

## 第518回 広島大学医学集談会：発表なし

## 第29回 広島大学大学院医歯薬学総合研究科発表会（医学）

（平成21年5月7日）

### 1. Detection of CpG island hypermethylation of caspase-8 in neuroblastoma using an oligonucleotide array

（オリゴアレイを用いた神経芽腫におけるカスパーゼ8のCpG領域のメチル化解析）

上松瀬 新  
展開医科学専攻病態制御医科学講座  
（外科学）

神経芽腫をはじめさまざまな進行した悪性腫瘍において、アポトーシスシグナルの一つである caspase8 はメチル化により不活性化されていることが明らかになってきている。

当科に保存されている神経芽腫の凍結標本のうち DNA と RNA が十分に採取できた症例 70 例を用いて caspase8 の遺伝子領域におけるメチル化を簡易アレイを用いて検出し検討した。簡易アレイは、スライドグラスにポリカルボジイミド樹脂処理を行い未修飾 DNA オリゴマーをスポットした（Carbo Station™, Nisshinbo Industries Inc.）自作のオリゴアレイで caspase8 発現との相関、臨床学的データ、予後との相関を検証した。

caspase8 の CpG 領域のメチル化は臨床データと有意に相関し、今回我々が開発したオリゴアレイは簡便にメチル化を検出することが可能で、神経芽腫の予後判定の一助として有用であると考えられた。

### 2. 15-Deoxy-D<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> inhibits angiotensin II-induced fibronectin expression via hepatocyte growth factor induction in human peritoneal mesothelial cells

（アンジオテンシン II 刺激下培養ヒト腹膜中皮細胞における HGF を介した 15d-PGJ<sub>2</sub> のファイブロネクチン産生抑制効果）

横山 敬生  
展開医科学専攻病態制御医科学講座  
（分子内科学）

近年、内因性 PPAR $\gamma$  アゴニストである 15d-PGJ<sub>2</sub>、および Hepatocyte growth factor (HGF) の線維化抑制効果が示唆されているが、腹膜線維化においては十分解明されていない。我々はすでに、ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) において Angiotensin II (Ang II) 刺激により Fibronectin (FN) 発現が亢進することを報告した。同実験系において、15d-PGJ<sub>2</sub> が FN 発現を抑制し、HGF およびその受容体である c-Met が関与するという仮説を Real-time PCR 法、Western Blotting 法を用いて検証した。HPMC には PPAR $\gamma$  が存在し、PPAR $\gamma$  アゴニスト (15d-PGJ<sub>2</sub>, pioglitazone) により HGF 発現は亢進した。15d-PGJ<sub>2</sub> 添加では、細胞内産生だけでなく上清への分泌も亢進した。同 HGF 産生は Ang II 存在下でも誘導され、PPAR $\gamma$  アンタゴニストの共培養により抑制された。HGF にて FN 発現が抑制され、c-Met のリン酸化が亢進した。同様に 15d-PGJ<sub>2</sub> 添加でも同リン酸化が亢進した。FN 発現は 15d-PGJ<sub>2</sub> により抑制され、c-Met のリン酸化阻害下においてその抑制効果が減弱した。以上から、15d-PGJ<sub>2</sub> は HPMC において抗線維化作用を有し、その抑制経路として HGF/c-Met の関与が示唆された。

### 3. Maternal postpartum learned helplessness (LH) affects maternal care by dams and responses to the LH test in adolescent offspring (産褥期母ラットにおける学習性無力は、母ラットの養育行動及び成長後の仔ラットの学習性無力試験に対する反応に影響を与える)

倉田 明子  
創生医科学専攻先進医療開発科学講座  
（精神神経医科学）

うつ病モデルの学習性無力 (LH) を用い、産褥期早期に LH を呈する母ラット (LH 母) の養育行動及び、成長後の仔の LH のリスクと視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系を検討した。LH 母では非学習

