

[原 著]

下肢末梢血管に対する非侵襲的評価として 非造影 MRI が有用であった 3 例

笹尾 卓史, 高山沙衣子, 森 雄大

医療法人三世会河内総合病院形成外科

Three Cases in which Non-enhanced MRI was Successfully Utilized for a Noninvasive Assessment of the Peripheral Artery of the Lower Limbs

Takashi SASAO, Saeko TAKAYAMA, Yudai MORI

Department of Plastic Surgery, Sanseikai Kawachi General Hospital

要 旨

虚血性下肢病変や足潰瘍病変の診断, 治療法の決定に重要であるのは, 血流評価である。血行の画像検査方法としては, 超音波検査, 足関節・上腕血圧比 (Ankle Brachial Index: ABI), 皮膚還流圧測定 (Skin Perfusion Pressure: SPP), 造影 CT (Computed Tomography Angiography; CTA), 造影 MRI (Magnetic Resonance Angiography; MRA), 血管造影 (Angiography) などがある。詳細な血管情報を得るためには造影検査が必要とされるが, 造影剤によるアレルギーなど副作用に注意する必要がある。虚血性下肢病変の患者の多くに腎機能不全を合併する事も少なくなく, 造影剤を使用する検査は敬遠されがちである。

我々は, 非造影 MRI を施行し, 虚血性下肢病変や足潰瘍病変の診断, 治療法の決定に画像診断を応用している。なかでも, FBI 法 (Fresh Blood Imaging), SSFP Time-SLIP 法 (Steady-State Free Precession Time-Spatial Labeling Inversion Pulse) の 2 法を組み合わせ, 総腸骨動脈から足背・足底動脈までを描出し, 診断や治療方針決定に有用であった。これら 2 法を適用し, 有用であった 3 例を経験したので報告する。

Key words: 非造影 MRI, FBI 法 (Fresh Blood Imaging), SSFP Time-SLIP 法 (Steady-State Free Precession Time-Spatial Labeling Inversion Pulse), 末梢動脈疾患 (peripheral arterial disease: PAD)

Abstract

To evaluate ischemia, ulcers, and the healing of the lower limbs, the investigation of the blood stream is most essential. Sonography, Ankle Brachial Index (ABI), Skin Perfusion Pressure (SPP), Computed Tomography Angiography (CTA), Magnetic Resonance Angiography (MRA), and Angiography Contrasting Inspection are methods indicated for laboratory imaging of blood circulation. However, allergy to contrast media should be considered a side effect. It is not so rare for most patients with ischemia of the lower limbs to present renal insufficiency. Therefore, examinations with contrast media are apt to be given a wide berth.

We currently use non-contrasting MRA, and have utilized the diagnostic images to decide on treatment methods for ischemia of the lower limbs and to diagnose pathological changes. Here, in a combination of two methods, Fresh Blood Imaging (FBI) and Steady-State Free Precession Time-Spatial Labeling Inversion Pulse (SSFP), images are markedly described from the common iliac artery to the dorsum of the foot and the sole artery of ischemic lower limbs. The combined application is very useful to diagnose ischemic lower limbs and to decide on treatment methods. This paper reports on three successful utilizations of noninvasive imaging methods, as experienced by its three authors.

緒 言

虚血性下肢病変や足潰瘍病変の診断、治療法の決定には、血流評価が重要である。現在用いられる血流評価としては、超音波検査、足関節・上腕血圧比 (Ankle Brachial Index: ABI)、皮膚還流圧測定 (Skin Perfusion Pressure: SPP)、造影 CT (Computed Tomography Angiography; CTA)、造影 MRI (Magnetic Resonance Angiography; MRA)、血管造影 (Angiography) などがあり、各々利点欠点がある¹⁾。詳細な血管情報を得るためには造影検査が必要とされるが、造影剤によるアレルギーなど副作用に注意する必要がある。虚血性下肢病変の患者の多くに腎機能不全を合併する事が少なくなく、造影剤を使用する検査は敬遠される傾向がある。

我々は、非造影 MRI を施行し、虚血性下肢病変や足潰瘍病変の診断、治療法の決定に画像診断を応用している。なかでも、FBI 法 (Fresh Blood Imaging)、SSFP Time-SLIP 法 (Steady-State Free Precession Time-Spatial Labeling Inversion Pulse) の 2 法を組み合わせ、総腸骨動脈から足背・足底動脈までを描出し、診断や治療方針決定に有用であった 3 例を経験したので報告する。

方 法

我々が使用した機器及び撮像シーケンスを以下に挙げる。

使用機器

MRI : EXCELART Vantage Powered by Atlas ZGV (東芝メディカルシステムズ社製)

ワークステーション : AZE Virtual Place 風神 (AZE 社製)

撮像シーケンス

FBI 法 : TR/TE=2400/80, NS=40, FOV=37, MTX=256, ST=3.5, FA=90, BW=651

SSFP Time-SLIP 法 : TR/TE=4.3/2.15, NS=60, FOV=33, MTX=256, ST=3, FA=120, BW=781

(TR : くりかえし時間, TE : エコー時間, NS : スライス枚数, FOV : 撮像範囲, MTX : 画素数, ST : スライス厚, FA : フィリップ角, BW : バンド幅。)

撮 像 法

1. 総腸骨動脈から足関節近傍 (FBI 法)

FBI 法は心拡張期と心収縮期の画像を差分し、動脈を選択的に描出する撮影法である。広範囲に撮れ、血流の早くない下肢動脈の描出能に優れている²⁻⁵⁾。

我々は Atlas Speeder body coil 2 個と spine coil を組み合わせ、後は 3 回の寝台移動のみで撮像を行っている。撮像にかかる時間は約 20 分である。後に Maximum IP, Stitching 処理にて、画像を提供している (図 1)。

(Atlas Speeder body coil, Spine coil : 複数のコイル素子 (エレメント) を用いて信号を受信するコイルのこと, Maximum IP : 最大値投影法, Stitching 処理 : 同一個体の画像を分割して投影し、後に合成処理。)

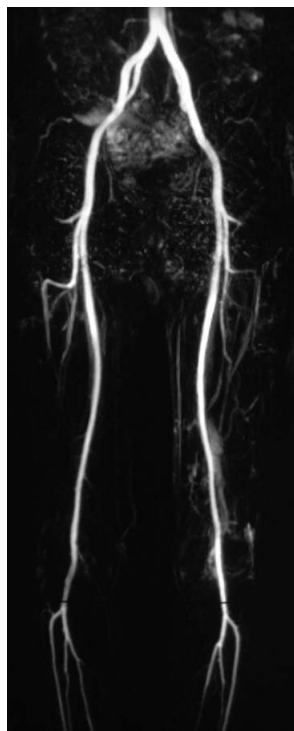


図 1 症例 1 FBI 法による下肢動脈非造影 MRI
両側大腿動脈から下腿の動脈群において、PTA など血管形成が必要な、明らかな下肢血管狭窄病変は存在していない。

2. 足部末梢動脈 (SSFP Time-SLIP 法)

これまで足部末梢動脈では血流速度が落ち inflow 効果が弱いこと、そして壊疽、浮腫により組織の T2 値が延長している事等の理由により、TOF, PC, FBI での描出は難しかった。そこで血液に Tag Pulse をあて、Labeling した血液を画像化する手法 (Time-SLIP 法) にて撮像を行った^{2,3,6)}。

撮像体位は足関節でのストレスがかからないよう自然位にし、検査中に足部を加温しながら行い血管拡張させた。足先は磁化率の影響が強く、Banding Artifact が目立ったため最短 TR/TE (4.3/2.15) にて撮像を行っている。

(inflow 効果：流入・流出効果。T2 値：各画像がもっている T2 の値。TOF：撮影範囲の外から流入したフレッシュなスピンの、十分な縦磁化をもっているため撮像面内において高信号を呈する現象。)

PC：スピンの位相情報から血流を画像化する。Tag Pulse：流体の標識。Labelling：標識。banding artifact：steady state coherent GRE 法は、スピンエコー信号、FID 信号、stimulated echo 信号の 3 つの信号をすべて利用するため信号採取効率がよく、高い S/N 比が得られるが、一方ではそれらの種々の echo の位相がずれた場合、お互いの信号が打ち消しあって生じる、その低信号の帯状のアーチファクトのこと。)

症 例

症例 1：

67 歳、男性。既往歴：糖尿病性眼症、糖尿病性腎症、閉塞性動脈硬化症。

2008 (平成 20) 年 8 月に視力低下の眼症状を自

覚し、糖尿病性網膜症により糖尿病の指摘を受け、眼科および腎臓糖尿病内科に通院加療を受けている。

2009 (平成 21) 年 2 月初旬に外傷により左第 5 足趾に創部を生じたが治癒が遅延し、2 月中旬より当科で加療を始めた。下肢動脈に FBI 法による非造影 MRI を施行した (図 1)。明らかな下肢血管狭窄病変は存在せず、後日施行した SPP や足部 MRI 検査より、経皮的血管形成 (Percutaneous Transluminal Angioplasty: PTA) の必要性はなく、足趾病変に対する加療を行った。壊死病変の進行強く、中足骨レベルまでのデブリードマンが必要となったが、4 月の退院時には歩行可能な状態であった。現在経過観察中であるが、創部の再発や悪化を認めていない。術後一時的に血液濾過を要する腎機能障害を認め、造影剤使用による検査はできる限りさけたい状況であった。また、壊死が進行し前敗血症症状であり、迅速な診断・加療に対して FBI 法による非造影 MRI は有用であった (図 2)。

症例 2：

28 歳、男性。既往歴：特記すべき事項なし。

2008 (平成 20) 年 9 月に右足部デグロウピング損傷受傷した。平成 21 年 2 月の時点で、右足背に皮膚皮下組織欠損創が存在し、周囲は瘢痕組織で拘縮部位もあった。同部に対し、当科で精査加療を始めた。動静脈損傷の有無を精査 (図 3) し、欠損組織周囲の組織や血管情報を得て、デブリードマンの範囲と、遊離皮弁のマイクロサージャリーによる吻合血管の適用部位を確認ができた。2 月 23 日に遊離鼠径皮弁移植を計画し、足背動脈



(a)



(b)

図 2 症例 1 左第 5 足趾糖尿病性壊疽 (臨床写真)
a：初診時 (外側より)、b：術後約 6 ヶ月 (外側より)。

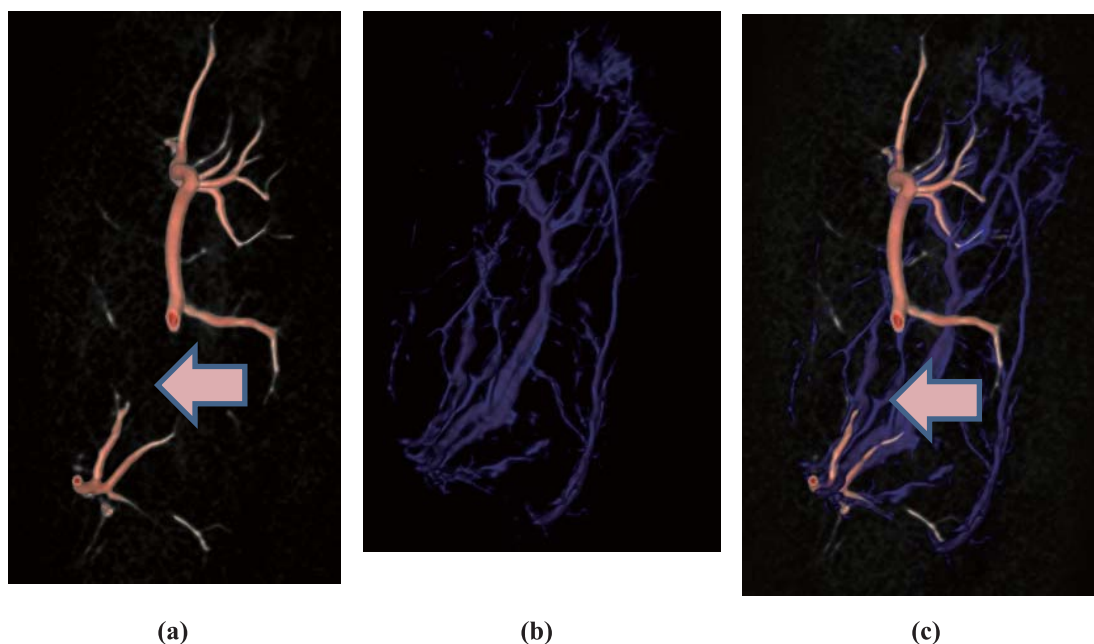


図 3 症例 2 右足背デグロービング損傷（術前）

a: 動脈 VR, b: 静脈 VR, c: 動・静脈 VR. 右足部動静脈に特記すべき異常は認められず。但し、足背部動静脈の欠損を認める（矢印部位に欠損を認める）。末梢足趾方向への血流の供給がなされているが、穏やかである。VR (volume rendering) とは、ある場所に光が当たると仮定し（仮想光源）、その構造物に生じる影付けの技術と、遠近法により解剖構造を表現する 3 次元画像処理法の 1 つである。

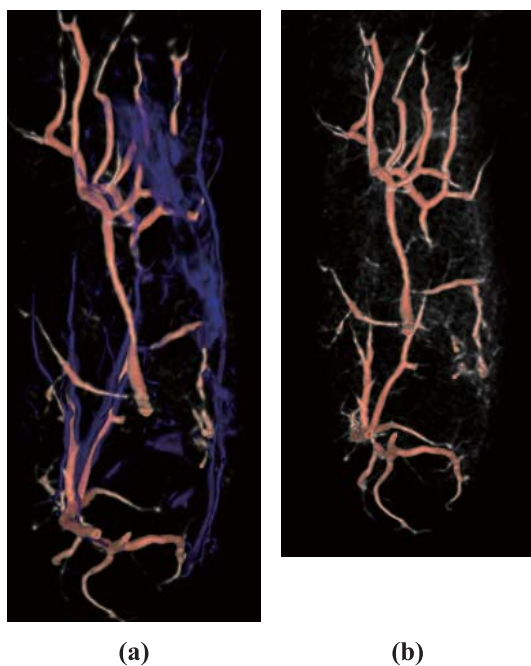


図 4

に吻合し、伴走する静脈も吻合した（図 4）。術後、皮弁状態は良好で、拘縮を認めず、歩行にて退院した。現在も経過観察中であるが経過良好である。手術に必要な組織・血管の情報を得ることができ、手術前、デブリードマンの範囲決定と遊離皮弁のマイクロサージャリー吻合血管の適応の決定に有効であった（図 5）。

症例 3 :

57 歳、女性。既往歴：糖尿病。

10 年以上前より、糖尿病を指摘され数年間治療をしていたが、自己判断にて治療を中止していた。

2008（平成 20）年 11 月初めより右足背部（第 1 趾間 MP 関節周囲）に皮膚潰瘍ができ、自ら治

図 4 症例 2 右足背デグロービング損傷（術後）

a: 動脈 VR, b: 動・静脈 VR. 右足部に遊離右鼠径皮弁術後約 2 週間。動静脈吻合により末梢足趾方向への血流の改善を認めることができる。



図5 症例2 右足背デグロビング損傷（臨床写真）
 a：手術のデブリードマンのデザイン
 b：術中デブリードマン後（矢印は足背動脈の中
 枢側断端）
 c：右足部に遊離右鼠径皮弁術後
 d：術後約1年

療をしていたが、創部増悪や血糖コントロール不良となり、当科にて精査加療が開始となった。右足部のVRとFatSAT T2Wを施行した（図6）。明らかな足部血管狭窄病変は存在せず、炎症および壊死は腱組織レベルであった。まずは保存的な加療を施行し、状況により外科的なデブリードマン

の計画をたてた。保存的に洗浄処置や軟膏処置にて治癒することが可能となり、歩行可能な状態で退院となった。前医で足趾切断術の適応との説明を受けていた症例であったが、加療方針の決定に有用で、足趾切断に不安を感じていた患者に対する説明にも有効であった。

考 察

近年、運動不足や肥満、食生活の欧米化により、生活習慣病が増加傾向である。2008（平成19）年に行われた厚生労働省の国民健康・栄養調査にて、日本の20歳以上の成人で、「糖尿病が強く疑われる人」、「糖尿病の可能性が否定できない人」の合計が約2210万人と推計されている⁷⁾。平成9年の約1370万人および平成14年の1620万人の推計結果と比較し、増加傾向にある。それに伴い治療する患者数も増加の一途をたどっており、末梢動脈疾患（peripheral arterial disease: PAD）による潰瘍や壊死を来す症例が増加している。下肢切断の原因として、交通事故が多い。症例2に挙げた外傷による欠損が、皮膚だけでなく、皮下脂肪、腱などの深部の組織まで及ぶデグロビング損傷もそのひとつである^{8,9)}。今後PADによる下肢切断を要する患者が増えてくると考えられる¹⁰⁻¹²⁾。

足潰瘍病変の治療を考える上で、血流評価が重要である^{13,14)}。特にPADで血行改善をしないまま不用意な壊死組織のデブリードマンを行うと、壊死をより近位へと拡大させる結果となる。診断を的確に行い、PTAやバイパス術を行ったり、症例2のように皮弁作成術により、切断を避けられる症例も存在する。糖尿病性足潰瘍の切断術に至る患者のうち、適切な診断や治療により85%が、救肢の可能性があるとの報告がある¹⁵⁾。PADでない症例で、局所治療を積極的に進めたり、遊離皮弁術を適用する場合の術前血流評価は重要である。

血行障害の診断としては、視診や種々の血流評価がなされる。検査方法としては、超音波検査、足関節・上腕血圧比（Ankle Brachial Index: ABI）、皮膚還流圧測定（Skin Perfusion Pressure: SPP）、造影CT（Computed Tomography Angiography; CTA）、造影MRI（Magnetic Resonance Angiography; MRA）、血管造影（Angiography）などがある⁶⁾（表1）。

ABIは、上腕血圧と下肢血圧の比（下肢血圧／

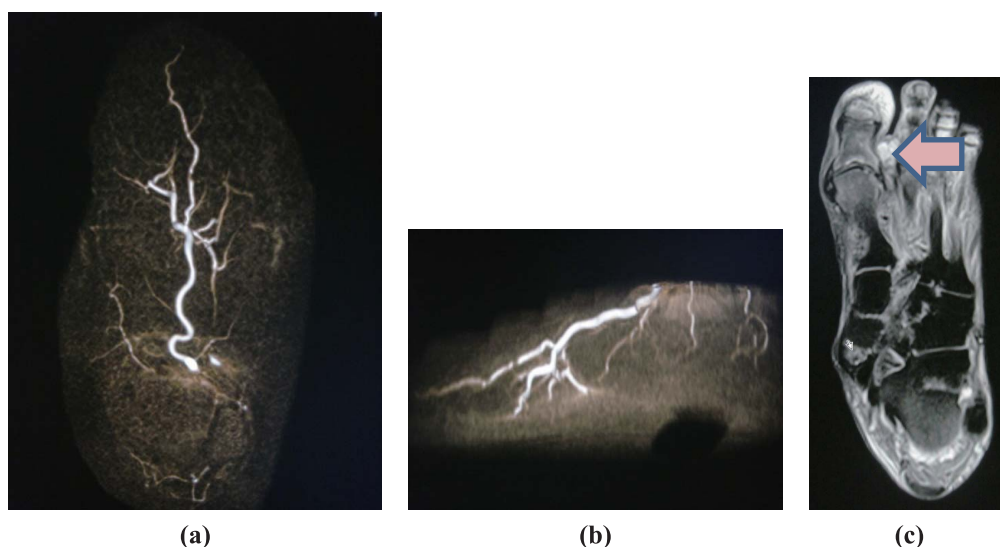


図 6 症例 3 糖尿病性皮膚潰瘍

a : 足背側より VR, b : 側面より VR, c : FatSAT T2W. (FatSAT : 脂肪抑制, T2W (T2 weight) : T2 (横緩和時間) を強調した画像). 右第 1 足趾 MP 関節付近および趾尖部に炎症所見が存在 (矢印部位). 右足背動脈弓以遠の趾骨動脈への血流は保たれている.

表 1 各血流評価法の利点と欠点

検査項目	利点	欠点
超音波検査	- 無侵襲で、簡易に繰り返して検査可能. - 動脈内腔の狭窄度, 内膜肥厚の情報や, 血流速度などの情報が得られる¹¹⁾.	- 手技に熟練を要すること. - 下肢全体に及ぶ画像描出が困難. - 高度石灰化があれば内腔評価が困難¹⁶⁾.
ABI	簡易に測定が可能.	高度石灰化があれば, 虚血があるにもかかわらず, ABI が低下しないことがある.
SPP	簡易に測定が可能.	- 測定中の患部の安静が必要. - ある程度の時間を要する.
CTA	- 短時間に下腿レベルまでの評価が可能. - 動脈石灰化領域の描出が可能.	- 高度石灰化がある場合やステント留置がされている場合では内腔が観察できないことがある. - 下腿動脈は脛骨と腓骨の存在のために評価が難しい場合がある.
造影 MRI	- 大血管や末梢血管評価に有用. - 高度石灰化があっても内腔の評価が可能である.	- 造影剤にはガドリニウム製剤が使用する可能性がある. - 狭窄が実際よりも強調されたり, 石灰化は描出されない. - 人工置換物の影響を受ける.
非造影 MRI	- 大血管や末梢血管評価に有用. - 高度石灰化があっても内腔の評価が可能.	- 狭窄が実際よりも強調されたり, 石灰化は描出されない. - 人工置換物の影響を受ける. - 人工置換物の影響を受ける. - 造影に比べ, 末梢脈管の描出に劣る.
動脈造影	末梢レベルの詳細な情報が得られる.	- 造影剤の使用. - 穿刺するなどの侵襲が多い.

上腕血圧)を求め、正常値は 0.95 以上 1.3 未満とされている。

SPP は、皮膚微小循環の血流を指標とした灌流圧のことであり、皮膚レベルの血流評価として使用されている。測定方法は、被験者をベッド上に仰臥位にさせて安静に保ち、測定部位に対してレーザードップラーセンサーと脈波プローブが装着したカフを巻く。測定を開始すると、カフの加圧により測定部位が駆血され、その後一定の速度で減圧し、遮断されていた血流が再び灌流し始めた時のカフ圧を SPP とする。値が 30 mmHg 以下なら、創傷治癒機転が働かないと考えられており¹⁷⁾、さらに、35 mmHg 未満の場合はデブリードマンの前に血行再建が必要であるとされている¹⁸⁾。

各々利点欠点はある。一般的に、詳細な血管情報を得るためには造影検査が必要とされているが、造影剤によるアレルギーなど副作用に注意を要する。虚血性下肢病変の患者の多くに腎機能不全を合併し、造影剤を使用する CT 検査などは敬遠される。またガドリニウム造影剤は、重篤な腎性全身性線維症 (Nephrogenic Systemic Fibrosis: NSF) を起こす報告もあり原則腎機能不全患者には使用を控える場合が多く、綿密な検討を要するとされている^{19,20)}。

我々は、非造影 MRA を施行し、虚血性下肢病変や足潰瘍病変の診断、治療法の決定に画像診断を応用している。なかでも、今回呈示した FBI 法 (Fresh Blood Imaging)、SSFP Time-SLIP 法 (Steady-State Free Precession Time-Spatial Labeling Inversion Pulse) の 2 法を組み合わせ、総腸骨動脈から足背・足底動脈までを描出でき、下肢の血管病変の診断や治療方針決定に有用である。

従来これらの方法も一度に広範囲を検査するには長時間の負担を要したが、Parallel Imaging (パラレルイメージングの一種で、coil の各チャンネルの感度分布の差を利用した、高速撮影技術。)併用による撮像時間の高速化やコイルシステムの進歩に伴い、広範囲を一度に撮像する事が可能になった。但し、外腸骨大腿動脈移行部での屈曲・蛇行が強い血管では乱流が起こるため、心収縮期での動脈像が Black Blood (Flow Void) (RF パルスで励起されたスピンが流れのため信号収集時には移動してしまい、無信号 (signal void) となる現象)にならず、差分の関係で動脈信号が弱く描出され

てしまう場合もあるため、注意を要する。

下肢動脈撮像で目的とされるのは主要動脈の形態、狭窄閉塞により生じた側副血行路の有無の評価や総腸骨動脈から足関節近傍であり、広範囲に撮像することも経皮的血管形成 (Percutaneous Transluminal Angioplasty: PTA) などの治療を行う上で必要である。

症例 1 の糖尿病性動脈硬化症や症例 2 のデグロービング損傷では末梢動脈循環不全から潰瘍形成やさらに重症になれば壊疽に陥る。今回、非造影 MRI 画像を用いて末梢血流や壊疽組織の情報を得たことは治療方針を立てる上で極めて役だった。

今後の課題として、FBI 法では安定した画像描出が可能となり、一定の評価は得られているが、足部末梢動脈での検討課題は多く存在する。治療法の進歩と共に画像に求められる要求も大きくなり、より末梢動脈を安定して描出することが望まれる。そのためには、ECG ゲート (心電図同期) のかけ方 (心拡張または STIR)、至適 BBTI (BLACK blood inversion time) など、多くの解決すべき項目が存在する^{2,21,22)}。今後、低侵襲な非造影 MRA にて最良の足部末梢血管画像を得るため、至適条件の検討を重ねていくことが必要と考える。さらに SPP との関連性や、血管病変や神経病変の合併などとの関連性など各症例に関してさらに検討するとともに、症例を重ねる必要がある。

今回、下肢血管病変の診断に非造影 MRI 検査が有用に使用でき、検査の有力な方法と考えるが、さらに非造影 MRI 検査の精度が上がり細部末梢血管を含めた下肢血管病変の診断手段に発展し、検査における患者負担が少なくなることが望まれる。

謝 辞

本報告において、多大なるご協力およびご教示をいただいた本院放射線部の前田年彦氏および向井正弘氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 杉本郁夫, 山田哲也, 川西 順ほか: 慢性動脈閉塞症に対する症候別の無侵襲診断法. 脈管学, 43: 297-301, 2003.
- 2) Miyazaki, M., Sugiura, S., Tateishi, F., et al.: Non-contrast-enhanced MR angiography using 3D ECG-

- synchronized half-Fourier fast spin echo. *J Magn Reson Imaging*, 12(5): 776–783, 2000.
- 3) Miyazaki, M., Lee, V.S.: Nonenhanced. MR angiography. *Radiology*, 248(1): 20–43, 2008.
 - 4) 沖川隆志, 浦田謙治, 和田博文ほか: ルーチン検査における非造影MRA (FBI法) の有用性. *INNERVISION*, 21(9): 47–50, 2006.
 - 5) 山本晃義: 非造影MRAの種類と特徴 総論. *Rad Fan*, 4: 25–30, 2006.
 - 6) 石本 剛: 3Tでの非造影MRA-3T TRANCEの真価と魅力. *INNERVISION*, 23(9): 46–49, 2008.
 - 7) 厚生労働省. 平成18年国民健康・栄養調査: 3–12, 2008.
 - 8) Bosse, M. J., Mackenzie, E. J., Kellam, J. F., et al.: An analysis of outcomes of reconstruction or amputation after leg-threatening injuries. *N Engl J Med*, 347: 1924–1931, 2002.
 - 9) Lange, R. H.: Limb reconstruction versus amputation decision making in massive lower extremity trauma. *Clin Orthop*, 243: 92–99, 1989.
 - 10) 柏木厚典: 磁気共鳴法を用いた糖尿病性足病変に対する新しい早期診断法. *Therapeutic Research*, 25(2): 323–328, 2004.
 - 11) 市岡 滋, 寺師浩人, 飯田修ほか: 足の創傷をいかに治すか. 克誠堂出版, 東京, pp 2–39, 2009.
 - 12) Rueda, C. A., Nehler, M. R., Perry, D. J., et al.: Patterns of artery disease in 450 patients undergoing revascularization for critical limb ischemia: Implications for clinical trial design. *J Vasc Surg*, 47: 995–1000, 2008.
 - 13) Tefera, G., Turnipseed, W. and Tanke, T.: Limb salvage angioplasty in poor surgical candidate. *Vasc Endovascular Surg*, 37: 99–104, 2003.
 - 14) Aulivola, B. and Pomposelli, F. B.: Dorsalis pedis, tarsal and plantar artery bypass. *J Cardiovasc Surg*, 45: 203–212, 2004.
 - 15) Armstrong, D. G., et al.: Diabetic foot ulcer: prevention, diagnosis and classification. *Am Fam Physician*, 57(6): 1325–1332, 1998.
 - 16) TASC (Trans Atlantic Inter-Society Consensus) II working group: Inter-Society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *J Vasc Surg*, 45(Suppl), 2007.
 - 17) Castronuovo, J. J. Jr., Adera, H. M., Smiell, J. M., Price, R. M.: Skin perfusion pressure measurement is valuable in the diagnosis of critical limb ischemia. *J Vasc Surg*, 26: 629–637, 1997.
 - 18) Tsuji, Y., Terashi, H., Kitano, I., et al.: Importance of skin perfusion pressure in treatment of critical limb ischemia. *Wounds*, 20: 95–100, 2008.
 - 19) 松本一宏, 陣崎雅弘, 栗林幸夫ほか: 重症虚血枝の画像診断最前線. *Diabetes Frontier*, 19(3): 313–316, 2008.
 - 20) Thomsen, H. S.: Nephrogenic systemic fibrosis: a serious late adverse reaction to gadodiamide. *Eur Radiol*, 16: 2619–2621, 2006.
 - 21) Miyazaki, M., Takai, H., Sugiura, S., Wada, H., Kuwahara, R., Urata, J.: Peripheral MR angiography: separation of arteries from veins with flow-spoiled gradient pulses in electrocardiography-triggered three-dimensional half-Fourier fast spin-echo imaging. *Radiology*, 227: 890–896, 2003.
 - 22) Urata, J., Wada, H., Kuwahara, R., Miyazaki, M., Nishiharu, T., Yamashita, Y.: Evaluation of lower extremity arterial diseases using flow-dephasing spoiler gradient pulses in ECG-triggered 3D half-Fourier FSE: initial experience [abstr]. In: Proceedings of the Tenth Meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine. Berkeley, Calif: International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 1750, 2002.

関西医科大学医学会賞

「関西医科大学医学会賞」は関西医科大学医師会の後援のもと、当該年に本学で学位を授与された若手研究者を鼓舞し、更なる飛躍を期待するために設けられた賞である。

応募者は医学会賞選考委員会の厳正なる審査のもと、優秀賞と奨励賞が決定される。

平成 20 年度第 8 回は 6 名の応募者の内から 1 名に優秀賞と 2 名に奨励賞が交付された。

本号に掲載の受賞者研究内容を参照されたい。

医学会会長 山下 敏夫

関西医科大学医学会賞交付規程

第一章 総 則

(目的)

第 1 条 本規程は本学の学術研究振興を目的として、関西医科大学医学会（以下「医学会」という）が当該年度の優秀学位論文ならびに関連業績に対して褒賞するために定めた規程である。

(後援)

第 2 条 前条の褒賞にあたっては、関西医科大学医師会（以下「医師会」という）が後援する。

(財源)

第 3 条 本賞の財源としては医学会、医師会双方の予算をもってあてる。

(交付対象)

第 4 条 研究業績および将来性を含めて本学学術集談会での講演内容を審査して毎年若干名に交付する。

第二章 交 付 手 続

(交付申込)

第 5 条 本賞の応募者は医学会事務局に備え付けの所定の申込書に必要事項を記入し、関連論文 3 篇以内を添えて毎年 1 月 15 日迄に医学会に提出する。

第三章 選 考

(選考委員の構成)

第 6 条 選考委員会は、次の委員で組織する。

(1) 職務上委員となるもの

医学会会長

医学会委員長

(2) 選挙により委員となるもの

教授会 4 名

助講会 5 名

関西医科大学医師会 教授 3 名

第 7 条 委員の任期は 2 年間とし、再任を妨げない。ただし、2 期を超えないものとする。

(選考委員会の開催)

第 8 条 毎年学術集談会開催日に選考委員会を催し講演内容と業績内容について選考を行う。

(審査会の成立)

第 9 条 選考委員会は選考委員の 3 分の 2 以上の出席をもって成立する。

(審査会の議長)

第 10 条 原則として医学会会長が議長となる。

(審査会の議決)

第 11 条 議決は出席選考委員の投票により決定する。

第四章 そ の 他

(本規程変更)

第 12 条 本規程の変更は医学会委員の 3 分の 2 以上の承認を得なければならない。

細則 1. 選考結果は毎年学術集談会終了時に発表し交付金を支給する。

なお、受賞者は関西医大誌誌上に講演内容を寄稿することとする。

付則 本規程は平成 13 年 9 月 1 日から施行する。

付則 本規程は平成 15 年 10 月 10 日から施行する。

[受 賞]

ホジキン病細胞株 KM-H2 による Foxp3 陽性細胞 および細胞傷害性 CD4 陽性 T 細胞の誘導

谷尻 力

(関西医科大学内科学第一講座)

The Differentiation of CD4⁺Foxp3⁺ T Cells and CD4⁺ Cytotoxic T-lymphocytes from CD4⁺ Naïve T Cells is Promoted by Hodgkin's Reed-Sternberg Cell Line (KM-H2)

Tsutomu TANIJIRI

Department of Internal Medicine 1, Kansai Medical University

はじめに

免疫機構は様々な生体内の恒常性を維持しており、腫瘍細胞排除といった抗腫瘍免疫も例外ではない。これに対して腫瘍細胞が宿主の抗腫瘍免疫を回避する機序も存在すると考えられている。実際にヒト卵巣癌など、様々な固形腫瘍において、末梢血液中および腫瘍組織内において制御性T細胞 (Treg) の増加が認められ、Treg が抗腫瘍免疫の抑制と腫瘍の進展に関与しているものと考えられている^{1,2)}。一般に腫瘍は密集した増殖とその拡大といった進展様式を特徴とするが、Hodgkin 病 (HD) の病変内では豊富な炎症細胞浸潤の中に、わずかの腫瘍細胞が孤立性に存在している。近年、HD のような特異な病変内にも多数の Treg が存在することが報告され、腫瘍における Treg の役割や起源が異なるのではないかと注目されている^{3,4)}。一般に Treg は宿主の胸腺で成熟した後、腫瘍細胞により末梢血流中から腫瘍局所へと化学遊走されるものと考えられているが⁵⁾、Treg は末梢血液中の前駆細胞から局所で分化誘導されることも知られている⁶⁻⁸⁾。我々はこれまでに Hodgkin's Reed-Sternberg (H-RS) 細胞由来の細胞株である KM-H2 が他の lineage marker を発現せず、成熟樹状細胞の marker を発現し、ヒト CD4⁺T 細胞を分化増殖させることを報告してきた^{9,10)}。そこで KM-H2 がヒト末梢血 CD4⁺T 細胞から CD25⁺Foxp3⁺ Treg へ

と直接分化誘導することが可能かどうかの検証を行った。

研究方法

インフォームドコンセントを得た健常者から末梢血を採取し、単核球層を比重遠沈法にて分離し、磁気ビーズ法により Naïve CD4⁺T 細胞を採取した。末梢血 Naïve CD4⁺T 細胞と、20 Gy 照射にて不活化させた KM-H2 を共培養し、共培養後の CD4⁺T 細胞における表面抗原、細胞内・核内物質についてフローサイトメトリー (FCM) を用いて解析した。サイトカイン産生能を ELISA 法及び FCM を用いて解析した。RT-PCR 法を用いて *FOXP3* 並びに *T-bet* を解析した。さらに共培養後の CD4⁺T 細胞を、不活化させていない KM-H2 を含めた各種腫瘍細胞株と再度共培養し、腫瘍細胞株に与える細胞傷害性について Cytotox96[®] を用いた比色法にて解析した。

結 果

KM-H2 のリンパ球活性化能

不活化 KM-H2 と Naïve CD4⁺T 細胞を 8 日間共培養することにより、得られた T 細胞 (KM-H2/T) は約 2.5 倍に増殖した (図 1A)。共培養開始時の Naïve CD4⁺T 細胞に CFSE をラベルすることにより、KM-H2/T には、分裂増殖する細胞と増殖しな

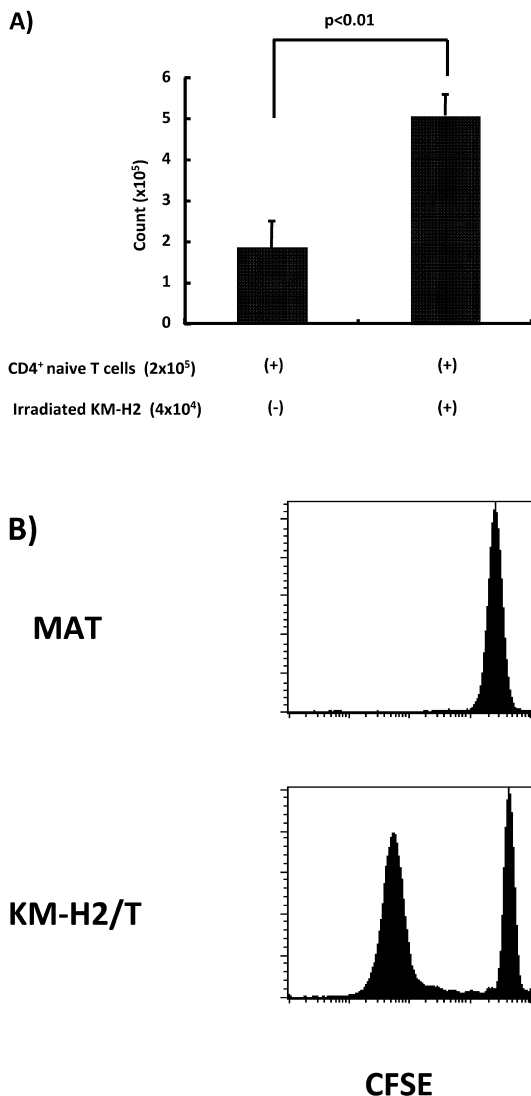


図1 KM-H2 との共培養による Naïve CD4⁺ T 細胞の分化・増殖。
 A) 不活化 KM-H2 と 8 日間共培養後の T 細胞数。
 B) CFSE-Naïve CD4⁺ T細胞とKM-H2との共培養。
 KM-H2/T: KM-H2 primed T cells, MAT: medium activated T cells.

