

## 第507回 広島大学医学集談会：No.10, No.12

## 第18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2月15日）

## —学位論文抄録—

1. Intraarticular injections of mesenchymal stromal cells in partial anterior cruciate ligament torn knees in a rat model  
（ラットモデルを用いた前十字靭帯部分損傷膝関節内への間葉系ストローマ細胞の注入）

金谷 篤

展開医科学専攻病態制御医科学講座（整形外科学）

【目的】前十字靭帯（ACL）の治癒能は乏しく、治療として靭帯再建術が広く行われているが、ACL 損傷の自然治癒症例の報告もあり、ACL の治癒能がないわけではない。一方、骨髄間葉系ストローマ細胞（MSC）はその分化能、増殖能の高さから、損傷靭帯の治療への応用が期待される。今回我々はラットの ACL 部分損傷膝関節内への MSC の注入による損傷 ACL への治癒効果を研究した。

【方法】SD ラットの ACL 部分損傷膝関節内に Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子導入ラットの MSC ( $1 \times 10^6$  個) を注入し (MSC (+) 群)、非注入群を MSC (-) 群とした。組織学的評価を術後 1, 2, 3, 4 週に、力学的評価 (ACL の最大破断負荷量) を術直後、術後 2, 4 週で行った。

【結果】組織学的には、MSC (-) 群では ACL 損傷部の退縮は継時的に著明となったが、MSC (+) 群では術後 2 週以降で損傷部の被覆組織および GFP 陽性細胞が確認できた。3 週では線維芽細胞を 4 週ではコラーゲン線維も確認できた。力学的評価では MSC (+) 群で術直後と比べ術後 2, 4 週で有意に改善し、4 週の時点で MSC (-) 群と比べ MSC (+) 群で有意に改善していた。

【考察】MSC (+) 群で、損傷 ACL の修復が促進されており、ACL 部分損傷膝関節内への MSC の注入は、ACL 部分損傷膝に対する有効な治療法になることが示唆された。

2. Prefabrication of vascularized bone graft using

a combination of fibroblast growth factor-2 and vascular bundle implantation into a novel interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic  
（FGF-2 を併用した連通性多孔体セラミックスによる血管柄付き人工骨の作製）

中佐 智幸

展開医科学専攻病態制御医科学講座（整形外科学）

連通性多孔体セラミックス (IP-CHA) に動静脈血管束を挿入し、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を投与することで IP-CHA 内で血管新生と骨新生を促すことで血管柄付き人工骨の作製を試みた。成熟日本白色家兎の右下腿内側で、伏在動静脈を末梢側で結紮・切離して挙上し、IP-CHA (22 mm × 20 mm × 5 mm) 内に FGF-2 (100 μg) を注入 (FGF 群) または生理食塩水のみを注入 (対照群) した後、IP-CHA 内の直径 2 mm の孔内に挿入した。IP-CHA を骨蠟で包み大腿皮下に固定し、術後 2 週で血管新生を、4 週で骨新生を評価した。FGF 群では対照群より良好な血管新生を認めた。FGF 群では良好な類骨形成を認めたが、対照群では類骨形成を認めなかった。IP-CHA に動静脈血管束を挿入し FGF-2 を単回投与することにより血管・骨新生が促進され、血管柄付き人工骨が作製できる可能性が示唆された。

3. Magnetically labeled human natural killer cells, accumulated in vitro by an external magnetic force, are effective against HOS osteosarcoma cells  
（外磁場により集積させた磁気ビーズ標識ヒト NK 細胞の HOS 骨肉腫細胞に対する効果）

中島 祐子

展開医科学専攻病態制御医科学講座（整形外科学）

腫瘍に対する細胞免疫療法には輸注細胞の組織への集積性が低い問題点がある。今回ヒト NK 細胞を磁

気標識して磁力で集積させる磁気細胞輸送システムを考案し、HOS 骨肉腫細胞に対する効果を評価した。

【方法】末梢血単核球を培養後、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK 細胞を磁気標識し、純度、傷害活性を測定後、ウェル底中央に磁石を置いて形成した外磁場の下で、この NK 細胞を滴下した時の細胞分布と、同様の実験を HOS 細胞上でを行い反応させた時の HOS 細胞の残存面積を測定し、磁石なし群と比較した。

【結果】純度は 97.7% で、HOS 細胞に対し高い傷害活性があった。磁石あり群では、磁石部位に NK 細胞が多数集積し、さらに、磁石部位から多くの HOS 細胞がアポトーシスをおこして剥離しており、残存面積は有意に小さかった。

【考察】磁力で集積した NK 細胞が HOS 細胞に有効に働き、アポトーシスを誘導したと考えられ、この方法は磁気細胞輸送システムとして、腫瘍の免疫療法において有用であることが示唆された。

