

# 平成19年度 ハイテク・リサーチ・センター整備事業 研究成果報告書

ライフサイエンスフロンティア研究グループ

研究プロジェクト名 ヒト難治性疾患治療を目指した分子基盤的研究

研究代表者及び分担者

研究室名	職名	氏名	研究の役割分担
薬・臨床ゲノム生化学	教授	豊田 裕夫	研究統括 ヒト卵膜細胞の恒常性維持機能解析
薬・薬物動態制御学	教授	林 正弘	生体膜透過機構に基づいた新規感染症対策法の開発
薬・病原微生物学	教授	笹津 備規	難治性疾患と微生物の関連性
薬・臨床薬理学	准教授	平野 俊彦	難治性疾患における薬物耐性発現機序とそれを標的とした薬物療法の基盤構築
薬・病態生化学	教授	野水 基義	基底膜構成分子の組織特異的な作用機序の解明と医薬分野への応用
薬・機能形態学	教授	馬場 広子	脱髄性疾患の治療を目的とした脱髄および脱髄再生メカニズムの解明
生命・ゲノム情報学	教授	深見 希代子	イノシトールリン脂質代謝による組織幹細胞の増殖、分化スイッチング制御
生命・環境ストレス生理学	教授	高橋 勇二	肺気道障害が誘導する肺神経内分泌細胞への分化促進機構解明
生命・脳神経機能学	教授	宮川 博義	シナプス伝達を介さないニューロン相互作用の脳機能障害における意義の解明

研究成果の概要

難治性疾患の発症には、多くの因子が複雑に関与している。本プロジェクトは疾患発症を「細胞機能の恒常性の異常」と捉え、恒常性の維持・恒常性回復を目指し、細胞死・細胞再構築・再生医療・細胞医療といった観点から解析することを目的としている。平成19年度の研究成果概要は以下のようにまとめることができる。

**<脳神経機能解析グループ>**海馬アストロサイトの系を用いて解析を行い、神経回路網におけるシナプス伝達を介さない相互作用機構の解析を行い、シナプス間隙より漏洩したグルタミン酸により NMDA 受容体が活性化されることを明らかにした。統合失調症の発症機序にこの受容体の関与が注目されていることから、興味ある結果といえる（宮川）。難治性神経疾患として認知症には、ニューロン変性に起因するアルツハイマー病に加えて、脳梗塞などによる脳血管性認知症も知られており、その多くは白質変性を伴うものが多い。そこで、脱髄疾患モデルラット（dmy）を用いて、病態変化に伴うタンパク質の網羅的解析を行い病態変化に関連したたんぱく質を同定した。この結果は脳神経疾患の病態発症予測が可能であることを示唆する興

味ある結果といえる（馬場）。

**<幹細胞機能解析グループ>**リン脂質代謝が、多くの上皮系組織由来のがん細胞や幹細胞の増殖・分化制御機構に関与していることから、ホスホリパーゼ(PLC)に着目して解析を行った。その結果乳がん細胞においては、浸潤突起部位に、また、毛皮 **bulge** に存在する幹細胞からへアケラチンへの分化にも PLC が重要な役割を果たしていることを明らかにした（深見）。正常ヒト胎児の肺上皮細胞から肺神経内分泌細胞への分化誘導を低酸素条件下行った。その結果、神経内分泌細胞への分化過程前期では、Notch シグナル経路の活性因子である、Ash1 発現増加、Hes1 発現減少、後期では両分子発現の増加することを明らかにした。（高橋）。ラミニン由来の機能ペプチドを多糖類に固定し3次元での培養可能なペプチドマトリックスを作成し、再生医学・組織工学分野に応用することを目的として、ラミニン-1 の 673 種類のペプチドをスクリーニングし、5種類のペプチドがアミロイド様繊維構造をとり、細胞接着・神経突起伸長を促進することを見出した（野水）。

**<感染機構解析グループ>**ピロリ菌(*H. pylori*)は消化性潰瘍や慢性胃炎の原因となる病原性細菌である。クラリスロマイシン (CAM), アモキシシリン (AMPC) にプロトンポンプ阻害剤を組み合わせた 3 剤除菌療法が用いられる。特に日本で問題となっている CAM 耐性機構の解析を行い、23S rRNA の塩基置換による患者を同定した（笹津）。敗血症のモデルとして腸管由来の内毒素 LPS の結腸粘膜透過機構を ABC トランスポーター遺伝子変動から解析した結果、感染病態初期で上昇、後期で減少と病態変化に伴った変化を明らかにした（林）。薬物耐性機構を解明することで個別化医療を目指す平野グループは、免疫抑制薬治療効果に対して抵抗性を示す要因の一つである P 糖タンパク質に着目し、SLE 患者や重筋力無力症患者由来末梢血単核細胞 (PBMNC) を用いて解析した。ステロイド治療耐性と P 糖タンパク質機能亢進との相関性を明らかにし、さらに、当該タンパク質発現抑制にタンゲレチンなどのフラボノイドが有効であることを明らかにした（平野）。ヒト卵膜組織の構成細胞は、ウイルス感染・酸化的ストレスなどの外来刺激に対し、平滑絨毛膜組織細胞では細胞死誘導がおり、羊膜組織細胞では起こらず、この相違羊膜細胞ではストレスに対する寛容性が絨毛膜細胞より大である可能性が示唆された。

このように本プロジェクトにおいては、グループを大きく<神経・幹細胞・感染>という3つに分けて緊密な連携のもと情報交換を行い、「ヒト難治性疾患の発症機構解析」を行うことを目指している。プロジェクトメンバーの活動は活発で、疾患発症に関して、基礎的および臨床的観点から多くの興味ある結果を得ることができた。

# ヒト卵膜細胞の恒常性維持機能解析

豊田 裕夫（臨床ゲノム生化学教室・教授）

## 1. 当初の研究目標

本研究は、ヒトの妊娠維持・出産および微生物感染時における母体・胎児の防御機構に重要な役割を果たしている、卵膜組織とその組織構成細胞の外来刺激応答機構を解析することで、生体の恒常性維持における細胞の役割を分子レベルで解析することを目的としている。ヒトの卵膜組織は、形態の異なる平滑絨毛膜組織細胞（chorion 細胞）と羊膜組織細胞（amnion 細胞）から構成されており、外来刺激（ウイルス感染応答、酸化ストレスなど）に対して異なった応答を示すことを明らかにしてきた。例えば、インフルエンザウイルス感染系においては、絨毛膜細胞（Chorion 細胞）は感染後細胞死が誘導されるが、羊膜細胞（Amnion 細胞）では、細胞死誘導は起こらないことを明らかにした。また、chorion 細胞では、IL-6、TNF- $\alpha$  など一連の炎症性サイトカインの分泌を認めた。興味あることは、chorion 細胞に IV 感染すると、単球分化を誘導する因子（単球分化誘導因子、monocyte differentiation-inducing factor (MDI)）が発現・分泌されることを明らかにした。この現象は amnion 細胞には認められないことから、MDI 因子の細胞生物学的特性を明らかにし、その細胞死誘導との相関性について検討することで、より詳細な誘導機構解析が可能と思われる。

IV 感染時に起こる感染応答が IV 特異的現象なのか、IV 感染特異的な現象かを検討する目的で、母体感染と異常出産との関連性が論じられているサイトメガロウイルス (CMV) を用いてそれぞれの感染応答について解析をおこなった。その結果、感染 chorion 細胞では、ウイルス増殖が進行し、新しく合成されたウイルス粒子は近接する細胞に次々と感染し細胞死を誘導するが、amnion 細胞では、感染細胞におけるウイルス複製は進行せず細胞死も誘導されず、いわゆる不顕性感染の最適モデルと思われる。このように卵膜構成細胞応答がウイルスにより異なることは興味あり、その分子機構を解析することは重要である。

このように、卵膜組織に誘導される細胞死が、その組織構成細胞により異なる現象は、酸化ストレスを組織にかけた場合においても認められる。すなわち、卵膜組織を *in vitro* で培養すると、chorion 細胞にの apoptotic の急速な進行が認められ、その進行に伴い Hemeoxygenase-1 (HO-1), Mn-superoxide desmutase (Mn-SOD), Inducible NO Synthetase (iNOS), Cyclooxygenase-2 (Cox-2) などの生体内 Redox 状態を調節するタンパク質の発現増大を認めている。

これらの結果を踏まえて、平成 19 年度においては、卵膜組織構成細胞によって、外来応答が異なる機構解析に焦点をあてること、また、卵膜組織に幹細胞の存在を確認できたことから、幹細胞の存在様式が、構成細胞で異なるかなどを含めて解析を行った。

## 2. 研究成果の概要

### (1) ウイルス感染応答

ヒト卵膜組織および卵膜平滑絨毛膜組織から調製した初代培養細胞（chorion 細胞）にインフルエンザウイルス（IV）を感染させると、apoptotic および IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF など、種々の炎症促進サイトカイン遺伝子発現が誘導されること、またウイルスにより apoptotic を起こし

ている chorion 細胞の加熱処理培養上清中に、単球を成熟したマクロファージに分化させる活性（単球分化誘導（monocyte differentiation-inducing, MDI）があることを初めて見出した。また、ウイルス感染により分泌される上記炎症性サイトカインが、MDI 活性成分であること、MDI 因子により分化したマクロファージが、ウイルス感染によりアポトーシスを起こしている、chorion 細胞を貪食することも明らかにした。したがって、ウイルス感染によりアポトーシスを起こしている chorion 細胞と単球/マクロファージの間には MDI 因子を介した相互作用が存在し、この結果感染細胞の排除機構構築に寄与していると考えられる。また、アポトーシス細胞の貪食反応の後には、細胞毒性を示す活性酸素の一つである、スーパーオキシドの爆発的産生が起ることも知られており、卵膜組織構成細胞により酸化ストレス応答が異なるという我々の知見と合わせて、興味ある結果といえる。

ヒトがインフルエンザに感染すると発熱、頭痛、全身倦怠感、関節痛、および咳、痰などの気道炎症を伴い、下痢などの胃腸症状を伴うことが良く知られている。また、合併症状として、時に肝脂肪変性と脳症を特徴とするライ症候群が知られており、特に小児においてアスピリン服用時の副作用として知られている。しかしながら、その詳細な機構は不明である。インフルエンザをヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 細胞に感染させると、24 時間後に細胞質に著しい空胞化が起こり、オイルレッド O 色素染色陽性を示す脂肪小滴の蓄積を認めた。また、これらの細胞では、IL-8, RANTES, MIP-1 $\beta$ , GRO- $\beta$ , アポトーシス誘導作用を示すデスリガンドである TNF- $\alpha$ , FasL, 抗ウイルス活性を示す IFN- $\alpha$ , - $\beta$  mRNA お発現が認められた。また、感染 48 時間後には、DNA の断片化が観察された。このように、ウイルス感染がサリチル酸の関与なしに、肝細胞に直接的に空胞化、脂肪滴蓄積、ある種のケモカイン、デスリガンド、インターフェロンの遺伝子発現、そしてアポトーシス過程を経た細胞崩壊を誘導することを明らかにした。

## (2) 卵膜組織細胞の酸化ストレス応答

これまで、卵膜組織構成細胞である、chorion 細胞、amnion 細胞が、酸化ストレスに対する応答が異なり、chorion 細胞のみに細胞死誘導が認められることを明らかにしてきた。また、特異的抗酸化剤を用いた結果、iNOS と Cox が細胞死誘導に重要な役割を示していることを明らかにした。これらの結果は ROS 産生系が chorion 細胞に細胞死を誘導する可能性を示唆している。しかしながら、何故、amnion 細胞では細胞死誘導が起こらないかについては不明な点が多い。そこで、酸化ストレスによる細胞死誘導が、生体内における ROS 産生系と消去系のバランスによって起こると考え、glutathione peroxidase や catalase の阻害剤存在下における細胞死誘導について検討を行った。その結果、これらの酵素活性を阻害すると chorion 細胞に細胞死誘導が認められるが、amnion 細胞には認められないことを明らかにした。また、これらの酵素活性を阻害すると、hemeoxygenase-1(HO-1)遺伝子発現が amnion 細胞にのみ認められた。これらの結果から、卵膜組織構成細胞の酸化ストレス応答の相違は、両細胞における、ストレス応答に対する寛容性の差である可能性が示唆された。

これらの結果を踏まえて、iNOS 遺伝子を chorion 細胞に導入し、アポトーシスが誘導されるか検討した結果、遺伝子導入された chorion 細胞にのみ細胞死

が誘導されたことから、chorion 細胞では、iNOS 発現系が細胞死誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

### (3) 卵膜細胞中の幹細胞の同定

卵膜組織の amnion 細胞はほぼすべての細胞に分化する能力を有するエピプラストから発生することから、幹細胞の存在が指摘され始めているが、chorion 細胞に関する研究は少ない。そこでこれらの細胞より幹細胞の同定をおこない、酸化的ストレス、ウイルス感染などの外来刺激に対する応答性を幹細胞以外の細胞のそれと比較することを目的として、幹細胞から組織構成細胞への分化条件の検討、幹細胞に発現される種々の遺伝子のプロファイリングを行った。

最適な培養条件下 (HGF, FGF, オンコスタチン, DEX) で培養すると、amnion 細胞では Chorion 細胞と比較して、Sox-2 と Rex-1 遺伝子発現が高いことが明らかとなった。Sox-2 は ES 細胞分化誘導制御に関するいくつかの遺伝子発現を制御する遺伝子といわれており、Rex-1 は未分化細胞のマーカーとして用いられる。このことから、amnion 細胞は chorion 細胞に比べてより未分化な細胞である可能性を示唆するものである。また造血系および非造血系 (神経細胞など) 分化能またヒト結腸がん細胞亜集団に発現されている CD133 抗原が chorion 細胞に発現されていることは興味ある知見である。さらに、これらの細胞を肝細胞に分化させる条件を検討した結果、肝細胞のマーカーとして albumin,  $\alpha$ -fetoprotein などの発現が両細胞に認められたが、amnion 細胞における発現の度合いは chorion 細胞のそれに比して高かった。また、代謝活性に関連する酵素の遺伝子発現が認められてことから、卵膜細胞中にある幹細胞を組織細胞に分化誘導させる条件を明らかにした。また、Nanog など、幹細胞に特異的に発現する分子の、組織染色を行った結果、幹細胞の割合は amnion 細胞に多いことも明らかにした。

## 3. 研究評価及び今後の研究計画

ヒト卵膜組織という異なる二種類の細胞からなるユニークなヒト由来組織を用いる本プロジェクトは、出産における卵膜組織の役割という生理学的観点からの重要性のみならず、体外刺激応答-微生物感染・薬物投与-を分子レベルで解析できる系として有用と思われる。我々はすでに、卵膜組織培養系・組織構成細胞の単離法などを確立し、その系を用いて、インフルエンザ感染に対する両細胞の応答をアポトーシス誘導の観点から解析し、chorion 細胞のみに感染後アポトーシス誘導を認め、amnion 細胞には認められないことを初めて明らかにしてきた。また、ウイルス感染により chorion 細胞より単球分化誘導因子活性を有する分子が分泌されることを明らかにしたことは、母体・胎児の微生物感染防御を考える上で重要な知見と思われる。また CMV 感染により、ウイルス由来 mIL-10 遺伝子発現が上昇し、細胞由来の免疫制御に関与するサイトカイン (IL-10 および IL-6) の遺伝子発現を抑制している可能性を示唆する結果は重要な知見と思われる。

また、卵膜組織構成細胞が、外来刺激に対して異なった応答をする機構解析を、ウイルス感染系以外にも、酸化的ストレス系を用いて行い、遺伝子導入などを行った結果、iNOS 遺伝子が chorion 細胞における細胞死誘導に重要な役割を果たし、HO-1 遺伝子発現などによる、ストレス回避機構が amnion 細胞で働くことで amnion 細胞は、酸化的ストレスに対する寛容性が chorion 細胞に比して高いこと、

を明らかにした。また、卵膜組織中における幹細胞の性質を構成細胞ごとに明らかにし、また、組織構成細胞への分化誘導が可能になったことから、本年度の研究目標について新しい展開も含めて十分な成果を達成出来た。

以上の結果から、今後は、ウイルス感染によるアポトーシス誘導機構の詳細について、関与する分子の同定、その機能解析を RNAi、DNA マイクロアレイなどを用いて、探索すること、またそれらの遺伝子を amnion 細胞で強制発現させた場合アポトーシス誘導が可能か、また、ウイルス由来サイトカイン発現と細胞免疫抑制との相関性の検討、MDI 活性を有する分子の特性解析を進め、その分子の同定を今後の研究目標とする。これらの結果は、卵膜組織・細胞における細胞死誘導機構に関する詳細な知見を与えるのみならず、卵膜組織の体外刺激応答機構に関する知見を基に、生体の恒常性維持の異常による種々の疾患の発症機構解明に寄与できるものと思われる。

#### 4. 研究成果の発表

##### 原著論文

(1) Uchide N, Ohyama K, Bessho T, Toyoda H

Effects of mitogen-activated protein kinase inhibitors on tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression and apoptosis induction in cultured human fetal membrane chorion cells infected with influenza virus.

Intervirology, 50, 99-107, 2007

(2) Yuan B, Ohyama K, Bessho T, Uchide N, Toyoda H

Imbalance between ROS production and elimination results in apoptosis induction in primary smooth trophoblast cells prepared from human fetal membrane tissues.

