

## 第524回 広島大学医学集談会：発表なし

## 第35回 広島大学大学院医歯薬学総合研究科発表会（医学）

（平成 22 年 8 月 5 日）

1. Expression and distribution of glucocorticoid isoforms in eosinophilic chronic rhinosinusitis  
（好酸球性副鼻腔炎におけるグルココルチコイドレセプターアイソフォームの発現と局在）

竹田 和正  
展開医科学専攻病態制御医科学講座  
（耳鼻咽喉科・頭頸部外科学）

【概論】グルココルチコイドレセプター  $\beta$  ( $GR\beta$ ) はステロイド抵抗性に関わりが報告されている。我々は好酸球性副鼻腔炎における  $GR\beta$  の発現と局在について検討を行った。

【方法】試料は当科で慢性副鼻腔炎患者 12 例と好酸球性副鼻腔炎患者 8 例に対して行った鼻副鼻腔手術の際に採取された副鼻腔粘膜を用いた。 $GR\alpha$  陽性炎症細胞数と  $GR\beta$  陽性炎症細胞数を免疫染色組織切片を画像解析する事により測定した。

【結果】 $GR\beta$  の発現は主に粘膜下に散在する炎症細胞において認められた。また、好酸球性副鼻腔炎においては篩骨洞粘膜での  $GR\beta$  の発現比率が慢性副鼻腔炎に比較して有意に高かった。

【考察】篩骨洞に特に強い病変を認める好酸球性副鼻腔炎において、 $GR\beta$  の発現が特に強く篩骨洞に認められたことは、ステロイド抵抗性の好酸球性副鼻腔炎の病因への関与を示唆している。

2. Gradient magnetic-field topography reflecting cortical activities of neocortical epilepsy spikes  
（傾斜磁場トポグラフィーは新皮質てんかん患者におけるてんかん棘波の脳表活動範囲を示す。）

白水 洋史  
創生医科学専攻先進医療開発科学講座  
（脳神経外科学）

傾斜磁場トポグラフィー（GMFT）は、脳磁図解析における新しい手法である。一般的な脳磁図解析である等価電流双極子（ECD）解析と異なり、脳磁場

活動を経時的空間的に表現することができる。これを新皮質てんかんのてんかん棘波解析に応用し、その有用性について検討した。当院にて切除手術を行った難治性新皮質てんかん患者 8 例を対象とし、GMFT 解析結果、ECD 解析結果、頭蓋内電極による解析結果、手術切除範囲および術後発作転帰について検討した。これらの分布を比較した結果、てんかん棘波の立ち上がり部分での GMFT（GMFT（O））の分布と頭蓋内電極解析により導き出された発作起始部位（IOZ）の分布との関連性に、術後発作転帰と有意な関連が見られた。本研究で、GMFT 解析が経時的空間的なてんかん棘波解析に優れていること、および新皮質てんかん患者のてんかん棘波解析において有用であることが示された。

3. Expression of phosphoprotein enriched in astrocytes 15kDa (PEA-15) in astrocytic tumors: a novel approach of correlating malignancy grade and prognosis  
（星細胞系腫瘍における phosphoprotein enriched in astrocytes 15kDa (PEA-15) の発現；悪性度と予後と相関する新たなアプローチ）

渡邊 陽祐  
創生医科学専攻先進医療開発科学講座  
（脳神経外科学）

Phosphoprotein Enriched in Astrocytes-15kDa (PEA15) は、アストロサイトにて発見されたリン蛋白で、転写活性因子やアポトーシスの制御などに関与している。

【目的】アストロサイトが起源である星細胞系腫瘍にて PEA15 の発現と悪性度や生命予後の相関を検討する。

【方法】対象は 1998 年より 2008 年までに、手術を施行した成人テント上星細胞腫（A）12 例、退形成星細胞腫（AA）9 例、膠芽腫（GBM）44 例、計 65 例である。PEA15 の発現は免疫組織化学染色を行い、悪性度および生存期間との相関を検討した。