い細胞の 2 集団が存在することが確認された (図 1B)。さらに Treg の代表的な marker である CD25 や intracellular CTLA-4 は経時的に up regulate していった (図 2A)。さらに CD25⁺ KM-H2/T は CD45RO, CD122, CD134 や GITR といった他の Treg 関連 marker は陰性であったが, CD25⁺ KM-H2/T はこれらの Treg 関連 marker を発現していた (図 2B)。

CD69 はすべての細胞が共培養開始後すみやかに陽性へと転じており, 増殖を示さなかった細胞も Naïve のままではなく, 何らかの differentiation をしていることが示唆された。

KM-H2 による *Foxp3* 陽性細胞の誘導

次にサイトカイン産生能を ELISA 法にて確認したところ, CD25⁺ KM-H2/T には産生を認めなかったが, CD25⁺ KM-H2/T は IL-10 や IFN- γ の産生を認めた (図 3)。さらに RT-PCR 法にて, CD25⁺ KM-H2/T は末梢血中の Treg と同様に *Foxp3* を mRNA レベルで発現していた。また CD25⁺ KM-H2/T が IFN- γ を産生していたので master Th1 transcriptional factor である *T-bet* を同様に検討したところ, CD25⁺ KM-H2/T にて発現が認められた (図 4A)。Flow cytometry にも CD25⁺ KM-H2/T の中には *Foxp3* を蛋白レベルで発現している細胞が認められた (図 4B)。*Foxp3* と IFN- γ の double staining を行ったところ, *Foxp3*⁺ 細胞は IFN- γ を産生せず, *Foxp3*⁻ 細胞が IFN- γ を産生していることが確認された (図 4B)。以上より, KM-H2/T は CD25⁺ *Foxp3*⁻ IFN- γ 産生細胞群と, CD25⁺ *Foxp3*⁺ IFN- γ 非産生細胞群と, CD25⁻ *Foxp3*⁻ IFN- γ 非産生細胞群の 3 群に分類された。

KM-H2 による細胞傷害性 T 細胞の誘導

次に, KM-H2/T を fresh の KM-H2 と再度 5 日間共培養したところ, KM-H2 のみで培養したものと比べて, CD25⁺ KM-H2/T と共培養することにより, KM-H2 の増殖抑制が確認された (図 5A)。そこで共培養後の KM-H2 において annexin V の陽性率を検討したところ, CD25⁺ KM-H2/T と共培養することにより約 9 割の KM-H2 が陽性となっていた (図 5B)。これらより, CD25⁺ KM-H2/T が KM-H2 にアポトーシスを誘導することが示唆されたため, 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が有する Granzyme や TIA-1 といった細胞質内顆粒蛋白や perforin を検討したところ, CD25⁺ KM-H2/T は Perforin や Granzyme A は検出されなかったが, *Foxp3* 発現の有無とは無関係に, Granzyme B や TIA-1 を細胞内に有している事が明らかとなった (図 5C)。さらに, CD25⁻ KM-H2/T は KM-H2 の viability に何ら影響を与えなかったが, CD25⁺ KM-H2/T は, KM-H2 を強力に傷害することが明らか

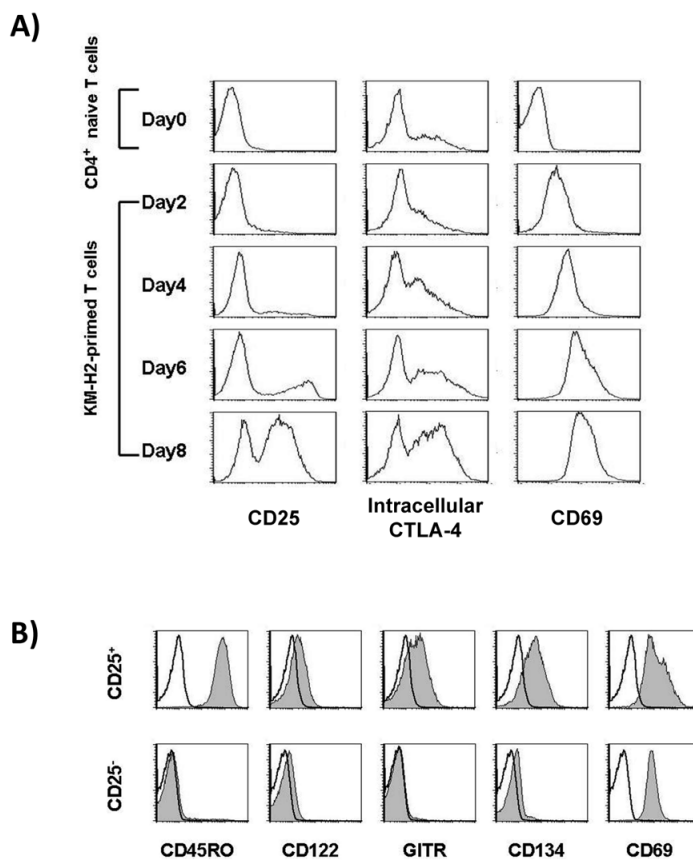


図 2 KM-H2/T 細胞における Treg 関連 marker.

A) 共培養後 2, 4, 6, 8 日目の CD25, Intracellular CTLA-4, CD69 染色.
 B) 8 日間共培養後の CD25 陽性, 陰性 KM-H2/T における表面 marker.

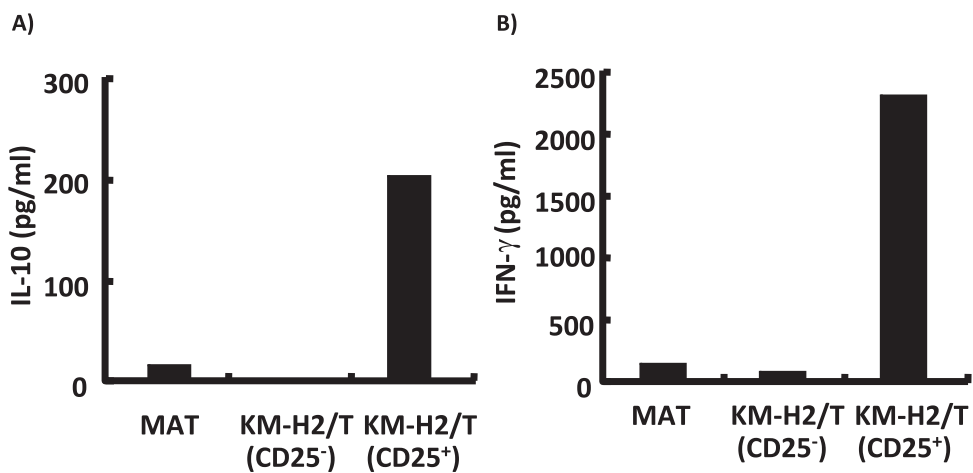


図 3 KM-H2/T 細胞のサイトカイン産生能.

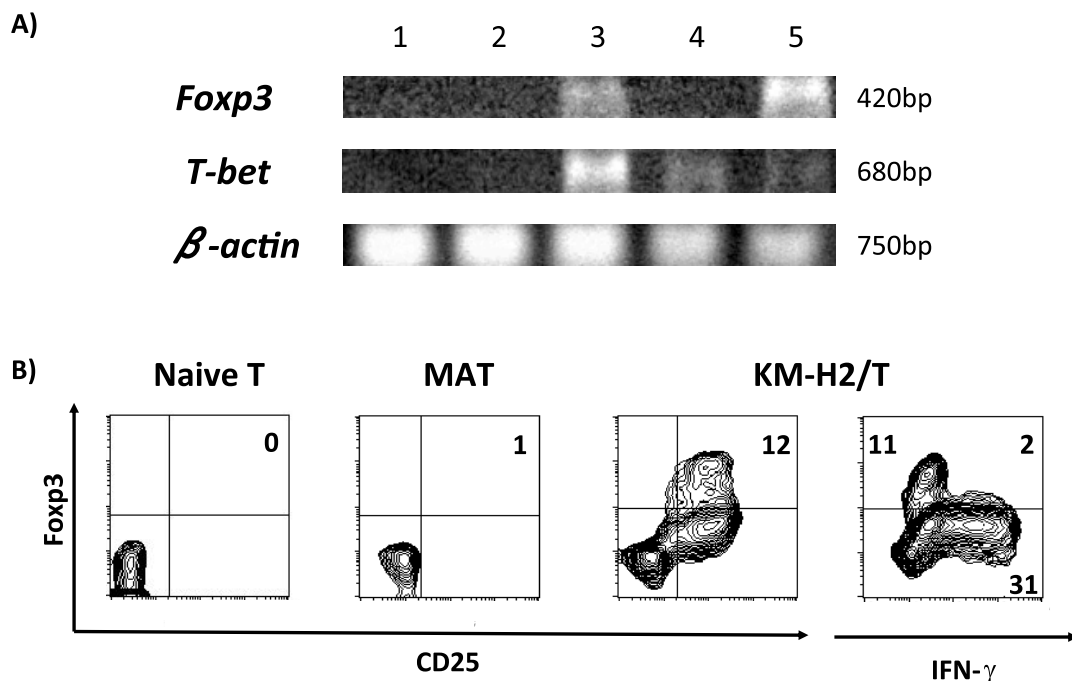


図 4 KM-H2/T 細胞における Foxp3 の発現.

A) RT-PCR 法.

Lane 1: MAT, Lane 2: CD25⁻ KM-H2/T, Lane 3: CD25⁺ KM-H2/T, Lane 4: 末梢血 CD25⁻CD4⁺ T, Lane 5: 末梢血 CD25⁺CD4⁺ T.

B) FCM 法による核内 Foxp3 と CD25 の二重染色 (左).

PMA, ionomycin, brefeldin A による再刺激後の Foxp3 と IFN- γ の二重染色 (右).

となった. また CD25⁺ KM-H2/T 細胞数依存性に細胞傷害能が高まっていることが確認された (図 5D). 以上より, KM-H2 は末梢血 Naïve CD4⁺ T 細胞より, Foxp3⁺ 細胞と同時に CD4⁺ CTL を誘導することが明らかとなった.

抗原提示能を有する腫瘍細胞株による Foxp3 陽性細胞と CD4 陽性 CTL の誘導

最後に KM-H2 以外の各種悪性腫瘍由来細胞株についても同様の解析を加えたところ, KM-H2 以外の他の HD 細胞株 (L-428, L-540) を用いても同様の細胞集団が誘導され, さらに B 細胞系 (Raji, LCL) やミエロイド系 (HL-60, THP-1) の細胞株でも誘導可能であった (図 6). しかし T 細胞系の Jurkat や上皮系腫瘍の Hela との共培養では得ることが出来なかった. これらの細胞株の違いを調べてみると, CD25⁺Foxp3⁺ 細胞を誘導するには腫瘍細胞株が抗原提示能を有している事が必須であることが明らかとなった.

考 察

昨今, 生体内において腫瘍細胞の増殖に Treg が深く関与していることが明らかとなり, これまでに様々な腫瘍組織中に Foxp3⁺ Treg が存在することが報告されてきた¹⁻⁴⁾. Treg は naturally occurring Treg (nTreg) と inducible Treg (iTreg) に大別される. nTreg は胸腺髄質において, 上皮由来の thymic stromal lymphopoietin (TSLP) によって活性化された CD11c⁺ DC により分化誘導され, 末梢血中に動員される⁵⁾. 一方, 末梢組織においても特定の条件のもとでは, Naïve CD4⁺ T 細胞より iTreg が誘導される⁶⁻⁸⁾. この nTreg と iTreg は表現型も機能も類似しており判別は困難であり, 腫瘍組織中の Foxp3⁺ Treg の起源は明らかとされていない. しかし, 卵巣癌では腫瘍細胞や腫瘍内に存在するマクロファージなどが CCR4 のリガンドである CCL22 を発現しており, CCR4 陽性の Foxp3⁺ Treg が腫瘍周辺へ動員されていると報告されている¹⁾. H-RS 細胞においても高頻度に TARC を発現しており,

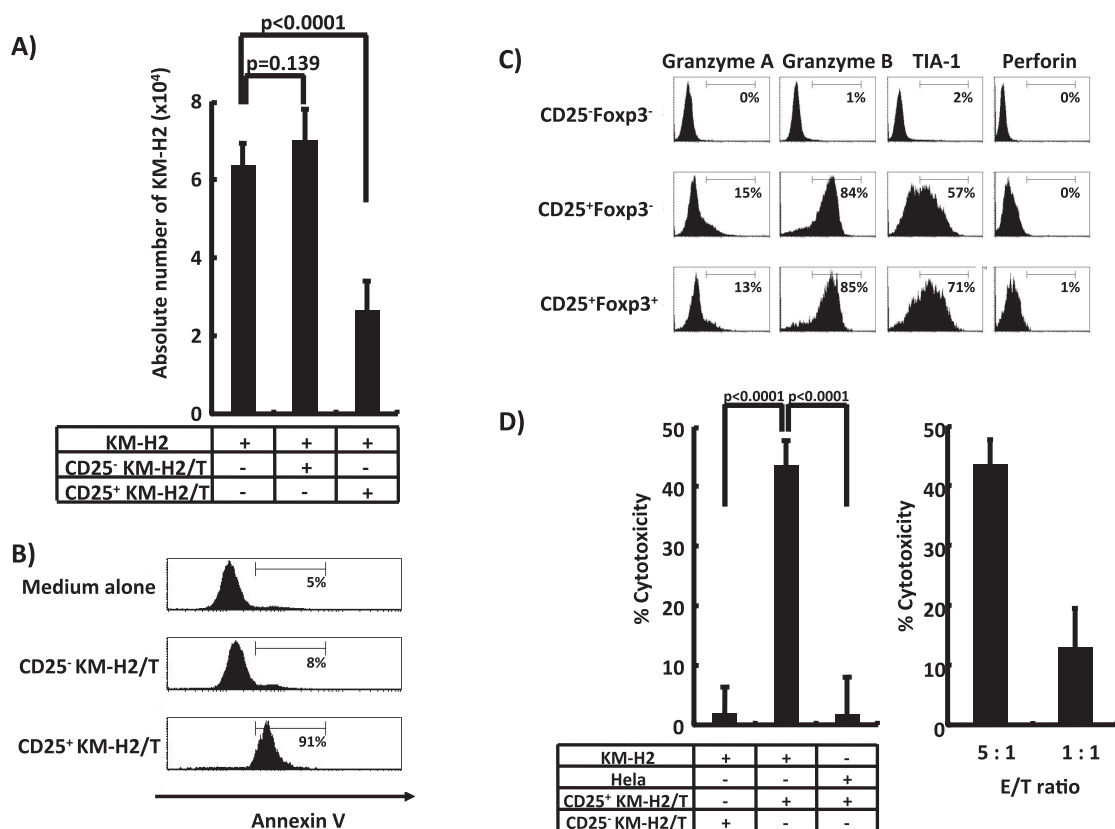


図 5 CD25⁺ KM-H2/T における細胞傷害能.

A, B) 8 日間共培養後の KM-H2/T を CD25 陽性群と陰性群に単離し、不活化していない KM-H2 と 5 日間再培養.

A) 再培養後の生存 KM-H2 数.

B) 再培養後の KM-H2 における Annexin V 染色.

C) CD25⁻FcγR3⁻, CD25⁺FcγR3⁻, CD25⁺FcγR3⁺ KM-H2/T における細胞傷害性顆粒の発現の有無.

D) (左) CD25 陽性または陰性 KM-H2/T を不活化していない KM-H2 もしくは Hela と 5 : 1 の割合で共培養した際の細胞傷害活性.

(右) CD25⁺ KM-H2/T と不活化していない KM-H2 をそれぞれの割合で再培養後した際の細胞傷害活性.

胸腺由来 FcγR3⁺ Treg が HD 病変への動員が示唆されている¹¹⁾. このように、これまで腫瘍に浸潤した FcγR3⁺ Treg は宿主の胸腺由来であるとの考え方が主流を占めてきた. 一方で、マウスでは腫瘍局所に存在する TGF-β により CD4⁺CD25⁻ 細胞から FcγR3⁺ Treg へ転換されることも報告されている^{7,8)}. 今回我々は初めて、ヒト腫瘍細胞株 KM-H2 が *in vitro* で Naïve CD4⁺ T 細胞を直接 FcγR3⁺ T 細胞へと転換することを証明した. さらに KM-H2 のみならず、他の H-RS 細胞株や、B 細胞系やミエロイド系の細胞株でも誘導可能であった. これらの細胞株は CD28 のリガンドである CD86 分子を共通して発現していたが、CD86 分子を発現

していない細胞株では誘導されなかった. また KM-H2 の培養上清の添加では誘導されず、腫瘍細胞と T 細胞との direct contact が必須であると考えられた. これらの所見は、抗原提示能を持つ腫瘍細胞株は FcγR3⁺ T 細胞の誘導が可能であることを示している. 従って *in vivo* でも抗原提示能を有する悪性腫瘍細胞は末梢流血中の Naïve CD4⁺ T 細胞を前駆細胞として腫瘍局所で FcγR3⁺ T 細胞を generate している可能性が示唆された (図 7).

腫瘍に浸潤した Treg が臨床像において果たす役割についても様々な考察がなされてきた. マウスにおいて、抗 CD25 抗体や抗 CTLA-4 抗体などを用いて Treg を除去すると抗腫瘍免疫が増強し腫瘍

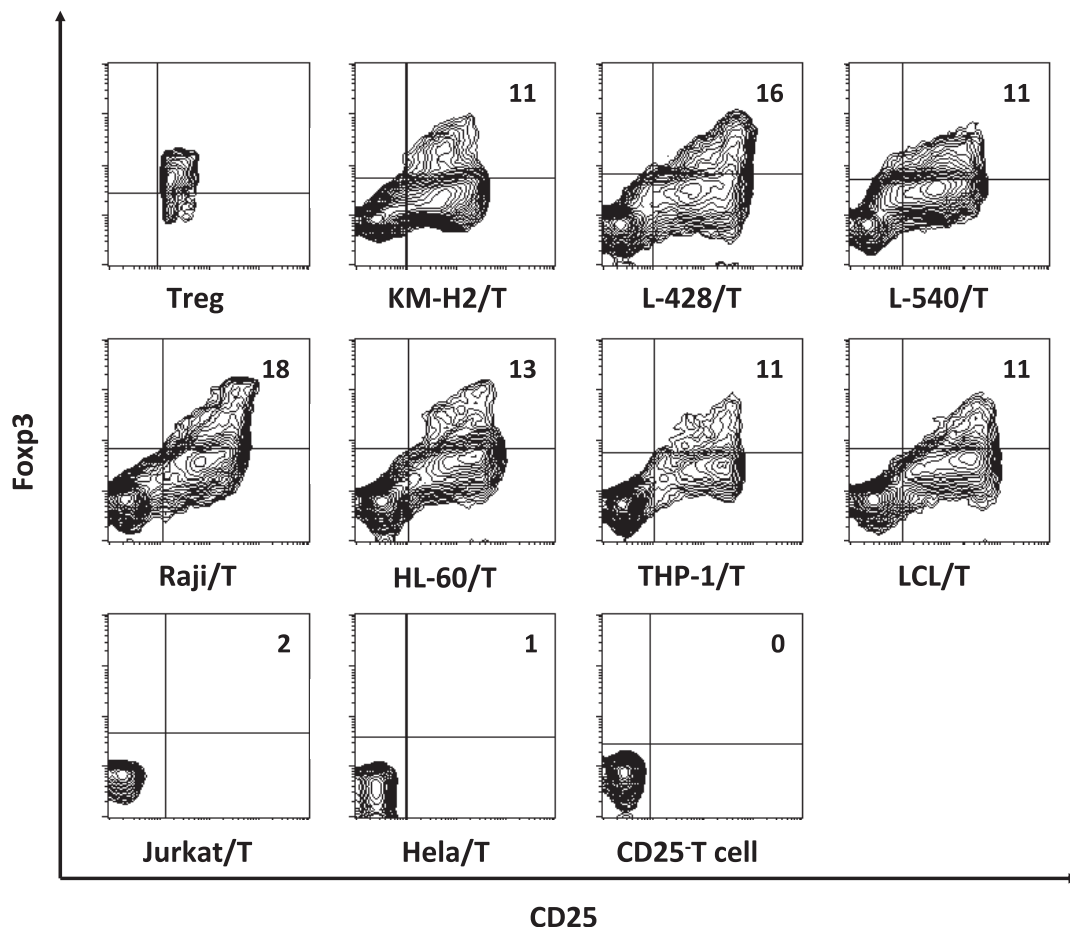


図 6 各種腫瘍細胞株との共培養。

それぞれの不活化細胞株と Naïve CD4⁺T 細胞の 8 日間共培養後の核内 Foxp3 と CD25 の二重染色。HD (KM-H2, L-428, L-540), B 細胞系 (Raji, LCL), ミエロイド系 (HL-60, THP-1), T 細胞系 (Jurkat), 上皮系 (Hela). 対象として, 末梢血中の Treg と CD25⁺CD4⁺T 細胞。

の退縮がみられる¹²⁾。またヒトにおいて、腫瘍局所に Foxp3⁺Treg が多く浸潤しているほど予後が不良であると、各種固形腫瘍の臨床研究において報告がなされている^{1,2)}。これらより、腫瘍組織に浸潤した Treg が宿主の抗腫瘍免疫を阻害し、結果として腫瘍細胞の増殖を助長していると考えられてきた。しかし最近になり、HD やある種の B 細胞性腫瘍などの造血器悪性腫瘍では、むしろ腫瘍局所での Foxp3⁺Treg が多いほど予後良好であるとの報告がなされ、両者での相反する結論が議論的となっている^{13,14)}。今回、抗原提示能を有する腫瘍は腫瘍局所で iTreg と同時に、IFN- γ を産生し、Granzyme や TIA-1 を有し、親細胞である腫瘍

細胞自身に killing 活性を有する CD4⁺CTL を産生誘導することを明らかにした。CD4⁺CTL は CMV や EBV などの慢性ウイルス感染患者血中にも増加していることが報告されており、この CD4⁺CTL は感染細胞自身の増殖を抑制することによって latent infection の維持に寄与と考えられている^{15,16)}。さらに、いずれの腫瘍細胞株で Foxp3⁺細胞を誘導した場合にも必ず CD4⁺CTL が同時に誘導されていることから、両者が協調的に分化・誘導・機能していると考えられた。以上より CD4⁺CTL による腫瘍細胞増殖の抑制が過度になりすぎないように、Foxp3⁺T 細胞が feedback をかけているものと推測された。このように Foxp3⁺T 細胞と

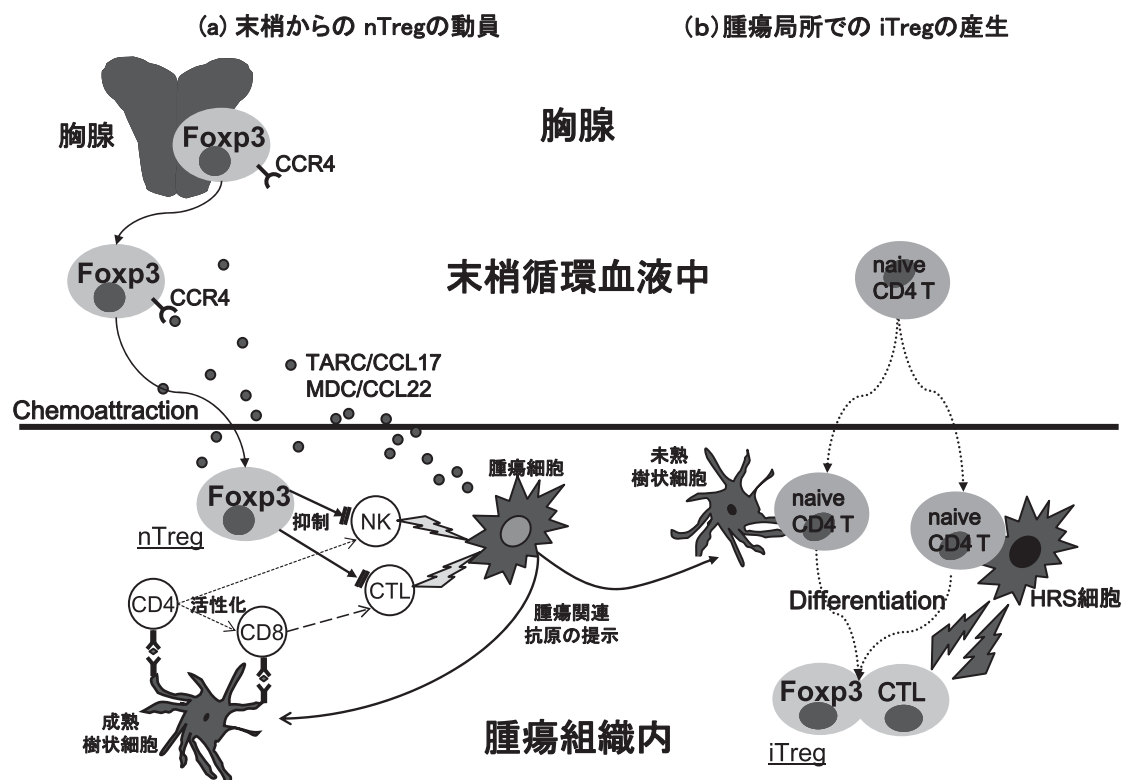


図 7 腫瘍組織における Treg の誘導.

同時に産生されてくる CD4⁺ CTL が存在することにより予後を改善している可能性が示唆された。しかし腫瘍局所における nTreg と iTreg/CD4⁺ CTL 誘導の相違が臨床的予後と関係するか否かは、今後さらなる検討が必要である。

結 語

現今、様々な腫瘍において Treg depleting therapy の前臨床的研究が盛んに行われているが、本研究の結果により、抗原提示能を持つ造血器悪性腫瘍には固形腫瘍とは異なった治療戦略を創案する検討の余地があると考えられた。

本論文は、学位論文 (Tanijiri T, et al., Hodgkin's reed-sternberg cell line (KM-H2) promotes a bidirectional differentiation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells and CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes from CD4⁺ naive T cells. J Leukoc Biol. 82: 576-584, 2007) を基に、第 8 回関西医科大学医学学会賞 (2009 年 3 月 6 日) に応募口演し、医学学会優秀賞を受賞した際の発

表要旨でもある。

文 献

- 1) Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., et al.: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med, 10: 942-949, 2004.
- 2) Petersen, R. P., Campa, M. J., Sperlazza, J., et al.: Tumor infiltrating Foxp3⁺ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. Cancer, 107: 2866-2872, 2006.
- 3) Marshall, N. A., Christie, L. E., Munro, L. R., et al.: Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. Blood, 103: 1755-1762, 2004.
- 4) Alvaro, T., Lejeune, M., Salvado, M. T., et al.: Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. Clin Cancer Res, 11: 1467-1473, 2005.
- 5) Watanabe, N., Wang, Y. H., Lee, H. K., et al.: Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. Nature, 436: 1181-1185, 2005.

- 6) Moseman, E. A., Liang, X., Dawson, A. J., et al.: Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 173: 4433–4442, 2004.
- 7) Ghiringhelli, F., Puig, P. E., Roux, S., et al.: Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*, 202: 919–929, 2005.
- 8) Liu, V. C., Wong, L. Y., Jang, T., et al.: Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol*, 178: 2883–2892, 2007.
- 9) Kamesaki, H., Fukuhara, S., Tatsumi, E., et al.: Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood*, 68: 285–292, 1986.
- 10) Uehira, K., Amakawa, R., Ito, T., et al.: A Hodgkin's disease cell line, KM-H2, shows biphenotypic features of dendritic cells and B cells. *Int J Hematol*, 73: 236–244, 2001.
- 11) Ishida, T., Ishii, T., Inagaki, A., et al.: Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res*, 66: 5716–5722, 2006.
- 12) Zou, W.: Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 6: 295–307, 2006.
- 13) Yang, Z. Z., Novak, A. J., Stenson, M. J., et al.: Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 107: 3639–3646, 2006.
- 14) Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., et al.: Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 93: 193–200, 2008.
- 15) van Leeuwen, E. M., Remmerswaal, E. B., Vossen, M. T., et al.: Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J Immunol*, 173: 1834–1841, 2004.
- 16) Khanna, R., Burrows, S. R., Thomson, S. A., et al.: Class I processing-defective Burkitt's lymphoma cells are recognized efficiently by CD4+ EBV-specific CTLs. *J Immunol*, 158: 3619–3625, 1997.

[受 賞]

アデノ随伴ウイルスベクターを用いた モルモット蝸牛内への遺伝子導入

小西 将矢, 河本 光平, 八木 正夫, 井上 俊哉, 友田 幸一

(関西医科大学耳鼻咽喉科学講座)

Gene Transfer into Guinea Pig Cochlea via Several Serotypes of AAV Vectors

Masaya KONISHI, Kohei KAWAMOTO, Masao YAGI, Toshiya INOUE, Koichi TOMODA

Department of Otolaryngology, Kansai Medical University

はじめに

神経性難聴である感音難聴は加齢・アミノグリコシド系薬剤・白金製剤・騒音暴露等にて容易にひきおこされる。これらの後天性の難聴は主に内耳の感覚細胞である有毛細胞の変性・消失に起因し、quality of life を低下させる。有毛細胞は一度消失すると再生せず永久的な難聴をきたすため、現在様々な方法で有毛細胞の再生が試みられているが、その中でも遺伝子導入の技術を用いた手技が最も効果的であり、安全かつ有効な遺伝子導入手技の確立が重要と考えられている¹⁻³⁾。

理想の遺伝子導入方法は人体に無害なベクターを用いること、遺伝子発現の on off が可能であること、そして目的とする細胞にのみ遺伝子発現できることである。人体の各組織によって当然これらの条件は異なってくるため、それぞれのケースにあったカスタマイズされたシステムの確立が必要となる。

アデノウイルスはその高率な遺伝子導入により臨床応用を含め、各分野で頻用されるベクターのひとつである。しかしながら内耳においては遺伝子導入可能な細胞は限られており、投与方法によっては内耳再生には向いていない⁴⁾。

内耳においては臨床応用を考慮すると、安全かつ簡便な投与経路で投与可能である必要があり、アデノ随伴ウイルスベクターがその候補となりうると考えられる。

今回我々は 6 種類の血清型のアデノ随伴ウイルスを用いてモルモット内耳に投与し、遺伝子発現分布の差、また聴覚閾値の変化について検討を加えた。また遺伝子発現分布の比較検討のためアデノウイルスベクターも用いた。

方 法

動物

体重が 350～400 g のハートレー系の有色モルモットを合計 36 匹使用した。動物の扱いは NIH のプロトコールもしくは文部科学省および関西医科大学動物実験委員会の規程に則った。

手術

キシラジンとケタミンの混合麻酔を腹腔内投与し、全身麻酔をかけたあとに左耳周囲を剃毛し、消毒ののちに 1%E リドカインで皮下麻酔を施行後、耳後部切開を入れた。中耳骨包を開放して蝸牛基底回転を明視下におき、正円窓から頂回転側約 2 mm の部位の蝸牛階基底回転に小孔をあけ、0.1 mm の直径（内径）をもつ極細のポリエチレンチューブを挿入し、5 μ l のウイルス溶液もしくはコントロール溶液をゆっくり注入した⁵⁾。すべての動物において左耳を術側とし、右側をコントロールとした。溶液の内耳内への拡散を期待して注入後約 10 分間チューブを留置したのちに抜去し、歯科用セメントで小孔を閉鎖した。中耳骨包

もセメントで閉鎖し、皮膚を PDS 糸で縫合して手術終了した。術後は感染予防としてクロラムフェニコールを皮下注した。術後は特に行動異常、食餌量低下、体重減少などの症状は認めなかった。

アデノ随伴ウイルスベクター

アデノ随伴ウイルスベクターは GFP 遺伝子、CMV プロモーターをもち、血清型は 1, 2, 5, 7, 8, 9 を使用した。これらのベクターはペンシルバニア大学の Vector Core より購入した⁶⁾。ベクター到着後は直ちに -80 度で保存し、使用する直前に解凍して人工外リンパ液で 2×10^9 genomic copies/ μ l になるように希釈した。

アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターは *LacZ* 遺伝子、CMV プロモーターをもち、かつ E1/E3 を欠損させた（自己複製不可）ベクターを使用した。これらのベクターはアイオワ大学より購入した。ベクター到着後は直ちに -80 度で保存し、使用する直前に解凍して人工外リンパ液で 2×10^7 infectious particles/ μ l 希釈した。

聴性脳幹反応 (acoustic brainstem response: ABR)

手術後の聴力閾値の変化を評価するために ABR を用いた。周波数は 4, 8, 16 kHz を使用し、手術前日にベースラインとして ABR 測定し、術後 7 日目に再び測定してその閾値の差を計算した。

組織処理

アデノ随伴ウイルスベクター注入群は術後 7 日目に、アデノウイルスベクター注入群は術後 4 日目にネンプタルにて深麻酔をかけたのちに断頭し、左右の蝸牛を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。遺伝子導入の分布を観察するために大きく 2 つのグループに分類した。1 つは surface preparation の群であり、もうひとつは凍結切片を作成する群である。Surface preparation においては蝸牛の骨を除去し、顕微鏡下で血管条・蓋膜を除去した後に蝸牛軸からコルチ器を摘出した。組織は 0.3% Toriton X で 10 分処理したのちに Rhodamin 標識 phalloidin にてアクチンフィラメントを、DAPI にて核を染色し、その後 goat anti GFP 抗体と FITC 標識抗ヒツジ IgG 抗体を用いて遺伝

子発現の分布を観察し、*LacZ* 遺伝子の発現は抗 β -galactosidase 抗体および FITC 標識抗マウス IgG 抗体を用いて観察した。凍結切片においては蝸牛を 3% EDTA で脱灰したのちに 30% スクロースに浸透させ、OTC で包埋してクライオスタットで 5 μ m に薄切した。シリーズセクションとして Rhodamin 標識 phalloidin、抗 GFP 抗体、抗 β -galactosidase 抗体、DAPI 抗体を用いて染色した。各組織の観察は蛍光顕微鏡下に観察し、デジタルカメラで撮影した。対側はすべてコントロールとして用いた。

結 果

外リンパ腔投与したアデノウイルスベクターと 6 種類のアデノ随伴ウイルスベクターのモルモット内耳蝸牛コルチ器での導入遺伝子発現を図 1 に示す（アデノ随伴ウイルスベクター血清型 1, 2, 5, 7, 8, 9 の cryosection がそれぞれ c/d, a, f, h, j, l であり surface preparation がそれぞれ e, b, g, i, k, m）。アデノ随伴ウイルスベクター 6 種類全てにおいて内耳蝸牛内に遺伝子発現を認めた。特に GFP 遺伝子発現は内有毛細胞に発現を強く認めており、血清型 1, 2 と 9 においては外有毛細胞にもその発現を認めた（図 1 a, b, d, e, l, m の矢頭）。神経線維やらせん神経節細胞にはどの血清型においても遺伝子発現は認めなかったものの、spiral limbus や spiral ligament といったコルチ器周辺の組織内においても、fibrocyte であると考えられる細胞に血清型 1 と 7 では遺伝子発現を認めた（図 1 d, h の白抜き矢印〈ligament〉・矢頭〈limbus〉）。特に血清型 9 に関しては今回が内耳への遺伝子導入としては初回の報告であり、他組織でその遺伝子発現力の強さが示唆されているため、今回他の血清型との比較対象として遺伝子導入を試みた。しかし他のベクターとの間に顕著な遺伝子発現の様相は呈さず、血清型 1 や 2 と比較的同様な遺伝子発現を認めた（図 1 l, m）。尚、反対側の蝸牛や人工外リンパ液注入群では遺伝子発現は認めなかった（それぞれ図 1 の n/o と p/q）。アデノ随伴ウイルスベクターの遺伝子分布のまとめは表 1 に示すとおりである。遺伝子発現の比較検討のため用いたアデノウイルスベクターでは同手技でコルチ器内への発現は認めず、外リンパ腔に裏打ちした細胞（mesothelium cell）にのみ発現を認めた（図 2）。これらの細胞への遺伝子発現は今回のどの種のア

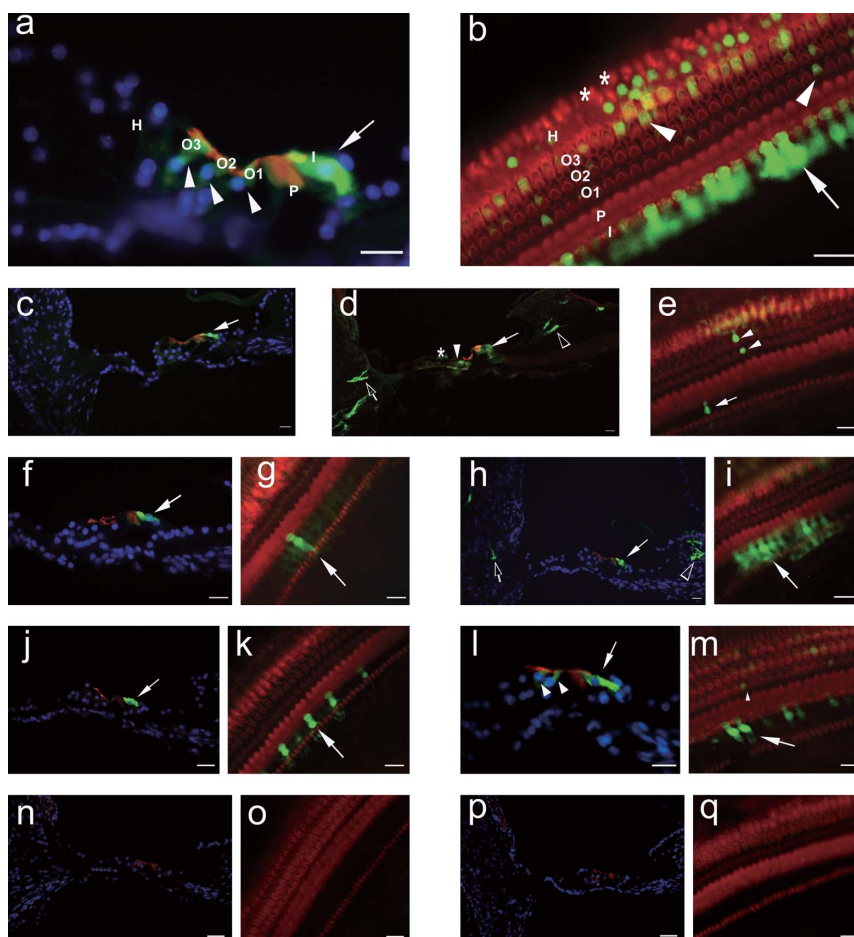


図 1 外リンパ腔投与した 6 種類のアデノ随伴ウイルスベクターのモルモット内耳蝸牛コルチ器での導入遺伝子発現 (アデノ随伴ウイルスベクター血清型 1, 2, 5, 7, 8, 9 の cryosection がそれぞれ c/d, a, f, h, j, l であり surface preparation がそれぞれ e, b, g, i, k, m). GFP 遺伝子発現は緑色, 核は青色 (DAPI), F-actin は赤色 (rhodamin 標識 phalloidin) で示した. cryosection と surface preparation とともに一列の内有毛細胞 (I) と 3 列の外有毛細胞 (O1, O2, O3) の間に支柱細胞 (P) が存在し, 外有毛細胞の外側にはヘンゼン細胞 (H) が存在している. アデノ随伴ウイルスベクター 6 種類全てにおいて内耳蝸牛内に遺伝子発現を認め, 特に GFP 遺伝子発現は内有毛細胞に発現を強く認めた. さらに血清型 1, 2 と 9 においては外有毛細胞にもその発現を認めた (a, b, d, e, l, m の矢頭). spiral limbus や spiral ligament といったコルチ器周辺の組織内においても, fibrocyte であると考えられる細胞に血清型 1 と 7 では遺伝子発現を認めた (d, h の白抜き矢印 <ligament>・矢頭 <limbus>). 血清型 9 に関しても血清型 1 や 2 と比較的同様な遺伝子発現を認めた (l, m). また反対側の蝸牛や人工外リンパ液注入群では遺伝子発現は認めなかった (それぞれ n/o と p/q). (スケールバーは全て 20 μ m)

デノ随伴ウイルスベクターにおいても認めなかった. 外リンパ腔投与による遺伝子発現は概してアデノ随伴ウイルスベクターとアデノウイルスベクターの両ベクターにおいて基底回転を中心に認め, 頂回転や第 3 回転といった蝸牛上方のコルチ器内にはその発現はほとんどなく, 唯一血清型 2 のみが第 3 回転まで内有毛細胞/外有毛細胞への遺伝子導入を認めた (表 2). 今回の内耳への遺伝

子導入の内耳毒性を評価するため, アデノ随伴ウイルスベクターの投与前後において ABR の閾値測定を施行した. 4, 8, 16 kHz の全てにおいて人工外リンパ液投与群とアデノ随伴ウイルスベクター投与群の間において有意な差は認められなかった (表 3). Surface Preparation 像においても GFP 遺伝子導入細胞における内, 外有毛細胞の変性, 消失は認められなかった.

