

第 1 1 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20日）

—学位論文抄録—

1. Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Experimental study using green fluorescent protein transgenic rats
（骨髄由来間葉系幹細胞を用いた半月板修復：GFP 遺伝子導入ラットを用いた実験的研究）

泉田 泰典

展開医科学専攻病態制御医科学講座（整形外科学）

【目的】半月板修復に対する骨髄間葉系幹細胞 (MSC) の影響を評価した。

【方法】12週齢 GFP 遺伝子導入ラット骨髄液を培養し、附着系細胞を MSC とした。12週齢 SD ラット半月板に径 1.2 mm の円柱状全層欠損を作製し摘出し、欠損部にフィブリン糊+MSC を充填したM群、フィブリン糊のみ充填したF群、欠損のままのC群を2, 4, 8, 12週器官培養した。

【結果】培養後2週のC群、F群では、紡錘形の線維芽細胞様細胞が欠損周辺部に侵入、M群では GFP 陽性円形細胞がフィブリン内に観察された。培養後4週のF群ではフィブリン充填部に多くの紡錘形細胞が存在し、M群ではフィブリン内の細胞周囲に細胞外基質の産生を認めた。培養後8, 12週ではF群はC群に比べ欠損部修復が早く、M群では8, 12週で軟骨細胞様細胞が認められた。細胞の蛍光は8週以降減衰した。

【考察】今回の結果から半月板修復において MSC がその細胞源として利用できる可能性が示唆された。

2. Facilitation of survival in a rat fulminant hepatic failure model by combination therapy using recombinant G-CSF and tacrolimus
（リコンビナント G-CSF とタクロリムスとの併用療法によるラット劇症肝不全モデルでの生存改善）

艾海提 雪合拉提（エハト・シヨハラト）

創生医科学専攻先進医療開発科学講座（外科学）

ラット劇症肝不全モデルを用いて rhG-CSF とタクロリムスの併用による生存率改善効果ならびに作用機序の違いを検討した。68%肝切除と24%血流遮断からなる処置前に単剤あるいは併用投与を行った。生存時間は併用群で著明に延長し12例中3例が5日間以上生存した。処置後12時間での残肝組織における DNA 合成速度は併用群でのみ促進していた。肝内 IFN- γ 産生および NK 活性は処置後低値を示し薬剤投与による低下はみられなかった。タクロリムス投与群と併用群でのみ TGF- α と HGF レセプターの転写レベル、インスリン・レセプターの転写および蛋白レベルが上昇していた。一方、rhG-CSF 投与群と併用群でのみ MMP-9 の転写レベル、VEGF の転写および蛋白レベルが上昇していた。タクロリムスの肝細胞再生促進作用と rhG-CSF の組織再構築改善作用の相乗効果による劇症肝不全における直接的な組織修復が示唆される。

3. Expression of tumor-associated differentially expressed gene-14 (*TADG-14/KLK8*) and its protein hK8 in uterine endometria and endometrial carcinomas
（正常子宮内膜と子宮内膜癌組織における Tumor-Associated Differentially Expressed Gene-14 (*TADG-14/KLK8*) とその蛋白 hK8 の発現に関する検討）

金 宏花

展開医科学専攻病態制御医科学講座（産科婦人科学）

正常子宮内膜9例及び子宮内膜癌21例を対象として、Semi-quantitative PCR 法により *TADG-14/KLK8* mRNA 発現レベルを検討した。正常子宮内膜での mRNA 発現量は増殖期内膜が分泌期内膜と比較して有意に高値であった ($P=0.0143$)。また、子宮内膜癌での *TADG-14/KLK8* mRNA 発現量は分泌期内膜と比較して有意に高値であった。つぎに、正常子宮内膜37例、子宮内膜癌44例を対象に免疫組織化学染色法により hK8 蛋白の発現レベルと臨床病理学的因子との関連を検討した。hK8 は増殖期内膜にて過剰発現

し、性ステロイドホルモンによる調節が示唆された。また子宮内膜癌発生の初期段階で過剰発現し、将来的に hK8 蛋白の過剰発現は閉経後女性における子宮内膜癌の早期診断に有用なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

4. Prediction of individual response to platinum/paclitaxel combination using novel marker genes in ovarian cancers

(卵巣癌における新規マーカー遺伝子を用いたプラチナ/パクリタキセル併用療法の効果予測)

小松 正明

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (産科婦人科学)

