

1 1. 末梢神経損傷後に誘導される視床神経回路の可塑的改編機構

植田禎史、中山寿子、金谷萌子、宮田麻理子
(生理学 (神経生理学分野))

〔目的〕 発達期の中枢神経系ではシナプスの形成と刈込みが適切に制御されることで機能的に成熟した神経回路が構築され、維持されていく。成熟した神経回路が維持される期間にもこのような神経可塑性は保たれており、例えば末梢神経が損傷を受けるような病的条件下では可塑性が亢進し、大規模な回路の改編が誘導されることが、異所感覚や異所性疼痛の神経基盤に繋がると考えられてきた。我々はマウスのヒゲ感覚経路をモデルに、発達期あるいは末梢神経損傷後の視床回路の大規模な改編メカニズムの解明を進めてきた。特に今年度の研究では末梢神経損傷後の可塑的視床回路改編を誘導するメカニズムに着目した。

〔方法〕 マウスのヒゲ感覚を中継する視床後内側腹側核 (VPM 核) は大脳皮質へ投射するグルタミン作動性の視床皮質投射ニューロンで構成される。これら視床ニューロンは、末梢の三叉神経が入力する脳幹の三叉神経主知覚核 (Pr5 核) のニューロンに由来するグルタミン作動性の軸索入力を受ける。一個の成熟した VPM 核ニューロンは基本的に一本の Pr5 核由来の軸索から入力を受ける。しかし、幼若期の未熟な、あるいは末梢神経損傷後の VPM 核ニューロンは複数本の Pr5 核由来の軸索入力を受ける。この VPM 核ニューロンへの軸索入力パターンは VPM 核ニューロンからの興奮性後シナプス応答を記録することで定量的に解析できる。我々は急性脳スライス標本を用いて単一 VPM 核ニューロンからの電気生理記録と Pr5 核由来の軸索電気刺激を組み合わせることで興奮性後シナプス応答を記録した。

脳幹 Pr5 核や視床 VPM 核にはヒゲの情報を表現する領域が形成されており、成熟した神経回路では Pr5 核から VPM 核への投射はヒゲ領域間でのみ形成される。しかし、幼若期の VPM 核ヒゲ領域にはヒゲ以外の顔面領域や体幹などの異なる身体部位に由来する脳幹領域からの入力 (異所性入力) が混ざっている。異所性入力は発達期のシナプス刈込みによって取り除かれるが、成熟後に末梢神経が損傷を受けることで、これら異所性の軸索が再び VPM 核ヒゲ領域に侵入する。我々は脳幹 Pr5 核ヒゲ領域に選択的に Cre を発現するマウス (Krox20-Cre) とレポーターマウスを交配することで、Pr5 核ヒゲ領域から VPM 核ヒゲ領域へ投射する軸索終末を可視化できる。脳幹から VPM 核へ投射するグルタミン酸作動性軸索の終末は基本的に VGluT2 (小胞性グルタミン酸輸送体 2 型) が発現しているため、パラホルムアルデヒド固定後の薄切脳切片を用いた VGluT2 の免疫組織化学染色を行うことで、VPM 核に入力するヒゲ由来の軸索終末と異所性の軸索終末を可視化し判別した。

末梢神経損傷モデルとして、マウスのヒゲ感覚を司る眼窩下神経 (三叉神経の第二枝) を麻酔下で切断した。術後はマウスを飼育ケージに戻し、5-6 日の飼育後に急性脳スライスの作製あるいはパラホルムアルデヒド固定・薄切切片の作製を行い、上記の電気生理または組織実験を行った。

〔結果〕 我々は VPM 核ニューロンにおける GABA 作動性入力強度の変化¹⁾、あるいは VPM 核ニューロンへ入力する軸索の起始核である Pr5 核における免疫応答細胞ミクログリアの活性化が²⁾、それぞれ眼窩下神経切断後に VPM 核で引き起こされるシナプス改編に先行して生じ、改編誘導を制御することを見出した。

〔考察〕 末梢神経切断後 5-6 日で視床回路には大規模な改編が誘導され、VPM 核ニューロンは多重軸索の入力を受け、VPM 核ヒゲ領域にはヒゲに由来しない異所性入力が入力する。これらシナプス改編の誘導はシナプス後部とシナプス前部で異なるメカニズムによって制御されることが示唆された。一方、これらシナプス後部とシナプス前部の改編誘導メカニズムがどのように関係するかについてはさらなる検討が必要である。

