

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業シンポジウム2009

病態解明から治療開発に向けたバリエーション研究

平成21年5月12日

自治医科大学

自治医科大学

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 シンポジウム2009

病態解明から治療開発に向けたバイオイメージング研究



日時:平成21年5月12日(火)13:30 ~

場所:自治医科大学 地域医療情報研修センター中講堂

開会の挨拶 (13:30~13:35) 高久史磨 自治医科大学 学長

イントロダクション (13:35~13:45) 小林英司 事業リーダー

司会 古川雄祐 13:45~14:30

肺がん発症マウスを用いた治療モデル実験 ゲノム機能研究部 間野博行

間葉系幹細胞腫瘍集積性のメカニズムと癌治療への応用 遺伝子治療研究部 内堀亮介

多発性骨髄腫の薬剤耐性機構の解明と治療への応用 幹細胞制御研究部 菊池次郎

司会 坂田洋一 14:30~15:30

蛍光発光イメージングが開くトランスレーショナル研究 バイオイメージング研究部 高橋将文

霊長類モデルにおける造血幹細胞のバイオマーキング 再生医学研究部 増田茂夫

レンチウイルスベクターをもちいた遺伝子改変血小板の *in vivo* 動態観察 分子病態研究部 大森 司

中枢性肺胞低換気症候群の病態に関わる分子的基盤 細胞生物研究部 池田啓子

司会 高橋将文 15:50~16:50

乳酸輸送体MCT2によるグルタミン酸受容体局在制御:
蛍光融合蛋白イメージング 統合生理学部門 前川文彦

下垂体後葉ホルモンとストレス 神経脳生理学部門 尾仲達史

ミトコンドリアを中心とした創薬標的タンパク質の探索研究 機能生化学部門 遠藤仁司

皮膚に注入されたマラリア原虫をバイオイメージングにより確認する 医動物学部門 松岡裕之



司会 小林英司 16:50~17:05

最新バイオイメージング機器説明

住商ファーマインターナショナル
プライムテック
ベルトールド ジャパン



特別講演 17:05~17:45

司会 村上 孝

財団法人癌研究会 癌研究所生化学部 部長 今村健志

光技術を駆使した革新的がん研究戦略
—がん細胞機能とがん微小環境のインビボイメージング—

閉会の挨拶(17:45~17:50) 富永眞一 医学部長



18:00~19:00 懇親会(西洋堂)

自治医科大学 バイオイメージング・シンポジウム プログラム事務局

自治医科大学 分子病態治療研究センター
バイオイメージング研究部(旧 臓器置換研究部)
〒329-0498 栃木県薬師寺3311-1
TEL:0285-58-7446; FAX: 0285-44-5365
E-mail:organt@jichi.ac.jp

自治医科大学私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
シンポジウム2009
大学院特別講義

光技術を駆使した革新的がん研究戦略

－がん細胞機能とがん微小環境のインビボイメージング－

財団法人癌研究会癌研究所
生化学部長 今村健志

細胞や生体分子の動態および機能を、生きている動物の中で解析して理解することは、現在の生命科学研究分野の最も重要な課題である。例えば、がんにおいては、がん細胞は、まず原発巣において増殖し、その病態は刻々と変化し、さらには血行性・リンパ行性に遠隔臓器に転移し、転移巣で新たな増殖・浸潤を開始する。また、がん細胞そのものだけでなく、周囲の微小環境が、発がんやがんの悪性化に大きな影響を及ぼしていることもわかってきた。よって、がんの病態解明には、インビトロで組織や細胞を固定したりすりつぶしたりする解析だけではなく、インビボで細胞機能と微小環境を時空間的かつ統合的に解析することが必須である。

