

学位取得者／学位記

●令和2年度 (2020.4~2021.3) ●

●学位取得者

萩原 真一郎

Prostaglandin E-major Urinary Metabolite as a Biomarker for Pediatric Ulcerative Colitis Activity
J Pediatr Gastroenterol Nutr 2017;64(6):955-961

取得年月日：2020年9月25日

平田 克弥

4-Phenylbutyrate ameliorates apoptotic neural cell death in Down syndrome by reducing protein aggregates

Sci Rep 2020 Aug 20;10(1):14047.

取得年月日：2020年10月31日

武鍵 真司 (令和2年度博士課程優秀者)

4-phenylbutyric acid enhances the mineralization of osteogenesis imperfecta iPSC-derived
J Biol Chem. 2020 Nov 23;296:100027.

取得年月日：2021年3月24日

山本 賢一

Genetic and phenotypic landscape of the mitochondrial genome in the Japanese population
Commun Biol, 31 : 104, 2020.

取得年月日：2021年3月24日



Prostaglandin E-major Urinary Metabolite as a Biomarker for Pediatric Ulcerative Colitis Activity

萩原 真一郎

大阪母子医療センター 消化器・内分泌科

J Pediatr Gastroenterol Nutr

2017;64(6):955-961

● 目的

Prostaglandin E-major urinary metabolite (以下PGE-MUM)は、尿から測定が可能であり、成人潰瘍性大腸炎 (以下UC) 活動性を反映するバイオマーカーとして報告され、近年注目されつつある。今回我々は、小児UC活動性の非侵襲的なバイオマーカーとして利用することができるか前方視的検討を行った。

● 方法ならびに結果

29名の小児潰瘍性大腸炎患者(女14名、男15名、8-18歳)と29名の年齢と性別をマッチさせたコントロール群が本研究に登録された。UCの臨床的活動性はPediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI)、内視鏡的活動性はMayoスコア、組織学的活動性はMattsスコアを用いた。Mayoスコアは小児栄養消化器肝臓認定医2名が判定し、Mattsスコアは病理専門医3名が盲検的に判定した。PGE-MUMはラジオイムノアッセイで測定した。PGE-MUMと比較するUC活動性バイオマーカーとしてCRPと血沈を用いた。PGE-MUMは、内視鏡的、組織学的に活動性のあるUC患者で上昇していたが、内視鏡的、組織学的に寛解にあるUC患者もしくはコントロール群では上昇していなかった。PGE-MUMは、PUCAI ($r=0.594$)、全大腸の中で最も高いMayoスコア($r=0.462$)と正の相関を示した。また全大腸を六区分に分けたときの、各々の最も高いMayoスコアとMattsスコアの合計は、PGE-MUMが最も高く相関しており(合計Mayoスコア; $r=0.694$, 合計Mattsスコア; $r=0.613$)、全大腸の炎症を反映していた。CRPはどの活動性指標とも相関を示さず、血沈は合計Mayoスコアとのみ正の相関を示した($r=0.490$)。

● 総括

PGE-MUMは、小児UCの全大腸の内視鏡、組織学的活動性を反映するバイオマーカーとして有用である。

● 本人コメント

潰瘍性大腸炎は近年増加傾向にあり、小児科でも患者数が増加しています。治療目標として粘膜治癒が提唱されていますが、粘膜の状態を確認するためには、大腸内視鏡が必要となります。小児患者さんは内視鏡の際に、鎮静・麻酔が必要なことが多く、下剤内服でも大変な思いをされることがあります。粘膜状態を反映する代替検査がないかと調べていたときに、尿で測定可能なPGE-MUMを知り、今回の研究を立案実行して、その成果をまとめることができました。現在、この研究を更に発展させ、多施設共同研究を行っています。このような貴重な機会を与えてくださった大園先生、恵谷先生をはじめ、ご指導いただいた先生方へ、この場を借りて厚く御礼申し上げます。



C4-Phenylbutyrate ameliorates apoptotic neural cell death in Down syndrome by reducing protein aggregates

平田 克弥
大阪母子医療センター 新生児科
Sci Rep 2020 Aug 20;10(1):14047.

