

血管内皮細胞の機能維持・破綻に関わる 脱ユビキチン化酵素 USP40 の機能解析

川 上 速 人 楊 國 昌¹ 竹 中 均²
渡 邊 卓³ 宮 東 昭 彦 西 堀 由 紀 野¹

杏林大学医学部解剖学

¹ 杏林大学医学部小児科学

² 杏林大学医学部生化学

³ 杏林大学医学部臨床検査医学

諸 言

神経変性疾患や癌などの病態に、細胞内の不要・変性タンパクの分解を担うユビキチン・プロテアソーム系の機能不全が関わる事が判明しつつある。不要・変性タンパクは、多数のユビキチンの結合（ポリユビキチン化）によりプロテアソームに輸送され、プロテアーゼによる消化後に新たなタンパク合成のリサイクル系に入る。したがって、このユビキチン化の制御システムは、至適タンパク分解過程とその後の新生蛋白の合成過程の重要な第1関門である。

Ubiquitin-specific protease family (USP) は、標的タンパクからユビキチンを離脱させ、そのユビキチンの修復と、新たな標的タンパクとの共有結合（ポリユビキチン化）へのリサイクルを促すと考えられている。最近、一部の USP において、特異的に認識し、分解を担当するタンパク基質が同定され始め、アポトーシスやタンパク輸送に於ける USP の重要性が判明してきた。しかし、未だ多くの USP のタンパク機能は解明されていない。Quesada らは、新規クローニング USP family のうち、USP isoform 40 (USP40) mRNA が多くの臓器に発現することを報告した (Quesada V, et al. Biochem Biophys Res Commun 314:54, 2000) が、そのタンパク機能については全く未解明であった。

一方、Tryggvason の研究グループ (Division of Matrix Biology, Karolinska Institute) が、新規腎糸球体特異的遺伝子群の1分子として、USP40 をあらためて報告した (Takemoto M, et al. EMBO J 25:1160, 2006)。そこで、本研究は腎を主体とした USP40 のタンパク機能について解析を行うことを目的とした。

方法と結果

ヒトと zebrafish の USP40 の間には 50% の相同性がある。まず、USP40 の器官発生における意義についてスクリーニングするために、zebrafish の USP40 の ATG 部分に対する morpholino を作製し受精卵に注入後、生後 72 時間個体について表現型の違いを検討した。図 1 上段に示すように、USP40 を完全欠失した個体は cardiac edema を呈した（矢印）。また、著明な脳の発育不全が観察された（図 1 下段）さらに、腎糸球体では矮小化された係蹄が観察され、腎糸球体構築の障害が示唆された（図 2）。これにより、USP40 はほ乳類においても、重要なタンパク機能を発揮する可能性が強く示唆された。そこで、齧歯類とヒトに共通するアミノ酸配列を認識する特異抗体の作製を試みた。まずヒト腎 cDNA ライブラリーからヒト USP40 のアミノ酸 756-901 に相当する部分の cDNA をサブクローニングし、大腸菌発現ベクターに挿入した後、大腸菌にて産生させたリコンビナントタンパクを作製した。これを抗原とした精製ラビットポリクローナル抗体を作製した。さらに、full-length USP40 のコンストラクトをサブクローニングし、ほ乳類発現用ベクターに挿入後、human embryonic kidney cell を用いてヒト USP40 安定発現株化細胞を作製した。抗 USP40 抗体の特異性を、この安定発現細胞を用いた免疫蛍光染色と western blot で確認した。図 3 に示すように、USP40 の細胞内局在は細胞質にびまん性に観察され、その分子量は約 150-kDa であった。次に、この抗体を用いて、マウス各臓器における USP40 の局在を検討した。図 4 に示すように、USP40 は肺、脳、肝臓、心臓において、毛細血管と小動脈の内皮細胞の細胞質に観察された。特

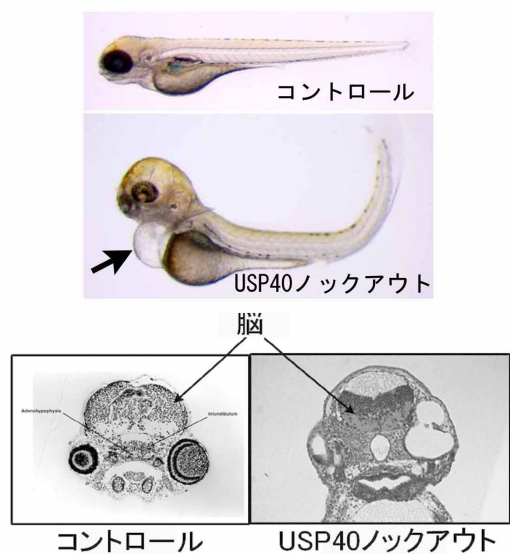


図1 USP40ノックダウンによるZebrafishの変化

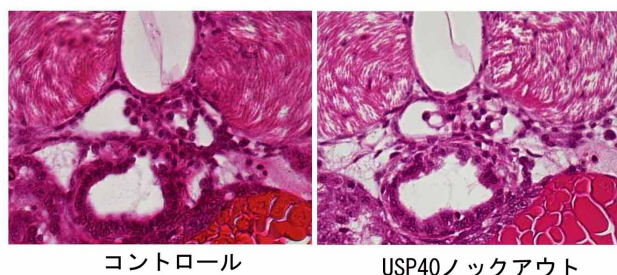


図2 USP40ノックダウンによるZebrafish糸球体の変化

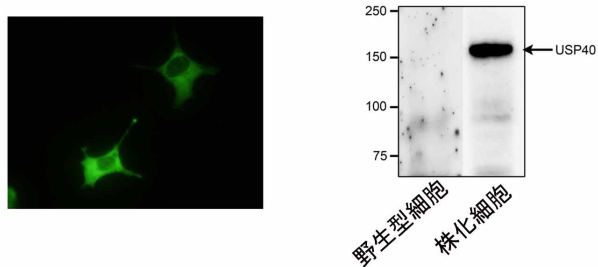


図3 安定発現株化細胞におけるUSPの局在と分子量

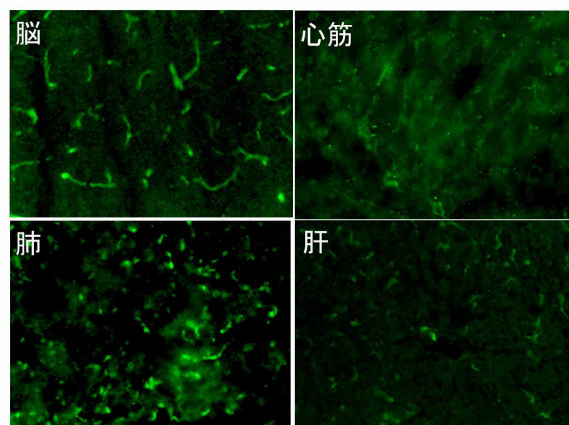


図4 各臓器におけるUSP40の免疫蛍光染色

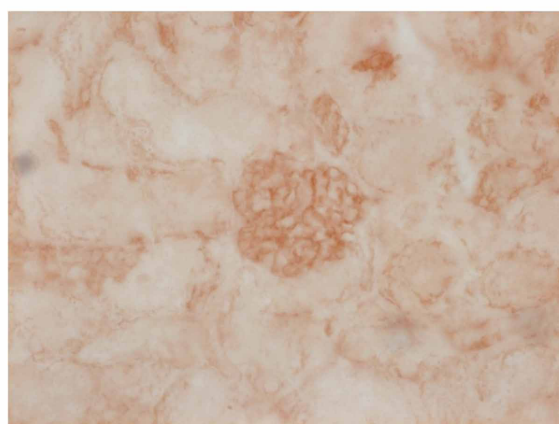


図5 成熟腎におけるUSP40の酵素抗体法による局在

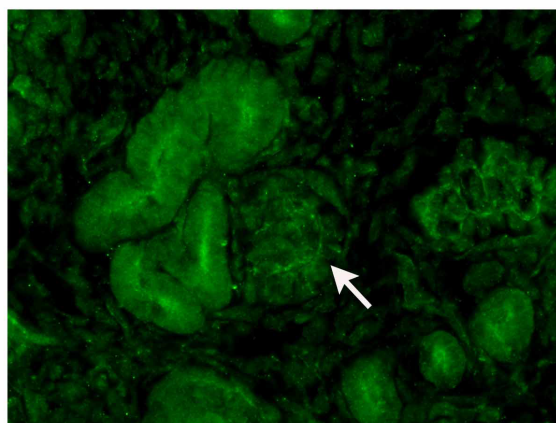


図6 S期糸球体におけるUSP40の免疫蛍光染色

に、腎においては、糸球体内皮に強く発現し、間質部位の血管における発現は弱く観察された（図5）。日齢12の胎児腎を用いた検討から、USP40は間質血管およびS期糸球体の進入血管においてすでに観察された（図6）。USP40のタンパク機能を解析するためには、その基質になるべきタンパク分子の同定が必要である。Full-length USP40とヒト腎ライブラリーを用いた yeast two-hybrid スクリーンを行ったが、baitであるUSP40の発現

が弱く、陽性データは得られなかった。血管内皮特に腎糸球体内皮は、細胞膜発現糖タンパクを強く発現している。その中でポドカリキシンは代表的糖タンパクである。このポドカリキシンを発現しているマウス糸球体内皮株化細胞のUSP40の有無を検討したところ、内因性に強く発現することが判明した。興味深いことに、この内皮細胞におけるUSP40の局在は、細胞質よりもむしろ細胞膜の裏打ち部位に強く観察された。この糸球体内皮株

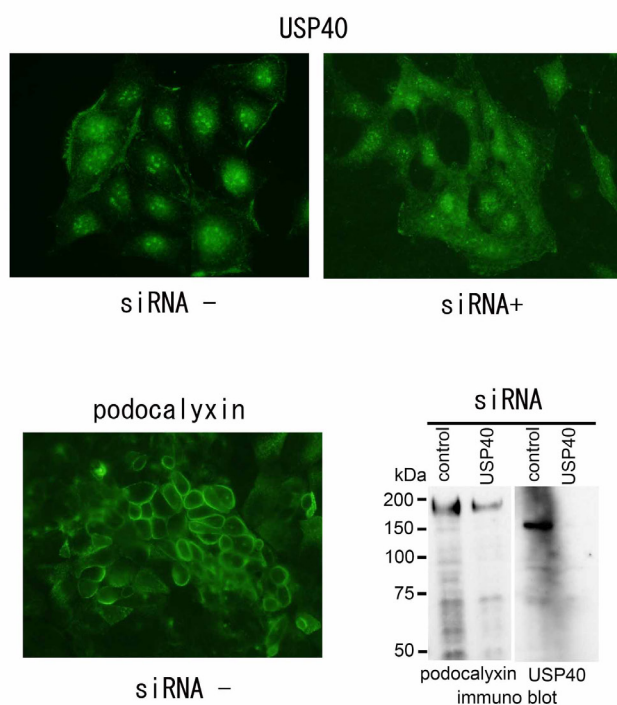


図7 糸球体内皮株化細胞におけるUSP40の発現
-----RNAノックダウンによる影響-----

化細胞に USP40siRNA を導入し USP40 のノックダウンを行ったところ、明らかなポドカリキシンのタンパク発現の低下が観察された (図 7)。

考察と今後の研究

今回の研究において、USP40 の局在は毛細血管と小動脈の内皮細胞の細胞質であることが判明した。胎児腎における検討から、間質の初期毛細血管と極初期糸球体において発現しており、本分子の血管形成における重要性が示唆された。脳の毛細血管における発現は、zebrafish におけるノックダウンの表現型である脳の形成不全の

