

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

視床下部インスリン／レプチン抵抗性の分子機構と摂食・糖代謝調節

研究代表者 小野 啓(大学病院 内分泌・糖尿病内科)

研究分担者 住田 崇*, 鈴木 徳子*

緒言

インスリンが血糖値を低下させるしくみは、いまだに完全には解明されていない。現在のところ、インスリンは肝臓・骨格筋・脂肪組織の3組織に作用して血糖値を下げると考えられている。骨格筋と脂肪組織では、インスリン受容体の活性化から始まり、IRS(インスリン受容体基質)、PI3キナーゼ、Aktの活性化を介して、最終的に糖輸送担体であるGLUT4の細胞膜表面への出現を起し、グルコースの細胞内への取り込みをさせる。一方、肝臓では、インスリンが作用すると、糖新生とグリコーゲン分解が抑制され、解糖とグリコーゲン合成が促進されることにより、その総和としての肝臓からの糖産生が抑制される。すなわち、肝臓と筋肉・脂肪とは、インスリンの作用機序は全く異なっている。近年、2型糖尿病においては肝臓においてインスリンの作用が低下している、つまり肝臓のインスリン抵抗性がその病態生理の中核を成しているという考えがあり、肝臓におけるインスリン作用のしくみ、および肝臓のインスリン抵抗性の起きるしくみの解明が非常に重要視されている。

インスリンが肝臓の糖産生を抑制するしくみには、2種類が知られており、直接作用と間接作用とよばれている。直接作用とは、インスリンが肝臓のインスリン受容体に結合してこれを活性化し、IRS1、PI3キナーゼ、Aktの活性化を起す。このAktが転写因子Foxo1を非活性化する。Foxo1は糖新生の律速酵素であるPEPCKおよびG6Paseの転写促進因子であるため、Foxo1が非活性化されるとこれらの酵素の転写が起らなくなり、糖新生が起らなくなる。また、Aktはグリコーゲン合成酵素の阻害因子であるGSK3を非活性化することにより、グリコーゲン合成を促進する。これらがインスリンの肝臓における直接作用とよばれている。一方、イン

スリンは視床下部の摂食中枢である弓状核に作用し、迷走神経を介して肝臓の糖新生を抑制するといふ、神経を介した経路があることが、最近Rossettiのグループ(Nature 2005;434:1026-31)、Bruningのグループ(Science 2000;289:2122-5)を中心として報告されている。これをインスリンの間接作用と呼ぶ。インスリンが視床下部弓状核に作用すると、インスリン受容体、IRS、PI3キナーゼの活性化を介してATP依存性カリウムチャンネルを活性化し、肝臓への迷走神経遠心路を興奮させる。この入力肝臓に達すると、肝臓のIL6/STAT3経路が活性化し、糖新生の律速酵素であるPEPCK、G6Paseの転写を抑制することにより、糖新生を抑制するという経路である。つまり、インスリンは肝臓に直接作用するしくみ、および視床下部を介して間接的に肝臓に作用するしくみの2通りで、肝臓の糖産生を抑制しているのである。

それでは、2型糖尿病の病態生理の中核を成していると言われている、肝臓のインスリン抵抗性というのは、直接作用と間接作用、どちらが障害されているのであろうか。当研究代表者は、この点を明らかにすべく、2005年4月より4年間、米国アルバートアインシュタイン医科大学のRossettiの研究室に留学し、研究を行った。その結果、インスリン抵抗性モデルである短期高脂肪食ラットにおいて、視床下部のインスリン情報伝達の中でIRS1の部分に障害が生じており、この原因として視床下部のS6キナーゼという酵素が活性化されているからであることを示した。つまり、視床下部S6キナーゼの活性化によりインスリンの視床下部における作用が障害をうけ、このことにより肝臓のインスリン抵抗性が生じていることが証明できた。この結果を、原著論文(J Clin Invest 2008;118:2959-68)に報告し、また総説(Cell Cycle 2009;8(18):2885)および(小野啓. 視床下部S6キナーゼと糖代謝・摂食調節. 分子糖尿病学の進歩 2009. 2009. p59-65)を執筆している。

短期間の高脂肪食負荷ラットにおける肝臓のイン

*大学病院 内分泌・糖尿病内科

スリン抵抗性が、視床下部のS6キナーゼの活性化によって起きていることが分かったところで、次なる疑問として、より長期間の過食の場合、あるいは糖尿病にすでになっている場合、肝臓のインスリン抵抗性が起きるしくみが果たして同じであろうか、という疑問が生じてくる。マウスの長期高脂肪食モデルの視床下部において、IRS1の脱リン酸化酵素でありIRS1を非活性化するPTP-1Bが増加しているという報告(J Biol Chem 2008;283:14230-41)、および、S6キナーゼと同様のしくみでIRS1を非活性化するIKK β の活性が上昇しているという報告(Cell 2008;135:61-73)が他のグループから成されている。これらの報告は、その結果として摂食調節が障害され、過食が起こる、という表現型を示したものであり、PTP-1BまたはIKK β のために肝臓のインスリン抵抗性が起こる、ということを示されていない。しかしながら、これらの分子が視床下部のインスリン抵抗性を引き起こし、インスリンの間接作用を障害することによって肝臓のインスリン抵抗性を引き起こしていることは十分考えられることである。すなわち、過食の長短や、インスリン抵抗性を起こす原因によって、肝臓のインスリン抵抗性のしくみが異なっている可能性がある。例えば、レプチン情報伝達異常のために肥満と重症の糖尿病を来すdb/dbマウスにおいては、肝臓自体のインスリン情報伝達がIRSのレベルから障害を受けているという複数の報告があり、肝臓へのインスリンの直接作用が障害されていることが肝臓のインスリン抵抗性の病態機序であることが予想される。

材料と方法

【実験A】

インスリン抵抗性/糖尿病モデルマウスおよびその

コントロールとして(a) C57BL6マウス(b) aに1日の高脂肪食を負荷したマウス(c) aに3日の高脂肪食を負荷したマウス(d) aに1週間の高脂肪食を負荷したマウス(e) aに11週間の高脂肪食を負荷したマウス(f) db/dbマウス(高度の糖尿病モデル)の6種類のマウスを用意し、各種組織において、シグナル伝達分子やその上流の因子が、モデルマウスでどのように変化しているかを、リアルタイムPCRおよびウエスタンブロットを用いて調べた。

【実験B】

Sprague-Dawleyラットの視床下部内側基底部(MBH)に、優位阻害型PTEN(My-C124S-PTEN)もしくはコントロールのLacZを発現するアデノウイルスベクターを注入し、注入後2週間における体重増加と摂食量を、通常食または高脂肪食を与えて測定した。また、同様の修飾を施したラットにインスリン負荷試験を行い、糖代謝への影響を調べた。

結果

【実験A】

興味深いことに、代表的なAMPKのリン酸化酵素であるLKB1の発現が、肝臓において、1日の高脂肪食とdb/dbマウスにおいて有意に低下(mRNAレベルにおいて $41 \pm 2\%$)していることが分かった(図1)。さらに、db/dbマウスにインスリン治療を施して血糖を改善すると、LKB1の発現レベルが回復することも分かった(図1)。そこで、ベクターを用いて肝臓にLKB1を強制過剰発現したときに、糖代謝がどのようになるかを調べたところ、db/dbマウスにおいてLKB1をレスキューすることにより、空腹時血糖(コントロール 218 ± 18 mg/dL 対 LKB1 158 ± 17 , $p < 0.05$)および糖

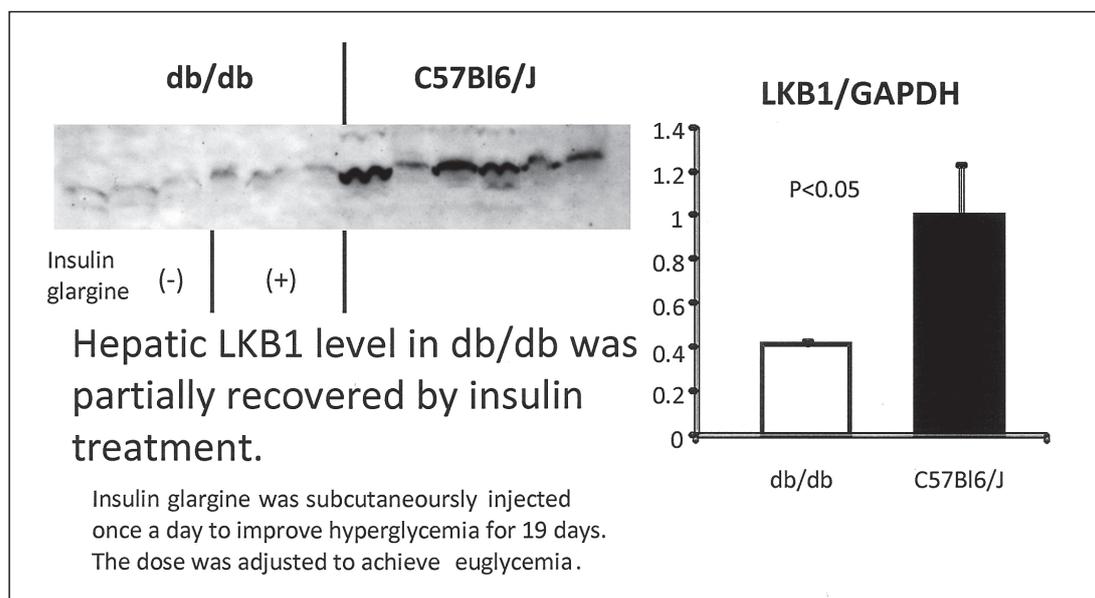


図 1. Hepatic LKB1 expression was lower in db/db mouse.

負荷15分後血糖(442 ± 13 mg/dL 対 355 ± 24)が改善することが示された(図2)。この時、Aktおよびその下流のGSK3のリン酸化はLKB1の強制発現において上昇していた(図3)。以上のことから、肝臓のLKB1の減少がインスリン抵抗性に関与しており、これを補うことで糖尿病が改善しうることが示唆された。

【実験B】

優位阻害型PTENをMBHに発現させたラットは、通常食を与えた場合には摂食量が減少していた(2.1 ± 0.8 g vs. 8.3 ± 3.2, p < 0.05, 術後1日; 図4)。興味深いことに、10%ラードを通常食に添加した高脂肪食を与えた場合には摂食量の減少は認められなかった(図5)。しかし、インスリン負荷試験においては、高

脂肪食投与下においても優位阻害型PTEN発現ラットでインスリン感受性が高い傾向が認められた(インスリン投与15分後のPTEN抑制ラットの血糖69 ± 5 mg/dL, コントロールは80 ± 6, p = 0.07; 図6)。

考 察

肝臓においてはLKB1のダウンレギュレーションがインスリン抵抗性に関与している可能性が示唆された。また、視床下部においては、PTENとこれによって代謝されるPIP3が摂食の調節と、糖代謝の調節とを独立したしくみで制御している可能性が示唆された。

今後、視床下部のシグナルと肝臓のシグナルとの関連において、これらの分子がどのように関与しているのかを解明するべく、さらに実験を続けている。

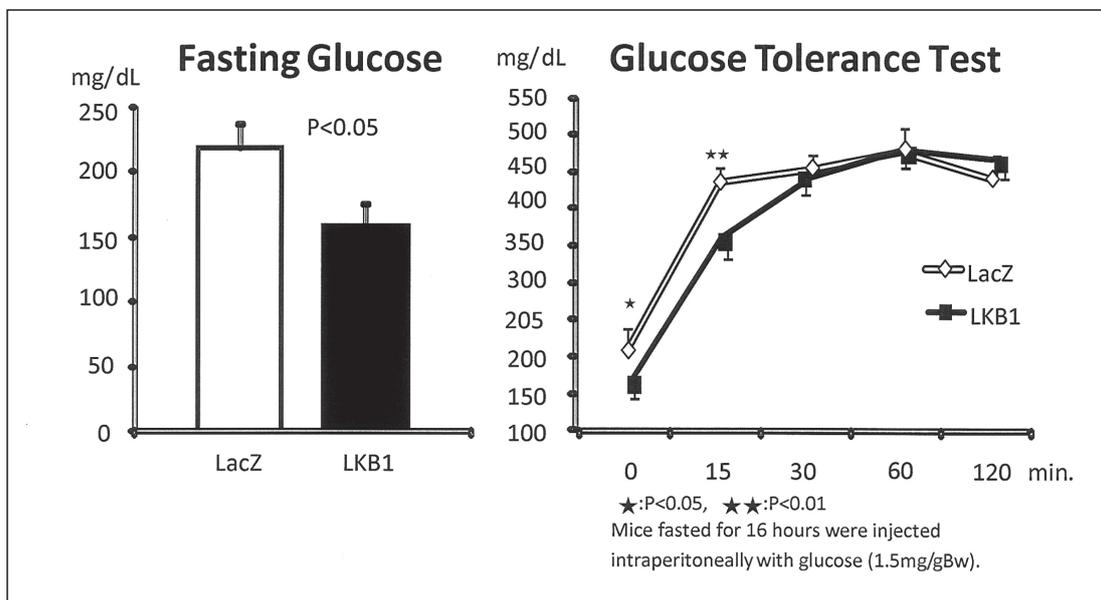


図 2. Hyperglycemia in db/db mouse was ameliorated by adenovirus-induced hepatic LKB1 expression.

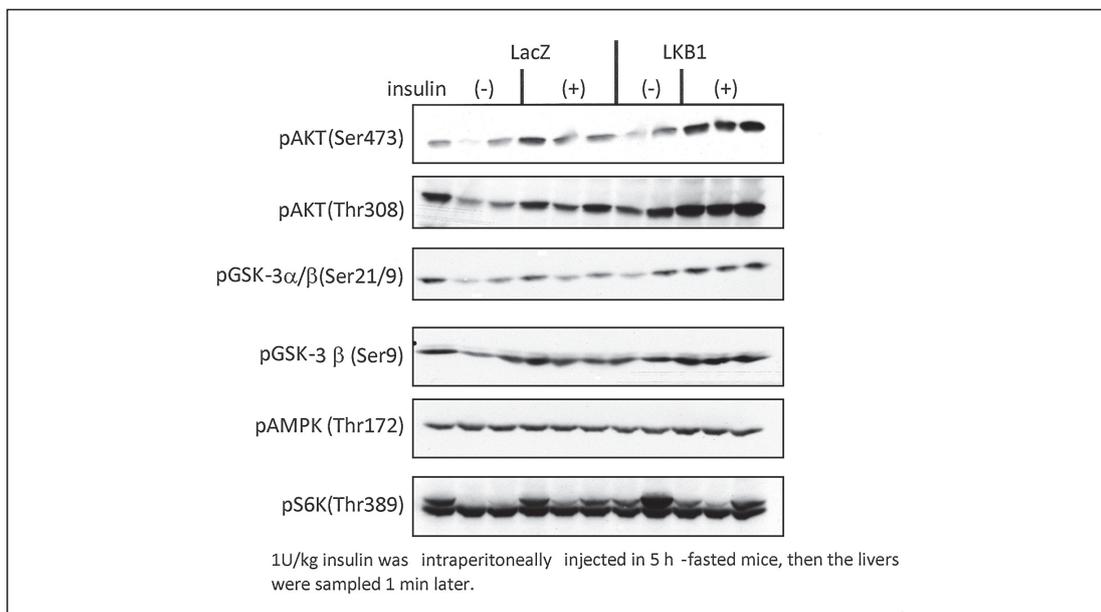


図 3. Insulin and AMPK signaling after insulin bolus injection.

