

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 年 3 月 7 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：廣島 健三
所属機関名：東京女子医科大学八千代医療センター
所属部署名：病理診断科 職名：教授
所在地：千葉県八千代市大和田新田 477-96
電話：047-450-6000 内線：7063



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

浙江省余姚市において多発する中皮腫症例の臨床病理学的検討および石綿曝露の解析

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：廣島 健三	職名：教授
所属機関名：東京女子医科大学八千代医療センター	部署名：病理診断科
中国側研究者氏名：高 志斌	職名：主任
所属機関名：浙江省余姚市人民医院	部署名：病理科

4. 当該研究における発表論文等

2011 年 2 月 23 日現在 なし

浙江省余姚市において多発する中皮腫症例の臨床病理学的検討および石綿曝露の解析

日本側研究者代表 廣島 健三
所属機関 東京女子医科大学八千代医療センター病理診断科 教授
中国側研究者代表 高 志斌
所属機関 浙江省余姚市人民医院病理科 主任

要 旨

浙江省寧波近辺では石綿加工業が 1958 年から始まり、1970 年代にクリソタイルの原石を手紡績でほぐしたり、石綿紡績に従事する者が大勢いた。森永らの 1997 年と 2007 年の調査で、胸膜プラーク、石綿肺、石綿肺癌が増えていることが分かったが、中皮腫はみられなかった。2008 年になって、浙江省余姚市人民医院において中皮腫と診断されている症例が多数いるとの情報を得て、同院を訪問し、中皮腫症例を確認した。本研究では、同院を再訪問し、過去 6 年間に中皮腫と診断された 37 例の生検標本の組織ブロックを貸借し、日本で免疫染色を行い、病理診断の妥当性を再評価した。その結果、腹膜中皮腫の 80%、胸膜中皮腫の 47%が中皮腫と診断できた。腹膜中皮腫は全員女性で、胸膜中皮腫も男女比は 1:2.4 で女性が多かった。今回検討した症例の多くは、かつて手紡績に従事した症例であった。また、家庭内で曝露した症例や、工場の周辺に居住していたために発症したと推測される症例もみられた。予後は不良なものが多かったが、化学療法により 3 年以上生存している胸膜中皮腫症例も存在した。また、腹部の手術で偶然に見つかった腹膜中皮腫症例が 2 例含まれていた。同地域では、現在も中皮腫症例は増えている。胸腔鏡の導入による胸膜中皮腫の早期診断、早期治療により予後の改善が期待できる。また、早期の腹膜中皮腫症例が見つかってきており、その組織学的特徴を解析することにより、腹膜中皮腫発生の機序を解明できる。

緒 言：

浙江省寧波近辺では石綿加工業が 1958 年から始まり、1970 年代にクリソタイルの原石を手紡績でほぐしたり、石綿紡績に従事する者が大勢いた。森永らは、1997 年と 2007 年に寧波地区の慈溪市の住民を対象に胸部レントゲン検査を行った。その結果、1997 年に胸膜プラークを 1.3%に、石綿肺を 0.4%に認め、2007 年には胸膜プラークを 32%に、石綿肺を 9%に認めた。肺癌症例もみられたが、中皮腫はみられなかった^{1,2}。廣島と森永は、2008 年に、余姚市人民医院を訪問し、同院において女性の腹膜中皮腫が 4 年間で 20 件以上診断されていることを確認した。しかし、腹膜中皮腫の診断は困難なことが多く、女性の腹膜中皮腫の場合、正診率は約 22%であると報告されているため³、再評価が必要である。一方、2009 年の第 2 回日中共同石綿シンポジウムで、余姚市人民医院の張継賢（呼吸器内科医）は、1999 年から 2008 年の間に同医院で診断された胸膜中皮腫 27 例の検討結果を発表した。本研究では、余姚市人民医院の腹膜および胸膜中皮腫症例の標本を用いて種々の免疫染色を行うことにより中皮腫の診断を確定する。

Key Words 中皮腫, 石綿, 手紡績, 余姚市, 免疫染色

対象と方法：

2004 年から 2010 年 8 月までに余姚市人民医院で中皮腫と診断された症例は 37 例あり、腹膜中皮腫と診断さ

れた症例は20例、胸膜中皮腫と診断された症例は17例である。腹膜中皮腫と診断された症例は、全員女性で、年齢は43歳から71歳で平均52.1歳、胸膜中皮腫と診断された症例は、男性5例、女性12例で、年齢は38歳から85歳で平均60.6歳である。

廣島と森永は2010年5月に余姚市人民医院を訪問し、これらの症例のブロックを貸借し、東京女子医科大学で再薄切し、HE染色と免疫染色を行った。用いた抗体名、希釈倍率、賦活化を表1に示す。

表1. 使用した抗体

抗体名	メーカー	希釈倍率	賦活化
CKAE1/AE3	DAKO	1:500	0.1%トリプシン 37度 30分
CAM5.2	Becton	希釈済み	なし
Calretinin	DAKO	1:100	MW クエン酸 Buffer(pH6.0) 40分
WT1	DAKO	1:400	MW トリス EDTA(pH9.0) 40分
D2-40	COVANCE	1:200	MW トリス EDTA(pH9.0) 40分
CEA	DAKO	1:100	なし
BerEP4	DAKO	1:50	0.05%プロテアーゼ 室温 10分
MOC31	DAKO	1:100	MW クエン酸 Buffer(pH6.0) 40分
ER	DAKO	1:100	MW トリス EDTA(pH9.0) 40分
PgR	DAKO	1:500	MW トリス EDTA(pH9.0) 40分
TTF-1	DAKO	1:200	MW トリス EDTA(pH9.0) 40分

2010年12月に、再度、余姚市人民医院を訪問し、臨床病理検討会を行った。臨床病理検討会には、日本側からは廣島(病理学)、森永(疫学および産業医学)が参加し、中国側からは余姚市人民医院の高志斌(病理学)、その他の病理医、吴晓东(呼吸器内科)、張継賢(呼吸器内科)、その他の呼吸器内科医、婦人科医、放射線科医、浙江省医学科学院の張幸(院長)が参加した。中国側の医師が臨床経過、石綿曝露歴、レントゲン所見、手術所見を説明したのちに、廣島が病理所見を発表した。この検討会ののち、検討症例をcategory 1から5に分類した。中皮腫でないとは診断できる症例をcategory 1、中皮腫らしくない症例をcategory 2、中皮腫の可能性はあるが、中皮腫ではない可能性もある症例をcategory 3、中皮腫らしい症例をcategory 4、確実に中皮腫と診断できる症例をcategory 5とした。

結果:

症例のまとめを表2、3に示す。

腹膜中皮腫と診断された症例は、category 1が3例、category 2はなく、category 3が1例、category 4が4例、category 5が12例であった。中皮腫と診断できるcategory 4あるいは5は20例中16例(80%)であった。中皮腫と診断した症例の組織型は上皮型が12例、二相型が4例であった。

胸膜中皮腫と診断された症例は、category 1が3例、category 2が2例、category 3が4例、category 4が1例、category 5が7例であった。中皮腫と診断できるcategory 4あるいは5は17例中8例(47%)であった。中皮腫と診断した症例の組織型は上皮型が6例、二相型が1例、肉腫型が1例であった。

代表的な症例を示す。

(症例PE04) 44歳の女性で、職業的な石綿曝露歴はないが、石綿を使用する石綿紡績加工を行う工場の周辺に居住していた。開腹による腹膜生検により上皮型中皮腫と診断され、上海大学で治療を受けるために転院をした。組織学的に、好酸性の細胞質を有する細胞が管状乳頭状構造を示して脂肪組織に浸潤をしている。免疫染色はcalretinin(+), WT1(-), D2-40(+), CEA(-), BerEP4(-), MOC31(-), ER(-), PgR(-)であり、category 5、上皮型中皮腫と診断した(図1)。

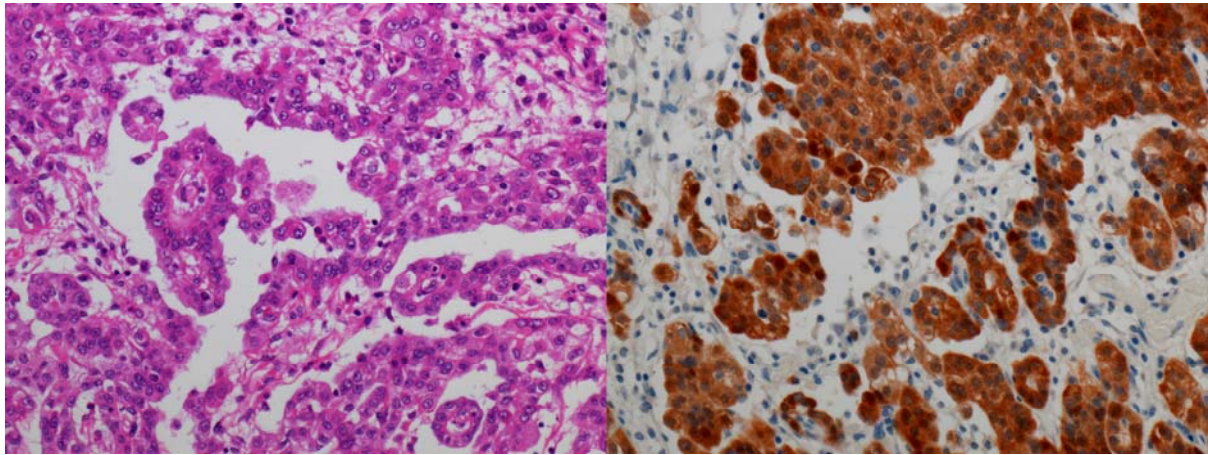


図1. HE染色(左)および免疫染色(calretinin)(右) (症例 PE04)

