

**Background** Proinflammatory cytokines play an important role in the development and progression of heart failure. Interleukin (IL)-10 has immunomodulatory effects on cardiovascular tissues including the inhibition of pro-inflammatory cytokine production. In this study, we determined whether IL-10 gene transfer could prevent the development and progression of heart failure.

**Methods and Results** Human IL-10 or LacZ expressing adeno-associated virus (AAV) vectors ( $2 \times 10^{11}$  genome copies/body) were injected into the anterior tibial muscle of 6 week-old Dahl salt sensitive rats. They were fed with a diet containing 8% NaCl for 12 weeks to induce hypertension and heart failure. The serum IL-10 concentration became significantly increased (86~398pg/ml) during a 12 week-period in IL-10-transduced rats. The blood pressure was not significantly different between IL-10-transduced rats and LacZ-transduced rats. The ejection fraction (EF) assessed by echocardiography was preserved in IL-10-transduced rats compared with LacZ-transduced rats (78.0 vs. 66.0%, respectively). Moreover, the plasma BNP level and survival rate were improved in IL-10-transduced rats compared with LacZ-transduced rats.

**Conclusion** AAV-mediated IL-10 gene transfer improves the left ventricular function and survival rate in a hypertensive heart failure model.

腸上皮化生の発生メカニズム, 特に転写因子 CDX1, CDX2の発現解析, 遺伝子異常の解明

内科学講座消化器内科学部門 江田 証

【背景】転写因子である CDX1/2が, 食道の腸上皮化生であり食道腺癌の発生母地として注目されている Barrett's epithelium において発現していることを, RT-PCR 法と免疫染色法にて

報告した。また特筆すべきことに, 逆流性食道炎の段階にて CDX2が発現していること, すなわち CDX2の発現は形態学的に腸の形質を呈する前の段階である逆流性食道炎にて発現しており, Barrett's epithelium 進展における trigger の可能性があることを報告してきた (Eda A, et al. Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa. *J. Gastroenterol* 38 : 14-22, 2003. Eda A, et al. Comparative Study of Homeobox Gene Expression, in the Inflammatory Esophageal Mucosa and Barrett's Esophagus. Digestive disease week, San Francisco, CA, May 19-22, 2002)。それに対し, CDX1は逆流性食道炎では発現しておらず, 胃の腸上皮化生, また Barrett's epithelium で発現しており, 腫瘍形成における関与が示唆されている。しかし, 代表的な胃癌細胞株では CDX1の発現が欠如している。胃癌細胞における, この CDX1の transcriptional silencing の分子メカニズムは解明されてはおらず, 多くの癌において, さまざまな遺伝子の silencing というものが, プロモーター領域のメチル化によって生じていることが報告されているため, 今回胃癌細胞株における, CDX1の promoter 領域のメチル化解析を行った。

【方法】胃癌細胞株における CDX1の全 exon を sequence したところ, mutation や homozygous deletion は認めなかった。胃癌細胞株における CDX1の発現の欠如が promoter 領域内に位置する CpG island のメチル化による可能性を考え, combined bisulfite restriction analysis (COBRA) と bisulfite sequencing を用いて, 6種類の胃癌細胞株 (MKN28, MKN45, MKN7, MKN74, AGS, KATO III) と 1種類の大腸癌細胞株 (SW480) の CDX1' CpG island のメチル化解析を行った。胃癌細胞株から DNA を抽出し, これに bisulfite modification を行った。COBRA の secondary PCR の増幅部位としては転写開始部位の -173~-19 に対応し, 3つの methylation-specific BstUI site を含む領域を選択し (図 1), 特異的プライマーを設計して解析した (図 2)。

