

1 1 . 腎性貧血患者の赤血球におけるホスファチジルセリンの検出

関桃子^{1,2}、新敷信人¹、中村史雄¹

(¹生化学、²腎臓内科学)

〔目的〕 慢性腎臓病患者の多くは腎性貧血を合併する。腎性貧血の原因として腎臓におけるエリスロポエチン産生の低下がよく知られており、現在腎性貧血の治療にはエリスロポエチンを直接補充する赤血球造血刺激因子製剤 (ESA) が使用されている。しかし一部の患者では ESA 抵抗性や ESA による副作用が問題となることがある。

腎性貧血が生じる他の機序として赤血球寿命の短縮も以前から指摘されており、その程度としては約 60 日間と正常の半分程度とする報告もある¹⁾。その機序としては腎性貧血患者の赤血球では健常者と比較して、赤血球膜を構成するリン脂質であるホスファチジルセリン (PS) が脂質二重層の外層に多く表在化し (PS 表在化率: 正常赤血球 $0.67 \pm 0.02\%$, 透析患者 $3.13 \pm 0.21\%$)、それをマクロファージに貪食されやすくなることとする報告が多数ある^{2),3)}。しかし PS 表在化のメカニズムやそもそも PS 表在化が赤血球寿命の短縮に関与しているかどうかは不明である。PS の局在は、赤血球膜に存在するフリッパーゼ及びスクランブラーゼにより制御されており、フリッパーゼは ATP を消費して能動的に PS を外層から内層へ輸送し、一方スクランブラーゼは濃度勾配に従って PS を拡散輸送する。これまでに我々は健常人の赤血球において、寿命に近い“老化した”赤血球ではフリッパーゼ活性が低下することで PS が表在化しやすくなることを示した⁴⁾。腎性貧血患者の赤血球でも PS が表在化しやすくなっているのであれば、フリッパーゼ活性の低下またはスクランブラーゼ活性の上昇によって起こると考えられる。腎性貧血患者の赤血球における PS 表在化の機序の解明は、将来的に赤血球寿命の短縮に対する治療法の開発の一助となる可能性がある。

本研究は透析患者で腎性貧血を呈している患者において、まず PS が多く表在化しているかどうかを明らかにすることを目的として実験を行った。

〔方法〕 東京女子医科大学病院血液浄化療法科で血液透析を施行されている患者の、定期採血の残余血液を用いた (倫理委員会承認番号 4822-R2)。また、以前測定した健常人の血液データを比較として用いた (倫理委員会承認番号 3835R)。採血は血液透析施行前に EDTA-2Na 入りの 2ml スピッツ (TERUMO 社製) へ血液を採取し検査を行なわれ、その後は 4°C で保存し、採取されてから 1~2 日後以内に解析を行った。血液は 3000 rpm、4°C、5 分で遠心分離し、リン酸緩衝食塩水 (PBS; 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4) で 3 回洗った。血球 1 μL を 1 mL の Annexin 用緩衝液 (5 mM CaCl₂ in TBS; 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.4) へ混合し、1 μL の Annexin V-FITC を添加し転倒混和後にセルアナライザ Beckman CytoFLEX S (巴研究棟 2F: 総合医科学研究所所有) で Annexin V-FITC の蛍光量を測定した。陽性コントロールはすでに PS が表在化することが知られている、赤血球内 Ca²⁺濃度を上昇させた赤血球とした。その赤血球は、洗浄した赤血球を 5 μM A23187 と Ca²⁺溶液 (5 mM CaCl₂, TBS, 1mM EGTA) と混合し 37°C で 30 分間加温し、その後 1% ウシ血清アルブミン溶液 (BSA, Ca²⁺溶液) で 2 回洗浄し A23187 を除去して作成した。

〔結果〕

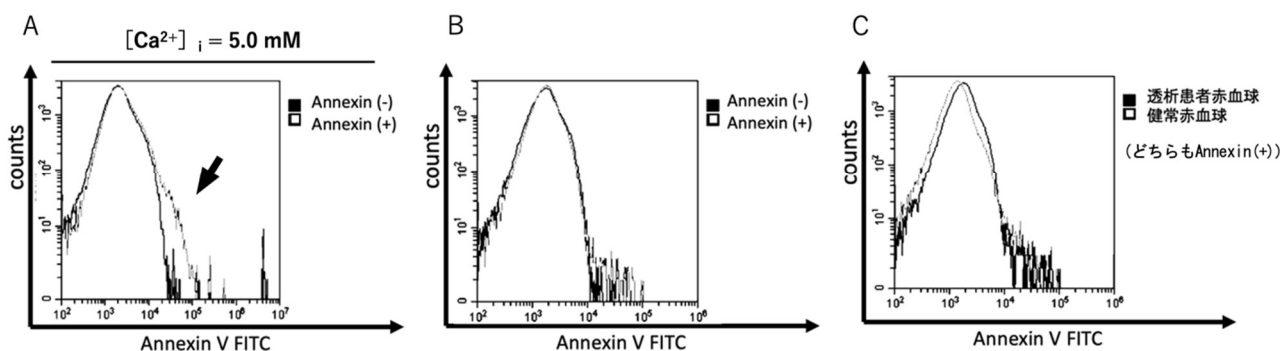


図 1. セルアナライザによる PS 表在化率の測定。A: 陽性コントロールの赤血球, B: 透析患者の赤血球における Annexin-FITC の有無の比較, C: 健常赤血球と透析患者赤血球の比較。矢印: PS 表在化 (PS 陽性) 赤血球。

