

平成19年度自治医科大学医学部 研究奨励金研究成果報告

ダブルバルーン内視鏡を応用した経皮内視鏡的 空腸瘻造設術の新たな方法の開発

内科学講座 消化器肝臓内科学部門
矢野 智則

背景

経腸栄養のルートとして、経皮内視鏡的胃瘻造設術 (PEG) はその手技の簡便性、安全性が認められ、広く普及している。しかし、胃手術後や、胃運動能の低下、胃食道逆流などの問題から胃瘻よりも空腸瘻がより適している症例も存在する。一方で経皮内視鏡的空腸瘻造設 (D-PEJ) は技術的に難しいことから、広く普及するには至っていない。

空腸は、通常の内視鏡では操作性を保ちつつ到達することが困難であるだけでなく、胃に比べて内径が小さいため穿刺部位を正確に決定する必要があり、腹壁と空腸の相対位置も変わりやすいという問題がある。

穿刺部位を決定するにあたって、内視鏡からの透過光を腹壁側から確認する「イルミネーションサイン」、腹壁からの指による圧迫を内視鏡側から確認する「指サイン」を用いるのが一般的だが、内視鏡先端からスネアを出して透視ガイド下に穿刺する方法や、注水してエコーで確認する方法が実験的に試みられてきた。しかし、穿刺部位を一度決定しても、実際に穿刺する時には、穿刺するはずだった小腸が移動してしまい、安全確実な穿刺は困難という問題は解決していない。

ダブルバルーン内視鏡 (DBE) は、内視鏡先端のバルーンとオーバーチューブ先端のバルーンを用いて腸管を把持し、腸管の伸展を抑制することで、全小腸観察を可能にした。これを用いることで、内視鏡の操作性を保ったまま、空腸に到達することができる。また、バルーン付きオーバーチューブを空腸内に留置したまま内視鏡のみを抜去することも可能である。

我々は、この DBE に、2つの磁石を組み合わせることで、D-PEJ の技術的な問題を解決できると考えた。

目的

DBE を用いた D-PEJ のより安全で簡便な新しい方法を開発するため、ミニプタを用いて試行し、有用性と安全性を検討する。

方法

腹壁と空腸との仮固定のため2つの磁石を用意する。空腸側固定具は5mm大の磁石で内視鏡先端に3cm長の糸でぶら下げるように固定する。腹壁側固定具には15mm径の円筒状の磁石を用意する。

48時間絶食にしたミニプタを用意し、全身麻酔下で経口的に内視鏡を空腸まで挿入する。指サインとイルミネーションサインを用いて、穿刺に適した部位を決定する。腹壁に腹壁側固定具を載せると、空腸側固定具が磁力によって引き寄せられ、腹壁側固定具の直下に仮固定される。

磁石で腹壁に仮固定された空腸を、ナイロン糸で固定するために北信式胃壁固定法¹を用いる。18G 注射針と、18G セルジンガー針の2本で穿刺するが、腹壁側固定具のすぐ横を穿刺すれば、確実に空腸を穿刺できる。18G 注射針から出したナイロン糸のループに、18G セルジンガー針から出した固定用ナイロン糸をくぐらせ、ループで固定用ナイロン糸を把持して体外に引き出し固定する。

14Fr pull-type PEG キットのシース付き穿刺針で本穿刺する。シースを通して挿入したガイドワイヤをスネアで把持し、オーバーチューブを残して、内視鏡ごとガイドワイヤを体外に引き出す。ガイドワイヤに結んだ feeding tube を、オーバーチューブを通して腹壁側から引っ張り出し、腹壁に固定する。オーバーチューブを通して内視鏡を再挿入して状態を確認して終了する。

結果

8匹のミニブタで試行したが、8匹全てでD-PEJ留置に成功し、一週間以上の経管栄養が可能であった。手技に関連した偶発症はなかった。

考察

DBEは空腸への到達と、そこでの正確な操作を可能にした。磁石固定により透視装置を使わずとも穿刺部位を確認するのに有用であった。オーバーチューブを通してのfeeding tube留置は創部感染と腸管粘膜損傷を防ぐ意味で有用である。

結論

DBEと磁石固定具を用いたD-PEJは有用で安全な手技である。

¹ 柴田ら, 日本消化器内視鏡学会雑誌 (0387-1207) 47巻9号 Page2146-2152 (2005.09)