#### 4. Expression of Polycomb-group (PcG) protein BMI-1 predicts prognosis in patients with acute myeloid leukemia

(ポリコム蛋白 BMI-1 の発現は急性骨髄性白血病の予後に関係している)

A.K.M. Moniruddin CHOWDHURY  
創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (血液内科)

We investigated BMI-1 expression in the blasts of acute myeloid leukemia (AML) by flow cytometry and analyzed whether it could predict prognosis in AML patients, because it is known to be required for self-renewal of leukemic stem cells. Percentage of BMI-1 expression in leukemic cells was analyzed in 64 patients with AML-M0 (n=4), M1 (n=12), M2 (n=13), M4 (n=10), M5 (n=6), granulocytic sarcoma (n=1), myelodysplastic syndrome (MDS)-derived AML (n=11) and therapy (t)-related AML (n=7). Weak but significant correlation of BMI-1 was seen only with CD34 positivity and unfavorable karyotype. Patients with lower BMI-1 positivity ( $\leq 55\%$ , n=33) had significantly longer overall survival (p=0.0001), cancer-specific survival (p=0.0000), relapse-free survival (p=0.0072), and remission duration (p=0.0065), when compared to the patients with higher BMI-1 (>55% n=31). By Cox's regression hazard model, BMI-1 expression

retained the significance for overall survival (p=0.000), cancer-specific survival (p=0.000), relapse-free survival (p=0.047) and remission duration (p=0.047). Among the patients with normal karyotype (n=28) BMI-1 was significant by univariate analysis. Moreover, BMI-1 expression was significant by both univariate and multivariate analyses, to predict survival, among the patients with intermediate karyotype (n=43) and de novo AML (n=46). In conclusion, BMI-1 expression could be a prognostic marker and useful target for therapeutic intervention.

#### 5. Establishment and characterization of a novel imatinib-sensitive chronic myeloid leukemia cell line MYL, and an imatinib-resistant subline MYL-R showing overexpression of Lyn (新規に樹立した慢性骨髄性白血病細胞株 MYL 及び Lyn 過剰発現イマチニブ耐性亜株 MYL-R についての解析)

伊藤 琢生  
創生医科学専攻先進医療開発科学講座  
(血液内科研究分野)

【目的】慢性骨髄性白血病 (CML) の治療薬として臨床で高い治療効果を示すイマチニブの耐性化メカニズムについて、新規樹立 CML 細胞株を用い解析した。

【方法】CML 患者骨髄細胞よりイマチニブ感受性の高い細胞株 (MYL と命名)、及びイマチニブの継続添加培養によりイマチニブ耐性細胞株 (MYL-R と命名) を樹立した。両細胞株について、各種遺伝子発現、蛋白リン酸化、イマチニブ添加によるそれらの変化を比較検討した。またイマチニブ耐性克服法として各種薬剤とイマチニブとの併用効果を行い検討した。

【結果と考察】MYL-R におけるイマチニブ耐性機序は BCR-ABL 非依存性であり、Lyn, Ras-MAPK の活性化が主因と思われた。耐性克服にこれらの pathways の阻害が選択肢の一つとして考えられ、Src-kinase family 阻害剤, Ras 経路阻害剤, さらに Lyn-siRNA が有効である可能性が示された。

#### 6. Enhancement of lymphokine-activated killer cell induction using anti-CD25 and anti-CTLA-4 monoclonal antibodies

(抗 CD25 抗体, 抗 CTLA-4 抗体による活性化リンパ球機能増強効果)

沖田 理貴  
創生医学専攻先進医療開発科学講座  
(腫瘍外科研究分野)

【目的】 担癌患者の抗腫瘍免疫抑制の一因として、制御性T細胞 (T-reg) の関与が明らかになりつつある。新たな癌免疫療法の開発を目指し、抗 CD25 抗体、抗 CTLA-4 抗体を用いた活性化リンパ球誘導について検討した。

【方法】 末梢血単核球より IL-2/ 抗 CD3 抗体システムを用いて活性化リンパ球 (LAK 細胞) を誘導する際の、抗 CD25 抗体、抗 CTLA-4 抗体添加による機能調整について検討した。

【成績】 抗 CD25 抗体、抗 CTLA-4 抗体添加群ではリンパ球増殖が増強され、胃癌細胞株に対する腫瘍傷害活性が増強された。誘導された LAK 細胞のフェノタイプは CD8 優位であり、抗 CTLA-4 抗体添加群では IFN- $\gamma$  産生能の増強を認め、細胞内 CTLA-4 および FOXP3 解析では CTLA-4 および FOXP3 陽性率の低下が認められた。