結果を説明可能と考えられる。USP40 のタンパク機能の根幹を解明するためには、その結合タンパク基質の同定が必須である。Partial-cDNA を用いた yeast two-hybrid スクリーンを現在行っている。糸球体内皮株化細胞を用いた siRNA によるノックダウン実験から、ポドカリキンもその基質の候補である可能性がある。最近、cre-recombinase-loxP システムを用いた血管内皮特異的に USP40 をノックアウトさせたマウスを樹立させた。生後 4 週間現在において明らかな表現型の異常は見られていない。今後の詳細なノックアウトマウスの観察を行う。

神経伝達におけるシンタキシン1アイソフォームの機能分化について

赤 川 公 朗¹ 藤 原 智 徳¹ 三 島 竜 也¹
永 松 信 哉² 金 井 正 美³

¹杏林大学医学部細胞生理学

²杏林大学医学部生化学（Ⅱ）

³杏林大学医学部解剖学（Ⅱ）

細胞内小胞の輸送や分泌小胞，シナプス小胞の開口放出を説明する最も有力な説として SNARE 仮説が提出されている。この仮説では細胞質に存在する因子である NSF-SNAP 複合体がターゲット膜上の多くの SNAP receptor (SNARE) に結合することで ER やゴルジ体等の細胞内膜どうし，或いは分泌小胞，シナプス小胞と形質膜との融合が制御されると考えられている。この仮説で想定されている SNARE 分子群の中でシナプス小胞の開口放出を制御するものとしてシナプス前膜に局在する syntaxin1 が知られている。Syntaxin1 には HPC-1/syntaxin1A (sy1A) と syntaxin1B(sy1B) という 2 種類のアイソフォームが存在する。両者は異なる遺伝子から産生されるが同一の神経細胞に共発現してアミノ酸配列も似通っている。それ故，これらの 2 種類の因子はシナプス伝達過程の中でもシナプス前の機序，特に興奮に伴う神経伝達物質の開口放出過程の安定性を維持する為に，ほぼ同等の働きをしながら並列に働く重複因子であると従来は考えられてきた。一方，シナプス終末に神経興奮が到達した後，神経伝達物質が開口放出により細胞外に遊離されるまでの時間経過に基づいて，1 ミリ秒前後で放出される速いシナプス伝達系と数十ミリ秒から数秒に至る遅いシナプス伝達が生理学的には区別されている。前者は Ach，グルタミン酸，GABA 等を含有する small synaptic vesicle(SSV)，後者は神経ペプチド、ノルアドレナリン，ドーパミン，セロトニン (5HT) 等のモノアミン類を含有する，主に large dense core vesicle (LDCV) と呼ばれる形態学的に異なるシナプス小胞により仲介されると考えられている。これらの 2 種の vesicle の開口放出機構には何らかの差異があると予想されているが，

詳細は明らかではなかった。最近，我々が sy1A と sy1B について遺伝子ノックアウトマウス (KO) を作成して，それらの神経系を詳細に比較検討した結果，速いシナプス伝達過程には sy1B が，遅いシナプス伝達過程には sy1A が働いており，sy1A と sy1B が神経細胞間のシナプス伝達において機能分化していることを見出した。其の知見について 2 種の KO の表現系の違いを示しながら報告する。

1. HPC-1/Syntaxin1A 遺伝子ノックアウトマウスの表現系

Sy1AKO(null mutant) は全く正常に生育し，外観上，神経機能は正常のように思われた。その中枢神経系は光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡による形態学的観察からも全く正常と考えられた。培養系での電気生理学的解析からは海馬や大脳皮質でのグルタミン酸，GABA 系の速い神経伝達は正常であることが示された。しかし海馬切片での電気生理学的観察からは長期増強が減弱しており，個体レベルでは恐怖条件付け学習の低下が認められた。興味あることはこの KO には人間の自閉性障害 (autistic disorder) に類似した情動行動の異常が観察された点である。人間の Williams 症候群患者 (WS) では 7 番染色体にはおよそ 2 Mb に亘る半接合体微小欠損領域があり，その欠損領域中に sy1A 遺伝子座位が含まれている (Nakayama et al., Cytogenetics and Cell Genetics, 1998)。WS は複数の遺伝子欠損に伴う複合症状を呈するが，精神神経症状の 1 つとして軽度の自閉性障害様の情動行動の異常，学習障害を有している。Sy1AKO の学習や行動を調べてみると，heterozygote, KO の順に遺伝子数の低

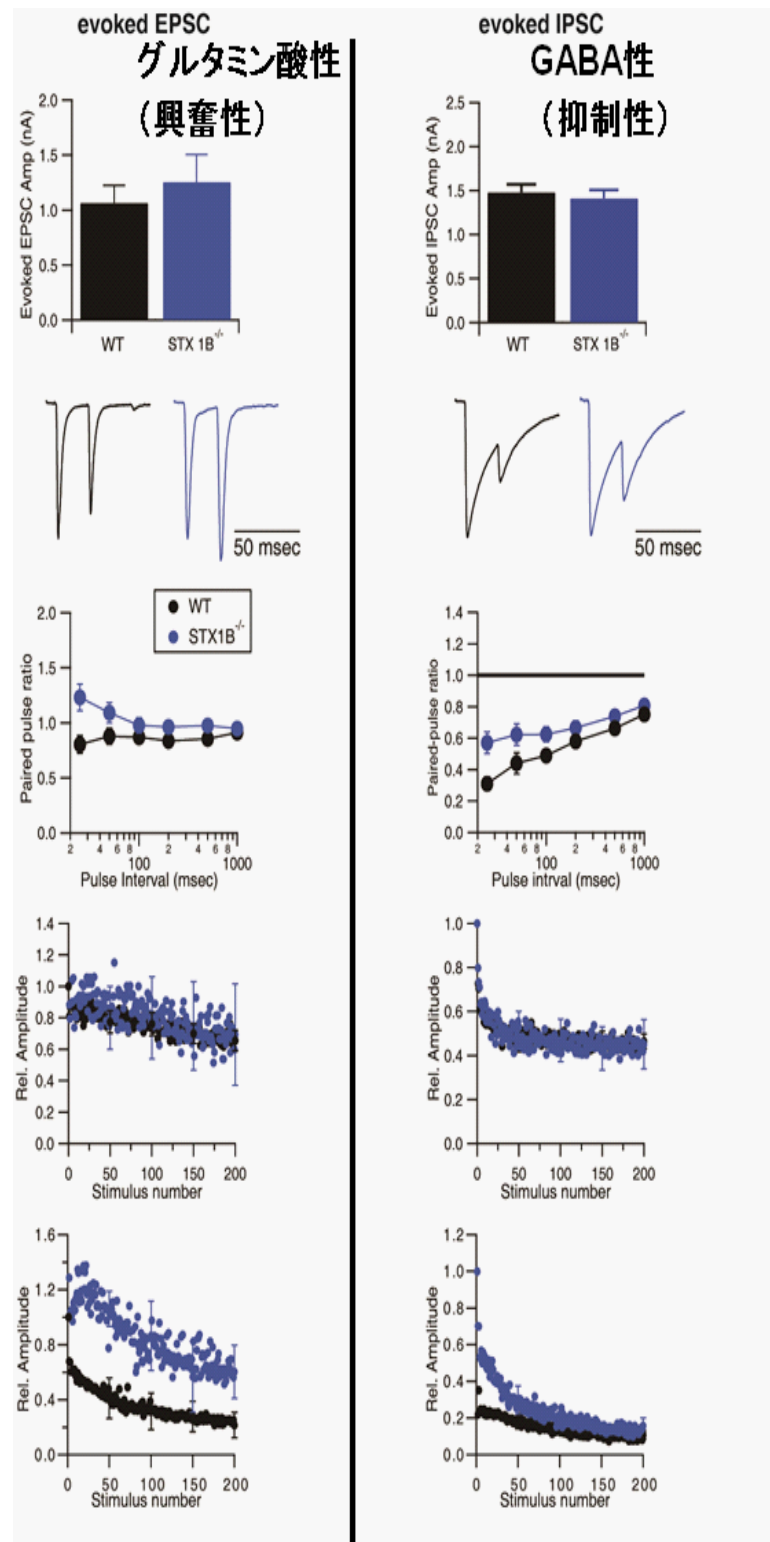


図 1 電気刺激された Sy1BK0 の培養神経細胞に見られる速いシナプス伝達の異常

中央の線の左側はパッチクランプ法により培養海馬神経細胞から記録したグルタミン酸性シナプス，右側は GABA 性シナプスの性状を示す。単一の電気刺激により惹起された evoked EPSC 及び IPSC（最上列）の amplitude は WT(黒) と KO(青) の間に有意差はない。2 列目はシナプス機能の指標となる 2 発連続刺激による paired pulse ratio 実験の記録例（刺激時間の間隔は 25 ミリ秒）。三列目は刺激の時間間隔を変えた paired pulse ratio 記録を示す。刺激間隔が短い場合に，有意な差が観察される。4，5 列目に刺激頻度が各々 1Hz または 20Hz で連続刺激した際の amplitude の変化を表す。刺激間隔が短い連続刺激の場合（5 列目）に sy1BK0 では evoked PSP の amplitude に有意な差（ANOVA）が認められ，グルタミン酸性，GABA 性シナプス共に障害されていることが分かる。

表 1 sy1AKO と sy1BKO に見られる神経系の異常

	致死性	中枢神経の 形態的異常	情動行動 異常	モノアミン性 伝達異常	Glu 性 伝達異常	GABA 性 伝達異常
Sy1AKO	—	—	+	+	—	—
Sy1BKO	+ ^a	+	+ ^{b,c}	—	+	+

+は異常があることを示す。

a ; 生後 2 週までに致死

b ; heterozygote mice の症状

c ; 二次的な障害と思われる

下に伴い情動行動異常や学習障害が増強してくる。このマウスでは痛覚過敏や聴覚過敏が認められ (Takasusuki et al., Eur.J.Neurosci. 2007), これも自閉性障害や WS でよく観察される症状である。これらのことから, 明らかな自閉性障害と sy1A 異常との関連は明確ではないが, 少なくとも WS の情動・学習の障害は sy1A 遺伝子の半接合体欠損に起因すると思われた。またマウス脳スライスをを用いた分泌実験や in vivo microdialysis 等により sy1AKO の中枢神経には 5HT, ドーパミン, ノルアドレナリン等の全てのモノアミン性神経系の分泌障害があることが示された。上記の KO の情動行動異常は向精神薬であるセロトニン選択的取り込み阻害剤等の効果から 5HT 性神経系の分泌障害に起因すると考えられた。一方, 海馬スライスをを用いた電気生理学的実験により長期増強の減弱が明らかとなり, その原因は主にドーパミン, ノルアドレナリンの分泌低下による adenylylase-cAMP-protein kinaseA 系の機能低下に起因することが示された (論文投稿中)。神経ペプチドに関しては視床下部からの CRH 分泌の低下が確かめられた。また副腎髄質クロマフィン細胞は発生学的には交感神経節後神経細胞にほぼ相当するが, 単離したクロマフィン細胞からのカテコラミン分泌をアンペロメトリー法により測定したところ分泌能の低下を認めた。これらの観察結果から, sy1A は従来信じられていたように全てのシナプス伝達の開口放出の必須因子であるというよりは, モノアミン性, 或いはペプチド性シナプス等の遅い神経伝達系を調節している因子である可能性が強く示唆された。