ストレス応答タンパク質 GRP78および HSP70に着目した吸入麻酔薬の抗ストレス効果の解析

麻酔科学集中治療医学講座 麻酔科学部門
佐藤 正章

【目的】

周術期の主要臓器は、手術操作、虚血およびショックなどにより、感染、低・高酸素、アシドーシス、低・高体温および炎症などのストレスに暴露されることがある。吸入麻酔薬に代表される麻酔薬は臨床的に抗ストレス効果を有することが報告されている。その一つに吸入麻酔薬の虚血モデルによるプレコンディショニング増強効果がある。この効果は虚血再灌流後合併症を明らかに軽減する。現在、これらの麻酔薬がどのようなメカニズムでこのような抗ストレス効果を発揮するのかはあきらかでない。近年、膜融合タンパク質 Syntaxin の変異線虫を用いた研究で、吸入麻酔薬が小胞輸送と神経伝達物質の調節メカニズムに関与する可能性が報告された。このことはヒトにおいても麻酔薬が“タンパク質の調節”に関与する可能性を示唆している。我々は今回、タンパク質の調節・成熟機構に関与するストレス応答タンパク質である小

胞ストレスタンパク質 GRP78と熱ショックタンパク質 HSP70に着目した。そこで本研究では、吸入麻酔薬セボフルランがストレス応答タンパク質 GRP78および HSP70の発現におよぼす効果を解析した。

【方法】

1) セボフルランのストレス応答タンパク質 GRP78および HSP70の発現の検討

週齢8週齢の C57/B6マウス (♂) の脳を用いた。0.5MAC の吸入麻酔薬セボフルランを純酸素下に8時間投与した。その後セボフルランの投与は中止して室内空気中で16時間経過観察した。検体は、セボフルラン投与前、セボフルラン8時間投与後およびセボフルラン中止16時間後に摘出した。その後氷上で溶解・破碎および遠心分離して可溶性のタンパク質を抽出した。タンパク質濃度は BSA 法で調整した。iBlot™ ウエスタンブロッティングシステムを用いて目的タンパク質の検出を行った。

2) 熱ストレス下におけるストレス応答タンパク質 GRP78および HSP70の発現の検討

ヒト子宮頸癌細胞由来の HeLa 細胞を用いた。吸入麻酔薬セボフルランを培養細胞に持続投与する実験系はサイドストリーム方式の呼吸ガスモニターとガスクロマトグラフィーで検討した。セボフルランは暴露濃度を3%として4時間投与した。ストレス条件は熱ストレスを42℃で1時間行った。目的タンパク質の発現はタンパク質プロットと細胞免疫染色とで検討した。

【結果】

1) マウスの脳において、HSP70タンパク質および GRP78タンパク質の発現量は吸入麻酔薬セボフルランを投与することで有意に減少した。2) 培養液中のセボフルランは目的の濃度になることが確認された。3) HeLa 細胞において、セボフルランを単独で投与した場合、HSP70タンパク質の発現に変化は認められなかったが、GRP78タンパク質の発現はセボフルラン投与により減少した。またセボフルランの投与下に熱ストレスを加えた場合、HSP70タンパク質の発現量は有意に増加した。一方、GRP78タンパク質の発現量は減少した。

【考察】

吸入麻酔薬セボフルランは GRP78の発現量

を減少させることが明らかになった。このことは組織の違いや種の違いにかかわらずセボフルランでは GRP78 タンパク質の発現量を減少させる可能性を示している。セボフルランが GRP78 の転写活性の結果によっては細胞内のタンパク質の品質管理においては負の効果を持つ可能性が考えられる。一方、セボフルランはストレスの負荷のない状況下では HSP70 タンパク質の発現を抑制し、熱ストレスが付加された時には、HSP70 タンパク質の発現量を増加させる可能性を示している。この現象は唯一の HSP 誘導剤として報告されているガラニルガラニルアセトンの特徴と類似している。今回我々の結果から、セボフルランの抗ストレス効果は、ストレス下に初めて HSP70 タンパク質を誘導することによりもたらされている可能性が考えられた。今後は GRP78, HSP70 の転写活性を検討することで吸入麻酔薬セボフルランの抗ストレス効果を明らかにしていく必要がある。

