

## 公益財団法人 寺岡記念育英会

### 2019 年度 研究活動費助成事業 研究活動報告書一覧

海外輸入された Ready-to-Eat 食品における薬剤耐性菌を用いた分子疫学解析 岡山大学 医歯薬学総合研究科 臨床感染症 准教授 萩谷英大	・・・ 1
精原細胞ニッチの再構築を用いた新規移植法によるマウス精巣内異種移植の試み 川崎医科大学 解剖学 講師 横西哲広	・・・ 4
高転移臓器における前転移 niche の性質の検討 岡山大学 医歯薬学総合研究科 口腔病理学分野 助教 河合穂高	・・・ 10
うつ発症予防を目指した香り分子吸入の研究 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床検査学科 講師 上野浩司	・・・14
制御性 T 細胞におけるユビキチンリガーゼ RNF146 の役割についての研究 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学 助教 勝山隆行	・・・18
炎症性骨破壊におけるアンジオテンシン II が及ぼす骨細胞における役割の検討 川崎医科大学 リウマチ・膠原病学 大学院生 赤木貴彦	・・・22

※対象者の所属・職位は、本助成事業への応募当時のものです。

# 海外輸入された Ready-to-Eat 食品における薬剤耐性菌を用いた分子疫学解析

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 瀬戸内（まるがめ）総合診療医学講座

萩谷 英大

## (研究成果の概要)

本研究では、薬剤耐性菌の国内流入ルートの一つの可能性として海外輸入食品を疑い、特にカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) を対象に特殊スクリーニング培地を用いた調査を実施した。合計 54 の食品サンプルを調査し、スクリーニング培地陽性が 1 サンプルで認められたが、菌種同定・薬剤感受性検査の結果、CRE は検出されなかった。本調査では、海外輸入食品が薬剤耐性菌の国内流入ルートであるという証拠を示すことはできなかったが、サンプル数が少ないことからその可能性を否定できるものではない。国際化が進む中、薬剤耐性菌対策は今後も医療現場内外で考えていく必要があり、今後も調査を継続してその可能性を検討していく必要がある。

## (本文)

### 【研究背景】

薬剤耐性菌 (Antimicrobial Resistance, AMR) は世界的な規模で医療上および公衆衛生上の脅威となりつつある。有効な対策が為されない場合、2050 年には AMR 関連死亡数は世界中で 1,000 万人以上に上ると試算されており、主要先進国首脳会議でも AMR 問題が主要議題として取り上げられ、「世界経済・移民問題・テロ対策などと並ぶ世界的な課題として、AMR 問題について各国が協調して取り組んでいく」ことが強調されている。中でも薬剤耐性菌時代における Last-Resort としての位置づけであるカルバペネム系抗菌薬に耐性化したカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE, Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*) が、世界中の臨床現場に驚異的なスピードで拡散している。

本研究に先立ち、感染症研究国際展開戦略プログラム (J-GRID) を通して、タイにおける AMR 疫学調査体制の基盤づくりに従事する傍ら、2015 年 7 月よりミャンマーの国営研究機関である国立医学研究所 (Department of Medical Research) との国際共同研究を立ち上げ、ミャンマー国内における CRE 疫学調査を開始した。これまでに、ヤンゴン都市部お

よび近郊地域で生活排水を中心とした環境調査を実施した結果、220 サンプルのうち 8.4% から NDM 型主体の CRE が検出されたことを発表した (1)。また、ヤンゴンの生鮮市場で売買されている食料品における CPE 検出率を調査したところ、93 サンプルから 15 株 (16.1%) を検出し、日常的に流通する食料品が CPE で汚染されている現状を明らかにした (2)。

私たちの研究により、CRE は患者臨床検体のみならず、東南アジアを中心としたインフラ整備が不十分な地域で、環境水・食肉・野菜などからも広く拡散しうることが明らかとなった。このことから日常生活の中で食事摂取を通して潜在的に CRE を保菌するリスクが広がっていることが推測される。



## 【目的】

本研究は、日本国内での食の安全という観点から、海外由来の小売・ネット通販されている Ready-to-Eat 食品を対象に CRE の保菌状況を調査する目的で実施した。CRE 用選択培地を用いて食品スクリーニングを行い、検出された CRE 株に対してゲノム解析を行い既存データベースと比較することで、食品由来株の薬剤耐性遺伝子のタイピング・ルーツなどを明らかにするとともに、ヒト由来株との相違点を模索する。

## 【方法】

### ① 食料品の回収

研究対象である Ready-to-Eat 食品は、小売販売・ネット販売の形で一般流通している海外輸入食料品とする。購入後に火を通して食すものは除外し、野菜・果物・加工食品などのうち入手したままの状態を摂取することを前提とした食品とした。

### ② 薬剤耐性菌のスクリーニング

本研究で対象とするのは、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) および基質拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (ESBL) 産生腸内細菌科細菌とする。この両者を同時スクリーニングするために、メーカー市販の ESBL・CRE 選択培地を用いる (クロモアガー KPC/ESBL 分画培地、関東化学)。

### ③ 菌種・薬剤感受性・タイピング・薬剤耐性メカニズムの同定

上記手法により得られた薬剤耐性菌を疑う菌株については、菌種同定 (質量分析法: MALDI-TOF-MS, Bruker)、薬剤感受性試験 (MicroScan WalkAway 96 Plus; Beckman Coulter, Brea, CA およびドライプレート栄研; Eiken Chemical Co., Tokyo, Japan)、さらに責任遺伝子を同定するためのシーケンス検査を行うこととした。具体的には、PowerSoil DNA isolation kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて DNA を抽出した後、MinION シーケンサー (Nanopore) を用いて解析する。Multilocus sequence typing (MLST) の判別は

Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>) および Institute Pasteur's MLST database (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) に照会のうえ判定する。さらに網羅的に薬剤耐性遺伝子を検出するために、得られたシーケンスデータを ResFinder database (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) で解析することとした。

### ③ リスク分類

食品ごとの薬剤耐性菌保有リスクを算出するために、輸入元や食品の種類などのカテゴリ別に汚染率を算出する。(なお、データ発表にあたっては、個人の業者などが特定されないように配慮する。)

## 【結果】

研究期間中に 54 サンプルの海外輸入商品を調査した。輸入元国はミャンマー34件、バングラディッシュ1件、パキスタン9件、タイ4件、ベトナム6件であった。図1に調査した食品サンプル写真の一部を例として提示する。

クロモアガー KPC/ESBL 分画培地でスクリーニングした結果、CRE を疑うコロニーは1サンプル (ミャンマー由来) から得られた。しかし、菌種は感受性良好な *Vibrio* 属であり、CRE は検出されなかったことから遺伝子型タイピング・薬剤耐性メカニズムの同定までは実施しなかった。

図1. 調査したサンプル





(ミャンマーからの輸入食品)

#### 【結語】

本調査は途中段階だが、現時点においては輸入商品がESBL産生菌／CREで汚染されているエビデンスは得られなかった。引き続き調査を継続して、正確な実態を把握していきたい。

#### 【文献】

- 1) Sugawara Y, Akeda Y, **Hagiya H**, Sakamoto N, Takeuchi D, Shanmugakani RK, Motooka D, Nishi I, Zin KN, Aye MM, Myint T, Tomono K, Hamada S. Spreading Patterns of NDM-Producing Enterobacteriaceae in Clinical and Environmental Settings in Yangon, Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Feb 26;63(3):e01924-18.
- 2) Sugawara Y, **Hagiya H**, Akeda Y, Aye MM, Myo Win HP, Sakamoto N, Shanmugakani RK, Takeuchi D, Nishi I, Ueda A, Htun MM, Tomono K, Hamada S. Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae harbouring blaNDM or blaIMI in local market foods of Yangon, Myanmar. *Sci Rep*. 2019 Oct 8;9(1):14455.

## 精原細胞ニッチの再構築を用いた新規移植法によるマウス精巣内異種移植の試み

(所 属)

川崎医科大学 解剖学

(氏 名)

横西 哲広

申請者は、ベンザルコニウム塩化物によってセルトリ細胞を除去したマウスの精巣に、別個のマウスの精巣細胞を精細管内移植することで、宿主の精巣内にドナー由来の精巣を再構築することに成功した。この研究成果は若年性男性がん患者の妊孕性の温存法への応用が期待されるが、ドナーの細胞の定着効率を改善させる必要がある。本研究では、ベンザルコニウム塩化物の精巣内注入にブスルファンの腹腔投与を加えることで、同種移植の効率を改善できることが示唆された。

### 背景

米国 NIH の報告によると、2014 年から 2018 年までの全人種の男女における、がん患者全体に占める 20 歳未満の罹患者は、およそ 1.0%と推定されている。近年の医療技術の発展によって、これらの治療成績は向上し、5 年生存率は 85%を超えるほどになった。このような背景もあり、2019 年 1 月時点での米国のがん治療後の生存者は、およそ人口の 5%を占めるようになった。小児期にがん治療を受けた約 3 割の患者で、性差なく不妊症を発症すると報告されており、がん完治後の大きな問題となっている。

性成熟した男性がん患者の妊孕能の温存法としては精液の凍結保存が確立している。しかし、精子までの分化はおよそ 13~14 歳と推定されているため、これ以前の年齢の患児には精液凍結保存は適応とならない。この場合、研究段階であるが、がん治療前の精巣組織の凍結保存が推奨されている(1)。実際に、ASCO (American Society of Clinical Oncology) は、性未成熟ながん患者の場合、臨床医は、生殖腺毒性を説明し、生殖腺の組織凍結保存法を提示し、適切な専門医へ紹介することを推奨している(2)。2004 年にホジキン病の治療前に採取し凍結保存した卵巣組織を、治療後に自身に移植して自然分娩が成功した報告から(3)、現在までに凍結卵巣組織を用いた挙児は 140 例を超えている(4)。しかし、凍結保存した未熟な精巣組織の解凍後の分化誘導法が確立していないことが問題である。

性未成熟な精巣組織や精原細胞の分化誘導法として、培養法があげられる。精巣の細胞培養による精子産生の試みは、過去多くの報告があるが、機能性を有する精子の産生は未だ達成されていない。精巣の組織培養も一世紀以上前から試みられ、2011 年に小川らによってマウスの精巣組織の培養が成功した(5)。この方法を用いて、新生仔マウスの精巣組織片をガラス化凍結保存し、解凍後に培養し、機能的な精子を得ることができた(6)。この気層液層境界培養法にマイクロ流体システムを導入し、培養期間を延長させることが可能となったことから、精子形成期間の長い大型動物にも応用されることが期待された(7)。このように、培養系の開発がなされているが、齧歯類での精子形成の報告にとどまっており、ヒトへの応用は困難であることが予想される。