2. Syntaxin1B ノックアウトマウスの表現系

Sy1BKO には生下時より明らかに運動障害が認められ, 生後 2 週程で致死となる点で sy1AKO と対照的であった。形態学的には生下時の sy1BKO 脳内には海馬,

小脳の発達障害と神経細胞の脱落, 大脳皮質の層構造の乱れが観察された。培養系では sy1BKO 神経細胞の生存に脆弱性が認められたが, 正常マウスより得たグリア細胞のフィーダー上では正常に生存できるので, sy1BKO ではグリア細胞の何らかの機能不全が神経系の発達障害の一因である可能性がある。電子顕微鏡的観察からは小脳や海馬内の興奮性シナプス終末における docked vesicle 数の減少が見られている。培養神経細胞では興奮性, 抑制性シナプス両者の微小シナプス後電位の頻度が有意に低下していた。更に電気生理学的なシナプス機能の指標である paired pulse ratio に異常が認められ, 特に神経細胞の興奮頻度が増大しているときにシナプス伝達機能の障害が顕著に惹起されることが分かった (図 1)。生後 7 日目の海馬脳スライスを使った解析で CA 1 神経細胞におけるシナプスの応答性や paired pulse ratio に異常があることが示された。また heterozygote は生育するものの, 個体レベルではペンテトラゾール誘発性の痙攣傾向が増大していて脳内での GABA 性神経伝達システムにも異常があると考えられた。脳スライスをを用いて上位中枢からの制御を除いた系での分泌実験ではモノアミン類の分泌障害はみとめられなかった。しかし一般に生体の脳内モノアミン神経系は速いシナプス伝達系により機能調節を受けていることが知られている。従って脳内での速い神経伝達系の一次的な異常が, 遅いシナプス伝達系にも影響して二次的な分泌低下を来した結果, 両者の障害が複合的に高次神経機能に影響して個体に行動異常を誘起させることが推測される。実際, 個体レベルでの行動実験からは heterozygote には情動行動異常が認められ, とりわけ統合失調症の中間表現系として広く知られている prepulse inhibition 試験に異常があることから, 統合失調症のモデルマウスとして有用である可能性が示された。

3. HPC-1/syntaxin1A と syntaxin1B のシナプス伝達における機能分化

現時点で判明している sy1AKO 及び sy1BKO の神経系に見られる異常について概略を表 1 に記した。これらの結果から sy1A と sy1B の神経系における機能が同一ではなく、sy1A がモノアミン等の遅い神経伝達をするシナプスで働くのに対して、sy1B は主に Glu, GABA 等の速いシナプス伝達や神経系の発達に重要であることが明らかとなった。しかし sy1A と sy1B の作用の違いが、遅い神経伝達を仲介する LDCV, 或いは速い神経伝達で働く SSV の開口放出機序と直接に対応するか否かはまだ不明である。さらには sy1A と sy1B 間では他の SNARE 因子との結合性に違いがあるのか、それが如何にして速い、或いは遅いシナプス伝達の調節の差に関わるのかといった分子論的基盤については今後の検討が必要である。

List of publication

1. HPC-1/syntaxin1A と syntaxin1B の機能分化 赤川公朗 生体の科学 61(2010)528-529
2. HPC-1/syntaxin 1A gene knockout mice show abnormal behavior possibly related to a disruption in 5-HTergic systems. T. Fujiwara et al., Eur J. Neurosci., 32(2010)99-107
3. Dysfunction of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in STX1A KO mice. T. Fujiwara et al., J. Neuroendocrinology (in press)

講演記録

1. Tomonori Fujiwara, Takefumi Kofuji¹, Tatsuya Mishima, Masami Kanai-Azuma² and Kimio Akagawa(¹Kyorin Univ. Sch. Med., Radio Isotope Lab., Tokyo, Japan, ²Kyorin Univ. Sch. Med., Dept. Anatomy, Tokyo, Japan): HPC-1/STX1A and STX1B might have distinct roles in neuronal function. 第 87 回日本生理学会、盛岡、平成 22 年 5 月 19 - 21 日.

2. 櫻井拓也¹, 北館健太郎², 西岡浩², 若命浩二², 藤井創², 小笠原準悦¹, 木崎節子¹, 石橋義永¹, 藤原智徳, 赤川公朗, 中野法彦³, 斎藤大蔵⁴, 根本浩一郎⁵, 芳賀脩光⁶, 大野秀樹¹ (¹杏林大学・医学部・公衆衛生学, ²(株)アミノアップ化学, ³藍野再生医療研究所, ⁴防衛医科大学校, ⁵日立横浜病院, ⁶日本橋学館大学・リベラルアーツ学部・総合経営学科): 老化促進モデルマウスの認知機能障害に対して oligonol は運動と同様に予防効果を持つ. 第 18 回統合医療機能性食品国際会議, 札幌, 平成 22 年 7 月 24-25 日.
3. Tomonori Fujiwara, Masumi Sanada, Takefumi Kofuji¹, Tatsuya Mishima and Kimio Akagawa (¹Kyorin Univ. Sch. Med., Radio Isotope Lab., Tokyo, Japan): A study on the phenotype of syntaxin1B knockout mice. 第 53 回日本神経化学会 第 33 回日本神経科学会 合同大会, 神戸, 平成 22 年 9 月 2-4 日.
4. Tatsuya Mishima, Tomonori Fujiwara, Takefumi Kofuji¹ and Kimio Akagawa (¹Kyorin Univ. Sch. Med., Radio Isotope Lab., Tokyo, Japan): Impaired induction of long-term potentiation in HPC-1/syntaxin 1A knockout mice may be due to altered catecholaminergic system. 第 53 回日本神経化学会 第 33 回日本神経科学会 合同大会, 神戸, 平成 22 年 9 月 2-4 日.
5. Suga K, Saito A, Mishima T and Akagawa K : Up-regulation of Syntaxin5 protein expression under ER stress. 第 53 回日本神経化学会 第 33 回日本神経科学会 合同大会, 神戸, 平成 22 年 9 月 2-4 日.
6. 櫻井拓也¹, 北館健太郎², 藤井創², 小笠原準悦¹, 木崎節子¹, 石橋義永¹, 藤原智徳, 赤川公朗, 芳賀脩光³, 大野秀樹¹ (¹杏林大学・医学部・公衆衛生学, ²(株)アミノアップ化学, ³日本橋学館大学・リベラルアーツ学部・総合経営学科): 運動および oligonol の摂取は老化促進モデルマウスの認知機能障害を予防する. 第 81 回日本衛生学会学術総会, 東京, 平成 23 年 3 月 25-28 日.
7. Tomonori Fujiwara, Takefumi Kofuji¹, Tatsuya Mishima and Kimio Akagawa(¹Kyorin Univ. Sch. Med., Radio Isotope Lab., Tokyo, Japan): The genetic analysis of HPC-1/STX1A and STX1B revealed the distinctive functions in vivo. 第 88 回日本生理学会大会, 横浜, 平成 23 年 3 月 28-30 日.

個別化医療を目指した難治性疾患である 肺動脈性肺高血圧症の遺伝子解析

吉 野 秀 朗 佐 藤 徹 蒲 生 忍¹
片 岡 雅 晴 相 見 祐 輝¹ 岡 明²
小 野 正 恵²

杏林大学医学部内科学 (II)

¹ 杏林大学保健学部分子生物学

² 杏林大学医学部小児科学

A. 研究目的

近年、循環器の機能とその制御に関わる多様なチャネルや情報伝達系の解明とヒトゲノム情報の蓄積に伴い、長くその原因が不明であった循環器疾患の幾つかの発症に関わる遺伝的背景が明らかにされてきた。多様な循環器疾患の中で明らかな遺伝 (家族) 性を示す例は限られているが、その背景因子としての遺伝子についての情報を得ることは、診断を確定し治療を進め、予後管理の上で貴重な手掛かりとなる。また遺伝的な変異には人種差があることから日本人のデータを蓄積することが必須である。本研究では、近年その原因となる遺伝子変異に関する情報が蓄積されてきた生命予後不良の難治性疾患、肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary Arterial Hypertension: PAH) (図 1) に絞り、杏林大学医学部付属病院が PAH 治療の拠点病院である特性を生かし、遺伝子の変異を網羅的に検出するシステムを確立する。さらに、遺伝カウンセリング体制の確立も含め、その結果を治療と予後管理に応用し個別化医療の実現を目指すものである。

PAH は若年女性を中心に発症する予後不良の疾患である^(1,2)。近年、プロスタグランジン I₂ (PGI₂)、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ V 阻害薬等の薬剤が開発され、病気の進行を遅延させ予後が改善されつつあるが、依然として予後不良の難治性疾患である^(3,4,5)。近年 BMPR2, ALK1, ENG 等の遺伝子の変異が PAH の発症に関与すると報告されているが、日本人でのデータは乏しい。本研究では、これまでの代表者の PAH 遺伝子解析の経験と本学が東日本の PAH 治療の最大規模の拠点病院であることを基に、¹⁾

BMPR2, ALK1, ENG の PAH 関連遺伝子の部分欠失について主に MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法 (図 2) で解析する。²⁾ 三遺伝子の全エキソンと隣接領域、また欠失を起こした領域の塩基配列を決定し、SNPs を含めた日本人の遺伝子変異の種類と頻度を明らかにする。³⁾ 遺伝子変異、現在使用可能な複数の PAH 治療薬との反応性の関連性、発症に関わる外的要因について臨床データから精査し、分子病態に即した適切な治療薬の選択や生活習慣等の指針作成等を介し個別化医療の実現を目指す。

ヒト難治性疾患の遺伝子解析では、変異の検出に多くの方法が考案されてきた。しかし、kbp 単位の欠失については、その存在と検出法は、従来あまり考慮されておらず、見逃されていた可能性が高い。PAH では BMPR2 のエキソン欠失が報告されて以来、～ 10kbps の部分欠失は優性遺伝し成人期に発症する疾患の原因として近年注目されている。この規模の欠失の検出に有効なのが MLPA 法であるが、未だにこれを用いた解析例は多くない。