Life Sciences, 82, 623-630, 2008

##### 総説・著書

(1) Uchide N, Toyoda H

Molecular Pathogenesis of Influenza Virus Infection: Apoptosis Induction and Macrophage Activation. In "Cellular Signaling and Apoptosis Research" (ed) Demasi AR, pp91-128, Nova Science Publishers, Inc, NY, 2007

(2) Uchide N, Toyoda H

Future Target Molecules for Influenza Treatment  
Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 8, 491-495 (2008)

(3) Uchide N, Toyoda H

Potential of Selected Antioxidants for Influenza Therapy  
Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry, 7 (ePub)

##### 国内学会発表

(1) 鈴木雅之、五来武郎、内手昇、豊田裕夫

Cytomegalovirus 感染による二種の正常二倍体胎児肺繊維芽細胞の応答  
ファーマ・バイオフォーラム 2007、2007年12月、大阪

(2) 鈴木雅之、五来武郎、内手昇、豊田裕夫

Cytomegalovirus 感染による二種の正常二倍体胎児肺繊維芽細胞の応答

日本薬学会 128 年会、2007 年 3 月、横浜

- (3) 竹田裕治、白井あゆみ、遠藤明香、別所俊夫、豊田裕夫  
ヒト卵膜由来細胞に対する幹細胞の表現型の検討  
第 7 回日本再生医療学会総会、2008 年 3 月、名古屋

# 生体膜透過機構に基づく新規感染症対策法の開発

林 正弘（薬物動態制御学教室・教授）

## 1. 当初の研究目標

薬物療法を考える場合、Pharmacokinetics(PK)-Pharmacodynamics(PD)理論は必要不可欠な理論である。PKはもちろん、その後の組織移行性をも含めると薬物トランスポーターの関与が薬効・副作用に大きく関わってくるということは近年の認識である。経口投与後の薬物吸収部位である腸管や、代謝を担う肝臓などに発現している ATP-binding cassette (ABC)トランスポーターは、生体内異物や薬物の解毒・排泄に関与し、これまでにヒトにおいては P-glycoprotein (P-gp/MDR1)・MRP・BCRP・BSEPなどが発見されている。これらは生体内の解毒排泄能の一端を担うと共に、薬物の組織細胞内移行をも阻害するため薬剤耐性獲得の原因ともなり得る。また、ABC トランスポーターは発現の程度における個人差に加え、病態時においても発現・機能が変動することが知られている。病態時におけるトランスポーターの発現変動は薬物の吸収動態・薬効・副作用の程度に影響を及ぼすと予想される。したがって、患者個々のトランスポーターの発現・機能を把握することは、薬物治療を成功させる上で重要な情報となり得る。そこで本研究では、薬物治療を行う上で、最小限の副作用で最大限の薬理効果を発揮させるための腸管吸収性と体内動態の非侵襲的予測法の確立を念頭におく。移植などの外科的手術を必要とされる場合には、免疫抑制剤の使用により感染症が惹起されることが危惧されている。その原因物質の一つと考えられているバクテリア由来の Lipopolysaccharide (LPS)は多臓器不全を介した敗血症から死へのカスケードインパクトである。この LPS の膜透過機構に基づいた体内動態制御による LPS の解毒排泄システムの開発を目的とすることが、本研究の最大の狙いである。

薬物および異物の体内動態の解明は、薬効および副作用の発現予測に重要な役割を果たしていることが認識されつつある。特にトランスポーターの発現および機能変動によって薬効および副作用の発現部位である組織移行性が変動するのであれば、病態時のトランスポーターの発現および機能変動を把握することは薬物治療効果を最大限に発揮し、副作用の回避を可能とする。各臓器におけるトランスポーター発現の知見を得るためには、現時点では直接体内から臓器を取り出す侵襲的手術が必要なため、トランスポーターの発現変動から疾患の治療・予防を臨床応用することは非実用的である。

本研究では、非侵襲的な方法による薬の体内動態、薬効・副作用の予測システムの開発を目指している。特に末梢血リンパ球に着目し、排泄型トランスポーターの遺伝子発現レベルとその調節機構を網羅的に解明し、遺伝子レベルから体内動態、薬効・副作用の予測評価を目指している。排泄型トランスポーターの網羅的遺伝子発現レベルの解析は、最小限の副作用で最大限の薬理効果を発揮できるシステム構築に繋がる。このような非侵襲的な方法は臨床現場において患者個人

の薬物体内動態を予測する際に大変有用である。

## 2. 研究成果の概要

感染症の原因物質としてあげられる LPS は、敗血症患者で確認されている細菌由来内毒素であり、敗血症を誘発し、多臓器不全から死へのシナリオが完成されている物質である。この LPS は腸管由来で体内に侵入することが知られているものの、その侵入ルートに関しては未だ解明されていない。そこで LPS のヒト腸管粘膜を介する透過機構の解明と、それに基づいた感染症予防・克服およびターゲット分子の探索を目的とした。

まず、ラット腸管における LPS の膜透過機構の解明に着手した。その結果、*in vitro* 膜透過実験を行い、LPS は結腸および回腸において温度・エネルギー依存的に細胞内に取り込まれ、その過程に一部 LPS の polysaccharide 部分の構造認識が関与していることを明らかにした。またこの現象は粘膜側、漿膜側いずれの方向からの取り込みにおいても見出された。一方、LPS の細胞内から管腔側への排泄方向の輸送に関しては、verapamil および probenecid の共存下でその輸送が顕著に阻害されたことから、この部分の膜透過過程には *mdr* および *mrp2* の関与が示された。つまり、LPS は高分子物質であるにも関わらず、LPS の構造認識に基づいた特殊な細胞内ルート(transcellular route)経由で透過することを明らかにすることができた。さらに興味深いことに、この過程には LPS のシグナル伝達に必須のレセプターとして注目されている Toll-like receptor 4(TLR4)および CD14 が関与することが明らかになった。また生体防御の面から考慮すると意外なことに、LPS の透過性は吸収方向優位であったが、LPS を腹腔内投与して作成した感染症病態モデルラットにおいては、吸収方向の透過性は低下し、逆に排泄方向の透過性が上昇した。つまり感染症時には生体の恒常性維持のため、異物の体内侵入を防御し、異物排泄能の亢進が誘発されると考えられる。これを確実にするために別途種々の検討を行ったところ、感染症病態時には、吸収に関与する粘膜側の TLR4 および CD14 の消失と、排泄に関与する *mdr-1* および *mrp2* の発現を明らかにするに至った。

このように LPS の特殊輸送機構の存在を明らかに出来たことは、結腸をターゲットとした LPS の解毒排泄システム、すなわち血中から管腔への排泄システム構築を目指す上で、大きな成果である。また、レセプターおよびトランスポーターの発現および局在が正常時と病態時では大きく異なることも判明した。今後、このメカニズムを制御することによって人為的に体内動態が制御可能と考えるに至った。

部位差を考察してみると、回腸での *mdr*、*mrp2*、TLR4、CD14 の発現レベルも LPS により影響を受けることが示されたが、結腸に比して複雑な部位であるため、詳細な膜透過機構の解明には至っていない。

トランスポーターおよびレセプター以外の膜透過性制御因子として細胞接着部分の Tight Junction(TJ)の機能について膜抵抗値から検討したところ、LPS による膜抵抗値の変化は見出されなかった。よって細胞間ルート(paracellular route)

の透過性は正常である可能性が考えられた。また **paracellular** マーカー物質の透過性から **TJ** 機能を評価したところ、膜抵抗値と同様、マーカー物質の膜透過性にも **LPS** の影響を受けないことが示された。

次に感染症の進行段階別（感染症初期および感染症進行期）による検討を行った。実験デザインは、ラットに**LPS**を単回および3日間腹腔内連続投与することで作成し、薬物の吸収部位（回腸）と解毒排泄部位（肝臓）での比較を行った。また、**LPS**による**P-gp**の変動に関与する生体因子の同定も試みた。その結果、感染症初期段階において、**P-gp/mdr-1**の発現にダウンレギュレーションが認められ、それに伴ったタンパクレベルの低下および**P-gp**機能レベルの低下も示された。これに対して感染症進行段階においては、**P-gp/mdr-1**発現のダウンレギュレーションには緩和が認められ、その緩和に対応して、タンパクレベルおよび**P-gp**機能レベルも回復を示した。一方、**IL-1 $\beta$** および**iNOS**は感染症初期段階において顕著に上昇したが、感染症進行段階においては初期段階に比較すると、その程度は低いものであった。一方、核内レセプターである**PXR**の発現レベルは、感染症初期段階には検出されなかったが、感染症進行段階においては顕著にその発現が認められた。以上のことより、**LPS**による回腸部の**P-gp/mdr-1**のダウンレギュレーションには**IL-1 $\beta$** と**iNOS**の発現が関与し、そのダウンレギュレーションの緩和には**PXR**の発現が強く関与することが明らかとなった。

これに対して、感染症初期段階の肝臓においても、**P-gp/mdr-1**のダウンレギュレーションが示されたが、感染症進行段階においては、回腸とは異なりその緩和は認められなかった。また、**IL-1 $\beta$** は感染症初期段階および進行段階において同レベルであり、また**PXR**の発現が両段階において認められなかった。

以上の結果より、**LPS**による肝臓の**P-gp/mdr-1**のダウンレギュレーションには**IL-1 $\beta$** の発現およびそのレベルの維持が強く関与していることが示された。一方、**P-gp**基質の静脈内投与後の体内動態（血中濃度推移、回腸管腔内への分泌クリアランスおよび胆汁排泄クリアランス）を検討したところ、正常ラット、感染症初期段階およびその進行段階における**P-gp**基質の腸管吸収および体内動態は、回腸および肝臓の**P-gp/mdr-1**レベルと高い相関が認められた。また、生検を用いた組織および臓器の遺伝子レベルから体内動態を予測可能であることが示された。

これらを踏まえ、ラット回腸、肝臓および末梢血リンパ球中 **ABC** トランスポーター**mRNA** 発現量を網羅的に解析した。その結果、感染症初期段階において、回腸および肝臓 **mdr1a**、**mrp2**、**bcrp** **mRNA** 発現量が低下し、感染症進行により、それらの **mRNA** 発現回復が見られた。また、回腸 **P-gp** 機能および肝臓 **P-gp** 機能、**mrp2** 機能は、感染症初期段階において低下し、感染症進行に伴い回復した。以上より、感染症病態時における **ABC** トランスポーターの発現および機能変動が、薬物療法時の副作用発現および薬剤耐性に影響を及ぼす可能性が示された。また、感染症初期段階において回腸および肝臓 **PXR** **mRNA** 発現量が低下し、感染症進行によりこれらの **PXR** **mRNA** 発現量は回復した。さらに、回腸および肝臓 **ABC** トランスポーター**mRNA** と **PXR** **mRNA** 発現変動との相関を検討したところ、**ABC** トランスポーターの発現変動に **PXR** が関与する可能性が示された。

感染症病態時の末梢血リンパ球に及ぼす影響および体内動態変動予測の可能性について検討したところ、感染症初期段階においては、末梢血リンパ球中 **mdr1a**、**mrp2**、**PXR mRNA** 発現量が上昇し、感染症進行により mRNA 発現上昇が抑制された。また、末梢血リンパ球中 **mdr1a** および **mrp2 mRNA** 発現制御因子として **PXR** の関与が示された。一方、末梢血リンパ球中 **bcrp mRNA** 発現量に変動は見られなかった。また、末梢血リンパ球中 **PXR mRNA** 発現変動と、回腸および肝臓 **ABC** トランスポーター mRNA 発現変動の相関を検討したところ、感染症初期段階において、末梢血リンパ球中 **PXR mRNA** 発現量より回腸 **ABC** トランスポーター mRNA 発現変動および肝臓 **mrp2 mRNA** 発現変動を予測できる可能性が示された。さらに末梢血リンパ球中 **PXR mRNA** 発現量から、感染症病態時における回腸・肝臓 **P-gp** および肝臓 **mrp2** 機能変動を予測できる可能性も示された。

### 3. 研究評価および今後の研究計画

結論としては、感染症病態の進行度に応じて、**ABC** トランスポーターの発現および機能が変動したことから、感染症時の薬物療法において、病態進行度別に薬物の体内動態変動を考慮する必要性が示された。また、感染症病態時において、末梢血リンパ球中における情報を基に、回腸および肝臓の機能変動を予測できることが示された。昨年度の研究成果は、他の疾患への応用が可能であり、患者個々に最適化されたテーラーメイド医療を行うにあたり、より有用な情報が得られると考えられ、ベストな成果として評価できる。

感染症は過去の病気との概念は現在では通用せず、新興感染症のみならず、再興感染症の脅威を身近に感じる時代に突入している。このような背景のもと、結腸は内毒素 **LPS** の解毒・排泄部位となり得るのか？を命題に本研究はスタートした。その結果、敗血症の原因物質である腸管由来の内毒素 **LPS** の結腸粘膜透過機構は **LPS** の構造認識を介した **Transcellular route** 経由していること、この透過過程には **LPS** のシグナル伝達に必須の **TLR4** および **CD14** が関与していること、感染症時には生体の恒常性を維持のため、異物排泄能が亢進すること、それには特に排泄型トランスポーターの **mdr-1** および **mrp2** の発現が関与していることが解明出来た。また、感染症の進行段階別のトランスポーターの発現および制御因子の同定も一部解明できた。

以上、感染症時における **mrp2** および **P-gp** の発現変動、機能変動およびその調節機構を明らかに、**LPS** の体内動態を積極的に変化させることで感染症の克服を図るという、生体膜透過機構に基づいた新規解毒排泄システムの開発を念頭においた場合、昨年度の成果は生体膜透過機構に基づいた新規感染症に対する新規な対策法に繋がると考えられる。

昨年度の研究計画では、**mrp2**、**P-gp** および **TJ** の発現・調節に関与する生体内因子のさらなる同定を試みることであった。同時に **TNF- $\alpha$** 、**IL-4**、**IL-10**、**iNOS**、**COX II**、**Heat shock protein(HSP)**に着目し、発現・機能変動を部位差も含めて検討予定であった。さらには **Th1** および **Th2** のバランスがトランスポーター、**TJ** へ関与する寄与および解毒排泄能との関わりを明らかにすることも検討予定であ

ったが、未検討部分として残っており、それらについては20年度の課題とした  
い。したがって、20年度は未検討部分も含め、①ABC トランスポーターの発現  
レベルおよび機能レベルについて、その腸管部位差を明らかにする。また肝臓に  
おける ABC トランスポーターの mRNA レベル、タンパク発現レベルを検討し、  
腸管との相違を明らかにする。②肝臓 ABC トランスポーターの発現・調節に関与  
する生体内因子の同定を試みる。すなわち、各種サイトカイン、熱ショックタン  
パクなど網羅的に解析する。③ABC トランスポーターの基質の体内動態を検討し、  
mRNA レベルおよびタンパクレベルとの対応を評価する。これらについては、タ  
ンパクレベルの検討を詳細に遂行し、一定の結論を出したいと考えている。

#### 4. 研究成果の発表

##### 総説

(1) Hayashi M., Tomita, M.

Mechanistic Analysis for Drug Permeation through Intestinal Membrane.  
Drug Metab. Pharmacokinet., 22(2): 67-77 (2007).

##### 国際学会発表

(1) Nakaike, M., Tomita, M., Hayashi, M.

Prediction of intestinal absorption and disposition by non-invasive method  
using peripheral blood lymphocyte.

4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery, 2007/6,  
Kanazawa, Japan

##### 国内学会発表

(1) 中池万里子、富田幹雄、林 正弘

腸管吸収性および体内動態を予測する非侵襲的システムの開発  
日本薬剤学会第22年会、2007年5月、東京

(2) 中池万里子、富田幹雄、林 正弘

Prediction of intestinal drug absorption and hepatic disposition by  
non-invasive method using peripheral blood lymphocyte.

第22回日本薬物動態学会、2007年10月、仙台

(3) 中池万里子、富田幹雄、畑中 恵、林 正弘

末梢血リンパ球を用いた感染症病態時における薬物体内動態予測の可能性.  
日本薬学会第128年会、2008年3月、横浜

## 難治性疾患と微生物の関連性

笹津 備規（病原微生物学教室・教授）

### 1. 当初の研究目標

人の消化器官に存在する種々の細菌は時としてさまざまな消化器関連疾患の原因となる。代表的なものに、人の胃に生息する *Helicobacter pylori* があげられる。

*H. pylori* はらせん状のグラム陰性桿菌であり、消化性潰瘍や慢性胃炎の原因となる病原性細菌である。日本では消化性潰瘍患者に対し2000年11月より *H. pylori* の除菌治療が保険適応となっている。また、近年では胃がんとの密接な関連も指摘されており、早期胃癌のEMR(内視鏡的粘膜切除術)後には積極的な *H. pylori* の除菌治療が推奨されている。

*H. pylori* の除菌には、マクロライド系抗菌薬のクラリスロマイシン (CAM),  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬のアモキシシリン (AMPC) にプロトンポンプ阻害剤を組み合わせた3剤除菌療法が用いられる。2000年に3剤除菌治療が保険適応となった当初は3剤除菌療法により90%以上の除菌率が得られていたが、現在の除菌率は70-80%であり、除菌不成功例が増加している。このような除菌不成功の主な原因は薬剤耐性である。特に日本ではCAM耐性 *H. pylori* が急速に増加しており、除菌不成功の主な原因となっている。CAM耐性 *H. pylori* によって除菌が不成功であった場合、再びCAMを用いた除菌療法を施行してもその除菌率は30%程度であることが知られている。CAM耐性 *H. pylori* 感染患者においては、CAMの代わりにメトロニダゾール (MTZ) を用いる除菌療法が非常に有用であることが明らかになっている。

CAMはマクロライド系抗菌薬であり、リボソームの50Sサブユニットを構成する23S rRNAに結合しタンパク質合成を阻害することにより抗菌作用を示す。*H. pylori* においては標的部位である23S rRNAの2142位もしくは2143位のアデニンの変異によりCAM耐性を示すことが報告されている。しかし一方、近年では2142位や2143位の以外の部位の変異が耐性に関与する可能性が報告されている。*H. pylori* は遺伝的多様性をもつため、日本で分離された菌株とヨーロッパやアメリカで分離された菌株では遺伝的背景が大きく異なる。しかし、日本の菌株においてのこれらの新規の変異がCAM耐性に寄与しているかどうかは明らかではない。そこで本研究では日本の分離株を用いて、23S rRNAの変異とCAM耐性との関連を調査した。

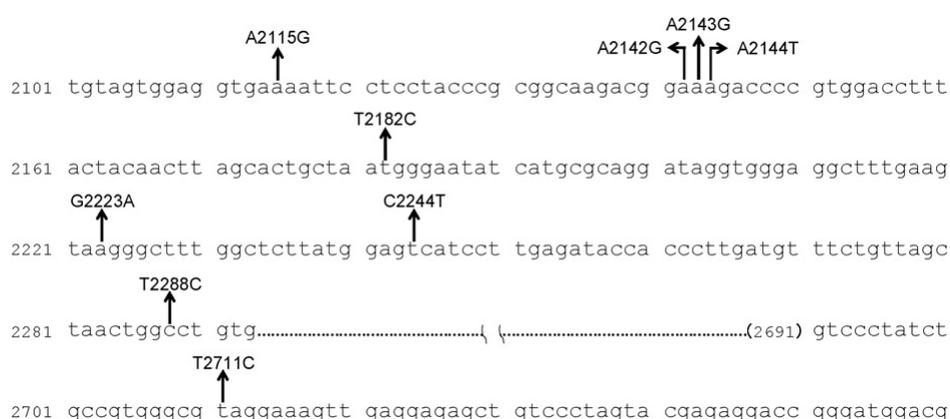
一方、AMPCはCAMと同じく3剤除菌療法に用いられる $\beta$ -ラクタム系の抗菌薬であるが、AMPC耐性 *H. pylori* は非常に少なくその分離頻度は1%以下である。従ってこれまで、*H. pylori*におけるAMPC耐性機構に関する報告は少ない。AMPCなどの $\beta$ -ラクタム系抗菌薬は細胞壁合成酵素であるPenicillin Binding Proteins (PBPs) に結合することにより細胞壁合成を阻害し抗菌作用を発揮する。*H. pylori* ではPBP変異がAMPC耐性に寄与している可能性が報告されているが、変異部位などは明らかとなっていない。そこで本研究では日本で分離されたAMPC耐性株を用いてPBP変異とAMPC耐性との関連を検討した。

## 2. 研究成果の概要

### (1) 日本の臨床分離 *H. pylori* 株におけるクラリスロマイシン耐性と 23S rRNA 変異の関連

菌株は日本で分離された *H. pylori* 株 81 株と *H. pylori* 標準株である UA802 株, ATCC700392 株, および ATCC700924 株を用いた. まず, 用いた 84 株の CAM 感受性を測定した結果, 臨床分離株 67 株は CAM 耐性株であり, 残りの臨床分離株 14 株と 3 つの標準株は全て CAM 感受性株であった. 67 株の CAM 耐性株のうち, 19 株 (28.4 株) は CAM の最小発育阻止濃度 (MIC) が 32 mg/L 以上を示す CAM 高度耐性株であった. 次に CAM 耐性と 23S rRNA 遺伝子の変異との関連を解析した. 対象とした変異部位は過去に報告されている 2115, 2142, 2143, 2144, 2182, 2223, 2244, 2288, 2711 の計 9 か所とした. 対象とした変異を Fig. 1 に, 本研究で明らかとなった変異の分布を Table 1 に示した.