【結論】 効果的な LAK 細胞誘導において、T-reg の機能制御は重要となる。

#### 7. Management of intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas Treatment strategy based on morphologic classification (膵管内乳頭腫瘍のマネージメント 形態分類別の治療戦略)

芹川 正浩  
創生医学専攻先進医療開発科学講座  
(分子病態制御内科学)

【背景】 IPMN の治療指針には、いまだ確立されたものは存在しない。

【目的】 IPMN の形態分類に着目し、良悪性の鑑別に有用な術前のマーカーの検討を行った。

【方法】 120 例の IPMN 症例を対象として、主膵管型と分枝型に形態分類を行い、画像診断における形態的指標を病理組織学的診断と比較検討した。加えて膵液を用いた検討の術前良悪性診断における有用性を検討した。また形態分類別に予後の検討を行った。

【結果】 主膵管型は分枝型に比べ悪性病変が高率であり、有意に予後不良であった。画像診断における主膵管径、結節性病変の頻度が悪性所見として有用であった。膵液中テロメラーゼ活性は良悪性の鑑別診断に有用であった。

【結語】 主膵管型では悪性病変の頻度が極めて高く、全例手術適応と考えられた。分枝型では、主膵管径、結節性病変の有無に加えて、膵液細胞診、膵液中テロメラーゼ活性測定を行い、手術適応を判断すべきと考えられた。

#### 8. Suppression of interferon-related promoter activation by hepatitis C virus proteins expressed in cultured cells (培養細胞で発現させたC型肝炎ウイルス蛋白によるインターフェロン関連プロモーターの抑制)

平松 憲  
創生医学専攻先進医療開発科学講座  
(分子病態制御内科学)

【背景と目的】 個々の HCV 蛋白の抗 IFN 作用における役割は、まだ十分に解明されていない。今回我々は、急性C型肝炎患者血清から分離した HCV-K 株 (genotype 1b) の各蛋白が、IFN シグナル伝達に及ぼす影響を検討した。

【方法】 HCV 各蛋白を個別に発現するプラスミドを作製した。これらを ISRE, GAS, PRD レポータープラスミドとともに Huh7 もしくは HeLa 細胞にトランジットに導入してレポーターアッセイを行い、HCV 各蛋白の IFN シグナル伝達に対する影響を調べた。

【結果】 core, E1, NS4A, NS4B 蛋白は IFN- $\alpha$  による ISRE 活性化を著明に抑制した。NS3, NS5A は抑制しなかった。NS3 と NS5A を除く全ての蛋白は IFN- $\gamma$  による GAS 活性化を抑制した。HCV 各蛋白は polyI:C による PRD 活性化を抑制しなかった。

【考察】 今後 Stable 細胞株での確認などが必要である。

#### 9. Circulating KL-6/MUC1 mucin carrying sialyl Lewis x oligosaccharide is an independent prognostic factor in patients with lung adenocarcinoma (シアリルルイス a 糖鎖が発現した KL-6/MUC1 の血清濃度は肺腺癌の独立した予後因子である)

稲田 順也  
展開医学専攻病態制御内科学講座 (分子内科学)

癌細胞が産生するムチンはセレクチンと相互作用をおこし癌転移に関与することが報告されている。

MUC1 ムチンに分類される KL-6 は腺癌細胞に高率に発現している。KL-6/MUC1 ムチン上にもセレクチンリガンドが存在し、セレクチンと相互作用を起こし癌の転移に関与している可能性がある。酵素免疫測定法 (ELISA) を開発し、健常者 97 例と肺腺癌患者 103 例を対象に、血清中の sialyl Lewis x (セレクチンリガンド) が発現した KL-6/MUC1 (以下 SLAK とする) の定量を行った。血清 SLAK 値は健常者と比較して肺腺癌患者で有意に高値であった。また、SLAK 高値群は低値群に比べ有意に予後不良であった。多変量解析では、SLAK 高値が肺腺癌患者の独立した予後因子であった。セレクチンリガンドが発現した KL-6/MUC1 (SLAK) は定量可能であり、その高い血中濃度は肺腺癌の独立した予後因子である。

10. Serum leptin and adiponectin are positively associated with bone mineral density at the distal radius in patients with type 2 diabetes mellitus

(2 型糖尿病患者における橈骨遠位端の骨密度は血清レプチン・血清アディポネクチンと正の関連を示す)

田村 朋子

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (分子内科学)

2 型糖尿病患者を対象として骨密度、骨代謝におけるレプチン、アディポネクチンの役割について検討した。

40 名の 2 型糖尿病患者の骨密度、体脂肪率、血清レプチン、血清アディポネクチン、尿中 NTX、オステオカルシンなどを測定した。

重回帰分析の結果、血清レプチン、血清アディポネクチン値と橈骨遠位端の骨密度の間に正の関連が認められたが、腰椎や大腿骨頸部の骨密度との間には関連を認めなかった。橈骨は腰椎、大腿骨頸部と比較すると皮質骨と海綿骨の比率が最も高く、2 型糖尿病患者では、海綿骨よりも皮質骨に骨減少が進行している可能性が考えられた。