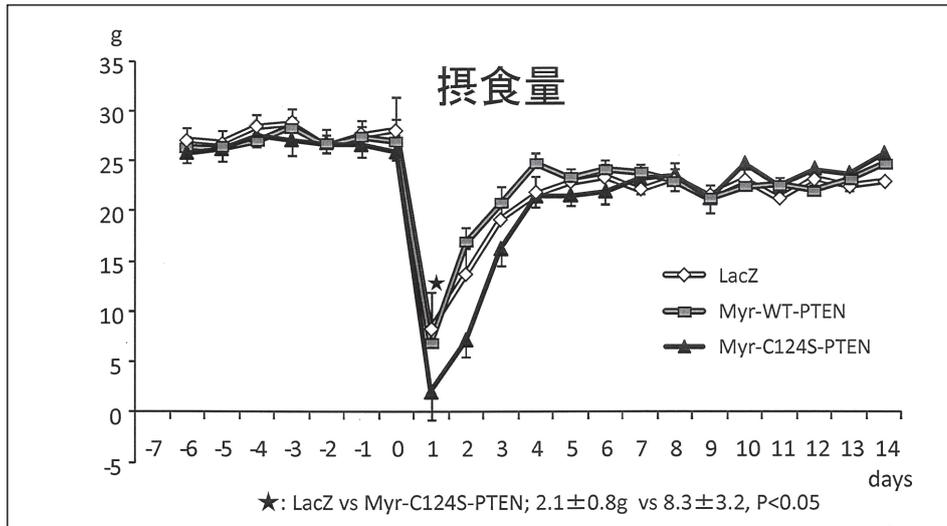


図 4. MBHのPTENを急性に抑制すると摂食量が減少した。

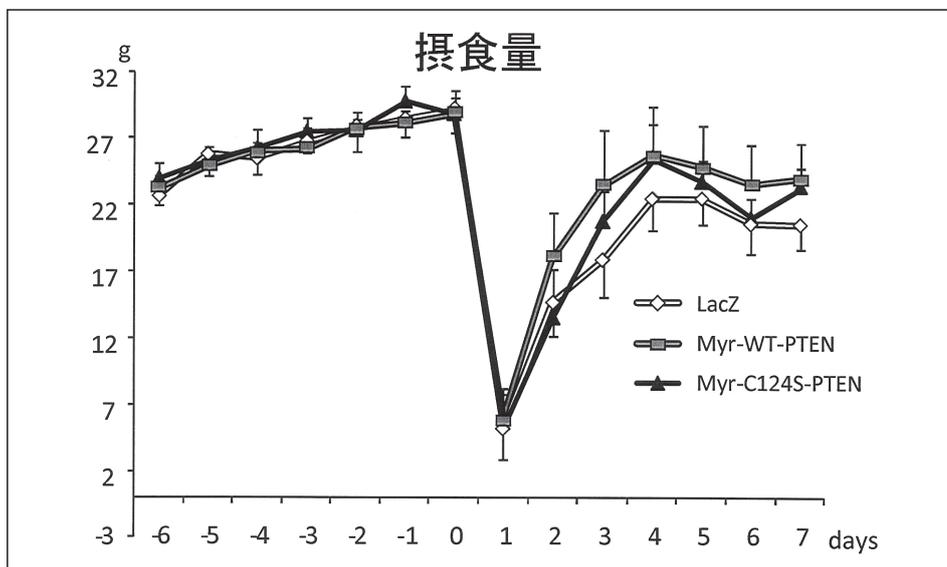


図 5. 高脂肪食負荷下ではPTENによる摂食への影響は消失した。

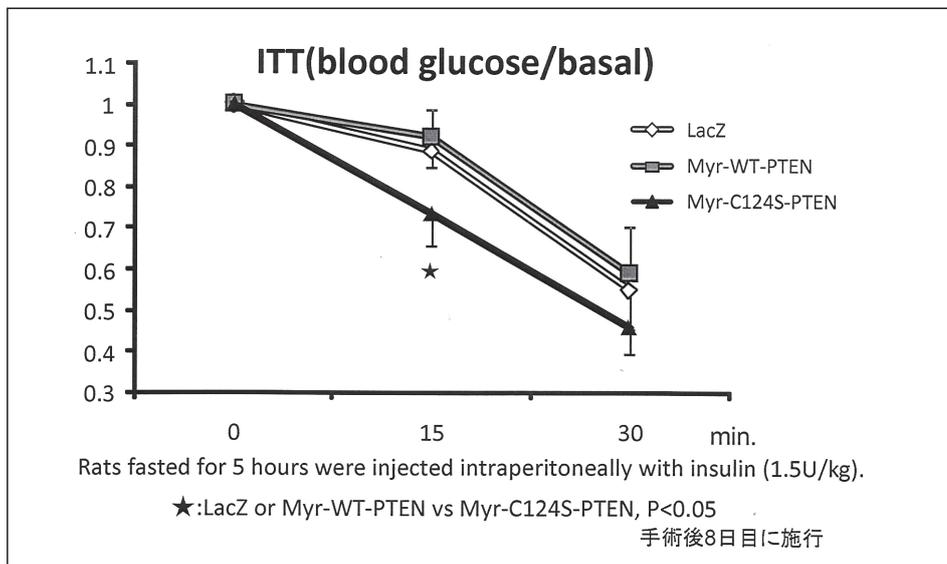


図 6. 高脂肪食負荷でもMBHのPTENを急性に抑制するとインスリン感受性が増大した。

研究成果リスト

学会発表

- 1) 住田崇, 小野啓, 他. 肝S6キナーゼの活性化はインスリンの肝糖産生抑制効果を傷害する. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010年5月, 岡山
- 2) Takashi Sumita, Hiraku Ono, et al. Role of hepatic LKB1 in the pathophysiology of diabetes in obese diabetic mouse. FASEB summer research conference, AMPK: Central Regulatory System in Metabolism & Growth, 2010年10月, 滋賀
- 3) Takashi Sumita, Hiraku Ono, et al. Acute suppression of hypothalamic PTEN reduces food intake and improves insulin resistance. 40th Keystone Symposia; Type 2 Diabetes, Insulin Resistance and Metabolism Dysfunction. Keystone, Colorado USA
- 4) 住田 崇, 小野 啓, 他. 視床下部PTENの摂食およびインスリン感受性調節における役割. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011年5月, 札幌

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

がん幹細胞において野生型 p53の活動を制限する nucleosteminの役割

研究代表者 加藤 英政 (ゲノム医学研究センター)

研究分担者 片野 幸¹⁾, 佐川 森彦²⁾

緒言

核小体に存在する nucleostemin (NS) は、がん細胞を始めとする様々な増殖性細胞にて、p53の機能と拮抗的に働くことが知られていた。我々の先行研究の結果、本因子はマウスES細胞の生存維持に深く関与することが判明した。近年、がん幹細胞という概念が導入されているが、遺伝子発現プロファイル比較の結果、これらとES細胞の遺伝子発現には根底の部分で強い相似性がある。これは、ES細胞における本因子NSの機能を追求すれば、がん幹細胞の生存維持を操れる可能性を示唆している。我々は、NSのES細胞における役割を注意深く解析し、その中心的なメカニズムに、幹細胞や多くのがん細胞で発現が見られる転写因子 Nanogの安定性を介している部分があることを発見した。また、NSが存在する核小体ということから連想して、我々はさらに「核小体ストレス」がNSの脱失を模倣し、Nanogを不安定化することを見いだした。

材料と方法

マウスES細胞を分子生物学的に改変し、nucleosteminタンパク質の発現がdoxycyclineを加えることで抑制される細胞を用いた¹⁾。解析に用いた分子生物学的・細胞生物学的手法は定法にしたかった。

結果

本研究における最大の発見は、この核小体因子 nucleostemin (以下NS) が、マウスES細胞において、その未分化性・分化多能性のキーとなる因子である Nanogの発現を調整している点である(図1)。

これは、今までその存在が知られていなかった本因子(Nanog)を直接制御する新しいメカニズムであり、しかもその因子が核小体に主に存在する点が興味深い

と考えた。この側面をさらに検証するため、NS低下に伴い発現が減少するNanogを強制発現によって補うことを考えた。その結果、Nanogを強制発現させた細胞では、NSを発現抑制しても、もはや細胞は分化せず、未分化な状態を保つことが示せた(図2)。

ActinomycinD (ActD) などの抗がん剤は、臨床的濃度においては、核小体ストレスを引き起こす。これは、リボソームを構成するリボソームタンパク質が核質に遊離することで発生するとされている細胞ストレス応答である。NSも、その脱失により、核小体ストレスを引き起こすことが知られていた。そこで我々は、野生型のマウスES細胞(CMTI-1株)に対して、ActDを作用させ、その効果を観察した。その結果、ここでも同様に、Nanogは転写量およびタンパク質量共に著明に減少することが観察できた(図3)。

考察

いくつかのがん種には、抗がん剤として ActinomycinD (ActD) が用いられている。ActDは通常RNAポリメラーゼIIの阻害剤(μM)と考えられているが、おそらくは臨床的な濃度(nM)では、RNAポリメラーゼIの阻害に選択的に働き、前述の核小体ストレスを引き起こすことが知られている。現在のところ、がん幹細胞とNanogの関連はまだ確定はしていないものの、glioblastoma multiformeなどの悪性型に現れるがん幹細胞様の細胞はNSを強く発現していることが報告されている。未分化性(=治療抵抗性)の強い細胞表現型を実現するために、生体内では通常未分化幹細胞・生殖細胞系列で発現するNanogを再利用して、根治の難しいがん幹細胞を含んだがん種が生存している可能性が想定され、本研究の成果は、がん対策に直結すると強く自負している。

引用文献

- 1) Nomura J, Maruyama M, Katano M, Kato H, Zhang J, Masui S, et al. Differential requirement

1) ゲノム医学研究センター

2) 総合医療センター 血液内科

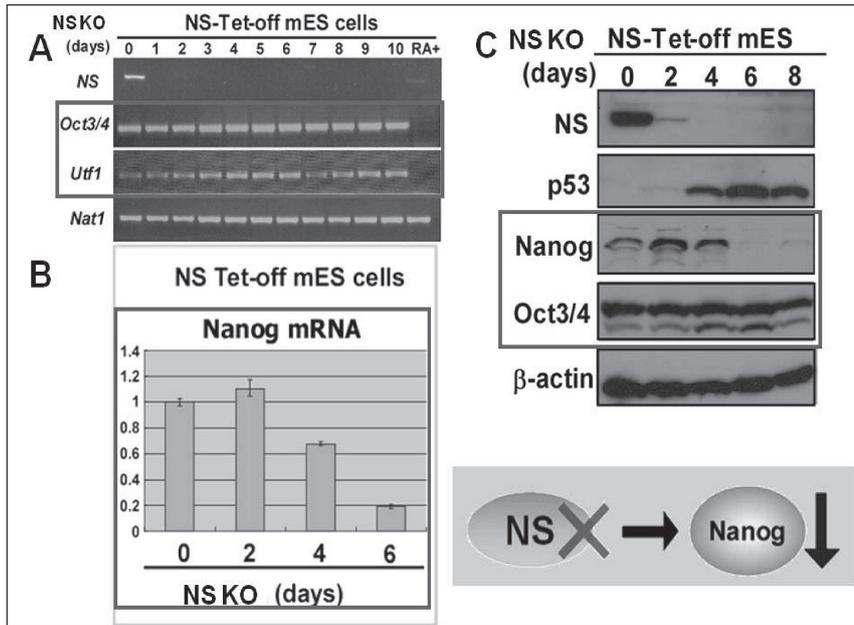


図 1. NS の発現抑制に伴う Nanog 発現減少. NS の発現抑制は, Oct3/4 や Utf1 の発現には影響がないが (A), Nanog は, てきめんに発現抑制される (B, C).

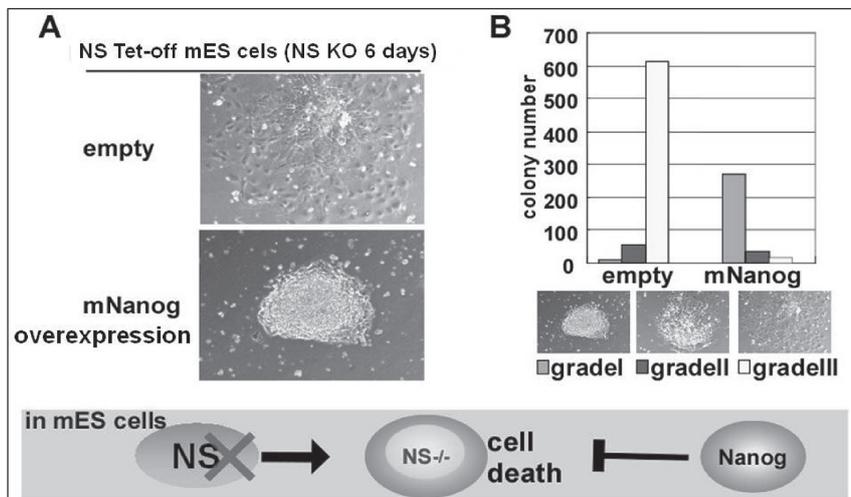


図 2. NS 低下時の Nanog の強制発現. Nanog の強制発現で ES 細胞の性質 (A) と数 (B) は回復する.

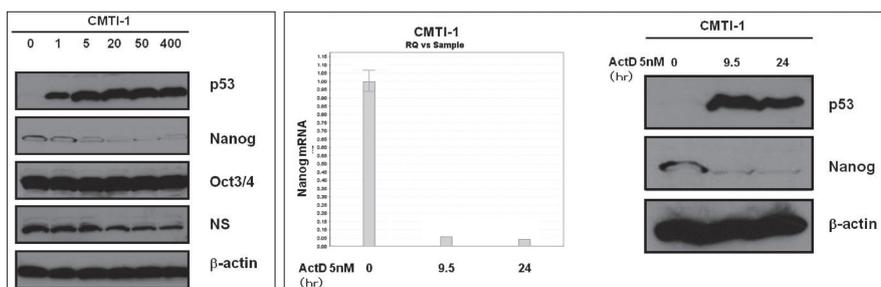


図 3. 核小体ストレス時のマウス ES 細胞における Nanog の減少. ActD を, 臨床レベルの低容量作用させるだけで, 幹細胞らしさが失われた.

for nucleostemin in embryonic stem cell and neural stem cell viability. *Stem Cells* 2009;27:1066-76.

研究成果リスト

- 1) Fujino N, Kubo H, Suzuki T, Ota C, Hegab A, He M, Suzuki S, Suzuki T, Yamada M, Kondo T, Kato H, and Yamaya M. Isolation of alveolar epithelial type II progenitor cells from adult human lungs. *Laboratory Investigation* 2011;91:363-78.
- 2) Watanabe Y, Numata K, Murata S, Osada Y, Saito R, Nakaoka H, Yamamoto N, Watanabe K, Kato H, Abe K, Kiyosawa H. Genome-wide analysis of expression modes and DNA methylation status at sense-antisense transcript loci in mouse. *Genomics* 2010;96:333-41.
- 3) Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R, Kawakami H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010;465(7295):223-6.
- 4) Hegab AE, Kubo H, Fujino N, Suzuki T, He M, Kato H, Yamaya M. Isolation and characterization of murine multipotent lung stem cells. *Stem Cells Dev* 2010;19:523-36.
- 5) Miyagi S, Kato H, Okuda A. Role of SoxB1 transcription factors in development. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(23):3675-84.

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

全ゲノム SNP 解析を用いた
日本人由来サルコイドーシス関連遺伝子の同定

研究代表者 田中 知明 (大学病院 呼吸器内科)

緒言

サルコイドーシス (以下サ症) は地域特異的に患者が発生することで知られており、症状は人種および民族的背景によって大きく異なる疾患である。日本におけるサ症は、罹患率は女性が多く、また地域として北海道に多いことが知られている (びまん性肺疾患に関する調査研究班 サルコイドーシス疾患の手引き-2006)。また欧米と異なり日本人には肺サ症患者が多く、いまだ原因は不明であるため、根治療法は存在していない。また、日本のサ症について、欧米各国と比べ発症率および有病率も低いとされている (森本ら 2004年サルコイドーシス疫学調査) ことから、日本人サ症の疾患因子は、海外症例とは異なることが強く示唆されている。

日本人サ症患者の遺伝的疾患素因は、海外症例の原因遺伝子との関連性は低いと考えられ、日本人サ症患者特異的かつ効率的に集積した単一もしくはごく少数の遺伝子による疾患モデルが想定される。この原因遺伝子が特定されれば、発症の原因となる危険因子の有無を想定できる。

そこで本研究は、疾患となる遺伝因子が、強い連鎖不平衡の影響を受け、かつそれらは同祖由来であると考えられる、特定地域に多発している日本人サ症患者を対象とし、同祖由来遺伝子からサ症の責任遺伝子を同定することを目的とし、ゲノムワイドでの単塩基多型 (SNP) およびコピー数多型 (CNV) データを集積し、解析を行った。

当初の計画予定とは異なり、患者群のみのデータ解析だけでなく、特定地域由来のコントロール群との比較検討を行う事になり、追加でデータを収集したため、解析がまだ未完了である。よって、現在の解析経過を報告する。

材料と方法

解析に使用したDNAは、共同研究先である旭川医

科大学呼吸器内科 大崎能伸教授および黒田光医師の元、旭川医科大学倫理委員会に提出されたプロトコルを基にインフォームドコンセントを得られた患者からの検体を収集したものをを使用した。

SNP解析およびCNV解析は、Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix社, USA) を用いた。解析依頼施設として AROS Biotechnology A/S 社 (Denmark) に依頼した。

試験期間中 (平成21~22年度) に、患者群150例およびコントロール群100例のGeneChip解析を施行した。

結果

実験当初に得られた患者群のみ80例のGenechip解析データを用い、Genotyping console (Affymetrix社) にてデータ解析を行った所、サ症患者群にコピー数減少領域 (3q26) が存在する事が明らかとなった。また、同領域以外にも別の染色体上に幾つかのコピー数増加領域の存在や (4q28, 9p23等)、幾つかの共通LOH領域が存在する事が分かった。さらに、これらの結果から3~4の患者グループが存在する可能性が示唆され、患者群に特異的なコピー数多型が存在する可能性が示唆された (data not shown)。

引き続き、追加で得られた患者群およびコントロール群のGeneChip解析データの収集を行い、HH-analysis (ホモ接合ハプロタイプ法解析プログラム; Miyazawa, et al. Am J Hum Genet 2007;80:1090-102.) にて現在解析を施行中である。患者群80例のみで行った予備解析の結果から、一部の患者群に共通のホモ接合領域が存在する可能性があるデータを得ている (data not shown)。

現在は、追加で収集および解析を行った同地域由来コントロール群のGeneChipデータも集積したため、これらコントロール群と疾患群との直接比較することで、より精度の高い解析結果を得る事を想定し、解析を継続中である。

考 察

本研究では、サ症患者由来のDNAより全ゲノムSNP情報の収集を目的として、得られた Genechip 情報を基に、Genome Wide な解析を行った。同患者群は、特定地域由来のグループであり、同時に同地域由来のコントロール群の全ゲノムSNP情報の収集も行っている。

同一疾患および同地域由来から得られた検体を解析した結果、コピー数多型の情報から、患者群内で数グループが存在する可能性が考えられた。この結果から、疾患関連遺伝子が単一でない可能性も考えられるが、現在詳細を検討中である。

海外症例において、サ症との関連遺伝子として報告されている、ドイツ人サ症症例の原因遺伝子として特定されたChromosome 10上の*ANXA11*遺伝子

(Hofmann, et al. Nat Genet 2008;40:1103-6) およびアフリカーアメリカ人サ症症例のChromosome 5上の*BTNL2* 遺 伝 子 (Rybicki BA, et al. Am.J.Hum.Genet 2005;77:491-9) のそれぞれの遺伝子領域と日本人由来サ症患者との関連性についても現在検討中である。

引き続き現在も継続して検体およびデータ集積と解析を継続して行っている。

研究成果リスト

- 1) Huqun, Fukuyama S, Morino H, Miyazawa H, Tanaka T, Suzuki T, et al. A quantitatively-modeled homozygosity mapping algorithm, qHomozygosityMapping, utilizing whole genome single nucleotide polymorphism genotyping data. BMC Bioinformatics 2010 Oct 15;11(Suppl 7):S5.

