

第514回 広島大学医学集談会：発表なし

第25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8月7日）

1. G to A hypermutation of hepatitis B virus （B型肝炎ウイルスの G to A 変異）

野口 千笑

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）

HIV では G から A への高頻度変異（G to A hypermutation）を来したゲノムがしばしば検出される。これは宿主蛋白 APOBEC3G の働きによりマイナス鎖 DNA が deamination を受けるため、宿主の抗ウイルス機構の一つとして注目されている。

B型肝炎ウイルス（HBV）は HIV と同じく複製過程に逆転写を含むが、通常のクローニングを行っても hypermutation を有するゲノムは全く検出されない。

本研究では、HBV の G to A 変異について検討し、肝細胞内で hypermutation が生じていることを見出した。さらに、インターフェロンが APOBEC3G の発現誘導、HBV 複製抑制と同時に hypermutation の増加を引き起こすことが明らかとなった。以上の結果から、この hypermutation 導入が HIV 同様 HBV に対しても生体のウイルス防御機構として機能している可能性が示された。

2. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 correlates with cell proliferation and renal injury in human glomerulonephritis （STAT3 はヒト糸球体腎炎において細胞増殖および腎障害と相関する）

荒川 哲次

展開医科学専攻病態制御医科学講座
（分子内科学）

【背景】STAT3 は細胞増殖に関与する転写因子である。今回、ヒト糸球体腎炎における STAT3 活性化の機序について検討した。

【方法】糸球体腎炎 45 例に対し、phosphorylated

STAT3（p-STAT3）免疫染色を用いて腎の糸球体および間質における STAT3 活性の評価を行い、STAT3 活性と各種パラメーターとの相関を検討した。

【結果】p-STAT3 陽性細胞数は、増殖性腎炎の糸球体および間質において有意な増加を認めた。また、p-STAT3 陽性細胞数は糸球体細胞数、PCNA 陽性細胞数、間質の線維化スコア及び腎機能とそれぞれ相関を認めた。

【考察】ヒト糸球体腎炎における STAT3 の活性化は、糸球体および間質の細胞増殖に関与していることが示された。STAT3 の活性化と臨床的および組織学的パラメーターとの相関は、STAT3 の経路が腎疾患の病因に対し重要な役割を担っていることを示唆するものである。

3. DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression （DEC1 は時計遺伝子の概日リズム位相を制御する）

中島 歩

展開医科学専攻病態制御医科学講座
（分子内科学）

【背景】分子時計のキーファクターである Bmal1, Clock は時計遺伝子の E-box（CACGTG）に結合して転写を促進し、PER, CRY, DEC は抑制的に働くことによって、24 時間の概日リズムを作り出す。しかし DEC1 の生理的役割には不明な点が多い。

【方法・結果】血清刺激によって mRNA レベルでの時計遺伝子の概日リズムを誘導した。Dec1 過剰発現により、E-box を持つ時計遺伝子の位相が後退した。また、これらの遺伝子の E-box には DEC1 が直接結合していた（ChIP assay）。一方、E-box を持たない時計遺伝子の位相はほとんど変化がなく、Per2 E'-box には DEC1 は直接結合しなかった。Luciferase assay の結果もこれと一致していた。Dec1 (-/-) 線維芽細胞では E-box を持つ遺伝子の位相が逆に前進した。Dec1 (-/-) マウスの行動解析では、

Dec1 (+/+) マウスと比較して、恒暗条件下における行動の周期が有意に長く、6時間の明暗周期の前進に対する適応が早まった。

【結論】DEC1は体内時計を正確に維持・調節する際に重要な役割を果たしていると考えられる。

4. One-year clinical outcomes of dialysis patients after implantation with Sirolimus-eluting coronary stents

(透析患者におけるシロリムス溶出性冠動脈ステント留置後1年の臨床成績)

岡田 武規

展開医科学専攻病態制御医科学講座

(分子内科学)

