

2015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

2015 年度共同研究等助成事業報告集目次

1. 調査・共同研究

成相 直	日中のもやもや病多発家系における全エクソーム解析による人種差を超えた真の病因遺伝子の探索……………	1
崔 星	重粒子と分子標的薬 Lapatinib や Pertuzumab との併用による乳癌幹細胞殺傷効果……………	6
貫名 信行	神経変性におけるタンパク質凝集の制御機構の解明 ……………	12
余 福勲	重症熱性血小板減少症候群（SFTS）迅速診断試薬の開発……………	16
小室 一成	食塩感受性高血圧の発症における炎症細胞の役割……………	20
寺坂 和祥	ウスバサイシンにおけるアリストロキア酸の蓄積機構の解明……………	24

2. 若手在留中国人研究者助成

夏 巨峰	肝細胞癌における漢方薬 cinobufacini および doxorubicin 併用投与有効性の検証……………	29
駱 予倩	らい菌のマクロファージ内寄生分子機構における peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) シグナルの関与…	33

日中のもやもや病多発家系における全エクソーム解析による 人種差を超えた真の病因遺伝子の探索

研究者氏名 □ 准教授 成相 直
日本所属機関 東京医科歯科大学脳神経機能
外科学分野
中国研究者氏名 □ 教授 段 煉
中国所属機関 中国人民解放军307医院脳血
管中心

要 旨

中国と日本のもやもや病の治療センターである2研究期間において共同で病因解明のための疾患関連遺伝子解析を行うための体制を整えた。東京医科歯科大学チーム、307 医院チームいずれもが自国患者の全エクソーム解析を取得研究費と用いて進めたことにより、これまで未報告のもやもや病関連の新規遺伝子変異を発見しており双方が現在学術誌投稿中であることを確認した。ただし、現時点ではそれぞれの国で共同研究者がいるため論文公表が確認されるまではデーターをオープンとする事が出来ないことも確認した。

一方で、双方の論文が採択された暁には、これまで取得した全エクソームデーターを交換して解析することでそれぞれの視点から今回発見した新規遺伝子変異の他国患者での発現に関する検討を行い民族差を超えた変異として認められるかどうかを検証することを契約した。

Key Words もやもや病，エクソーム解析，関連遺伝子，脳虚血

研究の背景と目標：

もやもや病は、脳ウィリス動脈輪の進行性狭窄とそれに伴う異常血管網増生により、小児と若年成人に脳梗塞や脳内出血を引き起こす原因不明の難病である。有病率は人口 10 万人あたり 3.16-10.5 人程度と報告されているように患者数は少数ではあるが、若年者に高度の脳障害をもたらす疾患の代表でありその治療法の探求は社会的にも意義は大きい。

現在までに疾患遺伝子同定のため連鎖解析や関連解析が行われ、近年有望な疾患遺伝子座として第17染色体のRNF213遺伝子領域のp. R4810K多型が同定され注目を集めた(Kamada et al. 2011, Liu et al. 2011)。しかし、この遺伝子変異は正常日本人やもやもや病以外の脳血管閉塞症患者でもしばしば発現することもわかり、またknock-inおよびknock-out mouseの両方で血管病変の発生につながらないことがわかったため、病因遺伝子変異とは考えられないと認識されるに至っている。さらに、この遺伝子変異は同じもやもや病と診断される患者においても発現率に人種差が大きいことも明らかとなった。すなわち同変異は日本人患者では80-90%の陽性率だが、中国人では20-30%、コーカサス人種に至っては0%であるなど、現実には人種を超えて共通に発生している脳血管病変の原因となる遺伝子変異の探索には更なるアプローチが必要であることが認識されるに至っている

人種差を超えた真のもやもや病病因遺伝子を発見するためのアプローチとしては、もやもや病を35年以上診療しつつ長期にわたるデーターベースを構築しかつ80家系をフォローしている東京医

科歯科大学脳神経機能外科学教室(Mukawa et al. 2012, Mukawa et al. 2013, Mukawa et al. 2015)と緊密な協力関係を維持している中華人民共和国人民解放軍脳血管センター脳神経外科段煉教授(東京医科歯科大学脳神経外科にて医学博士を取得し、現在中国のもやもや病治療のトップとなっている)が近年急速なペースで渉猟している中国のもやもや病患者とその家系(年間約350人の新規患者を受け入れ、最近一年半の治療例の中で既に55家系の家族発症例を集積報告している)の調査(Bao et al. 2012, Duan et al. 2012, Han et al. 2014, Bao et al. 2015, Liu et al. 2016)により、既報告RNF213遺伝子領域のp. R4810K多型が陰性な家系内の悉皆ゲノム解析を行う事が真の病因遺伝子の発見のための最短アプローチであると認識するに至り本研究を開始した。

対象と方法：

対象は、東京医科歯科大学脳神経機能外科学において1980年以降整備されている700名を超えるもやもや病患者のデータベースのうち、80家系の家族性もやもや病患者を解析の対象とした。全サンプルに対し既報告の関連遺伝子であるRNF213遺伝子領域R4810K多型のgenotypingを行ない同変異陰性の検体についてはRNF213遺伝子全coding領域の解析を行なっている。さらにRNF213遺伝子全coding領域にも有意な変異が見られないサンプルと、臨床的に貴重なサンプルに関しては全遺伝子領域を対象とした全エクソーム解析を行っている。

中国での対象は人民軍307医院脳血管中心が多数治療している同国のもやもや病患者であり、年間350-400例の新規患者を対象として同施設のバイオリソースセンターに集積されたDNAからの全エクソーム解析を行っている。この両施設のデータベースを結びつけ人種差を超えた真の疾患関連遺伝子を同定するための方策の策定に関し交流を行った。

研究期間における交流活動と今後の展望：

もやもや病患者の全エクソーム解析に関しては両施設のこれまでの方針に基づき研究を継続した。東京医科歯科大学の研究ではRNF213全領域の解析からp. R4810K多型以外の変異も疾患と有意に相関していることを明らかにした(Moteki et al. 2015)。中でもp. R4062Q変異は、一般人口に存在せず、複数の家族性もやもや病家系で検出されたのみならず、p. R4810K多型の発現がこれまで認められないとされていたコーカサス民族であるドイツ人のもやもや病患者に認められたことで、初の人種差を超えたもやもや病の発病に関与する病的変異であると認定されるに至った。更に長期フォローアップ患者から剖検サンプルも得られたので剖検標本の遺伝子解析も進めることができた(Mukawa, Nariai et al. 2015)。

研究交流に関しては、2015年7月にベルリンで開催された第4回国際もやもや病学会にて中国側の共同研究者である段煉教授と成相らの東京医科歯科大学チームが共々参会したため当地において共同研究打ち合わせ会を開催した。また、この両者に加えソウル国立病院のEun Jeong Kim教授との三者で日中韓の共同研究に関しても打ち合わせた。その結果、日中韓の三国での甲状腺機能亢進症に伴うもやもや病に関しての血液中ターゲット物質の調査を進めることなどを決定した。2016年2月には成相が北京の人民軍307医院脳血管中心を訪問しセミナーを行うとともに研究の現状に関し同センターのチームと討議した。

本研究期間の終了時点において東京医科歯科大学チーム、307医院チームいずれもが自国患者の全エクソーム解析を取得研究費と用いて進めたことにより、これまで未報告のもやもや病関連の新規遺伝子変異を発見しており双方が現在学術誌投稿中であることを確認した。それぞれの国で共同研究者がいるため論文公表が確認されるまではデータベースをオープンとする事が出来ないことも確認した。また、本論文の採択までは本報告書に関しても発見された変

異に関しての具体的な記載はできないことを容赦願いたい。

一方で、双方の論文が採択された暁には、これまで取得した全エクソームデータを交換して解析することでそれぞれの視点から今回発見した新規遺伝子変異の他国患者での発現に関する検討を行い民族差を超えた変異として認められるかどうかを検証することを契約した。

なお、東京医科歯科大学成相と北京の人民軍307医院脳血管中心の段煉教授との交流に関しては日中医学誌において紹介したので本報告書にも添付しておく。

結語：

これまでの日中のもやもや病治療センターにおける全エクソーム解析を用いた共同研究の中間結果からは日本からの既報告のRNF213遺伝子領域のp. R4810K多型以外の遺伝子変異がもやもや病の関連遺伝子として存在することは明らかになったと言える。むしろ同変以外のものが人種差を超えた疾患発現に関与する度合いが強いと思われる傍証もある。

今後の更なる交流の継続により両国での全エクソーム解析のオープン化ができればもやもや病の病因解明に大きな貢献ができるものと確信している。

また、本研究の成果の一部は、2016年4月16日に札幌で開催される第41回日本脳卒中学会総会でのシンポジウム「もやもや病の病因に迫る一血管病の病因を解く鍵」に演題採用され発表予定である。

活動記録 1

左より Eun Jeong Kim 教授、段煉教授、成相（第4回国際もやもや病学会（ベルリン）にて）



活動記録 2

北京307医院脳血管中心でのもやもや病セミナー後の同センター診療チームとの写真（2016年2月29日北京にて）



活動記録 3



20年の友好から始まった日中共同もやもや病研究 —段煉先生との交流を中心に—

東京医科歯科大学脳神経外科准教授
成相 直

筆者の日中共同研究の中国側のパートナーである段煉先生(解放军307医院・脳血管中心・脳神経外科・教授)に初めてお会いしたのは1996年10月20日のことでした。段先生は日本での研究留学を東京医科歯科大学脳神経科学教室で行うために来日されたのですが、当時筆者は「医局長」という教室の雑用係主任のような役職にあったため段先生を成田空港に出迎えに行ったのでした。その時の思い出を段先生が教室の発足30周年記念誌(1997年発行)に記されているのでその一部を転載します。

"October 20, 1996, it was cloudy Sunday. I felt nervous and scary when I arrived at the modern Narita airport from China since I could not speak Japanese. But after getting out of the custom I easily found Dr. Nariai, a very gentle young man who can speak English fluently. He introduced himself and the situation of the neurosurgical department, meanwhile taking me getting to the neurosurgical office of the university in Tokyo."

日本語が全くできないことを心配しながら来日された段先生に、英語でのコミュニケーションで問題なく日本で生活できるという印象を与えることができたのが私との出会いでした。

段先生は悪性脳腫瘍の基礎研究で医学博士を取得され2001年に中国に帰国されました。しかし、段先生の留学期間に興味を最もかき立てたのは「もやもや病」の治療でした。

「もやもや病」は子供や若い成人の脳血管に閉塞を来す原因不明の病気で、脳神経外科で行う血行再建術が一定の効果を持つ疾患です。当教室は当時の助教授であった松島善治先生が開発されたEDASと言う手術(頭皮の血管を血流が不足している脳の表面に置くだけで脳の血流が改善する手術。



図1 2014年6月に段煉先生が北京で主催した第4回国際もやもや病学会で講演を行った演者。左から韓国ソウル国立大学のKim先生、段煉先生、米国Stanford大学のLee先生、筆者。

後継の少ない効果的な手術法として広まった)により多くの患者を治療しています。段先生は留学中にこの手術の効果が非常に良いことに強い印象を持たれ、中国に帰国されて以来中国のもやもや病にこの手術法を積極的に用いることを始められたのです。

そして、現在では中国のもやもや病治療のトップとして認知されるようになりました。もやもや病は、比較的稀な疾患であり日本ではおそらく一万人程度の患者数と推測されていますが、現在段先生のもとには、年間で300-400人の患者さんが訪れるようになり、世界一のもやもや病治療センターになっていきます。

筆者が日本で治療する患者と段先生が中国で治療する患者の情報を交換することで、現在は原因不明の疾患の病因を追及して手術をしないで治せる疾患にしていきたいというのが段先生と私の共通の目標です。そのためには民族を超えた患者情報の収集が必要です。段煉先生が中国で企画している多国間共同研究(図1)も始まりました。これまでの友情を今後の日中合同での研究成果に結びつけることが私たちの現在の目標です。

日中医学 2015.11: Vol.30 No.3
61

参考文献:

- Bao, X. Y., L. Duan, D. S. Li, W. Z. Yang, W. J. Sun, Z. S. Zhang, R. Zong and C. Han (2012). "Clinical features, surgical treatment and long-term outcome in adult patients with Moyamoya disease in China." *Cerebrovasc Dis* **34**(4): 305-313.
- Bao, X. Y., L. Duan, W. Z. Yang, D. S. Li, W. J. Sun, Z. S. Zhang, R. Zong and C. Han (2015). "Clinical features, surgical treatment, and long-term outcome in pediatric patients with moyamoya disease in China." *Cerebrovasc Dis* **39**(2): 75-81.
- Duan, L., X. Y. Bao, W. Z. Yang, W. C. Shi, D. S. Li, Z. S. Zhang, R. Zong, C. Han, F. Zhao and J. Feng (2012). "Moyamoya disease in China: its clinical features and outcomes." *Stroke* **43**(1): 56-60.
- Han, C., H. Feng, Y. Q. Han, W. W. Liu, Z. S. Zhang, W. Z. Yang and L. Duan (2014). "Prospective screening of family members with moyamoya disease patients." *PLoS One* **9**(2): e88765.
- Kamada, F., Y. Aoki, A. Narisawa, Y. Abe, S. Komatsuzaki, A. Kikuchi, J. Kanno, T. Niihori, M. Ono, N. Ishii, Y. Owada, M. Fujimura, Y. Mashimo, Y. Suzuki, A. Hata, S. Tsuchiya, T. Tominaga, Y. Matsubara and S. Kure (2011). "A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene." *J Hum Genet* **56**(1): 34-40.
- Liu, P., C. Han, D. S. Li, X. L. Lv, Y. X. Li and L. Duan (2016). "Hemorrhagic Moyamoya Disease in Children: Clinical, Angiographic features, and Long-Term Surgical Outcome." *Stroke* **47**(1): 240-243.
- Liu, W., D. Morito, S. Takashima, Y. Mineharu, H. Kobayashi, T. Hitomi, H. Hashikata, N. Matsuura, S. Yamazaki, A. Toyoda, K. Kikuta, Y. Takagi, K. H. Harada, A. Fujiyama, R. Herzig, B. Krischek, L. Zou, J. E. Kim, M. Kitakaze, S. Miyamoto, K. Nagata, N. Hashimoto and A. Koizumi (2011). "Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in

vascular development." PLoS One **6**(7): e22542.

Moteki, Y., H. Onda, H. Kasuya, T. Yoneyama, Y. Okada, K. Hirota, M. Mukawa, T. Nariai, S. Mitani and H. Akagawa (2015). "Systematic Validation of RNF213 Coding Variants in Japanese Patients With Moyamoya Disease." J Am Heart Assoc **4**(5).

Mukawa, M., T. Nariai, M. Inaji, N. Tamada, T. Maehara, Y. Matsushima, K. Ohno, M. Negi and D. Kobayashi (2015). "First autopsy analysis of a neovascularized arterial network induced by indirect bypass surgery for moyamoya disease: case report." J Neurosurg: 1-4.

Mukawa, M., T. Nariai, Y. Matsushima and K. Ohno (2013). "Clinical features of familial juvenile cases of moyamoya disease: analysis of patients treated in a single institute over a 28-year period." J Neurosurg Pediatr **12**(2): 175-180.

Mukawa, M., T. Nariai, Y. Matsushima, Y. Tanaka, M. Inaji, T. Maehara, M. Aoyagi and K. Ohno (2012). "Long-term follow-up of surgically treated juvenile patients with moyamoya disease." Journal of neurosurgery. Pediatrics **10**(5): 451-456.

