

- apoptotic action of hepatocyte growth factor through mitogen-activated protein kinase on human aortic endothelial cells. *J. Hypertension* 18, 1411-20.
15. T. Nakamura, S. Mizuno, K. Matsumoto, Y. Sawa, H. Matsuda, and T. Nakamura (2000) Myocardial protection from infarction by endogenous and exogenous hepatocyte growth factor. *J. Clin. Invest.* 106, 1511-9.
 16. K. Kuba, K. Matsumoto, K. Date, H. Shimura, M. Tanaka and T. Nakamura (2000) HGF/NK4, a four-kringle fragment of hepatocyte growth factor, is an angiogenesis inhibitor that suppresses tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Res.* 60, 6737-43.
 17. K. Kuba, K. Matsumoto, K. Ohnishi, T. Shiratsuchi, M. Tanaka and T. Nakamura (2000) Kringle 1-4 of hepatocyte growth factor inhibits proliferation and migration of human microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 846-52.
 18. W. Sun, H. Funakoshi, K. Matsumoto, T. Nakamura. (2000) A sensitive quantification method for evaluating the level of hepatocyte growth factor and c-met/HGF receptor mRNAs in the nervous system using competitive RT-PCR. *Brain. Res. Brain. Res. Protoc.* 5,190-7.
 19. G. Shiota, T. Kunisada, K. Oyama, A. Udagawa, T. Nomi, K. Tanaka, A. Tsutsumi, M. Isono, T. Nakamura, H. Hamada, T. Sakatani, S. Sell, K. Sato, H. Ito, H. Kawasaki. (2000) In vivo transfer of hepatocyte growth factor gene accelerates proliferation of hepatic oval cells in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *FEBS Lett.* 470, 325-30.
 20. T. Takahashi, U. Koshimizu, H. Abe, T. Obinata and T. Nakamura (2001) Functional involvement of LIM-kinase in *Xenopus* oocyte maturation. *Develop. Biol.* 229, 554-67.
 21. T. Sumi, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Specific activation of LIM-kinase 2 via threonine-505 phosphorylation by ROCK under the control of Rho. *J. Biol. Chem.* 276, 670-6.
 22. K. Matsumoto and T. Nakamura (2000) Hepatocyte growth factor and met in tumor invasion-metastasis: Mechanisms related to cancer prevention. In "Cancer metastasis, molecular and cellular biology and clinical aspects" (eds by WG Jiang and RE Mancel), kluwer Academic Publishers. pp.143-93.
 23. K. Matsumoto, S. Mizuno, and T. Nakamura (2000) Hepatocyte growth factor in renal regeneration, renal disease, and potential therapeutics. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertension* 9, 395-402.
 24. F. Tamura, M. Masuhara, I. Sakaida, K. Okita, T. Fukumoto and T. Nakamura (2000) FK506 promotes liver regeneration by suppressing natural killer cell activity. *J. Gastroenterol. and Hepatol.*, in press.
 25. A. Uchiyama, T. Morisaki, M. Katoh, M. Kojima, Y. Matsunari, K. Beppu, A. Nakatsuka, M. Okido, H. Ichimiya, M. Nakagaki, H. Shimura, K. Matsumoto, T. Nakamura and M. Tanaka (2000) Significance of locally-secreted hepatocyte growth factor after thoracic cancer surgery as a stimulator for postoperative cancer invasion. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, in press.
 26. H. Azuma, S. Takahara, K. Matsumoto, N. Ichimaru, J. D. Wang, T. Moriyama, A. Wega, Y. Otsuki, M. Kitamura, A. Okuyama, Y. Katsuoka, A. Chandraker, M. H. Sayegh and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor prevents development of chronic allograft nephropathy in an experimental rat transplant model. *J. Am. Soc. Nephrol.*, in press.
 27. S. Mizuno, K. Matsumoto, J. Wen and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Intern.*, in press.
 28. T. Nakamura, S. Aoki, K. Kitajima, T. Takahashi, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Molecular cloning and characterization of Kremen, a novel kringle-containing transmembrane protein. *Biochem. Biophys. Acta*, in press.
 29. N. Maehara, K. Matsumoto, K. Kuba, K. Mizunoto, M. Tanaka and T. Nakamura (2001) NK4, a four-kringle antagonist of HGF, inhibits spreading and invasion of human pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer*, in press.
 30. N. Tsuzuki, T. Miyazawa, K. Matsumoto, T. Nakamura, K. Shima and H. Chigasaki (2000) Hepatocyte growth factor reduces the infarct volume after transient focal cerebral ischemia. *Neurol. Res.*, in press.
 31. K. Matsumoto and T. Nakamura (2001) Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Intern.*, in press.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

