慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	エクソ/エンドサイトーシスによる生体機能調節
Sub Title	
Author	山口, 和彦
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.1 (2004. 3) ,p.64- 66
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	話題
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040300-0065

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

わかった．ヒト腎上皮由来293細胞にDNMT3b4を強制発現したところ，発現量に依存してサテライト2におけるDNA脱メチル化が誘導された．DNMT3b4が傍セントロメアサテライト領域においてDNMT3b3と競合し，同領域のDNAメチル化が減弱して染色体不安定性に帰結する可能性があると考えられた．

現在，発がんにおけるDNAメチル化に関する基礎研究の成果を，がんの臨床に結びつけるに適した機を迎えていると考えられる．今後，血清検体などにおけるメチル化DNA検出法の確立が，発がんリスクの評価やがんの早期診断・病態診断に寄与し，DNAメチル化の補正ががんの予防・治療に結びつく可能性が期待される．

金井弥栄（国立がんセンター研究所　病理部）

乳癌診療における病理診断の役割

乳房に生じた腫瘍がどんな性質のものなのかを知るには腫瘍のヘマトキシリンエオジン（HE）染色標本の鏡検による病理組織診断が不可欠である．また，腫瘍が悪性とわかり，手術が行われた場合には，乳房温存手術の切除範囲決定，所属リンパ節転移の有無などがHEで診断され，臨床側に伝えられてその後の治療方針決定に役立てられる．

治療方針決定や治療効果判定の際には，HE診断が従来以上に重視される場面も出てきている．乳癌手術例の60〜70%は腋窩リンパ節転移陰性であるが，この内10〜15%で再発が見られる．そのような高リスク群を，原発巣のHE標本にて癌細胞の顔つき（病理学的悪性度）と浸潤径から選び，術後補助療法を施行して予後を改善せしめることが標準的治療戦略となってきた．また，近年広く行われている術前補助療法の際にも，HE標本で組織学的に癌が完全消失した場合（pCR）は予後良好である事が明らかになり，病理学的治療効果判定の臨床的重要性が増してきている．

一方で，HE診断だけでなく，免疫組織化学（IHC）などの手法を用いて癌細胞における分子レベルの知見の報告を求められることも多くなった．乳癌診療の分野では，癌遺伝子HER-2（c-erbB-2）過剰発現や遺伝子増幅，エストロゲン受容体（ER），プロゲステロン受容体（PgR）発現などの情報が含まれる．HER-2を標的としたヒト化単クローナル抗体である抗癌剤トラスツズマブ（ハーセプチン）は，単剤ないしタキサン系薬剤との併用により，HER-2過剰発現のある転移性乳癌に対して効果を表すことが示されている．また今後，術前・術後の補助療法に適応拡大すべく臨床試験が行われている．

トラスツズマブ治療適応の決定に際しては，乳癌組織の切除標本（10%ホルマリンで24〜48時間固定し，パラフィン包埋された組織切片）に対するHER-2の検査が必要となる．HER-2検査法には蛋白過剰発現を見るIHC法と遺伝子増幅を見るFISH法がある．IHC検査の結果は，癌細胞の膜染色状態と強度，面積により4スコアに分け，3+を適応あり，2+は適応可能性あり，0,1+を適応なしとする．スコア2+の乳癌は全体の約10%を占めるが，3+と異なり診断者間の判定再現性やトラスツズマブ奏効率が低い．従ってスコア2+の場合はFISH法による再検査を行い，遺伝子増幅陽性（2倍以上）例のみを治療適応とすることが推奨される．ホルモン療法についても，その適応はERまたはPgR陽性乳癌であり，現在IHC法でER，PgRの発現が検査されている．