作成日 : 2016年 3月15日

重粒子と分子標的薬 Lapatinib や Pertuzumab との併用 による乳癌幹細胞殺傷効果

研究者氏名	主任研究員 崔 星
日本所属機関	独立行政法人放射線医学総合研究所
共同研究者名	教授 于 冬
中国所属機関	蘇州大学 放射線医学防護学院

要旨

乳癌はサブタイプにより癌細胞の性質が異なる。その中で HER2 陽性乳癌は予後不良群でしたが、HER2 を標的とする分子標的薬（ハーセプチン）の登場により劇的に改善された。しかし、HER2 陽性群は依然 HER2 陰性群に比べ再発や転移を来しやすい。放医研では今まで 10 例近い重粒子線による乳癌試験治療を行っており、良好な治療成績が得られている。本研究では、乳癌細胞株 BT474、SKBR3 を用い、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞を分離・同定し、これら癌幹細胞に対して、炭素線、X 線照射単独或いは Lapatinib との併用後の細胞生存、spheroid 形成能、apoptosis 誘導の違い、癌幹細胞の割合の変化、細胞周期や DNA 損傷の違いについて比較検討した。BT474、SKBR3 細胞において CD44+細胞集団は検出できず、ESA+/CD24-細胞集団は 0.9~1.5%と存在し、ESA-/CD24+細胞集団に比べ有意に高い spheroid 形成能を有することが認められた。さらに、ESA+/CD24-割合は、X 線と Lapatinib との併用処置では顕著に増加させるのに対し、炭素線と Lapatinib との併用処置では有意に減少させ、顕著な subG1 や G2/M 期の延長、apoptosis 誘導が認められた。また、炭素線と Lapatinib との併用処置 24h 後、X 線照射のものに比べ、より大きいサイズの γ H2AX foci が認められた。以上より、HER2 陽性乳癌細胞において、ESA+/CD24-細胞は明らかに自己複製や放射線抵抗性を示しており、炭素線と Lapatinib との併用は炭素線、X 線照射単独に比べてより修復しにくい複雑な DNA 損傷を与えることによって乳癌幹細胞を有効的に殺傷する可能性を示唆した。

Key Words : 乳癌幹細胞、重粒子、生存率、DNA 修復

緒言

乳癌は女性がかかりやすい癌第 1 位で、日本では年間 5 万人超が新たに乳癌と診断され、女性癌死者数では、癌死全体で第 5 位となっている。中国では毎年 25 万人と世界平均の 2-3 倍増加率で増えており、2021 年以降では 250 万人になると推測しており、大きな社会問題となっている。現在、放医研では QOL に優れている重粒子臨床試験治療を開始しており、重粒子乳癌治療の効果をより高度な先進医療に発展させるためには、いかに再発や転移と深くかかわる癌幹細胞まで殺傷できるかなど分子レベルのメカニズム解明が不可欠である。近年乳癌治療においては、各種新規分子標的薬の有効性が報告され、その中の Lapatinib は、分子量が小さいため、細胞膜を通過し細胞内に入り EGFR および HER2

の 2 つの受容体に共通のチロシンキナーゼドメインに直接結合して、下流のシグナル伝達を抑制し、腫瘍細胞の増殖抑制或はアポトーシスを誘導することで制癌効果が証明され(1)、最近の海外臨床試験においては、Lapatinib 単独或は Trastuzumab との併用による手術可能な HER2 陽性乳癌や早期乳癌に対し有効性が報告されている(1, 2)。また、Pertuzumab は、HER2 受容体と他の HER 受容体 (EGFR/HER1、HER3 および HER4) との二量化を特異的に阻害するヒト化モノクローナル抗体で、進行性、転移性 HER2 陽性乳癌に有効であることが報告され(3)、新たな乳癌分子標的薬として期待されている。本研究では、乳癌細胞株 BT474、SKBR3 を用い、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞を分離・同定し、これら癌幹細胞に対して、炭素線、X 線照射単独或いは Lapatinib との併用後の spheroid 形成能、apoptosis 誘導の違い、癌幹細胞の割合の変化、細胞周期や DNA 損傷の違いについて比較検討した。

対象と方法

細胞株は BT474、SKBR3 の 2 種類の乳癌細胞株を使用し、乳癌幹細胞マーカーとされる ESA-PE、CD24-FITC を用いた。まず、BT474、SKBR3 細胞から FACS Aria を用い、癌幹細胞様細胞 (ESA+/CD24-細胞)、非癌幹細胞 (ESA-/CD24+細胞) を分離収集し、癌幹細胞様性質の有無を spheroid 形成能について評価した。そして、BT474、SKBR3 それぞれ細胞に対し、X 線或いは炭素線照射後の癌幹細胞様細胞 (ESA+/CD24-細胞) の割合の変化を FACS Aria にて解析した。炭素線照射は HIMAC (290 MeV/n, 50 keV/mm, 6-cm SOBP 中心)、X 線照射は 200kV_p (Pantac HF-320S, Shimadzu Co., Tokyo) を使用した。細胞周期解析には FACS Calibur (BD Bioscience) を、細胞生存は CellTiter-Glo™ kit (ProMega 社)、apoptosis 解析は Annexin V-PI kit (BD Bioscience)、DNA 損傷解析は γ H2AX 抗体 (Abcam 社) 用いて免疫蛍光染色法にて検出した。

結果

まず、炭素線と Lapatinib との併用は炭素線、X 線照射単独より有意な細胞生存を抑制が認められた (Fig. 1)。上記細胞において、ESA+/CD24-細胞集団は ESA-/CD24+細胞に比べ sphere 形成能が高く、炭素線と Lapatinib との併用によりその形成能が有意に抑制された (Fig. 2)。BT474 細胞において ESA+/CD24-細胞の割合は 0.9-1.5% 検出され、炭素線と Lapatinib との併用は炭素線、X 線照射単独に比べその ESA+/CD24-細胞の割合を有意に低下させた (Fig. 3)。細胞周期及び Apoptosis 解析では、炭素線と Lapatinib との併用処置では炭素線、X 線照射単独に比べ顕著な subG1 や G2/M 期の延長及び apoptosis 誘導が認められた (Fig. 4, 5)。また、BT474、SKBR3 より分離した ESA+/CD24-細胞と ESA-/CD24+細胞に対し、DNA 損傷マーカーである γ H2AX foci 数を 24 時間後測定したところ、炭素線と Lapatinib との併用処置では炭素線、X 線照射単独に比べてより多くの γ H2AX foci 数と大きいサイズの γ H2AX foci 残存が認められた (Fig. 6)。

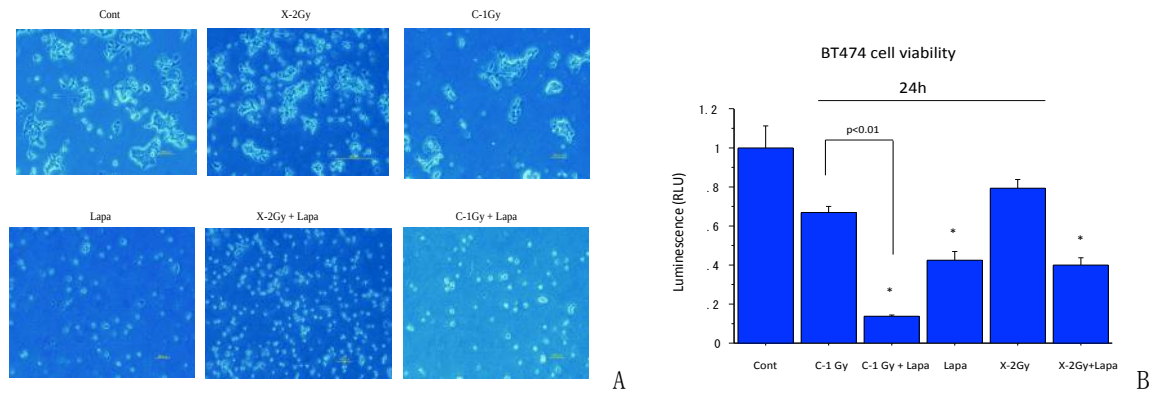


Fig.1 A. Morphological Changes 5 d after X-ray, Cion alone or in combination with Lapatinib (1μM) in BT474 Cells. B. Cell viability 24 h after X-ray, Cion alone or in combination with Lapatinib in BT474 Cells

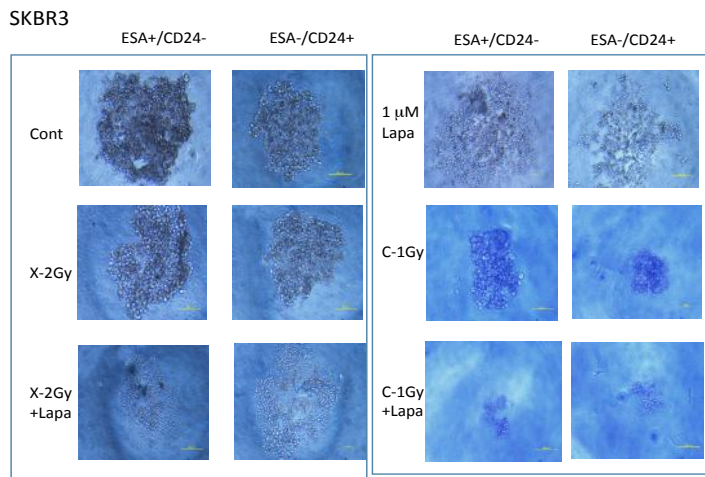


Fig.2 Spheroid formation ability after X-ray, Cion alone or in combination with Lapatinib (1μM) in SKBR3 Cells

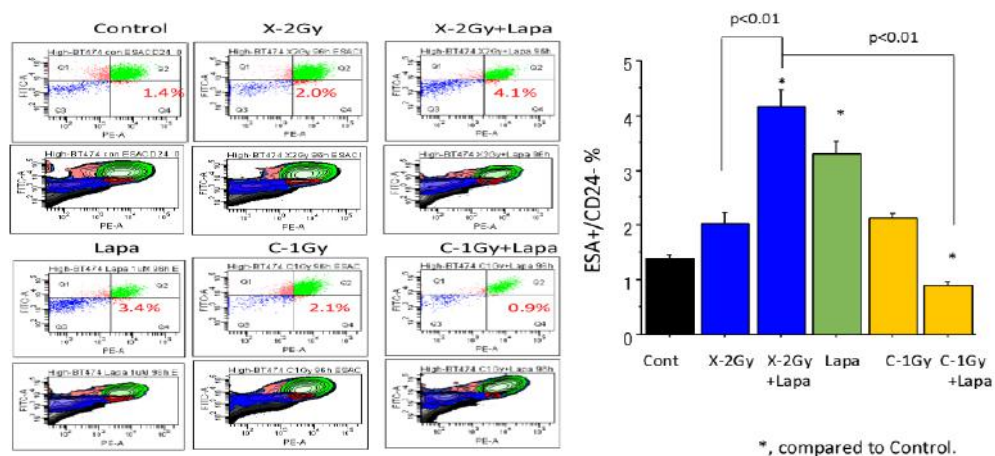


Fig.3 Proportion Changes of cancer stem cells 96h after X-ray, Cion alone or in combination with Lapatinib (1μM) in BT474 Cells

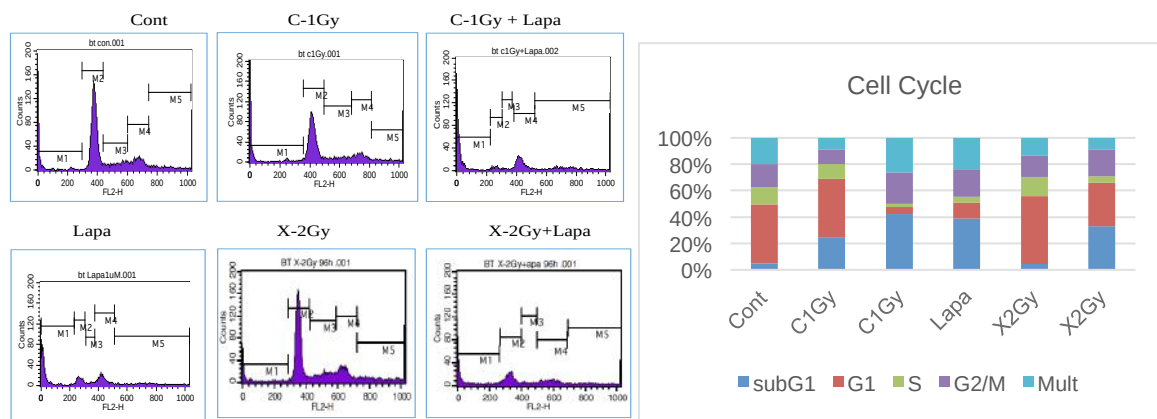


Fig.4 Cell cycle changes 96h after X-ray, Cion alone or in combination with Lapatinib (1μM) in BT474 Cells

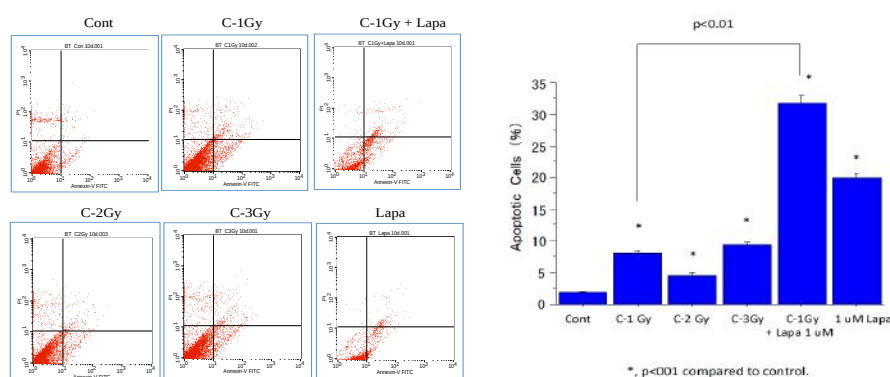


Fig.5 Induction of apoptosis after Cion alone or in combination with Lapatinib (1μM) in BT474 Cells

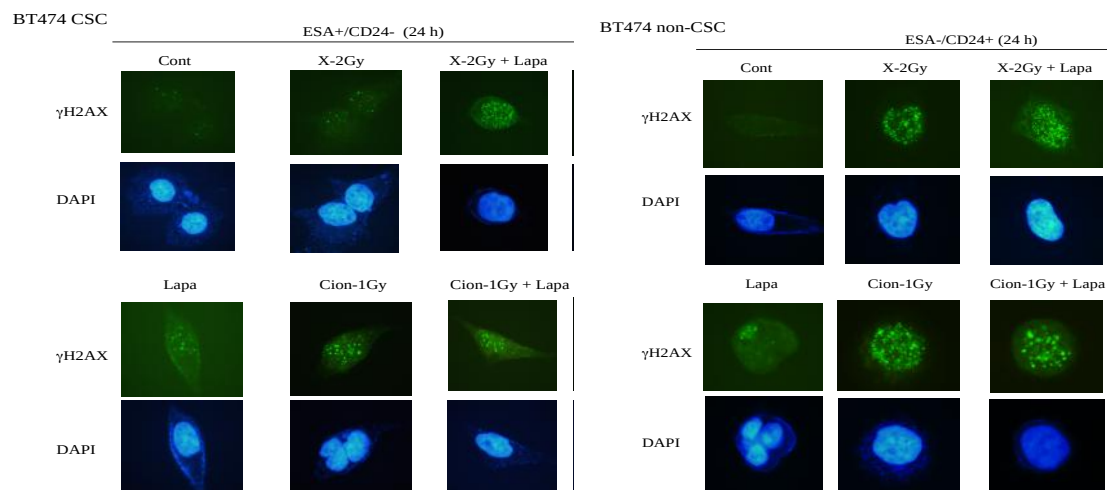


Fig.6 γH2AX formation 24h after X-ray, Cion alone or in combination with Lapatinib (1μM) in BT474 Cells

考察

我々は、重粒子線の高い制癌分子機構として、大腸癌、膵臓癌細胞株を用い、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞に対し、炭素線はX線照射に比べ生物効果 (RBE=2.1-2.3) とし

て 2 倍以上強く癌幹細胞を殺傷することを世界で初めて報告してきた (4, 5)。そして最近、炭素線と抗癌剤 Cisplatin との併用は難治性 Triple Negative 乳癌癌幹細胞をより有効に殺傷することを突き止めた (6)。今回我々は、HER2 陽性乳癌細胞株 BT474、SKBR3 を用い、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞を分離・同定し、これら癌幹細胞に対して、炭素線、X 線照射単独或いは Lapatinib との併用後の spheroid 形成能、apoptosis 誘導の違い、癌幹細胞の割合の変化、細胞周期や DNA 損傷の違いについて比較検討したところ、BT474、SKBR3 細胞において CD44+細胞集団は検出できず、ESA+/CD24-細胞集団は 0.9~1.5%と存在し、ESA-/CD24+細胞集団に比べ有意に高い spheroid 形成能を有することが認められた。炭素線と Lapatinib との併用は炭素線、X 線照射単独より有意に細胞生存や癌幹細胞様 ESA+/CD24-細胞集団の spheroid 形成能を顕著に抑制することが認められた。ESA+/CD24-割合は、X 線と Lapatinib との併用処置では顕著に増加させるのに対し、炭素線と Lapatinib との併用処置では有意に減少させ、顕著な subG1 や G2/M 期の延長、apoptosis 誘導が認められた。また、BT474 細胞より分離した ESA+/CD24-細胞と ESA-/CD24+細胞に対し、DNA 損傷マーカーである γ H2AX foci 数を 24 時間後測定したところ、炭素線と Lapatinib との併用処置では炭素線、X 線照射単独に比べてより多くの γ H2AX foci 数と大きいサイズの γ H2AX foci 残存が認められた。以上より、HER2 陽性乳癌細胞において、ESA+/CD24-細胞は明らかに自己複製や放射線抵抗性を示しており、炭素線と Lapatinib との併用は炭素線、X 線照射単独に比べより強く乳癌幹細胞を殺傷し、その機序として炭素線が修復しにくい DNA 損傷を与えることを見出した。この結果は、将来的に局所制御率が極めて優れている重粒子と分子標的薬 Lapatinib との併用処置が進行性、転移性 HER2 陽性乳癌治療に有効である可能性を示唆している。一方、Pertuzumab は、HER2 受容体と他の HER 受容体 (EGFR/HER1、HER3 および HER4) との二量化を特異的に阻害するヒト化モノクローナル抗体で、進行性、転移性 HER2 陽性乳癌に有効であることが報告され (3)、炭素線と Pertuzumab との併用効果について次回追ってご報告したい。

参考文献 (下線は代表研究者と共同研究者) :

1. Robidoux A, Tang G et al. Lapatinib as a component of neoadjuvant therapy for HER2-positive operable breast cancer (NSABP protocol B-41): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013 Nov;14(12):1183-92.
2. de Azambuja E, Holmes AP et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. *Lancet Oncol.* 2014 Sep;15(10):1137-46.
3. Swain SM, Kim SB et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2013 May;14(6):461-71.
4. Cui X*, Oonishi K, Tsujii H, Yasuda T, Matsumoto Y, Furusawa Y, Akashi M, Kamada T, Okayasu R. Effects of carbon ion beam on putative colon cancer stem cells and its comparison with X-rays. *Cancer Res.* 2011 May 15;71(10):3676-87.
5. Sai S*, Wakai T, Vares G, Yamada S, Kamiyo T, Kamada T, and Shirai T. Combination of Carbon Ion Beam and Gemcitabine Causes Unreparable DNA Damage and Death of Radioresistant Pancreatic Cancer Stem-Like Cells In Vitro and In Vivo 2015 *Oncotarget* Mar 20;6(8):5517-35.
6. Sai S*, Vares G, Kim EH, Karasawa K, Wang B, Neno M, Horimoto Y, Hayashi M.