〔結論〕 末梢神経切断後の視床回路の大規模な改編誘導の制御にはシナプス後部における抑制性入力強度とシナプス前部における神経免疫機構が関与することがわかった。

〔発表論文〕

- 1) Nagumo Y., Ueta Y., Nakayama H., et al. (2020) Tonic GABAergic inhibition is essential for nerve injury-induced afferent remodeling in the somatosensory thalamus and ectopic sensations. *Cell Rep.* 31(12): 107797
- 2) Ueta Y. and Miyata M. (2021) Brainstem local microglia induce whisker map plasticity in the thalamus after peripheral nerve injury. *Cell Rep.* 34(10): 108823

〔学会発表〕

- 1) Ueta Y., Sekino S., Katayama Y., and Miyata M. Brainstem microglia are critical for peripheral nerve injury-induced reorganization of thalamic circuits. 第 43 回日本神経科学大会、オンライン開催、2020/7
- 2) Osaki H., Kanaya M., Ueta Y., and Miyata M. The dysgranular area in the primary somatosensory cortex modulates nociception induced escape behavior. 第 43 回日本神経科学大会、オンライン開催、2020/7
- 3) Ueta Y. and Miyata M. Microglia in the brainstem promote peripheral nerve injury-induced circuit reorganization in the thalamus. 第 63 回日本神経化学大会、オンライン開催、2020/9
- 4) 植田禎史、宮田麻理子. 末梢神経損傷に伴う脳幹局所的なミクログリア活性は視床ヒゲマップの可塑的再構築を引き起こす. 2020 年度シナプス研究会 (生理学研究所)、オンライン開催、2020/12

1 2. 網羅的な遺伝子機能解析のための線虫変異体分離の効率化

末廣勇司¹、吉名佐和子¹、本橋智子¹、岩田悟¹、出嶋克史¹、三谷昌平^{1,2}

(¹生理学 (分子細胞生理学分野)、²統合医科学研究所)

〔目的〕 線虫 *C. elegans* は生物の基本情報が充実しており、全ゲノム解読が多細胞動物として最初に解読されたモデル生物である。我々は、この生物において、欠失変異体を収集することで、遺伝子の構造と機能の相関をシステマティックに解明し、ヒト疾患解析に役立てることを目的として変異体分離の技術開発と実際の分離を行っている。

〔方法〕 DNA 修復等に関わる線虫変異体に追加の変異導入を行い、個体を単一培養した（線虫は雌雄同体で1個体から無限に増殖可能）。使用した変異体は、*wrn-1*、*ced-4*、*cku-80*、*polq-1*、*pcn-1*、*atm-1*、*xpc-1*、*atm-1; xpc-1*（二重変異体）である。増殖した個体の一部から凍結保存ストックを作成し、残りをゲノム DNA の抽出に用いた。ゲノムを精製して次世代シーケンサー（ION Proton）にて全ゲノム解読を行い、バイオインフォマティクス手法を用いて、個々のストレインに存在する欠失変異を同定した。個体を解凍して、見つかった欠失変異の存在を PCR 法とサンガーシーケンスにて確認し、純化して凍結保存した。

〔結果〕 線虫の DNA 修復に関わる変異体の中で、*atm-1; xpc-1* 二重変異体バックグラウンドで最も効率良く変異体の分離ができた。得られた変異体の配列情報と最終的な変異体分離の結果を用いて機械学習を行い、次世代シーケンサーデータから本当の変異とシーケンスエラーの違いを識別することを試みた。95%程度の正確さで全ゲノムデータから欠失変異を見いだすことが可能であることが分かった。

〔考察〕 線虫ゲノムには4割弱のヒトなど高等生物のオーソログが存在すると言われている。今回の方法は、コンピュータ化、実験の自動化の比率が向上し、効率的には、我々が以前に開発した PCR スクリーニング方法による分離よりさらに向上した。

〔結論〕 従来の PCR スクリーニング法による変異体を合わせて線虫の全遺伝子の半数程度をカバーするまでに到達している。これらを用いてヒトの疾患モデル解析を行うことが可能となる。

〔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) Rikitake M, Matsuda A, Murata D et al.(2020) Analysis of GPI-anchored proteins involved in germline stem cell proliferation in the *Caenorhabditis elegans* germline stem cell niche. *J Biochem.*: 168(6):589-602

13. がんの転移前ニッチ形成におけるレクチン様酸化 LDL 受容体-1 の役割

瀧田守親、出口敦子、丸義朗
(薬理学)

