

200711002A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

非ヒト霊長類造血器腫瘍モデル作出と悪性腫瘍モデル作出に向けた
基盤技術の開発に関する研究(H19-生物資源-一般-002)

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 九州大学・生体防御医学研究所
ゲノム病態学分野
教授 谷 憲三郎

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
非ヒト霊長類造血器腫瘍モデル作出と 悪性腫瘍モデル作出に向けた基盤技術 の開発に関する研究	----- 1
谷 憲三朗	
II. 分担研究報告	
1. カニクイザルATLL作出に関する研究	----- 4
栗田 良	
2. 小型霊長類コモンマーモセット白血病 モデル作出に関する研究	----- 6
小林 誠一郎	
3. 小型霊長類コモンマーモセット白血病 モデル作出に関する研究	----- 8
佐々木 えりか	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 10
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 11

総括研究報告書

非ヒト霊長類造血器腫瘍モデル作出と悪性腫瘍モデル作出に向けた基盤技術の開発に関する研究

主任研究者 谷 憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 教授

研究要旨

サルに疾患モデルを作出することは新規薬剤の前臨床動物系の確立の観点から極めて重要である。成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)モデルカニクイザルの作出を目的にHTLV-1産生細胞を妊娠カニクイザル2頭に静脈投与しその後の経過を観察した。母体末梢血中に短期的にHTLV-1の存在が観察され、その後一過性に抗HTLV-1抗体の出現を認めた。また新生仔にも抗HTLV-1抗体の出現を一過性に認めたもののHTLV-1の存在は末梢血中には認められなかった。今後免疫抑制剤などの投与を併用し、まずHTLV-1キャリアーカニクイザルの作出を行うことが重要であると考えられた。

p190 BCR-ABLレンチウイルスベクターによる遺伝子導入自家末梢血幹細胞移植法ならびに骨髓内への同レンチウイルスベクターの直接遺伝子導入法を用いてコモンマーモセットに白血病（特に急性リンパ性白血病）を作出する研究を実施した。後者においては長期的にコモンマーモセット末梢血ならびに骨髓細胞内にp190遺伝子発現を長期的に観察したが、白血病発症は認められなかった。今後複数遺伝子導入での検討が必要と考えられた。

将来的に遺伝子ノックインモデル作出を目的にコモンマーモセットES細胞へのp53遺伝子への変異導入を目的にコモンマーモセットp53ゲノム解析とそれを基にZFPヌクレアーゼの設計・構築を開始した。

分担研究者

栗田 良 九州大学生体防御医学研究所・助教
小林誠一郎 東京大学医科学研究所・助教
佐々木えりか 実験動物中央研究所・研究員

A. 研究目的

近年のゲノム医療の進歩によりヒト細胞や遺伝子などを利用した研究から重要な知見が多く蓄積されるようになり、これらの情報を十分に生かした分子標的薬ならびに遺伝子治療薬の開発も急速に進められてきている。特に分子標的薬に関しては難治性悪性腫瘍に対する新規治療法として臨床での使用が次第になされてきている。しかし一方でこれら新規薬剤の開発においては今後さらにヒトゲノム情報に基づいた分子設計がなされてくることが予想され、その安全性ならびに有効性の検定に際してゲノムレベルで相同性の低いマウスモデルでは大きな限界が生じてくることが予想される。この観点からサル疾患モデルは極めて重要な情報を提供してくれることが期待できるものの、現在サルには悪性腫瘍モデルはない。この大きな理由はマウスと較べて世代時間が長いため、化学・放射線発癌誘導法は実用的ではなく、胚性幹(ES)細胞を用いたトランスジェニックもしくはノックアウト法による疾患モデル作出技術も開発されていないためである。本研究ではサルを用いて特に造血器悪性腫瘍モデルを作出することを第一の目的とする。さらに第二の目的として将来的に悪性腫瘍を含む種々の疾患モデルを作出することを最終目的に、サルES細胞を用いたノックイン法による悪性腫瘍モデル作出技術の開発を行う。

B. 研究方法

1. 成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)モデルカニクイザルの作出研究：
ATLLは母子垂直感染によって伝播することが知られている。そこでまずhuman T-cell leukemia virus type 1(HTLV-1)産生細胞(CM-1)を妊娠母体(n=2)に静脈投与し、その後母体の末梢血を随時回収してHTLV-1ウイルスの出現およびHTLV-1

抗体の推移を観察した。また出産（それぞれCM-1接種後48日および52日）の後は母乳も随時回収してHTLV-1ウイルスの存在を検証した。ウイルス産生細胞接種母体から出生した新生仔(n=2)はそれぞれの母体が授乳した母乳によって飼育し、随時採血を行って血中におけるHTLV-1ウイルスの存在および抗体価を解析した。さらに最初のCM-1接種の約7ヶ月後（出産から5ヶ月）において免疫抑制剤(FK506)投与下においてさらに別種のウイルス産生細胞を母体に静脈投与し、同様に血中におけるウイルスの存在および抗体価について解析をした。なお、予備実験において本研究に用いたCM-1およびMT-2の両細胞についてHTLV-1ウイルス産生能は確認済みである。

2. 遺伝子導入自家末梢血造血幹細胞移植による白血病誘導法の検討：

3匹の成体コモンマーモセットの末梢血単核細胞にレンチウイルスベクターでp190BCR-ABL遺伝子をin vitroで導入後、ブスルファン処置後のマーモセットに自家移植をした。

3. 大腿骨髓内直接ウイルスベクター注入法を用いた白血病誘導法の検討：

5-Fluorouracil (5FU)を大腿静脈内に投与後5日間連続のプレドニゾロン投与による免疫抑制を行い、左右両膝関節の1cm直上から大腿骨髓内にp190レンチウイルスベクターを骨髓内に注入した。各個体においてp190 BCR-ABL mRNAもしくはDNAをRT-PCR法もしくはPCR法を用いて検出した。

4. p53遺伝子変異導入サルES細胞の作製

サル悪性腫瘍疾患を作出する目的で、代表的ながん抑制遺伝子であるp53遺伝子に着目し、p53遺伝子変異導入サルES細胞の作製実験に着手した。p53遺伝子はヒトがん細胞において極めて高頻度にその変異が確認され、またマウス個体モデルにおいても同遺伝子の欠失及び変異が腫瘍形成を誘導することが報告されている(Lawrence et al., Nature. 356:215-221. 1992)。

本研究では

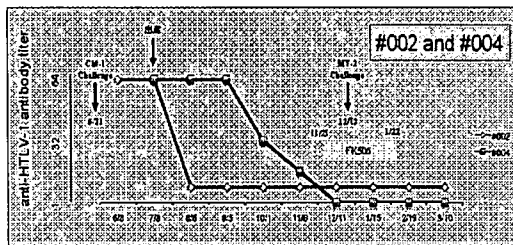
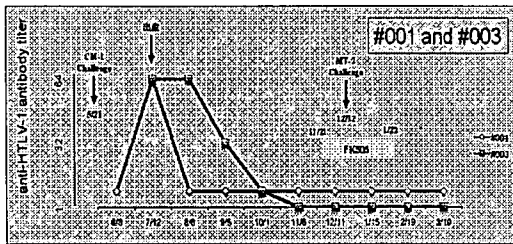
- 1) CM p53 cDNAのクローニング及び塩基配列決定
- 2) CM p53ゲノム(エクソン、イントロン)構造と塩基配列決定
- 3) CM ES細胞及び分化誘導したEB細胞においてp53遺伝子の発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」(一部旧組換えDNA実験指針)と各施設内動物実験に関する指針「九州大学動物実験に関する指針」「東京大学動物実験マニュアル」「医薬基盤研究所動物実験研究指針」にのっとり委員会において承認後安全かつ倫理的に研究を実施した。

C. 研究結果

1. 成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)モデルカニクイザルの作出研究: CM-1の接種後母体の血漿中において抗HTLV-1抗体価の一過性の上昇を観察したが、接種3ヶ月後までには陰性レベルにまで低下した。一方、MT-2投与に起因した抗HTLV-1抗体価の推移は確認されなかった。新生仔においても出生後3および4ヶ月間にわたって抗HTLV-1抗体価の上昇が観察されたもののそれ以降は陰性であった。さらに、実験期間を通じて母体の母乳と末梢血および新生仔の末梢血においてHTLV-1ウイルスの存在はPCRレベルで検出されなかった。



a) HTLV-1感染細胞 (CM-1, MT-2) 静脈投与後の (#001, #002) ならびに新生仔 (#003, #004) 血中抗HTLV-1抗体の推移

2. p190BCR-ABL遺伝子導入造血前駆細胞の自家移植後、2個体の末梢血で4週目と8週目に、骨髓では13週目にp190mRNA遺伝子の発現が確認されたが以降は検出されなかった。大腿骨髓内に直接ウイルスベクターを注入する方法により、長期観察の結果、大腿骨髓内にウイルスベクターを接種してから11ヶ月経過した個体I591と個体I2338、大腿骨髓内にウイルスベクターを接種してから1年4ヶ月経過した個体I2129と個体I2223のそれぞれの末梢血単核球と末梢血好中球からゲノムp190遺伝子mRNAの発現が確認された。また同時に血球ゲノムDNAにもp190遺伝子の組込が検出された。しかしながらウイルスベクター接種1年半の時点ではまだ白血病発症は認められなかった。

