

# 平成20年度自治医科大学大学院医学研究科 研究奨励賞研究成果報告

## 血友病マウスにおける血液凝固第Ⅷ因子に対する免疫寛容誘導とその機序の解明

地域医療学系専攻4年 石渡 彰

### 【目的】

血友病A遺伝子治療に必要な、肝臓特異的な第Ⅷ因子(FⅧ)の高発現を目的とし、reporter gene, FⅧ遺伝子を搭載したAAV8ベクターを血友病Aマウスに投与し導入遺伝子発現を検討する。

### 【方法および結果】

種々の promoter の下流に reporter gene あるいは canine B domain-deleted (BDD) FⅧ を配した AAV8ベクターを血友病Aマウスに投与した。CMV promoter あるいは  $\beta$ -actin promoter では肝臓以外に心臓や骨格筋に遺伝子発現がみられたが、human  $\alpha$ 1-antitrypsin (hAAT) promoter あるいは hepatic control region (HCR) enhancer を付加した HCRhAAT promoter を用いると肝臓に限局した遺伝子発現がえられた。また、HCRhAAT promoter は CAG promoter の約10倍の遺伝子発現能力を有した。 $\beta$ -actin promoter, hAAT promoter を用いると、高用量 ( $1 \times 10^{12}$ gc/mouse) ベクターを投与することで正常イヌ FⅧ活性の約50%のFⅧ活性上昇を得られたが、HCRhAAT promoter を用いた場合には、低用量ベクター ( $1 \times 10^{11}$ gc/mouse) 投与でも100-150%のFⅧ活性上昇が得られた。また、cFⅧ中和抗体の発生は、 $\beta$ -actin promoter を用いたときでは認められたが hAAT promoter, HCRhAAT promoter を用いた場合はみられなかった。

### 【結語】

強力な肝臓特異的 HCRhAAT promoter を用いた cFⅧ遺伝子導入により、血友病Aマウスにおいて長期的にFⅧ高発現を得ることができた。HCRhAAT promoter を用い、肝臓以外での導入遺伝子発現を抑えることによって、導入遺

伝子に対する免疫反応を最小化できる可能性と、有用性の高い血友病A遺伝子治療の可能性が示唆された。

## 骨形成・骨再生における Latexin の役割とそのメカニズムの研究

地域医療学系専攻4年 門内 一郎

本研究では、骨形成・骨再生における latexin の発現とそのメカニズムについて研究を行った。

C57BL/6N マウス胎仔(胎生15.5日)における latexin の発現は、静止軟骨細胞から前肥大軟骨細胞まで認められた。また、latexin の発現は Sox9 の発現領域とほぼ一致するものであった。成熟 C57BL/6N マウス脛骨骨折モデルでは、骨再生5日目、10日目では、増殖および前肥大軟骨細胞に latexin 陽性シグナルが観察された。骨再生15日目においては、骨再生5、10日目と比較して latexin 陽性細胞数は著しく減少していた。また、リアルタイム RT-PCR により、骨再生5日目において著しい latexin mRNA 発現上昇が認められ、骨再生10日目、15日目と徐々に発現低下が認められた。

上記の結果より latexin が軟骨細胞分化に関与するデータが得られたため、軟骨細胞分化を in vitro で反映する C3H10T 1/2 細胞を用いたマイクロマスカルチャー法による軟骨細胞分化実験を行った。BMP-2添加群で軟骨細胞分化が進み、この時の latexin の発現を、リアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロットを用いて検討した結果、BMP-2添加群において latexin mRNA およびタンパク質レベル共に発現上昇が認められた。

マウス latexin 発現 C3H10T 1/2 細胞を用いたマイクロマスカルチャーでは、BMP-2添加間においてコントロールである green fluorescent

protein (GFP) 発現株と比較して, latexin 発現株での有意な *Col2a1*, *Agc1*, *Col10a1* mRNA の発現上昇を認めた。

前述の実験において, BMP-2培養 2 日目に *Sox9* mRNA の有意な上昇が観察されたため, *Sox9* による latexin プロモーター活性化が考えられ, *Sox9* プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイによる検討を行った。その結果, *Sox9* 用量依存的なルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。

本研究により latexin は, 1) 骨形成・骨再生過程において, 静止期-増殖期-前肥大期における軟骨細胞に発現すること, 2) BMP-2 による軟骨細胞分化を促進すること, 3) BMP-2 シグナルから誘導された *Sox9* により調節されることを明らかにした。