HEレベルにしても分子の変化を見るにしても新たな検討を始めると，標本作製や検査自体，結果判定などの面で留意しなければならないことや，種々の業務上の問題点が出てくる．病理学的な悪性度や治療効果判定には，複数の基準が世に存在し，どの基準を採用すべきかという議論もあれば，適用上未解決の問題がある．HER-2スコア2+については上記の様にFISHによる再検査が必要となる．FISHは過固定だと検査の成功率が低い．ER，PgRについてはIHC法にて何%以上の癌細胞が陽性だとホルモン療法の対象とすべきかについて確固たる基準はまだない．

cDNAマイクロアレイやプロテオミックス技術の進歩により短時間で何百もの特異的蛋白の異常がわかり癌の個性診断が可能となると同時に，ごく少量の血液から癌診断が出来そうな勢いである．近い将来これらの成果は臨床応用され，医療のオーダーメイド化が実現することであろう．それでも現時点ではHE診断に求められる情報はむしろ増加しているようで，HEと分子変化の双方の情報提供を必要とされる病理側の二面対応の時代は当面続きそうだ．乳房以外の臓器の腫瘍や非腫瘍性病変の診断も同様の流れにあると思われる．

津田　均（防衛医科大学校　第二病理）

エクソ/エンドサイトーシスによる生体機能調節

2003年度ノーベル化学賞

本年度のノーベル化学賞はマキノン博士（アメリカ）とアグレ博士（アメリカ）に贈られた．受賞理由は「細胞膜に存在する，イオンや水のチャネル（通路）に関わる先駆的な発見」ということであった．マキノン博士はKイオン選択的チャネルがどのようにしてKイオンと

Na イオンを見分けることができるのか，という問題をX 線結晶学によって原子レベルで初めて明らかにした．イオンチャネルは神経，筋，感覚器等で興奮性を担う分子として知られているが，その蛋白質の構造と機能の関係が詳細に明らかになったことは，心筋細胞や脳神経細胞の疾患の理解や新薬の開発等に大きく貢献するだろう．アグレ博士は，細胞膜に存在すると想定されていた水のみを通す通路（水チャネル），アクアポリン AQP を実際に発見し，構造解析によって水のみが透過される仕組みを明らかにした．腎集合管における水の再吸収は AQP2 を通して行われている．AQP2 の機能の調節機構がまた興味深い．下垂体後葉より分泌される抗利尿ホルモン ADH により，集合管主細胞内の小胞膜上に貯蔵されていた AQP2 は細胞膜の管腔側表面に挿入され，結果的に水の通り道が増加し，浸透圧勾配に従って水が原尿より再吸収され，尿量が減少する．この細胞膜に AQP2 を乗せた小胞が融合し，AQP2 が細胞膜に付け加わる過程はエクソサイトーシスと呼ばれる．一方，血中 ADH 濃度が低下すると表面に発現していた AQP2 は周囲の脂質膜ごと細胞内に陥入し，小胞として内在化する．この過程をエンドサイトーシスと呼ぶ．このエクソサイトーシスとエンドサイトーシスによる膜蛋白質の表面発現調節は他にも，インシュリンによるグルコーストランスポーター GLUT-4 の表面発現調節，記憶学習の基礎となる海馬や小脳でのシナプス可塑性におけるグルタミン酸受容体 GluR の表面発現調節，などにおいても報告され，生体調節の基本メカニズムとして大変重要であるとの認識が深まりつつある．しかし，どちらの過程も多くの蛋白質分子が関与する複雑な過程であり，分子機構はなかなか解明されなかったが，近年，大きな進展が見られた．そして，このエクソ/エンドサイトーシスによる膜蛋白質のトラフィッキングは，医学生物学の中で重要であると考えられ，近い将来，この分野からノーベル賞受賞者が出るだろうとの評判が高い．

