

福井大学 助成研究成果集 2016

—明日への挑戦—

創造力、実践力。

国立大学法人



福井大学

UNIVERSITY OF FUKUI

目 次

No.	部 局	職	研究代表者	研 究 課 題	目次
■福井大学生命科学複合研究教育センター平成27年度研究費助成事業					
【学内共同研究等】					
1	子どものこころの発達研究センター 工学研究科	特命助教	岩田 圭子	精子エピジェネティックマークを介した子孫へのストレス性行動異常の伝承	4～ 5
2	工学研究科	准教授	小西 慶幸	(特許申請中のため非公開)	
		准教授	沖 昌也		
3	医学部	助教	伊藤 哲史	聴覚情報の脳内地図表現の解明	6～ 7
4	工学研究科	准教授	藤田 聡	ナノファイバーデバイスを用いた細胞遊走時における細胞内イオンの定量的解析	8～ 9
5	医学部 工学研究科	助教	橋本 智哉	ナノファイバー上の細胞遊走モデルを用いた悪性脳腫瘍遊走能抑制の検討	10～ 11
6	医学部	准教授	藤田 聡	制の検討	
		准教授	千原 一泰	貪食細胞におけるアダプター蛋白質3BP2の機能解析	12～ 13
7	工学研究科	准教授	里村 武範	超好熱菌色素依存性D-乳酸脱水素酵素を素子としたバイオセンサーの開発	14～ 15
8	医学部	教授	青木 耕史	ヒト大腸癌幹細胞におけるCDX2の役割の解析	16～ 17
9	医学部	助教	謝 敏カク	シナプス可塑性における脂質関連分子の新たな役割の解明	18～ 19
10	医学部	特命助教	竹内 綾子	Bリンパ球細胞機能を制御する新規Cl ⁻ 輸送体の同定	20～ 21
■福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成27年度公募採択型研究費					
【学内共同研究等】					
1	がん診療推進センター	助教	細野 奈穂子	骨髄異形成症候群におけるAzacitidineによる治療反応性とβcatenin経路の検討	24～ 25
2	医学部	助教	村井 宏生	小児気管支喘息患者に対する予後予測バイオマーカーの開発	26～ 27
3	医学部	講師	岸 慎治	悪性リンパ腫治療におけるkey drugの治療薬物モニタリング	28～ 29
4	医学部	准教授	糟野 健司	腎不全におけるレドックス制御破綻の血管石灰化への影響についての研究	30～ 31
5	医学部	医員	大蔵 美幸	Mcl-1を標的とする治療抵抗性多発性骨髄腫に対する新規治療法の開発	32～ 33
【奨励研究費】					
1	工学研究科	教授	櫻井 明彦	冬虫夏草によるコルジセピン生産に及ぼすアミノ酸の影響	34～ 35
2	医学部	准教授	水谷 哲也	子宮肉腫と子宮筋腫を鑑別する腫瘍マーカーの開発	36～ 37
3	医学部	准教授	此下 忠志	高感度ヒトLNPEP(AT4/IRAP)ELISA測定系の確立	38～ 39
■福井大学産学官連携本部平成27年度実用化研究助成(FUNTECフォーラム 福井大学研究シーズ紹介ポスター発表)					
【知財創出研究】					
1	工学研究科	准教授	阪口 壽一	酸素富化空気製造を効率化する空間保持材料の開発	42
【知財育成研究】					
1	産学官連携本部	准教授	吉長 重樹	4点支持歩行補助杖の実用化に関する研究	43
2	工学研究科	教授	橋本 保	ABA型トリブロック構造からなる高透過性・高選択性二酸化炭素分離高分子膜の開発	44
3	高エネルギー医学研究センター	准教授	松本 英樹	WHOストックバイル収載を目指した放射線障害防護剤としてのニトロ製剤の再評価	45

※所属・職については平成27年度末時点の表記としています

福井大学
生命科学複合研究教育センター
平成27年度研究費助成事業

精子エピジェネティックマークを介した 子孫へのストレス性行動異常の伝承

概	要
先行研究から、母体ストレスが発達障害発症のリスクファクターであることが示唆されており、さらに近年、孫の世代にまでその負の影響が受け継がれる事象が報告されている。しかしそのメカニズムは不明である。そこで我々は、マウスを用い、母体ストレスが仔および孫に与える影響の解明を試みている。現在、母体ストレスによる仔の行動異常（強迫性行動、社会的インタラクションの低下）がオスを介してのみ孫に受け継がれるという非常に興味深い結果を得ている。本研究では、行動異常を脳の遺伝子発現の変化から理解し、さらに精子のエピジェネティクス変化（エピジェネティックマーク）を介して孫に異常が受け継がれる可能性を検証し、精子エピジェネティックマークと行動異常という表現型の関連を明らかにすることを目的とする。	
関連キーワード	母体ストレス、マウス、行動異常、遺伝子発現、エピジェネティックマーク

多くの先行研究から、ヒトの妊娠期における母体ストレスが、生まれてきた子どもの自閉症、感情障害、ADHD などの発達障害のリスクファクターであることが示唆されている (Glover, 2015)。また古くからマウスやラットのような実験動物においても同様の結果が多く報告されている (Weller et al., 1988; Patin et al., 2005; Son et al., 2006)。さらに興味深いことに、近年の研究によって、孫の世代にまでその負の影響が受け継がれる事象が報告され注目を集めている (Bohacek et al., 2014)。そのメカニズムについては不明な点が多いが、エピジェネティクス変化 (エピジェネティックマーク (特に DNA メチル化)) を介している可能性が示唆されている。

我々は、マウスを用い、母体ストレスが仔 (F1)

および孫 (F2) に与える影響の解明を遺伝学的、行動学およびエピゲノムの解析から試みている。これまでの行動学的解析から、母体ストレスによる行動異常は F2 に受け継がれること、さらに、この異常はオスを介してのみ世代を超えて受け継がれるという非常に興味深い実験の結果を得ている (Fig. 1, 2)。この結果から、母体ストレスが F1 の精子のエピジェネティックマークを介して F2 に異常が受け継がれる可能性が考えられる。

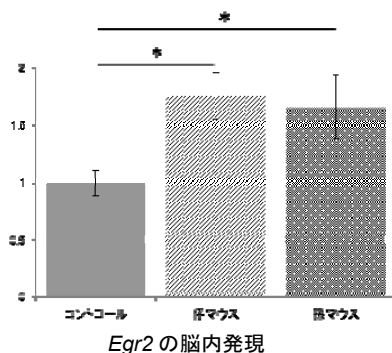
そこで、本研究ではまず F1、F2 の行動異常の原因を、脳の遺伝子発現変化から探る。さらに、発現の変化があった遺伝子について、F1 の精子の DNA メチル化状態を解析し、エピジェネティックマークを同定し、F2 への行動異常の伝承のメカニズムを明らかにする。

本研究では、右図のようなスキームで母体ストレスマウス (MS) からの F1 (♂) と F1 (♀) を父親に持つ F2 (♂) およびそれらに対するコントロールマウス (♂) を作製し、以下の解析を行った。MS は拘束ストレス (E9.5-出産まで、毎日 15 分間) を与えた。

-
- 妊産中に拘束ストレス(MS)
- ♂ Con (F1) vs ♂ MS(F1)
(A, C) 精子のメチル化解析
- ♀ Con (F1) vs ♂ Con (F1) vs ♂ MS(F2) vs ♂ Con(F2)
(B) 脳の神経学的解析・生化学的解析・遺伝子発現解析
- 相関性
- (D) 総合的解析と研究総括

2) F1, F2 脳の遺伝子発現解析

これら行動異常に関わる縫線核および前頭前野で以下の各因子の発現を、定量的リアルタイム PCR 法にて測定・解析した。具体的には、社会的相互作用に関連するセロトニン関連遺伝子 (*Slc6a4*, *Htr1a*, *Htr1b*, *Htr2a*, *Htr2c*, *Htr3a*, *Tph2*, *Maoa*, *Maob*)、その他社会的相互作用に関連する遺伝子 (*Bdnf*, *Trkb*, *GluA1*, *Gria2*, *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabrb3*, *Foxp2*, *Fos*, *Egr2*, *Drd2*, *Drd1*) を解析した。その結果、特に *Maoa* (縫線核)、*Htr2a* (前頭前野)、*Foxp2* (縫線核)、*Gabrb3* (前頭前野)、*Egr2* (前頭前野) の発現に有意な差が認められた。また、*Maoa*, *Htr2a*, *Foxp2*, *Gabrb3* は F1 のみ、*Egr2* は F1, 2 どちらにおいても発現の変化が認められ



た (下図)。

3) 精子のメチル化解析

現在、上記発現変化が認められた遺伝子のメチル化を F1 の精子を用いて解析している。

セロトニン神経の細胞体が局在する縫線核でセロトニン分解酵素 *Maoa* 発現の増加、投射先の前頭前野での *Htr2a* 発現の増加から、F1 の脳内ではセロトニンの放出量が減少している可能性がある。さらに *Foxp2* と *Maoa* には相互作用があることが報告されている。また、自閉症の死後脳研究において *Gabrb3* 発現異常が報告されている。F1, 2 共に変化していた *Egr2* は、脳の発達に関与しており、自閉症の死後脳研究において遺伝子発現の異常が報告されている。そのため仔マウスと孫マウスに共通して見られた社会性の異常や強迫行動の原因のひとつではないかと考えられる。今後、現在行っている精子のメチル化解析の結果を合わせ、F2 への行動異常の伝承のメカニズムについて検討する予定である。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- Silva JC, **Iwata K**, Steiner J, Guest PC, Turck CW, Nascimento JM, Martins-de-Souza D. (2016) Front Cell Neurosci, *in press*
- Ishibashi Y, Izumo N, **Iwata K**, Morikawa T, Kameyama T, Watanabe Y, Manabe T Matsuzaki H. (2016) Journal of Brain Science *in press*.
- Guest PC[#], **Iwata K**[#], Kato TA[#], Steiner J, Schmitt A, Turck CW, Martins-de-Souza D. (2015) Front Cell Neurosci, May 12;9:180 ([#]The first two authors contributed equally to this work.)
- Okamoto M, Iguchi T, Hattori T, Matsuzaki S, Koyama Y, Taniguchi M, Komada M, Xie MJ, Yagi H, Shimizu S, **Konishi Y**, Omi M, Yoshimi T, Tachibana T, Fujieda S, Katayama T, Ito A, Hirotsune S, Tohyama M, Sato M. DBZ Regulates Cortical Cell Positioning and Neurite Development by Sustaining the Anterograde Transport of Lis1 and DISC1 through Control of Ndel1 Dual-Phosphorylation. (2015) J Neurosci. 35:2942-58.

招待講演

- **Konishi Y**, Seno T, Kubota K, Sakae N, Takada H. 「The region specific control of branch stability in axonal arbors mediated by kinesin mediated transport」 9th International Symposium on Nanomedicine (2015)

活動

小西慶幸 数学協働プログラム ワークショップ 「細胞システムの理解と制御にむけた幾何学的方法の検討」 主催 (2015)

招待講演

小西慶幸、池野龍輝、瀬野岳史、面谷耕佑、栗下雅行、栄成美、佐藤真、高田宗樹 「微小管と軸索輸送の制御を介した軸索形態の維持システム」 第121回 日本解剖学会総会・学術集会 (2016)

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

現在受け入れ中

2015 年度 GSK ジャパン研究助成

申請予定

日本学術振興会・基盤研究 C (一般)
新学術領域研究 (公募研究)

生命科学複合研究教育センター
「平成27年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

聴覚情報の脳内地図表現の解明

研究代表者：伊藤 哲史（医学部・助教）
共同研究者：村瀬 一之（工学研究科・教授）

概 要	
聴覚神経回路がどのように音を表象するのか明らかにする上で、神経細胞集団の時空間活動様式、すなわち機能地図を明らかにすることは極めて重要である。機能地図を明らかにするために、生理学と形態学を結びつけることは必須であり、本研究は機能イメージングや記録細胞標識法によってこれを明らかにすることを目的としている。本年度は機能地図解析に役立つ3つの新しい機能イメージングの実験技法、すなわち①電位イメージングと軸索標識の結合、②カルシウムセンサー導入動物脳スライスの神経活動解析、③カルシウムセンサー導入動物による in vivo イメージング技法、を開発した。いずれの技法も機能イメージングとさらなる形態学的解析を可能にする特徴があり、今後これらの方法を用いて機能地図の形態・機能解析を行なっていきたい。	
関連キーワード	聴覚、神経回路、形態学、機能イメージング

研究の背景および目的

感覚神経回路において類似した刺激に応答する細胞が近くに配置する傾向がある。これを機能地図といい、その同定は神経回路の機能を知る上で本質的に重要である。時間変化を伴う複雑な音は自然環境中に満ちていて、それを検出する能力は生存上重要である。そのような音の特徴は脳内に機能地図のかたちで埋め込まれているのだろうか？

音の時間変化について検出する神経回路が聴覚系に存在することはわかっている。下丘は下位の聴覚神経核で並列処理された聴覚情報が初めて収束する場所であり、FM音などの複雑音に特異的に応答する細胞が出現する。下丘には応答周波数に対する機能地図が存在することがわかっているが、それ以外の音の特徴（例えばFM音のような複雑音）に関する機能地図の存在についてはよくわかっていない。

下丘内部は複数のシナプスドメインに分かれていることが複数の研究によって示唆されている（Ito and Malmierca, 分担執筆中）。各々のドメインは異なる神経核からの入力を受け、異なる神経核は異なる種類の音の特徴をコードすることから、シナプスドメインの配列が周波数以外の機能地図を作ると考えられる。シナプスドメインの中のニューロンは興奮性細胞、大型抑制性細胞、小型抑

制性細胞の少なくとも3種類に分類されることがわかっている。このうち、大型抑制性細胞は近隣のシナプスドメインの興奮性細胞から入力を受けることによって、より複雑な応答を作り出すことが想定されている。つまり、下丘の機能地図を考える際には、単に細胞の位置のみならず、細胞の種類も考慮すべきではないかと申請者は考えている。

下丘の機能地図を細胞種も考慮しつつ検討するのが当研究の目的である。実験1では、特にその機能がわかっていない下丘表層に機能構築があるか、種々の機能イメージング技法を用いて調べる。去年度までの研究によって、下丘表層の細胞が実際に音に応答することが確認され、さらに表層に機能構築が存在することが示唆された。そこで下丘表層の機能構築の有無をより詳細に検討することとする。高速イメージングが可能な電位イメージング法や、Ca²⁺指示蛍光タンパクを神経系に発現する遺伝子改変マウスを用いて、下丘表層の神経線維の配線や、機能構築の詳細について検討する。実験2では、3種類の細胞の音への応答性を作り出す基盤を調べるため、単一細胞レベルでの追求を行う。これによって細胞の種類も考慮に入れた機能地図を解明することが可能であると考えている。

研究の内容および成果

実験1：機能イメージングによる神経回路機能構築の解析

今年度は3種類のイメージング技法の開発を行

い、一定の成果を得た。それぞれ解説する。

1-1: 電位イメージングと軸索形態の関連解析

下丘スライスでの電位イメージングによって、

下丘皮質表層の神経線維走行には規則性があることが示唆されたが[8]、電位イメージングで観察された現象の形態学的基盤に関する研究は乏しい。機能地図解明のためには両者を結合することが欠かせない。そこで、刺激電極として、蛍光色素を詰めたガラス電極を使用し、電位イメージングで活動を示した軸索を標識する技法を開発した。まず上丘でこの実験を行ったところ、電位イメージングの活動伝播の初期の流れが標識軸索展開と定性的に合致することが確認された。現在標識軸索終末とイメージングの間に定量関係が存在するか検討中である (Morita et al., 投稿中、及び[10])。現在この技術を下丘に適用するための条件を検討中である。

1-2: Thy1-GCaMP3 マウスを用いた Ca^{2+} イメージング

従来頻用された蛍光色素を用いた Ca^{2+} イメージングは染色効率が良くない上、色素が固定不可能なため、標識細胞の同定が困難であった (例えば [11])。そこで、神経細胞特異的プロモーター制御下で Ca^{2+} センサー蛋白 GCaMP3 を発現する Thy1-GCaMP3 マウスを用いた Ca^{2+} イメージングを検討した。GCaMP は発現強度が強く、特定の細胞種で発現が見られることを免疫染色によって確認した。GCaMP が細胞外に流出するのを防ぐスライス作成法を導入することで、スライスを用いた Ca^{2+} イメージングの成功率を高めることができた。下丘では、下丘中心核や、下丘皮質 2 層の Ca^{2+} イメージングにこのマウスが適していることが確認

された。また、このマウスを慢性疼痛モデルにおける大脳皮質の自発神経活動変化を検出するのに利用することができた (伊藤晃、卒業論文)。

1-3: AAV-Syn-GCaMP6f を用いた in vivo Ca^{2+} イメージング

Thy1-GCaMP3 マウスの GCaMP 発現は下丘皮質表層では弱く、このため、当初予定した下丘皮質表層の in vivo Ca^{2+} イメージングには使いにくいことが判明した。そこで、P1 レベルで使用可能な組み換え AAV ベクターを利用して下丘皮質表層ニューロンに GCaMP を導入することを試みた。また、従来から in vivo 実験は動物の死亡率が高かったため、より安全な実験プロトコルの確立を目指した。結果、8 匹のマウスの下丘皮質表層ニューロンに 1 週間以上安定して GCaMP を発現させることに成功した。このような安定発現は蛍光色素を用いた Ca^{2+} イメージングでは不可能なことである。また、記録された蛍光強度変化も蛍光色素に比べて高く、本技法が有望であることがわかった (品川恭平、卒業論文)。

実験 2: 下丘単一ニューロンの機能形態学

本年度も傍細胞記録・染色実験を追加して行い、現在 109 個の下丘細胞の形態と生理学的性質に対応を与えることができた。またデータ解析プログラムの開発を行い、これによって、細胞の分類を行っているところである。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

2015 年度の発表論文は以下のとおり。下線は生命センター教員。

- [1] Ito T, Hioki H, Sohn J, Okamoto S, Kaneko T, Iino S, Oliver DL. Convergence of lemniscal and local excitatory inputs on large GABAergic tectothalamic neurons. *J Comp Neurol* 523: 2277-2296, 2015.
- [2] Ito T, Inoue K, Takada M. Distribution of glutamatergic, GABAergic, and glycinergic neurons in the auditory pathways of macaque monkeys. *Neuroscience* 310: 128-151, 2015.
- [3] Saito T, Ito T, Ito Y, Manabe Y. Long-term Follow-up Results of Regeneration Process of Fungiform Taste Buds After Severing the Chorda Tympani Nerve During Middle Ear Surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol* in press.
- [4] Ito T, Atoji Y. Tectothalamic inhibitory projection neurons in the avian torus semicircularis. *J Comp Neurol* in press.
- [5] Saito T, Ito T, Ito Y, Manabe Y, Sano K. Comparison of fungiform taste-bud distribution among age groups using confocal laser scanning microscopy in vivo in combination with gustatory function. *Eur J Oral Sci*, in press.
- [6] Ono M, Ito T. Functional organization of the

mammalian auditory midbrain. *J Physiol Sci*, 2015.

- [7] Ito T, Bishop DC, Oliver DL. Functional organization of the local circuit in the inferior colliculus. *Anat Sci Int*, 2015.

