

TNBS腸炎モデル

方法

動物: C57BL/6またはBALB/cマウス ♂ 6週齢

投与: エーテルで麻酔したマウスにゾンデ(マウス経口投与用)を直腸内に肛門から3 cm挿入し, 2.5% TNBS in 50 % ethanolを0.1 ml投与後, 尾を持ち逆さにして1分間保持

サンプリング: 投与2時間後に直腸摘出, PBSで洗浄後, スーパーテルで粘膜をしごき出して採取し, RNA laterに浸漬

遺伝子発現解析: GeneChip Mouse Genome 430 2.0使用
3匹分のサンプルをプールして用い, n=2で行った.

データはMAS5アルゴリズムで生成し, Global normalization後に解析した. GO解析にはDAVID Functional Annotation Tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)を用いた.

BALB/c > C57BL/6のプローブセットのGene Ontology (controlで2倍以上; 439プローブセット)

(top20)

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_CC_5	GO:0042611-MHC protein complex	8	1.96%	6.09E-04
GOTERM_CC_5	GO:0009897-external side of plasma membrane	10	2.48%	6.33E-04
GOTERM_BP_5	GO:0030101-natural killer cell activation	4	0.98%	1.36E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006915-apoptosis	23	5.64%	1.88E-03
GOTERM_BP_5	GO:0002621-leukocyte differentiation	9	2.21%	2.91E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006620-amino acid metabolic process	12	2.94%	3.37E-03
GOTERM_BP_5	GO:0008219-cell death	23	5.64%	3.60E-03
GOTERM_MF_5	GO:0008008-chemokine activity	6	1.23%	3.69E-03
GOTERM_BP_5	GO:0048534-hemopoietic or lymphoid organ development	12	2.94%	4.01E-03
GOTERM_MF_5	GO:0042379-chemokine receptor binding	6	1.23%	4.06E-03
GOTERM_BP_5	GO:0030097-hemopoiesis	11	2.70%	6.16E-03
GOTERM_BP_5	GO:0030098-lymphocyte differentiation	7	1.72%	8.04E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006644-phospholipid metabolic process	8	1.96%	8.27E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006643-membrane lipid metabolic process	9	2.21%	9.54E-03
GOTERM_BP_5	GO:0043066-negative regulation of apoptosis	9	2.21%	1.23E-02
GOTERM_BP_5	GO:0043069-negative regulation of programmed cell death	9	2.21%	1.34E-02
GOTERM_BP_5	GO:0030268-lipid modification	4	0.98%	1.49E-02
GOTERM_CC_5	GO:0042612-MHC class I protein complex	6	1.23%	1.68E-02
GOTERM_BP_5	GO:0048631-alpha-beta T cell activation	4	0.98%	1.78E-02
GOTERM_CC_5	GO:0005737-cytoplasm	106	26.74%	1.86E-02

C57BL/6 > BALB/cのプローブセットのGene Ontology
(controlで2倍以上; 769プローブセット)

(top20)

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_MF_5	GO:0008270-zinc ion binding	81	11.04%	5.31E-04
GOTERM_CC_5	GO:0046658-anchored to plasma membrane	5	0.68%	6.16E-04
GOTERM_CC_5	GO:0031225-anchored to membrane	5	0.68%	6.16E-04
GOTERM_CC_5	GO:0005737-cytoplasm	188	25.34%	1.82E-03
GOTERM_MF_5	GO:0048503-GPI anchor binding	11	1.50%	2.01E-03
GOTERM_BP_5	GO:0030029-actin filament-based process	14	1.91%	2.33E-03
GOTERM_MF_5	GO:0030145-manganese ion binding	10	1.36%	1.09E-02
GOTERM_BP_5	GO:0006464-protein modification process	56	7.63%	1.77E-02
GOTERM_CC_5	GO:0042598-vesicular fraction	11	1.60%	1.84E-02
GOTERM_CC_5	GO:0015629-actin cytoskeleton	13	1.77%	1.95E-02
GOTERM_BP_5	GO:0046328-regulation of JNK cascade	4	0.54%	2.18E-02
GOTERM_BP_5	GO:0031325-positive regulation of cellular metabolic process	19	2.59%	2.31E-02
GOTERM_BP_5	GO:0045941-positive regulation of transcription	16	2.18%	2.41E-02
GOTERM_MF_5	GO:0008235-metalloexopeptidase activity	6	0.82%	2.63E-02
GOTERM_CC_5	GO:0044445-cytosolic part	8	1.09%	2.76E-02
GOTERM_CC_5	GO:0005829-cytosol	20	2.72%	2.87E-02
GOTERM_BP_5	GO:0045935-positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	16	2.18%	2.92E-02
GOTERM_BP_5	GO:0016197-endosome transport	4	0.54%	2.99E-02
GOTERM_CC_5	GO:0005911-intercellular junction	10	1.36%	3.61E-02
GOTERM_CC_5	GO:0005792-microsome	10	1.36%	3.73E-02

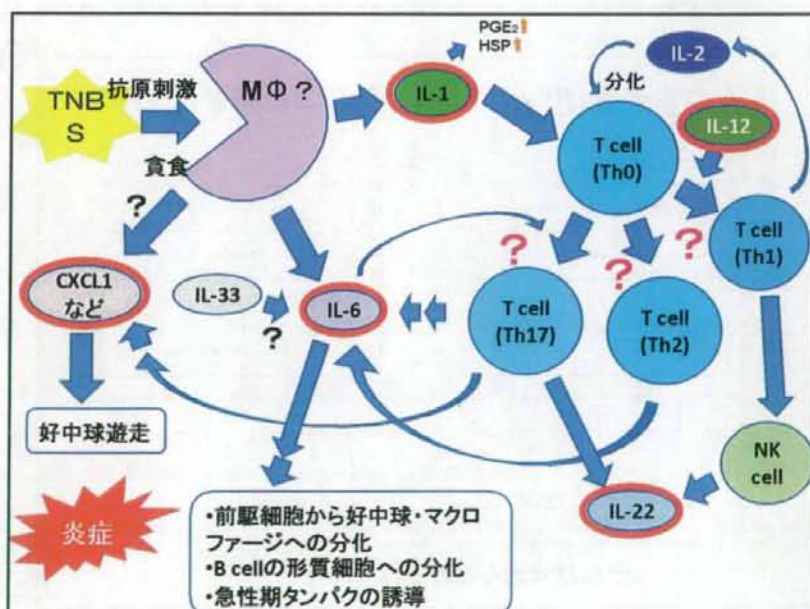
両系統ともTNBSで2倍以上発現変動したプローブセットの
Gene Ontology (717プローブセット)

(top20)

