

平成 20 年度医学部新研究プロジェクト研究成果報告

雑誌名	三重医学
巻	53
号	1-4
ページ	33-45
発行年	2010-03-04
URL	http://hdl.handle.net/10076/11351

平成 20 年度医学部新研究プロジェクト研究成果報告

区分 : A

- | | |
|---|-------|
| 1. 効果的腫瘍特異的 TCR 導入 T 細胞療法の開発
高抗腫瘍活性 T 細胞サブセットの探索 | 平山 倫子 |
| 2. Fibulin-3 を分子標的にした
変形性膝関節症の画期的な診断, 治療法の開発 | 中空 繁登 |
| 3. ヒト由来造血幹細胞を用いた Ph 染色体陽性白血病発症の
分子機構の解析 | 鈴木 圭 |
| 4. 2 光子レーザー顕微鏡と免疫電顕を用いた
インクレチン分泌細胞の発生と機能分化解析 | 鳥井 美江 |
| 5. 心筋ミオシン軽鎖キナーゼの分子性状と
心筋における機能の解析 | 谷口 正弥 |
| 6. 胚性幹細胞を用いた神経堤細胞発生過程の解析 | 川添真史郎 |
| 7. 弱毒ポリオウイルスを用いた神経芽腫の
新しい治療法の研究 | 豊田 秀実 |
| 8. 新しい心不全モデル創成と治療遺伝子の探索研究 | 梅本 紀子 |
| 9. 篩板置換・筋膜移植法を用いた嗅神経再生治療のための基礎研究 | 小林 正佳 |
| 10. マウス肺高血圧性血管病変における血球系幹細胞,
間葉系幹細胞の関与 | 大槻祥一郎 |

区分 : B

- | | |
|--|-------|
| 1. 繊維・粒子状物質による DNA 損傷性を指標とした
発がんリスク評価法の開発 | 平工 雄介 |
| 2. ヒト stroma cell を用いた T 細胞の初期分化・増殖制御機構
の解明と造血幹細胞移植への臨床応用 | 劉 冰 |
| 3. 比較定量ペプチドミクスによる肝疾患病態責任分子の解析と
新規バイオマーカーの探索 | 杉本 和史 |
| 4. 妊娠時酸化ストレスと児の生活習慣病発症との関係
エピジェネティクスの視点からの検討 | 梅川 孝 |
| 5. 活性化プロテイン C による骨リモデリングの
制御・調節機構の分子細胞学的研究 | 吉田格之進 |
| 6. 直腸癌における癌幹細胞の化学・放射線療法耐性
及び遠隔転移への関与に関する研究 | 問山 裕二 |

区分：A

新研究プロジェクト報告書

効果的腫瘍特異的 TCR 導入 T 細胞療法の開発
- 高抗腫瘍活性 T 細胞サブセットの探索

平山 倫子

三重大学大学院医学系研究科 がんワクチン治療学
Development of effective adoptive T cell therapy using tumor antigen-specific TCR gene-modified T cells.

Michiko Hirayama

Mie University Graduate School of Medicine,
Department of Cancer Vaccine

【目的】がんの免疫療法のひとつとして、養子免疫療法が注目を集めている。これは腫瘍抗原特異的 T 細胞から T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子配列を同定し、その TCR 遺伝子を他の T 細胞に導入して、人為的に腫瘍抗原特異的 T 細胞を作製した後、患者に投与するものである。しかし、 $\alpha\beta$ T 細胞に $\alpha\beta$ TCR を導入すると内在性 TCR と導入 TCR とで自己反応性等の規定外の TCR が形成される問題がある。一方、 $\gamma\delta$ T 細胞は $\gamma\delta$ TCR を発現し、 $\alpha\beta$ TCR と TCR の形成を行わない。また、腫瘍免疫において早期に IFN- γ を産生し、腫瘍拒絶に重要であることが知られている。今回、 $\gamma\delta$ T 細胞に腫瘍抗原特異的 $\alpha\beta$ TCR 遺伝子を導入し、その有用性を検討した。

【方法】 $\gamma\delta$ T 細胞リガンドとして報告されている 2-methyl-3-butenyl-1-pyrophosphate を用いて健常人末梢血単核球から $\gamma\delta$ T 細胞を増殖させ、HLA-A*2402 拘束性腫瘍抗原 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ 特異的 TCR 遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、サイトカイン及びエフェクター分子の産生を ELISA にて、また細胞傷害活性を ^{51}Cr releasing assay にて測定した。

【結果】 $\gamma\delta$ T 細胞に TCR 遺伝子と CD 8 遺伝子を共導入したとき HLA-A*2402/MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ テトラマーにて導入 TCR の発現が認められた (26.3-42.8%)。これらの細胞は導入 TCR, CD 8 依存のかつ抗原特異的に IFN- γ 産生および細胞傷害活性を示した。また経時的に解析した結果、TCR 遺伝子導入 $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞では $\gamma\delta$ T 細胞のほうが早期に Granzyme B を産生した

($\gamma\delta$: 12h, $\alpha\beta$ 24 h)。

【結語】 $\alpha\beta$ TCR を導入した $\gamma\delta$ T 細胞を用いた、効果的ながんの免疫療法の可能性が示唆された。

新研究プロジェクト報告書

Fibulin-3 を分子標的にした変形性膝関節症の
画期的な診断、治療法の開発

中空 繁登

三重大学大学院医学系研究科運動器外科学

変形性膝関節症 (以下膝 OA と略) は、65 歳以上人口の約 30 % にみられ、高齢者の増加とともに罹患率が増加している疾患である。しかし、その診断は主に X 線撮影によるものであり、疾患状況を定量的に把握する診断方法がない。発症初期に非侵襲的に膝 OA の進行を調べる診断方法の開発は、その後の治療方針決定に大きく貢献し、ステロイドや非ステロイド性鎮痛剤による対症療法あるいは人工関節を主とした手術療法しか存在しない現在の治療現場において、新しい治療法が開発が切望されている。我々は 1) 膝 OA の血清あるいは尿中マーカーとなる蛋白をコードする遺伝子の同定および測定系の開発 2) 膝 OA の治療薬開発のための新規標的蛋白の同定を行うことを最終目的として、同疾患の患者滑膜および軟骨組織において高発現している遺伝子に対し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングを行い、21 遺伝子を同定した。このうち、Fibulin-3 タンパクが膝 OA 患者の関節液、血清中で高値を示し、その発現量は OA の進行にほぼ相関することを明らかにした。次に我々はインスリン添加により軟骨分化するマウス胚性腫瘍細胞: ATDC 5 細胞株に Fibulin-3 遺伝子を導入し、安定的に Fibulin-3 タンパクを発現するクローンを樹立し、細胞外基質合成が著しく阻害されること・分化初期段階の反応である細胞凝集が生じないことを明らかにした。この Fibulin-3 の軟骨基質合成抑制のメカニズムを検討した結果、細胞凝集時に最も早期に作用する接着分子である N-cadherin の分解抑制が生じており、この抑制は Fibulin-3 が tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) と結合することで、N-cadherin の分解を担う matrix metallopro-