表2. 腹膜中皮腫と診断されていた症例

症例	年齢	性別	レントゲン所見	臨床経過	職業	暴露期間(年)	Category	組織型
PE01	49	女	フィルムなし		手紡績	7年	4	E
PE02	50	女	フィルムなし	腹水, 子宮に接して腫瘍	手紡績	8年	1	
PE03	68	女			手紡績	10-12年	5	B
PE04	44	女	フィルムなし	上海大学に転院	環境暴露		5	E
PE05	47	女	フィルムなし	上海大学に転院	不詳		5	E
PE06	71	女	PQ. 腸間膜の肥厚, 腫瘍なし.	腸間膜はもち状, 横隔膜上に結節. 5か月後に死亡.	手紡績	10年	5	E
PE07	48	女					1	
PE08	47	女	フィルムなし	他院で診断され, 治療のために受診. 2か月後に死亡.	手紡績	4-5年	5	B
PE09	52	女	フィルムなし	11か月後に死亡.	手紡績	5-8年	5	E
PE10	47	女		15か月後に死亡.	手紡績	1-2年	4	E
PE11	50	女	腸間膜の肥厚, AS. 腫瘍なし.	便秘. 6か月後に死亡.	手紡績	5年	3	
PE12	44	女	PQ. AS, 腫瘍あり.	広範に腫瘍を認め, 試験開腹. 1-2週後に死亡.	手紡績		4	E
PE13	55	女		腹水. 化学療法を行ったが, 腹水は減少しなかった.	手紡績	10数年	5	E
PE14	58	女	胸部にSCLS. 腸間膜の肥厚.		手紡績	12年	5	E
PE15	51	女		胆嚢摘出術中に胆嚢表面に結節.	手紡績	10数年	5	E
PE16	56	女	フィルムなし	子宮摘出術中に卵巣表面に結節. 他院に転院.	手紡績	5-7年	4	E
PE17	55	女		腹痛			1	
PE18	43	女	PQなし. AS.	腹痛. 経過観察中.	手紡績	4-5年	5	B
PE19	48	女	フィルムなし	腹痛. 腹水. 腸間膜はもち状. 経過観察中.	手紡績	10年	5	B
PE20	48	女	PQ. 腸間膜肥厚. AS(少量)	下腹部痛. 上海大学に転院.	環境暴露		5	E

E, 上皮型; B, 二相型; PQ, 胸膜プラーク; AS, 腹水; SCLS, subpleural curve linear shadow.

表 3. 胸膜中皮腫と診断されていた症例

症例	年齢	性別	レントゲン所見	臨床経過	職業	暴露期間 (年)	Category	組織型
PL01	63	女	フィルムなし		不詳		1	
PL02	38	女	びまん性胸膜肥厚. PE.	呼吸困難. 上海大学に転院. 1年後に死亡.	家庭内暴露		5	E
PL03	59	女			なし		3	
PL04	65	女	胸膜肥厚. PE.		手紡績	8年	5	E
PL05	71	男					3	
PL06	42	女	フィルムなし		手紡績	10年	5	E
PL07	47	女	胸膜の不整結節. PE.	死亡	手紡績	7-8年	5	E
PL08	69	男	フィルムなし		不詳		3	
PL09	61	男					1	
PL10	60	女	PQ. 限局性の胸膜腫瘍. PE. リンパ節腫大.	上海大学に転院. 化学療法を8コース施行. 経過観察中.	手紡績	暴露期間不詳	4	B
PL11	49	男	PQ. PE. 胸膜肥厚なし.	上海大学に転院. 生存.	家庭内暴露		1	
PL12	60	女	胸膜肥厚. PE. PQなし.		手紡績	7年	5	E
PL13	74	男	PQ. PE. 右胸壁の限局性腫瘍. 肋骨浸潤.		石綿工	5年	3	
PL14	58	女	胸膜肥厚. 左下葉の腫瘍.	臨床的に肺癌	手紡績	10年	2	
PL15	82	女	左胸膜肥厚. 左胸膜に石灰化.	咳嗽, 呼吸困難, 持続する発熱. 3か月後に死亡.	手紡績	20年以上	5	S
PL16	67	女	胸膜肥厚.	3か月後に死亡.	手紡績	11年	5	E
PL17	85	女					2	

E, 上皮型; B, 二相型; S, 肉腫型; PQ, 胸膜ブランク; PE, 胸水.

考 察 :

中皮腫は組織学的特徴により上皮型と肉腫型および両者が混在する二相型に分類される. 上皮型の腫瘍細胞は類円形の核を有し, 核の大小不同は比較的乏しく, 細胞質は好酸性である. 核分裂像や壊死は稀である. これらの腫瘍細胞は乳頭状にあるいは管腔を形成して増殖し, 充実性増殖もみられる. 肉腫型は紡錘形の異型細胞が花むしろ状に, あるいは特定のパターンを示さずに増殖する.

中皮腫は癌腫との鑑別が難しい. そこで, 免疫染色により, 中皮腫の陽性マーカー, 陰性マーカーを検討し, 中皮由来の腫瘍であることを確認する必要がある. 陽性マーカーとしては, calretinin, WT1, D2-40 を用い, 陰性マーカーとしては CEA, MOC-31, Ber-EP4 などを用いる. 腹膜中皮腫と腹膜あるいは卵巣の漿液性腺癌の鑑別においては, ER, PgR は有用である. 腹膜及び卵巣の漿液性腺癌では ER, PgR が陽性で calretinin は陰性であるのに対して, 腹膜中皮腫では, calretinin が陽性で ER, PgR は陰性である.

肉腫型は免疫染色による中皮腫の陽性マーカーがしばしば陰性であるため, 診断は上皮型よりも難しい. 肉腫型中皮腫では, CK AE1/AE3 は77%で陽性, calretinin は39%で陽性, thrombomodulin と CK 5/6 は29%で陽性であると報告されている⁴.

本研究では, 余姚市人民医院で中皮腫と診断された症例の標本を用いて, 診断の再検討を行った. 中皮腫は組織学的な特徴があるが, 免疫染色の結果, 腹膜中皮腫と診断された症例の80%, 胸膜中皮腫と診断された症例の47%が中皮腫と診断できた. 胸膜中皮腫の正診率が低い理由は, 経皮的生検で診断をしているため標本が小さく, 十分病理学的な検討ができないことによる. 胸腔鏡を用いた胸膜生検で大きな標本を採取することにより, 正診率が向上すると考えられる.

今回検討した症例は, 男性5例, 女性32例で, 男女比は1:6.4であり, 女性が多く含まれることが特徴である. 今回検討した症例のうち, 19名(51%)は手紡績に従事した女性であった. また, 石綿加工業が行われて

いた地域に居住していたため、環境曝露により発症したと考えられる症例が2例、家庭内手紡績で曝露したと考えられる症例が2例含まれていた。

検討した中皮腫症例は、診断されてから数か月から1年で死亡しており、一般的な中皮腫と同様に予後が不良であった。しかし、早期の腹膜中皮腫と考えられる症例も2例含まれていた。一例は胆嚢摘出術を行った時に胆嚢表面に不整な小結節を認め(PE15)、他の一例は子宮摘出術を行った時に卵巣表面に不整な小結節を認めた(PE16)。いずれも、病変は限局をしており、化学療法を加えることにより、良好な予後が期待できる。また、胸膜中皮腫のうち一例(PL10)は上海大学で化学療法を受け、3年間生存をしている。中皮腫でも化学療法が奏功し、長期間生存する症例があることを示す。また、胸膜中皮腫と診断された症例のうち一例(PL11)は、胸水を認めるが、胸膜肥厚がなく、病理学的には category 1 であり、3年間生存をしていることから、良性石綿胸水であると考えられる。良性石綿胸水は中皮腫との鑑別に重要であり、今後も症例が増えることが予測される。

現在も同院では中皮腫症例は増えており、胸膜中皮腫は胸腔鏡を用いた早期診断、早期治療が必要である。また、腹膜中皮腫の早期病変が含まれていることから、このような症例を詳細に検討することにより、中皮腫発生の機序が解明されることが期待される。

参考文献：

1. 森永謙二, 張幸. 浙江省寧波近辺地区における元石綿作業従事者の健康影響調査. 日中医学 1998;13:14.
2. 森永謙二, 張幸. 浙江省寧波近辺地区における元石綿作業従事者のコホート調査. 日中医学 2008;23:46.
3. Takeshima Y, et al. Accuracy of pathological diagnosis of mesothelioma cases in Japan: clinicopathological analysis of 382 cases. Lung Cancer 2009;66:191-7.
4. Attanoos RL, et al. Anti-mesothelial markers in sarcomatoid mesothelioma and other spindle cell neoplasms. Histopathology 2000;37:224-31.

作成日：2011年2月23日

財団法人 日中医学協会

2010年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011年 3月15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 太田 伸 生

所属機関名：東京医科歯科大学

所属部署名：大学院医歯学総合研究科

所在地：東京都文京区湯島1-5-45

電話：03-5803-5191



職名：教授

内線：

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

中国の日本住血吸虫症流行地に分布する中間宿主貝に対する住血吸虫の感染感受性の地理的特異性に関する研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 太田伸生

職名： 教授

所属機関名：東京医科歯科大学

部署名：大学院医歯学総合研究科

中国側研究者氏名： 陸 紹紅

職名：副所長（教授）

所属機関名：浙江省医学アカデミー

部署名：寄生虫病研究所

4. 当該研究における発表論文等

Taniguchi T, Kumagai T, Shimogawara R et al. Schistosomicidal and anti-

fecundity effects of oral treatment of synthetic endoperoxide N-89.

