

- ii. チオレドキシン (Trx) との共発現
- iii. Trx 融合蛋白として発現
- iv. GroES/L との共発現

を試みたが可溶性画分への発現増加は見られなかった。そこで、封入体からの可溶化、巻き戻しを試み成功した。不溶性タンパク質に 8 M 尿素を添加して可溶化し、Ni-NTA-agarose カラムに結合させたまま尿素濃度をゆっくり下げる Ni-NTA-agarose カラム法を行った。間違った S-S 結合をかけ直すために、酸化型グルタチオン/還元型グルタチオン混合溶液中で、穏やかに Ni-NTA agarose カラム上に固定した(His)₆-LECT2 を攪拌した。樹脂からの溶出後更に一週間の空気酸化を行った。精製後の最終収量は最小培地 1 リットル当たり約 1 mg だった。この方法で得た再生(His)₆-LECT2 の CD 及び NMR スペクトルを、CHO 細胞から発現精製した LECT2 のものと比較したところ、CD スペクトル (Fig.1)はいずれも 230 nm にピークを持つ β 構造に特徴的なパターンを示した。

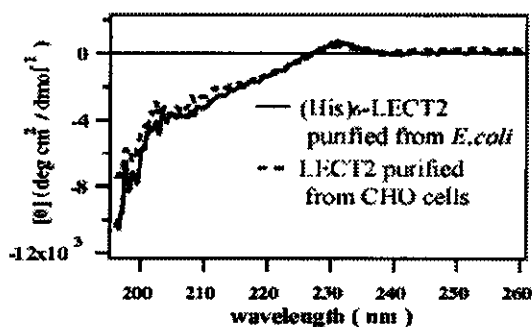


Fig.1 CD スペクトル
LECT2 (16.7 μM) from CHO cells and refolded (His)₆-LECT2 (21.3 μM) from *E. coli*.

さらに、NMR スペクトル (¹H-¹H NOESY)においてもシグナルが一致したことから、大腸

菌由来の(His)₆-LECT2 は CHO 細胞由来の LECT2 と同じ立体構造を持つと結論づけた。

以上の系を用いて、¹⁵N および ¹³C/¹⁵N で標識した(His)₆-LECT2 を調製し、3核3次元 NMR の測定と解析を行った。天然型立体構造を持つタンパク質に特徴的な分離の良いスペクトルが得られ、50 mM 硫酸ナトリウム存在下で測定したスペクトル (Fig.2)を帰属した。

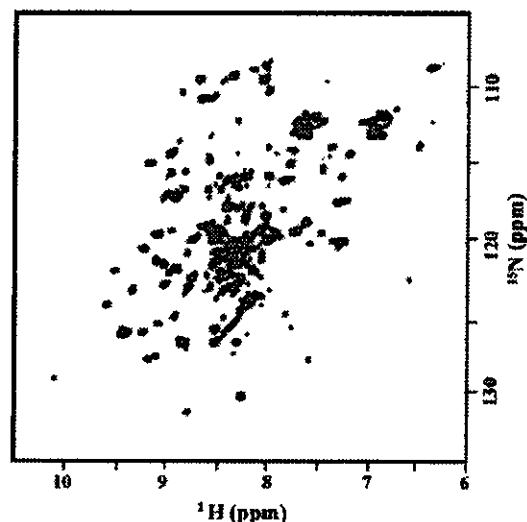


Fig.2 ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル

その結果、観測可能と期待される 130 スピン系 (140 アミノ酸-(N 末端+Pro 残基 9 個))のうち 110 について帰属をすることができた。

帰属した化学シフトの値を素に、CSI (chemical shift index)を用いて二次構造の分布を明らかにした (Fig.3)。その結果、(His)₆-LECT2 は β シートに富むタンパク質であり、α ヘリックスを含まないことが明らかとなった。

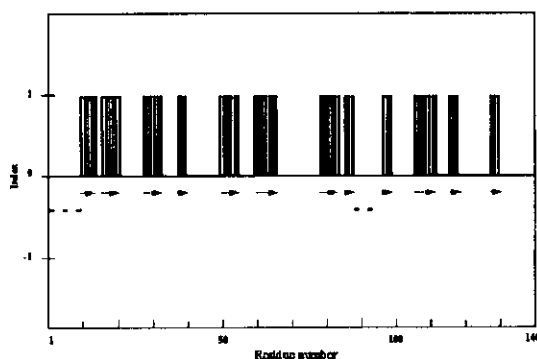


Fig. 3 化学シフト ($^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$, $^1\text{H}\alpha$) からの二次構造予測 (→ : β -strands、点線 : シグナルの未帰属領域)

(2)動物細胞 CHO 細胞による発現系を用いた LECT2 の X 線結晶構造解析

培養上清に分泌発現させる系を用いた (Yamagoe S. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 237, 1997)。

CHO 細胞を宿主とし、高発現プロモーター制御下で遺伝子を発現させた。陽・陰イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせ、SDS-PAGE において単一バンドとなる最終精製物が得られた。収量は 1L 培養液あたり約 5 mg であった。調製されたタンパク溶液を用いて Crystal Screen kit I, II, Wizard I,II による結晶化を試みた。いくつかの条件で結晶が得られ、X 線を照射したところ、分解能 1.8 Å の回折データが得られた。

位相角の計算を行うためにはさらに測定が必要だが、現在の結晶化条件は再現性が悪く、得られる結晶も小さいので、条件の再検討を行った。その結果、沈殿剤である ammonium sulfate の濃度を高くし、添加剤として 4% glucose を含む条件で良質の結晶が得られた (Fig.4)。

また、全く別の条件 (0.2M $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,

0.1M Tris-HCl pH8.5, 30% PEG4,000 : 4°C) でも結晶が得られたので、X 線を照射したところ 1.2~1.8 Å 程度の回折斑点が得られた。



Fig.4 LECT2 の結晶

タンパク質溶液: 20 mg/ml (50 mM sodium phosphate (pH 7.5), 700 mM NaCl)
リザーバー溶液: 0.01 M $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1M MES (pH6.5), 2.0 M ammonium sulfate
添加剤: 4% glucose

C. 今後の予定

(1)大腸菌を用いた発現系の構築と NMR を用いた立体構造解析

NOE データに基づいた原子間の距離制限情報を取得し、動力学計算を行い、三次元構造を決定する予定である。

(2)動物細胞 CHO 細胞による発現系を用いた LECT2 の X 線結晶構造解析

高分解の回折データを得られた結晶化条件を生かして位相角を決定し、構造計算を行う予定である。具体的な方法としては、LECT2 分子に適した重原子を化学結合させた結晶 (重原子同型置換体結晶) を用いる重原子同型置換法か、LECT2 分子内に存在する硫黄原子の異常分散を利用する単波長異常分散法 (SAD) を試みるつもりである。

D.研究発表

1) 論文発表

Kato, Y., Ito, M., Kawai, K., Nagata, K. and Tanokura, M. (2002) Determinants of ligand specificity in groups I and IV WW domains as studied by surface plasmon resonance and model building. *J. Biol. Chem.* 277, 10173-10177.

Asami, Y., Jia, D.-W., Tatebayashi, K., Yamagata, K., Tanokura, M. and Ikeda, H. (2002) Effect of the DNA topoisomerase II inhibitor VP-16 on illegitimate recombination in yeast chromosomes. *Gene* 291, 251-257.