teinase である a disintegrin and metalloprotease like domain 10 (ADAM 10) を抑制することが原因であることを突き止めた。つまり、Fibulin-3 が、細胞膜上での dynamic な N-cadherin の合成・分解の turnover を抑制することが軟骨分化抑制に大きく寄与しているものと考えられる。Fibulin-3 遺伝子が膝 OA の発症進展にいかに関与し、また、Fibulin-3 タンパクのバイオマーカーとしての有用性を検討するとともに、膝 OA の治療薬開発のための新規標的蛋白となる可能性を追求したいと考えている。

新研究プロジェクト報告書

ヒト由来造血幹細胞を用いた Ph 染色体陽性白血病発症の分子機構の解析

鈴木 圭

三重大学大学院医学系研究科 病態制御医学講座
血液・腫瘍内科学

【緒言】慢性骨髄性白血病 (CML) と一部の急性リンパ性白血病 (ALL) は、9 番染色体と 22 番染色体の相互転座 t (9; 22) (q 34; q 11) の結果、*BCR-ABL* 融合遺伝子が産生され発症する。*BCR-ABL* は p 210, p 190 の 2 種が大半を占めるが、これらの果たす役割は未だ不明な点も多い。既報は主として *BCR-ABL* を細胞株やマウス細胞に導入することで検討され、マウスでは *BCR-ABL* による CML 様病態の再現が報告されている。一方、ALL 様病態の再現はほとんど報告されておらず、ALL 発症の分子基盤は不明な点が多い。そこで今回、*BCR-ABL* をヒト造血幹細胞に導入し、白血病発症の分子機構における *BCR-ABL* の果たす役割を、p 210^{*BCR-ABL*} および p 190^{*BCR-ABL*} によりもたらされる病態の差異を念頭に置き検討することを目的とし本研究を計画した。

【研究方法】*BCR-ABL* (p 210 cDNA または p 190 cDNA) とコントロール (GFP) をレトロウイルスを用いてヒト造血幹細胞に遺伝子導入し、細胞増殖の観察並びに表現型の解析を行った。

【結果及び考察】遺伝子導入効率は、サイトカイン刺激下 2 日間培養後、p 190^{*BCR-ABL*} では 3.6 ± 0.58%, p 210^{*BCR-ABL*} では 2.7 ± 0.89%, コント

ロールでは 17 ± 3.5%であったが、2 週間後これらの割合はそれぞれ 87 ± 1.4%, 82 ± 6.9%, 17 ± 3.5%と *BCR-ABL* 導入群においてその割合が著しく増加し、細胞数はコントロールに比べて p 190^{*BCR-ABL*} で約 150 倍、p 210^{*BCR-ABL*} で約 100 倍に増加した。表面抗原解析では、コントロールは GPA⁺ CD 14⁺ CD 15⁻であったのに対し、*BCR-ABL* 導入群では p 190^{*BCR-ABL*}、p 210^{*BCR-ABL*} と同様に大部分が GPA^{high} CD 14⁺ CD 15⁻で赤芽球系への分化を示し、顕微鏡的観察においてもこれらの細胞は赤芽球系細胞として矛盾しなかった。

以上より今回行った *in vitro* の系においてはヒト造血幹細胞に *BCR-ABL* を導入すると、p 190^{*BCR-ABL*} および p 210^{*BCR-ABL*} 導入細胞とも同様に増殖能の亢進が見られるものの、分化は赤芽球へと向かい必ずしもヒトでの臨床病態 (CML, ALL) の再現は得られなかった。しかし、近年、*BCR-ABL* 陽性白血病においてリンパ球系の転写因子である *Ikaros* の DNA 非結合 isoform (Ik 6) の関与が示唆されており、現在、*BCR-ABL* と *Ik 6* との白血病発症における協調性について、臍帯血に加え、成人の造血幹細胞である末梢血幹細胞を用いて検討を進めている。

新研究プロジェクト報告書

2 光子レーザー顕微鏡と免疫電顕を用いた
インクレチン分泌細胞の発生と機能分化解析

鳥井 美江

(三重大学大学院医学系研究科ゲノム再生医学講座
神経再生医学・細胞情報学)

【研究背景・目的】

糖尿病は現在、予備軍も含めると 2,000 万人を超える重大な国民病である。近年、インスリン分泌に関係するインクレチンという消化管ホルモンが、低血糖の副作用のない新しい糖尿病治療薬として注目されている。インクレチンは食べ物が消化管を通過すると、その刺激が引き金となって小腸上皮細胞の一部の基底顆粒細胞から血中へと分泌される消化管ホルモンで、GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide: グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド) と GLP-1 (Glucagon Like Peptide-1: グルカゴン様ペプチ

ド-1) の2種類があり、膵細胞に作用して相加的にインスリン分泌を増強する働きがある。これまでの成獣動物組織を用いた研究により、GIP分泌細胞は上部小腸に多く散在し、GLP-1分泌細胞は下部小腸に多く散在することが知られていたが、幼若期や胎仔期についてはよくわかっていなかった。インクレチン分泌細胞がいつ、どこで、どのように発生するかを解明することは、将来的に、インクレチン分泌細胞を用いた細胞移植医療を考えていく上で重要な基盤となることから、今回特に胎仔期に着目して組織形態学的観点から解析を行った。

【研究方法】

妊娠マウスを開腹し、胎仔を取り出し固定した後、クリオスタットを用いて凍結切片を作製した。その後、インクレチンに対する特異抗体を用い、免疫電顕法や蛍光抗体法により、マウス胎仔腸組織におけるインクレチン陽性細胞を形態学的に解析した。

【研究結果】

GLP-1産生細胞はマウス胎生期中頃の十二指腸において孤発性に発生し、未発達な分泌顆粒を多く認めた。さらに、GLP-1陽性細胞は、同じく胎生期中頃の十二指腸において、クラスター様構造を形成することがわかった。また、このクラスター様構造の出現は一過性であることもわかった。

