

実験動物セミナー 第27回研究成果発表会抄録

Abstracts of the 27th Seminar of Laboratory Animal Center

2016年12月15日 山形大学医学部 山形医学交流会館大会議室

一般講演 1

マウス精巣におけるシスチントランスポーター・xCTの生理的機能の解析

○浜島真司*, 本間拓二郎*, 小林翔*, 倉橋敏裕*, **, 渡辺連***, 木村直子***, 佐藤英世****, 藤井順逸* (*山形大学大学院医学系研究科生化学分子生物学, ** (現)京都府立医科大学細胞再生医学教室, ***山形大学農学部食料生命環境学科動物機能調節学, ****新潟大学医学部保健学科生化学分子生物学)

哺乳類の精子形成過程において、核の塩基性タンパク質であるヒストンがプロタミンに置換される。プロタミンのシステイン残基の間にジスルフィド結合が形成されることで成熟精子となり、運動能が向上するほか、DNAは酸化傷害から保護される。一方で、プロタミンは多数のシステインを含むため、この置換過程には大量のシステインを必要とする。

哺乳類の細胞膜上に発現するxCTは、細胞内のグルタミン酸との交換輸送により、細胞外のシスチン（酸化型システイン）を取り込むアミノ酸輸送体である。細胞内でシスチンはシステインに還元され、タンパク質や抗酸化物質であるグルタチオンの合成に利用される。精巣においてxCTが発現することが報告されているが、その生理機能は解明されていないことから、我々はxCTがプロタミン合成に必要なシステインを供給しているという仮説を立て、xCT欠損マウスを用いて検討を行った。

最初にxCT欠損による雄性生殖能力への影響を検討した。雄の野生型(C57BL/6)またはxCT欠損マウス(6-8週齢)に対して雌の野生型マウスを2匹ずつ1週間同じケージで飼育した。その結果、同居した雌を出産させることができた雄の割合は、野生型に比べxCT欠損マウスで低かった。

次にこの原因を検討した。まず、性的に未成熟な3週齢から性成熟した8週齢のマウスを用いて精子数を測定した。その結果、精子はどちらも6週齢から観察されたものの、精子数はジェノタイプ間に差はみられなかった。そこで、次に野生型マウス由来卵とそれぞれ野生型およびxCT欠損マウスの精子を用い、体外受精・培養(IVFC)を行ったが、やはり受精率・発生率に顕著な差はみられなかった。

また、野生型マウスの精巣におけるxCTのmRNA発現は3週齢から認められ、性成熟に伴い増加することがわかった。一方で、精巣中のシステイン量およびグルタチオン濃度はジェノタイプ間で差がみられなかった。他のシステイン供給経路であるトランススルフィレーションやオートファジーに関与するタンパク質の発現変動を検討したものの、同様に顕著な違いは認められなかった。

以上の結果をまとめると、xCT欠損雄性マウスは野生型に比べて、精子の受精能や精子数に異常がみられないにも関わらず、生殖能力が低いことが明らかになった。一方で、xCTは精巣において性成熟に伴い増加するものの、xCT欠損によるシステイン供給への影響は小さいことが示唆された。今後は、xCT欠損オスマウスの生殖能力が低い原因を解明するために、マウスの求愛行動や性ホルモン産生への影響についても検討する予定である。

一般講演 2

近交系マウスの交配による雑種強勢は胚の孵化様式に影響を及ぼす

○本田美咲, 坂原聖士, 高倉啓, 黒谷玲子, 阿部宏之 (山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻)

【目的】生殖生物学の分野では近交系マウスを交配して得られた雑種第一世代(F1)が実験に用いられることが多い。F1マウスは雑種強勢により胚の発生が良好であるが、その詳細について十分な解析は行われていない。

そこで本研究では、初期胚における雑種強勢の詳細を明らかにするために、近交系マウス及びF1マウスの胚の発生能、孵化様式、ミトコンドリア機能の解析と細胞骨格及び細胞接着分子の局在観察を行った。

【方法】近交系マウスはC57BL/6N、C3H/HeNを用いた。C57BL/6N及びC3H/HeNの交配によりB6C3F1(C57BL/6N♀×C3H/HeN♂)とC3B6F1(C3H/HeN♀×C57BL/6N♂)のF1を得た。それぞれのマウスから回収した受精卵をmWM(37℃、5% CO2 in air)で培養し、リアルタイム培養細胞観察装置(CCM, ASTEC)を用いて胚の発生率、発生速度、胚盤胞孵化率及び孵化様式(スリットサイズ; 透明帯に形成する切れ目の大きさで分類、脱出部位; 内部細胞塊の位置を基準に栄養外胚葉を分類、収縮回数; 体積収縮率20%以上をstrong、20%未満をweakと定義し分類)を調べた。ミトコンドリア機能は胚の酸素消費量、ATP含量及びミトコンドリア膜電位(JC-1)を測定した。細胞骨格(F-アクチン)及び細胞接着分子(E-カドヘリン)の分布はそれぞれActi-stainTM 488 phalloidin及びE-cadherin rabbit mAb (Alexa Fluor 594 Conjugate)を用いて調べた。

【結果と考察】近交系及びF1マウスの胚では、胚の発生率と発生速度に大きな差はなかった。培養7日目の胚盤胞孵化率(%)は、C57BL/6N、C3H/HeN、B6C3F1及びC3B6F1で、それぞれ17.0、39.7、40.0及び55.4であり、C3H/HeNが高い孵化能力を有し、雌親がC3H/HeNであるC3B6F1において孵化率が最大になった。母系因子であるミトコンドリアに着目し、胚盤胞の酸素消費量、ATP含量及びミトコンドリア相対膜電位を解析した結果、系統間で大きな差は見られなかった。一方、孵化時に透明帯に形成する切れ目の大きさに着目したところ、C57BL/6NとB6C3F1は大きな切れ目を、C3H/HeNとC3B6F1は小さな切れ目を形成する割合が高く、母系因子の影響が大きいことが示唆された。また、C3B6F1は脱出部位においてどの部位からも同程度の割合で脱出し、収縮回数においてはweakの回数が顕著に多かった。F1マウスの胚盤胞では収縮に関係しているF-アクチンは細胞膜直下に多く集合しており、細胞接着分子であるE-カドヘリンが細胞接着部分で顕著に観察された。以上の結果より、C57BL/6NとC3H/HeNの交配による雑種強勢は胚の孵化において強く発現し、母系因子の影響が強いことが示唆された。また孵化現象にはF-アクチンの集合及び栄養外胚葉における細胞間の強い接着が重要であることが示唆された。