学会発表は以下のとおり (すべて第 38 回 日本神経科学学会 大会、ポスター発表)。下線は生命センター教員及び工学部学生。

- [8] 轟 真語, 伊藤 哲史, 池田 弘, 村瀬 一之 下丘表層における神経活動の計測
- [9] 伊藤 哲史, 阿閉 泰郎 鳥類下丘の GABA 含有細胞の超微形態
- [10] 森田 奈々, 長谷川 良平, 伊藤 哲史, 池田 弘, 村瀬 一之 軸索標識と電位イメージングを組み合わせることで上丘層間の機能的非対称を解明した
- [11] 福澤 拓也, 荒本 顕, 伊藤 哲史, 池田 弘, 村瀬 一之 マウス坐骨神経結紮による神経損傷が脊髄後角細胞の自発及び誘発活動に与える影響

「特記事項」

工学部卒業論文指導 3 件、修士論文指導 5 件。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科研費・基盤 (C) 代表 申請中

科研費・新学術 (公募) 代表 申請中

生命科学複合研究教育センター
「平成27年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

ナノファイバーデバイスを用いた細胞遊走時における 細胞内イオンの定量的解析

研究代表者： 藤田 聡（工学研究科・准教授）

共同研究者： 松岡 達（医学部・教授）、竹内 綾子（医学部・特命助教）

概 要	
細胞遊走とは、生体組織中を細胞が移動するプロセスで、創傷治癒や癌の転移などさまざまな生体現象で重要な役割を果たしているが、細胞内外との情報伝達と細胞遊走の関係についてはいまだ十分には理解されていない。本研究では、ナノファイバーを用いたアプローチにより、細胞体全体の遊走挙動細胞遊走時における細胞体全体に関わるカルシウムイオンの役割を明らかにすることを目的とする。1本のナノファイバー上での1細胞の遊走挙動と細胞内カルシウムイオン濃度について継時的に観察したところ、移動中の細胞では細胞内カルシウム濃度に際があること、細胞カルシウムイオン強度を変動させることで細胞遊走挙動を制御できる可能性があることが見出された。	
関連キーワード	細胞遊走、細胞内シグナル、Ca ²⁺ 、細胞極性、ナノファイバー

研究の背景および目的

細胞遊走とは、生体組織中を細胞が移動するプロセスで、創傷治癒や癌の転移などさまざまな生体現象で重要な役割を果たしている。細胞遊走の際の退縮や伸展などの機械的なメカニズムは、分子的にも詳細に理解されつつあるが、一方でどのようなタイミングで何がトリガーとなって遊走が起こるのか、遊走の方向性を決定するのは何か、といった細胞内外との情報伝達と細胞遊走の関係についてはいまだ十分には理解されておらず、解明が望まれている。

細胞内応答で重要な役割を果たす情報伝達物質として細胞内 Ca²⁺イオンがよく知られており、細胞遊走においても、伸展する細胞突起中での細胞内 Ca²⁺濃度の局在と細胞遊走の関連について報告されている。しかしながら、細胞質 Ca²⁺やER Ca²⁺のダイナミズムや Ca²⁺パルスの経時的な変化と細胞突起の伸長や退縮、さらには細胞全体の遊走挙動との関係はよくわかっていない。

これまでに研究代表者らは、ECM中における細胞の遊走挙動を詳細に解析する方法として、1本の

の微細ファイバーを作製し、このファイバーに沿って細胞が遊走する様子が、ECMに沿った細胞の遊走の様子を表すモデル化を試みてきた。この実験系では、繊維状の構造をとるECMのもっともシンプルなモデルとして、ECM中に存在する細胞の挙動を単純化することができる。すなわち細胞の遊走はファイバーに沿った一次元の動きのみに限定され、細胞の遊走方向において、細胞極性が明確に判断できる。細胞遊走時の細胞内 Ca²⁺のダイナミズムを解析するにあたり、先端突起等の細部の詳細な解析と細胞体全体における解析を比較検討しやすいと考えられる。

そこでナノファイバーを用いたアプローチにより、細胞体全体の遊走挙動細胞遊走時における細胞体全体に関わるカルシウムイオンの役割を明らかにするための実験系を構築することを本研究の目的とする。これにより、細胞の遊走制御につながり、さらには腫瘍細胞の転移、浸潤現象の解明にもつながることを期待している。

研究の内容および成果

【ナノファイバーの作製方法】エレクトロスピンニング法によりナノファイバーを作製した。エレクトロスピンニング法とは高電圧を印加したシリンジから溶液を射出することで、極細繊維を紡糸する方法である。今回、ファイバーの材料として、培養ディッシュの材料に用いられている素材と同一の材料であるポリスチレンを用いた。ポリマー溶

液の流速 1.0 ml/h、コレクタの回転速度 1,500 rpm、電界 2.5 kV/cm の条件でエレクトロスピンニングをおこない、アクリル製の担持用基板の上に紡糸した。ファイバーは、ファイバー担持用基板中央の培養領域に橋架けするように担持させた。この領域で、ファイバーは基板には接しておらず、細胞はこの橋架けされた部分で培養する。

【ファイバー上での細胞培養方法】ファイバーが担持された基板を、ファイバー担持面が下になるようにディッシュにセットし、腫瘍細胞株 HT-1080 細胞の懸濁液を播種し、2 h インキュベートして、ファイバーに細胞を接着させた。

【細胞内カルシウムの定量方法】細胞にカルシウム感受性蛍光色素 Cal-520AM (1.0 μ M) を添加し、37°C で 30 分間インキュベートすることで、色素を取り込ませた Cal-520AM は細胞内に取り込まれるとエステラーゼによる加水分解を受け、蛍光を発する。蛍光強度は Ca^{2+} イオン濃度に依存する。

【細胞遊走中の細胞内カルシウムの定量結果】本研究では細胞内のカルシウムイオン濃度を变化させる為の薬剤として BAPTA-AM を用いた。BAPTA-AM は細胞質内に取り込まれると加水分解され、細胞質内のカルシウムイオンのキレート剤として働く。これにより、細胞質内のカルシウムイオン濃度は減少する。

図 1 にファイバー上に播種した細胞の移動の様子とカルシウム指示薬の輝度変化の蛍光顕微鏡画像を示す。細胞はファイバー上で遊走する際、紡錘形の形態をとり、この形態を大きく崩すことなく、伸展と退縮を繰り返しながら遊走していた。添加前後でファイバー上を遊走する際の細胞体の長さを定量的に解析した。その結果、BAPTA-AM 添加前の細胞体の長さは、約 15-50 μm だったのに対し BAPTA-AM 添加後は、約 10-35 μm と短くなった。BAPTA-AM を添加することによって、細胞は小さく丸くなってしまいその場からほとんど遊走しなかった。細胞体内のカルシウムイオン濃度を表すカルシウム指示薬の局在を観察したところ、BAPTA-AM 添加前の遊走中の細胞では細胞体前方でイオン濃度の上昇がみられた。BAPTA-AM 添加後については、細胞内での局在は観察されなかった。細胞全体のカルシウムイオン濃度については BAPTA-AM を添加することによって大幅に減少した(図 2)。ファイバー上の細胞遊走速度を時間に対してプロットしたところ(図 3)、BAPTA-AM 添加後の細胞遊走速度は低下した。

以上より、移動中の細胞ではカルシウムの細胞内濃度に差があること、細胞カルシウムイオン強度を変動させることで細胞遊走挙動を制御できる

可能性があることが見出された。

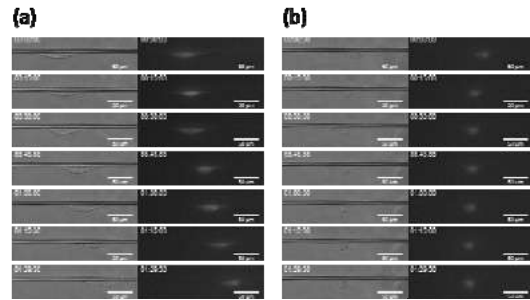


図 1. ファイバー上での細胞遊走とカルシウム指示薬の輝度。BAPTA-AM 添加前(a)および後(b)。

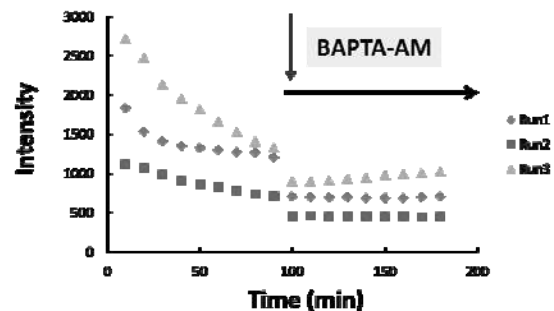


図 2. BAPTA-AM 添加前後のカルシウム指示薬の蛍光強度の変化。

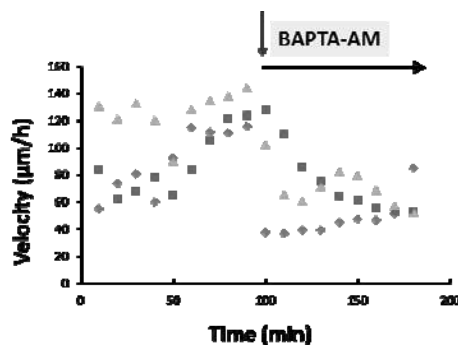


図 3. BAPTA-AM 添加前後の細胞遊走速度。

本助成による主な発表論文等、特記事項および 競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. O. Batnyam, H. Shimizu, K. Saito, T. Ishida, S. Suye, S. Fujita, Biohybrid hematopoietic niche for expansion of hematopoietic stem/progenitor cells by using geometrically controlled fibrous layers. *RSC Adv.* 5 80357-80364 (2015)
2. 早水 亮貴, 末 信一郎, 赤池 敏宏, 藤田 聡, カドヘリン固定化ファイバー上での細胞遊走挙動の解析, 第 4 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会 (2015)

3. 鳥本 雄太, 金森 啓一郎, 末 信一郎, 藤田 聡, 細胞形状の変形をもとにした 1 細胞遊走挙動の解析, 第 4 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会 (2015)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 藤田 聡, 科研費・基盤研究(A), 2015 年度, 次世代器官再生医療のための基盤技術の開発 (分担), 採択, 156 万円
2. 松岡達, 藤田聡, 竹内綾子, 科研費・基盤研究(B) (特設分野研究), 2016 年度, ミトコンドリアによる細胞遊走・走化調節に関する構成的システム生物学研究, 申請

生命科学複合研究教育センター
「平成27年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

ナノファイバー上の細胞遊走モデルを用いた 悪性脳腫瘍遊走能抑制の検討

研究代表者：橋本 智哉（医学部・助教）、藤田 聡（工学部・准教授）
共同研究者：北井 隆平（医学部・准教授）、菊田 健一郎（医学部・教授）

概 要	
本研究の目的は膠芽腫の浸潤遊走機構の抑制である。膠芽腫は集学的治療がなされても、全生存期間は約1年半である。局所制御は手術、放射線療法そして化学療法で一定の効果が得られたが、脳内転移巣や周囲脳への浸潤抑制が課題である。膠芽腫細胞は神経線維を介した遊走が知られている。神経線維を擬似したナノファイバーを用いて、細胞を single cell 状態で運動能を測定可能とした。具体的な研究項目は①微小管阻害剤に対する3種類の遊走モデルの遊走抑制効果の比較、②ナノファイバー上の生細胞において薬剤投与下での動態観察を行った。今後はこのモデルを用いた薬剤スクリーニングを遊走浸潤の抑制という視点で行いうると考えている。	
関連キーワード	膠芽腫、ナノファイバー、遊走能、細胞骨格、微小管阻害剤

研究の背景および目的

（研究の背景）

膠芽腫は、手術と化学療法、放射線治療等の集学的治療を行っても予後不良である。

その生物学的特徴は増殖、血管新生そして浸潤である。既に増殖、血管新生に対し、抗がん剤が使用されている。浸潤についての研究は、遅れている。膠芽腫は外科手術で除去しきれない周囲の脳から腫瘍細胞が浸潤遊走して転移巣が出現し、腫瘍増大し、死に至る。

腫瘍細胞は脳内で神経線維束に沿って遊走することが知られている。細胞遊走は細胞骨格の動態変化によって制御されており、アクチン重合に始まりそれに連動した微小管の動的不安定が細胞遊走に大きく関わっている。乳癌で新規の微小管阻害薬により微小管の動的不安定の機序も解明されつつある（Brice, Oncotarget 2015）。

しかしながら、悪性脳腫瘍細胞での遊走機序の検討は未だ充分になされていない。悪性脳腫瘍領域でもナノファイバーを用いて新しい治療が報告されている（Jain A, Nature materials 2014）。

本研究は細胞周辺の微小環境を模した培養系としてナノファイバーを用いる。これにより、生体中の腫瘍環境に類似した遊走形態を可視化し動的に観察し得ると考えた。

（材料と方法）

藤田は、ナノファイバーに沿って遊走する細胞の挙動をタイムラプス顕微鏡で観察することで1細胞の遊走挙動を定量的に評価する技術を確立している。本研究ではこの手法を用いた。

ナノファイバー上に腫瘍細胞を培養する本モデルの最大の利点は微小管阻害剤の効果を細胞の前後軸を明らかにしたうえで単純な1次元の運動として、細胞の動きを動的に観察しうることである。その点から次の実験を進めた。

1) 作用機序の異なる微小管阻害剤を IC₁₀ と IC₁₀ の半分の濃度で遊走阻害の効果を定量化した。具体的には細胞の速度、大きさ、方向性を測定した。

2) 生細胞状態で細胞骨格を免疫蛍光染色し、薬剤投与下でそれらの動的変化のパターンを解析した。35mmのガラスデッシュで微小管の構成成分であるチューブリンの動的不安定さを細胞皮質領域で観察した。さらに電界紡糸法で作製した1本のナノファイバー上で細胞骨格の動的変化を捉え、比較検討した。ナノファイバー上の細胞の極性と動的パターンに相関があるか検討する。

研究の内容および成果

1. ヒトグリオーマ細胞株 U87 において微小管阻害剤の遊走抑制効果

従来の遊走モデル wound healing assay と3次元に運動を示すトランスウェル膜を利用した cell migration assay を行った。ヒトグリオーマ細胞株 U87 に対する微小管阻害剤(Eribulin, Paclitaxel, Vincristine)の細胞毒性を MMT assay を用いて、 IC_{10} を求めた。 IC_{10} と IC_{10} の半分の濃度で従来の遊走モデルでの遊走抑制効果を検討した。Vincristine や Paclitaxel では遊走抑制効果があるが、Eribulin は wound healing assay で IC_{10} では遊走抑制効果は得られなかった。(図1)

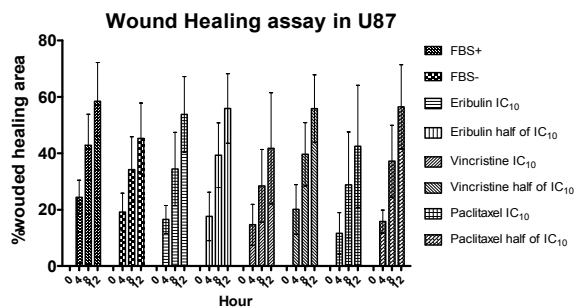


図1 U87 の wound healing assay

3 種類の微小管阻害剤 IC_{10} の抑制効果

3次元の cell migration assay では IC_{10} で遊走抑制効果は得られたが、3つの作用機序の異なる薬剤間での遊走抑制効果に差は得られなかった(図2)

Migration assay by inhibitors of microtubule in U87

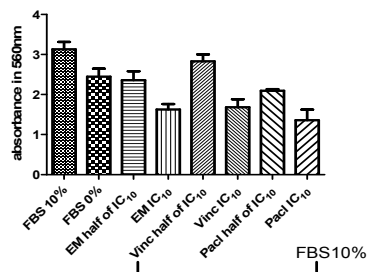


図2 U87 の cell migration assay

3 種類の微小管阻害剤の遊走抑制効果

2. 生細胞状態で conventional dish 或いはナノファイバー上に培養した場合での細胞骨格の動的変化を観察し、パターン化

Conventional dish 上に腫瘍細胞を培養し、共焦点顕微鏡下で細胞骨格を二重染色させ、3種類の微小管阻害剤 IC_{10} を各々投与した。それぞれの薬剤で微小管のチューブリンの動的形態変化をパターン化することができた。そこでナノファイバー上での培養細胞と同様に、single cell の状態で細胞骨格の動的変化を観察する予定である。(図3)

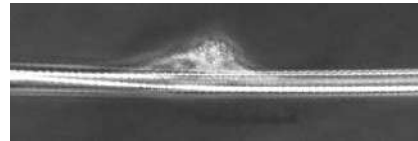


図3 ナノファイバー上 U87 bar 30 μ m
二重染色(チューブリン緑色、アクチン赤色)

3. ナノファイバー上での腫瘍細胞の遊走能評価

ナノファイバー上に遊走し single cell の状態で腫瘍細胞の速度や大きさや移動の方向性を計測した。各種の微小管阻害剤下で single cell でのバイオアッセイを行い、遊走抑制効果を定量化している。 IC_{10} Eribulin は遊走抑制効果があった。

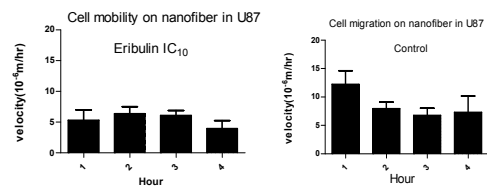


図4 U87 のナノファイバーモデルの運動評価
左図 Eribulin IC_{10} 右図 control

今後の発展

ヒトグリオーマ細胞の遊走の機序解明

異なる作用機序の微小管阻害剤を用いて、細胞極性の変化のトリガーとなると思われる蛋白やチューブリン結合蛋白の発現量を定量化し、ナノファイバー上での遊走能との関連性の有無を検討する

今後は遺伝子発現を制御した細胞で遊走能及び薬剤の効果の浸潤にかかわる実験を行っていく予定である。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成

「主な発表論文等」

1. O. Batnyam, H. Uematsu, C.W. Chou, S. Suye, S. Fujita, Taiwanin A incorporated polyurethane fiber sheets for prevention of postoperative cancer recurrence. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 26 558-571 (2015)
2. 藤田 聡, 微細ファイバーを用いた細胞遊走挙動の解析と制御, 数学協働プログラムワークショップ (2015)
3. 金森 啓一郎, 末 信一郎, 藤田 聡, シングルナノファイバーを用いた癌細胞浸潤現象の解析, 第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2015)

4. 藤田 聡, 荻原 裕佑, 金森 啓一郎, 鳥本 雄太, 末 信一郎, 微細ファイバーを用いた癌細胞浸潤の解析と制御, 第64回高分子討論会 (2015)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 藤田 聡, 科研費・基盤研究(A), 2015 年度, 次世代器官再生医療のための基盤技術の開発 (分担), 採択, 156 万円

生命科学複合研究教育センター
「平成27年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

貪食細胞におけるアダプター蛋白質 3BP2 の機能解析

研究代表者：千原一泰（医学部・准教授）

共同研究者：定清直（医学部・教授）、竹内健司（医学部・学内講師）、山内翔太（医学部・特命助教）

概 要	
アダプター蛋白質 3BP2 は、Syk を介する抗原受容体シグナル伝達を調節する。3BP2 の発現はマクロファージなどのミエロイド系細胞に強く認められるが、その機能は良く分かっていない。そこで、分化に伴い 3BP2 の発現レベルの上昇が見られる HL-60 細胞を用いて、マクロファージにおける 3BP2 の機能を解析した。ゲノム編集技術により作製した 3BP2 ノックアウト細胞を解析した結果、分化に伴う約 55kDa の蛋白質のチロシンリン酸化反応を 3BP2 が促進する可能性を見出した。CSF1 受容体や Mac-1 がこの反応の始点となり、シグナル伝達の下流で Fyn あるいは Lyn の機能を 3BP2 が調節している可能性が考えられた。本研究により、3BP2 がマクロファージの増殖や接着の制御に関わる可能性を新たに見出した。	
関連キーワード	貪食細胞、チロシンキナーゼ、アダプター蛋白質、シグナル伝達

研究の背景および目的

これまで我々は、B 細胞受容体や IgE 受容体シグナル伝達におけるアダプター蛋白質 3BP2 の機能を明らかにしてきた。現在さらに研究を進展させる目的で、マクロファージ様細胞に分化するミエロイド系細胞を用いて、貪食細胞における 3BP2 の機能を解析している。最近 3BP2 の発現が、HL-60 細胞の分化に伴い増強される事を見出した。分化した細胞では Src 型キナーゼのリン酸化が亢進するが、ゲノム編集技術により作製した 3BP2 ノックアウト細胞ではこの現象が見られなかった（未発表）。3BP2 の欠損は分化マーカーの発現に影響を与えないことから、上記の現象は分化異常によるものではないと考えられる。

Src 型キナーゼのリン酸化が亢進するメカニズムとして、Mac-1 を介する細胞接着が挙げられる。Mac-1 はマクロファージの代表的な分化マーカー

であり、インテグリン CD11b と CD18 の複合体である。Mac-1 がリガンド ICAM-1 を認識すると、CD18 の細胞内領域が Src 型キナーゼを活性化してシグナル伝達を開始する可能性が示唆されている。

本研究の目的は、アダプター蛋白質 3BP2 が Src 型キナーゼの活性化をどのように制御し、マクロファージの細胞接着や食作用を調節するのか明らかにすることである。

これまでの遺伝学的解析から、インテグリン Mac-1 のシグナル伝達に免疫受容体構成分子 FcRγ や Syk が関与する事が示唆されている。しかし、これらの分子がどのように Mac-1 のシグナル伝達を調節しているのか、そのメカニズムは不明である。本研究では生化学的解析とゲノム編集技術を組み合わせ、マクロファージにおける 3BP2 の機能の解明を目指す。

研究の内容および成果

1) ミエロイド系細胞における 3BP2 の発現調節

3BP2 の機能解析を行うために、ミエロイド系細胞における 3BP2 の発現について解析した。すでに 3BP2 の発現を確認していた HL-60 の他に、U937 や MOLM-13、MV4-11 などのマクロファージ様細胞への分化能を持つ細胞で 3BP2 の発現が認められた。U937 においては分化誘導に関わらず、常に高いレベルで 3BP2 の発現が見られたが、HL-60 や MOLM-13、MV4-11 では分化誘導により 3BP2 の発現レベルが増強された。HL-60 は、all trans retinoic acid (ATRA)により好中球様細胞へと分化させることが知られているが、3BP2 の発現は ATRA によっても増強された。それゆえ、3BP2 はマクロファージだけではなく好中球などの貪食細胞の機能調節に関わる可能性が示唆された。

2) 分化に伴う蛋白質のチロシンリン酸化反応へ 3BP2 が与える影響

2) 分化に伴う蛋白質のチロシンリン酸化反応へ 3BP2 が与える影響

HL-60 を PMA で処理すると、マクロファージ様細胞への分化に伴い細胞内蛋白質のチロシンリン酸化反応が増強される。そこで、3BP2 の発現が

この反応与える影響について解析した。分化誘導を行った細胞抽出液に対し、抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタンブロットを行ったところ、3BP2 ノックアウト細胞において分子量約 55kDa の蛋白質のチロシンリン酸化レベルが著しく低下した (図 1 B・矢印)。