遺伝子解析は多くの患者からのデータを得ることにより一段と有効となる。日本人に特有の遺伝子変異の同定と変異からの発症機序の解明、特に PAH では遺伝子変異と治療薬の選択について未だに検討されておらず、世界に先駆けた知見を得られる可能性がある。さらに、集学的に臨床データとの関連性を検討し解析することで今後の治療選択肢の検討と改善も含め、患者の QOL に大きく貢献できる個別化医療の実現に向け非常に意義があると思われる。

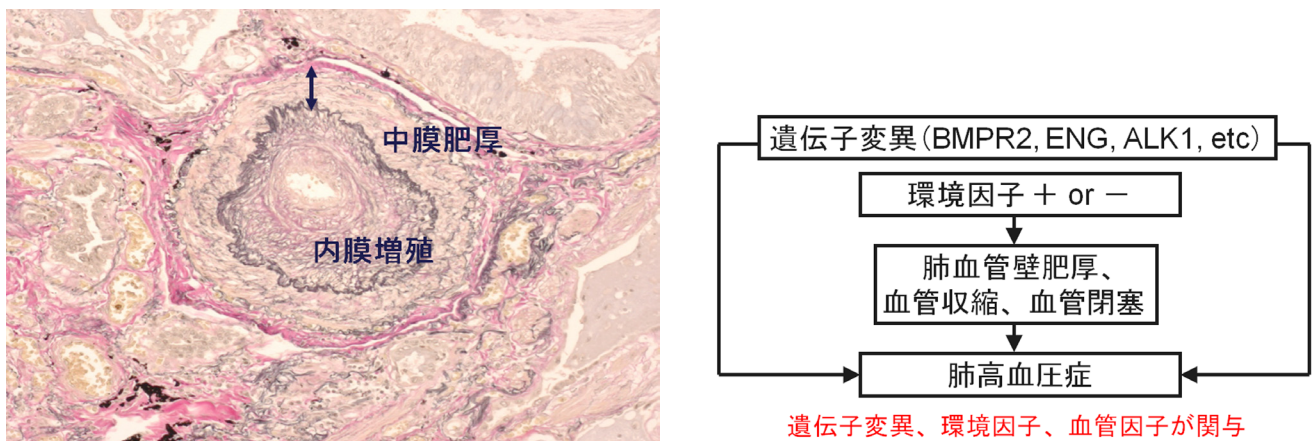


図1：肺動脈性肺高血圧 (PAH) の概要

左：PAHの肺動脈病理所見を示す。肺動脈内膜増殖と中膜肥厚を認め、血管内腔が著明に狭窄した plexiform lesion を形成することで、肺血管抵抗の上昇をきたし、肺動脈圧が上昇する。

右：PAHの発症機序を図示する。PAHは、BMPR2, ENG, ALK1等の既知の遺伝子変異のみでなく、未発見の遺伝子変異、及び、環境因子等の外的要因、血管収縮性の変化や血管閉塞を転機とした血管因子等の要因が複雑に絡み合うことにより発症すると予想される。

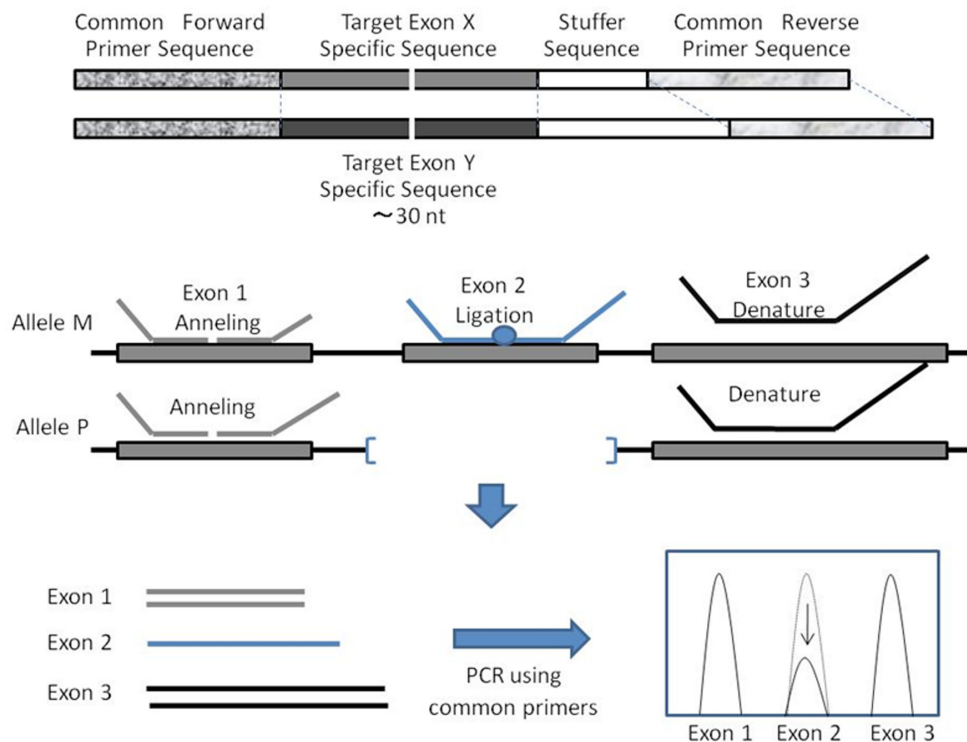


図2：MLPA法の概略

上段：各エクソンに対する特異的なプローブの構造

中段：各エクソンとプローブの結合

下段：プローブの増幅とフラグメント解析

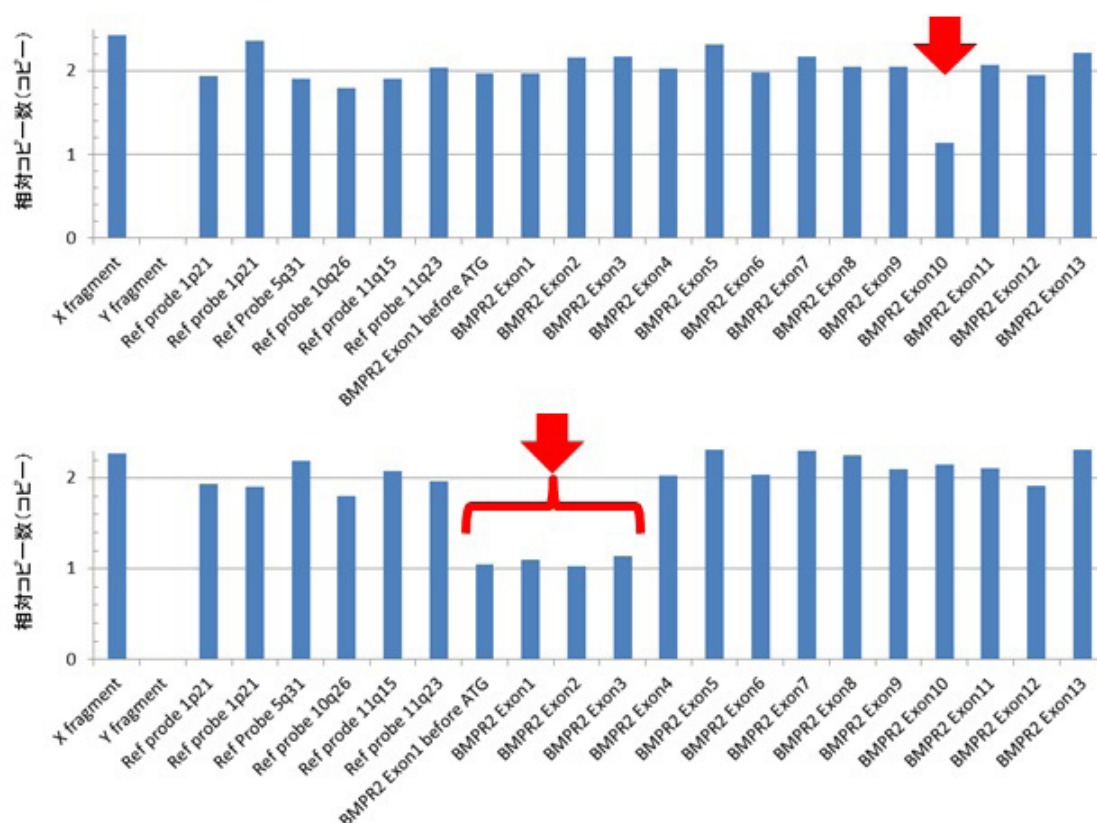


図3：MLPA 法による BMPR2 遺伝子のエクソン欠失

MLPA 法による BMPR2 遺伝子解析で変異を認めた結果の例を図示する。上段の患者では、エクソン 10 が欠失しており、下段の患者では少なくともエクソン 1 からエクソン 3 が欠失している。

B. 研究方法

① PAH 発症関連遺伝子解析系の確立

遺伝子の部分欠失の解析：PAH との関連が既に明らかにされている BMPR2, ENG, ALK1 の三遺伝子について MLPA 法で～10kbps の部分欠失の有無を確認する。

②点突然変異の解析：BMPR2, ENG, ALK1 の三遺伝子について、各エクソンと隣接領域を PCR 増幅し、微量の塩基配列決定法により全エクソンと隣接領域の塩基配列を解析する。この解析により SNPs を含め日本人の遺伝子変異の種類と頻度を明らかにする。

③遺伝カウンセリング体制を整えつつ、同意を得た患者の遺伝子解析を上記のシステムで実行し、日本での遺伝子変異の実態について明らかにする。本研究は遺伝子解析であり、倫理審査を要すると考えられる。本研究により得られる結果を患者の予後に有効にフィードバックするために遺伝カウンセリングは重要な役割を果たす。従って、本学の遺伝外来を担当する小児科との連携の元に遺伝カウンセリング体制を確立する。また本研究の成果をさらに有効にするため、データベース化し世界的なネットワークの確立を準備する。

④さらに治療薬応答性や発症に関わる外的要因について様々な臨床データを併せて検討し、個別化医療の実現を目指し治療薬選択や生活習慣等の指針作成等を介して患

者の QOL 向上に貢献する。

C. 研究結果

平成 22 年度は、本研究を遂行するための研究室を確保し、遺伝子解析等に必要な器材等を整備した。また、患者からの検体採取にあたり、杏林大学倫理委員会での承認を得た。外来来院患者および入院患者へ、十分な説明の後に同意書を取得し、遺伝子解析に必要な検体採取（採血）と DNA 抽出を実施した。なお、突然変異検出のみでなく、MLPA 法でも遺伝子解析を行い、エクソン欠失まで含めた幅広い遺伝子解析をできる体制を構築した。

平成 22 年度中に関連疾患を含めて 30 名分の検体採取を実施し遺伝子解析を施行した。その結果、特発性または家族性肺動脈性肺高血圧症患者 16 名において、BMPR2 遺伝子に関して、2 名に同じナンセンス変異（Exon3）を検出した。この変異は Sztrymf *et al* の報告に記載されている⁽⁶⁾。また、エクソン 1-3 の欠失 1 名とエクソン 10 の欠失 1 名を認めた（図 3）。後者の変異は Sztrymf *et al* の報告、及び Aldred *et al* の報告に記載されているが切断点が一致するかは不明である^(6,7)。前者に関しては類似の例は報告されていない。ENG 遺伝子に関しては、1 名に未だに報告が無いミスセンス変異を認めたものの、エクソン欠失はいずれも認めなかった。

