

## 第509回 広島大学医学集談会：No.1, No.2

## 第20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8月2日）

## —学位論文抄録—

## 1. Fragmentation of protein kinase N (PKN) in the hydrocephalic rat brain

（カオリン誘発水頭症ラットにおけるプロテインキナーゼ N (PKN) の断片化）

沖井 則文

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・背景】セリン / スレオニン・タンパク質リン酸化酵素のひとつである PKN (protein kinase N) はアポトーシス、アルツハイマー病、虚血性神経障害等への関与が示唆されている。我々はカオリン誘発水頭症モデルラットを作製し、水頭症における脳室拡大、学習能力と PKN の断片化との関連について検討した。

【結果】カオリン誘発水頭症ラットでは PKN 断片化の出現率が対照に比し有意に高かった。またその出現は2相性を示した。さらに、中脳水道周囲灰白質の PKN 断片化の有無は、脳室拡大や空間記憶障害の程度と相関していた。

【考察】水頭症による慢性・持続的な脳障害の際にも、PKN の断片化が見られることが明らかとなり、水頭症による持続的なアポトーシスの誘導が示唆された。また、少なくとも中脳水道周囲灰白質の PKN 断片化の有無は、脳室拡大、空間認知の低下の指標になることが示唆された。

## 2. Gradient magnetic-field topography for dynamic changes of epileptic discharges

（てんかん発射の動的変化のための傾斜磁場トポグラフィ）

橋詰 顕

創生医科学専攻先進医療開発科学講座  
（脳神経外科学）

時間分解能に優れた非侵襲的な検査法である脳磁図のデータ解析レベルを向上させるために傾斜磁場トポグラフィという手法を開発した。本学の脳磁計の磁束

検出コイルは平面型グラジオメータであり、電流源の直上で信号が最大となる特長がある。センサー位置を脳表に投射し、各センサーの傾斜磁場の信号強度により脳表上で色分けしトポグラフィ化することで脳活動の時間的・空間的变化の把握が一目瞭然となった。従来の等価電流双極子推定法では脳活動の重心座標と電流モーメントしか表現できないなどの問題があったが、本法により詳細な脳活動の評価が可能となった。特にてんかんの病態を評価するに当たり、本法はてんかん活動の起始部・広がりや優れた視認性でもって表現できるため、頭蓋内電極設置術の計画の指針になりうるなど臨床的意義は高い。

## 1. Detection of longitudinal ulcers and predicting the need for surgery with ultrasound in Crohn's disease

（体外式超音波検査を用いたクローン病における縦走潰瘍の診断と治療抵抗性の予測）

## 1) Sonographic detection of longitudinal ulcers in Crohn disease

（クローン病における体外超音波を用いた縦走潰瘍の描出の検討）

## 2) Predicting the need for surgery in Crohn's disease with contrast harmonic ultrasound

（クローン病における造影超音波検査を用いた治療抵抗性の予測）

國弘佳代子

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】クローン病 (CD) における体外式超音波 (US) を用いた縦走潰瘍の診断及び、造影超音波検査 (harmonic flush echo imaging) (H-FEI) による病変の活動性と治療抵抗性の評価について検討を行った。

【対象と方法】炎症性腸疾患 545 例を対象とし、US にて局所的層構造消失所見 (FD sign) の有無を検討した。また活動性 CD 患者 70 例の病変腸管に対し H-FEI を施行し、微細血流と活動性や予後に関して検討した。

【結果】他の検査にて縦走潰瘍を認めた80例中73例にUSでFD signを認めた。内科的治療による緩解群と手術群の間に臨床的所見では有意な差はなかったが、US所見で病変腸管壁の層構造消失所見とH-FEIによる豊富な微細血流が手術群で有意であった。

【結論】CDの診断においてUSによる通常観察に加えてH-FEIを施行することでより正確な活動性の評価や予後の推測が可能であった。

## 2. Growth Hormone Enhances Proliferation of Human Hepatocytes Grafted into Immuno-Deficient Mice with Damaged Liver

(成長ホルモンは免疫不全 / 肝障害マウスに移植したヒト肝細胞の増殖を強める。)

舛本 法生

創生医科学専攻先進医療開発科学講座  
(外科学)

