

4 1 . Programmed cell death protein 1(PD-1)と全身性エリテマトーデスモデルマウスの関連の検討

森山倫奈、勝又康弘、菊池華恵、針谷正祥
(膠原病リウマチ内科学)

〔目的〕 T細胞は全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) の病態の中心と考えられている。中でも、PD-1⁺CXCR5⁺CD4⁺として定義される濾胞性ヘルパーT (T follicular helper; Tfh) 細胞や、PD-1^{hi}CXCR5⁻CD4⁺として定義される、T peripheral helper (Tph)細胞が、近年注目されている。Tfh や Tph の主要な細胞表面マーカーでもある programmed cell death protein 1 (PD-1)は、リンパ球の活性化シグナルの亢進/抑制に働く膜蛋白質である。PD-1 及びそのリガンドは、末梢の免疫活性を抑制的に制御する。さらに、ヒト末梢血には、PD-1 やそのリガンドの可溶性蛋白が存在する。当教室は、ヒトの SLE 患者血清中では、可溶性 PD-1 が健常人や他疾患に比べて高濃度に存在し、疾患活動性とも関連することを論文報告した¹⁾。しかし、可溶性 PD-1 の作用については、SLE に限らず一般的にも不明のところが多い。一方で、ヒト SLE は不均一な疾患であり、ヒト患者由来サンプルを用いた検討だけでは、可溶性 PD-1 が SLE の病態にどのように関わっているのか解明することには限界がある。本研究は、SLE の自然発症モデル動物において、可溶性 PD-1 が、末梢血や各組織で経時的にどのように発現しているのか、また抗 dsDNA 抗体やループス腎炎などの病態とどのように関連しているのか、明らかにすることを目的とした。

〔方法〕 動物は、SLE の自然発症モデル動物である、BXSJ/MpJ-*Yaa* (オス) のマウスを用いた。また、C57BL/6 系統のマウスを非発症対照群とした。マウスは、本学の実験動物研究所で飼育した。生後 8 週、10 週、16 週の時点で顔面静脈からランセット法で末梢血を採取した。また、下腹部を圧迫摩擦して採尿した。体重測定や外観の経過観察の後、実験終了時には二酸化炭素ガス吸入により安楽殺を行った。心臓穿刺による採血を行った後、胸・腹腔内の諸臓器を採取し、脾臓や腎臓などの組織は、凍結保存した。血液は、動物用全自動血球計数装置を用いて末梢血数を測定した後に、血清を凍結保存した。血清中の可溶性 PD-1、抗 dsDNA 抗体を、市販 ELISA キット (PD-1: CUSABIO TECHNOLOGY、抗 dsDNA 抗体: 富士フイルムワコーシバヤギ) とマイクロプレートリーダー (Synergy LX) を用いて測定した。尿中の尿蛋白を尿検査用試験紙で半定量した。また、凍結保存したマウス脾臓の組織標本を抗マウス CD4 抗体 (RM4-5、BD Pharmingen) と抗マウス PD-1 抗体 (AF1021-SP、R&D)、および二次抗体 (Alexa Fluor® 647 AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)および Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG (H+L)、いずれも Jackson IRL) で染色し、用蛍光免疫組織染色で病理組織学的に観察した。一部の脾臓からは脾細胞浮遊液を作り、抗マウス CD4 抗体 (AF488、Biolegend) と抗マウス PD-1 抗体 (AF647、Biolegend) で染色し、各亜分画の細胞頻度をフローサイトメーター (CytoFLEX) で測定し、また細胞膜表面に発現する PD-1 の平均蛍光強度を測定した。

〔結果〕 BXSJ/MpJ-*Yaa* マウスは、C57BL/6 マウスに比べて、体重が少なく、蛋白尿が多く、血小板減少症が多くみられた。BXSJ/MpJ-*Yaa* マウス腎組織では、HE 染色や PAS 染色標本で、糸球体腎炎が認められた。BXSJ/MpJ-*Yaa* マウスは、C57BL/6 マウスに比べて、血清中の可溶性 PD-1 値が高値であり、その値は週数の多いマウスの方が高値であった。また、可溶性 PD-1 値は抗 dsDNA 抗体価

と相関した。BXSB/MpJ-*Yaa* マウスの脾臓の蛍光免疫組織染色においては、CD4 発現細胞において、PD-1 との共発現が認められた。脾細胞浮遊液のフローサイトメトリーでは、CD4 陽性細胞のうち、2/3 程度が PD-1 陽性細胞であった。

〔考察〕 SLE の自然発症モデル動物である、BXSB/MpJ-*Yaa* マウスにおいて血清中の可溶性 PD-1 が C57BL/6 マウスと比較して高値であった。血清中の可溶性 PD-1 は、蛋白尿、血小板減少症、抗 dsDNA 抗体など、SLE の病勢と関連していた。BXSB/MpJ-*Yaa* マウスの脾臓において、CD4 陽性細胞で PD-1 の発現が亢進していた。

〔結論〕 SLE の自然発症モデル動物である、BXSB/MpJ-*Yaa* マウスにおいて、PD-1 がその病態に関連し、血清中の可溶性 PD-1 が高値であることが示唆された。

〔文献〕

1) Hirahara S., Katsumata Y., Harigai M., et al. (2020) *Lupus* 9(7): 686-696

4 2. *BTNL8-BTNL3* 領域における 56kb 欠損と全身性強皮症の関連

川本学、樋口智昭、川口鎮司、針谷正祥
(膠原病リウマチ内科学)

〔目的〕 *Butyrophilin*(BTN)及び *Butyrophilin-like*(BTNL)ファミリーは B7 タンパクのホモログとして発見されたタンパク群で、ヒトでは免疫細胞を含む様々な組織において発現しており¹⁾、癌免疫や消化管を主として免疫反応への関与が報告されている。ヒト5番染色体長腕上に位置する *BTNL8-BTNL3*間の 56kb にわたる欠損は多人種において保存された common なものであり、この欠損により **BTNL8, BTNL3** の融合タンパクが発現されると共に、隣接遺伝子(*BTNL9*)産物の発現に影響を与えることが判明しているものの²⁾、疾患との関連についての既報は無い。

我々は定量 PCR マシンを用いた融解曲線分析により、*BTNL8-BTNL3* 領域における 56kb deletion の解析方法を確立し、さらに、56kb 欠損と全身性エリテマトーデス発症との関連について、昨年度の紀要で報告した。今年度は 56kb 欠損と全身性強皮症との関連について解析を行った。

〔方法〕

1. 解析対象

健常人 793 名と強皮症患者 336 名の genome DNA を用いて、解析を行った。カイ二乗検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

