

第10回

広島大学大学院医歯薬学総合研究科発表会（医学）

（平成18年2月2日）

—学位論文抄録—

1. Alterations and correlations of the components in the Wnt signaling pathway and its target genes in breast cancer

（乳癌における Wnt シグナル伝達経路の構成因子の異常とその相関関係及び標的遺伝子）

尾崎 慎治

創生医科学専攻先進医療開発科学講座（外科学）

cyclin D1 と c-myc は乳癌の発癌の鍵となる分子であり、これらの遺伝子の発現は Wnt シグナル伝達経路をはじめとした、いくつかのシグナル伝達経路を介して制御されている。本研究では49症例の原発性乳癌の凍結標本を使用し、cyclin D1, c-myc, β カテニン及びその他の Wnt シグナル伝達経路の構成因子の免疫組織染色と遺伝子配列検索を行い、その異常を分析した。cyclin D1 と c-myc の陽性率は55.1%と30.6%であった。 β カテニン, Axin1 の遺伝子変異は認めなかったが、 β カテニンの異所性の細胞質内発現は38.8%の乳癌サンプルで観察され、APC の発現減弱が34.7%に認められた。統計解析の結果からは、APC の発現減弱が β カテニンの細胞質内異常蓄積と関連しており、cyclin D1 及び c-myc の過剰発現の原因となっていることが推測された。

2. Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans

（ヒトにおける肝臓内 NK 細胞と末梢血 NK 細胞の肝細胞癌に対する細胞傷害の違い）

石山 宏平

創生医科学専攻先進医療開発科学講座（外科学）

我々は、生体肝移植時にドナー移植肝とレシピエント硬変肝から採取した肝臓内 NK 細胞と末梢血 NK 細胞の違いを検討した。無刺激末梢血 NK 細胞に TRAIL

は表出していないが、肝臓内 NK 細胞にはわずかに表出していた。IL-2 刺激肝臓内 NK 細胞の TRAIL 表出は増強したが、末梢血 NK 細胞は有意でなかった。IL-2 刺激により抑制レセプターの表出を維持した TRAIL 陽性 NK 細胞が増加した。HCC 腫瘍株に対する細胞傷害活性は無刺激下ではドナー肝臓内リンパ球のみに認めた。IL-2 刺激によりドナー肝臓内 NK 細胞はドナー、レシピエント末梢血 NK 細胞やレシピエント肝臓内 NK 細胞に比べて強い抗腫瘍活性を獲得した。IL-2 刺激肝臓内 NK 細胞はレシピエントおよび自己のリンパ芽球への細胞傷害を認めなかった。以上から、肝移植後の HCC 再発予防として IL-2 刺激ドナー肝臓内 NK 細胞の投与が期待される。

3. Family functioning and psychological distress among Japanese breast cancer patients and their families

（日本人乳がん患者とその家族における家族機能と心理的苦痛の関係）

大園 秀一

創生医科学専攻先進医療開発科学講座（精神神経医科学）

今回乳がん患者とその家族を心理社会的に包括的に支援するため、家族機能によってタイプ分類を行い、治療的家族介入の必要な家族群を明らかにする目的で本研究を計画した。対象は広島大学病院乳腺外科外来通院中の乳がん患者とその家族189名。文書による同意が得られた患者とその家族の不安・抑うつ・家族機能認知を自記式評価尺度を用いて測定した。解析は家族機能認知の結果を基にクラスター解析を行い、不安・抑うつを得られた群間で多重比較した。結果は凝集性、表出性共に高く葛藤性の低い「支持型」家族64名、凝集性、表出性は中等度で葛藤性が低い「中間型」家族60名、凝集性、表出性が共に低く葛藤性が高い「葛藤型」家族65名の3群に分類された。3群の中で「葛藤型」家族が最も高い不安・抑うつを呈した。従って特に「葛藤型」の患者・家族に対し、その「凝集性」を促進し「葛藤性」を軽減する介入が心理的苦痛の軽減に有効である可能性が示唆された。

4. Generation of tumor-reactive effector lymphocytes using tumor RNA-introduced dendritic cells in gastric cancer patients

(胃癌患者における腫瘍 RNA 導入樹状細胞を用いた抗腫瘍性リンパ球の誘導)

大下 純子

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (腫瘍外科学)

