

第513回 広島大学医学集談会：発表なし

第24回 広島大学大学院医歯薬学総合研究科発表会（医学）

（平成20年5月1日）

1. Selection of a novel drug-response predictor in esophageal cancer: A novel screening method using microarray and identification of *IFITM1* as a potent marker gene of CDDP response
 （食道癌における新規抗癌剤効果規定遺伝子の抽出：マイクロアレイを用いた新規スクリーニング法とCDDP 効果規定遺伝子としての *IFITM1* の同定）

麓 祥一

創生医科学専攻放射線ゲノム医科学講座
 （遺伝子診断・治療開発研究分野）

食道癌個別化化学療法の確立を目指し、新規マイクロアレイデータ解析法による5-FU, CDDP に対する効果予測遺伝子の同定を試みた。まず食道癌細胞株の網羅的遺伝子発現解析と薬剤感受性評価との順位相関解析及び二値化により、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が確認できた遺伝子を効果予測指標とし、予測性の高い *in vitro*, *in vivo* 効果予測式が得られた。特に CDDP 効果予測遺伝子候補として抽出された *IFITM1* は、予測式における重要性が高く、強制発現・ノックダウン実験においてもその発現レベルの変動と感受性変化の関連性が示され、食道癌における重要な CDDP 効果予測マーカー遺伝子のひとつであると考えられた。本研究により、新規マーカー遺伝子の同定に二値化による新規解析法が有用であり、それら抽出されたマーカー遺伝子を用いた効果予測は、個別化化学療法の確立に貢献することが期待された。

2. Human mismatch repair gene, *MLH1*, is transcriptionally repressed by the hypoxia-inducible transcription factors, DEC1 and DEC2
 （低酸素誘導性転写因子 DEC1, DEC2 によるミスマッチ修復遺伝子 *MLH1* 発現抑制）

中村 秀明

創生医科学専攻放射線ゲノム医科学講座
 （遺伝子診断・治療開発研究分野）

低酸素下癌細胞における *MLH1* 発現低下機構の解明を試みた。低酸素下癌細胞株において *MLH1* 発現は mRNA, 蛋白レベルでの低下が確認された。*MLH1* プロモーター領域をクローニングし、レポーターおよび様々な変異体を作製した。低酸素下で中心的役割を果たす HIF-1 の標的である転写抑制因子 DEC1, および DEC2 発現プラスミドを用いたレポーターアッセイや EMSA, ChIP アッセイから、*MLH1* プロモーター活性は、領域内の E ボックス様配列を介して、DEC により HDAC 依存的に抑制されることが明らかとなった。さらに、DEC 強制発現による内在性 *MLH1* 発現低下や、siRNA による HIF-1-DEC 経路阻害実験より、低酸素下での *MLH1* 発現低下機構に、HIF-1 および、その標的遺伝子産物 DEC1 または DEC2 が重要な働きをしていることが示唆された。

3. GABA_A receptors are associated with retinal ganglion cell death induced by oxidative stress
 （GABA_A 受容体は酸化ストレスにより誘導される網膜神経節細胞死に関与する）

奥道 秀明

創生医科学専攻先進医療開発科学講座
 （視覚病態学）

EAAC1 欠損マウスは、眼圧非依存性で酸化ストレスの影響による網膜神経節細胞死を生じるため、正常眼圧緑内障モデルマウスとされる。

我々の行ったプロテオーム解析により、EAAC1 欠損マウスの網膜において GABA_A 受容体 β 1 サブユニットの発現が上昇していることが分かった。マウスの網膜において GABA_A 受容体 β 1 サブユニットは網膜神経節細胞に局在し、さらにラット網膜神経節細胞由来のセルライン RGC-5 にも GABA_A 受容体 β 1 サブユニットは存在していた。

RGC-5 に対し GABA_A 受容体作動薬を過量に投与すると細胞死を生じ、その細胞死を GABA_A 受容体拮抗薬が抑制した。続いて RGC-5 に対して過酸化水

素を投与することで生じた細胞死および酸化ストレスマーカーの発現を, GABA_A 受容体拮抗薬がともに抑制した。

以上より, GABA_A 受容体が酸化ストレスにより誘導される網膜神経節細胞死に関与していると考えられる。

4. Myocardial protection against pressure overload in mice lacking Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1

(Heme oxygenase-1 の転写抑制因子である Bach1 遺伝子欠損マウスにおける, 圧負荷に対する心筋保護作用)