【背景】シロリムス溶出性冠動脈ステント (SES) の有効性は透析患者においては確立されていない。

【方法と結果】SESを用いて、2004年8月から2006年9月の間に経皮的冠動脈ステント留置術(PCI)を行った透析患者連続80症例を、2000年4月から2004年7月の間にベアメタルステント(BMI)を用いてPCIを行った透析患者連続124症例と比較検討した。SES留置後1年の重大心事故の発生率はSES群25.2%、BMS群38.2% ($p=0.048$)であった。多変量解析では、SES使用が、PCI後1年での重大心事故発生の独立した予測因子であった。サブグループ解析ではSESは小血管病変の患者、非糖尿病患者、高度石灰化病変を持たない患者で有効であった。

【結論】透析患者で、SESはPCI後1年での重大心事故の発生をBMSと比較して、ある程度抑えることが可能であった。

5. Engraftment of human hepatocytes in the livers of rats bearing bone marrow reconstructed with immunodeficient mouse bone marrow cells

(SCID化ラット肝臓へのヒト肝細胞の生着)

五十嵐友香

創生医科学専攻先進医療開発科学講座

(外科学)

我々はこれまでにヒト肝細胞キメラマウスを確立している。マウスは研究利用に限界があることからヒト肝細胞キメララットの作製を目指し研究を行った。

まず、ヌードラットに放射線照射後 SCID マウス

からの骨髄移植を施行し免疫不全 (SCID) 化した。ヒト肝細胞を SCID 化ラットに生着させるために、Retrorsine 投与、部分肝切除術の施行後に門脈からヒト肝細胞を移植した。肝組織の RT-PCR、免疫組織染色および血清中のヒトアルブミン濃度を同定し生着を評価した。

ヒト肝細胞を移植した SCID 化ラットにおいて、血清中にヒトアルブミンが、肝臓組織ではヒトアルブミンおよび各種 Cytochrome P450 の mRNA 同定され、免疫組織染色ではヒト肝細胞特異的抗体陽性のコロニーが観察された。

以上、適切な放射線照射と骨髄細胞移植の技術を用いることにより異種細胞であるヒト肝細胞を生着・増殖させることが可能であった。

6. Systemic glucocorticoid therapy reduces pain and the number of endoneurial Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF α)-positive mast cells in rats with a painful peripheral neuropathy.

(糖質コルチコイドの全身投与は末梢神経障害性疼痛を有するラットにおいて疼痛と神経組織内の TNF α 陽性肥満細胞数を抑制する)

林 玲子

展開医科学専攻病態制御医科学講座

(麻醉蘇生学)

臨床知見や基礎研究から、糖質コルチコイドが神経障害性疼痛の治療に有効である事が知られている。今回 chronic constriction injury を施術したラットを神経障害性疼痛モデルとして用い、術後5日目に10匹を2群に分け一方にトリアムシノロン (3 mg/kg)、他方に生理食塩水 (2 ml/kg) を投与し、術後14日目まで痛み行動の検査を行った。また免疫組織化学的手法を用い末梢神経の TNF α 、マクロファージ、肥満細胞を分析した。トリアムシノロン投与群では、有意に heat-hyperalgesia, mechano-allodynia が軽減し、同時に末梢神経における TNF α 陽性肥満細胞数を生理食塩水群に比して71.5% 有意に抑制した。これらの結果より、糖質コルチコイド投与による神経障害性疼痛の治療効果は、TNF α 陽性肥満細胞数を抑制することが作用の一部である可能性が示唆された。

7. Clinically relevant concentrations of olprinone reverse attenuating effect of propofol on isoproterenol-induced cyclic adenosine

monophosphate accumulation in cardiomyocytes (イソプロテレノール刺激で増加する心筋細胞内の cAMP 産生はプロボフォールの作用で減弱するが臨床使用濃度の塩酸オルプリノンはその作用を拮抗する)

黒川 博己
展開医科学専攻病態制御医科学講座
(麻酔蘇生学)

イソプロテレノール刺激で増加する心筋細胞内の cAMP 産生に対するプロボフォールの抑制作用と、オルプリノンによる臨床使用濃度での拮抗作用について実験した。ラット単離心筋細胞を用い cAMP は EIA を用いて測定した。結果は、イソプロテレノールもオルプリノンも濃度依存性に cAMP 産生を増加したが、オルプリノンでは臨床使用濃度の 10^{-7} M では有意な増加はなかった。プロボフォールはイソプロテレノール刺激により増加した cAMP を濃度依存性に抑制した。オルプリノン刺激時の cAMP は変化させなかった。オルプリノンは、臨床使用濃度でイソプロテレノール刺激に対するプロボフォールの cAMP 濃度上昇の抑制作用に拮抗した。以上、イソプロテレノール刺激で増加する心筋細胞内の cAMP はプロボフォールで減少したが、臨床使用濃度のオルプリノンはその作用を拮抗した。プロボフォールにより β AR シグナル伝達系が抑制されても、オルプリノンにより心機能改善が得られることが示唆された。