表 1 アデノ随伴ウイルスベクターによる GFP 遺伝子発現のまとめ

	IHC	OHC	PC	DC	HC	SGC	SLM/SLG
血清型 1	+	+	-	-	+	-	+
血清型 2	++	++	-	-	++	-	+
血清型 5	+	-	-	-	-	-	+
血清型 7	+	-	-	-	-	-	+
血清型 8	+	-	-	-	-	-	+
血清型 9	+	+	-	-	+	-	+

++ : GFP 発現強陽性 surface preparation. において GFP 発現細胞が蝸牛 1/4 回転内に 100 個以上.
 + : GFP 発現陽性 surface preparation. において GFP 発現細胞が蝸牛 1/4 回転内に 1 個以上 100 個未満.
 - : GFP 発現陰性 surface preparation. において GFP 発現細胞を蝸牛 1/4 回転内に認めず.

IHC: inner hair cell, OHC: outer hair cell, PC: pillar cell, DC: Deiter's cell, HC: Hensen's cell, SGC: spiral ganglion cell, SLM: Spiral limbus, SLG: Spiral ligament.

表 2 アデノ随伴ウイルスベクター外リンパ腔投与における蝸牛コルチ器内への遺伝子発現率

	血清型 1	血清型 2	血清型 5	血清型 7	血清型 8	血清型 9
IHCs (%)						
Basal turn	21.5	97.2	11.1	46.0	23.8	42.8
Second turn	3.0	21.1	0	9.2	4.5	8.7
Third turn	0	3.4	0	0	0	0
Apical turn	0	0	0	0	0	0
OHCs (%)						
Basal turn	2.5	47.9	0	0	0	13.8
Second turn	0.3	4.4	0	0	0	1.5
Third turn	0	1.3	0	0	0	0
Apical turn	0	0	0	0	0	0

考 察

昨今、様々な疾患の病態が分子、遺伝子レベルで解明されてきており、現在のところ治療のない多くの内耳疾患もその例外ではない。それらの疾患において遺伝子治療は有望な治療法であり将来性が見込まれている。遺伝子治療を成功させるためには遺伝子導入法の確立が必要であり、安全かつ正確な導入法の確立が要求される。その理想は特定の細胞に目的とする遺伝子を導入し、さらにその on/off を制御できることであるが、現段階ではその全てを律しえるシステムは存在せず、その開発が試行錯誤されている。内耳遺伝子導入においては現在まで数々のベクターが試みられ、その遺伝子の分布・効率について報告されている⁷⁻⁹⁾。近年の報告では動物種、ベクターの種類、投与経路、プロモーターの違いによって、遺伝子が導入される細胞が異なることが明らかにされつつあ

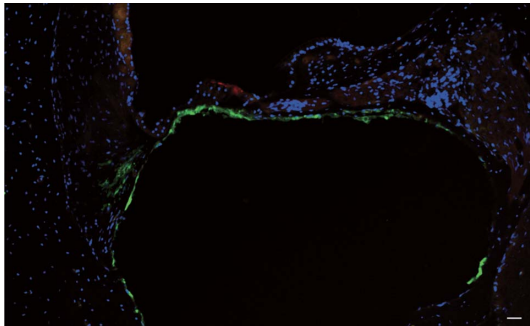
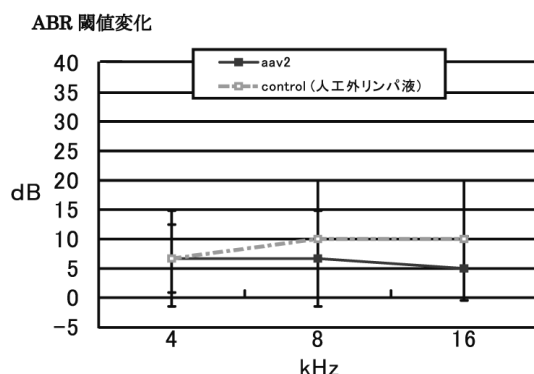


図2 外リンパ腔投与したアデノウイルスベクターのモルモット内耳蝸牛コルチ器での導入遺伝子発現。LacZ 遺伝子発現 (β-galactosidase) は緑色、核は青色 (DAPI)、F-actin は赤色 (rhodamin 標識 phalloidin) で示した。コルチ器内への LacZ 遺伝子発現は認めず、外リンパ腔に裏打ちした細胞 (mesothelium cell) にのみ発現を認めた。(スケールバーは 20μm)

表3 ABR 閾値変化



り^{10,11)}、内耳には多種類の細胞があるため、遺伝子導入できる細胞すなわち“ターゲティング”できる細胞によってはその効果は大きく異なる為、遺伝子分布を調べることは重要と考えられる。今回我々は外リンパ腔投与(cochleostomy)という投与経路にてCMVプロモーターを有する6つの血清型のアデノ随伴ウイルスベクターを用いて、内耳への遺伝子発現とその分布について検討した。内耳という周囲を骨壁に囲まれた特殊な空間内への遺伝子導入を考えた場合、投与経路の選択は非常に重要である。内耳の場合投与経路は大きく内リンパ腔投与と外リンパ腔投与に分かれる。コルチ器内により確実にベクターを導入することを考えた場合は内リンパ腔投与が有効であると考えられており、動物実験においてもモルモットですでにその手技は確立されている。ただ、手技の煩雑さや手技に伴う聴覚への副損傷を考えた場合臨床応用には向いていないと思われる。外リンパ腔投与は臨床的には正円窓経路法と人工内耳施工時に行うcochleostomyなどがあり、正円窓経路法は外来でも施工可能な手技となる。ただし動物実験レベルにおいてはモルモット内耳蝸牛内へアデノベクターを用いた実験で両者ともに行われており、確立した手技となっている^{5,12)}。外リンパ腔内への遺伝子発現レベルの高さと安全性の面を考慮した場合はcochleostomyが理想的とされており、今回我々はより臨床応用可能な遺伝子導入手技の確立を試みるためモルモット内耳蝸牛へのcochleostomyを用いた手技を選択するに至った。cochleostomyにおいては、さらにbolus shotで行うものとポンプを用いる手技とがあり、両手技とも

内耳に遺伝子発現をきたすという報告がモルモットでアデノ、アデノ随伴ウイルスベクター共にある^{1,5)}。ただ、ウイルスベクターが一般的に熱に弱いという性質を考慮した場合、ポンプを用いるとベクターは長時間体温下に存ポンプ内で存在することになり、失活する可能性があると考えられる。実際我々はアデノ、アデノ随伴ウイルスベクターの両者を用いポンプ経由にて外リンパ腔投与を行ったが蝸牛内への遺伝子発現は認めなかった(データ示さず)。それゆえ、モルモット内耳蝸牛へのウイルスベクターを用いる遺伝子導入という観点からはbolus shotによるcochleostomyが理想的であると考えられる。アデノ随伴ウイルスベクターはウイルスベクターとしては近年特に注目を浴びており、その理由としてベクターそのものが非毒性であるということ、多種臓器において遺伝子導入され、その遺伝子発現期間が比較的長期であることなどがあげられる。さらに血清型によっては遺伝子導入する細胞が異なってくる可能性が示唆されており、“ターゲティング”可能なベクターとして期待されている¹³⁻¹⁵⁾。各血清型間における組織特異(嗜好)性について言及すれば、中でも血清型2は汎用されており、肝、筋肉、肺や中枢神経系といった様々な種類の細胞に遺伝子導入が試みられその成果を得ている¹⁶⁾。血清型2とほぼ同様、多種に渡って遺伝子導入を示すがとりわけ筋肉における遺伝子導入率が高いとされているのが血清型1, 7, 9である。さらに肝臓においては血清型8では血清型2と比し約20倍も導入率が高いとマウスをもちいた研究で報告されている¹⁶⁾。中枢神経系の細胞においては血清型1, 4, 5が他の血清型と比し組織嗜好性が高いと報告されている¹⁶⁾。

内耳においては、Lalwamiらが最初にアデノ随伴ウイルスベクターによるポンプを用いた外リンパ腔投与法(cochleostomy手技)で、螺旋神経節やコルチを含めた周辺の組織に遺伝子導入されたと報告している⁹⁾。しかし実際コルチ器内のどの細胞内に導入をきたしたのかは定かでなく、またその後の他の研究者らの報告では外リンパ腔からのアデノ随伴ウイルスベクター投与ではモルモットコルチ器内への遺伝子導入は認めなかったと報告された⁴⁾。近年マウスにおいても同様にCBAプロモーターを有するアデノ随伴ウイルスベクター

を用い、正円窓膜を通して遺伝子導入が試みられており¹¹⁾、コルチ器内や螺旋神経節細胞に発現がみられたと報告されている。その中でとりわけ血清型 3 においては内有毛細胞に特異的に遺伝子導入がなされたと述べられ、“ターゲティング”の可能性を示唆している。さらにマウスの *in vitro* の実験において、GFAP プロモーターを有するアデノ随伴ウイルスベクターを培養されたコルチ器を含めた内耳細胞へ導入することで支持細胞への遺伝子導入を特異的に認めたとする報告もある。

今回我々が得た結果では汎用プロモーターである CMV プロモーターを有する 6 種の血清型全てで内有毛細胞への遺伝子導入を認めており、血清型 1, 2, 9 においては外有毛細胞においてもその発現が示された。とりわけ血清型 2 においてはその発現は強く基底回転から第 3 回転に至るまで大部分の内有毛細胞に遺伝子発現を認めていたが、他の血清型ではそのほとんどが基底回転から第二回転に局限していた。これらの傾向はアデノベクターにおいてもみられたが、外リンパ液の流量が極めて低いことの影響が大きいと考えられる。コルチ器内の細胞においては血清型 2 には劣るものの血清型 5, 7, 8 で内有毛細胞に特異的に遺伝子発現を認めているものの、コルチ器周辺の spiral imbus や spiral ligament といった組織中の fibrocyte にも今回用いた 6 種全てのベクターで遺伝子発現を認めており“ターゲティングベクター”という意味ではその使用は難しく、今後の課題と考えられる。

内耳再生においてコルチ器以外の蝸牛内の重要な細胞と考えられる螺旋神経節細胞への遺伝子導入に関しては、マウスにおいては中枢神経系に細胞嗜好性を認める血清型 5 を用いた場合、螺旋神経節細胞に遺伝子導入を認めていたが、今回我々の得た結果では螺旋神経節細胞にはいかなる血清型においてもその遺伝子発現を確認するには至らなかった。投与方法は共に外リンパ腔投与であることを考えればこれらの違いはプロモーターの違いや種の違いに依存すると考えられる。海馬領域のアデノ随伴ウイルスベクターによる遺伝子導入の報告では血清型とプロモーターの組み合わせ次第ではその発現分布が大きく異なることが示唆されており、GFAP 等他のプロモーターを有したアデノ随伴ウイルスベクターを同手技でモルモット

蝸牛に遺伝子導入を今後試みる必要性があると考ええる。

外リンパ腔投与法により遺伝子発現が内有毛細胞を主体としたコルチ器内の細胞に認めた理由としては、アデノ随伴ウイルスベクターの組織嗜好性とコルチ器の構造的な問題との影響があると推測される。アデノ随伴ウイルスベクターは血清型の違いにより細胞に進入する際に要する細胞表面受容体があり、血清型 2 においてはヘパラン硫酸プロテオグリカンや FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) やインテグリン $\alpha \cdot \beta$ がその候補とされている¹⁷⁻¹⁹⁾。さらにシアル酸の関与は血清型 4 や 5 で、血小板由来成長因子受容体は血清型 5 で、36 kD laminin receptor は血清型 2, 3, 8, 9 での関与が報告されている²⁰⁾。今回血清型 2 において最も強く遺伝子発現を認めたため、我々は最も有力な血清型 2 の共受容体であるヘパリン硫酸プロテオグリカンの関与を仮説として考えた。ヘパラン硫酸プロテオグリカンの中でも様々な細胞表面受容体としての関与が示唆されている Perlecan が蝸牛内においていかなる分布をしているのかを検討するため免疫染色を行った。結果に示していないが Perlecan の発現はコルチ器内には認めず、アデノ随伴ウイルスベクターによる遺伝子発現分布との一致はみなかった。他の報告においてもヘパリン硫酸プロテオグリカンはコルチ器内に発現を認めておらず、蛋白レベルにおいて発現レベルが弱すぎるのか、コルチ器内の細胞表面にヘパラン硫酸プロテオグリカンが存在しないのかは不明である。さらに laminin receptor やインテグリンに関しても同様に免疫染色を行ったが、その分布は見出せなかった(データ示さず)。細胞表面受容体を含め、アデノ随伴ウイルスベクターにおける細胞進入システムそのものが現在諸研究者らにより解明中であり、今後の結果が期待される。

コルチ器の構造的な問題から今回の遺伝子発現の結果について検討すると、蝸牛内において内リンパ腔と外リンパ腔は tight junction で隔離されており、その junction はコルチ器内においては reticular lamina に存在するとされている²¹⁾。すなわち外リンパ腔内に存在する外リンパ液は基底板を越え、コルチ器を構成する各細胞は外リンパ液で満たされていると考えられている。しかし、アデノベクターを用いた外リンパ腔投与では外リ

ンパ腔に裏打ちした細胞にのみ遺伝子発現が認められ、コルチ器内には遺伝子発現を認めなかった。すなわちアデノウイルスベクターは基底膜を越えることができなかったことが推測されるが、アデノウイルスベクターとアデノ随伴ウイルスベクターの注目すべき違いの一つはその大きさであり、後者は前者の約四分の一である²²⁾。すなわち今回の結果からアデノ随伴ウイルスベクターはその小ささゆえに基底膜を越えてコルチ器内に進入しえた可能性が示唆される。さらに内支柱細胞と内有毛細胞の間においても tight junction の欠如がいわれており²¹⁾、このことが内有毛細胞への発現が強くみられたことに関与している可能性も否めない。

今回のアデノ随伴ウイルスベクターを用いた外リンパ腔投与法の内耳の毒性の評価であるが ABR の評価においてはアデノ随伴ウイルスベクター投与前後で閾値変化は人工外リンパ液を同様に投与した場合と比して変わりなく、アデノ随伴ウイルスベクターそのものによる聴覚障害はなかったことが示唆された。Surface preparation 像、cross section 像ともに遺伝子導入された細胞の変性、消失は認めずベクターによる遺伝子導入が無毒であることを裏付けている。ベクター投与群、人工外リンパ液投与群ともに投与前後での聴覚閾値変化を考慮した場合、顕著な閾値上昇を認めなかったことから今回の cochleostomy による外リンパ腔投与手技が安全であることが示唆された。

結 語

今回、6 種類のアデノ随伴ウイルスベクターを用いてモルモット内耳における遺伝子分布の発現について検討した。臨床応用が可能である外リンパ腔への投与方法においてコルチ器への遺伝子発現を認めた。主な細胞は内有毛細胞であり、特に血清型 2 においてその効率は高かった。この遺伝子導入の手技において特に聴覚閾値に変化はみられず、安全に投与が可能であった。今後は異なる遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルスを作成し、内耳への効果につき検討を加えたい。

本論文は、学位論文 (J Gene Med 10: 610-618, 2008) を基に、第 8 回関西医科大学医学会賞 (2009 年 3 月 6 日) に応募口演し、医学会賞奨励賞を受賞した際の発表要旨でもある。また本研究は、関

西医科大学耳鼻咽喉科研究助成会の支援を受けた。

文 献

- 1) Lalwani, A. K., et al., *Development of in vivo gene therapy for hearing disorders: introduction of adeno-associated virus into the cochlea of the guinea pig*. Gene Ther, 1996. 3(7): p. 588-92.
- 2) Derby, M.L., et al., *Gene transfer into the mammalian inner ear using HSV-1 and vaccinia virus vectors*. Hear Res, 1999. 134(1-2): p. 1-8.
- 3) Han, J.J., et al., *Transgene expression in the guinea pig cochlea mediated by a lentivirus-derived gene transfer vector*. Hum Gene Ther, 1999. 10(11): p. 1867-73.
- 4) Ishimoto, S., et al., *Gene transfer into supporting cells of the organ of Corti*. Hear Res, 2002. 173(1-2): p. 187-97.
- 5) Stover, T., M. Yagi, and Y. Raphael, *Cochlear gene transfer: round window versus cochleostomy inoculation*. Hear Res, 1999. 136(1-2): p. 124-30.
- 6) Hildinger, M., et al., *Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer*. J Virol, 2001. 75(13): p. 6199-203.
- 7) Luebke, A. E., et al., *Cochlear function and transgene expression in the guinea pig cochlea, using adenovirus- and adeno-associated virus-directed gene transfer*. Hum Gene Ther, 2001. 12(7): p. 773-81.
- 8) Li Duan, M., et al., *Adenoviral and adeno-associated viral vector mediated gene transfer in the guinea pig cochlea*. Neuroreport, 2002. 13(10): p. 1295-9.
- 9) Lalwani, A., et al., *Long-term in vivo cochlear transgene expression mediated by recombinant adeno-associated virus*. Gene Ther, 1998. 5(2): p. 277-81.
- 10) Liu, Y., et al., *Promoter effects of adeno-associated viral vector for transgene expression in the cochlea in vivo*. Exp Mol Med, 2007. 39(2): p. 170-5.
- 11) Liu, Y., et al., *Specific and efficient transduction of Cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector*. Mol Ther, 2005. 12(4): p. 725-33.
- 12) Staecker, H., et al., *Gene expression in the mammalian cochlea: a study of multiple vector systems*. Acta Otolaryngol, 2001. 121(2): p. 157-63.
- 13) Rabinowitz, J. E., et al., *Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity*. J Virol, 2002. 76(2): p. 791-801.
- 14) Rutledge, E. A., C. L. Halbert, and D. W. Russell, *Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2*. J Virol, 1998. 72(1): p. 309-19.
- 15) Gao, G.P., et al., *Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy*. Proc Natl Acad Sci USA, 2002. 99(18): p. 11854-9.
- 16) Wu, Z., A. Asokan, and R. J. Samulski, *Adeno-associated*

- virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy.* Mol Ther, 2006. 14(3): p. 316–27.
- 17) Summerford, C. and R.J. Samulski, *Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions.* J Virol, 1998. 72(2): p. 1438–45.
- 18) Asokan, A., et al., *Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry.* J Virol, 2006. 80(18): p. 8961–9.
- 19) Qing, K., et al., *Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2.* Nat Med, 1999. 5(1): p. 71–7.
- 20) Kaludov, N., et al., *Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity.* J Virol, 2001. 75(15): p. 6884–93.
- 21) Nadol, J.B., Jr., *Intercellular junctions in the organ of Corti.* Ann Otol Rhinol Laryngol, 1978. 87(1 Pt 1): p. 70–80.
- 22) Dutta, S.K., *Isolation and characterization of an adeno-virus and isolation of its adenovirus-associated virus in cell culture from foals with respiratory tract disease.* Am J Vet Res, 1975. 36(3): p. 247–50.

[受 賞]

ヒト脂肪組織由来幹細胞における FGF-2 の 脂肪分化に与える影響

覚道奈津子, 下間亜由子, 楠本 健司

(関西医科大学形成外科学講座)

Fibroblast Growth Factor-2 Stimulates Adipogenic Differentiation of Human Adipose-derived Stem Cells

Natsuko KAKUDO, Ayuko SHIMOTSUMA, Kenji KUSUMOTO

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kansai Medical University

緒 言

脂肪組織には、脂肪組織由来幹細胞 (ASCs: Adipose-derived Stem Cells) と呼ばれる体性幹細胞が含まれており、それらは、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋肉細胞、神経細胞等へと分化する能力を有する¹⁻³⁾。ヒト ASCs のほとんどは、形態的には線維芽細胞の特徴を有し、標準的な組織培養の条件で容易に増殖し、長期の培養でも安定している⁴⁾。これまで臨床においては、間葉系幹細胞の採取源として代表的なものは骨髄であった。それに対し脂肪組織は、形成外科手術の際の余剰組織として採取することが容易であり、局所麻酔下でも採取可能である。また骨髄採取に比較して脂肪組織採取は侵襲も少なく、採取後の疼痛も非常に少なく、ドナーサイトの変形・欠損も非常に少なくおこなえる。

一方、Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) は、別名 basic FGF と呼ばれ、ヘパリン結合増殖因子ファミリーに属する⁵⁾。現在までに、20 種以上の FGF が同定されており、細胞増殖・血管新生を促進し、初期の分化や発生プロセスに重要な役割を果たすことが明らかになっている⁶⁾。臨床において遺伝子組み換え FGF-2 製剤は既に臨床使用が認

可され、褥瘡、皮膚潰瘍治療に使用されている。骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) に FGF-2 を添加すると、細胞増殖が促進し、脂肪細胞への分化を促進する⁷⁾。また、ASCs に FGF-2 を添加すると、骨への分化が阻害され⁸⁾、軟骨細胞への分化は促進する⁹⁾。しかし、ASCs の脂肪分化能に対する FGF-2 の効果に関する研究はこれまでに行われていない。

本研究では FGF-2 による ASCs の増殖と脂肪分化への効果とそのメカニズムについて検討をおこなった。ASCs の脂肪分化における増殖期、分化誘導期で FGF-2 を添加し、Oil red O 染色 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性の測定をおこない脂肪分化度を測定するとともに、脂肪分化特異的遺伝子の発現を Real-time RT-PCR を用いて検討した。

材料と方法

材料

FGF-2 は PeproTech, Ltd. (英国, ロンドン) から入手し、他の材料は特記したもの以外 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から入手した。細胞培養に関係するプラスチック類は、Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ) から入手した。

ASCs 初代培養

形成外科手術で摘出した余剰組織からヒト腹部

本論文は、Biochem. Biophys. Res. Commun. 359: 239-244, 2007 に掲載された論文を和文により二次出版したものである。

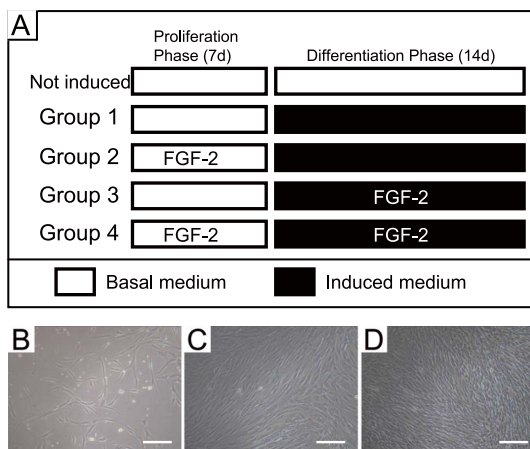


図 1 (A) 実験群. (B) 初代培養第 1 日の ASCs. (C) FGF-2 を添加せずに 7 日間培養した ASCs. (D) FGF-2 (10 ng/ml) を添加し 7 日間培養した ASCs. (Bar, 100 μm).

皮下脂肪を採取した。Zuk らの方法で (ASCs) を調製した^{1,4)}。すなわち、脂肪組織を 20ml のリン酸緩衝食塩水 (PBS) (9.57 mM, pH 7.4) で十分に 3 回洗浄し、小片に切り分け、0.1% collagenase 溶液を添加し、37°C で 40 分間振とうさせて細胞を分散させた。DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% ペニシリンからなる基礎培地を加えた後、1,500 rpm で 3 分間遠心分離した。100 mm ナイロンメッシュで、未消化組織を除去した後、十分に基礎培地で洗浄のち、プラスチックシャーレにて 37°C, 5% CO₂ 下に細胞培養した。シャーレ底面に接着した ASCs を基礎培地中で 3 代培養し実験に供与した。本研究は関西医科大学の倫理委員会の承認 (倫理承認第 617 号) を得て行った。次に、24 ウェルプレートに 1,000 cells/cm² の密度で ASCs を播種し、細胞の増殖期、分化期に FGF-2 を添加した (図 1)。すなわち、増殖期には 10 ng/ml FGF-2 を添加した、あるいは添加しない基礎培地にてコンフルエンスに到達するまで 2-3 日毎に培地交換を行い、分化期には FGF-2 の存在下、あるいは非存在下で、脂肪分化培地にて細胞を 14 日間分化させた (図 1)。脂肪細胞分化誘導には、それぞれ最終濃度が 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1 mM dexamethasone, 10 mM insulin, 200 mM indomethacin となるように分化誘導物質を基礎培地に添加し、これを脂肪分化誘導培地として用いた^{1,4)}。

Oil red O 染色

脂肪細胞分化誘導培地で ASCs を 14 日間培養したのち、PBS 溶解した 10% ホルムアルデヒド溶液中で 1 時間固定した。PBS で洗浄し、Oil red O 溶液 (Wako, Osaka, Japan) を用いて 2 時間染色し、その後、蒸留水で洗い流した¹⁰⁾。光学顕微鏡下で脂肪滴を観察した後、色素を 100% イソプロパノールに 15 分間溶解させた。溶液の吸光度を、Plate Readers (ARVO sx-1) (Perkin Elmer, Inc., MA, USA) を使って 500 nm で測定し脂肪分化度を測定した¹¹⁾。

総タンパク質量および GPDH 活性の測定

総タンパク質量は、BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE, Rockford, USA) を使用し測定した。GPDH 活性は、GPDH Activity Assay Kit (TAKARA BIO INC., Japan) を使用した。

RNA 抽出および cDNA 合成, Real-time RT-PCR

Total RNA を RNasy Mini Kit (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA) を用いて分離し、RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Inc.) を使い、DNase 処理を行った。4 μg の Total RNA に対し、250 pmol のランダムプライマー、100 U の SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) を 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT, ならびに 10 mM dNTPs を用いて逆転写を全容積 20 μl の反応系で実施した。Total RNA とランダムプライマーを混和したものを 70°C で 10 分間加熱し、その後直ちに氷上で冷却し、他の試薬を加えた。42°C で 50 分間、98°C で 5 分間加熱した後 cDNA を得た。

脂肪分化特異的遺伝子、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPARγ, Hs00234592_m1), glucose transporter 4 (GLUT4, Hs00168966_m1), CCAAT enhancer-binding protein α (C/EBPα, Hs00269972_s1) ならびに内部標準遺伝子 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプローブおよび TaqMan プローブを Applied Biosystems (TaqMan® Gene Expression Assays) から入手した。それぞれの TaqMan プローブをオリゴヌクレオチドの 5' 末端にある reporter dye (FAM) と、3' 末端にある quencher dye (TAMRA) で標識した。

標的 cDNA (PPARγ, GLUT4, C/EBPα) と内部

標準遺伝子 (GAPDH) の定量を, Real-time PCR Opticon 2 (MJ Japan, Tokyo, Japan) を使って実施した. データ収集と分析は, 装置付属のソフトウェアを用いて実施した. PCR は, 10–100 ng の全 RNA に相当する cDNA, 12.5 ml の 1×TaqMan Universal PCR Master Mix, 1.25 ml の 20×TaqMan Expression Assay 試薬を含む最終容積 25 μ l で実施した. サーマルサイクラーの設定条件は, 50 $^{\circ}$ C で 2 分間, 95 $^{\circ}$ C で 10 分間, 95 $^{\circ}$ C で 15 秒間, 60 $^{\circ}$ C で 1 分間を 50 サイクル実施した. comparative C_T データ解析法を用いてデータを解析した.

統計解析

Mann-Whitney U 検定を用いて, $p < 0.05$ を有意水準とし, グループ間を比較した. データは平均 $\pm$ S.D. で示した.

結 果

FGF-2 の添加による ASCs の形態変化

ASCs の脂肪細胞への分化に対する FGF-2 の効果を検討するため, 図 1A に示すグループ分けにて FGF-2 を添加した. すなわち, ASCs を基礎培地のみで培養し, 脂肪への分化誘導を行わない群 (Not induced), 分化誘導のみ行い, FGF-2 を添加しない群 (グループ 1), 増殖期にのみ FGF-2 を添加する群 (グループ 2), 分化期にのみ FGF-2 を添加する群 (グループ 3), 増殖期・分化期ともに FGF-2 を添加する群 (グループ 4) に分けた. 図 1 の白のボックスは基礎培地を示し, 黒のボックスは, 脂肪分化誘導培地を示す.

FGF-2 を添加, あるいは添加せずに 7 日間培養した ASCs の形態を位相差顕微鏡写真で観察したところ (図 1B, C, D), 初代培養された ASCs は, 初代培養第 1 日に, 線維芽細胞の外見を呈し (図 1B) FGF-2 を加えない Control 群と比較して, FGF-2 添加群は, 形態学的に細胞が小さく, 緊密で核は白く光っていた (図 1C, D).

ASCs の脂肪細胞分化に対する FGF-2 の効果

基礎培地のみで培養, すなわち脂肪細胞分化誘導を行わず, FGF-2 も添加せずに培養すると, 細胞内に脂肪滴は全く観察されなかった (図 2 “not induced”, 図 3B). さらに, 脂肪分化マーカーの一つである GPDH 活性は, 分化誘導物質が存在しな

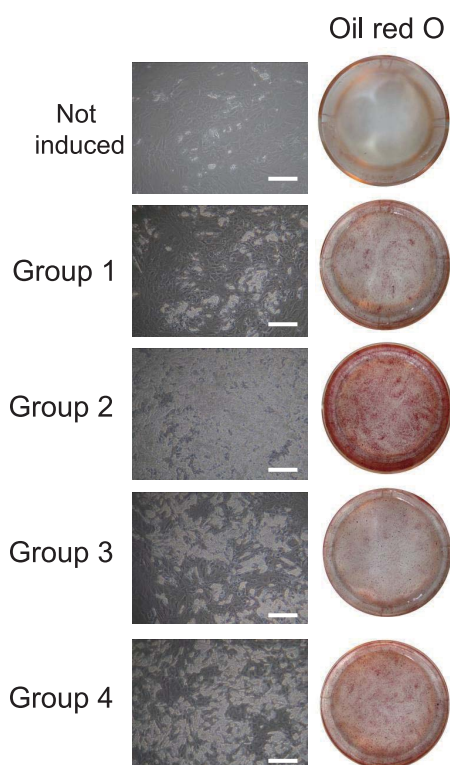


図 2 分化期 14 日目の位相差顕微鏡像と Oil red O 染色. (Bar, 100 μ m).

い場合には, ほとんど認められなかった (図 3A).

実験群の Oil red O 染色では FGF-2 を添加しなかったグループ 1 の細胞に脂肪分化誘導培地で誘導したところ ASCs の細胞質内に脂肪滴をわずかにしか生じなかった (図 2, グループ 1). 一方, 増殖期で FGF-2 を添加したグループ 2 において, ASCs の脂肪分化度は促進していた (図 2, 3B). 分化期だけに FGF-2 を添加したグループ 3 は, グループ 1 と比較して脂肪分化度にほとんど差を認めなかった (図 2, 3B). 増殖期, 分化期に FGF-2 を添加したグループ 4 は, 脂肪分化が促進していた (図 2, 3B). 脂肪蓄積量, GPDH 活性も, 上記の結果に対応する結果となり, グループ 1 と比較しグループ 2, グループ 4 において有意に促進していた. とくにグループ 2 において GPDH 活性は, グループ 1 に比較しグループ 2 が 4 倍の活性値を示していた.

脂肪細胞特異遺伝子 PPAR γ と, 脂肪細胞分化の後期マーカーである GLUT4 の発現を, 分化第 14

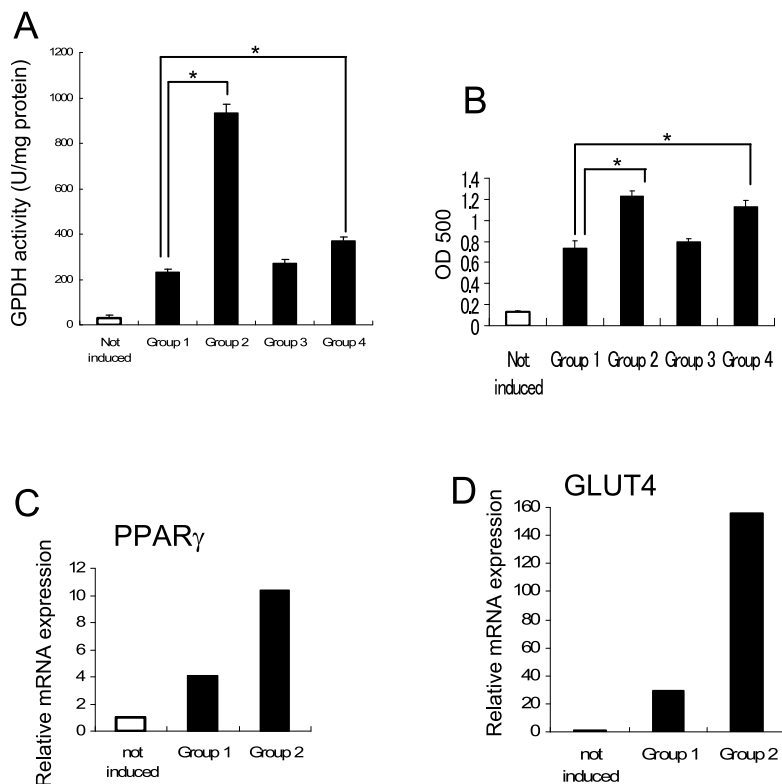


図3 (A) 分化期 14 日目の GPDH 活性. (B) 分化期 14 日目の脂肪分化度. * $p < 0.05$. (C) (D) 分化期 14 日目の PPAR γ と GLUT4 の発現.

日に Real-time RT-PCR にて検討した. 脂肪分化誘導培地処理した細胞群では, 誘導しなかったグループと比較して, PPAR γ の発現レベルが 4 倍になり, さらに増殖期に FGF-2 を添加したグループ 2 では PPAR γ の発現レベルが 10.8 倍増加した (図 3C). グループ 1 と 2 での GLUT4 の発現レベルは, 分化誘導を行わなかった群のそれぞれ 28.2 倍と 155.1 倍であった (図 3D).

ASCs の増殖期の FGF-2 添加群, 未添加群における PPAR γ ・C/EBP α の発現

PPAR γ と C/EBP α の遺伝子発現を, FGF-2 を添加した場合と添加しなかった場合での, コン플エンスまでの増殖期にて検討した (図 4). FGF-2 を添加した細胞での PPAR γ の発現は, 増殖期に FGF-2 を添加しなかったグループと比較して著明に増加した. とりわけ, FGF-2 を培地に添加すると, 第 5 日の PPAR γ の発現が 4.9 倍増加した (図

4A). 対照的に, FGF-2 で処理した細胞での C/EBP α 遺伝子の発現レベルは, FGF-2 を添加しなかったグループと比較してほとんど変化しなかった (図 4B).

