

AR 遺伝子に異常を認めない睾丸性女性化症例の陰部皮膚線維芽細胞を培養し、AR、グルココルチコイド受容体のキメラ受容体のトランスフェクションを施行し、リガンド依存性の転写活性化能を検討した。その結果、患者細胞では AR の AF-1 領域に特異的な機能障害が存在すること、さらにこの障害は AF-2 領域に結合する既知の共役因子の強制発現では代償されないことを明らかにした。本症例は共役因子病である可能性が示された。

佐谷（神経皮膚症候群）は、多彩な神経皮膚組織の異常に加え、両側聴神経鞘腫・髄膜腫などの多発性頭蓋内良性腫瘍を伴う常染色体優性優性遺伝疾患である神経線維腫症 2 型 (NF2) について、NF2 遺伝子変異によってもたらされる病態機序を解明することを目的として、その遺伝子産物 (merlin) が関わる細胞内シグナルと腫瘍形成との関連を明らかにする研究を進めてきた。本年度の成果は、merlin に少なくとも 5 種類の細胞内蛋白 (分子量から p70, p85, p125, p145, p165 と呼ぶ) が会合することをすでに見いだした。 p125 はポリ(ADP リボース)ポリメラーゼ (PARP) であることを昨年までの研究で同定している。今回、p125 を同定した時と同様に、大腸菌発現 NF2 蛋白アフィニティークロマトグラフィーを用い、牛脳抽出液より NF2 蛋白に特異的に結合する p85 ならびに p70 を精製しそのペプチド配列を決定したところ、それらは遺伝子修復に関連する分子である Ku85, Ku70 であることが判明した。更に、NF2 患者においてみられる変異型 NF2 蛋白の多くは、PARP, Ku85, Ku70 と結合することが出来ないことが分かった。一方、NF2 患者由来及び散発性の髄膜腫において merlin の発現が低下していることに着目し、その分解機構について解析を行った。merlin の分解を阻害する薬剤をスクリーニングし、特異的に分解を行うプロテアーゼの同定と、腫瘍における活性状態について検討を行ったところ、merlin は細胞内でカルパインによって分解されることを見いだした。更に、NF2 変異のない腫瘍ではカルパインが活性化しており、それによって merlin の過剰分解が生じていることを認めた。

東海林幹夫 (アミロイドーシス) は、1) A β 42 の生成亢進から A β 脳アミロイドーシスにいたる機序を明らかにするために、家族性アルツハイマー病で同定された変異原因遺伝子を発現する細胞系とトランスジェニックマウスを作成し解析した。さらに、2) 臨床的に AD を確実に診断し、開発されつつある治療

法を客観的に評価できる生物学的マーカーとしての脳脊髄液 A β 40/42, tau の臨床的意義 (Ann Neurol 1998) をさらに 2 つの大規模多施設共同研究により明らかにした。

Tg2576 (prion promoter+ β APP695DNL, Hsiao K, Harigaya Y, Younkin S, Nature 1996) マウス脳で典型的老人斑、び慢性老人斑、脳血管アミロイドの沈着がみられ、A β 40 と A β 42 および N 末端が修飾された A β が同定された。dystrophic neurites に β APP, Tau の蓄積がみられた。血漿 A β は A β 40 は 26, A β 42 は 4 pmoles/ml で、脳では A β 40 は 26, A β 42 は 13 pmoles/g で、老人斑の沈着とともに著明な増加を示した。Prion promoter β APP751DNL+I transgenic mice の血漿中では A β 40 は 14, A β 42 は 5 pmoles/ml で、脳では A β 40 は 16, A β 42 は 8 pmols/gbrain で軟膜下と実質内に老人斑様の A β 沈着がみられた。

Presenilin-1 M146L, C410Y transgenic mice の作成に関しては、prion promoterのもとに PS-1 M146L, PS-1 C410Y を発現するマウスを作成した。いずれのマウスの血漿と脳で A β 40 は増加したが、A β 42 に変化はなく、病理学的検索でも現在のところ明らかな変化は認められていない。今後、これらのマウスで再現された A β アミロイドーシスを阻止する治療薬の開発が望まれる。

Gunma-Tottori-Tohoku study in Japan 2 (GTT2) については、本年夏に発表された大規模多施設追跡調査 GTT1 study に新たに 92 の検体を追加して合計 328 例 (116 例の AD, 71 例の正常対照, 48 例の non-Alzheimer type dementia, 93 例の痴呆のない神経疾患) で脳脊髄液 A β 40/42, tau の臨床的意義が再検討された。GTT2 では Cutoff 値、感度・特異性は GTT と同様で、AD index で 78 %, 80 %, follow up で 93 % の感度が得られた。

Gunma-Tottori-Tohoku-Osaka study in Japan (GTTO) については、704 例 (281 例の AD, 107 例の正常対照, 121 例の non-Alzheimer type dementia, 195 例の神経疾患) で CSF tau の有用性を検討した。taupathy における tau の増加はなく、GTT2 の結果は taupathy などの多くの痴呆疾患と AD の鑑別にも有用であった。今後、これらのマーカーが現実の臨床場面で幅広く使用されることが望まれる。

滝山 (運動失調症) は、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションという方法により、DRPLA 剖検症例のホルマリン固定後の精巣、卵巣を用いて、パラ

フィン包埋し、厚さ 10 μ の連続切片を作成し、ついで脱パラフィン処理後 HE 染色を行った切片から直径 30 μ m の大きさで、精子、卵子の形成過程にある細胞群を切り取り、nested PCR により CAG リピートの増幅を行い、これが技術的に可能であることを証明した。最近の研究で、ヒトにおける世代間の CAG リピートの不安定性について、男性と女性でメカニズムが異なることが示唆されており（辻（分子病態研究班・班長）らが作成したトランスジェニックマウスを用いた解析から、オスでは精源細胞が繰り返し分裂する過程で伸長が生じ、メスでは meiotic arrest の期間に縮小が生じることが示唆されている）、このようなヒトの精巣、卵巣の生殖細胞の CAG リピートの解析は、CAG リピートの生殖細胞系列における不安定性機構の解析に重要であると考えられる。

工田（前庭機能異常）は、内耳炎、耳中毒性薬剤の内耳障害の発現に対する NO を中心としたフリーラジカルの相互作用を明らかにし、内耳炎あるいはそれに類似した疾患の内耳障害の発症のメカニズムと NO との関係を解明し、さらに、内耳障害の発症機序の各段階に対する選択的治療法の可能性を検討した。モルモット内耳障害モデルでは内耳への NOS II の発現とニトロチロシン、キサンチンオキシダーゼに対する免疫反応の出現、内耳の形態学的障害、並びにカロリック反応の低下、ABR 閾値の上昇が認められた。これらの内耳障害はステロイド、L-NAME、エブセレン、SOD により軽減された。これらのことより、内耳障害の発症には、NO、活性酸素ならびに両者の反応産物であるパーオキシナイトライトが強く関連していることが明らかとなった。さらにステロイドによる NOS II の mRNA の発現制御、NOS 阻害剤、SOD による NO、活性酸素の消去およびそれに引き続くパーオキシナイトライトの生成阻害、パーオキシナイトライト消去剤によるパーオキシナイトライトそのものの消去が前庭障害に対する有益な治療法となる可能性が示唆され、臨床的にもある程度の効果が認められた。以上、内耳障害の発症には NO を中心としたフリーラジカルが大きな役割をもち、その系を制御することにより内耳障害の予防、治療に応用できる可能性が示唆された。

塚田（原発性免疫不全症候群）は、無ガンマグロブリン症の病態機序についての解析を行った。伴性劣性無ガンマグロブリン血症（XLA）の責任遺伝子である Btk は B 細胞の分化増殖に重要な役割を果たしており、その活性の脱制御は何らかの免疫病の病因とな

り得る事が予想される。一方、チロシンキナーゼに存在する SH3 ドメインは、おそらくはそれに結合する分子によってそのキナーゼの活性を（多くの場合は負に）制御しているであろうということは以前から報告されてきた。以上の考えに基づき、Btk の SH3 ドメインをプローベとして Far-Western 法により新規分子 Sab を同定し、その活性を解析した。Sab 蛋白質の添付によって、Btk による基質のリン酸化および Btk の自己リン酸化が量依存的に抑制されることが示された。また、B 細胞抗原レセプターの刺激後、B 細胞内で Btk 依存的に生じるカルシウムの動員、イノシトルリン酸の生成等が Sab を強制発現させることにより抑制されることが示された。また B 細胞抗原レセプターの刺激後に生じる B 細胞のアポトーシスも Sab の強制発現により抑制された。これらの結果より Sab は Btk の活性抑制因子であると考えられた。Btk の失活は XLA のような免疫不全症の要因となるが、一方、Btk の抑制因子の変異は Btk の overactivation をひきおこし、自己免疫疾患等の病因になることも考えられ、現在この可能性について検討中である。

