

# 広島大学医学集談会

(平成17年2月3日)

## —学位論文抄録—

1. Liver sinusoidal endothelial cells contribute to alloreactive T-cell tolerance induced by portal venous injection of donor splenocytes  
(肝類洞内皮細胞はドナー脾細胞門脈投与によるドナー特異的免疫寛容に関与する)

時田 大輔

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (外科学)

ドナー脾細胞門脈投与によって誘導される特異的なT細胞の免疫寛容に肝類洞内皮細胞 (LSEC) が関与することを検討した。

Balb マウスをレシビエント, B6 マウスをドナーとして脾細胞の門脈投与後心臓移植を行うと, 門脈投与を行わず移植した群に対し, 生着日数は有意に延長した。

LSEC の表面抗原を解析すると, 抗原提示細胞 (APC) 様であり, 色素染色した B6 脾細胞を Balb に門脈投与すると, 約20%の LSEC がエンドサイトーシスし MHC Class II は増強していた。

B6 の脾細胞を門脈投与した Balb の LSEC をトランスウェルに単層に敷き詰め, ナイーブな Balb の T細胞を重層培養しトランスウェルを通過移動 (トランスマイグレート) させると, 無処置の Balb の LSEC をトランスマイグレートしてきた T細胞に比し, ドナー抗原に感作した Balb の APC に対する反応性は抑制され, この免疫抑制効果はドナー特異的であった。

2. Interaction of ligand-receptor system between stromal-cell-derived factor-1 and CXCR4 chemokine receptor 4 in human prostate cancer: a possible predictor of metastasis  
(ヒト前立腺癌における, SDF-1 と CXCR4 によるリガンド-レセプター機構の相互作用: 転移予測因子の可能性)

望月 英樹

創生医科学専攻病態探究医科学講座 (分子発がん制御)

【目的】前立腺癌の転移における SDF-1 と CXCR4 の役割について検討した。

【方法】ヒト前立腺癌細胞株 (LNCaP, PC3, DU145), 正常前立腺上皮細胞 (PrEC) における CXCR4 の発現を RT-PCR, ウェスタンブロットング法で検索した。PC3, DU145 にて migration assay, MTT assay を行い, SDF-1 に対する遊走能, 増殖能を評価した。前立腺癌組織を用い, 抗 CXCR4 抗体による免疫組織化学染色を行った。

【結果】CXCR4 の発現は, すべての前立腺癌細胞株で認められたが, PrEC では認めなかった。SDF-1 は DU145, PC3 の遊走能を有意に活性化させたが, 増殖能には影響しなかった。前立腺癌組織の57%が CXCR4 陽性であり, PSA 高値例で骨転移に有意な相関が認められた。

【結論】前立腺癌の転移に SDF-1 と CXCR4 の相互作用が関与していることが示唆された。

3. Activator protein accelerates dihydropyrimidine dehydrogenase gene transcription in cancer cells  
(Activator protein は癌細胞において dihydropyrimidine dehydrogenase 遺伝子の転写を促進する)

右近 圭

医学系研究科外科系病態治療専攻 (腫瘍外科学)

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) は抗癌剤 5-FU の減成酵素である。5-FU 応答の個体差予測を念頭に DPD 遺伝子 (*DPYD*) 発現調節機構の解明を試みた。まず, ヒト胎盤ゲノムライブラリーより *DPYD* 5' 上流域をクローニングし, 全長およびその欠失変異体のルシフェラーゼレポーターを作製し, 胃癌および形質転換腎細胞株への遺伝子導入実験を行った。その結果, 様々な転写調節領域の存在が示唆された。そのうち, -304~-279 領域は, PMA および ionomycin 処理による AP-1 の活性化を介した *DPYD* 転写活性化および発現量増加において重要であることが, real time RT-PCR, reporter assay, EMSA や immunoblotting にて確認された。*DPYD* 発現調節因

子としての PMA, ionomycin, さらに転写因子 AP-1 の同定は新発見であり, 5-FU 個別化化学療法の確立に貢献するものと考えられた。

#### 4. Influence of *Chlamydia pneumoniae* infection on aortic stiffness in healthy young men (*Chlamydia pneumoniae* 感染が若年健常男性の動脈硬化度に与える影響)

田崎 直仁

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (分子内科学)

