

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890282

研究課題名(和文) 法医解剖症例における胸腺リンパ体質と突然死の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Immunobiological analysis of cardiac muscle type ryanodine receptor genetic mutation mice

研究代表者

奥平 准之 (Okudaira, Noriyuki)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10635585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：【結果】RyR2-R420W miceのテレメトリー法による無麻酔下での心電図記録によると、カフェイン等の投与時に様々な不整脈が出現した。マウス臓器重量を測定した結果、RyR2-R420W miceでは、野生型マウスと比較して胸腺、脾臓で重量の増加が認められた。胸腺や脾臓などのリンパ組織において、リンパ球の分化やサイトカイン産生量を比較したが差異は認められなかった。胸腺、脾臓組織のmicroRNAを抽出し、マイクロアレイおよび定量RT-PCRを用いて解析した結果、mmu-miR-291b-5pの発現が変異マウスで減少する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether the R420W mutation of RyR2 is associated with the phenotypic characteristics of status thymicolymphaticus by generating a knock-in mouse model carrying the mutation. Homozygous (RyR2R420W/R420W) mice showed significant increases in thymus and spleen weights, when compared with wild-type mice. In addition, various types of arrhythmias were induced in RyR2R420W/R420W mice in response to the administration of caffeine and adrenaline; the same results were not observed in wild-type mice. These findings suggest that RyR2R420W/R420W mice exhibit status thymicolymphaticus-like phenotypes. This mouse model may be useful for studying the pathophysiology of this condition. The amount of mmu-miR-291b-5p from the thymus and spleen decreased in the RyR2R420W/R420W mice. These results suggested that mmu-miR-291b-5p possible may be associated with the pathophysiological process leading to the hypertrophy of lymphoid organs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学

キーワード：RyR2 突然死

## 1. 研究開始当初の背景

胸腺リンパ体質という概念は、古く 1889 年に Paltauf が記載したとされる。我が国においては、柴田らが突然死症例における胸腺体質について形態学的な検討を行っている(日本法医学雑誌 26,305-314,1972)。しかし、今日まで、突然死と胸腺リンパ体質に関する研究は殆ど行われず、その解明には至っていない。近年では、遺伝子組み換え実験や免疫学の様々な解析手法等が発明され、1960-1970 年代と異なり、突然死と胸腺リンパ体質の関連性を解析できる環境にある。本研究の着想に至ったのは、申請者の所属する講座の法医解剖の報告からである。原因不明の突然死症例は、法医学研究者にとって、解剖本来の目的である死因を明らかとすることができないという点だけでなく、遺族へ与える影響(死因説明において)もあり、問題が大きいと言わざるをえない。

こうしたことから、申請者の講座は、死因を検索する目的で、原因不明の突然死症例を用いて、運動時等に突然死を生じる、遺伝性不整脈疾患の原因遺伝子の変異解析を行ってきた。

本研究は、法医学分野で古くからいわれてきた胸腺リンパ体質の分子メカニズムを解明するもので、これまでそのような報告は皆無であり、独創的研究である。また、法医学の実際の現場で経験する症例を、モデルマウスや培養細胞を用いて検討することは、法医学研究の新しい手法であり、本研究は意義深い。

## 2. 研究の目的

本研究では、法医学における突然死のメカ

ニズムを、分子レベルで明らかにしたいと考える。突然死は、若年世代から起こる突発的な疾患であり、その発生メカニズムの詳細は不明である。また、こうした突然死の症例の中に、胸腺をはじめとするリンパ組織の肥大や大動脈径の狭小化など特有の形態学的特徴を伴う場合のあることが古くから知られている(胸腺リンパ体質)。実際の突然死症例の中には、胸腺リンパ体質類似の特徴を持つ突然死症例に、不整脈源性右室心筋症の原因遺伝子変異を少なくとも 5 例発見した。その遺伝子は  $Ca^{2+}$  放出シグナルを担う RyR2 (ryanodine receptor 2) であり、5 例変異と同じ変異を持った遺伝子組み換えマウスを作製した。本研究では、実際の症例と遺伝子組み換えマウスや培養細胞を用いて、突然死と胸腺リンパ体質の関連性を分子レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

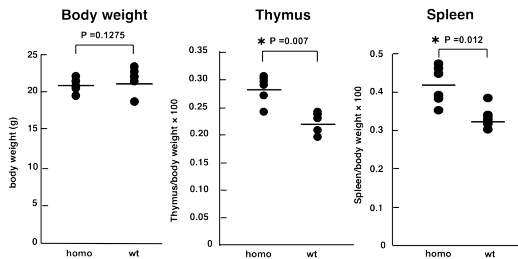
すでに作製済みのモデルマウスを用いて、免疫系・循環器系にどのような影響があるのか分子レベルで解析する。ホモ型マウスにおいて、胸腺肥大が認められたことから、胸腺から RNA を抽出し、RNA と miRNA の遺伝子発現レベルを野生型マウスと比較する。さらに、胸腺リンパ球を取り出し、特異的抗体で解析することで T 細胞分化マーカーへの影響を解析する。

