

## 報告書

平成14年度 丸木記念特別奨学研究費 B 研究実績報告書

## 膵臓ランゲルハンス島β細胞の再生と糖尿病治療への応用

受賞者 松本 征仁 (埼玉医科大学分子生物学教室)

糖尿病は、一度発症すると治療が困難であり、網膜症・腎症・神経障害・脳卒中・心臓病などの合併症を引き起こす重篤な慢性的疾患である。近年、新たな糖尿病の先端治療的アプローチとしてインスリンを分泌する膵β細胞を人為的に試験内で増幅させて利用しようとする再生医療による糖尿病治療の改善に大きな期待がよせられており、そのためには膵臓の発生・分化を理解することが不可欠であると考えられる。本研究は、遺伝子改変マウスを用いて膵臓の発生・分化のしくみを分子レベルで解明し、さらに糖尿病治療を目指した再生医療の基礎から臨床応用へ進展させることを目的としている。

再生医療による糖尿病治療を行うには、膵β細胞の分化を試験管内でコントロールし、効率良く増やす手法を確立する必要がある。bHLH型転写因子のNeurogenin3(Ngn3)は膵内分泌細胞・胃腸管組織の発生に重要であり、膵において前駆細胞で特異的に発現が認められる。このことはNgn3を発現する細胞を同定できれば、膵内分泌前駆細胞を単離できることを意味している。そこで私どもは、2重蛍光標識した遺伝子改変マウスを作製し、個体および試験管内で前駆細胞から膵β細胞分化のモニタリングを可能にする時系列分化システムを確立した。このマウスの特徴は、膵臓内分泌の前駆細胞に特異的に発現するNgn3遺伝子の制御下に緑色蛍光タンパク質(GFP)と不死化遺伝子SV40ラージT抗原(SVT)を、さらにインスリン遺伝子の制御下に赤色蛍光タンパク質(DsRed)を発現するため、GFPで標識した前駆細胞を生体内でSVTにより増幅できると共にβ細胞に分化すると赤色蛍光を発するのでリアルタイムで膵β細胞分化を個々の細胞レベルで検出できる事である。これらのマウスの解析の結果、消化管の一部に緑色の蛍光陽性の細胞の存在が観察され、また耐糖能の低下と膵ランゲルハンス島の部分的な形成不全が観察された。さらに興味深いことに、5ラインのうち3ラインの生存率が生後1年後において40%以下であることが判明し、膵・十二指腸周辺に実体蛍光顕微鏡観察下でGFP陽性の腫瘍の組織形成が認められ、中には脾・肝臓の肥大とともに腫瘍細胞

の浸潤または腫瘍が形成される個体が確認された。腫瘍組織の免疫組織染色の結果、これらの腫瘍細胞が抗SVT抗体および抗Ngn3抗体で陽性であることが確認されたが、インスリンやCA19-9などの膵臓内分泌または外分泌由来ならびに神経系やその他の腫瘍マーカーの発現を認めない。従って、これらの腫瘍細胞が未分化な前駆細胞に由来していることが期待される。さらに、2重蛍光標識の遺伝子改変マウス由来のGFP陽性DsRed陰性の膵臓細胞を細胞分離ののち、ニコチンアミド存在下で約2週間細胞培養を行った結果、DsRed陽性の細胞が観察された。すなわち、このことは生体内で起こる膵β細胞の分化を試験管内でリアルタイムで再現できたことを示唆しており、現在詳細な解析を行っている。

## 研究発表リスト

## ○原著論文

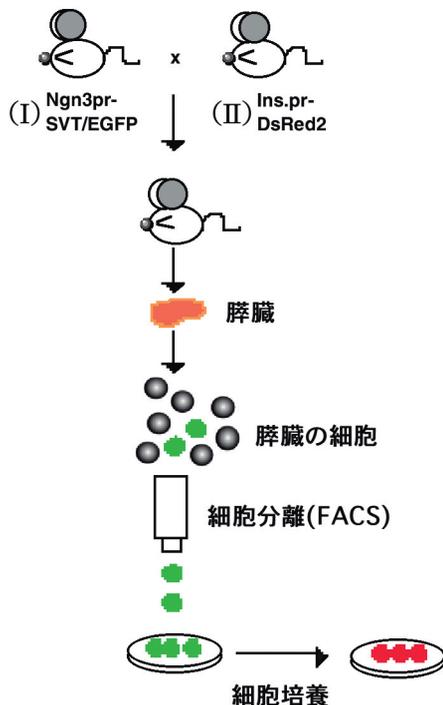
1. Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Takayanagi, H., Tsujimoto, M., Katayama, S., Hisatake, K. and Nogi, Y. Essential role of p38 MAP Kinase in Cathepsin K Gene Expression during Osteoclastogenesis through Association of NFATc1 and PU.1. (2004) J. Biol. Chem. in revision.
2. Fukuda, A., Nakadai, T., Shimada, M., Tsukui, T., Matsumoto, M., Nogi, Y., Meisternt, M., and Hisatake, K. A transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates a high level of transcription activation by GAL4-VP16. (2004) Mol. Cell. Biol. in press.
3. Fukuda, A., Tokonabe, S., Hamada, M., Matsumoto, M., Tsukui, T., Nogi, Y., Hisatake, K. Alleviation of PC4-mediated transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIIF. (2003) J. Biol. Chem. 278(17), 14827-31.
4. Nakagawa, K., Hisatake, K., Imazawa, Y., Ishiguro, A., Matsumoto, M., Pape, L., Ishihama, A., and Nogi, Y. The fission yeast RPA51 is a functional homolog of the budding yeast A49 subunit of RNA polymerase

I and required for maintaining transcription of ribosomal DNA. (2003) *Genes Genet. Syst.* 78, 199-209.

5. Maruyama, S., Sumita, K., Shen, H., Kanoh, M., Xu, X., Sato, M., Matsumoto, M., Shinomiya, H., Asano, Y. Identification of IFN regulatory factor-1 binding site in IL-12 p40 gene promoter. (2003) *J. Immunol.* 170(2), 997-1001.

○ 学会発表等

- 1 松本征仁, 久武幸司, 松本英子, 大島祐二, 茅野秀一, 谷口英樹, 禾泰壽 トランスジェニックマウスを用いた前駆細胞の単離と膵β細胞分化のリアルタイム検出系の開発 第47回日本糖尿病学会 2004
- 2 Matsumoto, M., Hisatake, K., Matsumoto, H., Oshima, Y., Kayano, S., Taniguchi, H., and Nogi, Y.



