

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

抗酸菌感染症の研究・米側との専門協議

研究分担者	牧野 正彦	(国立感染症研究所・感染制御部・部長)
研究協力者	鈴木 定彦	(北海道大学・人獣共通リサーチセンター・ 国際疫学部門・教授)
	柴山 恵吾	(国立感染症研究所・細菌第二部・部長)
	田村 敏生	(国立感染症研究所・感染制御部・室長)
	松本 壮吉	(新潟大学大学院・細菌学・教授)
	慶長 直人	(結核研究所・生体防御部・部長)
	河村 伊久雄	(京都大学大学院・微生物感染症学・准教授)
	向井 徹	(国立感染症研究所・感染制御部・室長)
	宮本 友司	(国立感染症研究所・感染制御部・主任研究官)

研究要旨.

アジア諸国における結核及びハンセン病の制圧を目指して以下の研究を展開した。まず、ベトナム医療従事者の潜在結核感染状況と遺伝的マーカーの検討を行ったところ、IL-12 受容体 $\beta 2$ 鎖遺伝子 (*IL12RB2*) プロモーター領域の機能的遺伝的多型が潜在結核感染群と関連していた。ケニア共和国 Kwale 地区の小学生について結核菌抗原に対する T 細胞応答と寄生虫感染の関連を検討した結果、一部の寄生虫感染と結核菌抗原に対する T 細胞応答に逆相関を認めた。結核発症予防策に関して、長い間ワクチンとして用いられてきた *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) は、現在では成人及び高齢者の結核発症を予防できなく、改良型 BCG の開発が不可欠となっている。これまでの BCG 改良戦略に基づき、ライソゾームへの移行を容易とするウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に対して、BCG 菌由来の heat shock protein (HSP) 70、活動期に発現する結核菌由来の Cys0 及び抗酸菌に幅広く存在する major membrane protein (MMP)-II 遺伝子を連結・導入し新しく BCG-dHCM を産生した。BCG-dHCM は菌体外へ HSP70-Cys0-MMP-II 融合蛋白を分泌し、ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び未感作 CD8 陽性 T 細胞を活性化して大量の IFN- γ を産生した。さらに、C57BL/6 マウスに BCG-dHCM を接種すると、HSP70・Cys0・MMP-II さらには結核菌の細胞質蛋白による二次刺激に強く反応するメモリータイプの T 細胞を多クローン的にかつ効率的に産生した。また、追加免疫ワクチンの開発を目的として免疫学的検討を加えると、Th1 分化誘導環境下で CD4 T 細胞が産生する IL-17F は結核防御に必須の細胞障害性 T 細胞の分化に必要であった。一方、結核菌に特異的な Th1 細胞の分化調節には免疫抑制性シグナル PD-1 が重要な役割を果たすが、メモリー T 細胞機能の発現制御においては PD-1 の影響は少ないことが判明した。薬剤耐性菌に関して、ミャンマーで分離された 178 株の多剤耐性結核菌におけるリファンピシン (RIF) ならびにイソニアジド (INH) 耐性に係る遺伝子変異の種類と出現頻度を明らかにした。また、結核菌由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素の立体構造情報に基づいたインシリコスクリーニングにより選択した化合物の中から、本酵素の活性を阻害する化合

物を見出した。ハンセン病に関して、ハンセン病早期診断法開発に応用し得る新たな菌体成分の同定を目指し、患者血清のメタボロミクス解析を行った結果、ハンセン病患者の血清において特徴的な傾向が認められることが判明した。さらに、人工培地で培養不可能な菌の遺伝子診断を容易にするための LAMP 法による検出法開発を進めた。特殊濾紙を用いた臨床検体による検討で、PCR 法と同等もしくは遜色ない検出感度を示し、臨床応用が可能であることを示唆した。

A. 研究目的

結核は毎年 800 万人の新規患者を生み 200 万人の結核病死をもたらす。また、結核菌は全世界の 3 分の 1 の人に潜伏感染している。そこで、アジアの潜在結核感染状況を明らかにし、結核感染免疫病態に関わる遺伝的マーカーを探索する。同時に、結核蔓延地域では、寄生虫感染の蔓延が一般的であるため、これらが結核に与える影響を解析することを目的の一つとした。一方、結核の発症を確実に予防する方策の確立が急務となっている。結核に対するワクチンとして *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) が広く使用されてきたが、成人の肺結核は予防できない。結核の発症を抑制するためには、ワクチン接種によってメモリータイプの CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を予め充分産生しておき、結核菌が免疫学的圧力を受けずに増殖可能な時間を短くする必要がある。そのため、本研究においては BCG に改良を加え、未感作 T 細胞を充分活性化できるリコンビナント BCG を作出することを目的とした。リコンビナント BCG の作出にあたっては、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に対して、BCG 由来の HSP70、活動期結核菌に発現する CysO 及び MMP-II 遺伝子を連結した融合遺伝子を導入した (BCG-dHCM の作製)。さらに、結核菌分泌蛋白由来の Th1 分化を主に誘導するペプチド (Th1 ペプチド) が誘導する細胞障害性 T 細胞への分化誘導機序を明らかにすることで、新たな結核ワクチン及び結核ワクチン効果判定方法を開発し、また、結核に対する感染抵抗性 T 細胞の分化および機能発現における各種共刺激分子の役割や自然免疫応答の働きを明らかにし、それらを介した

シグナルを制御することでワクチン効果を増強することを予防方策開発に関する目的とした。超多剤耐性結核菌は、全世界に広まりつつあり全人類の脅威となっている。しかし、ミャンマーで分離された多剤耐性結核菌の薬剤耐性に係る遺伝子変異に関する報告は十分と言えない。そのため、ミャンマーで分離された多剤耐性結核菌における耐性と遺伝子変異の関係を検討した。その一方、治療が困難な多剤耐性結核症や非結核性抗酸菌症に対する新規薬剤の開発が求められている。そこで、新規薬剤の候補化合物として、結核菌由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素の活性を阻害する化合物を見出すことを目的とした。また、ハンセン病の診断に関して、アジアにおけるハンセン病早期病型診断法の開発を目指し、病型と関連するらい菌及び宿主由来成分の同定を行い、それらを応用した診断法開発へと繋げる。現在確立されている診断法は、感度に問題をもつ抗酸菌染色法が唯一、日常的に使われている。そのため等温遺伝子増幅法 (LAMP) 法により簡易かつ安価ならい菌検出法の開発を行うことをハンセン病の診断に関する目的とした。

B. 研究方法

ハノイ市の医療従事者 109 名について、インターフェロンガンマ (IFN- γ) 遊離試験を実施して潜在結核感染を推定した後、末梢血中の免疫関連分子の mRNA 発現量と遺伝的多型を定量 RTPCR およびシーケンス法にて検討した。アフリカ、ビクトリア湖畔 Kwale 地区の 6 校の小学生について結核菌抗原、ESAT6、CFP10、MDP1 に対する T 細胞応答と寄生虫感染の関連について検討した。

UreC 遺伝子欠損リコンビナント BCG に、結核菌由来 MMP-II 遺伝子に *Cys0* と BCG 由来の HSP-70 遺伝子を結合させ、遺伝子導入しリコンビナント BCG (BCG-dHCM) を作製し、その未感作 CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞活性化能及びマウス生体内でのメモリー T 細胞産生能を評価した。CD4 T 細胞からの IL-17F 産生を誘導出来る Th1 ペプチドと誘導出来ない Th2 ペプチドを用いて細胞障害性 T 細胞分化誘導における IL-17F の役割を野生型及び IL-17F 欠損マウスを用いて検証した。C57BL/6 wild type、PD-1^{-/-}、NLRP^{-/-}、ASC^{-/-} および caspase-1^{-/-} マウスに結核菌あるいは BCG 菌を感染させ、経時的に臓器内菌数、各種サイトカイン産生および CD4⁺T 細胞の感染抵抗性 T 細胞の機能を解析した。ミャンマー国家結核プログラムで保存しているミャンマーで分離した多剤耐性結核菌 178 株より抽出した DNA を対象として *rpoB*、*katG*、*inhA* 遺伝子の PCR 産物を得た後、その塩基配列を決定した。結核菌由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素の立体構造情報に基づいたインシリコスクリーニングによって、本酵素に対して阻害活性を示すことが予想される化合物を選び、実際に本酵素に対する阻害活性を測定した。

ハンセン病患者、結核患者及び健常者の血清中に含まれる低分子化合物群について、精製及び誘導体化後、メタボロミクス解析 (GC-MS 分析による比較) を実施した。らい菌特異的 LAMP 法の特異性、検出感度を検討した。さらに、菌を溶解保存する特殊濾紙を利用した臨床サンプルによる検出感度を PCR 法と比較した。

