

# 2013年度 共同研究等助成金報告集

公益財団法人 日中医学協会

---

The Japan China Medical Association

## 2013 年度共同研究等助成事業報告集目次

### 1. 調査・共同研究

- 雷 小峰 肝線維化における TGF- $\beta$  誘導性分子 Hic-5 の機能解析・・・1
- 武部 豊 中国におけるエイズ流行の最新動向の調査研究と分子疫学に関する国際共同  
研究・・・5
- 潘 雷 東アジア地域における ALS 関連遺伝子変異の大規模スクリーニング研究・9
- 馬 寧 ヒ素曝露人群における健康リスクの予測・早期診断法の探索・・・11
- 村岡 修 砂漠人参カンカニクジュヨウの糖尿病予防および初期症状の改善効果と作用  
メカニズムに関する研究・・・16
- 安井 正人 リポ多糖刺激によるミクログリア活性化におけるアクアポリン4の役割・20

### 2. 若手在留中国人研究者助成

- 李 麗 頭蓋内胚細胞性腫瘍長期生存例の T2\*強調像 MRI 所見：全脳室照射 VS. 全脳照  
射・・・25
- 楊 伶俐 結節性硬化症における白斑の病態解明から、結節性硬化症の治療薬開発へ・29

## 肝線維化における TGF- $\beta$ 誘導分子 Hic-5 の機能解析

研究者氏名 助教 雷 小峰

日本所属機関 昭和大学医学部生化学講座

中国研究者氏名 教授 李 波

中国所属機関 瀘州医学院附属病院肝胆外科

### <要旨>

肝線維化は、主に HBV, HCV 感染やアルコールの過剰摂取、肥満による脂肪肝などが原因で発症し、肝臓内にコラーゲンなどの細胞外基質が過剰に蓄積する。進行すると、肝硬変や肝がんになり、死に至る場合がある。線維症と TGF- $\beta$  1 が密接に関与することがよく知られているが、その詳細なメカニズムがまだ解明されていない。我々は TGF- $\beta$  1 誘導性分子である Hydrogen Peroxide-inducible Clone 5 (Hic-5, 別名 transforming growth factor beta 1 induced transcript 1 (TGF- $\beta$  1I1)) に着目し肝線維化の発症機序解析を行った。ヒト肝線維化の進行に伴って Hic-5 が高発現し、Hic-5 陽性細胞として活性型肝星状細胞を同定した。さらに、肝臓線維化マウスモデルでは Hic-5 の欠損により肝臓線維症が顕著に抑制された。単離したマウス肝星状細胞では Hic-5 の欠損により細胞の活性化およびコラーゲン産生が制御された。今後、Hic-5 を標的分子として肝線維化の解析を行い、細胞内における Hic-5 の働きについてメカニズムを解明する必要がある。

### <Key Words>

肝線維化、肝星状細胞、TGF- $\beta$  1、Hic-5

### <本文>

#### 緒言

Hic-5 は 1994 年に過酸化水素および TGF- $\beta$  1 に応答し発現誘導される遺伝子としてクローニングされた<sup>1</sup>。その後この遺伝子は細胞外マトリックス (ECM) と細胞の接着点にある細胞接着斑タンパク質であることがわかった。近年我々は Hic-5 欠損マウスを作製し生体内における役割を検討したところ、動脈硬化、動脈瘤や癌などの疾患に関与していることが明らかとなった<sup>2</sup>。さらに癩痕形成<sup>3</sup>、糸球体硬化症<sup>4</sup>といった組織の線維化を伴う病態への関与が報告されている。線維化は臓器内にコラーゲン性細胞外マトリックスが筋線維芽細胞により過剰に蓄積する疾患である。肝炎ウイルスなどの原因で肝線維化が進行すると、肝硬変や肝がん

になり、死に至る場合がある。肝臓での筋線維芽細胞の主な供給源は肝臓星状細胞（HSC）であると考えられている。トランスフォーミング増殖因子-β1（TGF-β1）は線維化を促進するサイトカインで、潜在型 TGF-β1 は筋線維芽細胞を活性化しコラーゲン産生を促進する。我々は TGF-β1 誘導性分子である Hic-5 に着目し肝線維化の発症機序を解析した。

## 研究対象と方法

方法： I. ヒト肝臓線維化の組織解析： 蛍光免疫染色や免疫電子顕微鏡法によりヒト肝線維化組織にて Hic-5 の発現細胞の同定や発現量変化に関して非線維化組織と比較して検討する。さらに、肝線維化進行度と Hic-5 の発現量を定量的に解析することで、臨床症状と予後への Hic-5 の関与を検討する。 II. 肝線維化モデルマウスの作製と解析： 方法：胆管結紮(BDL)2週間或は四塩化炭素(CC14)投与 4週間による肝線維化モデルを作製しマッソントリクローム染色及びウェスタンブロットを用いて線維化程度を評価する。 III. 肝線維症発症抑制メカニズムに関する組織学的解析：発症メカニズムの解析には早期線維化病変（術後3、5、7日）を用い肝細胞損傷度、活性化した肝星細胞量を調べる。肝線維化の発症における TGF-β 上昇、活性酸素種の増加及びその下流でのコラーゲン産生が主因の一つとして知られている。そこで、病変組織切片と DCFH-DA を用いて組織内活性酸素産生量を、また免疫染色法で TGF-β 及びコラーゲン量を検討する。 IV. 肝線維症発症抑制メカニズムに関する細胞生物学、分子生物学的解析： マウス病変の組織学的解析で確認された変化を、マウスより分離した初代培養細胞（肝星細胞、マクロファージ）を用いて、細胞レベルの TGF-β や活性酸素種の産生能、コラーゲン合成量を上述方法で検討する。Hic-5 は直接核内へ移行し遺伝子発現を誘導することが証明されている。このことから、核での機能を介したメカニズムを想定に入れ実験を行う。

## 結果

### I. ヒト肝臓線維化の組織解析

蛍光免疫染色（図 1 A）および western blot 法（図 1 B）により正常肝臓と比べたところ、ヒト肝線維化組織では Hic-5 が高発現していることがわかった。さらに、Hic-5 の発現パターンは活性化した肝星細胞のマーカーである α-SMA と一致していることが判明した。

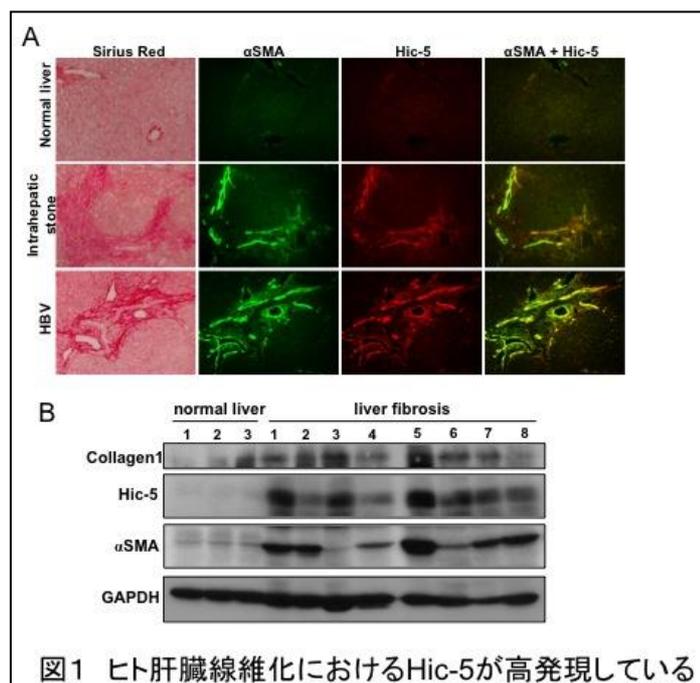


図1 ヒト肝臓線維化におけるHic-5が高発現している

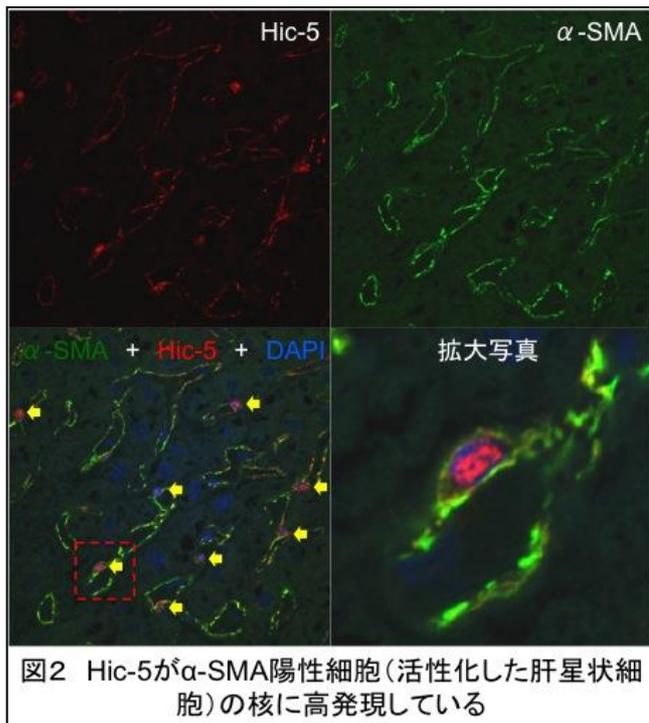


図2 Hic-5が $\alpha$ -SMA陽性細胞(活性化した肝星状細胞)の核に高発現している

興味深いことに、ヒト肝臓内の活性化された肝星状細胞 ( $\alpha$ -SMA 陽性細胞、図2 Green) では Hic-5 の発現は細胞質だけでなく、細胞核にも高発現している (図2, Red; 黄色矢印)。Hic-5 が細胞質局在する  $\alpha$ -SMA と違って活性化型肝星状細胞の細胞核内に働いていることが示されている。

II. 肝線維化モデルマウスの作製と解析：胆管結紮(BDL)2週間或は四塩化炭素(CC14)投与4週間による肝線維化モデルを作製し、組織評価および線維化マーカーを検討したところ、野生型マウスと比較して Hic-5 の欠損マウスでは顕著に肝線

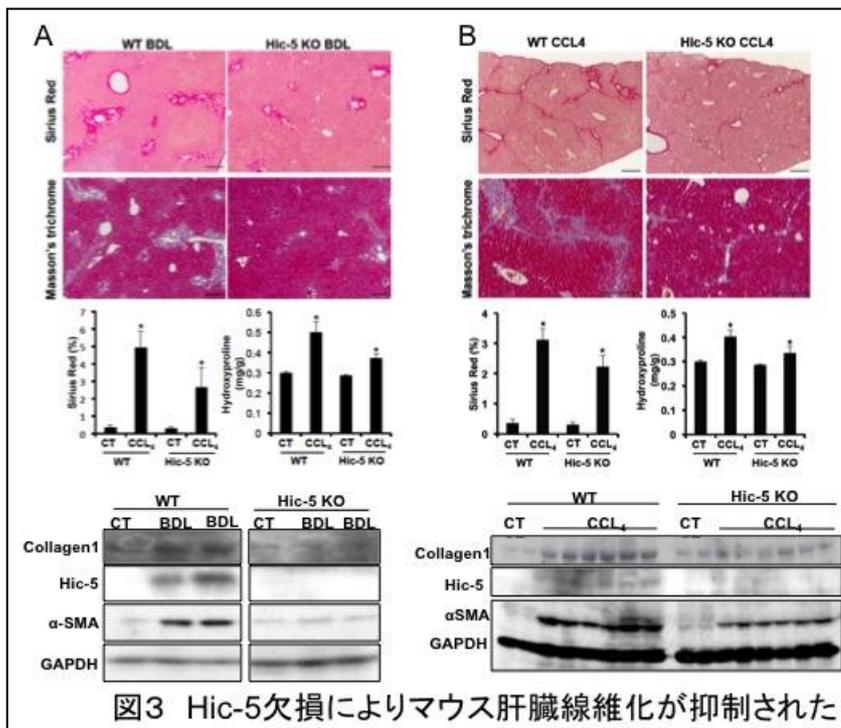


図3 Hic-5欠損によりマウス肝臓線維化が抑制された

維化が抑制されることが判明した (図3)。Hic-5 の欠損マウスではコラーゲン1の産生や  $\alpha$ -SMA の発現が減少していた。さらに、マウス肝臓組織評価したところ、ヒト肝臓組織と同様に Hic-5 が  $\alpha$ -SMA 陽性の肝臓星状細胞に同定した。さらに、線維化に関連する遺伝子を調べたところ、

Hic-5 が ECM 産生を制御する遺伝子を抑制したが、肝臓線維化に上昇した TGF- $\beta$  1 の発現に影響しなかった (図4)。つまり、Hic-5 が TGF- $\beta$  1 の下流として核に移動して直接 ECM の産生を制御している可能性が高いと考えられる。

そこで、我々はマウス肝臓星状細胞を単離し *in vitro* で細胞実験を進めている (図5)。

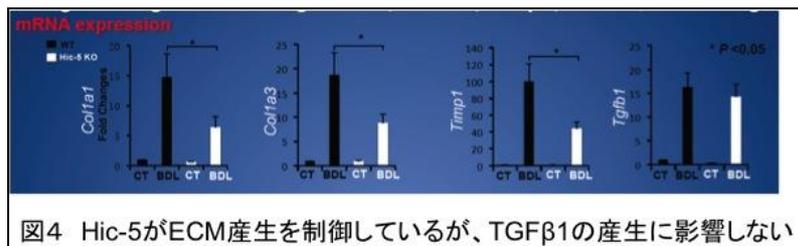


図4 Hic-5がECM産生を制御しているが、TGFβ1の産生に影響しない

### 考察

我々は肝臓線維化の過程で TGF-β 誘導分子として肝星状細胞の活性を制御する Hic-5 の機能を解明し、特に核に移行する現象が判明した。 Hic-5 の核内での機能として、遺伝子発現誘導機構への関与している報告や他の臓器線維化に Hic-5 と関与していることから、Hic-5 が TGF-β 1 の下流として核に移動して直接 ECM の産生の制御する可能性が高いと考えられる。現在細胞内制御のメカニズムを解析している。今後、Hic-5 が高特異性を持つ標的分子とした臓器線維化治療法の発案が可能になると考える。