【目的】 *C.pneumoniae* 感染が若年健常男性の動脈硬化度に与える影響について検討し, *C.pneumoniae* 感染が動脈硬化形成の初期段階に関与しているかどうかを明らかにすること。

【方法・対象】 若年健常男性102例を対象とした。動脈壁硬化度の評価は上腕一足首間の脈波伝播速度 (PWV) を用いて行い, *C.pneumoniae* 抗体価と PWV との関係について検討した。

【結果】 *C.pneumoniae* IgA 抗体陽性群は陰性群より PWV が有意に高く, さらに IgA 抗体陽性群を CRP の中央値により低値群と高値群に分類すると, 高値群の方が低値群より PWV が有意に高かった。多変量解析では IgA 抗体が陽性でかつ CRP が高値群であることが, PWV 高値であることの独立した予測因子であった。

【結論】 *C.pneumoniae* 感染は慢性炎症の関与により動脈硬化形成の初期段階に影響を与えている可能性が示唆された。

#### 5. Liver sinusoidal endothelial cells have a capacity for inducing nonresponsiveness of T cells across major histocompatibility complex barriers (肝類洞内皮細胞は同種異系 T 細胞の無反応性を誘導する能力を持つ)

尾上 隆司

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (外科学)

肝臓は免疫寛容性をもつ臓器とされ, この寛容性を *in vitro* で解析した。

まずマウス肝構成細胞群の分離法を確立した。類洞内皮細胞は抗 CD105 抗体で分離し, 免疫染色, 表面抗原で確認した。

次に分離肝構成細胞各分画を CFSE 染色した異系脾細胞と混合培養した。

全肝構成細胞を刺激細胞とすると, T 細胞増殖を認

めずアポトーシスしており, 肝内皮細胞を除去すると T 細胞の著しい増殖を認めた。さらに内皮細胞を再添加すると T 細胞増殖抑制効果が認められ, 細胞接触が必要であった。類洞内皮細胞を通過した B6 マウスリンパ球を Balb マウス脾細胞で再刺激すると Balb マウス類洞内皮を通過した T 細胞だけが増殖抑制され, さらに Balb-FasL ミュータントマウス類洞内皮細胞では特に CD4+T 細胞の増殖抑制が消失した。

まとめ: 肝類洞内皮細胞は反応性 T 細胞を MHC 特異的に寛容化し, その機序には Fas ligand が関与していた。

#### 6. Pulse wave velocity predicts cardiovascular mortality —finding from the Hawaii · Los Angeles · Hiroshima study—

(脈波伝播速度は心血管死亡の予測因子となりうる —ハワイ・ロサンゼルス・広島医学調査の結果から—)

荘川 知己

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (分子内科学)

【背景】 PWV と一般健診受診者における死亡予測因子の関係は明らかでない。

【目的】 ハワイ・ロサンゼルス・広島医学調査を受診した日系米人において, PWV 値が心血管死亡の予測因子となりうるか否かを検討した。

【方法】 対象は492名 (男性: 220名, 女性272名)。調査項目は身長, 体重, 血圧, 安静時標準12誘導心電図, 血液検査 (血清脂質, 血清尿酸値, 血糖値), PWV 値。

【結果】 PWV 低値群 ( $\leq 9.9$  m/s) 290例と PWV 高値群 ( $> 9.9$  m/s) 202例に分割し検討。10年後の心血管死亡回避生存率は PWV 低値群0.997, PWV 高値群0.993。単変量解析で年齢, PWV, 糖尿病が心血管死亡と関連していたが, 多変量解析では PWV 値 (相対危険度4.24, 95%信頼区間: 1.39–12.96,  $p < 0.01$ ) と糖尿病 (相対危険度2.27, 95%信頼区間: 1.13–4.54,  $p < 0.05$ ) が予測因子であった。

#### 7. Induction of apoptosis by ionizing radiation and CI-1033 in HuCCT-1 cells

(HuCCT-1 細胞株における放射線照射および CI-1033 添加時のアポトーシス誘導)

村上 正哲

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)

【背景】CI-1033 は EGF レセプターファミリーのチロシンキナーゼ阻害剤である。

【目的】ヒト胆管癌細胞株である HuCCT-1 に対し、CI-1033 添加、および放射線照射を併用した際のアポトーシス誘導に関し検討した。

【方法】CI-1033 添加および放射線照射施行時のアポトーシス誘導能の変化を flow cytometry を用い解析した。同時に、アポトーシス関連蛋白の変化を Western blot 法で検討した。

