

平成23年度自治医科大学医学部 研究奨励金研究成果報告

同種造血幹細胞移植後合併症に関わる抗体産生B細胞の解析 —アロタイプ解析によるウイルス特異抗体の動向—

自治医科大学医学部 総合医学 I
(自治医科大学附属さいたま医療センター血液科)
山崎 理絵

【背景】同種造血幹細胞移植後、移植前の感染により得られた種々のウイルス抗体価は、患者の残存形質細胞が消失するに伴い次第に減衰する。麻疹や流行性耳下腺炎では、10年で10%程度に減少するといわれる。一方、移植後再活性化が問題になりやすい水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) やサイトメガロウイルス (CMV) のドナー由来抗体の動向はあまりよく分かっていない。本研究では、IgG アロタイプに着目し、同種造血幹細胞移植後の VZV・CMV 特異的ドナー由来抗体の推移を麻疹抗体と比較解析した。

【対象・方法】当センターで同種造血幹細胞移植を行い1年以上生存している52例を解析の対象とした。患者および血縁ドナーの血漿を用いて、ELISA 法により IgG のアロタイプを解析した。ドナーと患者のいずれか一方のみが IgG1m (f) 陰性の、解析可能な10症例につき、移植後経時的に血漿を採取し、IgG アロタイプの変化を ELISA 法で確認するとともに、麻疹、VZV および CMV 特異的 IgG 抗体、IgG1m (f) 抗体の有無を ELISA 法で確認した。抗体価は陰性コントロールの吸光度の平均+2SD 値を cut-off 値とし、測定値の平均/cut-off 値 (C・O・I) が1以上であれば陽性と判定した。

【結果】①麻疹抗体の推移：総抗体価は徐々に低下し、4割弱が陰性化した。ドナー由来麻疹抗体は、移植後1年間ではほとんど検出されなかった。②VZV 抗体の推移：ACV の予防投与のため、移植後1年以内の帯状疱疹発症は認められなかった。VZV の総抗体価は、移植後少しずつ低下したが、陰性化したのは1割程度であった。アロタイプを見ると、レシピエントの残存抗体が優位であり、ドナー由来抗体は約半数で陽性化した。いずれも低抗体価のままであった。予防内服終了後、帯状疱疹を発症すると、これを契機にドナー由来 VZV 抗体価が既感染レベルに上昇することが分かった。③CMV 抗体の推移：移植早期に再活性化の問題になりやすい CMV 感染に伴う抗体の推移を見ると、ドナーレシピエントともに抗体を有する症例では、移植後60～90日の時点でドナー由来抗体が出現していた。ドナーが CMV 抗体陰性である場合、移植後ドナー由来 CMV 抗体が認められるタイミングは症例により多様であった。早い症例では移植後90日ごろから抗体価の上昇が確認されたが、移植後1年以上経って初めてドナータイプの特異抗体の出現を認めた症例もあった。

【結論】ドナー由来 VZV 抗体は、レシピエントの残存抗体だけが存在する麻疹に比べ、移植後早期に産生を認める

症例もある。しかし、通常の既感染レベルに抗体価が上昇するのは、臨床的に明らかな VZV 感染が認められてからである。ドナー由来 CMV 抗体は既感染ペアである場合、早期に上昇する。

いずれの場合も患者由来のウイルス特異抗体は、移植後完全キメラとなった後も長期に検出される症例が多く、ホストのプラズマ細胞の残存が示唆される。

染色体転座におけるヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の役割： ダイナミックな染色体構造の改変

