

平成20年度自治医科大学医学部 研究奨励金研究成果報告

プロスタグランジン E₂ 受容体選択的作動薬 による肺損傷抑制に関する検討

内科学講座 呼吸器内科部門
細野 達也, 坂東 政司, 杉山幸比古

【背景】

急性呼吸促迫症候群 (ARDS) は死亡率が35-65%と予後不良な疾患であり, また, 特発性肺線維症は肺の線維化を来す原因不明の難治性疾患で, 両疾患に対する有効な治療法は現時点において確立されていない。プロスタグランジン (PG) E₂ は抗炎症・抗線維化作用をもつ内因性防御因子とされ, 4種類の受容体 (EP1-4) を介し作用する。抗炎症・抗線維化作用は主に EP2・EP4を介するとされ, 併用による効果増強が報告されている。

【目的】

エンドトキシン (LPS) 肺損傷モデル・ブレオマイシン (BLM) 肺線維化モデルや, 肺構成細胞 cell line への LPS 刺激実験にて, PGE₂ 受容体選択的作動薬による肺障害抑制効果の検討を行うことを目的とした。

【方法】

① LPS 肺損傷モデルにおける EP2・EP4単独・併用投与。LPS 肺損傷モデル: time 0(hr) に LPS (100 μg/kg/60 μl) をマウスの鼻腔内に投与。マウスを EP2・EP4単独・併用投与群と生理食塩水投与群にわけて, 各群に LPS の鼻腔内投与を行い, time 6 (hr)・time 24 (hr) に犠牲死。肺胞洗浄液 (BALF) 中の総細胞数・細胞分画, 血清・BALF 中炎症性サイトカイン濃度を検討した。② BLM 肺線維化モデルにおける EP2・EP4単独・併用投与。BLM 肺線維化モデル: day 0に BLM (1mg/kg/50 μl) をマウスの気管内に単回投与。マウスを EP2・EP4単独・併用投与群と生理食塩水投与群にわけて, 各群に BLM の気管内投与を行い, day7・day28に犠牲死。肺損傷抑制効果は死亡

率, 体重減少, BALF 中の総細胞数・細胞分画にて, 肺線維化抑制効果は肺 Hydroxyproline の定量にて検討した。③肺胞マクロファージへの LPS 刺激における EP2・EP4単独・併用投与。LPS 刺激: MH-S 細胞 (murine alveolar macrophage cell line) に LPS 1 μg/mL の濃度で添加。EP2・EP4投与: 0.01, 0.1, 1, 10 μM の4濃度に調整し, LPS 刺激1時間前に単独・併用で添加。LPS 刺激6・24時間培養後に上清を回収し, 炎症性サイトカイン濃度の測定を行い検討した。

【結果】

① LPS 肺損傷モデルにおいて EP4投与・併用投与にて BALF 中の好中球を主体とする細胞浸潤を有意に抑制した。EP4投与にて LPS 投与6時間後の BALF 中の IL-6・TNF-α・MIP-2・IL-1β濃度の上昇抑制を認めた。また, EP4投与にて LPS 投与6・24時間後の血清 TNF-α 上昇抑制を認めた。血清 IL-6・KC 濃度は LPS 投与6時間後では上昇抑制を認めたが, 24時間後では増強されていた。EP2投与では有意な効果は認めなかった。② BLM 肺線維化モデルにおいて EP4投与・併用投与にて死亡率・急性期の体重減少・BALF 中の炎症細胞浸潤の抑制を認めた。しかし, 肺 Hydroxyproline の定量による肺線維化の抑制効果は認めなかった。EP2投与では有意な効果は認めなかった。③ LPS 刺激肺胞マクロファージにおいて EP4投与・併用投与にて, 6・24時間後の TNF-α・KC・MIP-2濃度の上昇抑制と24時間後の IL-6濃度の上昇抑制を認めた。EP2投与にて TNF-α濃度の上昇抑制を認めたが, IL-6・KC 濃度の上昇は増強されていた。

【結論】

EP4作動薬投与にて LPS や BLM による急性肺損傷の改善を認めたが, BLM による肺線維化の抑制は認めなかった。急性肺損傷における EP4作動薬を用いた治療の可能性が示唆された。

