

平成21年度医学部新研究プロジェクト研究成果報告

区分：A

- | | |
|---|-------|
| 1. ギャップ結合を介した内皮細胞間相互作用による炎症調節機構の解明 | 岡本 貴行 |
| 2. バルプロ酸胎内曝露動物における
血圧調節の神経回路発達と圧受容器反射の成熟 | 太城 康良 |
| 3. P型電位依存性カルシウムコンディショナル
ノックダウンマウスを用いたてんかん分子病態の解析 | 山村 哲史 |
| 4. ヒト冬眠タンパク質 HP のクローニングおよびその生理活性 | 藤田 聡 |
| 5. ヒト嗅細胞における嗅覚情報伝達機構の解明 | 西田 幸平 |
| 6. 肝温虚血再灌流障害における脾臓の役割
～未知なる臓器, 脾臓の知られざる機能～ | 加藤 宏之 |
| 7. モデル動物を用いた自閉症発症機構の解明
～脳内セロトニン量に影響を及ぼす因子の探索 | 井村誉史雄 |
| 8. スフィンゴシン 1-リン酸は敗血症における
DICの血栓形成亢進の潜在因子である事の解明 | 安川 淳 |
| 9. 高密度オリゴヌクレオチドアレイによる肝癌特異遺伝子の探索 | 田中淳一郎 |
| 10. 四日市公害患者の予後に及ぼす認定時検査成績等の影響 | 郭 鵬 |
| 11. TAFI/ApoE ダブルノックアウトマウスにおける
糖尿病性腎症の発症機構の解析 | 松本 和隆 |
| 12. 塩酸コカインの嗅細胞への影響：
嗅覚情報処理の基礎とコカインの安全性検討 | 玉利 健悟 |
| 13. 2光子レーザー顕微鏡を用いた
レーザー障害性血栓モデルの作成と抗血栓薬による評価 | 小池 勇樹 |
| 14. 脳灌流低下による微小循環不全に対する
トロンボモデュリンの血流改善効果 | 新堂 晃大 |

区分：B

- | | |
|--|-------|
| 1. 肝疾患特異ペプチドの糖鎖プロファイリングによる
新規バイオマーカーの探索 | 山本 憲彦 |
| 2. 休止期にある急性リンパ性白血病幹細胞に対する有効な治療開発 | 木平健太郎 |
| 3. 臍帯血移植におけるNKレセプターLy-49ファミリーの役割について | 天野敬史郎 |
| 4. 頸動脈ステント留置術に伴う脳梗塞合併症の予防に関する研究 | 濱田 和秀 |
| 5. 局所進行膵癌に対する、術前放射線化学療法による
宿主腫瘍免疫動態の変化 | 水野 修吾 |

区分：A

新研究プロジェクト報告書

ギャップ結合を介した内皮細胞間相互作用による炎症調節機構の解明

岡本 貴行

三重大学大学院医学系研究科
病態解明医学講座 分子病態学

【目的】

動静脈血栓症，心筋梗塞，脳梗塞など血栓性疾患の基盤には，慢性的な炎症と血液凝固の活性化を伴う血管内皮機能障害が存在する．血栓性疾患の克服には，血管内皮機能を制御する分子機構の解明が必要である．最近，細胞間ギャップ結合（GJ）の異常が不整脈，動脈硬化，高血圧の発症に関与することが報告された．本研究では内皮細胞での血液凝固や炎症の活性化におけるGJの役割を解明するため，炎症と血液凝固亢進時のGJ関連蛋白質の発現動態，GJを阻害した内皮細胞での炎症と凝固能の変化の解析を行った．

【方法】

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVECs）に腫瘍壊死因子（TNF- α ）刺激を加え，HUVECsにおけるコネキシン（Cx）32，Cx43 mRNA と蛋白質の発現量を Western blot 法で解析した．内皮細胞間GJの機能は蛍光色素のカルセインで染色したHUVECsと非染色HUVECsを共培養し，非染色細胞への色素の移行を指標に評価した．抗Cx32抗体処理してGJを阻害したHUVECsにTNF- α 刺激を加え，培養上清中のIL-6，単球走化性因子（MCP）-1の分泌量をELISA法で，mRNAの発現をReal time PCR法で解析した．

【結果】

TNF- α 刺激によりHUVECsのCx32蛋白質の発現量が減少することを明らかにした．また，TNF- α 刺激はHUVECs間のGJを介した細胞間相互作用を抑制した．コントロール抗体処理したHUVECsと比較して，抗Cx32抗体処理したHUVECsのIL-6とMCP-1蛋白，mRNAの発現量は未刺激時には差は認められなかったが，TNF- α 刺激時では，抗Cx32抗体処理したHUVECsではIL-6とMCP-1蛋白，mRNAの発現量は有意に増加した．

【結論】

Cx32を介した内皮細胞間相互作用は，炎症の活性化を制御，調節している可能性が示唆された．

新研究プロジェクト報告書

バルプロ酸胎内曝露動物における血圧調節の神経回路発達と圧受容器反射の成熟

太城 康良

三重大学大学院医学系研究科
発生再生医学分野

【背景】抗てんかん薬として知られるバルプロ酸（Valproic acid; VPA）は神経系の催奇物質でもある．先行研究において，VPAがマウス胎仔の脳神経の形態形成に影響することが，全胚培養系における曝露実験により報告されている．しかし，妊婦のVPA服用による胎児への影響を評価するためには，経胎盤的な曝露条件が望ましい．本研究では，血圧調節に関わる情報を伝達する舌咽神経・迷走神経も含め，脳神経の形態形成が経胎盤的なVPAの曝露によって影響を受け始める時期の特定を目的とした．

【方法】Wistarラット，プラグ確認日を胎齢（E）0.5とした．VPAの投与はE8，E9，E10またはE11にVPA（800 mg/kg）を1回経口投与した．E13で摘出された胎仔は，固定後，全胚でニューロフィラメントに対する免疫染色を行い，2H3モノクローナル抗体（Hybridoma Bank）とHRP結合の二次抗体を用いて，DABで神経線維を可視化した．

【結果】対照群と比較して，E9以降のVPA投与群では，三叉神経の免疫染色性の低下，顔面神経の脱束化，舌咽神経および迷走神経の免疫染色性の低下が観察された．動眼神経および副神経への影響はほとんど観察されなかった．

【結論】経胎盤的なVPAの曝露によりラット脳神経（三叉神経，顔面神経，舌咽神経，迷走神経）の形態形成に影響を受ける時期は，E9以降で，E10以降でより顕著なることが示唆された．舌咽神経と迷走神経の免疫染色性の低下は，細胞体数および軸索数の減少に起因するものと考えられる．このように，圧受容器反射などの血圧調節の生理的機能に影響を与えうる神経形態および発達

の遅延が確認された。

以上の研究成果は以下のように公表された。

- [1] 太城康良, 大藪明子, 井村誉史雄, 内田敦子, 成田正明 (2010) バルプロ酸曝露ラットにおける脳神経の形態発達 解剖学雑誌 Vol. 85 No. 2 P 72
- [2] 太城康良, 大藪明子, 井村誉史雄, 内田敦子, 成田正明 (2010) バルプロ酸曝露ラットにおける脳神経の初期発達 第 115 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 (岩手県・盛岡市)

新研究プロジェクト報告書

P 型電位依存性カルシウムコンディショナルノックダウンマウスを用いたてんかん分子病態の解析

山村 哲史

三重大学大学院医学研究科生命医科学専攻
神経感覚医学講座精神神経科学分野

【緒言】

P 型電位依存性カルシウムチャンネル (PVSCC) コンディショナルノックダウンマウス (P-CKO) を用い, PVSCC 機能低下が皮質非定型欠伸てんかん (AAE) 病態に関与する可能性を提示し, 同時に抗てんかん薬 carbamazepine (CBZ) による AAE 増悪を証明した. 加えて, P-CKO の情報伝達系機能変異と CBZ の薬力学特性を解析した.

