

広島大学医学集談会

(平成17年2月21日)

——学位論文抄録——

小倉 良夫

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (外科学)

1. Attenuation of telomerase activity by hammerhead ribozymes targeting human telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase in pancreatic carcinoma cells

(ヒトテロメラーゼ鋳型 RNA およびヒトテロメラーゼ逆転写酵素を標的としたハンマーヘッド型リボザイムによる膵癌細胞におけるテロメラーゼ活性抑制の検討)

林谷 康生

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (外科学)

【目的】膵癌に対するリボザイムのテロメラーゼ活性抑制について検討した。

【対象・方法】対象は膵癌培養細胞, PK-8 とした。

1. hTR を標的としたリボザイムを導入, テロメラーゼ活性を検討, 2. hTR または *hTERT*mRNA を標的としたリボザイムを発現するベクターを導入, テロメラーゼ活性, hTR, *hTERT*mRNA の発現を検討, 3. 染色体外自己複製能を有する *hTERT*mRNA を標的とするリボザイム発現ベクターを導入, テロメラーゼ活性を検討した。

【結果】リボザイムの直接導入でテロメラーゼ活性の低下を認め, リボザイム発現ベクターでは *hTERT*mRNA を標的とすることでより強いテロメラーゼ活性の抑制効果を認めた。hTR, *hTERT*mRNA の測定では, それぞれの標的 RNA の発現低下を認めたが, 他方の RNA ではむしろ上昇を認めた。染色体外自己複製能を有するベクターでは更に強いテロメラーゼ活性の抑制効果を認めた。

【考察】リボザイムを安定して発現する事がテロメラーゼ活性を抑制する上で重要であると考えられた。

2. Intracellular cytokine patterns of peripheral blood T cells as a useful indicator of activeness of Crohn's disease

(Crohn 病活動性指標としての末梢血 T 細胞細胞内サイトカインパターン解析)

クローン病 (CD) では局所のサイトカイン産生異常が指摘されているが, 末梢血リンパ球のサイトカイン産生は一定の見解が得られていない。我々は29例の CD 患者の末梢血中 T 細胞 CD45RO 及び各種サイトカイン (Interferon (IFN)- γ , Tumor necrosis factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)) を解析した。CD ではリンパ球数 (Ly), T 細胞数, ヘルパー T 細胞数 (hT), 細胞障害性 T 細胞数 (cT) で有意に低値を示した。CD を二群 (active CD (aCD), quiescent CD (qCD)) に分類すると, Ly, T 細胞数, hT, cT, CD45RO+ T 細胞数では有意差はなかった。aCD と qCD 間でサイトカイン産生細胞数を比較したところ, helper T 細胞では aCD で Th1-associated cytokine (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF) 産生細胞数が有意に多かった ($p=0.0097$, $p=0.0203$, $p=0.0118$)。CD では全体として免疫系の抑制が認められ, 末梢血中の特定のサイトカイン産生 T 細胞が病態の活動性に関連していた。今後末梢血 T 細胞の解析がクローン病活動性のより有用な指標となることが期待できる。

3. The role of angiogenesis, especially VEGF, in pancreatic ductal carcinoma

(膵癌における血管新生因子, 特に VEGF, の役割について)

1) Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival

(膵癌における血管新生因子の発現について: 臨床病理学的, 生命予後に関する検討)

2) Gemcitabine suppresses malignant ascites of human pancreatic cancer: correlation with VEGF expression in ascites

(Gemcitabine によるヒト膵癌の悪性腹水の抑制: 腹水中の VEGF 発現との関連について)

桑原 健一
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)

【背景と目的】 膵癌の種々の血管新生因子の発現を検討して有用な予後因子となるマーカーを明らかにすることを目的とした。続いて、現在、切除不能膵癌に対して使用されている抗癌剤である Gemcitabine を用いて、その効果及び腹水中 VEGF の変化を検討した。