CD45プラスゲートフローサイトメトリを用いたCMLとMDSにおける芽球の表現型の解析

輸血・細胞移植部
岡 智子

【背景】

慢性骨髄性白血病（CML）と骨髄異形成症候群（MDS）は多能性造血幹細胞のクローン性異常で起こる。CMLではt(9;22)転座（Philadelphia (Ph) 染色体）に伴うBCR/ABL融合遺伝子の形成がみられ、BCR/ABL融合遺伝子と特異的に結合するチロシンキナーゼ阻害薬（イマチニブ、IMB）が導入され、IMBによって高率に細胞遺伝学的効果（Ph染色体の消失、CCR）と分子遺伝学的効果（BCR/ABLの消失、MMR）がもたらされる。しかし、一部の症例ではCCRに導入されず、CCRに導入されない例での生存率は低下する。現在、IMB投与前にIMBの反応性を推測する簡便な検査法は存在しない。近年、骨髄に少数存在する芽球を他の細胞と分離し、芽球に発現している抗原発現を検査するCD45プラスゲートフローサイトメトリ（CD45-FCM）が開発された。今回、CD45-FCMを用いて未治療のCMLの骨髄の芽球の表現型を検査しIMBの反応性との関係を検討した。

【対象と方法】

対象は初発未治療の慢性期のCMLの患者32例。IMBを開始し6ヶ月後と12ヶ月後の時点で評価した。IMB投与前にCD45-FCMで骨髄の芽球の表現型を検査し、投与6ヶ月後と12ヶ月後に骨髄穿刺を行いCCRとMMRの有無を検査した。細胞を3重染色しCD45-FCM法で芽球の表面抗原を解析した。対照として健常ヒト（7例）と不応性貧血のMDS（35例）の骨髄を用いた。群間の有意差検定はMann-WhitneyのU検定を用い、P値0.05未満を有意差ありと判断した。

【結果】

IMB投与12ヶ月後にCCRに入った例をA群（26例）と入らなかった例をB群（6例）とした。両群で、年齢、性別、初診時の白血球数、初診時の血小板数、付加染色体の有無、

Sokal score、骨髄塗抹標本の芽球の%に差はなかった。IMBの1日当たりの投与量は、A群で349mg、B群で284.4mg（ $p=0.051$ ）とB群で少ない傾向を認めた。芽球のCD19陽性率はA群で18.0%、B群で3.6%とB群で有意に低下していた。両群の芽球にCD7、CD11b、CD13、CD33、CD25、CD56、HLA-DRの陽性率に差はなかった。CD33/CD10、CD33/CD19、CD13/CD10、CD13/CD19の比をとると、各々（A群、6.0；B群、56.6）、（A群、6.0；B群、34.5）、（A群、7.7；B群、33.1）、（A群、4.9；B群、23.8）とB群で有意に比が増加していた。MDSの骨髄の芽球のCD19陽性率は32.0%、健常ヒトでは60.2%で、上記の4つの比は、各々（健常ヒト、0.7；MDS、3.2）、（健常ヒト、0.5；MDS、3.2）、（健常ヒト、0.6；MDS、2.5）、（健常ヒト、0.6；MDS、3.0）で、MDSは健常ヒトに類似していた。IMB投与6ヶ月後にCCRに入った群（24例）と入らなかった群（8例）で比較したところ、患者背景に差を認めず、後者でCD13/CD10（ $p=0.06$ ）を除く他の3つの比が有意に増加していた。IMB投与6ヶ月後にMMRを得た群（17例）とそうでない群（9例）を比較したところ、患者背景に差は認めず、後者でCD33/CD10（ $p=0.05$ ）を除く他の3つの比が有意に増加していた。

【結論】

腫瘍化に伴い骨髄の芽球中のB前駆細胞の割合が減少すること、IMB投与前に骨髄の芽球のCD33またはCD13とCD10またはCD19の比を調べることによって、IMBの反応性を推測できる可能性が示唆された。

癌抑制分子Cbl変異体による白血病発症メカニズムおよびCbl分子による細胞骨格制御機構の解明

内科学講座血液学部門 鈴木 隆浩

【目的】

c-Cbl分子はRINGフィンガー型E3ユビキチン化酵素であり、チロシンキナーゼの分解を促進することでキナーゼシグナルを抑制するとさ

れる。最近, *cbl* 遺伝子変異が一部の急性骨髄性白血病に認められることが報告され, 我々も骨髄異形成症候群において, RING フィンガー活性の減弱に影響するリンカー部位の変異を確認しており, 同変異体は NIH3T3細胞を *in vitro* で形質転換し得ることを確認している。そこで, 変異体による造血器腫瘍発症メカニズムを解明するため, 本研究ではマウス未分化造血細胞に変異体を導入し, これを移植することにより *in vivo* での腫瘍発症モデルの作成を試みた。

