

図14-2 癌の告知の時期(自分)

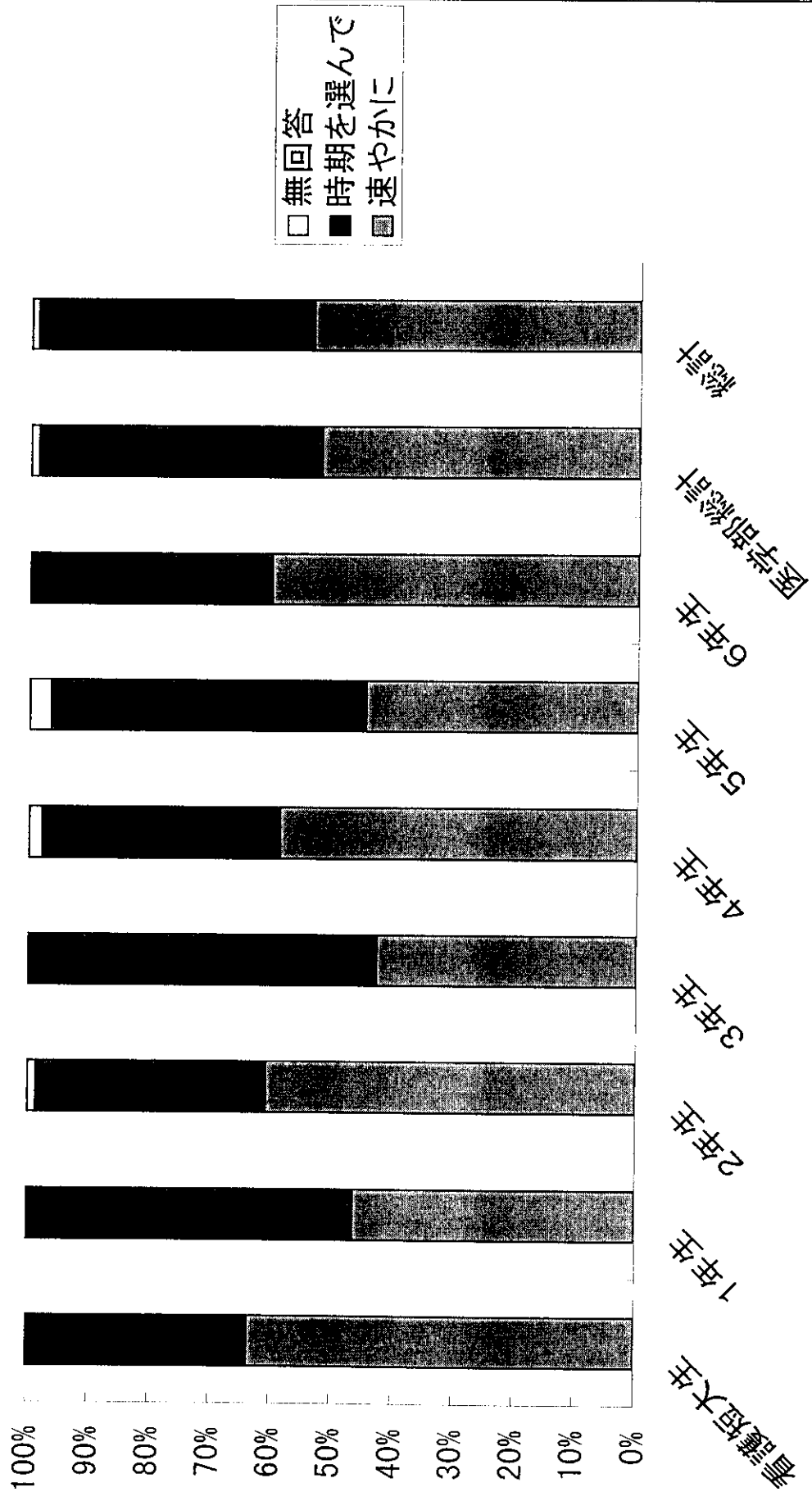


図14-3 癌の告知(家族)

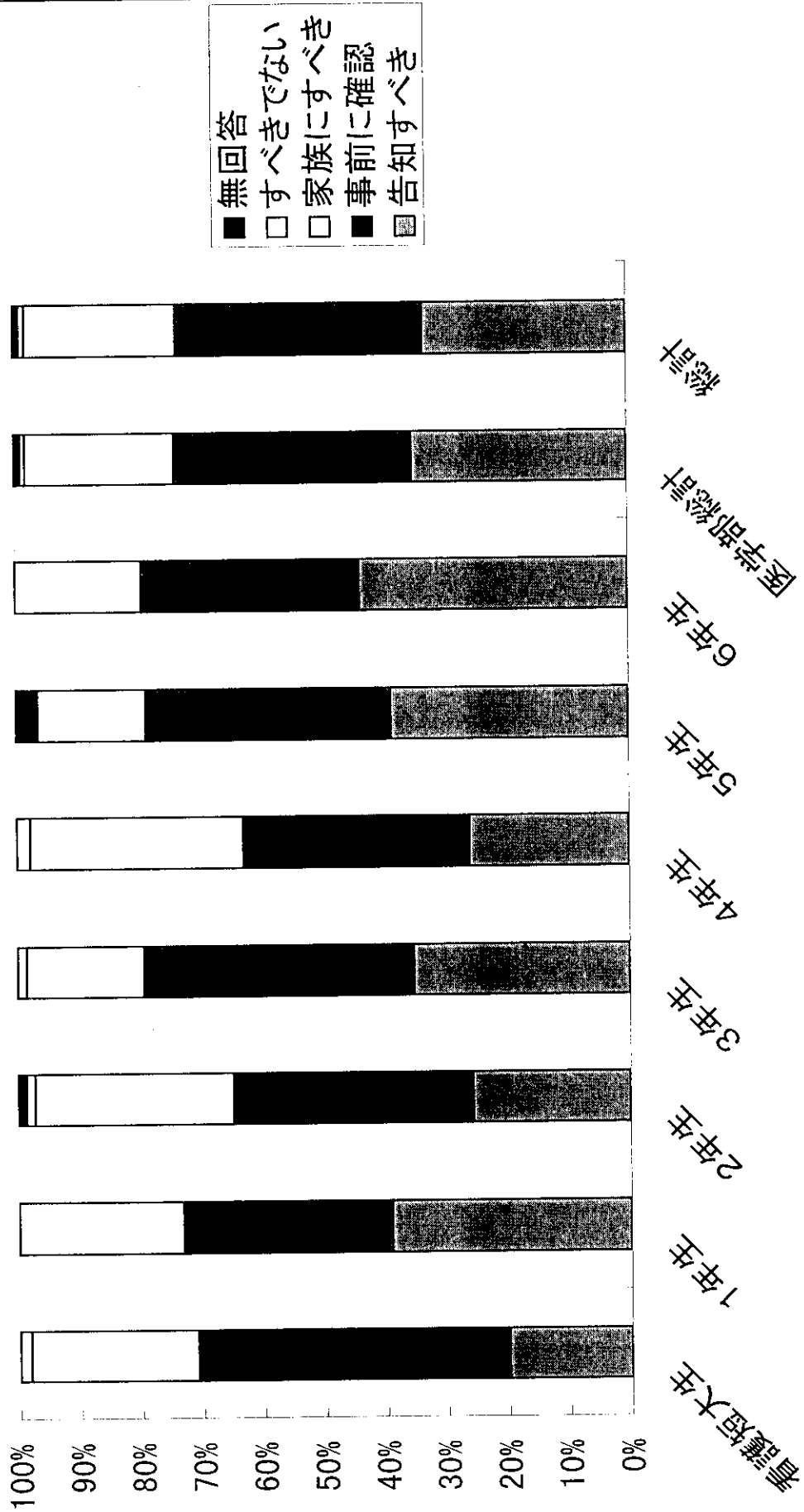


図14-4 癌の告知時期(家族)