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

プロレニン受容体の新たな機能

研究代表者 千本松 孝明(医学部 薬理学)

要旨

プロレニン受容体((pro)renin receptor: (P)RR)は、2002年に発見されたレニンアンジオテンシンシステム(RAS)の1因子である。(P)RRは、レニンの非活性前駆体プロレニンに結合し、非蛋白融解的にプロレニンをレニン活性化させる作用を有すると考えられている。プロレニン血中濃度は、レニンに比して約10倍高く、(P)RRによるプロレニンのレニン活性化は、組織(局所)RASのレニン供給源として重要な機能の1つであると考えられる。他方、(P)RRとプロレニンの結合は、細胞内情報伝達も誘導する。これはRAS非依存的な作用である。我々は、(P)RRが受容体ではなく、細胞内小器官で切断を受け、細胞外に分泌されることを発見した。分泌された(P)RRは、プロレニンに結合し、レニン活性化する。しかし分泌された場合、細胞内情報伝達は誘導されない。

RASの最終活性産物であるアンジオテンシンII(Ang II)は、腎臓傍糸球体細胞からのみ分泌されるレニンにより、angiotensinogenからAng Iに変換され、更にアンジオテンシン変換酵素(ACE)により、Ang IIに変換され、特異的受容体(タイプ1(AT₁受容体))に結合し、昇圧作用、細胞の増殖、肥大、分化等の生理活性を生じる。このシステムの過剰活性化が病態を形成する為、RAS抑制薬は、多くの大規模臨床試験において、極めて高い有効性を示し、RASが心血管系の機能調節、疾患形成に重要な因子である事を証明している。ところが、RASの律速酵素であるレニンに関しては不明な点が残されていた。血漿レニン活性が低いにもかかわらずRAS抑制薬が著効を示す患者さんは決して珍しくはない。すなわち、血漿レニン活性は必ずしも病態と相関せず、このことはシステムの説明とは明らかに矛盾する(Figure 1)。そのため組織(局所)RASという概念が生じるが、レニンは腎臓傍糸球体細胞からのみ産生されるので長い間各組織でのレニンの供給メカニズムは不明のままであった。

レニンは、アスパラギン酸プロテアーゼに属する酵素で、アンジオテンシノーゲンからAng Iへの変換をつかさどるレニンアンジオテンシンシステムの律速酵素である。プロレニンはN-末に43アミノ酸からなるプロセグメントを有するレニンの前駆体で、プロセグメントがレニン活性中心を覆っているためプロレニンは非活性前駆体である(Figure 2)¹⁾。レニンは腎臓傍糸球体細胞からのみ分泌されるが、プロレニンは腎臓以外にも副腎、網膜、胎盤、子宮、睪丸、顎下腺でも産生され、血中濃度はレニンのそれに比して約10倍高い²⁾。しかしプロレニンは血中ではレニンに変換されることはなく、非活性体のままであると考えられていたが、2002年に発見された(P)RRによりレニン活性を有することがわかった³⁾。

Human (P)RRは350個のアミノ酸からなる分子量約39 kDaの膜蛋白質でプロレニンのプロセグメントのハンドリング領域に結合する(Figure 3A)³⁾。するとプロレニンの立体構造が変化し、プロドメインの覆いがはずれ、酵素活性中心が露出しアンジオテンシノーゲンが入り込むことが可能となり酵素活性を生じる。これがプロレニンの(P)RRによる非蛋白融解的レニン活性化である(Figure 3A)⁴⁾。すなわち、プロレニンは(P)RRとの結合によりレニン酵素活性を獲得し、Ang II産生を誘導する。このメカニズムは、組織レニンアンジオテンシンシステムにおけるレニン活性の供給源として重要な機能の1つであると考えられている。

プロレニンと(P)RRの結合はプロレニンの酵素活性を誘導すると同時に、(P)RRの細胞内情報伝達を誘導する(Figure 3A)。プロレニンが(P)RRに結合すると、アゴニスティックに作用し、(P)RRの細胞質領域を介して細胞内シグナルが誘導されると考えられている。MAPキナーゼの1つであるERK1/2のリン酸化が促進され、TGF-β1、PAI-1の活性上昇により炎症が惹起され、線維化亢進などの病態が促進される⁵⁾。さらにプロレニン-(P)RRを介したサイクロオキシゲナーゼ2(COX-2)のアップレギュレーションも報告されている⁶⁾。ところが、我々は

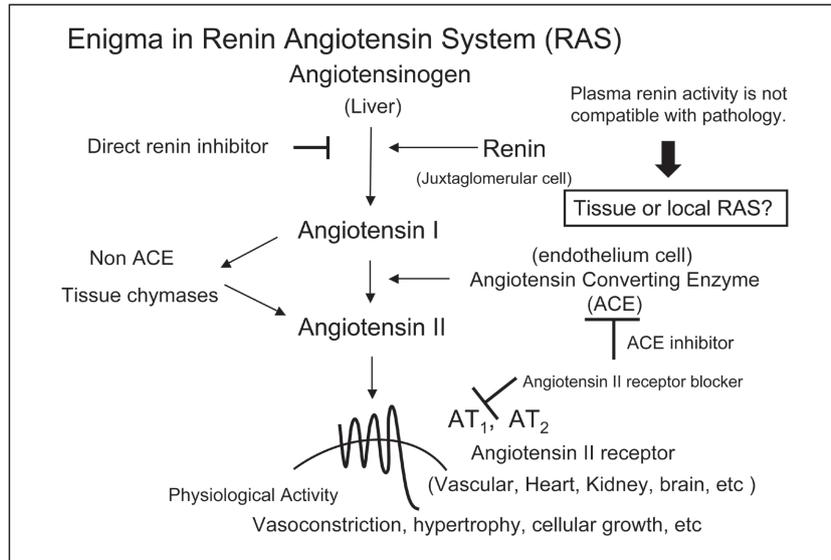


Figure 1.

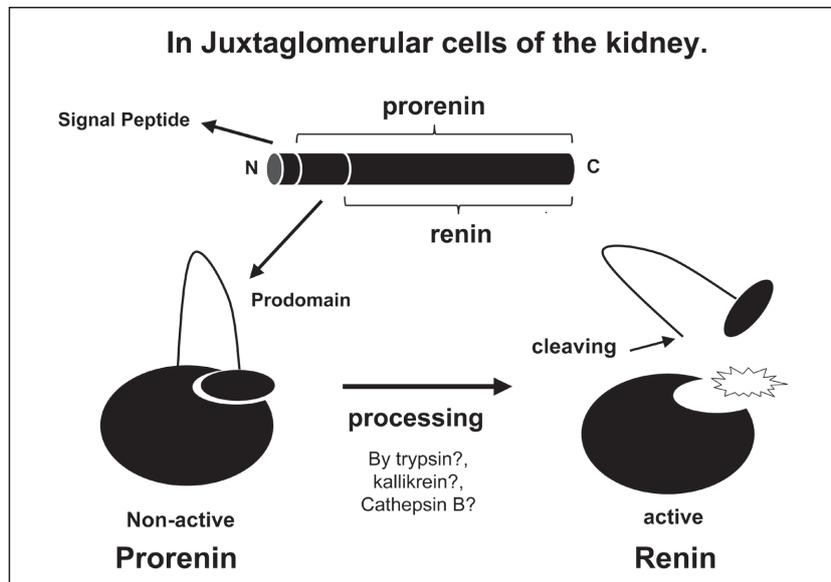


Figure 2.

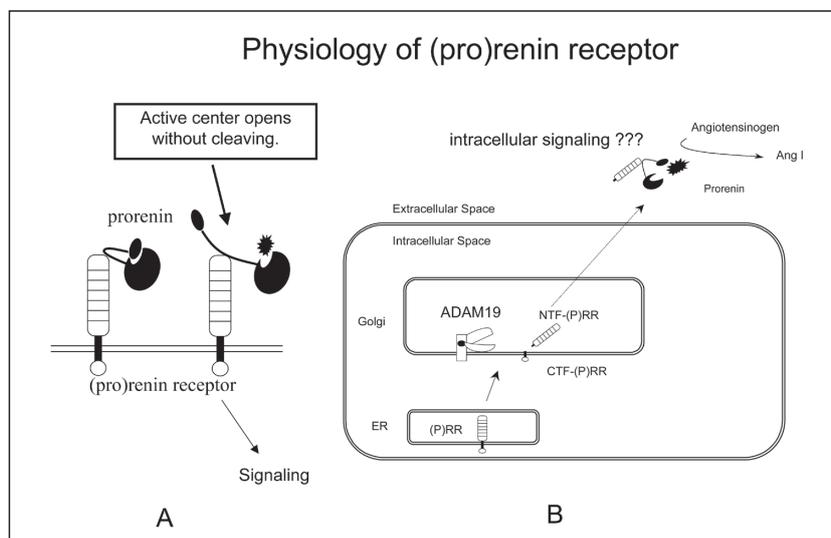


Figure 3.

(P)RRが膜蛋白ではなく、細胞外へ分泌されることを発見した⁷⁻⁸⁾。human(P)RR遺伝子のC-末に緑色蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) タグを付帯しCHO 細胞に恒常的に遺伝子導入したCHO 細胞-human(P)RRを作成したところ、細胞培養液中に切断されたN-末 (P)RRが、(P)RRの細胞外領域を認識する抗(プロ)レニン受容体抗体を用いたウエスタンブロット解析で検出された。内因性に(P)RRを発現する血管平滑筋細胞の培養液を用いても同様の結果が得られた。 Brefeldin A (BFA) というERからゴルジ体への細胞内輸送阻害薬を用いて(P)RRの細胞内局在を調べた結果、ERでは全長を有した(P)RRが局在し、ゴルジ体で(P)RRは切断されることが判明した⁷⁾。更に我々はゴルジ体における(P)RR切断酵素としてADAM (a disintegrin and metalloprotease) 19を同定した⁸⁾。(P)RRはシグナルペプチドを有し、分泌過程(exocytic pathway)に入る。その途中過程のゴルジ体で酵素により切断され膜貫通領域を失い、細胞膜に到達したN-末(P)RRは細胞膜に受容体として留まることはなく、細胞外へ分泌される。現在、この分泌型と受容体型(P)RRの区別する報告は存在しない。更に我々は、分泌型(P)RRが細胞外でプロレニンに結合し非蛋白融解的レニン活性を誘導することを報告した(Figure 3B)⁸⁾。分泌型(P)RRは細胞質領域を失っているため、プロレニンとの結合は細胞内情報伝達のトリガーとはならない。

終りに

我々は、(P)RRの新しい機能の1つとして分泌型(P)RRの存在を証明した。(P)RRはレニン・アンジオテンシンにおいて近年最も研究の進んだ領域の1つであるが、研究報告のあった生理機能すべてがコンセンサスを得ているわけではない。興味は尽きない。

謝 辞

このような発表の機会を頂き、山内俊雄学長、別所正美医学部長、医学研究センター 松下祥教授、同研究センター皆様に感謝申し上げます。

Reference

- 1) Wood JM, Stanton JL, Hofbauer KG. Inhibitors of renin as potential therapeutic agents. *J Enzyme Inhib* 1987;1:169-85.
- 2) Balakumar P, Jagadeesh G. Cardiovascular and renal pathologic implications of prorenin, renin, and the (pro)renin receptor: promising young players from the old renin-angiotensin-aldosterone system. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;56:570-9.
- 3) Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002;109:1417-27.
- 4) Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, Suzuki F, Nakagawa T, Tada Y, et al. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest* 2004;114:1128-35.
- 5) Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int* 2006;69:105-13.
- 6) Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu T, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats. *Kidney Int* 2006;70:641-6.
- 7) Senbonmatsu T, Iida S, Yoshikawa A, Aizaki Y, Xiao S, Nishimura S, Inagami T. New perspectives on secretion of (pro)renin receptor into extracellular space. *Front Biosci* 2010;1(2):1362-7.
- 8) Yoshikawa A, Aizaki Y, Kusano K, Kishi F, Susumu T, Iida S, Ishiura S, Nishimura S, Shichiri M, Senbonmatsu T. The (Pro)renin receptor is cleaved by ADAM19 in the Golgi leading to its secretion into extracellular space. *Hypertens Res* 2011.

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

新生犬心室機能特性と Ca Sensitizer の有効性に関する研究

研究代表者 先崎 秀明 (国際医療センター 小児心臓科)

研究分担者 増谷 聡*, 関 満*, 石戸 博隆*

緒言

新生児、乳児期は、小児期のうちでも心不全に陥る頻度が圧倒的に高い。しかも、一度心不全に陥ると従来の強心剤への反応は悪く、その予後は、すこぶる不良である。これらは新生児、乳児期の心血管機能特性によると考えられるが、今日まで、生体内における新生児、乳児の心機能特性はほとんど明らかにされていない。これらの解明は、新生児、乳児の心不全の病態を解明し、その予後改善に大きく役立つと考えられる。

さらに、近年新しい強心剤として、心筋のカルシウムに対する感受性を増強して収縮力を増強する薬、カルシウムセンシタイザーが開発され、心不全の治療への応用が期待されている。カルシウムセンシタイザーは、今日広く用いられている強心剤であるβ刺激薬(カテコラミン)やPDF3阻害薬に比し、細胞内カルシウム濃度を上げずにその強心作用を発揮するため、不整脈の発生や、酸素消費量の増加という従来の強心剤が持つ重大な副作用を回避できる可能性がある。さらに重要なことに、心機能が低下する種々の病態、たとえば、心不全や敗血症性ショックにおいては、β-レセプターとその後の経路の異常により、上記薬剤の効果が減じるが、カルシウムセンシタイザーは、β-レセプターの経路とは無関係に強心作用を発揮するため、有効な新しい強心剤として期待されている。今日まで、新生児、乳児を含め、小児心筋に対するカルシウムセンシタイザーの効果に関しては、全く知られておらず、その有効性が証明されれば、新生児、乳児期心不全の新しい治療法としての道を開き、その予後を劇的に改善する可能性がある。

これまで動物の単離心筋モデルにおいて、新生児の心筋は前負荷(心筋長)増加やβ-レセプター刺激に対する収縮力増強の反応が、成人動物に比し減弱していることが報告されており、これが新生時期の心

不全における難治性の、大きな要因の一つと考えられている。しかしながら、生体内における心血管系全体としての心能特性についてはほとんど知られておらず、ことに、不全心における心血管パフォーマンスに関しては、全く不明のままである。従って、この問題の解明は、新生児期心不全の病態の把握と、その治療に大きく貢献するものと考えられる。本研究は、総合的心血管機能特性評価法として高く評価されている心室圧容積関係を用いて、心室自体の、予備機能を含めた収縮性、拡張能、およびその血管系との統合、エネルギー関係、さらには、筋小胞体のカルシウムハンドリングにわたり、詳細に検討することを1つの目的とし、その臨床的意義は大きい。さらに、敗血症や先天性心疾患に伴う心不全が多く、临床上カテコラミン不応で、治療に抵抗性を示すことの多い新生児乳児期の心不全において、より有効な新薬の開発は、敗血症の予後や、先天性心疾患の術前術後の管理を劇的に改善する可能性がある。従って、今回我々の用いるカルシウムセンシタイザーの有効性が、小児の心臓に於て示されれば、その臨床的意義は、多大なものである。これまで、カルシウムセンシタイザーの小児期心臓(新生児乳児期を含め)への有効性は明らかにされておらず、この時期の心筋の特殊性を考慮しても、極めて重要なテーマである。

現在開発されているカルシウムセンシタイザーは、大なり小なりPDE3阻害薬としての性質を兼ね備えているが、今回我々の用いるカルシウムセンシタイザー EMD57033は、PDE3阻害作用が最も少なく(Lee et al. 1997, Cardiovasc Res), 従って、それに関連した副作用(不整脈、心筋酸素消費量増大)のリスクも低く、その有要性は、In vitro, In vivo, 両方の動物実験において示されてきている。筆者も、意識下、成人犬を用いた、正常および心不全に於ける動物実験で、本薬剤が、1) ドブタミン不応の心不全においても有効であること、2) 収縮力増強に伴う酸素消費量がドブタミンに比し80%近く低いこと、3) 心室拡張能

*国際医療センター 小児心臓科

も改善すること、を見出した。今回ドイツMERK社により、本研究のprotocolが受理され、幸いにも本薬の提供を受ける承認を得ることができ、小児心不全における新しい治療法確立のため、是非とも世界に先駆け遂行したい実験であると考える。

本研究の目的は、①新生児、乳児期における、生体内正常心および不全心の心血管挙動特性を、収縮性、拡張能、心室血管統合関係、心室Energy、心拍応答、 β -刺激応答、さらには、心筋小抱体Ca取込み能の検討から明らかにする事、さらに、②Ca Sensitizer EMD57033を用いて、この薬に対する反応を他の強心剤と比較し、新生児、乳児におけるその有用性を明らかにする事である。

方法

(対象、麻酔)

生後7日以内の新生子犬、および4カ月未満の乳児期相当の子犬を用い、全身麻酔下の実験を行う。麻酔は、心機能への影響を最小限にするため、ケタラール、フェンタニールで導入し、挿管人工呼吸管理で、フェンタニールを用いて維持する。

(心血管機能評価)

