抗酸化物質としての水素分子：”水素医学”の期待と展望

藤田 慶大
九州大学薬学府病態生理学分野

酸化ストレスという言葉が一般的になり、その主役である活性酸素・活性窒素種の過剰な産生がなぜ起こるのか、そしてそれらを如何にして減らすかという研究が盛んになると共に、多くの抗酸化剤の候補が登場した。しかしながら、未だかつてこれほど小さな、それでいて有力な候補物質があっただろうか、と思えるような報告がなされたのは、今から 3 年前の 2007 年。日本医科大学の太田教授らのグループが、「水素分子が抗酸化物質として酸化ストレスを軽減する」ことを Nature Medicine で報告（Ohsawa et al., 2007）して以来、水素分子の抗酸化作用が組織障害を防ぐという研究報告が次々と発表されている。

Ohsawa らの論文では、脳梗塞モデルラットに対して水素分子を 2%含んだガスを吸入させると、梗塞巣の拡大を防ぐことができ、その効果は細胞傷害性ラジカルであるヒドロキシルラジカルを選択的に除去することによると報告されている。生体内では、活性酸素・活性窒素種は細胞内シグナリングや食細胞の貪食時に必要であるように、実は欠かせないものである。しかし、多くの抗酸化剤は活性酸素を選別するようなことはしないため、不必要な活性酸素除去が問題視されるケースが少なくない。さらに、マウスやラットでは効果が見られるのに対し、ヒトでは効果が見られないというものも多く、日の目を見ることなく臨床応用へ進まなかった候補物質も数知れない。だが水素分子に関しては、その両方を解決するであろうと期待されている。

我々も、この報告とほぼ同時期（もっとも確信できたのは、この論文が報告されてからであった）に、水素分子の効果に着目して研究をしていた。我々の研究対象は脳梗塞ではなく、同じく脳内で酸化ストレスがその原因の一端とされているパーキンソン病であった。パーキンソン病は、脳内の黒質・線条体と呼ばれる部位に分布するドーパミン神経細胞が脱落することが原因で、固縮・振戦・無動・姿勢反射障害を四大徴候とする難治性の神経変性疾患として、アルツハイマー病に次ぐ有病率をもつ疾患である。このパーキンソン病におけるドーパミン神経細胞の脱落は、合成麻薬の副産物として同定された薬物、MPTP（1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine）を投与することによって再現することができる。MPTP は、ドーパミン神経細胞を選択的に脱落させることができ、その選択性は MPP+（MPTP の代謝物）がドーパミントランスポーターによって神経細胞内へ取り込まれることに起因している。MPP+による神経細胞死は、ミトコンドリア電子複合体の complex1 が選択的に阻害されることにより始まり、ミトコンドリア機能異常が原因となるさまざまな経路を介したア

ポトーシスが進むほか、神経伝達物質であるドーパミンの自動酸化によるドーパミン含量の減少、さらには脱落した神経細胞の周囲に存在するグリア細胞、特にミクログリアの活性化によって神経細胞死が助長されることも知られている。こと、フリーラジカルによる細胞傷害には、ミトコンドリアからの活性酸素・ドーパミンの自動酸化・活性化ミクログリアからの活性酸素および NO 合成酵素（誘導型 NO 合成酵素：iNOS）から産生される一酸化窒素などが関与しており、神経細胞死に酸化ストレスが深く影響していることは、多くの研究より明らかとなっている。

我々は、2009 年にこのパーキンソン病モデルマウスに対して水素含有水の飲用が神経保護効果を示すことを報告した（Fujita et al., 2009）。まず、MPTP による神経細胞死を抑制するかどうかを検討したところ、MPTP により約 60%神経細胞が脱落したのに対し、水素含有水は約 30%脱落を抑制することが分かった。次に、水素分子の濃度依存性に関する研究からは、水素濃度が 0.08 ppm と飽和濃度のおよそ 5%という低濃度であっても、神経細胞死を抑制することが明らかとなった。この低濃度の水素含有水は、電気分解で発生させた水素を用いて作成したものであったが、水素を金属マグネシウムの化学反応を用いて発生させることによって、より簡便に作成することができる。そこで、マグネシウムを用いた水素含有水でも、同等の効果を観察できるか検討したところ、やはり神経細胞死を有意に抑制することがわかった。この水には、水素だけでなく水酸化マグネシウムも溶解しており、溶液も弱アルカリ性を示すが、水素が含有されていないと神経細胞死を抑制することができなかったため、他の要因ではなく、水素が神経細胞死を抑制するために必須であることが判明した。また、水素含有水の飲水は、MPTP 投与後から開始しても神経変性を抑制できたことから、パーキンソン病発症後からでも神経変性を抑制できる事が期待できる。

さて、パーキンソン病は行動障害を主症状とする疾患である。しかしながら、MPTP の急性投与では、行動障害を観察することが非常に困難であるとされている。そこで行動障害を観察することができるとされる、MPTP 慢性投与モデルを作成し、パーキンソン病の病態により近い条件で水素含有水の効果を検証することにした。すると、MPTP 慢性投与による神経細胞死も、水素含有水により約 20%脱落が抑制されることが分かった。さらに open-field test による自発運動量測定実験においても、MPTP による自発運動量減少を、水素含有水が抑制することを明らかにした。

このように、水素含有水は MPTP 急性投与・慢性投与それぞれに対して神経保護作用を示したが、次に水素含有水の細胞保護作用のメカニズムについて検討することにした。まず、MPTP の代謝物である MPP+の含量を調べたところ、水素含有水によって脳内の MPP+は減少しなかったことから、水素分子は

MPTP の代謝には影響を及ぼさなかったと考えられる。次に、水素の抗酸化作用に着目し、ドーパミン神経細胞内で産生される活性酸素のうち、スーパーオキシドアニオンラジカル（$\cdot O_2^-$）の産生を、ジヒドロエチジウムによって検出した。すると、MPTP によって発生した$\cdot O_2^-$は、水素含有水飲水によって減少する傾向はあるものの有意な差を認めることはなかった。しかし、ヒドロキシルラジカル（•OH）による、黒質の神経細胞における脂質過酸化に対しては、水素含有水は顕著な抑制作用を示した。また、線条体のミトコンドリアにおいて、•OH による DNA の構成塩基のひとつである、グアニンの酸化体 8-oxoguanine の蓄積についても、水素含有水は顕著な抑制作用を示した。また、このときに活性酸素産生源のひとつである活性化ミクログリアは観察されなかったことから、活性酸素に関する検討実験で検出した活性酸素は、神経細胞内で産生されたものであると考えられる。こうした結果より、水素含有水による神経保護作用は、神経細胞において発生した活性酸素、なかでも•OH による酸化ストレスを減少させることによるものと考えられる。

さて、これまでの報告では水素分子は、飲用水を介した摂取と 2%水素ガスを混合したガスを吸入する二つの方法で投与されていたが、いずれの場合においても、血液中の水素度濃度上昇が確認されている。また筋中の半減期はおよそ 20 分であるなど、続々と水素分子の生体内キネティクスが明らかとされてきた（Nagata et al., 2009）。我々も、脳組織内に水素分子が到達するかどうかを調べるため、水素電極をラット線条体に挿入して経時的な変化を追跡した。すると、水素混合ガスを吸入直後から水素濃度の上昇を確認することができ、水素濃度はおよそ 0.2 ppm でプラトーになる。吸入を止めると水素濃度は、およそ 10 分で脳内から消失した。しかしながら、飲水では自由飲水およびカテーテル胃内挿入による強制投与であっても、水素濃度の上昇を検出することができなかった。水素電極の検出限界を下回る濃度であった可能性も考えられ、果たして上記のような活性酸素減少メカニズムに関して、これまで謳われた水素分子と活性酸素の直接的な反応（図１）が起こるかどうかについては、疑問の残る結果となった。