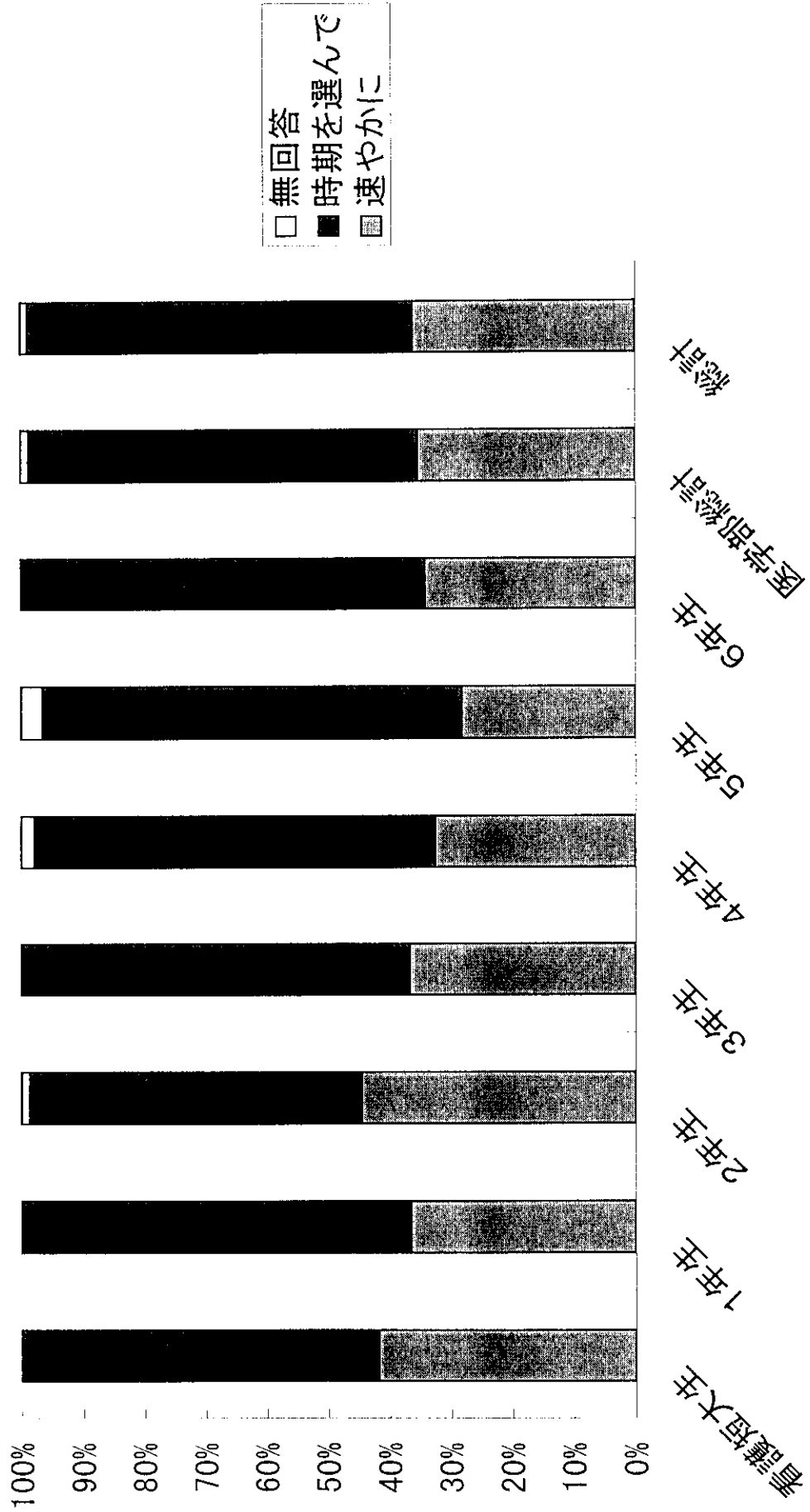


図15-1 精神病の告知

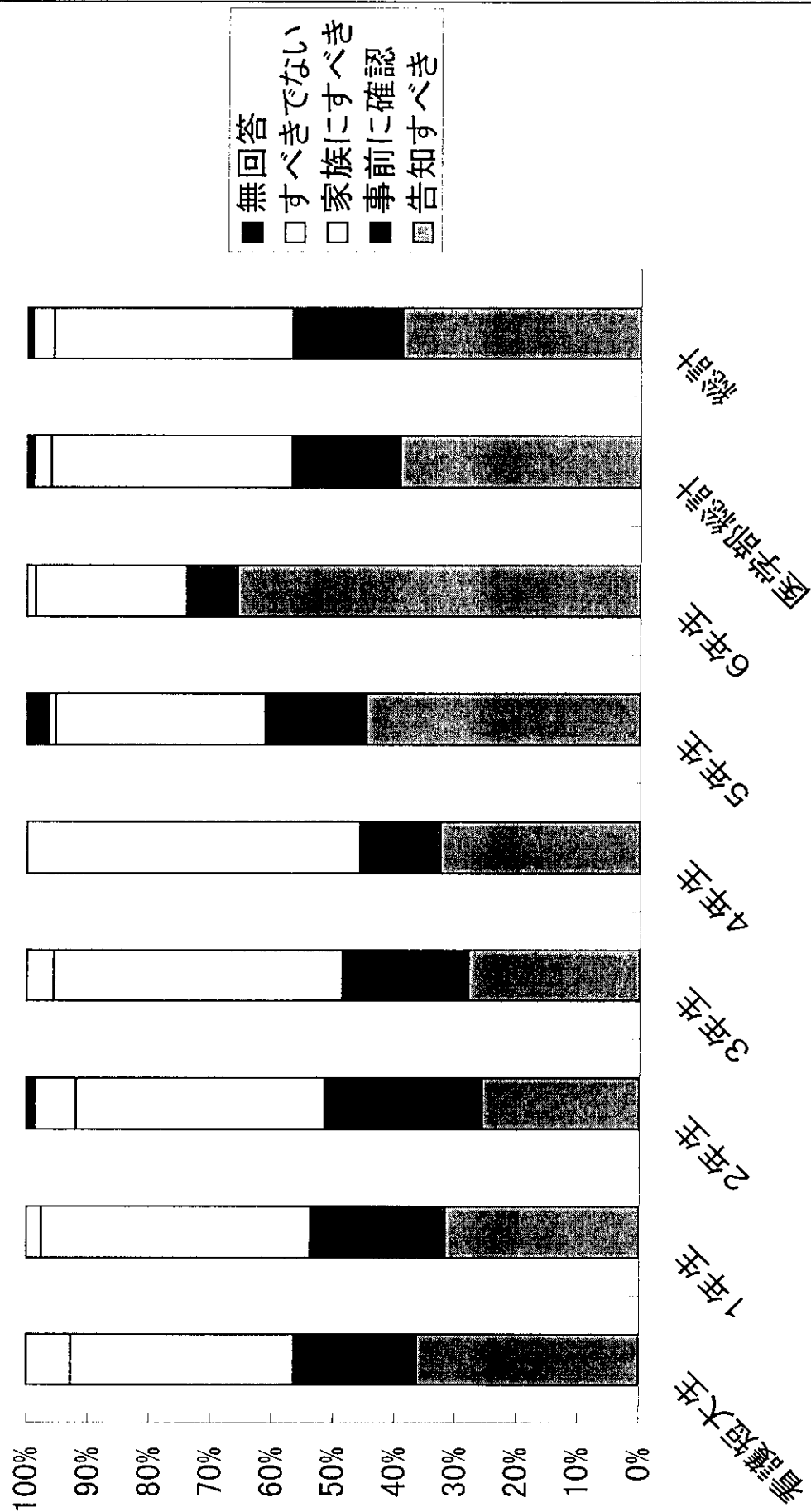
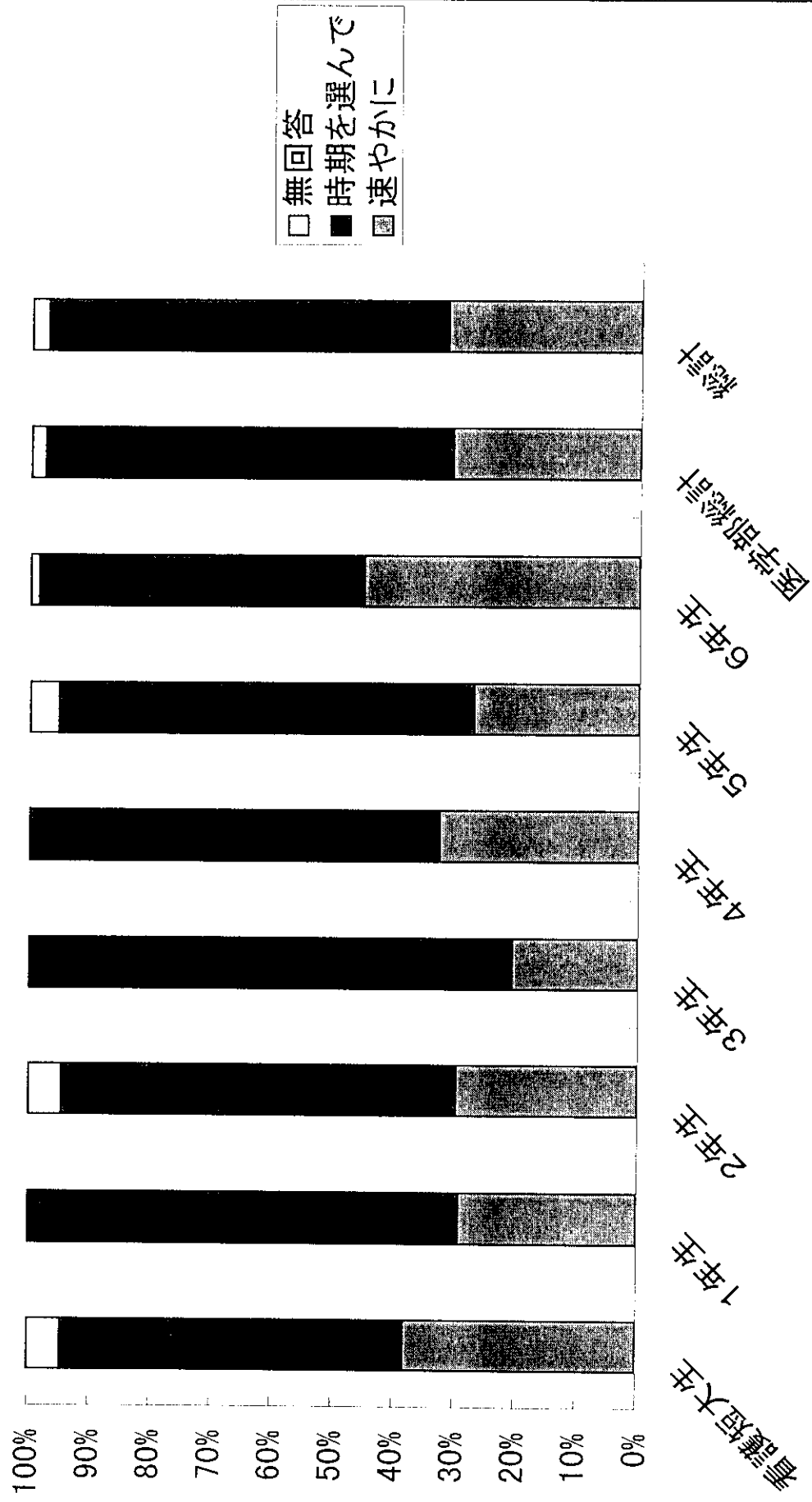


図15-2 精神病の告知時期



11) 難病の研究内容がホームページで閲覧できることを知っていますか？

1. 知っている
 利用したことがある
 利用したことはない
2. 知らない

12) 病気の情報をどこから得られればよいとお考えですか？

1. 担当医
2. 保健所（保健福祉センター）
3. 役所
4. マスコミ
5. 患者会
6. その他（ ）

13) 難病の情報についてどのようなことを知りたいですか？ 幾つでも選んで下さい？

1. 病気そのもの
2. 治療法
3. 生活改善方法
4. 精神的援助方法
5. 関係機関
6. 専門の病院（あるいは専門の医師）

今後の難病研究や事業に対して期待することをお聞きします。

14) 一番の目標は難病の病因解明と根治療法（根本的に治す治療）と思われます。これと平行して行う研究として望ましいのは何でしょうか？ 幾つ選んでもかまいません。選んだものの優先順位を（ ）の中に書いて下さい。

- （ ）精神面援助研究
（ ）生活改善方策研究
（ ）その他（ ）

15) 患者さん自身が精神面援助で望まれることは何だと思えますか？

1. 特にない
2. 自分の状況を知ってもらいたい（愚痴を聞いて欲しい）
3. ストレス発散の場所が欲しい
4. 専門のカウンセリングを受けたい
5. その他（ ）

難病にはこれといった治療法がなく、病気の症状のため日常生活に苦痛を伴う状態が長く続きます。難病の病名告知についての考えをお教えてください。

あなたが難病の場合