培養法以外の分化誘導法として、精細管内移植法と精巣組織移植法があげられる。精細管内移植法は、精子の幹細胞である精原細胞または精原細胞を含む精巣細胞懸濁液を、精細管内に逆行性に注入する方法である(8, 9)。この精細管内移植法はマウスやラットをはじめ、サルにも応用できることが知られている(10)。また、凍結保存した検体でも、精細管内移植法によって精子まで分化することが証明されている(11)。精巣組織移植とは、精巣組織片を宿主の背部皮下組織または精巣白膜下に移植する方法であり、齧歯類からサルまで成功している(12)。これらの移植法は宿主によって、自身の生体に移植する自

自家移植と、別の種の体内へ移植する異種移植に分類される。がん患者の治療前の検体を自家移植することにおいて、最も懸念すべき問題がある。それは、自家移植する組織または細胞の中に、がん細胞が混入している可能性を否定できない点である。白血病ラットの精巣から得た細胞懸濁液を別のラットの精巣に移植したところ、わずか 20 個の白血球細胞の混入によって宿主ラットに白血病を発症させた。このため、自家移植よりも異種移植の方が安全面において優れていると考えられる(13)。

安全性以外の異種移植における精巣組織移植の利点は、自身の精子形成の場である精細管の管腔構造や、ライディッヒ細胞や筋様細胞などの間質構造を保持したまま精巣組織を移植できることである。しかし、ヒト精巣組織を免疫不全マウスに異種移植した報告では、ヒト精原細胞は生存を認めたものの精子形成はおこらず、移植後 10 週ほどでヒトの精巣組織は萎縮し線維化をきたした(14)。この原因として、移植した組織の精細管が盲端となり、生理状態では存在する精細管内フローが失われていること、宿主からの栄養、酸素や老廃物などの代謝に必要な循環回路が無いことがあげられる。

一方、ヒトの精巣細胞を免疫不全マウスに異種精細管内移植した結果、ヒト精原細胞はマウスの精細管内で長期間生存し、増殖するものの、精巣組織移植と同様に、ヒト精子形成は進まなかった(15)。この原因として、マウスの精巣体細胞はヒトの精子形成を支持する能力がないと考えられる。そこで、精原細胞だけでなく、精子形成を支持する精原細胞ニッチを構成する体細胞も含めて精細管内に移植し、宿主精巣内でヒトの精巣が再構築できればヒトの精子形成が進むと期待された。

陽イオン界面活性剤あるベンザルコニウム塩化物は、点眼薬の防腐剤として使用されている一方で、長期的な使用によって角膜上皮細胞傷害を引き起こすことが報告されている。ベンザルコニウム塩化物による上皮細胞損傷に着目し、0.02%ベンザルコニウム塩化物をマウスの精細管内に注入すると、精巣上皮細胞であるセルトリ細胞を選択的に除去することができた。さらに、ベンザルコニウム塩化物によるセル

トリ細胞除去後のマウスの精巣に、別個のマウスの精巣細胞懸濁液を注入したところ、宿主マウスのセルトリ細胞だけでなく、生殖細胞や間質に存在する筋様細胞やライディッヒ細胞も置換され、宿主精巣の中でドナー由来の精巣を再構築でき、ドナーの精子形成を認めた(16)。この方法を用いた異種移植はヒトの妊孕性の温存法に応用できると考えられた。しかし、本手法では、ドナー細胞の定着率が低いことが問題である。

## 目的

ブスルファンは宿主の精原細胞を死滅させる作用を持つことから、精細管内移植法の前処置として用いられてきた(8)。本研究では、ベンザルコニウム塩化物注入に加えて、アルキル化剤であるブスルファンを投与することで、より多くのセルトリ細胞を除去でき、移植効率を向上できるか試みた。

## 材料と方法

### 【動物】

本実験は、生後 7 週齢以上 12 週齢以下の雄 C57BL/6Jc1 マウス（日本クレア）を用いた。飼育中、マウスは実験動物用飼料と水道水を自由に摂取させた。本研究は、川崎医科大学動物実験委員会の定めるガイドラインに従って実施した（川崎医科大学動物実験委員会承認番号：20-139）。

### 【ブスルファンの投与方法】

ブスルファンを N、N-ジメチルアセトアミド、ポリエチレングリコールで溶解させ、水で希釈した溶液を 3 日間、隔日で腹腔に 8.75mg/kg/day 投与した。コントロールには、何も溶解させていない同量の N、N-ジメチルアセトアミド、ポリエチレングリコールを水に溶き腹腔に注入した。

### 【ベンザルコニウム塩化物の準備】

ベンザルコニウム塩化物（ACROS ORGANICS、21541-0010）を 0.02%~0.06%に PBS で希釈した。

### 【ベンザルコニウム塩化物の精細管内注入法】

セボフルラン（濃度 4-5%、気流量 0.5L/min）を充満させた飼育箱の中にマウスをいれて麻酔し、処置中では吸入マスクにて麻酔を持続させた。

マウスを開腹し精巣を体表面に引き出し、ガラス管を精巣網に刺し、0.02%ブロモフェノールを加えたPBS またはベンザルコニウム塩化物を注入した。術後は速やかにバイクリルで腹膜と皮膚を縫合して閉腹した。

#### 【ドナー細胞の準備】

10日齢のCAG-EGFPマウス(日本クレア)の精巣を摘出し、PBSで洗浄後に、0.25%トリプシンで37度10分間反応させた。10%FBS in DMEMで酵素反応を止め、40 $\mu$ mのフィルターを通し、精巣細胞懸濁液を集めた。1x10<sup>7</sup>細胞/mlとなるように10%FBS in DMEMで再希釈した。

#### 【精細管内移植法】

吸入麻酔し、麻酔深度を確認した後に処置を開始した。マウスを開腹し精巣を体表面に引き出し、ガラス管を精巣網に刺し、0.02%トリパンブルーを加えたドナー細胞の懸濁液を注入した。精巣を腹腔内に戻し、速やかにバイクリルで腹膜と皮膚を縫合して閉腹した。

#### 【蛍光免疫染色】

精巣を摘出し、室温で30分振盪した後に、水平段に割を入れてさらに30分振盪させて4%パラホルムアルデヒド(paraformaldehyde:PFA)で固定、または4 $^{\circ}$ Cで一晩、4%PFAで浸漬固定し、翌日に水平段に割を入れた。PBSで洗浄後、スクロース溶液上昇系列(5%、10%、20%および50% in PBS)で処理して、OCTコンパウンド(Sakura Finetek)で凍結包埋した。サンプルは12 $\mu$ mで凍結切片を作成した。

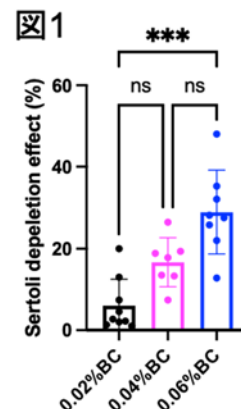
多重蛍光免疫染色では、サンプル上のOCTコンパウンドをPBSで除去し、0.2%PBT(PBS+Triton-X)を室温で5分間を3回繰り返す、膜透過処理を行った。次いで、ブロッキング液(10%FBS+3%BSA in 0.2%PBT)で、室温で1時間ブロッキング反応を行った。その後、一次抗体をブロッキング液で希釈し、4 $^{\circ}$ Cで一晩または室温で1時間反応させた。0.2%PBTで10分間3回洗浄した後、0.2%PBTで希釈した蛍光標識二次抗体を、室温で1時間遮光して反応させた。この時、同時に核をHoechstで対比染色した。PBSで10分間3回洗浄した後、ポリビニルアルコールで封入した。完成した標本は、共焦点レーザー顕微鏡

(LSM-700、Zeiss)で撮影した。

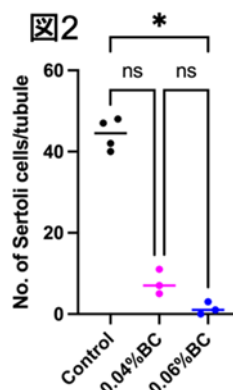
一次抗体はCy3-conjugated anti- $\alpha$ -Smooth Muscle Actin抗体(Sigma、C-6198)、抗SOX9抗体(Millipore、AB5535)、抗TRA98(GCNA1)抗体(Abcam、Ab82527)、抗GFP抗体(Aves、GFP-1020)、抗3 $\beta$ HSD抗体(TransGenic Inc、K0607)、抗MVH/DDX4抗体(Abcam、ab13840)と抗TRA98抗体(Abcam、ab82527)を用いた。

#### 結果

まず始めに、精細管内ベンザルコニウム塩化物(Benzalkonium Chloride;BC)注入によるセルトリ細胞の除去の再現性を検証した。C57BL/6Jc1マウスの精細管内にコントロールとしてPBS、0.02%、0.04%と0.06%BCを注入したところ、各濃度でセルトリ細胞の除去効果は見られた。しかし、0.02%BC注入群では、切片あたりのセルトリ細胞が除去された精細管の割合は2.7%と極めて少なかった(図1)。一方で、0.04%BC注入群では一切片あたり、17.8%の精細管でセルトリ細胞が除去され、0.06%BC注入群では27.9%の精細管でセルトリ細胞が除去され、前回の報告と同様だった(図1)。



次に、0.04%と0.06%BC注入群における、BCに影響を受けたと考えられる精細管内に残存するセルトリ細胞を、抗SOX9抗体を用いて数えた。その結果、コントロールではセルトリ細胞が45個であったのに対し、0.04%と0.06%BC注入群では、それぞれ7個と1個であった(図2)。

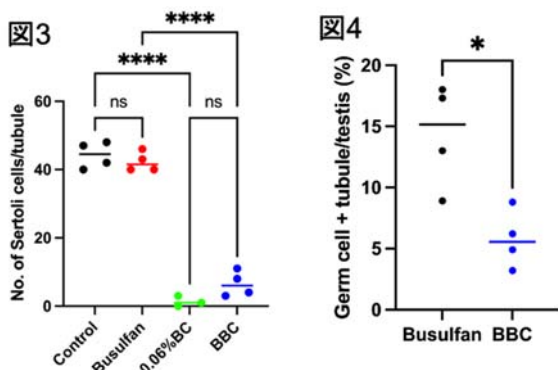


同様に、0.04%と0.06%BC注入群における、BCに影響を受けたと考えられる精細管内周囲の筋様細胞とライディッヒ細胞を、抗SMA抗体と抗3 $\beta$ HSD抗体で免疫染色して数えた。その結果、各群ともコント

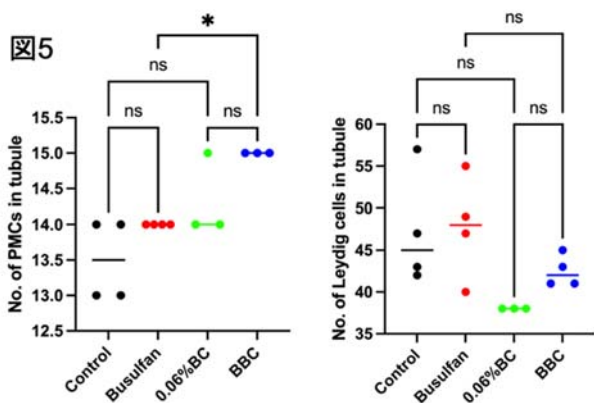
ロールと比較して、明らかな違いは認めなかった。以上から 0.06%BC が C57BL/6Jc1 マウス精巣のセルトリ細胞除去に効果を有し、間質細胞への影響がないことがわかった。

