

プログラム

P-1

胃癌症例における単一腫瘍腺管及び単一腸上皮化生腺管の分子解析

岩手医科大学・医学部・¹⁾臨床病理部門, ²⁾同DNA解析室

菅井 有¹⁾, 幅野 渉¹⁾²⁾, 中村眞一¹⁾

P-2

血清サイトカインを用いた切迫早産における予後因子マーカーの検索

岩手医科大学・医学部・産婦人科学講座

利部正裕, 庄子忠宏, 小山理恵, 室月 淳, 福島明宗, 吉崎 陽, 杉山 徹

P-3

TNF- α 遺伝子多型と糖尿病性細小血管・大血管障害, メタボリックシンドロームとの
関連

岩手医科大学・医学部・¹⁾糖尿病代謝内科, ²⁾同病理学第二講座

山科光弘¹⁾, 金子能人¹⁾, 梶原 隆¹⁾, 石井基嗣¹⁾, 藤原史門¹⁾, 種市春仁¹⁾,

武部典子¹⁾, 石田 弥¹⁾, 佐藤 譲¹⁾, 前沢千早²⁾, 増田友之²⁾

P-4

カルボニル化タンパクを指標とした個体老化の研究

岩手医科大学・医学部・法医学講座

熊谷章子, 中屋敷徳, 青木康博

P-5

Oligonucleotide-based Custom DNA Array Propose A Predisposition of SNPs in
Fibrinolysis and Coagulation System In Patients With Internal Carotid Artery Stenosis

Department of Laboratory Medicine¹, Neurosurgery², Anatomy³and DNA

Laboratories⁴Iwate Medical University, Morioka, Japan 020-8505

Kenji Nakai¹, Kuniaki Ogasawara², Takashi Inoue², Masakazu Kobayashi², Mayu

Oyanagi², Keiko Nakai¹, Akira suwabe¹, Wataru Habano⁴, Jiro Hitomi³, Akira

Ogawa²

P-6

性別・年齢別血清中フッ素濃度について

岩手医科大学・医学部・衛生学公衆衛生学講座

板井一好, 小野田敏行, 大澤正樹, 丹野高三, 坂田清美

P-7

DNA 修復タンパク質 XRCC1 のゲノム情報維持における役割の解析

岩手医科大学・医学部・生化学

高浪タカ子, 久保田美子

P-8

老人性難聴におけるミトコンドリア遺伝子多型の検索

岩手医科大学・医学部・耳鼻咽喉科学講座

大塚 尚志, 石島 健, 佐藤 宏昭

P-9

急性心筋梗塞症の末梢単核球での Heat shock protein 70 の発現を介した systemic inflammatory reaction について

岩手医科大学・医学部・内科学第二講座

佐藤 衛, 石川 有, 赤津智也, 伊藤智範, 中村元行

P-10

前癌病変における細胞／組織分化に関わるエピジェネティックな遺伝子制御機構の解除

岩手医科大学・医学部・¹⁾病理学第二講座, ²⁾同第一外科学講座

前沢千早¹⁾, 小笠原聡²⁾, 増田友之¹⁾

P-11

遺伝子発現情報に基づいた膀胱癌におけるMVAC術前化学療法感受性予測システムの構築とその評価

¹⁾岩手医科大学・医学部・泌尿器科学講座,

²⁾東京大学医科学研究所・ヒトゲノム解析センター,

³⁾理化学研究所・遺伝子多型研究センター,

⁴⁾高知大学医学部・泌尿器科学講座,

⁵⁾京都府立医科大学・泌尿器科学講座

高田 亮¹⁾, 片桐豊雅²⁾, 兼平 貢^{1, 2)}, 角田達彦³⁾, 執印太郎⁴⁾, 木恒 治⁵⁾,

小原 航¹⁾, 松下 靖¹⁾, 中村祐輔²⁾, 藤岡知昭¹⁾

P-12

ポストコンディショニングによる心筋虚血再還流障害軽減に関する研究

岩手医科大学附属循環器医療センター・心臓血管外科

金 一, 中島隆之, 石原和明

P-13

肝線維症治療戦略における標的分子の探索

岩手医科大学・医学部・病理学第二講座

増田友之, 前沢千早

P-14

頸動脈内膜剥離術後過灌流の発生メカニズムと神経組織に与える影響の解明

岩手医科大学・医学部・脳神経外科学講座

小笠原邦昭, 久保慶高, 吉田研二, 別府高明, 小川 彰

P-15

マンノース結合リボソームによる ITP モデルマウス治療の基礎的研究

岩手医科大学・医学部・血液内科

石田陽治, 村井一範, 筑紫泰彦, 小宅達郎, 古和田周吾

P-16

マウス紫外線照射モデルを用いた coenzyme Q の光老化抑制効果の検討

岩手医科大学・医学部・皮膚科学講座

高橋和宏, 前田文彦, 馬場俊右, 赤坂俊英

P-17

グリオーマの術前検査としての拡散テンソル MRI および拡散強調 MRI の応用

岩手医科大学・医学部・脳神経外科

別府高明, 久保慶高, 吉田研二, 小笠原邦昭, 小川 彰

P-18

リコンビナント DIs ワクチンによる粘膜免疫誘導

¹岩手医科大学・医学部, ²国立感染症研究所エイズ研究センター, ³北里研究所生物製剤研究所, ⁴国立感染症研究所ウイルス第三部, ⁵国立感染症研究所動物管理室

吉野直人¹, 兼清優², 萩原由加利³, 染谷健二⁴, 松尾和浩², 網康至⁵, 佐藤成大¹, 山本直樹², 本多三男²

P-19

抗原提示細胞系における細胞成熟化およびニコチン刺激時のニコチン受容体発現とサイトカイン分泌の変化

岩手医科大学・医学部・薬理学講座

近藤ゆき子, 平 英一

P-20

急性骨髄性白血病ならびに骨髄異形成症候群(MDS)における新規予後因子の探索と治療最適化の研究

岩手医科大学・医学部・¹先端医療センター・²血液内科

¹鈴木啓二郎, ²石田陽治

P-21

生物学的人工肝臓による劇症肝炎血漿浄化療法開発に向けた基礎的検討

岩手医科大学・医学部・¹⁾内科学第一講座, ²⁾バイオイメージングセンター
滝川康裕¹⁾, 井上絵里¹⁾, 林 世徳¹⁾, 鈴木一幸¹⁾, 吉田康夫²⁾,
遠山稿二郎²⁾

P-22

ヒト腫瘍における染色体不安定化に関連する遺伝子の網羅的検索

岩手医科大学・医学部・¹⁾DNA解析室, ²⁾臨床病理
幅野 渉¹⁾, 菅井 有²⁾, 中村真一²⁾

P-23

FACSAria を用いた造血幹細胞の分離採取法の確立と肝細胞への分化誘導

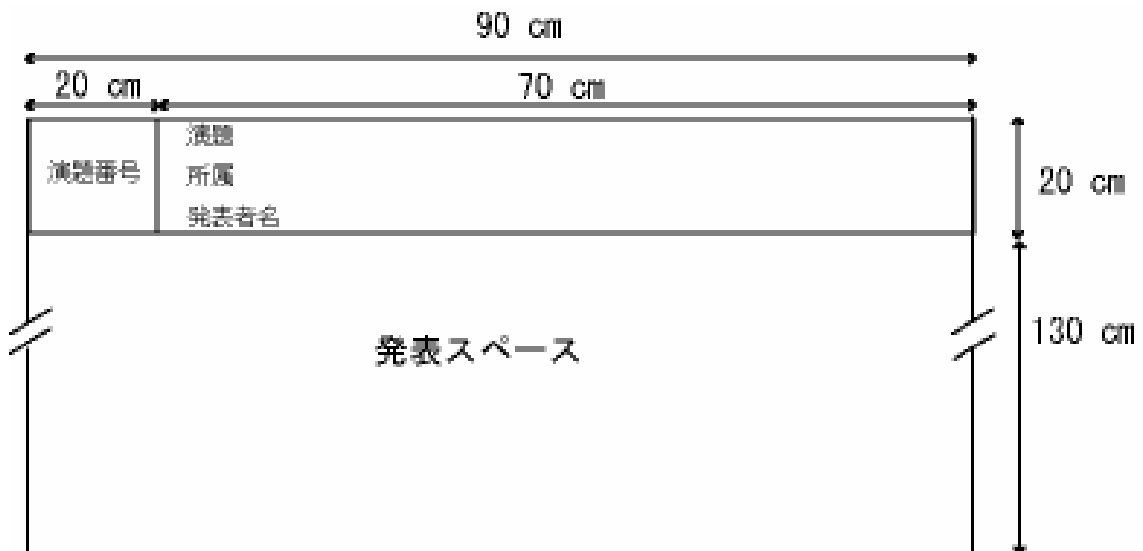
岩手医科大学・医学部・病理学第二講座
永田有希, 阿保亜紀子, 前沢千早, 増田友之

