

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293164

研究課題名(和文) 胸腺リンパ体質類似モデルの病態解析

研究課題名(英文) Pathophysiological study of the mice with thymicolymphaticus-like phenotypes

研究代表者

西尾 元(Nishio, Hajime)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90253260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：原因不明の突然死の原因となる心筋型リアノジン受容体遺伝子変異と若年者の死亡例にしばしば観察される胸腺肥大との関係について検討した。研究期間中に、リアノジン受容体遺伝子変異を伴った突然死症例は経験しなかった。リアノジン受容体を介する情報伝達と胸腺肥大との関係について、リアノジンペプチド抗体を作成して、実験的な胸腺肥大モデルの作成を試みたが、抗体価上昇を伴った動物の中に胸腺重量をはじめとする臓器重量の変化のみられたものはなかった。リアノジン受容体遺伝子変異と胸腺肥大との関係について、症例の蓄積などを通してさらなる検討が必要と思われた。

研究成果の概要(英文)：We studied the relationship between cardiac ryanodine receptor gene mutation and hypertrophy of the thymus, which is sometimes observed in sudden death cases of the young at autopsy. No case was found in the juvenile death cases with mutations of the ryanodine receptor gene during the examined years. We also examined the possibility that the cardiac ryanodine receptor gene mutations could lead to the hypertrophy of the thymus by producing model animals with ryanodine receptor antibodies. There were no model animals with elevation of the antibody titers against synthetic ryanodine peptide and thymic hypertrophy. Further study is necessary for understanding the possible involvement of the pathway through cardiac ryanodine receptor and thymic hypertrophy.

研究分野：法医学

キーワード：胸腺 突然死 不整脈

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肥大について形態学的な検討を行っている。同時期に著された法医学教科書の中で、松倉は胸腺リンパ体質について、「異常な身体内部環境バランス異常を示す一つの指標であり、その原因について明らかとされていないが否定されるべきものではない」と記載している（法医学、松倉豊治編、永井書店 315-3222, 1974）。

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検討することを目的とするもので、今日こうした観点から研究を行っている報告は皆無であり、独創的な研究である。多くの法医学研究者が時に経験するものの、その本体について理解に至っていない、古くから提示されてきた問題を検討するという点で、本研究は意義が深い。

また、本研究では、突然死と免疫システムの観点からも実験を行う。胸腺肥大に繋がる胸腺関連遺伝子と突然死の関係を踏まえた研究着眼点は他にはない独創的な研究である。

本研究の着想に至ったのは、日常の法医解剖の経験からである。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、遺族へ与える影響も大きく問題が大きいといわざるをえない。

こうしたことから、私たちは、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。

この中で、13 歳の原因不明の突然死症例に、不整脈源性右室心筋症の原因遺伝子 RYR2 変異を発見した。興味のある事に、この症例の胸腺は 70g と肥大しており、扁桃肥大も伴っ

ており、典型的な胸腺リンパ体質であった（Nishio et al. Cir J 70(11), 2006）。私たちは、この後、さらに 2 例の Ryanodine receptor 2 (RYR2) 変異が発見された突然死症例を発見したが、これら 2 例の症例も何らかの胸腺リンパ体質類似の臓器特徴を伴っている事を報告した（Nishio et al. Leg Med 10(4), 2008）。最近、原因不明の突然死症例に、やはり不整脈源性右室心筋症の原因遺伝子である DSP の変異を 3 例発見したが、このうち 2 例は何らかの胸腺リンパ体質に特徴的な臓器形態を示すことがわかった。

不整脈源性右室心筋症の原因遺伝子変異を伴った症例に、胸腺リンパ体質類似の特徴を示す症例が比較的高頻度に認められることが判明し、今回の研究の着想に至った。

2. 研究の目的

比較的若年者の突然死症例で、解剖によっても死因を明らかとすることのできない症例（原因不明の突然死）の死因診断は、法医学分野の一つの重要な研究題目である。古くからこれらの症例の中に、胸腺肥大等の特徴を示す症例があることが知られている（胸腺リンパ体質）。

私たちは、原因不明の突然死症例に、致死性不整脈の原因遺伝子変異を解析して、変異を伴った症例を報告してきたが、それらの中に、偶然、典型的な胸腺リンパ体質を示す症例を経験した。変異を導入したモデル動物には、胸腺肥大や不整脈が観察されることから、モデル動物は胸腺リンパ体質の類似モデルと考えられる。