一般講演 3

IL-21 isoform過剰発現マウスにおけるアナフィラキシー反応増悪のメカニズム

○武田裕司*, 荒木明美*, 根本信仁*, **, MD Yeashin Gazi*, 奈良英利*, 浅尾裕信* (*山形大学医学部免疫学講座, **山形大学医学部整形外科学講座)

【背景】Interleukin (IL)-21は、B細胞の高頻度突然変異誘導・NK細胞活性化・Th17細胞分化誘導など多様な活性を有する。このような多機能性サイトカインのIL-21は、次世代の免疫治療の有望な制御目標である。そこで我々は、IL-21 isoformがT細胞に特異的に発現するマウス(IL-21iso-Tg)を樹立し、IL-21の作用を明らかにする研究を進めている。IL-21 isoformはIL-21と同様の活性を示すことが判明している。

【目的】近年、今まで治療困難であった疾患に対し、特異抗体を用いた様々な生物製剤が臨床応用され、優れた治療成績が報告されている。そこで、当初、我々は、IL-21のB細胞の高頻度突然変異誘導能に着目し、IL-21iso-Tgを用いた高親和性イムノグロブリン(Ig)産生システム構築を目論んだ。そこで、モデル抗原のオovalbumin(OVA)を免疫したところ、通常のマウス(WT)と比し、IL-21iso-Tgの全身性アナフィラキシー反

応が増悪する現象を見いだした。この現象が高親和性抗体産生による結果と考え、血清中の抗体力価（親和性と抗体量）の測定を行った。しかし、予想に反し、抗体力価は、WTとIL-21iso-Tg間に違いを認めなかった。そこで、我々は、IL-21iso-Tgのアナフィラキシー反応増悪には、未知のIL-21の作用が内包されていると考え、この現象解明を試みた。

【結果】最初に、液性免疫応答が優勢に生じる系統のBALB/cを背景にしたIL-21iso-Tg (B/c-IL21iso-Tg) と、細胞性免疫応答が優勢に生じる系統のC57BL/6Jを背景としたIL-21iso-Tg (C/6-IL-21iso-Tg) のそれぞれについて、アナフィラキシー反応の感受性の違いを観察した。その結果、B/c-IL-21iso-Tgは、雌雄差なくアナフィラキシー反応増悪が生じた。一方、C/6-IL-21iso-Tgでは、アナフィラキシー反応増悪は、雄に限られた。組織学的には、小腸・脾臓において出血性の反応が認められたものの、IgE産生亢進は認められなかった。これらのことから、この増悪反応は、好酸球や好中球のFc受容体にIgGが結合することで誘導されるIgG誘導型アナフィラキシーで、且つ、IL-21iso-Tgにおいて、C/6-IL-21iso-Tgの雌以外に現れる現象であることが予想された。末梢白血球を検討したところ、雌のC/6-IL-21iso-Tgの好中球数が少なかったことから、好中球の作用がアナフィラキシー増悪に関与すると考えられた。小腸と脾臓は、恒常的にeotaxin-1,-2を発現して好酸球を恒常的に動員するため、IgG誘導型アナフィラキシーが生じ易い。そこで、eotaxin-1,-2のレセプターであるeotaxin receptor (CD193) の発現を検討した。通常では、CD193は、好酸球に発現し、好中球ではあまり発現しないが、IL-21iso-TgおよびIL-21存在下培養においてCD193が好中球で上昇していた。

【考察】これらのことから、IL-21iso-Tgでは、好中球分化の好酸球様分化への振動が生じてCD193発現が誘導され、アナフィラキシー増悪を生じさせたと考えられた。本研究結果から、IL-21は好中球にCD193を発現させ、エフェクター細胞増員を計り、腸管寄生などに対する防御反応の亢進に関与していると推察できる。

一般講演 4

JNK阻害薬AS602801による卵巣がん幹細胞の抑制

○榊宏諭*,**, 清野学*,**, 太田剛*, 永瀬智*, 北中千史**
(*山形大学医学部産婦人科学講座, *山形大学医学部腫瘍分子医科学講座)

【緒言】我々はこれまで卵巣がん幹細胞においてMAPキナーゼの一つであるc-Jun N-terminal kinase (JNK) ががん幹細胞の重要な特徴である自己複製能や腫瘍創始能、いわゆるがん幹細胞性の維持に必要であること、そしてJNK阻害薬であるSP600125が効果的に卵巣がん幹細胞のがん幹細胞性を喪失させることを明らかにし、JNK阻害薬が卵巣がん幹細胞治療薬として有用である可能性を報告してきた。しかしながらSP600125にはヒトに対する安全性情報が存在しないことから、速やかな臨床応用は困難と考えられる。そこで今回、子宮内膜症治療薬としてすでに第2相臨床試験まで完遂しているJNK阻害薬AS602801に着目し、その卵巣がん幹細胞に対する効果を検討した。

【方法】当科で樹立した卵巣がん幹細胞株A2780CSCおよびTOV21GCSCを使用した。これらの細胞に対して正常細胞に影響を及ぼさない濃度のAS602801で処理した後、細胞生存率をトリパンブルー染色法にて、細胞死誘導率をヨウ化プロピジウム取込法にて調べた。さらに一過的AS602801処理による自己複製能の変化を幹細胞マーカーの発現量およびsphere形成能を指標として調べた。また、一過的に薬剤処理した細胞をヌードマウス皮下に移植し、その後の腫瘍形成の有無を観察することで腫瘍創始能に与える影響を検討した。