Carbon ion beam combined with cisplatin effectively disrupts triple negative breast cancer stem-like cells in vitro. 2015 Mol Cancer Sep 4;14:166. doi: 10.1186/s12943-015-0429-7.

Sai S = Cui X, *, Corresponding author.

注：本研究は以下の学会で発表。

崔星、林光弘、于冬、堀本義哉、唐澤久美子

重粒子単独或はLapatinibとの併用によるHER2陽性乳癌幹細胞に対する影響

第24回日本乳癌学会総会 2016年6月16日-18日 東京 （予定）

作成日：2016年3月10日

神経変性におけるタンパク質凝集の制御機構の解明

研究代表者	教授 貫名 信行
日本所属機関	同志社大学大学院脳科学研究科
共同研究者	奥住文美, 黒澤大, 山中智行, 宮崎晴子 波田野琢, 服部信孝, 古川良明
中国側共同研究者	教授 王 光輝
中国所属機関	蘇州大学薬理学講座

要旨

神経変性の治療標的である病態制御因子を探索するため、ポリグルタミン病マウスにおいて掛け合わせによってそのオートファジー関連分子 p62, Atg5 をノックアウトすると細胞質凝集体が増加し、核内封入体が減少することを見出している。特に前者では寿命の延長も見られ、核内封入体減少に基づくものと考えられた。この現象はオートファジーが細胞質で作用しているためと考えられたため、細胞質封入体が主であるシヌクレイノパチーについて伝播現象を用いてタンパク質分解系の病態への影響を明らかにするため、伝播現象の基礎的検討を行った。

シヌクレイン凝集のシードを線条体に注入すると、凝集体が形成され、その分布からシードは順行性、逆行性に移動し、神経回路を介して伝播していることが示唆された。このシステムを用いることで異常凝集体のシード形成以降の病態制御因子を同定するアッセイ系が可能であることが示唆された。

Key Words 凝集体、伝播、シヌクレイン、パーキンソン病、多系統萎縮症

緒言

我々はポリグルタミン病における凝集体形成制御因子を探索し、オートファジーシステム、特に p62 のリン酸化が選択的オートファジーを制御し、凝集体形成に影響を及ぼすことを報告した (1)。さらに、p62, Atg5 のノックアウトにより細胞質封入体が増加し、核内封入体が減少し、p62 ノックアウトの条件下ではポリグルタミン病モデルマウスの寿命が延長するという現象を報告した (2)。このことはオートファジー系が細胞質において凝集体形成を制御していることを示唆しているが、他の神経変性疾患において凝集体形成の制御に影響を与えるかどうかは未だ明かではない。そこでシヌクレイノパチーにおいてこれらのシステムが制御因子かどうかを検討する系を確立することを目的とした。これまでの方法であれば p62 や Atg5 のノックアウトマウスとシヌクレイノパチーのマウスを掛け合わせ、凝集体の形成が増加するかどうかを検討するのが定法であるが、シヌクレイノパチーは伝播実験が成立することから、伝播実験によってアッセイが可能であるかどうかを検討することとした。

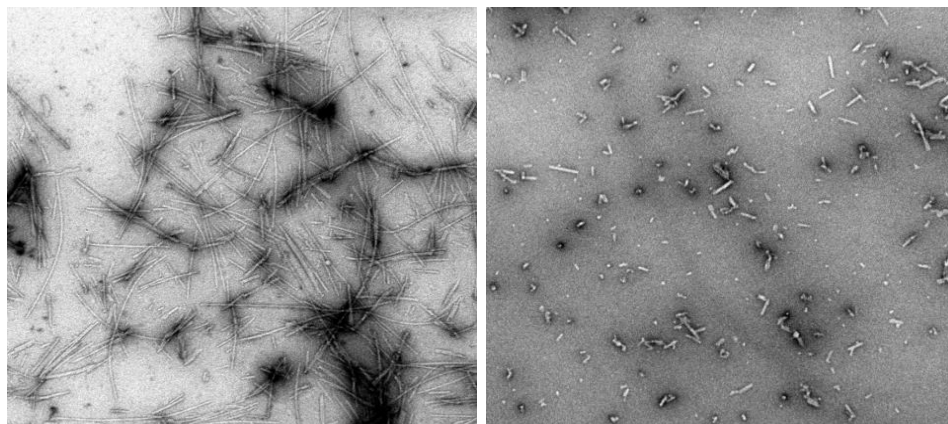
まずシヌクレイン凝集による伝播実験によってどのような系に広がるかどうかといった基礎実験を行った。パーキンソン病の病因タンパク質であるシヌクレイン凝集はプリオンタンパク質様に伝播するとの報告がなされている。プリオン様伝播とはシード(種)となる凝集タンパク質が取り込まれ、細胞内で増幅され、細胞間を伝搬すると考えられる。この現象は実際の疾患における正常タンパク質からのミスフォールドの過程を省略して、異常タンパク質の増殖、伝播過程を見ていると考えられる。本研究ではパーキンソン病、多系統萎縮症などシヌクレイノパチーの病態制御因子を明らかにするため、この伝播現象を利用し、シード発生以後の変化の制御因子を同定することを目的とする。

対象と方法

全長マウスシヌクレインを *in vitro* で合成し、3 日間振盪し、線維性凝集体を形成したことを確認した上、マウスの線条体に注入した。これを 6 ヶ月例において剖検しリン酸化シヌクレイン抗体によって凝集体形成を検討した。さらにマウス脳の脳梁離断を先行して行い、その後線条体に線維性凝集体を注入した。さらに外因性のシードがどれくらいの速さで移動しているのかを調べるために脳梁離断を、線維性凝集体注入前、注入後 1 日後、注入後 1 週間後と時間を振り分けながら施行し、リン酸化シヌクレイン抗体により伝播の状態を検討した。

結果

電子顕微鏡で線維形成されたことを確認し、さらに注入前の超音波処理した電顕像も確認した（図 1）。



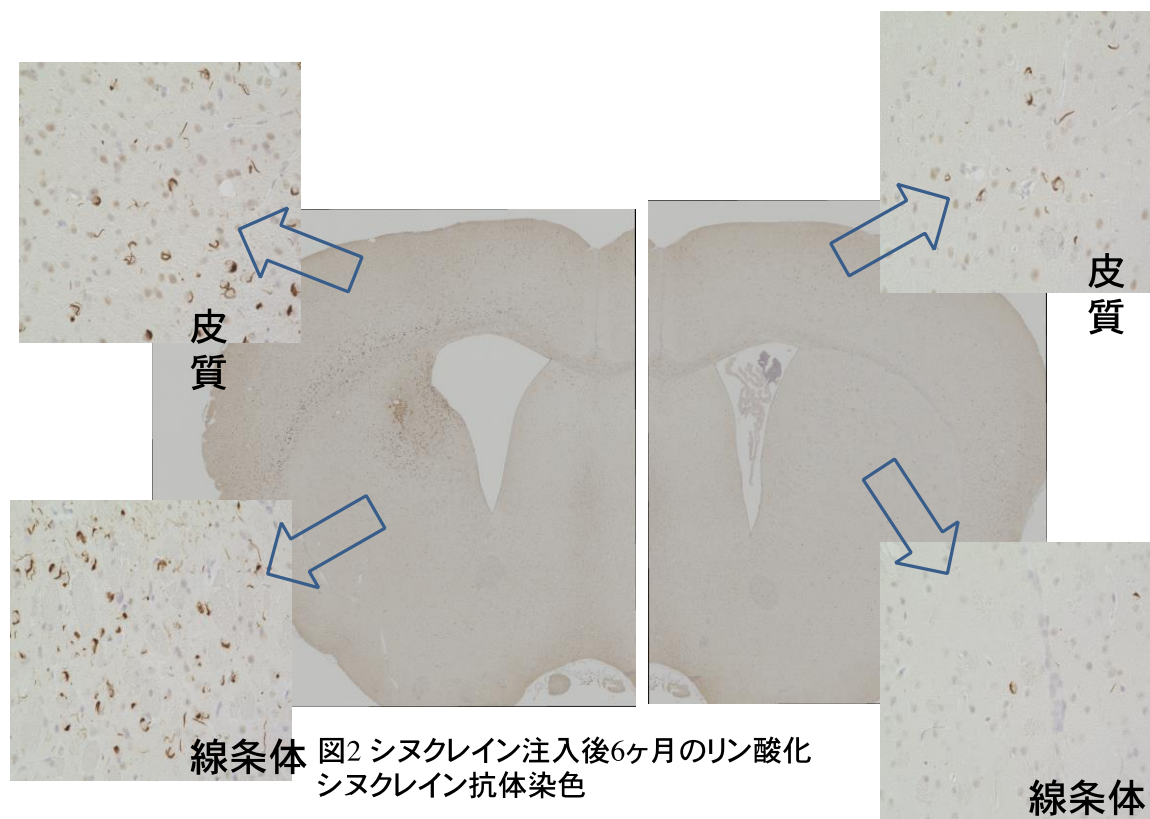
α-シヌクレイン線維◆

α-シヌクレイン線維
(超音波処理)◆

図1 注入したシヌクレイン線維の電顕像

片側線条体にシヌクレイン凝集体を注入したところ、6 ヶ月後のリン酸化シヌクレイン抗体による検討では、同側の線条体および大脳皮質神経細胞に凝集体を認めた。さらに対側の大脳皮質、線条体にも数は少ないもののシヌクレイン凝集を神経細胞の細胞質に認めた（図 2）。また同側黒質神経細胞にも凝集体を認めた。さらにこれらの凝集体含有細胞の細胞種を同定するため、線条体中型有棘神経細胞の細胞体マーカーとして DARPP32, 軸索のマーカーとして sodium channel beta4 subunit あるいは Nav1.2 の抗体（3）を用いて局在を検討したところ、凝集体は中型有棘神経細胞の細胞体、及び軸索に存在することが確認された。また黒質神経細胞のマーカーとして TH 抗体を用いて染色し、神経細胞及び軸索においてシヌクレイン凝集が存在することが確認された。これらの結果から注入されたシヌクレインはシードとして働き、順行性、逆行性に伝播されることが強く示唆された。

脳梁離断を行うと、離断していないマウスと比較して明らかに対側新皮質へ伝播するリン酸化シヌクレイン病変の減少を認めた。シヌクレインの伝播は単純な拡散というよりは神経を介した経シナプス輸送で行われていることが示唆された。さらに時間を振り分けて脳梁離断を行った場合、線維性凝集体注入に先行して脳梁離断を行ったマウスでは、対側皮質へ伝播するリン酸化シヌクレインの病変の減少を認めたが、注入を先に行い 1 日後に脳梁離断を行ったマウスでは反対側皮質や反対側線条体への伝播を認めた。この結果より注入したシードの移動や伝播はかなり早い段階で起こっている可能性が示唆された。



考察

ポリグルタミン病モデルマウスにおいて p62, Atg5 をノックアウトすることにより、細胞質封入体が増加し、核内封入体が減少することは、異常伸長ポリグルタミンが細胞質においてこれらの分子がノックアウトされることにより、オートファジーによる分解が阻害され、凝集性が増すためだと推察された。そのため、核移行が阻害され、核内封入体が減少、病態の改善が認められたものと考察した。

それではパーキンソン病、多系統萎縮症などの細胞質に形成されるシヌクレイン凝集においてはこのようなタンパク質分解系はどう影響するであろうか。パーキンソン病においてはシヌクレイン凝集体が主に黒質神経細胞に、多系統萎縮症においては主なシヌクレイン凝集体はオリゴデンドログリアに認められるが、神経細胞の細胞質にもシヌクレインの集積は認められる。そこでシヌクレイン凝集に対するこれらオートファジー系の分子の影響をみることにした。従来であれば、シヌクレイン過剰発現マウスとの掛け合わせを検討するのが通常であるが、最近注目されている凝集体の伝播現象を考慮すると外来性のシードを注入してその伝播現象に対する影響をアッセイできれば、より簡便になる可能性がある（図 3）。今回の検討により、確かに細胞体に対して順行性、逆行性にシヌクレインのシードが取り込まれていることが示唆された。ヌクレイノパチーに対する病態制御因子の検定に伝播現象を用いられるかどうかは、この凝集体のサイズの時間経過を定量できるかの検討が必要であり、今後の課題である。また脳梁離断によって極めて早期に凝集が移動していたことが示唆されたが、この系では細胞間移動を制御する因子と凝集の増大速度を制御する因子を同定できる可能性があると考えられる。マウスの掛け合わせによる凝集体制御因子のアッセイはいくつかの因子が絡み合っているため、結果からどこに働いているかが判定しにくいですが、本研究で示した伝播実験を用いたアッセイ法は制御因子の働いている標的を明らかにしやすいので、今後詳細な検討により、神経変性疾患の病態制御因子の同定に大きな役割を果たしうると考えられる。

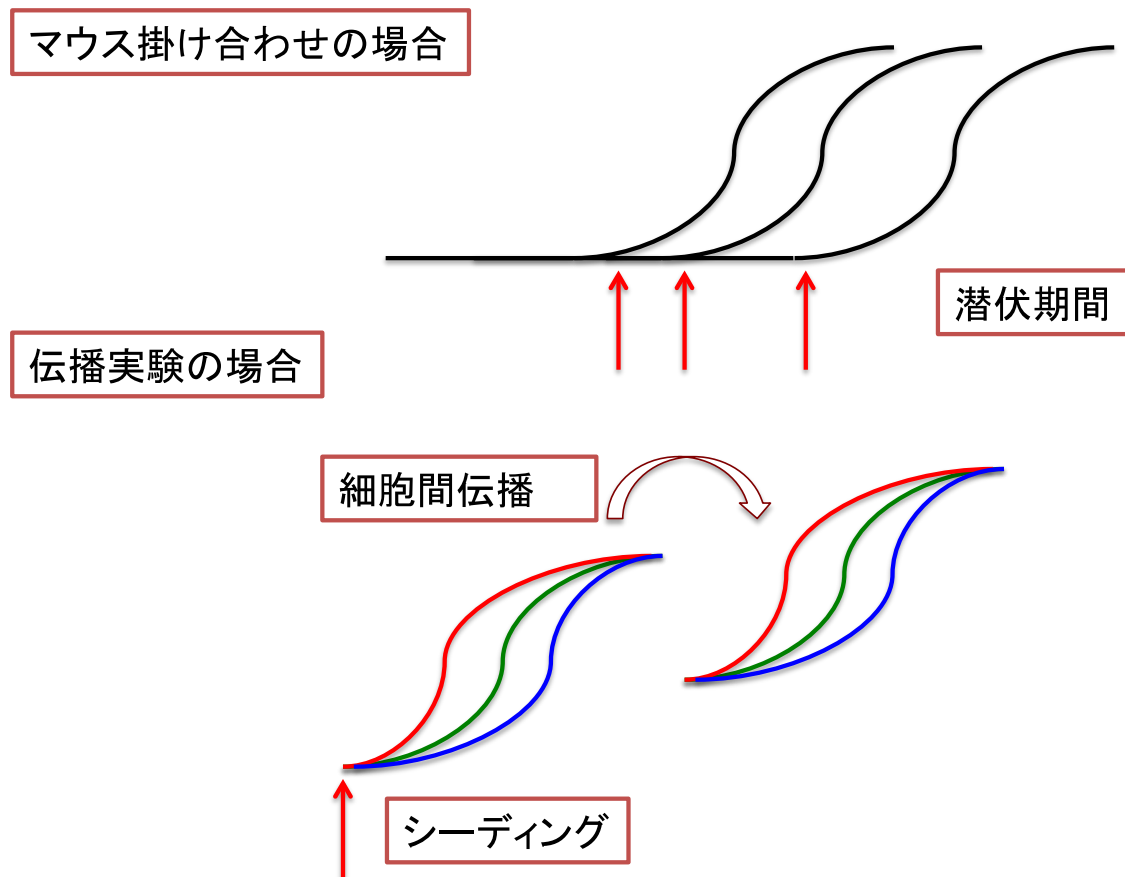


図3 伝播実験による凝集制御因子のアッセイ系

参考文献

- 1) Matsumoto G, Wada K, Okuno M, et al. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. Mol Cell. 2011;44(2):279-89.
- 2) Kurosawa M, Matsumoto G, Kino Y, et al. Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice. Hum Mol Genet. 2014.
- 3) Miyazaki H, Oyama F, Inoue R, et al. Singular localization of sodium channel beta4 subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum. Nat Commun. 2014;5:5525.