三戸 森児
創生医科学専攻探索医科学講座
(心臓血管生理医学)

Bach1 はストレス応答性の転写因子であり, heme oxygenase-1 の発現をコントロールしていると考えられている。我々は Bach1 KO マウスを用いて transverse aortic constriction (TAC) による左室の肥大, リモデリングについて検討した。

TAC 3 週間後には心室重量の増加, Myocyte cross-sectional area (MCA), Interstitial fibrosis の増大, ANP, BNP, β -MHC の re-expression, 超音波検査にて左室拡大, 左室肥大, 左室収縮能の低下が認められ, 左室の肥大, リモデリングの進行が示唆された。Bach1 KO マウスでは心室重量 (16%), MCA (36%), Tissue collagen content (38%) は減少し, 心室筋における ANP (75%), BNP (45%), β -MHC (74%) の発現は抑制された。Bach1 をノックアウトすることにより, 圧負荷前後において, 心室筋の HO-1 蛋白が up regulate され, 同時に HO 活性も増加していた。HO 阻害薬の投与を行ったところ, Bach1 ノックアウトにおける, 抗肥大効果, 抗リモデリング効果は消失した。

以上の所見より, Bach1 をノックアウトすることにより, cytoprotective に働く HO-1 を up regulate し, HO 活性を介して圧負荷による左室肥大, 左室リモデリングを抑制することが示唆された。

5. Suppressor of cytokine signaling1 inhibits pulmonary inflammation and fibrosis

(SOCS1 は肺における炎症と線維化を抑制する)

中島 拓

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (分子内科学)

SOCS はサイトカイン抑制分子として見出された。当科におけるこれまでの検討で SOCS1 は肺線維化の減弱に働くと考えられたため, *in vivo* での検討を行った。

SOCS1 ヘテロ欠損マウス (+/-) を用いたブレオマイシン (BLM) 肺傷害モデルを作成し肺の炎症, 線維化につき野生型と比較した。またヒト肺線維症 18 例の肺組織を用いて線維化と SOCS 発現の関連を検討した。さらにアデノウイルスベクターを用いた外因性 SOCS1 による肺線維化への影響を検討した。

SOCS1^{+/-} では, 野生型と比較し肺での炎症, 線維化が有意に増強した。ヒト肺組織を用いた検討では, SOCS1 発現は線維化が強い病態で減弱していた。外因性 SOCS1 投与により肺傷害は有意に抑制された。外因性 SOCS1 は肺組織における TNF- α の発現を有意に減少させ, このメカニズムが肺線維化抑制に対する主要因子であると考えられた。

6. Role of angiotensin II type 2 receptor in remodeling of the artery after wire injury in mice (ワイアー傷害後のマウス動脈リモデリングにおけるアンジオテンシン II タイプ 2 受容体の役割)

山本 佳征
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)

大腿動脈のワイアー障害モデルを用いて, 10-14 週の AT2 受容体ノックアウトマウスおよび野生型マウスでの血管傷害後再狭窄を観察し, 以下の結果を得た。1) 再内皮化や新生内膜の出現時期は両群で同様だった。2) ワイアー傷害後 28 日の標本において, 新生内膜の面積および細胞数は両群で有意差を認めなかった。中膜面積および細胞数は AT2KO で有意に高値だった。3) ワイアー傷害後 14 日の標本において, BrdU index は内膜においても中膜においても両群で同等だった。新生内膜は中膜に比べて著明に BrdU index は高値だった。4) ワイアー傷害から 2 時間後, 3 日後, 14 日後の中膜および 14 日後の新生内膜において TUNEL index は AT2KO にて有意に低値を示した。AT2 受容体のノックアウトはワイアー傷害後に中膜の血管平滑筋細胞のアポトーシスを抑制したが, 新生内膜の増殖には影響を与えなかった。

7. Regression analysis of maternal smoking effect on birth weight

(母親喫煙による出生時体重への影響に関する回帰分析)

克尤木 尼加提 (ケコム・ニジャト)
 展開医科学専攻病態情報医科学講座
 (計量生物研究分野)

少子化傾向が強まっている現代日本社会において、生まれてくる子供たちの健康度を維持することは重要な課題と考えられる。厚生労働省の調査によると日本の出生児の平均体重は、最近低下したと報告があった。その背景には、母親の妊娠前と妊娠中の日常生活習慣そして、多胎児の増加、早産及び胎児の子宮内発育遅延がその原因と示唆された。