考 察

本研究では, ヒト ASCs の脂肪分化の制御における FGF-2 の作用機序の一部と, ヒト ASCs の脂肪細胞分化における新しい *in vitro* モデルでの重要な特性について明らかにした. PPAR γ と C/EBP α は, 脂肪分化の後期段階で発現し, 脂肪細胞遺伝子の発現を誘導し, インスリン感受性を高めることを通じて脂肪細胞分化を促進するのに中心的な役割を果たしている^{12,13}. 増殖期の基礎培地に FGF-2 を添加すると, ASCs の重要な脂肪分化マーカーの一つである PPAR γ の発現が上昇した. FGF-2 を増殖期に添加された ASCs は, 添加されていない ASCs と比較して, 脂肪細胞に分化する

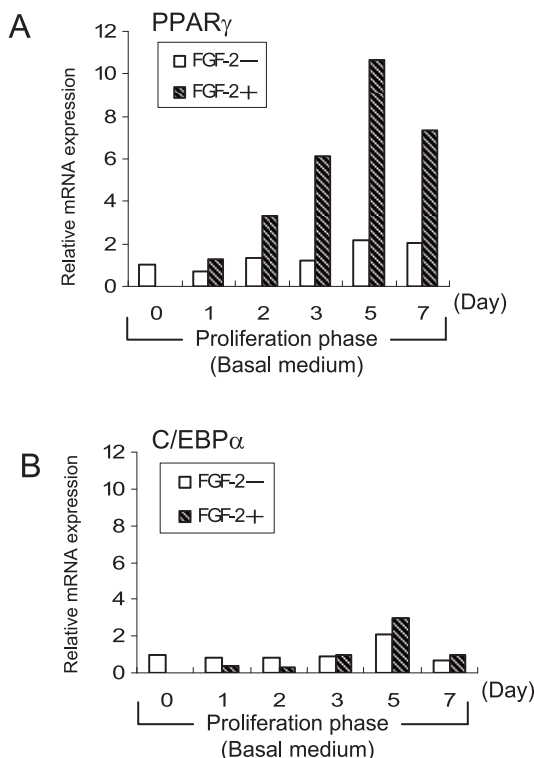


図4 ASCsの増殖期の FGF-2 添加群 (10 ng/ml), 未添加群における PPAR γ (A)・C/EBP α の発現 (B)。

割合が有意に高かった。Oil red O 染色と GPDH 活性の測定結果は、これらの結果を支持していた。以上より、FGF-2 で増殖した ASCs は、脂肪分化能力が高いことを示した。

近年、ヒト ASCs の増殖と、脂肪細胞への分化能力に対して FGF-2 が作用することが報告されている。Inoue らは、FGF (≥ 10 ng/ml) を含む通常培地で培養した ASCs を、脂肪分化誘導を行うと、GPDH の活性が有意に上昇し、それらの増殖や分化は、Scaffold や FGF-2 濃度の影響を受けることを報告した¹⁴⁾。しかし、彼らの実験系では、Scaffold としてポリマーフィルムを用いており、細胞培養プレートには、タイプ I もしくはタイプ IV コラーゲン、ゼラチン、FGF-2 がコーティングされていたものであるため FGF-2 の効果を正確に反映させる実験系とは言いがたい。また、10 ng/ml 以上の濃度の FGF-2 を脂肪分化誘導培地に添加すると、GPDH 活性を抑制したという報告もある¹⁵⁾。本研究では、分化誘導前に FGF-2 で細胞を処理すると、ASCs の脂肪分化が促進されるが、脂肪分

化誘導培地に FGF-2 を添加した場合 (グループ 3) には、促進効果は認められなかった。このように、ASCs の細胞培養において、分化誘導前に FGF-2 を添加した場合にのみ ASCs の脂肪細胞分化が促進されることが初めて明らかになった。この結果は、FGF-2 添加のタイミングが脂肪分化促進において重要であることを示している。

一方、BMSCs の PPAR γ リガンド誘発性の脂肪細胞形成を FGF-2 が高めたことが報告されている⁷⁾。Neubauer ら⁷⁾は、BMSCs の PPAR γ 発現を誘導することで、FGF-2 は脂肪細胞分化に直接の作用を発揮していると報告した。本研究においては、ASCs の増殖期に FGF-2 を添加することで、分化に著明な増加を引き起こすことを示し、FGF-2 投与群の PPAR γ の発現レベルも FGF-2 非投与群と比較して高かった。これらのデータは、脂肪細胞への分化系譜へのコミットメントに FGF-2 が直接の効果を有していることを示すものと考えられる。Balb/3T3-L1 前駆脂肪細胞の脂肪分化誘導実験系のなかで、MEK/ERK シグナル伝達経路を活性化させることで、PPAR γ 遺伝子発現レベルを高めて脂肪細胞形成を促進することが明らかになっている¹⁶⁾。脂肪細胞系譜へのコミットメントに対する直接の作用において、FGF-2 が分化に関与する機序として、MEK/ERK を含む MAPK シグナル伝達経路が、脂肪分化に重要な役割を果たしており、そのなかでも FGF-2 は MEK/ERK 経路の強力な活性化因子であることが知られている⁶⁾。従って、今後の研究課題として、本研究における脂肪分化における PPAR γ 遺伝子発現レベルの上昇と MEK/ERK シグナル伝達経路の関与の検討が重要であると考えられた。

幹細胞の再生医療応用においては、少量のドナー組織から分化能を有する幹細胞を大量調製することが求められる。本研究では、分化誘導前に ASCs に FGF-2 を添加すると、最も強い脂肪細胞分化を誘導することが明らかになり、GPDH 活性および Oil red O 染色が促進した。FGF-2 添加に伴い PPAR γ 遺伝子の発現も経時的に上昇した。FGF-2 は、強力な増殖促進効果を有するだけでなく FGF-2 を用いて ASCs を増殖させると、ASCs の脂肪細胞分化も促進することが示唆された。このことにより、FGF-2 添加培地を用いて少量のドナー (脂肪組織) から脂肪への分化能を有する幹細胞 (ASCs)

を大量に調製することが可能であることが明らかになり、今後 ASCs を用いた脂肪組織の再生医療応用に有用であることが期待される。

謝 辞

本研究にあたり御助言頂いた京都工芸繊維大学大学院応用生物学部門細胞分子工学講座教授・竹谷茂先生に深謝します。本研究の一部は、2005 年関西医科大学が学内研究助成Fを受けて行なった。

本論文は、学位論文 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 359: 239–244, 2007) を基に、第 8 回関西医科大学医学会賞 (2009 年 3 月 6 日) に応募口演し、医学会奨励賞を受賞した際の発表要旨でもある。

文 献

- 1) P. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. Futrell, A. Katz, P. Benhaim, H. Lorenz, and M. Hedrick, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7 (2001) 211–28.
- 2) M. Hedrick, and E. Daniels, The use of adult stem cells in regenerative medicine. *Clin Plast Surg* 30 (2003) 499–505.
- 3) D. De Ugarte, K. Morizono, A. Elbarbary, Z. Alfonso, P. Zuk, M. Zhu, J. Drago, P. Ashjian, B. Thomas, P. Benhaim, I. Chen, J. Fraser, and M. Hedrick, Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174 (2003) 101–9.
- 4) P. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D. De Ugarte, J. Huang, H. Mizuno, Z. Alfonso, J. Fraser, P. Benhaim, and M. Hedrick, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13 (2002) 4279–95.
- 5) D. Gospodarowicz, N. Ferrara, L. Schweigerer, and G. Neufeld, Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 8 (1987) 95–114.
- 6) C. Powers, S. McLeskey, and A. Wellstein, Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7 (2000) 165–97.
- 7) M. Neubauer, C. Fischbach, P. Bauer-Kreisel, E. Lieb, M. Hacker, J. Tessmar, M. Schulz, A. Goepferich, and T. Blunk, Basic fibroblast growth factor enhances PPAR-gamma ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett* 577 (2004) 277–83.
- 8) N. Quarto, and M. Longaker, FGF-2 inhibits osteogenesis in mouse adipose tissue-derived stromal cells and sustains their proliferative and osteogenic potential state. *Tissue Eng* 12 (2006) 1405–18.
- 9) M. Chiou, Y. Xu, and M. Longaker, Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343 (2006) 644–52.
- 10) A. Sen, Y. Lea-Currie, D. Sujkowska, D. Franklin, W. Wilkison, Y. Halvorsen, and J. Gimble, Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem* 81 (2001) 312–9.
- 11) Y. Choi, S. Cha, Y. Lee, S. Kwon, C. Park, and M. Kim, Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 345 (2006) 631–7.
- 12) Z. Wu, E. Rosen, R. Brun, S. Hauser, G. Adelmant, A. Troy, C. McKeon, G. Darlington, and B. Spiegelman, Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 3 (1999) 151–8.
- 13) W. Yeh, Z. Cao, M. Classon, and S. McKnight, Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9 (1995) 168–81.
- 14) S. Inoue, Y. Hori, Y. Hirano, T. Inamoto, and Y. Tabata, Effect of culture substrate and fibroblast growth factor addition on the proliferation and differentiation of human adipose stromal cells. *J Biomater Sci Polym Ed* 16 (2005) 57–77.
- 15) H. Hauner, K. Röhrig, and T. Petruschke, Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) on human adipocyte development and function. *Eur J Clin Invest* 25 (1995) 90–6.
- 16) D. Prusty, B. Park, K. Davis, and S. Farmer, Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 277 (2002) 46226–32.

第 125 回 関西医科大学学内学術集談会

日 時：平成 21 年 3 月 6 日（金） 午後 1 時 00 分～午後 3 時 39 分
会 場：関西医科大学附属枚方病院 講堂

特別講演

1. 生体組織の伸縮性を生み出す仕組み

薬 理 学 講 座 中 邨 智 之

一般演題

1. Hodgkin's Reed-Sternberg cell line (KM-H2) promotes a bi-directional differentiation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells and CD4⁺ cytotoxic T-lymphocytes from CD4⁺ naïve T cells (ホジキン病細胞株 KM-H2 による Foxp3 陽性細胞および細胞傷害性 CD4 陽性 T 細胞の誘導)

内科学第一講座 谷 尻 力

2. マクロファージにおける LPS 誘導性低酸素誘導性因子 1 活性化には活性酸素種を介した経路が関与する

麻 酔 科 学 講 座 西 憲 一 郎

3. Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (ヒト脂肪組織由来幹細胞における FGF-2 の脂肪分化に与える影響)

形成外科学講座 覚 道 奈 津 子

4. AAV ベクターを用いたモルモット蝸牛内への遺伝子導入

耳鼻咽喉科学講座 小 西 将 矢

5. Diffusion-weighted imaging for predicting new compression fractures following percutaneous vertebroplasty (椎体拡散強調画像による椎体形成術後の新たな圧迫骨折の予測)

精神神経科学講座 杉 本 達 哉

6. 強迫性障害における新しい脳画像研究 (拡散テンソル画像解析による臨床重症度判定の可能性について)

精神神経科学講座 齊 藤 幸 子

7. 出血性ショック後の CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 制御性 T 細胞を介した免疫抑制状態に高張食塩液と iNOS が及ぼす影響

救 急 医 学 科 諫 山 憲 司

8. ネフローゼ症候群疾患遺伝子研究の最近の知見—ポドサイド遺伝子変異の重要性—

男 山 病 院 内 科 塚 口 裕 康

9. 胸腺移植併用による新しい骨髄移植法の開発—T 細胞の分化増殖・制御に向けて—

病理学第一講座 保 坂 直 樹

特別講演

1. 生体組織の伸縮性を生み出す仕組み

薬理学講座 中邨 智之

私たちは、皮膚のたるみ、呼吸機能の低下、動脈の硬化といった体の変化に気づいたとき、年をとったな一と感ずる。実はこれらは体の組織の弾性（あるいは伸縮性）が老化とともに低下してくることが原因でおこります。組織の弾性は、弾性線維という細胞外線維によって担われています。弾性線維はゴムのように伸び縮みする線維で、皮膚や肺、動脈などにたくさんあります。この弾性線維が歳とともに劣化・分解することが、皮膚のたるみや肺気腫、動脈中膜の硬化などの老化関連疾患の直接原因となるのです。弾性線維は非常に再生されにくく、これらの治療を難しくしています。弾性線維の再生を目指すには、弾性線維のでき方を知る必要があります。私たちは弾性線維の形成に決定的な役割をはたす DANCE という蛋白質を発見しました。DANCE の遺伝子を欠くマウスは、皮膚のたるみ、肺気腫、動脈の硬化など、ヒトの老化によく似た症状を示していました。そして DANCE 蛋白質を細胞培養に加えると、弾性線維の形成が促進されました。この DANCE がどのようなメカニズムで弾性線維形成を促進するのかを手がかりに、弾性線維形成のしくみの解明、さらには弾性線維の再生を目指しています。

一般演題

1. Hodgkin's Reed-Sternberg cell line (KM-H2) promotes a bi-directional differentiation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells and CD4⁺ cytotoxic T-lymphocytes from CD4⁺ naive T cells

内科学第一講座 谷尻 力

はじめに 免疫機構は様々な生体内の恒常性を維持しており、腫瘍細胞排除といった抗腫瘍免疫も例外ではない。これに対して腫瘍細胞が宿主の抗腫瘍免疫を回避する機序も存在すると考えられている。実際にヒト卵巣癌など、様々な固形腫瘍患者において、末梢血液および腫瘍組織内におい

て制御性 T 細胞 (Treg) の増加が認められ、Treg が抗腫瘍免疫の抑制と腫瘍の進展に関与しているものと考えられている。一般に腫瘍は密集した増殖とその拡大といった進展様式を特徴とするが、Hodgkin 病 (HD) の病変内では豊富な炎症細胞浸潤の中に、わずかの腫瘍細胞が孤立性に存在している。近年、HD のような特異な病変内にも多数の Treg が存在することが報告され、腫瘍における Treg の役割や起源が異なるのではないかと注目されている。一般に Treg は宿主の胸腺で成熟した後、腫瘍細胞により末梢血流中から腫瘍局所へと化学遊走されるものと考えられているが、Treg は末梢血液中の前駆細胞から局所で分化誘導されることも知られている。我々はこれまでに Hodgkin's Reed-Sternberg (H-RS) 細胞由来の細胞株である KM-H2 が抗原提示能を有し、ヒト CD4⁺ T 細胞を分化増殖させることを報告してきた。そこで KM-H2 がヒト末梢血 CD4⁺ T 細胞から CD25⁺Foxp3⁺ Treg へと直接分化誘導することが可能かどうかの検証を行った。

研究方法 インフォームドコンセントを得た健康者から末梢血を採取し、単核球層を比重遠沈法にて分離し、磁気ビーズ法により Naïve CD4⁺ T 細胞を採取した。末梢血 Naïve CD4⁺ T 細胞と、20Gy 照射にて不活化させた KM-H2 を共培養し、CD4⁺ T 細胞について、表面抗原、細胞内・核内物質及びサイトカイン産生能についてフローサイトメトリーを用いて解析を行った。この CD4⁺ T 細胞を不活化させていない KM-H2 を含めた各種腫瘍細胞株と再度共培養し、腫瘍細胞株に与える細胞傷害性について比色法により解析した。

結果 KM-H2 は共培養した末梢血 Naïve CD4⁺ T 細胞を CD69⁺CD25⁺ 細胞群と CD69⁺CD25⁻ 細胞群へと分化・誘導した。CD25⁺ 細胞群は制御性サイトカインである IL-10 と IFN- γ の両者を産生し、RT-PCR 法にて *Foxp3* を発現することが確認された。この CD25⁺ 細胞群は Foxp3⁺IFN- γ ⁻ 細胞と Foxp3⁻IFN- γ ⁺ 細胞の独立した二つの細胞集団により構成されていること事が核内染色法により確認された。以上より KM-H2 は末梢血 Naïve CD4⁺ T 細胞を CD25⁺Foxp3⁺ 細胞へと直接分化誘導する能力を持つ事が確認された。一方、CD25⁺Foxp3⁻ 集団の細胞は Granzyme B と TIA-1 を発現しており、CD4⁺ CTL と同様の表現型を持っていた。こ

の CD4⁺ CTL は親細胞である KM-H2 に対して強力な細胞傷害能を示した。反面, CD4⁺ CTL は固形腫瘍由来の Hela 細胞には全く細胞傷害性を示さなかった。KM-H2 以外の各種悪性腫瘍由来細胞株についても同様の解析を加えたところ, CD25⁺Foxp3⁺ 細胞を誘導するには腫瘍細胞株が抗原提示能を有している事が必須であることが明らかとなった。いずれの腫瘍細胞株で Foxp3⁺ 細胞を誘導した場合にも必ず CD4⁺ CTL が同時に誘導されていることから両者が協調的に分化・誘導・機能している事が示唆された。

考察 これまで腫瘍に浸潤した Foxp3⁺ Treg は宿主の胸腺由来であるとの考え方が主流を占めてきた。卵巣癌などの腫瘍組織内では, CCR4 のリガンドである CCL22 が高発現されており, CCR4 陽性の Foxp3⁺ Treg が腫瘍周辺へ動員されているとの報告がある。しかし我々の結果は抗原提示能を持つ腫瘍細胞株は *in vitro* でヒト Naïve CD4⁺ T 細胞を直接 Foxp3⁺ T 細胞へと転換できることを示している。従って *in vivo* でも抗原提示能を有する悪性腫瘍細胞は末梢流血中の Naïve CD4⁺ T 細胞を前駆細胞として腫瘍局所で Foxp3⁺ T 細胞を generate している可能性が示唆された。他方, 腫瘍に浸潤した Treg が臨床像において果たす役割についても様々な考察がなされてきた。腫瘍局所に Foxp3⁺ Treg が多く浸潤しているほど予後不良であると, 各種固形腫瘍の臨床研究において報告がなされている。これら臨床経過との相関より腫瘍に浸潤した Treg が宿主の抗腫瘍免疫を障害し, 結果として腫瘍細胞の増殖を助長していると考えられてきた。しかし HD 等の造血管悪性腫瘍ではむしろ腫瘍局所での Foxp3⁺ Treg が多いほど予後良好であるとの報告がなされ, 両者での相反する結論が議論的となっている。

今回我々は HD 等の抗原提示能を有する腫瘍細胞は Foxp3⁺ Treg と同時に大量の CD4⁺ CTL を generate することを示した。これらの CD4⁺ CTL が親細胞である腫瘍細胞の進展を阻害し, それにより予後を改善している可能性が示唆された。現今, Treg depleting therapy の前臨床的研究が盛んに行われているが, 本研究の結果により, 抗原提示能を持つ造血管悪性腫瘍には固形腫瘍とは異なった治療戦略を創案する検討の余地があると考えられた。

2. マクロファージにおける LPS 誘導性低酸素誘導性因子 1 活性化には活性酸素種を介した経路が関与する

麻醉科学講座 西 憲一郎

Introduction マクロファージは様々な炎症部位で作用するが, このような部位である血管外の間質は正常組織に比べ一般的に酸素分圧が低い。先天性免疫反応を司る細胞が, 低酸素環境においても生存能力や生理学的機能を維持することを可能とする何らかの仕組みが存在するはずである。低酸素はサイトカインレセプターや表面蛋白発現, サイトカイン分泌, 接着, 移動, 貪食, 細胞生存など骨髄性細胞の性質に多様な影響を及ぼす。低酸素は, 細胞や組織が低酸素状態に適応するために重要なエリスロポエチンや VEGF や解糖系酵素や炎症性メディエーターなどの蛋白合成を増加させる遺伝子発現を誘導する。低酸素誘導性因子 1 (HIF-1 [hypoxia-inducible factor 1]) は, 酸素ホメオスタシスを調節するマスター転写因子である。HIF-1 は構成的に発現している HIF-1 β と誘導によって発現する HIF-1 α のサブユニットから二量体を構成されており, 支配遺伝子の制御領域に存在する HRE (Hypoxia Response Element) に結合し遺伝子の発現を誘導する。HIF-1 の生物学的活性の調節は, HIF-1 α サブユニットの生成, 分解, 転写活性によって主に担われていると現在では考えられている。

HIF-1 α の蛋白発現量と転写活性の調節のメカニズムはすでに広く研究されていて以下のような知見が得られている。HIF-1 α は酸素分圧依存性の水酸化により制御されており, 分子状酸素存在下においては VHL (von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein) を含むユビキチン結合酵素複合体によるユビキチン化の結果, HIF1 α 蛋白質は細胞内で半減期が 5 分程度でプロテアソーム分解されて発現量が低く維持されている。低酸素状態においては酵素反応における基質つまり酸素の減少のため HIF-1 α のプロリン残基の水酸化が抑制され, その結果 HIF-1 α 蛋白は安定化し細胞内での発現量が増加する。HIF-1 α の転写活性化能は, 正常酸素分圧ではアスパラギン残基の水酸化により HIF-1 α と p300/CBP との相互作用を妨げ, 抑制的に調節されている。プロリンとアスパラギン

の水酸化酵素は分子状酸素と α ケトグルタル酸を基質として利用する。プロリン水酸化酵素 PHD (prolyl hydroxylase domain-containing protein) とアスパラギン水酸化酵素である FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) は二価の鉄 (Fe^{2+}) をその触媒として含むため、鉄のキレート剤である desferrioxamine は正常酸素分圧において HIF-1 α の安定化と転写活性化を誘導する。対照的に、HIF-1 β はほとんどの細胞において安定して発現している。

様々な生理的刺激により非低酸素状態でも HIF-1 α 蛋白質の蓄積や低酸素誘導性遺伝子発現の調節が引き起こされる。内毒素 lipopolysaccharide (LPS) は敗血症性ショックの発症に影響を与える強力な炎症性因子である。LPS はマクロファージにおいて NF- κ B 経路を介して炎症性サイトカインの産生を誘導する。

骨髄系細胞の条件的遺伝子破壊の研究より、炎症反応とくにマクロファージの機能発現において HIF-1 α が重要な役割を果たしている事が証明されていたが、LPS 誘導性の HIF-1 活性化の分子機序は明確ではなく、特に単球からマクロファージへの分化の過程との関連を解析した研究は今まで存在しなかった。

この研究において我々は、単球—マクロファージの分化モデルとしてヒト単球性白血病細胞である THP-1 細胞を用い、細胞の分化過程と関連つけて LPS による HIF-1 活性化の機序を分子生物学的に解析した。

Materials and Methods モデル系としてヒト単球性白血病細胞である THP-1 細胞を使用した。マクロファージへの分化は phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) の添加により行った。低酸素処理は、1% O_2 –5% CO_2 –94% N_2 に調整された培養器により行った。

Results 単球系細胞である THP-1 細胞を PMA 刺激によりマクロファージ様に分化誘導させた細胞においては、LPS が容量依存性、時間依存性に HIF-1 α 蛋白質発現を誘導するが、未分化の THP-1 細胞ではその反応が認められなかった。また、LPS は HIF-1 α 蛋白質蓄積のみならず、HIF-1 α の転写活性化能を増強させ HIF-1 の支配下遺伝子の発現を増強した。THP-1 細胞の分化により HIF-1 α の mRNA レベルは上昇し、さらに LPS により刺激することで、HIF-1 α の mRNA レベルは上昇した。

また、抗酸化剤である *N*-acetylcysteine (NAC) が LPS 誘導性の HIF-1 α 蓄積を著明に抑制するのに対し、NF- κ B 阻害剤である BAY11-7082, resveratrol や NOS 阻害剤である L-NAME は LPS により誘導される HIF-1 α 蛋白質蓄積に影響を及ぼさなかった。分化 THP-1 細胞は、LPS により乳酸の産生が増加するがこの増加は、NAC、アスコルビン酸前処置により有意に抑制された。

Discussion THP-1 細胞を用いたマクロファージモデルにおいて、LPS による HIF-1 α 蛋白質蓄積には HIF-1 α mRNA レベルの上昇による蛋白生成の増加が関与していることが示された。また、抗酸化剤、NF- κ B 阻害剤、NOS 阻害剤を使用した実験結果により、LPS による HIF-1 α mRNA レベルの上昇には、NF- κ B 活性化や NO を介した経路ではなく reactive oxygen species (ROS) を介したシグナル経路が関与していることが示唆された。

さらに、LPS による HIF-1 α の活性化は未分化の THP-1 細胞では認められず、分化 THP-1 細胞でのみ HIF-1 の活性化が認められることから、マクロファージの機能維持に HIF-1 の働きが必要であることが示唆された。このような知見は、少なくともマクロファージが関与する炎症において低酸素誘導性の遺伝子応答が重要な役割を担っている事を示すもので、HIF-1 を標的とした炎症制御の新たな方法の開発につながる可能性がある。

3. Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells

形成外科学講座 覚道奈津子

目的 我々は多分化能を有する間葉系幹細胞として脂肪由来幹細胞 (ASCs) にし、組織再生を試みてきた (Kakudo et al., J Biomed Mater Res A, 84(1): 191–197, 2008)。

一方、FGF-2 (Fibroblast growth factor 2) は線維芽細胞や血管内皮細胞、骨髄由来間葉系幹細胞など種々の細胞に影響を与える増殖因子である。また、FGF-2 は ASCs の骨分化を抑制、軟骨分化を促進すると報告されている。しかしながら FGF-2 の脂肪分化への影響については明らかではない。そこで今回、FGF-2 の ASCs における脂肪分化に与える影響とそのメカニズムについて検討を行った。

方法 ヒト脂肪由来幹細胞 (ASCs) を調製し、3 継代目を以下の実験に用いた。ASCs を 7 日間 DMEM 培地で増殖させた (増殖期) 後、14 日間脂肪分化培地 (DMEM + インシュリン, IBMX, インドメタシン, デキサメタゾン) にて培養を行った (脂肪分化期)。その際、増殖期、脂肪分化期それぞれに FGF-2 (10ng/ml) を添加し、FGF-2 を加えないものをコントロール群とした。また GPDH 活性、脂肪分化マーカー (PPAR γ , GLUT4, C/EBP α) を Real-time RT-PCR にて測定し、Oil red O 染色を行うことにより脂肪分化度を比較検討した。

結果 FGF-2 を用いて ASCs を増殖させることにより PPAR γ の発現が有意に増加したが C/EBP α の発現増加は認められなかった。FGF-2 を用いて増殖させた群はコントロール群と比較して有意に脂肪分化が促進していた。分化期に FGF-2 を添加しても、増殖、分化への促進効果は見られなかった。

考察 FGF-2 は ASCs の増殖を促進させるだけではなく、PPAR γ の発現を増加させることにより脂肪分化も促進することが示唆された。FGF-2 添加培地による ASCs の増殖は、ASCs を用いた脂肪組織の大量再生への医療への応用に大いに期待される。

論文内容の意義 脂肪組織や軟部組織欠損は再建外科において重要なテーマの一つで、外傷や乳癌やその他の悪性腫瘍の切除による軟部組織欠損や、先天的に脂肪や筋肉が低形成または欠損する場合に行う。それらを解決するために、これまで人工的インプラント、筋皮弁、遊離脂肪移植などの再建技術が開発されてきたが、近年、再生医療技術を用いた組織工学的な脂肪組織の再建が注目されている。脂肪組織由来幹細胞 (ASCs) は骨髄間葉系幹細胞 (BSCs) と同様の多分化能をもつため、脂肪組織は骨髄に代替する幹細胞の供給源であると報告されている。脂肪組織は、形成外科手術の際の余剰組織として採取することは容易であり、局所麻酔下で採取可能である。また骨髄幹細胞採取に比較して脂肪組織採取は侵襲も少なく、採取後の疼痛も非常に少なく、ドナーサイトの変形・欠損も非常に少なく行なえる。

一方、FGF-2 (Fibroblast growth factor 2) は別名 bFGF (basic FGF) と呼ばれ、線維芽細胞や血管内皮細胞、軟骨細胞、骨髄由来間葉系幹細胞を増殖

させる因子である。また FGF-2 の製剤はヒトへの臨床使用がすでに認可されており、FGF-2 の凍結乾燥粉末を添付溶解液にて溶解し、スプレーにて噴霧することにより、形成外科分野で褥瘡、皮膚潰瘍に適用されている。

幹細胞の再生医療応用においては、少量のドナー組織から分化能を有する幹細胞を大量調製することが求められる。本論文により、FGF-2 は ASCs の増殖を促進させるだけではなく、PPAR γ の発現を増加させることにより脂肪分化も促進することが示唆された。このことにより、FGF-2 添加培地を用いて少量のドナー (脂肪組織) から脂肪への分化能を有する幹細胞 (ASCs) を大量に調製することが可能であることが明らかになり、今後 ASCs に FGF-2 の添加により脂肪組織の再生医療応用を極めて有効に進めることができることが期待される。

4. AAVベクターを用いたモルモット蝸牛内への遺伝子導入

耳鼻咽喉科学講座 小西 将矢

研究目的 内耳への遺伝子導入の技術は有効な治療法のない感音難聴の新しい治療戦略になりうると考えられている。この技術にはベクターの選択が重要なのはもちろんのこと、内耳の構造上局所投与を必要とするために臨床応用可能な投与手技を用いることが望ましい。過去には、主にアデノウィルスベクター (Ad) がその遺伝子導入効率の高さから用いられてきたが、コルチ器への遺伝子導入には内リンパ腔への投与手技が必要であると報告されている。しかしながら内耳に対する手術侵襲は大きいために、コルチ器をターゲットとした臨床使用は困難と考えられている。今回我々は臨床応用を念頭におき、ウィルスベクターとして毒性の少ないアデノ随伴ウィルスベクター (AAV) に着目し、また臨床応用可能な外リンパ腔への投与手技を用いてモルモット内耳への遺伝子導入を試みた。

研究方法 ハートレー系成熟モルモットの内耳へ enhanced green fluorescence protein (eGFP) を発現する AAV を局所投与し、コルチ器への遺伝子発現の分布を観察した。AAV はサイトメガロウィルス (CMV) プロモーターを有し、2 型をベースとし

た 2/1, 2/2, 2/5, 2/7, 2/8, 2/9 のハイブリッド 6 種を使用した。内耳への投与方法は人工内耳手術に準じ、蝸牛基底回転の外リンパ腔内へ直接ベクターを投与した。eGFP を発現する Ad も同様の手技で投与し、遺伝子発現の分布を比較した。投与 7 日後に深麻酔をかけて断頭し、両側の内耳を取り出した。surface preparation と凍結切片を作成し、蝸牛コルチ器内の遺伝子発現分布を観察した。聴覚機能の評価として、投与前と投与 7 日後に聴性脳幹反応 (auditory brainstem response: ABR) を施行し、その閾値変化を比較した。また AAV の細胞表面受容体として考えられているヘパラン硫酸、perlecan, integrin $\alpha 5 \beta 1$ の蝸牛内分布についても免疫染色法にて検討した。

結果 今回使用した AAV の血清型 6 種全てにおいて、蝸牛内への遺伝子導入が可能であった。遺伝子発現の分布は各血清型でやや異なっているものの、全ての血清型で内毛細胞への発現が認められた。最も効率よく遺伝子導入可能であったのは AAV-2/2 であり、外毛細胞へは AAV-2/1, -2/2, -2/9 で遺伝子発現を認めた。AAV-2/1, -2/2, -2/7, -2/8, -2/9 においては Spiral limbus や Spiral ligament の線維芽細胞にも遺伝子発現を認めた。Ad 投与耳において遺伝子発現は外リンパ腔を裏打ちする細胞に局限していた。形態学的評価では AAV 投与後に有毛細胞の消失は認めず、また ABR においてもベクター投与前後において閾値変化は 4, 8, 16 kHz のいずれの周波数においても 10 dB 以下であった。これらはコントロール群においても同様の結果であった。遺伝子発現の分布は蝸牛の基底回転には強く、頂回転に向かうほど減衰する傾向にあった。AAV の細胞表面受容体であるヘパラン硫酸や perlecan, integrin $\alpha 5 \beta 1$ の蝸牛内分布と遺伝子発現のあった細胞の分布との間には相関を認めなかった。

考察 臨床応用可能なアプローチにより AAV を内耳へ投与し、コルチ器内への遺伝子導入が確認された。ABR において閾値変化がみられず、コルチ器も形態学的に保たれていることより、投与手技は安全でベクターの内耳毒性もなく、臨床応用に結びつく可能性を示唆していた。ベクターを外リンパ腔に投与した場合、Ad では遺伝子発現は外リンパ腔内に局限していたが、AAV ではコルチ器、特に内毛細胞に優位に遺伝子発現を認めた。こ

の違いはベクターによるコルチ器基底膜の透過性の違いが関与していると推察するが、ヘパラン硫酸等の AAV 受容体の分布と AAV の遺伝子発現の分布との直接的な相関は認めることができなかった。今後はターゲティングを目的とした AAV の開発、他臓器への影響、遺伝子発現期間の検討にくわえ、難聴モデル動物での有毛細胞の保護や再生の可能性について検討していく必要があると考ええる。

5. Diffusion-weighted imaging for predicting new compression fractures following percutaneous vertebroplasty

精神神経科学講座 杉本 達哉

はじめに Percutaneous vertebroplasty (PVP) は脊椎圧迫骨折を生じた椎体に対して自己硬化性のセメントを注入し、骨折椎体の構造的安定化を図る手技である。その劇的な除痛効果のため、近年急速に普及してきたが、PVP 施行後に隣接椎体に新たな圧迫骨折が生じることを少なからず経験する。この危険度が PVP 前に予測可能であれば、隣接椎体に対する予防的 PVP が正当化される可能性がある。近年、MRI による拡散強調画像 (DWI) を椎体に応用し、apparent diffusion coefficient (みかけの拡散係数; ADC) を計測することでその状態を客観的に評価可能となってきた。本研究の目的は PVP 前の拡散強調画像より得られた隣接椎体の ADC 値が PVP 後の新たな圧迫骨折の予測因子となりうるかどうかを検討することである。

研究方法 対象患者は、2003 年 4 月～7 月に PVP が施行された 25 症例で、対象椎体は治療椎体の上下の隣接 49 椎体とした。MRI は PVP 施行前 3 日以内と、施行後 1 週間以内に、DWI の矢状断を撮像し、正中矢状断を用いて対象椎体の ADC を測定した。検討項目は、① 1 ヶ月以内に圧迫骨折を生じた椎体と圧迫骨折を生じなかった椎体との ADC 値の比較、② 各症例の有する隣接椎体の ADC 値の平均を算出し、その患者固有の ADC 値と定義し、1 ヶ月以内に圧迫骨折を生じた症例と圧迫骨折を生じなかった症例で ADC 値の比較、③ PVP 前後での隣接椎体の ADC 値の比較とした。

結果 PVP 後 1 ヶ月以内に 25 例中 7 例、7 椎体に新たな圧迫骨折が生じ (28.0%)、6 例が隣接椎体

の骨折 (24%), 1 例は非隣接椎体の骨折 (4%) であった。術後 1 ヶ月以内に新たな圧迫骨折を起こした 6 隣接椎体の術前 ADC 値は $0.55 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、骨折を認めなかった 43 隣接椎体の ADC 値は $0.20 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ であり、2 群間で統計学的な有意差が認められた ($p < 0.001$)。術後 1 ヶ月以内に隣接椎体に新たな圧迫骨折を起こした 6 症例の術前 ADC 値は $0.55 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、骨折を認めなかった 18 症例の ADC 値は $0.17 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ であり、2 群間で有意差が認められた ($p < 0.001$)。PVP 前の隣接椎体の平均 ADC 値は $0.24 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、PVP 後の隣接椎体の平均 ADC 値は $0.24 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ であり、2 群間には有意差は認められなかった。

考察 正常の椎体においては、間質腔に自由に運動できる水分子 (以下自由水) はほとんど存在しないため、MR 信号を発生させるような拡散可能なプロトンは非常に少なく、ADC の値は低値となる。反面、椎体内の ADC の高値は、拡散可能なプロトンが増加していることを意味し、間質腔内自由水の存在や腫瘍細胞などが骨髄に存在することが示唆される。椎体の ADC 値を検討した我々の研究では、1 ヶ月以内に圧迫骨折に発展した椎体は、椎体圧迫骨折に発展しなかった椎体に比較して ADC 値は高値であり、将来的に圧迫骨折に発展するリスクを有する椎体では、椎体内の自由水の量が正常椎体に比して増加している可能性があるものと考えられた。また、術前と術後 ADC 値の検討では、統計学的有意差は認められず、PVP 自体の隣接椎体への影響はないものと考えられた。われわれの研究結果は、セメント注入椎体に隣接する椎体の圧迫骨折を予測できる可能性があり、予防的 PVP の意義を明確にするうえで、ひとつの成果と考えられる。

結論 PVP 前の拡散強調画像より得られた隣接椎体の ADC 値は PVP 後の新たな圧迫骨折の予測因子となりうると思われる。

6. 強迫性障害における新しい脳画像研究 (拡散テンソル画像解析による臨床重症度判定の可能性について)

精神神経科学講座 齊藤 幸子

はじめに 強迫性障害は、煩わしい考えや行為が反復的に出現する慢性的な不安障害である。この

ため、強迫性障害患者は、自らの症状について過剰で不合理であるという洞察を有しているが、その多くが社会適応に問題点を有している。また、強迫性障害の 6 ヶ月有病率は 1~2 パーセント、生涯有病率は 2~3 パーセントと高率で、決してまれな疾患ではなく、重症になると、入浴や排泄にすら長時間を要し、患者は日々苦痛に苛まれる。治療としては認知行動療法と薬物療法の併用療法が推奨されており、海外においては難治例に対して、帯状回切除術が施行されることもある。

今日までの研究で、強迫性障害で障害される脳の部位は、単一ではなく、前頭葉眼窩皮質や皮質下構造、およびこれらの領域を結ぶ神経回路網であるとされてきた。しかし脳機能画像研究の多くは、独立した部位の異常を検出するにとどまり、回路網を構築している白質線維連絡の異常を検出する報告は散見されるのみであった。

このため我々は、本研究で、眼窩前頭葉皮質下回路の白質線維連絡の異常を検証する目的で、MRI における拡散テンソル解析法を用いて、強迫性障害における脳画像研究を実施した。

方法 対象患者は、Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition (DSM-IV) の診断基準に基づき、選出した強迫性障害患者 16 名で、対象患者の年齢は 16 歳以上 47 歳以下であった (28.7 ± 9.8 歳)。本研究の内容を十分に理解し、同意の得られた患者 (男性 7 名と女性 9 名) と、16 名の健常被験者 (男性 7 名と女性 9 名) (29.9 ± 9.0 歳) のテンソル MRI 画像を撮像した。

患者の強迫症状の重症度は、Yale-Brown 強迫観念・強迫行為評価尺度 (Y-BOCS) (26.0 ± 5.3 点) を用いて評価した。強迫症状に付随して生じてくることが予測される抑うつ症状の重症度は、Hamilton Depression Scale (HAM-D) (5.3 ± 2.7 点) を用いて評価した。

MRI 装置は、1.5 Tesla の GE Signa Horizon LX を用い、前交連および後交連を結んだ線 (AC-PC line) に平行な水平断面について spin — echo type single — shot echoplanar sequence (TR 2000 ms, FOV $24 \times 24 \text{ cm}$, マトリックス 128×128 , 加算回数 4 回, 4 mm slice thickness) の条件下で、 1000 s/mm^2 の拡散検出傾斜磁場を印加して拡散強調画像を得た。用手 ROI 法にて、テンソル解析を行い、Fractional Anisotropy (FA) と Mean Diffusivity (MD) 値と

を算出した。

ROI は、脳梁の 5 つの部位 (rostrum, genu, rostral body, isthmus, splenium) に設定し、ROI の大きさは $2 \times 2 \text{ mm}$ とした。

結果 16 名の強迫性障害患者と 16 名の健常者について、脳梁の 5 つの部位における、FA 値と、MD 値を得た。患者と健常者間の FA 値に有意差が認められた脳梁部位は、眼窩前頭葉から投射を受ける rostrum (患者の FA 値, 健常者の FA 値, P 値: 0.55 ± 0.07 , 0.69 ± 0.06 , $P < 0.001$) のみであった。他の 4 部位の FA 値は以下のとおりで、患者と健常者間の FA 値に有意差を認めなかった。(部位: 患者の FA 値, 健常者の FA 値, P 値, genu: 0.80 ± 0.07 , 0.81 ± 0.09 , $P = 0.70$, rostral body: 0.68 ± 0.08 , 0.70 ± 0.06 , $P = 0.46$, isthmus: 0.69 ± 0.08 , 0.73 ± 0.07 , $P = 0.06$, splenium: 0.87 ± 0.10 , 0.86 ± 0.08 , $P = 0.74$)。MD 値については、全ての脳梁部位で、患者と健常者間に有意差を認めなかった。また、患者の rostrum における FA 値と、強迫症状の重症度の指標である Y-BOCS 値が逆相関を示した ($r = -0.72$, $p = 0.002$)。

結語 拡散テンソル画像解析法は、水分子のブラウン運動の情報をもとに、テンソル楕円体の概念を応用したもので、生体内における水分子の拡散の偏り、すなわち「拡散異方性」の視覚化や定量化を可能とし、白質線維における器質的異常の検出に鋭敏である。制限の無い空間において水分子は三次元的に拡散するが、脳白質神経線維内ではミエリン鞘の細胞膜が水分子の拡散を制限するため、物質は神経線維に直行する方向に比べて、平行な方向により大きく拡散する。このように方向によって拡散が異なることを拡散異方性と称され、拡散異方性は、ミエリンの損傷や軸索の変性などにより影響を受けるとされている。

我々は、強迫性障害患者における白質線維連絡に着目し、拡散テンソル画像解析を用いて、今日までに提唱された強迫性障害の神経回路網の異常を検出するべく研究を進め、神経回路網の障害の程度が、臨床症状の重症度と関連するという結果を得た。将来この研究も含めた神経科学的脳画像研究が、強迫性障害の病態解明の一端を担うにとどまらず、強迫症状に苦しむ多くの患者の診断や治療方針に貢献していくものと考えられる。