2142 位の アデニンからグアニンへの変異 (A2142G) と 2143 位の アデニンからグアニンへの変異 (A2143G) はこれまでに CAM 耐性との関連が明らかになっている変異であるが,



**Fig. 1** Positions in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* analysed in this study. The positions correspond to the 23S rRNA gene of *H. pylori* strain UA802.

本研究においても A2142G は CAM 耐性株 5 株に, A2143G は CAM 耐性株 63 株に認められた. CAM 感受性株のなかにはこれらの変異を持つ株はいなかった. TH3636 株は A2142G および A2143G を両方もっており, CAM 高度耐性 (CAM の MIC ; 256 mg/L) を示した. A2142G 変異をもつ CAM 耐性株 5 株のうち, 4 株は CAM 高度耐性株であったが, 残りの 1 株は CAM の MIC が 4 mg/L であった. 2182 位の チミンからシトシンへの変異 (T2182C) は用いた 84 株のうち 70 株 (83.3%) において認められる変異であった. T2182C 変異と CAM 感受性との間に関連性は認められなかった. また, T2182C 変異と CAM 耐性レベルの間にも関連性は認められなかった. 2223 位の グアニンからアデニンへの変異 (G2223A) は対象とした菌株の 97.6% に, 2288 位の チミンからシトシンへの変異 (T2288C) は対象菌株の 95.7% に認められる変異であった. 2244 位の シトシンからチミンへの変異 (C2244T) は 2 つの CAM 耐性株に認められたが, CAM 感受性株である UA802 株においても認められる変異であった. 2115 位の アデニンからグアニンへの変異, 2144 位の アデニンからチミンへの変異, 2711 位の チミンからシトシンへの変異は対象とした菌株のいずれにも認められなかった.

**Table 1 Mutations in the 23S rRNA gene and clarithromycin susceptibilities in *Helicobacter pylori***

	MIC range ( $\mu$ g/mL)	No. of strains	No. (%) of strains with the following mutations in the 23S rRNA gene:								
			A2115G	A2142G	A2143G	A2144T	T2182C	G2223A	C2244T	T2288C	T2711C
Total	<0.008 to >128	84	0	5 (6.0)	63 (75.0)	0	70 (83.3)	82 (97.6)	3 (3.6)	45 (95.7) <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
CAM-susceptible strains	<0.008–0.063	17	0	0	0	0	13 (76.5)	16 (94.1)	1 (5.9)	11 (100.0)	0
CAM-resistant strains	2 to >128	67	0	5 (7.5)	63 (94.0)	0	58 (86.6)	66 (98.5)	2 (3.0)	34 (94.4)	0
CAM highly resistant strains	32 to >128	19	0	4 (21.1)	16 (84.2)	0	16 (84.2)	19 (100.0)	0	19 (100.0)	0

**(2) *H. pylori* におけるPenicillin Binding Protein 1変異とアモキシシリン耐性との関連**

菌株は1995年から2002年までに東京医科大学病院を受診した患者より臨床分離した15株, および*H. pylori* の標準株である ATCC43504 株, ATCC43629 株, ATCC700392株, ATCC700824株を用いた。まず,  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬であるAMPC, ペニシリン, セフトジジム, イミペネムの薬剤感受性を寒天平板希釈法により測定した。これらの菌株のMICをTable 2に示した。用いた19株のうち, 3株はAMPC耐性株であった (TH743株; 8 mg/L, TH517; 2 mg/L, TS1289; 0.5 mg/L)。また, 3株 (TS281, TS1112, TS287) はAMPC低感受性株であった (MIC: 0.063-0.125  $\mu$ g/ml)。残りの13株はAMPC感受性株 (<0.031 mg/L)であった。

**Table 2. MICs for *H. pylori* isolates used in this study**

Strain	MIC (mg/L)			
	Amoxicillin	Penicillin G	Ceftazidime	Imipenem
TH743	8	16	64	0.031
TH517	2	1	8	0.016
TS1289	0.5	0.5	8	$\leq$ 0.008
TS281	0.125	0.125	4	$\leq$ 0.008
TS1112	0.125	0.063	2	$\leq$ 0.008
TS287	0.063	-	-	-
TS603	0.031	0.063	2	$\leq$ 0.008
TH507	$\leq$ 0.008	$\leq$ 0.008	0.25	$\leq$ 0.008
TH564	$\leq$ 0.008	$\leq$ 0.008	0.25	$\leq$ 0.008
TH636	$\leq$ 0.008	$\leq$ 0.008	0.25	$\leq$ 0.008
TH951	$\leq$ 0.008	$\leq$ 0.008	0.5	$\leq$ 0.008
TS116	0.031	0.063	1	$\leq$ 0.008
TS523	$\leq$ 0.008	$\leq$ 0.008	0.5	$\leq$ 0.008
TS594	0.016	0.031	2	$\leq$ 0.008
TS648	$\leq$ 0.008	$\leq$ 0.008	1	$\leq$ 0.008
ATCC43504	0.016	0.031	1	$\leq$ 0.008
ATCC43629	$\leq$ 0.008	$\leq$ 0.008	0.25	$\leq$ 0.008
ATCC700392	$\leq$ 0.008	$\leq$ 0.008	1	$\leq$ 0.008
ATCC700824	$\leq$ 0.008	$\leq$ 0.008	0.25	$\leq$ 0.008

つぎにこれまでにAMPC耐性との関連が報告されているPBP1変異について着目した。*H. pylori* は遺伝的多様性があるため, AMPC感受性株同士でもPBP1配列が異なる部位が存在する。そこで, AMPC耐性に関与しない変異を調査するためにAMPC感受性株13株のPBP1配列を調査し, AMPC耐性株3株およびAMPC低感受性株3株のPBP1配列と比較することによりAMPC耐性に関与する変異を同定した。PBP1アミノ酸配列はPBP1をコードする*pbp1*遺伝子をPCRにより増幅し, DNAシーケンスにより得られた塩基配列から予測した。但し, ATCC700392株およびATCC700824株のPBP1配列は日本DNAデータバンクより得た。

得られたPBP1配列を比較した結果, PBP1を構成する全659アミノ酸のうちアミノ酸配列が完全に一致したのは590アミノ酸(89.5%)であり, 残りの69アミノ酸(10.5%)には菌株による多様性が認められた。

AMPC耐性株およびAMPC低感受性株に特異的な変異部位は9か所認められた (Table 3)。これらの変異部位は全てAMPCとPBPとの結合領域であるトランスペプ

**Table 3 Substitutions in PBP1 of amoxicillin-resistant *H. pylori* strains.**

Strain	AMPC MIC (mg/L)	Amino acid position of PBP1											
		320	366	369	374	414	423	556	558	562	593	595	595+
TH743	8	.	.	Thr	Leu	Arg	Phe	.	Ser	Tyr	Ala	Ser	-
TH517	2	.	.	.	Leu	.	Phe	.	.	Tyr	Gly	Ser	-
TS1289	0.5	Val	Leu	.	.	Arg	.	Ser	.	Tyr	.	Ser	-
TS281	0.125	.	.	Thr	.	.	.	.	.	.	.	.	Ala
TS1112	0.125	.	.	Thr	.	Arg	.	.	.	.	.	.	Ser
TS287	0.063	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Ala
AMPC-susceptible strains	≤0.031	Ala	Phe	Ala	Val	Ser	Leu	Thr/Ser <sup>1</sup>	Thr/Ser <sup>2</sup>	Asn	Thr	Gly/Ser <sup>3</sup>	-/Gly <sup>4</sup>

チダーゼ領域内に存在していた。AMPC耐性株であるTH743, TH517, TS1289株にはそれぞれ6か所, 4か所, 4か所の変異が認められた。これらの変異のうち, 562位のアスパラギンからチロシンへの変異 (Asn562→Tyr) は全てのAMPC耐性株に認められる変異であった。Asn562→Tyr変異はAMPC低感受性株には認められなかった。一方595位のグリシンからセリンへの変異もすべてのAMPC耐性株に認められたが, この変異はAMPC感受性株であるTS523株においても認められる変異であった。また, 556位のスレオニンからセリンへの変異および558位のスレオニンからセリンへの変異もAMPC耐性株だけでなくAMPC感受性株にも認められた変異であった。369位, 374位, 414位, 423位, 593位の変異は少なくとも2つのAMPC耐性株もしくはAMPC低感受性株に認められた変異であった。

そこで, これらの変異とAMPC耐性との関連を明らかにするためにAMPC耐性株であるTH743株およびTH517株のpbp1遺伝子を用い, ナチュラルトランスフォーメーション法によりAMPC感受性株であるATCC43504株を形質転換した。その結果, AMPC耐性形質転換株が高頻度で得られた ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$  / $\mu$ g DNA)。AMPC感受性株であるTS116株のpbp1遺伝子を用いた場合には形質転換株は得られなかった。無作為に抽出した形質転換株6株のAMPCのMICを測定した結果, 形質転換株のMICは0.25 - 1 mg/Lであり, 宿主株に比べて少なくとも16倍AMPC耐性レベルが上昇していた。これらの形質転換株のPBP1配列を決定した結果, AMPC耐性株に存在した6か所の変異のうち, 4か所の変異が導入されていた。これらの変異の中には解析したすべての形質転換株に導入されていない変異も存在したが, Asn562→Tyr 変異はすべての形質転換株に共通

**Table 4 Susceptibilities and substitutions in PBP1 of amoxicillin-resistant transformants**

Strain (Donor DNA)	AMPC MIC (mg/L)	Amino acid position of PBP1						
		369	374	414	423	562	593	
Recipient ATCC43504	0.016	Ala	Val	Ser	Leu	Asn	Thr	
Donor								
TH517	2	Ala	Leu	Ser	Phe	Tyr	Gly	
TH743	8	Thr	Leu	Arg	Phe	Tyr	Ala	
Transformants (Donor DNA)								
ATCC43504 (TH517 <i>pbp1</i> )	0.25	Ala	Leu	Ser	Phe	Tyr	Gly	
ATCC43504 (TH517 <i>pbp1</i> )	0.25	Ala	Leu	Ser	Phe	Tyr	Gly	
ATCC43504 (TH517 <i>pbp1</i> )	0.25	Ala	Val	Ser	Leu	Tyr	Gly	
ATCC43504 (TH743 <i>pbp1</i> )	1	Ala	Val	Arg	Phe	Tyr	Ala	
ATCC43504 (TH743 <i>pbp1</i> )	0.25	Thr	Leu	Arg	Phe	Tyr	Thr	
ATCC43504 (TH743 <i>pbp1</i> )	1	Thr	Leu	Arg	Phe	Tyr	Ala	

して導入されていた。

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

本研究では、*H. pylori* の23S rRNA変異とCAM耐性による関連を調査し、日本の*H. pylori* 株におけるCAM耐性は2142位もしくは2143位の変異によるものであり、他の部位の変異はCAM耐性に寄与している可能性が低いことを明らかとした。従ってCAM耐性*H. pylori* は23S rRNAの2142位もしくは2143位の変異を調べることにより検出することができることが明らかとなった。

日本におけるCAM耐性*H. pylori* の増加は深刻な状況であり、確実に除菌を行うには事前にCAM耐性を調べてから除菌治療を選択することが推奨されている。*H. pylori* の感染診断には、呼気や糞便などの非侵襲的に採取することのできるサンプルを用いた検査方法が一般的となっている。しかし一方、*H. pylori* のCAM感受性を測定するためには、内視鏡検査により得た胃の生検組織から培養した菌株を用いなくてはならない。そこで本研究から得られた結果を利用すれば、菌を培養することなくDNAを調べるだけでCAM耐性の有無を予測することができる。我々はこれまでに、糞便からDNAを抽出し、23SrRNA遺伝子を増幅し解析することによりCAM耐性*H. pylori* を非侵襲的に検出することのできる方法を開発してきた。本研究結果はこのような非侵襲的CAM耐性*H. pylori* 検出法の信頼性を高めるものであり、糞便からのCAM耐性*H. pylori*検出が臨床的にも有用に用いることのできる方法であることを示唆すると考えられた。

一方、本研究で対象としたCAM耐性株の耐性レベルは2から128 mg/Lと広範囲であったが、既知の23S rRNA変異とCAM耐性レベルとの間に関連性がないことを明らかとした。これまで23SrRNA変異以外の機構のCAM耐性への関与は報告されていないことから、*H. pylori* のCAM高度耐性には新規の耐性機構が関与している可能性が考えられた。また、本研究で調査対象とした変異部位である2711位はCAM低度耐性に寄与する変異として報告されている。しかし本研究で対象とした菌株にはCAM低度耐性株はなく、また2711位の変異を持つ株も認められなかった。従って、今後はCAM高度耐性株および低度耐性株を対象とし、新規のCAM耐性機構について調査することにより、CAM耐性レベルの違いが明らかになると考えられた。

さらに、本研究では日本の臨床分離AMPC耐性株を用いた検討により、AMPC耐性にはPBP1の562位の変異が関与している可能性を明らかにした。また、本研究で明らかとした562位の変異は過去に報告されているAMPC耐性株においても認められる共通の変異であった。これまでのAMPC耐性に関連するPBP1変異部位について統一した見解は得られていなかったが、本研究によりPBP1の562位の変異が大きく関与している可能性が考えられた。しかし、本研究で用いたAMPC耐性株は562位を含む複数のPBP1変異を持っており、変異の数が多いほど耐性レベルが上昇する傾向が認められた。従って、*H. pylori*はPBP1の562位を含む複数の変異によりAMPC高度耐性化する可能性が考えられた。

一方本研究で得られた臨床分離AMPC耐性株の*pbp1*遺伝子を用いたAMPC感受性株の形質転換株のAMPC耐性レベルは元の臨床分離AMPC耐性株に比較し低かった。*H. pylori* には高分子量PBPとしてPBP1以外にPBP2とPBP3が存在し、これらのPBPもAMPCとの結合能を持つことが明らかとなっている。しかしこれまでこれらのPBPと

AMPC耐性との関連について検討した報告はない。従って今後は、これらのPBPs変異についてもPBP1変異と合わせてAMPC耐性との関連を解析することにより、詳細なAMPC耐性機構の解明につながると考えられた。

#### 4. 研究成果の発表

##### 原著論文

- (1) Rimbara E, Noguchi N, Kijima H, Yamaguchi T, Kawai T, Sasatsu M.  
Mutations in the 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from Japan.  
*Int J Antimicrob Agents.*, Sep;30(3):250-4 (2007).
- (2) Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M.  
Correlation between substitutions in penicillin-binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*.  
*Microbiol Immunol.*, 51(10):939-44 (2007).
- (3) Noguchi N, Rimbara E, Kato A, Tanaka A, Tokunaga K, Kawai T, Takahashi S, Sasatsu M.  
Detection of mixed clarithromycin-resistant and -susceptible *Helicobacter pylori* using nested PCR and direct sequencing of DNA extracted from faeces.  
*J Med Microbiol.*, Sep;56(Pt 9):1174-80 (2007).
- (4) Kawai T, Kawakami K, Mikinori K, Takei K, Itoi T, Moriyasu F, Takagi Y, Aoki T, Watanebe K, Matsumoto Y, Rimbara E, Noguchi N, Sasatsu M.  
Efficacy of low-dose proton pump inhibitor (PPI) in the eradication of *Helicobacter pylori* following combination PPI/AC therapy in Japan.  
*Hepatogastroenterology.*, Mar;54(74), 649-54 (2007).

##### 総説・著書等

- (1) 笹津 備規, 野口 雅久 他  
第5版 薬科微生物学  
丸善株式会社, (2007).

