

平成23年度自治医科大学大学院医学研究科 研究奨励賞研究成果報告

亜ヒ酸誘発性 QT 延長に対する α -リポ酸の保護効果および作用機序の解明

地域医療学系専攻3年 熊崎 雅史

1. 目的

亜ヒ酸（三酸化ヒ素, As_2O_3 ）は、再発又は難治性の急性前骨髄球性白血病（APL）の治療薬であり、再発性 APL の第一選択薬として位置づけられている。しかしながら、亜ヒ酸は高率に心電図異常をきたし、torsades de pointes などにより突然死をもたらすことがあるために、その心毒性は臨床で大きな問題となっている。これまでに当教室では、亜ヒ酸による腎毒性に酸化ストレスが関与すること、および抗酸化作用を有するジチオール化合物である α -リポ酸がこの細胞毒性を軽減することを明らかにした。本研究は、 α -リポ酸が亜ヒ酸による心毒性に対しても保護効果を発揮するか否かを明らかにし、さらにその作用機序を解明することを目的とした。

2. 方法

1) 亜ヒ酸による QT 延長モデル動物の確立、および α -リポ酸の効果の検討。2) モルモット単離心室筋細胞を使用したパッチクランプ法による、心筋 K^+ 電流に及ぼす亜ヒ酸および α -リポ酸の効果の検討。3) 質量分析法 (ESI-TOF MS) による、両薬物の複合体形成の有無の検討。4) 亜ヒ酸誘発性 QT 延長に対する BAL (British anti-Lewisite) の効果の検討。

3. 結果

1) モルモットを使用した実験により、 α -リポ酸の同時および追加投与が亜ヒ酸による QT 延長を速やかに抑制することを明らかにした。2) モルモット単離心室筋細胞を使用したパッチクランプ法によって、亜ヒ酸による I_{Ks} 電流の抑制が α -リポ酸の添加によって通常レベルにまで回復することを明らかにした。3) 質量分析法を用いて亜ヒ酸および α -リポ酸の複合体形成の有無を確認したところ、両化合物が 1 : 1 の割合でキレート体を形成することを明らかにした。4) ヒ素中毒の解毒剤として臨床で使用されている BAL (キレート剤) が、亜ヒ酸による QT 延長を抑制するか否かを検討した結果、 α -リポ酸と同様に早急に QT 延長作用を抑制することを明らかにした。

4. 考察

α -リポ酸は非常に短時間（分単位）で QT 延長抑制作用を發揮することから、 α -リポ酸の有するキレート作用の関与が示唆された。実際に、BAL も亜ヒ酸による QT 延長を抑制することを確認した。従って、 α -リポ酸は亜ヒ酸と複合体を形成することにより心筋細胞に存在する I_{Ks} 電流の抑制を緩和し、早急に QT 延長抑制効果を發揮するものと考えられる。

室傍核 nesfatin-1 ニューロンの調節因子の解明

人間生物学系専攻3年
ガントウルガ グラムバザー

背景

Nesfatin-1 は Nucleobindin-2 由来の摂食抑制物質である。視床下部の paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN) の Nesfatin-1 ニューロンが摂食抑制に重要であることが明らかになっている。PVN の Nesfatin-1 ニューロンの下流神経経路に関してはいくつか報告があるが、PVN の Nesfatin-1 ニューロンの上流制御因子には不明な点が多い。PVN Nesfatin-1 の遺伝子発現は空腹で低下し、摂餌により増加することから、本研究では、摂食関連分子であるグルコース、インスリン、消化管ホルモン cholecystokinin (CCK) に着目し、これらが PVN Nesfatin-1 ニューロンの活性に影響するかを検討した。

方法

雄 C57BL/6 マウスから PVN を摘出し、酵素処理にてニューロンを単離し、カバーガラス上に静置した。Fura-2 を用いた蛍光画像解析により PVN 単離ニューロンの細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を測定した。各刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の測定後、抗 Nesfatin-1 抗体を用い免疫細胞染色を行い Nesfatin-1 ニューロンを同定した。

結果

グルコース (10 mM) (16.6%)、インスリン (10^{-13} M) (12.9%)、CCK (10^{-13} M) (20.5%) は PVN 単離ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ を増加させた。抗 Nesfatin-1 抗体による染色の結果、グルコース応答ニューロンの 58%、インスリン応答ニューロンの 63%、CCK 応答ニューロンの 50% が Nesfatin-1 ニューロンであった。