【材料・方法】

8 週齢の雄性 P-CKO と C 57 BL/6 (B 6) マウス前頭葉にプローブを挿入し microdialysis を用い L-glutamate (L-Glu), GABA, D-serine (D-ser) を回収し, xLC を用い濃度定量した. 基礎遊離およびカリウム刺激性遊離に対する, glia-toxin fluorocitrate (FLC), N 型 VSCC 阻害薬 ω -conotoxin GVIA (GVIA), PVSCC 阻害薬 ω -agatoxin IVA (IVA), CBZ の効果を P-CKO と B 6 で比較検討した.

【結果】

カリウム刺激性遊離の早期相は VSCC 阻害薬感受性が高く, 後期相は FLC 感受性が高く, VSCC 阻害薬感受性は GABA > L-Glu > D-Ser

で FLC 感受性は D-Ser > L-Glu > GABA であった. P-CKO は B 6 よりも FLC 感受性伝達成分が増加し, 加えて P-CKO の GVIA 感受性は亢進し, IVA 感受性は低下していた. CBZ は VSCC および FLC 感受性伝達の両成分を抑制していた. 特に, P-CKO の FLC 感受性 GABA 遊離は, B 6 よりも有意に抑制されていた.

【考察】

P-CKO の前頭葉伝達は PVSCC 機能低下に伴い, NVSCC 感受性伝達と FLC 感受性伝達 (gliotransmission) が増強していたが, CBZ はこの両伝達機能を抑制することで, 抑制性 GABA 伝達機能を興奮性 L-Glu・D-ser よりも有意に低下させることで, 相対的抑制性伝達機能低下をもたらした結果, P-CKO の AAE を増悪させたものと考えられた.

新研究プロジェクト報告書

ヒト冬眠タンパク質 HP のクローニングおよびその生理活性

藤田 聡

三重大学大学院医学系研究科
病態制御医学講座 循環器腎臓内科学

冬眠タンパク質 (Hibernation-specific protein; HP) は 1992 年にシマリスから発見された肝臓で産生され血中を流れる冬眠ホルモンである. 低体温での代謝の制御や免疫反応の賦活化など, あたかも同じ C1q ファミリーに属するアディポネクチンや補体 C1q 様の作用を有する. これまでシマリスでしか発見されていなかったが, ここ 2, 3 年でウシやヒトでも HP 様タンパク質の cDNA が存在する可能性があることがジーンバンクに報告された. そこで我々はウシおよびヒト HP をクローニングし, その生理活性を同定することを目的として研究を行った.

まず我々は HP20 様タンパク質の cDNA をウシの肝臓からクローニングし, ジーンバンクのデータが正しいことを確認した. Northern Blotting を行いウシの各臓器での発現を確認したところ, 肝臓で特異的に発現を認めた. 得られた cDNA を Bac-to-Bac ベクターに導入し, バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いた組換えタンパクの

精製に成功した。しかし、組換えタンパクの大量・分離精製には至っておらず、単離できしだい内皮細胞、筋細胞に精製した HP を加え、シグナル伝達分子の変化や各細胞の増殖能を含めた細胞機能を検討する予定である。さらにウシ HP20 をバイトにして yeast two hybrid 法により、HP20 の受容体および結合タンパク質を同定する予定である。

次いで我々はヒト肝臓組織から RT-PCR を用いこの遺伝子の cDNA の一部をクローニングすることに成功した。Marathon-ready human liver cDNA Library を用い、3' および 5' RACE の手法により cDNA 全長のクローニングを試み、約 250 bp の cDNA 断片がクローニングされたが、全長クローニングには至らなかった。そこで human liver Uni-ZAP XR Library を用い、得られた cDNA 断片をプローブとしてプラークハイブリダイゼーションによる目的遺伝子のクローニングを試みたが、目的遺伝子の検出には至らなかった。今後ウシ HP が単離できしだい抗体作製を行い、実際このタンパク質がヒトの血液を循環しているかどうかを検討していく予定である。

新研究プロジェクト報告書

ヒト嗅細胞における嗅覚情報伝達機構の解明

西田 幸平

三重大学医学部附属病院
耳鼻咽喉科・頭頸部外科

【目的】

ホールセルパッチクランプ法を用いた電気生理学的実験により、イモリおよびヒト嗅細胞における嗅覚情報伝達機構を分子レベルで解明する。その上で、嗅細胞が嗅覚障害の原因と考えられている物理的、化学的变化に対して、どのように影響を受けるかを確認し、嗅覚障害の原因メカニズムを明らかにすることが目的である。

【対象】

ヒトおよびアカハライモリの嗅粘膜細胞を対象とした。

【方法】

アカハライモリ嗅球および当院耳鼻咽喉・頭頸部外科の、鼻内手術施行患者より、術中に採取し

た嗅粘膜組織を薬品処理して細胞を単離した。ヒトおよび、イモリの嗅粘膜組織に嗅細胞が含まれることは嗅細胞の特異的マーカーである Anti Olfactory Marker Protein (OMP 抗体) Goat, と Alexa Fluor 488 rabbit anti-goat IgG で染色を別途行った。

実験には形態学的に嗅細胞と考えられるデンドライトがあり、楕円、もしくは円錐状の細胞を使用した。使用した細胞に Lucifer yellow を注入して標識し、これを OMP 抗体で免疫染色して嗅細胞であることを免疫組織学的に確認した。

嗅粘膜細胞の膜電流はパッチクランプ法を用いて測定した。上記実験系において、鼻内手術の局所麻酔薬として広く使用されている塩酸コカインを還流して嗅細胞が受ける影響を調べた。

【結果】

採取したヒトおよびイモリの嗅粘膜組織中に OMP 抗体で染色される細胞を認めた。

実験で用いたヒトおよびイモリの細胞に、Lucifer yellow と OMP 抗体双方で染色される細胞を認めた。

ホールセルとなったヒト嗅粘膜細胞で、 -100 mV から $+20$ mV まで脱分極したときの電流解析を行った結果、内向き電流を示す細胞が認められた。

嗅粘膜細胞に対する塩酸コカインの曝露では、イモリにおいては内向き電流、外向き電流が一時的に抑制された。

【展望と課題】

ヒト嗅細胞に対するパッチクランプ法において、ホールセルの作製がイモリの嗅細胞に比べて困難である。ヒト嗅細胞におけるパッチクランプ法を安定して行う方法を確認する必要がある。また、電気記録した細胞に OMP 染色法を施し、細胞同定を確実なものとする。今後、タバコの煙の成分や臭い物質を用いて嗅細胞を刺激し、それによる嗅細胞の膜電流の変化を調べることにより影響を調べていきたい。