近年、動物が生きた状態で細胞や生体分子を可視化するインビボ光イメージングが急速に進歩した。この背景には、分子生物学の進歩による新しい蛍光蛋白質や発光蛋白質の発見とその改良、近赤外蛍光プローブ作製技術の進歩、さらにレーザー、蛍光顕微鏡や超高感度CCDカメラなどの光学機器の性能の飛躍的向上がある。この新しいテクノロジーの台頭は、これまでの「要素還元論的分子生物学」または「インビトロ分子生物学」に対して、「インビボ分子生物学」と言うべき新たな研究のフレームワークを提供し、革新的な新研究領域の創成を促す。

本発表では、がん研究領域へのインビボ光イメージングの応用について、最近の我々のデータを紹介する。具体的には、生きているマウスでのがんの増殖と転移、およびがん細胞内のシグナル伝達系のモニタリング、がんの血管新生、リンパ管新生およびセンチネルリンパ節などのイメージングを紹介する。さらに、分子プローブを用いたプロテアーゼ活性のインビボイメージングやがん細胞の細胞周期のインビボイメージングの実例を紹介する。以上を踏まえ、光イメージング技術を用いた新たながん研究戦略の近未来の展望について考察したい。

演題	肺がん発症マウスを用いた治療モデル実験	
(演者所属) 分子病態治療研究センター ゲノム機能研究部	(演者氏名) 間野 博行	
<p>肺がんは先進国におけるがん死因の第一位を占める極めて予後不良の疾患であり、その治療成績を向上させるためにも発症原因に基づく新しい治療法の開発が待たれている。我々は肺がんにおける新たな原因遺伝子を同定する目的で組換えレトロウィルスを用いたがん遺伝子機能スクリーニング法を開発し、肺腺がん外科切除症例より新たな融合型チロシンキナーゼEML4-ALKを発見した(<i>Nature</i> 448:561)。本キナーゼは、ヒト2番染色体内の微少な逆位の結果、微少管会合タンパクEML4のアミノ末端側半分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ものである。EML4-ALKはEML4内のcoiled-coildメインを介して二量体化し恒常的に活性化されることで強いがん化能を獲得する(<i>Cancer Res</i> 68:4971)。本遺伝子を標的としたRT-PCR法は極めて感度の高い肺がんの早期発見法となるだけでなく(<i>Clin Cancer Res</i> 14:6618)、本遺伝子産物の酵素活性を阻害する化合物はEML4-ALK陽性肺がんの全く新しい分子標的治療剤になると期待される。実際EML4-ALKを肺胞上皮特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製したところ、驚くべき事に同マウスは生後僅か数週齢で数百個の肺がんを同時に発症する事が明らかになった(<i>PNAS</i> 105:19893)。すなわちEML4-ALKは同遺伝子陽性肺がんにおいて中心的な発がん原因であることが示された。本マウスはALK阻害剤による治療効果判定の良いモデル実験系となる。そこでALK阻害剤を同マウスに経口投与したところ、時間依存性に両肺内の腫瘍は速やかに速やかに消失した⁴⁾。ALKキナーゼはEML4と融合することで肺がんの原因となるだけでなく、我々はさらに点突然変異により小児神経芽細胞腫の発症要因となる事も明らかにした(<i>Nature</i> 455:971)。したがってALK阻害剤がこれら“ALKoma”の共通の分子標的治療剤になると期待される。</p>		