16) 特定疾患（難病）の告知について。

1. 本人に告知するべきである。
2. 診断確定前に告知の是非を本人に確かめる。
3. 家族には告知すべきだが、本人への告知は場合による。
4. 本人には告知すべきでない。

17) 告知の時期はいつ頃が適当と思われますか。

1. 診断がついたら可及的すみやかに。
2. 適当な時期を選んで告知する。

18) 告知の内容として必要と思われることは？ 幾つ選んでもかまいません。選んだものの優先順位を（ ）の中に書いて下さい。

- () 病名
- () 予後の見通し
- () 余命の予測
- () 治療法（のないこと）
- () 介護の見通し
- () その他（ ）

家族が難病の場合

19) 特定疾患（難病）の告知について。

1. 本人に告知するべきである。
2. 診断確定前に告知の是非を本人に確かめる。
3. 家族には告知すべきだが、本人への告知は場合による。
4. 本人には告知すべきでない。

20) 告知の時期はいつ頃が適当と思われますか。

1. 診断がついたら可及的すみやかに。
2. 適当な時期を選んで告知する。

21) 告知の内容として必要と思われることは？ 幾つ選んでもかまいません。選んだものの優先順位を（ ）の中に書いて下さい。

- () 病名
- () 予後の見通し
- () 余命の予測
- () 治療法（のないこと）
- () 介護の見通し
- () その他（ ）

難病と同様に悪性腫瘍（がん）の告知もその是非に議論があります。悪性腫瘍（がん）の病名告知についての考えをお教えてください。

あなたが悪性腫瘍（がん）の場合

22) 悪性腫瘍（がん）の告知について。

1. 本人に告知するべきである。
2. 診断確定前に告知の是非を本人に確かめる。
3. 家族には告知すべきだが、本人への告知は場合による。
4. 本人には告知すべきでない。