新研究プロジェクト報告書

肝温虚血再灌流障害における脾臓の役割
～未知なる臓器，脾臓の知られざる機能～

加藤 宏之
三重大学大学院医学系研究科
肝胆膵・移植外科学

虚血再灌流障害は肝臓外科にいてしばしば問題となる病態であるが，その発症機序については未だ明らかでない。近年，脾臓摘出が肝虚血再灌流障害を軽減させるという報告があるがその機序と意義については不明である^{1) 2)}。本研究は肝虚血再灌流時における未だ解明されていない脾臓の機能を明らかにし，脾臓摘出がなぜ肝障害を軽減させるかを，免疫学的アプローチを用いて解決することを目的としている。

【対象と方法】

14週齢（250～300g）Wistar rat に90分間の70%の温虚血再灌流障害のみを加えた群（IRI alone 群）と70% IRI 前に脾摘を行った群（SPN+IRI 群）を作製し，再灌流後6時間（6h）と24時間（24h）に血液と肝臓，脾臓を採取し検討した。

【結果】

6hにおけるIRI alone 群とSPN+IRI alone 群の比較では，SPN+IRI 群はIRI alone 群に比しGPTの有意な改善を認めた（8997±5338 IU/l vs. 32988±8997 IU/l, $P<0.01$ ）。組織学的にもIRI alone 群は著明な肝細胞壊死と類洞内のうっ血を認めたが，SPN+IRI 群では有意に改善されていた。炎症細胞浸潤マーカーである肝臓でのMPO活性（6h）もSPN+IRI 群は著しく低下していた（6h: 1.27 ± 0.88 vs. 31.9 ± 15.6 , $p<0.01$ ）が，障害肝へ浸潤細胞はマクロファージのみが優位に抑制されていた（6h: 2.2 ± 1.6 /HPF vs. 8.0 ± 2.4 /HPF, $p<0.01$ 24h: 2.16 ± 1.48 /HPF vs. 24.8 ± 16.8 /HPF, $p<0.05$ ）。さらにSPN+IRI 群の肝組織においてTh-2系抗炎症性サイトカインマーカーであるIL-10のmRNAがIRI alone 群に比し著増しており，また門脈中のIL-10濃度も上昇していた（6h: 157 ± 173 pg/ml vs. 37.1 ± 22.2 pg/ml, $p<0.05$ ）。一方IRI alone 群では，Th1系サイトカインでマクロファージ活性化因子であるIL-2の門脈中濃度が著増し，

脾臓でIL-2のmRNAの発現が亢進していた。

【結語】

肝臓が虚血され再度灌流されると脾臓がTh1優位の免疫応答し，肝臓におけるマクロファージを活性化し臓器障害を引き起こしていると考えられた。虚血前に脾摘を行うことによりこのTh1誘導免疫応答が脾臓で引き起こされず結果として肝臓内はTh2優位となりマクロファージの活性化が抑制され，臓器障害が軽減されると考えられた。

【参考文献】

- 1) Jiang H, Meng. F, Li. W et al. Splenectomy ameliorates acute multiple organ damage induced by liver warm ischemia reperfusion in rats. *Surgery*. 141: 32-40 (2007)
- 2) Okuaki Y, Miyazaki H, Zeniya M, et al. Splenectomy reduced hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in the rat. *Liver*. 16: 188-94 (1996)

新研究プロジェクト報告書

モデル動物を用いた自閉症発症機構の解明
～脳内セロトニン量に影響を及ぼす因子の探索

井村 誉史雄
三重大学大学院医学系研究科
発生再生医学

自閉症は対人関係の障害やコミュニケーション能力の低下を伴う先天性の発達障害であるが，早期に診断を確定し適切な療育を行えば，症状の軽減がみられることがわかってきている。しかし現時点では科学的根拠に基づいた診断方法が確立されていない。そこで我々の研究室では，妊婦が妊娠20-24日の間にサリドマイドやバルプロ酸を服用した時，自閉症児が誕生する確立が高いという疫学的事実をラットで再現させ¹⁾，その自閉症モデル動物2種と対照動物群（コントロール群）の間で発現が異なる遺伝子を比較し，診断基準となるバイオマーカーを探索することを試みた。モデル動物群とコントロール群の生後14日齢の前頭葉皮質からmRNAを抽出し，DNAマイクロアレイを行った結果，コントロール群に対し，両モデル動物群で優位に上昇が認められた遺伝子が53個，

また両モデル動物で優位に減少が認められた遺伝子が31個存在した。それらの中から、神経細胞の分化やミエリン形成を促し、発達障害との関連²⁾が報告されている v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ErbB2) に着目し、生体内で ErbB2 とヘテロダイマーを形成する EGFR, ErbB3, ErbB4 遺伝子も含めて、両群間における発現量の差をリアルタイム PCR で確認した。その結果、サリドマイド投与による自閉症モデルラットでは ErbB2 に加え EGFR, ErbB3 の発現量もコントロール群に対して有意に増加していることがわかった。一方バルプロ酸投与による自閉症モデルラットでは、EGFR, ErbB2 の発現量が有意に増加し、ErbB3, ErbB4 の発現量は減少していた。これらの結果から、ニューレグリン等をリガンドとする ErbB 受容体の発現量の変化が、自閉症診断の遺伝子マーカーとして使用できる可能性が示唆された。

- (1) Narita N, Kato M, Tazoe M, Miyazaki K, Narita M, Okado N. Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rat: putative animal models for autism. *Pediatr Res.* **52**: 576-579 (2002)
- (2) Barros CS, Calabrese B, Chamero P, Roberts AJ, Korzus E, Lloyd K, Stowers L, Mayford M, Halpain S, Müller U. Impaired maturation of dendritic spines without disorganization of cortical cell layers in mice lacking NRG1/ErbB signaling in the central nervous system. *PNAS.* **106**: 4507-4512 (2009)

新研究プロジェクト報告書

スフィンゴシン 1-リン酸は敗血症における DIC の血栓形成亢進の潜在因子である事の解明

安川 淳

三重大学大学院医学系研究科
病態解明医学講座 免疫学分野

【目的】我々は、活性化血小板から放出された Sph-1-P が TNF- α による血管内皮細胞の組織因子 (TF) 発現を劇的に増幅することで、局所での炎症増大に関与することを見出している。本研究では、Sph-1-P による TF 発現増幅機構の解析を行った。

【方法】ヒト臍帯静脈血管内皮細胞における TF 発現レベルはイムノアッセイにより、転写因子はゲルシフトアッセイおよび RT-PCR 法により解析した。

【結果】Sph-1-P による TF 発現増幅効果は、TNF- α だけでなく IL-1 β および LPS によっても誘導され、Sph-1-P 受容体 (S1P1 および S1P3) の阻害剤および MEK 阻害剤により強く抑制され、一方 JNK 阻害剤では Sph-1-P だけでなく TNF- α による TF 発現までも強く阻害された。また、転写因子について NF- κ B, Egr-1 および c-Fos の関与が示唆された。

