

2011 年度
共同研究等助成事業報告集

財団法人 日中医学協会

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成事業報告集目次

1. 調査・共同研究

鈴木	亨	疾患関連蛋白質の高次構造に基づく機能害剤探索	1
李	元元	Oridonin による膀胱がん細胞死誘導とその制御機構の研究: 新規依存性受容体 UNC5D の役割の検討	8
香山	不二雄	食品中有機塩素農薬、ダイオキシン類、重金属曝露の疫学調査	14
戴	毅	TRPA1 受容体を標的とする天然薬物成分の探索およびその鎮痛メカニズムの解析	30
崔	星	癌幹細胞を標的とした肝癌の重粒子線治療の基礎的究	37
秦野	伸二	筋萎縮性側索硬化症の発症分子メカニズムに関する研究	43
尾崎	由基男	ジスルフィド異性化酵素 ER p 57 の血小板活性化、血栓形成に於ける役割	49
橋本	謙二	薬物依存症の治療薬としてのミノサイクリンの効果と作用メカニズムに関する研究	54
安井	孝周	尿路結石の一塩基多型を用いた遺伝子診断方法の開発と人種差の検討	60
浅村	尚生	小型肺癌に対する根治術としての縮小手術の評価～日中間における小型肺癌に対する縮小手術の標準化に向けての検証	66
宋	培培	科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドラインの中国での構築に向けた先行的基盤研究	72
吉川	雅之	チャ (Camellia sinensis) 花部の生体機能成分の解明と定量分析	79
菅崎	弘幸	OPG 遺伝子導入へのセメント芽細胞の反応様式と歯根吸収抑制の関係	85
沈	潔	日本と中国を精通する医療ソーシャルワーカー (MSW) の人材育成に関する研究	91

2. 中国人研究者・技術者招聘

河野 茂 中国吉林省の HIV 浸淫地域における真菌の薬剤耐心性と疫学研究・・・95

3. 在留中国人研究者

- 張 冬穎 抗ヒスタミン薬含有 OTC 薬服用後における脳内ヒスタミン H1 受容体占拠率の時間推移：健常者における陽電子断層撮影法（PET）測定・・・102
- 焦 其彬 心房筋特異的遺伝子欠損法の開発と応用・・・・・・・・・・・・・・109
- 鄧 澤義 頭頸部癌発症における HPV 感染の役割及び SCCA と頭頸部癌予後に関する研究・・・・・・・・・・・・・・115
- 石 棟 開放隅角緑内障、正常眼圧緑内障、発達緑内障の分子遺伝学的解析・・・123
- 郝 佳 ビスフォスフォネート（BP）局所投与による、骨粗鬆モデルラット脛骨骨髓内に埋入した薄膜ハイドロキシアパタイト（HA）コーティングインプラント骨性結合への効果・・・・・・・・・・・・・・130
- 裴 麗瑩 要介護高齢者と要介護者を介護している高齢者の精神健康と生活満足度に影響する要因の研究－中国と日本の比較より・・・・・・・・・・・・136
- 高 靖 新規分子 PRIP の開口分泌における役割の解明・・・・・・・・・・・・143

4. トラベルグラント

- 祖父江 元 東アジア神経学フォーラム・・・・・・・・・・・・・・150
- 帖佐 徹 アジア環境サーベイランスワークショップ・・・・・・・・・・・・151
- 土井 由利子 2011年世界睡眠学会・・・・・・・・・・・・・・152
- 浅川 要 日本中医学会第1回学術総会・・・・・・・・・・・・・・153

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2012 年 3 月 14 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： 鈴木 亨
所属機関名： 東京大学
所属部署名： 医科学研究所 職名：助教
所在地： 東京都港区白金台 4-6-1
電話： 03-5449-5303 内線：



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

疾患関連蛋白質の高次構造に基づく機能阻害剤探索

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 鈴木 亨	職名：助教
所属機関名： 東京大学	部署名：医科学研究所
中国側研究者氏名： Mark Bartlam	職名：教授
所属機関名： 南開大学	部署名：生命科学学院

4. 当該研究における発表論文等

5. 成果の概要

数種の大腸菌発現ベクターを検討した結果、全長はほとんど不溶性画分に存在してしまうため調製が困難であったが、いままでよりも 100 アミノ酸ほど長い組み換え Tob タンパク質 (1-263 アミノ酸) を大量に調製できるようになった。既知の Tob 結合タンパク質である CNOT7 や PABP との直接結合も問題なく検出することができたので、Tob 結合低分子化合物を同定したときに、その効果を検索する手段に利用できる見込みとなった。次に立体構造解析を行うために高純度タンパク質の精製、結晶化の検討を行ったが、C 末端側の配列はやはり流動性が高い性質を持つと考えられ、単独での結晶化は困難であった。相互作用タンパク質との結合状態によって C 末端の流動性がなくなり、しっかりとした構造をとることが推測されたので、現在は CNOT7 との共結晶化を進めるための精製を行っている。

一方、Tob や CNOT7 と結合する低分子化合物の探索を進めた。in silico スクリーニングではいくつか候補を得たものの実際に結合を検出できるものの同定には到らなかった。Biacore を用いたフラグメントスクリーニングでは約 2000 の低分子化合物ライブラリーの中から 100 程度の Tob 結合低分子を選抜することができた。現在その中から Tob と CNOT7 の結合に影響する低分子をさらに探索する解析を進めている。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

中国人共同研究者は組み換えタンパク質の大量調製、精製、及び結晶化の最適化条件の探索を進めた。Tob タンパク質の精製までは順調に進めることができたが、結晶化の検討では 100 以上の条件を試したものの、良好な結果は得られなかった。熱力学的な解析などの結果から、相互作用分子との共結晶化が有効なのではないかと考え、現在 TobD2 (今回精製した 1-263 アミノ酸の組み換えタンパク質) と CNOT7 が相互作用したものの精製を開始している。精製同時に Tob と CNOT7 結合タンパク質に結合する低分子化合物の探索を行った。すでに解析結果の得られている Tob の前半 3 分の 1 [Tob (1-138)] と CNOT7 全長の 3 次元構造の情報に基づき、約 60 万の化合物データベースを使用して結合候補化合物のスクリーニングを行った。このスクリーニングでは特に CNOT7 の触媒活性部位、Tob と CNOT7 の相互作用面に焦点をあてて探索した。CNOT7 に関しては 4 つの候補を得た。しかし、Biacore による相互作用評価ではほとんど相互作用を検出することができず、in vitro 反応で CNOT7 の酵素活性を調べる解析でも何も影響を与えないという結果を得た。In silico スクリーニングの改善を検討すると共に、Biacore によるフラグメントスクリーニングで良い候補を得つつあるので、その低分子化合物で Tob との共結晶解析を主として進めるよう議論を進めている。

疾患関連蛋白質の高次構造に基づく機能阻害剤探索

研究者氏名	助教 鈴木 亨、田代 晋也、 教授 津本 浩平、 教授 山本 雅
所属機関	東京大学医科学研究所
共同研究者名	教授 Mark Bartlam、白玉巍
共同研究者所属機関	南開大学

<要旨>

細胞内シグナル分子Tob(Transducer of ErbB2)はRNA分解酵素であるCNOT7, mRNA結合タンパク質PABP, 骨形成関連分子Smadなど様々なタンパク質分子と物理的に相互作用し、多様な生命現象に関与している。Tob遺伝子の発現を欠損したマウスでは癌の自然発症率の増加のほか、骨芽細胞の割合の上昇に伴う骨密度の亢進が観察されている。従って、Tobと他の因子との相互作用を抑制するなど、Tobの機能に影響を与える低分子化合物を探索することは骨形成不全や癌の治療に効果のある薬剤開発の手掛かりとなる可能性がある。そこで立体構造面での理解を深めると共に、Tobと結合する低分子化合物、その中でも特に機能阻害、相互作用状態に影響を与える化合物の探索をin vitro、およびデータベースを使用したin silicoで進めた。立体構造解析については、結晶化までいたるにはさらなる改善が必要であるものの、これまでの138アミノ酸から263アミノ酸まで延ばしたTobの構造に取り組むことのできる可能性が持ち上がってきた。またTobに結合する低分子化合物の探索も進み、約2,000の低分子化合物の中から、100程度の候補を得ることができた。そのなかでも既知の相互作用分子の会合に影響を与え得る化合物の選別が可能な段階まで到達することができた。

<Key Words> Tob、CNOT7、mRNA制御、相互作用阻害

<緒言>

細胞内シグナル分子Tobは細胞の増殖、癌化、骨形成、DNA損傷依存的細胞死などに関与することが示されている分子である。その多様な生命現象に関与する上で、TobはRNA分解酵素CNOT7, mRNA結合タンパク質PABP, 骨形成関連分子Smadなど様々なタンパク質分子と物理的に相互作用することが重要である。Tob遺伝子欠損マウスは癌の自然発症率が高く、骨芽細胞の割合の上昇に伴う骨密度の亢進も観察されている。一方で、ある種のヒト癌細胞ではTobの発現を抑制すると抗癌剤の処理に強い感受性を示すという興味深い結果も得られた。従って、Tobと他の因子との相互作用を抑制したり、あるいはTobのタンパク質としての安定性に影響を与える低分子化合物を探索することは骨形成不全や癌の治療に効果のある薬剤開発の手掛かりとなる可能性があるとともに、Tobの新たな生物学的機能の発見にもつながることが期待される。研究者らを含むグループの近年の成果により、部分的なものではあるがTobの3次元立体構造をX線構造解析により明らかにすることができた。また、Tob類似タンパク質のBtg2では全体構造を明らかにした。このような研究背景を踏まえ、本研究ではより全長に近いTobタンパク質の立体構造の解明に取り組むと共に、Tobと結合する低分子化合物、その中でも特に機能阻害、相互作用状態に影響を与える化合物の探索を進めた。

<対象と方法>

「結晶化の検討とin silicoスクリーニング」ヒトのTobcDNAを大腸菌やバキュロウイルスを用いて組み換えタンパク質を作製する系に導入する。様々な長さのcDNAを挿入した構築を用意し、安定で且つ大

量に調製が可能な、なるべく全長に近い Tob タンパク質を選別する。その選別した構築の Tob を大量調製、精製して X 線結晶化、その後の構造解析の検討へと進めていく。並行して、すでに解析された CNOT7 の立体構造、Tob の部分立体構造の結果を利用して、結合する低分子化合物の探索をする。

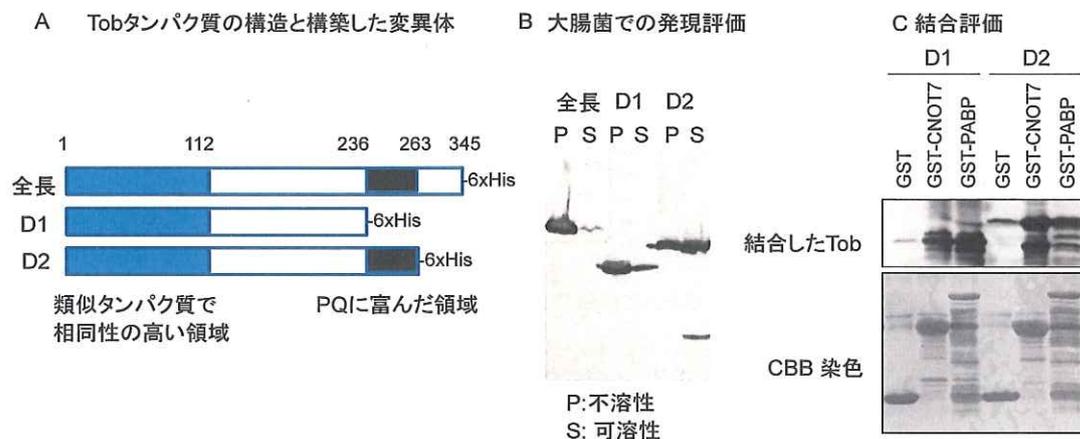
「低分子化合物のスクリーニング」構造解析結果の得られている Tob(1-138)を用いた。用いた装置は BiacoreT200 で、センサーチップ CM5 上にアミンカップリング法により Tob(1-138)を約 4000RU 固定化した。固定化バッファとしては PBS+0.005% Tween20 を用いた。

本研究中で用いたライブラリは、創薬オープンイノベーションセンターより提供されたフラグメントスクリーニング用ライブラリ(化合物濃度 10 mM, 1,994 化合物)である。このライブラリは主に可溶化度を指標に集められた分子量 200 Da 前後の化合物群であり、濃度 200 μM の条件下では 5%DMSO を含むバッファ中で十分な溶解度を示すことが確かめられている。このライブラリについて、化合物を溶解している DMSO も含めて DMSO 濃度 5%、化合物最終濃度 200 μM となるように 25 mM HEPES-NaOH (pH7.4), 150 mM NaCl, 10 μM MgCl₂, 0.005% Tween20 バッファを用いて希釈した。得られた化合物群をプレート(1 プレート 384 ウェル、計 6 枚)に分注し、Tob(1-138)を固定化した流路上に流した。

<結果>

すでに報告されている Tob の結晶構造はアミノ末端側 138 アミノ酸からなる全長の 3 分の 1 相当のものである。より全長に近い Tob タンパク質の立体構造解析を試みるため、まずは大腸菌で大量に組み換えタンパク質を調製する系のなかでもカルボキシ末端に精製用タグ(今回の場合ヒスチジン)を付加するベクター(pET26b)を利用した。これは Tob タンパク質の C 末端側の領域がタンパク質としての安定性に大きく寄与しており、カルボキシ末端側を欠損させたり、エピトープタグを付加した場合に哺乳動物細胞内では安定性が大きく向上するという性質に基づき、大腸菌内でもその性質が反映されることを推測した上での方策である。しかし、全長 Tob はやはり殆どすべてが不溶性画分として発現してしまう結果となった。カルボキシ末端の領域は安定性だけではなく、不溶性の要因ともなっていると考えられた。次にカルボキシ末端を欠損した欠変異体を作製し、大腸菌内での発現状況を調査した。作製した変異体はカルボキシ末端領域の特徴配列であるプロリン、グルタミン酸(PQ) rich 領域に着目して、開始メチオニンから PQ 領域の手前まで(1-236; D1)と PQ 領域まで(1-263; D2)の 2 つである(図 1 A)。2 つの構築では、全長に比べて不溶性からの改善を示し、特に PQ 領域を含んだ D2 では可溶性画分の飛躍的な増加がみられた(図 1 B)。そしてこのように調製した Tob の D1、D2 は CNOT7 や PABP と *in vitro* で特異的に、且つ強く結合する性質も保持していたので、その後の解析に使用できるものと考えられた(図 1 C)。

図 1 Tobタンパク質調製の評価

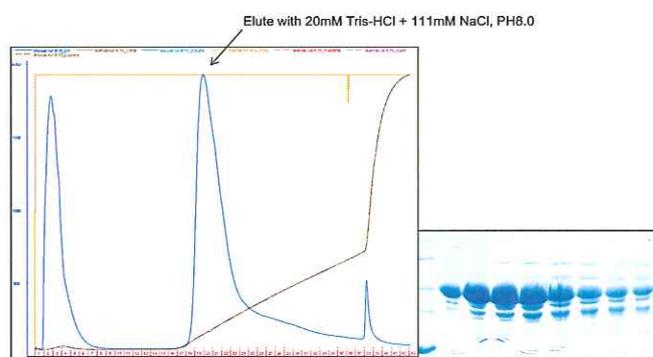


「結晶化の検討」

図1の結果よりTobD2が可溶性も高く、大量の調製が可能と考えられたので、精製、及び結晶化の検討を行った。まず大腸菌の可溶化液をNi-NTAカラムで大部分のHisタグ付きTobタンパク質を回収した。次にイオン交換カラム(Resource Q)、ゲルろ過カラム(Sephadex 75)にかけて精製を行った。イオン交換カラムによる精製の例を図2に示すが、良好な精製結果が得られている。そして、3つのカラムにかけて精製したTobについて結晶化の検討を行った。これまでにCrystal Screen I, II, Index 1-96, Wizard I, IIなど数多くの結晶化kitを用いて検討したが、結晶を得ることができなかった。Tobはリン酸化タンパク質であり、Tob(1-138)には含まれず、TobD1やD2に含まれる領域に主要なリン酸化部位を有している。そのリン酸化部位について、リン酸化状態を模倣するアミノ酸であるグルタミン酸に置換したTobでも同様の検討を行ったが、結果は同じであった。