【考察・展望】

インクレチン分泌細胞を含む腸内分泌細胞は、成獣動物においては陰窩に存在する小腸上皮幹細胞から分化してきた最終分化細胞であると考えられている。しかし、今回マウス胎仔において、成獣では見られないようなインクレチン陽性細胞の集合体を認めた。これは、インクレチン分泌細胞の発生・分化機構が、胎仔期と成獣期とで、必ずしも同一とは限らないことを示唆している。また、孤発性に発生したインクレチン陽性細胞が最終的にインクレチン分泌細胞へと機能的に分化していくかどうかは不明であり、今後、インクレチンをGFPによりラベルし、2光子レーザー顕微鏡を用いて解析していく予定である。

新研究プロジェクト報告書

心筋ミオシン軽鎖キナーゼの分子性状と心筋における機能の解析

三重大学大学院医学系研究科
循環器内科学 谷口 正弥

我々はブタ心筋から心筋ミオシン軽鎖キナーゼ(cMLCK)の精製を試みた。マウスcMLCKに対するポリクローナル抗体を作製し、ブタのネイティブcMLCKの精製を進めたが、精製した蛋白質にミオシン軽鎖に対するキナーゼ活性を認めなかった。調べてみるとcMLCKのC端側の触媒領域は種間での相同性が高いが、N端側については予想以上に相同性が低いことが判明した。作製したマウスcMLCK抗体はN端側のリコンビナント蛋白を抗原にしていることから、マウスcMLCK抗体はブタcMLCKとは反応せず、精製した蛋白質はcMLCKとは異なると判断した。この抗体を用いた蛋白精製は断念し、現在は種間で共通のペプチドをエピトープとして、ウサギに免疫し、新たな抗体作成を行っている。またブタ心筋の蛋白抽出液をイオン交換クロマトグラフィー及びカルモジュリン・アフィニティクロマトグラフィーに結合させた後、得られる分画に対し、ミオシン軽鎖を基質としたリン酸化アッセイを行い、リン酸化活性を指標に蛋白精製を開始した。今後、リン酸化アッセイと新たに作製した抗体を組み合わせ、cMLCKを精製し、心筋や平滑筋ミオシン軽鎖に対する酵素の性質、他のキナーゼによるcMLCK制御の有無および新たな結合分子の同定などを行う予定である。

一方、我々はcMLCKの心筋特異的トランスジェニックマウスを作製し、2系統でcMLCKが心筋特異的に過剰発現していることを確認している。今後、心エコーによる心機能評価、組織染色による心奇形の有無や線維化の有無、関連分子の蛋白発現やリン酸化レベルの変化を評価し、cMLCKの生体内での機能を明らかにしていく予定である。また明らかなフェノタイプを認めない場合には、大動脈結紮やアンジオテンシン刺激による心肥大モデルおよび種々の心不全モデルを作製する。そしてその表現系を野生型と比較検討し、心臓病におけるcMLCKの機能を明らかにする予定である。

新研究プロジェクト報告書

1) 表紙

研究課題：胚性幹細胞を用いた神経堤細胞発生過程の解析

氏名：川添真史郎

所属：大学院医学系研究科 ゲノム再生医学講座
再生統御医学分野

Title: Analysis of development of neural crest cells using embryonic stem cell

Name: Shinjiro KAWAZOE

Department of Physiology and Regenerative medicine Mie University Graduate School of Medicine

2) 要旨

マウス発生初期の神経管癒合部より出現する神経堤細胞の発生メカニズムを解明することを目的とした。試験管内で、神経上皮を標識できる胚性幹 (ES) 細胞 (Sox 1-EGFP 細胞)¹⁾ を用い、無血清、無フィーダー培養条件において Sox 1-EGFP 細胞から EGFP 陽性細胞 (神経上皮) が 70% 程度誘導できる分化誘導系を確立した。この分化誘導系を用いて、神経堤細胞を標識できる ES 細胞 (Wnt 1-EYFP 細胞) の EYFP 陽性細胞を高効率に誘導できるファクターの探索を行うことで、神経堤細胞の発生メカニズムを明らかにすることを試みた。候補因子として bFGF, BMP 2 等を用いたところ、bFGF を培養初期、4 日目に添加しても Wnt 1-EYFP 細胞の EYFP 陽性細胞誘導効率には影響はみられなかった²⁾。一方、BMP 2 を培養初期に添加した際には Wnt 1-EYFP 細胞からの EYFP 陽性細胞の誘導効率は通常より低下した。しかしながら、4 日目に BMP 2 を添加した際には通常の 2 倍以上の EYFP 陽性細胞が Wnt 1-EYFP 細胞より分化誘導可能であった。Sox 1-EGFP 細胞の大部分の EGFP 陽性細胞が 3 日目から 4 日目にかけ誘導できることから、神経上皮への運命が決定された細胞集団に BMP 2 が作用し、EYFP 陽性細胞を高効率に誘導できた可能性が考えられた。今後、EYFP 陽性細胞が神経堤細胞をどの程度標識できているかを含め、ES 細胞における内在性の bFGF, BMP シグナルにおいてもこの分化誘導系においてどのような影響を及ぼすのか詳細に検討する必

要性があると考えられる。

3) 本文

神経堤細胞の発生メカニズムを試験管内で解析した。

材料

細胞株

Sox 1-EGFP 細胞：Sox 1 遺伝子座に EGFP 遺伝子がノックインされた ES 細胞

Wnt 1-EYFP 細胞：Wnt 1 プロモーター下流に Cre を連結したマウスと Rosa 26-flox-EYFP マウスとの F1 マウス胚盤胞より樹立された ES 細胞

分化誘導培地

DMEM/F12 (Gibco), N2 (Gibco), B27 (Gibco) サイトカイン

bFGF (R&D), BMP 2

方法

無血清、無フィーダー培養条件下で、Wnt 1-EYFP 細胞に bFGF, BMP 2 等のサイトカインを添加し分化誘導した。

結果

BMP 2 を 4 日目に添加した場合のみ Wnt 1-EYFP 細胞から高効率に EYFP 陽性細胞を誘導できた。

考察

Sox 1-EGFP 細胞の大部分の EGFP 陽性細胞が 3 日目から 4 日目にかけ誘導できることから、神経上皮への運命が決定された細胞集団に BMP 2 が作用し、EYFP 陽性細胞を高効率に誘導できた可能性が考えられた。

4) 文献

- 1) Aubert J, Stavidis MP, Tweedie S, O'Reilly M, Vierlinger K, Li M, Ghazal P, Pratt T, Mason JO, Roy D, Smith A. Screening for mammalian neural genes via fluorescence-activated cell sorter purification of neural precursors from Sox 1-gfp knock-in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 100: 11836-11841 (2003)
- 2) Ying QL, Smith AG. Define conditions for neural commitment and differentiation. Methods Enzymol 365: 327-341 (2003)

