

2014年度 共同研究等助成金報告集

公益財団法人 日中医学協会

The Japan China Medical Association

廖文	In Vitro ヒト歯根膜様組織に対する至適矯正力の探索……………	25
任乾	精神疾患の病態解明と新規治療法の開発に関する研究……………	29

日中における2型糖尿病患者の治療効果とQOLを高める 『ファミリーパートナーシップ』看護援助システムの構築

研究者氏名	講師 カルデナス 暁東
日本所属機関	大阪医科大学看護学部
共同研究者名	田中 克子, 花房 俊昭
中国研究者氏名	看護部長 石 貞仙
中国所属機関	山西省人民病院看護部

要 旨

現在、日本と中国を含めた西太平洋地区において2型糖尿病患者が急増している。今後、日本と中国の患者とその家族の治療効果と自己管理能力、QOLを高めるため、今回は2型糖尿病患者の『ファミリーパートナーシップ』看護援助システムを開発し、その有効性を評価する目的で、研究を行った。日中両施設において、成人期の2型糖尿病患者とその家族を対象として、多職種による開催した「糖尿病サロン」に参加し、グループ講義と個別指導を受けてもらった。サロン日以外は研究者らによるメールで個別にフォローを行った。結果としては、食事・運動・薬物療法に伴う自己管理に関する知識・技術が高まり、血糖値が安定している傾向がみられた。また、患者とその家族の治療に対する負担感の軽減とQOLの向上傾向もみられた。糖尿病患者の療養生活においては、患者と家族が互いに影響し合う関係であるため、両者に同時に看護援助を行うことが重要である。開発した『ファミリーパートナーシップ』看護援助システムの有効性が期待できると考える。

Key Words

緒 言

2013年に国際糖尿病連合（International Diabetes Federation：IDF）は、ライフスタイルの変化や遺伝子の影響等により（中村，2009）、日本と中国を含めた西太平洋地区の糖尿病有病者数は1億3,800万人で、世界で最も糖尿病人口が多い地域であると発表した（IDF, 2013）。そのため、西太平洋地区の国々にとって糖尿病の予防・治療に向けた取り組みは喫緊の課題となっている。

近年、経済・文化・医療等の分野において、グローバル化が進み、各国間での糖尿病の予防・治療・看護に関連した知識や技術の交流と共有が可能となる。我々は2011年から、山西省太原市にある山西医科大学附属病院や山西省人民病院との学術交流・共同研究を始めた。これまでの学術交流・共同研究では、2型糖尿病患者とその家族が抱えている課題においては、国の事情による異なる点があるが、共通点も見られた。そのため、両国の患者とその家族の自己管理能力とQOLを高める看護援助プログラムを開発し、その有効性を検証していくことには意義があると考ええる。

2型糖尿病患者には、良好な血糖を維持するためのセルフモニタリング、食事・運動・薬物療法に関する自己管理行動が必要不可欠である。そのため、長期にわたる自己管理行動をサポートするための様々なアプローチが行われている。と同時に、患者とその家族のライフスタイルと生活の質（Quality of Life、以下QOLと略す）への影響が大きいともいえる。

本研究に参加することによって、長期戦である治療に伴う食事・運動自己管理によって生じる患者とその家族の負担感が軽減できる。患者と家族の食事・運動自己管理能力との治療効果を高め、患者とその家

族の QOL を高めることが期待できる。

本研究の目的は、2 型糖尿病患者の『ファミリーパートナーシップ』看護援助システムを開発し、その有効性を評価することであった。

研究対象と方法

1. 対象：

（中国）山西省人民病院内分泌内科、（日本）大阪医科大学附属病院糖尿病・内分泌内科外来に通院しているまたは糖尿病センターに入院している 20～65 歳の 2 型糖尿病患者とその家族、10 組程度である。対象者のリクルートは主治医と病棟看護師と相談した上で決定し、対象者に依頼を行っている。

対象者である患者の選定基準は下記の通りとなる。

- 1) 2 型糖尿病と診断され 6 か月以上経過している
- 2) 20～65 歳の成人である
- 3) 大血管系合併症・併発症がない
- 4) 食事療法は糖尿病食のみである

2. 方法

1) 介入：

「糖尿病サロン」（介入）を 2 回（1 回/2 か月）開催し、内容には、糖尿病の食事・運動自己管理に必要な知識・スキル、ちょっとした工夫および療養生活の中のこころの持ち方といったテーマのグループ講座、患者同士、家族同士の意見交流および医療従事者による個別指導を行っている。サロンが開催しない期間は、研究者による患者とその家族への電話もしくはメールを用いた個別フォローを行っている。研究期間中は、患者とその家族に『糖尿病ライフ』手帳への記入、スズケン社製の「ライフコーダー」を用いた日常生活の中の身体活動量、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社製「アキュチェック ST メーター」を用いた日々の血糖値を測定してもらっている。

2) データの収集：

質問紙一式の回答と定期受診時の血液検査値、『糖尿病ライフ』手帳の記録内容、「ライフコーダー」による測定した身体活動量、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社製「アキュチェック ST メーター」（自己血糖測定器を持っていない患者には研究者が準備し渡す）を用いた測定した血糖値は、本研究の分析データとなる。

患者を対象とした質問紙には、患者の基本属性・疾患・治療・日常生活習慣に関する『基本情報』・『家族尺度』・『食事・運動療法に関する自己効力感尺度』・『自己管理行動ステージ評価尺度』・『糖尿病自己管理についての意思決定バランス』・『SF8』・『POMS』が含まれる。

家族を対象とした質問紙には、『自己管理参加の行動ステージ評価尺度』・『糖尿病自己管理参加についての意思決定バランス』・『SF8』・『POMS』が含まれる。

定期受診時の検査値は、HbA1c、BS、血圧、身長、体重、HDL-コレステロール値、LDL-コレステロール値、中性脂肪、Ga 等が含まれる。

『糖尿病ライフ』手帳には、日々の血糖値、治療に伴う食事・運動自己管理行動、家族の食事・運動自己管理への参加度、患者と家族の気持ち・思いに関する内容等が含まれる。

3) データの分析：各種尺度得点、検査値の変化は、個人が特定できないよう SPSS17.0J for Windows を用いて、Mann-Whitney U 検定を行う。

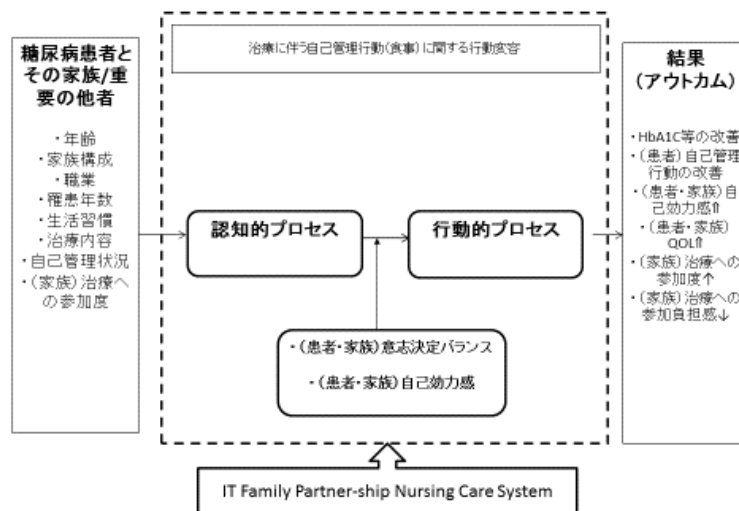


図 多理論統合モデルに基づいた研究枠組み

糖尿病サロンに参加しませんか？
 ～研究ご協力をお願い～

10,000円相当の自己血糖測定キットをプレゼント！

～研究の概要～
 医療者とご家族が、ともに患者さまを支援していく、という新しい援助プログラムの効果を評価します。

ひとりでも多くの患者さまが、良好な血糖コントロールを維持し、自分らしく生き生きとした生活を送ることが私達の願いです！

～募集対象者～
 ●2型糖尿病と診断され6か月以上、かつ20～65歳の患者さまとご家族

～お願いすること～
 ●「楽しく糖尿病と付き合うサロン」（合計2回）への参加
 ●アンケート（合計3回）の記入
 ●4か月間、食事・運動療法についての記録
 血糖値自己測定、万歩計による身体活動量の測定、手帳の記録

～お申込み方法～
 糖尿病代謝・内分泌内科の主治医にお伝えください。

～研究グループ～
 大阪医科大学 看護学部 慢性期成人看護学領域
 大阪医科大学 内科学Ⅰ 糖尿病代謝・内分泌内科
 研究代表者：看護学部慢性期成人看護学領域 講師 カルデナス暁東

大阪医科大学

図 研究対象者リクルート時のチラシ

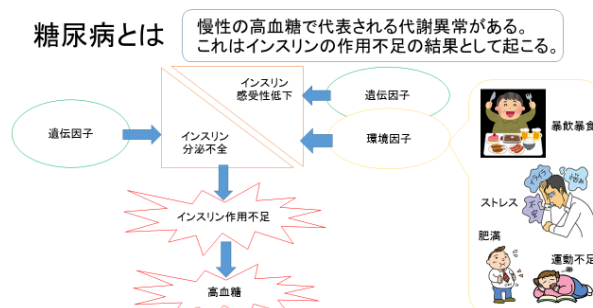


図 糖尿病サロン資料抜粋

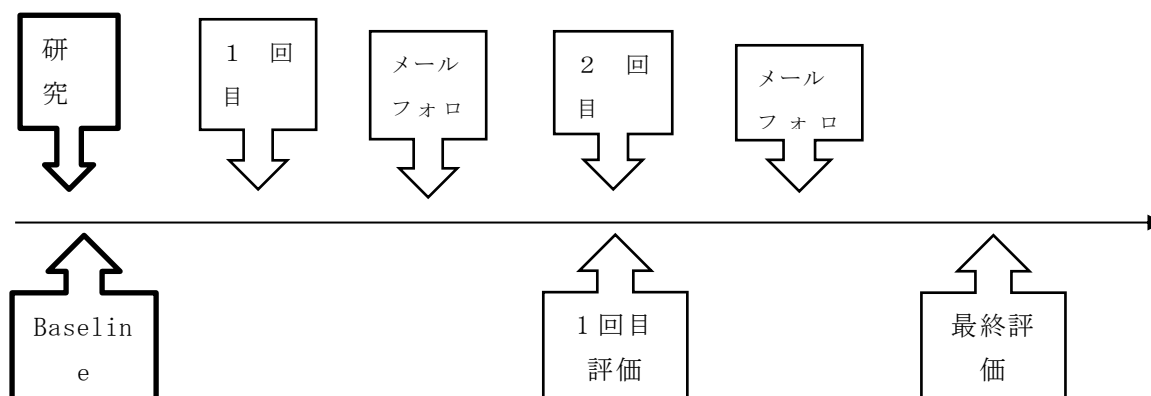


図 研究プロトコール

結 果

現在、中国側研究施設では、10 組のうち 5 組の患者とその家族が 2 回目の介入が終了し、他の 5 組は 1 回目の介入が終了した。日本側研究施設では、6 組のうち 3 組の患者とその家族が 2 回目の介入が終了し、他の 3 組は 1 回目の介入が終了した。

プログラム全体は終了していないため、統計分析を行っていないが、患者との話し合った内容を医師と共有することで、今後の治療方針（栄養指導も含む）にも参考となり、患者の状況に応じて栄養指導を行った。その結果、患者の HbA1c 値と日々の血糖値が安定している傾向がみられた。また、家族の治療への参加度が高くなり、本人とその家族の QOL 尺度（SF8）スコアの向上もみられている。

考 察

糖尿病患者は、日々の療養生活においてソーシャルサポートとして家族の気持ちや家族環境を含んだ様々な家族支援を受けており、それは患者が血糖コントロールを行うための自己管理行動やセルフケア行動に影響を与えている。その一方、患者の療養生活をサポートするにあたって、家族にも負担感やストレスが生じることもある。

今回は、最終的に統計分析を行っていないが、対象患者の血糖値の改善、患者とその家族の QOL の向上、療養生活に対する負担感の軽減傾向がみられているため、本研究の看護援助の有効性が期待できると考える。

参考文献

1. 山口曜子（2010）：2 型糖尿病をもつ有職患者への行動意思を促進するクリニックでの糖尿病教育プログラム，日本看護研究学会雑誌，33（5），65-74.
2. 村上美華，梅本彰子，花田妙子（2009）：糖尿病患者の自己管理を促進および阻害する要因，日本看護研究学会雑誌，32（4），29-38.