レトロウイルスライブラリーを用いた癌関連マイクロ RNA の同定

分子病態治療研究センターゲノム機能研究部
高田 修治

マイクロ RNA (miRNA) は約22塩基長の non-coding RNA であり、標的とする mRNA の 3'UTR に相互作用し翻訳をブロックする新たな蛋白質発現制御因子として現在注目を浴びている。miRNA はこれまで個体の発生や癌化機構において重要な役割を果たすことが予想されて来たが、ヒトの有する miRNA 遺伝子群の全容も未だ不明なままであり、特定の疾患発症への関与が証明された miRNA も僅かである。その一つの原因は微量の臨床サンプルから miRNA を効率よくクローニングする方法が存在しなかったことである。近年我々は臨床検体・小臓器など微量のサンプルから大量の miRNA をクローニングする新たな手法、mRAP (miRNA Amplification Profiling) を開発した。我々はこの方法を用いてヒトおよびマウスにおける miRNA の網羅的解析を目指している。本

mRAP 法を用いることで、僅か10ng ほどの RNA から miRNA を100万種類以上回収可能であり、従来の手法に比べて千倍以上の感度を有することが確認された。本研究では、mRAP を用い臨床検体での miRNA のクローニングによる発現プロファイルと、さらに miRNA の機能解析として miRNA の強制発現によるバイオアッセイを試みた。

我々は急性骨髄性白血病臨床検体および左室心筋切除検体に対して mRAP 法を応用し、これら臨床検体における miRNA の発現プロファイル決定と新規 miRNA の同定を目指した。計14600種類の低分子量 RNA 由来 cDNA クローンについて塩基配列を決定し、6462クローンの既知 miRNA 分子および226クローンの新規 miRNA 候補を同定した。我々は更にこうして同定した miRNA の細胞内機能を明らかにすべく、これら miRNA をレトロウイルスで発現させる機能スクリーニングシステムを開発した。これまで既知 miRNA 262種類、新規 miRNA 192種類についてそれぞれレトロウイルス発現ベクターを作成し、様々な機能スクリーニングを行っている。その中でマウス3T3繊維芽細胞を用いたフォーカスフォーメーションアッセイを行ったところ、明らかな形質転換能を有する miRNA を発見することに成功した。本 miRNA を発現する3T3クローンは、in vitro で形質転換能を有するだけでなく、ヌードマウスにおいて明瞭な皮下腫瘍を形成した。

以上より、我々の解析から「癌遺伝子」としての機能を有する miRNA を同定することができた。現在、この機能スクリーニングを進めると共に、マウスにおける全 miRNA 同定プロジェクトを終了しており、世界に先んじて、ほ乳類 miRNA の全容を明らかにしつつある。

アジア人民族を対象とした小胞体ストレス反応関連遺伝子多型の分子遺伝学的研究

地域医療学センター人類遺伝学部門
中山 一大

小胞体は分泌タンパク質・膜タンパク質の修

飾・折り畳みの場であるのみならず、細胞が各種ストレスに曝露された場合に、構造異常タンパク質の蓄積、すなわち小胞体ストレスをセンサーとしてこれを感知する役割を果たすと考えられている。

小胞体ストレスは膵臓β細胞のアポトーシスや、筋肉・肝臓・脂肪細胞などでのインスリン抵抗性の発露などの代謝異常に深く関与していることが知られている。細胞には小胞体ストレスに対する防御機構（小胞体ストレス反応）も備わっており、これに関わる多くの遺伝子座が同定されている。しかしながら、小胞体ストレス反応に関連する遺伝子の多様性と、代謝性疾患の発症との関連性については未知の部分が多い。本研究では、主にアジア人の民族集団を対象に、小胞体ストレス反応に関連する遺伝子の単一塩基多型（SNP）群と各種代謝異常リスクとの関連性を調査した。

モンゴル人集団（2型糖尿病患者281人・健康者666人を含む）と日本人集団（一般集団570人）よりインフォームドコンセントを得て採取したDNA試料に対して、小胞体ストレス反応に関連する15の遺伝子上の40座位以上のSNPについて遺伝子型スクリーニングを行った。遺伝子型の判定にはTaqMan Genotyping Assay SystemおよびABI PRISM 7900HTリアルタイムPCRシステムを用いた。その結果、Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 alpha Kinase 3 (EIF2AK3) 遺伝子のアミノ酸置換を伴うSNPであるCys136Ser, Arg166GlnおよびSer704Alaが、モンゴル人と日本人集団内において強い連鎖不平衡状態にあり、かつ両集団における男性のBody Mass Indexと相関していることが明らかになった。これら3つのSNPの遺伝子型頻度・対立遺伝子頻度を中国漢民族・タイ人・パラオ人・日本人（沖縄県集団）約1200人についても調査したところ、いずれの集団においても高い頻度で存在していることが明らかになった。

EIF2AK3タンパク質は、小胞体内への折り畳み異常タンパク質の蓄積を感知し、翻訳因子であるEIF2Aをリン酸化することによって新規タンパク質の翻訳を抑制し、小胞体ストレスを回避する役割を有する。EIF2AK3は多くの組織