齧歯動物では、肝細胞の増殖能がGHにより促進することが解明されている。本研究では、ヒト肝細胞におけるヒトGH(hGH)の増殖効果について検討した。

uPA/SCIDマウスに異種肝細胞を移植するとホスト肝臓が異種肝細胞に置き換わる。そのためヒト肝細胞を移植すると、マウス肝臓はヒト肝細胞に置換する。

本研究では、uPA/SCIDマウスに若年(6才, 女性)および成人(46才, 男性)のヒト肝細胞を移植後、hGH投与群、非投与群に分け増殖効果を検討した。

結果は、ヒトアルブミン値、置換率、BrdU陽性率、およびhGHにおける肝細胞の増殖関連遺伝子の発現量は、若年肝細胞を移植したhGH投与群は非投与群より増加していた。また成人肝細胞を移植したhGH投与群も非投与群より高い傾向にあった。

hGHがヒト肝細胞の増殖を促進することを証明した。またhGHの増殖効果は、若年ヒト肝細胞において、より高いことが示唆された。

## 3. The novel *IFNGR1* mutation 774del4 produces a truncated form of interferon- $\gamma$ receptor 1 and has a dominant-negative effect on interferon- $\gamma$ signal transduction

(*IFNGR1* 遺伝子における新規変異 774del4 は、異常な IFN- $\gamma$  受容体 1 を形成し、IFN- $\gamma$  のシグナル伝達にドミナントネガティブ効果を及ぼす)

岡田 賢

展開医科学専攻病態情報医科学講座  
(小児科学研究室)

IFN- $\gamma$  受容体 1 (IFN- $\gamma$  R1) 異常症は抗酸菌、サルモネラ菌等の細胞内寄生菌に選択的に易感染性を示す原発性免疫不全症である。*M. avium* による多発性骨髄炎を呈した患者において、責任遺伝子 *IFNGR1* にヘテロ接合性の新規遺伝子変異 (774del4) を同定した。患者末梢血 CD14 陽性細胞は、変異 IFN- $\gamma$  R1 を過剰に細胞表面に発現しており、IFN- $\gamma$  刺激による STAT1 リン酸化の障害、TNF- $\alpha$  産生能の低下を認めた。変異体の発現実験の結果、WT と比較して 774del4, 818del4 (本症に最も多い変異) 変異体は細胞表面に過剰発現し、シクロヘキシミド処理による蛋白合成阻害に対しても安定であった。IFN- $\gamma$  のシグナル伝達能を持たない変異 IFN- $\gamma$  R1 が過剰発現し、正常 IFN- $\gamma$  R1 の機能を阻害するドミナントネガティブ効果が、本症の病因であることが強く示唆された。

## 4. Cytoprotective effect of tauroursodeoxycholate on hepatocyte apoptosis induced by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand (PPAR $\gamma$ リガンド誘導肝細胞アポトーシスにおけるタウロウルソデオキシコール酸の細胞保護効果の検討)

野中 裕広

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】本研究では、核内受容体 PPAR $\gamma$  リガンドである troglitazone (TGZ) の細胞増殖抑制作用に、胆汁酸種 GCDC, TUDC がいかなる修飾をもたらすか *in vitro* で検討した。

【方法】肝細胞株 HepG2・OUMS-29・Huh7 に対し GCDC, TUDC を前投与した後、TGZ による細胞増殖動態に対する影響を評価した。更にその機序の解明のため MAPK・PPAR $\gamma$  のリン酸化への影響を検討した。

【成績】TGZ による細胞増殖抑制を GCDC は増強し TUDC は減弱させた。TUDC では ERK・PPAR $\gamma$  のリン酸化がみられ、TUDC による減弱効果は ERK 阻害剤の投与により消失した。

【結論】PPAR $\gamma$  リガンドは肝細胞の増殖を抑制し、この変化は胆汁酸の共存下で変化することが判明した。特に TUDC は TGZ 誘導アポトーシスに対し保

護的に作用し、そのメカニズムとして ERK の活性化が関与すると考えられた。

5. The extract of syngeneic keratinocytes enhances IgE production from BALB/c mouse splenic lymphocytes in vitro  
(同種角化細胞抽出物は BALB/c マウス脾細胞からの IgE 産生を増強する。)

森本 謙一  
創生医科学専攻探索医科学講座 (皮膚科学)

【背景】アトピー性皮膚炎の重症度と血清 IgE 値には緩やかな正の相関があり、皮疹の増悪・軽快に伴って血清 IgE 値も増減する。これは皮膚炎および搔破による表皮の細胞破壊と血清 IgE 値上昇との関連を示唆している。これまでの研究で、BALB/c マウスにその角化細胞株 PAM212 細胞の抽出物 (PAM 抽出物) を反復投与すると血清 IgE 値が上昇することが示された。

