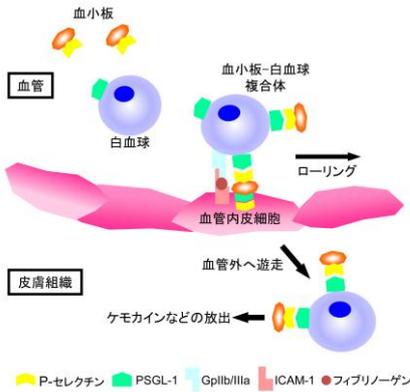


別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	皮膚科学	学内講師	峠岡理沙
研究の 名称	血小板機能の制御による炎症性皮膚疾患の新規外用治療剤の開発		
研究のキ ーワード (注1)	血小板、皮膚炎、外用剤		
研究の 概要 (注2)	<p>血小板は止血だけでなく炎症を含むさまざまな生体反応に深く関与していることが近年知られるようになった。本研究者は、炎症性皮膚疾患モデルマウスを用いて、血小板が皮膚炎部位への白血球遊走に深く関与していることを見出した。その機序として、血中での血小板表面の接着分子であるP-セレクチンを介した血小板-白血球複合体形成と血管への接着が皮膚炎組織への白血球遊走に重要であることを解明した。そこで本研究は皮膚炎における血小板P-セレクチン発現を抑制する薬剤の外用効果を検討することを目標とした。</p>  <p>グルコシダーゼ阻害剤であるカスターノスペルミンなどの薬剤は細胞表面のさまざまな接着分子の発現を抑制することが報告されている。そこでハプテンによるアレルギー性接触皮膚炎モデルマウスを用いて、マウス耳介皮膚にハプテンを塗布して皮膚炎を惹起させてから、上記薬剤を外用することにより、抗炎症効果を検討した。</p>		

<p>研究の背景</p>	<p>血小板は多くの生理活性物質を有し、止血だけでなく炎症を含むさまざまな生体反応に深く関与していることが近年知られるようになった。本研究者は、炎症性皮膚疾患モデルマウスを用いて、血小板が皮膚炎部位への白血球遊走に深く関与していることを見出した。その機序として、血中での血小板表面の接着分子であるP-セレクトリンを介した血小板—白血球複合体形成と血管への接着が皮膚炎組織への白血球遊走に重要であることを解明し、抗血小板薬の全身投与により皮膚炎が抑制されることを明らかにした。また代表的な炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎および乾癬患者において、血漿中の可溶性P-セレクトリンなどの血小板活性化マーカーが健常者に比べて有意に上昇し、そのマーカー値が疾患の病勢と相関関係を示すことを明らかにしており、炎症性皮膚疾患の患者では血中の血小板の活性化がおこっており、その活性化した血小板が炎症性皮膚疾患の病態に深く関与している可能性が示唆される。</p> <p>現在の炎症性皮膚疾患の主な治療薬はステロイド外用剤であるが、長期外用により皮膚萎縮、毛細血管拡張などの皮膚への副作用がしばしば認められることが問題である。したがって、炎症に深く関与している血小板P-セレクトリンの発現を抑制する薬剤を外用することにより皮膚炎を抑えることができれば、ステロイド外用剤でみられるような副作用を伴わない炎症性皮膚疾患の新しい外用治療剤の開発につながることを期待できる。そこで本研究は皮膚炎における血小板P-セレクトリン発現を抑制する薬剤の外用効果を検討することを目標とした。</p> <p>グルコシダーゼ阻害剤であるカスタノスペルミンなどの薬剤は細胞表面のさまざまな接着分子の発現を抑制することが報告されている。そこでハプテンによるアレルギー性接触皮膚炎モデルマウスを用いて、マウス耳介皮膚にハプテンを塗布して皮膚炎を惹起させてから、上記薬剤を外用することにより、抗炎症効果を検討した。</p>
<p>研究手法</p>	<p>ハプテンによるアレルギー性接触皮膚炎モデルマウスでは、ハプテン塗布数時間後より炎症反応が惹起され、約 24 時間後に炎症反応がピークに達する。ハプテン塗布 0.5 時間後～5 時間後のカスタノスペルミン外用時期を設定し、ハプテン塗布 24 時間後での炎症反応における抗炎症効果を検討した。外用による抗炎症効果の評価としては、耳介皮膚の腫脹の検討、ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的検討を行った。</p>
<p>研究の進捗状況と成果</p>	<p>カスタノスペルミン 10 µg/ml、100 µg/ml、1 mg/ml、溶媒のみをハプテン塗布0.5時間、2時間、5時間後に外用したところ、ハプテン塗布24時間後での耳介の腫脹については、カスタノスペルミンをハプテン塗布0.5時間後に外用した群では減弱傾向がみられたが、統計学的に有意差はみられなかった。他の群ではとくに変化はみられなかった。ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的検討では、どの群においてもとくに有意差はみられなかった。</p>

地域への研究成果の還元状況	<p>予想していた研究結果が得られず、現時点では研究成果を地域へ還元できていないが、今後研究を継続していくことにより、血小板活性の制御による新規治療法の開発につながる研究成果が得られれば、研究成果について論文・学会発表を行い、実際の臨床で使用される治療法につながっていくように努力していく予定である。</p>
今後の期待	<p>本研究では、接着分子の発現を抑制するカスタノスペルミン外用による皮膚炎の抗炎症効果は認められなかったが、これまでの研究成果により血小板活性の制御がアトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患の治療に有用である可能性が考えられ、今後研究を継続していくことにより、新規治療法の開発に関する研究につながることを期待できる。</p>
研究発表 (注3)	<p>該当なし。</p>