## 自閉性障害の病因としての G 蛋白結合型受容体遺伝子解析

地域医療学系専攻 3 年 齋藤 真理

### 【目的】

自閉性障害 (ASD) の発症には遺伝的要因が大きいことが知られており, 病因遺伝子解明研究が世界的に行われている。一部の ASD 家系で, シナプス結合に関連する *NLGN* や *SHANK3* に遺伝子変異が同定されたが, 多くの ASD 患者に共通するものはない。そこで, (研究 A) ASD 患者に共通する病態把握のため, ASD 患者リンパ芽球を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

また, 多くの脳発現 G protein-coupled receptor (GPCR) がシナプス形成や情報伝達機能に関与していること, ASD の病態にはシナプス形成や機能障害に関連していることが推測されており, 特に ASD との強い連鎖が報告されている 7q31 に局在する脳発現 GPCR は, ASD の病態に強く関連している可能性がある。そこで, (研究 B) 7q31 局在 GPCR (GPCR A, GPCR B) と ASD との関連検討のため, ASD 患者における GPCR A, B の遺伝子変異解析を行った。

さらに, GPCR の一つであるセクレチン受容体に関して, 一部の ASD 患者においてセクレチン治療が有効であること, セクレチン受容体ノックアウトマウスが, ASD の中核症状である社会性障害を呈することが報告されており, (研究 C) セクレチン受容体と ASD の関連検討のため, ASD 患者におけるセクレチン受容体遺伝子 (*SCTR*) 遺伝子変異解析を行った。

### 【方法および結果】

#### (研究 A) ASD 患者リンパ芽球を用いた網羅的遺伝子発現解析

ASD 患者 5 例, 正常例 5 例のリンパ芽球を同一条件下で培養した後に RNA 抽出し, FiligenArray Human 35k を用いて, 網羅的遺伝子発現解析を行い, シナプス形成・機能に関する dopamine, serotonin, Gamma-aminobutyric acid (GABA), Wnt signaling pathway, GPCR のクラスター解析を行った。

(結果) ASD 患者では, dopamine ( $P=0.03$ ), GABA ( $P=0.03$ ), GPCR ( $P=6.7E-16$ ) がクラスターとして有意に発現増加していることを確認し, さらに GPCR クラスターについては, GPCR の活性化に関連する遺伝子が有意に発現増加している ( $P=0.002$ ) ことを検出した。

#### (研究 B) GPCR A, GPCR B の遺伝子変異解析

ASD 患者 356 例 (日本人 72 例, 白人 191 例, Yu ら。白人 93 例, 齋藤ら。) を対象とし, ASD 患者の genomic DNA を用いて, 各遺伝子の全エクソンおよびその近傍を PCR 増幅し, 直接塩基配列決定法で変異の有無を解析した。

(結果) すでに報告した当研究室の Yu らの解析では, *GPR37* で R558G, Del1312F を各 1 例, *GPR85* で M152T, V221F を各 1 例検出した。今回新たに追加検討した白人 93 例では, *GPR37* で新たに E150K を 1 例検出し, 対照ではその変異が検出されなかった。*GPR85* では新たな変異は検出されなかった。

#### (研究 C) *SCTR* の遺伝子変異解析

ASD 患者 52 例を対象とし, ASD 患者の genomic DNA を用いて, 各遺伝子の全エクソンおよびその近傍を PCR 増幅し, 直接塩基配列決定法で変異の有無を解析した。

(結果) *SCTR* では, 6 種類の塩基置換を検出したが, いずれも対照で検出されるなど, ASD

の病因と考えられる変異は検出されなかった。

#### 【考察】

ASD 患者リンパ芽球を用いた網羅的遺伝子発現解析結果から、ASD の病態には dopamine, GABA, GPCR が関与している可能性が推測された。GPCR の中でも、特に ASD との強い連鎖が報告されている 7q31 局在の脳発現 GPCR である、*GPCR A* および *GPCR B* で、ASD 患者のみに変異が検出されたことから、両者が ASD の病態に関与している可能性が考えられた。今後、各遺伝子のノックアウトマウス解析を行い、遺伝子異常と行動異常の関連検討を行う予定である。また、GPCR の一つである *SCTR* については、本研究では ASD の病態との関連は証明されず、*SCTR* を介した他の機構あるいは *SCTR* の下流機構が ASD の病態に関連している可能性が推測された。今後、*Sctr* ノックアウトマウスを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、*SCTR* 遺伝子が関係する遺伝子変化を同定する予定である。