新研究プロジェクト報告書

弱毒ポリオウイルスを用いた神経芽腫の新しい治療法の研究

豊田秀実¹⁾，井戸正流²⁾，中西恭一²⁾，
堀 浩樹¹⁾，駒田美弘¹⁾

- 1) 三重大学大学院医学系研究科小児科学
2) 三重中央医療センター小児科

進行神経芽腫の予後は不良であり，新しい治療法の開発が望まれています．一方，ポリオウイルス（以下 PV）は急性灰白髄炎の原因ウイルスで，PV レセプター（以下 CD 155）を介して脊髄の前角細胞に感染します．こうした PV の神経細胞に対する親和性に着目し，我々は PV を神経芽腫の治療に応用しようと試み，PV ワクチン株が神経芽腫細胞に対して強い抗腫瘍活性を持つ事を報告してきました¹⁾．さらに神経芽腫を PV で治療することにより抗腫瘍免疫が誘導されることが示唆されました²⁾．そこで今回我々は抗腫瘍免疫獲得の機序を解明し，さらに神経芽腫の腫瘍特異抗原を同定することを目的として実験を行いました．抗腫瘍免疫誘導に関わる抗原を同定する第一段階として，PV 感染で細胞死した神経芽腫細胞には抗腫瘍免疫誘導能があるか否かを検討する必要があります．そのため我々は PV 感染で細胞死した神経芽腫細胞で CD 155 tgA/J マウスをワクチンした後，このマウスに Neuro-2 a^{CD 155} 細胞を移植し腫瘍増殖抑制効果があるか否かを検討しました．まず Sabin 1 感染により細胞死を誘導した Neuro-2 a^{CD 155} 細胞と，凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2 a^{CD 155} 細胞の 2 種類の Homogenate を準備しました．Sabin 1 を 1 週間おきに 3 回 CD 155 tgA/J マウスの腹腔内に注射し，

PV に対する中和抗体を獲得させ，3 週後にこれらの CD 155 tgA/J マウスを Homogenate で 1 週間おきに 3 回免疫し抗腫瘍免疫の誘導を試みました．その際，以下の 4 グループに分けて免疫しました．：PBS のみ，：Sabin 1 感染により細胞死を誘導した Neuro-2 a^{CD 155} 細胞（Homogenate），：凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2 a^{CD 155} 細胞（Homogenate），：凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2 a^{CD 155} 細胞（Homogenate）+ Sabin 1．免疫終了 3 週間後， 1×10^6 の Neuro-2 a^{CD 155} 細胞をマウスの尾静脈から静注し播種性腫瘍形成を予防できるか否かを検討しました．その結果，図 1 に示すように の Sabin 1 感染により細胞死を誘導した Neuro-2 a^{CD 155} 細胞（Homogenate）で免疫したマウスにのみ腫瘍増殖抑制効果が認められ，の PBS，の凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2 a^{CD 155} 細胞（Homogenate）や，の凍結・解凍により細胞死を誘導した Neuro-2 a^{CD 155} 細胞（Homogenate）+ Sabin 1 で免疫したマウスには肝臓の多発性病変が認められ（図 2），抗腫瘍効果が認められませんでした．この結果より，抗腫瘍免疫誘導に関わる抗原は，PV が神経芽腫細胞に感染し細胞死が誘導される過程で合成される可能性が高いと考えられます．今後我々は抗腫瘍免疫獲得の機序を解明し，神経芽腫の腫瘍特異抗原を同定するとともに，これらを用いてがんワクチンの作成を目指します．

文献

- 1) Toyoda H, Ido M, Hayashi T, Gabazza EC, Suzuki K, Kisenge RR, Kang J, Hori H, Komada Y.

Experimental treatment of human neuroblastoma using live-attenuated poli-

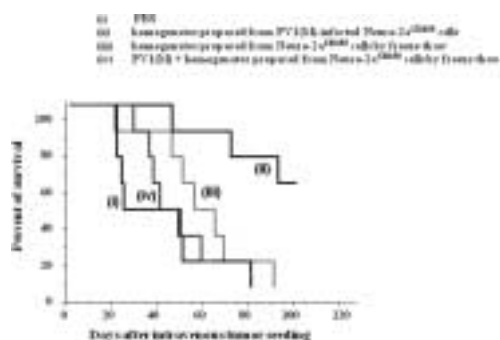


図 1



図 2

- ovirus. International Journal of Oncology. 24 49-58 (2004)
- 2) Toyoda H, Yin J, Mueller S, Wimmer E, Cello J. Oncolytic treatment and cure of neuroblastoma by a novel attenuated poliovirus in a novel poliovirus-susceptible animal model. Cancer Res. 67: 2857-2864 (2007)

新研究プロジェクト報告書

新しい心不全モデル創成と治療遺伝子の探索研究

梅本 紀子

(三重大学大学院医学系研究科 薬理ゲノミクス分野)

【目的】心不全患者は増加の一途をたどり、全世界で約 2,300 万人、我が国で約 160 万人に達する。心不全に対する標準的治療法は、急性期心不全患者に奏効し、生存率は向上したが、根本的な治療法としては不十分であるため、長期予後には多くの課題が残されており、未だ充分な心不全治療法は確立されていないといえる。

これまでに、我々は新しい心不全治療法開発のための新しい研究戦略を確立し、新しい治療関連遺伝子の発見に結びついている。具体的には、ゼブラフィッシュ心不全モデルを構築し、化合物スクリーニングにより治療効果の高い化合物を抽出し、遺伝子発現プロファイル解析および遺伝子介入により新しい心不全治療関連遺伝子を探索するものである。本研究では Cardiac troponin T (TNNT 2) の knockdown によりゼブラフィッシュ心不全モデルを構築し、治療応答性を定量的に評価する新しい心機能解析法を開発した。これら独自の研究戦略を応用し、新規治療関連遺伝子の発見および心不全治療法の確立をめざす。

【方法】新しい心機能解析法とは、ゼブラフィッシュの血漿および間質液へ移行する蛍光色素を応用した蛍光 In vivo イメージングにより、染色されない心筋壁の陰影を利用して心室内径変化を測定する方法である。心室内径値から、収縮末期および拡張末期容積、%FS、EF などのパラメータを算出し、TNNT 2 knockdown 心不全モデルにおいて定量的に心機能を評価した。