本研究で我々は、妊産婦の喫煙実態の把握及び妊産婦の喫煙や受動喫煙の出生時体重への影響評価を行うことを目的とした。アンケート調査データに基づいて、出生時体重の対数変換値を応答変数とする重回帰分析を適用した。それは従来の解析とは異なり、出生時体重の生の値に対して各危険因子が乗法的な効果を持つものと考えたからである。また、背景要因の調整には比較的規模の大きい非喫煙群を用いて、バイアス調整を行った。以上のことより、喫煙は出生時体重低下に関して危険要因であり、妊娠中に喫煙をしなければ出生時体重の低下を抑制できることが示唆された。

8. *In vitro* cartilage formation using TGF- β -immobilized magnetic beads and mesenchymal stem cell-magnetic bead complexes under magnetic field conditions

(磁気ビーズ標識 TGF- β と骨髄間葉系幹細胞-磁気ビーズ複合体を用いた磁気ターゲティング法による軟骨形成)

本山 満
 展開医科学専攻病態制御医科学講座
 (整形外科学)

骨髄間葉系幹細胞 (以下 MSC) は様々な組織への分化能を有している。我々は磁気ターゲティング法を用いて、MSC と抗体付加磁気ビーズ (以下 IMB) との複合体 (以下 MIC) を作製し、10 ng/ml の TGF- β を含む培地で軟骨分化誘導が可能であることを報告している。今回この外磁場を利用した MIC の軟骨分化誘導において、新たに考案した磁気ビーズ標

識 TGF- β を局所集中的に作用させることが可能か否かについて検討した。磁気ビーズと抗 CD44 抗体をアミド結合させ IMB を作製した。この IMB と外磁場を用い MIC を選択的に採取した。また TGF- β を同様の機序で磁気ビーズで標識した。培養はペレット培養の手法を用い、TGF- β の濃度と種類により 4 群に分け、軟骨分化について検討した。TGF- β を磁気標識し、外磁場を用いることで 1 ng/ml の TGF- β で MIC の軟骨分化が可能であった。本研究により、外磁場を用いて磁気標識 TGF- β を局所に作用させることで、より低濃度の TGF- β で、MIC の軟骨分化を促進させる可能性が示唆された。

9. Tendon-bone insertion repair and regeneration using poly-glycolic acid sheet in the rabbit rotator cuff injury model

(ウサギ腱板損傷モデルを用いたポリグリコール酸シートによる腱骨付着部の修復および再生)

横矢 晋
 展開医科学専攻病態制御医科学講座
 (整形外科学)

【目的】ウサギ腱板欠損モデルに 2 種類の生体吸収材料を用いることにより腱骨付着部の再生を試みることである。

【方法】ウサギ棘下筋に腱骨付着部から 10 mm × 5 mm 大の欠損部を作製し、同部にポリグリコール酸 (以下 PGA) シートとポリ乳酸カプロラクトン (以下 PLC) シートを充填し、術後 16 週において再生腱様組織を組織学的、生体力学的に評価した。

【結果】PLC シートを用いた群では組織学的に腱骨付着部に線維軟骨組織は認めず、腱実質部においても成熟した腱は再生されなかった。一方、PGA シートを用いた群では線維軟骨様組織にて連続する腱骨付着部の再生を認めた。両グループともタイプ III コラーゲン主体の腱実質部であり、生体力学的評価では最大破断強度、ヤング率ともに正常腱組織と比較すると劣っていた。

【結論】吸収速度の速い PGA シートを用いることにより、正常に類似した線維軟骨様組織にて連続する腱骨付着部が再生された。

10. Magnetically labeled neural progenitor cells, which are localized by magnetic force, promote axon growth in organotypic cocultures

(神経前駆細胞磁気ビーズ複合体が磁場存在下で脊髄軸索伸長に与える影響)

濱崎 貴彦

展開医科学専攻病態制御医科学講座
(整形外科学)

本研究の目的は、脊髄損傷に対する磁気ターゲティング法を用いた神経前駆細胞投与法の開発で、その効果、機序を解明することである。

1. まず神経前駆細胞磁気ビーズ複合体は、神経前駆細胞の未分化な細胞特性(生存率、分化能)を保ちながら、外磁場への誘導能を獲得していることを、*in vitro* で確認した。
2. 続いて中枢神経の軸索再生を定量的に評価できる脳・脊髄器官共存培養系を用い、移植する神経前駆細胞数の脊髄軸索伸長に与える影響を検討したところ、神経前駆細胞は移植細胞数の増加に伴い組織周辺に数多く集積し、脳皮質より脊髄内に伸長した軸索数は濃度依存性に促進されていた。
3. さらに外磁場なしで複合体と非複合体を移植したところ、どちらの細胞も組織近傍に散在し、組織内で伸長した軸索数はほぼ同等で有意差を認めなかった。それに対し複合体を外磁場により組織周辺に集積させると軸索伸長は有意に促進されていた。

