

第498回

広島大学医学集談会

(平成18年1月5日)

—学位論文抄録—

1. Biphasic effect of HMG-CoA reductase inhibitor, Pitavastatin, on vascular endothelial cell and angiogenesis

(HMG-CoA 還元酵素阻害薬, ピタバスタチンの血管内皮細胞, 血管新生に対する二相性効果)

勝本 征行
創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (分子病態制御内科学)

【目的】スタチン系薬剤, ピタバスタチン (PTV) の血管内皮細胞, 血管新生への直接効果について検討した。

【方法】ヒト微小血管内皮細胞 (HMVECs) を用い, 増殖を BrdU 法, 細胞死を色素排除法および蛍光核染色法, 遊走を擦過法および chemotaxis chamber 法に

より評価した。また, うずら受精卵尿漿膜法により血管新生を評価した。

【結果】PTV は, 低用量では HMVECs の遊走・増殖を促進し, 高用量では遊走能・増殖能を抑制し細胞死を誘導した。低用量における遊走・増殖はメバロン酸経路の中間代謝産物であるファルネシルピロリン酸, グラニルグラニルピロリン酸により抑制され, 高用量における細胞死の誘導はグラニルグラニルピロリン酸により抑制された。また PTV は低用量で血管新生促進傾向を示し, 高用量では抑制した。

【結語】PTV のメバロン酸経路を介した血管内皮細胞, 血管新生に対する二相性効果が示された。

2. SB-431542 and Gleevec inhibit Transforming Growth Factor- β -induced proliferation of human osteosarcoma cells

(SB-431542 と Gleevec は TGF- β によるヒト骨肉腫細胞の増殖を抑制する)

松山 茂生

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (視覚病態学)

TGF- β は多くの細胞において増殖抑制に働くが、間葉系細胞やある種のがん細胞では増殖促進に働く。しかしこの増殖促進のシグナル伝達機構はよくわかっていない。そこで MG63 ヒト骨肉腫細胞を用いて、このシグナル伝達機構を検討した。

MG63 細胞には TGF- β タイプ 1 受容体である ALK-1 と ALK-5 が発現し、機能していたが、ALK-5 キナーゼ抑制剤である SB-431542 にて増殖が抑制され、ALK-5 活性化型受容体の強制発現にて増殖が促進したことから、ALK-5 が増殖促進に関与していると考えられた。

DNA マイクロアレイによる TGF- β の調節遺伝子の発現解析では、PDGF-A をはじめとする成長因子の増加が認められたが、この増殖は Gleevec により抑制されたため、PDGF-A が関与していると考えられた。またこの増殖は、c-Myc の発現上昇が TGF- β の増殖抑制作用を打ち消しているためと考えられた。

3. Role of C-terminal region in the functional regulation of rat serotonin transporter (SERT)

(ラットセロトニントランスポーター機能調節における C 末端領域の役割)

望月 英毅

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (視覚病態学)

【目的】セロトニントランスポーター (SERT) の C 末端の機能調節における重要性を検討した。

【方法】FLAG タグを付加した SERT (FL-SERT) を安定発現する HEK293 細胞株を樹立し、この細胞に SERT C 末端 30 アミノ酸を GFP と融合させた蛋白質 (GFP-SERT-CT) を、或いはコントロールとして GFP を強制発現させ、^[3H]セロトニンの取込み活性を計測した。電気生理学的解析、細胞膜表面に発現する SERT の量的解析、GFP-SERT-CT の細胞内局在についても検討した。

【結果】GFP-SERT-CT の過剰発現は、細胞表面に発現する SERT を減少させることで取込み活性を抑制した。GFP-SERT-CT は、細胞膜に一部局在し、

FL-SERT やアクチン線維と共局在していた。

【結論】SERT C 末端は、アクチンとの相互作用と SERT の細胞膜の発現に重要な役割を持つ。

4. Proteome analysis of human vitreous proteins

(ヒト硝子体蛋白質のプロテオーム解析)

山根 健

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (視覚病態学)

【目的】中途失明原因の第一である糖尿病網膜症は、高血糖から始まり、多種多様な因子によりその病態が完成されている。糖尿病網膜症患者から採取された硝子体液を解析対象として、プロテミクスの手法を応用し、網羅的に発現している蛋白質の解析を試みた。

