在する. そこで, IL-6のみ, あるいはIL-6とsIL-6R $\alpha$ にて刺激を行ったところ, 関節リウマチ滑膜線維芽細胞において, *MMP1*, *3*, *13* 遺伝子の発現が亢進したが, 変形性関節症滑膜線維芽細胞においては変化が見られなかった(図4). 一方, *MMP9* 遺伝子の発現は, これらの刺激に対して関節リウマチ滑膜線維芽細胞

において反応が見られず, *MMP1*, *3*, *13* 遺伝子とはIL-6への反応性が異なると考えられた. 以上の結果より, *MMP* 遺伝子発現制御にはヒストン修飾が重要な役割を果たしていると考えられた.

## 考 察

本研究の結果から, 関節リウマチ滑膜線維芽細胞の活性化にエピジェネティクス制御の異常が関連していることが示された. 関節リウマチの滑膜線維芽細胞において, *MMP1*, *3*, *9*, *13* 遺伝子発現の亢進がヒストン修飾の変化と相関しており, *MMP* 遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造が関節リウマチの滑膜炎の病態において重要な役割を果たしていると考えられた. さらに, *MMP1*, *3*, *13* 遺伝子において, 緩んだクロマチン構造のために炎症性サイトカインIL-6刺激に対する反応性が亢進している事が示唆された. クロマチン構造の変化により関節リウマチの滑膜線維芽細胞の活性化が起こっていると考えれば, これを基に新しい検査・診断, 治療の開発につながる事が期待される.

*MMP* 遺伝子は炎症性サイトカインのTNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ にて活性化される事が知られているが, IL-6にて活性化されるという報告はこれまでにない. 皮膚の線維芽細胞にてIL-6刺激にて*MMP*の活性化が起

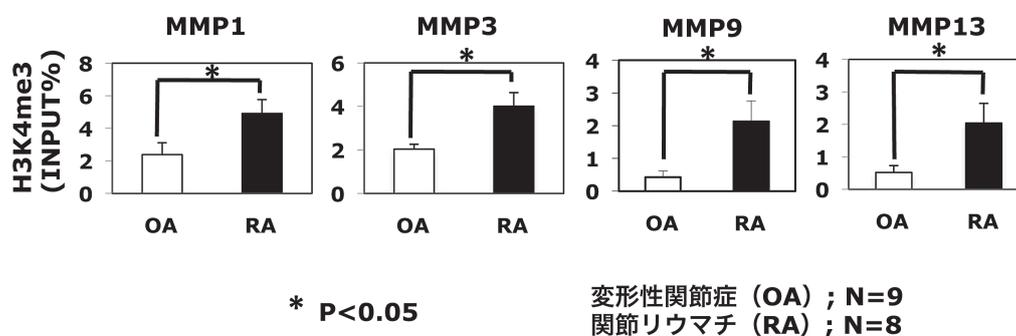


図2. 関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるH3K4me3.

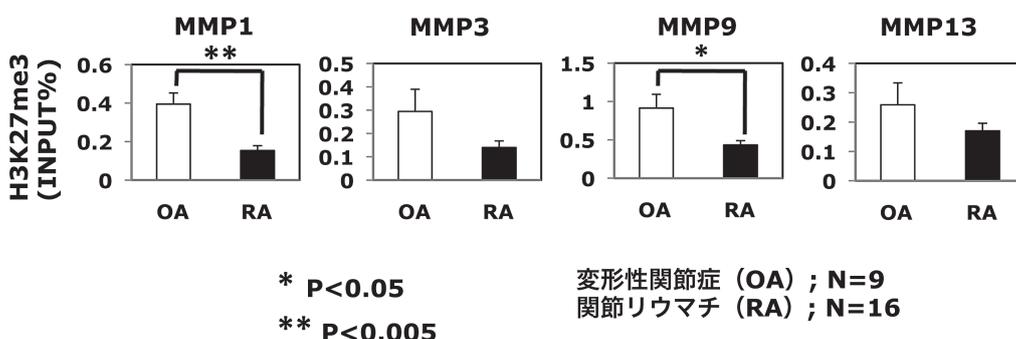


図3. 関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるH3K27me3.

こるという事は報告されている。関節リウマチにおいてIL-6は治療の標的分子の一つであり、関節炎の病態に強く関わっていると考えられているが、その機序の一つとしてMMP分子の活性化があるという事を本研究では示す事が出来た。

興味深い事に、MMP1, 3, 9, 13 遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造はすべて緩んだ構造であるにもかかわらず、IL-6に対する反応性が異なる事が判明した。MMP1, 3, 13 遺伝子はIL-6反応性であるにもかかわらず、MMP9 遺伝子ではIL-6に反応性が認められなかった。遺伝子転写の制御に関わる機構として、クロマチン構造以外に転写因子の結合がある事から、おそらくMMP9 遺伝子では転

写因子の結合に関して、他のMMP遺伝子と差があるのではないかと推測している。IL-6刺激シグナルの下流において、転写因子のSTAT3が働く事が知られている。今後、各MMP 遺伝子のプロモーター領域におけるSTAT3の結合に関して検討を進めたいと考えている。

近年、様々な疾患の病因としてエピジェネティクスの異常が判明し、精力的に研究されている。関節リウマチにおいてもまた同様であり、DNAメチル化、microRNAの関与が報告された。我々はヒストン修飾の異常という観点から関節リウマチの病態を解明していきたいと考えている。本研究の成果では、その足がかりとなる結果が得られた。

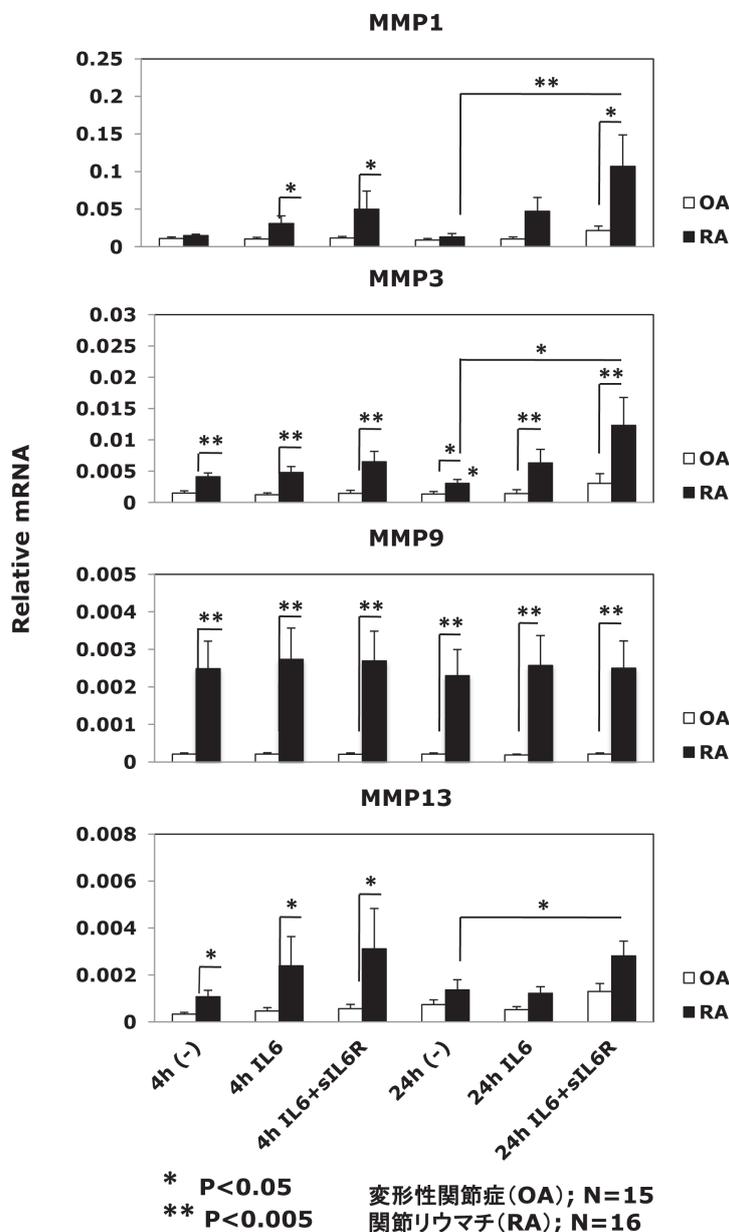


図 4. 関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるIL-6, 刺激後のMMP遺伝子発現変化。

## 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ゲノム医学研究センター遺伝子構造機能部門の黒川教授には多大なご指導を頂き、感謝申し上げます。滑膜組織の採取にご協力いただきました埼玉医科大学医学部整形外科・脊椎外科の織田弘美教授と金潤澤教授に感謝いたします。埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科の医局員および助手の方々には本研究の施行にあたり様々なご協力を頂き、感謝いたします。細胞培養や分子生物学的実験の技術的協力を頂きました黒澤奈津子様にも深謝いたします。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Weng NP, Araki Y, Subedi K. The molecular basis of the memory T cell response: differential gene expression and its epigenetic regulation. *Nat Rev Immunol* 2012;12:306-15.
- 2) Sato K, Miyoshi F, Yokota K, Araki Y, Asanuma Y, Akiyama Y, et al. Marked induction of c-Maf protein during Th17 cell differentiation and its implication in memory Th cell development. *J Biol Chem* 2011;286:14963-71.
- 3) 荒木靖人. CD8陽性T細胞の分化・機能における

ヒストン修飾の役割：ゲノムワイドな解析を含めた最新の知見. *臨床免疫学会誌* 2011;34:131-7.

### 学会発表

- 1) Araki Y, Yokota K, Sato K, Miyoshi F, Wada T, Kim YT, Oda H, Mimura T. Histone methylation is associated with MMP gene expressions in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, The 4th East Asian Group of Rheumatology (EAGOR2011), October 15, 2011, Tokyo, Japan
- 2) 荒木靖人, 横田和浩, 三由文彦, 佐藤浩二郎, 金潤澤, 織田弘美, 三村俊英. 関節リウマチの滑膜線維芽細胞におけるヒストンメチル化はMMPs遺伝子発現と関連する, 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会, 平成23年7月, 神戸
- 3) Subedi K, Araki Y, De S, Wood W, Sharov A, Zang C, Schones D, Lhotsky B, Dudekula D, Becker K, Ko M, Peng W, Zhao K, Weng NP. Dynamic changes of gene expression in concordance with histone modifications in CD8 T cells after activation. 98th The American Association of Immunologists Annual Meeting, May 13-17, 2011, San Francisco, California

特許出願  
該当なし

## 学内グラント 報告書

## 平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

インフルエンザウイルス特異的 CTL の誘導を増強する  
プラットフォームの開発

研究代表者 川野 雅章 (医学部 免疫学)

研究分担者 松井 政則<sup>1)</sup>, 禾 泰壽<sup>2)</sup>, 半田 宏<sup>3)</sup>

## 緒言

遺伝子疾患の治療法として、体内での確・高効率で標的細胞に遺伝子を運搬できることから、遺伝子治療用組換えウイルスベクターが開発されているが、染色体上の組み込みによって遺伝子が傷害されることやウイルスタンパク質の抗原性や毒性などの危険性から実用化には至っていない。また、遺伝子や薬剤を運搬する目的で、リポソームなどの人工ベクターの開発も行われているが、ベクター構造が極めて不安定、また、標的細胞特異的な運搬が困難であることなど、こちらも多くの課題が残っている。筆者らは、ウイルスの利点である、標的細胞を認識・侵入し、細胞内に目的物を的確に運び込む機能を利用するため、simian virus 40 (SV40) ウイルス外殻タンパク質のみを医療材料として応用する研究を行ってきた。

ポリオマウイルス科のSV40粒子は、主要外殻タンパク質VP1のみで構成され、5つのVP1で構築されるVP1五量体と呼ばれる構造体ユニットが72個集合化することで直径45 nmの球状粒子を形成する。一種類の外殻タンパク質から成る球状粒子として最も大きな構造で、VP1五量体の自己集合化能により球状粒子を、宿主因子を必要とすることなく構築することができる。また、SV40は1960年代のポリオワクチンの中に混入しており、当時ワクチンを接種された1,000万人以上のヒトで細胞毒性の報告は無く、従ってSV40 VP1はヒトに対して細胞毒性を有していないと考えられる。

SV40 VP1を医療材料として工学的に利用するためには、ウイルス粒子を精製するシステム、それを粒子構成単位であるVP1五量体に解離し、再び、ウイルス

粒子として試験管内で再構成する技術、DNAやタンパク質、薬剤、造影剤などを安定的に内包する技術、内包物を的確に体内の標的細胞に送り届ける技術の開発が必要である。これらの技術を構築するため、昆虫細胞内でVP1を発現させることでウイルス様粒子(VLP)を核内で多量に形成させた。さらに、粒子構成単位である、VP1五量体を得るために、感染細胞を溶解してVLPを精製後、VLPの解離物をゲルろ過法で高度にVP1五量体を精製する系を確立した<sup>1,2)</sup>。そして、試験管内で粒子を再構成する技術を確立するために、VP1五量体の自己集合化によりウイルス様粒子やチューブ状構造体を形成する条件を決定してきた<sup>3)</sup>。我々は粒子形成を誘導する因子を探索し、SV40の非主要構造タンパク質VP2/3あるいはdsDNAが粒子形成を誘導することを発見した<sup>4-6)</sup>。さらに、内包物を標的細胞に届けるため、外来タンパク質を粒子内部に内包する技術を確立するとともに<sup>7)</sup>、粒子表面を修飾することで特定の細胞を標的として目的物質を運び込む技術も構築した<sup>8,9)</sup>。

本研究では、医療材料として応用開発研究をしてきたSV40粒子に関する技術を、インフルエンザウイルス特異的細胞傷害性T細胞(Cytotoxic T lymphocyte: CTL)の誘導を増強するプラットフォームの開発に应用することを目的とした。CTLはウイルスが感染した細胞や、がん細胞など、正常な機能を果たさなくなった細胞を探し出して破壊する機能を有する。作用機序としては、例えば、インフルエンザウイルスのmatrix protein 1 (M1) HLA-A2 CTLエピトープに対して攻撃するCTLは、表面のT細胞受容体(TCR)が、ウイルスに感染した体内の細胞でHLA-A2を介して結合しているM1のCTLエピトープを認識し、その細胞を破壊する。目的のCTLエピトープに対してCTLを誘導するために、様々なアジュバントが開発されているが、CTLを誘導する効率の悪さや副作用などの多くの

1) 医学部 微生物学  
2) 医学部 分子生物学  
3) 東京工業大学

問題を抱えている。インフルエンザウイルスCTLエピトープを運搬するプラットフォームとしてSV40 VLPを用いることで、ウイルス粒子自体に存在するアジュバント効果によって、CTLエピトープに対して強力にCTLを誘導することが期待される。

## 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 $\beta$ 2-マイクログロブリン( $\beta$ 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 $\beta$ 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)<sup>10</sup>を使用した。HHDマウスは、仏・パスツール研究所・Lemonnier博士より供与された。

### 2. M1 CTLエピトープを挿入したSV40 VP1の作製

A型インフルエンザウイルスのM1タンパク質に対するHLA-A2のCTLエピトープ(GILGFVFTL)を野生型SV40 VP1遺伝子を用いてVP1のDEループ領域(M1-DE-VP1)およびHIループ領域(M1-HI-VP1)にオーバーハングPCR法によって挿入し、バキュロウイルス発現用プラスミドベクター、pFastBac1に組込んだ。

### 3. M1-DE-VP1 およびM1-HI-VP1 タンパク質発現バキュロウイルスの作製

組込んだプラスミドベクターを大腸菌のDH10Bacに形質転換し、転換したDH10Bacから組換えバキュロウイルスゲノムを精製した。リポフェクチン試薬を用いて精製したバキュロウイルスゲノムをカイコのSf-9細胞に導入し、3日後に組換えバキュロウイルスを含む培養上清を回収した。このバキュロウイルスを再びSf-9細胞に感染させ、3日後に培養上清を回収することで、十分にウイルスタイターの上昇した組換えバキュロウイルスを調製した。

### 4. M1-DE-VP1 およびM1-HI-VP1 タンパク質の調製

作製した組換えバキュロウイルスをSf-9細胞に感染させ、3日後に細胞を回収した。回収した細胞にソニケーション溶液(20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1% sodium deoxycholate)を加え、ソニケーションして細胞を破壊した。遠心機で15,000回転、5分、4°Cで遠心し、上清を除いた後、再懸濁溶液(20 mM Tris-HCl (pH7.9), 50% OptiPrep)を加えて再びソニケーションを行い、ペレットを懸濁した。この懸濁溶液をM1-DE-VP1溶液、および、M1-HI-VP1溶液とした。

### 5. M1-DE-VP1 およびM1-HI-VP1 タンパク質によるCTLの誘導

インフルエンザウイルス特異的CTLが誘導できるかどうかを検討するために、M1-DE-VP1溶液、および、M1-HI-VP1溶液をHHDマウスの足蹠に免疫した。そして、免疫7日後、細胞内サイトカイン

陽性CTLの測定をするために、マウス脾細胞をGILGFVFTLペプチドで抗原刺激した。その後、細胞表面をFITC-抗CD8抗体、細胞内部をPE-抗IFN- $\gamma$ 抗体で染め、それぞれのエピトープに特異的に反応するIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞数を、フローサイトメトリーで測定した。

(倫理面への配慮)

マウスは、埼玉医大・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. CTLエピトープを挿入したM1-DE-VP1 およびM1-HI-VP1 タンパク質の調製

オーバーハングPCR法で作製したM1-DE-VP1及びM1-HI-VP1を組込んだプラスミドから、組換えバキュロウイルスを作製し、Sf-9細胞に感染させた。感染3日後にSf-9細胞を回収、PBS(-)で洗浄した後、細胞をVP1超音波処理溶液で再懸濁し、超音波破碎した後、遠心して上清とペレットに分画し、上清を除いた。残ったペレットに50%Opti-Prep溶液(20 mM Tris-HCl (pH7.9), 50%Opti-Prep)を加えて、超音波処理することで再懸濁し、ペレット溶液とした。調製したペレット溶液をSDS-PAGEで泳動後、CBB染色によって染色することで精製度を確認した。確認した結果、M1-DE-VP1およびM1-HI-VP1由来の主要な50 kDaのタンパク質バンドが検出された。さらに下方には45, 40 kDaのタンパク質バンドが検出された。これらはVP1の分解産物である可能性が考えられた。この3バンド以外のタンパク質バンドはほとんど検出されなかったことから、M1-DE-VP1およびM1-HI-VP1タンパク質はこの方法で精製可能であることが示唆された。

### 2. CTLエピトープ挿入VP1によるIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の誘導

M1-DE-VP1およびM1-HI-VP1タンパク質を、8週齢のHLA-A2トランスジェニックマウスに足蹠経路で免疫した。免疫1週間後、マウスから脾臓を摘出し、リンパ球を調製した。脾臓から回収したリンパ球中に、M1のCTLエピトープ配列(GILGFVFTL)に反応して誘導されるCTLが存在することを調べるために、ICS(Intra-cellular cytokine staining)解析を行った。脾臓リンパ球をM1のCTLエピトープペプチド(GILGFVFTL)と共に培養した後、FITC-抗CD8抗体、およびPE-抗IFN- $\gamma$ 抗体で染色し、FACScan(BD)でドットプロット解析を行った。図に、ICSの2次元解析の結果を示した。

図に示すように、M1のCTLエピトープペプチドのインキュベーションによりCD8陽性・細胞内IFN- $\gamma$ 陽性細胞が誘導された。このことから、M1-DE-VP1およ

びM1-HI-VP1タンパク質は、アジュバントがなくても、CTLを誘導できることが示唆された。

### 考 察

M1-DE-VP1およびM1-HI-VP1タンパク質の免疫によって、アジュバントを加えることなく、一回の免疫によってM1のHLA-A2 CTLエピトープに対するCTLが誘導された。これは、SV40 VP1タンパク質がCTLワクチンのプラットフォームとして応用可能であることを示唆している。

ウイルス構造タンパク質を用いたワクチンの開発は、B型肝炎ウイルスのコアタンパク質を組換え体ワクチン製剤として昆虫細胞から調製したことから始まり、このような組換え体ワクチンとしてはB型肝炎ウイルスの他に、ヒトパピローマウイルスのL1タンパク質が知られている。これらのワクチンは、ウイルス粒子の活性を失活させる中和抗体の産生を誘導するだけでなく、ウイルス粒子タンパク質に対するCTLも誘導することから、様々な抗原エピトープ

に対する中和抗体やCTLエピトープに対するCTLを誘導するプラットフォームとしてこれらのウイルス粒子タンパク質を用いる開発が行われてきた。これまでに様々なウイルス粒子、例えば、大腸菌ファージや、酵母ウイルス、植物ウイルス、動物ウイルスなどの、あらゆるウイルス粒子タンパク質を免疫増強プラットフォームに用いようとする研究が行われている。ウイルスに対する中和抗体が反応するエピトープや、CTLエピトープをこれらのプラットフォームに挿入または内包させることで、アジュバントを用いることなく中和抗体やCTLを誘導されることが示唆されている。しかしながら、これらのプラットフォームがエピトープに対する免疫反応を誘導する詳細な分子メカニズムは未だに十分には明らかになっておらず、ウイルスタンパク質プラットフォームを用いた免疫誘導剤の研究開発は発展途上にある。

今回我々は、SV40 VP1タンパク質のDEおよびHIループ領域にA型インフルエンザウイルスM1のHLA-A2 CTLエピトープを挿入したキメラタンパク質

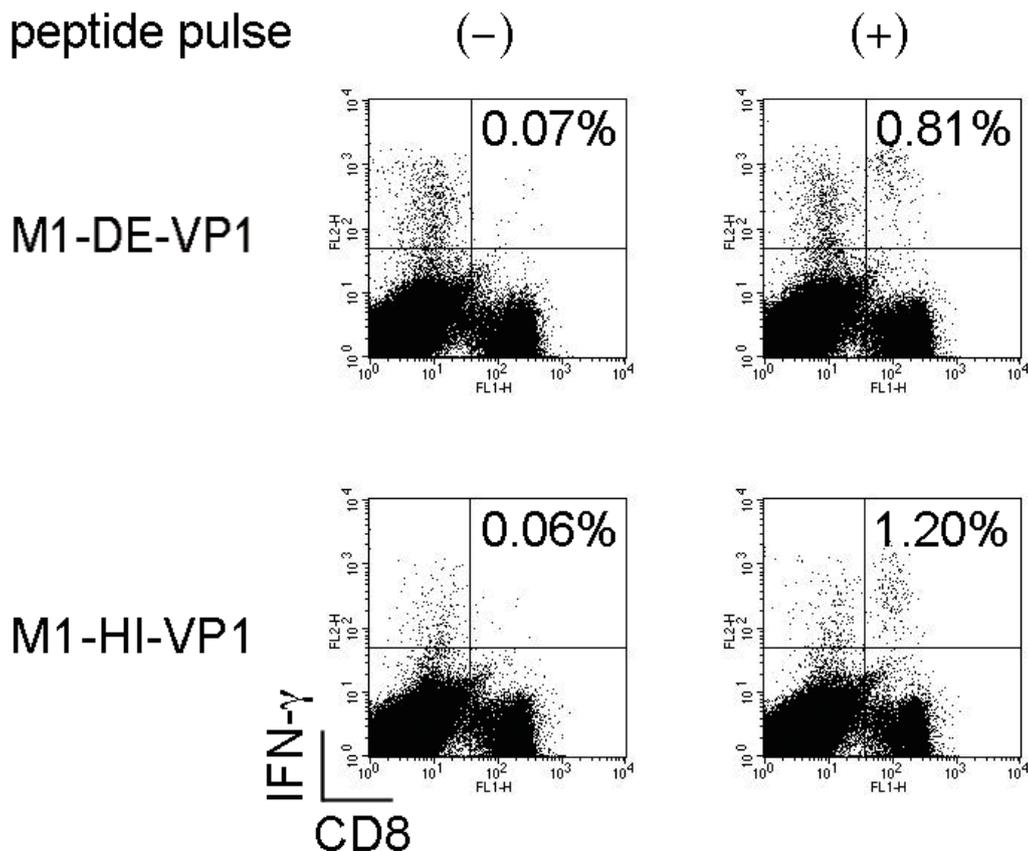


図. HLA-A2トランスジェニックマウスのICS解析. M1-DE-VP1 (上段) およびM1-HI-VP1タンパク質 (下段) をマウス足蹠部に免疫し、免疫1週間後に脾臓を摘出、リンパ球を調製した。調製したリンパ球をM1 CTLペプチド非存在下(左)、存在下(右)で5時間培養し、FITC-抗CD8抗体、及び、PE-抗IFN- $\gamma$ 抗体で染色し、FACSで解析した。パネル右上の%はリンパ球全体に占めるCD8陽性・IFN- $\gamma$ 陽性細胞の割合を示している。

を作製し, これを免疫することで目的のCTLエピトープに対するCTLを誘導できることを確認した. この実験においては, マウス1匹当たり50 µgのキメラタンパク質を免疫しており, キメラタンパク質中に含まれるM1 CTLエピトープとしては, およそ500 ngとなる. 不完全フロインドアジュバントを用いてM1に対するCTLを誘導する場合, 50 µgのM1 CTLペプチドを2回の免疫をすることで1%弱のCTLが誘導されるので, 不完全フロインドアジュバントを用いたM1ペプチドによるCTL誘導と同等かそれ以上のCTL誘導をペプチド量にして100分の1の量で行えるという計算になる. M1-DE-VP1およびM1-HI-VP1タンパク質の免疫は極めて効率良くCTLを誘導していることになる. 今後は, このような効率の良いCTL誘導が行われる分子機構を明らかにして行く予定である. 今日, 病原性ウイルスや, がん抗原のCTLペプチドでCTLを誘導することが難しい理由は, ペプチドの体内での滞留性が悪い, ペプチドが速やかに体内で分解してしまう, ペプチドの抗原性を増大するためのアジュバントに強い副作用があるなどの理由によって, 効果的にCTLペプチドを使用することができないことにある. 我々の研究開発しているウイルスタンパク質プラットフォームは, 挿入したペプチドを安定化し, 体内滞留性を上昇させる効果が期待でき, またプラットフォーム自体に抗原性があるのでアジュバントを使わずに効率良くCTLを誘導できることから, 病原性ウイルスやがん抗原CTLペプチドワクチンの効果を増強し, 治療効果を増大させることが期待される.

#### 引用文献

- 1) Kosukegawa A, Arisaka F, Takayama M, Yajima H, Kaidow A, Handa H. Purification and characterization of virus-like particles and pentamers produced by the expression of SV40 capsid proteins in insect cells. *Biochim Biophys Acta* 1996;1290:37-45.
- 2) Ishizu KI, Watanabe H, Han SI, Kanesashi SN, Hoque M, Yajima H, Kataoka K, Handa H. Roles of disulfide linkage and calcium ion-mediated interactions in assembly and disassembly of virus-like particles. *J Virol* 2001;75:61-72.
- 3) Kanesashi SN, Ishizu K, Kawano MA, Han SI, Tomita S, Watanabe H, Kataoka K, Handa H. Simian virus 40 VP1 capsid protein forms polymorphic assemblies in vitro. *J Gen Virol* 2003;84:1899-905.
- 4) Kawano MA, Inoue T, Tsukamoto H, Takaya T, Enomoto T, Takahashi RU, Yokoyama N, Yamamoto N, Nakanishi A, Imai T, Wada T, Kataoka K, Handa H. The VP2/VP3 minor capsid protein of simian virus 40 promotes the in vitro assembly of the major capsid protein VP1 into particles. *J Biol Chem* 2006;281:10164-73.
- 5) Tsukamoto H, Kawano MA, Inoue T, Enomoto T, Takahashi RU, Yokoyama N, Yamamoto N, Imai T, Kataoka K, Yamaguchi Y, Handa H. Evidence that SV40 VP1-DNA interactions contribute to the assembly of 40-nm spherical viral particles. *Genes to Cells* 2007;12:1267-79.
- 6) Enomoto T, Kukimoto I, Kawano MA, Yamaguchi Y, Berk AJ, Handa H. In vitro reconstitution of SV40 particles that are composed of VP1/2/3 capsid proteins and nucleosomal DNA and direct efficient gene transfer. *Virology* 2011;420:1-9.
- 7) Inoue T, Kawano MA, Takahashi RU, Tsukamoto H, Enomoto T, Imai T, Kataoka K, Handa H. Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with the minor capsid proteins VP2/3. *J Biotechnol* 2008;134:181-92.
- 8) Takahashi RU, Kanesashi SN, Inoue T, Enomoto T, Kawano MA, Tsukamoto H, Takeshita F, Imai T, Ochiya T, Kataoka K, Yamaguchi Y, Handa H. Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles. *J Biotechnol* 2008;135:385-92.
- 9) Kitai Y, Fukuda H, Enomoto T, Asakawa Y, Suzuki T, Inouye S, Handa H. Cell selective targeting of a simian virus 40 virus-like particle conjugated to epidermal growth factor. *J Biotechnol* 2011;155:251-6.
- 10) Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Pèrarnau 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.

#### 研究成果リスト

#### 論文

- 1) Soonsawad P, Xing L, Milla E, Espionza JM, Kawano M, Marko M, Hsieh C, Furukawa H, Kawasaki M, Weerachathanukul W, Srivastava R, Barnett SW, Srivastava IK, Cheng RH. Structural evidence of glycoprotein assembly in cellular membrane compartments prior to alphavirus budding. *J Virol* 2010;84:11145-51.
- 2) Shen PS, Enderlein D, Nelson CD, Carter WS, Kawano M, Xing L, Swenson RD, Olson NH, Baker TS, Cheng RH. The structure of avian polyomavirus reveals variably sized capsids, non-conserved inter-capsomere interactions, and a

possible location of the minor capsid protein VP4. *Virology* 2011;411:142-52.

- 3) Suda T, Kawano M, Nogi Y, Ohno N, Akatsuka T, Matsui M. The route of immunization with adenoviral vaccine influences the recruitment of cytotoxic T lymphocytes in the lung that provide potent protection from influenza A virus. *Antiviral Res* 2011;91:252-8.
- 4) Enomoto T, Kukimoto I, Kawano MA, Yamaguchi Y, Berk AJ, Handa H. In vitro reconstitution of SV40 particles that are composed of VP1/2/3 capsid proteins and nucleosomal DNA and direct efficient gene transfer. *Virology* 2011;420:1-9.
- 5) 半田宏, 川野雅章. ウイルスカプシドタンパク質を利用したDDS用医療材料の創製. *Drug Delivery System* 2011;26:230.

#### 著書

- 1) Kawano M, Xing L, Lam KS, Handa H, Miyamura T, Barnett S, Srivastava IK, Cheng RH. Development of Vaccines: From Discovery to Clinical Testing. John Wiley & Sons, Inc. 2011 part 5. design platform of nanocapsules for human therapeutics or vaccines, p.p. 125-41.