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_BP_5	GO:0009887-organ morphogenesis	40	6.26%	2.26E-08
GOTERM_BP_5	GO:0001526-angiogenesis	20	3.12%	4.03E-08
GOTERM_BP_5	GO:0001568-blood vessel development	24	3.75%	6.95E-08
GOTERM_BP_5	GO:0001944-vasculature development	24	3.76%	8.87E-08
GOTERM_BP_5	GO:0048514-blood vessel morphogenesis	22	3.44%	9.81E-08
GOTERM_MF_5	GO:0008201-heparin binding	12	1.88%	4.23E-07
GOTERM_MF_5	GO:0008009-chemokine activity	10	1.56%	4.66E-07
GOTERM_MF_5	GO:0042379-chemokine receptor binding	10	1.56%	5.87E-07
GOTERM_BP_5	GO:0006835-chemotaxis	16	2.34%	2.80E-06
GOTERM_BP_5	GO:0030334-regulation of cell migration	10	1.56%	5.82E-05
GOTERM_CC_5	GO:0005737-cytoplasm	184	28.75%	1.31E-04
GOTERM_BP_5	GO:0015698-inorganic anion transport	15	2.34%	1.55E-04
GOTERM_CC_5	GO:0015629-actin cytoskeleton	17	2.66%	2.27E-04
GOTERM_BP_5	GO:0007167-enzyme linked receptor protein signaling pathway	21	3.28%	2.46E-04
GOTERM_BP_5	GO:0006820-anion transport	16	2.50%	2.82E-04
GOTERM_BP_5	GO:0009888-tissue development	21	3.28%	2.93E-04
GOTERM_BP_5	GO:0007507-heart development	15	2.34%	4.39E-04
GOTERM_BP_5	GO:0048729-tissue morphogenesis	10	1.56%	4.72E-04
GOTERM_BP_5	GO:0009913-epidermal cell differentiation	7	1.09%	6.55E-04
GOTERM_BP_5	GO:0008544-epidermis development	11	1.72%	7.10E-04

(各系統ごとに行った結果も類似している)

Affy_ID	Gene_Title	Gene_Symbol	C57BL/6 control	C57BL/6 treated	BALB/c control	BALB/c treated	C57BL/6 T/C	BALB/c T/C
1448766_at	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100a9	0.017	2.081	0.011	4.118	122.25	365.88
1417487_at	fos-like antigen 1	Fosl1	0.125	4.573	0.025	3.957	36.61	158.87
1419561_at	chemokine (C-C motif) ligand 3	Ccl3	0.004	0.280	0.004	0.824	65.49	157.82
1449984_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Cxcl2	0.020	2.303	0.048	6.450	117.49	135.04
1425124_at	ring finger protein 183	Rnf183	0.009	0.831	0.008	0.933	96.68	115.08
1484713_s_at	histidine decarboxylase	Hdc	0.017	0.217	0.004	0.427	12.92	94.95
1427700_x_at	keratin 6A	Krt6a	0.008	0.864	0.013	1.100	101.64	86.48
1419394_s_at	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin A)	S100a8	0.054	1.536	0.028	2.158	28.35	77.57
1458498_at	---	---	0.013	0.456	0.008	0.409	35.95	54.40
1428781_at	dermokine	Dmkn	0.072	0.200	0.025	1.322	2.79	52.73
1419721_at	G protein-coupled receptor 109A	Gpr109a	0.020	0.163	0.005	0.236	8.11	59.51
1422240_s_at	small proline-rich protein 2H	Sprp2h	0.016	2.548	0.029	1.402	156.99	48.66
1417488_at	fos-like antigen 1	Fosl1	0.024	1.099	0.016	0.777	46.85	47.94
1418687_at	activity regulated cytoskeletal-associated protein	Arc	0.012	0.832	0.011	0.454	43.49	40.98
1448881_at	haemoglobin	Hb	0.006	0.165	0.006	0.219	26.00	39.80
1448239_at	heme oxygenase (decycling) 1	Hmox1	0.084	3.289	0.094	3.505	38.94	37.26
1420331_at	C-type lectin domain family 4, member e	Clec4e	0.042	0.105	0.005	0.175	2.49	33.37
1427381_at	immunoresponsive gene 1	Irg1	0.006	0.329	0.013	0.418	50.99	31.16
1420330_at	C-type lectin domain family 4, member e	Clec4e	0.020	0.444	0.018	0.571	22.18	29.34
1452521_s_at	plasminogen activator, urokinase receptor	Plaur	0.241	6.647	0.263	7.515	27.59	28.98
1438148_at	chemokine (C-C motif) ligand 3	Ccl3	0.014	0.081	0.010	0.283	5.69	28.31
1419209_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	0.047	0.433	0.125	3.453	9.18	27.55
1450297_at	interleukin 6	Il6	0.026	0.122	0.013	0.335	4.67	25.81
1427751_s_at	keratin 36	Krt36	0.117	2.957	0.387	7.769	21.82	20.07
1422784_at	keratin 6A	Krt6a	0.108	1.708	0.107	2.101	15.80	19.58
1448389_s_at	interleukin 1 beta	Il1b	0.186	2.395	0.230	4.478	12.19	19.48
1457844_s_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	0.101	0.486	0.203	3.937	4.81	19.35
1422783_s_at	keratin 6A	Krt6a	0.133	1.286	0.085	1.408	9.70	16.66
1419082_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2	Serpib2	0.004	0.116	0.003	0.057	32.80	16.59
1421041_s_at	glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya) // glutathion	Gsta1 // G	1.059	8.288	0.777	12.954	7.80	16.55



DSS腸炎モデル

方法

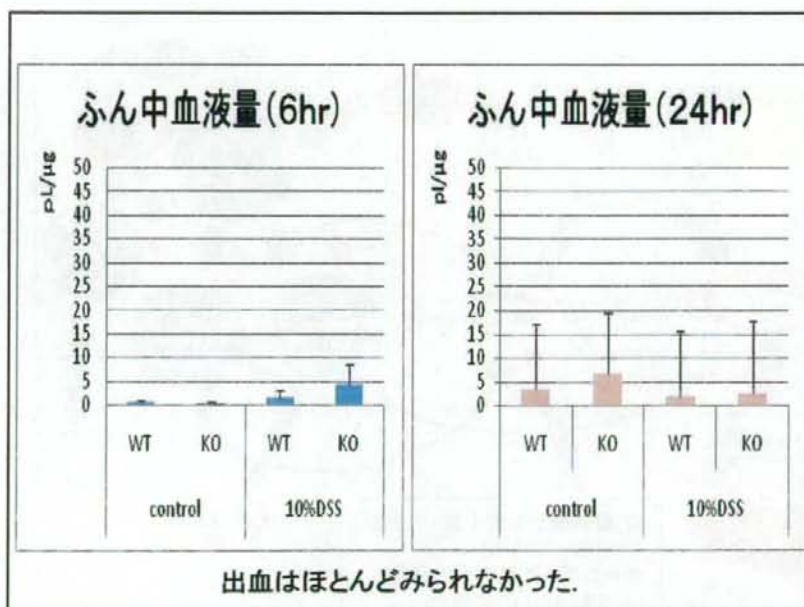
動物: ASK1 KOまたは野生型マウス(C57BL/6J) ♂ 7週齢

投与: 10% DSS in water 0.1 mlをTNBSモデルと同様に単回直腸内投与

サンプリング: 投与6時間後または24時間後に便を採取してから解剖し直腸を摘出。PBSで洗浄後、スパーテルで粘膜をしごき出して採取し、RNA laterに浸漬

遺伝子発現解析: GeneChip Mouse Genome 430 2.0使用 1匹/Chip, n=3. 解析はTNBSと同様.