注) 本研究は 2016 年 1 月 7 日「運動失調症の分子病態解明・治療法の開発に関する研究班」研究報告会にて口頭発表

作成日：2016 年 3 月 9 日

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）迅速診断試薬の開発

研究者氏名	助教 余 福勲
日本研究機関	長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学
中国研究者氏名	教授 許 汴利
中国研究機関	河南省疾病予防コントロールセンター

要旨:

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）は新興感染症である。組換え SFTSV ヌクレオカプシド蛋白（N 蛋白）とモノクローナル抗体を用いてイムノクロマトグラフィー（immunochromatography test ICT）法を利用して、SFTS 全抗体検査 ICT 法、Human SFTS IgG IgM 検査 ICT 法および SFTS 抗原検査 ICT 法三つの迅速な SFTS 診断方法を開発した。中国河南省で採集した SFTS 疑似患者血清と動物血清を用いて、ELISA 法に比べて SFTS 全抗体検査 ICT 法を評価した。SFTS 全抗体検査 ICT 法では動物と SFTS 疑似患者血清の結果 ELISA 法と全部一致した。この診断法は SFTS 患者の臨床診断だけではなく各種類の動物の SFTS 感染監視にも有用である。SFTS 疑似患者血清を用いて、ELISA 法に比べて Human SFTS IgG と IgM 検査 ICT 法を評価した。Human SFTS IgG と IgM 検査 ICT 法も SFTS 疑似患者血清の結果は ELISA 法と全部一致した。この検査法により人が過去感染したか（IgG）新しい感染か（IgM）を区別できる。また、SFTS ウイルス培養液と SFTS 患者急性期血清 141 検体を用いて、ELISA 法に比べて SFTS 抗原検査 ICT 法を評価した。SFTS 抗原検査 ICT 法は特異的に高感度で SFTS 抗原検出できた。しかし SFTS 患者急性期血清の中、陽性率は低かった。SFTS 患者は血清中 SFTS 抗原効率的に分泌されていないことが示された。

Key Words 重症熱性血小板減少症候群（SFTS）,ヌクレオカプシド蛋白（N 蛋白）,モノクローナル抗体,イムノクロマトグラフィー（immunochromatography test ICT）

緒言:

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）とは 2011 年に中国で発現されたブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される新しいウイルスによるダニ媒介性感染症である。中国では年間数千人の SFTS 患者が報告され、その半分は河南省で占めている。2013 年 1 月に日本で海外渡航歴のないヒトが SFTS に罹患していたことが初めて報告され、それ以降西日本の 15 県から多数の患者発生が報告されている。2016 年 2 月まで日本に 170 人の SFTS 患者が確認されている。致死率は 6.3～30%と報告されており、SFTS ウイルス（SFTSV）に感染すると 6 日～2 週間の潜伏期を経て、発熱、食欲低下、嘔気、嘔吐、下痢、腹痛などの消化器症状が多くの症例で認められ、頭痛、筋肉痛、意識障害や失語などの神経症状、リンパ節腫脹、皮下出血や下血などの出血症状などを起こす。検査所見上は白血球減少、血小板減少、AST・ALT・LDH の血清逸脱酵素の上昇が多くの症例で認められ、血清フェリチンの上昇や骨髄での血球貪食像も認められることがある。治療は対症的な方法しかなく、有効な薬剤やワクチンはない。感染経路はマダニ（フタトゲチマダニなど）を介したものが中心である。血液等の患者体液との接触によりヒトからヒトへの感染も報告されているが、患者が高度散発性的発生している。そのため SFTS 患者の臨床診断や動物の感染監視などに簡易かつ迅速な point of care testing (POCT) 診断試薬必要不可欠である。今回われわれは中国河南省疾病予防コントロールセンターとの共同研究で SFTS の迅速診断試薬の開発を試みた。

対象と方法:

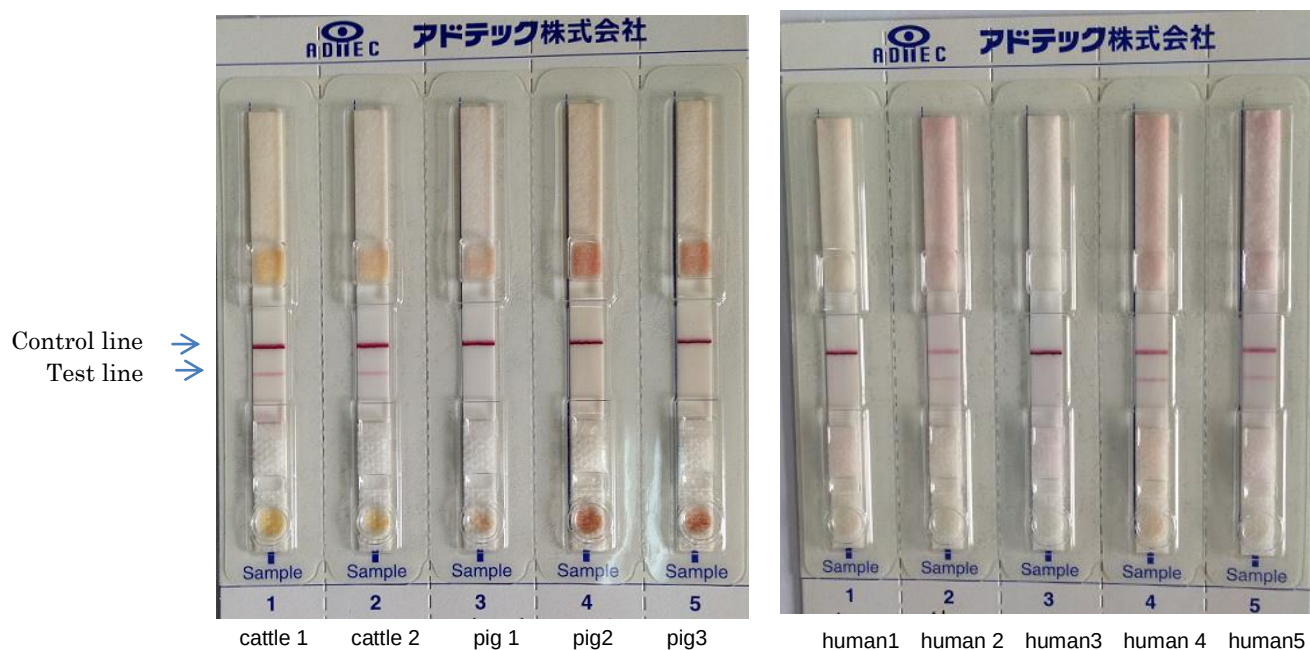
大腸菌発現系を用いて SFTS ウイルスのヌクレオカプシド蛋白 (N 蛋白) 発現・精製し、加えて抗 SFTSV N 蛋白のモノクローナル抗体を作成した。組換え SFTSV N 蛋白とモノクローナル抗体を用いて SFTS 快速診断法イムノクロマトグラフィー (immunochromatography test ICT) 法の開発を試みた。SFTS 全抗体検査 ICT 法、Human SFTS IgG と IgM 検査 ICT 法、SFTS 抗原検査 ICT 法三つの迅速な SFTS POCT 診断手法を開発した。中国河南省で採集した SFTS 疑似患者血清 102 検体、牛血清 10 検体、犬血清 10 検体、ヤギ血清 20 検体、豚血清 10 検体を用いて ELISA 法に比べて SFTS 全抗体検査 ICT 法を評価した。同じ SFTS 疑似患者血清 102 検体を用いて ELISA 法に比べて Human SFTS IgG と IgM 検査 ICT 法を評価した。また、SFTS ウイルス培養液と SFTS 患者急性期血清 141 検体を用いて ELISA 法に比べて SFTS 抗原検査 ICT 法を評価した。

結果：

- ① SFTS 全抗体検査 ICT 法：SFTS 疑似患者血清 102 検体中陽性 85 検体、陰性 17 検体である。牛血清 10 検体と犬血清 10 検体全部陽性である。ヤギ血清 20 検体中陽性 12 検体、陰性 8 検体である。豚血清 10 検体全部陰性である。この結果は ELISA 法に比べて全部一致している。SFTS 全抗体検査 ICT 法の敏感性と特異性は 100% である。

図 1 は動物 5 検体と疑似患者 5 検体の結果を示している。

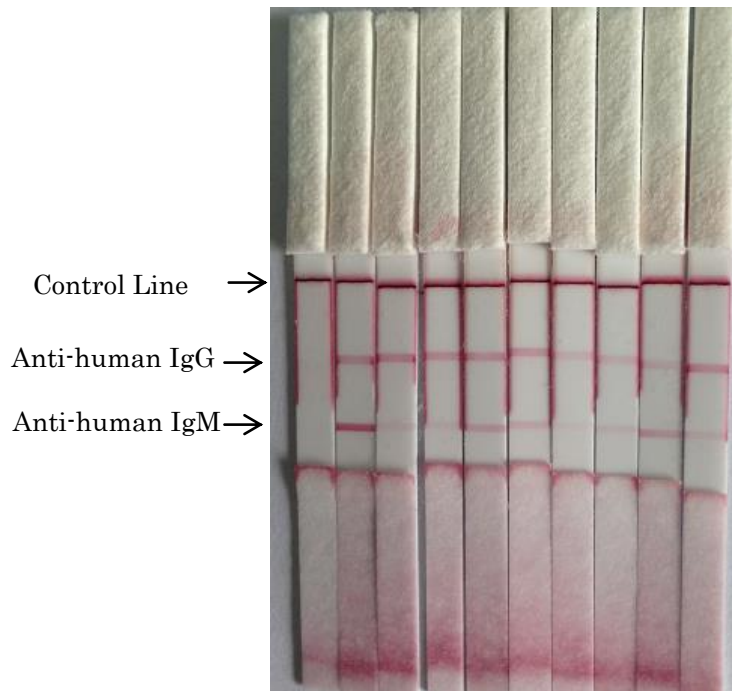
Fig 1. ICT for SFTSV total antibody detection in animals and human patients



- ② Human SFTS IgG と IgM 検査 ICT 法：SFTS 疑似患者血清 102 検体中陽性 85 検体、陰性 17 検体である。この結果は ELISA 法に比べて全部一致している。Human SFTS IgG と IgM 抗体検査 ICT 法の敏感性と特異性は 100% である。

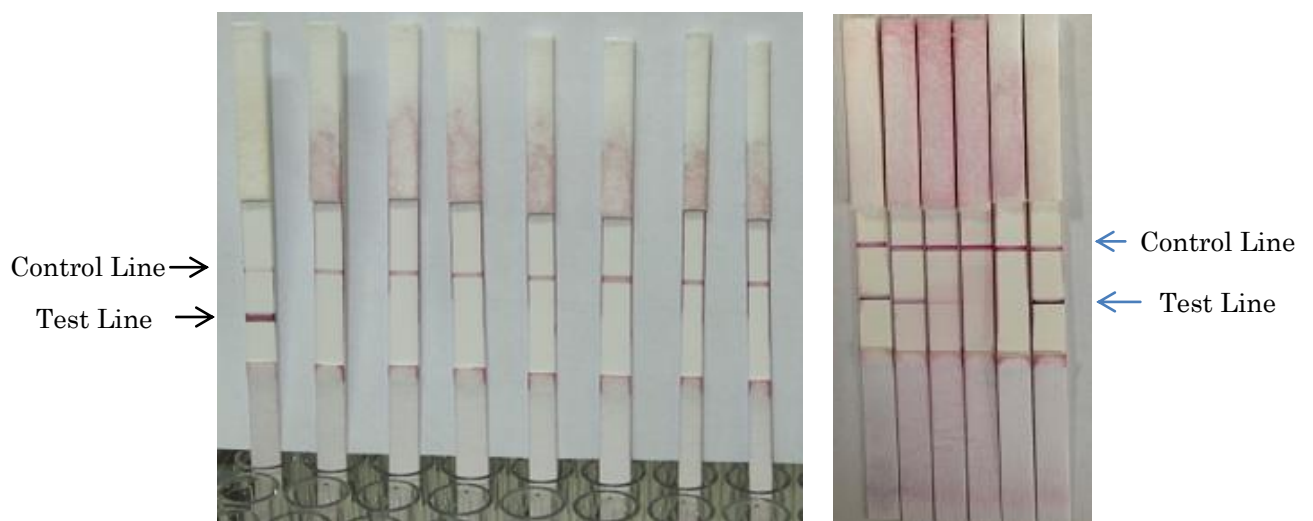
図 2 は SFTS 疑似患者血清 10 検体の結果を示している。左側の第一検体は陰性であり、ほか 9 検体 IgG, IgM 両方陽性である。

Fig. 2 ICT for human SFTSV IgG and IgM detection



③ SFTS 抗原検査 ICT 法：抗 SFTSV N 蛋白のモノクローナル抗体を用いて SFTS 抗原検査 ICT 法確立した。SFTS 抗原検査 ICT 法は SFTS ウイルス培養液を反応してほかのウイルスデング熱ウイルス 1 型, 2 型, 3 型, 4 型、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、リフトバレー熱ウイルスなど反応しない。SFTS 抗原検査 ICT 法の特異性を証明しました (図 3 左側)。また、SFTS ウイルス培養液を連続希釈して 1000 倍希釈まで検出できる、SFTS 抗原検査 ICT 法の感 sensitivity を示した (図 3 右側)。

Fig. 3 SFTSV antigen detection for different viruses and serial diluted SFTS virus culture fluid

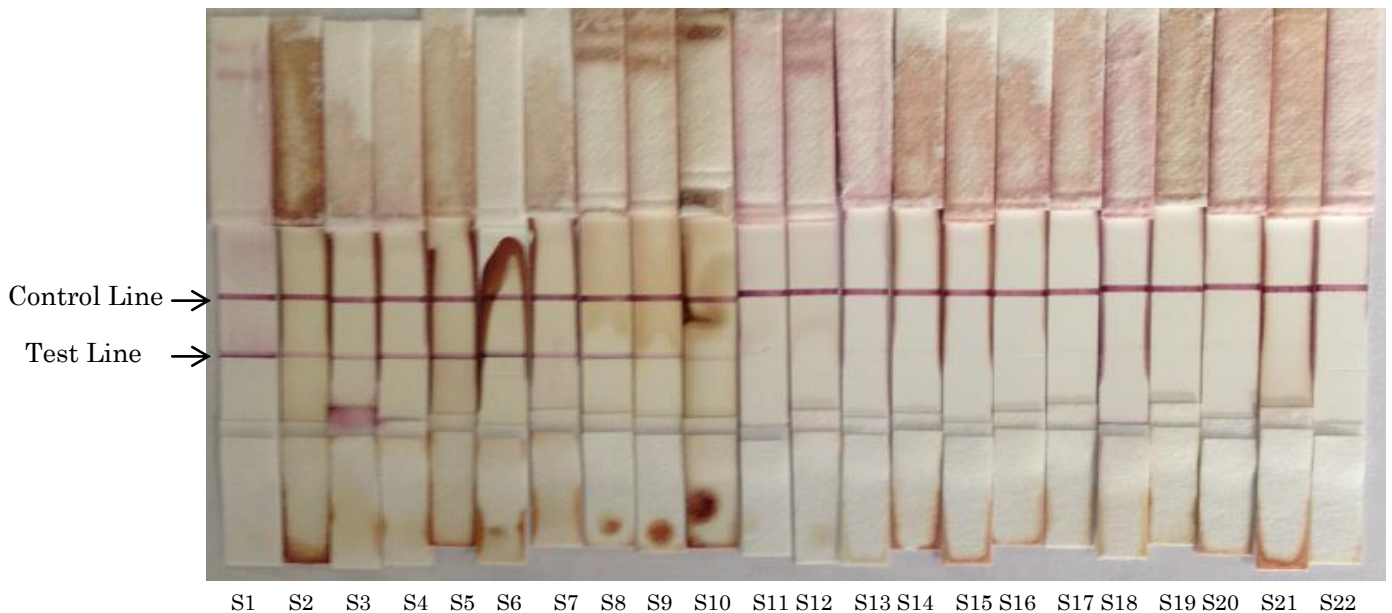


SFTSV Den1 Den2 Den3 Den4 JEV YFV RVFV $10^0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}$ PC