【結果】PEA15低発現 23例, 高発現 42例であった。高発現の症例の割合は, Aは100%, AAは88.9%に対し, GBMは50%であり, GBMはA及びAAに比し有意に高発現の症例が減少した ( $p=0.0006$ )。単変量解析, 多変量解析にてPEA15高発現の症例は有意に生存期間の延長を認めた ( $p=0.0034$ ,  $p=0.0024$ )。

【結論】星細胞系腫瘍においてPEA15の発現は悪性度と逆相関し, 転帰と相関した。

#### 4. Evaluation of Apoptosis and Immunohistochemical Expression of the Apoptosis-related Proteins in Mesothelioma (中皮腫におけるアポトーシスの評価とアポトーシス関連蛋白の免疫組織化学的発現)

金 龍男

展開医科学専攻病態情報医科学講座  
(病理学)

【目的】中皮腫における増殖・進展に, アポトーシスを制御するアポトーシス関連蛋白の消長がいかに関与しているかを検討する。

【材料・方法】34例の中皮腫組織標本と3種類の中皮腫細胞株のセルブロックを対象とし, アポトーシスについてはTUNEL法, bax, bcl-2, survivin, caspase-3, cleaved caspase-3の発現は免疫組織化学的染色を用いて検討した。また, 各10例の肺癌, 胃癌, 大腸癌の組織標本をアポトーシスの頻度の対照とした。Survivinについては, 3種類の中皮腫細胞株にてreal time RT-PCR方法によるmRNAの発現とwestern blot法による蛋白の発現も検討した。

【結果と考察】中皮腫組織におけるアポトーシスの平均インデックスは17.6で, 肺癌, 胃癌, 大腸癌より顕著に低かった。中皮腫細胞では細胞質におけるbax, survivin, caspase-3の発現は高頻度に認められたが, bcl-2の発現は乏しく, cleaved caspase-3は殆ど発現していなかった。中皮腫細胞株では, survivinのmRNAと蛋白の発現を確認できた。以上の結果から, 中皮腫においてsurvivinの高発現によって生じるアポトーシスの抑制が, その増殖に関連していることが示唆された。

#### 5. Aberrant promoter methylation of *WIF-1* and *SFRP-1, 2, 4* genes in mesothelioma

(中皮腫における *WIF-1*, *SFRP-1, 2, 4* 遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化)

河野 秀和

展開医科学専攻病態情報医科学講座  
(病理学)

【背景】中皮腫は侵襲的な悪性腫瘍で, プロモーター領域のメチル化により遺伝子発現は抑制される。遺伝子発現の網羅的解析を行い, 発現低下を示した遺伝子のメチル化を検討した。

【方法】46中皮腫組織で, *WIF-1* と *SFRP1, 2, 4* 遺伝子のメチル化 (MSP) と *WIF-1* 蛋白 (免染), 8中皮腫細胞株で, 脱メチル剤による *WIF-1* 蛋白 (Western blot, 免染), m-RNA発現 (RT-PCR), Wntシグナル経路の  $\beta$ -catenin 遺伝子蛋白発現 (免染) と変異 (sequencing) の有無を検討した。

【結果のまとめ】中皮腫では, *WIF-1* 遺伝子は, 非腫瘍部肺組織と比べて72倍の発現低下を認めた。*WIF-1* のメチル化は, 有意に高い頻度 (73.9%) で認められ, メチル化を認めた症例の多くで蛋白発現低下を認め, 脱メチル剤投与によって中皮腫細胞株での *WIF-1* の蛋白, mRNA 発現が回復したことは, 中皮腫において *WIF-1* 遺伝子はメチル化によりサイレンシングされていることが示唆された。 $\beta$ -catenin が, 核に発現せず変異も認めないことから, *WIF-1* 遺伝子のメチル化が Wnt- $\beta$ -catenin 経路とは関係しないことが考えられる。