便潜血検査: 採取した便を凍結乾燥させ、一定乾重量のサンプルを使用してヘモグロビンに対する抗体でwestern blot, densitometryで定量.



DSS投与6時間後に1.5倍以上変動したプローブセットの
Gene ontology (WT)

(top20)

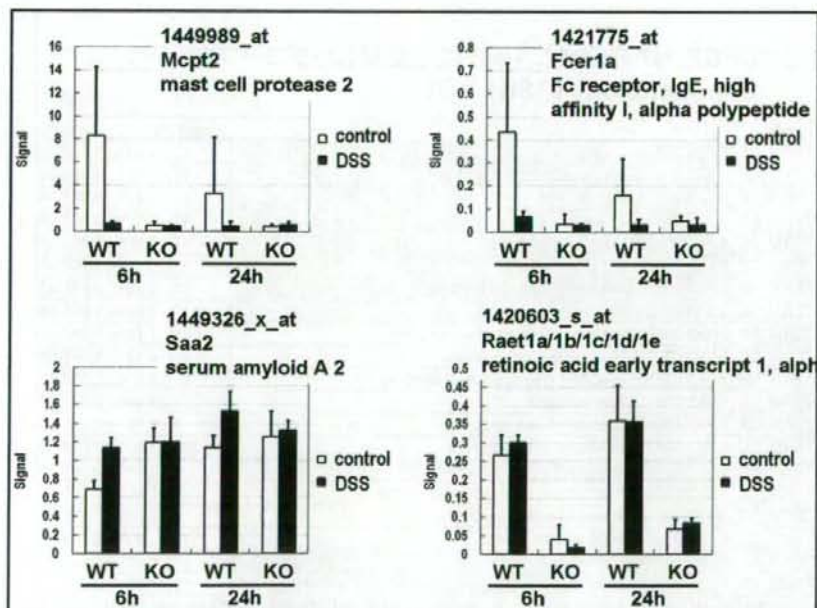
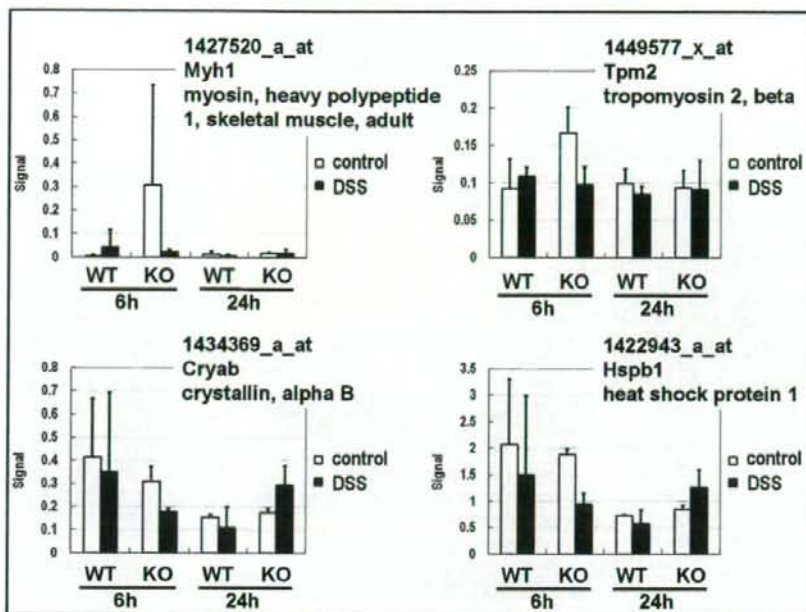
Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_BP_5	GO:0002626-acute inflammatory response	12	1.60%	2.57E-06
GOTERM_BP_5	GO:0009887-organ morphogenesis	33	4.41%	8.28E-06
GOTERM_CC_5	GO:0009897-external side of plasma membrane	16	2.01%	1.41E-04
GOTERM_BP_5	GO:0002449-lymphocyte mediated immunity	12	1.60%	1.62E-04
GOTERM_BP_5	GO:0050776-regulation of immune response	13	1.74%	2.80E-04
GOTERM_BP_5	GO:0050778-positive regulation of immune response	12	1.60%	3.21E-04
GOTERM_BP_5	GO:0002684-positive regulation of immune system process	12	1.60%	3.76E-04
GOTERM_BP_5	GO:0019724-B cell mediated immunity	10	1.34%	4.03E-04
GOTERM_MF_5	GO:0050381-unspecific monooxygenase activity	7	0.94%	6.26E-04
GOTERM_CC_5	GO:0005792-microsome	14	1.87%	9.62E-04
GOTERM_CC_5	GO:0042698-vesicular fraction	14	1.87%	1.27E-03
GOTERM_BP_5	GO:0008219-cell death	37	4.95%	1.35E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006956-complement activation, classical pathway	6	0.80%	1.40E-03
GOTERM_MF_5	GO:0005606-iron ion binding	21	2.81%	2.39E-03
GOTERM_BP_5	GO:0042231-interleukin-13 biosynthetic process	3	0.40%	2.52E-03
GOTERM_BP_5	GO:000904-cellular morphogenesis during differentiation	15	2.01%	2.80E-03
GOTERM_BP_5	GO:0002253-activation of immune response	9	1.20%	3.17E-03
GOTERM_BP_5	GO:0000902-cell morphogenesis	28	3.74%	3.82E-03
GOTERM_BP_5	GO:0050767-regulation of neurogenesis	7	0.94%	4.38E-03
GOTERM_BP_5	GO:0042981-regulation of apoptosis	25	3.34%	4.73E-03

DSS投与6時間後に1.5倍以上変動したプローブセットの
Gene ontology (ASK1 KO)

(top20)

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_CC_5	GO:0030017-sarcomers	17	1.69%	1.19E-08
GOTERM_CC_5	GO:0044449-contractile fiber part	17	1.69%	2.28E-08
GOTERM_CC_5	GO:0030016-myofibril	17	1.69%	6.29E-08
GOTERM_CC_5	GO:0031674-I band	12	1.20%	7.90E-08
GOTERM_CC_5	GO:0043292-contractile fiber	17	1.69%	1.10E-07
GOTERM_CC_5	GO:0030018-Z disc	11	1.10%	1.66E-07
GOTERM_BP_5	GO:0007517-muscle development	26	2.49%	5.51E-07
GOTERM_CC_5	GO:0015629-actin cytoskeleton	27	2.59%	1.04E-06
GOTERM_BP_5	GO:0002626-acute inflammatory response	15	1.49%	5.36E-06
GOTERM_BP_5	GO:0009887-organ morphogenesis	45	4.48%	6.02E-06
GOTERM_MF_5	GO:0032659-adenyl ribonucleotide binding	87	8.67%	5.78E-06
GOTERM_CC_5	GO:0005737-cytoplasm	276	27.49%	7.35E-05
GOTERM_BP_5	GO:0006953-acute-phase response	8	0.80%	8.11E-05
GOTERM_CC_5	GO:0043229-intracellular organelle	361	34.96%	8.77E-05
GOTERM_BP_5	GO:0006939-smooth muscle contraction	8	0.80%	2.08E-04
GOTERM_CC_5	GO:0046658-anchored to plasma membrane	6	0.60%	2.36E-04
GOTERM_CC_5	GO:0031225-anchored to membrane	6	0.60%	2.36E-04
GOTERM_CC_5	GO:0044444-cytoplasmic part	173	17.23%	4.32E-04
GOTERM_CC_5	GO:0005856-cytoskeleton	61	6.08%	5.14E-04
GOTERM_BP_5	GO:0014706-striated muscle development	16	1.59%	5.30E-04