図の説明. (I) 緑色蛍光タンパク質(GFP)トランスジェニック(Ngn3pr-SVT/EGFP)マウスの作製 このマウスのNgn3を発現する前駆細胞は, GFPと不死化遺伝子SV40ラージT抗原を一過性に発現するため, 増殖した前駆細胞を細胞分離装置(セルソーター; FACS)で分離することができる. さらにCreリコンビナーゼを発現するアデノウイルスを用いたCre-LoxPシステムを用いて, T抗原とGFP遺伝子を切除することで正常な細胞の性質が回復できると考えられる. (II) 赤色蛍光タンパク質(DsRed2) (Ins.pr-DsRed2)マウスの作製 インスリン遺伝子の制御下でDsRed2を発現する遺伝子改変マウスを作製し, (I)のマウスと交配させる. この遺伝子改変マウスより単離した前駆細胞は移植により生体内で, または試験管内培養でβ細胞の分化に伴って緑色から赤色蛍光として検出できる.

Establishment of isolation of pancreatic endocrine precursor cells. *Keystoe Symposia, Diabetes Mellitus*, Mar. 4-10. 2004 Banff

- 3 松本征仁, 久武幸司, 松本英子, 茅野秀一, 谷口英樹, 禾泰壽 遺伝子改変マウスを利用した膵内分泌前駆細胞の単離と性質の検討 第26回日本分子生物学会年会 ワークショップ 2003
- 4 松本英子, 松本征仁, 久武幸司, 禾泰壽 インシュリンプロモーターを用いたトランスジェニックマウスモデルによる膵β細胞分化の検出系の確立 第26回日本分子生物学会年会 2003
- 5 松本征仁 再生医療を目指した膵臓β細胞のリアルタイム分化検出システムの開発 特別講演:新潟大学 神経科学研究所 2003
- 6 松本征仁 多因子性疾患, 骨粗鬆症と糖尿病に関わる破骨細胞と膵臓β細胞をモデルとした転写因子を介した細胞分化の分子機構の解明—p38MAPキナーゼを介した破骨細胞分化, 再生医療を目指した膵臓β細胞のリアルタイム分化検出システムの開発 特別講演:埼玉がんセンター 2003
- 7 松本征仁, 甲川昌和, 久武幸司, 和田誠基, 禾泰壽 破骨細胞分化に伴うp38MAPKの標的因子NFATc1はPU.1との協調作用によりカテプシンK遺伝子の発現を誘導する 第26回日本分子生物学会年会 2003
- 8 Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Katayama, S., Hisatake, K. and Nogi, Y. Essential role of p38 MAP kinase signaling pathway for receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)-induced expression of marker genes in osteoclastogenesis. 1st Joint Meeting of IBMS-JSBMR 2003. Jun.7, Osaka.
- 9 Matsumoto, M., Nakagawa, K., Hisatake, K., and Nogi, Y. Establishment of isolation of pancreatic endocrine precursor cells. *Keystoe Symposia, Islet Biology*, Jan.21-26.2003 Keystone
- 10 松本征仁, 中川香を, 茅野秀一, 濱田光浩, 久武幸司, 禾泰壽 すい臓内分泌細胞の前駆細胞の単離のための検出システムの構築 第25回日本分子生物学会年会 2002

その他共同研究発表

- 1) M. Kogawa, S. Wada, M. Matsumoto, S. Yasuda, M. Iitaka, Y. Nogi, S. Katayama Differential regulation by cell adhesion on CT-induced ERK and p38 MAPK signaling in mature mouse osteoclasts 1st Joint Meeting of IBMS-JSBMR 2003
- 2) 安田重光, 甲川昌和, 和田誠基, 松本征仁, 禾泰壽, 飯高誠, 片山茂裕 成熟破骨細胞におけるカルシトニンシグナル伝達機構とMAPK関与の検討第76回日本内分泌学会学術総 2003
- 3) 今澤由紀子, 久武幸司, 中川香をり, 光澤浩,

- 津久井 通, 松本 征仁, 濱田 光浩, 石浜 明, 村松 實美, 禾 泰壽 分裂酵母 RNA ポリメラーゼI の新規サブユニットと RPA21, Rrn3p との相互作用 第25回 日本分子生物学会年会, 2002.
- 4) 福田綾, 床鍋 繁喜, 濱田 光浩, 松本 征仁, 津久井 通, 禾 泰壽, 久武 幸司 c-fos 遺伝子の転写調節機構の解析 第25回 日本分子生物学会年会 2002.
- 5) Hisatake K., Fukuda A., Tokonabe S., Hamada M., Matsumoto M., Tsukui T., Nogi Y. A regulatory role for TFIIF in transcriptional activation 第25回日本分子生物学会年会, シンポジウム, 2002.
- 6) 甲川 昌和, 安田 重光, 和田 誠基, 松本 征仁, 禾 泰壽, 片山 茂裕 成熟破骨細胞におけるカルシトニンシグナル伝達機構と MAPK 関与の検討 第4回骨粗鬆症学 2002
- 7) Hisatake K., Fukuda A., Matsumoto M., Tsukui T., Nogi Y. Stimulation of Promoter Escape by a Coactivator PC4 5th EMBL Transcription Meeting, August 24-28, 2002.

## 報告書

平成14年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

## C型肝炎ウイルス (HCV) に対するCTLワクチンの開発： HLA-A2 transgenic, H-2 class I knockout mouseを用いたHCV特異的 CTL誘導免疫法の研究

受賞者 松井 政則 (埼玉医科大学微生物学教室)

共同研究者 赤塚 俊隆\*

【緒言】C型肝炎ウイルス (HCV) 感染症において、細胞傷害性T細胞 (CTL) はウイルス除去に中心的な役割を担う。しかし、その抗原認識機構および活性化機構が複雑であるため、HCV特異的CTLを効率よく誘導するワクチンはまだない。我々は、HCVに対するCTLワクチンを開発する目的で、HCV特異的CTLを効率よく誘導する免疫方法をマウスで検討している。最近我々は、強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) に、組み換えアデノウイルス (AdV) を用いてin vitroでHCV由来エピトープを発現させ、そのDCをマウスに免疫する方法が有効であることを示した (Vaccine 21: 211-220, 2002)。しかし、この方法は、DCを調整する費用と手間がかかる。そこで、DCを使わない方法として、DNAワクチンを試みることにした。DNAワクチンは、体液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導できる、簡便で安全な方法として注目を浴びている。しかし、免疫誘導効率が悪く、方法を改善する必要がある。最近、抗原蛋白を発現するDNAで一次免疫し、同じ抗原を発現する組み換えウイルスで二次免疫する、プライム・ブースト免疫法が開発された。この方法は、DNAワクチンの繰り返し免疫より効率がよく、HIV感染症では既に臨床実験が始まっている。我々は、さらに効率を向上させるため、HCVコア蛋白を発現するプラスミドとTh1細胞を誘導するIL-12発現プラスミドを混ぜて一次、二次免疫し、HCVコア蛋白を発現するAdVで三次免疫することで、効率よくHCVコア特異的CTLが誘導できることを報告した (Vaccine 21: 1629-1639, 2003)。以上の実験は通常のマウスを用いたため、マウスのHCV特異的CTL反応を調べたに過ぎない。我々は次の段階として、上述の免疫方法でヒトのHCV特異的CTLを効率よく誘導できるかどうかを調べたいと思った。最近、パスツール研究所・Lemonnier博士はマ