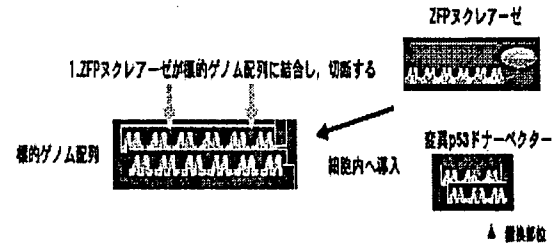
3. CM p53 cDNAのクローニング及び塩基配列決定
ヒト及びマウスの塩基配列を参考にPCRクローニング法により5' -非翻訳領域を含むCM p53 遺伝子を単離し、塩基配列決定を行った。その結果ヒトがん細胞において極めて高頻度にその変異が確認され、腫瘍形成を誘導すると考えられる3つのArg残基が全てCMにおいても保存されていることが明らかとなった。

4. CM p53 ゲノム(エクソン、イントロン)構造と塩基配列決定

3で決定したcDNA配列を参考に十数組のプライマーセットを作製し、CM p53ゲノム(エクソン、イントロン)構造の決定を行った。PCRクローニング法により計約15kbのゲノム断片を単離し、p53全ゲノム構造及び塩基配列決定を完了した。その結果、ヒトとCM間において極めて高度にゲノム構造が保持されていることが明らかとなった。

5. p53遺伝子の発現解析

CM ES細胞及び分化誘導したEB細胞においてp53遺伝子の発現解析をRT-PCR法により行った結果、未分化ES細胞でp53遺伝子の発現が観察された。



変異p53遺伝子導入用Zinc fingerヌクレアーゼの作製

D. 考察

母体ならびに新生仔において一過性の抗体上昇を認められたものの明らかなHTLV-1キャリアー状態の誘導はできなかった。原因としてCM1細胞接種数がまだ少ない可能性と、抗HTLV-1抗体の産生が考えられる。今後の検討として投与細胞数を増加させると共に、抗HTLV-1抗体誘導を防ぐ為の免疫抑制剤の前投与を考慮することが重要であると考えられた。

マーマセットにおいてヒト造血器腫瘍モデルを確立するためにはまだ多くの課題が残されているものの、in vivoにおいてp190遺伝子導入細胞の安定した体内増幅を得る可能性があることを明らかにした。本研究で得られた結果は、今後マーマセットを含む非ヒト霊長類の造血幹・前駆細胞を標的とする疾患モデル構築の上で有用な情報を提供できたものと考えられる。

現在、Sangamo社との共同研究により、4つのアミノ酸に対するp53遺伝子標的ZFPヌクレアーゼの設計・構築を行っていると同時にDNAブレイク修復時に挿入する変異p53ドナーベクターを作製中である。今後、これらの産物をCM ES細胞に導入する事により、p53遺伝子変異導入CM ES細胞の作製を行っていく予定である。

E. 結論

ATLLは、ウイルスキャリアーとして長期経過しその一部が白血病(リンパ腫)を発症する疾患である。キャリアー状態の維持、単クローン増殖、白血病化の病態変化は、宿主の世代時間、免疫状態に大きく依存していると考えられているが、その詳細な病態解明はまだ霊長類においてはなされていない。ウイルスキャリアー状態から発症に至るまでの病態の解明は本邦在住の

100万人のウイルスキャリアーの健康維持に対して極めて重要な情報となるものと考えられる。さらにATLL発症予防法の開発はこれらウイルスキャリアーの方に取っては切実な問題であり、その1候補として副作用の少ない免疫細胞療法は注目されているものの、ヒトでの使用の前に慎重な前臨床研究が必要であると考えられる。

コモンマーモセット末梢血中に長期間BCR-ABL遺伝子の存在が確認されたことで、骨髄内直接遺伝子導入法の有用性が明らかにされ、現在予定中の複数遺伝子導入の可能性が示唆された。

P53遺伝子変異導入サルES細胞の作製に必要な試料が準備できたことにより今後in vivoにおける研究を推進できるものと期待される。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakayama M, Muta H, Somada S, Maeda T, Mutoh T, Shimizu K, Suehiro Y, Hisano T, Kurita R, Shiraishi T, Mori M, Yoshikawa Y, Tsunetomi N, Uchida A, Tani K. Cronkhite-Canada Syndrome associated with schizophrenia Int Med 46:175-180, 2007.
2. Suehiro Y, Tachikawa Y, Abe Y, Ohshima K, Muta K, Tani K. Epithelioid hemangioendothelioma presenting with severe myelofibrosis and a high serum hyaluronan level. Eur J Haematol 79:349-353, 2007
3. Kudo S, Konda R, Obara W, Kudo D, Tani K, Nakamura Y, Fujioka T. Inhibition of tumor growth through suppression of angiogenesis by brain-specific angiogenesis inhibitor 1 gene transfer in murine renal cell carcinoma. Oncol Rep 18:785-791, 2007
4. Maeda T, Sugano M, Guan JZ, Oyama J, Higuchi Y, Makino N, Hatakenaka M, Muta H, Nakayama M, Nakazaki Y, Kurita R, Hiroshima T, Suzuki T, Tani K. Familial Turner mosaicism 46XX/45XO with brain calcification. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 19:342-343, 2007
5. Sun, X, Somada S, Shibata, K., Muta, H., Yamada, H., Yoshihara, H. Hobnad, K., Nakamura, K. Takayanagi, R., Tani, K., Podack, E., Yoshikai, Y. A Critical Role of CD30 Ligand/CD30 in Controlling Inflammatory Bowel Diseases in Mice. Gastroenterology 134:447-458, 2008
6. Inoue H, Iga M, Xin M, Asahi S, Nakamura T, Kurita R, Nakayama M, Nakazaki Y, Takayama K, Nakanishi Y, Tani K. TARC and RANTES enhance antitumor immunity induced by the GM-CSF-transduced tumor vaccine in a mouse tumor model. Cancer Immunol Immunother, 2008
7. Kim YT, Yoshida H, Kojima M, Kurita R, Nishii W, Muramatsu T, Ito H, Park SJ, Takahashi K. The Effects of Mutations in the Carboxyl-Terminal Region on the Catalytic Activity of Escherichia coli Signal Peptidase I. J Biochem. 143:237-242, 2008
1. Futami M, Hatano T, Soda Y, Kobayashi S, Miyagishi M, Tojo A. RNAi-mediated silencing of p190(Bcr-Abl) inactivates Stat5 and cooperates with imatinib mesylate and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in selective killing of p190(Bcr-Abl)-expressing leukemia cells Leukemia. 2008

2. 学会発表

1. 岡田美智代, 栗田良, 及川達夫, 横尾朋子, 末廣陽子, 佐々木えりか, 谷憲三朗
新しい造血因子探索を目的としたヒト胎児肝レンチウイルス発現ライブラリーの構築第69回日本血液学会、横浜 2007.10
2. Ryo Kurita, Tatsuo Oikawa, Michiyo Okada, Tomoko Yokoo, Norio Komatsu, Yoshikuni Tanioka, Erika Sasaki, and Kenzaburo Tani
Construction of a high performance lentiviral cDNA library derived from human fetal liver American Society of Gene Therapy(ASGT) 10th Annual Meeting in Seattle, June
3. 横尾朋子, 栗田良, 谷憲三朗
コモンマーモセットES細胞への遺伝子導入による血球分化誘導系の現状と今後の展開「宮崎大学医学部/九州大学生医研造血器腫瘍研究合同セミナー2007.11.17 (熊本)
4. Hiroyuki Inoue, Takafumi Nakamura, Terumasa Hisano, Meng Xin, Saori Asahi, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Yoshikazu Yonemitsu, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Non-transmissible SeV encoding murine GM-CSF, another potent vector system to produce autologous tumor vaccines. American Society of Gene Therapy(ASGT) 10th Annual Meeting in Seattle, June
5. Hiroyuki Inoue, Mutsunori Iga, Meng Xin, Ryo Kurita, Masaharu Nakayama, Yoko Suehiro, Yukoh Nakazaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani.
TARC and RANTES enhance immunological antitumor effect induced by GM-CSF transduced leukemia vaccine in mouse model. American Society of Hematology(ASHT) Annual Meeting and Exposition 2007 December
6. Hiroyuki Inoue, Takafumi Nakamura, Terumasa Hisano, Meng Xin, Saori Asahi, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Yoshikazu Yonemitsu, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani.
IN VIVO ANTITUMOR VACCINE EFFECTS OF NON-TRANSMISSIBLE SeV ENCODING GM-CSF IN MOUSE RENAL CELL CARCINOMA MODELS. 2007年6月29日第13回 日本遺伝子治療学会 場所：愛知県立がんセンター
7. Hiroyuki Inoue, Terumasa Hisano, Mutsunori Iga, Meng Xin, Saori Asahi, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Yoshikazu Yonemitsu, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani.
Non-transmissible SeV(dF)-transduced autologous GM-CSF cancer vaccine cells as a candidate for immune gene therapy. 2007年10月2日 第66回 日本癌学会学術総会 場所：パシフィコ横浜

分担研究報告書

カニクイザルATLL作出に関する研究

主任研究者 谷 憲三朗 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 教授
分担研究者 栗田 良 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 助教