ALK-1 遺伝子では遺伝子の機能を大きく損なうと予想される変異, また欠失のいずれも検出されなかった。

膠原病性肺高血圧症や慢性肺血栓塞栓症等の 2 次性肺高血圧症の患者 14 名には BMPR2, ENG, ALK-1 遺伝子の機能を大きく損なうと予想される変異, また欠失のいずれも検出されなかった。

D. 考察

本研究は PAH の日本人患者について, 原因遺伝子 BMPR2 の全エクソンと MLPA 法によって欠失を詳細に検討した初めての研究である。近年, 突然変異に加えて幾つかのエクソンが欠失する変異が, 多くの遺伝性疾患の原因となることが注目されている。我々の解析でも諸外国の報告と同じく BMPR2 遺伝子内に 10kbp 単位の欠失を見出した。この種の変異は従来のシーケンス解析では検出しえないもので, 従来リアルタイム定量 PCR 法での解析が主流であった。本研究で用いた MLPA 法は市販されている解析キットを用いるかぎり, 通常の DNA シーケンサーが使用できる環境と技術で対応できる高精度の解析法である。また, 欠失の検出やスクリーニングにはマイクロアレー法や CGH (comparative genome hybridization) 法が考案されているが, 技術的にまた費用的に多数の臨床検体の解析には不適當である。従来の報告では BMPR2 遺伝子の変異は, 突然変異とエクソン欠失を合わせて PAH 患者中の約 3 割程度と言われている^(8,9)。今回の我々の解析はまだ少数を解析したに留まるが, BMPR2 の変異に関してはその値を大きく越える可能性は低い。すなわち, PAH の発症には未だに解明されていない遺伝的な要因があると推定できる。新規の原因遺伝子の探索も重要な課題であり, TGF- β シグナル伝達系の属する幾つかの遺伝子が候補として検索されているが広く追認されるには至っていない⁽¹⁰⁾。新規の原因遺伝子変異に関して, 数種類の遺伝子候補を挙げ, 患者検体における遺伝子変異と欠失の有無を検索していく予定である。

また, 本解析で ENG に見られたミスセンス変異を含め, 幾つかの従来報告されていないミスセンス変異が検出されている。また, エクソン隣接領域の変異を含め多くの現時点でデータベースに収録されていない塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) が検出されている。ミスセンス変異を含めた多型の種類と頻度には人種差があるが, 現存のデータベースは必ずしも日本人の多型特性を抽出しうるものではない。従って, 本解析で見出したミスセンス変異等がどのような病的意義を持つのか, 今後, 関連疾患を含めて検体採取する患者数をさ

らに増やし解析を進める。また, 正常健常者集団での遺伝子解析を施行し, 当院患者において認められた遺伝子変異が病的意義を持つものか否かについての検討を行っていく。蓄積した遺伝子解析結果をもとに, 臨床データとの関連性を解析していく予定である。

E. 参考文献

1. Kataoka M, Nagaya N, Satoh T, Itoh T, Murakami S, Iwase T, Miyahara Y, Kyotani S, Sakai Y, Kangawa K, Ogawa S. A long-acting prostacyclin agonist with thromboxane inhibitory activity for pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 172 : 1575-1580, 2005
2. Satoh T, Kyotani S, Okano Y, Nakanishi N, Kunieda T. Descriptive patterns of severe chronic pulmonary hypertension by chest radiography. *Respiratory Medicine* 99 : 329-336, 2005
3. Kataoka M, Satoh T, Manabe T, Anzai T, Yoshikawa T, Mitamura H, Ogawa S. Oral sildenafil improves primary pulmonary hypertension refractory to epoprostenol. *Circ J* 69 : 461-465, 2005
4. Kataoka M, Satoh T, Manabe T, Anzai T, Yoshikawa T, Mitamura H, Ogawa S. Marked improvement with sildenafil in a patient with primary pulmonary hypertension unresponsive to epoprostenol. *Intern Med* 43 : 945-950, 2004
5. Sasayama S, Satoh T, Izumi T, Yoshida S, Kyotani S, Tahara N. Long-term trial of bosentan monotherapy for pulmonary arterial hypertension in Japanese patients. *Current Medical Research and Opinion* 23 : 395-400, 2007
6. Sztrymf B, Coulet F, Girerd B, Yaici A, Jais X, Sitbon O, Montani D, Souza R, Simonneau G, Soubrier F, Humbert M. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 177 : 1377-1383, 2008
7. Aldred MA, Vijayakrishnan J, James V, Soubrier F, Gomez-Sanchez MA, Martensson G, Galie N, Manes A, Corris P, Simonneau G, Humbert M, Morrell NW, Trembath RC. BMPR2 gene rearrangements account for a significant proportion of mutations in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat* 27:212-3, 2006
8. Girerd B, Montani D, Coulet F, Sztrymf B, Yaici A, Jais X, Tregouet D, Reis A, Drouin-Garraud V, Fraisse A, Sitbon O, O'Callaghan DS, Simonneau G, Soubrier F, Humbert M. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an ACVRL1 (ALK1) mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 181:851-61.2010
9. Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, Geraci MW, Hanaoka M, Loyd JE, Newman JH, Phillips JA 3rd, Soubrier F, Trembath RC, Chung WK. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54:S32-42. 2009
10. Shintani M, Yagi H, Nakayama T, Saji T, Matsuoka R. A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. *Med Genet* 46(5):331-337. 2009

損傷歯髄細胞の膜修復機構－象牙芽細胞への分化誘導への検討－

天 野 カ オ リ

杏林大学医学部解剖学（Ⅰ）

研究成果概要：

近年、移植再生領域におけるめざましい医科学研究成果の発展に伴い、口腔医療においても研究の進化と技術・材料の向上と共に再植、インプラントの需要普及率が年々増加傾向にある。一般的に半永久的治療法として認識されているインプラントを含めた移植・再植治療は根本的には損失歯牙に対する治療手段であり、すべての症例に対応する優先的第一選択とはいえず、従来のウ蝕や歯周疾患に対する確実な治療法開発もさらなる発展向上をする必要性があり、今後の口腔医療における重要な課題となることは明らかである。

歯髄が持つ歯牙に対する多大な役割を考慮すると、歯髄は可能な限り保存することを優先とした治療を行うことが最も理想的であるが、実際の治療では今なお抜髄処置が一般的である。すなわち損傷を負っていても、治療次第では十分生存する可能性を持つ歯髄組織を抜髄しているのが現状である。そこで本研究の目的である損傷後の歯髄細胞の修復過程を細胞膜レベルで明らかにすることは、これまでの歯髄に対する治療法とは全く異なる歯髄再生治療の起点として極めて重要な課題といえる。

研究目的：

機械的または物理的な損傷を受けた細胞において細胞膜の修復ならびに治癒過程は、細胞組織の生物学的再生能を解明する上で極めて重要な事項であるといえる。

本研究の目的は日常的な環境下において、歯科治療時の機械的な刺激や軽度外傷、薬品による化学的ストレスを受けて損傷を負った歯髄細胞が死滅せず生き延びて治癒する過程について、特に早期における修復機構について明らかにすることである。さらには象牙芽細胞への分化誘導能を解明すると共に、分化誘導を促進する刺激因

子を追及することにより、これからの口腔医療ならびに歯髄再生治療の発展を目的とする。

研究方法：

高速タービンによる切削後の歯髄細胞損傷

試料には 12 週齢 Wistar 系ラットを使用し、深麻酔下で下顎中切歯歯髄歯頸部付近を注水下、高速歯科用タービンにて点状露髄（歯髄が露出する程度の小径の損傷）程度の損傷を与えた（非損傷対照群は同ラット反対側下顎中切歯とする）。損傷後、1 時間、3 時間、24 時間後にそれぞれ 4 % パラホルムアルデヒド/PBS 溶液にて灌流固定をおこなった。下顎中切歯は下顎骨体と周囲組織と共に一塊で摘出し、4℃/10%/EDTA 溶液にて 6 週間脱灰したのち、凍結試料として 10μ 切片を作成した。

損傷細胞の染色には C-Fos 抗体（2 % bovine serum albumin 1:100）を使用し蛍光顕微鏡（キーエンス BZ9000）下にて観察した。また一部試料において損傷歯髄内の神経線維の状態を観察するために神経特異タンパクである protein gene product 9.5 (PGP9.5, 1:200) を使用し、染色を行った。

結果：

窩洞形成後 1 時間の損傷象牙質直下の歯髄内において C-Fos 抗体に濃染する細胞群が明瞭に認められた。最表層の細胞群は広範囲に破壊されていたが、その下層には損傷を受け、生存する細胞群の存在が認められた。同試料の対照群歯髄内において C-Fos の反応は認められなかった。

また損傷後 1 時間の歯髄内において PGP9.5 の反応は認められなかったが、対して、非損傷歯髄内には PGP9.5 の反応が認められ、神経線維の存在が確認された。