【方法と結果】 膵癌切除検体における VEGF, FGF-2, PD-ECGF および CD34 の発現を免疫組織学的染色で検討したところ、VEGF の発現率と微小血管密度および生命予後は有意な相関を認めた。次に、ヒト膵癌細胞株 SUIT-2 をマウスの腹腔内に注入し、Gemcitabine の腹腔内投与群、非投与群にて腹水の量、腹膜播種の結節数の計測し、腹水中の VEGF の発現量を ELISA 法にて検討した。投与群において、腹水の量、腹膜播種の結節数の抑制を認め、腹水中 VEGF も、投与群で有意な抑制を認めた。VEGF は膵癌の悪性腹水や腹膜播種の形成に関わり、Gemcitabine の腹腔内投与が悪性腹水や腹膜播種の治療として有効である可能性が示唆された。

4. Immunological study on cholangitis complicated colitis

(腸炎に合併する胆管炎の免疫学的研究)

1) Immune response in mouse experimental cholangitis associated with colitis induced by dextran sulfate sodium

(デキストラン硫酸ナトリウムにより惹起される腸炎に合併するマウス胆管炎モデルにおける免疫反応)

2) Therapeutic Role of Repeated stimulation of Natural Killer T Cells in Mouse Cholangitis Complicated with Colitis

(腸炎に合併するマウス胆管炎における NKT 細胞の反復刺激の治療的可能性)

沼田 義弘
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)

原発性硬化性胆管炎 (PSC) の原因は不明だが、その多くに炎症性腸疾患が合併するため、腸炎と胆管炎を同時に合併するモデルは PSC の病態解明に有用である。本研究の目的は実験腸炎モデルで胆道病変の検討を行い、腸炎に合併する胆管炎の免疫学的なメカニズムを解析し、新しい視点から治療戦略を検討することである。

デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) により CD-1 マウスに腸炎を誘導すると1/3に門脈域の炎症がみとめられ、表面抗原とサイトカインの解析から Th1 優位の炎症と NKT 細胞の関与が示唆された。この炎症は NKT 細胞の反復刺激により軽快した。肝由来の単核球では CD4/CD8 比の低下、NKT 細胞、NK 細胞の減少がみとめられ、培養上澄中の interferon- γ も低下していた。

DSS 腸炎に合併する胆管炎は Th1 優位であり、NKT 細胞の反復刺激で炎症が減弱し、同細胞を標的とする新たな治療法の可能性が示唆された。

5. Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver

(C型肝炎ウイルスコア蛋白は脂肪酸代謝を修飾し肝の脂肪蓄積を生じる)

山口 厚
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)

C型肝炎ウイルス感染においてはウイルス蛋白発現が病態を修飾していることが示唆されている。HCVcore 蛋白発現による脂質代謝に与える影響を脂肪酸代謝関連酵素と核内レセプターに焦点をあてて検討した。

【方法】 HCVcore 蛋白発現プラスミドを HepG2 に発現させ細胞内 TG 濃度と脂肪酸代謝関連酵素の発現量を評価した。HCVcore 蛋白組みかえアデノウイルスを C57BL/6 に投与し肝の中性脂肪 (TG)、脂質過酸化物質 (TBARS)、脂肪酸代謝関連酵素の mRNA 量を評価した。

【結果】 細胞レベルでは TG 濃度は、対照群と差を認めなかった。MTP, MDR3, PPAR γ が対照に比べ低下していた。マウスにおいて core 蛋白発現にて肝内 TG 量は増加した。AOX, CPT, MDR2, PPAR α , PPAR γ の低下を認めた。肝内 TBARS も増加した。

【考察】 HCVcore 蛋白発現にて脂肪蓄積を認め脂肪酸 β 酸化の律速酵素 (CPT, AOX)、胆道リン脂質分泌に必須な MDR3 の低下を認めた。これらを転写レベルで制御している PPAR α の低下も認め、連動して働く可能性が示唆された。脂肪蓄積とともに脂質過酸化物質も増加しており、HCVcore 発現と脂肪肝、酸化ストレスの発生が HCV 感染の病態に関与していると考えられた。

6. Ubiquitin-interacting motifs of Epsin are involved in the regulation of insulin-dependent endocytosis (Epsin のユビキチン結合モチーフはインスリン依存性エンドサイトーシスの制御に関与する)

杉山 真一郎

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)