24hでもWT,KOとも似た傾向だが、増殖や血管新生にかかわるGO termが増加



大腸粘膜細胞初代培養系の構築

方法

C57BL/6マウスの直腸を摘出し、アムホテシリンBを含むHBSバッファーで数回洗浄



5分ごとにボルテックスをしながらコラゲナーゼ、ディスパーゼ中で37°C, 40~50分インキュベート



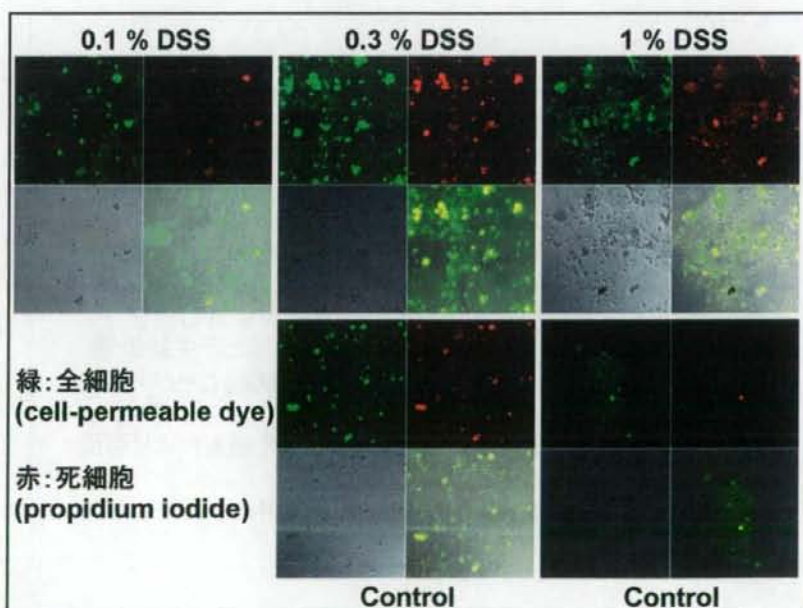
ナイロンメッシュを通し、3回洗浄してクリプト細胞を回収後、マトリゲルコートしたチャンバースライド上で培養



2日後に0.1, 0.3, または1% DSSを含む培地に交換



2日後にLive-Dead cell staining kit (Biovision)を用いて生死を判定



ま と め

1. 大腸粘膜において、BALB/cはC57BL/6よりもcontrol群においても免疫関連遺伝子の発現が高く、TNBS腸炎重篤度の差に関連すると考えられた。また両系統ともTNBS投与により炎症性サイトカインやケモカインなどの免疫関連遺伝子や血管新生に関与する遺伝子などの発現変動がみられた。
2. ASK1欠損マウスの大腸粘膜において、免疫系に関連する一部の遺伝子発現に野生型と差がみられた。またDSSの直腸内投与により、フェノタイプの表れていない初期段階においても一部遺伝子発現変動がみられたが、更なる検討が必要であった。
3. 大腸粘膜の*in vitro*モデルとして初代培養系を構築した。未だコンタミ防止、生存率向上が課題である。

結 語

本分担課題ではASK1欠損マウスを用いて大腸粘膜の遺伝子発現を網羅的に解析することにより、消化管粘膜毒性の発現機序を明らかにすることを目的とした。

そのためにTNBS腸炎モデル、DSS腸炎モデル、*in vitro*モデルについて検討し、TNBSモデルではマウスの系統により症状が異なることから系統間比較を行ったところ、免疫系の遺伝子発現に差のあることがわかった。またASK1欠損と野生型の間でも免疫系に関連する一部遺伝子の発現が異なることがわかったが、フェノタイプとの相関までは明らかにできていない。*In vitro*モデルについては課題が残ったが、更なる検討により利用可能という感触は得ている。

本研究により、炎症性腸炎の複雑な機序解明の一端をつかむことができた。

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

T細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究

研究分担者 北川 昌伸

東京医科歯科大学・歯学部総合研究科・包括病理学分野・教授

研究要旨

T細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムを解析することを目的として、細胞に著明なアポトーシスを誘導することが知られているドキシソルピシン投与マウスの胸腺および脾における遺伝子発現プロファイルの変化を経時的に解析した。投与によって有意な発現変化を示す遺伝子、感染に関わる遺伝子リストを作製し、網羅的に検討した。また、フレンド白血病ウイルスを用いてウイルス感染に対する胸腺・脾の宿主反応についても検討を開始した。

A. 研究目的

ウイルス感染に対する感受性を左右する薬剤について、宿主細胞(とくに胸腺や脾臓などの免疫系臓器)に及ぼす影響を網羅的に解析する。今回は各種細胞にアポトーシスを誘導することが知られているドキシソルピシンの投与による変化を観察した。

B. 研究方法

【マウス、細菌、薬剤】

- ・ C57BL/6 マウス、C3H マウス: 6 週齢 ♂を搬入し、8 週齢で実験を行った。
- ・ フレンド白血病ウイルス: 腹腔内接種した。
- ・ ドキシソルピシン処理: 1.5 or 15 mg/mouse を腹腔内投与した。

【実験プロトコール】

- ・ 経過観察群: ウイルス接種(+)および(-) → 経過観察
- ・ sacrifice 群: ウイルス接種(+)および(-)マウスに薬剤投与 → 1 hr, 6 hr, あるいは 24 hr 後にマウスを sacrifice し、胸腺および脾臓

を採取

- ・ Percellome 解析手順ののち、DNA あるいは RNA を調整し、dose dependency および時間経過の上から本班で開発された解析ソフトを用いて遺伝子発現プロファイルを作製した。

(倫理面への配慮)

動物実験はすべて東京医科歯科大学実験動物委員会の定める倫理基準に準拠して行うものとし、同委員会に申請して承認された方法(承認番号 0050015)ののちで行う。

C. 研究結果

1. ドキシソルピシン投与によっていくつかの遺伝子群の発現変化が認められた。
2. ウイルス感染との関連、宿主遺伝的背景の影響を含めてさらに詳細な解析を行っている。

D. 考察

免疫機能に影響を及ぼす薬剤を用いて、胸腺細胞の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析

し、シグナル伝達系への影響をパターン化できた。感染時はさらに複雑化すると予想されるが、その制御に向けての端緒となる。

ドキシソルピシンの影響をどのような機能群でとらえることができるか遺伝子発現プロファイルのパターンの上から分類し、in silico での解析も加えて、ウイルス感染に対する感受性の増強に寄与する因子を検討する系を構築したい。

E. 結論

薬剤の胸腺毒性のパターンとウイルス感染に対する宿主反応について Percellome による遺伝子発現解析を行い、有意義な結果を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

【原著論文】

Hasegawa M, Kurata M, Yamamoto K, Yoshida K, Aizawa S, Kitagawa M. A novel role for acinus and MCM2 as host-specific signaling enhancers of DNA-damage-induced apoptosis in association with viral protein gp70. *Leukemia Res*, 2009 in press.