炎症と線維化のメカニズムと防止に関する研究
—線維性病変における TGF- β の役割と抗 TGF- β 療法の有用性

分担研究者 上野 光 産業医科大学教授

研究要旨

炎症の遷延化や炎症に引き続く臓器線維化に重要と考えられる分子群およびそれらの機能を抑制する分子群を組換えアデノウイルスを用いて各疾患の動物モデル生体内に遺伝子導入し、臓器線維症の分子病態の解明と新しい治療法（遺伝子治療を含む）の開発をめざしている。とくに TGF- β に着目して研究を進めてきた。変異型 TGF- β 受容体の肝臓内遺伝子発現（線維化部分に存在する伊東細胞に発現）で TGF- β の作用を特異的に抑制すると、すでに確立した肝線維症の進展をも抑制できることが判明した。さらに、可溶型 TGF- β 受容体（受容体のうち細胞外領域のみ。分泌され血流に乗り遠隔地に到達し TGF- β を吸着する）遺伝子を標的臓器とは異なる部位（筋肉内）に導入することで、線維化をほぼ完全に抑制できることも実証された。可溶型受容体を用いれば遺伝子導入が難しい臓器・組織における病態解析および治療が可能となり、臨床応用への実用性も高い。

【研究目的】

臓器線維症は進行性の臓器機能低下を招来し患者の生活の質を著しく損ねるため臨床的には悪性疾患と言えるが、さらに悪性腫瘍の合併も多い。腎硬化症末期では透析が必要となり医療費の高騰も危惧されている。従って病態の分子レベルでの解明と有効な治療法の開発は重要な課題である。本研究では臓器線維化に重要と考えられる分子群やそれらの機能を抑制する分子群（Dominant-negative 受容体など）を、ウイルスベクターを用いて各疾患の動物モデル生体内に導入し、線維症発症・進展の分子機構の解析と有効な治療法（遺伝子治療を含む）の開発をめざす。とくに、細胞外マトリクスの産生・分解を

制御している最重要分子である TGF- β に着目し、変異型 TGF- β 受容体の導入によりその作用を特異的に抑制し、線維症の発症・進展における TGF- β の役割の解明と新規治療法の開発をめざす。

【研究方法】

TGF- β 受容体の細胞内キナーゼ部分を欠失した変異型受容体（Dominant-negative 受容体として野生型受容体機能を特異的に抑制）および細胞外領域のみの TGF- β 受容体（TGF- β を吸着して抑制）を作成しアデノウイルスベクターに組み込んだ（それぞれ AdT β -TR および AdT β -ExR）。臓器線維症のうちとくに肝臓線維症（Dimethylnitrosamine; DMN の腹腔内投与）および角膜線維症

(硝酸銀による焼灼)を用いて解析を進めた。それぞれ組織学的、生化学的、分子生物学的解析を加えた。

(倫理面への配慮)

本研究計画は九州大学および産業医科大学での組換え DNA 審査委員会の承認を受けている。動物実験は国内法に定められた方法に準拠し動物実験委員会の承認を受けている。なおアデノウイルスベクターは米国では臨床治験の承認を受けている。

【結果】

A. 肝線維化進展阻止実験

1. DMN を週 3 回 3 週間ラット腹腔内に投与して肝線維化を確立した後、1 度だけ AdT β -TR, AdLacZ (β -galactosidase を発現するコントロールウイルス)、あるいは生食水を門脈より注入した。そして DMN 処理をさらに 3 週間継続した (合計 6 週間)。導入遺伝子は線維化部分に存在する活性化伊東細胞で主に発現した。

2. 対照群 (AdLacZ 群および生食水群) では 6 週間の DMN 処理で線維化がさらに進展したが、3 週間目に AdT β -TR を投与した群では線維化の程度は (組織像に加え、肝臓組織中のヒドロキシプロリン量で定量評価) DMN 処理を 3 週間のみ行った肝臓と同程度の線維化に留まった。すなわち線維化の進展がほぼ完全に抑制された。