図2 TobD2の精製

Purification of TobD2-6His with Ion Exchange Chromatography(Resource Q)



「Tob, CNOT7に結合する低分子化合物のin silicoスクリーニング」

文献でえられた構造をもとに、約60万の化合物を含むデータベースの中から、Tob(CNOT7との結合面)とCNOT7(触媒活性部位)に結合する低分子化合物の探索を行った。先にCNOT7について有力な候補が4つ得られ、そのうち2つが入手可能なものだったので、結合を評価した。しかし、2つとも結合強度を示す値が5以下と極めて低く、結合の可能性を認められなかった。(結合する例は図4参照)1つの例を図3に示す。

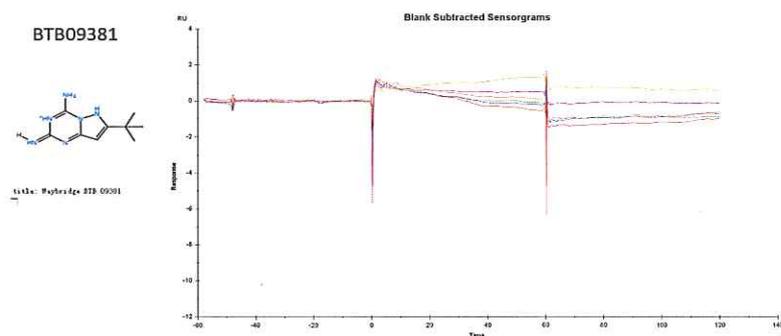


図3 CNOT7結合候補低分子化合物の評価。左は得られた候補の構造を示している。

CNOT7の酵素活性はin vitroで測定できるので、少なくとも酵素活性に影響するかどうか検討したが、この結合活性の結果と一致して、高濃度の設定でもCNOT7がポリARNを分解する活性を変化させないことも確認された。

「Tobに結合する低分子化合物探索」

フラグメントスクリーニング用ライブラリ(化合物濃度10 mM, 1994化合物)を用いて、Tobに結合する低分子化合物の探索を行った。このライブラリについて、化合物を溶解しているDMSOも含めてDMSO濃度

5%、化合物最終濃度 200 μM となるように 25 mM HEPES-NaOH (pH7.4), 150 mM NaCl, 10 μM MgCl_2 , 0.005% Tween20 バッファを用いて希釈した。得られた化合物群をプレート(1 プレート 384 ウェル、計 6 枚)に分注し、Tob1N138 を固定化した流路上に流した。この際、コンタクトタイムを 15 秒と比較的短めにとることで、非特異的な結合を防いだ。6 プレート中のうち一つについての結果を例として図 4 に示す。

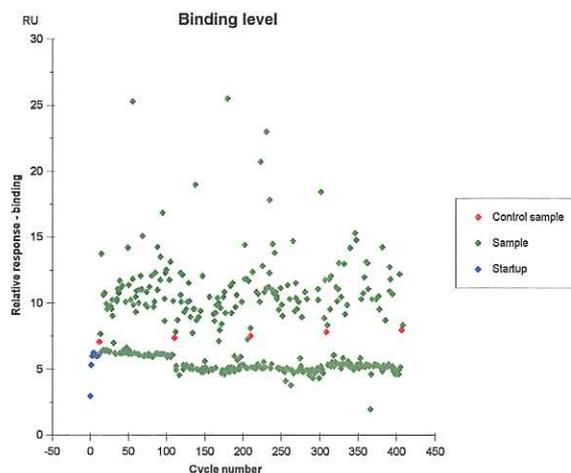


図 4 フラグメントスクリーニングの結果

緑点が各化合物サンプルを示し、赤点がネガティブコントロールとして用いた測定バッファを表す。グラフ縦軸は化合物が結合した量に対応する。本研究ではポジティブコントロールが存在しないため、各プレートから結合量上位 5%、なおかつ性質の良い結合を示した化合物を選択した。ここでいう性質の良い結合とは、結合、解離ともに速い結合のことである。(フラグメントスクリーニングの場合、得られる化合物の結合が弱いため、特異的な結合で解離が遅くなることはめったにない)。結果として、約 100 種類の化合物が選択された。次に Tob の機能に何らかの影響を与える目的にかなうものを選別するために、これらの特異的と考えられる結合を示した化合物について競合実験を行い、実際に蛋白質間相互作用を阻害する化合物を選別している段階である。

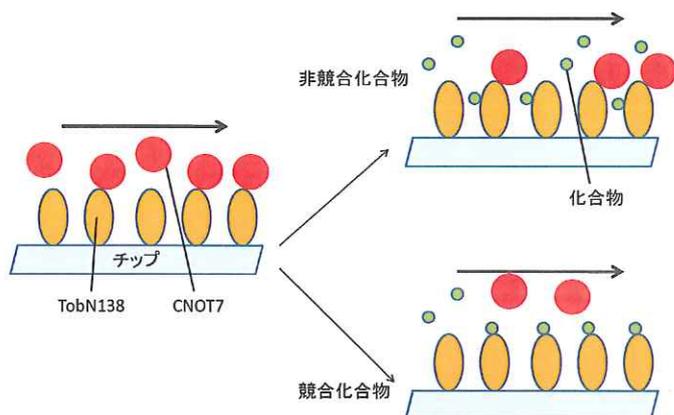
<考察>

今回の研究の結果、これまでよりも 100 アミノ酸以上長い組み換え Tob タンパク質を調製することが可能になり、精製標品も得ることができた。しかし結晶化となると困難な点が多く、いままでの研究結果からも C 末端部位の流動性が大きく不利な側面を与えていると考えられた。Tob と CNOT7 の熱力学的相互作用評価した結果、Tob の PQ に富んだ領域が CNOT7 との結合に際し、流動的ではなくなり、しっかりした構造をとる可能性が示唆されている。従って CNOT7 や PABP などの既知の相互作用分子との共結晶を作製することが有力な改善手段と考えられる。C 末端側の役割を考察する上でもその法が望ましいと考えられるので、現在 CNOT7 などとの共結晶化の条件検討を開始している。

Tob、CNOT7 と結合する低分子化合物の探索はデータベースを利用した *in silico* スクリーニングと Biacore を用いた *in vitro* スクリーニングの両方を用いた。*in silico* スクリーニングではより結合部位を限定させて探索できるという利点があり、目的とする低分子の同定が期待された。実際にいくつかの候補が得られたが、それらは結合しないという結果になった。Tob についてもいくつかも候補を得ているが CNOT7 の例を考えると、まずはスクリーニングについて改善をしなければならないかもしれない。さらにデータベース上に 60 万の化合物があるが、水や DMSO などに対する溶解度が考慮されていない点も問題があるかもしれない。同定されたうち、いくつかの低分子化合物は溶解しないためにその後の解析に進められないものも存在した。溶解しやすくなるような改変を加えるなどの手法も視野にいれるべきかもしれない。いずれにせよ、Tob についても得られた最終候補は、化合物が入手でき次第結合の評価

をする必要があると考えている。

一方で BiacoreT200 を用いたフラグメントスクリーニングでは特異的に結合する分子を得ることができた。こちらの解析は非特異的結合に注意することと、結合面を選択することは困難であるため、目的の化合物を得るためには何段階かのスクリーニングを行うことに多少の困難は存在するが、あくまで結合がスクリーニングの指標なので、効果的に進める事が出来た。約 2000 の化合物のうち 100 程度 Tob 結合低分子化合物として絞り込むことができ、現在 BiacoreT200 を用いた競合アッセイで CNOT7 との結合を阻害する化合物を探索している段階である。競合アッセイの概念図を参考資料として以下に示す。



参考資料 競合アッセイの概念図

チップ上に Tob (1-138) を固定化した状態で化合物と CNOT7 を同時に流す。競合する化合物の場合は CNOT7 の結合が阻害され、競合しない場合は阻害されない。もし仮に CNOT7 の結合が化合物の結合によって阻害された場合は、CNOT7 は化合物に比べ約 100 倍分子量が大きいいため、チップ上にかかる重さを認識する Biacore は CNOT7 単独を流した場合に比べ小さなレスポンスを示すと推測される。

<参考文献>

1. Wang H., et al. Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *The EMBO Journal* (2010) **29**, 2566-2576.
2. Horiuchi M., et al. Structural basis for the antiproliferative activity of the Tob-hCaf1 complex. *The Journal of Biological Chemistry* (2009) **284**, 13244-13255.
3. Suzuki T., et al. Proteasome-mediated degradation of Tob is pivotal for triggering UV-induced apoptosis. *Oncogene* (2009) **28**, 401-411.
4. Yang X., et al. Crystal structures of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity. *Nucleic Acids Research* (2008) **36**, 6872-6881.
5. Okochi K., et al. Interaction of anti-proliferative protein Tob with poly(A)-binding protein and inducible poly(A)-binding protein: implication of Tob in translational control. *Genes to Cells* (2005) **10**, 151-163
6. Yoshida Y., et al. Mice lacking a transcriptional corepressor Tob are predisposed to cancer. *Genes & Development* (2003) **17**, 1201-1206
7. Suzuki T., et al. Phosphorylation of three regulatory serines of Tob by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation. *Genes & Development* (2002) **16**, 1356-1370

作成日：2012年3月14日

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2012 年 3 月 14 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： 李 元元 
所属機関名： 千葉県がんセンター
所属部署名： 研究局 職名：研究員
所在地： 千葉県千葉市中央区仁戸名町666-2
電 話： 043-264-5431 内線：5202

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

Oridonin による膀胱がん細胞死誘導とその制御機構の研究：新規依存性受容体
UNC5D の役割の検討

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 李 元元	職名：研究員
所属機関名： 千葉県がんセンター	部署名：研究局
中国側研究者氏名： 朱 育焱	職名：助教授
所属機関名： 中国医科大学第一付属病院	部署名：泌尿器外科

4. 当該研究における発表論文等

投稿予定である。

5. 成果の概要

本研究ではヒト膀胱がん T24、EJ および J82 細胞へのオリドニンの抑制効果およびその細胞死制御機構の解明と標的分子の探索を行った。その結果、オリドニンはこれらの膀胱がん細胞株にアポトーシスおよびオートファジーを誘発することによって細胞死を引き起こすことが判明した。さらに、EJ 細胞株を接種したマウスモデルを用いた実験ではオリドニンの膀胱がんへの抑制効果を *in vivo* で検証した。三つの細胞株の中に、T24 と EJ 細胞には癌細胞の成長・転移に関わると言われる分泌蛋白質である netrin1 の発現が非常に高く、その発現はオリドニン処理によって時間依存的減少することが分かった。さらに、netrin1 特異的 siRNA を用いて内在性の netrin1 をノックダウンした条件下において、オリドニンによる細胞死誘導が促進されることが観察された。一方、netrin1 の発現がほとんど検出できない J82 細胞ではオリドニン処理によって、netrin1 受容体である UNC5A および UNC5D が誘導されるのが明らかになった。さらに、臨床検体を用いた解析では netrin1 およびその受容体 UNC5A と UNC5D の発現が筋層浸潤性膀胱がんにおいて有意的に高いことが見出された。これらの結果はオリドニンが膀胱がんに対して明らかな腫瘍抑制効果を持つことと、netrin1 とその依存性受容体 UNC5 ファミリーが膀胱がんの進展に関わっており、オリドニンによる膀胱がん細胞死誘導機構の標的分子の一つであることが示唆された。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

中国人共同研究者の朱 育焱氏は、膀胱がんの臨床検体を用いて、netrin1 およびその依存性受容体である UNC5A および UNC5D の発現を Real-time PCR 法にて調べた。さらに、netrin1 の発現を免疫組織化学染色法にて検討した。その結果、netrin1 およびその依存性受容体 UNC5A と UNC5D は膀胱がんにおいて発現され、その発現が筋層浸潤性膀胱がんにおいて有意的に高いことが見出された。これらの結果は、Netrin1/ UNC5 ファミリーが膀胱がんの進展に関与することが示唆された。

Oridonin による膀胱がん細胞死誘導とその制御機構の研究:

依存性受容体 UNC5 ファミリー/netrin1 の役割の検討

研究者氏名	李元元
日本所属機関	日本千葉県がんセンター 研究員
中国側共同研究者名	朱育焱
中国所属機関	中国医科大学第一臨床学院泌尿器外科 助教授
共同研究者名	中川原章

要旨

膀胱がんは泌尿器悪性腫瘍の1つであり、尿路系腫瘍の中で発生頻度が一番高いものである。本研究ではヒト膀胱がん T24、EJ および J82 細胞へのオリドニンの抑制効果およびその細胞死制御機構の解明と標的分子の探索を行った。その結果、オリドニンはこれらの膀胱がん細胞株にアポトーシスおよびオートファジーを誘発することによって細胞死を引き起こすことが判明した。さらに、EJ 細胞を接種したマウスモデルを用いた実験ではオリドニンの膀胱がんへの抑制効果を *in vivo* で検証した。三つの細胞株の中に、T24 と EJ 細胞には癌細胞の成長・転移に関わると言われる分泌蛋白質である netrin1 の発現が非常に高く、その発現はオリドニン処理によって時間依存的に減少することが分かった。さらに、netrin1 特異的 siRNA を用いて内在性の netrin1 をノックダウンした条件下において、オリドニンによる細胞死誘導が促進されることが観察された。一方、netrin1 の発現がほとんど検出できない J82 細胞ではオリドニン処理によって、netrin1 依存性受容体である UNC5A および UNC5D が誘導されるのが明らかになった。さらに、臨床検体を用いた解析では netrin1 およびその受容体 UNC5A と UNC5D の発現が筋層浸潤性膀胱がんにおいて有意的に高いことが見出された。これらの結果はオリドニンが膀胱がんに対して明らかな腫瘍抑制効果をもつことと、netrin1 とその依存性受容体 UNC5 ファミリーが膀胱がんの進展に関わっており、オリドニンによる膀胱がん細胞死誘導機構の標的分子の一つであることが示唆された。

Key Words オリドニン, 膀胱がん, 細胞死, netrin1, UNC5 ファミリー

緒言:

膀胱がんは泌尿器悪性腫瘍の1つであり、尿路系腫瘍の中で発生頻度が一番高いものである。膀胱腫瘍の約8割を占めている表在癌は、内視鏡治療と化学療法を組み合わせて治療を行ったとしても、術後2年の再発率が50~70%と言われている[1]。浸潤性膀胱がんは予後が不良で、5年生存率が40-50%である[1]。したがって、膀胱がんに対する新しい有効な治療法の開発が重要である。

一方、発生、血管新生、神経変性などに重要な役割を果たす netrin1 とその受容体 DCC および UNC5 ファミリー (UNC5A, UNC5B, UNC5C と UNC5D) は腫瘍形成および転移に関与することが報告されている。DCC および UNC5 ファミリーはリガンドである netrin1 の有無による抗アポトーシス応答とアポトーシス促進応答を切り替える機能を持つことによって依存性受容体 (Dependence Receptors) と呼ばれ、条件的な癌抑制因子として働いていると考えられる[2, 3]。その中に、UNC5D は最近我々が独自に開発した神経芽腫由来の cDNA ライブラリーを用いて同定した UNC5 ファミリー新規メンバーである。これまでの我々の研究結果から、DNA 損傷処理など様々な刺激に応じて細胞死が誘導される過程において UNC5D ががん抑制遺伝子 p53 のターゲットとして、アポトーシスを誘導することが明らかになった [4]。これまでに、これらの netrin1 受容

