

## 〔平成 20 年度山川寿子研究奨励賞受賞者研究発表〕

## 1. 慢性腎臓病と klotho の関連

(第四内科学) 杉浦秀和・土谷 健・新田孝作

〔目的〕 klotho はそのノックアウトマウスにおいて老化兆候を呈することより、老化抑制遺伝子として注目されている。また、FGF23 と共にカルシウム、リンの調節に関与することが報告されている。klotho 発現は比較的腎に特異的であるが、腎における老化に関する働きは十分に解明されていない。我々は、酸化ストレスモデルにて klotho の発現が減少し、klotho 過剰発現により酸化ストレス障害が改善したことを前回、報告した。慢性の酸化ストレスは慢性腎臓病の表現系である腎線維化の要因と考えられている。今回、腎線維化モデルにおける klotho 発現、線維化関連因子について検討した。〔方法〕(実験 1) 慢性腎線維化モデルとして Rat doxorubicin hydrochloride (DXR) induced nephropathy (1 回目 3mg/kg, 2 週間後に 2 回目 2mg/kg の DXR を尾静脈より静注) を作成。DXR 1 回目の投与後 16 週目に腎を採取した。(実験 2) klotho 低発現マウスにおいて腎を採取した。(実験 3) in vitro で mIMCD3 細胞を TGF-beta と共に培養し上皮間葉転換 (EMT) を生じさせ検体を採取した。それぞれ実験 1~3 の検体で klotho, 間葉系細胞のマーカーとして alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA), 上皮系細胞のマーカーとして E-cadherin を real-time PCR, Western blotting を用いて測定した。〔結果〕 in vivo の DXR nephropathy 群, in vitro の EMT 群 では, klotho, E-cadherin は減少し, alpha-SMA は増加していた。klotho 低発現マウスにて alpha-SMA の増加が認められた。〔結論〕 klotho は上皮マーカーである E-cadherin と同様な動きをし, 線維化マーカーである alpha-SMA と相反する動きをした。klotho は抗線維化作用を担い, 慢性腎臓病に関与している可能性が示唆された。今後は, klotho 低発現マウスを用いて, 腎線維化刺激による組織の変化を検討する予定である。

## 2. 超音波内視鏡を中心とする膵腫瘍の診断システム確立に関する研究

(消化器内科)

高山敬子

腫瘍性膵疾患は充実性腫瘍と嚢胞性腫瘍に大別され、組織型によりさらに多様な疾患を鑑別する必要がある。鑑別診断・悪性度診断・脈管侵襲などの病期・進展度診断に、mm 単位以下の詳細な評価が必要となる場合も多々あるが、この点に関して超音波内視鏡 (EUS) は消化管ガスなどのアーチファクトに影響されず膵全体を詳細に観察することが可能で、しかも被曝や検査の禁忌がなく、偶発症のリスクも少ないことから、膵疾患の画像診断において有用な検査法である。

膵腫瘍性疾患では、嚢胞性腫瘍では手術症例で術前

EUS 所見と病理所見とを対比した結果、嚢胞の形状・隔壁や被膜の有無と厚さ、膵管との交通の有無などからほぼ 9 割近くが EUS で術前に鑑別診断可能であった。また特に近年症例が増えている粘液産生性膵管内乳頭状腫瘍 (IPMN) では、嚢胞径や嚢胞内の壁に結節の有無・大きさなどから、EUS では 8 割前後で悪性度診断が可能であった。

また、膵病変に対する EUS ガイド下穿刺生検 (EUS-FNA) の診断能を検討した。穿刺回数少ない症例、経十二指腸的に穿刺した膵鉤部の症例などで検体不良となる傾向があった。重篤な偶発症はなかった。EUS-FNA は比較的安全に行える手技で、組織診断ができる点で臨床において有用と考えられ、診断率向上のため穿刺針・穿刺経路・回数・病理と細胞診の併診などの工夫を行っている。

## 〔平成 20 年度佐竹高子研究奨励賞受賞者研究発表〕

## 1. 日本人 2 型糖尿病疾患感受性遺伝子の同定

(第三内科学)

岩崎直子

我々は連鎖解析により日本人 2 型糖尿病感受性座位を 21 番染色体上に報告したが (Iwasaki N et al. Diabetes 2003), 今回はその結果に基づいて遺伝子の絞り込みを行った。当該領域に対し pooled DNA サンプル (対象 186/症例 189) を用いた CE-SSCP 法を行い、さらに個別サンプルの直接塩基配列決定法による関連解析によって 2 個の遺伝子に絞りこむことができた。うち 1 個の遺伝子について関連解析を行い、最終的に 1 個の有意な SNP を見出した (OR = 1.76,  $p = 6.7 \times 10^{-6}$ )。デンマーク人非糖尿病 4885 名, 2 型糖尿病 3531 名, 75g OGTT 正常型 5783 名を用いた検討では、リスクアレル頻度は 0.008 と極めて低く、白人で有意な関連を検出するためにはさらに多数のサンプルが必要であることが示され、人種による多様性が認められた。SNP の機能に関しては、リスクアレルを有する健常人で末梢血中の mRNA レベルが有意に高値であること、HEK293 細胞で強制発現させると、リスクアレルを導入した系において mRNA およびタンパク発現レベルが有意に上昇することを認めた。患者においてもアレルと診断後インスリン導入までの期間との間に有意な相関が認められることから、INS1 細胞でインスリン分泌への影響を観察した。siRNA により本遺伝子を knock down させると高グルコース濃度下でインスリン分泌を有意に増加させ、逆に強制発現させると有意に低下させた。次に、C57/B6 マウスとアキタマウスに siRNA 投与により mRNA を抑制したところ、アキタマウスでは糖負荷後に血糖値が有意に改善し、インスリン分泌の有意な改善が観察された。以上、全ゲノム連鎖解析ならびにその後の関連解析により、肥満を伴わない日