● 目的

ダウン症候群(DS)は21番染色体のトリソミーが原因である、最も頻度の高い染色体疾患である。DS患者は程度の差はあるが、全例に精神発達遅滞や認知障害が認められる。これまでにDS患者や胎児の剖検の脳の病理所見や動物実験、細胞実験などからDSの神経細胞は、成熟障害や神経細胞死を認めやすい特徴が明らかとなっている。こうした所見は、21番染色体上の重要な遺伝子(DYRK1A, APP, S100Bなど)の発現量が1.5倍に増加することが原因と考えられてきた。一方で、酵母やマウス、ヒトの細胞における知見で、染色体番号に関係なく、トリソミー細胞がタンパクの恒常性の破綻に関連する細胞ストレスを引き起こすことが明らかになりつつある。今回、我々は神経細胞におけるトリソミー共通の細胞ストレスに着目し、複数のヒトトリソミー症候群患者由来のiPS細胞を樹立し、神経分化誘導系を確立し、評価することで、トリソミー自体が神経細胞に与える影響を明らかにした。

● 方法

健常児、DS患児、13トリソミー患児の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を樹立し、各iPS細胞を胚葉体口ゼット法を用いて神経前駆細胞に誘導した。また各iPS細胞にテトラサイクリン誘導性にNGN2を発現するコンストラクトをpiggyBac vectorを用いてトランスフェクションし、iPS細胞から14日間で成熟神経細胞に誘導する系を確立した。タンパク合成の亢進はClick-iT® AHA Alexa Fluor® 488 Protein Synthesis HCS Assayを用いてメチオニンアナログの取り込みで評価した。ユビキチン、p62、GRP78/BIP、GAD153/CHOP、カスパーゼ3などはWestern blotや免疫染色で評価した。タンパク凝集体はPROTEOSTAT aggresome Detection kitを用いて評価した。免疫染色の定量にはIN CELL Analyzer 6000およびIN Cell Developer Toolbox 1.9を用いて行った。

● 成績

健常児の神経前駆細胞に比し、トリソミー神経前駆細胞においてタンパク合成の亢進、ユビキチンやp62の蓄積、タンパク凝集体の蓄積の所見を明らかにした。さらにトリソミー神経細胞は、健常児の神経細胞に比し、神経細胞の脱落を認め、カスパーゼ3陽性の神経細胞死を認める率が高く、p62を含むタンパク凝集体の蓄積を認め、小胞体ストレスマーカーであるGRP78/BIPとGAD153/CHOPの発現の上昇を認めた。iPS細胞から神経分化誘導する過程でケミカルシャペロンである4-PBAを投与することで、トリソミー神経細胞における上記表現型の改善を認めた。

● 総括

21, 13トリソミー神経細胞は、小胞体ストレスの上昇および神経細胞死という共通の表現型を認めた。神経分化誘導の初期の段階からケミカルシャペロンである4-PBAを投与することで、小胞体ストレスを軽減し、神経細胞死の表現型の軽減が得られた。本研究の結果から、DSの神経症状に対してトリソミー細胞に共通する細胞ストレス作用が、治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

●本人コメント

大学院では、さまざまなトリソミー症候群患者由来のiPS細胞の神経分化誘導という大きなテーマをいただき、大藪先生、北畠先生をはじめ、たくさんの先生方に研究の基礎からご指導いただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。新生児科医として、トリソミー症候群の患者さんやご家族と接する機会が多く、この分野から臨床応用に繋がる研究が進展することを願っています。



4-phenylbutyric acid enhances the mineralization of osteogenesis imperfecta iPSC-derived osteoblasts.

武鐘 真司

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

J Biol Chem. 2020 Nov 23;296:100027.