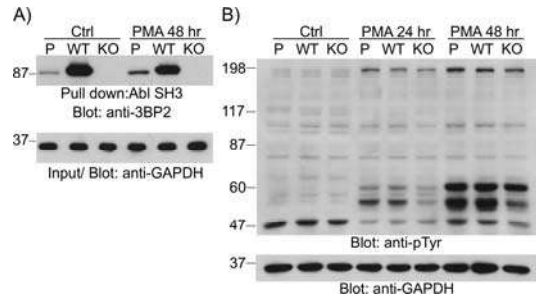


図 1 : A) 親株 (P), 3BP2 過剰発現株 (WT), 3BP2 ノックアウト細胞株 (KO) における 3BP2 の発現。B) 3BP2 の発現が PMA 処理により誘導される蛋白質のチロシンリン酸化反応に与える影響。

これまでの報告から、p52/p46 Shc や 3BP2 会合分子として同定されている HIP-55 (SH3P7/Abp1) がこの蛋白質である可能性が考えられる。今後、ゲノム編集技術を使い、分子の同定を試みる予定である。

3) 3BP2 が機能調節に関わる分子の探索

3BP2 によるチロシンリン酸化反応の制御メカニズムを明らかにするために、ゲノム編集技術を用いてチロシンリン酸化反応に関わる分子の探索を試みた。HL-60 を PMA で処理すると CSF1 と CSF1 受容体の発現が誘導され、オートクラインによる CSF1 受容体の活性化が起こるとの報告がある。そこで、CSF1 ノックアウト細胞を解析したところ、PMA 処理による蛋白質のチロシンリン酸化反応は殆ど消失した。また、PMA 処理により Mac-1 を介した細胞のコロニー形成が見られるが、Mac-1 ノックアウト細胞を解析したところ、細胞内蛋白質のチロシンリン酸化反応の減弱が見られた (図 2 A)。

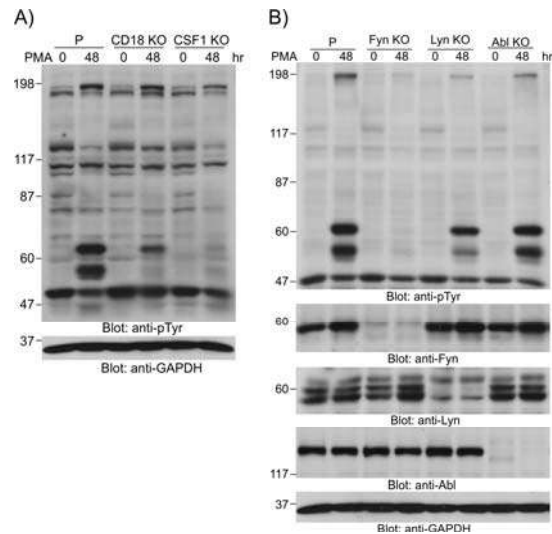


図 2 : A) CD18 (Mac-1), CSF1 ノックアウト細胞と、B) Fyn, Lyn, Abl ノックアウト細胞における PMA 処理により誘導される蛋白質のチロシンリン酸化反応。

これらの結果から、3BP2 は CSF1 受容体あるいは Mac-1 のシグナル伝達の調節に関わる可能性が示唆された。また、Fyn, Lyn のノックアウト細胞で PMA 処理による蛋白質のチロシンリン酸化反応が抑制されたことから (図 2 B)、3BP2 が CSF1 受容体や Mac-1 の下流で、これらの Src 型チロシンキナーゼの機能を調節している可能性が考えられた。

5) まとめ

本研究により 3BP2 が CSF1 受容体あるいは Mac-1 の下流で Src 型キナーゼの活性化を調節する可能性を見出した。今後の解析でそのメカニズムを明らかにしたいと考えている。また、3BP2 がマクロファージの増殖や接着、食食能をどのように調節するのか解析を展開していきたい。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Hepatitis C Virus Particle Assembly Involves Phosphorylation of NS5A by the c-Abl Tyrosine Kinase.
Yamauchi, S., Takeuchi, K., Chihara, K., Sun, X., Honjoh, C., Yoshiki, H., Hotta, H. and Sada, K.
J. Biol. Chem., 290(36), 21857-21864, 2015.

アダプター蛋白質 3BP2 は分化した AML 細胞において Src 型チロシンキナーゼの活性化を促進する。
千原一泰、吉木はつみ、加藤雄士、本定千知、山内翔太、竹内健司、定清直 2015 年 12 月 日本

分子生物学会年会・発表

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会 H28 年度科学研究費補助金 基盤研究 C

「チェルビズム病原蛋白質によるマクロファージの機能調節メカニズム」・代表・申請中

生命科学複合研究教育センター
「平成27年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

超好熱菌色素依存性 D-乳酸脱水素酵素を素子とした バイオセンサーの開発

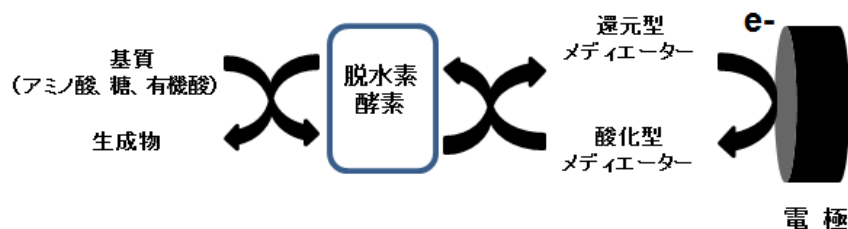
研究代表者： 里村 武範（工学研究科・准教授）
共同研究者： 末 信一郎（工学研究科・教授）、
坂元 博昭（産学連携本部・テニユアトラック講師）

概 要	
本研究では様々な疾病の診断用マーカー、あるいは食品の品質管理用マーカーとして期待されている D-乳酸を簡便に定量できるバイオセンサーの開発を行うことを目的とした。特に、現在 D-乳酸定量用バイオセンサー開発における課題となっている短寿命という要素を克服するため安定性が高い超好熱菌 <i>Caldiarchoaeum subterraneum</i> 由来色素依存性 D-乳酸脱水素酵素 (Cs-DLDH) を用いて、これまで開発が進んでいなかった D-乳酸定量用バイオセンサーの開発を行った。Cs-DLDH とカーボンナノチューブ (CNT) を Nafion によって電極に包括固定化した Cs-DLDH/CNT 修飾電極を作製し D-乳酸の定量を行った。その結果、30 から 2500 μM の D-乳酸をワイドレンジに定量できることが明らかとなった。また、血清中、赤ワイン中の D-乳酸の定量にも成功した。	
関連キーワード	超好熱菌、色素依存性 D-乳酸脱水素酵素、バイオセンサー

研究の背景および目的

D-乳酸は現在、医療や農業、食品の品質管理など多岐の分野で注目されている。その中で、医療分野においては、現代病である糖尿病や、その複合病である糖尿病ケトアシドーシスなどの病気診断のバイオマーカーとしての利用が期待されている¹⁾。健常者の血漿中の D-乳酸濃度は 250 μM 程度であることが知られている。一方、糖尿病患者の血漿中の D-乳酸濃度はおよそ 250~470 μM と上昇し、糖尿病型ケトアシドーシスに至っては、3.8 mM 以上という高い D-乳酸濃度を示すことが報告されている²⁾。このことから、生体内の D-乳酸を即位に測定することは、これら疾病の早期予防につながると考えられる。また、食品の分野においては、日本酒やワイン、ビールなどの発酵食品中に D-乳酸が含まれていることが知られており、ワインやビールにはそれぞれ 3.5~5.2 mM、0.75 mM 含まれていることが報告されている³⁾。ワインやビールは、生産地や種類によって含まれる D-乳酸濃度がほぼ一定であり、腐敗や損傷によって濃度大

幅に変化することが解っている。このため、これらの発酵食品中の D-乳酸濃度をモニタリングすることで、品質管理を簡便に行うことが可能となる³⁾。これらの理由から、どんな場所でも、迅速に再現性良く、D-乳酸を測定する方法が求められている。従来の D-乳酸の測定方法としては高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が挙げられる。しかし、HPLC は検出感度が高いが、測定に時間を要すること、装置が大きく研究室以外では実用性に欠けるといった問題が挙げられる。一方、酵素を電極用素子として用いる電気化学的バイオセンサーは簡便で再現性良く測定可能で安価かつ携帯可能な装置への応用が可能といった利点を有する（Scheme 1）。そこで本研究では、近年、全ゲノム配列が明らかとなった *Candidatus Calditerrarchaeum subterraneum* が有する色素依存性 D-乳酸脱水素酵素（DLDH）を素子とした電極を作製し電気化学的検出法による D-乳酸検出の検討を行った。



Scheme 1 酵素を電極用素子として用いた電気化学測定法の概略図

研究の内容および成果

Cs-DLDH をコードする遺伝子を大腸菌によるタンパク質発現用ベクターpColdI に導入し、大腸菌内で組換えタンパクの発現を行った。大腸菌によって生産された組換えタンパク質をニッケルカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによって電気泳動的に単一に精製した。精製した Cs-DLDH の酵素化学的性質の解析を行ったところ、80℃、10 分間の熱処理を行っても失活せず高い安定性を示し、バイオセンサー用素子として有用性が高いことが明らかとなった。そこで、Cs-DLDH をグラッシーカーボン (GCE) 電極上に CNT と Nafion を混合した溶液で包括固定化した Cs-DLDH/CNT/Nafion 修飾電極の作成を行い、本電極の機能評価を行った。まず、CNT の修飾量の最適化を検討した結果、CNT の濃度が 8 μg/ml で最も大きい酸化電流値が得られた。さらに、Cs-DLDH/CNT/Nafion 修飾電極における D-乳酸の検出限界及び定量性を検討した結果、30℃にお

いては、検出限界が 30 μM であり、30 から 2500 μM で高い直線性を有し広範囲の D-乳酸濃度を測定することが可能であることが明らかとなった (図 1)。この結果より、本酵素を用いた D-乳酸バイオセンサーは、ヒト血清中あるいは発酵食品中の D-乳酸を充分検出できる能力を有していることが判明した。また、Cs-DLDH/CNT/Nafion 修飾電極の長期安定性を検討した結果、1 ヶ月以上使用しても D-乳酸に対する電流応答を維持していることが確認できた (図 2)。これより、本電極は、高い長期安定性を有し、センサーに用いるにあたって非常に有用であると考えられる。次に、本センサーを用いて実際に血清中、赤ワイン中の D-乳酸濃度の定量を行った。その結果、管理血清中、赤ワイン中の D-乳酸の濃度は 263±4.4 μM、6.7±1.5 mM と算出された。これら算出された D-乳酸濃度はこれまで報告されている文献値の濃度範囲であったことから本センサーは医療、食品用 D-乳酸センサーとして有用であることが明らかとなった。

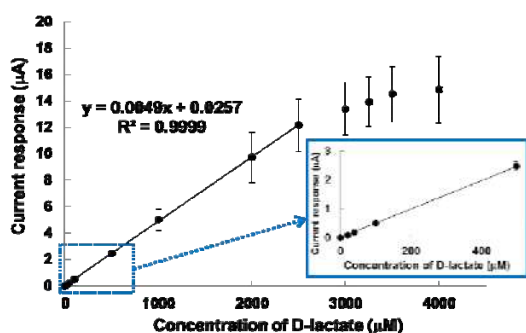


図 1 Cs-DLDH/CNT/Nafion 修飾電極による D-乳酸の検量線

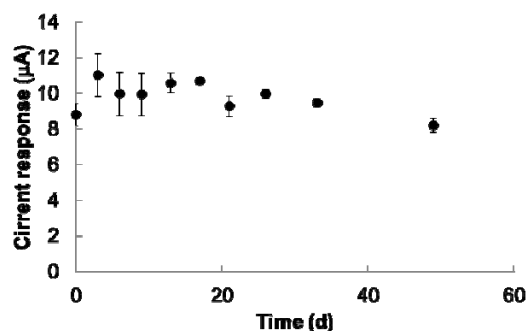


図 2 Cs-DLDH/CNT/Nafion 修飾電極の長期安定性

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

「好熱性アーキア由来色素依存性 D-乳酸脱水素酵素を用いた D-乳酸バイオセンサの開発」里村武範、大柳佑太、布浦拓郎、高木善弘、高見英人、高井研、櫻庭春彦、大島敏久、末信一朗
日本農芸化学会 2015 年度大会 札幌コンベンションセンター 平成 28 年度 3 月 28 日

海外雑誌に論文投稿準備中

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費補助金 基盤研究 C に申請中

生命科学複合研究教育センター
「平成27年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

ヒト大腸癌幹細胞における CDX2 の役割の解析

研究代表者：青木耕史（医学部・教授）

研究分担者：山口明夫（医学部・教授）・五井孝憲（医学部・准教授）

概 要	
これまでの我々の研究から、腸管上皮細胞の分化および恒常的機能の維持に不可欠なホメオボックス転写因子である CDX1 と CDX2 が大腸癌の悪性化や大腸癌細胞の幹細胞性を抑制していることが分かった。そこで、ヒト大腸癌の幹細胞性の制御における CDX1 と CDX2 の役割の解明を明らかにするために、ヒト大腸癌細胞から癌幹細胞を抽出（濃縮）して実験を進めることにした。そこで、まず、マウス腸腫瘍細胞から幹細胞を濃縮する実験系の構築を進めた。その結果、マウス腸腫瘍から、腫瘍幹細胞を濃縮する実験系を確立するとともに、CDX1 や CDX2 が大腸腫瘍細胞の幹細胞性を抑制することを遺伝学的に示すことができた。一方で、当初予定していたヒト大腸癌細胞を用いた実験を開始することができなかった。今後、マウスの腸腫瘍細胞を用いて確立した実験系を利用して、ヒト大腸癌細胞を用いた研究を進める。	
関連キーワード	CDX1、CDX2、大腸癌幹細胞性、大腸癌悪性化

研究の背景および目的

研究の背景) 近年大腸癌への罹患率が男性・女性ともに、増加しており、大腸癌を標的にした新たな治療標的の同定が課題となっている。そのためには、大腸癌の悪性化進展の機序解明が不可欠である。

これまでの解析から我々は、腸管の上皮細胞に特異的に発現しているホメオボックス転写因子である **CDX2** が大腸腫瘍形成の初期段階を抑制することなどを見出した。さらに、培養細胞やマウスの遺伝学手法を用いた解析から **CDX2** やそのファミリー分子である **CDX1** が、大腸癌細胞の悪性化

を抑制していることを明らかにした (Hori and Aoki *et al.*, unpublished)。また、その機序解析を進めることにより、**CDX1** と **CDX2** が大腸癌細胞の幹細胞性を抑制していることを見出した。

研究の目的) **CDX1** および **CDX2** によるヒト大腸癌細胞の癌幹細胞性の制御機構を明らかにするために、ヒト大腸癌からの癌幹細胞培養系の確立と、ヒト大腸癌細胞における **CDX1** と **CDX2** の役割の解明を目的として以下の実験を進めた。

研究の内容および成果

研究内容) 本研究課題では、ヒト大腸癌から、癌幹細胞を濃縮することが必要である。そこで、マウスの腸管腫瘍から腫瘍幹細胞を濃縮する実験の確立を進めた。スフェロイド培養系は、近年確立された幹細胞の培養方法である。ここでは、スフェロイド培養系を幹細胞培養系と呼ぶ。

また、マウスの腸腫瘍幹細胞培養系を用いて、**Apc** 遺伝子変異マウス、**cis-ApcCdx1** 遺伝子変異マウス、**Cdx2-cis-ApcCdx1** 遺伝子変異マウスの腸腫瘍から腫瘍幹細胞を培養

し、**CDX1** と **CDX2** が大腸腫瘍の腫瘍幹細胞の制御における役割の解明を進めた。

結果 1) 各遺伝子変異マウスの大腸腫瘍細胞からの幹細胞培養系の確立。

まず、それぞれの遺伝子変異マウスの大腸腫瘍から幹細胞の培養系の確立を行った。それぞれの大腸腫瘍から細胞を抽出し、マトリゲル中で、**Wnt** シグナルを活性化する組換えタンパク質を含む **conditioned** 培養液で培養した。図 1 の **poly#1** のように、**conditioned** 培養液を添加した状態では、正

常幹細胞が混在することが分かった（腫瘍細胞では、*Cdx1* 遺伝子の正常型が欠失する）。これは、このスフェロイド培養系が、正常腸上皮細胞の幹細胞の培養用に開発されたためである。そこで、conditioned 培養液を除いた培養液で一定期間培養した。その結果、conditioned 培養液を除くと正常幹細胞の増殖が抑制されるため、腫瘍幹細胞のみのスフェロイドが増殖した。そこで、これらの材料を用いて、次の実験を行った。

結果 2) *Cdx1* および *Cdx2* の欠損により大腸腫瘍細胞の腫瘍幹細胞性が上昇する。

これまでの解析から、ヒト大腸癌細胞株を用いた cDNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析から、CDX1 と CDX2 がヒト大腸癌細胞株の癌幹細胞性に関わる遺伝子の発現を顕著に低下することが分かった。この結果をマウスの遺伝学的手法を用いて、証明を試みた。*Apc* 遺伝子変異マウス、*cis-ApcCdx1* 遺伝子変異マウス、*Cdx2-cis-ApcCdx1* 遺伝子変異マウスの大腸に生じた大腸腫瘍から、スフェロイド培養を行った。図 2 に示すように、*Cdx2-cis-ApcCdx1* 遺伝子変異マウスの大腸腫瘍幹細胞は、*Apc* 遺伝子変異マウスの腫瘍細胞に比べて、増殖性が高い傾向があることがわかった（図 2: 球体の数が多い；現在、定量解析を進めている）。

そこで、腫瘍幹細胞のマーカー分子として最も重要な *Lgr5* 遺伝子の発現量を解析した。その結果、*Apc* 遺伝子変異マウスよりも、*Cdx2-cis-ApcCdx1* 遺伝子変異マウス由来の腫瘍幹細胞では、*Lgr5* 遺伝子発現量が、2 倍程度高いことがわかった（図 3）。すなわち、CDX1 と CDX2 が腫瘍細胞の幹細胞性を抑制していることが強く示唆された。今

後、ヒト大腸癌由来の細胞においても同様の解析を進める。

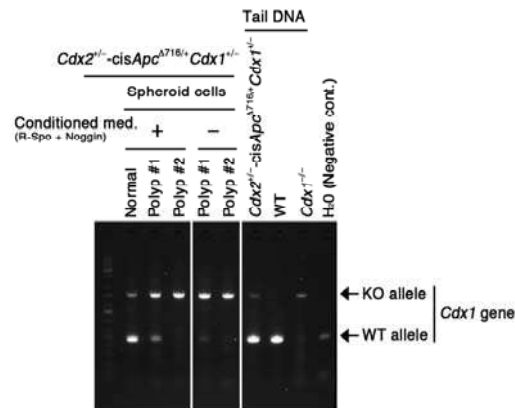


図 1. スフェロイド細胞での遺伝子型の解析

Spheroid cells derived from colonic tumors

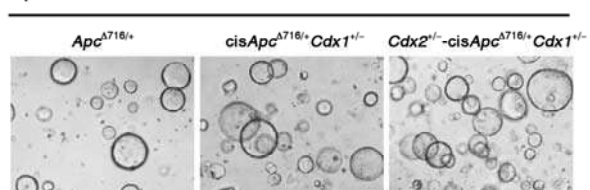


図 2. 各遺伝子変異マウスの腫瘍幹細胞

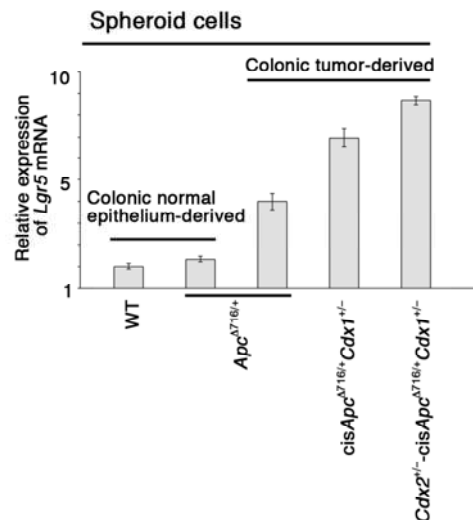


図 3. 腫瘍幹細胞での LGR5 遺伝子発現解析

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- 1) Reducing DNA methylation suppresses colon carcinogenesis by inducing tumor cell differentiation. Hatano Y, Semi K, Hashimoto K, Lee MS, Hirata A, Tomita H, Kuno T, Takamatsu M, **Aoki K**, Taketo MM, Kim YJ, Hara A, Yamada Y *Carcinogenesis*, Vol. 36(7), 719-729 2015
- 2) Hori K and **Aoki K** (corresponding au.), et al., Suppression of intestinal cancer stemness and

malignant progression by intestine-specific homeoproteins CDX1 and CDX2 (投稿準備中)