作成日：2015年 3月13日

免疫老化が加齢性疾患に及ぼす影響の解明

研究者氏名 □□ 准教授 佐野 元昭

日本所属機関 □□ 慶應義塾大学医学部循環器内科

中国研究者氏名 □□ 教授 陆林

中国所属機関 □□ 上海交通大学医学附属瑞金医院
循環器内科

要 旨

加齢に伴って急速に増加する加齢随伴記憶型T細胞集団はsenescence-associated secretory phenotypeを持ち、慢性炎症を基盤とした加齢関連疾患の発症に普遍的に関与していると考えられる。一方で、肥満、糖尿病は個体の老化を加速させることが知られているが、これらの患者ではより若年のうちから加齢随伴記憶型T細胞が増加する現象を見出した。本研究では、加齢と生活習慣病が心血管病、糖尿病を引き起こす共通の分子基盤として、加齢随伴記憶型T細胞の出現に着目して、その増加が内臓脂肪組織のリモデリング、インスリン抵抗性に及ぼす影響について、加齢マウス、食餌誘導性肥満モデルマウスを駆使して解析する。加齢マウスにおいて、加齢随伴記憶型T細胞が、2次リンパ組織である脾臓だけでなく、内臓脂肪組織中にも出現していること、寿命の延長効果が認められるカロリー制限をしたマウスでは、脾臓、内臓脂肪組織中のこの特殊なT細胞集団の出現が抑制されることを見出した。若いマウスから取り出した正常T細胞集団をラベルした後、加齢マウスに投与すると、短い期間で、加齢マウスにおいて出現する特殊なT細胞集団に変化することから、ある種の環境因子が、T細胞老化を加速する可能性が示唆された。また、抗体を用いてこの特殊なT細胞集団を除去すると加齢マウスの体重や、食欲には影響を与えずに、インスリン抵抗性を改善することを見出した。この結果は、免疫老化を抑制することで加齢に伴う慢性疾患を制御することができるという可能性を示唆する。

Key Words

T細胞, 加齢, 慢性炎症, 肥満、糖尿病

目的や研究背景：

京都大学の湊長博教授らは、CD4+ T細胞の加齢に伴う機能異常は、CD4+ 記憶型T細胞集団の全体的な機能低下ではなくて、CD4+ 記憶型T細胞集団の中にProgrammed cell death-1 (PD-1) を発現する特殊な細胞集団が出現することに起因することを提唱した。この特殊なT細胞集団は、抗原受容体を介する増殖や免疫サイトカイン産生などの獲得免疫機能を示さないが、恒常性維持増殖能をもち、オステオポンチンなどの炎症性サイトカインを産生するなどsenescence-associated secretory phenotype (SASP)の特徴を保有していることから、senescence-associated T cell (加齢随伴記憶型T細胞)と命名された。この老化随伴T細胞の出現は、老化マウスだけでなく、悪性疾患や全身性自己免疫性病の発症にも深く関与していることを報告している (Proc Natl Acad Sci U S A. 2009)。我々は、加齢マウスにおいて、加齢随伴記憶型T細胞が、2次リンパ組織である脾臓だけでなく、内臓脂肪組織中にも出現していること、寿命の延長効果が認められるカロリー制限をしたマウスでは、脾臓、内臓脂肪組織中のこの特殊なT細胞集団の出現が抑制されることを見出した。若いマウスから取り出した正常T細胞集団をラベルした後、加齢マウスに投与すると、短い期間

で、加齢マウスにおいて出現する特殊なT細胞集団に変化することから、ある種の環境因子が、T細胞老化を加速する可能性が示唆された。

研究対象と方法：

高脂肪食負荷によって食餌誘発性肥満（Diet-Induced Obesity）モデルを作製し、内臓脂肪組織において出現する加齢随伴記憶型 T 細胞の性質を明らかにし、加齢随伴記憶型 T 細胞が誘導される分子機序を解明する。さらに、加齢随伴記憶型 T 細胞を抗体で除去することによって、インスリン抵抗性が改善できるかを検証する。

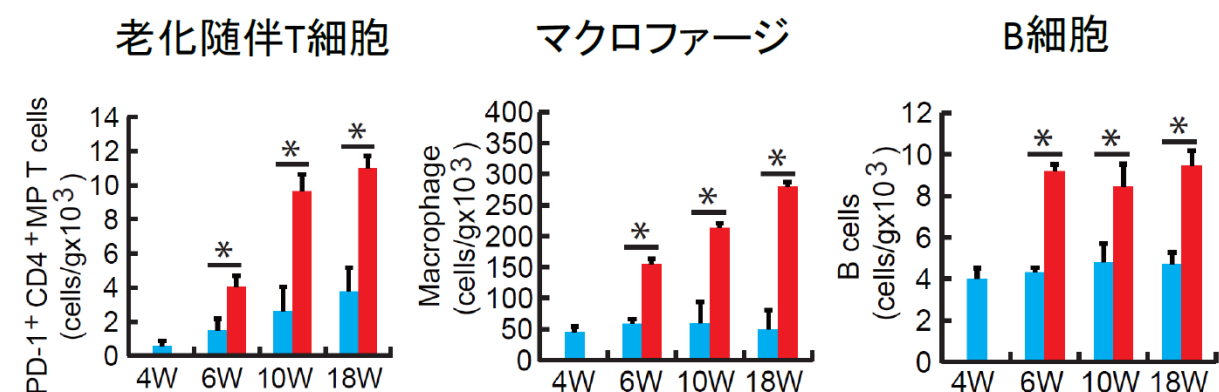
結 果：

（1）高脂肪食を負荷したマウスの内臓脂肪組織を経時的に解析して、加齢随伴記憶型 T 細胞の局在や、他の免疫細胞との4次元的な連携（時間空間的關係）を解析した。

生後4週間から高脂肪食を投与すると、体重が増加、内臓脂肪が蓄積し、耐糖能異常、インスリン抵抗性が出現する。これと一致して、内臓脂肪組織中に加齢マウスに出現する加齢随伴記憶型 T 細胞 [PD-1+ memory phenotype (MP) CD4+ T cell 細胞集団が出現していた(下図)。

老化随伴T細胞は高脂肪食負荷後2週間で出現する

■ 通常食群
■ 高脂肪食群



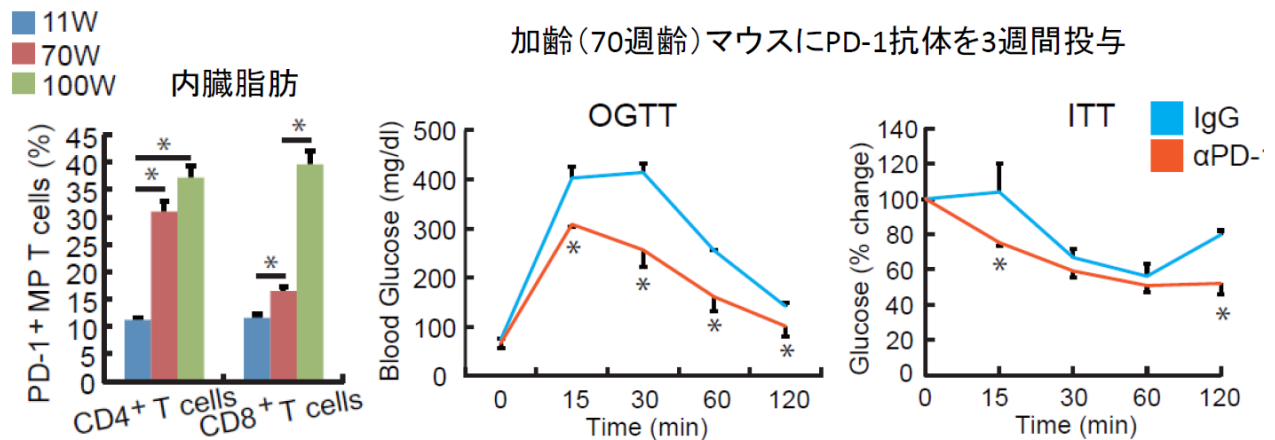
加齢随伴記憶型 T 細胞高脂肪食開始 2 週間後の早期から出現し、内臓脂肪組織の免疫染色を行うと、Crown-like structure の中で細胞死をおこした死亡細胞の周りを取り囲むように出現していた。

（2）食餌性肥満マウスの内臓脂肪から、加齢随伴記憶型 T 細胞を取り出して、抗原受容体刺激に対する増殖能、p21、DNA 障害マーカー γ -H2AX の発現の有無、免疫サイトカインの産生を確認する。加齢随伴記憶型 T 細胞は、抗原受容体刺激に対する増殖能が低下、p21、DNA 障害マーカー γ -H2AX の発現が亢進、高濃度のオステオポンを分泌することが分かった。

（3）抗体を用いて PD-1+加齢随伴記憶型 T 細胞を除去することによって、食餌性肥満マウスの内臓脂肪炎症、Crown-like structure の形成、インスリン抵抗性が改善した。高脂肪食負荷直後から、抗体を投与した場合には、内臓脂肪炎症、インスリン抵抗性の出現を抑制することができた。(下図)

（4）食餌誘発性肥満マウスの内臓脂肪から取り出した PD-1+加齢随伴記憶型 T 細胞を、通常食で飼育した非肥満マウスに adoptive transfer（細胞移入）すると、脂肪組織の炎症、Crown-like structure の形成インスリン抵抗性を惹起できた。

加齢マウスの内臓脂肪で増加している老化随伴T細胞を除去するとインスリン抵抗性が改善する



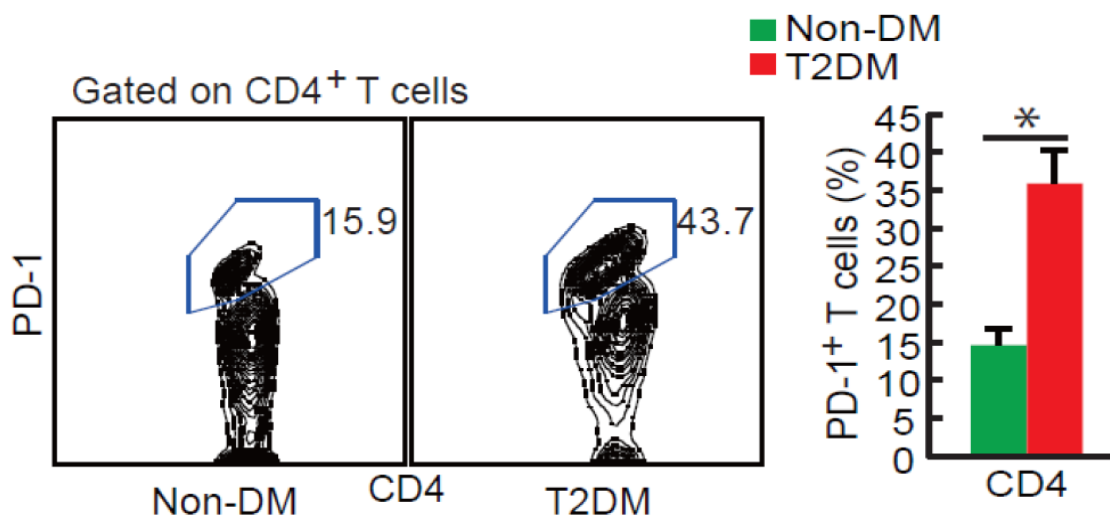
(5) 食餌誘発性肥満マウスの内臓脂肪で、加齢随伴記憶型 T 細胞が出現する機序を調べた。まずは、若い非肥満マウスの脾臓から取り出した T 細胞を低酸素、アンジオテンシン II、活性酸素、パルミチン酸、AGE、各種向炎症性サイトカインなどのストレス下で培養したが、加齢随伴記憶型 T 細胞は、出現しなかった。

次に、加齢随伴記憶型 T 細胞の出現に自己抗原刺激による反復刺激が関与している可能性を考慮して、マクロファージや B 細胞など、抗原提示細胞と正常 T 細胞の共培養を試みたところ、加齢随伴記憶型 T 細胞への分化が *in vitro* で再現された。

clodronate liposomesを用いてマクロファージを除去したマウス、B細胞のいないマウス(μ MTマウス)に高脂肪食負荷を行うと、内臓脂肪における加齢随伴記憶型T細胞の出現が抑制されることが確認された。

(6) 糖尿病患者、非糖尿病患者が胆嚢摘出術を受ける時に、収集した大網中に含まれる老化随伴 T 細胞 (PD-1⁺ T細胞) をFACSで解析した。その結果、糖尿病患者には、非糖尿病患者に比べて、有意に老化随伴 T 細胞が増加していた。(下図)

糖尿病患者の大網には老化随伴T細胞が非糖尿病患者より有意に多数含まれる



考 察：

糖尿病性合併症の中で、細小血管合併症（網膜症、腎症、神経障害）は、血糖の厳格なコントロールで

病態の進展抑制、改善治癒が認められる。一方で、大血管合併症（動脈硬化、心筋梗塞、脳梗塞）は、血糖の厳格なコントロールを行っても、病態の改善効果は乏しく、心血管イベント抑制効果は、いかに早期から治療介入できたかに依存している。糖尿病患者における”負の遺産”は、これまで高血糖の記憶として説明されてきたが、血糖値があまり高値でない耐糖能異常の患者でも動脈硬化は進行していく。申請者は「肥満、メタボリックシンドロームという病態において、内臓脂肪組織内の免疫空間ニッチェに錯乱がおこり、その情報が加齢随伴記憶型 T 細胞の蓄積という形で記憶される」ことが”負の遺産”の中心的プレイヤーであると発想するにいたった。加齢随伴記憶型 T細胞の蓄積は、インスリン抵抗性を引き起こし、糖尿病を発症させるだけでなく、動脈硬化の進行にも直接関与する。本研究課題では、過食に伴って内臓脂肪組織で加齢随伴記憶型 T 細胞が誘導されるメカニズム、加齢随伴記憶型 T 細胞のユニークな機能、その増加が内臓脂肪組織のリモデリング、インスリン抵抗性に及ぼす影響について、食餌誘導性肥満モデルマウスを駆使して解析した。加齢随伴記憶型 T 細胞を制御することによって糖尿病を制御する技術基盤として、有望であると考えられた。

参考文献：

1. Anti-programmed cell death 1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice. Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, Honjo T, Morino bu A, Hatachi S, Shimatani K, Tanak Y, Minato N, Kumagai S. J Immunol. 2010 Mar 1;184(5):2337-47.
2. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. Hatanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, Higuchi T, Yagi H, Takakura K, Minato N, Honjo T, Fujii S. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 27;104(9):3360-5.