7. 出血性ショック後の $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 制御性 T 細胞を介した免疫抑制状態に高張食塩液と iNOS が及ぼす影響

救急医学科 ○諫山 憲司, 村尾 佳則
平川 昭彦, 中谷 壽男

目的 出血性ショック後の $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 制御性 T 細胞 (Tregs) を介した免疫抑制状態に脾臓および胸腺で高張食塩液と iNOS がどの程度、関与しているかを検討した。

方法 wild type と iNOS ノックアウト (KO) マウスを用いた。全身麻酔下に左大腿動脈から脱血し、血圧を $40 \pm 5 \text{ mmHg}$ に 60 分保つ。蘇生群として HS 群 (4 ml/Kg の 7.5% NaCl と SB (Shed blood)) と 2LR 群 (SB の 2 倍量のラクテートリンゲル (LR) 液と SB) を作製し、無処置の Control 群、HS と 2LR 群の蘇生後 2, 6, 24, 48, 72 h で血漿中の cytokine (IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1) と 24, 48, 72 h で脾臓及び胸腺での $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs を測定した。

結果 IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1 は各群の 2 h で Control 群と比較し有意に増加した ($p < 0.01$)。TNF- α , MCP-1 は 2 h で iNOS ノックアウトマウスと比較し wild マウスにおいて有意に増加したが、IL-6 は有意に減少した ($p < 0.05$)。HS 群は 2LR 群と比較し有意に IL-6, TNF- α , MCP-1 を抑制した ($p < 0.01$)。IL-10 は 2 h において各群間で有意差を認めなかった。 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs は脾臓の 24, 48 h, 胸腺の 24 h で Control 群と比較し有意に増加した ($p < 0.01$)。 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs は脾臓の 24 h, 48 h, 胸腺の 24 h で wild マウスと比較し iNOS ノックアウトマウスにおいて有意に減少した ($p < 0.05$)。

考察 高張食塩液投与 (HS) は $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs に対する影響は示さなかったが、炎症性 cytokine の産生を有意に抑制した。 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs が脾臓の 24h, 48h, 胸腺の 24 h で wild マウスと比較し iNOS ノックアウトマウスにおいて有意に減少した。これらのことから iNOS の抑制と HS 投与が出血性ショック後の $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs を介した免疫抑制状態を回復させる作用があると考えられた。

8. ネフローゼ症候群疾患遺伝子研究の最近の 知見—ポドサイト遺伝子変異の重要性

男山病院内科 塚口 裕康

家族性ネフローゼ症候群の研究により、微小変化～FSGSの組織像を呈するネフローゼ発症には、ポドサイトのスリット膜や足突起が中心的役割を担うことが明確になった。濾過障壁機能に不可欠な新たな分子群や生物学的経路（細胞骨格、細胞シグナル伝達）が次々に明らかになった一連の流れは、臨床疾患の病態を突き詰めていく過程で導かれたもので、臨床と基礎の連携が新たな展開の原動力として重要であることを示している。

ネフリン、ポドシン、TRPC6等のネフローゼ責任分子は、ポドサイトスリット膜で機能的分子複合体を形成しており、いずれの構成分子の異常でも共通した最終経路である糸球体硬化像を介して末期腎不全に到る。これらの成果はネフローゼの病態理解にポドサイト病 (podocytopathy) という受傷メカニズムを基軸にした新たな視点を導入し、従来の病理形態分類の枠を超える疾患概念の転換をもたらしている。

これらの家族性ネフローゼの解析で得られたポドサイトを中心とした傷害機序は、日常遭遇する症例にも共通するプロセスであり、臨床医にとって分子機序を加味した考察は重要と思われる。

9. 胸腺移植併用による新しい骨髄移植法の開発 —T細胞の分化増殖・制御に向けて—

病理学第一講座 ○保坂 直樹, 池原 進

モデルマウスを用いて従来の骨髄移植 (BMT) では治療困難な疾患に対して、胸腺移植 (TT) を併用すると、T細胞機能が増強し、治療が可能になることを見いだした。今までの結果を報告する。

1. 低放射線照射や低骨髄細胞数下の移植において
生着率の向上及び長期間の生存が可能となる。

2. 担癌宿主に対して

強い抗腫瘍効果が得られるが、移植片対宿主病は軽度である。

3. 老齢化宿主に対して

1) 胎生期の TT を併用すると、生着及び生存率の改善が認められ、加齢に伴って発症する自己免疫性疾患も治療できる。

2) ドナー及びホストと異なる第3者からの胎生胸腺を用いても有効である。

4. 超致死量放射線照射宿主に対して

超致死量の放射線を照射したマウスに新生児期の TT と造血幹細胞を移植すると、急性腸管傷害が改善され、長期の生存が可能となる。

まとめ TT を併用した BMT は、従来の BMT より、種々の点で有用であることが示唆された。

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 の 結 果 の 要 旨

平成 20 年 度

平成 21 年 12 月 30 日

関 西 医 科 大 学

は し が き

本集は学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 7 条による公表を目的として平成 21 年 3 月 31 日までに本学で学位を授与した者の論文内容の要旨および審査の結果の要旨を収録したものである。

目 次

◎ 医 学 博 士

掲載順	学位記番号	氏 名	論 文 題 目	頁
1491	甲第 830 号	前 羽 宏 史	Non-invasive detection of ischemic left ventricular dysfunction using rest gated SPECT: expectation of simultaneous evaluation of both myocardial perfusion and wall motion abnormality.....	1
1492	甲第 831 号	小 西 将 矢	Gene transfer into guinea pig cochlea using adeno-associated virus vectors.....	2
1493	甲第 832 号	郭 可 泉	Long-Term Donor-Specific Tolerance in Rat Cardiac Allografts by Intrabone Marrow Injection of Donor Bone Marrow Cells.....	3
1494	甲第 833 号	覺道 (櫛田) 奈 津 子	Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells	5
1495	甲第 834 号	谷 尻 力	Hodgkin's Reed-Sternberg cell line (KM-H2) promotes a bidirectional differentiation of CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T cells and CD4 ⁺ cytotoxic T lymphocytes from CD4 ⁺ naive T cells	6
1496	甲第 835 号	宋 昌 烨	Facilitation of hematopoietic recovery by bone grafts with intra-bone marrow-bone marrow transplantation	7
1497	甲第 836 号	崔 文 昊	Analysis of Tolerance Induction Using Triple Chimeric Mice: Major Histocompatibility Complex-Disparate Thymus, Hemopoietic Cells, and Microenvironment.....	9
1498	甲第 837 号	若 松 隆 宏	The combination of glycyrrhizin and lamivudine can reverse the cisplatin resistance in hepatocellular carcinoma cells through inhibition of multidrug resistance-associated proteins	10
1499	甲第 838 号	豊島 (塚本) 麗 子	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced mammary carcinogenesis is promoted by short-term treatment with estrogen and progesterone mimicking pregnancy in aged female Lewis rats	11
1500	甲第 839 号	西 憲 一 郎	LPS Induces Hypoxia-Inducible Factor 1 Activation in Macrophage-Differentiated Cells in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner	12
1501	甲第 840 号	小 池 直 子	Human cord blood cells can differentiate into retinal nerve cells	14

1502	甲第 841 号	神 原 知 子	Propofol Suppresses Prostaglandin E ₂ Production in Human Peripheral Monocytes.....	15
1503	甲第 842 号	藤 田 賢 吾	Immunohistochemical identification of messenger RNA-related proteins in basophilic inclusions of adult-onset atypical motor neuron disease	17
1504	甲第 843 号	分 野 正 貴	The Alpha 2A-Adrenergic Receptor Gene Polymorphism Modifies Antidepressant Responses to Milnacipran	18
1505	甲第 844 号	山 戸 史 子	Elevated intracellular calcium in neutrophils in patients with Down syndrome.....	19
1506	甲第 845 号	熊 正 梅	Neuroprotective effects of amyloid β -derived non-toxic tripeptide (A β ₃₂₋₃₄ , Ile-Gly-Leu) against toxic amyloid β -induced neuronal toxicity in vitro and in vivo	20
1507	甲第 846 号	三 好 秀 明	Circulating Naïve and CD4+CD25high Regulatory T Cells in Patients With Autoimmune Pancreatitis.....	22
1508	甲第 847 号	松 村 義 隆	Helix-rich transient and equilibrium intermediates of equine β -lactoglobulin in alkaline buffer	23
1509	甲第 848 号	畑 埜 泰 子	Phagocytosis of heat-killed <i>Staphylococcus aureus</i> by eosinophils: comparison with neutrophils	25
1510	甲第 849 号	横 井 崇	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacillus Calmette-Guérin suppresses inflammatory T _H 2 responses by inducing functional alteration of TSLP-activated dendritic cells.....	26
1511	甲第 850 号	居 原 田 安 奈	Increased nitric oxide production by T-and B-cells in idiopathic nephrotic syndrome	28
1512	甲第 851 号	松 久 誠 治	Angiotensin II type 1 receptor blocker preserves tolerance to ischemia-reperfusion injury in Dahl salt-sensitive rat heart	29
1513	甲第 852 号	村 田 美 樹	Hepatitis B Virus X Protein Shifts Human Hepatic Transforming Growth Factor (TGF)- β Signaling from Tumor Suppression to Oncogenesis in Early Chronic Hepatitis B.....	30
1514	乙第 664 号	加 藤 順 子	Contribution of neural cell adhesion molecule (NCAM) to hemopoietic system in monkeys.....	32
1515	乙第 665 号	福 島 慎 太 郎	Effect of biliary obstruction and internal biliary drainage on hepatic cytochrome P450 isozymes in rats.....	33
1516	乙第 666 号	谷 万 喜 子	The acupuncture treatment of severe axial dystonia	34

【1491】

氏 名 (本 籍) まえ 前 ば 羽 ひろ 宏 ふみ 史 (大阪府)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 甲 第 830 号
学位授与の日付 平成 20 年 5 月 27 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目

Non-invasive detection of ischemic left ventricular dysfunction using rest gated SPECT: expectation of simultaneous evaluation of both myocardial perfusion and wall motion abnormality

論文審査委員 主査 (教授) 松田博子
(教授) 澤田 敏 (教授) 岩坂壽二

論文内容の要旨

【研究背景】

高度左心機能障害を有する慢性心不全患者において、その原因疾患を同定することは治療方針を決定する上で重要である。その原因疾患の中でも虚血性心疾患は、生命予後を規定する重要な因子であるものの、一方では血行再建を行うことにより生命予後の改善が見込めるという特徴を有するため、これら患者群においては心筋虚血を検出することは必須である。冠動脈造影検査は虚血性心疾患の診断に大きな位置を占めるものの、高齢者や糖尿病・腎障害を合併する患者群では造影剤腎症を来すことがあり躊躇することをしばしば経験する。非侵襲的検査による確定診断が望ましいものの、その方法、手段が確立していないのが現状である。心電図同期心筋 SPECT 検査は局所の心筋灌流と壁運動異常を同時に評価できる特徴を有し、その乖離部を評価することにより負荷検査を用いることなく慢性虚血領域を診断可能な利点を有する。

【研究目的】

安静心電図同期心筋 SPECT を用いて、高度左心機能障害を有する慢性心不全患者において、虚血性心筋症患者を特徴付けることが可能か否かを検討することを目的とした。

【研究方法】

対象患者は左室造影もしくは心臓超音波検査に

おいて、左室駆出率 40%以下を示した 54 人の慢性心不全患者とした。虚血性心筋症の定義は心筋梗塞、血行再建の既往、または左前下行枝近位部に 75%以上の有意狭窄を認めるもの、2 枝以上に 75%以上の有意狭窄を認めるものとし、非虚血性心筋症の定義は冠動脈疾患の既往がなく、冠動脈造影においても 40%以上の狭窄を認めないものとした。これらの定義を満たした虚血性心筋症 32 人、非虚血性心筋症 22 人に加え、正常対象群 71 人と比較することにより検討を行った。

^{99m}Tc -tetrofosmin 740 MBq を用いた安静時心電図同期 SPECT を撮像し、局所心筋灌流および壁運動は心電図同期プログラムより自動的に算出された数値を用いて評価を行った。従来の心電図同期 SPECT は 20 セグメントモデルであるが、正常群の検討から我々日本人の small heart においては、心基部心筋灌流の評価に対する信頼性が乏しいと考えられたため、心基部 6 セグメントを除いた 14 セグメントモデルを使用した。各領域の核種集積率が正常対象群の平均 -1 SD 以下の領域を集積低下領域、平均 -2 SD 以下の領域を高度集積低下領域と定義した。また、局所壁運動が正常対象群の平均 -1 SD 以下の領域を収縮能低下領域、平均 -2 SD 以下の領域を高度収縮能低下領域と定義し検討を行った。

【結果】

虚血性心筋症と非虚血性心筋症において、左室駆出分画、左室拡張末期容量に差は認められず (各々、 31 ± 7 vs. $27 \pm 9\%$, 161 ± 60 vs. 189 ± 69 ml)、収縮能低下領域数と高度収縮能低下領域数はいずれも差を認めなかった (各々、 13.5 ± 1.1 vs. 13.6 ± 0.9 領域, 10.6 ± 2.0 vs. 9.9 ± 3.0 領域) が、心尖部領域においては (6.7 ± 1.1 vs. 5.6 ± 2.0 領域, $p < 0.001$) と虚血性心筋症群で有意に多く認められた。集積低下領域数は、虚血性心筋症において有意に多く認められた (9.3 ± 3.8 vs. 2.0 ± 2.8 領域, $p < 0.0001$)。ROC 解析から集積低下領域数が 4 以下の場合、感度 = 88%, 特異度 = 91% をもって非虚血性心筋症を鑑別することが可能であった。更に、非虚血性心筋症患者が高度集積低下領域を全く有さなかったのに対し、虚血性心筋症は高度集積低下領域を 4.4 ± 0.2 領域認めた。

【考察】

従来の報告では、虚血性心筋症は壁運動異常が

冠動脈の走行に依存し局在するのに対し、非虚血性心筋症はび漫性に壁運動が低下することが多いとされる一方で、壁運動評価のみでの鑑別は困難であるとの報告もある。本研究では心尖部領域の高度収縮能低下数の比較により両者の鑑別が可能であると考えられた。冠動脈疾患により、高度左心機能障害を来す場合、心尖部を含む広範囲の虚血および心筋障害が必須であることの裏づけであると考えられる。つぎに心筋灌流に関しては、不可避である attenuation の関与もあり、虚血性心筋症の検出能力は一定の見解が得られていない。

本研究においては、14 領域中 4 領域以上に集積低下を認める場合虚血性心疾患であることが高い特異度をもって示されが、これに関しては心電図同期 SPECT を用いて、拡張期イメージのみを使用することにより部分容積効果を減弱させることを介して虚血性心筋症を鑑別できたものと考えられる。本法により運動あるいは薬物負荷を行うことなく、安静像のみで虚血性心筋症を鑑別し得たことは、NYHA class IV と評価し得る非代償性うっ血性心不全状態である患者に対しても、有用であることを意味し、臨床的に極めて意義深いことと考えられる。

【結語】

心筋灌流と局所壁運動を同時に評価可能な安静心電図同期心筋 SPECT を用いることにより、高度左心機能障害を有する慢性心不全患者から、虚血性心筋症患者を検出することが可能である。

審査の結果の要旨

慢性心不全の原因が虚血性心疾患の場合は、血行再建により予後の改善が見込めるため、原因疾患を同定することが重要である。本研究は、安静時心電図同期心筋 SPECT 検査で、心尖部に高度収縮能低下領域数が多くある場合、また中等度集積低下領域数が 14 領域中 4 以上の場合、虚血性心筋症の可能性が高いことを示した。非侵襲的検査による鑑別方法を示した本研究は臨床的に有意義であり、学位に値すると考える。

【1492】

氏名(本籍) こにし まさや 小西将矢 (大阪府)
学位の種類 博士(医学)
学位番号 甲第 831 号
学位授与の日付 平成 20 年 5 月 27 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目
Gene transfer into guinea pig cochlea using
adeno-associated virus vectors
論文審査委員 主査(教授) 藤澤順一
(教授) 伊藤誠二 (教授) 山下敏夫

論文内容の要旨

【研究目的】

内耳への遺伝子導入の技術は有効な治療法のない感音難聴の新しい治療戦略になりうると考えられている。この技術にはベクターの選択が重要なのはもちろんのこと、内耳の構造上局所投与を必要とするために臨床応用可能な投与手技を用いることが望ましい。過去には、主にアデノウイルスベクター(Ad)がその遺伝子導入効率の高さから用いられてきたが、コルチ器への遺伝子導入には内リンパ腔への投与手技が必要であると報告されている。しかしながら内耳に対する手術侵襲は大きいために、コルチ器をターゲットとした臨床使用は困難と考えられている。今回我々は臨床応用を念頭におき、ウイルスベクターとして毒性の少ないアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)に着目し、また臨床応用可能な外リンパ腔への投与手技を用いてモルモット内耳への遺伝子導入を試みた。

【研究方法】

ハートレー系成熟モルモットの内耳へ eGFP (enhanced green fluorescence protein) を発現する AAV を局所投与し、コルチ器への遺伝子発現の分布を観察した。AAV はサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターを有し、2 型をベースとした 2/1, 2/2, 2/5, 2/7, 2/8, 2/9 のハイブリッド 6 種を使用した。内耳への投与方法は人工内耳手術に準じ、蝸牛基底回転の外リンパ腔内へ直接ベクターを投与した。eGFP を発現する Ad も同様の手技で投与し、遺伝子発現の分布を比較した。投与 7 日

後に深麻酔をかけて断頭し、両側の内耳を取り出した。surface preparation と凍結切片を作成し、蝸牛コルチ器内の遺伝子発現分布を観察した。聴覚機能の評価として、投与前と投与 7 日後に聴性脳幹反応 (auditory brainstem response: ABR) を施行し、その閾値変化を比較した。また AAV の細胞表面受容体として考えられているヘパラン硫酸、perlecan, integrin $\alpha 5 \beta 1$ の蝸牛内分布についても免疫染色法にて検討した。

【結果】

今回使用した AAV の血清型 6 種全てにおいて、蝸牛内への遺伝子導入が可能であった。遺伝子発現の分布は各血清型でやや異なっているものの、全ての血清型で内毛細胞への発現が認められた。最も効率よく遺伝子導入可能であったのは AAV-2/2 であり、外毛細胞へは AAV-2/1, -2/2, -2/9 で遺伝子発現を認めた。AAV-2/1, -2/2, -2/7, -2/8, -2/9 においては Spiral limbus や Spiral ligament の線維細胞にも遺伝子発現を認めた。Ad 投与耳において遺伝子発現は外リンパ腔を裏打ちする細胞に限局していた。形態学的評価では AAV 投与後に有毛細胞の消失は認めず、また ABR においてもベクター投与前後において閾値変化は 4, 8, 16 kHz のいずれの周波数においても 10 dB 以下であった。これらはコントロール群においても同様の結果であった。遺伝子発現の分布は蝸牛の基底回転には強く、頂回転に向かうほど減衰する傾向にあった。AAV の細胞表面受容体であるヘパラン硫酸や perlecan, integrin $\alpha 5 \beta 1$ の蝸牛内分布と遺伝子発現のあった細胞の分布との間には相関を認めなかった。

【考察】

臨床応用可能なアプローチにより AAV を内耳へ投与し、コルチ器内への遺伝子導入が確認された。ABR において閾値変化がみられず、コルチ器も形態学的に保たれていることより、投与手技は安全でベクターの内耳毒性もなく、臨床応用に結びつく可能性を示唆していた。ベクターを外リンパ腔に投与した場合、Ad では遺伝子発現は外リンパ腔内に限局していたが、AAV ではコルチ器、特に内毛細胞に優位に遺伝子発現を認めた。この違いはベクターによるコルチ器基底膜の透過性の違いが関与していると推察するが、ヘパラン硫酸等の AAV 受容体の分布と AAV の遺伝子発現の分布

との直接的な相関は認めることができなかった。今後はターゲティングを目的とした AAV の開発、他臓器への影響、遺伝子発現期間の検討にくわえ、難聴モデル動物での有毛細胞の保護や再生の可能性について検討していく必要があると考える。

審査の結果の要旨

小西氏は、有効な治療法のない感音難聴等に対する遺伝子治療法の開発を念頭に、アデノ随伴ウイルス (AAV) をベクターとした蝸牛コルチ器への遺伝子導入の可能性を検討した。その結果、AAV の外リンパ腔への投与により、コルチ器の機能および形態に影響を及ぼすことなく、コルチ器内有毛細胞に導入遺伝子を発現させることに成功した。この成果は、内耳障害の遺伝子治療に向けた重要な一歩であり、学位に値すると考える。

【1493】

氏名(本籍) 郭^{かく} 可^か 泉^{せん} (中国)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 832 号

学位授与の日付 平成 20 年 5 月 27 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Long-Term Donor-Specific Tolerance in Rat
Cardiac Allografts by Intrabone Marrow Injection of Donor Bone Marrow Cells

論文審査委員 主査(教授) 藺田精昭
(教授) 池原 進 (教授) 今村洋二

論文内容の要旨

【はじめに】

免疫抑制剤の開発やその処方改善がなされているにもかかわらず、臓器移植後の慢性拒絶応答の制御や生涯にわたる免疫抑制剤の使用による副作用などの問題は解決すべき点として残されている。免疫抑制剤の作用は非特異的な免疫応答の抑制であり、移植臓器特異的な免疫応答のみを抑制する免疫寛容(トレランス)の誘導が最も効果的かつ安全な移植臓器の生着を保障するものと考えられる。骨髄移植(BMT)は血液系細胞をドナー

由来細胞に置換し、同時にドナー MHC 特異的トレランスの誘導と維持を可能にする方法であるが、従来の経静脈的骨髄移植 (IV-BMT) は、移植前処置にともなうレシピエントに対する負担、生着不全、あるいは移植片対宿主病 (GvHD) などの問題点もあり、臨床応用を考える上で、より有効な骨髄移植法の開発が必要である。これらの点を解決するために我々が確立した骨髄移植法が骨髄内骨髄移植 (IBM-BMT) である。MHC の異なる異系 (アロ) BMT において、IV-BMT 施行群に比し IBM-BMT 施行群では 1) ドナー由来血液系細胞および間葉系細胞の早期の置換・回復、2) ドナー免疫系細胞の早期再構築、が認められ、従来の IV-BMT では不可能であった難治性自己免疫疾患モデルマウス (MRL/lpr) の治療にも成功している。さらに、3) IBM-BMT を施行することにより前処置としての放射線照射量を軽減させてもドナー MHC 特異的トレランスの誘導とその長期的な維持が可能であり、4) IV-BMT 施行群に比べ GvHD の発症頻度も低いことが判明している。これらの利点を生かし、我々は IBM-BMT と同時に下肢、肺、あるいはラ氏島移植を行い、いずれの場合もドナー特異的トレランスの誘導と、免疫抑制剤を使用すること無しに移植臓器の長期生着という結果が得られている。本論文では IBM-BMT における利点を利用して異系心臓移植を行い、移植後の組織学的・免疫学的検討を通して IBM-BMT の有効性を確認した。

【研究方法】

1. IBM-BMT: ドナーとして F344 ラットを、またレシピエントとして MHC の異なる BN ラットを用いた。ドナー F344 ラットより採取した骨髄細胞 (BMCs) をレシピエントである BN ラットの骨髄内 (IBM-BMT) あるいは静脈内 (IV-BMT) に移植した。レシピエントに対する移植前処置として、フルダラビン投与および放射線照射 (3.5 Gy $\times$ 2 回 $\sim$ 5.0 Gy $\times$ 2 回) を行った。

2. 異所性心臓移植: 骨髄移植と同日にドナー F344 ラットの心臓を右頸部に異所性に移植した。

3. 解析: フローサイトメトリー法によりドナー細胞の置換を解析した。ドナー特異的トレランスの誘導と維持は MLR およびに皮膚移植片の生着によりを確認した。また移植した心臓の病理組織学的検討を行った。

【結果】

1. IBM-BMT 施行群においては、放射線照射量および移植細胞数を減少 (3.5 Gy $\times$ 2 回, 3×10^7 BMCs) させても 70% の細胞がドナー由来であるマクロキメリズムが観察され、IV-BMT 施行群ではドナー由来細胞の生着は認められなかった。

2. 上記の条件で心臓移植を行った場合、IBM-BMT 施行群では移植した心臓は長期間 (10 ヶ月以上) 生着し機能したが、IV-BMT 施行群では移植した心臓は 1 ヶ月以内に拒絶された。

3. 病理組織学的検討の結果、IBM-BMT 施行群においては移植した心臓の冠状動脈内膜の肥厚は軽度であったが、IV-BMT 施行群では中等度～重度の肥厚が認められると共に顕著な筋細胞萎縮が観察された。

4. IBM-BMT 施行群においては MLR および皮膚移植片の生着 (24 週以上) によりドナー特異的トレランスの誘導と維持が確認されたが、IV-BMT 施行群においてはドナー特異的なトレランスは誘導されておらず皮膚移植片は早期に拒絶された (10 日以内)。

【考察】

以上の結果から、移植前処置を軽減しても IBM-BMT を用いることでドナーマクロキメリズムとドナー特異的トレランスが容易に誘導され、かつ長期に亘り維持される事が明らかになった。病理組織学的検討においても慢性拒絶応答の兆候は認められず、また移植した心臓は長期間機能していることが明らかにされ、IBM-BMT が臓器移植に際しても有効な手段であることが確認された。トレランス誘導のメカニズムに関して、IBM-BMT 施行群においては胸腺内にドナー由来樹状細胞が認められドナー特異的トレランスの誘導に関与していることが示唆されたが、さらに胸腺髄質上皮についても今後検討を加えてゆきたい。

審査の結果の要旨

申請者らが開発した新しい骨髄移植の方法 (骨髄内骨髄移植) は、mild な前処置によっても、レシピエントにおけるドナーの造血系の細胞への置換率が向上することが判明している。本研究は、ラットを用いて心臓移植にこの骨髄内骨髄移植を併用することにより、mild な前処置 (3.5 Gy, 2 回分割照射と 1 回のフルダラビンの投与) により、

免疫抑制剤を長期間使用することなく、慢性の拒絶反応を抑制できることを証明したものである。以上より、本法はヒトの臓器移植にも将来応用が可能であり、十分に学位に値する価値ある研究と考えられる。

【1494】

氏 名 (本 籍) かくどう くした なつこ 覚道(櫛田)奈津子 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 833 号

学位授与の日付 平成 20 年 5 月 27 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目

Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells

論 文 審 査 委 員 主査 (教授) 藺田精昭
(教授) 池原 進 (教授) 楠本健司

論文内容の要旨

【はじめに】

近年、脂肪組織に成体幹細胞 (ASCs; adipose-derived stem cells) が存在し、骨、軟骨、脂肪など多系統の細胞への分化能があることが明らかにされている。脂肪組織は、形成外科手術の際の余剰組織として採取が容易で、局所麻酔下で採取可能である。また骨髄幹細胞採取に比較して皮下脂肪組織採取は侵襲や採取後の疼痛が少ないので、ドナーサイトの変形・欠損も非常に少なく利点が多い。

一方、Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) は別名 basic FGF と呼ばれ、線維芽細胞や血管内皮細胞、軟骨細胞および骨髄由来間葉系幹細胞の増殖因子として知られている。既に遺伝子組み換え FGF-2 製剤は臨床使用が認可され、褥瘡、皮膚潰瘍治療に有用に使用されている。FGF-2 は ASCs の骨分化を抑制し、軟骨分化を促進することが報告されているが、脂肪分化における影響については未だ明らかにされていない。本研究では FGF-2 による ASCs の増殖と脂肪分化への効果とそのメカニズムについて検討を行った。

【研究方法】

ASCs をブロック状腹部皮下脂肪組織より調製し、3 継代目を以下の実験に用いた。ASCs を 1×10^3 cell/cm² にて播種し、7 日間 10%FBS 添加 DMEM 培地で増殖させた (増殖期) 後、14 日間脂肪分化培地 (DMEM+insulin, IBMX, indomethacin) にて培養を行った (脂肪分化期)。その際、増殖期、脂肪分化期それぞれに FGF-2 (10 ng/ml) を添加し、FGF-2 の無添加群をコントロールとした。また、培養期間を通して DMEM 培地のみにて培養を行い、脂肪分化させなかった細胞を Not induced 群とした。細胞増殖度は MTT Assay にて測定した。また GPDH 活性、脂肪分化マーカー (PPAR- γ , GLUT4, C/EBP) を Real-time RT-PCR にて測定し、分化 14 日目において Oil red O 染色を行って脂肪蓄積量を測定し各群の脂肪分化度を比較検討した。

【結果】

増殖期に FGF-2 を添加した群は、コントロール群と比較して有意に MTT Assay 値、GPDH 活性、Oil red O 染色度、脂肪蓄積量が増加し、細胞増殖と脂肪分化の促進が観察された。中でも FGF-2 を増殖期のみに添加し脂肪分化期に添加しなかった群で著明に脂肪分化の促進を認めた。一方、脂肪分化期のみ FGF-2 添加した群では、コントロール群と比較し増殖や分化の促進効果を認めなかった。

FGF-2 を用いて ASCs を増殖させることにより経時的に PPAR γ の発現が増加したが、C/EBP α 発現の増加を認めなかった。Not induced 群は分化 14 日目でも脂肪分化はほとんど認めなかった。

【考察】

本研究の結果から、FGF-2 は ASCs の増殖と脂肪分化を促進させることが明らかになった。脂肪分化の促進には PPAR γ の発現が関与することが示唆された。さらに、FGF-2 添加培地を培養初期の増殖期に用いることにより少量のドナー (脂肪組織) から脂肪への分化能を有する幹細胞 (ASCs) を大量に調製することが可能であることがわかった。

幹細胞を応用した再生医療では、少量のドナー組織から分化能を有する幹細胞を大量調製することが求められる。本研究の結果に基づいて、今後 ASCs の培養初期に FGF-2 添加することで脂肪組

組織の再生医療を有効に進めることが可能になった。

審査の結果の要旨

脂肪組織由来幹細胞 (ASCs) の増殖期と脂肪分化期への FGF-2 による影響を検討した。その結果, FGF-2 は脂肪組織由来幹細胞 (ASCs) の増殖と脂肪分化の両者を促進させ, 特に増殖期にのみ FGF-2 を添加すると ASCs の脂肪細胞への分化が著明に促進することが明らかになった。また, FGF-2 による脂肪分化の促進に PPAR γ の発現が関与することも示された。以上より, FGF-2 添加培地を培養初期の増殖期に用いることにより少量のドナー由来脂肪組織から脂肪への分化能を有する幹細胞 (ASCs) を大量に調製することが可能であることが示された。今後, 培養中の FCS を除外するなどの改良は必要なものの, 培養初期に FGF-2 を添加することで ASCs を脂肪組織の再生医療に応用する可能性が示唆され, 医学上価値ある研究と認められた。

【1495】

氏 名 (本 籍) 谷 尻 力 (兵庫県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 834 号

学位授与の日付 平成 20 年 5 月 27 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Hodgkin's Reed-Sternberg cell line (KM-H2) promotes a bidirectional differentiation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells and CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes from CD4⁺ naive T cells

論文審査委員 主査 (教授) 池原 進
(教授) 藺田精昭 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【はじめに】

免疫機構は様々な生体内の恒常性を維持しており, 腫瘍細胞排除といった抗腫瘍免疫も例外ではない。これに対して腫瘍細胞自身が宿主の抗腫瘍免疫を回避し, 自身の保全を試みる機序が tumor

surveillance である。この tumor surveillance に宿主自身の制御性 T 細胞 (Treg) が密接に関与している傍証が蓄積されつつある。ヒトの卵巣癌などの固形腫瘍では腫瘍局所に多数の CD25⁺Foxp3⁺ Treg が浸潤しており, tumor surveillance に関与している事が明らかにされた。これらの Treg は宿主の胸腺で成熟した後, 腫瘍細胞により末梢血液中から腫瘍局所へと化学遊走されたものと考えられている。近年, 造血器悪性腫瘍である Hodgkin 病 (HD) においても他の固形腫瘍同様に腫瘍局所に多数の Treg が浸潤していることが報告された。我々はこれまでに Hodgkin's Reed-Sternberg (H-RS) 細胞由来の細胞株である KM-H2 が抗原提示能を有し, ヒト CD4⁺ T 細胞を分化増殖させることを報告してきた。一方で Treg は末梢血液中の前駆細胞から局所で分化誘導されることも知られている。そこで KM-H2 がヒト末梢血 CD4⁺ T 細胞細胞から CD25⁺Foxp3⁺ Treg へと直接分化誘導することが可能かどうかを検証する目的で今回の研究を開始した。

【研究方法】

インフォームドコンセントを得た健常者から末梢血を採取し, 単核球層を比重遠沈法にて分離し, 磁気ビーズ法により Naïve CD4⁺ T 細胞を採取した。末梢血 Naïve CD4⁺ T 細胞と, 20 Gy 照射にて不活化させた KM-H2 を共培養し, CD4⁺ T 細胞について, 表面抗原, 細胞内・核内物質及びサイトカイン産生能についてフローサイトメトリーを用いて解析を行った。この CD4⁺ T 細胞を不活化させていない KM-H2 を含めた各種腫瘍細胞株と再度共培養し, 腫瘍細胞株に与える細胞傷害性について比色法により解析した。

【結果】

KM-H2 は共培養した末梢血 Naïve CD4⁺ T 細胞を CD69⁺CD25⁺ 細胞群と CD69⁺CD25⁻ 細胞群へと分化・誘導した。CD25⁺ 細胞群は制御性サイトカインである IL-10 と IFN- γ の両者を産生し, RT-PCR法にて Foxp3 を発現することが確認された。この CD25⁺ 細胞群は Foxp3⁺IFN- γ 細胞と Foxp3⁻IFN- γ 細胞の独立した二つの細胞集団により構成されていること事が核内染色法により確認された。以上より KM-H2 は末梢血 Naïve CD4⁺ T 細胞を CD25⁺Foxp3⁺ 細胞へと直接分化誘導する能力を持つ事が確認された。一方, CD25⁺Foxp3⁻ 集団の

細胞は Granzyme B と TIA-1 を発現しており、CD4⁺ CTL と同様の表現型を持っていた。この CD4⁺ CTL は親細胞である KM-H2 に対して強力な細胞傷害性を示した。反面、CD4⁺ CTL は固形腫瘍由来の Hela 細胞には全く細胞傷害性を示さなかった。KM-H2 以外の各種悪性腫瘍由来細胞株についても同様の解析を加えたところ、CD25⁺Foxp3⁺ 細胞を誘導するには腫瘍細胞株が抗原提示能を有している事が必須であることが明らかとなった。いずれの腫瘍細胞株で Foxp3⁺ 細胞を誘導した場合にも必ず CD4⁺ CTL が同時に誘導されていることから両者が協調的に分化・誘導・機能している事が示唆された。

【考察】

これまで腫瘍に浸潤した Foxp3⁺ Treg は宿主の胸腺由来であるとの考え方が主流を占めてきた。卵巣癌細胞等は CCR4 のリガンドである CCL22 を発現しており、CCR4 陽性の Foxp3⁺ Treg が腫瘍周辺へ動員されているとの報告がある。しかし我々の結果は抗原提示能を持つ腫瘍細胞株は *in vitro* でヒト Naïve CD4⁺ T 細胞を直接 Foxp3⁺ T 細胞へと転換できることを示している。従って *in vivo* でも抗原提示能を有する悪性腫瘍細胞は末梢流血中の Naïve CD4⁺ T 細胞を前駆細胞として腫瘍局所で Foxp3⁺ T 細胞を generate している可能性が示唆された。他方、腫瘍に浸潤した Treg が臨床像において果たす役割についても様々な考察がなされてきた。腫瘍局所に Foxp3⁺ Treg が多く浸潤しているほど予後不良であると、各種固形腫瘍の臨床研究において報告がなされている。これら臨床経過との相関より腫瘍に浸潤した Treg が宿主の抗腫瘍免疫を阻害し、結果として腫瘍細胞の増殖を助長していると考えられてきた。しかし HD 等の造血器悪性腫瘍ではむしろ腫瘍局所での Foxp3⁺ Treg が多いほど予後良好であるとの報告がなされ、両者での相反する結論が議論的となっている。

今回我々は HD 等の抗原提示能を有する腫瘍細胞は Foxp3⁺ Treg と同時に大量の CD4⁺ CTL を generate することを示した。これらの CD4⁺ CTL が親細胞である腫瘍細胞の進展を阻害し、それにより予後を改善している可能性が示唆された。現今、Treg depleting therapy の前臨床的研究が盛んに行われているが、本研究の結果により、抗原提示能を持つ造血器悪性腫瘍には固形腫瘍とは異

なった治療戦略を創案する検討の余地があると考えられる。

審査の結果の要旨

癌患者の予後は局所における制御性 T 細胞 (Treg) の浸潤度が高いと不良とされているが、一部の腫瘍では逆の成績が報告されている。申請者は Hodgkin リンパ腫に由来する樹立細胞株 (KM-H2) の *in vitro* 実験系において naïve CD4⁺ T 細胞から KM-H2 細胞自身に作用する Treg 細胞と CTL が誘導されることを示し、抗原提示能をもつ腫瘍に共通する現象であることを明らかにした。本研究は担癌局所の免疫監視機構において新しい機構の存在を示唆した点で重要である。

【1496】

氏 名 (本 籍) 宋 昌 輝 (中国)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 835 号

学位授与の日付 平成 20 年 9 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目

Facilitation of hematopoietic recovery by bone grafts with intra-bone marrow-bone marrow transplantation

論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭
(教授) 池原 進 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【はじめに】

骨髄移植が難治性疾患の治療に用いられて久しいが、ドナー細胞の生着後においても T 細胞依存性の液性免疫の回復が特に成人の患者において遅延することが知られている。マウスを用いた移植実験においても、通常の静脈内法 (IV-BMT) で異系骨髄移植を行うと、T 細胞依存性抗原に対する免疫応答の回復が悪いことが報告されている。申請者らは、以前、骨髄ストローマ細胞を補う目的でドナーマウス骨 (骨髄細胞を吹き出したもの) を同時移植すると、骨内の骨髄ストローマ細胞が胸腺にも移住し胸腺細胞の positive selection に関

与する、すなわち、ドナー由来の T 細胞はドナータイプの MHC 拘束性を獲得し、T 細胞、B 細胞、抗原提示細胞 3 者の完全な連携が成立することにより T 細胞依存性の液性免疫が回復することを言い出した (Exp. Hematol. 28: 950, 2000).

最近、骨髓内移植法 (IBM-BMT) は IV-BMT 法と比べて移植効率が非常に高く、移植の成立しにくい組み合わせであっても成功することが、我々のみならず他の研究室においても報告されるようになった (Blood 97: 3292, 2001). 従って、ドナーマウス骨を IBM-BMT と同時に移植すれば、加齢マウスにおいてもまた移植骨髓細胞数が少なくても T 細胞機能の回復も含めた移植の成立を誘導できる可能性が考えられる.