〔目的〕 レクチン様酸化 LDL 受容体 (lectin-like oxidized LDL receptor-1; LOX-1)は酸化 LDL を認識する C 型レクチン受容体の一つであり、血管内皮細胞やマクロファージなどに発現して、動脈硬化の増悪化に関与することが知られている¹⁾。近年、LOX-1 はがんの病態にもその関与が示唆されているが、がんの転移前ニッチの形成における宿主 LOX-1 の役割は未だ不明である。そこで、我々は LOX-1 遺伝子欠損 (LOX-1-KO)マウスを用いて、がんの転移前モデルを作製し、転移前肺における免疫細胞のポピュレーション解析を行い、がんの転移前ニッチの形成における宿主 LOX-1 の役割を調べた。

〔方法〕 がんの転移前モデルはマウス Lewis 肺がん (LLC)細胞を LOX-1-KO マウスの背部皮下に移入して作製した。がん細胞の移入から 14 日後に肺を摘出し、酵素分散法により細胞を単離した。担がんマウスの肺由来細胞を CD45、CD11b、CD11c、NK1.1、B220、TCR β 、CD4、CD8、CD115、Ly6C、Ly6G、F4/80 に対する抗体でそれぞれ染色し、フローサイトメトリーにより取得したデータを Premium Cytobank の tSNE 解析法に供して免疫細胞のポピュレーション解析²⁾を行った。免疫細胞のポピュレーション解析に用いた表面抗原マーカーは次に示す通りである、CD11b⁺細胞: CD45⁺CD11⁺、NK 細胞: CD45⁺NK1.1⁺、B 細胞: CD45⁺B220⁺、ヘルパー T 細胞: CD45⁺TCR β ⁺CD4⁺CD8⁻、キラー T 細胞: CD45⁺TCR β ⁺CD4⁻CD8⁺、単球: CD45⁺CD11b⁺CD115⁺Ly6C⁺、肺胞マクロファージ: CD45⁺CD11c⁺F4/80⁺CD11b⁻、間質マクロファージ: CD45⁺CD11c⁺F4/80⁺CD11b⁺、樹状細胞: CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺、顆粒球: CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺、G-MDSC: CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺、M-MDSC: CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁺。

〔結果〕 野生型マウスでは担がんにより CD11b⁺、顆粒球、G-MDSC、M-MDSC の細胞集団の割合がそれぞれ増加した。一方、LOX-1-KO マウスにおいても 担がんにより CD11b⁺、顆粒球、G-MDSC、M-MDSC の細胞集団の割合が増加したが、それぞれの細胞集団の割合は野生型マウスに比べいずれも減少していた。

〔考察〕 LOX-1-KO マウスでは担がんによる肺への骨髄由来細胞 (CD11b⁺、顆粒球、G-MDSC、M-MDSC) の集簇が野生型マウスに比べ減少していることから、宿主の LOX-1 が転移前肺のニッチ形成に必要であることが示唆された。

〔結論〕 宿主の LOX-1 はがんの転移前肺のニッチ形成に必要である。

〔文献〕

- 1) Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. (1997) Nature 386(6620): 73-77
- 2) Acuff N.V. and Linden J. (2017) J. Immunol. 198(11): 4539-4546

14. カドミウムのヒト近位尿細管細胞における毒性発現機構

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〕 カドミウムばく露により、腎近位尿細管細胞において細胞死が誘導されるが、その分子機構は未だ解明されていない。我々は **HK-2** ヒト近位尿細管由来上皮細胞を用いて、カドミウム毒性を抑制する食品成分の同定とその作用機序の解析を試みており、最終的にカドミウムの毒性発現分子機構の解明を目指している。これまでの研究から、カドミウムばく露による **HK-2** 細胞死を抑制する食品成分を探索したところ、カドミウム毒性抑制効果を有するレスベラトロールとクルクミンに加え、食品成分 **X** を新たに同定した (論文投稿準備中)。さらに、クルクミンおよび成分 **X** は、カドミウムばく露依存的な **Akt** シグナルの活性化を減弱することで、**HK-2** 細胞死を抑制することがわかった。しかしながら、未だに **Akt** シグナルがどのようにしてカドミウムばく露依存的に惹起される **HK-2** 細胞死を促進するのかはわかっていない。

細胞に対して外部から特定の傷害ストレスが負荷されると、不良蛋白が蓄積し、ユビキチン化された後、最終的にアグリソーム (aggresome) と呼ばれる構造体に輸送・集積され、巨大な蛋白封入体が形成される。アグリソームは不良蛋白を特定の区域に集積・隔離することで、細胞が機能不全に陥ることから守る、多くの細胞に備えられた防御機構であると考えられている。アグリソームに蓄積した不良タンパク質はオートファジー・リソソーム分解系によって分解される。我々は、近年、カドミウムばく露依存的にアグリソームが形成されること、さらに、オートファゴソームがアグリソームに集積することを見出した。本研究では、カドミウムばく露依存的に活性化した **Akt** シグナルがどのような機能を持つのか明らかにするため、オートファゴソーム・リソソーム分解系に注目して解析を行った。