SFTS 患者急性期血清中 SFTS 抗原検出できるかを見るために SFTS PCR 陽性血清 141 検体を用いて SFTS 抗原検査 ICT 法で検査した。141 検体中陽性 15 検体しかなかった、陽性率は 10.64%。ELISA 法では同じ結果だった。

図4は SFTS 患者急性期血清 22 検体の SFTS 抗原検査 ICT 結果である。左側 10 検体は陽性で右側 12 検体は陰性だった。

Fig. 4 SFTSV antigen detection ICT using acute human patient sera



考察：

組換え SFTSV N 蛋白とモノクローナル抗体を用いて安全、簡便、迅速な SFTS 診断試薬の開発に成功した。SFTS 全抗体検査 ICT 法では動物と SFTS 疑似患者血清の結果は ELISA 法と全部一致した。この診断法は SFTS 患者の臨床診断だけではなくて各種類の動物の SFTS 感染監視にも有用である。Human SFTS IgG と IgM 検査 ICT 法も SFTS 疑似患者血清の結果は ELISA 法と全部一致した。この検査法は人が過去感染したか (IgG) 新しい感染か (IgM) を区別できる。SFTS 抗原検査 ICT 法は特異的に高感度で SFTS 抗原検出できる、しかし SFTS 患者急性期血清の中、陽性率は低かった。SFTS 患者は血清中 SFTS 抗原効率的分泌されていないことを示された。

参考文献：

1. Yu F, Du Y, Huang X, Ma H, Xu B, Adungo F, Hayasaka D, Buerano CC, Morita K. Application of recombinant severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleocapsid protein for the detection of SFTSV-specific human IgG and IgM antibodies by indirect ELISA. Virol J. 2015 Aug 4;12:117.
2. Xu B, Liu L, Huang X, Ma H, Zhang Y, Du Y, Wang P, Tang X, Wang H, Kang K, Zhang S, Zhao G, Wu W, Yang Y, Chen H, Mu F, Chen W. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of a new bunyavirus. PLoS Pathog. 2011 ;7(11):e1002369.

注：本研究は、2016 年 11 月 22 日第 63 回日本ウィルス学会学術集会にてポスター発表。

作成日：2016年3月12日

食塩感受性高血圧の発症における炎症細胞の役割

研究者氏名	教授 小室一成
日本所属機関	東京大学大学院医学系研究科循環器内科学
中国研究者氏名	教授 鄒 雲増
中国所属機関	復旦大学附属中山病院上海心血管病研究所

要旨

わが国には高血圧患者は約4,000万人いると言われている。日本、中国ともに食塩摂取量が多く、高血圧発症の大きな要因となっている。また、高血圧は心筋梗塞、脳卒中などの心血管疾患の原因として最も重要であることが知られているが、その成因については不明な点が多く残されている。私たちはこれまでに、高血圧による臓器障害としての心肥大および心不全の発症機序について共同研究を行い、これまでに数多くの研究成果を挙げてきた。そこで本研究では、高食塩食による血圧上昇の機序について、食塩感受性高血圧症モデルラット（Dahl ラット）と、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集による遺伝子改変ラットを用いて、炎症という観点から解析を行った。

8週齢の Dahl-S ラットに8%食塩添加飼料を与えると、3週間後に高血圧を発症するとともに、心肥大を呈することを tail-cuff 法による血圧測定や心エコーによる心機能評価により確認した。さらに、末梢血や脾臓、腎臓、心臓、腸における炎症細胞浸潤をフローサイトメトリーにより検討した。炎症の準用名メディエーターである IL-17 を CRISPR/Cas9 による遺伝子編集によりノックアウトした Dahl-S ラットおよび Sprague-Dawley (SD) ラットを作成し、食塩感受性高血圧の発症の有無について現在検討を進めている。

Key Words CRISPR/Cas9、Dahl ラット、IL-17、Th17 細胞、Treg 細胞

緒言:

わが国には高血圧患者は約4,000万人いると言われている。日本、中国ともに食塩摂取量が多く、高血圧発症の大きな要因となっている。平成23年（2011年）国民健康・栄養調査結果では、国民一人一日あたりの食塩摂取量は平均10.4g（男性11.4g、女性9.4g）であり、徐々に低下傾向にある。しかし、2012年策定の健康日本21（第2次）では、2022年までに国民の平均食塩摂取量を8.0gにすることが目標とされる一方で、2012年に発表された世界保健機構（WHO）のNa摂取量に関するガイドラインでは、一般成人の食塩摂取量を5g/日未満にすべきとされており、わが国の現状はこれらに遠く及ばない状況である。

また、高血圧は心筋梗塞、脳卒中などの心血管疾患の原因として最も重要であることが知られているが、その成因については不明な点が多く残されている。心臓は高血圧の最も重要な標的臓器の一つであり、高血圧と心臓病との関連性は強く、血圧水準が高いと心疾患の罹患率や死亡率が高くなる。わが国の心不全患者の登録研究であるJCARE-CARDによると、登録された心不全患者のうち高血圧の既往は52.6%にも見られる。高血圧の心臓における臓器障害は、後負荷の増大にともなう心肥大やリモデリングといった心筋への直接的な影響と、糖尿病や脂質代謝異常などの他の危険因子との相乗効果によって進行する冠動脈硬化の影響とがあるが、それらが複合的に作用することで心血管イベントのリスクが増大する。私たちはこれまでに、高血圧による臓器障害としての心肥大および心不全の発症機序について共同研究を行い、これまでに数多くの研究成果を挙げてきた。

近年、様々な病態における炎症の役割が大きな注目を集めている。炎症のプロセスには、感染や組織損傷

により誘導される急性炎症の機序だけでなく、組織への持続的なストレスによって軽度の炎症反応が誘導され、線維化などの組織リモデリングや機能障害を促進する慢性炎症の機序があることが明らかとなっている。

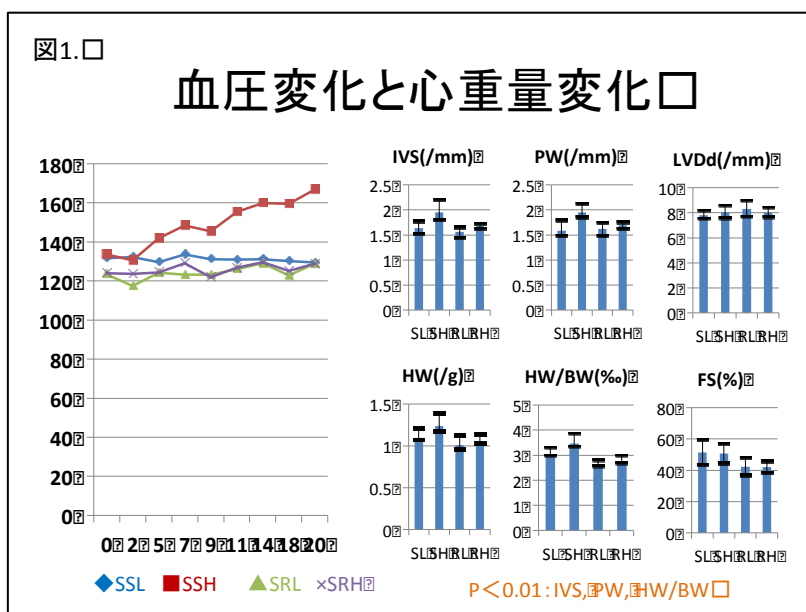
そこで本研究では、高食塩食による血圧上昇の機序について、食塩感受性高血圧症モデルラット (Dahl ラット) と、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集による遺伝子改変ラットを用いて、炎症という観点から解析を行った。

対象と方法:

- 1) 高血圧モデルラットの作成 : Dahl-Iwai S (Dahl-S) ラット 8 週齢より 3 週間 8% 食塩添加飼料あるいは通常飼料を与え、tail-cuff 法により血圧を測定する。Dahl-Iwai R (Dahl-R) ラットをコントロールとして用いる。また、心エコー法により心肥大や左室収縮能を評価する。安楽死させた後で、心重量と体重を測定する。
- 2) 炎症細胞浸潤の評価 (qRT-PCR 法) : Dahl-S ラットおよび Dahl-R ラットに 8% 食塩添加飼料あるいは通常飼料を与え、安楽死させた後で各種臓器 (小腸、大腸、皮膚、腎臓、脾臓) を摘出し、total RNA を抽出した後、qRT-PCR を行って *Il17a*, *Foxp3*, *Cd68*, *Rorc*, *Tgfb1*, *Il23p19*, *Il6* の遺伝子発現を比較検討した。
- 3) 炎症細胞浸潤の評価 (フローサイトメトリー法) : Dahl-S ラットおよび Dahl-R ラットに 8% 食塩添加飼料あるいは通常飼料を与え、安楽死させた後で小腸と腎臓を摘出し、フローサイトメトリーにより Th17+/CD3+CD4+ の Th17 細胞と Foxp3+/CD3+CD4+ の Treg 細胞の浸潤を比較検討した。
- 4) IL-17 ノックアウトラットの作成 : ラット *Il17a* 遺伝子に対する single-guide RNA を合成し、Cas9 mRNA とともに、Dahl-S ラットおよび SD ラットの受精卵にマイクロインジェクションを行い、胚を仮親ラットの卵管に移植、仮親から産仔を得た。Dahl-S ラットを用いたノックアウトラットの作成は日本側で行い、SD ラットを用いたノックアウトラットの作成は中国側で行った。

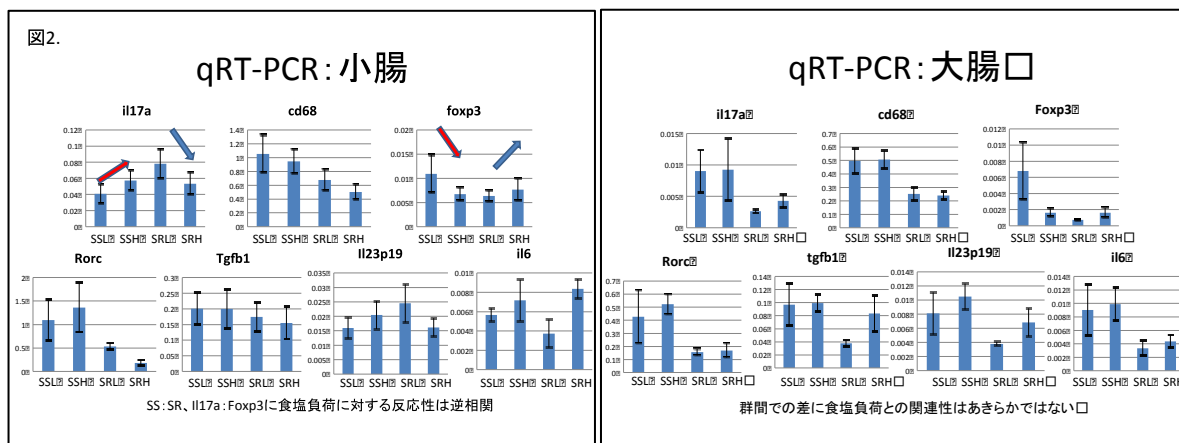
結果:

- 1) 高血圧モデルラットの作成 : Dahl-S ラットおよび Dahl-R ラットに、8 週齢より 3 週間 8% 食塩添加飼料あるいは通常飼料を与え、tail-cuff 法により血圧を測定した (図 1)。Dahl-S ラットは高食塩負荷後 7



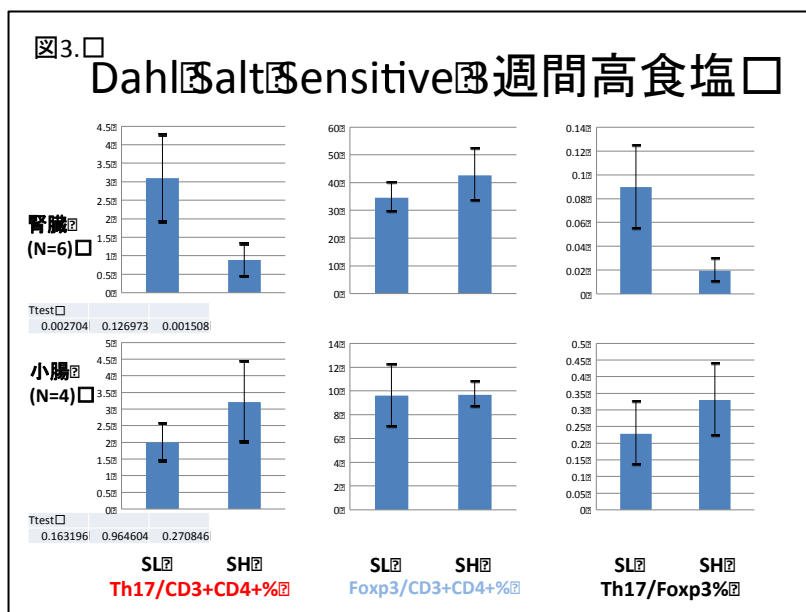
日目には血圧の有意な上昇を示した (SSH)。また、投与 3 週間後に行った心エコーでは、高食塩負荷を行った Dahl-S ラット (SH) で心室中隔厚 (IVS) や後壁厚 (PW) の有意な増加を認め、心体重比 (HW/BW) も有意に増加していた。ただし、左室内径短縮率 (FS) は有意な差は認めなかった。したがって、高食塩負荷を行った Dahl-S ラットは食塩感受性高血圧のモデルとして適していることが確認された。

- 2) 炎症細胞浸潤の評価 (qRT-PCR 法) : Dahl-S ラットおよび Dahl-R ラットに 8%食塩添加飼料あるいは通常飼料を与え、小腸、大腸、皮膚、腎臓、脾臓を摘出し、total RNA を抽出後した後に、qRT-PCR を行なって *Il17a*, *Foxp3*, *Cd68*, *Rorc*, *Tgfb1*, *Il23p19*, *Il6* の遺伝子発現を比較検討した。小腸と大腸において *Il17a* の発現が多く認められ、とくに小腸では *Il17a* と *Foxp3* の遺伝子発現は逆の変化を認めた (図 2)。しかし、いずれの臓器においても、食塩感受性との関連性において十分な差異を見出すことができなかった。qRT-PCR による遺伝子発現では炎症細胞浸潤の評価は困難と判断し、フローサイトメトリーでの評価を行うこととした。



- 3) 炎症細胞浸潤の評価 (フローサイトメトリー法) : Dahl-S ラットおよび Dahl-R ラットに 8%食塩添加飼

料あるいは通常飼料を与え、小腸と腎臓を摘出し、フローサイトメトリーにより Th17+/CD3+CD4+ の Th17 細胞と Foxp3+/CD3+CD4+ の Treg 細胞の浸潤を比較検討した (図 3)。Dahl-S ラットの



- 4) IL-17 ノックアウトラットの作成 : ラット *Il17a* 遺伝子に対する single-guide RNA を合成し、Cas9 mRNA とともに、Dahl-S ラットおよび SD ラットの受精卵にマイクロインジェクションを行い、胚を仮親ラットの卵管に移植、仮親から産仔を得た。Dahl-S ラットを用いたノックアウトラットの作成は日本側で行い、SD ラットを用いたノックアウトラットの作成は中国側で行った。

Dahl-S ラットは 3 ラインのノックアウトラットを得ることができ、Exon2 にそれぞれ 13 塩基、4 塩

基、7塩基の挿入変異を確認できている。今後は、Dahl-S ラットに対しては高食塩負荷、SD ラットに対しては DOCA-salt 負荷を行い、食塩感受性高血圧の発症の有無について検討を進めている。

考察:

