

第505回 広島大学医学集談会：発表無し

第16回 広島大学大学院医歯薬学総合研究科発表会（医学）

（平成19年1月4日）

——学位論文抄録——

1. Attenuated anterior cingulate activation during a verbal fluency task in elderly patients with a history of multiple-episode depression

（老年期反復性うつ病における言語流暢性課題遂行中の帯状回前部の活性低下）

高見 浩

創生医科学専攻先進医療開発科学講座
（精神神経医学）

過去の病相数により分類した老年期うつ病患者と健常対照者を対象に、言語流暢性課題遂行時の脳活動をfunctional MRIを用いて測定し、うつ病相の存在が脳機能に及ぼす影響について検討を行った。この研究は倫理委員会による審査後、対象者から文書による同意を得た上で行われた。対象は、50歳以上で発症し現在回復期にある大うつ病患者20例と健常対照者10例である。患者20例を、過去のうつ病相が1回のみの単一病相群10例と、2回以上の反復病相群10例に分類した。対象群間の比較において、反復病相群では、健常対照群に比し被殻・左外側淡蒼球・帯状回前部・右内側前頭回の、また単一病相群に比し帯状回前部の活性低下を認めた。単一病相群と健常対照群の比較では、脳活動の有意差を示す領域は認めなかった。この結果から、老年期うつ病における病相数あるいは再発の危険性に帯状回前部の活性低下が関与している可能性が示唆された。

2. Importance of early lighting conditions in maternal care by dam as well as anxiety and memory later in life of offspring

（母親ラットの養育行動と、仔ラットの情動、記憶機能に対する早期光環境の影響）

土岐 茂

創生医科学専攻先進医療開発科学講座
（精神神経医学）

産後早期の光環境が母の養育行動と、離乳後の仔の情動、記憶機能に及ぼす影響に関して、行動学的、分子生物学的検討を行った。産後早期のSDラットの母と仔を短日周期と長日周期、通常の明暗周期で飼育し、母の養育行動と離乳後の仔の情動、記憶機能と、それに関連したホルモンや分子の変化を評価した。短日周期を用いた概日リズムの操作により、母の養育行動が減少し、仔の情動、記憶機能の障害が行動と神経物質のレベルで共通して示された。長日周期では母と仔ともに、明確な変化は認められなかった。少ない養育を受けた仔が神経行動学的障害をきたすという結果は、げっ歯類や霊長類の母子を用いた先行研究で共通して見られる現象と一致していた。ラットの養育モデルから、産後早期の光環境は養育行動に影響すると同時に、それを受ける仔の神経行動学的発達を修飾するという可能性が示された。

3. Prostaglandin E₂ has no effect on two components of tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in mouse DRG

（プロスタグランジン E₂ はマウスの後根神経節におけるテトロドトキシン非感受性 Na 電流に影響を与えない）

鄭 泰星

創生医科学専攻病態探究医科学講座（神経生理学）

【目的】Nav1.8とNav1.9は痛覚伝搬に関わる小型無髄知覚神経に特異的に発現するTTX非感受性Naチャンネルである。これらのチャンネルによって引き起こされるNa電流がプロスタグランジンE₂（PGE₂）により増強することがいくつかのグループにより報告され、炎症などに伴う疼痛過敏の病態生理のひとつとして、PGE₂をはじめとする炎症関連物質によるTTX非感受性Na電流の感作という考えが広く認められている。本報告は、この考えを改めて検討したものである。

【結果と結論】PGE₂はTTX非感受性Na電流を増強しない。私たちは、最近、新しいタイプのTTX-非感

受性 Na チャンネル, Nav1.9 (NaN), によって引き起こされる Na 電流に見られる“kindling 現象”を報告しているが, 過去に得られた結果は, 当時知見がなかった Nav1.9 の kindling 現象を TTX 非感受性 Na 電流の増強とした可能性が考えられる。

4. Mutations of *KIT* gene in gastrointestinal stromal tumor (GIST)

(消化管間質腫瘍 (GIST) における *KIT* 遺伝子変異)

1) Deletion of the *KIT* gene is associated with liver metastasis and poor prognosis in patients with gastrointestinal stromal tumor in the stomach

(胃 GIST 患者において *KIT* 遺伝子の欠失変異は肝転移と不良な予後に関連している)

2) Genetic and pathologic characteristics of gastrointestinal stromal tumors in extragastric lesions

(胃以外の GIST における遺伝子変異および病理学的特徴)

趙 成大

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)

市立三次中央病院 (内科)

【目的】Gastrointestinal stromal tumor (GIST) の *KIT* と *PDGFRA* 遺伝子の変異を明らかにし, 臨床病理学的事項との比較を行った。