3. 対照群では肝不全で全例死亡したのに対し、AdT β -TR 群では全例が生存した。血中のヒアルロン酸や肝細胞由来酵素 (AST, ALT など) も対照群に比べ低値に保たれた。

4. 電顕で観察すると、対象群では Disse 腔に細胞外マトリクスが蓄積していたが、AdT β -TR 群では同部の蓄積が軽度であった。

さらに核の大きい再生幼若肝細胞が多数認められ、TGF- β の抑制により肝再生が促進されることが示された。

5. AdT β -TR 群では細胞内にレチノイド滴を多数含有するいわゆる分化型伊東細胞が多数出現した。対照群ではこうした分化型伊東細胞は一切観察できなかった。

B. 可溶性 TGF- β 受容体による肝線維化阻止

1. AdT β -ExR を筋肉内に投与すると血液中に可溶性受容体蛋白が 3 週間以上検出された。

2. DMN 処理を 3 週間行って肝線維化を定量評価すると、AdT β -ExR 群では線維化はほぼ完全に抑制された。

C. 可溶性 TGF- β 受容体による角膜線維化および血管新生の阻止

硝酸銀で角膜を損傷すると、細胞外マトリクスの蓄積、細胞浸潤そして血管新生が惹起されたが、AdT β -ExR を筋肉内に導入すると、そのいずれもが抑制された。血管新生まで抑制される機序として、TGF- β の作用が抑制されるためマクロファージの浸潤が抑制されるが、このマクロファージが VEGF を産生して血管新生を惹起するものと考えられる。事実、浸潤マクロファージ周辺で VEGF の産生が免疫染色で確認された。

【結論】

1) TGF- β の抑制により正常肝における線維化の発症ばかりでなく、すでに確立した線維化の進展をも抑制できることが明確に示された。抗 TGF- β 療法は臨床所見が明らかになった線維化進行例においても有効で

あることが予想される結果である。

2) 肝線維化モデルにおいて、TGF- β の抑制で肝細胞の再生が促進することが判明した。

3) 線維化責任細胞(伊東細胞)の分化型への回帰が観察された(ただし、活性化伊東細胞の形質がが分化型に戻ったのか、活性化伊東細胞のアポトーシスによる排除と分化型伊東細胞の再生促進の結果なのかは不明である)

3) 可溶型 TGF- β 受容体の有用性が複数の線維化モデルで確認された。臨床応用に対してより実用性の高い戦略の有効性が実証されたと言える。

【研究発表(論文発表)】

1. Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of Transforming Growth Factor- β prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 32: 247-255, 2000.
2. Sakamoto T, Ueno H, Sonoda KH, Hisatomi T, Shimizu K, Ohashi H, Inomata H. Blockade of TGF- β by in vivo gene transfer of a soluble TGF- β type II receptor in the muscle inhibits corneal opacification, edema and angiogenesis. *Gene Ther.* 7: 1915-1924, 2000.
3. Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Astuchi N, Takeshita A, Shimizu S, Ohashi H. A soluble TGF- β receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther.* 11:

33-42, 2000.

4. Tremain R, Marko M, Kinnimulki V, Ueno H, Bottinger E, Glick A. Defects in TGF- β signaling overcome senescence of mouse keratinocytes expressing v-Ha-ras. *Oncogene* 19: 1698-1709, 2000.

5. 上野 光

臓器線維症における TGF- β の役割と抗 TGF- β 療法の展望
医学のあゆみ(医師薬出版)194 巻 5 号
408-413, 2000

6. 中村 徹, Zhe Qi, 上野 光

肝線維化の分子機構 ;
肝線維化発症・進展における TGF- β の役割 : 抗 TGF- β 療法の有用性
最新医学(最新医学社) 55 巻 1796-1802,
2000

7. 上野 光

肝線維化と病態 ; 変異型 TGF- β 受容体導入による肝線維症の遺伝子治療
BIO Clinica (北隆館) 印刷中
8. 上野 光
疾病克服への細胞増殖因子研究—基礎・診断・治療 ; 変異型(可溶型)増殖因子受容体を利用した病態解析と疾患治療
Molecular Medicine (中山書店) 印刷中