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

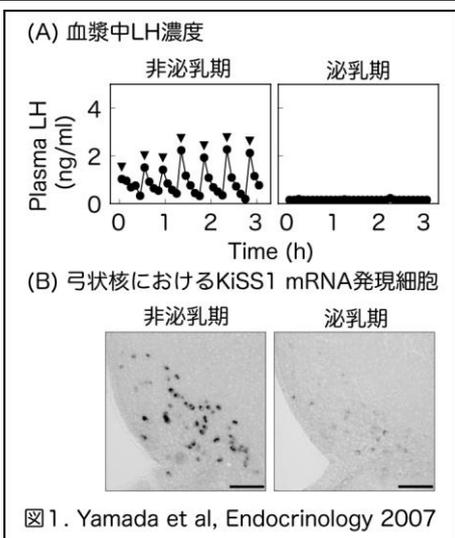
注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所属)	(職名・学年)	(氏名)
研究者	京都府立医科大学 生体構造科学	助教	山田 俊児
研究の名称	神経系におけるキスペプチン制御と吸乳刺激		
研究のキーワード (注1)	キスペプチン、授乳期、吸乳刺激		
研究の概要 (注2)	<p><u>キスペプチン</u>はヒトを含むほ乳類の生殖機能に対して強力な促進作用をもつ神経ペプチドである。ほ乳類の生殖機能は視床下部—下垂体—性腺軸と呼ばれる一連のメカニズムによって制御される。視床下部にある<u>性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 神経</u>から分泌される GnRH は、下垂体からのゴナドトロピン(卵胞刺激ホルモンと<u>黄体形成ホルモン (LH)</u>) を介して、性腺の活動を促す。GnRH は生殖機能を制御する「最上位のホルモン」として長い間君臨してきたが、キスペプチンは GnRH 分泌を制御するさらに上位のホルモンである。申請者らは LH 分泌が抑制される泌乳期の母ラットでは、乳仔からの<u>吸乳刺激</u>により視床下部<u>弓状核</u>のキスペプチン、およびその遺伝子である KiSS1 mRNA の発現が低下することを明らかにした(図1)。</p> <p>吸乳刺激によるキスペプチン神経とゴナドトロピン分泌の抑制はほ乳動物の生殖サイクル内で生じる生理的な作用である。申請者はその生理的なキスペプチン抑制メカニズムを解明し創薬に応用できれば、閉経後などの GnRH 分泌亢進にともなう過剰ゴナドトロピン分泌を抑制できるのではないかと考えた。本研究は、<u>キスペプチン神経を抑制する吸乳刺激の神経回路の解明</u>の第一歩として、吸乳刺激が弓状核の神経ペプチド発現に及ぼす影響を明らかにする事を目的とする。</p>		



研究の背景	<p>閉経に伴う下垂体からのゴナドトロピン過剰分泌は更年期障害や卵巣癌のリスク要因の一つと考えられている。申請者はゴナドトロピンの過剰分泌を抑制する手段として、吸乳刺激によるゴナドトロピン分泌抑制が、ほ乳動物において生理的作用であることに着目した。キスペプチン神経を抑制する吸乳刺激の神経回路を解明し、生体内に元来備わっている性腺機能抑制メカニズムを活性化するような創薬に応用できれば、閉経後などで生じる過剰ゴナドトロピン分泌を抑制できるのではないかと考えた。</p>
研究手法	<p>吸乳刺激を視床下部に伝達する神経伝達物質やその経路は未だ明らかとなっていない。そこで、本研究では吸乳刺激を視床下部につたえる（1）神経伝達物質の網羅的探索、と（2）神経回路の解剖学的探索の2つの実験を行った。</p> <p>（1）神経伝達物質の網羅的探索 real-time RT-PCR法を利用し、吸乳刺激を受ける母ラットと受けない母ラットの脳幹における感覚伝達関連因子および授乳関連因子の発現量を比較した。分娩後、8匹の仔ラットに授乳する母ラット（授乳群）と乳仔をすべて取り除いた母ラット（非授乳群）を準備し、分娩後8日目に脳幹を採取した。脳幹からtotal RNAを抽出し、real-time RT PCR法でgastrin-releasing peptide receptor (GRPR), corticotropin-releasing hormone (CRH), prodynorphin (PDYN), calcitonin-related polypeptide (CGRP), Substance P (SP), parathyroid hormone 2 (PTH2)の発現量を授乳群と非授乳群で比較した。</p> <p>（2）神経回路の解剖学的探索 授乳ラットおよび非授乳ラットの視床下部弓状核（キスペプチン神経が局在）にガラスマイクロピペットを用いて逆行性トレーサーであるFGを投与し、2日後に灌流固定をして脳を採取した。その後、FGと神経細胞の活性化マーカーであるcFosの二重免疫染色を行い、吸乳刺激で活性化し弓状核に神経投射する神経の局在を調べた。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>本研究により、PDYNとPTH2 mRNAが吸乳刺激により脳幹で増加する事が明らかとなった。PTH2に関しては、他の研究者の結果と同じであることから、本研究手法の確からしさを示していると思われる。一方で、PTH2がキスペプチンに影響するという研究はまだ行われていないので、さらなる発展が期待される。PDYNに関しては、弓状核のキスペプチン神経がPDYNの産物であるダイノルフィンにより抑制されるという結果がある。この事を考えると、脳幹から弓状核に投射するPDYN神経が吸乳刺激をキスペプチン神経に伝える事でキスペプチン発現が抑制される可能性が考えられる。今後は脳幹におけるPDYNとPTH2の形態学的解析と吸乳刺激で活性化するか否か、弓状核に神経投射するか否かを調べる必要があると考える。</p>

