



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	胸腺及び胸腺上皮性腫瘍における細胞内プロテアーゼの発現に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	木内, 静香
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2201 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12097号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61773
Type	doctoral thesis
File Information	Shizuka_Kiuchi_summary.pdf



学 位 論 文 (要 約)

胸腺及び胸腺上皮性腫瘍における
細胞内プロテアーゼの発現に関する研究
(Studies on the expression of intracellular protease
in the thymus and thymic epithelial tumors)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

木 内 静 香

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	3 頁
第一章	4 頁
緒言	5 頁
実験方法	7 頁
実験結果	9 頁
考察	12 頁
第二章	14 頁
緒言	15 頁
実験方法	16 頁
実験結果	18 頁
考察	20 頁
総括	22 頁
謝辞	24 頁
引用文献	25 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Shizuka Kiuchi, Utano Tomaru, Akihiro Ishizu, Makoto Imagawa, Sari Iwasaki, Akira Suzuki, Noriyuki Otsuka, Takahiro Deguchi, Tomohiro Shimizu, Katsuji Marukawa, Yoshihiro Matsuno, and Masanori Kasahara

Expression of cathepsins V and S in thymic epithelial tumors

American Journal of Surgical Pathology, submitted.

2. Utano Tomaru, Takahiro Tsuji, Shizuka Kiuchi, Akihiro Ishizu, Akira Suzuki, Noriyuki Otsuka, Tomoki Ito, Hitoshi Ikeda, Yuichiro Fukasawa and Masanori Kasahara

Decreased expression of a thymus-specific proteasome subunit $\beta 5t$ in Down syndrome patients

Histopathology, 67(2):235-44 (2015).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 安部樹太郎、有賀 茜、木内静香、外丸詩野、石津明洋、大塚紀幸、清水知浩、丸川活司、松野吉宏、笠原正典

Type B 胸腺腫、胸腺癌におけるカテプシンの発現

第 104 回日本病理学会総会、 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日・名古屋

2. Shizuka Kiuchi, Utano Tomaru, Takahiro Tsuji, Akihiro Ishizu, Akira Suzuki, Noriyuki Otsuka, Tomoki Ito, Hitoshi Ikeda, Yuichiro Fukasawa & Masanori Kasahara

Decreased expression of thymus-specific proteasome subunit $\beta 5t$ in Down syndrome patients

第 104 回日本病理学会総会、 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日・名古屋

3. 木内静香、外丸詩野、辻 隆裕、石津明洋、鈴木 昭、大塚紀幸、伊藤智樹、池田 仁、深澤雄一郎、笠原正典

ダウン症患者の胸腺におけるプロテアソームサブユニット $\beta 5t$ の発現低下

第 34 回日本胸腺研究会学術集会、2015 年 2 月 7 日・神奈川

緒言

細胞内タンパク質分解系は、細胞品質管理や細胞周期制御、各種シグナル伝達、ストレス応答、免疫反応など、生体内における多彩な生理機能と病態に関与しており、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系に大別される¹。ユビキチン・プロテアソーム系においては、20Sプロテアソームがプロテアーゼ活性を有し、その構成サブユニットである $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ がそれぞれカスパーゼ様活性、トリプシン様活性、キモトリプシン様活性を担っている^{2,3}。プロテアソームには3種類あり、体細胞に広く存在する構成型プロテアソームは $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ を有し、タンパク質代謝に働く。免疫プロテアソームはリンパ組織に発現し、インターフェロン γ により誘導される $\beta 5i$ サブユニットによりキモトリプシン様活性が増強し、主要組織適合遺伝子複合体(MHC) class I分子に結合するペプチドを効率よく産生する⁴。胸腺プロテアソームは、胸腺皮質上皮細胞に特異的に発現し、キモトリプシン様活性の低いサブユニットである $\beta 5t$ が20Sプロテアソームを形成し、胸腺皮質においてユニークなペプチドレパートリーを生み出すことで、MHC class I拘束性CD8⁺T細胞の正の選択に重要な役割を果たしている^{5,6}。一方、オートファジー・リソソーム系においては、リソソーム内に局在するプロテアーゼであるカテプシンが中心的役割を担っており、全身組織でのタンパク品質管理に加え、胸腺においてはMHC class IIに結合する自己ペプチドを産生することで、MHC class II拘束性CD4⁺T細胞の分化・成熟に寄与している⁷。プロテアソームやカテプシンは自己免疫疾患等の免疫異常に加え、悪性腫瘍を含む種々の疾患において発現の変化が報告されており⁸⁻¹¹、その発現解析は疾患の診断や病態解明に有用であると考えられる。

本研究の第一章では、胸腺腫瘍のうち最も頻度の高い胸腺上皮性腫瘍において、診断マーカーとしてのカテプシンの有用性を検討する目的でカテプシンV及びSの発現を免疫組織化学的に解析した結果を提示する。

また、第二章では、ダウン症患者の胸腺の組織学的変化について、特にプロテアソームサブユニット $\beta 5t$ の発現に着目して免疫組織化学的に解析し、ダウン症患者に特徴的な免疫異常との関連性について検討した結果を提示する。

略語表

本文中で使用した略語は以下のとおりである。

HE	hematoxylin and eosin
WHO	World Health Organization
CTL	cathepsin L
CTV	cathepsin V
CTS	cathepsin S
TECs	thymic epithelial cells
cTECs	cortical TECs
mTECs	medullary TECs
MHC	major histocompatibility complex
DS	Down syndrome