#### 学会発表

- 1) Kawano M, Suda T, Akatsuka T, Handa H, Matsui M. Development of a novel platform for CTL-based

influenza vaccine using virus like particles of simian virus 40, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 2011, Sapporo

- 2) Kawano M, Suda T, Ohno N, Akatsuka T, Matsui M. The route of immunization with adenoviral vaccine influences the recruitment of cytotoxic T lymphocytes in the lung that provide potent protection from influenza A virus, 2011 Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, November 2011, Chiba

#### 産業所有権

- 1) 発明の名称：ウイルス外殻構成タンパク質被覆構造体及びその製造方法，国際公開番号：WO2011/030682（公開日：2011/3/17），発明者：半田宏，土井浩司，榎本輝也，川野雅章
- 2) 発明の名称：細胞傷害性T細胞誘導剤，特願2011-107874，発明者：半田宏，川野雅章，松井政則
- 3) 発明の名称：生理的条件下でのウイルス粒子様構造体及びその形成方法，特許4734608，発明者：半田宏，中西章，川野雅章
- 4) 発明の名称：細胞傷害性T細胞誘導剤，特願2011-191208，発明者：半田宏，川野雅章，松井政則
- 5) 発明の名称：細胞傷害性T細胞誘導剤，PCT/JP2012/60910，発明者：半田宏，川野雅章，松井政則

## 学内グラント 報告書

## 平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

ペプチド表面結合リポソームワクチン用  
C型肝炎ウイルス CTL エピトープの同定

研究代表者 高木 徹 (医学部 微生物学)

## 緒言

Hepatitis C virusはフラビウイルス科に属するRNAウイルスであり、世界中に約1.5億人、日本では約200万人の感染者が存在するといわれる。そして、多くの感染者は、年齢とともに肝硬変、肝臓の経過をたどり死亡する<sup>1)</sup>。主な治療方法としてはPEG-IFNとリバビリン併用療法があるが、治癒率はわずか50%以下である。また、高価である上に副作用が強いことも知られている<sup>2)</sup>。従って、臨床においてHCVの予防・治療ワクチンの開発は急務である<sup>3)</sup>。

MHCクラスI拘束性CD8<sup>+</sup>Tリンパ球(CTLs)は、様々なウイルス感染の免疫制御に重要な役割を果たしている。HCV感染の場合、急性感染したチンパンジー<sup>4)</sup>とヒト<sup>5,6)</sup>において自然治癒する場合は、強いHCV特異的CTL反応が存在することが知られている。従って、HCV特異的CTLsは、HCVを根絶するために重要だと考えられる。

不飽和脂肪酸からなるリポソームの表面に結合した抗原は、抗原提示細胞(APCs)によってCTLsにcross presentationされることが以前報告された<sup>7)</sup>。私はリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)由来のドミナントエピトープをリポソーム表面に結合し免疫を行ったところ、免疫マウスで非常に効果的な抗ウイルス反応を示すことを報告した<sup>8)</sup>。すなわち、わずか280 ngのリポソームペプチドとCpG 5 µgの1回免疫で、変異株であるLCMV cl 13の感染を完璧に防御することに成功した。さらにCD4<sup>+</sup>T cellのヘルプがなくても、長期のメモリーCTLsが誘導できることを示した。このCTLベースのリポソームワクチンはSARSコロナウイルス<sup>9)</sup>のために開発され、マウスをheterosubtypicインフルエンザウイルスから防御するのにも十分効果的だった<sup>10)</sup>。

以上のことから、本研究では、HCVに対するHLA-A2拘束性エピトープペプチドを用いたワクチン

開発<sup>11)</sup>に引き続き、HLA-A24拘束性のCTLエピトープを同定し、またその中でリポソーム結合に適したエピトープをみつけることにより、有効なHCVワクチンの開発につなげることを試みた。

## 方法と材料

## 1. HLA-A 24トランスジェニックマウス(A 24 Tgマウス)

マウスMHCクラスIとβ2ミクログロブリン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\*2402(HLA-A24)とヒトβ2ミクログロブリン遺伝子とCD8分子をもつトランスジェニックマウスを使用した。A24Tgマウスは仏・パスツール研究所・Lemonnier博士より供与された。

## 2. 免疫方法

ペプチドプールリポソームの場合、リポソーム50 µlとCpG 5 µlをマウスのfootpadに免疫し、1週間後ブーストした。単独結合リポソームの場合、リポソーム20 µlとCpG 5 µlを同様にfootpadに免疫をし、1週間後ブーストをした。

## 3. IFN-γ ELISPOT assay

Mouse IFN-γ enzyme-linked immunospot (ELISPOT) set (BD Pharmingen, San Diego, CA)を用い、ナイーブマウスの脾細胞に対応したペプチドをパルスし40 GyのX線を照射したものを、免疫マウスの脾細胞と混ぜ2日間培養し測定した。

4. <sup>51</sup>Cr Release assay

ナイーブマウスの脾細胞に対応したペプチドをパルスし40 GyのX線を照射したものを、免疫マウスの脾細胞と混ぜ7日間培養する。標的細胞に対応したペプチドをパルスし<sup>51</sup>Crを取り込ませ、96well plateにエフェクター細胞とE:T/100:1の割合で入れ4時間培養し、その上清をγカウンターにて測定した。

## 5. Vaccinia virus 感染実験

免疫マウスに2×10<sup>6</sup> pfuの組み換えVaccinia virusを腹腔注射し5日後に卵巣を摘出し、凍結融解と超音波

処理し段階希釈したウイルス液をBSC-1細胞に感染させた。その2日後にクリスタルバイオレットにて細胞を染色しウイルス価を算出した。

6. エピトープ予測

Hepatitis C virus 1a株の遺伝子配列に基づき、HCVを構成するタンパク質のNS3, NS4領域のアミノ酸配列においてHLA-A2, HLA-A24結合モチーフに従い2種類のコンピュータプログラム「BIMAS」「SYFPEITHI」で9個のアミノ酸から成る94種類のエピトープを予測した。HCV 1b株と比較して2つ以上アミノ酸が異なるエピトープは除外した。そのエピトープに相当するペプチドはオペロン社により合成された。

結果

1. エピトープの予測

Hepatitis C virus 1a株の遺伝子配列に基づき、HCVを構成するタンパク質のNS3, NS4領域のアミノ酸配列においてHLA-A2, HLA-A24結合モチーフに従い2種類のコンピュータプログラム「BIMAS」「SYFPEITHI」で9個のアミノ酸から成る94種類のエピトープを予測した。HCV 1b株と比較して2つ以上アミノ酸が異なるエピトープは除外した。HLA-A2 HCV NS4から24種類, HLA-A24 HCV NS3から45種類, NS4から25種類を予測しペプチドを合成し, 溶解性により7-10個のペプチドプールにしリポソームに結合した (Table 1)。

2. プールペプチドリポソームのスクリーニング

a) IFN-γ ELISPOT assay : ナイーブマウスの脾細

胞に対応したペプチドをパルスし40 GyのX線を照射したものを, プールペプチドリポソーム免疫マウスの脾細胞と混ぜ2日間培養し測定したところ, グループ1, 2, 6, 7でIFN-γ 産生細胞が認められた。中でもグループ1の4番目(1A#4), グループ2の1番目(2B#1)のエピトープにおいて高いIFN-γ 産生が認められた(グループ1, 2, 6, 7の結果をFig. 1に示す)。

b) Vaccinia virusチャレンジ実験 : プールペプチド結合リポソーム免疫マウスに2 × 10<sup>6</sup> pfuの組み換えVaccinia virusを腹腔注射でチャレンジし5日後に卵巣を摘出しウイルス量を測定した。その結果グループ1, 3, 5, 6においてウイルスの感染が防御された (Fig. 2)。

3. 単独ペプチド結合リポソーム

これまでのスクリーニングで結果の良好だった(1A#4)と(2B#1)のペプチドを合成し, 単独でリポソーム表面に結合し免疫を行った。<sup>51</sup>Cr Release assayでは(1A#4)は活性は見られなかったが(2B#1)で強いCTL活性が認められた (Fig. 3)。IFN-γ ELISPOT assayでは2つのエピトープ共に良好な反応を示した (Fig. 4)。Vaccinia virusチャレンジ実験では(2B#1)が感染を防御した (Fig. 5)。

考察

HCV 1a を構成するタンパク質から2種類のリポソーム結合に適したエピトープが同定された。(2B#1)は既に同定・報告されているエピトープだが新規に同定した(1A#4)同様にリポソーム表面に結合させると,

Table 1. 合成したHCV由来ペプチド

NS3-A24 (45)	NS4-A24 (25)	NS4-A2 (24)
A: 10	A: 5	A: 5
B: 16	B: 4	B: 5
C: 14	C: 10	C: 3
D: 5	D: 6	D: 10

A:DWで溶解 B:<1N NaOH 10ul C:>1N NaOH 10ul D:不溶

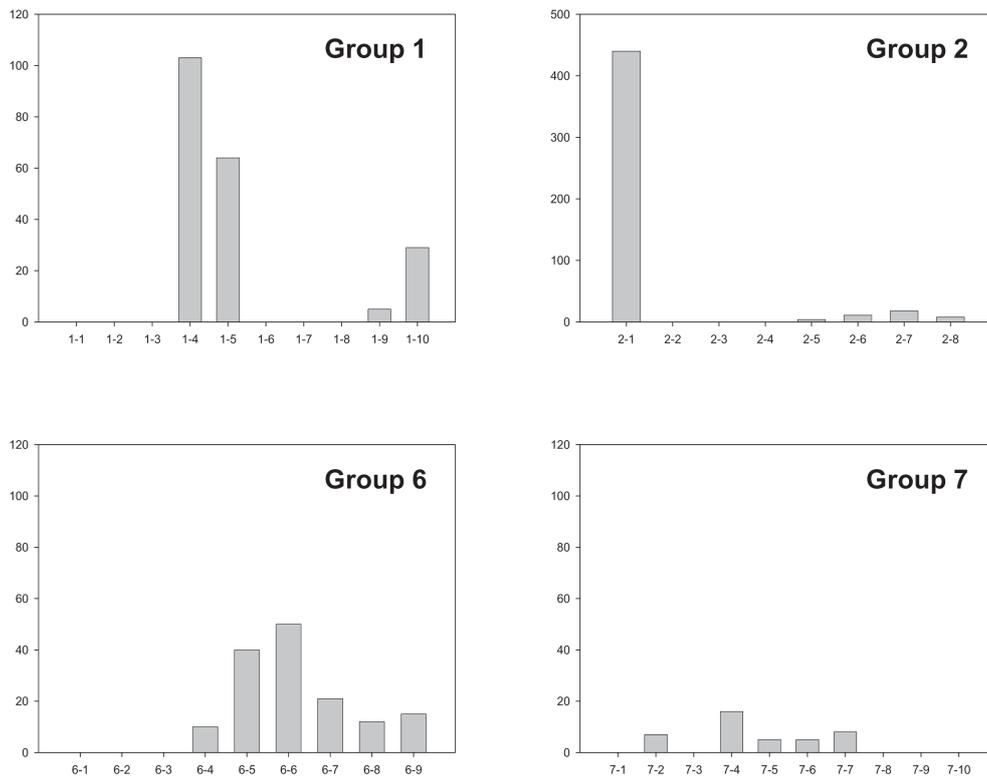
1: A (10)	Group 1	6: A (5)	Group 6	8: A (5)	Group 8
2: B (8)	Group 2	B (4)		B (2)	
3: B (8)	Group 3	7: C (10)	Group 7	9: B (3)	Group 9
4: C (7)	Group 4			C (3)	
5: C (7)	Group 5				

計94種のペプチドを溶解性によりA : DWで溶解, B : < 1N NaOH 10 μlで溶解, C : > 1N NaOH 10 μlで溶解, 不溶の4つに分け, 溶解性の高い順から9つのグループに分けプールした。

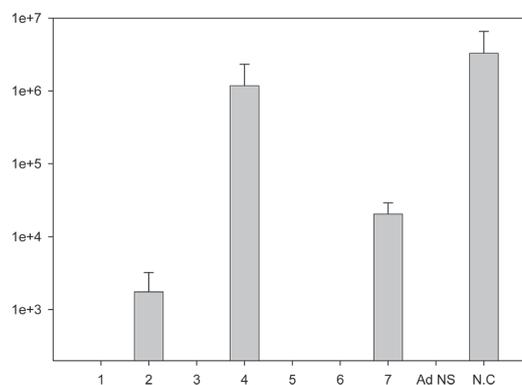
効率良くIFN- $\gamma$ を産生した。また(2B#1)においては強いCTL活性を示したが(1A#4)では確認されなかった。Vaccinia virusチャレンジ実験では(2B#1)のみが強いウイルス感染防御効果を示した。またVaccinia virusチャレンジ実験でグループ3, 4, 6, 7においても良好なウイルス防御が見られたため、これらのグループにもリポソーム結合に適した抗ウイルス効果を発揮するエピトープがあると考えられるため更に検討を繰り返している。

以上より現在の時点では(2B#1)がHCVに対して効果の高いワクチンになり得ることが示唆されている。

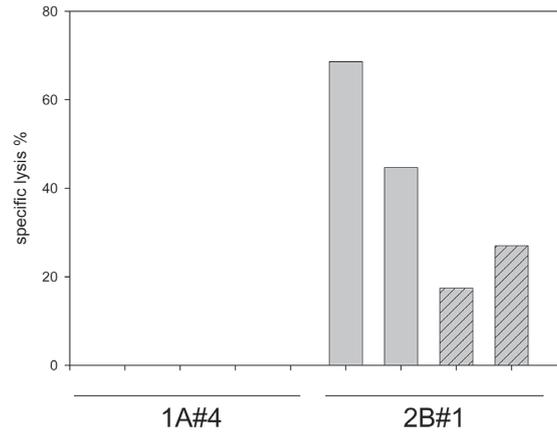
なお日本人のHLAの型は約30%がHLA-A2, 約50%がHLA-A24である。従って日本人の約80%はHLA-A2, A24のいずれかを所有している。我々の研究室ではHLA-A2の有効なエピトープを既に同定している(#3 YMNTPLPV)。そのエピトープと今回のHLA-A24のエピトープ合わせれば日本人の約80%に有効なワクチンになると考えられる。予防ワクチンとしてはまだ不十分であるがもし慢性肝炎の治療に使用できれば、十分に実用性を備えていると考えられる。この期待のもと現在、組み換えアデノウイルスを用い治療実験を行っている。



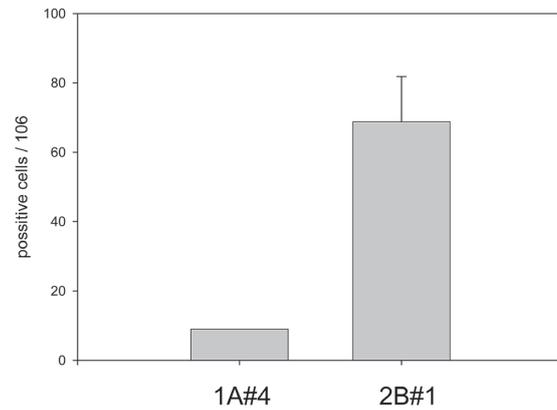
**Fig. 1.** Screening of pool Liposome 1-7. Each HLA-A24 Tg mouse received (f.p.) 50  $\mu$ l of pooled liposome containing 5  $\mu$ g of CpG. Spleen cells were prepared seven days after the last immunization for ELISPOT assays.



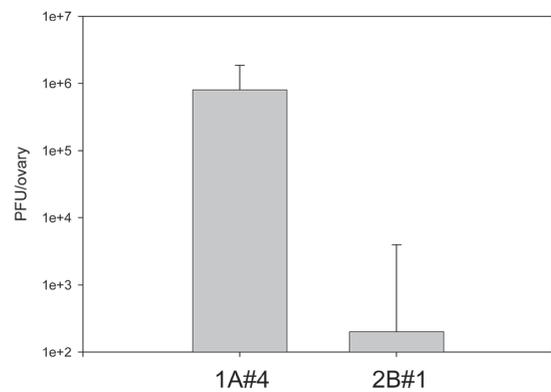
**Fig. 2.** Challenge experiments. The immunized and naïve mice were challenged at one week after the last immunization with  $2 \times 10^6$  PFU of VV-NS3 or NS4 (i.p.) and the virus titers in the ovaries were quantitated by plaque assays on BS-C-1 cells at day 5 postchallenge. A dotted line represents the lower limit of detection ( $2 \times 10^2$  PFU/gram [spleen]).



**Fig. 3.** <sup>51</sup>Cr Release assay. Each HLA-A24 Tg mouse received (i.p.) 20  $\mu$ l of Lip-1A#4 or Lip-2B#1 diluted in 30  $\mu$ l of PBS containing 5  $\mu$ g of CpG. Spleen cells were prepared seven days after the last immunization for <sup>51</sup>Cr release assays. E/T ratio was 100:1 (gray bars) and 30:1 (hatched bars). Data of two independent experiments are shown as two bars.



**Fig. 4.** ELISPOT (IFN- $\gamma$ ) assay. Each HLA-A24 Tg mouse received (i.p.) 20  $\mu$ l of Lip-1A#4 or Lip-2B#1 diluted in 30  $\mu$ l of PBS containing 5  $\mu$ g of CpG. Spleen cells were prepared seven days after the last immunization for ELISPOT assay.



**Fig. 5.** Challenge experiment. The immunized and naïve mice were challenged at one week after the last immunization with  $2 \times 10^6$  PFU of VV-NS3 or NS4 (i.p.) and the virus titers in the ovaries were quantitated by plaque assays on BS-C-1 cells at day 5 postchallenge. Mean values of virus titers of at least three mice/group are shown. A dotted line represents the lower limit of detection ( $2 \times 10^2$  PFU/gram [spleen]).

## 研究成果リスト

- 1) Takagi A, Kobayashi N, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Coupling to the surfaces of liposomes alters the immunogenicity of hepatitis C virus-derived peptides and confers sterile immunity. BBRC (2012) submitted.

## Reference List

- 1) Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL and Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* 2006;144:705-14.
- 2) Pawlotsky JM. Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. *Hepatology* 2006;43: S207-20.
- 3) Callendret B, Walker C. A siege of hepatitis: Immune boost for viral hepatitis. *Nat Med* 2011;17:252-3.
- 4) Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999;10:439-49.
- 5) Gruner NH, Gerlach TJ, Jung M-C, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, Hoffmann R, Zachoval R, Santantonio T, Cucchiari M, Cerny A, Pape GR. Association of hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 2000;181:1528-36.
- 6) Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Philips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499-512.
- 7) 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<sup>+</sup> T cells and induce potent antitumor immunity. *J Immunol* 2006;177:2324-30.
- 8) Takagi A, Matsui M, Ohno S, Duan H, Moriya O, Kobayashi N, Oda H, Mori M, Kobayashi A, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Highly efficient antiviral CD8<sup>+</sup> T-cell induction by peptides coupled to the surfaces of liposomes. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1383-92.
- 9) Ohno S, Kohyama S, Taneichi M, Moriya O, Hayashi H, Oda H, Mori M, Kobayashi A, Akatsuka T, Uchida T, Matsui M. Synthetic peptides coupled to the surface of liposomes effectively induce SARS coronavirus-specific cytotoxic T lymphocytes and viral clearance in HLA-A\*0201 transgenic mice. *Vaccine* 2009;27:3912-20.
- 10) Matsui M, Kohyama S, Suda T, Yokoyama S, Mori M, Kobayashi A, Taneichi M, Uchida T. A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A\*0201 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:1494-9.
- 11) Takagi A, Kobayashi N, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Coupling to the surfaces of liposomes alters the immunogenicity of hepatitis C virus-derived peptides and confers sterile immunity. BBRC (2012) submitted.

学内グラント 報告書

平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

## Coherent Anti-Stokes Raman Scattering による 無侵襲血糖値モニターの研究

研究代表者 戸井田 昌宏 (保健医療学部 医用生体工学科)

### 1. はじめに

生体を対象とした非侵襲的計測では、各種の物理エネルギーの中で光は適応性が高い。一方で生体を生きたままの状態 (in vivo) で光計測しようとする、生体固有の困難な問題が存在する。

第一に散乱現象である。散乱透過、散乱反射した光は、伝播履歴情報と位置情報はほとんど保持されないため、定量化と画像化は著しく困難である。

第二は生体内在物質による妨害の問題である。生体内の特定分子を識別するには分光計測 (蛍光、振動吸収) が有力であるが、生体内在物質には紫外～可視吸収をもつ蛍光物質が多種存在しアーティファクトの原因となる。このため目的物質固有の信号の弁別が困難である。

さらに第三は波長のミスマッチの問題である。生体分子はC-C、C-H、C-O等のband吸収で特定可能であるが、これら振動吸収の波長帯は赤外域である。生体は約70%が水であり、水の吸収は赤外域では大きく生体深部の振動分光計測を妨げる。一方で生体は0.7  $\mu\text{m}$  ~ 1.2  $\mu\text{m}$ の波長域は透過性が良く生体の光学的窓とも呼ばれている。このように生体を生きたままの状態で光計測する際、計測対象物の光特性とプローブ波長のミスマッチが生体内部の情報取得を困難にしている。これらが生体光計測の隘路となっている。

### 2. 研究の目的

本研究は上記生体光計測の隘路打破を目的とする。

目的物質からの信号を種々雑多な妨害信号から弁別するには、目的物質固有の信号が得られる赤外振動分光法が有力であるが、これでは生体内部情報を取得できない。生体内部の情報取得には生体透過性に優れた近赤外光をプローブとしたい。この生体の分光情報の取得における生体の光特性とプローブ波長の不整合の解決には、プローブ光として近赤外光を

使い赤外振動モードの情報を近赤外光で捉えられるCARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) が有望と考えている。これまでのOCT研究から生体組織2~3 mm程度の深部画像計測が可能なが実証できている<sup>1,2)</sup>。このことは、生体組織深度3 mm程度からの散乱反射光にはコヒーレンシーが残存していることの傍証でもある。このことから、散乱を伴う生体組織を対象として、励起光・プローブ光に近赤外波長を用いたCARSが適応可能との着想に至った。

一方医療ニーズをみると、血糖計測の非侵襲連続モニタリングが周術期の血糖管理、糖尿病患者管理から強く望まれている。しかし非侵襲血糖計測はこの30年来世界中で試みられているが、未だ実用に至っていない<sup>3)</sup>。ニーズとシーズの間に大きなギャップがあるのが非侵襲血糖計測分野である。

上記生体光計測の隘路を打破する全体構想の中で、本研究グラント期間では、非侵襲血糖計測を出口として、CARS技術の可能性検証を進めるための基本実験系を構築する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 近赤外光励起ラマン分光分析装置の開発

近赤外光励起によるグルコース水溶液からのストークスラマン信号およびアンチストークスラマン信号を検出するための励起光学系および回転楕円体集光器から構成されるラマン励起測定部を設計・試作した。

設計・試作したラマン励起測定部の概要を図1に示す。また回転楕円体集光鏡を図2に示す。

回転楕円体集光器の第1焦点にグルコース水溶液を満たした石英球セルを配置し、石英球セル中心にQ-SW Nd:YAGレーザー光を集光レンズによる集束する。集束点から発生するラマン散乱光は回転楕円体集光器の第2焦点に集められる。第2焦点に集光されたラマン散乱光は第2焦点を焦点にしたアクロマティックコンデンサレンズペアで集束され、ビーム径

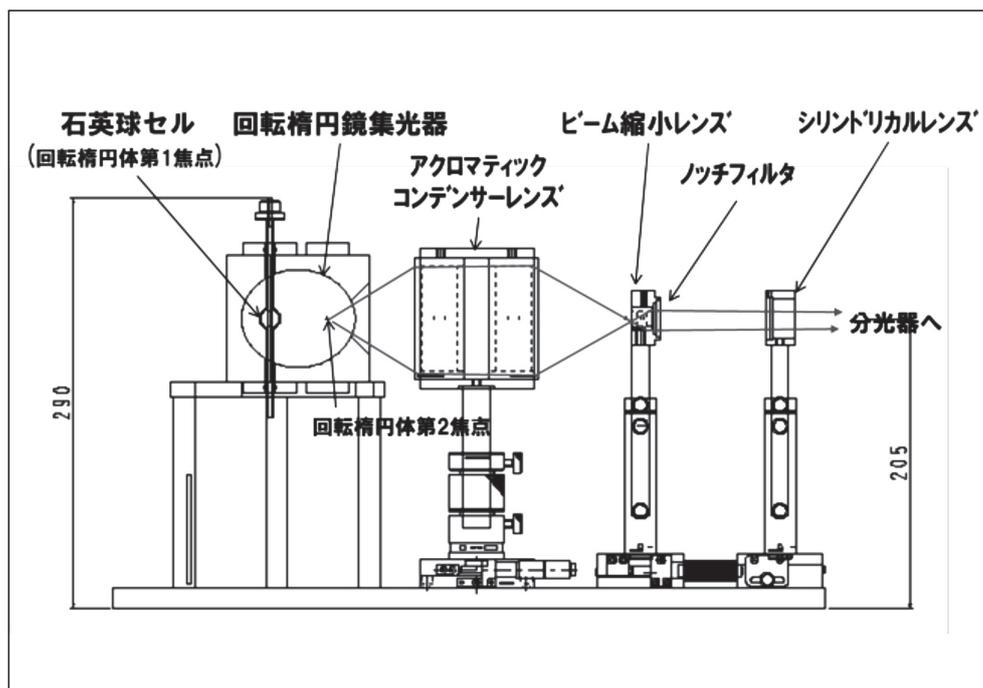


図 1. ラマン励起測定部の概要.

縮小レンズへ導光され、細径平行ビームに変換され、シリンダリカルレンズにより、後段の分光器へ導光される。

分光器はダブルモノクロメーターを用い、分光器出射スリット部に光ファイバー導光部を設け、光ファイバーを介して光検出器へラマン散乱光を導光する。光検出器からの出力はロックインアンプへ入力される。またQ-SWモニター信号(TTL)をロックインアンプの参照信号とした。ロックインアンプおよび分光器のモーターはPCで制御した。

試作したラマン励起測定部および分光解析部を用いて、グルコース水溶液からのラマン散乱光を分光解析した。またグルコース水溶液の濃度変化に対する、グルコース分子のC-O伸縮振動モードに対応したスペクトル成分の変化を評価した。

## (2) CARS実験システムの開発

既設のn秒Q-SW Nd:YAGレーザーとそのTHGを励起光としたOPO (Optical Parametric Oscillator) を用いたCARS実験系を構築した。図3にその実験概要図を示す。

Q-SW Nd:YAG/THGレーザーから基本波1064 nm光を取り出しCARS励起のポンプ光とした。またNd:YAG/THG励起のOPOからアイドラー光として1210 nm光を取り出しストークス光とした。ポンプ光は光遅延器を通してダイクロイックミラー上でストークス光と重畳される。ポンプ光とストークス光は光遅延器の調整によりタイミングを合わせる。タイミングの揃ったポンプ光とストークス光はCARS励起・検出系へプリズムミラーにより導入され、ダイクロイック

クミラーと近赤外用対物レンズ(×20)により、グルコース粉末試料に照射される。位相整合条件を満たす方向に放射されるアンチストークス光はグルコース粉末試料により散乱され、再び対物レンズにより集光されダイクロイックミラーを透過し、ポンプ光およびストークス光などの迷光をカットしアンチストークス光を透過するバンドパスフィルターを介して光検出器

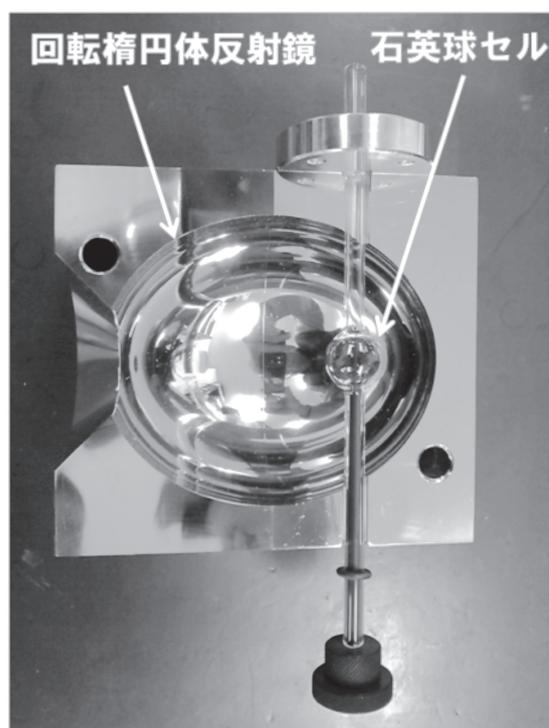


図 2. 試作した回転楕円体反射鏡 (1/2)

により検出される。なおCARS励起・検出系内の切り替えミラーおよびCCDによりポンプ光とストークス光と試料とのフォーカス調整がモニターを通して確認できる構成となっている。

このCARS実験システムにおいて、ポンプ光パルスのエネルギーを変化させた時のCARS信号強度を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 近赤外光励起グルコース水溶液ラマン散乱分光

試作・開発したラマン励起測定部および分光解析部を用いて、グルコース水溶液からのラマン散乱光を分光解析した。励起はQ-SW Nd:YAGレーザーの基本

波1064 nm光を用い、石英球セル中の1 molグルコース水溶液に励起レーザー集光レンズ $f = 75 \text{ mm}$ で集光した。レーザーエネルギーは50 mJ/P、繰り返しは10 ppsとした。またロックインアンプの時定数は1 secとした。その結果を図4に示す。

波長920 nm ~ 1100 nmのアンチストークス側の結果を示している。図中に矢印示したスペクトルは1064 nmは励起レーザー、1009 nm ( $493 \text{ cm}^{-1}$ ) ~ 1016 nm ( $444 \text{ cm}^{-1}$ )を含むスペクトル帯はグルコースの骨格振動モードに対応したスペクトルである。また940 nm ( $1200 \text{ cm}^{-1}$ ) ~ 950 nm ( $1100 \text{ cm}^{-1}$ )帯はC-O伸縮振動モードに対応したスペクトルである。

雑音スペクトルはあるものの、グルコースの指紋

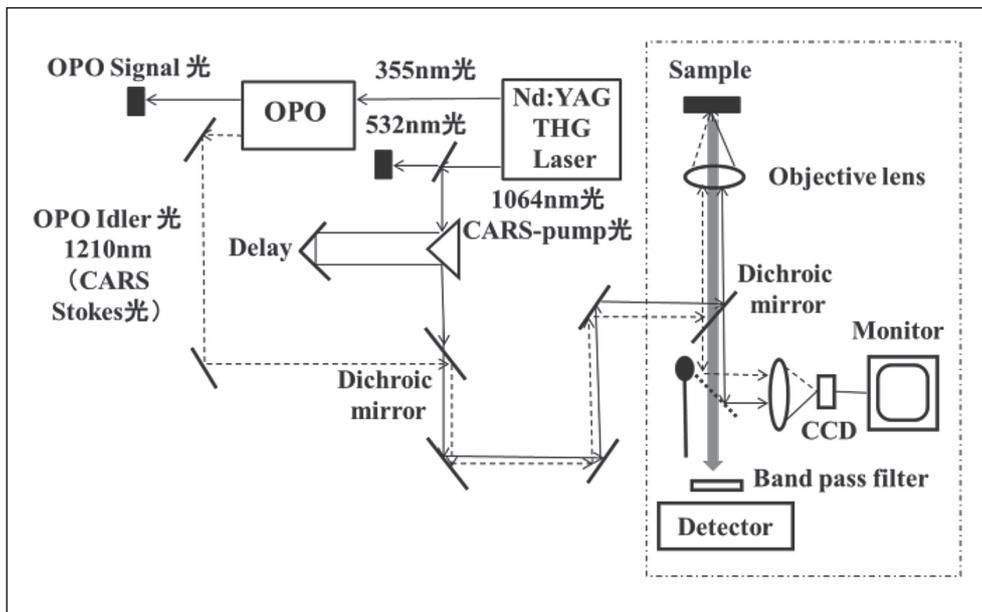


図 3. CARS実験システム概要図.

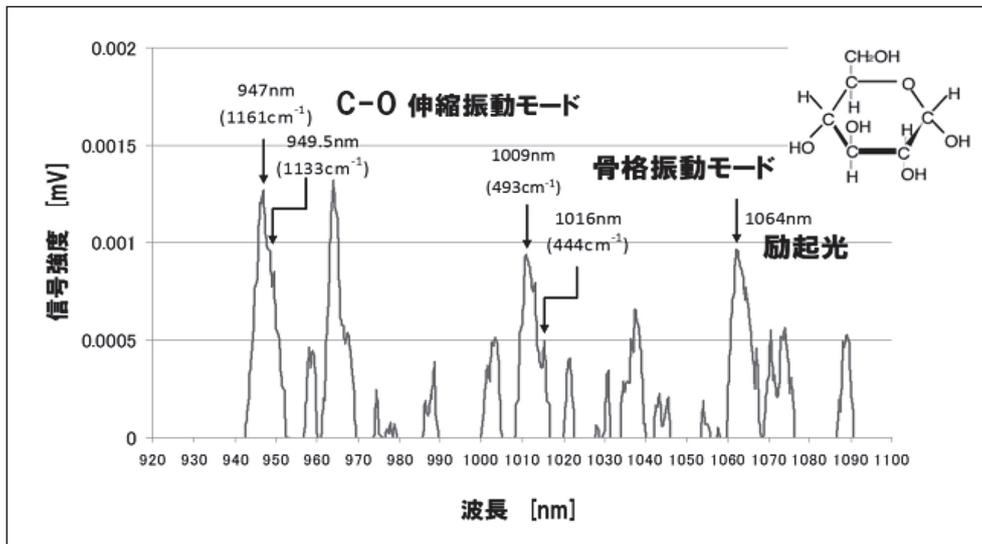


図 4. 1064 nm励起による1 molグルコース水溶液からのアンチストークスラマン光の分光スペクトル。励起光エネルギー：50 mJ/P × 10PPS, 時定数：1 sec.

スペクトルである、骨格振動モードならびにC-O伸縮振動モードに対応したスペクトルが確認できる。

次にラマン励起測定部のノッチフィルターを950 nm 中心波長、FWHM $10 \pm 2$  nmのバンドパスフィルターに替え、バンドパスフィルター直後の光検出器を配置し、グルコース水溶液の濃度を変化(50 ~ 1800 mg/dl)させて、950 nm帯のアンチストークスラマン光の強度を測定した。結果を図5に示す。

グルコース濃度変化に対しアンチストークス光強度が直線性を保持していることが確認できる。

## (2)CARS信号測定

図3に示したCARS実験系により、グルコース粉末を試料として、励起レーザーエネルギーに対するCARS信号の特性を評価した。図6にその結果を示す。

励起レーザーエネルギーの変化(10 ~ 50 mJ/P)に対しコヒーレントアンチストークス光強度が2乗特性を示していることが確認できる。

コヒーレントアンチストークス光強度は励起レーザーパルス光とストークスパルス光のタイミングに非常に鋭敏であるのは当然であるが、S/Nがパルスタイミングに対しても信号強度以上に鋭敏である

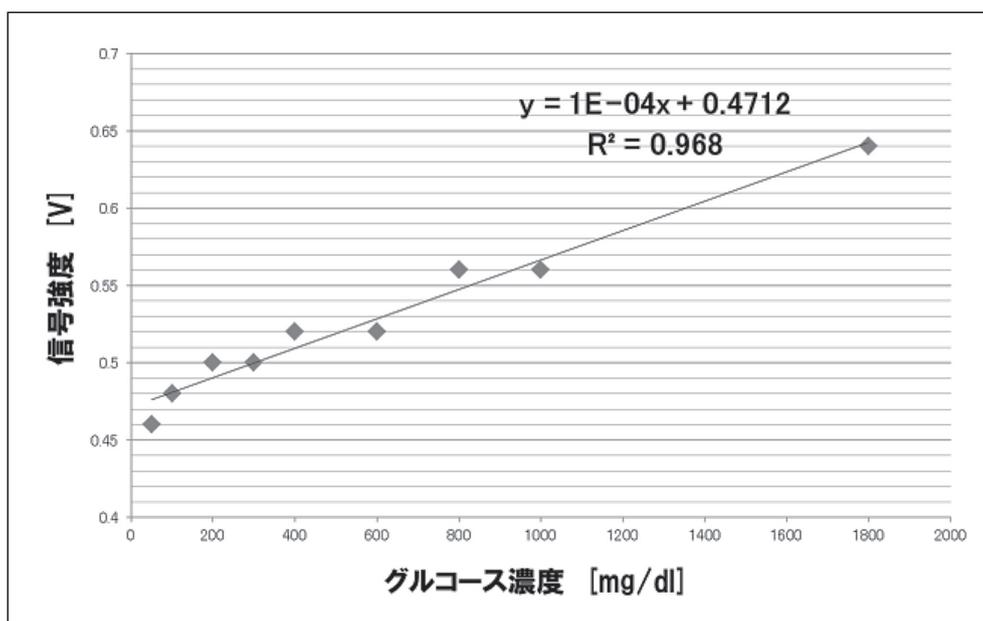


図5. グルコース濃度変化に対する950 nm帯アンチストークス光の強度特性.

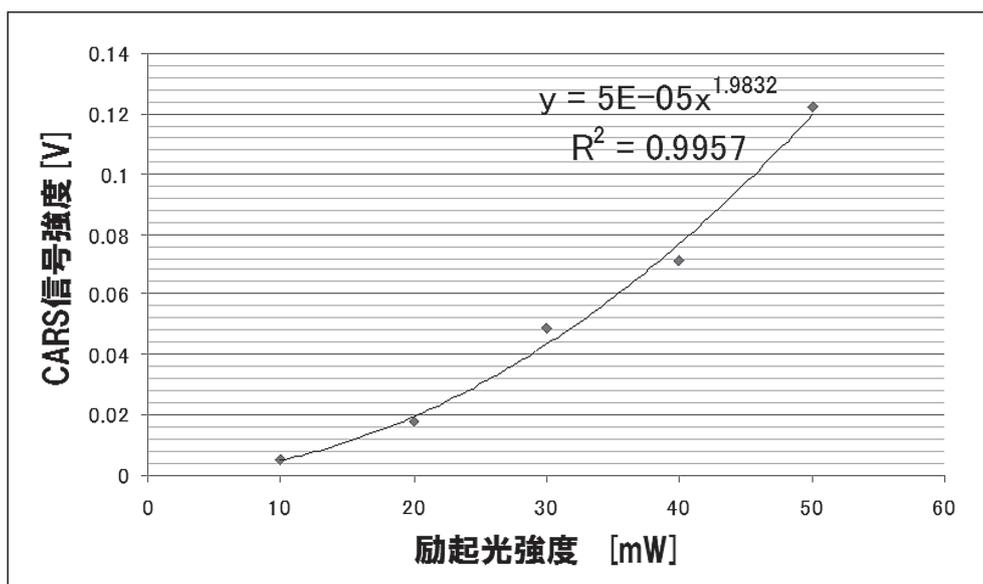


図6. 励起レーザーエネルギーに対するコヒーレントアンチストークス光強度特性. ポンプ光(1064 nm)エネルギー: 10 ~ 50 mJ/P × 10 PPS, ストークス光(1210 nm)エネルギー: 10 mJ/P × 10 PPS, 時定数: 1 sec.