【材料と方法】免疫組織化学的に *KIT* または *CD34* が陽性と判定された消化管間葉系腫瘍を GIST と定義し, 1980年~2004年まで当院で手術を行った胃 GIST 56例と小腸・大腸 GIST 13例を対象に検討を行った。遺伝子解析は手術により得られたパラフィン包埋切片から DNA を抽出し, *KIT* 遺伝子の exon 9, 11, 13, 17領域と *PDGFRA* 遺伝子の exon 12, 18領域を PCR により増幅し, Direct Sequence 法により行った。

【結果】胃 GIST においては *KIT* 遺伝子変異を有するものは変異のないのに比べ, 肝転移率が高い傾向にあり, 予後も悪い傾向にあった。変異の型別では欠失を含む群において肝転移率が有意に高く, 予後も有意に不良であった。胃 GIST に比べ, 小腸・大腸 GIST では *KIT* 遺伝子の欠失範囲が有意に大きく, 微小血管密度も有意に高かった。

5. DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in gastric carcinoma: Expression of the retinoid acid receptor beta, cellular retinol-binding protein 1, and tazarotene-induced gene 1 genes is associated with DNA methylation

(胃癌におけるレチノイン酸シグナリング関連遺伝子の DNA メチル化: retinoid acid receptor beta, cellular retinol-binding protein 1 および tazarotene-induced gene 1 の発現は DNA メチル化と関連する)

首藤 真理子

創生医科学専攻探索医科学講座 (分子病理学)

胃癌に抑制的に働くと考えられるレチノイン酸シグナル関連遺伝子, RAR- β , CRBP1, TIG1 の DNA メチル化と mRNA 発現を胃癌で検討した。胃癌細胞株では 3 遺伝子それぞれにおいて, 発現を認めない細胞株ではメチル化を認め, 5Aza-dc で処理を行うと発現が回復した。胃癌組織42例では RAR- β , CRBP1, TIG1 のメチル化は, 36%, 33%, 10%, 非腫瘍部組織30例では20%, 0%, 3%で, CRBP1 において有意差を認めた。若年健常者胃粘膜ではメチル化はなかった。胃癌組織では 3 遺伝子のメチル化状態に相関はなかったが, 3 遺伝子のいずれかにメチル化を認めるものは 57%と高頻度であった。3 遺伝子すべてにおいて, DNA メチル化症例では非メチル化症例と比較して, mRNA 発現レベルが有意に低かった。これら 3 遺伝子のメチル化は深達度, 転移, ステージとの関連は見出されず, 癌の発生に関わるものと考えられる。

6. Glucose-based PD solution but not icodextrin-based PD solution induces plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator in human peritoneal mesothelial cells via ERK1/2

(ブドウ糖透析液は ERK1/2 を介して培養ヒト腹膜中皮細胞からの plasminogen activator inhibitor-1 および tissue-type plasminogen activator の放出を促進させるが, イコデキストリン透析液ではこの効果がない。)

勝谷 昌平

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (分子内科学)

【目的】ブドウ糖およびイコデキストリン透析液の培養ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) の plasminogen acti-

vator inhibitor-1 (PAI-1), tissue-type plasminogen activator (t-PA) 放出に与える影響および extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) の関与について検討した。

【方法】HPMC をブドウ糖およびイコデキストリン透析液にて刺激した。培養上清中の PAI-1, t-PA は ELISA にて, ERK1/2 の活性化は, western blotting 法にて検討した。さらに PD98059 を用いて ERK1/2 の抑制試験を行った。

【結果】t-PA, PAI-1 の放出はブドウ糖透析液では濃度依存性に増加していたが, イコデキストリン透析液では有意に少なかった。ERK の活性化についても同様であった。PD98059 による抑制試験では, ブドウ糖透析液刺激においては t-PA, PAI-1 の放出が抑制されたが, イコデキストリン透析液ではこの変化がなかった。

【結論】ブドウ糖透析液は ERK1/2 を介して PAI-1, t-PA の放出を促進させるが, イコデキストリン透析液ではこの効果がない。

7. Intrathecally administered COX-2 but not COX-1 or COX-3 inhibitors attenuate streptozotocin-induced mechanical hyperalgesia in rats (ストレプトゾトシン誘発性糖尿病ラットの痛覚過敏は COX-2 阻害薬の髄腔内投与で改善するが COX-1 と COX-3 阻害薬では改善しない)

松永 亜希
展開医科学専攻病態制御医科学講座 (麻酔蘇生学)