【考察】Sph-1-P は TNF- α とは異なる MAPK 経路 (MEK-ERK 経路) を活性化し、一方 TNF- α は p38 および JNK 活性化に繋がる MAPK 経路を強く活性化することが考えられる。NF- κ B 活性化増幅メカニズムが未解明であるが、Sph-1-P および TNF- α に誘導されるこれらのシグナルはそれぞれどこかでクロストークしており、最終的な転写因子の発現や活性化が増幅されていることから、幾つかの未解明なシグナルの関与が十分に考えられる。今後の課題として、敗血症モデルマウスを用いて、その病態発現に Sph-1-P が重要である事を in vivo で示したいと考えている。

【結語】Sph-1-P は S1P 受容体から MEK および JNK, 転写因子 (NF- κ B, Egr-1 および c-Fos) の活性化または発現増幅を介して TNF- α による TF 発現を劇的に増幅することが示唆された。

文献

- 1) Anliker B, Chun J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* **279**: 20555-20558 (2004)
- 2) Hanel P, Andreani P, Graler MH. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *Faseb J.* **21**: 1202-1209 (2007)
- 3) Ito K, Anada Y, Tani M, Ikeda M, Sano T, Kihara A, Igarashi Y. Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **357**: 212-217 (2007)
- 4) Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, Camerer E,

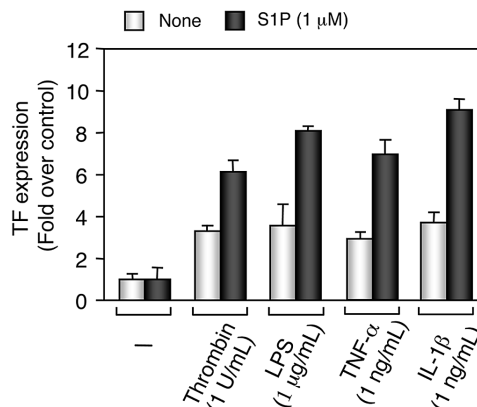


Fig. 1 Sph-1-P は HUVEC おいて様々な炎症性因子に誘導される TF 発現を相乗的に増幅する
HUVEC を Sph-1-P 存在又は非存在下でトロンビン、LPS、TNF- α および IL-1 β で 4 時間刺激後、イムノアッセイにて TF タンパク質の発現レベルを評価した。

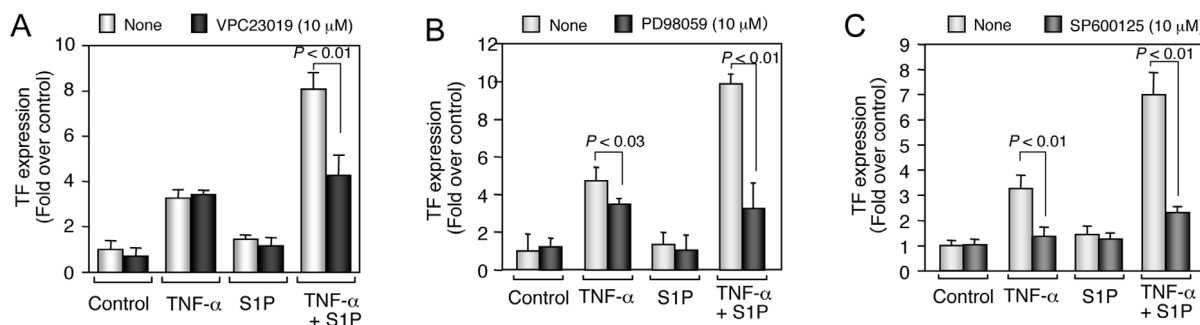


Fig. 2 S1P による TF 発現増幅効果に対する S1P 受容体、MEK または JNK 阻害剤による異なる阻害効果

S1P 受容体、MAPK 系に属する MEK または JNK に対する阻害剤をそれぞれ HUVEC に 30 分間前処理した後、1 ng/mL TNF- α および 1 μ M S1P それぞれ単独または同時刺激 4 時間による TF タンパク質発現量についてイムノアッセイにより評価した。(A) S1P1 および S1P3 に対するアンタゴニスト、(B) MEK 阻害剤 PD 98059、(C) JNK 阻害剤 SP600125 による TF 発現誘導に対する影響を示した。

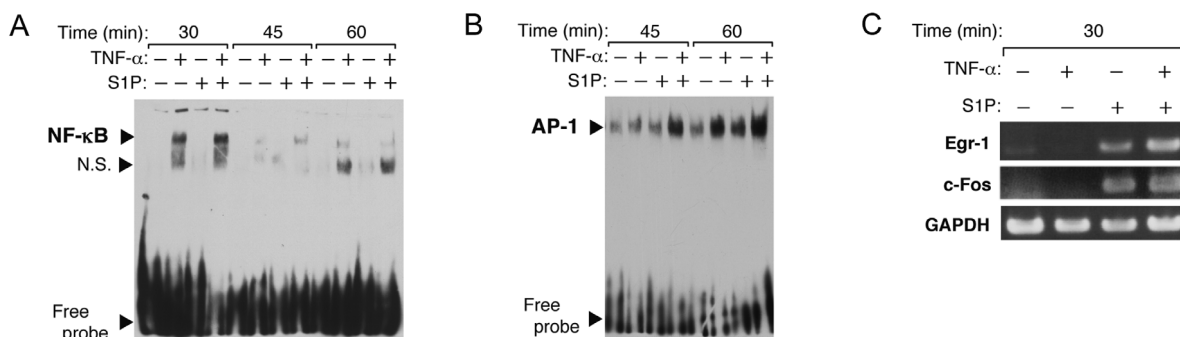


Fig. 3 Sph-1-P は TNF- α による転写因子 (NF- κ B, AP-1, Egr-1) の活性化または発現を増幅する
TF 遺伝子上流のプロモータ領域において TF 発現誘導に関わる重要な転写因子 NF- κ B, AP-1 および Egr-1 結合サイトが存在する。S1P (2 μ M) および TNF- α (1 ng/mL) にてそれぞれ単独または同時に各時間刺激した HUVEC から核タンパク質を抽出し、その中の転写因子 NF- κ B (A), AP-1 (B) の活性化についてゲルシフトアッセイにより評価した。さらに、HUVEC から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により転写因子 Egr-1 と c-Fos (AP-1 の構成タンパク質) の mRNA 発現量を検討した (C)。

- Zheng YW, Huang Y, Cyster JG, Coughlin SR. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science*. **316**: 295-298 (2007)
- 5) Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest*. **106**: 951-961 (2000)
- 6) Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood*. **102**: 3665-3667 (2003)
- 7) Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol*. **25**: 11113-11121 (2005)
- 8) Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR, English D. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest*. **108**: 689-701 (2001)
- 9) Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*. **99**: 301-312 (1999)
- 10) Igarashi J, Michel T. S1P and eNOS regulation. *Biochim Biophys Acta*. **1781**: 489-495. S 1388-1981 (2008)
- 11) Takeya H, Gabazza EC, Aoki S, Ueno H, Suzuki K. Synergistic effect of sphingosine 1-phosphate on thrombin-induced tissue factor expression in endothelial cells. *Blood*. **102**: 1693-1700 (2003)
- 12) Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med*. **355**: 1699-1713 (2006)
- 13) Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*. **83**: 536-545 (2008)
- 14) Okajima K. Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. *Immunol Rev*. **184**: 258-274 (2001)
- 15) Niessen F, Schaffner F, Furlan-Freguia C, Pawlinski R, Bhattacharjee G, Chun J, Derian CK, Andrade-Gordon P, Rosen H, Ruf W. Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature*. **452**: 654-658 (2008)
- 16) Liu Y, Pelekanakis K, Woolkalis MJ. Thrombin and tumor necrosis factor alpha synergistically stimulate tissue factor expression in human endothelial cells: regulation through c-Fos and c-Jun. *J Biol Chem*. **279**: 36142-36147 (2004)
- 17) Hezi-Yamit A, Wong PW, Bien-Ly N, Komuves LG, Prasad KS, Phillips DR, Sinha U. Synergistic induction of tissue factor by coagulation factor Xa and TNF: evidence for involvement of negative regulatory signaling cascades. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**: 12077-12082 (2005)

