

## 平成18年度自治医科大学医学部 研究奨励金研究成果報告

### オキシトシン／オキシトシン受容体の抗ストレス作用とその作用機序の解析

自治医科大学生理学講座神経脳生理学部門  
高柳 友紀

オキシトシンは様々なストレス刺激によって下垂体後葉から放出されるだけでなく、視床下部内で放出される。一方、オキシトシンを脳内に投与するとストレス反応が減弱すること、雌のオキシトシン遺伝子欠損マウスで不安が上昇することが知られている。また我々は、オキシトシンニューロンを刺激する体液浸透圧の上昇により、ストレス刺激に対する視床下部におけるノルアドレナリンの放出が減弱し、その結果神経内分泌系のストレス反応が減弱することを明らかにした。これらの結果から、オキシトシンには抗ストレス作用があると考えられる。本研究はこのオキシトシン／オキシトシン受容体系の抗ストレス作用の作用部位とその機序を明確にする事を目的とした。特異的なオキシトシン受容体アンタゴニストあるいはアゴニストが存在しないため、本研究では我々が作製したオキシトシン受容体遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。

1ヶ月間隔離飼育したマウスを resident, 複数飼いのマウスを intruder として攻撃行動を評価する Resident-intruder テストを行ったところ、雄のオキシトシン受容体遺伝子欠損マウスは野生型に比較して攻撃性が高いことが明らかとなった。しかし、リガンドのオキシトシン遺伝子欠損マウスでは攻撃性の上昇が認められなかった。そこで通常のヘテロ接合体同士の交配ではなく、ホモ接合体同士の交配によって胎児期に母親のオキシトシンが存在しない環境下で発育したオキシトシン遺伝子欠損マウスを得て検討したところ、受容体遺伝子欠損マウス同様の攻撃性上昇が認められた。これらの結果から、胎児期に母親から流入するオキシトシンが

胎児のオキシトシン受容体を活性化し、成体における攻撃性を制御している可能性が示唆された。

生後間もない仔マウスを母親から引き離すと超音波発声が惹起されることが知られており、この発声は母仔間交流の断絶に対する仔のストレス応答反応の一つと考えられている。オキシトシン受容体遺伝子欠損の仔マウスでは、母親と引き離れたときの超音波発声が野生型に比べて顕著に低下しており、母仔分離時のストレス応答反応に異常があることが示唆された。

一方で、うつ関連行動の評価として、尾を固定してぶら下げたときの不動時間の長さで回避意欲の程度を評価する尾懸垂試験を行ったが、オキシトシン受容体遺伝子欠損マウスでは雌雄共に野生型との差は認められなかった。また、ホットプレートテスト、tail immersion テストによってオキシトシン受容体遺伝子欠損マウスの痛覚反応を評価したが、これについても雌雄共に野生型と差はなかった。さらに、拘束ストレスによる摂食抑制についての評価を行ったところ、雄の野生型とオキシトシン受容体遺伝子欠損マウスで、同程度に抑制された。

また、雄のオキシトシン受容体遺伝子欠損マウスでは、寒冷暴露時の体温低下が野生型に比べて大きいことが明らかとなった。

以上のことから、オキシトシン／オキシトシン受容体系はマウスにおいて抗ストレス作用に重要な役割を持つと共に、その働きは胎児期の発達過程においても重要であることが示唆された。

### アルギニンメチル化の代謝制御作用の同定と肥満・糖尿病に対する治療応用の可能性

生理学講座統合生理学部門 岩崎 裕明

【背景・目的】 Protein arginine N-methyltrans-

ferase (PRMT) によるアルギニンメチル化は、その発見以降約四半世紀に渡り、不可逆で生化学的に安定した「静的」プロセスであると考えられ、リン酸化やアセチル化に比しその生体機能に対する役割は十分に注目されていなかった。しかし最近、Peptidyl arginine deiminase 4 がリガンド刺激後のアルギニンメチル化を短時間(分単位)の内に逆行性に制御することが報告され、アルギニンメチル化も他の翻訳後修飾と同様に、細胞内シグナル伝達機構を含む生体機能の広範な過程を「動的」に制御する可能性が指摘されている。一方、Northern Blot 法及び Western Blot 法による解析結果から、代表的な PRMT subtype である PRMT1 と PRMT4/CARM1 の発現がマウスの骨格筋で確認されたが、代謝調節に重要な役割を担う同組織における PRMT の役割を検討した研究は今までに見当たらない。そこで本研究では、骨格筋由来培養細胞を対象にインスリンシグナルに対する PRMT1 の作用の点から、アルギニンメチル化と代謝制御の関係について検証した。