で発現しており、特に膵臓で強く発現し、膵臓の分泌細胞での小胞体ストレスの管理に重要な役割を果たしていると考えられている。EIF2AK3遺伝子の3つのSNPのメジャーハプロタイプであるCys-Gln-AlaハプロタイプとSer-Arg-Serハプロタイプをそれぞれ293細胞内で強制発現させ、小胞体内カルシウムイオンの枯渇剤であるタプシガルギンにて小胞体ストレスを誘導した後、ウェスタン法を用いてEIF2Aをリン酸化する活性を比較した。その結果、ハプロタイプ間でEIF2Aをリン酸化する活性に差異がある可能性が示された。以上の結果より、EIF2AK3の機能的なSNPがアジア人における肥満などのメタボリックパラメーターと深く関与していることが示唆された。

プロヒピチンタンパク質によるミトコンドリアDNAの維持調節機構の解析

生化学講座機能生化学部門 笠嶋 克巳

ミトコンドリアは核とは異なる独自のゲノムDNA（ミトコンドリアDNA, mtDNA）を持つ細胞内小器官であり、呼吸を介して細胞内エネルギーの大部分を合成する。mtDNAは、タンパク質因子と共にDNA-タンパク質複合体（ミトコンドリアヌクレオイド）として存在し、これらタンパク質因子がmtDNAのコピー数の制御や転写、複製などに関わることがわかっている。哺乳動物のミトコンドリアヌクレオイドを構成するタンパク質因子は、酵母ほど明らかにされておらず、その機能や全容は未だに明らかでない。

プロヒピチン（Prohibitin, PHB）は、酵母から哺乳動物に至るまで高度に保存されたミトコンドリアタンパク質であり、酵母においては新規合成タンパク質の安定化を担うシャペロン様機能を持つことが知られている。哺乳動物PHBのミトコンドリア機能に関しては、長らく明らかにされていなかったが、最近の我々の研究により、PHB類似タンパク質であるヒトPHB2が、抗アポトーシスおよびミトコンドリアの形態制御など、多様な機能を果たしてい

ることがわかってきた。一方で近年のヌクレオイド構成因子の網羅的プロテオーム解析から、PHB タンパク質がミトコンドリアヌクレオイドに含まれることがわかってきたが、PHB と mtDNA の維持調節との関連性は明らかにされていない。

したがって本研究では、HeLa 細胞を用いた細胞生物学的手法により、ヒト PHB が mtDNA の維持調節に関わるか否かを検討した。その結果、実際に PHB が mtDNA の構成、およびコピー数制御に関わることを明らかにすることができたので報告する。まず、PHB の発現を RNA 干渉法によりノックダウンした HeLa 細胞のミトコンドリアでは、本来は NP-40 に不溶性である mtDNA が、一部可溶化していることが明らかになった。この結果は、PHB のノックダウンによりミトコンドリアヌクレオイドの構成が大きく変化したことを反映している。また、PHB ノックダウン細胞では、本来はスーパーコイル様構造をとる mtDNA がオープンサークル型構造をとりやすくなるなど、mtDNA のトポロジーが変化していることもわかった。さらに、こうしたミトコンドリアヌクレオイドの構成変化と関連した表現型として、PHB ノックダウン細胞では mtDNA がエチジウムブロマイドのような蛍光色素で染色できないこともわかった。

一方で PHB は、ヌクレオイドの主要構成因子である mitochondrial transcription factor A (TFAM) の安定化を担うことがわかった。TFAM は mtDNA のコピー数制御に関わるタンパク質であり、PHB ノックダウン細胞では、TFAM タンパク質レベルの低下、およびそれと相関した mtDNA コピー数の減少が観察された。したがって PHB は、TFAM の安定性を制御することにより、mtDNA のコピー数を調節していることもわかった。しかしながら、前述した PHB によるヌクレオイドの構成維持に TFAM は無関係であることもわかった。以上の結果から、PHB は TFAM 非依存的にミトコンドリアヌクレオイドの構成維持を行うこと、また TFAM 依存的に mtDNA のコピー数を制御していることが明らかとなった。