PPAR γ の消化管傷害での役割の検討と、その治療応用に関する研究

分担研究者 門脇 孝 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻糖尿病代謝内科助教授

研究要旨:通常 PPAR γ 発現のない胃でも虚血再灌流で発現が誘導され、傷害抑制に関与した。DSS 誘発腸炎でも PPAR γ リガンドが傷害、特に Th1 型の炎症を抑制した。その際、前投与は有効だが後投与は無効だった。消化管上皮で PPAR γ は内因性の傷害抑制経路として働き、同リガンドは腸炎の緩解導入より緩解維持に有用と考えられた。

A. 研究目的

感染性腸炎以外の腸炎には原因療法、特効薬がないが、糖尿病治療薬として開発された PPAR γ リガンドに腸炎治療薬としての可能性がある。昨年本剤の虚血再灌流腸傷害での防止効果を解明したのを受け、PPAR γ 発現のない胃の虚血再灌流での同分子の役割を解明し、またヒト腸炎のモデルの解析により治療法の確立を目指した。

B. 研究方法

マウスの虚血再灌流胃傷害、dextran sulfate sodium (DSS)誘発腸炎で各々 PPAR γ ヘテロノックアウト、3 種の PPAR γ リガンド投与の傷害への影響をみた。

(倫理面への配慮)

動物実験では動物愛護の観点から苦痛のないよう全身麻酔下に行った。人は対象としていない。

C. 研究結果

胃では通常 PPAR γ 発現はないが、虚血再灌流後は上皮の細胞質に発現した。虚血再灌流後は上皮に iNOS が発現し、apoptosis も誘導された。PPAR γ リガンドを前投与すると傷害は用量依存的に抑制され、PPAR γ は上皮の核に移行した。iNOS 発現や apoptosis は同剤投与で阻害された。DSS 腸炎ではマウスは腸炎で 10-14 日で死ぬが、DSS 投与前からの同剤投与は用量依存的に傷害を抑制した。リガンド治療群で腸の IL-4 発現増加、IFN γ , TNF α 発現抑制をみた。どちらの系でも PPAR γ 欠損マウスは傷害が強く、またリガンドの後治療では傷害抑制はなかった。

D. 考察

上皮への侵襲で細胞質に誘導される PPAR γ がリガンドにより核移行して炎症関連分子の誘導を抑制した。同剤による apoptosis 抑制も傷害抑制に働く。

E. 結論

PPAR γ リガンドの消化管傷害、特に Th1 型炎症の治療薬としての可能性が示された。Crohn 病は Th1 優位の炎症とされ、同病での有効性を示唆した。前投与が有効で、腸炎の緩解維持での有用性が考えられた。発現が減ると傷害抑制が弱いため、腸の PPAR γ 発現量が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ Nakajima et al. Endogenous PPAR γ mediates anti-inflammatory activity in a model of ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology* 2001;120:460-9.

2. 学会発表

・ Novel anti-inflammatory pathway mediated by PPAR γ in ischemia-reperfusion injury. Nakajima et al. (*Digestive Disease Week* 2000)

・ 炎症性腸疾患における PPAR γ の役割とそれに基いた治療方法の指針 (シンポジウム). 中島他. (第 43 回日本消化器病学会大会)

・ 急性胃粘膜病変における PPAR γ の役割と治療への応用可能性の検討. 中島他. (同上)

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書
BMPによる心筋細胞分化誘導の機序に関する研究
分担研究者 小室一成 千葉大学医学部第三内科 助教授

研究要旨

心筋細胞の分化に TGF β スーパーファミリーの中の BMP が重要であるが、BMP はリン酸化酵素である TAK と転写因子である Smad を介し ATF-2 を活性化することにより、心筋分化を促進している。

A. 研究目的

心不全の新しい治療法として心筋の新生・再生治療が注目されているが、非心筋細胞を心筋細胞に変換させるといった心筋細胞分化誘導法にしる、心筋前駆細胞を単離して *in vitro* で分化させ、移植するといった心筋細胞移植療法にしる、心筋細胞分化に関する深い理解が必要である。前回 TGF β スーパーファミリーの 1 つである BMP の作用を阻害する分子である noggin を発現させた細胞株(P19CL6noggin)を用い、BMP 下流のキナーゼである TAK と転写因子である Smad がともに重要であることを示した。今回は、その 2 つの系路がどのように心筋分化に関与しているかについて検討した。