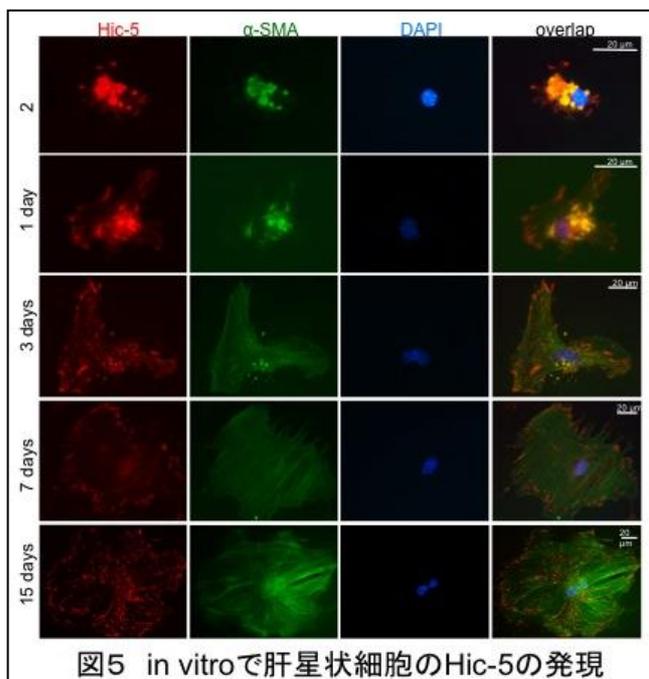


図5 *in vitro*で肝星状細胞のHic-5の発現

### 参考文献

1. Shibanuma M, Mashimo J, Kuroki T, Nose K. Characterization of the TGF beta 1-inducible hic-5 gene that encodes a putative novel zinc finger protein and its possible involvement in cellular senescence. **J Biol Chem.** 1994
2. Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Arita S, Miyauchi A, Miyazaki T, Miyazaki A. Hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) as a potential therapeutic target for vascular and other disorders. **J Atheroscler Thromb.** 2012
3. Inui S, Shono F, Noguchi F, Nakajima T, Hosokawa K, Itami S. In vitro and in vivo evidence of pathogenic roles of Hic-5/ARA55 in keloids through Smad pathway and profibrotic transcription. **J Dermatol Sci.** 2010
4. Hornigold N, Craven RA, Keen JN, Johnson T, Banks RE, Mooney AF. Upregulation of Hic-5 in glomerulosclerosis and its regulation of mesangial cell apoptosis. **Kidney Int.** 2010

作成日：2014年2月24日

## 中国におけるエイズ流行の最新動向の調査と分子疫学に関する国際共同研究

研究者氏名 □主任研究官 □武部 豊

日本所属機関 □国立感染症研究所エイズ研究センター

中国研究者氏名 □教授 邵 一鸣

中国所属機関 □中国疾病預防控制中心・性病艾滋病預防控制中心

### 要 旨

近年急速に拡大・変容しつつある中国におけるエイズ流行の分子疫学研究を行い、ウイルス播種の空間的・時間的様相、起源の解析、さらに周辺アジア諸国との流行の相互関係の解明を目指した。その結果、様々なリスク集団における急速な流行拡大を背景として、特徴的なHIV-1ヴァリエントの新生やその急速な播種の様相を明らかにした。また、これら共同研究を通じて、我が国を含む周辺アジア諸国の流行とのこれまでに明らかにされてこなかった相互関係を見いだした。

**Key Words** HIV、エイズ、分子疫学、系統樹解析

### 緒 言：

かつて中国においては、注射薬物乱用者 (Injecting drug user) やプラズマ供血経験者 (former plasma donor, FPD) など経血液的な経路による感染 (Blood-borne transmission) が流行の主体であったが、近年、性感染ルート [異性間および男性同性愛者 (MSM) 間] による感染が急速に拡大し、実に全体の75%以上を占めるような劇的な変化起きている。われわれは、このような中国ににおける流行の急速な変化に背景にある流行ウイルス株の特徴について分子疫学的な立場から解析を進め、その公衆衛生上の意義に関して考察しようとする。

### 対象と方法：

中国の各地域の様々なリスク集団に属するHIV-1感染者から血液検体を収集、HIV-1 *pol*領域あるいはほぼ完全長のウイルスゲノム (near full-length genome, NFLG) 配列を決定し、その系統関係や共通祖先分岐年代を系統樹解析およびBEAST法を用いて解析した。それら解析結果と、付帯する疫学的情報とを総合し、中国におけるエイズ流行の起源、播種の経路、時間的経過を推定・分析し、それらの公衆衛生学的な意義を考察した。

### 結 果：

#### (1) 中国における HIV-1 流行の起源・成り立ちの解明に向けた分子疫学研究

中国における HIV-1 流行の原因となっている多様なウイルス株の中で、最も重要な役割を果たしている流行株の一つが、東南アジア (タイ) に起源をもつ CRF01\_AE とよばれる組換え型流行株 (Circulating recombinant form, CRF) である。われわれは、本共同研究によって、中国に流布する CRF01\_AE 株が少なくとも 7 種の地域的・リスク集団特異的なヴァリエント (クラスター) に分類されることを明らかにした。

中でも、流行の規模の大きいクラスター1,2は、中国南部地域の注射薬物乱用者 (Injecting drug user, IDU) および異性間感染者 (Heterosexuals)の間の流行に、クラスター4と5は男性同性愛者 (men having sex with men, MSM) 間の流行に關与する特徴的なヴァリエントであることを見出した (発表文献 1)。

さらに、最新のデータ解析技術を用いることによって、これらヴァリエントの中国への侵淫が、いずれも中国の開放政策の一環として施行された海外渡航条件の制限緩和が行われた 1990 年代はじめにほぼ一致して起こっているという興味深い事実を明らかにした (図 1) (発表文献 1)。

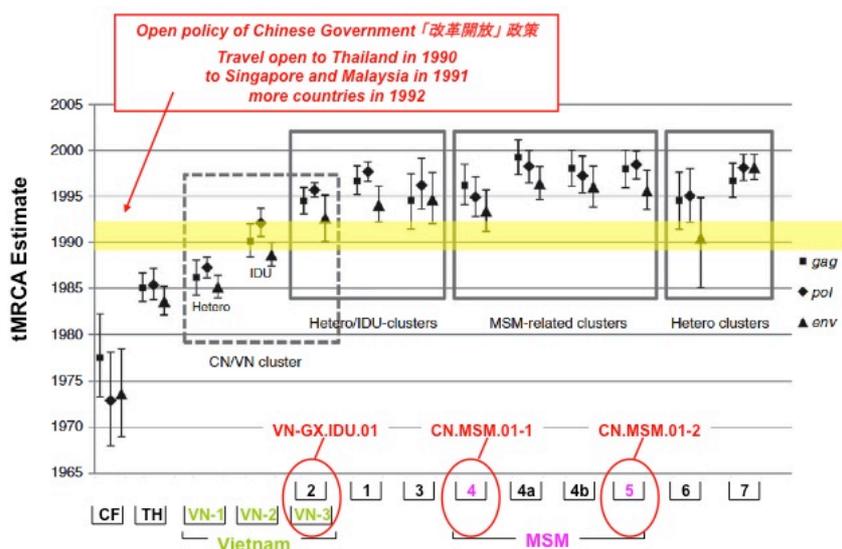


図1. 中国におけるCRF01\_AE 流行は1990年代に侵淫・播種した少なくとも7種のコファウンダー株によって形成されている。クラスター4, 5は中国のMSM集団に分布しているvariantで、文献2のCN.MSM.01-1, CN.MSM.01-2に対応する。前者CN.MSM.01-1は我が国のMSM集団に流入したことが最近明らかとなった (図2参照)。

## (2) 中国におけるHIV-1流行の我が国への波及に関する新知見に関して

中国における HIV 流行は近年急速な変容を遂げているが、中でも、世界諸地域と同様、男性同性愛者 (MSM) の間の流行が急速に拡大し、大きな公衆衛生上の問題となっている。この MSM 間の急速な感染拡大と軌を一にして、かつて流行の主体であった欧米型サブタイプ B から、東南アジアに起源をもつ CRF01\_AE への急速なシフトが観察される (発表文献 3)。

われわれは、中国内の MSM の間の流行にかかわる CRF01\_AE ヴァリエントの 1 つ (国際的な比較の便宜のために CN.MSM.01-1 という名称を提唱。上記のクラスター4 に一致する) が、我が国 MSM 集団に流入していることをはじめて明らかにした (図 2)。

この知見は、中国における MSM 間の流行の世界播種の最初の兆候を示すものと考えられ、今後、近隣アジア諸国さらに世界におけるエイズ流行の将来動向に影響を及ぼす可能性が懸念される。

また、一方、逆に、我が国の MSM に特徴的なサブタイプ B ヴァリエントが、中国の MSM 間にも見出されるという思いがけない事実が明らかとなった。

これらの観察は、我が国を含む東アジア地域の流行が予期せぬ規模に広がっており、これまで系統的には解析されることのなかった国際的なレベルでの相互関係が見出される可能性が推測される。これら知見を手掛かりとして、現在、中国を含む世界の諸研究機関との共同研究が進行中である (発表文献: 2, 和文解説論文: 9)。

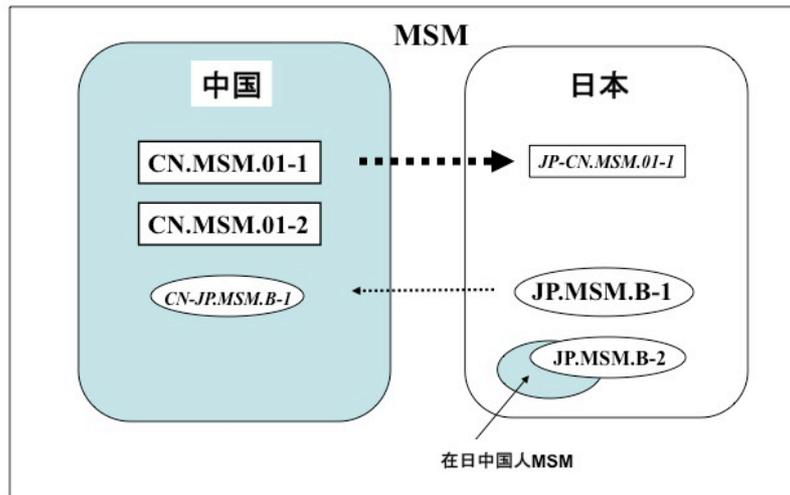


図2. 我が国と中国におけるMSM間の流行の予期しない繋がり (文献 2の知見に基づく模式図). 矩形および楕円形の枠は、それぞれ中国および我が国MSMに特徴的なCRF01\_AEおよびサブタイプBヴァリエントを示す。斜体は、それぞれの起源が国外(中国あるいは日本)にあること、またJP-CN.MSM.01-1あるいはCN-JP.MSM.B-1は、侵淫した各ヴァリエントが日本あるいは中国に特徴的なサブクラスターを形成することを示す(文献 9)。

### (3) 中国における組換えウイルスの多発的新生と新規組み換え型流行株 (CRF) の同定

様々な系統のウイルス株が流布 (co-circulate) している状況を背景として、異なる地域の複数のリスク集団において、多様な組換えウイルスが新生しつつあることを明らかにした。

なかでも集団内で広く播種している「組換え型流行株 (Circulating recombinant form, CRF)」とよばれる公衆衛生上重要な組換えウイルスを現在までに合計5種新たに発見し、HIV sequence databaseより正式承認を受けた。うち本共同研究によるものは、CRF57\_01B, CRF62\_01B, CRF65\_cpxの3種である (発表文献: 6-8, 和文解説論文: 10)。

#### 考 察 :

中国における流行が、IDUやFPDから、異性間感染によって一般集団に急速に播種しつつあり、公衆衛生学的な見地からはきわめて憂慮すべき状況にある。また、我が国を含む欧米先進国を追いかける形で、中国においてもMSM間の流行の拡大が始まっている。MSMの間の流行は、我が国を含む欧米諸国においては1980年代初めにはじまったのに対して、中国では、この7-8年の間に急速に拡大し、現在新規感染者の15%にも達している。しかも中国の版図の広大さ/人的・社会的多様性にもかかわらず、上に見るように原因ウイルスが数少ないファウンダー株によって引き起こされているという興味深い事実が明らかとなった (文献 1, 3)。このことは、中国のMSM集団においては非常に高いリスク行動が蔓延していることを示唆しており、教育・啓蒙活動を含む予防対策の強力かつ緊急の導入の必要性を示している。

また、リスク集団に複数の系統のウイルス株が流行している場合、比較的容易に組換えウイルスが生み出されることが知られている。中国では1990年代半ばに、CRF07\_BCとCRF08\_BCとよばれる2種の組換え型流行株 (CRF) がIDU集団に見いだされていたが、2012年に入って、中国のMSM集団内に、CRF55\_01B, CRF59\_01Bと呼ばれる2種の新種のCRFが見いだされた (これらは中国の他のグループとの共同研究によって見いだされたものである。文献 4, 5)。一方、本共同研究で発見されたCRF57\_01B, CRF62\_01B, CRF65\_cpxの3種のCRF (文献 6-8) は、いずれも中国雲南省の若年層の異性間感染者において見いだされたものであることに著しい特徴がある。このことは、中国の特定の地域においては、性的活動の高い若年層が、流行の播種の危機にさらされているこ

とを強く示唆するものである。

中国の流行は、無論中国だけの問題にとどまらない。文献 2 に示すように、我が国を含む周辺アジア諸国さらに世界的な規模で、中国のエイズ流行の波及・播種が開始している可能性があり、現在解析を進めている。