第一章

胸腺上皮性腫瘍におけるカテプシンの発現に関する研究

緒言

胸腺上皮性腫瘍は、胸腺上皮細胞を由来とする、あるいは胸腺上皮細胞への形態的・機能的分化を示す腫瘍であり、胸腺腫と胸腺癌に大別される。胸腺腫は胸腺組織を模倣する形態や機能を示す腫瘍であるのに対し、胸腺癌は胸腺腫のような organotypic な構造を欠き、浸潤性と核異型性を有した悪性腫瘍である¹²。胸腺上皮性腫瘍は、一般的には稀な腫瘍であるが、胸腺腫瘍の中では最も頻度が高い。多彩な病理組織像や臨床像を呈する疾患群を包含しており¹³、形態のみでその悪性度を必ずしも推定できない腫瘍を含むことから、従来より病理形態学的分類の作成には困難を伴ってきた。1960年代から、胸腺上皮性腫瘍の分類は、リンパ球と腫瘍性上皮細胞の比率で行われ、リンパ球優位型 lymphocyte predominant、上皮優位型 epithelial predominant、混合型 mixed epithelial and lymphocytic という診断名が用いられた。Rosai を中心とするアメリカ派は、AFIP Fascicle, 2nd series において、腫瘍細胞の形態と腫瘍細胞に混在する未熟 T リンパ球の比率で胸腺上皮性腫瘍を分類した¹⁴。一方で、Muller-Hermelink を中心とする欧州派は、胸腺上皮性腫瘍を機能すなわち組織発生に基づいて分類しようと試みた¹⁵。これら2派の意見が統一をみることはなく、国際間の比較や共同研究に困難を生じるようになった。このような背景の中で、世界保健機構（WHO）は1999年の第二版において、両派が用いることができる分類として、非特異的な呼称を用いた分類を発表し、2015年にはその分類を踏襲し遺伝子異常などの情報を加えた第四版を出版した。それによると胸腺腫瘍は形態に基づいて、A型胸腺腫、AB型胸腺腫、B型胸腺腫（B1、B2、B3）、胸腺癌に分類される^{16,17}。この分類法に関しては議論もあるが、国際的な組織学的分類、予後の予測や治療方針決定の指標として用いられている¹⁷⁻¹⁹。A型及びAB型胸腺腫は、多くがごく初期の病期にとどまり、予後良好である。B1型胸腺腫の悪性度は中等度と考えられており、B2及びB3型胸腺腫はより悪性度が高いとされる。胸腺癌はさらに予後不良で、生存率が低く、再発率も高い^{17,20}。臨床的には、B3型胸腺腫と胸腺癌を鑑別することが重要となるが、これらの腫瘍では細胞形態や構造に多様性があり、組織学的診断に難渋する場合がある。有用な診断マーカーの同定にあたっては、胸腺上皮性腫瘍の組織発生や細胞生物学について、より深

い理解が必要である。

システインカテプシンは、通常リソソームに局在し、細胞内タンパク分解に寄与している。ヒトでは 11 種類のシステインカテプシンが同定されており、カテプシン B、C、F、H、K、L、O、S、V、X、W である¹¹。正常胸腺では、カテプシン L (CTL) とカテプシン V (CTV) が胸腺皮質上皮細胞 (cTECs) に発現しているが、近年の研究では、胸腺皮質上皮細胞においては CTV がより優位に発現していると報告されている²¹。一方、カテプシン S (CTS) は胸腺髄質上皮細胞 (mTECs) と樹状細胞に発現している²²。胸腺及び末梢組織においては、これらのカテプシンは、MHC class II に結合する抗原ペプチドの産生において重要な役割を果たしている⁷ (図 1)。加えて、カテプシンは悪性腫瘍において発現が増強し、腫瘍の進展に寄与している^{10,11}。以上より、カテプシンは、胸腺上皮性腫瘍の鑑別マーカーや、悪性度の指標として有用である可能性が考えられる。

本研究では、胸腺腫瘍の鑑別診断におけるカテプシン染色の有用性を検討する目的で、77 例の胸腺上皮性腫瘍において CTV 及び CTS の発現を解析した。その結果、CTV は B 型胸腺腫と AB 型胸腺腫の全例で陽性となり、A 型胸腺腫の大部分で陽性となった (順に、29/29 例、26/26 例、4/5 例)。対照的に、CTS は B 型胸腺腫の全例に陰性であった。大部分の A 型胸腺腫と AB 型胸腺腫では CTS が陽性であった (順に、4/5 例、24/26 例)。興味深いことに、AB 型胸腺腫では、CTV は B 型成分に優位に発現しており、A 型成分に陽性を示したのはごく少数例であった。一方、CTS は多数例の A 型成分に発現が認められた。胸腺癌においては、CTV が 41.2%の症例に、CTS が 47.1%の症例に陽性となった (順に、7/17 例、8/17 例)。以上の結果より、カテプシンの発現は胸腺腫の形態像に関連していることが明らかとなった。さらに、カテプシンの発現パターンが B 型胸腺腫と胸腺癌との間で異なっていることから、カテプシンの免疫組織化学染色は B3 型胸腺腫と胸腺癌との鑑別に有用である可能性が推定された。カテプシンは腫瘍の増殖や浸潤に寄与していることから^{10,11}、カテプシンの異所性の発現、あるいは発現の増強が、胸腺上皮性腫瘍の生物学的態度に関与している可能性が考えられた。

実験方法

対象

北海道大学病院及び北海道大学大学院医学研究科において 1995 年から 2014 年の間に診断された 77 例の胸腺組織を用いた。患者の年齢は 13 歳から 79 歳の分布で、平均年齢は 57.0 歳（中央値：60 歳）であった。男女比は 37 : 40 であった。全症例、WHO 分類（第四版）に基づいて再分類した。5 例が A 型胸腺腫、26 例が AB 型胸腺腫、29 例が B 型胸腺腫（B1 : 8 例、B2 : 12 例、B3 : 9 例）、17 例が胸腺癌であった。胸腺癌は全例、扁平上皮癌であった。AB 型胸腺腫では、全例に A 型成分と B 型成分の両者を含んでいた。AB 型胸腺腫における B 型成分では、腫瘍細胞の形態に多様性があるため、本研究では B 型成分を形態学的特徴から以下の 3 群に分類し、検討を行った。紡錘形ないし楕円形の腫瘍細胞からなる成分を<b-1>とし、円形ないし多角形の腫瘍細胞からなる成分を<b-2>とし、円形ないし多角形の腫瘍細胞からなり、さらに髄質分化を伴う成分を<b-3>とした。コントロールとして用いた正常胸腺組織は、剖検症例より採取した。なお、本研究は、北海道大学病院及び北海道大学大学院医学研究科医学倫理委員会の承認を受けている。