そこで、今回申請者は、まず、生後 2-3 日齢と 4-5 週齢の骨由来骨髓ストローマ細胞の増殖力および造血幹細胞の支持能力を比較した. さらに、ドナー骨髓細胞を IV-BMT あるいは IBM-BMT したマウス (生後 15-16 週) に骨の同時移植を行い、生存率が上昇するか、また生着促進の機序について検討した.

【方法と結果】

1. 生後 2-3 日齢と 4-5 週齢のマウス骨由来骨髓ストローマ細胞の比較

生後 2-3 日齢あるいは 4-5 週齢の C57BL/6 マウスの骨髓細胞を 2 週間培養し、ストローマ細胞形成率を比較したところ、生後 2-3 日齢の方が有意に高かった. また、これら 2 種の骨髓ストローマ細胞上に生後 4-5 週齢の C57BL/6 マウスより精製した造血幹細胞を播き、5 日間培養してチミジンの取り込みを測定することにより、造血幹細胞に対する増殖支持能を比較した. この場合も生後 2-3 日齢の方が有意に高い値を示した. 従って、生後 2-3 日齢のマウス由来骨髓ストローマ細胞は、増殖能および造血支持能において生後 4-5 週齢よりも優れていると考えられる.

2. ドナー骨同時移植における生着促進とその機構の解析

レシピエントマウス (C57BL/6) に致死量 (5.5 Gy を 4 時間間隔で 2 回) の放射線を照射し、C3H マウスより得た 5×10^6 の骨髓細胞をレシピエントの脛骨内に直接移入した (IBM-BMT). 他のレシピエントには、同数の骨髓細胞を尾静脈内に投与した (IV-BMT). 一部のレシピエントには、腎臓と皮下

にドナー骨 (生後 2-3 日齢あるいは 4-5 週齢のマウスより採取) も移植した.

生存率は、生後 2-3 日齢のドナー骨を移植した IBM-BMT 群が最も高く、次いで生後 4-5 週目のドナー骨移植 IBM-BMT 群や IBM-BMT のみの群が高かった. 一方、IV-BMT のみの群や、IV-BMT と骨移植併用群は移植 15 週以内に全マウスが死亡した. 生後 2-3 日齢のドナー骨には、レシピエントマウスの生存率を上昇させる作用が高いと考えられる. 従って、以降の実験では、IBM-BMT のみの群 (IBM-BMT alone 群) と生後 2-3 日齢のドナー骨移植 IBM-BMT 群 (IBM-BMT+bone graft 群) との間で置き換わり等について詳しく比較検討した.

末梢血、骨髓、脾臓および胸腺細胞の FACS 解析により、IBM-BMT+bone graft 群ではすべての系統の血球がドナータイプに置換していたが、IBM-BMT alone 群ではレシピエントタイプのままであった. また、綿羊赤血球に対するブランク形成細胞法を用いた解析から、IBM-BMT+bone graft 群のマウスの脾臓由来 T 細胞はドナータイプの MHC 拘束性を獲得していることが明らかになった. さらに、混合リンパ球反応法で、IBM-BMT+bone graft 群のマウス脾臓細胞は、ドナーとレシピエント両方に対してトレランスになっていることも見出した.

次いで、実際にレシピエントの骨髓、脾臓および胸腺にドナーの骨髓ストローマ細胞が移住し生着しているかを解析するために、これらの組織あるいは培養によって得られた付着性細胞を骨髓ストローマ細胞に対して特異的な抗体と抗ドナータイプ H-2 抗体とで二重染色した. IBM-BMT+bone graft 群において、ドナーの骨髓ストローマ細胞が生着していることが確認された. 一方、IBM-BMT alone 群では、各組織の付着性細胞はレシピエントタイプであった.

【総括】

IBM-BMT法に生後2-3日齢のドナー骨同時移植を組み合わせることににより、加齢マウスにおいてもまた移植骨髓細胞数が少なくても T 細胞機能の回復も含めた移植の成立を誘導できることが明らかとなった. レシピエントの骨髓、脾臓および胸腺へのドナー骨髓ストローマ細胞の移住と生着が、重要な役割を果たしていると考えられる.

審査の結果の要旨

本研究は、マウスを用いて、骨髄内骨髄移植の際に、生後 4-5 週齢のマウスよりも、生後 2-3 日齢の若いマウスの骨を同時に移植する方が、移植骨髄細胞数が少なくても、T 細胞を含めた造血系の細胞の早期回復が期待できることを明らかにしたものである。その理由として、ストローマ細胞の増殖力並びに造血幹細胞支持能が、生後 2-3 日齢のマウスのストローマ細胞の方が、優れていること、さらに、ドナー骨髄ストローマ細胞のレシピエントの骨髄、脾臓および胸腺への移住能力に差があることが判明した。これら事実、骨髄内骨髄移植を実施する際、ストローマ細胞の補充という点からは、ドナーの年齢を充分に考慮する必要があることを示唆するもので、充分、学位に値する研究と考える。

【1497】

氏 名 (本 籍) 崔 ^{さい} 文 ^{ぶん} 昊 ^{こう} (中国)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 836 号

学位授与の日付 平成 20 年 9 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Analysis of Tolerance Induction Using Triple Chimeric Mice: Major Histocompatibility Complex-Disparate Thymus, Hemopoietic Cells, and Microenvironment

論文審査委員 主査 (教授) 福原資郎

(教授) 池原 進 (教授) 藺田精昭

論文内容の要旨

【はじめに】

近年 allogeneic 骨髄移植法は、多種の難病の有効な治療方法として確立されつつあるが、胸腺機能の低下した高齢者への骨髄移植は、十分に T 細胞の機能が回復せず、その成功率は低い。我々は以前、胸腺機能の低下した老齢化宿主に対して、胸腺移植を併用した骨髄移植法が有効であることを示した (PNAS 1996)。しかしながら、同じ donor から胸腺組織を手に入れるのは困難が予想され

る。今回、我々は host と major histocompatibility (MHC) と異なるドナーの骨髄細胞と第 3 者からの胸腺を移植し、その有効性を検討した。また、実際に老齢化促進モデルである senescence-accelerated mouse P1 strain (SAMP1) マウスも用いて解析した。

【研究方法】

実験 1: 致死量の放射線を照射した 8 週齢の胸腺を欠く Nude マウス、胸腺摘除を行った BALB/c マウス (どちらも H-2^d) に、当教室で開発した骨髄内骨髄移植法により 8 週齢の C3H マウス (H-2^b) の骨髄細胞を 1×10^7 個移植し、同時に腎被膜に胎生 16 日の B6 マウス (H-2^b) の胸腺を移植する群 (トリプルキメラマウス)、骨髄細胞と同じ C3H マウスの胸腺を移植する群、さらに胸腺移植を行わない群を作製した。

実験 2: 致死量の放射線を照射した老齢化促進モデル SAMP1 マウス (H-2^b) に、骨髄内骨髄移植法により 8 週齢の BALB/c マウスの骨髄細胞を 3×10^7 個移植し、同時に胎生 (16) 日の B6 マウスの胸腺を移植する群 (トリプルキメラマウス) と胸腺移植を行わない群も作製した。

以降、生存率、キメリズム、リンパ球機能、免疫寛容、及びその機構について解析した。

【結果】

実験 1: ヌードマウスや胸腺摘除マウスは、骨髄移植のみの群はほとんどが移植後 8 週以内に死亡した。胸腺を移植した群では、トリプルキメラマウス、MHC の一致した胸腺を移植した群は、12 週以上の長期間生存した。トリプルキメラマウスでは移植胸腺の生着を認め、かつ明らかな graft-versus-host disease (GVHD) や、host-versus-graft disease (HVGD) は見られなかった。すべての群のマウスで、造血系の細胞は骨髄細胞由来であったが、T 細胞は CD4, CD8 サブセットとも胸腺移植を行わない群より、胸腺移植を行った群の方が多く見られ、かつトリプルキメラマウスと MHC の一致した、胸腺を移植したマウスではほぼ同じ数であった。また、mitogen による T 細胞の反応性も、胸腺移植を行わない群は低下していたが、胸腺移植を行った群では十分な反応性を示し、さらにトリプルキメラマウスと MHC の一致した胸腺を移植したマウスは同等であった。さらに、トリプルキメラマウスでは当該の 3 種類の MHC に対

して、免疫寛容を認めた。その機構として、移植胸腺内に骨髄由来及び移植胸腺由来の樹状細胞を認め、DC による negative selection の機構が考えられた。

実験 2：老齡化促進モデル SAMP1 マウスでも、非胸腺移植群より胸腺移植を行ったトリプルキメラは長期間生存した。キメリズムでは、胸腺移植をしない群は拒絶反応が起こり骨髄由来の細胞は生着しなかったが、トリプルキメラは生着し、かつ骨髄細胞由来の CD4, CD8T 細胞、及び B 細胞を認めた。Mitogen による T 細胞の反応性も、無処置の SAMP1 マウスや胸腺移植を行わない群では低下していたが、胸腺移植を行った群では十分な反応性を示した。さらに、当該の 3 種類の MHC に対しても、免疫寛容を認めた。

【考察】

胸腺機能の低下した宿主において、胸腺を併用した allogeneic 骨髄移植法は、骨髄細胞の donor と異なる第 3 者からの胸腺でも有効で、かつ十分な免疫機能と寛容を得て長期間生存できることが明らかになった。さらに、複数の donor からの臓器移植への応用も可能であることが分かり、老齡化宿主への多種の疾患への治療法につながるものと考えられる。

審査の結果の要旨

胸腺機能の低下した老齡者への骨髄移植は、十分に T 細胞の機能が回復してこないため、その成功率は低いことが知られている。

本研究では、胸腺機能の低下した宿主（マウス）を用いて、同種骨髄移植の際、胸腺移植を併用した。胸腺移植は、組織適合抗原 (MHC) が骨髄ドナーやレシピエントの MHC とは異なる第 3 者からの胸腺移植を行っても、免疫機能が十分に回復し、免疫学的寛容が誘導され、マウスは長期間生存できることが判明した。将来、この方法は、ヒトへの応用の可能性もあり、また、老齡化宿主の多種多様の疾患治療法にもつながるものと考えられ、充分、学位に値する研究と考える。

【1498】

氏名(本籍) ^{わか まつ たか ひろ} 若松隆宏 (大阪府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 837 号

学位授与の日付 平成 20 年 9 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

The combination of glycyrrhizin and lamivudine can reverse the cisplatin resistance in hepatocellular carcinoma cells through inhibition of multidrug resistance-associated proteins

論文審査委員 主査(教授) 中邨智之
(教授) 螺良愛郎 (教授) 権 雅憲

論文内容の要旨

【はじめに】

肝細胞癌 (HCC) 患者に対する化学療法としてシスプラチン (CDDP) などが用いられる。しかし抗癌剤に対する自然耐性の他に多剤耐性関連蛋白 (MRP) による抗癌剤耐性獲得のため、進行肝癌に対する化学療法の奏成功率は低く予後不良である。その奏成功率を上げるためには MRP による多剤耐性を克服することが必要と考えられる。そこで CDDP 使用時に、MRP を基質とし、また臨床で広く用いられるグリチルリチン (GLY) やラミブジン (LAM) を併用することで MRP を介した modulator 効果により抗腫瘍効果が増強するかどうかについて、我々は CDDP 耐性培養肝癌細胞株を新たに樹立し、耐性獲得細胞における MRP の mRNA 発現量解析や、耐性株に対する薬剤の抗腫瘍効果の変化、また細胞内 CDDP 濃度測定を行い検討した。

【研究方法】

培養肝癌細胞株 (Huh7) に低濃度 CDDP を加え継代を行い、生き残った細胞にさらに高濃度の CDDP を加え継代を繰り返していく事で CDDP 5 µg/ml に耐性を持つ細胞株を樹立した。続いて Huh7 野生株と樹立した耐性株において alamar blue assay を用いて CDDP による抗腫瘍効果について検討を行った。次に野生株及び耐性株において RT-PCR, real-time PCR を行い MRP1, 2, 3, 4, 5, さらに薬剤耐性関連膜輸送蛋白である MDR1,

GST- π の発現について検討した. そして (i) 耐性株に CDDP を単独投与した場合, (ii) 耐性株に CDDP と GLY を併用投与した場合, (iii) 耐性株に CDDP と LAM を併用投与した場合, (iv) 耐性株に CDDP と GLY・LAM を併用投与した場合の生存率によりそれぞれの抗腫瘍効果を検討した. 更に CDDP 投与時の野生株内及び耐性株内 CDDP 濃度を原子吸光分析法により比較し, 続いて上記 (ii), (iii), (iv) における各細胞内 CDDP 濃度の変化について検討した.

【結果】

樹立した耐性株で対数増殖することを確認した. 培養 72 時間後の CDDP による IC_{50} は耐性株で野生株の 14.1 倍であった. CDDP 投与後, 経時的に耐性株では生存率の低下を認めなかったが, 野生株では有意に生存率が低下した. MRP1, MDR1, GST- π の発現量は野生株・耐性株でそれぞれ差を認めなかったが, MRP2, 3, 4, 5 の発現量は耐性株で野生株に比べそれぞれ有意に多かった. CDDP による生存率は (i) に比べ (ii), (iii) は有意に低下し, (iv) では (ii), (iii) よりも更に有意に低下した. 細胞内 CDDP 濃度は, (i) では野生株に CDDP 投与した際の 36.4% と減少したが, (ii), (iii) では (i) より有意に上昇し, (iv) では (ii), (iii) より更に有意に上昇を認めた.

【考察】

これまで CDDP 耐性獲得の原因として細胞内 CDDP 濃度の減少が関連することが肺癌の CDDP 耐性株において報告されている. 今回我々は肝細胞癌において MRP ファミリー (MRP2, 3, 4, 5) が CDDP 耐性株で野生株より高発現し, CDDP の細胞内濃度が CDDP 耐性株で野生株に比べ減少している事を確認した. MRP2, 3, 4, 5 の増加により CDDP が細胞外へより多く排出され細胞内 CDDP 濃度が減少する事が耐性獲得に関連すると考えられた. また, CDDP 耐性株に CDDP を単独投与した場合より CDDP に GLY, LAM を併用投与する事で生存率が低下し, その際細胞内 CDDP 濃度が上昇している事を確認した. これらは GLY, LAM が CDDP の modulator となり MRP を介した細胞からの CDDP 排出が抑制された事によるものと考えられた.

以上より CDDP に modulator となる薬剤を併用投与する事により, MRP を介した CDDP 排出を

阻害することで細胞内 CDDP 濃度が上昇し抗腫瘍効果が増強し, 肝細胞癌の CDDP 耐性を克服する事が示唆された.

審査の結果の要旨

癌細胞が抗癌剤に対する耐性を獲得するために, 肝癌などではシスプラチン等抗癌剤治療の奏効率が低い. このメカニズムは多薬排出トランスポーターの発現増加によるところが大きいとされている. 若松氏は, 多薬排出トランスポーターのうち, MRP2, 3 をグリチルリチンで, MRP4, 5 をラミブジンで競争阻害することによりシスプラチンの排出を抑制でき, 耐性の問題を改善できることを示した. 本研究は現在の抗癌剤治療の問題を克服するための方向性を示したものであり, 学位授与に値する.

【1499】

氏 名 (本 籍) ^{とよしま} 豊島 (塚本) ^{つかもと} 麗子 ^{れいこ} (神奈川県)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 甲 第 838 号
学位授与の日付 平成 20 年 9 月 25 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目

N-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis is promoted by short-term treatment with estrogen and progesterone mimicking pregnancy in aged female Lewis rats

論文審査委員 主査 (教授) 神崎秀陽
(教授) 螺良愛郎 (教授) 岡崎和一

論文内容の要旨

【目的】

疫学的に, 若年満期妊娠は乳癌のリスクを減少させる. これは人種を問わずみとめられ, 副作用なしに乳癌を予防し得る唯一の生理的現象である. この現象はラットにもみとめられ, 発癌物質への曝露前あるいは直後の若年期での妊娠は乳癌発生率や多発率を減少させ潜伏期を延長する. ラットにおける妊娠による乳癌発生予防効果は 3ヶ月齢以下の若年ラットへのエストロゲンとブ

ロゲステロンの短期投与で妊娠環境を模倣することにより達成可能である。経産婦の減少をみる現在、未産婦に対してエストロゲンとプロゲステロン処置を施すことにより、妊娠を模倣するホルモン環境を作出し、乳癌抑制ができれば、有用な試みと考える。しかし、疫学的にみると、35 歳以上の高齢での初回満期妊娠は同年齢層の未産婦に比して乳癌リスクが上昇する。しかし、高齢ラットへの短期エストロゲンとプロゲステロン投与の乳癌発生に及ぼす実験的検討は未だなされていない。そこで今回、高齢 Lewis ラットに、妊娠期ホルモン環境を模倣したエストロゲンとプロゲステロンの短期投与の *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) 誘発乳癌に与える影響について検討した。

【方法】

7 週齢雌 Lewis ラットに 20 mg/kg の MNU を腹腔内投与し、24 週齢時に乳腺腫瘍を触知するラットは実験から除外し、任意に選別した 5 匹も乳腺の発育を観察するため屠殺し、残りの半数 (25 匹) に 0.5 mg 17 β -estradiol および 32.5 mg progesterone を含有する 21 日間徐放錠 (E/P) を皮下に留置し、E/P 非投与群 (25 匹) と乳癌の発生につき比較検討した。ラットは乳腺腫瘍の腫瘍最大径が 1 cm 以上になった時点あるいは 48 週齢で屠殺した。屠殺時にはすべてのラットの乳腺腫瘍とともに“正常”乳腺組織を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、4 μ m の薄切切片を作製し、HE 染色を行い、<1 cm の微小乳腺腫瘍を摘出するとともに、乳腺腫瘍の組織分類を行った。また、 $\geq$ 1 cm 乳癌切片はケラチン 14 やエストロゲン受容体 (ER) とプロゲステロン受容体 (PgR) に対する免疫染色を行った。

【結果】

MNU 誘発 $\geq$ 1 cm 乳癌発生率は E/P 投与群では非投与群と比較して増加し (投与群: 非投与群 = 60% : 44%), 潜伏期間は短縮した (投与群: 非投与群 = 28.7 週 : 34.6 週)。また、腫瘍の多発率 (ラットあたりの全乳癌個数) は有意に上昇した (投与群: 非投与群 = 1.8 : 0.8)。なお、E/P 投与群ではエストロゲンレセプター (ER) およびプロゲステロンレセプター (PgR) 陰性の乳癌が有意に増加し、基底細胞形質を発現する細胞の不規則な出現とcomedo壊死を呈する乳癌が増加した。

【結論】

1. 高齢における妊娠を模倣する短期のエストロゲンとプロゲステロン曝露は乳癌発生の危険を増大した。

2. 発生した乳癌は ER, PgR 陰性のものが多く、comedo壊死を高頻度に見た。

3. 高齢期の短期エストロゲンとプロゲステロン曝露は予後不良乳癌の発生を促進する。

審査の結果の要旨

ヒト疾患の病態解析に動物モデルは必須である。ヒトでは高齢満期産は乳癌リスクを増すが、動物を用いた再現実験は行われていない。今回ラットにおいてこの現象を再現しうることを実証した価値ある検討と評価され、学位に相応する研究であると判断された。

【1500】

氏名 (本籍) ^{にし}西 ^{けんいちろう}憲一郎 (大阪府)
学位の種類 博士 (医学)
学位番号 甲 第 839 号
学位授与の日付 平成 20 年 9 月 25 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目

LPS Induces Hypoxia-Inducible Factor 1
Activation in Macrophage-Differentiated Cells
in a Reactive Oxygen Species-Dependent
Manner

論文審査委員 主査 (教授) 中邨智之
(教授) 伊藤誠二 (教授) 藺田精昭

論文内容の要旨

Introduction

マクロファージは様々な炎症部位で作用するが、このような部位である血管外の間質は正常組織に比べ一般的に酸素分圧が低い。先天性免疫反応を司る細胞が、低酸素環境においても生存能力や生理学的機能を維持することを可能とする何らかの仕組みが存在するはずである。低酸素はサイトカインレセプターや表面蛋白発現、サイトカイン分泌、接着、移動、食食、細胞生存など骨髄性

細胞の性質に多様な影響を及ぼす。低酸素は、細胞や組織が低酸素状態に適応するために重要なエリスロポエチンや VEGF や解糖系酵素や炎症性メディエーターなどの蛋白合成を増加させる遺伝子発現を誘導する。低酸素誘導性因子 1 (HIF-1 [hypoxia-inducible factor 1]) は、酸素ホメオスタシスを調節するマスター転写因子である。HIF-1 は構成的に発現している HIF-1 β と誘導によって発現する HIF-1 α のサブユニットから二量体を構成されており、支配遺伝子の制御領域に存在する HRE (Hypoxia Response Element) に結合し遺伝子の発現を誘導する。HIF-1 の生物学的活性の調節は、HIF-1 α サブユニットの生成、分解、転写活性によって主に担われていると現在では考えられている。

HIF-1 α の蛋白発現量と転写活性の調節のメカニズムはすでに広く研究されていて以下のような知見が得られている。HIF-1 α は酸素分圧依存性の水酸化により制御されており、分子状酸素存在下においては VHL (von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein) を含むユビキチン結合酵素複合体によるユビキチン化の結果、HIF1 α 蛋白質は細胞内で半減期が 5 分程度でプロテアソーム分解されて発現量が低く維持されている。低酸素状態においては酵素反応における基質つまり酸素の減少のため HIF-1 α のプロリン残基の水酸化が抑制され、その結果 HIF-1 α 蛋白は安定化し細胞内での発現量が増加する。HIF-1 α の転写活性化能は、正常酸素分圧ではアスパラギン残基の水酸化により HIF-1 α と p300/CBP との相互作用を妨げ、抑制的に調節されている。プロリンとアスパラギンの水酸化酵素は分子状酸素と α ケトグルタル酸を基質として利用する。プロリン水酸化酵素 PHD (prolyl hydroxylase domain-containing protein) とアスパラギン水酸化酵素である FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) は二価の鉄 (Fe²⁺) をその触媒として含むため、鉄のキレート剤である desferrioxamine は正常酸素分圧において HIF-1 α の安定化と転写活性化を誘導する。対照的に、HIF-1 β はほとんどの細胞において安定して発現している。

様々な生理的刺激により非低酸素状態でも HIF-1 α 蛋白質の蓄積や低酸素誘導性遺伝子発現の調節が引き起こされる。内毒素 lipopolysaccharide (LPS) は敗血症性ショックの発症に影響を与える

強力な炎症性因子である。LPS はマクロファージにおいて NF- κ B 経路を介して炎症性サイトカインの産生を誘導する。

骨髓系細胞の条件的遺伝子破壊の研究より、炎症反応とくにマクロファージの機能発現において HIF-1 α が重要な役割を果たしている事が証明されていたが、LPS 誘導性の HIF-1 活性化の分子機序は明確ではなく、特に単球からマクロファージへの分化の過程との関連を解析した研究は今まで存在しなかった。

この研究において我々は、単球-マクロファージの分化モデルとしてヒト単球性白血病細胞である THP-1 細胞を用い、細胞の分化過程と関連つけて LPS による HIF-1 活性化の機序を分子生物学的に解析した。

Materials and Methods

モデル系としてヒト単球性白血病細胞である THP-1 細胞を使用した。マクロファージへの分化は phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) の添加により行った。低酸素処理は、1% O₂-5% CO₂-94% N₂ に調整された培養器により行った。

Results

単球系細胞である THP-1 細胞を PMA 刺激によりマクロファージ様に分化誘導させた細胞においては、LPS が容量依存性、時間依存性に HIF-1 α 蛋白質発現を誘導するが、未分化の THP-1 細胞ではその反応が認められなかった。また、LPS は HIF-1 α 蛋白質蓄積のみならず、HIF-1 α の転写活性化能を増強させ HIF-1 の支配下遺伝子の発現を増強した。THP-1 細胞の分化により HIF-1 α の mRNA レベルは上昇し、さらに LPS により刺激することで、HIF-1 α の mRNA レベルは上昇した。

また、抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) が LPS 誘導性の HIF-1 α 蓄積を著明に抑制するのに対し、NF- κ B 阻害剤である BAY11-7082, resveratrol や NOS 阻害剤である L-NAME は LPS により誘導される HIF-1 α 蛋白質蓄積に影響を及ぼさなかった。分化 THP-1 細胞は、LPS により乳酸の産生が増加するがこの増加は、NAC, アスコルビン酸前処置により有意に抑制された。

Discussion

THP-1 細胞を用いたマクロファージモデルにおいて、LPS による HIF-1 α 蛋白質蓄積には HIF-1 α mRNA レベルの上昇による蛋白生成の増加が関与

していることが示された。また、抗酸化剤、NF- κ B 阻害剤、NOS 阻害剤を使用した実験結果により、LPS による HIF-1 α mRNA レベルの上昇には、NF- κ B 活性化や NO を介した経路ではなく reactive oxygen species (ROS) を介したシグナル経路が関与していることが示唆された。

さらに、LPS による HIF-1 α の活性化は未分化の THP-1 細胞では認められず、分化 THP-1 細胞でのみ HIF-1 の活性化が認められることから、マクロファージの機能維持に HIF-1 の働きが必要であることが示唆された。このような知見は、少なくともマクロファージが関与する炎症において低酸素誘導性の遺伝子応答が重要な役割を担っている事を示すもので、HIF-1 を標的とした炎症制御の新たな方法の開発につながる可能性がある。

審査の結果の要旨

低酸素は低酸素誘導因子 (HIF-1) を介して生体に多くの影響を及ぼす。本研究では自然免疫に重要な役割を果たすマクロファージの機能にも HIF-1 が重要な役割を果たすこと、低酸素のみならず LPS もマクロファージにおける HIF-1 産生を促進すること、さらにその過程には NF- κ B 活性化や NO を介した経路ではなく、活性酸素種 (ROS) を介する経路が重要であることを示した。以上の結果は炎症とマクロファージ、HIF-1 の関連をより明確にしたものであり、博士号に値する。

【1501】

氏名(本籍) 小池直子 (兵庫県)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲第 840 号

学位授与の日付 平成 20 年 9 月 30 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Human cord blood cells can differentiate into retinal nerve cells

論文審査委員 主査(教授) 藺田精昭

(教授) 池原 進 (教授) 松村美代

論文内容の要旨

【はじめに】

網膜神経細胞の変性が視機能障害の主要原因とされている中、薬物療法や網膜移植など網膜再生に対する様々な研究が行われてきたが、未だ臨床的に有用な方法は見付かっていないのが現状である。近年これらの疾患に関して、人工網膜の作成や再生治療が注目を集めており、再生治療の一手法として神経幹細胞が網膜神経細胞へ分化することが報告されている。最近、我々はマウスやラットを用いて骨髄細胞が網膜神経細胞へ分化可能であることを見いだした。これらにより網膜変性疾患治療への新たな可能性が示唆された。

ヒト臍帯血細胞は以前より血液疾患に対する治療として用いられてきたが、造血系幹細胞だけでなく神経細胞を含め様々な細胞に分化可能であることが近年報告されており、様々な疾患に対する治療法としての可能性が期待されている。このような背景から、今回我々は SCID マウスを用いてヒト臍帯血細胞の網膜神経細胞への分化の可能性について研究を行った。

【方法】

ヒト臍帯血から Lymphoprep を用いて単核球分画を抽出し抗ヒト lineage 抗体と magnetic beads を用いて lineage 陰性細胞を enrich した。8 週齢の SCID マウスに抗 asialo GM1 抗体を注射した後、網膜下に PKH26 で標識した前述の lineage 陰性ヒト臍帯血細胞 2×10^6 (5 μ l) を注入した。

2 週間後、SCID マウスより眼球を摘出し、網膜下注入部位を含む厚さ 10 μ m の切片を作成し、HE

染色と免疫染色を行った。免疫染色は抗ヒト nestin 抗体, 抗ヒト MAP2 抗体, 抗ヒト NSE 抗体, 抗 β -III tubulin 抗体, 抗 rhodopsin 抗体を用いて行い, 核は DAPI を用いて染色した。染色後, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。また, 眼球より RNA を抽出し cDNA を作成して Real Time PCR を行い human GAPDH, human rhodopsin の発現量を検討した。

【結果】

臍帯血細胞の網膜下注入 2 週間後の HE 染色にて網膜下の注入部位に様々な形態の細胞の増殖を認め, 免疫染色の結果, 臍帯血由来細胞の中に nestin, MAP2, NSE, β -III tubulin, rhodopsin 陽性の細胞を認めた。

また, Real Time PCR の結果, human GAPDH は human retina, lineage 陰性臍帯血細胞だけでなく, ヒト臍帯血細胞注入 SCID マウスの眼球にも発現が認められた。さらに human rhodopsin の発現を検討したところ, human retina だけでなくヒト臍帯血細胞注入 SCID マウスの眼球にも発現が認められた。

【結論】

Lineage 陰性ヒト臍帯血細胞を抗 asialo GM1 抗体処理後の SCID マウスの網膜下に注入した。2 週間後に眼球摘出を行い免疫染色検討を行ったところ, 注入細胞の中に神経細胞, 網膜神経細胞マーカー陽性の細胞を認めた。また PCR にて rhodopsin の発現を認めた。これらの結果より, ヒト臍帯血細胞は網膜神経細胞に分化しうる可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

網膜神経細胞の変性は視機能障害の主要な原因とされているが, いまだ臨床的に有用な再生治療法は開発されていない。本研究は, ヒト臍帯血由来 lineage 陰性細胞を SCID マウス網膜下に直接注入し, 網膜神経細胞への分化の可能性について検討している。移植 2 週間後に眼球を摘出して nestin, MAP2, NSE, β tubulin III, rhodopsin 抗体を用いる免疫組織学的検討を行ない, 注入細胞中に神経細胞, 網膜神経細胞マーカー陽性細胞を認めている。以上の結果より, ヒト臍帯血由来細胞中に網膜神経細胞に分化する細胞の存在が示唆された。臍帯血は再生医療の細胞源として近年注目されてお

り, 医学上価値ある研究と認められる。

【1502】

氏 名 (本 籍) 神 原 知 子 (京都府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 841 号

学位授与の日付 平成 21 年 1 月 27 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Propofol Suppresses Prostaglandin E_2

Production in Human Peripheral Monocytes

論文審査委員 主査 (教授) 伊藤誠二

(教授) 中邨智之 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【目的】

単球/マクロファージは, 自然免疫, 獲得免疫において重要な働きを担っている。また, これらの細胞が産生するプロスタノイド, とりわけプロスタグランジン (PG) E_2 は, 炎症, 免疫機能に大きな影響を及ぼすと考えられている。プロポフォル (2,6-diisopropylphenol) は, 麻酔の導入・維持だけではなく, 集中治療室における処置や鎮静にも広く使用される麻酔薬である。この薬は, 抗酸化作用を持ち, 好中球の食食活性を減弱し末梢血中の単核球からの炎症性サイトカインの分泌を抑制することにより, 抗炎症作用を持つと報告されている。しかし, プロポフォルによる PGE_2 産生に対する影響についてはほとんど知られていない。今回我々は, ヒト末梢血中の単球を用いてプロポフォルが PGE_2 産生に及ぼす影響を調べたので報告する。

【方法と結果】

ヒト末梢血から単球を分離し, プロポフォル (0-60 μ M) の存在下にリポポリサッカライド (LPS) (100 ng/ml) で 18 時間刺激し, 培養液中の PGE_2 , トロンボキサン (TX) B_2 , 腫瘍壊死因子 (TNF)- α の濃度を酵素免疫法にて測定した。LPS の刺激によりプロスタノイド濃度は劇的に増加し, プロポフォルはそれを著明に抑制した。これは, ラクテートデヒドロゲナーゼ (LDH) の測定により, プ

ロポフォルの細胞毒性によるものではないことがわかった。また、プロポフォルは $\text{TNF-}\alpha$ の濃度に影響を与えなかった。

PGE_2 , TXB_2 の産生が共にプロポフォルにより抑制されたため、その抑制がシクロオキシゲナーゼ (COX) レベルかそれより上流の酵素において起こっていることが推測された。そこで、細胞内 COX-1, 2 の蛋白発現をフローサイトメトリーによって測定した。COX-1 は LPS, プロポフォルのどちらにも変化を示さなかった。一方、COX-2 は LPS 刺激により著明に増加していたが、プロポフォルによる変化は見られなかった。このことから、プロポフォルは COX の蛋白発現を変化させないといえる。

過去の論文から、ヒト単球においてプロポフォルが誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 発現を抑制することにより COX 活性の低下を導く可能性を考え、我々は NOS の基質である L-アルギニンと選択的 iNOS 抑制剤である 1400 W を加えて培養を行い PGE_2 の濃度を測定した。その結果、L-アルギニンを加えてもプロポフォルによる PGE_2 抑制作用に影響はなかった。また、1400 W を加えても、LPS 刺激による PGE_2 産生増加に変化はなく、そこに L-アルギニンを加えても影響はなかった。このことから、NO はヒト単球において PGE_2 産生と無関係であるようだ。

次に、プロポフォルが COX 活性に与える影響を調べた。市販のキットを用いて精製された COX 酵素においてプロポフォルは濃度依存的に COX-2 活性を抑制した。ヒト単球についてはどうかを調べるために、LPS で 16 時間刺激した後洗浄したヒト単球を、アラキドン酸 ($10 \mu\text{M}$) を含む培養液中でプロポフォルとともに 1 時間培養し、上澄み液中の PGE_2 , PGD_2 , TXB_2 の濃度を測定した。プロポフォルは PGE_2 , PGD_2 , TXB_2 の濃度をすべて抑制しており、COX-2 活性を抑制した。さらに深くその抑制作用を明らかにするために、増量したアラキドン酸 ($100 \mu\text{M}$) を用いて同様の実験を行うと、プロポフォルの COX-2 活性の抑制作用が減弱した。

過去の論文において、 PGE_2 がインターロイキン (IL)-10 の産生を促しているというものがあることから、我々は、ヒト単球をプロポフォルの存在下に LPS で 18 時間刺激し、培養液中の IL-10 の産

生量を測定した。LPS 刺激により IL-10 は明らかに増加し、その増加はプロポフォルによって濃度依存的に抑制された。しかし、COX 阻害剤による IL-10 産生量への影響はみられなかったため、IL-10 はプロポフォルの PGE_2 抑制作用に関係していないと考えた。

臨床において用いられるプロポフォルであるディプリバンは、脂肪乳濁液に溶解しており、その主要な構成要素はアラキドン酸の基質となるリノール酸を多く含有するダイズ油である。それゆえ、このディプリバンの溶媒がプロポフォルの COX 活性抑制作用に影響を及ぼしている可能性がある。そこで我々は、これについてプロポフォルとディプリバンの比較を行った。その結果、双方とも PGE_2 の産生を抑制しているが、その抑制作用はプロポフォルよりディプリバンのほうが著明に減弱していた。

【結語】

プロポフォルは LPS により活性化されたヒト末梢血中の単球において PGE_2 産生を抑制することが分かった。このプロポフォルによる PGE_2 抑制作用は、COX 蛋白発現や基質による影響ではなく、COX 活性の抑制によるものであった。それゆえ、プロポフォルは、炎症、免疫において重要な効果を持つであろうと考えられる。

審査の結果の要旨

プロポフォルは LPS により活性化されたヒト末梢血中の単球において PGE_2 産生を抑制する。したがって、プロポフォルは、炎症、免疫において重要な効果を持つ可能性が考えられる。このプロポフォルによる PGE_2 抑制作用は、COX 蛋白発現や NO による影響ではなく、COX-2 活性の抑制によると考えられた。以上の結果は、ヒト末梢血中の単球におけるプロポフォルと PGE_2 との関連をより明確にしたものであり、博士号に値する。

【1503】

氏 名 (本 籍) 藤 田 賢 吾 (兵庫県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 842 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Immunohistochemical identification of
messenger RNA-related proteins in basophilic
inclusions of adult-onset atypical motor neuron
disease

論文審査委員 主査 (教授) 杉本哲夫

(教授) 山田久夫 (教授) 中村加枝

論文内容の要旨

【背景と目的】

「運動ニューロン病 (MND)」は運動神経が選択的に変性を来す疾患の総称である。MND の内にはいくつかの亜型が報告されており、その 1 つに「好塩基性封入体 (BI) を伴う MND」がある。若年発症の BI を伴う MND は、1941 年より相次いで報告されているが、成人発症の BI を伴う MND は報告が数少なく、疾患概念は確立されていない。病態は不明であるが BI は好塩基性であるため核酸との関連が指摘されている。そこで我々は Kusaka らにより報告された成人発症の BI を伴った MND 2 例 (1990, 1993 年) において本疾患に出現する BI における RNA 関連タンパクの関与について免疫組織化学的に検討した。

【対象と方法】

対象は、36 歳時に構音障害と右上肢筋力低下にて発症し 42 歳で死亡した男性例と、53 歳時に右下肢筋力低下で発症し 58 歳で死亡した男性例である。いずれも進行性の筋力低下を呈して呼吸不全で死亡し、病理学的に中枢神経細胞内に広範に BI が認められた。これらの症例の脳皮質神経細胞と脊髄前角細胞の細胞質に見られる BI を methyl-green-pyronin (MGP) 染色および poly A binding protein 1 (PABP1), T cell intracellular antigen 1 (TIA-1), ribosomal protein S6 (rpS6), ribosomal protein L28 (rpL28), decapping enzyme 1 (Dcp1), TAR-DNA binding protein 43 (TDP-43), alpha-

internexin に対する抗体を用いて免疫組織化学を行った。

【結果】

2 例の BI の染色結果は同様であった。BI は MGP 染色では桃色に染色され、RNAase を処理後の MGP 染色では、BI の染色性が消失したため RNA を含有していることが示唆された。また抗 PABP 1 抗体、抗 TIA-1 抗体、及び抗 rpS6 抗体を用いた免疫染色では、ほぼすべての BI が陽性反応を示した。一方で、抗 rpL28 抗体、抗 Dcp1 抗体、抗 TDP-43 抗体、抗 alpha-internexin 抗体では免疫反応性は認められなかった。

【考察】

本研究において、免疫組織化学的に局在を検討した PABP1, TIA-1, Dcp1 はいずれも mRNA に特異的に結合する RNA 結合蛋白である。今回の検討により、BI が複数の mRNA 結合蛋白に対する抗体で陽性反応を示したことから、BI には mRNA が含有されていると推察された。mRNA が細胞質内で凝集体を形成した、いわゆる RNA granule には、現在 3 種が知られている。すなわち、transport ribonucleoprotein particles (transport RNPs), processing bodies, stress granules である。transport RNPs は翻訳前の mRNA を細胞内の適切な翻訳の場まで輸送する構造物で、60S リボゾーム (rpL28) を含有している。processing bodies は翻訳の終了した mRNA を一時的に貯蔵した構造物で、mRNA のキャップ構造を除去するための Dcp1 を含有している。一方 stress granules は、細胞に対して何らかのストレスが加わった場合に翻訳を停止して mRNA を一時的に凝集・保護する構造物で、TIA-1, 40S リボゾーム (rpS6) を含有している。