考察

本研究で、グルコース、インスリン、CCK は PVN 単離ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ を増加すること、これら 3 因子の PVN における主要な標的が Nesfatin-1 ニューロンであることを明らかにし、これら 3 因子を Nesfatin-1 ニューロンの活性化因子として同定した。これらはいずれも食後増加する栄養素やホルモンであり、食事による Nesfatin-1 ニューロンの活性化に関与している可能性が示唆された。

膵 β 細胞 グレリン受容体の同定と全身糖代謝における役割

地域医療学系専攻4年 倉科 智行

【背景】

グレリンは、胃から発見された 28 アミノ酸からなるペプチドホルモンで、成長ホルモン分泌作用、食欲亢進作用、

インスリン分泌抑制作用など多彩な作用をもつ。グレリンの受容体である成長ホルモン分泌促進因子受容体 (growth hormone secretagogue-receptor: GHS-R) は GTP 結合蛋白質共役型受容体であり下垂体, 中枢神経, 膵島などへの発現が報告されているが, 膵β細胞でのグレリン受容体が GHS-R であると証明した報告はなかった。グレリンの糖代謝調節作用については, インスリン産生臓器への作用と, インスリン標的臓器への作用のどちらが主因かは明らかでない。本研究では GHS-R 欠損マウス (GHS-R KO) を用いて膵β細胞でのグレリン受容体が GHS-R であること, GHS-R KO の膵β細胞選択的に GHS-R 遺伝子発現を回復したマウス (以下β GHS-R マウス) を用いて, グレリンの糖代謝調節作用がインスリン分泌とインスリン感受性のどちらへの作用がより重要かを明らかにすることを目的とした。

【方法】

GHS-R KO と野生型マウス (C57BL/6J:WT) およびβ GHS-R マウスと対照マウス (rat insulin promoter-Cre: RIP-Cre マウス) を用いて以下の実験を行い, 内因性・外因性グレリンの糖代謝に与える影響を検討した。

1. 腹腔内グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験, 2. 分離膵島インスリン分泌試験, 3. 単離膵β細胞内カルシウム濃度測定, 4. 膵島免疫染色

【結果】

GHS-R KO では耐糖能とインスリン分泌が改善していた。グルコース刺激性インスリン分泌 (GSIS) は野生型より大きな反応がみられた。グレリン投与による GSIS および膵β細胞内カルシウム濃度上昇の抑制は, WT で観察されたが, GHS-R KO では抑制を認めなかった。β GHS-R では, RIP-Cre に比し耐糖能・インスリン分泌に差を認めなかった。またグレリンによるインスリン分泌抑制は再出現していた。

【考察】

GHS-R KO の GSIS 増強は, 内因性グレリン作用消失によりインスリン分泌が促進することを示唆した。また GHS-R KO での外因性グレリン効果の消失は, 膵β細胞のグレリン受容体が GHS-R であることの証明といえる。β GHS-R マウスでは GHS-R KO でみられた耐糖能改善やインスリン分泌亢進が消失したことより, 膵β細胞の GHS-R が, 全身糖代謝に影響を与えることが示唆された。

【結論】

GHS-R 欠損マウスの耐糖能の検討により, 内因性グレリン作用阻害がインスリン分泌亢進を介して耐糖能を改善させることを示した。さらにβ GHS-R マウスの検討により, グレリンの糖代謝調節作用には膵β細胞への作用が相対的に重要であることを示した。

本研究の臨床的意義として, グレリンの糖代謝作用の主要な仲介臓器が膵β細胞であることを明らかにし, 膵β細胞 GHS-R を分子標的とした新規糖尿病治療薬への治療的展開の基盤となると考えられた。