Ca²⁺を導入した陽性コントロールでは Annexin V-FITC を添加すると、10⁴以上の蛍光度を持つ赤血球が現れ (図 A ; 矢印)、これらを PS 陽性赤血球とした。透析患者の赤血球においても同様に Annexin V-FITC の添加の有無で比較したところ、PS 陽性赤血球は極少量であり (0.50% ± 0.32%, n=30)、既報のような表在化率の増加は見られなかった (図 B)。また、透析患者赤血球は健常赤血球と比較してヒストグラムが右にシフトしており、蛍光量が全体的に大きい傾向にあった (図 C)。

〔考察〕 これまで数多くの論文で健常人と比較して血液透析患者の赤血球では PS が多く表在化していると述べられてきたが、本研究では健常人のデータ数が過少ではあるが PS はほとんど表在化していないという結果であった。これまでの報告では陽性コントロールを置かず健常人の赤血球と腎性貧血のある患者の赤血球を直接比較していたため、本来の PS の表在化率を測定できていなかったことが疑われる。また図 C のように透析患者では蛍光度が全体的に高い方へシフトしており、PS 表在化率の誤判定に関与した可能性がある。本研究の結果を裏付けるために、今後健常赤血球との比較、実際にフリッパーゼ活性が低下していないこと及びスクランブラーゼ活性が上昇していないことを示す必要がある。以上のことから、PS の表在化率が腎性貧血患者の赤血球寿命短縮に関係するかどうかについては更なる検討が必要である。

〔結論〕 血液透析患者の赤血球では PS はほとんど表在化していなかった。血液透析患者の赤血球において、フリッパーゼ活性及びスクランブラーゼ活性の測定を含めて更なる検討が必要である。

〔文献〕

- 1) Mario Bonomini et al. American Journal of Kidney Diseases, 38: 807-814, 2002
- 2) Shu-Hong Bi et al. Renal Failure, 28: 573-576, 2006
- 3) Rosi Bissinger et al. Kidney and Blood Pressure Research, 41: 966-977, 2016
- 4) Momoko Seki et al. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 00: 1-10, 2020

〔学会発表〕

本研究は更なる検討の結果と併せて 2022 年度生化学会で発表予定である。

1.2. *in utero* electroporation 法を用いた *in vivo* 神経形態解析

瀧澤光太郎、中村史雄
(生化学)

〔目的〕 遺伝子の機能を *in vivo* で解析するためには、多くの場合ノックアウト/ノックインマウスが必要である。我々は主にチロシンリン酸化を介した神経細胞の発達をターゲットに研究を進めている。リン酸化によるシグナル伝達の解析には、非リン酸化変異体(Y→F 置換)やリン酸化の模倣(Y→D/E 置換)をはじめとした複数の変異体を用いることが多々あるが、*in vivo* 解析のためにこれら全てのノックインマウスを作製することは現実的ではない。一方で神経形態に限れば、子宮内の胎児への *electroporation* (*in utero* *electroporation*, IUE)により変異体を導入することで *in vivo* 解析が可能である。本稿では、*in vivo* 神経形態解析のために立ち上げた IUE 法の進捗を報告したい。

〔方法〕 胎生(E)12~14日のICR妊娠マウスを用いた。三種混合麻酔で麻酔し、腹壁を切開、子宮を露出させた。子宮壁越しに胎児脳室に tdTomato あるいは GFP 発現プラスミドを注入し、ピンセット型電極で電気パルスを与え、遺伝子導入した。その後通常の出産・育児を経て3~4週齢で灌流固定、100 μ m の切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

〔結果〕 E14 マウスの大脳皮質体性感覚野へ IUE した(図 1)。多くの II/III 層の細胞と、いくつかの IV 層の細胞が tdTomato でラベルされていた。E12 マウスでは主に IV 層に導入され、V 層への導入率は低かった。胎児の生存率(出生数/胎児数)は 50~60%で、そのうち遺伝子導入がされていた割合は E12 で約 25%、E14 で約 40%であった。蛍光タンパク質が導入された神経細胞は非常に明るく、樹状突起スパインのような微細な構造も可視化された(図 1C)。

〔考察〕 大脳皮質の神経細胞は、誕生した時期が遅いほど脳表層近くに配置される。

E12~13 に誕生した細胞は V 層に、E15~16 で

は II/III 層を形成する。今回、V 層と II/III~IV 層への導入を目的としてそれぞれ E12、14 で実験を行ったが、実際にラベルされた層は既報とやや異なっている。マウス系統によって 1 日程度のズレが生じている可能性が高い。

〔結論〕 大脳皮質神経への遺伝子導入に成功した。2022 年現在では胎児生存率が 90%程度まで向上している。今後は各種変異体を導入し、同様に解析を行っていく。

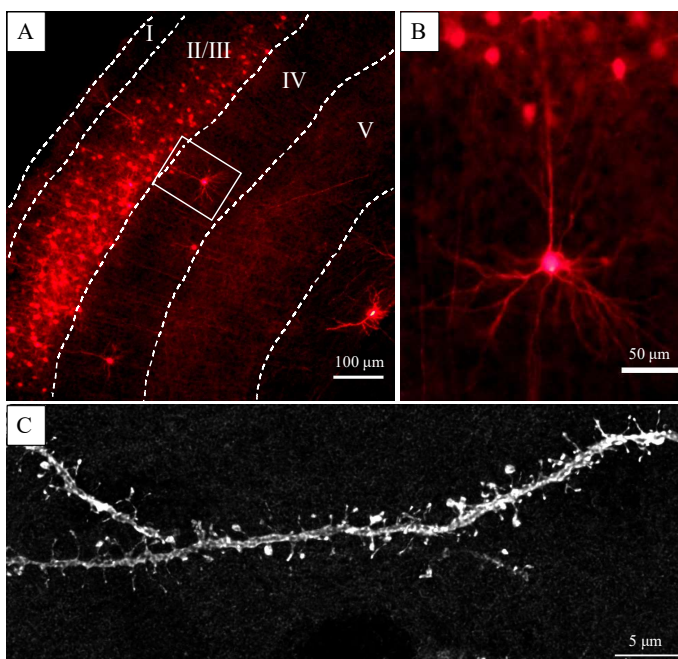


図 1. マウス大脳皮質への遺伝子導入

1.3. 電気生理学および組織形態学的な視床シナプス改編機構の解明

植田禎史、宮田麻理子

(生理学 (神経生理学分野))