体は遺伝子座のヘテロ接合性の消失 (Loss of heterozygosity, LOH) および発現低下がさまざまな腫瘍に検出された [5]。そして、netrin1 の発現は進行神経芽腫に高く、予後不良につながっている [6]。大腸がんでは netrin1 の発現パターンも異常になり、その受容体 DCC および UNC5 ファミリーが、大腸がん全体の半分以上においてダウンレギュレートされている [5, 7]。したがって、腫瘍形成および転移においては、netrin1 受容体経路が重要な役割を果たしているものと思われる。

オリドニン (Oridonin) は冬凌草 (*Rabdosia Rubescens*) と呼ばれる植物により抽出した生薬成分である。このオリドニンには抗炎症作用および抗腫瘍作用があることが知られている。これまでに、白血病、肝臓がん、大腸がんなど様々な悪性腫瘍においてオリドニンがアポトーシス (apoptosis) や自食作用 (autophagy) などを誘導し、がん細胞を細胞死させることが報告されているが [8-10]、膀胱がんでの抗腫瘍効果はまだ不明である。

本研究において、我々は定量的 PCR 法により 3 種類の膀胱がん細胞株および膀胱がん臨床検体における netrin1/UNC5 ファミリーの発現レベルを調べた。また、膀胱がんに対してオリドニンの抑制効果を in vivo および in vitro で検討した。さらに、オリドニンの細胞死制御機構における netrin1/UNC5 ファミリーの関与の有無を検討した。

対象と方法:

膀胱がん培養細胞株と siRNA 導入

ヒト膀胱がん細胞株 T24、EJ および J82 は 10% FCS を加えた RPMI 培地を用いて 37°C にて常法により培養した。Netrin1 siRNA (Santa Cruz) をマニュアルに従って細胞に導入した。48 時間後にオリドニン (Sigma) を添加し処理を行った。

RNA抽出と定量および半定量 RT-PCR

RNeasy Kit (Qiagen) または RNAiso Plus kit (TAKARA) を用いて培養細胞および臨床検体よりそれぞれ RNA を抽出し、マニュアルに従って cDNA を合成した。標的遺伝子の発現は定量 RT-PCR 法 (培養細胞由来サンプル: Applied Biosystems 7500; 臨床検体由来サンプル: Roche LightCycler) または半定量 RT-PCR 法にて測った。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内因性コントロールとした。

細胞増殖・細胞死解析

細胞増殖は細胞増殖アッセイキットの WST-8 (Dojinndo) を用いて解析した。細胞死は Trypan Blue 染色およびフローサイトメトリー法 (FACS) で検討した。Trypan Blue 染色ではオリドニンで処理した細胞を Trypan Blue (sigma) で染めて (0.2% (W/V))、血球計算盤を用いて総細胞数と青色に染められた死細胞数を算定した。FACS 解析では細胞をエタノールで一晩固定して、PI (Propidium Iodide) で染色した上で、細胞解析用装置 FACS Caliber (BD) にて解析を行った。

ウェスタンブロッティング

オリドニンで処理した細胞から調製した細胞ライセートを電気泳動によって分離して、PVDF 膜に転写し、特異的な抗体を用いて標的タンパク質の発現や活性化を ECL 検出法で検出した。

オリドニンによる抗腫瘍活性の in vivo 評価実験

1×10^6 の膀胱がん EJ 細胞をヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu, 6 週齢, ♀, 日本クリア) の皮下に移植した。移植五日後に腫瘍体積を指標にマウスを 2 群に群分け、オリドニン処理群にオリドニンを加えた PBS 溶液 (15 mg/kg/day) を、対照群に同量の DMSO を加えた PBS を腹腔内注射により 20 日間に投与した。腫瘍径を測定し、腫瘍体積の推移を観察した。実験が終わった際に、腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定した。

結果:

膀胱がんに対するオリドニンの抑制効果

オリドニンの膀胱がんに対する抑制効果を *in vitro* において検討した。ヒト膀胱がん細胞株 T24、EJ および J82 を用いてオリドニンで 24 時間に処理したところ、オリドニン投与量の用量依存的に細胞死が起こることが観察した (Fig. 1)。また、細胞増殖アッセイキットの WST-8 を用いた細胞増殖解析、Trypan Blue 染色および FACS 解析を行って、同様な結果を得た。さらに、ヌードマウスを用いた EJ 細胞移植モデルでのオリドニンの抗腫瘍活性を検討した。コントロール群に比べて、オリドニンを投与した実験群は腫瘍体積および腫瘍重量が有意的に減っていた。これらの結果から、オリドニンが膀胱がんに対して確実な抑制効果をもつことが明らかになった。

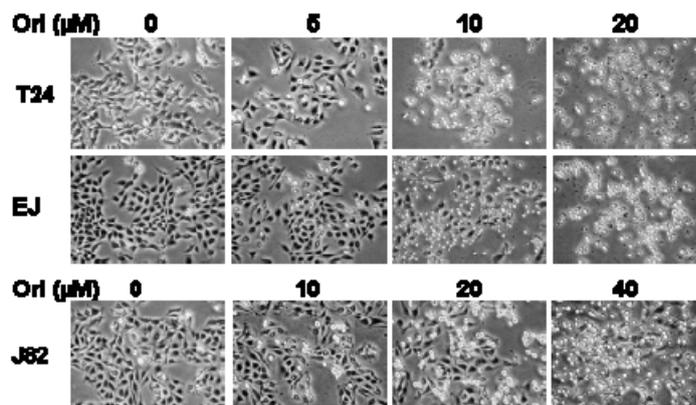


Fig. 1 オリドニンが膀胱がん細胞の細胞死を誘導する。

オリドニンによる膀胱がん細胞死誘導の機序

オリドニンによる膀胱がん細胞死誘導の機序を検討した。オリドニン処理を受けた細胞から調製した細胞ライセートを用いてウェスタンブロッティング法で解析をしたところ、アポトーシスを起こさせるシグナル伝達経路に重要な因子である PARP および caspase3 のオリドニン用量依存的活性化を検出した。さらに、オートファジーの特徴的なマーカーである LC3-II の増加が見られた (Fig. 2)。したがって、オリドニンによる膀胱がん細胞死の誘導過程において、アポトーシスとオートファジーの両方が活性化していることが判明した。

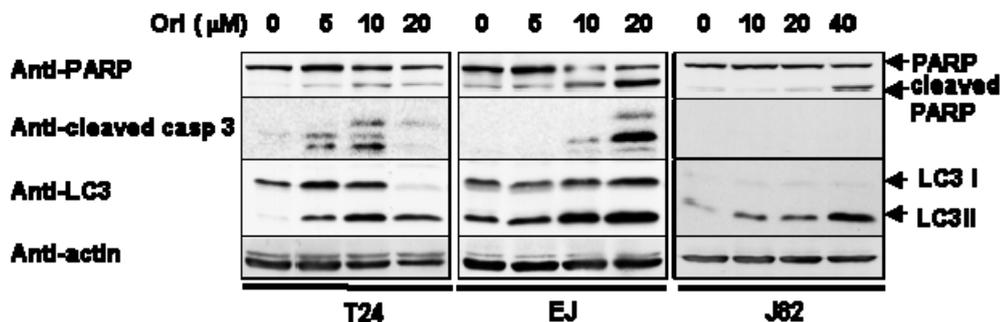


Fig. 2 オリドニンが膀胱がん細胞にアポトーシスとオートファジーを誘導する。

膀胱がんにおける netrin1/UNC5 ファミリーの発現

最近、UNC5D 遺伝子座を含む染色体 8 番のロックスが浸潤性膀胱がん患者に多くみられることが報告されている [11]。我々は膀胱がんにおける netrin1/UNC5 ファミリー mRNA の発現は定量 RT-PCR 法で測定した。その結果、netrin 1 およびその受容体 UNC5A と UNC5D の発現は T24 および EJ 細胞に高く、J82 にほとんど検出できなかった。一方、臨床検体を用いた解析では netrin 1 およびその受容体 UNC5A と UNC5D の発現

が筋層浸潤性膀胱がんに着意的に高いことが見出された。オリドニン処理に応じて、netrin 1 および UNC5A、UNC5D の発現は T24 細胞において、時間依存的に減少していた一方、EJ 細胞において、netrin 1 が下がっていたが、UNC5A と UNC5D が誘導された。J82 細胞には UNC5A と UNC5D が誘導された。さらに、netrin1 特異的 siRNA を用いて内在性の netrin1 をノックダウンした条件下において、オリドニンによる細胞死誘導が促進されることが観察された。

考 察:

本研究において、我々はオリドニンが膀胱がんに対して明らかな腫瘍抑制効果をもつことを *in vivo* と *in vitro* で検証した。その作用機構については、アポトーシスとオートファジーを誘導することによって細胞死を引き起こすことが半明した。さらに、我々は腫瘍形成および転移において重要な役割を果たしていると思われる netrin1 が膀胱がん細胞および筋層浸潤性膀胱がん組織に高く発現していることを見出した。そして、netrin1 の依存性受容体 UNC5 ファミリーメンバー UNC5A と UNC5D の発現が netrin1 の高発現細胞においても高いことから、netrin1/UNC5 経路は膀胱がん細胞の成長および浸潤・転移能につながる可能性が示唆される。興味深いことに、netrin1 の高発現細胞においてはオリドニン処理に応じて、netrin1 の発現が減少した一方、netrin1 の発現が検出できない細胞においてはその依存性受容体の UNC5A と UNC5D が誘導された。さらに、siRNA による netrin1 の発現抑制がオリドニンによる細胞死の誘導を促進した。これらの結果は netrin1/UNC5 がオリドニンによる細胞死誘導に重要な役割を担うことを示す。したがって、netrin1/UNC5 経路は膀胱がん治療の新たな標的分子になる可能性が示唆される。

参考文献:

1. Gallagher DJ, Milowsky MI. Bladder cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 10(3-4):205-15 (2009).
2. Goldschneider D, Mehlen P. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29(13):1865–1882 (2010).
3. Arakawa H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 4(12):978-87 (2004).
4. Wang H, et al. A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun.* 370(4):594-8 (2008).
5. Thiebault K, et al. The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(7):4173-8 (2003).
6. Delloye-Bourgeois C, et al. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med.* 206(4):833-47 (2009).
7. Mazelin L, et al. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature.* 431(7004):80-4 (2004).
8. Zhou GB, et al. Oridonin, a diterpenoid extracted from medicinal herbs, targets AML1-ETO fusion protein and shows potent antitumor activity with low adverse effects on t(8;21) leukemia *in vitro* and *in vivo*. *Blood.* 109(8):3441-50 (2007).
9. Gao FH, et al. Oridonin induces apoptosis and senescence in colorectal cancer cells by increasing histone hyperacetylation and regulation of p16, p21, p27 and c-myc. *BMC Cancer.* 10:610 (2010).
10. Wang H, et al. Oridonin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through MAPK and p53 signaling pathways in HepG2 cells. *Oncol Rep.* 24(3):647-51 (2010).
11. Koed K et al. High-density single nucleotide polymorphism array defines novel stage and location-dependent allelic imbalances in human bladder tumors. *Cancer Res.* 65(1):34-45 (2005).

作成日：2012 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会

2011 年共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2012 年 3 月 17 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団により助成金を受領し実施した調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受領者： 香山不二雄 

所属機関名：自治医科大学

所属部署名：医学部薬理学講座環境毒性学部門 職名：教授

所在地：栃木県下野市薬師寺 3 3 1 1-1

電話：0285-58-7336

内線： 3137

1. 受領金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

食品中有機塩素農薬、ダイオキシン類、重金属曝露の疫学調査

3. 研究組織

日本側研究者氏名：香山不二雄 職名： 教授

所属機関：自治医科大学 部署名：医学部薬理学講座環境毒性学部門

中国側研究者名：孫 素菊 職名： 助教授

所属機関：河北医科大学 部署名：医学部公衆衛生学院

4. 当該研究における発表論文等

Kayama F, Sun SJ, Nakamura M, Nakata T, Liu DW. Levels of dioxins, organochlorines, and heavy metals in fish and rice in China.

2012 年 8 月 26～31 日 DIOXIN2012 (オーストラリア ケアンズ) にて発表予定

5. 成果の概要

中国の河北省石家荘と天津市にて、米 21 検体および、魚 27 検体を採集した。

米中のカドミウム濃度、総ヒ素濃度、鉛濃度、クロム濃度を測定した。魚中の

ダイオキシン類および有機塩素系農薬の濃度を測定した。米中カドミウム濃度、

ヒ素濃度は数検体が、中国の最大許容濃度を越えていた。

ダイオキシン類濃度は、低い傾向を示したが、石家荘で購入した淡水魚中の

ダイオキシン濃度が海産魚のそれらより高い傾向を示し、湖沼の汚染があるこ

とが示唆された。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

河北省石家荘と天津市米検体および魚検体の収集と、来日時に日本国内の

(株) 日吉にて、米中重金属濃度を測定した。データの整理を行った。今回の

データはまだ、論文となっていないが、業績は、一連の関連のある 論文は、

Sun SJ, Kayama F, Zhao JH, Ge J, Yang YX, Fukatsu H, Iida T, Terada M, Liu DW. Longitudinal increases in PCDD/F and dl-PCB concentrations in human milk in northern China. *Chemosphere*. 2011 Oct;85(3):448-53.