11. Gene-environment association of an *ITGB2* sequence variant with obesity in ethnic Japanese (日本民族の肥満に対するインテグリン β 2 遺伝子多型の遺伝・環境要因の関連について)

栗屋 智一

展開医科学病態情報医科学講座(公衆衛生学)

α M β 2 インテグリン欠損マウスに高脂肪食を与えると肥満を生じると報告がある。しかし、ヒトでインテグリン β 2 サブユニットの変異が肥満に影響しているという報告はない。我々は日本人と遺伝的背景は同様であるが生活習慣が欧米化している日系米人の二つの集団でインテグリン β 2 サブユニット遺伝子多型(rs235326)を調べ、その多型と肥満の関連を検討した。

日系米人(274人)で日本人(377人)に比べ年齢が有意に高く、肥満や糖尿病の有病率が高かった。インテグリン β 2 サブユニット遺伝子多型 rs235326 のアリル頻度は2群で同様であった。日系米人では多型と肥満との関連を年齢で調節した解析で TT は C

carrier に比べて3.29倍(95%CI 1.25-8.67)肥満の割合が高かったが、日本人では関連が認められなかった。

インテグリン β 2 遺伝子は食生活が欧米化している日系米人では肥満と関連することが示唆された。

12. GSK-3 β regulates proper mitotic spindle formation in cooperation with a component of the gamma-tubulin ring complex, GCP5 (GSK-3 β による GCP5 との結合を介した細胞分裂期における紡錘系形成の制御機構)

泉 七衣

創生医科学専攻放射線ゲノム医科学講座
(分子細胞情報学)

GSK-3 は細胞骨格を構成する微小管網のダイナミクスの制御に関与していることがわかっています。今回私たちは GSK-3 が微小管形成に関わる γ TuRC (gamma-tubulin ring complex) の構成因子である GCP5 と結合することにより、分裂期紡錘系形成を制御していることを新たに見出しました。RNAi を用いた実験から GCP5 を激減させた細胞においてその細胞内の γ TuRC 量が減少し、さらに γ チューブリンの分裂期セントロソームへの局在が阻害されることがわかりました。それに対して GSK-3 阻害剤を用いると、GCP5 及び γ チューブリンの分裂期セントロソームへの局在が増強され、それに伴い微小管形成が異常に増進されました。GCP5 の RNAi によりこの微小管の異常形成を抑えることができました。これには GSK-3 の活性が γ TuRC とセントロソームの結合を制御しているからであることわかりました。

13. Surface plasmon resonance biosensor detects the downstream events of active PKC β in antigen-stimulated mast cells (表面プラズモン共鳴バイオセンサーは抗原刺激されたマスト細胞において PKC β の活性化の下流に存在する現象を反映する)

田中麻衣子

創生医科学専攻探索医科学講座(皮膚科学)

表面プラズモン共鳴(Surface plasmon resonance: SPR)バイオセンサーは、分子間の結合を計測することに広く用いられている。これまで我々は、SPR バイオセンサーを用いて金属板上の細胞の活性化を無標

識・リアルタイムに検出できることを見出し、得られる SPR シグナルは、細胞の形態学的な変化を反映していないことを明らかにした。しかしながら、SPR シグナルがどのような細胞内シグナル伝達系に対応するのかについては明らかでない。そこで今回我々は、RBL-2H3 マスト細胞を用いて抗原刺激による細胞内シグナル伝達系と SPR シグナルとの関連について検討を行った。RBL-2H3 細胞に優性阻害型 Syk, LAT または Gads を過剰発現させ、比較的上流に位置す

るシグナル伝達分子の活性化を抑制すると、抗原刺激による SPR シグナルは著明に減弱した。次に、これらの分子の下流にあたる PKC を RBL 細胞に過剰発現させると、PKC β 以外の isoform は抗原刺激による SPR シグナルを逆に抑制した。一方、唯一 SPR シグナルを抑制しない PKC β に対する特異的 siRNA を発現させると、SPR シグナルの減弱が認められた。