【結果と考察】TNNT 2 の knockdown により、

心室拡張末期径のみが選択的に短縮し、平均心室壁収縮速度および拡張速度が共に低下することが明らかとなった。

現在、TNNT 2 knockdown 心不全モデルにおいて、収縮期および拡張期における機能障害のメカニズムを解明し、治療関連遺伝子を探索している。

新研究プロジェクト報告書

篩板置換・筋膜移植法を用いた嗅神経再生治療のための基礎研究

小林 正佳

三重大学医学部附属病院耳鼻咽喉・頭頸部外科

近年、生活の質の向上に伴い、嗅覚障害の治療を求めて耳鼻咽喉科を受診する患者数が増加している。元来、脳神経系組織は再生、機能回復が困難と考えられてきたが、嗅神経は比較的強い再生力を有していることが知られている。しかし、実際の診療においては、頭部外傷などの末梢神経性嗅覚障害の予後は回復率約 30%と不良である。頭部外傷による嗅覚障害は、篩板レベルでの嗅神経切断・過伸展が原因と考えられている。障害された嗅神経の再生予後を左右するものとして、篩板レベルに形成される癒痕組織があり、これが嗅粘膜から再生してくる嗅神経の軸索が嗅球に再到達するのを物理的に妨げると考えられる。

このような予後不良例に対する改善策として、本研究では、癒痕化した篩板を切除して移植筋膜片と置換して、再生する嗅神経がこれを突き抜けて嗅球へ到達するかどうかを確認し、傷害された嗅神経系が回復するかどうかの確認を行った。

OMP-tau-lacZ マウスをペントバルビタールで麻酔し、マウスの前頭骨と鼻骨を削開して嗅球と鼻内の嗅粘膜を明視下においた。テフロンで作製した柔軟な神経切断カッターを左側の篩板と嗅球の間に挿入して嗅神経を切断した。右側は切断せず、コントロールとした。次に篩板を切除し、その欠損部に同一個体から採取した側頭筋膜片を挿入し、閉頭した。術後 5 日目、14 日目、42 日目、70 日目でマウスを生理食塩水とホルマリンで環流固定し、頭蓋を摘出し、脱灰処理した後、スライス切片標本を作製し、再生した嗅神経の嗅球到

達を組織学的に検証した。

この結果、一部のマウスで、再生した嗅神経が移植筋膜片を貫通して、嗅球に達するのを確認できた。

本研究は現在も継続中で、現在は再生嗅神経が嗅球に達する例と達しない例における局所組織環境の違い、再生神経の機能的再生の有無を検証するために、さらに研究を進めているところである。

新研究プロジェクト報告書

マウス肺高血圧性血管病変における血球系幹細胞、間葉系幹細胞の関与

大槻祥一郎

三重大学医学部附属病院小児科

研究報告

肺高血圧は、原発性ないし二次的に発症する難治性疾患で、有効な治療法開発には新たな病態解明が重要である。肺高血圧は、従来その機序として内皮機能障害、血管新生、内皮細胞のapoptosisが関わり、他に平滑筋細胞、線維芽細胞の分化増殖が知られる。一方、骨髄幹細胞の中には、それらの細胞に分化し得る血球系幹細胞（HSC）、間葉系幹細胞（MSC）など多分化能を有する細胞が、最近ではそれらの骨髄幹細胞が種々の臓器の生理的、病的状況において恒常性維持のcell sourceとなり得る事が報告される。

そこで、緑色蛍光色素（eGFP）発現マウスの全骨髄細胞ないし血球系幹細胞を照射野生型マウスに骨髄移植し、その後慢性低酸素暴露により肺高血圧マウスを作製する。肺血管病変組織を共焦点顕微鏡を用いて免疫組織学的に解析し、血球系幹細胞由来か間葉系幹細胞等他の幹細胞由来かを検討した。

肺高血圧モデルは野生型マウスにeGFP発現マウスの骨髄を移植し、21日間低酸素環境下（H群）または通常酸素下（N群）でそれぞれ飼育して作製した。肺高血圧の評価は、収縮期右室圧、右室左室重量比、血管病変の定量計測により行った。移植細胞は造血系、間葉系幹細胞の関与を比較するために骨髄総有核細胞（TNC）またはc-kit⁺、Sca-1⁺、Lineage marker⁻の造血系幹細胞分画（KSL）を用いた。

本モデルにおいて、収縮期右室圧と右室左室重量比の増加、血管病変の出現が確認された。TNC移植マウスにおいて、骨髄由来血管内皮細胞（EC）および骨髄由来マクロファージ（M₁）はH群で有意に増加した。KSL移植マウスではH群で骨髄由来M₁は有意に増加したが、骨髄由来ECは有意な変化を認めなかった。

骨髄造血系幹細胞と間葉系幹細胞は肺血管病変を構成する異なる細胞に分化し肺高血圧の病態形成に関与する事が示された。

区分：B

新研究プロジェクト報告書

繊維・粒子状物質による DNA 損傷性を指標とした発がんリスク評価法の開発

平工 雄介

三重大学大学院医学系研究科
環境社会医学講座 環境分子医学分野

アスベストによる悪性中皮腫や肺がんによって代表されるように、繊維・粒子状物質による健康障害は重大な社会問題である。工業や医療に応用されつつあるナノ素材については、ヒトへの安全性については不明な点が多いが、実験動物で発がんを起こすという報告がある。これらの物質の吸入により肺組織では慢性炎症が惹起され、活性酸素・窒素種の産生による DNA 損傷が発がんに関与すると考えられる。我々は、これまで種々の臨床検体や動物モデルを用いて、変異誘発性ニトロ化 DNA 損傷塩基である 8-ニトログアニンが炎症関連発がんの過程で生成されることを世界に先駆けて明らかにしてきた。本課題ではアスベストおよびナノ素材による DNA 損傷について、それぞれ実験動物および培養細胞を用いて検討を行った。

アスベストによる DNA 損傷：ICR 雄性マウスにアスベストを気管内投与し、肺組織を得た。組織中の DNA 損傷について免疫組織染色により解析した結果、気道上皮細胞の核で 8-ニトログアニンの生成を認めた。また、その過程には転写因子 NF- κ B の活性化を介した誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) の発現が関与することを明らかにした。アスベストの種類による DNA 損傷性を比較した結果、発がん性の強いクロシドライト (青石綿) の方がクリソタイル (白石綿) より有意に強く 8-ニトログアニンを生成することを明らかにし、DNA 損傷性がアスベストの発がん性と一致するという極めて注目すべき知見を得た。