【方法】正常硝子体に最も近いとされる黄斑円孔患者の硝子体をコントロールとして、糖尿病網膜症患者の硝子体との蛋白質の増減を検討した。二次元電気泳動を行い、検出された個々のスポットを切り出し、質量分析器で蛋白質同定を行った。

【結果】コントロールとした黄斑円孔の硝子体サンプルにおいて約 250 のスポットを検出し、その内 78 スポット、18 個の蛋白質を同定した。糖尿病網膜症の硝子体サンプルにおいて、約 650 のスポットを検出し、そのうち 141 スポット、38 個の蛋白質を同定した。

【結論】プロテオミクスの手法は、糖尿病網膜症の病態解明に有用である。

5. Genetic analysis of polymorphisms in biologically relevant candidate genes in patients with abdominal aortic aneurysms

(腹部大動脈瘤にその生物学的機能から関与が疑われる遺伝子の多型についての遺伝子学的検討)

尾形 徹

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (外科学)

腹部大動脈瘤の発生機序は未だ不明であるが、遺伝子的要因と環境的要因の両方が発症に関与する多因子複合疾患である。我々はその生物学的機能から関与が疑われる 13 の遺伝子を選び、その多型が本症と関連があるか否か、ケースコントロール研究を施行し検討した。その結果、家族歴の有無で階層化し、国と性別についてロジスティック回帰を用い求めた P 値において、蛋白分解酵素阻害因子 1 (TIMP1) の 2 つの多型 (nt+434, rw2070584) で、家族歴のない男性群と男

性健常者間に有意差を認めた。また TIMP1 の2つの多型のハプロタイプ分析にて、男性群と男性健常者間に有意差を認めた。この成果は今後本症の病態解明に役立ち、また本症に罹患し易いか否かを遺伝的に判定する、いわゆる遺伝子診断の発展に多に寄与するものと考ええる。

6. Efficient in vivo xenogeneic retroviral vector-mediated gene transduction into human hepatocytes (異種動物をもちいたヒト肝細胞へのレトロウィルスによる効果的な遺伝子導入)

江本健太郎
創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (外科学)

【目的】レトロウィルスで in vivo のヒト肝細胞へ遺伝子を導入する方法は危険を伴う。異種動物にヒト肝細胞を移植、増殖させ遺伝子を導入し、遺伝子治療を行うための技術を開発する。

【方法】uPA (+/+)/SCID (+/+) マウスにラットの肝細胞を移植した。移植後、細胞置換率、及び Brd-U 陽性率を計測し、ウィルスの投与時期を決定した。ウィルスを尾静脈より連日注射し、X-gal 染色で遺伝子導入率を計測した。同様の手法を用いて、ヒト肝細胞を持つキメラマウスにも感染させ、遺伝子導入率を計測した。

【結果】ラット肝細胞を移植したマウスは、移植後5週目にはほぼ100%がキメラ化していた。Brd-U 陽性率は2週目にも維持していたことから、移植後10日目よりウィルス投与を開始した。遺伝子導入効率は、5.3%であった。また、ヒト肝細胞を移植したマウスは85%がキメラ化しており、遺伝子導入効率は7.1%であった。

【結語】uPA/SCID マウスを用いることでヒト肝細胞を増殖させ、遺伝子導入が可能なることを証明した。

7. Diagnostic and prognostic impact of β -catenin alterations in pediatric liver tumors

(小児肝腫瘍の診断および予後因子としての β -カテニン異常)

山岡 裕明
展開医科学専攻病態制御医科学講座 (外科学)

小児悪性肝腫瘍の、 β -カテニン遺伝子 (*CTNNB1*) 異常について検索した。1986年12月から2004年11月までに経験した小児悪性肝腫瘍17例と、肝良性肝腫瘍4例を対象とし、肝切除時に採取凍結した腫瘍標本

よりDNAを抽出した。

CTNNB1 の異常は、hot spot とされる exon 3 をPCR法にて欠失を検索し、欠失の認めなかった症例では exon 3 をシーケンス解析した。また、 β -カテニン、E-カドヘリン、サイクリン D1 の発現を、免疫染色にて検討した。