今回のわれわれの検討で、BI の免疫組織化学的特徴は stress granule に類似していることが示された。したがって、成人発症の BI を伴う MND の病因には、細胞内に stress granule を形成し、存続するような特定のストレスが関与している可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

成人発症の好塩基性封入体を伴う運動ニューロン病は、報告が数少なく疾患概念が確立されていない。本研究は封入体形成への核酸の関与に着目し、各種の関連マーカーを用いた免疫組織化学染

色法を駆使し、2 症例の解析を行った。その結果、封入体は mRNA の凝集体であることを強く示唆する証拠を得た。この新知見は疾患の概念形成と今後の病因解明に資するところが大きく、学位に値するものと認定された。

【1504】

氏 名 (本 籍) ^{わけ} 分 ^の 野 ^{まさ} 正 ^{たか} 貴 (大阪府)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 甲 第 843 号
 学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目
 The Alpha 2A-Adrenergic Receptor Gene
 Polymorphism Modifies Antidepressant
 Responses to Milnacipran
 論文審査委員 主査 (教授) 中邨智之
 (教授) 中井吉英 (教授) 日下博文

論文内容の要旨

【研究目的】

選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRIs) paroxetine とセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRIs) milnacipran は、日本でうつ病の第一選択薬としてしばしば使用されるが、日常診療では 50–60% の反応率である。抗うつ薬反応の個人差には遺伝的背景が起因している可能性がある。

α 2A-アドレナリン受容体 (ADRA2A) は、自己受容体として全身交感神経活動の調整において中心的役割を果たす。近年、ADRA2A の機能的欠損がうつ病、注意欠陥多動障害、Tourette 症候群の原因として関係しているとの報告がある。

この研究では、ADRA2A のプロモータ部位に位置する C-1297G 遺伝子多型 (rs1800544) の遺伝的変異の影響が、SSRIs/SNRIs の抗うつ薬反応における予測因子となりえるか日本人うつ病患者で調査した。

【研究方法】

研究は関西医科大学精神神経科で行なわれ、関西医科大学と大阪大学の倫理委員会によって承

認された。すべての参加者から書面によるインフォームド・コンセントを得た。DSM-IV でうつ病と診断された日本人 93 患者がこの研究に参加し、paroxetine か milnacipran に無作為に割り当てられ、薬物投与前と投与後 2 週間ごとにハミルトンうつ病評価尺度 (HAM-D) で評価され、6 週間治療した。ADRA2A C-1297G 遺伝子多型が抗うつ薬の有効性の相関解析で考慮された。統計解析には SAS バージョン 8.2 を用いた。

【結果】

93 名 (男性/女性: 45/48; paroxetine/milnacipran: 46/47; 年齢: 48.2 ± 14.3 歳) が研究に登録された。Paroxetine 19 名, milnacipran 17 名が研究から脱落し、合計 57 名 (男性/女性: 30/27; paroxetine/milnacipran: 27/30; 年齢: 49.3 ± 12.6 歳) が解析の評価基準を満たした。

臨床改善では、paroxetine 27 名と milnacipran 30 名両群とも著明に改善した ($P < 0.001$) が、両群間に有意差はなかった。Paroxetine 群 54.3%, milnacipran 群 55.3% に副作用を認めたが両群間に有意差はなかった ($P = 1.000$)。

57 名を ADRA2A C-1297G 遺伝子多型の C/C, C/G, G/G の 3 グループに分類し、3 遺伝子型間で HAM-D 経時 6 週変化率 ($P = 0.019$) (repeated measures ANOVA) と 4 週 ($P = 0.034$), 6 週時 ($P = 0.028$) (ANOVA) の HAM-D 変化率に有意差を認め、抗うつ反応は、G/G より C アレル保有者で良かった。C アレルを優性遺伝子と考え、C アレル保有者と G/G 群で抑うつ症状の改善を比較した。Milnacipran 群で C アレル保有者が G/G 群より、HAM-D 経時 6 週変化率 ($P = 0.037$), 2 週時 ($P = 0.022$), 4 週時 ($P = 0.044$) HAM-D 変化率で著明な改善を示したが、paroxetine 群では有意差を認めなかった。

【考察】

我々の研究結果は ADRA2A がうつ病治療で重要な役割を果たすことを示唆した。この研究では、paroxetine と milnacipran は同等の臨床効果と副作用を持つことを証明した。また ADRA2A 遺伝子多型が SSRIs/SNRIs、特に milnacipran の抗うつ反応に関連している可能性を示した。ADRA2A 発現レベルが、milnacipran の効果に関係したかもしれないが、C-1297G 遺伝子多型によってもたらされる機能変化はまだ *in vivo/in vitro* で十分確認されていない。

【結語】

ADRA2A 遺伝子多型は milnacipran の反応を予測する適正な候補因子になるかもしれない。我々の結果はまだ予備的であり、より多くの症例が我々の結果を確認するのに必要とされる。しかし我々の知る限り、この研究は SNRI 反応と ADRA2A 変異の相関を示した最初の研究である。

審査の結果の要旨

うつ病において、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) とセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) は現在第一選択薬であるが、約 4 割の患者で効果がみられない。分野氏は、うつ病患者 93 名が参加する 6 週間の前向き臨床研究を行い、前シナプス自己受容体であるアドレナリン受容体 $\alpha 2A$ 遺伝子のプロモーター部位の 1 塩基多型が SNRI, SSRI に対する反応性に影響することを見出した。本研究は、ゲノム情報を用いて治療選択するテーラーメイド医療に生かすことが期待されるものであり、学位に値する。

【1505】

氏 名 (本 籍) ^{やま と ふみ こ} 山 戸 史 子 (奈良県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 844 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Elevated intracellular calcium in neutrophils in patients with Down syndrome

論文審査委員 主査 (教授) 中邨智之
(教授) 伊藤誠二 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨**【背景】**

ダウン症候群 (Down syndrome: DS) の患者では易感染性、白血病、自己抗体の出現など免疫異常に関連した病態を高率に合併する。易感染性の原因の一つとして好中球の走化能、貪食能の低下が報告されているが、その機序の詳細は不明である。

近年、好中球が活性化する際のセカンドメッ

センジャーとして細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が注目されており、その濃度変化は好中球活性化の指標になると考えられている。

今回私たちは DS における易感染性の原因を明らかにする目的で、DS 患児の好中球の $[Ca^{2+}]_i$ を測定し、若干の知見を得たので報告する。

【研究方法】

DS 患児 27 名 (DS 群: 8.6 ± 4.6 歳) と対照としての健康小児 14 名 (C 群: 12.0 ± 3.9 歳) からヘパリン加血 (静脈血 3 ml) を採取し、遠心分離法によって好中球を調整 (5.0×10^6 /ml) した。

調整した好中球を蛍光色素 fura-2AM で処理した上で、 $[Ca^{2+}]_i$ を蛍光分光光度計で定量し比較した。さらに好中球刺激物質 N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) を添加した場合と添加しない場合で、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化を DS 群と C 群の両群間で比較した。

【結果】

① fMLP を添加しない好中球において $[Ca^{2+}]_i$ は、DS 群において C 群に比して有意に高値であった (70.6 ± 28.0 nM vs. 44.4 ± 16.0 nM, $p < 0.01$)。

② fMLP を添加した場合の $[Ca^{2+}]_i$ の最高値も、DS 群において有意に高値であった (250 ± 91 nM vs 167 ± 60 nM, $p < 0.01$)。

③ 一方、fMLP による刺激後、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇速度は C 群に比して DS 群では緩徐で、 $[Ca^{2+}]_i$ が最高値に達するまでの時間は、DS において有意に長かった (23.3 ± 13.4 vs 12.4 ± 6.8 秒, $p < 0.01$)。

④ DS 群では、無刺激時および fMLP 刺激時、いずれの場合においても年齢 ($0.8 \sim 9.3$ 歳) と $[Ca^{2+}]_i$ の間に有意な相関関係が認められた (それぞれ相関係数 $r = 0.576$, $r = 0.492$, $p < 0.01$)。一方、C 群 ($4.4 \sim 17.8$ 歳) では、いずれの場合も両者の間に有意な相関関係は認められなかった。

⑤ 血清 Ca 濃度は DS 群で有意に低値を示した (DS 群: 8.2 ± 0.9 mg/dl, C 群: 9.2 ± 0.3 mg/dl, $p < 0.01$)。

【考察】

好中球内の Ca は、細胞内情報伝達物質として機能しており、その濃度は無刺激下においては極めて低く保たれている。しかしひとたび刺激が加わると、細胞外またはカルシオソーム (細胞内貯蔵部位) から Ca^{2+} が動員され $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する。したがって $[Ca^{2+}]_i$ は細胞内外の Ca の流入入のバ

ランスで調節されている。

今回、DS 患児の好中球機能を活性化刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の変化で評価した結果、刺激に対する反応遅延がみられた。この機序については不明であるが、DS 患児において $[Ca^{2+}]_i$ が有意に高値である一方、血清 Ca 濃度が有意に低値であったことから、DS では細胞内外の Ca の流入出バランスが細胞内に傾いていることが一因と思われた。すなわち無刺激下でも Ca^{2+} が好中球内に高濃度で維持されているため、刺激に対する Ca^{2+} の濃度勾配による動員が起りにくくなる可能性が考えられた。

いずれにせよ細胞内 Ca の動員が遅延すると好中球貪食能が低下することが知られており、今回の検討結果から DS 患児の易感染性の原因の一つとして『好中球の活性化遅延』が示唆された。

また DS 患児において、年齢と $[Ca^{2+}]_i$ の間に有意な相関関係が認められた。健康成人において無刺激下の $[Ca^{2+}]_i$ は加齢とともに上昇し、刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ の動員は遅延するという報告がある。DS では、30 歳を過ぎた頃から早期の老化が認められるが、DS においてのみ小児期から年齢と $[Ca^{2+}]_i$ の間に相関関係がみられたことは、DS における全身細胞の早期老化現象を反映している可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

ダウン症候群患者では易感染性、自己抗体の出現などの免疫異常を高率に合併する。山戸氏は好中球活性化シグナルのセカンドメッセンジャーである Ca^{2+} 濃度がダウン症候群患者で変化している可能性を考え、ダウン症候群患児 27 名、健康小児 14 名の好中球を採取してその細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。その結果、ダウン症候群患者の好中球ではベースラインの Ca^{2+} 濃度が高く、刺激に対しておこる Ca^{2+} 濃度上昇が遅延することを見出した。本研究はダウン症候群患者の免疫系におこる異常の一端を明らかにしたものであり、学位に値する。

【1506】

氏名(本籍) 熊^{しゅん} 正^{ずん} 梅^め (中国)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 845 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Neuroprotective effects of amyloid β -derived non-toxic tripeptide ($A\beta_{32-34}$, Ile-Gly-Leu) against toxic amyloid β -induced neuronal toxicity in vitro and in vivo

論文審査委員 主査(教授)伊藤誠二
(教授)杉本哲夫 (教授)日下博文

論文内容の要旨

【研究目的】

アミロイド β 蛋白はアルツハイマー病の病原ペプチドであり、その毒性メカニズムに基づいて毒性を防ぐ戦略が探索されてきた。これまでの報告では比較的高濃度 (10 μ M 以上) のアミロイド β 蛋白を用いて解析されてきたが、我々の研究室では、アルツハイマー病患者の脳脊髄液内濃度相当 (10 nM 以下) のアミロイド β 蛋白がホスファチジルイノシトール 4-リン酸要求性のクロライドイオンポンプ活性を抑制し、神経細胞内クロライドイオン濃度を上昇させ、ついでグルタミン酸誘発興奮毒性による神経細胞死を増悪させることを明らかにした。さらに、アミロイド β 蛋白がホスファチジルイノシトール 4-キナーゼ (PI4K) 活性を直接阻害すること、アミロイド β 蛋白の部分ペプチドの $A\beta_{31-35}$ を同時添加することにより、毒性アミロイド β 蛋白による PI4K 活性阻害および培養海馬神経細胞によるグルタミン酸興奮毒性による神経細胞死の増悪を抑制することを明らかにした。申請者は、アミロイド β 蛋白毒性に対して、拮抗薬として有用なアミロイド β 蛋白部分ペプチドの最小単位および修飾ペプチドの *in vitro* 探索と、その *in vivo* 作用を検討した。

【研究方法】

1. ラット脳海馬神経細胞初代培養方法：胎生 19 日齢の Wistar 系ラット脳より培養海馬神経細胞を作製し、培養 4 日目から非神経細胞除去のため

5 μ M Ara-A 処理し、8 日目から 2 日間アミロイド β 蛋白 (10 nM $A\beta_{1-42}$) およびアミロイド β 蛋白部分ペプチド (10 nM) を単独または同時添加した。グルタミン酸興奮毒性の観察のために、培養 10 日目に 10 μ M グルタミン酸含有無血清培養液で 10 分間処理し、その後 8 日目からの培養液と同じ培養液に交換し、2 日間 (12 日目) 培養した。

2. 細胞生存活性測定：細胞生存活性は、ミトコンドリア活性を反映する WST-8 還元活性と細胞膜障害を反映する乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出量により評価した。

3. 組換えヒト PI4K 蛋白の調製：human PI4KII α vector を *Escherichia coli* DH5 α に導入し、発現誘導後、産生された GST-PI4KII α 蛋白を GST-Sepharose 4B で精製した。

4. 組換えヒト PI4K 活性測定：PI4K 活性は、アミロイド β 蛋白 (10 nM $A\beta_{1-42}$) およびアミロイド β 蛋白部分ペプチド (10 nM) を単独または同時に含む反応液に組換え PI4KII α と PI および [γ - 32 P]ATP を加えた。反応後生じたリン酸化リン脂質を薄層クロマトグラフィーを用いて分離し、オートラジオグラムにて計測した。

5. 海馬内注入方法：4 ヶ月齢のヒトタウ V337M 変異体蛋白発現マウスを麻酔下で脳位置固定装置に固定し、人工髄液に溶解したアミロイド β 蛋白 (100 nM $A\beta_{1-42}$) およびアミロイド β 蛋白部分ペプチド (100 nM acetyl- $A\beta_{32-34}$) を単独または同時に脳海馬 CA1 領域 (AP -2.0 mm from the bregma, LAT -1.0 mm, DV +1.5 mm) に注入 (注入量 1.5 μ l, 0.22 μ l/min) した。麻酔覚醒後、飼育ケージに移動した。

6. モリスの水迷路試験：海馬内注入から 1 ヶ月後、水迷路試験を行った。始めの 3 日間は、避難台に目印のボールを立て、無目印空間 (プール周囲に白布で天井まで囲む) で遊泳の事前訓練 (4 試行：1 日 4 回 <1 回 1 分>, 30 分間隔) を行った。実験開始から 5 日間避難台を水面下 (0.5 cm) に沈め 4 方向 (東西南北：4 試行) から遊泳させ、5 日目の 4 試行後、避難台を除去し、1 分間遊泳させた。すべての遊泳記録をビデオに撮り、行動解析ソフト (SMART 2.5 version, Panlab-s) で解析した。

7. 脳組織染色：行動実験終了後、麻酔下に 4% パラホルムアルデヒドにて還流固定し、脳を摘出

し、後固定後 30% sucrose 溶液に浸透させ、包埋後凍結切片を作製した。変性神経細胞の検出には methyl green pyronin Y (MGPY) 染色を行い、アポトーシス細胞の検出には cleaved caspase-3 antibody を用いて免疫組織化学染色を行った。左右それぞれの海馬 CA1, CA3 および dentate gyrus 領域の総細胞数あたりの染色陽性 (変性) 細胞数を計算した。

【実験結果】

1. アミロイド β 蛋白由来トリペプチド ($A\beta_{32-34}$) のアミロイド β_{1-42} 蛋白誘発毒性に対する保護作用

1) 10 nM アミロイド β 蛋白 ($A\beta_{1-42}$) による PI4K 活性阻害は、10 nM のアミロイド β 蛋白部分ペプチド ($A\beta_{32-35}$) および $A\beta_{31-35}$ 由来の 3 つのペプチド断片 $A\beta_{31-34}$, $A\beta_{32-35}$ および $A\beta_{32-34}$ によって有意に減弱した。

2) 初代培養脳海馬神経細胞における 10 nM アミロイド β 蛋白 ($A\beta_{1-42}$) のグルタミン酸誘発神経細胞毒性の増強が WST-8 還元活性の減少との LDH 遊離の増加によって観察され、その神経細胞障害の増強は 10 nM のアミロイド β 蛋白部分ペプチド ($A\beta_{31-35}$) および $A\beta_{31-34}$, $A\beta_{32-35}$, $A\beta_{32-34}$ によって有意に減弱した。

3) $A\beta_{31-35}$ 由来の 3 つのペプチド断片のうち最も短い $A\beta_{32-34}$ である Ile-Gly-Leu (IGL) は、1 nM から用量依存的に有意に 10 nM アミロイド β 蛋白 ($A\beta_{1-42}$) による PI4K 活性阻害と初代培養脳海馬神経細胞のグルタミン酸誘発神経細胞毒性の増強を減弱させた。一方、 $A\beta_{32-34}$ の逆配列を持つ $A\beta_{34-32}$ ではこのような減弱効果は認められなかった。

2. 修飾アミロイド β 蛋白トリペプチド (acetyl- $A\beta_{32-34}$, acetyl-Ile-Gly-Leu) の *in vitro* およびヒトタウ V337M 変異体蛋白発現マウスにおけるアミロイド β_{1-42} 蛋白誘発神経細胞毒性に対する保護作用

1) 修飾アミロイド β 蛋白トリペプチド 3 種類 (acetyl-Ile-Gly-Leu, Ile-Gly-Leu-NH $_2$ および acetyl-Ile-Gly-Leu-NH $_2$) のうち acetyl-Ile-Gly-Leu (acetyl- $A\beta_{32-34}$) は、1 nM から用量依存的に有意に 10 nM アミロイド β 蛋白 ($A\beta_{1-42}$) による PI4K 活性阻害と初代培養脳海馬神経細胞のグルタミン酸誘発神経細胞毒性の増強を減弱させた。

2) 海馬内アミロイド β 蛋白注入後 1 ヶ月経過し

たマウスにのモリスの水迷路試験では、アミロイド β 蛋白 ($A\beta_{1-42}$) 注入群は明らかな空間認知障害が認められた。アミロイド β 蛋白 ($A\beta_{1-42}$) と修飾アミロイド β 蛋白トリペプチド (acetyl- $A\beta_{32-34}$) の同時注入群では空間認知障害の改善が認められた。

3) 行動実験終了後摘出した脳切片の MGPY 染色および cleaved caspase-3 antibody の免疫組織化学染色の結果、海馬 CA1, CA3 および dentate gyrus のいずれの領域においてもアミロイド β 蛋白 ($A\beta_{1-42}$) 注入群は有意に障害細胞数の増加とアポトーシス様細胞数の増加が認められた。アミロイド β 蛋白 ($A\beta_{1-42}$) と修飾アミロイド β 蛋白トリペプチド (acetyl- $A\beta_{32-34}$) の同時注入群では海馬のいずれの領域においても障害細胞数の減少が認められた。

【考察と結論】

非毒性修飾アミロイド β 蛋白トリペプチド (acetyl- $A\beta_{32-34}$: acetyl-Ile-Gly-Leu) は、おそらく膜タイプの PI4KII 活性障害を回復させることによって、*in vitro* および *in vivo* いずれの場合において、アルツハイマー病患者の脳脊髄液内濃度相当のアミロイド β 蛋白 ($A\beta_{1-42}$) 毒性を保護するものと考えられる。これらのことから非毒性修飾アミロイド β 蛋白断片 (acetyl- $A\beta_{32-34}$) は、アルツハイマー病の治療薬としてアミロイド β 蛋白拮抗薬の開発に有用であると考えられる。

審査の結果の要旨

アルツハイマー病の病原ペプチドであるアミロイド β は、神経細胞膜の PI4K を障害し、細胞毒性を発揮する。本研究で熊氏は、アミロイド β の部分配列である $A\beta_{32-34}$ (IGL) がアミロイド β による PI4K 障害とそれに引き続く細胞毒性をともに抑制できることを示した。さらに、アセチル化アミロイド β_{32-34} が AD モデルマウスにおいてアミロイド β による神経死と記憶低下を抑制できることを示した。本研究は AD の治療薬のリード化合物を見出したものであり、学位に値する。

【1507】

氏名(本籍) ^み三 ^{よし}好 ^{ひで}秀 ^{あき}明 (山口県)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 846 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Circulating Naïve and CD4+CD25high

Regulatory T Cells in Patients With Auto-

immune Pancreatitis

論文審査委員 主査(教授) 権 雅憲

(教授) 池原 進 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【研究目的】

自己免疫性膵炎 (Autoimmune pancreatitis; AIP) は、膵腫大と主膵管の狭細像を呈し、血清 IgG, IgG4 の上昇や自己抗体の出現など、その発症に自己免疫機序の関与が疑われる膵疾患であるが、その病態については不明である。

一方、様々な自己免疫性疾患の発症に制御性 T 細胞 (Regulatory T cell; Treg) が関与していることが示唆されており、さらに Treg にいくつかのサブセットが存在することが報告されている。そのうち CD45RA 陽性の Naïve-Treg は、Treg の特異的転写因子である Foxp3 を発現し CD4⁺CD25^{high}Treg と同様の抑制能を有するため、自己免疫性疾患との関与が予測されている。しかし AIP にこれらの Treg がどのように関与しているかは未だ不明である。そこで今回われわれは、AIP 患者における末梢血中の各種 Treg について他の慢性膵炎と比較し検討を行った。

【研究方法】

当院とその関連施設で得られた AIP 患者 27 名 (平均年齢 62 歳 (22–83 歳)、男女比 18 : 9、ステロイド投与群 12 名)、健康人 32 名 (平均年齢 63 歳 (41–76 歳)、男女比 23 : 9)、アルコール性慢性膵炎 12 名 (平均年齢 63 歳 (45–91 歳)、男女比 9 : 3)、特発性慢性膵炎 11 名 (平均年齢 52 歳 (22–80 歳)、男女比 2 : 9) の末梢血中の CD4⁺CD25^{high} (Conventional-Treg) 細胞、CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ (Naïve-Treg) 細胞をフローサイトメトリーを用い

て解析を行った。

【結果】

AIP 患者の Conventional-Treg は健常人・アルコール性慢性膵炎患者・特発性慢性膵炎患者と比較し有意に増加していた。一方、AIP 患者の Naïve-Treg は健常人・アルコール性慢性膵炎と特発性慢性膵炎を合わせた慢性膵炎患者と比較し有意に減少していた。さらにステロイド未投与群の AIP 患者の Conventional-Treg と血清 IgG4 値には正の相関 ($R=0.53$) が認められた。

【考察】

今回の検討において、AIP 患者の末梢血中の conventional-Treg は、健常人や他の慢性膵炎と比較し有意に増加していた。全身性エリテマトーデスや慢性関節リウマチなどの自己免疫性疾患では $CD4^+CD25^{high}$ Treg が減少しているとの報告が散見されるが、多発性硬化症では減少は認められないとの報告や、シェーグレン症候群では逆に増加しているとの報告もあり、自己免疫性疾患に $CD4^+CD25^{high}$ Treg の減少が必須のものではないようである。

AIP 患者では血清 IgG4 の上昇、膵や膵外病変に IgG4 陽性形質細胞の浸潤を特徴とするが、その役割や機序については未だ分かっていない。Robinson らは、高濃度の抗原が曝露されると T_H2 反応が抑制され T_H1 優位の反応に切り替わり、その結果 IL-10 産生制御性 T 細胞が増加し、産生された IL-10 が B 細胞の IgG4 クラススイッチを促すと報告している。以前我々は、AIP 患者の末梢血中の T_H1 型 $CD4$ 陽性細胞が増加していることを報告しており、今回ステロイド未投与群の AIP 患者の Conventional-Treg と血清 IgG4 値に正の相関 ($R=0.53$) が認められたことを考え合わせると、Conventional-Treg の増加が高 IgG4 血症に関与している可能性が示唆された。

一方 Naïve-Treg は AIP 患者の末梢血中では、健常人、他の慢性膵炎患者と比較し有意に減少していた。Naïve-Treg は Conventional-Treg と同様の抑制能を有していると報告されており、AIP の発症に Naïve-Treg の減少が関与している可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

自己免疫性膵炎 (AIP) は、発症に自己免疫機序

の関与が疑われる膵疾患であるが、その病態については不明である。三好氏は、AIP 患者における末梢血中の各種制御性 T 細胞 (Treg) を他の慢性膵炎と比較し、conventional (memory)-Treg の有意な増加と Naïve-Treg の減少を見出した。本研究は、AIP の発症や病態を解明する端緒となるものであり、学位に値すると認定された。

【1508】

氏 名 (本 籍) 松 村 義 隆 (福井県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 847 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Helix-rich transient and equilibrium inter-mediate of equine β -lactoglobulin in alkaline buffer

論文審査委員 主査 (教授) 藤井 茂
(教授) 伊藤誠二 (教授) 中邨智之

論文内容の要旨

【目的】

生命現象は様々な蛋白質によって支えられている。その蛋白質が生体機能を持つためには天然立体構造を形成しなければならない。よって、RNA から翻訳されたポリペプチド鎖がどのように折り畳まれて立体構造を形成するのかというフォールディング機構を知ることは生物物理学の重要課題の一つである。我々はウシの β ラクトグロブリンや src SH3 等、主に β 構造を有する蛋白質の folding 過程を調べてきた。その結果、これらの蛋白質は α ヘリックスからなる中間体を生じ、それを經由して天然状態の β 構造になることが分かった。さらにウシの β ラクトグロブリンについてはフォールディング・コアが観測されている。そこで我々は、天然立体構造がウシとほぼ同様で比較を行うのに好都合なウマの β ラクトグロブリンに注目し、そのフォールディングを調べた。ウマの β ラクトグロブリンはウシの β ラクトグロブリンと比較すると、(1) 自由になっているシステイン

残基がないためジスルフィド結合の交換がなく、(2) 酸性 pH からアルカリ性 pH まで単量体で存在でき、さらに (3) 大腸菌からの発現、精製の系が確立されているので様々な変異体を作れるといういくつかの利点を持つ。今回私は、ウマの β ラクトグロブリンのアルカリ性領域でのフォールディングを研究し、酸性領域と同様に α ヘリックスを多く含む中間体が形成されることを明らかにした。

【研究方法】

ウマの β ラクトグロブリンはミルクから精製したものと同様に大腸菌から発現、精製したものを用いた。

リフォールディングは変性剤グアニジン塩酸で変性させたウマの β ラクトグロブリンを希釈させ、低温用に特別に製作したストップト・フロー (SF) 法を用いた。またプローブとして α ヘリックスの量を測定する円偏光二色性 (CD) を用いた。

低温で実験を行うときは溶液を凍らせないために、ウシの β ラクトグロブリンでも用いられたエチレングリコールを使った。

【結果】

ウマの β ラクトグロブリンはグアニジン塩酸により天然状態から変性状態に徐々に構造変化し、その転移曲線は尿素によるものとほぼ同じ結果であった。また低温においてフォールディングを行うために、45%エチレングリコール存在下においてもグアニジン塩酸による変性転移を調べたところ、1 M 以下で天然状態を保ち 1.5 M の領域では平衡の非天然 α ヘリックス中間体を形成した。またそこからは濃度が上がるにつれて変性していった。これはウシの β ラクトグロブリンには見られない特徴である。またその転移曲線は温度依存がなく、酸性 pH 4 で見られるものと良く似ていた。

ここで 0% と 45% エチレングリコールでは構造変化がなく天然立体構造を保つことが分かったので、0% と 45% エチレングリコールの両条件で SF 法により変性状態から天然状態へ巻き戻るリフォールディングを行った。その結果、エチレングリコールの有無に関わらず、非天然の α ヘリックスを形成していると思われるバースト相が観測された。これは、ウマの β ラクトグロブリンが酸性 pH だけでなくアルカリ性 pH においても非天然 α ヘリックス中間体を形成してから天然状態まで折り畳まれることを示している。また、その

バースト相から天然状態までのフォールディング速度は温度が下がるにつれて遅くなっていった。これにより、 α から β への転移について活性化エンタルピーを初めて導き出すことができた。ウマの β ラクトグロブリンは 45% エチレングリコール存在下で 80 kJ/mol、ウシの β ラクトグロブリンではそれぞれ 0% と 45% エチレングリコールでそれぞれ 35 kJ/mol、70 kJ/mol であった。さらにウシで見られたフォールディング・コアの観測を試みたが、ウマの場合は観測されなかった。

【考察】

今回の研究で、ウマの β ラクトグロブリンは酸性だけでなくアルカリ性においても非天然 α ヘリックス中間体を形成するフォールディング経路を持つことが明らかになった。また酸性でもアルカリ性でも単量体で、且つ平衡およびフォールディングにおいて非天然 α ヘリックス中間体を観測できる良いモデル蛋白質であることが示された。蛋白質は一般に負に帯電しているため、酸性では正電荷による静電反発から分子サイズが大きくなり、その結果 α ヘリックスを形成することが研究報告されている。しかし我々により、フォールディングの初期過程においては pH やエチレングリコールの有無に関わらず局所相互作用による構造変化が主であることが示された。また我々は以前に、天然構造の 2 次構造組成の異なる蛋白質が、どの場合にも、それぞれ α ヘリックスを形成してから固有の天然立体構造へ折り畳まれることを報告しているが、今回のウマの β ラクトグロブリンの場合もその経路を通っており、この経路の一般性がさらに強く示される結果となった。

審査の結果の要旨

松村氏は、ウマ β ラクトグロブリンを用いて、弱アルカリ性の条件下でもフォールディングの初期過程に中間体として α ヘリックスの多い構造をとることを初めて示した。この結果は、いくつかのタンパク質のフォールディング初期過程において現れる α ヘリックスを多く含む構造中間体は、ある限定された pH 条件でのみ現れるものではなく、タンパク質がその構造を形成するために本質的に重要な中間体であることを一般化したもので学位に値する。

【1509】

氏 名 (本 籍) ^{はた の やす こ} 畑 埜 泰 子 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 848 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Phagocytosis of heat-killed *Staphylococcus aureus* by eosinophils: comparison with neutrophils

論文審査委員 主査 (教授) 藤澤順一
(教授) 池原 進 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【背景】

好酸球は、気管支喘息やアトピー性皮膚炎で組織傷害を起こし、それらの疾患の病因となることが考えられ、脱顆粒、活性化酸素産生、接着、走化能などの機能をもつことが知られている。しかし、細菌貪食の機能についての報告はなく、その機序も不明な点が多い。好中球が細菌を貪食・殺菌する機構についてはよく研究されているが、好酸球についてはほとんど報告がない。アレルギー性疾患では、好酸球の増多がしばしばみられる。また、アトピー性皮膚炎では、膿痂疹などの皮膚細菌感染の合併や症状の増悪をよく経験する。それらのアレルギー性炎症の場で、好酸球が細菌を貪食し、殺菌を行っている可能性があるが、明らかではない。

細菌感染の際の主な役割を担っているのは、好中球である。好中球は、接着、走化、貪食、活性化酸素産生、脱顆粒、殺菌などの機能を有し、細菌の貪食においては主役と考えられている。好中球の細菌貪食作用は、免疫グロブリンレセプターの CD16 (Fcγ レセプター III)、CD32 (Fcγ レセプター II)、補体レセプターの CD11b を介することが判明している。

一方、好酸球も好中球と同様、多彩な膜表面レセプターを発現している。中でも、免疫グロブリン Fcγ レセプターでは CD32、補体レセプターでは CD35、CD11b が多く発現している。しかし、それらの膜表面レセプターを介した好酸球の細菌貪食

作用に関する報告はない。

【研究目的】

好酸球が、好中球と同様に、貪食能や過酸化水素産生能を有するか否かを明らかにする。

【研究方法】

1. 正常成人の末梢血から、好酸球和好中球を、CD16 negative selection と比重遠沈法でそれぞれ分離する。

2. 分離した好酸球和好中球を、propidium iodide (PI) で染色したブドウ球菌で刺激した上で、活性化酸素の標識物質である dichlorofluorescein diacetate (DCF) を反応させ、フローサイトメトリーで過酸化水素産生能と貪食能とを、同時に定量的に測定した。

3. 分離した好酸球和好中球を、Fcγ レセプター (CD16・CD32)、補体レセプター (CD35・CD11b) に対する抗体で反応させた後、フローサイトメトリーで貪食能を定量的に測定し、それぞれの抗体による効果を検討した。

4. 共焦点レーザー顕微鏡で、好酸球を DCF と PI 染色したブドウ球菌に反応させ、好酸球が実際にブドウ球菌を貪食し、過酸化酸素を産生するかを確認した。

【結果】

1. 好酸球は、貪食能・過酸化水素産生能とともに、好中球の約 50% であった。

2. 貪食能は、好中球においては抗 CD16 抗体・抗 CD32 抗体で有意に抑制されたが、好酸球では抗 CD35 抗体で有意に抑制された。

3. 共焦点レーザー顕微鏡で、好酸球内に PI 染色したブドウ球菌を認め、またその食胞内に DCF を認めた。

【考察】

好中球と好酸球の細菌貪食能および過酸化水素産生能を、フローサイトメトリーで同時に定量化し、好酸球も好中球と同様に細菌を貪食し、過酸化水素を産生することが確認できた。また、その細菌貪食能・過酸化水素産生能は、好中球の約 50% であることが分かった。そして、実際に好酸球がブドウ球菌を貪食し、活性化酸素を産生することも確認できた。

さらに、好中球においては、Fcγ レセプターである CD16・CD32 に対する抗体で貪食は抑制されたが、好酸球では、補体レセプターである CD35

に対する抗体で抑制された。したがって、好酸球の貪食のメカニズムは、好中球と異なり、Fc γ レセプターによる関与はなく、補体レセプターによる関与が示唆された。

【結論】

好酸球も、好中球の 50% 程度の貪食能と過酸化水素産生能を有している。そして、ブドウ球菌の貪食における一連の過程は好中球と同様であるが、その刺激に対する受容体は、好中球と好酸球とで異なっている。

審査の結果の要旨

畑埜氏は、アレルギー疾患で増多がみられる好酸球の細菌貪食能および過酸化水素産生能に注目し、細菌の貪食・殺菌において中心的な役割を担う好中球と比較し解析した。その結果、好酸球も好中球の 50% 程度の貪食能および過酸化水素産生能を持っていること、および、抗中球とは異なったオプソニン受容体を介して貪食をおこなっていることを明らかにした。これらの結果は、アトピー性皮膚炎で併発する皮膚細菌感染症における好酸球の役割に示唆を与える新しい知見であり、学位に値すると考える。

【1510】

氏 名 (本 籍) よこ い たかし 横 井 崇 (奈良県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 849 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin suppresses inflammatory T_H2 responses by inducing functional alteration of TSLP-activated dendritic cells

論文審査委員 主査 (教授) 池原 進

(教授) 藺田精昭 (教授) 木梨達雄

論文内容の要旨

【背景・目的】

近年、先進諸国ではアレルギー疾患の増加が顕

著であり、その制御が重要な課題となっている。アレルギー性炎症は、Th2 細胞から産生されるサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) による免疫反応により引き起こされるが、最近、アレルギーをもたらず免疫カスケードのさらに上流にアレルギー誘導因子が発見された。この誘導因子はアトピー性皮膚炎患者のケラチノサイトや気管支喘息患者の気道粘膜に異常発現している thymic stromal lymphopoietin (TSLP) であり、このサイトカインにより活性化された CD11c⁺ ミエロイド系樹状細胞 (dendritic cell: DC) が炎症性 (TNF- α ⁺) Th2 サイトカイン産生細胞を誘導する。この際、TSLP-DC 上に発現する OX40 リガンド (OX40L) が必須であることも示された。したがって、TSLP-DC はアレルギー疾患に対する治療の新しいターゲットになりえるものと考えられる。

Bacillus of Calmette and Guérin (BCG) は、結核のワクチンとして広く安全に使用され、DC を成熟・活性化する強力な免疫アジュバントとして知られている。我々は、以前、BCG により活性化された DC は IFN- γ を旺盛に産生する Th1 細胞を誘導することを報告した。こうした免疫アジュバントの刺激を受けた DC によって Th2 細胞分化誘導能の制御が可能になれば、アレルギー疾患の有効な治療法の開発につながる。我々は、この作業仮説のもとに BCG の TSLP-DC に及ぼす影響を検討した。

【方法】

健康人ドナーの末梢血からマグネチックビーズ法およびセルソーターを用いて CD11c⁺ DC を単離し、TSLP または BCG の刺激による表面マーカーの発現、サイトカイン産生能、および Th 細胞誘導能を検討した。次に、TSLP 存在下および非存在下の BCG で DC を刺激した後、アロ CD4⁺ T 細胞と共培養し、Th1 細胞および Th2 細胞の誘導能を細胞内サイトカイン染色により検定した。さらに、レギュレーションアッセイを用いて、誘導されたヘルパー T 細胞の抑制能を検討した。

【結果】

TSLP, BCG, および TSLP 存在下の BCG による刺激は、いずれも DC を強力に活性化し成熟させた。TSLP の単独刺激を受けた DC からは IL-12 の産生を認めなかったが、BCG 単独刺激では大量の IL-12 を産生した。IL-12 の産生は TSLP 存在下

の BCG 刺激でも同様に確認された。次に、DC 上における OX40L の発現について検討した。DC は TSLP 刺激によりその細胞表面に OX40L を強く発現し、BCG 刺激により抑制された。この BCG による OX40L の発現抑制は RT-PCR でも確認され、遺伝子の転写レベルでの抑制と考えられた。

次に、TSLP および BCG の刺激を受けた DC と CD4⁺ naïve T 細胞を共培養し、誘導される T 細胞からのサイトカイン産生を検討した。TSLP 単独刺激の共培養 (TSLP-DC/T) では Th1 サイトカインである IFN- γ の産生はほとんど認められなかったが、炎症性 Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α) の産生を認めた。しかし、BCG と TSLP の同時刺激 (BCG+TSLP-DC/T) では大量の IFN- γ と IL-10 (制御性 Th1 サイトカイン) の産生を認め、炎症性 Th2 サイトカインの産生はほとんど認めなかった。この制御性 Th1 サイトカイン産生誘導系の共培養に IL-12 の中和抗体を添加すると IFN- γ の産生が減弱し、さらにリコンビナント OX40L を添加すると炎症性 Th2 サイトカインの産生増加が認められた。ELISA によるサイトカイン測定でも同様の結果が得られた。 [³H]thymidine incorporation による CD4⁺ T 細胞の増殖抑制試験では、BCG+TSLP-DC/T は優位に T 細胞の増殖を抑制した。これに IL-10 中和抗体を添加すると抑制は解除された。すなわち、BCG+TSLP 刺激により誘導される Th1 細胞は機能的にも制御性である。