自治医科大学私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

シンポジウム 2009

演 題	間葉系幹細胞腫瘍集積性のメカニズムと癌治療への応用	
(演者所属) 分子病態治療研究センター 遺伝子治療研究部	(演者氏名) 内堀 亮介、小澤 敬也	
<p>間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells; MSCs) は腫瘍組織へ集積する性質があり、治療分子を腫瘍局所へ送達するための担体としての利用が期待されている。これまでに、抗腫瘍性サイトカイン発現MSCsを利用した癌の治療実験が試みられており、メラノーマや乳癌のモデルマウスにおいて、腫瘍の増殖遅延効果や生存期間延長効果などが認められている。MSCsが腫瘍に集積する際、炎症性サイトカインやケモカインが遊走因子として関与していると考えられているが、未だ不明な点が多い。MSCsの腫瘍集積性を強化することにより治療効果を高めることが期待出来ることから、その腫瘍集積メカニズムの解明が重要な研究課題となっている。そこで我々は、炎症性サイトカインであるTNF-αで刺激したMSCsが血管内皮細胞に接着することに着目し、MSCsの腫瘍集積メカニズムの解明を試みた。</p> <p>本研究では、ヒト大腸癌細胞SW480を皮下移植したヌードマウスを担癌モデルマウスとして使用した。このマウスの左心室腔内にヒト骨髄由来MSCsまたはヒト胎児肺由来線維芽細胞WI-38を投与すると、腫瘍組織へのMSCsの集積は認められたが、WI-38の集積は認められなかった。生体イメージング装置IVISによる経時測定においても、腫瘍組織への集積はMSCsを投与した場合でのみ観察された。しかし、<i>in vitro</i>における各種増殖因子やケモカインに対する遊走能は、MSCsとWI-38の間に有意な違いを認めなかった。MSCsとWI-38をTNF-α刺激して比較したところ、MSCsの場合でのみ血管内皮細胞への接着反応の有意な亢進を認めた。この接着はVCAM-1やVLA-4に対する抗体によって部分的に阻害された。天然由来の化合物であるパルテノライドを担癌マウスに投与すると、MSCsの腫瘍集積性が抑制された。パルテノライドの作用で腫瘍局所におけるTNF-α産生の低下を認め、さらにTNF-α刺激によるMSCsのVCAM-1発現誘導も抑制された。</p> <p>以上の結果から、MSCsの腫瘍集積において、TNF-α刺激による接着分子(VCAM-1)の発現誘導が重要な役割を担っていることが示唆された。現在、この結果に基づき、MSCsの腫瘍集積性を強化する治療法の開発を進めている。</p>		

演題	多発性骨髄腫の薬剤耐性機構の解明と治療への応用	
(演者所属)	分子病態治療研究センター 幹細胞制御研究部	(演者氏名) 菊池 次郎
<p>【緒言】</p> <p>多発性骨髄腫は血液細胞の形質細胞が腫瘍化した造血器悪性腫瘍である。患者は薬物療法に対して強い抵抗性（薬剤耐性）を示すため、骨髄腫は現在のところ治療に至る治療法のない難治性の疾患である。</p> <p>骨髄腫細胞は主に骨髄内に存在し、骨髄ストローマ細胞との接着など微小環境との相互作用を介して薬剤耐性（接着耐性）能を獲得している。従って、接着耐性に鍵となる接着分子は薬剤耐性克服に向けた有望な治療標的になりうるものと推測される。骨髄腫細胞に発現する接着分子とその機能についてはこれまでも様々な報告があるが、どの分子が接着耐性の鍵分子であるかは未同定のままである。</p> <p>本研究では、sh-RNAを用いたloss-of-function解析から骨髄腫細胞の接着耐性誘導の鍵分子を同定し、その分子を標的とした治療法が接着耐性抑制に有効なことを明らかにしたので報告する。</p> <p>【結果】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 骨髄腫細胞株及び新鮮骨髄腫細胞を用いた接着分子の発現スクリーニングの結果、CD44、CD29/CD49d（VLA-4）、ICAM-1、CD138及び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に骨髄ストローマ細胞の共存下で抗骨髄腫薬を作用させた結果、VLA-4ノックダウン亜株にのみ有意な接着耐性の抑制を認めた。 3. 各接着分子に対する中和抗体の添加時も、VLA-4抗体添加時に有意な接着耐性の抑制を認めた。 4. 代表的な抗骨髄腫薬のうち、新規治療薬であるボルテゾミブにVLA-4発現低下作用と接着耐性抑制効果を認めた。 5. 骨髄腫細胞をボルテゾミブ処理した後に他の抗骨髄腫薬を作用させると、単独での作用時に比べ接着耐性を著明に抑制できた。 <p>【結論】</p> <p>骨髄腫細胞の接着耐性誘導の鍵分子としてVLA-4を同定した。ボルテゾミブにはVLA-4発現抑制を介した接着耐性抑制効果があり、他の抗骨髄腫薬との併用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。</p> <p>(Ref. Noborio-Hatano-K, Kikuchi-J, et al, Oncogene, 28, 231-242, 2009)</p>		

