

第510回 広島大学医学集談会：発表なし

第21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11月1日）

—学位論文抄録—

1. Systolic arterial pressure variability reflects circulating blood volume alterations in hemorrhagic shock in rabbits

（収縮期動脈圧変動は兎の出血性ショックの循環血流量を反映する）

江木 暁子

展開医科学専攻病態制御医科学講座
（麻酔蘇生学）

収縮期動脈圧変動（SAPV）の周波数解析の高周波数成分と systolic pressure variation（SPV）は、呼吸の影響を強く受けると同時に循環血流量を反映するという共通点がある。本研究ではウサギの出血性ショックモデルに人工膠質液を輸液して循環血流量を変化させ、循環血流量を最も反映する因子を調査した。全身麻酔下にウサギを脱血のみを行った群（脱血群）と脱血後に輸液を行った群（輸液群）に分けた。両群とも大腿動脈より1 ml/kg/分で25分間脱血し、ショックを作成した。その後輸液群では人工膠質液を1 ml/kg/分で25分間輸液した。両群とも安静時、脱血後、輸液終了5分後と1時間後の時点で計測を行った。

SAPVの周波数解析の総パワー、高周波数成分、低周波数成分はSPV、中心静脈圧、平均動脈圧よりも循環血流量と良い相関が認められ、このうち総パワーが循環血流量を最も良く反映した。

2. The role of telomeres and telomerase expression in pancreatic carcinogenesis

（膵腫瘍性疾患におけるテロメア・バイオロジーと発癌機構の解析）

1) Telomere shortening and telomerase expression during multistage carcinogenesis of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas

（膵 Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN) の発癌過程におけるテロメア短縮とテ

ロメラーゼ活性化機構）

2) Detection of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in tissue and pancreatic juice from pancreatic cancer

（膵癌における human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) 発現の検討と膵液細胞診への応用）

橋本 泰司

展開医科学専攻病態制御医科学講座
（外科学）

1) 膵 IPMN 発癌におけるテロメア・バイオロジーと発癌との関連、2) 膵癌術前診断における免疫組織学的 hTERT 発現検討の有用性について検証した。膵切除症例計141例を対象に、免疫組織学的 hTERT 発現、テロメラーゼ活性測定、FISH 法によるテロメア長の検討を行った。膵 IPMN において、病理学的な進行とともに hTERT 発現の増強を認めた。テロメアは、膵 IPMN 病変の進行とともに漸減、非浸潤癌以降でテロメアの究極的短縮を示し、境界病変から非浸潤癌病変がテロメア短縮、テロメラーゼ活性化の臨界点であることが示唆された。通常型膵管癌において、hTERT はテロメラーゼ活性と強い相関を認め、免疫組織学的手法は *in situ* 解析が可能で偽陰性、偽陽性例の鑑別にも有用であった。免疫組織学的 hTERT 発現の検討は、がん診断において有力なバイオマーカーであり、膵液細胞診の診断率の向上が期待できると考える。

3. Interferon therapy after curative treatment of hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma

（HCV 関連肝細胞癌の根治後におけるインターフェロン投与の検討）

1) Effects of a 24-week course of interferon- α therapy after curative treatment of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma（HCV 関連肝細胞癌の根治後におけるインターフェロン α 24週間投与の効果）

2) Low-dose intermittent interferon-alpha therapy for HCV-related liver cirrhosis after curative treatment of hepatocellular carcinoma (HCV 関連肝硬変の肝細胞癌根治後における間歇的インターフェロン α 少量投与)

丁 守哲
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)

HCV 関連肝癌は治療後の高い異所再発率や背景肝病変の進行により、局所制御のみでは長期予後の改善は期待できない。そのため癌の局所制御と同時に、残存背景肝に対する治療が重要である。これまでに肝癌根治後にインターフェロン (IFN) 療法を行うことで再発抑制効果を認めた報告はあるが、IFN の投与方法が様々である。また IFN 治療効果別による検討や背景肝予備能について検討した報告はなされていない。本研究では肝癌根治後 IFN 投与 (IFN- α 6MU 24 週投与と IFN- α 3MU 長期投与) が、癌再発抑止、生存率向上、肝予備能維持など予後改善に有用であるかを case controlled study にて検討した。その結果、ウイルス排除が最も予後改善に重要な因子であった。またウイルス排除困難な症例でも IFN 少量長期投与により肝予備能が維持され、再発癌に対する治療逸脱率を低下させ生存率の向上に繋がる可能性が示唆された。

4. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1

(ヘムは転写因子 Bach1 のユビキチン化と分解を誘導する)

川崎由香里
創生医科学専攻先進医療開発科学講座
(外科学)

転写因子 Bach1 は、酸化ストレス防御酵素であるヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) の発現を抑制的に制御している。ヘムは Bach1 の DNA 結合を阻害し核外排出へと導く。Bach1 の抑制から解除された HO-1 遺伝子のエンハンサー領域に転写活性化因子が結合し、HO-1 の発現が誘導される。本研究では、より詳細なヘムの Bach1 タンパク質代謝回転への関与を明らかにした。

