

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  $\beta$  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  $\beta$  細胞の観察を行った。

2) GK ラット膵  $\beta$  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  $\beta$  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、 $\beta$  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  $\beta$  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。 $\beta$  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、 $\beta$  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

線溶因子の関わりについて明らかにすることを目的に、*in vivo* および *in vitro* で解析を行い検討した。

## 2. 研究方法

### (1) ヒト鼻粘膜における線溶因子の発現とその局在

アレルギー性鼻炎患者より摘出した試料（下鼻甲粘膜）および採取した鼻汁を用いた。これらの試料に対し、RT-PCR 法による鼻粘膜における線溶因子 (t-PA, u-PA, PAI-1) の遺伝子発現の解析、鼻粘膜における免疫組織化学染色（線溶因子の局在）、fibrin autography による鼻汁中の t-PA および u-PA 活性の解析、鼻汁中の plasminogen 定量を行い、健常人と比較検討した

### (2) 線溶因子のノックアウトマウスを用いた感作実験

PAI-1ノックアウトマウスに対し、卵白アルブミン(OVA)を全身(腹腔内)および局所(点鼻)に投与して感作し、アレルギー性鼻炎モデルマウスを作成した。感作実験は Wild type マウス(WT)についても行った。検討項目は、行動観察と鼻過敏性の測定、血中の抗原特異的 IgG1, G2a, E および総 IgE の経時的測定、鼻腔洗浄液(NLF)中のサイトカイン(IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ )の測定、NLF中の総 PAI-1量と PAI-1活性の測定、RT-PCR 法による鼻粘膜における線溶因子(t-PA, u-PA, PAI-1)の遺伝子発現の解析、鼻粘膜における組織学的な変化(好酸球浸潤、上皮の杯細胞化生)・免疫組織化学染色(線溶因子の局在・コラーゲンの増生)等の解析、脾臓リンパ球を培養しての proliferation assay および cytokine assay である。

## 3. 研究成績

### (1) ヒト鼻粘膜における線溶因子の発現とその局在

RT-PCR では、u-PA と PAI-1についてはアレルギー群が非アレルギー群に比べて有意に発現が増加していた。

免疫組織化学染色では、アレルギー性鼻炎の鼻粘膜において、u-PA が腺組織粘液細胞に、そして PAI-1は腺組織漿液細胞に特異的に認められた。非アレルギー群の鼻粘膜においては u-PA や PAI-1の染色性は極めて弱かった。また、

t-PA は上皮および血管壁に認められたが、その染色性は強さ・局在とも、両群で特に差を認めなかった。

鼻汁の解析では、コントロール群においては、t-PA 活性のみが鼻汁中に認められたが、アレルギー性鼻炎患者の鼻汁中では、t-PA のみならず u-PA 活性も明瞭に認められた。またアレルギーの有無に関わらず、鼻汁中には plasminogen 活性が存在した。

### (2) 線溶因子のノックアウトマウスを用いた感作実験

WT-OVA 群において、鼻症状・ヒスタミン刺激に対する過敏性・特異的 IgG1および IgE 抗体・総 IgE 量は経時的に有意な増加を認めたが、PAI-1<sup>-/-</sup>-OVA 群ではそれらの変化が抑制される傾向にあった。対照的に、特異的 IgG2a は PAI-1<sup>-/-</sup>-OVA 群でのみ有意に増加を認めた。

RT-PCR では、WT-OVA 群の u-PA mRNA 発現が WT-control 群に比較して有意に増加していたのに対し、PAI-1<sup>-/-</sup>群では OVA 感作を行っても u-PA の発現は増加せず、WT-OVA 群と PAI-1<sup>-/-</sup>-OVA 群の間で u-PA mRNA 発現に有意差が認められた。PAI-1 mRNA の発現は、WT-OVA 群において WT-control 群に比較して有意に増加していた。

組織学的には、WT-OVA 群の鼻粘膜では、杯細胞化生・好酸球浸潤・上皮直下の I 型および III型コラーゲンの沈着が著明であったが、PAI-1<sup>-/-</sup>-OVA 群ではこれらの変化が抑制されていた。免疫組織化学染色での線溶因子の局在は、ヒト鼻粘膜における局在と同様の傾向であった。

NLF の解析では、WT-OVA 群においては総 PAI-1量・active PAI-1量・IL-4および IL-5量とも、WT-control 群に比べて有意に高値を示した。逆に IFN- $\gamma$  に関しては、PAI-1<sup>-/-</sup>-OVA 群が WT-OVA 群に比較して有意に高かった。