作成日：2015年 3月11日

小胞体ストレス応答の卵胞発育・成熟過程における意義の解明と 良好胚選択マーカーとしての有用性の検討

研究者氏名□□教授 大須賀 穰

日本所属機関□□東京大学医学部産科婦人科学

共同研究者名□□原田 美由紀

中国研究者氏名□□教授 趙 琳

中国所属機関□□中国大連医科大学附属第二病院

要 旨

我が国における女性の挙児の高年齢化に伴い、不妊症患者は増加の一途をたどっている。不妊治療においてはしばしば調節卵巣刺激が行なわれるが、その重大な合併症の一つとして卵巣過剰刺激症候群（OHSS）が挙げられる。一方、最近糖尿病、がんなど種々の病態において、小胞体ストレスが重要な役割を果たすことが明らかになってきた。本研究においては、卵巣顆粒膜細胞における小胞体ストレスがOHSSの病態形成に関わるという仮説のもと検討を行なった。体外受精治療時に得られたヒト卵丘細胞における小胞体ストレス応答因子spliced XBP1（sXBP1）mRNA発現は、中等症以上のOHSS発症群で非発症群に比し有意に亢進していた。ヒト顆粒膜培養細胞（GC）を用いた検討により、小胞体ストレス誘導剤Tunicamycin（Tm）刺激はGCにおける血管内皮増殖因子（VEGF；OHSSの病態の中心的因子）発現を増強した。また、hCGはGCにおけるVEGF発現を誘導することが知られているが、TmでGCを前処理することにより、すなわち小胞体ストレス存在下では、hCG応答性のVEGF発現は亢進し、さらにこの効果は小胞体ストレス阻害剤により減弱した。本研究により、OHSSの病態に、卵巣顆粒膜細胞における小胞体ストレス過剰発現、それに伴うhCG応答性のVEGF発現亢進が関与していることが示された。すでに他疾患で臨床応用されている小胞体ストレス阻害剤がOHSS予防に使用できる可能性が示唆された。

Key Words 小胞体ストレス， 顆粒膜細胞， 卵巣過剰刺激症候群， 血管内皮増殖因子

緒 言：

最近の我が国における女性の挙児の高年齢化に伴い、不妊症患者は増加の一途をたどっている。不妊治療においてはしばしば調節卵巣刺激が行なわれるが、その重大な合併症の一つとして卵巣過剰刺激症候群（OHSS）が挙げられる。OHSSの病態においては、卵胞発育に伴い卵巣顆粒膜細胞から分泌される血管内皮増殖因子（VEGF）が中心的役割を果たすことが知られている（1）。しかし、VEGF発現制御メカニズムについては未だ不明な点が多く、不妊治療中にひとたび多数の卵胞発育が認められた場合にOHSSを予防するには、卵胞成熟を誘導するhCG投与の中止を含めた治療の中断を選択せざるを得ないのが現状である。

一方、最近糖尿病、がんなど幅広い疾患の病態において、小胞体ストレスが重要な役割を果たすことが知られてきた（2，3）。小胞体は、タンパク質の修飾、折りたたみなどの品質管理を行なう細胞内器官であるが、細胞におけるタンパク質合成の需要が小胞体の品質管理能力を越えるような状況下では、異常な折りたたみ構造のタンパク質が小胞体内に蓄積する。この状態を小胞体ストレスと呼び、細胞増殖、低酸素、炎症など様々な生理的病理的状況下で惹起されることが知られている。小胞体ストレスに対し、細胞内では小胞体ストレス応答と呼ばれる一群の細胞内伝達経路が活性化される。小胞体ストレス応答は、

最初は細胞の恒常性を回復させるべく働き、それが不可能である場合には細胞死を惹起する、すなわち生と死の両方向スイッチとして働く、細胞に備わった非常に巧妙な仕組みであるといえる（4，5）。

我々は、調節卵巣刺激中の卵胞発育過程における卵巣局所環境の劇的な変化に伴い小胞体ストレスが惹起されOHSSの病態に関与するのではないかと考え、これを明らかにすべく以下の検討を行なった。

対象と方法：

1) ヒト卵丘細胞を用いた検討

体外受精患者のうち顕微授精を施行される患者においては、顕微授精時に、卵丘細胞（顆粒膜細胞のうち卵子周囲を取り巻くもの）を卵子から剥離するが、この卵丘細胞を卵子毎に分けて回収し保存した。卵丘細胞におけるspliced XBP1（sXBP1；小胞体ストレス応答因子の一つ）mRNA発現を、OHSS非発症群、中等症以上のOHSS発症群とで比較した。また、回収卵子数と卵丘細胞でのsXBP1mRNA発現との関連も併せて検討した。通常回収卵子数が多いほどOHSSの発症リスクが高いことが知られている。

2) ヒト顆粒膜細胞（GC）培養系を用いた検討

体外受精時に回収した卵胞液よりGCを分離培養して以下の実験に供した。

i) 小胞体ストレス誘導剤Tunicamycin（Tm）を添加し、sXBP1，VEGFmRNA発現を検討した。

ii) GCにおけるVEGF発現促進因子として、hCGが知られている。小胞体ストレス下でのGCのhCGに対する反応性の変化を検討するため、以下の実験を行なった。GCをあらかじめTm処理し、これにhCGを添加した際のVEGFmRNA発現を、Tmによる前処理をしない場合と比較した。

iii) ii)において、Tm処理をする前に小胞体ストレス抑制剤（TUDCA）処理を行なった際に、hCG応答性のVEGF発現に変化が認められるか検討した。

結 果：

1) ヒト卵丘細胞を用いた検討

卵丘細胞におけるspliced XBP1（sXBP1；小胞体ストレス応答因子の一つ）mRNA発現は、中等症以上のOHSS発症群において、非発症群に比し有意に増加していた（図1）。さらに、回収卵子数とsXBP1発現量の間には正の相関がみられた（図2）。

図 1. OHSS の有無による卵丘細胞における sXBP1 発現の相違

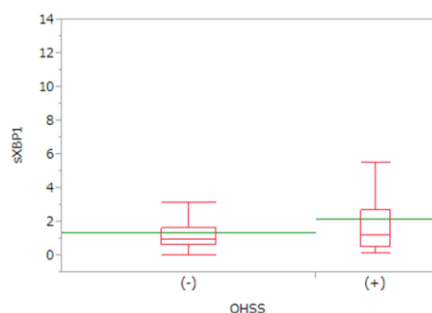
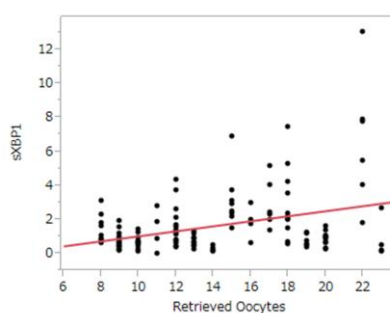


図 2. 回収卵子数と卵丘細胞における sXBP1 発現の関連



2) ヒト顆粒膜細胞（GC）培養系を用いた検討

i) 小胞体ストレス誘導剤Tunicamycin（Tm）添加により、GCにおいて6時間後よりVEGFmRNA発現が誘導された（図3）。また同実験系において3時間後よりsXBP1mRNA発現が誘導された（図4）。

ii) Tm前処理をしたGCにおいては、コントロール群に比し、hCG反応性のVEGFmRNA発現が増強していた（図5）。

iii) ii)において、Tm処理をする前に小胞体ストレス抑制剤（TUDCA）処理を行なった場合、Tm下、すなわち小胞体ストレス下での、hCG応答性のVEGF発現は抑制された（図6）。

図 3. Tunicamycin 刺激による顆粒膜細胞における VEGFmRNA 発現の変化
(白 : cont, 赤 : Tm 刺激)

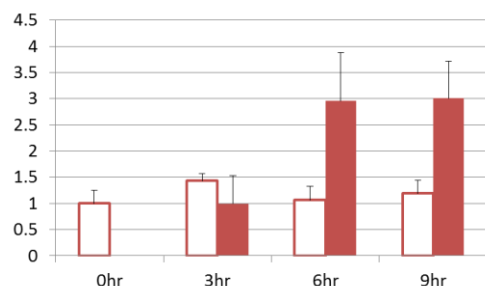


図 4. Tunicamycin 刺激による顆粒膜細胞における sXBP1mRNA 発現の変化
(白 : cont, 青 : Tm 刺激)

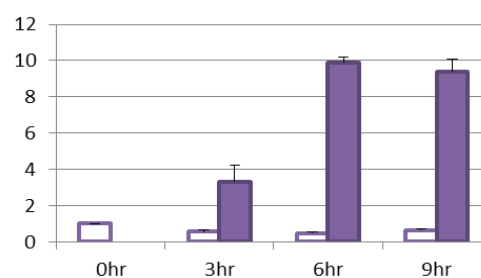


図 5. Tunicamycin 前処理による顆粒膜細胞における hCG 応答性 VEGFmRNA 発現の変化

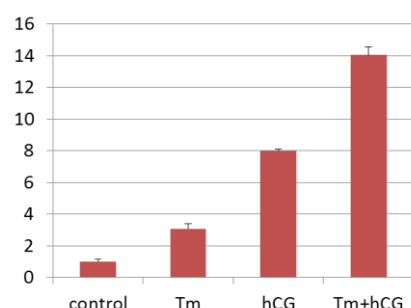
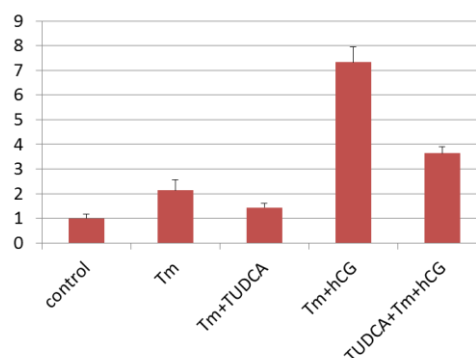


図 6. TUDCA 前処理による、小胞体ストレス存在下での顆粒膜細胞における hCG 応答性 VEGFmRNA 発現の変化



考 察 :

本研究により、卵巢顆粒膜細胞の小胞体ストレス応答因子発現が卵巢過剰刺激症候群患者において亢進していることが示された。さらに、顆粒膜細胞において小胞体ストレス応答刺激が血管内皮増殖因子VEGFの発現を亢進させること、またhCG応答性VEGF発現を増強することが示された。またこの反応経路にsXBP1経路が関与しており、小胞体ストレス阻害剤を投与することによりVEGF産生は抑制されることが示された。

以上の知見は、OHSSの病態に、卵巢顆粒膜細胞における小胞体ストレス過剰発現、それに伴うhCG応答性のVEGF発現亢進が関与していることを示すものであり、未だ不明である卵巢過剰刺激症候群の病態の一部を明らかにした。またこの結果は、すでに他疾患で臨床応用されている小胞体ストレス阻害剤がOHSS予防に使用できる可能性を示唆するものである。今後、卵巢過剰刺激症候群モデル動物に小胞体ストレス刺激剤、および阻害剤の投与を行ないその効果を検討することにより、臨床応用に向けた研究を進める予定である。

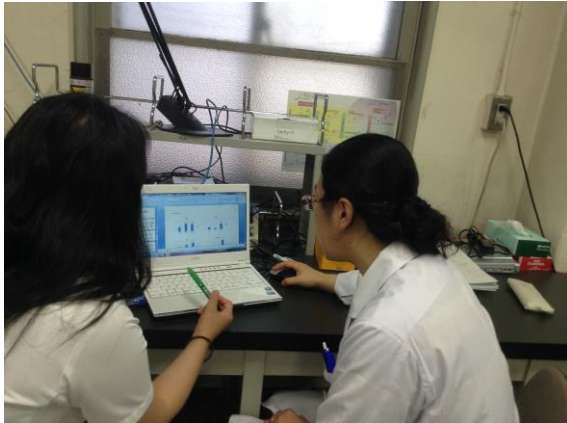
参考文献 :

1. Gomez R, Soares SR, Busso C, Garcia-Velasco JA, Simon C, Pellicer A. Physiology and pathology of ovarian hyperstimulation syndrome. Semin Reprod Med. 2010; 28: 448-57.
2. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. Science 2004; 306: 457-61.
3. Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein in tumor development: friend or foe

? Nat Rev Cancer 2004; 4: 966-77.

4. Ron D, Walter P. Signaling integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8: 519-29.

5. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decision. J Clin Invest 2005; 115: 2656-64.



中国側研究者（右）と日本側共同研究者によるミーティング風景

作成日：2015年 3月10日

大動脈瘤・解離の発症・進展におけるKrüppel-like factor 5 (KLF5) の役割の解明と治療戦略の開発

研究者氏名 ☐ 特任研究員 詹 紅
日本所属機関 ☐ 東京大学附属病院循環内科
共同研究者名
中国研究者氏名 ☐ 教授 鄭 斌
中国所属機関 ☐ 河北医科大学

要 旨

大動脈瘤は大動脈の局所的な拡張が持続進行し、遂に破裂に至る疾患である。最近の報告では、KLF 因子群（KLF15 等）はその形成を抑えることである。同転写因子の一つである KLF5 は心臓リモテリングや動脈硬化を制御していることが示唆されている。しかし KLF5 の大動脈瘤・解離発症における役割はまだ不明である。本研究では KLF5 のマクロファージ特異的ノックアウトマウスを用いて、大動脈瘤リモテリングにおける KLF5 の役割を明らかにする目的とした。

アンジオテンシンⅡの持続投与（AⅡと塩化カルシウム）による大動脈瘤のモデルを樹立した。さらに、マクロファージ中の KLF5 及び MicroRNA-155 を阻害することで、アンジオテンシンⅡ刺激による大動脈瘤の病変形成及び進行を抑えたことが明らかにした。

本研究では、心血管系疾患、特に大動脈瘤において、KLF5 及び MicroRNA-155 の標的遺伝子の阻害・調節による大動脈瘤進行抑制の新規治療法に結び付くことが期待できる。

Key Words 大動脈瘤、KLF5、マクロファージ、MicroRNA-155

緒 言：

大動脈瘤は大動脈の局所的な拡張が持続進行し、遂に破裂に至る疾患である。最近の報告では、KLF 因子群（KLF15 等）はその形成を抑えることである。同転写因子の一つである KLF5 は心臓リモテリングや動脈硬化を制御していることが示唆されている。しかし KLF5 の大動脈瘤・解離発症における役割はまだ不明である。本研究では KLF5 のマクロファージ特異的ノックアウトマウスを用いて、大動脈瘤リモテリングにおける KLF5 の役割を明らかにする目的とした。

対象と方法：

対象：KLF5 のマクロファージ特異的ノックアウトマウス、microRNA-155 ノックアウトマウス

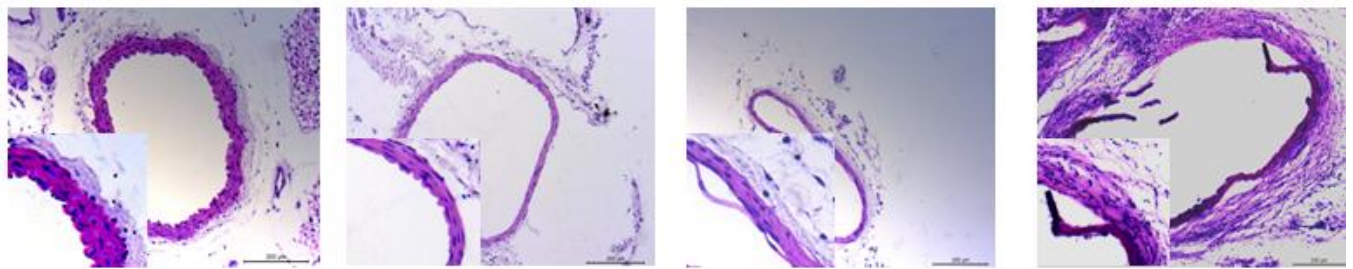
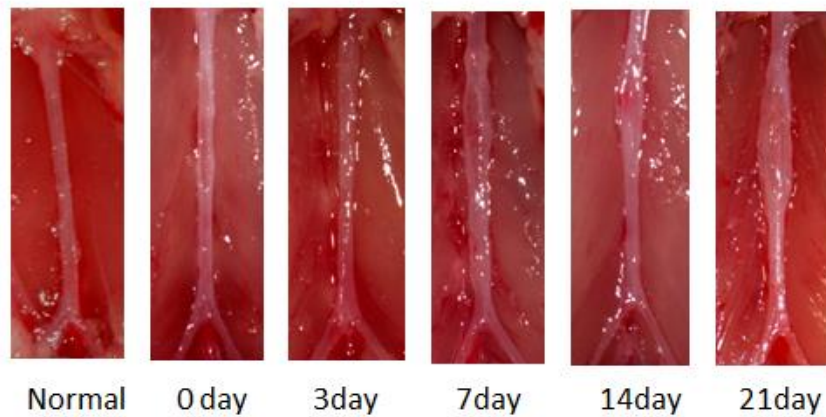
方法：AⅡ刺激（AⅡと塩化カルシウム）による大動脈瘤のモデル