食品中有機塩素農薬、ダイオキシン類、重金属曝露の疫学調査

日本側研究者氏名：香山不二雄

所属機関：自治医科大学

中国側研究者名：孫 素菊

所属機関：河北医科大学

【要旨】

中国の河北省石家荘と天津市にて、米 21 検体、魚 27 検体を採集し、米中カドミウム濃度、総ヒ素濃度、鉛濃度、クロム濃度を ICP-MS にて測定し、魚中有機塩素系農薬を GC/MS/MS にて、ダイオキシン濃度をケイラックス(CALUX)法にて測定した。米 21 検体のカドミウム、総ヒ素、鉛、クロム濃度を測定した。コーデックスのカドミウム濃度の最大値を 2 検体が、中国の食品中汚染物質許容濃度を 3 検体が超えていた。総ヒ素濃度は 6 検体が超えていた。鉛濃度は 1 検体が許容濃度と同じ濃度であった。中国の米中重金属濃度は、カドミウム、総ヒ素に関して、地域によってはかなり深刻な汚染状況にある可能性がある。

有機塩素系農薬濃度は、検出される魚は少なかった。しかし、DDT 代謝物/ DDT が 4 以下の検体があり、最近の DDT 使用の可能性が示唆された。

魚中ダイオキシン濃度は日本の海産魚の値に比べれば、低いレベルであるが、石家荘産の淡水魚のダイオキシン濃度が高く、内陸部の湖沼での養魚場のダイオキシン汚染または養殖用餌のダイオキシン濃度が高い可能性があり、今後とも調査を続ける必要がある。これまでの母乳調査で石家荘での経時的なダイオキシン濃度の上昇があることから、さらに、詳細な調査が必要である。

【緒言】

難分解性有機汚染物質(persistent organic pollutants; POPs)である有機塩素系農薬およびダイオキシンは、環境中に放出されるとなかなか分解されず、食物連鎖を通じて魚介類に蓄積され、食品から徐々に体内に蓄積される。ダイオキシンは脂肪性が高く、脂肪分の多い魚、肉、乳製品、卵などに蓄積されやすい。人の脂肪組織に溜まった POPs が母乳中に多く排出されるので、母乳中 POPs が高濃度となる。授乳期間中（1年間）に、母体に蓄積されたダイオキシンの約 60%が児の方に移行してしまうとも推定されている。

これまで、中国の母乳中ダイオキシン濃度および有機塩素系農薬（参考文献1，2，3）、臭素系難燃物質等（参考文献4）の調査を行ってきた。その結果、他の先進国はダイオキシン濃度が低下しているにもかかわらず、河北省石家荘にて経時的に採取した母乳中ダイオキシン濃度は上昇していることが明らかにしてきた（参考文献5）。

ダイオキシン類や有機塩素系農薬は蓄積性が高く、重金属汚染物質の母親から胎盤を介して胎児に移行し、胎児の発育に影響を与え、次世代に亘って影響する可能性が考えられている。

ダイオキシン類の発生源は、日本ではほとんど対策済であるが、中国は大気汚染、廃棄物焼却、化学工場、製鉄などからまだ発生しており、大気中粒子に付着し最終的に土壌や水を汚染する。さらにプランクトンや魚に食物連鎖も通して取り込まれていくことで、生物にも蓄積されていくと考えられている。日本では負荷量の60%が近海魚介類の摂取によるが、中国での曝露に関しては判っていない。それは、中国食品中のPOPs濃度および重金属濃度の知見が不足しているためである。そのため、中国にて採取した米、魚、肉類の重金属濃度、有機塩素系農薬濃度、ダイオキシン類濃度を測定して、中国食品の汚染レベルを調べると共に、摂取量から求められる曝露量から健康リスクを考察する必要がある。

【目的】

中国における重金属および難分解性有機汚染物質(POPs)の環境汚染に関してこれまで、河北医科大学と自治医科大学とは「日中母乳にダイオキシン、有機塩素農薬に係るリスク評価」について研究してきた。今回、中国の南部地域の米中重金属汚染と河北省石家荘および天津市にて魚を、石家荘で肉類を購入し、POPsとして有機塩素系農薬およびダイオキシン濃度を測定し、健康リスクに関して調査する。

【方法】

1. 食品収集（米、魚、肉類）

白米サンプルは、南部中国各地から21サンプルを収集した。河北省にて魚サンプル23品目（河北省石家荘市13品目、天津市10品目）それぞれ3検体を購入し、同重量を採取しプールサンプルとして混和して1検体とした。養殖場所は、鮎、紅焼魚（魚即）、鯉、鯰が石家荘近郊、草魚は黄河流域、ローチ（天津市）、鯉（天津市）、草魚（天津市）、ナマズ（天津市）、ハス（天津市）海水魚の採取場所は、鱈、鯛、平目、アイナメ、太刀魚、（浙江省舟山市）ボラ（山東省青島市）、鯖（江蘇省常州市、天津市）、太刀魚（天津市）、平目（天津市）、ハス（鯉科の肉食魚、天津市）、マナガツオ（江蘇省常州市）である。

肉類は石家荘市で購入し、魚と同様に3検体をプールして1検体とした。羊肉（内モンゴル自治区産）、鳥肉、豚肉、牛肉は石家荘周辺産であった。

2. 米中重金属測定

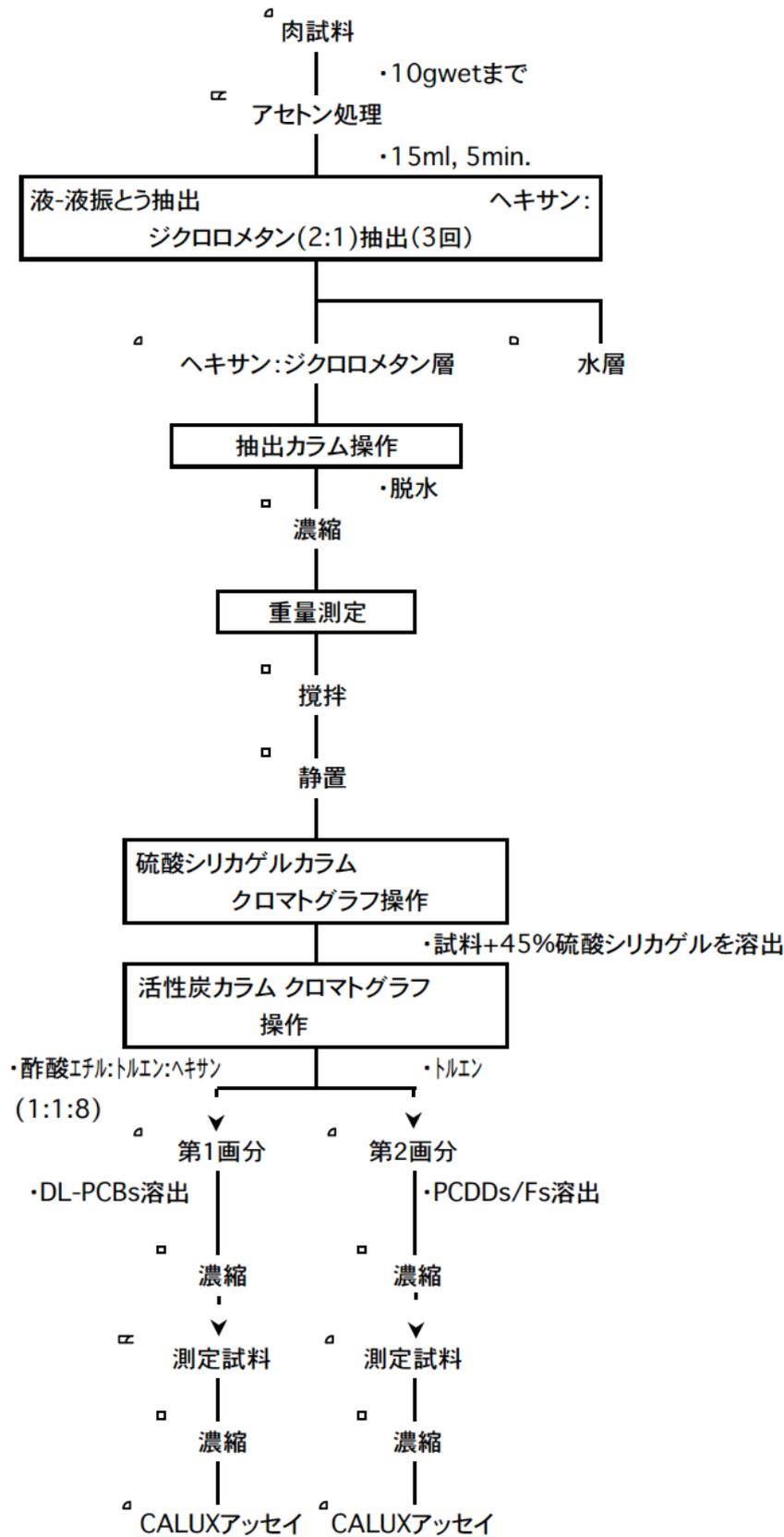
米サンプルは、(株)日吉にて粉碎の後に、約1グラムを正確に測り、硝酸にてマクロウェーブ抽出した後に、ろ紙で濾過した後に、ICP/MSにより、カドミウム、総ヒ素、鉛、クロム濃度を測定した。

3. 魚および肉中の有機塩素系農薬測定

それぞれの魚および肉はそれぞれの地域で3個体を1検体にプール試料とした。試料はホモジネートし、アセトン処理およびヘキサン抽出し、フロリジルミニカラムクロマトグラフィーにて抽出し、濃縮してヘキサン1mlに溶解して、GC/MS/MSにより測定した。て、サンプルを当教室に運び、食品中汚染物質を測定する必要がある。 α -ヘキサクロルヘキサン(α -HCH)、 β -HCH、 γ -HCH、 δ -HCH、HCB、ヘプタクロール(Heptachlor)、ヘプタコロール・エポキサイド(Heptachlor-epoxide)、オキシ・クロルデン(Oxy-Chlorden)、アルドリン(Aldrin)、ディルドリン(Dieldrin)、エンドリン(Endrin)、トランス・クロルデン(trans-Chlorden)、cis-Chlorden、trans-Nonachlor、cis-Nonachlor、2,4'-DDE、4,4'-DDE、2,4'-DDD、2,4'-DDT、4,4'-DDD、4,4'-DDTを測定した。

4. 魚および肉中ダイオキシン類測定

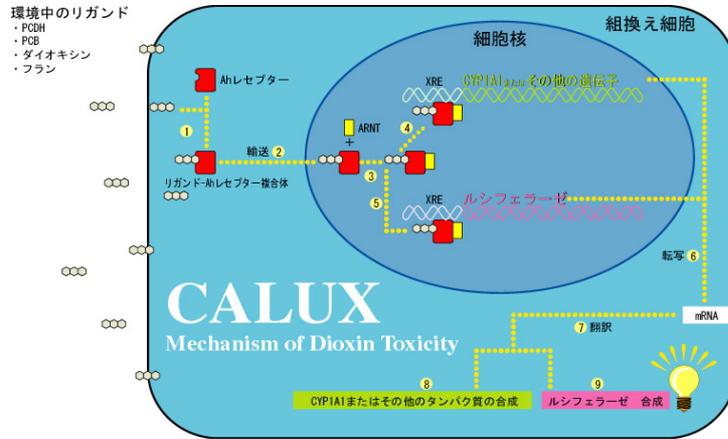
分析フロー(肉)



試料を前処理として、硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法（ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流域に 4 個のダイオキシン応答配列 DRE を含むシトクロム P450 (CYP1A1) プロモーターを持つプラスミド pGudLuc6.1 を、マウス肝ガン細胞 Hepa1c1c7 に導入した細胞) 用いて、細胞の蛍光を測り、2,4,7,8-TCDD に対する検量線から検体中の濃度を計算した。(生物検定法として、環境省の公定法および U.S. EPA の公定法)

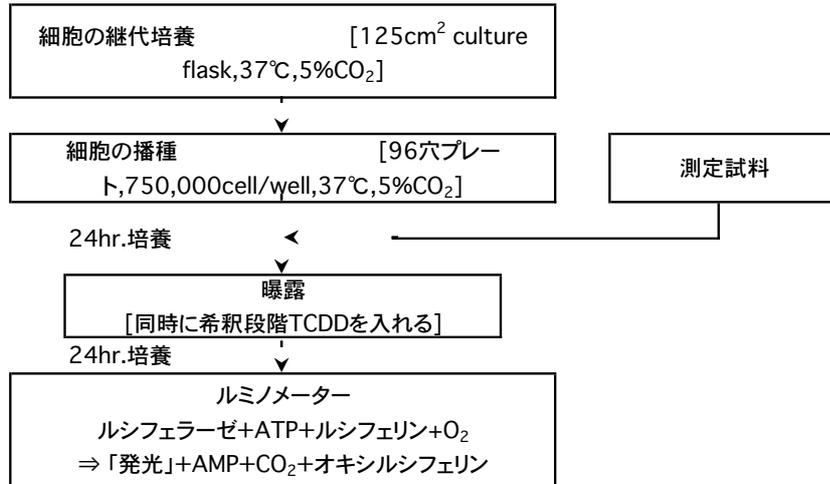
[ケイラックスH1L6.1c2細胞 原理図]

前処理に、硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞H1L6.1c2を用いたレポーター遺伝子アッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(ダイオキシン類応答性組換え細胞H1L6.1c2は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の近傍に4個のダイオキシン応答配列DREを含むシトクロムP450(CYP1A1)プロモーターを持つプラスミドpGudLuc6.1を、マウス肝ガン細胞Hepa1c1c7に導入した細胞)

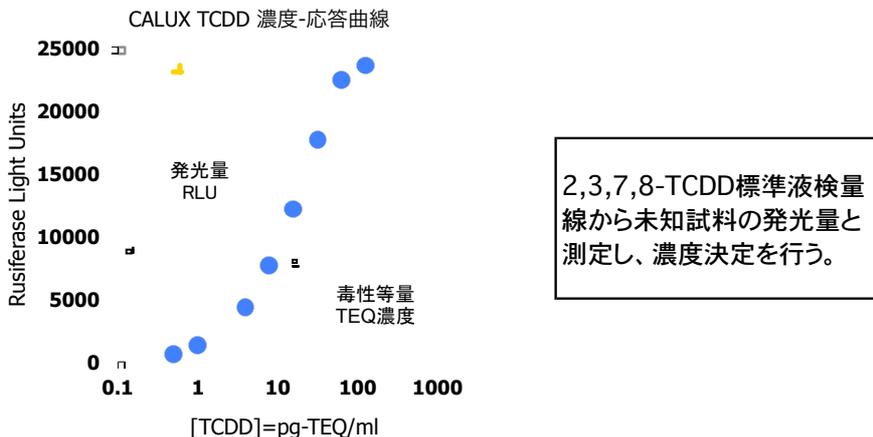


- ①AhRに結合、②核内への移行、③Arntとの結合、④、⑤DNA上のダイオキシン特異的応答領域への結合
- ⑥転写によるmRNAの誘導、⑦翻訳による各種蛋白質の生合成
- ⑧7-ethoxyresorufin (CYP1A1) ⇒ resorufin
- ⑨ルシフェラーゼ+ATP+ルシフェリン+O₂ ⇒ 「発光」+AMP+CO₂+オキシルシフェリン CALUX [発光光度計]

[ケイラックスアッセイフロー]



[ケイラックスにおけるTCDDの濃度-反応曲線]



【結果】

1. 米中重金属（カドミウム、ヒ素、鉛、クロム）を 21 検体について測定した。カドミウムの中央値 0.06mg/kg、幾何平均 0.06mg/kg、であった。しかし、検体 No. 4 は、0.55mg/kg、検体 No. 5 は 1.59mg/kg であり、コーデックスの最大値 0.4mg/kg、中国の食品中汚染物質基準値を定めた文書 GB2762-2005 の米中カドミウム濃度の基準値 0.2mg/kg を超えていた。21 検体中、0.2mg/kg を超えていた米サンプルは 3 検体であった。

米中ヒ素濃度は、中央値 0.13mg/kg、幾何平均 0.13mg/kg であった。21 検体中、6 検体が中国の基準値 0.15mg/kg を超えていた。

米中鉛濃度は、中央値 0.09mg/kg、幾何平均 0.09mg/kg であった。検体 No. 20 のみが、中国の基準値、0.2mg/kg と同じであり、それ以外は低かった。

米中クロム濃度は、中央値 0.10mg/kg、幾何平均 0.14mg/kg であり、すべての検体が中国の基準値 1.0mg/kg より大幅に低かった。

2. 魚中有機塩素系農薬

魚中有機塩素系農薬は HCH, HCB, Heptachlor, Aldrin, Dieldrin, Endrin, chlorden, DDT およびそれらの代謝物質が検出された。4,4'-DDE のみが 59.3% の検体で検出されたが、検体の 70% 以上が検出下限以下であった。最も高い総 DDT 濃度は、石家荘で購入した浙江省舟山市産のアイナメが高かった。2 番目に DDT 濃度が高かったのは、太刀魚 *Opsariichthys bidens* であった。石家荘および天津市で購入した海産魚の総 DDT 濃度が高かった。

図 3 に示す DDT 代謝物 / DDT の比率 (DDE+DDD/DDT) が低い検体が存在し、最近の DDT の使用を疑わせる結果である。DDT 代謝物 / DDT が 4 以下の検体は、浙江省舟山市産のアイナメ、太刀魚、河北省滄州市産の鯖、天津産の鯖およびアイナメ、太刀魚であった。

海産魚でヘキサクロルヘキサン HCH が検出されたのはボラのみであった。淡水魚で HCH が、鮎、鯉、ローチ、草魚、ナマズなどえ検出された。

食品中ダイオキシン濃度

魚中ダイオキシン濃度は、石家荘では淡水魚の方が、海産魚より高い傾向があることが明らかとなった。しかし、天津市で購入した淡水魚および海産魚はダイオキシン濃度が低い傾向があった。