辻（肇）（血液凝固異常症）は、tissue plasminogen activator の阻害因子であり線溶系の制御に重要な役割を果たしている Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) の血中レベルの上昇は、心筋梗塞や狭心症などの血栓性心疾患のリスクファクターとなり得ると考えられ注目されていることから、PAI-1 遺伝子の多型性が心筋梗塞発症のリスクファクターとして作用する可能性について検討した。すなわち、PAI-1 遺伝子の転写調節領域に連続して存在するグアノシン数の相違によって、4 個連続する遺伝子型（4 G）は 5 個存在する遺伝子型（5 G）について、本多型の遺伝子頻度、心筋梗塞発症との関連を明らかにすることを目的として検討を行った。すなわち、CAG にて冠動脈に狭窄の認められた心筋梗塞症例 66 例と健常者 62 例を対象とした。健常者群における各 genotype の PAI-1 活性は、5 G ホモ 26.3*2.6IU/ml に比較して 4 G ホモ 29.5*3.4IU/ml で有意な上昇を認めた。健常者 62 例で、それぞれの遺伝子頻度は 4 G : 5 G = 0.3 : 0.7 であった。一方、心筋梗塞群 66 例では 4 G : 5 G = 0.29 : 0.71 であり健常者とほぼ同様であり、心筋梗塞発症の遺伝的素因として PAI-1 の遺伝子多型が独立因子として強く関与していることを示唆する所見は得られなかったものに、血漿中の PAI-1 活性は心筋梗塞発症の危険因子とみなされる喫煙、肥満、高脂血症等におい

て上昇することが報告されることより、心筋梗塞発症と PAI-1 遺伝子多型の関連をこれらの危険因子を考慮してさらに検討する必要があると考えられた。

長谷川一子（神経変性疾患）は、神奈川県相模原市大沼地区に居住する常染色体優性遺伝様式をとる家族性パーキンソニズムについての臨床遺伝学的解析を行った。その臨床像は通常の孤発性パーキンソン病と差異を認めないが、神経病理学的には Lewy 小体陰性で、有意な神経原繊維変性も認めない。家族性パーキンソニズムの原因遺伝子として最近、 α -Synuclein, Parkin, Tau および UCH-L1 の各遺伝子が同定されている。今年度、相模原地区の家族性パーキンソニズムが、これら 4 種の既知遺伝子のいずれかの変異に起因する可能性を検証し、 α -Synuclein 遺伝子, Parkin 遺伝子, Tau 遺伝子, UCH-L1 遺伝子、のいずれにも変異を見いだせず、この家族性パーキンソニズム家系の原因遺伝子は、 α -Synuclein, Parkin, Tau, UCH-L1 いずれとも異なる新たな疾患であると想定される。今後、ポジショナルクローニングのアプローチによりこの家系における原因遺伝子が同定できれば、パーキンソニズム発症の解明につながる新たな知見となるものと考えられる。

藤原（強皮症）は、いくつかのサイトカインが細胞外マトリックス (ECM) 分子により異常に制御されることにより強皮症の病態が形成されるのではないかと考え、数種の ECM 成分と線維化関連サイトカインとの相互作用を固相法にて検討した。その結果、強皮症において量的に変動することが知られているコラーゲン、デコリン、デルマトポンチンが TGF- β 1, PDGF-BB, bFGF, IL-4 と結合し、さらに 2 種類の ECM 成分の複合体形成後はこれらのサイトカイン結合能が大幅に増加することが明らかとなった。またプラスミノーゲンアクチベーターインヒビターのプロモーター活性を指標とした TGF- β 1 の作用はデルマトポンチン存在下で増強され、コラーゲン共存下で抑制された。これらの知見は ECM がサイトカインの機能を多元的に制御することを示唆するものであり、ECM 成分の絶対的あるいは相対的な量的変化によりサイトカインの活性化が生じ、組織が線維化に向かう契機になると考えられる。本研究の特筆すべき点として、共存する細胞外マトリックス分子の相違により、TGF- β 1 の作用が異なったという点で、これにより細胞外マトリックス自身が細胞外でサイトカインの作用を調節していることが明らかになった。

細田（中枢性摂食異常症）は、中枢性摂食異常症に

おけるエネルギー代謝調節系を解析することにより、中枢性摂食異常症の病因と病態生理を解明することを目的として解析を行った。エネルギー代謝調節系は摂食調節系とエネルギー消費調節系より成る。摂食調節系で重要な分子として脂肪組織由来ホルモンのレプチンがあり、レプチンは脂肪組織の情報を視床下部に伝達し、摂食抑制作用を示す。遺伝性肥満動物や他の国での稀なヒト症例の報告によると、レプチン系の異常は高度肥満を引き起こす。本研究では、レプチン系の分子機構の解明、また中枢性摂食異常症におけるレプチンの病態生理的意義の検討を行った。エネルギー代謝調節系の、もう一つの系のエネルギー消費調節系の研究は遅れているが、本研究では我々が新たに同定したエネルギー消費調節の蛋白の脱共役蛋白質 3 (UCP3) の遺伝子発現調節を検討した。本研究において確立した radioimmunoassay (RIA) の血中レプチン濃度測定系で中枢性摂食異常症の代表的疾患の神経性食欲不振症 (AN) を検討し、AN 低体重群 (標準体重の 85%以下) の血漿レプチン濃度は、非肥満非やせの健常者より著明に低く、大半の症例で RIA 系の感度以下であった。 AN 回復体重群 (標準体重の 85%以上) の血漿レプチン濃度は低体重群より明らかに高値であった。AN で無月経などの性腺系異常が認められ、またレプチンによる視床下部一下垂体-性腺系の調節が示唆されているが、AN の性腺系異常における血中レプチン濃度低値の意義が注目される。我々は自身の RIA 系など従来の測定系に比較して、はるかに高感度の ELISA の血中濃度測定系の開発に成功し、AN 低体重群群で従来の測定系で感度以下であったレプチンの動きを検討することが可能になり、AN の病態の診断における血中レプチン濃度の意義が注目される。現在、我々は肝臓でレプチンを過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、対照マウスに比べて約 75-80%の体重の痩せマウスであることが明らかにしており、今後レプチン研究のモデル動物として期待される。

UCP3 は、我々などにより同定されたエネルギー消費調節の分子である。エネルギー代謝状態を情報伝達する核内転写因子の Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) が注目されているが、今回 PPAR の subtype の一つの PPAR γ のアゴニストの Thiazolidine (TDZ) による UCP3 遺伝子発現調節を検討した。TDZ の Wistar fatty rat へ投与の白色脂肪、及び白色脂肪初代培養系で UCP3 の発現増加を観察し、PPAR による

Ⅲ. 分担研究報告

細胞外マトリックス構成成分のサイトカインの生物活性に及ぼす影響

藤原作平
大分医科大学皮膚科

いくつかのサイトカインが細胞外マトリックス (ECM) 分子により異常に制御されることにより強皮症の病態が形成されるのではないかと我々は考え、数種の ECM 成分と線維化関連サイトカインとの相互作用を固相法で検討した。強皮症において量的に変動することが知られているコラーゲン、デコリン、デルマトポンチンが TGF- β 1、PDGF-BB と結合し、さらに 2 種類の ECM 成分の複合体形成後は両サイトカイン結合能が 2 ないし 6 倍に増加した。またプラスミノーゲンアクチベーターインヒビターのプロモーター活性を指標とした TGF- β 1 の作用と 3H-チミジンの取り込みを指標とした PDGF-BB の作用は共にデルマトポンチン存在下で増強され、コラーゲン共存下で抑制された。この結果デルマトポンチン-TGF- β 1、PDGF-BB 系によるサイトカインの作用増強が線維化の病態形成に関与している可能性が示された。

内耳障害と一酸化窒素

工田 昌也
広島大学医学部,耳鼻咽喉科

内耳障害と NO との関連を明らかにするため、モルモット内耳障害モデルを使用し、ABR、カロリック反応、内耳の形態学的変化、並びに NO 合成酵素(NOS)II、キサンチンオキシダーゼ(XO)、ニトロチロシンに対する免疫組織学的検討およびステロイド、NOS 阻害剤 (L-NAME)、SOD、パーオキシナイトライト消去剤 (エブセレン) による内耳障害予防効果の検討を行った。モルモット鼓室内への LPS、GM 投与により前庭器への NOS II、ニトロチロシン、XO に対する免疫反応の出現、ABR 閾値の上昇、並びにカロリック反応の低下が認められた。これらの内耳障害はステロイド、L-NAME、SOD、エブセレンにより軽減された。内耳炎、GM による内耳障害の発症には、NO、活性酸素、パーオキシナイトライトが強く関連しており、フリーラジカルの制御が内耳障害に対する有益な治療法となる可能性が示唆された。

HLA に関連したびまん性汎細気管支炎感受性遺伝子の探索

慶長直人
東京大学医学部呼吸器内科

びまん性汎細気管支炎の東アジア集積性から疾患感受性遺伝子の探索を進めてきたが、日本では HLA-B54 が、韓国では HLA-A11 が疾患と強い関連性を有することから、HLA-A、B 遺伝子座の間に候補遺伝子が存在する可能性がある。今回、まず HLA-A、B 座のほぼ中間に位置する HLA-E 遺伝子の多型性を検討したが、疾患とは有意な関連を示さなかった。そこで候補遺伝子の存在する範囲をより明確にする目的で、HLA-A、B 座間の 6 種のマイクロサテライトマーカーを用いたハプロタイプ解析と関連性の検討を試みた。その結果、患者に多く見られるハプロタイプはいずれも特定のマーカーの対立遺伝子を共有していた。またそのマーカーは疾患と関連性が強く、疾患感受性遺伝子座と近い位置にあると推定された。今後この周辺の 400 kb を詳細に検討し、疾患感受性遺伝子を明確にする必要がある。