B. 研究方法

P19CL6 細胞は 1%DMSO 下で培養すると 80% 上の細胞が自律拍動する心筋細胞に分化する。BMP の阻害分子である noggin を発現させた細胞株 CL6noggin は同様の処理でも心筋に分化しない。そこで P19CL6 と CL6noggin 細胞を用い TAK と Smad の共通下流分子の候補である ATF-2 の役割について検討した。具体的には P19CL6 細胞における ATF-2 の発現をノーザン解析し、次に ATF-2 の心筋特異的遺伝子の転写における作用を知るために、 β MHC プロモーターをもつルシフェラーゼレポーター遺伝子と ATF-2 を P19CL6 細胞に導入した。また ATF-2 の dominant negative mutant を作成し、P19CL6 細胞に導入し、心筋細胞分化に及ぼす作用について検討した。

C. 研究結果

ATF-2 は P19CL6 細胞において心筋分化誘導をかけるとその発現レベルが上昇した。また β MHC プロモーター活性は ATF-2 により上昇し、ATF-2 と Smad1/4、ATF-2 と TAK の強制発現によりさらに上昇した。また逆に ATF-2 dominant negative mutant では心筋特異的遺伝子の転写は抑制された。ATF-2 の dominant negative mutant を強制発現させると、P19CL6 の心筋細胞分化も抑制された。

D. 考察

BMP は心筋細胞分化に重要であるが、その役割はリン酸化酵素である TAK1 と転写因子である Smad といった 2 つの異なる分子によって果たされている。今年度は、その異なるタイプの 2 つの分子がどのようにして心筋分化を促進するかについて、共通の標的分子の候補である ATF-2 について解析した。ATF-2 は Smad との会合により、また TAK によるリン酸化により活性

が上昇すると報告されているが、確かに β MHC プロモーターを用いた解析により、ATF-2 と TAK1、ATF-2 と Smad を共に発現させることにより、より強い転写因子が得られた。今回の結果は、TAK と Smad が ATF-2 を活性化することにより心筋細胞分化を促進することを示唆している。

E. 結論

転写因子である ATF-2 が TAK と Smad の共通標的分子として心筋細胞分化に関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, Kudoh S, Oka Takimoto E, Hayashi D, Hosoda T, Habara-Ohkubo A, Nakaoka T, Fujita T, Yazaki Y, Komuro I. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocytes differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA4. *Mol Cell Biol* 19(10):7096-7105, 1999.

1. 学会発表

Monzen K, Komuro I, et al. Smads, TAK1 and Their Common Target ATF-2 Play a Critical Role in Cardiomyocyte Differentiation. *Circulation* 102:II108, 2000.

Toko H, Komuro I, et al. Csx/Nks-2.5 Plays a Critical Role in Protecting Cardiac Myocytes in the Adult Heart. *Circulation* 102:II110, 2000.

Hiroi Y, Komuro, et al. Tbx5 Associates with CSX/NKX 2.5 and Synergistically Activates Atrial Natriuretic Peptide (ANP) Promoter. *Circulation* 102:II220, 2000.

Oka T, Komuro, et al. Krab-Zinc Finger Protein, Zim 1, Associates with CSX and Regulates Cardiac-Specific Gene Expressions. *Circulation* 102:II235, 2000.

Zhu W, Komuro I, et al. Functional Analyses of CSX /Nks-2.5 Mutations That Cause Human Congenital Heart Disease. *Circulation* 102:II359, 2000.