Akashi T, Takemura T, Ando N, Eishi Y, Kitagawa M, Takizawa T, Koike M, Igari T, Kawachi H, Kobayashi D, Ito T, Kumagai J, Tanabe H, Ito T, Tamahashi U, Tsugata M, Chiba T, Hirooka S, Endo T, Kurata M, Yamamoto K, Warabi M, Tsunemi A, Kuroiwa T, Kayamori K, Sakamoto K, Ohtani Y, Miyazaki Y, Inase N, Yoshizawa Y. Analysis of sixteen cases of chronic hypersensitivity pneumonitis and comparison with idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia. *Am J Clin Pathol*, 2009 in press.

Konstantinou K, Yamamoto K, Ishibashi F, Mizoguchi Y, Kurata M, Sawabe M, Nakagawa Y, Suzuki K, Crawley JT, Kitagawa M. Angiogenic mediators of angiopoietin system are highly

expressed by CD10-positive lymphoma cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 2009 in press.

Hirokawa K, Utsuyama M, Ishikawa T, Kikuchi Y, Kitagawa M, Fujii Y, Nariuchi H, Uetake H, Sugihara K. Decline of T cell-related immune functions in cancer patients and an attempt to restore them through infusion of activated autologous T cells. *Mech Ageing Dev* 130:86-91, 2009.

Matsumoto T, Kumagai J, Hasegawa M, Ohno K, Mizusawa H, Kitagawa M, Eishi Y. Expression patterns of metalloproteinase in primary central nervous system lymphoma differs from those in nodal lymphoma. *Neuropathology* 28:277-285, 2008.

Chiba T, Shinozaki S, Nakazawa T, Kawakami A, Ai M, Kaneko E, Kitagawa M, Kondo K, Chait A, Shimokado K. Leptin deficiency suppresses progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 196:68-75, 2008.

Kurata M, Nakagawa Y, Yamamoto K, Suzuki K, Kitagawa M. Induction of integrin α_1 expression in bone marrow cells after chemotherapy correlates with the overexpression of lung resistance protein (LRP) and poor outcome in patients with multiple myeloma. *Am J Hematol* 83:755-757, 2008.

Shiraishi J, Nakagawa Y, Kurata M, Yamamoto K, Abe Y, Toyoda Y, Suzuki K, Kitagawa M, Takemura T. Follicular lymphoma with marked infiltration of eosinophils. *Pathol Int* 58:701-705, 2008.

【総説・著書】

Hirokawa K, Utsuyama M, Kikuchi Y, Kitagawa M. Proper assessment and restoration of immunological function for the improvement of QOL and elongation of healthy lifespan in the elderly. In *The Impact of Ageing* edited by Sinigoj G et al., pp363-372, 2008.

Kitagawa M, Hirokawa K. Aging, cancer and apoptosis in animal models and clinical settings. In *Handbook on Immunosenescence: basic understanding and clinical applications*. Springer, Fulop T et al. Eds. pp1165-1188, 2008.

Utsuyama M, Kikuchi Y, Kitagawa M, Hirokawa K. Age-related changes in subpopulations of peripheral blood lymphocytes in healthy Japanese population. In *Handbook on Immunosenescence: basic understanding and clinical applications*. Springer, Fulop T et al. Eds. pp203-218, 2008.

Hirokawa K, Utsuyama M, Kikuchi Y, Kitagawa M. Assessment of age-related decline of immunological function and possible methods for immunological restoration in elderly. In *Handbook on Immunosenescence: basic understanding and clinical applications*. Springer, Fulop T et al. Eds. pp1547-1570, 2008.

2. 学会発表

Terashima K, Mochimaru Y, Watanabe K, Matsumoto I, Kitagawa M, Yamamoto N, Shimizu N. A higher concentration of GM1-ganglioside and prion in follicular dendritic cells, FDC. The 27th International Congress of the International Academy of Pathology, ICP, Athens, October 12-17, 2008.

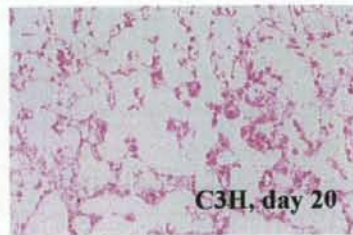
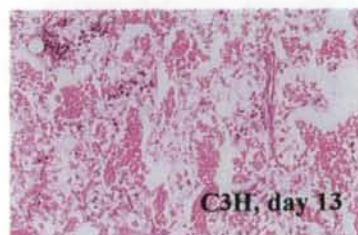
G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

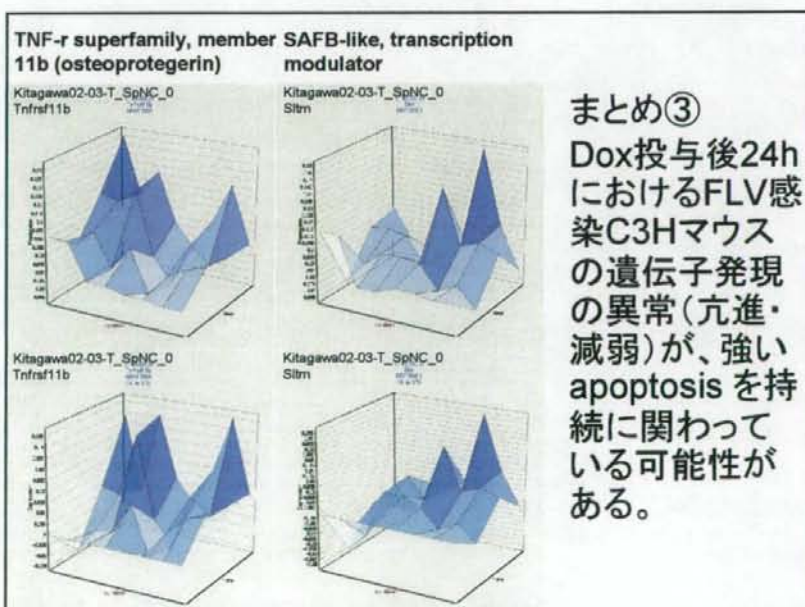
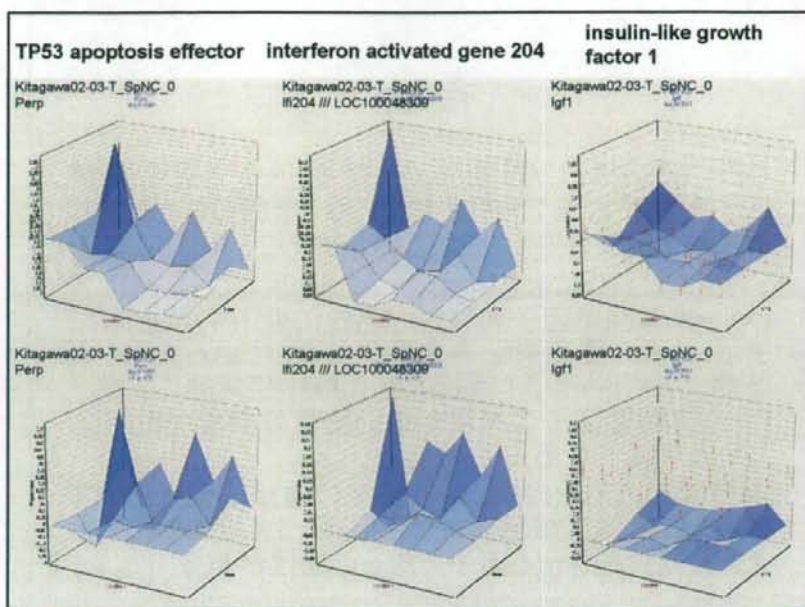
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