【方法】インスリン刺激前後のラット骨格筋由来培養細胞(L6)から得た粗蛋白から得た粗蛋白を低温下で破碎・遠心し、各細胞画分に分離精製して、PRMT1 の細胞内局在および methyltransferase 活性の変動を Western Blot 法や *in vitro* methylation 法により評価した。アルギニンメチル化阻害薬や PRMT1 に対する small interfering RNA (PRMT1-siRNA) により PRMT1 の methyltransferase 活性を修飾した後、インスリンシグナルの情報伝達分子の活性や細胞内へのグルコース取り込みの変化を、免疫沈降法、Western Blot 法や 2-deoxy- $^3\text{H}$ -D-glucose 法を用いて検討した。

【結果】ヒトインスリン刺激により、PRMT1 は速やか(5分以内)に細胞質画分から膜画分へと移行し、また同部における methyltransferase 活性が増強した。このインスリン依存性の酵素活性増強は、膜画分に局在する複数の蛋白の時間依存的なアルギニンメチル化を伴い、その修飾はアルギニンメチル化阻害薬や PRMT1-siRNA の前処置により阻害された。また同前処置は、インスリン受容体(IR)キナーゼ活性や insulin receptor substrate 1 (IRS-1) 活性を早期

に減衰し、さらに IRS-1 と phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) の連関やグルコースの取り込みも時間依存的に抑制した。

【結論】骨格筋において PRMT1 によるアルギニンメチル化は、インスリン刺激後のシグナル(IR-IRS-1-PI3-K 経路)の活性維持とその経路に依存するグルコース取り込み促進作用に必須と考えられた。従って PRMT1 は、同シグナルの調節因子としてインスリン抵抗性に伴う耐糖能異常に関与する可能性が示唆される。今後、インスリン依存性に PRMT1 によりアルギニンメチル化を受ける基質の同定とそのインスリンシグナル制御機構の解明が必要と考えられる。

## SNIP1 (Smad Nuclear Interacting Protein1) は c-Myc 蛋白を安定化し、その転写活性を促進する

病態生化学部門講師 藤井万紀子

c-Myc はがん原遺伝子産物のひとつであり、細胞周期の調節、増殖、分化、発生に重要な役割を果たす。これらの機能は、c-Myc と他の様々なコファクターとの結合や、c-Myc 自体が受けるリン酸化、グリコシル化、アセチル化やユビキチン化などにより制御される。c-Myc の半減期は短く、この代謝過程にプロテオソーム分解系が関わっていることが報告されている。がん細胞では、c-Myc の核内への蓄積とそれに伴う c-Myc 標的遺伝子の活性化が認められるが、プロテオソーム分解系による c-Myc の分解過程に何らかの異常が生じてこの蓄積が充進したことが、がん発生の原因のひとつであると考えられる。

SNIP1 (Smad Nuclear Interacting Protein1) は、細胞増殖抑制タンパク質である TGF- $\beta$  のシグナルを細胞内で阻害する因子としてクローニングされた。我々は、Yeast two-hybrid system により、SNIP1 と c-Myc が結合し、この結合には c-Myc の N 末端と SNIP1 の C 末端領域が重要であることを明らかにした。また、c-Myc の標的配列(E-box 配列)を持つ hTERT プロモーターの c-Myc による転写

活性を SNIP1 が更に増幅させることがわかった。E-box を持つ CDK2, LDH プロモーターでも同様の増幅が観察され、更に E-box に変異を入れたものでは全く転写が起こらなかったため、この転写活性および増幅は c-Myc の E-box への結合に依存するものであると考えられる。SNIP1 を SiRNA を用いてノックダウンすると、c-Myc は mRNA レベルでは影響を受けないが、タンパク質レベルでは発現が抑制された。この際、c-Myc の数多くの標的遺伝子についても mRNA レベルでの発現の低下が認められた。つまり、SNIP1 が c-Myc に結合することによりプロテオソームによる c-Myc の分解が阻害され、このことにより c-Myc を安定化させるのではないかということが予想された。そこで肺がん細胞株 H1299 細胞を用いて pulse chase を行うと、1 時間程度だった半減期が SNIP1 の発現を抑制することによって 30 分以下になった。更に SNIP1 の過剰発現により、c-Myc のユビキチン化が低下することも確認できた。これは SNIP1 が、F box protein のひとつである Skp2 の c-Myc への結合を競合阻害することによるものと考えられた。一方、標的遺伝子のプロモーター上で p300/c-Myc/SNIP1 の複合体形成が促進され、また安定化されることにより、c-Myc による転写活性の増強がおこることを示唆する結果も得た。

mouse embryonic fibroblast (MEF) を使用した *in vitro* transformation assay では、SNIP1 を過剰発現させることにより、c-Myc と H-Ras を co-transfect することによって形成される foci の数を上昇させるという結果を得た。また c-Myc を過剰発現させた Rat1 細胞で、SNIP1 を過剰発現させると足場非依存的なコロニー形成能を増強した。更に肺扁平上皮がん 150 例について免疫染色を用いて解析を行った結果、がん細胞における c-Myc の核内への蓄積の増加が SNIP1 の発現量増加と相関しているということが明らかになった。これらの結果は、SNIP1 が c-Myc の転写活性を増強するという *in vitro* の実験結果をサポートするものである。