##### 国内学会発表

- (1) 工藤 一郎, 入江 徹美, 宮崎 智, 山元 弘, 中村 明弘, 市川 厚, 伊藤 喬, 伊藤 智夫, 増野 匡彦, 原 博, 笹津 備規  
薬学共用試験 CBT 第1回トライアル報告  
第39回日本医学教育学会学会, 2007年7月, 盛岡
- (2) 林原 絵美子, 田沼 道也, 河合 隆, 野口 雅久, 笹津 備規  
糞便を用いた *Helicobacter pylori* のテーラーメイド除菌療法  
第19回微生物シンポジウム, 2007年9月, 東京
- (3) 若林 萌, 成井 浩二, 野口 雅久, 笹津 備規  
トリプトファン代謝物による微生物の増殖抑制効果

- 第 53 回日本化学療法学会東日本支部総会，2007 年 10 月，東京
- (4) 成井 浩二，野口 雅久，笹津 備規  
環境分離緑膿菌の薬剤感受性  
第 81 回日本細菌学会総会，2008 年 3 月，京都
- (5) 林原 絵美子，河合 隆，野口 雅久，笹津 備規  
*H. pylori* における PBP1, 2, 3 変異とアモキシシリン耐性との関連  
第 81 回日本細菌学会総会，2008 年 3 月，京都
- (6) 石田 なつみ，野口 雅久，中南 秀将，笹津 備規  
尋常性座瘡患者より分離した *Propionibacterium acnes* の薬剤感受性  
日本薬学会第 128 年会，2008 年 3 月，横浜
- (7) 田沼 道也，林原 絵美子，野口 雅久，笹津 備規  
タイ小児の *Helicobacter pylori* 感染率と薬剤感受性の検討  
日本薬学会第 128 年会，2008 年 3 月，横浜

# 難治性疾患における薬物耐性発現機序とそれを標的とした薬物療法の基盤構築

平野 俊彦（臨床薬理学教室・准教授）

## 1. 当初の研究目標

免疫関連疾患や悪性腫瘍などの難治性疾患において、治療薬に対する耐性の発現は治療を困難にする大きな要因の一つである。患者の薬物耐性発現の有無を知る手段として、患者由来細胞の *in vitro* における薬物応答性を捉える方法が有用と考えられている。即ち、免疫細胞や癌細胞が、*in vitro* において免疫抑制薬や抗悪性腫瘍薬の増殖抑制作用に抵抗性を示す場合、患者はこれらの薬物の治療効果に対しても抵抗性を示すというものである。本研究では、こういった薬物耐性の発現機序を分子生物学的手法により解明し、ひいては個々の患者の薬物耐性関連分子を標的としたテーラーメイド療法を行うための基盤を構築することを目的とした。

副腎皮質ステロイド（GC）や免疫抑制薬は、自己免疫疾患、アレルギー疾患、臓器移植等の治療に繁用される。しかしこれらの薬物に対する応答性が低く、十分な治療効果のないまま重篤な副作用発現に至る症例も少なくない。われわれはこれまで、患者末梢血単核細胞（PBMC）の *in vitro* における免疫抑制薬感受性が薬物の治療効果と関連することを報告してきた。この感受性データを基に薬物選択や投与量設定を行うことで、個々の患者に最適のテーラーメイド療法を行うことが可能と考えられる。しかし一方で、免疫抑制薬応答性の個人差の原因には不明な点が多く、GC耐性機構について気管支喘息や潰瘍性大腸炎などで幾つかの報告があるものの、多くの薬物耐性患者では耐性機序を前提とした理論的代替療法を行えないのが現状である。そこでまず、自己免疫疾患患者を対象とし、末梢血単核細胞の免疫抑制薬感受性を *in vitro* で検討し、そこで求められた薬物感受性と薬物の治療効果との関連を検討した。また薬物耐性の原因の一つと考えられる、溶連菌感染によってもたらされるスーパー抗原への暴露と、薬物の治療効果との関連を、健常者のPBMCを用いて検討した。一方、PBMC細胞膜上にはP糖タンパク質が存在し、免疫抑制薬など脂溶性の高い薬物の細胞外排出に係わっていることが示唆されている。これらのことから、P糖タンパク質の発現状況や機能が、PBMCの薬物耐性に係わっている可能性がある。そこで、*in vitro* におけるPBMCの薬物感受性や患者の免疫抑制薬治療応答性とP糖タンパク質機能との関連を、SLEや重症筋無力症患者を対象に検討した。

次に、抗悪性腫瘍薬に対する多剤耐性の原因として、P糖タンパク質の高発現が重要視されている。本研究では、P糖タンパク質を高発現するTリンパ芽球性白血病細胞株を用い、本細胞の増殖に対して抑制効果を示す天然化合物の探索とその作用機序について検討することを目的とした。

## 2. 研究成果の概要

### (1) SLE 患者の GC 療法応答性と末梢血単核細胞の P 糖タンパク質機能との関連

SLE 患者より分離した PBMC 中の CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、および CD8<sup>+</sup>細胞における P 糖タンパク質機能を、蛍光標識したモノクローナル抗体による細胞染色、細胞への R123 取り込みと排出、およびフローサイトメトリー法を組み合わせで検討した。GC 療法

に抵抗性を示す患者の PBMC 中の CD4+細胞は、治療に応答性が良好な患者の CD4+細胞に比べ、P 糖タンパク質機能が有意に亢進していた ( $p=0.0432$ )。CD4+細胞にはヘルパーT細胞が多く含まれることから、SLEにおいてヘルパーT細胞のP糖タンパク質機能が亢進すると、GCの効果が減弱され、患者はGCの治療効果に抵抗性を示す可能性が考えられた。

(2) 重症筋無力症患者における免疫抑制薬物療法と末梢血単核細胞のP糖タンパク質機能との関連

重症筋無力症患者から分離した PBMC 中の CD3+、CD4+、および CD8+細胞におけるP糖タンパク質機能を、(1)と同様の方法により検討した。治療に用いたGCの総投与量とPBMC中のCD3+あるいはCD4+細胞におけるP糖タンパク質機能とは、各々有意な正の相関を示した (共に  $p<0.05$ )。一方GC非投与患者に比べGC投与患者では、CD8+細胞におけるP糖タンパク質機能が有意に高かった ( $p<0.05$ )。

以上のことから、重症筋無力症患者に長期間GC療法を施すことにより、末梢血中のT細胞のP糖タンパク質機能が亢進することを示唆した。その結果GCの効果が減弱され、患者はGCの治療効果に抵抗性を示す可能性が考えられた。

(3) スーパー抗原で刺激したヒト末梢血単核細胞に対するビタミンD<sub>3</sub>誘導体の効果

乾癬治療におけるGC外用薬の効果には、個人差がみられる。また溶連菌感染が、乾癬発症やステロイドの治療効果に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、コンカナバリンA (con A) や溶連菌由来スーパー抗原SPEAで刺激したPBMCの増殖に及ぼすGCや活性型ビタミンD (VD) の効果を比較検討した。健常者17名の静脈血よりPBMCを分離し培地にけん濁後、con AまたはSPEAを加え、更にオキサロール (Oxa)、タカルシトール(Tac)、または酪酸プロピオン酸ベタメサゾン (BBP) を添加して80時間培養した。トリチウムチミジン存在下に更に16時間培養し、細胞に取り込まれた放射能を測定して、PBMC増殖を50%抑制する薬物濃度 (IC<sub>50</sub> ng/ml) を求めた。con A刺激したPBMCの増殖に対する、Oxa、Tac、およびBBPのIC<sub>50</sub>の中間値 (範囲) は、各々17 (0.007-5000)、1514 (2-3997)、および0.07 (0.001-223) ng/mlであった。一方SPEA刺激したPBMCに対する各薬物のIC<sub>50</sub>の中間値 (範囲) は各々2 (0.05-3349)、90 (1-322)、および292 (0.001-1172) ng/mlであった。con A刺激PBMCとSPEA刺激PBMC間でOxaやTacのIC<sub>50</sub>値に有意差はないが、BBPの場合はSPEA刺激PBMCの方が有意にIC<sub>50</sub>値が高く ( $p=0.0245$ )、感受性が低下していた。しかしSPEA刺激PBMCに対するBBPの効果は、Oxaを併用することにより改善した。SPEA刺激PBMCに対するBBPの抑制効果は激減するが、逆にVD<sub>3</sub>の効果は強く現れた。以上の結果から、溶連菌感染が疑われる乾癬症例では、GCの効果が減弱した場合VDの併用が有用と思われた。

(4) P糖タンパク質を高発現するヒト白血病細胞株に対する各種天然化合物および免疫抑制薬の効果

われわれの研究室にて樹立したP糖タンパク質を高発現するTリンパ芽球性白血病

細胞株MOLT4/DNR株細胞を用い、本細胞の増殖に対して抑制効果を示す天然化合物の探索とその作用機序について検討した。検討した化合物としては、各種フラボノイド、カルコン、ピラジン類やタクロリムス、シクロスポリンなど全40種であった。これらの化合物は、これまでの当研究グループの結果から抗白血病作用が期待できるものや、文献調査などからP糖タンパク質抑制効果が期待できるものなどであった。細胞増殖率は、細胞への $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み量によって検討した。さらに、MOLT4/DNR株細胞に対する各種化合物のアポトーシス誘導作用、および細胞のP糖タンパク質機能や細胞周期に及ぼす影響を、蛍光標識したモノクローナル抗体による細胞染色、細胞へのR123取り込みと排出、およびフローサイトメトリー法を組み合わせ検討した。

検討した化合物のうちフラボノイドのタンゲレチン、ノビレチン、バイカレイン、オーゴニンなどに、強いMOLT4/DNR株細胞増殖抑制効果を認めた ( $\text{IC}_{50}=1\sim 10\mu\text{M}$ )。タンゲレチンとノビレチンはMOLT4/DNR株細胞のP糖タンパク質機能を有意に抑制し、細胞のダウノルビシン感受性を回復させた ( $p<0.05$ )。またこれらのフラボノイドは、MOLT4/DNR株細胞に対しアポトーシスを誘導しないものの、細胞周期に有意な影響を及ぼし ( $p<0.05$ )、細胞をG<sub>1</sub>期で静止させることを示唆した。このようなフラボノイドの作用が、MOLT4/DNR株細胞に対する増殖抑制効果と関連するものと推察された。

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

本研究では先ず、免疫抑制薬の治療効果に対する抵抗性を発現する原因の一つとしてPBMC中のT細胞におけるP糖タンパク質機能に着目し、SLE患者や重症筋無力症患者を対象とした検討を行った。その結果、SLEにおいては、末梢血中のヘルパーT細胞のP糖タンパク質機能が亢進すると、GCの効果が減弱され、患者はGCの治療効果に抵抗性を示す可能性が考えられた。また重症筋無力症では、患者に長期間GC療法を施すことにより、末梢血中のT細胞のP糖タンパク質機能が亢進し、GCの効果が減弱されて患者はGCの治療効果に抵抗性を示す可能性が考えられた。以上のことから、T細胞のP糖タンパク質機能を検討することにより、GC療法に抵抗性を示す患者を選別したり、P糖タンパク質機能を制御する新たな治療法を開発できる可能性が生じた。これらの知見をふまえ、今後は末梢血中のT細胞のP糖タンパク質機能と薬物の治療効果との関連、および制御性T細胞が薬物治療応答性に果たす役割について検討していきたい。

次に、ビタミンD<sub>3</sub>誘導体がスーパー抗原刺激したPBMCの増殖を効果的に抑制することを、健常者PBMCを用いて示した。このことから、溶連菌感染が疑われる乾癬症例では、GCの効果が減弱した場合にビタミンD<sub>3</sub>の併用が有用と思われた。これらの知見をふまえ、今後は乾癬患者PBMCを用いて、ビタミンD<sub>3</sub>誘導体の同様の効果を検討するとともに、その作用機序について詳細な検討を加えて行きたい。

最後にP糖タンパク質を高発現するヒト白血病細胞株に対する各種天然化合物の効果を検討したところ、フラボノイドのタンゲレチン、ノビレチン、バイカレイン、オーゴニンなどに、強いMOLT4/DNR株細胞増殖抑制効果を認めた。このうち最も効果の強

かったタンゲレチンとノビレチンはMOLT4/DNR株細胞のP糖タンパク質機能を有意に抑制し、細胞のダウノルビシン感受性を回復させた。またこれらのフラボノイドは細胞をG<sub>1</sub>期で静止させることを示唆した。この成果は、P糖タンパク質を高発現するヒト白血病に対しても有効な治療法を開発する上で極めて重要な情報になるものと考えられる。今後は、これらの化合物の作用機序についてより詳細に検討していくとともに、研究室にて新たに入手した8種の有機砒素化合物の抗白血病効果についても検討していく方針である。

#### 4. 研究成果の発表

##### 原著論文(欧文)

- (1) Fukushima, H., Hirano, T., Oka, K. *Staphylococcus aureus* superantigens decreases FKBP51mRNA expression and cell response to suppressive efficacy of glucocorticoid in human peripheral blood mononuclear cells: Possible implication of MAPK pathways. *Eur. J. Pharmacol.*, 570(1-3), 222-228 (2007)
- (2) Arai, K., Uchiyama, T., Okubo, Y., Tsuboi, R., Oka, K., Hirano, T. Comparative study of the effects of betamethasone butyrate propionate, vitamin D<sub>3</sub> derivatives, and cyclosporine on human lymphocyte-proliferation stimulated with a *hemolytic streptococci* derived superantigen. *Eur. J. Pharmacol.*, 571 (2-3), 222-230 (2007)
- (3) Takeuchi, H., Matsuno, N., Senuma, K., Hirano, T., Yokoyama, T., Taira, S., Kihara, Y., Kuzuoka, K., Konno, O., Jyojima, Y., Mijiti, A., Akashi, I., Nakamura, Y., Iwamoto, H., Hama, K., Iwahori, T., Ashizawa, T., Nagao, T., Toraishi, T., Okiyama, K., Oka, K., Unezaki, S. Evidence of different relationship among AUC, peak, and trough levels between cyclosporine and tacrolimus in renal transplant recipients by new pharmacokinetic parameter, Area under the trough level (AUTL)-Why cyclosporine is monitored by C<sub>2</sub> level and tacrolimus by trough level-*Biol. Pharm. Bull.*, 31, 90-94 (2008)
- (4) Taira, S., Katsuyama, K., Konno, O., Ashizawa, T., Matsuno, N., Nagao, T., Hirano, T. Influence of bacterial superantigen TSST-1 against the anti-proliferative efficacy of immunosuppressive drugs and interleukin 2 production in peripheral blood mononuclear cells of hemodialysis patients and healthy subjects. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 30, 1-14 (2008).
- (5) Henmi, K., Yoshida, M., Yoshikawa, N., Hirano, T. P-glycoprotein functions in peripheral-blood CD4<sup>+</sup> cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Biol. Pharm. Bull.*, 31,873-878 (2008)

##### 原著論文(邦文)

- (1) 杉山健太郎、外山 聡、佐藤 博、齋藤和英、中川由紀、高橋公太、平野俊彦 *CiclosporinPharmaco-Clinical Forum 2006 アンケートの結果から-MTT 法による免疫抑制薬の感受性試験普及のために 今日の移植* 20, 545-548 (2007)
- (2) 平野俊彦、松野直徒、池田寿昭、竹内裕紀、畝崎 榮、虎石竜典、奥山 清、明石貴雄、阿不都許庫尔 米吉提、木原 優、今野 理、城島嘉磨、赤司 勲、平良眞一郎、浜 耕一郎、中村有紀、岩本 整、葦澤龍人、長尾 桓 敗血症患者末梢血単核細胞のマイトゲン応答性およびグルココルチコイド感受性 *Organ Biology*, 15, 49-55(2008)

##### 総説・著書等

- (1) 平野俊彦、腎疾患診療におけるセーフティーマネージメント 薬物療法：免疫抑制薬 腎と透析, 63(3),366-371 (2007)
- (2) 平野俊彦 腎移植における免疫抑制薬物療法 臨床検査, 52, 755-760(2008)
- (3) 平野俊彦 ミコフェノール酸の臨床薬物動態学と薬力学 薬理と臨床,18,317-324 (2008)

国内学会発表

- (1) 恩田 健二, 長島 真洋, 川久保 洋, 井上 正太, 平野 俊彦, 岡 希太郎 表皮角化細胞においてMEK/ERK阻害剤はTNF $\alpha$ による低下したグルコシルチコイド感受性を亢進する 第 77 回東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会 2007 年 6 月、東京
- (2) 中島佳奈子, 田中祥子, 齋藤豊和, 若田宣雄, 平野俊彦 重症筋無力症患者における末梢血単核細胞のカルシニューリン阻害剤感受性に関する検討第 17 回 日本医療薬学会年会, 2007 年 9 月, 前橋
- (3) 田中 祥子, 平野 俊彦, 若田 宣雄, 齋藤 豊和 重症筋無力症患者末梢血単核細胞におけるカルシニューリン阻害剤感受性およびP糖蛋白質機能と薬物応答性との関連 第 28 回 日本臨床薬理学会年会 2007 年 11 月, 宇都宮
- (4) 荒井佳恵, 大久保ゆかり, 平野俊彦, 坪井良治 溶血性連鎖球菌由来スーパー抗原 (SPEA)で刺激した乾癬患者末梢血単核細胞に対する活性型ビタミン D3 の増殖抑制効果 第 78 回東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会, 2007 年 12 月, 東京
- (5) 田中 祥子, 齋藤 豊和, 若田 宣雄, 平野 俊彦 重症筋無力症患者末梢血単核細胞におけるP糖蛋白質機能とカルシニューリン阻害剤応答性との関連 第 1 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2007 年 12 月、東京
- (6) 藏品 良祐, 大屋敷 純子, 平野 俊彦, 大屋敷 一馬 Heat shock protein 90 阻害剤による成人 T 細胞性白血病細胞の増殖抑制機構に関する検討 日本薬学会 128 年会 2008 年 3 月、横浜
- (7) 中島 佳奈子, 田中 祥子, 増田 眞之, 井戸 信博, 大塚 敬男, 西田 昌史, 内海 裕也, 平野 俊彦 重症筋無力症患者末梢血単核細胞におけるP糖タンパク質機能および制御性 T 細胞が治療応答性に及ぼす影響 日本薬学会 128 年会 2008 年 3 月、横浜
- (8) 天野 慶文, 田中 祥子, 中林 巖, 吉川 憲子, 明石 真和, 吉田 雅治, 高坂 聡, 奥山 清, 平野 俊彦 SLE 患者末梢血単核細胞におけるP糖蛋白質機能と病態との関連 日本薬学会 128 年会 2008 年 3 月、横浜

# 基底膜構成分子の組織特異的な作用機序の解明と医薬分野への応用

野水 基義（病態生化学教室・教授）

## 1. 当初の研究目標

個体の発生や再生などに深く関与している基底膜の主役的構成タンパクであるラミニンは、15種類のアイソフォームが組織特異的あるいは発生時の各段階で特異的に発現し様々な役目を果たしているため、各々のアイソフォームには組織特異的に機能する部位の存在が示唆されている。本研究の最大の特徴は、まず、この巨大で多機能なラミニンを組換えタンパクと網羅的ペプチドスクリーニングによって個々のレセプターに対応する機能ペプチドに分解し（分子解剖）、その機能ペプチドの生物活性を詳細に解析し、ラミニンの細胞特異的な機能部位の解明を行うという、システムティックなストラテジーに乗っ取っている点である。さらに応用として、機能ペプチドを人工の支持体に順次加えていくことにより、「ある機能」を発現するのに十分な構造的情報を得ること（機能要素の再構築）にある。具体的には、（1）多機能なラミニンをペプチドにまでダウンサイジング可能な機能単位を網羅的に解析する。（2）その機能単位に対して、レセプター結合および細胞へのシグナル入力との対応付けを行う。次に、（3）これらを用いた医薬分野への応用と、（4）人工のマトリックス（キトサン膜など）にこれら機能単位を付与し、組織工学や再生医学などの分野に応用するものである。本研究ではすべてのラミニンサブユニットの40%にあたる今までに手付かずの部分の細胞接着部位の同定と詳細な生物活性の解析を分子解剖→機能解明→再構築→応用の流れに従って研究を行い、組織工学への応用をはかる。