食塩負荷や摂取により、IL-17 産生 T 細胞 (Th17 細胞) の分化が促進され、Th17 が病態に関与する多発性硬化症モデルで症状が悪化することが最近報告された (Nature. 2013;496, 513-517, 518-522)。Th17 細胞は腸管に多く存在することから、高食塩負荷により腸管で Th17 が活性化する可能性がある。高食塩負荷をしていない Dahl-S ラットに、高食塩負荷をした Dahl-S ラットから腎移植をすると食塩感受性を獲得することから、腎臓が食塩感受性高血圧発症のエフェクターとして重要であることが示唆されている。

私たちのフローサイトメトリーの解析結果からは、小腸で確かに Th17 細胞が増加するが、逆に腎臓では減少する傾向にあった。このことが食塩感受性高血圧の病態にどのような意義があるのかは、IL-17 ノックアウトラットにおいて食塩感受性高血圧の発症がどのような影響を受けるかを検討することで明らかとなる。現在、Dahl-S ラットを用いたノックアウトラットの解析を日本側で、SD ラットを用いたノックアウトラットの解析を中国でひきつづき行っている。

本研究を通して、食塩感受性高血圧の病態に炎症細胞、とくに Th17 細胞が果たす役割について大きな知見が得られることと期待される。

最後になりましたが、研究助成金をサポートいただいた公益財団法人日中医学協会に深く感謝申し上げます。

作成日 : 2016 年 3 月 14 日

ウスバサイシンにおけるアリストロキア酸の蓄積機構の解明

研究者氏名	講師 寺坂 和祥
日本所属機関	名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学
中国研究者氏名	教授 袁 丹
中国所属機関	瀋陽薬科大学中薬学院

要 旨

生薬サイシン（細辛）は、温裏祛寒薬として小青竜湯や麻黄附子細辛湯など汎用性の高い漢方処方に配合される重要な生薬の一つであり、その基原は、ウマノスズクサ科に属するウスバサイシンまたはケイリンサイシンの根もしくは根茎である。ウスバサイシンの地上部には重篤な腎機能障害を引き起こすアリストロキア酸が含有されており、日本薬局方では純度試験で地上部の混入を規制している。アリストロキア酸は、チロシンを出発原料とするベンジルテトラヒドロイソキノリンアルカロイドであるが、その生合成や蓄積に関わる知見はほとんどなかった。そこで本研究では、ウスバサイシンにおけるアリストロキア酸蓄積機構を解明することを目的とした。まず、ウスバサイシン植物体の葉部の HPLC 分析を行った結果、アリストロキア酸 I が含まれることが明らかとなった。続いて、この葉部由来の培養細胞系を作出するため、カルス誘導を行った結果、カルス培養系を確立した。さらに、ベンジルテトラヒドロイソキノリンアルカロイド生合成系の酵素遺伝子のクローニングを試み、ホモロジーベースのクローニング法により、チロシン脱炭酸酵素と相同性を有する遺伝子断片を得た。

Key Words アリストロキア酸、ウスバサイシン、植物培養細胞、遺伝子クローニング

緒 言：

生薬サイシン（細辛）は、ウマノスズクサ科の多年草であるウスバサイシン（*Asarum sieboldii*）（Fig.1）およびケイリンサイシン（*Asarum heterotropoides*）の根および根茎を基原とする生薬である。サイシンは、沈静、鎮痛、解熱、鎮咳、去痰作用を持ち、汎用性の高い漢方処方である麻黄附子細辛湯や小青竜湯等に配合される重要な生薬の一つである。中国では、細辛の用部は全草であり、中国市場においてウスバサイシンは地上部を含むものとして流通している。ところが、地上部には腎障害を起こすアリストロキア酸（aristolochic acid）が含まれることが報告されている。これまでに中国由来の生薬に含まれるアリストロキア酸により、世界各地で腎障害の発生が報告されており、CHN（Chinese-herb nephropathy）もしくは AAN（Aristolochic acid nephropathy）と呼ばれている⁽¹⁾。また、バルカン地方にみられたバルカン腎症もアリストロキア酸が原因であるとされている。そこで、日本では地上部は使用されず、日本薬局方においても純度試験により地上部の混入を規制している。



Fig. 1 ウスバサイシン植物体

アリストロキア酸は、チロシンを出発物質とするベンジルテトラヒドロイソキノリンアルカロイドの構造を有している。ベンジルテトラヒドロイソキノリンアルカロイドは植物アルカロイドの1つの大きなグループを形成し、この中には、モルヒネやベルベリン等の現在有用とされている医薬品材料として重要な化合物も多い。ベンジルテトラヒドロイソキノリンアルカロイドの生合成経路は、2分子のチロシンを出発物質として、脱炭酸されて生成するドパミンと、アミノ基転移反応を経て生成する4-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドが縮合して生成する(S)-ノルコクラウリンを共通の前駆体としている。その後、水酸化とメチル化を受けて生成する(R)-レチキュリンからはモルヒネが、(S)-レチキュリンからはベルベリンが生成さ

れる。これらの生合成経路は化合物の有用性から多くの研究がなされてきた⁽²⁻⁵⁾。しかしながら、(S)-ノルコクラウリンから数段階を経て生成する (R)-オリエンタリンを前駆体とするアリストロキア酸の生合成についての知見はほとんどない (Fig. 2)。

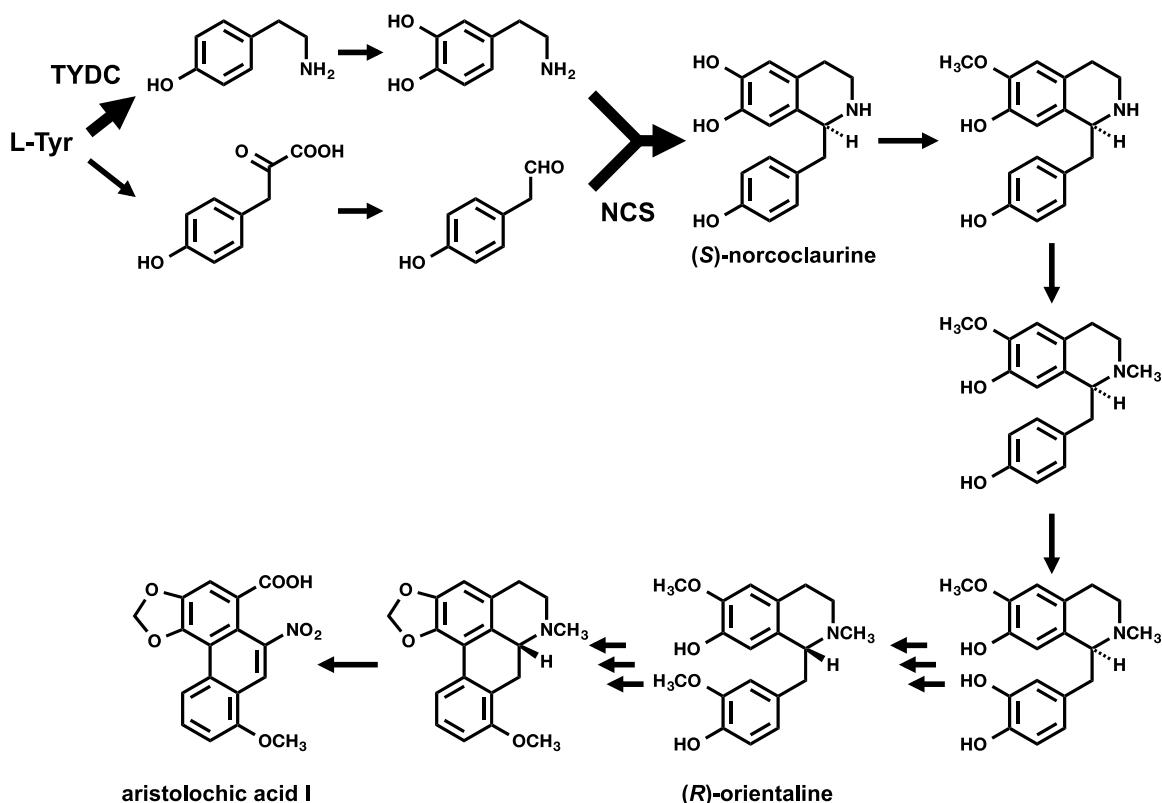


Fig. 2 アリストロキア酸の推定生合成経路

TYDC, チロシン脱炭酸酵素

NCS, ノルコクラウリン合成酵素

また、アリストロキア酸はウスバサイシンの地上部にしか含有されないことから、アリストロキア酸の植物体内での分布の制御は生合成もしくは輸送の段階で行われているものと考えられるが、詳細は不明であり、研究もほとんどなされていない。そこで、本研究では、ウスバサイシンを材料として、アリストロキア酸の蓄積機構の解明を目指した。

実験方法：

1. 植物材料

ウスバサイシン植物体は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センターより分与していた。室温 (20~25℃)、14 時間明期 - 10 時間暗期の植物培養棚で生育維持した。

2. ウスバサイシン植物体葉部のメタノール抽出液の HPLC 分析

ウスバサイシン葉部 0.11g (新鮮重) を液体窒素中で凍結粉砕し、メタノール 1 mL + 1 M HCl 100 μL を加え、30 分間超音波抽出を行った後、遠心分離した。上清を取り、濃縮乾固した後、MeOH 500 μL で再溶解し 10 μL を分析に用いた。

3. 植物体葉部からのカルス誘導

ウスバサイシンの葉部を切り取り、水洗後 70%エタノールに 30 秒間浸し、滅菌水で 6 回すすいだ。クリーンベンチ内で次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度: 8.5~13.5%) : 水 = 1 : 2 の混合液に 12 分間浸した後、滅菌水で 6 回すすいだ。オートクレーブ済のキムタオルで表面の水気を取り、滅菌済のメスで 1 cm 角程度に切り、培地に静置し、25℃で培養した。

4. ウスバサイシンからの遺伝子クローニング

ウスバサイシンの葉部 0.2 g (新鮮重) より、Plant total RNA Mini (VIOGENE) を用いて total RNA を抽出した。

3'-末端の増幅に用いた cDNA は、SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) を用いて、5'-末端の増幅に用いた cDNA は、SMARTer[®]RACE 5'/3' kit (TaKaRa Bio) を用いて添付プロトコールに従って cDNA を合成した。

3'-末端の増幅には、複数の植物種の TYDC および NCS のアミノ酸配列を比較し、保存された配列から TYDCs_Fw1 (5'-ACNCAYTGGCARWSICCNAAAYT-3')、TYDSs_Fw2 (5'-CAYGTNGAYGCNGCNTAYGC-3')、TYDCs_Fw3 (5'-GAYTAYAARGAYTGGCARAT-3')、NCSs_Fw1 (5'-GTNTTYGARAARYTIGAYGTNAT-3')、NCSs_Fw2 (5'-ATGATMGARGGNGGNTAYYTIGAYAT-3') を用いて、PCR 反応を行い、増幅された DNA 断片の配列を解析した。

結 果：

1. ウスバサイシン植物体に含まれるアリストロキア酸の分析

ウスバサイシン植物体の地上部にはアリストロキア酸が含まれているとされるが、植物体の生長段階や生育条件との関係は明らかではない。本研究で遺伝子源とする植物体にアリストロキア酸が含まれていない場合、生成に関与する遺伝子の発現も低い可能性が高く、遺伝子の単離に適さない。そこで、まずウスバサイシン植物体の葉部のメタノール抽出液を調製し、HPLC で分析を行った。その結果、アリストロキア酸 I、II の標品の保持時間および吸収スペクトルから、本研究で用いたウスバサイシン植物体の葉部には、微量ではあるがアリストロキア酸 I が含有されていた (Fig. 3)。

2. ウスバサイシン葉部のカルス誘導と生育条件の探索

ウスバサイシンには上胚軸休眠種子と呼ばれる特性があり、植物体が種子を飛散させる状態になっていても、種子内部の胚は十分に成熟していない。したがって、種子を得ても、発芽させるには追熟処理が必要となる。そのため、研究を行うにあたり継続的に植物材料を得るには、培養細胞系を用いる方が簡便であると考えた。そこで、ウスバサイシンのカルス誘導を行うこととした。ウスバサイシン葉部の表面殺菌を行った後、植物ホルモンの NAA および BA を 1~100 μ M の間で濃度を変化させた、MS 培地または LS 培地に静置した。その結果 100 μ M の NAA と 1 μ M の BA を含む LS 培地においてカルスの形成が確認出来た (Fig. 4)。

3. TYDC および NCS 遺伝子の cDNA クローニング

ウスバサイシンからのカルス誘導に想定以上に時間がかかったことから、アリストロキア酸輸送体の性質を検討し、候補となる輸送体を絞り込むことは難しいと考え、アリストロキア酸生合成酵素遺伝子の単離を行うこととした。ウスバサイシンからのアリストロキア酸生合成酵素遺伝子の単離にあたり、データベースに配列情報がほとんどなかったことから、ホモロジーベースのクローニングを行うことにした。まず、モルヒネやベルベリン生合成の研究から、比較的配列情報の多かった TYDC と NCS をターゲットとすることにした。TYDC は L-チロシンからチラミン、もしくは L-DOPA からドパミンを合成する反応に関与する酵素でありチロシン由来のアルカロイド生合成の初発段階に関わる重要な酵素である。NCS は 4-

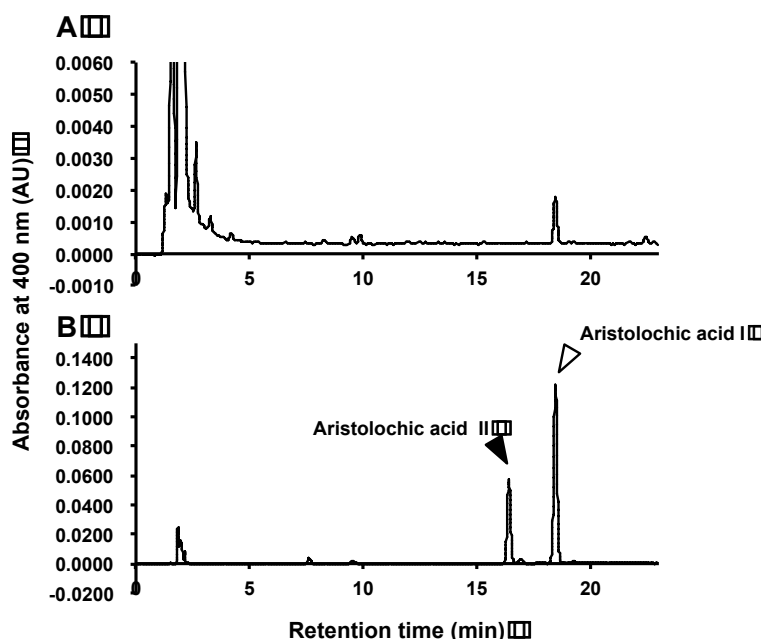


Fig. 3 ウスバサイシン葉部メタノール抽出液のHPLC分析
ウスバサイシン植物体の葉部をメタノール抽出し、HPLCで分析した。
A, ウスバサイシン植物体葉部のメタノール抽出液
B, アリストロキア酸 I, II の標準品



Fig. 4 ウスバサイシン葉部より誘導したカルス
ウスバサイシン植物体の葉部を表面殺菌し、
切断した後、LS培地に置床した。25℃暗黒
下で培養し、約4週間おきに継代した。ス
ケールバーは1 cm。□

ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドとドパミンからノルコクラウリンを生成する反応を触媒する酵素で、ベンジルテトライソキノリンアルカロイドの基本骨格形成に重要な役割を果たしている。これらの酵素はアリストロキア酸生合成に特異的ではないと考えられるものの、ベンジルテトライソキノリンアルカロイド生合成経路に特異的であることから、生合成調節に関する重要な情報が得られると考え、まずはこれらの酵素遺伝子の単離を行うこととした。

ウスバサイシン植物体の葉部から抽出した total RNA を元に cDNA を調製し、その cDNA を鋳型として degenerate primer を用いた 3'-末端側の増幅を試みた。その結果、目的のサイズに増幅が見られ、このバンドを単離し、配列を確認したところ、既知の TYDC と相同性のある 1 種類の遺伝子配列が得られた。引き続いて、得られた 3'-末端側の配列を元にプライマーを設計し、5'-末端側の増幅を試みたものの、現在までのところ、配列は得られていない。一方、NCS については保存配列が少なく 3'-末端側も得られていない。