## 右心不全と脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) との関連について

自治医科大学循環器内科 大谷 賢一

脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) は左心不全の重症度とよく正相関することが知られており、臨床の現場では理学的所見、画像所見や心電図・心臓超音波検査などとともに、血清 BNP 値を測定することで心不全の重症度、治療の効果判定、将来的な生命予後判定などを検討することに役立っている。一方、右心不全においても、BNP 値がその重症度と関連があるのかどうかということは、以前から慢性閉塞性肺疾患増悪と心不全増悪との鑑別の際などには、常に議論されている点である。

最近の研究では、血清 BNP 値は慢性肺疾患や右心不全でも上昇することが知られており、そのため肺疾患を伴った症例の左心不全増悪時の場合には、治療の選択に難渋させられることが予想される。

さて BNP とは 1988 年、Sudoh らによって豚の脳から単離されたペプチドホルモンで、32 個のアミノ酸により構成されている。BNP は心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) と同様に、主に心臓で分泌されるペプチドであり、ANP が主として心房から分泌されるのに対して、BNP は主に心室から分泌されている。また、BNP は心室の圧負荷、容量負荷に反応して分泌され、左心室のみでなく、右心室からも分泌されることが分かっている。BNP の生理学的作用としては、血管拡張作用、利尿作用、ナトリウム利尿作用、交感神経系およびレニン・アンジオテンシン系の抑制作用を有し、心不全の病態を改善させる方向へと働くことが報告されている。

本研究では、右心不全 (右心室機能障害) の重症度と血清 BNP 値との間に良好な正の相関関係が存在するかどうか、またその場合治療効果判定の目安になり得るかどうかを実際に検討することで、左心不全だけではなく右心不全を来す疾患についても血清 BNP 値を迅速に測定し、かつその推移をみることで、効率的かつ効果的な治療の選択に役立てることが可能かど

うかを検討することにした。

対象症例として、当科に入院した急性肺血栓塞栓症の症例を連続して選択し、入院時、退院時、半年後のBNP値を含めた各種血清マーカーの測定、および心臓超音波検査を施行することで、その病態の推移を検討することにした。なお深部静脈血栓症のみで、急性肺血栓塞栓症を合併していない症例は除外した。また、精神疾患を合併している症例については除外した。

症例は男性4人、女性4人の計8名で、平均年齢は58.4歳(31~77歳)であった。基礎疾患は抗リン脂質抗体症候群が2例、悪性腫瘍が2例、肥満が3例、高脂血症が3例、高血圧が1例、糖尿病が1例であった。治療法は全例ワーファリン導入、急性期のt-PA静注が3例、UK持続静注が1例、永久下大静脈フィルター留置が2例だった。入院時の平均血清BNP値は476pg/ml(12.2~1110)(正常値<20)と著明な上昇を認めていた。退院時の平均BNP値は44pg/ml(16.1~96.8)とわずかな入院の期間に著明な改善を認めた。その他のマーカーとしては、高感度CRPが高値であった。

具体的な対象症例の数値を表に示す。

	BNP (pg/ml)	RVd (RV/LV) (mm)	TR	syst.PAP (mmHg)	中隔扁平化
①59 F	1110.0	34 (0.87)	++++	54	+
②31M	1050.0	30 (0.86)	++	-	+
③63 F	143.0	34 (0.91)	++	18	-
④68 F	994.0	36 (1.06)	+++	60	+
⑤57M	238.0	33 (0.79)	+++	75	+
⑥77M	242.0	22 (0.54)	+	45	-
⑦38 F	19.8	25 (0.58)	-	-	-
⑧74M	12.2	30 (0.70)	+	-	-

また、中でも良好な経過をとった具体的な1例を以下に示す。

	入院時	退院時	半年後
BNP (pg/ml)	1110.0	96.8	23.3
EF (%)	55	70	66
RVd (mm)	34	33	33
RV/LV	0.87	0.69	0.75
TR	++++	++	+
Systolic PAP (mmHg)	54	39	25
中隔の扁平化	+	-	-

では、右心室機能障害は、具体的にどのように規定されるか？

1. 以下の所見のうち2つ以上を示したものとする (D. Logeart et al : Intensive Care Med 2007. 33:286-292)。

- ①右心室/左心室径の比が0.7以上
- ②右心室自由壁の壁運動低下
- ③吸気時の下大静脈径が10mm以上
- ④心室中隔の扁平化
- ⑤三尖弁逆流速度が2.7m/s(収縮期肺動脈圧が40mmHg)以上

