

実験動物セミナー 第28回研究成果発表会抄録

Abstracts of the 28th Seminar of Laboratory Animal Center

日時：平成29年12月21日(木) 14:00~18:00

場所：山形医学交流会館 大会議室

【一般講演1】

炎症性発がんにおけるIL-21の関与

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

【背景】慢性炎症は発がんの大きな背景要因である。ヒトの悪性腫瘍の少なくとも15-20%は、慢性炎症と関連があるとされている。ある種の大腸がんにおいても、潰瘍性大腸炎のような慢性炎症が背景にあるとされ、潰瘍性大腸炎は、大腸がんのリスクファクターである。IL-21アイソフォームをT細胞特異的に発現させたマウス(IL-21isoTgマウス)では、野生型マウスに比し、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)経口投与による潰瘍性大腸炎が増悪することを私達は既に報告している。このマウスに発がん誘導物質であるアゾキシメタンを前投与したところ、大腸がんの発生もより亢進することが分かった。この結果から、IL-21は、慢性炎症から発がんという一連の流れに強く関与することが推察された。

【目的】IL-21はB細胞に対してactivation-induced cytidine deaminase(AID)発現を亢進し、抗体遺伝子のクラススイッチや体細胞高頻度突然変異を誘導することが知られている。AIDは、生理的条件下では活性化B細胞のみに発現しているが、炎症臓器では異所性にAIDが発現し、遺伝子変異や染色体異常を引き起こすなど、発がんに関与していることが明らかにされている。本研究では、IL-21isoTgマウスでの大腸がんの発症に、IL-21によるAIDの誘導が関わっているのかどうかを明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】初めに、DSS誘導大腸炎の大腸組織においてAIDの発現が増加しているかRT-PCR法により調べたところ、コントロール組織に比し、有意に増加がみられた。また、AOM-DSSを投与したマウスの大腸上皮細胞(IEC)においてもAIDの発現が増加している傾向があった。これらAIDの発現上昇にIL-21が直接作用しているのかどうかを調べた。無処置のIECでは、弱いながら、IL-21受容体と γ c鎖の発現がみられ、IL-21で刺激したIECでは、ERK1/2の活性化が認められた。また、刺激後のERK1/2のCV値(Coefficient of Variation)が低下したことから、IL-21による細胞情報伝達分子の変化があることが分かった。さらに、これらIL-21の受容体発現はTNF- α 刺激により増加傾向を示し、炎症に伴って増加する可能性が示唆された。そこで、IECをIL-21単独、あるいはIL-21とTNF- α で刺激したところ、AIDの発現増加が確認された。次に、上記の結果をマウス大腸癌細胞株Colon-38を用いて確認した。Colon-38もIL-21受容体と γ c鎖を発現し、それらの発現は、IECと同様にTNF- α 刺激により増加した。さらに、IL-21やTNF- α 刺激によるAIDの発現増加も確認された。

【考察】以上の結果より、IL-21が炎症状態にある大腸上皮細胞上のIL-21受容体を介してAIDの発現を増加させ、炎症性発がんへと導いている可能性が示唆された。

【一般講演2】

マウス関節炎モデルにおける腸管免疫系の変化

○根本信仁**, 武田裕司*, 奈良英利*, 荒木明美*,
Md Yeashin Gazi*, 黒田悠太***, 高木理彰**, 浅尾裕信*
(*山形大学医学部免疫学講座, ***同整形外科学講座, **同腎泌尿器外科学講座)

演者の希望により抄録の掲載は控させていただきます。

【一般講演3】

パーキンソン病薬として開発されたCEP-1347はがん幹細胞標的治療薬として働く

○岡田雅司*, 武田弘幸**, 榎 宏倫****, 鈴木修平**,
北中千史* (*山形大学医学部腫瘍分子医科学講座, **同臨床腫瘍学講座, ***同産婦人科学講座)