〔方法〕 **HK-2** 細胞に **Akt** 阻害剤を 1 時間処理した後、塩化カドミウム (CdCl_2) を 1~30 時間ばく露し、細胞内シグナル伝達因子の挙動変化を解析した。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。細胞内アグリソームは、主に抗 ubiquitin 抗体を用いて抗体染色し、蛍光顕微鏡 (総研機器: Ti2E) を用いて解析した。細胞毒性は、死細胞の割合を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〕 **Akt** シグナルがオートファジー・リソソーム分解系においてどのような役割をもつのかを解析するため、**Akt** 阻害剤処理した **HK-2** 細胞をオートファジー関連因子 (**LC3B** および **p62**) およびリソソーム関連因子 (**LAMP1**) を特異的に認識する抗体を用いて免疫染色した。その結果、**Akt** 阻害剤処理した細胞では、コントロール細胞と比べて、**LC3B**、**p62** および **LAMP1** が共局在するドットが増加する、すなわちオートリソソーム (オートファゴソームがリソソームと融合した脂質二重膜) が増加することがわかった。さらに、カドミウムストレス下においては、コントロール細胞と比べて **Akt** 阻害剤処理した細胞では、アグリソームに集積するオートリソソームが増加することもわかった。オートファジー・リソソーム分解系の活性化を促進する転写因子として **TFEB** および **TFE3** が知られており、近年、**Akt** を機能阻害すると、**TFEB** および **TFE3** が活性化することが報告されている。そこで、**HK-2** 細胞に **Myc-TFEB** および **EGFP-TFE3** をそれぞれ発現させ、**TFEB** および **TFE3** の局在を確認

したところ、Akt 阻害剤処理した細胞では、コントロール細胞と比べて核内に局在する割合が増加した。このことから、Akt 阻害剤処理した HK-2 細胞では、TFEB および TFE3 の活性が促進されていると考えられる。また、カドミウムばく露処理によっても、TFEB および TFE3 の核内への移行は促進されるが、Akt 阻害剤処理することでそれがより促進することがわかった。そこで、Akt 阻害剤が示すカドミウムばく露依存的 HK-2 細胞死抑制能は、TFEB および TFE3 の機能に依存しているのかを調べるために、TFEB および TFE3 の siRNA を用いた機能阻害実験を行った。その結果、TFEB および TFE3 をノックダウンした細胞では、Akt 阻害剤の示すカドミウムばく露依存的 HK-2 細胞死抑制能が低下した。以上の結果から、Akt 阻害剤処理した細胞では、TFEB および TFE3 の機能が亢進した結果、カドミウムばく露によって惹起される HK-2 細胞死の減弱に繋がることが考えられる。

〔結論〕 本研究結果から、Akt 阻害剤処理により、TFEB および TFE3 を介して、オートファジー・リソソーム分解系が活性化し、カドミウムばく露依存的に惹起される HK-2 細胞死が抑制されることがわかった。一方、カドミウムをばく露した細胞では、Akt の活性が高い状態で維持されているため、TFEB や TFE3 が細胞質に局在すると予想したが、予想に反し、本研究結果では、カドミウムばく露依存的な TFEB および TFE3 の核内への移行が観察された。このことから、カドミウムばく露下の尿細管細胞において、TFEB および TFE3 の核内への移行を促進する Akt とは異なる別の経路が存在すると推測される。

15. 神経芽腫 SH-SY5Y を用いたカドミウム誘導細胞死に対するサルブリナルの影響と分子機構

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〕 哺乳類翻訳開始因子 eukaryotic translation initiation factor 2 subunit α (eIF2 α)は、小胞体 (ER) ストレスシグナリング protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) 経路の ON/OFF を担うリン酸化ターゲットサイトである。通常、外因性あるいは内因性のストレスが細胞刺激として小胞体内に伝わると、unfolded protein が蓄積して PERK が活性化し、eIF2 α がリン酸化 (p-eIF2 α) されて、以後、下流の分子が応答する。下流の分子には、分子シャペロンである GRP78 やアポトーシス促進因子である CHOP が転写誘導される結果、刺激に対する細胞生存あるいは細胞死が起こる。脱リン酸化酵素の阻害剤であるサルブリナルは eIF2 α の脱リン酸化を阻害する結果、リン酸化の持続をもたらし、細胞の生存を調節すると考えられているが、そのメカニズムは明らかにされていない。今回、神経芽腫由来の SH-SY5Y 細胞を用いて、塩化カドミウム (CdCl₂) 誘導細胞死に対するサルブリナルの影響と ER ストレス/オートファジー応答の分子基盤を調べた。