【結果】AS602801は卵巣がん幹細胞に細胞死を誘導する一方で、生存細胞における幹細胞マーカー発現、sphere形成能を抑制した。また、一過的AS602801処理の後、生存した細胞は持続的に腫瘍創始能を失っていた。

【結語】AS602801は卵巣がん幹細胞に対して細胞死誘導効果およびがん幹細胞性喪失効果を有することから、卵巣がん幹細胞標的治療薬として有望

と考えられる。

一般講演 5

一過性の脂肪蓄積はSOD1欠損マウスの肝臓を酸化ストレスから保護する

○石井直樹*, 伊藤純一*,**, 明原隆介*, 李在勇*, 倉橋敏裕*,**, 本間拓二郎*, 藤井順逸* (*山形大学大学院医学系研究科生化学分子生物学, **山形県立河北病院内科, ***(現)京都府立医科大学細胞再生医学)

飲酒歴はないがアルコール性肝障害に類似した脂肪性肝障害の認められる病態をまとめてNAFLD（非アルコール性脂肪性肝疾患）と称し、良好な経過をたどる単純性脂肪肝と、炎症を起し線維化が進行するNASH（非アルコール性脂肪肝炎）に分類され、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型とみなされる。NASHの発症には、第1段階の脂肪肝と、酸化ストレスをはじめとするセカンドヒットが関与すると考えられている。成人の約1%がNASHと推測されているが、肝硬変から肝癌へと進行する可能性があるため、その原因究明と予防対策が必要である。

食欲を制御するホルモンであるレプチンに機能障害があると過食により脂肪蓄積が増すため、メタボリックシンドロームの病態解析モデルとして繁用されている。一方、最初に生じる活性酸素種Superoxideの消去を担う抗酸化酵素のSuperoxide dismutase 1 (SOD1) を欠損すると、酸化ストレスレベルの上昇・脂質代謝異常・短命化・肝癌の発生率上昇などを示す。そこで本研究ではNASHの病態解明を目的として、食欲制御に関わるレプチン受容体を欠損するdbマウスとSOD1欠損マウス (KO) を交配することで、過食と酸化ストレスの両方の危険因子が早期にNASH症状を示す病態をもたらすと考えて、二重欠損マウス (KO::db) を作製した。そして、1) 野生型、2) db、3) SOD1単独欠損マウス、4) 二重欠損マウスの4群のマウスに通常餌または高脂肪餌を与えて観察を行った。その結果、1年間でほぼすべての二重欠損マウスが死亡したが、期待に反して観察期間内にNASHの病態である線維化の進展を認めなかった。また、SOD1単独欠損マウスは通常飼育でも4割程度は死亡したが、高脂肪餌の投与で生存率は改善した。さらに、SOD1単独欠損マウスでは高脂肪餌投与により肝臓への脂肪蓄積は増加したものの、肝逸脱酵素が減少し、酸化ストレスマーカーも低値を示したことから、本マウスでは蓄積した脂肪が肝障害をむしろ軽減していると思われる。以上の結果から、慢性的な脂肪肝はNASHに進行する危険性があるものの、一過性に蓄積する脂肪にはむしろ酸化的障害から肝臓を護る効果があることが示唆された。

一般講演 6

薬物性肝障害はSOD1欠損により軽減される

○白土貴也*, 本間拓二郎*, 李在勇*, 倉橋敏裕*,**, 藤井順逸* (*山形大学大学院医学系研究科生化学分子生物学, ***(現)京都府立医科大学細胞再生医学教室)

【目的】Superoxide dismutase 1 (SOD1) は、細胞質とミトコンドリア膜間腔に存在し、酸素が一電子還元を受けて最初に生じる活性酸素種のSuperoxideを消去する抗酸化酵素である。SOD1を欠損したマウスの肝臓では酸化ストレスが増大する結果、小胞体ストレスを伴う軽度の肝障害が惹起され、脂質合成の亢進とリボタンパク質の分泌抑制が起こり脂肪肝となる。チオアセトアミド (TAA) は肝障害を誘導し肝線維化モデルを作製する際の薬剤として頻用されるが、cytochrome P450 (CYP) 反応によって生じる酸化代謝産物が実際の肝障害を引き起こす。本研究では、酸化ストレスとTAA誘導性肝障害の関係を調べる目的で、SOD1欠損マウスと野生型マウスにTAAを投与して検討を行った。

【方法】約10週齢の野生型 (C57BL/6) およびSOD1欠損雄マウスに、致死量のTAA (500 mg/kg) を腹腔内投与し、120時間まで観察して生存率を確認した。同様に、野生型マウスにSOD1阻害剤・テトラチオモリブデン酸アンモニウム (ATTM) を腹腔内投与した後、1時間後にTAA (500 mg/kg) を投与して生存を観察した。また、致死には至らないTAA (200 mg/kg)

を腹腔内投与し、24時間後に剖検を行い、血漿中ALT値の測定と、肝臓の組織学的ならびに生化学的解析を行った。ウェスタンブロット法により肝臓中の各種タンパク質の発現を解析した。

【結果】生存実験では、野生型マウスは36時間以内に全て死亡したのに対し、SOD1欠損マウスは全個体が観察期間を通して生存した。野生型マウスにSOD1阻害剤を前投与すると、SOD1阻害剤非投与群に比べて延命が認められた。TAA (200 mg/kg) を投与した場合の血漿中ALTは、野生型マウスと比較してSOD1欠損マウスでは低値であった。また、野生型マウスではTAA投与によりSOD1の発現量が減少したが、他の抗酸化酵素についてはいずれのマウスでも変化はなかった。SOD1欠損マウスではTAAの主要な代謝酵素であるCYP2E1活性が非投与群においても低下しており、TAA投与によって生成されるアセチルリジン修飾タンパク質量は野生型マウスと比較して減少していた。脂肪滴表面タンパクであるPerilipin 2 (PLIN2) のタンパク質量はTAA投与によってSOD1欠損マウスで顕著に増加し、Oil Red O染色画像においても脂肪滴の蓄積が確認された。