中国におけるエイズ流行は、その多彩さとその像の急速な変化という点で、世界的にもきわめてユニークなものである。かつて欧米が、流行の世界播種に重要な役割を果たしたように、今後中国の流行が、世界に流行に新たなインパクトを及ぼすような事態が起こることは十分にありうると考えられる。今後、中国をはじめとして世界スケールでの注意深い流行のモニタリングの継続と、流行制圧に向けた取り組みの一層強力かつ迅速な展開の必要性を強調したい。

参考文献：

- 1) Feng Y, He X, Hsi JH, Li F, Li X, Wang Q, Ruan Y, Xing H, Lam TT, Pybus OG, **Takebe Y**, **Shao Y**. The rapidly expanding CRF01\_AE epidemic in China is driven by multiple lineages of HIV-1 viruses introduced in the 1990s. *AIDS*. 2013 Jul 17;27(11):1793-1802.
- 2) Kondo, M., Lemey, P., Sano, T., Itoda, I., Yoshimura, Y., Sagara, H., Tachikawa, N., Yamanaka, K., Iwamuro, S., Matano, T., Imai, M., Kato S. and **Takebe-Y**. Emergence in Japan of an HIV-1 variant associated with MSM transmission in China: First indication for the international dissemination of the Chinese MSM lineage. *J. Virol.* 2013, May;87(10):5351-61.
- 3) Han X, An M, Zhang M, Zhao B, Wu H, Liang S, Chen X, Zhuang M, Yan H, Fu J, Lu L, Cai W, **Takebe Y**, Shang H.\* Identification of three distinct HIV-1 founding strains responsible for expanding epidemic among men who have sex with men in nine Chinese cities. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2013 Apr 16;64(1):16-24.
- 4) Han, X., An, M., Zhang, W., Cai, W., Chen, X., **Takebe, Y.** and Shang, H. Genome Sequences of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form, CRF55\_01B, identified in China. *Genome Announc.* 2013 Jan;1(1). doi:pii: e00050-12. 10.1128/genomeA.00050-12.
- 5) Han X, An M, Zhang W, Zhao B, Chu Z, **Takebe Y**, Shang H. Genome Sequences of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF59\_01B) Identified among Men Who Have Sex with Men in Northeastern China. *Genome Announc.* 2013 Jun 27;1(3). doi:pii: e00315-13. 10.1128/genomeA.00315-13.
- 6) Wei H, Hsi JH, Feng Y, Xing H, He X, Liao L, Duan S, Ning C, Wang N, **Takebe Y**, **Shao Y**. Identification of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF62\_BC) in Western Yunnan of China. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013 Oct 29. [Epub ahead of print].
- 7) Wei H, Liu Y, Feng Y, Hsi JH, Xing H, He X, Liao L, **Takebe Y**, Li J, **Shao Y**. Genome Sequence of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF57\_BC) Identified from Yunnan, China. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013 Nov 8. [Epub ahead of print].
- 8) Feng Y, Wei H, Hsi JH, Xing H, He X, Liao L, Ma Y, Ning C, Wang N, **Takebe Y**, **Shao Y**. Identification of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF65\_cpx) comprised of CRF01\_AE and subtypes B and C in western Yunnan, China. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013 Nov 26. [Epub ahead of print].
- 9) **武部 豊**, 近藤真規子. 中国における男性同性愛者 (MSM) 間の HIV-1 流行の急速な拡大と我が国への流行波及に関する最新知見. 病原微生物検出情報 (IASR) 2013 年 3 月号.
- 10) **武部 豊**. アジアにおけるエイズ流行の分子疫学研究の最前線 (I) 「東南・東アジア地域における HIV-1 組換え型流行株 (CRF) の多発的新生」 病原微生物検出情報 (IASR) 2013 年 9 月号 ( 「エイズ特集」 )

## 東アジア地域におけるALS関連遺伝子変異の大規模スクリーニング

研究者氏名	研究員 潘 雷
日本所属機関	東海大学医学部基礎医学系 分子生命科学
共同研究者名	樊東昇, 横田隆徳, 商慧芳, 秦野伸二
中国研究者氏名	准教授 陳万金
中国所属機関	福建医科大学神経内科

### 要 旨

我々は、これまで欧米の研究機関との共同研究を基盤とし、ALS 原因遺伝子の一つである ALS2 遺伝子の同定、及びその機能解析について、細胞とマウスモデルを用いた研究を遂行してきた。そして、ALS の治療法開発に結びつくような多くの研究成果を積み重ねてきた。近年、多くの神経変性疾患において、多くの原因遺伝子が同定され、さらに世界中の多くの研究者により患者における遺伝子変異の解析が進んでいる。ことに、ゲノム解析技術の進歩により、現在では以前では同定不可能であった希な遺伝子変異による疾患発症の原因が次々と明らかになっている。しかし、疾患発症の原因となる遺伝子及びその変異の頻度については、民族の違い、すなわち遺伝的背景の違いが強く係わっていることが判明されつつある。実際、我々が行ったマウスでの実験研究によっても、遺伝的背景の違いが疾患発症の表現型に強く影響することが分かった。このような遺伝的背景について、我々は、かねてから大規模なアジア人における ALS 疾患基礎研究を推進することを模索してきた。アジア圏におけるグローバルな研究組織の構築は、アジア人に適した疾患治療法の開発を行うために不可欠であると考えられる。

**Key Words** ALS, 遺伝子, 変異, スクリーニング, 東アジア

### 緒 言：

本研究では、ALS 患者の遺伝子変異と発症との関係を解明するため、孤発 ALS 患者の遺伝子スクリーニングを行う。

### 対象と方法：

北京大学医学部第三付属病院神経内科に入院した孤発ALS患者384例と四川大学華西病院神経内科306例のサンプルをシクーンズし、まず、p62/SQSTM1遺伝子の変異をチェックした。

**結 果：**

四川大学のALS患者306名の内、3名の患者にp62/SQSTM1遺伝子の変異があることが分かった。

北京大学のALS患者384名の内、8名の患者にp62/SQSTM1遺伝子の変異があることが分かった。

**考 察：**

中国のALS患者におけるp62/SQSTM1遺伝子変異発生の割合は、欧米と比べると低いことが分かった。これらの現象は、アジア人の遺伝背景と欧米の本質の違いで引き起こされたがまたは本実験に使われた患者さんのサンプルの例数が少ないがについてさらに検討される必要があると思う。

作成日：2014年 3月13日

## ヒ素曝露人群における健康リスクの予測・早期診断法の探索

研究者氏名 □□ 教授 馬 寧

日本所属機関 □□ 鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部

共同研究者名 □□ 助手 大西 志保

日本所属機関 □□ 鈴鹿医療科学大学・薬学部

中国研究者氏名 □□ 教授 裴 秋玲

中国所属機関 □□ 中国山西医科大学・公衆衛生学院

### 要 旨

中国やバングラデシュなどアジアの国では地下水のヒ素汚染が深刻化しており、その飲用によるヒトへの曝露と健康被害が大きな社会問題となっている。慢性ヒ素中毒で最も重大な問題はがんであるが、曝露期間は 20 数年を経過しており、本格的ながん発症の顕在化までにヒ素による発がんのメカニズム、リスク評価、予防対策などの研究が特に重要である。本研究では、ヒ素汚染地域の各家庭にある飲用井戸水を採集し、ヒ素濃度を解析した。該当地域住民を対象に、生活環境・居住歴・職歴に関するアンケートを行い、ヒ素曝露状況を解析した。ヒ素以外の発がんリスクとして飲酒・喫煙歴などに関するアンケートも併せて行った。また現地医院の協力を得て皮膚検診を行い、臨床試料（血液・尿）および臨床データを収集した。尿中のヒ素濃度と酸化的 DNA 損傷マーカー 8-OHdG 量を測定し、皮膚病理変化および生活習慣（喫煙、飲酒、外出習慣など）との関係を解析した。その結果、長期低濃度ヒ素曝露群では、尿中のヒ素濃度と 8-OHdG 量が高く、飲用地下水中のヒ素濃度と尿中 8-OHdG 量に高い相関性があることが明らかになった。ヒト皮膚細胞をヒ素含有培地中で長期培養したところ、細胞周期が G2/M と S 期にシフトして細胞増殖が促進するとともに、ソフトアガーにおけるコロニー形成率の上昇（足場依存性の低下）がみられた。またコロニー形成率上昇と相関して、がん幹細胞マーカーである CD44v6 の発現が上昇していた。このヒ素処理細胞をヌードマウスに接種したところ、腫瘍形成を確認した。以上のように、ヒ素曝露は、酸化的 DNA 損傷、がん幹細胞生成、細胞増殖、足場依存性の喪失を引き起こし、腫瘍形成能を獲得し、がん発症に関与する可能性が示された。

**Key Words** ヒ素、汚染、発がん、酸化ストレス、8-OHdG、腫瘍形成

### 緒 言

国際がん研究機関（IARC）は、ヒ素およびヒ素化合物がヒトへの発がん性に十分な証拠があるとしてグループ 1 と評価している。地下地層にヒ素が含まれる地域は世界各地に点在し、ヒ素の自然環境汚染・ヒトへの健康影響が深刻である。中国やバングラデシュなどアジアの国では地下水のヒ素汚染が深刻化しており、その飲用によるヒトへの曝露と健康被害が大きな社会問題となっている。Rodríguez-Lado L 氏は 2013 年 8 月に米サイエンス誌に中国では 2000 万人近くがヒ素に汚染された地下水を飲んでいるとの研究結果を発表した<sup>1</sup>。高濃度のヒ素を含む水を飲み続けると慢性ヒ素中毒となり、皮膚の色素異常や角化症などの特徴的な症状のほか、消化器、泌尿器、循環器、神経などに非特異的な障害があらわれ、多彩な炎症疾患やがんの多発が見られる。高濃度ヒ素曝露者が、インド・バングラデシュ・ネパールで約 3500 万人と言われている。慢性ヒ素中毒で最も重大な問題はがんであり、曝露歴は 20 数年を経過中であり、本格的ながん発症の顕在化までにヒ素による発がんのメカニズム、リスク評価、予防対策などの研究が特に重要である。近年、地下水のヒ素汚染による大規模

な健康障害が中国、バングラデシュ、インドで報告され、一部の地域では安全な水供給の施策を行ってきた。しかし、安全な給水システムは飲料水が対象であり、野菜・食料の現地栽培生産には引き続きヒ素汚染地下水が使用されており、ヒ素汚染問題に対する根本的な解決はみられていない。そこで本研究では、中国山西省のヒ素汚染地域を中心に、ヒトへのヒ素曝露実態調査を実施し、ヒ素による健康障害の早期マーカーの解析を試みた。

実態調査は中国山西省において地下水のヒ素汚染がみられる地域にて行った。疫学調査および生体試料収集は、山西医科大学予防医学学院を拠点とし、山西医科大学の裴秋玲教授（毒理学講座主任）の協力を得て行った。実験・解析は鈴鹿医療科学大学で行った。

## 対象と方法

### (1) ヒ素曝露状況に関する試料収集

中国山西省のヒ素汚染地域住民を対象に、生活環境・居住歴・職歴に関するアンケートを行い、各家庭にある飲用井戸水を採集した。またヒ素以外の発がんリスクとして飲酒・喫煙歴などに関するアンケートも併せて行った。

### (2) ヒ素関連疾患患者の生体試料収集

インフォームド・コンセントの得られた住民を対象とし、現地医院の協力を得て皮膚検診を行い、臨床試料（血液・尿）および臨床データを得た。

### (3) ヒ素濃度測定および中毒状況の診断

飲用水は原子吸光分析を行い、ヒ素濃度を測定した。尿は、クレアチニンを基準としてヒ素濃度および酸化的 DNA 損傷マーカー 8-OHdG 量を解析した。血液・皮膚組織は、病理染色・生化学分析を行い、ヒ素曝露・中毒状況・マーカーの解析を行った。赤血球膜タンパクである CD35 および band3 の抗体、また、8-ニトログアニンおよび酸化的 DNA 損傷マーカー 8-OHdG の抗体などを用いて、染色・測定を行い、赤血球膜タンパクの変化・DNA 損傷を解析した。

### (4) 培養細胞・マウスを用いたヒ素曝露影響解析

ヒト正常上皮由来の不死化細胞株 HaCaT 細胞は微量ヒ素を含む培地中で長期培養し、ヒ素曝露による形質変化を解析した。また形質転換がみられた細胞をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成能を確認した。

## 成果と考察

本研究では、ヒ素汚染地域に長期間居住し、出稼ぎなどによる非汚染地域への外出が少ない住民として、対象地域の女性 54 人を調査対象とした。対象者を飲用地下水のヒ素濃度によって 3 群に分類したところ、高ヒ素濃度群（ヒ素濃度 50.00 $\mu$ g/L 以上）は 15 人、中ヒ素濃度群（ヒ素濃度>30.00–50.00 $\mu$ g/L）は 19 人、低ヒ素濃度群（ヒ素濃度 10.00–29.00 $\mu$ g/L）は 20 人であった。また、飲用水にヒ素汚染が見られず、生活の経済的水準が同様である隣接村から、18 名の健康女性を対照群とし、比較解析を行った。その結果、低ヒ素濃度群においても、尿中のヒ素濃度と 8-OHdG 量が対照群に比べて有意に高いことが示された（表 1）。飲用地下水中のヒ素濃度と尿中 8-OHdG 量、および尿中ヒ素濃度と尿中 8-OHdG 量の高い相関性があることが明らかになった（図 1）。

表1: ヒ素曝露人群と対照人群の飲用水ヒ素、尿中ヒ素及び尿8-OHdG量の比較

組	n(人数)	水(μg/L)	尿ヒ素(μg/g Cr)	尿8-OHdG(ng/mg Cr)
対照群	18	<10	4.61±2.38	2.09±0.97
ヒ素曝露群	54	33.63±3.67*	24.05±6.61*	12.16±2.88*

\* $P<0.05$ .