また, *Cbl* 分子はキナーゼシグナル制御の他にアダプター分子として機能し, 細胞接着・細胞骨格制御に関与することが知られている。腫瘍細胞では細胞接着機構の破綻がしばしば認められるため, 変異体と同様の状態になると予想される *Cbl* ノックアウト (*Cbl* KO) マウスを用いて, *Cbl* の細胞骨格制御機構について解析した。

【方法および結果】

腫瘍モデルマウスの作成では, 野生型 (*Wt*) および *Cbl* KO マウスの骨髄細胞に正常 *cbl* および変異体 *cbl* 遺伝子をレトロウイルスで導入し, 放射線照射マウスに移植した。その結果, 変異体導入 *Wt* 細胞を移植されたマウスで10匹中1匹のみで腫瘍発生が認められたものの, それ以外の移植マウスでは腫瘍発生は認められず, *cbl* 変異体は単独では腫瘍発生に結びつかないことが示唆された。

次に, *Cbl* 関連造血器腫瘍と細胞骨格制御異常の関連を検討するため, *Cbl* KO マウスの細胞骨格制御能について検討を行った。まず細胞運動能を検討するため, 骨髄未分化造血細胞 (Lineage 陰性細胞: *Lin*-細胞) の SDF1 およびフィブロネクチン (*Fib*) への走化能を Boyden Chamber を用いて測定したところ, KO 細胞では SDF1, *Fib* 共に有意に走化性の低下が認められた。また, 骨髄造血細胞の骨髄へのホーミング能を検討するため, 骨髄単核球を放射線照射マウス尾静脈に注射し, 3時間後の骨髄へのホーミングを測定したところ, KO 細胞では有意に定着が減弱していた。*Lin*-細胞でも同様の結果が認められており, *Cbl* KO 未分化造血細胞は骨髄へのホーミング能が低下していることが明らかとなった。また, 骨髄からの未

分化造血細胞の動員を検討するため, マウスに G-CSF を投与し, その後末梢血中に動員される未分化造血細胞 (*c-Kit*+, *Scal*+, *Lin*-細胞) 数を測定したところ, KO マウスでは有意に動員される細胞数が増加していることが明らかとなった。ホーミングの減弱および動員の増加には低分子量 G タンパク *Rac* の活性低下が関係していることが報告されているため, *Lin*-細胞の *Rac* 活性を測定したところ, KO 細胞では *Rac* 活性が減弱していることが判明した。さらに, KO マウスの胎児線維芽細胞を *Fib* コートプレート上に接着させ, 接着後のアクチンフィラメントの再構成を経時的に観察したところ, KO 細胞ではアクチンフィラメントの再構成が遅延していた。

【考察・結論】

造血幹細胞の骨髄へのホーミングには骨髄微少環境から放出される SDF1 などの走化因子が重要とされる。*Cbl* KO 血液細胞ではこれらの走化因子への遊走性が障害されており, このために骨髄ホーミングや G-CSF による幹細胞動員に異常をきたしていることが示唆される。*Cbl* は血液細胞における SDF1 や *Fib* から *Rac* に至るシグナルを制御しており, 血液細胞と骨髄微少環境との相互作用に重要な働きを担っていることが示唆される。

ヒツジ移植系での HoxB4-過性発現型 Sendai ウイルスベクターによるヒト造血幹細胞増幅効果と安全性評価

Safe and efficient expansion of human HSC with Sendai virus vector expressing HoxB4 in fetal sheep