肉中のダイオキシン濃度は低く、牛肉のみに検出下限を少し超える値が検出された。

【結論】

米 21 検体のカドミウム、総ヒ素、鉛、クロム濃度を測定した。コーデックスのカドミウム濃度の最大値を 2 検体が、中国の食品中汚染物質許容濃度を 3 検体が超えていた。総ヒ素濃度は 6 検体が超えていた。鉛濃度は 1 検体が許容濃度と同じ濃度であった。中国の米中重金属濃度は、カドミウム、総ヒ素に関して、地域によってはかなり深刻な汚染状況にある可能性がある。

有機塩素系農薬濃度は、検出される魚は少なかった。しかし、DDT 代謝物／DDT が 4 以下の検体があり、最近の DDT 使用の可能性が示唆された。

魚中ダイオキシン濃度は日本の海産魚の値に比べれば、低いレベルであるが、石家荘産の淡水魚のダイオキシン濃度が高く、内陸部の湖沼での養魚場のダイオキシン汚染または養殖用餌のダイオキシン濃度が高い可能性があり、今後とも調査を続ける必要がある。これまでの母乳調査で石家荘での経時的なダイオキシン濃度の上昇があることから、さらに、詳細な調査が必要である。

Table 1. The concentration of metal heavy in rice by ICP/MS(mg/kg)

Sample No.	Cd	As	Pb	Cr
1	0.06	0.15	0.05	0.10
2	0.01	0.10	0.05	0.10
3	0.04	0.09	0.05	0.64
4	0.55	0.07	0.06	0.08
5	1.59	0.10	0.16	0.09
6	0.09	0.15	0.06	0.19
7	0.17	0.18	0.07	0.10
8	0.01	0.10	0.09	0.04
9	0.15	0.35	0.09	0.08
10	0.05	0.27	0.07	0.30
11	0.07	0.12	0.06	0.20
12	0.02	0.10	0.10	0.10
13	0.05	0.13	0.07	0.12
14	0.08	0.12	0.09	0.04
15	0.09	0.13	0.08	0.13
16	0.02	0.18	0.10	0.10
17	0.11	0.16	0.15	0.33
18	0.01	0.07	0.15	0.74
19	0.05	0.13	0.16	0.06
20	0.29	0.15	0.18	0.04
21	0.03	0.18	0.20	0.96
ML	0.2(0.4*)	0.15	0.2	1.0

ML: maximum levels of contaminants in foods of China

***** : **0.4 mg/kg** is maximum levels of cadmium in rice of CODEX

Table 2. The concentration of Organic Chlorinated Pesticides in fish in Shijiazhuang and Tianjin (ng/g) (pool sample)

Fish	Production place	β -HCH	δ -HCH	HCB	2,4'-DDE	4,4'-DDE	2,4'-DDD	4,4'-DDD	2,4'-DDT	4,4'-DDT	Σ DDT	
Freshwater fish												
crucian	Shijiazhuang	2.19	ND	ND	ND	1.49	ND	ND	ND	ND	1.49	
carp	Shijiazhuang	1.07	ND	ND	1.37	6.85	ND	4.14	ND	ND	12.36	
big head carp	Shijiazhuang	ND	ND	ND	ND	3.04	ND	ND	ND	ND	3.04	
tilapia	Shijiazhuang	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
catfish	Shijiazhuang	ND	ND	2.12	ND	1.12	ND	ND	ND	ND	1.12	
grass carp	Yellow river	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Sea fish												
Cod	Zhoushan ,Zhejiang Province	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
sea bream	Zhoushan ,Zhejiang Province	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
silvery pomfret	Zhoushan ,Zhejiang Province	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
yellow croaker	Zhoushan ,Zhejiang Province	ND	ND	1.00	ND	19.22	4.50	38.78	6.78	34.29		
hairtail	Zhoushan ,Zhejiang Province	ND	ND	ND	ND	3.23	ND	ND	ND	5.25	8.48	
mullet	Qingdao, Shandong	1.24	ND	ND	ND	3.28	ND	1.20	ND	ND	4.48	
mackerel	Changzhou, Hebei Province	ND	ND	1.99	ND	13.60	ND	6.95	2.35	19.68	42.58	
Freshwater fish												
loach	Tianjin	13.61	1.60	3.84	ND	26.52	ND	2.71	ND	1.72	30.95	
carp	Tianjin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Grass Carp	Tianjin	1.18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Catfish	Tianjin	2.63	ND	1.15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
crucian	Tianjin	ND	ND	ND	ND	1.58	ND	ND	ND	ND	1.58	

Table 2 b

Sea fish											
Mackerel Fish	Tianjin	ND	ND	ND	2.65	ND	2.24	ND	1.40	6.29	
Hairtail	Tianjin	ND	ND	ND	1.50	ND	ND	ND	ND	1.50	
Yellow croaker	Tianjin	ND	ND	ND	8.28	ND	3.15	1.47	7.03	19.93	
<i>Opsariichthys bidens</i>	Tianjin	ND	ND	1.67	30.07	2.60	11.31	5.44	20.53	71.62	
Flatfish	Tianjin	ND	ND	ND	1.61	ND	ND	ND	ND	1.61	
Meat											
mutton	Neimeng Province	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
chicken	Shijaizhuang	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
pork	Shijaizhuang	ND	ND	1.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
beef	Shijaizhuang	ND	ND	3.54	2.05	ND	ND	ND	ND	2.05	
Detectable rate (%)		22.2	3.7	29.6	7.4	7.4	22.2	29.6	25.9		

ND: Not detected, pooled samples of 3 individual fish were measured by GC/MS/MS.

Table 3-a The ratios of DDE+DDD/DDT

Fish	Production place	2,4'-DDE	4,4'-DDE	2,4'-DDD	4,4'-DDD	2,4'-DDT	4,4'-DDT	DDE+DDD/DDT
Freshwater fish								
crucian	Shijiazhuang	ND	1.49	ND	ND	ND	ND	ND
carp	Shijiazhuang	1.37	6.85	ND	4.14	ND	ND	ND
big head carp	Shijiazhuang	ND	3.04	ND	ND	ND	ND	ND
tilapia	Shijiazhuang	ND						
catfish	Shijiazhuang	ND	1.12	ND	ND	ND	ND	ND
grass carp	Yellow River	ND						
Sea fish								
Cod	Zhoushan ,Zhejiang Province	ND						
sea bream	Zhoushan ,Zhejiang Province	ND						
slivery pomfret	Zhoushan ,Zhejiang Province	ND						
yellow croaker	Zhoushan ,Zhejiang Province	ND	19.22	4.50	38.78	6.78	34.29	1.51
hairtail	Zhoushan ,Zhejiang Province	ND	3.23	ND	ND	ND	5.25	0.61
mullet	Qingdao, Shandong	ND	3.28	ND	1.20	ND	ND	ND
mackerel	Changzhou, Hebei Province	ND	13.60	ND	6.95	2.35	19.68	0.93

Table 3-b

Freshwater fish										
loach		Tianjin		ND	26.52	ND	2.71	ND	1.72	17.00
carp		Tianjin		ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Grass Carp		Tianjin		ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Catfish		Tianjin		ND	ND	ND	ND	ND	ND	
crucian		Tianjin		ND	1.58	ND	ND	ND	ND	
Sea fish										
Mackerel		Tianjin		ND	2.65	ND	2.24	ND	1.40	3.49
hairtail		Tianjin		ND	1.50	ND	ND	ND	ND	
yellow croaker		Tianjin		ND	8.28	ND	3.15	1.47	7.03	1.34
<i>Opsariichthys bidens</i>		Tianjin		1.67	30.07	2.60	11.31	5.44	20.53	1.63
flatfish		Tianjin		ND	1.61	ND	ND	ND	ND	
Meat										
mutton		Neimeng Province		ND	ND	ND	ND	ND	ND	
chicken		Shijaizhuang		ND	ND	ND	ND	ND	ND	
pork		Shijaizhuang		ND	ND	ND	ND	ND	ND	
beef		Shijaizhuang		ND	2.05	ND	ND	ND	ND	
Detectable rate (%)				7.4	59.3	7.4	22.2	29.6	25.9	

ND: Not Detect

【関連文献】

1. Sun SJ, Zhao JH, Koga M, Ma YX, Liu DW, Nakamura M, Liu HJ, Horiguchi H, Clark GC, Kayama F. Persistent Organic Pollutants in Human Milk in Women from Urban and Rural Areas in Northern China. *Environ Res.* 2005 Nov;99(3):285-93.
2. Sun SJ, Zhao JH, Liu HJ, Liu DW, Ma YX, Li L, Horiguchi H, Uno H, Iida T, Koga, Yasuhiro M, Kiyonari, Nakamura M, Sasaki S, Fukatsu H, Clark GC, Kayama F
Dioxin concentration in human milk in Hebei Province in China and Tokyo, Japan: potential dietary risk factors and determination of possible sources *Chemosphere* 62: 1879-1888, 2006
3. Leng JH, Kayama F, Wang PY, Nakamura M, Nakata T, Wang Y.
Levels of persistent organic pollutants in human milk in two Chinese coastal cities, Tianjin and Yantai: Influence of fish consumption. *Chemosphere.* 2009 May;75(5):634-9.
4. Sun SJ, Zhao J, Leng JH, Wang P, Wang Y, Fukatsu H, Liu D, Liu X, Kayama F.
Levels of dioxins and polybrominated diphenyl ethers in human milk from three regions of northern China and potential dietary risk factors. *Chemosphere.* 2010 Aug;80(10):1151-9.
5. Sun SJ, Kayama F, Zhao JH, Ge J, Yang YX, Fukatsu H, Iida T, Terada M, Liu DW.
Longitudinal increases in PCDD/F and dl-PCB concentrations in human milk in northern China. *Chemosphere.* 2011 Oct;85(3):448-53. Epub 2011 Sep 3.

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2012 年 3 月 13 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： 戴 毅 
所属機関名： 兵庫医療大学
所属部署名： 薬学部 職名： 准教授
所 在 地： 兵庫県神戸市中央区港島 1-3-6
電 話： 078-304-3147 内線：

1. 助成金額：900,000 円

2. 研究テーマ

TRPA1 受容体を標的とする天然薬物成分の探索およびその鎮痛メカニズムの解析

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 戴 毅	職名：准教授
所属機関名： 兵庫医療大学	部署名：薬学部
中国側研究者氏名： 張 文生	職名：教授
所属機関名： 北京師範大学	部署名：資源学院

4. 当該研究における発表論文等

本研究成果の一部を第 28 回和漢医薬学会学術大会で発表した。

題名：ゴシユノの主成分エボジアミンによる一次知覚ニューロンの活性化

現在、論文発表に向けて執筆中である。

5. 成果の概要

われわれは TRP チャネル受容体ファミリーを標的とする天然薬物成分を探索し、その鎮痛作用機序を解析した。まず中国側研究者に依頼し、鎮痛作用を持つ漢方薬を実験研究の候補として文献的に調査してもらった。次に、中国側が提供した情報に基づき、TRP チャネルタンパクを標的とする天然薬物（生薬エキス）をカルシウムイメージング法を用いてスクリーニングした。結果として鎮痛効果の持つ漢方処方によく使われる呉茱萸及びその構成成分の一次感覚ニューロンに対する刺激効果が確認された。さらに呉茱萸構成成分のエボジアミンとルテカルピンについて、その鎮痛作用機序を詳細に解析した。

【目的】ゴシュユ（呉茱萸）は *Evodia rutaecarpa*（ミカン科）の果実で、有効成分としてエボジアミンおよびルテカルピンが知られている。漢方臨床においては、ゴシュユはその鎮痛効果が期待され、呉茱萸湯、温経湯、当帰四逆加呉茱萸生姜湯など疼痛性疾患を治療する処方に配剤されている。今回、ゴシュユの鎮痛薬理作用を調べるため、一次知覚ニューロンに対するゴシュユエキス、エボジアミンおよびルテカルピンの作用を Ca^{2+} imaging 法および whole-cell patch clamp 法を用いて測定した。

【方法】SD ラット（4 週齢）の脊髄後根神経節（DRG）を採取した後、DRG ニューロンをガラスプレートに播種し $37^{\circ}C$ の CO_2 インキュベータにて培養した。16-24 時間後、ゴシュユおよびその有効成分、カプサイシン、アリルイソチオシアネート、カプサゼピンなどの試料を投与し、細胞内 Ca^{2+} の変化を観察した。またゴシュユの主成分によるカプサイシン惹起電流への影響を調べた。

【結果】ゴシュユエキスの投与により、DRG ニューロンにおける Ca^{2+} の上昇が認められた。また、エボジアミンはゴシュユエキスと同じ効果が観察されたが、ルテカルピンは DRG ニューロンに対する効果が認められなかった。総 DRG ニューロン数の中で、カプサイシン（TRPV1 アゴニスト）、アリルイソチオシアネート（TRPA1 アゴニスト）、エボジアミンに反応した細胞はそれぞれ 52%、23%、38%であった。カプサイシンに反応した細胞のうちエボジアミンに反応したのは 71%、エボジアミンに反応したニューロンのうちカプサイシン陽性は 95%であった。一方アリルイソチオシアネートに反応を示す細胞とエボジアミンに反応を示す細胞は全く別のポピュレーションであることが明らかになった。また、エボジアミンの効果は細胞外 Ca をフリーにすることや、カプサイシン受容体選択的アンタゴニストであるカプサゼピンを投与することによって完全に抑制された。一方、エボジアミンの惹起電流はカプサゼピンによって完全にブロックされたが、エボジアミン存在下ではカプサイシンの惹起電流は増大した。

【考察】以上のことから、DRG ニューロンに対するゴシュユの刺激作用はルテカルピンではなく、エボジアミンであることが示唆された。またカプサゼピンによってエボジアミンの効果が完全にブロックされたことから、エボジアミンはカプサイシンと同じバインディングサイトをシェアし、TRPV1 を活性化させる可能性が示唆された。TRPV1 は、熱およびプロトンにより活性化される一次知覚ニューロンの nociceptor に特異的に発現する受容体で、痛み受容に重要な役割を担っている。カプサイシンは発痛物質である一方、TRPV1 受容体を脱感作させることで鎮痛効果を有することが知られており、ゴシュユの鎮痛薬理作用はその主成分のエボジアミンによる TRPV1 の脱感作が関与するものと考えられる。

【結語】呉茱萸の成分エボジアミンは TRP チャネルに介してその鎮痛効果を示すことが明らかになった。エボジアミンあるいは類似化合物を候補とした新薬開発が期待される。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

本申請に関わる研究においては、北京師範大学の共同研究者らは文献検索、候補薬物の選定、薬物および抽出成分の提供およびデータのディスカッションに、積極的に参加して下さった。中国は漢方医学の発祥地で、漢方薬（天然薬物）を用いた臨床経験の文献は非常に多いので、鎮痛効果を発揮しうる天然薬物の選定段階においては、中国人共同研究者は大きいな役割を果たした。先方の物的および知的資源を利用したからこそ、的確に候補薬物を同定できたと考える。また、豊富な天然薬物資源の確保が不可欠との意味では、天然薬物資源が非常に豊富な中国の研究者との連携で、薬物資源を最大限に確保できたことは、本研究成績の取得には不可欠な要素だったと考える。