Parasitol Int, 2011, 印刷中

中国の日本住血吸虫症流行地に分布する中間宿主貝に対する住血吸虫の感受性の地理的特異性に関する研究

研究者氏名 太田伸生

所属機関 東京医科歯科大学大学院

国際環境寄生虫病学分野・教授

共同研究者 陸 紹弘、聞 礼永、汪 天平

下河原理江子、熊谷 貴、二瓶直子、斎藤康秀

要旨

日本住血吸虫症の日本国内での流行は終息したが、今日でも中国揚子江流域とフィリピンなど地理的に隔離されて流行地が散在する。住血吸虫は中間宿主である貝とヒトを含む哺乳動物宿主で生活史が成立するが、異なった流行地の貝と住血吸虫との間での感染が成立するかは十分に解明されていない。日本では患者発生はないが中間宿主貝が存在する状況下で、外国から住血吸虫が持ち込まれるリスクを評価するための情報が十分でない。本研究ではアジア域内で住血吸虫または中間宿主貝の移動が発生した場合のリスク評価の資料として、中国、フィリピンまたは日本産の中間宿主貝が異なる流行地の住血吸虫に如何なる感染感受性を示すかを比較検討した。中間宿主貝である *Oncomelania hupensis* とその亜種に対する日本および中国株日本住血吸虫の感染効率を PCR と LAMP 法による遺伝子検出により調べた。その結果、日本株の *O.h.nosophora* は日本と中国の住血吸虫の感染を受容するのに対して、中国の *Oncomelania* 属貝は検討した何れの流行地の住血吸虫株に対しても感受性が低く、中間宿主貝の生体防御機能には大きな地理的特徴が認められた。本研究では貝の感染を従来よりも高い感度で検出する方法を応用することにより、精度の高い情報が得られた。モノの交流活性化に伴ってリスクが高くなる住血吸虫のアジア域内移動に対して、エビデンスに基づいたリスク評価を行うための基礎資料となると考えた。

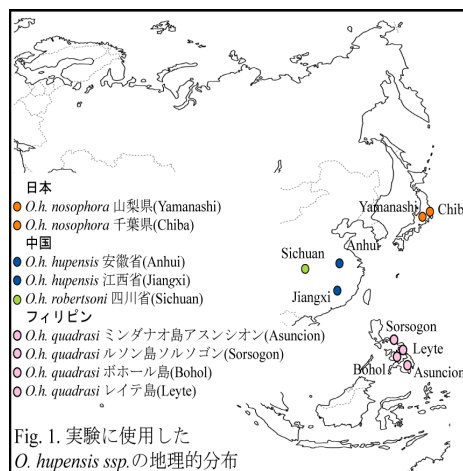
Key Words :日本住血吸虫 *Oncomelania*、感染感受性、LAMP 法、リスク評価

緒言

日本住血吸虫症は東アジアに流行地を抱える重要な熱帯感染症で、血管内寄生吸虫である日本住血吸虫 *Schistosoma japonicum* が原因となる寄生虫病である¹⁾。日本中間宿主とし、ヒトを含む哺乳動物を終卵が外界で孵化して幼虫が中間宿主貝にセルカリアとよぶ感染幼虫が水中で主体内では血管内で雌雄がペアを形成虫卵に対する宿主の免疫応答として

日本住血吸虫症は日本、中国、フィリピンが存在したが、日本では1996年には中国の揚子江流域と雲南省の一部、レイテ、パラワン島など、インドネシ

流行地である。日本住血吸虫の中間宿主 *Oncomelania hupensis* spp であり、その生息地は湿った草地である。日本ではミヤイリガイと呼ばれ (*Oh.nosophora*)、甲府盆地、備後平野、筑後平野などに分布して病気も流行していた。中国では *Oh. hupensis* と *Oh. robertsoni* が主に揚子江流域に生息し、特に前者が中国における主要な媒介者である。フィリピンでは *Oh. quadrasi* という小型の貝が媒介している。日本住血吸虫は一応一属一種とされるが、地理的に隔絶された環境下で、アジア域内相互に中間宿主貝と住血吸虫の組合せがどの程度厳密



住血吸虫は淡水産の巻き貝を中宿主とする生活史を形成する。虫に侵入し、一定の発育を遂げた後終宿主に経皮的に感染する。終宿して産卵し、毛細血管に塞栓した様々な病変が起こってくる。フィリピンおよびインドネシアに流公式に流行終息を宣言した。現在フィリピンのミンダナオ、ルソン、アのスラウェシ島の一部などが主は小型の淡水産巻き貝である

であるのかはよく判っていない。しかし、上記に示したように中間宿主貝は日本、中国、フィリピンそれぞれで別種（亜種）であるので、相互の地理的距離が住血吸虫-中間宿主貝の感受性に反映されていることも考えられる²⁾。日本国内で言えば、旧流行地である甲府と久留米とでは、それぞれの地理的分布に応じたミヤイリガイ株がその地域の住血吸虫だけを媒介するという報告もある。

経済発展が著しいアジア地域では人とモノの交流が活発になり、様々な感染症の移動も容易になってきた。住血吸虫は生活史が複雑であるために流行域の移動は本来起こりにくいが、アジア域内に中間宿主貝の生息域が散在していることを考えると、流行地からヒトを含む終宿主が移動する事により病気発生地域の拡大も可能性を否定する根拠はない。日本では流行は終息したが、甲府盆地にはミヤイリガイの生息地域が散在し、対策事業の終息に伴って生息域はむしろ拡大している。中国から何らかの方法で寄生虫が持ち込まれた場合の流行再興について、リスク評価のためのエビデンスが得られていない。

中間宿主貝の住血吸虫幼虫に対する感受性は、古典的には有毛幼虫（ミラシジウム）の暴露後16週間を待ってヒトへの感染幼虫であるセルカリアの遊出の有無を確認して判定していた。しかし、この方法では時間がかかることに加えて、貝の中での発育経過を追う研究は不可能であった。当研究室ではPCRやLAMPによる寄生虫遺伝子の検出系を利用し、中間宿主の各地理的分離株の住血吸虫株に対する感受性を評価する方法を確立したので³⁾、本研究においてその応用により中間宿主株と日本住血吸虫の感受性を時間経過で追いながら評価し、日本住血吸虫症のアジア域内での拡散のリスク評価を試みた。

対象と方法

Oncomelania 属貝: 使用した中間宿主貝は山梨県産（山梨株）および千葉県産（木更津株）の *O. h. nosophora*、中国安徽省産（Tonglin 株）および Anqin 株）および江西省産（Jiangxi 株）の *O. h. lupensis*、中国四川省産（Sichuan 株）の *O. robertsoni*、およびフィリピン産の *O. quadrasi* を用いた。山梨株を除いて他はすべて、実験室内飼育貝を用いた。



日本住血吸虫: 日本住血吸虫は山梨株と中国安徽省株を用いた。ともに実験室内でマウスを用いて継代維持してきたものを用いた。

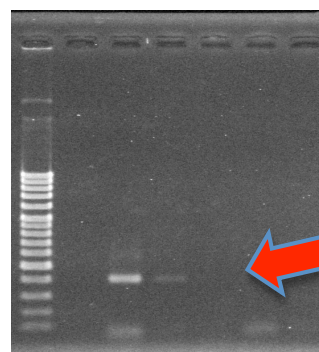
PCR法およびLAMP法: PCRとしては日本住血吸虫の28SリボソーマルDNAを標的として (GeneBank Accession# Z46504) *Oncomelania* 貝からの住血吸虫DNAの増幅を行った。396 bpのバンドの増幅を確認して感染を判定した。LAMP法には28SリボソーマルDNAのほかに Sjr2 (GeneBank Accession# AF412221) も用いて検討した。

住血吸虫感染検出: *Oncomelania* 貝を24穴プレートに1個ずつ加えてRPMI1640培地で満たしておき、そこに日本住血吸虫ミラシジウム20匹を添加した。顕微鏡で遊離しているミラシジウムがないことを確認して貝を別のプレートに移した。その24時間後以降、一定時間経過ごとに検出を行い、最終的には16週後のセルカリアの遊出まで追跡した。

(Sj:10pg 1pg 100fg DNA)

結果

貝からPCRによる住血吸虫感染の検出: 貝は殻ごと試験管した後PCRおよびLAMPに用いた。予備実験として行った検出DNAをテンプレートした場合は28SリボソーマルDNA検出を示した (右欄)。LAMP法による検出の場合も同等の感度がこれをDNA量換算した場合、1匹のミラシジウムが存在する感染を検出できる事が確認された。一方、より高感度で検出としたLAMP測定だが⁴⁾、われわれの方法では全く検出がで



内で破碎し、DNA抽出を行うでは日本住血吸虫ゲノムの場合、100fgの検出感度を得られ (データ不提示)、る貝であれば、その検出できるとされたSjr2を標的せず、遺伝子検出のための

標的としては必ずしも至適の標的遺伝子とは考えられなかった。

ミラシジウムの貝への侵入効率：貝にミラシジウムを添加24時間後にPCR実施した場合、貝への侵入効率についてのデー

	Habitat	Snail ssp	Sj Yamanashi		Sj Chinese	
			number of snails	Ratio *	number of snails	Ratio *
Japan	Yamanashi	<i>O.h.nosophora</i>	28/29	97%	6/12	50%
	Chiba		19/20	95%	0/10	0%
China	Anhui (Tongling)	<i>O.h.hupensis</i>	0/30	0%	3/13	23%
	Anhui (Anqing)		1/10	10%	0/10	0%
	Jiangxi		0/30	0%	3/12	25%
	Hunan		-	-	0/10	0%
	Sichuan	<i>O.h.robertsoni</i>	18/20	90%	-	-
Philippine	Luzon	<i>O.h.quadrasi</i>	13/20	65%	-	-
	Leyte		15/20	75%	-	-
	Bohol		11/20	55%	0/10	0%
	Mindanao		14/20	70%	0/10	0%