#### 6. Rapamycin enhances chemotherapy-induced cytotoxicity by inhibiting the expression of TS and ERK in gastric cancer cells

(胃癌細胞株における TS および ERK 発現抑制による rapamycin の化学療法細胞毒性の増強)

重松 英朗

創生医科学専攻放射線ゲノム医科学講座  
(腫瘍外科)

Rapamycin は mammalian target of rapamycin (mTOR) を選択的に阻害する分子標的治療薬であり, G1 arrest, 血管新生阻害作用および apoptosis 誘導作用を有する。mTOR 経路の活性化は多くの胃癌症例で認められていることより, われわれは胃癌細胞株に対する rapamycin の抗腫瘍効果および作用機序を検証した。胃癌細胞株として TMK-1, MKN-28, MKN-45 および MKN-74 細胞株を用いた。Rapamycin 単剤投与による G1 arrest 作用, 抗癌剤の抗腫瘍効果増強が確認された。Rapamycin 投与により 5-FU の標

的酵素である TS の発現が時間依存的および用量依存的に減少することを確認し、ドセタキセルとの併用において TS 発現がさらに抑制されることを確認した。TMK-1 においてドセタキセルと rapamycin 併用において ERK1/2, 4E-BP1 の抑制効果およびアポトーシス経路の活性化が確認された。これらの結果から mTOR 阻害剤が胃癌治療における新しい選択肢となりうるものと考えられた。

#### 7. Endogenous estrogen may prevent bone loss in postmenopausal hemodialysis patients throughout life

(閉経後血液透析患者の生涯を通じ、内因性エストロゲンは骨量減少を妨げる可能性がある)

杉屋 直子

展開医科学専攻病態制御医科学講座  
(分子内科学)

【背景】血液透析女性は腎性骨症と閉経後骨粗鬆症の骨脆弱化因子を持つが、エストロゲンをはじめとしたホルモン環境や骨代謝には不明な点が多い。

【方法】112名の閉経後血液透析患者のエストラジオール、テストステロン、性ホルモン結合グロブリン (SHBG), intact-PTH, 骨代謝マーカー、橈骨骨密度 (BMD) を測定。エストラジオールとSHBGより free estrogen index (FEI) を算出。12ヶ月後 BMD 年変化率を計算。慢性腎臓病のない25名の閉経後女性を対照群とした。

【結果】血液透析患者は対象群と比較しエストラジオールが高値であった。ステップワイズ多変量解析で BMD Z-score・BMD 年変化率に独立して影響する因子は、ともにFEIで正の相関であった。

【結論】閉経後血液透析患者の内因性エストロゲン値は閉経後健常女性より高く、生涯を通じ骨量減少を妨げる働きをもつ可能性がある。

#### 8. Plasma mRNA concentrations of placenta-specific 1 (PLAC1) and pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) are higher in early-onset than late-onset pre-eclampsia

(母体血中の placenta-specific 1 (PLAC1) と pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) mRNA 濃度は早発型妊娠高血圧症候群において遅発型妊娠高血圧症候群よりも上昇している)

児玉 美穂  
展開医科学専攻病態制御医科学講座  
(産科婦人科学)

【目的】妊娠高血圧症候群の早発型と遅発型における母体血中胎盤特異的 mRNA 濃度の違いを検討した。さらに胎盤組織における発現量に違いがあるかを検討することを目的とした。

【方法】母体血および胎盤組織からRNAを抽出し placenta-specific 1 (PLAC1) と pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) の発現量を定量し検討した。

【結果】母体血中胎盤特異的 mRNA 濃度は妊娠高血圧症候群において上昇しており、早発型において著明であった。胎盤組織における mRNA 発現量には差がなかった。

【結論】妊娠高血圧症候群での母体血中胎盤特異的 mRNA 濃度の上昇は胎盤絨毛障害によって血液中に漏出している mRNA が増加しているためであると考えられた。早発型での母体血中胎盤特異的 mRNA 濃度の著明な上昇から早発型で胎盤絨毛障害がより高度であると推測された。