性無力母(nLH 母)に比べ積極的養育が低下していた。6週齢の LH 母の仔は nLH 母の仔に比べ LH になる傾向が強く、LH 試験の結果と自身が受けた積極的養育に負の相関があった。LH 母の仔では基礎的な海馬 glucocorticoid receptor (GR) mRNA が nLH 母の仔より低下し、LH 試験後も血漿 corticosterone、海馬 GR mRNA が低下していた。以上から、産褥期母ラットの LH は積極的養育を低下させ、この養育の低下を介して成長後の仔の LH リスクを高めることが示唆された。また産褥期母の LH が仔の LH リスクを高める機序として、海馬 GR を介した HPA 系負のフィードバック障害が関与する可能性が考えられた。

#### 4. Regeneration of peripheral nerve after transplantation of CD133+ cells derived from human peripheral blood (ヒト末梢血由来 CD133 陽性細胞移植による末梢神経再生)

來嶋也寸無  
展開医科学専攻病態制御医科学講座  
(整形外科学)

【目的】ヒト末梢血から単離した CD133 陽性細胞をラット坐骨神経欠損モデルに移植し、末梢神経再生効果を検討した。

【方法】ヒトより採取した末梢血から CD133 陽性細胞、単核球をそれぞれ抽出し、免疫不全ラットの左坐骨神経 15 mm の欠損モデルに移植した。シリコンチューブにアテロコラーゲンゲル (AC) と PBS で充填し架橋したものを PBS 群、AC に単核球  $1 \times 10^5$  個を充填したものを MNC 群、AC に CD133 陽性細胞  $1 \times 10^5$  個を充填したものを CD133 群とした。移植後 8 週にて再生組織の評価を行った。

【結果】肉眼的な組織架橋形成は CD133 群では全例に、MNC 群では 5 例、PBS 群では 2 例のみに認められた。再生組織の有髄線維数、軸索直径、髄鞘幅、神経組織率を 3 群間で比較すると CD133 群は他群と比べ有意に神経再生が促進されていた。

【考察】CD133 陽性細胞の強力な末梢神経再生効果が確認された。

#### 5. Clonally expanded T lymphocytes from A-bomb survivors *in vitro* show no evidence of cytogenetic instability

(試験管内でクローン増殖させた原爆被爆者 T リンパ球は染色体不安定性を示さない)

濱崎 幹也  
創生医科学専攻病態探究医科学講座  
(細胞遺伝学)

放射線から受けた傷を修復した後、何世代も経過した細胞に誘導されるゲノム不安定性については数多くの報告があり、放射線晩発障害機構の本質ではないかと考える研究者も多い。しかし、ヒト正常細胞に関する報告はまだ十分ではない。そこで本研究では高線量原爆被爆者とその対照者から得られた末梢血 T リンパ球をそれぞれ試験管内でクローン増殖させ、培養中に生じた付加的な染色体異常の頻度から、ヒトにおける放射線誘発ゲノム不安定性の検討を行った。末梢血 T リンパ球のクローニングにより得られた 66 クローン (高線量被曝群 36 個、対照群 30 個) について培養中に生じた付加的な染色体異常を多色 FISH 法で解析したところ、交換型染色体異常で、かつ安定型染色体異常である転座 (t) と派生染色体 (der) の合計頻度は被曝群でやや高い傾向が見られたが、統計学的に有意な差は認められず、放射線誘発ゲノム不安定性の存在を示す明瞭な結果は得られなかった。

#### 6. Genetic ablation of the Bach1 gene reduces hyperoxic lung injury in mice: role of IL-6 (Bach1 遺伝子欠損マウスでは高濃度酸素による肺傷害が IL-6 の作用により軽減される)

谷本 琢也  
展開医科学専攻病態制御医科学講座  
(分子内科学)

Bach1 ノックアウト (KO) マウスは HO-1 の過剰発現により酸化ストレスに抵抗性を示す。しかしながら、高濃度酸素肺傷害における役割はまだ解明されていないため、高濃度酸素環境下での生存期間と肺傷害の程度を野生型マウスと比較した。Bach1 KO マウスでは、生存期間が有意に長く、肺傷害も軽度であったが、HO-1 の阻害剤投与はこれらに影響しなかった。一方、気管支肺胞洗浄液 (BALF) の IL-6 濃度は高値であり、IL-6 に対する siRNA の肺内投与により BALF の IL-6 濃度が減少し生存期間が短縮した。さらに、クロマチン免疫沈降により Bach1 が IL-6 プロモーター領域に結合し、酸化ストレスにより離脱する