倫理面への配慮 研究分担者及び研究協力が所属する機関の倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液及びサンプルドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解 (インフォームドコンセント) を得た。さらに、結果

について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。動物実験も同様に、それぞれの機関における動物実験委員会の審査を受けて遂行した。

C. 研究結果

末梢血中の免疫関連分子の中で *IL12RB2* のプロモーター多型の遺伝子高発現型として知られる変異は、非感染群 (n=68) に比して、潜在結核感染群 (n=41) で有意に低頻度であった。また感染群ではこの型と *IL12RB2* 発現量がよく相関していた。アフリカの結核蔓延国での解析の結果、*Schistosoma haematobium* 感染者と結核菌抗原に対する反応者との間には逆相関が認められた。新たに開発した BCG-dHCM は菌体外へ HSP70-Cys0-MMP-II 融合蛋白を分泌し、自然免疫応答に関する抗原提示細胞である樹状細胞及びマクロファージを強く活性化し、IL-12・INF α ・IL-1 β などのサイトカインを効率的に産生誘導した。同時に、樹状細胞の細胞表面の抗原提示に関わる分子を強く発現させ、さらに、ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化させ大量の IFN- γ を産生した。C57BL/6 マウスに BCG-dHCM を皮下接種し、4 週あるいは 12 週後に脾 T 細胞を分離し、*in vitro* で MMP-II・HSP70・Cys0 あるいは結核菌 H37Rv 由来細胞質蛋白で再刺激すると、大量の IFN- γ を産生した。IL-17F 欠損マウスでは Th1 ペプチドによる細胞障害性 T 細胞分化誘導が減弱し、IL-17F は本細胞の分化に必須であることが判明した。結核菌および BCG 菌感染後に産生されるメモリー T 細胞の機能制御には、PD-1 シグナルの影響は少ないことが示唆された。薬剤耐性菌の研究においては、RIF 耐性に係る変異として *rpoB* の 531 番目のアミノ酸をロイシンに置換する変異、INH 耐性に係る変異として *katG* の 315 番目のアミノ酸をスレオニンに置換する変異がもっとも高頻度に見出されたが、RIF および INH 耐性に係る遺伝子変異を持たない株がそれぞれ 28.7% および 27.5% の株に見出された。また、新規抗結核薬の開発では、結核菌由来ヌクレオチド加リン酸分解

酵素の活性を阻害する化合物を見出した。また、本酵素に加えて *Mycobacterium avium* や *M. smegmatis* 由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素の活性も阻害する化合物が見つかった。

ハンセン病患者及び対照群血清から得られた GC-MS のクロマトグラムを比較した結果、ハンセン病患者の血清においてクロマトグラムの一部が対照群とは異なる特徴的なパターンを示すことが判明した。また、らい菌検出 LAMP 法は、27 抗酸菌種の核酸を増幅せず、検出感度は 5 菌体であった。特殊濾紙を用いた検討では、MB 患者 60 検体で PCR 法と 100%、PB 患者 38 検体で 81.6% の一致率であった。

D. 考察

抗結核生体防御機構の中で、IL-12/IFN- γ 経路は、結核菌に対する免疫機構の中で重要な役割を果たしており、*IL12RB2* 発現の遺伝的背景の違いによる個体差が結核潜在感染成立に関与している可能性が示唆された。一方、IFN- γ はマクロファージを活性化して結核菌の殺戮を誘導するとともに、Th17A の活性化を抑制して好中球の肺内集積を抑制して急性炎症を抑制する上で極めて重要な役割を果たしている。したがって、抗結核ワクチンは、未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化し効率的に IFN- γ を産生する能力を有している必要がある。本研究において新しく作製したリコンビナント BCG、BCG-dHCM は、未感作 CD4 陽性 T 細胞及び未感作 CD8 陽性 T 細胞を強く活性化し、大量の IFN- γ を産生した。Cys0 は、ユビキチンスーパーファミリーに属し、活動期に発現し結核菌のマクロファージ内での生存を助長する。したがって、Cys0 は結核菌の生体外排除を誘導する上では、理論的に良好なターゲットと考えられる。HSP70-Cys0-MMP-II を細胞内で分泌させることで、Cys0・HSP70・MMP-II の三者が協調的に作用し、樹状細胞及びマクロファージを活性化し大量のサイトカインを産生誘導したと想定される。さらに、BCG-dHCM をマウスに接種すると、HSP70 及び MMP-II の

みならず Cys0 及び結核菌の細胞質蛋白に反応するメモリー T 細胞を産生した。これまでに、結核菌の肺内増殖を抑制し得るリコンビナント蛋白として、HSP70-MMP-II 融合蛋白を同定してきたが、これに加えて、BCG-dHCM では結核菌の生育・増殖に深く関与する Cys0 を導入し、Cys0 に直接的に作用し得るメモリー T 細胞が産生可能であった。したがって、BCG-dHCM はワクチンとしての必要条件を満たし、今後有望なワクチンとなり得るものと想定された。一方、免疫調整機構を有する PD-1 シグナルや ASC は、結核菌特異的な Th1 細胞への分化調節には重要な役割を果たしている。しかし、分化した Th1 細胞の機能制御には PD-1 とは異なる抑制性シグナルが要求され、このシグナル経路を明らかにすることが抗結核感染防御の発現制御を司るために必要となることが判明し、予防法を確立する上で新たな知見が得られた。一方、薬剤耐性に関しては、ミャンマーにおける多剤耐性結核菌株では特定の遺伝子変異を持たない株の割合が周辺国に比べて非常に高いことが判明した。これは、1) 別の遺伝子領域に変異を持つ多剤耐性結核菌が同国で蔓延している、2) 同国で実施されている薬剤感受性試験の精度が低い、のどちらかの可能性を示唆していた。今後、薬剤耐性結核菌を制御する上で、極めて重要なポイントが明らかになったと言える。

ハンセン病患者の血清において、メタボロミクス解析で特徴的な傾向が観察されたことは、血清中の低分子化合物群の構造或いは構成が対照群のものとは異なっており、ハンセン病に特有ならい菌代謝産物或いは生体由来成分が存在する可能性を示していた。本研究から同定される抗原は、これまでに想定されてきた診断用抗原とは全く別個のものであり、ハンセン病の早期診断技術の向上、及びそれに基づく厚生行政への貢献が期待できるものであった。また、交通網などが発達していないハンセン病濃厚流行地域でのハンセン病診断は、各種機材が揃っている先進国では想像を絶するものがある。核酸増幅による菌種同定法は PCR

が中心であるが、高額機器の使用はその普及を大きく妨げている。今回、進めている簡易かつ安価な LAMP 法によるらい菌同定法開発は、臨床サンプルの検討により実用可能な検出感度を示した。今後、上記問題を解決する糸口が見つかったと考えられる。

E. 結論

潜在結核感染に Th1 免疫遺伝子 *IL12RB2* の機能的多型の関与が示唆された。ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に結核菌由来の免疫原性蛋白及び結核菌の生育に関与する遺伝子を導入することにより、多クローンメモリー T 細胞の産生が可能であり、IL-17F は結核ワクチン効果を増強する因子であった。多剤耐性結核菌株の遺伝子型別を通じた状況解明が必要である。結核菌等抗酸菌の新規薬剤の開発につながる候補化合物を見出した。ハンセン病患者に特徴的な傾向がメタボロミクス解析により示唆された。らい菌検出 LAMP 法は、臨床応用が可能であることを示した。