天然薬物成分エボジアミンの鎮痛効果とそのメカニズムの解析

戴 毅¹、岩岡恵実子¹、張文生²

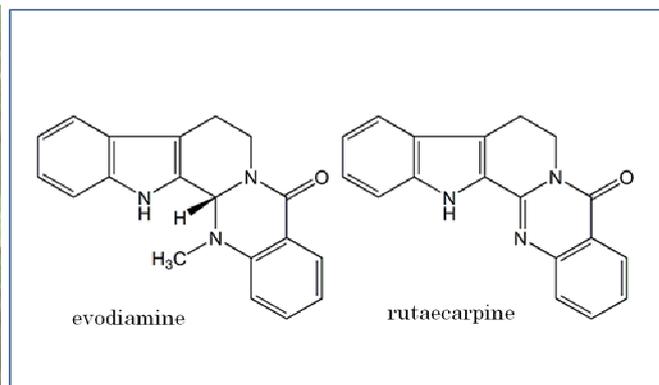
¹兵庫医療大学薬学部、²北京師範大学資源学部

【要旨】： 痛みは日常臨床上最も多い訴えである。我が国では、人口の 13.4% (1700 万人) が何らかの慢性的な痛みを抱えている。一方、慢性疼痛疾患に対する漢方薬治療がその優れた効果により注目され、漢方薬の成分から疼痛治療の新薬開発が期待されてきた。感覚神経終末に発現している TRP (transient receptor potential) ファミリータンパクの TRPV1 や TRPA1 などのチャネル受容体は、慢性・難治性疼痛疾患においてその発現変化、機能調節がダイナミック的に変動し、痛みの発生・維持に重要な役割が示唆されてきた。われわれのこれまでの研究によって、漢方薬を含むある種の天然薬物の鎮痛メカニズムに TRP チャネルの脱感作が関与していることが明らかとなった^{1~3}。本研究は TRPA1 および TRPV1 タンパクを標的とする新たな天然薬物成分をスクリーニングしたうえ、天然薬物成分エボジアミンの鎮痛効果とそのメカニズムを解析した。

Key Words: TRPA1, TRPV1, 疼痛, ゴシユユ, 一次感覚ニューロン

【緒言】 ゴシユユ (呉茱萸) は *Evodia rutaecarpa* (ミカン科) の果実で、有効成分としてエボジアミンおよびルテカルピンが知られている。漢方臨床においては、ゴシユユはその鎮痛効果が期待され、呉茱萸湯、温経湯、当帰四逆加呉茱萸生姜湯など疼痛性疾患を治療する処方に配剤されている。今回、ゴシユユの鎮痛薬理作用を調べるため、一次知覚ニューロンに対するゴシユユエキス、エボジアミンおよびルテカルピンの作用を Ca^{2+} imaging 法および whole-cell patch clamp 法を用いて測定した。

(ゴシユユとその主成分：)



【方法】SD ラット（4 週齢）の脊髄後根神経節（DRG）を採取した後、DRG ニューロンをガラスプレートに播種し 37°C の CO₂ インキュベータにて培養した。16-24 時間後、ゴシユユおよびその有効成分、カプサイシン、アリルイソチオシアネート、カプサゼピンなどの試料を投与し、細胞内 Ca²⁺ の変化を観察した。またゴシユユの主成分によるカプサイシン惹起電流への影響を調べた。

【結果】ゴシユユエキスの投与により、DRG ニューロンにおける Ca²⁺ の上昇が認められた。また、エボジアミンはゴシユユエキスと同じ効果が観察されたが、ルテカルピンは DRG ニューロンに対する効果が認められなかった。総 DRG ニューロン数の中で、カプサイシン（TRPV1 アゴニスト）、アリルイソチオシアネート（TRPA1 アゴニスト）、エボジアミンに反応した細胞はそれぞれ 52%、23%、38%であった。カプサイシンに反応した細胞のうちエボジアミンに反応したのは 71%、エボジアミンに反応したニューロンのうちカプサイシン陽性は 95%であった。一方アリルイソチオシアネートに反応を示す細胞とエボジアミンに反応を示す細胞は全く別のポピュレーションであることが明らかになった。また、エボジアミンの効果は細胞外 Ca をフリーにすることや、カプサイシン受容体選択的のアнтаゴニストであるカプサゼピンを投与することによって完全に抑制された。一方、エボジアミンの惹起電流はカプサゼピンによって完全にブロックされたが、エボジアミン存在下ではカプサイシンの惹起電流は増大した。

Fig.1 エボジアミンの投与による細胞内Ca²⁺濃度変化の一例

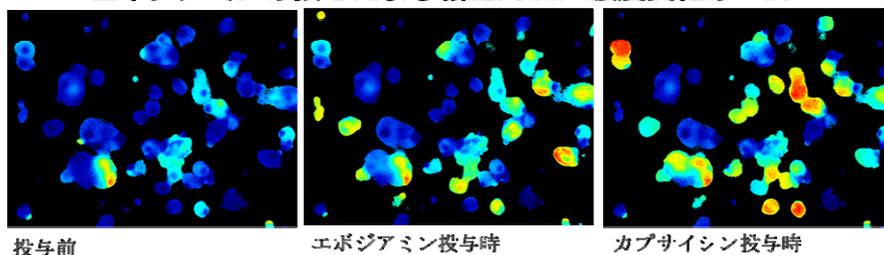
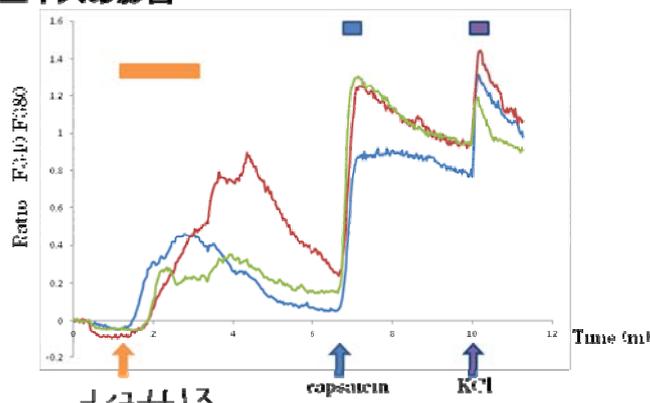
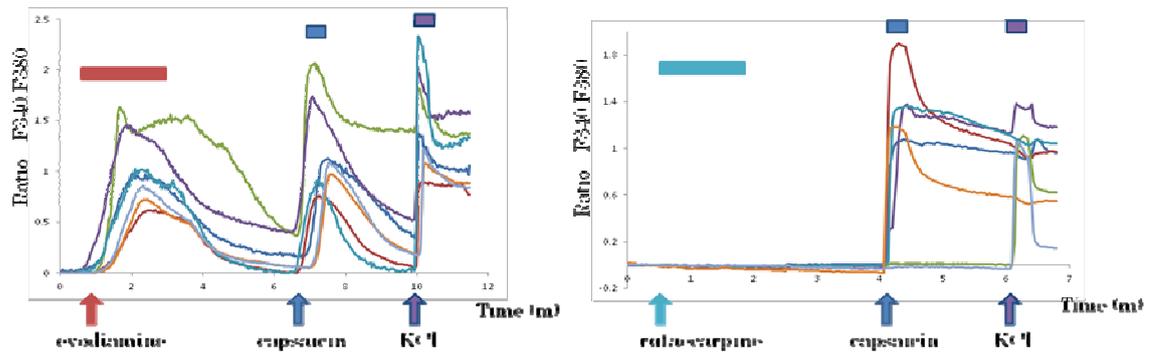


Fig.2 ゴシユユエキスの影響



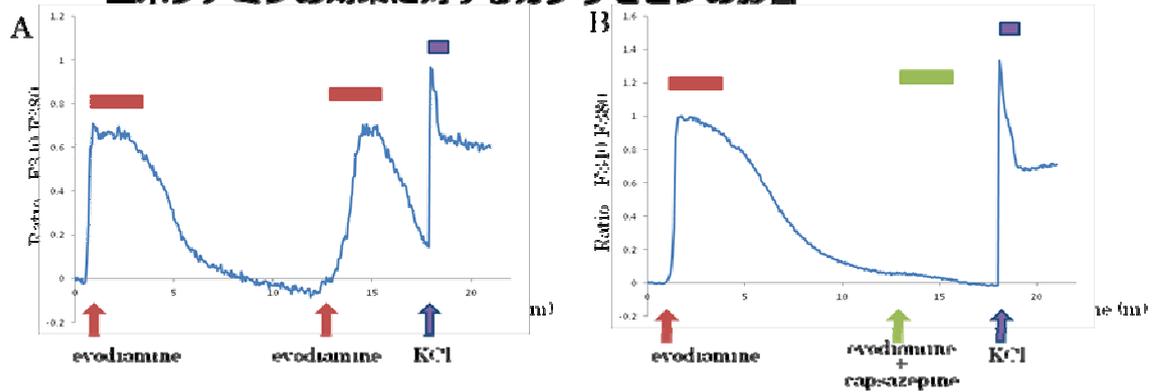
ゴシユユエキスの投与により、DRGニューロンにおけるCa²⁺ の上昇が認められた。

Fig.3 エボジアミンおよびルテカルピンの影響



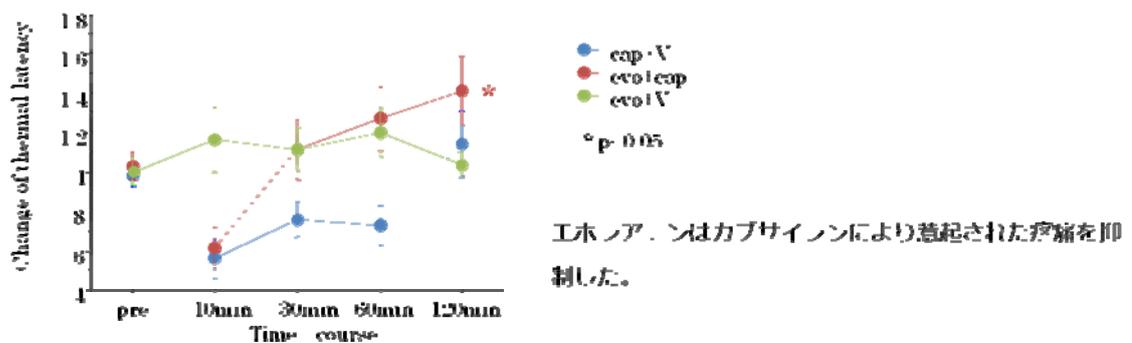
エボジアミンはゴシュユエキスと同じ効果が観察されたが、ルテカルピンはDRGニューロンに対する効果が認められなかった。

Fig.4 エボジアミンの効果に対するカプサゼピンの影響



エボジアミンの効果はカプサイシン受容体選択的アンタゴニストであるカプサゼピンを投与することによって完全に抑制された。

Fig.5 エボジアミンの疼痛行動抑制効果



エボジアミンはカプサイシンにより惹起された疼痛を抑制した。

【考察】以上のことから、DRG ニューロンに対するゴシュユの刺激作用はルテカルピンではなく、エボジアミンであることが示唆された。またカプサゼピンによってエボジアミンの効果が完全にブロックされたことから、エボジアミンはカプサイシンと同じバインディングサイトをシェアし、TRPV1 を活性化させる可能性が示唆された。TRPV1 は、熱およびプロトンにより活性化される一次知覚ニューロンの nociceptor に特異的に発現する受容体で、痛み受容に重要な役割を担っている。カプサイシンは発痛物質である一方、TRPV1 受容体を脱感作させることで鎮痛効果を有することが知られており、ゴシュユの鎮痛薬理作用はその主成分のエボジアミンによる TRPV1 の脱感作が関与するものと考えられる。

【結語】呉茱萸の成分エボジアミンは TRP チャネルに介してその鎮痛効果を示すことが明らかになった。エボジアミンあるいは類似化合物を候補とした新薬開発が期待される。

【参考文献】

1. **Dai Y**, Tomoko Moriyama, Tomohiro Higashi, Kazuya Togashi, Kimiko Kobayashi, Hiroki Yamanaka, Makoto Tominaga, Koichi Noguchi, PAR2-mediated potentiation of TRPV1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain, **J. Neurosci.**, 24, 4293-4299, 2004
2. **Dai Y**, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, Higashi T, Kobayashi K, Obata K, Yamanaka H, Noguchi K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **J Clin Invest.** 117(7):1979-87. 2007
3. Wang S, **Dai Y**, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M, Noguchi K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain.** 131:1241-51. 2008

注：本研究は、2011年8月27日第28回和漢医薬学会学術大会にてポスター発表した。

作成日：2012年3月13日

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2012 年 3 月 14 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： 崔 星



所属機関名：独立行政法人放射線医学総合研究所

所属部署名：重粒子医科学センター 職名：主任研究員

・次世代重粒子治療研究プログラム

所 在 地：千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1

電 話：043-206-3231

内線：

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

癌幹細胞を標的とした肝癌の重粒子線治療の基礎的研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 崔 星

職名：主任研究員

所属機関名：独立行政法人放射線医学総合研究所

部署名：重粒子医科学センター・次世代重粒子治療研究プログラム

中国側研究者氏名： 邵 春林

職名：教授

所属機関名：復旦大学

部署名：放射線医学研究所

4. 当該研究における発表論文等

なし

5. 成果の概要

肝癌は世界で最も罹患数が多い悪性腫瘍の一つで、毎年 60 万人以上が肝癌で死亡しているが、中国がその半数以上を占め、日本でも年間死亡数は 3.4 万人と癌死亡では 3 位である。放医研では今まで 300 例近い重粒子線による肝癌治療を行っており、良好な治療成績が得られている。本研究は、肝癌細胞株 Huh7、HepG2 を用い、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞を分離・同定し、これら癌幹細胞に対して、炭素線或いは X 線照射前後のコロニー形成能、spheroid 形成能、DNA 損傷の違いを調べ、また SCID マウスに移植し、腫瘍形成能の違いについて比較検討した。Huh7、HepG2 細胞において CD133+/CD90+ はそれぞれ 6.4% と 0.6%、CD44+/ESA+ 細胞は 1.5% と 0.2% であった。CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞は CD133-/CD90-、CD44-/ESA- 細胞に比べ有意にコロニー形成数が多く、spheroid 形成や腫瘍形成は CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞のみに認められた。CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞は、X 線、炭素線照射に対しても抵抗性を示すが、炭素線はより強い細胞殺傷能力が認められた。また、DNA 損傷解析では、X 線、炭素線照射後 1 時間では大きな違いを認めなかったが、X 線照射に比べて 24 時間後には炭素線照射後に明らかに多くの γ H2AX foci の残存が認められた。以上より、肝癌細胞において、CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞は明らかに自己複製や放射線抵抗性を示しており、炭素線は X 線照射に比べより強く肝癌幹細胞を殺傷し、その機序として炭素線が修復しにくい DNA 損傷を与えることを見出した。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

中国人共同研究者は、主に HepG2 細胞の癌幹細胞を分離していない状態の X 線照射後の colony assay から生存率の解析を行い、また分離した癌幹細胞に対する炭素線や X 線照射後の DNA 損傷、修復の解析を補助してくれた。

1. Sai S, Oonishi K, Kamijo T, Yamada S, Shao CL, Kamada T.
Effects of Carbon Ion Beams on Liver Cancer Stem-Like Cells and Its Comparison with X-ray
International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10 th Annual Meeting, June 13-16
in Yokohama, Japan (予定)

