

responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J. Biol. Chem.* 275 (9), 6075-6079.

⑨ Miyazono, K. (2000) Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *J. Cell Sci.* in press.

⑩ Beppu, H., Kawabata, M., Hamamoto, T., Chytil, A., Minowa, O., Noda, T., and Miyazono, K. (2000) BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev. Biol.* in press.

2. 学会発表

特に無し

G. 知的所有権の取得状況

特に無し

核内アセチル化制御による難治性疾患制圧法の開発

中島 利博

（筑波大学応用生物科学系・講師）

動脈硬化症、慢性関節リウマチ症をはじめとする種々の難治性疾患の病巣形成細胞の転写制御の恒常性の破綻が、特に個々の転写活性化因子のレベルで解析・報告されている。最近、殆どのシグナル依存的転写活性化因子と複合体を形成し、個々のシグナルを統合し標的遺伝子の転写を活性化する CREB binding protein(CBP)/p300 に代表されるコアクチベーター分子群がヒストンをはじめとする種々の核内蛋白質のリジン残基に対するアセチル基転移酵素であることが証明された。わたしたちは転写コアクチベーターを切り口として動脈硬化病巣血管平滑筋細胞およびリウマチ滑膜細胞の”転写制御の恒常性の破綻”を解析している。昨年度、抗アセチル化リジン抗体を作製し、同抗体により動脈硬化巣で血管平滑筋細胞の核内蛋白質のアセチル化が亢進（hypenuclear acetylation：HNA）していることを報告した。本年度は、培養血管平滑筋細胞を増殖因子で刺激することにより HNA を惹起できること、およびそのシグナル伝達経路の解析を行った。

A. 研究目的

血管平滑筋細胞の増殖と活性化・遊走は、動脈硬化症の病巣の形成に非常に重要である。それらの分子機構の解明は動脈硬化症の発症さらには治療法・予防法の開発に大きく貢献すると考えられる。これまで血管平滑筋細胞の転写制御の恒常性の破綻が、特に個々の転写活性化因子のレベルで解析・報告されている。

一方、我々をはじめとする幾つかのグループにより CREB binding protein(CBP)/p300 に代表される”コアクチベーター”分子群が殆どすべての転写活性化因子と複合体を形成し、個々のシグナルを統合していることが明らかとなった。また、その際に増殖性サイトカイン、ステロイド剤の標的分子であることも報告された。さらに、コアクチベーター分子がヒストンをはじめとする種々の核内蛋白質のリジン残基に対するアセチル基転移酵素であることが証明された。我々は転写コアクチベーターを切り口として関節滑膜細胞の”転写制御の恒常性の破綻”を解析している。本研究は同細胞での転写コアクチベーター機能をアセスメントすることを目的としている。

B. 研究方法

定法により得られたヒト臍帯由来の培養血管平滑筋細胞を用いた。核内アセチル化活性の定量は上記アセ

チル化リジン抗体に加え、ヒストンに対するアセチル化の活性を指標として検出した。培養血管平滑筋細胞の増殖は 3H-thymidine uptake 法、3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) assay (MTT 法)により測定した。

C. 研究結果

血管平滑筋細胞の mitogen、motogen かつ転写活性化剤であるトロンピンは血管平滑筋細胞に HNA を強く惹起した。この現象に MAP kinase pathway、および CBP が関与していることが明らかとなった。

D. 考察

これらの結果は血管平滑筋細胞の転写亢進状態に転写コアクチベーターレベルでの機能異常が関与していることをはじめて示すものである。また、これまで報告されている転写活性化因子レベルでの機能異常との相互作用が同細胞の転写亢進状態を形成していることが推測される。今後、転写コアクチベーターのこれらの機能を標的とすることにより動脈硬化症をはじめとする難治性疾患の制御法の開発を目指したい。

E. 結論

転写コアクチベーターの機能異常（HNA）が動脈硬化症の病巣血管平滑筋のみならず培養血管平滑筋細胞をトロンピン刺激することにより同様の現象を再現

することに成功した。今後、本再構成系を用いることにより、より詳細なHNAの分子機構、その病理的意義の解明、さらには転写コアクチベーターを標的とした難治性疾患の制御法の開発への展開が見込まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jukka Pitkänen, Vassilis Doucas, Thomas Stensdorf, **Toshihiro Nakajima**, Satoko Aratani, Kirsten Jensen, Hans Will, Perttu Vähämurto, Juha Ollila, Mauno Vihinen, Hamish S. Scott, Stylianos E. Antonarakis, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Kai Krohn, and Pärt Peterson . "APECED protein AIRE has transcriptional transactivating properties and interacts with common co-activator CBP." *J. Biol.Chem.* in press
- 2) M. Nakazawa, T. Hasunuma, T. Ohshima, T. Kobata, K. Nishioka, **T. Nakajima**.
CBP: a target molecule of HTLV-1 Tax in synovocyte activation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* inpress
- 3) M. Miyagishi, T. Ohshima, J-I. Ishida, R. Fujii, **T. Nakajima**, A. Fukamizu.
"Cell type-dependent transactivation or repression of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/Capsulin." *Molecular and Cellular Biochem.* in press .
- 4) D. Koya, J. W. Dennis, C. E. Warren, Y-W. Lin, F. J. Schoen, Y. Nishio, **T. Nakajima**, N. Takahara, M. Lipes, M. R. Montimny, G. L. King.
"Overexpression of Core 2 N-acetylglucosaminyltransferase Enhanced Cytokine Actions and Induced Hypertrophic Myocardium in Transgenic Mice." *FASEB. J.* 13 2329-2337 1999.
- 5) K-I. Kawahara, S. Watanabe, T. Ohshima, Y. Soejima, T. Oishi, S. Aratani, T. Amano, R. Fujii, M. Hagiwara, A. Fukamizu, **T. Nakajima**.
"Hypenuclear acetylation in atherosclerotic lesions and activated vascular smooth muscle cells." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 266 417-424 1999.
- 6) KP. Sarker, K. Abeyama, JI. Nishi, M. Nakata, T. Tokioka, **T. Nakajima**, I. Kitajima, I. Maruyama.
"Inhibition of Thrombin-induced Neural Cell Death by Recombinant Thrombomodulin and E5510, a Synthetic Thrombin Receptor Signaling Inhibitor." *Thrombosis and Haemostasis* 82 1071-1077 1999.