以上、アジア諸国における抗酸菌感染症の制御への貢献に大きな展開がみられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yang, R., C. Xi, D. R. Sita, S. Sakai, K. Tsuchiya, H. Hara, Y. Shen, H. Qu, R. Fang, M. Mitsuyama and I. Kawamura. 2014. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the maturation and secretion of IL-1 α from infected macrophages through the elevation of cytoplasmic calcium levels and calpain activation. *Pathog Dis.*, in press.
- 2) Mukai, T., Y. Tsukamoto, Y. Maeda, T. Tamura, and M. Makino. 2014. Efficient Activation of Human T Cells of Both CD4 and CD8 Subsets by Urease Deficient-Recombinant BCG that Produced a Heat Shock Protein 70-*M. tuberculosis*-Derived Major Membrane Protein II Fusion Protein. *Clin. Vaccine Immunol.*, 21: 1-11.
- 3) Wang, H., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino. 2013. An *in vitro* model of *Mycobacterium leprae* induced granuloma formation. *BMC Infectious Diseases*, 13: 279.
- 4) Hara, H., K. Tsuchiya, I. Kawamura, R. Fang, E. Hernandez-Cuellar, Y. Shen, J. Mizuguchi, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz and M. Mitsuyama. 2013. Phosphorylation of ASC acts as a molecular switch controlling the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nature Immunol.*, 14: 1247-1255.
- 5) Yokobori, N., B. Lopez, L. Geffner, C. Sabio y Garcia, P. Schierloh, L. Barrera, S. de la Barrera, S. Sakai, I. Kawamura, M. Mitsuyama, V. Ritacco and C. Sasiain Mdel. 2013. Two genetically-related multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains induce divergent outcomes of infection in two human macrophage models. *Infect. Genet. Evol.*, 16: 151-156.
- 6) Nakajima, C., A. Tamaru, Z. Rahim, A. Poudel, B. Maharjan, K. S. Aye, H. Ling, T. Hattori, T. Iwamoto, Y. Fukushima, H. Suzuki, Y. Suzuki, and T. Matsuba. 2013. A simple multiplex PCR for the identification of Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* with a lineage-specific mutation in *Rv0679c*. *J. Clin. Microbiol.*, 51: 2025-2032.
- 7) Phetsuksiri, B., J. Rudeeaneksin, S. Srisungngam, S. Bunchoo, D. Roienthong, T. Mukai, C. Nakajima, S. Hamada, and Y. Suzuki. 2013. Applicability of in-house loop-mediated isothermal amplification for rapid

identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex grown on solid media. Jpn. J. Infect. Dis., 66: 249–251.

- 8) Tateishi, Y., A. Tamaru, Y. Ogura, M. Niki, T. Wada, T. Yamamoto, K. Hirata, T. Hayashi, and S. Matsumoto. 2013. Whole-Genome Sequence of the Potentially Hypertransmissible Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strain OM-V02_005. Genome Announc 1.
 - 9) Osada-Oka, M., Y. Tateishi, Y. Hirayama, Y. Ozeki, M. Niki, S. Kitada, R. Maekura, K. Tsujimura, Y. Koide, N. Ohara, T. Yamamoto, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2013. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis. Microbiol. Immunol., 57: 30–37.
2. 学会発表
- 1) Makino, M. Novel vaccine development against leprosy. 18th International Leprosy Congress, 16th–19th September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 2) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of *Mycobacterium leprae*. 18th International Leprosy Congress, 16th–19th September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 3) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17–18 August, 2013, Sapporo, Japan.
 - 4) Shimohakamada, Y., T. Tamura, M. Makino, and S. L. Nutt. The role of follicular helper T cell in mycobacterial infection. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17–18 August, 2013, Sapporo, Japan.
 - 5) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, T. Tamura, T. Mukai, and M. Makino. Development of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG for the inhibition of *M. tuberculosis* multiplication in lung. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17–18 August, 2013, Sapporo, Japan.
 - 6) Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Maeda, and M. Makino. Construction of stable recombinant BCG which secretes HSP70-MMP-II fusion protein by chromosomal integration of the gene for leprosy vaccine. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17–18 August, 2013, Sapporo, Japan.
 - 7) Maeda, Y., T. Tamura, T. Mukai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells stimulated with a lipopeptide participate in intercellular communication. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17–18 August, 2013, Sapporo, Japan.
 - 8) Miyamoto, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Biosynthetic characterization of glucuronic acid-containing glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan.

- 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 9) Kawamura, I., S. Sakai and M. Mitsuyama. Blockade of PD-1 signal pathway causes exacerbation of *Mycobacterium tuberculosis* infection via excessive IFN- γ production by antigen-specific Th1 type CD4⁺ T cells. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 10) Nakajima, C., A. Tamaru, Z. Rahim, A. Poudel, B. Maharjan, S. A. Khin, and Y. Suzuki. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Asian Countries. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 11) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, and K. Shibayama. Structural insights into a diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv for the design of new anti-tuberculosis drugs. International Conference on Structural Genomics. 29th July-1st August, 2013. Sapporo, Japan.
- 12) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in the induction of Th1 immune response. 15th International Congress of Immunology. 22-27 August, 2013. Milano, Italy.
- 13) Kawamura, I. and M. Mitsuyama. Blockade of PD-1 signal pathway causes exacerbation of *Mycobacterium tuberculosis* infection via excessive IFN- γ production by antigen-specific Th1 type CD4⁺ T cells. 15th International Congress of Immunology. 22-27 August, 2013. Milan, Italy.
- 14) Suzuki, Y. Genetic background of the DNA gyrase in quinolone resistance. The 1st Korea-Japan leprosy meeting. 15-16 November, 2013, Seoul, Korea.
- 15) 牧野正彦. 結核ワクチン作製の試み. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 さいたま市
- 16) 河村伊久雄. 結核菌に対する宿主感染防御の発現制御. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 さいたま市
- 17) 松本 壮吉. 抗酸菌の潜伏感染や薬剤抵抗性に関わる分子メカニズム. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 さいたま市
- 18) 河村伊久雄. 結核菌に対する宿主感染防御の発現制御. The impact of PD-1 inhibitory signal on the resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. 第87回日本細菌学会総会 2014年3月 東京都
- 19) 森茂太郎, 金玄, 林原絵美子, 柴山恵吾. Functions and structures of MAV_3489 from *Mycobacterium avium* and MSMEG_2932 from *M. smegmatis*. 第87回日本細菌学会総会. 2014年3月 東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

分担研究報告書

寄生虫疾患の研究・米側との専門協議
アジア地域の寄生虫疾患に関する研究

研究分担者 平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所 教授

協力研究者 狩野繁之 国立国際医療研究センター研究所 部長
坪井敬文 愛媛大学無細胞研究センター 教授
野崎智義 国立感染症研究所 部長
北 潔 東京大学医学研究科 教授

研究要旨 アジア地域で問題となっている寄生虫疾患として、マラリア、住血吸虫症、赤痢アメーバ症、クリプトスポリジウム症を対象に、流行地の研究者および関連する米国の研究者と協力して、予防治療に寄与する研究を行った。その結果、三日熱マラリアのクロロキン耐性遺伝子の拡大様式、マラリアワクチンの新たな候補分子、住血吸虫ゲノム内の新たな治療薬標的分子、赤痢アメーバに特有なミトソーム関連分子、アスコフラノンの抗クリプトスポリジウム活性を発見した。

A. 研究目的

アジア地域で問題となっている寄生虫疾患として、マラリア、住血吸虫症、赤痢アメーバ症、クリプトスポリジウム症を対象に新たな予防治療法を作出する。

B. 研究方法

1. マラリア（協力研究者：狩野繁之・国立国際医療研究センター研究所、坪井敬文・愛媛大学無細胞研究センター）

狩野はフィリピンおよび韓国との共同研究により流行地の感染者のサンプリングを行い遺伝疫学による解析を行った。坪井は無細胞タンパク合成法により組み換えマラリア抗原を多数作成し、試験管内での抗体活性測定法によりワクチン活性を評価した。

2. 住血吸虫症

平山は、中国との共同研究により日本住血吸虫の膜抗原を遺伝子クローニングし、DNA配列の特徴を手掛かりにゲノム情報からそれらのゲノム内での分布を解析した。

3. 赤痢アメーバ症（協力研究者：野崎智義・国立感染症研究所）

野崎はバングラデッシュおよびバージニア大学との共同研究として、アメーバ赤痢とその近縁のアメーバ族の原虫のオルガネラの代謝経路に関する生化学的な研究を行った。

4. クリプトスポリジウム症（協力研究者：北潔・東京大学医学研究科）

北は、すでに他の原虫疾患でミトコンドリア関連酵素阻害活性の認められているアスコフラノンのクリプトスポリジウムに対する活性を調べた。

（倫理面での配慮）

ヒトの試料を対象にした場合、現地および日本の施設における倫理委員会の承認を得た後に研究を行った。また、動物実験に関しても同様に実験を行う施設における倫理審査委員会の審査を受け、承認されたのちに実験を行った。

C. 研究結果とD. 考察

1. マラリア

狩野らはpvmdr1遺伝子の解析結果より、同遺伝子に耐性型変異が観察された国や地域では、今後CQの使用に細心の注意が必要であると考えられた。またMS DNAの解析結果より、CQ耐性型変異は1ヶ所で発生したものが他の流行地域へ拡散したと考えるよりはむしろ、それぞれの流行地域独自に発生した（あるいは元々の地域集団に存在していた）可能性が高いと推定された。