本年度は、ラミニンの網羅的ペプチドスクリーニングによって同定してきた活性ペプチドのキトサン膜に固定化することによる機能性膜の作成と活性ペプチドのゲル化による機能性ゲルの作成を行う。ラミニンアイソフォームの発現が組織特異的であることを考慮し、アッセイに用いる細胞として、神経、表皮、血管内皮、線維芽細胞、上皮など由来の異なった株細胞を用い、細胞の運動能、細胞の伸展能、神経突起伸長能などの観点からペプチドの高次の生物活性を評価する。我々はすでに、活性のあったペプチドをキトサン膜に固定化することによりペプチドの細胞に対する作用を増強させうることを見出すとともに、神経突起伸長の促進作用を有するペプチド-キトサン膜の作成にも成功している。本研究で作成するペプチド-キトサン膜やペプチドゲルは神経再生や創傷治癒といった医用材料としての発展性を念頭においたもので新素材を用いた組織特異的医薬品創製に関する基盤研究ある。

## 2. 研究成果の概要

本研究は、ラミニン由来の機能ペプチドを多糖類に固定化することによって、3次元での細胞培養が可能なペプチドマトリックスを作成し、再生医学や組織工学分野に応用可能な医用生体材料を創製することを目的としている。我々は、組織の発生や修復・再生を調節している基底膜タンパク・ラミニンの機能部位を、ラミニン分子すべてをカバーしたペプチドを用いる網羅的なアプローチで約50種類の機能部位を同定してきた。

基底膜の主役的存在であるラミニン由来の活性ペプチドの同定と、それらが高次構造を作ることにより、器官発生、神経再生、創傷治癒などの高次生命現象に及ぼす役割を解明し、細胞特異的に働くペプチドゲルを医薬分野などに応用するための基盤づくりを目的に研究を行った。本年度はラミニン-1 の 673 種類のペプチドでのスクリーニングから同定した 60 種類の活性ペプチドの中で 5 種類がアミロイド様線維構造をとり、細胞接着や神経突起伸長を促進することを見出し、葛西ら *Biochemistry* 誌に報告した。本結果は、アミロイド様構造をとることによりゲル化する医用材料の創製に応用可能であるばかりではなく、アミロイド形成と疾患との関連の解析に重要な知見を与えるものである。

また、これまでの研究から、細胞は、AG73-キトサン膜にシンデカンをレセプターとして接着して丸いラフリング構造をとり、FIB1-、EF1zz-、531-キトサン膜にはインテグリンをレセプターとして接着して伸展することを報告してきた。これらのペプチドを種々の割合で混ぜてキトサン膜上に固定化することで細胞の接着活性や形態が異なることが確認された。なかでも、AG73 と FIB1 を 1 : 9 の割合で混合させた時に、細胞は最も強く接着・伸展することが観察された。次に、PC12 細胞を用い神経突起伸長活性を評価した。AG73-キトサン膜では細胞を中心に短く太い神経突起が見られ、FIB1-キトサン膜では細くて長い神経突起伸長が確認できたが、EF1zz-、531-キトサン膜上では神経突起伸長の促進は見られなかった。また、AG73 と FIB1 を混合しキトサン膜に固定化することで、細胞に強く接着し、かつ神経突起伸長も促進するペプチド-キトサン膜が作成できることが分かった。これらの結果より、異なるレセプターに作用する 2 種類のペプチドを混合し、キトサン膜に固定化することで細胞の接着・形態・分化をコントロールできることがわかった。これらのことから、複数の受容体に作用するタンパク質中の活性配列を同定し、それらの活性配列を含むペプチドを組み合わせた高分子複合体を作成することにより、複雑な生物活性を示すタンパクをミミックした材料をデザインできることが示唆された。また、これらの複数の受容体に同時に作用するペプチド-キトサン膜は細胞特異的な作用をデザインできるものであり、組織特異的な用途を目的とした医用材料として組織工学や再生医療の分野での応用が期待される。

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

基底膜の主役的存在であるラミニン由来の活性ペプチドの同定と、それらが高次構造を作ることにより、器官発生、神経再生、創傷治癒などの高次生命現象に及ぼす役割を解明し、細胞特異的に働くペプチドゲルを医薬分野などに応用するための基盤づくりを目的に研究を行った。本年度はラミニン-1 の 673 種類のペプチドでのスクリーニングから同定した 60 種類の活性ペプチドの中で 5 種類がアミロイド様線維構造をとり、細胞接着や神経突起伸長を促進することを見出し、葛西ら *Biochemistry* 誌に報告した。近年、アルツハイマー病の脳にラミニンが発現していることや、基底膜にアミロイド線維が形成されることなどが報告されている。基底膜タンパクであるラミニン由来のペプチドがアミロイド様線維を形成するという本研究の結果から、アミロイド線維の形成メカニズムや細胞への作用の解析が可能となり、アミロイドを形成する病気へのラミニンや基底膜の関与の手がかりとなることが期待される。また、活性ペプチドをキトサン膜に結合させたペプチドマトリックスを用いた研究成果は新規医用材料の開発に直結するもので、

組織工学や再生医療分野への応用が期待される。

本研究ではすべてのラミニンサブユニットの細胞接着部位の同定と詳細な生物活性の解析を分子解剖→機能解明→再構築→応用の流れに従って研究を行い、組織工学への応用を検討してきた。平成 20 年度の主な研究計画として細胞接着ペプチドの細胞膜上レセプターの同定をあげている。平成 20 年度は特にラミニン-1 由来の細胞特異的な活性ペプチドの細胞膜上レセプターの解析をペプチドを高分子担体に結合させた方法で行う。

さらに、平成 19 年度大きな進捗のあったペプチド-キトサン膜をさらに発展させ、多機能性のペプチド-キトサン膜の作成を行う。平成 19 年度は、レセプターの同定されている活性ペプチドをキトサン膜に結合することによりレセプター特異的な作用をみたが、平成 20 年度はレセプターの異なる複数種類のペプチドをキトサン膜に結合し、細胞に対し複数のレセプターと同時に作用することのできるペプチド-キトサン膜を作成し、多機能性材料の開発をはかる。さらに、インテグリンとシンデカンに作用する 2 種類のペプチドをキトサン膜に結合させ、2 種類のペプチドの相互作用を詳細に解析する。様々なペプチドの組み合わせにより、目的に適した活性を得ることが可能になるものと考えられる。平成 20 年度インテグリンとシンデカン（プロテオグリカン）をレセプターとする 2 種類のペプチドを固定化したキトサン膜に注目して基底膜様の組織特異的な作用を測定する。本研究は、基底膜と同等の機能を有するペプチド-キトサン膜の創製をめざしたもので、再生医療や組織工学に応用可能な理想的な医用材料の開発に直結するものである。

#### 4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) K. Kasai, S. Urushibata, K. Hozumi, F. Yokoyama, N. Ichikawa, Y. Kadoya, N. Nishi, N. Watanabe, Y. Yamada, and M. Nomizu.  
Identification of multiple amyloidogenic sequences in laminin-1.  
*Biochemistry*, 46(13), 3966-3974 (2007).
- (2) Y. Kikkawa, T. Sasaki, M.T. Nguyen, M. Nomizu, T. Mitaka, and J.H. Miner.  
The LG1-3 tandem of laminin alpha5 harbors the binding sites of Lutheran/basal cell adhesion molecule and alpha3beta1/alpha6beta1 integrins.  
*J. Biol. Chem.*, 282(20), 14853-14860 (2007).

総説・著書等

- (1) K. Hozumi, N. Yamagata, D. Otagiri, Y. Kikkawa, Y. Kadoya, and M. Nomizu.  
Peptide-chitosan membrane mimicking the dual-function of laminin  $\alpha$ 1 chain LG4 module.  
In Aimoto, S. and Ono, S. (Eds.): *Peptide Science 2007*, The Japanese Peptide Society, Toyama, Japan, pp. 111-114 (2008).
- (2) Y. Koike, K. Hozumi, Y. Kikkawa, and M. Nomizu.  
Biologically active sequences in the globular domain of laminin gamma2 chain.

In Aimoto, S. and Ono, S. (Eds.): Peptide Science 2007, The Japanese Peptide Society, Toyama, Japan, pp. 363-366 (2008).

- (3) T. Hayashi, K. Hozumi, Y. Kikkawa, and M. Nomizu.

Identification of biologically active sites on the N-terminal domain of laminin alpha2chain.

In Aimoto, S. and Ono, S. (Eds.): Peptide Science 2007, The Japanese Peptide Society, Toyama, Japan, pp. 367-370 (2008).

- (4) Y. Uchiyama, N. Suzuki, K. Hozumi, Y. Kikkawa, and M. Nomizu.

Identification of heparin binding sequences in the laminin  $\alpha 5$  chain LG4-5 module.

In Aimoto, S. and Ono, S. (Eds.): Peptide Science 2007, The Japanese Peptide Society, Toyama, Japan, pp. 371-374 (2008).

- (5) M. Nomizu, N. Yamagata, M. Mochizuki, Y. Kikkawa, and Y. Kadoya

Peptide-chitosan matrix: a new multifunctional biomaterial.

In Escher, E., Lubell, W.D., and Valle, S.D. (Eds.): Peptides for Youth, American Peptide Society, 2007, in press.

- (6) S. Takaki, K. Kato-Takagaki, N. Suzuki, S. Oishi, Y. Kikkawa, and M. Nomizu.

Cyclic peptide analogs of laminin active sequences enhance the biological activity.

In Escher, E., Lubell, W.D., and Valle, S.D. (Eds.): Peptides for Youth, American Peptide Society, 2007, in press.

#### 国際学会発表

- (1) M. Nomizu, N. Yamagata, M. Mochizuki, Y. Kikkawa, and Y. Kadoya.

Integrin type-dependent cell morphology on biologically active peptide-conjugated chitosan membrane.

20th American Peptide Society Symposium, 2007/06, Montreal, Canada.

- (2) S. Takaki, K. Takagaki, N. Suzuki, S. Oishi, Y. Kikkawa, and M. Nomizu.

Cyclic peptide analogs of laminin active sequences enhance the biological activity.

20th American Peptide Society Symposium, 2007/06, Montreal, Canada.

- (3) M. Nomizu, N. Yamagata, M. Mochizuki, and Y. Kikkawa.

Cell adhesive peptide-chitosan matrix: a New multifunctional biomaterial.

The 6th Symposium on Frontiers in Protein Chemistry and Biotechnology (SFPCB '07), 2007/08, Changchun, China.

- (4) Y. Kikkawa, T. Sasaki, M. T. Nguyen, M. Nomizu, T. Mitaka, and J. H Miner.  
The LG1-3 tandem of laminin alpha5 harbors the binding sites of Lutheran/basal cell adhesion molecule and alpha3beta1/alpha6beta1 integrins.  
XIIIth International Symposium on Basement Membranes, 2007/09, Cologne, Germany.
- (5) M. Nomizu, N. Yamagata, D. Otagiri, K. Hozumi, and Y. Kikkawa.  
Cell adhesive peptide as a powerful tool for cell engineering.  
4th International Peptide Symposium/7th Australian Peptide Conference, 2007/10 Cairns, Australia.
- (6) N. Yamagata, K. Hozumi, Y. Kikkawa, and M. Nomizu.  
Peptide mosaic chitosan membranes promote diverse biological functions.  
4th International Peptide Symposium/7th Australian Peptide Conference, 2007/10 Cairns, Australia.
- (7) K. Hozumi, N. Yamagata, D. Otagiri, Y. Kikkawa, Y. Yamada, and M. Nomizu.  
Dual-functional peptide-chitosan membrane mimicking the laminin a1 chain LG4 module.  
7th PanPacific Connective Tissue Societies Symposium, 2007/10 Cairns, Australia.
- (8) M. Nomizu, N. Yamagata, M. Mochizuki, and Y. Kikkawa.  
Cell adhesive peptide-chitosan membranes: a New multifunctional biomedical material.  
11th Korean Peptide Symposium, 2007/11, Seoul, Korea.
- (9) D. Otagiri, N. Yamagata, K. Hozumi, Y. Kikkawa, and M. Nomizu.  
Preparation of functional peptide-chitosan membranes using various biologically active peptides.  
11th Korean Peptide Symposium, 2007/11, Seoul, Korea.
- (10) Y. Taguchi, S. Kasai, M. Yamada, K. Hozumi, Y. Kikkawa, and M. Nomizu.  
Amyloid-like fibril formation of laminin active peptides.  
11th Korean Peptide Symposium, 2007/11, Seoul, Korea.
- (11) M. Nomizu, N. Yamagata, and Y. Kikkawa.  
Peptide-Chitosan Membranes Promote Diverse Biological Functions.  
The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting, 2007/12, Washington,

DC, USA.

- (12) S. Urushibata, T. Yoshimura, N. Suzuki, K. Hozumi, Y. Kikkawa and M. Nomizu.  
Identification of  $\alpha$ -dystroglycan binding sequences in the laminin  $\alpha 2$  chain G domain.  
The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting, 2007/12, Washington,DC,USA.

国内学会発表

- (1) S. Urushibata, N. Suzuki, K. Hozumi, Y. Kikkawa, Y. Yamada, and M. Nomizu  
Identification of the sequence with a heparin and  $\alpha$ -dystroglycan binding activity in the laminin  $\alpha 2$  chain LG4-5 module  
第 39 回日本結合組織学会学術大会, 2007 年 5 月, 東京
- (2) K. Hozumi, N. Suzuki, P.K. Nielsen, M. Nomizu, and Y. Yamada  
Laminin  $\alpha 1$  chain LG4 module promotes cell adhesion through syndecans and cell spreading through integrin  $\alpha 2 \beta 1$  distinct from laminin-1  
第 39 回日本結合組織学会学術大会, 2007 年 5 月, 東京
- (3) Y. Kikkawa, N. Takahashi, and M. Nomizu  
Primary culture of hepatocytes on synthetic peptides derived from laminin-111  
第 39 回日本結合組織学会学術大会, 2007 年 5 月, 東京
- (4) O. Okamoto, S. Fujiwara, N. Takahashi, A. Suzuki, M. Nomizu, E. Adachi, T. Ebihara, and T. Hattori.  
Analysis of interaction between extracellular matrix dermatopontin and collagen  
第 39 回日本結合組織学会学術大会, 2007 年 5 月, 東京
- (5) 松田佑二、高橋直哉、野水基義、吉川大和  
ラミニン-111 由来の合成ペプチドを基質に用いたラット肝細胞の培養  
第 14 回肝細胞研究会, 2007 年 6 月, 鹿児島
- (6) 野水基義  
日本ーアメリカーカナダ、どこで研究したい？  
第 47 回 生命科学 夏の学校, 2007 年 8 月, 埼玉
- (7) 小田切大、山縣夏美、吉川大和、保住建太郎、吉川大和、野水基義  
細胞接着ペプチドを付加した機能性キトサン膜の作成と生物活性

第 56 回高分子討論会, 2007 年 9 月, 名古屋

- (8) 保住建太郎、山縣夏美、小田切大、吉川大和、山田吉彦、野水基義  
ラミニン LG4 モジュールをミミックした多機能性ペプチド-キトサン膜の創製  
第 56 回高分子討論会, 2007 年 9 月, 名古屋
- (9) 藤森能、山縣夏美、小田切大、保住建太郎、吉川大和、野水基義  
2 種類のレセプターに作用するペプチド-キトサン膜  
第 56 回高分子討論会, 2007 年 9 月, 名古屋
- (10) 松田佑二、高橋直哉、野水基義、吉川大和  
ラミニン-111 由来の合成ペプチドを培養基質に用いた肝細胞機能の制御  
第 10 回日本組織学会, 2007 年 11 月, 東京
- (11) K. Hozumi, N. Yamagata, D. Otagiri, Y. Kikkawa, Y. Kadoya, and M. Nomizu.  
Peptide-chitosan membrane mimicking the dual-function of laminin  $\alpha 1$  chain  
LG4 module.  
第 44 回ペプチド討論会, 2007 年 11 月, 富山
- (12) Y. Uchiyama, N. Suzuki, K. Hozumi, Y. Kikkawa and M. Nomizu.  
Identification of heparin binding sequences in the laminin  $\alpha 5$  chain LG4-5 module.  
第 44 回ペプチド討論会, 2007 年 11 月, 富山
- (13) Y. Koike, K. Hozumi, Y. Kikkawa, and M. Nomizu.  
Biologically active sequences in the globular domain of laminin gamma2 chain.  
第 44 回ペプチド討論会, 2007 年 11 月, 富山
- (14) T. Hayashi, K. Hozumi, Y. Kikkawa and M. Nomizu.  
Identification of biologically active sites on the N-terminal domain of laminin  
alpha2 chain.  
第 44 回ペプチド討論会, 2007 年 11 月, 富山
- (15) K. Hozumi, N. Yamagata, D. Otagiri, Y. Kikkawa, Y. Kadoya and M. Nomizu.  
Peptide-chitosan membrane mimicking the dual-function of laminin  $\alpha 1$  chain  
LG4 module.  
第 44 回ペプチド討論会, 2007 年 11 月, 富山
- (16) 吉川大和、佐々木隆子、Mai Tuyet Nguyen、野水基義、三高俊広、Jeffrey H Miner  
ラミニン  $\alpha 5$  鎖の LG1-3 における Lutheran/B-CAM と integrin  
alpha3beta1/alpha6beta1 の結合