演者の皆様へ

演題は全てのポスター発表です。ポスター番号、添付用のピンは事務局で用意します。演題タイトルはご自分で用意下さい。14:30-15:00 までの間にポスター添付をお願いします。

15:30-16:00 までが討論時間となっております。ポスター前で活発な討論をお願いします。

ポスターの撤去は、16:00 時以降、各自すみやかにお願い致します。



P-1

胃癌症例における単一腫瘍腺管及び単一腸上皮化生腺管の分子解析

岩手医科大学・医学部・¹⁾臨床病理部門, ²⁾同DNA解析室

菅井 有¹⁾, 幅野 渉¹⁾²⁾, 中村眞一¹⁾

【目的】個々の単一腫瘍腺管及び単一腸上皮化生腺管の分子レベルの異常を知ることが目的に, 胃癌及び腸上皮化生における単一腺管の分子レベルでの解析を行った。【方法】20例の胃癌及び周囲の粘膜から腺管分離法を用いて単一正常腺管, 単一腫瘍腺管及び単一腸上皮化生腺管を分離・回収した。回収した各々10(腫瘍腺管)もしくは5個(腸上皮化生腺管)の単一腺管で構成されるサンプル(単一腺管群)と, 同一症例から20個の腫瘍もしくは腸上皮化生腺管を回収しDNAを抽出したサンプル(代表群)との間で, それぞれ3p, 5q, 4p, 9p, 17p, 18qのLOH及びMSIについて解析した。加えてp53変異についても検索した。代表サンプルでのみmethylation-specific PCR法でMINT1, MINT2, MINT31, hMLH1, p14, RUNX3のプロモーター領域のメチレーションの有無についても解析を行った。

【結果】全例において各単一腫瘍腺管の遺伝子解析が可能であった。単一腺管群の中には代表群の遺伝子異常とは異なった異常を示す単一腺管が含まれていた。代表群の腸上皮化生腺管には遺伝子異常はみられなかったが, 単一腺管群には遺伝子異常がみられた。メチル化は癌, 腸上皮化生双方にhMLH1とRUNX3に多く認められた。

【結語】

- 1) 同一腫瘍内で腺管単位の多様な分子異常のモザイク状態が示唆された。
- 2) 単一腸上皮化生腺管には早期胃癌に匹敵する分子レベルの異常がみられた。
- 3) 腸上皮化生腺管は分子モザイク状態であることが推測された。

P-2

血清サイトカインを用いた切迫早産における予後因子マーカーの検索

岩手医科大学・医学部・産婦人科学講座

利部正裕, 庄子忠宏, 小山理恵, 室月 淳, 福島明宗, 吉崎 陽, 杉山 徹

当院には国より指定された周産母子医療センターがあり, 切迫早産患者が岩手県内はもちろんのこと, 遠く県外からも切迫早産症例の母体搬送を受け入れている. 我々は, 切迫早産の予後を予測するマーカーとして以前より Heat shock protein 70(HSP70)と IL1 β および IL6 について末梢血および膣分泌液を用いて計測を行ってきた. HSP70 は、治療抵抗性の切迫早産において, 治療可能だった切迫早産と比べ高値を示すことが明らかになった. また, IL1 β および IL6 の母胎血中濃度は正常産より高く, 早産マーカーとして有用であることが明らかになった. 今回我々は, オープンリサーチプロジェクトに導入される多数の IL を同時計測可能なサスペンションアレイシステムを用い, IL についてさらに解析を行った.

症例は切迫早産が 21 例(早産 12 例, 満期産 9 例), 正常妊娠経過例 6 例, 非妊娠成人女性 3 例の 30 例を対象とした. いずれの症例も十分なインフォームドコンセントのもと, 書面にて同意を得た症例である.

切迫早産例はすべて当院に入院時に採取した血清を使用. その他は妊婦検診時に外来にて採取した血清を使用した. サイトカインの計測は Bio-Plex サスペンションアレイシステム(BIO-RAD 社)を使用し 17 種類のサイトカインを同時計測した.

IL-1 β , IL-6, IL-8 が有意に早産群に上昇を認めたが, その他のサイトカインには有意の上昇は認められなかった.

現在, 症例数を増やしさらに解析中である.

P-3

TNF- α 遺伝子多型と糖尿病性細小血管・大血管障害, メタボリックシンドロームとの関連

岩手医科大学・¹⁾糖尿病代謝内科, ²⁾同病理学第二講座

山科光弘¹⁾, 金子能人¹⁾, 梶原 隆¹⁾, 石井基嗣¹⁾, 藤原史門¹⁾, 種市春仁¹⁾, 武部典子¹⁾, 石田 弥¹⁾, 佐藤 譲¹⁾, 前沢千早²⁾, 増田友之²⁾

【目的】糖尿病性細小血管障害, 大血管障害(動脈硬化症), メタボリックシンドロームにおける炎症性サイトカインの役割が示唆されている. 本研究では2型糖尿病患者を対象に, 中心的炎症性サイトカインである TNF- α の遺伝子多型と細小血管障害, 動脈硬化症, メタボリックシンドロームとの関連を横断的解析によって検討し, 糖尿病性合併症およびメタボリックシンドロームの遺伝素因を明らかにすることを目的とした.

【対象】岩手医科大学医学部附属病院糖尿病代謝内科通院中の 2 型糖尿病患者, 男性 88 名, 女性 74 名, 計 162 名.

【方法】ダイレクトシーケンスによって TNF- α 遺伝子多型(G-238A, G-308A, C-857T, C-863T, T-1031C)を解析した. 同定された多型と各臨床データとの関連を検討した.

【結果】多型のアレル頻度はそれぞれ G-238A(0.6%), G-308A(2.2%), C-857T(11.1%), C-863T(16.7%), T-1031C(15.7%)であった. 臨床データとの関連は頻度の高い C-857T, C-863T, C-1031T についてのみ解析した. C-857T は血清 LDL-C が有意に高値であり(P=0.0461), 頸動脈のプラーク数も有意に多かった(P=0.0358). その他の脂質・糖代謝・細小血管障害などの諸因子には有意差を認めなかった. C-863T および C-1031T 多型については各因子と有意の関連を認めなかった.

【結語】TNF- α -C-857T 遺伝子多型と血清 LDL-C 高値および頸動脈プラーク数と有意の関連を認めた. C-857T 多型は TNF- α 高産生性であることが報告されており, 高 LDL-C 血症と動脈硬化症における TNF- α の関与が示唆された. TNF- α 高産生性遺伝子多型とメタボリックシンドロームとの関連ははっきりしなかったが, 症例数を増やしたさらなる検討が必要である.

P-4

カルボニル化タンパクを指標とした個体老化の研究

岩手医科大学・医学部・法医学講座

熊谷章子, 中屋敷徳, 青木康博

目的: ヒト体液(ヒト健康成人の血清, 剖検例からの硝子体液)中のカルボニル化タンパクを検出し, 加齢に伴う量的変化について検討した.