Sawano, Y., Muramatsu, T., Hatano, K., Nagata, K. and Tanokura, M. (2002) Characterization of genomic sequence coding for bromelain inhibitors in pineapple and expression of its recombinant isoform. *J. Biol. Chem.* 277, 28222-28227.

Iwasaki, W., Sasaki, H., Nakamura, A., Kohama, K. and Tanokura, M. (2003) Metal-free and Ca²⁺-bound structures of a multidomain EF-hand protein, CBP40, from the lower eukaryote, *Physarum polycephalum*. *Structure* 11, 75-85

Hatano, K., Kojima, M., Tanokura, M. and Takahashi, K. (2003) Nuclear magnetic resonance studies on the pK_a values and interactions of ionizable groups in bromelain inhibitor VI from pineapple stem. *Biol. Chem.* 384, 93-104.

Maeda, M., Takeuchi, K., Kojima, M., Tanokura, M., Kimura, K., Amemiya, Y., Kihara, H. and Takahashi, K. (2003) Kinetic studies of unfolding process of aspergillopepsin II by pH-jump methods. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 745-750.

Ito, M., Kato, Y., Nagata, K., Oda, Y., Yamagoe, S., Suzuki, K. and Tanokura, M. (2002) Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-

tagged recombinant human LECT2, a 16-kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. *Protein Express. Purif.*, in press.

Katayama, H., Nagata, K., Ohira, T., Yumoto, F., Tanokura, M. and Nagasawa, H. (2003) The solution structure of molt-inhibiting hormone from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J. Biol. Chem.*, in press.

Sadykov, M., Asami, Y., Niki, H., Handa, N., Itaya, M., Tanokura, M., and Kobayashi, I. (2003) Amplification of selfish restriction modification genes. *Mol. Microbiol.*, in press

2) 著書, 総説等

Okai, M., Onishi, H. and Tanokura, M. (2002) Crystallization of mutant smooth muscle myosin motor domains which have effects in ATP hydrolysis. *J. Muscle Res. Cell Motility* 23, 183.

Yumoto, F., Nagata, K., Iwasaki, W., Adachi, K., Kobayashi, Y., Nemoto, N., Ojima, T., Nishita, K. and Tanokura, M. (2002) NMR structure analysis of the C-terminal half of Akazara scallop troponin C from striated adductor muscle. *J. Muscle Res. Cell Motility* 23, 183.

秦野賢一、澤野頼子、田之倉優 (2002) パイナップル由来システインプロテアーゼインヒビターの構造と機能. *化学と生物* 40 (5), 320-325.

Hammes, B. D, Hooper, N. M. 著、田之倉優、阿久津秀雄、村松知成 訳(2002) 生化学キーノート. シュプリンガーフェアラーク東京、東京.

Hatano, K., Sawano, Y. and Tanokura, M. (2002) Structure-function relationship of bromelain isoinhibitors from pineapple stem. *Biol. Chem.* 383, 1151-1156.

- Sakurai, M., Tanokura, M., Zenno, S. and Saigo, K., (2002) Identification of possible substrate-specificity determinants in NfsA, the major oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*. *Flavins and Flavoproteins 2002* (Chapman, S., Perham, R. and Scrutton, N. eds.) 359-361, Rudolf Weber, Berlin, Germany.
- Lee, W. C., Hirai, T., Tanokura, M., Murphy, M. E. P., Zenno, S. and Saigo, K., (2002) Crystallographic analysis of a nitroreductase from *Helicobacter pylori* responsible for susceptibility to the antibiotic metronidazole. *Flavins and Flavoproteins 2002* (Chapman, S., Perham, R. and Scrutton, N. eds.) 873-877, Rudolf Weber, Berlin, Germany.
- 田之倉優 (2002) 生化学&ポストゲノム最前線. タンパク質の機能解析の実現に向けて. 日経サイエンス 2002, 112.
- Turner, P. C., McLennan, A. G., Bates, A. D., White, M. R. H. 著、田之倉優、村松知成、八木澤 仁 訳 (2002) 分子生物学キーノート. シュプリンガーフェアラーク東京、東京.
- van Holde, K. E., Johnson, W. C., Ho, P. S. 著、田之倉優、有坂文雄 監訳、新井宗仁、小島正樹、佐々木宏、鈴木倫太郎、武田茂樹、奈良雅之、秦野賢一、湯本史明 訳(2002) 物理生化学. 医学出版、東京.
- 田之倉優 (2003) 研究室紹介. 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻田之倉研究室. 構造生物 8, 73-75.
- 青峰正裕、有田眞、今西愿、清末達人、米谷快男児、田之倉優、西丸直子 著、有田眞、山田和廣 編集 (2003) 看護生理学第2版. スーベルヒロカワ、東京.
- 田之倉優、李愚哲 (2003) 発光関連酵素の構造生物学. 日本結晶学会誌 45 (1), 66-70.
- 3) 学会発表等
本間康平、李愚哲、山中亜利、中村裕彦、安宅光雄、田之倉優 (2002.6) モルフォドロムからみたタンパク質の結晶成長. 日本蛋白質科学会第2回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 80、名古屋.
- 李愚哲、松原俊之、大城隆、和泉好計、田之倉優 (2002.6) 脱硫酸酵素 DszB の結晶構造. 日本蛋白質科学会第2回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 80、名古屋.
- 湯本史明、奈良雅之、鍵裕之、岩崎わかな、尾島孝男、西田清義、永田宏次、大槻啓男、田之倉優 (2002.6) アカザラガイ閉殻筋トロポニンCおよびその変異体におけるFT-IRによるCa²⁺、Mg²⁺配位構造解析. 日本蛋白質科学会第2回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 96、名古屋.
- 加藤有介、伊藤三恵、河合勲二、永田宏次、田之倉優 (2002.6) グループ I, IV の WW ドメインの相互作用機構. 日本蛋白質科学会第2回日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集 103、名古屋.
- Lee, W. C., Toshiyuki, M., Ohshiro, T., Izumi, Y. and Tanokura, M. (2002.8) The Crystal Structure of Desulfurization Enzyme DszB. Abstracts of XIX Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography Vol I (Acta Cryst. A58 (Supplement)) C105, Geneva, Switzerland.
- 田之倉優 (2002.10) ニトロ/フラビン還元

