

NPY ニューロンに対する単独および相互作用は十分に解明されていない。そこで本研究では、グレリン、レプチンのNPY ニューロンに対する直接作用とシグナル伝達機構及びそれらの相互作用を解析することを目的とした。

2. 方法

成熟ラットより弓状核ニューロンを単離し、fura-2蛍光画像解析により細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を測定し、灌流下にホルモンなどを添加し細胞活性の変化を調べた。 $[Ca^{2+}]_i$ の測定後、抗NPY抗体を用いた免疫染色を行ってNPY ニューロンを同定し、反応性細胞に占めるNPY ニューロンの割合を調べた。

3. 結果

グレリン (10^{-12} M– 10^{-8} M) は、濃度依存性に弓状核ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ を増加させ、グレリン 10^{-10} M は35%の弓状核ニューロンを活性化した。グレリン応答性弓状核ニューロンの約80%はNPY免疫陽性であった。グレリンによる弓状核ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ 増加は、アデニル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼA、ホスホリパーゼCおよびN型 Ca^{2+} チャネルの阻害剤によって阻害された。グレリンに $[Ca^{2+}]_i$ 増加応答を示したNPYニューロンの約45%がレプチン (10^{-12} M) の共添加により抑制された。レプチンによるグレリン誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加の抑制は、PI3キナーゼとホスホジエステラーゼ3の阻害剤によって阻害された。一方、MAPキナーゼ、 K_{ATP} チャネルおよびSTAT3の阻害剤はレプチンによる抑制作用を変化させなかった。

4. 考察

グレリンは、弓状核NPYニューロンを直接活性化し、その機序にはアデニル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼA、ホスホリパーゼC、N型 Ca^{2+} チャネルが関与している。一方、レプチンは、グレリンによるNPYニューロンの活性化を抑制し、その機序はPI3キナーゼおよびホスホジエステラーゼ3が関与している。グレリン、レプチンによるNPYニューロンの正、負の制御と、それらに関わるシグナル伝達機序は、摂食・代謝調節に重要な役割を果たしていると示唆される。

心不全における慢性炎症と酸化ストレス —臨床研究を基盤とした新規治療法の開発—

地域医療学系専攻3年 去川 睦子

1. 目的

近年、動脈硬化、高血圧や心不全などの心血管病変において、慢性炎症や酸化ストレスの関与が示唆されている。我々はこれまでに、心不全患者の検体を用いて、炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL)-6と酸化ストレスマーカーである8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$ がBNPと相関して重症心不全患者で上昇しており、また入院後治療による症状改善に伴って減少することを明らかにし、心不全において炎症や酸化ストレスの亢進が病態の発症や進展に関与している可能性を指摘した。しかし、これらを標的とした心不全治療の可能性については十分に検討されていない。IL-10は、種々の炎症性サイトカインを抑制するほかに、内皮機能の改善や平滑筋細胞増殖の抑制などの多面的な作用を有することから、心血管病変を改善することが期待される。本研究では、ダール食塩感受性ラットにおいて、単回投与で長期安定発現が可能な1型アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いてIL-10を生体内で発現させ、心不全に対する抗炎症療法の効果を検討した。

2. 方法

治療群としてAAV-1 rat IL-10 (n=10)、コントロール群としてAAV-1 GFP (n=10)をそれぞれ 1×10^{12} g.c./body ずつ、5週令ダールラットの前脛骨筋に単回、筋注した。6週令より高食塩負荷を開始し、血圧、心エコー、臓器重量、心筋組織所見、生存率について検討した。

3. 結果

ベクター投与14週後の治療群の血中IL-10濃度は 986 ± 278 pg/ml と高値であった。血中TNF- α 濃度、心組織中TGF- β 濃度はIL-10群で有意に低下した。血圧は治療群で有意に低下し、血圧上昇抑制効果は血中IL-10濃度と高い相関を示した。心エコー上、治療群において、肥大型である11週令では左室肥大が、心不全期である19週令では左室収縮能低下および左室径拡大が有意に抑制されていた。心・肺重量は治