〔目的〕 事故や外傷に伴う四肢の切断や末梢神経の損傷は、患者に高頻度に慢性疼痛を引き起こす。この慢性疼痛は中枢性に原因がある神経障害性疼痛であり、神経損傷により誘導される脳の視床や大脳皮質における神経回路の大規模な再編が重要な神経基盤だと考えられてきた。しかし、末梢部の損傷が直接的に損傷を受けない中枢神経領域に神経可塑性を誘導する神経機構はよくわかっていなかった。そこで、我々はマウスの感覚神経切断モデルを用いて、神経切断後に視床のシナプス改編を誘導する機構を調べた。シナプス構造および機能の改編を制御する機構を明らかにするためには、シナプス改編を定量的に評価する実験系が必要となる。我々はこれまでに確立してきた電気生理学および組織形態学的な実験手法に立脚し、電気生理学的手法を用いたシナプス応答の記録、遺伝子改変マウスと免疫組織化学染色による経路選択的なシナプスの可視化法、ならびに脳定位手術を用いた局所領域のニューロンやグリア細胞の活動制御を組み合わせたシナプス改編の定量的評価系の確立を目指した。

〔方法〕 マウスの体性感覚視床核の視床皮質投射 (TC, thalamocortical) ニューロンは、脳幹ニューロンに由来する上行性の軸索入力を受ける。幼若期の TC ニューロンは複数本の軸索入力を受ける。その後、発達期のシナプス改編によってシナプス除去が進むことで、基本的には一本の軸索入力のみを受ける成熟型の回路へと改編される。一本支配が完成した後で末梢神経が損傷を受けると、TC ニューロンには再び複数本の軸索入力誘導され、幼若型の回路に改編される。この軸索多重支配と一本支配は電気生理学的に判別できる。TC ニューロンの細胞体からシナプス応答を記録する場合、多重支配を受けるニューロンでは軸索の刺激強度を上げるにつれてシナプス電流の振幅がステップ状に大きくなる。一方、一本支配を受けるニューロンでは軸索の刺激強度を上げ、閾値を超えるとシナプス電流が記録されるが、その振幅はそれ以上刺激強度を上げてても一定のまま保たれる。この振幅変動のステップ数が、記録ニューロンへ入力する軸索の本数に相当する。

脳幹から視床への投射にはトポグラフィがあり、例えば脳幹のヒゲ領域から視床のヒゲ領域へと体部位の一致した領域間で神経結合が形成される。幼若期、または末梢神経損傷後の幼若型の視床回路では、異なる身体部位に由来する異所性の入力形成される。脳幹のヒゲ領域の視床投射ニューロン選択的に Cre を発現するマウスと、視床における脳幹由来の軸索終末全てに発現するタンパク質の抗体染色を組み合わせることで、TC ニューロンへ入力するヒゲ由来と異所性の脳幹由来軸索終末を判別できる。

視床におけるシナプス改編機構を明らかにするためには、ニューロンやシナプス活動、あるいはそれらを制御するグリア細胞などの活動操作が有効である。脳幹と視床の神経結合を考える上で、シナプス前ニューロンが局在する脳幹領域と、シナプス後ニューロンが分布する視床領域それぞれで、局所的なニューロンまたはグリア細胞の活動操作が求められた。そこで、麻酔下のマウスの頭部を固定する脳定位手術を行い、視床または脳幹に該当する座標に向けて微量の試薬を注入した。

〔結果〕 上記の電気生理、組織形態、神経解剖学的な手法を組み合わせることで、構造と機能の両面から視床のシナプス改編を定量的に評価する実験系が確立できた¹⁾。

〔考察〕 これまでの研究では軸索の多重／一本支配と、それら個々の軸索の入力がヒゲ由来または異所性のどちらであるのかという点についてはまだ追及できていない。今後、電気生理記録を行ったニューロンにおける軸索入力を経路特異性を直接調べる事が出来る実験系を樹立することで、この未解明の課題を明らかにする必要があると考えている。

〔結論〕 構造的かつ機能的な視床シナプス改編をそれぞれ定量評価する実験系は確立した。今後の研究により、異なる身体部位に由来する経路選択的なシナプス入力などの構造的なシナプス改編と、シナプス応答の変化を引き起こす機能的なシナプス改編の両者が個々の TC ニューロンにおいてどのように関係するかを明らかにする必要がある。

〔発表論文〕

- 1) Ueta Y. and Miyata M. (2021) Electrophysiological and anatomical characterization of synaptic remodeling in the mouse whisker thalamus. STAR Protoc. 2(3): 100743