坪井らは、抗 RALP1 抗体は、メロゾイトが赤血球侵入時に必須な密着接合の形成を阻害することにより、増殖阻害活性を示すことが明らかとなった。また、同様のアプローチで、新規三日熱マラリアワクチン候補分子 PvMSP1P も同定した。さらに、ヒトから媒介蚊へのサイクルを断つことのできる新規伝搬阻止ワクチン候補抗原 HAP2 も同定した。

2. 住血吸虫症

日本住血吸虫虫卵由来の cDNA ライブラリーから、シグナル配列トラップ法という方法で、膜型あるいは分泌型タンパクとなる cDNA を多数クローニングした。それらの 3 分の 1 が同じシグナルを共有した異なる cDNA であったこ

とから、ゲノムデータ解析後、共通のシグナル配列を有する 34 の似通った遺伝子がゲノム中に広く散在し、一つの遺伝子族を形成していることを明らかにした。同遺伝子族の cDNA の配列を Blast サーチしたが遺伝子バンクのどの生物種（他の住血吸虫種を含む）にもヒットしなかった。しかし、ペプチドの 3 次元構造データベースを用いて、cDNA から予想されるアミノ酸配列に基づく構造相似性サーチを行うと、sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin (SEA) -domain containing proteins with heme-binding properties（ウニ精子タンパク、エンテロキナーゼ、アグリン（SEA）ドメインとヘム結合性ドメインを持つタンパクと非常に強い構造相同性を有することが判明した。そこで、住血吸虫由来の本遺伝子族の 3 つの cDNA クローンより組み換えタンパクを作製し、インシリコで強く示唆された SEA の特性であるグリカン結合性とヘム結合性についてインビトロでの解析をおこなった。（1）作製した組み換えタンパク 3 種は、それぞれ特定の糖鎖配列のグリカンとの強い結合性を示した。また（2）3 種類のヘム結合性実験を行い、いずれのタンパクも顕著なヘム結合性を示した。さらに（3）3 種類のタンパクをマウスに免疫して得られた抗血清あるいはモノクローナル抗体を用いた免疫染色により、このタンパクがいずれも虫体の表皮テグメントおよび消化管の粘膜上に強く発現していることが示された。

（1）日本住血吸虫にだけ観察され、他の住血吸虫種にみられないユニークな遺伝子族であり、進化的にも興味深い。（2）トランスポゾンによるゲノム内での重複により形成された遺伝子族であると想像され、構造上の相同性から示唆され、実際にインビトロで証明された糖鎖結合性やヘム結合性という、これらの遺伝子産物の機能が、寄生現象に重要な役割を果たしている可能性がある。たとえば宿主の免疫細胞との相互作用や主な栄養源であるヒト赤血球ヘモグロビンの解毒作用などである。今後ワクチン候補あるいは薬剤ターゲットとしての可能性を追求する予定である。

3. 赤痢アメーバ

赤痢アメーバではミトコンドリア外包膜の Tom40, Sam50 のみ他の真核生物と共通であり、それ以外の保存された外包膜因子及び内包膜の因子はゲノム中に存在しなかった。赤痢アメーバにおけるミトコンドリアの生理機能とタンパク質輸送装置の特殊性が明らかとなっ

た。

4. クリプトスポリジウム

北らはミトコンドリア電子伝達系に關与する原虫類に特有な酵素の研究を進め、中でも宿主哺乳類が持たないシアン耐性酸化酵素（Alternative oxidase: AOX）が格好の標的である事を見出した。そこでクリプトスポリジウムにおける AOX の局在を調べ、ミトソームへの局在を明らかにした。さらに AOX の強力な特異的な阻害剤で抗クリプトスポリジウム薬候補であるアスコフラノンとトリパノソーマの AOX の共結晶の立体構造解析から結合様式と阻害機構を明らかにした。

E. 結論

マラリア、住血吸虫症、原虫性下痢症という寄生虫疾患の中でもアジア地域で問題となっている疾患について、フィリピン、中国、韓国、バングラデッシュ、タイの研究者と協力し、米国の研究グループとの情報交換を行いながら、インパクトの医薬品開発に向けた研究成果をあげることができた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moritoshi Iwagami, Seung-Young Hwang, So-Hee Kim, So-Jung Park, Ga-Young Lee, Emilie Louise Akiko Matsumoto-Takahashi, Weon-Gyu Kho, Shigeyuki Kano. Microsatellite DNA analysis revealed a drastic genetic change of *Plasmodium vivax* population in the Republic of Korea during 2002 and 2003. PLoS Neglected Tropical Diseases 7: e2522, 2013.
2. Ito D, Hasegawa T, Miura K, Yamasaki T, Arumugam TU, Thonkukiattkul A, Takeo S, Takashima E, Sattabongkot J, Han ET, Long CA, Torii M, Tsuboi T. RALP1 is a rhoptry-neck erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum* merozoite and a potential blood-stage vaccine candidate antigen. Infect Immun. 2013, 81(11):4290-4298.
3. Cheng Y, Wang Y, Ito D, Kong DH, Ha KS, Chen JH, Lu F, Li J, Wang B, Takashima E, Sattabongkot J, Tsuboi T, Han ET.

- PvMSP1P, merozoite surface protein 1 paralog, is a novel erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium vivax*. *Infect Immun*. 2013, 81(5):1585-1595.
4. Miura K, Takashima E, Deng B, Tullo G, Diouf A, Moretz SE, Nikolaeva D, Diakite M, Fairhurst RM, Fay MP, Long CA, Tsuboi T Functional comparison of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidates by the standard membrane-feeding assay. *Infect Immun*. 2013, 81(12):4377-4382.
 5. Mbanefo EC, Kikuchi M, Huy NT, Shuaibu MN, Cherif MS, Yu C, Wakao M, Suda Y, Hirayama K. Characterization of a Gene Family Encoding SEA (Sea-urchin Sperm Protein, Enterokinase and Agrin)-Domain Proteins with Lectin-Like and Heme-Binding Properties from *Schistosoma japonicum*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jan 9;8(1):e2644.
 6. Harada, S., Inaoka, D. K., Ohmori, J. and Kita, K. Diversity of parasite complex II, *Biochim. Biophys. Acta*, 1827(5), 658-667, 2013
 7. Moore, A. L., Shiba, T., Young, L., Harada, S., Kita, K. and Ito, K. Unraveling the heater: new insights into the structure of the alternative oxidase. *Annu Rev Plant Biol*. 64:637-63. 2013.
 8. Young, L., Shiba, T., Harada, S., Kita, K., Albury, M. S. and Moore, A. L. The alternative oxidases: simple oxidoreductase proteins with a complex function. *Biochem. Soc. Transac*. 41, 1305-1311, 2013
 9. Makiuchi T, Nozaki T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie*. 2013 Dec 4. pii: S0300-9084(13)00427-6. doi: 0.1016/j.biochi.2013.11.018.
 10. Biller L, Matthiesen J, Kühne V, Lotter H, Handal G, Nozaki T, Saito-Nakano Y, Schümann M, Roeder T, Tannich E, Krause E, Bruchhaus I, The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Jan;13(1):132-44. doi:
2. 学会発表
 1. 石上盛敏, Weon-Gyu Kho, Pilarita Rivera, Elena A. Villacorte, 狩野繁之. Polymorphisms of *pvmdr1* and microsatellite DNA of *Plasmodium vivax* population showed no evidence of selective sweep by chloroquine pressure. 第82回日本寄生虫学会大会, 東京医科歯科大学 (2013年3月30-31日) .
 2. Kenji Hirayama: A gene family encoding membrane or secreting proteins with lectin-like and hemebinding properties from human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr, b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212, Bangladesh.
 3. Kiyoshi Kita: Novel Drug Target, Cyanide-Insensitive Alternative Oxidase of *Cryptosporidium*. 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr,b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212, Bangladesh.
 4. Takashi Kumagai: Efficacy Analysis of Newly Synthesized Compounds with Endoperoxide Activity, N-89/N-251, on Larval Stage *Schistosoma mansoni*. 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr,b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212, Bangladesh.
 5. Nguyen Tien Huy and Kenji Hirayama: High-Throughput Screening of Small Molecule Chemical Library for Novel Antimalarials. 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr,b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212, Bangladesh.
 6. Kiyoshi Kita: e-ASIA Presentation. 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr,b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212, Bangladesh.
 7. Moritoshi Iwagami: Molecular Genetic Epidemiology of Chloroquine-Resistant *Plasmodium vivax* Populations in Asia and the Western Pacific Region. 16th International

- Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr,b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212, Bangladesh.
8. Kenji Murai: Worldwide Distribution of Polymorphisms Associated with Delayed Clearance of *Plasmodium falciparum* Following Artemisinin Treatment: 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr,b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212, Bangladesh.
 9. Tomo Nozaki: Unique Evolution of the Mitochondrion-related Organelle in the Enteric Protozoon *Entamoeba histolytica*: A Potential Target for Drug Development. 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr,b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212, Bangladesh.
 10. Shinjiro Hamano: *Entamoeba moshkovskii* is Associated with Diarrhea in Infants and Causes Diarrhea and Colitis in Mice. A Potential Target for Drug Development. 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr,b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212, Bangladesh.
 11. Koji Watanabe: Asymptomatic Amebic Colitis among HIV-1 infected Individuals in Japan. 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr,b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212, Bangladesh.
 12. Keisuke Komatsuya: Synergy of Ferrous Ion on 5-aminolevulinic Acid Mediated Growth Inhibition of *Plasmodium*. 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr,b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212, Bangladesh.
 13. Kumiko Nakada-Tsukui: Functional Analysis of the AIG1 Family Proteins that were Originally Identified as Virulence- Related Genes in Comparative Genomic Analysis in *Entamoeba histolytica*. 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr,b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212, Bangladesh.
 14. Chiaki Tsuge: Effect of Ascofuranone and Its Derivatives on the Growth of *Trypanosoma brucei brucei* 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases. 9-11 February 2014, icddr,b, 68 Shaheed Tajuddin Ahmed Sarani, Mohakhali, Dhaka 1212,
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし

研究要旨：近年、発展途上国、とくに東南アジア諸国では、経済成長による生活環境の変化に伴い、糖尿病をはじめとする生活習慣病の爆発的な増加が問題となっている。本研究では、東南アジア地域特にベトナム、カンボジア地域を中心とした栄養摂取や肥満、過体重を評価すること、生活様式が欧米化した経済成長後の日本人における脂質や耐糖能(インスリン分泌能)の評価をすることでアジア人における栄養摂取と生活習慣病発症の関係を明らかにすることを目的としている。

近年発展の目覚ましい地域(ベトナムやカンボジア)での若年者を対象とした調査では、糖質摂取量は日本人若年者と差がないものの、異性化糖が総摂取糖質量に占める割合は日本人と比較して高かった。以上の結果から現時点では異性化糖含有量の高い食品の摂取が肥満の直接的な肥満の原因になっていないが、先進国と同様に将来的な肥満原因になる可能性が示唆され、早めの対策が望まれる。また近年若年者の肥満や過体重の割合は、年々増加傾向にあり、ハノイ市の今回の調査で20.2%であった。今後はハノイ市での学校単位での生活習慣介入プログラムを開発、実施し、肥満や過体重の有病率や発生率や肥満や過体重に関する知識レベルの変化を評価する予定である。

生活様式が欧米化した日本人に対してアポ B-48 や可溶性 LR11 などの生化学マーカーを測定したところ、アポ B-48 はタボリックシンドローム患者ばかりでなく腎障害を有する患者で高値であること、可溶性 LR11 は網膜症を合併する糖尿病患者で高値であることが判明した。今後は、日本人ばかりでなく他のアジア地域でも評価し、アジア人における意義と疾患発症の地域差を解明する。日本人をはじめとするアジア人では、糖尿病発症にインスリン分泌能低下が主体である。インクレチン関連薬 DPP-4 阻害薬は、日本ばかりでなくアジア地域でも臨床で広く使用されている。日本人2型糖尿病に対して、血糖改善効果は同等ながら DPP-4 阻害薬はスルホニル尿素(SU)薬に比較してインスリン初期分泌能を改善し、食後血糖を効果的に抑制することが示唆された。今後は、他のアジア地域での検討が必要と考えられる。

以上から経済成長による生活環境の急激な欧米化が進む東南アジア諸国と経済成長後の日本における栄養摂取と生活習慣病に関する研究を行い、情報を共有することで、欧米人とは異なるアジア人における生活習慣病の予防や治療法を確立できる可能性がある。

A. 研究目的

近年、発展途上国、とくに東南アジア諸国では、経済成長による生活環境の急激な変化に伴い、肥満や過体重の割合が増加し、糖尿病をはじめとする生活習慣病患者数が増加している。本研究では、特にベトナム、カンボジア地域を中心とした栄養摂取や肥満、過体重を評価すること、生活様式が欧米化した経済成長後の日本人における脂質や耐糖能(インスリン分泌能)の評価をすることでアジア人における栄養摂取と生活習慣病発症の関係を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

上記の目的を遂行するにあたり、近年発展の目覚ましい地域(ベトナムやカンボジア)での調査

を中心に

- 1) カンボジア国プノンペン市の若年者(7, 10, 13歳)の糖質摂取量の評価
- 2) ベトナム国ハノイ市の中学生を対象とした若年者における肥満や過体重割合と生化学データの評価
を行う。また日本人を対象に生活習慣病に関わる生化学マーカーやインスリン分泌能低下を主体とした日本人糖尿病患者を対象に糖尿病治療薬投与後のインスリン分泌能などを評価するため
- 3) 健康診断目的に受診した、何らかの投薬のない516症例を対象として動脈硬化の危険因子となるカイロミクロンレムナント(CM-R)の定量的マーカー アポ B-48 の測定と関連因子の評価
- 4) 糖尿病患者における肥満や栄養異常関連疾患

の病態を示す生化学マーカー可溶性 LR11の測定と関連因子の評価

5)糖尿病患者における糖尿病治療薬(DPP-4阻害薬, SU薬)における治療後のインスリン初期分泌能の評価を行った。

C. 研究結果

1) 89名において3日間の24時間思い出し法による食事調査を実施し、各糖類の菓子、飲料、間食からの摂取量を合計した総糖類摂取量(g/日/人)は、 $26.9 \pm 24.9g$ で同じ年齢の日本の若年者151名の糖類摂取量 $25.7 \pm 16.2g$ と近似していた。これらの値は、WHOの推奨量範囲にあり、欧米に比べると1/4程度であった。異性化糖が総糖類摂取量に占める割合は、プノンペンで46%、日本で26%であった。

2) 2013年12月及び2014年1月にかけて選別された2校(202名, 208名)において体重などの身体測定、生化学検査に関する基礎調査を行った。(メジアン(最大-最低)を、①2校をあわせたもの、②1校目、③2校目の順でデータを示す。)

BMI (kg/m²) : 19.3(12.5 - 35.0): ①19.2(12.5 - 35.0) ②19.4(13.5 - 28.0)

血糖値(mmol/L) : 4.9 (3.7-6.9): ①4.7 (3.8 - -6.2) ②5.0 (3.7 - 6.9)

総コレステロール(mmol/L) : 4.38(2.1 - 7.7): ①4.33 (2.1 - 7.7) ②4.4 (2.8 - 7.7)

中性脂肪(mmol/L) : 0.97(0.33 - 5.73): ①

1.05(0.37-5.73) ②0.90(0.33 - 3.55)

HDL(mmol/L) : 1.46(0.72 - 2.95): ①1.39(0.72-2.84) ②1.49(0.78 - 2.95)

LDL(mmol/L) : 2.32(0.68 - 5.50): ①2.30(0.68-4.64) ②2.35(0.82 - 5.50)

HbA1c(%) : 5.5(4.6 - 6.1): ①5.5(4.6-5.9) ②5.5(4.7 - 6.1)

Insulin(μU/mL) : 14.4(3.6-151.9):①13.7(3.7-151.9) ②15.2(3.6 - 114.8)

BMIについて、CDCガイドラインに沿って分類したところ、過体重或いは肥満と判定された生徒は全生徒の20.2%(410名中83名)であった。また、血糖値が6.7 mmol/Lを超える生徒が1名いた。