がん幹細胞は、高い未分化性や自己複製能・腫瘍創始能をもつ腫瘍中のごく一部のみに存在する細胞でありがんの再発・転移を担っていることから、がん幹細胞の制御こそががんの根治を目指す重要な鍵になると考えられている。このがん幹細胞の制御を目的として我々は、c-Jun N-terminal kinase (JNK) が様々ながん腫のがん幹細胞において自己複製能や腫瘍創始能といったがん幹細胞性の維持に必須の役割を果たしていること、代表的なJNK阻害薬であるSP600125が様々ながん幹細胞のがん細胞性を喪失させ、その腫瘍創始を抑制可能であることを本実験動物セミナー研究成果発表会にて報告してきた。これらの知見はJNK経路ががん幹細胞治療標的として有用であることを示しているが、上記SP600125が現在使用されているJNK阻害薬はヒトに対する安全性情報が存在せず、ヒトへの応用は現状困難であることが予想される。近年新薬の開発に関してドラッグリポジショニングと呼ばれる既存の治療薬から別の疾患に対して有効な薬物を見出す手法が注目を浴びている。今回我々は、パーキンソン病治療薬として開発され第二相試験はクリアしたが目的とした効果が得られなかった、Mixed-lineage kinase (MLK)-JNK経路阻害薬であるCEP-1347が、がん幹細胞を標的として働く可能性を見出したので報告する。

正常細胞および正常神経幹細胞に毒性を与えない濃度においてCEP-1347はグリオブラストーマ、卵巣がん、膀胱がん由来の種々のがん幹細胞に対して分化及び脱幹細胞化を誘導し、さらに自己複製能をも抑制した。また、一過的にCEP-1347で処理したグリオーマ幹細胞および膀胱がん幹細胞をヌードマウス皮下に移植すると、対照群では腫瘍が形成されたがCEP-1347処理群は全く腫瘍が形成されない、もしくは一旦形成されたとしても腫瘍の退縮したことから、CEP-1347は*in vitro*において腫瘍創始能を抑制可能であることが明らかとなった。*In vivo*実験においては、ヒトに投与可能量の1/10量程度のCEP-1347をマウスに一過的に全身投与することで、腫瘍中の腫瘍創始能力のあるがん幹細胞数を減少させる事をグリオーマ幹細胞連続移植モデルを用いて明らかにした。さらに、グリオーマ幹細胞同所性移植モデルを用いてCEP-1347を全身投与すると有意な生存期間の延長を認めた。以上の結果より、パーキンソン病治療薬として開発されたCEP-1347はドラッグリポジショニング法を用いることで、がん幹細胞を標的として*in vitro*のみならず*in vivo*でも有効に作用することが明らかとなったことから、CEP-1347は様々ながん幹細胞標的治療薬として有望であると考えられる。

【一般講演4】

セクレトグロビン3A2の肺気腫抑制メカニズムの解明

○小野莊太郎, 木下昂宗, 坂原聖士, 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)
演者の希望により抄録の掲載は控させていただきます。

【一般講演5】

セクレトグロビン(SCGB)3A2の加齢による肺への影響

○車塚日明*, 大島 蘭**, 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, **同工学部バイオ化学工学科)

演者の希望により抄録の掲載は控えさせていただきます。

【一般講演6】

マウス下垂体前葉におけるSCGB3A2発現制御機構の解明

○佐藤鈴奈*, 木下昂宗**, 坂原聖士**, 阿部宏之**, 黒谷玲子**
(*山形大学工学部バイオ化学工学科, **同大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻)

演者の希望により抄録の掲載は控えさせていただきます。

【一般講演7】

核内HMGB1はDNA傷害応答を介してアンジオテンシンIIによる病的心臓リモデリングを抑制する

○高橋徹也, 宍戸哲郎, 高橋 大, 有本貴範, 宮本卓也, 渡邊 哲, 久保田 功, 渡辺昌文 (山形大学医学部内科学第一講座)

演者の希望により抄録の掲載は控えさせていただきます。

【一般講演8】

マウス胚における微小管形成とミトコンドリア呼吸機能の解明

○佐藤 翼, 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)

演者の希望により抄録の掲載は控えさせていただきます。

【一般講演9】

高精度ミトコンドリアDNAコピー数定量システムの開発

○渡邊 光, 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)

演者の希望により抄録の掲載は控えさせていただきます。

【一般講演10】

近交系マウスの交配による雑種強勢は胚のハッチングにおいて発現する

○本田美咲, 渡邊 光, 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)