- 7) M. Miyagishi, **T. Nakajima**, A. Fukamizu .
"Molecular characterization of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/capsulin." *International Journal of Molecular Medicine* 5 27-31 1999.
- 8) T. Ohshima, **T. Nakajima**, S. Aratani, T. Ohishi A. Fukamizu, K-I., Yagami.
"CRM1 mediates nuclear export of parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS2." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 264 155-160 1999.
- 9) K. P. Sarker, T. Uchimura, **T. Nakajima**, M. Sorimachi, I. Kitajima I. Maruyama.
"Inhibition of Nitric oxide (NO)-induced Neuronal Cells Death by Epinephrine." *Neurosci. Res. Commun.* 25 79-88 1999.
- 10) K. P. Sarker, M. Nakata, **T. Nakajima**, I. Kitajima, I. Maruyama
"Increased Production of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by Angiotensin II in Neuro-2a cells." *Neurosci. Res. Commun.* 26 157-162 1999.
- 11) H. Shin, I. Kitajima, **T. Nakajima**, Q. Shao, T. Tokioka, I. Takasaki, N. Hanyu, T. Kubo, I. Maruyama.
"Thrombin receptor mediated signals induce expressions of interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor via NF- κ B activation in synovial fibroblasts." *Annals of the Rheumatic Diseases* 58 55-60 1999.
- 12) J. Ishida, S. Asada, H. Daitoku, K. Fujiwara, Y. Kon, K. Murakami, **T. Nakajima**, Y. Kasuya, A. Fukamizu.
"Expression and characterization of mouse angiotensin II type 1a receptor tagging hemagglutinin epitope in cultured cells." *International Journal of Molecular Medicine* 3 263-270 1999.
- 13) F. Ukaji, I. Kitajima, T. Kubo, C. Shimizu, **T. Nakajima**, I. Maruyama.
"Serum samples of patients with rheumatoid arthritis contain a specific autoantibody to "denatured" aldolase A in the osteoblast-like cell line, MG-63." *Annals of the Rheumatic Diseases* 58 169-174 1999.

2. 学会発表

本研究に関してはありません。

G. 知的所有権の取得状況

本研究に関してはありません。

加齢と凝固線溶系因子に関する分子病態学的解析

一瀬 白帝

（山形大学医学部分子病態学講座・教授）

心筋梗塞、脳梗塞の基盤である動脈硬化の開始と進展に重要な役割を果たす凝固線溶系の蛋白質プラスミノゲン、アポリポプロテイン(a)、XIII 因子遺伝子の発現調節領域に遺伝的多型性が存在することを発見したので、それらの遺伝子診断法を開発した。今年度は、まず、プラスミノゲン遺伝子の5'上流領域の6つの遺伝的多型性の組み合わせによるハプロタイプをアジア人と白人の健常者において調べたところ、日本人と韓国人、中国人はよく似た遺伝子頻度であったが、白人とは大きく異なっていた。また、XIII 因子遺伝子の基本的発現調節機構を解析し、5'領域周辺に同定された4つの遺伝的多型性について白人の健常者において調べたところ、これらの多型性と血中濃度との間に明らかな相関は認められなかった。今後、他の人種で多型性と血中濃度との相関を調べたり、培養細胞で多型性遺伝子の転写活性の変化を解析して、動脈硬化、血栓症との関連を検討したい。

A. 研究目的

心筋梗塞、脳梗塞の基盤である動脈硬化の開始と進展に重要な役割を果たす凝固線溶系の蛋白質プラスミノゲン、アポリポプロテイン(a)、XIII 因子遺伝子の発現調節領域には遺伝的多型性がある。これらの遺伝子はサイトカインやホルモンによって発現が誘導され、血中濃度も加齢により変動する。そこで、多数の症例で多型性の遺伝子診断を施行すると共に、培養細胞で多型性遺伝子の転写活性の変化を解析して、動脈硬化、血栓症との関連を検討することが本研究の目的である。

B. 研究方法

1) プラスミノゲン遺伝子5'発現調節領域の遺伝的多型性の遺伝子診断

プラスミノゲン遺伝子5'発現調節領域の-469、-413、-389、-245、-18、+10 bp の位置にある塩基配列がそれぞれA、C、A、A、T、C、であるものをI型、G、T、G、G、G、TであるものをII型と命名し、この領域を増幅するためのプライマー5'-CATGAATTCGA AAGATTGATGTCITTATAACATAATT-3'と5'-CACAG AATCCATGGCATATGTATTTTTACTAC-3'を作製した。検体のDNAは末梢血から抽出して、上記のプライマーを用いてPCR法にて増幅し、0.87 Kb の産物を制限酵素 Afl II あるいは Afl III で37°C 2 hr 処理した後、

アガロースゲルで電気泳動を行なった。

2) 凝固 XIII 因子Aサブユニット (XIIIa) の発現調節機構の解析

XIIIa を内因性に産生する骨髄巨核球系細胞 MEG-01 と単球系細胞 U937 からRNAを抽出し、5'-RACE、S1 マッピング、プライマー伸長法による解析に用いた。XIIIa のゲノミック DNA クローンから5'上流領域を切り出してプローブとした。

種々の長さの XIIIa 遺伝子5'領域を含む DNA 断片をCATベクターに挿入し、巨核球系、単球系細胞に導入してそれぞれの転写活性を測定した。また、培養細胞から核抽出液を調製し、32P でラベルした DNA 断片と混合して DNAase I フットプリンティングを行なった。プロテクトされた部位を選んでオリゴヌクレオチドを作製し、32P でラベルした後核抽出液と混合してゲルシフトアッセイを行なった。