● 目的

骨形成不全症 (OI) は主にCOL1A1、COL1A2遺伝子変異により骨脆弱性をきたす疾患である。対症療法としてビスホスホネート製剤による治療が行われているが、重症例に対する効果は限定的である。4-フェニル酪酸 (4-PBA) はOIゼブラフィッシュモデルに対して効果を示し、新規治療薬として期待される薬剤である。OI患者由来の細胞を用いて、OIの病態解析と4-フェニル酪酸の効果を検討することを目的とする。

● 方法

COL1A1あるいはCOL1A2遺伝子変異を同定したOI患者6例〔グリシン置換変異2例、ナンセンス変異1例、エクソンスキップ変異3例〕から、皮膚線維芽細胞を採取し、健常者由来線維芽細胞3株と比較して実験を行った。小胞体 (ER) 内へのI型コラーゲン蓄積の程度を蛍光免疫染色によって評価した。I型コラーゲンの遺伝子発現をRT-qPCRで、蛋白量をELISAで評価した。細胞から分泌されたI型コラーゲンの電気泳動パターンをSDS-PAGEで、翻訳後修飾をLC-MSで評価した。I型コラーゲンのらせん構造の異常をCollagen Hybridizing Peptideで検出した。線維芽細胞からiPS細胞を作成し、iPS細胞から分化誘導した骨芽細胞での石灰化能をアリザリンレッド染色とCa定量により評価した。上記の実験で4-PBAの効果を検討した。

● 結果

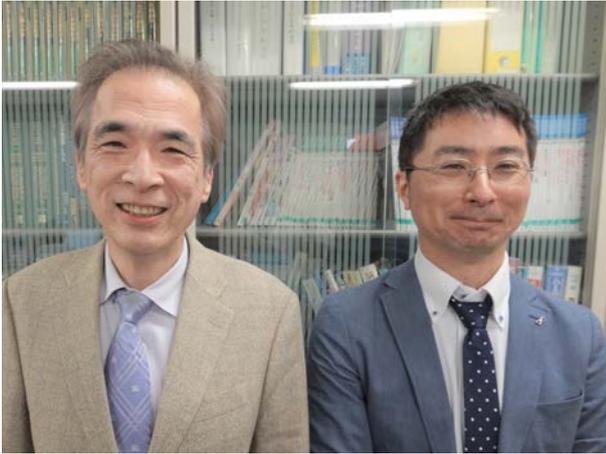
グリシン置換変異とエクソンスキップ変異のOIの線維芽細胞ではプロコラーゲンの過剰なERへの蓄積がみられ、4-PBAによって蓄積が減少した。I型コラーゲンの遺伝子発現、蛋白量はともにグリシン置換変異のOIで増加しており、4-PBAによっていずれも減少した。分泌されたI型コラーゲンの電気泳動パターンはグリシン置換変異のOIで健常より幅の広いバンドがみられ、LC-MSではリジンの糖鎖過修飾がみられたが、4-PBAによる変化はみられなかった。OI由来のI型コラーゲンにはらせん構造の異常が検出され、4-PBAによって異常が減少した。誘導骨芽細胞の石灰化能はグリシン置換変異のOIで低下しており、4-PBAの添加によって石灰化能が改善した。

● 総括

従来、I型コラーゲンの質に異常があるとされてきたグリシン置換変異のOIはI型コラーゲンの量の異常も有する可能性がある。4-PBAは過剰なI型コラーゲンの産生を抑制することでER内のI型コラーゲンの蓄積を減少させることに加えて、らせん構造を改善させることで石灰化能を促進させる可能性がある。我々はOIの治療薬として4-PBAの国内特許を2018年に取得しているが、4-PBAは既に他の疾患に対して臨床応用されているため、OIの新規治療薬として期待される。

●本人コメント

臨床の場で骨形成不全症の患者さんと接する機会を持ちながら、同疾患の治療法開発の研究を続けることができ、非常に有意義な研究生活を送ることができました。大藪先生をはじめ学内の先生方はもちろんのこと、学外の先生方にも多くのご指導を頂いて研究成果をまとめることができました。本当にありがとうございました。



Genetic and phenotypic landscape of the mitochondrial genome in the Japanese population

山本 賢一

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

Commun Biol, 31 : 104, 2020.