地域への研究成果の還元状況	本研究結果は、授乳ラットの性腺機能抑制メカニズムを解明するための第一歩として大変有意義なものとなった。ヒトにおいても、授乳期には、吸乳刺激により高プロラクチン血症やストレス応答の変化など、母親に様々な変化がもたらされる。本研究は直接的にヒトに応用できるものではないが、基礎研究として、ヒトの授乳期に起こる様々な問題の解決の糸口になることが期待される。
今後の期待	今後、脳幹におけるPDYNとPTH2に着目し、これらの神経とキスペプチン神経との連絡や、キスペプチン発現への影響を明らかにできれば、吸乳刺激による性腺機能抑制メカニズムの解明につながると考えられる。さらに、このメカニズムを人為的に活性化する方法を開発できれば、ゴナドトロピン分泌過剰を抑制する手段の一つとなることが期待される。
研究発表 (注3)	学会発表 第39回日本神経内分泌学会，2012.11.9.28-29，北九州 第118回日本解剖学会総会，2013.3.28-30，高松

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

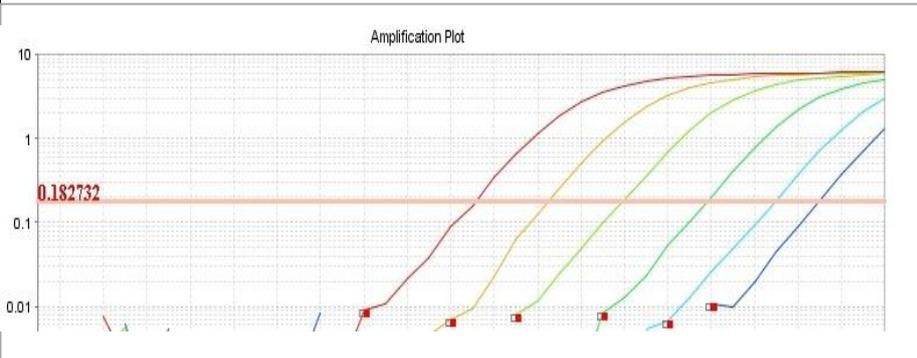
注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	小児発達医学	併任助教	吉田 秀樹
研究の名称	癌特異的microRNAを用いた微小残存病変マーカーの開発		
研究のキーワード (注1)	microRNA、微小残存病変（MRD）、横紋筋肉腫		
研究の概要 (注2)	<p>現在、微小残存病変（MRD）マーカーが存在しない癌種が多く存在する。MRDマーカーの確立により、治療反応性の評価が可能となる。一方、microRNAは様々な癌腫においてバイオマーカーとして注目されている。我々は、血清中のmir-206発現量が横紋筋肉腫の診断的腫瘍マーカーとなり得ることを明らかにした。そこで本研究では、横紋筋肉腫の患者骨髄を用いて、発症時・治療後・再発時のmiR-206の発現を評価し、発現との相関関係を後方視的に解析した。まずmiR-206の横紋筋肉腫MRDマーカーとしての有用性を検討し、実用化を目指した。</p>		
	 <p>図 1.Rh30 を段階希釈して healthy volunteer の末梢血単核細胞と混合し、miR-206 の発現限界を検討した。10⁴ レベルまで検出可能であった。 *左からRh30：血清単核細胞がそれぞれ1：1、1：9、1：99、1：999、1：9999である。なお、一番右のグラフはcycle数も37と多く、非特異的なものとする。</p>		

	<p style="text-align: center;"> 担癌患者 (横紋筋肉腫骨髄転移 陰性例を含む) healthy volunteer 骨髄転移陽性例 治療前：左 治療後：右 </p>
<p>研究の背景</p>	<p>白血病を始めとする一部の癌において近年、微小残存病変（MRD）という概念が標準化してきており、これらを指標としてより厳密な分子寛解を目指すことが長期予後の改善に役立つことが明らかになってきた。MRDは再発に際し、臨床所見や他の検査所見に先立って検出されるため、感度が高ければ、早期での再発の発見も可能と考えられる。横紋筋肉腫は小児の軟部腫瘍で最も頻度の高い癌であり、融合遺伝子PAX3-FKHRを有する群は依然治療反応性が不良であり、また再発率も高いため、治療後のフォローにおいて指標となるマーカーの確立が望まれる。近年20-24塩基の小分子機能的RNAであるmicroRNA（以下miRNA）の存在が明らかになり、癌の診断への利用が検討されている（大腸癌、乳癌、前立腺癌など）。miRNAは、安定性が高く、また癌種によって特異的であることが知られているため、今回我々は筋特異的miRNAが横紋筋肉腫のMRDマーカーとなり得るかに注目した。</p>
<p>研究手法</p>	<p>横紋筋肉腫の患者骨髄を用いてmiR-206の発現を評価し、病勢と発現の相関関係を後方視的に解析した。当施設の倫理委員会の認可を得たうえで、本人または代諾者の同意を得た当科での保存骨髄検体を解析に用いた。同時に、非横紋筋肉腫の患者骨髄検体において、miR-206の発現レベルも検討し、全く発現していないか、低いレベルでの発現しかないと確認した。</p>
<p>研究の進捗状況と成果</p>	<p>骨髄細胞に横紋筋肉腫の細胞株Rh30を混合したものは、その希釈率とmiR-206の発現レベルは相関しており、10^4レベルで検出可能であり、「骨髄中のmir-206発現量が横紋筋肉腫の診断的腫瘍マーカーとなり得る可能性」を示した（図1）。</p>