次に、ブスルファンを腹腔投与し、4 週間後に精巣内に PBS を注入した群を観察すると、生殖細胞は除去されたが、セルトリ細胞数はコントロールと変わらず精細管内に生存することを確認した。

N、N-ジメチルアセトアミド、ポリエチレングリコール溶液をコントロールとして腹腔内投与し、4 週後のマウス精巣に 0.06%BC を注入した群 (0.06%BC 群) と、ブスルファン投与 4 週間後に 0.06%BC を精巣内に注入群 (BBC 群) に分けてセルトリ細胞除去率を比較した。その結果、BBC 群と 0.06%BC 群間において有意差は認められなかったが、ブスルファン群と比較して BBC 群ではセルトリ細胞数は減少し (図 3)、生殖細胞が残存する精細管の率も低下した (図 4)。



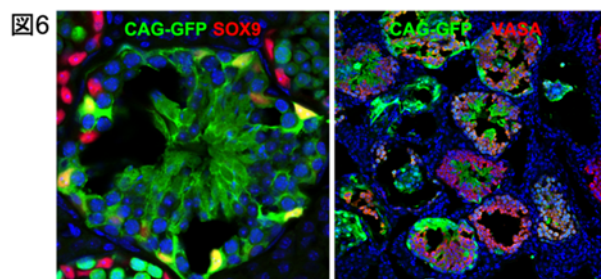
コントロールと比較し、ブスルファン群、BBC 群と 0.06%BC 群の筋様細胞とライディッヒ細胞の数に大きな差は見られなかった (図 5)。



BBC 群において、BC 群よりもセルトリ細胞の除去率が向上すると期待されたが、その効果は認めなかった。しかしながら、生殖細胞の除去効果を認めた

め、ブスルファン群、0.06%BC 群と BBC 群における同種移植効率を検討した。8 週齢の B6 マウスを、前述と同様に 3 群に分けて前処置を行った。ドナーには、全身の細胞に GFP を発現する同系統の CAG-GFP マウス新生仔の精巣細胞を用いた。移植 8 週後に各群の宿主精巣を固定し、免疫染色でドナー由来 (GFP 陽性) の精原細胞ニッチの再構築を評価した。移植は 3 回に分けておこなった。3 回のうち、2 回の移植実験で得られたドナー細胞懸濁液を、抗 TRA98 抗体または抗 VASA 抗体を用いて精原細胞を、抗 SOX9 抗体を用いてセルトリ細胞を、抗 3βHSD 抗体を用いてライディッヒ細胞を染色した。ドナー細胞懸濁液における各種細胞のポピュレーションは、精原細胞が 58% (585/1015 細胞)、セルトリ細胞は 16% (294/1815 細胞)、ライディッヒ細胞は 10% (103/1017 細胞) であった。

ブスルファン群 (n=5) における各種ドナーの定着は、精原細胞が 4 検体 (80%)、セルトリ細胞が 3 検体にわずかに認め (60%)、間質細胞の定着は認めなかった。ドナー由来の精子形成は 4 検体 (80%) であった。BC 群 (n=7) では、精原細胞の定着は 3 検体 (43%)



と低く、セルトリ細胞の定着を 3 検体 (43%)、間質細胞の定着を 2 検体 (29%) に認め、ドナー由来の精子形成は 3 検体 (43%) で認めた。BBC 群 (n=6) においては、ドナー精原細胞の定着は 6 検体すべてに認め (100%)、精原細胞とともに定着した SOX9 陽性のセルトリ細胞を 5 検体に認めた (83%)。3βHSD 陽性のライディッヒ細胞の定着は同定できなかったが、SMA 陽性の筋様細胞の定着を 2 検体であった (33%)。BBC 群では、移植した全ての宿主でドナー由来の精子形成を認めた (図 6)。以上、3 群の中でのドナー細胞の定着は精原細胞、セルトリ細胞、間質細胞ともに BBC 群で最も多かった。



## 研究成果

BBC群ではBC群と比較してセルトリ細胞除去効率に有意差を認めないものの、精細管内移植の定着効率は優れていた。BBC群において、ドナーのセルトリ細胞はドナー精原細胞と同一の精細管に定着していたが、ライディッヒ細胞の定着を認めなかった。ドナー細胞内のライディッヒ細胞が占める割合は約10%と低く、今後は細胞懸濁液の精製を調整や、精細管内移植と間質細胞移植の2段階移植法を試みるなどの工夫が必要と考えられる。移植は、BC注入後にセルトリ細胞と精原細胞が消失し、空の精細管が得られた時機に合わせて、注入4日後に行った。以前の報告では、0.02%BC注入後7日目に全精巣細胞を移植していた。0.06%BC注入後の炎症が間質細胞に影響を与えると仮定すれば、BC注入後の炎症を経時的に数値化し、BC注入から移植までの期間を改めて精査する必要があると考える。また全実験について、追加検証を行う予定である。

## 主な発表論文等

新学術領域研究「配偶子インテグリティ」第3回若手・公募班研究集会（7月5日、7月6日オンライン開催）「マウス精巣内異種精巣の構築」横西哲広

1. Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, Quinn GP, Reinecke J, Taylor HS, et al. Fertility Preservation in Patients With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(19):1994-2001.
2. Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(19):2500-10.
3. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 2004;364(9443):1405-10.
4. Donnez J, Dolmans MM. Fertility

Preservation in Women. *N Engl J Med*. 2017;377(17):1657-65.

5. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*. 2011;471(7339):504-7.
6. Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, et al. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun*. 2014;5:4320.
7. Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, et al. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci Rep*. 2016;6:21472.
8. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(24):11298-302.
9. Ogawa T, Aréchaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol*. 1997;41(1):111-22.
10. Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Sheng Y, et al. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell*. 2012;11(5):715-26.
11. Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med*. 1996;2(6):693-6.
12. Fayomi AP, Peters K, Sukhwani M, Valli-Pulaski H, Shetty G, Meistrich ML, et al. Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science*. 2019;363(6433):1314-9.
13. Jahnukainen K, Hou M, Petersen C, Setchell B, Söder O. Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes

transmission of leukemia. *Cancer Res.* 2001;61(2):706-10.

14. Schlatt S, Honaramooz A, Ehmcke J, Goebell PJ, Rübber H, Dhir R, et al. Limited survival of adult human testicular tissue as ectopic xenograft. *Hum Reprod.* 2006;21(2):384-9.

15. Nagano M, Patrizio P, Brinster RL. Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertil Steril.* 2002;78(6):1225-33.

16. Yokonishi T, McKey J, Ide S, Capel B. Sertoli cell ablation and replacement of the spermatogonial niche in mouse. *Nat Commun.* 2020;11(1):40.

## (表題) 高転移臓器における前転移 niche の性質の検討

(所属) 岡山大学 医歯薬学総合研究科 口腔病理学分野

(氏名) 河合穂高

### (研究成果の概要)

近年の研究では、腫瘍細胞が遠隔臓器に転移を起こす際に、腫瘍細胞の転移に先立って、前転移 niche と呼ばれる微小環境が形成され、その微小環境を足がかりとして転移が成立することが明らかとなっている。本研究では、腫瘍間質細胞の産生する CCL2 が高転移臓器である肺に CCR2 陽性 MDSC が集簇し、前転移 niche 形成に関与する可能性が示唆された。CCL2-CCR2 axis が高転移臓器の肺に CCR2 陽性 MDSC を集簇させ、転移を促進している可能性が考えられた。

### (本文)

#### 1 : 研究開始当初の背景

腫瘍が遠隔臓器に転移する際、臓器によって転移のしやすさは異なる。近年、この違いには「前転移 niche」と呼ばれる微小環境が関係していることがわかってきた。「前転移 niche」とは、腫瘍の影響により遠隔臓器で形成される微小環境のことであり、同微小環境を足掛かりにして、腫瘍の転移が成立する。

前転移 niche 形成には骨髄由来免疫抑制細胞 (myeloid derived suppressor cell: MDSC) が大きな役割を果たしている。MDSC は、癌免疫に重要な樹状細胞や M1 マクロファージなどの抗腫瘍免疫応答を抑制する。特に arginase1 陽性 MDSC は、T 細胞などの免疫応答を抑制しながら前転移 niche を形成し、腫瘍が転移しやすい環境をつくっているという報告がある。現在、口腔癌と前転移 niche の関係性については不明な点が多く、口腔癌における前転移 niche 形成メカニズムの解明は、口腔癌における遠隔臓器への転移を理解するうえで重要である。

また、近年、腫瘍組織を構成する腫瘍間質は、腫瘍細胞との密接な相互作用をし、浸潤や転移、免疫抑制など、腫瘍促進的に働くことが多数報告されている。それ以上に、間質の性質が腫瘍組織の性格全体を変えてしまうほど、大きなインパクトを持つことを我々のグループは発表してきた (Takabatake K, Kawai H, et al. *Int J Mole Sci.* 2020)。

本研究課題では、患者より得られた癌間質細胞

(PDS: Patient Derived Stromal Cells) と口腔癌細胞株 (HSC2) をヌードマウスに共接種し、高転移臓器での微小環境の変化について検討を行なった。

#### 2 : 研究の目的

腫瘍間質細胞は様々な因子を放出し、腫瘍細胞や周囲組織に影響を与えている。本研究では、2名の口腔扁平上皮癌患者から採取した PDS と、初代培養された成人のヒト皮膚線維芽細胞 (HDF: Human Dermal Fibroblast) をマイクロアレイ解析を用いて mRNA の発現を比較し、遠隔臓器の前転移 niche の形成に関与する因子を検討する。

#### 3 : 材料と方法

##### a) PDS の採取

2名の口腔扁平上皮癌患者の手術検体の腫瘍部分から、1x1 mm 大の組織片を採取した。採取した組織片は PBS で洗浄後裁断し、1mg/ml のコラゲナーゼとディスパーゼ混合溶液に 37 度 3 時間振盪させた。その後、10cm シャーレに組織を播種し、10%FBS  $\alpha$ -MEM で 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター 37 度で 7 日間培養した。細胞がコンフレントになったのを確認してから、アキュターゼを反応させ、細胞接着性の違いを利用して、PDS のみ採取した。採取された PDS を 10cm シャーレに播種し、10% FBS, 1% antibiotic/antimycotic,  $\alpha$ -MEM で CO<sub>2</sub> インキュベーター (CO<sub>2</sub> 濃度 5%) にて 37 度でさらに培養継代し、