2. *BTNL8-BTNL3* 領域における 56kb deletion の解析方法

日本人末梢血由来 genome DNA を用いて下記の primer により PCR を行い特定領域の増幅を行った。

(正常型) BTNL3.8-FW1:GGCACAACCCAGAACAAAGT

BTNL3.8-RV1:TGAGAACC AAAATGAGCACAA

(56kb 欠損) BTNL3.8-FW2:GGTCAAATAATAAGGGGATGAATG

BTNL3.8-RV2:GACACAGGAGTGTGCAAGGT

PCR には TOYOBO KOD SYBR PCR Master Mix を用い、上記4種の primer 全てを含む状態で multiplex PCR を行った。総研 2F に設置の Applied Biosystems 7500 Real-time PCR system を用いて Melting Curve 解析を試みると共に、アガロースゲル電気泳動により増幅産物の確認を行った。

〔結果〕 健常人群は 516/1070 (32.5%)、全身性強皮症群は 188/672 (28.0%) で 56kb deletion を認め、オッズ比 : 0.81 (95%信頼区間 : 0.66~0.98, $p=0.03$) と有意に全身性強皮症群で低下していた。

〔考察〕 全身性強皮症患者で *BTNL8-BTNL3*間の 56kb 欠損割合が有意に少なく、このことが全身性強皮症で認められる自己免疫異常に関連している可能性が示唆された。今後、この領域の欠損の機能解析や、臨床症状との関係について解析をすすめたい。

〔結論〕 今回の結果から、*BTNL8-BTNL3*間の 56kb 欠損が全身性強皮症患者の発症に関与する可能性が示唆された。

[文献]

- 1) Guo Y., Wang A. (2015) Front Immunol. Aug 18(6) :421
- 2) Aigner J., Villatoro S., Estivill X. (2013) BMC Genet. Jul 6(14):61

4.3. Trifluridine の効果予測因子と耐性メカニズムの検討

中島豪、近藤侑鈴、倉持英和
(化学療法・緩和ケア科)

〔目的〕 Trifluridine は結腸・直腸癌および胃癌に臨床応用されている抗がん剤である。第 III 相臨床試験の結果、プラセボと比較して結腸・直腸癌については全生存期間 7.1 カ月（プラセボ 5.3 カ月、 $P<0.0001$, HR0.68）、胃癌については全生存期間 5.7 カ月（プラセボ 3.6 カ月、 $P=0.0003$, HR0.69）と統計学的有意差をもって生命予後を延長することが知られている^{1,2)}。いずれのがん種についても、現在の診療ガイドラインでは後方ラインでの使用が推奨されているため、がんが進行している症例への使用となることが多く、投与による有害事象から体力低下、QoL 低下を来す症例も多い。現在、Trifluridine の奏功性を予測するための手段は確立していないが、効果予測が可能となれば、奏功性の低い症例への Trifluridine 投与回避、他剤検討が出来るようになり QoL の維持や緩和ケアの早期介入が可能となる。また奏功性の低い抗がん剤投与を回避することで医療経済上のメリットも期待できる。今回、Trifluridine への耐性細胞株を作製し、耐性に関わる因子を遺伝子学的背景から検討する。また、臨床症例で Trifluridine を投与された症例の奏功性とその患者のがん組織から得られた遺伝子学的背景とを検討し、Trifluridine 耐性株での遺伝子学的背景との同一性をみる。

〔方法〕 大腸癌/胃癌 培養がん細胞株を用いて Trifluridine 含有培地で継代し耐性株を作成する。元の細胞と耐性株との網羅的遺伝子発現比較解析を行い、耐性に関わる遺伝子候補を抽出する。また、耐性に関わる遺伝子候補の発現差異と実臨床の Trifluridine 奏功性について、臨床がん組織検体を用いて解析検討する。いずれも現在研究継続中である。

〔文献〕

- 1) Mayer, R.J. et al. (2015) N. Engl. J. Med. 372(20): 1909-1919
- 2) K Shitara et al. (2018) Lancet Oncol Nov;19(11): 1437-1448

4.4. 脊髄性筋萎縮症における治療有効性モニタリングのためのバイオマーカーの開発

大月典子、加藤環、横村守、松尾真理、齋藤加代子
(ゲノム診療科)

〔目的〕 脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy, SMA) は Survival Motor Neuron 蛋白質 (以下 SMN) 欠乏に起因する進行性神経筋疾患である。近年、神経細胞の SMN 発現誘導を目的とした核酸医薬(2017年)、遺伝子導入薬(2020年)、低分子医薬(2021年)が承認された。発症機序の解明とともに早期の治療開始と治療法選択が望まれているが、臨床有用性のある病態の客観的評価法 (バイオマーカー) は未だ確立されていない。我々は過去に報告したバイオマーカーである機能的 SMN 解析法の再検討に加え、Nash らの報告¹⁾による中枢神経系-循環器系 SMN 輸送の可能性についての検証を考えた。そこで微量 SMN 定量法を構築し、細胞内外の SMN 定量、機能的 SMN 解析と臨床情報を併せて解析する。本研究では、SMN 挙動を明らかにし、治療機序にかかわらず評価可能な SMA バイオマーカーの確立、更にその社会実装化を目的としている。

〔方法〕 SMA 群の治療前後の末梢血検体を継続的に回収し、通常運動機能を持つ成人を非 SMA 群 (コントロール群) として以下の3点について検討した。最終的に、検討結果と臨床情報 (運動機能評価および血液検査) との相関解析を行う。

1. イメージングフローサイトメーター (IFC) による CD33 強陽性細胞 (単球画分) の SMN 凝集 (SMN スポット) 解析および機能分子群との共局在解析 2. ELISA 法とウエスタンブロット法による細胞外 SMN 定量値 (末梢血・脳脊髄液) 3. ELISA 法による単位末梢血単核球当たりの SMN 定量値
なお本研究は東京女子医科大学倫理審査委員会より以下の承認を受けて行った。

脊髄性筋萎縮症患者由来細胞を用いた病態解明およびバイオマーカーの確立 (承認番号: No. 4786)

脊髄性筋萎縮症における治療有効性モニタリングのためのバイオマーカーの開発 (承認番号: No. 5639)

〔結果〕 IFC による SMN 解析では、非 SMA 群に比較して SMA 群で発現頻度とスポット陽性細胞比率が有意に低下する。治療過程における解析データの推移は現在データ蓄積中である。さらに機能分子の集積について数値解析を試行中である。

細胞外 SMN 解析では夾雑蛋白質の排除と回収画分が重要なポイントであり、検討の結果、アフィニティビーズを用いた分画単離法を採用した。単離画分は酵素活性の定量と IFC による画像解析を用い、安定した純度での回収に成功した。しかしながら、それらを用いた SMN 定量の結果、ELISA 法、ウエスタンブロット法ともに、定量下限 (50 pg/mL) 以下であることが懸念され、現状では比較できていない。PBMC では定量範囲内の値を得られており、データを蓄積している。