2. 以下の所見のどれかを示すものとする (T. Yardan et al : Int J Clin Pract 2007)。

- ①右心室/左心室径の比が1.0以上
- ②右心室拡張終期径が30mm以上
- ③右心室中隔の奇異性運動

さてD. Logeartらは、BNPとTroponin Iが急性肺血栓塞栓症において、入院後血行動態的に安定していただけるかどうかの予測マーカーとして有用であることを報告している。Troponinは心筋傷害によって放出され、肺血栓塞栓症では右心室壁への圧負荷の増大によって増加するとされる。ここでは、右心室機能障害はBNPが100pg/ml以上で、Troponin Iが0.1ug/l以上で出現するとされているため、これらのマーカーを測定することが治療方針の決定に有用であると報告している (Intensive Care Med (2007) 33:286-292)。

またR. Patrickらは、急性肺血栓塞栓症に重症合併症を伴ったかどうかと、血清BNP値との関連について検討を行っている。ここでの重症合併症とは、死亡、心肺蘇生後、人工呼吸器管理を要する、血管拡張剤を要する、血栓溶解剤を要する、外科的血栓除去術を要する、集中治療室への入室を要する、と規定されている。連続51症例で検討した結果、重症合併症を有するものと有しないものとは、入院時血清BNP値は274pg/ml対78pg/mlと有意な差があった。最適なBNP閾値は、200pg/mlであった (Am J Emerg Med 2006. September 603-607)。

さらにT. Yardanらは、連続40症例の急性肺血栓塞栓症を右心室機能障害の有無によって低リスク群と高リスク群に分け、それらの血清BNP値を測定した。結果は、低リスク群と高リス

ク群では入院時血清 BNP 値は $426 \pm 299$ pg/ml 対 $39 \pm 25$ pg/mlであった。そして、右心室機能障害の予測 BNP カットオフ値は90pg/mlと報告している (T. Yordan et al : Int J Clin Pract 2007)。

今回、我々の検討においても、右心室機能障害を伴った症例については、血清 BNP 値も著明に上昇している傾向を示した。治療効果が良好な例では、血清 BNP 値も著明に改善していた。右心不全においても、血清 BNP 値はその重症度に比例して上昇することが示唆され、入院時の値を見て重症度を判定することには意義があるものと考えられた。慢性肺疾患との関連についてもいくつかの論文では、急性肺血栓塞栓症を併発した際の呼吸困難時に、やはり血清 BNP 値測定が有用であると報告されていた。

今回、我々が検討した症例は、まだ数が少ないため、今後も症例の積み重ねが必要と考えられた。

## IL-21受容体細胞外ドメインを用いた移植片対宿主病治療の可能性

### 1) 自治医科大学内科学講座血液学部門

### 2) 自治医科大学輸血・細胞移植部

目黒 明子, 尾崎 勝俊, 翁 家国,  
佐藤 一也, 多々良礼音, 松 春子,  
畑中 恵子, 鈴木 隆浩, 森 政樹,  
永井 正, 室井 一男, 小澤 敬也

造血幹細胞移植は現在、白血病治療の標準的選択肢の一つとなっている。しかし同種造血幹細胞移植の場合、合併症で亡くなる可能性は依然として高い。この合併症の一つが移植片対宿主病である。治療には免疫抑制剤が用いられるが、重症例・難治例など治療抵抗性の場合も多い。また、免疫抑制状態で感染症が顕在化し、治療に難渋する場合もみられる。このような負の面と共に移植片には移植片対白血病作用があることが知られており、ある程度の移植片対宿主病は白血病の治療成績を向上させると考えられている。血液学に関わる者の共通の理想は、移植片対白血病作用を維持しながら移植片対宿

主病を抑制する方法の開発である。

我々は今回、この理想に近づく一つの手段として、IL-21を利用できないかどうかを検討した。IL-21は common  $\gamma$  chain ( $\gamma c$ ) family のサイトカインで、生体内では免疫グロブリンの産生、Th2分化、CD8細胞の抗腫瘍作用などで重要な役割を果たしていることが知られている。受容体は IL-21受容体と  $\gamma c$  の二つの鎖から構成され、T, B, NK, 樹状細胞に発現しており、IL-21はそれぞれの細胞にさまざまな作用をもたらすことが知られている。IL-21は TCR シグナルの存在下で T 細胞増殖を促進することから、GVHD においても何らかの役割を果たしているものと考えられるが、現時点で報告はない。IL-21のノックアウトマウスの脾細胞とワイルドタイプの脾細胞を移植し、移植片対宿主病の重症度を比較するとノックアウトマウスの方が軽症で、移植マウスの生存率も改善した。このことは IL-21シグナルが GVHD を正に制御していることを示している。