核内受容体 PPAR 発現リズムの制御機構の解明および治療効果に及ぼす影響

臨床薬理学部門 牛島健太郎

【背景・目的】生体は遺伝子の転写レベルから個体の行動レベルにまで、約24時間周期の日リズムを形成し、生体リズムは種々の疾患発症に密接に関与すると考えられている。核内受容体である PPARs (α , δ , γ) は、チアゾリジン誘導体やフィブラート系薬物の標的因子であり、その発現に日リズムを示すことが報告されている。そこで本研究では糖尿病モデル動物における PPARs 発現リズムの成因を解明し、さらに PPARs の発現リズムを考慮に入れて PPARs アゴニストを投与することによって、その治療効果が増強するか否かを検討した。

【方法】実験動物は6週齢の糖尿病モデルマウス (KK-Ay) を購入し、明暗周期 (12h:12h) 条件に2週間馴化させた後、実験に使用した。各 PPAR 遺伝子の発現リズムの検討では、2, 8, 14および20HALO (hours after lights on) に肝臓および脂肪組織を採取した。RNA を抽出後 Real-time PCR 方にて各遺伝子発現量を測定した。また、Pioglitazone (PGZ) の効果におよぼす投与時刻の影響を検討するため、PGZ を2または14HALO に14日間連日経口投与した。1晩の絶食後に血糖値を測定し、その後血液および脂肪組織を採取し、血液中のアディポネクチン量および組織中の HB-EGF mRNA 発現量を測定した。【結果・考察】PPAR α , δ , γ の各 mRNA 発現量は KK-Ay マウスの脂肪組織および肝臓において、有意な日内変動を示した。この3つのアイソフォームのうち、PPAR γ に着目し、5'上流域の塩基配列を検索した。その結果、時計遺伝子が結合する E-box (類似配列含む) が複数存在したため、PPAR γ 発現の日内リズムは Clock/Bmal1などの時計遺伝子により制御されている可能性が考えられた。また、PGZ の効果に及ぼす投与時刻の影響については、血糖値の減少は2HALO 投与で14HALO 投与よりも大である傾向が認められた。しかし PGZ によるアディポネクチン濃度の上昇には、投薬時刻の影響は認められなかつ

た。また、悪玉アディポサイトカインのうち、血管新生因子である HB-EGF に着目したところ、脂肪組織における HB-EGF 遺伝子発現は、明記にピークを示す日内変動を示した。また PGZ 2HALO 投与群において HB-EGF 遺伝子発現は有意に減少したが、14HALO 投与群では vehicle 群との間に差は認められなかった。以上より、PGZ の治療効果は、投薬時刻で変化する可能性が考えられた。しかし治療効果が大きくなる投与時刻と、PPAR γ 遺伝子発現が大きくなる時刻が一致していないため、PPAR γ 遺伝子の発現リズムは PGZ の治療効果に影響しない可能性が考えられる。今後、PPAR γ 発現リズムの成因を解明するとともに、PGZ の治療効果が投薬時刻で変化する要因について、検証していく必要がある。

マウス胚性幹細胞における、Wnt 刺激による効率の良い心筋細胞への分化誘導法の開発

内科学講座 循環器内科部門
病院助教 上野 修市

【目的】胚性幹細胞 (Embryonic stem cell: ES 細胞) 由来の心筋細胞は、心不全患者に対する細胞移植療法の有望なソースの一つである。しかし通常に未分化 ES 細胞を分化誘導するだけでは、僅かに数%程度の細胞しか心筋細胞へ分化しない。従って細胞移植療法への臨床応用には、より多くの心筋細胞を得ることが可能な培養方法を開発する必要がある。これまでニワトリやカエルなどの発生の研究において、Wnt/ β -catenin シグナル伝達系が心臓の発生に重要な役割を果たしていることが報告されている。我々はマウス ES 細胞において、Wnt-3a で刺激することにより無刺激に比べ約10倍もの効率で心筋細胞へ分化させる方法を開発した。そこで Wnt-3a 同様に心筋細胞への分化を促進することが報告されている様々な因子 (activin, bone morphogenetic proteins (BMPs)) を併用することにより、さらに効率の良い新たな心筋細胞への分化誘導法を開発することを目指す。

【方法】未分化マウス ES 細胞を leukemia

inhibitory factor を除いた培地で7日間浮遊状態で培養し、胚様体 (Embryoid body: EB) を形成することで心筋細胞への分化誘導を行う。まず我々が開発した Wnt/ β -catenin シグナル伝達系を活性化させる方法で、心筋細胞への分化を促進させる。すなわち100 ng/ml mouse recombinant Wnt-3a (mrWnt-3a) を分化誘導後2日から6日まで加え、Wnt/ β -catenin シグナル伝達系を活性化させ心筋細胞への分化を促進させる。次に、心筋細胞への分化を促進することが報告されている他の因子、activin A, BMP-2, 4を、その濃度および投与のタイミングを変えて追加添加し、分化誘導後9, 11, 14日に総胚様体数あたりの beating している EB の割合 (% beating EBs) を顕微鏡下に計測し、心筋細胞への分化がさらに増加するかを調べた。