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月, 横浜

(17) 細胞接着分子から創薬へ

野水基義

8th IBB Seminar, 2008 年 1 月, 東京

(18) マトリックスタンパクの分子解剖と医薬応用

野水基義

日本薬学会第 128 年会, 2007 年 3 月, 横浜

(19) 痔疾用剤であるトリベノシドによる基底膜分子・ラミニンの発現誘導

高木崇、岡部晃一、谷口正和、大町賢吾、鮫島輝行、保住建太郎、吉川大和、野水基義

日本薬学会第 128 年会, 2007 年 3 月, 横浜

# 脱髄性疾患の治療を目的とした脱髄および脱髄再生メカニズムの解明

馬場 広子（機能形態学教室・教授）

## 1. 当初の研究目的

神経系はニューロン（神経細胞）とそれを取り巻くグリア細胞から構成され、行動、思考、記憶、感情など、意識下や無意識下で行う様々な機能に関与している。ニューロンは、発生した活動電位を軸索やシナプスにより他のニューロンへ連絡し、回路を形成することで様々な情報処理を行っている。一方、グリア細胞は、これらニューロン同士の情報伝達をサポートしたり、調節したり、あるいはミエリン（髄鞘）を形成したりしている。多くのニューロンの軸索はミエリンと呼ばれる脂質二重膜が何層にも取り巻いた構造により覆われている。ミエリンは、高速な情報処理により様々な高次機能を行うために進化の過程で獲得した特殊構造である。絶縁体としてランビエ絞輪部において跳躍伝導を起こさせ、神経伝導速度を速める働きをしている。さらに、近年は絶縁体としてのみだけでなく絞輪部へのチャンネルの局在化や軸索輸送などにおいてもミエリンが重要な働きをしていることが明らかになってきている。髄鞘を形成するグリア細胞は中枢と末梢で異なり、中枢ではオリゴデンドロサイトであり、末梢ではシュワン細胞である。

神経系の病気には、原因不明で治療法が確立しておらず、症状が長期間にわたり、重度の後遺症などが残ったりする難治性のものがある。精神性の難治性神経疾患として代表的な認知症の約半数はニューロンの変性に起因するアルツハイマー病で占められている。認知症の残りの半数は脳梗塞などによる脳血管性認知症である。脳血管性認知症には白質変性(Binswanger型白質脳症など)を伴うものも多く見られる。また、多発性硬化症など白質（髄鞘）変性を伴う別のタイプの難治性神経疾患も存在しており、脱髄や髄鞘形成不全などにより発症する。さらに近年、精神性疾患の統合失調症においてオリゴデンドロサイト遺伝子に発現異常が存在することや脳の核磁気共鳴画像解析により前脳の白質異常が報告され、精神性疾患と白質変性との関連が注目されている。以上のような多くの難治性神経疾患に白質変性が関与するにもかかわらず、今のところ白質変性の発症メカニズムの十分な解明には至っていない。このような白質変性を伴う難治性神経疾患の治療には、脱髄メカニズムの解明とともに、ミエリン（髄鞘）維持・形成メカニズムの解明が不可欠である。

本研究ではミエリン形成過程や病態により変化するタンパク質の網羅的な解析のためミエリンタンパク質の2次元電気泳動法(2-DE)を用いた解析法を検討する。また、未だ原因遺伝子が同定されていない白質変性モデルラットの病態を生化学的、免疫組織化学的に解析を行い、発症メカニズムの解明を目指す。これらの解析により将来的には、白質変性過程に関与し変化するタンパク質群が明らかとなり、分子的メカニズムの解明とともに、白質変性が関与する難治性神経疾患などの治療法や予防法の確立に貢献できると考えられる。

## 2. 研究成果の概要

上記の観点から、本年度は白質変性モデルラット **dmy** のプロテオミクス解析を行い、脱髄発症に関連する分子を探索する。また、**dmy** の病態変化をより詳細に理解するために、組織学的な変化を種々の分子に対する抗体により解析した。さらに昨年度確立した陽イオン性界面活性剤を用いた 2-DE により、ミエリン画分に存在する高分子タンパク質の解析を行った。その成果の概要は以下のようになる。

### (1) 脱髄疾患モデルラット **dmy** の 2 次元電気泳動法によるプロテオミクス解析

近年、試料中のタンパク質を網羅的に解析する方法としてプロテオミクス解析が様々な分野で利用され、多くの研究成果を上げている。その中で 2-DE 解析はそれぞれのタンパク質の量的な変化などをスポットとして一度に比較するのに有効であり、多くの解析にとりいれられている。昨年度までの検討により、細胞質タンパク質の解析には固定化等電点電気泳動を用いた 2-DE (IPG/SDS-PAGE) が、また多回貫通型膜タンパク質、高分子量タンパク質、強塩基性のタンパク質の解析には陽イオン性界面活性剤を用いた 2-DE (16-BAC/SDS-PAGE、CTAB/SDS-PAGE) が有効であることが明らかとなった。ミエリンの形成や再生に関連するタンパク質を網羅的に解析するためにはこれら 3 種の 2-DE を組み合わせて解析する事が重要である。そこでこれらの 2-DE 法を用いて **dmy** のプロテオミクス解析を行った。

**dmy** (京都大学のナショナルバイオリソースプロジェクトより供与) は近年発見された非常に特徴的な形質を示す脱髄疾患モデルラットであり、生後 4 週まで正常と同様にミエリンを形成し、5 週より急激に脱髄を起こしはじめ、6 週には後肢麻痺を引き起こす。昨年度の組織学的な解析により生後 3 週から 4 週において白質に空胞化が見られ始めることから、発症前のこの時期を中心にプロテオミクス解析を行った。IPG/SDS-PAGE を用いた 3、4、7 週齢ラット頸髄細胞質画分の解析の結果、**dmy** で増加しているスポット 7 個と減少しているスポット 9 個の計 16 個が発現に差のあるスポットとして検出された。さらに、CTAB/SDS-PAGE を用いた 3、4、7 週齢ラット頸髄細胞質画分では、**dmy** で発現に差があるスポットとして 2 個が検出された。一方、膜画分ではほとんど差が認められないことから、病初期には膜タンパク質に大きな変化がない可能性が示唆された。IPG/SDS-PAGE で差を示したスポットの質量分析により、**dmy** の 4、7 週齢で減少するタンパク質として TDPOZ3 [TD (tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF) domain) and POZ/BTB domain containing protein 3] を、3 週齢で増加しているタンパク質として Aha1 (activator of HSP 90 ATPase) を同定した。

### (2) **dmy** 病態解析

**dmy** の病態をより理解するため昨年度に引き続き、種々の抗体を用いた免疫組織染色による解析を行った。脱髄によりすでに発症している 7 週齢 **dmy** ラット脊髄のパラフィン切片を用い、ミエリンタンパク質である MBP (myelin basic protein)、ミエリンと軸索の結合に関与する Caspr2 (contactin-associated protein-like 2)、アストロサイトのマーカーである GFAP (Glial fibrillary acidic protein)、ミクログリア

のマーカーである Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1)、オリゴデンドロサイト系細胞のマーカーである Olig2 (oligodendrocyte transcription factor 2)、軸索輸送傷害のマーカーとして使用される APP (amyloid precursor protein)の計 6 種のタンパク質に対する抗体を用いて解析した。その結果、前索を中心に MBP 陽性シグナルの減少が認められ、また、パラノドを形成する Caspr も減少していた。これらの減少は脱髄による結果だと考えられる。また、脱髄による炎症への反応として GFAP 陽性シグナルの増強や Iba1 陽性細胞の増加が認められた。さらに白質内における Olig2 陽性細胞や APP 陽性細胞の数が増加している傾向が認められた。これらはオリゴデンドロサイト様の形態をしていることから脱髄を補うためにオリゴデンドロサイト系の細胞が増加している可能性が示唆された。

### (3) ミエリン画分に存在する高分子タンパク質の解析

ダイナミックな膜構造であるミエリンを構成するタンパク質の多くは膜タンパク質であり、加えて強塩基性タンパク質も多く存在する。ミエリンタンパク質に関しては、従来の IPG を用いた 2-DE ではミエリンを構成する強塩基性のタンパク質や高分子量の膜タンパク質を十分に解析することができなかった。ミエリン画分の高分子のタンパク質には未だに同定されていないタンパク質が存在すると考えられる。昨年度確立した 16-BAC/SDS-PAGE による 2-DE は特に高分子量のタンパク質スポットの分離に優れている。そこで本年度はこの 16-BAC/SDS-PAGE によりミエリン画分に濃縮されてくる高分子量タンパク質の解析を行った。その結果、脳ホモジネートと比較してミエリン画分に含まれる高分子量タンパク質として 9 スポットが見いだされ、そのうちの 5 スポットを質量分析により同定した。そのうち 4 スポットはミエリン画分への存在が既に報告されている分子であったが、新しい分子としてミオシン 1 D (Myo1D) が同定された。特異抗体を用いたウエスタンブロット解析により、Myo1D は確かにミエリン画分に濃縮が示され、また 16-BAC/SDS-PAGE のスポットも特異抗体により認識を確認された。また特異抗体による成獣ラット小脳の免疫組織染色では白質部分が特異的に染色され、有髄軸索の多い白質への局在が示された。

## 3. 研究評価及び今後の研究計画

白質変性を伴う難治性疾患において、その変性の過程ではミエリン形成に関与する様々なタンパク質分子が変化していると考えられる。発症のメカニズムの理解には、そのようなタンパク質を正常時と病態時で網羅的に解析・比較することが有効である。また、ミエリン形成過程で変化するタンパク質を明らかにし、ミエリン形成メカニズムを詳細に明らかにすることはミエリン再生過程への応用へとつながると考えられる。dmy において今回同定した Aha 1 は ATP 依存性分子シャペロンである HSP 90 (heat shock protein 90) に結合し、活性化する補因子である。また HSP 90 は、ステロイドホルモン受容体やいくつかのキナーゼによる信号を情報伝達する分子として知られている。この分子を活性化する Aha 1 が増加することにより情報伝達に異常が生じ、dmy の病態が生じている可能性がある。一方、TDPOZ3 は TD と POZ/BTB domain を持つ zinc finger 型タンパク質として転写に関与すると考えられているが、今のところそ

の機能は明らかではない。これらの分子を解析していくためには、まず、**dmy** において実際に発現量が変化しているのかどうかを **RT-PCR** やウエスタンブロット法などにより確認する必要がある。また、*in situ* hybridization 法や免疫組織学的解析などにより、発現細胞を特定する必要がある。さらに関連分子を検索することで、脱髄への影響の可能性を検討することが重要であると考えられる。一方、今回、同定できなかったスポットに関しては、ゲルの染色法の改良やイオン化後分解物の質量分析 (**MALDI MS/MS**) を行うなど、質量分析の精度を高め、より多くのタンパク質の同定を可能とすることが必要であると考えられる。特に上記の2種のタンパク質を含め、脱髄を起こす以前である3~4週齢ですでに変化しているタンパク質は、**dmy** の病態形成の原因になっている可能性が考えられる。

また、今回、ミエリン画分に含まれる新しい分子として **Myo1D** が同定された。**Myo1D** は筋肉に存在するミオシンとは異なる非通常型のミオシンである。このタンパク質の機能の詳細に関しては現在明らかではないが、上皮系培養細胞への強制発現による解析では、エンドサイトーシスへの関与が示唆されている。生後初期のミエリン発生過程における解析では、ミエリン形成とともに発現が増加し、特異抗体を用いた組織解析では小脳白質へ局在が明らかとなり、**Myo1D** のミエリン形成への関与が示唆された。

以上、本年度の研究によりミエリンと関連する分子として少なくとも3種のタンパク質が新しく同定され、**2-DE** を用いたプロテオミクス解析の有効性が示された。本研究で明らかとなった、**dmy** で変化するタンパク質スポットを中心に解析を進行させることは、ミエリンの崩壊や維持に関連する新たな分子の発見へつながると考えられる。また、それらの分子が関与する機能・代謝経路などの詳細を解明することにより、未だ不明なヒトの脱髄性疾患の発症メカニズムの解明や治療法・予防法の開発へ発展すると思われる。さらに今回ミエリン画分に含まれる高分子量タンパク質として新しく同定された **Myo1D** は、ミエリンを形成するオリゴデンドロサイトで発現している可能性がある。そのため、今後、培養オリゴデンドロサイトの解析によりミエリン形成における **Myo1D** の機能解明が必要であり、**Myo1D** のミエリン形成との関わりを明らかにすることは、ミエリンの再生法を開発へとつながると考えられる。

#### 4. 研究成果の発表

原著論文

(1) Yamaguchi Y., Miyagi Y., Baba H.

Two-Dimensional Electrophoresis with Cationic Detergents: A Powerful Tool for the Proteomic Analysis of Myelin Proteins. Part 1: Technical Aspects of Electrophoresis.

J. Neurosci. Res., 86, 755-765 (2008)

(2) Yamaguchi Y., Miyagi Y., Baba H.

Two-Dimensional Electrophoresis with Cationic Detergents: A Powerful Tool for the Proteomic Analysis of Myelin Proteins. Part 2: Analytical Aspects.

J. Neurosci. Res., 86, 766-775 (2008)

総説・著書等

該当なし

国際学会発表

(1) Miyagi Y., Yamaguchi Y., Baba H.

Analysis of myelin proteins using CTAB/SDS-PAGE.

ISN and ANS, 21st Biennial Meeting, 2007/8, Cancun, Mexico

(2) Yamaguchi Y., Miyagi Y., Baba H.

Analysis of high molecular weight myelin proteins using 16-BAC/SDS-PAGE

ISN and ANS, 21st Biennial meeting, 2007/8, Cancun, Mexico

国内学会発表

(1) 宮城雄大、山口宜秀、馬場広子

Analysis of myelin proteins using CTAB/SDS-PAGE

第 30 回 日本神経科学大会、第 50 回日本神経化学大会、第 17 回日本神経回路学会大会、合同大会、2007/9、横浜

# イノシトールリン脂質代謝による組織幹細胞の増殖、分化スイッチング制御

深見希代子（ゲノム情報学研究室・教授）

## 1. 当初の研究目標

表皮と毛包、及び神経などの上皮系細胞、特に幹細胞の増殖・分化制御機構におけるイノシトールリン脂質代謝の役割を明らかにすることを目的とした。

上皮系細胞の特徴は分化に伴い極性を持つことである。ホスホリパーゼC(PLC)の基質であるホスファチジルイノシトール 4,5 二リン酸(PIP2)や PI3 キナーゼから産生するホスファチジルイノシトール 4,5 三リン酸 (PIP3) は、アクチン調節タンパク質等の活性制御等を介して極性を形成すると考えられる。そこで第一に、上皮組織幹細胞の分化（極性の形成）において、PIP2 から PLC に向かうシグナルと PI3 キナーゼに向かうシグナルのスイッチング、即ち PIP3/PIP2 バランスが分化と増殖の分岐点になると考え、これらの脂質の重要性を検証することにした。またリン脂質代謝の要の酵素である PLC の1つ PLCδ1 は極性のある上皮細胞に発現が非常に多いこと、PLCδ1 遺伝子欠損(KO)マウスは皮膚上皮系幹細胞の分化異常により皮膚腫瘍を形成することを報告しているため、イノシトールリン脂質代謝がどのようなメカニズムで皮膚上皮系幹細胞の増殖と分化制御に関わっているのかを明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究成果の概要

### (1) 上皮系がん細胞の浸潤突起形成にはPIP2、PIP3 が不可欠である

上皮系がん細胞である乳癌細胞を用いて、浸潤突起形成におけるリン脂質の重要性を検討した。まず PIP2 と強い結合性を有する PLCδ1・PH ドメインを用いて、PIP2 の局在を検討した所、PIP2 が浸潤突起部位に非常に多く存在していることが判明した。また抗 PIP2 抗体を細胞に導入すると、浸潤突起の形成が抑制されることから、PIP2 が突起形成に必須であることが判明した。さらに PI3 キナーゼ阻害剤存在下においても浸潤突起形成が抑制されることから、PIP3 も突起形成に関与することが判明した。

### (2) PLCδ1 は炎症反応を介して表皮の肥厚を制御する

PLCδ1KO マウスでは生後8日目での皮膚の肥厚が観察されるが、こうした肥厚と炎症やがんとの関連性が示唆されていることから、PLCδ1 と炎症との関連性を検討した。PLCδ1KO マウス皮膚では、マクロファージ、T細胞数が4～5倍多く存在していた。更に炎症性のサイトカインである IL-1β, IL-6, MMP-9 量が、PLCδ1KO マウス皮膚で有為に増加していた。こうした事実は PLCδ1 の欠損が炎症反応を誘導し、炎症性のサイトカインが上皮細胞である角化細胞の増殖を亢進していることを示している。また上皮細胞である HaCat 細胞において PLCδ1 RNAi した細胞では、約2倍増殖性が亢進していることが判明した。これらの結果は *in vivo* (マウス), *in vitro* (培養細胞) の両方の系において PLCδ1 が分化と増殖制御に重要な役割を担っていることを示している。

### (3) PLCδ1 は分化制御因子Foxn1 (ヌードマウス原因遺伝子) の下流シグナルとして機能する

PLCδ1KO マウスでは無毛となるなど、その表現型はヌードマウスに非常に似ている。そこでヌードマウスと PLCδ1KO マウスの皮膚構造を電顕で検討した所、毛が平たくなってい

ること、キューティクルが欠損しているなどの類似性が観察された。次に毛包における Foxn1, PLCδ1, ヘアケラチンである mHa3 の局在を in situ hybridization により検討した所、これらの mRNA はいずれも毛の形成に重要な precortex 部位に発現が見られ、機能的な関連性が高いことが示唆された。また毛周期における Foxn1, PLCδ1, mHa3 の発現変化にも強い相関がみられた。次に Foxn1 と PLCδ1 のシグナルの関連性を明らかにするため、U2OS 細胞に Foxn1 を強制発現した所、PLCδ1 の発現が誘導された。更にヌードマウスの皮膚において顕著な PLCδ1 発現量の減少が確認された。このことは、Foxn1→PLCδ1→mHa3 というシグナルの流れが存在することを示している。

Foxn1 は、毛包形成において毛包 bulge に存在する幹細胞からヘアケラチンへの分化に関与していると同時に、表皮幹細胞が増殖を停止し分化誘導する際にも重要であることが判明してきている。PLCδ1 が Foxn1 の下流シグナルとして存在することが明らかになったことから、PLCδ1 が表皮の幹細胞の分化制御にも関与することが示唆される。

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

#### (1) 浸潤突起形成・細胞内極性創成におけるリン脂質の役割解明

上皮系由来の乳癌細胞の転移能に相関する浸潤突起形成に PIP2 が必要であること、PI3 キナーゼおよび生成物である PIP3 が必要であることを見出したことは、がん治療においてイノシトールリン脂質が分子標的となり得ることを示す重要な成果である。すでに PI3 キナーゼは癌細胞の増殖に関与すること、PIP3 を PIP2 に変換する PTEN は癌抑制因子として働くことはよく知られているが、今後は浸潤突起形成に関与する PI3 キナーゼアイソザイムの同定を行なう必要がある。すでに我々はこうした PI3 キナーゼアイソザイムの候補を見出しているため、今後詳細に検討する。また PIP2 の合成に関わる PIP キナーゼアイソザイムの同定も今後必要だと考えられる。