この結果から、次に、IL-21シグナルの抑制が移植片対宿主病の治療法となるかどうかについて検討した。IL-21リガンドをトラップする目的で、5FU で処理したマウスから骨髓前駆細胞を取り出し、レトロウイルスを使って IL-21細胞外ドメインを強制発現させた。この細胞を脾臓細胞と同時に移植し、GVHD を惹起させると、空ベクター群に比べ有意な差をもって細胞外ドメイン群で生存率の改善が認められた。このことは発現させた decoy receptor が IL-21リガンドをトラップし、GVHD を抑制したものと考えられた。

以上の結果は、GVHD の治療法として IL-21シグナル抑制が臨床応用される可能性を示唆したものと考えられた。GVL に対する効果も今後検討していく予定である。

## 自閉性障害におけるエピジェネティクス機構に関連する遺伝子変異の解析

自治医科大学小児科学 中島 尚美,  
山形 崇倫, 桑島 真理,  
森 雅人, 桃井真里子

〔背景・目的〕自閉性障害（ASD）は、社会性の障害、コミュニケーション障害、常同的行動を特徴とする発達障害である。病因として、多因子遺伝であることやエピジェネティクス機序の関与も推定されている。自閉症状を示す Rett 症候群の病因遺伝子として、遺伝子発現調節に関与する *MECP2* が同定されており、*MECP2* により発現調節される遺伝子は ASD の候補遺伝子と考えられる。その一つである homeobox 遺伝子の *DLX5* は、ASD との連鎖が報告されている 7q21 にある imprinting 領域に局在するため、ASD との関連が強く示唆される。よって、*DLX5* およびその imprinting 領域に局在する遺伝子について、ASD 患者における遺伝子変異と発現の変化の有無を検討した。尚、*DLX5* は、リンパ球でも imprinting を受けていることから、リンパ球を用いて発現を解析した。

〔対象・方法〕親からインフォームド・コンセントを得た ASD 患者血液からリンパ球採取し、EB ウイルスにより芽球化し使用した。

解析した遺伝子は、*DLX5*、これと同じ *DLX* 遺伝子で *DLX5* に隣接する *DLX6*、および *MECP2* 結合部位近傍に局在する *PEG10*。

①遺伝子変異解析；リンパ芽球から DNA を抽出し、*DLX5*、*DLX6* の各エクソンを PCR 増幅し、WAVE™ を用いた DHPLC 法でフラグメント解析した。DHPLC 法で変異が検出されたものについて、シーケンスにて変異を確認し、さらにコントロールでの変異の有無を確認した。

②遺伝子発現解析；リンパ芽球から抽出した RNA を用いて cDNA を作製し、TaqMan probe を用いた Real-time PCR で遺伝子発現解析し、ASD 患者、Rett 症候群患者、コントロール間で発現レベルを比較した。

〔結果〕①遺伝子変異解析；*DLX5* に ASD 発症に関連する変異は検出されなかった。*DLX6* で、G656A の塩基置換による R219H 変異を 64 例中 2 例で検出し、コントロール 120 例では検出されなかった。2 例で、G450A (Q150Q) の SNP を検出した。

②遺伝子発現解析；ASD 患者 13 名、Rett 症候群患者 3 名、コントロール 8 名で発現解析した結果、*DLX5*、*DLX6* および *PEG10* とも、各群

で特徴的な発現パターンを示さなかった。しかし、ASD 患者 4 名で *DLX5* の発現が高値であった。*DLX6* に変異が検出された ASD 患者においても、他の ASD 患者やコントロールとの間に有意な発現の差はなかったが、リンパ球での *DLX6* の発現量は低く、遺伝子変異と発現量の関連の確定は不可能であった。

〔考察〕リンパ芽球では、Rett 症候群患者とコントロールで各遺伝子の発現量に有意な差が検出されず、また、ASD 患者全体でも発現に差はなかった。しかし、*DLX5* の発現が高かった ASD 患者がおり、それらにおいては、*DLX5* の発現、機能に関与する何らかの因子の異常が ASD の発症に関与している可能性も考えられた。*DLX6* に missense 変異が検出され、ASD との関連が示唆された。*DLX5* と *DLX6* は神経堤細胞の発生・分化に重要な機能を有し、脳にも発現しているが、脳での作用は不明である。*DLX5* および *DLX6* の脳での機能と ASD への関与について、さらに解析が必要である。

## 胃全摘術後のグレリン動態の変化と摂食に関する研究

外科学講座消化器外科学部門助手 小泉 大

【目的】グレリンは食欲亢進ホルモンで、70% が胃から分泌される。胃全摘術後には一般に体重減少、食欲減退が認められる。胃全摘術後における摂食とグレリンの関係について検討した。また、術後のグレリン投与による摂食増加効果について検討した。【方法】実験 1) 第 6 週齢雄性 Wistar 系ラットに胃全摘術を施行。Billroth II 法 (A 群) と Roux-en-Y 法 (B 群) で再建。術後 3 ヶ月の体重と摂餌量を測定した。実験 2) 犠牲死させ、血液と十二指腸を採取し、グレリン濃度を測定した。実験 3) 絶食試験を施行した。実験 4) 第 8 週齢の雄性 Wistar 系ラットを 2 群に分け、D 群にグレリン (10nM) を 1 日 1 回 7 日間皮下注射で投与した。対照群 (E 群) には同量の生理食塩水を投与した。投与前後で体重と 24 時間摂餌量を測定した。実験 5) 第 6 週齢の雄性

