

平成 21 年度 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 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く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	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。そこで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。特に難治性疾患として、神経疾患、がん、感染症に着目し、病態時の細胞変性を正常細胞のそれと比較することで発症機構解析を行ってきた。

本プロジェクトに参加しているグループを大別すると患者由来の試料などを用いて臨床応用を目指した臨床応用型研究グループ（林・笹津・平野）と、組織・細胞・動物モデルを用いて疾患発症機構解析を行う臨床基礎研究グループ（野水・馬場・深見・高橋・豊田・宮川）に分けられる。平成 21 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。

【臨床応用型プロジェクトグループにより】、

1. 患者由来糞便由来 DNA 試料を用いて、胃がん発症に関与する *H. pylori* の病原遺伝子解析を行い、高保菌率ではあるが、胃がん発症率の低いタイなどでは、日本とは異なり弱毒性であることを初めて明らかにし、*H. pylori* の胃がん発症への関与に重要な知見を与えた（笹津）。
2. 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末梢血リンパ球・回腸・肝臓における ABC トランスポーター遺伝子、PXR 遺伝子発現を中心に解析し感染初期と後期

で異なり、病態変化に伴う発現変化を明らかにした（林）。

3. 重筋力無力症患者由来末梢血中の制御T-細胞の機能と病態との相関などを明らかにし、最良の治療へ向けた個別化医療への基盤的成果をあげた（平野）。

【臨床基礎研究プロジェクトグループにより】、

1. 神経細胞の異常と脱髄による疾患（馬場）、脳における非シナプス伝達と脳機能障害との相関（宮川）、がん浸潤におけるリン脂質の役割、リン脂質の体性 幹細胞増殖におよぼす影響（深見）、肺がん発症における肺体性幹細胞の役割（高橋）、など細胞の恒常性維持機構の破綻と疾患発症に関する重要な基礎的データを得ることが出来た。
2. ラミニン分子の活性部位を含む網羅的ペプチド合成をおこない、合成ペプチドをキトサン膜に固定し、細胞の伸展を含む機能解析を行いペプチドの生物活性部位を明らかにした。この結果は、病態の解析・再生医療への応用などを考える上で重要な知見を与えた（野水）。
3. ヒト卵膜組織構成細胞に存在する iPS 様幹細胞の存在を明らかにし、幹細胞の細胞死誘導に Oct4 遺伝子が重要な役割を果たしていることを明らかにした（豊田）。これら基礎研究グループの幹細胞研究グループ（深見・高橋）、再生医療を目指す野水グループと密接な共同プロジェクトに発展する可能性がある。

このように本プロジェクトにおいては、グループを大きく臨床応用研究、臨床基礎研究に分けて神経疾患・腫瘍細胞増殖・感染・幹細胞、といった観点から各グループの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、特記すべきことは、トランスポーター関連・幹細胞関連研究において、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、これらはグループ間で共有できる多くの知見を含んでいる。これらの成果は、英文論文22報・総説11報、国際学会発表18、国内学会発表52に発表した。

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。ウイルス感染以外にも、酸化ストレスを組織にかけた場合においても、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認められた。すなわち、卵膜組織を *in vitro* で培養すると、chorion 細胞のみアポトーシス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。また、卵膜組織構成細胞中に、幹細胞の存在を確認しその幹細胞は人工的に多能性を獲得した iPS 細胞作成に必須である遺伝子・タンパク質を発現していることを確認した。

これらの結果を踏まえて平成 21 年度においては、卵膜組織構成細胞の外的刺激に対する異なる応答を酸化ストレス、亜ヒ酸などを含む薬物応答を中心に解析を行った。またこのような異なる応答に幹細胞がどのように関与しているかについても検討を加えた。

2. 研究成果の概要

(1) 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。そこで 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。また、この細胞死誘導が p38MAPK の活性化を介して起こることも明らかにした。

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。

(2) 卵膜細胞の外的刺激応答

亜ヒ酸が急性骨髄性白血病 (APL) 治療薬として注目をあびているが、その毒性による副作用などを含めて、作用機序に不明な点も多い。そこで外的刺激である酸化ストレスなどに対して (1) で述べたようなユニークな特性を有する、卵膜細胞を用いて、ヒト由来正常細胞に対する亜ヒ酸の影響について検討を行った。

その結果 chorion cells には細胞死が誘導されたのに対し amnion cells は抵抗性を示した。そこで、ICP-MS を用いて検討を行ったところ、chorion cells は amnion cells に比べて細胞内ヒ素量が高かった。さらに、経時的な亜ヒ酸の取り込みならびに排出について検討を行った。亜ヒ酸の取り込み速度は chorion cells が amnion cells に比べて速く、一方で、亜ヒ酸の排出速度は amnion cells が chorion cells に比べて速かった。この亜ヒ酸の取り込み・排出速度の違いにより生じる細胞内ヒ素量の差 (chorion cells > amnion cells) が、亜ヒ酸感受性の違い (chorion cells > amnion cells) に寄与している可能性が示された。

これらの結果は、卵膜組織構成細胞の外的刺激に対する応答の相違機構を解析することで、細胞の恒常性維持機構解析を行うことが可能であることを示唆する興味ある結果といえる。

(3) 卵膜細胞中の幹細胞の同定

卵膜組織の amnion 細胞 (A-cell) はほぼすべての細胞に分化する能力を有するエピブ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 (C-cell) に関する研究は少ない。そこで 2 種類の組織構成細胞における幹細胞関連遺伝子発現をタンパク質発現も含めて解析を行った。

両細胞に幹細胞関連遺伝子 (Nanog, Oct-4, Sox-2, Rex-1, Klf4) 発現を認めたが、C-cell において Rex-1 の発現は非常に僅かであることが明らかとなった。A-cell における Rex-1 の発現は 21 日目以降有意な減少が認められた。このことから、A-cell の方が C-cell に比べて未分化である可能性が示唆された。

そこで、外的刺激として、酸化ストレスをかけた時に両細胞の応答の相違を検討した。酸化ストレス (SNP) を加えた時の遺伝子発現において、C-cell のみ KLF4 遺伝子発現が SNP 濃度依存的に減少、癌抑制遺伝子の P53 の発現量は増加した。また Sox2 の場合は両細胞共に変化は見られなかったが、Oct4 の場合両細胞に形状の変化と他の幹細胞関連遺伝子の発現減少を確認した。

重要なことは、Oct4 遺伝子発現を抑制した場合、SNP 刺激による細胞死誘導に抵抗性を示す A-cell において、細胞死誘導が認められた。したがって、A-cell, C-cell の酸化ストレスによる細胞死誘導の相違に Oct4 遺伝子発現が重要な役割を果たしている

思われる。

(4) 病態時における細胞増殖抑制機構の解析

卵膜細胞という正常細胞でありながら、外的刺激に異なった応答を示す細胞から構成されている、というユニークな性状を有している。すでに述べたように、この系で得られた応答機構に関する情報は、病態発症機構解析におおいに役に立つと思われ、以下のがん細胞を用いて解析を試みた。

① 小細胞がん由来細胞増殖におよぼす抗酸化剤の影響

酸化ストレス応答機構について、卵膜組織構成細胞を用いて解析し、多くの知見が得られた。近年、酸化作用および抗酸化作用を持つ細胞膜透過性銅イオンキレーターとして知られている pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) が抗腫瘍活性を有することが明らかとなったことから、難治性の小細胞肺癌細胞を用いて、その増殖抑制効果について検討を行った。

PDTC による細胞増殖抑制作用は用いた 2 種のがん細胞で認められたが、NCI-H196 細胞においてより顕著な抑制効果が認められた。また、この抑制は PDTC による細胞内 ROS 量の増加、活性酸素消去系関連遺伝子発現の減少によることを明らかにした。また、増殖抑制は、NCI-H196 細胞では、細胞増殖に関与していると思われる *c-myc* 遺伝子発現の低下を伴う S 期への細胞集積が認められた。このような細胞周期の変化は抗酸化剤 NAC により阻害されたことから、増加した ROS が細胞周期に影響を与えている可能性が示唆された。

NCI-H196 細胞では、銅イオン排泄に関与する ATP7A 遺伝子発現レベルの減少が認められたことなどが明らかとなった。また、PDTC 共存下で、小細胞肺癌治療で多く用いられている、CDDP(シスプラチン)の細胞増殖抑制効果が増強されることも明らかにした。

以上の結果は、ストレス応答の指標である、ROS 産生、金属イオンの細胞内取り込み・排泄、細胞周期への影響ががん細胞増殖に関与していることを示唆し、これまで得られた卵膜組織構成細胞の酸化ストレス応答機構と比較し、興味ある結果を得ることが出来た。

② APL 患者由来脳髄液試料中の亜ヒ酸濃度

亜ヒ酸を投与された APL 患者中の血漿、脳髄液中 (CSF) の亜ヒ酸濃度を解析したところ、メチル化体が CSF 中に認められたことから、APL 患者に認められる中枢神経障害軽減に寄与することが示唆された。今後は卵膜細胞を用いた系で得られた、亜ヒ酸の取り込み、排泄機構に関与する遺伝子発現を患者由来組織・細胞を用いて行う。

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、酸化ストレス系、さらには白血病治療薬として注目を浴びている、亜ヒ酸を用いて行った。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。

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、さらに、卵膜組織中に iPS 様細胞の存在が確認出来たことは、今後の再生医療への応用も含めて興味ある知見である。

以上の結果から、今後は、卵膜細胞、および種々のがん細胞を用いて、外的刺激を与えた時の応答について解析を行い、細胞の恒常性維持機構の基盤的概念について検討を加える。特に興味あることは、外的刺激を与えた時に 2 種の卵膜組織構成細胞は異なった応答を示し、そこに幹細胞の Cot4 遺伝子が重要な役割を果たしていることを明らかにしたことである。そこで、今後は外的刺激を与えた時の幹細胞の挙動を中心に、それぞれ幹細胞遺伝子発現抑制下、詳細な解析を行う。また、酸化ストレス以外に、亜ヒ酸による細胞応答について、卵膜細胞で得られた応答機構とがん化した細胞での相違を中心に解析を行う。

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) Yuan B, Ohyama K, Takeichi M, Toyoda H. Direct contribution of inducible nitric oxide synthase expression to apoptosis induction in primary smooth chorion trophoblast cells of human fetal membrane tissues. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1062-9 (2009)
- (2) Kiguchi T, Yoshino Y, Yuan B, Yoshizawa S, Kitahara T, Akahane D, Gotoh M, Kaise T, Toyoda H, Ohyashiki K. Speciation of arsenic trioxide penetrates into cerebro spinal fluid in patients with acute promyelocytic leukemia. *Leukemia Res* 34: 403-405 (2010)

総説・著書

- (1) Uchide N, Toyoda H (2009) Virulence of influenza virus on human fetal membrane tissues. *In Infectious Pregnancy Complications*, Nova Science

Publishers Inc., New York, pp111-138

国内学会発表

- (1) 吉野雄大、袁博、武市信、貝瀬利一、豊田裕夫
ヒト卵膜由来正常細胞に対する亜ヒ酸の影響
第 15 回ヒ素シンポジウム, 2009 年 11 月、大阪
- (2) 吉野雄大、袁博、武市信、大山邦男、貝瀬利一、豊田裕夫
Effects of arsenic on normal cells from human fetal membranes
第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月、横浜
- (3) 野崎忠輔、吉野雄大、袁博、坂上正行、太田力、蒲生忍、武内信、大山邦男、貝瀬利一、豊田裕夫
Response to oxidative stress in stem cells prepared from human fetal membrane
第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月、横浜
- (4) 坂上正行、新屋敷康、宮本麻美子、太田力、豊田裕夫、蒲生忍
Gene expression patterns of pluripotent stem cells originated from human amnion
第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月、横浜
- (5) 田畑真一、袁博、豊田裕夫
Potent antiproliferative activity of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) against small lung cancer cells
第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月、横浜

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/MDR1 (P-gp/MDR1)・MRP・BCRP・BSEP などが検討されている。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・機能の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が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を開発することが、本研究の最大の目的である。

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の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

本年度は、感染症段階別病態モデルラットを用い、LPS 投与による末梢血リンパ球、回腸および肝臓における ABC transporter、PXR に与える影響さらに、LPS により誘導される生体内因子の変動を検討した。

第 1 に、感染症病態が与える末梢血リンパ球中 ABC transporter および PXR 遺伝子発現変動、Rho123 体内動態の変動、さらに各種 cytokine への影響を感染症段階別に検討した。末梢血リンパ球中 ABC transporter および PXR 遺伝子発現量は感染症初期に上昇し、感染症進行段階に応じて発現上昇が抑制されることが示された。また、感染症初期段階では P-gp 基質の排泄が遅延し、副作用の危険性が高まることが示された。さらに、感染症進行段階では静脈内投与された P-gp 基質の排泄能に、正常時との差が見られないことから、感染症段階に応じて薬物の投与量を考慮する必要があると考えられる。これら LPS 投与による ABC transporter 遺伝子発現量および機能変動に種々の cytokine が関与している可能性が示された。

第 2 に、感染症病態時における回腸 ABC transporter および PXR 遺伝子発現量、ABC transporter タンパク発現量、P-gp 機能、さらに、各種 cytokine への影響を感染症段階別に検討した。回腸 ABC transporter および PXR 遺伝子発現量は、感染症初期に低下し、感染症進行段階に応じて発現低下が抑制されることが示された。また、回腸 ABC transporter タンパク発現量は P-gp において遺伝子発現量と同様の変動を示したが、mrp2 および bcnp では有意な変化は見られなかった。さらに、感染症初期段階では P-gp 基質の回腸への排泄能が遅延し、感染症進行段階により亢進したことから、副作用の危険性が高まる可能性および薬物の回腸からの吸収低下による bioavailability が低下する可能性が示された。これら LPS 投与による回腸 ABC transporter 発現量および機能変動に種々の cytokine が関与している可能性が推察された。

第 3 に、肝臓に焦点を当て検討した。肝臓中 ABC transporter および PXR 遺伝子発現量は感染症初期に低下し、感染症進行段階に応じて発現低下が抑制されることが示された。また、肝臓中 ABC transporter タンパク発現量は LPS 投与による有意な変動を示さなかった。さらに、感染症初期段階では P-gp 基質の胆汁への排泄能が遅延したことから、副作用の危険性が高まる可能性が示された。これら LPS 投与による肝臓 ABC transporter 発現量および機能変動に種々の cytokine が関与している可能性が推察された。また、回腸と肝臓では cytokine の発生に差異が見られるため、臓器間での炎症の度合いによる薬物の体内動態の差を考慮する必要性が示唆された。