卵巣癌個別化化学療法を目指し、遺伝子発現解析によるプラチナ/パクリタキセル療法の効果予測モデルの開発を試みた。まず TXL, CDDP の既知効果関連遺伝子を効果予測指標の初期候補とした。また卵巣癌細胞株の網羅的遺伝子発現解析と薬剤感受性との順位相関解析および二値化を用いて、さらに予測性の高い新規候補遺伝子を策定した。定量的遺伝子発現解析にて再現性を確認できた遺伝子を効果予測指標とし、多変量重回帰分析を用いて予測性の高い *in vitro* 感受性予測モデルが得られた。さらにプラチナ/パクリタキセル療法の無増悪生存期間の予測に関し、臨床検体を用いて新規予測指標遺伝子の発現量を用いたモデルの有用性が示され、その臨床応用に向けた高い可能性が示唆された。本研究の手法は今後の卵巣癌個別化化学療法の発展に大きく寄与するものと考えられた。

5. Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation: immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique

(生体肝移植後の急性拒絶反応の発症率は従来の報告に比べ低率である：CFSE 色素染色法を用いたリンパ球混合試験による免疫学的解析)

田中 友加

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (外科学)

生体肝移植後には、拒絶反応と現疾患の再発などとの鑑別が困難な症例も少なくない。我々は、移植患者の免疫抑制状態の把握に CFSE 色素を用いたリンパ球混合試験 (CFSE-MLR) を確立し臨床応用した。

CFSE-MLR で拒絶と判定する所見は、ドナー抗原に対して CD25 の表出を伴う CD8⁺T 細胞の増殖指数の著明な増加を認めることである。当科で生体肝移植術を施行した29症例のうち、肝生検で急性拒絶反応と診断されたものは8例 (27.6%) であり、従来の報告とほぼ一致した。しかし CFSE-MLR で有意なアロ免疫応答の増強を認めた症例はわずか4例 (13.8%) であり、残り4例は臨床経過から判断して薬剤性肝炎または自己免疫性肝炎、ウイルス性肝炎の再発と考えられた。肝生検とともに CFSE-MLR を行うことは、組織変化と免疫応答の関係を掌握するために有効で、治療法を選択するための有用な指標となると思われる。

6. Anti-tumor effect of the anti-KL-6/MUC1 monoclonal antibody through exposing surface molecules by capping of MUC1

(抗 KL-6/MUC1 抗体は細胞表面上の MUC1 の capping によって細胞表面分子を露出し抗腫瘍効果を示す)

土井美帆子

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (分子内科学)

【背景と目的】 MUC1 ムチンは膜貫通型の高分子量糖蛋白であり、多くの腺癌細胞でその発現が亢進し、癌の浸潤、転移に強い影響を与える。間質性肺炎のマーカーとして知られる KL-6 は、MUC1 に属しており、KL-6/MUC1 に対する自己抗体は、非小細胞肺癌患者において発現が高いほど有意に予後が良好であった。今回 KL-6/MUC1 高発現細胞株を用い、抗 KL-6/MUC1 抗体の抗腫瘍効果について検討した。

【結果】 抗 KL-6/MUC1 抗体により、MUC1 が細胞膜上で capping をおこし、E-cadherin による細胞間接着能が回復し、細胞増殖抑制効果が認められた。また、MUC1 高発現の細胞では、抗 KL-6/MUC1 抗体による LAK 活性の増強を認めた。

【結論】 MUC1 の capping により細胞間接着因子や細胞表面上の腫瘍抗原が露出し抗腫瘍効果が出現した。今後の新しい抗体療法の可能性が示唆された。

7. Identification of a new family of spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) in the Japanese SCA population by the screening of PRKCG exon 4

(プロテインキナーゼ C γ 遺伝子 (PRKCG) エクソン4のスクリーニングによる遺伝性脊髄小脳変性症14型 (SCA14) の日本における新規家系の同定)

平本 恵子
創生医科学専攻先進医療開発科学講座
(脳神経外科学)

脊髄小脳失調症 (SCA) 14の原因はプロテインキナーゼ C γ 遺伝子 (PRKCG) であることが明らかになったが、日本で1家系、世界でも数家系の報告しかない。日本人における頻度および臨床像を明らかにすべく原因遺伝子不明の SCA 弧発例 650人および家族歴を有する232人の PRKCG の exon 4, 5 について Denatured HPLC で変異をスクリーニングし、直接シーケンス法による解析を行った。その結果 PRKCG の119番目のセリン残基からフェニルアラニン残基への新規な変異を弧発例に1例、家族歴を有する例に1例見出した。詳細に検討した結果2例は同一家系に属しており、家系内で同意を得た10人を検索したところ7例に同一変異を認めた。臨床症状から若年発症例 (1例)、高齢発症例 (4例)、未発症例 (2例) に大別され、若年発症例は難治性てんかん、歩行障害を主体とし、高齢発症例は歩行失調、滑動性眼球運動障害を認めた。