タが観察されると考えた。検討した結果、日本の住血吸虫は山梨株、木更津株の *Oh.nosophora* にはほぼ 100% の侵入効率を示した一方、中国の *Oh.hupensis* にはほとんど侵入ができなかった。しかし、*Oh.robertsoni* の Sichuan 株には *Oh.nosophora* と同等の侵入を示し、中国の中間宿主貝でも亜種の異なる 2 種類の貝では住血吸虫の侵入感受性が異なることがわかった。日本産住血吸虫はフィリピンのはに対しては中等度に侵入効率を示した (上図)。

一方、中国の日本住血吸虫はアジア域内全ての中間宿主貝に対して侵入効率が低く、同じ流行地の貝に対してでも 10-20% 程度の低い侵入効率しか示さなかった。フィリピンのはに対しては日本の住血吸虫と同様に、中間レベルの侵入効率しか示さず、中国の寄生虫に対して高い侵入効率を許容する中間宿主貝は観察することができなかった。

中間宿主貝内での感染幼虫への発育：ミラシジウム暴露後 16 週待つてセルカリア遊出までの期間のフォローを幾つかの寄生

	Habitat	Snail ssp	1Day	16Wks
			% *	% *
Japan	Yamanashi	<i>O.h.nosophora</i>	97%	67%
	Chiba		95%	ND
China	Anhui (Tongling)	<i>O.h.hupensis</i>	0%	0%
	Anhui (Anqing)		10%	5%
	Jiangxi		0%	ND
	Hunan		ND	ND
	Sichuan	<i>O.h.robertsoni</i>	90%	ND
Philippines	Luzon	<i>O.h.quadrasi</i>	65%	ND
	Leyte		75%	ND
	Bohol		55%	0%
	Mindanao		70%	0%

虫-中間宿主貝の組合せについて実施した。長期間の実験室内の貝飼育の困難性のために情報整理は困難であったが、可能な範囲で情報を整理した (左図)。最も注目した点は、Yamanashi 株の住血吸虫は Yamanashi 株の貝に 16 週後も高い感受性を示したのに対して、侵入効率では中等度の数値を示したフィリピンのはにつ

いては、16 週後ではセルカリア遊出が全く認められなかったことである。同様に高い侵入効率を示した千葉県産の貝や中国四川省の *Oh.robertsoni* での 16 週後までの発育効率の結論は残念ながら本報告の時点では得ることができなかった。少なくともミラシジウムの侵入と発育とが独立の規定機構を持っていることを示すデータであると考えた。一方、中国の貝に対しては日本産の住血吸虫の侵入効率が元々低かったが、侵入に成功したミラシジウムは感染幼虫まで発育可能であることが示唆

された。

考察

本研究では、日本住血吸虫ミラシジウムが、同じ *Oncomelania* 属の中間宿主貝であっても異なった感染感受性を示すことを明らかにすることができた。最も注目した所見は、日本の中間宿主貝がアジア域内の多くの寄生虫株に対して比較的高い感受性を示した一方で、中国揚子江流域に生息する中間宿主貝は恐らく物理的バリアも含めて、住血吸虫の侵入を許容しない事が推測された点である。さらに、侵入効率という観点からは、日本の住血吸虫が中国の貝でも、最も地理的距離が大きい四川省産の *O. h. robertsoni* に特に高い侵入効率を示したことは興味深い。*Oh. robertsoni* は形態学的に *Oh. nosophora* と類似しており、中国国内でも特異な共進化を遂げた寄生虫-中間宿主貝と考えらる。日本産の住血吸虫が *Oh. robertsoni* で感染幼虫まで発育できるか否かは未だ検討が終了していないが、*Oh. robertsoni* と *Oh. nosophora* は形態的にも類似しており、その起源の比較が興味深い。今後は揚子江下流域に分布する住血吸虫の *Oh. robertsoni* に対する感受性も整理する必要がある。

その一方で、中国住血吸虫株のミラシジウムをそれぞれの貝に暴露したところ、何れにおいても限られた侵入効率しか得ることができなかつた。中国安徽省の寄生虫を安徽省の貝に暴露した場合でさえも同様の結果しか得られなかつたので、中国産の中間宿主貝ではもともと自然防御免疫系が強く機能していることが考えられた。特に侵入後 24 時間にすでに PCR でも検出不能になるということは、強い虫体破壊機序が働いていることが推測され、中国の *Oncomelania* 属貝の生物学的特性を決定する機序の解明が興味深い。

中間宿主貝の住血吸虫に対する感受性を考える時、今回の研究から明らかなのはミラシジウムの侵入と貝体内での発育の 2 つの因子が独立して関与しているということである。日本産の住血吸虫は山梨株の貝体内に高率に侵入して、そのまま発育した。一方、日本産の住血吸虫は中国株の貝に侵入効率は悪いが、一旦侵入したらそのまま発育できることが推定される。しかし、日本産住血吸虫はフィリピン産の貝に侵入することは比較的容易であるが、その貝体内では強い発育阻害がかかっているデータであった。この事は中間宿主貝の住血吸虫ミラシジウムに対して、物理的バリアと生物学的バリアの 2 つの異なった機序が機能していることを示唆する。これらの機序解析を通して、中間宿主貝の日本住血吸虫に対する感染感受性の概要が解明されれば、それを応用して住血吸虫症対策戦略やリスク評価に新たな展望が拓かれると期待される。

参考文献

- (1) Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 2000;77:41-51.
- (2) Zhou XN, Wang LY, Chen MG, Wu XH, Jiang QW, Chen XY, Zheng J, Utzinger J, 2005. The public health significance and control of schistosomiasis in China—then and now. *Acta Tro*. 96: 97–105.
- (3) Kumagai T,* Furushima-Shimogawara R, Ohmae H, Wang TP, Lu SH, Chen R, Wen LY, and Ohta O. Detection of Early and Single Infections of *Schistosoma japonicum* in the Intermediate Host Snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay. *Am J Trop Med Hyg*. 83:542-8, 2010.
- (4) Xu J, Rong R, Zhang HQ, Shi CJ, Zhu XQ, Xia CM, 2010. Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Int J Parasitol* 40: 327–331.

注意・参考文献

本研究は2010年の第79回日本寄生虫学会にて口演発表した。

- (1) 中国安徽省における日本住血吸虫症中間宿主のサーベイランスツールの開発
- (2) LAMP法を用いた日本住血吸虫中間宿主貝の感染モニタリングとその疫学的応用の検討

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 年 03 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 喬 善楼
所属機関名：中部大学
所属部署名：生命健康科学部 職名：准教授
所在地：愛知県春日井市松本町 1200
電 話：0568-51-1111 内線：8115



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

脱共役タンパク質 UCP2 を標的にした大腸癌漢方治療法の研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 喬 善楼	職名：准教授
所属機関名：中部大学	部署名：生命健康科学部
中国側研究者氏名：李 晓涛	職名：教授
所属機関名：華東師範大学	部署名：生命医学研究所

4. 当該研究における発表論文等

投稿準備中。

脱共役タンパク質 UCP2 を標的にした大腸癌漢方治療法の研究

日本側研究者氏名 喬 善楼 准教授

所属機関 中部大学 生命健康科学部

中国側研究者氏名 李 曉涛 教授

所属機関 華東師範大学 生命医学研究所

要旨

食生活の欧米化に伴い、近年日本を始め、中国でも大腸癌の発病率が急増している。特に沿海地区の都市部では顕著な傾向が認められる。西洋医学における癌治療には、外科手術、放射線療法、抗癌剤による化学療法などは、癌細胞を攻撃するだけでなく、正常の細胞や組織にもダメージが及ぶという欠点がある。癌治療における最近の動向の1つとして、癌細胞に特有の解糖代謝亢進(ワールブルグ効果)に基づき、癌細胞だけを殺す理想的な新しい癌治療法への関心が高くなっている。我々はワールブルグ効果を制御する可能性のあるUCP2を注目し、大腸癌に対する抗腫瘍作用が知られている漢方薬から、UCP2抑制を示した白花蛇舌草(Baihuasheshecao)、半枝蓮(Banzhilian)を見出した。さらに、蛇舌草、半枝蓮による大腸癌細胞のミトコンドリア膜電位低下、細胞内ROSの増加、またはAktの活性低下などが明らかになった。半枝蓮、白花蛇舌草の抗癌薬物としての歴史的な背景に加え、今回明らかにしたUCP2抑制の結果は、将来UCP2に抑制作用のある成分を特定し、癌細胞だけを殺す理想の薬開発につながると期待される。[キーワード：大腸癌；漢方；UCP2]

緒言：

食生活の欧米化に伴い、日本では欧米諸国に多い大腸癌が非常に増えている。近年中国でも、大腸癌の発病率が急増している。特に沿海地区の都市部では顕著な傾向が認められる。西洋医学癌治療には、外科手術、放射線療法、抗癌剤による化学療法、ならびに免疫療法などがあり、今日の癌治療はこれらの方法を組み合わせて行われている。しかしこれらの治療法は、癌細胞を攻撃するだけでなく、正常の細胞や組織にもダメージが及ぶという欠点がある。最近、癌治療における漢方薬の有用性は、さまざまな基礎研究によって、科学的に立証され、国際的に見直され大きな注目を集めている。一方、大腸癌などの細胞は、酸素が充分にある環境でも嫌氣的にエネルギー(ATP)を生産する傾向があり、ワールブルグ効果と呼ばれている。しかし、なぜ癌細胞がこのように非効率な方法によるエネルギー生産(好氣的エネルギー生産のおよそ1/20の効率)を行っているのかについては、ノーベル賞科学者オットー・ワールブルグ博士によるワールブルグ効果の発見後、80年以上も経つが、今でも未解決な部分が多い。UCP2は細胞の代謝経路(解糖由来のピルビン酸、脂肪酸、グルタミン)の再プログラミング[1]、またはP53を介して好氣性代謝と嫌氣性代謝を決定する可能性が示唆されている[2]。従ってUCP2は大腸癌治療の新しいターゲットとして十分考えられる。本研究は、大腸癌に対する抗腫瘍作用が知られている生薬として、三稜(Sanleng)、莪朮(Ezhu)、白花蛇舌草(Baihuasheshecao)、半枝蓮(Banzhilian)などを用い、UCP2抑制作用のある漢方薬を探索し、更に抗大腸癌作用機序について検討したので報告する。