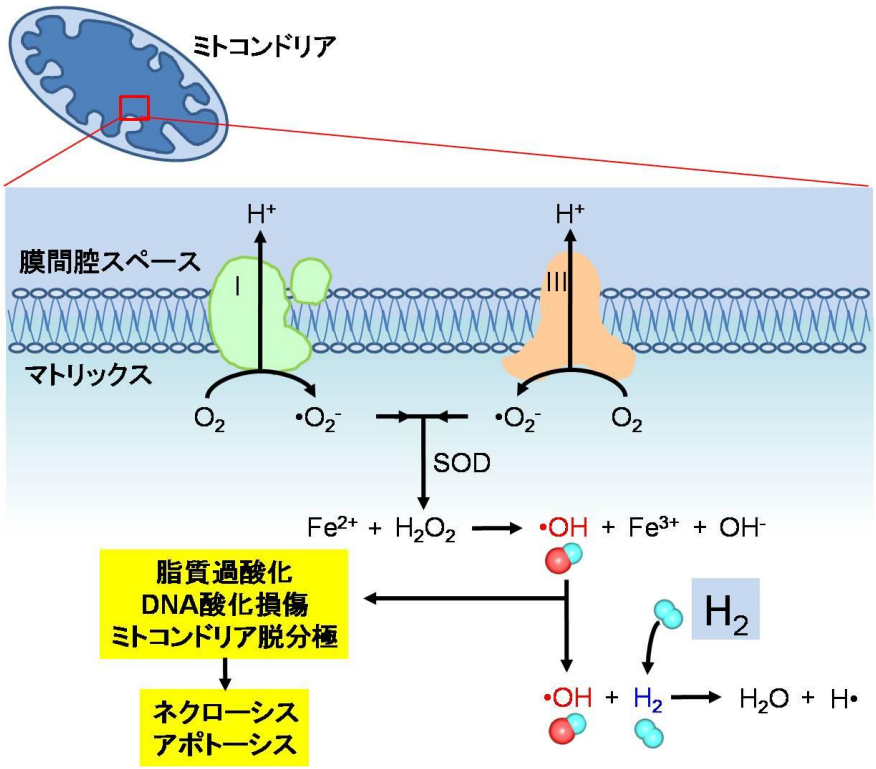

図１　ミトコンドリア電子伝達系における活性酸素産生と水素分子の作用
（参照：Katherine C Wood & Mark T Gladwin, 2007）

さらに、水素含有水をあらかじめ飲用していたラットから摘出した脳スライス標本において、hypoxia/reoxygenation を起こすと、reoxygenation の際に発生する・O_2^-が減少する事が報告されている（Sato et al., 2008）。これは、水素分子がヒドロキシルラジカル・OH に対して選択的に除去作用を示すという過去の報告とは矛盾する結果であり、水素分子の活性酸素減少作用については単なるヒドロキシルラジカル・OH との直接的な反応だけでは説明できないことになる。我々は現在、水素分子による活性酸素減少作用メカニズムに、ラジカルと直接的に作用するだけでない別の全く異なる作用があるのではないかと考え、検証を進めている。

さて、水素分子の酸化ストレス疾患への応用は、様々な疾患ですでに証明されている。今後は臨床応用を含めた研究が進み、水素分子を用いた疾患予防・治療への発展に大きく期待しているところである。では具体的にどのように利用すべきか、これまでの実験動物でのケースを例に紹介したい。まず、吸入による虚血・再灌流障害モデルへの応用では、再灌流時、すなわち活性酸素が大量に発生する際に水素分子を吸入・摂取することが重要であるとされている。また、飲水は予防の観点から、あらかじめ飲水しているだけでも効果が期待で

きるという成果もある。水素濃度に関する研究では、吸入では爆発の危険もあり 2%含有する混合ガスを使用した論文があるが、飲水の場合は大気圧下の飽和濃度 1.6 ppm の 10~20 分の 1 の濃度でも、酸化ストレスによる組織障害を抑制できる事が知られている。さらにユニークな報告としては、二糖類分解酵素であるα-グルコシダーゼ阻害剤は、ヒトにおける呼気中の水素濃度を上昇させ、腸移植時の血管障害を一部抑制するのではという仮説も提唱されている。こうした水素分子による酸化ストレス抑制作用が、臨床応用される日もそう遠くないかもしれない。将来、水素分子を医療現場でも用いられ、また日常生活の場でおいても疾患予防に飲水や吸入ができるようになれば、現在問題とされているストレス関連疾患の予防あるいは治療に有効である可能性が高い。従って、我々が行っているような水素分子に関する基礎的研究は、将来、医療において大きな意義を持つであろうと自負している。

グレリンによる大腸運動促進機構

平山晴子、椎名貴彦、嶋剛士、石見百江、志水泰武
岐阜大学大学院　連合獣医学研究科　獣医生理学研究室

はじめに

消化管の運動は、「第２の脳」と呼ばれるほど発達した内在神経系により制御され、中枢神経系の作用は内在神経系の働きに強弱をつけるに過ぎない。体外に摘出した消化管標本においても蠕動運動が起こるのは、このような内在神経系の働きに起因している。蠕動運動は、口側から肛門側へ方向性をもち消化管の内容物を送りだすような運動であるが、体外に取り出してもこの方向性は維持されることを考えると、非常によく統合・制御された運動を実現するための仕組みが消化管内に配置されていることがわかる。内在神経系は、感覚神経、介在神経、および運動神経を備えており、情報の受容、統合処理、および平滑筋への指令といった制御が中枢神経系とは無関係に遂行できる。内在神経系によって蠕動運動が制御される仕組みを解析するために、摘出標本を用いた実験は極めて有効である。しかし、消化管運動を制御する要素として、中枢神経系の作用を完全に無視することはできない。ストレスによって下痢や便秘になる場合があるが、これは中枢からのシグナルが消化管運動へ影響を与えることを示す典型例であろう。中枢からの制御も含めた消化管運動の解析を行うためには、中枢も含めた実験系、すなわち *in vivo* の実験系を組む必要がある。私たちはこれまでに、この中枢も含めた *in vivo* の実験系を確立しており、この系を用いることにより、摘出標本とは異なった視点での消化管運動の解析が可能である。本稿では、*in vivo* の実験系の概略を説明し、実験例としてグレリンによる大腸運動の促進作用について紹介する。

消化管運動を解析するための *in vivo* の実験系

図１に、消化管運動を解析するための、*in vivo* の実験系のセッティングを模式的に示した。消化管内腔圧の変化および内腔液の推送量により、運動性を評価する実験系であるので、ラットに次のような手術を施す。大腿動脈にカテーテルを挿入し、ケタミンと α-クロラロースの混液を持続的に注入することによって安定した麻酔状態を維持するとともに、

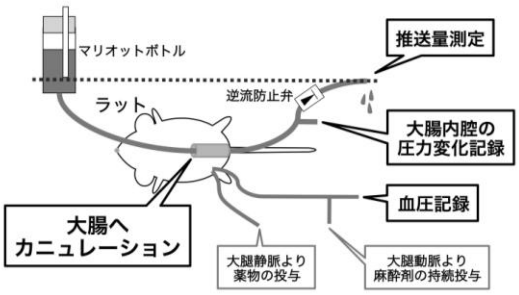

図１：*in vivo* 実験系のセッティング

血圧の記録を行う。薬剤の静脈内投与のために、大腿静脈にもカテーテルを挿入しておく。膀胱にもカテーテルを留置し、尿の充満を防ぐ。大腸の運動性を調べる場合は、結腸に切れ込みを入れ、結腸内の糞塊を除去した後、ジョイントを挿入し結紮する。肛門にもジョイントを装着する。結腸端のジョイントに、送液圧が一定になるようにマリオットボトルと連結したチューブを接続し、チューブ内は生理食塩水で満たす。肛門側のジョイントにつないだチューブは、三方活栓を利用して圧トランデューサーにつなぐとともに、液回収用の容器にセッティングする。このような術式を施すことにより、血圧、消化管内腔の圧変化、および単位時間あたりの内腔液の推送量が、パワーラボ上にリアルタイムで記録される。小腸の運動性を調べる場合においても、空腸の一部を体外に引き出し２カ所でジョイントを挿入する他は、大腸の場合と同じ方法である。

グレリンの作用

グレリンは、成長ホルモン分泌促進因子受容体（現在はグレリン受容体と呼ばれる[1]）の内因性リガンドとして、Kojima らにより 1999 年に発見されたホルモンである[2]。グレリンは、28 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンで、主に胃体部粘膜層に散在する X 細胞から分泌される。グレリンの作用としては、成長ホルモンの分泌促進や、摂食亢進、エネルギー代謝の調節など、様々なものが知られている[3]。グレリンの消化管に対する作用としては、これまでに、胃の運動促進や胃酸分泌亢進、小腸の運動亢進などが報告されている[4, 5]。大腸に対する作用はほとんど報告がなかったが、近年私たちは、前述の *in vivo* の実験系を用い、グレリン受容体の非ペプチド性アゴニストが脊髄の排便中枢を作用点とし、大腸運動を亢進させ排便を促すことを明らかにした[6]。図２に、グレリンアゴニストを使って明らかにした結果を示した。中枢に容易に移行する性質をもつグレリンアゴニストの静脈内投与により、大腸蠕動運動の激しい亢進が誘発された。アゴニストによる大腸蠕動促進効果は、ヘキサメソニウムの投与により遮断されたので、消化管内在神経系が作用点でないことが示された。この蠕動促進効果は、脊髄と大腸との連絡路である骨盤神経を馬尾切断により遮断した状態ではみられなかった。一方、骨盤神経の存在する状態で脊髄腔内にアゴニストを直接投与すると、大腸の蠕動亢進が観察された。また、第４脳室内投与によって大腸運動に変化はなく、前述の結果と併せ、グレリンアゴニストは脊髄排便中枢を作用点とし大腸の蠕動運動を亢進させることが示された。