\*埼玉医科大学微生物学教室

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とヒト $\beta$ 2-m遺伝子をいれたトランスジェニックマウスを作製した (HHDマウス)。このマウスは極めて免疫反応性が高く、普通のHLAクラスIトランスジェニックマウスでは難しい免疫原性の弱いHCV蛋白に対してもHLA-A2拘束性のCTL反応を誘導することができる。このマウスを用いて、本研究ではA) 新しいサイトカイン、IL-23, IL-27のDNAワクチンにおけるアジュバント効果について、及び、B) 既に報告された24種のHLA-A\*0201関連HCV由来エピトープの免疫原性について検討した。

A) 新しいサイトカイン、IL-23, IL-27のDNAワクチンにおけるアジュバント効果について (J. Virol. in press 2004)

【目的と意義】最近、IL-12と構造的・機能的に類似するサイトカイン、IL-23とIL-27が発見された。IL-23とIL-27はIL-12と同様に、細胞性免疫に重要なTh1細胞を誘導するが、Th1細胞のそれぞれ異なる分化段階に作用すると言われている。また、IL-12はCTL誘導に重要な働きをすることは多くの論文で示されたが、IL-23とIL-27についてはあまりわかっていない。我々は、上述のプライム・ブースト免疫法に適用して、IL-23およびIL-27がHCV特異的CTL誘導に対してアジュバント効果があるかどうかを検討した。

【材料と方法】1) マウス：上述のHHDマウスを使用した。2) 免疫：HCV蛋白発現プラスミドとIL-12, -23, -27発現プラスミドをそれぞれ混ぜて2回筋注し、その後、HCV蛋白を発現する組み換えアデノウイルスでブーストした。3) ペプチド：既知のHLA-A\*0201関連HCV由来ペプチド7種類を使用した。4) CTL活性：免疫2-3週後、脾細胞をin vitroでペプチド刺激し、 $^{51}\text{Cr}$ 遊離試験で測定した。5) CD8(+)/細胞内IFN- $\gamma$ 陽性細

胞：免疫マウス脾細胞をペプチドと一緒に5時間培養し、フローサイトメトリーで測定した。6) ELISPOT：IFN- $\gamma$  産生細胞数をELISPOT法で測定した。

**【結果と考察】**HCV蛋白発現プラスミドのみで免疫したマウスに比べ、IL-12、-23, または-27発現プラスミドと一緒に投与したマウスで、HCV特異的CTLの誘導が増強された。また、IL-12, IL-23, IL-27を混ぜて投与することで、相乗的なアジュバント効果が見られた。さらに、IL-12、-23, または-27発現プラスミドのみを事前に二度投与 (pre-injection) して、HCV蛋白を発現する組み換えアデノウイルスで免疫すると、HCV特異的CTLの誘導が増強された。従って、IL-23, IL-27にIL-12同様HCV特異的CTL誘導においてアジュバント効果があることが示され、プライム・ブースト免疫法におけるIL-23, IL-27の有用性が示唆された。

B) 24種類のHLA-A\*0201関連HCV由来エピトープの免疫原性について

**【目的と意義】**HCVのCTLワクチン開発のために、今まで多くのHCV由来エピトープが同定された。特にHLA-A\*0201は世界的に最もポピュラーなアレルであるため、30種類近くのHLA-A\*0201関連HCV由来エピトープが見つかった。しかし、効率のよいワクチンにするためには、免疫原性の高いエピトープ、すなわちドミナントエピトープを使う必要がある。本研究では、HHDマウスを用いて、既に報告されている24種類のHLA-A\*0201関連HCV由来エピトープについ

て、CTLの反応性、及びIFN- $\gamma$  陽性細胞数より検討し、ドミナントエピトープを探した。

**【材料と方法】**1) マウス：HHDマウスを用いた。2) 免疫：マウス骨髄細胞をGM-CSFとLPSで培養しDCを調整した。そして、組み換えアデノウイルスをin vitroで感染させてHCV蛋白を発現させ、マウス腹腔内に注射した。3) ペプチド：既知のHCV由来ペプチド24種類(core, 3; E1, 3; E2, 3; NS3, 5; NS4, 7; NS5A, 3)を用いた。4) CTLアッセイ：免疫2-3週後、脾細胞をin vitroでペプチド刺激し、<sup>51</sup>Cr遊離試験でCTL活性を測定した。5) ELISPOT：免疫したマウス脾細胞を調整しペプチドで刺激して、IFN- $\gamma$  産生細胞数をELISPOT法で測定した。6) 細胞内IFN- $\gamma$ ：免疫したマウス脾細胞をペプチドと一緒に5時間培養して、CD8陽性細胞内IFN- $\gamma$  陽性細胞をフローサイトメトリーで測定した。

**【結果と考察】**24種類のペプチドのうち約半数が、高いCTL活性を示したが、反応性の極めて低いエピトープも数個存在した。これは、ELISPOTアッセイやFlow cytometryの結果とほぼ一致したが、なかには一致しないものも存在した。現在HHDテトラマーでさらに解析中である。HCV蛋白は生体で有害に働く場合があることが知られており、このように複数のドミナントエピトープを探しだしてHCV蛋白の代わりに抗原として利用できれば、効率よく安全なワクチンになりうると思われる。

## 報告書

平成14年度 丸木記念特別奨学研究費 B 研究実績報告書

大腸癌発生におけるプロスタグランジン受容体を介する  
増殖因子産生制御の役割

受賞者 太田 慎一(埼玉医科大学消化器・肝臓内科学教室)

共同研究者 今井 幸紀<sup>1)</sup>, 新井 晋<sup>1)</sup>, 伴場 裕巳<sup>2)</sup>

## 緒言

非ステロイド系消炎鎮痛剤(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)には本来の消炎鎮痛作用以外に胃粘膜障害や大腸癌の発生を抑制する作用が報告されている。NSAIDはプロスタグランジン(PG)合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ(COX)を抑制し、PG合成を阻害する。NSAIDによる胃粘膜障害や大腸癌発生抑制にPG合成抑制がどのように関わっているかについては議論があり真の機構は明らかにされていないが、誘導性のCOXであるCOX-2が重要な働きをしている事が示唆されている。われわれは大腸だけでなく胃の前癌病変におけるCOX-2の局在を免疫組織化学を用いて検討した。さらにその機能的役割をcell lineを用いて検討した。以下にこれらの研究の概要を示す。丸木記念特別奨学研究費の助成を感謝する。