幹細胞制御研究部 助教 和田 妙子

【目的】染色体転座は造血器腫瘍のみならず、肺癌や前立腺癌などの固形腫瘍でも染色体転座が見られることがわかり、治療的意義も含めて大きな注目を集めている。染色体転座形成のメカニズムの解明は、より有効で安全な治療やがんの予防法の開発に役立つことが期待されるが、その詳細はほとんど明らかにされていない。ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) と複合体を形成し、遺伝子発現を抑制する。一方、LSD1 が染色体構造をダイナミックに改変すること、前立腺癌で染色体転座に関与しているアンドロジェン受容体と結合することが報告されている。また、HDAC は CtIP を脱アセチル化し、alternative NHEJ による DNA 修復を促進することが報告された。以上より、DNA 二重鎖切断部位に転写を抑制するためにリクルートされた LSD1/HDAC 複合体が染色体転座を誘導するという仮説を立てた。本課題においては、正常造血幹細胞・前駆細胞と白血病細胞における LSD1 の質的・量的違いを明らかにし、正常造血幹細胞における発現を人為的に変化させることでゲノムの不安定性が惹起されることを *in vitro* および *in vivo* の系で確認する。

【方法】1、正常血液細胞や白血病細胞株における LSD1 の発現を解析する。2、放射線照射によって LSD1 の発現が変化するかどうかを調べる。3、DNA 二重鎖切断部位への LSD1 のリクルートを共焦点顕微鏡にて確認する。4、放射線照射による染色体転座形成への LSD1 の影響を RT-PCR 法にて定量的に解析する。5、造血幹細胞に特異的に LSD1 を強発現するトランスジェニック・マウスを作製し、LSD1 発現変化の染色体転座形成への影響を *in vivo* で解析する。

【結果】LSD1 の発現は正常血液細胞においては極めて低く、白血病細胞株では強発現していた。とくに染色体転座を有する白血病細胞では、転座を有しない白血病細胞株に比べ LSD1 の発現が強かった。放射線照射を行った 293 細胞を用い LSD1 タンパクの発現を調べたが大きな変化は

確認できなかった。しかしながら、LSD1は通常は細胞の核全体に分布しているが、放射線照射後は γ -H2AXと共局在する傾向が見られた。LSD1を強発現させた293細胞に放射線照射を行い、その後のBCR-ABL, AML1-ETO, EWS-ERG融合遺伝子の有無を調べると、放射線照射後2日後に融合遺伝子の形成が見られた。対照群では認められなかった。以上の結果をin vivoで確認するため、現在、造血幹細胞に特異的にLSD1を強発現するトランスジェニック・マウスを作製している。

劣化臍島のMSCによる機能回復システムの開発

先端治療開発部門
寺谷 工, 笠原 尚哉, 小林 英司

我が国で移植に使用される臍島は、極めて強い阻血状態下にて心停止ドナーから臍臓が摘出され、UW等の冷保存液に浸して移植施設まで輸送される。そして認定施設で移植用臍島に分離・調製された後にレシピエントへと移植される。この一連の流れで臍島はレシピエントに移植されるまでに虚血や酵素処理など様々な障害を受け、欧米で使用されている脳死ドナーからの臍島に比べて機能が低下している。限りある臍島を確実に活用するためには、摘出臍島のviabilityを良い状態に保ち、長期間機能維持が可能とする組織保存液の開発が必須である。そこで我々は、Luciferase transgenic (Luc Tg) ラットから分離した組織や臓器を用いて、そのviabilityを非破壊的に、同一サンプルから評価が可能なスクリーニングシステムを開発し、様々な保存液を調べた結果、ET-Kyoto液が臍島保存に有効である事を明らかにした。

近年、再生医療の細胞治療ソースとして間葉系幹細胞(MSC)が注目されており、特に骨髄や脂肪に含まれる間葉系幹細胞(MSC)は「多種類のサイトカインの産生と分泌能」「免疫調節能」などユニークな特徴を有しており、種々の疾患を対照に治療への応用化が急速に進んでいる。我々はこのユニークな特徴を有するMSCを用いて、劣化した保存臍島の機能を賦活化させる作用について「Luciferase-transgenic LEW ラット (Luc-Tg ラット) 由来のMSCと分離臍島の共培養実験 (in vitro)」および「マウス糖尿病モデルに対する臍島及びMSC混合移植実験 (in vivo)」の研究を行った。その結果、MSCは劣化臍島の賦活化に寄与する事を明らかにした。