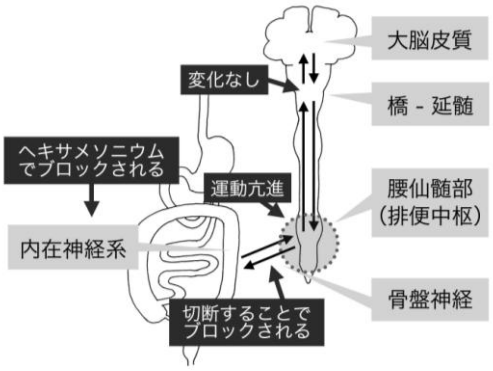

図２：大腸運動の制御に関与する部位とグレリンアゴニストの作用点

グレリンの脂肪酸修飾と大腸運動促進作用

グレリンは、３番目のセリン残基が脂肪酸による修飾をうけているという構造上の特徴をもつ。脂肪酸修飾をもつホルモンとして報告されているのは、現在グレリンのみである。生体内には、脂肪酸修飾をもつ型であるグレリンと、脂肪酸修飾を持たないデスアシルグレリンが存在している[2]。グレリン受容体への結合には脂肪酸修飾が必須であり[2,7]、修飾をもたないデスアシルグレリンは、グレリン受容体に対しては非活性型との認識がある。しかし近年、デスアシルグレリンは単独でも、生理活性作用をもつとの報告がなされてきている。培養細胞を用いた研究や[8,9]、*in vivo* の実験で摂食調節作用をもつなど[10]、デスアシルグレリンはグレリン受容体を介さない別の経路による作用をもつことが示唆されている。また、摂食に関する作用においては、グレリンとデスアシルグレリンの相互作用についても検討されている[11,12]。

グレリンが脊髄の排便中枢に作用し大腸運動を活性化する作用を発揮することを示した実験（図２）は、基本的に非ペプチド性アゴニストを用いているので、内因性のグレリンペプチドでも同じ効果が得られるか、効果があるとすればアシル化が必須であるか否か、検討した。グレリンを静脈内投与した場合、投与前後で大腸内腔圧の変動および単位時間当たりの内腔液推送量に変化は認められなかった。投与量は、摂食を亢進させるために充分な量であった。一方、脊髄腔内（L6-S1）にグレリンを投与すると、肛門側への内腔液の送り出しを伴う激しい内腔圧の変動が惹起された。この結果から、内因性のグレリンにも、非ペプチド性のグレリンアゴニストと同様の大腸蠕動運動に対する促進作用があることが明らかとなった。また、グレリンの静脈内投与によっては大腸の運動性に変化がなかったことから、胃から放出されるグレリンが血流を介して脊髄に作用しているのではなく、作用点である脊髄においてグレリンが産生されている可能性が強く示唆された。実際に、脊髄におけるグレリンの mRNA の発現を RT-PCR 法により確認した。

予め骨盤神経を切断しておくと、グレリンを脊髄腔内（L6-S1）に投与しても、大腸運動の亢進は誘発されなかった。この結果により、脊髄で産生されたグレリンが排便中枢を活性化させ、その情報が骨盤神経を介して大腸に伝えられ、最終反応として蠕動運動の亢進が惹起されると考えられる。作用点と考えられる脊髄排便中枢に、受容体が存在することを確認することは重要である。RT-PCR 法により検討した結果、脊髄排便中枢におけるグレリン受容体 mRNA の発現が確認された。*In situ* ハイブリダイゼーション法による知見[13]と良く一致していたので、この部位に受容体が存在する可能性は高いと考えられる。今後、免疫組織化学的な手法を用いた証明が必要であると思われる。

次に、グレリンの構造上の特徴である脂肪酸修飾の有無が、その作用に及

ぼす影響について検討した。脂肪酸修飾をもたないデスアシルグレリンの脊髄腔内（L6-S1）への投与によって、大腸の運動性に変化は認められなかったので、グレリンの大腸運動促進作用においても脂肪酸修飾は必須であることが示された。単独では効果のないデスアシルグレリンがグレリンの作用を減弱あるいは増強する可能性を検証するため、相互作用についても検討した。グレリンおよびデスアシルグレリンを同時に脊髄腔内に投与すると、グレリンの単独投与に比べその蠕動亢進作用がわずかに減弱した。しかし、グレリンは単回の投与により強い脱感作をもたらす性質があり、同一個体内でグレリン単独投与とグレリンおよびデスアシルグレリン同時投与の効果を比較・検討することができないため、確定的な結論を導くことは難しいと考えられた。そこで、グレリンの前投与により大腸の蠕動運動を亢進させた状態で、デスアシルグレリンを追加投与し、デスアシルグレリンのグレリンに対する影響を検討した。その結果、グレリンで誘発された激しい大腸の蠕動運動は、デスアシルグレリンの投与により抑制されることが判明した。従って、デスアシルグレリンは単独では効果がないものの、グレリンに拮抗する作用があることが明らかとなった。

脊髄排便中枢におけるグレリン作用と生理機能の関わり

脊髄排便中枢を介したグレリンの大腸運動促進作用が、通常の排便反射に寄与しているかどうかは興味深いポイントである。本研究で用いている *in vivo* の実験系では、口側端に接続しているマリオットボトルの位置を高くし大腸内圧を上昇させることにより、大腸内に糞塊が貯留した状態を実験的に作出し、蠕動運動の亢進を誘発できる。このような内腔圧の上昇に伴う運動亢進が、グレリンの作用によって媒介されているか否かを検討する実験を行った。グレリンを脊髄内に投与し受容体の脱感作を誘発した状態で、大腸内圧を上昇させたが、蠕動運動の亢進は影響を受けることなく健常に誘発された。この結果から、グレリンの大腸運動促進作用は排便のメカニズムに必須ではなく、補助的に大腸運動を調節している可能性が示唆された。脊髄のグレリンがどのような状況で大腸運動の調節に寄与するかについては、今後更なる検討が必要である。

まとめ

グレリンの受容体は脊髄排便中枢に存在し、胃から分泌されるグレリンではなく脊髄で産生されるグレリンを受容すること、グレリンの脊髄排便中枢における作用発現には脂肪酸による修飾が必須であることが示唆された。また、デスアシルグレリンは単独では効果をもたない

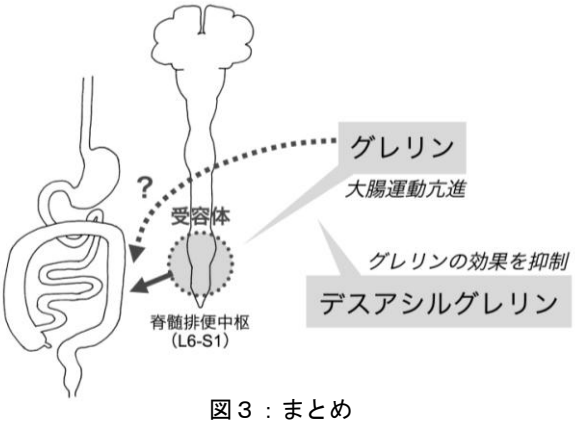

図３：まとめ

が、グレリン作用に拮抗することが示された。現在、グレリンの脊髄排便中枢における作用のさらなる検証のために、グレリン受容体拮抗薬である(D-Lys^3)-GHRP-6 を用いた実験を行っている。これまでに、骨盤神経以外を経由する中枢からの大腸運動制御システムが存在し、グレリンがそのシステムにも関与している可能性を示唆する実験結果が得られており、現在、より詳細な検討を行っているところである。

参考文献

1. Davenport AP, Bonner TI, Foord SM, Harmar AJ, Neubig RR, Pin JP, Spedding M, Kojima M, Kangawa K. International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. Pharmacol Rev 2005;57:541-6.
2. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 1999;402:656-60.
3. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. Physiol Rev 2005;85:495-522.
4. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. Biochem Biophys Res Commun 2000;276:905-8.
5. Fujino K, Inui A, Asakawa A, Kihara N, Fujimura M, Fujimiya M. Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. J Physiol 2003;550:227-40.
6. Shimizu Y, Chang EC, Shafton AD, Ferens DM, Sanger GJ, Witherington J, Furness JB. Evidence that stimulation of ghrelin receptors in the spinal cord initiates propulsive activity in the colon of the rat. J Physiol 2006;576:329-38.
7. Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van Der Ploeg LH, Heck JV. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. J Med Chem 2000;43:4370-6.
8. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonissoni S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, Graziani A. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. J Cell Biol 2002;159:1029-37.
9. Gauna C, Delhanty PJ, van Aken MO, Janssen JA, Themmen AP, Hofland LJ, Culler M, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ. Unacylated ghrelin is active on the INS-1E rat insulinoma cell line independently of the growth hormone secretagogue

receptor type 1a and the corticotropin releasing factor 2 receptor. Mol Cell Endocrinol 2006;251:103-11.

10. Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Nakazato M. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. Endocrinology 2006;147:2306-14.
11. Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Shimakura S, Uchiyama M, Kangawa K, Shioda S. Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. Peptides 2006;27:2321-5.
12. Inhoff T, Monnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wisser AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Tache Y, Kobelt P. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. Peptides 2008;29:2159-68.
13. Ferens DM, Yin L, Bron R, Hunne B, Ohashi-Doi K, Kitchener PD, Sanger GJ, Witherington J, Shimizu Y, Furness JB. Functional and in situ hybridization evidence that preganglionic sympathetic vasoconstrictor neurons express ghrelin receptors. Neuroscience 2010;166:671-9.

病態生理学会サテライトセミナー　-ES 細胞とバゾプレッシンニューロン-

大淵豊明[1]、横山徹[1]、藤原広明[1]、大坪広樹[1]、小林瑞[1]、高木都[2]、上田陽一[1]
[1]産業医科大学医学部　第 1 生理学
[2]奈良県立医科大学　第 2 生理学

はじめに

バゾプレッシン(arginine vasopressin: AVP)は抗利尿ホルモンとも呼ばれ、血漿浸透圧の恒常性を維持するために極めて重要なホルモンである。AVP ニューロンの活動性調節因子を解明することは生体内での浸透圧応答を理解する上でも非常に有意義であると考えられる。AVP を産生する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体は視床下部室傍核および視索上核(supraoptic nucleus: SON)に局在し、ここで産生された AVP は下垂体後葉へ投射した軸索終末から循環血中に分泌される。AVP 分泌は AVP 産生ニューロンの神経活動に依存しており、その神経活動は浸透圧などの細胞外環境および多数のシナプス入力によって修飾・調節される。シナプス入力はグルタミン酸を神経伝達物質とする興奮性入力と、GABA を神経伝達物質とする抑制性入力とに分けられる。我々は、AVP 遺伝子に緑色蛍光タンパク(enhanced green fuluorescent protein: eGFP)遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いてトランスジェニックラットを作出し、AVP ニューロンを緑色蛍光により生細胞の状態で同定することに成功した(1)。これを契機に、脳スライス標本を用いたシナプス入力の電気生理学的解析に加え、単離した AVP-eGFP ニューロンを蛍光顕微鏡下に同定した上での電気生理学的アプローチが可能となった(図 1)。

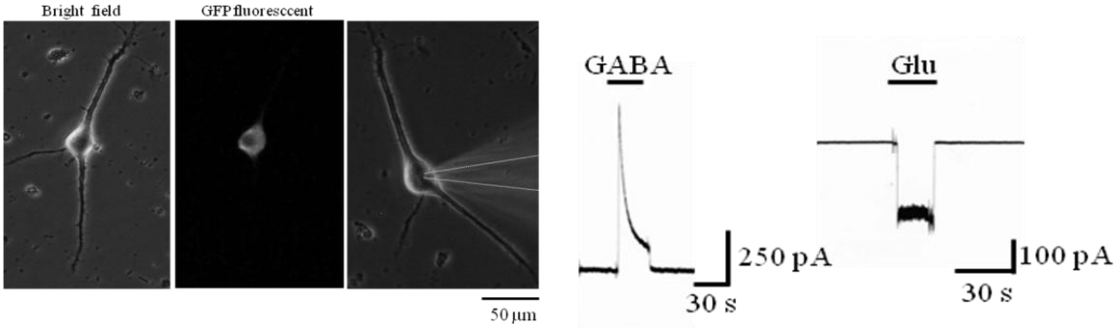

図 1. 単離・同定した AVP-eGFP ニューロンからホールセルパッチクランプ法(voltage-clamp mode)を用いて記録した 60 μM GABA および 10 μM グルタミン酸(Glu)に対する応答。

1. 抑制性シナプス入力の短期的な浸透圧刺激による影響

AVP ニューロンへの抑制性入力は短期的な浸透圧刺激による影響を受けないことが報告されていた。この点を確認するために、浸透圧刺激が抑制性入力へ及ぼす影響について調べた。具体的には視索上核を含むラット脳スライス標本(300 μm)を作成し、ホー

ルセルパッチクランプ法を用いて大細胞性神経分泌ニューロンから自発性抑制性シナプス後電流(spontaneous inhibitory postsynaptic currents: sIPSCs)の変化を記録した。高浸透圧溶液を 5 分間還流した場合、sIPSCs に変化は見られなかった。しかし、スライス標本を 2 時間以上高浸透圧(350 mOsm/kg)溶液で前処理すると、等浸透圧(300 mOsm/kg)溶液で前処理した場合に比べて sIPSCs の頻度と振幅は有意に減少した(図 2)。これまでにこのような現象は報告されていない。質疑応答の中で、「スライス標本で AVP ニューロンを同定する方法はあるのか。」が話題となった。AVP ニューロンは SON の腹側に多いという解剖学的な局在は知られているものの、実際に記録したニューロンが AVP ニューロンかどうかは不明である。今後の課題と思われた。

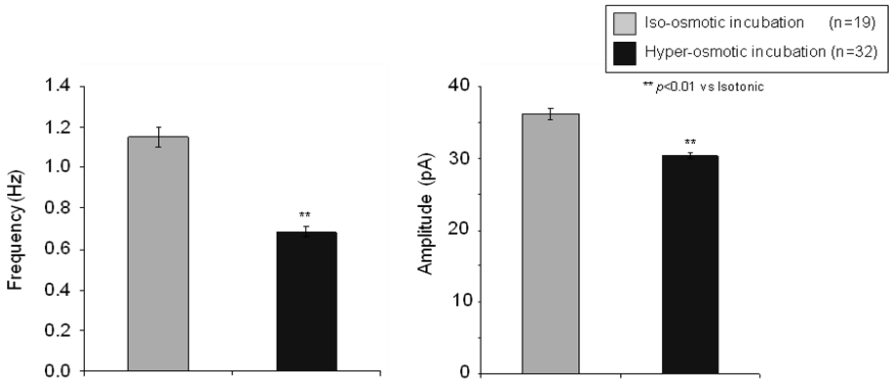

図 2. SON ニューロンにおける sIPSCs への浸透圧刺激(350 mOsm/kg、2 時間)の作用。

2. 脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor: BDNF)の抑制性シナプス応答への修飾作用

ラット SON では、浸透圧刺激により BDNF mRNA が増加することが知られている。BDNF は神経細胞の生存、維持、分化等に重要な役割を果たしており、これらの時間～日単位の長期的作用に加え、近年ではシナプス伝達修飾や神経活動調節などの秒～分単位の短潜時作用が注目されている。中枢神経系における BDNF による GABA 作動性伝達の短潜時修飾作用に発達時期特異性および脳内部位特異性が存在することが示唆されている(2)。我々は、図 2 で示した SON ニューロンの浸透圧応答性の変化に BDNF が関与している可能性について、電気生理学的に検討した(3)。3 週齢のラット SON ニューロンにおいて、BDNF(2 nM)は sIPSCs の頻度および振幅を短潜時で減少させた(図 3)。

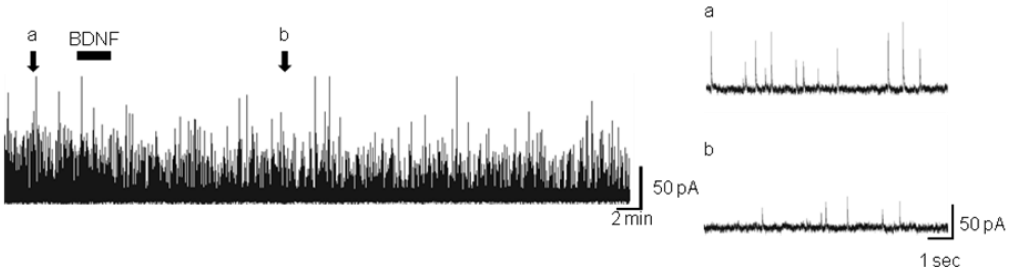

図 3. SON ニューロンにおける BDNF による抑制性シナプス入力への短潜時修飾作用。

BDNF による GABA 応答修飾作用の細胞内情報伝達系として、TrkB 受容体チロシンキナーゼを介した経路が知られている。Trk 受容体チロシンキナーゼ阻害剤である K252a(1 μM)細胞内投与下では BDNF による sIPSCs への作用は見られなかった(図 4)。