- 酵素の構造生物学と発生・分化の構造ゲノム科学. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 3S36-7、656、京都.
- 加茂昌之、工藤紀雄、李愚哲、本島浩之、田之倉優 (2002.10) *Thermus thermophilus* HB8 株由来 Peptide deformylase の結晶構造解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 2P-386、773、京都.
- 古沢豊、ヴェヌゴパランナガラジャン、宮内啓介、政井英司、田之倉優、福田雅夫、千田俊哉 (2002.10) ビフェニルジオキシゲナーゼの結晶構造解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 3P-296、885、京都.
- 宮川拓也、秦野賢一、山村明夫、西山真、田之倉優 (2002.10) プレセニリン 1 第 6 親水性ループの精製とその活性発現の解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 3P-627、936、京都.
- 櫻井雅弘、善野修平、西郷薫、田之倉優 (2002.10) 大腸菌ニトロ還元酵素 NfsA のランダム変異導入による反応特異性の解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 4P-099、984、京都.
- 秦野賢一、前田充孝、永田宏次、田之倉優、荘司顕 (2002.10) 土壌主成分フミン酸の構造活性相関. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 4P-183、998、京都.
- 村松知成、伊藤三恵、湯本史明、足立恭子、田之倉優 (2002.10) 真核生物 eRF1 終止コドン認識ドメインの立体構造解析. 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 4P-246、1008、京都.
- 田之倉優、李愚哲、櫻井雅弘、Murphy, M.E P.、善野修平、西郷薫(2002.10) ピロリ菌のニトロ還元酵素 RdxA の構造と機能. 日本バイオイメージング学会 第 11 回学術集会要旨集 A19、129-130、名古屋
- 村松知成、小田佳史、湯本史明、伊藤三恵、田之倉優 (2002.10) 真核生物ポリペプチド鎖終結因子 eRF1 の構造と終止コドン認識メカニズム. 日本バイオイメージング学会 第 11 回学術集会要旨集 P14、193-194、名古屋.
- 奈良雅之、森井尚之、湯本史明、鍵裕之、田之倉優 (2002.11) 赤外分光法によるカルシウム結合タンパク質と金属イオンとの相互作用の解析—合成カルシウム結合ペプチドによるアプローチ. 第 40 回日本生物物理学会年会講演予稿集 42 巻、S63、名古屋.
- 湯本史明、永田宏次、足立恭子、根本暢明、尾島孝男、西田清義、大槻磐男、田之倉優 (2002.11) アカザラガイ閉殻筋トロポニン I フラグメントを結合したトロポニン CC 端ドメインの溶液構造解析. 第 41 回 NMR 討論会講演要旨集、198-199、東京.

- 小田佳史、伊藤三恵、山越智、永田宏次、山本健二、鈴木和男、田之倉 優 (2002.11) NMR および X 線による LECT2 の構造解析. 生体防御機能異常ワークショップ-2002-講演要旨集、3-4、京都.
- Dawson, Wayne、伊藤三恵、山越智、山本健二、田之倉優、鈴木和男 (2002.11) LECT2 の多型における MD シミュレーションによる構造変化の解析. 生体防御機能異常ワークショップ-2002-講演要旨集、3-5、京都.
- Kato, Y., Ito, M., Kawai, K., Nagata, K., Tanokura, M. (2002.11) Determinants of ligand specificity in groups I and IV WW domains. Program and Abstracts of the Fifteenth Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2002), S2-2, 16, Fuchu, Tokyo, Japan.
- Tanokura, M., Suzuki, R., Nagata, K., Yumoto, F., Kawakami, M., Nemoto, N., Furutani M., Adachi, K. and Maruyama, T. (2002.12) Solution structure of an archaeal FKBP with a dual function of proline *cis-trans* isomerase and chaperone-like activities. Program and Abstracts of the 21st Century COE Program for Frontier in Fundamental Chemistry, The University of Tokyo – University Louis Pasteur Joint Symposium “Frontiers in Molecular Science” 29, Tokyo.
- Kamo, M., Kudo, N., Lee, W. C., Motoshima, H., Tanokura, M. (2002.12) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of peptide deformylase from *Thermus thermophilus* HB8. Structural Biology & Functionnal Genomics Singapore.
- Yumoto, F., Nagata, K., Adachi, K., Nemoto, N., Ojima, T., Nishita, K., Ohtsuki, I., Tanokura, M. (2002.12) Solution structure of troponin C C-domain complexed with troponin I fragment from Akazara scallop striated muscle. Structural Biology & Functionnal Genomics Singapore.
- Kudo, N., Yasumasu, S., Iuchi, I., Tanokura, M. (2002.12) Crystal structure of HCE-1, hatching enzyme of Medaka, *Oryzias latipes*. Structural Biology & Functionnal Genomics Singapore.
- 田之倉優 (2002.12) 生物マシーナリーの構造生物学. 日本結晶学会年会講演要旨集 2002、SB-II-01、12、東京.
- 加藤有介、伊藤三恵、河合勲二、永田宏次、田之倉優 (2002.12) グループ IV WW ドメインのリン酸リガンド認識機構とその決定要因について. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 W1aN-10、335、横浜.
- Sadykov, M., Asami, Y., Niki, H., Handa, N., Itaya, M., Tanokura, M., Kobayashi, I. (2002.12) Multiplication of a restriction modification gene complex. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 1P-0393、488、横浜.
- 村松知成、小田佳史、湯本史明、伊藤三恵、田之倉優 (2002.12) 真核生物ポリペプチド鎖終結因子 Erf1 の構造と終止

コドン認識メカニズム. 第25回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 1P-0619、526、横浜.

中村彰男、羽生田友紀、辛宏、三木直子、荻原哲、岩崎わかな、田之倉優、和田文孝、人見清隆、牧正敏、河野重行、小浜一弘 (2002.12) 真性粘菌フィザルムの新規カルシウム結合蛋白質 CBP40 の自己集合と生理学的機能について. 第25回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 1P-0812、558、横浜.

丸岡慎太郎、澤野頼子、工藤紀雄、加藤有介、加茂昌之、櫻井雅弘、入本慶宣、湯本史明、本間康平、李愚哲、河原林裕、田之倉優(2002.12) 超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 GMP synthetase の結晶構造解析. 第25回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 2P-0197、731、横浜.

澤野頼子、秦野賢一、村松知成、永田宏次、田之倉優(2002.12) パイナップル (*Ananas comosus*) 由来プロメラインインヒビターの構造機能相関の解析. 第25回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 2P-0198、731、横浜.

Dawson, W., Ito, M., Yamagoe, S., Yamamoto, K., Tanokura, M., Suzuki, K., (2002.12) Polymorphism and changes in the structural stability of LECT2 as evidenced by molecular dynamics simulations. 第25回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 2P-0199、732、横浜.

工藤紀雄、安増茂樹、井内一郎、田之倉

優(2002.12) メダカ孵化酵素 (HCE-1, HCE-2) の結晶化と立体構造解析. 第25回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 2P-0200、732、横浜.

小田佳史、伊藤三恵、山越智、山本健二、鈴木和男、田之倉優(2002.12) サイトカインLECT2のX線結晶構造解析. 第25回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 2P-0201、732、横浜.

伊東孝祐、中西雅之、李愚哲、善野修平、西郷薫、北出幸夫、田之倉優(2002.12) AzoR(AzoReductase)の結晶構造. 第25回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 2P-0202、732、横浜.

湯本史明、永田宏次、足立恭子、根本暢明、尾島孝男、西田清義、大槻磐男、田之倉優 (2003.1) アカザラガイ閉殻筋トロポニン CC 端ドメインのトロポニンI ペプチド複合体の構造. 2003 年生体運動研究合同班会議、福岡.

村上健次、湯本史明、大木進野、田之倉優 (2003.1) トロポニン TCI 複合体のNMR による解析. 2003 年生体運動研究合同班会議、福岡.

湯本史明、永田宏次、足立恭子、根本暢明、尾島孝男、西田清義、大槻磐男、田之倉優 (2003.1) アカザラガイ閉殻筋トロポニン C-トロポニンI フラグメント複合体のNMR 構造. 2003 筋生理の集い、慈恵医大.

田之倉優 (2003.2) NMR(核磁気共鳴)でタンパク質のかたちと動きを見る. バイオイメーキング「バイオイメーキングとナノテクノロジー」要旨集 3-6, 66-67、東京.