心血管機能は、下大静脈バルーン閉塞に伴う、前負荷減少時に、コンダクタンスカテーテルと高精度圧力センサー付ガイドワイヤーで構築した心室圧容積関係を用いて評価する。この方法は、従来用いられている駆出率や、最大圧変化率が負荷の影響を受けるのに対し、前負荷、後負荷、心室収縮性、拡張能、および心室エネルギーを個別にかつ統合的に評価でき、心血管パフォーマンスを総合的に判断できる優れた方法である。心血管機能は、これらの定常状態に加え、ペーシングによる心拍数増加時、および β 刺激に対する心血管挙動の反応を調べ、心予備力を評価する。さらに、心筋収縮に重要な役割を演ずる、心筋小抱体のCa取込み能を、一時Pacing停止後の収縮能の変化から算定する(Recirculation Fraction: RF)。心室圧容積は、コンピューターを用いてオンラインでモニターし、独自の解析ソフトを用いてデータ処理を行う。

(不全心の作成)

不全心は、新生時期に多く見られる心不全の形態を想定し、以下の3通りの方法で作成する。1) Propranol (0.05-0.1 mg/kg) 静注による急性心不全のモデル。2) 24 - 48時間、高心拍(250 - 300 /分) ペーシングによる亜急性心不全のモデル。3) エンドトキシン静注による、敗血症性ショックにおける心不全モデル。

(プロトコール)

1) コントロールとして、定常状態、 β -adrenergic 刺激時、ペーシングによる心拍増加時の心血管機能、およびRFを測定する。 β -adrenergic 刺激は、ドブタミンの負荷(5, 10, 15 μ /kg/分)、心拍応答は、Pacing

Wireによる右心房Pacingにより、自己心拍より30ずつ増加させ、心血管機能応答を測定する。RFは、各段階のPacing rateにおいて、Pacing停止後の最大圧変化率の心拍ごとの直線回帰の傾きより求める。次に、PDE3阻害薬(ミルリノン: 0.25, 0.5, 0.75 μ /kg/分) およびEMD57033を投与し、その反応を調べる。EMD57033は、1,2 propandiol に溶解後0.2, 0.5, 0.75, 1.0 mg/kg/分で投与し、dose-responseを決定する。

2) Propranol投与後、又は、エンドトキシン静注による敗血症性Shockにおいて、1)のProtocolをくり返す。3)さらに、24 - 48時間高心拍(250 - 300 /分)ペーシングによる亜急性心不全のモデルにおいても1)と同様の計測を行う。

結果

これまでLPS誘導における敗血症性ショックのモデルにおいてEMD57033の効果を検討できた。図1に示すように、LPS静注により心収縮性の指標である収縮末期圧容積関係の傾き(Ees, 矢印)は低下し、収縮性の低下をきたした。同時に起こる後負荷の減少により、この変化は負荷に依存の駆出率では検出できなかった。LPS後、Pacingやドブタミンに対する応答は有意に低下していた(図2, 3)。この状態で、EMD57033を投与すると著明な収縮能の上昇が得られた(図4)。従って、予備能の低下した心臓にもCa Sensitizerは有効に機能することが示された。

考案

敗血症ではドブタミンに対する心機能改善は減弱していたが、EMD57033はLPS投与前と同様の反応性を示した。EMD57033が新生児心不全の治療に大きな進歩をもたらす可能性につき更なる見当の価値あると思われる。今後、他の心不全モデルにおけるCa センタイザーの有用性の検討に期待が持たれる。

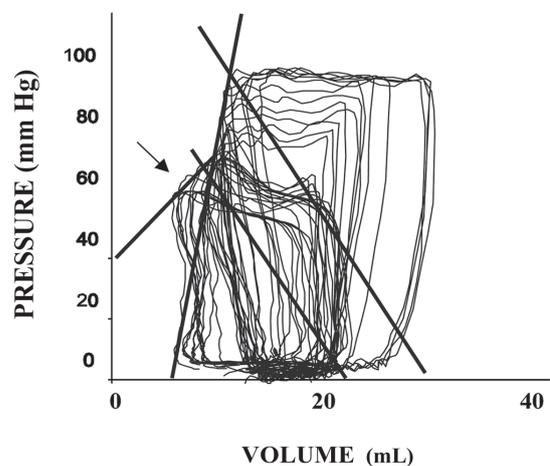


図 1.

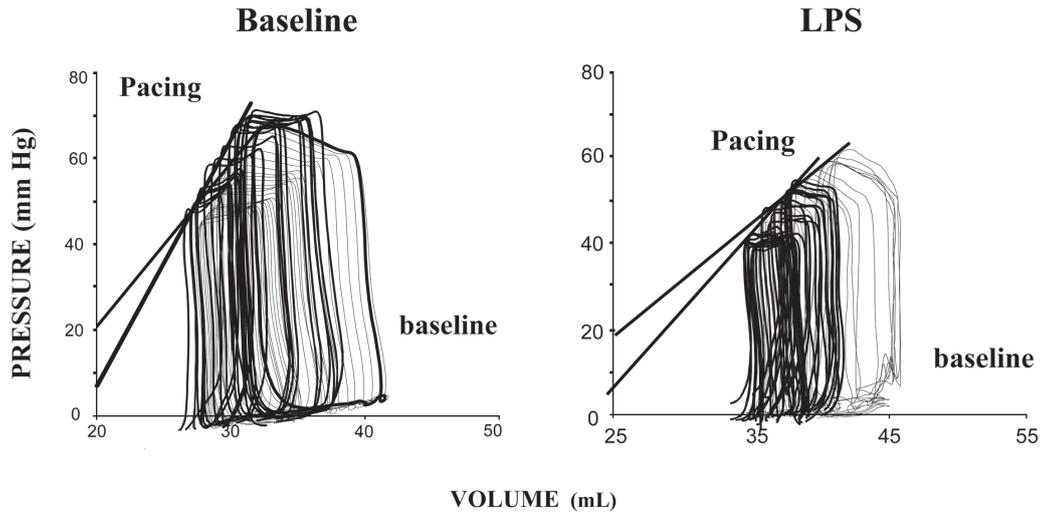


図 2.

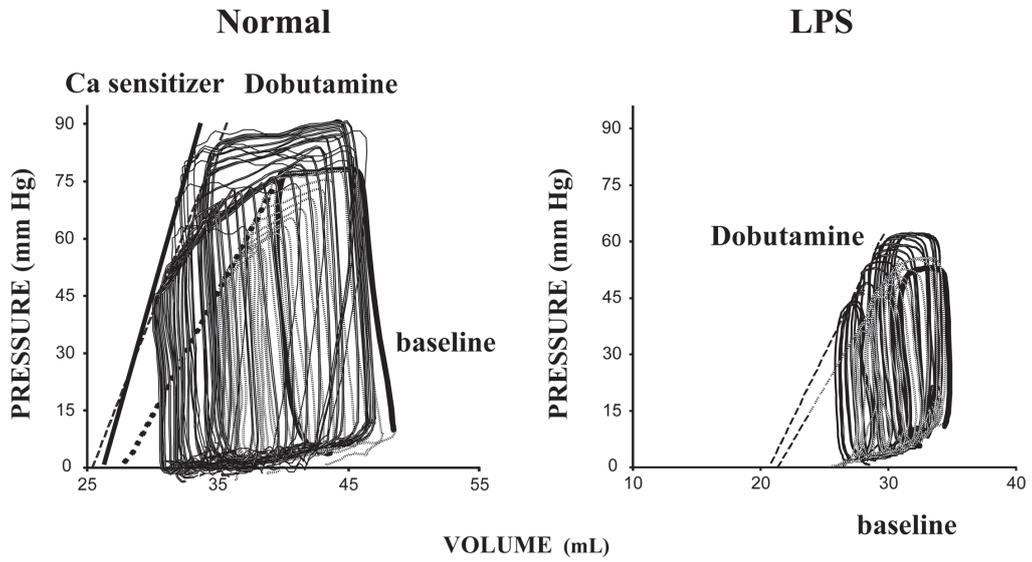


図 3.

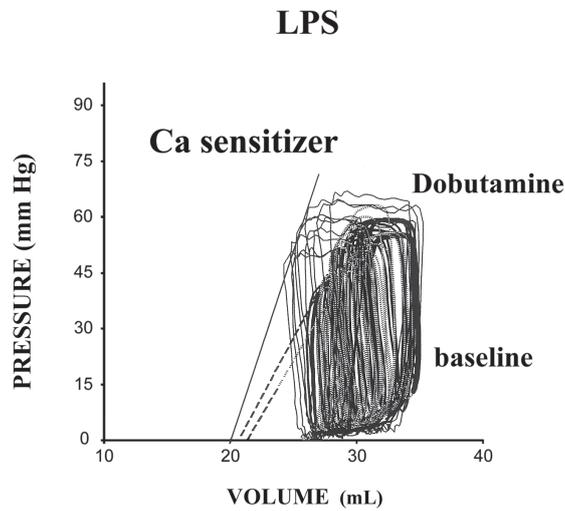


図 4.

研究成果リスト

論文

- 1) Senzaki H, Kass DA. Analysis of isovolumic relaxation in failing hearts by monoexponential time constants overestimates lusitropic change and load-dependence: mechanisms and advantages of alternative logistic fit. *Circ: Heart fail* 2010;3:268-76.
- 2) Masutani S, Taketazu M, Mihara C, Mimura Y, Ishido H, Tamotsu M, Kobayashi T, Senzaki H. Usefulness of early diastolic mitral annular velocity to predict plasma levels of brain natriuretic peptide and transient heart failure development after device closure of atrial septal defect. *Am J Cardiol* 2009;104:1732-6.
- 3) 増谷聡, 先崎秀明. カルシウムセンシタイザー—科学的根拠から小児の臨床まで. *日本小児循環器学会雑誌* 2009;25:9-17.
- 4) Iwamoto Y, Tamai A, Khono K, Masutani S, Ishido H, Okada N, Senzaki H. Usefulness of respiratory variation of inferior vena cava diameter in estimating elevated central venous pressure in children with cardiovascular disease. *Circ J* 2011;75:1209-14.
- 5) Kurishima C, Wada M, Sakai M, Kawakami K, Kondo T, Tamura M, Senzaki H. Congenital brain tumor: A fetal case of congenital germ cell intracranial tumor and review of literature. *Pediatrics Int.* 2011 (in press)
- 6) Kurishima C, Senzaki H. Tight interaction between central venous pressure and intracranial pressure in a 6-year-old patient with Fontan Circulation and Intracranial Hemorrhage. *Annals Thorac Surg* 2011;91(5):1611-3.
- 7) Iwamoto Y, Taketazu M, Senzaki H. Late clinical manifestations of mitral valve disease and severe pulmonary hypertension in a patient diagnosed with premature closure of foramen ovale during fetal life. *World J Pediatr* 2011;7:182-4.

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

2型糖尿病における脳内酸化ストレスの動態と
その制御による認知機能障害への効果

研究代表者 菅 理江 (医学部 生理学)

研究分担者 島津 智一¹⁾, 井上 郁夫²⁾

緒 言

糖尿病とその合併症は認知機能障害の危険因子として注目されている^{1,2)}。糖尿病患者は同年齢健常者と比較して、高次認知機能の低下が指摘され、認知症を引き起こしやすい³⁾。1型2型とも糖尿病は認知機能障害を引き起こすが、2型ではその障害が特に学習・記憶に影響する^{2,4)}。動物病態モデルを用いた研究では糖尿病由来の学習障害が、高血糖やその結果引き起こされる酸化ストレスによる動脈硬化や代謝異常と関連することが示唆されている^{5,6)}。糖尿病による組織損傷には酸化ストレスが大きな役割を果たし⁵⁾、脳組織の酸化ストレスによる損傷は認知機能障害をもたらす⁷⁾。しかし、2型糖尿病が学習障害をもたらすメカニズムは未だ明らかではない。

我々はこれまで2型糖尿病モデルラット Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF)を用いて、視覚弁別課題・迷路課題における学習障害と、それに伴う脳内酸化酵素の増加を示し、脳内酸化ストレスの学習障害への寄与を示してきた^{8,9)}。同時に、認知機能障害の抑制効果が報告されているペロオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) γ アゴニスト¹⁰⁾の一つであるピオグリタゾンの学習障害への効果を検討したが、糖尿病症状が顕著化する25-30週齢においては、投薬による血糖値のコントロールや酸化酵素の抑制は可能であるが、学習課題成績の改善は見られなかった⁹⁾。このことは高血糖の持続による血管障害だけがこの学習障害の要因ではないことをしめしており、高血糖をもたらすメカニズムそのものが機能不全を引き起こすとするれば、認知機能障害の要因は糖尿病発症の初期に見いだせると考えられる。

そこで本研究では、OLETFの発症期である20-25週

齢よりも前の時期に着目し、10, 15, 20週齢の学習能力と脳内酸化酵素の変化を検討した。認知症をはじめとした認知機能障害の鍵となる脳部位である海馬に焦点をあて、海馬依存型学習課題の一つである放射型迷路課題を用いて、2型糖尿病初期の学習障害の週齢による変化を示した。

材料と方法

本研究は埼玉医科大学動物実験委員会によって承認され(21M09-201, 22M15-373)、埼玉医科大学動物実験指針に基づいて実施された。

被験体：OLETFおよびその対照動物 Long Evans Tokushima (LETO) ラット (オス) 各36個体を被験体とした。被験体は大塚製薬徳島研究所より4週齢にて提供され、埼玉医科大学中央研究施設実験動物部門にて飼育された。OLETFおよびLETOは4週齢時の体重を元に各群の体重の平均値に差がないようにそれぞれ10, 15, 20週齢群の3群に分けられた。飼育室は23±1℃に維持され、照明は12:12 hの明暗サイクルに固定し、行動実験・脳・血液サンプルの採取はすべて明期に行われた。被験体は各週齢より個別ケージで飼育され、体重を測定した後に学習実験のためこの時の測定体重の85%になるように餌量を制限した。餌制限の1日目は空腹時血糖を測定するために12時間以上の断食とし、翌朝10時より簡易測定器によって尾静脈血の血糖値を測定した。飲水の摂取制限は行わなかった。

迷路課題：被験体は餌制限開始日から5日間放射状迷路と実験用餌ペレット (45 mg, Bio Serve) への馴化訓練を行った。迷路学習課題としては海馬依存型であり Episodic 型記憶のテストになると考えられている Win-Shift 型課題を用いた^{11,12)}。実験は訓練とテストの2フェーズからなり、訓練では8つのアームのうち4アームのみが選択可能になっており、4つのアーム全

1) 医学部 神経内科, 埼玉精神神経センター 神経内科

2) 医学部 内分泌・糖尿病内科

での餌を採ることでフェーズが終了する。残りの4つのアームはギロチン式ドアが降ろしてあり、被験体はアームに入ることができない。テストフェーズでは全てのアームに入ることができるが、そのうち訓練時にあった場所以外の4つのアームのみに餌がある。つまり訓練時に餌があった場所には餌は無く、そのアームに入るとはエラーと判定される。また一度入ったアームに再び進入した場合もエラーとなる。テストフェーズにおける総エラー数、完了までの総アーム進入数、総走行距離と速度が測定された。

抗酸化酵素の測定：行動実験終了後、被験体はペントバルビタール (150 mg/kg) 麻酔後、血液サンプルを採取し、リン酸緩衝食塩水 (0.1 M pH 7.4) で灌流後、脳サンプルを摘出した。脳組織は皮質、海馬、線条体から採取され、細胞質からタンパクを抽出した (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Pierce)。各 20 μ g のタンパクを 12% アクリルアミドゲルにて泳動し、ブロッティングした。Glutathione peroxidase (GPx), Cu²⁺-Zn²⁺ superoxide dismutase (CuZn-SOD) manganese SOD (Mn-SOD) の3つの抗酸化酵素に対する抗体を用い、HRP 標識抗体および化学発光法によって検出・測定した。ハウスキーピングタンパクとして GAPDH の測定も行い、各酵素の GAPDH に対する相対的光学濃度を用いて比較を行った。

結果

体重と血糖値の変化

10 週齢の時点から OLETF は LETO に比較して有意に体重が重く、20 週齢の時点では平均で LETO 439 g に対し OLETF 585 g と大きく差が開いていた ($P < 0.001$, Figure 1A)。空腹時血糖については 10, 15 週齢では有意な差は見られず、20 週齢でのみ OLETF の血糖値が LETO に対して有意に高かった ($P = 0.023$, Figure 1B)。このように OLETF では 2 型糖尿病の一つの特徴である肥満は早くから発現しているが、血糖値がはつきりと高くなるのは 20 週齢からであると言える。

学習課題

課題完了までの総エラー数を指標にとると、10 週齢においては LETO, OLETF の間に差はみられなかった。しかし、15 週齢、20 週齢においては OLETF のエラー数は有意に多く、顕著な学習障害がみられた。

抗酸化酵素の変化

簡易的な解析のみではあるが、10 週齢の OLETF の海馬で GPx の増加が見られた ($P = 0.026$)。他の週齢および脳部位の変化については現在解析をすすめているところである。

考察

2 型糖尿病ラット OLETF において、迷路学習課題の学習障害が 15 週齢以降に顕著化することが明らか

になった。10 週齢においては LETO との差が見られなかったことから、10-15 週齢の間に何らかの学習障害につながる脳機能不全が生じていると考えられる。今回用いた Win-Shift 型迷路課題は海馬依存型の学習であるということが知られており、特に海馬の不全が予想されるが、結論は学習実験の他のパラメータの詳細な検討と今回の実験と並行して採取した海馬歯状回の神経細胞新生の検討のための脳サンプルの解析 (現在解析中) によって明らかになるであろう。また簡易的な解析ではあるが 10 週齢の海馬で見られた抗酸化酵素の上昇は海馬における早期の変性を予期させるが、