方法: 試料に 2,4-dinitrophenylhydrazine(DNPH)を加えて hydrazone を形成させ, 分光光度計によるカルボニル化タンパクの定量を行い年齢による測定値の違いを観察した. またその試料に含まれる成分を 2 次元電気泳動で分離し, ウェスタンブロットティング後, 抗 DNP 抗体およびペルオキシダーゼ標識 2 次抗体を用いる免疫染色法により, カルボニル化タンパクのスポットを検出した. 同じ条件で電気泳動したタンパク染色像と免疫染色像を比較し, 発色スポットに相当するゲル領域を切り出してトリプシン消化後, MALDI-TOF MS で質量分析を行ってタンパクを同定した.

結果: 吸光度 375nm における hydrazone の濃度測定結果より, 加齢に伴いカルボニル化タンパクが上昇することが示唆された. またウェスタンブロットティング後の免疫染色像において, 血清サンプルでは男女とも 50 歳以上でカルボニル化タンパクが検出され, 分子量 20~30kDa のタンパクに加齢に伴う増加傾向が観察された. 硝子体液サンプルでは男女とも 40 歳以上でカルボニル化タンパクが著明に出現しており, 特に 60~80 歳代において 15~25kDa の低分子量領域の発色面積の増大がみられた. 特徴的なゲルスポットについて MALDI-TOF によるタンパク同定を行ったところ, IL-1R I, PK C-LIKE2, UDPGT, CNP などの存在を示唆する結果が得られた.

今後の計画: カルボニル化タンパクの検出・同定のデータを蓄積させ, 加齢に伴う量的変化と増加するカルボニル化タンパクを特定し, カルボニル化を指標とした法医学的年齢推定への応用を検討することを目標としている.

P-5

Oligonucleotide-based Custom DNA Array Propose A Predisposition of SNPs in Fibrinolysis and Coagulation System In Patients With Internal Carotid Artery Stenosis

Department of Laboratory Medicine¹, Neurosurgery², Anatomy³ and DNA Laboratories⁴ Iwate Medical University, Morioka, Japan 020-8505

Kenji Nakai¹, Kuniaki Ogasawara², Takashi Inoue², Masakazu Kobayashi², Mayu Oyanagi², Keiko Nakai¹, Akira suwabe¹, Wataru Habano⁴, Jiro Hitomi³, Akira Ogawa²

Early screening of individuals in at risk for severe internal carotid artery (ICA) stenosis is an important strategy for preventing ischemic cerebral stroke. At the stage of post sequence era, single nucleotide polymorphisms (SNPs) are likely to represent valuable resources. However, the standardization of genotyping of SNPs has not fully established. The purpose of this study is to evaluate candidate SNPs associated with severe ICA stenosis by newly developed oligonucleotide-based DNA array. The subjects consisted of 47 controls and 46 patients with severe ICA stenosis ($\geq 70\%$) who underwent carotid endarterectomy (CEA). We obtained blood samples and genomic DNA with an informed consent. We studied 8 candidate genes that included renin-angiotensin system [angiotensinogen (AGT), angiotensin II receptor type 1 (AGTR1), nitric oxide synthase 3 (NOS3)], growth factor (hepatocyte growth factor (HGF), transgelin (SM22), cytokine (chemokine receptor 2 (CCR2), coagulation-fibrinolysis system (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). Genotyping of candidate SNPs was analyzed using Line Probe Assay based on oligonucleotide-based DNA array. Results: The allele frequency of PAI-1 -1965 del G (OR: 0.3, 95% CI, 0.2-0.6) and MTHFR (OR 1.3, 95% CI, 1.0-1.5) were significantly different between controls and cases with ICA stenosis by Fisher's test. Multiple logistic analysis using revealed that diabetes mellitus (DM), SNPs in PAI-1 -1965 del G and MTHFR were an independent risk for ICA stenosis. In conclusion, Line Probe Assay was suitable for clinical use, and genetic factors of coagulation-fibrinolysis as well as DM were relevant in ICA stenosis.

性別・年齢別血清中フッ素濃度について

岩手医科大学・医学部・衛生学公衆衛生学講座

板井一好, 小野田敏行, 大澤正樹, 丹野高三, 坂田清美

【目的】空腹時の血清フッ素濃度を性別年齢別に多数例について検討した研究報告はみられない。本研究では健常な地域住民について空腹時血清中フッ素濃度を測定して男女別年齢階級別に比較検討した。

【方法】岩手県内の2町の40歳代から60歳代の住民について、性別年齢別に層別無作為抽出して得られた男性167名、女性167名を対象とした。採血は早朝空腹時に行い、血清中のフッ素イオン濃度はフッ素イオン電極を検出器とするフローインジェクション分析装置で測定した。同時に、対象者の居住する地区の飲料水中フッ素イオン濃度も同様の方法で測定した。男女間の比較にはt検定を用いた。関連要因で調整した血清フッ素イオン濃度の比較はANCOVAを用いて行った。

【結果】飲料水中のフッ素イオン濃度は0.021~0.15mg/lであった。男性および女性の血清中フッ素イオン濃度(平均値±標準偏差、 $\mu\text{g/l}$)はそれぞれ 9.40 ± 3.23 および 8.69 ± 3.04 と男性で有意($p < 0.05$)に高値を示した。40から60歳代までの年齢階級別フッ素濃度は、男性が 8.63 ± 3.00 , 9.68 ± 3.03 , 9.86 ± 3.52 , 女性では 7.25 ± 2.54 , 8.96 ± 3.14 , 9.81 ± 2.87 で男女ともに加齢に伴い有意($p < 0.05$)な上昇を示した。男女別に血清中フッ素濃度と関連がみられた項目を独立変数に選んで行った重回帰分析の結果、関連の認められた項目で補正した血清中フッ素濃度では、男女ともに加齢との関連が消失した。女性について関連項目で補正して閉経の有無別に検討した結果、閉経前で閉経後よりも有意($p < 0.05$)に高値を示した。

【結論】男性の血清中フッ素濃度は女性よりも高値を示した。フッ素濃度に関連している要因で補正すると男女ともに加齢の影響が消失した。関連要因で補正した血清中フッ素濃度は閉経後で前よりも有意に高値を示した。

DNA 修復タンパク質 XRCC1 のゲノム情報維持における役割の解析

岩手医科大学・医学部・生化学講座
高浪タカ子, 久保田美子

背景 ゲノムDNAは細胞の生存に必要な遺伝情報を保持する生体高分子化合物であり, その安定的な維持が細胞の正常な成長, 増殖, 生存に必須である. ところが, 他の生体分子と同様にゲノムDNAも生体内において様々な化学修飾を受けている. 特に酸化はDNA分子にとっても大きな影響を及ぼす化学変化であり, ほ乳類細胞に一日あたり数千個生じているという報告もある. さらに, アルキル化や脱アミノ化, 脱塩基なども数千個以上生じているという. これらのDNA損傷が修復されず残されれば, 正確な遺伝情報は失われ, 細胞の老化, がん化, 細胞死を引き起こすと考えられている. XRCC1 タンパク質は, 酸化, アルキル化, 脱アミノ化, 脱塩基などのDNA損傷を修復する反応経路に関与している様々な酵素と相互作用し, DNA修復を促進する機能がある. XRCC1 の欠損に起因する疾患は現在までに報告はないが, XRCC1 の多型とがんの罹患傾向については盛んに疫学的解析が行われている.

目的 我々は, XRCC1 の機能を解析することによってDNA修復効率の低下と細胞の老化, がん化, 細胞死の分子機構の関連について解析を進めることを大きな目標としている. 具体的に本オープンリサーチプロジェクトとしては, 1)ヒト集団中に存在するXRCC1 の多型が実際DNA修復効率に影響を与えているのかを解析すること, 2)XRCC1 と相互作用する新規のタンパク質を検索し, この相互作用によるXRCC1 のこれまで知られていなかった機能を明らかにすることの2点を目標とした.