継代数 15 までの細胞を、実験に使用した。

#### b) 細胞

使用した細胞は、ヒト由来口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC2) 及び、ヒト成人皮膚線維芽細胞の初代培養細胞 (HDF) を用いた。これらは、JCRB Cell Bank と Lonza Walkersville から購入した。細胞は 10cm シャーレに播種し、10% FBS, 1% antibiotic/antimycotic,  $\alpha$ -MEM で CO2 インキュベーター (CO2 濃度 5%) にて 37 度で培養を行った。

#### c) マイクロアレイ解析

HDF および PDS1/2 細胞を 3 日間培養し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用して培養細胞からトータル RNA を単離した。全 RNA の濃度と品質 (A260 / 280) は、Bioanalyzer (Agilent 2100) によって測定した。低入力クイックアンプレバリングキット (Agilent Technologies) を使用して 0.1  $\mu$ g のトータル RNA から cDNA を合成し、Agilent Technologies マイクロアレイ (SurePrint G3 Human 8x60K Ver. 3.0) のプローブにハイブリダイズさせた。HDF と PDS1/2 の遺伝子発現を比較し、さらに分析するために 3SD を超える発現する遺伝子を選択した。弁図は、Venny2.1 を使用して作成した。「細胞走化性に関連する遺伝子」を、DAVID Bioinformatics Resources6.8 を使用して選択した。HDF と PDS1/2 の DEG の棒グラフとヒートマップの表示は、Microsoft Excel を使用して作成した。

#### d) 動物実験

HSC-2 および HDF 共移植群 (HSC-2 + HDF)、HSC-2 および PDS 共移植群 (HSC-2 + PDS1 および HSC-2 + PDS2) の 3 種類の腫瘍モデル (それぞれ N=5) を作成した。腫瘍細胞は、HBSS (Gibco、Life Technologies、Carlsbad、CA、USA) に  $1.0 \times 10^6$  HSC-2/0.2ml および  $3.0 \times 10^6$  間質細胞/0.2ml の濃度で懸濁した。これらの細胞を、頭部皮下にシリンジにて移植した。また、CCR2 を遮断するために、腫瘍移植の 3 週間後、HSC-2 + HDF、HSC-2 + PDS1、および HSC-2 + PDS2 に、DMSO に溶解した CCR2 アンタゴニ

スト (RS 102895) を 3.0mg / kg の濃度で隔日に腹腔内注射しました。対照として、3%DMSO の腹腔内注射を行った。1 週間後、マウスを屠殺し、分析のために標本を作成した。

#### e) 標本作製・染色

検体は 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定した後、常法に従いパラフィン包埋し、ブロック作製のうえ 3  $\mu$ m の連続切片を作製した。切片はヘマトキシリン・エオジン染色、免疫組織化学的染色を行い組織化学的に観察した。

#### 免疫組織化学染色

一次抗体は以下のものを使用した。

一次抗体	メーカー	免疫動物	希釈倍率
CD11b	Abcam	rabbit	$\times 1000$
Gr1	Abcam	rat	$\times 200$
Arginase1	Abcam	rabbit	$\times 200$
CCL2	Abcam	rabbit	$\times 500$
CCR2	Abcam	rabbit	$\times 500$

DAB による発色、および核はヘマトキシリン染色を行い、光学顕微鏡で標本を観察した。

#### 蛍光免疫多重染色

MDSC 検出には、OPAL7 色マニュアル IHC キットを使用した。手技はマニュアルに従い染色を行った (<https://www.perkinelmer.com>)。切片を DAPI で対比染色し、ZEISS LSM 700 共焦点顕微鏡を使用して切片を観察した。

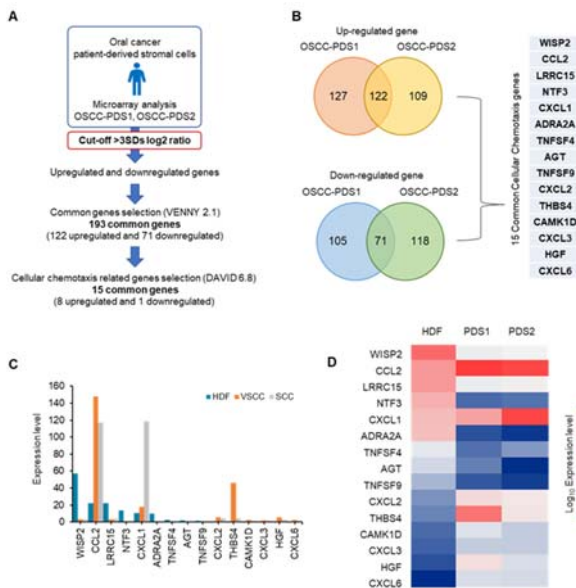
#### f) 陽性細胞の評価

各臓器について、抗体ごとに 5 枚ずつランダムに写真を撮影した。画像処理ソフトウェアである image j を用いて CD11b、Gr1 陽性細胞数を計測し、対照群、1 週目の腫瘍マウス、2 週目の腫瘍マウスで陽性細胞数を比較した。また、arginase1 陽性細胞については、組織内での偏在性を検討した。また、陽性細胞が顕著であった臓器を代表とし、クラスター数を計測した。

### 3 : 研究成果

#### a) PDS 群における CCL2 の発現上昇

PDS1 と HDF、および PDS2 と HDF では、それぞれ 249 個と 231 個の遺伝子発現が上昇しており、176 個と 189 個の遺伝子発現が減少していた。また、PDS1, 2 両方で上昇している遺伝子は 122 個で、減少している遺伝子は 71 個であった。これらのうち、「細胞走化性に関連する遺伝子」に絞り込んで検索を行うと、15 個の遺伝子が候補に挙げられた。このうち、発現レベルが高い遺伝子として CCL2 が見出された。

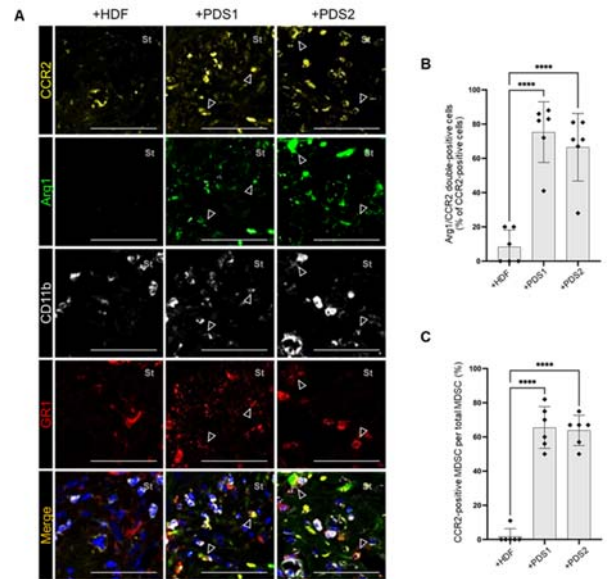


単球走化性タンパク質 (MCP-1) としても知られる CCL2 (C-Cモチーフケモカインリガンド2)、および CCR2 (CCL2 受容体) は、MDSC の移動に重要な役割を果たす。CCL2 は、前立腺がん、乳がん、悪性神経膠腫、結腸直腸がん、肺がんなどの腫瘍から分泌され、CCL2/CCR2 axis は、MDSC の動員を減らし、癌治療を改善するための潜在的なターゲットとして注目されている分子である。

#### b) CCR2 陽性 MDSC の浸潤

頭部に移植した腫瘍組織を組織学的に検討すると、免疫組織化学染色により CCL2 の発現が PDS 群で優位に上昇していることが確認された。また、腫瘍組織間質には、CCR2 陽性の血球系細胞の有意な増加が認められた。増加した CCR2 陽性血球系細胞は、Arginase-1, Gr-1, CD11b を発現しており、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC: Myeloid Derived Suppressor

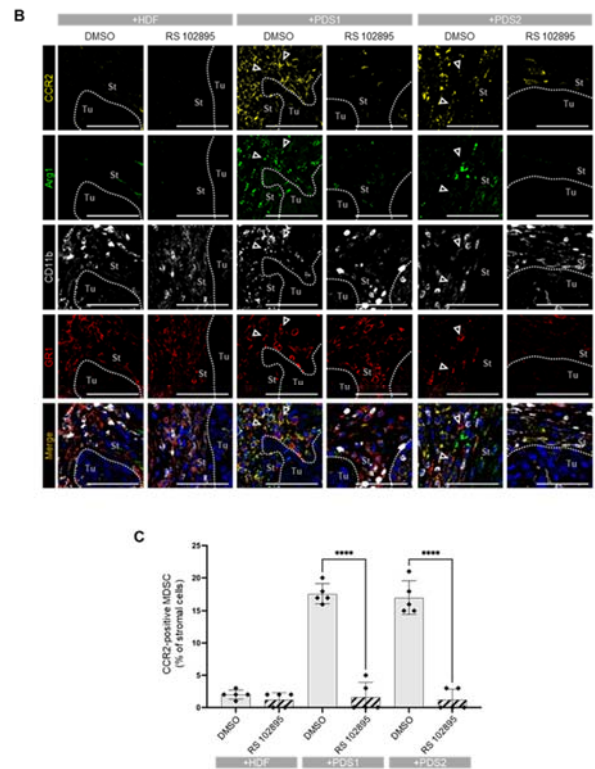
Cells) と考えられた。



これらのことから、患者由来腫瘍間質は CCL2 を分泌し、腫瘍組織に CCR2 陽性 MDSC の遊走を促進している可能性が示唆された。

#### c) CCR2 抑制剤による CCR2 陽性 MDSC の減少

それぞれの腫瘍移植マウスに CCR2 阻害剤を投与したところ、腫瘍間質に浸潤する CCR2 陽性 MDSC の数が PDS 群のみ優位に減少した。



これらのことから、PDS が分泌する CCL2 が CCR2 陽

性 MDSC の遊走に関与している可能性が示された。

#### d) 高転移臓器における CCR2 陽性細胞

高転移臓器である肺において、PDS 群で CCR2 陽性血球細胞が優位に増加していることが明らかとなり、CCR2 陽性 MDSC が肺の前転移 niche 形成に関与している可能性が示唆された。また、CCR2 阻害剤を投与すると、肺での CCR2 陽性細胞が優位に減少した。これらの結果から、CCR2 阻害剤は肺の前転移 niche 形成を阻害する可能性が示唆された。

#### 4 : 今後の展望

遠隔臓器への腫瘍の転移は患者の予後を著しく悪化させる。本研究課題で明らかとなった、前転移 niche の形成に関与する CCR2 陽性細胞の更なるプロファイルが明らかとなれば、阻害剤を事前に投与することで、腫瘍の転移を抑制する治療の開発につながる可能性がある。

#### 5 : 主な発表論文など

雑誌論文 : 3 件

1. **Kawai H\***, Oo MW, Tsujigiwa H, Nakano K, Takabatake K, Sukegawa S, Nagatsuka H. Potential role of myeloid-derived suppressor cells in transition from reaction to repair phase of bone healing process. *International Journal of Medical Science*. 2021; 18(8): 1824-1830.