免疫組織化学染色

1) 酵素抗体法

胸腺組織はホルマリン固定の後、キシレン中で脱パラフィン化し、アルコールと蒸留水にて水和した。抗 CTL 抗体、抗 CTV 抗体、抗 CTS 抗体は、それぞれ Abcam (Tokyo, Japan) と、Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA) より購入した。抗 Pan cytokeratin 抗体 (AE1/AE3) と抗 fascin 抗体は、DAKO (Tokyo, Japan) より購入した。CTL、CTV、CTS の単染色は、自動免疫染色機 (NexES、Roche Tissue Diagnostic Japan, Tokyo, Japan) を用いて、ストレプトアビジン—ビオチン法にて行った。CTV と keratin、CTS と keratin、CTS と fascin の二重染色は、上記の自動染色機にて、BOND Polymer Refine Detection kit 及び BOND Polymer Refine Red Detection kit (Leica, Tokyo, Japan) を用いて行った。

2) 免疫組織化学染色の判定基準

抗カテプシン抗体を用いた免疫組織化学染色（酵素抗体法）の判定は、腫瘍細胞の 20%以上が染色されている場合を陽性と判断した。染色強度の判定は、大部分の陽性細胞が微細顆粒状の染色パターンを示す場合を染色強度スコア 1 とし、より強い染色性を示す場合をスコア 2、非常に強い染色性を示す場合をスコア 3 として判定した。

統計分析

免疫組織化学染色の結果の分析は、Fisher's exact test で評価した。P 値は<0.05 を有意とした。

実験結果

胸腺腫及び胸腺癌におけるカテプシンの発現

はじめに、正常胸腺を用いてカテプシンの染色パターンを確認したところ、cTECsにおいてCTL及びCTVが陽性となり、mTECsにおいてCTSが陽性となることから、これらカテプシン抗体はcTECsとmTECsの分画に有用であることがわかる。cTECs、mTECsともに、微細顆粒状の染まりを示している。樹状細胞のようなプロフェッショナル抗原提示細胞は、CTS陽性となることが知られているが²²、本研究においても、主に髄質内で樹状の形態を呈する細胞にCTSが中等度～強陽性を示している。

全症例での検討に先行して、B型胸腺腫と胸腺癌において、抗CTL抗体及び抗CTS抗体を用いた免疫組織化学染色（単染色）を行い、方法において述べた基準に従って染色強度の評価を行った。CTLは、B型胸腺腫全例で陽性となり（100%）、胸腺癌では16例中9例で陽性となった（56.2%）。CTLの染色強度がスコア2を示した症例数は、B1胸腺腫、B2胸腺腫、B3胸腺腫の順に増加している（それぞれ0%、27.3%、55.6%、相関係数 $r=0.4788$ ）。CTLの染色強度がスコア3を示した症例はすべて胸腺癌であった。一方、CTSは、胸腺癌16例のうち9例で陽性となり（56.2%）、B型胸腺腫では全例が陰性であった（0%）。胸腺癌におけるCTSの染色強度は、スコア1または2であった。

次に、B3型胸腺腫と胸腺癌における、カテプシンの染色パターンを比較検討した。B3型胸腺腫では全例がCTL⁺/CTS⁻（パターン1）を示した。一方、胸腺癌では他の染色パターンを示す症例も少なからず存在し、3例がパターン1、6例がCTL⁺/CTS⁺（パターン2）、3例がCTL⁻/CTS⁺（パターン3）、4例がCTL⁻/CTS⁻（パターン4）を示した。以上の結果から、胸腺癌はB3型胸腺腫に比してより多彩なカテプシンの発現パターンを呈することが示された。

ヒト cTECs においては、CTL に比して CTV がより優位に発現すると報告されていることから、上記の先行研究をもとに、以降は抗 CTL 抗体に変えて抗 CTV 抗体を用い、全症例での検討を行うこととした。

腫瘍細胞におけるカテプシンの発現をより詳細に検討するために、カテプシンの単染色に加えて、複数の酵素抗体二重染色法による免疫組織化学染色を行った。はじめに、代表的染色像として B2 型胸腺腫の染色像を確認したところ、胸腺腫内の類円形ないし多角形の大型細胞の細胞質に、顆粒状の染まりを呈する CTV 陽性所見を認め、細胞形態から腫瘍内上皮細胞に CTV が陽性であると考えられた。CTV 陽性細胞が上皮細胞であることを確認するために、抗 CTV 抗体と抗 Pan-cytokeratin 抗体を用いた二重染色を酵素抗体法により行った。その結果、CTV を発現する細胞は抗 Pan-cytokeratin 抗体にも陽性を示すことから、CTV が胸腺腫の腫瘍性上皮細胞に発現していることが確認された。B2 型胸腺腫内には、CTS 陽性を示す樹状の胞体を有する細胞も散見されるが、細胞形態から樹状細胞であると考えられた。CTS 陽性細胞が上皮細胞ではなく樹状細胞であることを確認するため、抗 CTS 抗体と抗 Pan-cytokeratin 抗体及び樹状細胞のマーカーである抗 Fascin 抗体を用いた二重染色を酵素抗体法により行った。その結果、CTS を発現する細胞は抗 Pan-cytokeratin 抗体に陰性で、抗 Fascin 抗体に陽性を示すことから、B2 型胸腺腫においては、CTS が腫瘍性上皮細胞に陰性で、樹状細胞にのみ発現していることが確認された。