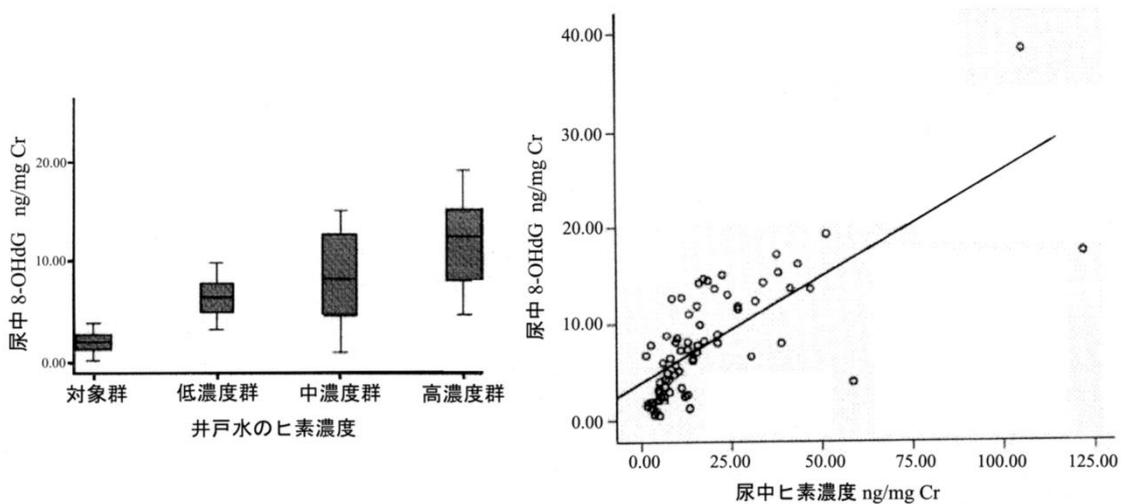


図1: 尿中8-OHdGと尿中ヒ素・井戸水のヒ素濃度の関係

尿中8-OHdGと皮膚病理変化の程度との関係を解析したところ、飲用水中のヒ素濃度が高い群ほど皮膚色素脱失・沈着および角化など病理変化発生の上昇が観察された(図2、表2)。また、末梢血塗抹標本では多核白血球の核に8-OHdGの強い免疫陽性反応を確認し、皮膚の病理損傷程度との関連性が高いことが明らかになった<sup>2</sup>。尿中ヒ素濃度の高い群で8-OHdG量が高かったことから、ヒ素曝露の高い住民はDNA酸化損傷の可能性がある、ヒ素による発がんなどの毒性発現リスクが高いことが示唆された。



図2. 慢性ヒ素曝露住民にみられる角化症。

表2: 尿中 8-OHdGと皮膚損傷の関連性

8-OHdG濃度 (ng/mgCr)	各群の人数	皮膚損傷人数	皮膚損傷%
4.68 (低ヒ素濃度群)	18	7	38.9
7.94 (中ヒ素濃度群)	18	12	66.7
11.07(高ヒ素濃度群)	18	15	83.3

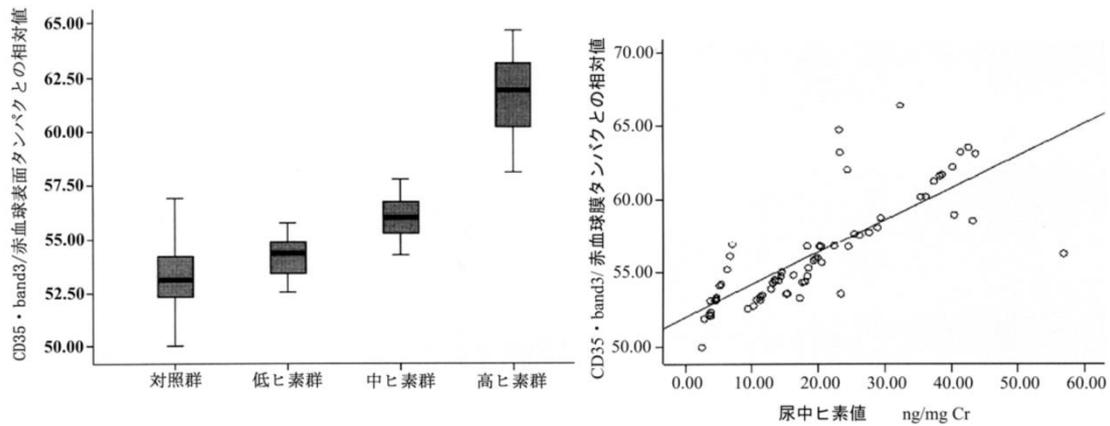


図3: 末梢血CD35・band3とヒ素濃度の関係

赤血球膜タンパク質に対する CD35 量および band3 量は、ヒ素曝露が高い群ほど有意に上昇していた ( $P>0.05$ ) (図 3)。CD35 と band3 抗体を用いて、赤血球膜における CD35 と band3 の発現を解析したところ、中ヒ素濃度群で強い免疫反応を確認した (図 4)。

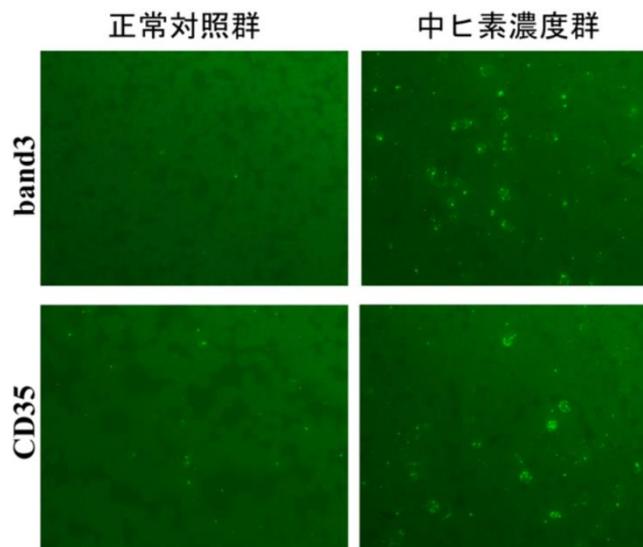


図 4: 末梢血の赤血球 CD35 と band3 免疫染色図。

慢性的なヒ素曝露により、ヒトの皮膚に扁平上皮がんを含む様々な障害を引き起こす。我々は、ヒト表皮角化細胞由来 HaCaT 細胞をヒ素 0.05ppm を含む培地中で 18 週間培養した後、ヌードマウスに接種することにより、腫瘍を形成させることに成功している。これは、ヒ素の低濃度長期曝露により、ヒト皮膚細胞が腫瘍形成能を獲得することを示しており、ヒ素発がんの解析に大変有用なモデルである。ヒ素処理細胞をソフトアガーを用いたコロニー形成法、FACS により解析し、また同細胞とマウス腫瘍組織について、幹細胞マーカー、がん抑制遺伝子 p53、転写因子 NF-κB の発現をウェスタンブロット、免疫染色により解析した。ヒ素含有培地中で長期培養することにより、細胞周期が G2/M と S 期にシフトするとともに、細胞増殖の促進とソフトアガーにおけるコロニー形成率の上昇がみられ、足場依存性を失って異常増殖することが明らかとなった。またコロニー形成率上昇と相関して、がん幹細胞マーカーである CD44v6 の発現が上昇していた。ヒ素処理細胞をヌードマウスに接種して形成した腫瘍組織では、p53、NF-κB および CD44v6 の発現が高く、NF-κB の発現誘導を介した CD44v6 の発現が、ヒ素発がん重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、ヒ素曝露ヒト皮膚細胞においてがん幹細胞の増殖やがん抑制遺伝子が多く見いだされることを明らかにした<sup>3</sup>。今後は、これらをバイオマーカーとし、末梢血の赤血球膜タンパクマーカーである CD35 と band3 を組み合わせて解析することにより、慢性的な低濃度のヒ素曝露による皮膚がん発症の高精度なリスク評価を行い、がん予防・診断法の確立をめざす計画である。

#### 参考文献：

1. Rodriguez-Lado L, Sun G, Berg M, Zhang Q, Xue H, Zheng Q, Johnson CA. Groundwater arsenic contamination throughout. China. Science. 2013 Aug 23;341(6148):866-868.
2. Pei Q, Ma N, Zhang J, Xu W, Li Y, Ma Z, Li Y, Tian F, Zhang W, Mu J, Li Y, Wang D, Liu H, Yang M, Ma C, Yun F. Oxidative DNA damage of peripheral blood polymorphonuclear leukocytes, selectively induced by chronic arsenic exposure, is associated with extent of arsenic-related skin lesions. Toxicol Appl Pharmacol. 2013 Jan 1;266(1):143-9.
3. Huang S, Guo S, Guo F, Yang Q, Xiao X, Murata M, Ohnishi S, Kawanishi S, Ma N: CD44v6 expression in human skin keratinocytes as a possible mechanism for carcinogenesis associated with chronic arsenic exposure. Eur J Histochem. 2013, Jan 14;57(1):e1

作成日：2014年 3月 10日

## 砂漠人参カンカニクジュヨウの糖尿病予防および初期症状の改善効果と作用メカニズムに関する研究

研究者氏名 □ □ 教授 村岡 修日

本所属機関 □ 近畿大学薬学部

共同研究者名 □ 森川 敏生, 二宮 清文

中国研究者氏名 所長 賈 曉光

中国所属機関 □ 新疆ウイグル自治区中薬民族薬研究所

### 要 旨

新疆ウイグル自治区ホータン地区において、砂漠緑化事業にともなう地域振興策として栽培生産されている生薬“カンカニクジュヨウ”の糖尿病予防および初期症状の改善効果を見いだした。すなわち、カンカニクジュヨウに含有される主要フェニルエタノイド配糖体である echinacoside (1) および acteoside (2) に 250—500 mg/kg の経口投与においてデンプン負荷マウスを用いた血糖上昇抑制作用が認められた。また、1 および 2 について、マウスに 125—250 mg/kg/day の用量にて二週間連続投与したところ、体重増加や摂餌量に影響を与えることなく、耐糖能の有意な改善効果が認められた。また、カンカニクジュヨウに含有される 18 種のフェニルエタノイド配糖体成分 (1—18) について、ラットレンズ由来アルドース還元酵素阻害活性試験を実施したところ、1 ( $IC_{50} = 3.1 \mu M$ ), 2 ( $1.2 \mu M$ ), isoacteoside (3,  $4.6 \mu M$ ), 2'-acetylacteoside (4,  $0.071 \mu M$ ), tubulosides A (5,  $8.8 \mu M$ ) and B (9,  $4.0 \mu M$ ), syringalide A 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (10,  $1.1 \mu M$ ), campneoside I (13,  $0.53 \mu M$ ) および kankanoside J<sub>1</sub> (14,  $9.3 \mu M$ ) に強い活性が認められた。とりわけ 4 は、陽性対照剤として用いた医薬品の epalrestat ( $0.072 \mu M$ ) と同定の活性強度であった。

**Key Words** カンカニクジュヨウ, echinacoside, acteoside, 抗糖尿病作用, アルドース還元酵素阻害

### 緒 言 :

ハマウツボ科 (Orobanchaceae) ニクジュヨウ属の多年生草本であるカンカニクジュヨウ (*Cistanche tubulosa* (Schrenk) R. Wight) は、ギョリュウ科 (Tamaricaceae) の小高木タマリクス (*Tamarix ramosissima* Ledeb.) の根に寄生して生育する。新疆ウイグル自治区のタクラマカン砂漠周辺では、地下 10 m 近くを流れる伏流水にまで根を伸ばせるポプラやタマリクスなどが生育可能であり、カンカニクジュヨウはそのタマリクスに寄生することで水や養分をもらい成長する。タクラマカン砂漠の西南部に位置するシルクロード西域南道最大の町であるホータン地区は、その苛酷な気候風土にもかかわらず世界有数の長寿地域として知られている。この地域ではカンカニクジュヨウを砂漠人参とよび不老長寿の源として常食してきたと伝えられている。<sup>1,2)</sup> 中華人民共和国薬典では、カンカニクジュヨウと、その同属植物のジュヨウ (*C. deserticola* Y. C. Ma) の肉質茎を乾燥したものを漢薬“肉蓯蓉”と規定している。<sup>3)</sup> また、新農本草経において、ニクジュヨウは上薬 (上品) に収載されており、その薬効として「五勞、七傷を主治し、中を補い・・・精気を益し、子多からしむ。婦人の腹中の硬結、腫瘍を治す」と記されている。その後の多くの本草書や医学書にも収載され、例えば「日華子本草」には、「男子の絶陽で興奮せぬもの、婦人の絶陰で妊娠せぬものを治す」などと記載されている。このように、ニクジュヨウは中国伝統医学において強壯、補精薬としてインポテンツ、腰膝の冷痛、遺尿、婦人の不妊症、血崩、帯下、便秘などの治療に用いられてきたが、近年の生物資源の枯渇から供給量が激減しており、その代替生薬としてカンカニクジュヨウが注目されている。

これまでにカンカニクジュヨウに関する生薬学的研究は、日中の研究者らによって盛んに実施されており、その男性ホルモン様作用、免疫増強作用、抗老化作用および認知障害改善作用などが報告されている。<sup>4,5)</sup> 我々の研究グループでもこれまでに、その含有成分研究や血管拡張作用および肝保護作用などに寄与する活性成分の同定を行っている。<sup>6-10)</sup> 本研究では、カンカニクジュヨウの機能解明研究の一環として、その主要フェニルエタノイド配糖体である echinacoside (1) および acteoside (2) が、デンプン負荷マウスにおいて血糖上昇抑制活性が認められたことから、含有フェニルエタノイド成分の抗糖尿病作用を検討した (Figure 1).