ことも示された。以上から, *Bach1* は IL-6 遺伝子のリプレッサーである可能性があり, *Bach1* KO マウスの高濃度酸素環境下での IL-6 過剰発現が肺傷害を軽減することが示唆された。

7. Effects of interconnecting porous structure of hydroxyapatite ceramics on interface between grafted tendon and ceramics  
(ハイドロキシアパタイトセラミックスの連通孔構造が移植腱とセラミックスの境界に及ぼす効果について)

大前 博路  
展開医科学専攻病態制御医科学講座  
(整形外科学)

本研究の目的は多孔体ハイドロキシアパタイトセラミックスの連通孔構造の違いが, 移植腱とセラミックスとの境界部に及ぼす変化について検討することであった。日本白色家兎 20 羽の膝関節面に作成した骨欠損部に, 2 種類の連通性の異なる多孔体セラミックスと腱との複合体を移植して比較した。連通性が豊富なセラミックスでは腱との境界部の孔内に血管を含んだ豊富な結合組織が伝導され, 孔内の結合組織から腱に膠原線維が連続性を有していた。腱のセラミックスからの引き抜き強度は, 連通性が豊富なセラミックスでは, 連通性が乏しいセラミックスに比べて有意に大きかった。多孔体セラミックスは連通孔構造が豊富であれば, その孔内に伝導された結合組織を介して移植腱と生物学的な境界部を有することが可能であった。このことは腱の付着部を含んだ骨欠損部を, 連通孔構造が豊富な多孔体セラミックスを用いて再建することが可能であることを示唆していた。

8. Cigarette smoking abolishes ischemic preconditioning-induced augmentation of endothelium-dependent vasodilation  
(喫煙は虚血性プレコンディショニングが誘発する内皮依存性血管拡張反応の改善効果を消失させる)

中村 秀志  
展開医科学専攻病態情報医科学講座  
(循環器内科学)

我々は虚血性プレコンディショニング (IPC) 刺激

の反復が一酸化窒素や内皮前駆細胞の増加を通じて内皮依存性血管拡張反応を増大させることを示した。本研究の目的は喫煙者の内皮機能に対する IPC の効果を調べることである。15 人の喫煙者と 15 人の非喫煙者におけるアセチルコリン (ACh) とソディウムニトロプルシッド (SNP) に対する前腕血流反応を刺激前と 4 週後で評価した。IPC 刺激は非喫煙者の内皮前駆細胞の数と遊走反応を増大させ, ACh に対する前腕血流の反応も増加させたが, 喫煙者ではいずれも変化がなかった。SNP に対する前腕血流反応は IPC 刺激前後で同等であった。NG-モノメチル-L-アルギニンにより非喫煙者では ACh に対する前腕血流反応が IPC による改善効果が消失した。以上から IPC は健康人の内皮機能保護効果を示したが, 喫煙者では内皮依存性血管拡張反応における IPC の改善効果が消失することを示した。

9. Changes in the agr locus affect enteritis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*  
(agr 遺伝子座の変化が MRSA 腸炎発症に影響する)

杉山 陽一  
展開医科学専攻病態制御医科学講座  
(外科学)

【はじめに】MRSA 腸炎は術後感染症の重大な原因であり, 最も重篤な疾患の一つである。本研究においては agr 遺伝子に着目し, その mRNA 発現の定量, シークエンスおよび毒素産生と MRSA 腸炎との関連を検討した。

【結果】定量 RT-PCR 法では, RNAII 発現量は腸炎・非腸炎群において違いがみられなかったものの RNAIII, *agrA*, *tst* 遺伝子および TSST-1 発現は有意に増加していた。PFGE で同一 genotype の株においても同様の傾向であった。シークエンス解析では, 全ての腸炎起因株において変異を検出した。腸炎起因株の多くは agr A 領域において同一変異を認めた。

【まとめ】以上の結果から, agr 遺伝子座での変異が MRSA 腸炎発症に関与していると考えられた。特に, 多くの腸炎起因株において agr A の C 末端における同一変異がみられたことから, この変異が agr A 発現量に大きく関与している可能性が示唆された。