〔考察〕 過去に我々は、IFC 法により観察された細胞内 SMN 凝集 (SMN スポット) が、細胞質および核内の Smith core protein (Sm) と共染色された結果より、機能的 SMN 検出のバイオマーカーとしての可能性を報告している。さらに本研究では、特異性向上のために核小体との機能的結合を示す特異蛋白質形成について解析している。これらの蛋白質は細胞周期の速い増殖期の細胞で検出が報告されているが²⁾、我々の検討している未刺激の新鮮 PBMC では目視可能な凝集体は報告されていない。そこ

で画像データのピクセル単位の蛍光強度を算出し、波長別の相似性評価を数値化する試みを検討中である。本法の確立により、客観的な分子挙動の評価によるバイオマーカーの信頼度が向上することを期待している。

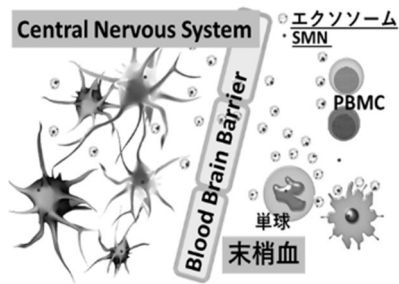


図 1. 中枢神経系から末梢組織への SMN 輸送モデル

また、我々は治療による SMN 発現増強を誘導された神経細胞より、SMN が末梢の血液細胞や筋組織に運搬される可能性を想定した (図 1) 3)。さらに検討に従い、治療開始直後だけではなく、末梢を循環し局所細胞とのクロストークを経た後の段階も重要であることに着目した。これらを経て解析に着手したものの、現段階では安定的な femto レベルの蛋白質の定量解析法を確立できていない。現在は治療開始前後の血漿と PBMC を経時的に凍結保存している。解析法確立の後に細胞内外の SMN 定量を速やかに行う予定である。

〔結論〕 現在承認されている 3 種の治療薬 (核酸医薬、遺伝子導入薬、低分子医薬) 前後の継続的な解析により、機能的 SMN 検出に機能分子との相似性評価解析を行うことで特異性が高まる可能性が示された。並行して同時期の末梢血検体を保存しており、今後、定量解析法の確立が急務である。

〔文献〕

- 1) Nash LA, McFall ER, Parks RJ, et al. (2017) Sci. Rep 7(1):13859
- 2) Tapia O, Lafarga V, Berciano MT, et al. (2014) J Cell Sci. 2014 Mar 1;127(Pt 5):939-46
- 3) Hornung S, Dutta S and Bitan G, (2020) Front Mol Neurosci. 13: 38

〔発表論文〕

- 1) Kato T, Matsuo M, Saito K, et al. (2021 *in press*) An overview of the clinical characteristics of Japanese patients with spinal muscular atrophy: data from SMART consortium. TWMUJ. 5
- 2) Otsuki N, Saito K, et al. (2018) A new biomarker candidate for spinal muscular atrophy: Identification of a peripheral blood cell population capable of monitoring the level of survival motor neuron protein. PloS One, 13(8) e0201764

〔学会発表〕

- 1) 加藤環、齋藤加代子、他. SMN 遺伝子領域のゲノム解析による SMA 患者の遺伝子型と表現型の研究. 日本人類遺伝学会第 66 回大会 横浜、2021/10
- 2) 大月典子、前川貴則、齋藤加代子、他. 脊髄性筋萎縮症 (SMA) のバイオマーカー: 末梢血を用いた SMN 蛋白質新規解析法の改善 日本人類遺伝学会第 25 回大会 横浜、2018/10
- 3) 大月典子、齋藤加代子、他. 脊髄性筋萎縮症 (SMA) のバイオマーカー: 末梢血を用いた SMN 蛋白質新規解析法の提案 第 63 回日本遺伝子診療学会 三重、2018/7

4 5. 健常無症候性保菌者由来腸管出血性大腸菌 (EHEC)の分子疫学解析

高橋里奈¹、鵜澤豊¹、荒井祐子¹、井口成一¹、宇野浩一²、野口秋雄²、金子寛²、佐藤寿夫²、菊池賢¹

(¹感染症科、²日本微生物研究所)

〔目的〕 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は日本で年間 4000-5000 例程が発生し、2-7%に溶血性尿毒症症候群 (HUS) を合併する。脳症を併発して死亡することもあり、公衆衛生上大きな問題となっている。EHEC には無症候性保菌者が知られているが、感染源となるのか、保菌者から発症するケースがあるのか、など、その病原性や疫学などについてはほとんど明らかになっていない。日本では食品衛生法により、諸外国には例のない食品取扱者に定期的検便検査が行われ、無症候性保菌者も届出義務が課せられているため、これらの無症候性保菌者由来 EHEC を調べることで、日本の健常者における EHEC 保菌状況や疫学、病原性などを推定しうる。これらの無症候性保菌者由来の EHEC では血清型別不明が大半を占め、発症者由来 EHEC とは異なる株であった。そこで、我々は健康保菌者由来 EHEC の多くを占める血清型別不能株の分子疫学的解析を行った。

〔方法〕 2016-2018 年に日本全国の健常食品関連従事者の検便検査で得られた EHEC (*stx1* ないし *stx2* 陽性株)のうち、デンカ生研の抗血清で型別不能となった 567 株の *stx* subtype, *eae*, *hly*, *ast*, *aggR*, *bfpA* の有無 (1-3)、 遺伝子による O 血清型別 4) を実施した。