【結果】予想に反し human recombinant BMP-2, 4 (hrBMP-2, 4) を10または100 ng/ml の濃度で追加添加しても、mrWnt-3a のみのコントロールに比べ、% beating EBs は変わらず、むしろ hrBMP-2, 4 を分化誘導後2-6日に追加添加した場合には、% beating EBs は有意に低下した。Wnt と BMP-2, 4 の相乗効果は認められなかった。

一方、human recombinant activin A を10または100 ng/ml の濃度で分化誘導後2-6日に追加添加した場合には、% beating EBs は有意に増加し ($79.4 \pm 5.1\%$ vs $63.6 \pm 4.8\%$, $p < 0.01$, $n = 3$, $81.6 \pm 1.5\%$ vs $53.6 \pm 3.1\%$, $p < 0.01$, $n = 3$)、Wnt と activin A の相乗効果を認めた。

【結論】Wnt に加え activin A で同時に刺激することにより、未分化マウス ES 細胞をより効率よく心筋細胞へ分化させることが可能である。

関節リウマチ患者に対する生物学的製剤投与における血中アディポサイトカイン濃度の推移

アレルギー膠原病学

長嶋 孝夫, 大西佐知子, 青木 葉子,
釜田 康行, 木村 洋貴, 上村 健,
岩本 雅弘, 吉尾 卓, 岡崎 仁昭,
簗田 清次

関節リウマチ (RA) の治療の主流は、これまでの NSAID, ステロイド, 抗リウマチ薬による治療から、生物学的製剤 (抗 TNF 製剤) を主体とする治療へと変遷を遂げた。最近、生物学的製剤による治療を受けた RA 患者の心血管イベントが減少し、生命予後が改善してきている、という報告がある。動脈硬化は動脈壁の慢性炎症であり、TNF α がその進展に大きな役割を果たしていると考えられる。そこで、動脈硬化に対し抑制的に働くアディポネクチンに注目し、抗 TNF 製剤を投与された RA 患者の、投与前後における総アディポネクチン、高分子アディポネクチン濃度の変化について検討した。対象は infliximab 投与患者 58 人、etanercept 投与患者 28 人。Infliximab 群では投与前、及び 3 回目 (6 週後) 投与前、etanercept 群では、投与前、投与 2 ヶ月目、最終投与前 (平均 7.2 ヶ月後) の血中濃度を測定した。

結果：抗 TNF 製剤投与前の血中総アディポネクチン濃度は健常人と比較し、有意差を認めなかった。女性は男性よりも総アディポネクチン濃度が高く、ステロイドを投与されている患者では、投与されていない患者と比較して低値であった。Infliximab, etanercept とも、女性 RA 患者のみ、投与後に有意の上昇が認められた。男性も投与後には上昇する傾向はあったが、有意差は認められなかった。高分子アディポネクチンも同様に、女性 RA 患者のみ有意に上昇が認められた。血中総アディポネクチン濃度と BMI, CRP との相関は認められなかった。抗 TNF 製剤は原疾患に対する抗炎症作用のみならず、アディポネクチン上昇を介した抗動脈硬化作用を持ち合わせている可能性が示唆された。

ルシフェラーゼ遺伝子導入トランスジェニックラットを用いた脂肪移植についての研究

形成外科

須永 中, 菅原 康志, 山口亜佐子
分子病態治療研究センター 臓器置換研究部
小林 英司

【目的】脂肪移植は術後の生着率が不安定であ

ることが難点であり、生着率を向上させるために様々な研究が行われてきた。しかし、移植後の脂肪組織を評価する方法としては、摘出標本の重量や体積、組織所見などが用いられることが多く、同一個体内における経時的な変化についての報告はない。我々は、蛍光酵素遺伝子を組み込んだ luciferase transgenic rat (luc-Tg rat) を donor とした脂肪移植を行い、近年幹細胞や腫瘍の研究で広く用いられるようになった in vivo bioluminescence imaging を用いて、移植された脂肪の in vivo tracking を試みた。