ウイルス性肺炎モデルにおけるパーオキシナイトライトによる急性肺傷害と遺伝子損傷メカニズム

赤池孝章
熊本大学医学部微生物学教室

ウイルス性肺炎モデルを用いて、パーオキシナイトライトによる蛋白 (チロシン) のニトロ化反応を介した組織損傷機構と遺伝子変異促進作用について解析した。その結果、マウスインフルエンザウイルス肺炎モデルの肺組織中に、ニトロチロシンが検出され、そのレベルは NO 合成酵素 (NOS) 阻害剤やパーオキシナイトライト消去剤の投与により有意に抑制された。また、NOS 阻害剤、パーオキシナイトライト消去剤により肺の病理組織学的変化が軽減し、マウスの生存率も改善していた。さらに、誘導型 NOS 遺伝子欠損マウスのウイルス肺炎モデルにおいては、ウイルスの遺伝子変異率が有意に低いことがわかった。このことは、パーオキシナイトライトが、ニトロ化反応を介して、細胞・組織障害作用を発揮するだけでなく、内因性変異原性物質として作用することを示唆している。今後、パーオキシナイトライトを標的とした各種難治性疾患の治療法の開発が期待される。

一酸化炭素を介した臓器機能制御機構：ヘムオキシゲナーゼの臓器内分布と門脈血行異常症

末松 誠
慶應義塾大学医学部医化学

肝および脾は体内で最も大きなヘム鉄の分解系であり、ヘムを分解して胆汁色素（ビリベルジン、ビリルビン）と一酸化炭素を生成するヘムオキシゲナーゼ (HO)の生理的意義が注目される。しかしながら本酵素の2つのアイソザイムの臓器内分布が不明であり、ヒトにおける病態生理学的意義は十分に解明されていない。平成9年度に作成したラット酵素の単クローン抗体の中からヒトに交叉反応を示すものを検索し、門脈血行異常症における発現異常を検討した。ラット肝細胞から RT-PCR 法により HO-1, HO-2 の cDNA を作成し、plasmid vector pEFneo にこれを導入しマウス由来 T 細胞株 WR19L を用いた stable transformant を樹立した。このミクロソーム分画をマウスに免疫、ラット HO-1 に対する抗体 GTS-1, HO-2 に対する抗体、GTS-2 を精製した。GTS-1 抗体はヒト HO-1 に特異的に結合し HO-2 とは交叉反応を示さなかった。大腸癌肝転移症例の健常部 wedge biopsy をコントロールとして、idiopathic portal hypertension (IPH) と診断され pancytopenia のために手術適応となった症例、および肝硬変症例の wedge biopsy から得られた肝組織の HO-1 発現を解析した。IPH 症例では Kupffer cell の密度には変化がないにもかかわらず HO-1 の発現が著明に低下していた。また同一症例の spleen では red pulp の拡大と HO-1 発現の上昇が認められた。一方肝硬変症例では HO-1 発現は Kupffer cell では保たれており、肝実質細胞での発現も認められた。以上の結果は類洞前性門脈圧上昇を機序とする IPH での HO-1 発現の低下は Kupffer cell がなんらかの機序で肝類洞血流のセンシングをしていることを示唆する所見と考えられる。

細胞内超微活性酸素代謝特性と FALS 病態の解析

井上 正康
大阪市立大学医学部第1生化学

<抄録=>各種疾患に短寿命の NO や活性酸素種の関与が示唆されているが、その実態は不明である。酸素消費量の多い脳は、数秒間の血流停止でも ATP レベルが激減して傷害される。不安定な短寿命の活性酸素を有効に代謝制御するには、これらの活性酸素の発生部位に消去酵素や抗酸化分子群が局在化していることが不可欠と考えられるが、それに関する情報は少ない。本研究により、低酸素局所では NO の寿命が著しく延長し、その作用が著しく増強することが判明した。また、分子状酸素、NO およびスーパーオキシド間のクロストークが血液循環動態やミトコンドリアのエネルギー代謝動態を制御していることが判明した。さらに、虚血病態では病巣指向性 SOD が NO 機能を増強して脳組織を友好に保護することも判明した。細胞質局在性と考えられてきた Cu/Zn-SOD がパーオキシゾームを主体とするオルガネラ膜にも結合するが、変異 SOD では結合性が著明に低下していることが判明した。

生体組織への遺伝子導入効率の増強と長期遺伝子発現ベクターの開発

金田 安史
大阪大大学院医研遺伝子治療学

難病の遺伝子治療のための遺伝子導入ベクターとして開発してきた HVJ-liposome の改良を行った。まず遺伝子導入効率の増強のために、ルシフェラーゼ遺伝子発現をもとに至適リポソームの脂質構成成分を検討し、HIV の脂質組成に酷似した AVE(Artificial Viral Envelope)-リポソームを開発し、これによる肝臓、骨格筋での遺伝子発現は従来型の HVJ-リポソームによる遺伝子発現の約 10 倍であった。次に導入遺伝子の発現の維持のための研究を行い、Epstein-Barr(EB)ウイルスの潜伏感染装置を用いた EB replicon vector を構築し、これを改良型 HVJ-liposome によりあらゆる組織細胞に導入することを試みた。この方法でマウス肝臓、骨格筋にルシフェラーゼ遺伝子を導入すると各々 35 日、96 日まで認められた。潜伏感染装置を持たないと各々 1、4 週間で発現がなくなった。

今井 圓裕

大阪大学医学部病態情報内科学

【目的】腎間質線維化モデルである一側尿管結紮モデルを用いて、TGF- β アンチセンスオリゴ (AS-ODN) の有効性について検討した。【方法・結果】はじめに、改良型 HVJ-liposome 法により FITC ラベルした ODN をラット尿管より逆行性に導入したところ、FITC-ODN は、腎間質細胞の核に集積していた。次に一側尿管結紮モデルに TGF- β に対する AS-ODN あるいはスクランブルオリゴ(Sc-ODN)を尿管より逆行性に腎臓へ導入し、TGF- β 、Type I Collagen mRNA の発現を検討するとともに、TGF- β AS-ODN が腎間質線維化を抑制しうるか検討したところ、AS-ODN 導入群では TGF- β 、Type I Collagen mRNA の発現が抑制されるとともに、Sc-ODN を導入した群に比し、腎間質の線維化が抑制された。【結論】改良型 HVJ-liposome 法を用いた腎間質細胞への TGF- β AS-ODN 導入は、間質線維化に対する遺伝子治療法として有効な方法となりうることを示唆された。

E-セレクトイン遺伝子導入によるラット大動脈への白血球接着の誘導

安河内 幸雄

東京医歯大難治研遺伝疾患

【目的】動脈硬化症や急性炎症などの炎症反応に深く関与している E-セレクトインを介する白血球接着機構を解明するため、E-セレクトイン遺伝子をラット大動脈へ導入し、E-セレクトインの過剰発現系を確立し、流速存在下での白血球接着現象を観察した。【方法】E-セレクトインアデノウイルスベクターを摘出ラット大動脈に導入し、その発現を免疫組織染色法およびウエスタンブロット法で確認した。さらに、白血球の接着機能を組み換えウイルスベクター導入大動脈片を還流装置に装着し走査型電子顕微鏡および蛍光ラベル白血球をもちい検討した。【結果】E-セレクトイン遺伝子導入大動脈において E-セレクトイン分子の発現を認め、また白血球の接着の誘導が確認された。【結論】アデノウイルスベクターを利用して E-セレクトインの過剰発現をラット大動脈に作成した。これらの導入 E-セレクトインは白血球の接着を誘導し、E-セレクトインを介する白血球接着機構に有用なシステムであることが示唆された。

佐谷秀行

熊本大学医学部腫瘍医学

神経線維腫症 2 型 (NF2) の責任遺伝子にコードされる蛋白が関わる細胞内シグナルを明らかにし、病態との関連について解析を行った。我々は昨年までの研究で、少なくとも 5 種類の細胞内蛋白が NF2 蛋白と会合することをすでに見だし、その一つはポリ(ADP リボース)ポリメラーゼ (PARP) であることを同定していたが、今回 NF2 蛋白はその N 端で DNA 修復にかかわる蛋白である Ku85、Ku70 と結合することを見いだした。NF2 患者における変異型 NF2 蛋白の多くは、PARP、Ku85、Ku70 と結合することが出来ないことが明かとなり、この複合体の形成が NF2 の機能にとって重要であることが示唆された。また、NF2 蛋白は細胞内でカルパインによって分解されることを見だし、NF2 変異のない腫瘍ではカルパインの活性化による NF2 蛋白の過剰分解が生じ、NF2 蛋白の不活性化がその腫瘍化の原因となっていることが示唆された。

ステロール反応性転写因子 (SREBP) の小胞体ループ切断プロテアーゼの精製

児玉 龍彦

東京大先端研分子生物学

SREBP は LDL 受容体などの転写調節を担っている細胞内コレステロール調節の中心となる転写因子である。SREBP は前駆体蛋白質として ER 膜や核膜に存在し、ステロール欠乏刺激により ER 腔内の部位で切断される。本研究では、この ER ループ切断部位を含むペプチド性基質を用いたアッセイ系を構築し、肝ミクロソーム画分に 0.5% MEGA 9 で可溶化される 3 種 (分子量 40 万, 6 万, 3 万) の活性を認めた。分子量 3 万の活性は配列特異的阻害剤で阻害され、カラムクロマトグラフィーにより SDS 電気泳動上 1 バンド (32 kD) に精製した。アミノ酸配列決定により、この活性は一本鎖カテプシン B であることがわかった。ヒトカテプシン B を細胞に遺伝子導入すると、細胞内の SREBP の活性はむしろ抑制されることから、分解を促進している可能性が考えられた。