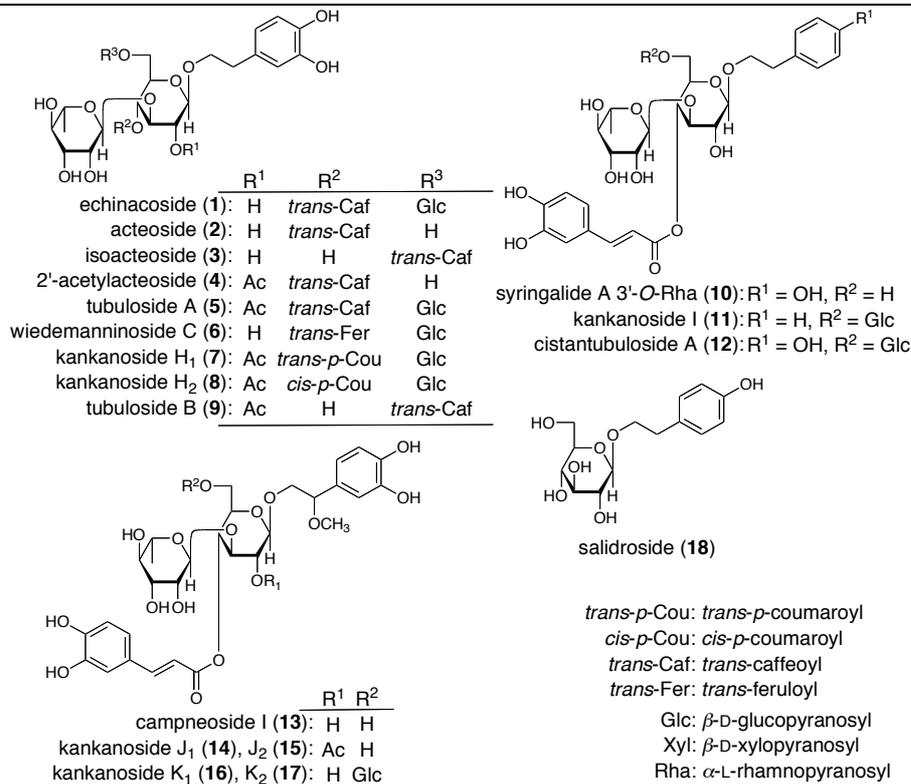


Figure 1. Principal phenylethanoids (1–18) from stems of *Cistanche tubulosa*

#### 対象と方法：

Echinacoside (1) および acteoside (2) について、食後血糖上昇抑制作用を検討する目的で、6 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、α化デンプン (1 g/kg) および 1 または 2 (250-500 mg/kg) を同時経口投与し、30分、1時間および2時間後の血糖値におよぼす影響について検討した。また、10 週齢の ddY 系雄性マウスに 1 または 2 (125-250 mg/kg/day) を投与し、MF 固形飼料にて 2 週間飼育したのち、20 時間絶食後α化デンプン (1 g/kg) 経口投与し、30分、1時間および2時間後の血糖値におよぼす影響について検討し、耐糖能におよぼす影響について検討した。一方、小腸に存在する糖質加水分解酵素であるα-グルコシダーゼの阻害活性について、Figure 1 に示す 18 種の含有フェニルエタノイド成分 (1–18) について、ラットおよびヒト小腸由来の酵素を用い、基質として麦芽糖およびショ糖を用いて検討した。あわせて、糖尿病性白内障や末梢神経障害の律速酵素であるアルドース還元酵素について、ラットレンズ由来酵素を用い、DL-glyceraldehyde を基質とした阻害活性試験を実施した。

#### 結果：

Table 1. Effects of single dose of echinacoside (1) and acteoside (2) on blood glucose levels in starch-loaded mice

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	N	Plasma glucose (mg/dL) <sup>a</sup>			
			0 h	0.5 h	1 h	2 h
Control	—	9	88.9 ± 3.8	246.9 ± 10.5	210.0 ± 9.8	174.8 ± 8.2
Echinacoside (1)	250	5	87.7 ± 7.0	255.0 ± 11.6	179.5 ± 4.1 <sup>b</sup>	148.1 ± 8.2
	500	5	81.4 ± 7.1	227.5 ± 5.2	175.7 ± 3.0 <sup>c</sup>	135.7 ± 7.9 <sup>c</sup>
Acteoside (2)	250	5	88.1 ± 4.2	235.4 ± 4.7	195.8 ± 4.3	164.6 ± 10.0
	500	5	87.0 ± 5.1	222.3 ± 8.0	178.5 ± 3.3 <sup>b</sup>	143.6 ± 5.3 <sup>b</sup>
Control	—	9	100.4 ± 7.2	216.0 ± 8.4	197.3 ± 7.1	172.8 ± 5.1
Acarbose	12.5	7	103.6 ± 7.9	160.6 ± 7.4 <sup>c</sup>	190.5 ± 6.7	201.2 ± 8.8 <sup>b</sup>
	25		99.2 ± 3.4	136.1 ± 3.8 <sup>c</sup>	149.9 ± 4.2 <sup>c</sup>	182.0 ± 10.0

<sup>a</sup>Values represent the means ± S.E.M.

Significantly different from the control group, <sup>b</sup>*p* < 0.05, <sup>c</sup>*p* < 0.01.

Table 1 に示すように、**1** および **2** は 250-500 mg/kg の経口投与において有意な血糖上昇抑制作用が観察された。

また、Table 2 に示すように、**1** および **2** の125-250 mg/kg/day の群において、デンプンを用いた耐糖能試験を実施したところ、有意な血糖上昇抑制作用が認められたことから、**1** および **2** が食後過血糖の上昇抑制のみならず耐糖能の改善作用を有することが示唆された。

**Table 2.** Effects of two weeks administration of echinacoside (**1**) and acteoside (**2**) on blood glucose levels in starch-loaded mice

Treatment	Dose (mg/kg/d, p.o.)	N	Plasma glucose (mg/dL) <sup>a</sup>			
			0 h	0.5 h	1 h	2 h
Control	—	9	99.2 ± 8.5	203.9 ± 8.5	172.4 ± 5.4	146.8 ± 5.3
Echinacoside ( <b>1</b> )	125	5	82.2 ± 4.3	182.9 ± 10.9	143.7 ± 8.4 <sup>b</sup>	122.1 ± 2.7 <sup>c</sup>
	250	5	84.0 ± 4.9	185.7 ± 10.2	147.1 ± 7.7 <sup>b</sup>	124.4 ± 2.3 <sup>c</sup>
Acteoside ( <b>2</b> )	125	5	86.1 ± 5.6	210.7 ± 10.5	179.5 ± 8.4	145.0 ± 4.0
	250	5	79.4 ± 2.3	170.6 ± 6.9	144.4 ± 6.4 <sup>b</sup>	107.1 ± 5.0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Values represent the means ± S.E.M.

Significantly different from the control group, <sup>b</sup>*p* < 0.05, <sup>c</sup>*p* < 0.01.

また、ヒト小腸マイクロゾーム分画由来α-グルコシダーゼを用いたマルターゼ阻害活性を検討したところ、中程度の活性が認められたのみであ

った [**1** (IC<sub>50</sub> = 125 μM), **2** (154 μM), acarbose (15.2 μM)] ことから、本活性の作用点としては糖質加水分解酵素の阻害作用による寄与は低いものと考えられる。加えて、アルドース還元酵素阻害活性について検討したところ、**1** (IC<sub>50</sub> = 3.1 μM), **2** (1.2 μM), isoacteoside (**3**, 4.6 μM), 2'-acetylacteoside (**4**, 0.071 μM), tubuloside A (**5**, 8.8 μM) および B (**9**, 4.0 μM), syringalide A 3-O-α-L-rhamnopyranoside (**10**, 1.1 μM), campneoside I (**13**, 0.53 μM) および kankanoside J<sub>1</sub> (**14**, 9.3 μM) に強い活性が認められた。とりわけ、**4** は市販アルドース還元酵素阻害剤の epalrestat (0.072 μM) と同程度の活性強度であった。<sup>11)</sup>

**Table 3.** Inhibitory effects on enzyme activities on rat small intestinal α-glucosidases, and rat lens aldose reductase (AR) activities

	Rat α-glucosidase IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>		AR IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
	Maltase	Sucrase	
Echinacoside ( <b>1</b> )	149	174	3.1
Acteoside ( <b>2</b> )	188	152	1.2
Isoacteoside ( <b>3</b> )	70.4	152	4.6
2'-Acetylacteoside ( <b>4</b> )	>300 (47.2) <sup>b</sup>	277	0.071
Tubuloside A ( <b>5</b> )	200	220	8.8
Wiedemanninoside C ( <b>6</b> )	>300 (46.2) <sup>b</sup>	>300 (43.5) <sup>b</sup>	>10 (37.8) <sup>c</sup>
Kankanoside H <sub>1</sub> ( <b>7</b> )	>300 (37.1) <sup>b</sup>	>300 (32.5) <sup>b</sup>	>10 (33.9) <sup>c</sup>
Kankanoside H <sub>2</sub> ( <b>8</b> )	>300 (4.6) <sup>b</sup>	>300 (3.1) <sup>b</sup>	
Tubuloside B ( <b>9</b> )	88.2	175	4.0
Syringalide A 3'-O-Rha ( <b>10</b> )	>300 (32.7) <sup>b</sup>	>300 (27.3) <sup>b</sup>	1.1
Kankanoside I ( <b>11</b> )	>300 (27.1) <sup>b</sup>	>300 (26.2) <sup>b</sup>	>10 (33.9) <sup>c</sup>
Cistantubuloside A ( <b>12</b> )	>300 (20.5) <sup>b</sup>	>300 (27.2) <sup>b</sup>	>10 (29.4) <sup>c</sup>
Campneoside I ( <b>13</b> )	>300 (27.0) <sup>b</sup>	>300 (38.8) <sup>b</sup>	0.53
Kankanoside J <sub>1</sub> ( <b>14</b> )	130	242	9.3
Kankanoside J <sub>2</sub> ( <b>15</b> )	131	228	>10 (39.6) <sup>c</sup>
Kankanoside K <sub>1</sub> ( <b>16</b> )	>300 (44.9) <sup>b</sup>	>300 (38.7) <sup>b</sup>	>10 (41.7) <sup>c</sup>
Kankanoside K <sub>2</sub> ( <b>17</b> )	>300 (47.6) <sup>b</sup>	>300 (38.7) <sup>b</sup>	>10 (38.2) <sup>c</sup>
Salidroside ( <b>18</b> )	>300 (5.9) <sup>b</sup>	>300 (8.1) <sup>b</sup>	>10 (12.3) <sup>c</sup>
Acarbose	1.7	1.5	
Epalrestat			0.072

<sup>a</sup>Each value represents the mean of 2-4 experiments. Values in parentheses present inhibition % at <sup>b</sup>300 μM (for α-glucosidases) or <sup>c</sup>10 μM (for aldose reductase).

## 考 察 :

新疆ウイグル自治区にて砂漠緑化事業に伴う人工栽培に取り組んでいる有用植物資源のカンカニクジュヨウについて、新たに抗糖尿病作用を見だし、その活性寄与成分としてフェニルエタノイド配糖体である echinacoside (**1**) および acteoside (**2**) を同定した。加えて、含有フェニルエタノイド成分の2'-acetylacteoside (**4**) に、糖尿病性白内障や末梢神経障害の律速酵素であるアルドース還元酵素に対する強い阻害活性を見出すなど、カンカニクジュヨウの機能性食品素材としての高付加価値化に資する成果を得た。

参考文献：

1. 吉川雅之, 村岡 修 監修：砂漠人参「カンカ」の機能と砂漠緑化, 薬用食品の開発II-薬用・有用植物の機能性食品素材への応用-, シーエムシー出版（東京）, 2012, pp. 249-262.
2. 楊衛 星, 賈 曉光 編：新疆常見薬用植物実用図譜, 新疆科学技術出版社（新疆・中国）, 2006, p. 122.
3. 国家薬典委員会 編：中華人民共和国薬典2010年版 一部, 中国医葯科技出版社（北京・中国）, 2010, p. 126.
4. 第 1 回国際カンカシンポジウム講演要旨集（大阪）, 2007.
5. 第 2 回国際カンカシンポジウム講演要旨集（大阪）, 2008.
6. Xie H., Morikawa T., Matsuda H., Nakamura S., Muraoka O., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 669—675 (2006).
7. Yoshikawa M., Matsuda H., Morikawa T., Xie H., Nakamura S., Muraoka O., *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 7468—7475 (2006).
8. Morikawa T., Pna Y., Ninomiya K., Imura K., Matsuda H., Yoshikawa M., Yuan D., Muraoka O., *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 1882—1890 (2010).
9. Pan Y., Morikawa T., Ninomiya K., Imura K., Yuan D., Yoshikawa M., Muraoka O., *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 575—578 (2010).
10. Morikawa T., Pan Y., Ninomiya K., Imura K., Yuan D., Yoshikawa M., Hayakawa T., Muraoka O., *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 1403—1407 (2010).
11. Morikawa T., Ninomiya K., Imamura M., Akaki J., Fujimura S., Pan Y., Yuan D., Yoshikawa M., Jia X., Li Z., Muraoka O., *J. Nat. Med.*, submitted.