次に小動物で得られたMSCによる劣化臍島の賦活化現象が臨床現場に应用可能かどうかについて、大動物であるブタモデルを用いて検討した。共同研究チームである東北大学でブタ臍臓を摘出し、酵素処理後にCOBE2991を用いて臍島へと分離し、そのサンプルを冷UW液に浸して自治医科大学まで宅配業者経由で搬送した(n=5, 平均搬送時間23時間)。搬送されたブタ臍島のviabilityは約60%まで低下していた。この劣化臍島をMSCと5日間共培養した結果、細胞内ATP含有量が培養開始前に比べて約1.7倍にまで回復する事、またTight-junction proteinの維持、そ

して抗アポトーシスの作用を有する事を明らかにした。

最後に、小動物から大動物の臍島を用いた実験のデータを基に、ヒト臍島を用いて検討した。本結果は、移植に不十分である劣化臍島の機能回復を数日間の時間を持って行なえる可能性を示す。

セロトニン症候群における脳内一酸化窒素動態の研究

自治医科大学精神医学講座
塩田 勝利, 西嶋 康一, 笠井麻紀子,
吉野 達規, 加藤 敏

【背景】

セロトニン症候群は、抗うつ薬の重篤な副作用で高熱を呈し死亡することもある。セロトニン症候群の病態は今だに不明なところが多く、有効な薬物治療も確立していない。近年、フリーラジカルである一酸化窒素(nitric oxide: NO)が神経毒性や高体温と関係していると報告されている。そこで今回、脳内マイクロダイアリシスを用いてセロトニン症候群動物モデルでの脳内NO動態を明らかにした。

【方法及び結果】

セロトニン症候群動物モデルとしては、筆者らが開発したtranylcypromine+fluoxetine投与モデル(Tra/Fluモデル)及びclorgyline+5-HTP投与モデル(Clo+5-HTPモデル)を用いた。両モデルともNO濃度の上昇を呈し、セロトニン症候群の高体温にはNOが関与していることが明らかになった。

また申請者らは、risperidoneがセロトニン症候群の高体温に有効であると報告しているが、risperidoneがセロトニン症候群での脳内NO動態にどのような影響を与えるか解明した。Risperidoneを前投与すると、両モデルでNO濃度上昇は有意に抑制された。これらのことから、risperidoneのセロトニン症候群による高体温に対する有効性の機序の一つとして、NO濃度上昇抑制効果があることが明らかになった。

【結論】

Risperidoneは、すでに世界中で非定型抗精神病薬として使用されており、安全性が確立されている薬剤である。そのためrisperidoneはセロトニン症候群に対して治療薬となりうる薬剤であることが、今回の実験で示唆された。

間葉系幹細胞の免疫抑制メカニズム：ヒトマウス間の相違についての検討

多々良礼音, 尾崎 勝俊, 畑中 恵子,
翁 家国, 目黒 明子, 松 春子,
永井 正, 室井 一男, 小澤 敬也

造血幹細胞移植は、難治性造血器疾患においても治癒を望める数少ない治療選択肢の一つであるが、特に同種移植

における合併症として移植片対宿主病 (GVHD) が知られている。治療には、免疫抑制剤であるステロイドホルモンが用いられるが、ステロイド抵抗性の症例も多く、このような難治症例に対する標準的治療法は確立していない。免疫抑制剤を追加するのが一般的であるが、治癒率が低く感染症の合併も多いため、生存率の改善の大きな障害となっている。最近、難治性急性 GVHD に対する新たな治療法として、間葉系幹細胞 (MSC) 投与が試みられている。ヒトの造血幹細胞移植後の GVHD に対して MSC を投与する方法は、2004年の Le Blanc らによる 1 例報告により注目されるようになった。さらに2008年には、EBMT より難治性急性 GVHD に対する Phase II study の結果が報告された。これによると、MSC 投与群での奏効率は実に70%と非常に良好な成績を報告している。