8. Increased plasma mRNAs of Placenta-specific 1 (PLAC1) and Glial Cells-missing 1 (GCM1) in mothers with pre-eclampsia
(妊娠高血圧症候群の母体血漿中には PLAC1, GCM1 mRNA 濃度が上昇している)

藤東 猶也
展開医科学専攻病態制御医科学講座 (産科婦人科学)

【目的】妊婦血漿中に存在する胎盤由来 mRNA (β hCG, hPL, PAPP-A, PLAC1, GCM) の濃度を測定し、正常妊婦 (N群) の妊娠中、分娩後の推移を明らかにし、妊娠高血圧症候群妊婦 (PE 群) とN群で濃度を比較し、胎盤由来 mRNA が妊娠高血圧症候群の予知マーカーとなり得るかを検討した。

【方法】N群の妊娠中、分娩後および両群の妊娠36週時に末梢血を採取し血漿 1.6 ml から RNA を抽出後、Oligo dT プライマーを用いて cDNA を作製し、リアルタイム PCR 法で各 mRNA 濃度を求めた。

【結果】N群の胎盤由来 mRNA は妊娠中それぞれ異なる推移を示し、PAPP-A 以外の mRNA は分娩後消失していた。PE 群の PLAC1, GCM1 mRNA 濃度はN群と比較し有意に高値であった。

【結論】妊婦血漿中の PLAC1, GCM1 mRNA は妊娠

高血圧症候群の発症予知マーカーとして使用できる可能性が示唆された。

9. Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations
(AML1/RUNX1 点変異を有する骨髄異形成症候群は RAS シグナル伝達経路の過反応状態を呈する)

新美 寛正
創生医科学専攻先進医療開発科学講座
(血液腫瘍治療開発)

AML1 点変異は、MDS 特に RAEB, RAEBt, MDS 由来 AML (これらを MDS/AML と定義) で高頻度に見られ、MDS/AML 発症の主因子と考えられているが、これのみでは発症しない。今回われわれは、AML1 点変異を有する MDS/AML の多段階発症機構を明らかにしようと試みた。AML1 点変異を有する MDS/AML の染色体異常の特徴は、比較的単純な7番染色体異常であった。遺伝子変異では、RTK-RAS 経路 (N-RAS, PTPN11, NF1, FLT3) の変異が高率で、p53 変異は認めなかった。また、SCF 刺激により c-KIT からの過剰な増殖シグナルが細胞内に伝達されることも示唆された。これらの染色体・遺伝子異常の所見は、AML1 正常 MDS/AML には低頻度であった。以上のことから、AML1 点変異を有する MDS/AML は特異な分子発症メカニズムを有しており、一疾患単位であると考えられた。

10. Mobilization of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells into the Injured Tissues after Intraarticular Injection and Their Contribution to Tissue Regeneration
(関節内投与された骨髄由来間葉系幹細胞の組織再生への寄与)

Muhammad Agung
展開医科学専攻病態制御医科学講座 (整形外科学)

【Purpose】 The purpose of present study was to evaluate active mobilization effect of mesenchymal stem cells (MSCs) into injured tissues after intraarticular injection of MSCs, and to evaluate their contribution to tissue regeneration.

【Methods】 MSCs, which were obtained from Green

fluorescent protein (GFP) transgenic Sprague Drawley (SD) rat and cultivated, were injected into normal SD rats in which multiple tissues had been injured including anterior cruciate ligament (ACL), medial meniscus, and articular cartilage of the femoral condyles. At 4 weeks after injection of MSCs, fluorescent microscopic observation, immunohistochemical or histological examinations were performed to evaluate mobilization of MSCs into injured tissue and their contribution to tissue regeneration.

【Results】 In the group of 1×10^6 MSCs injection, GFP positive cells could mobilize into the injured ACL alone in all 8 knees. In the group of 1×10^7 MSCs injection, GFP positive cells were observed in the injured site of ACL in all 8 knees and in the injured site of medial meniscus and cartilage of femoral condyles in 6 of 8 knees. More interestingly, extracellular matrix stained by toluidine blue was present around GFP positive cells in the injured femoral condyles cartilage and medial meniscus, indicating tissue regeneration.