シナプス小胞のエクソサイトーシス：SNARE 蛋白質と低分子量 G 蛋白質

エクソサイトーシスは分泌細胞，神経細胞等で顆粒（小胞）内の物質を分泌（放出）するメカニズムとして，研究が進められてきた．分泌・放出には SNARE（スネア）蛋白質と呼ばれる一群の蛋白質が必須である．特に細胞膜に存在するシンタキシン，SNAP-25 と小胞膜に存在する VAMP の 3 者は，coiled-coil 構造によってコア複合体を形成し，脂質膜同士の融合を実現させている．ボツリヌス毒素のサブタイプは VAMP，SNAP－25，シンタキシンを特異的に消化し，エクソサイトーシスを阻害する．神経細胞からの神経伝達物質放出では，神経情報を伝えるインパルス（秒速 0.3～100 m）がシナプス前終末に到着し Ca チャネルが開き，Ca イオンが流入しエクソサイトーシスがトリガーされ，神経伝達物質が放出され，数 10 nm のシナプス間隙を拡散し，シナプス後膜の受容体に結合し，受容体イオンチャネルをオープンさせシナプス電位を発生させて信号を伝達する．Ca イオンの流入から受容体イオンチャネルのオープンまで 0.2 ミリ秒と報告されている．速い放出を実現する機構として，シナプス小胞を Ca チャネル近傍にシンタキシンが繋ぎとめていること，RIM，Munc13 等の働きにより小胞が放出準備状態になること（プライミング）等が挙げられる．

SNARE 蛋白質以外に低分子量 G 蛋白質，Rab3A がエクソサイトーシスに関与している．Rab3A の遺伝子をノックアウト（Rab3A-KO）してもシナプス伝達は生じることから，エクソサイトーシスに必須ではない．しかし，Rab3A-KO 動物では前シナプス性可塑性が阻害されることから，シナプス伝達の修飾因子と考えられる．Rab3A はシナプス小胞の貯蔵プールから放出可能プールへの移送を促進するが，かえって放出確率は低下させる．他の低分子量 G 蛋白質による代償も考えられるので，Rab3A 以外の低分子量 G 蛋白質をも活性化する蛋白質 Rab3GEP の遺伝子ノックアウト（Rab3GEP-KO）動物で，SNARE による機能との相互関係を調べた．胎児より摘出した海馬神経細胞を培養し，シナプス機能を調べたところ，シナプス前終末からのエクソサイトーシスは抑圧されていた．高頻度刺激により，放出可能プールサイズを調べると差はなかったが，放出確率は低下していた．海馬シナプスでは Rab3GEP はドッキングの後，Ca 依存性膜融合より前のステップに関与していると考えられた．SNARE 蛋白質によるドッキング－膜融合の途中の過程を Rab 3 GEP によって活性化された分子が促進させている修飾作用が明らかになった（文献 1）．

記憶・学習の仕組み：エクソ/エンドサイトーシスによる受容体表面発現の制御

意識にのぼり，言語で陳述できる記憶，および空間的記憶は海馬により短期記憶から長期記憶に書き込まれる．海馬の障害では新たに長期記憶を獲得することが困難になる（前向性記憶障害）．長期記憶が書き込まれる場所は海馬傍回等の大脳皮質と考えられるが，記憶形成の基礎機構として，海馬におけるシナプス伝達長期増強 LTP が注目されてきた．近年，この LTP のメカニズムとして，グルタミン酸受容体のシナプス下膜へのエクソサイトーシ

スによる挿入が提案されている．これにより，シナプスの伝達効率が増強する．即ち，繰り返しシナプス入力を受けている神経細胞では，NMDA型グルタミン酸受容体のMgイオンによる阻害がはずれ，この受容体イオンチャネルを通ってCaイオンが流入する．Ca/Calmodulin依存性蛋白質キナーゼIIの活性化により，AMPA型グルタミン酸受容体1（GluR1）がエクソサイトーシスによりシナプス膜に挿入される，と考えられている．低分子量G蛋白質の関与も報告されている．

一方，意識に上らない手続き記憶，例えば自転車に乗れるようになる，テニスのサーブがうまく入るようになる，といった運動学習では小脳が中心的な役割を果たしている．小脳の出力細胞，プルキニエ細胞には2つの入力線維がシナプスを形成している．一つのプルキニエ細胞あたり数万本といわれる平行線維シナプスは体全体の筋紡錘や関節器官からの感覚情報，および大脳の運動指令のコピーを伝え，たった1本しかない登上線維シナプスは運動の目標からのズレを伝える，と考えられている．そして登上線維が強く応答している場合，この発火と同時にシナプス入力を受けた平行線維シナプスのAMPA型グルタミン酸受容体（GluR2）は活性を長期に抑圧される．これをシナプス伝達の長期抑圧（LTD）と呼び，小脳運動学習の基礎過程と考えられている．近年，この平行線維シナプスの長期抑圧の分子機構として，GluR2のエンドサイトーシスによる内在化が提案されている．筆者等は，常時，GluR2のエンドサイトーシスによる内在化が生じており，常時生じているエクソサイトーシスによる外在化と平衡していること，LTDにおいては表面発現しているGluR2の中で，内在化可能なプールが増加することを見出した．