原発性低脂血症の病因に関する研究

石橋 俊

東京大医学部糖尿病・代謝内科

原発性低脂血症には無ベータリポタンパク血症 (ABLP) と低ベータリポタンパク血症 (HBLP) の 2 種類ある。我々は、原発性低脂血症 3 例について遺伝子異常を検索した。[方法] 32 歳女 (症例 1)、27 歳男 (症例 2)、57 歳女 (症例 3)。血清脂質とアポ B のタンパクレベルの解析を行った。末梢血からゲノム DNA を抽出し、MTP とアポ B についてハプロタイプ解析を行った。MTP とアポ B について PCR 産物の塩基配列を決定した。MTP のミスセンス変異については、COS1 細胞に発現し、MTP 活性を測定した。[結果] 症例 1 はエクソン 11 の cDNA1385-1389 の 5 連続のアデニンのひとつが欠損し、フレームシフトを生じた。症例 2 はエクソン 16 内の cDNA2338 番目の A が T に置換する結果、780 番目の Asn が Tyr に変わるミスセンス変異だった。Asn780Tyr 変異の発現実験を行い、MTP 活性の欠損を証明した。症例 3 は、アポ BcDNA5472 の C が T に置換し、1755 番目の Gln がストップに変わるナンセンス変異であった。[結論] ABLP と HBLP の新たな遺伝子変異を同定した。

中枢性摂食異常症におけるエネルギー代謝調節の分子機構

細田公則

京都大大学院人間環境学研究所

エネルギー代謝調節は摂食調節とエネルギー消費調節より成り、中枢性摂食異常症で重要である。摂食調節系のレプチン、エネルギー消費調節系の脱共役蛋白質 3 (UCP3) を検討した。神経性食欲不振症の低体重群 (標準体重 85%以下) の血中レプチン濃度は非肥満非やせ健常者より著明に低値で、回復体重群 (標準体重の 85%以上) は低体重群より明らかに高値であった。肝臓特異的レプチン過剰発現トランスジェニックマウスで、生理的意義を検討している。UCP3 は、我々が同定したエネルギー消費調節の分子である。エネルギー代謝状態の情報伝達に関する核内転写因子の PPAR のアゴニストのチアゾリジンによる白色脂肪の UCP3 の発現増加を *in vivo* と *in vitro* で明らかにした。現在 UCP3 の転写調節を検討している。

副腎・性腺の発生・分化に関する核内受容体、およびその共役因子に関する検討: Ad4BP とアンドロゲン受容体共役因子

後藤公宣

九州大医学部附属病院総合診療部

ヒト Ad4BP 遺伝子異常症の解析を試みた。まず、ヒト Ad4BP 遺伝子を単離し、その構造を決定、プロモーター領域を解析した。続いて国内外の女性 3 例、および男性 1 例を解析した。男性例は死産症例で、Ad4BP ノックアウトマウスの表現形質と酷似した。患児脾臓は抗 Ad4BP 抗体で染色されず、かつエクソン 2、3、4 を含む領域は PCR で増幅されないなど、同領域の欠失による異常症であることが強く疑われたが、確証は得られなかった。

正常アンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子を有する睾丸性女性化症例の皮膚線維芽細胞を培養し、AR、グルココルチコイド受容体のキメラ受容体のトランスフェクションを施行し、リガンド依存性転写活性化能を検討した。患者細胞では AR の AF-1 領域に特異的な機能障害が存在し、共役因子病である可能性が示された。性分化異常症を検討するには、共役因子をも視点に入れる必要があると思われる。

LH 受容体異常による男性思春期早発症-male-limited precocious puberty (testotoxicosis)-の全国調査

矢野公一

旭川医大小児科

[目的] male-limited precocious puberty (MPP) は男児に発症するゴナドトロピン非依存性思春期早発症であり、LH 受容体遺伝子変異が病因であることが近年明らかとなった。日本での患者数を明らかにすることを目的に全国調査を行った。[方法] 全国の大学病院小児科、小児病院内分泌科等に MPP あるいは原因不明のゴナドトロピン非依存性思春期早発症男児に関する調査票を送った。[結果および考察] 全国 123 施設のうち 87 施設から回答を得た。7 施設から、LH 受容体遺伝子変異の確認例が 6 例、未確認例が 3 例報告された。日本での MPP 患者数は遺伝子変異未確認例を含めて 9 例と稀であった。遺伝子変異が確認された 6 例は、D578G 変異 1 例、A572V 変異 2 例、M398T 変異 3 例であった。このうち、家族性が 3 家系確認された。また、6 例中 5 例の最終あるいは現在の身長は 158 cm から 161 cm であり、日本人 MPP 患者の最終身長は極端な低身長ではないことが明らかとなった。

家族性 QT 延長症候群の遺伝子解析と血管病態形成における老化抑制遺伝子 *klotho* の果たす役割の解明

永井良三
群馬大学医学部第二内科

家族性 QT 延長症候群の原因遺伝子として *KVLQT1*, *HERG*, *SCN5A* が知られている。本研究では, *KVLQT1* および *HERG* の遺伝子構造を明らかにした。さらに, *KVLQT1* 遺伝子の 3 種類の新たな変異および *HERG* 遺伝子の 5 種類の新たな変異を同定した。また, 我々は, 最近, 動脈硬化などのヒトの老化によく似た表現型を示す新しい老化モデルマウスを開発し, その原因遺伝子 *klotho* を同定した。本研究により, 高血圧などの慢性疾患による持続的な腎臓へのストレスが *klotho* mRNA の発現を低下させることが明らかとなった。また, *klotho* 遺伝子欠損マウス (ヘテロ接合体) は食塩負荷により血圧が上昇することから, 今後, ヒトの食塩感受性高血圧と *klotho* 遺伝子の関係について検討する必要がある。

日本人における PAI-1 遺伝子多型と血栓性疾患

辻 肇
京都府立医科大附属病院輸血部

線溶系阻害因子 plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)の上昇は心筋梗塞の危険因子となり得ると考えられる。その発現は, 転写調節領域の連続するグアノシン数の相違により異なり, 4 個連続する遺伝子型 4 G は 5 個存在する 5 G よりも PAI-1 活性が高値とされる。本邦における本遺伝子頻度, 心筋梗塞発症との関連を検討した。心筋梗塞患者, 健常者を対象とし, 多型部分を PCR 法にて増幅, 塩基配列を確認後, SSCP 法にて 4 G ホモ, 4 G/5 G ヘテロ, 5 G ホモに分類した。健常者群で PAI-1 活性は, 5 G ホモに比較して 4 G ホモで有意な上昇を認めた。遺伝子頻度は, 健常者群で 4 G : 5 G = 0.3 : 0.7 であり, 本邦において 4 G 遺伝子頻度は低いと考えられた。一方, 心筋梗塞群では 4 G : 5 G = 0.29 : 0.71 と健常者とほぼ同様であり, 心筋梗塞発症の遺伝的素因として PAI-1 遺伝子多型が強く関与している所見は得られなかった。

血栓性素因プロテイン S 欠乏症の分子病態解析

小嶋哲人
名古屋大学医学部第一内科

特発性血栓症の基礎疾患の一つである先天性プロテイン S (PS) 欠乏症患者において PCR を用いて PS 遺伝子を解析した結果, Ser62 (TCA) → Stop (TGA) の遺伝子異常を同定した。患者血小板中の PS mRNA を用いてこの変異を解析したところ, 変異 mRNA では exon 4 の skipping が生じ, かつその発現量は正常 mRNA に比べて激減していた。DNA レベルの解析からはこの nonsense mutation により短い異常 PS が作られることが本 PS 欠乏症の発症病態と推察されたが, mRNA 解析の結果からこの変異は alternative splicing による exon skipping を誘導しその mRNA の発現量を低下させることが本患者におけ Type I PS 欠乏症の発症病態であると考えられた。本例は遺伝性疾患の分子病態解析において DNA だけでなく mRNA レベルの解析の重要性を示唆する症例と思われる。

不応性貧血進展に関与する転写伸長因子 MEN の造腫瘍活性

三谷 絹子
東京大学医学部血液腫瘍内科

不応性貧血の進展の際に染色体転座により転写制御因子 MLL とキメラを形成する転写伸長因子 MEN の造腫瘍活性を検討した。Rat1 細胞に MEN を遺伝子導入し MEN 発現細胞を用いて soft agar assay を行った所, MEN 発現細胞では mock 細胞に比してコロニー形成能の増強が観察された。また, MEN 発現細胞では血清要求性も低下していた。これらの効果はすべて lysine-rich domain 依存性であった。さらに, その分子生物学的基盤を検討した結果, MEN 発現細胞では Fos 蛋白質の発現及び AP-1 活性が lysine-rich domain 依存性に亢進していることが明らかになった。Fos の発現亢進は MEN の転写伸長活性によることが run-on assay により証明された。以上より, MEN の異常発現は AP-1 活性の刺激効果により造腫瘍活性に繋がり, 不応性貧血を進展させる可能性が示唆された。

