

平成19年度自治医科大学大学院医学研究科 研究奨励賞研究成果報告

グレリンの高血圧症，メタボリックシンドロームに対する効果及び作用機序の検討

地域医療学系専攻4年 青木 弘貴

1. 背景

1999年，寒川らによってグレリンが同定された。グレリンの受容体は心臓，血管に存在が確認され循環器系への関与が示唆された。グレリンの循環器系への作用に関しては様々な報告がなされているが，血圧に対する作用については明確な結論は得られていない。

2. 目的

本研究では食塩負荷高血圧モデルと，糖により誘発されるフルクトース負荷高血圧モデルを対象とし，異なる機序によって誘発される高血圧に対するグレリンの効果を比較検討することを目的とした。

3. 方法

食塩負荷モデルはダールラットを高食塩食(8.0% NaCl)投与群およびコントロール食(0.3% NaCl)投与群とし，さらに各群をグレリン投与群，Vehicle投与群にわけ4群とした。グレリンの投与は高食塩食の投与と同時に開始した。フルクトース負荷モデルは高フルクトース食(60%フルクトース)，コントロール食(60%コーンスターチ)をSDラットに12週間摂餌させた。その後，各群をグレリン投与群，Vehicle投与群にわけて4群とした。グレリンは両モデルとも10nmol/kgを3週間1日2回腹腔内に連日投与した。血圧は無麻酔下にTail cuff法により測定した。グレリンの投与開始後，2週間目に採血，採尿を行い，種々の測定を行った。

4. 結果

グレリンは食塩負荷モデル，フルクトース負荷モデルのいずれにおいても降圧効果を示した。フルクトース負荷モデルではコントロール食群と同レベルまでの降圧効果を示し，更に

グレリンの投与終了後も部分的な降圧効果が維持された。食塩負荷モデルでは，高食塩食 - Vehicle投与群に対して $\Delta = 10 \sim 20 \text{mmHg}$ の降圧効果を示した。高食塩食 - グレリン投与群では尿量の増加，尿中NOx排泄量の増加，腎臓でのnNOSの発現量の増加，血中アルドステロン濃度の低下を認めた。

5. 考察

本研究ではグレリンが食塩負荷モデル，フルクトース負荷モデルの異なる機序により誘発される高血圧モデルに対して降圧効果を持つことを示した。食塩負荷高血圧モデルに対しては部分的に，フルクトース負荷高血圧モデルに対して対しては完全なる降圧効果を示し，各モデルに対して異なる降圧効果を示した。これは高血圧の分類，病態解析にも応用されることが期待できる。

高密度 SNP アレイを用いた特発性肺線維症・肺癌における染色体構造異常の同定

地域医療学系専攻4年 榎本 宗浩

研究目的

肺癌は日本人における癌死亡の第1位をしめる難治性疾患である。一方，原因不明の慢性間質性肺炎である特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は，約20から30%に肺癌を合併することが知られている。IPFの発病には，肺癌と同様の染色体構造異常が関与していることが示唆されているが，詳細は不明な点が多い。本研究では，SNPタイピングアレイを用いて，肺癌およびIPF臨床検体の網羅的，コピー数変化 (copy number alterations: CNA)，ヘテロ接合性の消失 (loss-of-heterozygosity: LOH) 解析を大規模に行い，両疾患に関連する染色体異常部位の同定と，その部位に存在する遺伝子の機能解析を行うことを試みた。

研究方法

1992年から2006年の間、自治医科大学附属病院で診断、治療目的に外科的切除された肺癌40例、IPF 9例を含む慢性間質性肺炎21例の病変部肺組織、肺癌切除肺の健常部組織21例、および肺癌3例、IPF 1例、IPF以外の慢性間質性肺炎1例、健康ボランティア15例の末梢血液細胞を対象とした。各検体より抽出したDNAをAffymetrix社 Mapping 500K アレイプロトコールに従い解析し、全染色体のCNAとLOH予測をおこなった。その後、疾患別に高頻度で認められる、CNA及びLOH部位の遺伝子について、機能解析を行った。

研究成績

肺癌、IPFの全染色体に渡る平均解像度4.7kbpの詳細なCNA、LOHデータベースを得た。

CNA解析では、扁平上皮癌特異的なepithelial cell transforming sequence-2 oncogene (ECT2) 遺伝子を同定し、塩基配列上、機能異常を引き起こすようなスプライシング異常が生じていた。

LOH解析では、stromal antigen-1 (STAG1) がIPF症例の約80%と肺癌症例の約60%に共通してLOHの候補遺伝子となっていた。また臨床肺癌症例の約40%で病変部のSTAG1発現が、正常肺部分に比べ50%以上低下していた。STAG1のLOH可能性をもつ肺癌症例の約50%に、同遺伝子の機能喪失性スプライシング異常が発生していた。実験的に構築したSTAG1高発現細胞は増殖速度が低下していた。また、ルシフェラーゼアッセイやfluorescence activated cell sorting解析の結果、STAG1はTP53やRBなどの活性化を通して細胞周期のSからG2/M期を抑制すると考えられた。さらにRNA抑制実験では、STAG1の発現が約50%低下することで細胞が腫瘍性変化することを確認した。