「特記事項」なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 1) 公益財団法人持田記念医学薬学振興財団・研究助成金・代表・2015 年度・大腸癌細胞の幹細胞性の制御機構の解明・300 万円
- 2) 公益財団法人がん研究振興財団・代表・2015 年度・大腸癌細胞の幹細胞性の制御機構の解明・100 万円

生命科学複合研究教育センター
「平成27年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

シナプス可塑性における脂質関連分子の新たな役割の解明

研究代表者： 謝 敏カク（医学部・助教）

研究分担者： 深澤 有吾（医学部・教授）

概 要	シナプス伝達効率を動的に制御（シナプス可塑性）する仕組みは、学習記憶のモデルとして盛んに研究され、関連遺伝子やタンパク質の同定とその役割の理解が深まりつつある。一方、シナプス膜上に存在する脂質（膜脂質）と各可塑性関連タンパク質との相互作用やそのシナプス可塑性における機能的役割については殆ど不明である。本研究では、膜脂質の一種ホスファチジルイノシトール(3,4,5)三リン酸(PIP ₃)と特異的に結合する Phldb2(pleckstrin homology-like domain, family B, member 2)が、シナプスが形成されるスパインに PIP ₃ 依存的に局在し、グルタミン酸受容体のシナプス内係留とシナプス後肥厚タンパク質(PSD)-95の細胞内動態に関与することを突き止めた。また、Phldb2欠損マウスの海馬 CA1 シナプスでは、長期抑制(LTD)と長期増強(LTP)の両方のシナプス可塑性が欠如していることも見出した。これらの知見は、シナプス可塑性における膜脂質-タンパク質相互作用の重要性を提起し、その分子実体を明らかにした点で重要な発見である。
関連キーワード	Phldb2、シナプス、ノックアウトマウス、CaMKII

研究の背景および目的

シナプス伝達効率を動的（シナプス可塑性）に制御する仕組みは、学習記憶をはじめとする脳の高次機能に深く関与している。シナプス伝達の大きさはシナプス後電流を通す AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) のシナプス内発現数に比例することが示され、AMPA-R のシナプスへの運搬と除去に関わる分子機構の解析がタンパク質を中心に進められてきた。しかし、膜脂質の役割については、まだ十分に解析が進んでいない。ホスファチジルイノシトールは、リン酸基の数と位置により、細胞膜上で起こる種々の機能発現を制御している。神経細胞においては、ホスファチジルイノシトール(3,4,5)三リン酸(PIP₃)が AMPA-R のシナプス後肥厚部上での発現調節に関与することが近年報告された(Arendt KL et al., Nature Neurosci, 2010)。しかし、PIP₃ と相互作用する分子の実体は明らかにされておらず、その詳細は不明である。

我々は、pleckstrin homology like domain (PH domain) を持ち PIP₃ に特異的に結合する Phldb2 (pleckstrin homology-like domain, family B, member 2、別名 LL5β, Takabayashi, T and Xie M-J

et al., J. Biol. Chem. 2010) の細胞移動における役割を研究する中で、Phldb2 が成熟した脳にも発現し、神経細胞の興奮性シナプスが形成される樹状突起スパインに PIP₃ 依存的に局在していることを見出した。Phldb2 ノックアウト (KO) マウスを作製して、シナプスと Phldb2 との関係を検討すると、未成熟なスパイン形態である、フィロポディアと thin 型スパインが増加し、AMPA-R を構成するサブユニットの 1 種、GluA2 の発現が細胞全体としても、膜上発現としても減少していることを突き止めた。また、NMDA 処理による化学的な長期抑制 (LTD) に伴って起こる細胞膜上 GluA2/総 GluA2 の低下が、Phldb2 KO マウスでは有意に低いことも見出した。これらの結果は、Phldb2 がシナプス内 AMPA-R 発現の調節に深く関与し、シナプス可塑性に重要な分子であることを強く示唆している。

そこで本申請課題では、Phldb2 のシナプス機能関連分子との相互作用を AMPA-R を中心に明らかにし、脂質-タンパク質相互作用によるシナプス可塑性調節機構の実体を明らかにすることを目的とした。

研究の内容および成果

(1) Phldb2 はシナプス可塑性の発現に重要

生後 3 週齢マウスの脳スライスを作製し、高頻度電気刺激による LTP 誘導と低頻度電気刺激によ

る LTD 誘導を海馬 CA1 シナプスを対象に行った。Phldb2 KO マウスでは LTP また LTD の誘導が完全に阻害されていたことから、Phldb2 はシナプス機能の増強と減弱の両方向、即ちシナプス可塑性発現そのものに必須であることが示唆された。

(2) Phldb2 は AMPA-R 複合体を形成する

Cos 7 細胞に phldb2 と GluA1、または GluA2 を発現導入し、Phldb2 に対して免疫沈降すると、GluA1 と GluA2 の両方とも共沈されることから、Phldb2 がこれら AMPA-R サブユニットに直接結合することが示唆された。

(3) Phldb2 はシナプス膜表面における AMPA-R の発現密度の制御に関与

シナプス膜上の AMPA-R 発現に対する Phldb2 の役割を検討するために、凍結切断レプリカ標識 (SDS-FRL) 法を用いた AMPA-R 発現の高解像度解析を行った。10 週齢マウスの海馬固定組織を急速高圧凍結し、凍結切断レプリカを作製した後、SDS 処理により膜タンパク質以外の分子を洗い流してから、AMPA-R に対する免疫金標識を行った。電子顕微鏡下で海馬 CA1 錐体細胞のシナプスを膜内粒子 (IMP) の集積を頼りに同定し、興奮性シナプス後膜の面積と AMPA-R 標識数を測定した。総 AMPA-R 標識と GluA1 標識のラベルの両方で、シナプス面積と標識数の有意な正の相関が見られ、これは phldb2 KO マウスでも確認された。しかし、KO マウスでは、総 AMPA-R 標識、及び GluA1 標識の両方の標識密度が野生型マウスの標識密度に比べ有意に低いことが分かり、phldb2 の欠損が、単一シナプスレベルにおける AMPA-R 発現密度の制御に関与することが明らかとなった。また、KO マウスに見られた標識密度の減少は、LTP の初期相に深く関与する GluA1 の標識密度で顕著であったことから、phldb2 が AMPA-R 輸送機構の中でもシナプス可塑性に関わる機構に関与していることが強く示唆された。

(4) Phldb2 は PSD-95 のスパイン内動態を制御する

脂質関連分子を介する新たな AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス集積機構の解明後肥厚部 (PSD) と呼ばれ、神経伝達物質受容体をはじめとす

る種々のシナプス機能分子が集積することで、機能的な分子複合体を形成している。興奮性シナプスでこの分子複合体形成に中心的な役割を担う分子 (足場タンパク質) PSD-95 のシナプス発現が Phldb2 の制御下にあるかどうかを検討する目的で、培養海馬神経細胞の PSD-95 局在を、免疫染色法より比較検討した。その結果、KO マウスでは PSD-95 局在のピークがスパイン head の辺縁から樹状突起シャフトに移動していた。さらに、paGFP-PSD-95 の培養海馬神経細胞への発現誘導後の PSD-95 拡散動態解析で、PSD-95 の拡散が KO マウスで遅いことが判明した。これらのことから、Phldb2 は PSD-95 のスパイン内局在および移動も制御していることが示唆された。

(5) Phldb2 は NMDAR-CaMKII-AMPA 局在調節機構の形成維持に重要

興奮性シナプス伝達の可塑性は、NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA-R) から流入する Ca^{2+} がカルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) の活性化を誘導し、種々の AMPA-R シナプス局在制御関連タンパク質のリン酸化を制御することで誘導される。従って、NMDA-R-CaMKII 複合体の形成は、シナプス機能変化の方向性を問わず、シナプス可塑性の発現そのものに重要である。そこで、Phldb2 の CaMKII との結合能を検討した結果、CaMKII に直接結合することを見出した。さらに、CaMKII と NMDA-R (NR2A, 2B, NR1) の複合体が、KO マウスで WT マウスに比べて顕著に減少していることを、培養神経細胞を用いた免疫沈降実験により明らかにした。これらの結果から、シナプス可塑性の発現そのものが KO マウスで障害された原因として、Phldb2 の欠損により CaMKII がシナプスに運ばれず、NMDAR からの Ca^{2+} シグナルが AMPA-R に伝えられなくなったことが原因であると示唆された。

以上の研究結果から、Phldb2 が膜脂質との相互作用を介してシナプス伝達関連タンパク質のシナプス集積を担う分子であり、シナプス可塑性の発現に必須な重要な分子であることを突き止めると同時に、シナプス可塑性のメカニズムの一端を明らかにした。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「発表論文」

Okamoto M, Iguchi T, Hattori T, Matsuzaki S, Koyama Y, Taniguchi M, Komada M, Xie MJ, Yagi H, Shimizu S, Konishi Y, Omi M, Yoshimi T, Tachibana T, Fujieda S, Katayama T, Ito A, Hirotsune S, Tohyama M, Sato M. DBZ regulates cortical cell positioning and neurite development by sustaining the anterograde transport of Lis1 and DISC1 through control of Ndel1 dual-phosphorylation. J. Neurosci. 18・35・2942-58・2015.

Yagi H, Oka Y, Komada M, Xie MJ, Noguchi K, Sato M. Filamin A interacting protein plays a role in proper positioning of callosal projection neurons in the cortex. Neurosci. Lett. 26・612:18-24, 2016

本助成による成果発表は投稿する予定。

「学会発表」

謝 敏カク、八木 秀司、猪口 徳一、岡 雄一郎、黒田 一樹、深澤有吾、松崎秀夫、岩田圭子、柚崎 通介、松田 信爾、石川 保幸、佐藤真。Phldb2 はシナプスの可塑性を制御する。第 38 回日本神経科学大会、2015, 7.

謝 敏カク、八木 秀司、猪口 徳一、岡 雄一郎、黒田 一樹、深澤有吾、松崎秀夫、岩田圭子、柚崎 通介、松田 信爾、石川 保幸、佐藤真。膜脂質結合タンパク質 Phldb2 を介した AMPA 受容体局在制御機構。第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016, 3.

生命科学複合研究教育センター
「平成27年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

B リンパ球細胞機能を制御する新規 Cl⁻ 輸送体の同定

研究代表者： 竹内 綾子（医学部・特命助教）

概	要
細胞内 Cl⁻動態は、B リンパ球の様々な機能（抗原受容体刺激に対する細胞内 Ca²⁺応答性や走化性、ミトコンドリア機能など）と密接に関与する。しかし、既存の Cl⁻輸送担体の遺伝子ノックダウン、過剰発現では、これらの B リンパ球機能に変化が認められないことから、新規 Cl⁻輸送体の存在が強く示唆される。本研究では、B リンパ球機能を制御する新規 Cl⁻輸送体の同定を目指して、細胞生理学的・分子生物学的実験を行い、以下の知見を得た。新規 Cl⁻輸送体は、細胞内 Ca²⁺濃度やミトコンドリア膜電位による制御を受けた。細胞内 Cl⁻濃度、ミトコンドリア膜電位を指標にフローサイトメトリーにより細胞を分取し、DNA マイクロアレイに供した。その結果、細胞内 Cl⁻動態への関与が予測される候補遺伝子を抽出した。	
関連キーワード	B リンパ球、Cl ⁻ 輸送体、ミトコンドリア、DNA マイクロアレイ、クローニング

研究の背景および目的

我々は、種々の Cl⁻輸送体を幅広く阻害する niflumic acid (NFA) の添加により、培養 B リンパ球細胞 A20 の細胞内 Cl⁻濃度が著しく増大すること、それとともにミトコンドリア膜電位が脱分極することを見出した。また、NFA 存在下では、抗原受容体刺激に対する細胞内 Ca²⁺応答が減弱した。すなわち、細胞内 Cl⁻動態は、B リンパ球細胞の機能と密接に関与する。しかし、既存の Cl⁻輸送体 (CLC や CLIC ファミリー) について、A20 B リンパ球細胞における遺伝子ノックダウン及び過剰発現を行ったが、フェノタイプに違いは認められなかった。そこで、新規 Cl⁻輸送体が、「Cl⁻ダイナミクスーミトコンドリア機能ーB リンパ球機能連関」を制御するとの考えに至った。B リンパ球の機能（細胞内イ

オン濃度変化の程度や運動性など）には大きなばらつきが存在する。本研究では、このばらつきを利用して、フローサイトメトリーにより細胞内 Cl⁻濃度、ミトコンドリア膜電位を指標に細胞を分取し、トランスクリプトーム解析と組み合わせる。これによって、新規 Cl⁻輸送体のクローニングに挑戦する。

本研究により、新規 Cl⁻輸送体を中心とした「Cl⁻ダイナミクスーミトコンドリア機能ーB リンパ球機能連関」の全体像が明らかとなれば、B リンパ球細胞機能を制御するメカニズムの理解が飛躍的に進展し、新たな免疫制御法の開発にもつながると期待される。

研究の内容および成果

1. マウス由来培養 B リンパ球細胞 A20 を用いた細胞内 Cl⁻動態ーミトコンドリア機能ー細胞機能連関の解析

マウス由来 A20 B リンパ球細胞に細胞内 Cl⁻センサーである FRET タンパク clomeleon をトランスフェクションし、種々の条件における細胞内 Cl⁻濃度の変化を測定した (図 1)。NFA の添加により、細胞内 Cl⁻濃度は著しく増大した (A; clomeleon の YFP/CFP シグナルの減少は細胞内 Cl⁻濃度の増大に相当)。BAPTA-AM によって細胞内 Ca²⁺をキレートすると、細胞内 Cl⁻濃度は徐々に増大し、NFA による更なる増大は認められなかった (B)。FCCP によってミトコンドリア膜電位を脱分極させると、細胞内 Cl⁻濃度は徐々に増大し、NFA による更なる増大は認められなかった (C)。細胞内 Cl⁻動態の修

飾によって細胞内 Ca²⁺濃度やミトコンドリア膜電位が変化するのみならず、細胞内 Ca²⁺濃度やミトコンドリア膜電位によって、細胞内 Cl⁻動態が制御されることが明らかとなった。すなわち、「Cl⁻ダイナミクスーミトコンドリア機能ーB リンパ球機能連関」が存在することを確認できた。

2. 細胞内 Cl⁻濃度、ミトコンドリア膜電位を指標とした細胞の分取

図 1A で示した NFA による細胞内 Cl⁻濃度変化の大きさと、NFA 添加前の細胞内 Cl⁻濃度には、相関が認められた。したがって、NFA 添加前の細胞内 Cl⁻濃度の大小を指標に細胞を分取し、トランスクリプトーム解析によって *in silico subtraction* を行えば、NFA による細胞内 Cl⁻濃度変化を担う新規 Cl⁻輸送体を同定できると考えた。そこで、セルソー

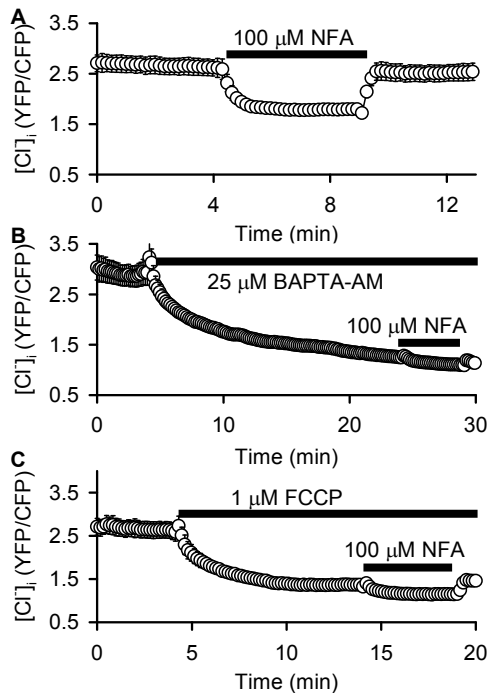


図1. 細胞内Cl⁻動態は細胞内Ca²⁺やミトコンドリア膜電位によって制御される。A. NFAによって、細胞内Cl⁻は増大する(YFP/CFPの減少はCl⁻の増大に相当する)。B. BAPTA-AMで細胞内Ca²⁺をキレートすると細胞内Cl⁻は増大し、NFAの効果は消失する。C. FCCPでミトコンドリア膜電位を脱分極すると細胞内Cl⁻は増大し、NFAの効果は消失する。mean $\pm$ SE, N=3-7

ターFACS AriaIIを用いて、細胞内Cl⁻濃度及びミトコンドリア膜電位を指標として細胞を分取した。細胞内Cl⁻濃度の検出は、Cl⁻感受性色素 SPQ (5 mM) を細胞に負荷することで行った。一方、ミトコンドリア膜電位の検出は、ミトコンドリア膜電位感受性蛍光色素 TMRE (25 nM) を負荷して行った。図2に示すように、細胞内Cl⁻濃度 (SPQ 蛍光強度は細胞内Cl⁻濃度と反比例する) とミトコンドリア

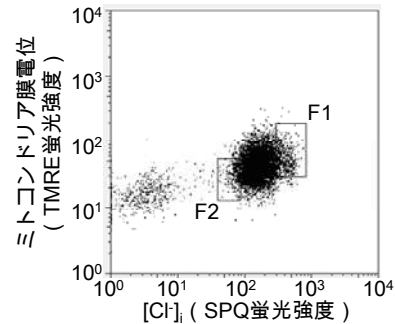


図2. 細胞内Cl⁻濃度ならびにミトコンドリア膜電位を指標とした細胞の分取。F1 (細胞内Cl⁻濃度が低く、ミトコンドリア膜電位が深い) ならびにF2 (細胞内Cl⁻濃度が高く、ミトコンドリア膜電位が浅い) の2つのフラクションから細胞を分取した。

膜電位には弱い相関が認められた。そこで、F1 (細胞内Cl⁻濃度が低くミトコンドリア膜電位が深い) ならびにF2 (細胞内Cl⁻濃度が高くミトコンドリア膜電位が浅い) の2つのフラクションから細胞を分取した。

3. DNA マイクロアレイによる *in silico* subtraction

上記2つのフラクションから total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ (Affymetrix 社; GeneChip Mouse Genome 430 2.0 array) に供した。*in silico* subtraction の結果、発現量に2倍以上違いが認められる遺伝子は564あった。その中には、aquaporin 6 や sodium-hydrogen exchanger 9 などのCl⁻輸送に間接的に関与する膜タンパクの他に、機能未知の膜タンパクも含まれていた。しかし、本DNAアレイはF1, F2それぞれ1サンプルずつを用いて予備的検討を行ったものであり、発現量が比較的小さい遺伝子については、発現量の違いが測定誤差の中に入ってしまう可能性もある。今後、サンプル数を増やし、統計解析を行うことで、候補遺伝子の絞り込みを行い、Cl⁻輸送に関与する新規輸送体の同定につなげたい。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. Kim B, Takeuchi A, Hikida M, Matsuoka S. Roles of the mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCLX, in B lymphocyte chemotaxis. (under revision)

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 公益財団法人 稲盛財団 研究助成・2016年度・新規Cl⁻輸送体によるCl⁻ダイナミクスミトコンドリアとBリンパ球の機能連関の制御メカ

ニズムの解明・代表・採択・100万円

2. 科研費・挑戦的萌芽研究・2016~2017年度・新規Cl⁻輸送体同定とこれを介したBリンパ球機能制御メカニズムの解析・代表・申請・500万円

福井大学
トランスレーショナルリサーチ
推進センター
平成27年度公募採択型研究費

骨髄異形成症候群における Azacitidine による治療反応性と β catenin 経路の検討

研究代表者：細野 奈穂子（がん診療推進センター・助教）

共同研究者：西 理恵（血液・腫瘍内科）

概 要	骨髄異形成症候群(MDS)は高齢者に多くみられる造血幹細胞の腫瘍性疾患であり、DNA メチル化阻害薬により生存期間延長効果が得られるがその機序は不明である。我々は MDS 由来培養細胞を用い、DNA メチル化阻害薬の投与によりがん遺伝子である WT1 の発現低下を誘導し造血幹細胞の生存に必須である β catenin 経路が抑制されることを見出した。臨床検体においても DNA メチル化阻害薬の効果が得られた群では WT1 値の減少を認めた。未治療の MDS 由来腫瘍細胞では β catenin 経路の活性化を認め、正常造血幹細胞では認められなかったことから MDS の腫瘍病態に関与していることが示唆された。本研究により、今まで不明であった DNA メチル化阻害薬の治療反応性に影響を及ぼす腫瘍病態機序の解明に貢献すると期待される。
関連キーワード	骨髄異形成症候群、WT1、DNA メチル化阻害薬、β catenin 経路

研究の背景および目的

骨髄異形成症候群(MDS)は高齢者に多くみられる造血幹細胞の異常による腫瘍性疾患であり、骨髄移植非適応の高リスク MDS 患者において Azacitidine が唯一、生存延長効果が示された薬剤である (Fenaux, Lancet Oncol 2009)。しかし、Azacitidine 治療を4コース施行し、52%の症例に治療反応が得られ(responder)生存期間の延長がみられたが、非反応例(non-responder)では生存延長効果はみられず、この responder と non-responder との差異をきたす生物学的な背景はいまだ不明である。

