

## 平成14年度自治医科大学大学院 研究奨励賞研究成果報告

### 心血管病に対する機械的ストレスの影響

地域医療学系 循環器・呼吸器疾患学  
3 学年 大木 るり

当院で心臓手術を施行した 9 例の患者右心耳心筋を採取し、Swan-Ganz カテーテル検査による圧データと心エコーによる三尖弁閉鎖不全の逆流流量をもとに、圧負荷群、容量負荷群、コントロール群の 3 群に分類した。DNA チップを用いて群別に遺伝子発現変化を検討した。圧負荷群において cyclin dependent kinase inhibitor1A (CDKI1A), MAP kinase phosphatase1 (MKP1) は、コントロール群、容量負荷群に比較して有意に遺伝子発現の亢進が認められた。細胞周期を阻止する CDKI1A, MAP kinase を不活化する MKP1 は real-time RT-PCR 法でもコントロール群に比較し発現亢進が確かめられた。さらに、シリコン膜上に生後 1 日のラット培養心筋細胞を付着させ strain device を用いて二次元方向性に心筋細胞を伸展することで機械的ストレスを加え、in vitro の系における蛋白発現量の変化を検討した。MKP1, CDKI1A のいずれにおいても機械的伸展刺激の amplitude 増加に伴う蛋白産生の亢進が認められた。本研究の結果より慢性的に圧負荷がかかった心筋では、細胞肥大に向う生体反応に対して自己防衛的に細胞周期の制御もしくは細胞肥大の抑制を行うことで、自ら平衡状態を保つ方向に調節している可能性が示唆された。

一方、高血圧による機械的ストレスが血管壁のマクロファージにどのような影響を及ぼすか解明することを目的として、ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞をシリコン膜上に付着させた後、機械的伸展刺激を加え DNA チップを用いた遺伝子発現解析を行った。6 時間の伸展刺激でコントロールに比較し、2.5 倍以上の発現亢進が認められた遺伝子は prostate apoptosis

response 4, interleukin 8 (IL8), IEX1 の 3 種類であった。Real-time RT-PCR 法にてその定量性を評価し、3 種類の遺伝子いずれにおいても、1% の伸展刺激では時間経過に伴い、6 時間の刺激では amplitude dependent に発現亢進が認められた。IL8 は、ELISA 法にて伸展刺激の時間経過とともに培養上清中への蛋白産生の亢進が確かめられた。ヒト単球系細胞株に機械的刺激を加えることにより、immediate early gene や inflammatory gene の発現亢進が認められ、これらが動脈硬化の促進やプラークの不安定化に影響を与えている可能性が示唆された。

### 文 献

Ohki R, Yamamoto K, Mano H et al.: Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays. *J Hypertens.* 20(4): 685-91, 2002.

### 高密度 DNA チップを用いた心肥大・心不全発症機構の解析

地域医療学系 循環器・呼吸器疾患学 4 学年  
上野 修市

心肥大は虚血性心疾患や不整脈、突然死などの危険因子である。また心不全は主要な死因の一つでありその予後は不良である。しかしこれらの発症メカニズムは未だ不明な点が多いのが現状である。遺伝的食塩感受性高血圧発症ラットである Dahl ラットは、高食塩負荷により高血圧性心肥大から心不全を発症する。本研究では、高密度 DNA チップを用いて Dahl ラット心筋における心肥大・心不全発症機構を解析した。

6 週齢より 8% の高食塩飼料摂取を開始し、正常コントロールには 0.3% の低食塩飼料摂取を続けた。6, 8, 11, 13 および 15 週齢において各群の Dahl ラット (各 n=2) の左室心筋より mRNA を抽出し、cDNA を合成した後 biotin

でラベルされた cRNA を合成した。これを 8799 個のラット 遺伝子がスポットされた Rat Genome U34A GeneChip にハイブリダイズし、遺伝子発現プロファイルを解析した。