3) XIIIa の5'領域の遺伝的多型性の解析

XIIIa の5'上流領域約1 Kb に位置する (AAAG)_n 繰り返し多型性、-831 bp に位置する C/T 多型性、-264 bp に位置する G/A 多型性、Intron A に位置する C/A 多型性を検出するために、それぞれ5'-GCAACAGAGC AAGACTTCATCTG-3' (5'-AGCCCCAAGGAAGATGAG TAAAC-3')、5'-AGTAAAGAAGGTTAGAAATAGCCAT

-3'(5'-CCACCTCCCGGGTTCAGGTG-3'), 5'-CTTGCCTG
GTACTCCCAGCAACTGG-3'(5'-TGGACGCAGCGGGC
CCTGGCTCAT-3'), 5'-CGCCTGCAGGTAAGCCATCG
-3'(5'-TGGACGCAGCGGGCCCTGGCTCAT-3')のプライ
マーをデザインし、PCRで増幅した後、制限酵素 Hph
I、Fok I、Taq I を加えて切断の有無をアガロースゲル
電気泳動にて判定した。なお、(AAAG)_n 多型はポリア
クリルアミドゲル電気泳動で判定した。

倫理面への配慮は、共同研究者が被験者のインフォ
ームドコンセントを得た上で採取した。当研究室に送
付された検体には、容易に氏名が同定されないように
ID番号のみがラベルされ、当初の目的である凝固、線
溶、血栓、動脈硬化に関わる遺伝子の解析にのみ用い
られている。なお、本研究は当医学部の倫理委員会の
承認を受けている。

C. 研究結果

1) プラスミノゲン遺伝子5'発現調節領域の遺伝的多 型性の遺伝子診断

ヒトプラスミノゲン遺伝子の5'上流領域に6つの遺
伝的多型性が存在するので、その組み合わせによりI
型、II型ハプロタイプと命名し、PCRで増幅したDNA
を制限酵素 Afl I、Afl III を用いて切断して遺伝子型を
決定した。なお、I型のホモ接合体のバンドは両酵素
で切断されず、II型のホモ接合体のバンドは両酵素で
切断されるので容易に型が判定される。54名の日本人、
79名の韓国人、72名の中国人、79名の白人の健常者
から採取したDNAを本法にて解析したところ、II型の
遺伝子頻度はそれぞれ、0.79、0.79、0.87、0.46とアジ
ア人と白人の間では大きく異なることが判明した。更
に、日本人、韓国人、中国人に共通な Ala601-Thr 変
異とハプロタイプの間を調べたところ、日本人症例
の3/4及び韓国人と中国人症例の全てで Ala601-Thr
変異がI型ハプロタイプに存在することが分かった。

2) XIII A の発現調節機構の解析

XIII A を内因性に発現している細胞株をスクリー
ニングして、単球系の U937 と巨核球系の MEG-01 が大
量の XIII A を産生していることをウエスタンブロッ
ティングとノーザンブロッティングにより突き止めた。こ
れらの細胞から抽出した RNA を用いて、5'-RACE、
S1-Nuclease マッピング、プライマー伸長法にて解析し
たところ、主な転写開始点は最初のエクソン/イント
ロン境界から 76 bp 上流であることが判明した。

XIII A 遺伝子のプロモーターは -114~+75 bp の領域
に存在することが CAT レポーターアッセイで突き止

められ、DNase フットプリンティング、ゲルシフトア
ッセイなどにより MZF-1、NF-1、SP-1 などの転写因
子が必須であることが分かった。-806~-290bp の上流
領域は MEG-01 ではエンハンサーとして働くが、
U937 ではサイレンサーとして働く。この領域の
GATA-1 と Ets-1 エlementが細胞株によって異なる
転写活性の原因である。

3) 凝固 XIII 因子Aサブユニットの5'領域の遺伝的多 型性の解析

XIII A 遺伝子の解析の過程で、4種類の多型性を同定
したのでそれぞれの部位について PCR 法によりゲノ
ム DNA を増幅し、(AAAG)_n 繰り返し数多型はアクリ
ルアミドゲル電気泳動で、他の3種類の一塩基多型性
(SNPs) はそれぞれ Hph I、Fok I、Taq I を用いて
PCR-RFLP 法で判定したところ、-831 bp C/T、-264 bp
G/A、イントロンAのC/A多型の対立遺伝子はそれぞ
れ90/10、128/26、117/37という頻度であった。(AAAG)_n
繰り返し数の頻度は、7、6、5、4、3回がそれぞ
れ37、20、13、3、6であった。これらの多型と XIII A
の血中濃度を比較したところ何れも有意な差は認めら
れなかった。ただし、(AAAG)_n 繰り返し4回の3例は
他のタイプの約2/3の XIII A 濃度を示した。

D. 考察

1) プラスミノゲン遺伝子5'領域のハプロタイプに関
しては、我々の以前の研究によりII型がI型の2倍の
転写活性を持つことが判明しており、個人の血中プラ
スミノゲン濃度の違いの原因である可能性がある。今
回、このハプロタイプの遺伝子診断が可能になったこ
とにより、各集団でのプラスミノゲン濃度との関係が
分析できるようになった。現在のところ、少数例の予
備実験では明らかな傾向が認められていないが、より
多くの検体を調べれば統計的処理が可能になる。

我々が以前日本人に多いと指摘した Ala601-Thr 変
異が同じアジア人である韓国人、中国人にもほぼ同じ
遺伝子頻度で見つかり、しかも同じハプロタイプ上
にあることが分かった。従って創始者効果である可能性
が極めて高い。また、この Ala601-Thr 変異は、少なく
とも3種のアジア人が現在のそれぞれの人種に分かれ
る前に出現し、人種の移動とともに拡散したものと
思われる。

2) 最近、動脈硬化や血栓症との関係が注目されるよ
うになった XIII 因子Aサブユニットの基本的発現調
節機構を初めて明らかにしたところ、同じ遺伝子ファミ
リーに属する他のトランスグルタミナーゼとは全く異

なることが分かった。これがそれぞれのトランスグルタミナーゼが別々の組織で特異的に発現する理由である。この結果を利用すれば、加齢と共に XIIIa の血中濃度が増加する現象の機序を解析することが可能になると期待される。