3. 知的所有権の取得状況

該当なし

動脈硬化形成における炎症の関与の解明と治療への応用に関する研究

（分担）研究者 森下 竜一 大阪大学医学部遺伝子治療学

炎症性サイトカイン及び接着因子発現に必須な転写因子NFκBに対するデコイの導入は、ブタ冠動脈バルーン障害モデルで障害後再狭窄抑制をもたらし、動脈硬化の新しい治療戦略として重要であることが明らかになった。

A、研究目的

動脈硬化形成における炎症の関与を検討し、新規治療戦略構築のために、本年度はバルーン障害によりブタ冠動脈バルーン障害後再狭窄モデルを作成し、NFκBデコイの血管内投与を行い、新生内膜形成について検討した。

B、研究方法

血管拡張術後再狭窄モデルはブタ冠動脈のバルーン障害により作成し、NFκBデコイの血管内投与をハイドロゲル法により行い、新生内膜形成の抑制効果を調べた。

C、研究結果

ブタ冠動脈へのFITCラベルしたNFκBデコイの導入により、血管中膜・内膜へデコイが導入できることが明らかになった。また、NFκBデコイの投与は、スクランブルデコイ投与群に比較して障害後4週間における新生内膜の形成を有意に抑制していた。ラットモデルでメカニズムを検討した結果、1) NFκBデコイ投与により接着因子ICAM及びVCAMの発現低下、2) 血管内へのマクロファージ及びTリンパ球の浸潤抑制、3) アポトーシス誘導を起こすがん抑制遺伝子p53の平滑筋細胞における活性化、4) 平滑筋細胞におけるアポトーシス細胞の有意な増加、が確認された。

D、考察

デコイによるNFκB活性化抑制は、接着因子発現亢進による血球系成分の浸潤抑制とがん抑制遺伝子p53の発現増加による平滑筋細胞の増殖抑制をもたらし、血管拡張術後再狭窄の予防法として重要であることが明らかになった。本研究で示された再狭

窄の遺伝子治療は、安全性が高く臨床応用に有用であると考えられる。現在、NFκBデコイによるヒト血管拡張術後再狭窄抑制の臨床研究を申請しており、炎症反応抑制による再狭窄治療は新しい治療戦略として有用であると考えられる。

E、結論

NFκBデコイ導入はブタ冠動脈バルーン障害モデルで障害後再狭窄抑制をもたらし、動脈硬化の新しい治療戦略として重要であることが明らかになった。

F、研究発表

1、論文発表

1) Matsushita H, Morishita R, Nata T, Aoki M, Nakagami H, Taniyama Y, Yamamoto K, Higaki J, Kaneda Y, Ogihara T. Hypoxia induced endothelial apoptosis through NFκB-mediated bcl-2 suppression: in vivo evidence of importance of NFκB in endothelial cell regulation. *Circulation Research* 2000;86:974-981

2) Aoki M, Nata T, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Nakabayashi M, Ogihara T, Kaneda Y. Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NFκB: anti-apoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. *Hypertension* (in press)

G、知的所有権の取得情況

1. 特許取得

森下竜一他。NFκBに起因する疾患の治療及び予防剤（特許平7-285504：WO96/35430）

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

糸球体再生を目指した糸球体上皮細胞の分化機構の検討

分担研究者 長田道夫 筑波大学臨床医学系病理部

研究要旨

糸球体上皮細胞が再生不能な終末分化細胞であるために糸球体は再生しない。これまでの研究から cyclin kinase inhibitor(CKIS)、ことに p27、p57 が本細胞の細胞周期停止に関与することが明らかになった。本年度は、糸球体硬化の初期病変においてこれらの因子が down-regulate していることを見いだした。さらに、分化誘導に重要とされる転写因子 PAX-2, WT-1 の発現調節における CKIS の役割を調べるために p27, p57, p27/p57 ノックアウトマウスを用いて糸球体の分化と転写因子の発現について検討した。その結果、器官培養系において p27/p57 は糸球体上皮細胞の転写因子発現に関与する可能性が示された。

A. 研究目的

糸球体が再生しないことが慢性腎不全の原因である。糸球体再生を阻む主因は糸球体を構成する細胞のうち糸球体機能を司る糸球体上皮細胞が再生不能な細胞と運命づけられていることにある。硬化に陥った糸球体では糸球体上皮細胞は脱落・消失し、代わってポーマン囊上皮細胞の形質を有する細胞が硬化巣を被覆する。本研究は、糸球体の再生の可能性を探るために糸球体上皮細胞を生体内で再生可能な細胞に誘導することを目指している。これまでの検討から細胞周期制御因子と糸球体上皮細胞の分化の間に関連がある可能性が示されている。そこで、これらの因子の deregulation がどのように糸球体障害に関与するのかについて検討した。