#### 9. Maternal breast milk odour induces frontal lobe activation in neonates: a NIRS study

(母乳の匂いにより誘発される新生児の前頭葉活動：近赤外分光法を用いた検討)

青山 志緒里  
展開医科学専攻病態情報医科学講座  
(小児科学)

嗅覚は愛着といった社会的相互作用において重要な役割を果たす。特に母乳の匂いは、新生児特有の反応を導くことがこれまでの行動観察法によって示されてきた。近赤外分光法 (NIRS) は、脳の神経活動とリンクする酸素化ヘモグロビンの濃度変化を非侵襲的にモニタリングする脳機能測定法である。本研究では、NIRS を用いて、新生児の前頭葉活動に対する母乳と人工乳の匂いの影響を比較することで、新生児の母乳への反応を脳機能の側面から検討した。同時に2つの匂い強度の差による影響を検討するため、強度を操作した人工香料に対する反応も検討した。

母乳の匂いは人工乳より有意に大きい賦活を示した。匂いの強度は賦活の違いに影響を与えなかった。それぞれ哺乳経験による差は認められなかった。これ

らから、匂いの強さ、匂いの経験にも関わらず、新生児は母乳と人工乳を区別し、母乳により強く反応していることが確認された。

10. Establishment of functional telomerase immortalized human hepatocytes and a hepatic stellate cell line for telomere-targeting anticancer drug development  
(テロメアを標的とした抗癌剤開発のための不死化肝細胞および肝星細胞の樹立)

脇 浩司  
 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)

我々は hTERT 遺伝子導入で不死化肝細胞 (Hc3716-hTERT) および不死化肝星細胞 (NPC2-hTERT) を樹立した。また、これらの細胞は分化機能および正常細胞としての性質を維持していた。

テロメアを標的とした抗癌剤である telomestatin は癌細胞で G-tail を短縮しアポトーシスを誘導することを報告してきたが、正常細胞でも高濃度では growth arrest を誘導する。これらテロメアを標的とする薬剤開発において、*in vivo* で使用する前に、細胞毒性を予測する細胞モデルが必要であると考えられる。そこで、樹立した不死化肝細胞で telomestatin 処理を行い、G-tail 長を G-tail telomere HPA 法で測定した。25  $\mu$ M の高濃度で、G-tail は短縮し、growth arrest が観察された。Telomestatin 処理による G-tail 短縮による肝細胞分化機能変化を調べた結果、ALB の発現は低下し、CYP3A family の発現も低下した。これらは親株と同様な変化であった。我々が樹立した不死化細胞は、分化能、正常性を維持し、大量に供給可能であり、テロメアを target とした抗癌剤開発において、有用な細胞モデルになりうると考えられた。

11. Is structural remodeling of fibrillated atria a consequence of tissue hypoxia?

(心房細動における心房の構造的リモデリングは組織の低酸素状態により引き起こされるのか?)

尾木 浩  
 展開医科学専攻病態情報医科学講座  
 (循環器内科学)

【背景】マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMPs) は細胞外基質の分解と修復に重要で、我々は心房細動 (AF) で MMP-9 が心房で増加する事を報告したが、機序は明らかではない。

【方法と結果】心臓手術中に 38 人の右心耳を採取し、AF の既往がある 13 人を AF 群、既往のない 25 人を洞調律 (RSR) 群とした。両群の血管内皮増殖因子 (VEGF)、VEGF receptor-1 & 2、低酸素誘導因子 (HIF)-1 $\alpha$  の発現をウェスタンブロット、real-time PCR、免疫染色で検討した。VEGF の蛋白と mRNA、HIF-1 $\alpha$  の蛋白、VEGF receptor-1 の mRNA は AF 群で有意に増加、免疫染色では AF 群で心房の動脈周囲に HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、MMP-9 の過剰発現を認めた。

【結論】AF の心房で VEGF と HIF-1 $\alpha$  の発現が増加していた。HIF-1/VEGF が MMP-9 の増加に関与している可能性がある。