77 例すべての胸腺腫と胸腺癌組織に対して上記のカテプシン単染色及び二重染色を行い、方法において述べた基準に従って染色強度の評価を行った。CTV は、AB 型の全例で陽性となり、先行検討での CTL の発現と同様に B 型胸腺腫の全例で陽性となった。A 型胸腺腫では 5 例中 4 例で陽性となり、胸腺癌では 17 例中 7 例で陽性となった。AB 型胸腺腫と B 型胸腺腫、胸腺癌のいずれも、約 1/3 の症例で染色強度がスコア 2 あるいは 3 を示した。CTS は先行検討と同様に B 型胸腺腫の全例で陰性となった一方、A 型胸腺腫では 5 例中 4 例が、AB 型胸腺腫では 26 例中 24 例が、胸腺癌では 17 例中 8 例が陽性を示した。A 型胸腺腫と AB 型胸腺腫の一部の症例では CTS の染色強度がスコア 2 を示した（それぞれ 1/4 例、4/24 例）。

AB 型胸腺腫におけるカテプシン発現の詳細な解析

AB 型胸腺腫は、リンパ球の乏しい A 型成分と、リンパ球に富む B 型成分から成り、両成分の割合は様々である。本研究では、AB 型胸腺腫における腫瘍細胞の割合と形態学的な多様性の関連性について検討するため、AB 型胸腺腫におけるカテプシンの発現をさらに詳細に解析した。対象症例の項で述べたように、B 型成分を形態学的特徴から<b-1>、<b-2>、<b-3>の 3 群に分類し、検討を行った。CTV は B 型成分で優位に発現し (26/26 例)、A 型成分での発現例は少数であった (3/26 例)。CTV の染色強度がスコア 2 を示した割合は、<b-1>、<b-2>、<b-3>の順に増加していた (順に 20.8%、25.0%、57.1%)。CTV とは対照的に、CTS は A 型成分で優位な発現を示した (24/26 例)。B 型成分における CTS 陽性細胞は<b-1>成分でのみ認められ、<b-2>と<b-3>成分では認められなかった。

B3 型胸腺腫と胸腺癌におけるカテプシン発現パターンの解析

最後に、B3 型胸腺腫と胸腺癌における、カテプシンの染色パターンを比較検討した。B3 型胸腺腫では全例が CTV⁺/CTS⁻ (パターン 1) を示した。一方、胸腺癌では他の染色パターンを示す症例が多く、3 例が CTV⁺/CTS⁺ (パターン 2)、5 例が CTV/CTS⁺ (パターン 3)、5 例が CTV/CTS⁻ (パターン 4) を示し、パターン 1 を示した症例は 4 例のみであった。以上の結果から、B3 型胸腺腫が常に CTV⁺/CTS⁻のパターンをとるのに対し、胸腺癌では多彩なカテプシン発現パターンを呈することが示された。

考察

本研究は、胸腺腫と胸腺癌における CTV 及び CTS の発現を酵素抗体二重染色法を用いて初めて検討したものである。本研究で、カテプシンは、胸腺腫の亜型によって異なる発現プロファイルを示した。興味深いことに、B 型胸腺腫は全例で CTV 陽性を示し、CTS は陰性であった。ヒト胸腺組織においては、CTL 及び CTV が cTECs に発現し、CD4⁺ T 細胞の正の選択に寄与し、CTS が mTECs に発現し、CD4⁺ T 細胞の負の選択に寄与している^{21,22}。本研究では、B 型胸腺腫において CTS ではなく CTV が発現していることを明らかにしたが、このことは、B 型胸腺腫が cTECs への分化傾向を有する細胞に由来するという仮説を支持するものであって、皮質と髄質の両方への分化能を持つ TEC 前駆細胞とされるものに由来するという最近の仮説にも矛盾しない²³⁻²⁶。

AB 型胸腺腫の大部分の症例では、CTV と CTS の両方が発現していた。AB 型胸腺腫はリンパ球に乏しい A 型成分と、リンパ球に富む B 型成分が種々の割合で混在し、多様な形態像を示す亜型である。AB 型胸腺腫については、最近、皮質と髄質の両方への分化能を持つが髄質への完全な成熟には至らない TEC 前駆細胞とされるものに由来するという仮説が提唱された²⁶。本研究では、CTV 陽性細胞が B 型成分で優位に認められ、A 型成分の大部分に CTS の発現が確認された。加えて、B 型成分を形態学的に 3 分類した場合、CTS の発現は<b-1>成分にのみ認められた。以上より、AB 型胸腺腫におけるカテプシンの発現パターンは、腫瘍細胞の形態像と関連し、分化の方向を反映していると考えられた。

先行研究で、胸腺上皮性腫瘍における $\beta 5t$ の発現を検討している^{25,27}。 $\beta 5t$ は、CD8⁺ T 細胞の正の選択に寄与する胸腺特異的なプロテアソームサブユニットであり、cTECs にのみ発現することが知られている^{5,28}。 $\beta 5t$ は胸腺皮質への分化能を有する腫瘍細胞に発現すると推定され、実際、 $\beta 5t$ は B 型胸腺腫の大部分の症例で陽性、A 型胸腺腫には陰性となった^{25,27}。加えて、AB 型胸腺腫の B 型成分には陽性、A 型成分には陰性となった²⁷。本研究では、AB 型胸腺腫における A 型成分で少数例ながら CTV が発現していることから、CTV に比して $\beta 5t$ はより cTECs への分化が進んだ腫瘍細胞に発現している可能性が考えられた。

A 型胸腺腫はしばしば、皮質マーカー、髄質マーカーのいずれも発現しないとされるが²⁶、本研究では CTV、CTS のいずれも、5 例中 4 例の A 型胸腺腫で発現が認められた。A 型胸腺腫は、完全摘出された場合には再発のリスクがない良性腫瘍だとされているが、局所再発や遠隔転移をきたす例外的な症例も報告されているのが実際である¹⁷。CTV 及び CTS の発現に関するさらなる検討に