B. 研究方法

1) ヒト腎疾患での硬化糸球体における細胞周期因子の発現と細胞形質の関連を免疫組織化学的に検討し、本細胞の脱分化と糸球体障害について明らかにする。

2) 細胞周期因子, p27, p57, p27/p57 の欠損したマウスを作製し、糸球体上皮細胞の分化について検討する。

倫理面への配慮：ヒト腎組織は生検、剖検で得られたものである。剖検の承諾は無論得られているが、ともに研究に使用するというインフォームドコンセントは過去の症例であるために得ていない。ノックアウトマウスはエーテル麻酔により安楽死させた後、開腹して採取した。

C. 研究結果

1) 巣状糸球体硬化症において、糸球体上皮細胞から p27, p57 が消退すること、同時に例外なく cytokeratin、転写因子 PAX-2 を発現することを見いだした。以上から、CKIS の down-regulation が細胞障害、脱分化を促し糸球体のリモデリングを阻んでいると考えられる。

2) p27/p57 double KO mice は胎生期に死亡することがわかったので、胎児から後腎組織を取り出して in vitro において分化を

誘導した。その結果、DKO mice においてはPAX-2の発現の減弱が抑制された。

during mouse development. *Anat Embryol* 2001; 203: 77-87

D. 考案

糸球体上皮細胞の分化、脱分化には細胞周期因子、とくに cyclin kinase inhibitor が関与していると考えられる。糸球体上皮細胞の再分化誘導に向けては、この細胞周期制御因子の分子機構を解明し、硬化糸球体に分化誘導因子を挿入することによって糸球体の構築再生を誘導することが、ひとつの方法であると考えられる。今後 DNA chip や subtraction hybridization 法などにより、発生期の progenitor からの分化誘導に関わる遺伝子の探索が重要と考えられる。

E. 結論

糸球体上皮細胞の再生には細胞周期因子とそれに伴う PAX-2 などの転写因子の調節機構が重要と考えられる。

F. 研究発表

1) 論文発表

1) Nagata M, Horita S, Shibata S, Shu Y, Hattori M, Ito K, Watanabe T: Phenotypic characteristics and cyclin dependent kinase inhibitor suppression in hyperplastic epithelial pathology in idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Lab Invest* 2000, 80:869-880

2) Barisoni L, Mokrzycki M, Sablay L, Nagata M, Yamase H, Mudel P: Podocyte cell cycle regulation and proliferation in collapsing glomerulopathies. *Kidney Int* 2000, 58:137-143

3) Nagata M: Pathogenesis of glomerulosclerosis; role of epithelial interactions. *Clin Exp Nephrol* 2000 4: 173-181

4) Nagahama H, Hatakeyama S, Nakayama K, Nagata M, Tomita K, Nakayama K: Spatial and temporal expression patterns of the cyclin dependent kinase inhibitors p27kip1 and p57kip2

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

遺伝性脊髄小脳変性症における経頭蓋磁気刺激の治療効果の検討

分担研究者 津田 丈秀

東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野

研究要旨：遺伝性脊髄小脳変性症における経頭蓋磁気刺激の治療効果を病型別に検討した。刺激療法後、遺伝性皮質小脳萎縮症では体幹失調を中心とする症状改善を認め、小脳・脳幹における有意な血流増加を認めた。また、両部位では脳糖代謝亢進も認められた。しかし、遺伝性オリブ橋小脳萎縮症及び比較対象としての孤発性オリブ橋小脳萎縮症では症状ならびに脳血流の有意な改善を認めなかった。今回の結果より、経頭蓋磁気刺激は遺伝性皮質小脳萎縮症の新たな治療法となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

経頭蓋磁気刺激の治療的応用はパーキンソン病やうつ病で試みられ、最近その有効性についての報告がなされている。しかし、遺伝性脊髄小脳変性症での試みはいまだなく治療効果については不明である。そこで、今回我々は遺伝性脊髄小脳変性症の経頭蓋磁気刺激の治療効果について臨床症状と脳血流および脳糖代謝変化を併せて病型別に検討した。