【方法】luc-Tg rat の鼠径から採取した free adiposal flap を Lewis rat の鼠径部に微小血管吻合を用いて移植した。(FAF 群: n=5) また、luc-Tg rat の傍精巣上体脂肪から free fat graft を採取して、Lewis rat の背部皮下に移植した。(FFG 群: n=10) 移植後は経時的に D-luciferin を静注し、移植脂肪から発せられる luminescent signal を Xenogen 社の IVIS^(R) にて計測した。

【結果】FAF 群では、flap からの luminescent signal の最大値は観察期間を通じてほぼ一定であった。各観察点における信号の最大値は D-luciferin 静注後 2 - 3 分後に得られた。FFG 群では、graft からの luminescent signal の最大値は、4 日目から 7 日目にかけて急激に増大し、12 日目まで一定に推移した後、12 日目から 17 日目にかけて急激に低下した。その後は 6 週目までほぼプラトーであった。移植後 3 日目までは、D-luciferin 静注後の信号強度の増加はゆるやかであったが、4 日目から 7 日目にかけての間に FAF 群とほぼ同じ増加曲線を描くようになり、その時期に graft への血流が回復したことが示唆された。

【考察】In vivo bioluminescence imaging は生体内の luciferase 発現細胞を非侵襲的かつ経時的に観察・定量できるという点で画期的なツールである。血行再建を伴わない遊離組織移植の場合、移植後の血流が回復していない移植初期では、信号強度が組織量を反映していないという欠点があるものの、長期の生着量評価において非常に有用であると考えられた。

ES 細胞における ERas の新たな作用機構

池田たま子¹, 藤城 修平¹, 後藤 典子²,
田中裕次郎¹, 古川 裕¹, 長谷川 寛¹,
岸 友紀子¹, 増田 茂夫¹, 高橋 和利³,
山中 伸弥³, 花園 豊¹

¹自治医科大学再生医学研究部

²東京大学医科学研究所システム生命医科学技術開発
共同研究ユニット

³京都大学再生医科学研究所

マウスでは、ERas 遺伝子は個体発生や ES 細胞の未分化性維持には関与しないものの、ES 細胞のみに発現し、その増殖能に関係する。一方、ヒトでは、ES 細胞・体細胞いずれにも ERas 遺伝子の発現がみられない。また、マウス ES 細胞は、霊長類 ES 細胞に比べて増殖能が高く、単細胞継代が可能であるが、霊長類 ES 細胞は単細胞継代すると高率にアポトーシスを起こす。このマウスと霊長類の ES 細胞の増殖能やアポトーシスの起こりやすさの違いは、ERas の発現量の違いに規定されるのではないかと考えた。最近、ヒト ES 細胞に ROCK 阻害薬を添加することにより、継代時の細胞死を抑制し、細胞増殖を促進できることが報告された。そこで、我々は、ERas と Rho-ROCK 経路に関係があると考え、研究を行った。

まず、サル ERas 発現を調べたところ、ES 細胞・生体各組織にマウスと比べ、極めて低いレベルの発現が認められた。そこで、サル ES 細胞に ROCK 阻害剤を添加したところ、ヒト同様、細胞死の抑制効果があった。さらに、ERas 欠損マウス ES 細胞 (ERas-null-ESCs) では、細胞増殖能の低下が報告されている。ERas-null-ESCs に、ヒト・サル・マウス ERas-cDNA を導入すると、各種 ERas 全てが細胞膜の裏打ちとして局在し、細胞増殖能の亢進が認められた。従って、ERas 遺伝子は、サル・ヒト・マウスでも細胞増殖能を亢進する働きをもつことがわかった。一方、ERas-null-ESC に ROCK 阻害剤の添加をしたところ、継代時の細胞死抑制効果 (Anoikis) により、細胞増殖能が亢進されることがわかった。次に、ERas の作用点が、Rho-ROCK 経路にあるかどうかを

調べる為に、活性型 RhoA アッセイを行った。ERas を強制発現した HeLa 細胞では、活性型 RhoA の減少し、さらに、ERas 遺伝子を再導入した Ras-null-ESCs 細胞では、活性型 RhoA の増加が認められた。従って、ERas 遺伝子の作用点は、ROCK の上流にある Rho である可能性が示唆された。

以上のことから、ERas と Rho-ROCK 経路は、極めて近接した作用点で、細胞死を抑制し、結果として細胞増殖を亢進させることがわかった。今後、サル・ヒト ES 細胞において、ERas 遺伝子の発現を制御することにより、マウス ES 細胞と同様に扱いやすい細胞が得られる可能性を検討していく予定である。