3. 研究の方法

(1) リアノジン受容体遺伝子変異突然死症例の検索

リアノジン受容体には、3 種類あり、このうち致死性不整脈の発生に關与するものは、心筋型のリアノジン受容体（2 型）である。この遺伝子の exon 数は 105 であり、これま

でのわたしどもの経験では、このうちの変異が多数存在する3箇所のhot spotの30個程度のexonをPCRによって増幅後に、直接シーケンスして変異などの有無を検索してきた。今回も、同様の方法で行う予定であったが、最近の遺伝子検索の方法で標準的となってきた次世代シーケンサーを用いた解析を行った。次世代シーケンサーによる解析方法については、解析内容の専門性が高いために、検査会社に委託して変異の有無の検索を行った。

(2)胸腺リンパ体質類似モデル動物を用いた心筋型リアノジン遺伝子変異の免疫系・循環器系に対する病態生理学的検討

すでに、わたしどもは、リアノジン受容体遺伝子変異(R420W)を導入したモデル動物がコントロール動物と比較して、胸腺重量が有意に増加していることを報告している。そのメカニズムを明らかとするために、胸腺からリンパ球を単離してリンパ球の表面マーカーの比較を行うことが有用と考えた。胸腺からリンパ球の単離、表面マーカーのフローサイトメトリーを用いた検討については、これまでのとおり、確立された方法によって施行した。

(3)リアノジン受容体抗体胸腺肥大モデル動物の作成実験

リアノジン受容体抗体が胸腺肥大の原因となるかどうかについて、心筋型リアノジンのN末のペプチドを合成し実験動物に免疫を行い、実際の臓器重量を測定した。ペプチドは免疫賦活物質(アジュバント)とともに、ミセルにした上で免疫した。免疫時のストレスや飼育環境の変化による胸腺重量の影響を考え、免疫回数を2回とした。動物屠殺前に、血清の抗体価を測定した。動物の免疫から抗体価の測定、臓器重量の計測について委託検査とした。

4. 研究成果

(1)リアノジン受容体遺伝子変異突然死症例の検索

運動時などに突然死亡して、にわかに死亡原因が診断できなかった法医解剖症例について、これまでに報告されており、かつ頻度の高いことが判明している遺伝子の変異解析を行った。対象とした遺伝子については、様々のイオンチャンネルをコードしている遺伝子である。

法医解剖事例の中で、これまでに致死性不整脈死亡の原因となることが報告されている遺伝子の変異は発見されなかった。法医解剖症例では、解析対象となる症例自体が、わたしどもの施設では、およそ1%程度であり、解析症例に限りのあることが原因と思われる。他施設による検討などの必要性が考えられた。

解析方法について、これまでのPCR産物の直接シーケンス法ではなく、次世代シーケンサーを用いた検索を行った。次世代シーケンサーによる解析結果の評価については、専門的な知識がいること、仮に変異が発見された場合、同一集団(東アジア集団など)における当該変異の出現頻度などの情報が不可欠であることなどを考慮すれば、次世代シーケンサーによる解析業者へ委託検査することが実際の、経済的であると考えられた。法医解剖事例における検討対象症例数が限られていることから、各法医学教室がそれぞれ遺伝子の網羅的解析を行うことは実際的でないと思われる。

(2)作成済みの胸腺リンパ体質類似モデル動物を用いた、当該遺伝子変異の免疫系・循環器系に対する病態生理学的検討

リアノジン受容体遺伝子変異を導入したマウスでは、胸腺重量の増加が確認される。しかしながら、胸腺リンパ球を用いたフローサイトメトリーによる検討では、リンパ球の

表面マーカーに有意な相違は発見されず、胸腺肥大をきたす理由については明らかとなっていない。

心筋細胞では、リアノジン受容体遺伝子変異を導入したマウスでは、細胞内のカルシウム濃度の増減に相違が確認されている。現在のところ、胸腺のリンパ球だけを解析した結果からは、リアノジン受容体を介する情報伝達の修飾が、どのように胸腺肥大に関係しているかについてはわかっていない。

リアノジン受容体抗体を用いた免疫染色の結果からは、リアノジン受容体は胸腺の中では、リンパ球ではなく、胸腺上皮細胞に豊富に発現していることが報告されており、上皮細胞機能を収縮することによって胸腺の重量に影響を及ぼしているのかもしれない。