12. Detection of Inappropriate Samples in Association Studies by an IBS-based Method Considering Linkage Disequilibrium between Genetic Markers

(関連解析における遺伝マーカー間の連鎖不平衡を考慮した IBS を用いた不良サンプルの検出法)

安東 正貴  
 展開医科学専攻病態情報医科学講座  
 (計量生物研究分野)

ありふれた疾患の感受性遺伝子を探索する関連解析においては、血縁関係のサンプルや混合サンプルに起因する不良サンプルの影響により、第 1 種の過誤の増大や検出力の低下を引き起こす。本研究においては、不良サンプルを検出する手法として、遺伝マーカー間の連鎖不平衡 (LD) を考慮した IBS (Identity-by-state) を用いた検出法を提案した。数値シミュレーションにより、提案法を用いて不良サンプルを検出するために必要な SNP 数を導出し、研究対象の SNP 数が少ない場合は先行研究における手法よりも検出性能が優れていることを示した。また、提案法を実際の胃がんの関連解析のデータへ適用し、連鎖不平衡を考慮することの有効性を示すと共に、きょうだい関係と考えられる不良サンプルを検出することができた。これらの結果により、関連解析における不良サンプルの検出において提案法が有効であること示した。

13. Clinical course and outcome of heart transplant recipients; *Single Center's Experience at National Cardiovascular Center*

(本邦の心臓移植患者の臨床経過および転帰：国立循環器病センター単施設における検討)

小田 登

展開医科学専攻病態情報医科学講座  
(循環器内科学)

【背景】本邦での心移植のうち39.1%が国立循環器病センター(NCVC)で施行されている。これまでに本邦での心移植後経過をまとめた報告はなく、本邦における心移植後患者の経過、予後、合併症などは明らかにしていない。

【方法】NCVCで心移植を施行された、術後1年以内の1名を除く26名を対象とし、臨床的背景、移植後経過、予後、合併症について、国際心肺移植学会(ISHLT)レジストリーと比較検討した。

【結果】本邦の心移植後患者はISHLTレジストリーと比較して、長期予後は非常に良好であった。移植後慢性期合併症の発生率は、移植後冠動脈病変を除いて、有意に低かった。加えて本邦での移植待機期間および左心補助人工心臓補助期間は、近年、延長傾向であった。

【考察】本邦での心移植後患者の経過は、患者コンプライアンスの良さなどから、概ね良好であった。しかしながら移植後冠動脈病変の発生は同等であり、今後も注意深い観察が必要であると考えられた。

14. Dosimetric verification of the anisotropic analytical algorithm in lung equivalent heterogeneities with and without bone equivalent heterogeneities

(骨等価媒質有無による肺等価媒質中におけるanisotropic analytical algorithmの線量検証)

小野 薫

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)

放射線治療計画装置Eclipse(Varian社)に搭載された線量計算アルゴリズム, anisotropic analytical

algorithm(AAA)について、不均質領域における線量計算精度の検証を行った。骨、肺、および水等価ファントムにより構成された不均質層ファントム内のAAAによる深部線量百分率(percent depth dose, PDD)は、モンテカルロ計算(MCNP4C)と比較し概ね3%以内の差であった。ただし、骨等価ファントムを含む大きな照射野では、最大誤差約5%と、やや大きな線量計算誤差を認めた。不均質領域におけるAAAの計算精度は非常に高精度であり、臨床使用において有用であることが分かった。ただし、条件によっては、やや大きい計算誤差を示しており、これらの線量計算誤差の原因として、密度の異なる媒質間においてエネルギースペクトルが顕著に変化したことが考えられた。

15. Search for transmembrane protein in gastric cancer by the *Escherichia coli* ampicillin secretion trap: expression of DSC2 in gastric cancer with intestinal phenotype

(CAST(*Escherichia coli* ampicillin secretion trap)法を用いた胃癌特異的膜蛋白質の探索：腸型粘液形質を有する胃癌におけるDSC2の発現)