増田 茂夫⁽¹⁾, 阿部 朋行⁽²⁾, 井上 誠⁽³⁾,
長谷川 護⁽³⁾, 林 聡⁽⁴⁾,
長尾 慶和⁽²⁾, 花園 豊⁽¹⁾

⁽¹⁾ 自治医大・再生医学

⁽²⁾ 宇都宮大・農学部

⁽³⁾ デイナベック株式会社

⁽⁴⁾ 国立成育医療センター・周産期診療部

【背景・目的】

これまでマウス移植系で HoxB4 遺伝子導入による造血幹細胞 (HSC) の増幅効果が報告されてきた。一方、HoxB4 発現レトロウイルスベクターを用いたサル・イヌの大型動物移植系では、マウスでは観察されなかった白血病の高率な発症が示され、安全性が危惧されている。そこで我々はセンダイウイルス (SeV) ベクターのうち特にポリメラーゼ遺伝子欠損型 SeV (SeV/ΔP) ベクターに注目した。これは通常の SeV ベクターがもつ自己複製能を欠損しており、HSC に対する高い遺伝子導入能は損なわずにその一過性発現を可能にする。今回この SeV/ΔP ベクターを用いた HoxB4 一過性発現によるヒト HSC 増幅に関する有効性と安全性をヒツジ移植系で検証した。

【方法】

ヒト臍帯血より CD34⁺ 分画を分離後、HoxB4 遺伝子発現 SeV/ΔP ベクターを 4 日間にわたって計 4 回感染させた。感染細胞は、免疫系が未成熟な 45-50 日齢 (満期 147 日) のヒツジ胎仔腹腔内へ移植した (HoxB4 群 $n=4$; 対照群 $n=4$)。生後の仔ヒツジ骨髄サンプルを用いたコロニー PCR によりヒト由来造血細胞の割合 (ヒトキメラ率) を定量評価した。また定期的な末梢血・骨髄評価により白血病発症の有無をモニターした。

【結果】

10⁵個の CD34⁺ 細胞を移植した場合、生後の仔ヒツジ骨髄中のヒトキメラ率は、HoxB4 群では対照群の 4.8 倍と計算された。なお移植後 12 ヶ月時点で白血病発症は皆無であり、仔ヒツジ骨髄・末梢血中に SeV ベクターゲノムの残存は PCR レベルで検出されなかった。

【結語】

SeV/ΔP ベクターによる HoxB4 の一過性発現の結果、ヒツジ胎仔移植の評価系で今まで報告されたレトロウイルスベクターとほぼ同等のヒト HSC 増幅効果が得られたと同時に、安全性に関してはレトロウイルスベクターを上回ると考えられた。

E 型肝炎ウイルスの感染性 cDNA クローンの確立と増殖機構解明への応用

感染・免疫学講座 ウイルス学部門

山田健太郎, 高橋 雅春, 星野 悠,
高橋 秀行, 市山 浩二, 長嶋 茂雄,
田中 利典, 岡本 宏明

我々は、最近、高力価の E 型肝炎ウイルス (HEV: JE03-1760F 株, 2.0×10^7 copies/ml) を含む糞便浮遊液を接種材料とし、肝癌細胞株 (PLC/PRF/5 細胞) および肺癌細胞株 (A549 細胞) を用いた効率的な HEV 細胞培養系を世界に先駆けて確立することができた (Tanaka et al. J Gen Virol 88:903-911, 2007)。その JE03-1760F 株の完全長 cDNA を含むプラスミド (pJE03-1760F/wt) を作製し、HEV の reverse genetics system を構築するとともに、これまでに機能が解明されていない ORF3 蛋白質のウイルス生活環における役割を明らかにすることを目的として本研究を行った。

1. 野生株 HEV の感染性 cDNA クローンの作製とその評価

野生株 JE03-1760F の全長 cDNA を含むプラスミド (pJE03-1760F/wt) を作製し、*in vitro* で合成した完全長 RNA を PLC/PRF/5 細胞に導入したところ、培養上清中への効率的な子ウイルス粒子の放出 (10^7 copies/ml) が認められた。この cDNA 由来 HEV は感染性を有し、培養上清を接種することにより PLC/PRF/5 細胞や A549 細胞で継代可能であった。両細胞において、糞便由来野生株 JE03-1760F と同等の感染性と増殖力を示すことが分かった。この研究成果を、J Gen Virol 誌 (Yamada et al., 90:457-462, 2009) に発表した。

2. ORF3 欠損変異クローンの作製とその解析

ORF3 の開始 (ATG) コドンを GCA に置換した変異ウイルス (pJE03-1760F/ΔORF3) を作製し、培養細胞に接種した。まず、IFA 法や Western blot 法によって細胞内で ORF3 蛋白質が発現されていないことを確認した。ORF3 蛋白質が産生されていないにも拘わらず、pJE03-1760F/ΔORF3 は感染性を有し、細胞内には HEV RNA を含有する浮上密度 $1.26-1.27 \text{ g/cm}^3$