E.知的所有権の取得状況

- 1)特許取得 なし
- 2)実用新案登録 なし
- 3)その他 なし

多臓器不全に伴う心筋炎、動脈炎、不整脈の解析

分担研究者 相澤義房 新潟大学大学院・循環器学分野 教授

協力研究者 小玉 誠 新潟大学大学院・循環器学分野 助教授

重症心筋炎は劇症型で発症し MOF を経て早期に死亡するものや、比較的緩慢に経過し拡張型心筋症の様相をきたしやがて心不全に陥る例がある。重症度や経過は、炎症に関わる免疫やサイトカインによって修飾され、またこれらの修飾は治療面からも意味がある。我々は当該施設で確立したラット自己免疫性心筋炎モデルを用い、細胞免疫の抑制とサイトカインなどによる自己免疫性心筋炎の治療効果を検討してきた。ここでは可溶性 CTLA-4 にラット IgG1 の Fc 部分を結合させた CTLA-4 IgG キメラ遺伝子を導入し T 細胞の副シグナルを抑制すると、血行動態、炎症像と心筋のリモデリングに改善を認めた。また、SLPI の腹腔への投与では無効であったが、遺伝子を組み込んだプラスミドベクターの遺伝子導入で有用な効果が認められた。

A. 研究目的

細胞性自己免疫によって誘発される自己免疫性心筋炎は我々の施設で確立された心筋炎モデルで、人の心筋炎モデルとしてまた心不全モデルとして有用で、発症と病態の形成と進展に細胞免疫および各種サイトカインが関わっている。

細胞性自己免疫は T 細胞を介した炎症性疾患であり、活性化 T 細胞の輸注による疾患転移が可能であることが知られている。病変部に浸潤する炎症細胞の主体はマクロファージと CD4+T 細胞で、CD8+T 細胞と B 細胞は殆ど認められない。かつてわれわれは EAM に対し、抗 T 細胞抗体やサイトカインの効果について報告してきた。

自己免疫性心筋炎である本モデルでの抗原

特異的な T 細胞の活性化には、抗原提示細胞の MHC class II による抗原提示と T 細胞 TCR を介した抗原特異的な主シグナルに加え、抗原提示細胞の B7 ファミリーと T 細胞の CD28 とを介する副シグナルの存在が必要である。そこで可溶性 CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated molecule-4) は副シグナルをブロックすることにより免疫反応を強力に抑制して心筋炎が改善するかを検討した。

次いで、炎症部位には種々の炎症細胞が浸潤し放出される蛋白分解酵素による組織破壊は、病変の形成を促進させると考えられる。Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) はエラスターゼ、カテプシン G、プロテイナーゼ-3、肥満細胞キマーゼなどのセリンプロテアーゼを抑制し、呼吸器疾患モデ

ルでの抗炎症効果が知られている。しかし心血管系に対する効果は不明であることから、自己免疫性心筋炎における SLPI の治療効果の有無を検討した。

B. 研究方法

1) EAM の作成

9 週齢の Lewis ラット(オス)に対し、既報⁴⁾の如く精製したブタ心筋ミオシンを PBS に溶解し 10mg/ml に調製する。これを等量等濃度の結核菌アジュバントと混和し、0.2ml を下肢に皮下注することでミオシンに感作させ、約 14 日頃より EAM を発症させた。

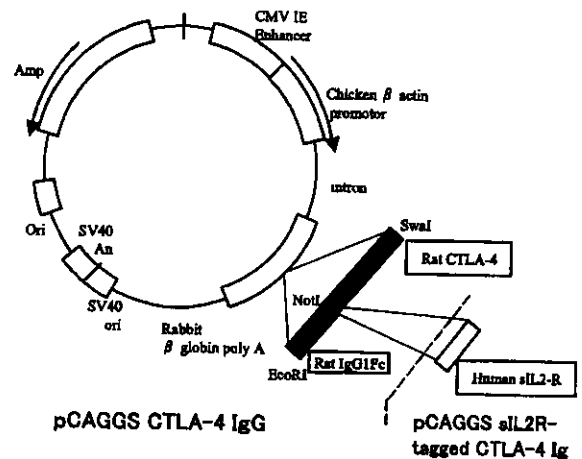
2) CTLA-4 の導入実験(図 1)

(1) プラスミドの作成

ラット脾臓の cDNA より KOD-plus DNA polymerase(東洋紡, 大阪)とプライマー(5'-gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGCgctgcccagaaac tgtg-3', 5'-gagagagaGAATTCactctggggtcatttaccggagagtg ggag-3')を用いて IgG-cDNA を精製し、これと発現プラスミド pCAGGS を制限酵素 EcoRI で処理した後に組み込み、pCAGGS-IgG を作成した。これを大腸菌 JM109 に導入し、培養後 Quantum Prep Plasmid Maxiprep kit(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)にて精製した。次いで EAM ラット心筋の cDNA より、プライマー(5'-gaGAATTCATTTAAATggcttgtcttggactccagagg-3', 5'-gcagcatcGCGGCCGCgtctgaatctgggcatggttctgg-3')を用いて同様の手法でラット CTLA-4 を精製し、これと pCAGGS-IgG を制限酵素 Swa-I と Not-I とで処理した後に組み込んだ。これを治

療用プラスミド pCAGGS CTLA-4 IgG とし、上記と同様の手法で精製した。

また、血中濃度測定のため、pCAGGS CTLA-4 IgG にヒト可溶性インターロイキン 2 受容体(sIL-2R)を組み込んだプラスミドを作成した。プライマー(5'-gcagcataGCGGCCGCactctgtgacgatgacccgccagag -3', 5'-gcagcataGCGGCCGCgtactctgttgtaaatatggacgt -3')を用いて同様の手法で sIL-2R を精製し、これと pCAGGS CTLA-4 IgG を制限酵素 Not-I で処理した後に組み込んだ(pCAGGS sIL2R-tagged CTLA-4 IgG)。



図—1 : pCAGGS STLA-4IgG の模式図

(2) 投与方法

治療用プラスミド pCAGGS CTLA-4 IgG(治療群, n=9)と、対照として何も組み込んでいない pCAGGS(対照群, n=9)をラット一匹に対し 800 μg 用意し、リンゲル液 20ml(約 80ml/kg)に混和し、ミオシン感作当日に尾静脈より約 10 秒で急速静注した。

(3) 血中濃度測定

正常ラットに上記の手法で pCAGGS sIL2R-tagged CTLA-4 IgG を投与し、経時的に採血した。sIL-2R の測定には Human IL-2 sR alpha ELISA Kit (Genzyme Techné, Minneapolis, MN) を用いた。

(4) 治療効果判定

EAM 急性期と推察される感作 17 日目に血行動態測定、心体重比計測および心筋採取を施行した。ラットは 2% イソフルレンにて麻酔し、その後血行動態への影響を考慮し 0.5% まで減量した。右大腿動脈から挿入したカテーテルにて平均血圧 (meanBP) を、右総頸静脈から挿入したカテーテルにより中心静脈圧 (CVP) を測定し、右内頸動脈から左室に挿入した圧トランスデューサーカテーテルにより左室圧 (LVP)、左室拡張末期圧 (LVEDP)、および dP/dT を測定した。心電図により心拍数 (HR) を計測した。