ことが確認できた。この現象はCARS信号のS/Nが非共鳴過程に律速されることを考えると、新たなCARS信号の高S/N計測の可能性を示唆するものとして興味深い。

### (3)まとめ

- ① 既設設備(レーザ, OPO, 分光器)を活用し, ラマン分光の基本的計測・解析系を開発・整備した。
- ② これによりグルコース水溶液のアンチストークスラマンを分光計測した。
- ③ グルコース水溶液の濃度変化に対し, C-O伸縮振動モードに対応した950 nm帯アンチストークス光強度が比例することを確認した。
- ④ グルコース粉末試料からのコヒーレントアンチストークス光を計測し, コヒーレントアンチストークス信号が励起光強度に対し2乗特性を示すことを確認した。

## 5. 主な発表論文等

[産業財産権]

○出願状況(計 1件)

名称 : 計測装置及び計測方法  
 発明者 : 戸井田昌宏  
 権利者 : 学校法人埼玉医科大学  
 種類 : 特許  
 番号 : 特願2012-39854  
 出願年月日 : 2012/02/27  
 国内外の別 : 国内

### 参考文献

- 1) 戸井田昌宏. 日本特許 3999437 光断層画像化装置, 富士フイルム 2007/8/17
- 2) Toida M, Kawahara K. USP 7,542,145 Optical tomography method and optical tomography system. FUJIFILM Corporation (Tokyo, JP) 2009/6/2
- 3) O Khalil. Review non-invasive glucose, measurement technologies: An update from 1999 to the dawn of the new millennium. Diabetes Technology & Therapeutics 2004;6(5)660-97.

## 学内グラント 報告書

## 平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

## 咀嚼筋腱膜過形成症のプロテオーム解析

研究代表者 依田 哲也 (大学病院 歯科・口腔外科)

研究分担者 坂本 安<sup>1)</sup>, 佐藤 毅<sup>2)</sup>, 中本 文<sup>2)</sup>

## 緒言

咀嚼筋腱・腱膜過形成症は、側頭筋の腱や咬筋の腱膜などが過形成するために、筋の伸展を妨げて開口制限を呈する疾患である。以前は、難治性の顎関節症あるいは筋突起過長症などと誤診され、適切な治療が行われないことも少なくなかった。2008年の日本顎関節学会学術大会シンポジウムでは全国から集計された143症例のデータをもとに、名称・診断・治療・病理所見などについて討論され、咬筋前縁部の張り出しの触知とMRIによる診断の有効性と、腱・腱膜切除術で高い治療結果を得られることが確認された。また、我々は術後の開口訓練を適切に行えば長期的にも良好であることを報告した<sup>1)</sup>。2011年のアジア顎関節学会では特別講演にも取り上げられるなど、近年注目を集めている疾患である。しかしながら本疾患の特徴である腱および腱膜の過形成の病態および成因は明らかになっていない。必ず両側に発症することや学童期より発症する症例もあることから、何らかの遺伝的要因があり、そこに環境要因が相乗して発症するのではないかと考えている。発症要因を検討するためにも、まず腱・腱膜過形成の病態を明らかにする必要がある。そこで我々は、本疾患の腱組織に発現するタンパク質の同定を行い、正常な腱組織との比較により、本疾患の腱組織の特徴を見出すことを目的として本研究を行った。

## 材料と方法

本疾患患者3名(疾患群)と開口制限のない顎変形症患者3名(対照群)の側頭筋腱を採取した(本学倫理委員会承認番号595)。採取組織をSKミル(トッケン社)で凍結破碎し、抽出バッファー(7 M urea, 2 M thiourea, 30 mM Tris, 3% CHAPS, 1%

Triton X-100)にて溶解後、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes kit, 3.5 K MWCO, 0.5-3 ml (PIERCE)にて脱塩を行った。凍結・乾燥後に再溶解し、PIERCE 660 nm Protein Assay (PIERCE)にて蛋白定量を行い1 mg蛋白量に調整した。等電点電気泳動はImmobiline Dry Strip pH3-11 18 cm (GE Healthcare)を用いて Ettan IPGphor II (GE Healthcare)にて以下のプログラムで試行した。100 V, 2時間(step-and-hold); 500 V, 1時間(gradient); 1000 V, 1時間(gradient); 8000 V, 1時間(gradient); 8000 V, 40時間(step-and-hold)。その後、SDS電気泳動をExcelGel SDS XL 12-14% 245 × 180 cm (GE Healthcare)を用いてMultiphor II 2-D (GE Healthcare)にて以下のプログラムで試行した。1000 V, 20 mA, 40 W, 45分間; 1000 V, 40 mA, 40 W, 5分間; 1000 V, 40 mA, 40 W, 160分間。CBB G-250にて染色を行ったものをGS-800 Calibrated Densitometer (BIO-RAD)にてスキャンし、PDQuest (2-D Analysis Software Version 7.3)にて画像解析を行い両者間の蛋白スポットの差異解析を行った。スポットに有意な濃度差を認める蛋白群に関してMALDI/TOF MS (AXIMA-GFR, 島津製作所)によるPeptide Mass Fingerprinting (PMF)分析を行った。

## 結果

96のスポットに対して解析を行った結果、29を同定し(図1)、発現量に違いがみられた蛋白質は4つであった(表1)。コントロール群と比較して疾患群で増加したものはChainB, Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D(図2),  $\beta$ -crysallin A4(図3)であり、減少したものはmyosin light chain4(図4), collagen  $\alpha$ 2 (VI)(図5)であった。

## 考察

Fibrinogenは肝臓で生成される分子量340 kDaの糖蛋白質であり、2つのDドメイン(85~100 kDa)とそ

1) 中央研究施設

2) 大学病院 歯科・口腔外科

の間にある1つのEドメインで構成される<sup>2,3)</sup>。トロンビンによりフィブリンへと変換され、出血などの損傷に対して修復細胞の浸潤、血管新生・細胞増殖・再上皮化・創傷収縮などの治癒メカニズムを促進する。しかし、このメカニズムに不均衡が生ずると過度の癒痕形成や臓器の線維化を引き起こす<sup>4)</sup>。フィブリノゲンの蓄積は、腎臓、膵臓、皮膚、筋肉など、いくつ

かの臓器での線維化を促進する因子とされ<sup>4,5)</sup>、腱組織においても腱障害での蓄積が報告されている<sup>6,7)</sup>。今回の結果におけるフィブリノゲンの増加は、本疾患の腱組織に何らかの損傷が存在し、その治癒が正常に行われず、線維化亢進・癒痕形成が起きている可能性を示唆していると考えられた。myosin light chain4はmyosin IIの調節軽鎖であり、そのリン酸化を介し

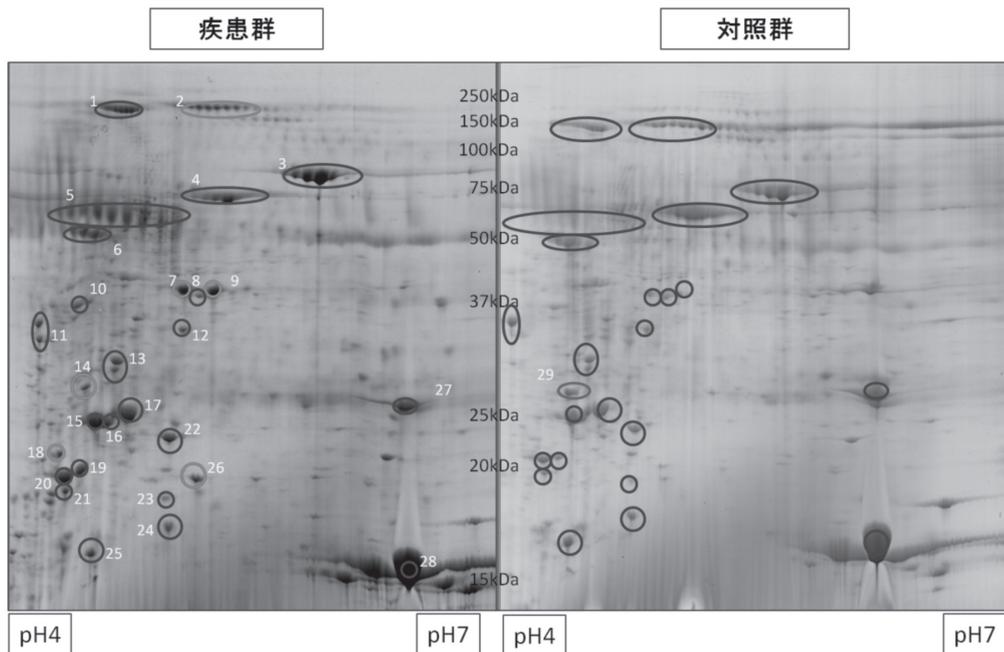


図 1.

表 1.

		MW	pI	score	coverage
1	liprin- $\alpha$	1326265	5.91	65	6
2	collagen alpha-2(VI) chain	109709	5.85	58	6
3	serotransferrin	79280	6.97	146	23
4	serum albumin	58513	5.92	92	17
5	nestin	177788	4.35	65	4
6	alpha-1-antitrypsin	44280	5.37	98	16
7	ChainB,Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D	36331	5.84	72	15
8	actin prepeptide	37125	5.19	83	20
9	ChainB,Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D	36331	5.84	88	22
10	actin,alpha cardiac muscle,isoform CRA_c	30498	5.23	77	17
11	tropomyosin beta chain isoform 1	32945	4.66	75	18
12	actin alpha skeletal muscle	42366	5.23	76	18
13	actin alpha skeletal muscle	42334	5.23	67	14
14	ChainB,Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D	38081	5.84	67	14
15	myosin light chain 1/3,skeltal muscle isoform 1f	21189	4.97	92	33
16	myosin light chain 3	22089	5.03	93	34
17	apolipoprotein A-1preprotein	30759	5.56	81	26
18	ChainB,Crystal Sstructure of Fibrinogen fragment D	38081	5.84	78	18
19	myosin regulatory light chain 2,venticular/cardiac muscle isoform	18777	4.92	82	27
20	myosin regulatory light chain 2,venticular/cardiac muscle isoform	18777	4.92	79	27
21	myosin regulatory light chain 2,skeltal muscle isoform	19116	4.89	80	33
22	TSA	18486	5.66	82	23
23	TSA	18486	5.66	71	21
24	transthyretin	13455	5.5	103	58
25	galectin	14917	5.34	80	33
26	beta-crystallin A4	22645	5.83	82	29
27	hemoglobin beta chain	11073	6.03	93	66
28	hemoglobin subunit beta	16102	6.76	81	37
29	myosin light chain 4	21665	4.97	131	31

てmyosin IIは活性される<sup>8)</sup>. 腱細胞(線維芽細胞)におけるmyosin IIは腱のコラーゲン線維の配列や安定, 腱の機械的性質(引張強度, 剛性)の生成に必要であり, *in vitro*でmyosin IIを不活化させた腱細胞は腱組織を収縮させなかった<sup>9)</sup>. 今回の実験でmyosin light chain4が減少したことはmyosin IIの不活化を意味し, 腱のコラーゲン線維の異常ならびに収縮機能や機械的

性質の低下が起きていることが考えられた.

collagen VIは非線維性コラーゲンであり,  $\alpha 1$  (VI),  $\alpha 2$  (VI),  $\alpha 3$  (VI)の3つの鎖からなる3量体である. 細胞外基質の異なる成分同士や細胞との結合に関与し, 組織特異的な構造や機能を生成し, collagen VIの欠損はコラーゲン線維の異常や機械的性質の低下を引き起こす<sup>10)</sup>. このことから, collagen  $\alpha 2$  (VI)の減少

### Fibrinogen fragment D

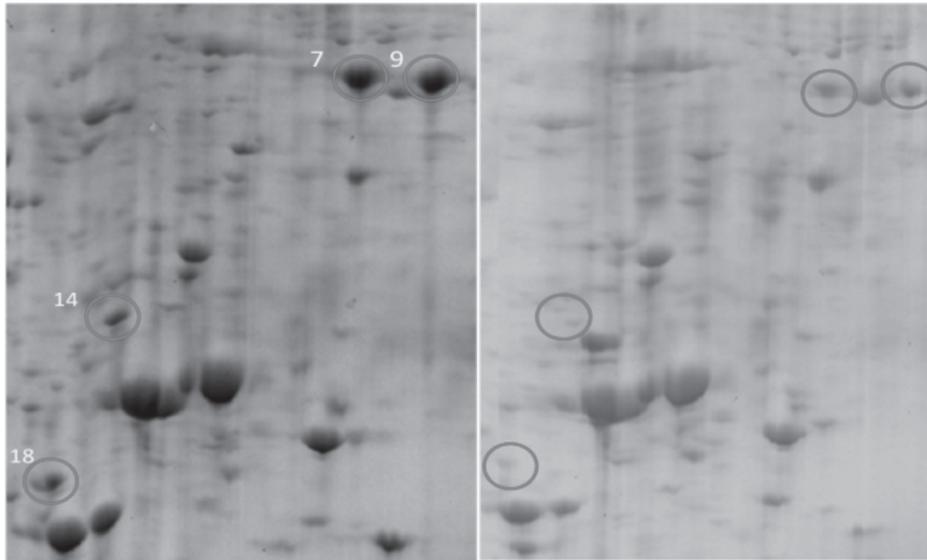


図 2.

### beta-crystallin A4

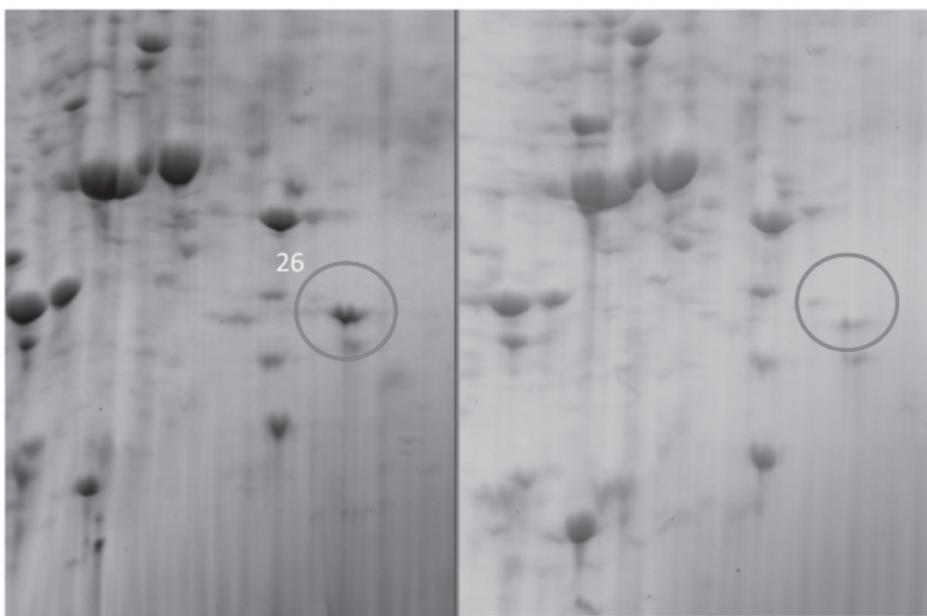


図 3.

により腱の構造と機能に異常を生じていることが考えられた。β-crytsallin 群は主に水晶体で発現し、酸化や加齢などのストレスのより凝集・不溶化し白内障の原因となる。β-crytsallin A4は網膜色素上皮の光照射の際に増加し、酸化ストレスに対して保護的に働くという報告はあるが<sup>11)</sup>、腱組織での発現や働きに関しては明らかになっていない。しかし、β-crytsallin B2の腎間質の線維化との関係を示唆する報告がある

など<sup>12)</sup>、クリスタリンは水晶体のみでなく、他の多くの臓器において重要な役割を果たしていると考えられており<sup>13,14)</sup>、今後の本疾患との関連の検討が望まれる。

以上のことから、本疾患における腱組織には、腱の損傷とその治癒異常、腱細胞の機能低下、コラーゲン線維の変化による変性、機械的性質の低下が起きており、正常な腱の機能を果たせない状態にあることが考えられた。

#### myosin light chain 4

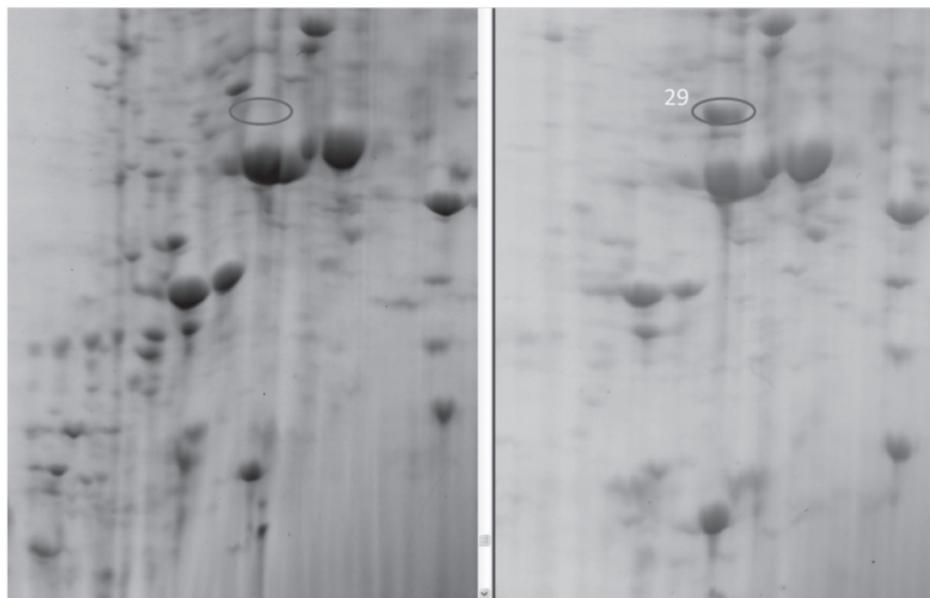


図 4.

#### collagen(α2) VI

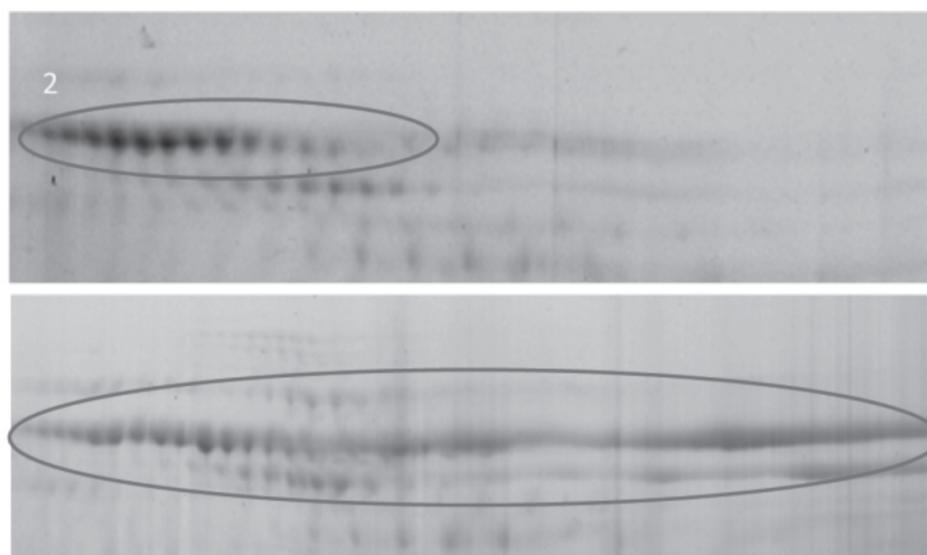


図 5.

## 参考文献

- 1) Yoda T, Sato T, Abe T, Sakamoto I, Tomaru Y, Omura K, et al. Long-term results of surgical therapy for masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia accompanied by limited mouth opening. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009;38:1143-7.
- 2) Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005;8:1894-904.
- 3) Bini A, Fenoglio JJ Jr, Mesa-Tejada R, Kudryk B, Kaplan KL. Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis* 1989;9(1):109-21.
- 4) Sørensen I, Susnik N, Inhester T, Degen JL, Melk A, Haller H, et al. Fibrinogen, acting as a mitogen for tubulointerstitial fibroblasts, promotes renal fibrosis. *Kidney Int* 2011;10:1035-44.
- 5) Vidal B, Serrano AL, Tjwa M, Suelves M, Ardite E, De Mori R, et al. Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev* 2008;13:1747-52.
- 6) Kvist MH, Lehto MU, Jozsa L, Järvinen M, Kvist HT. Chronic achilles paratenonitis. An immunohistologic study of fibronectin and fibrinogen. *Am J Sports Med* 1988;6:616-23.
- 7) Aström M, Rausing A. Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. *Clin Orthop Relat Res* 1995;316:151-64.
- 8) Gally C, Wissler F, Zahreddine H, Quintin S, Landmann F, Labouesse M. Myosin II regulation during *C. elegans* embryonic elongation: LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, three kinases with different roles. *Development* 2009;136(18):3109-19.
- 9) Kalson NS, Holmes DF, Kapacee Z, Otermin I, et al. An experimental model for studying the biomechanics of embryonic tendon: Evidence that the development of mechanical properties depends on the actinomyosin machinery. *Matrix Biol* 2010;29(8):678-89.
- 10) Izu Y, Ansorge HL, Zhang G, Soslowsky LJ, Bonaldo P, Chu ML, et al. Dysfunctional tendon collagen fibrillogenesis in collagen VI null mice. *Matrix Biol* 2011;30(1):53-61.
- 11) Lee H, Chung H, Lee SH, Jahng WJ. Light-induced phosphorylation of crystallins in the retinal pigment epithelium. *Int J Biol Macromol*. 2011;48(1):194-201.
- 12) Kang JH, Cho HJ, Lee IS, Kim M, Lee IK, Chang YC. Comparative proteome analysis of TGF-beta1-induced fibrosis processes in normal rat kidney interstitial fibroblast cells in response to ascofuranone. *Proteomics* 2009;9(19):4445-56.
- 13) Xi J, Farjo R, Yoshida S, Kern TS, Swaroop A, Andley UP. A comprehensive analysis of the expression of crystallins in mouse retina. *Mol Vis* 2003;9:410-9.
- 14) Graw J. Genetics of crystallins: cataract and beyond. *Exp Eye Res* 2009;88(2):173-89.

## 研究成果リスト

なし

## 学内グラント 報告書

## 平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>)  
欠損マウスにおけるウイルス感染防御

研究代表者 中野 貴成 (医学部 生化学)

研究分担者 松井 政則<sup>1)</sup>, 小谷 典弘<sup>2)</sup>

## 緒言

脂質ラフトはコレステロールに富んだドメインをなし、細胞膜上のタンパク質の不均一性および機能的集合に寄与している。特定のタンパク質は脂質ラフトへ輸送され、そこに係留される。脂質ラフトに集積したタンパク質はシグナル伝達など細胞の重要な機能に関わる<sup>1)</sup>。さらに膜の陥入や出芽を介して膜の代謝にも寄与している<sup>2)</sup>。また脂質ラフトはウイルスタンパクの集積に利用され、その後ウイルス粒子は脂質ラフトを介して細胞から出芽する<sup>3)</sup>。

脂質ラフトを介した膜の出入り、そしてその流動性にはクラスリンなどのタンパク成分だけでなく、膜成分の組成の変化も寄与していると考えられている。ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> はリン脂質をリゾリン脂質に酸化することで膜の構造を変化させる (図1)。それが、ウイルスが利用するラフトの fission に利用されている可能性がある。実際に人工膜においてホスホリパーゼ A<sub>2</sub> は脂質ラフトの出芽を促進する<sup>4)</sup>。

我々は小腸における細胞外酵素の食後ダイナミクスについて検討したとき、ミセルを形成する成分の1つであるリゾリン脂質によってラフトに係留されているアルカリホスファターゼが消失することを認めた<sup>5)</sup> (図2)。次いで腸上皮培養モデルを用いて、この消失には脂質ラフトが必要であり、また内因性のホスホリパーゼ A<sub>2</sub> を活性化することで、その遊離を促進できることを確かめた<sup>6)</sup>。

このようにホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の活性は脂質ラフトの fission に関係していることから、その障害はヒトに感染するウイルスの生活環の1つである細胞からの出芽が抑制されるかもしれない。これらの解明はウイルス感染メカニズムにおける更なる分子生物学的理解

と、新たな治療戦略を提示しうる可能性がある。そこで本研究では、*in vitro* および *in vivo* においてホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性を修飾した場合のウイルス感染・増殖効率の検討を試みた。

## 材料と方法

## インフルエンザウイルス

A/Aichi H3N2 インフルエンザウイルス (北海道大学獣医学部微生物学 喜田宏先生より) は孵化鶏卵培養法によって増殖させ、以下のウイルス感染実験に供試した。

*In vitro* ウイルス感染阻止アッセイ

MDCK にインフルエンザウイルスを 0.1 M.O.I (multiplicity of infection) で 1 時間感染させ、細胞を洗浄後 3 日間 2 μg/ml のアセチル化トリプシンを含む培養液で培養した。培養液を回収し、ウイルス力価を測定した。**カルシウム非依存ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> β 欠損マウス**

カルシウム非依存ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> β 欠損マウス (iPLA<sub>2</sub><sup>-/-</sup>) は大阪大学大学院医学系研究科遺伝医学講座遺伝子学 辻本賀英先生より供与いただいた<sup>7)</sup>。埼玉医大動物施設内で iPLA<sub>2</sub> β<sup>+/-</sup> 同士によるメーティングで iPLA<sub>2</sub> β<sup>-/-</sup>, iPLA<sub>2</sub> β<sup>+/+</sup> の個体を得た。遺伝子型は、ゲノム DNA をテンプレートとして、特異的プライマーを用いた PCR により確認した。

*In vivo* ウイルス感染実験

ケタミン麻酔下で、カルシウム非依存ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 欠損マウスもしくはその野生株に、1 匹あたり 1 × 10<sup>4</sup> の 50% 培養細胞感染濃度 (TCID<sub>50</sub>) のウイルスを鼻腔より感染させた<sup>8)</sup>。感染より 5 日後に肺組織を採取し、1 ml の PBS でホモジナイズして、その遠心上清をウイルス力価試験に供試した。

## インフルエンザウイルス力価試験

肺ホモジネートおよび培養上清の TCID<sub>50</sub> は Matsui らの方法<sup>9)</sup> に従い実施した。すなわち、肺ホモジネートの 10 倍希釈列を U 底の 96-well プレート内に

1) 医学部 微生物学

2) 医学部 生化学

調製し, そこに  $2.5 \times 10^4$  cells/well の細胞を播種した. 一日後にアセチル化トリプシンを含む培養液に交換し, さらに4日間培養した. 0.5%ニワトリ赤血球溶液を各wellに50  $\mu$ lずつ加え, 凝集パターンを観察した. ウイルス力価はTCID<sub>50</sub>により求めた.

#### 脂質ラフト染色

マウスより得た脾細胞の脂質ラフト Vybrant® Alexa Fluor® 488 Lipid Raft Labeling Kit (Invitrogen) を用いて染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した.

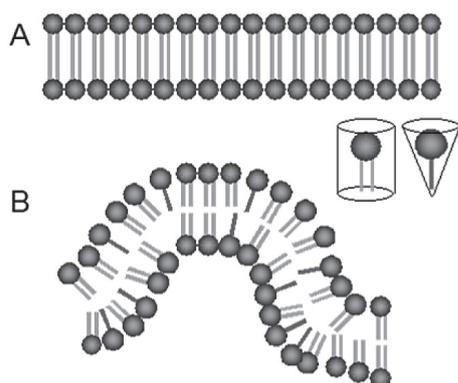


図1. リゾリン脂質の増加による膜構造変化のモデル図. A: 通常のリン脂質による二重膜構造. B: リゾリン脂質増加による膜構造の変化. B右上にリン脂質(左)とリゾリン脂質(右)の空間支配を示す.

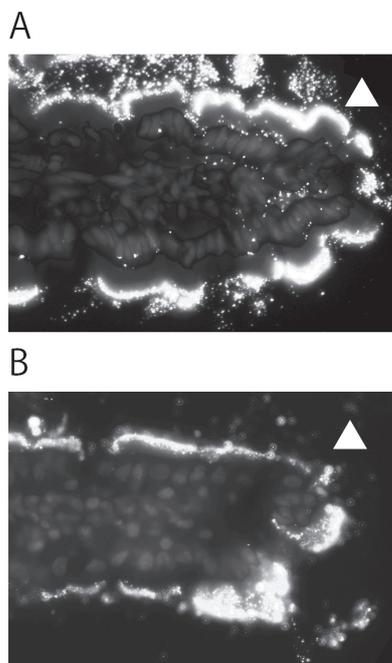


図2. 脂質負荷後に起こる脂質ラフト係留タンパク質アルカリホスファターゼ (ALP) の消失. 食前 (A) および食後 (B) の絨毛 ALP 活性染色像. 食後に矢印で示した活性陽性の部分の多くがBで消失していた.

## 結果

### iPLA<sub>2</sub> 活性阻害はMDCK細胞においてインフルエンザ増殖を抑制する

iPLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤 bromoenol lactone (BEL) および cPLA<sub>2</sub>/iPLA<sub>2</sub> 阻害剤 MAFP (methyl arachidonyl fluorophosphonate) は, 脂質ラフト形成阻害剤である methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) と同程度に培養上清中のウイルス力価を減少させた (図3). iPLA<sub>2</sub> は細胞膜リン脂質の再構成や分泌経路に重要な役割を果たしていることが知られている<sup>10</sup>. iPLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤 BEL 単独でもウイルス増殖を抑制できたことは, 本酵素が生体において脂質ラフト構造を利用した膜の代謝とダイナミクスを制御していることが考えられた.

### iPLA<sub>2</sub> $\beta$ 欠損マウスにおけるウイルス感染

MDCK細胞を用いた実験系において, iPLA<sub>2</sub> が脂質ラフトのダイナミクスを介してウイルス感染の経路に関与していることが示唆された. iPLA<sub>2</sub> には iPLA<sub>2</sub>  $\beta$  と iPLA<sub>2</sub>  $\gamma$  のアイソザイムがあるが, 生体では iPLA<sub>2</sub>  $\beta$  がその活性の多くを占め, 脳組織ではホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性全体のおよそ半分を占める. そこでこの iPLA<sub>2</sub>  $\beta$  を欠損したマウスで感染したインフルエンザの増殖を検討した. 予備検討の段階では wild-type, 欠損マウスにおいて肺ホモジネート中のウイルス力価に大きな差は認められなかった (図4). さらに個体数を増やして検討する必要がある.

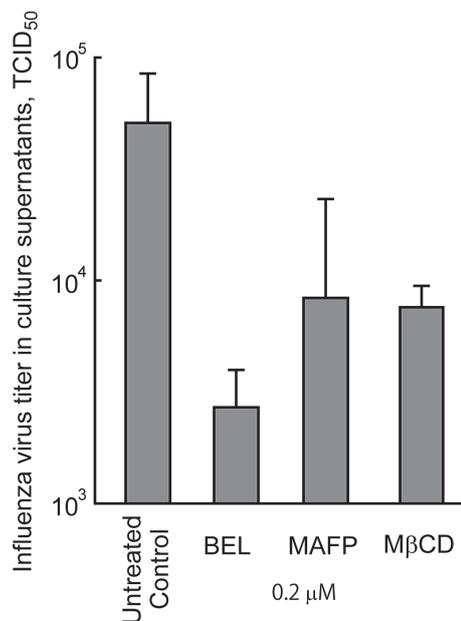


図3. 薬剤による *in vitro* ウイルス増殖防御. BEL, iPLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤; MAFP, iPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub> 阻害剤. M $\beta$ CD, 脂質ラフト形成阻害剤. BEL, bromoenol lactone; MAFP, methyl arachidonyl fluorophosphonate; M $\beta$ CD, methyl- $\beta$ -cyclodextrin.

### iPLA $_2$ $\beta$ 欠損マウスの脾細胞および腎臓初代培養細胞の脂質ラフト染色

インフルエンザ感染実験ではiPLA $_2$   $\beta$  欠損によって感染防御能への変化はあまり認められなかった。ウイルス感染防御は多様な因子が関係するシステムで

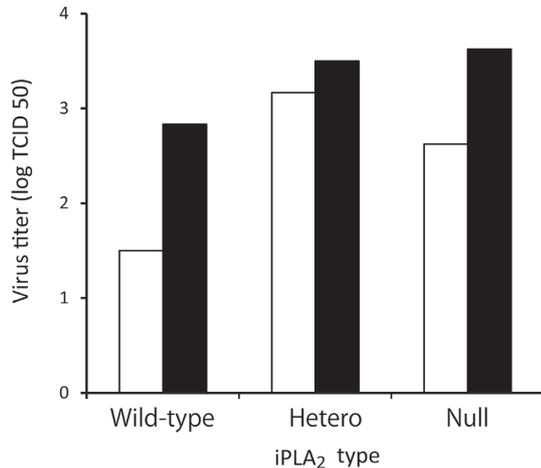


図 4. iPLA $_2$  欠損マウスにおけるウイルス感染防御能. インフルエンザ感染マウスより得た肺ホモジネートのウイルス力価により感染防御能を評価した. n2/ 群, 各個体の結果を白・黒のバーで示す.

あり, iPLA $_2$   $\beta$  欠損の影響が現れにくかった可能性がある. ではiPLA $_2$   $\beta$  欠損によって脂質ラフトの量的・質的变化はなかったのだろうか. iPLA $_2$   $\beta$  欠損の脂質ラフトへの影響を観察すべく, 脾細胞を調製し, 脂質ラフトを染色した. その結果, iPLA $_2$   $\beta$  欠損マウスでは脂質ラフトの染色が強く, 脂質ラフトが多く存在することが示唆された (図 5). また腎臓由来の繊維が細胞様初代培養細胞を同様に染色したところ, 野生株由来細胞に比較し, iPLA $_2$   $\beta$  を欠損した細胞では大きな脂質ラフトの形成が多く見られる傾向があった. これらの結果についてはまだ予備検討の段階にあり, 今後その有意性を確認する必要がある.

### 考 察

脂質ラフトはダイナミックに変化しながら, シグナル伝達, 膜の不均一性, 構造維持などに寄与している. そのダイナミクスを制御する因子はこれまで知られていない. 我々は小腸上皮細胞に発現する脂質ラフト集積タンパク質であるアルカリホスファターゼを観察する中で, その遊離とリゾリン脂質との関連を見いだした. アルカリホスファターゼを指標とした細胞レベルでの検討では, その遊離はホスホリパーゼ活性上昇により増加し, 脂質ラフト形成阻害剤により抑制されることを認めた.