阿南 勝宏

創生医科学専攻放射線ゲノム医科学講座  
(分子病理学)

癌特異的に発現し、分泌・膜蛋白質をコードする遺伝子を新規に同定することは、癌の新しい診断法、治療法の開発に重要である。本研究では、分泌・膜蛋白質をコードする遺伝子を効率的に同定できるCAST法を用いて、胃癌細胞株に特異的に発現する30遺伝子を新たに同定し、その中で膜蛋白質をコードするdesmocollin 2(DSC2)に着目した。免疫組織化学的な検討では、DSC2はStage I/IIの症例、分化型胃癌で有意に陽性率が高かった。深達度、リンパ節転移、予後との相関は認めなかった。各種粘液形質マーカーとの関連では、MUC2と有意な相関を示した。さらに、CDX2との間にも有意な相関を示し、DSC2の発現がCDX2により誘導されることも確認された。以上より、DSC2は胃癌において腸型粘液形質の発現に関与していることが示された。

16. BMI-1 expression is enhanced through transcriptional and posttranscriptional regulation during the progression of chronic myeloid leukemia

(慢性骨髄性白血病の進行に伴い BMI-1 の発現は転写及び転写後調節により亢進する)

Joyeeta Bhattacharyya  
 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)

**Background:** BMI-1, a member of PcG genes play a critical role in regulating the activity of hematopoietic stem and progenitor cells. BMI-1-overexpression predicts poor prognosis in myelodysplastic syndrome (MDS) as well as in patients with AML and CML. Chronic myeloid leukemia (CML) resulting from the neoplastic transformation of a hematopoietic stem cell is characterized by three clinical phases: chronic phase (CP), accelerated phase (AP) and blastic crisis (BC). We aimed to verify whether BMI-1 expression in CD34 (+) cells can be used as a molecular marker for monitoring disease progression in patients with CML.

**Materials and Methods:** 3 CML-BC cell lines (K562, KT1, and BV173), HEK-293 cells and samples from 61 patients (53 bone marrow and 8 peripheral blood samples) were used. CML cell lines were analyzed for BMI-1 expression by Western blot and Flow cytometry. HEK-293 cells were transfected with BCR-ABL. Western blot and RT-PCR helped in determining *BMI-1*, mRNA and BMI-1 protein

expression. RQ-PCR and Flow cytometry was performed to analyze the *BMI-1* mRNA and BMI-1 protein expression in CD34+ cells in CML patients. **Results and conclusion:** BMI-1 expression was found to be augmented in all CML-BC cell lines examined. To determine the relevance of BMI-1 with disease progression, BMI-1 expression in CD34 (+) cells at each of the CP, AP, and BC was examined. Interestingly, the level of BMI-1 expression was significantly higher in CP than in controls, which further increased during the course of the disease progression (control-5.33%; CP-36.93%; AP and BC-76.41%). When HEK 293 cells were transfected with BCR-ABL expression vector, not only the BMI-1 protein expression but also BMI-1 mRNA level was amplified *in vitro*, suggesting that BMI-1 was positively regulated by BCR-ABL. Curiously, mRNA level for BMI-1 were almost consistent during the disease progression from CP to BC (control-2.21; CP-9.77; AP and BC-9.70). This difference between BMI-1 protein and mRNA in CD34 (+) cells led us to speculate that BMI-1 is regulated at the posttranscriptional level in the course of disease progression. BMI-1 expression was augmented after treatment with proteasomal inhibitors (LLnL-26  $\mu$ M, 52  $\mu$ M and MG132-20  $\mu$ M) in HEK-293 as well as in K562 cells, which is derived from patients with BC. Our findings suggest that BCR-ABL mediated induction of BMI-1 could be involved in the development of CML and further its transition from CP to BC. We also suggest the usefulness of BMI-1 expression in CD34 (+) cells as a molecular marker for monitoring patients with CML.