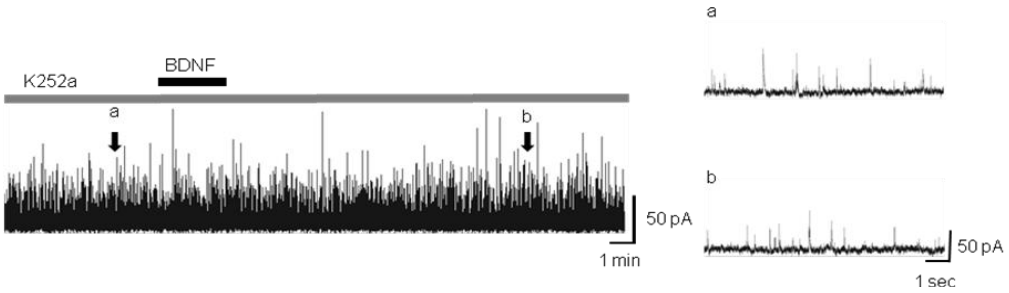

図 4. K252a (1 μM)存在下では、BDNF の抑制性シナプス入力への作用は見られなかった。

3. BDNF の細胞膜表面における GABA 受容体への作用

BDNF はニューロン膜表面の GABA 受容体の活性を量的かつ/または質的に低下させている可能性がある。そこで、AVP-eGFP トランスジェニックラットの SON を含む脳組織を単離・培養した後、蛍光顕微鏡下で AVP-eGFP ニューロンを同定し、ホールセルパッチクランプ法により BDNF が GABA 応答へ及ぼす影響について電気生理学的に検討した。電気記録は-20 mV 電位固定下に行った。単離したニューロンに BDNF(2 nM)を 10 分間前処理すると、BDNF を前処理しなかった場合に比べて GABA(60 μM)に対する反応が有意に減少した(図 5)。質疑応答の中で、「BDNF と KCCl 機能との関与も検討するべきではないか。」という指摘があった。本実験ではホールセルパッチクランプ法を用いているため細胞内の Cl^-濃度は一定の濃度に保たれている。そこで、今後の検討課題としたい。

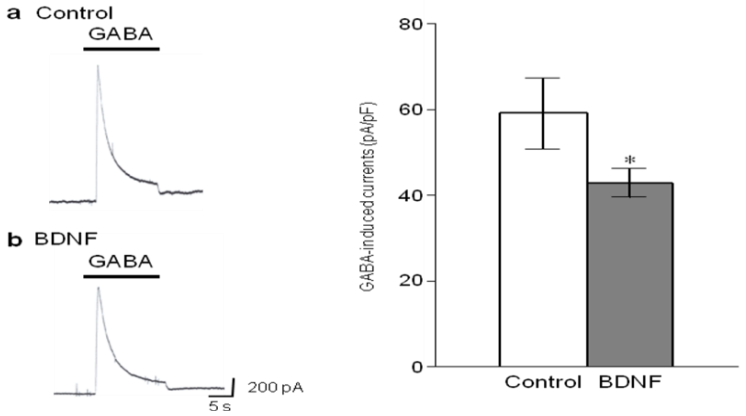

図 5. 単離したニューロンにおける BDNF(2 nM)前処理の GABA 応答へ及ぼす作用。

4. 考察

AVP ニューロンにおいて BDNF による短潜時修飾作用として神経細胞膜表面の GABA 受容体感受性が変化した。したがって、浸透圧刺激が BDNF を介して間接的に抑制性入力を修飾し、体液調節の恒常性維持に寄与している可能性がある。

おわりに

日本病態生理学会サテライトセミナーでは、ラット脳スライス標本および単離細胞を用いたホールセルパッチクランプ法により明らかとなった浸透圧調節メカニズムを中心に発表した。これらの実験を進める上で、高木都先生(奈良県立医科大学・教授)に御指導いただいている ES 細胞を用いた手技の応用は大変有用であった。質疑応答では若手とベテランの先生方による活発な意見討論が行われ、研究の展望が広がった。

参考文献

1. Ueta Y, Fujihara H, Serino R, Dayanithi G, Ozawa H, Matsuda K, Kawata M, Yamada J, Ueno S, Fukuda A, Murphy D. Transgenic expression of enhanced green fluorescent protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat. Endocrinology 2005; **146**: 406-413.

2. 鍋倉淳一, 溝口義人. BDNF の GABA 応答修飾作用. Clinical Neuroscience 2004; **22**: 300-302

3. Ohbuchi T, Yokoyama T, Saito T, Hashimoto H, Suzuki H, Otsubo H, Fujihara H, Suzuki H, Ueta Y. Brain-derived neurotrophic factor inhibits spontaneous inhibitory postsynaptic currents in the rat supraoptic nucleus. Brain Res 2009; **1258**: 34-42.

Immunoposttranscriptomics

-マクロファージ様細胞を用いた網羅的な翻訳制御解析を例に-

*北村　浩、伊藤　誠敏、小原　收
独立行政法人理化学研究所　免疫・アレルギー科学総合研究センター
免疫ゲノミクス研究グループ
*現：名古屋市立大学大学院医学研究科　病態医科学講座　病態モデル医学分野

1. Immunopostotranscriptomics とは

細胞機能の分子メカニズムを明らかにすることは生物学の大きな命題の一つである。種々の生体高分子の中でタンパク質は細胞機能の維持・発現に中心的な役割を担う。1950 年代頃からタンパク質精製技術とペプチドシーケンシング法が確立されたことにより次々に機能タンパク質が同定された。1970 年代にポール・バラック等によって分子クローニング技術が確立され、タンパク質の設計図となる DNA や mRNA の扱いが容易になると、機能タンパク質やその遺伝子の同定が加速化した。また、機能タンパク質や遺伝子が同定されると、これらを認識する抗体（タンパク質）やプローブ（DNA, RNA）が作られ、検出・定量することが可能になった。また遺伝子操作や胚操作の技術の発展も相まって、個々の分子の機能評価も洗練化されるようになった。このように個々の遺伝子/タンパク質ごとの解析アプローチが発達し、情報が蓄積されると、特に免疫系や神経系など複雑系を対象にした研究分野では機能分子間の相互作用を視野に入れた総合的なアプローチが熱望されるようになった。2000 年、ヒトゲノムのドラフトシーケンシングが終了しポストゲノム時代に突入すると、遺伝子/タンパク質の発現や機能を全ゲノムスケールで捉えようとする試みが盛んになった。これら網羅的・包括的な研究アプローチは omics と総称され、調べる対象の種類によって genomics(ゲノム DNA)、transcriptomics (mRNA などの転写物)、proteomics（タンパク質）などが確立した。また、metabolomics（代謝物質）のように特定の有機体に限定されないアプローチや、interactomics のように分子間の相互作用を対象とするアプローチもある。

独立行政法人理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫ゲノミクス研究グループは種々の免疫細胞を対象に、これまでに 400 以上の DNA マイクロアレイ実験と 300 程度のタンパク質発現解析を実施してきた。その過程で免疫細胞のタンパク質発現と mRNA 発現の間には一定の差異が見られることを明らかにした [1]。この違いは転写後制御や翻訳後制御に起因すると考えられる。転写後制御はスプライシング、RNA 編集、核外輸送など核内の調節イベントと、翻訳調節、mRNA の安定性の調節、細胞質内輸送など細胞質内のイベン