2. Takabatake K, **Kawai H\***, Omori H, Qiusheng S, Oo MW, Sukegawa S, Nakano K, Tsujigiwa H, Nagatsuka H. Impact of the Stroma on the Biological Characteristics of the Parenchyma in Oral Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Science*. 2020; 21(20): 7714.

3. Omori H, Shan Q, Takabatake K, Nakano K, **Kawai H**, Sukegawa S, Tsujigiwa H, Nagatsuka H. The origin of stroma influence the biological characteristics of oral squamous cell carcinoma. *Cancers*. 2021; 13: 3491.

学会発表 : 2 件

1. **河合穂高**, メイワトウ, 高嶋清文, 大森悠加, 中野敬介, 長塚仁. CCL2-CCR2 axis を介した癌関連線維芽細胞による骨髄由来細胞の動員. 第 110 回日本病理学会総会, 東京 (Web), 2021 年 4 月.

2. **河合穂高**, メイワトウ, 高嶋清文, 伏見滋子, 稲田靖則, 中野敬介, 長塚仁. 口腔扁平上皮癌における間質細胞が与える骨髄由来細胞の動員への影響. 第 31 回日本臨床口腔病理学会 学術大会, 愛知 (Web), 2020 年 9 月.

図書 : 0 件

産業財産権 : 0 件

## (表題) うつ発症予防を目指した香り分子吸入の研究

(所属) 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床検査学科

(氏名) 上野 浩司

### (研究成果の概要)

シトラールは様々な芳香性植物種の精油に含まれている1つのモノテルペンです。シトラール吸入によって生じる中枢神経系への生理的影響は不明瞭なままです。我々はシトラール吸入によってマウスの行動に与える影響について調べた。生後9週齢のマウスに一定時間のシトラールを吸入させた後、一連の行動実験(高架式十字迷路試験, オープンフィールド試験, Y迷路試験, テールサスペンション試験, 強制水泳試験など)を実施した。シトラールを吸入した生後9週齢のマウスはオープンフィールド試験において不安様行動の増加を示した。シトラールを吸入したマウスは中枢性鎮痛効果, 筋力低下を引き起こした。これらの結果は, シトラールは吸入によって, マウスの中枢神経系に作用し, 行動を変化させることを示している。

### 1. 研究開始当初の背景

現代の日本はストレス社会と言われているように、精神疾患患者の増加という大きな社会問題を抱えている。特にうつ病の社会的損失は2005年の時点で2兆円と推定されており、近年は軽くこの損失額を越えていると考えられる。他の先進国と同様、日本におけるうつ病から生じる社会的損失は莫大である。しかし、うつ病に対しての根本的な対策方法は存在しないのが実情であり、早急な対策が望まれている。

抗うつ薬の使用は口渇や肥満や性機能障害、2型糖尿病の増加、攻撃性の増加など様々な副作用が併存している。副作用に関するデータは過小評価されており、利益よりも害のほうが大きいことが指摘されている。そのため、効果的に副作用のない抗うつ薬の開発が望まれている。また、既存の抗うつ薬は発症後に処方されるものであり、予防のために服用する抗ストレス効果のあるものは未だ存在しない。うつ病の予防目的に摂取できる薬が開発されれば現代の日本へのニーズは非常に高いことが容易に推測される。

古来より植物由来のエッセンシャルオイルには抗うつ効果や抗ストレス効果、リラックス効果などがあるとされてきたがその科学的根拠は乏しかった。

申請者らは以前より植物に含まれる香気成分の中から生理的作用をもつ化学物質を探索し、その成果を精神疾患の治療薬として開発しようと研究を進めてきた。その結果、我々は薔薇の香り成分である2-フェニルエタノールには抗うつ作用のあることを明らかにして大きな話題となった。しかし、香りはヒトの場合は好き嫌いが激しく、好まない香りを嗅ぐ場合はストレスになってしまう場合がある。そのため、ヒトに対してうつ病の予防のために香味成分を摂取させる場合には多種類の抗うつ効果のある香気成分を発見しておく必要がある。そこで本研究では、我々のもつ香り成分による作用を調べる実験方法を駆使し、フルーツの各種香気成分からリラックス作用のある成分を明らかにすることを行った。

### 2. 研究の目的

ストレス社会において大きな問題となっているうつ病の増加を少しでも阻止すべく抗うつ効果のある香気成分を発見することで、ストレス社会を生き抜く新たな予防方法やうつ病の治療薬開発といった臨床研究に繋げる。

フルーツの香気成分の中にはベンゼン環をもつ化学物質が多くあり、心理的作用をもつ可能性が高い。

抗うつ効果意外にもリラックス効果、さらには認知機能向上効果、記憶力増強効果、抗不安作用効果などをもつ香気成分が見つかることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### 実験動物

9週齢の雄マウス(C57BL/6)を2つのグループに分けました。香り分子吸入群(n = 10)および吸入なしのコントロール群(n = 10)。マウスは日本チャールズ・リバー株式会社(神奈川県)から購入しました。12/12時間の明暗サイクル、室温23~26°Cの範囲で食物と水を自由に摂取できるケージ内でマウスを飼育しました。これらの実験は、米国国立衛生研究所(NIH)の実験動物の管理と使用に関するガイド(1996年改訂)に準拠しており、川崎医科大学の動物実験委員会によって承認を受けた後実施しました。

#### 香料の吸入

シト랄は東京化成工業株式会社(L0047, 東京, 日本)から購入しました。生理食塩水をコントロールとして使用しました。吸入は密閉容器で行いました。2 mLの香り物質(または生理食塩水)を吸収させたコットン(4×4 cm)を、穴の開いた蓋を持つステンレス鋼容器(60×60×35 mm)に入れました。マウスがコットンをなめたり触ったりすることは出来ない状況にしました。ステンレス鋼容器を新しい飼育ケージ(235×325×170 mm)内に置き、このケージをさらに大きな2つケージ(292×440×200 mm)で囲いました。コットンを配置して約20分後、マウスを30分間内部のケージに入れた。30分間吸入させた後行動実験を行いました。

#### 行動実験

すべての行動実験は明期(9:00~16:00)の間に実施しました。各行動実験は1日につき1テストのみとした。マウスはランダムな順序でテストしました。各試験の終了後、70%エタノールと次亜塩素酸を含む水で実験装置を洗浄し、嗅覚刺激によるバイアスの発生を防止しました。

#### ホットプレート試験

ホットプレートテストはマウスの温度感受性を評価するために用いました。マウスを55.0±

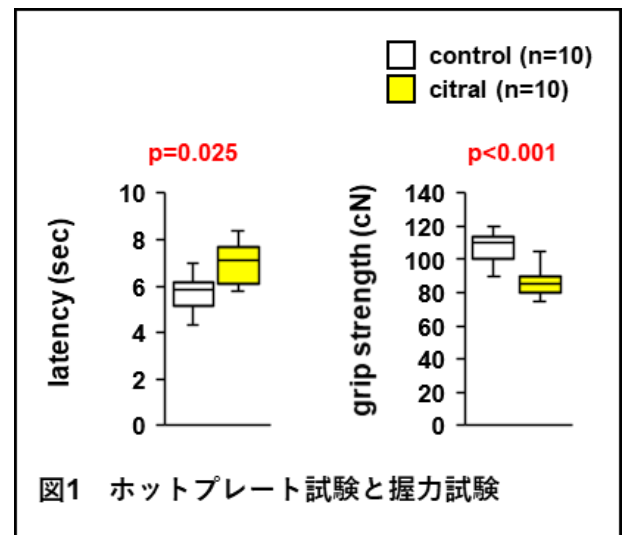


図1 ホットプレート試験と握力試験

0.3°Cに加熱した板の上に置き、最初の足の反応(足を上げる、舐める等)までの潜時を記録しました。組織損傷を防ぐためのカットオフ時間は30秒としました。

#### 握力試験

前肢の握力を評価するために、グリップ強度計を使用しました。前肢がワイヤーグリッドをつかむことができるように、マウスを尾で持ち上げて保持した。その後、グリッドを解放するまでゆっくり後ろに引き戻しました。前肢によって加えられるピーク力は、ニュートン(cN)で記録されました。

#### 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路を使用して不安様行動を調べました。実験装置は2つのオープンアーム(8×25 cm)と同じサイズの高さ30 cmの透明な壁のある2つのクローズドアームで構成されている。アームは白いプラスチック板で構成され、床から高さ40 cmであった。同じタイプのアームは互いに反対側に位置していました。マウスは最初にクローズドアームに直面

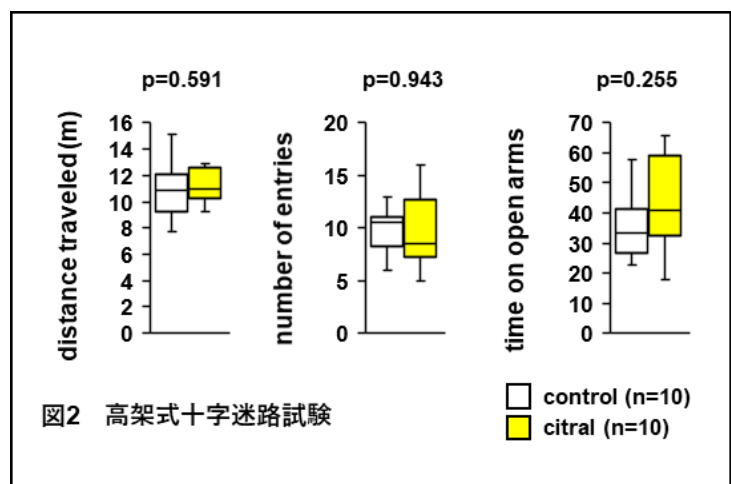


図2 高架式十字迷路試験



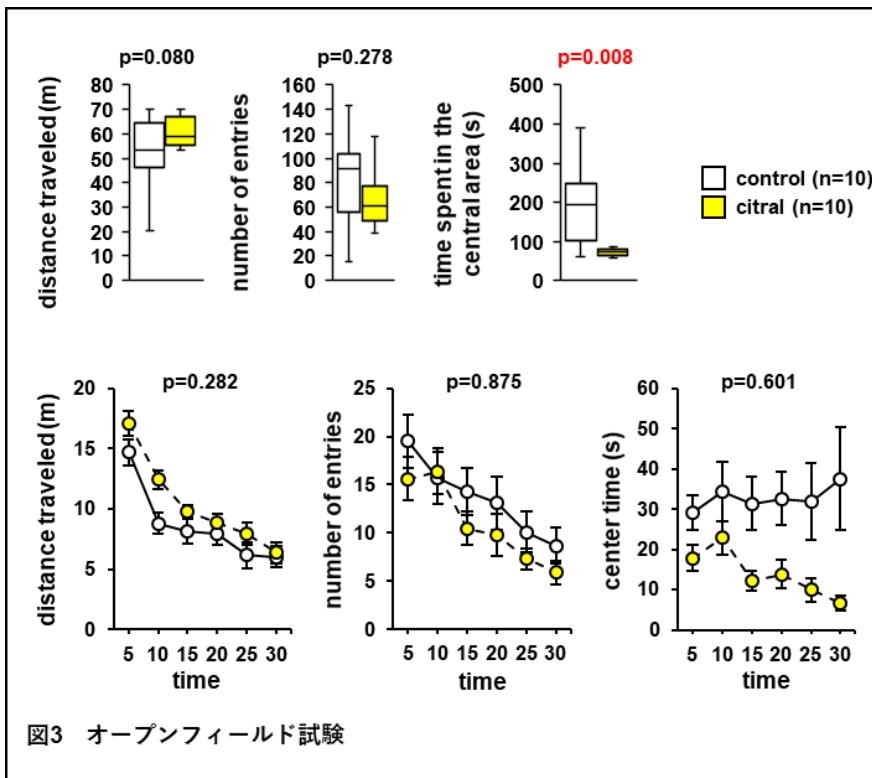


図3 オープンフィールド試験

して迷路の中央に置き、6分間自由に移動させました。マウスの行動はビデオで記録し、ビデオトラッキングソフトウェア(ANY-MAZE, Stoelting Co., Wood Dale. IL. USA)を使用して、アーム進入回数、移動距離(m),およびオープンアームで費やした時間を分析しました。