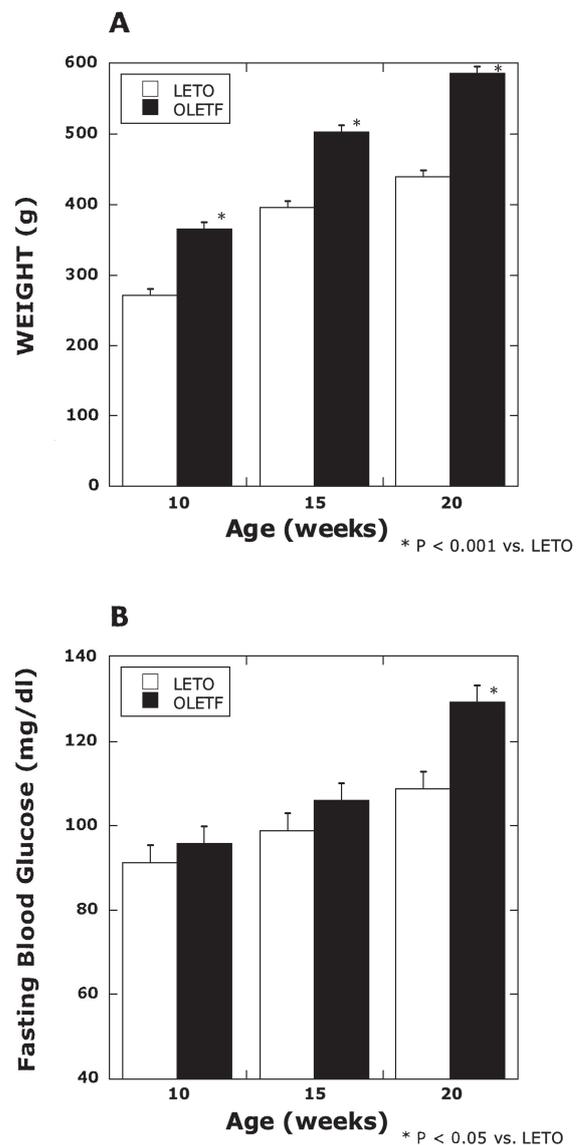


Figure 1. 週齢による体重と血糖値の変化。A) LETO (□) およびOLETF (■) の週齢による体重の増加を示す。10週齢よりOLETFの体重はLETOより重く、それは実験期間を通して変わらなかった。* $P < 0.001$ (LETOとの比較) B) LETO (□) およびOLETF (■) の週齢による空腹時血糖の変化を示す。全般にOLETFはLETOと比較して高い血糖値を示すが、20週齢で初めて有意な差異を示した。* $P < 0.05$ (LETOとの比較)。

それが糖尿病症状とそれに関連した学習障害と本当に関連しているのかという点で、個体ごとの学習結果や生理指標との関連性を注意深く検討する必要がある。血糖値と体重の比較から、15週齢ではOLETFの体重増加は明らかではあるが、明確な血糖値の上昇は見られていない。このことからこの学習障害は、血糖値の上昇そのものによる脳の変性に由来するものではないと言える。今後まだ解析の終わっていない抗酸化酵素の変化や脂質酸化のマーカー、およびインスリンをはじめとした血液サンプルの解析が、10-15週齢に起こる脳変性の手がかりになると考えている。

文 献

- 1) Ryan CM, Geckle MO, Orchard TJ. Cognitive efficiency declines over time in adults with Type 1 diabetes: effects of micro- and macrovascular complications. *Diabetologia* 2003;46:940-8.
- 2) Stewart R, Liolitsa D. Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabet Med* 1999;16:93-112.
- 3) Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006;5:64-74.
- 4) Awad N, Gagnon M, Messier C. The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function. *J Clin Exp Neuropsychol* 2004;26:1044-80.
- 5) Mastrocola R, Restivo F, Vercellinato I, Danni O, Brignardello E, Aragno M, et al. Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J Endocrinol* 2005;187:37-44.
- 6) Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 2006;537:106-10.
- 7) Fukui K, Onodera K, Shinkai T, Suzuki S, Urano S. Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Ann N Y Acad Sci* 2001;928:168-75.
- 8) 菅理江, 島津智一, 長谷川元, 井上郁夫, 渡辺修一, 荒木信夫他. 糖尿病モデルラットにおける認知機能障害と酸化ストレス, 第68回日本動物心理学会大会, 平成20年9月, 水戸
- 9) Suge R, Shimazu T, Hasegawa H, Inoue I, Hayashibe H, Watanabe S-I, et al. Effect of oxidative stress on learning in the early stages of type II diabetes in OLETF rats. *FENS Forum* 2008, 2008, Jul, Geneva, Switzerland
- 10) Watson GS, Cholerton BA, Reger MA, Baker LD, Plymate SR, Asthana S, et al. Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. *Am J Geriatr Psychiatry* 2005;13:950-8.
- 11) Packard MG, McGaugh JL. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 1996;65:65-72.
- 12) Sakamoto T, Okaichi H. Use of win-stay and win-shift strategies in place and cue tasks by medial caudate putamen (MCPu) lesioned rats. *Neurobiol Learn Mem* 2001;76:192-208.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 菅理江, 島津智一, 長谷川元, 井上郁夫, 渡辺修一, 荒木信夫, 島津邦男, 片山茂裕, 野村正彦. 2型糖尿病ラットにおける学習障害に伴う脳内抗酸化酵素の増加, 第69回日本動物心理学会大会, 平成21年9月, 岐阜
- 2) Suge R, Shimazu T, Hasegawa H, Inoue I, Watanabe S-I, Araki N, Shimazu K, Katayama S, Nomura M. Cerebral anti-oxidant enzymes increased with learning deficit in the OLETF, European Brain and Behaviour Society 40th Annual Meeting, 2009, Sept, Rhodes, Greece
- 3) 菅理江, 島津智一, 長谷川元, 井上郁夫, 渡辺修一, 荒木信夫, 島津邦男, 片山茂裕, 野村正彦. 2型糖尿病ラットの学習障害に伴う脳内抗酸化酵素の部位特異的増加, 第87回日本生理学会大会, 平成22年5月, 盛岡
- 4) Suge R, Shimazu T, Hasegawa H, Inoue I, Watanabe S-I, Araki N, Shimazu K, Katayama S, Nomura M. Glutathione peroxidase increase in hippocampus and cortex but not striatum with discrimination learning deficit in type 2 diabetes model rats, *FENS Forum* 2010, 2010, Jul, Amsterdam, The Netherlands
- 5) 菅理江, 島津智一, 長谷川元, 井上郁夫, 渡辺修一, 荒木信夫, 島津邦男, 片山茂裕, 野村正彦. 2型糖尿病ラットにおける発症初期の学習障害, 日本動物心理学会第70回大会, 平成22年8月, 東京

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

アレルギー疾患患者における上・下気道連関の研究

研究代表者 永田 真 (医学部 呼吸器内科, アレルギーセンター)

研究分担者 加瀬 康弘^{1),6)}, 善浪 弘善^{1),6)}, 中込 一之^{2),6)},中村 晃一郎^{3),6)}, 森 圭介^{4),6)}, 松下 祥^{5),6)}

緒言

アレルギー疾患では一人の患者に極めて高頻度に、アレルギー病態を基盤とした複数の疾患が同時に発症する特徴がある。その中でも特に、鼻アレルギーと気管支喘息が合併する割合は極めて高い。気管支喘息の側から見るとその50-80%にアレルギー性鼻炎が合併することが報告されている (Leynaert B, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:S201-5)。アレルギー性鼻炎と気管支喘息は、共に気道を病変の主座とするアレルギー疾患であることもあり、その両者が発症あるいは臨床的活動性等において相互に影響を及ぼし合うことも臨床的な問題となる。例えば、アレルギー性鼻炎患者は、健常者と比較し、約3倍喘息に移行しやすいことが報告されている (Settipane RJ, et al. *Allergy Proc* 1994;15:21-5)。このことは、アレルギー性鼻炎が気管支喘息発症の独立した危険因子であることを示唆している。アレルギー性鼻炎患者では、臨床的な喘息発症の有無とは無関係に、喘息で見られる病態生理学的異常である気道過敏性亢進が見られることも指摘されている (Ramsdale EH, et al. *J Allergy Clin Immunol* 1985;75:573-7)。さらにアレルギー性鼻炎患者では、臨床的な喘息を発症していなくても、喘息における重要なエフェクター細胞である好酸球の気管支への集積が見られることも報告されている (Djukanović R, et al. *Eur Respir J* 1992;5:538-44)。さらに興味深いことには、鼻へのアレルギー曝露が、直接アレルギーが到達していないと思われる下気道に対しても効果を示し、気管支平滑筋

収縮、好酸球浸潤、気道過敏性亢進を誘導することも報告されている (Corren J, et al. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:611-8)。さらに、鼻炎の治療を行うことで、喘息症状や気道過敏性が改善されることが再現性をもって報告され (Welsh PW, et al. *Mayo Clin Proc* 1987;62:125-34. Henriksen JM, et al. *Am Rev Respir Dis* 1984;130:1014-8. Foresi A, et al. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:274-82. Corren J, et al. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:250-6)、その臨床的アウトカムとして、気管支喘息の急性増悪頻度を減少させることも報告されている (Crystal-Peters J, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:57-62)。これらはいずれも上気道におけるアレルギー病態が下気道のアレルギー疾患に影響することを示す過去の研究成果である。我々は日本人の喘息患者を対象としたアンケート結果で和文雑誌ではあるが、まず埼玉県内の喘息患者の過半数でスギ花粉症の合併がみられ、これらの症例ではスギ飛散時期に呼吸機能悪化や臨床的増悪がみられること (福土雅彦, 他. *アレルギーの臨床* 2003;23:64-5)、かかる花粉飛散に伴う喘息増悪は西日本でもほぼ同頻度で関東と同様に認められること (徳安宏和, 他. *日本胸部臨床* 2007;66:245-50)を報告してきた。

本研究の大きな目的は“*One airway one disease*”の臨床的実態、病態メカニズムのさらなる解明、効率的な早期発見 (たとえば鼻炎症例における喘息発症の予知)、そして包括的治療の確立を推進する情報を集積することである。この2年間での学内グラントのサポートによって主として2件の臨床研究を企図して遂行したのでここにその成果を報告する。

材料と方法

1. 鼻炎症状と喘息症状の連関についてのアンケート調査

埼玉医科大学病院アレルギー・喘息センター、また

1) 医学部 耳鼻咽喉科
2) 医学部 呼吸器内科
3) 医学部 皮膚科
4) 医学部 眼科
5) 医学部 免疫学
6) アレルギーセンター

は耳鼻咽喉科外来に通院中の鼻炎症状と喘息症状を合併した患者126人を対象とした。鼻炎症状と喘息症状の連関についてアンケート調査を行った。性別は、男性49名、女性75名、記載なし2名であり、平均年齢は48.1歳であった。基礎疾患の内訳は、アレルギー性鼻炎82名、花粉症74名、慢性副鼻腔炎28名、気管支喘息113名、咳喘息16名であった。アンケート調査により、①鼻症状と喘息症状の連関の頻度②どのような患者で、鼻症状の変化によって、喘息症状が影響されるか、について検討した。統計学的解析として、異なる2群における検討には χ^2 乗検定を用いた。

2. スギ花粉症症例における下気道のアレルギー性炎症の検討

通年症状がなく、純粋に2～4月のスギ花粉飛散時期のみに鼻炎症状を呈する、スギ花粉症症例7例を対象とした。全例が非喘息症例であり、非喫煙者であった。慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気管支拡張症、びまん性汎細気管支炎などの慢性の気道性呼吸器疾患、心不全、脳血管障害など重症の基礎疾患を有する症例、妊娠している症例、鼻副鼻腔手術既往症例、う歯、歯科治療中の症例は除外した。

スギ花粉飛散前と飛散時期に、症状を評価し、呼気NOならびに呼吸機能検査を施行した。鼻症状の重症度評価は、鼻アレルギー診療ガイドラインに準拠しておこなった。呼吸機能検査は、オートスパイロ307(MINATO社製)を使用して行った。呼気NO濃度は、携帯用NO測定機器NIOX MINO(Aerocrine社)で測定した。

結果

1. 鼻炎症状と喘息症状の連関についてのアンケート調査

今回検討し得た鼻症状と喘息症状を合併した患者126名のうち、38名(30%)で、鼻症状の悪化に伴って喘息症状が悪化することを自覚していた。さらに28名(22%)で、鼻治療により喘息症状が改善することを自覚していた。

一方、28名(22%)で、喘息症状の悪化に伴って鼻症状が悪化すると自覚し、24名(19%)で、喘息治療により鼻症状が改善することを自覚していた。

どのような患者で、鼻症状の変化によって、喘息症状が影響されるか、についての解析を、アンケートの回答が得られた99名を対象としておこなった。鼻症状の変化が喘息症状に与える影響は、良好な喘息コントロールが得られていない患者で有意に強かった。すなわち、通年的に喘息症状がある群では、通年的には症状がない群と比較して、鼻炎症状の悪化により、喘息症状が悪化するとより自覚していることがわかった(通年喘息症状あり53%(31/58);喘息症状なし17%

(7/41); $p=0.0002$)。さらに、通年的に喘息症状のある群では、鼻症状の治療により喘息症状がより改善すると自覚していた(喘息症状あり36%(21/58);喘息症状なし17%(7/41); $p=0.03$)。

鼻炎症状の悪化に伴う喘息症状の悪化を自覚する頻度及び鼻炎治療に伴う喘息症状の改善を自覚する頻度は、喘息の重症度別で有意差はなかったが、最重症持続型(ステップ4でコントロール不良)に相当する5名の喘息患者においては、全員が鼻炎症状が悪化すると喘息症状が悪化すると回答していた。すなわち、重症度が高くなると両者の連関を認識しやすくなる可能性が示唆された。また、副鼻腔炎のある患者で両者の連関はより強い傾向にあった。

2. スギ花粉症症例における下気道のアレルギー性炎症の検討

スギ花粉症症例において、スギ花粉飛散前期にあらかじめ呼気NOが40ppb以上(喘息と診断しえるレベルの異常高値)であった症例が1症例存在した。これを除外した6症例について主にスギ花粉の季節性のアレルギー曝露に伴う変化の追跡を行った。

これらの6症例において、各症状、鼻内所見は、鼻腔容積変化を除くすべてにおいて、スギ花粉飛散期に症状は悪化し、鼻内所見でも有意な変化を示した($p<0.05$)。

呼気NO濃度については、飛散期、非飛散期で有意差を認め、飛散期で上昇していた($p<0.05$)。各症状、鼻内所見とNOとの相関性では、花粉症症例、非花粉症症例ともに有意な相関性は認められなかった。

呼吸機能検査では、スギ花粉飛散時期の前後において、VC、%VC、FEV1%、及びピークフロー(PEF)は有意な変動は認められなかった。なおこれらの6症例においては、スギ花粉飛散時期においても、明らかな気管支喘息症状を呈した症例はみられなかった。

考察

アレルギー性鼻炎の増悪に伴って喘息症状が悪化する機序としては、①アレルギーが直接下気道に到達し喘息症状を誘発する、②鼻閉塞によってアレルギーが下気道に侵入しやすくなる、③鼻局所でロイコトリエンなどの化学伝達物質が産生・放出され、一部が下気道に下降する、④アレルギー曝露に伴い鼻粘膜でのIL-5などのTh2サイトカインの産生が亢進し、骨髄に作用し好酸球を増加または活性化させ、気道への好酸球浸潤が増加する、などが想定されている。実際には、これらが複合的に病態形成に関与していると考えられるが、それぞれの関与の程度は不明である。今回、鼻疾患と喘息を合併する患者においては、約30%で両者の連関を自覚していた。鼻に対する治療は、通年的に喘息症状がある患者で特に、喘息コントロールに重

要と考えられた。自覚症状から見た場合、普段から喘息コントロールを良くすることが、鼻炎症状と喘息症状を合併している患者の管理において特に重要と考えられた。

アレルギー性鼻炎患者では、気管支喘息を発症していなくても、気道過敏性亢進や好酸球の気管支への集積などの喘息と同様の病態の存在がこれまでも観察されている。今回検討したスギ花粉症症例においては、喘息性気道炎症のバイオマーカーである呼気NOが、飛散期と非飛散期とで有意差が認められ、飛散時期における明らかな上昇が認められた。このことから、スギ花粉症症例では、喘息に代表される下気道のアレルギー症状を臨床的に明らかに呈していない症例においても、潜在的には下気道にアレルギー性炎症が発現することが示された。これらの症例では喘息症状自体の発現、あるいは呼吸機能検査での気流制限、閉塞性換気障害の発現などはみられておらず、純粋なスギ花粉症患者においてのみみると、かかる下気道での炎症病態は臨床的な喘息を発症する前段階的なものである可能性が推察された。症例数が少ないため、スギ花粉症による呼吸機能への影響の頻度、大きさまで

は言及できないが、呼気NOは、呼吸機能とは相間性を認めず、しかしながらスギ花粉飛散により有意な上昇が認められたことから、呼吸機能検査よりも早期に下気道の病態の変化を察知している可能性があるとも考えられた。

研究成果リスト

論文発表

- 1) 仲田 拓人, 中込 一之, 高久 洋太郎, 西原 冬実, 山口 剛史, 柚 知行, 萩原 弘一, 金澤 實, 加瀬 康弘, 永田 真. 鼻炎症状と喘息症状の連関についてのアンケート調査. アレルギー 2010;59:688-98.
- 2) Nagata M and Nakagome K. Allergen immunotherapy in asthma: current status and future perspectives. *Allergol Int* 2010;59:15-9.
- 3) Takaku Y, Nakagome K, Kobayashi T, Yamaguchi T, Nishihara F, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M, and Nagata M. Changes in airway inflammation and hyperresponsiveness after inhaled corticosteroid cessation in allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;152 (s1):41-6.