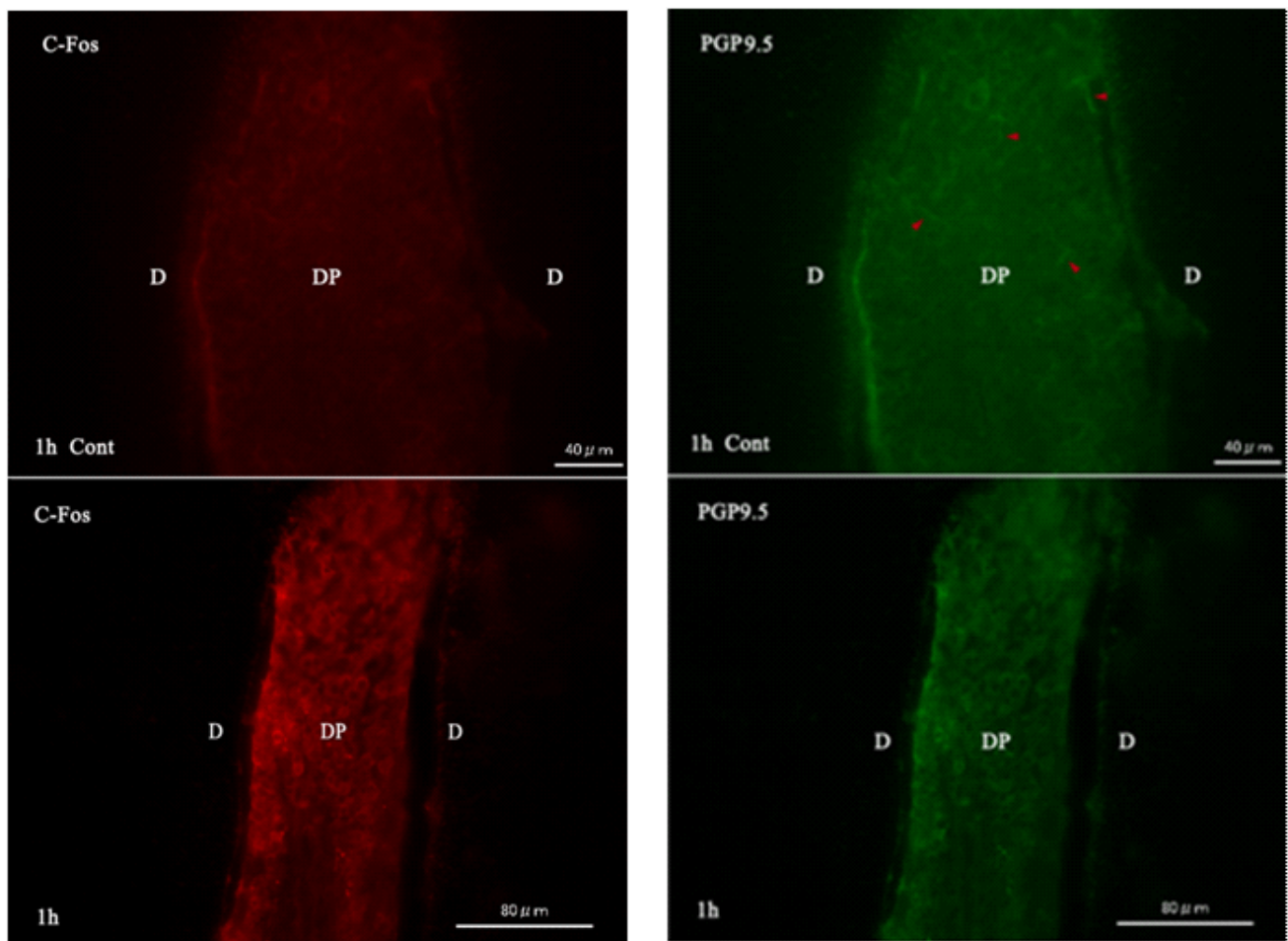


Fig.1 損傷後 1 時間の歯髄内部 C-Fos と PGP9.5 の反応 (矢頭：神経線維)

窩洞形成後 3 時間の象牙質直下の歯髄内最表層部位において C-fos に濃染する反応性または修復性と考えられる細胞の存在が認められた。また同試料損傷歯髄内において PGP9.5 に反応する神経線維の存在が同様に認められた。

考察：

口腔内は日常的に生理的・機械的にあらゆる刺激や損傷を受ける活動的な環境下であり、口腔内組織は頻繁に損傷と修復を繰り返している。例えばブラッシングは歯牙や歯周組織の清掃ならびに口腔内環境を整える目的があるが、加えて適度な刺激による歯周組織の活性強化へもつながることが知られている。このブラッシングのような日常的な機械的刺激による組織の損傷レベルを知るために、10 週齢ラット歯周組織（歯肉／舌筋）にブラッシングを行い、損傷後に死滅せず生存し続ける細胞群の存在を確認した (Amano, et al.)。今回 12 週齢のラッ

トを使用し、高速タービンにおいて直接歯牙組織に損傷を与え歯髄細胞の観察を行った結果、損傷後 1 時間ならびに 3 時間後に C-Fos に反応する細胞群の存在が認められた。また、PGP9.5 は損傷後 1 時間の損傷歯髄内において反応が認められなかったが、損傷後 3 時間の歯髄内では認められた。これらの結果より、歯髄細胞は損傷後 1 時間から 3 時間の間には修復が開始することが示唆された。

Amano K, Miyake K, Borke J.L, McNeil P.L.; Breaking biological barriers with a toothbrush. Journal of Dental research 86:769-774,2007

研究報告

損傷歯髄細胞の膜修復機構—象牙芽細胞への分化誘導への検討—

杏林大学医学部研究奨励賞中間報告会

杏林医学会総会 2010 年 11 月 20 日 三鷹

新規尿酸トランスポーター URATv1 の組織発現と ソーティングメカニズムの解明

木 村 徹

杏林大学医学部薬理学

背景と目的

尿酸は、ヒトにおいてアデノシンやグアノシンといったプリン体の最終代謝産物である。この尿酸の代謝経路はヒトおよびその近縁の類人猿に特有のものであり、他の種においては、尿酸は尿酸酸化酵素（ユリケース）によって開裂を受け代謝される。したがって、ヒトでは血清尿酸値が高値を示し、尿酸の排泄低下や産生亢進によって高尿酸血症を発症する。よって、生体内における尿酸の排泄・再吸収を行うシステムの機能解析が重要である。近年我々は、グルコーストランスポーターに属する GLUT9 (SLC2A9) が、尿酸に対して高い輸送活性を持つ排泄型の尿酸トランスポーターであり、近位尿細管の血管側での尿酸の排泄路として働いていることを示した。GLUT9 の輸送活性は電位依存性であったことから、我々は URATv1 と改名した。

URATv1 には以前からスプライスバリエントが存在することが報告されている。この2つのスプライスバリエントは、開始コドンの位置が異なることによって作られる N 末端が短い 511 アミノ酸 (URATv1-S とする) または N 末端が長い 540 アミノ酸 (URATv1-L とする) の 2 種類の URATv1 である。これら両者の C 末端 490 アミノ酸残基は共通しているが、URATv1-S と URATv1-L の N 末端のそれぞれ 21, 50 アミノ酸残基異なっている。そこで、2つのスプライスバリエントをそれぞれ認識する抗体を作製し、ヒト組織における局在を明らかにし、極性細胞内でのソーティングメカニズムの解明を目的として研究を行った。

方法

(1) ヒト組織における URATv1 の発現部位の検討

URATv1-S と URATv1-L との間で異なる N 末端を GST と融合する形で精製した。これをウサギに免疫す

ることによって、URATv1-S と URATv1-L をそれぞれ認識する抗体を得た。この抗体を用いてヒト組織切片の免疫染色を行い、それぞれの発現部位の検討を行った。

(2) URATv1 内に存在する極性輸送ターゲッティングシグナル部位の解析

腎臓由来細胞である MDCK 細胞に GFP を融合させた URATv1-S または URATv1-L を発現させた。また極性発現に重要な部位を決定するために、N 末端から数残基ずつを欠失させた変異体を作製し、MDCK 細胞に発現させて細胞内極性輸送に関わるアミノ酸配列部位の決定を行った。

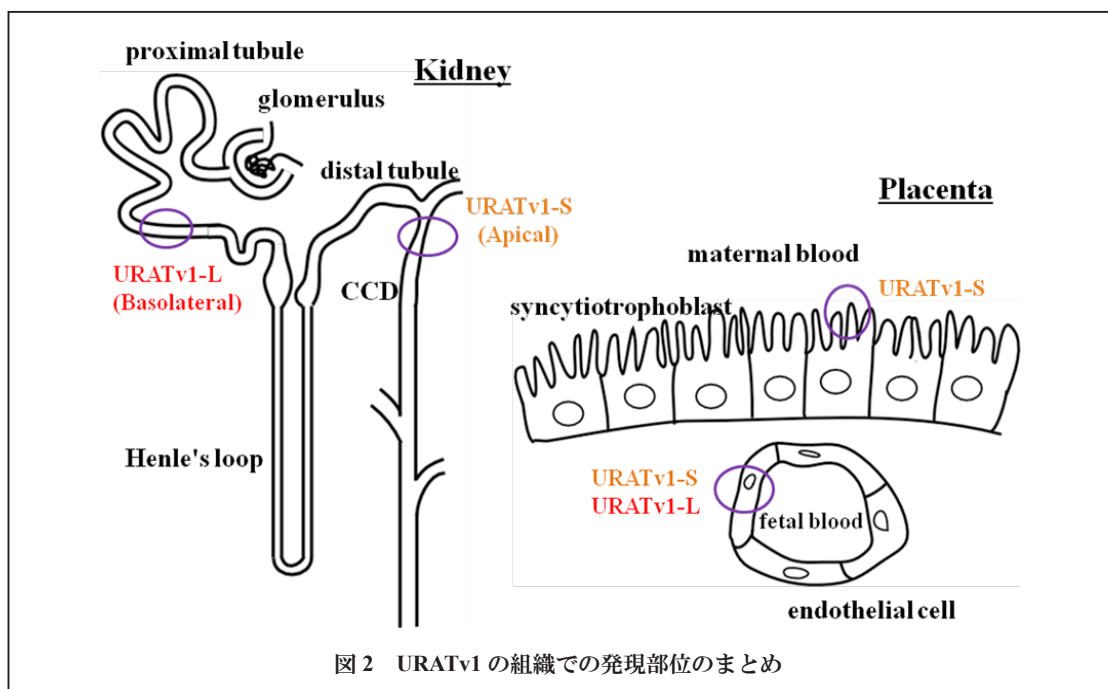
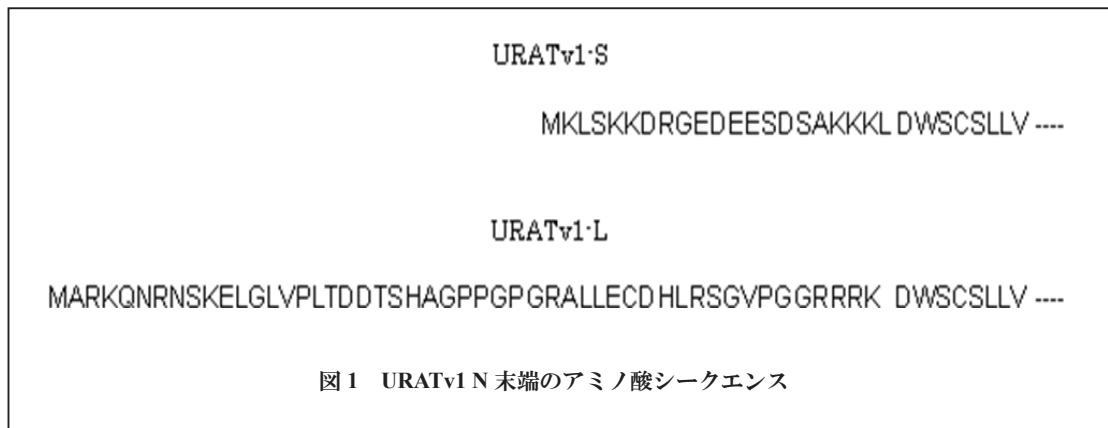
結果

(1) URATv1 の発現部位の検討

図 1 に URATv1 の N 末端領域のアミノ酸配列を示した。URATv1-S と URATv1-L の N 末端はそれぞれ 21, 50 アミノ酸残基異なっており、URATv1-L の配列中には細胞内極性発現に重要であると思われる di-leucine モチーフが存在する。この異なるアミノ酸配列を認識する抗体を作成し、ヒト組織切片の蛍光染色を行った。URATv1-S と URATv1-L の両方の RNA が発現している組織は、腎臓と胎盤のみと報告されている。そこで、ヒト腎臓および胎盤の組織染色を行った。その結果、腎臓において URATv1-S は皮質集合管の管腔側に発現が見られる一方、URATv1-L は近位尿細管の血管側に局在していた。また胎盤では、URATv1-S は合胞体栄養膜細胞の刷子縁膜側（母体血側）と血管内皮細胞に発現が見られるが、URATv1-L は血管内皮細胞および結合組織に発現していた。このように URATv1-S と URATv1-L では、発現している部位も、管腔側／血管側というその極性発現も全く異なっていた（図 2）。