3) 今回 XIIIa 遺伝子の 5'領域の多型性と血中 XIIIa 濃度を比較することのできたイタリア健康人では、一部を除いて特定のタイプと濃度の高・低との明らかな関連は認められなかった。従って、定常レベルにおける XIIIa 発現効率は in vivo では差がないものと思われる。この点については、少なくとも種類の別の人種(例えば日本人)で同様の検討を行ない、大まかな結論を出したい。また、共同研究者に依頼して性別・年齢のデータを得て、本来の目的である加齢の影響について検討を加えたい。

E. 結論

今年度の研究によって、動脈硬化、血栓に関与する2つの遺伝子の5'発現調節領域の解析がより進展した。今後はそれぞれの次の課題に取り組み、研究を前進させると共に、もう一つの重要な危険因子であるアポリポ蛋白(a)と加齢の関連の研究にも取り組みを開始したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Masafumi Kida, et. al.: Transcriptional Regulation of Cell Type-specific Expression of the TATA-Less A Subunit Gene for Human Coagulation Factor XIII. *J. Biol. Chem.*, 274 (10); 6138-6147, 1999.

2) Asako Ooe, et. al.: Common Mutation of Plasminogen Detected in Three Asian Populations by an Amplification Refractory Mutation System and Rapid Automated Capillary Electrophoresis. *Thromb. Haemost.*, 82 (4); 1342-1346, 1999.

2. 学会発表

1) A. Ichinose: Classification of Factor XIII Deficiencies. The 45th Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee, Washington, D.C., USA, August 1999.

2) S. Maeda, et. al.: Intracellular aggregation of mutant A subunits cause type II factor XIII deficiency. The Xth International Congress on Thrombosis and Haemostasis, Washington, D.C., USA, August 1999. *Thrombosis and Haemostasis (Suppl.)*; 18, 1999.

3) A. Ooe, et. al.: Molecular Defects of 3 Natural Plasminogen Mutants Expressed in a Mammalian Cell line:

An Additional Glycosylation Impairs Enzymatic Activity of the D676N Mutant. The Xth International Congress on Thrombosis and Haemostasis, Washington, D.C., USA, August 1999. *Thrombosis and Haemostasis (Suppl.)*; 222, 1999.

4) A. Ichinose: Lipoprotein(a). The Xth International Congress on Thrombosis and Haemostasis, Meet the expert session, Washington, D.C., USA, August 1999.

5) M. Souri, et. al.: Intra- and Extra-cellular Instability of a Novel Y283C Mutant of the A Subunit for Coagulation Factor XIII Caused by Impaired Protein Folding, Dimer Formation, and Heterotetramer Assembly. Japan-Korea Joint Conference on Transglutaminases, Fukuoka Japan, December 1999.

6) A. Ichinose: Characterization of the Gene for Human Protein Z. The 44th GTH Meeting, Freiburg Germany, February 2000.

7) 一瀬白帝: Lp(a)、第24回日本脳卒中学会総会シンポジウム、横浜、1999年4月、*脳卒中* 21(1); 93, 1999.

8) 梅津和夫 他: 凝固因子 FXIII の STR 多型とタンパク多型との関連について、第83次日本法医学会総会 広島 1999年4月、*日本法医学雑誌* 53(Suppl); XXX, 1999.

9) 一瀬白帝: 凝固線溶系因子の遺伝子異常と分子病態、第47回日本輸血学会総会教育講演 仙台 1999年5月、*日本輸血学会雑誌* 45(2); 124, 1999.

10) 一瀬白帝 他: トランスグルタミナーゼ研究の到達点、第72回日本生化学会大会シンポジウム 横浜 1999年10月、*生化学* 71(8); 658, 1999.

11) 惣宇利正善 他: 単球系 U937 および巨核球系 MEG-01 培養細胞における凝固 XIII 因子 A サブユニットの発現・存在様式、第72回日本生化学会大会 横浜 1999年10月、*生化学* 71(8); 732, 1999.

12) 奥村太郎 他: ARMS法によるアポリポ蛋白(a)遺伝子5'発現調節領域のタイピング、第22回血栓止血学会、宇都宮、1999年12月、*日本血栓止血学会誌* 9(4); 251, 1999.

13) 大江麻子 他: プラスミノーゲン異常の分子病態、第22回血栓止血学会、宇都宮、1999年12月、*日本血栓止血学会誌* 9(4); 251, 1999.

G. 知的所有権の取得状況

特に無し

老化に伴う心臓機能低下に関する研究

鄭 忠和

（鹿児島大学医学部第一内科・教授）

本研究では、冠動脈造影上ほぼ正常と思われる冠動脈を有する症例のうち、加齢による影響をみるため、冠危険因子をもたない 26 名を対象とした。冠動脈における血管面積、内腔面積、プラーク面積を計測し、各々の指標と年齢との関連を検討し、また代償性血管拡大反応としての血管リモデリングに対し加齢の及ぼす影響についても検討を加えた。その結果、プラーク面積と血管面積は加齢により増加すること、また代償性血管拡大反応としての血管リモデリングの程度は加齢により減弱することを示唆する結果が得られた。一方、各種薬物を負荷した時の冠動脈径の変化率と冠血流量の増加率を測定することにより、内皮依存性ならびに内皮非依存性の冠動脈拡張機能を検討したところ、冠動脈の抵抗血管レベルでは、内皮依存性および非依存性いずれにおいても拡張機能は加齢とともに減弱することを示唆する結果が得られた。加齢により冠動脈の抵抗血管レベルにおける拡張能と冠血管の代償性血管拡大反応は減弱することが示唆された。

A. 研究目的

加齢により、冠動脈の血管機能の低下、血管構造の再構築により、心血管疾患が招来されるとされている。加齢に伴い、冠動脈の内皮機能が低下していくことが報告されており、このことが冠動脈における冠攣縮、血栓形成、ひいては心筋梗塞の発症につながると考えられる。一方、代償性血管拡大反応はプラーク形成による内腔狭小化に対する内腔保持のための血管リモデリングの一つであるが、この血管反応が内皮機能と密接な関連性があることも報告されている。そこで本研究の目的は、まず、冠危険因子をもたない症例において、冠動脈における内皮依存性および内皮非依存性の血管拡張反応を検討し、加齢がこれらの血管拡張に及ぼす影響を確認し、さらに冠動脈のプラーク形成とリモデリング反応が加齢によりどのように変遷していくかを検討することである。