演者の希望により抄録の掲載は控えさせていただきます。

【一般講演11】

絶食したSOD1欠損マウスに蓄積する脂肪滴は臓器障害の原因とはならない

○李 在勇, 小林 翔, 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・分子生物学講座)

Superoxide dismutase-1 (SOD1) は、酸素分子が一電子還元を受けて最初に生じるsuperoxideを消去する酵素で、主に細胞質に、そして一部はミトコンドリア膜間腔に局在する。その欠損により活性酸素種の寿命が延長するため、全身に酸化ストレスをもたらす。SOD1欠損マウスに高脂肪餌を与えて飼育すると、野生型マウスに比べて肝臓により多くの脂肪滴が蓄積するが、内臓脂肪の蓄積量は野生型マウスに比べてむしろ少ない。本マウスの初代培養肝細胞では脂肪合成が活性化され、急速に脂肪滴が蓄積するが、この過程にはSOD1欠損により増加した酸化ストレスと小胞体ストレスが関係する。また、野生型マウスの場合は、絶食1日目をピークに肝臓に一過性の脂肪滴の蓄積が起こり2日目には減少するが、SOD1欠損マウスでは、絶食後3日目でも脂肪滴の大部分がそのまま保持され、一方で肝障害が惹起される。このようにSOD1欠損による酸化ストレス下では様々な脂質代謝異常が認められる。

本研究では、絶食したSOD1欠損マウスの臓器に蓄積する脂肪滴が臓器障害の原因となると考え、脂質代謝を中心に検討を行なった。3日間絶食した後に再給餌すると、野生型マウスでは体重がほぼ1日で回復したが、SOD1欠損マウスのほとんどは回復せずに死亡した。絶食により糖質から主に脂質を利用するようにエネルギー代謝が変化するため、絶食中の脂肪酸とその代謝産物であるケトン体を測定した。その結果、血中脂肪酸

の増加の程度は野生型に比べて少なく、主要なケトン体成分の β ヒドロキシ絡酸については2日目からすでに減少に転じた。組織学的解析では、肝臓以外にも腎臓と心臓に顕著に脂肪滴の蓄積と障害が認められ、ALT・BUN・CPK・LDHといった臓器障害マーカーが増加していた。一般に蓄積脂肪は臓器の機能不全の原因と考えられている。そこで高脂肪餌の摂取は脂肪滴の蓄積量を増やし絶食による障害を悪化させる要因ではないかと考え、SOD1欠損マウスに高脂肪餌を2週間摂取させ、その後に絶食を行なった。その結果、高脂肪餌の摂取で各臓器の脂肪滴の蓄積量はむしろ多かったにもかかわらず、絶食による臓器障害や生存率はむしろ改善するという予想に反する結果が得られた。以上の結果は、酸化ストレスに伴って形成される脂肪滴は、飢餓時には臓器障害を抑え生存の維持に働くことを示しており、ストレス時に脂肪合成が亢進し脂肪滴を蓄積するのは、野生動物が厳しい自然環境を生き抜くための適応のひとつとして獲得してきた防御系と考えることができる。

【一般講演12】

ϵ 型ジアシルグリセロールキナーゼの欠損は脂肪細胞における脂質代謝異常を惹起する

○中野知之, 後藤 薫 (山形大学医学部解剖学第二講座)

脂質は生体膜構成要素であると同時に生命活動のための重要なエネルギー源である。一方、脂質代謝の異常は肥満や二型糖尿病の原因となるため、そのホメオスタシスは厳密に制御されている。すなわち、摂食などにより得られるエネルギーのうち、余剰分は主に脂肪細胞の脂肪滴に中性脂質 (TG) として貯蔵されるが、TGは必要に応じて分解され、エネルギー源として利用される。TG合成の中間産物であるジアシルグリセロール (DG) は、プロテインキナーゼC (PKC) やRasGRPなどを活性化する脂質性二次伝達物質としても機能することから、エネルギー代謝系と細胞内情報伝達系の分岐点に位置すると考えられる。よってDGの代謝は両者のバランス制御において重要な役割を果たす。DGキナーゼ (DGK) はDGをリン酸化しフォスファチジン酸を産生する酵素であり、哺乳類において10種のアイソザイムからなる酵素ファミリーを形成する。各アイソザイムは異なる細胞内局在を示すことから、オルガネラ特異的な機能を果たすと考えられている。我々は、DGKアイソザイムのうち、脂質合成に中心的な役割を果たす小胞体に局在するDGK ϵ の機能解析を行ってきた。