結 果：

1) 大動脈瘤・解離モデル（アンジオテンシンⅡと塩化カルシウム刺激による）の確立

C57BL/6 マウスを用いて、大動脈瘤・解離モデル（アンジオテンシンⅡと塩化カルシウム刺激による）を確立した（図 1 上）。更に、アンジオテンシンⅡ持続投与および塩化カルシウム刺激による大動脈瘤モデルにおいて、通常マウスとの差異を形態学的・組織病理学的に調べた。大動脈の弾性線維の破綻がみられた（図 1 下）。

図1



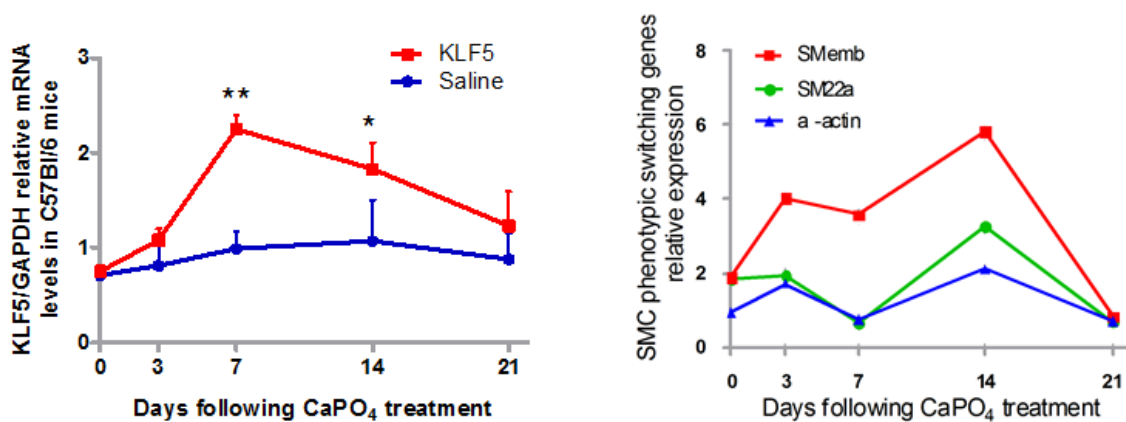
HE stain of aortas exposed to CaPO₄ on postoperative day 0, 3, 7, 14.

2) マクロファージKLF5の大動脈瘤・解離形成における重要性の検討

a) アンジオテンシン II の刺激による大動脈瘤において、Real-time PCR方法で、転写因子であるKLF5及びSMC phenotypic switching genes (SMembとSM22a)の発現が増加していることを確認した (図2)。その結果によるとKLF5等は大動脈瘤形成に関与することが考えられる。

図2

KLF5 and phenotypic modulation of SMCs

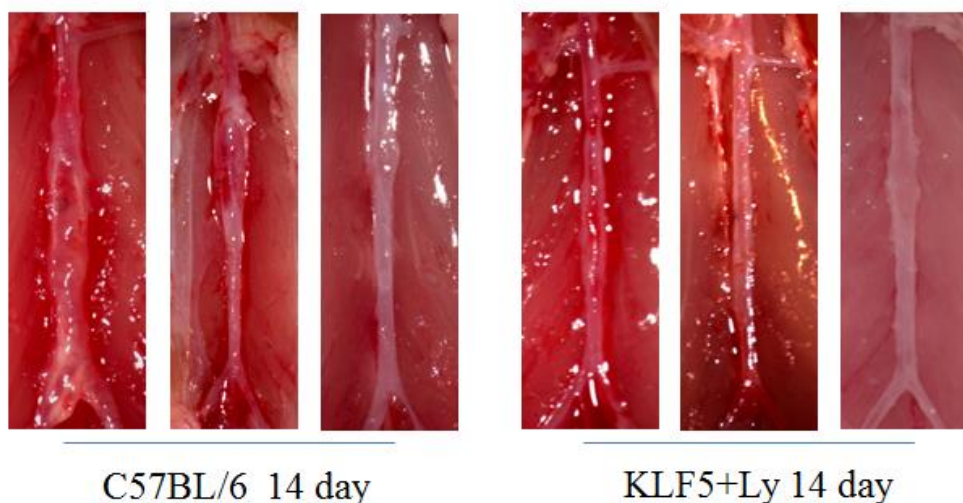


b) マクロファージKLF5の大動脈瘤・解離形成における重要性の検討

細胞成分として、マクロファージが大動脈瘤・解離の発症に関与することが示唆されている。申請者らは、マクロファージ特異的 KLF5 ノックアウトを用いて、アンジオテンシンⅡの刺激による大動脈瘤の病変形成および進行を抑制することかどうか検討した。その結果、マクロファージ特異的 KLF5 ノックアウトにおいてアンジオテンシンⅡ刺激により大動脈瘤病変形成及び進行を抑えたことが明らかにした（図3）。

図3

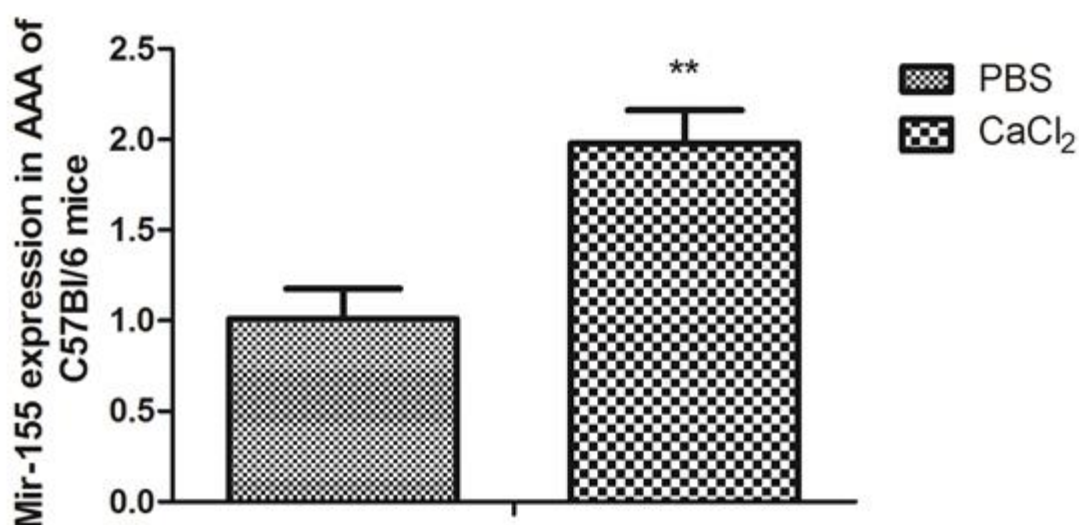
Conditional-knockout KLF5 mouse aortas were harvested on day 14



3) MicroRNA-155の大動脈瘤・解離形成における重要性の検討

a) アンジオテンシンⅡの刺激による大動脈瘤において、Real-time PCR方法で、MicroRNA-155の発現が増加していることを確認した（図4）。その結果によるとMicroRNA-155は大動脈瘤形成に関与することが考えられる。

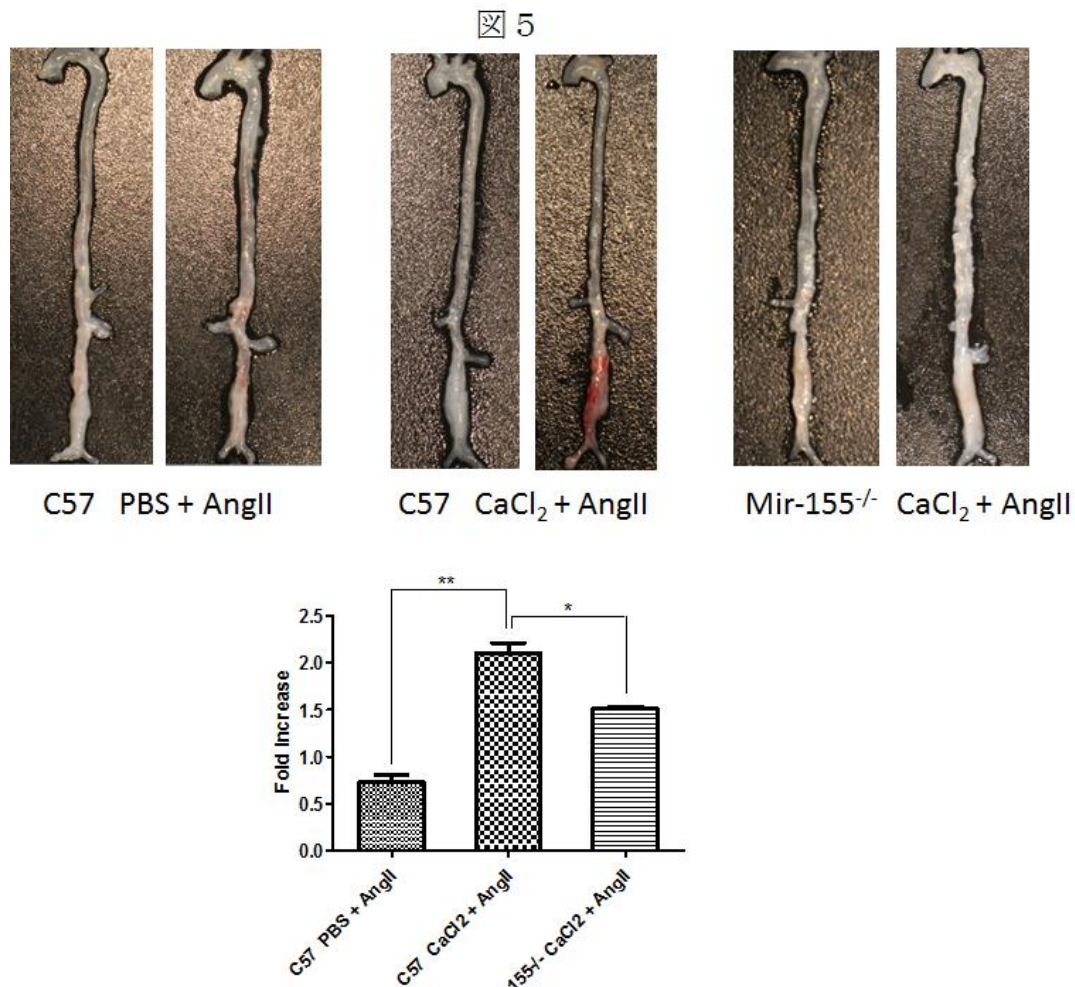
図4



b) MicroRNA-155の大動脈瘤・解離形成における重要性の検討

申請者らは、MicroRNA-155 ノックアウトを用いて、アンジオテンシンⅡの刺激による大動脈瘤の病変形成および進行を抑制することかどうか検討した。その結果、MicroRNA-155 ノックアウトにおいて

アンジオテンシンⅡ刺激により大動脈瘤病変形成及び進行を抑えたことが明らかにした（図5）。



考 察：

アンジオテンシンⅡの刺激による大動脈瘤において、転写因子である KLF5 及び MicroRNA-155 の発現が増加していることが認められた（図4）。さらに、マクロファージ中の KLF5 及び MicroRNA-155 阻害することで、アンジオテンシンⅡ刺激による大動脈瘤の病変形成及び進行を抑えたことが明らかにした。本研究では、心血管系疾患、特に大動脈瘤において、K L F 5 及び標的遺伝子の阻害・調節による大動脈瘤進行抑制の新規治療法に結び付くことが期待できる。

参考文献：

1. Shi H, Wen JK, Miao SB, Zheng B. KLF5 and hhLIM cooperatively promote proliferation of vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell Biochem.* 367:185-94 (2012).
2. Kimura T, Shiraishi K, Furusho A, Ito S, Hirakata S, Nishida N, Yoshimura K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Ikeda Y, Miyamoto T, Ueno T, Hamano K, Hiroe M, Aonuma K, Matsuzaki M, Imaizumi T, Aoki H. Tenascin C protects aorta from acute dissection in mice. *Sci Rep* 4, 4051 (2014).