## 研究結果

## 1. 胃と大腸の前癌病変におけるCOX-2の発現

大腸癌の前癌病変であるヒト大腸腺腫においてCOX-2は腫瘍表面下の間質細胞特にマクロファージに高発現していた。大腸では過形成性ポリープは多くの場合小さく内視鏡的切除の対象にならない事から、胃の過形成性ポリープと腺腫のCOX-2発現を検討した。興味深い事に胃の過形成ポリープでは大腸腺腫と同様の腫瘍表面下の間質細胞にCOX-2発現を認めたのに対して胃腺腫では殆ど発現を認めなかった。更に発現細胞を免疫組織学的に検討した所COX-2発現細胞はマクロファージと筋線維芽細胞と考えられた。

## 2. 細胞株を用いた腫瘍血管新生因子VEGFのPGによる産生制御

PGEはEP<sub>2</sub>・EP<sub>4</sub>PG受容体を介してU-937細胞(ヒトマクロファージのモデル)のVEGF産生を著明に亢進

させた。PGI受容体に特異的なリガンドであるシカプロストとイロプロストも劇的にマクロファージのVEGF産生を亢進させた。PPAR $\gamma$ のリガンドであるPGJ<sub>2</sub>誘導体はマクロファージのVEGF産生を劇的に亢進させたが、PPAR $\delta$ のリガンドであるPGL<sub>2</sub>誘導体はこの作用が無かった。大腸癌細胞株ではPGE受容体やPGI受容体のリガンドではなく、PPAR $\gamma$ とPPAR $\delta$ のリガンドに有意のVEGF産生亢進作用が認められた。

## 3. 抗潰瘍薬であるレバミピドのPG受容体を介するサイトカイン産生亢進に対する抑制作用

レバミピドは単独ではマクロファージにおけるVEGF産生亢進に影響を与えなかった。しかしながらPGEによる産生刺激は抑制した。PGJ<sub>2</sub>誘導体による産生刺激には影響を与えなかった。同様にPGの膜受容体を介するIL-6・IL-8の産生亢進は抑制するが核内受容体を介するこれらのサイトカインの産生亢進には影響を与えなかった。

これらの結果から間質細胞に発現したCOX-2は大腸では大腸腺腫から大腸癌への進展過程に胃では腺腫ではなく過形成性ポリープの癌化過程に関与している事が示唆された。その機構としては癌細胞と間質細胞それぞれの細胞に発現した細胞膜・核内PG受容体を介するVEGF産生亢進が関与している可能性が示唆された。抗潰瘍薬であるレバミピドはPGの膜受容体を介したVEGF産生亢進を抑制し、大腸癌や胃癌の発生を抑制する可能性があるが、詳細な検討は今後の課題である。

## 研究発表

## (1) 学会誌等

- Ota S, Bamba H, Kato A, Kawamoto C, Yoshida Y, Fujiwara K. COX-2, prostanoids and colon cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 16 Suppl 2:102-6,2002
- Bamba H, Ota S, Arai S, Ban S, Shimizu M, Imai Y, Kawamoto C, Yoshida Y, Fujiwara K. Expression of

1) 埼玉医科大学消化器・肝臓内科学教室, 2) 埼玉医科大学総合医療センター研究部門

Cyclooxygenase-2 in hyperplastic gastric polyps. *J Exp Clin Cancer Res* 22:425-430,2003

- Bamba H, Ota S, Kato A, Miyatani H, Kawamoto C, Yoshida Y, Fujiwara K. Effect of rebamipide on prostaglandin receptors mediated increase of inflammatory cytokine production by macrophages. *Aliment Pharmacol Ther* 18 Suppl 1:113-118,2003

## (2) 口頭発表

### 海外学会

- Bamba H, Ota S, Kato A, Tokuyama K, Miyatani H, Kawamoto C, Fujiwara K. Effects of Rebamipide on Prostaglandin Receptors-Mediated Increase of Inflammatory Cytokine Production by Macrophages. 第103回米国消化器病学会 (2002)
- Bamba H, Ota S, Arai S, Ban S, Imai Y, Miyatani H, Kawamoto C, Shimizu M, Yoshida Y, Fujiwara K. Promotion of angiogenesis may play a role in the pro-tumorigenic activity of COX-2 during growth of human hyperplastic gastric polyps, but not human gastric adenomas. 第104回米国消化器病学会 (2003)

### 国内学会

- 伴場裕巳, 太田慎一, 加藤章, 川本智章, 藤原研司, 吉田行雄: 細胞膜・核内プロスタグランジン (PG) 受容体による血管内皮増殖因子 (VEGF) 産生の制御. 第62回日本癌学会総会 (2002)
- 伴場裕巳, 太田慎一, 加藤章, 徳山哲, 宮谷博幸, 川本智章, 吉田行雄, 藤原研司: プロスタグランジン (PG) 受容体を介する血管内皮増殖因子 (VEGF) 産生亢進作用に対するレバミピドの影響. 第88回日本消化器病学会総会 (2002)
- 伴場裕巳, 太田慎一, 加藤章, 宮谷博幸, 川本智章, 吉田行雄, 藤原研司: 大腸癌発生における細胞膜・核内プロスタグランジン (PG) 受容体による血管内皮増殖因子 (VEGF) 産生制御. 第13回日本消化

器癌発生学会総会 (2002)

- 伴場裕巳, 太田慎一, 新井晋, 今井幸紀, 伴慎一, 宮谷博幸, 川本智章, 吉田行雄, 藤原研司: 腫瘍細胞における細胞膜・核内プロスタグランジン (PG) 受容体による血管内皮増殖因子 (VEGF) 産生制御. 第61回日本癌学会総会 (2002)
- 伴場裕巳, 太田慎一, 加藤章, 宮谷博幸, 川本智章, 吉田行雄, 藤原研司: 胃腫瘍発生における cyclooxygenase-2 (COX-2) の役割. 第44回日本消化器病学会大会 (2002)
- 伴場裕巳, 太田慎一, 藤原研司: 消化管腫瘍の発生進展における cyclooxygenase (COX)-2 の役割. 第89回日本消化器病学会総会 (2003): ワークショップ7: 炎症からの発癌過程: 特にサイトカインの役割
- 伴場裕巳, 太田慎一, 加藤章, 宮谷博幸, 今井幸紀, 川本智章, 清水道生, 吉田行雄, 藤原研司: 大腸癌発生抑制における cyclooxygenase (COX)-2・プロスタグランジン (PG) 受容体の役割. 第14回日本消化器癌発生学会総会 (2003)
- 伴場裕巳, 太田慎一, 新井晋, 伴慎一, 宮谷博幸, 今井幸紀, 川本智章, 清水道生, 吉田行雄, 藤原研司: 胃腫瘍発生における cyclooxygenase-2 (COX-2) 発現と血管新生. 第62回日本癌学会総会 (2003)
- 伴場裕巳, 太田慎一, 吉田行雄: 消化管癌のケモプリベンションにおける標的としての cyclooxygenase-2 (COX-2) の意義. 第45回日本消化器病学会大会 (2003) パネルディスカッション8 大腸癌の前癌病変とケモプリベンション