トに分かれ、複数の制御分子をシェアしあいながら相互調節を行う複雑な調節系である（図１）。

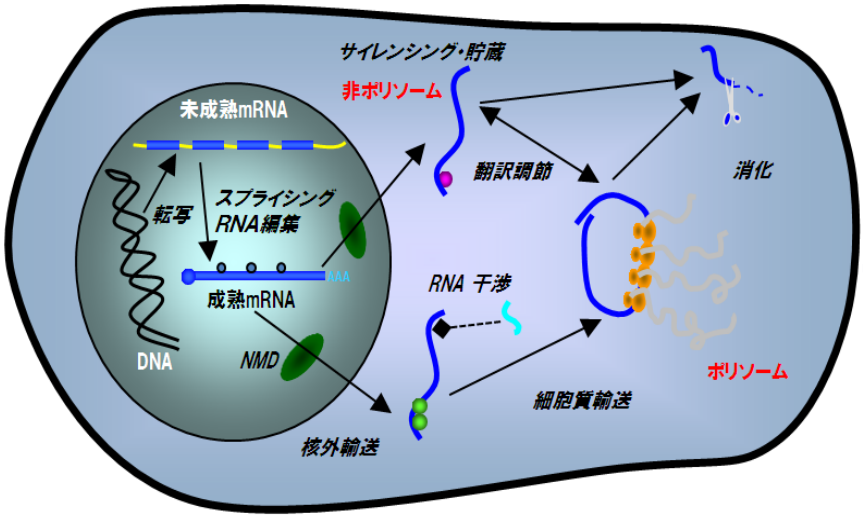

図１　様々な転写後制御。転写後、mRNA は核内、細胞質内の様々な分子イベントにより制御される。我々はこの転写後制御の総体を posttranscriptome と命名した。また posttranscriptome を解析するアプローチを posttranscriptomics と呼んでいる。

我々はこれら転写後制御の“宇宙”を postotranscriptome と命名し、これらを網羅的手法で記述しようとする試みを posttranscriptomics と名付けた。さらに免疫細胞を対象にした posttranscriptomics を immunoposttranscriptomics と呼ぶことにした。

Posttranscriptomics は調べる対象が多岐に渡るため、用いる解析手法も様々である。例えば調節因子に着目する場合、調節因子がタンパク質成分であるなら定量的・定性的な proteomics の手法がとられる。調節因子が small RNA などの機能性 RNA ならそれらに特化したマイクロアレイや次世代シーケンサーが用いられる。一方、調節を受ける側(=mRNA)に着目する場合、例えばスプライシング制御を受ける mRNA が調査対象なら、エクソンアレイ解析やエクソン濃縮サンプルの次世代シーケンサー解析が行われる。このように posttranscriptomics は新たな解析機器の開発に大きく依存しているが、解析に用いるサンプルを工夫することで従来型の DNA マイクロアレイを用いてもアプローチが可能である。即ち、細胞分画法とマイクロアレイ解析を組み合わせることで posttranscriptomics を実践できる。例えば、細胞をなんらかの物質で刺激後、経時的に核および細胞質を分画し、それぞれの mRNA 発現プロファイルを比較していくと、核外輸送の段階で調節を受ける mRNA をスクリーニングできる。また、多数のリボソームと会合し翻訳状態にあるポリソーム mRNA と、翻訳状態

にない非ポリソーム mRNA は比重が異なるのでショ糖密度勾配超遠心分離法で分離できる。これらの発現プロファイルを蓄積することで、mRNA の翻訳状態をゲノムレベルで調べることが可能である[2, 3]。本稿ではグラム陰性細菌のリポ多糖体(lipopolysaccharide、LPS)でマクロファージ様細胞を刺激後、総細胞質 mRNA、ポリゾーム mRNA、非ポリゾーム mRNA の発現パターンを比較し、LPS が翻訳に与える影響をゲノムスケールで検討した例を紹介する[3]。

2. マクロファージと LPS

マクロファージ(大食細胞)は白血球の一種で、血液中に約 5%を占める単球から分化する。その名の通り貪食能が高く細菌やウイルス、死細胞を貪食し消化する。故にマクロファージは生体内に侵入・発生した異物の排除を担う最初の免疫バリアであり、脊椎動物・無脊椎動物双方に存在する原始免疫系の中心的な細胞として知られる。一方脊椎動物では、マクロファージは消化した産物(抗原)を提示し、種々のサイトカインや補助因子を介してリンパ球を活性化し、獲得免疫系の発動にも重要な役割を担う。したがってマクロファージは初期免疫応答のエフェクター細胞であり、且つ、後期免疫応答のコーディネーターでもある極めて重要な細胞群といえる。

大腸菌やサルモネラ菌などグラム陰性細菌の細胞壁成分である LPS は O 抗原と呼ばれる多糖部分と Lipid A からなる糖脂質である。主にマクロファージや単球、樹状細胞などミエロイド系の免疫細胞の Toll-like receptor (TLR)4 複合体により認識され、これらの細胞を強力に活性化する。特に LPS で活性化したマクロファージは貪食能や活性酸素の産生が亢進し殺菌能が高まる。また interleukin-1β や tumor necrosis factor (TNF) αなどのいわゆる炎症性サイトカインや、prostaglandin E_2 などのエイコサノイドを大量に産生し初期免疫反応や炎症反応を惹起する。これまでに LPS 刺激後のマクロファージを用いて沢山の transcriptome 解析がなされ、この細胞の LPS 応答を担う分子が次々に同定された。我々が過去同定した MAIL/IkBζや SSeCKS も transcriptomics により見出された分子である[4, 5]。

単球・マクロファージの LPS 応答において、NF-κB などの転写因子を介した転写制御が重要であることは旧知の事実である。しかしその一方で転写制御だけでは説明づけられない現象もある。例えば Voitenok らは今から約 20 年前、LPS 刺激後の単球による TNFα の産生は転写阻害剤である actinomycin D や α-amanitin では阻害できないが、翻訳阻害剤である cycloheximide では阻害できると報告した[6]。その後 Anderson らは TNF αの産生は TIA-1 や tristetraprolin など mRNA の AU-rich element に結合する *trans*-acting factor により転写後制御の段階で調節を受けていることを示した[7]。一方で、最近の microRNA (miRNA)の解析では、miR-155 や miR-146 といった miRNA がマクロファージによる炎症性メ

ディエーターの産生を負のフィードバック制御し、LPS 寛容に関わることも示されている[8]。このように LPS 応答における転写後調節の重要性を示唆する報告は年々蓄積されているが、その役割の大きさを全ゲノムスケールで評価することは未だ十分ではない。

3. LPS によるミトコンドリアタンパク質の翻訳抑制

我々は様々な転写後調節のなかで翻訳制御に着目し全ゲノムスケールで調査した。大腸菌 LPS(100ng/mL)でマウスマクロファージ細胞株 J774.1 細胞を刺激後、ポリソーム、非ポリソーム、総細胞質画分をそれぞれ 0, 1, 2, 4 時間後に調製し、総 RNA 量を定量した。その結果、どの画分も刺激 4 時間後まで有意な変動は見られなかった。同様に、総タンパク質量や新生タンパク質量も刺激 24 時間後まで変化しなかった。以上の結果から、マクロファージの総翻訳活性は LPS の影響を受けないことが示された。実際、mRNA の細胞内分布を Affymetrix 社の Mouse Genome 430 GeneChip でマイクロアレイ解析しても、1) 90%以上の mRNA が好んでポリソーム画分に分布し、2) 発現量の高いリボソームタンパク質の mRNA はポリソーム、非ポリソーム双方に分布し、3) ferritin などの mRNA は好んで非ポリソームに分布するといった mRNA の基本的な細胞質内分布パターンは刺激前後で概ね保存されていた。このことから、LPS による翻訳制御は特定の遺伝子群に限定された現象であることが予想された。

次に我々は個々の mRNA の分布について調べ、翻訳制御を受ける mRNA を探索した。まずマイクロアレイで得られた各画分での mRNA 量とポリソーム/非ポリソーム発現比という 4 つの指標の LPS 刺激前後の変化を算出し、それらの値を基に 4 つのグループに分類した(図 2)。

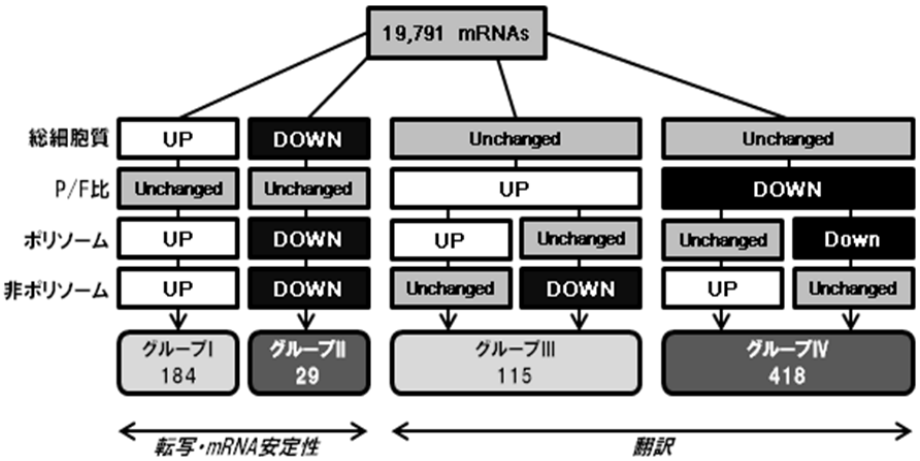

図 2　LPS により制御される遺伝子群の分類。マクロファージ細胞株 J774.1 を LPS(100ng/mL)で刺激した後に、総細胞質、ポリソーム、非ポリソーム画分の mRNA をマイクロアレイ解析した。各画分での mRNA 量とポリソーム/非ポリソームの発現比（P/F 比）から、総 mRNA 量で制御されているグループ I と II、翻訳制御を受けているグループ III および IV を同定した。