ブルトン型 チロシンキナーゼ (Btk) の SH3 ドメイン結合蛋白質 Sab による Btk 活性の制御

塚田 聡

大阪大医学部分子病態内科学

ブルトン型チロシンキナーゼ (Btk) は、ヒト伴性劣勢無ガンマグロブリン血症 (XLA) およびマウス X 染色体連鎖免疫不全症における欠損遺伝子である。XLA 患者では B 細胞の成熟障害が観察され、このような病態は Btk が B 細胞の成熟に不可欠であることを示唆している。我々は Btk の SH3 ドメインに結合する新規の分子 Sab を報告したが、本研究では Sab が Btk 活性の抑制因子であるという結果を得たので報告する。Sab は B 細胞レセプター (BCR) 刺激に続くカルシウムの動員とイノシト³リン酸の生成をも抑制し、Btk のトランスインヒビターとして BCR 経路の細胞内シグナル伝達に抑制的な機能を果たしていると考えられる。

再生不良性貧血 —発作性夜間血色素尿症症候群のモデルマウス作製

木下 タロウ

大阪大微生物病研免疫不全

再生不良性貧血に高率に合併する発作性夜間血色素尿症では、PIG-A 遺伝子が変異した異常造血幹細胞が拡大する。このメカニズムを明らかにするため発作性夜間血色素尿症の発症に関わる 2 つの要因の第 1 を持ったモデルマウスを作製した。コンディショナル遺伝子ターゲティングにより、片方の X 染色体上の Pig-a 遺伝子が破壊されたヘテロの遺伝子が破壊されたヘテロの雌胎児を作った。この胎児の発生 14 日目の肝細胞を致死量照射したマウスに移植した。移植 6 週間後から 42 週にわたってすべての血液細胞の系統に多数の GPI アンカー型タンパク質欠損細胞が存在し、Pig-a 欠損造血幹細胞と正常細胞がキメラに E と正常細胞がキメラにベ胞がキメラになった目的のモデルマウスが得られたことがわかった。このマウスは、再生不良性貧血で想定されている自己免疫反応を起こしたとき、Pig-a 欠損細胞が拡大するか解析できるなど、再生不良性貧血—発作性夜間血色素尿症症候群の発症機構解明に役立つと考えられる。

分子インデックス法による神経変性疾患病態関連分子の探索

道勇 学

名古屋大医学部神経内科

アルツハイマー病 (AD) 大脳皮質および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 脊髄前角の神経細胞変性死に関わる遺伝子の探索を目的に、分子インデックス法を用いて前年度までに選択した cDNA について、AD では 94 個中 40 個、ALS では 84 個中 13 個の多数例での定量スクリーニングを終了した。各 cDNA の正常対照に対する各疾患の発現比は 0.1-14 であり、これらの発現変化が神経変性の分子病態を反映している可能性が示唆された。また未知遺伝子については完全長 cDNA の取得を試みた。その結果、AD では全長が約 1.5kb、765bp (推定 255 アミノ酸残基、分子量約 26kD) の ORF 中にロイシンジッパー構造と SH3 の結合部位のモチーフをもったプロリンが豊富な配列のある新規遺伝子を同定した。ALS については、神経細胞特異的で前角運動ニューロンでの発現が確認され、かつ ALS 脊髄前角で発現が 1/10 に著しく低下している約 4kb の cDNA を含め現在 5 個の未知遺伝子の同定を進めている。

鉄代謝のマスター蛋白、IRP2 の神経変性疾患への関与:

岩井 一宏

京大医学研究科免疫細胞生物

神経変性疾患では病巣部での鉄等の金属、蛋白の酸化的变化が認められ、組織障害への関与が注目されている。鉄代謝のマスター制御因子である RNA 結合蛋白、IRP2 は I 脳で発現が高く、アルツハイマー病巣に蓄積していることが報告されている。IRP2 の RNA 結合活性がアルミニウムの存在により鉄非依存的に増強される事よりのトランスフェリン受容体の産生増強、フェリチンの産生低下を生じ、ラジカル産生を高める可能性を示唆した。アルツハイマー病とアルミニウムの関連については、現在は否定的であると考えられていることから、我々はアルミニウムにはとらわれず、IRP2 の安定化を来す因子の更なる探索を進め、神経変性疾患における鉄代謝異常への IRP2 の関与の解析を進めていく予定である。また、鉄蓄積の認められる患者組織における IRP2 量を検索し、IRP2 の他の神経変性疾患の病態形成への関与を検索したいと考えている。

長谷川一子

北里大学東病院神経内科

相模原地区の常染色体優性遺伝様式をとる家族性パーキンソニズム, 臨床的には孤発性パーキンソン病と差異を認めないが, 病理学的には Lewy 小体陰性で, 明らかな神経原線維変性も認めない. 今回はこの家系の原因遺伝子の検索の一環として既報告遺伝子である α -Synuclein, Parkin, Tau および UCH-L1 の各遺伝子について検討した. α -Synuclein, Parkin 遺伝子には報告されているような点変異や欠失はなかった. Tau 遺伝子についてもエクソン 12 での点変異, イントロン 10 での複数の塩基変異はなかった. UCH-L1 遺伝子ではエクソン 4 での変異はなかったが, 検討した 9 例でイントロン 4 内に, C362 \rightarrow G の塩基置換を認めた. この塩基置換は健常者および家系内健常者でも認められ, 疾患とは無関係な遺伝子多型のひとつと考えた. よって, 自験家系の原因遺伝子は, これらの既報告遺伝子とは異なる可能性が高く, 今後の検討が必要である.

沖縄地方に多発する感覚障害を伴う家族性神経原性筋萎縮症 (Hereditary Motor and Sensory Neuropathy with Proximal dominant involvement: HMSN-P) の臨床・病理学的検討とその遺伝子連鎖解析

中川 正法

鹿児島大学医学部第 3 内科

目的: HMSN-P の臨床的, 病理学的, 遺伝学的検討を行う.

方法: 臨床症状, 電気生理所見, 神経病理所見の検討. HMSN-P 17 家系 59 名 (患者 42 名) の遺伝子連鎖解析. 結果: 本症は, 常染色体優性, 成人発症の近位筋優位の筋力低下, 筋痙攣, 深部腱反射消失, 感覚神経障害, 高 CK 血症, 高脂血症, 耐糖能異常, 脊髄前角細胞, 後根神経節細胞の脱落, 後索障害, 末梢神経有髄神経の著明な脱落を特徴とする. 連鎖解析では, D3S3652, D3S1591, D3S1281 にて, 最大 lod score 4.63, 3.13, 3.09 を得た. DNA ハプロタイプの検討から, D3S1591 と D3S1281 の間に疾患遺伝子座が示唆され, DISMULT 分析では, この領域に強い連鎖不平衡 (LD 4.93) が示された. 結論: HMSN-P は, 後索, 前角細胞, 後根神経節障害を示す疾患であり, 遺伝子座は 3q13.1 の 3 cM に存在する.

岩坪 威

東京大大学院薬学系臨床薬学

α -synuclein の神経変性における役割を追求してきた. 本年は Lewy 小体以外に多系統萎縮症 (multiple system atrophy) でオリゴデンドログリアに出現する glial cytoplasmic inclusion (GCI) にも α -synuclein が蓄積すること, プレセニリン遺伝子変異を有する家族性アルツハイマー病脳においても α -synuclein 陽性の Lewy 小体が辺縁系に出現することを見出した. さらに培養細胞系への α -synuclein 遺伝子導入実験, モノクローナル抗体を用いた ELISA による α -synuclein 定量系の確立などを進めた.

Alzheimer 病における Ab アミロイド蓄積機構の研究—診断・治療マーカーによる検討—

東海林 幹夫

群馬大学医学部神経内科

アルツハイマー病 (AD) を確実に診断し, 開発されつつある治療法を客観的に評価できる生物学的なマーカーを検討した. 多施設から得られた合計 338 例の脳脊髄液を用いて Ab40, Ab42, Tau を測定した. AD 患者が 119 例, 正常対照 (tNC) が 73 例, AD 以外の痴呆疾患 (NA) が 49 例, その他の神経疾患 (ND) が 97 例であった. Tau は AD 群で有意に上昇し, MMSE, FAST と相関した. Ab1-40 は有意な差はなく, Ab1-42(43) は AD 群で有意に早期から低下していた. Tau と Ab ratio (Ab1-40/ Ab1-42(43)) の積 (AD Index) を用いると, AD 群で有意な上昇がみられた ($p < 0.01$). 診断感度は 77%, 特異性は 79% であった. 平均 20 ヶ月間経過を追うと診断感度は 97% に改善し, 臨床的にも十分使用できるマーカーと考えられた.