〔方法〕 SH-SY5Y 細胞に CdCl₂ を 0-2.0 μ M、サルブリナルを 10 μ M の条件下で 24 時間処理した。細胞死は MTT assay で評価した。また、ER ストレス/オートファジーの応答因子の定量はリアルタイム PCR および western blotting で評価した。オートファジーをライブイメージングするため、Cyto-ID®を用いてオートファゴソームを蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。オートファジーの誘導と阻害を決定するため、バフィロマイシン A1 を用いて flux assay を行った。

〔結果〕 CdCl₂ 濃度依存的に細胞生存率が減少し、サルブリナルとの併用で細胞生存率低下は抑えられた。CdCl₂ 濃度依存的に、p-eIF2 α 、GRP78、p62、LC3B はタンパク質レベルで上昇し、サルブリナルを併用処理するとさらに上昇した。CHOP mRNA は、CdCl₂ 濃度依存的に上昇し、サルブリナルを併用処理すると上昇が抑えられた。オートファゴソームは、CdCl₂ 単独処理で上昇し、サルブリナル併用処理でさらに上昇した。flux assay から、カドミウムはオートファジーを阻害することが分かった。一方、サルブリナル単独では、オートファジーを誘導することが明らかとなった。

〔考察〕 サルブリナルは、CdCl₂ 誘導による eIF2 α のリン酸化を持続させることで、GRP78 の誘導を増大し、CHOP mRNA の誘導を抑制するため、細胞死は抑えられたと考えられる。また、カドミウム単独処理によるオートファジーの阻害に対して、サルブリナルは、むしろオートファジーを誘導するため、カドミウムの細胞死が抑制されたと考えられた。

〔結論〕 近年報告されている ER ストレス応答とオートファジーとの協働による細胞生存・死の決定機構の関与が示唆される。

16. 水中に存在するヒト DNA 抽出法の検討

町田光世、木林和彦
(法医学)

〔目的〕 法医学では事件や事故の発生場所、死体が放置されていた場所を特定することは重要な鑑定事項である。その中でも水中は事故や事件で死亡や遺棄の場所となることが多く、浴槽内やプール、海水浴場、河川での溺死或いは河川や海域への死体投棄等が見られる。溺水の患者の多くは溺死が発生した場所から救出されたり病院に搬送されたりする等して移動されるため、溺水が発生した場所を特定する必要がある。従って、水中から死亡者や他者の DNA が検出されれば死亡場所や死亡状況の特定につながると考えられる。本研究では、水中に存在するヒト DNA が検出される至適条件の検討を行った。

〔方法〕 ボランティアから採取した浴槽の水をグラスファイバーフィルターでろ過し、キットの種類 (DNeasy Blood and Tissue kit、QIAamp DNA Mini kit、QIAamp DNA Investigator kit)、Proteinase K の反応時間 (1 時間、3 時間、一晩)、ろ紙の細断の有無についてヒト DNA の抽出量と DNA の分解度を比較した。ヒト DNA 量は Kapa hgDNA Quantification and QC Kit の 41 bp の DNA 濃度を基にし、DNA 分解度は、41 bp と 129 bp の DNA 濃度を測定して各 DNA 濃度から 41 bp:129 bp の比を計算した。なお、本研究は本学倫理審査委員会の承認を得て実施した (No. 2021-0007)。

〔結果〕 ヒト DNA の抽出量は DNeasy Blood and Tissue kit が最も少なく QIAamp DNA Mini kit と QIAamp DNA Investigator kit が多かった。また、Proteinase K の反応時間は、一晩の反応時間の方が 1 時間の反応時間よりも多く、3 時間と一晩の反応時間の間では差が認められなかった。さらに、ろ紙は細断した方が細断しないより時よりも有意に多かった。DNA の分解度は、QIAamp DNA Investigator kit が最も多かったが、Proteinase K の反応時間の間と、ろ紙の細断の有無の間には差が認められなかった。

〔結論〕 水中からヒト DNA が検出される至適条件は、ヒト DNA の抽出量が最も多くかつ DNA 分解度が低い時である。以上の結果から、QIAamp DNA Investigator kit を用いること、Proteinase K を一晩反応すること、ろ紙を細断することが必要であることが示唆された。