以上、感染症段階に応じたラット末梢血リンパ球、回腸および肝臓 ABC transporter、PXR 遺伝子発現量、回腸および肝臓 ABC transporter タンパク発現量、P-gp 機能の変動を明らかにした。

本年度の結果をもとに、次年度においては感染症段階に応じた末梢血リンパ球中 PXR 遺伝子発現変動と回腸および肝臓における ABC transporter の発現、機能を予測する手段として末梢血リンパ球を用いることの可能性を検討することとする。

3. 研究評価及び今後の研究計画

ヒト末梢血単核球(PBMCs)に LPS を曝露すると MDR1 遺伝子の発現低下が起こる

という報告がなされている。しかし、この結果は本研究で得られた結果とは矛盾している。これは、ヒト末梢血単核球に LPS を曝露した検討において、LPS 曝露時間が最長でも 3 時間と短いことが原因であると考えられる。本研究においては、LPS 投与 8 時間後にラットから採血を実施しており、LPS 刺激に伴う cytokine 産生が既に誘発された状態であり、血中には高濃度の IL-2 が存在すると考えられる。よって、採取された末梢血リンパ球は IL-2 の曝露を受け、YB-1 の活性化に伴い *mdr1a* および *mrp2*、*bcrp* 遺伝子の発現上昇が起こったと考えられる。しかし、本研究ではこれまでに IL-2 遺伝子の発現変動を検討していないことから、LPS 投与による IL-2 遺伝子の変動を明らかにし、ABC transporter の発現および機能の制御機構を検討する必要がある。

また、ABC transporter の発現誘導に関与する PXR 遺伝子発現量も、LPS 単回投与により上昇が見られた。LPS 投与における腸管および肝臓 PXR 遺伝子発現低下は、炎症応答により産生された IL-6 により、PXR 遺伝子の転写が抑制されるために起こると報告されている。しかし、末梢血リンパ球における詳細な報告はなく、本研究における LPS 単回投与時の末梢血リンパ球中 PXR 遺伝子発現誘導に関与する明確な因子は未だ不明である。これまでにステロイド剤の Dexamethasone により、ヒトおよびラット肝臓における PXR mRNA 発現量が上昇したという報告がなされており、PXR 遺伝子誘導にステロイドホルモン受容体である glucocorticoid receptor の影響が示唆されていることから、ステロイドホルモンを始めとした様々な生体内因子が発現誘導に関与している可能性が高いと考えられる。

LPS 3 回連続投与により、種々の cytokine 発現量はいずれも高値を示し、末梢血リンパ球で見られた LPS 単回投与での上昇と異なる結果が得られた。LPS 投与により血中および腸管組織中 TNF α 濃度が上昇することは広く知られている。また大腸菌腹腔内投与感染後、血中 TNF α 濃度は 90 分で最大となり、他の 3 時間程度で CTRL レベルまで低下することも示されている。TNF α はエンドトキシンあるいはバクテリア暴露後に最初に誘導される cytokine であり、他の cytokine 産生の引き金となると考えられている。また、LPS による炎症時には IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF α および IFN γ などの炎症性 cytokine の分泌が誘導され、発熱・血圧低下などの症状が引き起こされることも報告されている。炎症性 cytokine は、LPS 投与後短時間で発現が上昇し、発現が低下した後にも発熱などの症状が続くこと、LPS 投与による iNOS の誘導は、回腸で顕著であるという報告を考え合わせると、回腸における組織障害に iNOS が深く関わっていると考えられる。

iNOS は細菌性エンドトキシンや炎症性 cytokine の刺激によって発現が誘導され、カルシウム非依存的に大量の NO を産生すること、LPS 投与による様々な障害の要因として、NO が着目されていることから、小腸・肝臓・腎臓における薬物 transporter の機能や発現が NO によって制御されていることも十分に考えられる。一方、LPS による PXR 発現や ABC transporter 発現低下は、Proinflammatory cytokine 阻害では PXR 発現や ABC transporter 発現低下に抑制がかかり、iNOS 阻害は抑制されないという iNOS 関与に否定的な報告もあることから、iNOS、proinflammatory cytokine (IL-1 β)、PXR の 3 者は密接に関わっていると考えられる。この 3 者の相関に関する詳細な検討が将来、感染症などの障害による体内動態の変動予測につながると考えられる。

LPS 投与により肝臓中 cytokine 発現量はいずれも末梢血リンパ球および回腸で見られた傾向と異なり、LPS 5 回連続投与においても高値を示すものが認められた。肝臓はリンパ組織である脾臓により生成された cytokine や感作リンパ球が血流を介して次に流入する臓器であるため、LPS 投与時の障害が最も大きな臓器である。このため回腸に比べて肝臓では、IL-1 β などの炎症性 cytokine が LPS 単回投与時から高発現したと考えられる。また、肝臓へ流入する全血流量の約 3/4 は、胃や腸から門脈を介して流入することから、LPS 投与によって発生した障害因子（種々の活性酸素や cytokine など）が、門脈を経て肝臓へ流入し、直接的な障害あるいは間接的に何らかのシグナル応答を介して障害を誘発する可能性は十分に考えられる。これまでに、LPS 投与により肝臓の NF- κ B や AP-1 といった転写因子の活性化を介した Kupffer 細胞の活性化により、腫瘍壊死因子 (TNF- α) やインターロイキン(IL)-1 β などの炎症性 cytokine の放出、iNOS の活性化を介して産生された NO などの活性酸素種の放出を介して、肝細胞障害が引き起こされるという報告がある。さらに、NO によって肝臓の mdrla、Bsep、mrp2、mrp3、Oatp1, 2 などの種々の transporter や、PXR、RXR、FXR、CAR などの核内レセプターが遺伝子レベルで発現量が低下することが報告されていることから、iNOS は肝臓において transporter の機能および発現量を変動させる重要因子であることが考えられ、回腸に比べて肝臓の iNOS が顕著に上昇したと推察できる。さらに、血中の炎症性 cytokine 濃度によって肝臓の P-gp や mrp2 の発現量が減少することも報告されており、今年度得られた我々の知見と一致している。

肝臓に発現する transporter は P-gp および bcrp に比較して mrp2 が高発現しているということは昨年度既に見出されている。また、bile canalicular membrane に発現が認められている ABC transporter は上記以外に胆汁酸排泄 transporter である Bsep (bile salt export protein = spgp : sister of P-gp) が報告されている。さらに、肝取り込みに関与している有機アニオン transporter (Oatp) や有機カチオン transporter (Oct) などが血管側に面した sinusoid membrane に発現していることから、次年度は LPS 投与による肝臓の機能変動を P-gp に加え、mrp2 を始め種々の transporter の機能変動について検討し、LPS 投与による網羅的な解析が必要であると考えられる。

4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) Tomita M, Kanbayashi A, Murata H, Tanaka A, Nakaike M, Hatanaka M, Hayahsi M. Effect of lipopolysaccharide on P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary excretion of rhodamine123 in rats. *Int. J. Pharm.*, **392**: 35-41 (2010)

総説・著書等

- (1) 富田幹雄, 林 正弘
第2章 薬の運命、スタンダード薬学シリーズ、薬と疾病 P4-P20
(東京化学同人) 日本薬学会編、2009年。
- (2) 富田幹雄, 林 正弘
トランスポーターの遺伝子多型、医薬品トキシコロジー改訂第4版、2009年。

国内学会発表

- (1) 畑中 恵, 富田幹雄, 中池万里子, 林 正弘

薬物の体内動態を予測する非侵襲的システムの構築

日本薬剤学会第 24 年会, 2009 年 5 月, 静岡

- (2) 畑中 恵, 富田幹雄, 林 正弘

末梢血リンパ球を用いた薬物体内動態変動の予測

日本薬物動態学会第 24 回年会, 2009 年 11 月, 京都

- (3) 畑中 恵, 富田幹雄, 甲斐友視, 林 正弘

末梢血リンパ球を用いた Lipopolysaccharide 誘発感染症時における薬物体内動態を予測する非侵襲的システム

日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月, 岡山

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

人の胃に生息する *Helicobacter pylori* はらせん状のグラム陰性菌で、消化性潰瘍や慢性胃炎の原因となる病原細菌である。また、*H. pylori*は胃がんの発生と密接な関連があることが明らかとなり、1994年にWHOは*H. pylori*をグループ I 発がん因子に分類している。*H. pylori*感染者は全て組織学的胃炎を伴うが、そのうち消化性潰瘍や胃MALTリンパ腫あるいは胃癌を発症する感染者はごくわずかである。*H. pylori*と胃がん発症のメカニズムは不明であるが、*H. pylori*は菌株により病原性が異なる可能性が指摘されている。タイやベトナムでは、*H. pylori*感染率が日本より高いにも関わらず、胃がんによる死亡率は日本に比べて著しく低い。これは、Asian paradox (Asian enigma)といわれている。このことより、*H. pylori* は地域により病原性の異なる菌株が分布していると考えられる。*H. pylori*の代表的な病原因子であるCagA (Cytotoxin associated gene A) はCag Pathogenic Islandの中にコードされている約130kDaのタンパク質である。CagAはIV型分泌装置により宿主細胞内に注入され、リン酸化を受けた後、様々なカスケードを介し炎症性サイトカインの発現誘導、異常な細胞増殖やHummingbird様といわれる特徴的な形態学的変化をもたらす。これらの作用の結果、CagA保有株はCagA非保有株に比べて胃がん発症の母体となる萎縮性胃炎をより強く引き起こし、胃癌発症の危険率を高めることが明らかとなっている。CagAはC末端側にEPIYA配列を含む繰り返し配列をもち、この領域のチロシンがリン酸化されることにより宿主細胞内で生物活性を発現する。繰り返し配列はEPIYA周辺配列の違いによりEPIYA-A、-B、-C、-Dに分類され、欧米の株の多くは主にEPIYA-A、-Bを持つCagAもしくはEPIYA-A、-B、-Cを持つCagA (欧米型CagA) を保有するのに対し、日本などの東アジア地域の株の多くは

EPIYA-A、-B、-DをもつCagA (東アジア型CagA) を保有する (Fig. 1)。近年、東アジア型CagAは欧米型CagAに比べ生物活性が強く、胃がん発症に深く関与している可能性が報告されている。

一方、*H. pylori* の培養は難しく、上部消化器内視鏡検査による胃生検材料からのみ培養が可能である。内視鏡検査は侵襲的であり、患者に苦痛を伴う。そのため、小児や内視鏡検査が出来ない患者からの胃生検採取ならびに *H. pylori* の培養は困難である。そこ

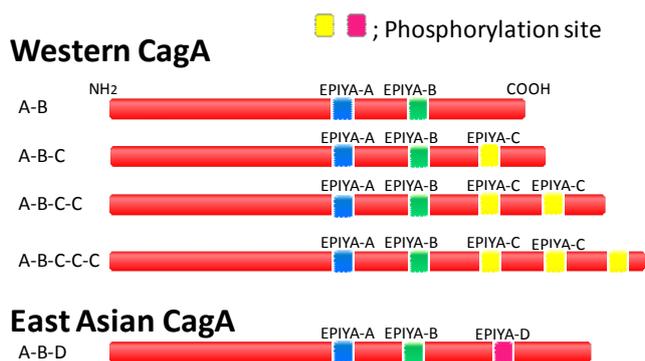


Fig. 1. Comparison of Western CagA with East Asian CagA

EPIYA-A, EPIYAKVNKKK(A/T/V/S)GQ; EPIYA-B, EPIY(A/T)(Q/K) VAKKVNAKI; EPIYA-C, EPIYATIDDLG; EPIYA-D, EPIYATIDFDEANQAG.

で、我々は糞便から PCR 等の DNA 診断に使用できる高純度かつ高収率 DNA 抽出を開発した。さらに、*H. pylori* のクラリスロマイシン (CAM) 耐性は、リボソームの 50S サブユニットの 23S rRNA の変異であることが知られているため、内視鏡を行わずに *H. pylori* の 23S rRNA 遺伝子を検出し、クラリスロマイシン耐性に関与する遺伝子変異を検出する方法を開発してきた。この方法は内視鏡の困難な小児においても *H. pylori* の遺伝学的情報が得られる有用な方法であると考えられる。そこで本研究では、我々の糞便からの DNA 精製を用いて *H. pylori* を検出し、*H. pylori* の病原因子 CagA を検出・タイピングする方法の開発を行った。この CagA タイピング法を用いた小児における *H. pylori* の CagA の分布を調査し、Asian Paradox の解明を試みた。

2. 研究成果の概要

検体は、2006 年 8 月にタイのチェンマイ大学 Dr. Boonyaritichaijij によって集められたチェンマイ在住の小児 284 名(男児 113 名、女児 110 名、性別不明 61 名、平均年齢：6.6 ±2.2 歳、年齢不明 60 名)の凍結保存した糞便を用いた。本研究はタイ・チェンマイ大学の倫理委員会の承認を得て行った。糞便からの *H. pylori* DNA の抽出・精製は我々が開発した物理的破壊法により細胞を破壊後、シリカカラムにて DNA を精製した。得られた DNA から Nested-PCR を用いた *H. pylori* 特異的な 23S rRNA の検出から *H. pylori* 感染を判定した。CagA をコードする遺伝子 *cagA* についても、独自のプライマーを設計し、Nested-PCR で検出を行った。*H. pylori* のクラリスロマイシン (CAM) 耐性は、23S rRNA の変異領域の DNA シーケンス解析から判定した。DNA データベース上の既知の *H. pylori* の *cagA* シーケンスから *cagA* 共通領域を検索し、*cagA* の A-B 領域を増幅する *cagA* 検出プライマーを設計した。さらに、*cagA* の繰り返し配列 EPIYA による CagA タイピングは、Western CagA と East Asian CagA に特徴的な領域を増幅するプライマーを設計し、それぞれに特異的な PCR を行うことで CagA タイピング PCR 法を開発した。Nested-PCR で増幅した DNA 断片はシーケンスから確認した。

まず、*H. pylori* の感染調査では、284 名のうち 120 名 (42.3%) の小児において *H. pylori* が検出された。感染率を年齢別に比較した結果、幼児期から高率で *H. pylori* 感染が認められたものの、年齢による感染率に有意な差は認められなかった。また、男女間での感染率にも差は認められなかった。糞便の *H. pylori* 抗原による確認試験においても同等の結果であった。したがって、日本の小児 *H. pylori* 感染率

Table 1. Prevalence of *H. pylori* with the mutation in 23S rRNA gene from 120 children in Chiang Mai, Thailand