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

交流磁界が細胞内Caイオン濃度の調整機能に及ぼす影響の解析

研究代表者 駒崎 伸二 (医学部 解剖学)

研究分担者 猪股 玲子*

緒言

生活環境に存在する交流磁界(たとえば、高圧送電線から発生される交流磁界など)から我々が受ける影響については、現在までに数多くの研究が行われ、交流磁界が人体に及ぼすさまざまな影響が報告されている。それらの中でも、近年、特に重要な社会問題として提起されているのが、低周波交流磁界の長期暴露による人体への影響である。たとえば、交流磁界への長期暴露によるアルツハイマー病や乳癌の発症率の増加、メラトニン分泌の減少などの影響が指摘されている¹⁻⁴⁾。しかしながら、それらの研究は、疫学的な調査を中心としたものであり、交流磁界が生物の細胞に及ぼす生理的な作用や、それらが病気の発症に及ぼすメカニズムなどについては依然として不明な点が多い。

我々は以前に行った研究で、環境からの影響を受けやすい発生初期の胚細胞に対する交流磁界の影響を解析した。その結果、WHOが安全とする基準値に近い強さの交流磁界(50 Hz, 5-30 mT)でも、両生類の胚の発生速度の増加や、胚細胞内のCaイオン濃度の上昇などが引き起こされることを明らかにした⁵⁾。そこで、今回の研究では、低周波交流磁界の作用により引き起こされる細胞内Caイオン濃度の変化と、それが胚細胞の運動性に及ぼす影響を解析した。

今回の研究で問題としている交流磁界が細胞内のCaイオン濃度に及ぼす影響については、動物の発生への影響のみならず、アルツハイマー病や乳癌などの発症、メラトニンの分泌機能などにも密接に関わっている事象であるがゆえに、ここで明らかにされた事実は、交流磁界が人体に及ぼすさまざまな影響の解明とその予防策に貢献することが期待される。

材料と方法

実験材料には両生類のイモリ(*Cynops pyrrhogaster*)の胚を用いた。両生類の胚は、実験材料として扱いや

*医学部 解剖学

すく、発生学に関する膨大な研究データの蓄積があることなどから、この種の実験によく用いられる材料の1つである。採卵用のイモリは、秋に新潟県から採取し、冷蔵庫(10℃前後)の中で冬眠させておいた。実験に先立ち、冷蔵庫から取り出したイモリにヒトのゴナドトロピン(ゴナトロピン、あすか製薬)を腹腔内に注射することにより受精卵を産卵させ、それを目的の発生ステージ(原腸胚, Stage 12)になるまで水道水中で発生させた。

両生類の原腸胚の時期には、原腸の陥入と中胚葉の形成を中心とした活発な形態形成運動が行われる。それを成り立たせているのが、3つの胚領域(予定外胚葉、予定中胚葉、原口形成域)に引き起こされる活発な細胞運動である(図1A)。胚細胞の運動性は自動能(Motility)と移動性(Migration)を中心に成り立っている。そこで、今回は、図1に示した3つの胚領域から胚細胞を取り出して、交流磁界がそれらの胚細胞の運動性と細胞内Caイオン濃度に及ぼす影響の関連性について調べた。

胚細胞の培養にはSteinberg's solution(両生類の胚の培養に一般に用いられている生理食塩水)を使用した。胚細胞の解離は、Ca²⁺、Mg²⁺-freeのSteinberg's solution(1 mM GEDTAを含む)を用いた。解離した胚細胞は、図1Bに示した培養装置により、交流磁界の影響を解析した。この際に、作用させた50 Hzの磁界強度は胚細胞が置かれたチャンバーの中央部で20-30 mTであった。

胚細胞の自動能を解析する際には、細胞の凝集を防ぐためにCa²⁺、Mg²⁺-freeのSteinberg's solution(1 mM GEDTAを含む)を用いるとともに、細胞がガラス面に粘着するのを防ぐためには、培養チャンバーの底面のカバーガラスをウシ血清アルブミンでコートした。一方、胚細胞の移動性の解析には、細胞が移動運動しやすいように、培養チャンバーの底面のカバーガラスをフィブロネクチン(Itoham Foods Inc.)でコートした。解離した胚細胞は、磁界を作用させない状態と、磁界

を作用させた状態とを比較することにより磁界の影響を解析した。

培養中の胚細胞の様子はタイムラプスビデオ撮影装置で20秒間隔にて記録し、その連続画像をもとに、磁界が胚細胞の自動能と移動性に及ぼす影響を解析した。胚細胞の移動性の解析にはフリーの画像解析ソフトのImage Jを用いて細胞の軌跡解析を行った。細胞内のCaイオン濃度の変化はCaイオン濃度測定用の蛍光試薬であるFura-2-AM (同仁化学)を用いて1分間隔で測定した。その際の測定方法は前回の研究⁵⁾に従った。蛍光の変化はImageJを用いた画像処理により数値化した。

結果

胚細胞の自動能への影響

予定外胚葉から解離した胚細胞は、硝子様の丸い突起 (Hyaline bleb) を形成して、その突起を移動させる周転運動 (Circus movement) を活発に行っていた (図2A)。磁界を作用させた後でも、それらの細胞の形態変化には顕著な変化は見られなかった。予定中胚葉から解離した細胞も、活発な硝子様の突起形成を行っていたが、突起の周転運動は予定外胚葉細胞と比べると活発ではなかった。磁界を作用させても、ほとんどの細胞はそのまま突起形成を続けていたが、一部の細胞 (約15%) に突起形成の停止が見られた。原口形成域から解離した細胞は、予定外胚葉や予定中胚葉の細胞とは異なり、多くの細胞が硝子様の突起を形成していなかった。一部の細胞が長く伸びた虫様の形 (Vermiform) をして伸縮運動をくり返していた。磁界を作用させても、それらの細胞の形態には顕著な変化

は見られなかった。

以上の3部分について、磁界を作用させた後に観察された胚細胞の形態変化の割合を比較したのが図2Aの棒グラフである。予定外胚葉細胞と予定中胚葉細胞については、磁界をかけた後に突起形成を停止した細胞の割合、そして、原口形成域については、磁界をかけた後に虫様の細胞から丸い細胞に変化した細胞の割合を比較した。その結果、予定中胚葉細胞にだけ、交流磁界の作用による胚細胞の形態変化の有意な差が確認された。

胚細胞の移動性への影響

ここでは、自動能への影響が顕著に見られた予定中胚葉細胞について解析した。交流磁界を作用させた場合と、作用させない場合 (Control) の胚細胞の移動性の変化について、細胞の軌跡解析を行って両者を比較した。交流磁界を作用させると、一部の細胞は細長く変化 (極性を形成) して移動性が活発になった (図2B-a, b)。磁界を作用させた前と後の一定時間における細胞の軌跡の比を比較すると、磁界を作用させないControlでは、そのMean \pm 2SDの範囲内に細胞の約97%が分布していたが、磁界を作用させた場合では、約31%の細胞がこの範囲を超えた移動性の増加を示した (図2B-c, d)。

胚細胞内のCaイオン濃度への影響

胚から解離した予定中胚葉細胞にFura-2-AMを取り込ませた後、2波長 (340 nmと380 nm) 測定法によるリアルタイム画像解析法を行った。写真は撮影した蛍光画像の例を示す。今回の結果では、調べた40細胞のうちの約42%の細胞が磁界に反応して細胞内Caイオン濃度を上昇させた (図3B-a)。細胞内Caイオン

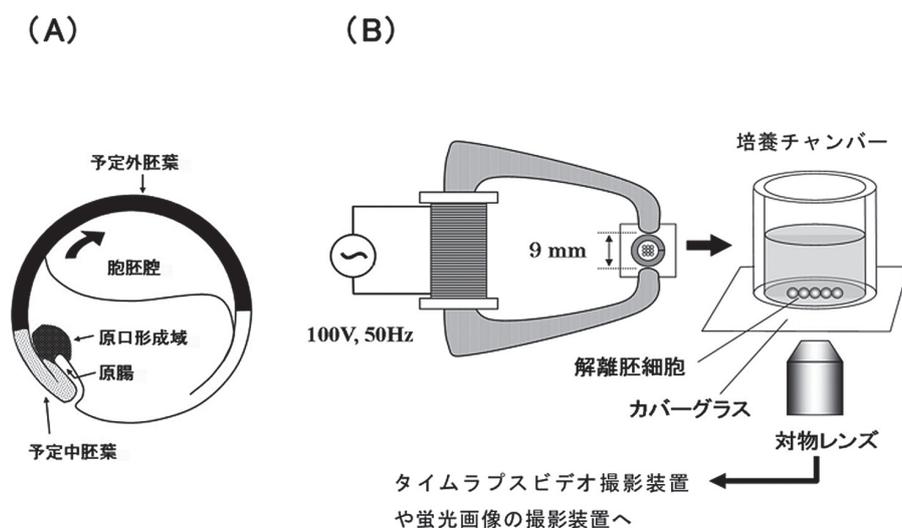


図1. 今回の実験に用いた両生類の原腸胚と交流の作用を調べた装置の概略図。A: 原腸胚形成の際に活発な細胞運動を行う3つの部分 (予定外胚葉, 原口形成域, 予定中胚葉) の細胞が調べられた。B: 胚から解離された細胞に交流磁界を作用させながら培養する装置の模式図。細胞の形態や蛍光の変化は一定間隔で連続的に撮影された画像をもとに解析された。

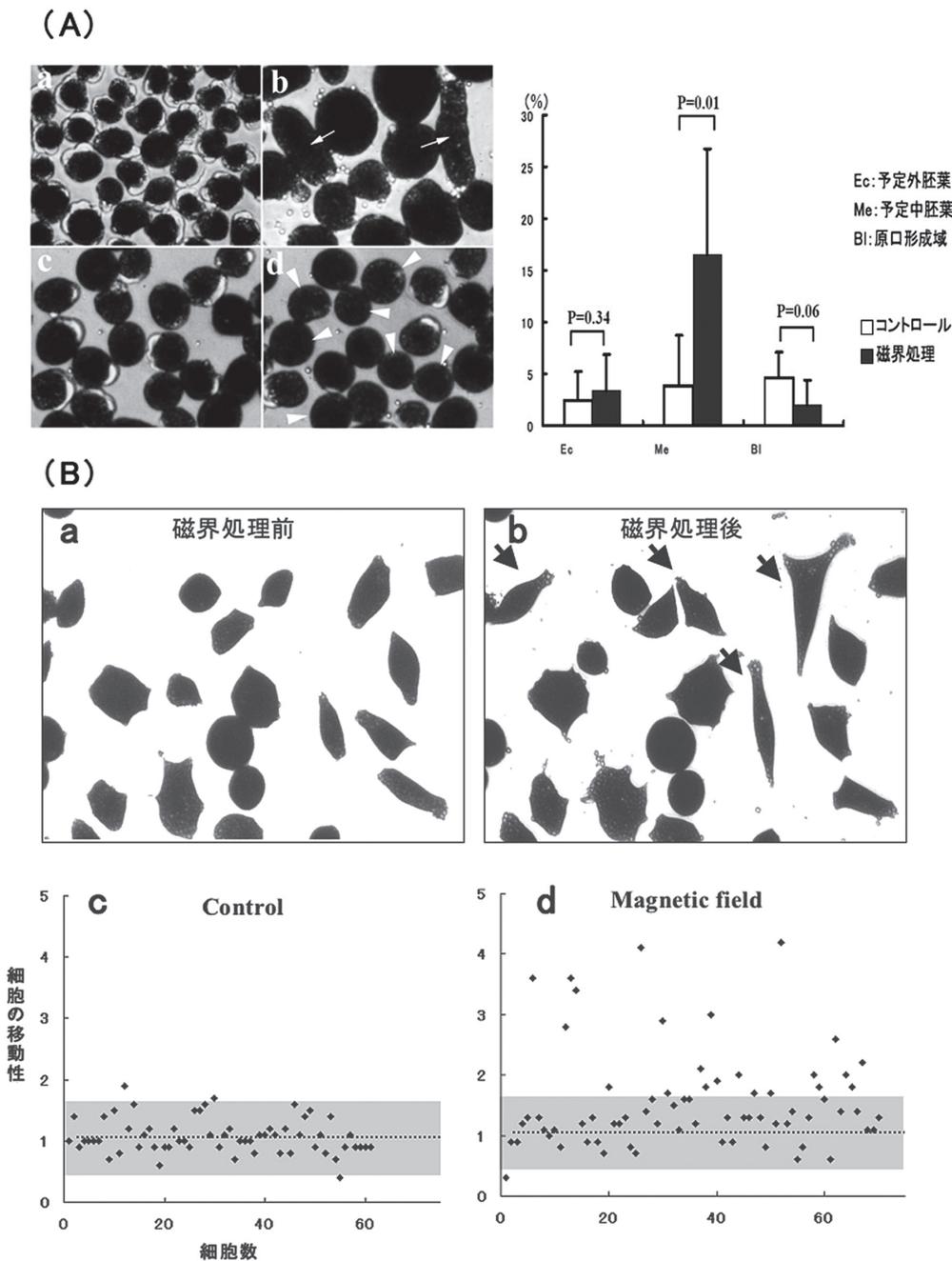


図 2. 磁界の作用による細胞の形態変化. A: 磁界の作用による細胞の形態変化. 磁界処理前の予定外胚葉細胞 (a), 原口形成領域の細胞 (b, 矢印はVermiform細胞を示す), 予定中胚葉細胞 (c), そして, 磁界処理後の予定中胚葉細胞 (d, 矢印は磁界の作用により硝子様突起形成を停止した細胞) を示す. 右の棒グラフは磁界処理により細胞の形態が変化した割合の比較を示す. それぞれの実験グループとも, 4胚以上(平均6胚)について調べた. 予定外胚葉, 予定中胚葉の細胞については, 磁界をかけた後に突起形成を停止した細胞の割合, そして, 原口形成域については, 磁界をかけた後に虫様の細胞から丸い細胞に変化した細胞の割合を比較した. B: 磁界処理前と磁界処理後の予定中胚葉細胞の形態変化を示す. 磁界処理により, 長く伸びた細胞(矢印)の出現が観察される. 写真の下の散佈図cとdは, それぞれ, 磁界処理なし(Control, 4胚, 全61細胞)と磁界処理(Magnetic field, 6胚, 全70細胞)した細胞の移動性の変化を示す. 縦軸に示した細胞の移動性は, 磁界を作用させる前と後の一定時間における細胞の軌跡の比(磁界を作用させた後の距離/磁界を作用させる前の移動距離)を示す. 横軸は細胞の数を示す. 灰色で示した部分はControlのMean±2SDの範囲を示す.

は磁界の作用により上昇し、磁界の作用が停止されるとその濃度は減少した。しかし、磁界を停止した後も、磁界を作用させる前よりも高い値の細胞内Caイオン濃度が維持されていた。また、磁界を作用させて

も細胞内Caイオン濃度の変化が見られない細胞が約30%存在した(図3B-b)。残りの約28%の細胞には、磁界の作用によりわずかな細胞内Caイオン濃度の増加が観察された。

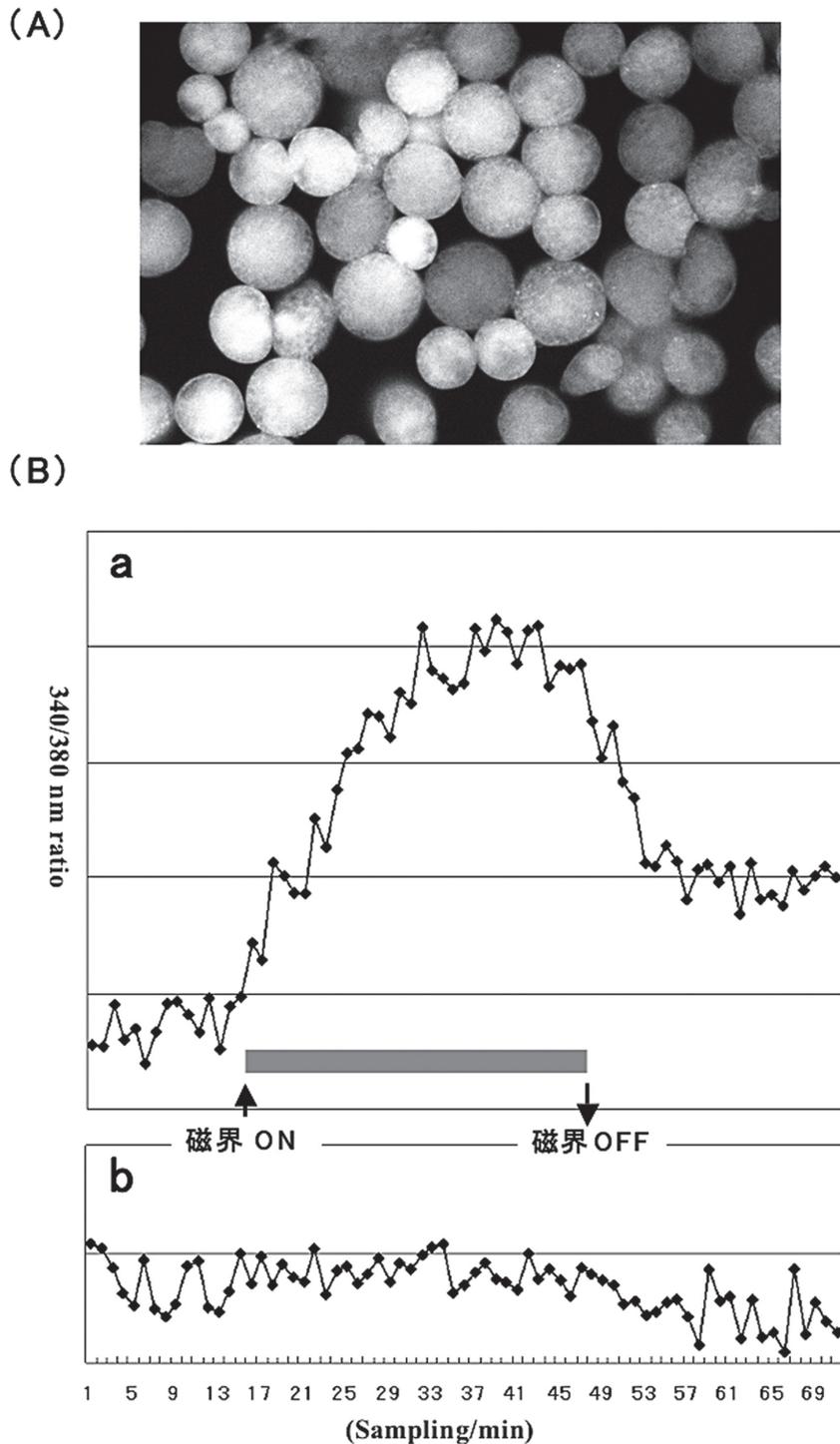


図3. 磁界の影響により引き起こされた細胞内Caイオン濃度の変化。A：調べた細胞の蛍光画像の例を示す。B：Fura-2-AMを取り込ませた細胞に340 nmと380 nmの紫外線を交互に照射して、Fura-2の蛍光の変化を冷却 CCDカメラで撮影した。1分毎に撮影された連続写真をもとに、ImageJを用いて340/380 nmの比の変化が計算された。交流磁界の作用で細胞内Caイオン濃度が顕著に増加した細胞の例(図3B-a)と、交流磁界を作用させても変化が見られなかった細胞の例(図3B-b)を示す。