結論

ECT2は肺扁平上皮癌の成立に関与する遺伝子の可能性があり、STAG1は、IPFの癌化に関与するあらたな癌抑制遺伝子の候補と考えられた。

潰瘍性大腸炎の発癌とDNA異常メチル化の意義

地域医療学系専攻4年 岡田晋一郎

目的

潰瘍性大腸炎の大腸癌発生率は通常型散発性大腸癌より高く、原因として慢性炎症の関与が示唆されている。慢性炎症に伴う発癌過程では、癌関連遺伝子のDNAメチル化異常が観察され、癌化の背景に遺伝子修飾異常が関与していると考えられるため、潰瘍性大腸炎特有のDNAメチル化異常の関与を予測し、その同定と検証を行った。

方法

7例の担癌潰瘍性大腸炎症例の癌部と非癌部から抽出したDNAを対象にMethylation sensitive representational difference analysis (MS-RDA)法を用いて、潰瘍性大腸炎の癌部に特有のメチル化異常遺伝子(Pleckstrin and Sec7 homology domains: PSD)を同定し、そのプロモーター領域のメチル化異常頻度を、Methylation specific PCR法で評価した。

潰瘍性大腸炎癌部から抽出したRNAを対象に、リアルタイムRT-PCR法で遺伝子発現を定量した。さらに、PSD遺伝子の発癌に関する機序を検討するため、PSD-small interfering RNAの遺伝子導入によってその発現を抑制されたヒト線維芽細胞の細胞老化、アポトーシスの誘導、細胞増殖能をそれぞれ β -galactosidase活性の測定、Apop Tagによるアポトーシス細胞の検出、抗Ki-67抗体の免疫組織化学染色を行い、評価した。

結果

MS-RDA法によりPSDを同定し、そのメチル化異常は、潰瘍性大腸炎癌部で7例中6例(85.7%)に認め、非癌部では7例中3例(42.9%)だった。また、PSD遺伝子発現は癌部の7例中5例(71.4%)で抑制された。

PSDの発現を抑制したヒト線維芽細胞における β -galactosidase陽性細胞は18.9%で、抗Ki-67抗体陽性細胞は12.8%であり、いずれもPSD発現を抑制しなかったヒト線維芽細胞と比べ統計学的に有意差があった。

結論

MS-RDA 法により検出された PSD 遺伝子は 担癌潰瘍性大腸炎の癌部で高頻度にメチル化され、その発現は抑制されていた。PSD 遺伝子のメチル化異常は細胞老化の抑制と細胞増殖能の促進により、潰瘍性大腸炎の発癌に関与していることが示唆された。

IFN-lambda (IL-28/29) による宿主腫瘍免疫の誘導とそのメカニズムの研究

地域医療学系専攻 4年 佐藤 篤子

A 研究目的

腫瘍免疫活性化を目的として、近年行われているサイトカイン治療は、十分な効果が得られないことが問題となっている。そこで、ゲノム解析により同定される新規サイトカインが注目され、その生物学的意義や応用が大きな興味となっている。新規サイトカイン IFN-lambda (IL-28/IL-29) は、がん細胞の増殖を制御するとともに、宿主 NK 細胞の活性化を介して抗腫瘍効果を発揮する。本研究では IFN-lambda による NK 細胞の活性化と抗腫瘍効果について、NK 細胞活性化因子である IL-21 を指標に検討を行った。

B 研究方法

サイトカイン刺激後の NK 細胞内の perforin を Western Blot 法で解析し、さらに NK 細胞の増殖を BrdU uptake で比較した。また luciferase 遺伝子を導入した Yac-1 細胞の luc 活性を指標に、サイトカイン刺激後の NK 細胞による cytotoxic assay を行った。次に、IFN-lambda 或は IL-21 を一過性に発現させた B16/F10 細胞による肺転移モデルマウスを作成し、抗腫瘍効果を比較検討した。

C 研究結果

IFN-lambda 及び IL-21 で刺激した DX5+ NK 細胞は、両者で増殖能に大きな差は認めず、perforin の induction は IFN-lambda 刺激群の方が増強していた。また cytotoxic assay の結果、IL-21 刺激群が、IFN-lambda 刺激群よりも luc 活性を低下させ ($p < 0.001$)、強い細胞傷害活

性を示した。マウス肺転移モデルでは、IFN-lambda 及び IL-21 治療群で優れた肺転移形成抑制能を示したが、両者に有意差は認めなかった。これらの抗腫瘍効果は prf KO, T-bet KO マウスではキャンセルされた。

D 考察と結論

IFN-lambda の NK 細胞への効果は不明な点が多い。本研究で IFN-lambda による NK 細胞増殖能、活性化能の誘導効果は、IL-21 には及ばないことがわかった。また NK 細胞を介した腫瘍破壊について、免疫不全マウスの結果より IFN-lambda による治療効果は、effector 分子の存在、すなわち perforin, Th1 サイトカインを介してひきおこされると示唆された。