自治医科大学私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

シンポジウム 2009

演題	蛍光・発光イメージングが拓くトランスレーショナル研究	
(演者所属) 分子病態治療研究センター バイオイメージング研究部	(演者氏名) 高橋 将文	
<p>傷害を受けたり欠損したりした組織や臓器を再生させて機能を回復させる再生医療が注目されており、骨髄幹細胞を用いた再生医療はいくつかの疾患において、すでに臨床応用もなされている。しかしながら、この治療法の正確な機序についてはいまだ議論が多く、さらなる研究が求められている。我々は、移植した細胞の分化・増殖を追跡するために、GFP、RFP(DsRed)、LacZ、luciferase等、広範な組織に発現するトランスジェニック(Tg)ラットを作製し、“color-engineered rat system”を構築してきた。このシステムによって、神経、皮膚、心筋、肝細胞など、生体内における移植細胞の挙動や相互作用について解析を行い、移植・再生医学研究にこのシステムが非常に有用であることを報告してきた。さらに、luminescence発光を利用したバイオイメージングでは、個体内における癌細胞の挙動のみならず、各種治療評価モデルとしても有効であることも示してきた。これらの結果は、「発光」と「蛍光」に基づくレポーターシステムが長期の細胞・組織の可視化システムとして極めて利用価値が高いことを示すものであり、バイオイメージング技法の発展は新しい医学研究の探索・発展に不可欠な要素となると考えられる。</p>		

演題	霊長類モデルにおける造血幹細胞のバイオマーキング	
(演者所属)	分子病態治療研究センター 再生医学研究部	(演者氏名) 増田 茂夫
<p>【背景】 我々は霊長類モデルを用いて移植後の造血幹細胞(HSC)の体内動態を検証してきた。検証方法としてレトロウイルスベクターによるHSCのバイオマーキングを行ってきたが、今回特に二重標識法によって2群の細胞集団の運命を比較追跡したので紹介する。また後述するヘミ骨髄内移植を施行することによって個体間のデータの差異を解消・克服することが可能となった。</p> <p>【目的】 これまでマウス造血幹細胞移植の系で間葉系幹細胞(MSC)共移植によるHSCの生着促進効果が報告されてきた。今回われわれは霊長類モデルを用いて骨髄内移植(iBMT)におけるMSC共移植の効果を検証した。</p> <p>【方法】 カニクイザル自家移植の系で実験を行った($n=3$)。まず自家のHSC(CD34陽性細胞)とMSC(骨髄ストローマ細胞)を分離・回収した。HSCは2等分してそれぞれ別のレトロウイルスベクター(<i>neo</i>耐性遺伝子を有するG1NaまたはLNL6)で標識した。骨髄非破壊的前処置の後、同一個体内でヘミ骨髄内移植を施行した。すなわち右側(右上腕・大腿骨)にはHSCとMSCの共移植、左側(左上腕・大腿骨)にはHSCの単独移植をそれぞれ施行し、評価は中立の腸骨骨髄・末梢血のほか、四肢骨髄で行った。生着後、二つの標識を区別するPCRを施行し、両群の生着への貢献度を定量した。</p> <p>【結果】 1頭目は移植後46日目に腸骨骨髄のコロニーPCRを施行した結果、共移植群由来のCFUが48%(22/46)、単独移植群由来のCFUが11%(5/46)と、共移植群で明らかに高かった(4.4倍)。2頭目・3頭目は移植後の末梢血のそれぞれ2.0%, 0.4%が標識されており(すなわち移植細胞由来)、いずれもそのほぼ全てが共移植群由来だった。また移植後それぞれ39, 56日目に四肢骨髄のコロニーPCRを施行した結果、共移植群由来のCFUが明らかに多く(6倍, 1.6倍)、反対側骨髄への遊走・生着も認められた。</p> <p>【結語】 カニクイザルの自家骨髄内移植の系でHSCのバイオマーキングを行い解析した結果、MSC共移植群で造血細胞の生着率が高まることが示された。MSC共移植による生着率向上の機序は今後の課題だが、本研究ではレトロウイルスベクターによるバイオマーキング技術の有用性に関して霊長類モデルを用いて例示できた。</p>		