記憶形成は陳述記憶の場合も手続き記憶の場合も，グルタミン酸受容体表面発現のエクソ/エンドサイトーシスによる制御，として統一的に理解できる．エクソ/エンドサイトーシスは血糖値調節，尿量調節の他に受精時においても本質的な働きをしている．分子機構の理解の上に，エクソ/エンドサイトーシスに関する新たな臨床応用の展望が開けてくるだろう．

文　献

1) Yamaguchi K, Tanaka M, Mizoguchi A, Hirata Y, Ishizaki H, Kaneko K, Miyoshi J, and Takai Y. A GDP/GTP exchange protein for the Rab3 small G protein family up-regulates a postdocking step of synaptic exocytosis in central synapse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99：14536-14541 (2002).

山口　和彦（理研・脳センター・記憶学習）

プロトンは伝達物質になり得る

感覚神経系において受容野周辺からの側抑制は受けた刺激の輪郭を際立たせ，像や物体の形の認識の上で極めて重要なメカニズムである．視覚系ニューロンは網膜視細胞から外側膝状体のニューロンに至るまで円形で同心円状の受容野を持っている．側抑制によって受容野中心部と周辺部は拮抗した性質を持つ．網膜における側抑制はすでに視細胞レベルで観察されており，水平細胞が錐体視細胞の周辺受容野形成に関与しているという考え方は1970年代から多くの研究者が認めるところであった．

水平細胞は，暗時，視細胞から持続的に放出されるグルタミン酸によって脱分極している．光照射によって視細胞が過分極しグルタミン酸の放出量が減少すると水平細胞は過分極する．水平細胞はギャップ結合によって近隣の水平細胞同士が電気的なつながりを持ちシンチチウムを形成しているので，その受容野はきわめて広い．

水平細胞から視細胞へのフィードバックのメカニズムとして，これまで広く信じられてきたのはGABAを伝達物質とするフィードバック機構である．水平細胞はGABA作動性であるし，脱分極によるGABAの放出，視細胞のシナプス終末に局在するGABA受容体などGABA仮説を支持するデータが数多く提出されている．しかし，錐体視細胞の周辺応答はpicrotoxinを投与してGABAの効果を除去しても見られることから，GABA仮説を批判した報告もあった．GABA仮説に代わる仮説の中で数年前から提唱されたオランダのKammermansらの電界効果仮説は奇抜である．彼らは水平細胞の樹状突起が錐体視細胞のシナプス終末に陥入型のシナプスを形成していることから，周辺部照射によって水平細胞が過分極し，その時，水平細胞の樹状突起先端に流入する電流によって陥入型のシナプスのシナプス間隙の電位は他の細胞外部の電位よりも低く（マイナスに）なるであろうと考えた．その結果，錐体視細胞のシナプス終末部の膜電位は相対的に脱分極し，終末部にあるL型カルシウムチャネルが活性化されてグルタミン酸の放出が増えるというものである．

この研究に強い興味を抱き，イモリ網膜スライス標本を用いて電界効果仮説を追試しようとしたわれわれは，かえってこれを否定することになった．たしかに，錐体視細胞のカルシウム電流は水平細胞を過分極させると増大し，脱分極させると減少するが，この効果は標本を灌流している溶液の緩衝力を高めると消失した．そのため，われわれは錐体視細胞のカルシウム電流は，電界効果ではなく，水平細胞の膜電位によってもたらされたpHの変化によって修飾されていると結論した．周辺部光照射