<i>H. pylori</i> 23S rRNA	No. of subjects (%)
Wild type	85 (70.8)
Mutant	
A2142G	1 (0.8)
A2143G	29 (24.2)
Mixed type	
A2142G & wild	0 (0.0)
A2143G & wild	5 (4.2)

Wild type: No mutation was detected in 23S rRNA gene

Mutant: The mutation (A2142G and/or A2143G) was detected in 23SrRNA gene

Mixed type: The mutation (A2142G and/or A2143G) and wild type were detected in 23S rRNA gene

は 10%前後であることから、タイ小児の感染率は明らかに高いものであった。

次に、糞便から *H. pylori* が検出された 120 名(男児 47 名、女児 43 名、性別不明 30 名、平均年齢：6.63±2.23 歳)について CAM 耐性 *H. pylori* の検出を行った (Table 1)。*H. pylori* の CAM 耐性に関与する部位を DNA シーケンスにより解析した。23S rRNA の 2142 位または 2143 位に A から G への変異のあるもの (Mutant) を CAM 耐性株、変異のないもの (Wild type) を CAM 感受性株とした。さらに、CAM 耐性株と CAM 感受性株の混合感染を Mixed type とした。その結果、Wild type は 85 例 (70.8%)、Mutant は 30 例 (25.0%)、Mixed type は 5 例 (4.2%)でありタイの小児における CAM 耐性率は 29.2%であった。この値は、日本の小児における CAM 耐性率と同程度に高いことから、タイの小児においても CAM 耐性 *H. pylori* 感染は深刻な状況にあると考えられた。

さらに、*H. pylori* 陽性の小児 120 名における *cagA* 遺伝子の検出を行った (Fig. 2)。その *H. pylori* 感染小児 120 名のうち 59 名 (49.1%) の糞便サンプルにおいて *cagA* 遺伝子が検出された。年齢および性別による CagA 保有率に有意な差は認められなかった。*H. pylori* CagA 陽性であった 59 名の小児の糞便サンプルにおいて、CagA のタイピングを行った結果、4 名 (6.8%)において EPIYA-D を保有する東アジア型 CagA、20 名 (33.9%)において EPIYA-C を保有する欧米型 CagA が検出された。残りの 35 名は CagA タイピング PCR により EPIYA-C 及び EPIYA-D が検出されなかった。そこでこれらの検体から無作為に抽出した 14 例について、

シーケンスにより EPIYA 周辺領域のアミノ酸配列を解析した結果、いずれも EPIYA-C および EPIYA-D を保有していないことが確認された。この結果は、これらの 35 名 (59.3%)は EPIYA-C を保有しない欧米型 CagA であることを示唆している。したがって、タイの *H. pylori* に

感染している小児のうち、CagA をもった *H. pylori* を持っている小児は約半分であるが、それらのほとんどは欧米諸国で分離される弱毒性の Western CagA であることが明らかとなった。

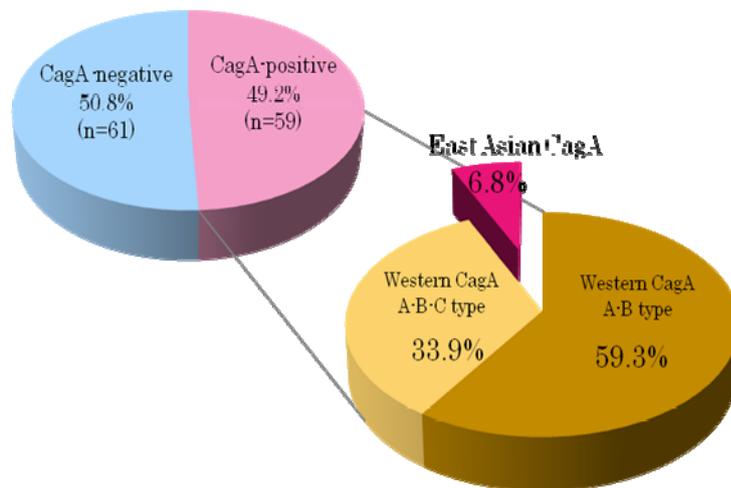


Fig. 2. CagA status of *H. pylori* in Thai children

3. 研究評価及び今後の研究計画

本研究では小児においても糞便を用いて簡便に *H. pylori* を検出し、病原因子の一つである CagA をタイピングする方法を開発した。本法を用いた *H. pylori* 感染と CAM 耐性 *H. pylori* の研究によりタイ小児における *H. pylori* 感染率および CAM 耐性率を明らかにした。欧州における *H. pylori* 感染診断基準では、*H. pylori* の CAM 耐性率が 15~20%の地域におい

ては、予め CAM 感受性試験を行うべきであると提言されている。タイ小児における CAM 耐性率は 20%を超えていることから、CAM 感受性試験を行わない場合には CAM の使用は避けるべきであることが示唆された。今後は薬剤耐性率を踏まえた新たなレジメの確立が必要となることが示唆された。

さらに、糞便から *cagA* 遺伝子の検出およびタイピングをする方法を確立した。CagA タイピングの結果、タイ小児に感染している *H. pylori* の CagA 保有率は約 50%であり、その多くは弱毒性と考えられている欧米型 CagA であることを明らかとした。日本の成人における *H. pylori* の CagA 保有率は 90%以上であり、これらの多くは強毒性の東アジア型の CagA であることが明

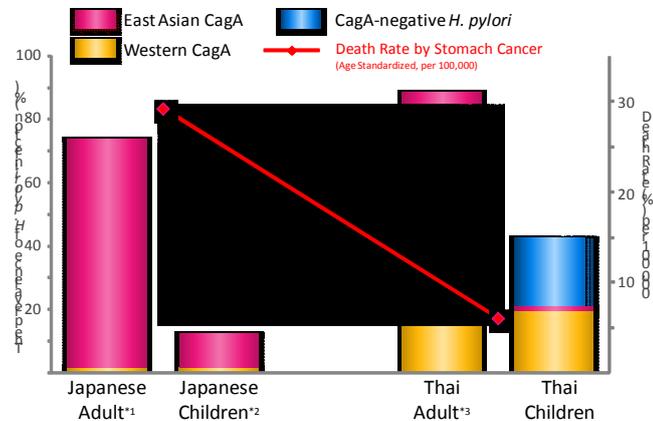


Fig. 3. Comparison of *H. pylori* prevalence and CagA status between Japanese, Thai Adult, and Thai children

¹Zhou W et al. FEMS Immunol Med Microbiol. 2004, ²Azuma T et al. Aliment Pharmacol Ther. 2004, ³Vilaichone RK et al. Helicobacter 2004

らかとなっている (Fig. 3)。したがって、タイ小児における *H. pylori* の CagA は日本と大きく異なる分布をしていることが明らかとなった。以上より、タイにおいて *H. pylori* 感染率が高いにも関わらず、胃癌による死亡率が低い原因として、CagA 陽性 *H. pylori* が少なく、さらに高病原性を示す東アジア型 CagA を保有する *H. pylori* が非常に少ないことが関与している可能性が考えられた。したがって、*H. pylori* の CagA タイプは胃癌の発症リスクを予想する重要な因子となると考えられる。小児における *H. pylori* 感染診断基準及び除菌ガイドラインが未だ確立されていないことから、本研究で確立した糞便から *H. pylori* の病原性や薬剤感受性を調査した結果は、小児における *H. pylori* 除菌治療における有用な知見となると考えられる。

最近、グラム陽性レンサ球菌 *Streptococcus bovis* による感染性心内膜炎の患者では大腸がんを発症している頻度が高いことが報告されている。そこで、上部消化器だけでなく、大腸がんなどの下部消化器疾患と微生物の関連性についても含めて研究する計画である。

4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) Tanuma, M., Rimbara, E., Noguchi, N., Boonyaritichaij, S., Kuwabara, K., Fukunaga, Y., Sasatsu, M., Analysis of clarithromycin resistance and CagA Status in *Helicobacter pylori* by use of feces from children in Thailand. J. Clin. Microbiol. 47, 4144-4145 (2009)
- (2) Rimbara, E., Tamura, R., Numata, M., Noguchi, N., Kawai, T., and Sasatsu, M., Detection of clarithromycin-resistant and -susceptible *Helicobacter pylori* from culture isolates, gastric juice, and feces. Helicobacter, 14, 156-157 (2009)

総説・著書等

- (1) 河合 隆、山本 圭、福澤麻里、山岸哲也、八木健二、福澤誠克、片岡幹統、川上浩平、柳沢京介、森安史典、林原絵美子、野口雅久、笹津備規
最も効率的な *Helicobacter pylori* 除菌法とは。
Helicobacter Research 13, 469-473 (2009)
- (2) Noguchi, N.,
Helicobacter,
Molecular Detection of Foodborne Pathogens, CRC Press, 181-200 (2009)

国際学会発表

- (1) Takagi A, Deguchi R, Yamada T, Noguchi N, Suzuki T, Matsushita M, Mine M, Sasatsu M.
Effect of Pretreatment with *Lactobacillus gasseri* OLL2716 on clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* eradication.
Digestive Diseases Week, 2009/6, Cicago, USA

国内学会発表

- (1) 高木敦司、出口隆造、河合 隆、野口雅久、笹津備規
クラリスロマイシン耐性 *H. pylori* 除菌におけるテプレノンと *L. gasseri* OLL2726 併用の効果についての検討
第 15 回日本ヘリコバクター学会、東京、2009 年 6 月
- (2) 野口雅久、 中南秀将、 浜田幸宏、 矢後和夫、 笹津備規
アカントアメーバに対する抗真菌薬の感受性測定
第 57 回日本化学療法学会総会、東京 2009 年 6 月
- (3) 藤塚一行、 明石貴雄、 堺 智津子、 野口雅久
入院患者に持参薬を使用することによる経済効果
第 163 回東京医科大学医学会総会 2009 年 6 月、東京
- (4) 野口雅久
第 14 回日本小児 *H. pylori* 研究会
CagA から見た Asian Paradox、2010 年 3 月、東京
- (5) 笹木 優、野口雅久、笹津備規
Helicobacter pylori の球状化における *mreB* の発現
日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月、岡山

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・教授）

1. 当初の研究目標

難治性疾患の治療においては、薬物療法の奏功性が患者の予後に大きく係わる。薬物療法に抵抗性を示す症例では、死の転帰をたどる場合も少なくない。本研究は、重症筋無力症や悪性腫瘍などの難治性疾患患者の薬物耐性発現機序を解明し、それに係わる細胞や分子を標的とした新たな治療法を開発するための基盤を構築することを意義・目的とする。

本研究ではまず、重症筋無力症（MG）患者における末梢血リンパ球の免疫抑制薬感受性や薬物の治療効果と、制御性T細胞の機能や割合との関係を調べる。また、MGの病態に深く関連する抗アセチルコリン受容体（AChR）抗体の産生にはB細胞が係わっているため、B細胞機能の異常についても合わせて検討する。具体的には、MG患者より得た末梢血単核細胞（PBMC）の *in vitro* 増殖に対する各種免疫抑制薬の効果や、薬物感受性と薬物の治療効果との関連を調べる。特に、制御性T細胞、Th1細胞、およびTh2細胞の機能や割合が、免疫抑制薬のリンパ球抑制効果あるいは薬物の治療効果に及ぼす影響を検討する。制御性T細胞、Th1細胞、およびTh2細胞の割合は、フローサイトメトリー法により各々測定する。患者の臨床経過は、血清中のAChR抗体価や患者の症状を点数化したMGスコア等により評価する。なお本研究は、東京医科大学の倫理委員会により承認され、神経内科の医師指導のもとに行われた。

一方、抗癌薬耐性を克服するための耐性機序や新しい治療薬に関する研究では、抗癌薬耐性を獲得しているヒト白血病細胞株や有効な抗癌薬が無いヒトメラノーマの細胞株細胞を用い、これらの細胞に対するフラボノイドあるいは脂溶性ビタミンの効果を検討する。

我々がかねてより、各種フラボノイドがヒト癌細胞株の *in vitro* 増殖を強く抑制し、しかもこれらのフラボノイドは正常ヒト PBMC のマイトゲン応答性増殖に対しては抑制効果が少ないことを報告してきた。そこで、癌細胞増殖抑制効果が比較的強い、かんきつ類由来のフラボノイドであるタンゲレチンとノビレチンが、抗癌薬耐性を獲得しているヒト白血病細胞株の増殖に及ぼす効果を検討する。

次にビタミンは、古来より健康維持や老化防止、あるいは癌の予防に有効であるとして一般的に摂取されている。現在ビタミンとして知られているものは 20 種類に及び、その溶解性から水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンに大別される。現在までに、主にビタミン E (VE)、ビタミン B (VB)、ビタミン A (VA)、およびビタミン D (VD) において、antioxidants として発癌予防作用のあることが報告されている。また近年では、これらに加えて、ビタミン K (VK) にも抗腫瘍効果があることが報告されており、癌細胞の分化誘導、アポトーシス誘導、あるいは細胞毒性のある抗癌剤との併用により、抗癌剤の毒性を緩和しつつ抗腫瘍効果を増強させるなどの目的で VK の臨床応用が試みられている。このように、脂溶性ビタミンは全種において抗腫瘍効果を有することが示唆されて

いる。以上のような背景を踏まえ、本研究では、脂溶性ビタミンであるトレチノイン (ATRA)、VD₃、VE、VK₁、VK₃、および VK₅ がヒトメラノーマ細胞の増殖に及ぼす効果を比較検討し、また臨床的にも有効と思われる薬物については、その作用機序についてさらに検討を行うこととした。

2. 研究成果の概要

(1) 重症筋無力症患者における T 細胞あるいは B 細胞異常と免疫抑制薬物療法による治療効果との関連

MG は、全身の筋脱力感を主訴とする自己免疫疾患である。MG では主に、神経筋接合部の構成タンパクを標的とする AChR 抗体により、神経筋伝達の障害がおこる。胸腺は、T 細胞の分化や自己反応性 T 細胞の除去に関わり、免疫応答を確立するのに重要な臓器であるが、胸腺中には AChR 様構造を有する筋様細胞が存在することも明らかとされている。MG 症例の多くは、過形成や胸腺腫などの胸腺異常を合併しており、胸腺摘出が行われるが、症状が安定するまで免疫抑制薬物療法を継続する必要がある。MG に対する薬物療法としては、一般にコリンエステラーゼ阻害薬や副腎皮質ステロイド (GC) 薬が用いられている。しかし GC の薬効には個人差があり、治療効果が不十分な患者や、再燃を繰り返し離脱が困難な患者も存在する。胸腺摘出後においても、GC 療法に対して抵抗性を示す患者や、副作用により GC を使用できない患者に対しては、タクロリムスやシクロスポリンなどのカルシニューリン阻害薬が用いられる。