#### オープンフィールド試験

オープンフィールド試験によってマウスの探索様行動、不安様行動、および一般的な活動量を調べました。各マウスは壁(45×45×40 cm)に囲まれた正方形の装置の中央に配置しました。総移動距離(m)と中央エリアで費やされた時間を記録しました。中央エリアは箱の中央の20×20 cmの部分として定義しました。実験装置は100 luxで照らしました。マウスの行動は30分間にわたって記録し、ANY-MAZEソフトウェアを使用してデータ分析を行いました。

#### Y迷路試験

Y迷路試験装置(各アームの長さ:40 cm, アームの下部の幅:3 cm, アームの上部の幅:10 cm, アームの壁の高さ:12 cm)を使用して空間作業記憶を調べました。マウスをY迷路の中心に最初に置き、6分間自由に行動させました。視覚的な合図は実験室

の迷路の周りに配置しました。ANY-MAZEソフトウェアを使用して総移動距離(m),アームへの進入回数,および交互の数を分析しました。

#### テールサスペンション試験

テールサスペンション試験によってマウスのうつ様行動を調べました。各マウスは粘着テープを尾の先端から1 cm未満の位置に貼り、白いプラスチック製の箱の床から高さ60 cmの位置に吊り下げられました。吊り下げられたマウスの行動を6分間記録しました。ビデオカメラで画像を撮影してマウスの不動時間を測定しました。ANY-MAZEソフトウェアを使用してデータの分析を行いました。

を使用してデータの分析を行いました。

#### 強制水泳試験

Porsolt 強制水泳試験を使用してマウスのうつ様行動を調べました。実験装置はアクリル樹脂製のシリンダー(高さ20 cm×直径10 cm)で構成されていました。シリンダーに深さ7.5 cmまで水(23°C)を入れました。マウスをシリンダー内に6分間置き、その行動を記録しました。テールサスペンション試験と同様に不動時間はANY-MAZEソフトウェアを使用して評価しました。

#### 統計解析

データは、一元配置分散分析(ANOVA),反復測定分散分析を使用して分析しました。p値が0.05より下回った場合に統計的に有意とみなした。データは

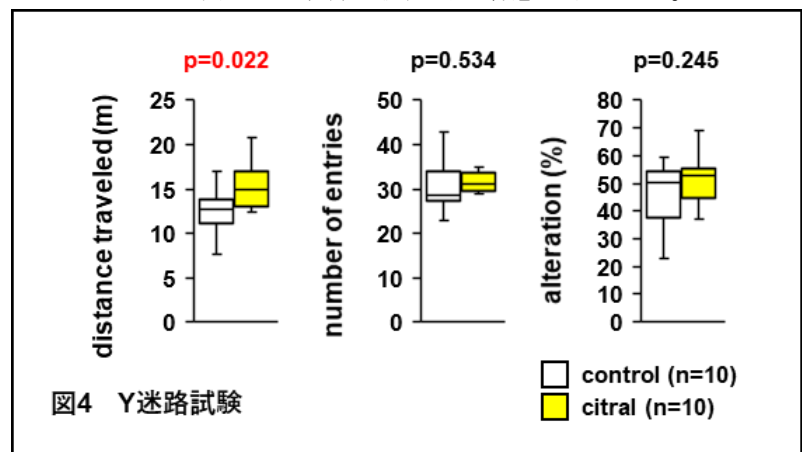


図4 Y迷路試験

箱ひげ図として表示しました。

#### 4. 研究成果

本研究において、我々はシトラールの吸入は中枢性鎮痛効果、筋力低下、不安様行動の増加、活動量の増加を引き起こすことを明らかにした。

シトラールには抗侵害受容作用があることが報告されており、5-HT<sub>2A</sub> セロトニン受容体の有意な活性化を伴うことが見出されている。本研究においても、シトラールの吸入は抗侵害受容作用をホットプレートテストにおいて示した。この結果はシトラールの吸入は腹腔内投与と同様の作用を発揮することを示している。以前の研究においてシトラールのマウスへの腹腔内投与によって鎮静作用と運動弛緩作用があることが示されている。さらには、シトラールには高用量の投与によって不安惹起作用があることも報告されている。シトラールを吸入する時間を変化させることでマウスの行動も変化するのか明らかにする研究が必要である。

シトラールの吸入はマウスに対して前肢の握力低下を生じさせた。先行研究においても、シトラールの腹腔内投与による実験において、ロタロッド試験でマウスの筋弛緩が報告されている。

本研究は、高架式十字迷路試験ではシトラールの吸入はマウスに不安様行動を増加させなかったが、オープンフィールド試験においてマウスは不安様行動を増加させることを示した。高架式十字迷路ではシトラールの腹腔内投与によってマウスのオープンアームへの侵入数が減少することが示されている。本研究は過去の研究と同様にシトラールの吸入はマウスに不安様行動を増加させることを示している。

マウスの場合と同様にヒトでも、シトラールを含むフレグランスの吸入やシトラールが使用された生活用品の使用によってこれらの神経心理的作用があるかは不明であるが、類似の神経回路構造を所持することより同様の効果がある可能性がある。詳細は、ヒトを対象に効果を確認するさらなる研究が必要で

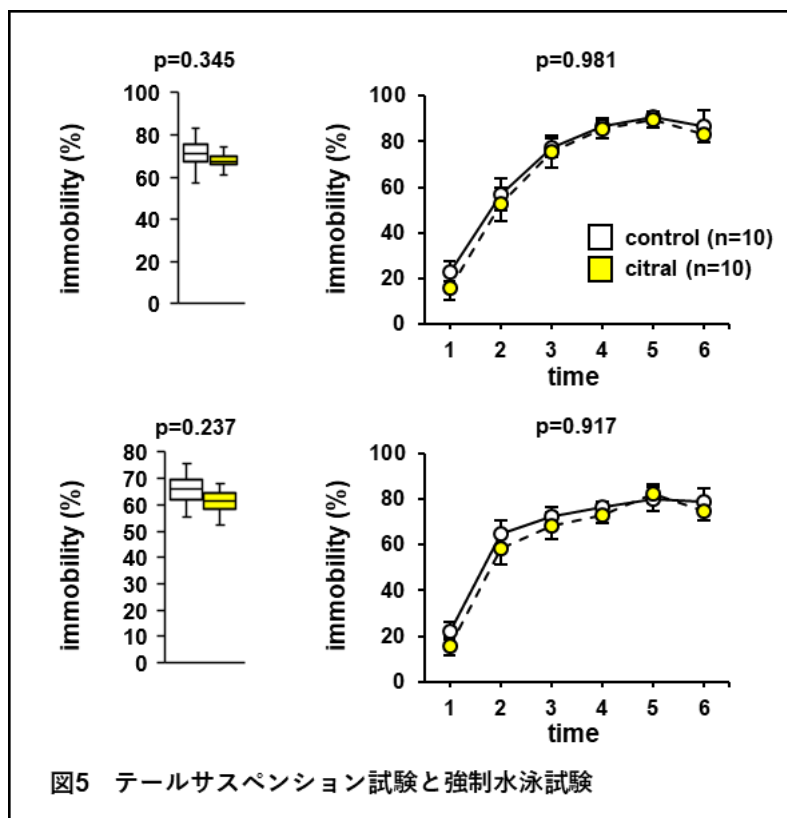


図5 テールサスペンション試験と強制水泳試験

ある。

本研究では、シトラールの吸入によって、どういった経路でシトラールがマウスの中枢神経系に作用して行動を変化させたのかは調べていない。また、マウスと同様にヒトでもシトラールの吸入によって行動が変化するかは不明である。シトラールによる中枢神経系への作用メカニズム、分子メカニズムを明らかにするにはさらなる研究が必要である。

本研究はシトラールを含むエッセンシャルオイルや様々な製品において、シトラールを吸入することで脳神経に影響を与えるという科学的根拠の一端を示した。

#### 5. 主な発表論文等

①雑誌論文：1件

1. 上野 浩司. ヘキサナール吸入による神経心理学的影響. AROMA RESEARCH. 22(1), 11-13. 2021.