研究要旨

成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)モデルカニクイザルの作出を目的にHTLV-1産生細胞を妊娠カニクイザル2頭に静脈投与しその後の経過を観察した。母体末梢血中に短期的にHTLV-1の存在が観察され、その後一過性に抗HTLV-1抗体の出現を認めた。また新生仔にも抗HTLV-1抗体の出現を一過性に認めたもののHTLV-1の存在は末梢血中には認められなかった。今後免疫抑制剤などの投与を併用し、HTLV-1キャリアーカニクイザルの作出を行うことが重要であると考えられた。一方、将来的に遺伝子ノックインモデル作出を目的にコモンマーモセットES細胞へのp53遺伝子変異導入を目的にコモンマーモセットp53ゲノム解析とそれを基にZFPヌクレアーゼの設計・構築を開始した。

A. 研究目的

成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)は我が国に多く、難治性かつ予後不良の疾患である。これまでにATLL発症モデルは非ヒト霊長類においては報告されておらず、本モデル動物を作出する事は本疾患の病態の解明のみならず、新規治療法開発を目的とした前臨床試験を行う上で重要である。そこで、われわれは本研究において、カニクイザルをモデル動物として供試し非ヒト霊長類ATLLモデルを構築することを目的とした研究を行った。

B. 研究方法

1. 成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)モデルカニクイザルの作出研究: ATLLは母子垂直感染によって伝播することが知られている。そこでまずhuman T-cell leukemia virus type 1(HTLV-1)産生細胞(CM-1)を妊娠母体(n=2)に静脈投与し、その後母体の末梢血を随時回収してHTLV-1ウイルスの出現およびHTLV-1抗体の推移を観察した。また、出産(それぞれCM-1接種後48日および52日)の後母乳も随時回収してHTLV-1ウイルスの存在を検証した。ウイルス産生細胞接種母体から出生した新生仔(n=2)はそれぞれの母体が授乳した母乳によって飼育し、随時採血を行って血中におけるHTLV-1ウイルスの存在および抗体価を解析した。さらに最初のCM-1接種の約7ヶ月後(出産から5ヶ月)において免疫抑制剤(FK506)投与下においてさらに別種のウイルス産生細胞を母体に静脈投与し、同様に血中におけるウイルスの存在および抗体価について解析をした。なお、予備実験において本研究に用いたCM-1およびMT-2の両細胞についてHTLV-1ウイルス産生能は確認済みである。

2. p53遺伝子変異導入サルES細胞の作製
サル悪性腫瘍疾患を作出する目的で、代表的ながん抑制遺伝子であるp53遺伝子に着目し、p53遺伝子変異導入サルES細胞の作製実験に着手した。p53遺伝子はヒトがん細胞において極めて高頻度にその変異が確認され、またマウス個体モデルにおいても同遺伝子の欠失及び変異が腫瘍形成を誘導することが報告されている(Lawrence et al. Nature. 356:215-221. 1992)。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」(一部旧組換えDNA実験指針)と各施設内動物実験に関する指針「九州大学動物実験に関する指針」「医薬基盤研究所動物実験研究指針」にのっとり各施設内委員会において承認後(承認済み)、安全

かつ倫理的に研究を実施した。

C. 研究結果

1. 成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)モデルカニクイザルの作出研究: CM-1の接種後母体の血漿中において抗HTLV-1抗体価の一過性的上昇を観察したが、接種3ヶ月後までには陰性レベルにまで低下した。一方、MT-2投与に起因した抗HTLV-1抗体価の推移は確認されなかった。新生仔においても出生後3および4ヶ月間にわたって抗HTLV-1抗体価の上昇が観察されたもののそれ以降は陰性であった。さらに、実験期間を通じて母体の母乳と末梢血および新生仔の末梢血においてHTLV-1ウイルスの存在はPCRレベルで検出されなかった。

2. p53遺伝子変異導入サルES細胞の作製

a) CM p53 cDNAのクローニング及び塩基配列決定
ヒト及びマウスの塩基配列を参考にしPCRクローニング法により5' -非翻訳領域を含むCM p53 遺伝子を単離し、塩基配列決定を行った。その結果ヒトがん細胞において極めて高頻度にその変異が確認され、腫瘍形成を誘導すると考えられる3つのArg残基が全てCMにおいても保存されていることが明らかとなった。

b) CM p53ゲノム(エクソン、イントロン)構造と塩基配列決定

上記で決定したcDNA配列を参考に十数組のプライマーセットを作製し、CM p53ゲノム(エクソン、イントロン)構造の決定を行った。PCRクローニング法により計約15kbのゲノム断片を単離し、p53全ゲノム構造及び塩基配列決定を完了した。その結果、ヒトとCM間において極めて高度にゲノム構造が保持されていることが明らかとなった。

c) p53遺伝子の発現解析

CM ES細胞及び分化誘導したEB細胞においてp53遺伝子の発現解析をRT-PCR法により行った結果未分化ES細胞でp53遺伝子の発現が観察された。

D. 考察

本研究結果から母体ならびに新生仔において一過性の抗体上昇を認めたものの明らかなHTLV-1キャリアー状態の誘導はできなかった。原因としてCM1細胞接種数がまだ少ない可能性と、抗HTLV-1抗体の産生が考えられる。今後の検討として投与細胞数を増加させると共に、抗HTLV-1抗体誘導を防ぐ為の免疫抑制剤の前投与を考えると重要であると考えられた。

現在、Sangamo社との共同研究により、4つのアミノ酸に対するp53標的ZFPヌクレアーゼの設計・構築を行っていると同時にDNAブレイク修復時に挿入する変異p53ドナーベクターを作製中である。今後、これらの産物をCM ES細胞に導入する事により、p53変異導入CM ES細胞の作製を行ってい

く予定である。
CM ES細胞及び分化誘導したEB細胞においてp53
遺伝子の発現解析をRT-PCR法により行った結果
未分化ES細胞でのp53遺伝子の発現が観察された

E. 結論

ATLLは、ウイルスキャリアーとして長期経過しその一部が
白血病(リンパ腫)を発症する疾患である。キャリアー状
態の維持,単加増殖,白血病化の病態変化は、
宿主の世代時間,免疫状態に大きく依存している
と考えられているが、その詳細な病態解明はまだ
霊長類においてはなされていない。ウイルスキャリアー
状態から発症に至るまでの病態の解明は、本邦
在住の100万人のウイルスキャリアーの健康維持に対して
極めて重要な情報となるものと考えられる。さら
にATL発症予防法の開発はこれらウイルスキャリアーの
方にとって切実な問題であり、その1候補と
して副作用の少ない免疫細胞療法は注目されて
いるものの、ヒトでの使用の前に慎重な前臨床
研究が必要であると考えられる。
P53遺伝子変異導入サルES細胞の作製に必要な試
料が準備できたことにより今後in vivoにおける
研究を推進できるものと期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakayama M, Muta H, Somada S, Maeda T, Mutoh T, Shimizu K, Suehiro Y, Hisano T, Kurita R, Shiraiishi T, Mori M, Yoshikawa Y, Tsunetomi N, Uchida A, Tani K. Cronkhite-Canada Syndrome associated with schizophrenia *Int Med* 46:175-180, 2007.
2. Maeda T, Sugano M, Guan JZ, Oyama J, Higuchi Y, Makino N, Hatakenaka M, Muta H, Nakayama M, Nakazaki Y, Kurita R, Hiroyama T, Suzuki T, Tani K. Familial Turner mosaicism 46XX/45XO with brain calcification. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 19:342-343, 2007
3. Inoue H, Iga M, Xin M, Asahi S, Nakamura T, Kurita R, Nakayama M, Nakazaki Y, Takayama K, Nakanishi Y, Tani K. TARC and RANTES enhance antitumor immunity induced by the GM-CSF-transduced tumor vaccine in a mouse tumor model. *Cancer Immunol Immunother*, 2008
4. Kim YT, Yoshida H, Kojima M, Kurita R, Nishii W, Muramatsu T, Ito H, Park SJ, Takahashi K. The Effects of Mutations in the Carboxyl-Terminal Region on the Catalytic Activity of Escherichia coli Signal Peptidase I. *J Biochem.* 143:237-242, 2008

2. 学会発表

1. 岡田美智代, 栗田良, 及川達夫, 横尾朋子, 末廣陽子, 佐々木えりか, 谷憲三朗
新しい造血因子探索を目的としたヒト胎児肝
レンチウイルス発現ライブラリーの構築第69
回日本血液学会、横浜 2007.10

2. Ryo Kurita, Tatsuo Oikawa, Michiyo Okada, Tomoko Yokoo, Norio Komatsu, Yoshikuni Tanioka, Erika Sasaki, and Kenzaburo Tani
Construction of a high performance lentiviral cDNA library derived from human fetal liver
American Society of Gene Therapy(ASGT) 10th Annual Meeting in Seattle, June