CD4⁺ CD25⁺ 制御性 T 細胞 (Treg 細胞) は自己反応性 T 細胞の活性化を制御するため、その異常が自己免疫疾患の発症に関与すると考えられている。Treg 細胞はマスター遺伝子である Foxp3 を発現しており、胸腺において分化・成熟し、あるいはナイーブ CD4⁺ T 細胞から分化する。一方、IFN- γ を産生する Th1 細胞と IL-4 を産生する Th2 細胞はお互いに恒常性を保っているが、この Th1/Th2 バランスの破綻が自己免疫疾患につながる可能性が指摘されている。新たなサブセットである IL-17 を産生する Th17 細胞は、炎症性自己免疫疾患の発症と関与しているが、MG 患者において Th17 細胞の報告はまだない。Th17 細胞は、マスター遺伝子 ROR γ t を発現している。免疫抑制薬は Th 細胞のサイトカイン産生に影響を与えるため、末梢 T 細胞サブセットの分化あるいはバランスに影響を与えると考えられる。本研究では、MG 患者における自己反応性 T 細胞の活性化に関与すると思われる CD4⁺ T 細胞の分化およびその機能異常を明らかとすることを目的とし、更に免疫抑制薬物療法の影響や治療効果との関連についても合わせて検討を行った。

一方、MG において T 細胞依存性の B 細胞の活性化により、自己抗体の産生が誘導されることが報告されている。近年、B 細胞を標的とした自己免疫疾患の治療が注目されており、MG 治療においても B 細胞抗原である CD20 分子を標的としたモノクローナル抗体であるリツキシマブの有効性が報告されている。T 細胞-B 細胞間のシグナル伝達は主に T 細胞受容体を介して行われるが、CD40L-CD40、B7h-inducible costimulator (ICOS)、あるいは B cell activating factor belonging to the tumor necrosis family (BAFF)-BAFF receptor (BAFF-R) などの共刺激分子群は、双方への補助シグナルを伝達する。これらの相互作用は B 細胞におけるアポトーシスの阻害や増殖の増強、免疫グ

ロブリンのクラススイッチを増強に関与する。そこで本研究では、さらに MG 患者の PBMC 中の B 細胞に発現する共刺激分子と MG の病態との関連を検討するとともに、MG における免疫抑制薬物療法が共刺激分子発現に及ぼす影響を検討した。

① MG 患者における T 細胞異常と免疫抑制薬物療法による治療効果との関連

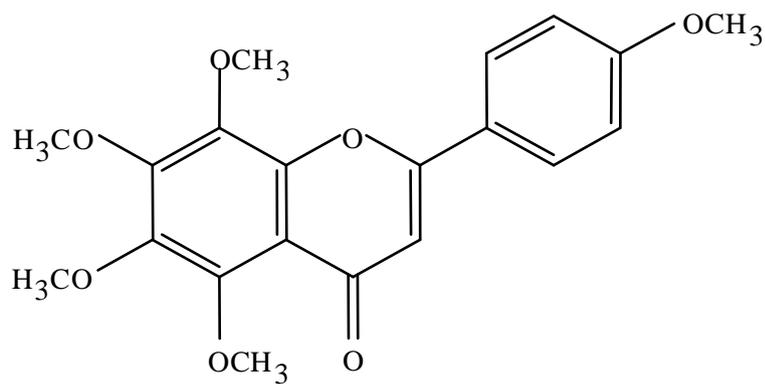
MG 患者末梢 CD4⁺ T 細胞中では、Th1 細胞が優位であり、MG の重症度が高いほど Th1 優位になる傾向があることが示唆された。一方、MG 患者における CD4⁺ CD25⁺ Treg 細胞の割合および PBMC における Foxp3 mRNA 発現量は健常者と比較して有意に低かった。シクロスポリンを治療に用いている患者群では 12 ヶ月経過後に Th2 細胞の割合が上昇し、Th1/Th2 バランスが減少した。一方、プレドニゾロンを治療に用いている患者群では 12 ヶ月経過後に Th2 細胞および Th17 細胞の割合が上昇した。しかしながら CD4⁺ CD25⁺ Treg 細胞の割合と免疫抑制薬物療法との関連はなかった。治療効果の指標として、12 ヶ月間治療後の血漿中抗 AChR 抗体価の変化率、重症度の評価である QMG スコアの変化率およびプレドニゾロン投与患者におけるプレドニゾロンの 1 日投与量変化率を用い、末梢 CD4⁺ CD25⁺ Treg 細胞と治療効果との関連について検討を行った。QMG スコアあるいはプレドニゾロンの 1 日投与量変化率と末梢 CD4⁺ CD25⁺ Treg 細胞の割合の変化率との間に負の相関を認めた。

② MG 患者における B 細胞異常と免疫抑制薬物療法による治療効果との関連

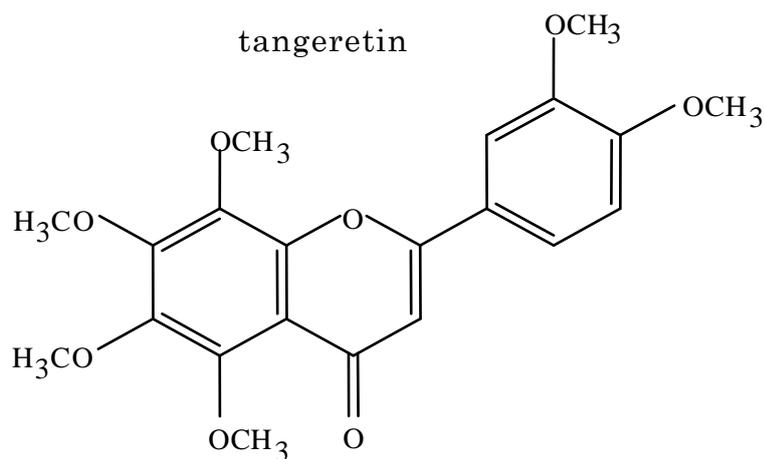
CD19⁺B 細胞中の CD40 発現細胞率は胸腺摘出術の有無に関わらず、MG 患者群で有意に高かったが、CD40 発現細胞率と MG の病態との関連は確認されなかった。胸腺摘出を行った MG 患者群では、CD19⁺B 細胞中の BAFF-R 発現細胞率が胸腺摘出を行っていない MG 患者群と比較して有意に低値を示した。末梢 CD4⁺ T 細胞中の CD40L および ICOS 発現細胞率は MG 患者群および健常者群間で有意差は認められなかった。しかしながら、プレドニゾロンにカルシニューリン阻害薬を併用して治療を行っている患者群では、免疫抑制薬を治療に用いていない患者群と比較して、PMA およびイオノマイシン刺激下における CD4⁺ T 細胞中の CD40L および ICOS 発現細胞の割合が有意に低値を示した。また、健常者 PBMC においても、PMA およびイオノマイシン刺激による CD4⁺ T 細胞中の CD40L および ICOS 発現細胞の誘導が、*in vitro* でシクロスポリンまたはタクロリムスで処理することによって抑制された。

(2) P-糖タンパク質を高発現するヒト T リンパ芽球性白血病細胞に対するポリメトキシフラボノイドの効果

P-糖タンパク質を高発現し各種抗癌薬に対して耐性を示すヒト T リンパ芽球性白血病細胞株 MOLT-4/DNR 細胞と、その親株の MOLT-4 細胞に対する、ポリメトキシフラボノイドのタンゲレチンおよびノビレチン (Fig. 1) の効果を検討した。



tangeretin



nobiletin

Fig. 1 タンゲレチンとノビレチンの化学構造

種々の濃度のタンゲレチンまたはノビレチン存在下に細胞を培養後、細胞に取り込まれる³Hチミジンの放射エネルギーにより、細胞増殖に及ぼすこれらポリメトキシフラボノイドの抑制効果を判定した。その結果、タンゲレチンとノビレチンがいずれの細胞に対しても 15 μ M 以下の濃度で、細胞増殖を 50%抑制することが分かった。またこれらポリメトキシフラボノイドは、細胞増殖を抑制する濃度において MOLT-4/DNR 細胞の P-糖タンパク質機能を抑制することを明らかとした。さらにこれらポリメトキシフラボノイドは、MOLT-4/DNR 細胞とその親株の MOLT-4 細胞のいずれに対しても、アポトーシスを誘導することを示した。

(3) ヒトメラノーマ細胞の *in vitro* 増殖に及ぼす脂溶性ビタミンの効果

ヒトメラノーマ細胞株 A375 細胞の *in vitro* 増殖に及ぼす各種脂溶性ビタミン単独の効果、および各種脂溶性ビタミンに抗癌薬のダカルバジン併用した時の効果を検討した。また、ヒトメラノーマ細胞株 A375 細胞に対する各種脂溶性ビタミン単独、および各種脂溶性ビタミンにダカルバジンを併用した際のアポトーシス誘導作用について検討を行った。その結果、以下のような知見を得た。

- ① VD₃、VK₃およびVK₅が、*in vitro*におけるメラノーマ細胞株 A375 細胞の増殖を抑制することを示した。
- ② VK₃は、ダカルバジンとの併用により A375 細胞の増殖をより強く抑制した。
- ③ ATRA、VE および VK₁には、A375 細胞に対する増殖抑制効果がなかった。
- ④ VK₃とVK₅は、A375 細胞にアポトーシスを誘導した。
- ⑤ VD₃、ダカルバジン、および脂溶性ビタミンとダカルバジンとの併用は、A375 細胞におけるアポトーシス細胞の有意な増加をもたらさなかった。

3. 研究評価及び今後の研究計画

本研究では先ず、MG 患者 PBMC の T 細胞あるいは B 細胞異常と薬物の治療効果との関連を検討した結果、以下のような知見を得た。

すなわち、MG 患者の末梢 T 細胞における Th1 細胞および CD4⁺ CD25⁺ Treg 細胞の異常を明らかとした。免疫抑制薬による治療は、Th1 細胞への分化を抑制し得るものと考えられる。しかしながら、CD4⁺ CD25⁺ Treg 細胞の数あるいは機能を回復することが、MG の治療において有用と考えられた。

また、MG 患者において胸腺摘出術が、CD40 および BAFF を介する B 細胞の活性化を抑制する可能性が示唆された。また、プレドニゾロンとカルシニューリン阻害薬の併用による免疫抑制薬物療法は、CD40L や ICOS を介する T-B 細胞の相互作用を抑制することにより治療効果を示す可能性を提示した。

今後は、これらの情報を MG 治療の個別化に応用するための基盤構築を目指す。すなわち、MG 患者 PBMC の T 細胞あるいは B 細胞異常の簡便な検出法の開発と、それに基づく具体的な治療指針の確立が今後の研究課題である。

一方、P-糖タンパクを高発現する抗癌薬耐性ヒト T リンパ芽球性白血病 MOLT-4/DNR 細胞に対するポリメトキシフラボノイドの効果を検討した結果、タンゲレチンとノビレチンが MOLT-4/DNR 細胞の増殖を抑制し、さらにこれらのポリメトキシフラボノイドが MOLT-4/DNR 細胞の P-糖タンパク質機能を抑制し、また細胞にアポトーシスを誘導することを示した。以上の結果から、P-糖タンパクを高発現する抗癌薬耐性の白血病に対し、タンゲレチンやノビレチンなどのポリメトキシフラボノイドは、P-糖タンパク質機能を抑制しかつ細胞にアポトーシスを誘導することにより、抗白血病作用を示す可能性を提示した。

今後は、正常細胞の増殖に対するポリメトキシフラボノイドの影響や、より強い抗白血病細胞効果を示すフラボノイド類やその他の天然化合物あるいは医薬品を探索することが課題である。

最後に、脂溶性ビタミンがヒトメラノーマ細胞に及ぼす効果の検討から、VD₃、VK₃ および VK₅ が A375 細胞に対して増殖抑制作用を示し、更に VK₃ と VK₅ が A375 細胞にアポトーシスを誘導することを明らかとした。今後、メラノーマ治療におけるこれら脂溶性ビタミンの臨床応用を目指すためには、VK₃ や VK₅ のさらに詳細な抗メラノーマ細胞効果の機序を明らかにする必要がある。また、ヒトメラノーマ細胞を移植したマウスにおける脂溶性ビタミンの抗腫瘍効果について、今後検討する必要がある。

4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) Masuda M, Tanaka S, Nakajima K, Yamada N, Ido N, Ohtsuka T, Nishida M, Hirano T and Utsumi H. Clinical implication of the type 1/type 2 balance of helper T cells and P-glycoprotein function in peripheral T lymphocytes of myasthenia gravis patients. *Eur J Pharmacol* 627: 325-331; 2010
- (2) Ishii K, Tanaka S, Kagami K, Henmi K, Toyoda H, Kaise T, Hirano T. Effects of naturally occurring polymethoxyflavonoids on cell growth, P-glycoprotein function, cell cycle, and apoptosis of daunorubicin-resistant T lymphoblastoid leukemia cells. *Cancer Invest* 28: 220-229; 2010

総説・著書等

- (1) 平野俊彦、免疫抑制療法と免疫療法 腎と透析 66(6):919-925; 2009

国内学会発表

- (1) 田中 祥子、山田 奈緒、中島 佳奈子、増田 眞之、井戸 信博、大塚 敬男、西田 昌史、内海 裕也、平野 俊彦 重症筋無力症患者におけるシクロスポリン療法の有用性に関わる末梢 T 細胞関連因子の研究 第 19 回 日本医療薬学会年会 2009 年 10 月 長崎
- (2) 松本 萌、増田 眞之、田中 千菜美、山田 奈緒、中島 佳奈子、田中 祥子、井戸 信博、大塚 敬男、西田 昌史、伊藤 操、内海 裕也、平野 俊彦 重症筋無力症患者における T 細胞異常と治療応答性との関連 第 80 回 東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会 2009 年 11 月 東京
- (3) 田中 祥子、松本 萌、山田 奈緒、中島 佳奈子、増田 眞之、井戸 信博、伊藤 傑、内海 裕也、平野 俊彦 重症筋無力症患者における末梢 CD4+ CD25+ 制御性 T 細胞および Th17 細胞と治療効果との関連 第 37 回日本臨床免疫学会総会 2009 年 11 月 東京
- (4) 田中 祥子、増田 眞之、松本 萌、井戸 信博、伊藤 傑、内海 裕也、平野 俊彦 重症筋無力症患者における末梢 CD4+ CD25+ 制御性 T 細胞および Th17 細胞と治療効果との関連 第 30 回 日本臨床薬理学会年会 2009 年 12 月 横浜
- (5) 松本 萌、増田 眞之、田中 千菜美、山田 奈緒、中島 佳奈子、田中 祥子、井戸 信博、大塚 敬男、西田 昌史、伊藤 傑、内海 裕也、平野 俊彦 重症筋無力症患者における T 細胞異常と治療応答性との関連 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 岡山
- (6) 田中 千菜美、松本 萌、増田 眞之、山田 奈緒、中島 佳奈子、田中 祥子、井戸 信博、大塚 敬男、西田 昌史、伊藤 傑、内海 裕也、平野 俊彦 重症筋無力症患者におけるカルシニューリン阻害剤による治療の有用性に関する検討 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 岡山