【方法】BALB/c マウスより調整した脾リンパ球あるいは B 細胞の培養系に PAM 抽出物を添加し、上澄中の IgE 濃度と細胞中の  $\epsilon$  germline transcription ( $\epsilon$ -GT) を測定した。

【結果】上澄中の IgE 濃度は添加した PAM 抽出物の濃度依存性に上昇した。また  $\epsilon$ -GT も濃度依存的に増強された。これらの効果は、単離した B 細胞の培養系でも同様に認められた。

【結論】PAM 抽出物はマウス B 細胞の IgE クラススイッチと IgE 産生を増強する。

6. Connective tissue growth factor (CTGF) is an indicator of bone involvement in multiple myeloma, but matrix metalloproteinase (MMP) 9 is not

(多発性骨髄腫の骨病変において、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 9 ではなく、CTGF が指標となる)

宗正 昌三  
創生医科学専攻放射線ゲノム医科学講座  
(血液内科研究分野)

多発性骨髄腫 (MM) の骨病変は、近年、骨芽細胞の分化障害に伴う骨修復障害にも起因するとの報告が相次いでいる。今回我々は、間葉系幹細胞から骨芽細胞

への分化において重要な結合組織増殖因子 (CTGF) をサンドウィッチ ELISA で計測し、多発性骨髄腫患者と悪性リンパ腫患者及び正常人との比較検討を行った。更に骨病変を合併している多発性骨髄腫の患者と合併していない患者についても比較検討を行った。結果、多発性骨髄腫の患者血清は悪性リンパ腫患者や正常人と比較して、総 CTGF 量は同等であったが、whole-CTGF が有意に低値であり、更に骨病変を有する患者では有しない患者と比較して、治療歴に関係なく、whole-CTGF の総 CTGF に対する割合が有意に低値であった。以上の所見より、骨病変を有する MM 患者の病態と CTGF の切断とが関係すると推測され、骨髄腫患者の骨病変には CTGF が指標となることが示唆された。

7. Implication of the inflammatory cytokines in the gastric carcinogenesis from chronic gastritis, and its progression

(慢性胃炎及び胃癌の進展における炎症性サイトカインの関与)

1) Chronic gastritis with expression of inducible nitric oxide synthase is associated with high expression of interleukin-6 and hypergastrinemia.  
(慢性胃炎における iNOS の発現と組織 IL-6, 高ガストリン血症の関連)

2) Involvement of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 in progression of human gastric carcinoma.  
(胃癌の進展における炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  IL-6) の関与)

甲斐 広久  
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)

1. *H.pylori* 陽性胃炎は、胃癌のハイリスクグループである。中でも iNOS 陽性慢性胃炎は発癌率が高いことを報告してきた。1 では同胃炎の炎症性サイトカイン及び血清マーカーと臨床病理学的特徴を検討した。iNOS 陽性の慢性胃炎は 31.9% であった。また陰性群と比較して、萎縮の程度と関係なく血清ガストリンが有意に高値であり、組織 IL-6 の濃度が有意に高値を示した。iNOS 発現胃炎では、血清ガストリンが臨床的なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

2. 胃癌症例の組織中のサイトカインを検討した。

IL-1 $\beta$  値は癌部で有意に高値であった。癌部における IL-1 $\beta$  値, IL-6 値は, 非スキルスタイプで有意に高値であった。癌部における IL-6 値は腫瘍の深達度, リンパ管侵襲と相関していた。サイトカインの発現と予後の相関は認めなかった。

IL-1 $\beta$ , IL-6 は胃癌の増殖, 進展に関与していることが示唆された。

8. Development of a novel method to detect *Helicobacter pylori cagA* genotype from paraffin-embedded materials: Comparison between patients with duodenal ulcer and gastric cancer in young Japanese  
(パラフィン包埋切片を用いた *Helicobacter pylori cagA* 遺伝子多型解析法の開発: 日本人における十二指腸潰瘍患者と若年者胃癌患者との比較検討)

上田 裕之  
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)

【対象と方法】対象は 29 歳以下の若年者胃癌 32 症例と若年者十二指腸潰瘍 39 症例, 計 71 人。組織学的胃炎の程度は Updated Sydney system で評価, *H. pylori* は Giemsa 染色標本と免疫組織化学にて判定した。*H. pylori* DNA は, 20 症例の胃体部および前庭部パラフィン包埋切片より抽出した。*cagA* 遺伝子は, PCR 法により増幅し direct sequence にて型判定を行った。