【目的】腫瘍抽出 RNA を導入した培養樹状細胞を抗原提示細胞として用いた抗腫瘍性効果細胞 TRiDAK (Tumor RNA-introduced Dendritic cell-activated Killer) の誘導について検討する。

【方法】胃癌細胞株 MKN45 および胃癌腹水症例 6 例と健常者 3 例を対象とし TRiDAK を誘導し解析した。

【結果】腫瘍 mRNA と培養樹状細胞を用いて、抗腫瘍性効果細胞 TRiDAK が再現性をもって誘導可能であった。TRiDAK 細胞は正常細胞を認識せず、腫瘍特異的かつ導入 mRNA 特異的に IFN- γ 反応を示した。その腫瘍細胞障害の分子機構として HLA class I および class II 経路の関与が示唆された。抗原ペプチド-DC 系に比較し優れていた。

【結論】TRiDAK 細胞は広範囲の腫瘍抗原を認識し安全かつ繰り返し誘導可能であり、進行胃癌症例に対する新しい養子免疫療法として期待される。

5. Near-infrared spectroscopic analysis of hemodynamics and mitochondrial redox in right lobe grafts in living-donor liver transplantation

(生体部分肝移植における右葉グラフトの微小循環動態とミトコンドリアレドックスの近赤外分光法による解析)

満田 裕

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (外科学)

右葉グラフト生体肝移植の場合、中肝静脈枝 (MHV) 再建を客観的に判定する方法の確立が望まれている。我々は近赤外分光法 (NIRS) を用い MHV 再建の必要性を判断してきたが、再建不要例で術後肝機能障害をきたす症例があり、右葉グラフト前区域の血行動態とミトコンドリア呼吸鎖の障害が術後に与える影響を解析し、再建基準の再検討を行った。

グラフト初期灌流時の Hb 組織残存率が70%以上の症例は再建によってグラフト機能障害を回避できた。Hb 残存率40~70%の症例は術後一過性に AST・ALT

の有意な上昇を認めた。しかし T-Bil では有意な上昇は認めなかった。さらに細胞内呼吸鎖の障害の有無で検討すると、障害がある症例において有意で持続的な高 Bil 血症を認めた。

中肝静脈枝に起因する前区域鬱血に伴うミトコンドリアレドックスの機能障害が移植後の高 Bil 血症につながり、このような場合には中肝静脈枝再建が必要と思われる。

6. Synergistic effects of docetaxel and S-1 by modulating the expression of metabolic enzymes of 5-fluorouracil in human gastric cancer cell lines

(ヒト胃癌細胞株における 5-FU 代謝酵素発現修飾によるドセタキセルと S-1 併用における相乗効果)

和田 幸之

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (腫瘍外科学)

胃癌に対する docetaxel と 5-FU・S-1 の併用効果のメカニズムの解明を目的とした。ヒト胃癌細胞株 TMK-1, MKN-28, -45, -74 を用いて docetaxel/5-FU 同時投与時の細胞増殖抑制効果を検討した。単剤投与と比較し感受性の増強が強くと認められた。同時投与時の 5-FU のリン酸化酵素 orotate phosphorybosyl transferase (以下 OPRT), 分解酵素 dihydropyrimidine dehydrogenase (以下 DPD), DNA 合成阻害酵素 thymidylate synthase (以下 TS) の mRNA, 蛋白発現の変化および活性の変化を検討したところ、OPRT 発現は3.9倍に増強、DPD 発現は0.27倍に減弱、TS 発現は0.49倍に減弱しており、濃度依存性、時間依存性の変化であった。ヌードマウスに TMK-1 を移植し、docetaxel/5-FU・S-1 併用での抗腫瘍効果を検討したところ、ともに強い相乗効果が認められた。以上より、docetaxel と 5-FU・S-1 の併用は 5-FU の代謝酵素発現を modulate し、効果増強作用を有することが明らかとなった。

7. ⁹⁰Sr concentration in cow teeth from South Ural region, Russia, using Monte Carlo simulation

(モンテカルロ計算を使ったロシア南ウラル地域の牛歯中⁹⁰Sr 濃度の測定)