8. Hypoxia-induced upregulation of endothelial small G protein RhoA and Rho-kinase/ROCK2 inhibits eNOS expression

(血管内皮において低酸素下に誘導される低分子量 G 蛋白質 RhoA および Rho-キナーゼ/ROCK2 の発現上昇は eNOS 発現を抑制する)

金 洪国
創生医科学専攻病態探究医科学講座
(脳神経内科学)

【背景と目的】 RhoA の標的蛋白質である Rho-kinase は活性化型 RhoA との結合により活性化され、生理活性を示す。一酸化窒素 NO は、血管内皮において内皮型 NO 合成酵素 eNOS により合成される。本研究は、低酸素下の血管内皮細胞において eNOS の発現に RhoA と Rho-kinase が果たす役割につい

て検討した。

【方法】 ヒト上皮系 HEK293 細胞, 神経系 SH-SY5Y 細胞, ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC を用い, HUVEC に RhoA, Rho-kinase の発現ベクターおよび RhoA siRNA の導入後, 低酸素負荷と正常酸素下での各蛋白質発現について解析した。

【結果と考察】 上皮系細胞, 神経系細胞と異なり, HUVEC では低酸素負荷により RhoA の発現は増加した。HUVEC では低酸素負荷により Rho-kinase の発現は増加し, eNOS 発現は低下した。また, 活性化型 RhoA, 活性化型 Rho-kinase の発現により, eNOS 発現低下は促進され, RhoA の発現抑制, Rho-kinase と RhoA の結合阻害により, eNOS 発現低下は抑制された。血管内皮細胞において RhoA および Rho-kinase の抑制は eNOS の発現増加を通して血管機能の調節と維持に良いはたらきをする可能性が示唆された。

9. Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus

(単回の拘束ストレスは、ラット海馬における、脳由来神経栄養因子 (BDNF) の転写産物発現及びプロモーター領域のヒストンアセチル化のプロフィールに異なった変化を引き起こす)

淵上 学
創生医科学専攻先進医療開発科学講座
(精神神経医科学)

ストレスにより、脳内での遺伝子発現変動が報告され、ストレスに伴う海馬の BDNF 発現変動の機序を解明する目的で、急性拘束ストレスをラットに負荷し、BDNF 発現の検討、プロモーターのヒストンアセチル化の検討を行った。BDNF 発現変化とプロモーターのヒストン H3 のアセチル化の変化は相関しており、BDNF 発現の減少に、プロモーターのヒストン H3 のアセチル化の減少の関与が示唆され、それらの変化は、24 時間後にはすべて回復した。他のストレスモデルでは、異なる exon の減少や、異なるプロモーターのヒストン H3, H4 のアセチル化の変化が報告されており、ストレスによる BDNF の発現変動は、ストレス因により異なり、その相異はヒストン修飾の相異の関係していることが示唆された。また、全て

の変化は24時間後に回復し、ストレスによるBDNFの発現変化に、ヒストンアセチル化の変性が寄与していることも示唆された。

10. Decreased levels of ghrelin, cortisol, and fasting blood sugar, but not n-octanoylated ghrelin, in Japanese schizophrenic inpatients treated with olanzapine

(オランザピンにて治療を行った日本人の統合失調症入院患者において、活性型グレリンは変化がないが、グレリン・コルチゾール・空腹時血糖は減少する)

田中 和秀
創生医科学専攻先進医療開発科学講座
(精神神経医科学)