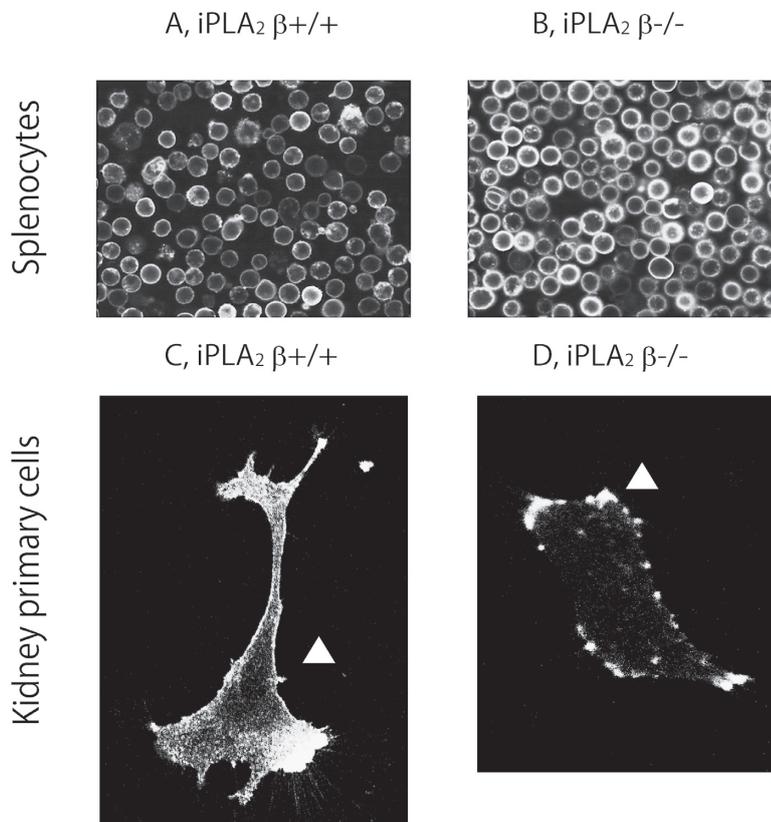


図 5. 脾臓リンパ球および腎臓由来線維芽細胞の脂質ラフト染色.

インフルエンザウイルスは細胞から出芽する際に脂質ラフトを利用する。その過程にホスホリパーゼ活性が関与しているかどうかを、細胞およびマウスにて検討した。その結果、ホスホリパーゼ活性、特に*iPLA<sub>2</sub>*の阻害によって細胞におけるウイルス増殖が減少していた。しかしながら主要な*iPLA<sub>2</sub>*アイソザイムである*iPLA<sub>2</sub>β*欠損マウスではウイルス増殖抑制効果は認められなかった。これは発生過程において*iPLA<sub>2</sub>β*欠損が*iPLA<sub>2</sub>*のアイソザイムである*iPLA<sub>2</sub>γ*などによって補償された可能性もある。*iPLA<sub>2</sub>β*欠損マウスを昨年4月によく導入できたが、繁殖が悪く*iPLA<sub>2</sub>β*欠損マウスを多数得ることが難しいため、まだ実験数が少ない。今後メーティングの規模をスケールアップし、試験数を増やして検討していく必要がある。

幸いなことに今年四月より生化学に赴任された小谷典弘先生は細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法<sup>11)</sup>を開発された脂質ラフト研究の第一人者である。早速共同研究を開始し、*iPLA<sub>2</sub>β*欠損マウスの脾細胞の脂質ラフトを染色したところ、Wild typeに比較し、*iPLA<sub>2</sub>β*欠損マウスの細胞の方がより強く染色され、脂質ラフトに富んでいることが示唆された。また腎臓由来の繊維が細胞様初代培養細胞では*iPLA<sub>2</sub>β*欠損により大きな脂質ラフトが形成される傾向を認めた。今後、*iPLA<sub>2</sub>β*欠損による脂質ラフトの質的・量的変化についてさらに検討を進めていく予定である。

*iPLA<sub>2</sub>β*はパーキンソン病の早期発症関連遺伝子であり<sup>12)</sup>、この欠損マウスは神経軸索ジストロフィー様の表現型を示す。欠損マウスは末梢・中枢を問わず神経細胞が加齢とともに退行し運動を含めた広範な機能低下を示す。しかしながらその神経細胞退行のメカニズムについてはよく分かっていない。我々はさらに*iPLA<sub>2</sub>β*欠損マウスを用いてその退行と脂質ラフトとの関連について研究を進めたい。

## 謝 辞

本研究の実施にあたりご協力いただきました生化学ならびに微生物学の皆様に感謝いたします。また感染動物の利用について有益なご助言を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。

## 引用文献

- 1) Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(1):31-9.
- 2) Lajoie P, Nabi IR. Regulation of raft-dependent endocytosis. *J Cell Mol Med* 2007;11(4):644-53.
- 3) Takeda M, Leser GP, Russell CJ, Lamb RA. Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(25):14610-7.
- 4) Staneva G, Angelova MI, Koumanov K. Phospholipase A<sub>2</sub> promotes raft budding and fission from giant liposomes. *Chem Phys Lipids* 2004;129(1):53-62.
- 5) Nakano T, Inoue I, Alpers DH, Akiba Y, Katayama S, Shinozaki R, et al. Role of lysophosphatidylcholine in brush-border intestinal alkaline phosphatase release and restoration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;297(1):G207-14.
- 6) Nakano T, Inoue I, Shinozaki R, Matsui M, Akatsuka T, Takahashi S, et al. A possible role of lysophospholipids produced by calcium-independent phospholipase A(2) in membrane-raft budding and fission. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788(10):2222-8.
- 7) Shinzawa K, Sumi H, Ikawa M, Matsuoka Y, Okabe M, Sakoda S, et al. Neuroaxonal dystrophy caused by group VIA phospholipase A2 deficiency in mice: a model of human neurodegenerative disease. *J Neurosci* 2008;28(9):2212-20.
- 8) Suda T, Kawano M, Nogi Y, Ohno N, Akatsuka T, Matsui M. The route of immunization with adenoviral vaccine influences the recruitment of cytotoxic T lymphocytes in the lung that provide potent protection from influenza A virus. *Antiviral Res* 2011;91(3):252-8.
- 9) Matsui M, Kohyama S, Suda T, Yokoyama S, Mori M, Kobayashi A, et al. A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A\*0201 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(3):1494-9.
- 10) Takenouchi T, Sato M, Kitani H. Lysophosphatidylcholine potentiates Ca(2+) influx, pore formation and p44/42 MAP kinase phosphorylation mediated by P2X7 receptor activation in mouse microglial cells. *J Neurochem* 2007;102(5):1518-32.
- 11) Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, Taniguchi N, Honke K. Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(21):7405-9.
- 12) Kauter KM, Höft C, Rissling I, Oertel WH, Möller JC. The PLA2G6 gene in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011;26(13):2415-7.

## 学内グラント 報告書

## 平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

## 着床不全に対する新規治療法の開発とその臨床応用

研究代表者 梶原 健 (大学病院 産科・婦人科)

研究分担者 板倉 敦夫\*

## 緒言

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

ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)は受精後7日目以降の胞胚から分泌されており、一般に知られている黄体賦活作用による妊娠維持機構以外にも、子宮内膜組織にはLH/CG受容体が発現していることから、着床期周辺の子宮内膜細胞に対するhCGの直接的な作用、さらに胚と子宮内膜の相互作用も想定されている。しかし、hCGの子宮内膜に対する直接作用に関しては未だ不明な点も多い。

子宮内膜の脱落膜化は受精卵の着床、絨毛細胞の侵入、胎盤の形成に重要な過程であり、これまでに我々はこの過程においてフォークヘッド転写因子の一つであるFOXO1が重要な役割を果たしていることを明らかとした。脱落膜化障害は着床障害、しいては不妊および産科異常の原因となる可能性が考えられている。本研究では子宮内膜間質細胞(HESCs)培養系を用いhCGが及ぼす脱落膜化さらには各種転写因子の発現に対する影響、またその分子メカニズムに関して検討を行い、hCGのHESCsの脱落膜化過程に及ぼす有用性の有無とその分子メカニズムを*in vitro*のレベルで検討し、その臨床応用の可能性を探ることを目的とした。

\*大学病院 産科・婦人科

## 材料と方法

## 1. ヒト子宮内膜間質細胞の分離・培養

手術で得られた標本から子宮内膜を採取し、間質細胞(HESCs)を分離・培養に用いた。既報の方法に従い、酵素処理後、子宮内膜組織を腺細胞と間質細胞に分離し、間質細胞をチャコール処理した10% FBS(DCC-FBS)、グルタミン、抗生物質を含んだDMEM/F12を用い、37℃、95% air、5% CO<sub>2</sub>の条件下にて培養した。Confluentに達したHESCsは0.5 mM 8-bromo-cAMP(8-bro-cAMP)と10<sup>-6</sup>M medroxyprogesterone acetate(MPA)の両者にて脱落膜化刺激を行い、同時に0.01~1 IU/mlの遺伝子組み換え recombinant hCG(rhCG)または尿由来 urinary hCG(uhCG)を添加し培養した、4日間培養を行い、タンパク質を抽出した。なお培養液は2% DCC-FBS、グルタミン、抗生物質を含んだDMEM/F12を用いた。

## 2. タンパクの精製とWestern blot解析

分離・培養したHESCsよりNP-40 lysis buffer(1% nonidet P-40, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 30 mM Na β-glycerophosphate, and protease inhibitors)を用いてタンパク質を抽出した。抽出したタンパク30 μgを10% SDS-PAGEゲルにて泳動後、PVDF-membraneへブロッティングした。一次抗体として抗FOXO1抗体(Cell Signaling社)、抗Cu, Zn-SOD1抗体(Santa Cruz社)、抗Mn-SOD抗体(Santa Cruz社)、抗LH/CG受容体抗体(Santa Cruz社)、抗α-Tubulin抗体(Santa Cruz社)を用い、ECL Detection System(Amersham社)により、それぞれのタンパク質を検出した。

## 3. アポトーシス細胞の検出

脱落膜化刺激を行ったHESCsに0.01~1 IU/mlのhCGを同時に添加した群と添加しない群を作製し4日間培養した。酸化ストレスとして100 mMの過酸化水素を添加し、さらに4時間培養しCell Death

Detection ELISA plus kit (Roche Diagnostics 社) を用いてアポトーシス細胞を検出した。

#### 4. 蛍光免疫組織化学

ガラス・カバースリップ上でHESCs培養し、前述した方法で脱落膜化刺激を3日間行い、同時に0.1 IU/mLのhCGを添加した群と、添加していない群を作製した。100 mMの過酸化水素を添加しさらに4時間培養し、その後4%パラホルムアルデヒドにて2時間固定した。抗Bax抗体 (Santa Cruz 社)、抗Bcl-2抗体 (Dako 社) にて蛍光免疫組織化学法を用いその発現を検討した。

### 結 果

#### 1. HESCsにおけるLH/CG受容体の発現

HESCsにおけるLH/CG受容体の発現は脱落膜化刺激を行うことにより、その発現は抑制されたが、rhCGを添加することにより回復してきた。

#### 2. HESCsの形態に及ぼすhCGの影響

HESCsは形態学的には8-bro-cAMPとMPAによる刺激を行うと脱落膜化細胞に特有な大型の敷石状の形態を示していた。しかし脱落膜化刺激を行ったHESCsにrhCGを添加しても大きな形態学的な変化は示さなかった。

#### 3. HESCs酸化ストレス抵抗性へのhCGの影響

以前我々が報告したのと同様に、脱落膜化刺激を行うことにより過酸化水素(酸化ストレス)にて誘導されるアポトーシス細胞は有意に減少した。さらに脱落膜化したHESCsにrhCGを添加することにより濃度依存性にアポトーシス細胞は減少した。これまでに我々が脱落膜化刺激により誘導され、脱落膜化機構に重要な役割を果たしていると報告してきた転写因子のひとつであるFOXO1は、8-bro-cAMPとMPAによる刺激によりその発現は誘導され、hCGを添加することにより、さらに濃度依存性にその発現は誘導された。またFOXO1の標的遺伝子で活性酸素消去酵素であるMn-SODも同様にrhCGを添加することにより濃度依存性にその発現が増強された。しかし他の活性酸素消去酵素のCu, Zn-SODおよびcatalaseの発現には変化はなかった。

一方、pro-apoptotic因子であるBaxはrhCGを添加することによりその発現は抑制されたが、anti-apoptotic因子であるbcl-2の発現はrhCGを添加することにより増強していた。

#### 4. 製剤の由来によるhCGの影響の相違

現在hCGは製剤の由来が異なる遺伝子組み換え技術により作成されたrhCGと尿由来uhCGの2種類の製剤があるが、製剤による作用の差についても検討した。上述したように過酸化水素によって誘導されるアポトーシス細胞はrhCGの添加により減少したが、uhCGを添加すると逆に増加した。

### 考 察

脱落膜化HESCsはrhCG添加により(1)FOXO1を介したMn-SODの発現誘導(2)Baxの発現抑制、bcl-2の発現誘導、の2つのメカニズムを介して、酸化ストレス抵抗性が強化されることが明らかとなった。rhCGは子宮内膜に作用し、転写因子の発現を介して妊娠維持作用を果たし、その適切な使用が着床率を向上させる可能性が示唆された。

### 研究成果リスト

#### 1. 論文発表

- 梶原健, 石原理. ホルモン療法による着床率の向上. 臨床婦人科産科 2010;64:858-61.
- Brosens JJ, Hodgetts A, Feroze-Zaidi F, Sherwin JR, Fusi L, Salker MS, Higham J, Rose GL, Kajihara T, Young SL, Lessey BA, Henriot P, Langford PR, Fazleabas AT. Proteomic analysis of endometrium from fertile and infertile patients suggests a role for apolipoprotein A-I in embryo implantation failure and endometriosis. Mol Hum Reprod 2010;16:273-85.
- Kajihara T, Uchino S, Suzuki M, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O. Human chorionic gonadotropin confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis in decidualizing human endometrial stromal cells. Fertil Steril 2011;95:1302-7.
- Kajihara T, Tochigi H, Uchino S, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O. Differential effects of urinary and recombinant chorionic gonadotropin on oxidative stress responses in decidualizing human endometrial stromal cells. Placenta 2011;32:592-7.
- Kajihara T, Tochigi H, Prechapanich J, Uchino S, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O. Androgen signaling in decidualizing human endometrial stromal cells enhances resistance to oxidative stress. Fertil Steril 2012;97:185-91.

#### 2. 学会発表

- Kajihara T, Ishihara O. Decidualized HESCs treated with rhCG become resistant to cell death induced by oxidative stress, IFSS2010 20<sup>th</sup> World Congress on Fertility and Sterility, 平成22年9月, Munnich
- 梶原健, 中山真人, 鈴木元晴, 難波聡, 三木明德, 岡垣竜吾, 板倉敦夫, 石原理. 子宮内膜脱落膜化細胞の酸化ストレス抵抗性獲得メカニズムの検討, 第62回日本産科婦人科学会総会・学術集会, 平成22年4月, 東京
- 梶原健. 着床不全の病態と治療法の可能性 -hCG療法を中心に(シンポジウム), 第142回日本生殖医学会関東連合地方部会, 平成22年6月, 栃木

- 4) 梶原健, 栃木秀乃, 石原理. 脱落膜化細胞へのhCGの直接作用はレコンビナントと尿由来で異なる, 第28回日本受精着床学会総会・学術講演会, 平成22年7月, 横浜
- 5) 梶原健, 栃木秀乃, 内野聡美, 石原理. 脱落膜化細胞へのhCGの直接作用は製剤の由来により異なる, 第55回日本生殖医学会・学術講演会, 平成22年11月, 徳島
- 6) Kajihara T, Prechanich J, Tochigi H, Ishihara O. Differential effects of urinary and recombinant chorionic gonadotropin on oxidative stress responses in decidualizing human endometrial stromal cell, 16<sup>th</sup> World Congress on In Vitro Fertilization, 平成23年9月, Tokyo
- 7) Prechanich J, Kajihara T, Tochigi H, Ishihara O. Heparin prevents programmed cell death induced by oxidative stress in human decidualized endometrial stromal cells, 16<sup>th</sup> World Congress on In Vitro Fertilization, 平成23年9月, Tokyo
- 8) Prechanich J, Kajihara T, Tochigi H, Uchino S, Ishihara O. Heparin prevents programmed Cell Death Induced by Oxidative Stress in Human Decidualized Endometrial Stromal cells, 第56回日本生殖医学会学術講演会・総会, 平成23年12月, 横浜
- 9) 梶原健, 栃木秀乃, 板倉敦夫, 石原理. 子宮内膜脱落化細胞へのhCGの直接作用はレコンビナントと尿由来で異なる, 第63回日本産科婦人科学会学術講演会, 平成23年8月, 大阪
- 10) 梶原健, 小黒辰夫, 田中嘉代子, 内野聡美, 栃木秀乃, 石原理. 子宮内膜脱落膜化細胞に対するアンドロゲンの直接的影響, 第43回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 平成23年9月, 大阪
- 11) 梶原健, 栃木秀乃, 内野聡美, 石原理. アンドロゲンは子宮内膜脱落膜化細胞に対して形態的・機能的にも影響を与える, 第56回日本生殖医学会学術講演会・総会, 平成23年12月, 横浜

### 3. 受賞

IFFS2010 (国際不妊学会) Poster Prize. Kajihara T, Ishihara O. Decidualized HESCs treated with rhCG become resistant to cell death induced by oxidative stress

## 学内グラント 報告書

## 平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

## 脳内神経回路オシレーション発生における GABA ニューロンの役割

研究代表者 伊丹 千晶 (医学部 生理学)

研究分担者 村越 隆之\*

## 緒言

神経の活動依存的変化(可塑性)は、脳の神経回路形成と記憶学習の基本メカニズムと考えられている。発達期の脳の神経回路形成は、遺伝的因子と経験的因子の相互作用によって進行する。とりわけ臨界期には、経験依存的に神経回路を再構成し、それ以後の脳機能を規定することになる。

大脳皮質のニューロンは、興奮性と抑制性の2種類に大別されるが、抑制性ニューロンは、全体の約20%を占める。興奮性細胞は伝達物質としてグルタミン酸を放出し、シナプス後細胞に脱分極を起こすが、抑制性細胞は、 $\gamma$ アミノ酪酸(GABA)放出して、シナプス後細胞に過分極を起こし、興奮性ニューロンの情報伝達を調節している。

発達期の視覚皮質では、GABA細胞が可塑性の発現に重要な働きをしていることが示唆されていることから<sup>1)</sup>、GABA細胞と可塑性発現との関連には多大の注目をうけているが、過分極が可塑性を発現させるメカニズムの詳細についてはほとんどわかっていない<sup>2)</sup>。

一方、脳の特定部位では興奮性シナプスの活動に伴い、抑制性ニューロン回路に振動(オシレーション、リズム活動)を誘発することが知られている。例えば、Non-REM睡眠開始時に脳波で記録される除波・紡錘波は、視床-皮質回路のオシレーションにより発生すると示唆され、記憶形成や癲癇発作に関与していると考えられている。

本研究では、抑制性回路が脳機能にどのように関与しているのか、特に、抑制性回路の異常により起こる神経ネットワークオシレーションなどの脳のリズム活動、及び可塑性発現のメカニズムを検討する。

## 材料と方法

\*医学部 生化学

抑制性回路が「神経可塑性」にどのように寄与しているか明らかにするため、外的刺激に最も感受性をもつ「臨界期」と呼ばれる時期のマウス大脳皮質を実験材料とした。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。刺激電極を入力線維(視床または皮質2/3層)に置き、皮質第2/3層の興奮性細胞(顆粒細胞、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ホールセル電流を記録した。記録は電流固定下で行い、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

## 抑制性回路の発達によるスパイクタイミング依存性可塑性の変化

視床からの興奮性入力、皮質第4層細胞にシナプス結合し、さらに4層細胞は2/3層細胞へシナプス結合する。体性感覚皮質の臨界期可塑性には、4層-2/3層間シナプスが重要な役割を果たすと考えられている。また、このシナプスは、可塑性の方向と程度がシナプス前細胞(4層細胞)とシナプス後細胞(2/3層細胞)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)が重要と考えられている。以前、我々は、視床からダイレクトに入力を受ける4層パルブアルブミン陽性FS(Fast spiking cell)抑制性細胞の発現は、生後2週以降に始まることを示した<sup>3)</sup>。また、このFS細胞は、4層-2/3層フィードフォワード抑制回路を形成し、4層細胞と2/3層錐体細胞の発火タイミングを極めて精密に制御していることを示した<sup>4)</sup>。すなわち、生後2週以降にはじめて、4層→2/3層順のスパイク発火が起こることになる。そこで今回、スパイク発火順序形成前後(生後2週前後)でスパイクタイミン

グ依存性可塑性の性質が変化する可能性を検討し、抑制性回路の発達と可塑性発現の関連を探索した。その結果、これまでの報告と一致して、生後3週以降では、プレーポスト順の発火タイミングでは、長期増強 (Long-Term Potentiation; LTP)、ポストプレー順の発火タイミングでは、長期抑圧 (Long-Term depression; LTD) が誘発されることが確認出来た<sup>5)</sup>。ところが、生後2週目にはポストプレータイミングによる長期抑圧が欠落し、その代わりに、LTPが誘発することを見出した。すなわち、生後2週目ではプレーポスト順でもポストプレー順でもいずれもシナプス強度が強化され、生後3週以降とは異なるスパイクタイミング依存性可塑性を示すことが明らかとなった。

#### スパイクタイミング依存性可塑性の性質変化メカニズム

大麻の有効成分であるカンナビノイドは、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。一方、大脳皮質体性感覚野においては、4層-2/3層間のスパイクタイミング依存性可塑性のうち、ポストプレータイミング刺激による長期抑圧は、カンナビノイド依存性であることが知られていた。上述のように、生後2週令の動物では4層-2/3層間には異なるスパイクタイミング依存性可塑性が発現され、長期抑圧が見られないことを明らかにしたが、長期抑圧の欠落は、4層-2/3層シナプスにおいて、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。

#### 臨界期開始にはLTDが必要である

ラットやマウスなどのげっ歯類では、体性感覚、なかでも頬ヒゲの感覚が非常に良く発達し、大脳皮質体性感覚野第4層には、同一の髭からの入力を受ける神経細胞が集まったバレル構造が存在する。臨界期において、頬ヒゲからの入力を遮断することにより体性感覚野第4層から2/3層への興奮性シナプス伝達が減弱する。これは、入力遮断による神経活動の低下により長期抑圧が誘導されているということが示されており<sup>6)</sup>、臨界期可塑性の発現には、ヒゲ除去により誘発される長期抑圧が必要であることが明らかとなっている。一方我々は、上述のように生後2週目には長期抑圧が欠落していることを見出した。このことは、長期抑圧メカニズムの獲得が臨界期可塑性の開始を導くことを強く示唆している。そこで我々は、長期抑圧が欠落した生後2週令のマウスにおいて、ヒゲを切除により4層-2/3層シナプス伝達が減弱するかを調べた。その結果、生後2週令以前に施行したヒゲ切除では、4層-2/3層の興奮性シナプス伝達が減弱しないことを見出した。このことは、活動依存的長期抑圧の獲得が臨界期開始には必要であることを示している。

臨界期発現のメカニズムを明らかにすることは、社

会的影響力も甚大であると考えられる。直接的には、早期教育や生涯教育のあり方等に議論を起すことも考えられる。また、臨界期発現を制御する方法を見出せば、さらに影響力は大きい。具体的には、薬物により可塑性発現を制御することが可能となれば、例えばリハビリテーション時の効果的投薬や訓練法の開発、また認知症の改善薬の開発等も視野に入ることが期待される。

#### 引用文献

- 1) Hensch TK, Stryker MP. Columnar architecture sculpted by GABA circuits in developing cat visual cortex. *Science* 2004;303:1678-81.
- 2) Fagiolini M, Fritschy JM, Löw K, Möhler H, Rudolph U, Hensch TK. Specific GABA<sub>A</sub> circuits for visual cortical plasticity. *Science* 2004;303:1681-3.
- 3) Itami C, Kimura F, Nakamura S. Brain-derived neurotrophic factor regulates the maturation of layer 4 fast-spiking cells after the second postnatal Week in the developing barrel cortex. *J Neurosci* 2007;27:2241-52.
- 4) Kimura F, Itami C, Ikezoe K, Tamura H, Fujita I, Yanagawa Y, Obata K, Ohshima M. Fast activation of feedforward inhibitory neurons from thalamic input and its relevance to the regulation of spike sequences in the barrel cortex. *J Physiol* 2010;588:2769-87.
- 5) 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.
- 6) Allen CB, Celikel T, Feldman DE. Long-term depression induced by sensory deprivation during cortical map plasticity in vivo. *Nat Neurosci* 2003;6:291-9.

#### 研究成果リスト

##### 論文

- 1) Itami C, Kimura F. Developmental switch in the spike-timing dependent plasticity contributes to the initiation of the critical period. (Submitted)
- 2) 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. *Cereb Cortex*. 2012 Mar 30.
- 3) Kimura F, Itami C, Ikezoe K, Tamura H, Fujita I, Yanagawa Y, Obata K, Ohshima M. Fast activation of feedforward inhibitory neurons from thalamic input and its relevance to the regulation of

spike sequences in the barrel cortex. *J Physiol* 2010;588:2769-87.

#### 学会発表

- 1) 木村文隆, 伊丹千晶, 山崎美和子, 渡辺雅彦. 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の収束, 第89回日本生理学会大会, 平成24年3月, 長野
- 2) 伊丹千晶, 山田真弓, 木村文隆, 池田正明, 中尾啓子. 子宮内電気穿孔法と電気生理学的手法による大脳皮質体性感覚野抑制性神経細胞の分化・成熟の分子機構の解析, 第34回日本分子生物学会年会, 平成23年12月, 横浜
- 3) Itami C, Kimura F. A developmental switch in the spike timing dependent plasticity coincidentally occurring with the initiation of map plasticity in the barrel cortex, Society for Neuroscience (41<sup>th</sup> Annual meeting), November 2011, USA
- 4) 水井利幸, 上垣浩一, 石川保幸, 原とも子, 高橋正身, 塩坂貞夫, 伊丹千晶, 熊ノ郷晴子, 小島正己. 多型による神経栄養因子の新しい機能制御, 第34回日本神経科学大会, 平成23年9月, 横浜
- 5) 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の集束, 第34回日本神経科学大会, 平成23年9月, 横浜
- 6) 安達直樹, 沼川忠広, 熊丸絵美, 伊丹千晶, 千葉秀一, 飯島良味, 仙波りつ子, 功刀浩. フェンサイクリジンが引き起こすシナプス減少にBDNFの機能障害が関与する, 第34回日本神経科学大会, 平成23年9月, 横浜
- 7) Kimura F, Itami C. Developmental switch in the spike timing dependent plasticity at layer 4 to layer 2/3 synapses in coincidence with the initiation of critical period in the mouse barrel cortex, 8<sup>th</sup> IBRO world congress of neuroscience, July 2011, Italy
- 8) 伊丹千晶, 木村文隆. バレル皮質生後2週目に現れる2/3層錐体細胞へのスパイクタイミング依存性可塑性の解析, 第88回日本生理学会大会, 第116回日本解剖学会総会・全国学術集, 平成23年3月, 横浜
- 9) Itami C, Yanagawa Y, Kumanogoh H. Gene expression analysis of inhibitory cells derived from developing barrel cortex in BDNF knockout mice, 第32回日本分子生物学会年会, 平成22年12月, 神戸
- 10) 長岡麻衣, 伊丹千晶, 山田真弓, 木村文隆, 池田正明, 中尾啓子. 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・神経化学的解析法の開発, 第32回日本分子生物学会年会, 平成22年12月, 神戸
- 11) Itami C, Kimura F. Characterization of bilateral spike timing dependent plasticity specifically appeared during the 2nd postnatal week at L4-L2/3 synapses in the mouse barrel cortex, Society for Neuroscience (40<sup>th</sup> Annual meeting), November 2010, USA
- 12) 安達直樹, 沼川忠広, 熊丸絵美, 伊丹千晶, 仙波りつ子, 功刀浩. フェンサイクリジンはBDNFの分泌阻害を介して大脳皮質ニューロンの興奮性シナプスを減少させる, *Neuro* 2010, 平成22年10月, 神戸
- 13) 木村文隆, 伊丹千晶. バレル皮質4層-2/3層間のスパイクタイミング依存性可塑性と発達に伴う変化, *Neuro* 2010, 平成22年10月, 神戸
- 14) 木村文隆, 伊丹千晶. 4-2/3層間シナプスのフィードフォワード抑制による発火タイミング制御の発達とそれに伴うSTDPの変化, 第87回日本生理学会大会, 平成22年5月, 神戸

## 学内グラント 報告書

## 平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

Arterial spin-labeled MRI を用いた鍼刺激前後の脳血流評価  
—片頭痛患者と健康成人の比較—

研究代表者 山口 智 (大学病院 東洋医学診療科)

研究分担者 荒木 信夫<sup>1)</sup>, 松田 博史<sup>2)</sup>, 本田 憲業<sup>3)</sup>, 松居 徹<sup>4)</sup>,  
三村 俊英<sup>5)</sup>, 小俣 浩<sup>5)</sup>, 菊池 友和<sup>5)</sup>, 鈴木 真理<sup>5)</sup>,  
田中 晃一<sup>5)</sup>, 新井 千枝子<sup>5)</sup>

## 緒言

東洋古来の伝統医療である鍼治療は、単に局所の反応だけでなく、主に高位中枢を介して自律神経や免疫・内分泌機能などの反応が関与し、数多くの疾患や症状の改善に寄与しているという理念のもとに、我々は、鍼治療が各種生体機能や主に疼痛性疾患に及ぼす影響を研究してきた。これまで、一次性頭痛である緊張型頭痛の発症機序や鍼治療の作用機序について、plethysmographyやEMG, thermography, open loop video pupillographyを用いて検討した結果、頭痛の発症機序は、頭部の筋群よりも後頸部や肩甲上部・肩甲間部の筋群の過緊張が重要な役割を果たし、鍼の作用機序はこうした筋群の過緊張を緩和し、循環動態を正常化することにより頭痛の改善に寄与していることがわかった。また、こうした鎮痛機序は単に局所の反応(軸索反射)のみならず高位中枢(Edinger-Westphal核・中脳中心灰白質)に影響を及ぼし、自律神経系が重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、緊張型頭痛患者と健康成人の鍼刺激による生体反応を比較した結果、患者と健康成人に及ぼす影響は異なり、鍼刺激はホメオスターティックな反応であることも示唆された。そこで本研究の目的は、片頭痛の病態と片頭痛の発作予防に対する鍼治療の作用機序について、非侵襲的で反復検査が可能であるASLMRIを用い、脳血流量の変化を鍼治療前後で比較することである。

## 対象と方法

対象は、関係学会のHPなどにより募集した。片頭痛患者の含有基準は、年齢が18歳以上65歳未満、国際頭痛分類第Ⅱ版の片頭痛の診断分類を満たすことである。除外基準は、脳血管障害等の既往歴、緊張型頭痛、群発頭痛を有するものである。また、健康成人の含有基準は、年齢が18歳以上65歳未満、除外基準は、脳血管障害等の既往歴、国際頭痛分類第Ⅱ版の一次性頭痛を有するものである。

方法は、被験者に30分間以上の安静を保持した後、鍼刺激前、鍼刺激中5分・10分、鍼刺激終了直後、終了後15分・30分において3TのMRI装置を用い、全脳平均血流に対する相対的な血流分布を分析し、鍼治療前後の脳血流量を比較した。鍼刺激部位は、頸肩部では板状筋上の完骨穴、僧帽筋上部線維上の肩井穴および頭部では側頭筋上の頷厭穴、顔面部では咬筋・翼突筋上の頬車穴へ長さ50mm、直径0.2mmの非磁性鍼(銀鍼：青木実意社製)を使用した。

統計学的手法は、鍼治療前後の比較についてはANOVA法を用い、各群間に差が認められた場合には、post-hocテストにTukey-Kramer法を用い検討した。

ASLMRIは、MRI装置3TのSiemens社製MAGNETOM Verioを用い、pulsed ASLにより、全脳で11スライスの脳血流測定を行い、1回で4分間の平均脳血流を測定した。得られた脳血流画像は脳実質外の信号を取り除いた後、スライス間の補間により28スライスの画像とした。また、安静時の画像にその後の画像の位置あわせを行った後に、線形変換と非線形変換をStatistical Parametric Mapping (SPM)により行い、灰白質の標準脳画像に変形

1) 大学病院 神経内科  
2) 国際医療センター 核医学科  
3) 総合医療センター 放射線科  
4) 総合医療センター 脳神経外科  
5) 大学病院 東洋医学診療科

した. さらに画像平滑化を行った後に, SPMで安静時画像とその後の画像について統計学的検定を行った.

本研究は片頭痛患者については埼玉医科大学病院IRB (Institutional Review Board)と同総合医療センターIRBを, 健康成人については埼玉医科大学倫理委員会の承認を受け, 対象者全員からinformed consentを得て施行した.

## 結果

対象は, 片頭痛患者10例(男性3例 女性7例 平均年齢 $39.2 \pm 11.2$ 歳 (mean  $\pm$  S.D.))と健康成人10例(男性6例 女性4例 平均年齢 $32.3 \pm 9.2$ 歳)であった.

鍼刺激前の片頭痛患者の脳血流量は, 健康成人と比較した結果, 後頭葉と右側頭葉で高く, 左側頭葉と頭頂葉楔前部で低下していた(図1).

片頭痛患者と健康成人は共に, 視床や視床下部および弁蓋部や帯状回, 島の血流が, 鍼刺激中5分・10分後は増加した. また, 片頭痛患者では刺激終了直後および15分・30分後に同部位の血流の増加が持続していた. さらに, 片頭痛患者は健康成人と比較した結果, 鍼刺激中・刺激終了後で視床や視床下部および弁蓋部や帯状回, 島の血流増加反応が顕著であり, 頭頂葉楔前部が特異的に増加した(図2, 3).

## 考察および結語

片頭痛患者と健康成人では鍼刺激による反応性が異なることが示された. 近年, 片頭痛の病態の一つに中枢における脳の機能異常が関与していることが報告されており, 今回の成績から鍼治療は, こうした高位中枢の反応性を正常化することにより, 発作予防に寄与している可能性が考えられた.

## 研究成果

### 学会報告

- 1) 山口智, 菊池友和, 小俣浩, 田村直俊, 荒木信夫. Arterial spin labelingを用いた鍼刺激が脳血流に及ぼす影響 片頭痛患者を対象とした検討, 第64回日本自律神経学会総会, 2011年10月, 秋田
- 2) 菊池友和, 山口智, 小俣浩, 田村直俊, 荒木信夫. Arterial spin labelingを用いた鍼刺激が脳血流に及



図1. 鍼刺激前の片頭痛患者と健康成人の脳血流量の比較.

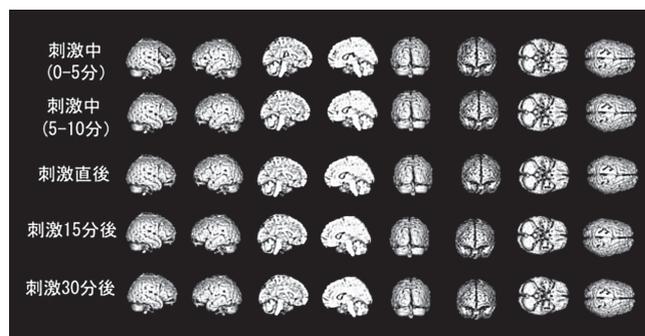


図2. 鍼刺激前後における健康成人の脳血流量比較.

