

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

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは安全性が高く、長期間にわたり導入遺伝子の発現が得られることから、遺伝子治療領域における有力なベクターである。今回、アルギニンバゾプレシン (AVP) を先天的に欠損した遺伝性中枢性尿崩症ラット (尿崩症ラット) を用いて、ホルモン欠損症に対する遺伝子治療の有効性について検討した。

CMV プロモーターによりドライブされるラット正常 AVP 遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを作製し、尿崩症ラットの両側視床下部視索上核 (SON) にラット定位脳手術装置を用いて合計  $6 \times 10^{10}$  genome copies 投与した (治療ラット)。また対照には、 $\beta$ -galactosidase 遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを用いた (対照ラット)。治療ラットにおいてベクター投与後 70 週を越えて尿量の減少と尿浸透圧の増加がみられ、尿崩症が改善した。また対照ラットに比べ有意な体重の増加がみられた。

次に導入遺伝子による AVP 産生を確認するため、ベクター投与 10 週後に治療ラットの脳を摘出し AVP 免疫染色を施行したところ、SON に AVP 陽性細胞を多数みとめた。また下垂体中の AVP 含量を RIA にて測定したところ、治療ラットにおいて下垂体の AVP 含量が増加しており、導入遺伝子により視床下部で産生された AVP が下垂体に輸送されていることが示された。

導入遺伝子により産生された AVP の分泌動態を評価するため水制限、高張食塩水負荷、急性水負荷試験を行った。24 時間の水制限または高張食塩水投与により、血中 AVP は基礎値に比べ有意に増加した。一方急性水負荷により尿量が増加し尿浸透圧は低下し、水利尿がみられた。

以上より AAV ベクターを用いた中枢神経系に対する遺伝子導入では、長期間にわたる導入遺伝子の発現が示された。さらに治療ラットにおいて AVP が SON, 下垂体および血液中で検出されたことから、導入遺伝子により産生された AVP は通常の分泌経路をとるものと考えられた。また水制限や高張食塩水負荷により AVP 分泌が刺激され、水負荷により水利尿がみられたことから、導入遺伝子により産生され

た AVP の分泌を生理的刺激により制御することが可能であると推察された。

この実験モデルを用いることにより、ホルモン欠損症に対する遺伝子治療の検討や新たな AVP の生理作用の同定が可能になると期待される。

#### 造血幹細胞分画を用いた新たな DNA チップ実験法による骨髄異形成症候群の病態解析

地域医療学系 血液・免疫疾患学 4 学年

上田 真寿

MDS は比較的発症率の高い疾患であるにもかかわらず適切な診断法・治療法が存在せず、我々は本目的のために MDS 各病期の患者骨髄より造血幹細胞相当分画を純化し、DNA チップ解析を用いて病態解明を行った。

AC133 は造血幹細胞に最も特異的なマーカーの一つである。学内外の共同研究施設の協力の基に様々な血液疾患患者フレッシュ検体より AC133 陽性分画のみを純化・保存する「Blast Bank」を設置した。

Mergen 社の HO3DNA チップとカスタムメイド DNA チップを用いて、Blast Bank 中の MDS サンプル RA11 例、RAEB 5 例、MDS-associated leukemia 14 例、また健常人 2 例より抽出した mRNA にて DNA チップ実験を行った。実験の結果、その結果予後不良群で高発現を呈する遺伝子群が 11、予後良好群で高発現をする遺伝子群が 6 同定された。予後良好群で高発現を示す遺伝子群のひとつとして PIASy 遺伝子が同定された。症例数を増加して行った定量的 real-time PCR 法によっても本遺伝子の発現変化が確認された。

次にインターロイキン 3 (IL-3) によって増殖し、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 添加によって成熟好中球に分化するマウス骨髄系細胞株 32D を用い、PIASy をテトラサイクリンと  $\beta$  エストロジェンの dual-regulation による遺伝子発現誘導システムを用いて発現させる系を構築した。PIASy を発現させた時の影響を観察した。具体的には、Wright-Giemsa 染色を用いた形態学的観察、フローサイトメーターによるアポトーシスの検討、を行い、PIASy 蛋白の発