

動率・超活性化率の変化をコントロールと比較した。なお、オカダ酸・カリキュリン A はともに PP1 および PP2A の阻害剤であり、IC50 値はオカダ酸 (PP1: 10-15nM, PP2A: 0.1nM), カリキュリン A (PP1: 2nM, PP2A: 0.5-1.0 nM) である。また、m-TALP 添加による超活性化過程精子からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE で分離後、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロッティングでリン酸化タンパク質の変化を検出し、さらに 0.1nM オカダ酸添加精子での変化と比較した。

【結果】精子運動率はコントロール精子と PP 阻害剤添加精子とともに運動開始から 90% を超え、差を認めなかった。超活性化完了時間はコントロール精子では運動開始から約 3 時間であったが、PP 阻害剤添加精子はいずれの濃度においても約 2.5 時間で超活性化が完了した。また、コントロール精子よりも 10nM オカダ酸添加精子はより早期にタンパク質チロシンリン酸化が起こっていた。

【結論】PP2A 阻害により精子超活性化がより早期に完了しており、超活性化の過程には PP2A が関与していることが示唆された。今後、その他のキナーゼ・フォスファターゼについての検討を進めていく予定である。

フローサイトメトリを用いた微小残存リンパ腫細胞の検出

輸血・細胞移植部 山本 千鶴

背景：悪性リンパ腫は、B 細胞性と T 細胞性に大別されるが、B 細胞性リンパ腫が悪性リンパ腫の過半数を占めている。B 細胞性リンパ腫は、細胞表面に B 細胞抗原である CD19 や CD20 を発現していることが特徴である。悪性リンパ腫は、進展度によって臨床病期の I 期から IV 期に分けられ、臨床病期が進むにつれて予後不良である。悪性リンパ腫は、しばしば骨髄に浸潤するが、骨髄に浸潤すると臨床病期は IV 期となり予後不良が示唆される。悪性リンパ腫の骨髄浸潤は、骨髄塗抹標本や骨髄病理組織検査 (両者を合わせて PTH) によってなされるが、これら

の検査では微小な悪性リンパ腫細胞の検出は困難である。私たちは、B 細胞性リンパ腫に発現している CD19 抗原に着目し、フローサイトメトリを用いて骨髄細胞中の CD19 陽性細胞における軽鎖の発現を検討した (CD19-FCM)。B 細胞性リンパ腫では、腫瘍化に伴い軽鎖の発現は κ または λ の何れかになるので、CD19 陽性細胞中の κ と λ 比を算出することによって B 細胞性リンパ腫細胞の有無を判定することができる。健常ヒト骨髄単核細胞と B 細胞性リンパ腫患者の骨髄単核細胞の検討から、 κ と λ 比の正常範囲は 0.5-3.0 である。また、健常ヒト骨髄単核細胞と B 細胞性リンパ腫細胞の混合実験から、CD19-FCM の感度は 10% と判明している。そこで、B 細胞性リンパ腫患者の骨髄細胞を CD19-FCM を用いて検査し、CD19-FCM の結果が予後を反映するか検討した。

対象と方法：対象は、初発または再発の 85 例の B 細胞性リンパ腫。男性 50 例、女性 35 例。組織型はびまん性大細胞型リンパ腫 29 例、ろほう性リンパ腫 20 例、その他の組織型 36 例。全例、フローサイトメトリでリンパ腫細胞に CD19 の発現を認めた。当部のフローサイトメトリ検査に出された骨髄細胞の一部を単核細胞に分離し、FITC 標識抗体 (陰性コントロール, CD5, CD10, CD20, CD14, CD34, immunoglobulin, κ , λ) と PE 標識 CD19 で 2 重染色した。染色した細胞は、Cytron または FACS Calibur フローサイトメータを用いて測定した。 κ と λ 比が 0.5 未満または 3.0 を超えた場合、B 細胞性リンパ腫細胞の混入と判断した。