【成績】すべての検体において *H. pylori* は確認されたが, 体部胃炎は十二指腸潰瘍症例より若年者胃癌症例において有意に高度であった。パラフィン包埋切片より *H. pylori* DNA を抽出し, *cagA* 遺伝子の塩基配列の解読法を確立した。その結果, 全症例において *H. pylori cagA* は東アジア型であり, さらに体部, 前庭部間において, その配列は完全に同一であった。

【結語】*H. pylori cagA* はパラフィン包埋切片から検討可能である。若年者胃癌症例に特徴的な高度体部胃炎は *H. pylori* CagA 蛋白の多型のみでは説明できず, 他の塩基配列部の多型, もしくは菌株の接着以降のイベント等が関与している可能性が示唆された。

9. Melanoma-associated antigen-A1 expression predicts resistance to docetaxel and paclitaxel in advanced and recurrent gastric cancer  
(MAGE-A1 の発現は進行再発胃癌において

docetaxel と paclitaxel の感受性予測因子となる)

鈴木 崇久  
創生医学専攻放射線ゲノム医学講座  
(腫瘍外科研究分野)

【目的】SAGE 法を用い胃癌発癌に関する遺伝子の網羅的発現解析を行い TRAG-3 に注目した。TRAG3 はタキサン系薬剤耐性と関連があると考えられ, 近傍には MAGE が存在し他癌において耐性との関連が示唆されている。

胃癌において MAGE 遺伝子の発現がタキサン系薬剤を基本とした化学療法の耐性や効果の予測の有用性を検討した。

【材料・方法・結果】1. 切除不能もしくは再発胃癌としてタキサン系薬剤が投与された 41 症例について免疫染色し MAGE-A1 の発現をみた。9.8% に認め, いずれもタキサン系抗癌剤治療に抵抗性だった。

2. MAGE-A1 遺伝子の DNA のメチル化を MSP によって評価した。脱メチル化を 24.4% に認め, 蛋白発現との比較では相関を認めた ( $p=0.0021$ )。治療効果との比較では相関は認められなかった ( $p=0.7245$ )。

3. MTT assay を行い MAGE-A1 導入細胞で細胞増殖能への影響を検討した。強制発現により化学療法に対する感受性が増強した。

【結論】胃癌患者において, MAGE-A1 発現がタキサン中心の化学療法の治療効果予測因子となりうる。

10. Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation

(細胞がん化におけるエイム・ワン (オーロラ B) キナーゼの役割解明研究: 染色体パッセンジャー蛋白によるがん遺伝子ラズ活性増強効果について)

神田 暁史  
創生医学専攻放射線ゲノム医学講座  
(ゲノム応答研究分野)

エイム・ワンは哺乳類で少なくとも 3 種類知られているオーロラ・キナーゼの中で唯一, 酵母から高等植物やヒトに至るまで広く真核生物において機能的構造的に保存されている B タイプのオーロラ (オーロラ B) であり, 有糸分裂過程で正確な染色体凝縮と赤道面への整列, 姉妹染色体分配と細胞質分離に働く。本研究ではオーロラ B の細胞がん化における生理的意

義を知るために、BALB/c 3T3 A31-1-1 細胞を標的とした試験管内発がん実験系での解析をおこなった。その結果、オーロラ B にはがん遺伝子ラスの活性を増強する効果があった。また、上流がん遺伝子サークの活性に対しても影響を与えたが、下流がん遺伝子ラフの活性には影響が無く、オーロラ B はがん遺伝子情報伝達経路上、ラス、あるいはその下流で機能することがわかった。同様の効果は、オーロラ B のキナーゼ活性に必須であるセントロメア蛋白質 INCENP においても観察された。

11. Clinical and epidemiological evaluation of pathophysiology of lower urinary tract symptoms and dysfunction in children

(小児の下部尿路機能および下部尿路障害の疫学、臨床的病態解明)

梶原 充  
創生医科学専攻先進医療開発科学講座  
(腎泌尿器科学)

【目的】小児下部尿路機能および下部尿路障害の頻度、病態の疫学・臨床的解明。

【方法】疫学研究は、小学生 6,917 名を対象に下部尿路障害の種類、頻度を調査し、臨床研究は夜尿症が主訴の 88 名の小児を対象に、monosymptomatic nocturnal enuresis (MNE) と nonMNE の頻度、治療効果、基礎疾患を調査。

【結果】疫学研究；返答率 76.4%。尿失禁、夜尿症の頻度は 6.3%, 5.9% (MNE 3.5%, nonMNE 2.4%) で、学年につれ低下した。尿失禁と nonMNE は、膀胱炎の既往、便秘と関連していた。臨床研究；NonMNE を 24% に認め、nonMNE は膀胱炎の既往、便秘と関連し、器質的の下部尿路閉塞、膀胱尿管逆流症を高率に合併した。