の粒子が存在することが分かった。しかも、細胞内での HEV RNA レベルは野生株を接種した場合と同等であった。しかしながら、興味深いことに培養上清中では HEV RNA は検出されなかった。一方、野生株では培養上清中に効率よく子ウイルス（浮上密度 $1.15-1.16 \text{ g/cm}^3$ ）が放出され、その表面に ORF3 蛋白質を有することが抗 HEV ORF3 モノクローナル抗体を用いた immuno-capture PCR 法によって実証された。

これまで ORF3 蛋白質の機能は不明であり、ウイルス粒子との関係も明らかにされていなかった。本研究によって、ORF3 蛋白質が HEV 粒子の放出に必須であり、放出された粒子上に細胞膜成分とともに構造蛋白質の一つとして存在していることが初めて明らかになった。これらの研究成果は J Gen Virol 誌に (Yamada et al., 90:1880-1891, 2009) に公表された。

なお、本研究は本学で許可された遺伝子組換え実験計画（許可番号：07-7, 07-8, 08-24, 08-25）のもとで実施された。

小児 IgA 腎症に対する口蓋扁桃の関与の解明

小児科学講座

金井 孝裕, 小高 淳, 伊東 岳峰,
斎藤 貴志, 青柳 順, 桃井真里子

【背景】

IgA 腎症は、メサンギウム細胞の増殖・基質の増生とともに、メサンギウム領域に免疫グロブリン IgA（・補体成分 C3）の沈着を生じる、慢性糸球体腎炎として、1969年に Berger により報告された。IgA 腎症に対する治療法は今日においても確立されておらず、治療に抵抗を示した場合、発症30年後には5割の罹患者が末期腎不全に陥るとされている。しかし、近年、Hotta らの提唱する、IgA 腎症に対する口蓋扁桃摘出+ステロイドパルス療法の有効性が認識されつつあり、口蓋扁桃における、糖鎖不全 IgA・IgA1 サブクラス産生異常が、本症罹患者の一部において生じていることが分かってきた。しかし、同時に口蓋扁桃と糖鎖不全 IgA・IgA1 サブクラス産生異常の関係だけでは説明し

きれない病態も存在することも分かってきた。

1980年代に入り、メサンギウム領域に IgA の沈着はあるが、メサンギウム細胞の増殖・基質の増生はなく、メサンギウム領域への C3 の沈着もない症例が Sinnah と Waldherr らにより報告され、IgA 沈着症として、IgA 腎症と区別されている。

これまでに、本症罹患者の口蓋扁桃と、補体活性化との関連調べた報告はなく、IgA 腎症病態に対する口蓋扁桃の作用機序を明らかにするために、IgA 腎症罹患者の口蓋扁桃に対し、補体活性化因子の発現を病理学的に調べた。

【対象と方法】

本研究は、自治医科大学生命倫理委員会にて承認を受け、本研究に参加した患者・保護者からは、文章で同意を得た。

対象は、当科腎臓外来で、病理学的に IgA 腎症と診断された児（男3名、女11名、中央値年齢13歳、幅9-15）の摘出扁桃14検体とした。対照は、当院耳鼻咽喉科で、睡眠時無呼吸症候群（SAS）のため、口蓋扁桃を摘出した児（男3名、女4名；中央値年齢7歳、幅6-8）の摘出扁桃7検体とした。これらの摘出口蓋扁桃に対し、ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色とともに、補体活性化因子の発現の検討のために、補体活性化因子の CD11b (EPITOMICS, Inc.), CD21 (EPITOMICS, Inc.), CD35 (DAKO), CD46 (Hycult biotechnology b.v.), CD55 (SANTA CRUZ Biotechnology, Inc.), を、二次抗体には EnVision™ systems (DAKO) を用い、酵素抗体法にて、免疫染色を行った。

【結果】

HE 染色では、二群間の染色上の違いは明らかでなかった。CD11b 染色では、リンパ濾胞中心部に CD11b 陽性細胞を確認した症例数は、IgA 腎症群で、14例中1例、SAS 群では、7例中5例だった。CD21染色では、リンパ濾胞中心部に CD21陽性細胞を確認した症例数は、IgA 腎症群で、14例中11例、SAS 群では、7例中4例だった。CD35染色では、リンパ濾胞辺縁部に CD35陽性細胞を確認した症例数は、IgA 腎症群で14例中8例、SAS 群で7例中2例だった。