材料及び方法：

1、生薬としての三稜、莪朮、白花蛇舌草、半枝蓮を大晃生薬有限会社より購入し、それぞれ50gを精製水500mlで3時間熱湯抽出、次に抽出液を減圧下で乾燥した。乾燥品を50mMリン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、抽出物を最終濃度100mg/mlとなるように調整した。

2、細胞および細胞培養：SW480細胞(Human colon adenocarcinoma cell line)を使用した。細胞は、10%牛胎児血清(以下FBS、GIBCO社)、streptomycin(Invitrogen社)100U/ml、およびpenicillin(invitrogen社)0.1mg/mlを含むRPMI1640(wako社)を用いて、5%CO₂内、でインキュベートした。細胞の剥離は0.25% Trypsin

1mM EDTA によった。細胞数を 2×10^5 個/ml に調整したのち、三稜、莪朮、白花蛇舌草、半枝蓮を添加して 24 時間インキュベートしたものを実験系に用いた。

3、細胞内活性酸素の測定：細胞内 ROS の測定として、非蛍光の DCFH-DA (2,7'-dichloro fluorescein diacetate) が ROS に反応して蛍光の DCF に変化することから、その蛍光を測定することによって生成された ROS 量を求めた。

4、ミトコンドリア膜電位の解析：細胞のミトコンドリア膜の電位(potential)を観察するために $2 \mu\text{M}$ rhodamine123 を含む Medium で 10 分間培養しミトコンドリアを蛍光標識した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。結果、Mm1 細胞のミトコンドリア膜電位は M1 細胞より弱いことが明らかとなった。

5、MTT Assay: *In vitro* の抗腫瘍効果の評価は、MTT 試薬 (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide;Sigma) を用いた。細胞浮遊液を、96 穴マイクロプレート (Costar) に生細胞 10^5 cells/0.1mL/well となるよう調整分注した上、漢方添加 (対照は漢方非添加) 後 48 時間培養し、MTT 試薬を添加して生細胞量の測定を行った。

6、Western blot 法：細胞溶解液 (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate) を用いた。総蛋白 $25 \mu\text{g}$ を 5-15%SDS-PAGE を用いて電気泳動した後、PVDF 膜に転写して 3%アルブミンで約 1 時間室温にてブロッキングを行った後、Akt/Ser473 (AnaSpec 社, 1:250), NFkB (BD Bioscience 社, 1:250)、UCP2 抗体 (SantaCruz 社, 1:1000 希釈) と一晩反応させた。0.05%の Tween 20 含んだ PBS にて 3 回洗浄後ペルオキシダーゼ結合抗ラビット IgG (SantaCruz 社, 1:1000 希釈) と室温で 1 時間反応させ、洗浄後 ECL 法にて発色させ、FUJIFILMLAS-3000 (露光時間: 2 分、検出感度: High) で検出した。

結果：

1、細胞生存率に及ぼす漢方薬の影響。三稜、莪朮、白花蛇舌草、半枝蓮添加における SW480 細胞の生存率を調べ、対照との比較から、漢方添加による増殖抑制率を算出した (図 1)。白花蛇舌草は濃度依存的に SW480 細胞の生存率が顕著に減少した。莪朮と半枝蓮処理した細胞は軽度 (30~40%) の増殖抑制作用を示したが、三稜は効果が認められなかった。

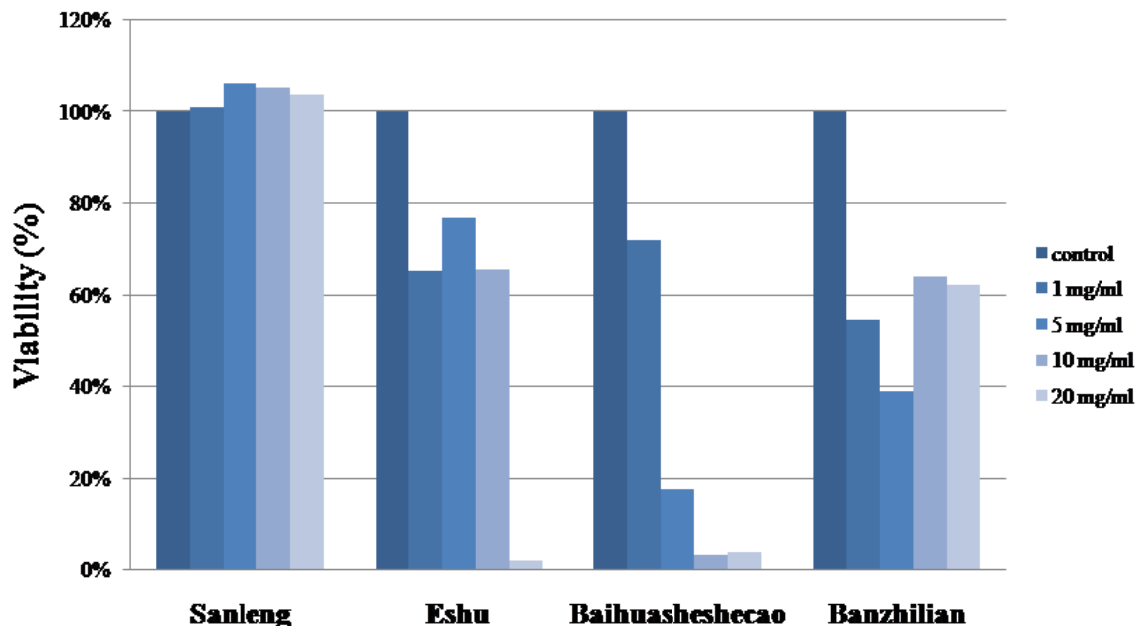


Fig. 1

2、細胞内活性酸素におよぼす漢方の影響。漢方による癌細胞抑制作用に ROS が関与するかを検討したところ、白花蛇舌草と半枝蓮添加群では、SW480 細胞内 ROS の顕著な増加が認められた (図 2)。一方三稜、莪朮処理した

場合は軽度な ROS の産生が確認できた。

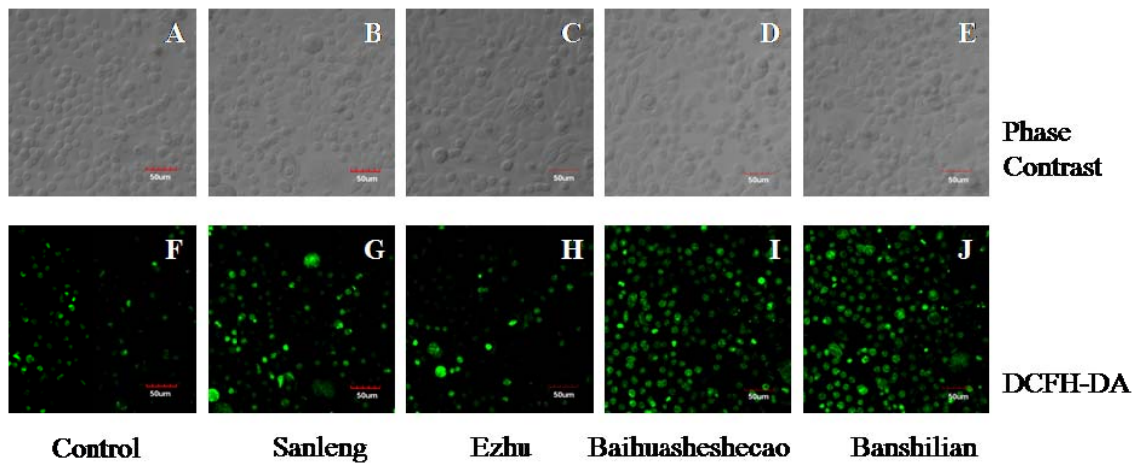


Fig. 2

3、W480 細胞のミトコンドリア膜電位におよぼす漢方の影響。MTT Assay および細胞内活性酸素産生の結果より、本研究は白花蛇舌草と半枝蓮に注目し、細胞のミトコンドリア膜の電位(potential)を観察するために5 μ MMitoTracker を含むMediumで10分間培養しミトコンドリアを蛍光標識した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、SW480 細胞のミトコンドリア膜電位は白花蛇舌草、半枝蓮処理によって低下することが明らかとなった(図3)。

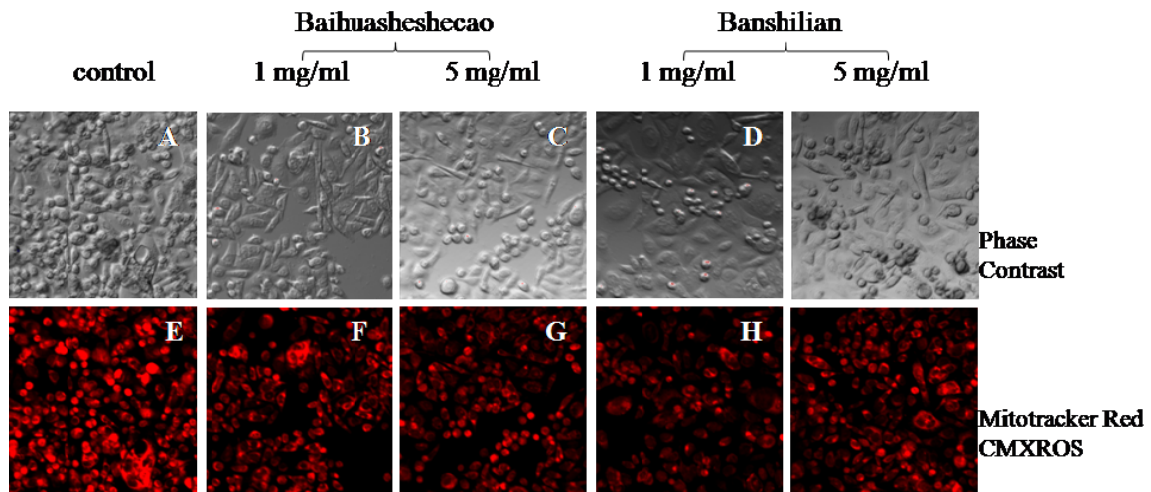


Fig. 3

4、UCP2 の発現におよぼす白花蛇舌草と半枝蓮の影響。UCP2 は白花蛇舌草と半枝蓮処理濃度が上がるにつれ発現が減少した。Akt では経時的にリン酸化が減少した(図4)。NF κ B 蛋白量の変化は白花蛇舌草と半枝蓮添加前後で変化は認められなかった。