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。本研究の最大の特色は、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

ラミニンの活性ペプチドは様々な活性を有することから医薬分野への応用が期待できるが、ペプチドはそのままでは分解されやすく、組織に長くとどめることは困難である。すなわち、これらのペプチドを医薬分野へ応用するためにはペプチドの活性を効率良く細胞に作用させることが重要になってくる。そこでこれまで、これらの活性ペプチドをキトサン膜に固定化したペプチド-キトサン膜を作成し、組織工学や再生医療への

応用を検討してきた。キトサンは生分解性であり、人工皮膚などの形ですでに臨床応用されている素材で、ペプチド-キトサン膜は人工基底膜として将来的に、創傷治癒や神経再生を目的とした再生医学や組織工学の分野での応用が期待できる。一方で、最近の研究から細胞接着には足場の物理的特性が重要であることがわかってきた。そこで、受容体の異なるラミニンの活性ペプチドを厚さを変えたキトサン膜 ($1.5\text{-}1500\text{ng/mm}^2$) に化学的に固定化し、細胞への接着活性を調べたところ、活性ペプチドによって細胞接着伸展に違いがみられた。例えば、膜貫通型プロテオグリカンであるシンデカンを受容体とする AG73 (RKRLQVQLSIRT) を固定化したキトサン膜上では細胞はキトサン膜の厚みに関係なく接着し、インテグリン $\alpha V \beta 3$ を受容体とする A99 (AGTFALRGDNPQG) を固定化したキトサン膜上では 3 及び 30 ng/mm^2 のとき細胞は強く接着伸展した。PC12 細胞を用いて神経突起伸長の促進活性を検討したところ、A99 を固定化したキトサン膜上において神経系細胞の神経突起伸長は $30\text{-}1500\text{ ng/mm}^2$ 促進されるが、AG73 ではキトサンの厚みに左右されず促進されることがわかった。また、AG73 と A99 を組み合わせてキトサン膜上に結合させたところ、キトサン膜の厚さに関係なく細胞接着、細胞伸展、神経突起伸長が促進されることがわかった。さらに細胞内シグナル分子 FAK のリン酸化も AG73 と A99 を組み合わせることで促進することがわかった。AG73 はシンデカン、A99 はインテグリンをレセプターとして細胞に対し作用することから、今回の研究の結果から細胞表面レセプターの種類により足場の物理的特性が異なること、キトサン膜上で AG73 と A99 を組み合わせるさせることにより異なるレセプター同士の相互作用で生物活性が促進されることがわかった。以上の実験から、ラミニン-111 由来の細胞接着活性をもつペプチドをキトサン膜に固定化することにより、巨大分子ラミニンで起こっているような異なるレセプター同士の相互作用を模倣した、再生医学や組織工学に応用可能な機能性膜の調製が可能であることが示された。これらの研究結果は、(1)Hozumi ら、*Biomaterials*, 31, 3237-43 (2010)などに報告した。

これまでラミニン-111 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。本研究では、これまで同定してきたラミニン-111 由来のアミロイドペプチド (A119: LSNIDYILIKAS, AG97: SAKVDAIGLEIV, B133: DISTKYFQMSLE, and B160: VILQQSAADIAR) にインテグリン $\alpha v \beta 3$ 結合ペプチド RGD を含有させたマルチファンクショナルなペプチドをデザインして、その生物活性を測定した。その結果、RGD を結合させた 4 種類のペプチドはいずれもアミロイド様線維を形成し、細胞接着伸展活性を有することがわかった。また、いずれのペプチドへの細胞接着活性も抗インテグリン αv 抗体で阻害されることから、RGD 配列のインテグリン $\alpha v \beta 3$ 活性が維持できていることが確かめられた。B133 はインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ と結合することがわかっているが、RGD-B133 はインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ とインテグリン $\alpha v \beta 3$ の両方と結合することが示され、マルチファンクショナルな線維形成ペプチドが作成できることが確認できた。さらに、RGD 含有アミロイド様線維形成ペプチドの神経再生医療への応用を期待し、PC12 細胞を用いた神経突起伸長活性を測定した結果、4 種類のペプチドすべてが神経突起伸長を促進した。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、活性ペプチドを不溶化することでペプチドマトリックスとして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。これらの結果は、(2)Ohgaら、*Biomaterials*, 30, 6731-6738 (2010) に報告した。

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。本年度はラミニン由来のペプチドでのスクリーニングから同定した受容体の異なるペプチドを組み合わせて、タンパク質の機能を合成ペプチドを用いることで模倣した。近年、細胞表面レセプターの中でも中心的な役割をしているインテグリンは単体でなく、他のレセプターと相互作用することにより、その活性を促進させていることが報告されている。本研究の結果は、キトサンに結合させたペプチド-キトサン膜上でインテグリン結合ペプチドとシンデカン結合ペプチドの両方を混合させることで細胞接着伸展活性だけでなく、細胞内シグナルも増強されることを証明した。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 22 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 22 年度は特にラミニン-111 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 21 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-キトサンおよびペプチド-アルギン酸膜・ゲルの作成を行う。平成 21 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たが、平成 22 年度は異なる複数種類のペプチドをキトサンおよびアルギン酸膜・ゲルに結合し、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-キトサンおよびペプチド-アルギン酸膜・ゲルを作成し、多機能性材料の開発をはかる。さらに、キトサンとアルギン酸はその物性が異なっていることから、レセプターによって最適な足場が異なってくることが予想され、レセプターと足場の化学的物性の最適化についての検討を行う。アルギン酸はキトサンに比べ比較的粘性の高い物性を有していることからペプチド-アルギン酸ゲルとしての利用が可能であり、利用形態に応じたペプチド-高分子担体の応用化が期待できる。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) Hozumi K, Otagiri D, Yamada Y, Sasaki A, Fujimori C, Wakai Y, Uchida T, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M. Cell surface receptor-specific scaffold requirements for adhesion to laminin-derived peptide-chitosan membranes. *Biomaterials*. 31, 3237-43 (2010).
- (2) Ohga Y, Katagiri F, Takeyama K, Hozumi K, Kikkawa Y, Nishi N, Nomizu M. Design and activity of multifunctional fibrils using receptor-specific small peptides. *Biomaterials*, 30, 6731-6738 (2009)

総説・著書等

- (1) Hozumi K, Kobayashi K, Katagiri F, Kikkawa Y, Kadoya Y, Nomizu M. Mixed Syndecan-and Integrin-Binding Peptides Accelerates Cell Adhesion Through the Synergetic Interactions. *Peptide Science 2009*, 93-96, The Japanese Peptide Society 2010.
- (2) Takeyama K, Katagiri F, Ohga Y, Hozumi K, Kikkawa Y, Kadoya Y, Nomizu M. The laminin B133 peptide (DSITKYFQMSLE) recognizes syndecan and integrin. *Peptide Science 2009*, 55-58, The Japanese Peptide Society 2010.
- (3) 保住建太郎、野水基義
基底膜.
遺伝子医学 MOOK 別冊 ますます重要になる細胞周辺環境（細胞ニッチ）の最新科学技術, 201-205, 株式会社ディカルドゥ, 2009

国際学会発表

- (1) Hozumi K, Yamagata N, Fujimori C, Katagiri F, Kikkawa Y, Kadoya Y, Nomizu M. Peptide-chitosan membranes can mimic the biological activities of laminin alpha1 LG4 module
8th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2009/06, Hayama, Kanagawa
- (2) Kikkawa Y, Takahashi N, Matsuda T, Miwa T, Akizuki T, Kataoka T, Katagiri F, Hozumi K, Nomizu M..
Primary culture of hepatocytes on A13 peptide derived from laminin alpha1 chain
8th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2009/06, Hayama, Kanagawa
- (3) Hozumi K, Yamagata N, Fujimori C, Katagiri F, Kikkawa Y, Kadoya Y, Nomizu M. Peptide-chitosan membranes can mimic multi-functional proteins
Barcelona BioMed Conference, Peptide Engineering Meeting (PEM5), 2009/10, Barcelona, Spain.
- (4) Hozumi K, Yamagata N, Fujimori C, Katagiri F, Kikkawa Y, Kadoya Y, Nomizu M. Mixed peptide chitosan membranes are multifunctional and can mimic the activities of laminin alpha1 LG4 Protein
3rd. Asian-Pacific International Peptide Symposium, 2009/10, Jeju Island, Korea.

- (5) Hozumi K, Sasaki A, Otagiri D, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M.
Laminin active peptides conjugated on chitosan membrane as a cell adhesive matrix
The American Society for Cell Biology: 49th Annual Meeting, 2009/12, San Diego, USA
- (6) Fujimori C, Hozumi K, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M.
Analysis of subtype specific integrin cross-talk using integrin binding peptide conjugated chitosan membranes
The American Society for Cell Biology: 49th Annual Meeting, 2009/12, San Diego, USA

国内学会発表

- (1) 片岡輝、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 A13 (RQVFQVAYII-IKA) を基質に用いたラット肝細胞の培養
第 16 回肝細胞研究会, 2009 年 6 月, 山形
- (2) 佐々木彩乃、小田切大、山田雄二、保住建太郎、吉川大和、片桐文彦、野水基義
ラミニン活性ペプチドを付加した機能性キトサン膜の生物活性
第 58 回高分子討論会, 2009 年 9 月, 熊本
- (3) 保住建太郎、小林一樹、藤森能、片桐文彦、吉川大和、門谷裕一、野水基義
異なる細胞表面受容体間のシナジェティック効果を誘起する医用材料の開発
第 58 回高分子討論会, 2009 年 9 月, 熊本
- (4) 山田雄二、片桐文彦、保住建太郎、野水基義
細胞接着ペプチドを用いた機能性三次元培養システム
第 58 回高分子討論会, 2009 年 9 月, 熊本
- (5) 保住建太郎、小林一樹、片桐文彦、吉川大和、門谷裕一、野水基義
異なる細胞表面受容体に結合するペプチドを用いた受容体間相互作用の解析
第 46 回ペプチド討論会, 2009 年 11 月, 北九州
- (6) 高木雅晴、大賀有希子、竹山一基、片桐文彦、保住建太郎、吉川大和、野水基義
バイオマテリアルとしての細胞接着性ペプチド線維
第 46 回ペプチド討論会, 2009 年 11 月, 北九州
- (7) 山崎ちさと、門谷裕一、保住建太郎、小杉日登美、浅田真一、野水基義、小出隆規
受容体特異的な細胞接着を制御する人工コラーゲンの開発
第 46 回ペプチド討論会, 2009 年 11 月, 北九州
- (8) 山田雄二、野水基義
細胞接着ペプチドの医薬応用再生医療に向けて
第 130 回日本薬学会, 2010 年 3 月, 岡山

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）を伴うものが多く見られる。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、中枢脱髄疾患モデルラットの解析やミエリンの形成・維持に関与すると考えられるタンパク質などの機能解析を行う。そして、これらの解析により、脱髄発症メカニズムの解明や脱髄性疾患治療法の開発を目指す。

2. 研究成果の概要

上記の観点から、本年度はミエリン形成時や脱髄時の白質内で活性化するミクログリア特異的に発現する PLD4 に的を絞り解析を行った。その成果の概要は以下のようになる。

(1) ミエリン形成時白質内や脱髄病巣部で活性化するミクログリアにおける PLD4 の発現

ホスホリパーゼ D (PLD) は、ホスファチジルコリンを加水分解し、コリンとホスファチジン酸 (PA) を生じる酵素である。PLD ファミリーには数種のサブタイプが存在し、PLD1 と PLD2 は、生成した PA により、細胞骨格の再構築、エキソサイトーシス、食・飲作用、癌化、細胞接着や走化性などに関与し、神経系や免疫系などで重要な働きを担うと考えられている。一方、膜貫通ドメインを持つタイプとして PLD3、PLD4、PLD5 などがジーンバンクに登録されているが、それらの機能は未だ全く分かっていない。最近、理研・脳センターの古市氏らにより、生後 7 日にマウス脳梁や小脳白質内の細胞特異的に発現する分子として PLD4 が見いだされた。PLD4 は、PLD1 や PLD2 などと異なり、ホスファチジルコリンを加水分解する酵素活性を持たない新しいタイプの PLD であることが明らかとされている。昨年度の研究では各種細胞マーカーに対する抗体による免疫染色と、PLD4 mRNA に対する *in situ* hybridization (ISH) との二重染色を行い、PLD4 を発現している細胞が、ミエリン形成期の白質内で活性化するミクログリア (アメボイドミクログリア) であることを明らかにした。また、その発現は生後 7 日をピークにしている可能性が示唆された。そこでこれらの結果に基づき、まず小脳白質におけるミエリン形成過程と一致するのかどうかをミエリン形成の指標となるミエリン塩基性タンパク質 (MBP) に対する抗体を用いて免疫染色を行い、PLD4 の ISH 像やミクログリアのマーカーである Iba1 に対する免疫染色像と詳細に比較した。生後 0 日、3 日、5 日、7 日、10 日の小脳パラフィン切片を用いた解析の結果、MBP 陽性像が見られ始める生後 3 日の小脳基部に、PLD4 を発現する Iba1 陽性のアメボイドミクログリアが認められた。また、生後 5 日、7 日と MBP 陽性像が小脳の各葉内部に進みミエリン形成が進行するに従い、活性化ミクログリアも移動するとともに数が増加した。そしてミエリン形成がさらに進んだ生後 10 日には PLD4 発現細胞は減少していた。以上の結果から、PLD4 を発現するアメボイドミクログリアは、明らかにミエリン形成過程とともに移動・増殖し、正常な白質形成に関与していることが示唆された。