23) 告知の時期はいつ頃が適当と思われますか。

1. 診断がついたら可及的すみやかに。
2. 適当な時期を選んで告知する。

家族が悪性腫瘍の場合

24) 悪性腫瘍（がん）の告知について。

1. 本人に告知するべきである。
2. 診断確定前に告知の是非を本人に確かめる。
3. 家族には告知すべきだが、本人への告知は場合による。
4. 本人には告知すべきでない。

25) 告知の時期はいつ頃が適当と思われますか。

1. 診断がついたら可及的すみやかに。
2. 適当な時期を選んで告知する。

精神病もこれといった治療法がなく、長い療養生活を強いられることがあります。精神病の病名告知についての考えをお教えてください。

本人が精神病の場合

26) 精神病の告知について。

1. 本人に告知するべきである。
2. 診断確定前に告知の是非を本人に確かめる。
3. 家族には告知すべきだが、本人への告知は場合による。
4. 本人には告知すべきでない。

27) 告知の時期はいつ頃が適当と思われますか。

1. 診断がついたら可及的すみやかに。
2. 適当な時期を選んで告知する。

ご協力ありがとうございました。
告知についてご意見がありましたらお書き下さい。

胚性幹細胞の神経難病への治療応用に関する研究

分担研究者 関野 宏明（聖マリアンナ医科大学脳神経外科学）

研究要旨 マウス胚性幹細胞を選択的に神経系細胞に分化誘導する条件を検討した結果、低濃度 FCS、gelatin、レチノイン酸を添加した条件が最も効率が悪かった。またラットを用いた神経幹細胞の同種間移植では移植細胞が宿主脳に良好に生着することが明らかになった。

A.研究の目的

胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) は身体各臓器に分化しうる多能性の幹細胞である。受精後 3 日目の胚盤胞の内細胞塊に由来して、多分化能を有し、*in vitro* でも神経系細胞、血液系細胞、骨格筋細胞、心筋細胞など種々の細胞系列に分化しうること、自己再生能がありその増殖能がほぼ無限であること、遺伝子導入が他の細胞と比べ容易であることなどの特性から移植治療の新しい臓器供給源として期待されている。本研究ではマウス ES 細胞から選択的に神経系細胞へ分化誘導する培養系を確立し、将来的に神経系の修復による神経難病への治療応用を目指し、その基礎的検討を行った。またラット神経幹細胞を同種間移植することで生着についての組織学的観察を行い、臨床応用の問題点について検討した。

B.研究方法

1) マウス ES 細胞の維持培養: ES 細胞株 E14.1 株をマイトマイシン C 処理したマウス胎児線維芽細胞を支持細胞とし、leukemia inhibitory factor(LIF) 存在下で、継代培養した。2) 神経系細胞へ分化誘導: 維持培養 ES 細胞より LIF を除去し、シャーレに付着する支持細胞を除去しながら、種々の濃度のレチノイン酸(Retinoic acid : RA)存在下で浮遊培養を行い、経時的に神経系に特異的なマーカー (nestin: 神経幹細胞もしくは前駆細胞、MAP2 (microtubule-associated protein 2): 神経前駆細胞、

GFAP (glial fibrillary acid protein): グリア前駆細胞細胞、GalC (galactocerebrosidase): オリゴデンドロサイト前駆細胞、NFM (neurofilament middle chain): 成熟神経細胞、NCAM180 (neural cell adhesion molecule 180kD): 成熟神経系細胞接着因子) を免疫染色法、RT-PCR 法により観察した。さらに、培養液の FCS の濃度、gelatin 添加による三次元培養系の神経系分化に及ぼす影響を検討した。3) ラットの神経幹細胞を胎生 16 日のラット胎仔の終脳より分離培養を行った。培養液は DMEM/F12 培地にインスリン 25 μ g、アボトランスフェリン 100 μ g、プロゲステロン 20nM、プトレッシン 100 μ M、亜セレン酸 Na30nM、b-FGF20nM を添加したものを使用し浮遊培養を行った。移植前 4 日間は培養液に BrdU(プロモデオキシウリジン)を 5 μ M 連日添加し細胞に標識した。成熟ラットの脳に生理食塩水を 5 μ l 注入し組織を一部破壊することで非特異的疾患のモデルとし、病変作成後 7 日目にマイクロシリンジを用いて病変作成部近傍に細胞懸濁液 (10⁴個/ μ l) を 5 μ l 注入した。さらに 7 日後にラットを麻酔死させた後に脳を取り出し固定、染色を行った。

C.研究結果

1) 神経系細胞への分化誘導: ES 細胞は LIF 除去により神経幹細胞のマーカーである nestin の mRNA の発現が僅かではあるが RT PCR 法で検出され、免疫染色法でも nestin 陽性細胞が散在性に確認され

た。浮遊培養条件では ES 細胞はどの方向に分化を誘導しても embryoid body(EB)を形成し、その中で成熟組織に分化していく。RA 添加により神経系細胞への分化を誘導すると内部に集塊状に nestin 陽性となる EB が出現した。続いて、MAP2、GFAP の mRNA の発現が RT-PCR 法により確認され、これらの発現は分化誘導後 12 日目で最強となった。本研究で検討したいずれの培養条件でもほぼ同様の所見が確認されたが、もっとも効率よく神経系細胞が誘導されたのは 1%FCS+1 μ M RA+3% gelatin の培養条件を用いた場合であった。2) ラット損傷脳に BrdU をマーカーとした細胞を移植した。移植細胞は損傷脳の周囲に散在しており周辺の脳組織と良好に生着し、拒絶反応を思わせる様な炎症性細胞の著明な浸潤は見られなかった。

D. 考察

神経系細胞の分化誘導に関して、本研究で低濃度の FCS に RA、gelatin を添加した培養条件がもっとも効率的であることが明らかになった。また、ラットを用いた同種間移植の実験では神経幹細胞移植が宿主脳に良好に生着することが確認された。神経系細胞の移植が現在でもなお治療法の確立していない変性疾患を初めとした神経難病に対する根本的治療となる可能性は高い。今後は選択的に分化誘導した神経系細胞を神経系変性疾患のモデルに移植し、組織学的、電気生理的、さらにその行動から ES 細胞由来の移植療法の有用性を評価する。

E. 健康危機情報

特記すべきことなし。

F. 研究発表

1.大塩恒太郎、酒井晃司、林龍男、関野宏明、大湊政之、大和田滋：300MHz in vivo ESR を用いた実験的外傷性脳損傷におけるニトロキシラジカル減衰速度の検討、磁気共鳴と医学、2000、11：55～

58

2.卯津羅雅彦、間淑郎、田中克之、山口由太郎、関野宏明、湯浅英樹、明石勝也：高血圧性脳内血腫急性期の血腫増大予測に対する造影および follow up CT の有用性、日本救急医学会雑誌、2000、11 (7)：

333～337

3.桜井孝、林龍男、安部重蔵、安達茂樹、関野宏明：高血圧性脳内血腫に対する定量的血腫除去手術の有用性 ～定量化した脳血流量、麻痺の経時的変化の検討から～、脳神経外科ジャーナル、2000、9(10)：

665～671

4.坂本辰夫、干川芳弘、林龍男、田口芳雄、関野宏明：器質化あるいは石灰化慢性硬膜下血腫に対する内膜温存手術、脳神経外科ジャーナル、2000、9 (8)：541～546

5. K. Ohshio, K. Sakai, T. Hayashi, H. Sekino, M. Ominato, S. Owada : Analysis of free radical reaction in experimental brain injury using 300 MHz in vivo ESR spectroscopy, Neurotrauma Research, 1999, 11 : 39～42