〔学会発表〕

- 1) Ueta Y., and Miyata M. Microglia in the brainstem induces synaptic remodeling and map reorganization in the thalamus after peripheral nerve injury. 第 44 回日本神経科学大会、オンライン開催、2021/7
- 2) 植田禎史、宮田麻理子. マウス体性感覚視床における末梢神経損傷後のシナプス改編制御. 第 68 回中部日本生理学会、オンライン開催、2021/10
- 3) Ueta Y. Microglial regulation of peripheral nerve injury-induced synaptic remodeling in the thalamus. 2021 AuPS scientific meeting (annual meeting of Australian Physiological Society)、オンライン開催、2021/11

1.4. 抗痛風薬フェブキソスタットは老化抑制と加齢関連疾患軽症化に有用である

吉名佐和子¹、伊豆原郁月¹、鎌谷直之²、三谷昌平^{1,3}

(¹生理学 (分子細胞生理学分野)、²株式会社スタージェン、³総合医科学研究所)

〔目的〕 日本を含め多くの国では人口の少子高齢化が進んでおり、高齢者の身体機能の低下や認知症を含む加齢性疾患の増加による国民全体への負担を減らすことが喫緊の課題である。痛風の治療薬フェブキソスタットはヒポキサンチンを分解して尿酸を生成する過程を阻害することで IMP を増やし、その結果として効率的に ATP 合成を促進する。我々はこの作用を利用し、ATP 増加効果によるミトコンドリア負荷の減少が起こるか否か、さらには、老化抑制や加齢性神経変性疾患モデルの表現型の改善の有無を検証することを目的とした。

〔方法〕 線虫の野生型及び変異体株を用いてデータを取得した。線虫 *C. elegans* は uricase (尿酸分解酵素) がゲノムから欠損している点でマウスなどの他の哺乳動物と異なり、ヒトと同様であることを利用した。加齢に伴う骨格筋の減少 (サルコペニア) のモデルとして、体壁筋の核に GFP を発現したトランスジェニック株を用いて、加齢と共に、筋細胞の減少を観察した。フェブキソスタット処理個体の筋肉のミトコンドリアの形態を電子顕微鏡で観察した。ミトコンドリア機能阻害を行うアジ化ナトリウム投与は線虫に致死効果を持つ。フェブキソスタット投与によりアジ化ナトリウムによる致死性が軽減するかを調べた。線虫にパーキンソン病の原因タンパク質の1つと言われている α -Synuclein を強制発現し、運動機能低下やそれによる二次的成長障害を評価するトランスジェニック株を用いて、症状の改善度を評価した。アルツハイマー病での神経変性の直接的原因の1つと言われるタウタンパク質を強制発現した線虫で、フェブキソスタットを投与することで運動機能低下を軽減できるかを評価した。野生型線虫は寿命が短いことからこれに種々の濃度のフェブキソスタットを投与することで、寿命測定を行った。

〔結果〕 線虫にフェブキソスタットを投与することで、加齢に伴うサルコペニアの進行が遅れることが示された。また、このような個体で電子顕微鏡観察を行ったところ、フェブキソスタット投与個体では加齢に伴うミトコンドリアの崩壊が抑制されていた。サルコペニアへの効果、アジ化ナトリウムによる致死性、寿命の延長効果では高濃度のフェブキソスタットでは中等度より低くなる傾向があった。このような条件下で線虫個体内の尿酸値を測定したところ、中等度のフェブキソスタットでは尿酸値の低下はあまり見られなかったが、高濃度のフェブキソスタット処理時では尿酸値が無処理の半分程度の濃度まで低下していた。尿酸は抗酸化効果を持つことが知られており、尿酸あるいはビタミン C を同時に加えると、高濃度のフェブキソスタットで強いアジ化ナトリウム抵抗性や抗加齢効果が認められた。寿命測定やパーキンソン病モデルでもフェブキソスタットと抗酸化物の併用は顕著な効果を示した。フェブキソスタットはタウタンパク質強制発現のアルツハイマー病モデルトランスジェニックにも顕著な表現型改善効果が見られた。

〔考察〕 フェブキソスタットはヒポキサンチンの分解に関わるキサンチンデヒドロゲナーゼ/キサンチンオキシダーゼの阻害化合物であり、痛風の良い治療薬として既に確立している。この化合物は線虫

の酵素に対してもヒトと同様の酵素阻害活性を持っていることが分かった。フェブキソスタットを適切な濃度で投与することで、老化や加齢に伴う線虫疾患モデルなどで有効な表現型の軽減効果が見られ、抗酸化化合物により効果が増強した。ヒトでも同様の効果が期待され、高齢者の身体機能の向上や認知症などの加齢性疾患の予防に有効であると期待される。ヒトでは痛風患者での抗加齢効果が調べられつつあり、有効であるという報告も出つつある。

〔結論〕 ヒトで抗加齢性疾患への予防薬として使用するためには早い機会にランダム化比較試験の実施を進めることが重要である。

〔発表論文〕

- 1) Suehiro Y., Yoshina S., Motohashi T., et al. (2021) Efficient collection of a large number of mutations by mutagenesis of DNA damage response defective animals. *Sci Rep.* 11(1):7630
- 2) Hori S. and Mitani S. (2022) The transcription factor unc-130/FOXD3/4 contributes to the biphasic calcium response required to optimize avoidance behavior. *Sci Rep.* 12(1):1907
- 3) Dejima K. and Mitani S. (2022) Balancer-assisted outcrossing to remove unwanted background mutations. *MicroPubl Biol.* 2022:10.17912/micropub.biology.000561
- 4) Yoshina S. and Mitani S. (2022) Integration of multicopy extrachromosomal transgenes into defined loci without phenotypes. *MicroPubl Biol.* 2022:10.17912/micropub.biology.000571
- 5) Yoshina S., Izuhara L., Kamatani N., et al. (2022) Regulation of aging by balancing function and antioxidant levels. *J. Physiological Sciences*, in press.