【考察】

従来のアレルギー疾患の治療は、主に免疫カスケードの下流に位置するエフェクター相に作用し、自覚症状の改善を得るものであった。今回、我々は、免疫アジュバンドである BCG によって炎症性 Th2 誘導性 DC を制御性 Th1 誘導性 DC に機能変換できること、そしてこの機能変換は DC 表面上の OX40L 発現の抑制と DC からの IL-12 産生誘導に依存することを明らかにした。こうした免疫カスケードの上流におけるアレルギー炎症の抑制機構の解明は、アレルギー疾患の根本的治療薬の開発を促すものと考ええる。

審査の結果の要旨

従来のアレルギー疾患の治療は、主に免疫カスケードの下流に位置するエフェクター相に作用し、症状の改善をはかるものであった。

今回、申請者らは、免疫アジュバンドである BCG によって、アレルギーをもたらす炎症性 Th2 誘導性樹状細胞 (DC) を制御性 Th1 誘導性 DC に機能変換できること、そしてこの機能変換は DC 表面上の OX40L 発現の抑制と DC からの IL-12 産生誘導に依存することを明らかにした。このような免疫カスケードの上流におけるアレルギー炎症の抑制機構の解明は、アレルギー疾患の根本的治療薬の開発を促すものである。

【1511】

氏 名 (本 籍) ^{いほらだ あん な} 居原田 安 奈 (大阪府)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 甲 第 850 号
 学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目
 Increased nitric oxide production by T-and
 B-cells in idiopathic nephrotic syndrome
 論文審査委員 主査 (教授) 池原 進
 (教授) 伊藤誠二 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【はじめに】

小児特発性ネフローゼ症候群 (Idiopathic Nephrotic Syndrome: INS) の主たる病因は、T 細胞の機能障害であると考えられてきた。しかし最近、B 細胞の機能障害も関与しているとの報告が相次いでなされている。また INS の蛋白尿を惹起する因子として患者血漿中の血管透過性亢進因子の存在が想定されており、その一つに一酸化窒素 (NO) があげられる。しかしその代謝の速さゆえに今日まで NO を直接測定した報告はない。

【目的】

小児の INS の病因および蛋白尿の出現機序を明らかにするために、T 細胞と B 細胞の NO 産生量を検討する。

【対象と方法】

対象

INS 患児 12 例 (平均年齢 7.3 歳、発症時と寛解時)、その他の腎疾患患児 16 例 (9.5 歳)、および対照

としての健常小児 42 例 (7.7 歳) を対象とし、両親からの同意を得た上で採血を行った。INS 患児とその他の腎疾患患児においては全例、副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制剤の内服をしていない状態で採血した。

方法

① 対象から全血 100 μ l を採血する。

② CD3 陽性細胞 (T 細胞) と CD19 陽性細胞 (B 細胞) に対するモノクローナル抗体を反応させた上で、NO と特異的に結合する蛍光色素・4,5-diaminofluorescein-FM diacetate (DAF-FM DA) を反応させる。

③ CD3 陽性細胞と CD19 陽性細胞から産生される細胞内 NO 量をフローサイトメーターで平均蛍光強度として定量する。

④ 対象の血漿中の NO 代謝産物 (NOx) 濃度も比色分析法で測定する。

⑤ 細胞内 NO 産生量と血漿 NOx 濃度を INS 患児、その他の腎疾患患児、および対照小児の 3 群間で統計学的に比較検討する。さらに INS 患児においては発症時と寛解時で細胞内 NO 産生量と血漿 NOx 濃度を比較する。

【結果】

① T 細胞と B 細胞から産生される細胞内 NO 量は INS 発症時には他の群に比べて有意に ($P < 0.01$) 増加していたが、寛解時には健常小児と同程度に減少していた。

② 血漿 NOx 濃度も、INS 発症時には他の群に比べて有意に増加していた ($P < 0.01$) が、寛解時には健常小児と同程度に減少していた。

③ 細胞内 NO 産生量と血漿 NOx 濃度は、寛解時の INS 患児とその他の腎疾患患児、健常小児の間では有意差が認められなかった ($P > 0.05$)。

④ 血漿 NOx 濃度と尿蛋白量は、INS 患児では有意な正の相関を示したが、その他の腎疾患群では相関は認められなかった。

【考察】

INS の病因はいまだに不明であるが、T 細胞の機能障害が何らかの血管透過性亢進因子の過剰産生を生じ、その結果、糸球体上皮細胞の機能障害を起こし発症すると考えられている。実際に INS 患者の T 細胞培養上清をラットに投与することで、ラット腎糸球体基底膜の陰イオンを減少させて大量の蛋白尿が誘発されることが報告されている。

しかし近年、ステロイドの無効な難治性の INS 患者において、抗 CD20 モノクローナル抗体・リツキシマブの投与によって B 細胞が減少すると同時に寛解が得られ、B 細胞数の増加に伴って再発するという報告がなされ、INS での免疫機能異常が T 細胞だけでなく、B 細胞にも存在する可能性が示唆されている。

また INS 患者で蛋白尿を来す血管透過性亢進因子としてはこれまで各種サイトカインが検討されてきたが、近年、NO の関与を示す報告も散見される。実際、NO が腎臓で重要な役割を果たすことはよく知られている。しかし過去の報告では INS 患児における NO 代謝産物を測定しており、細胞種別の NO 産生量を評価したものはない。

申請者らは NO に特異的に結合する蛍光色素・DAF-FM DA を用いて、CD3 陽性細胞 (T 細胞) と CD19 陽性細胞 (B 細胞) の NO 産生能を検討した。

その結果、INS 患児においては T 細胞と B 細胞において疾患活動期にのみ有意に NO 産生が亢進していること、そして血漿 NOx 濃度と尿蛋白量の間には有意な正の相関があることを明らかにした。

これらのことから INS の病因として「T 細胞と B 細胞を含む免疫調節細胞の機能異常によって過剰産生された NO が糸球体毛細血管透過性を増大させて、蛋白尿を惹起する」という機序が示唆された。

【結論】

小児の INS には T 細胞だけでなく、B 細胞もその病因に関与している。そして INS 患児の蛋白尿出現にはそれらの細胞から産生される NO が重要な役割を演じている。

審査の結果の要旨

小児の特発性ネフローゼ症候群 (INS) の主たる病因は、T 細胞の機能異常によると考えられてきたが、本研究は、多数の INS 患児と他の腎疾患患児を比較して、T 細胞のみならず、B 細胞の異常、特に NO の過剰産生が INS の病因に重要な役割を演じていることを、初めて明らかにしたもので、学位に充分値する研究と認定された。

【1512】

氏 名 (本 籍) 松^{まつ} 久^{ひさ} 誠^{せい} 治^じ (岐阜県)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 甲 第 851 号
 学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目

Angiotensin II type 1 receptor blocker
 preserves tolerance to ischemia-reperfusion
 injury in Dahl salt-sensitive rat heart

論文審査委員 主査 (教授) 中邨智之
 (教授) 松田博子 (教授) 伊藤誠二

論文内容の要旨

【はじめに】

虚血性心疾患は先進国における主要な死因であり、生命予後、機能的予後は心筋梗塞領域の広がりや密接に関係している。また、高血圧は虚血性心疾患の大きなリスクファクターであり、梗塞領域を増加させない降圧療法が望まれる。

【研究目的】

本研究の目的は降圧薬として広く用いられているアンジオテンシン II タイプ 1 受容体遮断薬 (ARB) が高血圧心において虚血再灌流傷害を予防する機序を検討することである。高血圧心では心筋局所のレニン-アンジオテンシン系が活性化され、心筋細胞に酸化ストレスが加わることが知られている。この酸化ストレスは心筋肥大のシグナルを活性化する一方、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) を過剰発現させて虚血等の種々のストレスから心筋細胞を保護する役割を果たしていると考えられている。そこで、このような高血圧心に抗酸化薬を投与することは iNOS の発現を抑制し、虚血耐性を減弱させることが推察される。これに対して、ARB が酸化ストレスを抑制し、iNOS の発現を抑制するにもかかわらず心筋虚血、再灌流障害に対する保護作用が惹起される機序は不明であった。そこで私は ARB が iNOS の代わりに内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) を活性化して心保護的に作用しているのではないかと考え研究を始めた。

【研究方法】

6 週齢の食塩感受性 Dahl ラット (DS)、食塩抵抗性 Dahl ラット (DR) に対し、8%塩分食を 6 週間与え、左冠動脈を 30 分間閉塞後、2 時間の再灌流を行った。ARB としてロサルタンを 2 週間投与し、ARB 心筋虚血耐性における酸化ストレスの役割を検討するために抗酸化剤である N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (MPG) を 2 週間投与した。心筋虚血耐性における iNOS と eNOS の役割を検討するために iNOS の選択的阻害剤である 1400 W と非選択的 NOS 阻害剤である N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を冠動脈閉塞 30 分前に投与した。酸化ストレスの指標としてニトロロシン化タンパク (NT) を測定した。eNOS の活性化と iNOS の発現はリン酸化 eNOS と iNOS をそれぞれウエスタンブロット法で定量することにより評価し、iNOS 活性は L-シトルリンアッセイ法を用いて測定した。

【結果】

DS ラットにおいてロサルタンと MPG は共に NT の産生と iNOS の発現を抑制したが、ロサルタンのみが eNOS を活性化した。DR ラットにおいてはロサルタンと MPG は心筋梗塞サイズに影響を与えなかったが、DS ラットにおいてロサルタンは梗塞巣を縮小したのに対し MPG は梗塞巣を増加させた。DS ラットにおいて 1400 W は iNOS 活性の抑制に伴い梗塞巣を増加させたが、ロサルタンは梗塞巣を増加させなかった。L-NAME はロサルタンを投与した DS ラットにおいて NOS 活性を抑制し梗塞巣を増加させた。

【考察】

高血圧心における虚血耐性の機序と近年降圧療法に最も頻用される ARB の心筋保護効果の機序に関して DS ラットを用いて検討した。DS ラット心では NT の産生で評価した酸化ストレスの亢進に伴って iNOS が過剰発現していたが、MPG と 1400 W がこの心臓において虚血、再灌流後の梗塞巣を増大させたことから、高血圧心では酸化ストレスに伴う iNOS の過剰発現が虚血耐性の獲得に重要な役割を果たしていると考えられた。一方、ロサルタンは DS ラット心において iNOS の発現を抑制したが eNOS を活性化した。1400 W はロサルタンを投与した DS ラット心の梗塞サイズに影響を与えなかったが、L-NAME はこの心臓におい

て虚血、再灌流後の梗塞巣を増大させたことから、高血圧心におけるロサルタン投与下での虚血耐性の温存には eNOS の活性化が重要な役割を果たしていると考えられた。このように ARB は MPG のような非特異的抗酸化薬と異なり、酸化ストレスの原因を除去して iNOS 依存性虚血耐性を eNOS 依存性虚血耐性に転換させる降圧薬として虚血性心疾患を伴った高血圧治療に貢献していることが示唆された。

審査の結果の要旨

アンジオテンシン II タイプ 1 受容体遮断薬 (ARB) は高血圧心の虚血再灌流傷害を予防できる。松久氏はこの分子機序を高血圧心ラットモデルを用いて研究した。ARB の投与は酸化ストレスを抑制することによって iNOS の発現をも抑制してしまうが、かわりに eNOS のリン酸化による活性化をもたらした。その結果、非特異的抗酸化剤では梗塞領域が拡大するのに対して ARB は梗塞領域を拡大させなかった。本研究は、虚血再灌流傷害に対する ARB の特異的薬理作用を明らかにしたものであり、学位に値する。

【1513】

氏 名 (本 籍) 村 田 美 樹 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 852 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Hepatitis B Virus X Protein Shifts Human

Hepatic Transforming Growth Factor (TGF)- β

Signaling from Tumor Suppression to

Oncogenesis in Early Chronic Hepatitis B

論文審査委員 主査 (教授) 伊藤誠二

(教授) 螺良愛郎 (教授) 権 雅憲

論文内容の要旨

【背景】

TGF- β シグナルは、リン酸化された Smad3 で、伝達される。リン酸化部位には、C 末端 (Smad3C)

と中央に位置するリンカー部 (Smad3L) が知られている。今回 TGF- β シグナル伝達が、B 型肝炎ウイルス (HBV) 持続感染に伴う癌化過程にどのように関わったかを、Smad3 のリン酸化に焦点を絞り、培養細胞、HBx トランスジェニックマウス、ヒト B 型慢性肝疾患組織を用いて検討した。

【方法と結果】

(1) B 型慢性肝炎において HBV 由来の HBx 蛋白が c-Jun N-terminal kinase (JNK) を含む MAPK カスケードを活性化させ、癌化を促すと言われている。そこで HBx 導入培養肝細胞の Smad3 リン酸化及び標的遺伝子発現を Western blot 法で解析し、生物学的機能として DNA 合成能を検討した。HBx を過剰発現した培養肝細胞では、JNK が活性化され、Smad3L をリン酸化した。pSmad3L は c-Myc の転写を刺激し、細胞増殖を高めた。次にリンカー部リン酸化を阻害すると、HBx 導入肝細胞で減弱していた TGF- β 依存性の pSmad3C を介した p21^{WAF1} の転写促進や細胞増殖抑制能が、親肝細胞と同等に認められるようになった。これらから HBx/JNK/pSmad3L 経路は細胞増殖に関与し、pSmad3C 経路は細胞増殖抑制に関わっていると考えられた。

(2) Smad3KO マウス由来の線維芽細胞にリンカー部リン酸化を欠くミュータントをノックインした細胞を用い、Smad3 リン酸化を検討した。Smad3L リン酸化の程度に比して pSmad3C は阻害されたため、pSmad3L 癌化シグナルと pSmad3C 癌抑制シグナルは、相反する関係にあると思われた。

(3) HBx 蛋白をトランスジェニックマウスで過剰に発現させると肝癌が誘発される。そこで HBx トランスジェニックマウスの肝組織 (正常肝、前癌病変、肝癌) を用いて Smad3 のリン酸化及び標的遺伝子発現を免疫組織染色及び蛍光抗体法で確かめた。前癌病変から肝癌に進展するにつれて Smad3L のリン酸化、ならびに c-Myc の発現が増強した。

(4) 当院で肝生検を施行した B 型慢性肝炎 70 例、肝硬変 10 例及び肝癌 10 例において Smad3 の部位特異的リン酸化と標的遺伝子の発現を免疫組織染色、蛍光抗体法で検討し、さらに Smad3L リン酸化と炎症・線維化の程度、及び HBV-DNA 量との関係を調べた。ヒト慢性 B 型肝炎において、Smad3L リン酸化は炎症の程度に関わらず、HBV-DNA 量と正の相関を示した。慢性肝炎組織の

Smad3 リン酸化は, pSmad3L 優位群と pSmad3C 優位群に大別された. トランスジェニックマウス同様に肝炎の進行に伴って pSmad3L と c-Myc 発現は増強し, pSmad3C と p21^{WAF1} 発現は減弱した.

(5) 慢性 B 型肝炎 60 例を対象に 12 年間での累積発癌率を Smad3 の高リン酸化群, 低リン酸化群で比較した. 肝細胞での高 pSmad3L 群と低 pSmad3C 群が高率に発癌していた. この群には, F1, A1 症例や若年発症が含まれていた.

【結論】

B 型肝炎において HBx 蛋白は, JNK を活性化し, pSmad3C/p21^{WAF1} を介する癌抑制シグナルから pSmad3L/c-Myc を介する癌化シグナルへの転換を促した. Smad3 の部位特異的リン酸化は, 肝発癌を予測する新規バイオマーカーとして, B 型肝炎患者に用いられることが期待される.

審査の結果の要旨

本研究は, *in vitro* ならびに HBx トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 実験により, HBx 蛋白による JNK 活性化-Smad3 のリンカー部のリン酸化-c-Myc を介する一連の癌化シグナルが B 型肝炎の肝細胞癌の発癌機序に重要であることを明らかにし, さらに慢性 B 型肝炎患者生検サンプルで癌化における Smad3L リン酸化の重要性を実証した. 肝癌の発症機構の基礎研究から臨床研究に渡る体系的な研究で, 学位に値する研究と考えられた.

【1514】

氏 名 (本 籍) 加 藤 順 子 (京都府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 乙 第 664 号

学位授与の日付 平成 20 年 11 月 27 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目

Contribution of neural cell adhesion molecule (NCAM) to hemopoietic system in monkeys

論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭

(教授) 木梨達雄 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【序論】

NCAM (CD56) は, 主に神経細胞や NK 細胞に発現している接着分子であるが, 申請者らは, 最近マウスの造血支持細胞にも発現し, 造血幹細胞との相互作用に重要な働きをしていることを見出した (Stem Cells, 23: 1389, 2005).

また, マウス胎仔の骨髓付着性細胞から CD56 を高発現する細胞株を樹立したところ, 造血支持能のみならず, 間葉系幹細胞としての性質も有することが明らかとなり, CD56 が間葉系幹細胞のマーカーとしても使用できる可能性が示唆された (Stem Cells, 24: 482, 2006).

今回申請者は, CD56 がサル造血系においても重要な役割を果たしているか, さらに CD56 が間葉系幹細胞のマーカーとなりうるかについて検討した.

【方法と結果】

1) サル骨髓付着性細胞の性状の解析

カニクイザル骨髓細胞中の CD56 陽性細胞はわずかであったが, 2-3 週間培養後得られた付着性細胞 (均一な線維芽細胞様の形態を示す) のほとんどが CD56 陽性となり, 間葉系幹細胞のマーカーである CD29 の発現も見られた. 一方, 造血細胞のマーカーである CD11b, CD14 や CD34 の発現は培養後ほとんど検出されなくなった.

この付着性細胞は, 脂肪細胞や骨芽細胞への分化誘導が可能であったことから, 間葉系幹細胞としての性状を有すると考えられる.

2) サル造血幹細胞濃縮画分での CD56 の発現

サル骨髓細胞より造血幹細胞を精製し、CD56 の発現の有無を検討した。骨髓細胞より密度勾配遠心法および磁気ビーズ成熟細胞除去法にて造血幹細胞を濃縮して lineage-negative cells (Lin⁻ cells) を得、抗 CD34 抗体と抗 CD56 抗体とで二重染色した。Lin⁻ cells 全体の中では CD34⁺/56⁺ 細胞は 9.1%であったが、造血幹細胞が属する芽球画分にゲートをかけた場合、CD34⁺/56⁺ 細胞の割合は 20.6%に増加した。次に、CD34⁺/56⁺ 細胞と CD34⁺/56⁻ 細胞との造血コロニー形成能を比較したところ、CD34⁺/56⁺ 細胞の方で高い値が得られた。

3) 骨髓付着性細胞の造血支持能と抗 CD56 抗体による造血阻害

サル骨髓細胞より Lin⁻ cells を精製し、同一のサル由来の骨髓付着性細胞の上に播種して低濃度のサイトカインの存在下で培養したところ、3 週目まで活発な造血が観察された。培養液交換の際に得られた培養上清中の浮遊細胞は、メチルセルロース半固形培地で造血コロニーを形成した。一方、骨髓付着性細胞の非存在下で Lin⁻ cells を培養した場合、2 週目以降細胞はほとんど回収できなくなり、骨髓付着性細胞が造血の維持に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

骨髓付着性細胞と Lin⁻ cells との共培養系に抗 CD56 抗体を加えると、抗体の濃度依存的に造血幹細胞の増殖が抑制されたことから、骨髓付着性細胞や造血幹細胞上に発現されている CD56 分子がサルの造血に関与していることが強く示唆された。

4) サル骨髓の組織学的検討

サル骨髓組織を抗 CD56 抗体で免疫染色すると、CD56 陽性のストローマ細胞が散見された。CD56 陽性の造血細胞と CD56 陽性のストローマ細胞が接着している箇所も確認された。

【結論】

1) マウスと同様にサルの造血系においても CD56 は、造血幹細胞と造血支持細胞の相互作用に重要な働きをしていると考えられる。

2) CD56 は、CD56 同士で互いに結合するホモフィリック型の結合様式をとる。従って、造血幹細胞と造血支持細胞は、両者が発現する CD56 を介して結合している可能性が推察される。

3) CD56 を高発現している骨髓付着性細胞が、

間葉系幹細胞の性状を有することから、CD56 はマウスと同様に間葉系幹細胞のマーカーとして使用できる可能性がある。

審査の結果の要旨

NCAM (CD56) は、主に神経細胞や NK 細胞に発現している接着分子である。本研究は、サル骨髓由来 CD34⁺ 細胞の一部と大半の骨髓付着性細胞が CD56 分子を発現しており、共培養系における骨髓付着性細胞の造血細胞支持能に CD56 分子が関与していることを明らかにしている。サル造血系において、CD56 分子が造血幹細胞と造血支持細胞の相互作用に関与していることを初めて示唆した点で価値ある研究と認められる。

【1515】

氏 名 (本 籍) ^{ふく しま しんたろう} 福島 慎太郎 (徳島県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 乙 第 665 号

学位授与の日付 平成 20 年 11 月 27 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目

Effect of biliary obstruction and internal biliary drainage on hepatic cytochrome P450 isozymes in rats

論文審査委員 主査 (教授) 権 雅憲
(教授) 伊藤誠二 (教授) 中邨智之

論文内容の要旨

【研究目的】

肝の Cytochrome P450 は、多種多様な薬物等の外因物質、ステロイドホルモン等の生理的物質の代謝に重要な役割を果たしている。

P450 は、その多様な機能により、分子多様性が認められ、多くの P450 遺伝子の存在が報告されている。

これまでに、胆管結紮 (BDL) による閉塞性黄疸モデルにおいて、P450 量は低下し、特に、雄生ラットに特異的な CYP2C11、CYP3A2 の活性は他の分子種と比較し、より強く低下し mRNA の発現量も低下すると報告されている。

また、閉塞性黄疸－内瘻化モデルを用いた検討では、肝の P450 量は閉塞性黄疸において低下し、内瘻化により回復することが報告されているが、分子種の変化については明らかではない。

当研究では、ラット閉塞性黄疸－内瘻化モデルを用い、胆管閉塞ラットにおける胆道ドレナージ前後の P450 分子種の変化について検討した。

【研究方法】

Wistar 系雄性ラットを用い、胆管閉塞－内瘻化モデルを作成した。胆管閉塞群では胆管閉塞 4 日後に、また、内瘻群では胆管閉塞 4 日後に内瘻化しその 6 日後に肝を摘出した。P450 分子種 (CYP1A2, CYP2B, CYP2C11, CYP2E1, CYP3A1, CYP3A2, CYP4A1) の mRNA 発現を、Competitive RT-PCR 法を用いて分別定量した。また、肝のミクロゾーム分画を調製し、P450 量、aniline 4-hydroxylase 活性、aminopyrine N-demethylase 活性、7-ethoxycoumarin O-deethylase 活性の各基質代謝活性を測定した。

【結果】

胆道閉塞により上昇していた血清 ALT 値および総ビリルビン値は、内瘻化 6 日目にはもとのレベルまで回復し、閉塞性黄疸は消失した。

CYP 総量、各基質代謝活性は、閉塞性黄疸 4 日目には低下し、内瘻化により回復した。

各 P450 分子種の mRNA 発現量は、CYP2B, CYP2C11, CYP2E1, CYP3A1, CYP3A2 で、胆管閉塞により有意に低下し、いずれの分子種も、内瘻化によりもとのレベルまで回復した。CYP1A2 の mRNA 発現量は、胆管閉塞により有意に低下し、内瘻化により回復したが、もとのレベルまでは回復せず、コントロールと比較して有意に低値を示した。CYP4A1 の mRNA 発現量は、胆管閉塞により低下せず、内瘻化により上昇した。

【考察】

胆管閉塞により CYP 総量は低下し、各 P450 分子種の mRNA 発現量が低下することを明らかにした。これは、閉塞性黄疸における CYP 総量の低下は、CYP 各分子種が mRNA レベルで低下をきたす機序が存在する事を示唆している。

また、内瘻化前後の CYP の変化は、各分子種によって違いがある事より、その機序は単一ではなく、複数の機序が存在する事を示唆している。

臨床的には、総胆管結石、胆管癌などによる閉塞性黄疸患者に対し、内視鏡的胆道ステント挿入

などの胆道ドレナージが一般的に行われており、黄疸改善に十分な効果が認められている。今回の検討でも、胆道閉塞により上昇していた血清 ALT 値および総ビリルビン値は、内瘻化後には回復し、閉塞性黄疸は消失した。同様に、低下していた CYP 総量も回復した。しかし、CYP 各分子種の mRNA 発現量は、内瘻化により充分回復しないものや、胆道閉塞で変化せず、内瘻化で増加するものもあった。これらより、閉塞性黄疸の一般的な指標である血清 ALT 値や総ビリルビン値が改善した後も、薬物代謝能への影響が残存している可能性があり、薬物投与は、慎重に行う必要があると考えられる。

審査の結果の要旨

チトクローム P-450 (CYP) は薬物や毒物などの活性化代謝や解毒代謝を担う酵素であり、数多くの分子種が存在している。本論文はラットの閉塞性黄疸－内瘻化モデルを用いて胆道ドレナージ前後の CYP 分子種の変動を検討し、閉塞性黄疸の指標である従来の肝機能検査では評価できない CYP 分子種の変動を見いだした。これらの成果は閉塞性黄疸解除後の薬物投与や手術の術前評価の新たな指標となる可能性があり、学位に値すると認められた。

【1516】

氏 名 (本 籍) 谷 ^{たに} 万 ^ま 喜 ^き 子 (大阪府)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 乙 第 666 号
学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目

The acupuncture treatment of severe axial dystonia

論文審査委員 主査 (教授) 日下博文
(教授) 中村加枝 (教授) 中井吉英

論文内容の要旨

【はじめに】

ジストニアは異常な筋緊張によって身体のあら

ゆる部位に不随意運動や姿勢異常をきたす疾患である。治療法は、ボツリヌス治療、Muscle Afferent Block (MAB) 療法、手術療法などの西洋医学的治療が行われることが多く、鍼治療の報告は少数である。また本疾患は、神経内科領域で診断されることが多いが、中にはうつ病のような精神症状を合併している症例が存在し、また抗精神病薬の副作用を原因とする症例が少なくない。抗精神病薬の副作用で起こる遅発性ジストニアの治療は、精神科領域では難渋であることが知られているが、決定的な治療法のないのが現状である。本論文では、統合失調症治療経過中に頸部及び体幹に不随意運動と異常姿勢を生じて発症した、重度の軸性ジストニア症例 1 例に対する鍼治療効果について報告した。

【研究方法】

症例は、初診時 28 歳の女性である。中学 3 年生時に、幻覚症状や辻褄の合わない言動がみられ、小児保健施設を受診。約一年間入院した。一時治療を中断したが、時々幻聴が出現して、それに伴う被害関係妄想を認め、X-5 年 9 月に、Y 精神科病院を再受診した。統合失調症と診断され、薬物療法が再開されるとともに通所デイケアによる社会療法が導入された。精神症状は安定したが、X-1 年 12 月頃より右肩が挙上する不随意運動が出現した。内服薬を調整したが徐々に不随意運動は増強し、体幹にも出現した。内服薬での治療が困難と判断され、X 年 7 月、鍼治療目的で関西医科大学精神神経科ジストニア外来を受診した。

ジストニアの症状は、安静座位および安静立位において、頸部が重度の左側屈を呈する場合と、ほぼ正中位に立ち直る場合とを繰り返す不随意運動が著明であった。頸部には左側屈と同時に右回旋も認められた。体幹は左側屈および右肩甲帯挙上を呈した。不随意運動と異常姿勢の要因として、頸部の左側屈および右回旋をもたらし左胸鎖乳突筋の筋緊張亢進、左腹筋群の収縮不全による体幹の左側屈方向へのくずれと、体幹の左側屈を制御できない右脊柱起立筋の収縮不全が挙げられた。右肩甲帯挙上の要因として、右僧帽筋（上部線維）の筋緊張亢進も存在した。

鍼治療は、左胸鎖乳突筋の筋緊張抑制を目的に左側の合谷、左腹筋群の筋収縮促進を目的に左側の衝陽、右脊柱起立筋の筋収縮促進を目的に右側

の崑崙、右僧帽筋（上部線維）の筋緊張抑制を目的に右側の外関への置鍼を行って、効果を検討した。

鍼治療導入に際して、筆者らが行った頸部ジストニアに対する鍼治療効果とともに、本症例に対する治療適応の可能性および鍼治療の安全性について説明した。また、鍼治療継続中においていつでも鍼治療を中止することができる旨の説明も行い、鍼治療への同意を得た。

【結果】

治療開始初期には定期的な鍼治療が継続できず、十分な改善は得られなかったが、X+1 年 12 月以後週 1 回の頻度での鍼治療継続が可能となり、頸部および体幹の姿勢に改善が認められた。X+3 年 5 月には安静座位では頸部および体幹は正中位に保たれ、不随意運動もみられなくなった。

【考察】

抗精神病薬の副作用として起こるジストニアの治療は、難渋であることが知られている。原因となった薬剤を中止あるいは減量することにより、ジストニアの改善を認めたという報告があるものの、精神症状の状態によっては、休薬・減薬を続けるのが困難な場合も多い。ジストニアの罹患筋に対して、東洋医学的な観点から考慮した循経取穴による鍼治療を行い症状の改善を認めた。それにとまって精神症状にも安定を認めた。本症例の治療結果から、難治とされる、軸性ジストニアを含む遅発性ジストニアに対する鍼治療の有用性が示唆された。

審査の結果の要旨

ジストニアは、薬剤投与、定位脳手術などいくつかの治療が試みられてはいるが、依然として難治性の障害である。著者らは、その治療に鍼治療を応用することを長年検討し、経穴への置鍼、集毛鍼を用いる治療法を独自に構築した。そして、頸部ジストニア患者において 72.9%という高い臨床症状改善率を認めた。視床などの脳血流改善を SPECT で確認した。

このように高い有効率を示した治療法を、統合失調症治療経過中に生じた重度の軸性ジストニア症例に対して行い著明な改善を認めた。難治とされる軸性ジストニアを含む遅発性ジストニアに対する鍼治療の有用性が示され、今後の臨床応用が期待される。学位に値するものと認定された。

編 集 委 員 (ABC 順)

芦高恵美子, 足立 靖, 播磨 洋子, 稲葉 宗夫,
權 雅憲, 北尻 雅則, 岡本 祐之, 杉本 哲夫,
螺良 愛郎, 高橋 寛二, 高屋 淳二, 山田 久夫,
山内 康雄
会費 年間 3,000 円

関 西 医 科 大 学 雑 誌

第 61 卷 第 2, 3, 4 合併号
平成 21 年 12 月 18 日印刷
平成 21 年 12 月 30 日発行

編 集 発 行 所

〒570-8506 大阪府守口市文園町 10 番 15 号
関 西 医 科 大 学 医 学 会
TEL 06-6992-1001 内 2216
FAX 06-6992-1409
igakkai@takii.kmu.ac.jp
<http://www3.kmu.ac.jp/igakukai/>

印刷：中西印刷株式会社
〒602-8048 京都市上京区下立売通小川東入
TEL 075-441-3155 (代)
FAX 075-417-2050
<http://www.nacos.com/nakanishi>

平成 21 年度予算

収入の部	
科 目	予 算 額
前年度繰越金	10,331,874 円
会 費	1,500,000 "
投 稿 料	60,000 "
広 告 料	0 "
預 金 利 息	769 "
大学補助金	950,000 "
寄 付 金	0 "
雑 収 入	0 "
収 入 合 計	12,842,643 円

支出の部	
科 目	予 算 額
印刷製本費	11,139,043 円
通信運搬費	400,000 "
消 耗 品 費	300,000 "
会 合 費	500,000 "
雑 費	500,000 "
支払手数料	3,600
支 出 合 計	12,842,643 円
収支差引残	0 円

平成 20 年度決算

収入の部		
科 目	予 算	決 算
前年度繰越金	8,263,311 円	8,263,311 円
会 費	1,500,000 "	1,602,000 "
投 稿 料	120,000 "	81,588 "
広 告 料	0 "	135,000 "
預 金 利 息	769 "	12,897 "
大学補助金	950,000 "	950,000 "
寄 付 金	0 "	0 "
雑 収 入	0 "	314 "
収 入 合 計	10,834,080 円	11,045,110 円

支出の部		
科 目	予 算	決 算
印刷製本費	9,134,080 円	103,760 円
通信運搬費	400,000 "	101,430 "
消 耗 品 費	300,000 "	7,746 "
会 合 費	500,000 "	0 "
雑 費	500,000 "	500,000 "
		300
小 計	10,834,080 "	713,236 "
次年度繰越金		10,331,874 "
支 出 合 計	10,834,080 円	11,045,110 円
収支差引残	0 円	0 円

投 稿 規 定

1. 投稿者は原則として会員に限る。ただし原稿の採否および会員以外の投稿については編集委員に委任する。
2. 原稿の内容は綜説・原著・臨床・症例・経験・速報・業績抄録・寄稿・その他とし特に紙数を制限しない。
3. 原稿は他の雑誌などに未掲載のものに限る。
4. 投稿論文の採否・掲載順位・印刷方法・体裁は編集委員会において決定する。
5. 原著・臨床・症例・経験については必ず欧文抄録を添付する。その他の原稿についても編集委員が必要と認めた場合は欧文抄録の提出を依頼することがある。
6. 原稿の執筆はつぎの要領に従う。
 - a. 原稿は青または黒で楷書、横書きとし、常用漢字、新かなづかいを用いる。欧語はすべて活字体とし、日本語で書く場合にはかたかなを用いる。
 - b. ワードプロセッサを使用する場合は、B5 または A4 の大きさの用紙に字間および行間をあけて 20 字 × 20 行で記すこと。
 - c. 論文の記載順序は①表題②著者名③所属④内容要旨 (600 字以内) ⑤ Key Words (5 語以内) ⑥ 本文 (原著の場合は原則として緒言・材料と方法・成績・考察・結論の順) ⑦文献⑧図表およびその説明⑨英文抄録とする。
 - d. 学術用語、諸単位は各学会所定のものに従い、数字は算用数字、数量の単位は下記による。
m, cm, mm, l, ml, kg, g, °C, % など。
 - e. 表・図・写真などは鮮明なものでなければならない。その種類別の一連番号を記入する。
表・図・写真は別紙に記入もしくは貼付し、説明をつけて本文原稿の最後にまとめる。アート紙希望のものはその旨記入する。本文の欄外にそれらの挿入箇所を指定する。
 - f. 引用文献は最後に一括し、下の順序に従って書く。
雑誌については、
著者名 (共著者の場合は全名を記載する) :

表題、雑誌名 (正規の略名) 巻数 : 初頁—終頁、西暦年次、とする。

例 藤田達士 : 細胞外液をめぐる諸問題。麻酔, 17 : 1108-1119, 1968.

例 Magoun, H. W.: The ascending reticular activating system. Res Ass Nerv ment Dis, 30: 480-492, 1951.

単行本については、

著者名 : 表題、書名 (編者名)、版数、巻数、発行社名、発行地名、初頁—終頁、西暦年次、とする。

例 木村 淳 : 神経刺激法と誘発電位。誘発電位と筋電図—理論と応用、医学書院、東京、pp 115-219, 1990.

例 Marty, A. and Neher, E.: Tight-seal whole—cell recording. Single—Channel Recording (Sakmann, B. and Neher, E. eds.), Plenum Press, New York, pp 107-122, 1983.

g. 英文抄録の記載順序は、表題、氏名、所属、内容要旨 (500 語以内) とする。英文は専門的知識のある人の校正を経たものでなければならない。

7. 原稿の提出は編集委員宛とし、受付順に掲載するのを原則とする。

8. 原稿は原著3部、その他の論文は2部を提出する。

9. 著者による校正は原則として2回とする。校正に際して組版面積に影響を与える改変や極端な組替えは許されない。

10. 原稿の届け先は下記とする。

〒 570-8506 大阪府守口市文園町 10 番 15 号

関西医科大学内

関西医科大学医学会編集委員会宛

電話 (06) 6992-1001 (大代表)

掲載料について

原著及び症例報告等の投稿については、投稿料が必要であるが、その他のものについては原則として無料とする。

1. 和文普通組、欧文、文献組、組表、トレース、凸版、写真版 (カラーを含む) 等はすべて時価 (実費負担) とする。

2. 別刷は 30 部まで贈呈、それ以上は実費負担。

3. 学内会員については、各頁につき、和文 500 円、欧文 800 円の割引を行う。

関西医科大学雑誌

第 61 卷 第 2, 3, 4 合併号

平成 21 年 12 月 30 日発行

原 著	：下肢末梢血管に対する非侵襲的評価として非造影 MRI が有用であった 3 例 笹尾卓史, 高山沙衣子, 森 雄大(175)
案 内	：関西医科大学医学会賞および交付規程(183)
受 賞	：ホジキン病細胞株 KM-H2 による Foxp3 陽性細胞および細胞傷害性 CD4 陽性 T 細胞の誘導 谷尻 力(184)
	アデノ随伴ウイルスベクターを用いたモルモット蝸牛内への遺伝子導入小西将矢, 河本光平, 八木正夫, 井上俊哉, 友田幸一(192)
	ヒト脂肪組織由来幹細胞における FGF-2 の脂肪分化に与える影響 覚道奈津子, 下間亜由子, 楠本健司(200)
記 録	：第 125 回 関西医科大学学内学術集談会(206)
博士学位論文	平成 20 年度(1)

関
西
医
科
大
学
雑
誌

第
六
十
一
卷
第
二
・
三
・
四
合
併
号

平
成
二
十
一
年
十
二
月
発
行

THE JOURNAL
OF KANSAI
MEDICAL
UNIVERSITY

関西医科大学雑誌

CONTENTS

Original:	Three Cases in which Non-enhanced MRI was Successfully Utilized for a Noninvasive Assessment of the Peripheral Artery of the Lower LimbsTakashi Sasao, Saeko Takayama, Yudai Mori(175)
Awards:	The Differentiation of CD4+Foxp3+ T Cells and CD4+ Cytotoxic T-lymphocytes from CD4+ Naive T Cells is Promoted by Hodgkin’s Reed-Sternberg Cell Line (KM-H2) Tsutomu Tanijiri(184)
	Gene Transfer into Guinea Pig Cochlea via Several Serotypes of AAV VectorsMasaya Konishi, Kohei Kawamoto, Masao Yagi, Toshiya Inoue, Koichi Tomoda(192)
	Fibroblast Growth Factor-2 Stimulates Adipogenic Differentiation of Human Adipose-derived Stem CellsNatsuko Kakudo, Ayuko Shimotsuma, Kenji Kusumoto(200)