グループ I と II はポリソーム/非ポリソーム比が刺激前後で変化しないが、細胞質 mRNA 量が増加(グループ I, 転写亢進または安定性の増加、184 遺伝子)または減少(グループ II、転写抑制または安定性の低下、29 遺伝子)するものである。一方でグループ III、IV は細胞質 mRNA 量に変化は見られないが、ポリソーム/非ポリソーム発現比が増加（グループ III、翻訳促進、115 遺伝子）または減少(グループ IV、翻訳抑制、418 遺伝子)するものである。これら遺伝子グループの機能注釈づけを行うために、次に Gene Ontology 解析を行った。予想通りグループ I には炎症反応や免疫反応を担う分子が多数見出された。驚くべきことに、翻訳抑制を受けるグループ IV にはミトコンドリアのタンパク質が統計学的有意に多数含まれていた。実際、Northern blot 解析でアレイ解析の再現性を確認したところ、LPS 刺激後、superoxide dismutase 1(Sod1) や cytochrome c oxidase Va (COX5a) などの 7 種のミトコンドリアタンパク質の mRNA は、総細胞質画分ではほとんど変化しないが、ポリソーム画分では大きく減少し、非ポリソーム画分では増加していた(図３)。これに一致して、Sod1 や Cox5a の総タンパク質レベルや新生タンパク質レベルは LPS 刺激後著減した。

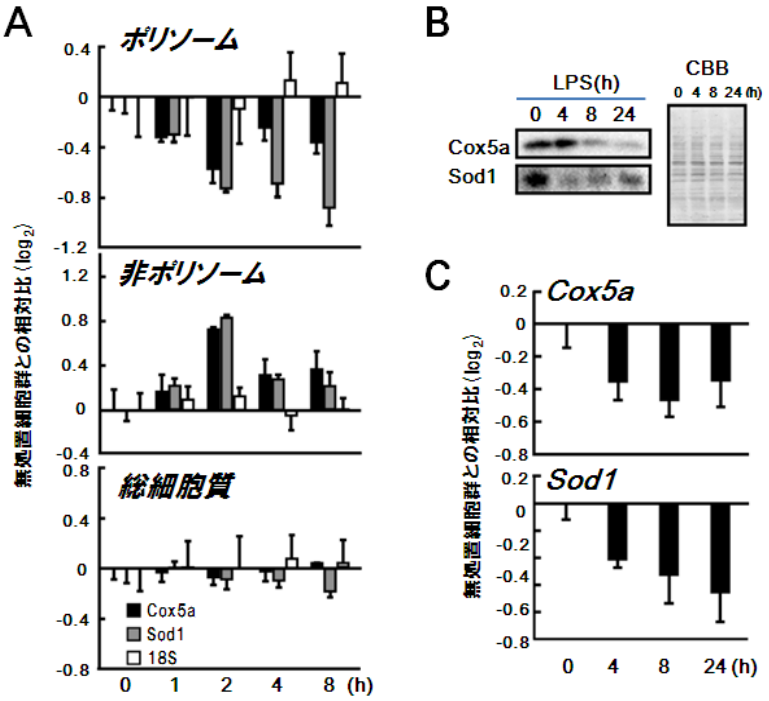

図３　LPS によるミトコンドリアタンパク質の翻訳抑制。ここでは Cox5a および Sod1 の結果を示す。(A)ポリソーム画分、非ポリソーム画分、総細胞質画分での mRNA レベル。値は無処置細胞群の平均値に対する変化比±SD で表わす。*P<0.05 (各群 n=4)。コントロールとして 18S リボソーマル RNA の発現レベルも示す。(B) Western blot 解析。3 回実験は再現しており、その典型的な一例について示す。(C) 新生タンパク質発現レベル。^{35}S-メチオニン存在下で培養後、免疫沈降を行い、分子量が一致するバンドの放射活性を測定した。値は無処置細胞群の平均値に対する変化比±SD 。*P<0.05 (各群 n=3)。

以上の結果を考え合わせると、LPS 刺激後ミトコンドリアタンパク質の中には翻訳抑制を受ける集団が存在することが判明した。

4. LPS による呼吸鎖抑制の意義と分子メカニズム

翻訳抑制を受けたミトコンドリアタンパク質の中には、呼吸鎖複合体 I および IV の構成タンパク質が複数含まれていた。そこで、我々は LPS 刺激後、呼吸鎖複合体が障害をうけるのではないかと考えた。まず各複合体の量を Blue-Native PAGE- Western blot 解析で調べたところ、LPS 刺激後複合体 V の量は変化は限定的だが、複合体 I や IV は大きく減少していた(図 4)。これに一致して、複合体 I と IV の酵素活性の有意な低下がみられ、細胞内 ATP レベルが減少した。

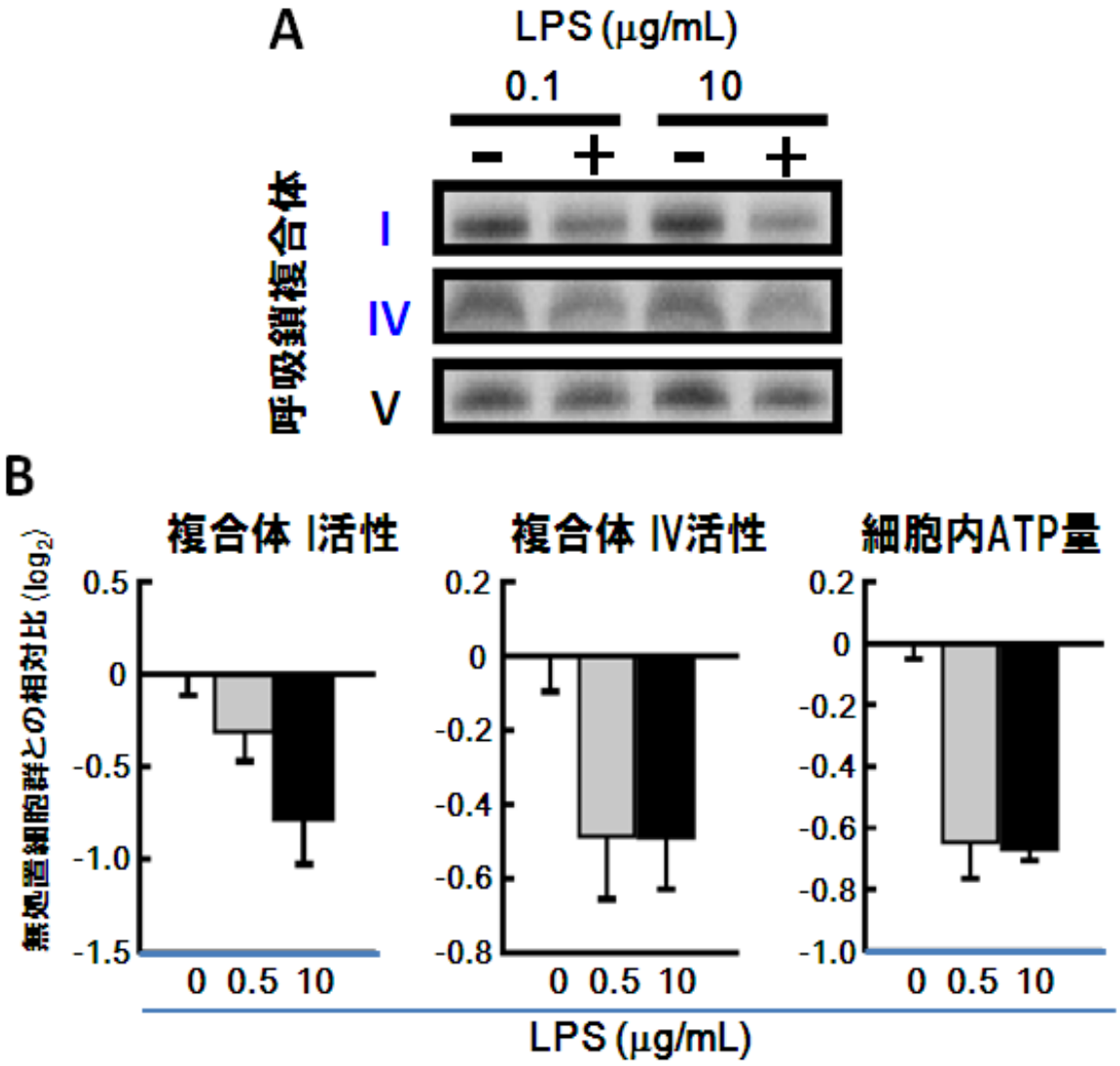

図 4　LPS による呼吸鎖の阻害。(A) LPS 刺激後 24 時間後の複合体 I, IV, V の量を Blue Native-PAGE- Western blot 解析で調べた。(B) 複合体 I, IV の酵素活性。LPS 刺激 24 時間後にミトコンドリアを分離し測定した。値は無処置細胞群の平均値に対する変化比±SD で表わす。* P <0.05 (各群 n=13)。(C) 細胞内 ATP レベル。* P <0.05 (各群 n=13)。