Epsin はレセプターのエンドサイトーシスを制御する重要な分子である。Epsin が受けるユビキチン化という翻訳後修飾はエンドサイトーシスの調節に必要である。さらに、Epsin は二つの UIM: ユビキチン結合モチーフを有している。本研究では Epsin の UIM について、その機能とエンドサイトーシスにおける役割の解析を行った。

Epsin は UIM においてユビキチン化蛋白質と結合した。またこの結合にはどちらか一方の UIM では不十分で、二つの UIM の両者が必要であった。さらに UIM は Epsin 自身のユビキチン化にも重要であった。UIM 変異体である EpsinDA を恒常的に発現させた細胞では野生型 Epsin と異なり、インスリン受容体のエンドサイトーシスに影響しなかった。従って UIM はインスリン受容体のエンドサイトーシスの制御に重要であることが示唆された。

7. Polymorphism of the *MUC1* mucin gene is associated with susceptibility to lung adenocarcinoma and poor prognosis (*MUC1* ムチン遺伝子の多型は肺腺癌の疾患感受性と不良な予後に関する)

満田 一博

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (分子内科学)

MUC1 は腺癌に過剰に発現している膜蛋白であり、tandem repeat と呼ばれる繰り返り配列の回数による長さの多型が知られている。今回、肺癌患者と非癌呼吸器病患者および健常者との genomic DNA による MUC1 の tandem repeat 長の多型について検討を行った。

非癌呼吸器病患者および健常者の MUC1 の tandem repeat 長の中央値 (2280 bp) にて、2280 bp より大きいものを L、それ以下を S と分類し、遺伝子型と各症例との関係を比較した。肺腺癌患者は有意に遺伝子型の LL の割合が多く、また健常者は SS が多かった。肺腺癌患者と健常者との間にも有意な分布の偏りを認

めた。また、肺腺癌患者の予後と遺伝子型の検討では、LL の方が LS+SS に比べ予後不良だった。つまり、長い MUC1 は肺癌の疾患感受性や予後に影響を与える可能性が示唆された。

8. TGF- β 1 induced by high glucose is controlled by angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blocker on cultured human peritoneal mesothelial cells

(ヒト腹膜中皮細胞において高濃度グルコースによって誘発される TGF- β 1 はアンジオテンシン変換酵素阻害薬およびアンジオテンシン II 受容体拮抗薬によってコントロールされる)

久傳 康史

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (分子内科学)

腹膜の線維化に関与するメカニズムを明らかにするため、ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) において高濃度グルコースで誘発される TGF- β 1 に対するアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) およびアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) の効果を検討した。

HPMC においてアンジオテンシン II (AII) 産生経路の mRNA の発現が認められ、それらはグルコース濃度の増加にしたがい有意に増加した。また、培養上清における AII と TGF- β 1 の産生は増加し、細胞活性・増殖は減少した。ACEI と ARB を添加すると TGF- β 1 の産生増加および細胞活性・増殖の減少は有意に抑制された。その効果は ACEI と ARB の併用添加でより効果的であった。

本研究の結果は CAPD 患者における腹膜機能低下および線維化の予防、治療に ACEI および ARB が有益である可能性を示唆した。

9. Activation of human SII cortices during exploratory finger movement and hand clenching tasks

(手指の探索動作及び手掌把握課題におけるヒト二次体性感覚野の活性化)

堀江 ノブコ

創生医科学専攻病態探究医科学講座 (脳神経内科学)

ヒトの一次感覚野は体性感覚の認識に関与し、二次感覚野は感覚の弁別や記憶を含む高次の体性感覚に関与していると考えられている。9人の健常成人男性に3秒毎に左正中神経上手首部に電気刺激を加えなが

ら、脳磁計により体性感覚誘発磁場を測定し、手指による小物体の探索及び手掌把握課題がヒト二次感覚野に与える影響について検討した。一次感覚野 (SI 皮質) 由来の等価的電流双極子の強度が探索期に減少した一方で、二次感覚野 (SII 皮質) 由来の等価的電流双極子の強度は、刺激と同側半球 (iSII 皮質) では探索期に増加し、刺激と反対側半球 (cSII 皮質) では把握期に減少した。探索による iSII 皮質の活動が、詳細に物体の形状を把握しようとするような高次の体性感覚情報の処理において重要な役割を果たしていると考えられた。また強い単純な筋収縮は SII 皮質の中でも特に cSII 皮質を抑制することが観察され、高次体性感覚処理を抑制するものと考えられた。