考察：

正常細胞は、エネルギー産生に主にクエン酸回路(クレブス回路)を用いるが、癌細胞はこれとは異なり、嫌気性解糖系を経て生産されるエネルギーに多くを依存している特異的代謝現象ワールブルグ効果がある[3]。現在癌検出法であるPET検査は、癌細胞がグルコースを正常細胞よりも大量に消費する特異的代

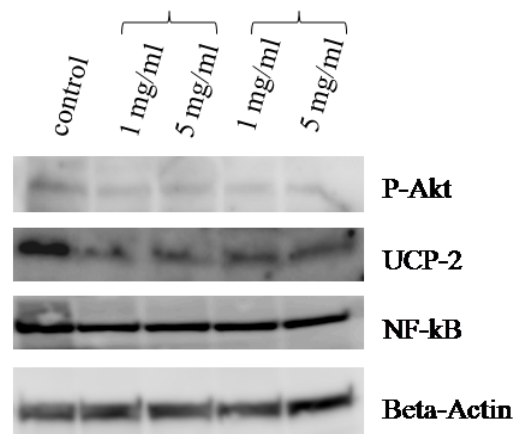


Fig. 4

謝現象を利用している。この機序については、未解決の点が多い。最近 UCP2 は細胞の代謝経路（解糖由来のピルビン酸、脂肪酸、グルタミン）の再プログラミング[1]、または P53 を介して好気性代謝と嫌気性代謝を決定する可能性が示唆されている[2]。UCP はミトコンドリア内膜に存在し、ミトコンドリアの電子伝達系と ATP の合成は、内膜を介するプロトン濃度勾配を解消する特殊なチャンネルであり、今は UCP2, 3, 4, 5 など UCP ファミリーを成している[4]。UCP2 は 1997 年クローニングされ、生体各臓器に広くその発現が認められた。UCP2 が大腸癌を含め、胆管癌[5]、甲状腺オンコサイトーマ、肝癌細胞株[6]、Hela 細胞[7]、大腸癌細胞株 (Caco2, SW480)、乳癌細胞株 (MCF7) [8]、抗癌剤耐性癌細胞株などに高発現していることが明らかとなった[9-11]。大腸癌分化度は UCP2 の発現量に比例することがわかっている[11]。我々もマウス骨髄白血病細胞において正常より UCP2 タンパクは 10 倍以上上昇する報告をした[12]。また、UCP2 ノックアウトマウスにおいて大腸癌が出来やすいことが報告され、その原因として大腸粘膜上皮に活性酸素の蓄積と NF κ B の活性化が示唆された[13]。これらの一連の研究は、UCP2 は細胞内の活性酸素を感知・制御することにより、癌細胞増殖促進に深く関与していると推測される[14, 15]。UCP2 は大腸癌治療の新しいターゲットとして十分考えられる。UCP2 の antagonist として、漢方薬で使用されているクチナシ果物抽出エキスクチナシの主成分である (genipin) が有名、癌細胞においては UCP2 抑制効果がなかった (未発表データ)。今回、我々は 大腸癌に対する抗腫瘍作用が知られている 生薬として 莪朮、三稜、白花蛇舌草、半枝蓮のうち、半枝蓮と白花蛇舌草の UCP2 抑制作用を見出した。

白花蛇舌草と半枝蓮は中国の民間療法として外傷・化膿性疾患・各種感染症や肺癌や胃癌などの治療に使用されてきた。培養癌細胞を用いた実験で、白花蛇舌草によるヒトの乳癌細胞や前立腺癌細胞の増殖を抑える効果も報告されている。半枝蓮には、癌細胞の増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用、抗変異原性作用、抗炎症作用、発癌過程を抑制する抗プロモーター作用などが報告されている[16]。さらに最近、米国では進行乳癌患者に対する臨床試験も実施され、半枝蓮の有効性を示唆する結果が得られている[17]。半枝蓮の熱水抽出エキス BZL101 は嫌気性解糖系を阻害し、癌細胞をエネルギー不足に追い込む[18]。これにより癌細胞には細胞死が起こるが、正常細胞はほとんどダメージを受けない。大腸癌株 SW480 における半枝蓮と白花蛇舌草による UCP2 タンパクの低下は、酸化的リン酸化を亢進させ、ミトコンドリアに大量の ROS が産生されるため、腫瘍抑制に繋がる可能性が示唆される。

また癌細胞サバイバルメカニズムとして多くの細胞で観察されているものに、PI3K/Akt/mTOR シグナルの亢進がある[19]。Akt には 2 つの調節ドメインが知られており、PDK1 により Thr308 が、Ser473 は PDK2 などいくつかのキナーゼによりリン酸化される。このリン酸化が癌化、増殖および Bcl-2 ファミリー-Bad、caspase-9、Forkhead transcription factor、I κ B キナーゼなどのリン酸化による抗アポトーシス活性を含む Akt の活性化に重要である。従って Akt 活性の抑制は、癌化学療法の重要な標的となる。本研究では半枝蓮、白花蛇舌草処理による Akt Ser473 リン酸化レベルの低下は、大腸癌の増殖抑制にも寄与する可能性が示唆された。

以上の結果から、半枝蓮、白花蛇舌草は単味生薬としても *in vitro* での抗大腸癌作用があり、そのメカニズムとして、ミトコンドリアの UCP2 発現抑制、ミトコンドリア膜電位の低下、ROS の増加、または Akt の活性制御によるものと考えられる。

References

1. Samudio I, M Fiegl and M Andreeff (2009) Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res* 69:2163-2166
2. Matoba S, JG Kang, WD Patino, A Wragg, M Boehm, O Gavrilova, PJ Hurley, F Bunz and PM Hwang (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312:1650-1653
3. Warburg O, F Wind and E Negelein (1927) The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* 8:519-530
4. Krauss S, CY Zhang and BB Lowell (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:248-261
5. Berthiaume EP and J Wands (2004) The molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis*

6. Carretero MV, L Torres, U Latasa, ER Garcia-Trevijano, J Prieto, JM Mato and MA Avila (1998) Transformed but not normal hepatocytes express UCP2. *FEBS Lett* 439:55-58
7. Mills EM, D Xu, MM Fergusson, CA Combs, Y Xu and T Finkel (2002) Regulation of cellular oncosis by uncoupling protein 2. *J Biol Chem* 277:27385-27392
8. Fine EJ, A Miller, EV Quadros, JM Sequeira and RD Feinman (2009) Acetoacetate reduces growth and ATP concentration in cancer cell lines which over-express uncoupling protein 2. *Cancer Cell Int* 9:14
9. Harper ME, A Antoniou, E Villalobos-Menuet, A Russo, R Trauger, M Vendemelio, A George, R Bartholomew, D Carlo, A Shaikh, J Kupperman, EW Newell, IA Bespalov, SS Wallace, Y Liu, JR Rogers, GL Gibbs, JL Leahy, RE Camley, R Melamed and MK Newell (2002) Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J* 16:1550-1557
10. Savagner F, B Franc, S Guyetant, P Rodien, P Reynier and Y Malthiery (2001) Defective mitochondrial ATP synthesis in oxyphilic thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4920-4925
11. Horimoto M, MB Resnick, TA Konkin, J Routhier, JR Wands and G Baffy (2004) Expression of uncoupling protein-2 in human colon cancer. *Clin Cancer Res* 10:6203-6207
12. Nishio K, S Qiao and H Yamashita (2005) Characterization of the differential expression of uncoupling protein 2 and ROS production in differentiated mouse macrophage-cells (Mm1) and the progenitor cells (M1). *J Mol Histol* 36:35-44
13. Derdak Z, P Fulop, E Sabo, R Tavares, EP Berthiaume, MB Resnick, G Paragh, JR Wands and G Baffy (2006) Enhanced colon tumor induction in uncoupling protein-2 deficient mice is associated with NF-kappaB activation and oxidative stress. *Carcinogenesis* 27:956-961
14. Mattiasson G, M Shamloo, G Gido, K Mathi, G Tomasevic, S Yi, CH Warden, RF Castilho, T Melcher, M Gonzalez-Zulueta, K Nikolich and T Wieloch (2003) Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* 9:1062-1068
15. Teshima Y, M Akao, SP Jones and E Marban (2003) Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* 93:192-200
16. Kim EK, KB Kwon, MJ Han, MY Song, JH Lee, YS Ko, BC Shin, J Yu, YR Lee, DG Ryu, JW Park and BH Park (2007) Induction of G1 arrest and apoptosis by *Scutellaria barbata* in the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *Int J Mol Med* 20:123-128
17. Perez AT, B Arun, D Tripathy, MA Tagliaferri, HS Shaw, GG Kimmick, I Cohen, E Shtivelman, KA Caygill, D Grady, M Schactman and CL Shapiro A phase 1B dose escalation trial of *Scutellaria barbata* (BZL101) for patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 120:111-118
18. Fong S, M Shoemaker, J Cadaoas, A Lo, W Liao, M Tagliaferri, I Cohen and E Shtivelman (2008) Molecular mechanisms underlying selective cytotoxic activity of BZL101, an extract of *Scutellaria barbata*, towards breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 7:577-586
19. Tsuruo T, M Naito, A Tomida, N Fujita, T Mashima, H Sakamoto and N Haga (2003) Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci* 94:15-21