自治医科大学私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

シンポジウム2009

<p>演題</p>	<p>レンチウイルスベクターをもちいた遺伝子改変血小板の <i>in vivo</i> 動態観察</p>	
<p>(演者所属) 分子病態治療研究センター 分子病態研究部</p>	<p>(演者氏名) 大森 司</p>	
<p>血小板は一次止血栓の形成を担うだけでなく、血栓形成部位において活性化に伴い自身の下流に含まれる凝固因子や増殖因子を放出する分泌細胞としての特徴も持つ。我々は血小板特異的プロモーター (GPIb・p) を持つレンチウイルスベクターを造血幹細胞に感染させ造血幹細胞移植を行うと無核の血小板に目的蛋白の発現が可能となることを報告した (FASEB J 20:1522-4, 2006)。この系により血液凝固因子を血小板に発現させ、血小板を凝固因子の放出細胞として応用すると血友病Aマウスの出血傾向が改善する (FASEB J20:1522-4, 2006; Mol Ther 6:1359-65, 2008)。現在、血友病遺伝子治療の有望な一手法として検討を続けている。さらにRNAiの手法により血小板の目的蛋白のノックダウンに成功し、血小板内シグナル伝達研究法に応用している。U6プロモーターの下流にshRNA配列を発現し、かつGPIb・pの下流にGFPを発現しうるレンチウイルスベクターを作成し、マウス骨髄細胞に感染させ同様に移植を行った。移植後のGFP陽性血小板に目的蛋白の発現低下が認められ、この手法で細胞骨格蛋白Talin-1をノックダウンするとアゴニスト刺激後のGFP陽性血小板の活性化 (インテグリン・IIb・3の活性化) やフィブリノゲンへの伸張反応が抑制された (ATVB 27:2266-72, 2007)。我々の開発した上記の系は無核の血小板における目的蛋白の発現調節法として注目されている。またこのレンチウイルスベクターはCMVプロモーターを用いると神経幹細胞へのGFPラベルも容易に可能となる。我々はこのベクターを用いて脂質メディエーターであるスフィンゴシン1-リン酸の受容体が神経幹細胞の神経損傷部位への遊走に重要であることを報告した (Stem Cells 25:115-24, 2007; Stroke 39:3411-7, 2008)。今回の“病態解明から治療開発に向けたバイオイメージング研究”では、以上の研究手法を応用し、実際の病的血栓形成や神経修復課程での細胞遊走をイメージングとして時間軸でとらえることを目的としている。この手法を用いれば、抗血栓薬を始めとした薬剤の治療効果や遺伝子改変血小板の血栓形成への関与、また神経修復への神経幹細胞の動態などが可視化でき、今まで以上に明確な結果・結論が導き出せると考えている。このシンポジウムでは今までの実験経過を簡潔に概説すると共に、今回の事業で行う研究の方向性について紹介したい。</p>		