アミロイド前駆体 APP に見いだされた神経特異的細胞死の調節的誘導機能

西本育夫
慶應義塾大学医学部薬理学教室

APP は老人斑の主成分アミロイドの前駆体であるが、神経細胞特異的に細胞表面にも存在する膜貫通蛋白である。我々は、世界に先駆けて、APP が正常機能を営む可能性を見出し、その検討に全力を挙げてきた。本研究では、前年までに、家族性アルツハイマー病変異 APP による神経細胞死機構の解明に独創的な成果をあげてきた。本年度は、非変異型 APP を検討した。初代培養神経細胞のモデル F11 細胞に APP695 を発現した F11/APP 細胞を樹立した。これを用いて、抗 APP 抗体が、細胞表面に存在する APP の細胞外領域に働いて、細胞種特異的なアポトーシスを誘導することを明らかにし、APP は、免疫細胞における Fas と相同の調節的な細胞死誘導分子の機能を持つと結論した。この新しく見いだされた非変異型 APP の細胞死制御機能は、APP に変異のない弧発性アルツハイマー病における神経細胞死機構に全く新規の考え方を提示する。

DRPLA 遺伝子内 CAG リピートの不安定化機構の解析

滝山嘉久
自治医大神経内科

今回我々は、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) 法を用いて、DRPLA におけるヒト生殖細胞の分化過程のどの段階でリピート数が不安定となるのかを、剖検組織を用いて検証した。方法として、まず、DRPLA 剖検例の formalin 固定後の精巣と卵巣を paraffin 包埋し、厚さ 5-10 μ m の連続切片を作成した。次いで、脱 paraffin 処理後 HE 染色を行った切片から、LCM100 (ARCTURUS)を用いて、直径 30 μ m の大きさで精子・卵子の形成過程にある種々の細胞(群)を切り取り、nested PCR 法により CAG リピート部分を増幅した。PCR 産物は、ABI PRISM 310 genetic analyzer にて電気泳動し、CAG リピート数を解析した。その結果、(1) formalin 固定後の組織切片から採取した細胞(群)においても、CAG リピート数を同定することができた。(2) 現在のシステムでは関心領域を直径 30 μ m 以下に絞り込むことは困難であるために、特に精巣の精子形成過程にある細胞を単離することはできなかった。ごく最近米国で発売され始めた LCM200 では、直径 7.5 μ m の範囲で細胞を採取できるので、この system を導入する予定である。(3) 今後、DRPLA をはじめとする CAG リピート病の生殖細胞を単一細胞レベルで解析し、精子・卵子のどの形成過程でリピートが不安定となるのかを明らかにして、その分子機構を解明したい。

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症遺伝子の解析

山田正夫

国立小児病院小児医療研先天異常

CAG リピートの伸長を伴う疾患はこれまでに 8 種の神経変性疾患や失調症で見出されている。主として歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)遺伝子と産物について解析し、リピート伸長によって神経細胞が死に至る分子機構、変性死が生じる脳の部位を決定する分子機構の解明を目指す。伸長トリプレットリピートから生産される単一アミノ酸の連続鎖は、調べた限り、どのアミノ酸でも一定長以上であれば凝集傾向があり、細胞にアポトーシスを引き起こす。顕微鏡下で観察される凝集体の形成以前に Caspase8 が分解を受けることを見出し、凝集体よりも凝集性が重要であり、また本反応に Caspase8 が重要な働きを示すことがわかった。DRPLA はインスリン/IGF の下流でシグナル伝達に関与していること、またアルギニン-グルタミン酸が交互に繰り返すモチーフを介して、相互結合することを見出した。

ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死の分子解析

垣塚 彰

(財)大阪バイオサイエンス研究所

抄録

我々は、ハンチントン舞踏病、Machado-Joseph 病などの遺伝性神経変性疾患に共通する伸長したポリグルタミンを同調発現させる培養神経細胞 PC12 を樹立し、解析を行った。培養神経細胞に発現したポリグルタミンは核内に凝集体を形成し、それに続いて細胞死が引き起こされた。そして、その核内凝集体に一致してストレス等により活性化されるキナーゼ SEK1 が活性化されることが見出された。さらに、ドミナントネガティブ SEK1 は著明に細胞死を抑制したが、核外輸送シグナルを用いて細胞質に発現させたドミナントネガティブ SEK1 は細胞死を抑制できなかった。さらに、この細胞死に抵抗性を示す細胞では核内凝集体を持たず、凝集体は細胞質にのみ存在していた。以上の結果から、核内で凝集したポリグルタミンにより SEK1 を介する細胞死シグナルが活性化され神経細胞死が誘導されると結論された。

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症蛋白の伸長ポリグルタミン鎖のアデノウイルスベクターを用いた発現による神経細胞障害機構の解析

辻 省次

新潟大学脳研究所神経内科学教室

DRPLA をはじめとする CAG リピート病では、伸長したポリグルタミン鎖を含む蛋白断片による gain of toxic function の機序が想定されている。一方、CAG リピート病の患者剖検脳の神経細胞に核内封入体が見出され注目されてきている。我々は正常及び伸長したポリグルタミン鎖を含む DRPLA 蛋白の断片又は全長を発現するアデノウイルスベクターを作成し、分化型 PC12 細胞に発現させたところ、変異蛋白の断片又は全長を発現させた細胞では核内封入体が出現した。変異蛋白断片を発現させた細胞では、高率にアポトーシスが認められたが、変異全長蛋白を発現させた細胞ではアポトーシスは誘導されなかった。核内封入体の形成は CAG リピート病の病態と関連すると考えられるが、その存在が必ずしも細胞死に直結するものではないと考えられた。

IV. 分担別報告

細胞外マトリックス構成成分のサイトカインの 生物活性に及ぼす影響

藤原 作平 岡本 修

はじめに

全身性強皮症では、皮膚をはじめ各種の臓器にコラーゲン、プロテオグリカン等の細胞外マトリックス (ECM) 構成成分の量的変化が報告されている (1)。我々は真皮に比較的豊富に存在するにもかかわらずまだ機能が十分解明されていないデルマトポンチンという分子の性状解明を試み (2)、この分子が真皮の主要なプロテオグリカンであるデコリンと結合すること、およびこの分子が強皮症の病変部で多く発現していることを明らかにした (2)。一方本疾患の線維化部位ではサイトカインの過剰産生が証明されており、本疾患の病態として理解されている (3)。またプロテオグリカンの一つであるデコリンが、強い線維化誘導能を有するサイトカインである transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) と結合し、その生物活性を抑制することが近年示され (4)、産生されたサイトカインの機能を局所で制御するという ECM の新たな役割が明らかになってきた。ECM 成分の組成変化が、その場における各種サイトカインの動態や機能に影響を与え、線維化の進展や維持に関与するのではないかと我々は考え、以下の研究をおこなった。デルマトポンチン、デコリン、I 型コラーゲンと線維化を誘導するサイトカインである TGF- β 1、platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)、fibroblast growth factor-2 (FGF-2) 等との相互作用、およびこれらのサイトカインの生物活性に及ぼす影響を検討した。

材料と方法

1. 材料

I 型コラーゲン、デコリン、デルマトポンチンはウシ真皮より抽出、精製した (2, 5)。¹²⁵I 標識

TGF- β 1、PDGF-BB、FGF-2 は NEN Life Science Products 社 (Boston, MA)、TGF- β 1 は Pepro Tech EC 社 (London, UK)、PDGF-BB、FGF-2 は Genzyme 社 (Cambridge, MA) の製品を使用した。プラズミノーゲンアクチベーターインヒビターのプロモーターにルシフェラーゼを結合したコンストラクトを導入したミンク肺上皮細胞 (PAI/L MLEC) は東北大学加齢医学研究所、安部まゆみ博士より供与された (6)。

2. デルマトポンチンとコラーゲン、デコリンの相互作用

コラーゲンあるいはデコリンを 96 ウェルプレートに固相化し、デルマトポンチンを加えて室温で 12 時間反応させた。結合したデルマトポンチンを抗血清ならびにペルオキシダーゼ法にて検出した (7)。

3. ECM 成分とサイトカインの相互作用

ECM 成分を上記と同様の方法で固相化し、¹²⁵I 標識サイトカインを加え、12 時間反応させた後、0.3 M 水酸化ナトリウム溶液にて溶出し、放射活性を測定した。

4. ECM 成分が TGF- β 1 の生物活性に及ぼす影響

PAI/L MLEC をプレートに播種し、一晚接着させた後、50 pM の TGF- β 1 と ECM 成分と 1 時間反応させた DMEM に培地を置換して 16 時間培養した。培養後、ルシフェラーゼアッセイキット (Promega) を用いて細胞抽出液のルシフェラーゼ活性を測定した。活性を Relative Light Unit (RLU) で表示した。

5. ECM 成分が PDGF-BB、FGF-2 の生物活性に及ぼす影響

コンフルエントに達したヒト線維芽細胞の培地を、10 ng/ml の PDGF-BB あるいは 0.2 ng/ml の FGF-2 を ECM 成分と 1 時間反応させた DMEM に置換して 20 時間培養した。³H-チミジンを加えてさらに 3 時間培養し、³H-チミジンの放射活性を液

体シンチレーションカウンターにて測定した。

結果

1. デルマトポンチン、デコリン、コラーゲンと TGF- β 1 の相互作用および細胞に対する影響

デルマトポンチンは固相化した I 型コラーゲン、およびデコリンに濃度依存性に結合した。デルマトポンチン、コラーゲン、デコリンは各々単独で濃度依存性に TGF- β 1 と結合した (Fig.1A)。二量体構造を破壊して一量体とした TGF- β 1 はこれらの ECM 成分と結合しなかった。このようなデルマトポンチンおよびデコリンと TGF- β 1 の相互作用は溶液中のデルマトポンチン、あるいはデコリンによって抑制された。一方、コラーゲン-デルマトポンチン複合体、デコリン-デルマトポンチン複合体はコラーゲン、デコリン単独の場合の各々約 2 倍、3 倍の TGF- β 1 を結合した。デルマトポンチンと一定量の TGF- β 1 を混合して PAI/L MLEC に加えると、ルシフェラーゼ活性は加えたデルマトポンチンの濃度に依存性増加して TGF- β 1 単独の場合の約 2 倍となり、逆にコラーゲンを加えると、ルシフェラーゼ活性は約 50 % 減少した (Fig.1B)。