考 察：

本研究では、ウスバサイシンにおけるアリストロキア酸の蓄積機構について明らかにするために、まず適切な植物材料の確保について検討した。本研究で使用したウスバサイシンは基原の正しいものであり、葉部にアリストロキア酸も含有されていたものの、培養細胞系確立のためのカルス誘導が難しかった。最終的には、カルス培養系はできたものの、その後の解析には十分ではなく、アリストロキア酸含量の定量にも至っていない。カルス誘導は、植物体の状態に依存することから、今後は、様々な生育段階のウスバサイシン植物体を用いることで、より多くの培養細胞ラインを作出できると思われる。植物材料の確保が困難だったことから、当初計画を変更し、少量の植物材料からでも可能である、アリストロキア酸生合成系の酵素遺伝子のクローニングを試みた。その結果、TYDC の 3'-末端側断片が得られ、これはケシ科の植物またはウマノスズクサ科植物由来の TYDC と高い相同性を有していた。しかし、未だ 1 種類の配列しか取れておらず、5'-末端側の単離にも至っていない。配列相同性を利用したクローニングは効率よく、また網羅的に目的遺伝子の配列を得られる方法であり、またモルヒネを生合成するケシにおいては 10 種類以上の TYDC が存在することから⁶⁾、より多くの cDNA が得られることを期待していたが、本研究では、1 種類しか単離できていない。この理由として、1 つに primer 設計がよくなかったことが考えられる。今後保存配列の選択を変更することと、degeneracy の数を変更することによる primer 設計の見直しと、PCR 条件を改善することで、より多くの断片を得たい。また、別の理由として、ウスバサイシン植物体の材料に課題があったと考えられた。ウスバサイシン植物体として、今回使用したものは比較的に未成熟のものであり、アリストロキア酸含量も十分でなかった可能性がある。生育段階とアリストロキア酸含量の関係は未解明であるため、今後、様々な生育段階のウスバサイシン植物体を入手し、アリストロキア酸含量を定量することで、より良い材料を得られると考えられる。また、本研究で確立したウスバサイシン培養細胞を用い、培養条件を変えることでアリストロキア酸生成量に変化があれば、これも遺伝子単離の材料として有用なものになると思われる。

参考文献：

1. Debelles FD, Vanherweghem JL, Nortier JL. Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. *Kidney Int.*, **74**, 158-69 (2008).
2. Sato F, Tsujita T, Katagiri Y, Yoshida S, Yamada Y. Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: norcoclaurine 6-O-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Eur. J. Biochem.*, **225**, 125-131 (1994).
3. Morishige T, Tsujita T, Yamada Y, Sato F. Molecular characterization of the S-adenosyl-L-methionine: 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 23398-23405 (2000).
4. Samanani N, Facchini PJ. Purification and characterization of norcoclaurine synthase. The first committed enzyme in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.*, **277**, 33878-33883 (2002).
5. Yamada Y, Kokabu Y, Chaki K, Yoshimoto T, Ohgaki M, Yoshida S, Kato N, Koyama T, Sato F. Isoquinoline alkaloid biosynthesis is regulated by a unique bHLH-type transcription factor in *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiol.*, **52**, 1131-41 (2011).
6. Facchini PJ, Penzes-Yost C, Samanani N, Kowalchuk B. Expression patterns conferred by tyrosine/

dihydroxyphenylalanine decarboxylase promoters from opium poppy are conserved in transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, **11**, 69-81 (1998) .

作成日 : 2016 年 3 月 13 日

細胞癌における漢方薬cinobufaciniおよびdoxorubicin併用投与有効性の検証

研究者氏名：夏 巨峰

所属機関名：東京大学大学院医学研究科
臓器病態外科学口座

要 旨：

Cinobufaciniの漢方薬は既に臨床で肝癌や白血病などの補助療法として治療に使われています。私の研究室では以前の研究でCinobufaciniが肝癌の成長を抑制効果があると思われています。今回の研究では、漢方薬のcinobufaciniと化学療法に使われるdoxorubicinを併用して、単独の薬より癌への抑制効果が増加すると思います。アポトーシスに関連する遺伝子の検査とタンパク質の変化から検証した結果、併用治療の方が癌抑制効果が強いという結果が出ました。その後、cinobufaciniから肝癌に有効な活性成分bufalinとcinobufaginを分離し、cinobufaciniを混合物として使うより単独でbufalinかcinobufaginを使う方が癌の抑制効果が更に優れた治療効果が得られる事を発見しました。以上の結果をもちましてcinobufaciniとdoxorubicinの併用治療は更に肝細胞癌を効果的に抑制出来る効果を持つことを証明されました。

Key Words： 肝癌, cinobufacini, doxorubicin, ミトコンドリアを介したアポトーシスシグナル経路, Fasアポトーシスシグナル経路

緒 言：

肝癌は世界中特に東アジアで癌の深刻な問題になっています。化学療法は一般に臨床で肝癌の治療に使う方法です。しかし化学療法に使われる薬には副作用があり、徐々に薬物耐性が出てくるようになります、これらが深刻な問題になっています。漢方薬は中国、日本、韓国等の国に何千年もの臨床治療の歴史があります。漢方薬には高い効果、容易に入手出来る事と副作用が少ない事で、患者さんのQOLを高める長所があります、常に癌の治療へ使われています。大量な抗ガン成分bufalin、cinobufagin等を含むCinobufaciniはヒキガエルの皮膚から取れる水溶性の漢方薬です。2005年cinobufaciniは中国食品薬品監督局から癌治療薬として許可を得て、肝癌、膵臓癌、肺癌等の治療として使われています。私の研究室の以前の研究の結果ではcinobufaciniが肝細胞癌のアポトーシスを促進する事を証明できました。しかし漢方薬の成分が非常に複雑し分子のメカニズムがまだ分かりません。それゆえ常に化学療法と併用して癌治療をしてきました。Doxorubicinは常に化学療法として使われていますが、しかしたくさん副作用と薬物耐性がある事です、そこで実験を通してcinobufaciniとdoxorubicinを併用治療する事で優れた癌抑制効果を証明し、またこれらのシグナル経路を検証をします。

対象と方法：

研究対象は三種類の肝癌細胞：HLE, HepG2, 和HepG2. 2. 15。実験方法はMTT細胞活性測定法；Realtime PCRで細胞中のアポトーシス遺伝子の変化を測定；Western Blotで細胞中のアポトーシスのタンパク質の変化を測定。

結 果：

- (1) cinobufaciniとdoxorubicinの併用使用は単独治療より肝細胞癌の抑制効果が優れている。
- (2) 薬を使用24時間後に併用薬用組のアポトーシスの遺伝子 (Bcl-2, Bax, Bid, Cytochrome C) の発見レベルが単独薬用組よりの変化が見える。
- (3) 薬を使用24時間後に併用薬用組のアポトーシスのタンパク質 (Bcl-2, Bax, Bid, Cytochrome C, Caspase-3/8/9) の発見レベルが単独薬用組よりの変化が見える。
- (4) 薬を使用24時間後にcinobufacini組のアポトーシスの遺伝子 (Bcl-2, Bax, Bid, Cytochrome C) の発見レベルがbufalin組とcinobufagin組より変化が見られる。
- (5) 薬を使用24時間後にcinobufacini組のアポトーシスのタンパク質 (Bcl-2, Bax, Bid, Cytochrome C, Caspase-3/8/9) の発見レベルがbufalin組とcinobufagin組より変化が見られる。

考 察：

先ず、生化学実験と細胞実験を通して、cinobufaciniとdoxorubicinの併用療法は同じ濃度のほかの薬より肝癌抑制効果が優れている結果があり、したがって、cinobufaciniを一種の化学療法の補助療法として化学療法薬doxorubicinの抗癌効果を増加する事が出来る。その後、cinobufacini中の二種類の活性抗癌成分bufalinとcinobufaginを対照組としcinobufaciniとの抗癌効果の差比べた所、生化学実験と細胞実験の結果はcinobufaciniと比べてbufalin又はcinobufaginより抗癌効果が優れている事を証明できました。これでbufalinとcinobufaginの他にcinobufaciniの中にまだ他の有効な抗癌成分がまだ研究と探求の余地があります。

参考文献：

1. Parkin, D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 118: 3030-3044, 2008.
2. Tao, Z.G., J.Y. Gao, G.L. Zhang, M.M. Xue, W.Q. Yang, C.Y. Tong, and Y. Yuan. Shufeng Jiedu Capsule protect against acute lung injury by suppressing the MAPK/NF- κ B pathway. *BioScience Trends*. 8: 45-51, 2014.
3. Jiao, B., and J.J. Gao. Intensive research on the prospective use of complementary and alternative medicine to treat systemic lupus erythematosus. *Drug Discov Ther*. 7: 167-171, 2013.
4. Huang, H.B., X.N. Peng, and C.W. Zhong. Idiopathic pulmonary fibrosis: The current status of its epidemiology, diagnosis, and treatment in China. *Intractable Rare Dis Res*. 2: 88-93, 2013.
5. Gao, J.J., Y. Inagaki, X. Li, N. Kokudo, and W. Tang. Research progress on natural products from traditional Chinese medicine in treatment of Alzheimer's disease. *Drug Discov Ther*. 7: 46-57, 2013.
6. Gao, J.J., Y. Inagaki, and Y. Liu. Research progresses on flavonoids isolated from traditional Chinese medicine in treatment of Alzheimer's disease. *Intractable Rare Dis Res*. 2: 3-10, 2013.
7. Melendez-Martinez, A.J., A.F. Nascimento, Y. Wang, C. Liu, Y. Mao, and X.D. Wang. Effect of tomato extract supplementation against high-fat diet-induced hep

- atic lesions. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2: 198-208, 2013.
8. Xia, J.F., J.L. Chen, Z.M. Zhang, P.P. Song, W. Tang, and N. Kokudo. A map describing the association between effective components of traditional Chinese medicine and signaling pathways in cancer cells in vitro and in vivo. *Drug Discov Ther.* 8: 139-153, 2014.
 9. Qi, F.H., Z.X. Wang, P.P. Cai, L. Zhao, J.J. Gao, N. Kokudo, A.Y. Li, J.Q. Han, and W. Tang. Traditional Chinese medicine and related active compounds: A review of their role on hepatitis B virus infection. *Drug Discov Ther.* 7: 212-224, 2013.
 10. Makau, J.N. K. Watanabe, N. and Kobayashi. Anti-influenza activity of *Alchemilla mollis* extract: Possible virucidal activity against influenza virus particles. *Drug Discov Ther.* 7: 189-195, 2013.
 11. Xia, J.F. J.J. Gao, Y. Inagaki, N. Kokudo, M. Nakata, and W. Tang. Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: Recent approaches using HepG2 cell line. *Drug Discov Ther.* 7: 1-8, 2013.
 12. Wong, R., C.M. Sagar, and S.M. Sagar. Integration of Chinese medicine into supportive cancer care: a modern role for an ancient tradition. *Cancer Treat Rev.* 27: 235-246, 2001.
 13. Gai, R.Y., H.L. Xu, X.J. Qu, F.S. Wang, H.X. Lou, J.X. Han, M. Nakata, N. Kokudo, Y. Sugawara, C. Kuroiwa, and W. Tang. Dynamic of modernizing traditional Chinese medicine and the standards system for its development. *Drug Discov Ther.* 2: 2-4, 2008.
 14. Lu, C.X. K.J. Nan, and Y. Lei. Agents from amphibians with anticancer properties. *Anticancer Drugs.* 19: 931-939, 2008.
 15. Jin, J.Y., Z. Xu, Z. Zheng, and S. Wan. Involvement of caspase-3 activity and survivin down-regulation in cinobufacini-induced apoptosis in A 549 cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 234: 566-572, 2009.
 16. Cui, X.Y., Y. Inagaki, D.L. Wang, J.J. Gao, F.H. Qi, B. Gao, N. Kokudo, D.Z. Fang, and W. Tang. The supercritical CO₂ extract from the skin of *Bufo bufo garzarizans* Cantor blocks hepatitis B virus antigen secretion in HepG2.2.15 cells. *BioScience Trends.* 8: 38-44, 2014.
 17. Li, F., R. Yang, Y. Weng, and X. Tang. Preparation and evaluation of lyophilized liposome-encapsulated bufadienolides. *Drug Dev Ind Pharm.* 35: 1048-1058, 2009.

作成日 : 2016年 3月 10日

Figure 1. Growth inhibition effect of cinobufacini on HLE (A, C) and HepG2 (B, D) cells.

Figure 2. Effect of a combination of reagents on transcription of apoptosis-related genes.

Figure 3. Changes of apoptotic proteins after treatment with a combination of reagents in HCC cells.

Figure 4. The mitochondria- and Fas-mediated apoptotic pathways induced by cinobufacini.

Figure 1

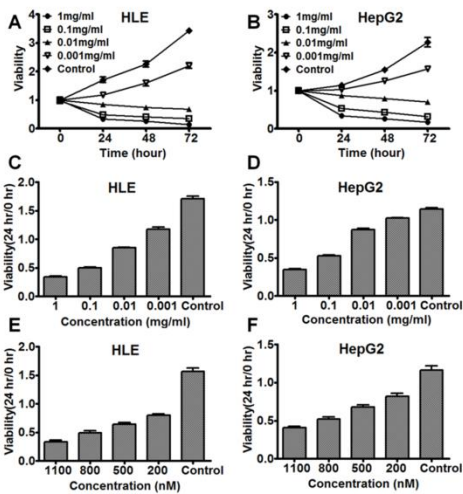


Figure 2

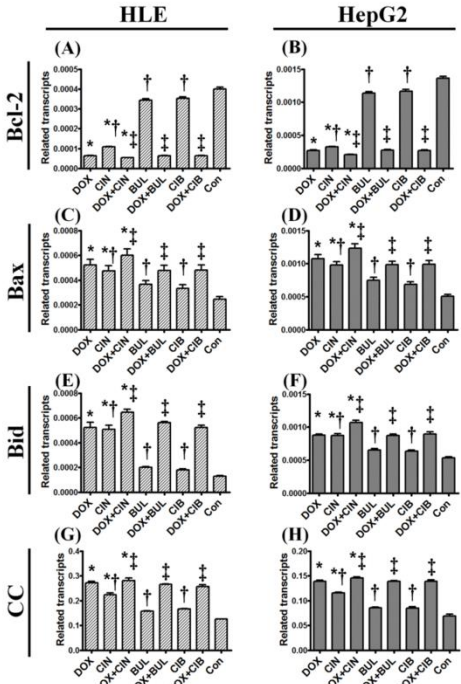


Figure 4

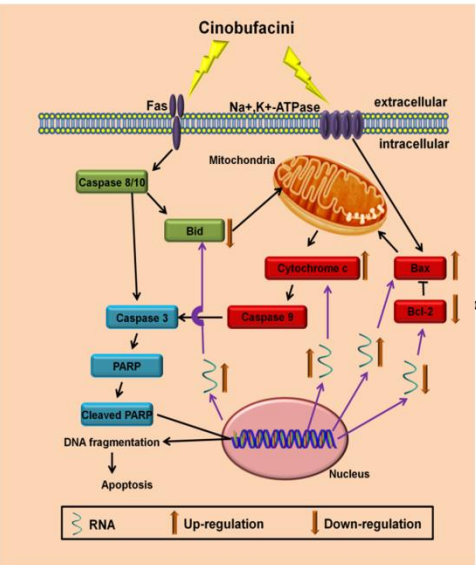
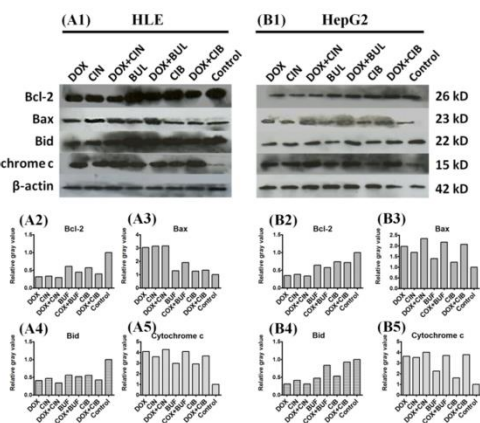


Figure 3



らい菌のマクロファージ内寄生分子機構におけるperoxisome proliferator-activated receptors (PPARs) シグナルの関与

研究者氏名：駱 予倩

所属機関名：国立感染症研究所ハンセン病センター

要 旨

ハンセン病の起因菌であるらい菌が、自然免疫反応の中核であるマクロファージ内に寄生するという最も典型的な細胞内寄生細菌であるが、その分子機構は未だ不明である。らい菌に感染したマクロファージをDNAマイクロアレイにより網羅的に解析したところ、脂質蓄積に密に関わる種々の宿主遺伝子発現が特異的に変動することがわかった。これらの遺伝子は、一つ共通の転写因子であるperoxisome proliferator-activated receptors (PPARs)によって調節されると知られている。したがって、本研究ではPPARシグナルがらい菌の細胞内寄生への関与について検討した。その結果、らい菌感染後PPAR- γ とPPAR- δ との活性化がマクロファージ内脂質蓄積を誘導することが示唆された。また、臨床検体を用いPPARシグナルの標的宿主遺伝子ADRPの実的な発現量を治療前後等経時的に評価したところ、ハンセン病治療前に検出されたが、治療後検出されない程度に減少したことが明らかになった。一方、感染後特異的な宿主遺伝子発現は、ハンセン病の病型や予後を推測する新規biomarkerになると考えられるため、PPARs標的遺伝子ADRPの発現レベルを多数のハンセン病患者から採取した検体で治療前後等経時的に評価した。