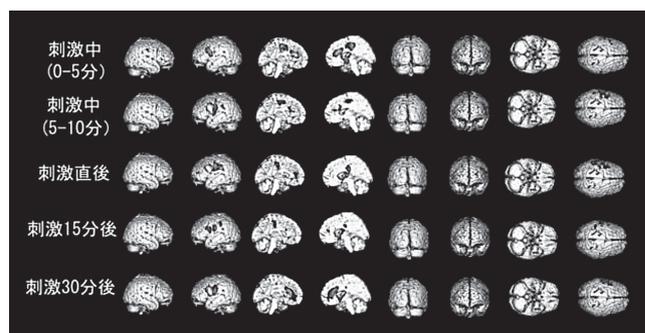


図3. 鍼刺激前後における片頭痛患者の脳血流量比較.

- ぼす影響 健康成人を対象とした検討, 第64回日本自律神経学会総会, 2011年10月, 秋田
- 3) 山口智. シンポジウム: 片頭痛と自律神経 片頭痛の発作予防に対する鍼治療効果, 第39回日本頭痛学会総会, 2011年11月, さいたま
  - 4) 菊池友和, 山口智, 小俣浩, 田中晃一, 鈴木真理, 磯部秀之, 三村俊英, 荒木信夫. Arterial spin labelingを用いた鍼刺激が片頭痛患者の脳血流に及ぼす影響, 第39回日本頭痛学会総会, 2011年11月, さいたま

## 学内グラント 報告書

## 平成21-23年度 学内グラント終了時報告書

卵巣がんにおける micro RNA の新規マーカー  
および分子標的としての有用性の検討

研究代表者 長谷川 幸清 (国際医療センター 婦人科腫瘍科)

## 緒言

卵巣がんはもっとも死亡率の高い婦人科がんであり、プラチナ製剤、タキサン製剤の誕生により生存率の改善はある程度確認できたものの、多くの場合2年以内に再発しやがては化学療法耐性となり予後不良である。そのため新しい治療法の開発や、臨床上有用なマーカーの発見、さらには新規治療標的の同定は急務である。これまで卵巣がんについて行われてきた研究の多くはprotein-coding genesについて焦点が絞られていた。一方protein-coding genes以外のnon-coding genesから転写される、いわゆるnon-coding RNAsにも生物学的な機能を持った一群が存在することが明らかになってきている。しかし、これらのnon-coding RNAsに対する研究はいまだ始まったばかりである。non-coding RNAsの中でもマイクロRNA (miRNA) と呼ばれる～22塩基からなるsmall RNAはprotein-coding geneの発現制御をおこない、細胞増殖やアポトーシスに深く関わっていると考えられている。これまでの研究では特にmiRNAは悪性転化や発生、幹細胞のホメオスタシスなどにおいて大きな役割を果たしていることがわかってきている。約600ものmiRNAがすでに同定されており、理論的にはヒトゲノム上には約1000ものmiRNAが存在すると考えられている。miRNAはまず核内で60から70塩基のprecursor miRNAs (pre-miRNAs) へとプロセッシングされ、その後細胞質へと移動する。ここでpre-miRNAsはさらにプロセッシングを受け、22塩基からなる成熟二本鎖miRNAとなる。そしてRNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる機能性複合体を形成し、ターゲットとなる遺伝子のmRNAの3'末端非翻訳領域(3'UTR)に結合し、その遺伝子の発現制御に関与する。miRNAマイクロアレイによるがんと正常組織の比較において、多くのがん種においてmiRNAの異常発現が認められることがわかってきた。また

miRNAの発現パターンを比較解析することによって、同じがん種であっても生物学的あるいは臨床的な違いを判別することが可能であることがわかってきた。これらのことからmiRNAはがん抑制遺伝子あるいはがん原遺伝子としても機能する可能性があることが推測されている。事実、*let-7*は*RAS*を、*mir-15*と*mir-16*は*BCL2*の発現を抑制することが明らかになり、*mir-17-92 cluster*は肺がんおよびlymphomaでがん遺伝子としての役割が示唆されている。以上のことより腫瘍発生におけるmiRNAの役割を理解することは今後の新しいマーカーの発見、予防、治療の開発の大きな手がかりとなる可能性がある。

私たちが以前行ったmiRNAマイクロアレイを用いた網羅的解析によると広範なmiRNAが卵巣がんにおいて発現低下しており、そのうちの約40%はゲノミックコピー数の低下、あるいはエピジェネティックサイレンスによるものと考えられた。これまでの研究でがん抑制遺伝子と強く示唆されているmiRNAは*Let-7*である。*Let-7 family*は肺がんにて発現低下が認められ、予後とも相関する。私たちのmiRNAマイクロアレイの解析により*Let-7 family*のひとつである*Let-7i*の発現低下は卵巣がんのプラチナ耐性に深く関わっており、予後とも相関することを発見した。このようにある種のmiRNAは卵巣がんの予後や治療法に対するマーカーや治療標的となる可能性が明らかになってきた。

私たちはいくつかのmiRNAが卵巣がん患者の予後や悪性度と強く相関していることをすでに報告した。*mir-182*は30%の卵巣がんにおいてDNAコピー数の増加が認められ、mature *mir-182*もDNAコピー数に相関して強発現していることから、卵巣がんにおいて潜在的ながん遺伝子としての役割を果たしている可能性が高い。また*mir-146*は卵巣がんの予後と強く相関することがわかっている。また*mir-376*や*mir-432*はがん抑制遺伝子としての役割を持つ可能性がある。

これらのことから *mir-182*, *mir-146*, *mir-376* や *mir-432* の卵巣がんにおける役割を明らかにすることは、今後これらのmiRNAがリスクファクターや予後因子としてのマーカー、あるいは卵巣がん治療のためのターゲットとして利用するために非常に重要であると考えられる。

miRNAが卵巣がんにおいて新規マーカーや治療標的として利用できるかを検討するために、卵巣がんにおいて特定の機能を持つと期待されている *mir-182*, *mir-146*, *mir-376* や *mir-432* などの生物学的な機能を明らかにし、さらにそのmiRNAが発現を制御しているターゲットとなる遺伝子を同定する。このことによって卵巣がんの進展や悪性化などのメカニズムにmiRNAが重要な役割を果たしていることが明らかになる。つまり卵巣がんにおいてmiRNAを新規マーカーあるいは治療標的として利用することが理論的にも裏付けることができる。

## 方法

### 1. 卵巣がん細胞株におけるmiRNA, mRNAの発現解析

SKOV3, OVCAR3をはじめとする卵巣がん細胞株より NucleoSpin miRNA (マッハライナーゲル) を用いて small RNA を含む分画で抽出し、アジレントバイオアナライザーにてRNAのintegrityを確認した。次に Universal cDNA Synthesis Kit (Exiqon), あるいは ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO) を用いて cDNA を合成し、SYBR Green master mix, Universal RT (Exiqon) あるいは ABsolute QPCR ROX Mix (Thermo Scientific) を使用して、定量的 PCR を行いそれぞれの miRNA, mRNA の発現定量を行った。内部標準として U6snRNA および GAPDH を使用した。

### 2. 細胞株への遺伝子導入

遺伝子導入については、pcDNA3.1-Zeo を改変した pcDNA3.1sp を利用した。このベクターの BamHI-SpeI 部位に GFP を挿入し、pcDNA3.1GFPsp を作成した (Fig. 1)。pcDNA3.1GFPsp の SpeI-NotI 部位に目的の pri-miRNA を挿入したものを遺伝子導入に利用した。卵巣がん細胞株 SKOV3, A2780 などを細胞数  $5 \times 10^3$  でまき、12時間後に 0.2  $\mu$ g の pcDNA3.1GFP-mir182 を導入し、その4時間後に培地交換を行った。遺伝子導入試薬としては HilyMax (DOJINDO) を使

用した。また miRNA mimic, miRNA inhibitor (Applied Biosystems) も利用した。細胞培養プレートに終濃度 10 nM あるいは 50 nM になるように miRNA mimic, miRNA inhibitor を添加したところに卵巣がん細胞株 SKOV3, A2780, TAYA, RMG1 を細胞数  $1 \times 10^3$  でまいて遺伝子導入を行った。遺伝子導入試薬としては Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen) を使用した。

### 3. 細胞表面抗原の測定

細胞表面の抗原の発現については、BioLegend あるいは eBioscience の抗体を使用して、FacsCalibur (BD bioscience) を用いて測定した。

### 4. 細胞増殖試験

遺伝子導入を行ってから96時間後に CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を用いて検討した。

### 5. 標的遺伝子探索

miRNA の標的遺伝子予想には TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) を利用した。

## 結果

### 1. *mir-182* のもつ細胞増殖能の検討

*mir-182* の発現は卵巣がんの予後不良と関連すること、また卵巣がん患者の30%にDNAコピー数の増加が認められることから、細胞増殖に深く関わる機能をもつと考えた。まず、*mir-182* が低発現の SKOV3, OVCAR3 を用いて、pcDNA3.1GFP-mir182 をそれぞれの細胞にトランスフェクションし、一過性の過剰発現系において、MTS法により、細胞増殖能を検討した。しかし対照にくらべて明らかな差を認めなかった。

続いて安定発現系において確認することが必要と考え、トランスフェクション後に Zeocin 耐性遺伝子をマーカーとしてセレクションを行った。SKOV3-GFP-miR182, SKOV3-GFP について細胞増殖能について検討を行ったが、明らかな差を認めなかった。mature miRNA を直接導入するために、*mir-182* mimic を SKOV3 にトランスフェクションをしたところ対照群に比較して細胞増殖能が亢進していることがわかった。また逆に *mir-182* inhibitor を用いると細胞増殖能が低下することがわかった (Fig. 2)。以上のことから *mir-182* は細胞増殖能を亢進させるような癌原遺伝子候補となると考えられた。

### 2. *mir-182* と T細胞浸潤

CD3, CD8T 細胞の浸潤は卵巣癌の予後良好な因子として報告されている (Zhang et al NEJM 2003)。以前行った卵巣がんの miRNA マイクロアレイと発現アレイを再解析し、*Mir-182* の発現と CD8 の関連性を調べたところ、逆相関を認めた ( $p < 0.001$ )。定量的 PCR

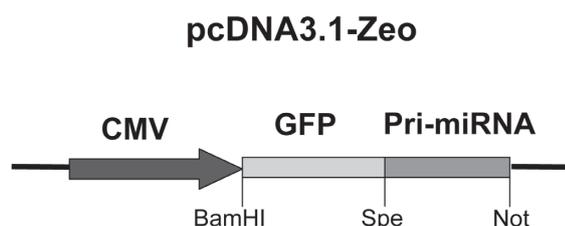


Fig. 1. miRNA expressing construct.

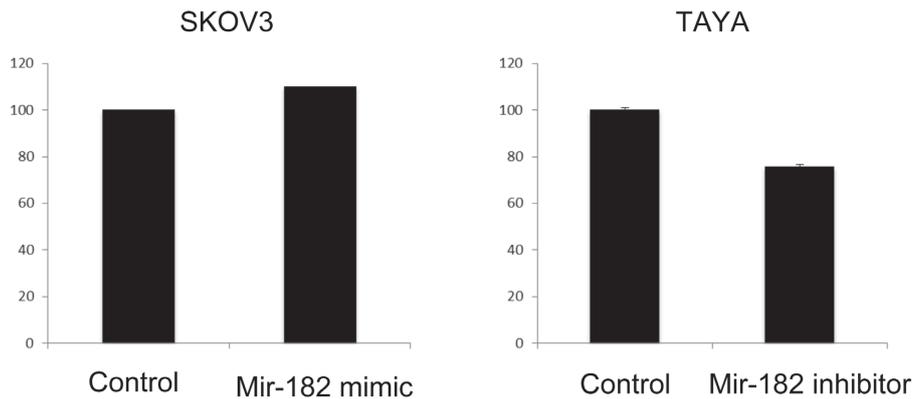


Fig. 2. mir-182 promotes ovarian cancer cells growth.

法によって、*mir-182*、*CD8*の発現をそれぞれ検討したところ、*mir-182*高発現卵巣癌組織において*CD8*の発現が少ないことがわかった (Fig. 3). このことから *mir-182*が何らかの機序により *CD8*陽性Tリンパ球の卵巣がん組織への浸潤をブロックし、これが予後に影響している可能性が考えられた。

3. *mir-146b*の発現と卵巣癌予後

*mir-146b*の発現も卵巣がんの予後不良と関連していることが以前行ったmiRNAマイクロアレイより明らかになっている。様々な種類の細胞における *mir-146b*の発現を検討したところ、*mir-182*は卵巣癌腫瘍細胞で過剰発現が認められるが、*mir-146b*はがん細胞ではなく、マクロファージに高発現していることがわかった。マクロファージの浸潤は卵巣癌の予後不良因子としても知られ、卵巣癌組織における *mir-146*はマクロファージの浸潤を反映している可能性が考えられた。

4. *mir-376a*及び*mir-432*と細胞増殖能

*mir-376a*および*mir-432*の発現低下は卵巣がん予後増悪と関連することが報告されている。卵巣がん細胞株におけるその発現を検討したが、ほとんどの卵巣がん細胞株において*mir-376a*および*mir-432*の発現は抑制されていた。一方で、DNAメチル化阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によってその発現が亢進することからエピジェネティックなサイレンスを受けており、卵巣がんにおけるがん抑制遺伝子候補とも考えられた。pcDNA3.1-GFPspを用いて*mir-376a*および*mir-432*を安定的に過剰発現するSKOV3を作成、それぞれの増殖能をMTS法により検討したが*mir-376a*および*mir-432*による明らかな細胞増殖抑制効果は認めなかった (Fig. 4)。

5. *mir-376a*及び*mir-432*と標的遺伝子

*mir-376a*及び*mir-432*の標的候補遺伝子をTargetScan及びPicTarを用いて選び出し、それらのGene Ontology解析を行った。その結果、免疫反応に

関わる分子が*mir-376*、*mir-432*と関わりが強いことがわかった。そこで標的遺伝子候補から免疫にかかわる遺伝子に注目するとMICB、HLA class II分子がその両方の標的遺伝子候補であることがわかった。それぞれフローサイトメーターによりMICBの発現について確認するとSKOV3細胞において*mir-432*を過剰発現した場合にMICBの発現低下が確認できた (Fig. 5)。このことからMICBは*mir-432*の標的遺伝子となる可能性が示唆された。また卵巣がん細胞株ではHLA class IIを発現する細胞は確認できなかった。

考 察

*mir-182*、*mir-146b*、*mir-432*の卵巣がんにおける役割の一部が明らかになり、その生物学的機能と臨床における特徴との関連づける一つの要因となることが明らかになった。このような機能を持つマイクロRNAは卵巣がんの新規バイオマーカーあるいは治療標的としても有用であると考えられた。

今回の結果から卵巣癌において新しい機能性分子群である、マイクロRNAが臨床マーカーとして利用できる可能性が示された。今後は進行期卵巣がん

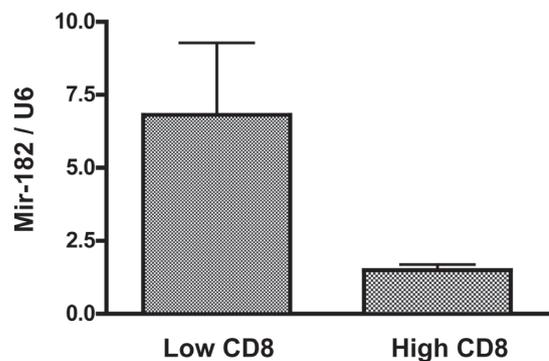


Fig. 3. High mir-182 expression in low CD8 infiltrated tumors.

対するより良い治療法の開発, 治療有効な患者の選別のため, dose-dense Paclitaxel/Carboplatin 腹腔内投与併用療法という新たな投与方法によるTC療法の臨床研究 (DOFMET Protocol #4/UMIN00001713) の卵巣癌組織を用いて網羅的マイクロRNA解析を行い,

その有用性と安全性に関する予測因子を明らかにする予定である。さらに新規分子標的候補を網羅的マイクロRNA解析, 網羅的遺伝子発現解析ならびに分子腫瘍学・バイオインフォマティクスの手法を用いて同定を試みる予定である。

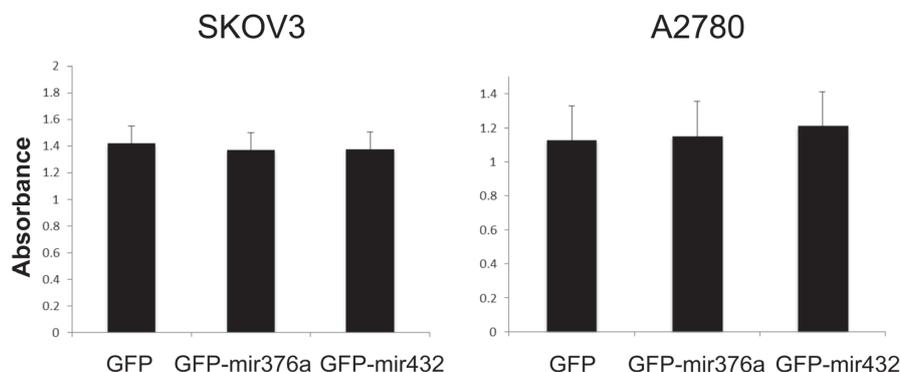


Fig. 4. No growth inhibitory effect for mir-376a and mir-432.

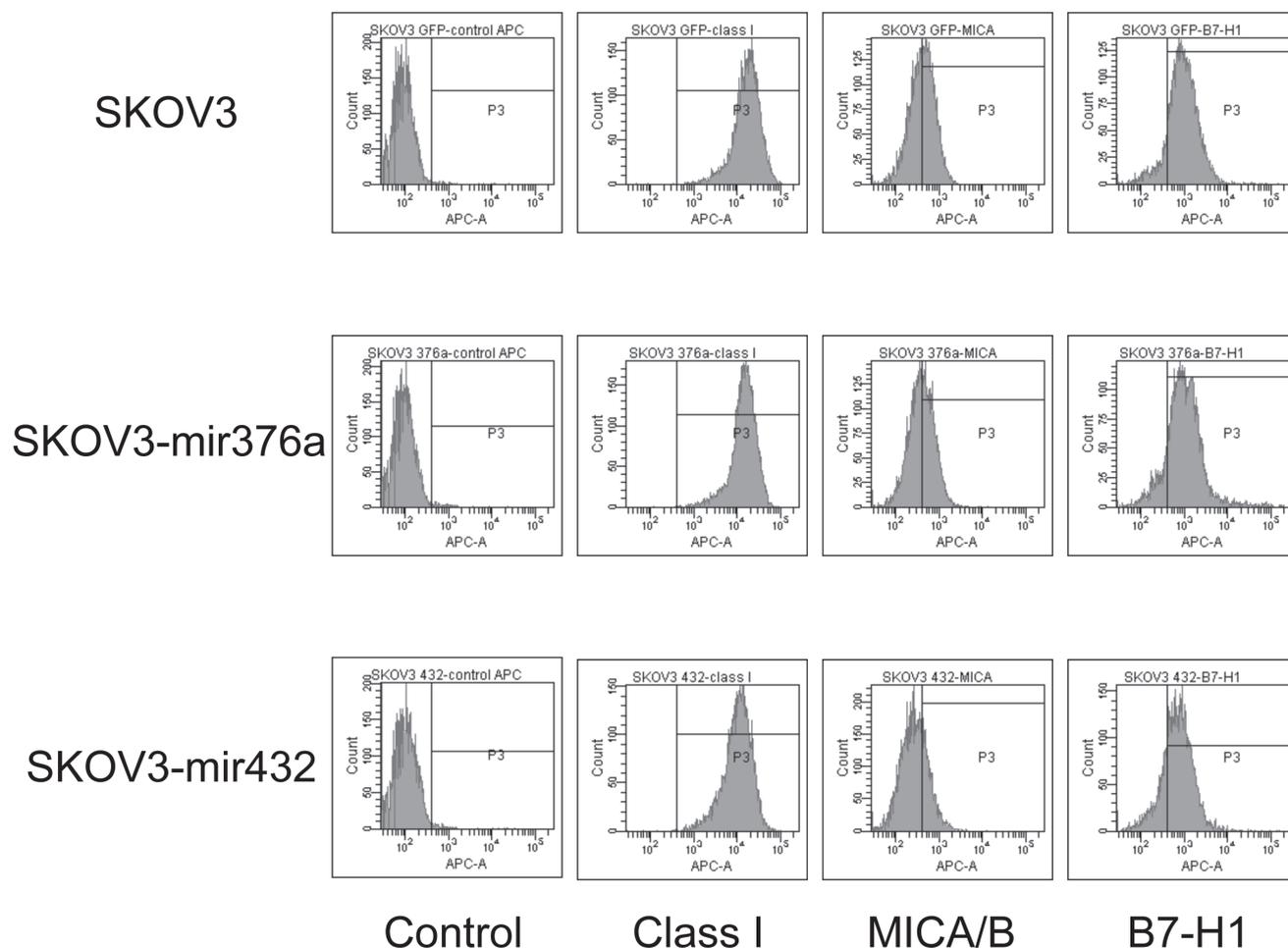


Fig. 5. mir-432 overexpression downregulates MICA/B expression in ovarian cancer cells.

## 研究成果リスト

## 雑誌論文

- 1) Nagao S, Iwasa N, Kurosaki A, Nishikawa T, Ohishi R, Hasegawa K, Goto T, Fujiwara K. Intravenous/intraperitoneal paclitaxel and intraperitoneal carboplatin in patients with epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal carcinoma: a feasibility study. *Int J Gynecol Cancer* 2012;22(1):70-5.
- 2) Goto T, Takano M, Ohishi R, Iwasa N, Shimizu M, Hasegawa K, Nagao S, Fujiwara K. Single nedaplatin treatment as salvage chemotherapy for platinum/taxane-resistant/refractory epithelial ovarian, tubal and peritoneal cancers. *J Obstet Gynaecol Res* 2010;36(4):764-8.

- 3) Kozawa E, Matsuo Y, Hasegawa K, Fujiwara K, Sakurai T, Kimura F. Spontaneously ruptured endometrioma associated with endometrioid adenocarcinoma: MR findings. *Magn Reson Med Sci* 2010;9(4):233-6.

## 学会発表

- 1) 長谷川幸清. 婦人科がんに対する維持化学療法のエビデンス構築に向けて, 第9回山形骨盤外科学研究会, 2011年1月22日, 山形
- 2) 長谷川幸清. 健常人末梢血単核球を用いたカツマキソマブのin vitroにおける抗腫瘍効果の検討, 第50回日本婦人科腫瘍学会, 2011年7月23日, 札幌
- 3) 長谷川幸清. シンポジウム: がん薬物療法のバイオマーカー・婦人科がん, 第49回日本癌治療学会学術集会, 2011年10月27日, 名古屋

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

## 小児の駆出率の保たれた心不全の病態解明と発症予測への展望

研究代表者 増谷 聡 (総合医療センター 小児循環器科)

研究分担者 先崎 秀明\*

## 緒言

成人領域の駆出率の保たれた心不全 (HFpEF) は、駆出率の低下した心不全 (SHF) と同様の臨床症状を呈する心不全症候群である。HFpEFは、成人心不全の約半数を占め、高齢・女性・高血圧などの危険因子が明らかにされ、予後はSHFと大きく変わらず悪いことが示されている。数多くの研究が成人のHFpEFの病態の特徴を、さまざまな角度から明らかにしてきた。一方で小児期においては、HFpEFの病態が存在するのかさえ明らかではなかったが、我々は、小児においても成人のHFpEFと同様の病態、すなわち、心室の拡大を伴わず、駆出率が保たれているにも関わらず、拡張能の低下を有し、水分管理に難渋して容易に肺うっ血に至る患者が乳幼児の先天性心疾患手術後の一部に存在することに注目し、検討を加え、報告してきた。本研究では、小児におけるHFpEFの病態を明らかにするとともに、どのような疾患にHFpEFが発症しやすいか、その予測について検討を加えることを目的とした。

## 方法

2000年以降埼玉医科大学小児心臓科を受診した18歳以下の患者を調査対象とした。駆出率の保たれた心不全：HFpEFは、欧州でのコンセンサス(成人)に準じて、心不全症状を有し、左室駆出率が50%以上で、拡張障害のあるものとした。肺疾患、肺血流増多によるもの、III度以上の房室弁逆流、手術後2ヶ月以内の症例は除外した。コントロールとして、年齢をほぼマッチさせた、同時期に心臓カテーテル検査を受け、心不全を認めない症例群(小短絡の心室中隔欠損および動脈管開存、冠動脈病変を認めない川崎病)とした。HFpEFの神経液性因子特性がSHFと異なるのではないかという仮説を検討するために、駆出率が50%以下のSHF群も抽出した。

\*総合医療センター 小児循環器科

身長、体重、経皮的酸素飽和度、人工換気、水分制限の有無・程度、心不全重症度、包括的心臓超音波検査、手術後評価のため心臓カテーテル検査が適応となった症例では心室圧、大動脈圧等の測定、およびアルドステロン・B型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の測定を行って群間の比較を行い、小児のHFpEFの demographic, 血行動態, 神経液性因子の特徴の検討を行った。

包括的心臓超音波検査では、心房・心室容積、心室壁厚、ドップラー、組織ドップラーの計測と血圧測定を同時に行う。左室容積より前負荷を、収縮末期壁応力・血圧より後負荷を、駆出率・心拍補正平均円周短縮速度と収縮末期壁応力の関係より収縮能を評価した。また、拡張能評価として、拡張早期僧帽弁輪速度より弛緩を、拡張早期僧帽弁流入速度/僧帽弁輪速度/一回拍出量より心室の硬さ (Stiffness) を評価した。

神経液性因子として血漿アルドステロン・BNP濃度の測定を、末梢静脈または下大静脈よりの検体を採取し、前述の評価項目とともに測定を行った。

## 結果

29例のHFpEFが抽出され、全例が先天性心疾患の手術後であった(図1)。拡張型心筋症を中心とするSHF群と比較し、年齢が有意に小さかった。疾患患者構成は成人例と異なり、一歳前後までの幼少児に後発し、体重・身長ともに小さく、成長発達障害を来していた。一部の症例で水分制限が必要であった。HFpEFは、コントロールと比して収縮期血圧が有意に高かった(93.6 ± 17.6 vs 84.5 ± 8.0 mmHg)が、SHFでは有意な相違は観察されなかった。

HFpEFを来たす疾患は、(1)左室圧負荷疾患(大動脈縮窄・離断)、(2)左室に容量負荷のかかりにくく、手術前に左室が小さい疾患(ファロー四徴、総肺静脈還流異常)、(3)その他として手術中および手術前の低酸素・虚血イベントの既往、大動脈手術後症例に大別

された(図1).

心臓超音波検査では、SHF群はコントロールに比し、左室拡張末期径が増大し、駆出率が低下していたが、HFpEF群ではコントロール群と同等であった。心室壁の相対的な厚さを示すRelative wall stiffnessは、HFpEF群で有意に上昇していた。僧房弁流入波形は、拡張早期E波に有意差はみられなかったが、拡張後期A波はHFpEF群で有意に高く、心房収縮に依存した心室流入が示唆された。

心臓カテーテル検査における心室最小血圧、拡張末期血圧は、コントロールに比して両心不全群で上昇していたが、HFpEF群ではSHF群と比し、軽度の上昇であった。心室弛緩特性の異常も、HFpEF群では有意ではあるが軽度の異常に留まった。

HFpEF、SHFの両心不全群で、投薬内容や水分制限に有意差を認めなかったが、アルドステロンはHFpEFで、BNPはSHF群で有意に高く、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン(RAA)系とナトリウム利尿ペプチド系のバランスが両心不全群で異なっていた(図2)。

考案

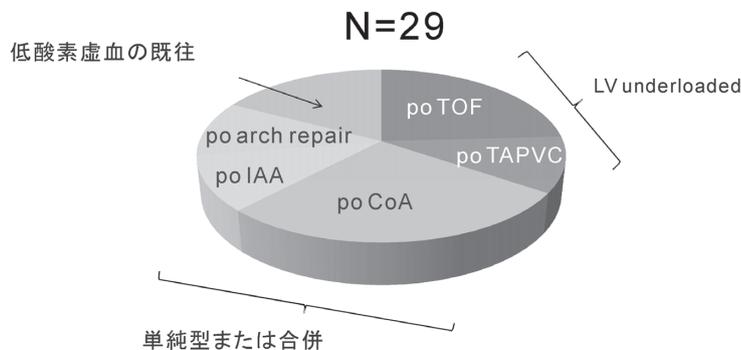
本研究は、小児期にHFpEFが存在することを示し、その臨床的特徴、血行動態・神経液性因子特性を

明らかにした。すなわち、①一歳前後と年齢の小さい児を中心としていること、②特定の疾患の手術後に多くみられること、③心室の大きさはコントロールとほぼ同等であるが、求心性肥大を来し、拡張障害を有すること、④血圧が高いこと、⑤RAA系とナトリウム利尿ペプチド系のアンバランスを認めることなどである。

これらの特徴のうち③④は成人のHFpEFと共通する特徴であり、①②は小児期特有の観察事項である。

小児HFpEFにおけるアルドステロン高値は、心室・血管硬化の結果であると考えられる一方、心筋の繊維化・肥大を促進させて病態を進展させる一因である可能性がある。ナトリウム利尿ペプチドはアルドステロン分泌に抑制的に働き、心筋の繊維化・肥大を抑制するが、小児HFpEFではSHFに比してBNPは高くなく、抗アルドステロン薬やナトリウム利尿ペプチド製剤投与は病態の改善に有効な可能性がある。これらの薬剤を含む治療内容が病態・経過に与える影響は今後重要なテーマである。また成人においても⑤の特徴がみられるか、治療に伴っていかに変化するかは今後の検討に値すると考えられる。

一方で小児HFpEFの多くを構成する疾患群である、大動脈縮窄・離断、ファロー四徴、総肺静脈還流異常においても、多くの症例ではHFpEFを発症してい



po, post operative state of; TOF, tetralogy of Fallot; TAPVC, total anomalous pulmonary venous connection; LV, left ventricle; CoA, coarctation of aorta; IAA, interruption of aortic arch

図 1.

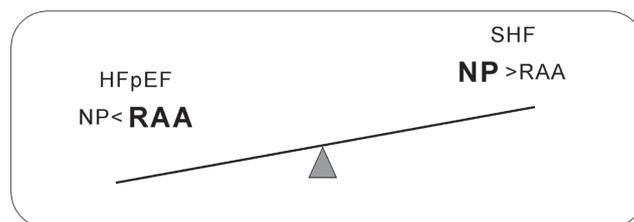


図 2.

ない。このような疾患のなかで、どのような症例が HFpEF に至るのかの予測因子につき、現在検討中である。具体的には、①大動脈縮窄・離断は左室後負荷増大群であり、後負荷増大にさらされていた時間として手術時年齢や手術後残存圧較差が、その結果として心室壁の肥厚、心房容積の増大、手術後の上肢血圧・残存圧較差の存在などが予測因子になるか、②手術前に左室が小さい疾患（ファロー四徴、総肺静脈還流異常）では、手術前の経皮的酸素飽和度、心室容積などが予測因子になるか、などの検討である。そのほかに手術における人工心肺時間、大動脈遮断時間や、手術前・手術中の低酸素性虚血の影響も検討に加える必要がある。

予測因子が明らかになれば、発症予防にむけた薬物療法、水分管理、手術前・手術中管理、手術時期・手術戦略における工夫により、一部の症例で発症の回避につながるかもしれない。小児期 HFpEF の病態理解により、小児期心不全の管理・アルゴリズムが大きく update される可能性が期待されるとともに、成人の HFpEF に還元できる知見がある可能性も大きく、今後の検討を加えていきたい。

また、小児 HFpEF の病態と予後との関連も未解明のテーマであり、本研究終了後も対象患者の追跡を継続し、病態と長期予後との関連の検討も行っていきたい。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Tamai A, Kurishima C, Seki M, Masutani S, Taketazu M, Senzaki H. Stent implantation for effective treatment of refractory chylothorax due to superior vena cava obstruction as a complication of congenital cardiac surgery. *Clin Med Insights*

*Cardiol* 2012;6:97-101.

- 2) Masutani S, Taketazu M, Ishido H, Iwamoto Y, Yoshiba S, Matsunaga T, Kobayashi T, Senzaki H. Effects of age on hemodynamic changes after transcatheter closure of atrial septal defect: importance of ventricular diastolic function. *Heart Vessels* 2012;27(1):71-8.
- 3) Masutani S, Senzaki H. Left ventricular function in adult patients with atrial septal defect: implication for development of heart failure after transcatheter closure. *J Card Fail* 2011;17(11):957-63.
- 4) Kawasaki H, Seki M, Saiki H, Masutani S, Senzaki H. Noninvasive assessment of left ventricular contractility in pediatric patients using the maximum rate of pressure rise in peripheral arteries. *Heart Vessels* 2011 [Epub ahead of print].
- 5) Iwamoto Y, Tamai A, Kohno K, Masutani S, Okada N, Senzaki H. Usefulness of respiratory variation of inferior vena cava diameter for estimation of elevated central venous pressure in children with cardiovascular disease. *Circ J* 2011;75(5):1209-14.