## (3) 出版物

- Hiromi Bamba and Shinichi Ota. Roles of cyclooxygenase-2 in the development of gastrointestinal tumors. *Recent Research developments in Recent Research developments in Biophysics & Biochemistry*. pp345-362A. Gayathri. Research Signpost, 2003

## 報告書

平成14年度 丸木記念特別奨学研究費 B 研究実績報告書

再生不良性貧血における染色体不安定性が白血病への  
病態移行に与える影響に関する研究

受賞者 矢ヶ崎 史治 (埼玉医科大学血液内科学教室)

共同研究者 松田 晃\*, 別所 正美\*

**[要旨]** 再生不良性貧血 (AA) の予後は免疫抑制療法の導入により改善したが、一部の症例が治療後に数的染色体異常を有する急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形性症候群 (MDS) に移行する。今回我々は、未治療 AA 19 例の骨髄細胞を対象に、分裂期染色体における染色体不安定性のマーカーと考えられる Premature Chromatid Separation (PCS) の出現頻度と間期核 FISH 法による 1, 6, 7, 8, 17 番染色体の異数性との相関を検討した。結果、解析染色体のいずれかに異数性を認めた群 (13 例) では PCS は  $24.2 \pm 9.0\%$  で、(-) 群の  $7.0 \pm 8.8\%$  に比して有意に高かった ( $p=0.007$ )。染色体の数的異常が個々の細胞に出現するモザイク異数性を呈するが、染色体異常の内訳は減数性で  $-6(42\%)$ ,  $-1(37\%)$ ,  $-7(26\%)$ , 増数性では  $+6(37\%)$ ,  $+8(21\%)$ ,  $+1(16\%)$  であり、クローン性疾患移行時に好発する染色体異常が多かった。以上より AA では初診時より染色体不安定性によりモザイク異数性が起きていると考えられた。

**[緒言]**

再生不良性貧血 (AA) は、造血幹細胞の減少により汎血球減少をきたす良性疾患と考えられており、近年、免疫抑制療法 (IST) により予後は著しく改善した。しかし、IST 後、約 10 年で 10-15% の症例が骨髄異形性症候群 (MDS) や急性骨髄性白血病 (AML) に移行 (clonal evolution) することが問題になっている<sup>1)</sup>。MDS/AML 移行例における染色体異常は  $+8$ ,  $-7$  等の数的染色体異常の頻度が高いことが特徴であり、これらの病態変化は骨髄移植後には認められない。そこで我々は、AA 治療前にこれらの数的染色体異常がすでに発生している可能性を考え、潜在的な  $-7$  minor clone の存在と clonal evolution との関連性を高感度 Two-color FISH 法を用いて検討してきた。結果、AA 初診時に存在する  $-7$  minor clone は早期に clonal

expansion するものと、治療後に感度以下に消退するものがあることが判明した<sup>2)</sup>。近年、AA 治療後に一過性に  $-7$  などの染色体異常が出現し自然消退する報告も散見される。また別所らによるセントラルレビューによって AA と診断され IST を施行された 79 例の病態移行に関する前方向研究の結果、観察期間 1 年で MDS 移行と診断されたのは 5 例でいずれも治療前後ともに染色体異常は認めないこと、治療前後で核型解析が可能であった 56 例中、10 例 (17.9%) に染色体異常が出現するが形態学的に MDS や AML の移行を認めないことが明らかにされた。染色体異常の内訳は  $-7:5$  例;  $del(13):2$  例;  $+8:1$  例;  $+22:1$  例; その他: 1 例であった。さらに間期核 FISH 法による解析では治療後 11.1% に  $-7$  陽性化を認めた<sup>3)</sup>。過去の報告では AA から MDS 移行までの期間の中央値は約 5 年であり、染色体異常として  $-7$  や  $+8$  が多いことが知られており、本研究の結果は病態移行に先立って染色体異常が早期に出現している可能性を示唆している。

今日まで、癌細胞における数的染色体異常は癌化の結果生ずる染色体不安定性に起因する二次的なものと考えられてきた。近年、急速に染色体分裂機構が分子生物学的に解明されつつあり<sup>4)</sup>、mitotic check point 遺伝子である MAD2 の haplo-insufficient mice では染色体不安定性が生じ減数性染色体異常が発生すること、長期の潜伏後に肺癌が発生することが報告され注目されている<sup>5)</sup>。さらに mitotic check point 機構に異常が発生すると紡錘糸阻害剤存在下でも、cohesin の分解により姉妹染色体の早期解離現象、premature chromatid separation (PCS) が発生した。また Kajii らによって PCS 家系におけるホモ接合体例では Wilms 腫瘍が高率に発生することも報告<sup>6)</sup>され、PCS が発癌の initiation になりうることを示唆されている。

そこで我々は AA における数的染色体異常の発生原因として、染色体分配異常を引き起こす染色体不安定性が AA で亢進している可能性を考え、染色体不安定

\* 埼玉医科大学血液内科学教室

性を示唆すると考えられるPCSの分裂期染色体における出現頻度と間期核FISH法を用いた骨髓細胞における染色体異数性との相関を検討した。

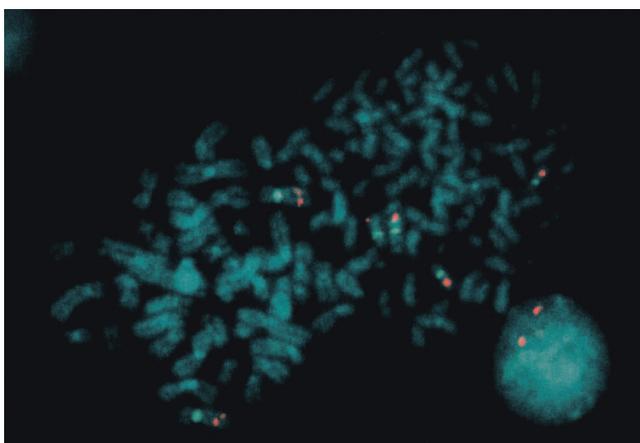
**[対象と方法]**

1998年5月から当科で入院加療された再生不良性貧血19例および健常者7例の骨髓細胞における染色体異数性とPCSを以下の方法で検討した。CEP7と7q31上のD7S486に対するdual color probeをcohybridizationし間期核500個を観察し、両者のsignalが一ケのものを-7とした。CEP6, CEP8およびCEP1, CEP17をそれぞれcohybridizationし間期核200個におけるsignal数をカウントした。さらに骨髓液にcolcemid 0.01µg/mlを添加し、37℃、18時間培養。常法に従って、低張および固定処理した。上記のFISH標本における分裂前期から中期の染色体を最低20細胞観察しPCSの出現頻度を解析した。