より、A 型胸腺腫の組織発生や生物学的態度に関する新たな知見がもたらされることが期待される。

臨床的には、B3 型胸腺腫と胸腺癌との鑑別が重要であるが、その診断にしばしば難渋する。本研究では、B 型胸腺腫と胸腺癌で、カテプシンの発現パターンが異なることが明らかになった。B3 型胸腺腫と異なり、胸腺癌では約半数が CTS を発現していた。さらに、胸腺癌における CTV 及び CTS の発現パターンは多彩で、4 つのパターンを呈した。以上の結果より、CTV 及び CTS の発現パターンの解析は、CD5 や c-kit、GLUT-1、胸腺プロテアソームサブユニット $\beta 5t$ 等の既知のマーカーとの併用により、B3 型胸腺腫と胸腺癌との鑑別に有用であると考えられた^{25,27,29-34}。

システインプロテアーゼであるカテプシンは、細胞内リソソームに局在し、免疫応答における抗原提示や、骨・軟骨代謝、角化細胞の分化、神経伝達物質やホルモン産生といった生理的機能を有するタンパク分解酵素として認識されていた^{11,21}。近年の研究では、カテプシンの発現増強や活性亢進が、神経障害や心血管疾患、肥満、炎症性疾患、癌において、病態形成に関与していることが示唆されている^{11,21}。特に、カテプシンは腫瘍の進行、浸潤において重要な役割を担っており、腫瘍組織におけるカテプシンの発現増強は予後不良に関わるとされている^{10,11}。カテプシンは、腫瘍形成プロセスへの関与や、腫瘍微小環境における細胞外マトリックスの分解やリモデリングに関与することで、腫瘍の進展・浸潤に寄与することが明らかにされている^{10,11}。乳癌や大腸癌組織では異所性に CTV が発現すると報告されている³⁵。また、CTS は腫瘍形成や血管新生、浸潤、転移に重要な役割を担うとされている^{10,36}。本研究では、複数の胸腺腫や胸腺癌でカテプシン発現の増強（染色強度スコア 2 あるいは 3）が認められた（表 3）。カテプシンの発現増強や異所性発現は、胸腺上皮性腫瘍において、その生物学的態度に影響を及ぼしている可能性があり、近年、他の悪性腫瘍で示されているようにカテプシンが治療標的となり得ると考えられた^{10,11}。

第二章

ダウン症患者の胸腺における プロテアソームサブユニット $\beta 5t$ の発現に関する研究

緒言

ダウン症 (DS) はヒトにおける最も一般的な染色体異常であり³⁷、免疫異常を含む、複雑な臨床所見を呈する³⁸。DS 患者は感染症や悪性腫瘍に罹患しやすいために高い死亡率を示す。DS 患者においては、リンパ球の減少、皮質の萎縮、皮髄境界の不明瞭化などに特徴づけられる胸腺異常を示すことが長く注目されてきた^{39,40}。このような形態異常は DS 患者の免疫異常に寄与すると考えられている。

胸腺内部では、TECs が T 細胞選択と成熟に必要な微小環境を形成している⁴¹。近年、マウスおよびヒトにおいて、cTECs のみで発現するプロテアソーム β サブユニットが発見された^{5,28}。 β 5t と命名されたこのサブユニットは、胸腺プロテアソームの構成成分で、MHC class I 拘束性 $CD8^+$ T 細胞の成熟とレパトア形成に関与している^{6,34,42}。リンパ球の脱落と皮質の萎縮は、DS 患者の胸腺組織で頻繁に観察され、cTECs の変化を伴う異常な胸腺微小環境は、DS 患者の異常な T 細胞成熟に関与する可能性があると考えられる。実際、DS 患者の胸腺では、 $\alpha\beta$ -T 細胞レセプターを高発現する、成熟した胸腺細胞が減少している^{38,43}。本研究では、胸腺組織における β 5t の発現を分析し、機能的な cTECs が、DS および他の 2 つの一般的な生存可能なトリソミー (13 トリソミー及び 18 トリソミー) の患者において発現するかを検討した。加えて、胸腺における MHC class II 拘束性 $CD4^+$ T 細胞の成熟に関与するプロテアーゼであるカテプシンの発現についても検討した。

実験方法

症例の選択および胸腺組織の組織学的 Grading

胸腺組織は、31 例の剖検症例にて採取されたものであり、4 例が 13 トリソミー、14 例が 18 トリソミー、13 例が 21 トリソミーであった。患者の年齢は生後 1 日から 55 ヲ月であり、平均年齢は 3.6 ヲ月、男女比は 12 : 19 であった。全例を再検討し、DS 胸腺の形態についての先行研究をもとに^{39,40}、以下のように分類した。

グレード 1 : 正常からある程度のリンパ球貪食

グレード 2 : 顕著なリンパ球貪食 (starry-sky)

グレード 3 : 皮質の菲薄化を伴う軽度の胸腺皮質細胞脱落

グレード 4 : 皮髄境界の消失を伴う胸腺細胞の高度脱落

グレード 5 : 完全な皮質の消失を伴う胸腺小葉構築の破壊

ヒト組織に関連したすべての実験は、北海道大学医学研究科倫理委員会の承認を得た。

免疫組織化学染色

1) 蛍光抗体法

脱パラフィンされ再水化されたスライドガラスを処理し、標準的なマイクロウェーブ加熱法で賦活化した。スライドガラスは 10% ヤギ血清入り PBS を室温で 1 時間反応させた後、ヒト β 5t に対するウサギ抗血清、および DAKO (Tokyo, Japan) から購入した抗 Pan-cytokeratin 抗体 (AE1/AE3) を 4°C で一晩反応させた⁷。二次抗体として Alexa 594-conjugated goat anti-rabbit IgG あるいは Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Tokyo, Japan) を反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。正常マウス血清およびマウス IgG1 を陰性コントロールとして用いた。

2) 酵素抗体法

ホルマリン固定切片をキシレンで脱パラフィンし、段階的なアルコールと蒸留水で再水和した。 β 5t および keratin の発現を検知するために、 β 5t のウサギ抗血清および抗 Pan-cytokeratin 抗体 (AE1/AE3) を上記の通り用いた。抗 CTL および抗 CTS 抗体は、それぞれ Abcam (Tokyo, Japan) および Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA) より購入した。胸腺組織スライドガラスは、標準的なマイクロウェーブ加熱法で抗原賦活化処理を行い、一次抗体を反応させた後、二次抗体として streptavidin-biotin-horseradish peroxidase (DakoCytomation, Tokyo, Japan) を反応させ検出した。