B. 研究方法

胸痛の精査で冠動脈造影を施行し、造影上、冠動脈病変を認めず、かつ高脂血症、高血圧、糖尿病、喫煙、家族歴の冠危険因子をもたない 26 症例を対象とした。男性：11 名、女性：15 名、平均年齢：50.3±10.9 (27~69) 歳。Ca 拮抗剤、硝酸剤、ACE 阻害剤は、48 時間以上の休薬を行い、冠動脈造影を施行した。そして

以下の手順に従い各指標を求めた。

- 1) コントロール冠動脈造影。
- 2) Doppler flow wire を左前下行枝に挿入し、コントロール冠血流速度波形を記録。
- 3) アデノシン 36 μ g を左前下行枝に選択的に投与し、最大冠血流速度を記録。
- 4) アセチルコリン負荷を左前下行枝に選択的に多段階濃度漸増法 (10-6, 10-5, 10-4 mol/l) により行い、各濃度投与終了時に冠血流速度の記録と冠動脈造影を施行。
- 5) ニトログリセリンを左前下行枝に選択的に投与し、冠血流速度の記録と冠動脈造影を施行。
- 6) 血管内超音波 (IVUS: Intravascular ultrasound) を用いて左前下行枝の血管断面をビデオに記録。
- 7) 各症例毎に 3~4 断面を任意に選択して得られた 97 断面の血管内エコー像を計測。

冠血流量の算出には、平均冠血流速度×血管内腔断面面積×0.5 の計算式を用いた。血管内エコー像の計測にあたっては、内弾性板で囲まれた面積を血管面積とし、血管面積から内腔面積をさしひいた面積をプラーク面積とした。

測定値はすべて平均±標準偏差で表示した。年齢とプラーク面積、血管面積、内腔面積の各関連、プラー

ク面積と血管面積との関連、および年齢と冠血流増加率との関連の評価には回帰分析を用いた。また、若年者 (50 歳未満) と老年者 (50 歳以上) の比較においては unpaired t-test を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

1) プラーク面積 (Y) は加齢とともに増加傾向を示し、年齢 (X) との間に $Y = 0.051 X + 0.11$, $r = 0.28$, $p < 0.01$ の有意な正の相関をみとめた。血管面積 (Y) と年齢 (X) との間においても $Y = 0.07X + 8.02$, $r = 0.21$, $p < 0.05$ の有意な正の相関をみとめたが、内腔面積と年齢との間には関連をみとめなかった。

2) 50 歳未満群 (10 症例、40 断面) と 50 歳以上群 (16 症例、57 断面) にわけて比較検討したところ、プラーク面積は、50 歳以上群が 50 歳未満群に比し、有意 ($p < 0.05$) に大であった ($3.2 \pm 2.5 \text{ mm}^2$ vs. $2.0 \pm 1.5 \text{ mm}^2$)。血管面積は 50 歳以上群が 50 歳未満群に比し大である傾向を示したが、有意差はなかった ($11.7 \pm 3.7 \text{ mm}^2$ vs. $10.6 \pm 4.2 \text{ mm}^2$)。その結果、内腔面積は、両群間で差異をみとめなかった ($8.6 \pm 3.4 \text{ mm}^2$ vs. $8.6 \pm 3.5 \text{ mm}^2$)。

3) 50 歳未満群と 50 歳以上群にわけて血管面積 (Y) とプラーク面積 (X) との関連を評価したところ、50 歳未満群では、 $Y = 1.65X + 7.27$, $r = 0.58$, $p < 0.0001$ 、50 歳以上群では $Y = 0.62X + 9.75$, $r = 0.43$, $p < 0.01$ と両群ともに有意な正の相関をみとめたが、単位面積あたりのプラーク増大に対する血管面積の増大の程度は 50 歳未満群が 50 歳以上群に比し、有意に大であった (1.65 vs. 0.62)。

4) アデノシンに対する血流増加比 (Y) は加齢とともに減少傾向を示し、年齢 (X) との間に $Y = -0.026 X + 4.15$, $r = 0.63$, $p < 0.01$ の有意な負の相関をみとめた。アセチルコリンに対する血流増加率 (Y) も加齢とともに減少傾向を示し、年齢 (X) との間に $Y = -4.2 X + 289.4$, $r = 0.52$, $p < 0.01$ の有意な負の相関をみとめたが、アセチルコリンに対する冠血管径の変化率については、年齢との間に有意の関連をみとめなかった。

D. 考察

本研究においては、冠動脈造影上ほぼ正常とおもわれる症例でかつ高脂血症、高血圧、糖尿病、喫煙、家族歴の冠危険因子と弁膜症、心筋症、左室肥大を有さない症例のみを対象とした。この症例選択において冠動脈の機能および形態を評価することは加齢による冠動脈への特異的影響を評価することを可能にすると考えられる。

加齢と血管機能の関係については従来より加齢が血管の内皮機能を低下させるとする報告があり、本研究の結果も概ねこれに一致する。冠動脈の抵抗血管の内皮機能の指標とされるアセチルコリンに対する冠血流増加率は加齢とともに低下した。しかしながら、冠動脈の心外膜血管の内皮機能の指標とされるアセチルコリンに対する冠動脈血管径の変化率は加齢との関連をみとめなかった。このことは、冠動脈の心外膜血管径の増加率と内皮機能との関連は低濃度のアセチルコリン負荷時にのみ認められるとする報告があり、我々の使用したアセチルコリンの投与量が比較的高濃度であったことに起因する可能性は否定できない。また、加齢によりアセチルコリンあるいはアデノシンに対する血流増加率が低下するのは、加齢とともに収縮期血圧と心拍数が上昇するため安静時の冠血流が増加していることによるとする報告があるが、本研究では、50 歳未満群と 50 歳以上群の間で収縮期血圧、心拍数、安静時冠血流のいずれにおいても有意差はみとめられなかった。よって、アデノシンに対する内皮非依存性の冠血流増加とアセチルコリンに対する内皮依存性の冠血流増加が年齢とともに低下していくことは加齢による特異的な反応を示していると考えられる。