〔結果〕 図 1 に *stx1* 保有株、*stx2* 保有株、*stx1+stx2* 保有株毎の *stx* subtype と発症に大きく寄与する *eae* の有無を示す (ほとんどの EHEC 腸管感染症発症者由来株では *eae* が陽性となる)。*stx1* のみを保有する株では *stx1a* が 139 株と最も多く、54 株で *eae* を同時に保有していた。一方、*stx2* のみ保有する株、*stx1+stx2* 保有株ではほとんど *eae* 保有株は認められなかった。図 2 に *stx* subtype 毎の *eae*, *ast*, *hlyA* 保有状況を示す。*eae* 以外に、発症に寄与する因子として、*hlyA*, *ast*, *aggR*, *bfpA* などが知られているが、*aggR*, *bfpA* 保有株はみられなかった。*eae* は *stx1* 保有株に多く、*hlyA* は *stx1*, *stx2*, *stx1+stx2* いずれにもみられた。*ast* は特に *stx2* に多くみられた。図 3 に *stx1* 保有株における血清型別を示す。最も多かったのは既知の血清型で型別不能株で 69 株あり、16 株が *eae* 陽性であった。O-70, O-71, O-84, O-118, O-124, O-150, O-156, O-186 は全て *eae* 陽性で、中でも O-156 は 16 株全てが *eae* 陽性であった。図 4 に *stx2* 保有株における血清型別を示す。最も多かったのは *stx1* 保有株同様、型別不能株で 134 株あったが、*eae* 陽性は 2 株に留まった。O-80, O-92 は、株数は少ないものの、全て *eae* 陽性であった。図 5 に *stx1+stx2* 保有株における血清型別を示す。最も多かったのはやはり型別不能株で 19 株あったが、*eae* 陽性はみられなかった。*eae* 陽性は O-109 株のみにみられた。図 6 に *stx2* で最も多かった *stx* subtype, *stx2e* 保有 122 株の血清型別を示す。*stx2e* はヒトからの分離がほとんど知られておらず、ヒトに対する病原性が低いとされる。血清型別では型別不能株で 67 株、継いで O-100, O-9, O-9/O-89, O-89 などであった。これらはいずれも *eae*, *hlyA*, *aggR*, *bfpA* を保有していなかった。

〔考察・結論〕 健常保菌者由来で多くを占める O 抗原血清型不明 EHEC 株には非常に多様な種類の株が含まれており、40%は遺伝子による血清型別でも型別不能な株で、これらは未知の血清型と考えら

れる。*eae* 保有株は 12%のみであるが *stx1* では 39%と比較的高率にみられた。*stx2*ではヒトからの分離例がほとんど知られておらず、病原性が極めて低いとされる *stx2e* が 39%と最多で、*eae*, *hlyA*, *aggR*, *bfpA* の病原因子も保有していなかった。これらのことから、健常保菌者由来 O 抗原血清型別不能株の多くは病原性が低い株が多く含まれており、現在、行われている就業制限などの必要性に乏しいと考えられるが、今後、更なる検証が必要と考えられた。現在、発症者からの分離頻度の高い O-26, O-103, O-111, O-157, O-145, O-165 などの健常保菌者由来株との比較検討を行っており、今後発表する予定である。

[文献]

- 1) Chakraborty S, Deokule JS, Garg P, et al. (2001). Concomitant infection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in an outbreak of cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139 in Ahmedabad, India. J Clin Microbiol 39 (9):324-3246
- 2) Osek J. (2003). Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains and their major virulence factor genes. J Appl Microbiol 95 (6):1217-1225
- 3) Zhang Jm Xu Y, Ling X, et al. (2020). Identification of diarrheageic *Escherichia coli* by a new multiplex PCR assay and capillary electrophoresis. Mol Cell Probes 49 (2): 101477
- 4) Iguchi A, Iyoda S, Seto K, et al. (2015). *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. J Clin Microbiol 53 (8): 2427--2432

[学会発表]

- 1) 高橋里奈、鶴澤 豊、井口成一、宇野浩一他. 無症候性保菌者由来腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析. 第 94 回日本細菌学会総会ワークショップ 岡山県岡山市 2021.3.25

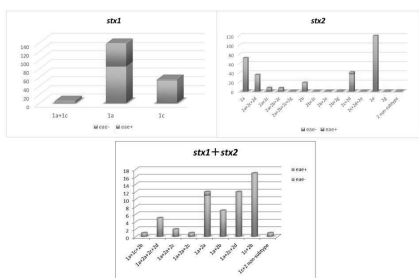


図 1. 健常無症候性保菌者由来 EHEC 株の *stx* subtype、*eae* 保有数

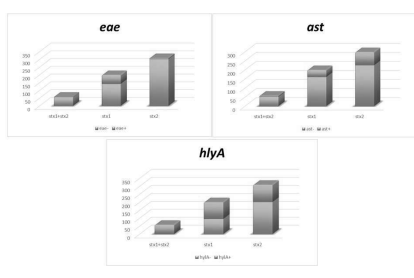


図 2. 健常無症候性保菌者由来 EHEC 株の各種病原遺伝子保有数

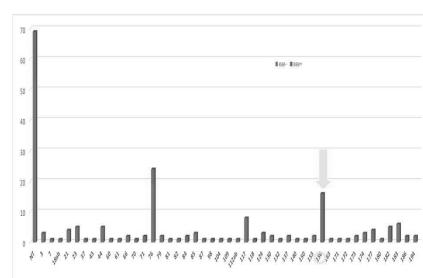


図 3. 健常無症候性保菌者由来 EHECstx1 保有株における血清型 (*eae* 陽性数)



図 4. 健常無症候性保菌者由来 EHEC *stx2* 保有株における血清型 (*eae* 陽性数)

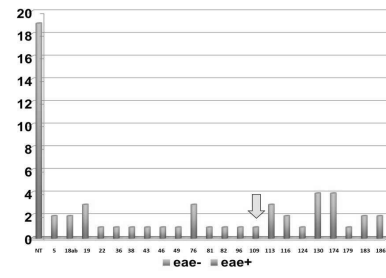


図 5. 健常無症候性保菌者由来 EHEC *stx1+stx2* 保有株における血清型 (*eae* 陽性数)

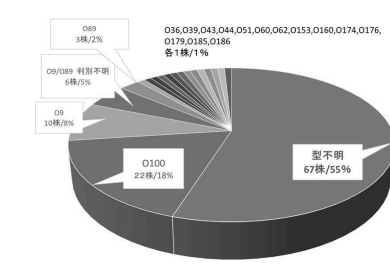


図 6. 健常無症候性保菌者由来 EHEC *stx2e* 保有株の O 抗原血清型分類 (全 122 株)

46. ヒストン修飾因子に注目した骨髄異形成症候群と自己免疫疾患の共通分子基盤の解明

岩崎正幸、世良康如、本田浩章
(実験動物研究所)

〔目的〕 エピジェネティクス制御の破綻が造血器腫瘍や自己免疫疾患の発症・維持に重要な役割を果たしている。骨髄異形成症候群(MDS)には自己免疫疾患が高頻度に合併することが知られているが、その理由は不明である。我々はヒストン脱メチル化酵素 UTX ノックアウトマウスを作製したところ、MDS 様の病態に加えて自己免疫疾患の病像を呈することを見出した。本研究は MDS と自己免疫疾患の合併疾患モデルである UTX 欠失マウスの解析を通じて、両疾患に存在する共通の分子メカニズムを明らかにし、新規治療法開発の探索を目的とする。