**[結果]**

**再生不良性患者骨髓細胞におけるPCSの出現**

AAで認められた典型的PCS像をFig.1に示す。PCSの発生比率はAA治療前(n=19)で19.0±11.5% (median ± SD) (range:0-37.4)であり健常者骨髓(n=7)では10.8±3.9% (median ± SD) (range:2.9-14.5)であった(Fig. 2)。両群間に有意差は認められなかったが(p=0.088; Mann-Whitney U)。AAではPCSの発生比率が高い症例(PCS>20%)が53% (10/19)に認められ(Table 1)、PCSの発生比率と重症度の相関は認めなかった(Fig 2)。さらに個々の症例の治療経過におけるPCSの推移を検討すると、初診時にPCS高値を示した症例(20.0%、



**Fig 1.** A representative premature chromatid separation metaphase (right) and a normal metaphase (left) from BM cells of a patient with aplastic anemia, treated with 0.01 µg of colcemid/ml for 18hrs. FISH analysis using dual color probes for the centromere (green) and D7S486 (red) of chromosome 7 shows completely separated sister chromatids with the premature metaphase of chromosome 7.

**Table 1.** Patient Characteristics and Results of Interphase FISH and PCS Analyses

Patient No.	Age/y.	Sex	Gbanding	Severity	Therapy	Res to Tx	WBC	Neu	Hb	Plt	RBC	Ret	PCS%	No.of Meta	Aneu	+7 (%)	-7 (%)	+8 (%)	-8 (%)	+6 (%)	-6 (%)	+1 (%)	-1 (%)	+17 (%)	-17 (%)
SM-P1	68F	F	46,XX[20]	non S	CyA	NR	2400	960	7.5	1.5	202	5.25	2	50no	0	0.2	1.1	3.6	3.2	3.2	3	3	0	1.0	
SM-P2	64F	F	46,XX[20]	non S	ATG+PSL	ND	2460	934	7.3	2.4	212	4.35	7	102no	0	0.6	0.5	4.5	1.5	8.5	1	3.5	0	1.1	
SM-P3	83F	F	46,XX[20]	S	CyA	NR	2240	531	5.7	1.2	152	1.98	10	20no	0	0.2	0.4	8.2	0	3.8	1	4	0	1.0	
SM-P4	77F	F	46,XX[20]	S	CyA	NR	1270	240	5.3	0.4	173	0.62	15.4	26yes	0	0.6	0	9	0.8	10.1	1	3	0	12.5	
SM-P1	5F	F	46,XX[20]	non S	BMT	NR	5170	1225	7.1	3.9	208	2.13	20	100yes	0	1.9	0.8	3.9	1.6	5.4	5	3	0.5	7	
SM-P5	21M	M	46,XX[20]	S	ATG+CyA	RES	2880	345	4	0.7	119	0.96	27	44yes	0	1.3	0.3	8.5	0.3	21.5	0	3.5	0	16.5	
SM-P6	51F	F	46,XX[20]	S	ATG+CyA	NR	2380	595	6.1	0.8	179	1.29	5	30no	0	0.8	0	4.5	0	7	1	3.5	0	1.1	
SM-P7	32F	F	46,XX[20]	S	ATG+CyA	RES	1570	471	6.8	0.9	193	5	20	50yes	0	1.1	0.5	3.5	0	4.5	0	2.5	0	6	
SM-P8	71F	F	46,XX[20]	non S	CyA	RES	2440	854	8.1	2.5	269	5.7	37.4	91yes	0	0.4	4.2	8.8	2.3	8.3	2.5	3.5	4	11.5	
SM-P9	74M	M	46,XX[20]	S	CyA	ND	1070	43	4.5	0.5	129	0.4	30.6	49yes	0	0.6	2.5	5.5	0	15.5	3.5	6.5	0	11.5	
SM-P10	47M	M	46,XX[20]	S	ATG+CyA	RES	670	312	5	1.6	159	2.04	19.2	47yes	0	1.6	4	4.9	3.6	7.1	4	1.5	8.5		
SM-P11	68F	F	46,XX[20]	S	CyA	NR	2700	493	7.1	0.9	242	0.97	30.2	63yes	0	0.2	1	2.8	3.2	3.7	5	3.5	3	9	
SM-P12	45F	F	No Analyzable Metaphase	VS	ATG+CyA	NR	1050	73	4.8	0.3	185	0.389	0	8no	0	0.4	0	9	0	1.3	0	2.5	0	12.5	
SM-P13	71F	F	46,XX[20]	non S	CyA	NR	4390	1360	7.6	2.3	262	1.73	23	61no	0	0.8	0.5	4.4	0	5.9	0	4	0	1.2	
SM-P14	61F	F	46,XX[20]	VS	ATG+CyA	RES	1440	115	5.1	0.9	163	0.88	1.5	24yes	0	0.4	0	12.9	0.4	18.4	1.5	5	0	1.5	
SM-P15	42F	F	46,XX[20]	non S	ATG+CyA	ND	2850	660	7.5	0.7	244	4.94	1.5	20yes	0.7	1.8	2.5	7	1.5	13.5	1	5	0	12.5	
SM-P16	66F	F	46,XX[20]	non S	ATG+CyA	RES	2750	853	6.6	5.7	190	3.09	25.5	55yes	0.8	0.4	0	13.1	0.5	22.3	1	13.9	0	17.9	
SM-P17	38M	M	No Analyzable Metaphase	S	ATG+CyA	NR	1580	284	7.6	0.7	251	0.3	6.5	62yes	0	0.8	0.5	14	0.5	25.1	0.5	10.4	0	19.9	
SM-P18	34F	F	45,XX,-5[1] 45,XX-19[1], 46,XX[18]	non S	CyA	RES	2090	690	3.8	1.4	103	2.47	34.4	29yes	0	0.2	0	7.4	0	10.3	0	10.4	0	11.9	

Severity was defined according to the EBMT criteria. VS means very severe; S, severe; and non S, non severe. Res to Tx means response to the indicated therapy at the 9th month, evaluation was performed according to the EBMT response criteria. RES includes both CR and PR. ATG, antithymocyte globulin; CyA, Cyclosporin A; ana, anabolic steroid; BMT, allogeneic bone marrow transplantation; WBC, number of white blood cells per 10<sup>9</sup>/L; Neu, number of neutrophils per 10<sup>9</sup>/L; Hb, hemoglobin concentration (g/dl); Plt, number of platelets per 10<sup>9</sup>/L; RBC, number of red blood cells per 10<sup>9</sup>/L; Ret, number of red blood cells per 10<sup>9</sup>/L; PCS means the percentage of metaphase with the premature chromatid separation in the total metaphases analyzed (indicated by No. of meta); Aneu (yes) indicates the presence of aneuploidy of chromosome 1, 6, 7, 8, and 17. Percentage of nuclei with triple signals or single signal in at least 200 nuclei studied by interphase FISH analyses for chromosome 1, 6, 7, 8, and 17 are shown respectively.