加齢による冠動脈の形態的变化としては、過去に剖検例を用いた研究で、加齢により血管径は増加するが、内腔径は不変とする報告がある。生体で血管内超音波法を用いて検討した本研究の結果はこれに一致する。さらに本研究において、代償性血管拡大反応としての血管リモデリングの程度が 50 歳以上群に比し、50 歳未満群で有意に大であることを示した。この事実に関する報告は今までになく、極めて貴重な新知見であると思われる。加齢とともにプラークは増大していくが、代償性血管リモデリングにより血管径が増大することで内腔径を保持し、血流量の減少を防いでいる。しかしながら、加齢とともに代償性血管リモデリングの程度は減少し、プラークの増大に抗しきれなくなり、内腔径の減少を招く結果となると思われる。

加齢により冠動脈の抵抗血管レベルでの内皮依存性と内皮非依存性の拡張反応は減弱することにより冠血流の減少をきたし、一方で代償性血管リモデリング反応の減弱により内腔の狭小化をきたす。これらのことが加齢にともなう冠動脈疾患の増加と関連している可能性が示唆される。

E. 結論

加齢により冠動脈の抵抗血管レベルの拡張能と代償

性血管拡大反応としての血管リモデリングの程度は減弱する。

F. 研究発表

1. 論文発表

特に無し

2. 学会発表

第 47 回日本心臓病学会 1999 年 9 月、横浜

G. 知的所有権の取得状況

特に無し

老化と肺の退行性変化に関する研究

荏原 順一

（秋田大学医学部臨床検査医学・教授）

ヒト気道上皮細胞株が IGF-1 によって分化増殖し、IGF-1 レセプターを介したシグナルで増殖し得ることを DNA 合成により確認した。またこの系は老化という諸因子や各種薬剤の気道上皮細胞増殖に対する作用などを客観的に評価するのに有用な方法であると考えている。

A. 研究目的

肺の老化加齢による変化は、肺支持組織の弛緩によるいわゆる弛緩肺が特徴と考えられる。肺という臓器における支持組織構成細胞の一つである気道上皮細胞・肺繊維芽細胞の分化増殖が、通常よりも変化をきたしたことがその主因と推測される。肺の気道上皮細胞の遊走や、分化は、Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) に主に反応して維持されるとされている。そこで老化による肺細胞の IGF-1 に対する反応系を研究することは、老化に伴う肺変化、肺の退行性変化を究明することにつながると思われる。以下のような研究を施行する。1) 老化による気道上皮細胞の IGF-1 に対する反応性の変化、2) IGF-1 産生細胞である肺マクロファージの各種刺激による IGF-1 産生への老化の影響、3) 老化による気道上皮細胞・肺繊維芽細胞の IGF-1 受容体に対する変化。1) について低下が見られ、その現象の原因として 2) 3) に変化が見られるとすれば、これらを upregulation する因子の検索、以上を検討することで、老化、加齢による肺の老化を予防することも可能と考えられる。IGF-1 に対する反応系を in vitro で正確に把握する系の確立を目標とし、可能であればその modulation を行う factor を検討しようとした。

B. 研究方法

まずヒト気道上皮細胞が IGF-1 レセプターによって増殖する指標をつかむことを目的とした。気道上皮細胞の増殖反応は、通常の細胞と同様、DNA 合成として 3H-thymidine を検討した。ヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 を 96 穴マイクロプレートで培養し、2 時間あるいは 24 時間培養し、各濃度の IGF-1 と 3H-thymidine を加え、さらに 6 時間あるいは 24 時間培養した。そ

してオートハーベスターで細胞を回収し、DNA 合成の指標として 3H-thymidine の取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。また必要に応じて、気道上皮細胞の反応系である IGF-1 レセプターの発現をそれに対するモノクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリー法にて解析した。

C. 研究結果

細胞を 2 時間培養後、IGF-1 を 24 時間作用させた条件で正確に把握でき、この系で IGF-1 の濃度が 10⁻⁹M 以上で 3H-thymidine の取り込みは増加しており、気道上皮細胞の増殖が促進されていた。また IGF-1 の濃度が 10⁻⁸M 以上では 3H-thymidine の取り込みはプラトーとなった。また、この系に対して炎症性のケモカインである Eotaxin, RANTES は apoptosis を介さない系で抑制的に作用し、炎症細胞である好酸球の顆粒タンパクは IGF-1 レセプター発現を増強することで促進することが観察された。

D. 考察

かかる細胞増殖反応系の検討の結果より、IGF-1 の気道上皮細胞増殖作用は 10⁻⁸M で最大となり、それ以上では一定であった。IGF-1 の気道上皮細胞の増殖が促進されている可能性が示唆された。また IGF-1 における反応系でその modulation を検討するには、10⁻⁹M が適当であることが示唆される。従ってこの系を用いることにより、IGF-1 等の増殖・成長因子に対する老化をはじめ様々の modulation を検討することが可能と考えられる。事実、炎症性ケモカインが、アポトーシスの系を介さず、抑制的に作用していることを現在観察している（論文作成中）。また、炎症性分子によっては IGF-1 レセプターに作用し、最終的な IGF-1 によ

る上皮細胞の増殖にも関与することも考えられた。

E. 結論

この系は IGF-1 の気道上皮細胞増殖作用を客観的に評価するのに有用であり、今後、老化といった諸因子や、各薬剤の気道上皮細胞増殖に対する作用を評価するのに有用と考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ Oyamada H, Kayaba H, Kamada Y, Kuwasaki T, Yamada Y, Kobayashi Y, Cui CH, Honda K, Saito N, Chihara J : An optimal condition of bronchial cell proliferation stimulated by insulin-like growth factor I. Int Arch Allergy Immunol (in press).