	横紋筋肉腫の骨髄転移陰性例では、miR-206の発現レベルは低かった。また非横紋筋肉腫の患者骨髄検体においても同様に、miR-206は低いレベルでの発現しかないと確認した。横紋筋肉腫の骨髄転移陽性例は1例しか存在せず、miR-206の発現レベルは他と比較すると高値であったが、残念ながら有意差を見出せなかった（ただし、この骨髄陽性症例は、PET-CTのみ椎体に陽性所見があるものであり、腸骨では陽性とは言えない可能性が残る；図2）。
地域への研究成果の還元状況	本研究の成果により、mir-206のMRDマーカーとして用いることで治療反応性のモニタリングができ、結果的に患児のQOL向上につながる可能性を示した。また癌種特異的miRNAを用いる同様の手法は、未だ腫瘍マーカーが確立されていない様々な癌種で応用できる可能性があり、今後の大学のがん治療研究推進の一助になると考える。
今後の期待	今後、骨髄転移陽性症例があればmiR-206の発現レベルの経過を追跡することで、臨床検体においても診断的腫瘍マーカーとして成立することを証明する。そして横紋筋肉腫治療における確固たるlandmarkとしたい。更には他の癌種においても新たな腫瘍マーカーを探求し実臨床への応用を目指す。
研究発表（注3）	1. Miyachi M, <u>Yoshida H</u> , et al. Circulating muscle-specific microRNA, <i>miR-206</i> , as a potential diagnostic marker for rhabdomyosarcoma. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 2010; 400: 89-93.

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	京都府立医科大学 分子標的癌予防医学	博士後期課程 4年	谷口 知行
研究の 名称	レスベラトロール結合タンパク質の同定およびがん予防における機能 解明		
研究のキ ーワード (注1)	がん予防、ケミカルバイオロジー、レスベラトロール、標的分子		
研究の 概要 (注2)	<p>ポリフェノール的一种であるレスベラトロール(図1)は、様々ながんにおいて、抑制、予防効果を有することが報告されている。しかしながらレスベラトロールが何に直接結合することで抗がん効果を発揮するのかほとんど解明されていない。そこでアフィニティービーズ法によりレスベラトロールの直接の標的分子の解明に挑戦したところ、これまでにレスベラトロールと関連報告のないタンパク質 A が見出された。レスベラトロールを細胞に処理するとタンパク質 A の発現量が低下することが見出された。続いて RNA 干渉法によりタンパク質 A の発現を抑制したところ、がん細胞の増殖抑制効果が見られた。また、このとき細胞死抑制タンパク質 B が減少し、細胞死が強く誘導されることを見出された。さらに、タンパク質 A の発現抑制時にレスベラトロールを処理すると、レスベラトロールのがん抑制効果が減弱することを見出された。以上、<u>レスベラトロールの新規結合タンパク質として新たにタンパク質 A を発見し、タンパク質 A ががん細胞において細胞死を抑制する機能を持つこと、レスベラトロールがタンパク質 A を抑制することでがん抑制効果を示すことを発見した。今後はタンパク質 A の機能を詳しく検討し、抗がん効果を検証することで、明確ながん予防法の確立に繋がる</u>ことが期待される。</p>		
研究の 背景	<p>当教室ではこれまでに様々な食品成分にがん予防効果があることを報告してきた。しかしながらこれらの食品成分がどの分子を標的として、がん予防効果を発揮しているのかはほとんど明らかとなっていない。近年の遺伝子改変マウスなどの研究成果の蓄積により、がんは組織、およびその細胞ごとに発癌の分子メカニズムが異なることが</p>		

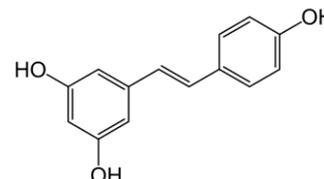
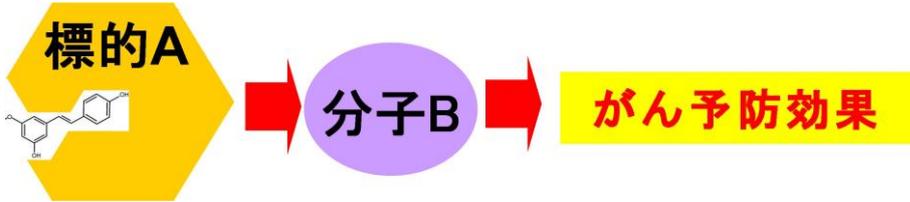