抗精神病薬オランザピン (OLA) 誘発性の体重増加の機序解明のため、28例の統合失調症 (SZ) 患者にOLAを16週投与し体重、糖代謝系、脂質代謝系、食欲制御ペプチドの変化を計測した。服用中の抗精神病薬は2wで漸減中止し、OLAを漸増し20 mg/dayの投与とした。抗精神病薬以外の薬剤は変更せず、食事は研究期間中一定とした。OLA投与開始前、開始4・8・16週間後に、身体検査 (体重・BMI)、血液生化学検査、精神症状の評価 (PANSS) を施行し、比較検討した。精神症状の評価では、陽性・陰性尺度、総合点数とも有意に改善した。体重やBMIには有意な変化はなかったが、空腹時血糖値や遊離脂肪酸値は有意に減少した。グレリン値は、8、16週後で有意に減少し、活性型グレリン値に有意な変化はなかった。慢性SZ入院患者ではOLA長期投与による体重増加が誘発されず、グレリン値も有意に減少することが示された。

11. Accuracy of sonographic elastography in the differential diagnosis of enlarged cervical lymph nodes: comparison with conventional B-mode sonography

(腫大頸部リンパ節の良悪性鑑別における超音波エラストグラフィの正診率：従来法Bモード法との比較)

Farzana Alam
展開医科学専攻病態情報医科学講座
(放射線医学)

【目的】腫大頸部リンパ節の良悪性鑑別における超音波エラストグラフィ (弾性検査) の正診率を従来法Bモード法との比較において検証すること

【方法】37名の患者からの85ヶのリンパ節 (悪性: 53, 反応性: 32) に対してエラストグラフィ, Bモード法を施行した。エラストグラフィはリンパ組織の弾性, 分布性状, 割合により5 pattern に分類した (1: 軟性~5: 硬性)。Bモード法はリンパ節の短径, 形状, 辺縁性状, 輝度, リンパ門の有無の5つの診断基準を設け, 加算方式とした。ROC解析により良悪性の診断基準を設定し, エラストグラフィでは分類3~5を, Bモード法はスコア7~10を悪性とした。

【結果】感度/特異度/正診率はBモード法で98% / 59% / 84%, エラストグラフィで83% / 100% / 89%, 両者の組合せでは92% / 94% / 93%であった。

【結論】高い特異度のエラストグラフィと, 高い感度のBモード法を組み合わせることにより, 腫大頸部リンパ節の転移診断能を向上させることが可能であることが示唆された。

12. Magnetic force-assisted meniscal resection under arthroscopy

(磁力を利用した関節鏡視下半月板切除法)

湯川 岳夫
展開医科学専攻病態制御医科学講座
(整形外科)

【背景・目的】鏡視下半月板切除術において, 半月板の損傷部位によっては, 視野が十分に得られず切除困難となる例が存在する。本研究では, 外から与えた磁力による半月板断端の操作性を関節鏡視下に検証し, 臨床応用の可能性について検討した。

【方法】豚の膝関節4膝を摘出した後, 関節を展開し, 半月板に縦断裂を作製し, 鏡視用のポータルを作製した。半月板の遊離断端を金属クリップで把持した後, 外磁場発生装置を用いて関節外から磁場を形成した状態で, 関節鏡視下半月板切除を行った。

【結果】半月板の遊離断端を把持した金属クリップと関節外から加えた磁力により, 半月板の遊離断端を鉗子で把持することなく, 様々な方向に随意的に牽引することが可能であり, 半月板切離部の視認および切除が容易となった。

【考察・結論】今回の方法は, 鏡視下半月板切除術において有用であり, 臨床的にも応用可能と考えられた。

13. Neurodevelopmental abnormalities associated with severe congenital neutropenia due to the R86X mutation in the *HAX1* gene
(*HAX1* 遺伝子の R86X 変異による中枢神経系異常を合併する重症先天性好中球減少症)

石川 暢恒
展開医科学専攻病態情報医科学講座
(小児科学)

【緒言】アポトーシス抑制因子 *HAX1* は、近年重症先天性好中球減少症 (SCN) の原因遺伝子の一つとして同定された。本研究では *HAX1* を含む SCN の原因遺伝子解析を行い、その臨床像を検討した。