一方、ミクログリアは、骨髄単球由来の細胞で、脳の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられている。静止状態にあるラミファイドミクログリアは成熟した正常脳内にほぼ均等に散在し、前述のような発達過程の白質内以外に脳の損傷時や様々な病態時に活性化し、アメボイドミクログリアに変化することが知られている。そこで病態時に活性するアメボイドミクログリアにおいても PLD4 が発現しているのかどうかを確かめるために、脱髄モデルマウス (PLP^{tgf}マウス) を用いて PLD4 の発現を調べた。脱髄病巣部の活性化ミクログリアにおいても PLD4 の発現が認められた。このマウスは、一旦は正常なミエリンを形成するが、その後ミエリンが壊れて、脱髄を起こすマウスである。脱髄が顕著になる 4.5 ヶ月齢のマウス小脳を用いた免疫組織染色では異常な MBP 陽性像を示す病巣部において、Iba1 の強発現が認められ、また、PLD4 抗体による陽性像もその部分に多く認められた。したがって、脱髄病巣部で活性化すアメボイドミクログリアにおいても PLD4 が発現していることが確認された。

(2) ミクログリア系培養細胞を用いた PLD4 の機能解析

活性化したミクログリアにおける PLD4 の機能を明らかにするためには、培養細胞系が有用である。そこで正常な C57BL/6j マウス脳由来の株化ミクログリアである MG6 を用い解析を行った。昨年度の実験では、リポポリサッカライド(LPS)刺激により活性化する MG6 で Iba1 発現の上昇とともに PLD4 発現が上昇した。また、蛍光標識したバイオパーティクルの貪食により生じる食胞に PLD4 が集積することから、貪食に関与している可能性が示唆された。そこで本年度は、貪食作用を中心に、PLD4 の細胞内局在や、RNA 干渉法を用いた PLD4 発現抑制により貪食に影響があるかどうかを調べた。抗 PLD4 抗体を用いた免疫染色では、小胞体や細胞内小胞の他に核内にも存在することが明らかとなった。また早期エンドソームと後期エンドソームのマーカーとの免疫多重染色により、早期エンドソームに多く存在していることが明らかとなった。次に PLD4 特異的な siRNA を用い、PLD4 の発現を抑制したところ、バイオパーティクルを多く貪食した MG6 細胞数が減少していることが FACS による分析で明らかとなった。

3. 研究評価及び今後の研究計画

今回、PLD4 はミエリン形成期の白質内だけでなく、脱髄時の病巣部に存在するアメボイドミクログリアに発現していることが確かめられた。また、ミクログリア系培養細胞を用いた RNA 干渉法による PLD4 発現抑制実験により、PLD4 が貪食に関与していることが明らかとなった。ミクログリアは、中枢神経系において、損傷時や様々な病態時、さらにミエリン形成期の白質内で活性化することが知られている。サイトカインなど種々の液性因子を放出し、同時にアメボイドミクログリアとしてファゴサイトーシスを行い、損傷修復環境やミエリン形成環境を整えていると考えられている。白質変性を伴う難治性疾患の治療法の開発には、発症や変性の過程の理解とともに、ミエリン形成メカニズムの詳細を明らかにすることがミエリン再生過程への応用や脱髄の予防へとつながると考えられる。したがって、これらの過程に関与すると考えられているアメボイドミクログリアの中心的な働きである貪食能にどのように PLD4 が関与しているのかを細胞内外の情報伝達網も含めて明らかにすることは非常に重要である。他の貪食細胞における解析から、ファゴサイトーシスには PLD1 や PLD2 も働いていると考えられているので、ミクログリア系株化培養細胞や初代培養ミクログリア細胞への強制発現系などを用い、PLD1 や PLD2 の働きも考慮しながら、PLD4 の関与するミクログリアの活性化メカニズムやファゴサイトーシスのコントロールメカニズムを明らかにする必要がある。また、現在、スクリーニングまで終わっている組換え ES 細胞を用いて、引き続き PLD4-コンディショナル KO マウスの作製を行い、このマウスの表現型などを解析することが生体内における PLD4 の機能を明らかにするために重要である。

一方、神経系の難治性疾患には末梢神経の脱髄を伴うものも少なくない。また、脱髄損傷部には、貪食能を持ちミクログリアと起源が同じだと考えられているマクロファージの集積が認められている。そこで末梢神経系の脱髄部に集積するマクロファージにも PLD4 が発現しているかどうかを調べるために、末梢神経脱髄モデルマウス

の坐骨神経病巣部における PLD4 の発現を解析する必要がある。

今後進められるこれらの研究は、脱髄性疾患の発症メカニズムの解明や再生治療法並びに予防法の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

該当なし

総説・著書等

該当なし

国際学会発表

(1) Ohtani Y, Yamaguchi Y, Kitani H, Ikenaka K, Sato Y, Furuichi T, Baba H.

Analysis of PLD4 in amoeboid microglia

The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSN Joint Meeting, 2009/8, Busan, Korea

(2) Yamaguchi Y, Ishibashi T, Ishikawa S, Baba H.

Expression of unconventional myosin 1D in CNS myelin

Ninth Biennial Satellite Meeting of the ISN on Myelin Biology, 2009/8, Gyeongju, Korea

国内学会発表

(1) 大谷嘉典、山口宜秀、木谷裕、池中一裕、佐藤友美、古市貞一、馬場広子

アメボイドミクログリアにおける PLD4 の解析

第 52 回日本神経化学会（伊香保）大会、2009 年 6 月、群馬

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（生命科学部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。

このリン脂質代謝の要の酵素である PLC の 1 つ PLC δ 1 は極性のある上皮細胞に発現が非常に多いこと、PLC δ 1 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。特に、組織幹細胞の増殖、分化制御のメカニズム解明により、癌などの疾病治療の他、再生医療発展の基盤作りを目指すことにした。

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リン脂質代謝が関与している

第一に、上皮系がん細胞である乳癌細胞での浸潤突起形成において、リン脂質の重要性を検討した。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ので、抗 PIP2 抗体を細胞に導入した所、浸潤突起の形成が抑制されたことから、PIP2 が突起形成に必須であることが判明した。こうした結果は浸潤突起形成における PIP2 の重要性を強く示している。またこうした浸潤突起形成には PIP2 を含む脂質 Raft の形成が必須であることを明らかにした。

次に PIP2 を基質として PI3 キナーゼによって産生される PIP3 が浸潤機構に関与することが示唆されているので、PI3 キナーゼ、PIP3 の浸潤突起形成における重要性を検討した。まず PI3 キナーゼ阻害剤である Wortmannin や LY294002 で MDA-MB-231 細胞を処理した所、浸潤突起形成が抑制されることが明らかになった。また PIP3 の局在とその浸潤突起形成における役割を検討するため、PIP3 特異的プローブである Akt・PH ドメインを発現した所、浸潤突起を含む細胞膜が染色された。また Akt・PH ドメインの過剰発現により、浸潤突起形成が阻害された。これらの結果は、浸潤突起形成に PIP3 が不可欠であることを示している。

更に大腸癌細胞を用いて E-カドヘリンの発現における PIP2 の役割を検討した。大腸癌において悪性度と E-カドヘリン或いは vitaminD receptor (VDR) の発現レベルは互い

に逆相関することが報告されている。大腸癌細胞SW480はVDRを発現しており、vitaminD3誘導体で処理するとE-カドヘリンの発現が誘導されて上皮様に分化することから、SW480/VDR シグナル応答系のシステムは大腸癌治療に関する良いモデル系となる。E-カドヘリンの発現にPIP2が何らかの役割を担っていると考え、種々のPIP2合成酵素アイソザイムのsiRNAを行い、E-カドヘリン発現への影響を検討した。その結果、PIPKIIβのRNAiにより、E-カドヘリンの発現が顕著に抑制された。このことはPIPKIIβを介したPIP2合成が大腸癌細胞でのE-カドヘリンの発現制御に重要な役割を持つことを示している。以上のことは、癌細胞の機能にPIP2、PIP3が不可欠であること、更にPIP2/PIP3のバランスが浸潤突起形成や細胞接着・細胞極性形成に重要であることを示している。

(2) 毛形成における PLCδ1 の役割

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。これまでにヌードマウスと PLCδ1KO マウスの類似性を、皮膚切片の光顕像、電顕像観察により比較し明らかにしてきた。また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、Foxn1→PLCδ1→mHa3 というシグナルの流れが存在することが示した。そこで次に、「ヌードマウスの体毛減少は PLCδ1 欠損が原因である」ことの個体レベルでの検証を行なうために、ヌードマウスの原因遺伝子である Foxn1 プロモーター制御下で PLCδ1cDNA を発現するトランスジェニックマウスを作製し、ヌードマウスと交配させることによりヌードマウスに Foxn1 プロモーター制御下の PLCδ1 を強制発現させたマウスを作製した。ヌードマウスの体毛減少が PLCδ1 の発現低下のみで説明できるのであれば、ヌードマウスに PLCδ1 を発現させることにより、体毛が正常に形成されるようになることが期待される。現在までの解析では、毛形成は回復していないが、毛包は形成され、ヘアケラチンも部分的に回復することが判明した。このことから、Foxn1 の下流には PLCδ1 以外の分子を介したシグナル経路が存在し、ヘアケラチンの発現に関与することが示唆された。

Foxn1 の下流で毛の形成に関わる分子として Notch が報告されている。そこで PLCδ1KO マウスの毛包での Notch の発現を *in situ* hybridization で調べた所、顕著な減少が観察された。皮膚全体を用いた qRT-PCR では PLCδ1KO マウスで減少がみられないことから、Notch の減少は毛包特異的な減少である事が判明した。このことは、毛包形成において、Foxn1 の下流で PLCδ1 および Notch が働いていることを示唆するものである。

3. 研究評価及び今後の研究計画 1200

(1) 上皮系がん細胞の浸潤突起形成・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 が必要であることを示した。現在浸潤突起形成における PI 3 キナーゼの重要性、特に PI3 キナーゼの中でどのアイソザイムが重要な役割を果たしているかを解析しており、浸潤突起形成における PIP2/PIP3 のバランスの全容解明に向けて今後更に検討していきたい。またこうした事実は癌細胞の浸潤転移において、イノシトールリン脂質が分子標的薬となり得ることを示しており、応用性も期待できる。アッセイ系を立ち上げ、化合物ライブラリーを用いたスクリーニングも検討していく予定である。

(2) 毛形成における PLC δ 1 の役割

PLC δ 1K0 マウスとヌードマウスとの類似性を検討した結果、ヌードマウス原因遺伝子である Foxn1 からのシグナルを PLC δ 1 が受け、ヘアケラチンである mHa3 にシグナルを出していること示した。「ヌードマウスの体毛減少は PLC δ 1 欠損が原因である」ことの個体レベルでの検証を行なうために、ヌードマウスの原因遺伝子である Foxn1 プロモーター制御下で PLC δ 1cDNA を発現するトランスジェニックマウスを作製し、ヌードマウスと交配させることによりヌードマウスに Foxn1 プロモーター制御下の PLC δ 1 を強制発現させたマウスを作製した。この結果、トランスジェニックマウスでは毛形成が部分的に回復することが判明した。このことは、Foxn1 の下流には PLC δ 1 以外の分子を介したシグナル経路が存在し、ヘアケラチンの発現に関与することを示唆している。そこで Foxn1 の下流で毛形成に関与する Notch に着目し、PLC δ 1K0 マウス毛包での Notch の発現を検討した所、Notch の発現が顕著に抑制している事が判明した。このことは Foxn1 \rightarrow Notch \rightarrow PLC δ 1 のシグナルが毛包形成に極めて重要であることを示している。Notch は皮膚幹細胞の分化制御において、必須な役割を担う分子であり、PLC δ 1 が皮膚幹細胞の分化制御機構に重要であることを示唆するものである。今後他の組織幹細胞での分化制御にも PLC δ 1 がどのように関与しているのかを明らかにしていくことが重要であると考えられる。

4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) Mizokami A, Tanaka H, Ishibashi H, Umabayashi H, Fukami K, Takenawa T, Nakayama KI, Yokoyama T, Nabekura J, Kanematsu T, Hirata M. GABAA receptor subunit alteration-dependent diazepam insensitivity in the cerebellum of phospholipase C-related inactive protein knockout mice. *J. Neurochem.* in press
- (2) Okada M, Taguchi K, Maekawa S, Fukami K, Yagisawa H. Calcium fluxes cause the nuclear shrinkage and translocation of phospholipase C-d1 into the nucleus. *Neurosci. Lett.* **472**, 188-93 (2010)
- (3) Yamaguchi H, Yoshida S, Muroi E, Kawamura M, Kouchi Z, Nakamura Y, Sakai R, Fukami K. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase Ia are required for invadopodia formation in human breast cancer cells. *Cancer Sci.* 101,1634-38 (2010)
- (4) Kanemaru K, Nakahara M, Nakamura Y, Hashiguchi Y, Kouchi Z, Yamaguchi H, Oshima N, Kiyonari H, Fukami K, Phospholipase C-eta2 is highly expressed in the habenula and retina. *Gene Expr. Patterns.* **10**, 119-126 (2010)
- (5) Fujii M, Kanematsu T, Ishibashi H, Fukami K, Takenawa T, Nakayama KI, Moss SJ, Nabekura J, Hirata M. Phospholipase C-related but catalytically inactive protein is required for insulin-induced cell surface expression of g-aminobutyric acid type A receptors. *J. Biol. Chem.* **285**, 4837-46 (2010)
- (6) Matsuda M, Tsutsumi K, Kanematsu T, Fukami K, Terada Y, Takenawa T, Nakayama KI, Hirata M. Involvement of phospholipase C-related inactive protein

in the reproductive system through the regulation of gonadotropin levels. *Biology of Reproduction*. **81**, 681-689 (2009)

- (7) Yamaguchi H, Shiraishi M, Fukami K, Tanabe A, Ikeda-Matsuo Y, Naito Y, Sasaki Y. MARCKS regulates lamellipodia formation induced by IGF-I via association with PIP₂ and beta-actin at membrane microdomains. *J. Cell. Physiol.* **220**, 748-55 (2009)
- (8) Yamaguchi H, Takeo Y, Yoshida S, Kouchi Z, Nakamura Y, Fukami K. Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Res.* **69**, 8594-8602 (2009)

総説・著書など

- (1) Fukami K, Inanobe S, Kanemaru K, Nakamura Y. Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating balance of phosphoinositides. *Progress in Lipid Research* (in press)
- (2) Nakamura Y, Fukami K. Roles of phospholipase C isozymes in organogenesis and embryonic development. *Physiology*. **24**, 332-41 (2009).