しかし、MSC による免疫抑制メカニズムについては、諸説入り乱れておりいまだ確立していない。以前より、MSC が産生する indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), prostaglandin E2 (PGE2), TGF- β などが、T細胞増殖を抑制する因子として報告されてきた。申請者の研究室では、マウスの MSC を用いて、MSC の T細胞増殖抑制因子として NO (一酸化窒素) が重要な働きをしていることを報告した。この報告で、MSC が活性化 T細胞からのシグナルを受け、NO 合成酵素 (iNOS) を介して NO を産生していることを明らかにした。さらに、IFN- γ と TNF- α など、少なくとも2つの因子が、NO 産生に不可欠である事などを示した。

今回われわれは MSC の免疫抑制メカニズムについて、マウス-ヒト間での比較を行うこととした。これは、マウス MSC の免疫抑制メカニズムと Th17分化誘導に関する研究過程において、Th17分化誘導条件下ではマウス MSC の一酸化窒素 (NO) 産生がほとんど認められなかった事による。マウス MSC において NO は、非常に限定的な特定の T細胞分化誘導条件下でのみ産生され、その効果を発揮するに留まる。ヒト MSC においても NO 産生が T細胞分化誘導条件によって異なるのかを明らかにすることは、MSC の今後のヒトへの臨床応用を目指す上で非常に重要なことであると考えられた。

そのために、まずヒト MSC のセルバンク構築を行った。当院血液科外来に受診した種々の血液疾患患者 (疑い症例でその後健常者と判明した症例を含む) から同意を取得の上 (本学疫学研究承認済み)、骨髓穿刺液より MSC を培養した。その結果、現時点で約30症例の MSC を採取した。その中から健常者の MSC を用いて、初めに Th1 分化誘導条件下にてヒト単核球と共培養した。その結果、マウス MSC と異なり、ヒト MSC においては Th1 分化誘導条件下においても NO 産生がほとんど認められない可能性があることが分かった。またマウス MSC と比較すると、T細胞抑制能も軽度であることが明らかとなった。

肝臓特異的コレステロール合成酵素群欠損マウスの血中・肝脂質代謝と肝障害の検討

内科学講座内分泌代謝学部門 永島 秀一

【背景】

コレステロール (Chol) は主に肝臓で酢酸からメバロン酸やスクアレン等を経て合成される。この経路は一般にステロール経路と呼ばれるが、Chol 合成以外にも分枝経路を持ち、非ステロール経路と呼ばれる。非ステロール経路では細胞の生存に関連した分子が合成される。HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) はステロール及び非ステロール経路双方の上流に位置する律速酵素である。一方でスクアレン合成酵素 (SS) は HMGCR の下流にあり、非ステロール経路分枝後のステロール経路の最初の酵素である。HMGCR 阻害薬 (スタチン) は、高 Chol 血症の治療薬として最も重要である。しかし、スタチンにより重篤な肝障害等の臓器障害が希に出現し、ステロールあるいは非ステロール経路の抑制のどちらがこれに寄与しているのかは明らかではない。

【方法】

我々は発生工学的に、Cre-LoxP システムを用いて生体の Chol 代謝において最も重要である肝臓特異的に HMGCR 及び SS 欠損マウスを作成し、生体におけるステロールあるいは非ステロール経路の抑制の影響を検討した。