【方法・結果】18例の SCN の遺伝子解析を行い、11例に *ELA2* 遺伝子変異、5例に *HAX1* 遺伝子変異を同定した。*HAX1* 変異群5例のうち、3例は R86X 変異のホモ接合体、2例は同胞で R86X 変異と 376-434del の複合ヘテロ変異であった。R86X 変異を持つ全例で精神発達遅滞が認められた。てんかんは R86X ホモ接合体の3例に認められた。なお、*ELA2* 変異群には神経系異常を呈する症例は存在せず、血液学的所見については18例間で差異は認められなかった。

【結語】*HAX1* の R86X 変異により SCN に加えて、精神発達遅滞及びてんかんを発症することが示された。*HAX1* が中枢神経系発達に重要な役割を果たすことが示唆された。

14. High frequency of *AML1/RUNX1* point mutations in radiation-associated myelodysplastic syndrome around Semipalatinsk Nuclear Test Site.

(セミパラチンスク核実験場近郊住民の骨髓異形成症候群 (MDS) において *AML1/RUNX1* 点変異は高頻度である)

Zharlyganova DINARA
展開医科学専攻病態情報医科学講座
(線量測定・評価研究分野)

In this study, we investigated the *AML1* mutations in radiation-exposed patients with MDS/AML among the residents near the Semipalatinsk Nuclear Test Site (SNTS), where the risk of solid cancers and leukemias were increased due to the

radiation effects.

We collected smear slides of bone marrow aspiration from 125 cases with hematological diseases. There were 73 cases from the hospitals in the vicinity of SNTS, including 36 cases of acute myeloid leukemia (AML), 5 cases of acute lymphoid leukemia (ALL), 2 cases of chronic myeloid leukemia (CML), 5 cases of refractory anemia of myelodysplastic syndrome [MDS (RA)] and 25 cases of MDS/AML. Fifty-two cases diagnosed in Astana City Hospital (non-exposed area) included 14 cases of AML, 3 cases of ALL, 15 cases of CML, 7 cases of MDS (RA) and 13 cases of MDS/AML. All patients near the SNTS were divided into four radiation dose groups according to their total effective doses; (1) high level group (greater than 300 mSv), (2) middle level group (50 to 300 mSv), (3) low level group (0.1 to 50 mSv), and (4) negligible level group (less than 0.1 mSv). Patients born long after atmospheric or surface nuclear explosions were classified in the negligible group. We analyzed exons 3 through 8 of the *AML1* gene by PCR-SSCP assay using genomic DNA and confirmed mutations by sequence analysis. *AML1* point mutations were identified in 7 patients, all of them with MDS/AML. No *AML1* mutation was found in the patients with MDS (RA), AML, ALL and CML. *AML1* point mutations were detected in 7 of 18 (39%) radiation-exposed MDS/AML patients. In contrast, no *AML1* mutation was found in 13 cases of unexposed MDS/AML. The frequency of *AML1* mutations in radiation-exposed patients with MDS/AML was significantly higher compared with unexposed patients ($p < 0.05$).

These results suggested that radiation might contribute to the development of MDS/AML through *AML1* mutations among the residents near the SNTS. We also found a significant correlation between individual estimated doses and *AML1* mutations. Considering these results, *AML1* point mutations might be a specific biomarker that differentiates radio-induced MDS/AML from spontaneous MDS/AML.

15. Activation of KIF4A as a prognostic biomarker and therapeutic target for lung cancer

(KIF4A の肺癌における予後マーカー, 治療標的としての役割)

谷脇 雅也
展開医科学専攻病態制御医科学講座
(分子内科学)

肺癌に対する Laser Microbeam Microdissection (LMM) を用いた cDNA マイクロアレイによって, 肺癌で高頻度に高発現しているキネシンモーターファミリーに属する蛋白である KIF4A を同定した。KIF4A は精巢のみに発現を認める癌精巢抗

原であり, 組織マイクロアレイによる検討によって, KIF4A の発現が高い非小細胞肺癌患者は有意に予後不良であることが示された。また, KIF4A に対する siRNA を用いた発現阻害実験で, 肺癌細胞の増殖と強く関わることを示された。KIF4A は予後と強く関わることから癌の悪性度にも関わることを考え, matrigel invasion assay によって, KIF4A を強制発現させた細胞では有意に浸潤能が亢進することを示した。以上から KIF4A は肺癌に対する分子標的薬, 癌ワクチン, 予後マーカー開発において有望な蛋白であると考えられた。