3)日本人におけるアポ B-48 濃度は、男性(閉経女性)、BMI 25kg/m^2 以上、脂質異常症およびメタボリックシンドローム(MetS)患者で有意に高値であり、これらのリスク因子数の増加に相関して上昇した。さらに脂質異常のない健常例では基準値上限 $5.7\mu\text{g/mL}$ 、基準範囲(平均 $\pm 1.96\text{SD}$); $0.74\text{-}5.65\mu\text{g/mL}$ であった。さらに、アポ B-48 濃度を慢性腎臓病(CKD)患者において検討した。アポ B-48 濃度は尿蛋白陽性群および

eGFR 低値群がそれ以外より高値に分布し、log アポ B-48 濃度および log アポ B-48/中性脂肪(TG)比は高 eGFR 尿蛋白陰性群に比較して高 eGFR 尿蛋白陽性群、低 eGFR 尿蛋白陰性群、低 eGFR 尿蛋白陽性群で有意に高値であり、その有意差は他の測定項目の中で最も強かった。eGFR は log アポ B-48 濃度と log アポ B-48/TG 比と強く逆相関していたが、蛋白尿は log アポ B-48 比とのみ強く相関し、log アポ B-48/TG 比は eGFR 低下の有意な規定因子である事が判明した。以上の事から、空腹時アポ B-48 濃度の基準値上限が判明し、今後の CM-R 蓄積リスクを評価し得るようになり、またアポ B-48 濃度の上昇は、日本人において心血管イベントのみではなく、腎機能障害のリスクを増加させる事が判明した。

4) 日本人糖尿病患者 80 名に対し可溶性 LR11 の測定を行ったところ、網膜症を合併する糖尿病患者は血中および硝子体液中 LR11 値が有意に高値だった。硝子体液中 LR11 値も網膜症を有する糖尿病患者で高値だった。

5) 2 型糖尿病患者 171 人に対し DPP-4 阻害薬 sitagliptin(S) とスルホニル尿素(SU)薬 glimepiride(G)治療 52 週後のインスリン初期分泌能 insulinogenic index (I.I.)を比較検討した。G 群 85 人と S 群 86 人に割り付けられた。治療により両群の HbA1c は 7.4%から 6.8%まで低下した。治療 52 週後の I.I.は S 群で有意に高く(P=0.036)、また I.I.が高い患者ほど糖負荷 60 分後血糖は低下した(R²=35%)。同一群間での薬物治療前後の比較では、I.I.の改善率が G 群で変化を認めず S 群で有意に上昇した。以上の結果から、インスリン分泌能低下主体の日本人 2 型糖尿病に対して、DPP-4 阻害薬は SU 薬に比較してインスリン初期分泌能を改善し、食後血糖を効果的に抑制することが示唆された。

D. 考察

カンボジアの調査で現時点では異性化糖含有量の高い食品の摂取が肥満の直接的な肥満の原因になっていないが、先進国と同様に将来的な肥満原因になる可能性が示唆され、早めの対策が望まれる。またハノイ市では、近年若年者の肥満や過体重の割合は年々増加傾向にある。今後は、学校単位での生活習慣介入プログラムを開発、実施し、肥満や過体重の有病率や発生率や肥満や過体重に関する知識レベルの変化を評価する予定である。

日本人に対して測定した生化学マーカー アポ B-48 や可溶性 LR11 は、生活習慣病ばかりでなく、慢性腎臓病や糖尿病性網膜症などで高値になることが明らかとなった。今後は、日本人ばかりでなく他のアジア地域でも評価し、アジア人における意義と疾患発症の地域差を解明する。また日本人 2 型糖尿病患者に対する DPP-4 阻害薬長期投与は、同じインスリン分泌促進系

に属する SU 薬と比較してインスリン分泌能を改善させたが、他のアジア地域での検討が必要と考えられる。

E. 結論

経済成長による生活環境の急激な欧米化が進む東南アジア諸国と経済成長後の欧米化した日本において栄養摂取と生活習慣病に関する研究を行うことで欧米人とは異なるアジア人での生活習慣病の予防や治療法を確立できる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuda D, Nishida M, Arai T, Hanada H, Yoshida H, Yamauchi-Takahara K, Moriyama T, Tada N, Yamashita S. Reference Interval of apolipoprotein B-48 concentration in healthy Japanese individuals. *J Atheroscler Thromb* (印刷中)
2. Okubo M, Hanada H, Matsui M, Hidaka Y, Masuda D, Yamashita S. Serum apolipoprotein B-48 levels are associated with reduced estimated glomerular filtration rate and increased proteinuria (投稿中)
3. Shiba T, Bujo H, Takahashi M, Sato Y, Jiang M, Hori Y, Maeno T, Shirai K. Vitreous fluid and circulating levels of soluble LR11, a novel marker for progression of diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 251(12), 2689-95, 2013
4. Shirai K, Saiki A, Oikawa S, Teramoto T, Yamada N, Ishibashi S, Tada N, Miyazaki S, Inoue, I, Murano S, Sakane N, Asahara N, Bujo H, Miyashita Y, Saito Y. *Obes Res Clin Pract*. 7(1), e1-e88, 2013
5. Ogita M, Miyauchi K, Dohi T, Tsuboi S, Miyazaki T, Yokoyama T, Yokoyama K, Shimada K, Kurata T, Jiang M, Bujo H, Daida H. Increased circulating soluble LR11 in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*. 415, 191-4, 2013
6. Ikeda, K., Fujimoto, S., Goto, M., Yamada, C., Hamasaki, A., Ida, M., Nagashima, K., Shide, K. Kawamura, T., and Inagaki, N. A new equation to estimate basal energy expenditure of patients with diabetes. *Clin. Nutr*. 32:777-782, 2013
7. Kondo, Y., Harada, N., Sozu, T., Hamasaki, A., Yamane, S., Muraoka, A., Hatrda, T., Shibue, K.,

Nasteska, D., Joo, E., Sasaki, K., Inagaki, N. A hospital-based cross-sectional study to develop an estimation formula for 2-hours post-challenge plasma glucose for screening impaired glucose tolerance. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 101 (2) : 218-25, 2013

8. Hosokawa M, Hamasaki A, Nagashima K, Harashima S, Toyoda K, Fujita Y, Harada N, Nakahigashi Y, Fujimoto S, Inagaki N. Lack of goal attainment of LDL cholesterol levels in management of type 2 diabetes mellitus. *Internal Medicine*. 52:2409-2415, 2013
9. Harashima S, Tanaka D, Yamane S, Ogura M, Fujita Y, Murata Y, Seike M, Koizumi T, Aono M, Wang Y, Inagaki N. Efficacy and safety of switching from basal insulin to sitagliptin in Japanese type 2 diabetes patients. *Horm Metab Res*. 45(3): 231-238, 2013
10. Harashima S, Fukushima T, Sasaki M, Nishi Y, Fujimoto S, Ogura M, Yamane S, Tanaka D, Harada N, Hamasaki A, Nagashima K, Nakahigashi Y, Seino Y, Inagaki N. Self-monitoring of blood glucose (SMBG) improves glycemic control in oral hypoglycemic agents (OHA)-treated type 2 diabetes (SMBG-OHA Study). *Diabetes Metab Res Rev*. 29(1):77-84, 2013
11. Nishimura A, Harashima S, Honda I, Shimizu Y, Harada N, Nagashima K, Hamasaki A, Hosoda K, Inagaki N. Color record in self-monitoring of blood glucose improves glycemic control by better self-management. *Diabetes Technology and Therapeutics*. (印刷中)

2. 学会発表

- European Atherosclerosis Society (H25)
- 日本循環器学会学術集会 (H25)
- 日本動脈硬化学会学術集会 (H25)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

がんの研究・米側との専門協議

研究分担者 中釜 斉 独立行政法人国立がん研究センター研究所 所長

研究要旨

アジア諸国に蔓延するがんを含む疾病を減少させるために、アジア地域に特徴的な新規の環境要因を明らかにすると共に、環境要因によるがんを含む疾病の発生機構を解明する。新規のがん予防法の開発や、アジア人に特徴的な遺伝的素因に基づく高危険度群の推定によるがん発生の減少を目指す。日本以外のアジア地域で顕在化しているがんの病因も、日米両国では環境の違いから主たる病因の陰に潜んでいる可能性があり、本研究で解明される病因の除去による環境要因特異的ながん発生の低減化は、日米両国にも応用可能である。

環境要因では、中国大陸からの長距離輸送性大気汚染(PM_{2.5}を含む)に関して、日本に比較し、北京の大気中の粉塵や重金属濃度、粉塵の変異原性は非常に高く、日本への越境汚染も認められた。DNA付加体の網羅的解析から、地域による脂質酸化由来DNA付加体profileの違いを見出し、腫瘍での変異プロファイルも異なる可能性が示唆された。アジアで急増する糖尿病に関しては、発がん高リスクの内因性候補物質 ABAQ が、DSS 併用マウス大腸発がんモデルで大腸発がん促進作用を示すこと、遺伝的要因では、日本の膵がんの症例対象研究から、肥満・糖尿病関連遺伝子の SNP と膵がんリスクの有意な関連を見出した。又、候補要因の発がんへの影響を解析する *in vitro* 発がんモデルを開発中であり、マウス腸管・肺・胆管・膵臓の正常上皮由来 3D 培養系で、遺伝学的再構成による発がんを確認した。