まとめ②

- コントロールにおける遺伝子の発現量は、B6に比べてC3Hマウスにて高く、FLV感染(+)のほうが(-)に比べ高い。
- Dox処理したC3Hマウスは一過性に発現量が低下し(1h)、その後再上昇するも、発現の変化に乏しい。
- Dox処理したC3Hマウスの遺伝子発現量が時間経過とともに低下するものもみられる。
- B6マウスと同様の遺伝子発現の濃度依存性のピークを認めるものの、ピークの発現量の変化は相対的に軽度。
- B6でみられた発現のピークがほとんど消失するものもある。
- これらの変化はアポトーシス促進/抑制因子に関わらず、アポトーシス関連遺伝子における一定の傾向としてみられる。

FLV 感染C3Hマウスにアポトーシスの持続に関わる可能性のある遺伝子の検索





考察

- C3HマウスはFLV感染により、アポトーシス促進/抑制因子が高い状態で維持されている。細胞のsurvivalにおける不安定性をもたらしていると考えられる。
- ドキソルビシンによるアポトーシス誘導にて、早期にアポトーシス関連因子発現が一過性に低下する現象は、アポトーシス関連遺伝子発現が亢進している細胞が即時的にアポトーシスに陥ることにより、相対的にアポトーシス関連因子の発現が低い細胞の割合が増加している可能性がある。
- 24時間後のFLV感染C3Hマウスの遺伝子発現の異常は、in vivoの実験結果と照らし合わせるとアポトーシスを長期持続させる因子である可能性がある。

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

中枢神経系に作用する薬物の骨代謝への影響に関する研究

研究分担者 池田 通
長崎大学大学院・歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

臨床で日常的に用いられている中枢神経系に作用する薬物のうち、alprazolam がヒトの骨代謝に及ぼす影響をラット及びマウスへの連続経口投与実験で確かめた。19年度までに、alprazolam を投与したラットで骨折治癒での仮骨形成促進が約 25%の頻度で確認された。そこでさらに、薬物投与マウスの大腿骨に直径 1.2 mm の骨孔を開け、同部が治癒する過程での遺伝子発現を解析する目的で、術後 7 日目の治癒骨組織を用いてジーンチップ解析を行った。その結果、体内のリン代謝調節で重要な役割を担う DMP1 遺伝子の上昇を確認した。

A. 研究目的

骨代謝調節の分子機構は、破骨細胞形性因子である Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand (RANKL) の発見によって急速に明らかになりつつある。骨芽細胞が産生する RANKL を、その受容体である RANK を有する破骨細胞前駆細胞が受けることによって多核巨細胞である破骨細胞へと分化し、さらに活性化する。また、RANK と同様に RANKL と結合することができる分子 osteoprotegerin (OPG) が知られており、OPG は可溶性蛋白として細胞から遊離しているため RANKL と結合してもその情報を細胞に伝えないことから、RANKL による破骨細胞形成を阻害する役割を担っている。骨代謝がこうした分子の相互作用によって調節されていることが明らかになった上、ビスフォスホネート製剤の臨床応用によって薬物による骨代謝のコントロールがかなり可能となってきた。しかしながら、副作用の問題も出始めている上、高齢社会において骨粗鬆症患者が今後激増することが予想される我が国においては、さらなる研究が望まれる。

そのような状況の中、視床下部に作用して摂食抑制作用や性腺調節機能等を有する leptin が、交感神経刺激を介して骨芽細胞表面にある adrenergic α_2 受容体に間接的に作用して骨芽細胞の増殖を抑制することが明らかにされ、中枢神経系の骨代謝調節機能が存在することがわかってきた (Cell 111, 305-317, 2002)。その後、leptin

が circadian rhythm を制御する遺伝子の一つである clock 遺伝子を介して骨芽細胞の増殖に影響を及ぼすこと (Cell 122, 803-815, 2005) や、摂食抑制作用のある神経ペプチドである neuromedin U に骨芽細胞増殖抑制作用があることが示され (Nature Medicine 13, 1234-1240, 2007)、中枢神経系による骨芽細胞増殖調節機構の研究にも新たな展開が見えてきた。

一方、骨吸収をつかさどる破骨細胞に対しては、大麻の薬効成分である cannabinoid の受容体を經由したシグナルが破骨細胞形成に重要な影響を与えているという報告がなされ (Nature Medicine 11, 774-779, 2005)、破骨細胞に cannabinoid 受容体が存在することが示されるとともに、leptin によって発現が制御される神経ペプチドである cocaine amphetamine regulated transcript が破骨細胞形成に影響を及ぼすことが示唆され (Nature 434, 514-520, 2005)、中枢神経系に骨代謝全体を制御する機構が存在することがほぼ明らかとなった。

人体への作用で上記に関連があると思われる過去の報告を調べると、報告は少ない上結果にもばらつきがあるものの、中枢神経系に作用する薬物が骨代謝に影響を及ぼすことを示唆する論文がいくつか出されており、日常の臨床で使用されている中枢神経系に作用する薬物にも、直接または間接的に骨組織に作用して骨代謝に介入しているものが存在することが強く疑われる。さらに、

中枢神経系に作用する薬物の投与を受けていた患者で受傷後に過剰な仮骨形成が認められた複数の自験例があったため調査した結果、ベンゾジアゼピン系の alprazolam、チエノジアゼピン系の etizolam、ベンズアミド系の sulpiride 等が関与している可能性が疑われた。またこれらの薬物が骨代謝に影響を及ぼすことを示唆する臨床論文もあった (Epilepsy and Behavior 5, S24-S29, 2004; Pharmacological Research 50, 93-97, 2004; Archives of Internal Medicine 164, 1567-1572, 2004)。これらの薬物の骨代謝への副作用はまだ問題視されていないが、ある期間連続投与される可能性が高い薬物でもあり、患者に無視できない影響を及ぼしている可能性がある。また、これらの薬物が leptin に対してどのように作用するか未だ報告がない上、leptin による交感神経を介した骨代謝調節機構も未だ全容は研究過程にあって不明な点が多く、今後早急に研究が進展して行くと予想される。本研究では、臨床で日常的に用いられているこうした薬物を動物に連続投与する実験を通して、その骨代謝への作用機序を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