申請者は MDS 由来の細胞株を用いて、Azacitidine と同じ DNA メチル化阻害薬の一つである decitabine を低濃度で長期間培養し、脱メチル化が特異的にみられた遺伝子を網羅的に解析した。

Decitabine の長期投与により、MDS 細胞株は分化成熟を示し、PRKC apoptosis WT1 regulator (PAWR) 遺伝子のプロモーター領域の脱メチル化が強く認められ、同タンパクの発現増加も認められた。PAWR は血液悪性腫瘍においては oncogenic な作用をきたす WT1 の発現を抑制することが知られており、上記細胞株において、その下流の DKK2 の発低下の確認が得られている。

上記実験結果より、申請者は DNA メチル化阻害剤の抗腫瘍効果の標的因子として WT1-DKK2 経路の下流であり造血幹細胞の生存に必須な Wnt/ β catenin 経路に注目し、DNA メチル化阻害薬の投与により、WT1 および PAWR 遺伝子の発現変化と、Wnt/ β catenin 経路の抑制を検討する事を本研究の目的とした。

研究の内容および成果

MDS 由来細胞株(MDS-L)に DNA メチル化阻害薬(decitabine: DAC)の共培養を行ったところ、DAC 投与細胞(MDS-L-DAC)においてコントロール(MDS-L)と比べ WT1 遺伝子の有意な発現低下がみられた(図1)。

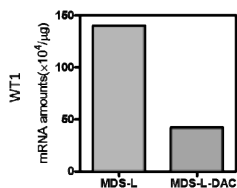


図1. DAC による WT1 遺伝子の発現変化

また、DAC 投与群では腫瘍細胞の分化傾向がみられており、これらの細胞で β catenin の発現を検討したところ、MDS-L-DAC 細胞において β catenin の抑制が認められた(図2)。



図2. DAC による β catenin の抑制

MDS と診断され、DNA メチル化阻害薬 (Azacitidine; AZA)を投与された16例でWT1の推移を検討したところ、血液学的改善(Hematologic improvement; HI)が得られた症例では、WT1値の減少している症例が多く認められたが、病勢の改善がみられなかった症例(stable disease;SD または progressive disease;PD)ではWT1値は不変もしくは増加をきたしていた(図3)。

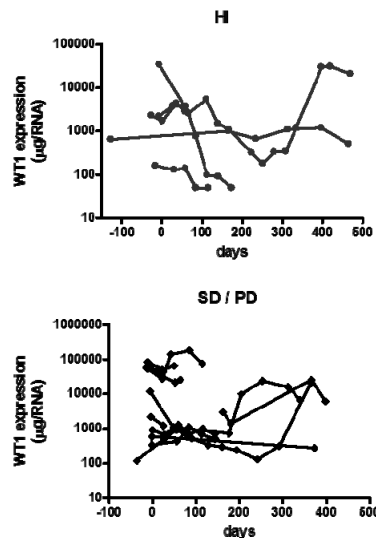


図3. 血液学的改善効果とWT1の推移

MDSにおいては骨髄中に腫瘍細胞が占める割合は病勢により様々であり、数%以下であることもあるため、我々はCD34陽性腫瘍細胞成分を磁気ビーズを用いて分離し、フローサイトメトリーを用いてβcateninの発現を試験的に検討した。コン

トロールとして、CD34陽性正常造血幹細胞を用いた。図4に示すように、CD34陽性正常造血幹細胞では、βcatenin陽性細胞の割合は0.1%であったが、MDSから白血病化した未治療の腫瘍細胞では、βcateninは強陽性を示した(陽性細胞44%)。更にDNAメチル化阻害薬であるAZAでの治療例ではCD34陽性腫瘍細胞において、βcateninは陰性であった。

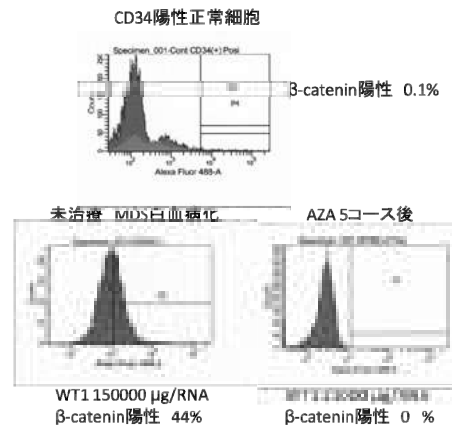


図4 CD34陽性細胞(正常およびMDS由来腫瘍細胞)におけるβcatenin陽性率

以上より、DNAメチル化阻害薬の使用により、がん遺伝子であるWT1の発現低下がみられ、それに伴い腫瘍細胞の生存に必須なβcatenin経路の抑制をきたすことを認めた。今後、WT1の発現量の変化とβcatenin活性化の直接的な関連を示すために二重染色にて検討する予定である。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

本研究の結果は2016年度に血液悪性腫瘍疾患の雑誌に投稿予定である

「特記事項」

本研究結果の一部は第74回日本癌学会(2015年10月)および北陸造血器腫瘍研究会(2016年3月)において一般演題として発表した。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

助成組織・助成制度・種目・期間・研究課題・代表/分担・採否・採択金額など
特になし

小児気管支喘息患者に対する予後予測バイオマーカーの開発

研究代表者：村井宏生（医学部病態制御医学講座小児科・助教）

共同研究者：大嶋勇成（医学部病態制御医学講座小児科・教授）、
安富素子（医学部病態制御医学講座小児科・講師）、
岡崎新太郎（大学院生）、河北亜希子（医学部附属病院小児科・病院助教）
濱田敏彦（医学部附属病院検査部・技師長・臨床准教授）、
橋本儀一（主任臨床検査技師）、木戸口周平（臨床検査技師）、
津田由美子（臨床検査技師）

概 要	小児気管支喘息は気道の狭窄部位や気道炎症の種類が異なる様々なフェノタイプからなる症候群と考えられている。近年、気道炎症の成立には、Th2 細胞を中心とした獲得免疫のみならず、自然免疫も重要な役割を持つことが明らかにされつつある。また小児気管支ぜんそくの予後を既定する因子として気道リモデリングの有無が報告されている。本研究では、気道リモデリングに関わると報告されている、Chitinase-3 like protein(YKL-40)に着目し小児で非侵襲的に採取可能な唾液中の YKL-40 が予後予測バイオマーカーとして有用か否かを検討した。唾液中 YKL-40 濃度は喘息発作重症度スコアや、気道抵抗、気道の好酸球性炎症を反映する FeNO とも有意な相関を認めなかったものの、末梢気道による気道閉塞指標である、V50/V25 と有意な正の相関を認めた。唾液中 YKL-40 は気道リモデリングを反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。
関連キーワード	気管支喘息、小児、バイオマーカー、YKL-40

研究の背景および目的

小児気管支喘息では、慢性持続性炎症とその修復過程で生じる気道リモデリングが予後に重要な意味を持つと報告されている。現在、成人領域では呼吸機能を測定するための種々の方法が試みられているが、コンプライアンスが芳しくない乳幼児は、侵襲性の高い検査や、他動的に行う検査を行うことが困難である。近年安静時の気道抵抗を測定できる強制オシレーション法（モストグラフ）を用いた呼吸抵抗試験が脚光を浴びているが、小児の場合、身長、体重、そして年齢などの因子に影響を受けること、また施行する際の姿勢により測定値が大きく変化する可能性がある。呼気中一酸化窒素（以下 FeNO）は気道の好酸球性炎症を評価する方法である、近年小児においても保険適応となったが一定時間持続的に呼気排出が必要であ

り、低年齢では施行が困難であること、またステロイドの影響を非常に受けやすくステロイド投与群では重症喘息発作でも低値となってしまうなどの問題が存在する。そのため、低年齢児において非侵襲的な手法を用いて、慢性持続性炎症、および病態を反映するバイオマーカーの開発が急務となっている。今回我々は、気道炎症後の修復過程で生じる気道の再構築（リモデリング）に関係する Chitinase like protein 3 (YKL-40)に着目し、従来より用いられている、呼吸機能検査、呼気中 NO 測定、また現在当院小児科及び検査部において行われている気道抵抗検査と比較することで、気道炎症の病態の違いや気道リモデリングの程度を測定できるバイオマーカーとしての開発を行うことを目的とした。

研究の内容および成果

今までに本研究への参加同意を得られてい 39 症例の解析を元に、今回新たに参加同意を得られた 30 症例をリクルートし、解析を行った。患者家族歴、既往歴、発作頻度、発作重症度に加えスパイロメーターの測定を行い、好酸球性気道炎症の指標となる呼気中 NO は Ninox Mino を用いて測定した。また、唾液サンプルキット (Salimetrics Childrens Swab, Funaoshi, Japan) を用いて唾液

を収集し、採取した唾液中 YKL-40 を ELISA (R&D systems) を利用して測定し、各種呼吸機能、臨床パラメーターとの相関を解析した。

1) 唾液中 YKL-40 と喘息の重症度との関係

喘息発作の重症度の指標である Acute asthma intensity research score と唾液中 YKL-40 濃度の間には有意な差を認めなかった。また唾液中

YKL-40 は個人の喘息発作の増悪の有無においても有意な相関が認められず、短期的な重症度の指標とはならない可能性が示唆されたが、症例数が少なくさらなる検討が必要である。(図1)。

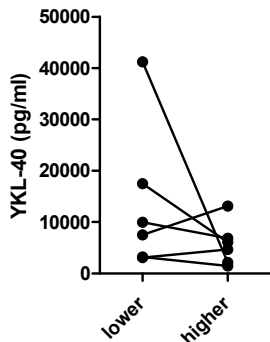


図1 唾液中 YKL-40 と喘鳴重症度との関係

2) 唾液中 YKL-40 濃度と気道抵抗の相関

我々のこれまでの検討から、モストグラフによる呼吸機能測定値である R5, R20, R5-R20 は年齢と相関するため、非喘息児の値より各パラメーターの回帰式を作成し、年齢による予測との比を求めることで標準化し(%R5, %R20, %R5-R20)、検討を行った。しかしながら、唾液中 YKL-40 濃度は、気道抵抗を反映するとされる %R5, %R20 気道不均等を反映する %R5-R20 といずれとも相関を示さなかった。

3) 唾液中 YKL-40 濃度と呼気中 NO 濃度との関係

気道リモデリングが進行した成人の気管支喘息患者では血清中 YKL-40 が高値を示すことが報告されている。今回血清中 YKL-40 と気道好酸球性炎症の指標である FeNO とのあいだの相関に関して更に検討を行ったが、有意な差は認めなかった。

3) 唾液中 YKL-40 濃度と呼吸機能の相関

今回、唾液中 YKL-40 と一秒率である FEV1.0.(%) においては有意な相関を認めなかったものの、V25,

V50/V25 とは有意な正の相関を認めた。V25, V50/V25 は末梢気道による気流閉塞を示唆していると報告されている。気道リモデリングが引き起こされると、気道の線維化が引き起こされ、伸展性が低下することから唾液中 YKL-40 は気道リモデリングの指標となりうる可能性がある。この気道リモデリングの存在は、小児における喘息の予後に影響すると言われるために、唾液中 YKL-40 はひいては気管支喘息の予後予測因子として使用できる可能性もある。

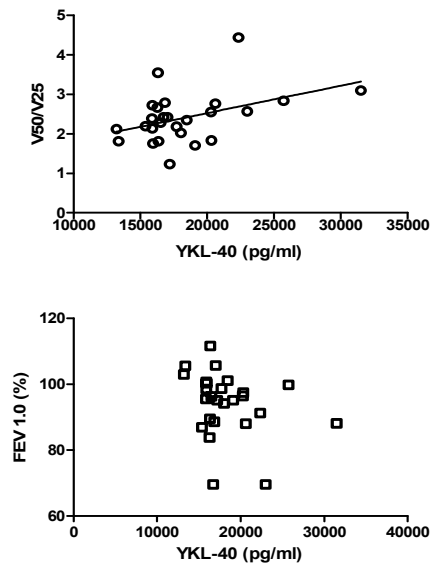


図2 唾液中 YKL-40 と V50/25, FEV1.0%との関係

唾液中 YKL-40 は気道リモデリングを反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。今度の唾液中への分泌調節機序を明らかにするとともに、小児喘息の難治症例の検討を行うことで、病態の理解に有用と考えられる。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表等」

国際学会での発表

Saliva-SP-D Is a Practical Marker to Identify the Peripheral Airway Inflammation. (AAAAI meeting 2015, Houston, Oral presentation)

Standardized resistance is a practical indicator in asthmatic patients, those who cannot perform spirometry. (AAAAI meeting 2014, Houston, poster presentation)

国内学会での発表

唾液中サーファクタントプロテイン D は局所性炎症マーカーとなりうるか。
日本小児呼吸器学会 (口演, 2014 10 月)

唾液中サーファクタントプロテイン D は局所的気道炎症の指標となりうるか？

第 51 回日本小児アレルギー学会 (口演, 2014 11 月) 唾液中サーファクタントプロテイン D は気道炎症の指標となりうるか。(第 41 回北陸アレルギー研究会 口演, 2014 12 月)

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター

悪性リンパ腫治療における key drug の治療薬物モニタリング

研究代表者：岸 慎治（医学部・講師）

共同研究者：五十嵐敏明（福井大学医学部附属病院 薬剤部）

概 要	一般に抗がん薬は治療域と毒性の幅が極めて狭いにもかかわらず作用には幅広い個人差が存在するため、がん化学療法は本来治療薬物モニタリング(TDM)が重要な分野である。投与された抗がん薬の薬物動態とその治療効果および副作用との関連が明らかとなり、個人差が予測できれば、抗がん薬のテーラーメード治療が可能となり、将来のがん化学療法は飛躍的に安全かつ効果的に行いうる。本研究では悪性リンパ腫患者において、治療の key drug である vincristine と doxorubicin の血中薬物動態を測定し、その治療効果及び副作用との関連につき検討を行う事で将来の個別化医療の一助となる事を目的とする。Vincristine, doxorubicin ともその薬物動態は幅広い個人差を認めた。Vincristine の薬物動態は薬物固有の副作用である末梢神経障害および、予後（無病再発率）と関連を認めた。Doxorubicin の薬物動態は好中球減少と関連していた。
関連キーワード	vincristine, doxorubicin, 悪性リンパ腫, PK/PD, 治療薬物モニタリング

研究の背景および目的

一般に抗がん薬は致死の毒性を有するにも関わらず治療域と毒性の幅が極めて狭く、しかもその作用には幅広い個人差が存在し、ときに予想外の毒性が出現したり、期待どおりの抗腫瘍効果が得られない症例が存在する。この患者間のばらつきの原因として薬剤相互作用、年齢、性別、栄養状態、肝・腎機能、腫瘍組織型、局在部位、腫瘍量、病期、薬剤耐性などがあげられ、これらの結果、抗がん薬の血中・組織中濃度に相違が生じ、個人差が生じると考えられている。そのため、がん化学療法は本来治療薬物モニタリング（therapeutic drug monitoring :TDM）が重要な分野である。投与された抗がん薬の薬物動態とその治療効果および副作用との関連が明らかとなり、個人差が予測できれば、抗がん薬のテーラーメード治療が可能となり、将来のがん化学療法は飛躍的に安全かつ効果的に行いうる。抗がん薬の血中・組織中濃度とその効果・副作用との関連の報告は主として欧米で methotrexate の大量投与時等で詳細な報告が散見されるが、本邦で、特に成人血液腫瘍患者における報告はほとんど無い。

本研究で TDM を予定する薬剤においても、例えば我々の前臨床試験では anthracycline 系薬剤の心毒性は血中濃度曲線下面積ではなく最高血中濃度に依存する事が示唆されている（leukemia and Lymphoma, 2005）が、実際の臨床の間では明らかなでない。またこれまで研究代表者は、米国で、小

児急性リンパ球性白血病患者について、治療の key drug である methotrexate の血中濃度が同薬による瘰癧の副作用およびその背景となりうるホモシステイン血中濃度と関連する事、同薬のクリアランスが消化管毒性および高ビリルビン血症に関連する事、etoposide の血中濃度がステロイド投与と関連する事および同薬の時間血中濃度曲線下面積（AUC）は好中球減少と関連する事をみだし論文として報告した（J Clin Onc 2003, blood 2007, blood 2004）。

悪性リンパ腫は化学療法により治癒が期待できる代表的疾患で、その標準療法はほとんどが CHOP 療法である。CHOP 療法は通常外来治療が可能な化学療法であるが、時に薬剤特有の重篤な副作用が出現し、通常量の治療ができない症例や、同じ病理組織でありながら、効果の無い症例が存在する。その理由はリンパ腫そのものの背景からの検討はなされているが、患者個人の背景からの検討はほとんどなされていない。

そこで本研究では悪性リンパ腫患者において、その key drug である vincristine と doxorubicin の血中薬物動態を測定し、その治療効果及び副作用との関連につき検討を行う事で将来の個別化医療の一助となる事を目的とする。当研究が明らかとなり抗がん薬の TDM が一般臨床で広く可能となれば、がん化学療法は飛躍的に安全かつ効率に行い得る。

研究の内容および成果

【方法と対象】対象は悪性リンパ腫患者 27 例（男/女：11/16）で全例に CHOP like regimen が施行された。Vincristine については酢酸エチルにて抽出後、内部標準をビンブラスチンとして、液体ク

ロマトグラフ-質量検出器を用いて測定を行った。検量線は良好な相関が得られ、検出限界は 0.1ng/ml であり、簡便かつ鋭敏な血中濃度の定量が可能であった。doxorubicin については既報の方

法を改変し蛍光 HPLC 法を用いて血中濃度測定を行い、検出限界は $0.005 \mu\text{g/ml}$ であった。経時的に採血を行い、血中濃度は 2 コンパートメントモデルで解析した。副採用の評価には CTCAE v4.0 を用いた。

【結果】 Vincristine の薬物動態は、クリアランス; $0.56 \pm 0.23 \text{ L/h/kg}$ 、消失相半減期; $31.5 \pm 29.9 \text{ h}$ 、AUC ; $65.2 \pm 42.0 \text{ ng} \cdot \text{h/ml}$ 、doxorubicin の薬物動態は、クリアランス; $0.47 \pm 0.26 \text{ L/h/kg}$ 、消失相半減期; $37.9 \pm 47.3 \text{ h}$ 、AUC ; $75.6 \pm 68.0 \text{ mg} \cdot \text{h/ml}$ であり幅広い個人差を認めた。

Vincristine について、Grade 2 以上の末梢神経障害を認めた症例 ($n=6$) は Grade1 以下の症例 ($n=16$) に比し、消失相半減期の延長 ($57.5 \text{ vs. } 21.9 \text{ h}$ $P < 0.05$ 図 1)、AUC の増加 ($86.2 \text{ vs. } 58.0 \text{ ng} \cdot \text{h/ml}$ $p=0.06$) を認めた。

悪性リンパ腫のうち、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) の患者で、再発した症例では VCR の AUC が有意に低く (寛解持続例: $90.8 \text{ ng} \cdot \text{h/ml}$ 平均観察期間 4.4 年、再発例 $41.2 \text{ ng} \cdot \text{h/ml}$ 再発までの平均期間 0.9 年 $p < 0.05$)、Vincristine の AUC が $60 \text{ ng} \cdot \text{h/ml}$ 以上の患者群で無増悪生存期間 (PFS) が延長する傾向を認めた (図 2)。

doxorubicin については、副作用に関して、grade4 の好中球減少が重篤な患者で半減期が延長していた (図 3)。悪性リンパ腫の治療効果と Doxorubicin の薬物動態については関連は無かった。

【まとめ】 Vincristine, doxorubicin の血中薬物動態はその副作用と関連があり、therapeutic drug monitoring を行う事で、悪性リンパ腫に対する将来の個別化治療の一助になると推測された。今後症例を集積するとともに、cyclophosphamide、prednisolone 等他の key drug についても測定し、薬物相互作用についても検討を行う予定である。さらに個人差の背景に存在すると考えられる、代謝酵素や、受容体など薬剤の“標的”における遺伝子多型についても検討を行う予定であり既に一部の患者で DNA を採取し解析を開始している。

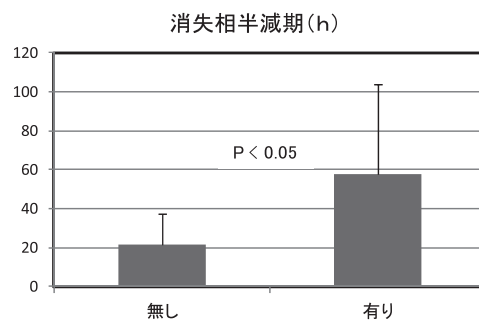


図1. Vincristineの血中濃度と末梢神経障害

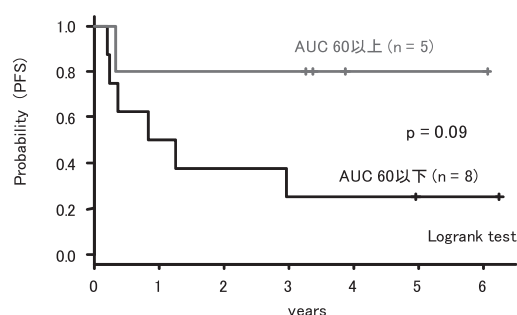


図2. DLBCL再発とvincristineの薬物動態

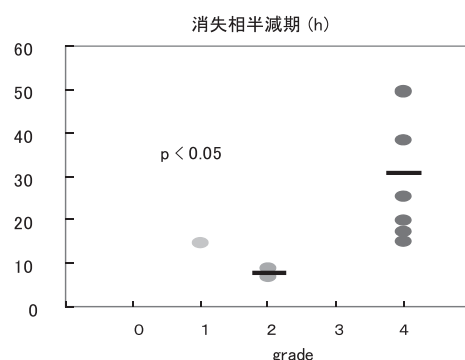


図3. Doxorubicinの薬物動態と好中球減少

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

悪性リンパ腫患者における vincristine の薬物動態と副作用、治療効果の検討、日本臨床薬理学会、2015 年、東京
2016 年日本血液学会、日本臨床薬理学会に発表予定。