血行動態測定後、下大静脈より脱血したのち心臓を摘出、周囲組織と心房を除去したのち心重量 (HW) を測定し、体重との比 (HW/BW) を算出した。

心筋は 3 つに横断し、中間部を 10% ホルマリン液にて固定後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。炎症部位と非炎症部位とを標本の色調の差を利用して選別し、横断面における炎症部位の面積比率を Lumina Vision および Mac Scope (三谷商事、福井) にて算出した。

(5) 定量的 RT-PCR 法

心尖部をトリゾル試薬 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) にて処理し RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて $5 \mu\text{g}$ の RNA から cDNA を作成した。心機能評価のため、定量的 RT-PCR 法にてラット心房利尿ペプチド (ANP) m

RNA を測定した。心筋での ANP-mRNA 発現は心筋病変の重症度を鋭敏に反映する指標である¹⁶⁾。定量的 RT-PCR 法については既報のとおりであり¹⁷⁾、検体の濃度を算出した後、分子量とアボガドロ数を用いて総 RNA $1 \mu\text{g}$ 中の ANP-mRNA のコピー数を求めた。

3) SLPI の導入実験

(1) プラスミドの作成

SLPI の高い血中濃度を、より長期間得るために、IgG の Fc 部との融合蛋白を形成するようプラスミドを設計した。始めに、ラット脾の cDNA を鋳型とし PCR 法を用いてラット IgG1Fc を複製し、プラスミドベクター pCAGGS の EcoR I 部に挿入した。このとき同時に 5' 端に Swa I、Not I 制限酵素配列も挿入した (センスプライマー gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGCcgtgccagaaactgtg、アンチセンスプライマー gagagagaGAATTCactctgggggtcatttaccggagagtgaggag)。同部の間に EAM ラット心の cDNA を鋳型として複製したラット SLPI を挿入した (センスプライマー gaGAATTCATTTAAATgaagtcctgcggcctgttcct、アンチセンスプライマー gcagcatcGCGGCCGCcactgggggaaggcagacttt)。以上の方法で、pCAGGS-rat SLPI-rat IgG1Fc を作成し、その治療効果の検討に用いた。

(2) 筋肉内導入

ラットをジエチルエーテルで麻酔した後に、 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整したプラスミドを $50 \mu\text{L}$ ずつ前脛骨筋に 4 回注射し、直後に既報のごとく electrical pulse を加えた (14)。

(3) C 端側半量体 SLPI (1/2 SLPI)

上述したようにプロテアーゼインヒビター

としての効果の首座は SLPI のカルボキシ端側ドメインである。このカルボキシ端側半量体 (1/2 SLPI) をリコンビナント蛋白 (ヒト遺伝子由来) として (帝人株式会社より供与) 治療実験に用いた。

(4) 実験プロトコール

24 匹の Lewis ラットを第 0 日に感作し、第 2 日および第 5 日に筋肉内遺伝子導入を行った。治療群には pCAGGS-rat SLPI-rat IgG1Fc を導入し (SLPI 群, N=12)、対照群には目的遺伝子を挿入していない empty pCAGGS を導入した (コントロール群, N=12)。EAM の急性期に相当する第 17 日に屠殺し評価を行った。全例について、心体重比を測定した。各群 6 匹ずつの半数に対して、ハロセン吸入麻酔下にカテーテルを挿入し、中心静脈圧 (CVP)、平均血圧 (MAP)、左室拡張末期圧 (LVEDP)、収縮期圧最大上昇速度 (dp/dt max)、拡張期最大圧下降速度 (dp/dt min) を測定した (15)。屠殺後、心臓を摘出し中部横断切片をホルマリン固定、パラフィン包埋処理後、Azan-Mallory 染色による病理組織学的検討を行った。病理組織での心筋壊死・線維化領域はカラー イメージ画像解析ソフトウェア (Mac SCOPE ver. 2.6, MITANI Corp.) を用いて定量的に解析した。

別に 16 匹の Lewis ラットを第 0 日に感作した。治療群には 1/2SLPI 30mg/kg/日を PBS に溶解し 1 日 2 回に分け腹腔内投与した (1/2SLPI 群, N=8)。対照群には同量の PBS を投与した (PBS 群, N=8)。第 1 日から第 20 日まで投与を行い、第 21 日に屠殺し評価を行った。全例について心体重比および実験①と同じくカテーテルを挿入し、MAP、CVP、LVEDP、dp/dt max、

dp/dt min を測定した。

実験①、②ともに二群間で各パラメーターの比較をした。また血行動態の各パラメーターと心体重比の相関も検討した。

4) 推計学的検討

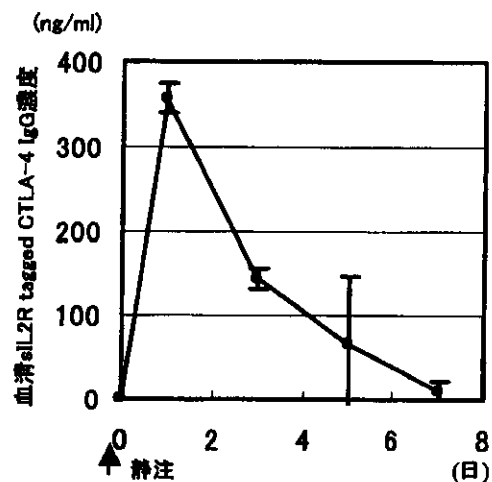
数値は平均±標準誤差で表し、群間比較は対応のない t 検定を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。相関分析は単回分析を用いて行った。

C. 研究結果

1) CTLA-4 の導入実験

pCAGGS sIL2R-tagged CTLA-4 IgG の静注投与後の血中濃度を図 2 に示す。静脈投与後 2 日目で最大に達し、以後徐々に減少したが、100mg/ml の以上の濃度は 5 日まで維持された。

翌日の値は 354 ± 16 ng/ml で、7 日目では 11 ± 10 ng/ml であった。



図— 2 : pCAGGS sIL2R-tagged CTLA-4IgG の急速静脈投与後の血清 sIL2R の推移。

体重は治療群で有意に高く、心重量および心

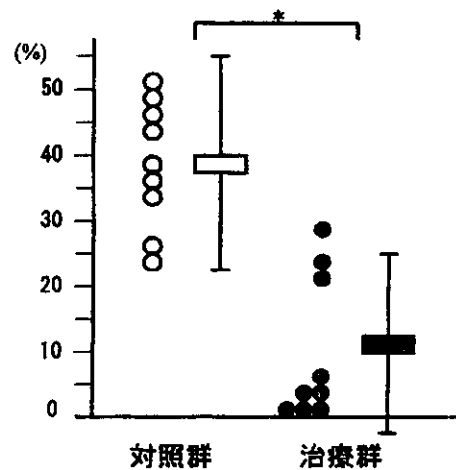
体重比は治療群で有意に低かった。組織学的には、対照群では心筋に広範な炎症細胞の浸潤と浮腫、壊死像が全例で認められたが、治療群のいくつかは殆ど炎症所見が認められず、炎症部位の面積比率は炎症領域も縮小を認めた (12.2±13.9% vs. 37.4±12.2%)。低かった (図3および表—1)。