【考察】

CD11b陽性細胞は、IgA腎症患児の口蓋扁桃には少なく、IgA腎症の病態と関連している可能性が示された。CD21・35陽性細胞は、両群間において、明らかな差はなかった。しかし、各濾胞中心部、または、濾胞周辺における陽性細胞数には、差があった。また、同一の口蓋扁桃検体においても、濾胞断面が変わることで染色程度が変わる可能性もあり、今後の検討課題である。

ネスファチン-1の摂食調節機構の解明：視床下部オキシトシン神経の役割

前島 裕子¹, Udval Sedbazar¹,
須山 成朝¹, 河野 大輔¹, 尾仲 達史²,
高野 英介¹, 吉田 なつ¹, 小池 正人⁴,
内山 安男⁴, 藤原 研³, 屋代 隆³,
出崎 克也¹, 清水 弘行⁵, 中田 正範¹,
森 昌朋⁵, 矢田 俊彦¹

¹自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門

²生理学講座神経脳生理学部門

³解剖学講座組織学部門

⁴順天堂大学神経生物学形態学講座・神経機能構造学

⁵群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学

Nesfatin-1は2006年に発見された摂食抑制ペプチドであり、その摂食抑制作用はレプチンとは独立しており、かつメラノコルチン系を介することが報告されているが、その作用メカニズムの詳細は未解明である。本研究はNesfatin-1 (Nesf-1)による摂食抑制経路を明らかにすることを目的とした。Nesf-1の脳室内投与(ICV)によりc-FOSタンパクは視床下部室傍核(PVN)、延髄孤束核(NTS)を含むいくつかの神経核に発現しており、PVNの局所投与により摂食の抑制が見られたことから、PVNはNesf-1の摂食抑制仲介部位の一つであることが示唆された。

さらに、ICV後にc-FOSタンパクを発現したPVNニューロンの23%がオキシトシン(OXY)ニューロンであった。Nesf-1は、PVNより単離したOXYニューロンに直接作用し

て細胞内Ca²⁺を増加させたことから、OXYニューロンはNesf-1の標的細胞の一つであると考えられた。

PVNにおいてNesf-1とOXYは同一ニューロンに高頻度に共局在し、PVN OXYニューロンの約50%にNesf-1の発現が観察された。さらに電子顕微鏡像においてPVNニューロンにNesf-1を含む分泌顆粒が検出された。そこでNesf-1分泌によるOXYニューロンの調節を検討した。Nesf-1の添加はPVNスライスからOXY分泌を起こした。PVNスライスを高K⁺溶液で刺激するとOXYの分泌が観察され、その分泌はNesf-1 IgGの前処理による内因性Nesf-1作用阻害により著明に抑制された。この結果より、PVNにおいて内因性Nesf-1はautocrine/paracrine作用によりOXY分泌を促進していることが示唆された。さらにNesf-1による摂食抑制がOXY受容体アンタゴニストにより完全に消失した。以上より、Nesf-1の摂食抑制作用はOXY経路を介している。

Nesf-1 ICVによりPVNのOXYニューロンとNTSにc-FOS発現が見られ、またPVNのOXYニューロンの多くはNTSへ投射することが報告されている。本研究において、OXYによる摂食抑制はメラノコルチン3/4受容体アンタゴニストにより消失したことから、Nesf-1-OXY系の下流にNTS propiomelanocortin (POMC)ニューロンの関与が示唆された。そこでNTSより単離したニューロンにOXYを添加すると細胞内Ca²⁺の増加が見られ、OXY応答細胞の約60%はPOMCニューロンであった。さらにNTS POMCニューロンの周囲にはOXYニューロンの軸索末端が確認された。以上の結果より、OXYのNTS POMCへの直接作用が考えられた。