【結果】

①肝臓特異的 HMGCR 欠損マウスの解析

①6週齢までに肝不全を伴う脂肪肝や低血糖で大半が死亡した。メバロン酸投与によって完全に救命され、ブドウ糖投与によって部分的に救命できた。②遺伝子レベルでは肝臓特異的にほぼ完全な HMGCR の欠損がみられたが、HMGCR 活性や Chol 合成能は45%の低下にとどまった。このことから HMGCR 蛋白は転写後に高度に保たれるメカニズムを持っていることが推測された。③3週齢で血漿 Chol の26%の低下がみられたが、死亡直前には肝障害に伴う異常リポ蛋白の出現と血漿 Chol の上昇がみられた。④肝臓の Chol 含量は10%とわずかな低下にとどまったが、これは他臓器からの供給により代償されたものと考えられた。一方でトリグリセリド含量は1.8倍に亢進しており、脂肪酸合成能の亢進によるものと考えられた。ただし脂肪酸合成経路の最上流に位置する sterol regulatory element binding protein (SREBP) 1c の発現亢進は見られなかったため、これとは独立したメカニズムの存在が示唆された。⑤脂肪肝の他、肝障害には70%の非ステロール産物の低下やアポトーシスが寄与していたことが明らかとなった。

②肝臓特異的 SS 欠損マウスの解析

①欠損マウスは致死的ではなかった。12週齢で肝障害がみられたが、24週齢で消退していた。②遺伝子、蛋白、活性いずれのレベルでも肝臓特異的に SS の欠損を確認した。③血漿 Chol は週齢によって異なるが30%程度低下した。これは肝からの VLDL 分泌能の低下が主な機序であり、肝 LDL 受容体の発現亢進によるものではなかった。

④肝臓の Chol 含量の低下はみられなかった。また脂肪肝は見られなかったが、肝細胞のアポトーシスが認められた。⑤SSより上流で分枝する非ステロール経路産物であり、かつ過量であると細胞のアポトーシスを誘導しうるファルネソールの合成が16倍と亢進していた。

【考察】

肝臓特異的 HMGCR 欠損マウスの解析では、肝臓の非ステロール産物は生体にとって不可欠であることが明らかになり、SS欠損マウスでは、この非ステロール産物が過剰であっても、一過性ではあったが、肝障害を来たすことが明らかとなった。そのほか前者の解析から、SREBP1cを介さない新規の脂肪酸合成経路の存在やメバロン酸経路と肝糖新生経路との新たな関連が示され、後者の解析から、肝臓の Chol を維持するためには、肝 LDL 受容体を介さない経路の存在が推測された。

唾液腺での外来遺伝子発現制御系を利用したワクチン抗原媒介蚊の解析

感染・免疫学講座 医動物学部門
山本 大介

感染症（マラリア、デング熱、黄熱病など）を媒介する蚊において、遺伝子組換え技術は病原体の寄生メカニズムを解明するための非常に有効なツールであるだけでなく、不妊化、胚発生致死、あるいは寄生抑制などの遺伝子組換えシステムを作出することで病原体の伝播阻止にも利用できると期待されている。これらの組換えシステムの実用化には未だ様々な問題があるが、すでに海外ではネッタイシマカにおいて胚発生致死システムの野外放飼実験がおこなわれている。一方、これらに加えてワクチンなどの治療薬の新しい投与方法への応用も提唱されており、これは 'flying syringe' などと呼ばれている。蚊は吸血時に円滑に吸血を行うために、吸血対象の皮膚に唾液を注入することが知られているが、遺伝子組換え技術により唾液中に治療薬的因子を発現させることが出来れば吸血行動を利用した投与が可能となると考えられる。また、注入された唾液タンパク質に対して抗体が誘導されることも知られており、ワクチン抗原などを唾液中に発現させることで病原体に対する抗体を誘導することも期待できる。

最近の我々の研究により、ハマダラカ (*Anopheles stephensi*) では唾液腺特異的に機能するプロモーターを利用して、唾液腺で外来遺伝子を発現させ、さらに唾液中に発現したタンパク質を分泌させることが可能になってきた。そこで本研究では、ハマダラカ唾液中にマラリアのワクチン抗原候補分子を発現させ、吸血により媒介可能かどうかマウスモデルを用いて解析を行った。マラリアのワクチン候補抗原として知られる Circumsporozoite protein (CSP) のネズミマラリア (*Plasmodium berghei*) のホモログにおいて、抗原性の高いことが知られるリピート領域部位の3回リピート配列 (PbCS3R) を DsRed の C 末端側につなげた遺伝子 (DsRed-PbCS3R) を、唾液腺特異的プ