作成日：2015年3月15日

中国の食道・噴門部胃がん多発地域における DNA付加体の網羅解析と発症要因の探索

研究者氏名 □□ ユニット長 戸塚 ゆかり
日本所属機関 □□ 国立がん研究センター
中国研究者氏名 □□ 教授 魏 文
中国所属機関 □□ 中国医学科学院腫瘍研究所

要 旨

食道がん多発地域及び低発地域の食道がんの手術検体（非癌部）から抽出したDNAを用いて、アダクトーム解析の後に主成分（PCA）分析を行なった結果、*N*-ニトロソピペリジン (NPIP) 由来の付加体である、THP-dGが高発地域に特徴的な付加体としてスクリーニングされた。更に、パイロットスタディとしてこれら地域住民の末梢血DNAの分析を行なった。その結果、標準品であるTHP-15N-dGと同じ保持時間に m/z : 352.2- >236.1のシグナルを持つピークが観察され、これら試料中にTHP-dGが存在することがわかった。NPIPはラットに食道癌及び肝臓がんを誘発することが報告されている。また、NPIPは食品中に存在すること、及び内因的にも生成することなどから、程度の差はあるものの、ヒトはNPIPに日常生活において曝露していることが考えられる。

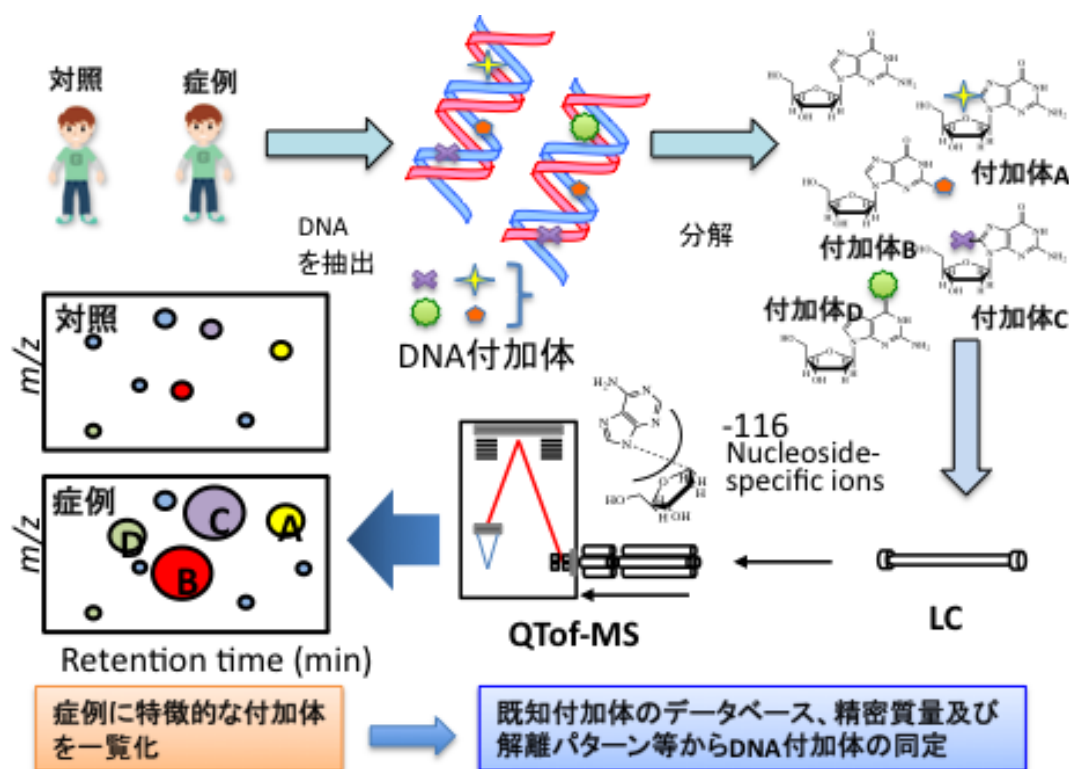
Key Words 食道癌多発地域, DNA付加体網羅解析, 主成分分析, *N*-ニトロソピペリジン, 質量分析機器

緒 言 :

中国河北省南部の磁県は食道がんの多発地域として知られている。この地域では、この30年で食道がんの罹患率は減少傾向を示しているとは言え、他の地域や日本と比較すると未だに高い。また、この地域では噴門部胃がんの罹患数も多いことが特徴的であり、噴門部胃がんの罹患数に関してはこの20年で5倍程度増加している。これまでの調査結果から、硝酸塩の摂取、低栄養、家族歴等が食道がんの発生に関係しそうなことが報告されている。しかしながら、これらの地域における食道がん、噴門部胃がんの要因は未だに不明である。

一方、最近、DNA付加体を網羅的に解析しカタログ化する方法（アダクトーム法）が確立された。この方法は、genome DNAを酵素消化した後に液体クロマトグラフィー連結型質量分析器（LC-MS）で解析することによりDNA付加体の全体像を把握することを可能とした方法である（図1）。DNA付加体はバイオマーカーとして発がん要因の検索にしばしば利用される。食道がん・噴門部胃がんについても、発がんを誘発する地域的な要因があるものと推察されることから、高発地域患者と低発地域患者のDNA損傷の様相に違いがあるかどうかを網羅的に解析すれば、食道がん高発地域における要因を解明できると考えた。本研究では、中国の食道がん多発地域の発がん要因を探索するため、多発地域（磁県）及び低発地域（石家荘）において収集した食道がんの手術検体を用い、DNAアダクトーム解析法により食道がん発生に関与するDNA付加体の探索を行なった。

図 1 DNAアダクトーム法のワークフロー



対象と方法：

食道がん・噴門部胃がん多発地域（磁県；n=7）及び低発地域（石家荘；n=8）において、食道がんの手術検体（非癌部を使用）からgenome DNAを抽出した。喫煙及び飲酒はDNA付加体生成への影響を及ぼす事が知られているので、喫煙も飲酒もしていない人をそれぞれの地域から抽出した。抽出したgenome DNAを酵素を用いてモノヌクレオシドに分解し、スピンカラムで精製した後にLC-ESI/Q-TOF-MS(Waters)で分析した。各サンプル毎に3回分析し、再現性の得られたピークのみを抽出した。データの解析はソフトウェア（M markerLynx, Waters）を用いた。次に、多発地域及び低発地域に特徴的なDNA付加体をスクリーニングするため、主成分分析（PCA）を行なった。

結 果：

食道がん多発地域（磁県；n=7）及び低発地域（石家荘；n=8）の食道がんの手術検体（非癌部）から抽出したDNAを用いて、アダクトーム解析を行なった結果、両地域において多量のDNA付加体が検出されていることがわかった。この多量に観察されているDNA付加体の中から、それぞれの地域に特徴的な付加体を探索するために、主成分(PCA)分析をおこなった。最終的に、高発地域に特徴的な付加体として複数の付加がスクリーニングされた。スクリーニングされたDNA付加体のm/z値を独自に構築した付加体データベースと比較し、同定を試みたところ、高発地域に特徴的である付加体のうちの 하나가既知付加体であるN2-(3, 4, 5, 6-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)deoxyguanosine (THP-dG)であることが推測された。この付加体はN-ニトロソピペリジン(NPIP)由来の付加体であり、ラットに食道癌及び肝臓がんを誘発することが報告されている。次に、定量的な質量分析機器を用いて、アダクトーム解析に用いた手術検体から本当にTHP-dGが検出されるかどうかの検証を試みた。まず、THP-dGの標準品を化学合成し、定量的な質量分析機器によるTHP-dGの分析条件を確立した後、アダクトーム解析に用いた、中国の食道癌高発地域の手術検体および末梢血DNAの分析を行なった。その結果、標準品であるTHP-15N-dGと同じ保持時間にm/z: 352.2→236.1のシグナルを持つピークが観察され、これら試料中にTHP-dGが存在することがわかった。

考 察：

THP-dGはNPIPから生成される付加体であり、NPIPはラットに食道癌及び肝臓がんを誘発することが報告されている。また、NPIPは食品中（ある種の野菜、胡椒や加工肉等）に存在することや、生体内物質であるピペリジンのニトロソ化により生成することなどから、程度の差はあるものの、ヒトはNPIPに日常生活において曝露していることが考えられる。従って、今後は、中国の食道癌低発地域、高発地域で生活する別の集団を用いてTHP-dGの解析を行い、NPIPの曝露と中国における食道癌高発地域の食道癌発症との関係について検討する必要がある。また、NPIPの曝露と中国における食道癌高発地域の食道癌発症との関係について検討する必要がある。更に、NPIP曝露の基となり得る環境因子を、疫学研究により得られた、被験者の曝露の情報から探索する。

注：本研究は、2014年7月『第41回毒性病理学会』、2014年9月『日本癌学会第73回大会』及び2014年12月『日本環境変異原学会43回大会』にて口演発表を行なった。

作成日：2015年 2月25日

PM2.5 に対するヒト曝露評価モデルの開発

研究者氏名	新添 多聞
日本所属機関	京都大学大学院医学研究科・特定研究員
中国研究者氏名	王 自發
中国所属機関	中国科学院大気物理学研究所・教授

要 旨

本研究では中国から飛来する PM2.5 の指標として PM2.5 中の鉛の同位体比に着目した。京都、瀋陽、長沙において PM2.5 のサンプリングを行い、鉛同位体比の測定を行った。また、大気輸送モデルを用いた鉛の拡散シミュレーションを行い、測定値との比較検討を行った。瀋陽、長沙での PM2.5 濃度は京都のおよそ 8 倍であった。瀋陽、長沙の鉛の同位体比の測定値は既往研究で指摘されてきた特徴にほぼ従い、中国北部と南部を代表する結果となった。一方、京都のサンプルについては日本の鉛よりも瀋陽の鉛に近い特徴を持っていた。後方流跡線解析の結果から、これは中国東北部から流入する気塊の影響を反映した結果であることを強く示唆することが示された。大気拡散シミュレーションの計算値は京都ではほぼ測定値と一致したが、瀋陽では若干の過大評価、長沙では過小評価となった。また、京都における中国からの影響を過小評価している可能性が高い。これは大気輸送モデルに与えた鉛放出量が現在の鉛放出量の強度と分布を捉えきれていないことが原因であると考えられる。本研究により PM2.5 中の鉛の同位体比が中国起源の PM2.5 の指標として利用できることが示されたが、今後、指標として定量的に利用するためにはさらに調査を継続し、鉛同位体比の測定データを蓄積する必要がある。

Key words PM2.5 , 鉛, 同位体比, 越境大気汚染

緒 言 :

PM2.5 は空気力学直径 2.5 μm 以下の大気中浮遊粒子を指し、呼吸によりヒトの肺の奥深くに侵入して沈着し、呼吸器だけでなく、循環器にも影響すると考えられている。近年、中国の急速な経済発展に伴って大気汚染が深刻化し、PM2.5 が極端な高濃度となる事象が頻繁に報告され、ヒトの健康被害が懸念されている。中国で発生した PM2.5 は大気の流れによって全球規模で広範囲に輸送されるため、越境大気汚染による日本への影響も懸念されている。その一方で、PM2.5 の発生源は日本国内にも存在し、その影響は必ずしも小さくないと考えられているが、その実態はいまだ不明である。そのため、中国で発生した PM2.5 の日本への影響の定量的評価も難しくしているのが現状である。

PM2.5 の発生源についての検討を難しくしているのが、PM2.5 が多種多様な成分の集合体であることによる。その主な成分は硫酸塩、硝酸塩、有機炭素、黒鉛であるが、それぞれに複雑な発生源を持つ。硫酸塩、硝酸塩、黒鉛については化石燃料の燃焼といった人為的な発生源が主であり、発生源の特定と定量的な評価がある程度は可能である。一方、有機炭素には様々な化学種が含まれるだけでなく、主要な発生源として石油関連産業などの人為的なものだけでなく、樹木から発生する揮発性有機化合物などの自然由来の寄与が大きいことで知られており、発生源の定量的評価が極めて困難である。

中国における主要なエネルギー源は石炭である。石炭は PM2.5 の主要な発生源の一つで、消費量の増加とともに石炭の低質化が懸念されている。燃焼時に硫酸塩の前駆種である二酸化硫黄と黒鉛が発生すると同時に、重金属の一種である鉛が発生する。鉛には安定同位体の Pb204 と、放射性同位体の Pb206、207、

208 が存在し、物質に含まれる鉛の同位体比がその物質の起源や年代の同定に利用されているが、特に中国起源の鉛の同位体比には特徴があることで知られている (e.g. Inoue and Tanimizu, 2008)。筆者らはこれまで中国起源の鉛の大気を通じた越境輸送とヒト曝露について共同で数値的研究を行ってきたが (Niisoe et al., 2010, 2011)、今回は中国起源の PM2.5 の指標として鉛に着目した。

本研究では京都と中国北部の瀋陽および南部の長沙において PM2.5 のサンプリングを実施して鉛同位体比の測定を行った。また、大気輸送モデルを用いた鉛の拡散シミュレーションを行い、測定値との比較検討を行った。

研究方法：

京都（2014 年 11 月 5～12 日）、瀋陽（同年 10 月 21～23 日）、長沙（同年 10 月 24～26 日）において、PM2.5 インパクタを装着したハイボリュームエアサンプラー（SHIBATA HV-500R）を用いて PM2.5 のサンプリングを行った。サンプリング高度はそれぞれ 3m、12m、40m である。

次に、京都でのサンプリング期間中の大気の流れを調べるために、後方流跡線解析を行った。気象庁 MSM の 925hPa（高度約 800 m）の 3 時間ごとの解析値を用いて、2014 年 11 月 5～12 日に京都上空にあった気塊の 1 時間ごとの位置を 7 日間遡った。

さらに、大気輸送モデルを用いた大気拡散シミュレーションにより、サンプリング期間中の大気中鉛の再現を行った。大気輸送モデルとして、気象モデルとの online 結合モデルである WRF-Chem V3.6.1 を用いた。各 time step ごとに予報された時々刻々の気象変動が拡散に反映される。気象場の初期値と境界値として気象庁の MSM 解析値を用いた。計算領域は東アジア全域、ランベルト正角円錐図法を採用し、空間解像度は 90 km である（図 1）。大気への鉛の排出量としては Niisoe et al. (2010)での推定値を用いた。また、モデルにおいて鉛の粒径は $1\mu\text{m}$ に固定した。計算期間は 2014 年 10 月 1 日から同年 11 月 12 日までで、大気中鉛の初期値はゼロとした。

結 果：

京都、瀋陽、長沙における測定結果を表 1 に示す。京都における PM2.5 の重量濃度は $14.6 \mu\text{g m}^{-3}$ であった。瀋陽、長沙では京都のおよそ 8 倍で $100 \mu\text{g m}^{-3}$ を超えていた。大気中鉛の重量濃度では京都と瀋陽、長沙の差はさらに大きく、京都が 5.3 ng m^{-3} であるのに対して瀋陽はおよそ 22 倍の 116.0 ng m^{-3} 、長沙はおよそ 56 倍の 294.8 ng m^{-3} であった。大気拡散シミュレーションの計算値は京都ではほぼ測定値と一致したが、瀋陽では若干の過大評価、長沙では過小評価となった。

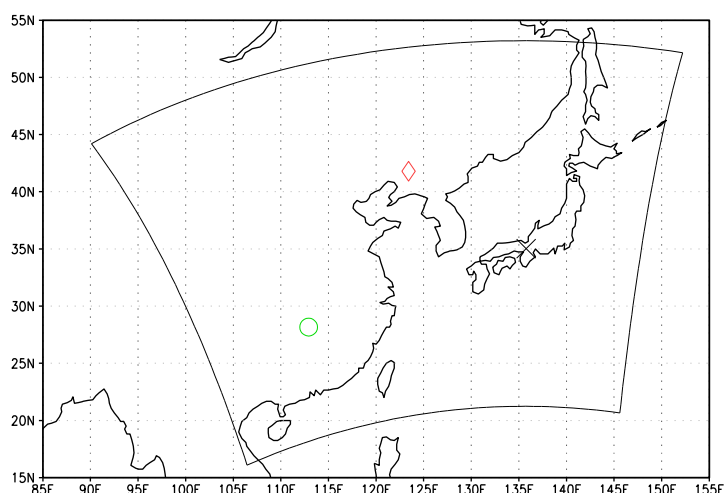


図 1．大気拡散シミュレーションの計算領域。×、◇、○はそれぞれ京都、瀋陽、長沙の位置を表す。

表 1. 測定結果。

	重量濃度		同位体比		
	PM2.5 ($\mu\text{g m}^{-3}$)	Pb* (ng m^{-3})	Pb204/Pb206	Pb207/Pb206	Pb208/Pb206
京都	14.6	5.3 (5.7)	0.0558	0.871	2.14
瀋陽	124.7	116.0 (209.7)	0.0537	0.849	2.11
長沙	113.3	294.8 (122.0)	0.0548	0.859	2.11