これら環境要因の同定やその暴露の解析は、暴露の低減化や新規のがん予防法の開発に、アジア人に特徴的な遺伝的要因の解析は高危険度群の推定に役立つと考える。

A. 研究目的

がんを含むヒトの疾病発生には、環境要因と遺伝的要因、更にはそれらの相互作用が深く関与している。環境要因には外的(環境)要因と内的(環境)要因があり、外的要因としては、地域特有の因子に加え、近年の著しい経済成長による環境悪化に伴う

もの(大気汚染等)がある。内的要因としては、自然突然変異によるゲノム変異やゲノム不安定性の誘発に加え、慢性炎症、糖尿病等の影響が最近特に注目されている。更に、アジア人と欧米人では遺伝的背景が異なり、アジア人に特徴的な遺伝的素因が EGFR 変異陽性の肺腺がん等の地域特有な

疾病の発症に影響すると考えられる。

アジア諸国に蔓延するがんを含む疾病の減少のために、アジア地域に特徴的な新規の環境要因を明らかにすると共に、環境要因によるがんを含む疾病の発生機構を解明する。新規のがん予防法の開発や、アジア人に特徴的な遺伝的素因に基づく高危険度群の推定によるがん発生の減少を目指す。

加えて、日本以外のアジア地域で顕在化しているがんの病因も、日米両国では環境の違いから、主たる病因の陰に潜んでいる可能性があり、本研究で解明されるアジア地域特有な病因の除去により、環境要因特異的ながん発生の低減化を日米両国でも実現できることが期待される。

B. 研究方法

主に胃がん、肺がん及び糖尿病患者のがん発生の原因となるアジア地域に特徴的な環境要因を同定し、疫学研究による検証を行うと共に、候補要因の発がんへの影響を解析する。又、アジア人に特徴的な遺伝的要因の影響も解析する。候補要因の発がんへの影響が確認されたならば、更なる疫学研究での前向き研究による検証をめざし、高危険度群の推定や疾病のバイオマーカーの開発から、その予防法を開発し、がん発生の減少をめざす。

今年度は、環境要因の同定として(1)~(3)を、遺伝的要因の解析として(4)を行い、又、候補要因の発がんへの影響を解析するために(5)を行った。[]内に研究協力者を示した。
(1) 黄砂やPM2.5を含む長距離輸送性大気

汚染及びそのヒト健康への影響

[渡辺徹志 京都薬科大学 教授]

2012年11月~2013年2月(非黄砂期)に中国で、日本海沿岸3地点(太宰府市、鳥取県湯梨浜町、富山県射水市)では同期間に加え2013年3月~5月(黄砂期)まで、大気粉塵を捕集し、粉塵濃度及び粉塵中の化学成分(発がん性金属を含む金属元素15種類、イオン類8種類、変異・発がん性を有する物質を含む多環芳香族炭化水素類(PAH)10種類)を定量した。また、大気粉塵抽出物の遺伝子毒性として、ネズミチフス菌 YG1024 に対する変異原性を±S9mix で解析した。空気塊の移動経路は、アメリカ合衆国海洋大気庁の HYSPLIT を用いる後方流跡線解析で求めた。

(2) アジア人の DNA 付加体について

[梶村春彦 浜松医科大学 教授]

ヒト組織における、DNA 塩基修飾、DNA 付加体の検索、或いはその関連酵素のヒト腫瘍における変化を解析した。アジア地域、特に中国の胃がん蔓延地(中国安徽省蘆江病院)及び日本の胃がんの胃粘膜組織から、DNA を酸化防止剤存在下で抽出し、網羅的 DNA 付加体解析 (adductome 解析) を行った。また、同位体を用いた DNA 付加体の標準品を合成し、定量性の確保も試みた。

(3) 糖尿病の発がん高リスクの候補物質 (ABAQ) と発がんの関連の解析

[若林敬二 静岡県立大学 教授]

内因性メイラード反応生成物である ABAQ は、*in vitro*, *in vivo* において遺伝毒性を示し、糖尿病患者の発がん高リスクの

候補物質である。ABAQの大腸発がん性を、被験物質をマウス腹腔内に単回投与後、1週後に2%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS, 大腸炎症誘発剤)を1週間飲水投与する、DSS併用マウス大腸発がんモデルを用いて検討した。6週齢♂ICRマウスを用いて、ABAQ(100 mg/kg 体重)+DSS、ABAQ(200 mg/kg 体重)+DSS、ABAQ(200 mg/kg 体重)、DSS投与群、無処理の対照群の5群で検討し、実験は16週で終了した。大腸を病理組織学的に解析し、更にβ-catenin、minichromosome maintenance protein 2(MCM2)、及びprogrammed cell death 4(PDCD4)を免疫組織学的に検討した。

(4) 膵がん発生への遺伝的要因の影響及び環境要因との交互作用の検討

[菊地正悟 愛知医科大学 教授]

2010年1月～2012年5月に、中部、関東、北海道にある5施設で集めた、膵がん症例360例、及び対照群として悪性腫瘍以外で通院している400例を用いた。肥満・糖尿病関連遺伝子であるFTO(rs9939609)、PPARG2(rs1801282)、ADIPOQ(rs1501299)、ADRB3(rs4994)、KCNQ1(rs2237895)、KCNJ11(rs5219)、TCF7L2(rs7903146)、CDKAL1(rs2206734)の一塩基多型(SNP)と膵臓がんリスクの関連を、多変量解析で解析した。

(5) マウス上皮由来初代培養細胞を用いた*in vitro*発がんモデルの開発

マトリゲルを用いる3次元培養により、マウス肺及び胆管の上皮由来初代培養細胞

を樹立した。胆管は、近年、国内の印刷工場での職業性胆管がんが問題となっており、使用した有機溶剤による化学発がんが強く疑われている。

初代培養細胞に、レンチウイルスを用いてがん抑制遺伝子のshRNAを導入し、遺伝学的再構成を行った。*Kras*の活性化は、LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来細胞へのCre recombinaseの導入により行った。遺伝学的再構成を行った細胞のヌードマウスでの造腫瘍能を解析した。ヌードマウス皮下腫瘍の組織学的解析、及び上皮細胞のマーカであるサイトケラチン19(CK19)の発現を免疫組織学的に検討した。皮下腫瘍から培養細胞を樹立し、低接着プレート上でのスフェロイド形成能を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、各研究施設の動物実験倫理委員会の承認を得た後に、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。ヒト検体を用いる研究では、各研究施設の倫理委員会の承認を得た後に、各研究施設の指針に従って実験を実施した。海外で得られた検体に関しては、当該国の共同研究者が所属機関の倫理的承認を得た。

C. 研究結果

(1) 黄砂やPM2.5を含む長距離輸送性大気汚染及びそのヒト健康への影響

北京における大気粉塵濃度は49～830・g/m³(平均値329・g/m³)であり、日本海沿岸3地点では平均値が15～37・g/m³

であった。これまでの調査結果から、大気粉塵濃度の約半分が PM_{2.5} であると考えられる。又、北京での大気粉塵、Ca、Pb、SO₄²⁻、PAH の各濃度、変異原活性の平均値は、日本海沿岸 3 地点における平均値のそれぞれ 10~20 倍、7~10 倍、13~31 倍、5~10 倍、150~300 倍及び 23~50 倍であり、各項目とも北京では日本国内と比べ、非常に高い値であった。国内 3 地点の比較では、いずれの値も大宰府>湯梨浜>射水であった。

湯梨浜における大気粉塵、Ca、Pb 及び SO₄²⁻の濃度は、1 月 29, 30 日及び、3 月 8~10 日に高かった。後方流跡線解析の結果、1 月 30 日及び 3 月 8 日に日本海沿岸 3 地点で捕集した大気粉塵は、中国から 1~2 日で各地点に移流したことが示唆された。

(2) アジア人の DNA 付加体について

日本及び中国の胃がん患者の胃粘膜を用いた adductome 解析から、日中では、脂質酸化由来 DNA 付加体の profile が異なり、腫瘍での変異 profile も異なる可能性が示唆された。又、小型の DNA 付加体は定量的に測定可能であり、数種の exocyclic etheno-DNA 付加体についても、標準品を作成し、定量を試みている。