ロモーターの制御下で発現する遺伝子組換えシステムを作出した。作出されたシステムの唾液腺において DsRed-PbCS3R の存在がウェスタンブロット解析や蛍光観察から確認でき、口吻から分泌されていることが分かった。

そこで、このシステムをマウスに頻回吸血させて CSP に対する抗体誘導を ELISA 法およびウェスタンブロット法により解析したところ、頻回吸血された4匹のマウスのうち2匹において CSP に対する抗体が出来ていることが確認された。また、これらのマウスの血清を用いてスポロゾイトに対して蛍光免疫染色を行った場合でも血清に含まれる抗体はスポロゾイトを認識することが分かった。次にこれらの抗体がスポロゾイト表面にある CSP に結合することでスポロゾイトの肝細胞への感染に影響を及ぼすか調べた。これまでの研究から、CSP はスポロゾイトの肝細胞への侵入に重要なタンパク質であり、抗 CSP 抗体はスポロゾイトの肝細胞への感染を阻害することが知られている。ハマダラカ唾液腺から解剖して得られたスポロゾイトを、頻回吸血によって抗 CSP 抗体が誘導されたマウスの血清中で培養した後、HepG2細胞に加え、マラリア原虫の増殖を18S rRNA を指標にリアルタイム PCR をもちいて解析したところ、これらの血清にはスポロゾイトの肝細胞への感染を抑制する能力があることがわかった。これらの結果は今回作出したシステムがネズミマラリアに対するワクチン媒介蚊としての機能を持つ可能性を示すものであり、本研究に用いた技術はマラリアに対するワクチン媒介蚊作製に有効なツールになり得ることを示すものである。

神経細胞樹状突起での局所翻訳後輸送経路における Golgi outposts の機能解析

自治医科大学解剖学講座解剖学部門
大江 総一, 野田 泰子

神経細胞において、神経細胞の成長、極性の獲得、神経突起の形成には細胞膜への膜成分並びに膜タンパク質の供給が必須な機序であり、それらは小胞体、ゴルジ体を介した分泌経路に依存していると考えられている。神経細胞では核周囲のゴルジ体に加え、樹状突起において Golgi outposts と呼ばれる、シス-トランスの極性をもつ微小な膜性槽の存在が確認されている。これまでの研究により、この樹状突起に存在する Golgi outposts は膜タンパク質の細胞膜への輸送や、樹状突起の極性形成に不可欠な細胞膜への膜脂質の局所的な供給源としての役割を果たしていると考えられているが未だ十分な研究が行われていなかった。

今回我々はゴルジ体のトランス側に局在する事が報告されていた Bicaudal-D2 (BicD2) に着目し、ラット脳 total RNA からのクローニング、蛍光タンパク質の付加、培養神経細胞への遺伝子導入を行い各種ゴルジ体マーカーとの共染色を行った。その結果、BicD2はゴルジ体選択的セラミドプローブである BODIPY と共局在するもののシス側タンパク質である GM130 とは共局在せず、さらにトラ

ンス側タンパク質である β -1, 4 ガラクトシルトランスフェラーゼとも共局在しなかった。また RNA 結合タンパク質であり RNA granule の構成タンパク質である CPEB, Stau2 との共発現実験の結果, BicD2 は CPEB とはよく共局在するものの Stau2 とはほとんど共局在しなかった。さらに免疫沈降実験の結果から BicD2 と CPEB が確かに相互作用する事が確認された。これらの結果から, 神経細胞樹状突起において構成タンパク質の異なる Golgi outposts が存在する事が示唆され, また BicD2 は一部の RNA granule にも局在する事が明らかとなった。