まず、細胞をヘミン処理することにより Bach1 が分解されることを見出した。この分解はプロテアソーム

阻害剤により抑制された。さらに Bach1 がヘミン誘導性にポリユビキチン化されることを明らかにした。これらのことから、Bach1 がユビキチンプロテアソーム系によって分解されていることが示された。また、この Bach1 のユビキチンプロテアソーム系による分解を触媒する E3 ユビキチンリガーゼが HOIL-1 であることを同定した。

5. Clinical significance of mucosal suppressors of cytokine signaling 3 expression in ulcerative colitis (潰瘍性大腸炎における粘膜 suppressors of cytokine signaling 3 の発現の臨床的意義)

宮中 芳浩
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)

【対象と方法】潰瘍性大腸炎 (以下 UC) 患者 62 名を対象とした。大腸内視鏡検査にて直腸粘膜を観察し、内視鏡的 Matts' grade により分類した。その後、直腸から内視鏡的に大腸粘膜組織を採取した。採取された組織を組織学的 Matts' grade により分類した。同部位から採取された凍結切片より mRNA の抽出に用いない、RT-PCR 法を行った。これにより得られた PCR 産物を対照として用いた GAPDH と対比し半定量化した。

【成績】SOCS3 mRNA の発現は UC において炎症が強くなるほど有意に増加した。SOCS3 mRNA レベルは予後に相関関係を認めた。しかしながら SOCS1 の発現は炎症の程度、予後とは相関を認めなかった。

【結語】SOCS3 の発現は、UC の炎症の進展に重要な役割を持つことが考えられた。直腸の SOCS3 の発現を調べることは UC 患者の有用な予後マーカーになる可能性が示唆された。

6. Demethylation of promoter C region of estrogen receptor α gene is correlated with its enhanced expression in estrogen-ablation resistant MCF-7 cells

(エストロゲン枯渇耐性 MCF-7 細胞におけるエストロゲン受容体 α 遺伝子のプロモーター C 領域の脱メチル化はその高発現と関連する)

莊巖 哲哉
展開医科学専攻病態情報医科学講座
(放射線生物学・分子疫学部)

閉経後のエストロゲン受容体 (ER) α 陽性乳癌の治療にアロマトラーゼ阻害剤を用いると、乳癌細胞中のエストロゲンが枯渇し増殖が抑制されるが、中にはアロマトラーゼ阻害剤に対して耐性を示すようになるものがある。共同研究者である正村らは ER α 陽性乳がん細胞株である wild-type MCF-7 をエストロゲン枯渇条件下で長期間培養することにより、エストロゲン枯渇耐性を獲得した LTED 細胞を樹立した。この亜株はエストロゲンを再添加した状態で長期間培養することにより元の wild-type 細胞に戻る。また、彼らは wild-type 細胞に比べ LTED 細胞での ER α 高発現を報告している。しかし ER α が LTED 細胞株で高発現するメカニズムは未だ解明されていない。

今回我々は LTED 細胞と wild-type 細胞における ER α mRNA の転写、ならびにメチル化について比較検討した。

7. Effect of aerobic exercise training on oxidative stress in patients with type 2 diabetes

(2型糖尿病における有酸素運動が酸化ストレスに及ぼす効果)

野島 秀樹
展開医科学専攻病態制御医科学講座
(分子内科学)

【目的】2型糖尿病 (DM) 患者において有酸素運動が酸化ストレスに及ぼす影響を調べる。

【対象】2型 DM 患者 103名(男性 66名, 女性 37名)

【方法】対象者を A 群 (運動指導及びスポーツセンターでの定期的指導) 43名, B 群 (運動指導のみ) 44名, C 群 (対照) 16名に分けた。運動指導は中等強度の有酸素運動を1日30分以上で週3日以上とした。A, B 群は介入前, 6, 12ヶ月後に, C 群は介入前と12ヶ月後に採血, 採尿を行った。

【成績】グリコアルブミン (GA) は A, B 群で6, 12ヶ月後に, C 群で12ヶ月後に有意に低下した。尿中8-OHdG は A, B 群では12ヶ月後で有意に低下したが C 群では変わらなかった。尿中8-OHdG の12ヶ月間の変化率は, GA の変化率と正相関を認めた。

【結論】2型 DM 患者において有酸素運動により耐糖能の改善と共に, 酸化ストレスが低下し, 耐糖能の改善と酸化ストレスの低下に関連を認めた。

8. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus

and its susceptibility to interferon
(合成クローンを用いたヒト肝細胞キメラマウスへの HCV 感染および genotype 別のインターフェロン感受性の検討)

平賀 伸彦
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)