シクロオキシゲナーゼ (COX) のどの型が糖尿病ラットの痛覚過敏に関与しているかを知るために, COX-1, COX-2, COX-3 の各選択的阻害薬を用いて調べた。雄性 Sprague-Dawley ラットにストレプトゾトシン 75 mg/kg を腹腔内投与して糖尿病モデルを作成し, 後肢底部に痛覚過敏をきたした個体について, 腹腔内投与3週間後に髄腔内カテーテルを留置し, その1週間後に各選択的阻害薬を髄腔内投与した。COX-2 阻害薬 SC-58125 (7-100 μ g) と NS-398 (7-60 μ g) では用量依存性に痛覚過敏を改善した。COX-1 阻害薬 SC-560 は 100 μ g で痛覚過敏を軽度改善した。SC-560 10 μ g と COX-3 阻害薬 (アセトアミノフェン 1-7 mg) は痛覚過敏を改善しなかった。以上のことから糖尿病ラットの痛覚過敏では, COX-2 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

8. Heme oxygenase-1 gene enhancer manifests silencing activity in a chromatin environment prior to oxidative stress

(ヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子エンハンサー配列は非ストレス下においてクロマチン構造依存性に転写抑制作用を示す)

土肥 由裕
創生医科学専攻探索医科学講座 (心臓血管生理医学)

ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現は2つのエンハンサー (E1, E2) と転写因子 Bach1 (BTB and CNC homology 1) によって制御される。最初に, E2 エンハンサーに含まれる複数の MARE (Maf recognition element) 配列に, 転写抑制因子 Bach1 (BTB and CNC homology 1) が結合することで HO-1 の転写が抑制されることをリポーターアッセイによって明らかとした。しかし, MARE のサイレンサー活性は検出できず, 次にクロマチン構造を含めた解析を行った。染色体上に野生型および変異型 HO-1 E2-GFP 遺伝子を組み込んだ安定細胞株を樹立ところ, 変異型に比べて野生型での GFP 発現レベルは抑制されており, また HO-1 誘導剤であるカドミウム刺激により著明に活性化に転じた。以上より, MARE の転写調節能にはクロマチン構造が重要であることが証明された。

9. Effect of edaravone, a novel free radical scavenger, on endothelium-dependent vasodilation in smokers

(喫煙者の血管機能に及ぼす抗酸化薬エダラボンの効果)

日域 大輔
創生医科学専攻探索医科学講座 (心臓血管生理医学)

喫煙者では酸化ストレスの増大により一酸化窒素 (NO) 活性が低下し, 血管機能が障害されている。本研究では抗酸化薬エダラボンが喫煙者の血管機能に及ぼす影響を検討した。対象は男性喫煙者10人, 非喫煙者10人。acetylcholine を上腕動脈に直接投与した際の内皮依存性血管拡張反応を前腕血流量変化にて評価した。次に, エダラボン同時投与下に同様の測定を行った。また, N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) 投与後に同様の測定を行った。酸化ストレス指標として尿中 8-OHdG を測定した。喫煙者の内皮依存性血管拡張反応は有意に低下し, 尿中 8-OHdG は増加し

ていた。エダラボンは喫煙者の内皮依存性血管拡張反応を有意に改善し、L-NMMA 投与によりその効果は消失した。エダラボンは喫煙者の酸化ストレスを軽減することにより NO 活性を亢進し血管機能を改善させることが示唆された。

10. Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells
(B 細胞における Bach2 による形質細胞分化因子 Blimp-1 の抑制)

落合 恭子
創生医科学専攻病態探究医科学講座 (細胞再生学)

Bach2 は、血液細胞系列において B 細胞特異的に発現する転写抑制因子である。ノックアウトマウスの解析より、Bach2 は抗体アイソタイプのクラススイッチ、抗原親和性抗体産生のための体細胞突然変異に必須であることが示された。しかし、B 細胞における Bach2 標的遺伝子は不明であった。ここでは、Blimp-1 遺伝子が Bach2 の標的遺伝子であることをゲルシフトアッセイ、Bach2 遺伝子ノックダウン細胞等を用いて明らかにした。Blimp-1 は形質細胞分化に必須の転写因子であり、B 細胞分化に必要な遺伝子の発現を抑制する。Bach2 は B 細胞分化過程において、Blimp-1 遺伝子を抑制することにより形質細胞分化にブレーキをかけ、クラススイッチ等を可能にするものと考えられる。

11. Overexpression of the orotate phosphoribosyl-transferase gene enhances the effect of 5-fluorouracil on gastric cancer cell lines
(OPRT 遺伝子の過剰発現による胃癌細胞株における 5-fluorouracil の抗腫瘍効果の増強)

埜本 純哉
創生医科学専攻先進医療開発科学講座
(腫瘍外科研究分野)

胃癌細胞株への強制発現系での *in vitro* および *in vivo* 感受性変化解析を通じて OPRT の 5-FU 効果発現における役割を明らかにすることを試みた。