生存率は、Kaplan-Meier 法で算出し、群間の有意差検定は Log-rank test を用いて検討した。生存率に及ぼす因子は、単変量の比例ハザードモデルを用いて検討した。

結果：検査時の結果から、CD19-FCM(-) PTH(-) (49 例), CD19-FCM(+) PTH(-) (23 例), CD19-FCM(+) PTH(+) (13 例) の 3 群に分けられた。化学療法は、CHOP 療法または CHOP 療法の変法を受けた例が 47 例で最も多かった。観察期間の中央値は 10.5 ヶ月。2 年の生存率は、CD19-FCM(-) PTH(-) が $69 \pm 7\%$, CD19-FCM(+) PTH(-) が $45 \pm 11\%$, CD19-FCM(+) PTH(+) が $31 \pm 15\%$ であった

($p=0.0270$)。2年の無病生存率は、CD19-FCM(-)PTH(-)が $69 \pm 7\%$ 、CD19-FCM(+)PTH(-)が $30 \pm 11\%$ 、CD19-FCM(+)PTH(+)が $21 \pm 13\%$ であった($p=0.0016$)。生存率に及ぼす因子の検討では、65歳以上、PS 2以上、Stage III以上、PTHで骨髄浸潤あり、CD19-FCMで骨髄浸潤ありが予後不良因子であった。

結論：CD19-FCMを用いた骨髄浸潤の評価は、B細胞性リンパ腫の予後因子となる可能性が示唆された。

脳神経節形成における Six1, Six4の機能解析

細胞生物研究部学内講師 小西 慶幸

和文要約：当研究室では器官発生における転写因子 Six の役割を解析してきた。Six1 と Six4 は発生初期において脳神経節内の感覚神経細胞に豊富に発現する¹⁾。これまでの解析から、脳神経節のうち三叉神経節において、Six1 または Six4 単独の欠損では顕著な異常が見られないのに対し、Six1, Six4 二重欠損マウスの神経節においては神経細胞が著しく減少することが明らかになった^{2,3)}。Bcl-x は神経細胞の生存維持に特に重要な因子である。免疫組織染色により、Six1, Six4 二重欠損マウスの三叉神経節において Bcl-x の発現が減少することが観察された。この研究により、分化初期の感覚神経細胞の生存維持に関わる機構について新たな知見が得られたと考えられる。

キーワード：Six1, Six4, 神経発生, アポトーシス, 三叉神経節

ランニングタイトル：Six1, Six4による神経細胞の生存調節

引用文献

- 1) Kawakami K. et al. : Six family genes-- structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays* 22, 616-626, 2000.
- 2) Ozaki H. et al. : Six4, a putative myogenin gene regulator, is not essential

for mouse embryonal development. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3343-3350, 2001.

- 3) Ozaki H. et al. : Six1 controls patterning of the mouse otic vesicle. *Development* 131, 551-562, 2004.

The function of Six1 and Six4 in the development of cranial ganglia

Division of Biology, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University

Yoshiyuki Konishi

英文要約：Survival of sensory neurons is tightly regulated in a cell-type and developmental-stage-specific manner. Transcriptional regulatory mechanisms underlying this regulation remain to be elucidated. In the present study, we investigated the role of Six1 and Six4 in the development of trigeminal ganglia. Abundant expression of Six1 and Six4 was noted in sensory neurons during early trigeminal gangliogenesis. Loss of both Six1 and Six4 in mice caused severe defects in the trigeminal ganglia, wherein massive apoptosis accompanied by activation of caspase-3 was observed at early but not late stages of gangliogenesis. In *Six1^{-/-} Six4^{-/-}* mice, trigeminal sensory neurons were generated, but showed reduced expression of Bcl-x compared to the wild-type mice. Accordingly, neurons from the deficient mice could not survive in culture even in the presence of neurotrophins. Our results suggest a cell-intrinsic role of Six1 and Six4 in the survival of early-generated trigeminal sensory neurons.

担癌患者における免疫機能とポリアミンとの関係

総合医学第2助手 中村 豪