B. 研究方法

対象は遺伝性皮質小脳萎縮症 6 例（SCA type6：5 例、SCA type8：1 例）、遺伝性オリブ橋小脳萎縮症 7 例（SCA type1：2 例、SCA type2：1 例、SCA type3/MJD：4 例）。効果比較のため孤発性オリブ橋小脳萎縮症 6 例も対象とした。マグスティム 200 磁気刺激装置を用い、各例に対し単発刺激 30 回/day を連日 3 週間施行した。また、実刺激との効果比較のため擬似刺激も同様に連日 3 週間施行した。治療前後の血流変化は ^{99m}Tc -ethyl cysteinat dimer をトレーサーとした SPECT を用いパトラックプロット法により定量した。一方、脳糖代謝変化は ^{18}F -FDG PET (model SET-2400W scanner) を用いて定量した。また、臨床症状は“つぎ足歩行”を中心に評価をおこなった。尚、本療法は東北大学倫理委員会の承認を得、本人同意のうえ施行した。また、対象者の病型を同

定するにあたりインフォームドコンセントのうえ遺伝子解析を施行した。

C. 研究結果

刺激療法後、遺伝性皮質小脳萎縮症 6 例において、体幹失調を中心とする症状の有意な改善を認めた。また、小脳及び脳幹部で有意な血流増加を認め、 ^{18}F -FDG の取り込み増加も認めた。しかし、一方では遺伝性オリブ橋小脳萎縮症と孤発性オリブ橋小脳萎縮症の各群においては臨床症状や血流の有意な改善を認めなかった。また、擬似刺激後では、いずれの群でも症状の有意な改善を認めなかった。

D, E. 考察・結論

以上の結果より、経頭蓋磁気刺激療法は遺伝性皮質小脳萎縮症の新たな治療法となる可能性が示唆された。同時に小脳・脳幹の脳血流増加と脳糖代謝亢進は臨床症状改善と密接に関連することが示唆され、遺伝性皮質小脳萎縮症の病態機序究明のうえでも重要な所見と思われた。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Abe, T., Tsuda, T., Yoshida, M., Wada, Y., Kano, T., Itoyama, Y. and Tamai, M.: Macular degeneration associated with aberrant expansion of trinucleotide repeat of the SCA7 gene in 2 Japanese families. *Archives of Ophthalmology* (2000) 118: 1415- 1421
- 2) Onodera, H., Okabe, S., Kikuchi, Y., Tsuda, T. and Itoyama, Y.: Impaired chemosensitivity and perception of dyspnoea in Parkinson's disease. *The Lancet* (2000) 356: 739-740
- 3) Onodera, H., Okabe, S., Kikuchi, Y., Tsuda, T. and Itoyama, Y.: Parkinson's disease and impaired chemosensitivity to hypoxia. *The Lancet* (2000) 356: 2099
- 4) Onodera, Y., Aoki, M., Tsuda, T., Kato, H., Nagata, T., Kameya, T., Abe, K. and Itoyama, Y.: High prevalence of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) in an isolated region of Japan. *Journal of the Neurological Sciences* (2000) 178: 153-158
- 5) Sato, N., Imaizumi, K., Manabe, T., Taniguchi, M., Hitomi, J., Katayama, T., Yoneda, T., Morihara, T., Yasuda, Y., Takagi, T., Kudo, T., Tsuda, T., Itoyama, Y., Makifuchi, T., Fraser, P.E., St. George-Hyslop, P.H. and Tohyama, M.: Increased production of β -amyloid and vulnerability to ER stress by an aberrant spliced form of presenilin-2. *The Journal of Biological Chemistry* (2000) Oct 12 (on-line version)
- 6) 小野寺宏、津田丈秀、岡部慎一、菊池喜博：パーキンソン病の呼吸異常の原因について—どうやって呼吸不全と突然死を防ぐか—。 *難病と在宅ケア* (2001) 6: 43-47
- 7) 小野寺好明、津田丈秀、糸山泰人：東北地方における遺伝性脊髄小脳変性症の特異性。 *神経内科* (2000) 53: 99-103
- 8) 津田丈秀、糸山泰人：脊髄小脳変性症の臨床遺伝学—臨床と分子遺伝学の概説。 *Molecular Medicine* (2000) 臨時増刊号ゲノム時代の脳神経医学 37: 16-22
- 9) 津田丈秀、小野寺好明、糸山泰人：Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7)。 *脳と神経* (2001) 1: 25-33