図1 *trans-resveratrol*

	<p>明らかとなってきた。このことから、今後食品成分による明確ながん予防を達成するためには、これら食品成分がどのような標的分子に作用することでそのがん抑制効果を発揮するのか解明する必要があると考えられる。レスベラトロールは赤ワイン、ブドウなどに豊富に含まれるポリフェノールの一種であり、抗がん効果、抗糖尿病効果、寿命延長効果など多種の活性が報告されている食品成分である(Baur J.A. <i>et al.</i> Nat. Rev. Drug Discov., 2006)。近年、レスベラトロールの活性の一つである老化誘導性代謝疾患の抑制効果の標的分子が同定され学術的に高い評価を受けた (Park S. <i>et al.</i>, Cell 2012)。レスベラトロールは多種の活性をもつことから、その生理活性を引き起こす標的分子の解明は新規のがん抑制メカニズムの解明や、抗癌剤の開発に繋がるのが期待できる。そこで本研究はレスベラトロールの直接結合タンパク質を同定し、機能解析を行うことで、レスベラトロールの抗がん効果の標的分子を解明することを目的とした。</p>
<p>研究手法</p>	<p>本研究はがん細胞内のレスベラトロール結合タンパク質を同定し、レスベラトロール結合タンパク質が癌細胞においてどのような機能を担っているか検証することで、レスベラトロールの標的分子を解明することを目的とした。はじめに【1】アフィニティービーズ法と質量分析計を用いてレスベラトロール結合タンパク質の単離、同定を試みた。また、【2】レスベラトロールがレスベラトロール結合タンパク質にどのような影響を及ぼすか Western blot 法により解析した。次に【3】siRNA を用いてレスベラトロール結合タンパク質のノックダウンを行い、WST-8 法、フローサイトメーターを用いた細胞周期測定、およびアポトーシス定量を行うことで、がん細胞の増殖に与える影響を解析した。また、【4】細胞周期やアポトーシス定量の結果に基づき、レスベラトロール結合タンパク質ノックダウン時に変動するがん関連タンパク質の変動を Western blot 法で解析した。さらに【5】レスベラトロールがレスベラトロール結合タンパク質を介してがん細胞の増殖抑制を誘導するか検証した。</p>
<p>研究の進捗状況と成果</p>	<p>【1】の検討結果、新規レスベラトロール結合タンパク質としてタンパク質 A を見出した。【2】の検討結果、レスベラトロールはタンパク質 A の発現量を減少させることを見出した。【3】の検討結果、タンパク質 A の発現抑制は細胞死を誘導し、がん抑制効果を示すことを見出した。【4】の検討結果、タンパク質 A の発現抑制時に、細胞死抑制タンパク質 B が減少することを見出した。【5】の検討結果、レスベラトロールはタンパク質 A を介して細胞増殖抑制効果を示すことを見出した。以上の結果から、レスベラトロールはタンパク質 A を標的とし、タンパク質 B を減少させて、がん細胞に細胞死を誘導することで増殖抑制効果を示すことがわかった(図2)。</p>

	 <p>図2 レスベラトロールは標的分子 A を介し、がん増殖抑制効果を示す</p>
地域への研究成果の還元状況	赤ワインやブドウに豊富に含まれ、なおかつサプリメントとしても販売されることから、レスベラトロールは一般社会においても馴染み深い食品成分である。よって本研究が成し遂げるレスベラトロールの標的分子の解明は、がん予防研究に留まらず、一般社会にも影響を与えることが予測される。現在国際誌に投稿準備中である。
今後の期待	本研究においてレスベラトロールの抗がん効果の標的分子としてタンパク質 A を世界で初めて発見した。今後はタンパク質 A の機能を詳しく解析しつつ、がん予防効果についてさらなる実証を積み重ね、レスベラトロールによる明確ながん予防法の確立に繋げる必要がある。レスベラトロールには抗がん効果の他に抗糖尿病効果、抗アルツハイマー効果などの魅力的な生理活性が報告されている。故にタンパク質 A はレスベラトロールのがんの抑制効果以外の生理活性を説明できる可能性があり、今後さらなる研究が必要と考えられる。
研究発表 (注3)	現在これらの研究成果を国際誌に投稿準備中である。

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	内科学 血液・腫瘍内 科学	大学院・3年	小林 覚
研究の 名称	<i>MYC-IGH</i> 転座を有する高悪性度B細胞リンパ腫における <i>BACH2</i> の機能解析		
研究のキ ーワード (注1)	染色体転座、B細胞リンパ腫、 <i>BACH2</i>		
研究の 概要 (注2)	<p><i>MYC</i>を含む double <i>IGH</i>転座を有し、極めて予後不良の経過をとった治療関連 B 細胞リンパ腫から、<i>IGH</i> 転座の新規相手遺伝子として BTB and CNC homology 2 (<i>BACH2</i>)を 2011 年に同定した。</p> <p><i>BACH2</i>は B 細胞に特異的な転写抑制因子であり、クラススイッチ組換え、高頻度体細胞突然変異、胚中心形成に必要とされている。癌抑制遺伝子とも考えられており、その高発現症例は B 細胞リンパ腫における予後良好因子とされている。解析した症例では <i>IGH</i> との転座でキメラ転写産物を形成することにより、<i>BACH2</i> が恒常的に発現していた。しかし、正常 <i>BACH2</i> により抑制される <i>PRDM1</i> は発現していた。このことから、キメラ遺伝子形成によって、<i>BACH2</i> は異なる機能を持つ可能性が考えられた。</p> <p>さらに造血器腫瘍細胞株を用いた <i>BACH2</i> 発現量解析の結果、<i>MYC-IGH</i> 転座を有する高悪性度のバーキットリンパ腫 (BL) 細胞株において <i>BACH2</i> の高発現を認めることができた。以上の結果から、<i>MYC</i> を含む <i>IGH</i> 転座を有する B 細胞リンパ腫では、<i>BACH2</i> が未知の機能により、その悪性化の機序に関与していることが示唆された。</p> <p>本研究ではB細胞リンパ腫におけるその分子機構を同定する。それによって<i>MYC-IGH</i>転座を有し、極めて予後不良のB細胞リンパ腫の悪性化のメカニズムを解明する。</p>		