②学会発表：0件

③図書：0件

④産業財産権：0件

## (表題) 制御性 T 細胞におけるユビキチンリガーゼ RNF146 の役割についての研究

(所属) 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学

(氏名) 勝山 隆行

(研究成果の概要)

近年自己免疫疾患の病態におけるユビキチン修飾の重要性が注目されている。本研究では、ユビキチン E3 リガーゼの 1 つである RNF146 が T 細胞の生存や活性化、制御性 T 細胞分化や機能に与える影響について検討を行い自己免疫疾患における RNF146 の役割を明らかにすることを目的とした。RNF146 を選択的にノックアウトした T 細胞を用いて様々な解析を行うことにより、T 細胞機能における RNF146 の役割を解明する。

(本文)

### 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の病態には自然免疫、獲得免疫の両者に関わる様々な免疫担当細胞が重要な役割を果たすことが知られているが、近年 T 細胞が果たす役割が改めて注目されている。制御性 T 細胞は免疫抑制を司る役割を持った細胞分画であり、そのマスター遺伝子が Foxp3 であることが知られている。がん免疫においては種々の抗腫瘍免疫応答を抑制することにより免疫逃避機構に関与するが、自己免疫疾患においては過剰な自己免疫を抑制し病態制御の役割を果たす。自己免疫疾患の病態においては、Th1/Th2/Th17 細胞などのエフェクター T 細胞への分化異常や異常活性化に加えて、制御性 T 細胞の機能低下も重要な役割を担うことが報告されている。

ユビキチン修飾系は代表的な翻訳後修飾系であり、免疫担当細胞内のシグナル伝達のあらゆるレベルでユビキチン化が関与していることが明らかとなってきたため、近年自己免疫疾患の病態における重要性が注目されている。ユビキチン修飾酵素である A20 は NF $\kappa$ B を制御しその変異は関節リウマチや全身性エリテマトーデスのリスクとなる(Cicacci C, et al. Immunol Res, 2019)。RNF146 はユビキチン E3 リガ

ーゼの 1 つであり、標的タンパク質である AXIN のユビキチン化を介して Wnt- $\beta$  カテニンシグナルを制御する(Zhang Y, et al. Nat Cell Biol, 2011)。癌細胞株を用いた *in vitro* での検討では、RNF146 が LKB1 のユビキチン化を促進し AMPK シグナルを制御することが報告されている(Li N, et al. Nat Commun, 2019)。また、破骨細胞や骨芽細胞においては 3BP2 を介してその分化や機能に重要な役割を果たすことも明らかとなっている(Matsumoto Y, et al. J Clin Invest 2016)。一方で、RNF146 やその標的分子、下流シグナルが制御性 T 細胞を含む免疫担当細胞においてどのような役割を果たすかはこれまで検討されていない。

筆者はこれまで全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患における T 細胞の役割について研究を行ってきた。今回、T 細胞、特に制御性 T 細胞の機能と RNF146 の関連を明らかにすることで、これまで知られていなかった RNF146 ならびにその下流分子が免疫担当細胞で果たす役割について解明することを目的として本研究を計画した。将来的には自己免疫疾患の病態に RNF146 が果たす役割を解明し、新規治療標的開発の端緒となることが期待される。

本研究では、既存の RNF146<sup>lox/lox</sup> マウスに新たに

Lck Cre マウスを交配することで T 細胞選択的 RNF146 ノックアウトマウス(KO)を作製する。これまで検討されていない同マウスを用いることで制御性 T 細胞の分化や機能に RNF146 が果たす役割について明らかにすることができる。

## 2. 研究の目的

本研究では、T 細胞選択的 RNF146 ノックアウトマウスを用いて RNF146 が T 細胞の生存や機能に与える影響を明らかにする。さらに、制御性 T 細胞に着目してその分化、増殖、抑制能に RNF146 が果たす役割について解明することでこれまで知られていなかった RNF146 の免疫担当細胞における役割を明らかにする。

また、将来的には自己免疫疾患における当該分子の果たす役割を解明したいと考えている。そのため、自己免疫疾患モデルマウスとの交配も開始し、RNF146 をノックアウトすることが病勢や臓器障害にどのような影響を与えるかを明らかにすることも目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、まず T 細胞特異的ノックアウトマウスを用いて *in vivo* で全身性の自己免疫性疾患様病態発症にユビキチンリガーゼが果たす役割について検討すると同時に、制御性 T 細胞(Treg)の発生・維持への影響を検討する。続いて、*in vitro* の解析で Treg の機能や分化の評価、細胞内シグナルやユビキチン化標的分子の検討を行うこととした。

具体的には、免疫担当細胞に広く発現する E3 ユビキチンリガーゼの 1 つである RNF146 に着目し、University of Toronto, Prof. Robert Rottapel と共同で作製した RNF146<sup>lox/lox</sup> マウスと Lck Cre マウスと交配することで T 細胞特異的 RNF146 KO マウスを作製する。*In vivo* の解析では、生存期間、体重変化、尿蛋白、自己抗体産生などにより自己免疫疾患様病態について評価する。また、肺、腎臓、腸管などの主要臓器障害について組織学的な評価を行う。各臓器での細胞浸潤については免疫組織染色、フローサイトメトリーを用いて評価する。続いて、胸腺や脾臓

における Treg 数についてフローサイトメトリーで確認する。マスター転写因子である Foxp3 の発現レベルについては平均蛍光強度(MFI)でも評価を行うこととした。

*In vitro* の解析では、活性化マーカーの発現やサイトカイン産生、増殖能などの T 細胞機能評価をフローサイトメトリーで行った。さらに、RNF146 欠損 T 細胞でのシグナル異常について、Syk や NFκB などの下流シグナルや mTOR pathway の活性化についてもウエスタンブロット法で評価し、3BP2 や LKB1 などの既知の標的タンパク質の発現量やユビキチン化も確認した。また、制御性 T 細胞への分化実験を行い、Foxp3 発現の制御に RNF146 が果たす役割を明らかにすることとした。具体的には、脾臓から分離キットを用いて naïve CD4 T 細胞を分離し、CD3/CD28 抗体の刺激下で IL-2、TGF-β とともに 72 時間培養を行うことで Treg へと分化誘導されることが知られている。コントロールならびに KO マウスから分離した naïve CD4 T 細胞を比較することで、RNF146 が Treg 分化に果たす役割を明らかにすることができる。転写因子発現の制御に関しては免疫沈降や質量解析法などにより RNF146 の新規標的タンパク質の発見も含めて解析を行うことで RNF146 やユビキチン修飾の未知の役割を明らかにすることとした。

さらに、RNF146 欠損 Treg の抑制能について評価するため、*in vitro* Treg suppression assay を行う。具体的には、フローサイトメトリーを用いて Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>)と non-Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>)をソーティングし、CD3/CD28 抗体の刺激下で様々な比率で共培養を行う。CFSE 染色を用いて non-Treg の増殖を確認することで Treg による抑制能を評価できる。コントロールと KO マウス由来の Treg で抑制能を比較することにより、RNF146 欠損が Treg 抑制能に与える影響を明らかにすることができる。

さらに、全身性エリテマトーデス疾患モデルマウスである B6/lpr マウスとの交配も行い、自己免疫疾患における当該分子の役割について *in vivo* での検討を行うこととした。全身性エリテマトーデスの病態において T 細胞で RNF146 がどのように機能する

かを明らかにすることにより病態解明や新たな治療標的の開発に寄与できると考えた。

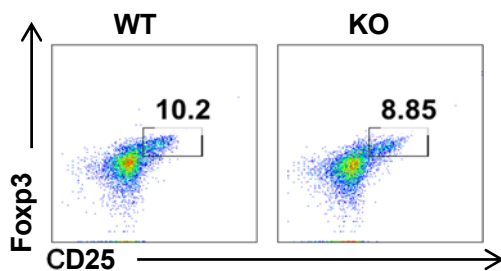
#### 4. 研究成果

まずは University of Toronto, Prof. Robert Rottapel と共同で作製した *RNF146<sup>lox/lox</sup>* マウスと Lck Cre マウスと交配することで T 細胞特異的 RNF146 KO マウスを作製した。マウス作出に時間を要したが、最終的に T 細胞選択的 RNF146 ノックアウトマウス (*RNF146<sup>lox/lox</sup> LCK Cre+*マウス, KO マウス)の安定的な作出が可能となった。

この KO マウスと野生型マウス(WT マウス)の比較を行った。生後 12 週までの比較では、生存率に差はなく明らかな皮膚炎・関節炎といった視診上確認できる異常所見は認められなかった。また、体重にも差はみられなかった。脾臓重量についても有意差は認めていない。各臓器の組織学的な評価については現在検討中である。

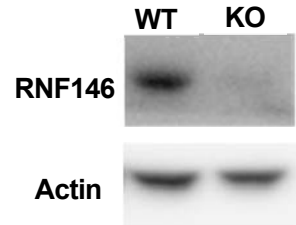
続いて、同ノックアウトマウスを用いて脾臓細胞の解析をフローサイトメトリーで行った。T 細胞分画・B 細胞分画の割合については WT マウス・KO マウス間で有意差は認めなかった。一部の活性化マーカー、エフェクター細胞分画が KO マウスで増加する傾向を認めており、更なる検討を進めている。

制御性 T 細胞についても検討を行った。マスター転写因子である *Foxp3* の発現については顕著な差は認められなかった。一般的な制御性 T 細胞の分画とされている CD4+CD25+*Foxp3*+細胞の割合についても、明確な差は認められなかった(図 1)。Naïve CD4 T 細胞からの制御性 T 細胞分化(induced-Treg)について現在検討を行っている。また、制御性 T 細胞の抑制能の評価も *in vitro*, *in vivo* で確認する予定である。



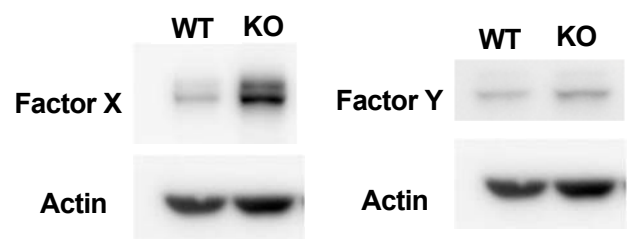
(図 1)

続いて、ウェスタンブロット法により KO マウスの T 細胞における蛋白発現の評価を行った。まず、WT マウス・KO マウスの脾臓細胞から磁気ビーズを用いて T 細胞を分離した。分離された T 細胞における RNF146 の発現を確認したところ、図 2 の通り RNF146 の発現が抑制されていることが確認できた。



(図 2)

さらに、RNF146 の下流シグナルについて検討を行った。RNF146 の標的基質となる既知の複数の分子について検討を行ったところ、Factor X の発現が KO 細胞 T 細胞で著明に増加していることが明らかとなった。一方でその他の因子(Factor Y など)については WT T 細胞と KO T 細胞の両方で差はみられなかった(図 3)。これらの標的のユビキチン化についての評価ならびに T 細胞活性化に関与する細胞内シグナルについての検討を進めており、RNF146 が T 細胞機能に果たす役割について解明していく。



(図 3)

(得られた成果の位置づけ)

RNF146 に関連したシグナル経路については、これまで骨芽細胞・破骨細胞を中心に研究が進められてきた。本研究では、自己免疫疾患にユビキチン化修飾が重要な役割を果たすことに着目し、RNF146 が T 細胞機能にどのような影響を与えるかについて検討を行った。T 細胞機能についての詳細な解明については現在検討を続けているが、本研究を通じて

RNF146 の未知の役割を明らかにすることにより、全身性エリテマトーデスをはじめとする種々の自己免疫疾患の病態解明、新たな治療戦略の確立に寄与できる可能性があると考えられる。

(今後の展望)

現時点では制御性 T 細胞の機能に RNF146 が果たす役割については検討できていない。今後は、抑制能の評価を *in vitro*, *in vivo* の両方で検討するとともに、制御性 T 細胞の機能に関与することが知られている各分子の発現についてもフローサイトメトリーで検討する。さらに、RNF146 の下流シグナルについてより詳細な検討を進めることで治療標的となる細胞内経路の同定を試みる。