〔学会発表〕

- 1) 町田光世、木林和彦. 変性試料に対する全ゲノム増幅 (mIPEP 法) の有効性. 第 104 次日本法医学学会学術全国集会、京都、2020/6
- 2) 木林和彦、町田光世. 水死体発見現場の水中からヒト DNA の検出を試みた法医解剖例. 第 89 回日本法医学学会学術関東地方集会、東京ガーデンパレス、東京、2020/10

1.7. 抗血栓薬服用が外傷性脳損傷に与える影響

多々良有紀、島田亮、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〕 8～10 週齢雄マウス (C57BL/6J) に、ワルファリンを給水ボトル中の水に溶かし、24 時間摂取させた。ワルファリン濃度は低濃度 (0.35mg/kg/24h) と高濃度 (0.70mg/kg/24h) とした。三種混合麻酔薬を用いた全身麻酔を行い、脳挫傷作成装置 (Impact One, Leica) を用いて大脳皮質に局所性脳挫傷を形成した (外傷群)。頭皮切開のみのマウスと比較した (Sham 群)。受傷後 2 時間、1 日、3 日に脳と心臓血を採取し、PT-INR (プロトロンビン時間)、脳出血量、ワルファリン血中濃度を測定した。

〔結果〕 ワルファリン高濃度投与マウスの受傷後 1 日において外傷群は PT-INR 値が延長する傾向があった。また、高濃度投与の外傷群において受傷後 1 日に脳出血量が多い傾向が見られた。さらに、ワルファリン血中濃度は高濃度投与の受傷後 1 日において外傷群は高濃度に検出される傾向があった。

〔考察〕 ワルファリン高濃度投与マウスの受傷後 1 日において PT-INR 値が延長し、ワルファリン血中濃度が高い傾向にあることから、外傷性脳損傷がワルファリンの作用に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

〔結論〕 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していることが示唆された。ワルファリン服用時の外傷性脳損傷の増悪機序の解析にはワルファリンの摂取量や血中濃度を検討する必要があると考えられた。

〔文献〕

1) Kibayashi K. (2019) IATSS Research 43: 71-74

18. マウス脳損傷後の髄膜リンパ管の発現

島田亮、木林和彦
(法医学)

〔目的〕 髄膜リンパ管は脳脊髄液と脳の組織液を深部頸部リンパ節に輸送している。外傷性脳損傷では、頭部に作用した外力が髄膜を介して脳を損傷するので、髄膜リンパ管障害の脳機能への影響が予想される。本研究では、外傷性脳損傷での髄膜リンパ管障害を捉えるため、受傷後の髄膜リンパ管内皮細胞の遺伝子発現の変化を検討した。

〔方法〕 マウス(約 10 週齢)の頭部に硬膜の上から打撃を加えて大脳皮質に損傷を形成した。受傷後 3 日目の髄膜から Flow-cytometry のセルソータ機能を用いて髄膜リンパ管内皮細胞を採取した。Realtime PCR を用い髄膜リンパ管内皮細胞の mRNA 発現解析を行った。

〔結果〕 髄膜リンパ管内皮細胞数は損傷群では Sham 群と比べて有意に減少した。リンパ管に特異的に発現する Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (Lyve1)の髄膜リンパ管内皮細胞の mRNA 発現量は損傷群では Sham 群と比べて有意に減少した。一方、リンパ管新生にかかわる FMS-like tyrosine kinase 4 (Flt4)と neuropilin 2 (Nrp2)の髄膜リンパ管内皮細胞の mRNA 発現量は損傷群では Sham 群と比べて有意に増加した。

〔考察〕 外傷性脳損傷での髄膜リンパ管内皮細胞の障害と新生が確認され、髄膜リンパ管障害の病態への関与が示唆された。

〔結論〕 本研究は、外傷性脳損傷が髄膜リンパ管に障害を与えることを確認できた。今後、脳への影響に関して、解析する必要があると考える。

〔文献〕

- 1) Maloveska, M. (2018) *Neurol. Res.* 40: 372-380.
- 2) Shimada R, Nakao K, Kibayashi K, et al. (2012) *J.Clin.Neurosci.* 19(3): 447-451.
- 3) Da Mesquita, S. (2018) *Nature* 560: 185-191.
- 4) Shimada R, Abe K, Kibayashi K, et al. (2014) *Neurol.Res.* 36(3): 239-246