注：本研究は、2013年8月31日-9月1日『第30回和漢医薬学会学術大会』にて口演発表、2013年11月1-2日『第5回食品薬学シンポジウム』にてポスター発表および『*Journal of Natural Medicines*』誌に投稿中（参考文献11）である。

作成日：2014年 3月12日

## リポ多糖刺激によるミクログリア活性化におけるアクアポリン4の役割

研究者氏名 教授 安井正人  
日本所属機関 慶應義塾大学医学部薬理学教室  
共同研究者名 黄 娉, 阿部陽一郎  
中国研究者氏名 教授 韓 晶岩  
中国所属機関 中国北京大学医学部基礎医学院

### 要旨

脳浮腫や炎症性脳疾患に対する新薬開発の標的分子としてアクアポリン4 (AQP4) が注目されている。我々は、炎症性脳疾患におけるミクログリアの活性化にAQP4 が関与していることを示してきた。本研究では、マイクロRNAi (miRNAi) の技術を用いて、ミクログリア、アストロサイトにおけるAQP4 を選択的にノックダウンする手法を確立し、特にミクログリア活性化におけるアクアポリン4発現誘導の役割に着目しつつ、脳浮腫や炎症性脳疾患の新たな治療法開発を目指した。ミクログリア活性化に伴うAQP4の発現誘導については、マウスミクログリア細胞株であるMG5を用いて検討した。この細胞はリポ多糖 (LPS) で刺激すると、IL-1 $\beta$ やIL-6といった炎症性サイトカインの発現が誘導されることが知られている。この細胞を用いてLPS刺激によるAQP4の発現が誘導されるか否か検討したところ、IL-1 $\beta$ やIL-6の誘導に必要な濃度の10倍を要したものの、AQP4の発現が誘導され、この系によりLPS刺激に伴うAQP4発現誘導の意義を解析することが可能であることが確認できた。一方、miRNAiについては、マウスAQP4 (mAQP4)に対するノックダウン効果が期待される4つの候補配列について、mAQP4を安定発現するCHO細胞を用いてその効果を見たところ、少なくとも3種類の配列において効果が認められた。そこでこれら3種類の配列を複数連結したコンストラクトをアデノウイルスベクターに組み込み、初代培養アストロサイトの内在性AQP4に対するノックダウン効果を検討したところ、感染4日目ではほとんど効果が見られなかったが、6日目では完全ではないものの、AQP4の発現が低下した。これはおそらくAQP4タンパク質が比較的安定であり、ノックダウン効果の発現に長期を要すると考えられ、RNAiの手法によるAQP4発現制御による脳浮腫や炎症性脳疾患の治療効果は期待できないとの結論に至った。

**Key Words** 脳浮腫, アクアポリン4 (AQP4), ミクログリア, RNAi, 抗AQP4抗体

### 緒言:

脳浮腫は脳幹ヘルニアを誘発する可能性が高いため、そのコントロールは臨床で極めて重要である。しかしながら、脳浮腫に対する画期的な新薬は未開発のままで、現在なお対症療法に頼らざるを得ない状況が続いている。脳浮腫や炎症性脳疾患に対する新薬開発の標的分子としてアクアポリン4 (AQP4) が注目されている。例えば、AQP4ノックアウトマウスを用いた検討により、細胞毒性脳浮腫においてはAQP4の発現の消失によって脳浮腫の程度が軽減されることが示されている (1)。一方、我々は、脳損傷時にミクログリアでAQP4が発現してくること、更にAQP4ノックアウトマウスを用いることでAQP4を欠如させておくと活性化に伴うミクログリアの形態変化、食食能の増加、サイトカインの誘導が著しく抑制されることを見だし、炎症性脳疾患におけるミクログリアの活性化にAQP4が関与していることを示した (2)。

本研究では、マイクロRNAi (miRNAi) の技術を用いて、ミクログリア、アストロサイトにおけるAQP4を選択的にノックダウンする手法を確立し、ミクログリア活性化におけるアクアポリン4発現誘導の役割に着目しつつ、脳浮腫や炎症性脳疾患の新たな治療法開発を目指す。

### 対象と方法:

#### 1. ミクログリア細胞株MG5におけるリポ多糖によるAQP4の発現誘導

マウスミクログリア由来の細胞株MG5とMG5細胞の培養に必要な培養上清を調製するためのアストロサイト様細胞株A1

細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。MG5 細胞は、A1 細胞の培養上清と 10% ウシ胎仔血清を含む DMEM を 7:3 で混合した培地により培養した。A1 細胞は 10%ウシ胎仔血清を含む DMEM で培養した。

MG5 細胞を活性化させるため、リポ多糖 (LPS, Sigma) 2  $\mu\text{g/ml}$  あるいは 20  $\mu\text{g/ml}$  で 24 時間刺激した。LPS 刺激による AQP4 発現誘導は、RT-PCR により評価した。LPS 刺激後の活性化の指標としては CD11b, IL-1 $\beta$ , IL-6 を用いた。

全 RNA は Isogen (ニッポンジーン) により抽出し、うち 2  $\mu\text{g}$  から SuperScript VILO Master Mix (invitrogen) により cDNA を合成し、GoTaq (Promega) により PCR を行った。用いたプライマーは以下の通りである。AQP4, 5'-AACCTCACCGCTGGCCATGGGCTCCTG-3' and 5'-TACGGAAGACAATACCTCTCCCGAAGAGTC-3'; CD11b, 5'-GACAGGTGCCCTCTACCAGTGTGACTACAG-3' and 5'-TCGTCCGAGTACTGCATCAAAGAGAACAAG-3'; IL-1 $\beta$ , 5'-AGGCCTAATAGGCTCATCTGGGATCCTCTC-3' and 5'-GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTGCAGTTGTC-3'; IL-6, 5'-TTCTTGGGACTGATGCTGGTGACAACCACG-3' and 5'-AGGTAGCTATGGTACTCCAGAAGACCAGAG-3'; GAPDH, 5'-ACTGGTGTCTTACCACCATGGAGAAGGC-3' and 5'-CATGAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTAGC-3'.

## 2. RNAi による AQP4 発現抑制効果の検討

AQP4 のノックダウンは BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (Invitrogen) を用いて構築した。既に用意されている RNAi のターゲットとなる 4 カ所の候補配列に相当するオリゴDNA をそれぞれ pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR に組み込み、特異的プライマーを用いて塩基配列を確認し、それぞれ #24, #25, #26, 及び #27 と命名した。まずは単独での効果を確認し、効果のあったものについては複数連結することにより相乗的に RNAi 効果が得られるか試みた。RNAi は、最終的に *in vivo* 投与による脳浮腫治療効果を検討する目的でゲートウェイシステムを用いてアデノウイルスベクターによる発現系へと組み込んだ。

RNAi の効果は、ウェスタンブロッティングにより AQP4 タンパク質量を陰性コントロールと比較することで評価した。まず pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR に組みこんだコンストラクトを、マウス AQP4 M1 アイソフォーム cDNA を組み込んだ発現ベクターとともに一過性に CHO 細胞にトランスフェクションすることで確認した後、アデノウイルスベクターへと組換え、AQP4 を安定発現した CHO 細胞株、及び初代培養アストロサイトに感染させ、内在性 AQP4 に対する効果を評価した。

## 結果：

### 1. ミクログリア細胞株 MG5 におけるリポ多糖による AQP4 の発現誘導

ミクログリア細胞株である MG5 の LPS 刺激に伴う活性化における AQP4 の役割を調べるため、MG5 細胞を LPS で 24 時間刺激後 RNA を抽出し、RT-PCR により AQP4 の発現レベルを調べた。ミクログリアの活性化は炎症性サイトカイン等、3 種類のマーカーの発現の有無により判断した。CD11b は LPS 刺激前からある程度発現が見られ、LPS 2  $\mu\text{g/ml}$  24 時間の刺激により増加した。一方、IL-1 $\beta$  及び IL-6 は LPS 2  $\mu\text{g/ml}$  24 時間刺激により発現が強く誘導された (図 1)。このことから、生体内のミクログリア同様、MG5 細胞は LPS 刺激により活性化ミクログリアの性質を獲得することが確認できた。この状況下で、AQP4 の発現を調べたところ、LPS 2  $\mu\text{g/ml}$  では誘導されず、20  $\mu\text{g/ml}$  で弱いながら発現が見られた (図 2)。

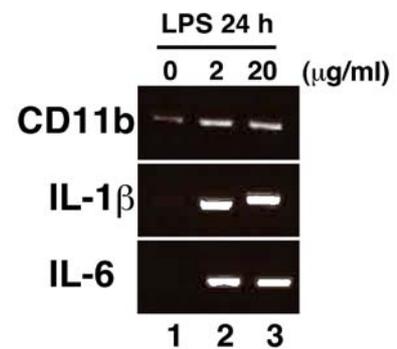


図1. MG5細胞における活性化ミクログリアマーカーの発現。ミクログリア細胞株であるMG5をリポ多糖 (LPS) 2  $\mu\text{g/ml}$  (レーン2)、あるいは20  $\mu\text{g/ml}$  (レーン3) で刺激し、活性化ミクログリアのマーカーであるCD11b、IL-1 $\beta$ 、及びIL-6に対するプライマーセットを用いてRT-PCR法により各マーカーのmRNAレベルでの発現を未刺激の細胞 (レーン1) と比較した。

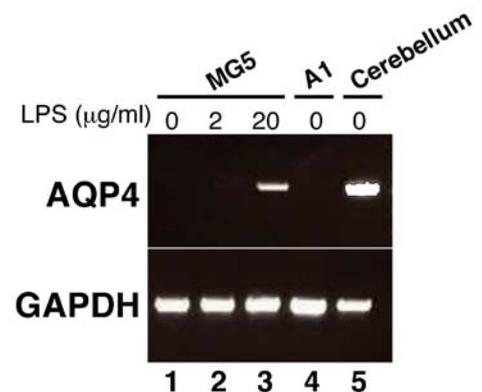


図2. MG5細胞におけるLPS刺激によるAQP4の発現誘導。MG5をLPS 2  $\mu\text{g/ml}$  (レーン2)、あるいは20  $\mu\text{g/ml}$  (レーン3) で刺激し、AQP4に対するプライマーセットを用いてRT-PCR法により各マーカーのmRNAレベルでの発現を未刺激の細胞 (レーン1)、陰性コントロールであるA1細胞 (レーン4)、陽性コントロールである小脳 (レーン5) と比較した。

## 2. RNAiによるAQP4発現抑制効果の検討

AQP4をノックダウンするために適していると考えられる4つの配列の候補をpcDNA6.2-GW/EmGFP-miRに組み込み(図3, a)、AQP4 M1あるいはM23アイソフォームを安定発現するCHO細胞株に一過性導入し、それぞれのノックダウン効果をウェスタンブロッティングにより確認したところ、#25を除く3つのコンストラクトで弱いながらRNAiの効果が認められた。(図4, レーン2、4及び5)。そこで、これらmiR RNAiコンストラクトを複数連結し(図3, b-e)、RNAi効果の増強を試みた。これらコンストラクトをM23L-mAQP4 M1の発現ベクターとともにCHO細胞にトランスフェクションし、AQP4の発現をウェスタンブロッティングにより検討したところ、調べた限り全てのコンストラクトにおいて、ノックダウン効果が確認できた(図5)。これらコンストラクトが、AQP4を内在性に発現する細胞に対しても有効か否かを検討するため、まずM23L-mAQP4 M1を安定発現するCHO細胞株にこれらコンストラクトを一過性に導入し、その効果を検討した。ところが予想に反し、これらコンストラクトは安定発現株に対してはほとんど効果を示さなかった(図6)。この原因の一つとして、miR RNAiのコンストラクトの導入をリポフェクション法による一過性発現の系で行ったため、トランスフェクション効率が低く、RNAiが導入されなかった細胞で全く効果を発揮できなかったためと考えられた。そこで、導入効率がほぼ100%を達成でき、また将来的に*in vivo*での効果が期待できるアデノウイルスベクターを用いることにした。作製したアデノウイルスベクターを初代培養アストロサイトに感染させ、4日目及び6日目にタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングによりAQP4の発現を見たところ、4日目では非感染細胞、あるいは無関係な遺伝子を組み込んだウイルスを感染させた細胞と比較してAQP4の発現量は変化していなかったが、6日目ではAQP4の発現が顕著に減少していた。

### 考察:

1. ミクログリア細胞株MG5におけるリポ多糖によるAQP4の発現誘導  
ミクログリア細胞株MG5を用いた検討より、20 µg/mlという高濃度を要したものの、LPS刺激によりAQP4発現誘導がRT-PCRレベルで確認でき、*in vivo*における現象を再現できることが示された。よってこの系を用いてLPS刺激により誘導されるAQP4の役割を解析することが可能であることが確認できた。

## 2. RNAiによるAQP4発現抑制効果の検討

将来的な*in vivo*における脳浮腫や炎症性脳疾患の治療を視野にい

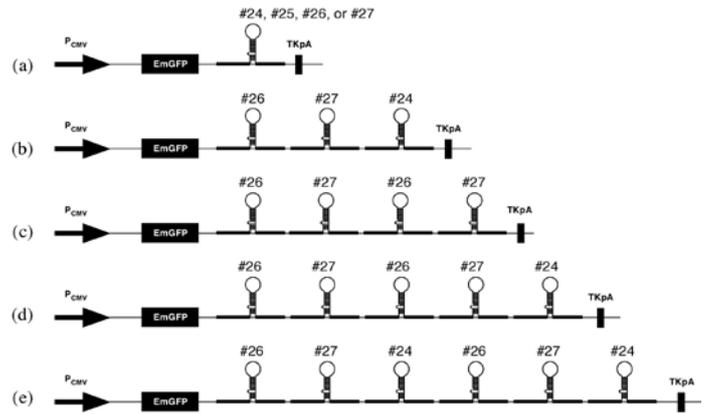


図3. RNAi発現コンストラクトの模式図

AQP4をノックダウンする為に適した4つの配列の候補(#24, #25, #26, #27)をそれぞれpcDNA6.2-GW/EmGFP-miRに組み込み(a)、AQP4を安定発現するCHO細胞に一過性に導入し、その効果を検討した。その結果から、更にいくつかの候補配列を連結したコンストラクトを作製した(b-e)。