平成 19 年度までに仮骨形成促進作用があると判断された alprazolam [ベンゾジアゼピン系] (30・g, 120・g/kg) 及び sodium valproate [パルプロ酸ナトリウム系] (20mg, 80mg/kg) の各薬物を 0.5% メチルセルロース水溶液に懸濁したものを所定濃度になるように蒸留水に希釈し (メチルセルロースの最終濃度はいずれも 0.005% になるよう統一)、生後 8 週齢メス Wistar 系ラット (1 群 8 匹) に、ゾンデにより連日経口投与する実験を行った。投与量は一般的な人体への投与量を各動物の体重に換算したものを基準とし、その他に 4 倍量 (人体における 1 日投与量の極量) を投与量として設定した。また対照として、薬物を除いて同様に調製したものを連続経口投与した。その結果、alprazolam 投与ラットの骨折治癒部において対照と比較して軟骨組織の形成を伴う過剰な仮骨形成を約 25% の出現頻度で認めた。また、組織解析により外骨膜側の隆起の他、内骨膜側 (骨髄側) での軟骨の形成促進を認めた。

これらの結果を受け、生後 5 週齢の C57BL/6 マウスに alprazolam 120・g/kg とするよう連日ゾンデにて経胃管投与を行った。

投与 7 日目に左大腿骨骨幹部に歯科用ラウンドバーにて直径 1.2mm の骨孔を開けた後、創部

を縫合、閉鎖した。術翌日より 7 日間引き続き alprazolam を連日投与し、大腿骨の骨孔治癒部位の検体を採取した。検体採取に際し、周囲の軟骨組織と骨髄組織は可及的に除去した。採取した検体は大部分骨組織からなるため、液体窒素で凍結した状態でハンドミルにより粉碎し、粉碎材料を RNA later 液に浸漬し、ジーンチップ解析に供した。

さらに、alprazolam の骨組織細胞への直接作用を確認するために、骨芽細胞前駆細胞を含んでいる骨髄間葉系細胞を 5 週齢マウス大腿骨及び脛骨から採取し、10% FCS を含む α -MEM 培養液で培養、増殖させ、少量のエタノールで溶解した alprazolam を α -MEM 培養液で希釈した後、 $1 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-6}M$, $1 \times 10^{-7}M$ の各濃度になるように細胞に添加し、24 時間後に細胞を採取、RNA を抽出後、骨芽細胞の分化マーカーである osteocalcin, Runx2, alkaline phosphatase (ALP) の各遺伝子発現の変化を定量的 PCR 法で解析した。対照として alprazolam を含まない上記の希釈溶液を同量同様に添加した。定量的 PCR は、Mx3005P QPCR System (Stratagene) と蛍光標識プライマー Runx2: Mm00501580_m1, Alkaline phosphatase (ALP): Mm00475834_m1, Osteocalcin: Mm03413826_mH, Gapdh: Mm99999915_g1 (Applied Biosystems, CA) を用いて行った。

C. 研究結果

【一般所見】

薬物を投与したことによる急性毒性、顕著な行動変化等は認められなかった。また、骨折手術創の治癒経過の肉眼所見に薬物投与による差は認められなかった。

【ジーンチップ解析】

骨組織の破碎後 RNA の分解が比較的少なかった 4 検体 (薬物投与群 2 検体、対照群 2 検体) についてジーンチップ解析が行われた。検体採取時の混入によると強く疑われる筋肉組織由来の遺伝子群及び骨髄細胞由来遺伝子群を除いた遺伝子を解析した結果、発現上昇を認める遺伝子として Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) が検出された。

【培養細胞実験】

骨髄間葉系細胞に alprazolam をいずれの濃度に添加しても、骨芽細胞の分化マーカーである

osteocalcin, Runx2 及び ALP の発現に変化は見られなかった。

D. 考察

今回の実験で使用した薬物 alprazolam が骨代謝に影響を及ぼすことを示唆する報告は少数見られる。いずれも人における長期投与例で骨量の減少が認められたという単発的な報告にとどまり、これらの薬物が骨代謝にどのように影響を及ぼしているかについての詳細は全く不明である。

今回の動物実験では一部の薬物投与動物における骨折部位の仮骨形成亢進及び、ほとんどの薬物投与動物における皮質骨の肥厚反応が確認された(18年度、19年度)。さらに組織所見を詳細に検討した結果、外骨膜側の膜性骨化による肥厚に加え、内骨膜側には軟骨組織の添加による肥厚が認められた。このことは、alprazolam が軟骨内骨化及び膜性骨化とともに影響を及ぼすことが示唆され、また、骨折等の何らかの刺激に対して骨芽細胞のみならず軟骨細胞に強く影響を及ぼすことが示唆された。しかも、このような変化は骨折治癒部位にのみ認められたので、成熟骨組織に存在する骨芽細胞、骨細胞、軟骨細胞及び破骨細胞には直接影響を及ぼすことはなく骨組織が形成され、成熟する過程でその増殖または分化・成熟に影響を及ぼしていることが考えられた。

現在注目されている leptin による骨芽細胞増殖調節機構は、骨芽細胞の分化には直接影響がないと考えられている(Cell 111, 305-317, 2002)。また、詳細は不明であるものの、軟骨内骨化をきたす海綿骨部位と膜性骨化をきたす皮質骨部位に leptin の影響による差はなく、leptin が骨組織全体に均等に影響を及ぼすことが疑われている(Nature Medicine 13, 1234-1240, 2007)。本研究で alprazolam の投与によっても大腿骨の骨芽細胞の分化マーカーにならな変化が見られなかった(19年度)。また、マウス骨髄由来間葉系細胞に alprazolam を添加しても骨芽細胞の分化マーカーである osteocalcin, Runx2, ALP の発現に変化が見られなかったことから、alprazolam が骨芽細胞の分化には直接関与していないことが示唆された。

Alprazolam の投与によって仮骨形成が促進されるという今回の動物実験結果は、この薬物投与を受けた患者の骨量が減少するという人における過去の報告とは異なるが、人におけるこれまでの

報告は骨折治癒や成長期の骨組織に関するものではなく、あくまでも成熟した骨組織への影響を見ているものであるため、本研究結果とは必ずしも矛盾しないと判断される。しかし、人においては通常1日3回経口投与されるこれらの薬物を、今回の動物実験では1日1回投与している点の違いが実験全体にどのような影響を及ぼしているか、投与期間の違いでどのような影響があるか等については今後検討する必要があると思われる。