「特記事項」

臨床研究として、説明と同意書を含む詳細な研究計画書が作成されており、倫理的な配慮についても本学の IRB で十分な検討がなされ、承認されている。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

平成 28 年度科学研究費助成事業 (学術研究助成基金助成金) 基盤研究 (C) に研究代表者として申請中。研究課題: リンパ腫に対する CHOP 療法の網羅的 PG-PK-PD 相関によるテーラーメード化

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター 腎不全におけるレドックス制御破綻の血管石灰化への 影響についての研究

研究代表者：糟野健司（医学部・准教授）

共同研究者：岩野正之（医学部・教授）、腰地孝昭（医学部・教授）

概 要	慢性腎臓病(CKD)における血管石灰化は虚血性心疾患や脳血管障害の基盤病態であり、これらの血管疾患は腎不全患者の最多死亡原因となっている。血管石灰化に深く関わる Matrix Gla Protein (MGP) はレドックス反応により Gla 化を受け活性型となる。このレドックス反応には thioredoxin-related transmembrane protein (TMX) 1、TMX4 などの thioredoxin ファミリーが関与することが報告されている。本研究では末期腎不全患者では血管を含めた全身でレドックス制御因子の変動が起こっているかどうかを調べた。末期腎不全を有する透析患者の血管平滑筋ではチオレドキシンの染色が増加し、血清チオレドキシン濃度は腎機能障害が悪化するにつれ増加することを観察した。これらの結果は腎障害時に血管を含めた全身でレドックス破綻を起こしていることが示唆され、今後の研究により血管石灰化に対する治療法開発に繋がると考えられた。
関連キーワード	腎不全、血管石灰化、ビタミンK、Matrix Gla Protein、レドックス

研究の背景および目的

腎不全患者の死亡原因は虚血性心疾患・脳血管障害が最多で、これらは慢性腎臓病(CKD)合併症として医療経済の面でも世界的な問題となっている。腎不全における血管障害の基盤原因として血管石灰化が注目されているが石灰化の発症機序は完全解明されておらず、根本的な治療法が存在しない。血管石灰化抑制に深く関わる血中蛋白の一つに Matrix Gla Protein (MGP) がある。MGP は Vitamin K を補酵素とするレドックス反応で Gla 化を受け活性型となる。MGP 遺伝子欠損マウスは全身の動脈が石灰化し死亡することが報告されている (Luo G et al. Nature 1997)。活性型 MGP は血管平滑筋で Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) と結合して BMP-2 の作用を阻害し、血管平滑筋細胞か

ら骨芽細胞様細胞への分化誘導を抑制することで石灰化を阻害すると考えられている。Vitamin K の触媒反応は Vitamin K epoxide reductase (VKOR) と thioredoxin-related transmembrane protein (TMX) 1、TMX4 によるレドックス反応が成立することで初めて機能することが報告されている (Schulman S et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010)。実臨床でも Vitamin K 阻害剤ワルファリンが高度血管石灰化を引き起こすことが報告されている (Rao N. NEJM. 2013)。研究代表者はこれまで腎障害時に腎実質でレドックス破綻が起こることを発見してきたが、本研究では腎障害時の血管でのレドックス破綻が血管石灰化の病態に関与している可能性を検証する。

研究の内容および成果

生体レドックス反応を司る制御機構の一つにチオレドキシン (thioredoxin; TXN) ファミリーによる制御系がある。チオレドキシンは活性部位には2つのシステイン残基を有し、これらのチオール基を電子供与体としたレドックス反応を介して基質側のジスルフィド結合を二つのチオール基へと還元し、自らのチオール基をジスルフィド結合として酸化型へ変化する。チオレドキシンはピリミジン代謝酵素の一つである NADPH-チオレドキシンジスルフィドレダクター (thioredoxin-disulfide reductase) により、以下のレドックス反応を形成する。



このレドックス反応は細胞内において、NF-κB や AP-1、P53 などの転写調節因子に結合して転写活性

を調節したり、ASK-1 へ結合することで細胞死を調節することが知られている。

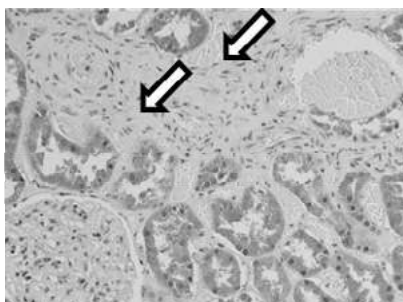
これまで血清チオレドキシンは酸化型であることが知られていたが (Nakamura T, et al. Free Radic Res. 2007)、研究代表者は急性腎障害で尿細管上皮細胞が酸化ストレスを受けると細胞内の還元型チオレドキシンが酸化型となって細胞外へ放出され尿中に増加することを発見し報告してきた (第 54 回日本腎臓学会総会学術総会 優秀演題賞受賞、Kasuno K, et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2014)。

今回、研究代表者は腎機能正常・尿所見正常の急性脳出血で死亡した死亡解剖症例と蛋白尿があるも腎機能は正常の腎組織、動脈硬化血管石灰化病変を合併した末期腎不全透析患者の死亡解剖症

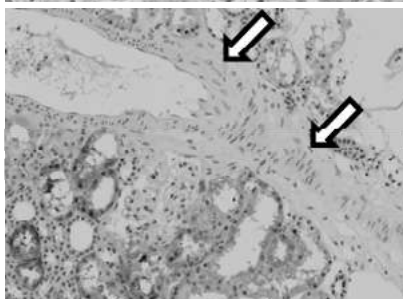
例において免疫組織染色を行った結果、腎不全の無い患者では蛋白尿の有無に関わらず血管平滑筋にチオレドキシンの染色を認めなかったが、末期腎不全を有する透析患者では血管平滑筋にチオレドキシン染色が増加していることを観察した(図1未発表)。

図1 腎不全における血管平滑筋のチオレドキシン染色

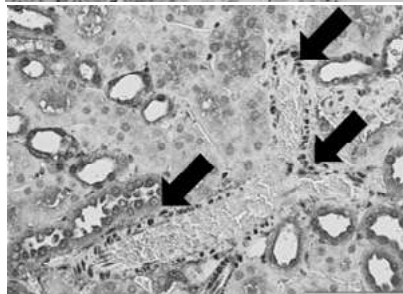
腎不全(-)
蛋白尿(-)



腎不全(-)
蛋白尿(+)

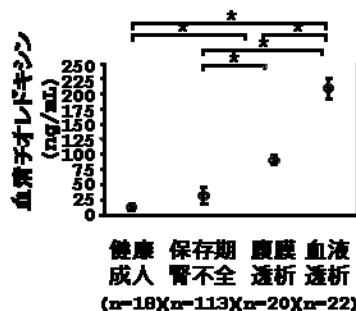


腎不全(+)
蛋白尿(+)



さらに、健康成人、腎機能軽度～中等度障害の保存期腎不全患者、高度腎機能障害のある腹膜透析患者、血液透析患者の血清におけるチオレドキシン濃度を測定したところ、腹膜透析患者、血液透析患者で有意に血清チオレドキシンが増加していることが分かった(図2未発表)。

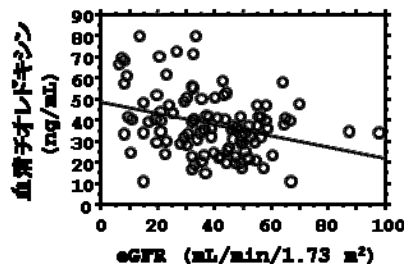
図2 腎不全による血清チオレドキシンの増加



血清チオレドキシンの上昇が透析療法によるものなのか腎不全によるものなのかを調べるため、保存期腎不全のみを対象に血清チオレドキシン濃度を腎機能別にプロットした結果、血清チオレドキシン濃度は腎機能に逆相関し、腎機能障害が悪化するにつれ血清チオレドキシン濃度が増加することが分かった(図3未発表)。

図3 保存期腎不全患者の腎機能別血清チオレドキシン濃度

$N=113$; $R^2 = -0.102$; $p=0.0009$



以上の結果から末期腎不全患者では血管を含めた全身でレドックス制御因子の変動が起きていると考えられた。次年度では腎障害時の血管におけるレドックス破綻の詳細についてチオレドキシン以外の分子も含めた生体レドックス制御因子を観察し、腎障害時のレドックス破綻とMGPの不活化が血管石灰化の病態に関与している可能性を検証する。これにより腎不全の血管石灰化の原因が解明できれば、血管石灰化に対する治療法の開発に繋がる可能性がある。

本助成による主な発表論文等、特記事項および

「主な発表論文等」

1. Tobino K, Kasuno K, et al. Gende- and disease-specific urinary thioredoxin in chronic kidney disease patients with or without type 2 diabetic nephropathy. Nephrology (Carlton) 20:368-374, 2015
2. Kasuno K, Koshiji T, Iwano M, et al. Renal redox

dysregulation in AKI: application for oxidative stress marker of AKI. Am J Physiol Renal Physiol. 307:F1342-1351, 2014

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
基盤研究(C)(一般) 研究代表者(H28～H30)
「末期腎不全におけるレドックス制御破綻が血管石灰化へ及ぼす影響に関する研究」5,000千円

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター

Mcl-1 を標的とする治療抵抗性多発性骨髄腫に対する 新規治療法の開発

研究代表者：大蔵 美幸（医学部・医員）
共同研究者：山内 高弘（医学部・教授）

概 要	
	造血器悪性腫瘍の一つ、多発性骨髄腫は、様々な新規治療薬の開発にもかかわらず、いまだ難治性である。近年、キードラッグであるプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブへの耐性が顕在化し、その耐性克服は骨髄腫治療における最大の課題である。癌細胞の薬物耐性に抗アポトーシス蛋白が関与していることが示唆されている。我々は、ボルテゾミブ耐性細胞株において骨髄腫細胞の生存に必須な抗アポトーシス蛋白 Mcl-1 が高発現していることを見出した。さらに抗アポトーシス因子 survivin の阻害薬である YM155 は、survivin よりも Mcl-1 をより強く抑制することで、ボルテゾミブ耐性細胞株に対し強力な抗腫瘍効果を示すことを見出した。YM155 は Mcl-1 を抑制することで、ボルテゾミブ耐性を克服できる可能性が示唆された。
関連キーワード	多発性骨髄腫、Mcl-1, survivin, YM155

研究の背景および目的

研究の背景

多発性骨髄腫は腫瘍性形質細胞が骨髄中で増殖する造血器悪性腫瘍で、大量化学療法や造血幹細胞移植によっても治療困難な疾患である。プロテアソーム阻害薬、ボルテゾミブは新規治療薬の先駆けとして、骨髄腫治療に大きな変革をもたらした。しかし、2008 年に承認を受けて以来、その耐性が顕在化し、ボルテゾミブ耐性克服こそが現在の骨髄腫治療における最大の課題である。アポトーシス（プログラムされた細胞死）のメインマシナリーである BCL2 ファミリー蛋白は、アポトーシスの on/off を決定する機構を有しており、現在までに 30 を超える蛋白質が同定され、アポトーシス抑制型と促進型に大別される。アポトーシス抑制型の蛋白（抗アポトーシス蛋白）は様々な癌細胞で高発現しており、癌治療のターゲット分子として注目を集め、それらに対する阻害剤の開発がおこなわれているが、いまだ実用化されている薬剤はない。

我々はこれまで、骨髄腫における抗アポトーシス分子 survivin の阻害薬 YM155 の作用機序について検討を重ねてきた。YM155 は Hela 細胞にトランスフェクションした survivin 遺伝子のプロモーター/ルシフェラーゼ系を用いたレポーターアッセイによるスクリーニングにより見出された低分子化合物である。これまで、YM155 は多く

の癌細胞株において in vitro で細胞増殖抑制効果が確認され、さらにその作用機序として、survivin だけでなく細胞の増殖に関わるその他の蛋白にも作用することが複数報告されている。我々のこれまでの検討でも、骨髄腫細胞株において、YM155 による survivin の抑制効果はそれほど強くなく、survivin よりもむしろ、骨髄腫細胞の増殖に重要な役割を果たす BCL-2 ファミリー蛋白の一つである、抗アポトーシス蛋白 Mcl-1 の発現を強く抑制し、強力な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなっている。

抗アポトーシス蛋白の高発現が薬剤耐性のメカニズムの一つであることはすでに報告されており、骨髄腫細胞におけるボルテゾミブ耐性機序に抗アポトーシス蛋白がどう関わっているか、また、ボルテゾミブ耐性克服のための新たな治療ターゲット分子としての抗アポトーシス蛋白に注目した。

研究の目的

ボルテゾミブ耐性骨髄腫細胞株を樹立し、抗アポトーシス蛋白の発現を親株と比較する。さらに、ボルテゾミブ耐性細胞株における YM155 の抗腫瘍効果とその作用機序、とくに Mcl-1 に対する作用を検討する。

研究の内容および成果

研究結果

1) ボルテゾミブ耐性細胞株の樹立、および、YM155 の抗腫瘍効果の検討。

骨髄腫細胞株 U266 を用いて、ボルテゾミブ耐性細胞株 U266/BTZ を樹立した。U266/BTZ 細胞株は、これまでの報告にもある通り、ボルテゾミブが結合するプロテアソーム $\beta 5$ サブユニットに point mutation を認めた。この U266/BTZ 細胞株を用いて YM155 を所定の濃度で加えて、72 時間培養し細胞増殖抑制効果を WTS アッセイを用いて検討したところ、親株と同等の抗腫瘍効果を認めた (図 1)。

図 1 U266 と U266/BTZ におけるボルテゾミブ、YM155 に対する IC50

	ボルテゾミブ に対するIC50	YM155 に対するIC50
U266	3.5nM	3nM
U266/BTZ	150nM	4nM

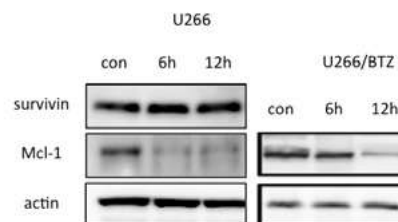
2) ボルテゾミブ耐性細胞株における抗アポトーシス蛋白の発現レベルの検討。

親株 U266 およびボルテゾミブ耐性細胞株 U266/BTZ より、それぞれ蛋白を抽出し、抗 Mcl-1 抗体、抗 Bcl-2 抗体、抗 survivin 抗体を用いてウェスタンブロットを実施した。親株と比較し、U266/BTZ 細胞株では、bcl-2 と survivin の蛋白発現が低下していた。一方、Mcl-1 の蛋白発現は明らかに増加していた。

3) ボルテゾミブ耐性細胞株における YM155 の作用機序の検討。

親株 U266 に YM155 を加え所定の時間培養し、細胞を回収した後に蛋白を抽出した。抗 survivin 抗体および、抗 Mcl-1 抗体を用いてウェスタンブロットを実施した。図 2 に示すように、YM155 は survivin よりもむしろ Mcl-1 の蛋白発現を強く抑制していることがわかった。ボルテゾミブ耐性細胞株 U266/BTZ においても抗 Mcl-1 抗体を用いて、ウェスタンブロットを実施したところ同様に Mcl-1 の発現を強く抑制していた。

図 2 U266 と U266/BTZ における YM155 による抗アポトーシス蛋白の抑制効果



まとめ

今回のわれわれの検討で、ボルテゾミブ耐性細胞株において、親株と比較し抗アポトーシス蛋白 Mcl-1 が高発現していることを見出し、薬剤耐性のメカニズムの一つである可能性が示唆された。さらに YM155 は survivin 阻害薬として開発されたものの、親株においてもボルテゾミブ耐性株においても、抗アポトーシス蛋白 Mcl-1 を強く抑制し抗腫瘍効果を発揮することがわかった。これらより、YM155 はボルテゾミブ耐性を克服できる可能性があると考えられた。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

上記データは

2015 年日本血液学会学術集会 口演

2015 年米国血液学会 ポスター

で発表した。

現在、論文作成中である。

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター

冬虫夏草によるコルジセピン生産に及ぼすアミノ酸の影響

研究代表者：櫻井 明彦（工学研究科・教授）

概 要	
冬虫夏草サナギタケ (<i>Cordyceps militaris</i>) によるコルジセピン生産の生産性向上を目的として、培養液のアミノ酸の影響について検討した。20種類のアミノ酸の影響について液体表面培養法で検討したところ、アラニン、イソロイシン、グルタミン、グルタミン酸がコルジセピン生産に影響していることが明らかとなった。中でもグルタミンの影響は大きく、グルタミンを 40g/L 添加すると菌糸体の増殖量は約 2/3 まで低下し、コルジセピン生産量は約 2.5 倍に上昇した。次に、回転円板型培養器を用いてグルタミンの影響を検討したところ、反復回分培養においてグルタミンを 40g/L を添加した培養液ではコルジセピン生産量は約 4 倍、コルジセピン生産速度は約 3.5 倍に上昇した。一方、増殖量の低下は観察されなかった。	
関連キーワード	冬虫夏草、 <i>Cordyceps militaris</i> 、抗腫瘍物質、コルジセピン、アミノ酸

研究の背景および目的

【研究の背景】

冬虫夏草サナギタケが生産する固有成分であるコルジセピン (3'-デオキシアデノシン、図 1) は、生体内でアデノシンのアナログとして働き、核酸の伸長を阻害することにより抗腫瘍作用を発揮する。*in vitro* 実験では多くのガン細胞に対して抗腫瘍性を示すことが報告されているが、天然のサナギタケの資源量が少ないこと、さらに子実体中のコルジセピン含有量が非常に低いことから工業的な生産には至っていない。また、コルジセピンは *in vivo* 実験では生体内でアデノシンデアミナーゼにより分解されるため、その効果が *in vitro* に比べて低下することが知られている。このため、コルジセピンの大量生産技術、および生体内での効果の高いコルジセピン誘導体の開発が期待されている。

コルジセピンの生産技術については、冬虫夏草の菌糸体培養による生産が中国や韓国を中心に積極的に検討されているが、その生産性は実用レベルには達していない。このため、当研究室ではイオンビーム照射によりコルジセピン高生産変異株

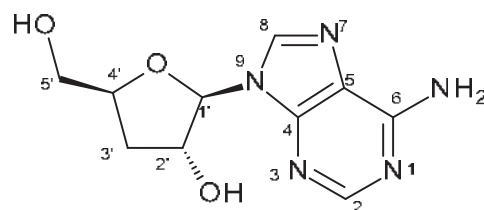


図 1 コルジセピンの構造

の作出を検討し、実用レベルのコルジセピン生産性を得ることに成功した。しかしながら、培養液に高価な成分を高濃度に添加する必要があるため、培養液のコストが実用化の課題となっている。

【本研究の目的】

本研究の最終目的は、新規な生理活性物質としてコルジセピンの誘導体を合成し、その生理活性性質を評価することである。本年度は、新規生理活性物質の原料となるコルジセピンの高効率生産条件を確立することを目標として、培養液のアミノ酸組成の影響について検討した。

研究の内容および成果

【実験方法】

コルジセピン生産菌として、冬虫夏草 (サナギタケ) をイオンビームにより変異させた *Cordyceps militaris* G81-3 株を用いた。培養は液体表面培養 (培地 150mL) および回転円板型培養器 (培地 700mL、図 2) を用いて行った。また、回転円板型培養器の円板枚数は 9 枚とし、菌体固定化用織物として HA5960W (八田経編製) を用いた。円板回転速度は 5rpm、通気量は 0.5vvm とした。グルコース 86.2 g/L、Hypolytepton 23.5 g/L に微量金属を加えた培地組成を基本培地 (Reference) とし、これに 20 種類のアミノ酸を添加したものを Control 培地とした。