3) 免疫組織化学染色の判定基準

抗 β 5t 抗体に対する免疫組織化学染色は、皮質領域における keratin 陽性細胞に対する β 5t 陽性細胞の割合に、既報に準じた判定法による染色強度を加味して評価した¹²。

スコア 1 : 80% の keratin 陽性細胞が中等度から強度の染色性を示す

スコア 2 : 50-80% の keratin 陽性細胞が弱から中等度の染色性を示す

スコア 3 : 50% 未満の keratin 陽性細胞が、弱い染色性を示す

統計分析

免疫組織化学染色の結果の分析は、Fisher's exact test で評価した。P 値は <0.05 を有意とした。

実験結果

トリソミー31 症例の胸腺組織を、実験方法に記載した方法で評価した。

概して、組織学的変化は 13 トリソミーおよび 18 トリソミーで軽度であり、全例グレード1から3であった。対照的に、21 トリソミーでは、13 例中7例(53.8%)がグレード1から3となる一方、13 例中6例(46.1%)がグレード4または5であった。このように、21 トリソミーの症例では、胸腺細胞の脱落を伴うより高度な組織学的変化を示す傾向がある。なお、組織学的変化と患者の年齢には有意な関連性を認めない。

グレード1から3では、TECs はほぼ正常の組織像であり、類円形ないし多角形で、keratin 陽性細胞は典型的な樹状の形態を示した。対照的に、グレード4および5の胸腺では著明な線維性変化を認め、紡錘形細胞が破壊された皮質領域に見られた。これらの細胞は keratin 陽性で、上皮への分化傾向を示した。

トリソミー患者の胸腺組織における $\beta 5t$ の発現を評価するため、最初にグレード4や5といった高度な胸腺組織の変化を示す症例で、免疫蛍光染色を施行した。グレード1と評価された胸腺は $\beta 5t$ を発現し、抗 $\beta 5t$ 抗体に強く染色された細胞の大部分は、抗 keratin 抗体にも染色された。グレード4の胸腺では、多くの keratin 陽性細胞は $\beta 5t$ 陰性であった。さらに、グレード5の胸腺では $\beta 5t$ の発現をほとんど検出できなかった。

次に、その他のトリソミー症例の胸腺組織を、抗 $\beta 5t$ 抗体および抗 keratin 抗体で染色し、すべての症例における免疫染色の結果を、実験方法に記載した採点基準で評価した。多くの keratin 陽性細胞が観察されたが、グレード4および5と評価された胸腺において、 $\beta 5t$ の発現は顕著に低下していた。組織学的変化からの予測に一致して、18 例中14例(77.8%)の13あるいは18トリソミーはスコア1となり、残りの4例(22.2%)はスコア2であった。21トリソミーの患者においては、6例(46.1%)、2例(15.4%)、5例(38.5%)がそれぞれスコア1、2、3であった。これらの結果から、21トリソミー患者では、 $\beta 5t$ の発現が高頻度に低下していることが示される。

最後に、DS 患者の胸腺組織で CTL および CTS に対する免疫染色を施行した。カテプシンは、MHC class II 分子が提示する抗原ペプチドを産生する、エンドソーム/リソソーム経路における一連のタンパク分解酵素であり、胸腺における T 細胞のレパトア形成に関与する。正常胸腺では、CTL は cTECs に、CTS は髄質 TECs (mTECs) に発現する²²。グレード 4 あるいは 5 の DS 患者の胸腺 6 例中、CTL は 5 例で発現したが、CTS は全例で陰性であった。この結果は、CTL の発現が、 $\beta 5t$ の発現に比べてよく保たれているとともに、DS 患者の破壊された胸腺皮質組織における紡錘形細胞が、mTECs 由来の上皮細胞ではないことが推定される結果である。

考察

本研究は、高度な組織学的変化を示す DS 患者の胸腺において、 $\beta 5t$ の発現が失われる傾向があることを初めて報告したものである。DS 患者における胸腺の形態学的異常について報告した先行研究に一致して、21 トリソミーの約半数において、胸腺細胞の脱落を伴う高度な組織変化がみられ、グレードは 4 あるいは 5 であった。こうした症例では、ケラチン陽性の上皮細胞は保たれているが、 $\beta 5t$ の発現は低下していた。 $\beta 5t$ は胸腺プロテアソームの構成要素であり、皮質分化を示す TECs にのみ発現する^{5,6,25,28}。TECs は胸腺における T 細胞分化に重要であり、特に cTECs は T 細胞の正の選択に関与している^{6,34,41,42}。したがって、胸腺組織における $\beta 5t$ 発現低下は、DS 患者の免疫異常に関与している可能性がある。

先行研究では、正常 TECs の紡錘形細胞や線維性組織への置換といった、DS 患者の胸腺における高度な組織学的変化は、“fibrotic involution”⁴⁰ として報告されている。本研究では、グレード 4 あるいは 5 を示す DS 患者の胸腺皮質領域で高頻度に観察される紡錘形細胞が、 $\beta 5t$ の発現を失った keratin 陽性 TECs であるということを明らかにした。TECs は胸腺構築の破壊に伴い二次的に $\beta 5t$ の発現を失い、 $\beta 5t$ 陰性の非機能性 cTECs は、組織破壊に反応して増殖している可能性がある。

マウスでは、胎生 12.5 日から cTECs 上に $\beta 5t$ の発現が確認されるが、この発言は FOXP1 に依存するものの、胸腺細胞とのクロストークには依存しないことが知られている⁴⁴。一方、髄質の微小環境は、正の選択を経た $\alpha \beta$ -T 細胞の分化に依存している⁴⁵。最近の報告では、mTECs の分化には NF- κ B シグナルによって調整されるクロストークが必要であることが示されている⁴⁶。以上のことから、DS 患者の胸腺髄質における高度な組織学的変化は、皮質の変化に伴う胸腺細胞の減少に起因する可能性が考えられる。本研究は、DS 患者の胸腺における $\beta 5t$ の発現を検討しているため、胸腺皮質の変化に焦点を当てた研究となっているが、胸腺髄質における組織学的変化の解析もまた、DS 患者の免疫異常という病態においては重要であると考えられる。