15. 急性呼吸窮迫症候群モデルマウスを用いた TLR4 内因性リガンドの関与

出口敦子、瀧田守親、丸義朗
(薬理学)

〔目的〕 これまでに、当講座では、がんが転移する前の段階において、将来の転移先となる臓器に予め生着に好都合な Toll 様受容体 4(TLR4)依存的な転移前微小環境を形成し、転移を亢進することを見いだしてきた。現在、世界中で猛威をふるっている新型コロナウイルス感染症の重症化例において、S100A8/S100A9 の発現が上昇することが報告されている¹⁾。TLR4 リガンドである LPS 多糖類による ARDS モデルを参照し、S100A8 投与による急性呼吸急迫症候群病態が誘導されるかを検証し、急性呼吸窮迫症候群における S100A8 の関与を検証することを目的とする。

〔方法〕 野生型マウスに所定量の S100A8 を気管内スプレーし、所定時刻に末梢血、肺を採材し病理解析を行った。この時、組織の一部、末梢血を採取し、フローサイトメトリー(ベックマンコールター)により骨髄由来免疫抑制性細胞を解析した(本学動物実験倫理委員会承認済)。

〔結果〕 ヒトにおける急性呼吸窮迫症候群の定義には硝子膜の出現が定義されているが、マウスにおいては、ARDS の定義として、硝子膜の出現は必須条件ではない。ごく最近、ヒト ACE2 トランスジェニックマウスにおいて SARS-CoV-2 感染により、硝子膜様の変化が報告とされている²⁾。リポ多糖類(LPS) または、S100A8 を気管内投与後、骨髄由来抑制性細胞が肺に動員されること、また硝子膜様の構造変化が S100A8 投与においても認められたことから、LPS と S100A8 の共通の受容体である TLR4 依存的である可能性が示唆された(発表論文 1)。

〔考察〕 TLR4 外因性リガンドである LPS や TLR4 内因性リガンド S100A8 をマウス気管内投与後の肺において、骨髄由来抑制性細胞の動員が誘導されることから、急性呼吸窮迫症候群において TLR4 依存的に S100A8 が病態の進行に関与する可能性が示唆された。

〔結論〕 S100A8 の機能や TLR4 シグナル伝達経路を抑制する薬剤では、マウスモデルにおける急性呼吸窮迫症候群の発症を抑制できるかどうかを今後検証したい。

〔文献〕

- 1) Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, et al., Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell*. 2020; 182, 1401-1418
- 2) Hong W, Yang J, Bi Z, et al., A mouse model for SARS-CoV-2-induced acute respiratory distress syndrome. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6, 1

〔発表論文〕

- 1) Deguchi A, Yamamoto T, Shibata N, Maru Y. S100A8 may govern hyper-inflammation in severe COVID-19. *FASEB J*. 2021 Sep;35(9):e21798. doi: 10.1096/fj.202101013

〔学会発表〕

- 1) 出口敦子、丸義朗 「転移前微小環境形成による転移促進」第 80 回日本癌学会学術総会、シンポジウム（口頭）、2021 年 9 月 30 日、神奈川（横浜）
- 2) 出口敦子、西川喜代孝、丸義朗 「S100A8 を標的とした新規がん微小環境改善薬の開発」日本医療研究開発機構革新的医療技術創出拠点 令和 3 年度成果報告会、ポスター発表（Zoom）、2022 年 2 月 21 日、東京

16. 神経芽腫における銀ナノ粒子のプログラム細胞死の誘導

宮山貴光、松岡雅人

(衛生学公衆衛生学 (環境・産業医学分野))

〔目的〕 銀ナノ粒子は、小胞体ストレス/オートファジー機構に作用して細胞死を誘導すると考えられているが、分子メカニズムは明らかにされていない。本研究では、神経芽腫のモデル疾患細胞である SH-SY5Y 細胞を用いて、銀ナノ粒子による小胞体ストレス/オートファジーの分子基盤と近年注目されているオートファジーのネガティブレギュレーター Rubicon(Run domain protein as Beclin 1 interacting and cysteine-rich containing)との関連性を調べた。

〔方法〕 SH-SY5Y 細胞に、銀ナノ粒子(0 - 100 $\mu\text{g Ag/mL}$)と eIF2 α のリン酸化持続を起こすサルブリナル 10 μM を 24 時間処理した。細胞死は MTT assay で評価した。リソソームとオートファゴソームを LysoTracker と DAPI を用いてそれぞれ蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡でライブイメージングした。小胞体ストレス/オートファジー関連因子の定量は western blotting および q-PCR で評価した。

〔結果〕 銀ナノ粒子処理濃度依存的に細胞死は誘導され、サルブリナルの併用でさらに増加した。銀ナノ粒子単独処理と比較して、サルブリナルの併用条件下では、細胞内のオートファゴソームの蓄積が観察されるとともに、リン酸化 eIF2 α 、GRP78、CHOP、p62、LC3B-II は増加することがわかった。一方、Rubicon の発現は銀ナノ粒子単独処理で増加し、サルブリナルの併用下で抑制された。

〔考察〕 銀ナノ粒子とサルブリナルの併用は、アポトーシス関連因子 CHOP の上昇のみならず、Rubicon の発現抑制も導く。銀ナノ粒子は、小胞体ストレスを介した CHOP 発現を誘導すると同時に、Rubicon の機能破綻を介してオートファゴソームの蓄積を促進し、細胞死を導くものと考えられた。