〔方法〕 tamoxifen 投与で UTX を全身で後天性に欠失を誘導することが可能なコンディショナルノックアウトマウスを作製し、tamoxifen を腹腔内投与後、経過観察した。コントロールとノックアウトマウスの造血細胞(c-Kit+, Lin-, Sca-1+)を用いて、RNA-seq を行い、網羅的遺伝子発現解析を行った。

〔結果〕 UTX ノックアウトマウスは MDS 様の血球異常を示すと共に(図 1)、肺の非区域性炎症(図 2, 左図矢印)、間質性肺炎および肺血管炎間質性肺炎(図 2, 中図矢印)、メサンギウム増殖性糸球体腎炎(図 2, 右図矢印)というヒト ANCA(anti-neutrophil cytoplasmic antibody)関連小血管炎(ANCA-associated vasculitis; AAV)に極めて類似する病像を呈することを見出した。さらに、造血細胞における遺伝子発現解析を行った結果、UTX 欠損細胞では制御性 T 細胞(Treg)関連の免疫抑制性サイトカイン・アダプター分子の発現が強く抑制されている一方で、複数のインターフェロン関連分子の発現が高度に増強していた(表 1)。

〔考察〕 今回の結果は、UTX 欠失はヒストン H3K27 メチル化脱制御を介して遺伝子発現を攪乱することにより、MDS と AAV という異なる疾患の分子病態に関与していることを強く示唆した。また、MDS における造血不全の一因として免疫機構の異常が示唆され、Treg の関与も指摘されているが^{1),2)}、我々の遺伝子発現解析の結果はそれを裏付けるものであった。

〔結論〕 我々が作製した UTX 欠失マウスは MDS と AAV の発症を説明しうる初めてのモデルマウスであり、今後、さらに UTX 欠失マウスの病理および免疫異常の解析を進め、UTX 欠失が MDS および AAV 発症に関与する共通の分子機構を明らかにしていきたい。

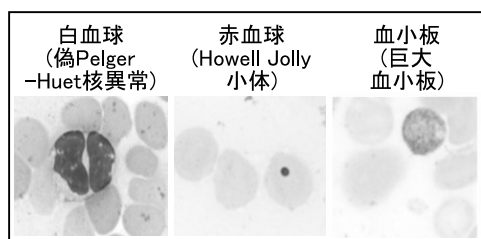


図 1. UTX 欠失マウスにおける血球異常

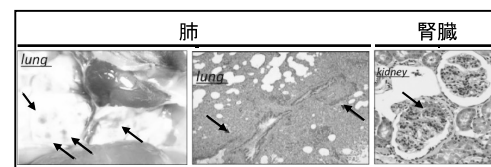


図 2. UTX 欠失マウスにおける血管炎

表 1. 造血細胞における遺伝子発現解析

発現低下遺伝子		発現上昇遺伝子	
遺伝子名	KO/Ctrl	遺伝子名	KO/Ctrl
Ctla4	0.19	Ifng	18.0
Lag3	0.32	Ifi204	11.3
Ebi3	0.06	Ifi205	42.0
IL-10	0.48	Cxcl9	18.4
Nlrc3	0.23	Cxcl10	16.9
Lax1	0.15	Irf1	1.9

[文献]

- 1) Voulgarelis M., Giannouli S., Ritis K., et al. (1997) Eur J Clin Invest. 34(10): 690-700
- 2) Kordasti SY., Ingram W., Hayden J., et al. (2007) Blood. 110: 847-850

4.7. 造血器におけるヒストン脱メチル化酵素 UTX の機能解析

世良康如、岩崎正幸、宮川佳彦、小泉美穂、本田浩章
(実験動物研究所)

〔目的〕 遺伝子発現を抑制する役割をもつヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) の脱制御は、老化との関連性が推察される¹⁾。我々は、H3K27me3 を基質とするヒストン脱メチル化酵素 UTX に着目し、UTX を全身で後天的に欠失を誘導することが可能なコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製した。作製したマウスは、生後約 1 年で脱毛や白内障といった老化表現型を呈したことから (図 1)、UTX 欠失によるエピジェネティクス脱制御が、組織幹細胞老化を引き起こすと推測された。そこで、幹細胞が単離、培養可能な造血系に着目し、解析を行った。

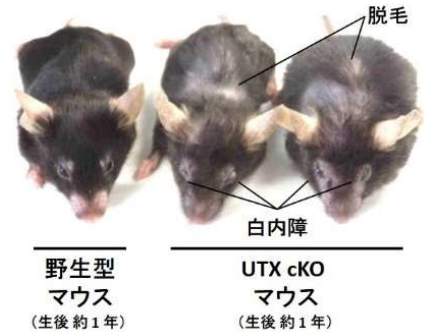


図 1. *Utx* cKO マウスは早期に老化する

〔方法〕 コントロールと *Utx* cKO マウスから単離した造血幹細胞に対して、次世代シーケンサー (NGS) による網羅的発現解析 (RNA-seq) と抗 H3K27me3 抗体を用いた網羅的クロマチン修飾解析 (ChIP-seq) を実施した。RNA-seq から得られた発現プロファイルと既存の老化造血幹細胞の発現プロファイルの相関を、GSEA (gene set enrichment analysis) によって検証した。また、発現プロファイルと ChIP-seq から得られた H3K27me3 プロファイルを比較することで、UTX の H3K27me3 脱メチル化活性の標的遺伝子を探索した。さらに機能的な老化を検討するため、競合的骨髄移植、老化造血幹細胞特異的な表面マーカーの測定、DNA 損傷修復のカイネティクスの測定を行った。

〔結果〕 発現プロファイルをもとにした GSEA の結果、造血幹細胞での UTX 欠失によって発現変動する遺伝子群と、老化によって発現変動する遺伝子群には有意な相関が認められた (図 2)。この結果は、遺伝学的に *Utx*cKO 造血幹細胞は老化状態にあることを示唆している。

発現プロファイルと H3K27me3 プロファイルの比較の結果、UTX 欠失造血幹細胞では、TGF beta signaling 関連遺伝子群の遺伝子座に H3K27me3 が集積していることが示唆された。実際に、発現プロファイルからは、TGF beta signaling 関連遺伝子群の発現が低下していることが示唆されている。しかしその一方で、*Utx*cKO と老化によって相関のみられた発現変動遺伝子の多くは、UTX の脱メチル化活性による制御下になかった。UTX は H3K27me3 脱メチル化活性の他にクロマチンを緩めることで発現を促進させる SWI/SNF 複合体や遺伝子発現を亢進させる機能をもつ H3K4 のメチル化を行う Compass-like 複合体の構成因子であることが報告されている²⁾。そこで、公共データベース上の、これらの複合体の構成因子に対する抗体を用いた ChIP-seq データと、*Utx*cKO