27.0%)はいずれも骨髄移植やIST反応後に5.0%に低下しており,うち1例はAA再燃時にPCSの再上昇(34.5%)を認めた.またISTに対して不応性を示した症例ではPCS高値が持続した.また初診時PCSが0%であった症例は,IST不応時,46%に上昇し約10ヶ月という短期間の内に数的染色体異常を伴うMDSに移行した.MDS移行後はPCSは低下し安定した(Fig. 4).

染色体異常性

Table 1で示すように,様々な染色体の数的異常が個々の細胞に出現しておりモザイク異常性を呈していた.異常性の内訳を見ると減数性では-7:5例,-8:3例,-6:8例,-1:7例,-17:3例,増数性では+8:4例,+6:7例,+1:2例,+17:2例であり,AA初診時に好発する+8,+6やclone性疾患移行の際に好発する-7な

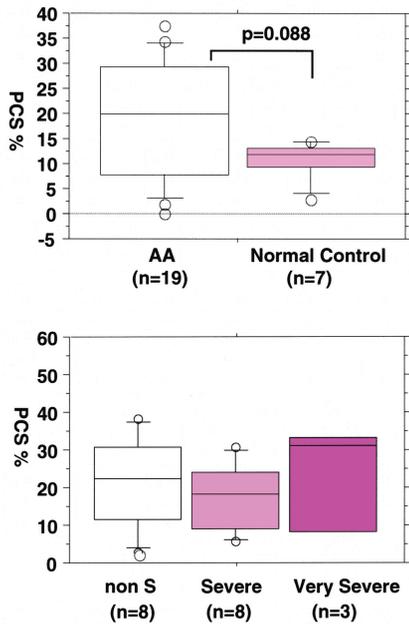


Fig 2. PCS Metaphase of Bone Marrow Cells in Patients with Aplastic Anemia and Healthy Volunteers. Box plots of the percentage of PCS metaphases are shown. The boxes extend from the 25th percentile to the 75th percentile, the lines indicate the median values, and the whiskers indicate the range of values. Statistical difference was evaluated using the Mann Whitney U analysis.

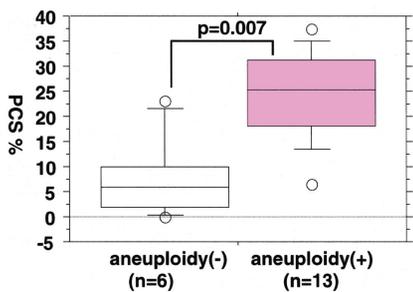


Fig 3. Rate of PCS metaphase are significantly higher in AA patients with aneuploidy in comparison with those without aneuploidy. Box plots of the percentage of PCS metaphases are shown. The boxes extend from the 25th percentile to the 75th percentile, the lines indicate the median values, and the whiskers indicate the range of values. Statistical difference was evaluated using the Mann Whitney U analysis.

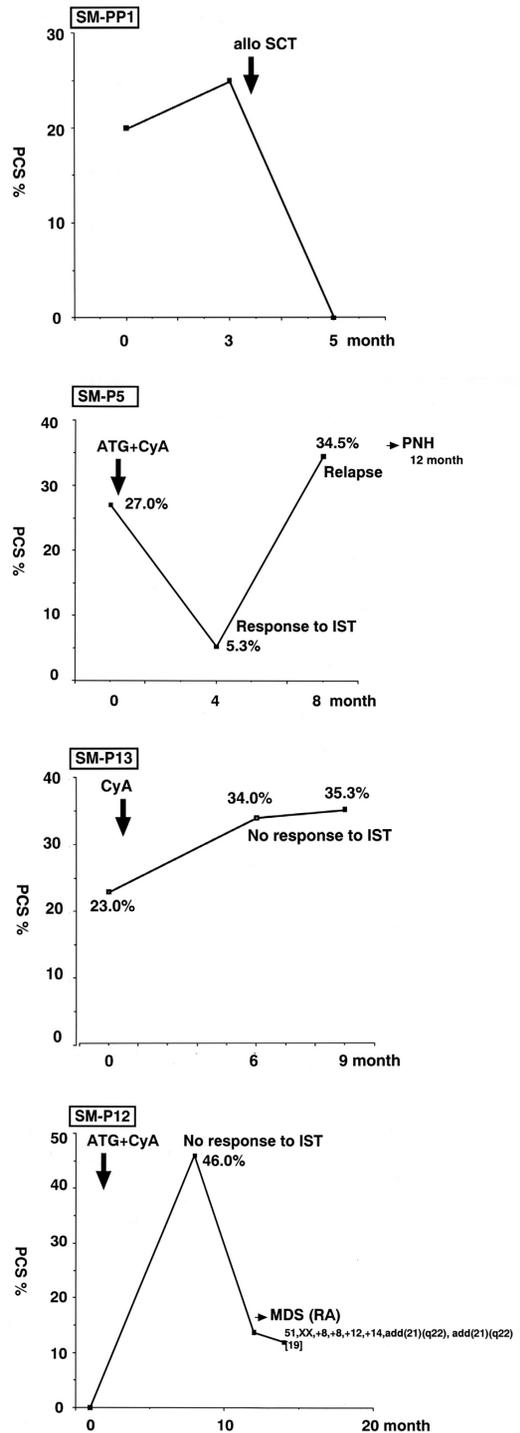


Fig. 4. Representative change of PCS in the clinical courses of patients with AA.

どの頻度が高かった (Table 2). また-6が全症例の42%と高い頻度で認められた. また初診時PCSが34.4%と高値であった症例では核型解析でもモザイク異数性が認められた. さらにFig. 3で示すように, PCSと異数性の関係を検討すると, 解析染色体のいずれかに異数性を認めた群 (13例) ではPCSは $24.2 \pm 9.0\%$ で, (-)群の $7.0 \pm 8.8\%$ に比して有意に高かった ( $p=0.007$ ).