その結果、新たな心肥大関連遺伝子として 12-lipoxygenase および pancreatitis-associated protein を同定した。これらはともに心筋以外の細胞において細胞増殖に関わることが報告されており、これらが心肥大の進展に寄与している可能性が考えられた。また心不全発症早期から特異的に発現量が低下する遺伝子として D-binding protein (DBP) を発見した。そこで DBP と心筋収縮機能との関連を明らかにするため、DBP および dominant negative DBP (dnDBP) 発現アデノウイルスベクターを作成し、これらを新生仔ラット培養心筋細胞へ遺伝子導入し Angiotensin II (Ang II) 刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の変化を解析した。その結果、DBP の過剰発現において Ang II 刺激による心筋細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は有意に増加し、一方 dnDBP の過剰発現では逆に低下した。近年心不全の原因として心筋の  $[Ca^{2+}]_i$  動態異常が注目されている。DBP が Ang II 刺激による心筋の  $[Ca^{2+}]_i$  変化に影響を及ぼすことが明らかとなったことは重要な知見である。すなわち DBP 発現量の低下は、心筋細胞の  $Ca^{2+}$  動態調節蛋白の機能に異常を来し心不全の原因となる可能性が示唆された。この  $Ca^{2+}$  動態異常を修復することが新たな心不全治療法となる可能性がある。

マウス NKT 細胞の新規抗体 U5A2-13 を用いた対応膜抗原の発現クローニング並びに機能解析

地域医療学系 消化器疾患学 4 学年  
清水 敦

## 1 目的

マウス NKT 細胞は NK1.1<sup>+</sup>T 細胞と定義されるが、NK1.1 抗原の発現は C57BL/6 系統に限定されるため、それ以外の系統での NKT 細胞の研究には制約があった。マウス系列に拘わらず NKT 細胞を認識するモノクローナル抗体 U5A2-13 が樹立されたが、これが認識する抗原は不明であった。本研究では、メラノーマ転移

モデルにて U5A2-13 抗体と抗 NK1.1 抗体の違いを確認したうえで、U5A2-13 抗体に対応する細胞膜抗原の cDNA クローニングを施行した。

## 2 方法

2.1 NKT 細胞の抗腫瘍能に対する U5A2-13 epitope の関与を B16メラノーマ肺転移モデルを用いて検討

2.2 U5A2-13 抗体が認識する抗原の発現クローニング並びにコードされる蛋白の同定

2.3 U5A2-13 epitope の検索

## 3 成績

3.1 U5A2-13 抗体前投与による NKT 細胞抗腫瘍能の減弱

メラノーマ転移モデルにおいて U5A2-13 抗体の前投与により用量依存性に肺転移数は上昇した。この時 NK1.1<sup>+</sup>T 細胞数は減少せず non-depleting であったが、U5A2-13 epitope が down-modulate された。

3.2 U5A2-13 抗体が認識する抗原の同定

BCL1 より cDNA ライブラリーを作製し濃縮の後、陽性クローンを分離した。シーケンスの結果マウス ICAM-1 に一致した。次に Western blot 並びに免疫沈降により蛋白を同定した。さらに U5A2-13 抗体は ICAM-1 遺伝子破壊マウスでは反応しないことを確認した。

3.3 epitope の検索

ICAM-1 の欠失変異体を作製し COS-7 細胞に transfect して U5A2-13 抗体との反応性を検証した。U5A2-13 抗体との反応には ICAM-1 のドメイン 2 ならびに 3 が重要であった。

## 4 考察

U5A2-13 抗体が認識する蛋白は ICAM-1 であり、U5A2-13<sup>+</sup>NKT 細胞は ICAM-1<sup>high</sup> T 細胞に相当した。細胞膜上で ICAM-1 はダイマーもしくはオリゴマーを形成するとされる。ICAM-1<sup>high</sup> である NKT 細胞上ではダイマー等が相対的に多くなり、U5A2-13 抗体の conformational epitope が形成されると推測している。

中枢性尿崩症ラットに対するバゾプレシン遺伝子導入：ホルモン分泌と生理作用の検討

地域医療学系 内分泌代謝疾患・病態解析学  
4 学年 井手野順一