### 学会発表

- 1) Masutani S. Heart failure with preserved ejection fraction in children. (invited lecture). The 4th Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society 2012, Taipei, Taiwan
- 2) 増谷聡, 中川良, 小島拓朗, 栗嶋クララ, 齋木宏文, 葭葉茂樹, 石戸博隆, 竹田津未生, 小林俊樹, 先崎秀明. 小児期の駆出率の保たれた心不全の頻度と臨床的特徴, 第115回日本小児科学会学術集会, 2012年4月, 福岡

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

## GLUT4小胞輸送に必要な蛋白同定による糖尿病治療薬の開発

研究代表者 保坂 利男（大学病院 内分泌内科・糖尿病内科）

## 緒言

我が国には現在約740万人以上が糖尿に罹患していると推測されており、その中の90%以上を2型糖尿病が占めている。2型糖尿病では、インスリン分泌障害と同時にインスリン抵抗性が認められる。インスリン抵抗性とは、インスリンがインスリン感受性臓器である筋肉、脂肪組織において、糖をうまく取り込めない状態であり、その病態の解明には、それらの組織において、インスリン作用（インスリンのインスリンレセプター結合）後の糖取り込みのメカニズムを明らかにする必要がある。その中でも必須な機構は、インスリンによる糖輸送担体 GLUT4 の細胞膜への動員である。今日までこの分野において、世界中で数々の研究がなされてきたにもかかわらず、いまだに解明はされていない。特にインスリン受容体、phosphatidylinositol (PI) 3キナーゼ、Akt2と続く細胞内情報伝達の次のステップから最終段階の GLUT4 の細胞膜動員のステップの間については全くのブラックボックスの状況である。

研究代表者らは、インスリンによる糖輸送機構のインスリンレセプター基質及び下流のPI3-キナーゼアイソフォームを同定して (J Biol Chem 1996;271(10):5317-20., 1997;272(12):7873-82), それぞれの役割を明らかにした。現在インスリンによる糖輸送機構にPI3-キナーゼとAkt2が必須であると考えられている。いくつかの候補分子もあり、研究代表者らも含めて、国内外でAkt2の下流タンパクの同定が長年行われてきたが未解決の状態のままである。同様に一般的な小胞輸送関連タンパクを候補に GLUT4 小胞に関与しているかの研究も精力的に行われてきたが、未だに GLUT4 小胞移動とインスリンシグナルを結びつける必須のタンパクは見つかっていない。以前より、インスリン存在、非存在下において、ラットの脂肪細胞、培養脂肪細胞から GLUT4 小胞構成タンパクは遊離され解析はされてはきたが、未だにインスリンシグナルに必須のタンパクは見つかっていない。研究

者代表者も GLUT4 小胞に存在し、インスリンにより細胞膜に移動するほぼ100% GLUT4 と同様な動態を示す膜タンパク IRAP をえさに結合タンパク p115 の同定、解析を行った (Mol Biol Cell. 2005;16(6):2882-90)。p115 は、インスリン依存性の GLUT4 小胞の細胞内貯蔵部位につなぎ止めておくために必須なタンパクであることがわかった。しかしながらインスリン依存性膜動員関連した蛋白ではなかった。インスリン刺激後に細胞内 GLUT4 小胞は、細胞内貯蔵部位から細胞膜に移動する。現在まで一部明らかとなった小胞関連蛋白だけでは、インスリンの特異性を完全に説明することはできず、新たな細胞内局在関連蛋白（つなぎ止め蛋白など）、細胞膜結合、融合に関連した蛋白の存在が示唆される。小胞のリサイクリングなどで GLUT4 小胞すべてが単離されても、バックグラウンドが影響して、インスリン感受性 GLUT4 小胞における必須タンパクの同定には限界があるものと思われた。そこで本研究では、遺伝子改変培養脂肪細胞（アデノウイルスを使った dominant negative Akt or constitutive Akt 過剰発現細胞株）で GLUT4, IRAP (GLUT4 の小胞に存在し同様の動態を示すタンパク) の細胞内ドメインとの結合する新規タンパク質の同定、解析を行うことで、GLUT4 膜動員に必須のタンパクが同定され、そのタンパクをターゲットとした糖尿病治療薬の開発につながると推測される。

## 材料と方法

## 材料

プラスミド

IRAP(1-109)- His8- CBD: pTYB4 IRAP(1-109)- His8- CBD

pTYB4 vector の Chitin binding domain (Intein) の外側に His 配列を8回繰り返した tag を付けて、IRAP(1-109) を ligation させた Vector を作製

pTYB4 vector (New England Biolab)

細胞：3T3-L1 脂肪細胞

## 方法 培養, 継代

培養前駆脂肪線維芽細胞 3T3-L1 fibroblast を 15 cm dish で Medium (DMEM 25 mM Glucose + 10 % CS, 500 units Penicillin/Streptomycin) を使用し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した. Fibroblast の状態で 100% Confluent から 2 日後に分化導入 Medium (DMEM 25 mM Glucose + 10% FBS with 10 µg/ml Insulin, 0.5 mM IBMX, 100 µM Dexamethazone, 0.1% Troglitazone) に交換する事で, 分化導入を行った (Day0). 分化導入 Medium を 48 ~ 72 時間作用させた. その後は, 2 日おきに Medium 交換 (Medium: DMEM 25 mM Glucose + 10% FBS) を行った. 実験に用いる際は, Day8 ~ Day10 の脂肪細胞を用いた.

## IRAP (1 - 109) -His 8 -Ni Column を用いての L1 細胞株からの結合蛋白の同定

IRAP(1-109)-His8-intein-ベクターが導入された BL21(DE3) から, IPTG を使い融合蛋白を発現, 抽出, その後 2 回にわたるビーズの精製法を用いて, IRAP(1-109)-His8-Ni Column を作製した. このカラムを用いて, まずは, 正常 3T3-L1 脂肪細胞株の細胞分画 [cytosol, LDM (low density microsome)] とのアフィニティークロマトグラフィを行った. その後結合したタンパクを抽出, 濃縮し, SDS-PAGE で分離, CBB 染色で検出されたバンドを切り出し MS 解析 (MALDI-TOF) で結合蛋白の同定をおこなった.

## 結果

### IRAP (1 - 109) に結合したタンパクの MS 解析の結果

図 1 に示したようなサイトゾル, LDM の SDS-PAGE のバンドを切り出して解析することでタンパクを同定した (代表的な蛋白を表 1, 2 に示す). 今回の数回の実験ではインスリン刺激によって明らかに変化を認める IRAP 結合タンパクは SDS-PAGE では見つけることはできなかった. 表 1, 2 で示したタンパクの中には, GLUT4 のトランスロケーションへの関与が報告されているタンパクも同定されている. 一方で GLUT4 小胞に直接結合するとの報告はされていない蛋白も見つかり現在特異的な結合に関して免疫沈降法などを使って確認中である. さらに cytosol 及び LDM のどちらにおいても細胞骨格関連タンパクは認められたが, LDM では, G 蛋白やモーター蛋白等も同定された (表 2).

## 考察

今回のアプローチで GLUT4 小胞の細胞内輸送に関与している細胞骨格蛋白 (gelsolin, vimentin, vinculin) やインスリン応答性 GLUT4 トランスロケーションに関与している微小管のモーター蛋白に関連した KIF5B なども同定されている. さらに GLUT4 を豊富に含む

エンドソーム分画でアクチンと結合し存在することで IRS-PI3K シグナル伝達を保つ機能を果たしていると考えられている膜結合蛋白の spectrin も見つかった.

今回の研究代表者らのアプローチでは, 非特異的な結合を最小限に減らした IRAP-N 末端のアフィニティークラムを作製し, これを用いる事で結合候補タンパ

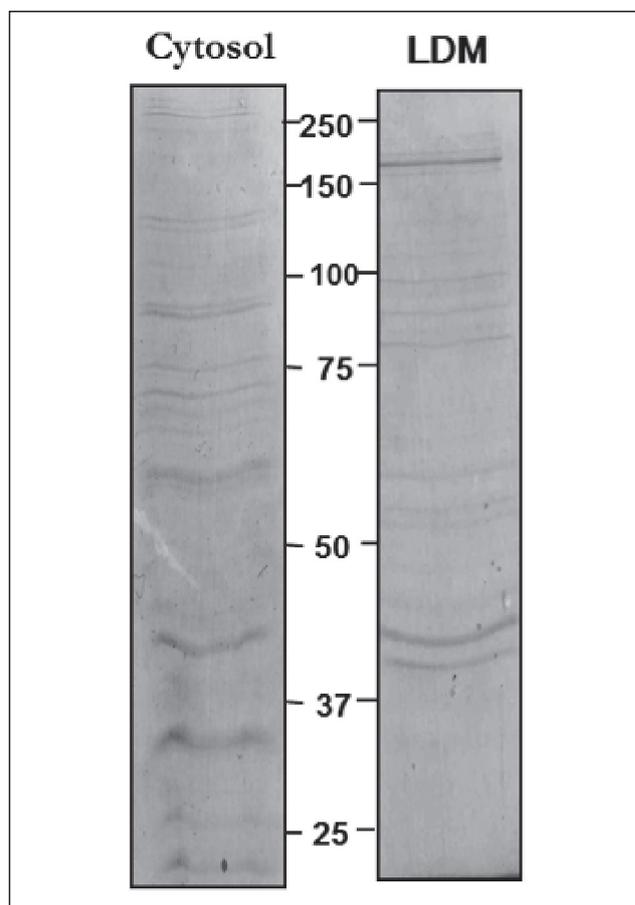


図 1. インスリン刺激後 IRAP1-109 に結合した蛋白. インスリン刺激後 3T3-L1 脂肪細胞から抽出した cytosol, LDM を IRAP1-109 ビーズに結合させ, SDS-PAGE で分離後クマジーブルー染色を行った.

表 1. サイトゾルで同定した代表的な IRAP(1-109) 結合蛋白

Protein	Function
Triosephosphate isomerase 1	Enzyme
Aldolase A	Enzyme
Glutamine synthetase	Enzyme
Pyruvate carboxylase	Enzyme
Annexin A5	膜結合蛋白質
Vimentin	filament protein
Gelsolin	アクチンフィラメントの結合・切断
Vinculin	アクチン結合蛋白

クの同定に成功した。今後、この方法を発展させて、緒言にも述べた遺伝子組み換え法によりインスリンシグナルを改変させたインスリン感受性細胞から効率よくIRAP, GLUT4小胞に結合するインスリン関連タン

表 2. LDMで同定した代表的なIRP(1-109) 結合蛋白

Protein name	Function
MACF1 (microtubule actin crosslinking factor)	cytoskelton associated protein
ACF7 (actin crosslinking family 7)	cytoskelrtal linker protein
KIF3B	motor protein kinesin superfamily protein
Ras	G protein
twinfilin	cytoskelton associated protein
PDZK1	scaffolding protein
pancreastain (chromogranin A)	secreted proten
spectrin	membrane associated protein
Golgin	Golgi associated protien
SUMO1	Ubiquitin modifizer
titin	a gigantic filamentous muscle protein
RanGAP1/RanBP2	G-protein related protein
CaMKK1 alpha	signal protein
FYVE	RhoGEF

パクの同定などの実験を継続して進める予定である。一方で、今回のアプローチから新規のGLUT4小胞に結合する脂肪酸結合蛋白も同定しており、現在機能解析およびノックアウトマウスの作製を開始している(詳細非表示)。また、現在同定した機能不明のタンパクや今後見つかるであろうIRAP, GLUT4小胞結合タンパクの中には、今後の糖尿病治療薬開発につながる可能性を秘めているものもあると考えられ更なる解析を進めている。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Hirata Y, Hosaka T, Iwata T, Le CT, Jambaldorj B, Teshigawara K, et al. Vimentin binds IRAP and is involved in GLUT4 vesicle trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;405(1):96-101.
- 2) Li Q, Hosaka T, Shikama Y, Bando Y, Kosugi C, Kataoka N, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) mediates 5-HT-induced insulin resistance through activation of EGF receptor-ERK1/2-mTOR pathway. *Endocrinology* 2012;153(1):56-68.

### 学会発表

該当なし

### 特許出願

該当なし

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

新規消化管ホルモン IBCAP を標的にした  
膵β細胞再生の分子基盤の解明

研究代表者 横尾 友隆 (ゲノム医学研究センター)

研究分担者 豊島 秀男\*

## 緒言

日本人のライフスタイルの欧米化により、糖尿病、高脂血症、高血圧や肥満といった生活習慣病患者数が増加の一途をたどっていることから、そのメカニズムの解明、より有効な治療法の確立が世界的にも急務となっている。

インスリンは血糖を低下させる唯一のホルモンで、膵β細胞でのみ分泌される。1型糖尿病では自己免疫的プロセスによってβ細胞が絶対的に減少する。2型糖尿病においてもβ細胞が相対的に減少し、十分なインスリンが分泌されず血糖値が上昇する。膵β細胞の増殖、維持、再生の制御を理解することで膵β細胞の減少を食い止め、再生することが可能になれば、糖尿病治療へ応用することで、根治を目指すことが可能となる。現在のところ、根治療法として、膵島移植が行われているが、生着率が低いことや、絶対的ドナー数の不足が問題となっており、膵β細胞再生やES/iPS細胞から膵β細胞への分化誘導方法について世界中で試みられているが<sup>1,2)</sup>、インスリン産生量不足やグルコース応答性に乏しいなど限界がある。

近年、消化管は栄養の消化をするとともに消化管ホルモンを分泌する内分泌器官としても注目を受けている。消化管ホルモンであるGLP-1、GIPはインスリン分泌の誘導や肥満との関連も示唆されていること<sup>3,4)</sup>からも消化管ホルモンの詳細な検討は、エネルギー代謝や摂食行動など、生活習慣病においてその成因の新しいメカニズムの解明および治療法の開発につながる。中でもGLP-1アナログやGLP-1分解酵素であるDPP-IVの阻害薬は最近新しい糖尿病治療薬として臨床で使われ始めており、今後の糖尿病の治療を大きく変える可能性が注目されている。

われわれは、以前より消化管に注目し、新規消

化管特異的分泌タンパクおよび膜タンパクの単離、同定を、ひいては新規消化管ホルモンの探索を目的として、消化管特異的な分泌タンパクおよび膜タンパクをマウス腸管より作成したcDNAライブラリーよりOligo-cap SST (Signal Sequence Trap) 法でスクリーニングし<sup>5,6)</sup>、同定された因子の解析を行ってきた。スクリーニングの結果、新規消化管特異的分泌タンパク遺伝子IBCAP (Intestinal Beta-cell Augmenting Promoter)を同定した。

本研究では、われわれが発見した新規消化管ホルモンIBCAPについて、このIBCAPによる膵β細胞増殖に関わる分子メカニズムを明らかにし、膵臓・膵β細胞再生医療への臨床応用へ向けた基礎的な分子基盤の解明を目的に行った。

## 材料・方法

IBCAP-トランスジェニック (Tg) マウスおよびIBCAP-ノックアウト (KO) マウスは、ホルマリン灌流固定後、膵臓をパラフィン包埋し切片を作製しアルデヒドフクシン染色を行った。膵β細胞の増殖能の検討には、マウス膵β細胞株MIN6細胞を用いた。また、解析に用いた分子生物学的・細胞生物学的手法は定法に従った。

動物実験については、埼玉医科大学動物実験規定において決められた倫理基準に従って行った。

## 結果

この新規消化管ホルモンIBCAPは、機能の一部として、マウス単離ラ氏島におけるインスリン分泌刺激を誘導する可能性が考えられる結果を得ている。また、アデノウイルスによるIBCAPを強制発現させたマウスでは膵臓ラ氏島に作用し、ラ氏島の増殖や保護作用など形態学変化を起こし、糖尿病改善作用を持つことが考えられた。本研究計画では、これまでに機能未知な

\*ゲノム医学研究センター

新規消化管ホルモンIBCAPを標的として、将来的には臨床応用を目指し、膵β細胞の増殖・再生の分子基盤の解明を目的に、今回は膵β細胞の増殖について焦点をあてて検討を行った。

まず始めにIBCAPのGain of Function/ Loss of Functionによる膵β細胞増殖作用をIBCAP-Tg/ KOマウスの膵臓切片のアルデヒドフクシン染色を観察した。その結果、IBCAPの機能として膵ラ氏島の増殖と深く関与する可能性を示唆していた (data not shown)。

次に、*in vitro* の系でもIBCAPにより膵β細胞の増殖を示すかどうかについて膵β細胞の培養細胞株であるMIN6細胞を用いて検討を行った結果においても、*in vivo*と同じく、IBCAPには増殖刺激作用を持つと言う事を強く示唆する結果を得た (data not shown)。

## 考 察

IBCAPはインスリン分泌促進作用を示すなどインクレチン様作用を持つことが考えられることから、IBCAPは糖尿病治療の標的となり得る可能性を秘めている。本研究では、IBCAPの膵β細胞増殖について検討を行った。その結果、このIBCAPは機能の一部として、膵臓β細胞増殖促進作用を持つことが考えられた。しかし、膵β細胞への分化に対する効果・作用については今回未検討である。IBCAPは既存の膵β細胞への分化誘導法の時間短縮・効率化や膵島移植に対する保護・生着率向上など様々な場面で重要な因子になり得る可能性が考えられるために、これからの解析が待たれる。

また、IBCAPの活性化は切断された後、IBCAPペプチドとなって活性体となることが予想されるために、その1次構造の決定や活性体ペプチドに対する受容体の同定が今後重要になってくると考えられる。IBCAPは他の消化管ホルモンとは有意な相同性を持たないことも特徴であり、そのためIBCAPの生理的意義や糖尿病との関連性が解明されると、糖尿病の根治につながる可能性が考えられる。

今回の検討の結果を併せて考えると、IBCAPはインスリン分泌促進作用とともに、膵β細胞増殖作用への関与が考えられることから、糖尿病治療あるいは膵再生医療の標的となりうる可能性が考えられ、今後の詳細な解析が必要だが創薬・臨床への応用が期待される。

## 謝 辞

本研究はゲノム医学研究センターゲノム科学部門、実験動物施設において実施されました。御協力頂きましたゲノム医学研究センター所長 岡崎康司教授、技術員 伊関美緒子さん、そして多くの共同研究者の

方々に深謝致します。

また、このような発表の機会を頂き、別所正美学長、医学研究センター 松下祥教授に感謝申し上げます。

## 研究成果リスト

### 学会発表

- 1) 横尾友隆, 渡邊和寿, 飯田薫子, 鈴木浩明, 島野仁, 石川三衛, 川上正舒, 山田信博, 岡崎康司, 豊島秀男. 新規消化管ホルモン因子IBCAPによる膵β細胞増加作用の解析, 第26回日本糖尿病合併症学会, 2011年10月14日, 大宮
- 2) Toyoshima H [Invited Speaker]. IBCAP; discovery of another intestinal hormone with beta cell augmenting activity, The 2011 International Conference on Diabetes and Metabolism, November 11, 2011, Seoul, Korea
- 3) Yokoo T, Watanabe K, Tada Iida K, Suzuki H, Shimano H, Kawakami M, Yamada N, Okazaki Y and Toyoshima H. Demonstration of IBCAP as a Novel Intestine-specific Secretory Protein with Incretin-like Activity, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, 横浜

### 参考文献

- 1) Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, et al. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res* 2007;17:333-44.
- 2) Mao GH, Chen GA, Bai HY, Song TR, Wang YX. The reversal of hyperglycaemia in diabetic mice using PLGA scaffolds seeded with islet-like cells derived from human embryonic stem cells. *Biomaterials* 2009;30:1706-14.
- 3) Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 2006;368:1696-705.
- 4) Drucker DJ. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2007;117:24-32.
- 5) Wang Y, Suzuki H, Yokoo T, Iida KT, Kihara R, Miura M, et al. WGEF is a novel RhoGEF expressed in intestine, liver, heart, and kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:1053-8.
- 6) Watanabe K, Okamoto F, Yokoo T, Iida KT, Suzuki H, Shimano H, et al. SPARC is a major secretory gene expressed and involved in the development of proliferative diabetic retinopathy. *J Atheroscler Thromb* 2009;16:69-76.

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

生体吸収性素材を併用した自己組織化素材と  
自己組織幹細胞を用いた頭蓋骨再生法の開発

研究代表者 宮内 浩（大学病院 脳神経外科）

## 1. 緒言

従来頭蓋形成術では、自家骨の他には自己組織化しない人工骨が使われることが多かった。人工骨は往々にして隣接組織間の血流や相互作用を遮断し、周辺組織の脆弱化や歪み、易感染性を昂じる原因となる。結果として、外傷では破損や感染を、成長・老化に伴っては脱落・変形や皮膚表面への露出などを生じた。これらの問題を未然に防ぎ、成長過程の小児でも頭蓋骨や皮膚など周辺組織の成長に即したRemodelingを受ける頭蓋形成術の開発が望まれている。

## 2. 目的

自家骨の使用が期待できない症例などで、人工骨が移植後に自己組織化され、Remodelingにより本来の組織構造と機能構造を再構築し、生来の頭蓋骨と融合し、結果として継ぎ目を残さない頭蓋骨再生の技術を開発する。最終的に、隣接組織間での相互作用や頭蓋骨の骨組織としての機能も再建する、生来の自家骨組織として置換される生体再生基盤を提供する。

## 3. 対象と方法

## 【素材戦略】

自家組織化を期待する素材、それをサポートし手術操作を安定的に導く素材を、それぞれの短所を補完するように複合的に併用する。

## 1) 自己組織化素材：多孔体Hydroxyapatite (HA) 顆粒

自家骨としてremodelingされる適切な素材で、自己組織化を効率よく誘導するために、培養下での細胞の生着を電子顕微鏡で観察し、素材と生体の相互作用を観察した。

## 2) 生体吸収性素材：PLLA-PGA, PEG

構造を保持し、機能的形態を維持する。しかし、時間とともに自らは自己組織化せずにやがて緩徐に水解吸収される。

## 【移植戦略】

## 3) 移植アニマルモデル：

HA素材をマウスに移植し、素材の経過を観察した。また、移植素材を電子顕微鏡で観察した。

## 4) 治療対象

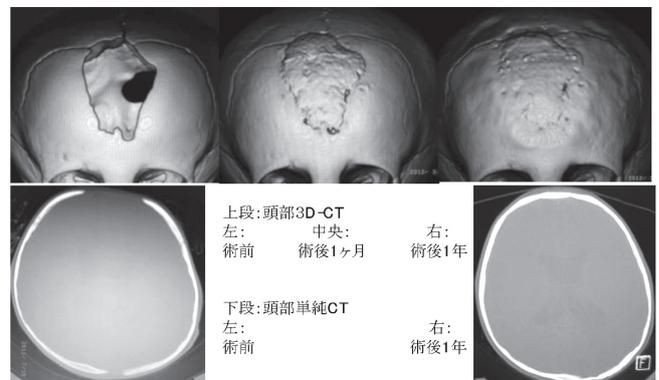
先天性頭蓋骨欠損の女兒に、HA多孔体顆粒の移植を行った。

## 5) 手術戦略

手術では、それまでの実験データも考慮し、自己組織化後の形態が異なる人工物同士が隣接することや切開線（縫合線）が人口構造物を横切ることが無いようにデザインした。また、二次的な手術戦略にも考慮した。

HA多孔体・PEG・PLLA-PGA co-polymer plateを用いた。これら手術材料は臨床使用が認可されて既に上市されている素材である。

術式として若年女兒であることを考慮し、閉創後目立ちにくいように設定した。また、術後は、定期的にCTで頭蓋骨形成状況を経過観察した。



## 4. 結果

## 1) 自己組織化素材/hydroxyapatite (HA) の細胞実験：

骨芽細胞への分化能を持った間葉系幹細胞の継続的なHA顆粒内部への細胞浸潤が観られた。

## 2) 生体吸収性素材：PLLA-PGA, PEG

3ヶ月程度の形状の維持と周辺部からの水解反応を確認した。既に上市されている素材のため、手術材料として適切であると思われた。

## 3) 移植アニマルモデル

移植片には良好な自家骨化反応が観られ、一部緻密骨への形状変化も確認された。「生体の正常な構造物との連続性」が自家組織化反応のKey Signalの一つとなる可能性が示唆された。また、適切な生体内環境においては、自己組織化素材がその場に相応しいRemodelingを受けることが示された。

## 4) 手術

移植人工構造物などの生着や安定性は全く問題なく、感染などの周術期が合併症も全くなかった。

移植人工構造物の形態が崩れることは無く、海綿状骨様の強度から緻密骨への形状変化とともに強度が増し、経皮的に触診できた。

CT scanによる定期的な観察では、生体吸収性素材が吸収されるにつれ、経時的に滑らかな骨表面に変化するとともに正常骨との接合線が不明瞭になって融合していく様子が観察された。

## 5. 考 察

組織の再生過程よりも、生体内での自己組織化反応の過程は不明な点が非常に多く、素材の選択・使用方法・移植手術手技などの点で、最適化にはまだ甚だ不十分である。自家骨など自己組織由来の素材であっても、少なくとも移植直後は、それはまだ単なる異物に過ぎないため、自己組織化するためには適切な移植環境を構築することが必要である。それによって構造と機能を再建する再生反応を期待できる。一方で、炎症性反応などによる、自己組織化すべき移植素材の吸収や異物化を惹起させないための工夫も必要である。つまり、皮膚・骨膜・骨・移植素材(自己組織化素材)の各層に連続した手術侵襲部位が互いに交錯しない工夫が、自己組織化素材の移植手術ではきわめて重要である。組織の各層間に連続した手術侵襲は各組織間に跨った炎症性反応を惹起し、結合組織性瘢痕化に

よって、血流誘致を阻害し組織の構造や機能の再生を阻害する要因となる。

今後、より良い生物学的再生反応を引き出す移植技術の開発が望まれる。

## 6. 結 語

本症例は、若年女兒の先天性頭蓋骨欠損に対し、複数の素材を補完的に用いて、自己組織化反応により頭蓋形成を行った症例である。手術に併せて、基礎研究を行い、前例の無い画期的な方法として新たな頭蓋骨再生法を開発した。この技術は、他科への応用も充分可能である。

治療に際し、

1. 自己組織化素材の適切な選択と使用方法、
2. 吸収性素材による支持・補強と構造維持、
3. 「生体の正常な構造物との連続性」が自家組織化反応のKey Signalとなる、

などの点が重要である。

## 7. 研究成果リスト

### 論文

- 1) 宮内浩, 藤巻高光, 西川亮, 松谷雅生. Seamless cranioplasty (継ぎ目のない頭蓋形成)への試み. 第5回日本整容脳神経外科研究会記録集. In printing.

### 学会発表

- 1) 宮内浩, 藤巻高光, 西川亮, 松谷雅生. 構造と機能の自己修復能を持つ頭蓋骨の再生, 第70回学術総会日本脳神経外科学会, 2011年10月12日, 東京
- 2) 宮内浩, 藤巻高光, 西川亮, 松谷雅生. Seamless cranioplasty (継ぎ目のない頭蓋形成)への試み, 第5回日本整容脳神経外科研究会, 2012年3月31日, 東京

### 文 献

- 1) Barth A. Ubere Histlogische Befund nach Knochenimplantation. Arch Klin Chir 1893;46:409-17.

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

次世代シーケンサーによる高速な既知の  
疾患遺伝子スクリーニング系の開発

研究代表者 神田 将和 (ゲノム医学研究センター)

## 緒言

近年出現した高出力シーケンサーによる高速なゲノム解析に基づいた診断支援の可能性がよく議論されている。本研究ではミトコンドリア呼吸鎖異常症をモデル疾患としてプロトタイプの開発を行った。対象とした理由は、従来法では確定診断に労力と時間を要する、また小児において重篤な表現型を呈し、100以上の多岐に渡る原因遺伝子を背景にもつからである。今回は高出力シーケンサーを用いた実験系が、100以上ある原因遺伝子を短時間・広範囲・高精度でスクリーニングできる能力があるかを評価することを目的とした。我々はカスタムキャプチャー用オリゴライブラリーのプロトタイプ設計に続き、実際の実験を行い、検証を行った。結果として、ミトコンドリア病で見られるヘテロプラスミーに対して実用可能であることを明らかにできた。また現在盛んに用いられているエキソーム法を含めて、キャプチャー型の欠点である領域に対しては、単純にバイトオリゴを増量させるだけで全てのケースには対応できないことが明らかになった。また用いた中の2検体においては疾患の原因となりうる候補変異を見出した。

## 材料と方法

## ミトコンドリア病由来DNAの収集・準備

本学の小児科の協力を得て既に完了しており、今回の申請では10検体を解析に用いた。実験自体の検証を行うため、事前に作成したポジティブコントロールDNAも別途用いた。

## ミトコンドリア病原因遺伝子を抽出するためのカスタムキャプチャーの設計

ミトコンドリアDNA全周およびターゲットとした特定遺伝子のエキソン部位とのみハイブリダイゼーションする合成オリゴを設計し、ゲノムDNAから

シーケンスしたい領域だけを抽出できるカスタムキャプチャーとした。

## シーケンス解析

患者検体由来ゲノムDNAを10検体ほどシーケンスデータとして産生し、変異検出の解析を行った。またヘテロプラスミー検出感度の簡易テストとして、PCRにより増幅した断片を任意の比率(1:99, 5:95, 10:90, 20:80など)で混ぜ合わせることで、シーケンスにより混合比率がどの程度まで検出できるのかを観察した。解析はゲノム医学研究センターに設置してあるクラスマシンの次世代シーケンサーのデータ解析環境を整備して行った。

## 結果

今回プロトタイプとして設計したオリゴライブラリーによるシーケンス結果の中から、ヒトゲノム中のPOLG2遺伝子座位での結果を示す(図1)。対象としたエキソン領域だけを効率良く選択的にシーケンスしていることが観察できた。またミトコンドリアゲノム全域も対象としており、それらのシーケンス結果を示す(図2)。ほぼ全域においてシーケンスをすることに成功し、最大で各サンプルにおける多型の存在も観察できた。

次に市販エキソーム製品の捉えない領域についてもバイトオリゴを設計した場合、シーケンスを得たケースの確認ができた(図3)。

最後にPCR産物を任意の比率で混合した擬似サンプルの解析から、感度良く混合比率が再現されていることが確認できた(図4)。

1:99の混合サンプルではミトコンドリアゲノム1676番目の塩基を520,706回シーケンスしており、G塩基が515,158回コール(99%)された。1%のみ混合したA塩基のコールは5,238回(1%)であった。シーケンスエラーに起因するその他の塩基はそれぞれC塩基が17回、T塩基が293回であった。

5:95の混合サンプルではミトコンドリアゲノム1676番目の塩基を562,227回シーケンスしており、G塩基が534,384回コール(95%)された。5%のみ混合したA塩基のコールは27,497回(5%)であった。シーケンスエラーに起因するその他の塩基はそれぞれC塩基が49回、T塩基が295回であった。

**考 察**

今回の実験は遺伝子100個のエキソン領域90%程度をカバーし、そこにある変異を網羅的に検出できる系を目指した。精密な解析はまだ十分に行っていないが、シーケンスデータを観察する限りは一部のエキソン以外、キャプチャー及びシーケン

スに成功していた。うまくいかない一部の領域だが、この原因についてはGCリッチな配列によるPCR増幅の効率低下が予想された。ミトコンドリアゲノムのシーケンスデータについては、マッピングする際にrCRSと呼ばれるミトコンドリアゲノム配列を用いている。この配列と日本人が保有するミトコンドリアゲノムとは差異があるため、マッピングバイアスを生んでいると思われる領域が認められた。そのような条件下ではあるが、全域をシーケンスすることに成功し、また図4で示した高い精度でヘテロプラスミーを検出できる知見を得た。また今回の実験は性能評価を主としているため、検体のセレクションにバイアスがあるが、既知の原因遺伝子2つに変異候補

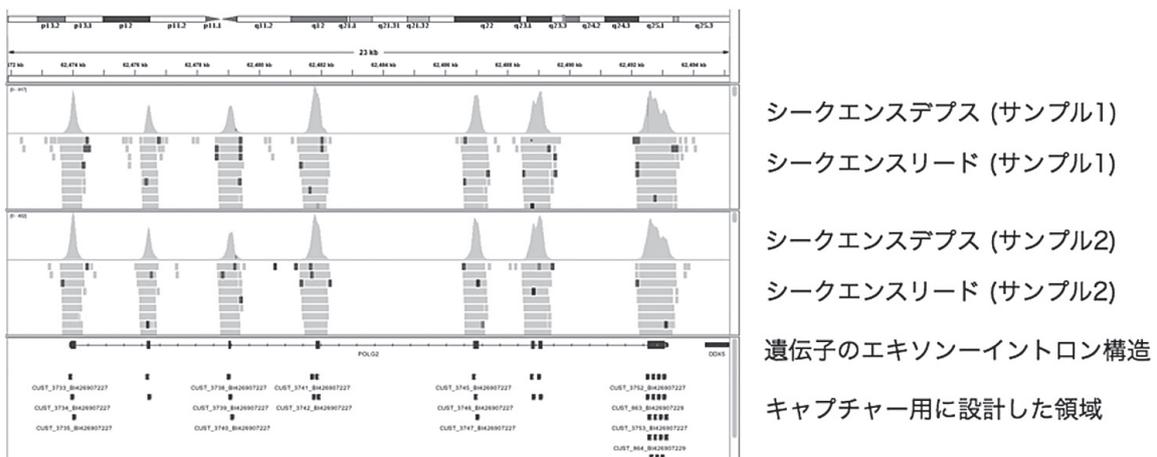


図 1. カスタムキャプチャーによる特定のゲノム領域のシーケンス。得られたシーケンスデータをマッピングし、可視化した。遺伝子のエキソン構造に沿って設計したバイト(最下段)により、対象エキソンのDNAのみが選択的にシーケンスされていることが分かる(図上部のシーケンスリード)。

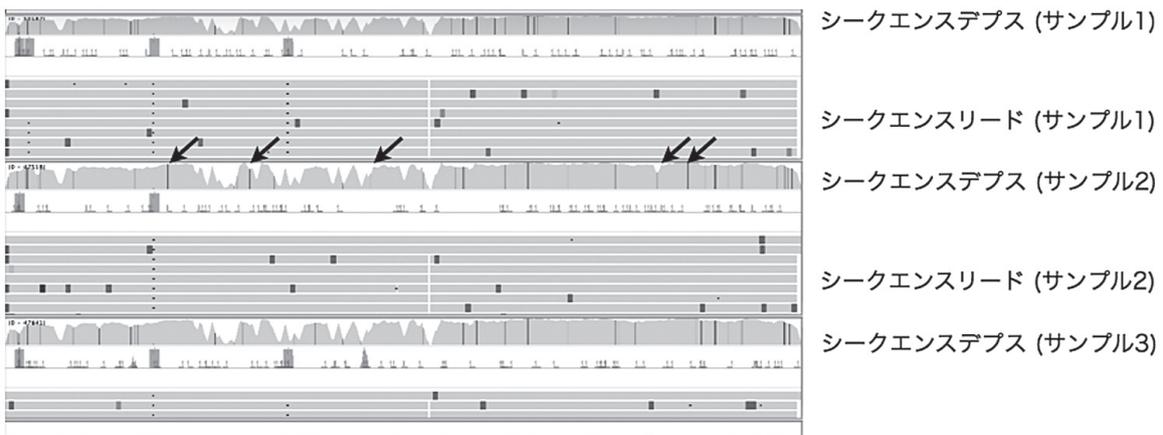


図 2. カスタムキャプチャーによるミトコンドリアゲノム全域のシーケンス。得られたシーケンスデータをマッピングし、可視化した。各サンプルのシーケンス深度(何回その位置の塩基がシーケンスされたかを表す数値)の中で、色が異なる部分(矢印)ではリファレンスミトコンドリアゲノム配列 rCRS とシーケンスが異なることを示しており、各検体での差異が見てとれる。