Tieliewuhan Yilidana

原爆放射線医科学研究所線量測定・評価研究分野

本研究は、歯に蓄積した ⁹⁰Sr 濃度を“イメージン

プレート”を用いて精度よく評価するための基礎研究である。

試料中でのベータ線の減衰は大きく、3 mm 程度で吸収される。従って ^{90}Sr 濃度評価を正確に行うために必要となる標準線源は、歯試料と同じ厚さであることが望まれる。しかしながら実際に得られる試料の厚さは様々であるため、厚さが異なってもその補正を正確に行うための方法を開発し、その有効性を明らかにした。結果として、試料が薄いほど解像度が良く、従って精度良い ^{90}Sr 濃度評価や将来の ^{90}Sr 分布評価に適したイメージングプレート信号像が得られるが、試料厚さばらつきによる ^{90}Sr 濃度評価の誤差は、試料が薄いほど大きくなることが分かった。従って、厚さを一様に、かつ精度よく調整することが不可欠となるが、調整が難しい場合は厚さ変化の少ない小片に歯を分けることが現実的である。

8. Generation of bone marrow-derived neural cells in serum-free monolayer culture

(無血清単層培養による骨髄由来神経細胞の産生)

籾 拓郎

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (脳神経外科学)

【目的】成体内にも幹細胞が存在することが明らかとなっている。骨髄中の幹細胞は自家移植が可能な点から主要な細胞ソースと考えられている。今回我々は神経系へ分化骨髄細胞を優位に増殖する方法を検討した。

【対象と方法】ラット骨髄より細胞を採取、ECM 上で bFGF 存在下に無血清培養を行った。培養細胞の BrdU の標識数及び nestin の発現を検討した。また神経栄養因子添加により神経分化を誘導し、免疫組織学的検討を行った。また同系脳内へ細胞移植した。

【結果】ECM 使用により無血清条件下に単層培養が可能であった。増殖した細胞は小型で円形から紡錘形であった。細胞は経時的に増殖し21日間で5.4倍となった。BrdU の標識数は培養21日目まで維持された。また nestin の発現が認められた。細胞は分化条件で突起を伸長し、Tuj1, NSE, GFAP を発現した。移植細胞の生着と migration が認められた。

【結論】無血清単層培養により骨髄細胞は増殖し、神経系への分化を示した。

9. A variable number of tandem repeats polymorphism in an E2F-1 binding element in the 5' flank-

ing region of SMYD3 is a risk factor for human cancers

(SMYD3 の 5' flanking region にある E2F-1 結合領域の variable number of tandem repeats polymorphism はヒト腫瘍におけるリスクファクターである)

柘植 雅貴

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)

2004年にヒストンメチル化酵素 SMYD3 が、大腸がん、肝がん、乳がんで発現亢進していることが報告された。今回、SMYD3 の発現亢進メカニズムの解明を目的として検討を行った。SMYD3 のプロモーター解析により、転写調節領域とその転写因子 E2F-1 を同定した。E2F-1 の発現により転写は活性化し、SMYD3 の発現も誘導された。転写調節領域にある 'CCGCC' の2回または3回リピートの VNTR は、大腸がん、肝がん、乳がん患者では、健常者に比べ3回リピートの homozygote が有意に多く ($P=2.3 \times 10^{-8}$, 9.1×10^{-6} , 7.0×10^{-10})、胃がん患者では有意差は認められなかった ($P=0.060$)。以上より、SMYD3 発現亢進には E2F-1 が関与し、同領域の VNTR は、遺伝学的検討により3回リピートの homozygote が大腸がん、肝がん、乳がんにおけるリスクアレルであると考えられた。

10. Adrenomedullin causes coronary vasodilation in humans: effects of inhibition of nitric oxide synthesis

(アドレノメデュリンはヒト冠動脈を拡張する:NO合成酵素阻害の効果)

上田 健太郎

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)

【背景】アドレノメデュリン (AM) のヒト冠動脈への作用機序は明らかでない。

【目的】AM のヒト冠動脈に及ぼす効果を検討した。

【方法】正常冠動脈例10例を対象とし、低容量 (1 ng/kg/min) および高容量 (10 ng/kg/min) の AM を左冠動脈に注入した。また、L-NMMA 投与後も AM を繰返し注入した。ドップラーワイヤーにて血流速度を測定し、定量的冠動脈造影法にて冠動脈径を計測した。また、血流速度と冠動脈径より冠血流量を算出した。