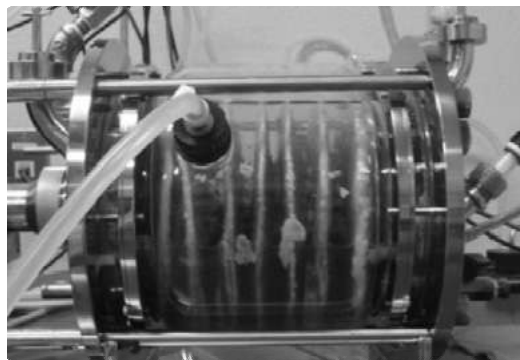


図 2 回転円板型培養器

また、Control 培地からアミノ酸を1種類だけを除いたものをアミノ酸(-)培地としてアミノ酸の影響について検討した。

【アミノ酸の影響】

20種類のアミノ酸についてコルジセピン生産についての影響を検討したところ、アラニン (Ala)、イソロイシン (Ile)、グルタミン (Gln)、グルタミン酸 (Glu) を添加しない場合にコルジセピン生産量が有意に低下した (図3)。中でも影響が大きかったグルタミンとグルタミン酸の2つについて濃度の影響を確認したところ、いずれも添加することによってコルジセピン生産量は増大した。特にグルタミン酸 (Gln) の影響が大きく、40g/L 添加した場合には Control の2.5倍以上のコルジセピン生産量が得られた (図4)。一方、菌体の増殖量は Control の2/3まで低下していた。これらの結果から、グルタミンはコルジセピンのプリン環を構成する原料として使われるだけでなく、冬虫夏草の代謝経路に影響を及ぼすと考えられる。

【回転円板型培養器によるコルジセピン生産】

図4に示すようにグルタミンの添加によりコルジセピン生産量は上昇するが、液体表面培養では35日間程度の長期間の培養を必要とする。そこで比較的培養期間の短い回転円板型培養器によるコ

ルジセピン生産を検討した。培養液の入れ替えによる反復回分培養を行ったところ、グルタミンを添加した場合には、液体表面培養以上の効果が得られ、積算コルジセピン生産量は未添加の約4倍、生産速度は約3.5倍となった。一方、増殖量の低下はみられなかった。

【まとめ】

コルジセピン生産にはグルタミンが大きく影響していることが明らかとなった。今後は、グルタミン含有率を考慮して窒素源の種類と濃度を最適化し、コルジセピン生産技術の確立を目指す。

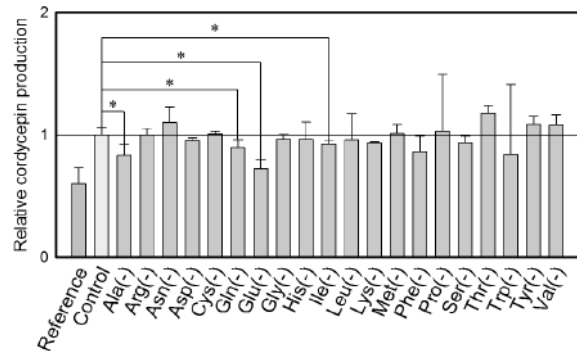


図3 アミノ酸とコルジセピン生産の関係

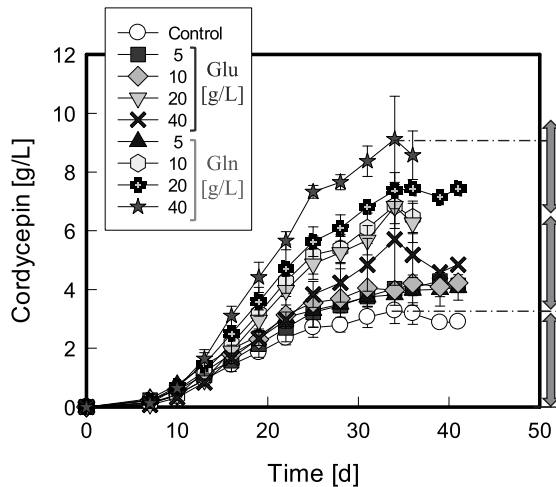


図4 コルジセピン生産へのグルタミン (Gln) とグルタミン酸 (Glu) の影響 (液体表面培養)

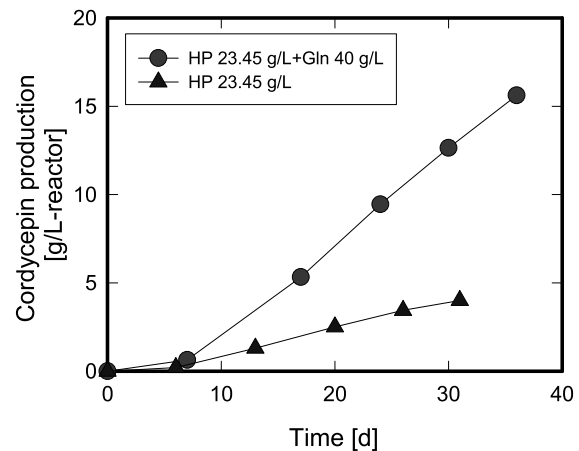


図5 グルタミンの積算コルジセピン生産量への影響 (回転円板型培養器)

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」Mina Masuda, Masanori Hatashita, Shinya Fujihara, Yu Suzuki, Akihiko Sakurai: Simple and efficient isolation of cordycepin from culture broth of a *Cordyceps militaris* mutant, Journal of Bioscience and Bioengineering, 120, 732-735 (2015)

櫻井明彦、増田美奈: コルジセピンの製造および精製方法、特許登録番号 5850497 (2015)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

JST・A-STEP・FS ステージ・探索タイプ・2014年12月～2015年11月・冬虫夏草変異株を用い

た生理活性物質コルジセピンの大量生産法の開発・分担・採択・170万円

JST・マッチングプランナープログラム・2016年6月～2017年3月・コルジセピン含有機能性食品の実用化に向けた生産プロセスの開発と安全性評価・代表・申請中・248万円

JSPS・科研費・基盤(C)・2016年4月～2019年3月・回転円板型培養器を用いたコルジセピン生産プロセスの開発・代表・申請中・49

子宮肉腫と子宮筋腫を鑑別する腫瘍マーカーの開発

研究代表者：水谷 哲也（医学部・准教授）

共同研究者：吉田 好雄（医学部・教授）

概 要	
子宮肉腫は稀な疾患であるが、血行性転移による他臓器への再発率が高く予後不良な難治性疾患である。一方、良性の子宮筋腫は30代女性の約1/3に認められる疾患である。これらは、画像診断では区別できないケースがあり、正確に判断する為には外科病理検査が必要となる。そこで本研究では、血液を測定することで子宮肉腫を鑑別できるバイオマーカーの開発に取り組んでいる。私どもが確立した子宮肉腫モデルマウスと公共データベースを用いた解析より子宮肉腫を鑑別する血中生理活性物質の候補を挙げた。これらの患者血液濃度を測定したところ、4つの生理活性物質の測定により子宮肉腫を鑑別出来る可能性が示された。現在これらの生理活性物質を迅速に測定する新たな方法の開発に取り組んでおり、その実用化を目指している。	
関連キーワード	子宮肉腫、子宮筋腫、バイオマーカー、生理活性物質

研究の背景および目的

子宮がんの中で子宮肉腫は子宮体部悪性腫瘍の3-8%を占めるまれな疾患であるが、有効な化学療法は確立されておらず、主な治療法は外科療法となる。しかし、子宮摘出後に血行性転移による他臓器への再発率が高く、5年生存率は30%と非常に予後不良な腫瘍である。一方、良性の子宮平滑筋腫（子宮筋腫）は30代女性の約1/3に認められるが、悪性の子宮肉腫と鑑別する診断マーカーは確立されておらず、正確に判断する為には外科病理検査を必要とするのが実状である。その為、良性の子宮筋腫として子宮摘出した後に悪性の子宮筋肉腫と判明することもあり、病理診断が非常に困難な疾患として知られている。

私どもは、GFP遺伝子を導入したヒト子宮肉腫由来MES-SA細胞を樹立し、この細胞を免疫不全マウ

スに同所移植する実験モデルを確立している。このマウスの特徴は、転移や腹膜播種が再現性良く認められる点である。さら同所移植を繰り返していく中で、肺への転移数が多く見られる株（高転移株）と、転移がほとんど見られない株（低転移株）の樹立に成功している。また、樹立したモデルマウスの原発腫瘍の高転移株、低転移株よりライン化した細胞も作製している。

本研究では、この転移モデルや細胞株を用いることで転移メカニズムの解明や転移能に影響を与える因子の同定を目指す。さらに患者血中生理活性物質を測定することで、子宮肉腫と子宮筋腫を早期に鑑別する新たなバイオマーカーの作製と測定法の開発を目指している。

研究の内容および成果

（１）ヒト子宮筋肉腫の発生・転移機序の解明

樹立したモデルマウスの原発腫瘍の高転移株、低転移株およびこれらの原発巣から採取しディッシュで増殖した細胞を用いて、DNAマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、高転移株と低転移株の原発巣においてCellular MovementやCell Morphologyに関与する遺伝子発現が変化していることを明らかにした。また、これらをライン化した細胞株では高転移株と低転移株において、Small G proteinや細胞外基質に関与する遺伝子発現が変化していることを明らかにした。これらの遺伝子発現や転移への影響について現在も継続して解析中である。

（２）子宮肉腫と子宮筋腫を鑑別するバイオマーカーの開発

子宮肉腫と子宮筋腫を鑑別するバイオマーカーの候補は、以下の2つの方法より得た。

- 1) 同所移植マウスの原発巣を用いたDNAマイクロアレイの結果を基に①肺への血行性転移が認められる細胞株（高転移株）が転移の認められない細胞株（低転移株）より有意に発現量が高い遺伝子および②他の細胞株より有意に発現量が高い遺伝子。
- 2) 公開されているデータベースを用いて、子宮肉腫57例、子宮筋腫23例、正常子宮筋23例の遺伝子発現量を比較し、子宮肉腫特異的に高発現し

ている遺伝子。

候補として挙げられた9種の遺伝子について、それらの遺伝子産物（Neuromedin B, Adrenomedullin, Osteopontin, GDF-15, Progranulin, Midkine, CD147, PTHrP および BMP7）を検討した。インフォームドコンセントが得られた婦人科腫瘍患者の血中濃度をELISA または IRMA により測定した結果、これらの中から4種の生理

活性物質（Midkine、Osteopontin、GDF-15、Progranulin）の測定を組み合わせることによって、子宮肉腫を鑑別出来る可能性が示された（図1）。

現在、子宮肉腫バイオマーカーの化学発光システムによる迅速測定キットの開発に繋げるため、東洋紡の小型化学発光免疫自動分析装置POCubeによる測定系の開発を目指している（図2）。

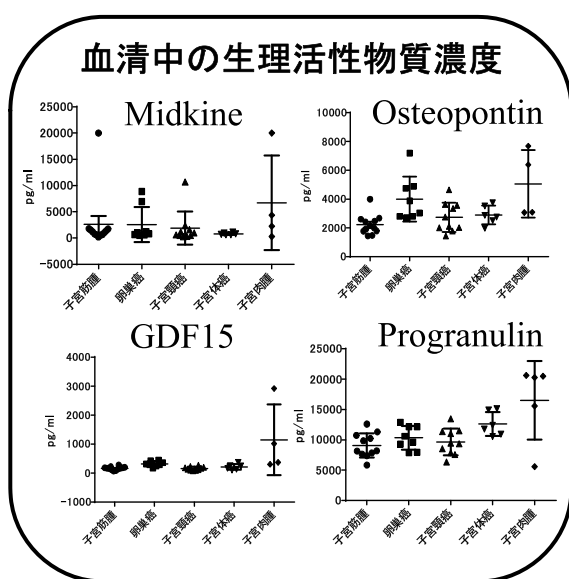


図1 婦人科腫瘍患者におけるMidkine、Osteopontin、GDF-15、Progranulinの血中濃度



図2 小型化学発光免疫自動分析装置POCube

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- 1, Kawabe, S., Mizutani, T., Ishikane, S., Martinez, M. E., Kiyono, Y., Miura, K., Hosoda, H., Imamichi, Y., Kangawa, K., Miyamoto, K., Yoshida, Y.: Establishment and characterization of a novel orthotopic mouse model for human uterine sarcoma with different metastatic potentials. *Cancer Lett.* 366, 182-190 (2015).
- 2, Mizutani, T., Kawabe, S., Ishikane, S., Imamichi Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Identification of novel steroidogenic factor 1 (SF-1)-target genes and components of the SF-1 nuclear complex. *Mol. Cell. Endocrinol.* 408, 133-137 (2015).
- 3, Mizutani, T., Ishikane, S., Kawabe, S., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of genes related to progesterone production. *Endocr.J.* 62, 757-763 (2015).
- 4, Hattori, Y., Yamada, S., Yamamoto, M., Orisaka, M., Mizutani, T., Yoshida, Y.: Ovarian mucinous

adenocarcinoma with functioning stroma in postmenopausal women: aromatase and SF-1 expressions. *J. Ovarian Res.* 8, 73 (2015).

「特記事項」

平成27年4月

日本内分泌学会研究奨励賞 受賞

平成27年7月

特許出願

出願番号：特許出願 2015-152893

発明者：水谷哲也、宮本 薫、河邊真也、石兼 真、吉田好雄、福田 真、山本 真

発明の名称：子宮肉腫と子宮筋腫を鑑別する腫瘍マーカーの開発

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

公益財団法人 喫煙科学研究財団 研究助成金
研究課題：妊娠・胎児系における遺伝子発現およびエピゲノムに対する喫煙の影響・代表・採択

高感度ヒト LNPEP (AT4/IRAP) ELISA 測定系の確立

研究代表者：此下忠志（医学部・准教授）
電話：0776-61-8353、メールアドレス：konosita@u-fukui.ac.jp
共同研究者：

概 要	高感度ヒト LNPEP (AT4/IRAP) ELISA 測定系の確立
これまで DNA チップを用い腎生検組織に対して施行した網羅的発現遺伝子解析により、高血圧/糖尿病に特有な発現変動を示す遺伝子としてアンジオテンシン IV 受容体 (AT4) を抽出、想定される可溶成分に対してポリクローナル抗体による感度 0.01nmol/ml レベルの測定系を確立した。そこで臨床症例の血漿濃度の測定を施行した。陽性群で有意に BMI が低値であり、かつ有意にアンジオテンシン I が低値で、整合性のある成績と考えられた。しかし感度については、陽性率が 14.3%と十分には高くない。そこでモノクローナル抗体による高感度測定系の確立を進めた。マウスの免疫、脾臓、リンパ節と X63 との細胞融合を行い、スクリーニングを進め、clone:48A3、55A2、57A2、62A2、77A1 を選択、組み合わせ試験の結果、固相化側に 62A2、77A1 を用い、標識側に 46A1-Fab' を用いるものが最適と考えられこれを各 2 キット作成し、感度の改善が確認され、測定条件等の最適化を進めている。	
関連キーワード	網羅的発現遺伝子解析、レニン-アンジオテンシン系、AT4、IRAP、LNPEP

研究の背景および目的

これまで申請者らは、腎生検標本 RNA を用い、DNA チップによる 55,000 遺伝子転写物の網羅的解析で、生活習慣病で特異的に変動するクラスターを抽出し、Ontology 解析、Pathway 解析からアンジオテンシン II 消去系遺伝子群の一遺伝子である LNPEP (AT4/IRAP)などを抽出した。(図1)。

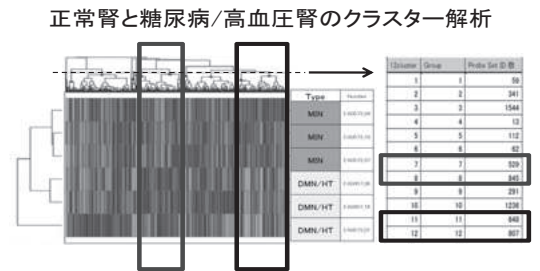


図1 正常腎と糖尿病/高血圧腎のクラスター解析
抽出された個別の遺伝子につき RT-PCR 法で評価し、生活習慣病対象においてこの LNPEP (AT4/IRAP) の発現変動が示唆された (図2)。

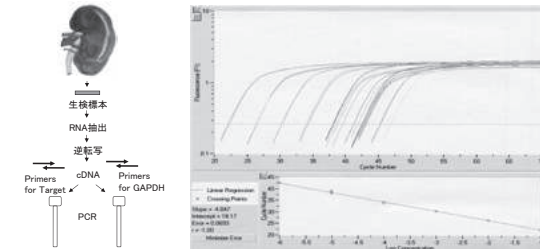


図2

LNPEP (AT4/IRAP)は膜型酵素であり。構造から Phe154 と Ala155 の間で分解され、約 800 アミノ酸配列分が Soluble Form となると想定される (図3)。

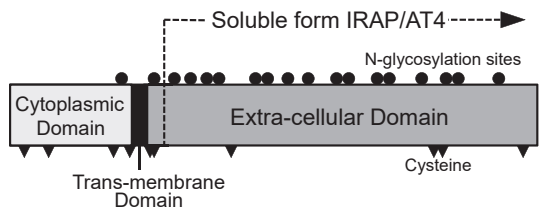


図3
そこで 3 か所の抗体作製部位を設定し、ウサギを免疫し 3 抗体を作成、サンドイッチ法による ELISA の測定系作成を進めた (図4)。

LNPEP(IRAP/AT4)の抗体作製部位

1 MEPTNDRLQ LPRNMIENSM FEEEPDVVDL AKEPCLHPL E PDEVEYEPRG SRIIVRGLGE
61 HEMEEDEEDY ESSAKLLGMS FMNRSSGLRN SATGYRQSPD GACSVPSPART MVVCAEVIVV
121 AVSIVMIVYL LPRGTETKEG CHKKNGSGL ICPFATNGKL FFWAQIRLPT AVVPLRYELS
181 LHPNLTSMTF RGSVTISVQA LQVITWNIHL STGHNISRVY FMSAVSSQEK QAEILEYAYH
241 GAIAVAPEA LLAGHNYTLK IEYSANISS YYGYFYGSYT DESNEKKYFA ATQFELPAAR
301 SAFPCEDEPA FKATFIKII RDEQYALSN MPKSSSVLD DGLVQDEFSE SVKMSYLYVA
361 FIVGEMKNLS QDVNGTLVSI YAVPEKIGQV HYALETTVKL LEFFQNYFEI QYPLKLDLV
421 AIPDFEAGAM ENWGLITFRE ETLVDSNTS SMADRLVTK IAHELAHQW FGNLVTMKWVW
481 NDVLWNEGFA TFMEYFSLER IKELSSYED FLDAFRTMK KSLNSHPT SSSVOSSEQI
541 EEMFDSLSEY KGSLLMLK TYLSEDFQH AVVLYLHNS YASIGSDDLV DSFNEVTNQT
601 LDVKRMKWTW TLQKGFLPVT VQKKGKELFI QQERFFLNMK PEIQPSDTSY LWHIPLSYVT
661 EGRNYSKYQS VSLLDKKSGV INLTEEVLVW KVNNMNGYY IVHYADDWE ALIHLKINP
721 YVLSKDRAN LNNIFELAG LQKPLKRAF DLNLYGNEN HTAPTEALF QTDLYNLLE
781 KLYMDLASR LVTRVFKLQ NQIQOQTWTD EGTPSMRELK SALLEFACH NLGNCSTAM
841 KLFDWMAASN GTQSLPTDVM TTVFKVGAKT DKGWSFLGK YISIGSEAEK NKILEALASS
901 EDVRKLYWLM KSSLNGDNFR TQKLSFIIRT VGRHFPGLL AWDFVKNWN KLVQKFLPS
961 YTIONIVAGS TYLFSTKTHL SEVGAFFENQ SEATFRLRCV QEALVQLN IQWMEKNLKS
1021 LTWWL

図4
最も感度の高い組み合わせから、標準品を用いて検量線の作製を試み、ELISA のキットを作製した。これによる臨床症例の測定を進め、さらに高感度系の確立を進める。

研究の内容および成果

二抗体法による ELISA の測定系としてのキットが作製され、実際の測定では検量線用標準品の希釈段階ともども有効な発色が確認され、またプレートリーダーによる測定で、精度の高い測定が可能であることが確認された (図 5)。

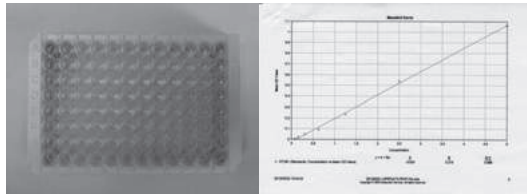


図 5

652 例の臨床検体 (血漿) の測定を実施し、93 例 (14.3%) で感度以上の値が得られ (陽性群)、陰性群と陽性群の分散分析では Angiotensin I (対数変換) : 1.84 ± 0.67 vs 1.57 ± 0.84 ($p=0.0014$)、BMI : 24.0 ± 3.9 vs 23.1 ± 3.7 ($p=0.042$) などの有意差が得られた。(図 6)

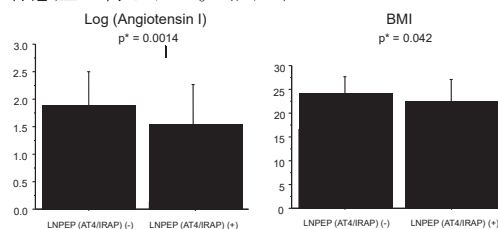


図 6

これらの成績は整合性を持って意味のあるものである。しかしながら陽性率は 14.3% と必ずしも高いものではない。そこで高感度測定系の作製によ

り、臨床上より有意義なバイオマーカーが開発される可能性が考えられ、この作製を進めた。

マウスの免疫、脾臓、リンパ節と X63 との細胞融合を行い、上清スクリーニングを進め、clone: 48A3、55A2、57A2、62A2、77A1 を選択、サンドイッチ ELISA 法による組み合わせ試験の結果、固相化側に 62A2、77A1 を用い、標識側に 46A1-Fab' を用いるものが最適と考えられこれを各 2 キット作成し、感度の改善が確認され、現在測定の最適化を進めている。(図 7)

Anti-LNPEP Biotin サンドイッチ Assay
× 46A1 抗体での検証

検体	Anti-mouse LNPEP Mouse IgG (μg/ml)	46A1	46A3	55A2	57A2	62A2	77A1	46A1
Place	Anti-mouse LNPEP Mouse IgG (μg/ml)	46A1	46A3	55A2	57A2	62A2	77A1	46A1
C-26	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	0.001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	0.01	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	0.1	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	1	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	10	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
C-26	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	0.001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	0.01	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	0.1	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	1	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	10	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
C-26	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	0.001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	0.01	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	0.1	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	1	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	10	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

ブランク補正

検体	Anti-mouse LNPEP Mouse IgG (μg/ml)	48A3	55A2	57A2	62A2	77A1	46A1
Plate	100	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
100	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
10	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
1	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
0.1	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
0.01	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
0.001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Blank (no sample)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Blank (no enzyme)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

図 7

現在 duplicate sample で再現性等は適正であり、明確な感度の改善が得られている。ドラフトとして、第一世代測定系との相関も見られ、1,000 例規模の測定を進めており、臨床上、高血圧、糖尿病、脂質異常症、肥満、慢性腎臓病等、主として生活習慣病におけるバイオマーカーとしての意義を検討する。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Makino Y, Konoshita T*, Omori A, Maegawa N, Nakaya T, Ichikawa M, Yamamoto K, Wakahara S, Ishizuka T, Nakamura H; Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC) Study Investigators
A genetic variant in the distal enhancer region of the human renin gene affects renin expression.
PLoS One 10: e0137469, 2015. 9
Konoshita T*, Nakaya T, Sakai A, Yamada M, Ichikawa M, Sato S, Imagawa M, Fujii M, Yamamoto K, Makino Y, Arakawa K, Suzuki J, Ishizuka T, Nakamura H; Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC) Study Investigators
Determinants of plasma renin activity - Role of a human renin gene variant as a genetic factor.
Medicine 93: e354, 2014. 12
Ichikawa M, Konoshita T*, Nakaya T, Yamamoto K, Yamada M, Sato S, Imagawa M, Makino Y, Fujii M, Zenimaru Y, Arakawa K, Suzuki J, Ishizuka T, Nakamura H
Genetic variant of the renin-angiotensin system and prevalence of type 2 diabetes mellitus: a modest but significant effect of aldosterone synthase.
Acta Diabetol 51: 595-599, 2014. 8
Konoshita T*, Makino Y, Kimura T, Fujii M, Morikawa N,

Wakahara S, Arakawa K, Inoki I, Nakamura H, Miyamori I and the Genomic Disease Outcome Consortium (G-DOC)
Study Investigators

A crossover comparison of urinary albumin excretion as a new surrogate marker for cardiovascular disease among 4 types calcium channel blockers.