*カッコ内は拡散シミュレーションによる計算値。

図 2 は Pb208 と Pb206 の Pb207 に対する同位体比の散布図である。鉛同位体比のプロットはほぼ一直線上に並ぶが、中国産の鉛のプロットはその直線よりも下側に位置し、中国北部の鉛は左下、中国南部の鉛は右上に並ぶという特徴がある (e.g. Inoue and Tanimizu, 2008)。本研究による瀋陽、長沙での測定値は直線の下側で瀋陽が左下、長沙が右上となった。一方、京都での測定値は直線上に位置せず、むしろ瀋陽の測定値の下に位置した。

図 3 は京都での測定期間である 2014 年 11 月 5 日から同月 12 日までの京都上空 925 hPa の気塊の後方流跡線である。7 日間で計 56 本の流跡線があるが、ほぼすべての気塊が中国東北部から来ていることがわかる。図 4 は大気拡散シミュレーションによる、中国起源の大気中鉛の京都での測定期間と同期間で平均した地表付近の濃度 (ng m^{-3}) である。1 ng m^{-3} を超える領域が西日本を覆っているのがわかる。

考 察：

瀋陽、長沙での PM2.5 濃度が京都のおよそ 8 倍であることから中国都市部での大気汚染の深刻さを窺うことができる (表 1)。鉛濃度で見ると差が大きくなることから、中国の PM2.5 は鉛の含有量が高いという特徴がある。さらに、瀋陽と長沙では PM2.5 濃度が同程度であるのに対して鉛濃度では長沙は瀋陽の 2.5 倍であり、長沙での鉛含有量の高さが際立っている。

瀋陽、長沙の鉛の同位体比は既往研究で指摘されてきた特徴にほぼ従い、中国北部と南部を代表する結果となった (図 2)。

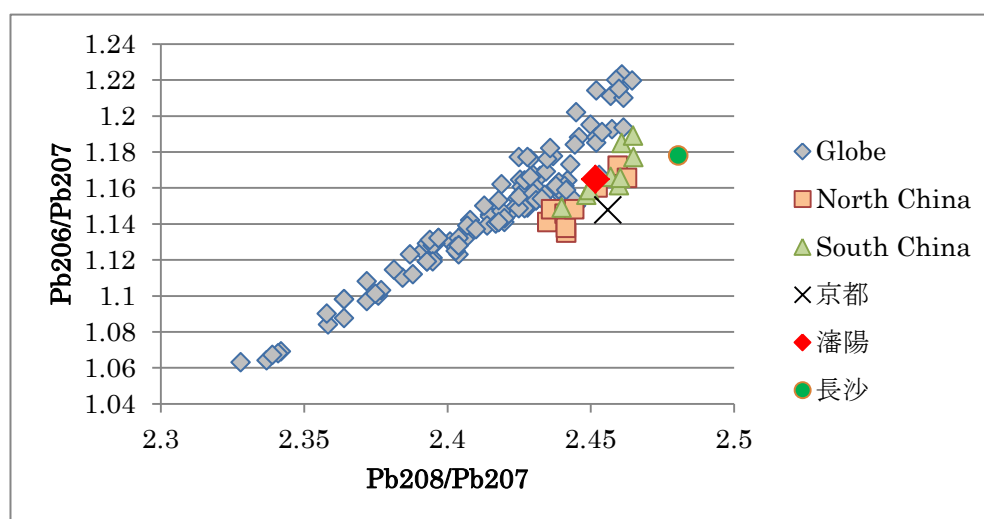


図 2. 大気中鉛の同位体比の散布図。×、◇、○はそれぞれ京都、瀋陽、長沙における測定値を表す。■、△、◇はそれぞれ既往研究による中国北部、中国南部、全球のその他の地域における測定値 (Bollhöfer and Rosman, 2000; 2001; Mukai et al., 2001)。

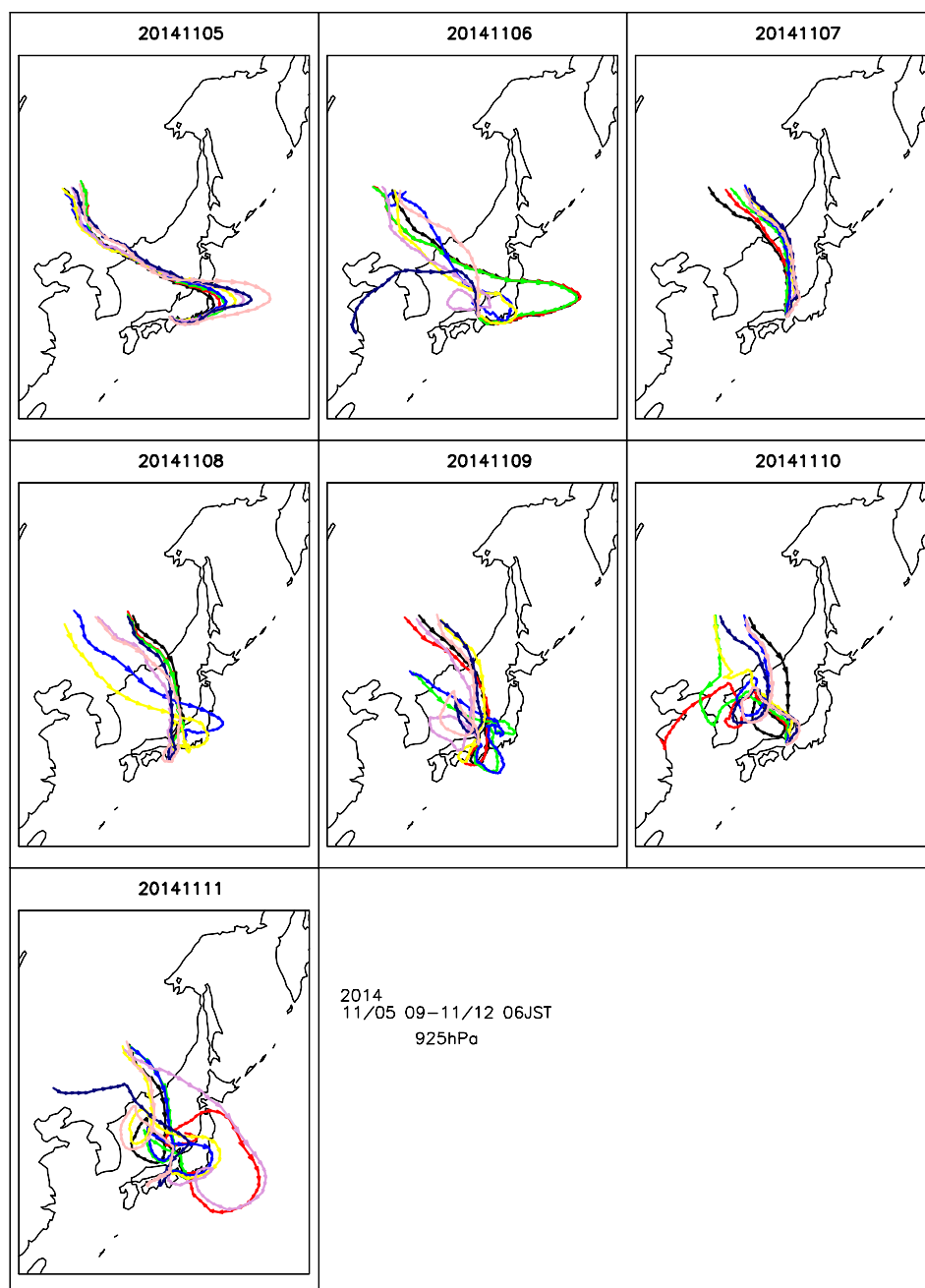


図3．2014年11月5日9時から同月12日6時までの京都上空925 hPa（高度約800 m）の3時間ごとの気塊の7日間の後方流跡線。

一方、京都のサンプルについては中国産以外の鉛の従う直線より離れ、瀋陽の鉛に近い結果となった。後方流跡線解析の結果（図3）によれば、京都でのサンプリング期間中は中国東北部からの気塊が盛んに流入しており、中国から日本海へ大気の流れ出すという冬季の季節風に特徴的な気象場であったことがわかる。従って、京都で採取したサンプルが中国東北部の鉛の影響を強く受けていると考えてよい。

京都でのサンプリング期間中の中国起源の鉛の平均濃度場を拡散シミュレーションで再現すると、期間中の濃度場を反映して 1 ng m^{-3} を超える領域が西日本上空に張り出しており、京都が中国大陆から流入する鉛の影響を受けていたことがわかる（図4）。ただし、 1 ng m^{-3} は京都における鉛濃度の測定値（ 5.3 ng m^{-3} ）の20%程度に過ぎない。図2の鉛同位体比によれば京都におけるサンプルはほとんどすべてが中国東北部の影響を受けていたことになるが、拡散シミュレーションでは中国からの影響を過小評価していること

になる。

図4の中国起源の鉛の平均濃度は大気輸送モデルに与えた中国での鉛の放出量を反映している。この放出量の強度と分布は2001年のエネルギー消費量と人口に基づいており、図4の分布に見られるように中国東北部では瀋陽に集中する。ところが瀋陽での鉛濃度の計算値は測定値のfactor 1.8の過大評価である(表1)。一方、長沙ではfactor 2.4の過小評価である。従って、現在の鉛放出量の強度と分布を捉えきれていない可能性がある。図3の後方流跡線によれば、京都に流入する気塊は瀋陽よりも北方から飛来していることが多い。モデルで中国東北部から京都への影響を過小評価しているのは、この地域の鉛放出量を過小評価している可能性が高い。

本研究ではPM_{2.5}中の鉛同位体比が中国起源のPM_{2.5}の指標として利用できるという観点から、京都、瀋陽、長沙においてサンプリングを行い、同位体比の測定を行った。京都のサンプルに見られた鉛同位体比は、中国東北部から流入する気塊の影響を反映した結果であることを強く示唆する結果となった。今後、鉛同位体比を中国から飛来するPM_{2.5}の指標として定量的に利用するためにはさらに調査を継続し、データを蓄積する必要がある。

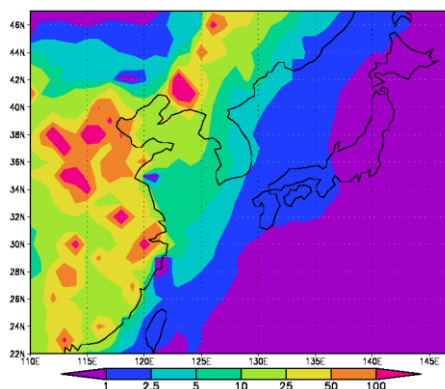


図4. 中国起源の大気中鉛の2014年11月5日9時から同月12日6時までの地表付近の平均濃度(ng m^{-3})。

参考文献：

1. Bollhöfer, A., Rosman K. J. R., 2000. Isotopic source signatures for atmospheric lead: The southern hemisphere. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 64(19), 3251-3262.
2. Bollhöfer, A., Rosman K. J. R., 2001. Isotopic source signatures for atmospheric lead: The northern hemisphere. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 65(11), 1727-1740.
3. Mukai H., Tanaka A., Fujii T., Zeng Y., Hong Y., Tang J., Guo S., Xue H., Sun Z., Zhou J., Xue D., Zhao J., Zhai G., Gu J., Zhai P., 2001. Regional characteristics of sulfur and lead isotope ratios in the atmosphere at several Chinese urban sites. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 1064-1071.
4. Niisoe T., Nakamura E., Harada K., Ishikawa H., Hitomi T., Watanabe T., Wang Z., Koizumi A., 2010. A global transport model of lead in the atmosphere. *Atmos. Environ.* 44, 1806-1814.
5. Niisoe T., Harada K.H., Hitomi T., Watanabe T., Hung N.N., Ishikawa H., Wang Z., Koizumi A., 2011. Environmental ecological modeling of human blood lead levels in East Asia. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2856-2862.