#### [考察・結論]

今回の検討から, AAの半数例でPCSが高値 (>20%)を示し, 治療反応例ではPCSが低下するこ

とが明らかになった. 1,6,7,8,17番染色体のいずれかに異数性を認めた症例ではPCSが高値のものが多く, PCSと染色体異数性には有意な相関関係が認められた. 以上よりPCSはAAにおける染色体不安定性を示すマーカーと考えられる. また短期培養する前に, 4°C overnightで保存した検体ではPCSは認められないことから, 従来の外注検査の検体でPCSを評価することは出来ないことに注意すべきである. MDSやPNHといったclone性疾患移行例では初診時PCSは低値であったがMDS移行直前にPCSの上昇を認め, 治療抵抗性AAではPCS高値の状態が持続していることから, 治療抵抗例ではPCSによる染色体不安定性が遷延し clonal evolutionのリスクが高まると予想される. 今後はPCSによる染色体不安定性がclone性疾患移行の危険因子になりうるかを, 症例を拡大し観察期間を延長して検討する必要がある.

#### [結論]

AAではPCSにより染色体不安定性が亢進し染色体異数性が生じやすい病態が存在すると考えられる.

#### [文献]

1. Socie G, et al. N Engl J Med 1993;1152
2. 別所正美, 他 特発性造血障害に関する研究班 平成13年度研究事業報告書, 2002; 65
3. Bessho M, et al. Int J Hematology 2003;77:152
4. Nasmyth K. Science. 2002;297(5581):559 Review
5. Michel LS, et al. Nature. 2001, 409:355
6. Kajii T, et al. Am J Med Genet. 1998;78:245

**Table 2.** Summary of results of Interphase FISH Analyses for Gains and Losses of Chromosomes 1, 6, 7, 8, and 17

Chr.	No. of Pts (%)	Range, %	Normal Control	
			Cut off, %	(mean $\pm$ SD, %)
-6	8/19 (42)	10.1-25.1	8.9	(8.0 $\pm$ 0.9)
-1	7/19 (37)	5.0-13.9	4.3	(3.3 $\pm$ 1.0)
-7*	5/19 (26)	1.1-1.9	0.8	(0.4 $\pm$ 0.4)
-8	3/19 (16)	12.9-14.0	10.0	(7.9 $\pm$ 2.1)
-17	3/19 (16)	16.5-19.9	13.6	(10.7 $\pm$ 2.9)
-----				
+6	7/19 (37)	1.1-3.6	1.0	(0.7 $\pm$ 0.3)
+8	4/19 (21)	2.5-4.2	1.3	(0.7 $\pm$ 0.6)
+1	2/19 (11)	5.0-5.5	3.6	(1.9 $\pm$ 1.7)
+17	2/19 (11)	3.0-4.0	2.5	(1.0 $\pm$ 1.5)
+7*	0/20 (0)	-	1.0	(0.7 $\pm$ 0.3)

Cut off values are shown as mean plus standard deviation of positive rates per at least 200 nuclei for each chromosome aneuploidy from 6 BM samples from healthy volunteers. \*indicates that the values were obtained by the highly sensitive dual color interphase FISH method for chromosome 7 aneuploidy. No. of patients means the number of patients whose BM cells are positive for each chromosome aneuploidy.

## 報告書

平成14年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

## VEGF遺伝子多型と糖尿病合併症との関連の検討

受賞者 栗田 卓也 (埼玉医科大学内分泌・糖尿病内科学教室)

共同研究者 犬飼 浩一\*

糖尿病網膜症の発症には血糖コントロール以外に遺伝因子の関与が考えられているが、これまでに確定したものはほとんどない。また、網膜症の病期にかかわらず出現し視力低下を来す糖尿病黄斑症については、予知マーカーとしての遺伝因子の重要性は明らかであるが、これまでにほとんど報告がない。

そうした背景のもと、われわれは網膜症および黄斑症の遺伝因子の解析を行ってきた。まず、血管内皮増殖因子(VEGF)に注目した。VEGFは血管新生作用以外にも、強力な血管透過性亢進作用、血栓形成による血管閉塞促進作用を有しており、網膜症の3つの基本的病態である①網膜血管の透過性亢進、②網膜血管の内腔閉塞、③血管新生をすべて説明しえる。さらに、黄斑症(黄斑浮腫)における黄斑部の血管透過性の亢進にもVEGFは寄与する。スクリーニングにより見出した転写調節領域および3'非翻訳領域の多型を、2型糖尿病268例において関連解析および多重ロジスティック回帰分析により検討したところ、5'非翻訳領域のC(-634)G多型が網膜症と有意に関連していた<sup>1)</sup>。ハプロタイプ解析からは-634多型が網膜症と直接関連していることが示唆された<sup>1)</sup>。

さらに、国際共同研究により、VEGF多型は筋萎縮性側索硬化症(ALS)とも関連することを見出した<sup>2)</sup>。また、C(-634)G多型は側頭動脈炎(巨細胞性動脈炎)、乾癬とも有意に関連することが報告された。機能的にも、VEGF多型は血中VEGF濃度と関連し<sup>1)</sup>、in vitroでの転写活性に影響をしていた<sup>2)</sup>。C(-634)G多型は、VEGF遺伝子の翻訳開始位置にも影響し、large VEGF isoform(L-VEGF)の形成を通じて疾患感受性に関与することが示唆された<sup>2)</sup>。さらに最近、われわれは黄斑症の発症にVEGF多型が関与することも認めた。なお、VEGF多型は腎症とは関連せず、神経症との一次的な関連も否定的であった。

われわれは、ALR2, eNOS, MTHFR, PEDF(血管新生抑制因子)、TGF- $\beta$ 1の各遺伝子についても検討し

た。eNOS遺伝子については、27 bp繰返し多型およびT(-786)C多型が網膜症には関連しないものの黄斑症とは有意に関連していた<sup>3)</sup>。27 bp繰返し配列多型あるいはそれと強い連鎖不平衡にあるT(-786)C多型は機能的にはeNOSの発現低下への関与が報告されており、内皮細胞から産生されるNOの低下が黄斑症の発症に関与することが示唆される。現在、われわれはさらに詳細な解析を当院眼科との共同研究として行っている。

## 文献

- 1) Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, Inoue I, Katayama S. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(5):1635-9.
- 2) Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet*. 2003;34(4):383-94.
- 3) Awata T, Neda T, Iizuka H, Kurihara S, Ohkubo T, Takata N, Osaki M, Watanabe M, Nakashima Y, Sawa T, Inukai K, Inoue I, Shibuya S, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, in press.

\*埼玉医科大学内分泌・糖尿病内科学教室