(3) 糖尿病の発がん高リスクの候補物質 (ABAQ) と発がんの関連の解析

大腸 dysplastic crypt の誘発は、ABAQ 群で 5 匹中 1 匹、1 匹当たりの個数は 0.20 ± 0.45 個であった。ABAQ(100 mg/kg) + DSS 群では 15 匹中 4 匹、0.53 ± 1.13 と有意に、ABAQ(200 mg/kg) + DSS 群では、15 匹中 10 匹、1.60 ± 1.50 と更に増加した。これ

らの dysplastic crypt の細胞質及び核では β-catenin の発現が認められ、MCM2 も陽性であったが、PDCD 4 の発現は陰性だった。どの群でも大腸がんは誘発されなかった。

(4) 膵がん発生への遺伝的要因の影響及び環境要因との交互作用の検討

膵がん症例では 24.1%に、対照群では 8.7%に糖尿病の既往を、喫煙者（過去に喫煙歴のある者を含む）は症例では 59.7%、対照では 49.5%であった。年齢、性別で調整後、FTO (rs9939609) では、TT 遺伝子型と比較し、TA のオッズ比は 1.49 (95%信頼区間 (CI): 1.09-2.03)、AA は 1.49 (95%CI: 0.67-3.29) であった。ADIPOQ (rs1501299) では、AA と比較し、AC のオッズ比は 1.79 (95%CI: 0.98-3.23)、CC は 1.86 (95%CI: 1.03-3.38) と有意に高く、SNP と膵がんについて正の関連を認めた。対照的に、年齢、性別、BMI、糖尿病の既往、喫煙歴で調整後、KCNQ1 (rs2237895) では、AA と比較し CC は 0.57 (95%CI: 0.34-0.96) と有意に低く、SNP と膵がんについて負の関連を認めた。その他の遺伝子型については、有意な関連を認めなかった。

(5) マウス上皮由来初代培養細胞を用いた *in vitro* 発がんモデルの開発

肺では、LSL-*Kras*^{G12D} マウス由来初代培養細胞において、*Kras* 活性化に続けて、2 種のがん抑制遺伝子 (GeneA, GeneB) の発現抑制により、ヌードマウス皮下に carcinoma を形成した。この carcinoma の領域は、CK19 陽性であり、上皮細胞由来であった。*Kras* の活性化、*Kras* の活性化

+shGeneA、*Kras* の活性化 +shGeneA +shGeneB と遺伝学的再構成した細胞は、ヌードマウス皮下に、各々 hyperplasia, dysplasia, carcinoma を形成した。又、皮下腫瘍から樹立した培養細胞は、スフェロイド形成能を示した。

マウス肝内胆管由来の初代培養細胞を樹立した。肺と同様の *Kras* の活性化と 2 種のがん抑制遺伝子の発現抑制により、ヌードマウス皮下での carcinoma 形成を認め、CK19 陽性の上皮細胞由来だった。又、遺伝学的再構成により、hyperplasia, dysplasia, carcinoma の各組織型の皮下腫瘍を形成可能であった。

D. 考察

(1) 黄砂や PM2.5 を含む長距離輸送性大気汚染及びそのヒト健康への影響

北京における大気粉塵、Ca、Pb、SO₄²⁻、PAH の各濃度、変異原活性は、日本海沿岸 3 地点と比べ、非常に高い値であった。大気粉塵中の Ca は、主に地殻・土壌に、Pb、SO₄²⁻、PAH は主に燃焼に、Ca 及び SO₄²⁻ は海塩にも由来すると考えられる。PAH 及び変異活性は、北京と国内の差が他の項目と比較して非常に大きかったが、飛来途中での紫外線等による分解が原因と考えられた。

国内 3 地点では、各項目とも中国に最も近い大宰府で最も高く、越境汚染の影響と推測された。1 月 29, 30 日、及び 3 月 8~10 日の値が日本海沿岸で高いのは、黄砂の飛来が西日本で広く観測されたこと、及び気塊の移動経路解析から、黄砂の飛来が原因

の中国からの越境汚染が考えられた。

中国のみならずインドなどでも PM_{2.5} による大気汚染が問題化しており、今後、経済発展に伴い、アジア各国でも大気汚染が深刻化すると考えられる。PM_{2.5} 等の大気粉塵の飛散状況を測定し、その生物影響を解明することは、健康被害の推定、暴露の低減、原因物質の軽減による呼吸器疾患等の疾病予防策の構築に重要である。

(2) アジア人の DNA 付加体について

Adductome 解析で測定した暴露指標である DNA 付加体 profile からの環境要因の探索の可能性を示した。又、広範な解析が可能となる、FFPE 検体からの DNA を用いる adductome 解析も検討する予定である。

アジアの他地域でも、同様な手法により、新規の環境要因の同定が可能であり、食生活あるいは感染因子等の予防可能な原因ならば、これを直接的に除去することで、アジア地域の疾病の予防に貢献できる。

(3) 糖尿病の発がん高リスクの候補物質 (ABAQ) と発がんの関連の解析

日本の疫学データでも、糖尿病は、全がん、大腸がん、肝臓がん、膵臓がんのリスク増加と関連している。そこで、ABAQ と大腸発がんの関連を、DSS 併用マウス大腸発がんモデルを用いて検討した結果、大腸 dysplastic crypts の誘発を促進する作用が認められた。今後、ABAQ の大腸発がんへの影響の更なる検討とともに、肝発がんへの影響の検討が重要である。

I 型及び II 型糖尿病モデルラットにおける尿中 ABAQ 量は野生型に比較して高く、

ABAQ の生体内生成を確認している。糖尿病患者の生体内でも ABAQ が生成され、肝臓および大腸などの組織に変異を誘発する可能性がある。今後、健常人及び糖尿病患者の尿中 ABAQ 量を解析して、ABAQ のヒト発がんへの関与を明らかにする。

(4) 膵がん発生への遺伝的要因の影響及び環境要因との交互作用の検討

日本人の症例対照研究である今回の研究では、肥満・糖尿病関連遺伝子 FTO rs9939609 と膵がんリスクとの関連が認められたが、米国の hospital-based 症例対照研究では、BMI が 25 以上の群でのみ関連していた。マイナーアレル頻度のアジア人 (12-18%) と白人 (30-50%) の違いが理由と考えられる。今後、FTO の遺伝子型と膵がんの関連を更に検討する必要がある。

糖尿病関連遺伝子型のうち、ADIPOQ (rs1501299)、KCNQ1 (rs2237895) は膵がんリスクとの関連が認められたが、更なる追試による確認が必要である。又、インスリン分泌より、インスリン抵抗性が膵がんリスクに関連する可能性が示された。

近年、アジアにおいて糖尿病は急増している。糖尿病患者のがんを含む疾病に対する高リスク要因に関して、糖尿病状態による内因性発がん物質の発生機構及びその生体影響の解明は、生体内生成の抑制・がん予防剤の開発等によるがん予防策の構築のために重要である。遺伝的要因に関しては、膵がんリスクに対する SNP の関連について、欧米から多数報告されているが、アジア人特有の要因もあると考えられ、日本人を含

むアジア人の症例を用いた分子疫学研究は重要である。

(5) マウス上皮由来初代培養細胞を用いた *in vitro* 発がんモデルの開発

マウス正常上皮細胞由来の初代培養は、腸管・肺・胆管でも可能であり、膵臓でも確認している。肺・胆管由来の培養細胞とも、*Kras* の活性化、2 種類のがん抑制遺伝子の発現抑制の組み合わせによる遺伝学的再構成により、ヌードマウス皮下で hyperplasia、dysplasia、更には carcinoma を形成した。又、肺の皮下腫瘍由来細胞はスフェロイド形成能を示し、スフェロイド形成能を、ヌードマウスでの造腫瘍能を検討する前の段階での *in vitro* マーカーとして活用できる可能性がある。

shApc 導入小腸細胞への PhIP 処理は、ヌードマウス皮下腫瘍の形成に影響を与え、又、化学物質の S9 mix 添加による代謝活性化の手法も確立している。今後は、腸管での PhIP、肺での NKK(タバコ特異的ニトロサミン)、B(a)P (PHA の 1 種) 等をモデル化合物とした暴露条件の検討などにより、*in vitro* 発がんモデルの構築を試みる。「遺伝学的再構成」による腫瘍形成を確認した *shRNA* の導入細胞を用いる、発がん高感受性モデルも検討する。

in vitro 発がんモデルが構築できれば、*in vivo* 発がん性試験に先行するスクリーニングや用量の検討に有用であり、新規の環境要因候補の発がんへの影響や、遺伝的要因でも、候補遺伝子の *shRNA* 導入による発がんへの影響を解析可能である。