2. 学会発表

・ RANTES, Eotaxin はヒト気道上皮細胞の増殖を抑制する-apoptosis 誘導の可能性-. 崔昌浩, 萱場広之, 本田耕平, 斎藤紀先, 山田佳之, 小林佳美, 小山田一, 鎌田由美子, 鍛崎智映, 荏原順一 第48回日本アレルギー学会総会, 1999

・ 気道炎症における気道上皮細胞再生に関する検討と IPD の作用. 小山田一, 萱場広之, 鎌田由美子, 本田耕平, 斎藤紀先, 鍛崎智映, 浦山 修, 荏原順一 第38回日本呼吸器学会総会, 1998

G. 知的所有権の取得状況

特に無し

研究成果の刊行に関する一覧表

平成11年度 研究成果の刊行に関する一覧
長寿科学総合研究事業

- 1) Mitsuhashi, N., Miki, T., Senbongi, H., Yokoi, N., Yano, H., Miyazaki, M., Nakajima, N., Iwanaga, T., Yokoyama, Y., Shibata, T., and **Seino, S.** MTABC3, a novel mitochondrial ABC protein involved in iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* (In press)
- 2) Brown, H., Meister, B., Berggren, P.-O., Rhodes, C. J., **Seino, S.**, and Fried, G. Synaptotagmin isoforms are distinctly compartmentalized in pancreatic endocrine cells. *Diabetes*. (In press)
- 3) **Seino, S.**, Iwanaga, T., Nagashima, K., and Miki, T. Perspective in Diabetes : Diverse roles of K_{ATP} Channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. *Diabetes*. 49:311-318, 2000
- 4) Liu, M., **Seino, S.**, and Kirchgessner, A. L. Identification and characterization of glucoreponsive neurons in the enteric nervous system. *J. Neurosci.* 19:10305-10317, 1999
- 5) Sunaga, Y., Ingaki, N., Gono, T., Yamada, Y., Ishida, H., Seino, Y., and **Seino, S.** Troglitazone but not pioglitazone affects ATP-sensitive K^+ channel activity. *Eur. J. Pharmacol.* 381:71-76, 1999
- 6) Suzuki, M., Fujikura, K., Kotake, K., Inagaki, N., **Seino, S.**, and Takata, K. Immunolocalization of sulfonylurea receptor 1 in rat pancreas. *Diabetologia*. 42:1204-1211, 1999
- 7) Beguin, P., Nagashima, K., Nishimura, M., Gono, T., and **Seino, S.** PKA-mediated phosphorylation of the human K_{ATP} channel : separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J.* 18:4722-4732, 1999
- 8) Kawaki, J., Nagashima, K., Tanaka, J., Miki, T., Miyazaki, M., Gono, T., Mitsuhashi, N., Nakajima, N., Iwanaga, T., Yano, H., and **Seino, S.** Unresponsiveness to glibenclamide during chronic treatment induced by reduction of ATP-sensitive K^+ channel activity. *Diabetes*. 48: 2001-2006, 1999

- 9) Nishimura, M., Miki, T., Yashima, R., Yokoi, N., Sato, Y., and **Seino, S.** Angiopoietin-3, A novel member of the angiopoietin family. *FEBS Lett.* 448:254-256, 1999
- 10) Miki, T., Nagashima, K., and **Seino, S.** The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in pancreatic β -cells. *J. Mol. Endo.* 22:113-123, 1999
- 11) Nishihara, A., Hanai, J., Imamura, T., **Miyazono, K.**, and Kawabata, M. E1A inhibits transforming growth factor- β signaling through binding to Smad proteins. *J. Biol. Chem.* 274(40):28716-28723, 1999
- 12) Nakao, A., Fujii, M., Matsumura, R., Kumano, K., Saito, Y., **Miyazono, K.**, and Iwamoto, I. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 104(1):5-11, 1999
- 13) Fujii, M., Takeda, K., Imamura, T., Aoki, H., Sampath, T. K., Enomoto, S., Kawabata, M., Kato, M., Ichijo, H., **Miyazono, K.** Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblastic and chondroblastic differentiation. *Mol. Biol. Cell.* 10(11):3801-3813, 1999
- 14) Hanai, J., L.F. Chen., Kanno, T., Ohtani-Fujita, N., W.Y. Kim., W.H. Guo., Imamura, T., Ishidou, Y., Fukuchi, M., M-J. Shi., J. Stavnezer., Kawabata, M., **Miyazono, K.**, and Ito, Y. Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads: Synergistic induction of the immunoglobulin germline Ca promoter. *J. Biol. Chem.* 274(44):31577-31582, 1999
- 15) Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J-i., Kusanagi, K., Nemoto, N., **Miyazono, K.**, and Kawabata, M. c-Ski acts as a transcriptional corepressor in TGF- β signaling through interaction with Smads. *J. Biol. Chem.* 274(49):35269-35278, 1999
- 16) Tada, K., Inoue, H., Ebisawa, T., Makuuchi, M., Kawabata, M., Imamura, T., and **Miyazono, K.** Region between α -helices 3 and 4 of the Mad homology 2 domain of Smad4: Functional roles in oligomer formation and transcriptional activation. *Genes Cells.* 4(12):731-741, 1999
- 17) Kusanagi, K., Inoue, H., Ishidou, Y., K. Mishima, H., Kawabata, M., and **Miyazono, K.** Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad binding element. *Mol. Biol. Cell.* 11(2):555-565, 2000