	<p>B細胞の分化と遺伝子発現</p> <p>MYC/IGH 陽性リンパ腫での予測されるBACH2の働き</p>	<p><u>B 細胞分化過程における PRDM1、BACH2 の働きについて</u></p> <p>通常、<i>BACH2</i> の発現が活性化することで、<i>PRDM1</i> の発現が抑制され記憶 B 細胞、<i>PRDM1</i> が活性化することで形質細胞へと分化が進む。しかし、<i>MYC/IGH</i> 陽性リンパ腫では <i>BACH2</i> が高発現していたことから、<i>PRDM1</i> を抑制していることが推測され、形質細胞への分化が抑制されている可能性が考えられる。</p>
<p>研究の背景</p>	<p>B細胞腫瘍では免疫グロブリン遺伝子 (<i>IG</i>) が、<i>MYC</i>、<i>BCL2</i>、<i>BCL6</i> など B細胞の増殖、分化、細胞死等の様々な機能を有する遺伝子と再構成を起こし、相手遺伝子を活性化することによって腫瘍化に密接に関与すると考えられている。しかし、その機序については未だ明確になっていない。一方、これらの遺伝子再構成が同一細胞に二種類以上認められる症例は、“double-hit” lymphoma として知られ、2008年のWHO分類で一つのカテゴリーとされた。特に <i>MYC</i> を含む double <i>IGH</i> 転座を示す症例では白血化や中枢神経浸潤の頻度が高く、1年以内に死亡するなど極めて予後が不良であり、その病態解明が喫緊の課題である。</p>	
<p>研究手法</p>	<p>In vitro における <i>BACH2</i> 発現抑制効果の検討</p> <p>i) BL細胞株における <i>BACH2</i> 発現抑制による分化誘導効果の検討 BL細胞株 Daudi, Namalwa, Ramos を用いる。</p> <p>a) siRNA を用いた <i>BACH2</i> 発現抑制</p> <p>b) Real-time PCR 法による <i>BACH2</i>, <i>PRDM1</i> 発現量の検討</p> <p>c) siRNA 導入後の細胞の生存率、形態変化の検討</p>	
<p>研究の進捗状況と成果</p>	<p>In vitro における <i>BACH2</i> 発現抑制効果の検討を行った。</p> <p><i>BACH2</i> の高発現が認められたバーキットリンパ腫細胞株 4 株 (Daudi, Namalwa, UH-1, Ramos) に対して、<i>BACH2</i> に対応した shRNA を用いてその発現抑制効果を検討した。各細胞株に対して shRNA を電ポレーション法にて導入を行い、24 時間後の発現量をリアルタイム PCR 法により確認した。その結果、<i>BACH2</i> 及びそのシグナル下流に存在する <i>PRDM1</i> の発現は通常のバーキットリンパ腫細胞株と比較し、その発現を有意に抑制することが認められなかった。原因として、各細胞への shRNA の導入効率が低いことが考えられ、現在、方法の改善を行い、研究を継続中である。</p> <p>また化合物を用いたスクリーニングで <i>BACH2</i> 高発現の細胞株に対して、細胞内シグナル及び生存に影響を与えるような化合物の検討を行う。</p>	

地域への研究成果の還元状況	現在、研究成果を当科のホームページに掲載できるよう準備中である。
今後の期待	近年の分子標的治療薬の開発によりB細胞リンパ腫の治療成績は著しく改善した。しかし、未だに完治は困難であり、更なる治療法の開発は喫緊の研究課題である。本研究で、腫瘍化における <i>BACH2</i> の関与と分子機構が明らかになれば、極めて高悪性度のB細胞腫瘍に対する <i>BACH2</i> による新規治療法の開発のみならず、新規分子標的の同定にもつながる魅力的な研究課題である。加えて、本研究の成果を他領域における悪性腫瘍治療法の開発にも応用しうる可能性が高い。
研究発表 (注3)	<ul style="list-style-type: none"> ・第71回日本癌学会（2012年） ・第74回日本血液学会（2012年）