レプチンと尿中 NTX の間には負の関連が認められ、レプチンが 2 型糖尿病患者において骨吸収を抑制し骨減少に対し保護的な作用を持つ可能性が考えられた。

2 型糖尿病患者においてレプチンとアディポネクチンは橈骨遠位端の骨密度に対して保護的役割を持つ可能性が示唆された。

11. Sarpogrelate hydrochloride, a selective 5-HT<sub>2A</sub> antagonist, improves vascular function in patients with peripheral arterial disease

(選択的セロトニン 2A 受容体拮抗薬である塩酸サルボグレラートは末梢動脈疾患患者の血管機能を改善する)

宮崎 政則

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (外科学)

【目的】塩酸サルボグレラートが、末梢動脈疾患 (PAD) 患者の血管内皮機能を改善するという報告は未だなされておらず、本研究では、塩酸サルボグレラートの血管機能に対する効果を評価した。

【対象と方法】PAD 患者 21 名をサルボグレラート投与群とコントロール群に分け、サルボグレラート群には、塩酸サルボグレラート 100 mg を 1 日 3 回、24 週間投与した。血管内皮機能は、反応性充血 (RH) 法を採用し、プレチスモグラフィを用いて前腕血流量 (FBF)、下腿血流量 (LBF) を、研究の開始時 (0 週)、12 週後、24 週後に測定した。

【結果】サルボグレラート投与群において、12 週後に RH に対する最大 FBF と最大 LBF は有意に増加し、24 週でも維持されていた。一方、コントロール群では、24 週間で有意な変化を認めなかった。

【結論】サルボグレラートの長期投与は、PAD 患者の障害された血管機能を改善した。

12. Inhibition of tumor growth in immunocompromised hosts by restoring type-2 immunity using infusion of G-CSF-treated allogeneic CD8<sup>+</sup> leukocytes

(免疫抑制下ホストに対する G-CSF 動員 CD8 陽性アロ白血球投与は 2 型免疫応答を介して抗腫瘍効果を発現する)

大森 一郎

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (外科学)

G-CSF 動員アロ白血球投与 (G-DLI) が免疫抑制下担癌状態のラットに及ぼす影響を検討した。タクロリムスのみを投与されたラットの腫瘍は実験期間中、継続的に増大した。ホストに対して G-CSF を直接投与しても腫瘍の増大は抑制できなかったが、G-DLI により腫瘍の増大が抑制された。CD8 陽性細胞にて G-DLI を行うと腫瘍の増大はさらに強く抑制された。このことより G-CSF により誘導された CD8 陽性のアロ白血球が GVM 効果を発現することを確認した。

本実験では、さらにキメラリズムを必要としない2型の免疫応答による抗腫瘍効果を確認した。G-CSF による直接的な抗腫瘍効果がなかったことからドナー細胞の免疫系が抗腫瘍効果の発現に必須であることは明らかであり、CD8 陽性細胞が2型免疫応答においても GVM 効果は認めうることを報告した。

13. Vitamin D3, vitamin K2, and warfarin regulate bone metabolism in human paranasal sinus bones

(Vitamin D3, vitamin K2, warfarin はヒトの副鼻腔骨の骨代謝を調整する)

杉本 一郎

展開医科学専攻病態制御医科学講座  
(耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学)

慢性副鼻腔炎にて内視鏡下副鼻腔手術を施行した6例から、篩骨洞由来の骨芽細胞を3代継代培養し、ビタミン D3 (Vit D3), K2 (Vit K2) および K2 阻害薬のワーファリンが副鼻腔由来の骨芽細胞の骨代謝に及ぼす影響について検討を行った。副鼻腔の骨芽細胞に対する高濃度 Vit K2 刺激および Vit D3 と Vit K2 の共刺激は過去の長管骨での結果と同様に骨代謝を亢進させ、ワーファリンは、副鼻腔の骨芽細胞においても Vit D3 と Vit K2 の共刺激により誘導された骨代謝の亢進を阻害することが認められた。また Vit D3 と Vit K2 の共刺激により培養液中の TGF- $\beta$ 1 濃度は有意に低下し、TGF- $\beta$ 2 濃度は有意に上昇した。TGF- $\beta$ 1, 2 産生の結果と培養骨芽細胞の石灰化能を比較検討し、TGF- $\beta$ 2 が TGF- $\beta$ 1 と比べ骨形成に強く関連していることが推察された。