Int J Cardiol 166: 448-452, 2013. 6

Fujii M, Inoki I, Saga M, Morikawa N, Arakawa K, Inaba S, Yoshioka K, Konoshita T, Miyamori I*

Aldosterone inhibits endothelial morphogenesis and angiogenesis through the downregulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 expression subsequent to peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

J Steroid Biochem Mol Biol 129: 145-152, 2012. 4

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

平成 22～24 年度 文部科学省科学研究費補助金基盤研究 (C) 22590909 網羅的発現遺伝子解析により抽出された高血圧関連遺伝子 AT4/IRAP の役割

平成 25～27 年度 文部科学省科学研究費補助金基盤研究 (C) 25461245 アンジオテンシン IV 受容体可溶性成分の高感度測定系構築と臨床的有用性の評価

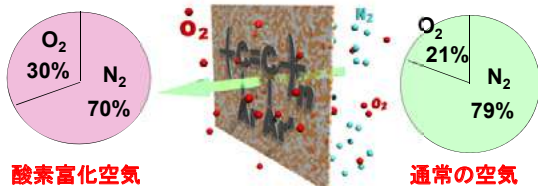
**福井大学
産学官連携本部
平成 27 年度実用化研究助成
(FUNTEC フォーラム
福井大学研究シーズ
紹介ポスター発表)**

酸素富化空気製造を効率化する 空間保持材料の開発

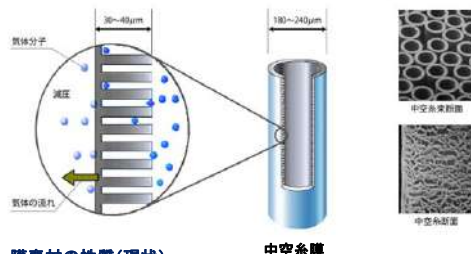
材料開発工学専攻 ○阪口 壽一・Lin Yi

酸素富化空気を作る（酸素富化膜）

空気を通すと酸素の濃度を上げることができる膜



実際に使用される中空糸膜



膜素材の性質（現状）

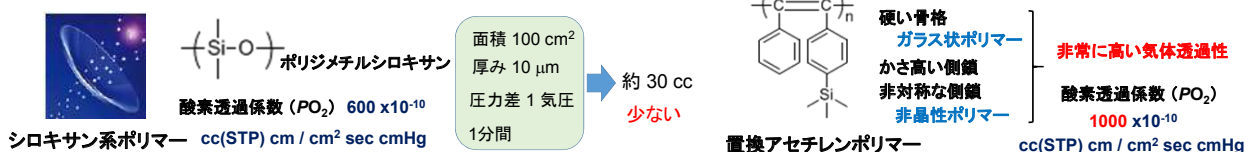
酸素透過係数 (PO_2) $500 \sim 1000 \times 10^{-10} \text{ cc(STP) cm} / \text{cm}^2 \text{ sec cmHg}$
 酸素選択性 (PO_2/PN_2) $2.0 \sim 3.0$

酸素富化空気の利用例

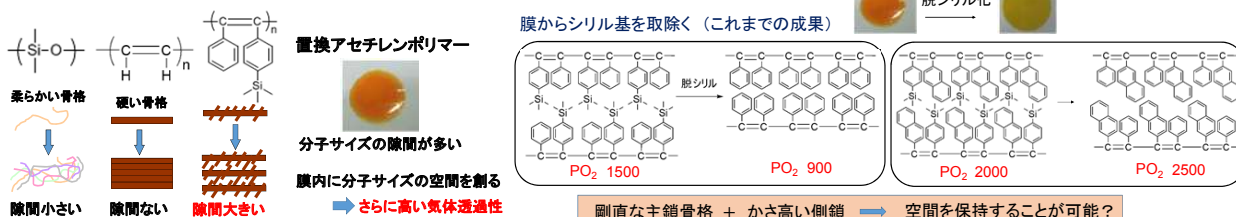
- ・医療用の酸素富化空気の供給
- ・家庭用の酸素富化空気の供給
- ・工業用の酸素富化空気の供給



現在の酸素富化膜の材料

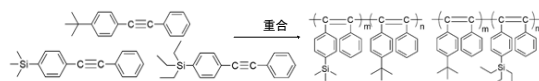


高ガス透過性ポリマー膜の開発（空間保持材料の開発）

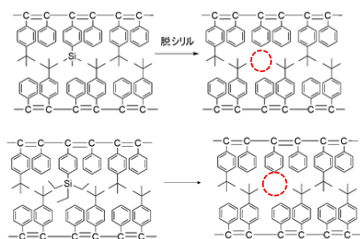


実験内容

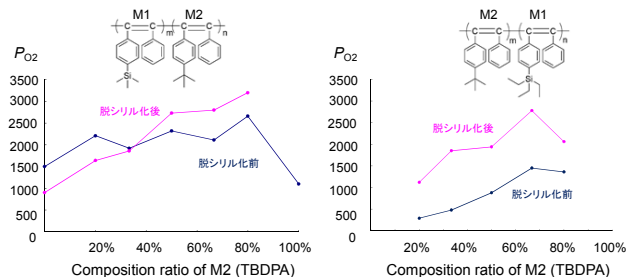
① シリル基とトリブチル基を有するモノマーの共重合（コポリマーの合成）



② 膜作製後にシリル基の脱離



不規則性による
間隙の形成は？
最適シリル基の
割合は？
取除くシリル基の
サイズは？



まとめ

- ・コポリマー化により透過性増加（不規則性が上がり、ポリマー鎖が並びにくい）
- ・20～30%の置換基を取除くと透過性が高い（取りすぎると空間が潰れる）
- ・大きなシリル基ほど脱離後の透過性増加率は高い（大きな空間が形成）

平成27年度実用化研究助成事業

福井大学産学官連携本部 吉長重樹

4点支持歩行補助杖の実用化に関する研究

1. 背景と目的

従来の歩行補助4点支持杖一杖を体の前に置き、腰を曲げて前傾姿勢で歩行する

- ・腰や腕に負担がかかる
- ・スムーズな歩行ができない。

腰や腕への負担を少なくしたスムーズな歩行を実現する4点支持杖の開発

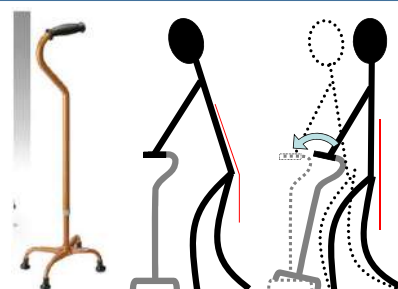


図1 市販品

図2 市販品使用時の負担

2. 杖の開発

特許4905031号
歩行補助用杖



図3 ダンパー付支持脚 図4 傾斜機構付(棒バネ) 図5 傾斜機構付(板バネ)

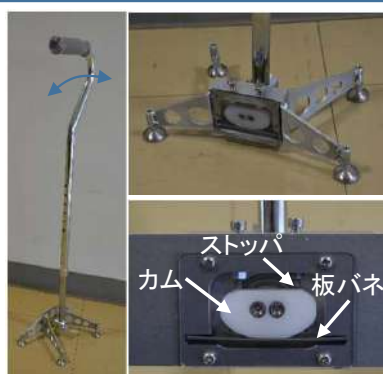


図6 傾斜機構付杖(板バネ)

- ・杖支柱の傾斜とともに、カムが回転し、板バネを押し下げることで傾斜時の反力が発生する。
- ・軽量でシンプルな構造
- ・カムの形状と板バネの材質や板厚で傾斜反力を調整

3. 被験者による比較試験結果

左半身片麻痺の被験者による市販4点支持杖と傾斜機構を有する開発杖との比較を実施した結果を示す。

- ・図7は歩行時の連続写真を重ね合わせたものである。市販杖に比べ開発杖は歩行がスムーズで歩行時の歩幅も大きい
- ・図8は歩行時の荷重位置を示したものである。市販杖では体の外側から内側に向け荷重しているのに対し、開発杖ではほぼ垂直に荷重している。

以上の結果から、傾斜機能付開発杖は市販品に比べ、歩行がスムーズであり荷重しやすいことがわかる。ただし、被験者は杖が傾斜することによる心理的不安を感じており、被験者に合わせた傾斜時の反力の設定や安定性向上が必要であると考えられる。

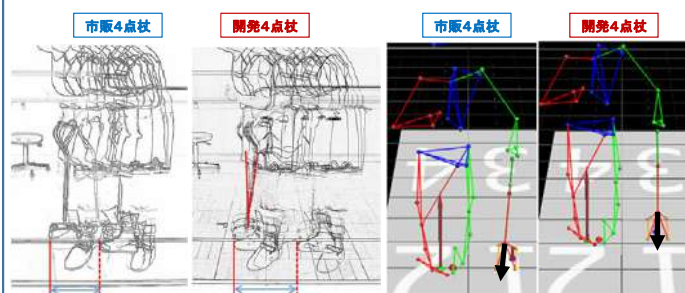


図7 歩行のスムーズさと歩幅の比較

図8 歩行時の重心と杖の関係

4. カム形状の改良

(1)楕円カムの長径短径比を変更することにより傾斜時の反力を変化

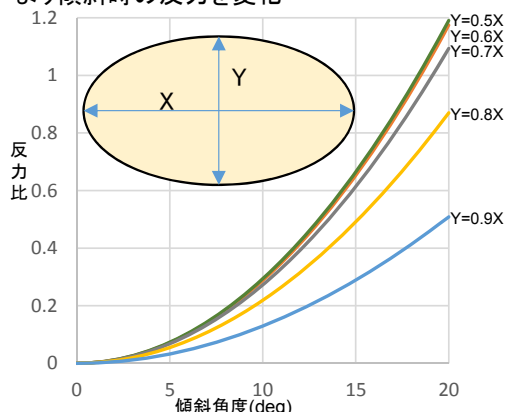


図9 傾斜角度と傾斜反力の関係

(2)安定性向上を目的とし、カムの長径を前後異径とすることにより前方には傾斜しやすく、後方には傾斜しにくい杖とする。



図10 前後異径カムと異径カムを用いた杖

福井大学大学院 工学研究科 材料開発工学専攻 奥永陵樹・橋本 保

氣體分離法

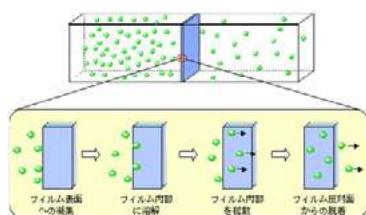
- 化学吸收法
- 物理吸收法
- 深冷分离法
- 膜分离法

膜分離法

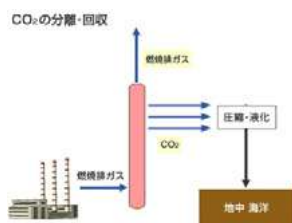
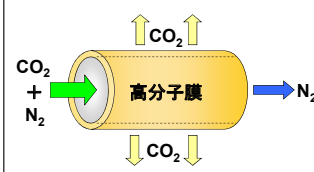
メリット
省エネルギーで
二酸化炭素を回収可能

デメリット

特定気体の選択的な分離が困難

$$\text{H}_2 < \text{CO}_2 < \text{N}_2 < \text{CH}_4$$
$$0.29 \quad 0.33 \quad 0.36 \quad 0.38$$


二酸化炭素が優先して高分子膜を透過

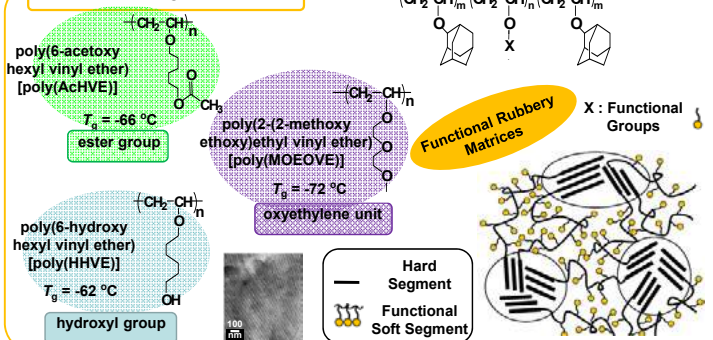


燃烧排ガス(CO₂濃度14~25%)
 ↓ → 99%濃度CO₂を回収
 処理後排ガス(CO₂濃度3~6%)

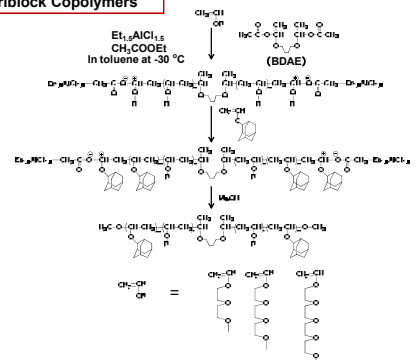
CO₂分離市場(2030)



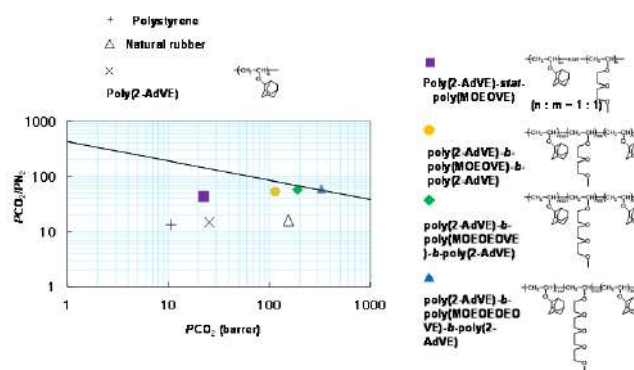
Introduction of Functional Group in Soft Segment



Scheme of ABA-type Triblock Copolymers



Polymer	PO_2 (barrer)	PN_2 (barrer)	PCO_2 (barrer)	PCO_2/PN_2
	6.01	1.69	25.2	14.9
J. Appl. Polym. Sci., 114, 2339 (2009).				
	2.05	0.554	22.3	40.3
(n : m = 1 : 1)				
	7.05	2.11	113	53.6
	10.3	3.29	189	57.4
	18.2	5.93	326	54.8

1 barrer = $1 \times 10^{-10} \text{ cm}^3 (\text{stp}) \text{ cm cm}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ cmHg}^{-1}$ 





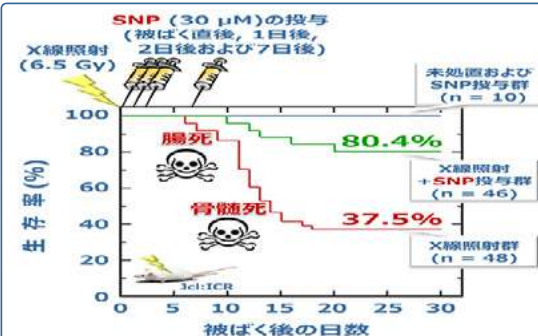
WHOストックパイル収載を目指した 放射線障害防護剤としてのニトロプルシドナトリウムの再評価

松本 英樹

福井大学 高エネルギー医学研究センター がん病態制御・治療部門
hidekim@u-fukui.ac.jp

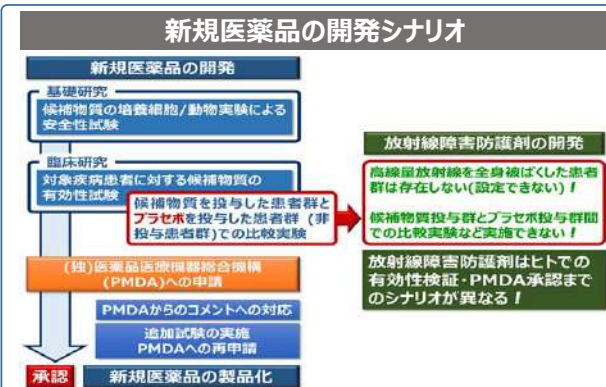


今までの研究成果 正常マウス(Jcl:ICR)を用いたニトロプルシドナトリウム(SNP)の放射線障害防護能試験

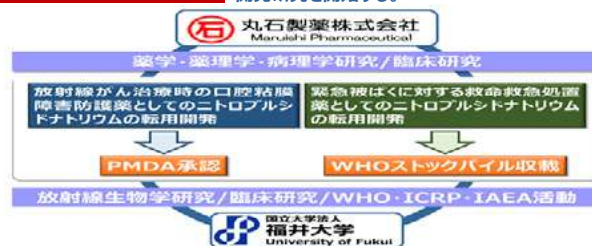


小腸幹細胞のアポトーシス抑制が顕著に認められた！

大腿骨髄幹細胞の回復が顕著に認められた！



丸石製薬株式会社との共同開発研究 丸石製薬(株)から提出された研究企画書は既に承認済みである。今後共同研究契約を締結し、開発研究を開始する。



頭頸部腫瘍の放射線がん治療時の口腔粘膜防護剤としてのニトロプルシドナトリウムの転用開発



WHOストックパイル収載を目指した放射線障害緩和剤としてのニトロプルシドナトリウムの転用開発



福井大学助成研究成果集 2016

—明日への挑戦—

発行日 平成29年2月17日

編集 福井大学研究推進委員会

研究推進委員会（平成27年度）

委員長	理事（副学長）研究・国際	岩井 善郎
委員	附属図書館長	寺尾 健夫
〃	産学官連携本部長	米沢 晋
〃	附属国際原子力工学研究所長	安濃田良成
〃	高エネルギー医学研究センター長	岡沢 秀彦
〃	遠赤外領域開発研究センター長	谷 正彦
〃	子どものこころの発達研究センター長	上田 孝典
〃	総合情報基盤センター長	細田 陽介
〃	ライフサイエンス支援センター長	定 清直
〃	生命科学複合研究教育センター長	上田 孝典
〃	トランスレーショナルリサーチ推進センター長	宮本 薫
〃	URAOオフィス所長	鷺田 弘
〃	教育地域科学部教授	山本 博文 (H27. 4. 1～)
〃	医学部教授	内木 宏延
〃	工学研究科教授	福井 一俊

発行 福井大学
〒910-8507 福井市文京3丁目9-1
(総合戦略部門研究推進課)
TEL 0776-27-8880
E-mail skkenkyo-k@ad.u-fukui.ac.jp

印刷 能登印刷株式会社