作成日： 2015年3月11日

In Vitro ヒト歯根膜様組織に対する至適矯正力の探索

研究者氏名： 廖 文

所属機関名： 大阪歯科大学歯科矯正学講座

要 旨

矯正力を歯根膜に加えることによって、歯根膜が様々な成長因子を分泌し、歯槽骨を吸収する。適正な矯正力は至適矯正力という、それは最大の骨吸収を引き起こす最小な矯正力である。至適矯正力を明らかにすることは、矯正歯科治療の効果を高める上で有意義であると考えられる。われわれは、ヒト歯根膜細胞をポリ乳酸不織布で三次元培養することによって、*In Vitro* 歯根膜様組織を作成した。*In Vitro* 歯根膜様組織に対して負荷をかけた。異なる負荷に対して、走査型顕微鏡写真で、細胞および細胞外マトリックスの形態学的変化が認められなかった。さらに、カスパーゼ-3/7 蛍光染色写真で細胞のアポトーシスの変化も認められなかった。リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって負荷および負荷の期間における遺伝子発現の変化が認められた。以上、矯正力は歯根膜で引き起こす反応がシミュレートされたと判断し、*In Vitro* 歯根膜様組織は歯根膜圧迫側の至適矯正力シミュレーションに適するモデルであることを証明した。さらに、現在、歯根膜牽引側モデルの材料として使われるジメチルポリシロキサン（PDMS）膜の疎水性を改良するため、放電プラズマやフィブロネクチンタンパク質による表面処理を行った。その結果、フィブロネクチンタンパク質処理群の表面荒さは最も大きかったか、放電プラズマ処理群の純水表面接着角は最も小さかった。そして、1h と 24h の細胞接着実験では、放電プラズマ処理群および放電プラズマとフィブロネクチンタンパク質の二重処理群において、PDMS の細胞接着性の有意な上昇が認められた。

Key Words 至適矯正力 歯根膜細胞 *In Vitro* シミュレーション

緒 言：

至適矯正力を明らかにすることは、矯正歯科治療の効果を高める上で有意義であると考えられる。われわれはヒト歯根膜細胞を用いて、ポリ乳酸不織布を足場材料とし、歯根膜様組織を *In Vitro* で作製した。本研究では三次元 *In Vitro* 歯根膜様組織を歯根膜圧迫側モデルとして使用し、それに対して負荷をかけることで矯正力をシミュレートし、形態学的な変化と遺伝子発現の解析を行った。その後、歯根膜牽引側モデルとしてすでに使用されている PDMS 膜の疎水性を改良し、それを歯根膜細胞の有効な培養に使えるどうかを確認した。

対象と方法：

三次元 *In Vitro* 歯根膜様組織の足場材料は、溶媒キャスト粒子溶出法で作製した。すなわち、ポリ-L-乳酸をジクロロメタンに溶解させ、塩化ナトリウムと混合し足場材料を作製した。足場材料の厚さは $400 \pm 50 \mu\text{m}$ 、気孔率は 83.3%、気孔サイズは $75\text{--}150 \mu\text{m}$ 、形状は円形、直径は 0.6 cm とした。 1×10^5 個ヒト歯根膜細胞を足場材料上に遠心回転で播種し、14日間培養することによって *In Vitro* 歯根膜様組織を作製した。その後、*In Vitro* 歯根膜様組織にステンレス球を用いて 5、15、25 および 35 g/cm^2 の負荷をかけ、5% C

O₂、37℃の条件で14日間培養した。(図1) 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、細胞および細胞外マトリックスの形態学的変化の評価を行った。さらに、蛍光染色を行い、カスパーゼ-3/7を用いて細胞のアポトーシスについて調べた。その後、トータルRNAを抽出しcDNAを合成し、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて、負荷および負荷の期間における遺伝子発現の変化を調べた。

牽引側モデルとして使用するPDMS膜は、処理方法によって、3つの実験群と1つの対照群に分類した。実験群 (NP) では、Strex社製の放電プラズマ処理機を用いてPDMS膜を処理し、実験群 (NF) では、37℃の0.02 mg/ml フィブロネクチン溶液中30分間浸漬し、実験群PFのPDMS膜においては、NP群の様な処理を行った以後、NF群と同様の処理を行った。対照群 (NN群) は非処理群とした。原子力顕微鏡 (AFM) を用いて材料表面の荒さを調べ、純水を用いて材料表面の接着角 (濡れ性) を調べた。その後、 6×10^4 個ヒト歯根膜細胞を256 mm²のPDMS膜に播種し、蛍光染色および細胞数自動計測システムを用いて、播種後1hの細胞接着数を調べ、WST-8細胞記数試薬を用いて、播種後24hの細胞接着数を調べた。

結 果：

三次元 *In Vitro* 歯根膜様組織においては、SEMで負荷後の表面を観察するどころ、細胞および細胞外マトリックスの形態変化が認められなかった。(図2) また、その断面観察にも同様な結果が得られた。(図3) カスパーゼ-3/7蛍光染色では、負荷および負荷の期間が蛍光の強度に影響を及ぼさないことが分かった。(図4) PCRの結果から、7日目と14日目のRANKL遺伝子および14日目BMP-2遺伝子の発現については、15および35g/cm²の負荷が他の負荷と比較して最も高かったものの、Double Peakの傾向を示した。14日目のALP遺伝子とPLAP-1遺伝子の発現については、5g/cm²の負荷で最も高かった。FGF-2およびOPG遺伝子の発現については、負荷とはかかわらず、14日の発見は最も高かった。I型コラーゲンの7日目と14日目の遺伝子発現は、負荷とはかかわらず、1日目および3日目より高かった。(図5)

牽引側モデル実験においては、NF群の表面荒さは2.630nmと最も大きかった。(図6) NP群の純水表面接着角は $6.42 \pm 2.00^\circ$ と最も小さかった。(図7) 播種後の細胞接着量は、1hと24hと関係なく、NPとPF群はNF群より有意に高かったと、全ての実験群は対照群より有意に高かった。(図8、図9)

考 察：

In Vitro ヒト歯根膜様組織に対し矯正力をシミュレートした負荷をかけても、細胞数の形態学的な変化やアポトーシスは認められないことが分かった。一方、負荷および負荷の期間により遺伝子発現の変化を認め、矯正力の生体反応を *In Vitro* でシミュレートすることが示唆された。

牽引側モデル実験においては、放電プラズマ処理や放電プラズマとフィブロネクチンの二重処理は、PDMS膜の歯根膜細胞接着性を増強した。今後、細胞進展実験機を用いて、牽引伸展時PDMS膜からの細胞数の変化および細胞の遺伝子発現を調べ、適切な表面処理方法をさらに絞り込む予定である。

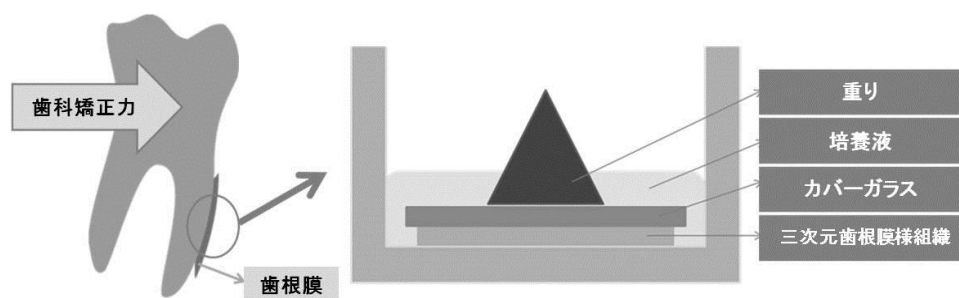


図1

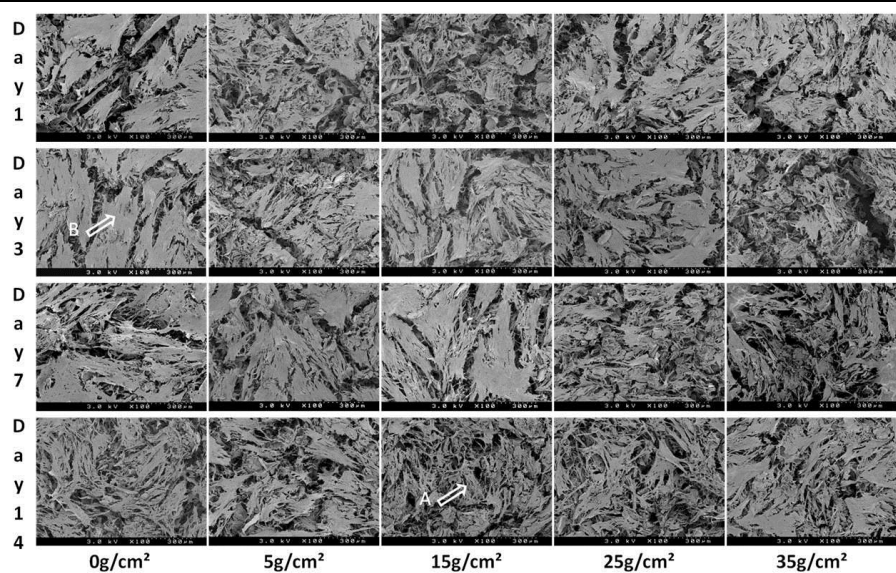


图2

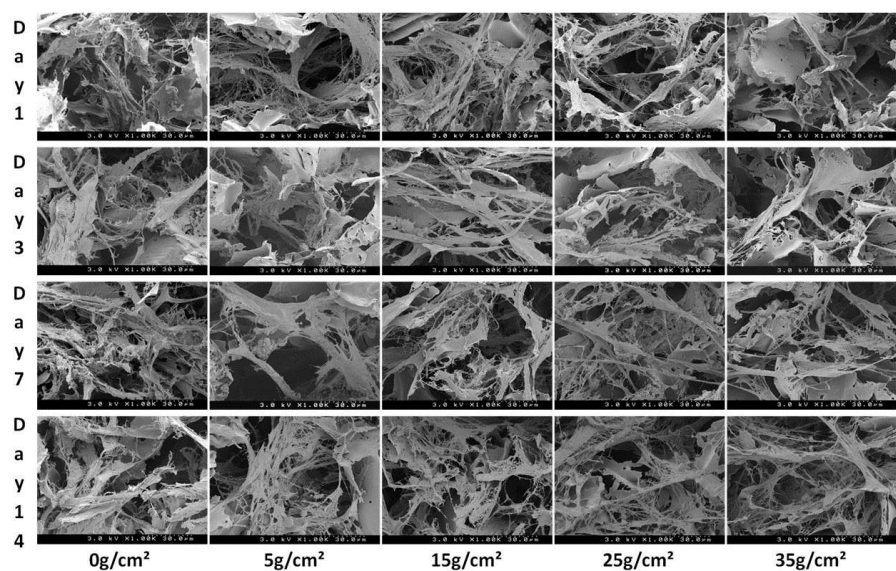


图3

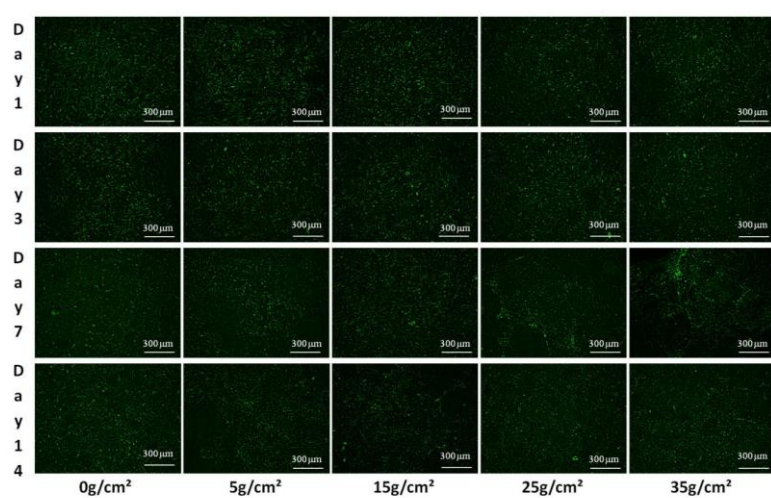


图4

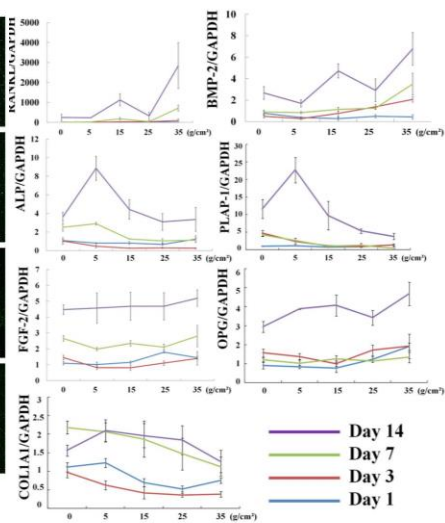


图5

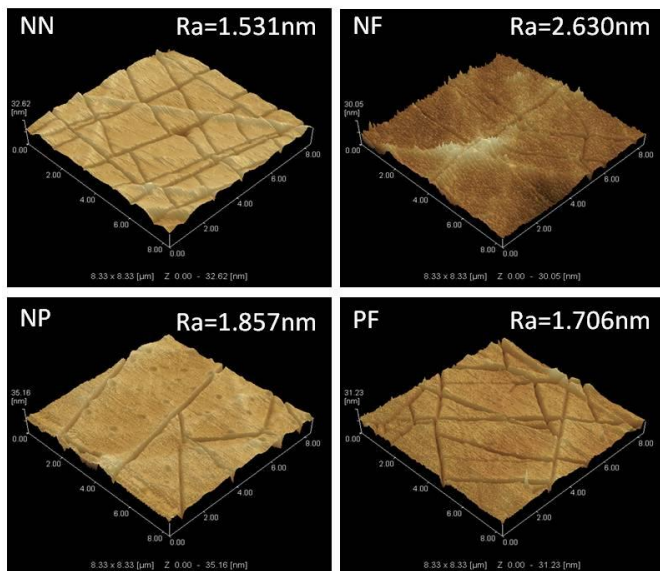


図6

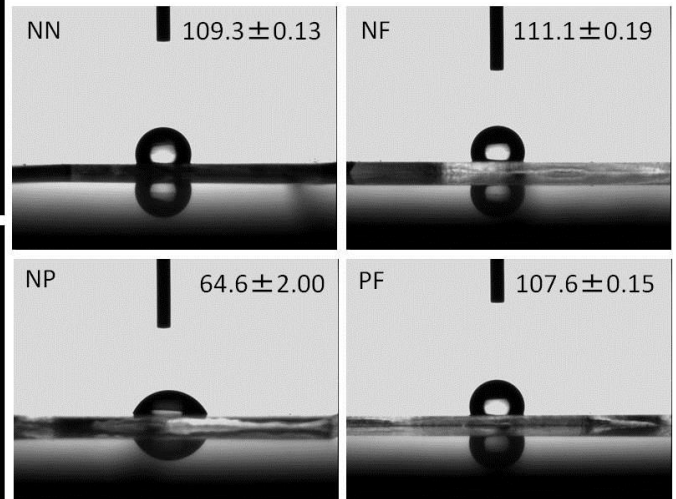


図7

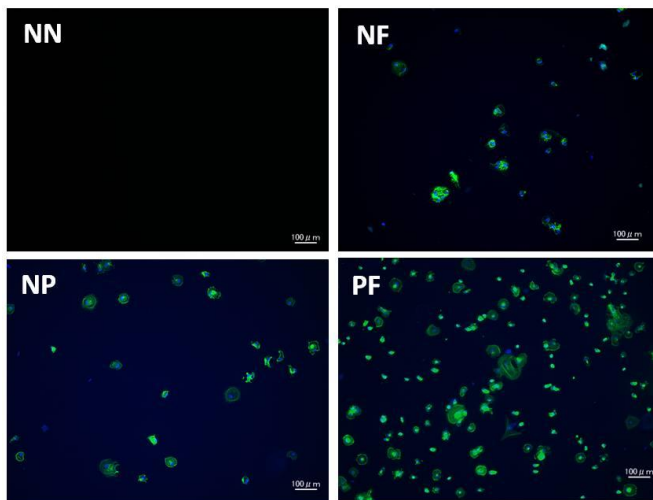


図8

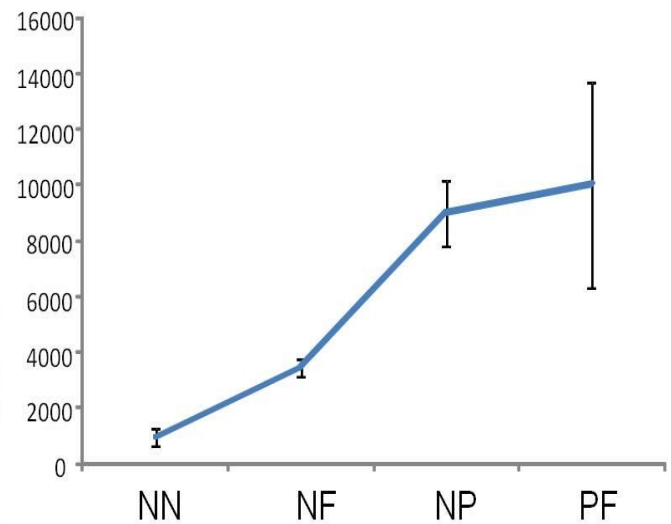


図9

参考文献：

1. Liao W, Okada M, Sakamoto F, Okita N, Inami K, Nishiura A et al. In vitro human periodontal ligament-like tissue formation with porous poly-l-lactide matrix. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(6):3273-80.
2. Okita N, Honda Y, Kishimoto N, Liao W, Azumi E, Hashimoto Y et al. Supplementation of strontium to a chondrogenic medium promotes chondrogenic differentiation of human dedifferentiated fat cells. *Tissue Engineering*. 2015(ja).