〔結論〕 本研究は、小胞体ストレス/オートファジー機構を介した銀ナノ粒子の細胞死決定メカニズムの解明につながる。

〔発表論文〕

1) 宮山貴光、松岡雅人 (2021) 銀ナノ粒子による肺がん細胞のプログラム細胞死. 細胞 53: 46-47

〔学会発表〕

- 1) Miyayama T., Matsuoka M., Involvement of ER stress response/autophagy in silver nanoparticles exposure-induced cell death in SH-SY5Y cells, The 8th International Symposium on Metallomics, Kanazawa, JAPAN, 2022/7
- 2) 宮山貴光、松岡雅人、神経芽腫における銀ナノ粒子誘導細胞死とルビコンの発現、第 49 回日本毒性学会学術年会、札幌、2022/6-7
- 3) 宮山貴光、松岡雅人、銀ナノ粒子による神経芽腫の小胞体ストレス/オートファジーのクロストークと細胞死、第 92 回日本衛生学会学術総会、オンライン開催、2022/3

- 4) 宮山貴光、肺がん細胞における銀ナノ粒子の細胞内分布と細胞死、第 8 回研究交流セミナー、オンライン開催、2022/3
- 5) 宮山貴光、銀ナノ粒子による神経芽腫のプログラム細胞死の解明、第 365 回東京女子医科大学学会例会、オンライン開催、2022/2

17. カドミウム長期曝露による肺癌の悪性転化に対する eIF2 α の脱リン酸化阻害剤 salubrinal の効果の検討

藤木恒太、松岡雅人

(衛生学公衆衛生学 (環境・産業医学分野))

〔目的〕 今なお身近な環境汚染物質カドミウムはコメなどの食事や喫煙、産業活動によってヒトが曝露される金属である。カドミウムにヒトが曝露されると、腎機能障害が惹起される。一方、カドミウムは国際癌研究機関 IARC の発癌性リスク評価のグループ 1 に分類される高い発癌性を有する金属である。そのため、喫煙などにより肺組織がカドミウムに曝露されることで、肺癌の発生リスクが高まるのではないかと考えられている。近年、我々はカドミウム長期曝露依存的に、肺癌細胞が上皮間葉転換 (EMT) し、高い細胞増殖率、細胞移動能および抗癌剤耐性を獲得する、すなわち悪性度が高まることを明らかとした¹⁾。しかしながら、その分子基盤は十分に明らかにできていない。

小胞体ストレス応答は、外的・内的要因により、小胞体内に不良タンパク質が蓄積 (小胞体ストレス) することで惹起される細胞応答である。小胞体ストレス応答を担う主要経路の一つに PERK- eIF2 α -ATF4 経路がある。小胞体ストレス下では、活性化した PERK (リン酸化酵素) によってリン酸化された eIF2 α は、多くのタンパク質の合成を低下させる一方、ATF4 (転写因子) の翻訳を促進する。ATF4 は標的因子に、抗酸化酵素などの細胞保護作用をもつ因子と、細胞死を促進する CHOP (転写因子) を持つ。そのため、PERK- eIF2 α -ATF4 経路は小胞体ストレス下における細胞の生・死のバランスを調節する役割を担う。我々の研究室では、カドミウムは小胞体ストレスを介して腎毒性を発揮すること、また、カドミウムの持つ腎毒性が salubrinal (脱リン酸化酵素 PP1 による eIF2 α の脱リン酸化阻害剤) 処理することで緩和されることを見出した²⁾。しかしながら、salubrinal によるカドミウム腎毒性軽減効果は、ATF4 に依存しない作用も認められており、その作用機序はいまだ明確でない。また、カドミウム長期曝露による肺癌の悪性化に対して salubrinal がどのような効果を発揮するのかは不明であるため、我々はその点を明らかにすることを目指した。

〔方法〕 ヒト肺基底上皮腺癌 A549 細胞に、塩化カドミウム (CdCl₂) を 9~14 週間曝露し、高い細胞移動能および抗癌剤耐性を獲得した A549 細胞 (R-A549 細胞) を樹立した。一方、salubrinal 処理は、カドミウム長期曝露中、継続的に処理を行う場合 (sal 継続処理)、また R-A549 樹立後に 48 時間処理を行う場合 (sal 単回処理) のそれぞれの効果を検討した。細胞内の蛋白量は、回収した細胞抽出液を用いたウエスタンブロットにより検出した。特定の因子の細胞内局在は、抗体染色後、蛍光顕微鏡 (総研機器: Ti2E) を用いて解析した。細胞移動能は、wound healing assay を用いて評価した。細胞死亡率は、細胞死検出試薬トリパンブルー染色法で定量した。

〔結果および考察〕 カドミウム長期曝露により EMT が惹起された R-A549 細胞では、コントロール細胞と比べ、上皮系因子 (E-cadherin) が減少する一方、間葉系因子 (N-cadherin、PAI-1) が増加する。そこで、EMT に対する salubrinal の効果を検討するため、これら因子の発現量に対する影響を検討した。その結果、カドミウム長期曝露に依る E-cadherin の発現量の低下および N-cadherin の発現量の増加に対しては、sal 継続処理の影響がほとんど確認されなかったが、PAI-1 の発現量が有意に減少