ジーンチップ解析の結果 alprazolam 投与によって骨組織で発現上昇する遺伝子の有力な候補として DMP1 が見いだされた。DMP1 はラット切歯の cDNA ライブラリーから見つかった酸性リン酸化細胞外マトリックス蛋白であり、この遺伝子のノックアウトマウスではくる病及び骨軟化症が発症し(Nature Genetics 38:1310, 2006)、かつ、DMP1 は遺伝性の低リン酸血症性くる病の原因遺伝子であることが判明している(Nature Genetics 38:1248)。ノックアウトマウスの骨組織では著明な類骨の増加と石灰化障害、成長板軟骨の著明な増加、関節軟骨の肥大等くる病特有の所見が認められている。DMP1 は骨や歯の基質蛋白であり、類似した他のタンパク質、matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) や osteopontin 等とともに SIBLING (small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein) と呼ばれている。このうち、DMP1 と MEPE は cathepsin B によって分解され、分解産物が体内のリン代謝の中心的な調節因子として働いている Phex や FGF23 の機能や発現を調節していることがわかっており、さらなる解析が期待されている。MEPE はリンの排泄を促進する作用があると考えられており、MEPE のノックアウトマウスは骨量が増加して、石灰化も亢進すると報告されている。一方、MP1 の作用はノックアウトマウスの解析結果を考えると骨組織の石灰化機構に不可欠な因子であると思われ、MEPE との相互関係は明らかとされていないが、MEPE とは相反する作用を発揮していると考えられる。このことから、DMP1 の発現上昇は骨の石灰化や化骨に有利に働くことが疑われる。

本研究では alprazolam 投与により骨折部位の化骨の促進や軟骨組織の形成促進が認められたが、こうした組織反応にジーンチップ解析により検出された発現上昇遺伝子のひとつである DMP1 が関与している可能性は十分に考えられる。また、DMP1 は骨小腔内の骨細胞(osteocyte)で強く発現されることが知られているが、骨細胞で産生された DMP1 はそのまま骨基質として骨内に蓄えら

れ、これが破骨細胞による骨吸収で体液中に遊離してリン代謝に関与すると考えられる。我々は、このような基質蛋白が骨代謝調節に重要な影響を及ぼしていることから、人工のセラミックに蛋白を担持させ、組織反応を調べる実験系の確立も行った。新規に開発したカルシウム欠損型ハイドロキシアパタイト(HA)は骨内に移植すると骨形成を刺激するが(Biomaterials 29:2719-2728, 2008)、体液中の因子が HA に吸着することによって骨形成促進が起こる可能性が疑われる。このカルシウム欠損型 HA には酸性蛋白を選択的に吸着させる性質があり、体液中のどのような蛋白が吸着し、骨形成を促進するか現在検討中であるが、酸性基質蛋白で、かつ HA に吸着性がある DMP1 は有力候補の一つである。

Alprazolam 投与による化骨促進により創部は一過性に隆起するが、その後骨のリモデリングにより最終的には正常に治癒すると考えられる。従ってこの反応は、骨折部位の早期治癒には寄与しても何ら為害作用はないと思われ、本研究が DMP1 を介した骨代謝機構の解明に寄与する他、臨床的には骨折治癒促進薬の開発等にも役立つ重要な情報を提供していると考えられる。

E. 結論

中枢神経系に作用する薬物のうち、alprazolam は骨折部位の化骨を促進するが、正常骨組織には影響を及ぼさない。また、alprazolam は骨髄間葉系細胞の骨芽細胞への分化には直接関与しない。ジーンチップ解析から alprazolam 投与により DMP1 の発現が上昇することが示され、化骨促進作用が DMP1 を介したものであることが示唆される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuda, T., Ioku, K., Yonezawa, I., Minagi, H., Gonda, Y., Kawachi, G., Kamitakahara, M., Shibata, Y., Murayama, H., Kurosawa, H., and Ikeda, T.: The slow resorption with replacement by bone of a hydrothermally synthesized pure calcium-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials* 29:2719-2728, 2008.
- 2) Takahashi, T., Kamitakahara, M., Kawachi, G., and Ioku, K.: Preparation of spherical porous granules composed of rod-shaped hydroxyapatite and evaluation of their protein adsorption properties. *Key Eng. Mater.* 361-363:83-86, 2008.
- 3) Ioku, K., Kamitakahara, M., Kawachi, G., Gonda, Y., Okuda, T., Yonezawa, I., Kurosawa, H., and Ikeda, T.: Microstructure designing of porous β -tricalcium phosphate for control of reactions in the bone. *Key Eng. Mater.* 361-363:989-992, 2008.
- 4) Gonda, Y., Ioku, K., Okuda, T., Kawachi, G., Yonezawa, I., Kurosawa, H., and Ikeda, T.: Application of newly developed globular-shaped granules of beta-tricalcium phosphate for bone substitute. *Key Eng. Mater.* 361-363:1013-1016, 2008.
- 5) Gonda, Y., Ioku, K., Okuda, T., Shibata, Y., Kamitakahara, M., Kawachi, G., Yonezawa, I., Kurosawa, H., and Ikeda, T.: Osteoconductivity of hydrothermally synthesized beta-tricalcium phosphate composed of rod-shaped particles under mechanical unloading. *Key Eng. Mater.* 396-398:253-256, 2009.
- 6) Ioku, K., Kamitakahara, M., Watanabe, N., Kawaguchi, O., Murakami, S., and Ikeda, T.: Calcium phosphate porous materials with unique microstructures. *Key Eng. Mater.* 396-398:645-648, 2009.

2. 学会発表

- 1) 権田芳範、柴田恭明、井奥洪二、池田 通: 柱状粒子ハイドロキシアパタイト球状顆粒の骨組織への移植による吸収と骨伝導、第50回歯科基礎医学会総会、2008年9月23日～25日、東京。
- 2) Gonda, Y., Ioku, K., Okuda, T., Shibata, Y., Kamitakahara, M., Kawachi, G., Yonezawa, I., Kurosawa, H., and Ikeda, T.: Osteoconductivity of hydrothermally synthesized beta-tricalcium phosphate composed of rod-shaped particles under mechanical unloading. *Bioceramics* 21, Oct. 24-26, 2008, Buzios, Brazil.
- 3) Ioku, K., Kamitakahara, M., Watanabe, N., Kawaguchi, O., Murakami, S., and Ikeda, T.: Calcium phosphate porous materials with

unique microstructures. Bioceramics 21, Oct. 24-26, 2008, Buzios, Brazil.

- 4) 権田芳範、奥田貴俊、井奥洪二、柴田恭明、米澤郁徳、黒澤 尚、池田 通:柱状粒子 β -リン酸三カルシウム球状顆粒の不動化骨組織における吸収と骨伝導、第 26 回日本骨代謝学会学術集会、2008 年 10 月 29 日～31 日、大阪。

G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

中枢神経系に作用する薬物の 骨代謝への影響に関する研究

池田 通、権田芳範、柴田恭明
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科口腔病理学分野

【背景】

精神科に通院する患者の骨密度や骨折治癒に異常があることが多い傾向を感じている臨床医が少なからず存在し、投与薬物による副作用が疑われるが、世界的に見ても系統だった研究はほとんどなされていない。

そのような状況の中、視床下部に作用し、摂食抑制作用や性腺調節機能等を有するleptinが、交感神経刺激を介して骨芽細胞表面にあるadrenergic β 2受容体に作用して間接的に骨芽細胞の増殖を抑制することが明らかにされ、中枢神経系の骨代謝調節機能が存在することがわかってきた(Cell 111, 305-317, 2002)。