	対照群(n=9)	治療群(n=9)	p value
心重量 (g)	1.11 ±0.07	0.86 ±0.18	p<0.01
体重 (g)	218 ±5.36	238 ±14.1	p<0.01
心体重比 (×1000)	5.06 ±0.42	3.73 ±0.95	p<0.01
炎症領域 (%)	38.6 ±12.3	12.1 ±13.91	p<0.05
血行動態指標			
HR (bpm)	377 ±27.8	402 ±25.3	n.p.
CVP (mmHg)	5.93 ±3.08	2.87 ±1.12	p<0.05
AP (mmHg)	78.8 ±5.74	94.8 ±11.6	p<0.01
LVP (mmHg)	95.1 ±7.73	117 ±14.5	p<0.01
LVEDP (mmHg)	11.7 ±2.62	7.38 ±2.28	p<0.05
dP/dT max	6034 ±1344	8833 ±1969	p<0.01
dP/dT min	-5654 ±1147	-8069 ±1266	p<0.01

表—1：対照群と治療群の解剖組織学的および血行動態指標の比較

血行動態指標では、右房圧、左室拡張末期圧、dP/dt min は治療群で有意に低く、平均血圧、左室圧、dP/dt max は治療群で有意に高かった (表1)。

心尖部における ANP の mRNA 量は、治療群で有意に低かった (3.85±2.21×10⁵ vs. 0.40±0.4810⁵ 分子数で P<0.01)。

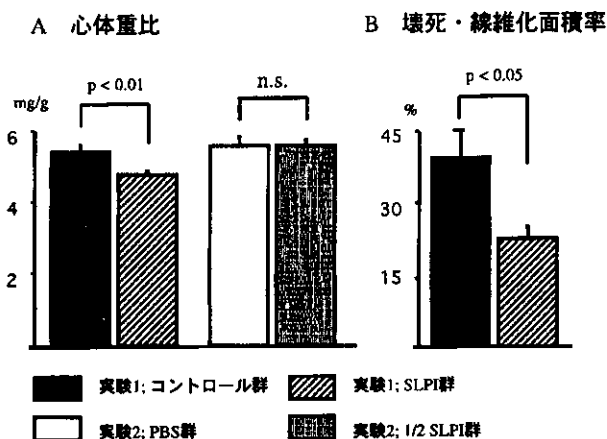


図—3：心筋炎感作17日目での心臓横断面での炎症領域の比較。治療群で有意に炎症領域が縮小した (P<0.01)。

CTLA-4IgG キメラ遺伝子の導入群は対照群に比し dp/dt max (8833±1969 vs. 6034±1344) は有意に高く、中心静脈圧 (2.9±1.1mmHg vs. 5.8±3.0mmHg), 左室拡張末期圧 (7.4±3.3mmHg vs. 11.4±2.5mmHg), dP/dTmin (-8069±2366 vs. -5727±1084) はと治療効果が認められた。心体重比は有意に小であった。また、心筋病変の重症度を鋭敏に反映する指標である心房利尿ペプチドの mRNA 量は治療群で有意に低かった。

2) SLPI の導入実験

実験①では SLPI 群の心体重比はコントロール群に比して有意に低下を認めた (SLPI 群; 4.75±0.12mg/g 対コントロール群; 5.44±0.18 mg/g, p<0.01)。実験②では 1/2SLPI 群と PBS 群に明らかな差は認められなかった (1/2SLPI 群; 5.59±0.16mg/g 対 PBS 群; 5.57±0.26mg/g, n. s.) (図 4A)。



図—4：治療群と対照群との心体重比、壊死・線維化面積の比較

(2) 血行動態パラメーター

カテーターによる血行動態の計測では、実験①、②ともにそれぞれの2群間で明らかな差は認められなかった。しかし、実験①ではSLPI群がコントロール群に比して良好な傾向を示した。実験②では逆に、1/2SLPI群はPBS群に比較して悪化傾向を示し、平均血圧に関しては、SLPI群がPBS群に比べ有意に低値であった(1/2SLPI群; 53.5 ± 4.7 mmHg 対 PBS群; 67.4 ± 2.3 mmHg, ($p < 0.05$)) (表2)。

	実験 1		実験 2	
	コントロール群	SLPI群	PBS群	1/2 SLPI群
CVP (mmHg)	5.2 ± 0.6	4.1 ± 0.5	7.7 ± 0.8	7.7 ± 1.3
mAP (mmHg)	61 ± 5	68 ± 2	67 ± 2	$53 \pm 5^*$
LVEDP (mmHg)	13 ± 2	10 ± 1	16 ± 2	15 ± 2
+ dp/dt max (mmHg/sec)	2717 ± 252	3350 ± 162	3043 ± 141	2424 ± 371
- dp/dt min (mmHg/sec)	2736 ± 332	3092 ± 96	2674 ± 200	2216 ± 342

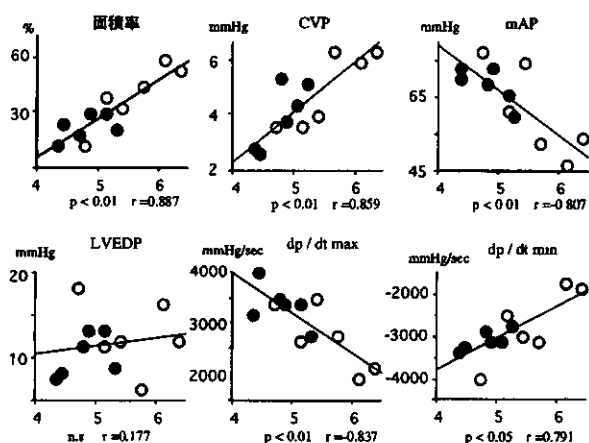
数値はすべて平均 ± 標準誤差。CVP: 中心静脈圧, mAP: 平均血圧, LVEDP: 左室拡張末期圧, dp/dt max, 収縮期最大上昇速度, dp/dt min, 拡張期最大下降速度
* $p < 0.05$ (実験 2; PBS 群に対する検定)

表 2：治療群と対照群での血行動態指標の比較

3) 病理組織による心筋壊死・線維化評価

実験①の Azan-Mallory 染色組織標本を用い心筋壊死・線維化面積を全体の面積に対するパーセンテージとして表し(面積率)、SLPI群とコントロール群の比較を行った(図1B)。SLPI群の壊死・線維化面積はコントロールに比して有意に低下を認めた(SLPI群; $22.3 \pm 2.6\%$ 対コントロール群; $39.7 \pm 16.8\%$, $p < 0.05$)。

実験①では心体重比と面積率、血行動態パラメーターのあいだにはLVEDPを除き、良好な相関が認められた(図5)。実験②では心体重比と血行動態パラメーターの相関分析を行ったが、相関は認められなかった。



図—5：心体重比と各パラメーターとの関係

D. 考察

実験的自己免疫性心筋炎においてプラスミドを用いた CTLA-4 IgG 遺伝子導入療法は、組織学的所見および心機能を著しく改善させた。また SPLI の導入でも同様の改善所見を得た。

かつてわれわれは自己免疫性心筋炎に対し、抗T細胞抗体やサイトカインの効果について報告してきた。CTLA-4を用いた治療法は、T細胞活性化における副シグナルの遮断による強い

免疫抑制作用を誘導し、かつ、これは特異的な免疫抑制を期待できるにも拘わらず、自己抗原に関する知見を必ずしも必要としないという利点を持つ。CTLA-4 による副シグナル遮断は、自己免疫疾患においてきわめて有効な治療法であるといえることが本モデルでも実証された。