することが確認された。また、R-A549 細胞では、細胞内にストレスファイバー（アクチン繊維束）が形成されるが、sal 継続処理の影響は観察されなかった。一方、R-A549 細胞の細胞増殖能および細胞移動能は、sal 継続処理により低下した。しかし、予想外にも R-A549 細胞の抗癌剤耐性は sal 継続処理により増加した。sal 単回処理では、R-A549 細胞の細胞増殖率は有意に低下したが、PAI-1 の発現量、細胞移動能に対する影響はわずかであった。次に、sal 継続処理により PAI-1 の発現量の抑制が確認されたことから、sal 継続処理による細胞増殖能、細胞移動能、抗癌剤耐性に対する効果は、PAI-1 の発現量の減少を介した作用であるかを調べるため、PAI-1 の siRNA によるノックダウン実験を行った。その結果、PAI-1 をノックダウンした R-A549 細胞では、E-cadherin の減少、N-cadherin の増加がわずかに抑制され、細胞増殖能および細胞移動能が抑制された。一方、cisplatin に対する耐性は低下した。また、R-A549 細胞のストレスファイバー形成に対する PAI-1 ノックダウン処理の影響は観察されなかった。このことから、sal 継続処理の R-A549 細胞に対する cisplatin 耐性以外（細胞増殖能および細胞移動能の低下）の効果は、PAI-1 の発現量の低下を介していると考えられる。

次に、R-A549 細胞に対する sal 継続処理と PAI-1 ノックダウン処理の cisplatin 耐性に対する作用の乖離はどのようにして生まれているのかについて検討した。近年、salubrinal 処理した胃癌細胞では、ATF4 の発現量が増加し、cisplatin 耐性が上昇することが報告されている³⁾。このことから、sal 継続処理した R-A549 細胞でも ATF4 の発現量が増加し、cisplatin 耐性を獲得しているのではないかと考え、その可能性について検討した。その結果、興味深いことに sal 継続処理した R-A549 細胞では、R-A549 細胞と比べて eIF2 α のリン酸化が有意に上昇しているにも関わらず、ATF4 の発現量の増加がほとんど見られなかった。このことから、現時点では、R-A549 細胞の sal 継続処理により獲得される高い cisplatin 耐性が ATF4 の発現量の増加に依存するものであるとは言い難い。この点については、今後更に解析する必要がある。

〔結論〕 今後、更に salubrinal、ATF4、eIF2 α 、PAI-1、EMT の相互作用に注目した解析・解釈が必要である。salubrinal を使用した論文はストレス応答の分野を中心に増加傾向にある。また、近年、ATF4 を介さない eIF2 α のリン酸化の重要性も報告されつつあり、我々の解析結果が、ストレス応答分野における有用な知見に繋がることを期待している。

〔文献〕

- 1) Fujiki et al., J Biol Chem, 2017
- 2) Komoike et al., Arch Toxicol, 2012
- 3) Wang SF et al., Int J Mol Sci, 2018

18. 抗血栓薬が外傷性脳損傷の重症度に与える影響

多々良有紀、木林和彦

(法医学)

〔目的〕 高齢者は転倒等の外傷性脳損傷のリスクに加えて様々な基礎疾患を有している。脳疾患や心疾患を有する高齢者が増加し、血栓の形成を抑えるための抗凝固薬や抗血小板薬等の抗血栓薬を服用している患者も増加している。抗血栓薬服用者が外傷性脳損傷を受傷した場合、出血傾向のために外傷性脳損傷が悪化することが予想される。本研究では、抗血栓薬を投与したマウスに外傷性脳損傷を受傷させ、抗血栓薬服用時における外傷性脳損傷の増悪の実態、および血中抗血栓薬濃度との関係性を明らかにすることを目的とした。今回は抗血栓薬のうち抗凝固薬のワルファリンを用いた。

〔方法〕 ビタミンK欠乏飼料で飼養したマウス (C57BL/6J・8~10 週齢) にワルファリン (低投与量 0.35mg/kg/24h・高投与量 0.70mg/kg/24h) を経口投与し、脳挫傷作成装置 (Impact One, Leica) で大脳皮質に局所性脳損傷を作成した。ワルファリン未投与、頭皮切開のみ又は骨窓形成のみのマウスと比較した。受傷2時間、1日及び3日後にプロトロンビン時間、脳出血量及び血中ワルファリン・7-水酸化ワルファリン濃度を測定した。

〔結果〕 ワルファリン高投与量投与の損傷群で、受傷1日後に血液プロトロンビン時間延長、脳出血量増加及び血中ワルファリン・7-水酸化ワルファリン濃度高値の傾向が観察された。

〔考察〕 ワルファリンは高濃度投与において外傷性脳損傷の重症度に影響を及ぼすこと及び外傷性脳損傷がワルファリンの作用に影響を及ぼす可能性が示唆された。ワルファリン服用者の外傷性脳損傷の重症度判定には、ワルファリンの摂取量及び血中濃度の検討が必要と考えられた。

〔学会発表〕

1) 多々良有紀、中尾賢一朗、木林和彦. 抗血栓薬が外傷性脳損傷の重症度に与える影響. 第106次日本法医学会学術全国集会、名古屋、2022/6

19. 水中に存在するヒト DNA を用いた入浴時間の推定

町田光世、木林和彦

(法医学)

〔目的〕 法医学では事件・事故の発生場所や死体が置かれていた場所の特定は重要な鑑定事項である。浴槽、プール、河川、海水浴場等の水中は溺水事故の発生場所であり、稀には死体投棄の場所にもなる。溺水患者が水中から救出され病院に搬送された場合等では溺水の発生場所の特定が必要である。水中と臓器中のプランクトンの種類から溺水場所を調べることがあるが、浴槽やプールの水にプランクトンは通常含まれていない。水中から死亡者や他者の DNA を検出すれば死亡場所や死亡状況の特定につながると予想される。本研究では入浴中の水に含まれるヒト DNA 量や DNA 分解度、正しく検出された STR ローカス数などを経時的に調べ、入浴時間に関する項目を多変量解析により検討した。