6.K. Sakai, T. Hayashi, H. Sekino, K. Ohshio : Morphological changes of cerebral cortical blood vessels after controlled cortical impact injury in rats, Neurotrauma Research, 1999, 11 : 69～72

G. 知的所有権の取得状況

なし

特定疾患治療に対する新しいアプローチ

分担研究者 永渕裕子 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター

研究要旨 ほとんどの特定疾患は細胞内シグナル伝達の異常を伴い、その結果、Th1/Th2 バランスが崩れ、病態を発現する。我々は先に Tec ファミリーに属するチロシンキナーゼである Txk が Th1 特異的転写因子であることを見だし報告した。Txk の遺伝子治療による Th1/Th2 の相互転換をはかる目的で今年度はまず特定疾患の中でもベーチェット病や全身性エリテマトーデスにおける Txk の発現およびその役割を検討した。対照疾患として Th2 疾患であるアトピー性皮膚炎や気管支喘息などを用いた。Th1 疾患のリンパ球で Txk の発現増加をみとめ、Th2 疾患では Txk の発現が低下していた。Txk は特定疾患の治療のターゲットとなることが示唆された。また、特定疾患対策事業に導入される再生医学関連の基礎的検討を行い、胚性幹細胞を体外で培養して造血幹細胞を樹立する基礎技術を確立した。特定疾患により機能低下した組織の修復をめざしたい。

胞をマイトゲン刺激すると、Txk の発現が細胞質から核内

研究協力者

宮城司 聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学

A.研究目的

特定疾患は原因不明で治療方法も確立されていないため、特定疾患におけるサイエンス、アート、ヒューマニティという立場から原因究明はもとより、治療に直結する成果が期待されることが多い。特定疾患の多くは免疫異常が関与することが報告されており、その免疫異常には T 細胞の関与が示唆されている。T 細胞はその産生するサイトカイン産生パターンによりインターフェロン γ (IFN γ)を産生する Th1 細胞

と IL-4 や IL-5 を産生する Th2 細胞に分類される。特定疾患においてこの Th1/Th2 の不均衡が病態形成に関与していることが報告され、この不均衡を是正することが疾患の治療につながると考えられている。我々は先に Tec ファミリーの一つである Txk が Th1 細胞のサイトカイン産生を制御する転写因子であることを報告した (Kashiwakura, et al. J Exp Med190(8):1147-1154,1999)。Txk は IFN γ を産生するヒト T 細胞クローン Th1,Th0 に発現しており、IFN γ を産生しない Th2 細胞には発現していない。また Jurkat 細胞に Txk を遺伝子導入すると IFN γ 産生が亢進する。ヒト末梢血 T 細

へ移行していくのが観察でき、ルシフェラーゼ活性により Txk が IFN γ のプロモーター領域に特異的に作用すること、ゲルシフトアッセイによりこの Txk と IFN γ プロモーター領域の特異的オリゴヌクレオチドが特異的に結合していることを明らかにした。

Txk の遺伝子治療による Th1/Th2 の相互転換をはかる目的で今年度はまず特定疾患における Txk の発現とその役割を検討した。

さらに、これからは病気を薬剤や外科的治療によって病態の改善を目指すだけでなく、再生医学をとりいれて自己修復能力を用いた治療を目指し、病気を癒す必要がある。最終的には発病そのものを防止することに力を注がなければならない。これら自己修復能力を用いた治療法、発病の防止に成功すれば、将来特定疾患に苦しむ人が減少するだけでなく、医療費を大幅に節減することも可能になる。胚性幹(ES)細胞の分化能は造血系細胞、血管内皮細胞、心筋細胞等の中胚葉系、神経細胞といった外胚葉系、インスリン産生細胞のような内

胚葉系への分化といった多岐に渡っている。本研究では特定疾患対策事業への再生医学の導入の基礎的検討を行うことを目的に胚性幹細胞からの造血幹細胞の誘導を試みた。

B. 研究方法

I. 特定疾患における T_{xk} の発現とサイトカイン産生性について

特定疾患患者及び正常者へバリン加末梢血よりフィコールハイパーク比重遠心法により、リンパ球を分離した。さらに羊赤血球とのロゼット形成法により、T細胞と非T細胞に分離した。末梢血T細胞の一部はMACS (magnetic cell sorting) により negative selection で分画し、CD4 およびCD8 陽性T細胞を回収した (純度99%以上)。

BD患者末梢血リンパ球からのサイトカイン産生はELISA法で測定した。一部の実験では末梢血リンパ球からのIFN γ のmRNAの発現をRT-PCR法で検討した。

ベーチェット病(BD)患者結節性紅斑部位の生検皮膚組織は聖マリアンナ医科大学皮膚科学溝口先生より、对照疾患として用いたアトピー性皮膚炎(AD)皮膚組織は広島大学皮膚科学山本先生より供与された。BDおよびSLE患者末梢血T細胞でのT_{xk}の発現はウエスタンブロット法で検討した。BD患者皮膚組織におけるサイトカインおよびT_{xk}の発現は皮膚生検組織より凍結切片を作成し、免疫組織化学染色で検討した。

II. マウス胚性幹(ES)細胞からの造血幹細胞の誘導実験

ES細胞株はE14.1でケルン大学のKlaus Rajewsky先生から分与された。ES細胞はマイトマイシン処理したマウス不活化線維芽細胞をフィーダー細胞とし、LIF (Leukemia inhibitory factor)存在下に継代培養した。造血系細胞への誘導は、未分化なES細胞をゼラチンコートディッシュ上で6日間培養した。培養後、CD34、CD45等の細胞表面抗原は蛍光標識抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーで解析した。E-カドヘリンの発現はウエスタンブロット法で検討した。RT-PCR法でFLK1の発現を検討した。

造血系細胞への分化を判定するマーカーとして以下のマーカーを用いて、造血系細胞の出現・動態を検討した。

E-カドヘリンは非中胚葉系細胞に発現する接着分子である。

FLK(fetal liver kinase)1は血管内皮増殖因子、VEGFのreceptorであり、造血と血管内皮、両方の系に分化する細胞に発現しているといわれている。CD31は血管内皮細胞に発

現する。CD34は造血幹細胞のマーカー、CD45は白血球系細胞の表面マーカーである。

C. 研究結果

I. 特定疾患における T_{xk} の発現とサイトカイン産生性について

1) BD患者末梢血リンパ球培養上清中のサイトカイン産生

非刺激状態でBD患者末梢血リンパ球の培養上清のサイトカイン産生を測定した。BD患者末梢血リンパ球においては正常者と比べ、非刺激で、IFN γ の産生亢進を認めた。またIFN γ の産生を誘導することが知られるIL-12の産生もBD患者で亢進していた。一方、IL-4産生は低下していた。

BD患者でのIFN γ およびIL-12は採血時に口腔内アフタを有した症例、血沈亢進例、眼発作時など活動期に産生亢進している傾向が認められた。

2) 眼発作時と寛解期で経時的にBD患者リンパ球のサイトカイン産生を検討した。眼発作時にはIFN γ およびIL-12つまりTh1サイトカインの亢進を認め、IL-4産生つまりTh2サイトカインは低下していた。寛解期にはIFN γ およびIL-12つまりTh1サイトカイン産生は低下し、相対的に、IL-4産生つまりTh2サイトカインは亢進していた。活動期BD患者ではTh1サイトカイン優位であると考えられた。