【考察】酸化ストレス状態であるSOD1欠損マウスは、野生型マウスに比べてTAAによる肝障害に対して耐性であった。SOD1欠損マウスではCYP2E1活性が低下していることでTAAによる肝障害が軽減されたと考えられる。

一般講演 7

アルデヒド還元酵素 (AKR1a) 欠損は四塩化炭素誘発脂肪肝を悪化させる

○明原隆介*, 本間拓二郎*, 李在勇*, 宮田哲**, 藤井順逸* (*山形大学大学院医学系研究科生化学分子生物学, ** (独) 地域医療機能推進機構大阪病院内科)

アルデヒド還元酵素AKR1aは、糖尿病合併症の原因の一つと考えられている終末糖化産物 (AGEs) の中間体である3-デオキシグルコソニルやメチルグリオキサールなどのジカルボニル化合物を無毒化する解毒酵素である。アスコルビン酸 (AsA) は霊長類などの一部の動物を除いて、D-glucoseから多段階を経て合成されるが、AKR1aとアルドース還元酵素 (AKR1b) がそのうちの一つの過程を触媒し、AKR1aがその8~9割を、残りをAKR1bが担っている。

四塩化炭素 (CCl₄) は、シトクロムP450 (主にCYP2E1) の作用により反応性の高いトリクロロメチルラジカル (・CCl₃) やトリクロロメチルペルオキシラジカル (Cl₃COO・) に変換され、酸化ストレスを誘導する。一方で、CCl₄は小胞体におけるミスフォールドタンパク質の蓄積を引き起こし、小胞体ストレスを誘導する。これらのストレスによりアポリポタンパク質の分泌抑制やミトコンドリアトリグリセリド輸送タンパク質 (MTP) の分解が促進する結果、脂肪肝や肝線維化を含む肝障害を引き起こすため、げっ歯類における肝病態モデルの作製に広く利用されている。

本研究では、野生型マウスおよびAKR1a欠損マウスのCCl₄誘発肝障害に対するAKR1aの防御効果について検討し、AsAがどのように関与するかについても併せて検討した。まず、CCl₄投与後、野生型マウスに比較してAKR1a欠損マウスでは脂肪蓄積が増悪化し、脂肪滴形成に関わるPLIN2のタンパク質量が顕著に増加していた。このとき、AKR1a欠損マウスでは小胞体ストレスが亢進していたことから、脂肪の分泌障害が強く起こり、脂肪肝が悪化したと考えられる。CCl₄投与によりいずれのマウスにおいてもCYP2E1のタンパク質量及び活性の減少が認められた。AKR1a欠損マウスの肝臓ではAsAの合成量が少ないため、CCl₄投与後にCYP2E1による代謝活性化で生じたラジカルの消去能が低下し酸化ストレスが亢進することが示唆された。一方で、AsAの自由給水によりAKR1a欠損マウスではCCl₄投与による酸化ストレス、小胞体ストレスおよび脂肪肝形成が緩和された。以上の結果から、AKR1a欠損マウスではAsAが欠乏するためにCCl₄投与で酸化ストレスが増加し、その結果タンパク質の酸化的折りまの障害による小胞体ストレスが亢進して脂肪肝が悪化したと考えられる。

一般講演 8

セクレトグロビン3A2の肺気腫抑制に対する可能性

○小野莊太郎*, 木下昂宗**, 荒井康子**, 阿部宏之*, 黒谷玲子* (*山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻, **山形大学工学部バイオ化学工学科)

セクレトグロビン (SCGB) 3A2は主に肺気管支上皮細胞で産生される新規の分泌タンパク質であり、各種マウスモデルを用いた実験によりアレルギー性肺炎と肺線維症の改善と肺発生における気管支分岐促進や増殖促進効果を有することが明らかになっている。一方、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) はタバコ煙などの有害物質を長期に吸引曝露することで生じ、気道病変と気腫病変が複合的に作用する多因子疾患であり、未だ治療法が確立されていない。本研究では、種々の機能を有するSCGB3A2がCOPDにおいても改善効果を示すのではないかと期待した。

実験にはC57BL/6N系の*Scgb3a2*^{-/-} 欠損 (KO) マウスおよび肺特異的過剰発現 (TG) マウス、および野生型 (WT) マウスを使用した。COPDマウスモデルは6ヶ月間のタバコ煙曝露によって作製した。初めに、マウスの肺コンプライアンスを評価し、KOマウスでは非曝露条件下でWT、およびTGより有意に高いことが明らかになった。肺胞壁間距離 (Lm) と肺胞の破壊指数 (DI) の評価では、タバコ煙曝露によりWTとKOマウスのLm値とDI値は共に増加したが、TGマウスでは曝露による上昇は認められなかった。この時、WTとTGマウスでのSCGB3A2に対する免疫組織化学によって、WTマウスではタバコ煙曝露によるSCGB3A2発現の低下が確認され、TGマウスでは曝露後も高い発現が観察された。以上の結果から、SCGB3A2による気腫化抑制の可能性が示唆された。そこで、SCGB3A2による気腫化抑制の作用機序解明のためにα1-antitrypsin (A1AT) に着目した。A1ATの免疫組織化学の結果、曝露によってA1AT発現はWTマウスで減少し、KOマウスでは曝露非曝露に関係なくA1AT発現はほぼ認められなかったが、TGマウスでは曝露後もA1AT発現は維持されていた。我々はSCGB3A2がSTAT1のリン酸化を促進することを既に報告しており、STAT3がA1AT転写を促進することが報告されていることから、マウス肺繊維芽細胞株MLgを用いてSCGB3A2のA1AT発現におけるSTAT1とSTAT3の機能をウェスタンブロット法にて解析した。SCGB3A2は、A1AT, STAT1, STAT3発現及びSTAT1とSTAT3のリン酸化を促進した。siRNAによるSTAT1とSTAT3のノックダウン (KD) 実験では、STAT3-KDによってA1AT発現は減少し、STAT1-KDによって増加した。以上の結果より、SCGB3A2はSTAT1とSTAT3を介してA1ATを調節することが示唆された。また、SCGB3A2はSTAT3のリン酸化を促し、A1AT発現量を増加し気腫化の抑制に寄与する可能性が示された。