演題	「中枢性肺胞低換気症候群の病態に関わる分子的基盤」	
(演者所属) 分子病態治療研究センター 細胞生物研究部	(演者氏名) 池田 啓子	
<p>呼吸は通常無意識に行われる。これを司っているのは脳幹の呼吸中枢にあるニューロン群であり、基本的な呼吸のリズムを設定している。先天性中枢性肺胞低換気症候群 (Congenital Central Hypoventilation Syndrome, C-CHS) はオンディーヌの呪い症候群という名でも知られ、睡眠時無呼吸、低酸素・高炭酸ガス血症に対する換気応答障害を特徴とする。最近、生直後から発症するC-CHSや、幼児期や成人で発症する中枢性肺胞低換気症候群 (Late Onset-CHS, LO-CHS) の病因として、転写因子PHOX2Bのポリアラニン伸長変異やフレームシフト変異が報告されている。この病態の神経生理学的基盤として、中枢化学受容器の機能不全 (高炭酸ガスに対する呼吸を司る神経系の反応が欠如または低下)、呼吸リズム形成機構の機能不全、または両方が組み合わさった機能不全などが想定されているが、詳細は明らかになっていない。</p> <p>私たちは現在まで、ラット脳幹摘出標本を用い、延髄呼吸中枢における呼吸リズム形成の神経生理学的機構を、電気生理学とバイオイメージング手法を組み合わせて以下の点を明らかにしてきた (文献1, 2, 3)。</p> <p>①呼吸神経活動のリズム形成部位は、生理学の教科書の記載にあるpre-Boetinger複合体神経群ではなく、傍顔面神経核呼吸ニューロングループ (pFRG) であること。②pFRGが呼吸リズム形成と中枢化学受容両方に重要な役割を果たすこと。③ナトリウムポンプノックアウトマウスではpFRGとpre-Boetinger複合体神経群の結合が欠如しているため、出生直後からの呼吸活動が開始しないこと。</p> <p>最近、私たちは、詳細な電気生理学的手法と <i>in situ</i> hybridization法・免疫染色法を組み合わせた実験により、炭酸ガス応答性かつ呼吸リズム形成pFRGニューロンは、pre-Iニューロンと呼ばれる神経細胞であることを単一神経細胞レコーディングにより同定し、PHOX2B陽性であることを明らかにした。このpre-Iニューロンの特徴等、呼吸神経生理学の最新の知見を併せて紹介する。</p> <p>文献</p> <p>1. Respiratory Physiol. & Neurobiol. (Review) 2009 <i>in press</i>. 2. J Neurosci. 28(48):12845-12850, 2008. 3. J Physiol. 584(Pt 1):271-284, 2007.</p>		