考 察

低周波交流磁界が胚細胞に及ぼす作用を解析した今回の研究から、中胚葉の一部の細胞が磁界に対する顕著な反応が見られた。それらの細胞では、磁界の作用により細胞の自動能が変化し、細胞の移動性が増加した。そして、その原因が磁界の作用による胚細胞内のCaイオンの上昇による可能性が指摘された。

今回の研究で明らかにされたように、磁界に反応して形態や運動性を変化させたのは一部の細胞だけである。なぜ、一部の胚細胞だけが磁界に反応するのか、依然として不明な点が多い。このように、同じ種類の細胞でも磁界の作用が大きく異なることは、今までの研究ではあまり問題にされてこなかった。おそらく、この点が研究結果の違いや、研究結果の解釈に混乱を招いている大きな原因の1つになっていると考えられる。

異なる種類の細胞（たとえば、筋細胞、神経細胞、分泌細胞など）では細胞内のCaイオン濃度調節系の構造や機能が異なるので、おそらく、その違いが磁界の影響の違いを反映している可能性が考えられる。それゆえ、今後の研究ではこの点を考慮して、交流磁界が細胞内Caイオン濃度調節機構に及ぼす影響の分子メカニズムを解析することが重要であると思われる。

細胞内Caイオン濃度の変化は、遺伝子発現や細胞のさまざまな生理機能などに密接に関連するがゆえに、磁界の作用により引き起こされる細胞内Caイオン濃度の変化は、磁界が人体に及ぼす影響を考える上で最も重要な点の1つと考えられる。たとえば、最近問題になっている、交流磁界とアルツハイマー病や乳癌の発生率を増加、そして、メラトニン分泌の減少などには、磁界による細胞内のCaイオン濃度への影響が少なからず関与していることが指摘され

ている⁴⁾。それゆえ、今回の研究で提起された問題点のさらなる解明は、アルツハイマー病や乳癌などをはじめとして、交流磁界が人体に及ぼしうる影響の解明とその予防策に大きく貢献すると考えられる。

引用文献

- 1) Davanipour Z, Tseng C-C, Lee P-J, Sobel E. A case-control study of occupational magnetic field exposure and Alzheimer's disease: results from the California Alzheimer's Disease Diagnosis and Treatment Centers. *BMC Neurology* 2007;7:13-23.
- 2) Garcia AM, Sisternas A, Hoyos SP. Occupational exposure to extremely low frequency electric and magnetic fields and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2008;37:329-40.
- 3) Huss A, Spoerri A, Egger M, Rössli M. Residence near power line and mortality from neurodegenerative diseases: Longitudinal study of the Swiss population. *Am J Epidemiol* 2008;169:167-75.
- 4) Davanipour Z, Sobel E. Long-term exposure to magnetic field and the risks of Alzheimer's disease and breast cancer: Further biological research. *Pathophysiology* 2009;16:149-56.
- 5) Komazaki S, Takano K. Induction of increase in intracellular calcium concentration of embryonic cells and acceleration of morphogenetic cell movements during amphibian gastrulation by a 50-Hz magnetic field. *J Exp Zool* 2007;307:156-62.

*本研究における研究成果の学会や出版物への発表はまだなされていない。

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

細胞分化に伴う上皮 Na チャネルの発現と
組織内局在を規定する因子の同定

研究代表者 高田 真理 (医学部 生理学)

研究分担者 金子 優子¹⁾, 青葉(藤牧) 香代¹⁾, 穂苅 茂²⁾

緒言

上皮 Na channel (epithelial Na channel: ENaC) は上皮細胞膜に局在し、電解質、体液調節に関わるイオンチャネルである。例えば腎臓の尿細管、肺の上皮 Na 輸送 (Na 再吸収機構) が有名である。ENaC は感覚器 (味細胞、蝸牛管の Reissner 膜等) にも発現している。また、およそ Na の再吸収とは無縁とおもわれる哺乳類皮膚 (表皮細胞) にも発現している¹⁾。表皮における ENaC の機能は定まっていない^{2,3)}。

ENaC は α -, β -, γ -subunit の3種の subunit からなり $2\alpha + \beta + \gamma$ の4量体で機能すると言われている¹⁾。Amiloride という薬品がありこの薬品は ENaC の blocker である。通常、上皮全体を横切る電流 (上皮電流)、あるいは細胞膜を横切る電流 (膜電流) が amiloride で block されたとき、活性を持つ ENaC が存在しその機能が block されたとみなされる。Amiloride-blockable current の存在は活性を持つ ENaC が細胞膜に局在する証である¹⁾。

人為的に subunit の組み合わせを変えた ENaC を作成し、その活性を調べた研究では、活性発現には α -subunit (α -ENaC) の存在が必須であると言われている。すなわち、 $\alpha\beta$ もしくは $\alpha\gamma$ の組み合わせは channel として機能するが (amiloride-blockable Na current が流れるが)、 $\beta\gamma$ の組み合わせでは機能しない⁴⁾。Amiloride は α -subunit を block する⁵⁾。

両生類皮膚は後期胚発生 (変態) 期にその形態と機能が大幅に変化する。例えばウシガエルでは、幼生皮膚の形態は頂側にアピカル細胞を有し、魚類型であるが、成体皮膚は頂側が角化層をなし、哺乳類型である^{6,7)}。幼生皮膚には ENaC 活性は無いが (幼生皮膚の上皮電流が amiloride で block されない)、成体皮

膚には発現している (成体皮膚の上皮電流は amiloride で block される)。活性を持つ ENaC (ENaC 活性 = amiloride-blockable 反応) は変態期に発現する⁸⁻¹⁰⁾。

成体両生類皮膚は体の外側から内側に向けて皮膚を横切る Na 輸送を行っている。このため哺乳類腎尿細管における Na 再吸収機構研究のためのモデル上皮として使われてきた¹¹⁾。両生類皮膚は、1) Na 再吸収器官の観点から ENaC の発現、局在、活性調節を、2) 哺乳類型皮膚の観点から皮膚の形成と ENaC との関連、の両者を明らかにするための格好の素材となろう。

我々はウシガエル幼生皮膚を EDTA 処理することで、表皮が表皮幹細胞である基底細胞のみからなる皮膚を作成でき、この試料を corticoid 存在下で培養すると形態的にも機能的にも成体皮膚を分化誘導できることを見いだした。すなわち、表皮の形態は胚芽細胞、有棘細胞、顆粒細胞、角化細胞からなる成体型となり、上皮電流は amiloride で block された。Corticoid の中には aldosterone が最も強力であった¹²⁾。一方、EDTA 処理した幼生皮膚を corticoid + prolactin (PRL) (もしくは growth hormone: GH) で培養すると幼生皮膚を分化誘導できることを見いだした。すなわち表皮の形態は基底膜側から、基底細胞 (basal cells)、スケイン細胞 (skein cells)、アピカル細胞 (apical cells) からなる幼生型をなし、上皮電流は amiloride で block されなかった^{13,14)}。この事実は、例えば、corticoid 存在下の培養では ENaC の合成が行われる、しかし、corticoid に加えて PRL が存在すると ENaC は合成されない、もしくは ENaC は合成されるものの細胞膜への局在に障害が生じる、の可能性を示す。いずれにせよ、培養条件を変えることで形態および ENaC 活性の異なる皮膚を分化誘導できるこの実験系は、本課題を研究するための最適の実験系の一つと考えた。

この考えに基づきわれわれは、幼生皮膚、成体皮膚、EDTA 処理した幼生皮膚を corticoid 存在下で培養した

1) 医学部 生理学
2) 医学部 生化学

ものとcorticoid + PRL存在下で培養したもの, 都合4種の皮膚を用い, RT-PCRでENaC mRNAの発現を調べた. さらに α -ENaCに対する抗体(anti α -ENaC)を作成して幼生皮膚と成体皮膚を対象に α -ENaC蛋白の発現と局在をwestern blottingと免疫染色で調べた. その結果, 1) ENaCの3種(α -, β -, γ -subunit)すべてのmRNAは成体皮膚ではもちろんのこと, 幼生皮膚, 両培養条件下の皮膚に発現していた(つまり人為的に成体皮膚/幼生皮膚の分化誘導をおこなったとき, どちらにも発現した). 2) anti α -ENaCは幼生/成体皮膚の82 kDaのバンドに反応するとともに, 幼生皮膚のアピカル細胞全周, 成体皮膚の顆粒細胞の頂側細胞膜に反応した¹⁵⁾.

上皮Na輸送においてNaは頂側細胞膜のENaCを通過して細胞内に入り, 側底側のNa/K pump (Na/K-ATPase)により側底側に汲み出される. そこでENaCは上皮の頂側の細胞の, しかも頂側細胞膜に局在している必要がある. 成体皮膚においてそこは顆粒細胞の頂側細胞膜である. また幼生皮膚においてそこはアピカル細胞の頂側細胞膜である. ENaCの機能発現の見られない(amilorideという薬品で抑制される上皮電流が見られない)幼生皮膚でENaC mRNAが発現していて, α -ENaC蛋白が, たとえ全周とはいえ頂側細胞の細胞膜に反応していた実験事実に対し, 次の疑念が浮かび上がった. 1) RT-PCRのためのサンプリングにおいては, 幼生皮膚の表皮側をスライドグラスで掻きとることで表皮を集めた. この作業においては真皮の一部も掻きとられてしまう可能性が高い. そこでENaC mRNAの発現が表皮を構成する, アピカル細胞, スケイン細胞, 基底細胞のどの細胞に由来するのかが明確でないとともに, 真皮の細胞に由来した可能性も残ってしまう. さらに, ENaC mRNAがアピカル細胞以外の細胞に由来するとすれば, なんてそんな細胞に発現する必要があるのか?という新たな別の疑問も生じる. そこで是非とも, 幼生皮膚におけるENaC mRNAの局在を研究し, アピカル細胞に局在しているのかどうかを調べる必要がある. 2) anti α -ENaCはJensik et al.¹⁶⁾がクローニングしたウシガエルの α -ENaCのアミノ酸配列の一部を用いて作成した¹⁵⁾. 抗体は抗原のアミノ酸配列を識別するというよりも, 抗原分子に類似の立体構造を識別する可能性が高い. ウシガエルのアミノ酸配列の一部を利用して作成したanti α -ENaCが反応した蛋白は, 立体構造が類似の, α -ENaCとは別の蛋白である可能性もある. もしくは, 抗体は真に α -ENaCと反応しているにしても, 幼生皮膚の細胞膜に局在する α -ENaCには, 何かの理由で, amiloride-blockableな反応が見られない様態を示している可能性がある. こう考えるなら, 作成したanti α -ENaCが反応しているのが(western blottingにせよ免疫染色にせよ), 真にENaC蛋白なのかどうか

を確定しておく必要がある.

この第一の疑念を解くために, 本学内グラント研究では, *in situ* hybridizationの実験手法を用い, 表皮におけるENaC mRNAの局在を調べた.

材料と方法

材料

ウシガエル(かつて*Rana catesbeiana*と命名されていたが, 現在は*Lithobates catesbeianus*と呼ばれている)幼生, 成体は動物商から購入した. 幼生はMS222存在下の冷却水で麻酔し, その後ピスし, 腹部皮膚を切り出した. 成体はウレタンを脊髄腔内に注入して麻酔し, その後ピスし, 腹部皮膚を切り出した.

RNAの抽出

成体皮膚の表皮側をスライドグラスで掻き取り表皮を集めた. 全RNA(total RNA)もしくはpoly(A)⁺ RNAs(mRNAs)を, 掻き取った表皮から分離した. 全RNAはChomczynski and Sacchi¹⁷⁾により分離した. Poly(A)⁺ RNAsの分離にはFastTrack Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いた.

RNA probeの作成

ウシガエル成体表皮Poly(A)⁺ RNAsからRT-PCR法とTA Cloning法を用いてウシガエルの α -, β -, γ -ENaC¹⁶⁾とウシガエルの成体ケラチン(RAK; type I keratin: Suzuki et al.¹⁸⁾)を部分クローニングし, RNA probe作成時のテンプレートとして用いた. Digoxigenin (DIG) 標識RNA probeの作成にはDIG RNA Labeling Kit SP6/T7 (Roche Diagnostics)を用い, RNA probeは, quick-spin column (G-50 Sepadex Columns Radiolabeled RNA Purification; Roche Diagnostics)で精製した.

Northern blot

各DIG標識RNA probeの特異性を確認するためにnorthern blotを行った. ウシガエル成体表皮Poly(A)⁺ RNAs (0.1-0.2 μ g/lane)を0.22 mol/Lのformaldehydeを含む1% agarose gelでMOPS buffer中で泳動分離した. 泳動後, RNAをNytran SuPerCharge membrane (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire, England)に転写した. 転写膜をDIG標識RNA probeとhybridizeした. 転写膜は洗浄後, 非特異的シグナルをBlocking Reagent (Roche Diagnostics)でブロックし, アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体 (Roche Diagnostics)と反応させた. その後, NBT/BCIP (Roche Diagnostics)を用いた発色反応を行い, probeとRNAとのhybridizationシグナルを検出した.

In situ hybridization

切り出した幼生, 成体皮膚は4% paraformaldehydeで固定した. 10-20% sucroseで置換した後, O.C.T. compoundに包埋, 凍結切片を作成し, スライドグラ

スに貼付けた。凍結切片は、Protease K処理後、4% paraformaldehydeで再固定した。その後常法に従い、TEA (triethanolamine) 処理等の前処理を行い、DIG 標識 RNA probe と hybridize した。Hybridize した切片は洗浄後、RNase 処理で余剰の RNA probe を分解し、さらに洗浄した後 Blocking Reagent (Roche Diagnostics) で非特異的シグナルをブロックし、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics) と反応させた。抗体反応後、洗浄し、NBT/BCIP (Roche Diagnostics) を用いた発色反応を行い、光学顕微鏡で probe と mRNA との hybridization シグナルの局在を観察した。

結果

Northern blotting

α -, β -, γ -ENaC の mRNA はそれぞれ 2281 bp, 2745 bp, 2497 bp である¹⁶⁾。また RAK (Rana adult keratin) の mRNA は 1700 bp である¹⁸⁾。

作成した RNA probe の特異性を調べるため、northern blot 解析を行った (図 1)。 α -, β -ENaC と RAK の DIG 標識 RNA probe を用いた northern blot 解析の結果、それぞれ目的の大きさの 1 本バンドが検出された。この結果は、本研究で用いた α -, β -ENaC および RAK に対する probe が、各遺伝子に特異的な probe であることを示している。我々は、 α -, β -ENaC および RAK に対する probe が信頼できると考え、*in situ* hybridization 実験に用いた。

一方、 γ -ENaC の DIG ラベル RNA probe ではシグナルは検出できなかった。我々は、 γ -ENaC に対する probe を数種作成したが、いずれもシグナルは検出できなかった (data not shown)。

In situ hybridization

In situ hybridization 法で成体ウシガエル皮膚の ENaC mRNA の局在を調べた (図 2)。 α -ENaC の DIG 標識 RNA probe を hybridize した結果、シグナルは、成体表皮の顆粒細胞だけでなく、有棘細胞、さらに一部ではあるが胚芽細胞からも検出された (図 2A)。 β -ENaC の probe を用いた結果では、hybridization シグナルは、顆粒細胞と顆粒細胞に近い有棘細胞の一部から検出されたが、胚芽細胞では検出されなかった (図 2C)。RAK の probe を用いた結果は、Suzuki et al.¹⁸⁾ の結果同様、成体皮膚の胚芽細胞に強いシグナルが検出され、細胞全体に染色が見られた (図 2E)。一方、 α -, β -ENaC の結果では、シグナルは核付近に集中していた (図 2A, C)。角化細胞と真皮には非特異的シグナルのみが見られた。

我々は、 γ -ENaC についても数種の RNA probe を用いて *in situ* hybridization を試みたが、northern blot 解析の結果同様、特異的なシグナルは検出できなかった (data not shown)。