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2011 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 秋山 泰身 
所属機関名：東京大学 医科学研究所
所属部署名： 分子発癌分野 職名：准教授
所 在 地： 東京都港区白金台 4-6-1
電 話： 03-5449-5276 内線：75276

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

自己免疫疾患の抑制に必須な胸腺環境と T 細胞の分化制御

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：秋山 泰身	職名： 准教授
所属機関名： 東京大学 医科学研究所	部署名：分子発癌分野
中国側研究者氏名： Yu Zhang	職名： 教授
所属機関名： 北京大学	部署名：

4. 当該研究における発表論文等

なし

自己免疫疾患の抑制に必須な胸腺環境と T 細胞の分化制御

研究者氏名 秋山泰身
日本研究機関 東京大学医科学研究所
中国側共同研究者 Yu Zhang
中国研究機関 北京大学

要 旨

胸腺髄質上皮細胞は自己免疫疾患の抑制に必須と考えられている。これまで胸腺髄質上皮細胞は、自己臓器反応性 T 細胞が発生途中にアポトーシスにより除去することで自己免疫疾患の抑制を行っていると考えられてきた。ところが最近、胸腺髄質上皮細胞が、胸腺内の T 細胞の最終分化段階にも関与することが明らかとなってきた。そのメカニズムを解明するために、胸腺髄質上皮細胞の成熟に必須なシグナル伝達因子である TRAF6 を欠損するマウスにおいて、胸腺内の T 細胞の分化を検討したところ、髄質で起きる分化段階の中で、最終段階が抑制されていることが明らかとなった。ついで TRAF6 に依存して分化する胸腺髄質上皮細胞がどのような機構で T 細胞分化を制御するのか調べるために、TRAF6 の上流のサイトカインシグナルである RANKL が、*in vitro* で胸腺髄質上皮細胞を分化誘導する際に、発現が上昇誘導する遺伝子をマイクロアレイ法により同定した。その結果、RANKL 刺激依存的な胸腺髄質上皮細胞の分化誘導に伴い、I 型インターフェロンの 1 つ IFN β および I 型インターフェロン誘導遺伝子群が誘導されるとの実験結果を得た。今後、I 型インターフェロンと T 細胞の胸腺内分化の関連、および胸腺髄質上皮細胞による自己免疫疾患の抑制における I 型インターフェロンおよびその誘導遺伝子の役割について検討することで、自己免疫疾患制御や T 細胞分化における新たな知見が得られると考えられる。

緒 言

個体の防御システムの 1 つである免疫系は、自己と非自己を巧妙に識別する。この識別機構は自己組織に対する免疫応答を抑制し、さらには食物などの無害な非自己に対しても免疫応答を抑制する。その一方で、外来病原体など有害な非自己のみならず癌のような有害な自己に対しても免疫応答は惹起する。これら識別機構の異常は、自己免疫疾患、アレルギー、癌などの難知性疾患発症の原因となり得る。

免疫系の識別機構がどのようにして成立するのか、未だに謎の部分が多く、その解明は基礎医学や免疫学における重要課題の 1 つである。また免疫系の識別機構を人為的に制御できれば、自己免疫疾患やアレルギーあるいは癌などの治療応用へと展開が期待できる。

獲得免疫応答に重要な T 細胞は、ほとんどが胸腺で分化成熟する。その際、自己に反応し得る T 細胞は胸腺で除去される。さらに、免疫反応を抑制する制御性 T 細胞も、そのほとんどが胸腺で分化する。これらの機構は、個体の自己-非自己識別機構に重要であり、その異常はヒトに自己免疫疾患を引き起こす(参考文献 1)。すなわち胸腺は T 細胞を産生するだけでなく、免疫系の自己-非自己識別能も制御していると考えられる。

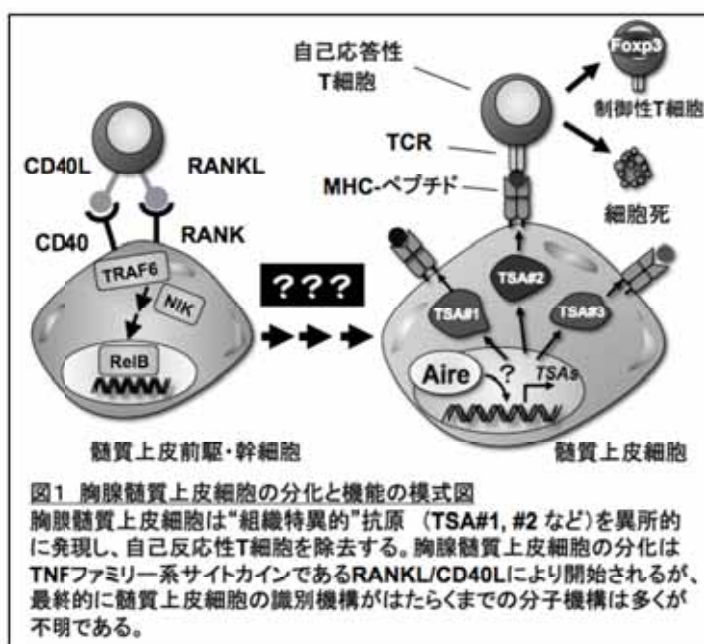


図1 胸腺髄質上皮細胞の分化と機能の模式図

胸腺髄質上皮細胞は“組織特異的”抗原 (TSA#1, #2 など) を異所的に発現し、自己反応性 T 細胞を除去する。胸腺髄質上皮細胞の分化は TNFファミリー系サイトカインである RANKL/CD40L により開始されるが、最終的に髄質上皮細胞の識別機構がはたらくまでの分子機構は多くが不明である。

胸腺が T 細胞の“識別能”を決定する上で重要なのが、T 細胞表面の抗原受容体(TCR)と抗原提示細胞の主要組織適合抗原 (MHC) ペプチド複合体との相互作用である。その際に抗原提示細胞として機能する細胞の一群が、胸腺の髄質領域に局在する「髄質上皮細胞」であり、他の細胞には見られないユニークな性質を持つ。すなわち、髄質上皮細胞は、(インシュリンのように) 特定組織に固有に発現するタンパク質を、微量であるが多種類にわたり「異所的に」発現する (図 1; 参考文献 2)。これまでに、髄質上皮細胞はこれら“組織特異的”抗原を、胸腺内で T 細胞へ“異所的”に提示することで、自己組織に応答する T 細胞を除去する、あるいは転写因子 Foxp3 を発現する制御性 T 細胞の分化を誘導する、との仮説が提唱され (図 1)、この機構は個体の自己-非自己識別に必須と考えられている (参考文献 2)。実際、ヒト自己免疫疾患の原因遺伝子である Autoimmune regulator (AIRE) は髄質上皮細胞において、一部の組織特異的抗原の発現を制御することで自己免疫疾患を抑制する、と判明した (参考文献 3)。一方で、本研究課題の中国側の共同研究者である Yu Zhang 博士は、Aire 欠損マウスで T 細胞の最終分化が異常となることを発見している (参考文献 4)。この結果は、これまでに考えられていた機構以外に胸腺髄質上皮細胞による自己免疫疾患の抑制機構が存在することを示唆している。そこで本研究課題は、胸腺髄質上皮細胞の分化研究を行ってきた報告者と、胸腺髄質での T 細胞の最終分化を研究してきた中国側研究者とが情報交換しながら共同研究を行うことで、自己免疫に必要な胸腺髄質上皮細胞と T 細胞の分化機構の関連を明らかにすることを目的とした。

研究対象と方法

<マウス>

TRAF6 欠損マウスは以前に報告したものをを用いた (参考文献 5)。胸腺器官培養に用いた胎仔マウスは、日本クレアより購入した妊娠マウスより調製した。

<抗体、試薬類>

APC-Cy5 ラベル抗 CD4 抗体、PE-Cy5 ラベル抗 CD8 抗体、FITC ラベル抗 CD69 抗体、PE ラベル抗 Qa2 抗体はファージングより購入した。組み換え RANKL は和光純薬より購入した。

<胎仔胸腺器官培養の調製と組み換え RANKL タンパク質による刺激実験>

胎生 14 日目の野生型 および TRAF6 遺伝子欠損の胎仔マウス胸腺を採取し、2'-DG (2'-Deoxyguanosine), 10%FBS を含む R10 培地に浮かべたフィルター上で 4 日間培養した。ついで組み換え RANKL の存在下、様々な時間培養した。培養した胸腺ストローマから RNeasy micro Kit (QIAGEN) を用いて、RNA を調製した。RNA は Superscript III cDNA synthesis kit (Invitrogen) を用いて、cDNA を合成した。cDNA を鋳型とし、各々の遺伝子に特異的なプライマーと Fast Start Universal SYBR-Green Master MIX を用いた SYBR-Green 法により、ABI 7300 Real time PCR system を用いて定量的 RT-PCR を行った。定量した値は各々のサンプルの Gapdh の発現量で補正した。

<胸腺細胞の調製とフローサイトメーターによる解析>

生後約 14 日の TRAF6 欠損マウスおよび野生型コントロールマウスから胸腺を採取した。ついで得られた胸腺を、スライドグラスによりすりつぶし、胸腺細胞とした。胸腺細胞を蛍光ラベルした表面抗原抗体により常法に従って染色した。染色後、フローサイトメーター (FACS Caliber II; BD バイオサイエンス) により解析した。死細胞は 7-amino-actinomycin D により除外して解析した。