一般講演 9

成長因子Midkineは細胞表面のNucleolinを介し肺動脈性肺高血圧症を悪化させる

○木下大資, 宍戸哲郎, 高橋徹也, 横山美雪, 高橋大, 有本貴範, 宮本卓也, 渡邊哲, 今田恒夫, 久保田功 (山形大学医学部内科学第一講座)

【背景】肺動脈性肺高血圧症は根本的治療のない進行性の疾患である。Midkineは細胞増殖、抗アポトーシス、炎症細胞の遊走など、多彩な作用を有する成長因子である。一方、Nucleolinは細胞表面に発現し、細胞増殖に関与するMidkineの受容体の一つと考えられている。本研究では肺動脈性肺高血圧症において、Midkineが細胞表面Nucleolinを介して、肺動脈性肺高血圧症の進行に関与すると仮説を立て検討を行った。

【方法・結果】低酸素誘導肺高血圧マウスおよび肺動脈性肺高血圧患者の血清・肺でMidkineの発現が見られた。Midkine欠損遺伝子改変マウスでは低酸素誘導肺高血圧における肺血管リモデリングおよび右室肥大が抑制されていた。肺動脈血管平滑筋細胞 (PASMC, pulmonary arterial smooth muscle cell) において低酸素刺激により、Nucleolinの核から膜への局在変化が見られた。MidkineとNucleolinの免疫沈降では、低酸素刺激により

MidkineとNucleolinの相互作用が増加した。Midkineは上皮成長因子受容体(EGFR, epidermal growth factor receptor)の活性化を促すが、MidkineによるEGFRの活性化は、低酸素下でさらに増強した。MidkineによるPASMCの増殖作用は、正酸素下に比べて低酸素下ではさらに増強した。siRNA (small interfering RNA) を用いてNucleolinの発現を抑制すると、MidkineによるEGFRの活性化は抑制された。またEGFRの発現を抑制すると、MidkineによるEGFR下流シグナルのERK1/2 (extracellular regulate kinase) の活性化が抑制された。Nucleolin阻害剤のAS1411はMidkineとNucleolinの結合を抑制し、MidkineによるEGFRの活性化および細胞増殖を抑制した。Su5416を用いて作成したラット重症肺高血圧モデルにおいても、AS1411は右室収縮期血圧を有意に低下し、右室肥大を軽減した。組織学的検討では、AS1411投与により肺血管リモデリングが有意に抑制され、細胞増殖マーカーであるPCNA (proliferation cell nuclear antigen) の発現が有意に減少した。

【結論】Midkineは低酸素刺激により細胞表面に発現したNucleolinを介して、肺動脈性肺高血圧の進行に関与することが示唆された。

一般講演10

マクロファージにおける転写因子MafBとエフェロサイトーシスの関係

○佐藤正道, 中野寛之, 佐藤建人, 五十嵐朗, 東海林吉兼, 井上純人, 柴田陽光, 久保田功 (山形大学医学部内科学第一講座)

【背景】アポトーシスは動物にとって生体の維持に必要な不可欠な機構である。また、アポトーシス細胞を生体内で処理する機構であるエフェロサイトーシスも同様に重要な機構である。本研究では当講座で研究している転写因子MafB (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B) とエフェロサイトーシスの関係について検討した。

【方法】当講座でMafBの発現を抑制したRAW264.7-MafB-shRNA cell lineとそのコントロールとしてRAW264.7-control-shRNA cell lineを樹立した。それらを用いて、アポトーシス細胞の貪食能であるエフェロサイトーシスの陽性細胞の割合について蛍光顕微鏡下およびフローサイトメトリーを用いて検討した。また、エフェロサイトーシスのレセプターとして報告されているAxlについてリアルタイムPCRおよびウエスタンブロッティングを用いてmRNAおよび蛋白を相対定量し比較した。さらに、green fluorescent protein (GFP)-tagged Axl plasmid (MG50126-ACG, Sino Biological Inc.) またはコントロールとしてGFPのみを発現するempty plasmid (VCA-1003, Lonza, Basel, Switzerland) をRAW264.7-MafB-shRNA cell lineにエレクトロポレーション法を用いて導入し、Axlを強制発現させて、エフェロサイトーシスについて比較した。

【結果】RAW264.7-MafB-shRNA cell lineでエフェロサイトーシスは著明に抑制されていた。また、AxlのmRNAおよび蛋白発現はRAW264.7-control-shRNA cell lineと比較し、RAW264.7-MafB-shRNA cell lineで著明に抑制されていた。また、empty plasmidを導入したRAW264.7-MafB-shRNA cell lineと比較し、GFP-tagged Axl plasmidを導入しAxlを強制発現させたRAW264.7-MafB-shRNA cell lineでエフェロサイトーシスは亢進していた。

【結論】MafBがAxlの発現を制御することが示唆された。MafBを抑制することでRAW264.7細胞のエフェロサイトーシスが抑制され、これらの結果からMafBがAxlの発現を促進し、エフェロサイトーシスを亢進させることが示唆された。

一般講演11

二重表面修飾型インプラントの作製と骨結合性

○米澤美咲, 山本修 (山形大学大学院理工学研究科)

【緒言】現在、齲蝕・歯周炎や事故等が原因で天然歯を喪失した患者に対し、歯科用インプラントの埋植治療が盛んに行われている。その一方で、我が国は世界でも類を見ない超高齢化社会に突入しており、高齢者に対するインプラント治療では歯槽骨の骨量低下や骨萎縮等の症例が挙げられ、

抜歯窩の骨形成の促進とインプラント治療期間の短縮が求められている。そこで我々はクロムイオンによるコラーゲン分子の架橋形成および亜鉛イオンによる骨形成促進(分化・石灰化の促進)を目的とし、これら2つの因子を導入した新規インプラントの開発を考えた。本報告では二重表面修飾型インプラントを作製し、*In vivo*で評価した結果、インプラント治療期間の短縮および骨結合力の増大が明らかとなったことについて報告する。