11. A semi-parametric method for describing the age-specific distribution of clinical measurements in cross-sectional study

(横断的研究における臨床検査値の年齢別分布を記述するためのセミパラメトリック法)

Mohd. Muzibur Rahman
展開医科学専攻病態制御医科学講座
(計量生物研究分野)

疾患の診断や予後予測の研究においては臨床検査値(以下 検査値という)の百分位数の情報が役立つものと考えられる。従来、正規分布モデルや対数分布モデルが分布の百分位数を評価するために多用されてきた。しかしこれらのモデルがうまく適用しない場合も存在している。その場合、適当な代替りのモデルを用意する必要がある。

この論文で、我々は検査値の分布を年齢依存母数を持たせた拡張ベキ正規モデルにより記述し、未知母数についてはノンパラメトリック平滑法により推定する方法を提案した。

提案する方法を広島大学病院で計測された各種検査値データへ応用した結果、多くの検査値において若い年齢層での比較的な大きな分散及び、45歳の辺りに小さい分散が認められた。

12. Meniscal regeneration using tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow

(ラット正常半月より作製した足場材料とラット骨髄間葉系細胞を用いた組織工学的手法による半月再生の研究)

山崎 琢磨
展開医科学専攻病態制御医科学講座 (整形外科学)

【目的】 本研究の目的は半月板再生に対する同系ラット半月板より作製した足場材料 (scaffold) の有用性及び骨髄間葉系細胞 (MSC) の軟骨への分化の可能性を *in vitro* で評価することにある。

【材料及び方法】 Sprague-Dawley ラット (SD ラット) 膝から摘出した半月板より scaffold を作製し、green fluorescent protein 遺伝子導入 SD ラット (GFP ラット) 骨髄液より単離した MSC を scaffold に播種して組織培養後に組織学的評価及び GFP 陽性細胞の発現の観察、軟骨基質の mRNA 発現の評価を行った。さらに培養組織の硬度を計測した。

【結果】 培養1週で scaffold に GFP 陽性細胞を、培養2週で細胞外基質の産生を一部に認めた。培養4週の組織で aggrecan の発現を認めた。また組織は経時的に硬度が増加した。

【結語】 本法による組織再生はより機能的な半月板の再生に有用と考えられた。

13. Suppression of STAT3 activity by Duplin, which is a negative regulator of the Wnt signal

(Wnt シグナル抑制因子 Duplin による STAT3 活性化の制御)

山科敬太郎
創生医科学専攻探索医科学講座 (分子細胞情報学)

Duplin は β -カテニンと結合することにより β -カテニンと TCF の結合を阻害し、Wnt シグナルを抑制する。しかし、Duplin ノックアウトマウスでは Wnt シグナルの機能していない胎生5.5日に致死となった。したがって、Duplin は Wnt シグナルを抑制する以外の機能があると考えられた。本研究では、Duplin の新たな機能を明らかにするために Duplin に結合する蛋白質を検索し、機能解析を行った。その結果、Duplin の結合蛋白質として PIAS3 を同定した。PIAS3 は STAT3 の転写活性を抑制することから、Duplin が STAT3 の転写活性に影響を与えるかを解析

した。Duplin は核内で STAT3 と結合して STAT3 の DNA 結合を阻害し、STAT3 の転写活性を抑制することを明らかにした。以上の結果から、Duplin は複数のシグナル伝達経路に対し抑制因子として機能することが示唆された。

14. The neutrophil/Th1 lymphocyte balance and the therapeutic effect of granulocyte colony stimulating factor in TNBS-induced colitis of rat strains (複数の系統のラットを用いた TNBS 誘導性腸炎における好中球/Th1 リンパ球バランスと G-CSF の治療効果)

吉満 政義

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (外科学)

炎症性腸疾患の動物実験モデルである TNBS 腸炎

を 5 系統ラットに作製し、大腸炎のタイプと rhG-CSF 前処置の治療効果を検討した。内因性 G-CSF 産生性 (LPS に対する脾細胞) の高低により 2 分された 5 系統のうち、低い系では、急性炎症期の IL-12p35 亢進とそれに続く慢性炎症期の IFN- γ 亢進によりリンパ球主体の腸炎 (クローン病型) が形成された。rhG-CSF 前処置がこれらのサイトカインを抑制したために病理像や体重減少や生存率に対する治療効果が発揮された。高い系では、慢性炎症期に形成された好中球主体の腸炎像 (潰瘍性大腸炎型) や体重減少は、rhG-CSF 前処置により改善も増悪も認めなかった。以上のことは、ヒトのクローン病に対する rhG-CSF 治療の有効性の可能性を示しただけでなく、潰瘍性大腸炎を含む他の炎症性腸疾患全体に対しても rhG-CSF 治療が安全に使用できる可能性を示したと言える。