近年、DS 患者で免疫障害に関与する多数の遺伝子の発現が変化していることが明らかになってきた⁴⁷。DS 患者の胸腺は、あるパターンの広範囲の遺伝子発現低下を示す結果、胸腺の機能低下を来している可能性がある。本研究結果は、このような遺伝子群に、 $\beta 5t$ をコードする遺伝子が含まれることを示唆している。 $\beta 5t$ をコードする遺伝子は 21 番染色体に位置していないが、DS 患者の胸腺において調節の失われる遺伝子は必ずしも 21 番染色体に位置してはいない⁴⁸。

実際、近年の報告では、21 番染色体は micro-RNA を保有し、これが過剰発現することで、他の染色体にコードされる遺伝子の発現をも調節しているとされている⁴⁹。胸腺において $\beta 5t$ の発現を調節する機序は未だ明らかではないが、DS 患者の胸腺組織における遺伝子プロファイルと転写ネットワークの分析は、 $\beta 5t$ の発現機序を解明する一助となり得る。

総括

1. カテプシンの発現は胸腺腫の形態像に関連していることが明らかとなった。また、カテプシンの発現パターンは B 型胸腺腫と胸腺癌との間で異なることが明らかとなった。

以上の新知見より、カテプシンの免疫組織化学染色が胸腺上皮性腫瘍の組織発生の推定と本態解明に有用である可能性が考えられた。また、カテプシンの免疫組織化学染色が、ときに困難を伴う B3 型胸腺腫と胸腺癌との鑑別に有用である可能性が推定された。カテプシンは腫瘍の増殖や浸潤に寄与していることから、カテプシンの発現増強や異所性発現は、胸腺上皮性腫瘍において、その生物学的態度に影響を及ぼしている可能性があり、カテプシンは胸腺腫瘍の治療標的にもなり得ると推定された。

胸腺上皮性腫瘍は、胸腺においては最も頻度の高い腫瘍であり、形態像や臨床病態の異なる一連の腫瘍を包含する疾患概念である。そのため、悪性度や腫瘍に随伴する免疫異常といった生物学的態度の予測や腫瘍の組織発生の推定に迫る診断マーカーの開発が望まれてきたが、そのようなマーカーとしてカテプシンが有用である可能性が本研究によって示された。

2. ダウン症 (DS) 患者の胸腺は組織学的変化を呈し、高度な変化を伴う胸腺組織においては $\beta 5t$ の発現が低下することが明らかになった。

胸腺プロテアソームの構成要素である $\beta 5t$ は cTECs 上に発現し、T 細胞の正の選択に関与していることから、胸腺組織における $\beta 5t$ 発現低下は、DS 患者の免疫異常に関与している可能性が推定された。

DS 患者の胸腺は、広範囲の遺伝子発現低下を示す結果、胸腺の機能低下を来している可能性があり、本研究結果は、このような遺伝子群に、 $\beta 5t$ をコードする遺伝子が含まれることを示唆している。胸腺において $\beta 5t$ の発現を調節する機序は未だ明らかではないが、DS 患者の胸腺組織における遺伝子プロファイルと転写ネットワークの分析は、 $\beta 5t$ の発現機序を解明する一助となり得ると考えられた。

細胞内プロテアーゼの果たす役割は多岐に渡り、正常組織における生理機能のみならず、腫瘍をはじめとする様々な疾患においてその病態形成に関与している。本研究では、胸腺での発現が免疫機構の形成に重要であるとされるプロテアーゼであるカテプシンとプロテアソームに着目し、その発現を形態学的解析と合わせて検討することにより、疾患の診断マーカーあるいは治療標的としての有用性や、病態解明の可能性を示した。今後は、より多くの症例解析により、カテプシン染色や $\beta 5t$ 染色の有用性が確立され、疾患の病態や診断・治療に関する理解が深まることが期待される。

謝辞

本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学大学院医学研究科病理学講座分子病理学分野 笠原正典教授に深く感謝いたします。

また、本研究において直接ご指導頂いた北海道大学大学院医学研究科病理学講座分子病理学分野 外丸詩野准教授に心から感謝いたします。

最後に、本研究を支えて下さった、分子病理学分野、北海道大学病院病理診断科/病理部、KKR 札幌医療センター病理診断科、市立札幌病院病理診断科の皆様心よりお礼申し上げます。

引用文献

- 1 Ciechanover, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 79-87 (2005).
- 2 Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F. & Seemüller, E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380 (1998).
- 3 Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, A. L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **65**, 801-847 (1996).
- 4 Tanaka, K. & Kasahara, M. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev* **163**, 161-176 (1998).
- 5 Murata, S. *et al.* Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* **316**, 1349-1353 (2007).
- 6 Murata, S., Takahama, Y. & Tanaka, K. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr Opin Immunol* **20**, 192-196 (2008).
- 7 Cresswell, P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* **84**, 505-507 (1996).
- 8 Feist, E. *et al.* Autoantibodies in primary Sjögren's syndrome are directed against proteasomal subunits of the alpha and beta type. *Arthritis Rheum* **42**, 697-702 (1999).
- 9 Scheffler, S. *et al.* Autoimmune reactivity against the 20S-proteasome includes immunosubunits LMP2 (beta1i), MECL1 (beta2i) and LMP7 (beta5i). *Rheumatology (Oxford)* **47**, 622-626 (2008).
- 10 Fonović, M. & Turk, B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta* **1840**, 2560-2570 (2014).
- 11 Turk, V. *et al.* Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 68-88 (2012).
- 12 Travis, W. D. *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. (IARC Press, 2004).
- 13 Shimosato, Y., Kameya, T., Nagai, K. & Suemasu, K. Squamous cell carcinoma of the thymus. An analysis of eight cases. *Am J Surg Pathol* **1**, 109-121 (1977).
- 14 Rosai, J. & Levin, G. *Tumors of the Thymus. Atlas of Tumor Pathology, 2nd series, fascicle 13*. (Armed Forces Institute of Pathology, 1975).
- 15 Kirchner, T. *et al.* Well-differentiated thymic carcinoma. An organotypical