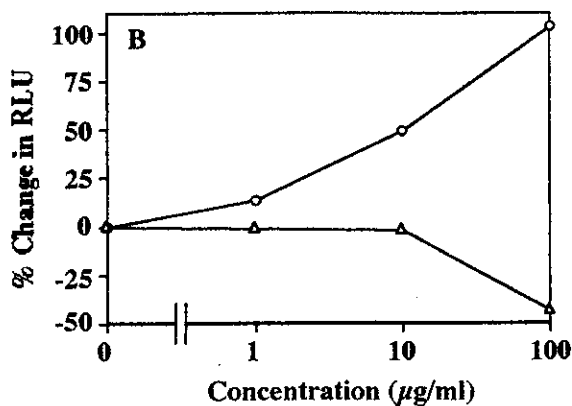
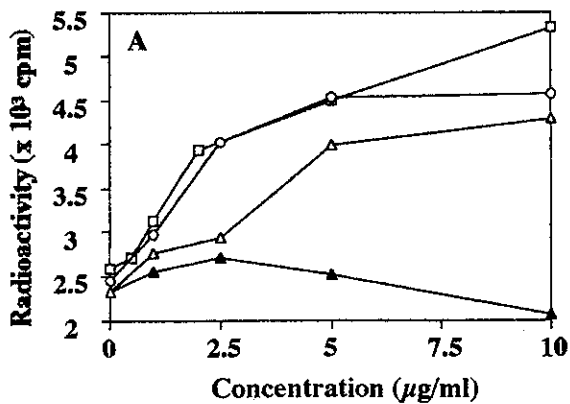


Fig. 1

2. デルマトポンチン、コラーゲン、デコリンと PDGF-BB の相互作用および細胞に対する影響

デルマトポンチン、コラーゲン、デコリンは各々単独で PDGF-BB と結合し、その結合は溶液中のこれらの蛋白質によって抑制された。一方、コラーゲン-デルマトポンチン複合体、デコリン-デルマトポンチン複合体はコラーゲン、デコリン単独の場合の各々約 6 倍および 2 倍の PDGF-BB を結合した。デルマトポンチンと一定量の PDGF-BB を混合して培養線維芽細胞に加えると、 ^3H -チミジンの取り込みは加えたデルマトポンチンの濃度依存性に約 50 % 増加し、PDGF-BB とコラーゲンを混合した場合は、取り込みは約 50 % 減少した。デルマトポンチンと一定量の PDGF-BB およびコラーゲンを混合して培養線維芽細胞に加えた場合には、デルマトポンチンの濃度依存性に ^3H -チミジンの取り込みは約 50 % 増加した。

3. デルマトポンチン、コラーゲン、デコリンと FGF-2 の相互作用および細胞に対する影響

コラーゲン、デコリンは各々単独で FGF-2 と結合したが、固相化デルマトポンチンは FGF-2 と結合しなかった。一方、コラーゲン-デルマトポンチ

Fig. 1. (A) Interaction of dermatopontin, decorin, collagen and their complexes with TGF- β 1. Dermatopontin (\circ), decorin (\triangle), type I collagen (\square), or BSA (\blacktriangle) were coated on wells at the concentration indicated along the horizontal bar and a 5×10^4 cpm of ^{125}I -TGF- β 1 was added to the wells, the bound radioactivities were counted. Vertical bar represents the radioactivity of bound TGF- β 1. (B) Influence of dermatopontin and collagen on the bioactivity of TGF- β 1. Dermatopontin (\circ) or type I collagen (\triangle) at the concentration indicated along the horizontal bar was incubated with 50 pM of TGF- β 1. After incubation they were added to wells containing 2×10^4 PAI/L MLECs and incubated for 16 h at 37 °C. Luciferase was extracted and its activity was measured by luminometer. Change of relative light unit (RLU) compared to wells containing only TGF- β 1 is expressed as %.

ン複合体、デコリン-デルマトポンチン複合体はコラーゲン、デコリン単独の場合の2倍のFGF-2を結合した。デルマトポンチンあるいはコラーゲンと一定量のFGF-2を混合して培養線維芽細胞に加えると、³H-チミジンの取り込みは加えた蛋白質の濃度依存性に約20~25%減少し、デルマトポンチンと一定量のFGF-2およびコラーゲンを混合して培養線維芽細胞に加えた場合は、³H-チミジンの取り込みの減少傾向はさらに高度となった。

考察

TGF- β 1, PDGF-BB, FGF-2は線維芽細胞のコラーゲン合成を亢進させることが知られており、線維化の成立に密接に関与することが示唆されている(8)。本研究では、これらのサイトカインがECM成分およびそれらの複合体に結合することに加え、ECM成分によってこれらのサイトカインの生物活性が多様に制御されることが明らかとなった。このことは、細胞を取り巻く微小環境の変化によってサイトカインの作用が異なりうることを強く示唆する。

これらのサイトカインの中でも、TGF- β 1は強皮症病変部で強く発現し、強皮症の病態形成に寄与する有力な候補と考えられている。強皮症皮膚ではコラーゲンとデルマトポンチンの蓄積が認められ(2)、線維芽細胞からの両者の産生がTGF- β 1によって亢進することから(9)、TGF- β 1が強皮症皮膚でこれらの蓄積に寄与していると考えられる。デルマトポンチンがTGF- β 1共存下でPAI-1プロモーター活性をさらに増強させることが明らかになったが、TGF- β 1の他の生物活性、即ちコラーゲン産生の増強、および線維化の維持にも貢献していることが想定される。コラーゲンはPDGF-BBによる線維芽細胞の³H-チミジン取り込みの増加を抑制し、デルマトポンチンはこのコラーゲンのPDGF-BB活性抑制に拮抗することから、デルマトポンチン-PDGF-BB系も線維化に重要な役割を担っていることが予想される。それに対してFGF-2の³H-チミジン取り込みは、コラーゲンやデルマトポンチンおよびこれらの複合体によって抑制されるのみであったという事実から、細胞外マトリックス成分との相互作用が線維化へ及ぼす影響は低いと考えられる。

本研究ではデルマトポンチン-TGF- β 1系、デルマトポンチン-PDGF-BB系によるサイトカインの作用増強が線維化の病態形成に大きく関わっている可能性が示され、デルマトポンチンの発現抑制が

線維化進展を防ぐ可能性が示唆された。

文献

- 1) Fleischmajer R, Perlish JS.: Glycosaminoglycans in scleroderma and scleredema. *J. Invest. Dermatol.* 58:129-132, 1972
- 2) Okamoto O, Suzuki Y, Kimura S et al. : Extracellular matrix 22-kDa protein interacts with decorin core protein and is expressed in cutaneous fibrosis. *J. Biochem.* 119:106-114, 1996
- 3) Kulozik M, Hogg A, Lankat-Buttgereit B et al. : Co-localization of transforming growth factor β 2 with α 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J. Clin. Invest.* 86:917-922, 1990
- 4) Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E.: Negative Regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin. *Nature* 346:281-284, 1990
- 5) Nakamura T, Matsunaga E, Shinkai H.: Isolation and some structural analyses of a proteodermatan sulphate from calf skin. *Biochem. J.* 213:289-296, 1983
- 6) Abe M, Harpel JG, Metz CN et al. : An assay for transforming growth factor- β using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct. *Anal. Biochem.* 216:276-284, 1994
- 7) Okamoto O, Fujiwara S, Abe M et al. : Dermato-pontin interacts with transforming growth factor- β and enhances its biological activity. *Biochem. J.* 337: 537-541, 1999
- 8) Kaehaeri VM, Larjava H, Uitto J.: Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression- transforming growth factor- β 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol. Chem.* 266:10608-10615, 1991
- 9) Kuroda K, Okamoto O, Shinkai H.: Dermato-pontin expression is decreased in hypertrophic scar and systemic sclerosis skin fibroblasts and is regulated by transforming growth factor- β 1, interleukin-4, and matrix collagen. *J. Invest. Dermatol.* 1999 (in press).