3. 横尾朋子, 栗田良, 谷憲三朗
コモンマーマセットES細胞への遺伝子導入による血球分化誘導系の現状と今後の展開「宮崎大学医学部/九州大学生医研造血器腫瘍研究合同セミナー2007.11.17 (熊本)
4. Hiroyuki Inoue, Takafumi Nakamura, Terumasa Hisano, Meng Xin, Saori Asahi, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Yoshikazu Yonemitsu, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Non-transmissible SeV encoding murine GM-CSF, another potent vector system to produce autologous tumor vaccines. American Society of Gene Therapy(ASGT) 10th Annual Meeting in Seattle, June
5. Hiroyuki Inoue, Mutsunori Iga, Meng Xin, Ryo Kurita, Masaharu Nakayama, Yoko Suehiro, Yukoh Nakazaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani.
TARC and RANTES enhance immunological antitumor effect induced by GM-CSF transduced leukemia vaccine in mouse model. American Society of Hematology(ASJT) Annual Meeting and Exposition 2007 December
6. Hiroyuki Inoue, Takafumi Nakamura, Terumasa Hisano, Meng Xin, Saori Asahi, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Yoshikazu Yonemitsu, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani.
IN VIVO ANTITUMOR VACCINE EFFECTS OF NON-TRANSMISSIBLE SeV ENCODING GM-CSF IN MOUSE RENAL CELL CARCINOMA MODELS. 2007年6月29日第13回 日本遺伝子治療学会 場所: 愛知県立がんセンター
7. Hiroyuki Inoue, Terumasa Hisano, Mutsunori Iga, Meng Xin, Saori Asahi, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Yoshikazu Yonemitsu, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani.
Non-transmissible SeV(dF)-transduced autologous GM-CSF cancer vaccine cells as a candidate for immune gene therapy. 2007年10月2日 第66回 日本癌学会学術総会 場所: パシフィコ横浜

小型霊長類コモンマーモセット白血病モデル作出に関する研究

主任研究者 谷 憲三朗 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 教授
分担研究者 小林誠一郎 東京大学医科学研究所・分子療法研究分野 助教

研究要旨

p190 BCR/ABLレンチウイルスベクターによる遺伝子導入自家末梢血幹細胞移植法ならびに骨髓内への同レンチウイルスベクターの直接遺伝子導入法を用いてコモンマーモセットに白血病（特に急性リンパ性白血病）を作出する研究を実施した。後者においては長期的にコモンマーモセット末梢血ならびに骨髓細胞内にp190遺伝子発現を長期的に観察したが、白血病発症は認められなかった。今後複数遺伝子導入での検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

成人急性リンパ性白血病(ALL; Acute Lymphoblastic Leukemia)の約25-30%にフィラデルフィア染色体(Ph)が認められ、発症における根本的役割を演じることがよく知られている。Phは9番染色体と22番染色体の長腕間相互転座 t(9;22)(q34;q11)の結果生じ、BCR-ABL キメラ遺伝子が形成され190kDのキメラタンパク質(p190^{BCR-ABL}、以下p190と略す)を生じる。このp190はBCRエキソン1由来の配列を介して4量体を構成し、分子内および分子間の自己リン酸化によってキナーゼ活性を高めるため、細胞内の複数のシグナル伝達系(Jak-Stat系、Ras-Raf-MAPキナーゼ系、Junキナーゼ系、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ-Akt系など)を刺激してアポトーシスの抑制と増殖促進に働き、ALLの病態形成の中心はBCR-ABLタンパク質である。Ph-ALLは造血幹細胞移植療法や新規の薬剤をもってしても極めて予後不良な病型であることが統計学的に示されており、Ph-ALLに対する新規治療戦略や治療法の開発が望まれる。このような新規治療の開発、特に前臨床試験における疾患モデル動物の意義は重要であり、人との種差の観点から霊長類モデルの重要性は疑いの余地がない。本研究ではPh ALLコモンマーモセットモデル作出を第一の目的に、レンチウイルスベクターシステムを用いてマーモセットの造血細胞にp190遺伝子を効率良く導入し形質転換した細胞を自家移植する。さらにp190遺伝子を直接マーモセット骨髓内に注入して骨髓前駆・幹細胞に導入しin vitroならびにin vivoでの経過観察を行う。さら白血病に代表される腫瘍性造血では、正常造血の場合と同様に、自己複製能力を有する白血病幹細胞が集団の維持と拡大を担っていることが知られており、本研究は、白血病幹細胞の特性を把握し、治療の標的分子を探索することを第二の目的とする。

B. 研究方法

1. 遺伝子導入自家末梢血造血幹細胞移植による白血病誘導法の検討：
3匹の成体コモンマーモセットの末梢血単核細胞にレンチウイルスベクターでp190遺伝子をin vitroで導入後、ブスルファン処置後のマーモセットに自家移植をした。
2. 大腿骨髓内直接ウイルスベクター注入法を用いた白血病誘導法の検討：
5-Fluorouracil (5FU)を大腿静脈内に投与後5日間連続のプレドニゾン投与による免疫抑制を行い、左右両膝関節の1cm直上から大腿骨髓内にp190レンチウイルスベクターを骨髓内に注入した。各個体においてp190 BCR-ABL mRNAもしくはDNAをRT-PCR法もしくはPCR法を用いて検出した

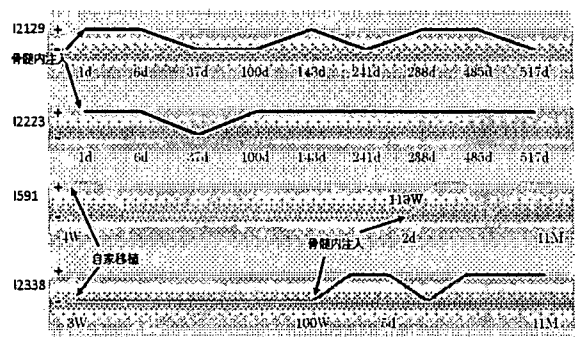
3. hTERTプロモーターレンチウイルスベクターの作製：hTERT（ヒトテロメラーゼ逆転写酵素：正常の造血幹細胞でその活性が高いことが報告されている）遺伝子上流約1.2kbに及ぶプロモーター領域に蛍光タンパク質（hrGFPまたはVenus）の遺伝子をつないだ発現ユニットを含む第3世代の自己不活化レンチウイルスベクターを作製した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」（一部旧組換えDNA実験指針）と各施設内動物実験に関する指針「九州大学動物実験に関する指針」「東京大学動物実験マニュアル」にのっとり各施設内委員会において承認後（承認済み）、安全かつ倫理的に研究を実施した。

D. 研究結果

p190遺伝子導入造血前駆細胞の自家移植後、2個体の末梢血で4週目と8週目に、骨髓では13週目にp190遺伝子mRNAの発現が確認されたが、以降は検出されなかった。大腿骨髓内に直接ウイルスベクターを注入する方法により、長期観察の結果、大腿骨髓内にウイルスベクターを接種してから11ヶ月経過した個体I591と個体I2338、大腿骨髓内にウイルスベクターを接種してから1年4ヶ月経過した個体I2129と個体I2223のそれぞれの末梢血単核球と末梢血好中球からゲノムp190mRNA遺伝子の発現が確認された。また同時に血球ゲノムDNAにもp190遺伝子の組込が検出された。しかしながらウイルスベクター接種1年半の時点ではまだ白血病発症は認められなかった。



造血幹細胞移植：骨髓内注
入：I2129, I2223&I591(自家移植より113週後), I2338(自家移植より100週後)大腿骨髓内直接遺伝子導入
+ : p190 Positive; - : p190 Negative

hTERTプロモーターレンチウイルスベクターによる解析の結果、白血病細胞集団にはhTERTプロモーター活性の連続的なヒエラルキーが存在することが判明した。

E. 結論と考察

1. マーモセットにおいてヒト造血器腫瘍モデルを確立するためにはまだ多くの課題が残されているものの、in vivoにおいてp190遺伝子導入細胞の安定した体内増幅を得る可能性があることを明らかにした。本研究で得られた結果は、今後マーモセットを含む非ヒト霊長類の造血幹・前駆細胞を標的とする疾患モデル構築の上で有用な情報を提供できたものと考えられる。
2. レンチウイルスベクターの高い感染効率は従来困難であった白血病患者から分離された検体の解析を可能にした。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Futami M, Hatano T, Soda Y, Kobayashi S, Miyagishi M, Tojo A. RNAi-mediated silencing of p190(Bcr-Abl) inactivates Stat5 and cooperates with imatinib mesylate and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in selective killing of p190(Bcr-Abl)-expressing leukemia cells. *Leukemia*.2008

2. 学会発表

1. 二見 宗孔、波多野 利行、曾田 泰、小林 誠一郎、宮岸 真、東條 有伸 P190^{Bcr-Abl}の発現制御によるStat5リン酸化の特異的抑制とイマチニブ、17-AAGと協調した細胞死の誘導 2007年・日本血液学会総会
2. 中山 紳、長村-井上 登紀子、横山 和明、石下 郁夫、尾上 和夫、二見 宗孔、小林 誠一郎、大野 伸広、大井 淳、高橋 聡、内丸 薫、東條 有伸 慢性骨髄性白血病—細胞遺伝学的寛解例の免疫学的解析：インターフェロン群とイマチニブ群の比較 2007年・日本血液学会総会
3. Futami M, Hatano T, Soda Y, Kobayashi S, Miyagishi M, Tojo A. Inhibition of Stat5 phosphorylation and enhancement of imatinib/17-AAG induced cell death by anti-p190^{Bcr-Abl} shRNA. 2007年,日本癌学会総会
4. Kobayashi S, Tsai H, Izawa K, Inoue Y, Tojo A. Bioimaging analysis of stem cell signals in cancer cells using lentiviral reporter vector system. 2007年,日本癌学会総会
5. Futami M, Hatano T, Soda Y, Kobayashi S, Miyagishi M, Tojo A. RNAi-mediated silencing of p190^{Bcr-Abl} inactivates Stat5 and cooperates with imatinib mesylate and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in selective killing of p190^{Bcr-Abl}-expressing leukemia cells. 2007年,アメリカ血液学会
6. Tsai H, Kobayashi S, Itoh K, Ishida T, Umezawa K, Tojo A. Microenvironmental up-regulation of NF- κ B activity via p65-dependent and independent pathways in a bioimaging model of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. 2007年,アメリカ血液学会
7. 小林 誠一郎、蔡 慧珍、伊澤 清子、井上 優介、東條 有伸 レンチウイルス・レポーターベクターを用いた各種幹細胞シグナル活性のライブイメージング 2007年・日本分子イメージング学会