【結果】高容量 AM により冠動脈は有意に拡張した ($3.7 \pm 0.5\%$, $P < 0.001$)。いずれの容量の AM も冠血

流量を有意に増加させた（低：55.7±13.9%，P<0.01；高：48.8±9.8%，P<0.001）。L-NMMAによりAMの冠動脈拡張作用は消失し，冠血流量増加作用も有意に減弱した（P<0.01）。

【結語】AMは主にNOを介してヒト冠動脈を拡張した。

11. The effects of ZD1839 (Iressa), a highly selective EGFR tyrosine kinase inhibitor, as a radiosensitizer in bile duct carcinoma cell lines (ヒト胆管癌細胞株における放射線増感剤としてのEGFR阻害剤(ZD1839)の効果)

宮田 英樹

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)

選択的EGFR阻害剤であるZD1839はEGFRを過剰発現している癌において放射線感受性を増加させることが知られている。われわれは，ヒト胆管癌細胞株におけるZD1839の放射線感受性に対する効果について検討した。ヒト胆管癌細胞株におけるEGFRの発現はwestern blotにて確認された。放射線照射により，EGFRおよびその下流のERK，p38，JNKおよびAKTはいずれもリン酸化された。そのリン酸化は各種阻害剤併用にて抑制された。しかし，各種阻害剤の放射線感受性をコロニー形成能により比較検討したところ，ZD1839とPI3K阻害剤のみが放射線感受性を増加させた。以上より，EGFR-PI3K-AKTが放射線抵抗性に関与することが考えられ，ZD1839はEGFRの自己リン酸化を阻害することにより，AKTのリン酸化をも抑制し，ヒト胆管癌細胞株において放射線増感剤になりうることを示唆された。

12. Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers

(日本人の甲状腺未分化癌におけるWntシグナル構成因子の免疫組織染色及び遺伝子変異の解析)

栗原 毅

創生医科学専攻先進医療開発科学講座(外科学)

【はじめに】甲状腺未分化癌におけるWntシグナル伝達経路の異常及び標的遺伝子のcyclin D1，c-mycの発現を検討した。

【方法】22症例の甲状腺未分化癌標本に対し，

cyclin D1，c-myc，βカテニンの免疫染色とβカテニン，APC，AXIN1遺伝子の配列検索を行った。

【結果】免疫染色ではcyclin D1とc-mycに27.3%と59.1%の陽性例を認めた。βカテニンにおいて，核に濃染例を40.9%，細胞質の濃染例を63.6%に認めた。βカテニン，APC，Axin1遺伝子変異は4.5%，9.0%，81.8%に認めた。

【考察】各免疫染色の結果に相関関係は認めなかったが，βカテニンの免疫染色において，陽性例が高率に認められたこと，また高率にAxin1の遺伝子異常が認められたことにより，甲状腺未分化癌の発生においてWntシグナル伝達経路の異常が関与していると思われた。

13. Glycogen synthase kinase-3 and h-prune regulate cell migration by modulating focal adhesions

(Glycogen synthase kinase-3とh-pruneは接着斑の調節を介して細胞運動を制御する)

小林 剛

創生医科学専攻探索医科学講座(分子細胞情報学)

Glycogen synthase kinase-3(GSK-3)は糖代謝をはじめ遺伝子発現や細胞増殖，分化，細胞死など，多岐にわたる細胞機能を制御する。

本研究では，GSK-3βに結合する蛋白質として細胞運動や乳癌の転移に関連することが示唆されているh-pruneを同定した。GSK-3はh-pruneとGSK-3のリン酸化酵素活性依存性に結合し，この複合体形成が細胞運動に必要であった。GSK-3とh-pruneは接着斑で複合体を形成し，ともに細胞運動や接着斑のdisassembly，focal adhesion kinase(FAK)や低分子量G蛋白質Racの活性化に必要であった。大腸癌組織におけるh-pruneの発現は癌浸潤能やリンパ節転移と有意に相関した。

以上の結果から，GSK-3とh-pruneはFAKやRacの活性化を介して接着斑のdisassemblyを調節することで細胞の運動を制御していることが明らかとなった。また，癌細胞におけるh-pruneの発現は癌の浸潤，転移の指標として有用であると考えられた。