Wistar 系ラットに対して胃全摘術を行い、胃全摘モデルを作成した。再建は Billroth II 法で行った。2群に分け、術後2週、6週時にF群にグレリン (10nM) を1日1回7日間皮下注射で投与した。対照群 (G群) には同量の生理食塩水を投与した。投与前後で24時間摂餌量を測定した。**実験6)** 胃全摘モデルを2群にわけ、術後12週時にH群にグレリン (10nM) とI群に生理食塩水を1日1回皮下注射で投与した。その翌週には逆にH群に生理食塩水、I群にグレリン (10nM) を投与した。投与前後で24時間摂餌量を測定した。**【結果】実験1)** 体重 ( $\pm$ SE)(g) はA群137.0 $\pm$ 3.1, B群237.3 $\pm$ 5.3, 対照 (C群) 345.8 $\pm$ 5.8で、摂餌量 ( $\pm$ SE)(g/日) はA群8.9 $\pm$ 0.3, B群12.8 $\pm$ 0.4, C群17.9 $\pm$ 1.1。いずれも各群間で有意差を認めた。**実験2)** 血漿グレリン濃度 (C-RIA) ( $\pm$ SE)(fmol/ml) は、A群393.0 $\pm$ 40.0, B群350.0 $\pm$ 23.2, C群815.0 $\pm$ 53.7と、A・B群は有意に低値。十二指腸組織中グレリン濃度 ( $\pm$ SE)(fmol/mg) は、A群269.9 $\pm$ 12.6, B群246.8 $\pm$ 13.4, C群140.8 $\pm$ 2.8で、A・B群は有意に高値。**実験3)** 血漿 Des-acyl グレリン濃度 (ELISA) は絶食前でA群49.5 $\pm$ 5.2, B群49.1 $\pm$ 19.0, 後でA群184.5 $\pm$ 47.3, B群161.1 $\pm$ 17.2で両群共絶食後に上昇した。**実験4)** 7日間の積算摂餌量はD群132.5 $\pm$ 1.7g, E群125.1 $\pm$ 2.9g (P=0.04) でグレリン投与により有意に摂食量が増加した。**実験5)** 7日間の積算摂餌量は術後6週ではF群69.2 $\pm$ 2.1g, G群68.2 $\pm$ 2.5g (P=0.75), 術後12週ではF群53.7 $\pm$ 1.6g, G群52.5 $\pm$ 1.3g (P=0.56) であり、術後6週時、12週時とも摂餌量に相違を認めなかった。**実験6)** 術後12週時では、24時間摂餌量はH群9.0 $\pm$ 0.4g, I群8.0 $\pm$ 0.2g (P=0.03) であり、グレリン投与により、摂餌量は増加した。**【結論】** 胃全摘後の再建術式の違いで体重・摂餌量に有意差を認めたが、血漿グレリン濃度とは相関しなかった。術後、グレリンは十二指腸で代償性に産生され、その分泌は食事によって調節されている。非胃全摘モデルではグレリン投与で摂餌量が増加した。胃全摘術後では、グレリンの投与は術後早期には摂餌量を増加させなかったが、術後3ヶ月には摂餌量を増加させた。グレ

リンが胃全摘術後の摂食改善治療薬となりうる可能性が示唆された。

## コンピューターシミュレーションを用いた脳動脈瘤内部における血流動態の解析

自治医科大学血管内治療部病院助教  
庄島 正明

### 1. 研究目的

脳動脈瘤は血管の分岐部・屈曲部などの血流が衝突する部位に存在するため、脳動脈瘤が発生してから破裂へ至る過程の中で血流の及ぼす影響は大きいと考えられている。「血流による摩擦力」とよべる壁面せん断応力は脳動脈瘤の発生と強く関連している事が報告されている。壁面せん断応力が生理的範囲を超えて作用すると、血管径を拡張させるようなりモデリングが始まるが、そのときに内弾性板を断裂させる。血管分岐部などで局所的に高い壁面せん断応力が持続的に作用すると、局所的な内弾性板断裂が生じて脳動脈瘤の発生につながる。

しかし、脳動脈瘤の破裂に血行力学的ストレスがどのように作用するかに関する知見は現在のところほとんどない。脳動脈瘤の画像検査所見や手術中所見から脳動脈瘤壁に血流が強く衝突している様に見えるため、血流の衝突力が脳動脈瘤を破裂させているのではないかと想像されていたが、血流の衝突力は従来想像されていたよりも小さく、脳動脈瘤壁を破綻させる力がないことが報告された。一方、壁面せん断応力に関しては、脳動脈瘤が破裂する部位では大きく作用するとする報告と小さいとする報告があり、意見が分かれている。