細胞内 ATP の枯渇はネクローシスの主因となる。一方で特定の複合体の機能阻害はミトコンドリアでの活性酸素産生を促し、結果としてミトコンドリア膜透過遷移現象 (membrane pore transition , MPT)が生じ、細胞質に放出された cytochrome c によりアポトーシスへとつながることも知られている[9]。実際 LPS 刺激後ミトコンドリアの MPT は LPS の容量依存的に刺激 8 時間頃から観察される。また JC-1 染色でミトコンドリア膜ポテンシャルを評価したところ、LPS 刺激 12 時間後にはポテンシャルの低下がみられた。さらに 24 から 48 時間後にかけてヨウ化プロジウム染色陽性の死細胞の増加が認められた。以上のことから LPS によるミトコンドリア呼吸鎖タンパク質の翻訳抑制は、ミトコンドリアの機能低下をもたらし、結果としてマクロファージの細胞死に関わっていると考えられる。実際これらのイベントのタイムコースを対比させると、①mRNA レベルの翻訳抑制（1 時間以後）、②呼吸鎖タンパク質レベルの減少（4 時間以後）、③呼吸鎖複合体の減少と活性低下（8 時間以後）、④ミトコンドリアの機能不全（8 時間以後）、⑤細胞死（24 時間以後）と矛盾はない(図５)。

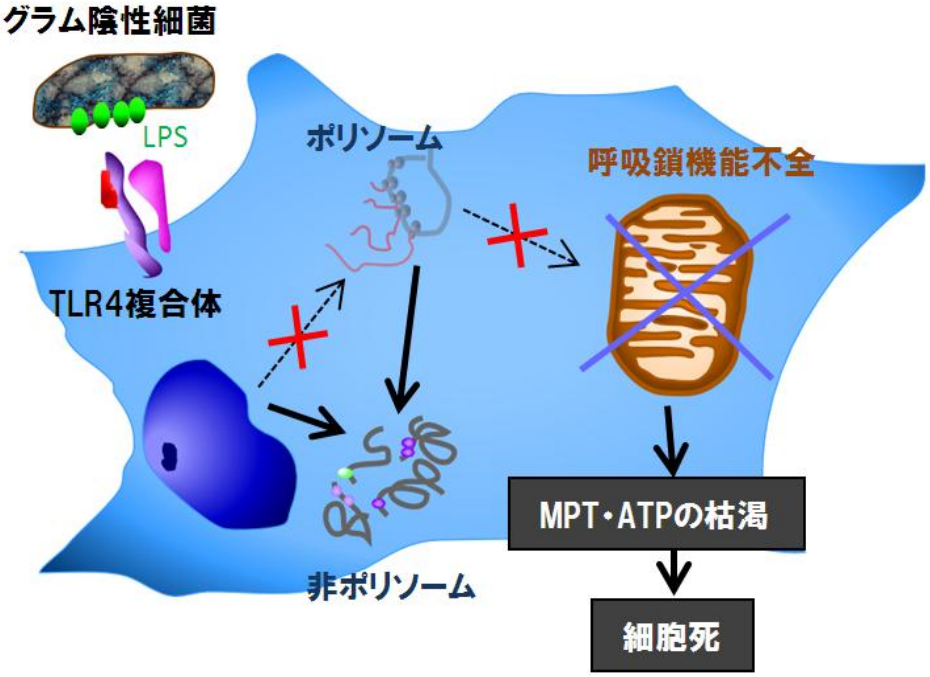

図５ LPS による呼吸鎖タンパク質の翻訳阻害と細胞死。マクロファージは LPS 刺激後、炎症や免疫反応に関わる様々な分子を誘導する一方で、ミトコンドリアの呼吸鎖タンパク質の翻訳を阻害する。その結果、呼吸鎖は機能不全に陥り ATP の枯渇とミトコンドリア膜透過遷移現象（MPT）による細胞死に至る。この反応は活性化マクロファージによる炎症・免疫反応を終結させ、過活性による自己傷害を防ぐ役割を果たしていると想定される。

最後に我々は呼吸鎖タンパク質の翻訳抑制の分子機構についても検討した。これまでのマイクログリア細胞を用いた検討から interferon-γと LPS の共刺激時の呼吸鎖の抑制は一酸化窒素（NO）を介していることが示された[10]。そこで LPS 単独刺激後の翻訳抑制も NO を介しているのか検討した。NO の細胞内蓄積を diaminofluorescein-FM diacetate 染色で評価したところ、LPS 刺激 2 時間後や 4 時間後では蓄積は認められなかったが、1 日後には顕著な蓄積が見られた。しかし、呼吸鎖タンパク質の翻訳抑制は刺激わずか 1 時間後から生じ、2 時間後にはピークに達することを考え合わせると、NO が翻訳抑制の責任因子とは考えにくい。実際、NO 合成阻害剤である L-NAME (2mM) を処置しても、LPS 刺激後の呼吸鎖タンパク質の翻訳抑制や、呼吸鎖複合体の量・活性の低下は回復しなかった。最近我々は複数のタンパク質キナーゼの阻害剤を混ぜて処置すると LPS 刺激後の翻訳抑制が完全に回復することを見出しており、今後制御系の詳細な分子メカニズムの解明が待たれる。

5. 終わりに

本稿ではマクロファージ様細胞の翻訳制御を例に Immunopostotranscriptomics について述べた。特に免疫学の領域においては、代表的な免疫抑制剤 FK506 の標的分子が翻訳制御キナーゼである mTOR であることや、昨今の miR-155/-146 の機能解析の結果から転写後制御の重要性を疑う余地はない。しかしこれまでの免疫学分野における転写後制御を対象とした研究の多くはごく限られた“メジャー”遺伝子の発現制御に注視し、網羅的・包括的な視野に立った検討は大きく立ち遅れている。しかし疾患や細胞現象の分子基盤を正しく評価するためには、研究者の主観を排し、”data-driven”な立場に立った検討が不可欠である。posttranscriptomics の試みは転写後調節の解析をゲノムスケールまで対象を広げた完全な”data-driven” アプローチである。本研究で到達したミトコンドリアの呼吸鎖複合体は LPS 応答時にはあまり注目されない“マイナー”な標的であるが、生物においては生死を決定する基本的な機能複合体である。今回の成果は活性化マクロファージによって惹起される炎症・免疫反応を終結させる新たなメカニズムを発見したことに他ならない。今後様々な免疫細胞に posttranscriptomics を展開することにより、免疫細胞の異常に起因する自己免疫疾患やがん、肥満や糖尿病などの病態メカニズムの一端が解明されることを期待する。

参考文献

1. Hijikata A, Kitamura H, Kimura Y et al. *Bioinformatics* 23, 2934-2941, 2007
2. Kitamura H, Nakagawa T, Takayama M et al. *FEBS Lett* 578, 180-184, 2004
3. Kitamura H, Ito M, Yuasa T et al. *Physiol Genomics* 33, 121-132, 2008

4. Kitamura H, Kanehira K, Okita K et al. *FEBS Lett* 485, 53056, 2000
5. Kitamura H, Okita K, Fujikura D, et al. *J Histochem Cytochem* 50, 245-255, 2002
6. Voitenok NN, Misuno NI, Panyutich AV et al. *Immunol Lett* 20, 77-82, 1989
7. Anderson P, Philips K, Stoecklin G et al. *J Leukoc Biol* 76, 42-47, 2004
8. Biswas SK and Lopez-Collazo E. *Trends Immunol* 30, 475-487, 2009
9. Cai J, Yang J and Jones DP. *Biochim Biophys Acta* 1366, 139-149, 1998
10. Moss DW and Bates TE. *Eur J Neurosci*, 13, 529-538, 2001