## 4. 研究成果

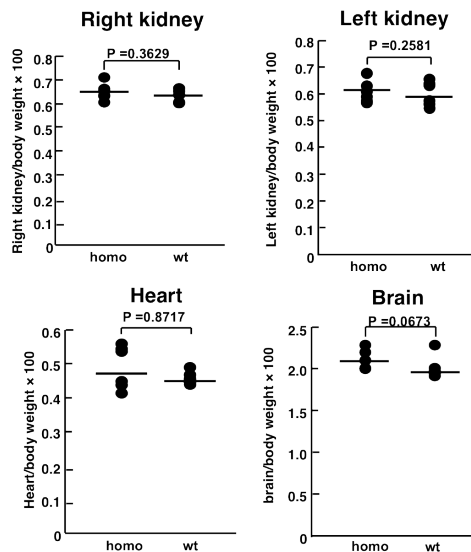
RyR2-R420W mice を作成し、心電図解析、免疫学的機能解析、遺伝子発現解析を行った。RyR2-R420W mice のテレメトリー法による無麻酔下での心電図記録によると、カフェイン

等の投与時に様々な不整脈が出現した。マウス臓器重量を測定した結果、*RyR2-R420W* miceでは、野生型マウスと比較して胸腺、脾臓で重量の増加が認められた。

### 胸腺と脾臓で臓器重量が増加する

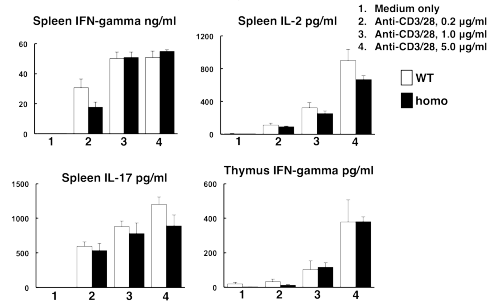


腎臓、心臓、脳では臓器重量に違いは認められなかった。



胸腺、脾臓、骨髄、腸管リンパ節のリンパ組織において、リンパ球の分化 (CD3ε, CD4, CD8, CD19, CD21, CD23, CD25, CD28, CD44, CD62L, CD69, CD138, B220)、抗体産生量 (IgD, IgM)、炎症性サイトカイン産生量を比較したが差異は認められなかった。*RyR2* は、胸腺上皮細胞に発現していることを免疫組織化学染色により明らかにしたが、野生型と変異マウスでその発現量や局在に違いは認められなかった。

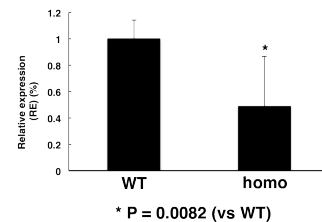
### サイトカイン産生量の比較



胸腺、脾臓組織の microRNA を抽出し、マイクロアレイおよび定量 RT-PCR を用いて解析した結果、*mmu-miR-291b-5p* の発現が変異マウスで減少する結果が得られた。

以上の結果から、薬剤投与によって *RyR2-R420W* mice に多様な不整脈が誘発されることから、このマウスは CPVT もしくは ARVC のモデル動物になりうることを示唆される。しかし、本研究では、なぜ胸腺が肥大するのかを明らかにすることができなかった。*RyR2* は、胸腺上皮細胞に発現し、何らかの因子を相互作用することによって、胸腺を肥大化させることが推察される。その際、胸腺で作成されるリンパ球やサイトカインには影響しないことは今回の実験結果から明らかになった。

### *Mmu-miR-291b-5p* は homo マウスの胸腺で発現量が減少する



### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

1. 奥平准之、西尾元 Mice with the R420W

Cardiac Ryanodine Receptor Mutation  
Exhibit Status Thymicolymphaticus-Like  
Phenotypes (心筋型リアノジン受容体遺伝子  
(RyR2)変異マウスの免疫生物学的機能解  
析)第36回日本分子生物学会年会 演題番  
号:P3-0919, ポスター発表, 12月5日、2013  
年.

2. 奥平准之、森川公子、西口美紀、主田英  
之、大内晴美、佐藤貴子、鈴木廣一、西尾元  
心筋型リアノジン受容体遺伝子変異マウス  
(*RyR2*-R420W mice)の病態解析 第97次日  
本法医学会学術全国集会 B22 口頭発表 6,  
28, 2013.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

奥平 准之 (OKUDAIRA, Noriyuki)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10635585