脳動脈瘤が破裂に至る過程で壁面せん断応力がどのように関与するかを明らかにするには、Prospectiveな観察が必要である。脳動脈瘤は破裂する際に形状が変化する可能性があるため、破裂した後の脳動脈瘤内の血流を解析しても、「将来破裂する部位」の血流動態についての知見を得ることはできない。

本研究では未破裂の段階で発見された脳動脈瘤に対して経過観察をしていたが、破裂に至っ

た症例で血流解析を行い、「将来破裂する部位における血流動態」を明らかにすべく、コンピュータシミュレーションを利用して血流解析を行った。

## 2. 研究方法

症例：59歳男性、脳内出血を生じた際に脳底動脈先端部の未破裂脳動脈瘤が発見された。以後、脳動脈瘤に関して経過観察がされている。2007年3月に三次元回転血管撮影を含む脳動脈瘤精査が行われたが、その1ヶ月後に脳動脈瘤が破裂してクモ膜下出血を生じて来院した。三次元回転血管撮影を含む検査で脳動脈瘤の形状を評価し、血管内治療を行った。術後の経過は良好で独歩退院した。

本症例では破裂前後で脳動脈瘤に関して詳細な三次元画像が撮像されており、破裂前後で形状の変化した部位（つまり破裂部位）と、破裂する前の脳動脈瘤内の血流解析を行うことができる。

血流解析には汎用の有限体積法流体ソルバー（SCRYU/Tetra for Windows version 6, Cradle Co. Ltd., Osaka）を用いた。入口境界条件はPhase Contrast Magnetic Velocimetryにより計測した。出口条件は表面圧力ゼロ、壁面条件はno slip and rigid wallを適用した。3拍動周期の計算に7日間を要した。内部の血流動態を流速・流線表示により観察した。また、壁面せん断応力を算出した。

## 3. 研究結果

脳動脈瘤の破裂は、脳動脈瘤の先端部分で生じていた。血流解析を行うと、脳動脈瘤の破裂部位には血流の強い衝突は認められなかった。動脈瘤壁における圧力分布を解析したが、破裂部位で局所的な圧力上昇は認められなかった。動脈瘤壁におけるせん断応力分布を解析すると、脳動脈瘤破裂部位における値は著しく低かった。

## 4. 結論

脳動脈瘤は血流分岐部に発生するため、血流が衝突することで強いストレスが発生して破裂に至ると考えられてきた。しかし研究者は脳動脈瘤の血流解析を行い、血流によるストレスの大きさは小さく、血行力学的ストレスは力学的には脳動脈瘤破裂に関与していない可能性を報

告してきた。そして、かえってせん断応力が小さすぎることが脳動脈瘤壁の劣化を促進して破裂へのトリガーとなる、とする仮説を提唱したが、それに反する報告もなされている。本症例は破裂前の血流解析結果と破裂部位との関連を検討できた点で、非常に貴重な結果である。解析結果は、研究者の提唱した仮説を裏付け、脳動脈瘤が将来破裂した部位に作用するせん断応力は生理的範囲を下回る小ささであった。

## 神経組織修復へのスフィンゴシン-1リン酸の関与

分子病態治療研究センター分子病態研究部  
大森 司

【背景・目的】スフィンゴシン1-リン酸（sphingosine 1-phosphate; Sph-1-P）は細胞膜構成成分であるスフィンゴミエリンが、いわゆるスフィンゴミエリンサイクルにより代謝をうけることで生じる脂質である。その存在は古くから知られていたものの、生理意義は不明なままであった。1998年にSph-1-Pが7回膜貫通型受容体を介して増殖、遊走などの作用を引き起こすことが報告され、リゾリン脂質の新しい生理機能として1つのブレイクスルーとなった。神経幹細胞（neural stem/progenitor cell; NPC）は中枢神経損傷部位に集積する特徴があり、局所において損傷を軽減し修復する作用があると考えられている。中枢神経損傷部位におけるstem cell factor (SCF), stromal cell-derived factor 1- $\alpha$  (SDF-1), fibroblast growth factor (FGF)などの増殖因子やサイトカインの重要性が唱えられる中、NPCの遊走メカニズムに関しては不明な点が多い。この研究では、リゾリン脂質メディエーターであるスフィンゴシン1-リン酸に着目し、中枢神経損傷部位におけるNPC遊走への関与について検討を行った。

【方法・結果】E14ラット前脳よりNPCを分離培養し、以下の検討に用いた。NPCの遊走をボイデンチャンバー法にて検討を行うと、FGF, EGF, SDF-1等の増殖因子やサイトカイン、またlysophosphatidic acid (LPA)