脊髄神経節における感覚神経細胞の多様化機構の解明

細胞生物研究部 矢嶋 浩

【目的】

脊髄神経節は神経堤細胞由来であり、頭尾軸に沿った繰り返し構造として観察され一見単純である。しかしその中に存在する神経細胞は、担う体性感覚・神経繊維の種類・投射する領域が実に多様であり、唯一つとして同じものが存在するようには見えない。この様な脊髄神経節を司る発生プログラムの解明は、生物学的にも基礎医学的にも非常に意義のあるものであると考えられるが、ほとんど手が着けられていない。そこで、脊髄神経節に異常が認められる *Six1/Six4* 二重欠損マウスを解析することでこの発生プログラムを明らかにすることを目的とした。

【結果】

①祖先型一次知覚神経細胞の出現

ヒトを含めた羊膜類の体幹部で一次知覚を担う神経細胞の細胞体は、神経管の外にある脊髄神経節に納められている。しかし、より原始的な体制とされる無羊膜類の魚類や両生類では、体幹部の一次知覚神経が神経管の中にも存在する。それらの細胞は Rohon-Beard 細胞 (以下 RB 細胞) と呼ばれ、神経堤細胞と同じく、

神経外胚葉と非神経外胚葉の境界が由来であるとされている。さらに原始的な、神経堤細胞を持たない頭索類ナメクジウオの一次知覚神経がRB細胞と同様の形態を持つことから、その出現は神経堤細胞の獲得以前にさかのぼるとされている。一次知覚の起源型と考えられるこのRB細胞は羊膜類には認められないことから、知覚神経の進化・多様化の過程で「失われた発生プログラム」であると考えられてきた。しかしながら驚くべきことに、*Six1/Six4* 二重欠損マウスでは知覚神経様細胞が神経管の中に存在した。その細胞は魚類ゼブラフィッシュ・両生類アフリカツメガエルのRB細胞で発現が認められる *Isl1/2*, *TrkC*, *Tlx3*, *Kvl1.1*などのマーカーを発現していた。さらに、RB細胞の特徴である神経管外への軸索伸長や細胞死による消失も観察されたことから、この細胞がRB細胞に極めて近い存在であることが示唆された。また、アフリカツメガエルRB細胞では *Six1* の発現が認められなかった。これらの結果は、無羊膜類から羊膜類への進化の過程において、RB細胞の発生プログラムは失われてしまったのではなく、*Six* 遺伝子の機能によって「隠されている」可能性を示すものである。

②脊髄神経節を構成する細胞種の異常

発生中の脊髄神経節においては、神経細胞に分化する前駆細胞は *Isl1/2* を発現し、また、グリア細胞に分化する前駆細胞は *Sox10* を発現している。これら2種類の前駆細胞は特徴的な局在をしており、*Sox10* 陽性細胞が *Isl1/2* 陽性細胞を取り囲む様に分布している。しかしこの *Six1/Six4* 二重欠損マウスにおいては、*Isl1/2*, *Sox10* 陽性細胞の局在が変化し、混じり合い背腹軸に沿って分散して分布する傾向にあった。また、野生型には存在しない *Isl1/2*, *Sox10* 両陽性の細胞が認められた。

③脊髄神経節の形態異常

腰部脊髄神経節においては、発生の初期には神経堤細胞の移動経路などに顕著な変化は見られないものの、発生後期では脊髄神経節の癒合が観察された。

④ cre-lox システムを用いた *Six1* 強制発現による表現型の回復

Six 遺伝子は神経堤細胞のみならず間充織や

筋肉にも発現が認められる。観察された表現型の原因が、神経堤細胞そのものに発現している *Six* 遺伝子の欠損によるものなのか否かを明らかにするため、神経堤細胞特異的な発現が報告されている *P0-cre* マウスと *CAG-lox-stop-lox-Six1* 導入マウスを用い、*Six1/Six4* 二重欠損マウスにおいて神経堤細胞特異的に *Six1* を強制発現させた。その結果、前述した多くの表現型が回復したことから、神経堤細胞自身に発現している *Six* 遺伝子が脊髄神経節の発生プログラムにおいて重要な役割を果たしていると考えられた。

【考察】

観察された結果は、脊髄神経節の発生プログラムにおいて、複数の局面で *Six* 遺伝子が重要な役割を担っていることを示唆するものである。特に、RB細胞における *Six* 遺伝子発現の獲得がRB細胞から脊髄神経節へという一次知覚神経進化・多様化の鍵になっている可能性、神経堤細胞分化の機構と節構造の形成や維持の機構が互いに密接に関連しあい不可分である可能性、などは大変興味深いと考える。