3) BD患者末梢血T細胞をCD4陽性細胞とCD8陽性細胞に分画し、IFN γ mRNAの発現をRT-PCR法にて検討した。

正常者T細胞ではIFN γ mRNA発現は全く認めず、BD患者では一部はCD4、CD8いずれの細胞でもIFN γ mRNAの発現を認めたが、CD4陽性細胞のみでIFN γ mRNA発現を認める症例もあった。

4) BD患者末梢血T細胞でのT_{xk}の過剰発現

ウエスタンブロット法を用いて検討した結果、正常者末梢血T細胞に比べて、BD患者末梢血T細胞におけるT_{xk}の発現は亢進していた。

5) そこで、次にBD皮膚病変部におけるT_{xk}の発現を検討した。

免疫組織化学染色法でBD結節性紅斑部の皮膚生検組織においてリンパ球浸潤部位に一致してT_{xk}の発現を認めた。AD患者皮膚組織ではリンパ球浸潤を認めるが、T_{xk}の発現は認めなかった。

6) BD患者皮膚組織におけるTh1型サイトカインの産生につきBD患者皮膚組織で発現を認めたT_{xk}がIFN γ 産生

に参与するかを検討するために、BD 患者皮膚組織におけるサイトカイン産生を免疫組織化学染色法で検討した。

BD 患者皮膚組織浸潤細胞から IFN γ の産生を認め、IL-4 産生は認めなかった。一方、AD 患者皮膚組織では IL-4 産生を認め、IFN γ 産生は認めなかった。

7) IL-12, IL-18 による正常者 CD4 陽性 T 細胞の T α k の発現増強

BD 患者皮膚組織における T α k の発現を制御するサイトカインはないかを検討するため、まず正常者 CD4 陽性 T 細胞に各種サイトカインを添加し、T α k の発現に対する影響を検討した。

a) Th1 サイトカインの産生を促進するサイトカインである IL-12 と IL-18 を正常者末梢血 CD4 陽性 T 細胞に添加し、T α k の発現をウエスタンブロット法で検討した結果、IL-12, IL-18 添加により CD4 陽性 T 細胞の T α k の発現は亢進した。

b) 末梢血 CD4 陽性 T 細胞に IL-12, IL-4 を添加し、T α k の発現を免疫染色法で検討した結果、IL-12 添加で CD4 陽性 T 細胞の T α k の発現は亢進し、IL-4 の添加により T α k の発現は減弱した。

以上の結果から T α k は Th1 指向性のサイトカインによりその発現が増強することが明らかになった。

8) BD 患者皮膚組織における IL-12, IL-18 の産生

次いで、BD 患者皮膚組織における IL-12, IL-18 産生を免疫組織化学染色法で検討した結果、BD 患者皮膚組織において IL-12, IL-18 の産生を認めた。一方、AD 患者皮膚組織では IL-12, IL-18 産生共に認めなかった。

9) T α k の発現制御による IFN γ 産生の抑制

最後に T α k の発現を制御することが IFN γ 産生の抑制につながるかを検討する目的で以下の実験を行った。

a) 正常者末梢血 T 細胞をマイトゲン刺激し、T α k のセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加し、サイトカイン産生を ELISA 法で検討した。T α k アンチセンスは IFN γ 産生を抑制したが、IL-4, IL-2 産生には影響しなかった。また T α k センスオリゴはいずれのサイトカイン産生にも影響しなかった。

b) 抗原特異的ヒト T 細胞クローン Th1, Th0 を抗原刺激し、T α k のセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加し、サイトカイン産生を ELISA 法で検討した。

T α k アンチセンスは Th1 および Th0 細胞からの IFN γ 産生

を抑制したが、IL-4, IL-2 産生には影響しなかった。また T α k センスオリゴはいずれのサイトカイン産生にも影響しなかった。

II. マウス ES 細胞からの造血幹細胞の誘導実験

ES 細胞から造血幹細胞への分化を誘導するため、未分化な ES 細胞をゼラチンコートディッシュ上で 6 日間培養し、各種抗体を用いて、造血系細胞の出現・動態を検討した。

1) E-カドヘリンの発現について

非中胚葉系細胞に発現する接着分子である E-カドヘリンの発現をウエスタンブロット法で検討した。

positive control には上皮性腫瘍細胞の KATO3 を用いた。120KD の E-cadherin が未分化 ES 細胞に発現しており、分化とともにその発現量が減少、消失した。非中胚葉系細胞マーカーの E-カドヘリンが消失することで中胚葉系である造血系細胞への分化が推察された。

2) FLK1 の発現について

RT-PCR 法で FLK1 の発現を検討した。positive control にはマウスの受精後 9 日目の胎芽を、negative control には成体マウスの脳を用いた。

未分化な時から mRNA レベルではすでに FLK1 が発現していた。分化 4 日目には FLK1 が消失していた。FLK1 の発現は一過性で、急激に増加し、そして減少するとされています。FLK1 の消失はさらに分化が進んだと考えられた。

3) FLK1 から CD45 までの分化マーカーの発現について

FLK1 から CD45 までの分化マーカーの発現を未分化 ES 細胞と分化 7 日目で比較してフローサイトメトリーで解析した。FLK1 は 0.9% が 2.1% まで上昇した。CD31 は 95% の陽性細胞が 31% まで減少した。CD34 は 1% から 35% の増加を示した。CD45 に関してはわずかな増加が認められた。これらの結果から造血系細胞への分化ができたと考えられた。

D. 考察

BD 患者では末梢血リンパ球においても、また結節性紅斑部位生検組織に浸潤するリンパ球においても Th1 サイトカインの産生が亢進し、特に疾患活動期に亢進する傾向が認められた。この Th1 サイトカイン産生には T α k の関与が考えられ、また Th1 指向性サイトカインである IL-12, IL-18 が T α k の発現亢進に関与すると考えられた。末梢血 T 細胞に

における Txk の発現は活動期 BD 患者、非活動期 BD 患者いずれにおいても認められ、BD 患者においては内因性に Txk の発現亢進が存在し、細菌感染や heat shock protein (hsp)等が疾患増悪のトリガーとなり、Th1 サイトカイン産生が起きることが考えられた。また、今回データを示さなかったが、特定疾患の中で SLE 患者末梢血リンパ球での Txk の発現及びサイトカイン産生を検討した。SLE 患者では Th2 サイトカインの中でも IL-6 の産生が病態形成の主体を占めており、IL-4 産生は顕著ではなく、また自己反応性 T 細胞クローンのサイトカイン産生も IL-6 産生が主体であり、クローンによっては Th1 サイトカインの産生亢進を認めるものもあり、Th1, Th2 バランスおよび Txk の発現からでは病態を説明できなかった。また対照疾患として Th2 優位な疾患として知られている気管支喘息患者末梢血リンパ球やアトピー性皮膚炎の皮膚病変部リンパ球では IL-4 の産生亢進と IFN γ の産生低下、Txk の発現低下を認めた。これらの結果より、疾患活動期に Th1 優位であった BD 病については Txk を遺伝子操作することで、Th1 サイトカインの産生を抑制し、それが疾患の改善、治療につながる可能性が考えられた。

また、マウス ES 細胞を用いて、造血幹細胞への分化誘導を試みた。ES 細胞をゼラチンコートディッシュ上で培養することで、非中胚葉系細胞マーカーの E-カドヘリンが消失し、中胚葉系である造血系細胞への分化が推察された。さらにその一部は CD34 陽性細胞となり、CD45 陽性細胞の出現も確認した。造血幹細胞への分化誘導の際に出現する血管内皮細胞のマーカーを有する細胞の存在も確認できた。今回の実験では造血幹細胞への分化誘導には成功したが、再現性をもって、効率よく、CD34 陽性細胞を得ることはできなかった。この問題点をクリアするためには、造血幹細胞を誘導するのにより適した環境を見出し、サイトカインなどの growth factor の添加が必要と考えられた。現在、メチルセルロース上での培養を試み、また SCF、IL-3、IL-6、エリスロポエチン、G-CSF、GM-CSF や、VEGF などのサイトカインの添加を検討している。