10. ラットにおける海馬機能およびタンパク質発現に対する母子分離の影響

渡邊 隆之

創生医科学専攻先進医療開発科学講座 (精神神経医科学)

新生児期に母子分離ストレスを与えたラットにおける恐怖条件付けによるすみ行動の変化、更にラット海馬タンパク質発現の変化に関する検討を行った。ラットは非母子分離群、母子分離群に分けた。行動学的検討では、母子分離によって自発運動量や不安行動に影響を及ぼすことなく恐怖条件付け実験における文脈的刺激暴露時のすみ行動が減少した。抗体アレイ、ウエスタンブロッティングによるタンパク質発現の検討では、母子分離によりラット海馬においてインテグリン $\beta 3$ の発現が減弱することが見出された。本研究の結果は、恐怖条件付けにおける文脈的刺激暴露時のすみ行動時間の減少が母子分離による海馬依存性記憶の障害と関係しているものと考えられ、その分子生物学的機序として海馬におけるインテグリン $\beta 3$ の発現の低下が関与している可能性を示唆している。

11. Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer

(上皮性卵巣癌における Th1, Th2 サイトカイン mRNA 発現量の測定とその臨床病理性の因子、予後との関係)

楠田 朋代

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (産科婦人科学)

【目的】卵巣癌組織における Th1, Th2 サイトカインの mRNA 発現を検討した。

【方法】上皮性卵巣癌40例の初回手術時の摘出標本で TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-6, IL-10 に対し GAPDH を内部対象として real-time PCR 法を行い、臨床的諸因子 (組織型, 臨床進行期, 分化度, 予後) との関連を検討した。

【成績】TNF- α , IFN- γ の発現量は漿液性腺癌が非漿液性腺癌と比較し有意に高値であった ($p < 0.05$)。II 期以上の進行例において TNF- α の発現量高値群は低値群と比較し有意に予後良好であった ($p = 0.033$)。

Th1/Th2 値 (TNF- α · IFN- γ · IL-12p40/IL-6 · IL-10) を設定すると予後と相関し、最も強く相関した IFN- γ · IL-12p40/IL-6 値 ($p = 0.004$) は多変量解析においても独立予後因子として選択された ($p = 0.009$)。

12. CB1 cannabinoid receptor stimulation modulates transient receptor potential vanilloid receptor 1 activities in calcium influx and substance P release in cultured rat dorsal root ganglion cells (ラット一次知覚神経における CB1 カンナビノイド受容体によるバニロイド受容体 1 活性の制御機構)

大下 恭子

展開医科学専攻病態制御医科学講座 (麻酔・蘇生学)

カンナビノイドが TRPV1 活性に及ぼす影響をラット脊髄神経節初代培養細胞 (DRG 細胞) を用いて検討した。CB1 カンナビノイド受容体アゴニストである HU210 はカプサイシンによる細胞内へのカルシウム流入を抑制した。ブラジキニン 100 nM を DRG 細胞に3時間処置すると、COX-2 mRNA の発現誘導とともにカプサイシン誘発性サブスタンス P 遊離増強を引き起こし、その反応増強は HU210 および PKA のインヒビターによって抑制された。また、HU210 はフォルスコリンによる細胞内 cyclic AMP 産生増加、カプサイシン誘発性サブスタンス P 遊離増強を抑制した。以上の結果から、カンナビノイドは一次知覚神経において TRPV1 の活性を直接制御すると共に、cyclic AMP/PKA 系を抑制することで、ブラジキニンによる TRPV1 の感作を抑制し、それらの機構を介して抗侵害受容作用、抗痛覚過敏作用を発揮するものと考えられた。

13. 原爆被爆者の平均余命に関する研究

末永 昌美

展開医科学専攻病態情報医科学講座 (放射線分子疫学)