〔方法〕 ボランティア (n=11) が浴槽内に入浴し、入浴前、入浴 1 分、2 分、5 分、10 分後に採取した浴槽内の水 2 リットルをガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ過後のろ紙を細断後 QIAamp DNA Investigator kit で DNA を抽出した。ヒト DNA 量は Kapa hgDNA Quantification kit の 41 bp の DNA 濃度を基にして算出し、DNA 分解度は 129 bp と 41 bp の DNA を定量した後、129 bp:41 bp の比を計算した。抽出した DNA は AmpFlSTR Identifiler Plus kit で増幅後 STR 解析を行った。本研究は本学倫理審査委員会の承認を得て実施した (2021-0007)。

〔結果〕 入浴時間とヒト DNA 量の関係は相関係数 $r=0.268$ で相関はなかったが、入浴時間と DNA 分解度の関係は相関係数 $r=0.694$ であり、入浴時間が長いほど未分解の DNA が増加する傾向を示した。入浴時間と正しく検出された STR ローカス数の関係は相関係数 $r=0.558$ であり、入浴時間が長いほど正しく検出された STR ローカス数は増加する傾向を示した。また、入浴時間とアリルピーク高の関係は相関係数 $r=0.691$ であり、入浴時間が長いほどアリルピーク高が高まる傾向を認めた。

〔結論〕 浴槽内の水中に含まれるヒト DNA の解析では DNA 分解度や正しく検出された STR ローカス数、アリルピーク高からヒトが水中に浸かっていた時間の推定が可能と考えられた。

〔発表論文〕

- 1) 町田光世、木林和彦. (2022) 水中からヒト DNA を抽出する方法の検討. DNA 多型 vol. 30 (1): 49-50

〔学会発表〕

- 1) 町田光世、木林和彦. 水中に放出されたヒト DNA 抽出法の検討. 第 30 回日本 DNA 多型学会、Web 開催、2021/12
- 2) 町田光世、木林和彦. 浴槽内の水中に含まれるヒト DNA の解析による入浴時間の推定. 第 106 次日本法医学会学術全国集会、愛知、2022/6

20. 次世代シーケンサーを用いた STR 近傍配列中多型の利用

多木崇、木林和彦

(法医学)

〔目的〕 ゲノム DNA 中の STR と呼ばれる、数塩基の単位配列が反復する配列は、反復数の個人差を利用して、犯罪捜査等の個人識別で広く利用されている。STR 領域を増幅し、増幅産物を電気泳動した際の移動度から反復数の推定が行われているが、遠い血縁関係を鑑定する際などに、反復数のみでは情報量が不足する場合があった。STR の反復配列に隣接する近傍配列中には塩基の置換・挿入・欠失等の様々な多型があることが明らかにされつつあり、次世代シーケンサーで STR の近傍配列を調べることで、反復数以外の多型情報も利用した識別力の向上が期待されている。一方、法医学試料ではしばしば、ゲノム DNA の断片化が観察され、長い DNA 配列の解析は困難となる。本研究では、様々な分解度の DNA に対して、次世代シーケンサーを利用した STR 解析の際の解読近傍配列の長短による取得配列量の比較を行った。

〔方法〕 常染色体 15 箇所の STR を PCR で増幅するためのプライマーセット (PS) を 2 種類設計した。1 つは STR 近傍配列の取得を最小限にするもの (short_PS:sPS) であり、他の 1 つは最大限近傍配列を取得するもの (long_PS:IPS) とした。解読可能な STR 近傍配列長は、sPS を用いた場合は平均 26 塩基、IPS を用いた場合は平均 208 塩基であった。2 種類の市販コントロール DNA (K562 DNA, 2800M Control DNA) について sPS と IPS を用いて STR 領域を増幅後、MiSeq を用いて配列を取得した。STR 反復配列と STR 近傍配列はオープンソースのソフトウェア (FDStools¹⁾) を用いて解析した。K562 DNA については、30 分から 24 時間の間、70°C で熱処理し、sPS と IPS を用いた増幅と配列解読を行なった。取得配列量はリード数を用いた。

〔結果〕

○熱未処理 DNA

STR 近傍配列中、K562 DNA は sPS で 4 箇所と IPS で 6 箇所、2800M Control DNA は sPS で 5 箇所と IPS で 7 箇所の多型が確認された。何れのコントロール DNA もアンプリコンが 200 塩基長を越えるとリード数が減少傾向となった。

○熱処理 DNA

15 箇所の STR のリード数の合計は、全ての熱処理時間で sPS を用いた場合が IPS の場合に比べて大きい値であった。sPS と IPS の何れを用いた場合でも、熱処理時間の増加に伴い、アンプリコンが長い STR のリード数は減少傾向、アンプリコンが短い STR のリード数は増加傾向があった。IPS を用いた場合、16 時間以上の熱処理では、アンプリコンが 350 塩基長以上の STR で配列未検出の場合があった。

〔今後の予定〕 コントロール DNA を用いた実験の結果、DNA の分解程度によっては、STR 近傍配列中の多型利用が有用と考えられた。今後は、法医学試料中の DNA を用い、STR 近傍配列中の多型情報の有用性を調べていく予定である。

[文献]

1) Hoogenboom J., van der Gaag K.J., de Leeuw R.H. et al. (2017) *Forensic Sci. Int. Genet.* 27: 27-40