本研究の当初の計画では、胸腺重量の変化が実際に認められていることから、胸腺のリンパ球の分化に特徴があるものと予想していたが、フローサイトメトリーによる検索からは、差異が認められず、当初計画していた、リンパ球の分化などに関する生化学的、分子生物学的な研究が行われていない。

一般に、胸腺の上皮細胞に関する研究は、胸腺のリンパ球に対するものと比較すると、報告が少なく、今後の免疫学をはじめとする研究の内容の進展によって明らかとする方策を期待したい。

(3) リアノジン受容体抗体胸腺肥大モデル動物の作成実験

リアノジン受容体の変異を導入したモデル動物で、胸腺重量が有意に増加することがすでに確認されており、リアノジン受容体を介する情報伝達が胸腺における細胞の成熟や分化に影響を与える可能性について、リアノジン受容体抗体を用いた検討を行った。

実験動物に、リアノジン受容体ペプチドを免疫して、血清中で抗体価の上昇を確認した後、当該実験動物の各種の臓器重量の変化

を検討したが、胸腺をはじめとする各種の臓器に抗体価上昇に伴って変化するような臓器は認められなかった。

今回免疫源としたリアノジンペプチドは、N末端に位置するものを用いた。ペプチド抗体の種類などによって結果が異なる可能性もあるが、現時点では、リアノジン受容体抗体作成による実験的胸腺肥大モデルの作成は成功していない。しかし、胸腺肥大をともなう神経疾患の中に、胸腺肥大をともなう症例があり、こうした症例では、血清中にリアノジン受容体抗体が高率に検出されると報告されており、今後の検討が必要と考える。興味あることに、こうした症例の血清にみられるリアノジン抗体の多くは、N末端付近に対するものである。

(4) 今後の展望

本研究の当初の計画では、胸腺重量の変化が実際に認められていることから、胸腺のリンパ球の分化に特徴があるものと予想していたが、フローサイトメトリーによる検索からは、差異が認められなかった。胸腺リンパ球の分化に目立った変化を生じておらず、胸腺重量に増加が生じる現象について、さらなる検討が必要と思われる。

リアノジン受容体が、胸腺ではリンパ球よりも胸腺上皮細胞により豊富に発現していることがわかっており、上皮細胞に胸腺肥大現象の原因があるのかもしれない。現在のところ、胸腺上皮細胞の単離はリンパ球ほどには容易ではなく、解析自体が進んでいない。しかし、胸腺上皮に関する知見がすすんでおり、これに関する免疫学分野の知識の蓄積が期待される。

法医学の現場では、今でも胸腺肥大を伴う突然死症例が散見される。実験動物の解析では、胸腺肥大の原因遺伝子座が複数特定されており、リアノジン受容体遺伝子以外にも胸腺肥大の原因となる遺伝子が存在すること

は明らかである。こうした遺伝子を伴った症例が解剖によっては死因を特定できない原因で死亡した場合には、胸腺肥大を伴った原因不明の突然死症例として分類されることになる。一般に、アポトーシスに関連する遺伝子のノックアウトマウスや変異マウスの中には、胸腺肥大が観察されるものもあるので、胸腺肥大をきたした突然死症例の全ての原因がリアノジン受容体遺伝子変異で説明することはできない。しかしながら、わたしどもの経験した実際の原因不明の突然死解剖症例の中に、典型的な胸腺肥大と突然死原因となる R420W 変異をともに備えた症例があったことは、リアノジン受容体遺伝子変異が胸腺リンパ体質の一つのモデルとなりうることを示唆しており、胸腺肥大をきたすメカニズムの理解のための検討は、法医学分野で必要と考えられる。特にわが国の法医学関係者が、1960 年代から胸腺リンパ体質について検討を行っており、日本におけるこの分野の進展が期待される。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者には下線)

[学会発表](計 2 件)

奥平准之、西尾元

Mice with the R420W cardiac ryanodine receptor mutation exhibit status thymicolymphaticus-like phenotypes.

第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 05 日 神戸国際会議場(神戸)

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

2013 年 06 月 28 日 ロイトン札幌(札幌)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西尾元 (NISHIO, Hajime)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90253260

(2)研究分担者

奥平准之 (Okudaira, Noriyuki)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10635585