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	消化器外科	大学院 4 年	竹下宏樹
研究の 名称	アダプター蛋白XB130による癌関連microRNAの発現制御		
研究のキ ーワード (注 1)	XB130, アダプター蛋白, microRNA, 癌		
研究の 概要 (注 2)	<p>アダプター蛋白は、結合ドメインを介して他の蛋白と複合体を形成することにより、細胞シグナルを伝播する(Flynn DC et al. 2001. Oncogene)。癌においても様々なシグナル伝達を介して、癌関連遺伝子の発現調節を行い、発癌や癌の悪性度に関与している。近年、トロント大学外科のMingyao Liu教授らは、新規アダプター蛋白XB130をエンコードする遺伝子xb130をクローニングした(Xu J et al, J Biol Chem 2007. Shiozaki A et al, J Clin Bioinforma 2011.)。XB130のN末端には、はSrc homology (SH) 2、SH3結合モチーフを持ち、Src活性、Aktリン酸化などの、チロシンキナーゼ関連シグナルを制御する。既に、甲状腺癌・肺癌細胞株において、XB130が細胞増殖・アポトーシス関連蛋白の発現制御により、癌の増殖が促進されることが解明されている (Shiozaki A, et al. 2011. Am J Pathol, Lodyga M et al. 2008. Oncogene)。</p> <p>申請者は、2011年7月から2012年3月まで、トロント大学外科に留学し、Liu教授の指導の下、XB130の癌における機能解析を行い、既に甲状腺癌において、XB130が発現を制御する38種類のmicroRNAを同定した。</p> <p>今回、既に同定済みのXB130が発現を制御する38種類のmicroRNAの細胞増殖やアポトーシスなどに関与する機能を解析し、癌細胞におけるアダプター蛋白XB130の癌関連microRNAの発現を制御する全く新たなメカニズムについて究明する。</p>		
研究の 背景	<p>癌に対する治療が進歩した現在でも、手術切除不能および再発癌に対する治療には限界があり、予後はきわめて不良である。新たな治療法の開発のためには、発癌や癌の増殖、浸潤、転移などの悪性度に関与するメカニズムを理解することが重要である。</p> <p>microRNA(miRNA)は約22塩基からなるsmall non-codingRNAであり、メッセンジャーRNA(mRNA)の切断や翻訳抑制を行うことでターゲット遺伝</p>		

	<p>子の発現を抑制する。近年、microRNAは様々な癌で高頻度に発現異常をみとめ、発癌や癌の悪性度に関与していることが明らかになっている(He L et al. 2005. Nature)。したがって癌における、microRNAの発現制御のメカニズムを究明することは新規抗癌治療のターゲットとなる可能性を秘めているが、現在のところわずかな報告があるのみである。</p>
研究手法	<p>XB130が発現を抑制しているmicroRNA中から、miR33a, miR149, miR193a-3pに注目した。ターゲット予測データベースを使用して、それぞれのmicroRNAのターゲット遺伝子を予測し、その中から、細胞増殖やアポトーシスなどに関与する遺伝子を選択した(miR33a-CEBPG, MYC miR149-CEBPG, FOSL1 miR193a-3p - SLC7A5, DECR1, SETD8)。実際にターゲットとなっているかについての検討は以下のように行った。</p> <p>①mirVana™ miRNA Mimic (Ambion, Austin, TX)を甲状腺癌細胞株に導入して、各microRNAを過剰発現させ、各遺伝子の蛋白発現の変化をWestern blottingにて解析した。</p> <p>②上記①で発現に変化のあった遺伝子のmRNA 3'UTR塩基配列導入したpmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega, Madison, WI, USA)を甲状腺癌細胞株にトランスフェクションさせて、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)にてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>miR33aはMYCをdirectにtargetとしており、発現を抑制していた。同様にFOSL1はmiR149の、SLC7A5はmiR193a-3pのdirect targetであった。これらの遺伝子は癌遺伝子として既に報告があり、XB130がmicroRNAの発現を抑制することで癌遺伝子の発現を調節する新規の発癌メカニズムが解明された。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>現在、microRNAは新たな抗癌治療のターゲットとして注目されており、癌におけるmicroRNAの発現異常を改善することを目的とする新規抗癌治療が研究されている。この新規抗癌治療と、当該研究を組み合わせることにより、癌関連遺伝子のmicroRNAを介した発癌に対する働きのみを選択的に抑制する抗癌治療が期待できる。</p>
今後の期待	<p>当該研究は他の多くの癌関連遺伝子にも応用も可能ある。また、microRNAは、癌だけでなく炎症性疾患、感染症、生活習慣病などにも関与していることが明らかとなっており、これらの疾患にも新たな治療のターゲットとして極めてインパクトが高いものと考えられる。</p>

研究発表 (注3)	甲状腺癌におけるXB130の癌抑制microRNAの発現抑制と癌増殖への関与 第71回日本癌学会学術総会(2012年9月19-21日、札幌)
--------------	---