新研究プロジェクト報告書

高密度オリゴヌクレオチドアレイによる肝癌特異遺伝子の探索

田中淳一郎

三重大学医学部附属病院

消化器・肝臓内科

今回我々は遺伝子発現プロファイル解析を行うことにより、正常肝、慢性肝炎・肝硬変から肝細胞がん にいたる病態進行における遺伝子発現の変動を明らかにし、これにより疾患関連パスウェイを推定し、発症の key となる因子を同定することを目的に以下の研究を行った。【方法】正常肝組織 15 例、肝細胞癌患者の非癌部と癌部それぞれ 15 例を用いた。DNA コピー数はアフィメトリクス社の Mapping Array を用いて、解析は CNAG を用いた。遺伝子発現頻度解析では、同

様にアフィメトリクス社の Gene Chip を用いて、Gene Spring により解析した。これらの結果より標的遺伝子の mRNA 発現を定量 RT-PCR 解析で確認し、さらに抗体を作製したタンパク質での発現をウェスタンブロットで検討した。【結果】①正常肝組織 15 例、肝細胞癌の癌部、非癌部組織 15 例を用いて高密度オリゴヌクレオチドアレイによる DNA コピー数異常と遺伝子発現頻度解析を行った結果、新たな増幅領域 13q 19p を見出した。②正常肝、非癌部と癌部において、DNA コピー数異常と遺伝子発現頻度解析の結果を比較することにより、8q と 13q における肝がん関連候補遺伝子として膜タンパク CTHRC1 と転写因子 Zic2 など 10 近い新規がん関連遺伝子候補を見出した。③定量的 RT-PCR によりこれらの遺伝子の mRNA が肝癌組織内において過剰発現していることが確認された。また、その発現パターンは、Zic2-mRNA は正常肝、肝癌患者の非癌部では発現の増強は認めず、肝癌組織のみで過剰発現が認められた。CTHRC1-mRNA は正常肝、肝癌患者の非癌部、肝癌組織と段階的に発現の増強が認められた。④CTHRC1 に対するポリクローナル抗体を作製し、ウェスタンブロットにより HepG2 において CTHRC1 が発現していることを確認した。【考察・結語】今回検討した遺伝子の肝癌発症、進展における DNA コピー数、遺伝子発現異常の報告はなく、新規肝癌遺伝子である可能性が示唆される。癌化への関与に関して更なる検討を行っている。

新研究プロジェクト報告書

四日市公害患者の予後に及ぼす認定時検査成績等の影響

郭 鵬¹、横山和仁²

¹ 三重大学大学院医学系研究科
公衆衛生・産業医学分野

² 順天堂大学医学部衛生学講座

【緒言】

四日市では、1960 年代から 70 年代に渡って大気汚染による健康被害が重大な社会問題となった。その後、公害健康被害補償法が実施された。亜硫酸ガスの排出量によって企業より従量制の金額を

徴金するシステムが実施され、1970 年代以降大気汚染は大きく改善した。大気汚染解消後は、気管支喘息と肺気腫による死亡率は急激に減少し、1980 年代初めには四日市喘息問題は終息したとされる¹⁾。しかし、公害により呼吸機能が障害された患者にとっては大気が浄化されても喘息症状は消失し難い。今回の研究では、肺機能や症状および生活習慣などの患者の予後への影響を明らかにする。

【方法】

分析は多変量コックス回帰分析を用いた。

【結果】

男性が年齢、一秒率、観察終了時の喫煙および咳と痰、女性が年齢、BMI、一秒率および観察終了時の喫煙が予後に影響した。

【考察】

本研究では、年齢と喫煙および FEV₁% は男性と女性の死亡に影響することを示した。咳と痰は男性の生存に影響したが、女性は BMI の影響を受けた。

本研究では、死亡率は年齢の影響を受けた。これは、観察開始時の男性と女性の年齢が高かったと考えられる。喫煙は他の研究²⁾と一致して本研究の男性と女性の死亡に影響していた。FEV₁% の低下は COPD 患者の死亡の危険性を増加した²⁾。本研究において、FEV₁% が死亡率と有意な関係のあることが男性と女性で観察された。ラングラ³⁾が慢性粘液分泌過多は男性 COPD 患者の死亡に影響があったと報告した。女性は咳と痰の影響がないに対し、性差に関する更なる研究をする必要がある。本研究では COPD 患者が体重不足の原因で死亡が増加した。

大気汚染がすでに解決されたにもかかわらず、認定患者の肺機能や症状および喫煙は健康への影響があることが示唆された。

文献

- 1) 吉田克巳. 四日市公害—その教訓と 21 世紀への課題. 第 1 版. 200-202. 東京, 柏書房 (2002)
- 2) Ekberg-Aronsson M, Pehrsson K, Nilsson JA, Nilsson PM. Lofdahl CG Mortality in GOLD stages of COPD and its dependence on symptoms of chronic bronchitis. *Respiratory Research*. 6: 98-107 (2005)

- 3) Lange P, Nyboe J, Appleyard M, Jensen G, Schnohr P. Relation of ventilatory impairment and of chronic mucus hypersecretion to mortality from obstructive lung disease and from all causes. *Thorax*. 45: 579-585 (1990)

新研究プロジェクト報告書

TAFI/ApoE ダブルノックアウトマウスにおける糖尿病性腎症の発症機構の解析

松本和隆, 矢野 裕
三重大学医学部附属病院 糖尿病内分泌内科

【目的】

TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) は線溶抑制蛋白であり, 慢性腎炎モデルや急性腎障害モデルにおける腎障害が TAFI ノックアウト (KO) マウスでは抑制されることを報告してきた。一般的に糖尿病には脂質異常症が高率に合併しており, 両方ともに腎症の促進因子と考えられている。今回, ストレプトゾトシン (STZ) による高血糖と ApoE 欠損による脂質異常症の両者を有するマウスにおいて TAFI 欠損による糖尿病性腎症への影響を検討する。

【方法】

9-11 週齢の C57 BL/6 の野生型マウス (WT), TAFI KO マウス (TAFI KO), ApoE KO マウス (ApoE KO) TAFI/ApoE KO マウス (TAFI/ApoE KO) について, STZ を腹腔内に注射し血糖上昇確認 24 週後に腎臓を摘出し採血をおこなった。またそれぞれの群に STZ のかわりに生食を用いた群を作製し, 合計 8 群のマウスについて検討を行った。