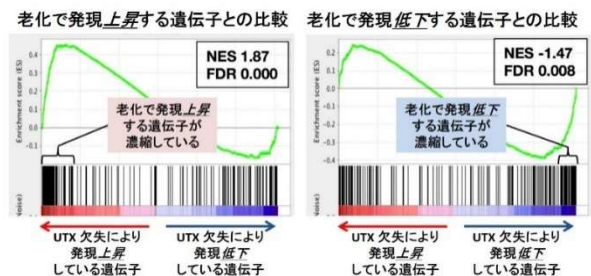


図 2. *UTX*cKO 造血幹細胞の発現プロファイルは老化造血幹細胞と相関する

造血幹細胞の発現プロファイルや老化造血幹細胞の発現プロファイルと比較を行った。その結果、多くの老化や UTX 欠失により発現変動する遺伝子が SWI/SNF 複合体や Compass-like 複合体の制御下にある可能性が示された。

次に、機能的な老化を、a) 競合的骨髄移植、b) 老化造血幹細胞に特異的な表面マーカー、c) DNA 損傷修復のカイネティクス、という 3 つの観点から検証した。a) 老化造血幹細胞は骨髄再構築能が低下することが知られている。そこで、コンジェニックマウスを用いた競合的骨髄移植を行い、移植後の末梢血中のドナー細胞の割合によって骨髄再構築能を評価した。その結果、*Utx* cKO ではコントロールと比較し、末梢血中のドナー細胞の割合が著しく低下しており、骨髄再構築能が低下している事が示された。b) CD41 は老化した造血幹細胞で特異的に認められる表面マーカーである³⁾。この CD41 陽性細胞の割合を *Utx*cKO 造血幹細胞において検証した。その結果、*Utx*cKO では、コントロールと比較し CD41 陽性細胞の割合が有意に増加しており、老化造血幹細胞と同様の結果であった。c) DNA 損傷部位にはリン酸化された γ H2AX や 53BP1 が迅速に集積し、修復が完了するとその集積が解消する。この集積は免疫染色で focus として検出でき、放射線照射後の focus の形成から解消までのカイネティクスが老化造血幹細胞では遅延することが報告されている⁴⁾。このカイネティクスを検討した所、放射線照射後 18h で、コントロールでは全ての focus が消失したのに対し、*Utx* cKO 造血幹細胞では focus の残存が顕著に見られた(図 3)。以上から、*Utx*cKO 細胞機能的にも老化状態にあることが示された。

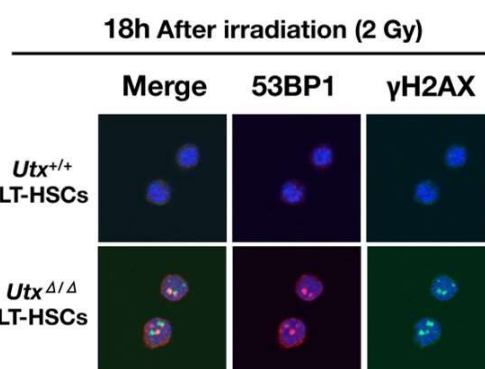


図 3. UTXcKO 造血幹細胞の DNA 損傷応答は遅延する

〔結論〕 UTX は脱メチル化活性依存的、非依存的な機能両方を介して老化関連遺伝子を制御することで造血系の維持に関与している。

〔発表論文〕

1) Sera Y., Nakata Y., Ueda T., et al (2021) UTX maintains the functional integrity of the murine hematopoietic system by globally regulating aging-associated genes. *Blood*. 137(7): 908-922

〔文献〕

1) Sun D., Goodell MA., et al. (2014) Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. *Cell Stem Cell*. 14(5): 673-88

2) Van der Meulen J., Speleman F., Van Vlierberghe P., (2014) The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. *Epigenetics*. 9(5): 658-68

3) Gekas C., Graf T. (2013) CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood*. 121(22): 4463-72

4) Flach J., Passegué E., et al. (2014) Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature*. 512(7513): 198-202

48. ヒストンの修飾因子 UTX の脳特異的な欠損マウスの解析

小泉美穂、世良康如、岩崎正幸、本田浩章
(実験動物研究所)

〔目的〕 幹細胞の機能維持には DNA メチル化やヒストンの化学修飾など、エピジェネティックな調節が重要な役割を果たしている。幹細胞においては、転写促進に働くヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K4me3) と転写抑制に働くヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) が共存する bivalent な状態にあり、どちらかのトリメチル化が解除され遺伝子発現が on または off の状態となり、細胞増殖・細胞分化が促されると考えられている。

この 2 つのヒストン修飾に X 染色体特異的ヒストン修飾因子”UTX (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X chromosome、別名 Kdm6a)”が関与し、ヒストン H3K27 では脱メチル化に、ヒストン H3K4 ではメチル化に関与していると報告されている。

脳においても、ヒストン修飾が脳神経細胞の遺伝子発現の制御に関わっていると考えられるが、脳神経発生・分化における UTX の機能はほとんど解明されていない。我々はこの問題を解決する目的で、脳特異的 UTX 欠損マウスを作製し解析を行なった。

〔方法〕 脳特異的 UTX 欠損マウスは、*Utx^{floxed/floxed}* マウス³⁾と神経幹細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Sox1Cre* マウス⁴⁾を交配し作製した。胎児と出生後 0 日の仔を採取し、形態観察と脳組織から切片を作製し観察を行った。次に、E12.5 の神経幹細胞 (CD133^{high}) と E18.5 の神経幹細胞 (CD133^{high}) とニューロン (CD133^{low}) を用いて RNA-Seq を行い、GSEA (gene set enrichment analysis) で発現解析を行った。その後、E12.5 の神経幹細胞 (CD133^{high}) を採取し、H3K4me1、H3K4me3、H3K27me3 の抗体を用いて、タンパク質と DNA との相互作用を分析することが出来る CUT&Tag(Cleavage Under Targets and Tagmentation)を行った。

〔結果〕 UTX を脳特異的に欠損させた *Utx^{floxed/floxed}/Sox1Cre* マウス (KO) は、出生後まもなく死亡することが判明した。脳組織切片の観察では、E17.5 においてコントロール (Ctrl) と比較して KO で側脳室、第三脳室、第四脳室の全ての脳室で脳室拡大が認められた。RNA-Seq から得られた発現プロファイルに対して GSEA 解析を行った結果、E12.5 の神経幹細胞では、DNA 複製機構関連の gene set で負の相関が認められた (図 1)。また、RNA-Seq の発現プロファイルと CUT&Tag の H3K27me3 の結果を比較したところ、神経細胞の発生に関わる遺伝子において相関が認められた。