国際学会発表

- (1) Ishii R, Hirata M, Suzuki M, Matsuoka S, Nakamura Y, Kouchi Z, Yamaguchi H, Sasaki T, Kitamura T, Fukami K. Physiological functions of phospholipase C $\delta 1$ in adipose tissue development and obesity (part1), The 6th Japan-Korea Conference on cellular signaling for young scientists, 2009/11, Nagasaki
- (2) Shibayama N, Kouchi Z, Fukuda T, Igrashi T, Nakamura Y, Yamaguchi H, Yanagi S, Fukami K. Phospholipase C $\delta 3$ is involved in neurite outgrowth of cerebral cortical neurons and Neuro2A cells, The 6th Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2009/11, Nagasaki
- (3) Inanobe S, Nakamura Y, Ichinohe M, Hirata M, Kouchi Z, Yamaguchi H, Fukami K. Lack of phospholipase C $\delta 1$ accelerates skin wound healing, The 6th Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2009/11, Nagasaki
- (4) Sugiyama M, Sakaue-Sawano A, Iimura T, Fukami K, Kitaguchi T, Kawakami K, Okamoto H, Higashijima S, Miyawaki A. Illuminating Cell-Cycle Progression Inside Developing Zebrafish Embryo -A novel insight of early skeletogenesis, The 26th Naito Conference on Osteobiology, 2009/11, Awaji
- (5) Nakamura Y, Ichinohe M, Takahashi S, Inanobe S, Kanemaru K, Fukami K, Phospholipase C- $\delta 1$ Regulates Hair Keratin Expression And Hair Shaft Formation Downstream of Foxn1, The American Society for Cell Biology 49th Annual meeting, 2009/12, San Diego

国内学会発表

- (1) 太田百絵、豊田雅士、山崎-井上麻由、深見希代子、梅澤明弘. ヒト間葉系幹細胞の骨分化における糖脂質糖鎖の機能解析、第3回 GLIT(糖鎖産業技術フォーラム)、2009/5、東京

- (2) 深見希代子、生命現象におけるリン脂質代謝の重要性、国立生育医療センターセミナー、2009/5、東京（招待講演）
- (3) 山口英樹、竹尾由希子、吉田周平、河内全、中村由和、深見希代子. 浸潤突起形成における脂質ラフトとカベオリンの役割、第61回日本細胞生物学会（ワークショップ）、2009/6、名古屋
- (4) 柴山奈美、河内全、五十嵐隆公、中村由和、山口英樹、深見希代子. Phospholipase C δ 3はNeuro2a細胞における神経突起伸長に関与する、第61回日本細胞生物学会大会、2009/6、名古屋
- (5) 平田真之、石井里佳、一戸学、中村由和、河内全、山口英樹、深見希代子. 肥満におけるホスホリパーゼC δ 1の生理機能解析、第61回日本細胞生物学会大会、2009/6、名古屋
- (6) 稲野邊俊一、中村由和、一戸学、平田真之、河内全、山口英樹、深見希代子. 創傷治癒におけるホスホリパーゼC δ 1の役割、第51回日本脂質生化学会、2009/7、名古屋
- (7) 河内全、五十嵐隆公、柴山奈美、中原真道、中村由和、山口英樹、深見希代子. Neuro2a細胞の神経突起伸長におけるPLC δ 3の機能解析、第51回日本脂質生化学会、2009/7、名古屋
- (8) 山口英樹、深見希代子. 脂質ラフトとカベオリン-1はヒト乳癌細胞による浸潤突起形成及び細胞外基質の分解に必要である、第68回日本癌学会学術総会、2009/10、横浜
- (9) 岡本奈緒子、安川麻美、毎田佳子、工富知子、深見希代子、William C. Hahn、増富健吉. hTERTと核小体GTP結合タンパク質GNL3L/NSは腫瘍形成能を制御する、第68回日本癌学会学術総会、2009/10、横浜
- (10) 深見希代子、平田真之、石井里佳、一戸学、中村由和、ホスホリパーゼC δ 1は様々な生理機能に関与する、第82回日本生化学会大会、2009/10、神戸（シンポジウム、招待講演）
- (11) 中村由和、一戸学、平田真之、高橋佐織、深見希代子. ホスホリパーゼC δ 1はFoxn1下流に位置し毛の形成を制御している、第82回日本生化学会大会、2009/10、神戸
- (12) 河内全、小堀真平、宮崎聡一郎、中村由和、山口英樹、深見希代子. 大腸癌細胞におけるvitaminDレセプター依存的なE-cadherinの発現誘導にPIP kinase II β が関与する、第82回日本生化学会大会、2009/10、神戸
- (13) 金丸佳織、中村由和、河内全、山口英樹、深見希代子. 白血球の機能、分化におけるホスホリパーゼC δ 1の機能解析、第82回日本生化学会大会、2009/10、神戸
- (14) 高橋佐織、一戸学、中村由和、平田真之、河内全、山口英樹、深見希代子. PLC δ 1による毛包形態および毛の構成ケラチン発現の制御、第82回日本生化学会大会、2009/10、神戸
- (15) 石井里佳、平田真之、鈴木睦美、松岡翔一、中村由和、河内全、山口英樹、深見希代子. 脂肪細胞形成におけるホスホリパーゼC δ 1の生理機能解析、第82回日本生化学会大会、2009/10、神戸

- (16) 深見希代子、リン脂質代謝が創る生命のしくみ、群馬大学生体調節研究所グローバルCOE 特別セミナー、2009/2、前橋（招待講演）
- (17) 岡本奈緒子、安川麻美、毎田佳子、工富知子、深見希代子、William C. Hahn、増富健吉. The interaction of hTERT and nucleolar GTP-binding protein GNL3L and Nucleostenmin regulates tumor initiating cell behavior、第32回日本分子生物学会年会 2009/12、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環境汚染物質（タバコの煙、オゾン、ニトロサミン等）の曝露との関連も報告されている。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細胞への分化と関連することや、喫煙が原因の一つである肺小細胞癌(SCLC: small cell lung cancer)の起源細胞であることが示唆されている。

神経内分泌細胞は、末梢肺気道上皮細胞の障害修復時に、細胞増殖と分化を制御する役割が示唆されている。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前駆細胞からクララ細胞への分化を促進する作用を有する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、その分化過程の詳細な解析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、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、Ash1の肺神経内分泌細胞への分化における役割を検討する目的で、Ash1強制発現系、また、Notchの役割を検討する目的でγセクレターース阻害剤を用いて、さらに研究を進めた。

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。Ash1 遺伝子のノックアウト動物は肺に神経内

分泌細胞がほとんど、見いだされない。そして、出生後に死亡することが知られている。しかし、Ash1 の発現によって、肺組織幹細胞、あるいは、神経内分泌前駆細胞から肺神経細胞への分化が誘導されるかは明らかではない。そこで、本年度は、Ash1 の強制発現系を作製することを試みた。

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中枢神経系の発達過程の研究から報告されている。一方、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上皮細胞に傷害を与えると Shh の発現が増加した後に神経内分泌細胞への分化誘導がみられるという報告がなされた。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、シグナル伝達経路を活性化される。すると Gli および Ptc の転写を活性化する。さらに、Gli は Shh 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。中枢神経系の研究から Hes1 は Notch1 により制御されていることが示されている。しかし、このような調節系が肺の発達過程で機能していることの証明はなされていない。また、視神経の分化過程で Hes1 の制御は Notch1 ではなく Shh によってなされているという報告が近年なされた。このようなことから、肺の神経内分泌細胞への分化過程への Shh の関与を *In vitro* の系を用いて明らかにすることは大変興味深い。そこで、Shh 系を阻害する薬剤を用いてその影響を検討することとした。

本研究では、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 とカルシトニン遺伝子関連ペプチド (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 シグナル系に関連した 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の推定を昨年度に引き続き解析した。

In vitro における肺神経内分泌細胞分化を次のように誘導した。肺上皮幹細胞と考えられているハムスター由来の M3E3/C3 細胞をコラーゲンゲルを形成させた Dish 上に低密度で播種し 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 (N₂65%、O₂20%、CO₂15%) で 2 日間 (N2)、4 日間 (N4)、あるいは低酸素 (N₂85%、CO₂15%) で 2 日間 (H2)、4 日間 (H4) 培養した。NEC への分化程度はおもにグリメリウス染色法と抗 CGRP 抗体を用いた蛍光抗体法により判定した。

(1) Ash1 強制発現の影響

肺神経内分泌細胞への細胞分化に Ash1 が必須であることは Ash1 欠損マウスの解析から明らかにされている。Ash1 欠損マウスは神経内分泌細胞が肺組織にほとんど存在せず、また、我々が用いている細胞培養系においても Ash1 mRNA のノックダウンによって神経内分泌細胞への分化が抑制される傾向を示した。しかし、NeuroD や Math3 が神経内分泌細胞への分化に重要な働きを果たしているとする結果も報告されている。我々が用いている *In vitro* 細胞分化系は因子間の相互作用を解析する優れた実験系であり、Ash1 の発現が神経内分泌細胞分化の十分条件であるか否かを検討することが可能である。そこで、ハムスターあるいはヒトの Ash1 タンパク質を強制発現する系を作成

することを試みた。

今回、CMV プロモーターの下流に Ash1 全長のカクボキシル末端に 3XFlag の融合タンパク質を発現するベクターを構築した。このタンパク質発現プラスミッドを HeLa 細胞、M3/C3E3 ハムスター胎仔肺由来細胞にリポソーム法を用いてプラスミッド遺伝子を導入した。一過性の発現では、遺伝子導入後、1 日、2 日、3 日後に細胞を固定し観察した。また、安定発現細胞株を分離し、検討を加えた。すなわち、強制発現 2 日後に、ネオマイシンを培養液に添加しネオマイシン体制株を分離した。その後、Ash1 安定発現細胞をコラーゲンゲル上に培養し、神経内分泌細胞への分化を試みた。

Ash1 一過性の発現細胞において、Ash1 は主に核に発現した。HeLa 細胞、あるいは、M3/E3C3 細胞への強制発現によって、細胞の形態に変化はなく、Ash1 発現のみによって神経様細胞への分化は観察されなかった。また、コラーゲンゲル上への培養を行ったが、細胞形態の変化は観察されなかった。

(2) Ash1 欠失変異体の強制発現の影響

Ash1 タンパク質は 236 このアミノ酸からなり、14 個の連続したグルタミン配列 (Poly-Q 配列) がアミノ酸 50 番目から存在する。また、Poly-Q 配列は遺伝的な多型を示し、この配列の長さや疾患の関連性も指摘されている。また、Pro18Thr 変異のヘテロ型は遺伝的低換気症の原因となり、Ash1 タンパク質の 111-115 番目までのアミノ酸の欠失変異も遺伝的低換気症をもたらす。さらに、アミノ酸 34 番目から始まるポリアラニン配列のアラニン 13 個のうち 8 個を欠失した変異は遺伝的低換気症と結腸肥大症 (Haddad Syndrome) の原因となることが知られている。そこで、完全長、また、Polyalanine および Polyglutamine を欠失した変異 Ash1 タンパク質をハムスター胎仔由来の M3E3/C3 細胞、ヒトグリオーマ細胞 (T98G)、褐色細胞腫細胞 (PC12)、および、ヒト肝がん細胞 (HepG2) に強制発現させることを試みた。野生型の Ash1 はいずれの細胞を用いたときにも、主に核に存在した。また、PolyAQ 欠失タンパクは、M3/E3C3 細胞、T98T 細胞、PC12 細胞では、主に細胞質に存在した。しかし、HepG2 細胞では核に存在した。これらの結果は、PolyAQ 配列が、細胞内分布に重要な働きを果たしている可能性を示唆した。

(3) Notch 阻害剤添加の影響

Notch は細胞膜に存在する受容体で、隣接する細胞に発現している膜結合性のリガンド、例えば、Jagged などによって活性化される。その後、Notch の細胞質内ドメインが γ セクレターゼによって切断されて、切断ペプチド断片が標的遺伝子の転写を活性化する。神経内分泌細胞ではその標的遺伝子が Hes1 であると推定されている。Hes1 は Ash1 の転写抑制因子として機能する。今回、Notch 阻害剤の DAPT を M3/E3C3 細胞の分化培養系に添加してその影響を検討した。その結果、神経内分泌細胞への分化を促進する傾向を認めた。

3. 研究評価及び今後の研究計画

今回の実験から、Ash1 の強制発現のみによって神経内分泌細胞への分化が起きないことが示され、Ash1 は神経内分泌細胞分化の必要条件ではあるが、十分条件ではないことが示された。神経細胞への分化因子としてこれまで、Ash1 に加えて、NeuroD が知

られていた。近年、マウス胚性線維芽細胞を神経幹細胞へ分化転換を誘導する因子として **Ash1**、**Brn2**、および、**Myt1l** が同定されて。転写因子として機能するこれら 3 遺伝子の導入により、誘導性神経幹細胞が得られ、神経再生への応用が期待されている。しかし、これら 3 因子の誘導によって分化する神経細胞は中枢神経細胞の特徴を有しており、肺神経内分泌細胞のような末梢感覚神経と性質を有していない。今後、本培養システムを応用することによって、**serotonin** 合成を行う末梢感覚・自律神経系細胞への分化誘導因子が同定されるものと期待される。

これまで、主に哺乳動物の中枢神経細胞の分化系を用いた研究から、神経細胞分化における **Ash1** 発現の重要性と **Hes1** による制御が論じられてきた。ラット胎児（妊娠 16 日目）の脳から中枢神経系幹細胞を分離し、**PDGF**（血小板由来増殖因子）の添加によって神経細胞への分化を誘導した。その過程で、**PDGF** 添加前には、**Hes1** は **Ash1** プロモーター上で転写抑制複合体を形成し、さらに、**Hes1** は ClassC 型の **Ebox** 配列に結合して転写を抑制していることが示された。この過程で、**TLE** 転写抑制共役因子と相互作用し、その複合体には **PARP1** (**poly(ADP-ribose) polymerase1**) が含まれる。さらにこの抑制複合体はヒストン脱アセチル化酵素複合体と相互作用して **Ash1** の転写を抑制している。**PDGF** の添加によって細胞内の Ca^{++} 濃度が上昇し、この上昇が、**CaMKII δ** (**Ca-dependent protein kinase II δ**) の活性化をもたらす。活性化した **CaMKII δ** は **PARP1**、**TLE1** をリン酸化し、**PARP1** のリン酸化によって一連のタンパク質の **ADP** リボシル化が起き、ヒストン脱アセチル化酵素複合体および **TLE1** 転写抑制共役因子は **Hes1** 複合体から解離する。これら抑制複合体に代わって、ヒストンアセチル化複合体が **Hes1** 複合体と相互作用し **Ash1** の転写が開始され、神経細胞への分化誘導が起こることが報告されている。