● 目的

ミトコンドリアは真核細胞に存在し、酸化リン酸化を通じて細胞生存に必要なエネルギーを産生する非常に重要な器官の一つである。ミトコンドリアは核ゲノムと異なる独自のゲノム（ミトコンドリアゲノム）を持ち、環状2本鎖構造や母型遺伝といった核ゲノムとは異なる特徴を有している。ミトコンドリアゲノムに関する研究は古くからなされており、その構造やヒトの疾患や形質との関わりが調べられてきているが、バイオバンクスケールのサンプルと、次世代シーケンサーを用いた、大規模で網羅的な解析は、特に非ヨーロッパ人集団においては、ほとんどなされていない。今回、我々はバイオバンクジャパンのデータを用いて、日本人集団におけるミトコンドリアゲノムの遺伝的、表現的な特徴の解明を行なった。

● 方法ならびに結果

バイオバンクジャパンにより収集された1928人の末梢血DNAによる全ゲノム情報を用いてミトコンドリアゲノム配列解析をホモプラミー変異に絞って行った。D-Loop領域と呼ばれる非コード領域に変異の集積を認め、ほとんどの変異が稀な変異であった。配列情報へ機械学習手法を適応した共通祖先グループ(ハプログループ)解析では、日本国内で、本州と沖縄でハプログループの分布が異なることが判明した。また教師なし機械学習により、3~4桁のハプログループが日本人集団の遺伝的な多様性を示すことが判明した。次にミトコンドリアゲノムの遺伝的構造に関する解析を行い、核ゲノムと比較することで、ミトコンドリアゲノムには組み替えや強い連鎖不平衡(LD)ブロックがないこと、一方で、ゲノム全長にわたるLD関係を持つハプロタイプが存在することが全ゲノム情報を用いることで確認できた。またミトコンドリアゲノムコピー数を全ゲノム情報のデプスから求め、核ゲノムとの関連を行い、ミトコンドリアゲノム複製に関与するTFAM遺伝子SNP(rs11006126)で既報と同じ正の効果量を確認した。

最後に全ゲノム情報と、バイオバンクジャパンにより収集された日本人集団15万人のタイピングアレイの部分的なミトコンドリアゲノム情報を遺伝型インプューションにより統合することで、206の高精度なミトコンドリアゲノム変異を推定し、疾患、臨床検査値、食生活習慣などの99の形質の関連を調べた。Creatine kinaseでゲノムワイド有意水準($P=2.5 \times 10^{-6}$)を超えるシグナルを、またAST, sCr, eGFR, バセドウ病でsuggestiveな有意水準($P=2.4 \times 10^{-4}$)を超えるシグナルを初めて検出した。特にCK, AST, sCr, eGFRではLD関係にある変異が有意水準を超えており、ミトコンドリアゲノムのpleiotropicな影響を確認することができた。またバセドウ病で認めた変異は日本人や東アジア人のみで認める低頻度アレル(AF=0.036 in 1000 Genomes Project JPT, AF=0.016 in 1000 Genomes Project EAS)であり、ミトコンドリアゲノムの人種特異的な影響も確認できた。

● 総括

バイオバンクスケールの全ゲノム情報を用いることで、日本人集団におけるミトコンドリアゲノムの遺伝的、表現的特徴を包括的に把握することができた。ミトコンドリアゲノムのヒト形質(筋肉、腎臓、肝臓、甲状腺)への影響も確認することができ、ヒトゲノムにおけるミトコンドリアゲノムの重要性が確認されるとともに更なるヒトとミトコンドリアの関係が解明されることが期待される。

●本人コメント

ミトコンドリアは、小児においても成長発達において重要な働きをしており、ミトコンドリアの機能の解明に新たな一石を投じることができたと思います。また、本研究はin silicoで全て実施しており、阪大小児科の研究の歴史においても新たな1ページを刻むことができたのではないかと考えています。これも全て、このような機会を与えてくださり、種々ご助言をくださった大藺恵一先生、一から研究指導をくださった遺伝統計学教室の岡田随象先生、また公私に渡り支えてくださった腎研の先生方のおかげです。厚く御礼申し上げます。今後も小児医療の発展に貢献できるよう、さらに尽力して参ります。