【結果】

- ① 血糖については, WT 群, ApoE KO 群, TAFI/ApoE KO 群で生食群に比較して糖尿病群の方が約 3 倍, TAFI KO 群では約 2 倍の上昇が認められた。
- ② 総コレステロールについては, ApoE KO 群において, 生食群に比較して糖尿病群の方が, 約 1.5 倍の上昇を認めた。しかし他の群では有意差を認めなかった。
- ③ 血中 TAFI については, TAFI KO 群, ApoE/

TAFI KO 群ではすべて感度以下であった。ApoE KO 群において, 糖尿病群では生食群の約 5 倍の上昇が認められた。

- ④ TAFI が活性に関与する補体のひとつである C5a は, 各群で生食群, 糖尿病群ともに有意な変動は認められなかった。
- ⑤ 血中 Cr については, ApoE KO 群で WT 群に比較し, 生食群で約 4 倍, 糖尿病群で約 3 倍の上昇がみられたが, TAFI KO 群, ApoE/TAFI KO 群では上昇は認められなかった。
- ⑥ ApoE/TAFI KO 群の糖尿病群で腎腫瘍が 40% に認められたが他の群では 0% であった。

Cr について ApoE KO 群が最も悪化しているが, ApoE/TAFI KO 群で Cr の上昇が抑制された。これは糖及び脂質代謝異常による腎機能の低下について TAFI 欠損により保護的に作用していると考えられる。現在引き続き腎組織の検討や各成長因子, 細胞外マトリックスなどについて検討している。また, 腫瘍について病理学的検討を行うとともに他の臓器についての腫瘍の有無とその評価も同時に行いその機序の検討を行っている。

新研究プロジェクト報告書

塩酸コカインの嗅細胞への影響:

嗅覚情報処理の基礎とコカインの安全性検討

玉利 健悟
三重大学大学院医学系研究科
システム神経科学分野

【目的】

耳鼻科領域の鼻内手術では局所麻酔薬として塩酸コカインを用いるが, 鼻内に存在する嗅細胞への影響を調べた報告はほとんどない。本研究は現在同時進行中のヒト嗅細胞の機能解明に際して, 局所麻酔下で提供されたヒト組織が, 実験に使用出来るのかを検証すると共に, コカインによる嗅覚障害との関連性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

嗅細胞はアカハライモリの嗅粘膜から酵素処理で単離し, 倒立顕微鏡下で嗅細胞を確認した。膜電流の解析は Whole cell 記録の状態で行い, 電

極には K^+ solution を充填した。 Na^+ 電流の解析では K^+ 電流、 Ca^{2+} 電流をブロックするため、細胞外液を Ringer 液から K^+-Ca^{2+} blocking solution に変え、電極に Cs^+ solution を充填して電流記録を行った。塩酸コカインは膜電流の記録時 Ringer 液、 Na^+ 電流の記録時 K^+-Ca^{2+} blocking solution に溶かし、微小ガラス管から puff する方法と細胞外液が最終濃度 0.001 mM から 10 mM になるまで灌流する方法を用いた。

【結果】

電圧固定下で -100 mV から 40 mV まで脱分極パルスを与え、膜電流を記録し、塩酸コカインの作用を調べた。耳鼻科手術時に用いられる 5% の塩酸コカイン puff すると外向き電流、内向き電流が共に抑制された。また、1 mM 塩酸コカインを灌流しても、同様の結果が得られた。さらに、これらの抑制作用は塩酸コカインを washout すると完全に回復した ($n=10$)。

膜電流の内、 Na^+ 電流に対する塩酸コカインの影響を 0.001 mM から 10 mM まで変化させて調べた ($n=5$)。その結果、濃度依存的な抑制が見られ、1 mM でほぼ完全に抑制し、washout すると、即座にほぼ完全に回復した。 Na^+ 電流に対する塩酸コカインの IC_{50} は $42 \mu\text{M}$ であり、Hill 定数は 1.1 であった。

【展望と課題】

鼻内手術における塩酸コカインは、可逆的に嗅細胞の活動性を抑制すると考えられる。この事実は、局所麻酔下で提供されたヒト組織を用いた電流解析においては障害は少なく、また、迅速な回復が認められたことから、嗅覚障害との関連は少ないと考えられる。今後は他の電流に対する影響を調べると共に、におい応答に対する影響を明らかにすることで、塩酸コカインと嗅覚メカニズムの関係性をより詳細に解析する必要があると考えられる。

新研究プロジェクト報告書

2 光子レーザー顕微鏡を用いたレーザー障害性血栓モデルの作製と抗血栓薬による評価

小池 勇樹

三重大学大学院医学系研究科
消化管小児外科学講座

【目的】血栓症関連疾患の発生率・罹患率・死亡率は、現在の医療現場において非常に大きな位置を占めており、血栓症に関する研究は、数多くの該当疾患を包括したきわめて重要なものとなる。現在までに、血栓に関する研究は *in vitro* で主に行われてきたが、近年の目覚ましいテクノロジー分野での発達により、*in vivo* における研究が可能となってきている。しかし、血栓形成のメカニズムを詳細に分析・検討された研究は十分に成されていないのが現状である。数年前に海外で開発された Two-photon laser-scanning microscopy (TPLSM) は、個体が生きたままの状態でも、蛍光標識された組織内部の観察が可能であり、我々はこの TPLSM を用いて血栓形成・溶解のメカニズムを解明することが可能になると考え、今回の研究を計画した。

【研究方法】TPLSM を用いて、beta-actin-green fluorescent protein transgenic mouse (GFP mouse) に Laser induced thrombosis を形成し、その様子をリアルタイムに観察した。またマウスの右大腿静脈にカニューレーションを行い、これより抗血栓薬 (t-PA, Heparin) の投与を行った。

【結果】Photobleaching が少なく組織貫通性にすぐれた TPLSM の特徴により、動脈壁の血管平滑筋だけでなく、血管内皮層までをそれぞれ同定することが可能となった。この特徴を活かし、血管内皮層を選択的に Laser 照射することにより、これまでの血栓モデルでみられてきた血管壁の腫脹や膨化・狭窄・破綻等を全く伴わない、血管内皮障害性の血栓モデルが初めて作製可能となった。Laser 照射から約 5~10 分後において、血管障害部位に接触した血小板は、障害部位の下流端より Shear stress に打ち勝って、一時的に Straight-line formation を形成していた。さらに血栓形成が始まるに従って、血栓は障害部位の下流端より徐々に増大していく様子がリアルタイムな動画として、詳細に観察可能であった。この

ように作製された血栓に対し、Pretreatment / Early phase of thrombus formation / Late phase of thrombus formation の各グループにおいて、生食・ヘパリン・t-PA 各投与群での血栓形成抑制と血栓溶解の効果判定が可能であった。

【結語】今回作製されたレーザー障害性血栓モデルは、血管壁全体への影響が最小限に抑えられており、より信頼性の高い血栓形成と血栓溶解における解析が可能となった。今後、この血栓モデルを用いた新規抗凝固薬の効果判定等が、同一個体においてかつリアルタイムに解析可能と考えられた。

新研究プロジェクト報告書

脳灌流低下による微小循環不全に対するトロンボモデュリンの血流改善効果

新堂 晃大
三重大学大学院医学系研究科
神経病態内科学

【はじめに】

小血管病変に伴う慢性脳低灌流状態が subcortical vascular dementia の病態と考えられている。我々は動物実験の結果から慢性脳低灌流状態では白質軟化症類似の病態が形成されることを確認している。頸動脈狭窄病変による慢性脳灌流低下の血行動態に関しては、慢性に低下する病態上、不明な点が多い。今回、マウス慢性脳低灌流モデルを作製し、2光子励起レーザー顕微鏡(2PLSM)を用いて経時的に観察を行った。