#### (2) 皮膚における上皮細胞、免疫細胞、間質系細胞間の相互作用の検討

PLCδ1KO マウス皮膚や、上皮細胞である HaCat 細胞で PLCδ1 RNAi を行なった場合著しい細胞増殖の亢進が観察されることから、PLCδ1 が表皮幹細胞の分化に向かうシグナルを制御していることが判明したことは注目すべき点である。マウスの皮膚においては、表皮の増殖に炎症反応が関与することが強く示唆されることから、免疫細胞がどのようなサイトカインを分泌し、表皮角化細胞の増殖を引き起こすのか、こうしたメカニズムにどの様に PLCδ1 が関わっているのかなどの解明を今後行なう。また皮膚は真皮に存在する間質系細胞（繊維芽細胞）からのサイトカイン分泌が表皮角化細胞の増殖に関与することも予想されることから、表皮角化細胞、免疫細胞、間質系細胞間の相互作用の解明も必要である。

表皮に存在する幹細胞は周りの微小環境に依存して、幹細胞の維持または増殖を経て分化するという方向性の決定を行なっている。Foxn1 は毛包形成の制御と共に、表皮幹細胞の分化を制御していることから、今回 PLCδ1 が Foxn1 の下流シグナルとして存在することを明らかにしたことにより、PLCδ1 が表皮幹細胞の分化を制御していることが予想される。今後、PLCδ1 の欠損が微小環境の変化をもたらし、幹細胞の維持に影響を与えている可能性等を検討する。

#### 4. 研究成果の発表

##### 原著論文

- (1) Ichinohe, M., Nakamura, Y., Sai, K., Nakahara, M., Yamaguchi, H., Fukami, K. Lack of phospholipase C-d1 induces skin inflammation.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. **356**, 912-8, 2007
- (2) Mizokami, A., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Yamaguchi, T., Tanida, I., Takenaka, K., Nakayama, K.I., Fukami, K., Takenawa, T., Kominami, E., Moss, S. J., Yamamoto, T., Nabekura, J., Hirata, M. Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of gamma2 subunit-containing GABA(A) receptors to the cell surface.  
J. Neurosci. **27**,1692-701, 2007.
- (3) Suetsugu,S., Banzai,Y., Fukami, K., Kataoka, Y., Takai,Y., Yoshida, N., Takenawa, T. Male-specific sterility caused by the loss of CR16.  
Genes Cells, **12**, 721-33, 2007
- (4) Nishida,T., Terashima,M., Fukami, K., Yamada, Y. PIASy controls ubiquitination-d  
ependent proteasomal degradation of Ets-1.  
Biochem J. **405**, 481-8, 2007
- (5) Nishida,T., Terashima,M., Fukami, K., Yamada, Y. Repression of E1AF transcriptional  
activity by sumoylation and PIASy.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. **360**, 226-32, 2007
- (6) Kurokawa,M, Yoon,S. Y., Alfandari,D., Fukami,K., Sato,K.,and Fissore, R. A. Proteolytic  
processing of phospholipase C $\zeta$  and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations during mammalian fertilization.  
Dev. Biol. **312**, 407-18, 2007.
- (7) Imai,T., Kasai,K., Kurita,J.,Fukami,K., Tashiro, M. and Shimotakahara, S. Expression and  
characterization of a pleckstrin homology domain in phospholipase C, PLC- $\eta$ 1.  
Protein Expr. Purif. **56**, 247-52, 2007
- (8) Nakamura Y., Ichinohe M., Hirata M., Matsuura H., Fujiwara T., Igarashi T., Nakahara M.,  
Yamaguchi H., Yasugi S., Takenawa T., Fukami K., Phospholipase C-d1 is an essential  
molecule downstream of Foxn1, the gene responsible for the nude mutation, in normal hair  
development.  
FASEB J. **22**, 841-849, 2008.
- (9) Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., Fukami, K., Kano, M. Mechanisms of  
depolarization-induced endocannabinoid release: Pharmacological and genetic approach.  
Neuropharmacology, **54**, 58-67, 2008
- (10) Sakaue-Sawano,A., Kurokawa,H., Morimura, T., Hanyu,A., Hama,H., Osawa,H.,  
Kashiwagi,S., Fukami,K., Miyata,T., Miyoshi,H., Imamura,T., Ogawa,M., Masai, H. and  
Miyawaki, A. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression.  
Cell, **132**, 341-343, 2008

総説・著書など

- (1) Fukami, K., Ichinohe, M., Hirata, M., Nakamura, Y. Physiological functions of Phospholipase C delta-type. Advan. Enzyme Regul. in press

国際学会発表

- (1) Yamaguchi, H., and Fukami, K., Molecular mechanisms of invadopodium formation: the roles of phosphoinositides and lipid microdomains. 5th Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2007/7, Gyeongju, South Korea
- (2) Ichinohe, M., Hirata, M., Takenawa, T., Nakamura, Y., Fukami, K. Lack of phospholipase C-d1 induces skin inflammation, The 5th Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2007/7, Gyeongju, South Korea
- (3) Hirata, M., Ichinohe, M., Matsuura, H., Nakamura, Y, Fukami, K. Functional analysis of Phospholipase Cd1 in normal coat development, The 5th Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2007/7, Gyeongju, South Korea
- (4) Fukami, K., Ichinohe M., Matsuura, H., Nakamura, Y. Physiological roles of Phospholipase Cd1 in regulation of epidermal homeostasis and formation of hair follicle. 48<sup>th</sup> International symposium on regulation activity and synthesis in normal and neoplastic tissues, 2007/9, Bologna, Italy (招待講演)
- (5) Fukami, K., Nakamura, Y. Phospholipase C delta-type isozymes have individual physiological functions in mice. Pohang Conference on Cellular Signaling 2008/2, Pohang, Korea (招待講演)

国内学会発表

- (1) 山口英樹、深見希代子. 浸潤突起形成の分子機構と癌浸潤転移における役割. 第40回日本発生活物学会第59回日本細胞生物学会合同大会 (ミニシンポジウム、招待講演)、2007/5、福岡
- (2) 中原真道、橋口祥子、永田静香、山口英樹、深見希代子. 神経細胞におけるホスホリパーゼ Ch2 の生理機能の解析. 第49回日本脂質生化学会、2007/6、札幌
- (3) 一戸学、中村由和、深見希代子、PLCd1 の欠損は皮膚炎症を惹起する、第49回日本脂質生化学会、2007/6、札幌
- (4) 平田 真之、中村 由和、深見 希代子、毛形成におけるホスホリパーゼ Cd1 の生理機能の解析、第49回日本脂質生化学会、2007/6/6、札幌
- (5) 一戸学、中村由和、佐井賢太郎、深見希代子、皮膚炎症の惹起におけるホスホリパーゼ C-d1 の役割、第77回東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会、2007/6、東京
- (6) 深見希代子、幹細胞分化異常がもたらす上皮系腫瘍形成におけるリン脂質代謝の関与、がん特定班会議、2007/6、東京
- (7) 深見希代子. 神経機能における新規ホスホリパーゼ C と G タンパク質の相互作用、G タンパク質班会議、2007/7、東京
- (8) 深見希代子. ホスホリパーゼ C シグナリングと病態、第69回バイオサイエンス研究会、2007/8、神戸(招待講演)
- (9) 深見希代子. リン脂質が創る生命のしくみ、東京医科歯科大学セミナー、2007/10、東京

- (10) 深見希代子. 「がん発生メカニズム」、東京医大がん専門薬剤師に対する研修、2007/10、東京
- (11) 深見希代子. 「迷いながら、一生懸命」第40回日本薬剤師会学術総会シンポジウム（招待講演）、2007/10、神戸
- (12) 橋口祥子, 中原真道、永田静香、山口英樹、深見希代子、神経細胞特異的に発現するホスホリパーゼ C(PLC) $\eta$ 2 の結合タンパク質の解析、日本生化学会、分子生化学会合同、2007/12、横浜
- (13) 五十嵐隆公、中村由和、河内全、山口英樹、深見希代子、ホスホリパーゼ C(PLC) $\delta$ 3 の神経突起伸長への関与、日本生化学会、分子生化学会合同、2007/12、横浜
- (14) 櫻井和之、平田真之、中村由和、河内全、山口英樹、深見希代子. Phospholipase Cd3 は myosin IV と結合し内耳有毛細胞において共発現する 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、2007/12、横浜

# 肺気道障害が誘導する肺神経内分泌細胞への分化促進機構解明

高橋 勇二（環境ストレス生理学研究室・教授）

## 1. 当初の研究目標

肺神経内分泌細胞は胎児中期に気道上皮に現れ、神経ペプチドなどを分泌し、気道の分枝や上皮細胞の増殖に重要な役割を果たしている。また、上皮細胞の修復時に肺神経内分泌細胞数が増加し、さらに、突発性間質性肺炎の患者において肺神経内分泌細胞の増加が報告されている。従って、肺神経内分泌細胞への分化機構の解明は正常な肺発達や肺疾患の病因の理解に重要であると考えられる。しかし、これまで肺神経内分泌細胞の分化過程を解析する適切な細胞培養系の開発が遅れ、その分化過程の解析は充分には進められていない。

神経内分泌細胞の増殖と分化は慢性肺疾患や汚染物質（タバコの煙、オゾン、ニトロサミン等）の曝露と関連が報告されている。また、低酸素性肺高血圧症とも関連して、低酸素刺激に応答して、血管収縮作用をもつセロトニンを血中に放出し、肺泡毛細血管循環の調節と血管平滑筋の肥厚との関連が指摘されている。タバコに含まれるニコチンおよびそのニトロソ誘導体に対しても鋭敏に反応することが知られている。さらに肺の傷害修復の際にClara細胞の起源となり得ることや、喫煙と関連する肺小細胞癌(SCLC: small cell lung cancer)の起源細胞であることが示唆されている。

神経内分泌細胞を含む全ての末梢肺気道上皮細胞は同じ幹細胞に由来することが示唆されている。ナフタレンをマウスに曝露すると、末梢気道が傷害を受けて、やがて、神経内分泌細胞塊の過形成がおこり、引き続き、上皮の再生が起こる。この時、クララ細胞がナフタレン曝露により障害を受け神経内分泌細胞の増加に引き続きCCSP(Clara cell secretory protein)を発現する細胞が増加する事から神経内分泌細胞はクララ細胞の前駆細胞であると考えられている。また、神経内分泌細胞は肺組織幹細胞の微小環境の維持に重要な役割を果たしていることも示唆されている。

このように、肺神経内分泌細胞は肺の発達および疾病の発症と深く関連することが考えられ、その、増殖と分化機構に興味を持たれているが、これまで肺神経内分泌細胞の分化過程を解析する適切な細胞培養系の開発が遅れ、その分化過程の解析は充分には進められていない。本研究課題の遂行によって、コラーゲンゲル上での細胞培養、その後の低酸素培養という培養環境が肺神経内分泌細胞への分化を促す機構を明らかにし、肺発達の機構の解明と突発性間質性肺炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease）そして、肺小細胞癌の発症機構の理解と治療法の開発に有用な基礎知識が集積される。

本年度は、コラーゲンゲル上での培養した肺気道上皮細胞を低酸素条件下で分化させ、この分化過程において、Notch因子およびSHH因子群の役割を解析すること、また、ニコチン受容体サブタイプ発現を同定することを目的に研究を進めた。

## 2. 研究成果の概要

胎児期の肺における NEC への分化には bHLH ドメインをもつ転写調節因子 Ash1 の発現が必須であることが知られている。また、Ash1 の発現・機能を抑制する Hes1 が Notch シグナル経路の活性化によって誘導されることが報告されている。近年、発生形態形成過程に関与する Shh が Hes1 の発現を促進すること、肺にナフタレンを曝露して傷害を与えると Shh の発現が増加した後に NEC への分化誘導がみられるという報告がなされた。これらの報告は、Shh が NEC 分化に関与していることを示唆している。Shh は、Ptc レセプターに結合することで Ptc を介する Smo の抑制を解除し、シグナル伝達経路が活性化される。すると Gli や Ptc 等の転写が活性化され、Gli は Hh シグナル下流の標的遺伝子の発現制御に関わると考えられている。低酸素条件下において NEC 様細胞に分化することが報告されている分化多能性肺幹細胞を用い、神経内分泌細胞の鑑別染色であるグリメリウス法、および肺神経内分泌細胞特有の分泌タンパク質である Chromogranin A と CGRP の検出、そして CGRP mRNA 発現量を指標として NEC への分化状態を解析した。さらに、Notch シグナル経路に関連した Notch1、Hes1、Ash1、および、Shh シグナル経路に関連した Shh、Smo、Ptc1、Gli1 の発現解析を行うことにより、NEC への分化過程に関連した遺伝子調節のカスケード機構を推定した。

分化誘導を行うために、コラーゲンゲルを形成させた Dish 上に低密度で細胞を播種し 5 日間培養した (G5)。その後、分化誘導培地に変更し、通常酸素 (N<sub>2</sub> 65%、O<sub>2</sub> 20%、CO<sub>2</sub> 15%) で 2 日間 (N2)、4 日間 (N4)、あるいは低酸素 (N<sub>2</sub> 85%、CO<sub>2</sub> 15%) で 2 日間 (H2)、4 日間 (H4) 培養した。NEC への分化程度はグリメリウス法と蛍光抗体法により判定し、Notch、および、Shh シグナル関連因子の mRNA 発現量を測定した。さらに、Notch および Shh シグナル経路の推定のため、Shh シグナルのアンタゴニストである Cyclopamine 4 μM を曝露し、また、RNAi 法を用いて Ash1 発現を抑制し、各因子の変化を解析した。

### (1) Notch シグナル経路の関与

NEC への分化過程において、Ash1 mRNA 量は G5 では C に比べ有意に増加し、H4 ではさらに増加した。逆に、Hes1 mRNA 量は G5 では C に比べ有意に減少した。これらのことより、NEC 分化過程に Notch シグナル経路が重要な働きをしていることが示唆された。特に、Ash1 については 2 段階に増加し、G5 までの Ash1 の増加は Hes1 の減少によるものであること、H4 におけるさらなる増加は低酸素刺激によるものであることが示唆された。

### (2) Shh シグナル経路の関与

Shh mRNA 量は G5 では C に比べ有意に減少した。逆に Ptc1、Gli1 mRNA 量は G5 では C に比べ有意に増加した。また、Cyclopamine 曝露により Shh シグナルを抑制した場合にも、グリメリウス法による銀の沈着数の増加、CGRP タンパク質の発現増加、および CGRP mRNA 量の有意な増加をもたらし、Shh シグナルの抑制が NEC への分化を促進した。さらに、コラーゲンゲル上での培養時に Ash1 mRNA 量の増加、Hes1 mRNA 量の減少傾向がみられたことを考え合わせると、Shh シグナルが NEC 分化過程に関与し、分化過程初

期の Hes1、Ash1 の発現を制御している可能性がある。

### (3) 胎児肺上皮細胞に発現するニコチン型アセチルコリン受容体サブタイプの同定

ニコチン型アセチルコリン受容体は 5 量体として働き、5 個のサブユニットが同心円状に配置し中央のポケットを介してカルシウムイオンの流入を制御するリガンドゲート型イオンチャンネルである。α 型(α 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 の 9 種類)と β 型(β 2, 3, 4 の 3 種類)のサブユニットが知られ、(α)3(β)2 のヘテロ 5 量体、あるいは、(α)5 のホモ 5 量体として存在している。今回サブユニットの α 1、α 3、α 4、α 5、α 7、β 2、β 4 の発現を確認するために以下のプライマーをデザインした。

α 1 : sense(5' GCT CTG TCG TGG CCA TCA A' ), antisense(5' CAC TCC CCG CTC TCC ATG 3' )

α 3 : sense (5' AAC CTG TGG CTC AAG CAA ATC T 3' ), antisense (5' CAT GAA CTC TGC CCC ACC AT 3' )

α 4 : sense (5' GTG GAT GAG AAAG AAC CAG ATG ATG 3' ), antisense (5' CAG CGC AGC TTG TAG TAG TG 3' )

α 5 : sense (5' AGA TGG ACC CCT GAT GAC TAT GGT 3' ), antisense (5' AAA CGT CCA TCT GCA TTA TCA AAC 3' )

α 7 : sense (5' GCT GCT CGT GGC TGA GAT C 3' ), antisense (5' TGG CGA AGT ACT GGG CTA TCA 3' )

β 2 : sense (5' CTG GAT CCT TCC CGC TAC AAC 3' ), antisense (5' TGG GTC AGC CAG ACA TTG GT 3' )

β 4 : sense (5' TCA CAG CTC ATC TC ATC AAG CT 3' ), antisense (5' CCT GTT TCA GCC AGA CAT TGG T 3' )

肺細胞に対する対照細胞として HeLa 細胞を用いた。肺細胞、HeLa 細胞では α 1 サブユニットは発現していない事が確認できた。肺細胞では α 3、α 4、β 2 サブユニットが発現していたが、HeLa 細胞では発現していない事が確認できた。

α 5、α 7、β 4 サブユニットはグラジエントをかけて PCR を行ない、発現を確認した。α 5 サブユニットは肺細胞、HeLa 細胞ともに発現していた。また、α 7 サブユニットは両細胞ともに発現していなかった。一方、β 4 サブユニットは肺細胞では発現していたが、HeLa 細胞では発現が確認できなかった。

## 3. 研究評価及び今後の研究計画

### (1) Notch シグナル経路による神経内分泌細胞分化への影響

神経内分泌細胞分化過程において Ash1 mRNA 量は、コラーゲンゲル上での培養時と、その後低酸素条件での培養時に 2 段階に増加することが確認された。コラーゲンゲル上で培養した細胞は、それ以前の細胞と比べ神経内分泌細胞分化マーカーの発現に変化を示さなかったが、低酸素条件において 2 段階的に Ash1 増加が増強した細胞では、分泌顆粒の増加、神経内分泌細胞特有の分泌タンパク質の発現増加が認められたことより、2 段階目

の Ash1 の増加が神経内分泌細胞への最終分化に重要であることが考えられる。肺起源前駆細胞において、Ash1 の増加により神経内分泌前駆細胞へ分化し、Notch が活性型だと Ash1 が抑制されクララ細胞へ、不活性型だと Ash1 がさらに増加し神経内分泌細胞へと分化することが示唆されている。このことから、胎児肺上皮細胞においても Ash1 発現の 2 段階の増加が NEC 分化過程の初期、後期として関与している可能性がある。