### マクロファージにおける HSL 過剰発現による ABCA1 の発現誘導とそのメカニズム

地域医療学系専攻 4 年 田副 文子

#### 目的

マクロファージ由来の泡沫細胞は、コレステロールエステル (CE) を過剰蓄積している。細胞内の CE は、最終的に中性コレステロールエステル水解酵素 (NCEH) の働きにより加水分解を受け、遊離コレステロール (FC) となり、ATP-binding cassette transporter A 1 (ABCA1) により細胞外へ放出される。近年、泡沫化したヒトマクロファージ THP-1 に、ホルモン感受性リパーゼ (HSL) を過剰発現させると、NCEH 活性が上昇し、CE の蓄積が抑制されることが岡崎らによって報告された。このとき、ABCA1 の発現が上昇し、コレステロールの細胞外放出が亢進した。今回、HSL を過剰発現した泡沫化マクロファージを用いて、ABCA1 発現誘導に対する HSL の役割について検討を行った。

#### 方法

発現ベクター pCI-HSL を用いて、マウスマクロファージ RAW264.7 に HSL を過剰発現させ、 $\beta$  VLDL による泡沫化の後、NCEH 活性を測定した。また、ABCA1 mRNA の発現を検討し、細胞内 FC 及び CE を測定した。続いて ABCA1 プロモーターレポーターベクター、ABCA1-luc を作成した。ABCA1-luc 及び pCI-HSL を遺伝子導入した泡沫化 RAW264.7 の ABCA1 プロモーター活性を検討した。ABCA1 プロモーターには liver X receptor (LXR) の応答領域 LXRE が存在し、LXR/retinoid X receptor (RXR) が結合する。LXR, RXR のリガンドを RAW264.7 に負荷し、ABCA1 プロモーター活性を検討した。

#### 結果

- 1) HSL 過剰発現泡沫化マクロファージはコントロールに比べ、NCEH の活性が 2.6 倍に上昇した。ABCA1 プロモーター活性は 2 倍に上昇し、ABCA1 mRNA の発現増加を確認した。細胞内の CE は 17% 減少し、FC は 38% 増加した。
- 2) RAW264.7 に T0901317, 22(R)-Hydroxycholesterol, 24(S), 25-Epoxycholesterol, 9-cis retinoic acid を負荷させると、ABCA1 プロモーター活性はコントロールに比べ、それぞれ 4.8, 3.5, 7.0, 3.4 倍に上昇した。
- 3) ABCA1 プロモーターの deletion を行ったところ、LXRE を含まない領域でのプロモーター活性の消失を認めた。LXRE へ mutation を導入した場合もプロモーター活性は消失した。

#### 考察・結論

細胞内で FC は、オキシステロールに変換され、LXR 活性化を介して ABCA1 の発現を誘導する。今回の実験結果から、HSL を過剰発現させた泡沫化マクロファージにおける ABCA1 の発現増加には FC の上昇が深く関与しており、ABCA1 の転写調節には、プロモーター領域の LXRE が重要であると考えられる。

## 肝臓特異的コレステロール合成酵素群欠損マウスにおける肝臓脂質代謝と肝毒性の解析

地域医療学系専攻4年 永島 秀一

### 【目的】

内因性のコレステロール (Chol) 合成経路は一般にステロール経路と呼ばれ、またこの経路は細胞機能の維持に重要な非ステロール経路を分枝する。両経路の上流に位置する HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) 及び、HMGCR の下流に位置し、ステロール経路のみに関与するスクアレン合成酵素 (SS) を肝特異的に欠損させたマウスを作成し、両酵素欠損の生体への影響について検討した。

### 【方法】

*Cre-loxP* システムを用いて発生工学的に肝特異的 HMGCR 欠損 (L-HMGCRKO), 及び SS 欠損 (L-SSKO) マウスを作成し、これらの血漿・肝脂質代謝、肝機能について検討した。