本研究では、DGK ϵ 遺伝子欠損 (KO) マウスを高脂肪食 (HFD) で40日間飼育し、脂肪、肝臓、骨格筋など糖脂質代謝関連臓器における変化を解析した。その結果、HFD給餌DGK ϵ -KOマウスは、野生型マウスに比べて、精巢上体周囲白色脂肪組織における過剰な脂肪沈着を伴う体重の増大が生じることを見出した。組織学的解析の結果、DGK ϵ -KOマウスの脂肪細胞は野生型に比べて大型化し、マクロファージの浸潤が顕著であることが明らかになった。ウェスタンブロット解析の結果、脂肪組織におけるTG分解に中心的な役割を果たすAdipose triglyceride lipase (ATGL) およびDGをモノアシルグリセロールに分解するhormone sensitive lipase (HSL) のタンパク発現が低下していたことから、同マウス白色脂肪細胞では脂質分解能が低下し、貯蔵TGおよび中間産物DG量が増加していることが示唆された。さらに、糖負荷試験の結果、HFD給餌のDGK ϵ -KOマウスでは高血糖レベルの遷延が生じていた。両マウスの間にインスリン分泌能に差は認められず、さらにDGK ϵ -KOマウスではインスリンシグナル経路を抑制するPKC θ の活性化が生じていたことから、インスリン抵抗性が惹起されていることが示唆された。以上の変化は肝臓や骨格筋では認められないことから、HFD給餌下で顕われるDGK ϵ -KOマウスの体重増加、すなわち肥満は白色脂肪細胞における脂質分解能の低下が直接の原因であることが考えられた。

【一般講演13】

創傷ラットモデルを用いたハイドロジンカイト粉末の皮膚再生効果

○中山賢典, 山本 修 (山形大学大学院理工学研究科)

【緒言】皮膚の瘻痕組織は正常皮膚と内部構造が異なり、審美性の低下、ひきつれ等による運動機能の低下につながる。したがって、皮膚内部の組織を正常皮膚に近い組織へ再生させることが重要になる。そこで、治癒機能を活性化させる因子として Zn^{2+} イオンに注目した。亜鉛は生体における必須微量元素であり、生体内の多くの酵素において活性の中心をなしている。この酵素は創傷治癒に必要な血管新生やコラーゲンの線維化に起因するので、創傷部位に Zn^{2+} イオンを供給することで酵素の働きを増強し、創傷治癒を促進すると考えた。本研究では創傷内への Zn^{2+} イオン溶出量とpHを制御できると考えられるハイドロジンカイトに注目し、ハイドロジンカイトの皮膚創傷治癒効果の検証及び創傷治癒に適した合成条件の選定を研究目的とした。

【実験方法】粉末試料は亜鉛源と炭酸源の混合し、pHを調整しながら中和反応によって粉末試料を合成した。合成した粉末は粉末X線回折測定(XRD)により結晶構造の同定をした。また Zn^{2+} イオン溶出量とpH測定は粉末スラリー液を用いて測定した。山形大学動物実験委員会承認の下、粉末試料の創傷治癒効果を検討した。麻酔下のラットの両腹側部に皮下組織に至る創傷を作成し、右腹側部をControl群として創傷被覆材を適用し、左腹側部には0.005gの粉末試料を塗布した後に創傷被覆材を適用した。1～4週間経過後、創傷部位の組織学的観察と血管数カウントを行った。