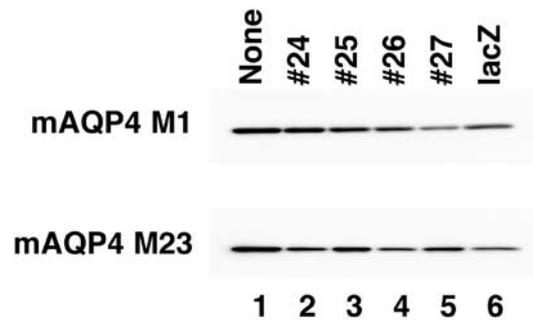


図4 マウスAQP4ノックダウンのためのRNAiの効果の検討  
AQP4をノックダウンする為に適した4つの配列の候補である#24(レーン2)、#25(レーン3)、#26(レーン4)、#27(レーン5)及びAQP4とは無関係な遺伝子(lacZ, レーン6)のRNAi配列をそれぞれpcDNA6.2-GW/EmGFP-miRに組み込み、AQP4 M1(上段)あるいはM23(下段)を安定発現するCHO細胞に一過性に導入し、その効果をWestern blottingにより検討した。

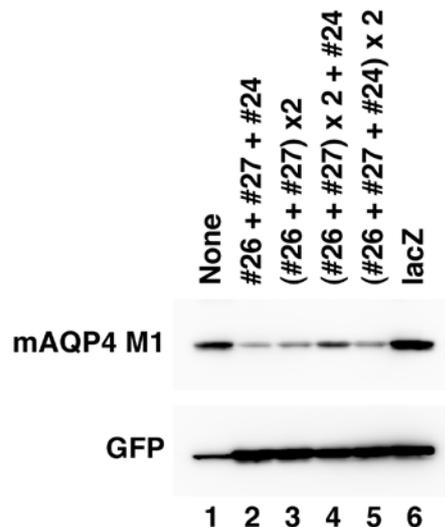


図5 一過性発現系における複数のmiR RNAiによるマウスAQP4ノックダウン効果の検討

マウスAQP4に対してノックダウン効果が見られたRNAiの配列を複数連結し、ノックダウン効果の増強が見られるか否かについて検討した。各RNAiコンストラクトとM23L-mAQP4 M1のほ乳類発現コンストラクトを共発現させ、ウェスタンブロッティングによりノックダウン効果を評価した。各コンストラクトの構造は図3に示している。

れ、特に RNA ポリメラーゼ II により発現誘導可能な miR RNAi の系を用いて mAQP4 のノックダウンを試みた。あらかじめ用意されている 4 種類の候補について個々に検討したところ、3 つのコンストラクトで効果が期待できたため、これらを複数連結したコンストラクトを作製し、効果の増強を試みた。mAQP4 発現コンストラクトとともに一過性に CHO 細胞にトランスフェクションした場合は十分効果が確認できたもの、AQP4 を内在性に発現する細胞にこれら RNAi コンストラクトを一過性に導入し多場合はほとんど効果を示さなかった。一つの原因として、リポフェクション法による遺伝子導入効率の低さが考えられたため、アデノウィルスベクターによりほぼ 100% の導入効率を実現した。しかしながら、ウィルス感染後 6 日を経過しないと RNAi の効果が現れなかった。これはおそらく AQP4 タンパク質が安定であるため、mRNA レベルで抑制できても、タンパク質レベルで効果を発揮するのに時間を要することを示していると考えられる。よって、脳浮腫や炎症性脳疾患の治療目的では RNAi の手法は相応しくないとの結論に至った。

### 3. 今後の展望

RNAi による AQP4 の発現抑制については、予想外に AQP4 タンパク質が安定であったことから、効果の発現に長期を要し、実際の治療に用いることは困難であると予想される。

一方、我々は脱髄を伴う自己免疫疾患である視神経脊髄炎 (NMO) の発症メカニズム解明の過程において、AQP4 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の作製を試み、複数の抗体を得ることに成功した (3, 4)。これら抗体の幾つかは、AQP4 の細胞外ドメインに結合することにより速やかに AQP4 の内在化を引き起こすことが明らかになった。これにより細胞膜表面の AQP4 タンパク質は著しく減少する (投稿準備中) ことから、これら抗体を人 IgG とのキメラ化あるいはヒト化 (humanize) することにより脳浮腫や炎症性脳疾患の新たな治療法の確立が期待される。現在局所脳虚血モデル (中大脳動脈閉塞モデル) による効果の検討に入るところである。

### 参考文献 :

1. Manley, G.T., Fujimura, M., Ma, T., Noshita, N., Filiz, F., Bollen A.W., Chan, P., and Verkman, AS. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat. Med.* (2000) 6, 159-163.
2. Ikeshima-Kataoka, H., Abe, Y., Abe, T., and Yasui, M. Immunological function of aquaporin-4 in stab-wounded mouse brain in concert with a pro-inflammatory cytokine inducer, osteopontin. *Mol. Cell. Neurosci.* (2013) 56, 65-75.
3. Ramadhanti, J., Huang, P., Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Sakihama, T., Misu, T., Fujihara, K., Hamakubo, T., Yasui, M., and Abe, Y. A novel monoclonal antibody against the C-terminal region of aquaporin-4.

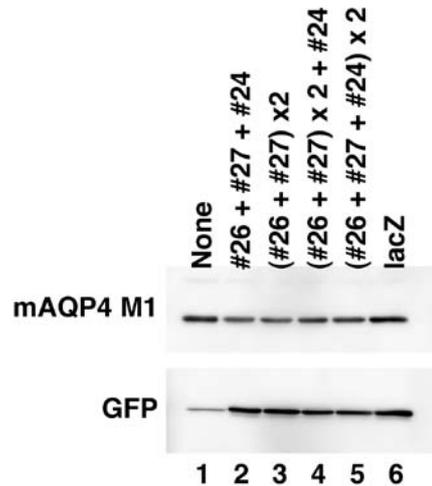


図6 mAQP4安定発現CHO細胞における複数のmiR RNAiによるマウスAQP4ノックダウン効果の検討  
図5で用いたものと同じRNAiコンストラクトをmAQP4安定発現CHO細胞に一過性にトランスフェクションし、AQP4のノックダウン効果をウェスタンブロッティングにより評価した。

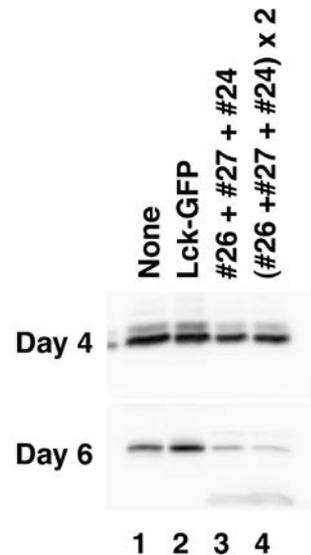


図7 初代培養マウスアストロサイトの内在性AQP4に対するアデノウィルスベクターによる複数のmiR RNAi発現の効果  
mAQP4に対するmiR RNAiをアデノウィルスベクターに組み込み、初代培養アストロサイトに感染させ、4日後、及び6日後にタンパク質を抽出し、内在性AQP4に対するノックダウン効果をウェスタンブロッティングにより評価した。陰性コントロールとしてmAQP4に対してノックダウン効果のないコンストラクトであるLck-GFP (レーン2) を用いている。

*Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* (2013) 32, 270-276

4. Miyazaki, K., Abe, Y., Iwanari, H., Suzuki, Y., Kikuchi, T., Ito, T., Kato, J., Kusano-Arai, O., Takahashi, T., Nishiyama, S., Ikeshima-Kataoka, H., Tsuji, S., Arimitsu, T., Kato, Y., Sakihama, T., Toyama, Y., Fujihara, K., Hamakubo, T., and Yasui, M. Establishment of monoclonal antibodies against the extracellular domain that block binding of NMO-IgG to AQP4.

*J. Neuroimmunol.* (2013) 260, 107-116.

作成日： 2014年 3月 5日

# 頭蓋内胚細胞性腫瘍長期生存例の T2\* 強調像 MRI 所見：全脳室照射 vs. 全脳照射

研究者氏名：李 麗

所属機関名：東北大学病院

## 要 旨

【背景・目的】放射線照射後に MRI-T2 or T2\* 強調像で微小低信号が検出され、放射線による微小血管障害を反映すると考えられている。詳細な検討はなされておらず、臨床的意義は明らかでない。本研究では、脳照射後に微小低信号の数と放射線治療の線量・照射野との関連性を調べる。【方法】頭蓋内胚細胞腫瘍放射線治療後、10 年以上経過した例を対象に、軸位断 T2\* 強調像を用いて微小低信号について全脳室照射群 ( $n = 14$ ) と全脳照射群 ( $n = 19$ ) を比較した。【結果】91% (30/33 例) に微小低信号が検出された。微小低信号は照射野に出現し、全脳室群では平均 3 個、全脳群では平均 8 個が検出された。全脳群は全脳室群に比べて微小低信号が有意に多く出現した ( $P < 0.01$ )。また、高線量照射域では低線量照射域に比べて有意に多かった ( $P < 0.01$ )。【結論】放射線照射後には、微小低信号は照射野に高頻度出現し、照射野の範囲や線量に依存して出現した。

## Key Words

頭蓋内胚細胞腫、全脳照射、全脳室照射、T2\* 強調像、微小低信号

## 緒 言

脳腫瘍に対する全脳照射後の長期生存例における、患者の 20~50% に晩期認知機能障害が指摘されている<sup>1,2</sup>。晩期認知機能障害の発症機序はまだ正確には判っていないが、いくつかの研究では、放射線誘発認知機能障害は、脳血管性認知症であることを示唆している<sup>3</sup>。放射線照射後に MRI-T2 or T2\* 強調像で微小低信号が検出されている。Radiation-induced cavernous malformation と呼ばれ、放射線照射による微小血管障害を反映すると考えられている<sup>4,6</sup>。放射線誘発した、微小低信号の程度に関して、全脳照射群と全脳室照射群との比較研究はまだ報告されていない。本研究では、脳照射後に微小低信号の頻度・数と放射線治療の線量・照射野との関連性を調べる。

## 対象と方法

### 1) 患者

1983 年から 2001 年まで当院で治療された、胚細胞腫瘍 33 症例を対象とした。33 症例は全脳室照射群と全脳照射群に分ける。全脳室群は全脳室をカバーするように放射線をかける症例で、14 例である。全脳群は全脳をカバーする全脳照射が 1 回にかけたことがあるもの、と定義されており、19 症例である。総線量、初回治療時の平均年齢、平均フォロー期間、いずれも 2 群間に有意差はない (表 1)。

### 2) MR 評価

1.5T の MRI 装置 (Signa Horizon LX CV/I; GE Mediacal System, Milwaukee, Wis) で撮影した。全脳室照射の範囲を考慮して、側脳室レベルは Zone 2、側脳室の頭側は Zone 1、側脳室の尾側は Zone 3 と定義する。Zone ごとの平均線量は、表 2 で示している。

画像解析は、軸位断 T2\*強調像 (T2\*WI) を用いてスライスごとに微小低信号を数える。

表 1

	総線量 (Gy)	初回治療時の 平均年齢 (y)	平均フォロー アップ期間 (y)
全脳室群 (n = 14)	54	16	15
全脳群 (n = 19)	51	15	17

表 2

	Zone 1	Zone 2	Zone 3
全脳室群 (n = 14)	0 Gy	54 Gy	0 Gy
全脳群 (n = 19)	24 Gy	51 Gy	24 Gy

## 結 果

### 1) 微小低信号の頻度

T2\* 強調像では、33 例の中に 30 例 (91%) は、微小低信号が検出された (図 1)。

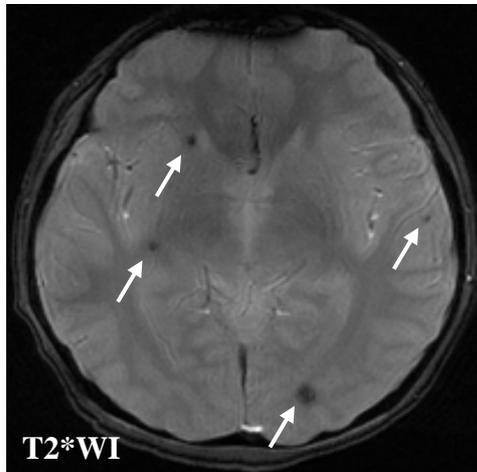


図 1. 微小低信号の検出

### 2) 全脳室群 vs. 全脳群

2 群間で、微小低信号の数を比較した。全脳室群で、平均 3 個の微小低信号が検出され、全脳群で、平均 8 個が検出されている。全脳群は、全脳室群に比べて微小低信号が有意に多かった ( $P < 0.01$ , Mann-Whitney's U test)。

### 3) 高線量域 vs. 低線量域

各群では、各 Zone の微小低信号の数を比較した (図 2)。全脳室群では、Zone 1 と Zone 3 で微小低信号が認められなかった。全脳群では、Zone 2 での微小低信号が Zone 1 or Zone 3 よりも有意に多かった ( $P < 0.01$ , two factor ANOVA followed by the Tukey-Kramer test)。

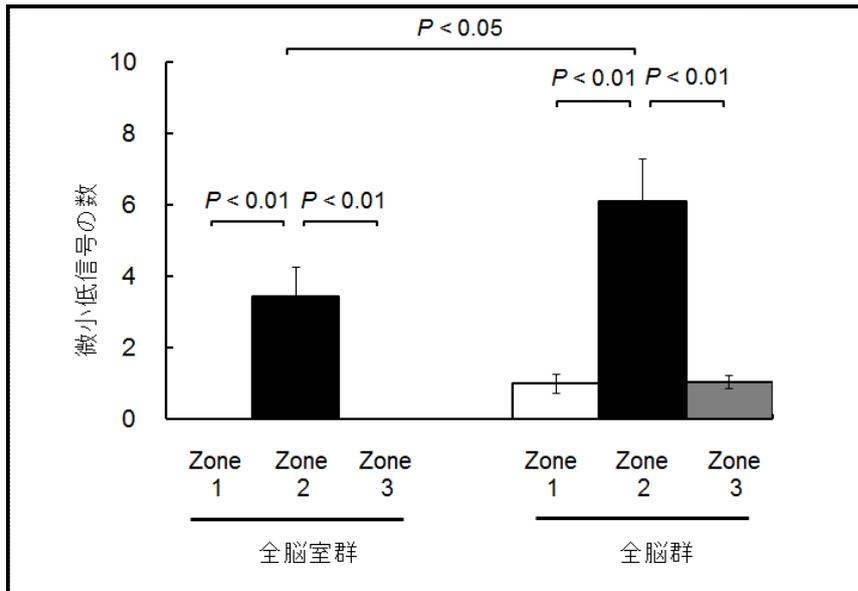


図2. 微小低信号の数の比較：

- (1) 全脳室群 vs.全脳群；
- (2) 高線量域 (Zone 2) vs.低線量域 (Zones 1 and 3)