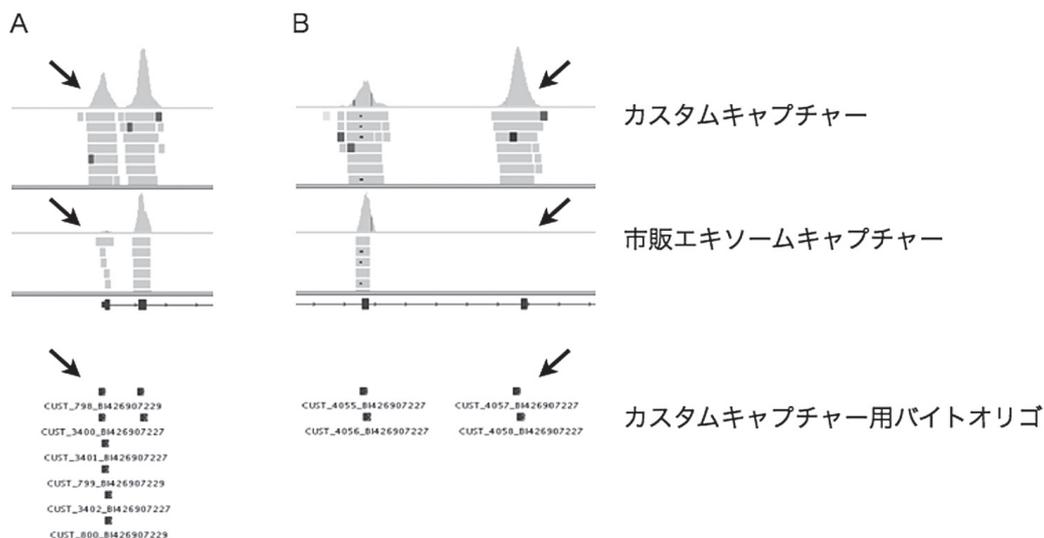


図 3. 対象エクソンへのバイト設計によるシーケンス範囲の向上. 現在流通しているエクソームキャプチャーでは対象とされていないエクソンであっても、キャプチャー用オリゴを追加することでキャプチャーできた。

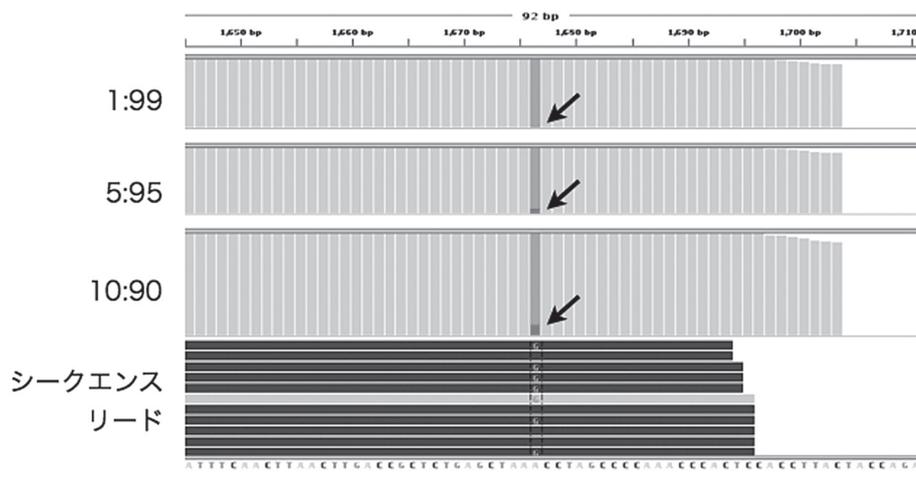


図 4. PCR産物を任意の比率で混合したサンプルを用いた検出感度の測定. 横軸はミトコンドリアDNA配列上の位置, 縦軸の数字はPCR産物の混合比率を示している. 実際の混合比率とシーケンスで検出される混合比率は一致していた。

得たため、これらについては検討を進めていく。

本研究はまだ十分なデータが揃っていないが、今後の追加実験・解析をすることで現行手法の限界と、今後でてくる新技術を加えたアプローチによるゲノム情報による診断支援を行える可能性を引き続き考えていきたい。

#### 研究成果リスト (論文, 学会発表, 特許出願等)

\* 本研究における研究成果の学会や出版物への発表はまだなされていない。

#### 謝 辞

本研究を行うにあたり、カスタムキャプチャー用オリゴライブラリの設計において本学ゲノム医学研究センター・トランスレーショナルリサーチ部門・仲地豊助教とゲノム科学部門・森山陽介特任研究員に、高出力シーケンサーの実験と混合サンプルの条件設定においてはトランスレーショナルリサーチ部門・平田智子技術員・岡崎康司教授に多大な協力を頂きました。深く感謝いたします。

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

肝胆膵術後、胆管—腸吻合部合併症予防を目的とした  
生体吸収性ステントの臨床応用

研究代表者 宮澤 光男 (国際医療センター 消化器外科)

研究分担者 小山 勇\*, 合川 公康\*, 利光 靖子\*, 岡田 克也\*

## 1. 研究の背景

現在、肝胆膵領域の手術においては、胆管—胆管、胆管—腸、膵管—腸吻合部にチューブ状のステント (TS) を挿入する場合がある。このステントの役割としては、吻合部の形状を保持する (吻合部の狭窄、変形を予防)、吻合部にかかる圧を除く (吻合部の縫合不全予防)、等が考慮されているが、どのような太さ、硬さ、形状、長さのステントが適当か、等不明な点が多い。さらに、ステント挿入後、何をエンドポイントとしてステントを抜去するか、その留置期間も不明確である。我々は、現行のTSにおいては、胆管吻合部に「良好な胆管再生過程」が誘導できない場合があり、術後、胆管—腸吻合部狭窄、等の胆管合併症が生じると考えて、自己拡張型の生体吸収性胆道ステント (BAS) を開発している。

## 2. 研究の目的

我々の開発しているBASと従来のTSとで狭窄部治療後の組織再生の相違を比較し、ステントの役割を検討した。

## 3. 研究の方法

雑種ブタを全身麻酔下開腹、肝外胆管を同定し、フアーター乳頭部より約1 cm 肝側胆管を糸にて結紮。1週後、再開腹し、胆管結紮糸を解放した。十二指腸を切開し、狭窄した胆管部分に、フアーター乳頭を確認しながら、ポリグリコール酸製ステント (拡張時直径5 mm) (BAS) を挿入した。シリコン性TSも同様に挿入した。ステント挿入3か月後、狭窄部を組織学的に検討した。

## 4. 研究成果

## 結果

\*国際医療センター 消化器外科

3か月後BASは狭窄部には存在せず、また狭窄部は他の部位の肝外胆管と差異は認められなかった。組織学的には、狭窄部は良好な上皮再生がおり、血液生化学的にもすべてのブタで胆道系酵素の上昇は認められなかった。TSは狭窄部に存在し、組織学的に胆管狭窄部には上皮再生は認められなかった。(結語と考察)胆管狭窄部に「良好な胆管再生」を誘導するためにはTSと比較しBASが優位であり、また吻合部狭窄予防のためのステントは2週間程度の挿入が必要十分であると考えられた。

## 臨床研究

上記の結果を受けて、病院IRB、大学倫理委員会の承認を得て、胆管—空腸吻合のある5症例において、このステントの安全性を確認する臨床研究を施行した。このステントの安全性を検討する臨床研究においては、安全にステントを術中の胆道再建に利用可能であることが示された。現在、有効性を検討する試験を検討中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線) [雑誌論文] (計5件)

- 1) Miyazawa M, Aikawa M, Okada K, Toshimitsu Y, Okamoto K, Koyama I, Ikada Y. Regeneration of extrahepatic bile ducts by tissue engineering with a bioabsorbable polymer. J Artif Organs 2011;15(1):26-31. 査読有
- 2) Aikawa M, Miyazawa M, Okamoto K, Toshimitsu Y, Torii T, Okada K, Akimoto N, Ohtani Y, Koyama I, Yoshito I. A novel treatment for bile duct injury with a tissue-engineered bioabsorbable polymer patch. Surgery 2010;147:575-80. 査読有
- 3) Aikawa M, Miyazawa M, Okada K, Toshimitsu Y, Okamoto K, Akimoto N, Koyama I, Ikada Y.

Development of a novel reflux-free bilioenteric anastomosis procedure by using a bioabsorbable polymer tube. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2010;17:284-9. 査読有

- 4) 宮澤光男, 合川公康, 小山勇. 胆管腸吻合の功罪—胆管腸吻合は胆管癌の発生率を増加させる可能性がある—. 日本胆道学会雑誌 2010;24:87-92. 査読有
- 5) 宮澤光男, 合川公康, 岡田克也, 上野陽介, 利光靖子, 高瀬健一郎, 岡本光順, 小山勇, 筏義人. 生体吸収性素材を用いた胆管再生 胆管上皮再生過程を考慮した新規治療法の開発. 胆と膵 2011;32(11):1243-7. 査読無

〔学会発表〕(計5件)

- 1) 宮澤光男, 合川公康, 岡田克也, 利光靖子, 岡本光順, 山口茂樹, 小山勇. 長期QOLを考慮した近未来胆管空腸吻合術 自己拡張型生体吸収性ステントの留置, 日本臨床外科学会, 2011年11月, 東京
- 2) 宮澤光男, 合川公康, 利光靖子, 岡田克也, 岡本光順, 小山勇. 胆道手術における胆管—腸吻合部縫合不全, 狭窄予防を目的とした生体吸収性ステントの臨床応用, 日本胆道学会, 2011年9月, 宮崎

- 3) 宮澤光男, 合川公康, 岡田克也, 利光靖子, 上野陽介, 高瀬健一郎, 岡本光順, 山口茂樹, 小山勇, 筏義人. Tissue engineeringを応用した肝胆膵手術の機能温存 胆道を再生させる治療法開発を目指して, 日本肝胆膵外科学会, 2011年6月, 東京
- 4) 宮澤光男, 合川公康, 岡田克也, 利光靖子, 上野陽介, 高瀬健一郎, 岡本光順, 山口茂樹, 小山勇. 肝胆膵手術における胆管—腸吻合部縫合不全, 狭窄予防を目的とした生体吸収性ステントの臨床応用, 日本消化器外科学会総会, 2011年7月, 名古屋
- 5) 宮澤光男, 合川公康, 利光靖子, 岡田克也, 上野陽介, 山口茂樹, 岡本光順, 小山勇. 胆管上皮の良好な再生過程誘導を目指した生体吸収性胆道ステントの臨床応用, 日本消化器病学会, 2011年5月, 東京

〔図書〕

(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

ビスフォスフォネート関連顎骨壊死に対する  
低侵襲な外科療法開発のための基礎的研究

研究代表者 佐藤 毅 (大学病院 歯科・口腔外科)

研究分担者 福島 洋介<sup>1)</sup>, 佐藤 智也<sup>2)</sup>, 千田 大<sup>1)</sup>

## 緒言

ビスフォスフォネート関連顎骨壊死 (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw : BRONJ) はビスフォスフォネート (bisphosphonate : BP) の投与時に顎骨に関連する観血的処置を受けることで発症すると考えられている。その病態については、破骨細胞をターゲットとした骨吸収抑制・骨細胞の減少・口腔細菌感染・血管新生抑制・上皮細胞増殖抑制など多くの要因が複合的に絡み合っており引き起こされる<sup>1)</sup>。BPには経口剤と注射剤があるが、前者は骨粗鬆症に対して、後者は悪性腫瘍による高カルシウム血症・多発性骨髄腫による骨病変および固形癌骨転移による骨病変・乳癌の溶骨性骨転移に対して適応がある。経口剤の投与期間が3年未満である場合は、休薬することで観血的処置を行うことが可能であるが、注射剤の場合は悪性腫瘍骨転移に伴う、病的骨折・放射線治療・手術療法・高カルシウム血症などの骨転移に伴って発生する事象である骨関連事象 (skeletal-related event : SRE) を悪化させる可能性があるため原則として休薬は推奨されない<sup>2)</sup>。現在BRONJに対する治療法として、消毒薬による定期的洗浄、抗生剤の長期投与、顎骨の外科的切除があるが、洗浄や抗生剤投与の効果は期待できない。一方で、外科的切除は根治的治療法であるが、侵襲が大きく咀嚼機能が著しく損なわれる。注射BP製剤は、SRE発生の抑制効果があり、疼痛軽減・全身状態QOLの維持効果・進行再発癌骨転移の発生遅延効果・体動能力の保持をもたらす。そこで我々は、BRONJ病態モデルにおけるBRONJに対する侵襲の少ない治療法の開発についての基礎研究を立案した。本研究では、マウスにBPを静脈内投与して抜歯を行い、BRONJを発

症させた病態モデル動物を作製し、マウスの皮下より採取した脂肪組織から脂肪組織由来間葉系幹細胞 (AD-MSC) を分離して、BRONJ病態モデルマウスに投与することでBRONJが治癒するかどうかを組織学的に検討した。

## 材料と方法

BALB/cマウスを日本SLC社より購入した。Zometaはノバルティス社より分与されたものを用いた。BALB/cマウス(テストおよびコントロール各々4匹)にZometa (125 µg/kg)を3日おきに、3週間静脈内投与し、Day 10にて上顎切歯を麻酔下にて抜歯した (BRONJ-mice)。別のBALB/cマウスの腹部より白色脂肪を採取して間質細胞成分を遠心分離して除去し、ディッシュで培養して増殖させ、 $1 \times 10^6$ 個に調整した脂肪細胞由来間葉系幹細胞 (AD-MSC) をPBSで希釈したものを用意した。テスト群としてBRONJ-miceにおいて抜歯直後にAD-MSCを尾静脈内より注射してAD-MSCを移植したB4AD (+) mice (4匹)を、コントロール群としてBRONJ-miceにおいて抜歯直後にPBSを尾静脈内より注射したマウスB4AD (-) mice (4匹)を作製した。抜歯後14日目で過剰麻酔 (ソムノペンチル100 mg/kg, i.p.) による安楽死後、1塊として取り出した上顎骨サンプルと、脊椎骨 (L4) サンプルの非脱灰標本を作製した。上顎骨サンプルの組織学的評価については、HE染色とTrichrome染色を行い壊死骨・新生骨・結合組織を染め分け、顕微鏡下で5箇所以上の部位の撮影を行い、画像を取り込んでNIH image Jにて全面積に対する壊死骨の面積を計測した。また、脊椎骨は骨形態計測を行い、骨量 (bone volume/tissue volume) についてテストとコントロールとの比較を行った。

## 結果

上顎骨サンプルについては、B4AD (-) miceと比較

1) 大学病院 歯科・口腔外科

2) 大学病院 形成外科・美容外科

して, B4AD (+) miceにおいて壊死骨面積が有意に減少した(図1). 脊椎骨については, B4AD (-) miceと比較して, B4AD (+) miceにおいて骨量が増加した(図2, 図3).

## 考 察

今回, われわれは脂肪細胞由来間葉系幹細胞が, 注射BP製剤投与マウスの骨組織に対して骨量増加に作用することを見出した. Kikuiiriらは, 骨髄細胞由来間葉系幹細胞がBRONJの治癒を促進することを報告

したが<sup>3)</sup>, 脂肪細胞においても同様に治癒を促進する可能性があることを示唆している. AD-MSCは骨髄からの採取に比較して簡便, かつ大量の幹細胞が採取可能で, 患者への負担が少なく最近注目されている細胞治療であり, 腫瘍や炎症性疾患に対する応用が期待されている<sup>4,5)</sup>. 今回の研究結果から, 細胞移植にて創部の治癒を期待できる可能性が示唆された. 今後は, より臨床に近いモデルマウスとして, 乳癌骨転移モデルマウスにBP製剤を投与して, 同様に骨形態計測や免疫学的解析を行い発展的な研究を行う予定である.

## 参考文献

- 1) Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S, Soen S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: position paper from the Allied Task Force Committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan Osteoporosis Society, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology, and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Bone Miner Metab* 2010;28(4):365-83.
- 2) Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. Task force on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw -2009 update. *Aust Endod J* 2009;35(3):119-30.
- 3) Kikuiiri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, et al. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res* 2010;25(7):1668-79.
- 4) Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24(4):150-4.
- 5) Grisendi G, Bussolari R, Cafarelli L, Petak I, Rasini V, Veronesi E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res* 2010;70(9):3718-29.

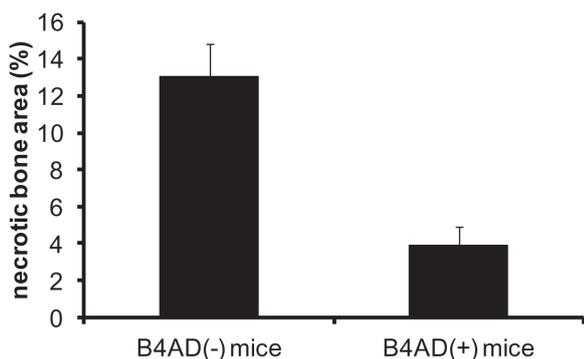


図1. 上顎骨における壊死骨面積.

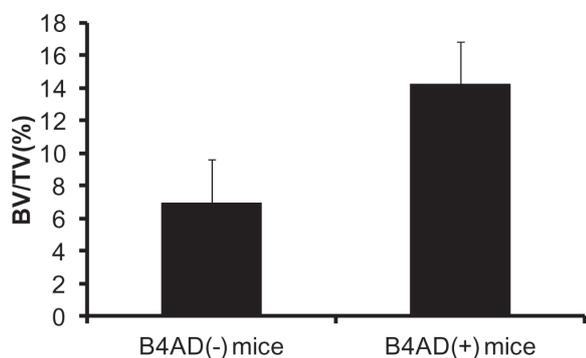


図2. 脊椎骨における骨量.

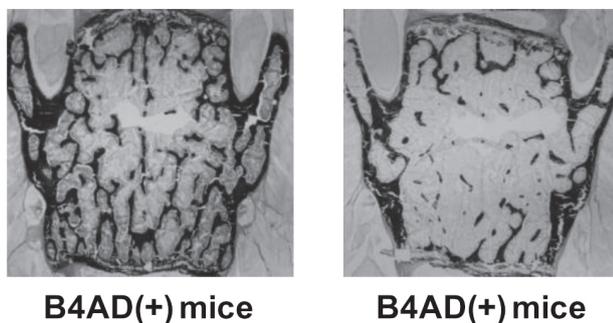


図3. 脊椎骨のvon Kossa染色.

## 研究成果リスト

なし

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

神経ペプチドを利用した多能性幹細胞から  
膵β細胞の分化・再生誘導と糖尿病の再生医療

研究代表者 松本 征仁 (医学部 分子生物学)

研究分担者 犬飼 浩一<sup>1)</sup>, 平崎 正孝<sup>2)</sup>, Mark Huisling<sup>3)</sup>, Wylie Vale<sup>3)</sup>

## 緒言

現代はストレス社会といわれ、日常生活における慢性的なストレスの亢進が虚血性心疾患・肥満・糖尿病などさまざまな生活習慣病を悪化させるリスクファクターであることがよく知られている。例えば、急性ストレスは血中の血糖値を上昇させることがよく知られているが、これは視床下部から分泌される神経ペプチドCorticotropin releasing factor (CRF/CRH)が、視床下部-下垂体-副腎 (HPA axis) を介してグルココルチコイド (GCs) を分泌させてストレス応答を制御している。しかしながら、従来ストレス応答と糖尿病との相関は指摘されていたが、血糖調節を行うインスリンを分泌する膵臓β細胞とストレス応答との詳細な分子機序については明らかでない。近年、CRFファミリーおよびGPCRクラスBに属するCRF受容体が選択的に膵島に発現することが著者らのグループにより報告され、CRFファミリーに属する神経ペプチドによる膵β細胞の機能を調節することが明らかとなった。実際、著者らはCRFファミリーが膵臓β細胞を標的として高血糖時のインスリン分泌を上昇させること、β細胞の増殖を促進させることなどCRFファミリーの新たな機能を見出してきた。

一方、今日のインスリン依存性糖尿病の治療法は、インスリン療法や経皮経肝門脈穿刺による膵島移植が有効であるが、度重なる注射による患者負担が大きいことやドナーの確保が難しいため、全ての糖尿病患者に満足のいく治療を提供できないのが現状である。このため、次世代の糖尿病治療として脚光を浴びている胚性幹 (ES) 細胞やiPS細胞を用いた膵β細胞の再生医療による先端的アプローチ法が期

待されている。しかしながら、ES細胞・iPS細胞共に多能性幹細胞から膵β細胞までの分化の道のりが長く多段階かつ複雑であるため、内・外胚葉前駆細胞が混在する培養系から糖尿病の治療に有効となる品質の高いβ細胞数の確保が困難であることを理由にインスリン依存性糖尿病の再生医療の実用化への発展の機会を失っており途上の段階といえる。従って、膵内分泌前駆細胞・β細胞の終末分化と膵島形成を適切にコントロールして臨床現場に安定的な膵β細胞の供給を可能にする手法の開発が必須である。内分泌前駆細胞において一過性に発現するマスター転写因子Neurogenin (Ngn) 3は膵β細胞の分化のみならず糖尿病モデルのβ細胞の再生過程に必須であることが知られている (図1)。これまでにβ細胞分化に重要な転写因子Pdx1, NeuroD, Nkx2.2, Nkx6.1, Rfx6.2, Sox9とNgn3などのβ細胞系統マーカーが同定されているが、各々の機能とβ細胞の終末分化については不明な点が多く残されている。近年、これらの遺伝子を生体内にウイルスベクターを用いて膵外分泌細胞や肝臓などの膵臓以外の組織において膵β細胞の分化転換・複製・再生を誘導することが報告されており、重要な点はいずれのβ細胞が生じる過程においてNgn3が不可欠という事実である。本研究では、膵β細胞の機能促進・細胞死・分化誘導に対する神経ペプチドの有効性について検討したので報告する。

## 材料と方法

**培養細胞：**MIN6細胞株は10% FBS (Sigma社) と1% Penicillin-Streptomycin (ナカライテスク(株)) を添加したDMEM (Sigma社) 培地中にて、37°C, 5%, CO<sub>2</sub>条件の下、培養した。

**マウス膵島：**12～16週齢のC57BL6/Nマウス門脈よりcollagenase type P (Roche社) 溶液を注入した膵臓を摘出し、37°Cにて10分間振湯後、Ficoll溶液にて密

1) 大学病院 内分泌内科・糖尿病内科

2) 医学部 分子生物学

3) ソーク研究所

度勾配遠心により膵島を単離した. 膵島細胞の培養は, 10%FBS, 1%Penicillin-Streptomycinを添加したRPMI (Invitrogen社) 培地中にて培養した.

**実験動物マウス:** 埼玉医科大学中央実験施設実験動物部門BS室にて実験動物管理運営規定に基づき飼育され, 苦痛軽減・安楽死に配慮した指針に従い実験を実施した. 共同研究で使用した遺伝子改変マウスについては米国ソーク研究所実験動物施設 (SARF) の実験動物管理運営規定に基づき飼育管理され, 苦痛軽減と安楽死に配慮した指針に基づき採材等の実験を行った.

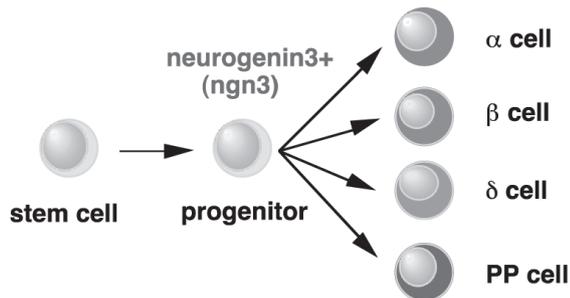


図 1.

結果

CRF 受容体 CRFR1が膵臓  $\beta$  細胞に発現し, グルコース濃度依存的に MAPキナーゼ経路の活性化を介してマウス膵島からインスリン分泌を上昇させる働きがあること (図 2 A),  $\beta$  細胞の増殖を誘導することを見出した (図 2 G, H). CRFファミリーには, 視床下部から分泌されHPAaxisの制御に重要な因子が含まれる. 膵島および膵  $\beta$  細胞株 MIN6細胞を用いて CRF, 膵  $\beta$  細胞に高発現する CRFファミリーの刺激によって, 受容体 CRFR1と CRFR2を介して cAMP 濃度の上昇と転写因子 CREBの活性化が誘導された. さらに, CRFファミリー受容体 CRFR2alphaは  $\beta$  細胞株 MIN6に発現すること, ストレスホルモンであるグルココルチコイド (GCs) で  $\beta$  細胞株の MIN6細胞株を処理すると, CRFR2alphaの発現が上昇するのに対し CRFR1の発現が顕著に低下することを見出した. さらに CRFR1と CRFR2の活性化は炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ による  $\beta$  細胞のアポトーシス, Caspase-3の断片化, Baxの発現を抑制することが明らかとなった

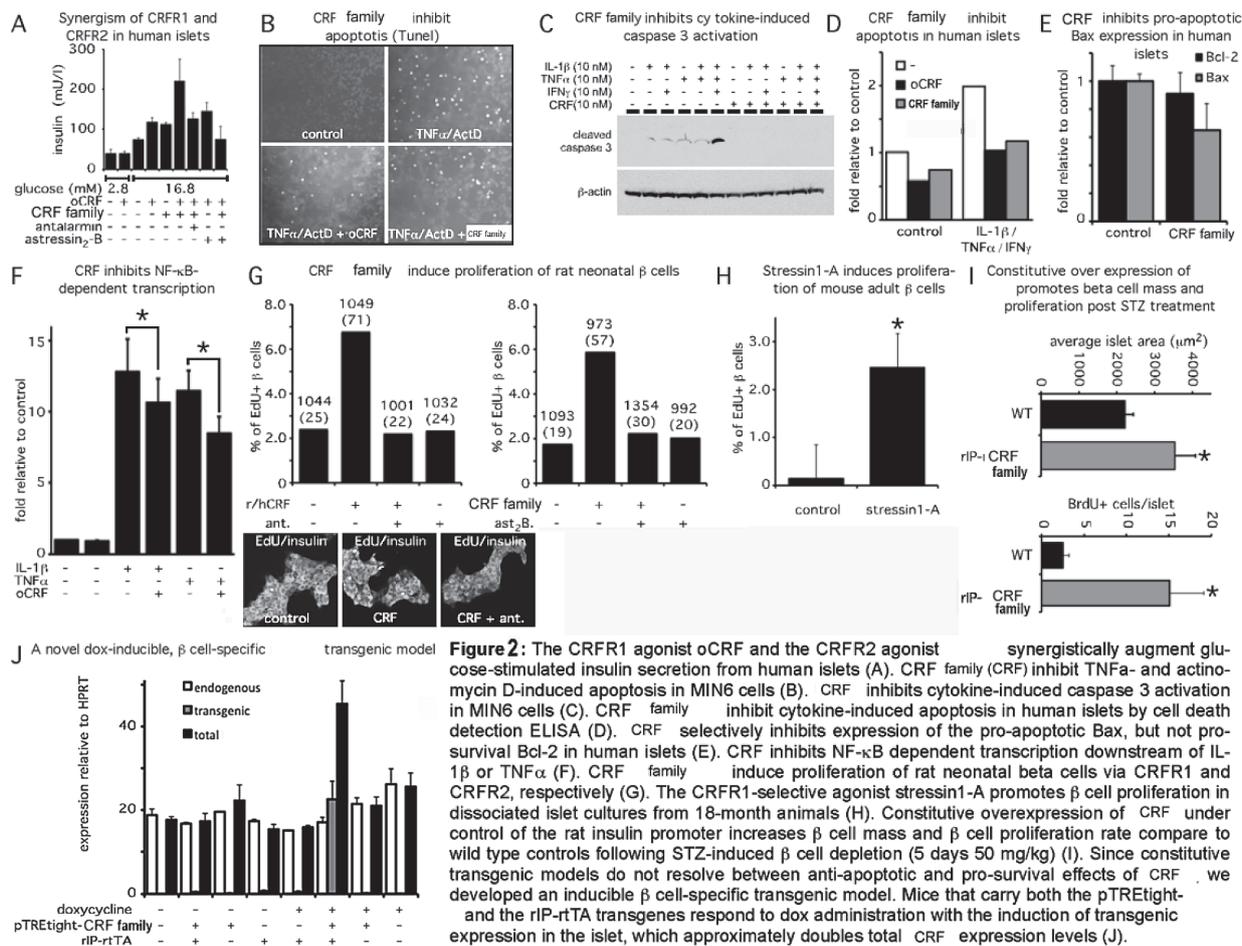


図 2.

(図2 B, C, E). CRFR2を生体マウスで活性化した遺伝子改変マウスにおいて膵島の肥大およびBrdU取り込み率の上昇が認められた(図2 I). 興味深いことにCRFファミリーは膵内分泌前駆細胞内に発現する転写因子Ngn3遺伝子の発現を調節することを見出した.

## 考 察

現在の食餌療法・抗糖尿病薬やインスリン投与等では合併症の併発の遅延効果を主体とした治療法であるため根本治療を目指した治療としては不十分である。また膵臓・膵島を用いたβ細胞の移植治療では必要な細胞数の確保が困難であることに加え組織適合性による拒絶反応など深刻な問題があり、iPS細胞やES細胞を用いた再生医療実用化には至っておらず、糖尿病の発症機序はもとより膵臓β細胞の発生・分化の詳細な分子機構については多くの不明な点が残されている。近年 GPCRクラスB受容体GLP-1受容体のアゴニストであるExedin-4やGLP-1を分解するプロテアーゼを標的とするDPP-4阻害剤がインスリン分泌を促進し、グルカゴン分泌を抑制することから臨床的な実用化が行われている。しかし、服用患者の約40%に嘔吐などの副作用が認められるなど、これら対症療法に置き換わるような画期的な再生医学プロトコルの開発が必要とされている。コルチコトロピン放出因子(CRF)は、視床下部より分泌されHPA(視床下部-下垂体-副腎)経路を介して、ストレス応答を制御しているため、受容体欠損マウスでは鬱病耐性になることから神経科学的に重要なホルモンである。これまでの著者らのグループおよび本研究の成果により、CRFファミリーが膵臓β細胞の機能を促進すること、増殖を誘導すること、アポトーシスを抑制することより、体系的にβ細胞の品質と機能を管理し恒常性を維持する重要な役割を担う可能性が示唆された。また、ストレス状況下におけるCRFファミリーが選択的に受容体を介したシグナル伝達機構により、一方のホルモンが不足または過剰になった場合に備え、互いに協調し合いインスリン分泌を調節し血糖値を厳密にコントロールしている可能性が考えられる。今後、糖尿病モデルマウスの解析による実用性の証明により、神経ペプチドCRFファミリーによる糖尿病の再生医療への応用が期待される。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Huising MO, Pilbrow AP, Matsumoto M, van der Meulen T, Park H, Vaughan JM, Lee S and Vale W. Glucocorticoids differentially regulate the expression of CRFR1 and CRFR2 $\alpha$  in MIN6 insulinoma cells and rodent islets. *Endocrinology* 2011;152:138-50.
- 2) Neda T, Inukai K, Kurihara S, Ono H, Hosaka T, Nakamoto H, Katayama S, Awata T. Hypoglycemic effects of colestimide on type 2 diabetic patients with obesity. *Endocr J* 2012;59(3):239-46.
- 3) Inoue T, Kozawa E, Okada H, Inukai K, Watanabe S, Kikuta T, Watanabe Y, Takenaka T, Katayama S, Tanaka J, Suzuki H. Noninvasive evaluation of kidney hypoxia and fibrosis using magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1429-34.
- 4) Ito D, Inukai K, Sumita T, Ono H, Katayama S, Awata T. Regulation of pigment epithelium-derived factor (PEDF), an insulin resistance-inducing adipocytokine in 3T3-L1 adipocytes. *J Diabetes Metab* 2011;2:1000151.

### 学会発表

- 1) Hirasaki M, Huising MO, van der Meulen T, Shimizu M, Nogi Y, Vale W and Matsumoto M. Divergent regulation of pancreatic endocrine cell differentiation from endocrine progenitor cell line Tec-3p cells, 71th 米国糖尿病学会(ADA), 2011 June, San Diego
- 2) 加藤直樹, 松本征仁, 緒方正人, 禾泰壽, 酒井宏哉, 織田弘美. 生体内のp38MAPKの酵素を介したシグナル伝達経路に神経再生制御因子が存在する, 第22回日本抹消神経学会学術集会, 平成23年9月, 沖縄
- 3) Matsumoto M, Huising MO, van der Meulen T, Hirasaki M, Vale W. Notch-mediated epigenetic regulation is critical for maintenance of pancreatic endocrine progenitors via possible integration with HB-EGF and CRF-family. 第34回日本分子生物学会年会, 平成23年12月, 横浜

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

## 次世代シーケンサーを活用した乳がんの新規診断・治療法の開発

研究代表者 伊地知 暢広 (ゲノム医学研究センター)

研究分担者 堀江 公仁子<sup>1)</sup>, 佐伯 俊昭<sup>2)</sup>, 大崎 昭彦<sup>2)</sup>

## 緒言

乳がんの発生・増殖にはエストロゲンシグナルが密接に関与している<sup>1)</sup>。乳がんの多くはエストロゲン受容体 (ER) を発現しており, エストロゲン依存性の増殖を示す。ERはリガンド依存性の転写因子で, エストロゲンの結合により活性化され, ゲノム中のエストロゲン応答配列 (ERE) に結合し, その近傍の標的遺伝子の転写を直接調節することで, エストロゲン作用を媒介している。ERのEREを介した転写調節には様々なcoregulatorやcofactorが関わっており, クロマチンレベルでのダイナミックな制御メカニズムが考えられている<sup>2)</sup>。中でも近年, フォークヘッド転写因子 (FOX) ファミリーがステロイド受容体との相互作用を介してホルモン依存性がんに関与していることが明らかとなりつつある。特に, FOXA1は乳がんにおけるERのパイオニア因子と考えられており<sup>3,4)</sup>, クロマチンのリモデリングを介してエストロゲン標的遺伝子の転写調節に関わることが注目されており, ER機能とホルモン応答の重要な決定因子と考えられている<sup>5)</sup>。近年では, クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) とDNA chip法を組み合わせたChIP-on-chip解析や, ChIP assayと次世代シーケンサーを組み合わせたChIP-seq解析など, 網羅的な解析手法の目覚ましい発展を基盤として, FOXA1に加えGATA-4やAP-2 $\gamma$ , TLE1などの他の転写因子の関与が報告され, ER転写の複雑な調節メカニズムがゲノムワイドに明らかにされつつある<sup>6,7)</sup>。臨床においては, ERに対する拮抗阻害薬である抗エストロゲン製剤タモキシフェン (TAM) が乳がんの内分泌療法として用いられており, エストロゲン依存性乳がんの治療に奏功している。しかしながら, TAMの長期投与により耐性を獲得するがんが生じることが大きな問題となっており, 有効な治療法が未だ確立されていない。このような乳がん

のエストロゲン依存性から非依存性を獲得する過程におけるスイッチングのメカニズムとして, エストロゲンにより正に制御される遺伝子とその制御から逸脱することにより, エストロゲン非存在下でも発現し, エストロゲン非依存性を付与している可能性が考えられる。したがって, 乳がんにおけるエストロゲンシグナルのさらなる解明を基盤とした, 新たな診断・治療法確立のための新規分子標的の探索が急務とされている。

我々は, 次世代シーケンサーを用いた解析により着目したFOX転写因子ファミリーに属するFOXP1がアンドロゲン受容体 (AR) との相互作用を介してARの転写抑制に関わることを報告した<sup>8)</sup>が, FOXP1はER陽性乳がん細胞におけるエストロゲン応答遺伝子でもあり, ERのEREを介した転写活性を増強し, エストロゲン依存性の増殖を促進することを明らかにした。さらに, 乳がん臨床検体において, FOXP1の発現がERやFOXA1の発現と正に相関し, リンパ節転移などの悪性度とは負の相関を示し, 乳がんの予後良好に関わる因子であることを報告した (Shigekawa et al., 2011)。

本研究では, 乳がんにおける新規診断・治療法の開発を目的として, FOXP1ならびにFOXA1に着目し, 術後タモキシフェン治療を受けた乳がん患者における臨床的意義を検討した。

## 材料と方法

乳がん臨床検体を用いた解析は, 国際医療センター乳腺腫瘍科との共同研究として行った。埼玉医科大学国際医療センター乳腺腫瘍科に加え, 四国がんセンター, 国立がんセンターならびに東京都立駒込病院にて集積された乳がん組織切片を対象とした。パラフィン包埋した乳がん組織を薄切後, 定法に従って脱パラフィン処理と親水化処理を行った後, 121°Cで15分間の抗原賦活化処理を行った<sup>9)</sup>。その後, 抗FOXP1抗体, 抗FOXA1抗体を用い, ポリマー試薬

1) ゲノム医学研究センター

2) 国際医療センター 乳腺腫瘍科

法 (Envision, Dako 社) と 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate kit (Vector 社) により免疫染色を行った。病理評価は2名の病理医により Allred score 法を用いて行った。FOXP1, FOXA1 の免疫反応性と各種臨床パラメーターならびに再発・予後との相関について、カイ2乗検定, Kaplan-Meier 法, Log-rank 検定, ロジスティック回帰分析を用いて解析した。

## 結果

乳がんのタモキシフェン療法における FOXP1 ならびに FOXA1 の臨床的意義を明らかにするため、術後タモキシフェン療法を施行され、予後情報ならびに治療経過の判明している乳がん組織パラフィン切片を対象に、FOXA1 ならびに FOXP1 の免疫組織学的解析を行い、タモキシフェン治療効果との関連について検討した。生存曲線解析ならびに多変量解析から、FOXA1 ならびに FOXP1 の免疫染色性は、いずれも Relapse-free 群で有意に多く観察され、Relapse-free survival, Overall survival のいずれの予後との間にも有意な相関を示すことが明らかとなった。さらに興味深いことに、FOXA1 と FOXP1 の共陽性の場合それぞれ単独の場合に比べ、より強い有意差をもって予後良好性を示した。これらの結果から、FOXA1 と FOXP1 の両方の免疫染色性が、再発乳がんのタモキシフェン治療効果規定因子として有用であることが示唆された。

## 考察

乳がん臨床検体を用いた発現プロファイル解析から、FOXA1 は ER $\alpha$  陽性で比較的予後良好かつ分化度の高い luminal type の乳がんマーカーとして認識されている<sup>10-14)</sup>。本研究における免疫組織学的検討においても、ER $\alpha$  ならびに PgR 発現との有意な正の相関が観察された。また、FOXA1 と FOXP1 はそれぞれ単独でも乳がんのタモキシフェン治療乳がん患者の予後良好との間に正の相関関係を有することが明らかとなった。さらに興味深いことに、これら二つの因子を組み合わせることで、タモキシフェン治療効果を予測しうる有用な診断マーカーとなりうることが示唆された。

本研究から、ER 転写機構における FOXP1 と FOXA1 の機能的関連が示唆された。これらの研究をさらに発展させることで、乳がんのタモキシフェン耐性獲得メカニズムの解明、ひいては治療抵抗性乳がんの診断・治療法開発につながることを期待される。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Shigekawa T, Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. FOXP1, an estrogen-inducible transcription

factor, modulates cell proliferation in breast cancer cells and 5-year recurrence-free survival of patients with tamoxifen-treated breast cancer. *Horm Cancer* 2011;2:286-97.