次に, 樹状突起における分泌タンパク質の局所翻訳および以降の膜輸送における Golgi outposts の役割を検証するために, 局所翻訳を受けるレポータータンパク質を発現するベクター (BDNF-GFP-CaMKII α 3'UTR, BDNF-GFP-3CPEs) を構築し培養神経細胞への遺伝子導入を行った。レポータータンパク質は遺伝子導入24時間後ゴルジ体に集積し, また細胞全体に分泌小胞として分布していた。ここでゴルジ体以降の分泌輸送経路をとめるために20°C 3時間培養したところ, ゴルジ体での集積には変化がなかったが小胞の局在が消失した。さらに20°C 3時間培養中に BDNF 50 μ g/ml 刺激を与えると樹状突起において顆粒状の局在が観察された。また BicD2 との共発現実験からレポータータンパク質と BicD2 の共局在が確認された。これらの結果から, BDNF 依存的に局所翻訳されたレポータータンパク質が Golgi outposts で集積しその過程に BicD2 が関与していることが示唆された。さらにこの局所翻訳されたレポータータンパク質は BicD2 同様に樹状突起において GM130 とともに β -1, 4 ガラクトシルトランスフェラーゼとも共局在しなかった。過去の報告から, 小胞体からゴルジ体への輸送を阻害することが報告されている Brefeldin A (BFA) は Golgi outposts を介する輸送経路には影響がないとされてきたが, 今回の系でも同様に, BFA 存在下においてもレポータータンパク質と BicD2 の局在に変化は見られなかった。

本研究結果より, 神経細胞樹状突起において BicD2 は RNA granule と相互作用し樹状突起に運ばれる mRNA の局所翻訳と Golgi outposts への集積に関与している事が示唆された。

マウスにおける消化管細菌叢の解析

内科学講座消化器内科学部門
特命学内講師 坂本 博次

【目的】転写因子である Cdx2 の胃粘膜における発現誘導が, 腸上皮化生の原因であると考えられているが, 正常胃粘膜における胃内細菌叢と腸上皮化生粘膜における細菌叢の差異については明らかではなかった。今回この点を明らかにするため, まず正常マウスの消化管細菌叢の検討を行った。

【方法】正常マウス (C57BL/6J) 12匹よりそれぞれ胃粘膜, 空腸粘膜, 回腸粘膜, 盲腸粘膜, 大腸粘膜, 糞便を採

取し, 各菌種に特異的な ribosomal RNA (rRNA) 分子を標的とした定量的 RT-PCR 法を行い存在する細菌の種類と数を解析した。

【結果】総菌数の中央値は胃粘膜5.2 (\log_{10} cells/g 粘膜), 空腸粘膜0.0 (\log_{10} cells/g 粘膜), 回腸粘膜5.2 (\log_{10} cells/g 粘膜), 盲腸粘膜6.7 (\log_{10} cells/g 粘膜), 大腸粘膜5.6 (\log_{10} cells/g 粘膜), 糞便10.2 (\log_{10} cells/g 糞便) であり, 胃, 回腸, 大腸ではほぼ同等の総菌数を示し, ヒトで一般的に見られる下部消化管で菌数が増える傾向は見られなかった。

各菌種別の検討では, いくつかの検体からは胃ではヒトの糞便によく見られる *Clostridium coccooides* group, *C. leptum* subgroup, 大腸では *Bifidobacterium*, *Prevotella* といった偏性嫌気性菌, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* といった通性嫌気性菌が検出されたが, 一部の検体に限られていた。中央値として解析した場合には盲腸, 糞便以外では *Lactobacillus* 以外の菌種はほとんど検出されなかった。