また CTLA-4 IgG 遺伝子導入療法は、抗原感作とほぼ同時期の単回投与できわめて有効な結果を得た。これには、静注法での投与直後に高い血中濃度が得られ、かつ数日間は一一定濃度を保ったことで、CTLA4 による副シグナル遮断と抗原感作による T 細胞刺激がほぼ同時期に生じ、ミオシン抗原に対し T 細胞の応答がもたらされたためと考えられた。

CTLA-4 IgG は、ラット CTLA-4 とラット IgG の Fc 領域からなるキメラ蛋白である。IgG Fc 成分の大量投与が EAM に対し奏功するという報告があるが、今回の我々の実験では CTLA-4 IgG の血中濃度はラット本来の免疫グロブリン血中濃度よりはるかに低く、病態に影響を与える可能性は極めて低いと考えられた。

ウイルスベクターを用いた CTLA-4 IgG 遺伝子導入療法は、EAM も含め多くの自己免疫疾患モデルに用いられ、有効性が高く評価されている。今回の実験で、プラスミドベクターによる治療は、それとほぼ同等の効果を得ることが確認された。さらに、プラスミドによる遺伝子導入治療はウイルスベクターよりいくつかの点で有利である。即ち、DNA 合成は容易に行うことが可能で、化学的・生物学的に安定しており保存が簡便であり、遺伝子治療には大量のベクターを必要とするが、大量のプラスミド精製も

低コストで行うことが可能である。

今回、我々は尾静脈からの急速静注によるプラスミド導入を試みた。プラスミドの筋肉内投与に加え electroporation を施行することで高い遺伝子発現を得られると報告に基づき、当初我々も筋肉内投与による CTLA-4 IgG の治療実験を行った。しかしその効果は微弱であり、血行動態にはほとんど差が認められなかった。急速静注による CTLA-4 IgG 治療は高い効果が得られており、急速静注法は筋肉内投与に比してより効果的な遺伝子治療手段であると言える。体重の 10% 近いリンゲル液を急速に静注するため、容量負荷が血行動態に及ぼす影響も懸念された。しかし、無治療の感作 17 日目の EAM ラットの血行動態と比較したところ、対照群と有意差がなく、一時的な容量負荷は EAM の血行動態には影響しないと思われた。

他の研究者により、アデノウイルスベクターによる CTLA-4 IgG 治療が、心体重比や組織学的所見、細胞性および液性免疫反応において EAM の進展・発症を劇的に抑制することに成功している。今回、我々の研究において、プラスミドによる CTLA-4 IgG 治療は EAM の発症を強く抑制し、組織学的所見のみならず血行動態においても改善が認められた。治療群のうち 5 例は組織学的に全く炎症が認められず、アデノウイルスベクターと同等の効果を持つ可能性が示唆された。

次いで SLPI の遺伝子治療を行った。SLPI は広範囲のセリンプロテアーゼ群を抑制するが、これらプロテアーゼ群は好中球やマクロファージより放出される。セリンプロテアーゼは細胞外マトリックス破壊をもたらす。基底膜はエ

ラスチンより構成されセリンプロテアーゼの標的物質の一つである。基底膜の破壊は透過性の亢進をもたらし、結果として炎症細胞の浸潤を容易とする。脳心筋炎ウイルスを用いたウイルス性心筋炎モデルでは、合成エラスターゼインヒビターやSLPIの相同物質であるエラフィンによる炎症の抑制効果が報告されている。SLPIも同様な機序による抗炎症効果が期待される。

今回の実験で、心体重比、壊死・線維化面積率への改善がSLPI-IgG1Fc融合遺伝子による治療によってもたらされた。血行動態では治療群で改善傾向を認め、各パラメーターと心体重比との間にも良好な相関を認めた。有意差を得るに至らなかったのは、カテーテル検査を施行できた例は全体の半数に限られたため例数が少ないためと考えられた。

一方、1/2SLPI腹腔内投与では治療効果が得られなかった。

SLPI-IgG1Fc融合遺伝子と1/2SLPI腹腔内投与実験の差には、1)SLPIに対する持続的暴露と間欠的暴露の差、2)ラット遺伝子とヒト遺伝子由来リコンビナント蛋白の差、3)二量体とカルボキシ端半量体の差、4)前者はIgG1Fc融合物質であることなどがあげられる。2)についてはヒト1/2SLPIがラットエラスターゼを抑制することは既に確認されており、3)についてはプロテアーゼ抑制効果の主体はカルボキシ端であることから、両実験結果に差を生じた原因としては否定的である。アミノ端は抗ウイルスおよび細菌作用が報告されているが、今回の実験で用いたのは自己免疫機序の心筋炎でありこれらの関与は小さいと思われる。4)に関して、ガン

マグロブリン大量投与によるEAMの治療効果が報告されており、大量ガンマグロブリンによる樹状細胞のFcレセプターのブロックが機序として考えられている。しかし、今回用いた筋肉内遺伝子導入で得られる目的物質の血中濃度は最大で10-20ng/mlであり、生体本来が有するラットIgG濃度はおよそ15mg/mlであることから、その影響は否定的でと考えられる。1)については、SLPIは半減期が約30分と短く、不安定物質とされており、投与形態の違いが大きく影響したものと推測される。腹腔内埋め込み浸透圧ポンプによる持続投与方法も可能性があるが、3週にわたる体内留置下ではSLPIが変性する可能性が高いことから、工夫を要するものと思われる。従って遺伝子導入による治療がSLPIのデリバリーシステムとして優れていると考えられる。

SLPIはアミノ端側が抗ウイルス、細菌作用を有すると考えられており、ヒト心筋炎ではその抗炎症効果期待した臨床使用の可能性はある。今後、さらなる研究がなされることが期待される。

E. 結論

CTLA-4によりT細胞の副シグナルの抑制による免疫抑制は、T細胞の関わる自己免疫性心筋炎モデルに治療効果を示した。これは本心筋炎モデルがT細胞が主役を担っていることから妥当な観察と言える。炎症巣ではSLPIは各種のプロテアーゼを抑制することで、細胞死や組織崩壊を抑制することが心筋炎でも期待される。実際、SLPI-IgG1Fcキメラ遺伝子の導入によって、心筋炎は改善した。

遺伝子導入として、骨格筋内に電気パルスに

よって導入、急速静脈投与による導入などあるが、後者ではより簡便かつ有用と思われる。

特定の蛋白や活性物質を持続的に産生することで、炎症巣に作用し、炎症過程を修飾することで有用な効果をもたらしたと考えられ、これらは従来の薬物治療とは違う遺伝子導入の特徴があると言える。以上、難病疾患を想定し新たな治療の可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hanawa H, et al. J Med Genet 39:4:286-291, 2002
- 2) Kodama M et al. Myocarditis: From Bench to Bedside 197-214, 2002
- 3) Shiono T et al. Circulation Journal 66:4:385-389, 2002
- 4) Hanawa H et al. Clinical Science 103:623-632, 2002
- 5) Watanabe K et al. Journal of Cardiovascular Pharmacology 41:Suppl. 1;S99-S103, 2003
- 6) Watanabe K et al. Journal of Cardiovascular Pharmacology 41:Suppl. 1;S93-S97, 2003