【結果】CI-1033 添加を先行させ、後に放射線照射を施行した場合、アポトーシス細胞は62.6%と著明に増加した。その際、Fas リガンド発現の増加および Bid の活性化を認めた。

【結語】HuCCT-1 において、放射線照射に先行する CI-1033 添加により、Fas リガンド発現の増加および Bid の活性化に起因すると思われるアポトーシスが誘導された。

#### 8. Dynamic cytoplasmic anchoring of the transcription factor Bach1 by intracellular hyaluronic acid binding protein IHABP

(細胞内ヒアルロン酸結合蛋白 IHABP による転写因子 Bach1 の動的細胞質アンカリング)

山崎 力

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (外科学)

ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) は抗酸化ストレス作用を有する。通常は転写抑制因子 Bach1 が HO-1 エンハンサー領域上の MARE 配列に結合し、その発現を抑制する。カドミウムなどの酸化ストレスやヘム濃度の上昇により、Bach1 がこの配列からはずれ転写活性化因子 Nr2 が結合し、HO-1 の発現が誘導される。Bach1 はヘムやカドミウム応答性の核外排出シグナルを有し、さらに細胞質貯留に必要な領域を有する。

酵母ツーハイブリッド法により、この領域への結合蛋白として細胞内ヒアルロン酸結合蛋白 (IHABP) を同定した。IHABP は Bach1 の細胞質貯留に必要な領域と結合し、両者は微小管上でファイバー状に共局在した。FRAP 分析により両者は異なる微小管結合特性を有した。IHABP により Bach1 の転写抑制作用は減弱し、IHABP の過剰発現で内在性 HO-1 が誘導された。

以上より、IHABP は Bach1 を細胞質の微小管上に動的にアンカリングし、さらに HO-1 などの Bach1 標的遺伝子の発現を調節することが示唆された。

#### 9. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats

(マクロファージ浸潤の抑制はラット肝星細胞の活性化および肝線維化を抑制する)

今村 道雄

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)

変異型 TGF- $\beta$ II 型受容体発現 adenovirus (AdT $\beta$ -TR), 変異型 MCP-1 発現 adenovirus (Ad7ND) をラットに静注し肝臓内の TGF- $\beta$ , MCP-1 のシグナルを阻害後 (コントロール: AdLacZ), dimethylnitrosamine (DMN) を投与し、肝線維化を惹起した。コントロール群は、マクロファージ浸潤および星細胞の活性化を認め、著明な肝線維化を呈した。Ad7ND 群では、マクロファージ浸潤は抑制され、星細胞は活性化せず、健常肝と同程度であった。AdT $\beta$ -TR 群では、マクロファージ浸潤、星細胞の活性化はコントロール群と同程度であったが、活性化星細胞はアポトーシスにより消失し、線維化は起こらなかった。星細胞の活性化は、マクロファージから産出される因子によると思われ、MCP-1 ブロックはこれを阻害し、線維化を抑制するのに対し、TGF- $\beta$  ブロックは活性化星細胞をアポトーシスにより排除することで線維化を抑制すると思われた。

#### 10. Intravenously injected neural progenitor cells of transgenic rats can migrate to the injured spinal cord and differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes

(経静脈的投与により神経前駆細胞は脊髄損傷部に到達し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化した)

藤原 靖

展開医科学専攻病態制御医学講座 (整形外科学)

神経前駆細胞は脊髄損傷動物モデルへの移植治療における有効性が報告されているが、これまでの実験では損傷脊髄に直接注射針で細胞を注入しているものが多く、安全性および移植細胞の脊髄実質への移行性の点で疑問があった。そこで、演者らはラット脊髄損傷モデルに対して経静脈的に神経前駆細胞を試みた。GFP 陽性トランスジェニックラット胎仔海馬由来の神経前駆細胞を用い、追跡した結果、経静脈的に移植された神経前駆細胞は未分化な状態を保ったまま脊髄損傷部に到達していることが示された。さらにニュー

ロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化が認められ、これらの細胞は8週の時点でも生着していた。このことから、移植細胞は脊髄損傷部において分化能力を維持しており、神経前駆細胞経静脈的投

与法はこれまでの局所投与法と同様に脊髄損傷治療に有用で、かつ局所に対してより低侵襲な方法となりうる可能性が示唆された。