療群で減少しており、心筋組織所見では、細胞浸潤と線維化が有意に抑制されていた。生存率は治療群で著明に改善した。

4. 結論

AAV ベクターを用いた IL-10 の体内発現は、高血圧、心筋リモデリング、心不全や生存率の改善をもたらした。IL-10 を用いた抗炎症療法は、今後の新しい心不全の治療戦略として期待される。

疾患モデル動物 (GK ラット) を用いた 2 型糖尿病の進行メカニズムに関する研究

地域医療学系専攻 3 年 名本 和子

I. 背景と目的

GK (Goto-Kakizaki) ラットは、後藤・柿崎らにより開発された 2 型糖尿病の自然発症モデル動物であるが、どのような経過をたどって病態が進行するのかわかっていない。本研究は、まず免疫組織化学や電子顕微鏡を用いて、GK ラットの病態の進行に伴う膵ランゲルハンス氏島の形態学的な変化を検討し、さらに糖尿病の病態の進行を β 細胞間の細胞間相互作用の観点からの検討も加えたものである。

II. 研究方法

1) 7, 14, 21, 35 週の雄 GK ラットより膵臓を採取し、免疫組織化学と電子顕微鏡を用いて、膵ラ氏島 β 細胞の観察を行った。

2) GK ラット膵 β 細胞間のコネキシン 36 の発現状態を蛍光免疫染色し、画像処理ソフトを用いてギャップ結合の定量的解析を行った。

III. 結果と考察

ラ氏島の β 細胞を免疫染色すると、14, 21 週でのインスリンの反応は低下していたが、電顕による微細構造観察ではゴルジ装置の発達や、粗面小胞体の拡張像が見られ、機能亢進像を示していた。インスリンの分泌に合成がおいつかないという機能亢進像と考えた。しかしその後、 β 細胞数は減少しつつラ氏島の崩壊が進み、35 週では集団を形成していた β 細胞が孤立性に散在する傾向を示すようになった。一方、インスリンの免疫反応性は上昇していた。微細構造

上、分泌顆粒数は増加し、粗面小胞体やゴルジ装置の発達は少なくとも 14, 21 週の時より悪くなっていた。 β 細胞からのインスリンの分泌能が低下し、新たなインスリン合成も滞る状態にあると考えられた。

一方、 β 細胞はラ氏島の中心部に集団をなして存在し、細胞間のギャップ結合が発達している事が一般に知られている。ギャップ結合の存在は細胞間相互作用により、効率よくインスリンを共同放出するのに好都合である。膵ラ氏島ギャップ結合の構成蛋白であるコネキシン 36 の抗体を用いた免疫染色により、その発現数の比較をしたところ、病態が進行すると共に、ギャップ結合の量も低下する傾向が得られた。この結果は細胞間相互作用の低下がインスリン放出の反応性の低下の原因の一つであることを示唆するものである。

鼻粘膜における線溶因子の発現とその生理的・病的意義の解析

地域医療学系専攻 4 年 瀬嶋 尊之

1. 研究目的

アレルギー性鼻炎では鼻粘膜局所におけるアレルギーの成立(感作)から組織変化にまで至る過程は複雑である。こうした過程には、数々のサイトカインやケモカインが関与していると考えられるが不明な点も多く、いまだ治療に難渋する原因となっている。最近、血栓溶解に関わる線溶因子 (t-PA : tissue type plasminogen activator, u-PA : urokinase type plasminogen activator, PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1 など) が組織修復や細胞移動などの様々な生体反応に重要な役割を果たしていることや、PAI-1 とアレルギーとの関係などが相次いで報告されている。さらに、鼻粘膜の病的変化に対する線溶因子の関与も報告されつつある。これらの点を踏まえ本研究では、まずヒト鼻粘膜における線溶因子の局在と、その役割について解析を行った。次いで、PAI-1 ノックアウトマウスを用いてアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製し、感作から組織変化に至る過程への