19. 次世代シーケンサーを利用した STR 解析

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が不足する場合があった。STR 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。STR の配列解読の際には、反復配列の両脇にプライマーを設計して PCR により目的配列を増幅するが、プライマーの位置によって反復配列以外にも、反復配列近傍の様々な長さの DNA 配列を解読することができる。これまでに、近傍配列中の多型情報をどれくらい利用できるかについての詳しい報告はない。

そこで、本研究では STR を次世代シーケンサーで解読する際、近傍配列の長短によって得られる多型情報の量、様々な分解程度の DNA を解析した場合に得られる情報量を明らかにする。その結果、DNA の分解程度に応じて、最大限の多型情報を得るための解読近傍配列長に関する指針が得られると考えられる。

〔方法〕 ヒト常染色体上に存在し、個人識別で広く用いられている 15 箇所の STR を multiplex PCR で増やすためのプライマーセット (PS) を 2 つ設計した。1 つの PS は STR 近傍配列の取得を最小限にするもので、もう 1 つの PS は、次世代シーケンサーで解読できる配列長を考慮して、最大限近傍配列を取得するためのものである。市販のコントロール DNA に対して 1st PCR によって 15 ヶ所の STR 領域を同時に増幅した後、2nd PCR でシーケンス用のタグ配列を付加した。次世代シーケンサーを用いて 2nd PCR 産物の配列を取得した。取得した配列から、オープンソースのソフトウェア (FDStools¹⁾) を利用して STR 情報を取得し、PCR で 15 ヶ所の STR 領域が増幅され、配列解読されたかを調べた。

〔結果〕 近傍配列を最小限取得するための PS を用いた場合、PCR 反応の主生成物がプライマーダイマーとなり、各 STR のリード数が非常に小さくなった。一方、近傍配列を最大限取得するための PS を用いた場合、プライマーダイマーの生成量は少なかったものの、STR サイトによるリード数のばらつきが大きくなった。

〔今後の予定〕 近傍配列を最小限取得するための PS は、プライマー設計位置の変更等で、プライマーダイマーの生成量の抑制を図るとともに、PCR 産物のサイズ分離精製でプライマーダイマーを除去できるか検討する。近傍配列を最大限取得するための PS に関しては、PCR の際のプライマー濃度を調整して、各 STR に関して同程度のリード数を得られるような反応条件を探索する。

以上の PCR 条件の最適化後、健常人の爪サンプルを用いて、STR の反復配列、近傍配列中の多型情報を取得し、DNA の分解度との関係を調べる。なお、本研究は本学倫理委員会の承認を受けて実施している (承認番号 : 408)。

[文献]

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

2 0 . Application of conditional reprogramming culture to analyse Japanese primary ciliary dyskinesia

Atsushi Kurokawa¹, Mitsuko Kondo¹, Nahoko Honda¹, Mami Orimo¹, Tomohiro Akaba¹, Mayoko Tsuji¹, Ken Arimura¹, Osamitsu Yagi¹, Kiyoshi Takeyama¹, Kazuhiko Takeuchi² and Etsuko Tagaya¹

(¹Department of Respiratory Medicine, ²Department of Otorhinolaryngology, Head & Neck Surgery, Mie University Graduate School of Medicine)

[Purpose] Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare genetically heterogeneous disorder of ciliary ultrastructure and function, and has been diagnosed by transmission electron microscopy (TEM), a high-speed video microscopy analysis (HSVA), and genetic analysis ¹. To avoid the misdiagnosis of secondary ciliary dyskinesia derived from infection or inflammation, primary cell culture has been recommended in PCD diagnosis. However, the success rate of cell culture is not so high. The conditional reprogramming culture (CRC) method, a combination of a Rho-kinase inhibitor and fibroblast feeder cells, has recently been applied to airway genetic diseases. This study aimed to evaluate the value of CRC in the diagnosis of Japanese PCD.

[Methods] Eleven patients clinically suspected of PCD were included; airway epithelial cells from biopsy specimens obtained through bronchoscopy were cultured at an air-liquid interface (ALI) combined with the CRC method. Ultrastructure by TEM, defects of mutated ciliary protein by immunofluorescence (IF), and ciliary movement by the HSVA were analysed. Genetic testing of blood was performed in a part of the patients. This study was approved by the Ethical Committee of Tokyo Women's Medical University (Approval number: 258C; April 10, 2018, 5819; September 18, 2020). Written informed consent was obtained from all patients.