本研究結果より、Nesf-1はPVN OXY - NTS POMCニューロンを介して摂食抑制を起こすことが明らかとなった。

分化マーカー発現プロファイリングによる肺腺癌の分類とその分子細胞生物学的特性

統合病理学
松原 大祐

EGFR 遺伝子変異を有する肺腺癌は、組織形態上、肺胞上皮癌的な特徴を有するなど、肺癌の中で明確な subgroup を形成している。本研究で、我々は主に肺腺癌細胞株40株（肺腺癌細胞株35株、大細胞癌4株、腺扁平上皮癌1株）を用いて、EGFR、MET のリン酸化レベルをウェスタンブロット法によって検討し、ダイレクトシーケンシング、SNP アレイ解析を用いてEGFR、MET の遺伝子異常を調べ、さらに、オリゴヌクレオチドアレイ解析によって抽出したいくつかの遺伝子の発現パターンをもとに、肺腺癌細胞株の分類を試みた。【結果】肺腺癌細胞株は2つのグループに分かれ、Group1 (n=22) はMET、EGFR の高度の活性化が見られ、MET の増幅とEGFR 変異が高頻度で認められた。一方、Group2 (n=18) は、MET とEGFR の活性化は乏しく、MET 増幅もEGFR 変異も認められなかった。また、Group1はTTF-1、MUC1、CK7、MET、HER3、integrin beta6、E-cadherin、P-cadherin、urokinase-type plasminogen activator (u-PA)、Cox-2、laminin gamma2の高発現が見られ、一方、Group2は、vimentin、FGFR1、TCF-8の高発現が見られた。さらに、MET 阻害剤を中心とした薬剤の感受性について検討した。MET 阻害剤、EGFR 阻害剤に対して何らかの感受性を示す細胞株はGroup1に有意に多かったが、MET 阻害剤に高感受性を示したのはMET 増幅を伴う細胞株のみであり、MET の活性化レベルと感受性は必ずしも一致しなかった。40株のMET、EGFR、HER2の変異と増幅、KRAS 変異を調べたところ、EGFR 増幅を除いて相互排他的であり、MET、EGFR、HER2の変異と増幅は全てGroup1に局限した。MET の高い活性化レベルにも関わらず、MET 阻害剤抵抗性の株は、EGFR、HER2などの異常が高頻度に認められた。MET 増幅を有する細胞株では、MET 阻害剤により下流のERK、AKT の活性化

レベルが低下するが、抵抗性の株においては、変化はなかった。最後に我々の Group 分類の妥当性を検討するため、公開されている多施設間の肺腺癌症例442例のオリゴヌクレオチドアレイ解析データ (Nat Med. 2008 Aug;14(8):812-3.) を使い、今回抽出した Group1, 2に特徴的な遺伝子発現をもとに、Cluster 解析を行った。その結果、肺腺癌細胞株における Group1、Group2それぞれに相当する cluster を見出したが、Group1はさらに2群に分かれ、上皮マーカー (TTF-1、MUC1、CK7) の高発現を見せるものの、増殖、浸潤に関する遺伝子発現の低い cluster (Group1A) と上皮マーカーの発現を見せ、増殖、浸潤に関する遺伝子も高発現を示す cluster (Group1B) に分かれた。Group1B、Group2の肺腺癌症例はGroup1Aの肺腺癌症例よりも有意に予後不良であり、組織形態学的に低分化であった。Group1B と Group2との間に臨床病理学的因子の有意な差はなかったが、術後化学療法、放射線療法の有無と生命予後を検討したところ、Group2のほうがGroup1Bよりも化学療法、放射線に対し高い感受性を示す可能性が示唆された。【結論】上皮マーカー (TTF-1、MUC1、CK7) を発現する肺腺癌 (Group1) はMET 増幅、EGFR 変異を高頻度に有し、MET、EGFR の高度の活性化が見られ、MET 阻害剤、EGFR 阻害剤に対しなんらかの感受性を示した。一方、Group2はそれらの遺伝子の異常、活性はほとんど見られず、細胞生物学的な性質も異なる。Group2はGroup1とは異なる治療戦略が必要である。

高血圧患者のモーニングサージと血管内皮機能、圧受容体反射の関連

甲谷 友幸, 星出 聡, 江口 和男,
石川 譲治, 島田 和幸, 苅尾 七臣
自治医科大学内科学講座 循環器内科学

要約：近年、血管内皮機能が心血管リスクをもつ患者で低下しているとの報告がされている。高血圧患者においても、他の高血圧性臓器障害を持たない段階で血管内皮障害が存在すること

も示されている。一方、圧受容体感受性の低下も動脈硬化に関連していることが示されている。本研究では、外来通院中の治療中高血圧患者93名を対象に、診察室血圧および自由行動下血圧測定を行った。右上腕のFlow-mediated vasodilatation (FMD) で血管内皮機能の評価を行い、また圧受容体反射 (BRS) を測定した。対象者の平均年齢は 63 ± 11 歳、男性は49%であった。