<倫理的な考慮>

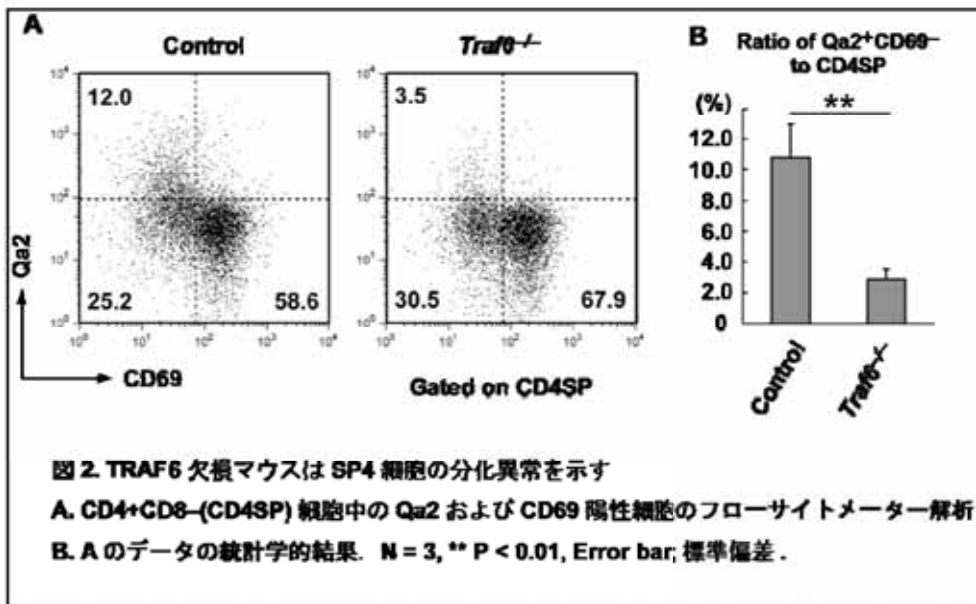
本研究課題ではヒトを対象とする研究は行っていない。マウスの飼育及び実験は東京大学の定める規定に従い行った。

結果

1. 胸腺髄質上皮細胞の形成が不全になる遺伝子改変マウスにおける T 細胞の後期分化

胸腺細胞は、その前駆細胞が胸腺に移入した後、いくつかの分化段階を経て、最終的にリンパ節など他の組織で免疫応答を

行う成熟した T 細胞へと分化する。その際、分化する T 細胞と胸腺内に存在する上皮細胞などの相互作用が重要となる。胸腺は皮質と髄質に分かれるが、胸腺に移行した前駆細胞はまず皮質に移行し、CD4 と CD8 の両方の表面抗原を持つ T 細胞へ分化した後、髄質へ移行する。ついで T 細胞は胸腺髄質上皮細胞と相互作用することで、自己反応性 T 細胞が除去される。同時に T 細胞は髄質で、SP1 (6C10+CD69+Qa-2-)、SP2 (6C10+CD69+Qa-2-)、SP3(6C10-CD69-Qa-2-)、SP4(6C10-CD69-Qa-2+)の過程を経て分化する (参考文献4)。



T 細胞の後期分化における胸腺髄質上皮細胞の役割を明らかにするために、成熟した胸腺髄質上皮細胞をほとんど持たない TRAF6 欠損マウス (参考文献5) について、CD4+CD8⁻画分内の CD69 と Qa-2 の発現をフローサイトメーターで検討した (図2)。野生型マウスでは、これまでの報告と一致して、SP1/SP2 画分、SP3 画分、SP4 画分に分離できた。一方、TRAF6 欠損マウスの胸腺では CD69-Qa-2⁺ の SP4 画分が有意に減少していた。

この結果は、TRAF6 依存的に分化した胸腺髄質上皮細胞は T 細胞の後期分化、特に SP3 から SP4 への移行に重要な役割を果たすことを強く示唆している。

2. RANK シグナル依存的に胸腺髄質上皮細胞で発現するサイトカインの同定

実験1の結果は、成熟した胸腺髄質上皮細胞は T 細胞の後期分化を制御していることを示しているが、その制御がどのような分子機構でなされているのか不明である。そこで TRAF6 依存的に胸腺髄質上皮細胞が分化するに伴い発現上昇するサイトカインを検討した。TRAF6 は

TNF レセプターファミリーからのシグナルを伝達し、NF-κB など転写因子を活性化するシグナル伝達因子である。胸腺髄質上皮細胞は TRAF6 の上流で機能する TNF レセプターファミリーメンバーの RANK のシグナルにより分化が誘導されることを以前に報告した (参考文献6)。これまでの報告者らの研究において、未熟な胸腺上皮細胞を含む胎仔胸腺ストローマ器官培養に TNF ファミリーに属する Receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) を作用させ

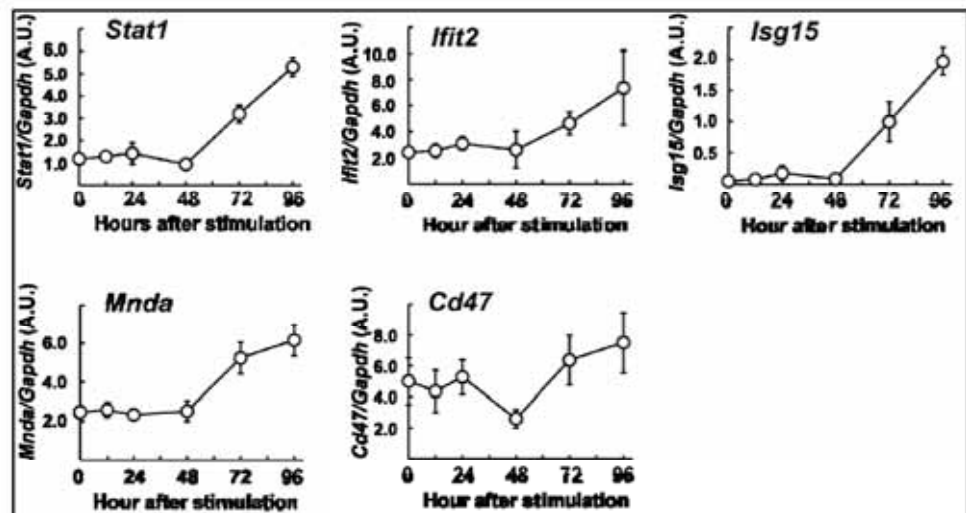


図3. 胸腺ストローマ器官培養における I 型インターフェロン誘導遺伝子の RANKL 依存的な発現変動

胎仔胸腺ストローマ (胎齢 14.5 日) に組み換え RANKL タンパク質 (1ug/ml) を作用させ、Stat1, Ifit2, Isg15, Mnda, CD47 の遺伝子発現を定量的な RT-PCR で検討した。

ることで成熟した胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導できることを見いだしている(参考文献6)。そこで、この実験系を利用して、髄質上皮細胞が分化するに伴い、変動する遺伝子群をマイクロアレイ解析により同定した。興味深いことに、それらの遺伝子群の中には、I型インターフェロンにより発現が誘導される遺伝子が多く含まれていた。まず、RANKL 依存的にこれらのI型インターフェロン誘導遺伝子が発現誘導することを確認するために、RANKL 刺激した胸腺ストローマ器官培養から得られるcDNA を定量的RT-PCR 法により解析した(図3)。その結果、複数のI型インターフェロン誘導遺伝子がRANKL 刺激依存的に誘導されることが証明した。

図3の結果は、I型インターフェロンが胸腺髄質上皮細胞でRANKL 依存的に発現誘導していることを示唆する。どこでI型インターフェロンの発現を定量的RT-PCR 法で解析したところ、胎仔胸腺ストローマでRANKL 依存的にIFN β が発現誘導することが分かった(図4)。

考 察

本研究課題でTRAF6欠損胸腺の解析により、TRAF6シグナルに依存して分化した胸腺髄質上皮細胞がT細胞の後期分化を制御していることが明らかとなった。さらにTRAF6を活性化して胸腺髄質上皮細胞の分化を誘導するRANKLシグナルは、胸腺上皮細胞より成る胸腺ストローマでI型インターフェロンであるIFN β およびI型インターフェロン誘導遺伝子群が発現誘導されることが明らかとなった。I型インターフェロンは末梢組織でのT細胞の分化に関与することが知られているが、胸腺で機能については報告がなく、I型インターフェロンが胸腺内T細胞の分化や自己免疫応答性T細胞の除去にどのように関与するのか、引き続き検討を行っている。

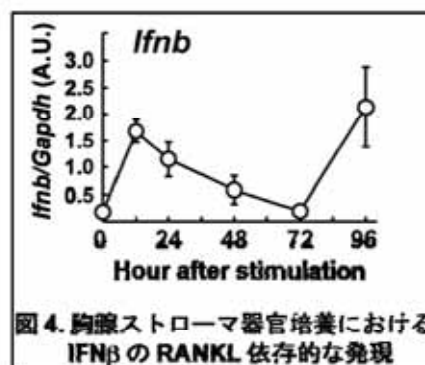


図4. 胸腺ストローマ器官培養におけるIFN β のRANKL 依存的な発現

参 考 文 献

1. Kamradt T. et al., *N. Engl. J. Med.*, 344, 655-664 (2001)
2. Kyweski B & Klein L., *Annu. Rev. Immunol.*, 24, 571-606 (2006)
3. Peterson P. et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 948-957 (2008)
4. Li J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 184, 18175-18180 (2007)
5. Akiyama T. et al. *Science* 308, 248-251 (2005)
6. Akiyama T* *Immunity* 29, 423-437 (2008)