癌幹細胞を標的とした肝癌の重粒子線治療の基礎的研究

研究者氏名	崔 星
日本所属機関	独立行政法人放射線医学総合研究所
共同研究者名	邵 春林
中国所属機関	復旦大学 放射線医学研究所

要旨

肝癌は世界で最も罹患数が多い悪性腫瘍の一つで、毎年 60 万人以上が肝癌で死亡しているが、中国がその半数以上を占め、日本でも年間死亡数は 3.4 万人と癌死亡では 3 位である。放医研では今まで 300 例近い重粒子線による肝癌治療を行っており、良好な治療成績が得られている。本研究は、肝癌細胞株 Huh7、HepG2 を用い、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞を分離・同定し、これら癌幹細胞に対して、炭素線或いは X 線照射前後のコロニー形成能、spheroid 形成能、DNA 損傷の違いを調べ、また SCID マウスに移植し、腫瘍形成能の違いについて比較検討した。Huh7、HepG2 細胞において CD133+/CD90+ はそれぞれ 6.4% と 0.6%、CD44+/ESA+ 細胞は 1.5% と 0.2% であった。CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞は CD133-/CD90-、CD44-/ESA- 細胞に比べ有意にコロニー形成数が多く、spheroid 形成や腫瘍形成は CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞のみに認められた。CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞は、X 線、炭素線照射に対しても抵抗性を示すが、炭素線はより強い細胞殺傷能力が認められた。また、DNA 損傷解析では、X 線、炭素線照射後 1 時間では大きな違いを認めなかったが、X 線照射に比べて 24 時間後には炭素線照射後に明らかに多くの γ H2AX foci の残存が認められた。以上より、肝癌細胞において、CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞は明らかに自己複製や放射線抵抗性を示しており、炭素線は X 線照射に比べより強く肝癌幹細胞を殺傷し、その機序として炭素線が修復しにくい DNA 損傷を与えることを見出した。

Key Words : 肝癌幹細胞、重粒子、生存率、DNA 修復

緒言

肝癌は、肝臓原発の原発性肝癌と、他臓器悪性腫瘍が肝臓に転移した転移性肝癌に大きく分けられる。原発性肝癌はさらに、肝細胞癌(HCC) (95%を占める)と胆管細胞癌(3%)に大別される。肝細胞癌は世界で最も罹患数が多い悪性腫瘍の一つで、日本や中国はともに増加傾向であり、年間死亡数で中国は 35 万人、日本は 3.4 万人とがん死亡ではそれぞれ 2、3 位である。肝癌の主な原因は、ウイルス性肝炎、それも B 型肝炎と C 型肝炎とされ、日本の肝癌の原因を見ても、ウイルス性肝炎が 90% (75%が C 型肝炎、15%が B 型肝炎) を占めている。肝細胞癌治療の考え方としては、「肝機能」と「進行度」のバランスを考えて治療戦略を決定するが、初回治療で肝切除が 31%、局所壊死療法が 27%、肝動脈塞栓療法が 36%、化学療法が 5%と 90%が局所療法である。放医研では今まで 300 例近い重粒子線による肝癌治療を行っており、良好な治療成績が得られている。例えば、52.8GyE/4 回/1 週の照射法では、3 年局所制御率 96%と 3 年生存率 57%と優れた成績を得ており、さらに現在少分割短期照射 2 回/2 日照射法の第 I/II 相試験が行われている。肝切除療法の累積生存率は、1 年 93%、2 年 83%、3 年 61%(第 15 回全国原発性肝癌追跡調査報告書、2002 年、日本肝癌研究会編)であることから、重粒子線治療は肝切除に匹敵する治療効果を

有すると言える (1)。本研究は、重粒子線の肝癌に対する高い治癒率の分子機構について、放射線抵抗性や薬剤耐性と強く関与するとされる癌幹細胞に焦点を合わせ、これら癌幹細胞に対して、炭素線或いは X 線照射前後のコロニー形成能、spheroid 形成能、DNA 損傷の違いを調べ、また SCID マウスに移植し、腫瘍形成能の違いについて比較検討した。

対象と方法

細胞株は HepG2、Huh7 の 2 種類の肝癌細胞株を使用し、肝癌幹細胞マーカーとされる CD133-PE、CD44-PE、ESA-FITC、CD90-FITC を用いた。まず、HepG2、Huh7 細胞から FACS Aria を用い、癌幹細胞様細胞 (CD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞)、非癌幹細胞 (CD133-/CD90-、CD44-/ESA-細胞) を分離収集し、癌幹細胞様性質の有無を colony 形成能、spheroid 形成能及び免疫不全 SCID マウス移植腫瘍形成能について評価した。そして、HepG2、Huh7 それぞれ細胞に対し、X 線或いは炭素線照射後の癌幹細胞様細胞 (CD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞) の割合の変化を FACS Aria にて解析した。さらに、HepG2、Huh7 細胞から分離した癌幹細胞様細胞 (CD133+/CD90+) の X 線或いは炭素線照射後の colony 形成数を求めた。炭素線照射は HIMAC (290 MeV/n, 50 keV/mm, 6-cm SOBP 中心)、X 線照射は 200kV_p (Pantac HF-320S, Shimadzu Co., Tokyo) を使用した。FACS 解析には FACS Aria, BD Bioscience (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を使用した。

結果

まず、HepG2、Huh7 細胞を FACS Aria を用いて CD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞の割合を測定したところ、CD133+/CD90+ はそれぞれ 6.4% と 0.6%、CD44+/ESA+細胞は 1.5% と 0.2% であった。HepG2 細胞から CD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞と CD133-/CD90-、CD44-/ESA-細胞に分離収集し、各々の細胞集団の colony formation assay と sphere formation assay を施行した。Fig. 1A, B に示されているように CD133+/CD90+細胞集団は CD133-/CD90-細胞集団に比べ、colony 形成能、sphere 形成能がともに高いことが認められた。また、HepG2、Huh7 より分離した CD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞 5000 個を免疫不全 SCID マウス右下腿皮下に、CD133-/CD90-、CD44-/ESA-細胞 5000 個を左下腿皮下に移植したところ CD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞を移植した足にのみ腫瘍形成を認めた (Fig. 1C)。

次に、癌幹細胞様細胞 CD133+/CD90+細胞集団と非癌幹細胞様 CD133-/CD90-細胞集団に対し、炭素線と X 線照射の殺傷能力の違いについて、X 線或いは炭素線照射後の colony 数を求めた。その結果、X 線或いは炭素線照射後 CD133-/CD90-細胞集団のコロニー形成数が CD133+/CD90+細胞集団のものより有意に少なく、X 線や炭素線に対しても感受性を示した。一方、CD133+/CD90+細胞集団に関しては、Fig. 2 に示されているように炭素線 1 Gy 照射は X 線 2 Gy 照射に比べ、有意にコロニー形成数が少なく、炭素線が CD133+/CD90+細胞をより強く殺傷することが示唆された。さらに、Huh7 細胞から分離した CD133+/CD90+細胞に対し、DNA 損傷マーカーである γ H2AX foci 数を測定したところ、X 線、炭素線照射後 1 時間では大きな違いを認めなかったが、X 線照射に比べて 24 時間後には炭素線照射後の方が明らかに多くの γ H2AX foci の残存が認められた (Fig. 3)。

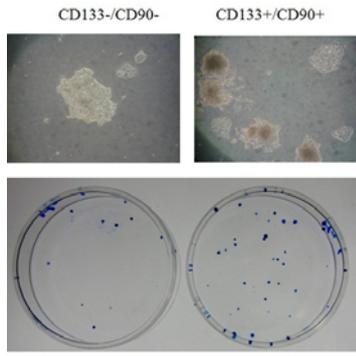


Fig. 1A

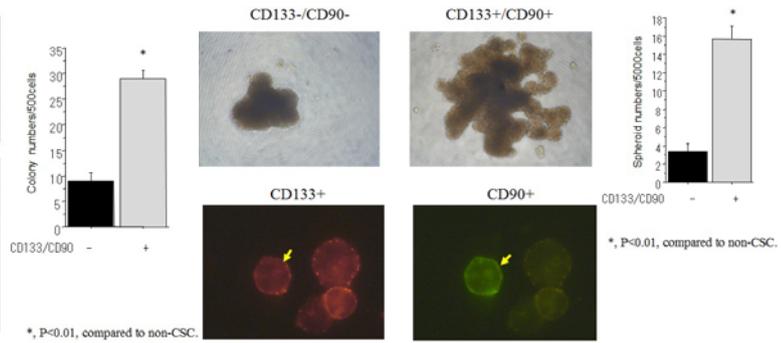


Fig. 1B

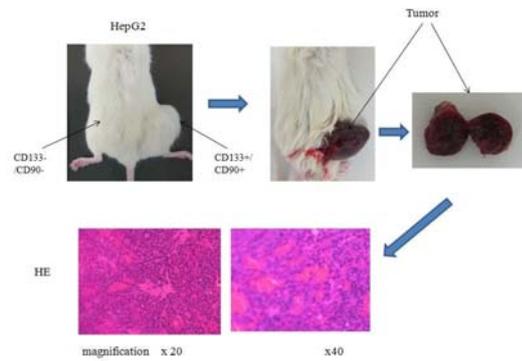


Fig. 1C

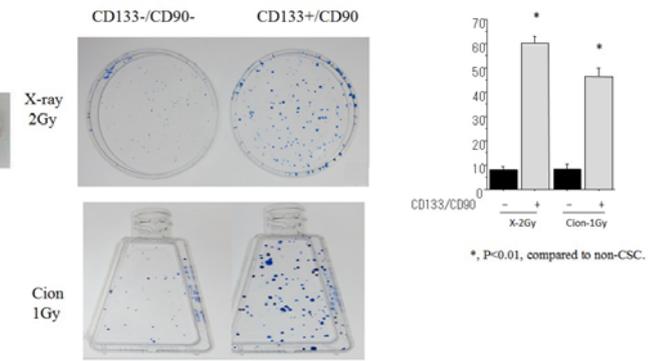


Fig. 2

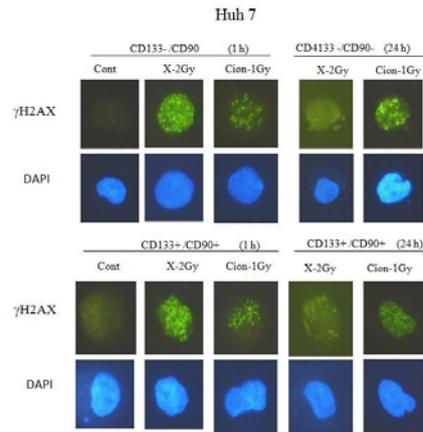
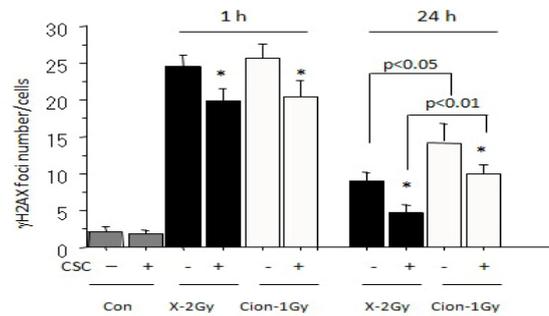


Fig. 3



考察

今回我々が使用した肝癌細胞株 HepG2、Huh7 においては CD133、CD90、CD44、ESA の 4 種類のマーカー全てが認められた。それで、我々は、HepG2、Huh7 細胞から CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ と CD133-/CD90-、CD44-/ESA- 細胞を分離収集し、癌幹細胞様性質の有無を in vitro における colony formation assay と sphere formation assay、in vivo における免疫不全 SCID マウス移植腫瘍形成能を調べたところ、CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細胞集団の癌幹細胞様性質が確認された。今まで、肝癌幹細胞を同定するマーカーとして、Ma らの CD133、CD44 (2)、Terris らの ESA (3) と Yang らの CD90+ (4) が報告されている。我々は、最近、術後再発性大腸癌に対し、炭素線照射により高い治癒率が得られているメカニズムについて、大腸癌幹細胞の観点から解析してきた (5)。今回、我々は重粒子線の肝癌幹細胞に対する影響について調べたが、HepG2 や Huh7 等肝癌細胞株から分離した CD133+/CD90+、CD44+/ESA+ 細

胞集団が癌幹細胞様性質を有していることが確認された。HepG2、Huh7 細胞から分離収集した癌幹細胞様細胞 CD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞集団と非癌幹細胞様 CD133-/CD90-、CD44-/ESA-細胞集団に対し、炭素線と X 線照射の殺傷能力をコロニー形成数で求めた結果、X 線或いは炭素線照射後 CD133-/CD90-細胞集団のコロニー形成数は CD133+/CD90+、CD44+/ESA+細胞集団に比べ有意に少なく、X 線や炭素線に対しても感受性を示すことが分かった。CD133+/CD90+細胞集団に対し、同じ生物効果線量炭素線 1 Gy 照射後のコロニー形成数が X 線 2 Gy 照射後のものに比べ有意に少ないことが認められた。また、X 線照射に比べ、炭素線照射 24 時間後肝癌幹細胞様細胞に対して明らかにより多くの γ H2AX foci の残存が認められ、炭素線は修復困難な DNA 損傷を与えていること示唆された。

以上より、炭素線は術後の局所再発、転移、化学療法や一般放射線抵抗性と深く関わっているとされる肝癌幹細胞に修復しにくい DNA 損傷を与えることでより効果的に殺傷することが考えられ、これが炭素線の肝癌に対する高い治癒率をもたらす分子的メカニズムの一つであることを示唆した。

参考文献（下線は代表研究者と共同研究者）：

1. Kato H, Tsujii H, et al., Results of the first prospective study of carbon ion radiotherapy for hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Aug 1;59(5):1468-76.
2. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology.* 2007 Jun;132(7):2542-56.
3. Terris B, Cavard C, Perret C. EpCAM, a new marker for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2010 Feb;52(2):280-1. Epub 2009 Nov 10
4. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell.* 2008 Feb;13(2):153-66.
5. Cui X, Oonishi K, Tsujii H, Yasuda T, Matsumoto Y, Furusawa Y, Akashi M, Kamada T, Okayasu R. Effects of carbon ion beam on putative colon cancer stem cells and its comparison with X-rays. *Cancer Res.* 2011 May 15;71(10):3676-87.

注：本研究は以下の学会で発表。

1. 崔星、大西和彦、山田滋、鎌田正
ヒト肝細胞癌における癌幹細胞の同定及び X 線や重粒子線照射による影響
第 54 回日本放射線影響学会 2011 年 11 月 16～19 日 神戸（口頭発表済み）
2. Sai S, Oonishi K, Kamiyo T, Yamada S, Shao CL, Kamada T. Effects of Carbon Ion Beams on Liver Cancer Stem-Like Cells and Its Comparison with X-ray. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting, June 13-16 in Yokohama, Japan（予定）

作成日：2012 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2012 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：秦野 伸二
所属機関名：東海大学 医学部
所属部署名：分子生命科学 職名：教授
所在地：神奈川県伊勢原市下糟屋 143
電話：0463-93-1121 内線：2568



1. 助成金額：1,000,000 円

2. 研究テーマ

筋萎縮性側索硬化症の発症分子メカニズムに関する研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：秦野 伸二

職名：教授

所属機関名：東海大学

部署名：医学部

中国側研究者氏名：商 慧芳

職名：教授

所属機関名：四川大学

部署名：华西医院

4. 当該研究における発表論文等

Pan L, Yoshii Y, Otomo A, Ogawa H, Iwasaki Y, Shang HF, Hadano S:

Different human copper-zinc superoxide dismutase mutants, SOD1^{G93A} and SOD1^{H46R}, exert distinct

harmful effects on gross phenotype in mice. PLoS ONE, in press, 2012.