小型霊長類コモンマーモセット白血病モデル作出に関する研究

主任研究者 谷 憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野 教授
 分担研究者 佐々木えりか 実験動物中央研究所・胚性幹細胞生物学・研究員

研究要旨

小型霊長類コモンマーモセットに疾患モデルを作出することは新規薬剤の前臨床動物系の確立の観点から極めて重要である。本研究では先ずES細胞への遺伝子改変を行う為にAmaxa社Nucleofactorを用いた遺伝子導入効率を検討し、最高60.6%の遺伝子導入条件を設定できた。次に骨髓細胞への遺伝子改変を目的に、遠隔地へのコモンマーモセット骨髓細胞の輸送の際、一部を切開した骨を4°C、DMEM培養液中で保存することが適切であることを明らかにした。

A. 研究目的

サルを実験動物として用いることにより、より精度の高い前臨床研究を行うことが可能となる。特に近年、急速に開発が進められている分子標的薬、遺伝子治療薬の有効性・安全性の検討にはサルを用いた前臨床研究が必須と考えられる。そこで、小型霊長類コモンマーモセットを用いた疾患モデル作出を目指して、マーモセットES細胞への遺伝子変異導入法の検討を行った。また、コモンマーモセットを用いたフィラデルフィア陽性急性リンパ性白血病モデルの作出には大量のマーモセット骨髓が必要となるが、当研究所と九州大学とは距離が離れているため、骨を輸送する必要がある。そこで骨髓を劣化させることなく輸送する方法を検討した。

B. 研究方法

マーモセットES細胞での相対的組み換えを目指した遺伝子導入の条件検討Amaxa社のnucleofactorを用い、marmoset ES細胞への遺伝子導入効率の検討を行った。マウスES細胞用条件を用いて 5×10^6 個のマーモセットES細胞に、20 ugのtransgene (pCXN2-Venus) を、4種類のプログラム (A13, A23, A24, A30) で導入し、5日後導入効率を定量した。骨髓採取を目的とした遠隔地へのマーモセット骨の輸送廃用もしくは他の実験の計画上、殺処分されるマーモセットの大腿骨および上腕骨雌11匹分、雄2匹分を採取した。ついで皮膚、筋肉を取り除いた上で骨の一部を切開し、DMEM培地中に浸した状態で4°Cを保ったまま九州大学へ輸送した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」(一部旧組換えDNA実験指針)と各施設内動物実験に関する指針「実験動物研究所動物実験に関する指針」にのっとり施設内委員会において承認後(承認済み)、安全かつ倫理的に研究を実施した。輸送されたマーモセットの骨は培養液を用いて骨髓細胞をフラッシュ後、フィコールを用いた比重分離法により、単核球を単離した。続いて、CM CD34抗体を用いてCD34陽性細胞を分取後、遺伝子導入実験用サンプルとして小分注し、保存した。

C. 研究結果

Amaxa社のnucleofactorを用い、marmoset ES細胞への遺伝子導入効率の検討を行った結果、最も効率の高かった条件(A13)では60.6%であった。しかし、導入後のゲノムへのインテグレーションの効率、及びその後の発現については未知であった。そこで、直鎖化したトランスジェン(EF1alpha-EGFP-F2A-Neo)を至適条件でマーモセットES細胞へ導入し、G418による選別を行った。その結果、合計23個のG418耐性コロニーが得られた。DMEM培地中、4°Cにて輸送されたマーモセットの骨は培養液を用いて骨髓細胞をフラッシュ後、フィコールを用いた比重分離法により、単核球を単離した。続いて、CM CD34抗体を用いてCD34陽性細胞を分取後、遺伝子導入実験用サンプルとして小分注し、保存した。

E. 結論

通常マウスES細胞へのエレクトロポレーションの際に得られる薬剤耐性コロニー数がおおよそ500~1,000個程度であるので、インテグレーション効率はマウスES細胞の1/20~1/50程度であると考えられる。マウスES細胞と同程度の頻度で相同組み換えが起こると仮定すれば、相同組み換え体を得るまでに10回前後のエレクトロポレーションが必要となることが予想される。

G. 研究発表

- 学会発表
 1. コモンマーモセットの卵子成熟培地の比較検討とその後の発生率について
島田亜樹子、大岩亮、上岡美智子、塩澤誠司、佐々木えりか 第54回実験動物学会(江戸川区民ホール、東京)
 2. コモンマーモセット卵子成熟に及ぼす輸送の影響について
平川玲子、島田亜樹子、大岩亮、佐々木えりか、外丸祐介 第54回実験動物学会(江戸川区民ホール、東京)
 3. プロモーターの違いによるコモンマーモセット胚性幹(ES)細胞における導入遺伝子の発現効率の検討
大岩亮、水島友子、三好浩之、佐々木えりか 第54回実験動物学会(江戸川区民ホール、東京)

4. コモンマーモセット体細胞クローン胚の体外発
生能
外丸祐介、平川玲子、島田亜樹子、塩澤誠司、
佐々木えりか
第54回実験動物学会（江戸川区民ホール、東
京）
5. 実験動物としてのコモンマーモセットの有用性
佐々木えりか
第54回日本実験動物学会総会、大会総会主催
ランチオンセミナー
江戸川区民ホール、東京、平成19年5月
6. マーモセットの発生工学と遺伝子改変の展望
佐々木えりか
シンポジウム「ゲノム解析からin vivo解析へ
の回帰」
つくば国際会議場、つくば市、平成19年11月

2. 実用新案登録

トランスジェニック動物を作出する方法
日本出願番号：特願2008-017955（平成20年1月
29日）

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakayama M, Muta H, Somada S, Maeda T, Mutoh T, Shimizu K, Suehiro Y, Hisano T, <u>Kurita R</u> , Shiraishi T, Mori M, Yoshikawa Y, Tsunetomi N, Uchida A, <u>Tani K</u> .	Cronkhite-Canada Syndrome associated with schizophrenia	Int Med	46	175-180	2007
Suehiro Y, Tachikawa Y, Abe Y, Ohshima K, Muta K, <u>Tani K</u> .	Epithelioid hemangioendothelioma presenting with severe myelofibrosis and a high serum hyaluronan level	Eur J Haematol	79	349-353	2007
Kudo S, Konda R, Obara W, Kudo D, <u>Tani K</u> , Nakamura Y, Fujioka T	Inhibition of tumor growth through suppression of angiogenesis by brain-specific angiogenesis inhibitor 1 gene transfer in murine renal cell carcinoma.	Oncol Rep	18	785-791	2007
Maeda T, Sugano M, Guan JZ, Oyama J, Higuchi Y, Makino N, Hatakenaka M, Muta H, Nakayama M, Nakazaki Y, <u>Kurita R</u> , Hiroyama T, Suzuki T, <u>Tani K</u> .	Familial Turner mosaicism 46XX/45XO with brain calcification	J Neuropsychiatry Clin Neurosci	19	342-343	2007
Sun, X, Somada S, Shibata K, Muta H, Yamada H, Yoshihara H, Hobnad K, Nakamura T, Takayanagi R, <u>Tani K</u> , Podack E, Yoshikai Y.	A Critical Role of CD30 Ligand/CD30 in Controlling Inflammatory Bowel Diseases in Mice.	Gastroenterology	134	447-458	2007
Inoue H, Iga M, Xin M, Asahi S, Nakamura T, Kurita R, Nakayama M, Nakazaki Y, Takayama K, Nakanishi Y, <u>Tani K</u> .	TARC and RANTES enhance antitumor immunity induced by the GM-CSF-transduced tumor vaccine in a mouse tumor model	Cancer Immunol Immunother	in press (電子版のみ)	-	2008
Kim YT, Yoshida H, Kojima M, <u>Kurita R</u> , Nishii W, Muramatsu T, Ito H, Park SJ, Takahashi K	The Effects of Mutations in the Carboxyl-Terminal Region on the Catalytic Activity of Escherichia coli Signal Peptidase I	J Biochem	143	237-242	2008
Futami M, Hatano T, Soda Y, <u>Kobayashi S</u> , Miyagishi M, Tojo A.	RNAi-mediated silencing of p190(Bcr-Abl) inactivates Stat5 and cooperates with imatinib mesylate and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in selective killing of p190(Bcr-Abl)-expressing leukemia cells.	Leukemia.	in press (電子版のみ)	-	2008

Cronkhite-Canada Syndrome Associated with Schizophrenia

Masaharu Nakayama¹, Hiromi Muta¹, Shinichi Somada¹, Toyoki Maeda¹, Toshitaka Mutoh¹,
Kanako Shimizu¹, Yoko Suehiro¹, Terumasa Hisano¹, Ryo Kurita¹, Takeshi Shiraishi²,
Masaki Mori², Yasuji Yoshikawa³, Nobuto Tsunetomi^{3,4},
Akihiro Uchida⁵ and Kenzaburo Tani¹

Abstract

Here, we report a case of Cronkhite-Canada syndrome in a patient with schizophrenia. A 64-year-old man, who had been diagnosed as having a schizophrenic disorder at the age of 30, presented with alopecia, atrophic nail changes, hyperpigmentation of the skin, and inflammatory polyposis of the stomach and colon. Endoscopic ultrasonography of the stomach and colon revealed diffuse mucosal thickening with small hypoechoic areas, corresponding to edema of the lamina propria. After treatment with parenteral hyperalimentation and tranexamic acid, his physical findings and polyposis gradually improved. This is the first report of Cronkhite-Canada syndrome in a patient with schizophrenia.