Key Words らい菌、マクロファージ、脂質代謝、PPARsシグナル、ハンセン病

緒 言：

ハンセン病は、抗酸菌の一種であるらい菌に感染することによって起こる慢性の感染症である。らい菌は、自然免疫反応の中核であるマクロファージの細胞内に寄生するという最も典型的な細胞内寄生細菌であるが、何故免疫監視機構を逃れてそのような細胞内寄生が可能であるのかについてはほとんどわかっていない。所属研究室これまでの研究で、らい菌感染によって宿主マクロファージにおける菌の細胞内寄生に関わると考えられる遺伝子発現が大きく変化することを明らかにしてきた(1-5)。らい菌の加熱死菌やコントロールとして用いた菌とほぼ同じサイズの粒子であるラテックスビーズによっても一過性に遺伝子発現が変化するがすぐに元に戻り、らい菌の生菌によってのみ遺伝子発現変化が持続することがわかってきた。タンパクの発現変化も同様であった。これらのことから、らい菌は感染した宿主の遺伝子発現変化を持続的に誘導することによって、自身の寄生に都合の良い細胞内環境を構築するものと考えられた。そのようならい菌生菌に特異的な遺伝子発現変化の全体像を解明するため、らい菌の生菌あるいは死菌で宿主細胞であるマクロファージに感染させた後、宿主細胞の遺伝子変化をDNAマイクロアレイで網羅的に解析した。そこで、脂質蓄積に密に関わる種々の宿主遺伝子発現が特異的に変動することがわかった。これらの遺伝子は、一つ共通の転写因子であるperoxisome proliferator-activated receptors (PPARs)によって調節されると知られている。したがって、本研究ではPPARシグナルがらい菌の細胞内寄生への関与について検討を行った。

対象と方法：

先行研究で得られたDNAマイクロアレイのデータで、複数のPPARsシグナルの標的遺伝子発現がらい菌に特異的に変動することが明らかになった。これらの結果に基づいて、本研究で、まず、ヒトのマクロファージ前駆細胞であるTHP-1細胞において、らい菌感染後PPAR転写因子ファミリーメンバー(PPAR- α

と PPAR- δ と PPAR- γ)と標的遺伝子それぞれの発現変動をリアルタイム PCR により調べた。さらに、PPARs の阻害剤または刺激剤を用い、細胞内脂質蓄積の変化を評価し、らい菌の細胞内寄生における PPAR シグナルの関与を検討した。

中国の共同研究者が、倫理委員会の承認および患者の同意を得て種々の病態や治療前後に採取した皮膚スミア検体を 15 例収集した。これらの検体から精製した RNA を用い、らい菌の細胞内寄生に重要な PPARs 標的遺伝子 ADRP の実際の発現量をリアルタイム PCR により評価した。

結 果：

1) 感染後PPARs標的遺伝子らの発現変化が確認された。DNAマイクロアレイで明らかになった脂肪細胞

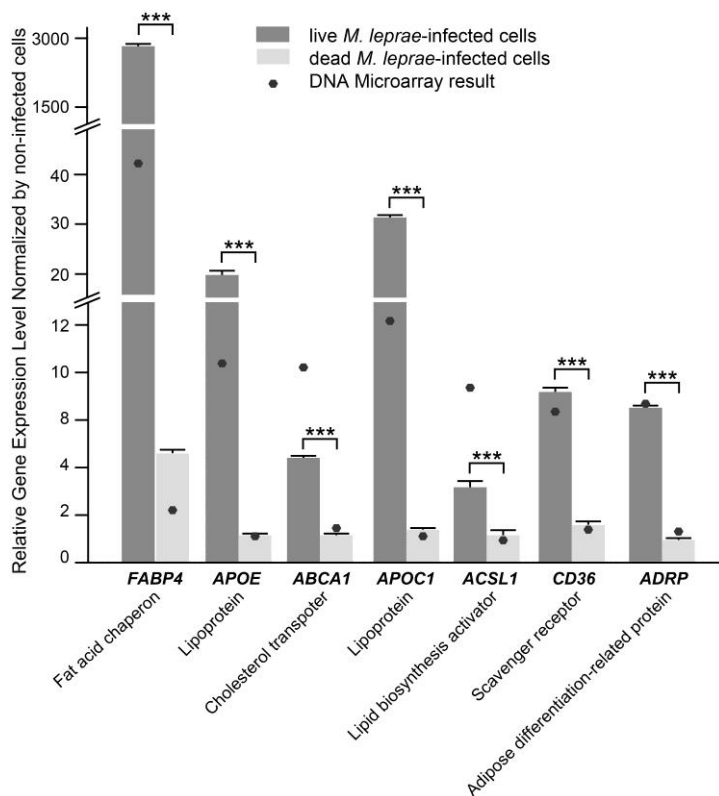


図 1、Real-time PCR により、DNA マイクロアレイで同定した各種 PPARs 標的遺伝子の mRNA 発現量を調べた。各遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH でノーマライズした。Bars: real-time PCR データ。Dots: DNA マイクロアレイデータ。***: $p < 0.001$ 。

分化(adipocyte differentiation)マーカーとして知られており、脂質の生成や取り込み、輸送に働くいくつかの遺伝子(ADRP, FABP4, ACSL1, CD36, APOE, APOC)の mRNA 発現量がらい菌の生菌のみに強く誘導されたことがわかった。これらの遺伝子の発現変化が、検出精度のより高い real-time PCR によりも確認された (図1)。らい菌の生菌がこれらの遺伝子を誘導することにより、脂質の豊かな細胞内環境を作り上げることが示唆された。

2) PPAR- δ と PPAR- γ がらい菌の生菌の宿主遺伝

子調節機能に関与することが示唆された。らい菌の生菌の感染で発現が強く誘導された遺伝子: ADRP、FABP4、CD36、APOE、APOC が、peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) という転写因子により転写が調節されることが多くの文献で報告された(6-10)。PPARs (PPAR- α と PPAR- δ と PPAR- γ という3つのメンバーがある)が、核受容体の一種のことであり、脂質の細胞内代謝や細胞の分化に密接に関与している転写因子であるとされている。PPARs は、遊離脂肪酸などの

内因性リガンドまたは様々な合成的外在性リガンドとの結合により活性化され、retinoid X receptor (RXR) とヘテロを形成し、peroxisome proliferator hormone response elements (PPREs) という標的遺伝子 DNA 上の特定領域に結合し、標的遺伝子の転写を調節する。THP-1細胞や人皮膚角化細胞において、PPAR- δ の激动剤が ADRP の発現を誘導し細胞内脂質の蓄積を促進することが報告された。分子クローリング研究により ADRP の DNA 上に PPREs の配列も確認された。また、脂質代謝調節機能のほかに、PPAR- γ と PPAR- δ がヒトマクロファージにおいて nuclear factor- κ B シグナルに拮抗し自然免疫反応を抑制する機能も報告された。このような PPARs シグナルがらい菌の脂質誘導機能および自然免疫反応抑制機能に関与するかどうかについてはいまだ報告がない。それを調べるために、まず、THP-1細胞にらい菌の生菌と加熱死菌(菌の数/細胞数=100/1)を別々に6時間または48時間感染させ、感染前と感染後の THP-1細胞から total RNA を精製し、real-time PCR で PPAR- α と PPAR- γ と PPAR- δ の mRNA 発現量を調べた。その結果、らい菌の生菌が特異的に PPAR- γ と PPAR- δ の mRNA 発現を誘導したことが明らかになった (図2)。

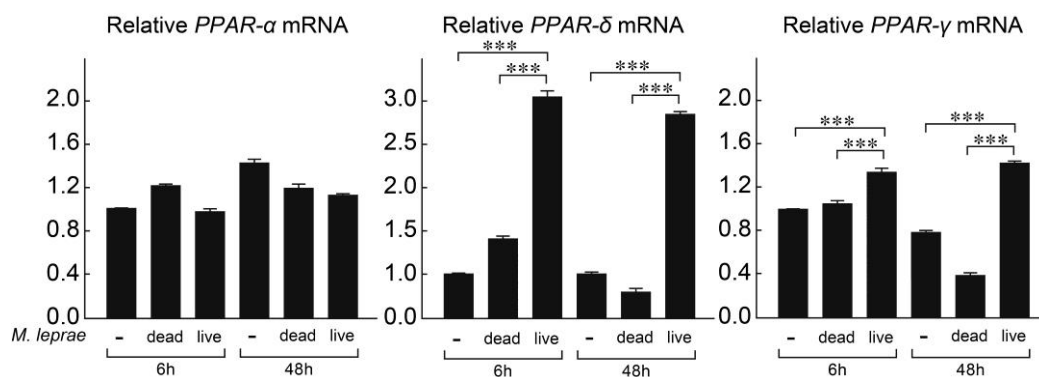


図 2、らい菌の死菌または生菌の感染による宿主細胞の PPARs 発現変動。THP-1 細胞に、らい菌の生菌と加熱死菌（菌の数/細胞数=100/1）を別々に 6 時間または 48 時間感染させ、感染前と感染後の THP-1 細胞から total RNA を精製し、real-time PCR により上記の遺伝子の mRNA 発現量を調べた。各遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH でノーマライズした。***: $p < 0.001$ 。

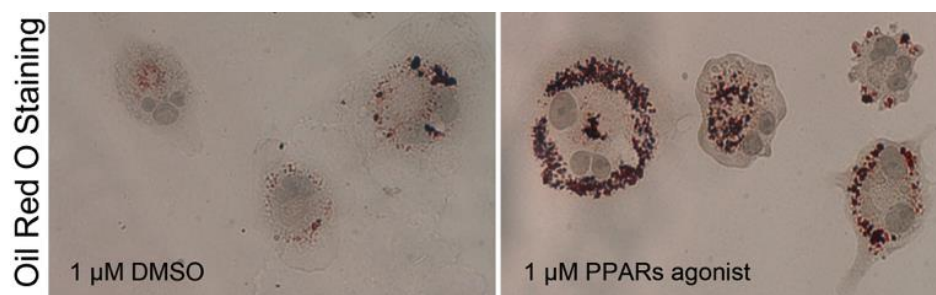


図 3、PPARs agonist がマクロファージ内脂質蓄積を誘導する。1 μ M DMSO または 1 μ M L-165,041 (Sigma, L2167) を用い、THP-1 細胞を 48 時間処理し、オイル赤 O 染色により、細胞内脂質蓄積を評価した。細胞核はヘマトキシリンで染色した。写真のオリジナル拡大倍数は X400 である。

れたが、治療後検出されない程度にまで減少した。ハンセン病の予後や治療効果の判定に役立つ遺伝子を同定するための検討を行うために、ハンセン病治療前後の患者からの皮膚検体における PPARs 標的遺伝子の実際の発現レベルを調べた。上海皮膚病病院の医師の協力を得て、臨床検体採取が行われた。倫理委員会で承認され患者へのインフォームドコンセントを得て、一年間をわたって、様々なハンセン病の臨床病型を持っておられる患者さん（総計15名）から、ハンセン病治療前と八月間の治療完了後に皮膚

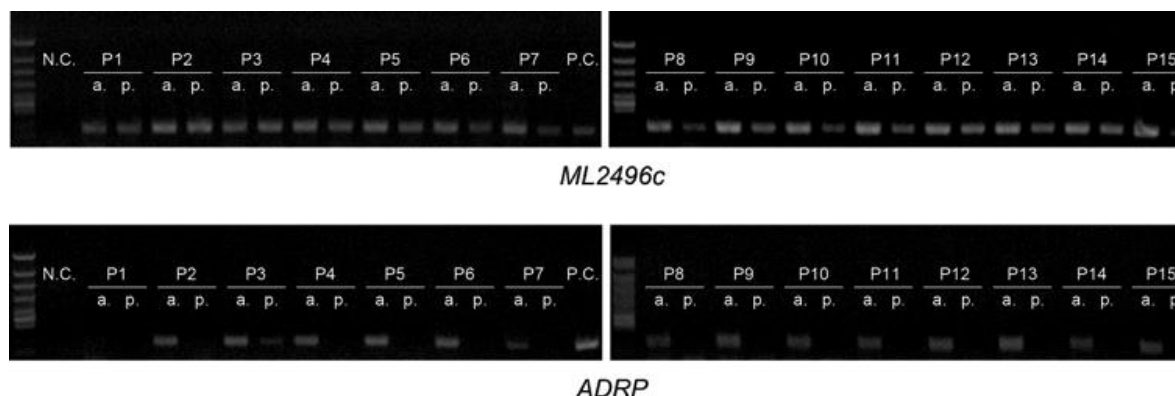


図 4、ハンセン病治療後 ADRP の発現が検出されない程度に減少した。患者さん（総計 15 名）から、ハンセン病治療前後に皮膚スミア検体を採取した。これらの検体から RNA を精製し、らい菌の遺伝子 ML2496c（上）および PPARs の標的遺伝子 ADRP（下）の実際の発現レベルを RT-PCR で検査した。N.C.: negative control, P.C.: positive control, P1, P2, P3, ... P15: 患者 1、患者 2、患者 3、... 患者 15。a.: 治療前。p.: 治療後。

3) PPARシグナルの活性化がマクロファージ内脂質蓄積を誘導する。 PPARシグナルの活性化がマクロファージにおいて脂質蓄積を誘導できるかどうかを調べるために、PPARシグナルの特異的

刺激剤L-165,041 (Sigma, L2167)を用い、マクロファージを処理48時間後、オイルレッドO染色により、細胞内脂質蓄積を評価したところ、1 μ M DMSO処理のコントロールと比べたら、1 μ M L-165,041処理のマクロファージでは、脂質が大量に誘導されたことが明らかになった（図3）。

4) ADRP発現がハンセン病治療前に検出さ

スメア検体の採取を行った。採取された皮膚スメア検体はRNA抽出までは70%エタノールに保存されていた。これらの検体からRNAを精製し、らい菌の遺伝子*ML2496c*およびPPARsの標的遺伝子*ADRP*の実際の発現レベルをRT-PCRで検査した。その結果、抗菌薬で治療して菌は死滅したと考えられた後でも、残存する菌体の遺伝子*ML2496c*はRT-PCRにより検出された（図4）。一方、治療前に*ADRP*の発現は検出されたが、治療後に*ADRP*の発現は検出されない程度に減少した（図4）

考 察：

本研究によって、脂質代謝や免疫反応に関わる転写因子であるPPAR- δ とPPAR- γ がらい菌のマクロファージ内寄生機構に関与することが明らかになった。また、PPAR- δ とPPAR- γ との標的遺伝子である*ADRP*がハンセン病治療効果を評価するための臨床検査biomarkerとして有用であることが示唆された。

参考文献：

1. Suzuki K, Takeshita F, Nakata N, Ishii N, Makino M. Localization of CORO1A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochem Cytochem* 39(4):107-112, 2006.
2. Tanigawa K, Suzuki K, Nakamura K, Akama T, Kawashima A, Wu H, Hayashi M, Takahashi S, Ikuyama S, Ito T, Ishii N. Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol Lett* 289(1):72-79, 2008.
3. Tanigawa K, Suzuki K, Kimura H, Takeshita F, Wu H, Akama T, Kawashima A, Ishii N. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin Exp Immunol* 156(3):495-501, 2009.
4. Degang Y, Akama T, Hara T, Tanigawa K, Ishido Y, Gidoh M, Makino M, Ishii N, Suzuki K. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *PLoS Negl Trop Dis* 6(12):e1936, 2012.
5. Tanigawa K, Degang Y, Kawashima A, Akama T, Yoshihara A, Ishido Y, Makino M, Ishii N, Suzuki K. Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *Microb Pathog* 52(5):285-291, 2012.
6. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93(2):241-252, 1998.
7. Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, Serhan CN, Spiegelman BM. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 275(3):1873-1877, 2000.
8. Vosper H, Patel L, Graham TL, Khoudoli GA, Hill A, Macphree CH, Pinto I, Smith SA, Suckling KE, Wolf CR, Palmer CN. The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem* 276(47):44258-44265, 2001.
9. Schadinger SE, Bucher NL, Schreiber BM, Farmer SR. PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(6):E1195-1205, 2005.
10. Targett-Adams P, McElwee MJ, Ehrenborg E, Gustafsson MC, Palmer CN, McLauchlan J. A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. *Biochim Biophys Acta* 1728(1-2):95-104, 2005.

注：本研究は、2015年6月10日『6th Congress of European Microbiologists』にて口演発表した。

作成日：2016年 3月6日