5. 成果の概要

- ・4種類の正常及び変異型 cDNA クローンの構築 (TARDBP^{WT}、TARDBP^{A382T}、FUS^{WT}、FUS^{R495X})。
- ・上記 cDNA を PITT 用ターゲティングベクターに組み込み、ベクターを構築した。
- ・作製した全てのコンストラクトが目的とする遺伝子産物を発現することを確認。
- ・完成した4種類のコンストラクトをマウス受精卵に顕微注入した。
- ・TARDBP^{A382T} 遺伝子を導入した TG マウス (ファウンダー) の作出に成功した。
- ・遺伝的背景の違いが ALS マウスモデル疾患発症に影響することを確認した。
- ・中国人 ALS 患者における新たな遺伝子変異及び多型の存在を明らかにした。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

- ・中国国内における ALS 患者の DNA サンプル並びに臨床情報を収集。
- ・患者から採取した血液からのゲノム DNA 抽出。
- ・遺伝子配列の決定及び解析。
- ・変異 SOD1 マウスの表現型に関する解析。
- ・中国人 ALS 患者における新たな遺伝子変異及び多型の存在を明らかにした。
- ・遺伝的背景の違いが ALS マウスモデル疾患発症に影響することを確認した。

筋萎縮性側索硬化症の発症分子メカニズムに関する研究

日本研究者氏名	秦野 伸二
日本所属機関	東海大学医学部 教授
共同研究者名	大塚正人, 潘雷, 大友麻子
中国研究者氏名	商 慧芳
中国所属機関	四川大学华西医院 教授

要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) をはじめとする多くの神経変性疾患の病因は未だ不明であり、その有効な治療法及び治療薬はない。疾患の発症機構の解明と治療法・治療薬の開発には、優れた疾患動物モデルの利用が必須である。これまで、家族性 ALS 原因遺伝子 *SOD1* の変異型遺伝子 (*SOD1*^{G93A}) を導入したトランスジェニック (TG) マウスが世界的に広く利用されてきた。しかし、*SOD1*^{G93A}-TG マウスで治療効果のある薬がヒト患者では全く効果が見られていないという問題が明らかとなっている。本研究では、ゲノム特定部位に目的とする遺伝子を単一コピーで効率良く導入する独自のトランスジェニックマウス作製法を用いて、新規の ALS マウスモデルを作出することを目的とした。具体的には、特定ゲノム部位に単一コピーの変異或いは野生型 *TARDBP* 並びに *FUS* 遺伝子を挿入した TG マウス系統の樹立を試みた。さらに、中国人患者を対象とした ALS 発症原因の解析を行うとともに、これまでに開発されている ALS 疾患モデル動物 (変異 *SOD1*-TG マウス) を用いて、遺伝学的背景の違いが疾患発症に及ぼす影響について併せて解析した。その結果、新規の ALS マウスモデル (*TARDBP*^{A382T}) マウスの作出に成功した。また、遺伝的背景の違いが変異 *SOD1*-TG マウス ALS モデルの疾患発症に影響することを明らかにするとともに、中国人 ALS 患者における ALS 原因遺伝子の新たな変異及び遺伝子多型の存在を明らかにした。

Key Words 筋萎縮性側索硬化症, 動物モデル, 遺伝的背景, *TARDBP* 遺伝子, *SOD1* 遺伝子

緒言:

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) をはじめとする多くの神経変性疾患の病因は未だ不明であり、その有効な治療法及び治療薬はない。ALS 患者の中には前頭側頭葉型認知症 (FTLD) を併発する患者群が存在し、現在 ALS/FTLD として位置づけられている。近年、ALS 及び ALS/FTLD の共通の原因として *TARDBP*、*FUS*、*UBQLN2*、*C9ORF72* 等の遺伝子が同定され、ALS と FTLD は同一あるいは類似の分子機構により発症する疾患群であると考えられるようになった。特に、*TARDBP* と *FUS* の遺伝子産物である TDP-43 及び *FUS* は、孤発性 ALS 患者のみならず、FTLD、アルツハイマー病患者脳においてもその凝集体蓄積が見られることから、疾患発症との関連が注目されている。

疾患の発症機構の解明と治療法・治療薬の開発には、優れた疾患動物モデルの利用が必須である。これまで、家族性 ALS 原因遺伝子 *SOD1* の変異型遺伝子 (*SOD1*^{G93A}) を導入したトランスジェニック (TG) マウスが世界的に広く利用されてきた。しかし、*SOD1*^{G93A}-TG マウスで治療効果のある薬がヒト患者では全く効果が見られていないという問題が明らかとなっている。さらに、最近、ALS 原因遺伝子 (*TARDBP*) 過剰発現 TG マウスあるいはラットが作出されているが、野生型遺伝子の TG マウスでも神経症状を発症するなど多くの問題が未解決である。これらは、薬の開発が特定の限局した動物モデルに依存していることに加え、従来の TG マウス作製法では、導入遺伝子が挿入されるゲノム部位並びに挿入コピー数がランダムとなり、場合によっては遺伝子挿入による他の遺

伝子破壊が起こるためであると推定される。本研究では、ゲノム特定部位に目的とする遺伝子を単一コピーで効率良く導入する独自のトランスジェニックマウス作製法（Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis ; PITT） [1]を用いて、新規の ALS マウスモデルを作出することを目指す。具体的には、特定ゲノム部位に単一コピーの変異或いは野生型 *TARDBP*並びに *FUS*遺伝子を挿入した TG マウス系統を樹立することを第一の目標とする。

一方、ALS の発症頻度については、人種差は無いとされるが、実際にはこれまでの ALS に関する研究は欧米主導であり、従ってその解析も Caucasian（白人）を対象としたものが主流であった。本研究は、日中共同研究により、アジア人、特に中国人を対象とした ALS 発症原因の解析を行うとともに、これまでに開発されている ALS 疾患モデル動物（変異 *SOD1*-TG マウス）を用いて、遺伝学的背景の違いが疾患発症に及ぼす影響について併せて解析する。

対象と方法:

(1) 新規 ALS マウスモデルの作出

本研究では、共同研究者の大塚らが独自に開発した TG マウス作製法[1]を用いて、新規の ALS マウスモデルを作出する。目的とする遺伝子を着実に全身で発現させるため、プロモーターとして CAG プロモーターを使用する。PITT 法は、Cre-loxP システムに基づいた RMCE 法を TG 作製に応用したものである（図 1 参照）。本実験では、マウス *Rosa26* 遺伝子座に loxP カセットを有するノックインマウス（作製済）を用いる。PITT 法を用いることにより、同一遺伝子座に単一コピーの異なった遺伝子

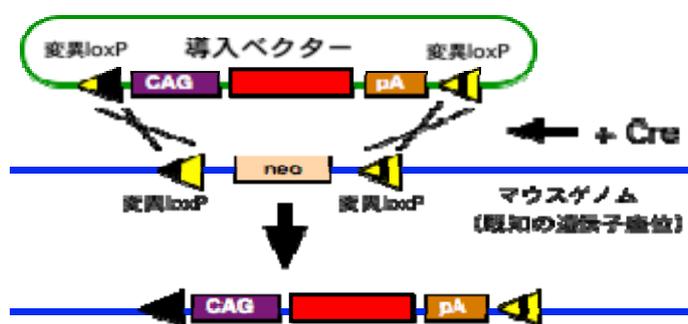


図 1) RMCE法の経路
(PITT法ではこれを受精卵で行う)

(変異) の挿入が可能となり、これまで不可能であった遺伝子型-疾患表現型相関の個体レベルでの検証が可能となる。本実験で導入する遺伝子は、*TARDBP* 及び *FUS* の 2 種類であり、変異体としては *TARDBP*^{A382T} 及び *FUS*^{R495X} を作製し、正常型のクローンも含め合計で 4 種類のターゲティングコンストラクトを作製する。具体的には、各遺伝子の翻訳領域全長 cDNA 配列を PITT 法用のターゲティングベクターに組み込み、正常型の各遺伝子コンストラクトを構築する。そして、PCR を用いた点突然変異導入法により、目的とする遺伝子内に疾患遺伝子変異を導入したベクターを構築する。完成した各ターゲティングコンストラクトを、Cre 発現ベクターと同時に変異型 loxP を持つノックインマウスの交配で得られた受精卵に顕微注入し、マウスを産出する。得られた仔マウスの遺伝子タイピングを行ない、正確に目的とする位置に遺伝子が挿入されたマウスを選抜する。

(2) 遺伝的背景、性差、及び遺伝子変異の違いが *SOD1*-TG マウスの疾患表現型に及ぼす影響の解析

近年、遺伝的背景等の違いがマウスにおける症候表現型に大きく影響し、そのことが実験結果の解釈を誤った方向へと導いていると指摘されている。本研究ではそのことを踏まえ、既存の ALS マウスモデルにおける疾患表現型が系統等により影響されるか否かについて精緻に検証した。神経病理学的症候の異なる 2 種類の ALS マウスモデル (*SOD1*^{H46R}、*SOD1*^{G93A}-TG マウス) を、夫々 2 種類の系統 (*C57BL/6N* 及び *FVB/N*) へとコンジュニック化 (10 世代以上の戻し交配による遺伝的背景の均一化) し、さらにそれらの変異 *SOD1*-TG マウスにおける体重の変動及び疾患進行による死亡日齢 (寿命) を解析した。

(3) 中国人 ALS 患者における疾患関連遺伝子配列の解析

中国国内、特に四川省を中心とした地域における家族性並びに孤発性 ALS 患者の DNA サンプル並びに臨床情報

を収集し、研究リソースバンクの構築を継続的に行った。患者から採取した血液からゲノム DNA を抽出した。そして、遺伝子増幅 (polymerase chain reaction; PCR) 法により、*TARDBP* 遺伝子の各エクソンを増幅し、それらの塩基配列を決定した。さらに、*ATXN2* 遺伝子内の CAG 反復配列の増幅を行い、リピート数を解析した。決定した遺伝子配列を、データベース上の正常者のものと比較し、患者特異的変異の有無、並びにアジア人に特異的遺伝子変異の同定を試みた。

結果:

(1) 新規 ALS マウスモデルの作出

始めに、変異遺伝子コンストラクトの作製を行った。具体的には、ヒトの *TARDBP* 及び *FUS* 遺伝子について、各遺伝子の翻訳領域全長 (ORF) の cDNA 配列をヒト RNA より RT-PCR により増幅し、クローン化することにより正常型の各遺伝子コンストラクトを構築した。次に、PCR を用いた点突然変異導入法により目的とする遺伝子内に疾患遺伝子変異を導入し、最終的に 4 種類の正常及び変異型 cDNA クローンを得た (*TARDBP*^{WT}、*TARDBP*^{A382T}、*FUS*^{WT}、*FUS*^{R495X})。さらに、それらの cDNA を PITT 用ターゲットベクターに組み込み、各 PITT コンストラクトを完成させた。作製したコンストラクトが正しく目的とする遺伝子並びにタンパク質を発現することを確認するため、作製したコンストラクトを COS-7 細胞にトランスフェクションし、発現タンパク質をウェスタンブロット法にて解析した。その結果、作製した全てのコンストラクトが目的とする遺伝子産物を発現することが確認された。次に、完成した 4 種類のコンストラクト (*TARDBP*^{WT}、*TARDBP*^{A382T}、*FUS*^{WT}、*FUS*^{R495X}) を、各々 300~500 個の受精卵に Cre 発現ベクターと同時に顕微注入することにより TG マウスの作出を試みた。現在、*TARDBP*^{A382T} 遺伝子を導入した TG マウス (ファウンダー; F0) の作出に成功している。今後、得られた仔マウスの遺伝子タイピングを行ない、4 種類の新規トランスジェニックマウス (*TARDBP*^{WT}、*TARDBP*^{A382T}、*FUS*^{WT}、*FUS*^{R495X}) の系統樹立を目指す計画である。

(2) 遺伝的背景、性差、及び遺伝子変異の違いが SOD1-TG マウスの疾患表現型に及ぼす影響の解析

本研究では、遺伝的背景の違いが ALS マウスモデルの表現型にどのように影響について解析するため、2 種類の遺伝的背景 (C57BL/6N 及び FVB/N) を有する 2 種類の変異 SOD1 発現マウス (*SOD1*^{H46R}、*SOD1*^{G93A}-TG マウス) を作出し、体重及び寿命の解析を行った。その結果、*SOD1*^{G93A}-TG マウスは *SOD1*^{H46R}-TG マウスよりも重症化すること、さらにその重症度は C57BL/6N より FVB/V 系統で顕著であること、さらに FVB/V 系統の *SOD1*^{G93A}-TG マウスでは性差が見られ、雄が雌より早期に発症し、死に至ることが判明した。従って、変異 SOD1 に起因した運動ニューロン変性は、複数の他の遺伝的要因により調節されていると考えられた [2]。

(3) 中国人 ALS 患者における疾患関連遺伝子配列の解析

中国人における ALS 原因遺伝子 (*TARDBP*) の変異及び遺伝子配列多型について解析した。合計 165 名の ALS 患者のゲノム DNA を用いて *TARDBP* 遺伝子配列を解析した結果、新たなミスセンス変異 (N378S 変異) を見出すとともに、数種類の多型配列の検出に成功した [3]。しかし、*TARDBP* 遺伝子変異の頻度は 0.61% であり、既に報告されている欧米人 ALS 患者における変異の頻度より有意に低いものであった [3]。本研究ではさらに、近年見出された新たな ALS 関連遺伝子である *ATXN2* (Ataxin-2) 遺伝子について、345 名の中国人 ALS 患者における遺伝子内ポリグルタミン反復配列長について解析した。欧米人における先行研究では 22-33 リピートの反復配列が ALS 発症リスクをあげることが報告されているが、本研究では 27 リピート以上の反復配列が ALS 発症に若干関連している可能性が示された [4]。

考察:

多くの神経変性疾患は、欧米のみならず日本、中国を含めたアジア地域においても、各国国民の高齢化に伴ってその罹患率は上昇の一途を辿っている。特に神経変性疾患の中でも最も過酷とされている神経難病 ALS 及び認知症の治療法・治療薬の開発は喫緊の課題である。しかし、そのような状況にも関わらず、現在、国内外での治

療研究や臨床試験の結果に希望の持てるものは極めて少ない。一方、近年の遺伝子組換え技術の著しい進歩により数多くの神経変性疾患モデル動物が作出されつつあるが、未だ有用なモデル動物の開発は十分ではない。実際、前臨床動物試験で使用されている疾患モデル系は極めて限られているのが現状である。本研究は、これまでにない独自の手法により、新規の ALS 及び ALS/FTLD マウスモデルを作出しようとする独創的・挑戦的研究である。本研究の遂行により、これまでの疾患モデル系統からは得ることができないような新たな知見を得ることが強く期待される。さらに、本研究で用いる新規 TG マウス作製法、ならびにその手法により作出される新規 ALS/FTLD マウスモデルは、共通の研究技術・リソースとして当該研究関連領域において広く利用され、その結果 ALS 及び FTLD の発症機構の解明と治療研究の飛躍的な発展に貢献できる。さらに、神経変性疾患の治療法の開発は、高齢化が進む日本及び中国国民の医療および福祉の向上と医療費削減に直接結びつくものであり、期待される社会的貢献度は極めて大きいと考えられる。

参考文献:

- [1] Ohtsuka M, Ogiwara S, Miura H, Mizutani A, Warita T, Sato M, Imai K, Hozumi K, Sato T, Tanaka M, Kimura M, Inoko H: Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression. *Nucleic Acids Res* 38: e198, 2010.
- [2] Pan L, Yoshii Y, Otomo A, Ogawa H, Iwasaki Y, Shang HF, Hadano S: Different human copper-zinc superoxide dismutase mutants, SOD1^{G93A} and SOD1^{H46R}, exert distinct harmful effects on gross phenotype in mice. *PLoS ONE*, in press, 2012.
- [3] Huang R, Fang DF, Ma MY, Guo XY, Zhao B, Zeng Y, Zhou D, Yang Y, Shang HF: TARDBP gene mutations among Chinese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2010.
- [4] Chen Y, Huang R, Yang Y, Chen K, Song W, Pan P, Li J, Shang HF: Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine: a possible risk factor for Chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 32: e1921-1925, 2011.

注：本共同研究の成果の一部は、2012年3月に下記の論文に掲載された。

Pan L, Yoshii Y, Otomo A, Ogawa H, Iwasaki Y, Shang HF, Hadano S: Different human copper-zinc superoxide dismutase mutants, SOD1^{G93A} and SOD1^{H46R}, exert distinct harmful effects on gross phenotype in mice. *PLoS ONE*, in press, 2012.

作成日：2012年3月9日