Abstract

Regulation of the Biological Function of Cytokines by
Extracellular Matrix Components

by

Sakuhei Fujiwara and Osamu Okamoto

from

Department of Dermatology, Oita Medical University

In the lesional skin of systemic sclerosis, the amount of various extracellular matrix components increased, and several kinds of cytokines were reported to contribute to such change. The aim of this study was to clarify whether extracellular matrix components affect to the function of cytokines. The interaction between the extracellular matrix (ECM) components and various cytokines were examined using a solid-phase assay, and the influence of ECM components on the biological function of cytokines was monitored by the promoter activity of plasminogen activator inhibitor-1 in mink lung epithelial cells or ^3H -thymidine uptake by cultured fibroblasts. Dermatotopontin, which is reportedly overexpressed in the lesional skin from systemic sclerosis (SSc) patients, interacted with type I collagen and decorin. It also interacted with cytokines including transforming growth factor (TGF)- β 1 and platelet-derived growth factor (PDGF)-BB, but not with fibroblast growth factor (FGF)-2. Collagen and decorin also interacted with these cytokines. The collagen-dermatopontin complex and the decorin-dermatopontin complex bound 2 to 6 times more cytokines than their individual binding. Dermatotopontin further enhanced the promoter activity of plasminogen activator inhibitor-1 in the presence of TGF- β 1, and it also enhanced ^3H -thymidine uptake by fibroblasts in the presence of PDGF-BB. It decreased ^3H -thymidine uptake by fibroblasts in the presence of FGF-2. On the other hand, collagen inhibited the promoter activity of plasminogen activator inhibitor-1 in the presence of TGF- β 1, as well as ^3H -thymidine uptake by fibroblasts in the presence of PDGF-BB. When co-incubated with collagen and PDGF-BB, dermatopontin reversed the inhibitory function of collagen on the activity of this cytokine, while it enhanced the inhibitory activity of collagen on FGF-2 function. As a result, dermatopontin enhanced the biological function of both TGF- β 1 and PDGF-BB, and this might contribute to fibrotic process in systemic sclerosis. The fibrosis might be controlled by inhibiting the expression of dermatopontin.

内耳障害と一酸化窒素

工田昌也 夜陣紘治

はじめに

一酸化窒素(NO)は、L-アルギニンを基質とする酵素(NOS)から産生される脂溶性のラジカルであるが、近年、細胞間の情報を伝達する新しいオートコイドとして、循環のみならず、免疫及び神経生理の分野で注目を集めている。生理的に低濃度で産生されるNOは、神経伝達や血流調節に関わる重要な生理学的メディエーターとして機能している^{1,3)}。内耳では蝸牛、前庭器、神経節、内リンパ嚢などで構成型のNOS(NOS I、III)が認められ、感覚細胞や神経節では神経情報伝達に関与し、水分移行上皮、内リンパ嚢では内リンパ、イオンの恒常性の維持に関与している^{4,6)}。しかしながら、一方でNOが多量にかつ持続的に産生された場合、もう一つの主要なフリーラジカルであるスーパーオキシド(O²)と相互に作用し、NOそのものでは認められない多彩な病態生理学的特性を示すことが明らかにされ^{1,3)}、同様のことが内耳でも生じることを我々はすでにLPS内耳炎モデルを用いて確認した。今回はこれに引き続き、各種内耳障害モデルを利用し、内耳障害におけるNO、O²、パーオキシナイトライトの関与、治療法の可能性について検討するとともに臨床的にメニエール病患者に抗フリーラジカル療法を行い、メニエール病の病態の解明と治療法の開発を試みた。

対象と方法

1) モルモット内耳障害モデルの作製

- i) モルモット LPS 内耳炎モデル：プライエル反射正常の成熟、有色モルモット（体重 250-300g）の腹腔内に 0.1 mg LPS (*E. Coli*) を投与、24 時間後に LPS 1 mg を経鼓膜的に中耳腔内に投与した。
- ii) *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (PaExoA) 内耳炎モデル：プライエル反射正常の成熟、雄、albino Sprague-Dawley ラット（体重 320-480g）に PaExoA 5 μg を経鼓膜的に中耳腔内に投与した。
- iii) GM 投与モデル：有色モルモットに GM5mg を経鼓膜的に中耳腔内に投与した。

2) 内耳における NO、O²、パーオキシナイトライト生成の解析

LPS 投与終了後 48 時間の時点でネブタールによる深麻酔下に 4 %パラホルムアルデヒドにより心腔内より灌流固定後断頭、内耳を摘出した。試料は 1.5% Triton X-100 にて処理した後、抗 NOS II 抗体、抗キサンチンオキシダーゼ(XO)抗体、抗ニトロチロシン抗体を用いて、LSAB 法により免疫染色を行い、顕微鏡にて観察した^{5,6)}。

3) NOS 阻害剤、O²消去剤、ステロイド、およびエブセレンによる治療実験

NOS 合成阻害剤として N-nitro-L-arginine methylester (L-NAME)を LPS と同時に 1 mg 中耳腔内に投与。ステロイドはデキサメタゾン 1 mg/kg を LPS 投与 2 時間前に筋注。O²消去剤は superoxide dismutase (SOD)3000 IU を中耳腔内に投与。さらに、これまでパーオキシナイトライトと最も速く反応し消去するといわれているエブセレン 100 mg/kg を LPS 投与直前と 24 時間後に経口投与した。

4) カロリック反応、ABR

薬剤投与前、および投与終了後 48 時間にカロリックテストを行い眼振持続時間を測定した。ABR は PaExoA 投与前、および投与終了後 72 時間、2 ヶ月後に測定した。

5) 臨床応用

メニエール病患者 10 名にフリーラジカル消去剤 (gultathione、rebamipide) を投与し、治療効果を検討した。

結果

内耳障害動物では蝸牛コルチ器、半規管膨大部後、平衡斑の感覚細胞に種々の程度の変性を認めた。これらの形態学的変化は L-NAME、SOD、エブセレン等の投与により軽減した。免疫組織学的検討では、コントロール動物の内耳では NOS II、XO、ニトロチロシンに対する反応は認められなかったが、内耳障害動物では蝸牛有毛細胞、支持細胞、血管条、前庭感覚細胞、前庭暗細胞、移行上皮に反応が認められた。LPS 投与動物では投与 48 時間後にカロリック

ク反応の有意な低下が認められ、この反応の低下は L-NAME、デキサメタゾン、SOD、エブセレンにより有意に抑制された。また、PaExoA 投与モデルでは ABR 閾値の上昇が L-NAME の鼓室内投与により予防された。

臨床的にはメニエール病患者にフリーラジカル消去剤を投与したところ 10 名中 5 名でめまい発作の消失、4 名で聴力改善、など 60%以上の患者で治療効果を認めた。

考察

NO 供与体の鼓室階灌流により CAP、CM の低下と感覚細胞、支持細胞の障害が惹起されるが、NO 放出を阻害する L-methyl arginine や SOD を前投与することによりこれらの障害が有意に抑制されることなどから、NO の過剰産生が蝸牛障害を引き起こす要因となるとともに NO と O₂との反応が耳毒性に強く関連していることが示唆されている^{7,8)}。今回の研究により内耳障害時には前庭器、コルチ器でも NOS II が発現することが明らかとなった。内耳での NOS II 陽性細胞から産生される過剰の NO は周囲の組織に障害的に作用し、内耳機能障害、すなわちカロリック反応の低下、ABR 閾値の上昇を引き起こすと考えられるが、これらの内耳機能障害は NOS 阻害剤である L-NAME により抑制された。このことは NO が内耳の機能的形態的障害の発現に強く関係していることを表わしているものと思われる。

NO が関連する毒性の発現機構に関しては、NO と他の物質、とりわけ O₂との反応が毒性の発現に関与しているという説がある⁹⁾。NO と O₂は、ほぼ拡散律速に近い速度で速やかに反応し、より反応に富むパーオキシナイトライトが生じ、これが各種疾患病態や炎症反応のメディエーターとして作用する⁹⁾。実際、今回の研究で LPS 投与、GM 投与により前庭器でも NO に加えて O₂、パーオキシナイトライトが産生されることが NOS II、XO、ニトロチロシンに対する免疫組織化学的検討により明らかとなった。さらに LPS によるカロリック反応の低下、LPS、GM による内耳の形態学的障害は O₂消去剤である SOD、パーオキシナイトライト消去剤であるエブセレンにより有意に抑制された。これら

のことから内耳障害の発症には NOS II の発現による NO の過剰産生とそれに引き続く NO と O₂の反応によるパーオキシナイトライトの産生が主要な役割を果たしていることが明らかとなり、ステロイド、NOS 阻害剤、SOD、エブセレンが内耳障害に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

これらの事を基礎にして、今回メニエール病患者にフリーラジカル消去剤を投与し、治療効果を検討したところ 60%以上の治療効果を認め、フリーラジカルの制御による治療はメニエール病だけでなく広く内耳障害全般の治療に応用でき、メニエール病の治療の発展に大きく寄与することが期待される。

参考文献

- 1) Förstemann U, Closs EI, Pollock JS, et al.: Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23:1121-1131,1994
- 2) Schmidt HHHW, Walter U: NO at work. *Cell* 78:919-25,1994
- 3) Beckman JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 271:C1424-C1437,1996
- 4) Franz P, Hauser-Kronberger C, Böck P, et al.: Localization of nitric oxide synthase I and III in the cochlea. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 116:726-731,1996
- 5) Takumida M, Anniko M: Localization of nitric oxide synthase isoforms (NOS I, II and III) in the vestibular end organs of the guinea pig. *ORL*: in press.
- 6) Takumida M, Zhang DM, Anniko M: Localization of nitric oxide synthase isoforms (I, II and III) in the endolymphatic sac of the guinea pig. *ORL* 59:317-321,1997
- 7) Amae FR, Comis SD, Osborne MP: NG-methyl-L-arginine protects the guinea pig cochlea from the cytotoxic effects of pneumolysin. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 115:386-391,1995
- 8) Amae FR, Comis SD, Osborne MP, et al.: Possible involvement of nitric oxide in the sensorineural hearing loss of bacterial meningitis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 117:329-336,1997
- 9) Dawson VL, Dawson T., Bartley DA, et al.: Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* 13:2651-2661,1993