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	京都府立医科大学 皮膚科学教室	大学院・4年	和田誠
研究の 名称	血管肉腫細胞株に対する分子標的薬による増殖抑制効果の検討		
研究のキ ーワード (注1)	血管肉腫 PI3K阻害剤 mTOR阻害剤 cyclinD		
研究の 概要 (注2)	血管肉腫細胞株(ISOS-1, ISO-HAS)に低分子化合物を添加し、増殖抑制効果を検討する。		
研究の 背景	血管肉腫は極めて予後の悪い皮膚悪性腫瘍であるが、抗腫瘍効果を示す分子標的薬は現在見つかっていない。		
研究手法	血管肉腫細胞株 (ISOS-1, ISO-HAS) にRAF阻害剤、MEK阻害剤、PI3K阻害剤、mTOR阻害剤などを添加し、増殖抑制・アポトーシスをWST-8 assay, FACSを用いて解析する。また薬剤添加後の細胞を回収し、ウエスタンブロッティングを行い、分子標的薬の作用機序を評価した。		
研究の進 捗状況と 成果	血管肉腫細胞株(ISOS-1, ISO-HAS)にRAF阻害剤、MEK阻害剤、PI3K阻害剤、mTOR阻害剤を添加し、WST-8を用いて増殖抑制効果を検討し、PI3K阻害剤、mTOR阻害剤が細胞の増殖を抑制することが分かった。FACSを用いて細胞周期解析を行い、PI3K阻害剤、mTOR阻害剤がISOS-1細胞に対してG1周期停止を誘導した。薬剤添加後の細胞を回収しウエスタンブロッティングを行った結果、cyclinD1, cyclinD2, cyclinD3のタンパク量が減少し、G1期停止に関与していることが確認された。またAKT阻害剤はAKTのリン酸化を抑制したがcyclinDのタンパク量に影響を与えなかった。現在PDK1阻害剤を用いて更なる解析を行っており、治療標的となりうる分子の同定を試みている。		

地域への研究成果の還元状況	今後、血管肉腫細胞の治療標的となる分子が同定された場合には、既存の分子標的薬が使用できる可能性もあり、治療効果の改善が期待できる。
今後の期待	血管肉腫細胞株に対して増殖抑制効果を示す低分子化合物の作用機序をさらに解明することで、新たに創薬の可能性が生まれる。
研究発表 (注3)	

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	京都府立医科大学大学 院 免疫学	大学院生 3 回生	西岡 敬介
研究の 名称	人工染色体を用いた、iPS細胞から機能性細胞系譜への分化誘導に伴うエピジェネティック制御の解析		
研究のキ ーワード (注1)	エピジェネティクス、iPS細胞、分化		
研究の 概要 (注2)	<p>染色体上に起こるエピジェネティック修飾は、細胞の分化制御や種々の疾患の発症・進展と深く関連しているが、その制御メカニズムには不明な点が多い。そこで我々は、継時的にエピジェネティック変化を解析できる人工染色体Epigenosomeの開発を行っている。EpigenosomeをiPS細胞へ導入し、様々な組織細胞への分化に伴う遺伝子抑制または遺伝子発現に伴うエピジェネティック変化の機構を解析することを目的とした（図）。</p> <pre> graph TD A[Epigenosome 人工染色体] -- 導入 --> B[iPS 細胞] B -- "分化誘導 (+薬剤選択)" --> C[様々な細胞] C -- "種々の分化段階の細胞から、Epigenosomeを抽出・精製" --> D[解析対象とするゲノム領域の エピジェネティックマークの解析 (bisulfite sequencing, CHIP等)] </pre> <p>Epigenosomeを用いた解析系の開発のため、未分化能の維持に関わる遺伝子と、分化した組織細胞で働く遺伝子に着目した。分化能を有する前駆細胞株に導入し、遺伝子発現制御に伴うエピジェネティック修飾をバイサルファイトシーケンシングにて解析した。</p>		

研究の背景	<p>DNAのCpGメチル化やヒストンのアセチル化、メチル化といったエピジェネティック修飾は、細胞分化の制御に極めて重要な役割を果たしている。さらに種々の疾患の発症・進展と深く関連している。しかしながら、これらのエピジェネティック修飾がいつどのように起きるのか等に関しては不明な点が多い。</p> <p>そこでこれらのメカニズムを解明する目的で、iPS細胞を用いて遺伝子発現または発現抑制に伴うエピジェネティック変化を継時的に解析ができる解析方法を確立し、分化誘導の機構解明に資することとした。</p>
研究手法	<p>種々のターゲット遺伝子の領域を含むBACクローンを用いて、培養細胞内に安定的に維持される人工染色体、Epigenosomeの開発を行った。</p> <p>構築したEpigenosomeを、iPS細胞を含む各種培養細胞へ導入し、薬剤選択下で培養を行った。その後、細胞を分化誘導し、継時的に核を抽出して、バイサルファイトシーケンシングにてEpigenosome上のCpGメチレーションを解析した。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>EpigenosomeはヒトiPS細胞、ヒトとマウスの培養細胞株に導入後、核内に移行することが示された。薬剤選択下長期培養において安定して核内に維持されること、Epigenosomeが細胞内で複製したことを確認した。</p> <p>また、分化能を有するマウス培養細胞株へEpigenosomeを導入した場合は、半年以上経過しても安定して核内に維持されていた。導入前後でCpGメチル化状態をバイサルファイトシーケンシングにより比較すると、導入後で一部のCpG部位のde novoのメチル化がみられた。</p> <p>現在、バイサルファイトシーケンシングに加えてChIPにより解析を進めている。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>本研究で開発する解析系は、さまざまな組織細胞、臓器や疾患を対象とした研究に用いることができ、京都府立医科大学発の新しい研究の潮流を生み出すことができる。</p>
今後の期待	<p>今後さらなる解析を続けることで、分化誘導に伴うエピジェネティック変化がいつどのように起こるか等について、新しい情報を得られるものと期待できる。確立した解析系をiPS細胞に応用することで細胞分化に伴う様々な遺伝子のエピジェネティック制御を解析でき、生活習慣病などエピジェネティクスが重要な鍵を握る疾患の病態メカニズムの解明につながる可能性を有して</p>

	いる。
研究発表 (注3)	なし

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。