ナノ素材による DNA 損傷：ナノ素材として、ゴム製品やインクなどに使用されるカーボンブラック、および半導体などへの応用が期待されるカーボンナノチューブによる DNA 損傷について検討した。ナノ素材は凝集しやすいため、懸濁液の超音波処理 (凝集体の分散) および遠心沈降 (粗大粒子の除去) により、素材をナノサイズに調製す

る条件を確立した。これらの素材をマウスマクロファージ (RAW 264.7) およびヒト正常気管上皮 (HBEpC) の培養細胞に添加して免疫細胞染色を行った結果、いずれの場合も細胞内で 8-ニトログアニンの生成を認めた。

以上の結果から、8-ニトログアニンは繊維・粒子状物質による炎症を介した発がんリスクを評価する新規バイオマーカーとして期待される。今後は、繊維・粒子状物質の曝露を受けた個人のリスク評価法および新規に産業応用される物質のリスク予知法の開発に向けて、本課題の成果を基盤とした科学的エビデンスを集積していくことが必要である。

新研究プロジェクト報告書

ヒト stroma cell を用いた T 細胞の初期分化・増殖制御機構の解明と造血幹細胞移植への臨床応用

劉 冰¹⁾、大石晃嗣²⁾

- 1) 三重大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学
- 2) 三重大学医学部附属病院輸血部

【背景と目的】これまでヒトリンパ球系前駆細胞の分化に関する *in vitro* での研究は、マウス骨髓由来のストローマ細胞株を用いて行われてきた。我々は、よりヒトの造血系に近いと考えられる培養系で研究するため、ヒト骨髓由来不死化ストローマ細胞に注目し検討をおこなった。

【方法】不死化ヒトストローマ細胞を 25 cm² フラスコで培養し confluent にした後、CD 34+ 臍帯血造血前駆細胞を、種々の造血因子を含む 20% FCS α MEM 培地で 3 週間培養し、細胞数および表面形質を検討した。

【結果】不死化ストローマ細胞は、造血因子無添加でも CD 19+B 細胞の分化を支持するが、flt-3 ligand (Flt 3 L) と IL-7 の添加により、さらに多くの CD 19+ 細胞が生成された。この CD 19+ 細胞は、一部 CD 20 陽性であるが、PreB 細胞で発現する VpreB が陰性であり、細胞内 μ 鎖を発現していないことから、ProB 細胞であると考えられた。一方、不死化ストローマ細胞は、造血因子無添加で CD 7+ 細胞の生成も支持し、Flt 3 L と IL-7 の添加により、さらに CD 7+ 細胞

の生成が促進された。この CD 7+細胞は、一部 CD 2 陽性であるが、CD 1 a や細胞内 CD 3 は陰性であり、NK 細胞に発現する CD 56 も陰性であることから、ProT 細胞であることが示唆された。さらに、stem cell factor (SCF) や thrombopoietin (TPO) の添加は、CD 19+細胞や CD 7+細胞の生成を促進し、IL-3 は CD 19+細胞への分化を抑制することが明らかとなった。

【考察】本研究により、ヒト不死化ストローマ細胞がヒト B および T リンパ球系細胞の初期の分化・増殖を支持することが明らかとなった。さらにこの共培養系を用いて、Flt 3 L, TPO, SCF, IL-3 などの造血因子が、B および T 細胞の初期分化を正あるいは負に制御することが明らかとなった。現在、ストローマ細胞に、Notch ligand Delta-1 あるいは Delta-4 を発現させ、T 細胞分化がどの程度支持されるようになるか検討している。これらの研究は、臍帯血移植後の免疫回復を促進する新規治療法の開発や、腫瘍特異的免疫療法を臍帯血移植で実施するための、重要な基盤研究となると考えられる。

新研究プロジェクト報告書

比較定量ペプチドミクスによる肝疾患病態責任分子の解析と新規バイオマーカーの探索

杉本 和史

三重大学医学部附属病院・中央検査部

癌の局所においては多くのプロテアーゼにより細胞内外の蛋白が分解され、疾患特異的なペプチドームが産生されている。肝細胞癌でも特異的なペプチドが出現していると考えられ、そのバイオマーカーとしての有用性が期待される。

これまでに我々は 2 D-μHPLC-MALDI-TOF-MS 法により血中の質量 5000 以下のペプチドを中心に網羅的に解析する手法を開発した。この手法により各種肝疾患の血清を解析、比較し、数種類のペプチドが肝疾患のマーカーとして有用である可能性を見出し、なかでも肝疾患進行の有用なマーカーとして inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITHH 4) のペプチド断片を同定した。免疫組織染色により肝細胞癌組織に ITHH 4 が発現することも確認した。またこのペプチド

を免疫沈降後、質量分析によって検出し、多くの検体を同時に解析することを可能にした ImmunoMS 法を開発した。このペプチドをマーカーとして利用することで ALT 正常の慢性肝炎を 92% (ROC=0.9) の感度で検出することが可能であった。また、肝細胞癌と肝硬変は 84% (ROC=0.7) の感度で分離可能であった。さらに、このペプチド断片は二次元電気泳動のパターンから、10 の variants に分離され、neuraminidase 処理で variants 出現が認められなくなったことから糖鎖修飾の差異に起因することが明らかとなった。HCC 113 例、LC 100 例、慢性肝炎 102 例における検討で、これら 10 の peptide variants はそれぞれ異なる動態を示し、なかでも variants 9, 10 は HCC への進展とともに特異的に発現レベルが上昇していた。この 2 つの peptide variants を組み合わせることで、CH と HCC は 85% (ROC=0.89)、LC と HCC は 84% (ROC=0.77) の感度で分離可能であり、特に stage 1 の初期の HCC では vs. CH, vs. LC ともに 100% の感度で分離可能であり、初期の HCC マーカーとしての有用性が示唆された。

新研究プロジェクト報告書

妊娠時酸化ストレスと児の生活習慣病発症との関係 - エピジェネティクスの視点からの検討

梅川 孝¹⁾、紀平知久²⁾、村林奈緒³⁾

- 1) 三重大学医学部附属病院周産母子センター
- 2) 三重大学医学部 医学・看護学教育センター
- 3) 三重大学医学部附属病院産科婦人科

【目的】我々は、hTRX-1 過剰発現マウス (以下 Tg) を用いたこれまでの検討から、抗酸化系機構が胎盤において glucocorticoid 代謝を活性化し、糖輸送機構を介して胎児発育と関連していることを確認している。今回は、抗酸化系機構が離乳期と成獣期の糖代謝に与える影響について検討を行った。