- low-grade carcinoma with relationship to cortical thymoma. *Am J Surg Pathol* **16**, 1153-1169 (1992).
- 16 Rosai, J. & Sobin, L. H. *Histological typing of tumours of the thymus*. 2nd ed. edn, (Springer, 1999).
 - 17 Travis, W. D. *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. (IARC Press, 2015).
 - 18 Okumura, M. *et al.* The World Health Organization histologic classification system reflects the oncologic behavior of thymoma: a clinical study of 273 patients. *Cancer* **94**, 624-632 (2002).
 - 19 Suster, S. & Moran, C. A. Thymoma classification: current status and future trends. *Am J Clin Pathol* **125**, 542-554 (2006).
 - 20 Venuta, F. *et al.* Thymoma and thymic carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* **37**, 13-25 (2010).
 - 21 Reiser, J., Adair, B. & Reinheckel, T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest* **120**, 3421-3431 (2010).
 - 22 Anderson, G., Lane, P. J. & Jenkinson, E. J. Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat Rev Immunol* **7**, 954-963 (2007).
 - 23 Müller-Hermelink, H. K. & Marx, A. Pathological aspects of malignant and benign thymic disorders. *Ann Med* **31 Suppl 2**, 5-14 (1999).
 - 24 Müller-Hermelink, H. K. & Marx, A. Thymoma. *Curr Opin Oncol* **12**, 426-433 (2000).
 - 25 Yamada, Y. *et al.* Expression of proteasome subunit $\beta 5t$ in thymic epithelial tumors. *Am J Surg Pathol* **35**, 1296-1304 (2011).
 - 26 Ströbel, P. *et al.* Corticomedullary differentiation and maturational arrest in thymomas. *Histopathology* **64**, 557-566 (2014).
 - 27 Yamada, Y. *et al.* Expression of thymoproteasome subunit $\beta 5t$ in type AB thymoma. *J Clin Pathol* **67**, 276-278 (2014).
 - 28 Tomaru, U. *et al.* Exclusive expression of proteasome subunit $\beta 5t$ in the human thymic cortex. *Blood* **113**, 5186-5191 (2009).
 - 29 Berezowski, K., Grimes, M. M., Gal, A. & Kornstein, M. J. CD5 immunoreactivity of epithelial cells in thymic carcinoma and CASTLE using paraffin-embedded tissue. *Am J Clin Pathol* **106**, 483-486 (1996).
 - 30 Hishima, T. *et al.* CD5 expression in thymic carcinoma. *Am J Pathol* **145**, 268-275 (1994).
 - 31 Pan, C. C., Chen, P. C. & Chiang, H. KIT (CD117) is frequently overexpressed

- in thymic carcinomas but is absent in thymomas. *J Pathol* **202**, 375-381 (2004).
- 32 Nakagawa, K. *et al.* Immunohistochemical KIT (CD117) expression in thymic epithelial tumors. *Chest* **128**, 140-144 (2005).
- 33 Kojika, M. *et al.* Immunohistochemical differential diagnosis between thymic carcinoma and type B3 thymoma: diagnostic utility of hypoxic marker, GLUT-1, in thymic epithelial neoplasms. *Mod Pathol* **22**, 1341-1350 (2009).
- 34 Tomaru, U. & Kasahara, M. Thymoproteasome: role in thymic selection and clinical significance as a diagnostic marker for thymic epithelial tumors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **61**, 357-365 (2013).
- 35 Santamaría, I. *et al.* Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. *Cancer Res* **58**, 1624-1630 (1998).
- 36 Wang, B. *et al.* Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem* **281**, 6020-6029 (2006).
- 37 Hassold, T. J. & Jacobs, P. A. Trisomy in man. *Annu Rev Genet* **18**, 69-97 (1984).
- 38 Kusters, M. A., Verstegen, R. H., Gemen, E. F. & de Vries, E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin Exp Immunol* **156**, 189-193 (2009).
- 39 Levin, S. *et al.* Thymic deficiency in Down's syndrome. *Pediatrics* **63**, 80-87 (1979).
- 40 Larocca, L. M. *et al.* Morphological and immunohistochemical study of Down syndrome thymus. *Am J Med Genet Suppl* **7**, 225-230 (1990).
- 41 Takahama, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* **6**, 127-135 (2006).
- 42 Nitta, T. *et al.* Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity* **32**, 29-40 (2010).
- 43 Murphy, M., Lempert, M. J. & Epstein, L. B. Decreased level of T cell receptor expression by Down syndrome (trisomy 21) thymocytes. *Am J Med Genet Suppl* **7**, 234-237 (1990).
- 44 Ripen, A. M., Nitta, T., Murata, S., Tanaka, K. & Takahama, Y. Ontogeny of thymic cortical epithelial cells expressing the thymoproteasome subunit $\beta 5t$. *Eur J Immunol* **41**, 1278-1287 (2011).
- 45 van Ewijk, W., Shores, E. W. & Singer, A. Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol Today* **15**, 214-217 (1994).
- 46 Anderson, G. & Takahama, Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol* **33**, 256-263(2012).

- 47 Lima, F. A. *et al.* Decreased AIRE expression and global thymic hypofunction in Down syndrome. *J Immunol* **187**, 3422-3430 (2011).
- 48 Sommer, C. A., Pavarino-Bertelli, E. C., Goloni-Bertollo, E. M. & Henrique-Silva, F. Identification of dysregulated genes in lymphocytes from children with Down syndrome. *Genome* **51**, 19-29 (2008).
- 49 Kuhn, D. E. *et al.* Human chromosome 21-derived miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts. *Biochem Biophys Res Commun* **370**, 473-477 (2008).