Key words: Cronkhite-Canada syndrome, endoscopic ultrasonography, schizophrenia

(DOI: 10.2169/internalmedicine.46.1735)

Introduction

Cronkhite-Canada syndrome (CCS), first reported in 1955 by Cronkhite and Canada, is a rare gastrointestinal polyposis accompanied by diarrhea, hypoproteinemia, and ectodermal changes, such as skin hyperpigmentation, alopecia, and atrophic nail changes (1). CCS, a non-hereditary disease, is most commonly seen in middle-aged patients (2). Although more than 300 patients have been reported worldwide, the etiology of CCS remains unknown. We evaluated a case of CCS in a patient with schizophrenia that was successfully treated with parenteral hyperalimentation and tranexamic acid. We discuss the correlation between psychiatric disorders and the CCS phenotype, including the characteristic findings of endoscopic ultrasonography (EUS) seen in this patient.

Case Report

A 64 year-old Japanese man with schizophrenia exhibited waxing and waning psychiatric symptoms, for which he was followed by a local hospital for the past 35 years. Medications administered over the last two years included haloperidol (9 mg/day), biperiden (3 mg/day) and flunitrazepam (4 mg/day), and he was stable. Five months prior to admission, the patient's laboratory data were within normal limits, with the exception of a low serum cholesterol level of 117 mg/dl (Table 1). At that time, he did not exhibit any specific symptoms, such as anemia, leukocytosis, thrombocytosis, hypoproteinemia, or hypokalemia. Three months later, he reported taste disturbances and loose bowels (5-8 times per day). After experiencing listlessness of the legs, he was transported to the emergency department by an ambulance. Head computed tomography did not reveal evidence of cerebral vessel disease; his laboratory data, however, displayed

¹ Department of Advanced Molecular and Cell Therapy, Kyushu University Hospital, and Department of Molecular Genetics, Division of Molecular and Clinical Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, ² Department of Molecular and Cellular Biology, Division of Molecular and Surgical Oncology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Beppu, Oita, ³ Division of Clinical Laboratory, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Beppu, Oita, ⁴ Department of Gastroenterology, Shin Beppu Hospital, Beppu, Oita and ⁵ Uchida Hospital, Beppu, Oita

Received for publication January 20, 2006; Accepted for publication August 3, 2006

Correspondence to Dr. Kenzaburo Tani, taniken@bioreg.kyushu-u.ac.jp

Table 1. Laboratory Data on Premorbid State, Admission, and Post-treatment

	5 months before	Upon admission	4 months later			Upon admission	4 months later		
WBC	5810	9410	4360	μL	(4000-8000)	IgE	1200	670	IU/mL (<250)
RBC	467×10^4	322×10^4	312×10^4	μL	(410-530)	Zn	49	73	$\mu\text{g/dL}$ (65-110)
Hb	14.3	10.0	9.6	g/dL	(14-18)	Mg	2.2	2.3	mg/dL (1.8-2.6)
Ht	43.5	29.9	28.6	%	(40-48)	Cu	49	80	$\mu\text{g/dL}$ (68-128)
Plt	35.2×10^4	34.4×10^4	30.8×10^4	μL	(13-35)	Mn	0.6	0.8	$\mu\text{g/dL}$ (0.8-2.5)
						Vit.B1	11	NE	ng/mL
TP	7.2	3.7	6.5	g/dL	(6.7-8.3)	Vit.B6	2.2	NE	ng/mL (6.0-40.0)
Alb	NE	1.9	3.6	g/dL	(4.0-5.0)	Vit.B12	240	NE	pg/mL (233-914)
T-Chol	117	86	98	mg/dL	(128-220)	Folic acid	5.7	NE	ng/mL (3.6-12.9)
TG	101	77	71	mg/dL	(30-150)	CD4/CD8	2.0	NE	(0.6-2.9)
Na	138	138	133	mEq/L	(138-146)	IL-3	<31	<31	pg/mL
K	4.4	3.5	4.2	mEq/L	(3.6-4.9)	IL-4	8.0	5.9	pg/mL (<6.0)
Cl	102	105	99	mEq/L	(99-109)	IL-5	5.6	<5.0	pg/mL (<10.0)
Ca	NE	6.5	8.2	mg/dL	(8.7-10.3)	GM-CSF	<8.0	<8.0	pg/mL
CRP	NE	1.73	0.17	mg/dL	9<0.20)	Tryptophan	20.2	72.5	nmol/mL (37-75)
FDP	NE	5.3	0.3	$\mu\text{g/mL}$	(<5.0)	Cystine	16.9	36.9	nmol/mL (29-49)

NE; not examined

**Figure 1. Physical findings on admission (March, 2003). Alopecia (a; frontal to central region of the head), atrophic nail changes (b), and hyperpigmentation of the skin (b, dorsum of hand).**

severe hypokalemia (1.8 mEq/L), hypoproteinemia (5.0 g/dL), and hypoalbuminemia (2.5 g/dL). He was initially treated with fluid and electrolyte replacement; his leg function returned to normal within several days. As his bowel abnormalities continued, we performed endoscopic examination of the upper gastrointestinal tract and colon. We found multiple polyps with an edematous mucosa in both the stomach and colon. He was then admitted to the Medical Institute of Bioregulation Hospital, Kyushu University for a more thorough investigation and treatment.

His history of previous symptoms with the additional signs of alopecia (Fig. 1a; frontal to central regions of the head), atrophic nail changes (Fig. 1b), and hyperpigmentation of the skin (Fig. 1b; dorsum of hand), the patient was

diagnosed with CCS. Further laboratory examination identified anemia, mild leukocytosis, and mildly increased C-reactive protein levels (Table 1). Serum IgE levels were 1,200 IU/ml [normal range(nl): <250]; idiosyncratic IgE examination could not identify any allergens. Serum mineral levels of zinc, manganese, and copper were decreased at 49 $\mu\text{g/dl}$ (nl: 65-110), 0.6 $\mu\text{g/dl}$ (nl: 0.8-2.5), and 49 $\mu\text{g/dl}$ (nl: 68-128), respectively. IL-4 levels had increased to 8.0 pg/ml (nl: < 6.0). Analysis of the plasma concentrations of 41 serum amino acids discovered that the levels of tryptophan and cystine were significantly decreased to 20.2 nmol/ml (nl: 37-75) and 16.9 nmol/ml (nl: 29-49), respectively (Table 1). Alpha-antitrypsin clearance, a readout of intestinal absorption, gave an absorption rate of 18.9 ml/day, which is

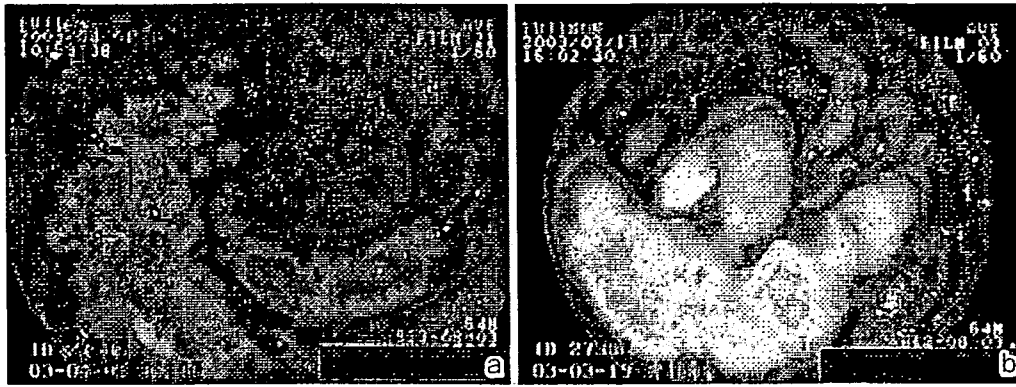


Figure 2. Endoscopic findings of the gastrointestinal tract on admission. a; the stomach revealed mucosal edema and diffuse polyposis with irregularly-sized, hemispherical elevated lesions. b; endoscopic findings of the colon revealed multiple polyposis, with individual polyps measuring less than 25 mm.