結果 1)XRCC1 の多型には, アミノ酸置換を伴うものがいくつか知られている. このうち, この存在が最初に報告された3カ所の多型について, XRCC1 欠損細胞に強制発現させ, この細胞株のDNA損傷に対する感受性や, DNA修復効率を定量した. その結果, Arg280His多型のXRCC1 を発現する細胞株はDNA損傷に対して感受性を示し, DNA修復の速度も遅くなっていた. さらに, DNA損傷処理後のXRCC1 の核内局在が野生型に比べて減弱していた. 以上のことから, ヒト集団中のArg280His多型はゲノムの維持機構に影響を与えられた. この培養細胞を用いた実験を支持するデータが米国の疫学調査から出されていることから, 日本におけるこの多型の頻度の解析などが今後行われることを期待している.

2)XRCC1 に相互作用する新規のタンパク質を, 酵母 2 ハイブリッド法によって検索したところ, クロマチンリモデリングに関与しているタンパク質が同定された. 現在この相互作用について免疫沈降, ゲル濾過などの方法で確認している. さらに, この相互作用の意義を調べるため, 相手タンパク質を siRNA によって発現を抑制し, その細胞が DNA 損傷に対して感受性を示すかを解析しようとしている.

老人性難聴におけるミトコンドリア遺伝子多型の検索

岩手医科大学・医学部・耳鼻咽喉科学講座

大塚 尚志, 石島 健, 佐藤 宏昭

【はじめに】近年高齢者人口は年々増加傾向にあり日本においては加速度的に増加している。同時に老化の 1 つの徴候である老人性難聴は、個人の老年期の生活の質、また社会的な生活を保持するうえで大きな障害となる。先進諸国では人口の約 6-8%が発症していると推定されている。2006 年度版高齢化社会白書では、わが国の 65 歳以上の高齢者人口は 2,560 万人であり、総人口に占める割合は 20.0%にのぼっている。また 65 歳以上の人口推移は 2015 年には高齢化率が 26.0%、2050 年には 35.7%に達し、国民の約 3 人に 1 人が 65 歳以上の高齢者という本格的な高齢社会の到来が見込まれている。老人性難聴は内耳、中枢いずれにも細胞の変性や消失を認めることから、我々は体細胞の代謝に必要不可欠であり、細胞の死に大きく関与するとされるミトコンドリアに着目し、老人性難聴に特異的なミトコンドリア遺伝子多型の検索を行った。

【対象と方法】難聴高齢者群は 65 歳以上の老人性難聴者(男性 25 名, 女性 22 名, 平均年齢 77 歳)45 名(予定 50 名)と、健聴高齢者群は 65 歳以上で難聴の訴えがない方(男性 14 名, 女性 30 名, 平均年齢 72.8 歳)47 名(予定 50 名)とし、過去に耳疾患、頭部外傷、ストレプトマイシン使用歴がなく、また 糖尿病を含む代謝性疾患の既往を持たない方を対象とした。また全対象には本学倫理委員会認可の書面を用い本研究の主旨を十分にご理解頂き、同意ならびに署名を得ている。末梢静脈血検体より遺伝子を抽出し、PCR 増幅後にオートシーケンサーにて塩基配列の同定し、得られた塩基配列情報から老人性難聴群に特異的なミトコンドリア遺伝子多型を検索している。

【結果】現在、両群それぞれ 24 検体、計 48 検体のミトコンドリア全遺伝子配列を決定しており、その結果から既知難聴関連ミトコンドリア遺伝子多型部位においては、両群間の出現頻度は統計学的に明らかな優位差は認めていない。老人性難聴群に特異的なミトコンドリア遺伝子多型は検索中である。

【考察】現代の高齢者社会は急速に進行しているなか、特に地方においては高齢者の孤立化が顕著である。加えて老人性難聴は高齢者の社会的参加活動の障害にさらに拍車をかけるものである。老人性難聴においてはその発症機序は明らかになっておらず、またその発症要因においても不明な点が多いため多因子疾患と考えられるが、その 1 つとしてミトコンドリア遺伝子多型を検索している。現在はその結果、対象数ならびに塩基配列の同定領域からも明確な結論を導くことはできないが、今後更なる検討を重ねていく予定である。

P-9

急性心筋梗塞症の末梢単核球での Heat shock protein 70 の発現を介した systemic inflammatory reaction について

岩手医科大学・医学部・内科学第二講座

佐藤 衛, 石川 有, 赤津智也, 伊藤智範, 中村元行

背景: 我々は, 急性心筋梗塞症(AMI)の末梢単核球では, toll 様受容体 4(TLR4)を介した炎症性サイトカインカスケードが活性化し, その活性化の程度は, AMI の臨床的重症度と関連していることを報告した(Satoh M, et al. Int J Cardiol. 2006; 109:226-34). 近年, heat shock protein (HSP) 70 が, TLR4 の内因性リガンドであることが明らかとなってきた(Vabulas RM, et al. J Biol Chem 2002;277:15107-15112).

目的: 末梢血中 HSP70 と TLR4 シグナルとの関連を明らかにする. さらに, それらの発現と AMI の臨床的重症度との関連を検討する.

方法: AMI 群 52 例(平均年齢 64.9 ± 1.5 歳)および対照群 20 例(平均年齢 63.7 ± 1.7 歳)を対象とした. AMI 群(第 1 病日, 第 14 病日)および対照群から末梢血液を採取し, 血清中 HSP70, interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , 単球での TLR4 の発現を測定した.

結果: 血清中 HSP70 の発現は, AMI 群で対照群と比較し高値であった(第 1 病日 1254.4 ± 102.3 pg / mL, 第 14 病日 625.8 ± 15.3 pg / mL, 対照群 545.3 ± 11.5 pg / mL, $P < 0.01$). AMI 群での HSP70 の発現は, 単球での TLR4、血清中 IL-6 および TNF- α の発現と正の相関を認めた. AMI 群のうち心不全合併例(15 例)では, 非合併例と比較し, HSP70 が高値であった(637.5 ± 40.2 pg / mL vs. 448.7 ± 32.4 pg / mL, $P < 0.01$). AMI 群の単球培養モデルでは, HSP70 刺激により濃度依存性に TLR4 の発現および IL-6, TNF- α の産生が亢進した. また, これらの産生は, 抗 TLR4 抗体の添加により抑制された.

結語: 末梢血中 HSP70 の発現は, TLR4 シグナルを介した炎症性サイトカインの産生に関与し, また, HSP70 の発現は, AMI の臨床的重症度と関連していることが示唆された.

P-10

前癌病変における細胞／組織分化に関わるエピジェネティックな遺伝子制御機構の解除

岩手医科大学・医学部・¹⁾病理学第二講座, ²⁾同第一外科
前沢千早¹⁾, 小笠原聡²⁾, 増田友之¹⁾

【目的】悪性腫瘍の発生・進展の過程には複数の遺伝子異常が蓄積している。これらの異常において、遺伝子自体 (genetic) に生じる構造的な異常ばかりでなく、epigenetic な異常の蓄積が持つ意義は大きい。分化した細胞の遺伝子発現は genetic, epigenetic な機構により細胞特異的に制御され、その機構は個体の恒常性に不可欠である。この機構の破綻は、化生性変化や脱分化などの形質転換を誘導する可能性があり、発がんのイニシエーションとしても重要な要因である。本研究では、乳癌の癌抑制遺伝子として単離された maspin の異常発現が化生性変化やがんの脱分化などの表現型と密接に関係することを明らかにした。

【方法】521 症例 (9 臓器) の良・悪性腫瘍と正常組織, 27 株の関連臓器細胞株を対象とした。遺伝子産物の発現は免疫染色で、発現制御機構については epigenetics および転写因子の異常を解析した。