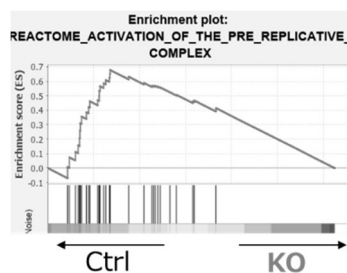


図1. 脳特異的に UTX を欠損させた E12.5 のマウスは、DNA 複製機構関連の遺伝子の発現が低下する

〔考察〕 脳特異的 UTX 欠損マウスで認められた上記の表現型は、UTX 欠損による遺伝子発現制御の破綻が原因であると考えられる。また、UTX は、脳神経系の発達において DNA 複製機構に関与していることが示唆された。今後は、脳神経系の増殖・分化に関わる抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、UTX がどのように脳神経系の発達に関与しているのか、さらに詳しく検討する予定である。

〔結論〕 脳特異的 UTX 欠損マウスは、出生直後に死亡し、E15.5 以降で脳室の拡大が認められた。UTX は、脳神経系の発達において DNA 複製機構に関与していることが示唆された。

〔文献〕

- 1) Hong S., Cho YW., Yu LR., et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104(47): 18439-18444
- 2) Cho YW., Hong T., Hong S., et al. (2007) J. Biol. Chem. 282(28): 20395-20406
- 3) Sera Y., Nakata Y., Ueda T., et al. (2021) Blood. 137(7): 908-922
- 4) Takashima Y., Era T., Nakao K., et al. (2007) Cell. 129(7): 1377-1388

49. マウスモデルを用いたエピジェネティクス変異による前立腺癌発症機構の解明

村元啓仁^{1,2}、岩崎正幸¹、世良康如¹、本田浩章¹

(¹実験動物研究所、²順天堂大学泌尿器科)

〔目的〕 DNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティクス制御は組織恒常性に重要であり、その変異は発癌に深く関与する。前立腺癌では、ヒストン修飾因子である UTX(KDM6A)の変異が高率に認められる¹⁾。UTXはX染色体由来であり、Y染色体にはその相補体である UTYが存在するが、前立腺癌においてはUTX変異に加えてUTY欠失が報告されており、UTX/UTYの機能欠失が協調して発癌に関与している可能性が高い。本研究は我々が独自に作製したモデルマウスおよびこれまでに樹立された細胞株を用いて、前立腺癌発症機構におけるUTXおよびUTY機能欠失の関与を解明することを目的とする。得られた結果は、前立腺癌を含めたヒト悪性腫瘍におけるエピジェネティクス変異による発癌機構に新たな知見ともたらず共に、エピジェネティクス変異やその下流の遺伝子発現変化を対象とした新規治療法の開発に役立つことが期待される。

〔方法〕 *Utx^Δ*, *Uty^Δ*, *p53^{+/-}*マウスに週齢7-9週前後から高脂肪食を投与し、前立腺癌を発症するのを経過をみる。*In vitro*においては、マウス前立腺癌細胞株の7113-D3に対してCRISPR-Cas9システムを使い、*Utx*欠失、*Uty*欠失、*Utx/Uty*両欠失細胞株を樹立し、野生型との増殖能を比較する。

〔結果〕 前立腺組織特異的に *Utx* と *Uty* 両欠失(*Utx^Δ*, *Uty^Δ*)、*p53*ヘテロ(*p53^{+/-}*)の遺伝子改変マウスを作成した。このマウスに8-9週齢から高脂肪食を投与したところ、投与後4ヶ月でGleason score (GS)=3+3の前立腺癌を発症することを確認した(図1)。また、マウス前立腺癌細胞株7113-D3を用いて増殖曲線を調べたところ、野生型よりも *Utx* 欠失細胞株の方が増殖能は高いことが明らかになった(図2)。