床下部弓状核 AgRP ニューロンによる骨代謝調節

笹沼 秀幸¹⁾, 中田 正範²⁾,
矢田 俊彦²⁾, 星野 雄一¹⁾

¹⁾ 自治医科大学整形外科学教室

²⁾ 自治医科大学統合生理学教室

要約

視床下部弓状核 AgRP ニューロンによる骨代謝調節作用を同定するために, AgRP ニューロン内シグナル伝達物質である PDK1とその下流にある FoxO1に注目した。AgRP ニューロン特異的 PDK1欠損マウスを作成し, 次にこのマウスの FoxO1をドミナントネガティブ化する目的でΔ256 FoxO1をトランスジェニックしたマウス (Δ256FoxO1AgRP^{pd}Δ) を作成した。AgRP^{pd}Δマウスと AgRP Cre マウスのメスの比較で, Δ256FoxO1AgRP^{pd}Δマウスは低身長と大腿骨長の短縮を示した。大腿骨の pQCT 解析で皮質骨と海綿骨の骨密度・骨強度は低下していた。骨代謝回転は高回転型であった。また, 血中 GH と IGF1濃度の低下を認めた。視床下部 GHRH の mRNA 発現と下垂体 GH の mRNA 発現は低下していた。AgRP^{pd}Δマウスと Δ256FoxO1AgRP^{pd}Δのメスの比較では Δ256FoxO1AgRP^{pd}Δは骨密度が増加しており, 血中 IGF-1濃度が高値を示した。AgRP ニューロンの PDK1-FoxO1経路は骨代謝調節を行い, このシグナルは GHRH-GH-IGF1経路を介していることが示唆された。

造血器疾患の化学療法および造血幹細胞移植の治療成績改善のための合併症の現状解析

総合医学第1 仲宗根秀樹

【背景】

血液疾患の根治的治療として造血幹細胞移植が行われている。しかし, 移植片対宿主病という新たな疾病を生み出してしまう可能性がある。特に移植後後期に出現する慢性移植片対宿主病は, 患者の生活の質を脅かす最大の問題である。本研究は, その特異的治療を模索するため, 新たな視点から病態をとらえることを目的とした。

【研究方法】

1) 慢性移植片対宿主病に対するイマチニブの予防効果の検討

フィラデルフィア染色体陽性白血病 (PhALL/CML) の治療として用いられるイマチニブは, bcr/ablのみならず血小板由来因子受容体 (PDGF 受容体) の経路も阻害し, 慢性移植片対宿主病に伴う線維化を抑制し, 重症度を低下させる可能性がある。関東造血細胞移植共同研究グループ内の PhALL/CML 症例のうち, 移植後イマチニブ未使用20例と継続3か月以上のイマチニブ予防的使用76例を後方視的に比較した。

2) アディポネクチン濃度と移植片対宿主病の重症度との関連解析

慢性移植片対宿主病は自己免疫疾患と非常に類似した症状をとる。昨今、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンが、自己免疫疾患でも重要な役割を担っていることが報告された。同種移植患者34症例（男18:女16例）と健常人（男11:女15例）を対象として、血清高分子量アディポネクチン濃度を ELISA 法により測定し、移植後移植片対宿主病との関連性を検討した。

【結果】

1) 慢性移植片対宿主病に対するイマチニブの予防効果の検討

3年累積慢性移植片対宿主病発症率はイマチニブ使用群41.1% vs 未使用群71.3% (P=0.0083) であった。多変量解析では、イマチニブ使用が発症の低リスクとして同定された (HR 0.266, P=0.013)。

2) アディポネクチン濃度と移植片対宿主病の重症度との関連解析

移植症例34人のうち22人に慢性移植片対宿主病があった。血清高分子量アディポネクチン濃度は、慢性移植片対宿主病の有無別に、女性で 21.7 ± 11.0 vs 9.1 ± 6.1 $\mu\text{g/ml}$ (P<0.001), 男性で 10.1 ± 6.8 vs 4.3 ± 2.9 $\mu\text{g/ml}$ (P=0.003) と慢性移植片対宿主病を有する症例が高かった。多変量解析でも慢性移植片対宿主病の重症度が血清高分子量アディポネクチン濃度高値に関連した (P<0.01)。また移植症例の血清高分子量アディポネクチン濃度は、慢性移植片対宿主病の増悪とともに上昇し、改善とともに低下していた。

【結論】

慢性移植片対宿主病に対する分子標的治療薬による予防戦略や、アディポカインの関わりという新たな視点から病態生理を示すことができた。こうした取り組みが、今後の病態の解明と新規治療につながることを期待する。