H. 知的財産権の出願。登録状況

なし

7 生日および 21 生日低酸素性虚血性脳症動物モデル におけるシクロスポリンの効果

分担研究者 布井 博幸 宮崎医科大学小児科 教授
研究協力者 池ノ上 克、池田 智明 宮崎医科大学産婦人科

研究要旨 我々は前に、新生児の低酸素性脳症患者で血中 cytochrome c の上昇を認め、低酸素性虚血性脳症動物モデルでも、髄液および血中 cytochrome c の上昇を確認した。このことから、低酸素性脳症患者の治療へこの動物モデルが応用できると考え、シクロスポリンの抗アポトーシス効果を 7 生日および 21 生日低酸素性虚血性脳症動物モデルを用いて検討した。その結果 21 生日ラットでは明らかなシクロスポリンの効果が得られたが、7 生日ラットでは効果を認められなかった。生後の日数における成熟の過程に疾患感受性の差の原因があるのではないかと考えられた。

A. 研究目的

我々はこれまで、発症から短期間の間に多臓器不全を引き起すインフルエンザ脳症患者のサイトカインや血清 cytochrome c 値について検討し、同患者では全身臓器のアポトーシスが誘導されている可能性を示唆してきた⁽¹⁾。

昨年、7 生日ウイスター系ラットの低酸素性虚血性脳症ラットモデル実験を行い、経時的脳組織変化と血中および髄液中の cytochrome c 濃度の比較を行った。この結果 48 時間で血中および髄液中濃度に cytochrome c 濃度の有意な上昇が認められ、同時に行った脳組織障害と cytochrome C の上昇の程度が比例していたことから、この新生児低酸素性脳症動物モデルではこれまでの遅発性細胞死 (apoptosis) が誘導されているという結果⁽²⁾ を支持することとなった。

今回、この 7 生日 (新生児) および 21 生日 (成人) 低酸素性虚血性脳症動物モデルを用いて、遅発性細胞死 (apoptosis) に対するシクロスポリンの細胞死抑制効果を検討した。

B. 研究方法

前回と同様、アポトーシスによる低酸素性虚血性脳症ラットモデルとして、ウイスター系ラットの総頸動脈を結紮後、7 生日と 21 生日ラットで各々 2 時間と 45 分低酸素状態 (8%O₂) にし、その後平常の飼育を行った。

この直後と 24 時間後にシクロスポリン (10mg/Kg) の腹腔注射を行い、抗アポトーシス効果を検討した。21 生日ラットで 2 時間の低酸素負荷では全 20 匹のラットが死亡し、7 生日ラットと同等の生存率を得るため低酸素状態は 45 分間とした。

昨年までの報告から、低酸素状態から解放後 48 時間後に髄液と採血を行った。同時に脳組織染色により、虚血性脳障害の程度を確認した。

髄液と血清の cytochrome C は ELIZA 系を用いて行った。

C. 研究結果

1) 7 および 21 生日低酸素性虚血性/シクロスポリンラットモデルで組織変化比較をし

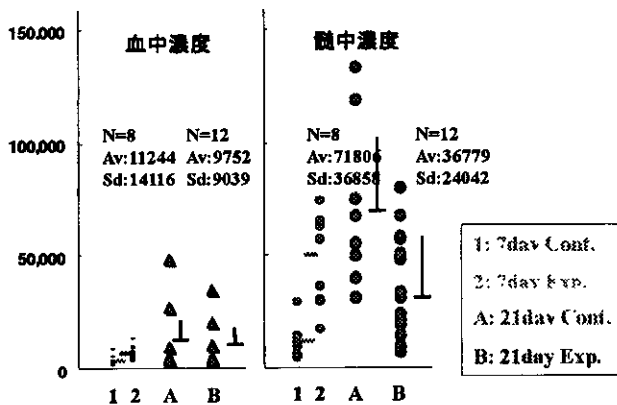
たところ、21生日ラットモデルで肉眼的な壊死像変化の明らかな差が認められたが、7生日ラットモデルでは認められなかった。

21生日ラットHIE実験での脳組織変化

	Atrophy	CX	CA1
コントロール群	8/11	7/9	10/11
Cy-A 実験群	3/11	2/11	5/11

2) 7および21生日ラットモデルでの48時間後血中および髄液中 cytochrome c 濃度を比較したところ、血中濃度での有意差は認められなかったが、髄液中濃度では21生日モデルのシクロスポリン使用群で有意な cytochrome c 濃度の低下を認めた。

7, 21生日ラットでの血/髄中 cytochrome c 濃度



D. 考察

7生日（新生児相当）ウイスター系ラットの低酸素性虚血性脳症モデルでは2時間の低酸素条件にも耐え生存したが、21生日ラットでは全20匹とも48時間以内に死亡したので、7生日ラットと同様の生存率が得られる45分を採用して、今回の実験を行った。

今回の実験では、7生日ラットにシクロスポリン投与した場合、髄液での cytochrome C 上昇に何ら差を見出せなかったが、21生日（成人ラット相当）ラットでは差が認められた。同時に行った脳組織障害と cytochrome C の上昇の程度も良く比例していた。

これまで、成人ラットではシクロスポリンの有効性を証明した報告と、新生児ラットでの無効性³⁾を報告したがあり、同じ系で両者を比べた報告が無かった。確かに条件がおなじでなく、比較が難しいが、我々の実験系では前の報告を支持する結果であった。

シクロスポリンのアポトーシス抑制効果については、ミトコンドリアからの選択的な cytochrome C 漏出機構（Bax チャンネルや VDAC-Bax チャンネルなど）のシクロフィリンDに作用して起こるのではないかと考えられているので、cytochrome C 漏出機構の成熟にかかわっているのではないかと注目している。

E. 結論

低酸素性虚血性脳症ラットモデルで髄液 cytochrome C を指標にその治療法を開発することは、インフルエンザ脳炎脳症などの激しい apoptosis を起こしている疾患のアポトーシス抑制療法を確立する上でも重要であろうと思われた。

参考文献

1. 布井博幸、水上智之、レジナ・マルカド、三 洩浩、西原重剛、後藤善隆、緒方敬之、森島恒 雄、中山慎一、森信二、坂田宏、森裕美、真鍋 孝治、足立尚登、遠藤文夫、渡辺啓祐：インフ ルエンザ感染症における重症度判定のための マーカーの検討：小児感染免疫 13：225-232、 2001
2. Wako Nakajima, et al.: Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration

after hypoxic ischemia in the newborn rat. J Neuroscience 20: 7994-8004, 2000

3. Puka-Sundvall M, et al.: Cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: Involvement of mitochondrial permeability transition? Dev Neurosci 23: 192-197, 2001

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshikazu Sugimoto, Satomi Tsukahara, Shigeo Sato, Mutsumi Suzuki, hiroyuki Nunoi, Harry L. Malech, Michael M. Gottesman, and Takhashi Tsuruo. Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 *in vivo* from an *MDR1*-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91. J Gene Med. In Press (2003).
2. 布井博幸、林摩耶、早見典子、原田優、林幹夫、広瀬真次、松本栄悠、水間洋、日高文郎、外山誠也、水上智之 小児免疫不全 臨床と研究 79:1404-1410, 2002
3. Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H. The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. EMBO J. 21:6312-20 (2002) .