- 2) Abe Y, Ijichi N, Ikeda K, Kayano H, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Forkhead box transcription factor, forkhead box A1, shows negative association with lymph node status in endometrial cancer, and represses cell proliferation and migration of endometrial cancer cells. *Cancer Sci* 2012;103:806-12.
- 3) Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. Association of double-positive FOXA1 and FOXP1 immunoreactivities with favorable prognosis of tamoxifen-treated breast cancer patients. *Horm Cancer* 2012;3:147-59.

### 学会発表

- 1) 伊地知暢広, 重川崇, 阿部弥生, 池田和博, 堀江公仁子, 茅野秀一, 津田均, 大崎昭彦, 竹田省, 佐伯俊昭, 井上聡. 乳がんならびに子宮内膜がんにおけるフォークヘッド転写因子 FOXA1 の機能と臨床的意義, 第19回日本ステロイドホルモン学会, 2011年11月26日, 福岡市
- 2) 重川崇, 伊地知暢広, 池田和博, 堀江公仁子, 清水千佳子, 佐治重衡, 青儀健二郎, 津田均, 大崎昭彦, 佐伯俊昭, 井上聡. ER陽性乳癌におけるフォークヘッド転写因子 FOXP1 の役割, 第12回関東ホルモンと癌研究会, 2012年1月21日, 文京区

### 参考文献

- 1) Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;51:55-67.
- 2) Hall JM, McDonnell DP. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv* 2005;5:343-57.
- 3) Lupien M, Eeckhoutte J, Meyer CA, Wang Q, Zhang Y, Li W, Carroll JS, Liu XS, Brown M. FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer-driven lineage-specific transcription. *Cell* 2008;132:958-70.
- 4) Grange T, Roux J, Rigaud G, Pictet R. Cell-type specific activity of two glucocorticoid responsive units of rat tyrosine aminotransferase gene is associated with multiple binding sites for C/EBP and a novel liver-specific nuclear factor. *Nucleic Acids Res* 1991;19:131-9.
- 5) Carroll JS, Brown M. Estrogen receptor target

- gene: an evolving concept. *Mol Endocrinol* 2006;20:1707-14.
- 6) Holmes KA, Hurtado A, Brown GD, Launchbury R, Ross-Innes CS, Hadfield J, Odom DT, Carroll JS. Transducin-like enhancer protein 1 mediates estrogen receptor binding and transcriptional activity in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:2748-53.
- 7) Tan SK, Lin ZH, Chang CW, Varang V, Chng KR, Pan YF, Yong EL, Sung WK, Cheung E. AP-2  $\gamma$  regulates oestrogen receptor-mediated long-range chromatin interaction and gene transcription. *EMBO J* 2011;30:2569-81.
- 8) Takayama K, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Murakami K, Hayashizaki Y, Ouchi Y, Inoue S. FOXP1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374:388-93.
- 9) Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Fujimura T, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. Estrogen-related receptor  $\gamma$  modulates cell proliferation and estrogen signaling in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;123:1-7.
- 10) Habashy HO, Powe DG, Rakha EA, Ball G, Paish C, Gee J, Nicholson RI, Ellis IO. Forkhead-box A1 (FOXA1) expression in breast cancer and its prognostic significance. *Eur J Cancer* 2008;44:1541-51.
- 11) Badve S, Turbin D, Thorat MA, Morimiya A, Nielsen TO, Perou CM, Dunn S, Huntsman DG, Nakshatri H. FOXA1 expression in breast cancer—correlation with luminal subtype A and survival. *Clin Cancer Res* 2007;13:4415-21.
- 12) Thorat MA, Marchio C, Morimiya A, Savage K, Nakshatri H, Reis-Filho JS, Badve S. Forkhead box A1 expression in breast cancer is associated with luminal subtype and good prognosis. *J Clin Pathol* 2008;61:327-32.
- 13) Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
- 14) Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-74.

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

## ペルオキシソーム局在プロテアーゼ Tysnd1 の脳神経系での役割

研究代表者 水野 由美 (ゲノム医学研究センター)

研究分担者 穂田 真澄\*

## 緒言

ペルオキシソームは細胞内小器官の一つで超長鎖脂肪酸の代謝、フィタン酸等分岐鎖脂肪酸の代謝、リン脂質の一種であるプラスマローゲン合成などを担う。ペルオキシソームやペルオキシソームタンパク質が欠損するペルオキシソーム病では発達障害、精神発達遅滞、運動能力、視力、聴力の低下などが見られる。また、予後不良で重篤な事が多く生体内でのペルオキシソームの機能が重要であると思われた。しかし、ペルオキシソームの障害がなぜ神経症状を呈するかについての明確な答えはまだ見つかっていない。このような中、2007年に新たに同定されたTysnd1は、ペルオキシソームでの脂質代謝を担う酵素を切断するペルオキシソームプロセッシングプロテアーゼである事が明らかとなった。これまでの研究で、Tysnd1によるペルオキシソームの脂質代謝酵素の切断は、ペルオキシソームの脂質代謝機能の安定に重要である事を明らかにした(論文投稿中)。しかし、まだ、Tysnd1と脳の機能についての解析はなされていない。

そこで本研究では、Tysnd1欠損マウスを用い、ペルオキシソーム局在プロテアーゼであるTysnd1の脳での役割を解明する為の基礎となる解析を行った。

## 材料と方法

Tysnd1欠損マウスはCre-LoxPシステムによりTysnd1のエキソン2-4を欠失させた、全身でTysnd1が欠損しているものを解析に使用した。ホモのTysnd1欠損マウスはヘテロマウス同士の交配により得た。動物実験は埼玉医科大学動物実験委員会の承認を得た。また、動物福祉の観点から出来るだけ動物に苦痛を与えない実験方法を選択し、埼玉医科大学実験動物指針に従い行った。

マウスの脳の観察は、パラフィン切片をつくり、ヘマトキシリン・エオシン染色またはトルイジンブルー

染色にて行った。

## 結果

Tysnd1欠損マウスの脳のパラフィン切片を作り小脳、海馬、大脳皮質を光学顕微鏡観察したところ、長期飼育をしたTysnd1欠損マウスにおいて特徴的な所見が見られた(data not shown)。しかし、個体差の可能性もあるためさらに個体数を増やして解析をする必要があり継続中である。

また、神経症状との関連を調べるための行動解析では、9週令の野生型とTysnd1欠損マウスを各20匹、合計40匹用意した。マウスの行動解析では、各実験群をn=20の系で網羅的スクリーニングを行うのが一般的である。このため、実験に必要な十分なマウスを得るための親のヘテロのマウスを雌雄あわせて80匹用意する必要があったことから時間がかかり、解析は現在進行中である。

## 考察

Tysnd1欠損マウスは出生時には野生型マウスとの見かけ上の差は無いが、長期飼育によって脳神経系に違いが認められる可能性がある。ペルオキシソームの脂質代謝機能の低下による疾患、特に、中年期以降に症状の現れるヒト神経変性疾患との関連性や、その発症のメカニズムの解析にTysnd1欠損マウスが有用であると思われる。引き続き行動解析等を詳細に進める事で、これらの点について明らかにできると考える。

## 研究成果リスト

## 学会発表

- 1) Mizuno Y, Ninomiya Y, Iseki M, Iwasa H, Nakachi Y, Akita M, Tsukui T, Ito C, Toshimori K, Shimozawa N, Nishimukai M, Hara H, Maeba R, Okazaki T, Horai Y, Watanabe M, Motegi H, Wakana S, Noda T, Kurochkin IV, Mizuno Y, Schoenbach C, Okazaki Y. Tysnd1 deficiency interferes with mouse

\*中央研究施設 形態部門

- peroxisomal functions, 第34回日本分子生物学会年会, 4T18pII-4, 2011年12月16日, 横浜市
- 2) 水野由美, 伊関美緒子, 穂田真澄, 水野洋介, 岡崎康司. Tysnd1欠損細胞を用いたペルオキシ
- ソームタンパク質の細胞内局在解析, 第9回RCGMフロンティアシンポジウム, P30, 2011年11月3日, 埼玉県

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

## 皮膚扁平上皮癌におけるエストロゲンの役割

研究代表者 阿部 佳子 (総合医療センター 病理部)

研究分担者 新井 栄一\*

## 緒言

エストロゲンは乳癌のみならず卵巣癌、前立腺癌、直腸癌などにおいて癌化や増殖に関与することが知られている。皮膚においてエストロゲンは、創傷治癒や加齢に伴う変化に関与することが知られているが、皮膚癌に対する関与がいかなるものかは興味深い。

真皮に存在する線維芽細胞はアロマターゼというエストロゲン産生酵素を発現することが知られており、創傷治癒の過程のみならず、癌の浸潤の背景に局所のエストロゲン供給源となる能性が考えられる。また、過度の日光照射は皮膚扁平上皮癌発症を導く要因のひとつであるが、病理学的に年余にわたる日光照射の影響は真皮の弾性線維の変性(solar elastosis)という現象に現れる。これは、真皮の線維芽細胞の変化を介してエストロゲン環境の変化を引き起こしている可能性が想起される。

これまでに、皮膚扁平上皮癌および上皮内癌(Bowen病および日光角化症)の臨床検体に対する免疫染色により、エストロゲン受容体(ER $\alpha$ , ER $\beta$ )、アンドロゲン受容体、アロマターゼの発現の違いを、正常皮膚(剖検症例から採取)との比較により行ってきた(図1)。その結果、エストロゲン受容体の発現は、ER $\alpha$ の発現が浸潤癌である皮膚扁平上皮癌において、上皮内癌より有意に高いことがわかった。また、真皮におけるアロマターゼの発現は、浸潤癌と日光角化症で同程度に認められるのに対して、Bowen病(solar elastosisが見られない症例)では認められなかった(以上は東北大学倫理委員会承認2008-503に基づいて行い、2010年USCAP(Washington DC)にて発表)。

以上より、皮膚扁平上皮癌の浸潤にエストロゲンが関与する可能性があると考え、培養細胞による実験を試みた。

## 材料と方法

\*総合医療センター 病理部

**培養細胞:** ヒト皮膚扁平上皮癌由来培養株細胞株(HSC-1, HSRRBより購入)とヒト乳癌由来培養株細胞株(MCF-7)は20% FBS(GIBCO社)と1% Penicillin-Streptomycin(GIBCO社)を添加したRPMI培地(GIBCO社)中にて、37°C, 5% CO<sub>2</sub>下において培養した。

**RT-PCR:** 上記培養細胞よりmRNAを抽出しRT-PCRによりエストロゲン受容体(ER $\alpha$ , ER $\beta$ )、アンドロゲン受容体(AR)、アロマターゼに対するmRNAの半定量的に測定した。Primerは表1の通りで2step PCR(95°C 3秒60°C 30秒)を40 cycle 施行した。Inner controlはGAPDHを用いた。

## 結果

今回対象としたmRNAの発現が報告されているMCF7をpositive controlと考えてHSC-1におけるmRNAの発現の有無を検討した。HSC-1における各mRNAの量は図2に示すごとく、ER $\alpha$ がCYP19A-1, ER $\beta$ に比して多く見られた。しかしながら、ER $\alpha$ の量はMCF-7と比較すると約1/100の量であった。なお、ARは非常に少なかった。

## 考察

エストロゲン受容体はER $\alpha$ とER $\beta$ のisoformがあり、癌が発症する臓器により異なる発現頻度を呈する。乳癌で治療方法を検討する目的などで検索されるのはER $\alpha$ であるが、肺癌や直腸癌で高頻度に見られるエストロゲン受容体はER $\beta$ である。また、癌の増殖や増殖抑制は、ER $\alpha$ とER $\beta$ の発現のバランスによるということも提唱されている。過去に行った皮膚癌に対する免疫染色で、ER $\beta$ は正常、上皮内癌、扁平上皮癌のいずれにおいても陽性所見が得られた。扁平上皮癌では、ほとんど認められないものから高率に発現するものまでばらつきがあり、今回用いた培養細胞でほとんど認められないとしても不思議はない。

また、正常、上皮内癌、扁平上皮癌の間でER $\beta$ 発

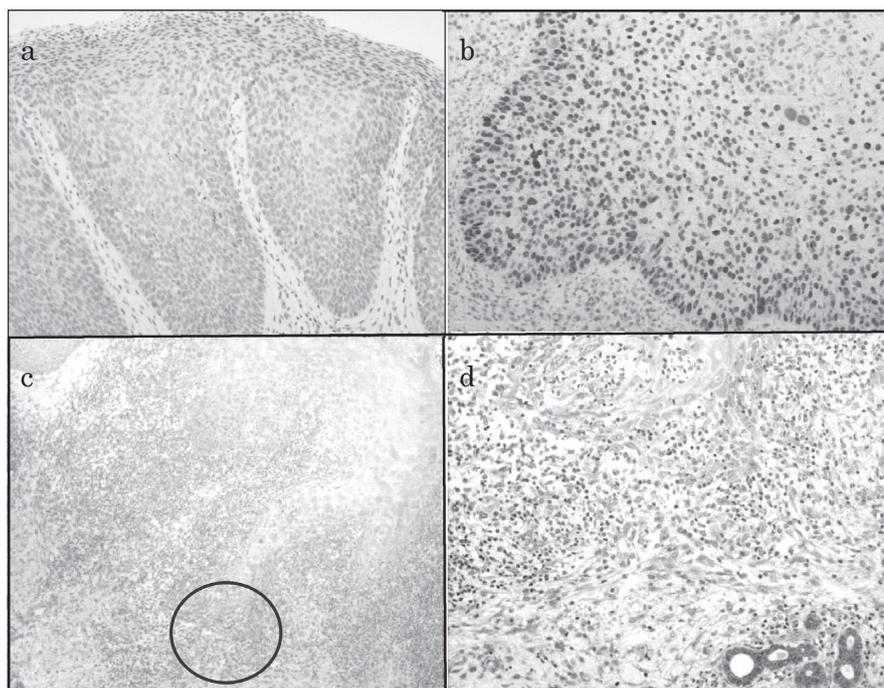


図 1. 皮膚上皮内癌および扁平上皮癌における免疫染色. Bowen 病ではER $\alpha$  陰性 (a) に対して, 扁平上皮癌ではER $\alpha$  陽性 (b). 扁平上皮癌に対するaromatase の染色では (c: 弱拡大), 真皮にaromatase 陽性細胞が見られる (d: cの青丸部分の強拡大).

表 1.

遺伝子名	Primer	
CYP19A1(Aromatase)	Forward	5'-CCT TCT GCG TCG TGT CAT GCT-3'
	Reverse	5'-GGA GAG CTT GCC ATG CAT CAA-3'
ESR1(ER)	Forward	5'-AGA CAC TTT GAT CCA CCT GA-3'
	Reverse	5'-CAA GGA ATG CGA TGA AGT AG-3'
ER $\beta$	Forward	5'-CCT GGC TAA CCT CCT GAT GC-3'
	Reverse	5'-ACC CCG TGA TGG AGG ACT T-3'
AR	Forward	5'-CCT CTC TCA AGA GTT TGG AT-3'
	Reverse	5'-TCG AGT TCC TTG ATG TAG TTC-3'

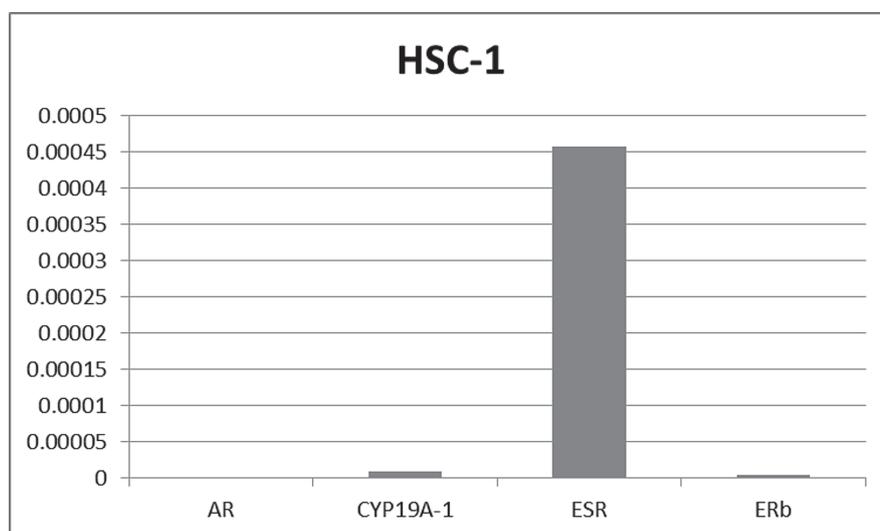


図 2. ヒト皮膚扁平上皮癌の培養細胞株におけるRT-PCRの結果.

現頻度に有意な差異は認められておらず、緒言にも述べたごとく皮膚扁平上皮癌の進展におけるエストロゲンの影響はER $\alpha$ を介して起こる可能性が高い。本研究では、HSC-1にER $\alpha$ のmRNAが認められ、以後のエストロゲン作用を見る実験に使用できる可能性が確認された。現在、受容体タンパクの発現について確認中であり、今後エストロゲン滴下による浸潤能、増殖能の変化についての実験を行う予定である。

#### 参考文献

- 1) Schweikert HU, Milewich L and Wilson JD. Aromatization of androstenedione by cultured human fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metabol* 1976;43(4):785-95.
- 2) Mills SJ, Ashworth JJ, Gilliver SC, et al. The sex steroid precursor DHEA accelerates cutaneous wound healing via the estrogen receptors *2005;125(5):1053-62.*

#### 研究成果リスト

#### 英文論文

- 1) Inoue T, Miki Y, Abe K, et al. The role of estrogen-metabolizing enzymes and estrogen receptors in human epidermis. *Mol Cell Endocrinol* 2011;344(1-2):35-40.
- 2) 伊藤路子, 青木見佳子, 黒澤真澄, 新井栄一, 川名誠司. Primary cutaneous CD4 + small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphomaの1例. *臨床皮膚科* 2011;65(13):1085-8.
- 3) 新井栄一, 山田和哉, 中塚貴志, 広藤亜樹子, 土田哲也, 清水道生. 臀部の巨大粉瘤から生じた有棘細胞癌. *日本皮膚病理組織学会会誌* 2011;27(1):9-12.
- 4) 広藤亜樹子, 中村晃一郎, 滝口光次郎, 倉持朗, 土田哲也, 新井栄一, 他. 下腹部に生じた keratoacanthomatous SCCの1例. *日本皮膚病理組織学会会誌* 2011;27(2):33-40.
- 5) Arai E, Jin L, Nagata K, Shimizu M. In: Mandi Murph, editors. *Melanoma in the clinic: diagnosis, management and complications of malignancy*. 1st ed, Croatia: In Tech; 2011.p.15-22.

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了時報告書

## 小型尿路上皮癌細胞が持つ癌幹細胞的性格について

研究代表者 周東 真代 (保健医療学部 健康医療科学科)

## 緒言

尿路上皮癌(UC)は、欧米では最も頻度の高い悪性腫瘍の1つであり、日本でも今後、増加する腫瘍の1つと考えられている<sup>1,2)</sup>。また、UCは組織学的異型度によって、臨床的予後の良い低異型度症例群と、強い浸潤性や転移を示し腫瘍死に至る高異型度症例群に分類され、それぞれ治療法が大きく異なる<sup>1,3-5)</sup>。よって、各症例の細胞異型に代表される異型度の判定は、病理診断のみならず治療戦略上も重要である。すなわち、病理学的異型度を客観的に評価し、浸潤や転移能の高い予後不良の症例を早期に検出することが望まれる。

UCの異型度は、構造異型と細胞異型の観点から判断されるが、特に細胞異型の評価が重要な因子である。しかしながら、細胞異型の発生機序は不明な点が多い。我々は、細胞異型の分子病理学的背景を明らかにすべく、multicolor FISH法による染色体解析から染色体の増加が直接、細胞異型の形成に関与していることを明らかにしてきた<sup>6)</sup>。この研究の過程において、正常基底細胞に類似する小型癌細胞に注目した。

一方、正常尿路上皮は、基底細胞、中間細胞および表層細胞の3種類の細胞で構成されているが、基底細胞はCytokeratin (CK) 5, CK17や67LR, 中間および表層細胞はCK18やCK20などが発現している<sup>7)</sup>。さらに、UCでは、CK5およびCK20の発現異常が知られている<sup>8,9)</sup>。このような基底細胞の性格をもった細胞がUC組織に存在すると報告されており、癌幹細胞との関連が示唆されている<sup>10-12)</sup>。

本研究では異型度の異なる低異型度症例および高異型度症例を対象にCK5を基底細胞、CK20を表層細胞、Ki-67を増殖能の指標として、多重蛍光免疫組織染色を行い、同一細胞の核面積を計測し、細胞核形態、CK発現異常および細胞増殖能の関係を多面的に解析し癌幹細胞的存在について検討した。

## 材料と方法

対象は、TUR-BTおよび手術材料で採取された低異型度UC5例および高異型度UC7例で、ホルマリン固定パラフィン包埋材料から6 μm切片を作製し、三重蛍光免疫染色を行った。

一次抗体の標識にはZenon Alexa Fluor キットを用いた。一次抗体はCK5 (clone XM26, Novocastra, Mouse mAb, IgG1), CK20 (clone Ks.20.8, DAKO, Mouse mAb, IgG2a), Ki-67 (clone MIB1, DAKO, Mouse mAb, IgG1) を用いた。CK5はZenon Alexa Fluor 555 (Invitrogen), CK20はZenon Alexa Fluor 488 (Invitrogen), Ki-67はZenon Alexa Fluor 647 (Invitrogen)で標識した。

脱パラフィン後、Target Retrieval solution pH9 (DAKO), 95℃, 40分で抗原の賦活化を行い、直接法で4℃一晩反応させた。PBSで5分3回洗浄後、5%ホルムアルデヒドで15分再固定した。再度、PBSで5分3回洗浄後、DAPI-II (Abott)で核染色した。

染色標本は蛍光顕微鏡 (Zeiss) で観察後、各症例の代表的な染色パターンを部位をCCDカメラ (Zeiss) にて対物40倍で撮影し、疑似カラーで重ね併せて染色画像とした。平均142個の腫瘍細胞のCKとKi-67発現パターンおよび核面積を計測した。核面積の計測は、画像解析ソフトIsis (Zeiss)を用いた。

## 結果

## 1. CK発現と異型度の解析 (Table 1)

各症例の解析結果をTable 1に示す。低異型度症例では5例中3例がCK5 (+) /CK20 (+) 細胞を主体とし、高異型度症例では7例中6例はCK5 (-) /CK20 (+) 細胞を主体とした。

低異型度UCより得られた748細胞はCK5 (+) /CK2 (+) 細胞が61%, ついでCK5 (-) /CK20 (+) 細胞が36%であった。一方、高異型度UCより得られた951細胞はCK5 (+) /CK20 (+) 細胞が27%でCK5 (-) /CK20 (+) 細胞が70%であった。CK発現パターンによるカイ2乗検定 $P < 0.01$ で、低異型度UC細胞と高異型度UC細胞において、有意差がみられた。

## 2. Ki-67とCK発現の解析 (Table 1, Fig. 1)

Table 1の各症例の解析結果ではKi-67によるMIB-1 indexが10%を越えた症例は低異型度症例1例, 高異型度症例5例であった. また, Ki-67 (+) 細胞 (低異型度 UC : 59細胞, 高異型度 UC : 180細胞) のCK発現パターンを解析したところ, いずれもCK5 (-) /CK20 (+) 細胞が高頻度で低異型度 UC 細胞は59%, 高異型度細胞は69%であった (Fig. 1). しかし, CK発現パターンによる4群についてマンホイットニのU検定をしたが, 有意差はなかった.

## 3. CKと核面積の解析

CK発現パターンによる4群の核面積をSteel-Dwas test で比較するとCK5 (+) /CK20 (+) とCK5 (-) /CK20 (+) の間にP < 0.01で有意差がみられた.

## 考察

### 1. CK発現と異型度の解析

正常ではアンブレラ細胞のみに陽性であるCK20は,

悪性化することにより全層が陽性に転化することが知られている<sup>8,9</sup>. また, CK20の発現はFGFR-3変異よりも先であるとの報告もある<sup>13</sup>. 今回の結果からは異型度にかかわらず, 低異型度 UC 細胞と高異型度 UC 細胞でCK20の発現はほとんどの細胞で陽性であった.

一方, CK5の発現は低異型度 UC 細胞で多いのに対し, 高異型度 UC 細胞では陰性化していた. 高度に腫瘍化した基底細胞の性質として67LRとCK17さらにはCEACAM6の同時欠乏がみられたというHe Xらの報告に類似していた<sup>10</sup>.

CK発現パターンは低異型度症例ではCK5 (+) /CK20 (+) 細胞が主体で, 高異型度症例ではCK5 (-) /CK20 (+) 細胞が主体で異なった. よって, 異型度とCK発現パターンとの間には関連があると考えられた.

### 2. Ki-67とCK発現の解析

Ki-67 (+) 細胞は異型度に関わらずCK5 (-) /CK20 (+) 細胞が最も高頻度で, ついでCK5 (+) /CK20 (+) 細胞であった. このことより, MIB1陽性率が高い

Table 1. CK expression pattern and MIB-1 index (%)

Grade	Case	CK5+CK20+	CK5+CK20-	CK5-CK20+	CK5-CK20-	MIB-1 Index (%)
Low	1	71.4	0.0	28.6	0.0	2.9
	2	100.0	0.0	0.0	0.0	0.8
	3	75.9	9.5	13.6	0.9	3.6
	4	35.8	1.5	62.0	0.7	9.5
	5	20.9	0.0	77.8	1.3	21.5
High	6	16.4	0.0	83.6	0.0	9.4
	7	20.0	0.0	80.0	0.0	5.7
	8	25.0	0.0	75.0	0.0	12.2
	9	71.4	0.0	28.6	0.0	20.4
	10	39.2	0.0	56.8	4.1	33.8
	11	12.4	0.0	86.8	0.8	16.5
	12	4.5	5.6	81.6	8.4	28.5

Boxes with grey backgrounds indicate most CK expression pattern.

Boxes with black backgrounds indicate more than 10% MIB-1 positive cells.

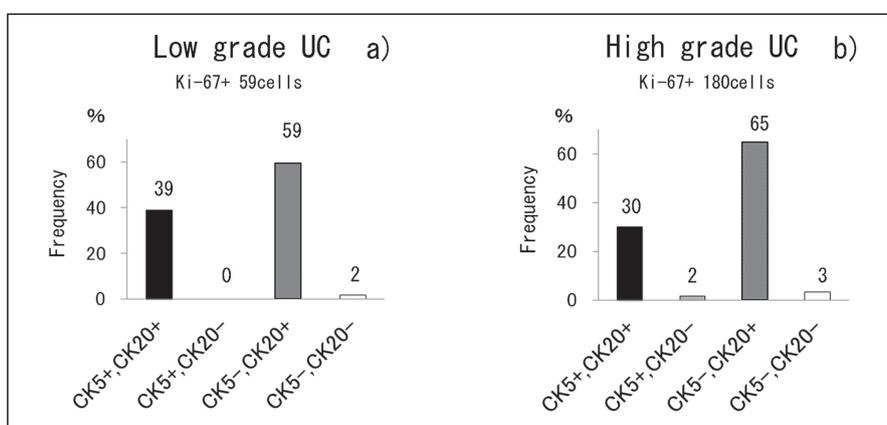


Fig. 1. CK expression pattern of Ki-67 positive cells. a) Low grade UC 59 cells, b) High grade UC 180 cells, Ki-67 (+) cells were mainly CK5 (-) /CK20 (+) cells.

CK5 (-) / CK20 (+) 細胞が増加することが高悪性度と関わっている可能性があると考えられた。

### 3. CKと核面積の解析

我々は以前の研究結果<sup>6)</sup>から高異型度の小型癌細胞の存在に注目してきた。それと同時に癌幹細胞的細胞の性質としてCK5 (+) / CK20 (-) / CD44 (+) 細胞を挙げている研究<sup>14)</sup>からCK5 (+) / CK20 (-) 細胞を癌幹細胞との関連を示唆して注目していた。今回の解析結果でもCK5 (+) / CK20 (-) 細胞は少数であったが小型細胞として見られた。

細胞増殖能を示すKi-67 (+) 細胞を組み合わせた解析ではCK5 (-) / CK20 (+) 細胞が最も多く見られた。CK5 (-) / CK20 (+) 細胞は小型から大型のものまで様々な大きさで出現していた。このことよりCK5 (-) / CK20 (+) 細胞にも癌幹細胞との関連から注目する必要があると考えられた。

総合するとUCでは正常では表層細胞のみに陽性を示すCK20が全層陽性化し、基底側で発現していたCK5は陰性化した。異型度に関係なく、細胞周期に入っているKi-67 (+) 細胞のほとんどはCK20を発現していた。これらのことから、UC細胞の核の形態異常を形成する背景には、細胞増殖能異常に関係したサイトケラチン発現異常が存在すると考えられた。今後も小型癌細胞の形質について面積を併せた解析を進め、癌幹細胞的性格を検討していきたい。

### 文 献

- 1) Mueller CM, Caporaso N, Greene MH. Familial and genetic risk of transitional cell carcinoma of the urinary tract. *Urol Oncol* 2008;26:451-64.
- 2) Matsuda T, Marugame T, Kamo K, Katanoda K, Ajiki W, Sobue T. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2003: based on data from 13 population-based cancer registries in the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) Project. *Jpn J Clin Oncol* 2009;39:850-8.
- 3) Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Lyon: IARC Press; 2004.
- 4) Oosterlinck W, Solsona E, Akaza H, Busch C, Goebell PJ, Malmstrom PU, et al. Low-grade Ta (noninvasive) urothelial carcinoma of the bladder. *Urology* 2005;66:75-89.
- 5) Cheng L, Davidson DD, Maclennan GT, Williamson SR, Zhang S, Koch MO, et al. The origins of urothelial carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010;10:865-80.

- 6) Shuto M, Seyama A, Gotoh Y, Kamada K, Nakamura M, Warigaya K, et al. Significant correlation between chromosomal aberration and nuclear morphology in urothelial carcinoma. *Acta Histchem. Cytochem* 2012;45:25-33.
- 7) Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 2008;129:705-33.
- 8) Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40:403-39.
- 9) Langner C, Wegscheider BJ, Rehak P, Ratschek M, Zigeuner R. Prognostic value of keratin subtyping in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch* 2004;445:442-8.
- 10) He X, Marchionni L, Hansel DE, Yu W, Sood A, Yang J, et al. Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma. *Stem Cells* 2009;27:1487-95.
- 11) McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tran M, Majewski T, Lee S, et al. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urol Oncol* 2010;28:429-40.
- 12) Tran MN, Goodwin Jinesh G, McConkey DJ, Kamat AM. Bladder cancer stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010;5:387-95.
- 13) van Oers JM, Wild PJ, Burger M, Denzinger S, Stoehr R, Roskopf E, et al. FGFR3 mutations and a normal CK20 staining pattern define low-grade noninvasive urothelial bladder tumours. *Eur Urol* 2007;52:760-8.
- 14) Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:14016-21.

### 研究成果リスト

#### 論文

Shuto M, Seyama A, Gotoh Y, Kamada K, Nakamura M, Warigaya K, et al. Significant correlation between chromosomal aberration and nuclear morphology in urothelial carcinoma. *Acta Histchem. Cytochem* 2012;45:25-33.

#### 学会発表

周東真代, 村田晋一, 瀬山敦, 後藤義也, 中村勝, 鎌倉靖夫, 鎌田孝一, 清水道生, 渡辺宏志, 福田利夫. 尿路上皮癌細胞におけるサイトケラチン発現と核形態および細胞増殖能の解析, 第50回日本臨床細胞学会秋期大会, 平成23年10月, 新宿