

[平成 21 年度山川寿子研究奨励賞受賞者研究発表]

1. 遺伝子導入線維芽細胞の肝細胞への分化誘導に関する研究

(消化器内科学)

小木曾智美

[目的]非代償期肝硬変の治療として線維芽細胞を用いて肝細胞に特異的な遺伝子を導入し、肝細胞に分化誘導することを目的として研究を行った。[方法]肝臓に発現する遺伝子 HNF3 β , 4 α , C/EBP β , および cMyc をレトロウイルスベクターに組み込み、それぞれクローニングした。大腸菌で増殖・発現させ、精製したプラスミドを Lipofectamine 2000 を用いて、293T 細胞にトランスフェクションし、ウイルス上清を回収した。凍結保存したウイルス上清を、添加 30 分前よりポリブレン処理をしたヒト皮膚線維芽細胞に感染させた。サイトカインや増殖因子、およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を添加した肝細胞培地に置換して培養。蛋白発現を immunoblot および蛍光抗体染色にて確認した。さらに肝臓のマーカーであるアルブミン(ALB), α フェトプロテイン(AFP), CYP3A4 の発現を PCR にて確認した。ALB は qPCR, ELISA 法にて定量化した。肝臓の機能的評価として、インドシアニンググリーン (ICG) の細胞内への取り込みと PAS 染色を行った。[成績・考案]ヒト線維芽細胞は肝細胞に特異的な遺伝子を発現していなかったが、レトロウイルス感染 2 日目には発現した。単独感染では 50% の細胞に遺伝子発現を認め、複数感染では 20% ほどに認めた。3 因子もしくは cMYC を加えた 4 因子の同時感染により、ALB 産生を認めるようになった。AFP は発現せず、4 因子の感染により CYP3A4 の発現を認めた。ALB 産生は感染 20 日後には 3ng/ml・3 日に増加した。感染細胞において、PAS 染色は陽性、ICG の取り込みを認めた。[結論]ヒト線維芽細胞に肝臓の遺伝子を導入することにより、成熟肝細胞誘導を認めた。

2. 間質性肺炎におけるロイコトリエンの役割

(内科学 (第一))

出雲雄大

[目的]近年、間質性肺炎 (ILD) ではロイコトリエン B₄ (LTB₄) や Th2 サイトカインがその病態に関わっていると考えられている。今回我々は ILD において LTB₄ や Th1, Th2 サイトカインと予後との関係について検討した。[方法]当科において 1995~2002 年の間に ILD の診断目的に気管支肺泡洗浄を施行し、臨床的に診断された特発性肺線維症 (IPF) 19 例および膠原病肺 21 例の計 40 例を対象とした。気管支肺泡洗浄液 (BALF) 中の LTB₄, IFN- γ , IL-4, IL-6 を測定し、中央値で 2 群に分け、予後との関係を Kaplan-Meier 法で検討した。また、手術肺組織について LTB₄ 受容体である BLT1 および BLT2 の免疫染色を行った。[結果]BALF 中の LTB₄ 高値群 (> 91.4pg/ml) と低値群 (\leq 91.4pg/ml) では高値群で有意に生存期間の低下を認めた (平均生存期間 19.4 ヶ月 vs 42.1 ヶ月, $p=0.037$)。一方、IFN- γ , IL-4, IL-6 は有意差を認めなかった。IPF 肺組織では正常肺と比較し肺胞マクロ

ファージ、肺胞上皮に BLT1 発現の増強を認めたが、BLT2 の発現は認めなかった。[結論]BALF 中の LTB₄ 高値は ILD の予後不良因子であり、BLT1 の発現増強から、その病態に LTB₄-BLT1 経路の関与が示唆された。現在、前向きに検討を行っている。

[平成 21 年度佐竹高子研究奨励賞受賞者研究発表]

1. レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系が脂肪細胞の機能・形態におよぼす影響

(¹内科学 (第二), ²国立病院機構京都医療センター) 田辺晶代¹・成瀬光栄²・立木美香¹・津曲 綾¹・木村 瞳¹・高野加寿恵¹・肥塚直美¹

[目的]アンジオテンシン (Ang) II は脂肪細胞の機能・分化に密接に関連する。本研究ではメタボリックシンドローム (Met-S) ラットにおいて Ang II 阻害が脂肪細胞機能、形態に及ぼす影響を検討した。[方法]高血圧自然発症ラット (SHR) に Leptin (Lep) 受容体遺伝子変異を導入した SHR/NDmcr-cp (ND) ラットを用いた。10 週齢の ND ラットに vehicle (ND 群), Ang II 受容体阻害薬 (ARB; ARB 群), Ang II に影響のない降圧剤 Hydralazine (Hyd 群) を 8 週間投与した。脂肪組織の Lep, Adiponectin (Adip), PPAR γ mRNA 発現, 血中 Lep (p-Lep) および Adip 濃度 (p-Adip) を解析した。さらに脂肪細胞形態を比較した。[成績]ND 群は非肥満 SHR と比較して体重, p-Lep, p-Adip, Lep mRNA が有意に増加, Adip mRNA, PPAR γ mRNA は有意な減少を示した。ARB 群, Hyd 群では ND 群と比較して血圧が有意に低下したが、体重, p-Lep, Lep mRNA は不変であった。ARB 群は Hyd 群と比較して p-Adip, PPAR γ mRNA 増加を示したが、Adip mRNA は両群ともに同等に増加した。脂肪細胞形態は皮下脂肪では 3 群間に差を認めず、内臓脂肪では ARB 群で細胞配列の不整形化、細胞の小型化が見られた。[結論]Met-S モデルラットにおいて Ang II 阻害は脂肪細胞の機能改善、分化誘導、リモデリングに関与することが示された。

2. 慢性糸球体腎炎に対するリツキシマブ治療

(内科学 (第四))

武井 卓

[目的]慢性糸球体腎炎に対する CD20 モノクローナル抗体であるリツキシマブの早期経過 (投与後 6 ヶ月) における有効性、副作用を検討する。[方法]リツキシマブ 375mg/m² の単回投与を行い、投与時と 1, 3, 6 ヶ月後の尿蛋白, 尿潜血, アルブミン, クレアチニン, IgG, A, M, CD4/8, CD19, CD20, IL-4, プレドニゾロン量の推移, 副作用を調べた。さらに、各疾患に分けて有効性を検討した。[結果]投与後 6 ヶ月では全体で尿蛋白は 3.7 \pm 3.4 から 1.3 \pm 2.0 g/day へ CD19 は 7.1 \pm 4.4 から 1.3 \pm 2.2%, CD20 は 7.4 \pm 4.2 から 0.5 \pm 0.7%, プレドニゾロン量は 16.6 \pm 12.4 から 7.5 \pm 9.7mg/day へ有意に低下した。疾患ごとでは、すべての疾患で CD19, CD20 は有意に低下した。微小変化群, 巣状糸球体硬化症, 膜性腎症で尿蛋白の有意な低下, アルブミンの有意な上昇が得られたが、IgA 腎