<p>演題</p>	<p>乳酸輸送体MCT2によるグルタミン酸受容体局在制御 ：蛍光融合蛋白イメージング</p>	
<p>(演者所属) 生理学講座 統合生理学部門</p>	<p>(演者氏名) 前川 文彦、矢田俊彦</p>	
<p>【背景】 糖尿病が学習障害の原因となるという証拠が疫学調査のみならず糖尿病モデル動物においても見いだされつつある。一方、我々は肥満・糖尿病モデル動物において、1)大脳皮質・海馬で乳酸輸送体MCT2が過剰発現している事、2)ニューロン後シナプス膜周囲部にMCT2がGluR2 (AMPA受容体サブユニット)と共局在する事、を既に見いだしており、糖尿病モデル動物の学習機能障害とMCT2過剰発現との関連に注目している。</p> <p>【目的】 MCT2過剰発現がGluR2の発現量を制御し、グルタミン酸伝達に影響を与え、高次脳機能異常の一因となるという仮説を立てた。この仮説を証明する第一歩として、培養細胞において、MCT2がGluR2の細胞内局在と細胞膜表面発現を如何に制御するか蛍光融合蛋白イメージングにより検討した。</p> <p>【方法】 mStrawberry (mStb、赤色蛍光蛋白)-MCT2の融合蛋白 (mStb-MCT2)と、Venus (緑色蛍光蛋白) -GluR2の融合蛋白 (Venus-GluR2)を発現するベクターを作成し、それらを神経芽腫細胞株Neuro2Aあるいは初代培養ニューロンで共発現させ、それぞれの細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。さらに、Venus-GluR2ではVenusが細胞外に位置していることを利用して、細胞膜表面のVenus-GluR2の発現量をVenusに対する抗体を用いて免疫細胞化学的に定量化した。また、免疫プロットにより全Venus-GluR2発現量も定量化した。</p> <p>【結果】 単独で発現させた場合、mStb-MCT2は核周囲の特定の細胞内小器官に局在していた。一方、Venus-GluR2は細胞質全体に一樣に分布していた。mStb-MCT2とVenus-GluR2を共発現させた場合にはVenus-GluR2が特定の細胞内小器官に移動し、mStb-MCT2と共局在した。対照としてmStbとVenus-GluR2を共発現させた場合は単独発現と同様Venus-GluR2は細胞質全体に発現していた。さらに、細胞膜表面のVenus-GluR2発現量、全Venus-GluR2発現量を検討したところ、mStb-MCT2との共発現によってどちらも有意に低下していた。</p> <p>【結論】 MCT2はGluR2を特定の細胞内小器官に留めおく事で、膜表面での発現量/全発現量を抑制的に制御していると考えられる。肥満・糖尿病時には脳内MCT2過剰発現がGluR2の発現と細胞膜移行の低下を引き起こしグルタミン酸伝達に異常が起こり、学習障害に関与する可能性が示唆される。</p>		

自治医科大学私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

シンポジウム 2009

演題	下垂体後葉ホルモンとストレス	
(演者所属) 生理学講座 神経脳生理学部門	(演者氏名) 尾仲 達史	
<p>ストレス刺激は下垂体前葉からのACTH放出を促進させ、その結果、副腎皮質からの糖質コルチコイド放出を増加させる。このACTH放出の上流は、視床下部小細胞性領域のCRHニューロンとバゾプレシンニューロンである。急性のストレスの場合は、CRHが主な働きをなしていると報告されている。しかし、CRHとバゾプレシンのどちらが主な働きをなすかは、用いるストレス刺激の種類と用いる動物の種により異なるという報告もある。今回、ラットを用い、急性ストレス刺激と慢性ストレス刺激負荷時における視床下部バゾプレシンニューロンのイメージング研究を行った。</p> <p>急性の精神的なストレス刺激を加えると、視床下部視索上核局所におけるバゾプレシン放出は増加したが、視床下部におけるバゾプレシン合成は低下した。一方、血中バゾプレシン濃度は低下した。</p> <p>次に、慢性ストレスのモデルとして、慢性関節炎動物モデルを使用してバゾプレシンニューロンのイメージングを行った。慢性関節炎動物においては血中コルチコステロン濃度が増加していた。慢性関節炎動物においては視床下部の小細胞性領域と大細胞性領域の室傍核と視索上核のバゾプレシン合成が増加していることが示唆された。血中のバゾプレシン濃度も上昇していた。これに対して視床下部小細胞性領域のCRHの合成は減少していた。従って、慢性ストレス時のバゾプレシンの重要性が確認された。</p> <p>以上の結果から、バゾプレシンニューロンのイメージング研究は視床下部におけるストレス応答の解明に有用であると考えられる。</p>		