【方法】施設内動物実験委員会承認の下、8 週齢の雄性 Tg (n=4-8) と野生型マウス (以下 Wt, n=4-6) を雌性 Wt と交配し妊娠させた。雄性仔マウスを検討対象とし、4 週齢で離乳を行った。4 週齢および 10 週齢において空腹時血糖値、イ

ンスリン値を測定し糖負荷試験を行い、5 週齢および 10 週齢においてインスリン負荷試験を行った。

【成績】離乳後の体重および摂取カロリー量は両群間で有意差を認めなかった。4 週齢における空腹時血糖、インスリン値および糖負荷試験に有意差を認めなかった。10 週齢における空腹時血糖値、インスリン値は Tg 群で有意に低かったが、糖負荷試験において Tg 群で有意なインスリン分泌の低下および血糖の上昇を認めた ($p < 0.01$)。しかし、5 週齢および 10 週齢におけるインスリン負荷試験では有意差を認めなかった。各群のインスリン値を 4 週齢と 10 週齢で比較したところ、Wt 群で有意な増加 (4 週齢: 117.9 ± 17.6 vs. 10 週齢: 371.6 ± 35.6 pg/ml, $p < 0.01$) を認めたが、Tg 群では有意差を認めなかった (4 週齢: 174.2 ± 32.5 vs. 10 週齢: 195.4 ± 40.7 pg/ml, $p = 0.74$)。また、10 週齢における膵臓の insulin-2 および pancreas duodenum homeobox-1 (Pdx-1) の遺伝子発現が、Tg 群において有意に減弱していた。

【結論】上記結果より、妊娠時抗酸化系機構が、胎盤における glucocorticoid 代謝や、膵臓の Pdx-1 発現を介して、膵臓の機能形成やその維持に影響を与えている可能性が考えられた。今後は、エピジェネティクス制御機構の関与について検討を加える予定である。

(本研究結果は第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会において高得点演題に選ばれた)

新研究プロジェクト報告書

活性化プロテイン C による骨リモデリングの制御・調節機構の分子細胞学的研究

吉田格之進

三重大学大学院医学系研究科

分子病態学分野

活性化プロテイン C (APC) は、抗凝固・抗炎症セリンプロテアーゼであり、凝固補酵素蛋白質の第 Va 因子及び第 VIIIa 因子を分解することにより血液凝固系を制御すると共に、血管内皮細胞プロテイン C 受容体 (EPCR) に結合後、プロテアーゼ活性化受容体-1 (PAR-1) を活性化する

ことにより、抗炎症作用や抗アポトーシス作用を発揮する。骨に物理的障害が加わり生じる骨折などの病態では、傷害部位における血液凝固の亢進が認められるが、凝固系の活性化と骨リモデリングの関連性については明らかでない。本研究では、ヒト骨芽細胞の増殖とヒト破骨細胞の分化に及ぼす APC の影響を解析した。はじめに、APC の骨芽細胞の増殖に及ぼす影響を WST-1 assay により、破骨細胞分化に及ぼす影響を TRAP 染色により検討した結果、APC は骨芽細胞の増殖をその濃度依存性に促進すること、及び APC は破骨細胞分化をその濃度依存性に抑制することが明らかになった。続いて、骨芽細胞及び破骨細胞上の EPCR, PAR-1 の発現を免疫蛍光染色法及び RT-PCR 法により検討した結果、両細胞では、EPCR, PAR-1 の両者が発現されていることが明らかになった。次に、APC の両細胞に対する作用における EPCR, PAR-1 の関与について EPCR, PAR-1 特異的抗体を用いて、同様に WST-1 assay 及び TRAP 染色により検討した結果、APC の両細胞に対する作用は、抗 EPCR 抗体により阻害されるが、抗 PAR-1 抗体では影響されないことが明らかになった。さらに、リン酸化 p 44/42 MAPK 特異的抗体を用いた Western Blot 法により、骨芽細胞では APC により p 44/42 MAPK の活性化が促進されること、及び NF- κ B 特異的 ELISA 法により、破骨細胞では APC により NF- κ B の活性化が阻害されることが明らかになった。

以上の結果より、APC は、EPCR を介して、p 44/42 MAPK の活性化することにより骨芽細胞の増殖を促進し、NF- κ B を活性化することにより破骨細胞の分化を抑制することが明らかになった。

新研究プロジェクト報告書

研究表題

「直腸癌における癌幹細胞の化学・放射線療法
耐性及び遠隔転移への関与に関する研究」

著者：問山裕二，井上靖浩，三枝 晋，

田中光司，三木誓雄，楠 正人

所属：三重大学大学院病態修復医学講座

消化管小児外科学講座

Title: 「Association between cancer stem cell
and metastasis in rectal cancer treated with
chemo-radiotherapy followed by surgery」

Author: Yuji TOIYAMA, Yasuhiro INOUE,

Susumu SAIGUSA, Kouji TANAKA,

Chikao MIKI, Masato KUSUNOKI

Department of Gastrointestinal and Pediatric
Surgery, Mie University Graduate School of
Medicine

報告書

背景：直腸癌に対する術前化学放射線療法は局所
制御に優れるものの遠隔転移再発のため，生存期
間延長への十分なエビデンスは得られていない¹⁾。
理論的には補助化学療法による強力な systemic
control が予後改善に期待されるが，術前術後の
至適スケジュールはいまだ確立されていない。従っ
て，化学放射線療法を用いても予後不良な患者を
選別できる標的分子マーカーが存在すれば，分子
標的治療薬を応用することで，生存期間の延長が
期待できる。今回癌幹細胞マーカー CD 133 なら
びに幹細胞の転写因子である OCT 4，SOX 2 の
発現を検討し，直腸癌術前化学放射線療法後の術
後遠隔再発との関連を検討した。

対象及び方法：術前化学放射線療法を施行した
Stage II/III 直腸癌 40 例を対象とした。抗癌剤
はフッ化ピリミジン製剤とし，放射線治療効果は
大腸癌取扱規約に従った。治療前生検および
micro-dissection 法による切除標本の遺残癌組織
における CD 133，OCT 4，SOX 2 の発現を real
time PCR にて定量，臨床病理学的因子と検討を
行った。また免疫組織学的検討によるそれぞれの
発現 pattern を検討した。

結果：観察期間の中央値は 41 カ月。局所再発 0
例，遠隔転移再発 6 例であった。Grade 2 以上の
responder は 32.5%に認められたが，一次効果と