肝不全を有する urokinase-type plasminogen activator (uPA) トランスジェニックマウスと免疫不全の severe combined immune deficient (SCID) マウスを交配させた uPA/SCID マウスに経脾的にヒト肝細胞を移植したところ, マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウス (キメラマウス) が作製される。このキメラマウスに, HCV genotype 1a クローン pCV-H77C を *in vitro* transcription 法にて合成した RNA をマウス肝臓内へ直接注入し, genotype 2a クローン pJFH-1 は *in vitro* transcription 法にて RNA を合成し electroporation 法にて Huh7 細胞に transfection, 3日後の培養上清を静脈内投与した。投与後, 2週おきにマウス血清を採取し, real time PCR 法により血中 HCV RNA を測定し感染を確認した。また, これらのマウス血清を naïve なキメラマウスに投与したところ, 感染が確認され, 1000 IU/g/day の IFN- α を2週間連日筋注したところ, genotype 1a 感染マウスでは, 血中 HCV RNA は投与1週間後0.6 log の低下であったが, genotype 2a 感染マウスではすべて感度以下に低下した。これらの感染マウスを用いて HCV genotype 間での *in vitro* における IFN 感受性の検討が可能であった。

9. Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif

(YMDD モチーフ以外のアミノ酸変異が関与する新規ラミブジン耐性 B 型肝炎ウイルスの出現)

八辻 寛美
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)

ラミブジン投与中の B 型慢性肝炎症例から tyrosine-methionine-aspartate-aspartate (YMDD) モチーフにアミノ酸変異を認めない新規ラミブジン耐性 B 型肝炎ウイルスを検出した。患者血清から HBV-

DNA を抽出し耐性獲得前後の HBV polymerase 領域のアミノ酸変異を比較したところ、S331C 変異と reverse transcriptase (rt) A181T 変異が認められた。そこで患者血清から抽出された HBV-DNA を元に HBV 産生プラスミドを作成し、HepG2 細胞に transient transfection し、ウイルス複製能及び薬剤耐性を検討した。rtA181T 変異は複製能に影響を与えなかったが、野性株と比較し3倍のラミブジン耐性を示した。一方 S331C 変異はいずれにも影響を与えなかった。ヒト肝細胞キメラマウスにラミブジン耐性血清及び野生株血清を投与し、持続感染確認後にラミブジンを投与した。6週間後に HBV-DNA はそれぞれ 0.39, 2.8 log copies /ml 減少し、*in vitro* にもラミブジン耐性が証明された。rtA181T 変異の簡易検出法として restriction fragment length polymorphism (RFLP) -PCR method を確立し、ラミブジン耐性 B 型慢性肝炎患者 40 人のうち本症例と異なる 1 人から rtA181T のみに変異があるウイルスが検出された。

10. Monocyte chemoattractant protein-1 transfection induces angiogenesis and tumorigenesis of gastric carcinoma in nude mice via macrophage recruitment

(胃癌における MCP-1 の発現はマクロファージの集積を介して、腫瘍の増殖と血管新生を促進する)

黒田 剛

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】Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の胃癌の増殖、進展に及ぼす影響についてヌードマウス腫瘍移植モデルを用い検討した。

【方法】MCP-1 遺伝子導入により MCP-1 高発現胃癌細胞株を作成し、ヌードマウスの皮下組織または胃壁に接種し、造腫瘍能、腫瘍増殖速度を評価した。生着した腫瘍組織を用い、免疫組織学的に、微小血管密度、マクロファージ浸潤を評価した。

【結果】マウスの皮下における腫瘍増大速度は、MCP-1 遺伝子導入により有意に促進された。また、MCP-1 遺伝子導入によりマウスの胃壁での造腫瘍性、リンパ節転移が促進された。MCP-1 遺伝子導入株ではコントロールに比し、腫瘍内部でより多くのマクロファージの浸潤と、高い血管密度を認めた。

【結語】ヒト胃癌細胞が発現する MCP-1 は、腫瘍組織内にマクロファージを遊走、活性化させ、血管新生を促進させることが示唆された。

11. Role of osteoprotegerin in arterial calcification: development of new animal model

(動脈石灰化における Osteoprotegerin の役割 - 新しい動物モデルの開発 -)

折田 裕一

展開医科学専攻病態制御医科学講座
(分子内科学)

【目的】骨粗鬆症を呈する OPG 遺伝子欠損マウスを用いて短期間に動脈石灰化を発生させ、組織学的研究に適したモデルを確立する。

【方法】マウスに高リン食と活性型ビタミン D3 を負荷し、血清、組織中の ALP の測定や光学・電子顕微鏡で組織学的観察を行った。

【結果】負荷を行ったマウスの動脈壁の石灰化面積は有意に増加を認め、電子顕微鏡にて血管平滑筋細胞の細胞質内や細胞外基質に石灰化を認め、アポトーシスやマクロファージは認めなかった。血清や骨組織中の ALP 値は有意に高値を示し、ALP アイソザイムでは、大動脈組織と骨組織が同様の泳動パターンを示した。

【結論】OPG 遺伝子欠損マウスを用いて動脈石灰化を誘発させるモデルを確立した。血管の石灰化は血管平滑筋細胞にアポトーシスを認めず、マクロファージなどの浸潤細胞を認めないのが特徴である。石灰化機序の一つに骨型 ALP の関与を認め、骨代謝との関連性を示唆した。