【結果】1. maspin の発現頻度と特徴: maspin 蛋白質の発現を①胃癌 (80%), 胆道系腫瘍, 甲状腺低/未分化癌 (50%), 子宮内膜癌 (60%) で認めた。黒色腫, 乳房外 Paget では低頻度 (10%) であった。肝癌, 骨肉腫, 膠芽腫, 甲状腺分化癌および良性腫瘍では発現を認めなかった。②胆嚢癌, 甲状腺癌, 子宮内膜癌では squamous differentiation の出現と密接な関連を認めた。③甲状腺癌の分化度と相関していた。④胃癌および胆石症患者の粘膜上皮で腸上皮化生部分に一致して異常発現を認めた。2. maspin 遺伝子の発現制御機構: ①maspin の発現制御は肝癌細胞株を除いて、プロモーター領域の DNA メチル化の状態に依存していた。腫瘍原発巣や腸上皮化生性粘膜でのメチル化の解析結果も同様であった。②肝癌株のプロモーター領域は低メチル化状態であったが、アセチル化処理でも発現誘導を生じなかった。③maspin の発現は転写因子の変異・発現状態には影響を受けていなかった。

【結語】maspin 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化の解除は複数の悪性腫瘍で蛋白の異常発現を誘導する。maspin 蛋白の異常発現は腫瘍の組織型や分化度, 胃や胆道粘膜上皮の化生性変化と密接な関連があることが示された。

遺伝子発現情報に基づいた膀胱癌におけるMVAC術前化学療法感受性予測システムの構築とその評価

¹⁾岩手医科大学・医学部・泌尿器科学講座, ²⁾東京大学医科学研究所・ヒトゲノム解析センター, ³⁾理化学研究所・遺伝子多型研究センター, ⁴⁾高知大学医学部・泌尿器科学講座, ⁵⁾京都府立医科大学・泌尿器科学講座

高田 亮¹⁾, 片桐豊雅²⁾, 兼平 貢^{1, 2)}, 角田達彦³⁾, 執印太郎⁴⁾, 木恒 治⁵⁾, 小原 航¹⁾, 松下 靖¹⁾, 中村祐輔²⁾, 藤岡知昭¹⁾

[目的] 浸潤性膀胱癌に対する標準的治療は膀胱全摘除術であるが, 単独では50%の患者が遠隔転移で死亡する. これは診断時すでに, 画像上明らかではない微小転移が高率に存在する事が示唆され, 補助化学療法が行われる. M-VAC 術前補助化学療法は, 微小転移を抑制する事により予後を改善させ, また著効例では膀胱温存により患者の QOL の改善が期待される. しかしながら, 化学療法無効群では根治手術の遅延や癌の進行によって予後の悪化をきたすことより, 個別的な治療に向けて術前化学療法の効果判定が急務である. そこでわれわれは, M-VAC 術前化学療法に対する感受性予測システムの開発を目的に研究を行った.

[対象と方法] 浸潤性膀胱癌 40 例を対象として, 化学療法施行前に検体を採取後, M-VAC 術前化学療法を 2 コース施行. 病理・画像所見によるダウンステージによりその感受性を評価した. 得られた検体は, 膀胱癌細胞のみをマイクロディセクション法を用いて選択的に採取し, 約 28000 種類の遺伝子からなる cDNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析より, 膀胱癌特異的な遺伝子情報を抽出した. この遺伝子情報と感受性の統計学的解析により, 感受性予測システムの構築を行った.

[結果] 18 学習症例の遺伝子情報を用いた統計学的解析より, MVAC 術前化学療法感受性予測 14 遺伝子を同定し, これらの発現情報に基づいた MVAC 感受性予測システムを構築した. さらに, 臨床応用を見据えて, これら感受性予測 14 遺伝子における real-time PCR を用いた感受性予測システムを構築し, 独立したテスト 22 症例を用いた検証により, このシステムが高い精度で感受性を予測することが可能であることを証明した.

[今後の計画] 追加症例を用いて予測システムの更なる検証を行うと共に, 臨床応用に向けさらに簡便でかつ迅速な感受性予測システムの開発を試みる.

ポストコンディショニングによる心筋虚血再還流障害軽減に関する研究

岩手医科大学附属循環器医療センター・心臓血管外科
金 一, 中島隆之, 石原和明

心筋梗塞に代表される虚血性心疾患は, 近年その病因解明のみならず急性期治療においてはインターベンション, 血栓溶解療法など急速な進歩を遂げている. こうした治療の背景には, 虚血心筋に対し早期の可逆的な機能回復期に血行を再開させる事が心筋壊死の進展を最小限にとどめ患者の予後に影響するというエビデンスに基づいている. 再還流は心筋梗塞巣の軽減, 収縮障害, アポトーシスの軽減など必要不可欠な治療である. しかしながら, 再還流それ自体が虚血後の一過性あるいは致死的な障害を惹起する, いわゆる虚血再還流障害を引き起こすことも現在周知の事実となっている. よって, 再還流障害をいかにコントロールできるは循環器領域のみならず虚血に陥った各臓器においても主要な治療戦略の1つであると考えられる.

1986年 Murryらにより報告された Ischemic preconditioning: IPC (ある一定時間の虚血に先行させて間欠的な短時間の虚血を行うことにより, 心筋梗塞巣の著明な減少効果が認められた.) という強力な内因性心筋保護効果の発現以来, 本現象による心筋の虚血耐性あるいは再還流障害軽減のメカニズムが解明されてきた. しかしながら, 一方でこの概念を積極的に臨床の場で応用する, つまり, 虚血再還流障害を軽減させるために正常な臓器に間欠的な短時間の虚血を先行させる事は現実的ではない. こうした虚血再還流障害を軽減するための1つの方法として, 再開された血流をコントロール(血流を急速に再開させるのではなく徐々に増加させていく)することにより障害を軽減できるとした報告が近年発表された. そして, この概念を応用して虚血に陥った心筋に対し再還流直後よりある一定期間の間欠的な血流の停止, 再開を繰り返す(これを IPC に対し Ischemic Postconditioning: 以下 Post-con と表す)ことにより, 虚血再還流障害の軽減を認めることが部分心筋虚血モデルにおいて示された.

今回の発表では, これまで認められたそのメカニズムに関して発表を行う.

肝線維症治療戦略における標的分子の探索

岩手医科大学・医学部・病理学第二講座

増田友之, 前沢千早

【目的】肝臓は物質の代謝・解毒に中心的な役割を担っており、生体にとって欠くことのできない実質臓器である。本邦では肝炎ウイルスの汚染率が高く、慢性肝炎、肝硬変を経て肝癌あるいは肝不全で死亡する例が多い。肝炎・肝硬変は肝線維症と総称され、これらに対する有効な治療法の開発は社会的急務となっている。

我々は、肝線維症治療戦略において以下の2つの点を大きな標的機構と考えている。

- ① 慢性炎症によって頻りに繰り返される壊死・再生の結果生じる、肝細胞分裂寿命の短縮の克服
- ② 肝血流阻害の最大の要因となりうる肝線維化の克服

本研究では、肝線維症の新たな分子標的治療法の開発を目的に、肝細胞の分裂寿命の延長に関する実験的研究と、肝の線維化に中心的役割を担う肝星細胞 (hepatic stellate cell; HSC) の活性化抑制に関する分子機構の同定を行った。

【方法】

- ① 肝細胞の分裂寿命の延長に関する実験：hTERT (human telomerase reverse transcriptase) のプロモーター領域に estrogen response element が存在することに着目し、エストロゲンによる肝細胞の分裂寿命に関する実験を *in vitro*, *in vivo* で行った。
- ② HSC の活性化抑制作用を持つ、trichostatin A (TSA) および interferon- γ (IFN- γ) の活性化抑制機構の同定を目指し、プロテオーム解析を行った。