脾臓リンパ球の培養実験では、WT-OVA 群において、OVA 刺激にたいする増殖性・IL-4、および IL-5産生が、PAI-1<sup>-/-</sup>-OVA 群のそれらと比べて有意に高かった。逆に IFN- $\gamma$  産生は、PAI-1<sup>-/-</sup>-OVA 群のほうが WT-OVA 群に比較して有意に高かった。

#### 4. 考察

今回の研究において、RT-PCR や免疫組織化学染色の結果から鼻粘膜中(ヒトおよびマウス)の線溶因子の存在が確認できた。特に、ヒト・マウスともにアレルギー性炎症において u-PA と PAI-1 の発現が増加し、u-PA は PAI-1 と結合して複合体を形成することでその活性が抑制されることを考えると、アレルギー性炎症における PAI-1 の増加は生体の持つ u-PA 活性の制御機構という点から非常に合理的に説明できる。また、t-PA の発現場所や鼻汁中での活性を考えると、鼻粘膜-鼻汁における t-PA の役割の 1 つが、平時における鼻汁の性状(特に粘稠度)の調節を行うことと考えられる。一方でアレルギー性鼻炎における u-PA 発現の増加・鼻汁中の活性出現などは、アレルギー性鼻炎で特徴的な多量に産生される鼻汁の粘稠度を下げ、その排泄を容易にするのに役立っていると考えられる。

抗原に対する免疫応答は、Th1 および Th2 反応に大きく分けられる。PAI-1 ノックアウトマウスの感作モデルでは、アレルギー性炎症が抑制されるという結果(Th2 反応は抑制され Th1 反応が優位な傾向)が、行動観察・特異的抗体価やサイトカインの測定・組織所見の観察などで得られた。過去の関連する報告では、PAI-1 は細胞接着・移動を促進することで cell-to-cell あるいは cell-to-ligand を介した細胞(白血球・炎症細胞)のシグナル伝達に深く関与することが示唆されている。よって PAI-1 は、抗原刺激に対する免疫反応の調節因子としての役割を有することがうかがえる。以上を踏まえて今後は、鼻粘膜の病態への線溶因子の関与を逆に利用し、疾患の予防・制御・治療に役立つ方法の考案も期待される。

#### 5. 結論

線溶因子が粘稠度など鼻汁の性状を調整している可能性が示唆された。特にアレルギーでは u-PA や PAI-1 が、鼻汁の量や質的变化に加え、炎症細胞浸潤や組織改変にも関与する可能性が示された。またノックアウトマウスを用いた実験では、PAI-1 欠損によりアレルギー性炎症が抑制されるという結果が得られ、PAI-1 を含む線溶因子はアレルギーの成立過程でも重要な因

子であることが示された。

### 膵星細胞増殖機構における Angiotensin II と TGF- $\beta_1$ の細胞内情報伝達機構の検討

地域医療学系専攻 4 年 濱 公治

#### 1. 研究目的・背景

慢性膵炎とは膵の線維化と外分泌・内分泌機能の障害を特徴する疾患であるが、未だに根本的な治療法は確立していない。それどころか、膵線維化の分子機序には未だ不明な点が多い。1998年に単離・同定された膵星細胞(Pancreatic stellate cell: PSC)は、膵線維化の発症・進展において中心的な役割を果たしている。PSC は膵に炎症が生じると各種炎症性サイトカインにより活性化され、盛んに増殖し、コラーゲンやファイブロンectinなどの細胞外基質を産生・放出することで膵の線維化を促進する。一方、Angiotensin II は慢性膵炎における膵線維化において促進的に作用していることが *in vivo* 実験より示唆されたが、その機序は未だに明らかではない。本研究では、Angiotensin II の膵線維化促進機構を明らかにする目的で、Angiotensin II の PSC 増殖に対する作用とその分子機構を検討する。

#### 2. 研究方法

PSC は、Nycodenz 勾配遠心法によってラット膵より単離した。TGF- $\beta_1$  刺激伝達経路抑制タンパクである Smad7 の発現は、Reverse transcription-polymerase chain reaction 法によって測定し、検討した。Angiotensin II の Smad7 発現促進作用における Protein kinase C (PKC) の機能を、PKC 抑制剤である Go6983、および PKC 活性化剤である 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate でそれぞれ PSC を前処理することにより検討した。

#### 3. 研究結果

これまで我々は、Angiotensin II が Angiotensin II-type1 (AT<sub>1</sub>) 受容体を介して PSC の増殖を促進する経路として、1) EGF 受容体を transactivate し、更にその下流にある ERK を活性化する経路と、2) Smad7 発現を増強す