注：本研究は、2014年6月29日『近畿東海矯正歯科学会』にて口演発表、
2014年10月16日『The 13th Annual Session Of The Chinese Orthodontic Society』にてポスター発表。

作成日：2015年3月5日

精神疾患の病態解明と新規治療法の開発に関する研究

研究者氏名：任 乾

所属機関名：千葉大学社会精神保健教育研究センター

要 旨：

覚せい剤の乱用はうつ症状などの精神障害を引き起こすことが知られているが、根本的な治療薬はない。これまでの多くの研究から、脳由来神経栄養因子 (BDNF: brain-derived neurotrophic factor) とその受容体 Tropomyosin-related kinase (TrkB) は、うつ病の病態及び抗うつ薬の治療メカニズムに関わっていることが報告されている。本研究では、覚せい剤の繰り返し投与後に観察されるうつ症状における BDNF-TrkB シグナルの役割を調べた。さらに、TrkB アンタゴニストである ANA-12 の抗うつ効果も検討した。実験には、C57BL/6 雄性マウスに覚せい剤 (3mg/kg, S.C.) を 1 日 1 回 5 日間投与した、最終投与 3 日後から 2 週間まで、尾懸垂試験、強制水泳試験、ショ糖飲水試験を用いて、うつ症状の評価を行った。また、Western blot を用いて、覚せい剤繰り返し投与後のマウス脳各部位 BDNF の発現量を測定した。覚せい剤を繰り返し投与したマウスでは、尾懸垂試験、強制水泳試験の無動時間が有意に延長し、ショ糖飲水試験では有意に減少し、これらのマウスはうつ症状を呈した。このうつ症状は、覚せい剤最終投与 2 週間後でも観察された。また、覚せい剤繰り返し投与後のマウス脳の側坐核の BDNF の発現量が有意に増加することが判った。さらに、TrkB アンタゴニストの長期投与では、覚せい剤の繰り返し投与によるうつ症状を改善することも判った。本研究の結果より、覚せい剤の繰り返し投与は、うつ症状を引き起こし、これらのうつ症状には、脳の側坐核の BDNF-TrkB シグナルの亢進に関わっている可能性が判った。

Key Words: 薬物乱用、うつ病、BDNF、側坐核、methamphetamine

緒 言：

覚せい剤などの違法薬物の乱用による精神・神経障害は、日本だけではなく、中国でも大きな社会問題になっている。覚せい剤の長期使用による様々な精神障害が出現することが知られている、特に慢性の覚せい剤乱用患者は、うつ、不活発や不眠などの退薬症状を生じる報告が知られている。しかし、覚せい剤の長期使用に伴う精神神経障害及びうつ症状など退薬症状に関しては根本的な治療薬が無く。これまでの研究から、腹側被蓋野 (VTA) — 側坐核 (NAc) における BDNF-TrkB シグナルの亢進は、うつ病を引き起こすことが報告されている。しかし、覚せい剤投与による神経障害のメカニズムは未だ不明である。以上のことから、覚せい剤乱用による精神・神経障害への治療薬の開発が不可欠である。今回、研究者は、覚せい剤の長期使用後に観察されるうつ症状には、BDNF-TrkB シグナルに関わっているという仮説を立てた。現在覚せい剤の繰り返し

返し投与によって生じる行動異常及びうつ症状における BDNF-TrkB シグナルの役割を調べて、覚せい剤精神病の病態解明と新規治療法の開発について研究進んでいる。

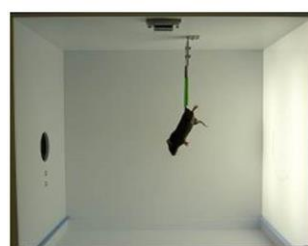
対象と方法:

本研究では、雄性 C57BL/6N マウスを用い、methamphetamine (METH, 3 mg/kg) を 1 日 1 回 5 日間投与し、右図に示す運動量測定 (Locomotion test, LMT)、尾懸垂試験 (Tail suspension test, TST)、強制水泳試験 (Force swimming test, FST) およびショ糖飲水試験 (Sucrose preference test, SPT) を用いて実施し、うつ症状を評価する。

また、覚せい剤投与後に、マウスの脳組織を取り、Western blot 方法で各部位 (側坐核、線条体、海馬、前頭皮質など) の BDNF の発現量を測定する。更に、覚せい剤を繰り返し投与したから 1 週間後に、TrkB アンタゴニスト ANA-12 及びアゴニスト 7,8-DHF を 2 週間連続投与し、覚せい剤の繰り返し投与によるうつ症状を改善するかどうかを検討する。



運動量測定



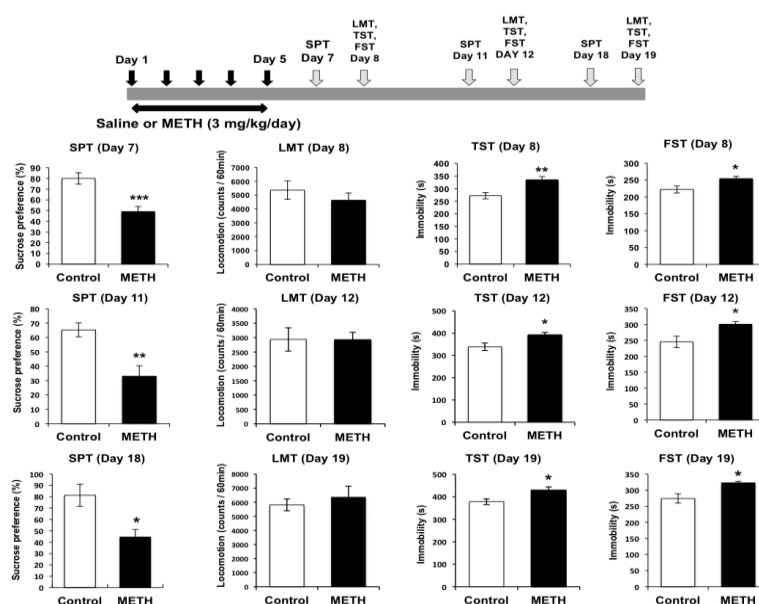
尾懸垂試験



強制水泳試験

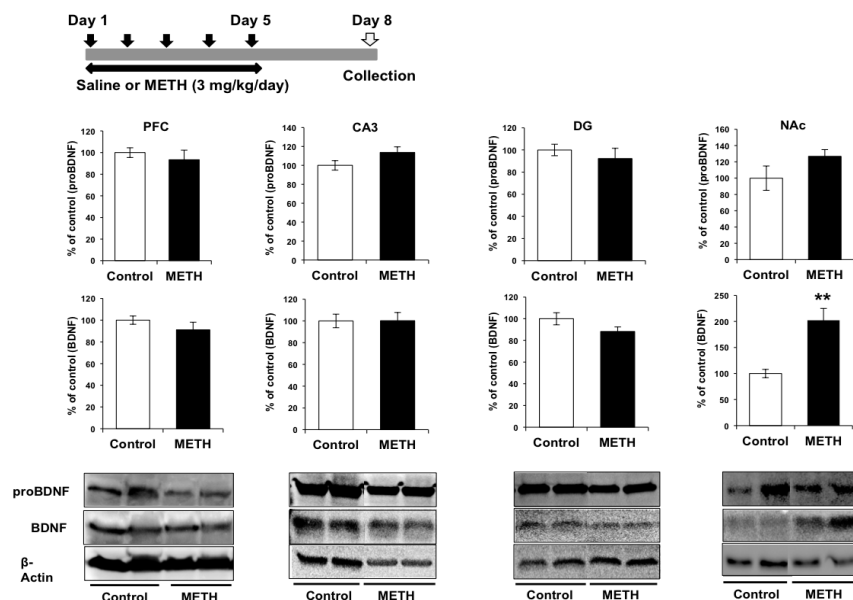
結 果:

- 1) 雄性 C57BL/6N マウスに METH (3mg/kg) を 1 日 1 回 5 日間繰り返し投与した 2 日後から、ショ糖飲水試験、運動量測定、尾懸垂試験及び強制水泳試験を行い、うつ症状を評価した。METH を繰り返し投与後マウスでは、尾懸垂試験及び強制水泳試験の無動時間が有意に延長し、ショ糖飲水試験では有意に減少し、うつ症状を生じることが判った。さらに、これらのうつ症状は、2 週間までも観察された (図 1)。



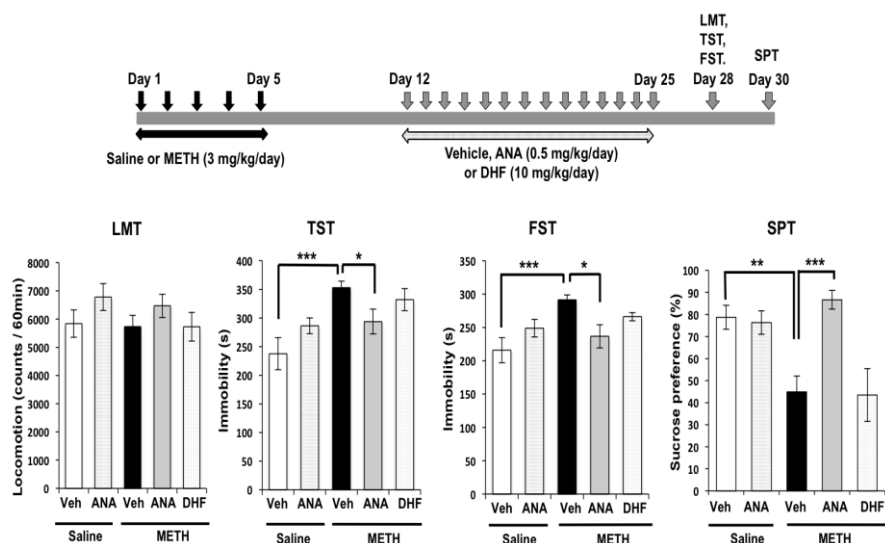
(図 1)

- 2) 雄性 C57BL/6N マウスに METH (3mg/kg) を 1 日 1 回 5 日間繰り返し投与した 3 日後、マウスの脳組織の前頭皮質 (PFC)、側坐核 (NAc)、海馬の CA3 と DG 領域を取り出し、Western blot 方法を用い、マウス脳組織各部位の BDNF 発現量を測定した。覚せい剤を繰り返し投与したマウスの脳組織に、側坐核の BDNF 発現量は生理食塩水投与群と比べて、有意に増加することが判った。一方、前頭皮質や海馬では変化が見られませんでした (図 2)。



(図 2)

- 3) 以上の結果から、覚せい剤の繰り返し投与したマウスでは、うつ症状を呈して、脳の側坐核の BDNF が増加したことが判った。次に、TrkB のアンタゴニストである ANA-12 を用い、上記の同様に覚せい剤を繰り返し投与した 1 週間から、ANA-12 (0.5mg/kg) を 2 週間連続投与し、ANA-12 の抗うつ効果を検討した。ANA-12 の 2 週間連続投与では、尾懸垂試験及び強制水泳試験で覚せい剤の繰り返し投与によ



(図 3)

る延長した無動時間をブロックした。更に、ANA-12 の連続投与では、覚せい剤によるショ糖飲水試験の減少を有意に抑制した。一方、TrkB アゴニストである 7,8-Dihydroxyflavone (DHF) の投与では、覚せい剤による行動異常を改善することが見られなかった (図 3)。

考 察:

覚せい剤の乱用は、日本だけではなく世界中で問題になっており、その病態解明と治療法の開発が急務である。本研究では、覚せい剤の長期繰り返し投与による、うつ症状を形成した。また、TrkB アンタゴニストである ANA-12 の慢性投与では、覚せい剤の投与によるうつ症状を改善されることを確認し、抗うつ効果を示した。更に、覚せい剤繰り返し投与後のマウス脳各部位の中に、側坐核だけの BDNF 発現量が増加したことも確認した。これらの結果より、覚せい剤の長期使用による精神神経障害及びうつ症状では、BDNF-TrkB シグナルの亢進に強く関わっていることが確認しており、更に、TrkB アンタゴニストでは覚せい剤精神病の治療薬としての可能性が示唆される。

参考文献:

1. Ren Q, Zhang JC, Fujita Y, Ma M, Wu J, Hashimoto K (2013). Effects of TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone on sensory gating deficits in mice after administration of methamphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* **106**: 124-127.
2. Ren Q, Zhang JC, Ma M, Fujita Y, Wu J, Hashimoto K (2014). Protective effects of TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone on the behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. *Psychopharmacology* **231**: 159-166.
3. Zhang JC, Wu J, Fujita Y, Yao W, Ren Q, Yang C, et al (2015). Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Int J Neuropsychopharmacol* 2014 Oct 31;18(4). pii: pyu077. doi: 10.1093/ijnp/pyu077.

注：本研究の結果は、2014年11月15日～19日にアメリカのワシントンで開催される Neuroscience 2014 学会でポスター発表を行いました。

作成日：2015年3月12日