【材料作製と実験方法】テトラヒドロキシ亜鉛酸水溶液およびヘキサヒドロキシ酸水溶液の2種類の表面処理溶液を調整した。まず、円柱状純Ti製インプラント(φ 2 mm × 10 mm)をテトラヒドロキシ亜鉛酸水溶液に浸漬し、70℃で24 h保持することで亜鉛修飾型インプラントを作製した。その後、ヘキサヒドロキソクロム酸水溶液に浸漬し、60℃で3 h保持することによりクロム修飾を行い、洗浄・乾熱滅菌処理を経て動物実験用インプラント(二重表面修飾型インプラント: Zn / Cr Ti)とした。山形大学動物実験委員会の承認と指針に基づき、骨-インプラント間の結合性を*In vivo*で評価した。麻酔下におかれた日本白色家兔(Std: JW / CSK)の大腿骨を露出後、直径2 mmの孔を形成、孔内にZn / Cr Tiを埋植した。4～12週間経過後の大腿骨を摘出し、骨-インプラント間の剪断強度測定を行い、骨結合強度の指標とした。

【結果と考察】平均表面粗さ(Ra)は未処理のTiが約0.42 μmであるのに対してZn / Cr Tiではその値が約0.85 μmに増加していた。また、水接触角は、未処理のTiでは約90°であるのに対してZn / Cr Tiでは4.5°に低下したことからZn / Cr Tiは極めて高い親水性を有していることがわかった。Zn / Cr Tiを37℃に保持した生理食塩水中に浸漬させ、液中へ放出されたイオン濃度をICP-MSにて測定した結果、72 hでZnイオンが約0.05 μmol / L、Crイオンが約0.16 μmol / Lの放出が確認された。これらイオン量は、既知の細胞毒性を示す濃度(IC50値)よりも低値であることがわかった。また、Zn / Cr Ti表面に存在するCr成分は三価の化合物であり、細胞傷害をもたらすとされる六価クロムではなかった。ウサギを用いた*In vivo*実験では、4、8および12週間経過後のZn / Cr Tiの骨結合力は、それぞれ約5.04 MPa、約6.71 MPa、約9.09 MPaであった。このことから値は未処理の純Tiと比較して著しく高い骨結合力を示すことがわかった。この結果は、インプラント表面から放出されたZnイオンおよびCrイオンが関与したと推定された。これらの結果から作製したZn / Cr Tiは高い骨結合力をもたらす新規インプラント材料として期待できると考えられる。

一般講演12

親水基付与した炭素材料の骨接着性

○永井克樹, 山本修 (山形大学大学院理工学研究科)

【諸言】金属製歯科用インプラントと上部構造の合金との間で生じるガリパニック作用(異種金属接触腐食)による金属イオン溶出の危険性が近年指摘されている^[1]。そこで金属イオンの溶出が生じないインプラントの開発が急務である。炭素材料は細胞学的に低侵襲性で金属イオンの溶出がない。しかし、自家骨とインプラントが強固に接着するには炭素材料表面を親水化する必要がある。本研究では、親水基を付与したガラス状炭素と未処理のガラス状炭素(以降AQ-GC, C-GC)の骨接着性の比較を*In vivo*で評価・検討を行ったので報告する。

【実験手順】ロッド状AQ-GC(Φ2mm×10 mm)と水が接触したときの角度をマイクロスコープにて測定した。次に骨とインプラントの骨接着性を*In vivo*で評価した。本動物実験は、山形大学動物実験委員会の承認に基づいて行った。まず、AQ-GCを24 h紫外線滅菌後、麻酔下におかれた日本白色家兔の大腿骨に2 mmの孔を形成し、孔内にAQ-GCを埋入した。4、8および12週間経過後に大腿骨を摘出し、骨-インプラント間の剪断強度を測定した。骨接着試験後、基材表面の付着物を顕微鏡及びラマン分光光度計で観察・分析した。インプラント周囲の骨組織はヘマトキシリン・エオシン染色され、生物顕微鏡で組織観察を行った。

【結果と考察】水接触角度は、C-GCが約90°であるのに対してAQ-GCでは51°に低下していたことからAQ-GCは親水性であることがわかった。骨

インプラント間の剪断強度は埋入期間の経過に伴い増大し、埋入12週の時にC-GCが約1.8 MPaであったのに対して、AQ-GCでは約5.6 MPaとなり、有意差が認められた。大腿骨から取り出したインプラント表面に付着物の存在を観察したところ、付着物は骨由来の無機および有機成分を含む物質であることがわかった。組織観察より、すべての埋入期間において骨中の炎症性所見は認められなかったことから、AQ-GCは生体に対し為害性を示さないと考えられた。本研究で得られたAQ-GCの骨接着性は表面が疎水性のより約3倍高い。また、市販されている純チタン製インプラントと比較した場合でも、約4倍の高い骨接着性を示した。4、8及び12週全ての埋入期間においてAQ-GCはC-GC及びTiよりも有意に高い骨接着性を示した。この結果は、インプラント表面の親水性が接着タンパクの吸着を高め、埋入初期段階での骨-インプラント界面の一次固定化の促進に関与したと推察した。これらの結果より、骨接着性を高めるためには親水性が必要でありAQ-GCは高い骨接着性をもたらしインプラントであることが明らかとなった。

参考・引用

[1] M. Yamazoe ; “Study of corrosion of combinations of titanium/Ti-6Al-4V implants and dental alloys” ; *Dental Materials Journal* 29 : 542- 553 (2010)

一般講演13

亜鉛修飾型チタンメッシュによる骨再生と組織観察

○渡辺麗奈*, 齋藤健太*, 山本修** (*山形大学工学部, **山形大学大学院理工学研究科)