など他の生理活性脂質のなかでも Sph-1-P が NPC に対する最も強力な遊走因子であった。チェッカーボード解析で Sph-1-P は chemotaxis だけでなく chemokinesis も促進することが示唆された。NPC には 5 つある Sph-1-P 受容体の中でも S1P<sub>1</sub> 受容体の豊富な発現を認めた。また Sph-1-P の遊走は百日咳毒素感受性であった。 [<sup>3</sup>H] Sph の代謝を検討したところ、Sph-1-P の産生や細胞外への放出は認めなかった。以上より Sph-1-P の作用は細胞膜上の受容体を介することが示唆され、さらにオートクライン的な Sph-1-P の作用は否定された。

次に、脊髄損傷部位における Sph-1-P の役割をさらに明らかにするために IH impactor (200kdyn) による定量的な圧挫によるラット脊髄損傷モデルを用いて、中枢神経損傷部位の Sph-1-P 濃度を HPLC 法にて測定した。興味深いことに、損傷 7 日後に損傷部位における Sph-1-P の有意な上昇を認めた。免疫染色により、損傷部位における Sph-1-P の上昇には、アストロサイトやマイクログリアなどのグリア細胞が関与することが示唆された。shRNA 発現レンチウイルスによる S1P<sub>1</sub> 受容体ノックダウンにより、NPC の *in vitro* における Sph-1-P に対する遊走が抑制されるだけでなく、*in vivo* でも脊髄損傷近傍に移植した NPC の損傷部位への集積が抑制された。

【結論】 Sph-1-P はその受容体である S1P<sub>1</sub> を介して、NPC の中枢神経損傷部位への集積に関与していることが示唆された。この Sph-1-P をターゲットとした治療戦略が中枢神経疾患の治療に応用可能かもしれない (Stem Cells 2007; 25: 115-124)。

## 幹細胞の骨髄ホーミングを誘導する糖鎖性分子の探索と幹細胞純化への応用

幹細胞制御研究部助教 菊池 次郎

### 【研究背景と目的】

造血幹細胞の特徴には、自己複製能や高い骨髄親和性 (ホーミング能) と薬剤耐性能を持つこと等が挙げられる。白血病など造血器腫瘍細

胞の中にも造血幹細胞様の集団があり、癌幹細胞または白血病幹細胞と呼ばれている。白血病幹細胞も先に示した造血幹細胞と同様な特徴を持っており、白血病完治に向けた幹細胞標的療法のニーズが高まっている。このうち白血病幹細胞の骨髄ホーミングは、微小環境への生着や接着を介した薬剤耐性に関わることが示されており、その制御因子の同定は新規治療法の開発においても重要である。これまでの研究を通して、造血幹細胞や白血病幹細胞の骨髄ホーミングに関わる分子として、細胞表面の接着分子であるインテグリンやケモカイン受容体などが報告されている。しかしながら、糖鎖性分子については、細胞間接着の最初の重要なステップに関与するにも関わらず、その同定はほとんど進んでいなかった。今回、プレ B 白血病細胞株をモデルに、白血病幹細胞の骨髄ホーミングに関わる糖鎖性分子の探索と同定を試みた。

### 【実験結果】

(1)プレ B 白血病細胞株や新鮮白血病細胞表面に発現する糖鎖性分子を、糖鎖抗原に対する抗体を用いてフローサイトメーターにより検出した。その結果、プレ B 白血病細胞株 KM3 や NALL1 において、造血幹細胞の存在する骨髄微小環境の構成細胞であるストローマ細胞にも発現する E-セレクトリンを介した接着に関与する糖鎖抗原 CD15s の発現を見いだした。(2)免疫沈降法とウェスタンブロット解析から、この CD15s 糖鎖抗原のキャリアタンパク質が、細胞外領域に多数の糖鎖付加を持つ表面抗原 CD43であることを明らかにした。(3)セレクトリンを人工的に発現させた COS 細胞を用いてセレクトリン依存性の細胞間接着能を解析した結果、E-セレクトリン依存性の接着能を有することを明らかにした。(4)KM3 や NALL1 以外の細胞株や新鮮プレ B 白血病細胞においても CD43 及び CD15s 発現を検出した。(5)プレ B 白血病細胞株 NALL1 の CD43 発現を RNA 干渉 (short interfering RNA ; siRNA) を用いてノックダウンさせた細胞を免疫不全マウスへ移植し、骨髄へのホーミング能を解析した。その結果、NALL1 細胞の骨髄ホーミングが著明に減退することを明らかにした。

### 【考察】

プレB白血病細胞において骨髄ホーミングに関与する糖鎖性分子として CD43及び CD15s 糖鎖抗原を同定した。この分子を標的に白血病幹細胞の骨髄ホーミングの抑制が可能であり，既存の抗がん剤との併用により，治療効果の向上が期待できるものと思われた。