さらに、疾患モデルマウスでも同様の検討を行うことにより、自己免疫疾患における RNF146 の役割を明らかにする。マウスから得られた知見をもとに、将来的にはヒト患者検体でも同様の傾向がみられるかを確認し、臨床応用の可能性について検討を進める。

5. 主な発表論文など

現時点では当該研究については雑誌論文並びに学会発表は行なっていない。

# 炎症性骨破壊におけるアンジオテンシン II が及ぼす骨細胞における役割の検討

川崎医科大学 リウマチ・膠原病学

赤木 貴彦

## 研究成果の概要

近年、レニン・アンジオテンシン系 (RAS) が骨代謝に関与していることが報告されている。本研究では、アンジオテンシン II (Ang II) が関節リウマチなどの炎症性骨破壊に及ぼす影響について検討を行い、過剰な Ang II 存在下では骨破壊が増強していることを見出した。慢性腎臓病や肥満などによる RAS 系活性化状態を合併した関節リウマチでは、RAS 活性化が骨びらんを増強している可能性があり、RAS 系阻害薬が骨破壊を軽減する可能性が示唆された。

### 1. 研究開始当初の背景

アンジオテンシン II (Ang II) は、レニン・アンジオテンシン系 (RAS) の最終代謝産物であり、血管収縮による血圧の恒常性維持や、体液量の調節を行っている。近年、Ang II を含めた RAS が、全身への作用とは別に、組織局所で Ang II が産生され、auto/paracrine 的に作用する局所的な RAS が存在し、臓器自体の機能調節に寄与していることが報告されている (Physiol Rev. 2006;86:747-803)。また、臓器の機能調節とは別に、炎症や線維化による病的な組織リモデリングにも働いていることが報告されており、Ang II 変換酵素阻害薬や Ang II 受容体阻害薬が疾患進展抑制目的に使用されている (Ann Rev Pharmacol Toxicol. 2010;50:439-65.)。

Ang II による組織局所での作用の 1 つとして、骨代謝に関与していることが知られている。Ang II は骨芽細胞の RANKL 発現誘導を介して破骨細胞分化を亢進させ、Ang II の持続投与は全身の骨量低下を引き起こすことが報告され (FASEB J. 2008;22:2465-75.)、RAS が亢進した高血圧マウスは骨量低下の表現系を呈することが報告されている (J Bone Miner Res. 2009;24:241-50.)。また、コホート研究において、アンジオテンシン変換酵素阻害薬の使用が骨折リスクを下げる事が報告されている (J Hypertens. 2006;24:581-9.)。

関節リウマチは、炎症性骨破壊を呈する代表的な疾患であり、その病態として関節内で破骨細胞の活性化による骨破壊が起こっていることが既に知られている。関節リウマチ患者や関節炎ラットの滑膜や滑液において、Ang II や Ang II タイプ 1 受容体 (AT1R) の発現が亢進していることが報告されている (Arthritis Rheum. 2007;56:441-7.)。

### 2. 研究の目的

関節リウマチにおいて、関節局所に RAS の構成要素である Ang II や AT1R の発現の亢進が、関節リウマチを代表する炎症性骨破壊に及ぼす役割については解明されていない。そこで、関節炎による炎症性骨破壊を自然発症するマウスにおいて、Ang II が骨破壊に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。本研究により、炎症性骨破壊における RAS の関与が明らかとなれば、アンジオテンシン II 及びその下流のシグナルを標的とした新規治療戦略の開発へと展開できるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

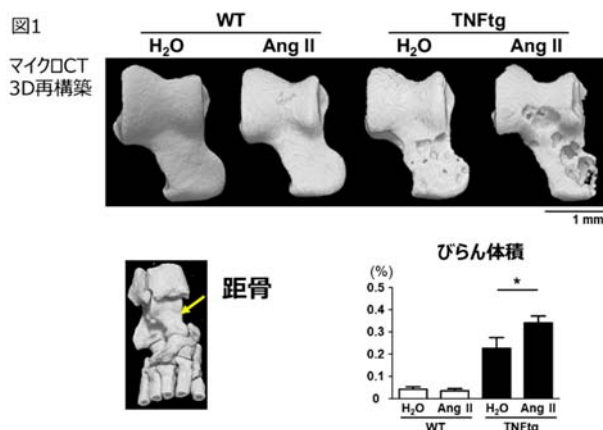
まず、関節炎を自然発症するヒト TNF トランスジェニック (TNFtg) マウスの足関節における AT1R の発現を、定量 PCR とウエスタンブロット法、免疫組織染色で評価を行った。次に、12 週齢の野生型及び

TNFtg マウスに浸透圧ポンプを用いて Ang II (1.44 mg/kg/day) を4週間持続皮下投与し、16週齢時に体重、関節炎スコア(関節腫脹)を評価した。その後、マイクロCTで足関節(距骨)の骨びらん、ならびに全身骨への影響を評価するため、海綿骨(第5腰椎・脛骨骨幹端)と皮質骨(脛骨中央骨幹)を撮影した。骨びらは、BV(Bone volume:骨量)とEv/Rpv(Eroded volume per repaired volume:骨びらん体積)で、海綿骨骨量はBV/TV(Bone volume per total volume)、皮質骨骨量はCt.Th(Cortical thickness:皮質骨幅)で評価した。距骨の骨びらは組織学的にも評価を行った(HE染色:炎症細胞浸潤、Safranin O染色:軟骨破壊、TRAP染色:破骨細胞形成をそれぞれ評価)。評価はES/BS(Eroded surface per bone surface:骨びらん面積)とN.Oc/BS(number of osteoclasts per bone surface:骨表面における破骨細胞数)で行った。

次に、TNFtg マウスとAT1R欠損(AT1R<sup>-/-</sup>)マウスを交配させ二重変異(TNFtg/AT1R<sup>-/-</sup>)マウスを作成し、AT1R欠損がTNFtgマウスの炎症性骨破壊ならびに全身骨に与える影響について上記と同様の方法で評価した。

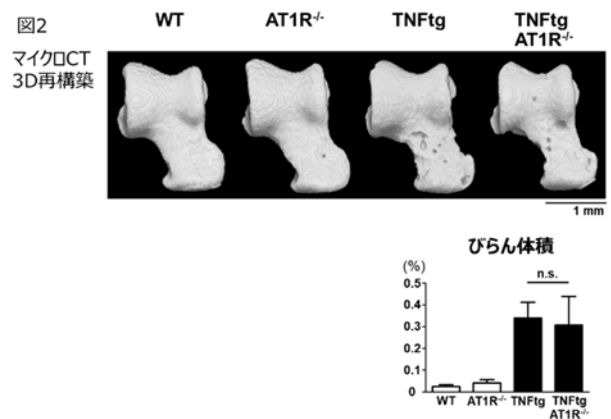
#### 4. 研究の成果

TNFtgマウスの足関節で、AT1R遺伝子とタンパクの有意な発現亢進を認めた。TNFtgマウスへのAng II投与群と対照群(H<sub>2</sub>O投与)の比較では、体重や関節炎スコア、組織学的な炎症細胞浸潤や軟骨破壊の程度に差は認めなかった。距骨の骨びらは、Ang II投与により、野生型(WT)と比較して、TNFtgマウスで有意に悪化した(図1)。組織学的な解析では、



ES/BSやN.Oc/BSにおいて、Ang II投与によりWTと比較してTNFtgマウスで骨びらん・破骨細胞形成が増悪する傾向を認めた。Ang II投与による全身の骨への影響として、海綿骨(第5腰椎・脛骨骨幹端)と皮質骨(脛骨中央骨幹)の解析を行った。対照群においてWTと比べて、TNFtgマウスでは脛骨中央骨幹での皮質骨幅が有意に低下していたが、その他の部位では変化は見られなかった。また、Ang II投与はWTやTNFtgマウスの全身骨に対して影響を及ぼさなかった。

次に、二重変異(TNFtg/AT1R<sup>-/-</sup>)マウスを用いて、AT1R欠損が骨びらんに改善するか検証するために、TNFtg群とTNFtg/AT1R<sup>-/-</sup>群の比較を前述の方法と同様の方法で行った。その結果、関節炎スコアや組織学的解析、骨びらん(図2)において有意な差は認めず、骨破壊の改善は認めなかった。また、全身骨(海綿骨や皮質骨)の評価においても同様に有意な差は認めなかった。



関節炎を自然発症するTNFtgマウスを用いて、Ang IIが炎症性骨破壊に与える影響を検討した。その結果、Ang II投与下では関節炎の悪化は認めなかったが、骨びらは増強した。つまり、Ang IIが炎症とは独立した機序で、TNFを介した炎症性骨破壊を増強させた可能性が考えられた。過去の既報より、Ang IIが骨芽細胞などの間葉系細胞に作用しRANKL発現を亢進させることで、破骨細胞分化を促進することが報告されている。また、TNFなどの炎症性サイトカインが滑膜細胞でのRANKL発現を増加させ、破骨細胞分化や成熟を促進させることが知られている(FASEB J. 2008;22:2465-75.)。これらの報告より、TNFによるRANKL発現亢進をAng IIが増強し、その結果、破骨細胞



胞分化を促進し、骨破壊を増強するという機序が考えられた。

Ang II 投与下では関節炎に伴う骨びらんが増強したが、AT1R 欠損では軽減しなかった。すなわち、関節リウマチなどの炎症性骨破壊をきたす関節炎では、Ang II が異常高値となると、骨破壊が増強する可能性が考えられた。腎血管性高血圧症、慢性腎臓病や肥満などによる RAS 活性化状態を合併した関節リウマチ患者では、RAS 活性化が骨びらんを増強している可能性があり、RAS 系阻害薬が骨破壊を軽減する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### ① 雑誌論文：1 件

**Akagi T**, Mukai T, Mito T, Kawahara K, Tsuji S, Fujita S, Uchida HA, Morita Y. Effect of Angiotensin II on Bone Erosion and Systemic Bone Loss in Mice with Tumor Necrosis Factor-Mediated Arthritis  
Int J Mol Sci. 2020; 21(11): 4145.

### ② 学会発表：3 件

**Akagi T**, Mukai T, Mito T, Kawahara K, Tsuji S, Fujita S, Uchida HA, Morita Y. Excessive Angiotensin II exacerbates bone erosion in a murine tumor necrosis factor-mediated arthritis model. 第 65 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2021/4/26 WEB 開催.

**Akagi T**, Mukai T, Mito T, Kawahara K, Tsuji S, Fujita S, Uchida HA, Morita Y. Effect of Angiotensin II on Bone Erosion and Systemic Bone Loss in Mice with Tumor Necrosis Factor-Mediated Arthritis. The 22nd Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2020) 2020/10/24 Virtual congress

**赤木貴彦**, 向井知之, 河原恭子, 守田吉孝. 炎症性骨破壊におけるアンジオテンシン II の役割の検討. 第 40 回日本骨形態計測学会 2020/06/18 WEB 開催.

### ③ 図書：0 件

### ④ 産業財産権：0 件