【実験結果と考察】合成した粉末試料のサンプル名はZN-Na-7、ZN-Na-9、ZS-Na-6.5、ZS-Na-7、ZS-Na-9とし、実験に使用する試料とした。これら粉末試料のXRD回折パターンはZS-Na-6.5のみブライアニングイト相と同定され、他の粉末試料はハイドロジンカイト相と同定された。 Zn^{2+} イオン溶出量測定の結果、粉末試料から Zn^{2+} イオンの溶出が認められた。粉末スラリーのpHは、pH 6.99からpH 8.19の範囲であった。1、2週間経過後のヘマトキシリン・エオジン染色の結果、ZN-Na-9を塗布した創傷部位には、Controlと比較してより強い炎症性細胞浸潤を認めた。この理由は、ZN-Na-9を塗布したことで創傷部位のpH値が上昇し、至適なpH値から逸脱したためであると考えられる。マッソントリクローム染色を行った切片を観察したところ、ZS-Na-7を塗布した創傷部位ではControlや他の粉末と比較して太く密なコラーゲン線維が形成されていた。また、4週間経過時のControlとZS-Na-7の組織を比較すると、ZS-Na-7の創傷部位のコラーゲン線維において配向性を持ち、より正常皮膚に近い皮膚再生が観察された。この結果より、Controlより粉末試料を塗布することで治癒が進行することが明らかとなった。またハイドロジンカイトにおいてZS-Na-7が創傷治癒の好適材料であると考えられる。

【一般講演14】

シモンコライトにおける創傷治癒の有意の効果

○永島美希, 山本 修 (山形大学大学院理工学研究科)

【緒言】創傷治癒には様々な酵素が関与しており、その1つに亜鉛依存性マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)がある。MMPsはタンパク質分解酵素の1つであり、炎症性細胞から産生される。MMPsは活性部位に Zn^{2+} イオンを持ち、創傷治癒において細胞遊走や血管新生を亢進することが期待される。本研究では Zn^{2+} イオンの溶出が期待できる材料としてシモンコライトを創傷に適用し、創傷治癒の有意の効果を検討することを目的とした。

【実験】亜鉛源とアルカリ源を用いた液相合成により、シモンコライト粉末 $Zn_5(OH)_8Cl_2 \cdot 5H_2O$ を作製した。さらに、比表面積の増加に伴う Zn^{2+} イオン溶出量の増加を目的として、シモンコライトをセラミックスボールミルで粉砕した。粉末特性評価として結晶構造の同定、pH及び Zn^{2+} イオン溶出量測定を行った。動物実験は以下のように行った。山形大学動物実験委員会承認の下、ラットの両腹側部に皮下組織に至る創傷を作成した。Control群は医療用創傷被覆材のみを適用し、Sample群はシモンコライト粉末0.005gを塗布後、医療用創傷被覆材を適用した。経過観察期間終了後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、マッソントリクローム(MT)

染色及び新生血管数の計測により組織評価を行った。

【結果と考察】作製した粉末はX線回折パターンにより $Zn_5(OH)_8Cl_2 \cdot 5H_2O$ のシモンコライト単一相であると同定された。生理食塩水中におけるシモンコライト粉末のpH値は角化細胞及び線維芽細胞増殖における至適pHの範囲内であった。測定された Zn^{2+} イオン溶出量は細胞増殖を阻害しない $500 \mu\text{mol/L}$ 以下であった。組織染色の結果、経過観察期間2週間で観察された細胞種はControl群とSample群の間で違いはなかった。しかし、コラーゲンの形成はControl群と比較して、Sample群では正常に近いコラーゲンの配向性が観察された。また、経過観察期間4週間ではControl群で再生されなかった皮膚付属器(毛包)がSample群で観察された。この結果より、Sample群が正常皮膚と類似構造を持つことが明らかとなった。また Zn^{2+} イオンは血管新生に関与しているため、創傷部の新生血管数を計測した。Control群と比較して、Sample群では血管新生の亢進が認められた。以上の結果より、ラットに対するシモンコライト粉末の創傷治癒効果が明らかとなった。そこで、ラットよりヒト皮膚に近いブタの創傷にシモンコライト粉末を適用した。経過観察期間2週間ではControl群と比較してSample群の方が上皮化の亢進が認められた。観察された細胞種はControl群とSample群の間で違いはなかったが、Sample群でコラーゲン形成の亢進が認められた。新生血管数計測の結果、Control群と比較してSample群は血管数が有意的に増加した。以上の結果より、ヒトの皮膚に近いブタに対してもシモンコライト粉末の創傷治癒効果が認められた。したがって、コラーゲン形成及び血管新生の亢進から、シモンコライト粉末から溶出した Zn^{2+} イオンによって創傷治癒が亢進されたと結論づけられた。