[Results] CRC exhibited more augmented proliferative capacity than the conventional method, and yielded dense ciliated cells (Figure. 1A, B) with a high success rate (~90%). By genetic analysis, two patients had two heterozygous mutations in *DNAH11*, and one had compound heterozygous mutations in *DNAH5*. In patients with a positive PCD diagnosis, the ciliary ultrastructure phenotype (ODA defect or normal ultrastructure) and IF findings (loss of DNAH5 or DNAH11 protein) were confirmed after CRC (Figure 1C, D). In *DNAH11*-mutant cases, the HSVA enabled the identification of ciliary beat patterns exhibiting reduced bending in the proximal region with reduced waveform amplitude.

[Discussion] Epithelial cells showed a ciliary phenotype in PCD following ALI culture with CRC, which facilitated PCD diagnosis. In subjects without PCD, SCD is reduced after culture, which helps rule out PCD ². To improve the accuracy of PCD diagnosis, it is necessary to establish an efficient method in airway epithelial cell culture. CRC can acquire stem-like characteristics of

preserved ability to differentiate without altering the genetic background of primary cells³). In this study, primary cell culture with CRC allowed rapid expansion of airway basal cells from small biopsy specimens and generated well-differentiated ciliated cells with a high success rate. This is the first study to investigate Japanese PCD with cultured epithelial cells from biopsy specimens. Approximately 30% of PCD cases exhibit normal findings on TEM; IF is useful for diagnosis⁴). The *DNAH11* mutation is a common cause of PCD with normal ultrastructure.

[Conclusions] CRC method is useful in PCD diagnosis, and provides a useful tool for ensuring that the clinical phenotype and genotype are compatible with the ciliary phenotype. This study might contribute to PCD diagnosis and future research in Japan.

[Reference]

- 1) Orimo M., Kondo M., Takeyama K., et al. (2019) Intern Med. 58: 2383-6.
- 2) Hirst RA., Jackson CL., Coles JL., et al. (2014) PLoS One. 9: e89675.
- 3) Liu X., Ory V., Chapman S., et al. (2012) Am J Pathol. 180: 599-607.
- 4) Kurokawa A., Kondo M., Orimo M., et al. (2021) Respir Investig. 59: 550-4.

[Conference Presentation]

- 1) Kurokawa A., Kondo M., Takeyama K., et al. Japanese cases of primary ciliary dyskinesia with *DNAH5* and *DNAH11* mutations. The 24th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Hanoi, Vietnam, 2019/11
- 2) Kurokawa A., Kondo M., Takeyama K., et al. Two Japanese cases of primary ciliary dyskinesia with confirmed genetic mutations. The 60st Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society, Tokyo, Japan, 2020/10
- 3) Kurokawa A., Kondo M., Tsuji M., et al. The usefulness of airway epithelial cell culture derived from conditionally reprogrammed cells in diagnosis of primary ciliary dyskinesia. The 61st Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society, Tokyo, Japan, 2021/04

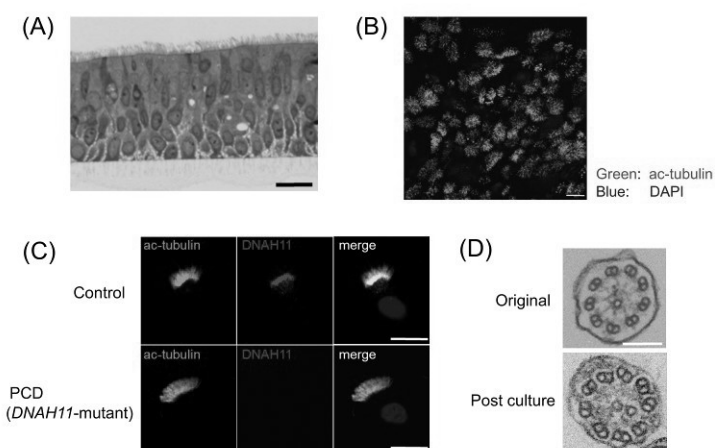


Figure 1. Primary ciliary dyskinesia (PCD)-derived human airway bronchial epithelial cells cultured using air-liquid interface method with conditional reprogramming culture (CRC). (A) Toluidine blue stain. (B) Immunofluorescence with anti-acetylated tubulin antibody visualizes the entire ciliary axonemes (green). (C) The defect of *DNAH11* protein was confirmed after CRC in *DNAH11*-mutant PCD case. In control cells, *DNAH11* protein (red) was localized to the proximal region of the ciliary axonemes. (D) Transmission electron microscopy of a cilium in PCD. The defect of outer dynein arms was maintained after CRC. Scale bars equal to (A-C) 20 μ m, (D) 100 nm.

✳For a color print of the Figure 1, see page 120.