(2) ターゲッティングシグナル部位の解析

GFP を融合させた URATv1-S と URATv1-L をそれぞ



れ MDCK 細胞に導入し、細胞内局在の観察を行った。URATv1-S は管腔側と基底側の両方に発現が見られたが、URATv1-L では、基底側のみに発現が見られた。したがって、URATv1-S と URATv1-L との間で異なっているアミノ酸配列内に、極性輸送に関わるターゲティングシグナルが存在すると思われた。そこで、このシグナル部位を決定するために、N 末端から数残基ずつを欠失させた変異体を作製し、MDCK 細胞に発現させてその細胞内極性輸送に関わるアミノ酸配列部位の同定を行った。その結果、URATv1-S では、N 末端側のアミノ酸 16 残基を欠失させても、野生型と同様に管腔側を基底側の両方に発現が見られた。URATv1-L と異なる部位、つまり 20 残基を欠失させると (D5S)、タンパク質として不安定になるためか、発現がほとんど見られなかった。URATv1-L では、N 末端から 25 残基欠失させても、野生型の URATv1-L と同様に基底膜に

のみ発現が見られた。これに対し、N 末端から 30 残基を欠失させると、野生型と異なり管腔側と基底側の両方に発現が見られるようになった。これらの結果から、URATv1-L の N 末端の 26 から 30 番目の間に極性発現に重要な部位が存在することが考えられた。そこで、この 26 から 30 番目のアミノ酸をアラニンに置換した変異体に関して検討を行った。しかしながら、この変異体は野生型の URATv1-L と同様に基底膜のみに発現が見られた。また、URATv1-L の N 末端領域には細胞内の極性発現に重要であるとされる di-leucine モチーフが存在するため、この部位のアラニン変異体に関しても検討を行った。しかしながら、この変異体も野生型の URATv1-L と同様に基底膜のみに発現が見られた。

以上の結果から、URATv1-L の細胞内トラフィックには N 末端領域が重要であるが、そのトラフィックに関与する領域が複数存在することが示唆された。

List of publications

Functional Analysis of Human Sodium-Phosphate Transporter 4 (NPT4/SLC17A3) Polymorphisms.

Jutabha P, Anzai N, Kimura T, Taniguchi A, Urano W, Yamanaka H, Endou H, Sakurai H.

J Pharmacol Sci. 2011, 115 : 249-253.

新規有機酸トランスポーター OAT10 の消化管での発現

木村 徹¹⁾, 安西尚彦¹⁾, Jutabha Promsuk¹⁾, Sirirat Amonpatumrat¹⁾, 鈴木裕一²⁾

消化と吸収 2010, 33 : 376-379

Human sodium-phosphate transporter 4 (hNPT4/SLC17A3) as a common renal secretory pathway for drugs and urate.

Jutabha P, Anzai N, Kitamura K, Taniguchi A, Kaneko S, Yan K, Yamada H, Shimada H, Kimura T, Katada T, Fukutomi T, Tomita K, Urano W, Yamanaka H, Seki G, Fujita T, Moriyama Y, Yamada A, Uchida S, Wempe MF, Endou H, Sakurai H.

J Biol Chem. 2010, 285 : 35123-32.

尿酸トランスポーター URAT1 トランスジェニックマウスにおける尿酸の体内動態

塚田愛, 木村徹, Promsuk Jutabha, 安西尚彦, 市田公美, 櫻井裕之

痛風と核酸代謝 34 : 171-178 2010

講演記録

2011.2.19

14th International Symposium on Purine and Pyrimidine

Metabolism in Man (PP11)

Elucidation of urate transport mechanism by analysis of renal urate transporters' transgenic mice.

Toru Kimura, Ai Tsukada, Sirirat Amonpatumrat, Toshiyuki Fukutomi, Promsuk Jutabha, Thanapol Thammaphapip, Eun Ji Lee, Kimiyoshi Ichida, Naohiko Anzai, Hiroyuki Sakurai

2011.2.17

第44回日本痛風・核酸代謝学会総会

尿酸トランスポーター URATv1/GLUT9 の組織発現と極性細胞におけるソーティングの解析

木村徹, 安西尚彦, 櫻井裕之

2010.12.13

50th The American Society for Cell Biology Annual Meeting

Isoform specific tissue distribution of URATv1/GLUT9 and their trafficking in the polarized cells.

Toru Kimura, Naohiko Anzai, Hiroyuki Sakurai

2010.7.10

第5回トランスポーター研究会年会

尿酸輸送機構の解明を目的とした尿酸トランスポーター過剰発現マウスの解析

木村徹, 塚田愛, Sirirat Amonpatumrat, 福富俊之, Promsuk Jutabha, 金井好克, 市田公美, 河原克雅, 安西尚彦, 櫻井裕之

2010.6.16

第53回日本腎臓学会年会

尿酸輸送体過剰発現マウスを用いた尿酸輸送機構の解析

木村徹, 塚田愛, Sirirat Amonpatumrat, 福富俊之, Promsuk Jutabha, 金井好克, 市田公美, 河原克雅, 安西尚彦, 櫻井裕之

長期シナプス可塑性に対するシンタキシン 1A の新たな生理機能の解明

三 嶋 竜 弥

杏林大学医学部細胞生理学

syntaxin 1A は中枢神経系全域に発現する膜タンパク質で、神経伝達物質の開口放出や形質膜上のニューロモジュレーター輸送体の活性や局在の調節に関与していることが知られている。しかし、これまで分子レベルで調べられてきた syntaxin 1A の生理的機能がシナプス可塑性や記憶・学習等の高次機能に対してどのように機能しているのかは不明である。これまで我々は syntaxin 1A のノックアウト (KO) マウスを作成し、syntaxin 1A の機能解析を行ってきた。単一シナプスでの神経伝達物質放出機構や海馬スライスにおけるシナプス可塑性について調べたところ、基本的な興奮性・抑制性シナプス伝達機能に異常は見られなかったが、CA1 領域における長期増強 (LTP) の振幅の有意な低下が見られた (図 1)。また行動解析では恐怖条件付け学習において記憶の固定、消去過程に異常が見られた。さらに線条体や視床下部でモノアミン放出量が減少していた。これらの結果から、syntaxin 1A はシナプス小胞の開口放出に関与するが、必須ではないことが明らかとなった。しかし一方で、KO マウスにモノアミン放出に異常が見られたことから syntaxin 1A が有芯小胞からのモノアミン放出を介してシナプスの可塑的变化に関与している可能性が示唆された。またこれまでに神経の可塑的变化にモノアミンを含む神経調節因子が深く関与しているという報告がいくつもあり、syntaxin 1A KO マウスにみられる海馬での LTP 異常と脳内モノアミンとの関係を調べることにした。そこで本研究では、海馬急性スライス標本を用いて KO マウスの LTP 異常に対するモノアミンの影響を解析した。

まず最初に KO マウスと野生型マウスの海馬におけるモノアミン含有量と分泌量を計測したところ、KO マウスのセロトニンの含有量に有意な増加がみられたがノルアドレナリンとドーパミンの含有量に差は見られな

った。また、各モノアミンの基礎分泌量には差は見られなかったが、KO マウスでは KCl 刺激時のノルアドレナリンとドーパミンの放出量が有意に減少していた。そこで、LTP 誘発時のカテコールアミン分泌量の減少が LTP 異常の原因となっている可能性を検討した。LTP 誘発刺激の前にカテコールアミンを投与し、LTP 異常に対する影響をみたところ、ノルアドレナリン投与によって KO マウスの LTP 異常が回復することを確認した (図 2)。ドーパミン投与でも同様に LTP 異常が野生型マウスと同程度に回復した。この回復効果はノルアドレナリンの β アドレナリン受容体のアゴニストやドーパミンの D1/D5 受容体のアゴニストでも再現できた。 β アドレナリン受容体と D1/D5 受容体はどちらも G タンパク質の G_{us} サブユニットを介して cAMP/PKA 情報伝達系を活性化するため、syntaxin 1A KO マウスではカテコールアミン放出量の低下により cAMP/PKA 情報伝達系の機能低下が起これ、LTP 異常がおこっていることが示唆される。さらに LTP 誘発刺激の前にフォルスコリンを投与し cAMP/PKA 情報伝達系を活性化することによっても KO マウスの LTP 異常が回復することを確認した。LTP の長期的な発現には PKA の活性化が必須であることは以前から知られており、cAMP/PKA 情報伝達系の機能低下と LTP 異常との関連が示唆される。

一方、野生型マウスではカテコールアミン投与によって LTP の振幅に変化は見られなかった。そこで、野生型マウスにおいて LTP 誘発時のカテコールアミンの必要性を検証するために β アドレナリン受容体と D1/D5 受容体の機能阻害を行ったところ、各受容体を単独で機能阻害しても LTP に変化は見られなかった。次にカテコールアミンの合成を薬理的に阻害し、ノルアドレナリンとドーパミンの効果を同時に排除したところ、LTP の

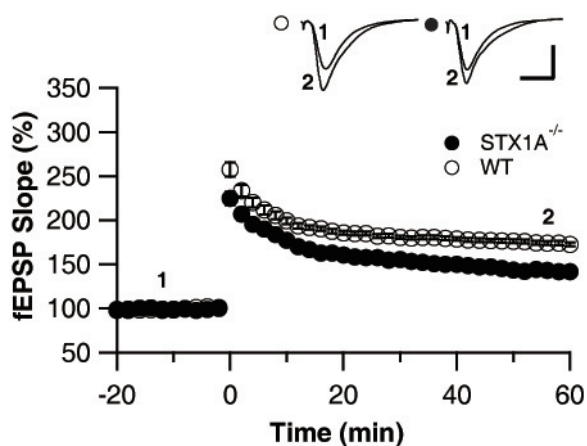


図1 Schaffer 側枝-CA1 錐体細胞間シナプスでの LTP。野生型 (WT) に対してノックアウト (STX1A^{-/-}) マウスの LTP の振幅が有意に減少している。0 分のところで LTP の誘発刺激を与えている。

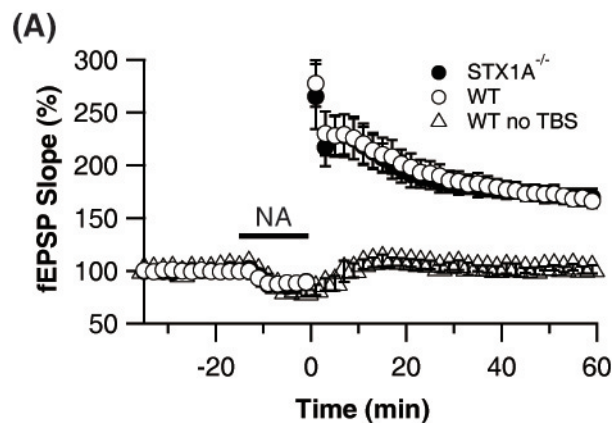


図2 LTP 誘発刺激の前にノルアドレナリン (NA) を投与すると LTP 異常に回復が見られた。

振幅の有意な低下が見られた。さらにこの状態の海馬スライスにノルアドレナリンもしくはドーパミンを投与したところ、カテコールアミン合成阻害による LTP 異常が回復することを確認した。この結果から、LTP の正常発現には LTP 誘導時に少なくともノルアドレナリンとドーパミンのどちらか一方が機能していることが必要であることがわかった。

以上の結果から、syntaxin 1A KO マウスはシナプス小胞による神経伝達物質放出は正常であるが、有芯小胞によるカテコールアミン放出に異常が見られることがわかった。この放出異常により LTP 誘発時にシナプス部位での cAMP/PKA 情報伝達系の機能低下が起こり、LTP 異常を引き起こすことが強く示唆された。今後の課題として、syntaxin 1A の欠損により有芯小胞の開口放出にのみ異常が見られる原因を解明する必要があると考えられる。

List of publications

1. Tanaka K, Iijima T, Mishima T, Suga K, Akagawa K, Iwao Y. Ca(2+) Buffering Capacity of Mitochondria After Oxygen-Glucose Deprivation in Hippocampal Neurons. *Neurochem Res.* 2009;34(2):221-226
2. Iijima T, Tanaka K, Matsubara S, Kawakami H, Mishima T, Suga K, Akagawa K, Iwao Y. Calcium loading capacity and morphological changes in mitochondria in an ischemic preconditioned model. *Neurosci Lett.* 2008;448(3):268-72.