- 18) Ishida,W., Hamamoto,K., Kusanagi,K., Yagi,K., Kawabata,M., Takehara,K.,T.K. Sampath., Kato,M.,and **Miyazono,K.** Smad6 is a Smad1/5-induced Smad inhibitor: Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J.Biol.Chem.* 275(9):6075-6079,2000
- 19) **Miyazono,K.** Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *J.Cell Sci.* 2000 (In press)
- 20) Beppu,H., Kawabata,M., Hamamoto,T., Chytil,A., Minowa,O., Noda,T., and **Miyazono,K.** BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev.Biol.* 2000 (In press)
- 21) J.Pitkänen., Vassilis Doucas, T.Sternsdorf., **Nakajima,T.**, Aratani,S., K.Jensen., H.Will.,Perttu Vähämurto., J.Ollila., V.Mauno.,H.S.Scott.,S.E.Antonarakis., Kudoh,J., Shimizu,N.,K.Krohn.,and P.Peterson. APECED protein AIRE has transcriptional transactivating properties and interacts with common co-activator CBP. *J.Biol.Chem.* (In press)
- 22) Nakazawa,M.,Hasunuma,T.,Ohshima,T.,Kobata,T., Nishioka,K.,and **Nakajima,T.** CBP: a target molecule of HTLV-1 Tax in synoviocyte activation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (In press)
- 23) Miyagishi,M., Ohshima,T., Ishida,J-i., Fujii,R., **Nakajima,T.**,and Fukamizu,A. Cell type-dependent transactivation or repression of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein,POD-1/Capsulin. *Molecular and Cellular Biochem.* (In press)
- 24) Koya,D., J.W.Dennis., C.E.Warren., Y-W.Lin., F.J.Schoen., Nishio,Y., **Nakajima,T.**, Takahara,N.,M.Lipes.,M.R.Montminy.,and G.L.King. Overexpression of Core 2 N-acetylglycosaminyltransferase Enhanced Cytokine Actions and Induced Hypertrophic Myocardium in Transgenic Mice. *FASEB.J.* 13:2329-2337,1999
- 25) Kawahara,K-I., watanabe,S., Ohshima,T., Soejima,Y., Oishi,T., Aratani,S., Amano,T., Fujii,R., Hagiwara,M., Fukamizu,A.,and **Nakajima,T.** Hypernuclear acetylation in atherosclerotic lesions and activated vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 266:417-424,1999
- 26) KP.Sarker., Abeyama,K., Nishi,J-I., Nakata,M., Tokioka,T., **Nakajima,T.**, Kitajima,I., andMaruyama,I. Inhibition of Thrombin-induced Neural Cell Death by

Recombinant Thrombomodulin and E5510, a Synthetic Thrombin Receptor Signaling Inhibitor. *Thrombosis and Haemostasis*. 82:1071-1077,1999

27) Miyagishi, M., **Nakajima, T.**, and Fukamizu, A. Molecular characterization of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/capsulin.

International Journal of Molecular Medicine. 5:27-31,1999

28) Ohshima, T., **Nakajima, T.**, Aratani, S., Ohishi, T., Fukamizu, A., and Yagami, K-I. CRM1 mediates nuclear export of parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 264:155-160,1999

29) K.P.Sarker., Uchimura, T., **Nakajima, T.**, Sorimachi, M., Kitajima, I., and Maruyama, I. Inhibition of Nitric oxide(NO)-induced Neuronal Cells Death by Epinephrine. *Neurosci. Res. Commun.* 26:157-162,1999

30) K.P.Sarker., Nakata, M., **Nakajima, T.**, Kitajima, I., and Maruyama, I. Increased Production of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by Angiotensin II in Neuro-2a cells. *Neurosci. Res. Commun.* 26:157-162,1999

31) Shin, H., Kitajima, I., **Nakajima, T.**, Shao, Q., Tokioka, T., Takasaki, I., Hanyu, N., Kubo, T., and Maruyama, I. Thrombin receptor mediated signals induce expressions of interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor via NF- κ B activation in synovial fibroblasts. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 58:55-60,1999

32) Ishida, J., Asada, S., Daitoku, H., Fujiwara, K., Kon, Y., Murakami, K., **Nakajima, T.**, Kasuya, Y., and Fukamizu, A. Expression and characterization of mouse angiotensin II type Ia receptor tagging hemagglutinin epitope in cultured cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 3:263-270,1999

33) Uakji, F., Kitajima, I., Kubo, T., Shimizu, C., **Nakajima, T.**, and Maruyama, I. Serum samples of patients with rheumatoid arthritis contain a specific autoantibody to "denatured" aldolase A in the osteoblast-like cell line, MG-63. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 58:169-174,1999

34) Kida, M., Souri, M., Yamamoto, M., Saito, H., and **Ichinose, A.** Transcriptional Regulation of Cell Type-Specific Expression of the TATA-Less A Subunit Gene for Human Coagulation Factor XIII. *J. Biol. Chem.* 274(10):6138-6147,1999

- 35) Ooe, A., Kida, M., Yamazaki, T., Sang-Chul Park, Hamaguchi, H., Antonio Girolami, **Ichinose, A.** Common Mutation of Plasminogen Detected in Three Asian Populations by an Amplification Refractory Mutation System and Rapid Automated Capillary Electrophoresis. *Thromb. Haemost.* 82(4):1342-1346, 1999
- 36) Oyamada, H., Kayaba, H., Kamada, Y., Kuwasaki, T., Yamada, Y., Kobayashi, Y., Cui CH, Honda, K., Saito, N., **Chihara, J.** An optimal condition of bronchial cell proliferation stimulated by insulin-like growth factor I. *Int Arch Allergy Immunol.* (in press)
- 37) Nakata, M., Yata, J., Soejima, N. **Maruyama, J.** Leptin potentiates platelet function via leptin receptor. *Diabetes.* 48:426-429, 1999
- 38) Kishida, A., Nakashima, M., Sakamoto, N., Serizawa, T., **Maruyama, J.**, Akashi, M. Study on Complex Formation Between Recombinant Human Thrombomodulin Fragment and Thrombin Using Surface Plasmon Resonance. *American Journal of Hematology* 63:136-140, 2000
- 39) Sarker, P.K., Abeyama, K., Nishi, J., Nakata, M., Tokioka, T., Nakajima, T., Kitajima, I., **Maruyama, J.** Inhibition of Thrombin-induced Neuronal Cell Death by Recombinant Thrombomodulin and E5510, a Synthetic Thrombin Receptor Signaling Inhibitor. *Thromb Haemost* 82:1071-7, 1999
- 40) Nakata, M., Uto, N., **Maruyama, J.**, Yada, T. Nitric Oxide Induces Apoptosis via Ca^{+2} - Dependent Processes in the Pancreatic β -cell Line MIN6. *Cell STRUCTURE AND FUNCTION* 24:451-455, 1999

事務局：鹿児島大学医学部臨床検査医学講座

〒890-8520

鹿児島市桜ヶ丘8丁目35-1

TEL：099-275-5437

FAX：099-275-2629