## 考 察

(1) 本研究では、全症例の91% (30/33例) で微小低信号が検出された<sup>7-9</sup>。T2強調像を用いた過去の研究より高頻度に検出された。原因として、T2\*強調像の高検出感度と、長いフォローアップ期間と、この2つが考えられる。(2) 全脳群は、全脳室群に比べて微小低信号が有意に多かった。全脳群では全脳室群よりも微小血管障害が高度に生じていることが示唆された。(3) 全脳室群では、Zone 2のみ、微小低信号が生じた。この結果から、微小低信号は照射野に出現すると考えられた。(4) 全脳群では、Zone 2での微小低信号が Zone 1、Zone 3よりも有意に多く出現していた。Zone 2の平均総線量は Zone 1、Zone 3よりも有意に高いため、微小低信号は線量に依存して出現する可能性があると考えられた。

## 結 論

放射線照射後には、微小低信号は照射野に高頻度に出現し、照射野の範囲や線量に依存して出現した。

## 参考文献：

1. Roman, D.D. and P.W. Sperduto, Neuropsychological effects of cranial radiation: current knowledge and future directions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1995. **31**(4): p. 983-98.
2. Greene-Schloesser, D., et al., Radiation-induced brain injury: A review. *Front Oncol*, 2012. **2**: p. 73.
3. Brown, W.R., et al., Capillary loss precedes the cognitive impairment induced by fractionated whole-brain irradiation: a potential rat model of vascular dementia. *J Neurol Sci*, 2007. **257**(1-2): p. 67-71.
4. Ciricillo, S.F., P.H. Cogen, and M.S. Edwards, Pediatric cryptic vascular malformations: presentation, diagnosis and treatment. *Pediatr Neurosurg*, 1994. **20**(2): p. 137-47.
5. Gaensler, E.H., et al., Radiation-induced telangiectasia in the brain simulates cryptic vascular malformations at MR imaging. *Radiology*, 1994. **193**(3): p. 629-36.
6. Baumgartner, J.E., et al., Pathologically proven cavernous angiomas of the brain following radiation therapy for pediatric brain tumors. *Pediatr Neurosurg*, 2003. **39**(4): p. 201-7.

7. Lew, S.M., et al., Cumulative incidence of radiation-induced cavernomas in long-term survivors of medulloblastoma. *J Neurosurg*, 2006. **104**(2 Suppl): p. 103-7.
8. 11. Burn, S., et al., Incidence of cavernoma development in children after radiotherapy for brain tumors. *J Neurosurg*, 2007. **106**(5 Suppl): p. 379-83.
9. 12. Koike, S., et al., Asymptomatic radiation-induced telangiectasia in children after cranial irradiation: frequency, latency, and dose relation. *Radiology*, 2004. **230**(1): p. 93-9.

注：本研究は、2013年12月1日『99<sup>th</sup> *Radiological Society of North America (RSNA)*』にて発表

作成日：2014年3月12日

## 結節性硬化症における白斑の病態解明から、結節性硬化症の治療薬開発へ

研究者氏名：楊 伶俐

共同研究者：楊 飛、 田中 まり

実験助手：滕 蘭婷

所属機関名：大阪大学医学系研究科皮膚科教室

### 要 旨

結節性硬化症 (Tuberous Sclerosis Complex, TSC) は全身に過誤腫と呼ばれる良性腫瘍や顔面血管線維腫、てんかん、精神発達遅延、白斑など多彩な症状を示す疾患であるが、その病態はまだ未解明であり、確立された治療法はない。結節性硬化症 (Tuberous Sclerosis Complex) は原因遺伝子 TSC1, TSC2 が同定されているが、病態に未解明な部分が多く、確立された治療はない。

本研究では、結節性硬化症における白斑の病態解明するため、1) 正常皮膚から樹立された Melanocyte, keratinocyte, fibroblast を用いて、TSC1, TSC2 を SiRNA でノックダウン (KD) し、また、2) 結節性硬化症患者から Melanocyte, keratinocyte, fibroblast を樹立して、患者さんの病態を細胞レベルで再現するモデルを構築し、遺伝子、蛋白発現 profile の中、色素産生などの病態へ影響する因子を探索した。

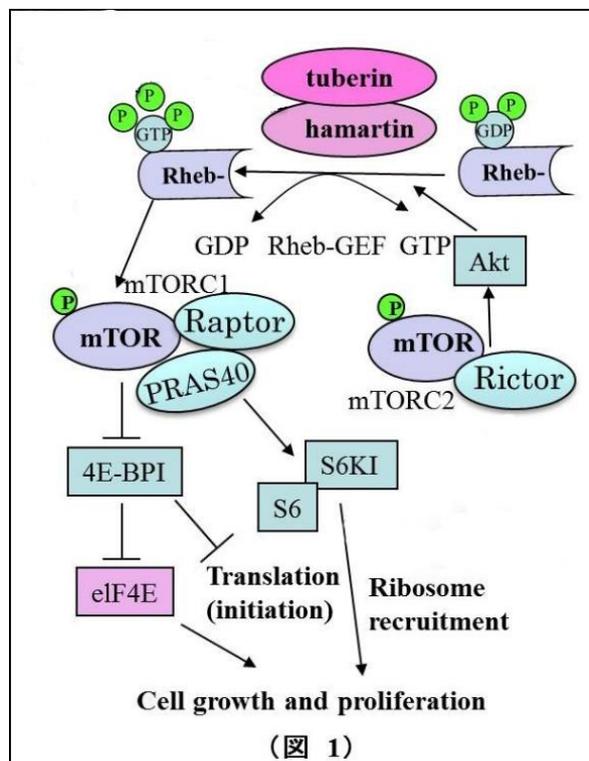
探索した結果、1) 正常メラノサイトと比べ、作られた結節性硬化症白斑モデルメラノサイトでは、オートファジー機能の低下が見られた。2) メラノサイトにおいて、オートファジー機能の低下が色素産生の低下と関連していることが分かった。3) メラノサイトにおけるオートファジーの機能異常が結節性硬化症の白斑形成に関与することが示唆された。

そこで、オートファジーがどのように色素産生と関連しているかについて解析し、結節硬化症の更なる病態解明および治療にもつながると考えられる。

Key Words : 結節性硬化症、 TSC、 白斑、 オートファジー

**緒言：**結節性硬化症は1835年に初めて報告された疾患で<sup>1)</sup>、皮膚、神経系、腎、肺、骨など全身過誤腫を特徴とし、皮膚以外にも脳、肺、心、腎、骨などのほぼ全身の臓器に多様な症状を呈する。1935年に常染色体優位遺伝であることが判明した<sup>2)</sup>。しかし、その後、約一世紀にわたってほとんど病態の解明はなされなかった。

1993年に16番の染色体上にTSCの遺伝子の一つであるTSC2遺伝子が<sup>3)</sup>、さらに1997年には9番染色体上にTSC1の遺伝子が同定されたことにより<sup>4)</sup>、本症の解明が飛躍的に進んだ。さらに最近、図1に示しているように、tuberin-hamartin複合体がRheb (Ras homolog enriched in brain)のGTPase activating protein (GAP)として作用し、Rheb-GTPを不活性化し、mammalian target of rapamycin complex1 (mTORC1)を抑制することにより、その下流のS6K1, ribosomal protein S6や4E-BP1に作用することが分かった<sup>5)</sup>。その結果、細胞の増殖や大きさが制御される。これら、TSC1, TSC2の作用機序で、TSCの腫瘍形成のメカニズムは説明できるが、白斑などの腫瘍病変以外のメカニズムは説明できない事の方が多く、今後のさらなる研究が必要と思われる。



**対象と方法：**

1) 正常皮膚から樹立された Melanocyte, keratinocyte, fibroblast を用いて、TSC1, TSC2 遺伝子発現を SiRNA でノックダウン (KD) し、結節性硬化症モデル細胞を構成し、また、2) 結節性硬化症患者から Melanocyte, keratinocyte, fibroblast を樹立して、患者さんの病態を細胞レベルで再現するモデルを構築し、マイクロアレイ遺伝子解析方法、proteome 解析方法とパスウェイ解析などを用い、それらの遺伝子、蛋白発現 profile の中、色素産生などの病態へ影響する因子を探索する。以上より得られた結果を real-time PCR、western blotting、細胞免疫染色、組織免疫染色、電子顕微鏡などで再検討する。

**結果：**

以上マイクロアレイ遺伝子解析方法、proteome 解析方法とパスウェイ解析など網羅的な解析と他詳細な解析を行った結果、メラノサイトにおいて、興味深いデータを得ることができた。

1) 正常メラノサイトと比べ、RNAi 手法により TSC1, TSC2 をノックダウンした結節性硬化症白斑モデルのメラノサイトでは、オートファゴゾームのマーカーである LC3 の発現が低下している

ことが見られた。また、それとともに、色素産生マーカである TRP-1、Melan-A などのタンパク質レベルの発現が TSC1、TSC2 遺伝子欠損により、有意に減少していることも見られた。2) メラノサイトにおいて、オートファジーの重要因子である ATG7 をノックダウンすることにより、色素産生能が顕著に抑えられることが見られた。この結果から、オートファジー機能の低下が色素産生の低下と関連していることが分かった。3) メラノサイトにおけるオートファジーの機能異常が結節性硬化症の白斑形成に関与することが示唆された。

**考察 :**

結節性硬化症は、下記図 2 で示しているように TSC1、TSC2 とよばれる遺伝子の異常により、PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達系の制御機能が働かなくなり、mTOR という酵素が過剰に活性化されることが言われているが、本研究では、表皮メラノサイトにおいて、TSC1、TSC2 遺伝子欠損することにより、これまでに、オートファジーは細胞が飢餓状態に陥った際に、細胞質やオルガネラの一部を分解して、生き延びるためのエネルギーやタンパク質を合成するといわれている。臨床医療においては、オートファジーが、がん、アルツハイマー病などの神経変性疾患、2 型糖尿病、感染症など様々な疾患に関与することが分かっている。本研究では、結節性硬化症モデルのメラノサイトでは、オートファジーが低下されるとともに、色素産生機能が低下することが分かった。メラノソーム熟成や分泌にオートファゴゾームが深く関わっていることが示唆される。また、これらの機序は結節性硬化症白斑の病態形成に関与していることも示唆された。本研究成果を活用することで、皮膚の色素産生、白斑病態形成に新たなアプローチを提案できると考えられる。

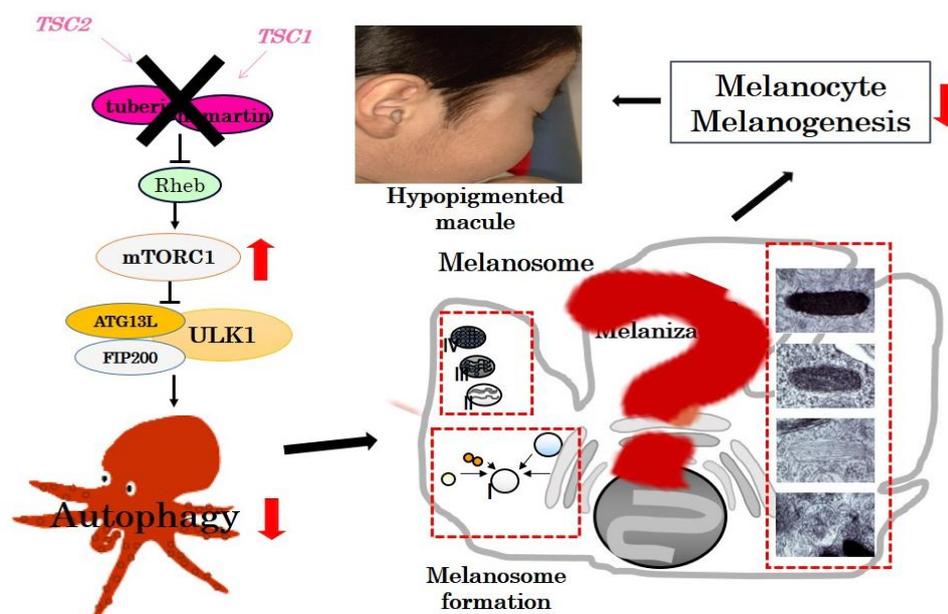


図 2

参考文献 :

- 1) Rayer PFO: Traite theorique et pratique des maladies de la peau ed. JB baillier, Paris, 1835.
- 2) Gunther M, Penrose LS: The genetics of epiloia. J Genet, 31: 413-430, 1935.
- 3) The European chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium: Identification and characterization of tuberous sclerosis gene on chromosome 16, Cell, 75: 1305-1315, 1993.
- 4) Van Slechtenhorst M, Hoogt R, Hermans C, et al: Identification of The Tuberous Sclerosis Gene TSC1 on Chromosome 9q34, Science, 277: 805-809, 1997.
- 5) Potter CJ, Huang He, Xu T: Drosophila TSC1 functions with TSC2 to antagonize insulin Signaling regulating cell growth cell proliferation, and organ size, Cell, 105: 357-368, 2001.

注: 本研究は、2013年11月16日「第25回日本色素細胞学会学術大会」国際シンポジウムにて口演発表。

2014年3月11日