単変量解析では男性でFMDは低く (4.9 ± 2.9 vs. $6.1 \pm 3.1\%$, $p=0.046$)、また年齢とFMDは有意な逆相関がみられた ($r=-0.23$, $p=0.029$)。診察室血圧および24時間平均血圧とFMDは有意な相関は見られなかった。血圧モーニングサージとFMDは有意な正相関がみられた ($r=0.20$, $p=0.05$)。年齢、性、24時間血圧を補正しても血圧モーニングサージはFMDと有意な正相関がみられた ($\beta=0.24$, $p=0.026$)。血圧モーニングサージは(早朝2時間の平均収縮期血圧-夜間最低収縮期血圧)で定義されるため、年齢、性、早朝2時間の平均収縮期血圧、夜間最低収縮期血圧をモデルに入れてFMDとの相関を調べると、夜間最低収縮期血圧とFMDは有意な負の相関があり ($\beta=-0.33$, $p=0.019$)、夜間最低収縮期血圧高値がFMDのリスクである可能性が示唆された。早朝血圧は有意な因子として残らなかった。

BRSは年齢や性別と有意な相関は見られなかった。BRSは睡眠時血圧と逆相関があり ($r=-0.24$, $p=0.05$)、24時間自由行動下血圧で評価した日中血圧と睡眠時血圧の差に正相関していたが ($r=0.24$, $p=0.046$)、これらの関係は年齢、性、24時間平均血圧で補正すると有意ではなかった。

モーニングサージではなく夜間最低収縮期血圧が血管内皮機能障害と関連していた。介在するメカニズムとして睡眠時無呼吸や食塩感受性などが考えられるが今後の検討課題である。

尿中 $\beta 2$ ミクログロブリンの血球貪食症候群早期診断への応用：成人症例での検討

大西佐知子, 釜田 康之, 長嶋 孝夫,
上村 健, 岩本 雅弘, 簗田 清次
自治医科大学 アレルギー・膠原病学部門

目的：1994年 Hibi らにより、血球貪食症候群の病勢を反映するマーカーとして尿中 $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2m$) が有用であると報告された。現在、小児のマクロファージ活性化症候群において尿中 $\beta 2m$ が活動性の指標として用いられている。一方、成人の血球貪食症候群では、病勢を反映するマーカーとして血清フェリチンが用いられている。本研究では、尿中 $\beta 2m$ が膠原病関連血球貪食症候群の成人例において、早期診断および活動性の指標として有用かどうか検討した。また、 $\beta 2m$ の発現は $IFN \gamma$ と $TNF \alpha$ により調節され、血球貪食症候群では $IFN \gamma$ と $TNF \alpha$ が過剰に産生されるといわれている。本研究では、患者血清の $IFN \gamma$ と $TNF \alpha$ を測定し、尿中 $\beta 2m$ および血清フェリチンの変動と比較研究した。

方法：当科に入院した患者のうち、血球貪食症候群を発症した5人を対象にした。基礎疾患は、全身性エリテマトーデス4人と関節リウマチ1人であった。5人の患者の尿中 $\beta 2m$ 、尿中NAGおよび血清フェリチンを経時的に測定した。血清 $IFN \gamma$ ・ $TNF \alpha$ は市販のELISAキットを用いて測定した。

結果：全例で尿中 $\beta 2m$ は病初期より上昇し、早期診断に有用であった。また病勢を鋭敏に反映するため治療効果判定の指標としても有用であった。経過中、尿中NAGの変動はほとんど認めなかった。血清 $IFN \gamma$ 、 $TNF \alpha$ 濃度が病勢と相関していたのは1例のみで、他はこれらのサイトカインの明らかな上昇は認めなかった。結論：尿中NAGと解離する尿中 $\beta 2m$ 上昇は、腎障害とは考えにくく、血球貪食症候群などサイトカインストームの存在を示唆する。本研究の5症例では、血球貪食症候群の経過と尿中 $\beta 2m$ は明らかに相関し、血球貪食症候群の早期診断・治療効果判定に有用であった。また、血球貪食症候群の発症には $IFN \gamma$ 、 TNF

a 以外のサイトカインの関与も示唆された。