【考察】本研究で確認された細菌叢の種類は通常ヒトの腸内細菌叢で認められる細菌とほぼ同様の傾向が認められた。しかし, 通常ヒトでは検出されにくい胃粘膜からも各種細菌が検出された。これは胃内の pH がマウスではヒトよりも高く殺菌されにくいいため, またマウスが頻りに食餌を摂取しており, 口腔内細菌等が検出されやすい傾向があるためと考えられた。盲腸の総菌数が高い傾向が認められたのは, 盲端となっており内容物が停滞するためと考えられた。

今回得られた結果を基礎データとして, 今後腸上皮化生の胃粘膜における細菌叢の解析を行い比較検討する予定である。

色素上皮由来因子による新規軟骨肉腫治療法の検討

自治医科大学附属さいたま医療センター総合医学2
遠藤 実

骨肉腫などの全身化学療法が有効な骨原発性腫瘍と違い, 全身化学療法が無効な軟骨肉腫の5年生存率はいまだに50%程度と低い。そのため, 治療成績の向上にはこれまではない新たな展開が期待されている。腫瘍の進展には血管新生が必須である。そこで我々は, 生体内で最大の血管新生阻害効果を持つ色素上皮由来因子 (pigment epithelium-derived factor 以下 PEDF) に着目した。研究指導者である秋山達 (自治医科大学附属さいたま医療センター総合医学2 整形外科 講師) はこれまでに PEDF が破骨細胞機能の抑制効果も持つことを見出した。骨内に発生する軟骨肉腫が局所で増殖し転移巣を形成するには, 破骨細胞を誘導して骨を破壊する必要がある。さらに PEDF の腫瘍細胞抑制効果も報告されている。よって, PEDF は軟骨肉腫進展を複数の経路で阻害する可能性がある。PEDF の軟骨肉腫抑制効果を解析し, PEDF の軟骨肉腫治療効果を検討するのが本研究の目的である。

In vitro の研究予定は 1. PEDF の軟骨肉腫腫瘍細胞による破骨細胞誘導機能に対する効果, 2. PEDF の軟骨肉腫

腫瘍細胞による血管新生誘導に対する効果, 3. PEDF の軟骨肉腫腫瘍細胞に対する直接効果の *in vitro* の解析と, 軟骨肉腫臨床検体より様々なサイトカイン発現レベルの軟骨肉腫細胞株を樹立し, PEDF の有効性に関する検討, であった。

現在, 研究室を立ち上げている段階であるが, 破骨細胞誘導能に対する抑制効果と PEDF の軟骨肉腫腫瘍細胞による血管新生誘導に対する効果の確認はできている。

現時点では色素上皮由来因子 (PEDF) の骨代謝と血管新生における影響を *in vitro* の研究で解析している。

骨代謝と腫瘍成長において血管新生は非常に重要な役割を果たすため, 骨原発性悪性腫瘍である軟骨肉腫を研究する上で非常に重要な研究テーマである。

PEDF 生体内で最も強力な血管新生阻害因子であるため, 血管新生因子である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に対する作用に焦点を絞って研究を進めている。

VEGF の骨代謝における重要性はこれまでに報告されているが, PEDF が骨代謝においても拮抗するという点については報告されていない。

マウス骨髄細胞を用いた破骨細胞実験系による *pilot study* のデータでは VEGF は PEDF の効果を阻害し, 破骨細胞の骨吸収活性を回復し生存を延長した。しかしながら, 破骨細胞形成については強い形成促進作用は確認できなかった。最適条件が見つけられていない可能性があるため, 今後, 実験サンプル数が増やして, 最適条件を見つけ出す予定である。さらに VEGF に対する中和抗体が PEDF と同等の効果を持つかについても検討し, PEDF と VEGF の相互作用のみで破骨細胞への効果を説明できるかどうかを確認する。さらに, VEGF は破骨細胞分化誘導因子の一つである M-CSF と類似の機能を持つことが知られているので, M-CSF による PEDF 阻害機能があるかどうかについても確認する

以上のことを確認してマウス実験系を実施する予定である。