【諸言】骨は生体部位によって微構造が異なり、骨髄量の差によって骨再生能力が異なるため、骨髄量の多い大腿骨と比べて頭蓋骨は骨再生能力が低くなる。骨折や頭蓋骨の欠損などの骨損傷に対して、プレートやメッシュ状のチタンを用いての修復・固定をする治療が行われている。しかし、プレートを用いた骨治癒には長期間を要し、頭蓋骨への埋植部位ではメッシュの露出と骨吸収が起こることが欠点として指摘される。そこで骨の形状に適した成形が可能かつ生体適合性をもつ骨再生用足場としてチタンメッシュを選択した。さらに、チタンメッシュに亜鉛イオンを修飾することにより、硬組織と軟組織の再生効果が得られると考えた^{[1][2]}が、骨再生に適したメッシュの目の大きさも明らかにされていない。そこで、本研究では、目の開きが異なる亜鉛修飾したチタンメッシュの足場効果を大腿骨と頭蓋骨を用いて*in vivo*で評価することを目的とした。

【材料作製と実験手順】80 meshのチタンメッシュを8 mm×13 mmの長方形、100 meshと30 meshのチタンメッシュを直径11 mmの真円状に加工し、それぞれ大腿骨および頭蓋骨埋植サンプルとした。0.5 mol/Lのテトラヒドロキシ亜鉛酸溶液を調製し、チタンメッシュを60℃で24時間浸漬することで、亜鉛修飾型チタンメッシュ (Zn-modified Ti) を作製した。また、未修飾のものをControlとした。作製した材料は、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による表面粗さ計測と走査型電子顕微鏡 (SEM) による表面形態観察で評価した。山形大学動物実験委員会承認の下で、SDラットの大腿骨に約3 mm×10 mmの長形、頭蓋骨に直径約8.5 mmの円形の骨欠損を作成し材料の埋植実験を行った。4週間経過後、骨を摘出して骨再生評価を行った。評価方法は形状観察、骨欠損部に対する骨再生率の算出、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による組織学的評価を行った。

【結果および考察】CLSMおよびSEMによる観察の結果、Zn-modified Tiの表面は亜鉛修飾により微細な網目状の構造が観察され、Controlよりも表面粗さが有意的に増大した。大腿骨欠損部に80 meshを埋植した結果、Control、Zn-modified Tiともに骨欠損は完全に修復した。摘出骨のHE染色切片を観察したところ、Zn-modified Tiの再生骨はControlよりも厚く形成されたことから、Zn-modified Tiは大腿骨における骨再生を促進する効果があることがわかった。頭蓋骨の欠損部に100 meshと30 meshを埋植した。ControlとZn-modified Tiの骨再生率に有意差は認められなかった。しかし、摘出骨のHE染色切片を観察するとZn-modified TiはControlと比

べて再生骨が厚く再生され、再生骨内部に骨芽細胞が多数存在していた。この結果は、Zn-modified TiはControlよりも骨形成が亢進していることを示している。また、100 meshと30 mesh ともにメッシュ表面に新生血管とコラーゲン層が形成された。コラーゲン層はControlよりもZn-modified Tiの方が厚く形成された。100 meshと30 meshのメッシュ上のコラーゲンを比較すると100 meshの方が厚いコラーゲンが形成された。100 meshのコラーゲンのHE染色切片を観察した結果、ControlよりもZn-modified Tiの方が頭皮側に太く密なコラーゲンが形成された。100 meshのZn-modified Tiにおいてコラーゲンが密に形成されたのは、体表面積当たり亜鉛の溶出量が多いことに起因すると考えられる。以上の結果より、Zn-modified Tiは硬組織と軟組織の再生に有効な材料である可能性が示唆された。

参考・引用

[1]Kazuyuki Yusa: In vitro prominent bone regeneration by release zinc ion from Zn-modified implant,Biochemical and Biophysical Research Communications 412, p273-278, 2011

[2]Yu Sasaki, Sathi Gulsan Ara, Osamu Yamamoto:In vivo evaluation of wound healing property of zinc smectite using a rat model,Journal of the Ceramic Society of Japan 124 (12) (印刷中)

一般講演14

多血小板フィブリンによる家兎膝骨軟骨欠損の修復効果

Efficacy of platelet rich fibrin for osteochondral repair of the knee in a rabbit model

○丸山真博, 佐竹寛史, 成田淳, 本間龍介, 長沼靖, 高木理彰 (山形大学整形外科科学講座)

【目的】多血小板フィブリン (PRF) は、ガラス製の採血管にて血液を遠心することにより、ウシトロンビンや塩化カルシウムなど添加物を必要としない自己血由来のフィブリンゲルである。PRFは多血小板血漿と同様に多種の成長因子を含み、骨分化誘導能を有することから歯科領域で用いられている。一方、PRFの軟骨分化誘導能については*in vitro*の報告は散見されるが、その効果については不明な点が多い。本報告の目的は、PRFによる骨軟骨欠損の修復効果について家兎を用いて調査することである。

【方法】週齢13週の子日本白色家兎42羽を用いた。PRF群と対照群に分けた。PRF群では、全身麻酔下に心臓より採取した血液10 mlをガラス製の採血管に入れ3,000 rpm、10分間遠心し、中間層に生成したフィブリンゲルをPRFとして使用した。右膝蓋骨溝に直径5 mm、深さ5 mmの骨軟骨欠損を作成し、PRFを欠損部に充填した。反対側は別の実験を行った。対照群では何も投与しなかった。骨軟骨修復について、術後3週、6週、および12週にICRSスコア (12点満点、0点:未修復, 12点:完全修復)を用いて肉眼的に評価した。また、サフラニンO染色を行い、Wakitaniスコア (14点満点、14点:未修復, 0点:完全修復)を用いて組織学的に評価し2群間で比較した。評価は盲検下に医師3名が行った。統計学的分析にはMann-Whitney *U* 検定を使用し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】肉眼的評価では、術後3週のPRF群は対照群と比べ軟部組織で修復され、ICRSスコアは有意に高かった (PRF群 5.1 ± 1.3 , 対照群 3.4 ± 0.5 , $P < 0.01$)。術後6週および12週では、2群とも欠損部は修復され、ICRSスコアに差はなかった (術後6週: PRF群 11.1 ± 1.2 , 対照群 9.4 ± 3.0 , $P = 0.34$, 術後12週: PRF群 11.6 ± 0.5 , 対照群 11.1 ± 0.4 , $P = 0.07$)。組織学的評価では、術後3週のPRF群は基底部に軟骨組織が増生し、対照群よりもWakitaniスコアが有意に低かった (7.3 ± 1.5 , 9.3 ± 2.0 , $P < 0.05$)。同様に、術後6週では、PRF群のほうがサフラニンOの染色性が良好であり、軟骨様組織の増生が多くみられ、WakitaniスコアはPRF群が有意に低かった (3.4 ± 2.6 , 7.0 ± 2.8 , $P < 0.05$)。術後12週では、PRF群の欠損部は硝子様軟骨組織で修復されていたが、対照群は線維軟骨様組織で覆われていた。術後12週のWakitaniスコアはPRF群が有意に低かった (3.0 ± 2.1 , 6.1 ± 3.0 , $P < 0.05$)。