完全長 cDNA 発現レトロウイルスライブラリーを用いた肺癌原因遺伝子の同定

地域医療学系専攻 4年 曾田 学

肺癌は先進国における悪性腫瘍死亡原因の第 1 位を占める予後不良の疾患であるが、発癌メカニズムについては不明な点が多く有効な治療法も限られている。今回、外科的に切除された肺癌臨床検体より作成した cDNA をレトロウイルスプラスミドに挿入することで、cDNA 発現組み換えレトロウイルスライブラリーを構築し、マウス線維芽細胞 3T3 を用いたフォーカス形成アッセイを行うことで、肺癌発症に関与する癌遺伝子を同定することを目的とした。

その結果、微量管会合タンパク EML4 と、受容体型チロシンキナーゼ ALK の細胞内領域とが融合した新しい活性型チロシンキナーゼ EML4-ALK が肺がん症例の一部で発現していることを発見した。EML4-ALK は非常に強い癌化能を有するチロシンキナーゼで、本遺伝子を導入した 3T3 細胞をヌードマウスに皮下接種すると巨大な腫瘍を形成した。また、EML4-ALK はチロシンキナーゼ活性依存性に癌化能を獲得していることも明らかになった。我々は別の実験で、EML4 の塩基性ドメインを介して EML4-ALK が恒常的に二量体化することで、外部リガンド刺激の有無にかかわらず常に活性

化され、強力な細胞増殖シグナルを発信することを確認した。

この遺伝子の発現頻度に関して検討した結果、本邦の非小細胞肺癌症例の約5%に認められた。また同遺伝子陽性症例には既知の癌遺伝子である KRAS, EGFR の変異は認められず非小細胞肺癌の新たなサブグループを定義すると考えられる。

臨床応用として、ALK 阻害剤が *EML4-ALK* 陽性肺癌に対する分子標的治療剤になると期待される。このことを検討するために *EML4-ALK* 導入によりサイトカイン非依存性に増殖可能になった細胞株に対し、ALK 活性阻害物質である WHI-P154 を添加してみた。その結果 WHI-P154 の濃度依存性に細胞増殖が著明に抑制され細胞死が誘導されることが確認された。すなわち *EML4-ALK* 活性依存性に増殖している癌細胞に対しては、ALK 阻害剤が有効な分子標的治療薬になり得ることが示されたのである。また、喀痰からの RT-PCR 法による *EML4-ALK* 遺伝子の検出も可能で、本遺伝子陽性肺癌患者の早期スクリーニングに応用できることも確認した。

EML4-ALK は、肺癌の新たな分子診断法および分子標的療法剤の開発を可能にする優れた標的分子と考えられる。

多発性骨髄腫をモデルとした癌幹細胞標的療法の開発

地域医療学系専攻4年 畑野かおる

【緒言】

多発性骨髄腫は薬物療法に抵抗性を示し、治癒に至る治療法が確立されていない。骨髄腫細胞と造血支持細胞との接着により誘導される薬剤耐性 (cell adhesion mediated drug resistance; CAM-DR) において、鍵となる接着分子などは十分に解明されていない。一方、ボルテゾミブは CAM-DR 抑制作用を有する骨髄腫の新規治療薬だが、その作用機序は十分に解明されていない。本研究では、骨髄腫細胞に発現する接着分子から CAM-DR 誘導の鍵分子同定を試み、

これを標的とした CAM-DR 抑制方法を検討した。

【結果】

1. 骨髄腫細胞株及び骨髄腫患者由来の骨髄細胞にて、CD29 (β 1-integrin), CD44, CD49d (α 4-integrin, VLA-4の subunit), CD54 (ICAM-1), CD138 (syndecan-1) 及び CD184 (CXCR4) の高発現を認めた。2. sh-RNA により各接着分子の発現をノックダウンした骨髄腫細胞株亜株を樹立し、骨髄ストローマ細胞との共培養系を用いて CAM-DR を比較した結果、CD49d ノックダウン亜株にのみ有意な CAM-DR の抑制効果が認められた。3. 代表的な抗骨髄腫薬のうち、ボルテゾミブは有意な CD49d 発現低下作用を示したが、vincristine (VCR), dexamethasone (Dexa), および doxorubicin (Doxo) ではこの作用は認められなかった。4. ボルテゾミブ処理した骨髄腫細胞のストローマ細胞への接着能は著明に低下した。5. 共培養系において、骨髄腫細胞をボルテゾミブ処理した後に VCR または Dexa を作用させると、単剤作用時に比べ CAM-DR を著明に抑制できた。6. ウェスタンブロット法及び RT-PCR 法の解析から、ボルテゾミブが転写レベルで CD49d 発現を抑制することが示唆された。

【結論】

骨髄腫細胞の CAM-DR における鍵分子として VLA-4 を同定した。ボルテゾミブには VLA-4 発現の抑制とストローマ細胞への接着能低下によると思われる有意な CAM-DR 抑制効果が認められた。VLA-4 を標的とした治療法が骨髄腫患者の薬剤耐性克服に有効である可能性が示唆された。