### 【成績】

(1) L-HMGCRKO マウスは肝不全で大多数が生後約5週齢で死亡した。肝の HMGCR 遺伝子は90% 以上欠損していたが、HMGCR 酵素活性、Chol 合成能は共に40% の低下、非ステロール産物の合成は70% の低下にとどまった。また血漿総 Chol は24% の低下であった。この一方で、肝の脂肪酸合成能は亢進しており脂肪肝を呈した。(2) L-SSKO マウスにおいても肝障害が認められたが、致死的ではなかった。肝の SS 遺伝子、SS 酵素活性及び Chol 合成能のほぼ完全な欠損を認め、血漿総 Chol 値は週齢により30~50% 低下した。この一方で、生体に多量に存在した場合に毒性を示す非ステロール産物のファルネゾールの合成は16倍と亢進していた。また肝の Chol 含量はコントロールと比べて不変であった。

### 【結論】

肝の HMGCR, SS 遺伝子欠損の双方で肝障害を呈したが、前者で致死的であったのは非ステロール産物の合成低下を伴ったためと考えられた。また HMGCR 遺伝子が90% 以上欠損しても酵素活性は40% の低下にとどまる代償機転が存在することや、HMGCR 酵素活性の低下

が脂肪肝を誘発することが明らかとなった。さらに肝の SS 遺伝子欠損によりステロール経路がほぼ完全に遮断されても肝外の Chol により肝内の Chol が充足する機転の存在が明らかになった。

## ピロリ菌感染に伴う胃細菌叢の病原性

地域医療学系専攻3年 林 芳和

### 目的

胃・十二指腸粘膜より検出される *Helicobacter pylori* (*H. pylori*, ピロリ菌) 以外の細菌, non-*H. pylori* 細菌の種類および量の検討を行う。また、これらの菌の検出と *H. pylori* 感染との関連、これらの菌の病原性を検討する。

### 方法

当院にスクリーニング検査目的に上部消化管内視鏡検査 (EGD) を受けに来院した外来患者を対象とした。EGD 施行時に内視鏡下で胃液、胃体部粘膜組織、胃幽門部粘膜組織、十二指腸粘膜組織を採取した。胃液採取直後に胃液の pH を測定した。引き続き、胃液とホモジナイズした各々の組織を階段希釈し、好気培養用の培地 5 種類、微好気培養用の培地 2 種類、嫌気培養用の培地 7 種類に接種し、細菌培養を行った。培養後に各々の培地上に形成されたコロニー数をカウントし、細菌数を測定した。また、胃液のアスコルビン酸濃度、亜硝酸濃度を測定した。*H. pylori* 陽性患者は除菌治療を行った。除菌成功後に再度 EGD を施行し、同様の評価を行い、除菌前の結果と比較した。

### 結果

患者52人中26人が *H. pylori* 陽性で、26人が陰性であった。*H. pylori* 陽性群では、胃液の pH は  $6.1 \pm 2.5$  と中性に近く、アスコルビン酸濃度は低下、亜硝酸濃度は上昇していた。*H. pylori* 陽性群では、胃粘膜、十二指腸粘膜いずれにおいても、non-*H. pylori* 細菌が検出された。これら細菌の主体をなす菌の種類はレンサ球菌科、ナイセリア属、ヘモフィルス属、フソバクテリウム属、ベイヨネラ属の5種類であった。一方、*H. pylori* 陰性群では、胃液の pH は  $2.2 \pm 1.7$

と低く、アスコルビン酸濃度は高く、亜硝酸濃度は低かった。*H. pylori* 陰性群では、胃粘膜、十二指腸粘のいずれからも、*non-H. pylori* 細菌はほとんど検出されなかった。除菌前後で評価できた8人については、除菌前に比して除菌後では胃液のpHが有意に低下しており、胃の細菌数は有意に減少していた。また、多くの除菌後症例では細菌が全く検出されなくなっていた。

#### 考察

*H. pylori* 感染随伴して、*non-H. pylori* 細菌による胃細菌叢が形成されていた。これは *H. pylori* 感染により慢性萎縮性胃炎が生じた結果、胃液pHが上昇し、*non-H. pylori* 細菌が生存可能になったためと考えられる。これらの *non-H. pylori* 細菌が胃粘膜病変の形成に関与している可能性がある。上記の患者らから採取した菌株は凍結保存してある。今後それら各菌株の病原性を評価し、*H. pylori* の病原性と比較する予定である。