【結果】1.エストロゲンの hTERT に対する影響：①エストロゲンは、肝初代培養細胞において hTERT 遺伝子のプロモーター領域を刺激し転写活性を上昇させることで、テロメラーゼ活性を上昇させた。②エストロゲン添加による長期継代培養では、テロメア長の短縮を抑制可能であった。③四塩化炭素肝硬変モデルラットでも、エストロゲンの投与により、肝細胞のテロメア長の短縮抑制が可能であった。2.HSC の活性化抑制薬剤によるプロテオーム解析：①TSA, IFN- γ による線維化関連分子の分泌抑制が認められた。②新たに TSA, IFN- γ には脂肪酸代謝系の関連酵素に影響を与えることが明らかとなり、HSC の本来の機能である fat storing cell としての形質回復にも役立つことが明らかとなった。③ IFN- γ には TNF-alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) の発現抑制を介した HSC 活性化抑制作用があることを明らかにした。

【結語】肝線維症の分子標的治療薬として、肝細胞の分裂寿命の延長には外因性のエストロゲンが、肝線維化の抑制には TSA, IFN- γ が有効である可能性が示唆された。

頸動脈内膜剥離術後過灌流の発生メカニズムと神経組織に与える影響の解明

岩手医科大学・医学部・脳神経外科

小笠原邦昭, 久保慶高, 吉田研二, 別府高明, 小川 彰

『目的』1)頸部頸動脈内膜剥離術後過灌流の発生に術前慢性脳虚血とともに術中急性虚血が関与しているかどうか. 2)頸部頸動脈内膜剥離術中の内頸動脈遮断により脳内にフリーラジカル反応が起こるのか. また, 起こるとしたら, この程度と術後高次脳機能との間に関連があるのか. さらに, 術後高次脳機能障害をきたした症例の脳代謝はどうなっているのか. を解明することを目的とした.

『方法』術前後に脳血流 SPECT により脳循環を, 術中に経頭蓋脳酸素飽和度モニターにより脳虚血状態を測定した. また, 術中に頸静脈球部から持続的に頭蓋内からの静脈血をサンプリングし, 脳内フリーラジカル反応の指標である MDA-LDL を内頸動脈遮断前, 中, 解除後に測定した.

『結果』1)について:術後過灌流は術前脳循環低下症例の 18 例中 10 例(56%)に発生した. 術前脳循環正常症例(71 例)では 1 例も術後過灌流は出現しなかった. 頸動脈遮断中に重度の虚血を呈した 16 例中 9 例(56%)に術後過灌流が出現した. 頸動脈遮断中に重度の虚血を呈さなかった 73 例中術後過灌流を呈したのは 1 例(5%)であった. 多変量解析では術前の脳循環低下と頸動脈遮断中の重度脳虚血が術後過灌流発生の有意な独立因子であった. 2)について:頸動脈内膜剥離術55症例につき検討した. 脳内のフリーラジカル反応の指標である頸静脈球部 MDA-LDL 濃度は, 内頸動脈遮断前に比し内頸動脈遮断解放後5分および 20 分で有意に高い値を示した. また, 遮断中の脳虚血重症度と遮断解放後の頸静脈球部 MDA-LDL 濃度は高い正の相関を示した. また, 遮断解放後の頸静脈球部 MDA-LDL 濃度は術後高次脳機能障害発生の有意な独立因子であった. さらに, 術後高次脳機能障害例は MRI では形態的に異常はなかったが, PET による脳酸素代謝は明らかに低下していた.

『結論』1)頸部頸動脈内膜剥離術後過灌流の発生に術前慢性脳虚血とともに術中急性虚血が関与している. 2)頸部頸動脈内膜剥離術中の内頸動脈遮断により脳虚血が強ければ強いほど脳内にフリーラジカル反応が強く起こる. この脳内フリーラジカル反応は術後高次脳機能の出現に関与している.

P-15

マンノース結合リポソームによる ITP モデルマウス治療の基礎的研究

岩手医科大学・医学部・血液内科

石田陽治, 村井一範, 筑紫泰彦, 小宅達郎, 古和田周吾

はじめに: 特発性血小板減少性紫斑病(Idiopathic Thrombocytic Purpura: ITP)とは, 明らかな原因や基礎疾患がないにもかかわらず, 血小板の破壊が亢進し, 血小板減少をきたす後天性疾患である. 血小板破壊機序としては血小板に対する自己抗体が血小板に結合し, 網内系のマクロファージの Fc レセプターに自己抗体・血小板複合体が結合し貪食されてしまうと考えられている. 治療としては副腎皮質ホルモン投与で約2/3が軽快し, 残りの1/3の2/3も摘脾で軽快する. 約1割が不応性となる. 不応性の原因ははっきりしていないが, マクロファージが脾臓のみならず至る所に存在するためかもしれない. そこで, 網内系のマクロファージを特異的に破壊させる薬剤の開発を行った. マクロファージはマンノースレセプターを表面上に発現しているために, マンノースをもつ物質を特異的に貪食する. ドキソルビシンを内包した, 表面にマンノースを結合させたリポソームを作製して以下の実験を行った.

方法と結果: ddYマウスにTGC2mlを腹腔内投与し, 72時間後にマクロファージを採取した. マクロファージにマンノース(+)/(-) ドキソルビシン内包リポソームを加え30分間37°Cでincubation後にMTTアッセイを行ったところ, 有意にマンノース(+)
リポソームのほうがマンノース(-)リポソームよりも生存率は低下した. 同様にマクロファージによるマンノース(+)/(-) ローダミンラベルリポソームの取り込み実験をしたところ, マンノース(+)
リポソームのほうがマンノース(-)リポソームよりもローダミン取り込みは増加した.

ddYマウスにマンノース(+)/(-) ドキソルビシン内包リポソームを投与後24時間後に抗マウス血小板抗体を投与した. 12時間後に血小板数を測定したところ, マンノース(-)
リポソーム投与群は8匹中8匹が血小板減少をきたしたのに対しマンノース(+)
リポソーム投与群は8匹中6匹が血小板は減少せず正常値であった.

結論: マンノース(+)
ドキソルビシン内包リポソームはマウスの体中のマクロファージを特異的に破壊することが強く示唆された. 将来的にITPの治療にマンノース(+)
ドキソルビシン内包リポソームが有効となる可能性が考えられた.

P-16

マウス紫外線照射モデルを用いた coenzyme Q の光老化抑制効果の検討

岩手医科大学・医学部・皮膚科学講座

高橋和宏, 前田文彦, 馬場俊右, 赤坂俊英

ヘアレスモルモット(メス, 1歳)8匹の背部皮膚に対し, 平成16年5月28日より, 週3回, UVB照射を施行した. 初回照射量 0.036 J/cm^2 より開始し漸増, 8月12日の単回照射量 0.126 J/cm^2 , 計 4.534 J/cm^2 照射した. この時点で, 皮膚は鱗屑を伴う外観を呈したが, 病理組織学的には健常部と比較して明らかな差をみなかった. 以後も週3回, 単回照射量 0.25 J/cm^2 に設定し, 計56回, 平成17年2月17日の時点で総照射量 18.534 J/cm^2 まで照射した. 照射部位に若干の鱗屑紅斑を呈したが, この時点においても病理組織学的所見に健常部と明らかな差はなかった. さらに平成17年10月最終週まで総照射量 46.3 J/cm^2 のUVB照射を行ったが, 形態学的, 病理組織学的な変化は現れなかった.

他施設との共同研究において, ヘアレスマウス HR-1 を用いたしわ解析の研究を行っているが, このマウスでは照射により約1~2ヶ月で形態的变化, またMMPの変化が現れることを確認しており, 当科でもこのマウスを現在UVB照射中である. しかし, 同実験系を用いている研究者間で, マウス自体の皮膚特性の変化と思われるが, 以前はUVB照射により明らかなしわ形成がみられたHR-1マウスに, 個体により照射してもしわが形成されないものが現れ, 問題となっている.