E. 結論

BD 患者では末梢血リンパ球および結節性紅斑生検組織リンパ球において Txk の発現が亢進し、IFN γ などの Th1 型サイトカインの産生過剰をもたらすと考えられた。Th1 優位

な疾患では Txk の発現亢進が観察され、Th2 優位な疾患では Txk の発現低下が認められた。Txk の遺伝子治療をすることで Th1/Th2 の相互転換を行うことが特定疾患の治療につながる可能性が示唆された。

またマウス ES 細胞から造血幹細胞への分化誘導に成功した。今後、特定疾患により機能低下した組織の修復をめざしたい。

F. 健康危機情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wakisaka, S., Suzuki, N., Nagafuchi, H., Takeba, Y., Kaneko, A., Asai, T. and Sakane, T.: Characterization of tissue outgrowth developed in vitro in patients with rheumatoid arthritis; involvement of T cells for the development of tissue outgrowth. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121(1):68-79, 2000.
- 2) 下山義博、岳野光洋、永渕裕子、鈴木 登、坂根 剛：ベーチェット病患者における自発的サイトカイン産生 炎症 日本炎症学会 20 (2) :157-164, 2000.
- 3) 坂根 剛、永渕裕子：インドメタシンと瘻撃。この薬のこの副作用 (松田重三編) 医歯薬出版、54-55、2000.
- 4) 坂根 剛、永渕裕子：全身性エリテマトーデスの病態形成に関する分子群 転写因子 臨床免疫 34 (4) :483-486, 2000.
- 5) 坂根 剛、永渕裕子：播種性好酸球性膠原病. 日本臨床 (2000 年増刊号 免疫症候群)、32:602-604, 2000.
- 6) 坂根 剛、永渕裕子：ベーチェット病、朝倉書店、東京、PP219-226, 2001.
- 7) 永渕裕子:Itk 欠損 CD4T 細胞における TH2 分化障害 臨床免疫 (印刷中)

2. 学会発表

国際学会

- 1) Sakane, T., Nagafuchi, H., and Suzuki, N.: **block symposium** The role of Txk, a member of tec family non-receptor tyrosine kinase, in Th1 cell development and interferon- γ production by human T lymphocytes. *Immunology* 2000. The American

Association of Immunologists and Clinical Immunology Society
Joint Annual Meeting. Seattle, Washington, 2000

2) Nagafuchi, H., Suzuki, N., and Sakane, T.: **block symposium**
Defective recombination activating gene expression of human
anti-DNA antibody secreting cells in systemic lupus
erythematosus. Immunology 2000. The American Association
of Immunologists and Clinical Immunology Society Joint Annual
Meeting, Seattle, Washington, 2000

3) Tsukasa Miyagi, Hiroko Nagafuchi, JunMing Ye, Noboru
Suzuki and Tsuyoshi Sakane. NOVEL THERAPEUTIC
TARGET, TXK, A MEMBER OF TEC FAMILY NON-
RECEPTOR TYPE TYROSINE KINASE, OF T HELPER 1
CELL ASSOCIATED AUTOIMMUNE DISEASES. *Arthritis
Rheum.*, 43(9, suppl.): S362, 2000.

4) Hiroko Nagafuchi, Noboru Suzuki, Masako Mizoguchi,
Shoso Yamamoto and Tsuyoshi Sakane. EXCESSIVE TXK
EXPRESSION LEADS TO THE SKEWED T HELPER 1 CELL
RESPONSE IN PATIENTS WITH BEHCET'S
DISEASE. *Arthritis Rheum.*, 43(9, suppl.): S1776, 2000.

5) Hiroko Nagafuchi, Noboru Suzuki, and Tsuyoshi
Sakane. Relation of receptor editing mechanism to failure of
peripheral self tolerance in mature B cells in patients with
systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum.*, 43(9,
suppl.): S1037, 2000.

6) Mitsuhiro Taleno, Hiroko Nagafuchi, Yuko Takeba, Noboru
Suzuki, and Tsuyoshi Sakane. The pathogenic role of
autoreactive T cells specific for the human heat shock protein
60kD derived peptide in Behcet's disease. *Arthritis Rheum.*,
43(9, suppl.): S345, 2000.

国内学会

1) 永淵裕子, 鈴木 登, 坂根 剛. 慢性関節リウマチ (RA) 患
者におけるプロモクリプチン(BRM)治療の妥当性. 第 97 回
日本内科学会講演会. 2000年4月 京都

2) 永淵裕子, 鈴木 登, 坂根 剛. 全身性エリテマトーデス
(SLE) 患者抗 DNA 抗体産生 B細胞における Recombination
activating gene(RAG)発現異常. 第 44 回日本リウマチ学会総
会・学術集会. 2000年5月. 横浜

3) 永淵裕子, 鈴木 登, 坂根 剛. SLE 患者 B細胞における
Recombination activating gene(RAG)の発現異常と抗 DNA 抗
体産生. 第 21 回日本炎症学会, 2000年7月. 東京

4) 永淵裕子, 鈴木 登, 坂根 剛. ベーチェット(BD)病患
者の Th1 型炎症の維持における Txk の重要性. 第 21 回日本
炎症学会, 2000年7月.

5) 永淵裕子, 鈴木 登, 坂根 剛. Txk のインターフェロ
ン (IFN) γ 遺伝子発現機構. 第 65 回日本インターフェロ
ン・サイトカイン学会, 2000年7月 仙台

6) 永淵裕子, 鈴木 登, 坂根 剛. ベーチェット(BD)病患
者の Th1 型炎症の維持における Txk の役割. 第 28 回日本
臨床免疫学会総会. 2000年9月. 東京

7) 坂根剛, 永淵裕子, 鈴木登. 新規の Th1 型特異的転写因

子 Txk による IFN γ 遺伝子活性化機構. 第 30 回日本免疫
学会総会・学術集会 2000年11月. 仙台

8) 宮城 司, 永淵裕子, 青木治人, 浅井富明, 金子敦史,
坂根剛. 慢性関節リウマチ(RA)の Th1 型炎症における Txk
の役割. 第 30 回日本免疫学会総会・学術集会 2000年11
月. 仙台

9) 葉 俊明, 永淵裕子, 溝口昌子, 坂根剛.
ベーチェット病(BD)の Th1 型炎症における Txk の役割. 第
30 回日本免疫学会総会・学術集会 2000年11月. 仙台