OPRT 発現ベクターを作成し、リポフェクション法にてヒト胃癌細胞株 TMK-1、MKN-45 に導入した。OPRT の蛋白発現は親株に対し導入株でそれぞれ 7.8 倍、2.1 倍に増加し、酵素活性値は 38.1 倍、8.0 倍に増

加した。5-FU の抗腫瘍効果を MTT アッセイ法で検討したところ、親株に比べ導入株では IC₅₀ 値はそれぞれ 1/14、1/6 まで低下し、5-FU 殺細胞効果の増強が認められた。

更に各細胞群をヌードマウス皮下に移植し、5-FU を腹腔内投与したところ導入株は親株と比べそれぞれ 46.5%、39.1% に腫瘍の縮小が認められた。

以上より、OPRT 蛋白を高発現させることで 5FU に対する抗腫瘍効果が増強することが示された。

12. Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype

(Serial analysis of gene expression データ解析によって同定されたクロードイン18遺伝子の腸型胃癌における発現低下)

眞田 雄市
創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (腫瘍外科)

我々は、SAGE 法により胃癌で発現が低下していると推測される遺伝子候補を同定した。その中で、高頻度に発現低下を認める遺伝子として、クロードイン 18 (以下 CLDN18) が同定された。CLDN18 は T/EBP/Nkx2.1 の下流遺伝子として同定され、肺特異的な CLDN18a1 と、胃特異的な CLDN18a2 の 2 種のバリエーションを有する。腫瘍における発現解析は行われていない。そこで、胃癌における CLDN18 の発現様式を検討した。定量的 RT-PCR では、23 症例中 13 症例 (56.5%) において胃癌部での発現低下を認めた。146 切除検体を用いた免疫染色では、正常胃粘膜の細胞膜に局在を認めた。胃癌においては、146 症例中 84 症例 (57.5%) において、発現低下を認め、進行胃癌 65 症例での検討では、発現低下を認める症例の 5 年生存率は有意に低下していた ($p=0.0346$)。胃型、腸型での発現様式の検討では、腸型胃癌において有意に発現が低下していた ($p=0.024$)。本研究により、CLDN18 の発現低下は進行胃癌における予後因子として有用であり、腸型の胃癌で有意に発現が低下しており、発癌の早期に関与していると考えられた。

13. DNA methylation of genes linked to retinoid signaling in squamous cell carcinoma of the esophagus: DNA methylation of *CRBP1* and *TIG1* is associated with tumor stage

(食道扁平上皮癌 (ESCC) のレチノイン酸シグナリングと関係する遺伝子の DNA メチル化 CRBP1 と TIG1 の DNA メチル化は腫瘍ステージと関連する)

水入 寛純

創生医科学専攻先進医療開発科学講座
(腫瘍外科研究分野)

レチノイドシグナル関連遺伝子である RAR- β , CRBP1, TIG1 の食道扁平上皮癌における意義を明らかにする目的で、食道扁平上皮癌28例と正常粘膜10例について、methylation specific PCR 法で DNA のメチル化の状態を解析した。mRNA の発現レベルは定量的 real-time reverse transcription PCR 法にて測定した。得られた結果について、臨床病理学的事項も含め、統計学的に解析した。その結果、RAR- β , CRBP1, TIG1 が DNA のメチル化によって比較的高頻度に不活化されていることが明らかとなった。特に、CRBP1 と TIG1 のメチル化は早期の癌では認められずステージの進行と相関することから、癌の進展に関与することが示唆された。検討した3遺伝子はいずれも脱メチル化剤によって発現が誘導されることが知られており、治療の分子標的となる可能性が示唆された。

14. In vitro tissue engineering of a cardiac graft using a degradable scaffold with an extracellular matrix-like topography

(細胞外物質様の構造を持つ生体分解性の骨格を使用した生体外における心筋移植片の作成)

石井 修

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (外科学)

心筋の組織工学は心不全の心臓に心筋組織を補う事を目指してきた。我々は新しい細胞外物質様の構造を持つ生体分解性の一時的骨格を利用した心筋移植片を作成した。電気的紡績機で生体分解性ポリマーのナノファイバーメッシュを張り細胞外物質に似た構造を作成、新生児ラットより心室筋細胞を採取し4~5億個/グラフトとし5枚重ねて立体的な組織片を作成。14日間の培養後固定し検討した。心筋の拍動は初めは弱い時間が共に協調し強くなった。組織では5枚のグラフトは結合しその細胞間にコラーゲンも認めた。心筋細胞間に gap junction も発現しコネキシン43を認めた。心筋グラフトの場合、生体外で心筋のブロックを作成することは重要でありグラフトは良く融合し協調して拍動した。ナノファイバーの骨格は形状の調整や作成も容易であり、細胞外物質様の構造が十分な細胞接着面積を確保し細胞間の接合も最大限可能となる。