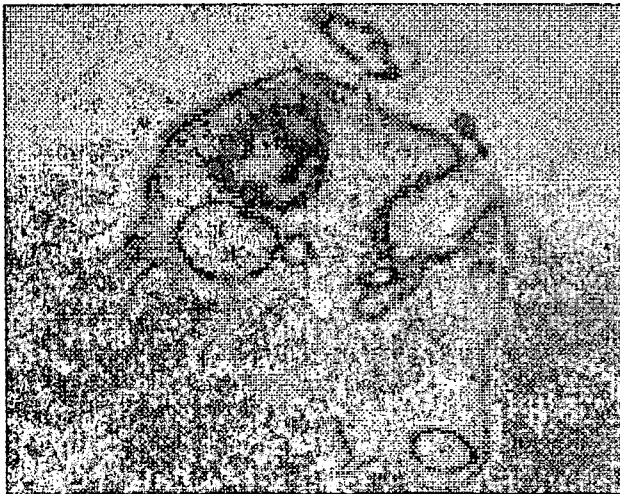


Figure 3. Histological findings of the stomach (HE stain, $\times 40$). Inflammatory polyps were sessile lesions composed of cystically dilated irregular glands within the lamina propria, which was expanded by edema and an inflammatory infiltrate.

at the upper limit of the normal range.

Endoscopic studies of gastrointestinal tract exhibited polyposis with edematous mucosae of the stomach (Fig. 2a) and colon (Fig. 2b). A small number of polyps were also observed within the small intestine. Histopathological analysis revealed (Fig. 3) that all of the polyps were benign. These inflammatory sessile polyps were composed of focally dilated irregular foveolar glands within the lamina propria, which had expanded due to edema with eosinophilic infiltration. The lamina propria in the superficial portion was expanded to a greater extent than that in the deeper portion. EUS of the stomach and colon indicated thickening of the mucosa and small hypoechoic areas in the dilated mucosa of both the stomach (Fig. 4) and colon. Immunostaining with monoclonal antibodies specific for CD4, CD8, and CD56 revealed non-specific inflammatory changes. Cells infiltrating

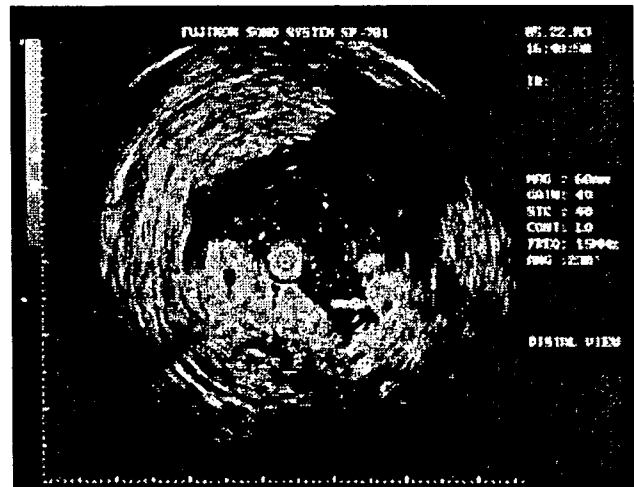


Figure 4. Endoscopic ultrasonographies (EUS) findings of the stomach. Thickening of the mucosae, but not submucosal areas was observed. Arrows indicate hypoechoic areas. The colon exhibited similar changes.

the gastric mucosae were primarily CD4-positive cells, with far fewer CD8- or CD56-positive cells.

As initial treatment, we administered intravenous hyperalimentation (IVH) with amino acids and minerals and oral vancomycin hydrochloride (2 g/day). We avoided giving corticosteroid therapy because of his intestinal infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the possibility of exacerbation of the patient's schizophrenia. One month later, while his intestinal infection had resolved, the loose bowels, hypoalbuminemia, and polyposis persisted. Oral administration of anti-plasmin (tranexamic acid: 750 mg/day) was begun, which rapidly improved the patient's loose bowels and hypoalbuminemia (Fig. 5). Four months later, his serum mineral and amino acids levels had improved, and his IgE and IL-4 levels had decreased (Table 1). His physical signs were significantly improved (Fig. 6a and b);

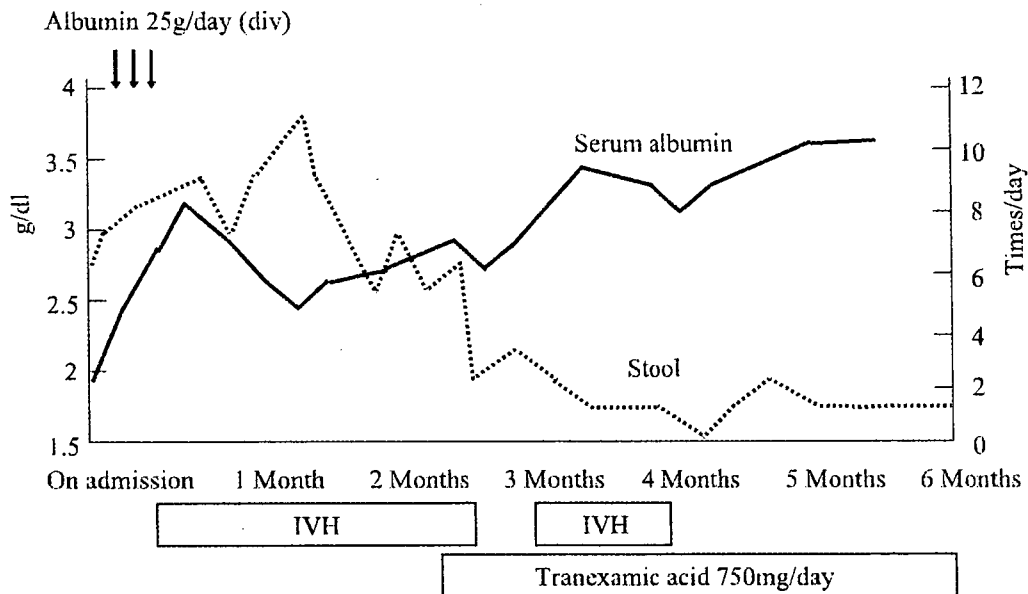


Figure 5. Clinical course of this patient. The solid line indicates serum albumin levels, while the dotted line indicates the number of stools per day.

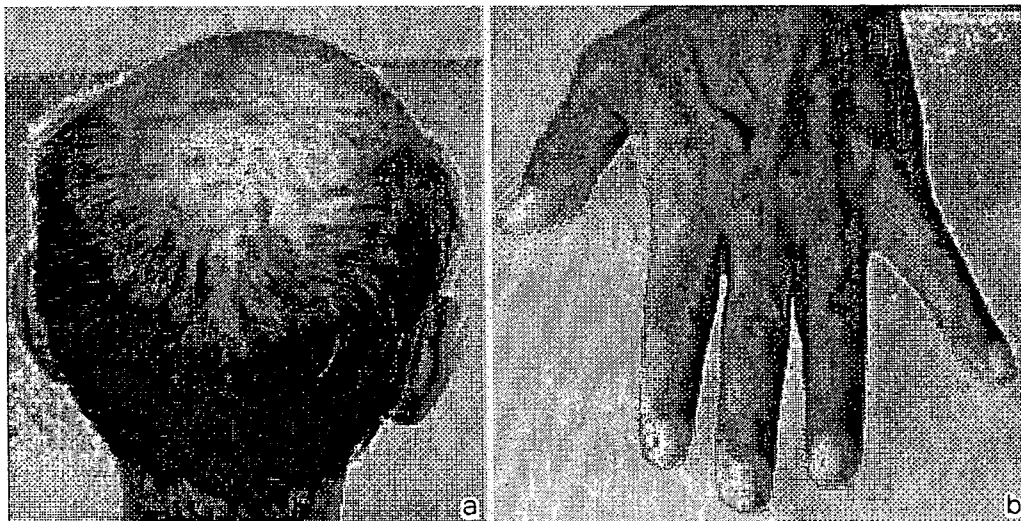


Figure 6. Physical findings post-treatment. Alopecia (a), atrophic nail changes (b), and hyperpigmentation of the skin (b) were significantly improved.

his endoscopic findings demonstrated improvement in the mucosal edema and a decreased number of polyps in the stomach and colon (Fig. 7). EUS findings also confirmed a reduction in mucosal thickening. The patient was then started on an oral elementary diet. Five months later, he began eating a regular diet while continuing oral administration of anti-plasmin. He has remained well for the past eight months without a recurrence of symptoms.