【一般講演15】

頭蓋骨欠損の再生における亜鉛修飾チタンメッシュの重要性

○渡辺麗奈, 山本 修 (山形大学大学院理工学研究科)

【緒言】骨髄量の少ない頭蓋骨は、大腿骨より骨再生能力が低いことが知られている。骨再建術や頭蓋骨の欠損などの骨損傷がある場合、骨セメントやメッシュ状チタンが用いられているが、治療には長期間かかり完全な修復には至らない。骨再生には骨由来の細胞が必要であるが、頭皮側の結合組織からの血管も必要になる。それにはメッシュの目の大きさが関係するが、骨再生に適したメッシュの目の大きさは明らかになっていない。亜鉛イオンは硬組織の石灰化と軟組織の血管新生に働くことが知られている。そこで、本研究では亜鉛イオン放出が可能となる亜鉛修飾チタンメッシュに施し、異なるメッシュに関する骨再生効果を*in vivo*で検討した。

【実験方法】30および100 meshのチタンメッシュを直径11mmの真円状に加工した。まず、0.5mol/Lのテトラヒドロキソ亜鉛酸溶液を調製し、60°C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。作製した材料に対して、表面形態の観察と表面粗さ計測を行った。山形大学動物実験委員会の承認に基づいて、SDラットおよびブタの頭蓋骨に直径約8.5mmの円形の骨欠損を作成し、材料の埋植実験を行った。SDラットでは4週間、ブタでは3週間経過後に骨およびメッシュ上に形成された軟組織を摘出し、骨欠損部に対する骨再生率の算出とヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、マッソントリクローム(MT)染色による組織学的評価を行った。

【結果と考察】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に増大した。

頭蓋骨の欠損部に30および100meshを埋植した結果、頭蓋骨の骨再生には、目の細かい100meshが適しており、Zn-modified Tiが骨再生を亢進させることが明らかになった。さらに、摘出骨のHE染色切片を観察した結果、Controlと比較してZn-modified Tiの新生骨内部および表面には豊富な骨芽細胞が存在していた。MT染色切片を観察した結果、Zn-modified Tiは自家骨からの細胞質領域の延長が新生骨の先端部にみられた。また、Zn-modified Tiの軟組織の組織学的評価を行った結果、軟組織のメッシュ

側には豊富な新生血管が観察された。以上のラットにおける実験結果より、頭蓋骨の骨再生には100meshが適していることが明らかになった。

次に、ヒトの頭蓋骨の構造と類似しているブタの頭蓋骨を用いて実験を行った。埋植材料を100meshとし、頭蓋骨欠損作成時に硬膜を残存させた。巨視的観察の結果、Controlは欠損が大きく残っていたのに対し、Zn-modified Tiの欠損部は完全に修復していた。摘出骨のHE染色切片を観察した結果、Controlと比較してZn-modified Tiは新生骨部の石灰化が亢進していた。MT染色切片を観察した結果、Zn-modified Tiの骨欠損作成部に形成されたコラーゲン組織は、太く密で配向性があった。100meshのZn-modified Tiを埋植することで頭蓋骨の骨再生が亢進することが明らかになった。

以上の実験結果より、100meshのZn-modified Tiは頭蓋骨の骨再生に非常に有効であり、骨再生に対するメッシュの効果が明らかとなった。

【一般講演16】

ミニブタと硬性樹脂包埋を用いた胆管金属ステント留置による組織学的影響の検討と新規ポリマーコーティングステントの安全性評価

○石澤哲也, 牧野直彦, 安藤嘉章, 松田暁子, 柿崎泰明, 斎藤吉彦, 池田千咲, 菅原心平, 上野義之 (山形大学医学部内科学第二講座)
演者の希望により抄録の掲載は控させていただきます。