広島大学原爆放射線医科学研究所に登録されている原爆被爆者228,764人 (男性103,050人, 女性125,714人) を用い, 1975, 1980, 1985, 1990, 1995年の生命表を作成し, 生命表法から被爆者の放射線影響について検討した。1975~1995年において, 被爆者の平均余命は男女ともに延びており, 被爆状況別では入市およびその他の被爆者と比べて, 爆心地より2 km以内で被爆した直接被爆者 (直爆者) で短い傾向にあった。がん死亡確率は, 男女ともに直爆者で有意に高い傾向にあり, 男性の直爆者では年々有意に上昇していた。がんを除去した場合の平均余命の延びが最も大きく, 被爆状況別では, 入市およびその他の被爆者と比べて, 男女ともに直爆者で延びは大きかった。生命表法を用いた本研究においても, 直爆者におけるがん死亡は入市およびその他の被爆者と比べて放射線の影響を受けていることが確認された。

14. 自然死産危険度の時空間分布についての検討

島本 武嗣

展開医科学専攻病態情報医科学講座 (計量生物)

本研究の目的は, 最近の日本における死産危険度の経年変動及び地理分布の実態を明らかにし, 各種背景要因との寄与について検討することにある。

日本の1992年から1997年の期間における年次別市区町村別人口動態死産児表及び出生児表を用い, その対象は3,396市区町村別の出生 (7,303,534件) 及び死産 (116,067件) である。母年齢, 初産・経産, 嫡出子・非嫡出子を背景要因として使用した。また, 嫡出子で初産の場合における自然死産について母年齢に関する調整及び経験ベイズ法とノンパラメトリック平滑化の適用による各年次各市区町村別相対危険度指標を構築し, 地図上にプロットすることで時空間分布の視覚化を行った。

結果として, 初産に比べ経産の死産危険度が高いこと, 死産危険度は経年的に低下しており地域格差も減少していること, その一方で, 高危険度や低危険度を持つ地域の特異的な集積が存在することが明らかになった。

15. Multi-target models and their application to data analysis of cellular mortality due to radiation exposure

(多標的モデルと放射線曝露による細胞死に関するデータ解析への応用)

I Made Arcana

展開医科学専攻病態情報医科学講座 (計量生物)

We consider multi-target models for use in analyzing data of the dose-response relationship. The target sizes we are concerned with here are both homogeneous, as assumed in the classical model, and heterogeneous, as simplified using geometric progression. We apply two models for establishing the multi-target models: a Poisson regression model constructed by assuming that the response variable Y follows Poisson distribution, and a gamma-frailty model as a Poisson mixture model derived by adding random common risks having a gamma distribution. Applying these models to experimental data relating the effects of miso fermentation-stages on the survival rate of cells of intestinal crypts of mice exposed to radiation yielded the result that there were substantial frailties associated with all miso fermentation-stages. Short-term and medium-term fermented miso provided similar effects, whereas long-term fermentation had the lowest relative risk value, indicating a significant protection of the crypts against exposure effects. A gamma-frailty model based on heterogeneous target size was more suitably applied when there were at least 3 dead stem cells having 10 target genes.

16. SUMO-1 modification of PIASy, an E3 ligase, is necessary for PIASy-dependent activation of Tcf-4

(E3 リガーゼ PIASy の SUMO-1 修飾は PIASy 依存性の Tcf-4 活性化に必要である)

井原 基公

創生医科学専攻探索医科学講座 (分子細胞情報学)

多くの蛋白質が SUMO (small ubiquitin-like modifier) 化と呼ばれる翻訳後修飾を受けている。Wnt シグナル伝達経路の転写因子 Tcf-4 (T-cell factor) は SUMO 化されることで, その転写活性が促進されるこ

とが明らかになっているが、その制御機構は不明である。また、SUMO 化を促進する酵素 PIAS ファミリーが SUMO 化される生理的意義についても不明である。本研究では、SUMO リガーゼ PIASy が SUMO 化される部位を同定した。SUMO 化されない PIASy 変異型や、SUMO を N 末端に融合させた PIASy 変異型の局

在は野生型と異なり、両者は Tcf-4 の SUMO 化と転写活性を促進しなかった。従って、Wnt シグナル伝達経路において PIASy が SUMO 化されると PIASy と Tcf-4 が共局在し、その結果、Tcf-4 の SUMO 化と転写活性を制御することが示唆された。