【方法】

GFP-transgenic mouse (Green mouse) に頸動脈狭窄病変を作製した。総頸動脈に内径 0.18 mm のコイルを装着、または結紮して狭窄性病変を作製、左右の組み合わせで血流低下の程度をコントロールし、つぎの4群を作製した。A群：狭窄なし、B群：両側コイル装着、C群：左結紮(右狭窄なし)、D群：左結紮 右コイル装着。これらのモデルに対して2PLSM下では、白血球、血小板、内皮細胞はGFP陽性細胞として観察可能である。また、Tex Red 標識 Dextran を静脈内投与することにより、赤血球はTex Red 欠損影として確認が可能であり、この赤血球移動を

line scanning することによって流速の測定が可能である。A, B, C, D の各群で狭窄性病変作製後30分の流速測定、白血球のrollingとadhesionの程度を評価した。C群では、狭窄前、狭窄後30分、狭窄後3日、狭窄後1週間にvelocity測定、白血球のrollingとadhesionの程度を評価した。

【結果】

頸動脈狭窄病変を有する群では術直後から流速の低下を認め、流速低下のピークは3日目であった。また、慢性脳低灌流状態では血管壁を中心に白血球の著明なrollingとadhesionを認めた。

【考察】

急性脳虚血において、白血球のrollingやadhesionは2次障害に重要な役割を果たしていると考えられている。白血球のrollingやadhesionは血管内皮細胞上に発現するadhesion moleculeを介して起こると考えられているが、shear stressが低下しすぎると、これらのadhesion moleculeの発現が抑制されたとの報告もある。今回の実験ではrollingやadhesionが遷延性に持続していることが認められ、慢性脳低灌流状態における病態メカニズムとしてより深く関与していることが示唆された。

トロンボモデュリンは血管内皮に存在する抗凝固物質であり、トロンビン作用の抑制などから抗凝固作用を持つ。今後は、トロンボモデュリンを投与し、血流改善効果について確認を行っていく。

区分：B

新研究プロジェクト報告書

肝疾患特異ペプチドの糖鎖プロファイリングによる新規バイオマーカーの探索

山本 憲彦

三重大学医学部附属病院 消化器内科

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。

我々はこれまでに二次元液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) を組み合わせることにより、新規肝癌マーカーとして inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4) のペプチド断片を同定した。また、その後の検討により ITIH4 の 35 kD 断片が糖鎖構造の相違から 10 の variants に分離されることが明らかとなり、この variants を利用することで HCC 113 例、LC 100 例、慢性肝炎 102 例における検討で、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 とともに 100% の感度で分離可能であることを報告してきた。

ITIH4 は元来 120kD の蛋白であるが、カリクレインにより切断され 85kD と 35kD の蛋白が形成される。また、肝細胞内では IL-6~STAT3 への経路に影響を与えることで発癌に関与することが考えられる。我々は ITIH4 の癌マーカーとしての有用性のみならず、肝発癌と糖鎖修飾の関連を解析しようと試みている。そのため、HepG2 より RT-PCR により全長 (120kD)、85kD、35kD の ITIH4cDNA を作製し、これらをそれぞれ発現するプラスミドベクターを作製した。まず、各種細胞株で 35kD 蛋白を強制発現させ、糖鎖修飾が肝細胞癌特異的であるかどうかを確認したい。次には ShRNA による KO で細胞の増殖能、アポトーシス耐性への変化を解析したいと考えている。併行して癌マーカーとしての有用性を更に確立するため症例数の積み重ね、他の癌での発現確認も行っている。

新研究プロジェクト報告書

休止期にある急性リンパ性白血病幹細胞に対する有効な治療開発

木平健太郎

三重大学大学院医学系研究科
病態解明医学講座 小児科学分野
大学院博士課程 4 年次

(背景)

急性リンパ性白血病 (ALL) は、最も発生頻度が高い小児がんである。小児期 ALL に対する治療は、過去 40 年間で飛躍的に向上し、約 80% に長期生存が期待できるようになっている。しかし、依然、初期治療反応不良あるいは再発する一群が存在している。これらの治療抵抗性 ALL の実数は、急性骨髄性白血病や悪性リンパ腫の新規発症数より多く、かつ生命予後が極めて不良であることから、小児腫瘍学の領域では、新しい治療開発が望まれる疾患群となっている。

難治性 ALL 細胞の治療抵抗性については、これまで薬剤耐性の面から研究が進められてきたが、近年、提唱されるようになったがん幹細胞の概念が、ALL 細胞を用いた研究においても報告が散見されるようになった。我々も白血病幹細胞が ALL 再発に深く関与していると考え、ALL 幹細胞の細胞動態について骨髄間質細胞との相互関係に着目した研究を進めている。

GFP 陽性不死化骨髄間質細胞と我々の研究室で樹立した小児期発症 B precursor ALL 細胞株を用いて実験を行った。この系は、生体内での骨髄微小環境を *in vitro* で再現する実験系である。骨髄幹細胞 (MSC) と付着した ALL 細胞が、白血病幹細胞としての性質を有していることを確認することを目的に以下の実験を行った。

(実験 1)

MSC に接着した ALL 細胞の細胞周期を検討したところ、浮遊状態に比較して MSC に付着した ALL 細胞では G1 期の比率が高かった。また、Time-lapsing image を用い、doubling time を計測したところ、細胞分裂の時間が極めて遅くなることを観察した。

(実験 2)

MSC に接着した ALL 細胞の表面マーカーを検討したところ、骨髄間質細胞と接着した ALL 細

胞は、接着により表面マーカーの発現に変化が生じていた。MSCに接着した細胞は、がん幹細胞のマーカーとして報告されているCD133, CD34などを発現し、CD38の発現が消失していた。

(考察)

これらの観察は、ALL細胞が、骨髄間質細胞と接触することにより、白血病幹細胞としての性質を持つようになること、あるいは休止期に導入されることを示唆している。

今後は、これらの新知見に基づき、骨髄間質細胞との接着により、白血病幹細胞としての表現型を持つに至った白血病細胞の生物学的特性についての検討をさらにすすめる、骨髄間質細胞に接着した白血病細胞を標的とする分子の同定を計画している。

新研究プロジェクト報告書

臍帯血移植におけるNKレセプターLy-49ファミリーの役割について

天野敬史郎, 平山雅浩

三重大学大学院医学系研究科 小児科学分野

【要旨】臍帯血移植における拒絶の現象をNKレセプターであるLy-49ファミリーの観点で検証を行った。新生児期のマウスのNK細胞は様々なパターンのLy-49レセプターの発現がみられた。また、新生児期のNK活性が成年期マウスに比べて低いことが示された。これらの結果は今後移植モデルにおいて検証することで、臍帯血移植におけるNK細胞と拒絶のメカニズムの解明に繋がると考えられた。

【はじめに】臍帯血移植において問題となる生着不全は一部にNK細胞レセプターが関与すると言われている¹⁾²⁾。NK細胞には抑制性レセプターと活性型レセプターが存在しており、これらの相互作用の結果により拒絶が起こるとされる³⁾。本研究はLy-49システムを有するNK細胞が臍帯血移植の拒絶にいかに関与するか検証を行なう。