【一般講演17】

CoQ₁₀とアスコルビン酸によるSOD1欠損雌マウスの生殖機能の改善

○石井直樹*, 本間拓二郎*, 李 在勇*, 小林 翔*, 三橋 輝**, 木村直子***, 山本順寛**, 藤井順逸* (*山形大学大学院医学系研究科, **東京工科大学大学院, ***山形大学大学院農学研究科)

酸素分子が一電子還元を受けて生じるスーパーオキシドからは種々の活性酸素種が連鎖的に生成し、健康障害や老化促進の原因となる。したがって、スーパーオキシドの消去を担う抗酸化酵素SODは、酸化ストレスから生体を防御する上で重要な役割を果たしている。SOD1ホモ欠損 (KO) 雌マウスは産仔数の著しい低下を示し、酸化ストレスによる不妊症のモデルとなる。*in vitro*の検討では、KOマウス卵子由来の胚は、2細胞期ですべての胚発生が停止するが、低酸素培養によってほぼ完全に救済される。しかしヘテロ欠損雌マウスからはメンデルの法則に従った比率でKOマウスが生まれることから、酸素濃度の低い母胎内では胚発生はほぼ正常に進行することを示している。

不妊の原因が主に母胎にあると考え、今回はKO雌マウスに抗酸化剤を投与し、その卵巣機能に対する効果を検討した。まず性腺刺激ホルモン投与による過排卵処理を1~4回行い排卵される卵子の数に違いがないか調べたが、KOならびに抗酸化作用のあるアスコルビン酸 (AsA) 1.5g/Lを投与したKOマウスと野生型マウスの間で違いを認めなかった。次に補酵素Q₁₀ (CoQ₁₀) 1g/LとAsA 1.5g/L投与の効果について検討した。生後1ヶ月で離乳した雌KOマウスに、i) 通常水・ii) CoQ₁₀水・iii) AsA水・iv) CoQ₁₀+AsA水を飲水投与し、8週齢で野生型雄マウスと同居させ、その後2ヶ月間に渡り産産能力について調べた。その結果、野生型雌マウスは平均7.3匹の仔を産産し、そのほとんどが2腹目でもほぼ同数を産産した。それに対してKO雌マウスではいずれの群でも産仔数は少なく (群ごとの平均2.8~4.1匹)、CoQ₁₀とAsAを投与しても産仔数に改善を認めなかった。しかし通常水では1割のKO雌マウスが2腹目を産産しただけだが、CoQ₁₀もしくはAsAの投与により半数以上のマウスが2腹目も産産し、2回目の妊娠の際にも卵巣機能が維持されていた。妊娠雌マウスのプロゲステロン値については、WTとKOマウスの間で違いはなく、CoQ₁₀とAsAの投与による効果も認めなかった。

以上の結果は、CoQ₁₀とAsAの摂取は雌KOマウスの生殖機能維持に有効なことを示しているが、妊娠から産産までのどの段階でその作用が発揮されるかについては更なる検討が必要である。

【一般講演18】

アスコルビン酸合成能の欠損はマウスの運動能力を高める

○高橋未来*, 本間拓二郎*, 石井直樹*, 宮田 哲**, 中島 修***, 藤井順逸* (*山形大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学講座, ** (独) 地域医療機能推進機構大阪病院内科, ***医学部メディカルサイエンス推進研究所遺伝子実験センター)