【結語】小児下部尿路障害は多彩で高頻度であった。全例が治癒するわけではなく、昼間の下部尿路障害を合併する nonMNE は、泌尿器科的異常の可能性を包括した病態と推測される。

12. The integrin  $\alpha 5 \beta 1$  regulates chondrocyte hypertrophic differentiation induced by GTP-bound transglutaminase 2

(インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  は GTP 結合トランスグルタミナーゼ 2 によって誘導された軟骨細胞肥大分化を制御する)

田中 久美  
展開医学専攻病態制御医科学講座  
(整形外科学)

内軟骨性骨化で起こる軟骨細胞の肥大分化と同様の変化が変形性関節症でも観察される。近年 GTP 結合トランスグルタミナーゼ 2 (以下 TG2) の添加によりインテグリン依存性軟骨細胞肥大分化が誘導される事が報告されたが詳細な機序は不明である。今回、ヒト不死化軟骨細胞株 CH8 細胞を使用し GTP 結合 TG2 が誘導する軟骨細胞肥大分化におけるインテグリンの役割を検討した。CH8 細胞に発現しているインテグリンに対する抗体を加えて GTP 結合 TG2 誘導軟骨細胞肥大分化の実験を行った。結果、軟骨細胞肥大分化に関与しているインテグリンは  $\alpha 5 \beta 1$  であることが判明した。GTP 結合 TG2 と CH8 細胞は主に  $\alpha 5 \beta 1$  を介して接着し、GTP 結合 TG2 からインテグリンを経由するシグナルは抗  $\alpha 5 \beta 1$  抗体で阻害された。軟骨細胞肥大分化に関与しているインテグリンを同定した事は、変形性関節症の新たな治療法を開発する一助になると思われる。

13. V1 receptor activation induced by hemorrhage and sympathoinhibition in the mesentery and hindquarters of spontaneously hypertensive rats (SHR の内臓及び下肢筋血管において失血と交感神経抑制によって誘発される V2 受容体の活動)

池 弘星  
創生医科学専攻病態探求医科学講座  
(神経生理学)

SHR の局所血行動態におけるバンプレッション V1 受容体拮抗剤 (V1A; 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) の作用を調べた。SHR と WKY の上腸間膜動脈及び腹部大動脈末端 (下肢筋血管) の血流は、電磁流量計によって測定された。血圧下降を生じない程度の少量 (0.3 ml/100 g weight) の出血後、V1A の静脈投与は、SHR, WKY とも、上腸間膜動脈血管抵抗 (SMR) をほとんど変化させない。一方、同じように出血後、先に交感神経節遮断剤 (C6; 25 mg/kg) をゆっくりと静注しても、SMR は、SHR, WKY ともほとんど変化しなかったが、さらに V1A を投与すると、SHR のみで SMR は減少した。下肢筋血管抵抗は、SHR, WKY とも、出血後に有意に増加し、C6 投与で減少する。V1A 投与の効果はない。以上 (1) SHR で上昇している

SMR は、交感神経遮断後では、バンプレッションによって維持される。(2) 下肢筋血管抵抗は血圧が下降されようとしたとき、血圧を補償するために交感神経基礎緊張を高める。

#### 14. Protective effects of PPAR- $\gamma$ ligand on apoptosis and HGF induction in renal ischemia-reperfusion injury

(腎虚血再灌流傷害におけるアポトーシスと HGF 産生に対する PPAR- $\gamma$  リガンドの保護効果)

土井 盛博  
展開医科学専攻病態制御医科学講座  
(分子内科学)

【目的】腎虚血再灌流傷害ラットにおける Troglitazone の尿管アポトーシスと HGF 発現に対する効果を検討する。

【方法】Troglitazone 投与による尿管アポトーシスに対する効果を、cleaved caspase-3 と single stranded DNA (ssDNA) 染色で評価した。PPAR- $\gamma$  の発現を real time RT-PCR 法とウエスタンブロッティング法で、HGF の発現を real-time RT-PCR 法と免疫染色で検討した。

【結果】Cleaved caspase-3 と ssDNA は Troglitazone 投与群で有意に減少していた。PPAR- $\gamma$  と HGF の mRNA と蛋白の発現とも、Troglitazone 投与群の方が、コントロール群より発現が亢進していた。

【結語】PPAR- $\gamma$  リガンドは、HGF の発現を亢進し、腎虚血再灌流ラットの尿管アポトーシスを抑制する。