【方法】

1) 様々なStrainのマウスのLy-49ファミリーの分布をフローサイトメーターを使用して解析する。Ly-49の抑制性レセプターとしてLy-49A, Ly-49C/I, Ly-49G2を、活性型レセプターと

してLy-49Dを、生後3日以内のB6, BALB/c, C3H, DBA/2マウスの末梢血および脾臓細胞での発現をそれぞれで比較した。

2) 新生児末梢血および脾臓中のNK細胞を使い、Cr release assay法により細胞障害活性を確認した。

【結果】B6, BALB/c, DBA/2のマウスにおいてDX5(+)NK細胞のLy-49A, Ly-49C/I, Ly-49G2, Ly-49Dの分布はStrainにより全く違っていた。また、1つのNK細胞にレセプターを1つのみ発現するものから4つすべて発現しているものまで様々なポピュレーションが存在していた。C3Hマウスにおいては個体差もみられ、一部のマウスではほとんどNK細胞が認められない個体もみられた。Cr release assayによるNK活性は各Strainの差は顕著ではないが、成年期マウスと比較すると有意に低下していることが認められた。

【まとめと今後の課題】今回の研究でNK細胞は、そのレセプターの発現から様々なポピュレーションが存在することがわかった。これはT細胞の多様な認識機構とは違い、単純なパターン認識というNK細胞の性格を反映したものと考えられる。また、成年期と違い、新生児期のNK活性が低いことは臍帯血移植における拒絶との関連が示唆された。今後は臍帯血移植のマウスモデル¹⁾⁴⁾を用いて、拒絶におけるLy-49ファミリーの役割について調べることを課題にあげられた。

【参考文献】

- 1) Hirayama M, Genyey C, Brownell A, and Kaplan J. IL-2-activated murine newborn liver NK cells enhance engraftment of hematopoietic stem cells in MHC-mismatched recipients. *Bone Marrow Transplant.* **21**: 1245-1252 (1998)
- 2) Mattsson J, Ringden O, and Storb R. Graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* **14**: 165-170 (2008)
- 3) Lundqvist A, McCoy JP, Samsel L, and Childs R. Reduction of GVHD and enhanced antitumor effects after adoptive infusion of alloreactive Ly49-mismatched NK cells from

MHC-matched donors. *Blood*. **109**: 3603-3606 (2007)

- 4) Davenport C, Kumar V, and Bennett M. Use of newborn liver cells as a murine model for cord blood cell transplantation. *J Immunol*. **151**: 1597-1605 (1993)

新研究プロジェクト報告書

頰動脈ステント留置術に伴う脳梗塞合併症の予防に関する研究

濱田 和秀

三重大学大学院医学系研究科
脳神経外科学講座

【目的】頰動脈狭窄症はアテローム血栓性脳梗塞の主要原因のひとつであり、近年高齢者などの高リスク症例で頰動脈ステント留置術 (Carotid Artery Stenting: CAS) が施行されるようになったが、未だ脳塞栓症の合併症発生率が CEA より高いことが問題となっている。頰動脈狭窄の原因となるプラークの発生には炎症による血管内皮細胞障害や酸化 LDL (low density lipoprotein) の関与が示されている。プラークの性状を知ること、塞栓性合併症の発生率減少に寄与することになるが、CAS の際に狭窄部位周辺から回収する血液中のマーカーを調べることにより、プラーク中の炎症系サイトカインを検出することができ、術中脳塞栓症と炎症系サイトカインの関連性をみちびきだせるものと考えられる。

【研究方法】CAS を行った 14 例に対して、橈骨動脈および頰動脈狭窄部でステント留置前後で採血を行い、炎症系マーカーを ELISA 法を用いて定量した。

【結果】アディポネクチンは頰動脈狭窄部周辺で術前後ともに橈骨動脈よりも高く、IL-6 は CAS 後に狭窄部周辺および橈骨動脈で採取した両者ともに CAS 前よりも高値になっていた。

【考察】症例数も少なく、数値としてもばらつきが多く、断定はできないが、CAS の際にプラーク内からは IL-6 が遊離し、血液中に拡散する。狭窄部周辺にはアディポネクチンの量が多いことまでは示せたものの、プラーク内での局在は不明である。今後症例数を重ねることにより、プラーク

と炎症系マーカー・画像の合致が行えるものと思われる。術中の塞栓予防のための術前の medication の選択にも影響を与えるのではないと思われる。

新研究プロジェクト報告書

局所進行膵癌に対する、術前放射線化学療法による宿主腫瘍免疫動態の変化

水野修吾, 岸和田昌之

三重大学医学部附属病院 肝胆膵・移植外科

【背景と目的】教室では、難治癌の代表である膵癌の治療成績を向上させる目的で、消化器・肝臓内科、放射線科の協力を得て、2005 年から現在までに 87 例の局所進行膵癌に対し、術前放射線化学療法 (NCRT) を施行した後に外科的切除を行い良好な成績を得てきた。一方、各種癌腫瘍免疫には抑制性 T 細胞並びに CD 4+ 細胞 ATP 活性を代表とした、宿主腫瘍免疫反応が重要視されているが、正確に免疫力の評価を行った報告はない。本研究では局所進行膵癌の NCRT 前後と手術後における免疫力を評価したので報告する。

【対象と方法】2009 年 5 月から 2009 年 12 月までに当科で NCRT 施行後膵切除術を行った、UICC Stage III 以上の局所進行膵癌症例 11 例を対象とした。男性 6 名、女性 5 名、平均年齢は 67 歳 (59-78) であり、全例、超音波内視鏡下細胞診にて診断後、放射線治療を 5 週間施行し、この間にジェムシタビン (1000 mg/mm²) を 4 回施行。6 週間後に前方到達法による膵切除を施行した。NCRT 前後と膵切除後 1-2 ヶ月目に、血中総タンパク、アルブミン、総コレステロール、トリグリセリドの推移を、また免疫能評価として血中総リンパ球数、CD 4 陽性細胞 ATP 活性の推移を検討した。尚、CD 4+ ATP 活性は、免疫能測定キットとして米国 FDA にて認可された Cylex 社 ImmuKnow assay kit を用いた。

【結果】血中総タンパク、アルブミン、総コレステロール、トリグリセリドは NCRT 前と比べて経過中に有意な差を認めなかった。血中総リンパ球数 (/μl) は、NCRT 前後、手術前後では差がなかったが、NCRT 前 1293 (730-1700) と比べ、手術後は 808 (570-1190) と有意に低下していた

($p=0.037$). 一方, CD 4+ ATP 活性 (ATPng/ml) は治療前の時点で 434 (297–583) と健常人と同等であったが, NCRT 後に 324 (223–376) と有意に低下し ($p=0.031$), 手術後も 311 (234–405) と NCRT 前に比べて有意に低下していた ($p=0.016$) が, 手術前後では差を認めなかった.

【結論】 局所進行膵癌患者では, 治療前には消化管癌のような免疫力低下を認めなかった. NCRT を行う局所進行膵癌では, 今後免疫力向上のために, 免疫賦活栄養剤等の積極的な導入が必要であると考えられた.