適度な運動は生活習慣病の予防や各種疾患の発症リスクの減少に役立ち、健康維持に重要である。一方、運動は活性酸素を産生させる活動でもあり、急激な運動は酸素摂取量を高め、活性酸素による脂質、タンパク質、DNA障害を増加させ、生体に酸化ストレスを与えうる。アスコルビン酸 (AsA) は、グリコーゲンを起源とするD-グルコースから多段階の反応を経て生合成され、抗酸化作用を有する。ヒトをはじめとした霊長類ではAsAを合成することができないが、実験動物として繁用されるマウスなどのげっ歯類はAsAの生合成が可能である。アルデヒド還元酵素 (Akr1a) は肝臓に多く発現し、様々なカルボニル化合物を無毒化する解毒酵素として機能するほかに、AsA生合成経路の1つの過程を触媒する。先行研究では、Akr1a欠損マウスでは実際に肝臓でのAsA合成量が著しく減少することが報告されている。そのため、Akr1a欠損マウスでは活性酸素が増加し、運動時には酸化ストレス障害が増強されて運動機能が低下することが予測される。本研究は、Akr1a欠損がマウスの運動能に及ぼす影響とAsAの関与について明らかにすることを目的として運動負荷試験を行った。12~15週齢、雄性的野生型マウス、Akr1a欠損マウスおよび離乳時からAsA 1.5g/Lを継続的に飲水投与したAkr1a欠損マウス (Akr1a+AsA) に対し、トレッドミル装置 (MK-690S; 室町機械製) による運動負荷試験を行った。2日間の短い訓練走行ののち、3日目に本試験を行い、マウスが疲労するまでの走行距離を測定した。その結果、予想に反して、野生型マウスと比較してAkr1a欠損マウスおよびAkr1a+AsAマウスは総走行距離が有意に延長した。運動後では血漿AST値は全ての群で増加したため、運動による筋肉の傷害には実験群で違いはないと考えられた。一方、野生型マウスでは運動後に血糖値が有意に低下したが、Akr1a欠損マウスおよびAkr1a+AsAマウスでは有意な低下を認めなかった。また、Akr1a欠損マウスおよびAkr1a+AsAマウスでは運動前後の血糖値の増減量と総走行距離との間に負の相関関係が認められた。そこで、肝グリコーゲン含量を測定した結果、野生型マウスと比較してAkr1a欠損マウスおよびAkr1a+AsAマウスでは増加傾向にあった。いずれの結果においても、AsA投与の有無による違いを認めなかった。以上の結果から、Akr1a欠損マウスではAsA投与の有無にかかわらず、野生型マウスと比較して運動持久力が高いことが明らかになった。Akr1a欠損マウスではグリコーゲンがAsA合成に使われずに肝臓に蓄積することで、運動時におけるエネルギー源となり走行距離が延長した可能性が示唆された。

【一般講演19】

DGK-εノックアウトマウスを用いた行動解析

○多田裕治*, 松本翔平*, 水野綱紀*, 武内健太郎*, 田崎太一*, 藤原浩樹*, 後藤 薫**, 藤井 聡* (*山形大学医学部生理学講座, **同解剖学第二講座)

本研究ではDGK-εKOマウスを用いて情動運動機能、運動協調性にどのような影響が出てくるかについて調べた。行動解析ではオープンフィールドテストを実施し、探索行動や排尿、排便、洗顔、身繕い、立ち上がりなどの情動行動を評価した。また、回転棒テストを実施し、筋力と運動協調性を評価した。記憶の学習への影響については恐怖条件づけを用いて、記憶過程の獲得、想起、消去について解析を行った。

【方法】被験体はDGK-εノックアウトマウスと野生型マウスを用いた。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。

行動解析には、オープンフィールドテスト、回転棒テスト、恐怖条件づけ学習を行った。被験体は8～16週齢雄性マウスを用いた。オープンフィールドテストでは、自発運動装置を用いて30分間の行動量を測定した。回転棒テストでは、最大観察時間は5分間とし、連続的に回転数をあげるトライアルを行い、マウスの落下するまでの時間を測定した。恐怖条件づけ学習では、恐怖条件づけ過程で、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】 本研究では、DGK-εノックアウトマウスに対するメタンフェタミンの投与が、情動運動機能や運動協調性にどのような影響を与えるかに

ついて検討した。情動運動機能を検討するため、オープンフィールドテストにおいて自発運動量、探索行動量を測定した結果、WTマウス群とKOマウス群の立ち上がり回数に有意差が見られた。運動協調性について検討するため回転棒テストにおいて、運動学習行動を測定した結果、顕著にKOマウス運動協調性が低いことが示された。記憶の学習への影響については、獲得時には影響は見られないが、想起に影響が見られた。本研究では、情動運動機能、運動協調性に注目してDGK-εノックアウトマウスが多動的な行動を示す結果を得ることができた。さらに多方面からの検討を行い、行動解析する必要がある。