再発には相関はなかった。CD 133，SOX 2，
OCT 4 発現の検討では放射線量が多い群で発現
が高く（図 1），CD 133 と OCT 4，SOX 2 とそ
れぞれ有意に相関を認めた（図 2）。免疫染色で
は，CK 20 に染色されない管腔形成をしている上
皮に CD 133 が染色され，その周囲を腺管状に取
り巻くように SOX 2，OCT 4 が染色された（図
3，4）。術後再発と CD 133，SOX 2，OCT 4 発
現の検討では，有意に再発群で CD 133，SOX 2，
OCT 4 が高く（図 5），CD 133，SOX 2，OCT 4
発現高値群とともに Disease free survival が有
意に短かった（図 6）。術後再発を既定する因子
は pN，SOX 2 発現高値であり，多変量解析では
SOX 2 発現高値が独立因子であった（表 1）。

考察：化学放射線治療後の遺残癌には治療抵抗性
の癌幹細胞の発現が高くなり，CD 133，SOX 2，
OCT 4，CK 20 の免疫組織学的検討では，CK 20
の発現を認めない細胞に CD 133 が発現し，以前
の報告に同様に sphere の如く SOX 2，OCT 4
細胞が発現しており^{2, 3)}，未分化で腫瘍形成能を
維持した細胞の存在が術後遠隔再発を規定してい
ることが推測された。

文献：

- 1) Colorectal Cancer Collaborative Group.
Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a
systematic overview of 8,507 patients from
22 randomised trials. *Lancet*. 358: 1291-1304
(2001)
- 2) Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E,
Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria
R. Identification and expansion of human
colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 445
111-115 (2007)
- 3) Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H,
Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M.
Characterization of a side population of
cancer cells from human gastrointestinal
system. *Stem Cells*. 24: 506-513 (2006)

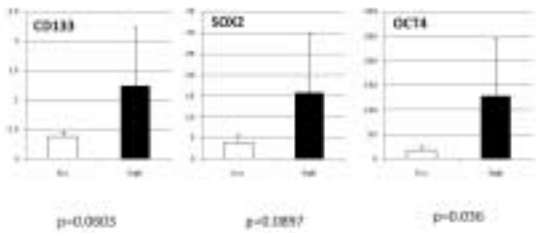


图 1

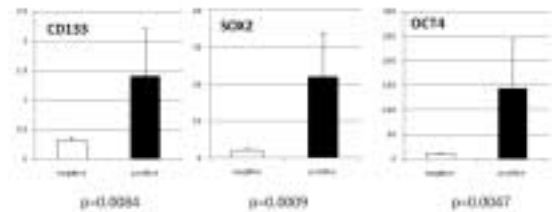


图 5

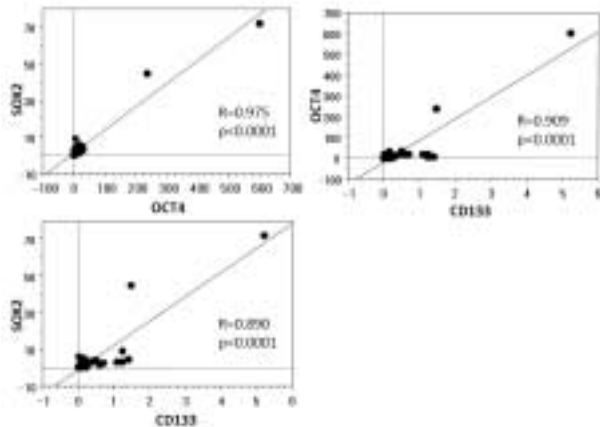


图 2

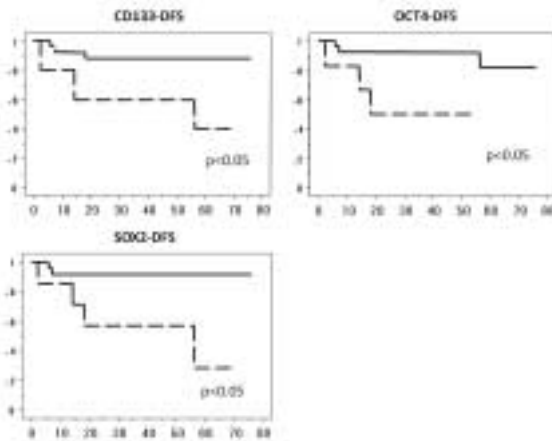


图 6

表 1

Uni- and Multivariate analysis for predictors of tumor recurrence after chemoradiotherapy followed by surgery

Univariate			
Variables	HR	95%CI	p-value
T classification in resected sample (T3-4 vs T1-2)	5.7719	0.4507 to 1.0003	0.7378
Lymph node metastasis in resected sample (yes vs no)	6	1.3208 to 53.8504	0.0091
Radiation effect (postoperative vs nonoperative)	0.0004	0.1388 to 3.8802	0.8146
CD133 gene expression (cut-off vs not-cut-off)*1	0.2900	0.0448 to 32.8383	0.8816
OCT4 gene expression (cut-off vs not-cut-off)*2	0.4000	1.3007 to 20.8817	0.0488
SOX2 gene expression (cut-off vs not-cut-off)*3	0.0800	1.8008 to 53.8504	0.01
Multivariate			
Lymph node metastasis in resected sample (yes vs no)	25.8171	1.5725 to 351.7040	0.0494
SOX2 gene expression (cut-off vs not-cut-off)	25.8175	1.3818 to 460.7760	0.0274

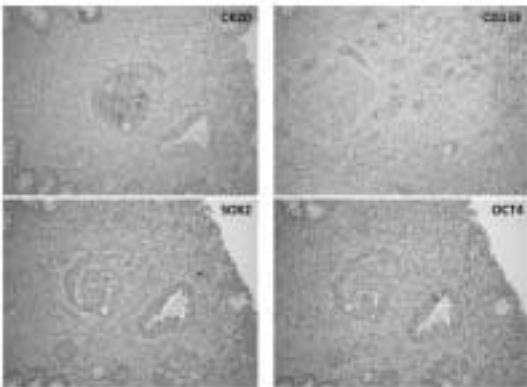


图 3

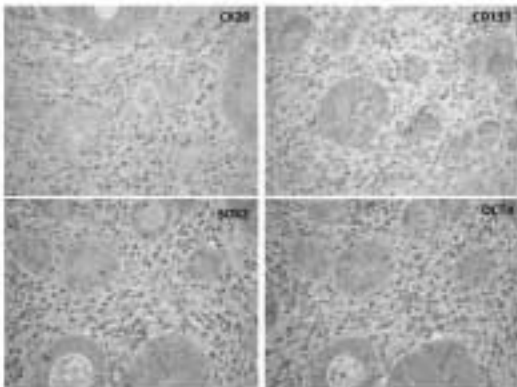


图 4