10) 宮城司, 鈴木登, 岳野光洋, 永淵裕子, 坂根剛
ES 細胞より造血系細胞への分化. 第 2 回神奈川血液・免疫
フォーラム 2000年11月

H知的財産権 なし

[IV] 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Y. Yamada, A. Kuroe, Q. Li, Y. Someya, A. Kubota, Y. Ihara, Y. Tsuura and Y. Seino.	Genomic variation in pancreatic ion channel genes in Japanese type 2 diabetic patients.	Diabetes Metab Res Rev			in press
A. Shiraishi, Y. Yamada, Y. Tuura, S. Fujimoto, Y. Toyoda, I. Miwa and Y. Seino.	A novel glucokinase regulator in pancreatic β cells	J Biol Chem	276(4)	2325-2328	2001
S. Fujimoto, Y. Tsuura, H. Ishida, K. Tsuji, E. Mukai, M. Kajikawa, Y. Hamamoto, T. Takeda, Y. Yamada and Y. Seino.	Augmentation of basal insulin release from rat islets by preexposure to a high concentration of glucose.	Am J Physiol (Endocrinol Metab)	279	927-940	2000
S. Toyokuni, S. Yamada, M. Kashima, Y. Ihara, Y. Yamada, T. Tanaka, H. Hiai, Y. Seino and K. Uchida.	Serum 4-hydroxy-2-nonenal- modified albumin is elevated in the patients with type 2 diabetes mellitus.	Antioxid and Redox Signal	2(4)	681-685	2000
T. Iwakura, S. Fujimoto, S. Kagimoto, A. Inada, A. Kubota, Y. Someya, Y. Ihara, Y. Yamada and Y. Seino.	Sustained enhancement of Ca ²⁺ influx by glibenclamide induced apoptosis in RINm5F cells.	Biochem Biophys Research Commun	271(2)	422-428	2000
Y. Ihara, Y. Yamada, S. Toyokuni, K. Miyawaki, N. Ban, T. Adachi, A. Kuroe T. Iwakura, A. Kubota, H. Hiai and Y. Seino.	Antioxidant α -tocopherol ameliorates glycaemic control of GK rats, a model of type 2 diabetes.	FEBS lett	473(1)	24-26	2000
N. Ban, Y. Yamada, Y. Someya, Y. Ihara, T. Adachi, A. Kubota R. Watanabe, A. Kuroe, A. Inada, K. Miyawaki, Y. Sunaga, Z.P. Shen, T. Iwakura, K. Tsukiyama, S. Toyokuni, K. Tsuda and Y. Seino.	ATF-2 is a positive regulator in CaM kinase IV-induced human insulin gene expression.	Diabetes			
E. Mukai, H. Ishida, S. Fujimoto, M. Kajikawa, Y. Okamoto, J. Fujita, Y. Hamamoto, Y. Tsuura, Y. Yamada, N. Furukawa, T. Ohta, and Y. Seino.	The insulinotropic mechanism of the novel hypoglycemic agent JTT-608: direct enhancement of Ca ²⁺ efficacy and increase of Ca ²⁺ influx by phosphodiesterase inhibition.	Br J Pharmacol	49(7)	1142-1148	2000
H. Mori, H. Ikegami, S. Seino, J. Takeda, Y. Seino, T. Hanafusa, T. Awata, T. Kadowaki, N. Yamada, N. Iwasaki, T. Sanke, K. Nanjo, Y. Oka, E. Maeda and M. Kasuga.	The Met416 \Rightarrow Val variant in the glycogen synthase gene.	Diabetes Care	129(5)	901-908	2000
K. Nuroi, K. Yasuda, H. Yanaka, A. Kubota, Y. Okamoto, T. Adachi, N. Shihara, M. Uno, L. Xu, S. Kagimoto, Y. Seino, Y. Yamada and K. Tsuda.	Wortmannin, a PI3-kinase inhibitor: Promoting effect on insulin secretion from pancreatic β cells through a cAMP-dependent pathway.	Biochem Biophys Res Commun	23(11)	1709-1710	2000
M. Hosokawa, H. Tsukada, K. Fukuda, M. Oya, M. Onomura, H. Nakamura, M. Kodama, J. Fujita and Y. Seino.	Therapeutic effect of basic fibroblast growth factor on experimental pancreatitis in rat.	Pancreas	27(3)	798-805	2000
T. Adachi, K. Yausda, Y. Okamoto, N. Shihara, A. Oku, K. Ueta, K. Kitamura, A. Saito, Y. Yamada, H. Yano, Y. Seino and K. Tsuda.	T-1095, renal Na ⁺ -glucose transporter inhibitor, improves hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats.	Metabolism	20(4)	373-377	2000
			49(8)	990-995	2000

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
K. Miyawaki, Y. Yamada, H. Yano, H. Niwa, N. Ban, Y. Ihara, A. Kubota, S. Fujimoto, M. Kajikawa, A. Kuroe, K. Tsuda, H. Hashimoto, T. Yamashita, T. Jomori, F. Tashiro, J. Miyazaki, and Y. Seino.	Glucose intolerance caused by a defect in the enteroinular axis: A study in gastric ingibitory polypeptide receptor knockout mice.	Proc Natl Acad Sci USA	96(26)	14843-14847	1999
M. Kajikawa, H. Ishida, S. Fujimoto, M. Nishimura, J. Fujita, Y. Tsuura, Y. Okamoto, A.W. Norman, and Y. Seino.	An insulintropic effect of vitamin D analog with increasing intracellular Ca ²⁺ concentration in pancreatic β cells through non genomic signal transduction.	Endocrinology	140(10)	4706-4712	1999
S. Dupont, N. Vionnet, J.C. Chevre, S. Gallina, C. Dina, Y. Seino, Y. Yamada, and P. Froguel.	No evidence of linkage or diabetes-associated mutations in the transcription factors BETA2/NEUROD1 and PAX4 in type II diabetes in France.	Diabetologia	42(4)	480-484	1999
Y. Tsuura, S. Fujimoto, M. Kajikawa, H. Ishida and Y. Seino.	Regulation of intracellular ATP concentration under condition of reduced ATP consumption in pancreatic islets.	Biochem Biophys Res Commun	261(2)	439-444	1999
A. Inada, Y. Someya, Y. Yamada, Y. Ihara, A. Kubota, N. Ban, R. Watanabe, K. Tsuda, and Y. Seino.	The cyclic AMP response element modulator family regulates the insulin gene transcription by interacting with transcription factor IID.	J Biol Chem	274(30)	21095-21103	1999
N. Shihara, K. Yasuda, T. Moritani, H. Ue, T. Adachi, H. Tanaka, K. Tsuda, and Y. Seino.	The association between Trp64Arg polymorphism of the β 3-adrenergic receptor and autonomic nervous system activity.	J Clin Endocrinol Metab	84(5)	1623-1627	1999
J. Fujita, K. Tsuda, T. Takeda, L. Yu, S. Fujimoto, M. Kajikawa, M. Nishimura, N. Mizuno, Y. Hamamoto, E. Mukai, T. Adachi, and Y. Seino.	Nisoldipine improves the impaired erythrocyte deformability correlating with elevated intracellular free calcium-ion concentration and poor glyceemic control in NIDDM.	Br J Clin Pharmacol	47(5)	499-506	1999
R. Watanabe, Y. Yamada, Y. Ihara, Y. Someya, A. Kubota, S. Kagimoto, A. Kurose, T. Iwakura, Z.P. Shen, A. Inada, T. Adachi, N. Ban, K. Miyawaki, Y. Sunaga, K. Tsuda, and Y. Seino.	The MH1 domains of smad2 and smad3 are involved in the regulation of the ALK7 signals.	Biochem Biophys Res Commun	254(3)	707-712	1999
Y. Ihara, S. Toyokuni, K. Uchida, H. Odaka, T. Tanaka, H. Ikeda, H. Hiai, Y. Seino, and Y. Yamada.	Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic β - cells of GK rats, a model of type 2 diabetes.	Diabetes	48(4)	927-932	1999
大塩恒太郎、酒井晃司、林龍男、関野宏明、大澤政之、大和田滋	300MHz in vivo ESRを用いた実験的外傷性脳損傷におけるニトロキシラジカル減少速度の検討。	磁気共鳴と医学	11	55-58	2000
卯津羅雅彦、間淑郎、田中克之、山口由太郎、関野宏明、湯浅英樹、明石勝也	高血圧性脳内血腫急性期の血腫増大予測に対する造影およびfollow up CTの有用性	日本救急医学会雑誌	11(7)	333-337	2000