Discussion

The etiology of CCS remains unclear. Goto et al (2) re-

ported that stresses, such as excessive physical exertion and mental strain, may trigger this syndrome. He also reported a frequency (3%) of concurrent psychiatric disorders in patients with CCS. A case of CCS associated with schizophrenia, however, has not previously been reported. Multiple case reports (3-5) have detailed patients with inflammatory bowel disease associated with schizophrenia; the relationship between psychiatric illness and the etiology of the GI disease remains unclear. Recently, acute brain syndrome as a consequence of CCS was reported (6) to be caused by the lack of electrolytes and important nutrients resulting from malabsorption. In the case reported here, however, schizo-

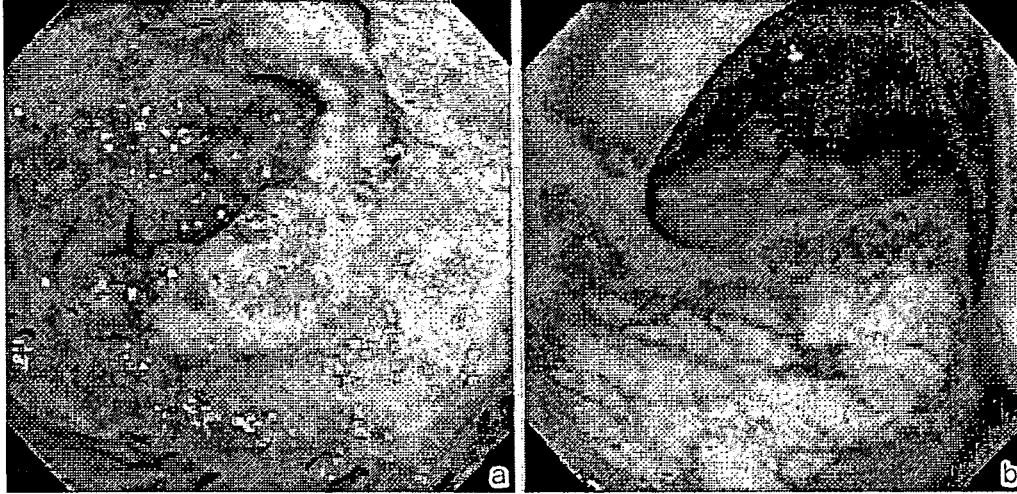


Figure 7. Endoscopic findings of the gastrointestinal tract post-treatment. Polyposis and the amount of edematous mucosae were slightly decreased in the stomach (a) and decreased considerably in the colon (c).

phrenia preceded the onset of CCS by more than 30 years. We could not find a direct association between these two diseases, the mental stress of his long-standing psychiatric illness may have contributed to the onset of CCS. Indeed, his psychiatric symptoms got slightly worse just prior to this episode of CCS. We hypothesize that the worsening of his schizophrenia served as the trigger for the crisis of CCS.

Lavrey et al (7) and Filloux et al (8) reported phenothiazine-induced acute colitis in patients receiving butyrophenones. In the present case, the initial examination documented increased levels of serum IgE and IL-4, which decreased after treatment. Although IL-4 is a cytokine that promotes IgE secretion, we could not identify any targeted allergens by idiosyncratic IgE examination. As eradication of MRSA did not influence the GI manifestation of disease, we hypothesized that CCS was not triggered by an intestinal infection in this patient.

Makiyama et al (9) reported that gastrointestinal endoscopy of patients with CCS revealed irregular-sized, reddish, small and hemispherical elevated lesions. Histology of a polyp biopsy demonstrated cystic dilatation of the glands with hypersecretion, dilatation of the lymphatics, marked edema of the interstitium, and cellular infiltration. In this case, gastrointestinal colonoscopy revealed mucosal edema and diffuse polyposis with irregular-sized, hemispherical elevated lesions; the majority of the polyps measured less than 25 mm in length. These polyps, with cystically dilated spaces containing mucin, inflammatory cells, and debris, were lined by a non-neoplastic glandular epithelium. Similar cystic changes were observed in the nonpolypoid mucosa. The histological appearance of this specimen was consistent with previous reports of CCS (9).

To investigate the gastric wall thickening seen in CCS, Ward et al (10) performed EUS, identifying a thickening of the submucosa and multiple distinctive submucosal cystic

structures. We also used EUS to examine the stomach and colon, discovering thickening of the mucosa, but not submucosal areas. We also identified hypoechoic areas within the dilated mucosae. Presumably, these are areas of cystic dilatation of glands exhibiting hypersecretion, a characteristic feature of CCS.

The standard regimen for CCS is daily oral administration of 30 mg prednisolone and/or enteric nutrition and multivitamin supplementation (11). Futagami et al (12) reported five cases of CCS treated with steroid pulse therapy. In all of these cases, malabsorption improved remarkably after treatment, with resolution of the diffuse gastrointestinal polyposis. Viranuvatti et al (13) described a patient that received three days of high-dose corticosteroids; treatment, however, had to be discontinued because of steroid-induced psychosis. We avoided corticosteroid therapy in this case because of his co-existing intestinal infection and preexisting psychiatric disorder. Tranexamic acid was given to the patient instead, as described by Koishi (14). Although the combination of corticosteroids and tranexamic acid is more effective (11), Goto et al (15) reported that anti-plasmin therapy could also be used effectively for CCS treatment. In this case, treatment with anti-plasmin alone was able to resolve the symptoms and intestinal disturbances rapidly in the absence of corticosteroids.

Although Goto (16) reported multiple cases of long-term survival after treatment with high caloric fat-containing parenteral nutrition, corticosteroids, and anti-plasmins, the prognosis of patients with CCS is generally poor. Approximately 20% of patients die of recurrences. Spontaneous regressions, however, were observed in 5-10% of CCS cases, regardless of treatment (13, 17, 18). The most serious complication of CCS is gastrointestinal malignancy; 15% of patients eventually develop colon cancer (19). Although this patient has remained healthy for eight months since being discharged, it

is imperative to follow this patient very carefully.

We thank Drs. Norimoto Nakamura and Takashi Yao (Department of Anatomic Pathology, Graduate School of Medicine, Ky-

ushu University, Fukuoka, Japan) for their useful discussion of our histological findings. We also thank Dr. Yoko Hirashima (Asami Hospital, Beppu, Oita, Japan) for the medical treatment of this patient's schizophrenia.

References

1. Cronkhite LW, Canada WJ. Generalized gastrointestinal polyposis: An unusual syndrome of polyposis, pigmentation, alopecia and onychotrophia. *N Engl J Med* **252**: 1011-1015, 1955.
2. Goto A. Cronkhite-Canada syndrome: epidemiological study of 110 cases reported in Japan. *Nippon Geka Hokan (Arch Jpn Chir)* **64**: 3-14, 1995.
3. Chiba M, Igarashi K, Gotoh M, Arakawa H, Masamune O. A case of ulcerative colitis associated with schizophrenia. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* **83**: 693-696, 1986 (in Japanese).
4. Dohmen K, Yamano Y, Omori F, et al. Ulcerative colitis associated with pyoderma gangrenosum and schizophrenia- a case report. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* **88**: 1250-1255, 1991 (in Japanese).
5. Cucino C, Sonnenberg A. The comorbid occurrence of other diagnosis in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **96**: 2107-2012, 2001.
6. Peitl A, Vucic Peitl M, Pavlovic E, Ljubicic D. Acute brain syndrome as a consequence of the Cronkhite-Canada syndrome. *Psychiatr Danub* **17**: 90-93, 2005.
7. Larrey D, Lainey E, Blanc P, et al. Acute colitis associated with prolonged administration of neuroleptics. *J Clin Gastroenterol* **14**: 64-67, 1992.
8. Filloux MC, Marechal K, Bagheri H, et al. Phenothiazine-induced acute colitis: a positive rechallenge case report. *Clin Neuropharmacol* **22**: 244-245, 1999.
9. Makiyama K, Iwanaga S, Katsumata T, et al. A case of Cronkhite-Canada Syndrome -with special reference to magnifying endoscopic observation of polyps and Coeliac angiographic findings. *Dig Endosc* **4**: 433-439, 1992.
10. Ward EM, Wolfsen HC, Raimondo M. Novel endosonographic findings in Cronkhite-Canada syndrome. *Endoscopy* **35**: 464, 2003.
11. Yamashita T, Miyazawa M, Suzuki H, et al. A case of Cronkhite-Canada syndrome improved markedly with antiplasmin agent and steroid. *Gastroenterol Endosc* **38**: 45-50, 1996 (in Japanese, Abstract in English).
12. Futagami K, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G. Five cases of Cronkhite-Canada syndrome treated by steroid pulse therapy. *Digestion and Absorption* **21**: 151-154, 1998 (in Japanese, Abstract in English).
13. Viranuvatti V, Damrongsak C, Chainuvatti T, Vanasin B, Chandcharoensin C. Cronkhite-Canada syndrome. Report of a case with spontaneous recovery. *J Med Assoc Thailand* **64**: 261-266, 1981.
14. Koishi T. A case of Cronkhite-Canada syndrome. *Nippon Naika Gakkai Zasshi (J Jpn Soc Int Med.)* **65**: 1060, 1976 (in Japanese).
15. Goto A, Shibuya C, Matsunami E. Cronkhite-Canada syndrome. *Shokaki Geka Seminar* **15**: 111-143, 1984 (in Japanese).
16. Goto A. Cronkhite-Canada syndrome: observations about treatment course and prognosis of 123 cases reported in Japan. *Nippon Geka Hokan (Arch Jpn Chir)* **57**: 427-433, 1988 (in Japanese).
17. Hashimoto K, Kashihara T, Kotani K, et al. A case of Cronkhite-Canada syndrome with spontaneous regression. *Gastroenterol Endosc* **3434**: 2615-2621, 1992 (in Japanese, Abstract in English).
18. Iijima T, Nambu M, Miyamura T. A long-term survived case of Cronkhite-Canada syndrome showed resolution of gastrointestinal polyposis. *Nippon Jpn J Gastroenterol* **84**: 749-753, 1987 (in Japanese).
19. Imamura A, Murashima Y, Kato M, et al. Course of gastrointestinal polyps of Cronkhite-Canada syndrome; including review of 53 cases reported in Japanese literature during the last ten years. *Stomach and Intestine* **28**: 1295-1303, 1993 (in Japanese).