【結果】COBRA の結果, MKN28, 74, 7, 45,

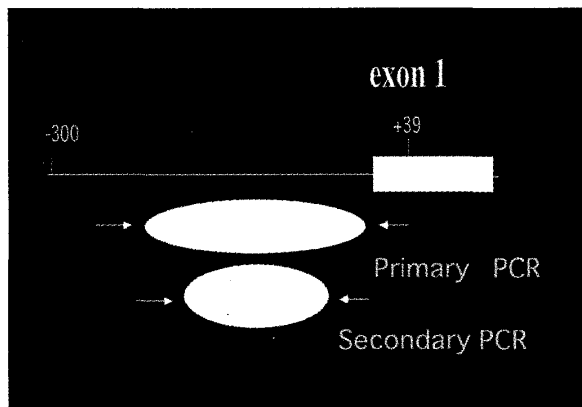


図1. 解析した CDX1 のプロモータ領域

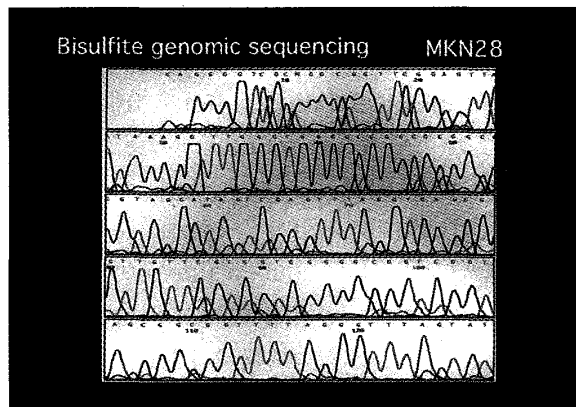


図4. MKN28における bisulfite sequencing の結果

The primer sequences used for primary and secondary PCR amplification of CDX1 were as follows:  
 primary PCR forward,  
 5'-TTTTGATT(C/T)G(C/T)GGTT(C/T)GGAGG-3';  
 primary PCR reverse,  
 5'-CC(C/T)AAATACAC(C/T)AAC(C/T)AATCCT-3';  
 secondary PCR forward,  
 5'-GAAATGTAAATT(C/T)GTTT(C/T)GGTT-3';  
 secondary PCR reverse,  
 5'-C(C/T)C(C/T)CATACTAAACCCTTAAAA-3'.

図2. nested PCR で用いた primer

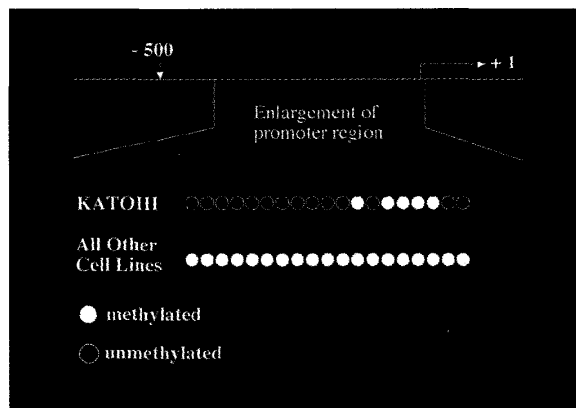


図5. プロモータ領域のメチル化解析の結果

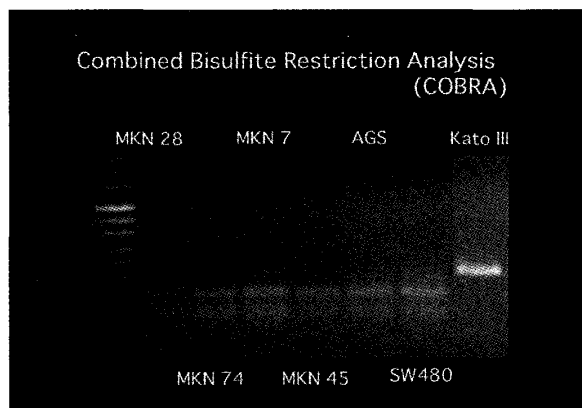


図3. COBRA の結果

AGS, SW480でメチル化陽性であった(図3)。さらに詳細な情報を得るため, bisulfite genomic sequencingを行った(図4)。

CDX1gene 転写開始部位の上流に5種類の胃癌細胞株でdense methylationを認めた。対照的にKATOIIIでは, sparse methylation(26%)を認めた(図5)。

【考察】以上より, 胃癌細胞株における CDX1

の発現の欠如は, CDX1の promoter 領域のメチル化の関与が示唆された。

遺伝性脊髄小脳変性症の原因蛋白 aprataxin の相互作用蛋白の単離と機能解析

内科学講座神経内科学部門 嶋崎 晴雄

背景・目的

常染色体劣性遺伝性の脊髄小脳変性症は, 欧米ではフリードライヒ失調症が最多であるが, 日本では低アルブミン血症を伴う早発型失調症が多いとされている。低アルブミン血症を伴う早発型失調症とヨーロッパに多い眼球運動失行を伴う早発型失調症は, ごく最近, aprataxin 遺伝子に共通の変異が見い出されたことより, 同じ疾患であると考えられるようになった。両疾患をまとめて, 眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早発型失調症 (early-onset ataxia