講演記録

1. HPC-1/syntaxin 1A ノックアウトマウスの LTP 異常におけるカテコールアミン系の関与 三嶋竜弥, 藤原智則, 小藤剛史, 赤川公朗 第 33 回日本神経科学大会, 神戸, 平成 22 年 9 月 2-4 日
2. HPC-1/syntaxin 1A ノックアウトマウスの LTP 異常における cAMP 情報伝達系の関与 三嶋竜弥, 藤原智則, 小藤剛史, 赤川公朗 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋, 平成 21 年 9 月 16-18 日

マイクロアレイを用いたベーチェット病ぶどう膜網膜炎に対する 抗 TNF- α 抗体療法の作用機序の解明

渡 邊 交 世

杏林大学医学部眼科学

目的：失明率の高い難治性ぶどう膜炎として知られるベーチェット病網膜ぶどう膜炎に対して、2007 年 1 月より生物学的製剤である抗 TNF- α 抗体 (インフリキシマブ) が保険適応となり、その有効性が報告されている。その一方で、抗 TNF- α 抗体療法の作用メカニズムについては不明な点が多い。今回、我々はベーチェット病ぶどう膜網膜炎における抗 TNF- α 抗体療法の作用機序を明らかにするため、マイクロアレイの手法を用いてインフリキシマブ (IFX) 治療前後の末梢血単核球における遺伝子発現の変動について検討を行った。

方法：ベーチェット病患者 (4 例：男性 1 例、女性 3 例、21-64 歳) から IFX 投与開始前と投与開始 22 週間後に末梢血 20ml を採取。比重遠心法にて単核球を分離後、total RNA を抽出した。

吸光度を測定し、RNA の収量を確認後 CodeLink human whole genome bioarray にて治療前後の末梢血単核球における遺伝子発現量を比較した。また症例間で特定の発現パターンを有する遺伝子群を同定するためにクラスタリング解析を行った。さらにマイクロアレイで得た遺伝子発現量の確認をするために選択した遺伝子について定量 PCR を施行した。

結果：4 例中 3 例 (症例 1, 3, 4) で IFX 治療前に比べ治療後は眼炎症発作回数が減少した。IFX 治療開始後に 2 倍以上の発現上昇がみられた遺伝子数は症例 1:138 個、症例 2:188 個、症例 3:271 個、症例 4:1717 個であった。一方で、治療前に比較して 1/2 以下の発現低下がみられた遺伝子数は症例 1:267 個、症例 2:456 個、症例 3:356 個、症例 4:456 個であった。

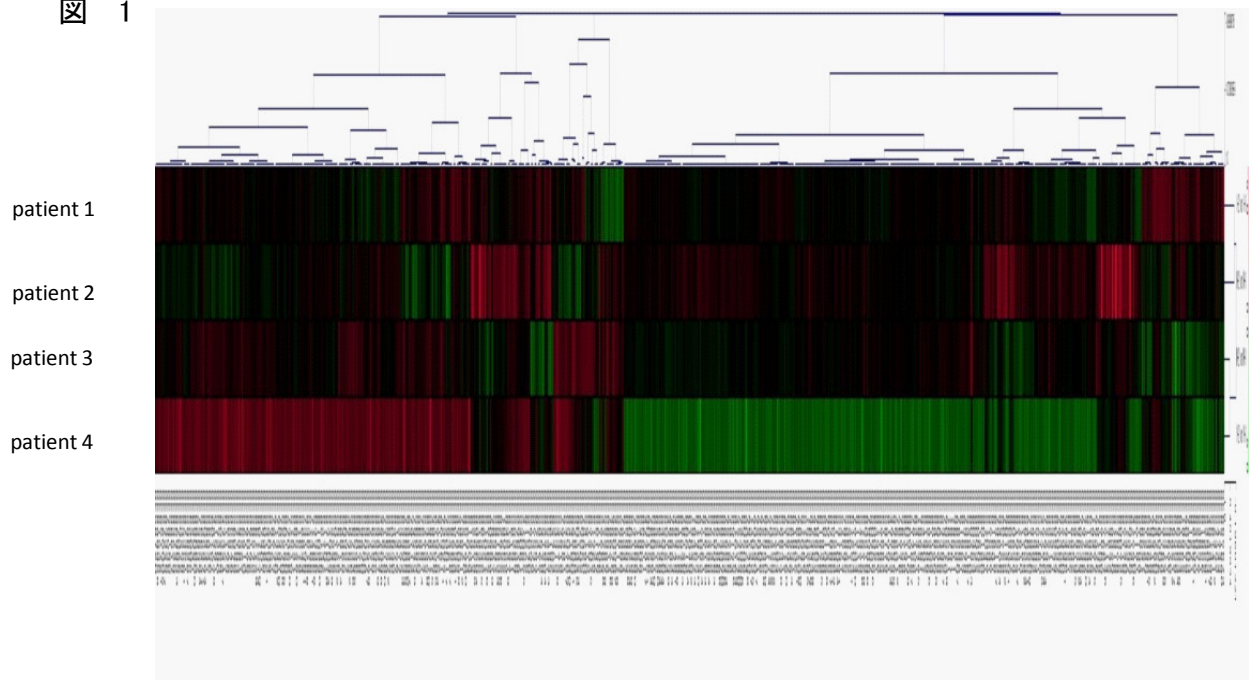
Pathway 解析を行ったところ、様々な遺伝子群の発現の変動がみられたが、特にケモカインシグナル関連遺伝子群、Toll-like-receptor (TLR) 関連遺伝子群、サイトカイン受容体遺伝子群の発現の有意な低下が各症例でみられた。一方、発現の上昇した遺伝子群も多数みられたが、症例間で共通した遺伝子パスウェイは認められなかった。さらにクラスタリング解析を行ったが、症例数が少なかったため特定のクラスターの同定には至らなかった (図 1)。

代表的な炎症関連分子群について個別に検討したところ、炎症性サイトカインである interleukin (IL)-1, IL-2 受容体, IL-6 受容体 (CD126), gp130, また自然免疫系において重要な作用を有する TLR の中で、特に TLR-2, 4, 8 の発現低下が 4 例でみられた。IL-1 受容体タイプ 2, IL-6 受容体 (gp130), TLR-2 については定量 PCR にて発現の低下が確認された。

さらに 4 例に共通して発現の低下した遺伝子として 8 遺伝子が同定された。その一つである CLEC4E (C-type lectin domain family 4, member E) は結核菌の細胞壁の主成分であるコードファクターを認識するリガンドとして同定された分子であり、マクロファージによる結核菌の認識に重要な役割を果たすことが近年報告されている。IFX 治療後の重篤な副作用の一つとして結核による肺感染症の発生が挙げられる。末梢血単核球の TLR, CLEC4E の発現低下は IFX 治療後に生じる細菌性肺炎、特に結核菌に対する感染防御機構の低下に関与する可能性が示唆される。

結論：IFX 治療開始後、末梢血単核球において炎症性サ

図 1



イトカイン, ケモカイン, TLR-2, CLEC4E などの遺伝子発現の低下が確認された。炎症性サイトカイン, ケモカインの発現低下, TLR 分子の発現低下が IFX によるベーチェット病ぶどう膜網膜炎の抑制に関与している可能性が示唆された。

今後さらに症例数を増加し, ベーチェット病ぶどう膜網膜炎に対する IFX の作用機序について解析を進める予定である。

口演

1. 渡邊交世, 慶野博, 中島史絵, 瀧 和歌子, 岡田アナベルあやめ: 眼結核診断における QuantiFERON-TB2G の有用性についての評価、第 63 回日本臨床眼科学会学術展示優秀賞受賞講演, 第 114 回日本眼科学会総会, 名古屋, 平成 22 年 4 月 15 日。
2. 渡邊交世: サブスペシャリティ・サンデー・白内障診療の落とし穴・白内障の形態と症状 - 視力に影響する混濁はどれ? 第 114 回日本眼科学会総会, 名古屋, 平成 22 年 4 月 18 日。
3. 渡邊交世, 中野敦雄, 二宮タ子, 永本敏之: アトピー性皮膚炎患者における結膜嚢細菌叢, 第 49 回日本白内障学会, 第 25 回日本白内障屈折矯正手術学会, 大阪, 平成 22 年 6 月 25 日。

4. 渡邊交世, 慶野 博, 井上 真, 吉野 啓, 岡田アナベルあやめ: 結核性ぶどう膜炎の合併が疑われた眼内悪性リンパ腫の 1 例, 第 44 回日本眼炎症学会, 東京, 平成 22 年 7 月 9 日。
5. 渡邊交世, 中野敦雄, 二宮タ子, 永本敏之: 小眼球における白内障手術, 第 34 回日本眼科手術学会, 京都 平成 23 年 1 月 30 日。

論文

1. 渡邊交世, 三木大二郎, 岡田アナベルあやめ, 平形明人: 急性網膜壊死の治療成績の検討, 日本眼科学会雑誌, 115: 7-12, 2011.
2. Taki W, Keino H, Watanabe T, Nakashima C & Okada AA. Interferon- γ Release Assay in Tuberculous Scleritis Arch Ophthalmol 129:368-71, 2011.
3. Nakashima C, Keino H, Watanabe T, Taki W & Okada AA. Intravitreal bevacizumab for iris metastasis of small-cell lung carcinoma with neovascular glaucoma. Jpn J Ophthalmol 55: 80-81. 2011.
4. Keino H, Watanabe T, Sato Y & Okada, AA. Oral Administration of Retinoic Acid Receptor- α -Specific Ligand Am80 Suppresses Experimental Autoimmune Uveoretinitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 52: 1548-1556, 2011.
5. Keino H, Watanabe T, Taki W, Nakashima C & Okada AA. Clinical features and visual outcomes of Japanese patients with scleritis." Br J Ophthalmol 94: 1459-1463, 2010.