Ash1 の転写を活性化する配列として、神経芽腫 (**Neuroblastoma**) を用いた研究から **Ash1** 転写開始上流 4 **Kbp** 付近に **Gata** 結合サイトや **CREB** 結合サイト、さらに、**E-box** 配列が関与するエンハンサー配列の存在が指摘されている。これらの配列には **CREB/ATF** 因子、**N-Myc** 因子、そして、**CBP** などの共役因子の結合が関わる。そのほか、これらエンハンサー領域には、**AP-1**、**Oct-1**、**BMP**、**NKX-2** などの転写調節因子の結合配列の存在が明らかになっている。さらに、成熟ラットの脳で神経細胞の増殖が観察されている海馬の歯状回 (**dentate gyrus**) および脳室下帯 (**subventricular zone**) は **Ash1** を発現しており成熟動物の中枢神経細胞の分化においても胎児期と同様に **Ash1** タンパク質が重要な働きを行っていると考えられている。この細胞分化には **apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)**タンパク質、および、**all-trans retinoic acid (ATRA)** の刺激が引き金となり **Myocyte enhancer factor 2C (MEF2C)** の活性化が重要であることが成熟ラット脳の花馬から分離した神経前駆細胞から神経細胞への分化過程で重要な役割を果たしていることが報告されている。本因子が結合可能な **DNA** 配列がヒト **Ash1** プロモーター上の転写開始点から 1 **k b p** 上流までの領域に 2 カ所存在することが知られている。

このように **Ash1** 発現制御系として複数エンハンサーの存在が知られており、胎児肺気道上皮細胞から神経内分泌細胞への細胞分化過程において **Ash1** 発現の制御系を明らかにすることは重要である。これらの解明は、これまで治療法がほとんど知られていな

かった難治性疾患の治療の糸口の提供につながるものと期待される。

Ash1 の変異が低換気症などの疾病と関連することが知られている。Ash1 の Polyalanine 配列は、鳥類からほ乳動物への進化の過程で獲得された配列であることが明らかにされている。しかし、その役割については不明な点が多い。Polyalanine の繰り返し伸長すると、タンパク質の溶解性が低下し神経細胞の機能を阻害することが報告されている。今回の実験結果は、Polyalanine および Polyglutamine 配列は、細胞内局在を制御する配列であることが示唆しており、今後詳細な解析が期待される。

4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) Yoshimi T, Hashimoto F, Takahashi S, Takahashi Y.
Suppression of embryonic lung branching morphogenesis by antisense oligonucleotides against HOM/C homeobox factors.
In Vitro Cell. Dev. Biol. (In Press)

国際学会発表

- (1) Tatsuya Yoshimi, Shin-ichi Yokobori, Yuji Takahashi, Yoshio Sugaya, and Takashi Miura. A study for environmental assessment of pollutants using HSP70-cognate genes in Chironomidae. 3rd International Symposium on Environmental Physiology of Ectotherms and Plants (ISEPEP3) 2009/8, Tsukuba, Japan

国内学会発表

- (1) Fujii K, Chida Y, Umemura M, Yoshimi T, Takahashi S, Takahashi Y.
Acceleration of pulmonary neuroendocrine cell (PNEC) differentiation by Shh signal inhibitor. 第31回日本分子生物学会年会、2009/12、横浜
- (2) 清水悠介、須永絵理、高橋勇二、根本直、NMR-メタボリック・プロファイリングによるマウス新生仔尿の解析、2010年 ICGN マウス研究会、2010/02、茨木市

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、この相互作用の以上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21年度の当初の研究計画は以下のものであった。

- (1) 平成18年度には、海馬アストロサイトがシナプスから放出される伝達物質に応答して示す電位、電流およびCa応答を、電気生理学的手法および高速Caイメージング法を用いて検討し、海馬錐体細胞において新規なプラトー状電位の発生を確認した。平成19年度には、この電位がシナプス外NMDA受容体の活性化に起因するものであることを明らかにした。平成20年度は、このプラトー電位の発生に伴う細胞内Ca濃度変化を高速Caイメージング法を用いて検討し、尖頭樹状突起では、電位依存性Caチャンネルをブロックした条件の元においても細胞内Ca濃度が上昇し、そのCa上昇はNMDA受容体のグリシン結合部位の選択的阻害薬によって消失することを見出した。平成21年度は主に基底樹状突起における細胞内Ca濃度を検討する。
- (2) 細胞外電位を介する非シナプスの相互作用の存在を検討するため、高速Caイメージング及び電位イメージングによって海馬ニューロンの集団的活動を解析する。
- (3) 非シナプスの相互作用によって神経細胞の活動が調節されるメカニズムを、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、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応答を検討する。本年度はラット味蕾の味覚の特性を解析する。
- (4) ショウジョウバエ神経系において、出力の決定にどのような様式のニューロン間相互作用が関与しているかを検討する目的で、神経発火パターンの解析と神経筋接合部における逆行性情報伝達の解析を行う。

2. 研究成果の概要

上記の観点から平成 21 年度には海馬スライス標本内 CA 1 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) 昨年度の研究では海馬スライス標本内 CA 1 野錐体細胞に発生する NMDA 受容体の活性化によって発生するプラトー電位に伴う細胞内 Ca 濃度変動を、Ca イメージング法を用いて検討した。その結果、尖頭樹状突起では電位依存性 Ca チャンネルをブロックした条件の元においても細胞内 Ca 濃度が上昇し、その Ca 上昇は NMDA 受容体のグリシン結合部位の選択的阻害薬によって消失することを見出した。本年度は基底受容突起において検討するとともに、尖頭樹状突起における応答との比較検討を行った。その結果、基底樹状突起においても尖頭樹状突起と同様にプラトー電位に伴って顕著な細胞内 Ca 濃度が見られることを確認した。しかしながら、この Ca 濃度上昇は電位依存性 Ca チャンネルをブロックした条件では消失した。尖頭樹状突起においても、さらに詳細な検討を行った結果、プラトー電位に伴う Ca 濃度上昇は、尖頭樹状突起においても電位依存性 Ca チャンネルをブロックした条件では消失することを確認した。細胞外液の Mg イオンを除去した条件でも結果は同じであった。以上のことから得られる結論は、プラトー電位には顕著な細胞内 Ca 濃度上昇が伴うが、その経路は電位依存性 Ca チャンネルからの Ca 流入に依存するものであるということである。
- (2) 以前より、シナプスを介さないニューロン間相互作用の機序として、細胞外電位を介した相互作用の可能性を検討してきた。本プロジェクトにおいてニューロン間相互作用の研究に高速イメージング法を用いることを計画し、昨年度は電位イメージング法を用いてシナプス電位の伝播に対する細胞外電位勾配の影響を検討した。本年度は、それに加え、高速 Ca イメージングを用いて多数の海馬ニューロンの活動を検出し、細胞外電場に対する応答を検討する計画を開始した。その第一段階として、多数の神経細胞に Ca 色素を負荷する方法の開発及び予備的な電場応答の解析を行った。その結果、Bolus loading 法によって、ラット海馬スライス標本内の多数の錐体細胞から、同時かつ個別に Ca 変動を記録する事が可能となった。直流電場に対する応答を検討したところ、細胞体において、5mV/mm 程度の電場に対して自発 Ca 変動頻度に変化がみられることを確認し、さらにより強い電場に対して Ca レベルの増減が見られることを見出した（伊藤智久、修士学位論文「海馬スライス標本において CA 1 局所回路網内細胞集団の活動を個別に解析するための実験系の構築」。）Ca イメージングのデータを統計的に処理してノイズを除去し、Ca 濃度に変換するためのアルゴリズムを並行して開発した（角田）。

電位イメージングによって以前に得ていた実験結果の理論的解釈のために、一端にリークを持つ単純ケーブルの電場応答についてケーブル方程式を解き、交流電場に対する応答を理論的に予想した（毛内）。分岐を持つケーブルについての計算論的解析を進めている（青山）

- (3) 化学感覚に関係する神経細胞・味細胞の非シナプスの細胞間相互作用についての研究では、1) 酸味の味細胞集団による受容機構について、TRP チャンネルファミリーの一つをコードする PKD113 の機能について解析を行った。PKD113 ノックアウトマウス

の鼓索神経活動の神経記録を行い、その成果をChemical Senses誌に刊行した("Taste Function in Mice with a Targeted Mutation of the PLD113 gene" T. M. Nelson et al., 2010)。2)マウス舌スライス標本を用いた、Ca蛍光指示薬の味細胞への導入法の改良を行った。(菊地琴美卒業論文『ホールセルパッチクランプ法によるマウス舌スライス標本中の味細胞の味覚応答記録法の確立』) 3)マウス大脳の味覚皮質細胞集団からのCa応答記録法を確立した。(渡邊晋太郎卒業論文『Ca²⁺イメージング法を用いた味覚刺激に対するInsular Cortexの反応の測定』)

- (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に関し、ショウジョウバエ幼虫が運動する際にみられる、体節間に伝わる神経発火のパターンについて解析した。その結果、左右の同体節では、同期した発火パターンが、前後の体節では、一定の時間差を持って、発火パターンが伝わるということが明らかになった。この、後者の、前後の体節への発火パターンの伝播が正常に行われるためには、感覚神経細胞の、樹状突起の形態が正常であることが重要であることも明らかにした。

3. 研究評価および今後の研究計画

NMDA受容体のアンタゴニストが統合失調症の陽性症状および陰性症状に良く似た症状を誘起すること等から、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。通常はシナプス後膜に存在するNMDA受容体の活性化を想定して発症メカニズムを検討するが、NMDA受容体は他のグルタミン酸受容体に比べてアフィティが高く、シナプス外に存在する受容体の関与を検討すべきである。我々の見出したNMDA受容体依存性プラトー電位はシナプス外受容体の漏洩グルタミン酸による活性化によって生じるものであり、統合失調症の発生機序解明のための重要な鍵となる可能性が考えられる。

本研究によってプラトー電位に伴って顕著なCa濃度上昇がみられること、さらにCa濃度上昇の経路が電位依存性Caチャンネルであることを示すことができた。次の段階として、シナプス外に存在するNMDA受容体の機能が局所神経回路網のシナプス応答の決定にどのように関与し、ひいてはその不全が統合失調症などの精神障害にどのように関与するのかを検討する計画である。その為の予備的研究として海馬神経回路網の多数のニューロンの活動を同時的に観察する手法を開発してきたが、ようやく実用段階に達した。細胞外電場刺激によって樹状突起先端部に分布するNMDA受容体を活性化することが可能であるので、Ca濃度変化を指標として、「細胞外電位を介する非シナプ斯的相互作用」と「漏洩グルタミン酸を介する非シナプ斯的相互作用」の存在と、機能的意義を検討する計画である。

味細胞集団およびショウジョウバエについては、予備的段階の研究を進めているが、いずれも、「生体にとっての意味が明確な入力」に対して神経回路網の振る舞いが決定される過程を解明することを目指したものである。こうした研究と哺乳類の脳神経系における動作原理の研究とを並行して進めることによって、神経系一般に共通する動作原理を見出すことが可能になると考えている。

4. 研究成果の発表

原著論文

- (1) Monai H., Omori T., Okada M., Inoue M., Miyakawa H., Aonishi T. An analytic solution of the cable equation predicts frequency preference of a passive shunt-end cylindrical cable in response to extracellular oscillating electric fields. *Biophys. J.* 98: 524-533 (2010).
- (2) Aoyama S., Omori T., Aonishi T., Inoue M., Miyakawa H., Morphology dependence of the passive membrane potential response of a neuron for alternating extracellular electric field. 信学技報, vol. 109, no. 461, NC2009-103, pp. 89-94
- (3) Mounai H., Omori T., Okada M., Inoue M., Miyakawa H., Aonishi T. An analytical solution of the cable equation predicts the frequency preference of a passive non-uniform cylindrical cable in response to extracellular oscillating electrical fields. *BMC Neuroscience* 2009, 10(Suppl 1):P38
- (4) Nelson TM, Lopezjimenez ND, Tessarollo L, Inoue M, Bachmanov AA, Sullivan SL. Taste Fuction in Mice with a Targeted Mutation of the PLD113 gene. *Chem Senses*. 2010 Jul 6. [Epub ahead of print]

国際学会発表

- (1) Mounai H., Omori T., Okada M., Inoue M., Miyakawa H., Aonishi T., An analytical solution of the cable equation predicts frequency preference of a passive non-uniform cylindrical cable in response to extracellular oscillating electrical fields. *Neuroscience* 2009, 2009/10 Chicago, USA
- (2) Tsunoda T., Omori T., Okada M., Miyakawa H., Aonishi T., Statistical estimation of intracellular calcium ion concentration and influx from calcium imaging. *Neuroscience* 2009, 2009/10 Chicago, USA
- (3) Mounai H., Omori T., Okada M., Inoue M., Miyakawa H., Aonishi T., An analytical solution of the cable equation predicts the frequency preference of a passive non-uniform cylindrical cable in response to extracellular oscillating electrical fields. 18th Annual Computational Neuroscience Meeting Berlin, Germany, 13 July 2009)

国内学会発表

- (1) Tsunoda T., Omori T., Miyakawa H., Okada M., Aonishi T., Estimation of intracellular calcium ion concentration and Ca influx by nonlinear state space modeling. 第 32 回日本神経科学学会大会 2009/9 名古屋
- (2) Aoyama S., Omori T., Aonishi T., Inoue M., Miyakawa H., Morphology dependence of the membrane potential response of a branched neuron for extracellular electric filed : a modeling study. 第 32 回日本神経科学学会大会、2009/9 名古屋
- (3) Mounai H., Omori T., Okada M., Inoue M., Miyakawa H., Aonishi T., An analytical solution of the cable equation predicts frequency preference of a cylindrical cable in response to extracellular fields. 第 32 回日本神経科学大会、2009/9 名古屋
- (4) 青山悟、大森敏明、青西享、井上雅司、宮川博義、交流細胞外電場に対するニューロンの受動的膜電位応答の形態依存性. 電子情報通信学会 NC 研究会 2010/3 東京

- (5) 角田敬正、大森敏明、宮川博義、岡田真人、青西享、粒子フィルタによる細胞内 Ca^{2+} 動態の推定 ～実データへの応用～. 電子情報通信学会 NC研究会 2010/3 東京