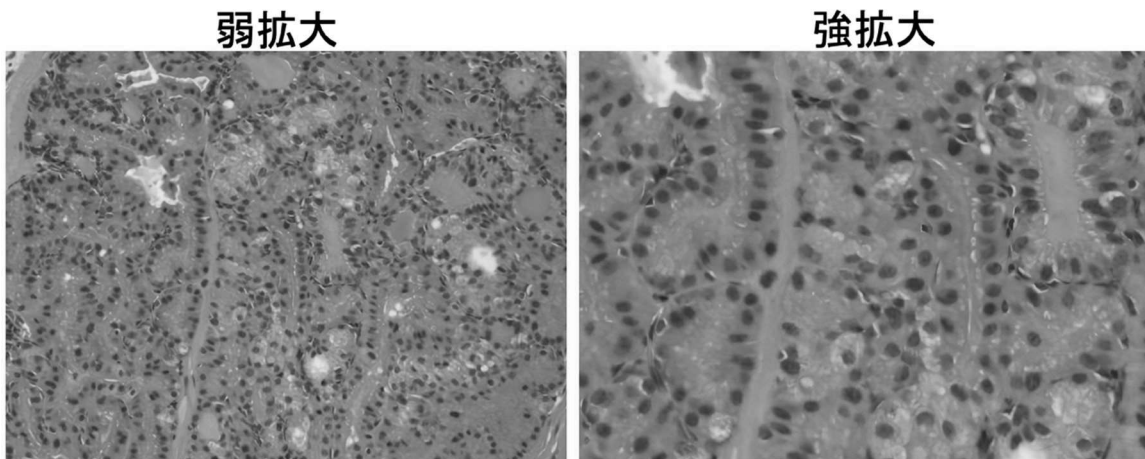


図1. マウス前立腺 HE染色

核小体が明瞭化し、核の形態や大きさが不整になっている。腺管構造を保っており、Gleason score = 3+3の所見である。

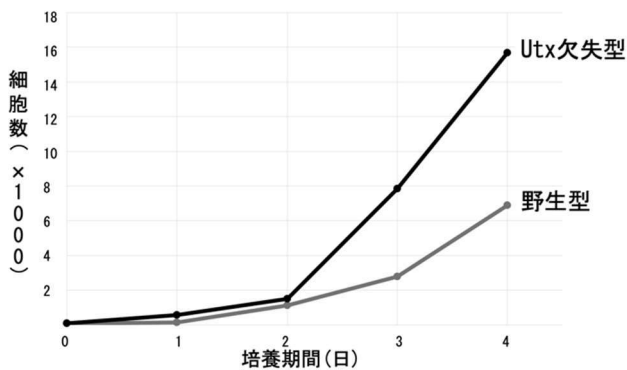


図 2. 7113-D3 の細胞増殖曲線

96 well プレートに 1×10^3 cells/well で播種

播種後 1、2、3、4 日後に計測

〔考察〕 過去に報告された前立腺癌モデルマウスで *p53* 変異を導入して作成されたマウスは、*p53* 変異とともに *PTEN* や *Rb* などの癌抑制遺伝子を変異させて作成していた²⁾。申請者は、前立腺組織特異的 *Utx* 欠失および *Uty* 欠失、*p53* ヘテロのマウスに高脂肪食を投与して前立腺癌モデルマウスの作成に成功しており、前立腺癌におけるエピジェネティクス変異モデルとしては世界で初めてのマウスモデルである。このマウスを使用することによりヒト前立腺癌に近い結果を得ることが期待できる。また、*In vitro* の結果から、前立腺癌発症機構に *UTX* 欠失と *UTY* 欠失が寄与していると考えられる。本研究によって *UTX* および *UTY* の機能が明らかになれば、*UTX* 欠失や *UTY* 欠失がみられる泌尿器癌以外での癌腫でも、発症機構の解明につながる可能性がある。今後、*In vivo* においては、さらに長期間マウスを経過観察して、前立腺癌の悪性度の増悪があるか、転移が出現するのかをみる。また、*In vitro* においては、ために野生型細胞株と *Utx* 欠失、*Uty* 欠失、*Utx/Uty* 両欠失細胞株で RNA seq およびパスマウエイ解析として gene set enrichment analysis (GSEA) を行い、浸潤能に関連のある遺伝子を含め、網羅的に遺伝子発現変動を比較すると共に、H3K27me3 および H3K4me1 に対する抗体で免疫染色を行い、表現型が *UTX* による H3K27 脱メチル化によるものか、または Compass-like complex を介したものかについて検討する。さらに *UTX* 抗体で ChIP seq を行うことにより AR 内での *UTX* の作用領域を同定し、*UTX* の前立腺癌発症機構の関わりについて解明する。

〔結論〕 前立腺癌発症機構に *UTX* 欠失と *UTY* 欠失が寄与していると考えられる。本研究によって *UTX* および *UTY* の機能が明らかになれば、*UTX* 欠失や *UTY* 欠失がみられる泌尿器癌以外での癌腫でも、発症機構の解明につながる可能性がある。

〔文献〕

- 1) Van der Meulen J., Speleman F., Van Vlierberghe P. (2014) The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. *Epigenetics* 9(5): 658-668
- 2) Wu X., Gong S., Roy-Burman P., et al. (2013) Current mouse and cell models in prostate cancer research. *Endocrine related cancer* 20(4): 155-170

50. 造血器腫瘍の増殖機構解明と標的分子の探索

小笠原壽恵、川内喜代隆、マーシャル祥子、風間啓至、佐倉宏
(東医療センター・内科)

〔目的〕 造血器腫瘍には多数の骨髄系及びリンパ系の腫瘍が含まれ、高齢化社会の現在これらは増加傾向にある。一方、分子遺伝学的解析の進歩により疾患の理解も深まりつつあるが、比較的稀な疾患の解析は充分ではない。我々は、急性単球性白血病患者の白血病細胞並びに当院で樹立した HHV-8-unrelated primary effusion lymphoma (PEL)-like lymphoma 患者由来の培養細胞を用いて、分子生物学的および生化学的解析を行い治療標的となる分子の同定を試みた。

〔方法〕 (1) 本態性血小板血症に続発した急性単球性白血病患者の白血病細胞から DNA を抽出し JAK2 および TET2 遺伝子の解析を行った。さらに免疫組織化学で TP53 の発現を検討した。(2) PEL-like lymphoma 患者腹水より Ficoll 比重遠心法でリンパ腫細胞を単離し RPMI-1640 培地中で培養し OGU-1 細胞を樹立した。OGU1 細胞の VEGF および VEGFR mRNA の発現と miRNA 解析、増殖・生存に関与するシグナル分子の解析を行った。

〔結果〕 (1) 本態性血小板血症の腫瘍細胞は JAK2V617F 変異が認められたが、急性単球性白血病転化時の腫瘍細胞は JAK2 変異を認めず TET2 遺伝子の点突然変異 (g.4760G>T) を検出した。また、白血病細胞は TP53 を過剰発現していた。(2) PEL-like B-cell lymphoma 由来の OGU1 細胞は、VEGF/VEGFR-1 の mRNA を発現し VEGF 阻害剤や抗 VEGF 抗体で増殖が抑制された。また、VEGF の制御に関連する miR-17 や miR-20a の高発現が見られた。CD20 抗体処理による増殖抑制は認めなかった。シグナル伝達分子の解析では PKC α , SRC, LYN の活性化を認めたが、MEK/ERK、PI3K/Akt 阻害剤での増殖抑制は見られなかった。一方、MG132 や bortezomib などの proteasome 阻害剤処理でリンパ腫細胞の増殖抑制を確認した。

〔考察〕 (1) 本態性血小板血症を含む骨髄増殖性腫瘍からの急性白血病転化は 3-20%とされており、一旦白血病転化すると難治性で治療法は確立していない。特に単球性白血病転化は少なく病態も不明な点が多い。今回の結果は、骨髄増殖性腫瘍の前駆細胞クローンが TET2 変異を獲得するも JAK2 変異を有さないクローンから派生した事を示唆している。TET2 は脱メチル化に関与するエピジェネティック制御因子で有り、治療標的として azacytidine などのエピジェネティック修飾薬を組み入れる事が重要と考えられる。(2) PEL-like lymphoma は胸腹水を特徴とする B 細胞リンパ腫であり治療法は確立されていない。OGU1 細胞は血管透過性を誘導する VEGF を多量に産生する腫瘍細胞で有り、VEGF が腫瘍細胞の増殖や生存に重要である事を示した。シグナル伝達分子として PKC, SRC、proteasome 等の関与が示唆された。特に細胞周期制御蛋白の分解等に関与する proteasome 阻害剤が OGU1 細胞の増殖・生存を強力に抑制した事から bortezomib などの proteasome 阻害は PEL-like lymphoma の治療薬として有望と考えられた。

〔結論〕 造血器腫瘍としては比較的稀な、骨髄増殖性腫瘍に続発した急性単球性白血病と PEL-like lymphoma の遺伝子および生化学的解析を行った。前者では TET2 と TP53 が後者では VEGF と proteasome が増殖に関与し治療標的の可能性が示唆された。今後、網羅的遺伝子解析や代謝経路を含めたさらなる標的の探索が必要と考えられる。

〔文献〕

- 1) P. Lundberg, A. Karow, R. Nienhold, R. et al. (2014) Blood, 123: 2220-2228
- 2) Kawauchi K, Ogasawara T, Aiba M, et al. (2016) Eur. J. Haematol. 96: 144-151