Ash1 発現を転写レベルで抑制する Hes1 について調べたところ、分化過程初期において Ash1 mRNA 量の増加とは逆に Hes1 mRNA 量は減少していた。しかし、分化過程後期の Ash1 mRNA 量の増加時には、Hes1 mRNA 量も増加したことより、2 段階目の Ash1 mRNA 発現量の増加に関しては Hes1 による制御ではないことが考えられる。このことより分化過程初期では Hes1 発現の減少により Ash1 発現が誘導されたこと、分化過程後期では Hes1 発現に関係なく、低酸素刺激により Ash1 発現が誘導されたことが示唆された。

### (2) Shh シグナル抑制による神経内分泌細胞分化の促進

Shh mRNA 発現量は分化過程初期において減少していた。また、Smo に直接結合することにより Shh シグナルを阻害する cyclopamine を曝露した結果、神経内分泌細胞への分化は促進されたことから、Shh シグナルの抑制が神経内分泌細胞分化過程に関与していることが示唆された。Shh は肺の発生における分岐に関与するが、神経内分泌細胞が主に存在している細気管支、終末細気管支が形成されはじめるマウス 16.5 日胚頃から発現が減少していくという報告がある。Shh の発現減少が *in vivo* においても神経内分泌細胞の分化に関与している可能性がある。また、Shh シグナルは小脳における顆粒神経前駆細胞において G<sub>1</sub> cyclin 発現を促進し、細胞周期進行を維持していることや、終脳において Shh シグナルを抑制したところ、神経前駆細胞の数が劇的に減少したことなどから、神経前駆細胞の維持に必要であることが示唆されている。このことより、Shh シグナルは細胞の維持に関与し、細胞分化を阻害していることが示唆された。

### (3) Ash1 の機能

分化過程後期の低酸素条件での培養において Ash1 発現が顕著に増加した場合に CGRP 発現も増加したこと、および Ash1 発現を抑制すると CGRP mRNA 量は減少したことより、Ash1 は CGRP の発現を制御していると考えられる。前立腺神経内分泌癌細胞におけるマイクロアレイの結果より、Ash1 の標的遺伝子は cAMP シグナリングを促進する Adcy9 や、Cell Cycle を停止させる Bub1、Cdkn2d、また、突起の伸長に関与する Ndr4 などであると報告されている。今回の実験においては Ash1 の発現抑制による神経内分泌細胞分化への影響を細胞レベルにおいては検出できなかったが、細胞増殖や、分化に直接関与していることが予想される。

Ash1 発現の抑制により Notch シグナル関連因子の Notch1、Hes1 mRNA 発現量が減少した。NEC へと分化した細胞においては Ash1 の発現増加により細胞膜タンパクの Delta-like 1(Dll1)の発現を誘導し、Dll1 は近隣の細胞が持つ Notch に結合することにより Ash1 発現を抑制することで、近隣の細胞が NEC へと分化することを阻害していると考えられている(12)。M3E3/C3 cell から NEC への分化過程においても、Ash1 から Notch1、および Hes1 へのフィードバック作用の存在が示唆される。また、Shh mRNA 量が増加し、

Ptc1、Gli1 mRNA 量は減少したことより、Shh シグナルにおいてもフィードバック作用が存在することが示唆される。

以上の結果より、胎児肺気道上皮細胞から神経内分泌細胞への細胞分化系を確立し、その分化過程において Ash1 が二段階に増加することにより、神経内分泌細胞分化が促進することが確認された。また、分化過程初期において Shh シグナルから Hes1-Ash1 の発現の制御が行われていること、更に分化過程後期においては逆に Ash1 から Shh シグナル関連因子発現への制御機構が存在し、Notch シグナルと Shh シグナル間に何らかのクロストークが存在することが示唆された。今後この点をさらに検討必要がある。

#### (4) 胎児肺上皮細胞に発現するニコチン型アセチルコリン受容体サブタイプの同定

ニコチン型アセチルコリン受容体のサブタイプ遺伝子は 12 種類が知られている。今回の中での 7 種類の発現を検討した。正常な非神経組織には  $\alpha 7$  サブタイプが見いだされている。今回の実験では培養細胞を用いて  $\alpha 7$  サブタイプを検出できなかった。今後さらに、今回検討できなかったサブタイプを加え、検討を進める必要がある。

ニコチンは肺の疾患との関連が強く示唆されている。ニコチンは肺上皮細胞の細胞増殖を促進し、さらに、アポトーシスを抑制することが報告されており、神経内分泌細胞への分化制御にどのような経路を経て影響を及ぼすのかに関して分子的な解析をさらに進める必要があろう。

#### 4. 研究成果の発表

##### 原著論文

(1) Watatani, Y., Kimura, N., Tonaki, D., Hirose, H., Takahashi, S., Takahashi, Y.,  
Amino acid limitation induces expression of ATF5 mRNA at post-transcriptional levels,  
Life Sciences, 80,879-885. (2007)

##### 国内学会発表

(1) 地田 義明、古堅 裕、広瀬 秀徳、吉見 立也、高橋 滋、高橋 勇二  
培養細胞系を用いた肺神経内分泌細胞の分化機構の解析  
第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会合同大会 2007/12、横浜

# シナプス伝達を介さないニューロン相互作用の脳機能障害における意義の解明

宮川 博義 (脳神経機能学研究室 教授)

## 1. 当初の研究目標

脳機能の主役は主神経細胞と呼ばれるグルタミン酸作動性神経細胞であり、主細胞および介在神経細胞の間のシナプス伝達の異常が脳機能の異常の原因となると通常は考えられている。しかし、神経回路網にはシナプス伝達を介さない相互作用メカニズムが存在し、むしろ、この相互作用の異常が様々な脳疾患の原因である可能性が考えられる。

シナプス伝達を介さない相互作用として、第一に主神経細胞および介在神経細胞の生成する細胞外電場を介する相互作用、第二にグリア細胞が神経伝達物質に応答して情報伝達物質を放出するあるいは細胞外環境を調節する作用が重要であると考えられる。本研究は、これらのシナプス伝達を介さない相互作用が主細胞のシナプス応答にどのような影響を及ぼすかを解析し、脳機能障害の根本的原因の解明とその対処法に対する基礎的知見を得ようとするものである。

以上の目的のために、本研究では哺乳動物の神経系としてラットの海馬スライス標本内神経回路、嗅球スライス標本内神経回路、ラット味蕾スライス標本、モデル動物としてショウジョウバエの運動関連神経回路を実験対象として電気生理学的解析、光学的解析、遺伝子操作技術、行動解析等を実施する。平成19年度の当初の研究計画は以下のものであった。

(1) 昨年度は、先行研究におけるアストロサイトにシナプス入力によって誘起される内向き電流の解析の結果を踏まえて海馬錐体細胞の応答を検討したところ、これまでに知られていない新たなプラトー状電位の発生が確認出来た。今年度は、この電位の発生機序、発生条件、神経回路活動における意義等の検討を進める計画であった。

(2) 平成18年度にはラットの海馬スライス内神経回路について直流細胞外電場を負荷した際の錐体細胞の膜電位を高速電位イメージング法によって解析し、漏洩イオンチャンネルが尖端樹状突起に高密度に分布し樹状突起先端部分の膜抵抗を低くしている可能性を示す結果を得た。本年度は電気生理学的記録法を用いて漏洩チャンネルの分布を検討する計画であった。さらに、次年度には細胞外電場存在条件におけるシナプス電位の伝播を高速電位イメージング法によって検討する計画であった。

(3) 昨年度は、ショウジョウバエの神経筋シナプスにおける分子メカニズムの検討を行ったが、我々がショウジョウバエを研究に用いる本来の理由は、微小ながらも生きた脳全体の活動を検討することが出来る点にある。今年度は、運動出力の決定にどのようなタイプのニューロン間相互作用が重要であるかの検討を開始する計画であった。

(4) グリア細胞が神経細胞の活動を調節するメカニズムを、処理される情報の内容が明確であるモデル神経系において検討するために、今後、化学受容に関与する感覚受容器および神経系において、化学物質刺激に対する各種細胞のCa<sup>2+</sup>応答を検討する予

定である。今年度は嗅球神経系の応答をCaイメージングおよび電位イメージング法を用いて検討する計画であった。

## 2. 研究成果の概要

上記の観点から平成19年度には海馬スライス標本内CA1野錐体細胞および嗅球内神経細胞の応答の解析、さらにショウジョウバエの運動関連神経回路の解析について検討した。その成果の概要は以下のようである。

(1) 海馬スライス標本内CA1野錐体細胞の電氣的活動をホールセルクランプ法を用いて観察し、反復シナプス刺激及びグルタミン酸局所投与に対する応答を検討した。既に先行研究において、これまでに知られていない新たなプラトー状電位の発生を確認していたので、この電位の発生機序、発生条件、神経回路活動における意義等の検討を進めた。その結果、この新規な応答がシナプス外に存在するNMDA型グルタミン酸受容体を介する応答であることを見出した。この成果は国際学会において発表し、さらに論文として公表した。

従来よりNMDA型グルタミン酸受容体が海馬錐体細胞に存在することは知られており、シナプス可塑性の必要条件の1つである細胞内Ca濃度上昇の経路であると信じられてきた。今回の発見、すなわちシナプス間隙から漏洩したグルタミン酸によってNMDA受容体が活性化され、プラトー状の電位を発生するという発見はNMDA受容体の機能的意義に新たな観点を与えるものとなる。大脳皮質においてはUp-state/Down-stateと呼ばれる持続的脱分極の間欠的発生と認識機序との関係が注目されている。海馬においてはNMDA受容体依存性に持続的脱分極が発生し、これが記憶の想起や認識に関わっている可能性が考えられる。

(2) 神経細胞の活動の結果として細胞外に電位勾配が発生し、そのことによって神経細胞の活動が何らかの影響を受けるとすれば、シナプスを介さない相互作用の機序となりうる。この仮説を検証するために人工的に細胞外に電位勾配を与え、電気刺激によって誘起されたシナプス電位の樹状突起に沿っての伝播を高速電位イメージング法によって影響を検討した。ラット海馬スライスは細胞が整然と層構造を形成して並び、シナプス応答を高速電位イメージング法によって解析するのに適している。以前の研究により、先頭樹状突起先端部及び基底樹状突起への入力にともなうシナプス電位の伝播についての知見は得られていたので、今回、直流細胞外電場に対する影響を検討した。その結果、シナプス電位そのものの大きさと時間経過は電場によって有意な影響を受けないが、細胞体あるいは樹状突起における活動電位発生の確率が電場の方向に依存して影響を受けることが判明した。このことは、神経細胞の活動に伴う細胞外電位勾配を介する相互作用の可能性を支持しているものである。

(3) Caイメージング法を用いて嗅球内神経細胞群の活動を観察することを計画し、そのための技術的開発を行った。本研究室では従来、主として海馬神経回路を対象とした研究を進めてきたが、海馬は神経系の上位に位置しており、その部位が関与している情報の内容が明確ではない。そこで感覚系入力が直接的に入力しており、なおかつ海馬に似た構成の神経回路を有する嗅球内神経回路を対象とした研究を進めること

を計画したのである。匂い刺激の情報は嗅球に層をなして整然と並ぶ僧帽/房飾細胞の先端部（糸球体）に入力し、傍糸球体細胞、顆粒細胞などを介した、あるいは直接の相互作用によって処理されると考えられる。そこで、研究の第一段階として、複数の僧帽/房飾細胞の応答を同時に観察し、回路としての応答解析することを可能にする方法を開発する必要があった。本研究室は従来よりCaイメージングを主たる研究手法の一つとして用いてきたので、いくつかのCaイメージング法を嗅球神経回路に適用し、Ca変動を指標として神経回路活動を解析する手法の開発を目指した。その結果、電気穿孔法を用いて複数の僧帽/房飾細胞に蛍光Ca色素を導入することにより、複数細胞の活動を同時的に観察することに成功した。現段階ではCa濃度上昇に4つのパターンがみられている。これらがそれぞれどのような電氣的活動あるいは細胞内過程を反映したものであるのかを解明するために単一細胞からの電位記録とCaイメージングを同時的に行ったところ、単一活動電位発生に伴う一過性のCa応答、バースト状活動電位発生に伴う複数ピークを有するCa応答、閾値下膜電位変動に伴うと思われるピーク値の低いCa応答等に分類できた。これらの知見を元に、糸球体への入力に対する複数の僧帽/房飾細胞の応答を同時に観察した。その結果、広範な入力に対して、遅延時間にばらつきのある応答が得られ、局所的入力に対しても、入力を直接には受けていない僧帽/房飾細胞がCa応答を示した。これらの結果は、異なる糸球体に主樹状突起を投射する僧帽/房飾細胞間に興奮性の相互作用が存在する可能性を示唆している。

(4) ショウジョウバエの神経シナプスにおけるシナプス形成の非シナプ斯的制御機構の検討を行った。先行研究においてシナプス後細胞のCaMKIIの活性に依存して、シナプス前終末の大きさとシナプス後細胞のグルタミン酸受容体の量が調節されていることを見出していたが、さらに今年度は、シナプス後細胞のグルタミン酸受容体の局在が調節を受けているか否かを検討した。その結果、シナプス後細胞のグルタミン酸受容体の局在もシナプス後細胞のCaMKIIの活性に依存して調節されていることを見出した。

### 3. 研究評価および今後の研究計画

これまでの研究の過程において、アストロサイトにおける電流の解析からシナプス伝達物質漏洩を介する相互作用の存在を予想した。さらに漏洩グルタミン酸がNMDA型受容体を活性化する可能性に着目し、このことが新たに見出したプラトー状電位の発生機序であるとの仮説を立て、その検証を行った。その結果として、まさしく仮説を裏づける結果が得られた。統合失調症のメカニズムとして近年NMDA受容体が注目されているが、その機序は不明である。19年度のプラトーポテンシャルの発生機序に関わる研究成果は、統合失調症の発生機序解明のための重要なステップであると考えている。

NMDA型グルタミン酸受容体にカップルしたイオンチャネルはCaイオンに対しても透過性があることが知られている。海馬は記憶の獲得に重要な脳部位であるとされており、そのモデルとして長期増強現象が研究されてきた。長期増強現象の成立には細胞内Ca濃度上昇が必要とされている。海馬錐体細胞に存在するNMDA型グ

ルタミン酸受容体の活性化が長期増強現象などのシナプス可塑性の必要条件の1つである細胞内Ca濃度上昇の経路であると信じられてきた。ところが、意外なことにNMDA受容体からのCa流入に起因する細胞内Ca上昇を明確に示した報告は発表されていない。研究代表者の宮川は約15年前にもシナプス応答に伴うCa濃度上昇が主として電位依存性Caチャンネルからの流入であることを報告し、さらに当研究室の助手であった中村は細胞内CaプールからのCa放出によってより大きなCa濃度上昇が生じることを報告している。しかるに今回、我々はNMDA型グルタミン酸受容体の活性化を介する持続的脱分極を見出した。この持続的脱分極に伴ってNMDA受容体を介した有意なCa流入が生じている可能性が考えられる。そこで今後の計画の一つとして、この持続的脱分極（プラトー状電位）に伴う細胞内Ca濃度上昇を検出し、それが電位依存性Caチャンネルを介したCa流入や細胞内CaプールからのCa放出を抑えた条件下でも検出可能か否かを検討したい。

細胞外電位勾配を介した相互作用の研究に介しては、樹状突起先端部のリークチャンネルの存在を高速電位イメージング法とともに電気生理学的手法を用いて検討する計画である。

嗅球神経回路の応答の解析は、今回開発したCaイメージング手法を活用して、細胞の応答の分類と応答の相関を検討する。

ショウジョウバエについてはシナプスにおけるグルタミン酸受容体の調節機構を検討するとともに、行動の解析と神経回路レベルの研究をと結びつけるための技術的開発を進める。

#### 4. 研究成果の発表

原著論文

1) Manita S., Suzuki T., Inoue M., Kudo Y., Miyakawa H.

Paired-pulse ratio of synaptically induced transporter currents at hippocampal CA1 synapses is not related to release probability  
Brain Research, 1154, 71-79, 2007

2) Suzuki, T., Kodama, S., Hoshino, C., Izumi, T., Miyakawa, H.

A plateau potential mediated by the activation of extrasynaptic NMDA receptors in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons.  
European Journal of Neuroscience, 28, 521-534, 2008

国際学会発表

1) Suzuki, T., Hoshino, C., Miyakawa, H., Synaptically induced plateau-like potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Annual Meeting of Society for Neuroscience 2007/11 San Diego, U.S.A.

2) Inoue, M., Glendinning JI, Theodorides ML, Harkness S, Li X, Bosak N, Beauchamp GK, Bachmanov AA, Polymorphisms in the Tas1r3 Gene Alter Taste Responses to Sweeteners: Evidence from 129.B6-Tas1r3 Congenic Mice. 29th Annual Meeting of the Association for Chemoreception Sciences (AChemS XXIX)

2007/4 Sarasota, U.S.A.

- 3) Morimoto, T., Sibuya, K., Nobechi, M., Honma, K., and Miyakawa, H.,  
Activity-dependent regulation of the glutamate receptor localization in  
Drosophila neuromuscular synapses. *Neurobiology in Drosophila*, 2007/10, Cold  
Spring Harbor
- 4) Morita, M., Metabotropic glutamate receptor-induced and intrinsic calcium  
oscillation in astrocytes. USA-Japan joint meeting for glial research, 2008/3,  
Philadelphia

国内学会発表

- 1) Sasajima, R., Miyakawa, H., and Morimoto-Tanifuji, T., Classification of Bursting  
Segmental nerve Activity that Regulates Movement in Drosophila Larvae. 第8  
回ショウジョウバエ研究集会、2007/7、淡路島
- 2) 森本 - 谷藤高子、渋谷謙吾、宮川博義 ショウジョウバエ神経筋シナプスにおける  
活動依存的グルタミン酸受容体局在調節機構の解明 *Neuro2007*(第30回日本神経  
科学大会、第50回日本神経化学学会大会、第17回日本神経回路学会大会)、2007/9 横  
浜
- 3) 太田桂輔、青西亨、渡部重夫、宮川博義、大森敏明、岡田真人 ベイズ統計に基づ  
いた海馬 CA1 錐体細胞の摂動応答計測 *Neuro2007*、2007/9 横浜
- 4) 森本 高子、笹島 留衣子、宮川 博義、ショウジョウバエ幼虫の運動を制御する  
神経回路の解析 第45回日本生物物理学会、2007/12 横浜