グリオーマの術前検査としての拡散テンソル MRI および拡散強調 MRI の応用

岩手医科大学・医学部・脳神経外科

別府高明, 久保慶高, 吉田研二, 小笠原邦昭, 小川 彰

『目的』1) 組織内での水分子の拡散の強さと方向性の指標である拡散テンソル MRI による fractional anisotropy (FA) をグリオーマ腫瘍内で測定し, FA が各症例の腫瘍の組織構築をどのように反映しているかを検討した. 2) 組織内の水分子の拡散の強さを表す拡散強調 MRI を用いた, 3 dimensional anisotropy contrast axonography (3DAC) は脳内神経線維の走行を3原色で表すことが出来る手法である. 錐体路近傍に発生した膠芽腫が 3DAC 上でどのように神経線維に影響を与えているかを検討した. 以上, 1) 2) の検討を行い, 拡散テンソル MRI および拡散強調 MRI がグリオーマの術前検討に有用であるかを評価した.

『方法』上記 1) ではグリオーマ症例 29 例を対象に, 術前に拡散テンソル MRI を撮像し腫瘍部位に ROI をとり FA を計測した. FA と組織型の関係, FA と細胞密度, 血管密度の関係, 膠芽腫に限って FA と MIB-1 の関係を検討した.

上記 2) では, 膠芽腫症例 19 例を対象に, 術前に 3DAC を撮像し, 錐体路の色調変化と片麻痺の関係, 色調変化と FA の関係について検討した.

『結果』1) について: FA と組織型の関係では, 悪性度が増すほど FA が上昇する傾向を認めた. FA と細胞密度, FA と血管密度は正の相関を示した. 膠芽腫においては FA と MIB-1 は高い相関を示した. 2) について: 膠芽腫における 3DAC では, 腫瘍に隣接する錐体路の色調は不変, 黒色変化, 消失の3種類に分類された. とくに黒色変化した症例の片麻痺は他より強く非可逆的であり, FA も他より有意に低値をしめし, 黒色変化が錐体路への腫瘍浸潤を示している可能性が示唆された.

『結論』1) 2) の結果から拡散テンソル MRI および拡散強調 MRI がグリオーマ症例の術前検討に非常に有用であることが示唆された.

リコンビナント DIs ワクチンによる粘膜免疫誘導

¹岩手医科大学医学部, ²国立感染症研究所エイズ研究センター, ³北里研究所生物製剤研究所, ⁴国立感染症研究所ウイルス第三部, ⁵国立感染症研究所動物管理室

吉野直人¹, 兼清優², 萩原由加利³, 染谷健二⁴, 松尾和浩², 網康至⁵, 佐藤成大¹, 山本直樹², 本多三男²

HIV 感染の 80%以上は性感染であり, HIV は最初に生殖器や直腸の粘膜面を通過し感染していく. 即ち, これらの粘膜部位での防御能を高めることが HIV 感染防御において非常に効果があるものと考えられる. ワクシニアウイルス DI 株(DIs)は, 哺乳類細胞では増殖性がないため安全性が高い.

本研究では SIV Gag を組み込んだリコンビナント DIs (rDIs) を, 経鼻または経口でマウスに免疫し抗原特異的免疫応答を粘膜組織で誘導できるか検討した. これらのマウスでは SIVp27 特異抗体が血清中で検出され, さらにマウスの糞抽出液, 腔洗浄液中でも特異抗体が誘導された. SIVp27 特異抗体産生細胞は, 脾臓, パイエル板, 小腸の粘膜固有層リンパ球でも ELISPOT 法で検出された. 細胞性免疫応答は, 皮内免疫マウスの脾臓から分離した CD4 陽性 T 細胞に SIV Gag で特異的な刺激を加えることにより Th1 / Th2 サイトカインが産生された.

一般に粘膜免疫は粘膜を介した刺激により誘導され, 皮内接種のような全身免疫を誘導する条件下では粘膜免疫は誘導されないと考えられている. しかし, 皮内接種を行ったマウスでは全身免疫のみならず粘膜免疫も誘導された. これらの免疫応答は, 大腿部及び肩甲骨間のいずれに皮内免疫した場合でも観察された. また, 非働化し感染性をなくした rDIs では, これらの免疫応答は非常に弱くなっていた. 以上より, rDIs ワクチンは皮内接種により腔や腸管といった HIV 感染の標的となる粘膜部位に免疫を誘導することが出来ることが明らかになった.

経鼻免疫, 皮内免疫ともにワクチン接種後 1 年経過しても特異抗体は維持されており, DIs は粘膜免疫に対し有効かつ安全性の高いウイルスベクターであることが明らかになった.

P-19

抗原提示細胞系における細胞成熟化およびニコチン刺激時のニコチン受容体発現とサイトカイン分泌の変化

岩手医科大学・医学部・薬理学講座

近藤ゆき子, 平英一

[目的] 神経系と免疫系の相互的調節について研究が始まって久しいが, 詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない. 昨年, 迷走神経刺激を介して, 炎症反応, 特にマクロファージの機能が神経性調節を受けていることが示され, この過程において $\alpha 7$ 型のニコチン性アセチルコリン受容体(以下 nAChR)が重要な役割をは果たしていることが明らかになった. そこで今回私達は, 抗原提示細胞の1つである樹状細胞について培養細胞を用いて nAChR の発現とその機能を検討した.

[方法] 実験には樹状細胞系の培養細胞である JAWSII 細胞(C57BL/6 系 p53-deficient mouse の骨髄由来の細胞)を用いた. 細胞に発現している nAChR の各サブユニットの mRNA を RT-PCR により検出した. また, JAWSII 細胞に発現している nAChR と細胞表面抗原についてはフローサイトメトリーを用いて検討した. 細胞からのサイトカイン分泌は Bio-Plex Suspension Array System を用いて定量を行った.

[結果] RT-PCR の結果から JAWSII 細胞には $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$, $\beta 4$ サブユニットの mRNA が発現していた. フローサイトメトリーによる nAChR の検出は Alexa488 で標識した α -bungarotoxin を用い, その結果, 細胞表面に nAChR が確認された. また, マウスの単球および樹状細胞上に確認される CD80, CD86, MHC-I, CD11c の細胞表面抗原 が JAWSII 細胞上にも確認された. さらに, リポポリサッカライドや腫瘍壊死因子の樹状細胞成熟化刺激により, 細胞表面抗原の発現がより成熟した樹状細胞のパターンへと変化し, 細胞表面の nAChR は消失した. 以上より JAWSII 細胞において細胞が未成熟から成熟する過程で nAChR が細胞表面から消失することによりアセチルコリン刺激あるいは迷走神経の支配を受けにくくなる可能性が示唆された.

P-20

急性骨髄性白血病ならびに骨髄異形成症候群(MDS)における新規予後因子の探索と治療最適化の研究

岩手医科大学・医学部・¹⁾先端医療センター, ²⁾血液内科

¹⁾鈴木啓二郎, ²⁾石田陽治

Nucleoside analogue の代謝酵素である細胞内 high Km 5'-nucleotidase1 (cN-II) や deoxycytidine kinase (dCK)の発現が急性骨髄性白血病の予後に関連すると報告されている。ハイリスク骨髄異形成症候群(MDS)においてこれらの関連は不明であり, cN-II と dCK の発現 と予後との関連を検討した。本研究ではハイリスク MDS (RAEB、RAEB-t)と診断された 22 例の診断時骨髄単核球細胞より total RNA を抽出, cDNA を作成の後, Real-time PCR (LightCycler)で cN-II mRNA, dCK mRNA, β -actin mRNA を測定した。cN-II と dCK の発現は, K562 細胞を基準とし, β -actin mRNA との相対的定量法で表した。22 例 (男女比 1.66, 年齢 66.4 ± 7.9 歳)のハイリスク MDS 群における cN-II 発現量は平均値 1.56 ± 1.61 , 中央値 1.36 (0.77-6.77)で, 対照 (12 例, 平均値 0.23 ± 0.06 , 中央値 0.67 (0.17-0.34))と比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。またハイリスク MDS 群における dCK 発現量は対照と比べ有意な差はみられなかった。治療群 (n=15)の全生存期間(OS)の中央値は 16.5 ヶ月 (2.0-91.0)。cN-II 発現高発現群 (\geq 中央値, 8 例)の OS は 22.0 ヶ月, 低発現群 (7 例)は 15 ヶ月で, cN-II 高発現群で有意に短かった($p < 0.01$)。また治療開始からの生存期間(PCS)の中央値は 14.0 ヶ月で, cN-II 高発現群で 10 ヶ月, 低発現群では 16 ヶ月と高発現群で OS 同様に有意に短かった($p = 0.012$)。dCK の発現は生存期間に影響はなかった。cN-II 発現の差異は MDS 症例の予後に関連する因子であることが考えられた。