【考察】PRFを充填することにより骨軟骨欠損は硝子軟骨様組織で修復されたことから、PRFは骨軟骨損傷に対する新しい治療法になる可能性が示唆された。

一般講演15

ハチミツの小腸機能回復効果に関する研究

○高橋巧，増田夏海，山内彩綾，鈴木拓史（山形大学地域教育文化学部食環境デザインコース）

【背景と目的】小腸は、栄養素の消化・吸収を介して我々の生命を維持するだけでなく、腸管に張り巡らされた神経ネットワークを介した恒常性維持にも寄与している。この小腸機能を維持しているのが消化管内への栄養素の流入刺激である。この刺激が長期に渡り途絶えると小腸絨毛は顕著に萎縮し、その機能は衰退する。したがって、このような状態から速やかに離脱することが健康的な生活を営むためには重要となる。これまでに、小腸絨毛萎縮を伴う小腸機能低下状態からその機能を回復させるために、単糖類であるグルコースとフルクトースの経口摂取が有効であることを明らかにしている。そこで本研究では、単糖類としての糖質を80%以上含むハチミツを持つ栄養特性に着目し、ハチミツの経口摂取が小腸機能回復に与える影響を検討した。

【方法】Wistar系雄ラット（8週齢、体重約200g）に対して、中心静脈栄養法（TPN）を7日間施行した。TPNでは、1日当たり250 kcal/kgとなるようにシリンジポンプを用いて頸静脈に留置したカテーテルを介したTPN輸液投与を実施した。TPN施行後8日目から1日当たりの投与熱量の10%あるいは20%となるようにハチミツ溶液とハチミツ溶液中に含まれる単糖組成と同量のグルコース・フルクトース混合溶液のいずれかを経口から3日間投与した。投与終了時に解剖し、空腸組織を採取した。採取した空腸組織を用いて、小腸絨毛形態観察、栄養素の消化・吸収関連遺伝子発現解析、タンパク質発現解析、二糖類分解酵素活性測定を実施した。

【結果と考察】ハチミツの経口摂取は、低下した小腸機能を顕著に回復させた。とくに、三大栄養素の消化・吸収機能の回復に対して有効であることが明らかとなった。その有効性は、1日当たりの全投与熱量の10%相当のハチミツの投与で確認された。一方、20%熱量相当の糖溶液を摂取させた群では顕著な効果が見られなかった。その理由として、多量の糖溶液の経口投与が、消化管に対して悪影響を与えた可能性が示唆された。身近な食品でありながら、小腸機能回復・小腸機能維持にとって有効な栄養素を豊富に含むハチミツは、小腸機能回復促進補助食品としての利用が期待される。また、ハチミツを日常的に摂取することで健常な小腸機能維持効果が

期待される。一方で、ハチミツの多量摂取は、含有しているフルクトースの過剰摂取に繋がる可能性も併せ持つため、ハチミツの1日当たりの適正摂取量については、今後の検討課題である。

一般講演16

慢性アルコール投与が恐怖条件づけ記憶に与える影響

○高橋直弘*，田口将啓*，三浦裕希*，山田隆明*，藤原浩樹*，添川清貴*，金子健也*，大津芳**，藤井聡*（*山形大学医学部生理学講座，**山形大学環境保全センター）

【背景】飲酒と記憶に関しては、我々の日常生活において非常に深い事柄である。慢性的アルコールの摂取は自分の意志でコントロールできなくなる精神的依存、震顫妄想などの退薬症状等を引き起こし、アルコール依存症の患者は、うつ病、不安障害、統合失調症等、心身に多くの疾患を抱える危険性を持っている。

アルコールの急性的な摂取によるアルコール性記憶障害は一般に広く知られているが、アルコールの慢性投与による影響に関しては不明な点が多い。本実験では、恐怖条件づけを用いて、記憶の記録と想起に重点を置いて検討する。条件刺激には光刺激、無条件刺激には電撃を対呈示し、消去では条件刺激のみの呈示を行い、アルコールの慢性投与が記憶にあたえる影響について検討した。

【方法】被験体はウィスター系雄性ラットを用いた。被験体の飼育環境は22±2℃、湿度50±10%、12/12時間の明暗サイクル（午前6時の点灯）で維持した。被験体は7日間、食餌と水は自由摂取状況下で飼育され、被験体は約3か月間、アルコール飼料またはコントロール飼料の食餌制限下で飼育した。実験に先立ってすべての被験体はハンドリングを経験した。恐怖条件づけでは、被験体は16週齢ウィスター系雄性ラットを用いた。恐怖条件づけ過程では、光刺激10秒間呈示後1mA500m秒の電撃の対呈示を5回行った。消去過程では、光刺激10秒間を30回呈示し、3日間行った。

【結果】恐怖条件づけでは、慢性アルコール投与が記憶の記録、想起に影響を及ぼすか検討した。条件づけでは、慢性アルコール投与の有無では差が認められなかったが、試行回数が増加するごとに恐怖が獲得された。よって、アルコールの慢性投与は記憶の記録に影響しなかった。また、消去手続きでコントロールに比べ慢性アルコール投与が恐怖記憶の想起されにくいことが示された。恐怖条件づけでは、慢性アルコール摂取が恐怖記憶の想起を悪くしたと結論した。慢性アルコール投与により恐怖記憶の想起に影響を及ぼすことが示された。