自治医科大学私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

シンポジウム 2009

演題	ミトコンドリアを中心とした創薬標的タンパク質の探索研究	
(演者所属) 生化学講座 機能生化学部門	(演者氏名) 遠藤 仁司	
<p>ミトコンドリアは、各種の老化性疾患やメタボリックシンドロームなどの代謝性疾患などに密接な関わりがある。特にミトコンドリア膜画分は、ATP産生、活性酸素産生、アポトーシス誘導のみならず、最近ではミトコンドリアヌクレオイド局在とその複製・遺伝子発現等の装置、ミトコンドリア膜形態調節装置や各種トランスポーターなどが存在するミトコンドリアの重要な機能が集積した場である。本研究では、ミトコンドリアに特化したプロテオーム解析を起点に、代謝調節に有効な新規の創薬ターゲットを創出することを目的とする。</p> <p>まず、ヒト培養細胞から単離したミトコンドリアの膜画分を材料として、二次元電気泳動法や質量分析法を用いて網羅的プロテオーム解析を行った。その結果、多数の機能未知のタンパク質（アノテーションのない遺伝子を多数含む）を同定した。現在、これらの未知タンパク質の機能を解析しており、創薬ターゲットの候補となることを期待している。次に、疾患プロテオームのモデルとして、やせ（Lean）や肥満（Fatty）を特徴とするラット肝臓のミトコンドリア膜画分を単離し、各々のタンパク質を蛍光色素で標識した後DIGE法にて変動タンパク質のスポットの同定を行った。現在、質量分析による変動タンパク質の同定と解析を行っている。</p> <p>一方、機能未知のミトコンドリア膜タンパク質として同定されたPHB2は、元来エストロゲンレセプターの転写活性の抑制因子（REA）として単離されたタンパク質である。我々は、そのミトコンドリアでの機能を解析したところ抗アポトーシス作用、膜電位調節作用、ミトコンドリア形態維持作用を同定した。さらに、エストロゲンによりミトコンドリアと核をシャトルする分子であることを同定した。エストロゲンは、肥満を抑制することが知られている。現在、このPHB2が核に移行することにより、脂肪細胞の分化を調節するかどうかを検討している。</p>		

自治医科大学私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

シンポジウム 2009

<p>演題</p>	<p>ハマダラカから皮膚内に放出されたマラリア原虫を バイオイメージングにより観察する</p>	
<p>(演者所属) 感染・免疫学講座 医動物学部門</p>	<p>(演者氏名) 松岡 裕之</p>	
<p>蚊は吸血源の動物の皮膚にとまり血管を探すときに、まず唾液を出す。唾液には麻酔作用を有する物質や血管を拡張させる物質が含まれている。蚊（ハマダラカ）が唾液腺内にマラリア原虫のスポロゾイトを持っていれば、このとき皮膚内に唾液といっしょにスポロゾイトも注入される。こうして皮膚内に注入されたスポロゾイトは自ら血管壁を見つけその中に侵入して血流に乗ると私は考えている。したがってマラリア感染の最初は皮膚であると主張している（皮膚ステージの存在）。そうであるならば、原虫が皮膚内に留まっているうちに、その場で原虫を殺す方策があるはずである。私はネズミマラリア原虫（<i>Plasmodium berghei</i>）にルシフェラーゼ遺伝子を組み込み発現させることに成功した。これを利用するとマラリア原虫が蚊の体内あるいはマウス体内に局在するとき、これを可視化することができる。マウスの体表の一点（直径3mm）にのみ感染蚊をプロービングさせ、皮膚内に注入されたスポロゾイトのもつルシフェラーゼにより可視化する。この部位を灸により加熱するとそのマウスはマラリアを発症しなかった。灸の部位をずらすとそのマウスはマラリアを発症した。感染蚊のプロービングを受けて5分以上経ってから灸を当てているのに、それでもマラリア発症を抑えられるということは、この間スポロゾイトはまだ皮膚内に留まっていた、血管内に侵入していないことを示唆している。すなわちマラリア感染蚊の刺咬を受けたと思った時、その部位に灸を当てればマラリア発症を予防できる可能性がある。また皮膚への吸収が迅速に起きる基剤を使って抗スポロゾイト薬剤を皮膚に塗布してもよいだろう。ひいては、皮膚内でスポロゾイトを殺すことを想定したワクチンを開発することも有意義と思う。</p>		