肝芽腫では、*CTNNB1* 異常が高頻度に認められ、*CTNNB1* 遺伝子に異常を認めない症例においても、 β -カテニンの核への蓄積を認めた。以上から、 β -カテニン染色による核での蓄積は、小児肝悪性腫瘍、特に肝芽腫の臨床診断に有用であると考えた。また、 β -カテニンとサイクリン D1 の細胞膜での発現は、悪性肝腫瘍の予後因子となる可能性が考えられた。

8. Levels of omega-3 fatty acid in serum phospholipids and depression in patients with lung cancer

(肺がん患者における血清リン脂質中オメガ3系脂肪酸とうつ病との関連)

小早川 誠
大学院医学系研究科内科系専攻 (神経精神医科学)

オメガ3系脂肪酸である EPA 及び DHA の欠乏と一般のうつ病との関連が示唆されているが、臨床特性の異なる可能性のあるがん患者のうつ病においては不明である。本研究では、血清リン脂質中オメガ3系脂肪酸とうつ病の関連について検討した。国立がんセンター肺がんデータベース研究の参加者より、自記式抑うつ評価尺度を用い、性、年齢、臨床病期、身体活動度をマッチングした各81例の大うつ病群、小うつ病群、非うつ病群を選択した。ガスクロマトグラフィーを用いて脂肪酸分画を測定し比較した。その結果、EPA には有意差を認めなかったが、DHA は小うつ病群で高かった。非がん患者のうつ病での先行研究の報告と一致しなかったが、その原因としてがん患者と非がん患者のうつ病の臨床特性が異なる可能性が考えられた。また小うつ病と大うつ病の病態が異なる可能性も示唆された。

9. IL-4 modulates the histamine content of mast cells in a mast cell/fibroblast co-culture through a Stat6 signaling pathway in fibroblasts

(IL-4 はマウス骨髄由来培養マスト細胞と線維芽細胞の共生培養系において線維芽細胞の Stat6 シグナル伝達系を介してマスト細胞成熟を制御する)

鍋島裕紀子

創生医科学専攻探索医科学講座 (皮膚科学)

皮膚マスト細胞のモデルとしてマウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) と線維芽細胞の共生培養系を用いて, IL-4 がマスト細胞にもたらす効果および線維芽細胞の役割について検討をおこなった。共生培養系において IL-4 は BMMC の増殖を促進し, 一方単独培養系においては BMMC, 線維芽細胞の両者の Stat6 を活性化した。共生培養系における線維芽細胞の役割を検討するために, dominant-negative 型の Stat6 を導入した線維芽細胞と BMMC の共生培養をおこなったところ, IL-4 添加により BMMC の増殖促進は認められたが, 細胞 1 個当りのヒスタミン含有量は通常の線維芽細胞を用いた場合に比べて約 50% に減少した。一方, 活性化型の Stat6 を導入した線維芽細胞を BMMC と共生培養すると, BMMC 1 個当りのヒスタミン含有量は約 2 倍に増加した。以上の結果から, IL-4 は線維芽細胞の Stat6 シグナルを介して線維芽細胞からマスト細胞成熟因子を産生させ, マスト細胞のヒスタミン含有量を制御していると考えられた。

10. Cyclic and characteristic expression of pAkt in human endometrium and decidual cells *in vivo* and *in vitro*

(ヒト子宮内膜および脱落膜細胞におけるリン酸化 Akt の周期的変化に関する *in vivo* および *in vitro* の研究)

豊福 彩

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (産婦人科学)

【目的】近年, リン酸化 Akt (pAkt) とアポトーシス抑制, 細胞間構築の改変などとの関連が注目されている。子宮内膜間質細胞における pAkt の発現を, *in vivo* と *in vitro* の両面から検討した。

【対象・方法】摘出子宮より子宮内膜を, 子宮外妊娠例より脱落膜を得た。pAkt の発現量は, ウエスタンブロットティングで, 局在は免疫組織染色にて検討した。*in vitro* にて脱落膜化させた間質細胞を用いて, IGF-I と PI3K 阻害剤である LY294,002 の影響を検討した。

【結果】pAkt は脱落膜で有意に増加し, 脱落膜細胞では核と細胞質が著明に染色された。*In vitro* で脱落膜化させた間質細胞では, pAkt の発現は著明に減少していたが, その発現は IGF-I により回復し, LY294,002 により抑制された。子宮内膜や脱落膜組織での pAkt の発現量の制御は IGF の影響を受けていることが示唆された。