生物学的人工肝臓による劇症肝炎血漿浄化療法開発に向けた基礎的検討

岩手医科大学・医学部¹⁾内科学第一講座,²⁾バイオイメージングセンター
滝川康裕¹⁾, 井上絵里¹⁾, 林 世徳¹⁾, 鈴木一幸¹⁾, 吉田康夫²⁾, 遠山稿二郎²⁾

【目的】近年の人工肝補助装置による血液浄化療法の進歩にも関わらず、劇症肝炎の内科的救命率は 40%前後に留まっており、肝移植の 80%に遠く及ばないのが現状である。原因は、広範肝細胞死と肝細胞再生不全にあり、その克服には肝組織の微少環境を抗アポトーシスおよび肝細胞再生促進の条件に補正することが重要と考えられている。しかし、現在の血液浄化療法には限界があり、十分な効果が得られていない。この観点から、我々は、高度の肝細胞機能を保持した肝細胞株を用いた人工肝臓装置により、劇症肝炎患者血漿を浄化するための基礎的検討を行った。

【方法】立体培養により高度の肝細胞機能を発揮すると言われる肝癌細胞株 FLC-4 を、ラジアルフロー型細胞培養装置を用いて、多孔質支持体シラン上で、無血清培地 ASF-N(味の素社)環流下に 4-8 週間培養し、以下の項目を検討した。1. 細胞形態:培養終了後、細胞を支持体とともに 2.5%グルタルアルデヒドで固定後、走査型電子顕微鏡により観察した。2. 細胞数の推定:バイオリアクター前後の培養液中の溶存酸素濃度の差を酸素消費量とし、また、培養液中のブドウ糖濃度から 1 時間あたりブドウ糖消費量を算出し、これらの消費量からリアクター内の細胞数を概算した。3. 肝細胞特異的遺伝子の発現:培養終了後の肝細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR によりアルブミン、AFP、HNF-4、OTC、フィブリノゲンの発現を検討した。4. 肝細胞機能:培養液中のアルブミン、尿素濃度からこれらの合成分泌能を、また、アンモニア負荷、ICG 負荷実験から解毒能を検討した。

【成績】1. 細胞形態:培養細胞は強固な細胞間接着をもって密に配列し、一部は微絨毛の形成を認めたが、毛細胆管形成は明らかではなかった。2. 細胞数:酸素消費、ブドウ糖消費ともに細胞播種 4 日-3 週間より有意の上昇を認め、4-8 週で平衡に達した。3. 肝特異的遺伝子発現:アルブミン、AFP フィブリノゲン mRNA の発現を認めたが、HNF-4、OTC の遺伝子発現は検出されなかった。4. 肝細胞機能の発現:アルブミンおよび尿素的分泌を認め、アンモニア処理を認めたが、負荷 ICG は 20 分後に低下した後、緩やかな低下に留まった。

【結論】培養細胞は上皮性の発育を示し、一部の肝細胞特異的遺伝子、肝細胞機能を発現したが、十分な血漿浄化能を得るにはさらに改良が必要である。

ヒト腫瘍における染色体不安定化に関連する遺伝子の網羅的検索

岩手医科大学・医学部・¹⁾DNA解析室, ²⁾臨床病理

幅野 渉¹⁾, 菅井 有²⁾, 中村真一²⁾

【目的】ヒト腫瘍ではゲノムの不安定化が染色体レベルで起こり aneuploid(異倍体)核として観察される。遺伝子変異マウスの実験などから DNA のメチル化状態の変化が染色体の不安定化に関係することがわかってきた。だが、その分子機構の詳細は明らかにされていない。我々は同一腫瘍内に diploid(二倍体)および aneuploid 癌細胞が共存する multiploid 大腸癌を対象とし、両癌細胞間で DNA メチル化状態の異なる遺伝子を網羅的に検索し、染色体不安定化の関連遺伝子の同定を試みた。

【方法】大腸癌の新鮮組織を対象に腺管分離を行い、フローサイトメータにより ploidy を評価した。multiploid 癌 26 例よりソーティングにより diploid および aneuploid 癌細胞核を分離・回収した。そのうち 5 例を対象に MCA(methylated CpG island amplification)法を行い、両群でメチル化状態の異なる遺伝子断片を検索した。

【結果】aneuploid 癌細胞における hypermethylation(11 種)または hypomethylation(13 種)が予想される DNA 断片がそれぞれ同定された。このうち SALL4 遺伝子のプロモーター領域の hypermethylation は aneuploid 癌細胞において高頻度に検出された。一方、SALL4 遺伝子座近傍の ZFP64 遺伝子の hypermethylation も高頻度に検出されたが、ploidy との関係は見出されなかった。

【結論】multiploid 癌を解析モデルとした新しいアプローチは染色体の不安定化に関係する候補遺伝子の同定に有用と思われた。特に SALL4 遺伝子のメチル化による機能変化が大腸癌における染色体不安定化に関与する可能性が示唆された。

FACS Aria を用いた造血幹細胞の分離採取法の確立と肝細胞への分化誘導

岩手医科大学・医学部・病理学第二講座

永田有希, 阿保亜紀子, 前沢千早, 増田友之

我々は肝炎などによって失われた肝細胞を造血幹細胞を用いて補充するための研究を行っている。造血幹細胞が肝細胞に分化可能であることは知られているが、具体的にどのような種類の造血幹細胞が効率良く肝細胞へ分化しているのか、また、その際どのような細胞内変化が必要とされているのか等については、明らかにされていない部分が多い。そこで我々は、最も効率良く肝細胞へ分化する細胞集団を明らかにし、それらの細胞が肝細胞へ分化していく過程における遺伝子やタンパクの発現変化、クロマチン構造の変化などを解析していこうと考えている。

マウス骨髄から抽出した単核球に免疫抗体、蛍光色素を処理し、幹細胞マーカーとして知られる表現型の分布を FACS Aria を用いて解析した。その結果、ほとんどの SP 細胞が分化マーカー陰性、c-kit/Sca-1 陽性かつ CD34 陰性であることがわかった。すなわち、幹細胞と提唱されている SP 細胞は他のマーカーにより幹細胞と提唱されている KSL 細胞、CD34 陰性細胞とほぼ同一の細胞集団であることが判明した。

SP 細胞を造血幹細胞として分取し、肝細胞へ効率良く分化していくような誘導培地の組成を探索するために、現在様々なサイトカインを含む培地を用いた分化誘導実験を行っている。また、分化/発生に重要な役割を担う分子として近年注目を集めている miRNA を用いた分化誘導を試みている。SP 細胞と肝細胞における miRNA の発現を miRNA array を用いて解析したところ、いくつかの miRNA が SP 細胞または肝細胞特異的に発現していることがわかった。これらの miRNA はそれぞれの細胞の特性維持に重要であると考えられる。肝細胞への分化過程における miRNA 発現パターンの変化を解析し、*in vitro* の系で再現することによって、造血幹細胞を効率良く肝細胞へ分化させることが可能になると考えている。