さらに我々は、同様の方法でウシガエル幼生皮膚における ENaC mRNA の局在を調べた。しかしながら、幼生皮膚ではどの遺伝子の probe を用いても非特異的シグナルが強くてため、antisense probe の結果と sense probe の結果との比較から特異的なシグナルを検出することができなかった。従って、ウシガエル幼生皮膚における ENaC mRNA の局在は α -, β -, γ -ENaC のいずれについても判定できなかった。

考察

本研究では *in situ* hybridization を用いて成体と幼生ウシガエル皮膚における ENaC mRNA の局在を調べた。

成体表皮において、 α -ENaC mRNA は顆粒細胞、有棘細胞、胚芽細胞に発現していた。 β -ENaC mRNA は顆粒細胞と有棘細胞に発現していた。 γ -ENaC についてはシグナルが検出されず、局在を判別できなかった。今回我々は、 γ -ENaC の RNA probe を数種作成したが、そのいずれも northern blot 解析及び *in situ* hybridization で成体皮膚の γ -ENaC mRNA の存在を捉えることができなかった。 γ -ENaC に対する probe 作成のために選んだ配列部位や、長さに問題があったか、あるいは、成体皮膚に発現している γ -ENaC

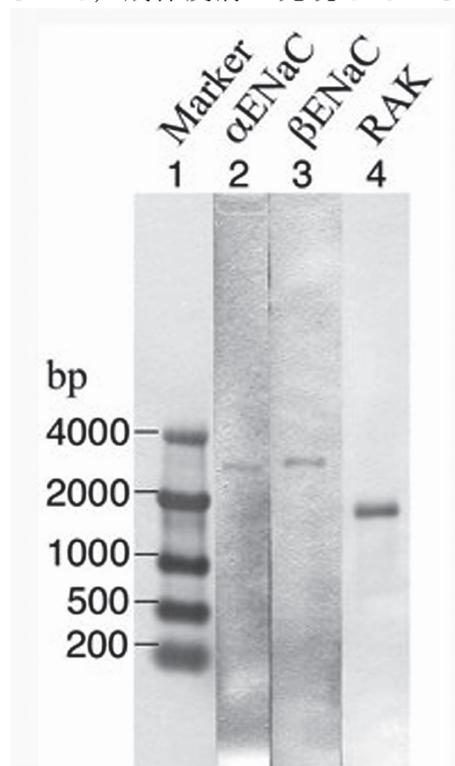


図 1. Northern blot analysis of mRNA expressions of ENaC subunits and adult *Rana* keratin (RAK). Lanes contain 0.1-0.2 μ g of mRNA from bullfrog epidermis. The membrane was hybridized to DIG-labeled α -ENaC (lane 2), β -ENaC (lane 3), and RAK (lane 4) probes. Marker, RNA ladder.

mRNAの量が, 採用した実験手法で捉えるには少なすぎた可能性がある.

ENaCは表皮の頂側細胞の頂側細胞膜に局在してはじめて上皮Na輸送に関与できる. それとともに, 頂側細胞の頂側細胞膜に局在していれば他の細胞に発現している必要は無い. 成体表皮における最外層の角化細胞は最終分化をとげ死に至っている細胞である. 顆粒細胞こそが生きて生体機能に役割をはたす頂側の最外層の細胞である. そこでENaC蛋白は顆粒細胞に発現しその頂側に局在していれば十分である. Takada et al.¹⁵⁾の免疫染色によれば, anti α -ENaCは顆粒細胞の頂側細胞膜に反応がみられた. それゆえ成体皮膚においてはENaC mRNAも顆粒細胞のみに局在していると予想していた. しかし, *in situ* hybridization

法を用いた本研究で, α -, β -ENaCのmRNAは顆粒細胞にはもちろんのこと, 有棘細胞にも発現していることが明らかになった. さらに, α -ENaC mRNAは胚芽細胞にも発現していることが明らかになった. 本研究は, 成体皮膚においては, ENaC mRNAはENaC蛋白の発現に先行し, 細胞分化の早い時期から発現することを示した. また, この結果から, 上皮Na輸送機能に無関係と思われる有棘細胞/胚芽細胞に発現しているENaC mRNAの役割は何か, という新しい疑問が提示された.

本研究の目的の一つは幼生皮膚におけるENaC mRNAの局在の解明であった. RT-PCRによる研究では幼生皮膚において α -, β -, γ -ENaCのmRNAのいずれも発現していた¹⁵⁾. しかし, *in situ* hybridization

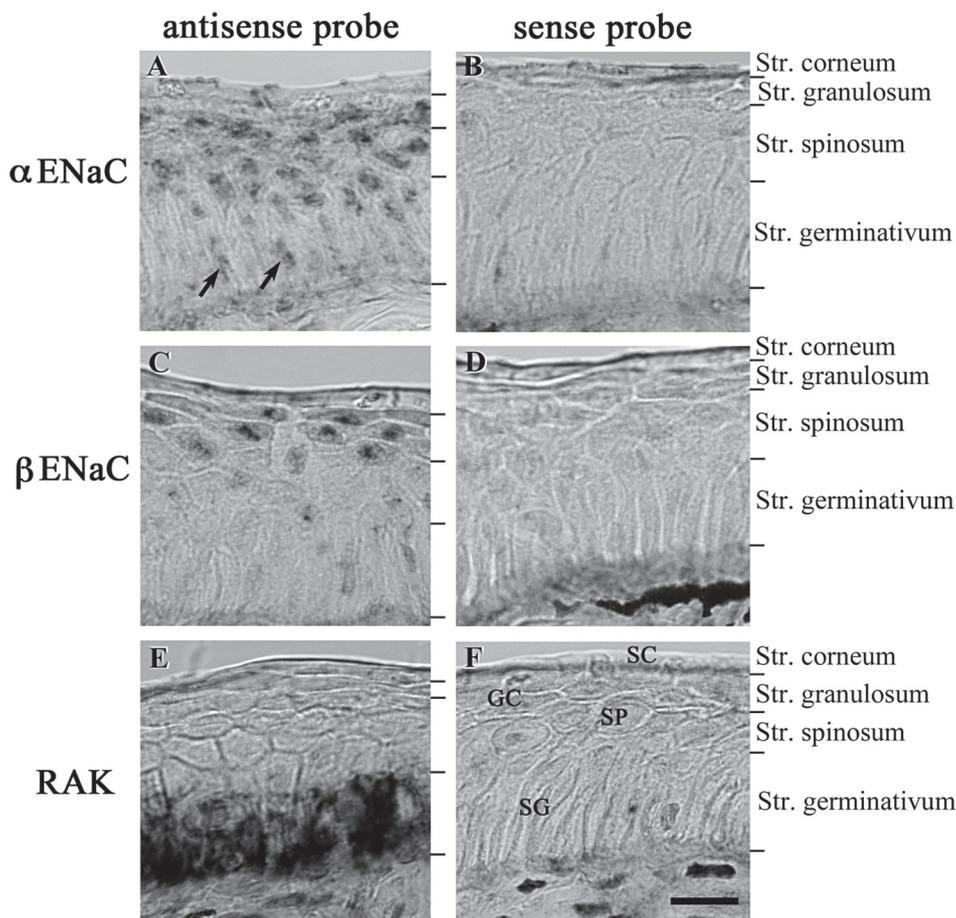


図 2. Localizations of α - and β -ENaC, and RAK (*Rana* adult keratin) mRNAs in the normal adult bullfrog skin were examined by *in situ* hybridization. Photomicrographs of vertical sections of such skin hybridized with specific RNA probe for α - or β -subunit of ENaC, or RAK. a and b, α -ENaC; c and d, β -ENaC; e and f, RAK. A, C, and E, antisense probe; B, D, and F, sense probe. Hybridization signal for α -ENaC was detected in both the Str. granulosum and the Str. spinosum. In addition, a few cells in the Str. germinativum expressed α -ENaC (arrows in a). Hybridization signal for β -ENaC was detected in both the Str. granulosum and the upper Str. spinosum. Hybridization signal for RAK was detected in the Str. germinativum. Non-specific staining was observed in the Str. corneum and the dermis (図 2A-F). SC, cornified cells; GC, granular cells; SP, spinosal cells; SG, germinative cells. Bar: 20 μ m.

では幼生皮膚において α -、 β -、 γ -ENaCのmRNAのいずれの発現も捉えられなかった。RT-PCRではmRNAの存在を増幅して捉える。そこでmRNAの発現量が少なくても捉えることができた可能性がある。幼生皮膚において発現している α -、 β -、 γ -ENaC mRNAは*in situ hybridization*でとらえるには少なすぎたのかもしれない。今後、少ない発現量のmRNAでもmRNAの存在をとらえることのできる新たな*in situ hybridization*の方法を開発する必要がある。

anti α -ENaCは幼生表皮の頂側細胞であるアピカル細胞の細胞膜に反応した¹⁵⁾。それにも関わらず幼生ではENaC機能(amiloride-blockable response)が見られない^{8-10, 19)}。 α -ENaC蛋白がアピカル細胞の全周に局在することに問題があるのかもしれない。あるいは、幼生皮膚の α -ENaC蛋白は修飾され(あるいは修飾を受けず)、本来の機能が見られないのかも知れない。さらにanti α -ENaCが真に α -ENaC蛋白と反応しているのではなく、幼生皮膚に存在する全く別の蛋白に反応し、それを α -ENaCのsignalと誤解した可能性も残る。anti α -ENaCの反応する蛋白の実体を2次元泳動とTof/MS解析で研究する必要がある。これらの解明がENaC蛋白の局在調節の今後の検討課題となった。

今後の展開

我々はすでに上記方面の研究を開始した。研究にあたっては2次元泳動後、anti α -ENaCに反応したspotをgelから切り出し解析することになる。Gelのspot位置の信頼性を高めるため、泳動用のcontrolとしてENaC-HA(HA-tagの付いたENaC)を合成し、その泳動パターンと比較することにした。University of Southern IllinoisのDr. Jensikから、彼が作成した α -ENaC-HA constructの供与を受けた。Constructを大腸菌で大量合成し、HEK細胞にtransfectして α -ENaC-HAを合成させた。 α -ENaC-HAが合成されたかどうかはSDS-PAGE後western blottingし、anti α -ENaCとanti HAとで反応させて確認した。現在 α -ENaC-HAの2次元泳動にかかっているところである。

さらに、constructをEDTA処理した幼生皮膚にtransfectすれば、constructは表皮幹細胞である基底細胞にtransfectされることになる。それをcorticoid/cortidoid + PRLで培養すれば、成体皮膚/幼生皮膚を分化誘導した場合のENaC-HAの発現と局在の挙動の相違をよりの確に捉えることができるはずである。この研究も開始した。

これら研究はDr. Jensikとの共同研究として進行中である。それとともにこの研究が次の学内グラント採択につながることを願っている。

なおENaC mRNAの*in situ hybridization*の結果はActa Histochemicaに印刷中である²⁰⁾。

引用文献

- 1) Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared stress. *Physiol Rev* 2002;82:735-67.
- 2) Brouard M, Casasdo M, Djelidi S, Barrandon Y, Farman N. Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation. *J Cell Sci* 1999;112:3343-52.
- 3) Mauro T, Guitard M, Behne M, Oda Y, Crumrine D, Komuves L, Rassner U, Elias PM, Hummler E. The ENaC channel is required for normal epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 2002;118:589-94.
- 4) Ishikawa T, Marunaka Y, Rotin D. Electrophysiological characterization of the rat epithelial Na⁺ channel (rENaC) expressed in MDCK cells: effects of Na⁺ Ca²⁺. *J Gen Physiol* 1998;111:825-46.
- 5) Kashlan OB, Sheng S, Kleyman TR. On the interaction between amiloride and its putative α -subunit epithelial Na⁺ channel binding site. *J Biol Chem* 2005;280:26206-15.
- 6) Whitear M. Epidermis. In: Bereiter-Hahn J, Matoltsy AG, Richards KS, editors. *Biology of the integument 2*. Berlin: Springer-Verlag; 1986. P. 8-38.
- 7) Robinson DH, Heinzerman MB. Morphology of ventral epidermis of *Rana catesbeiana* during metamorphosis. *Anat Rec* 1987;217:305-17.
- 8) Cox TC, Alvarado RH. Electrical and transport characteristics of skin of larval *Rana catesbeiana*. *Am J Physiol* 1979;237:R74-9.
- 9) Hillyard SD, Zeiske W, Van Driessche W. A fluctuation analysis study of the development of amiloride-sensitive Na⁺ transport in the skin of larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biochim Biophys Acta* 1982;692:445-61.
- 10) Takada M. Differentiation of the active sodium transport system during metamorphosis in *Rana catesbeiana* skin in relation to cadmium- and amiloride-induced responses. *Jpn J Physiol* 1985;35:525-34.
- 11) Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1951;23:110-27.
- 12) Takada M, Yai H, Takayama-Arita K. Corticoid-induced differentiation of amiloride-blockable active Na⁺ transport across larval bullfrog skin in vitro.

- Am J Physiol Cell Physiol 1995;268:C218-26.
- 13) Takada M, Yai H, Takayama-Arita K, Komazaki S. Prolactin enables normal development of ACh-stimulated current in cultured larval bullfrog skin. Am J Physiol 1996;271:C1059-63.
- 14) Takada M, Kasai M. Growth hormone is a weaker candidate than prolactin for the hormone responsible for the development of a larval-type feature in cultured bullfrog skin. J Exp Biol 2003;206:1137-41.
- 15) Takada M, Shimomura T, Hokari S, Jensik PJ, Cox TC. Larval bullfrog skin expresses ENaC despite having no amiloride-blockable transepithelial Na⁺ transport. J Comp Physiol B 2006;176:287-93.
- 16) Jensik PJ, Holbird D, Cox TC. Cloned bullfrog skin sodium (fENaC) and xENaC subunits hybridize to form functional sodium channels. J Comp Physiol B 2002;172:569-76.
- 17) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156-9.
- 18) Suzuki K, Sato K, Katsu K, Hayashita H, Kristensen DB, Yoshizato K. Novel *Rana* keratin genes and their expression during larval to adult epidermal conversion in bullfrog tadpoles. Differentiation 2001;68:44-54.
- 19) Takada M, Yai H, Komazaki S. In vitro treatment of bullfrog tadpoles with aldosterone potentiates ACh-receptor channels, but not amiloride-blockable Na⁺ channels in the skin. Zool Sci 1997;14:883-6.
- 20) Kaneko Y, Fujimaki-Aoba K, Watanabe S, Hokari S, Takada M. Localization of ENaC subunit mRNAs in adult bullfrog skin. Acta Histochemica 2011 (in press) (DOI:10.1016/j.acthis.2011.02.008).

研究成果リスト

学会発表

Kaneko Y, Fujimaki-Aoba K, Watanabe S, Hokari S, Takada M. Expression pattern of ENaC mRNAs in adult bullfrog skin, 第32回日本分子生物学会年会, 平成21年12月, 横浜

論文

Kaneko Y, Fujimaki-Aoba K, Watanabe S, Hokari S, Takada M. Localization of ENaC subunit mRNAs in adult bullfrog skin. Acta Histochemica 2011 (in press)

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

地域の社会福祉施設での早期体験実習は医学生の意識をどう変えるか

研究代表者 佐藤 真喜子(地域医学・医療センター)

研究分担者 荒木 隆一郎¹⁾, 柴崎 智美¹⁾, 鈴木 洋通¹⁾, 森 茂久²⁾,
有田 和恵²⁾, 鈴木 郁子³⁾, 丸木 和子³⁾

はじめに

埼玉医科大学は障害者・高齢者福祉施設を擁した全国でも数少ない医科大学である。特に重症心身障害児施設光の家療育センターは、重度の知的障害に重度の身体障害を併せ持つ医療的ケアのニーズが高い障害児者が利用し、医師を含んだ専門職種間の連携が実践されている。こういった特徴を活かし、埼玉医科大学では、医学を学習することへの関心を高め、医学生として備えておくべき基本的な臨床技能を修得することを目標に臨床入門実習を行っている。その一環である光の家療育センターでの実習では、1年生、2年生に対して、障害児者とコミュニケーションをとること、患者のケアについて職種間で考え方を共有することを目標に実施している。

1年生で行われる光の家実習では、学生1人が光の家の交流スペースに集まる利用者1名を担当し、カラオケなどをしながらコミュニケーションをとる実習を半日実施している。利用者のコミュニケーションの手段は、言語・文字盤・身体的サインなど様々である。

また2年生では、平成21年度は、新型インフルエンザ対策のため臨地実習に替えて光の家スタッフによって光の家利用者の症例のビデオを提示、症例を踏まえたKJ法、SGDによる少人数演習、および全体での発表・討論を実施した。平成22年度には、各学生の担当する利用者に関する事前配布資料に基づき職員と意見交換、情報収集を行ったあと、コミュニケーションや直接介助を約3時間実施した。

これまで障害児者と医学生、看護学生等との交流を含む早期体験実習の効果が報告されており、障害を持つ人とのことばや身振りによるコミュニケーション

の重要性の認識や、実習によって重症心身障害児への印象がnegativeな印象からpositiveな印象へ変化することが確認されている^{1,2)}。

そこで私たちは、将来医師として、患者中心の医療、チーム医療を実践するために身につけておくべき、人をケアすることや、医師や職種の役割、ノーマライゼーションやコミュニケーションについての意識や理解が、医学部入学早期における障害児者施設での実習により、どのように変化するか、自記式調査票を用いて調査し、障害児施設での実習の効果を検討した。

対象と方法

対象は実習に参加した、平成20年度1年生107名(男子学生61名、女子学生46名)、平成21年度1年生111名(男子学生70名、女子学生41名)、2年生110名(男子学生64名、女子学生46名)、平成22年度1年生124名(男子学生81名、女子学生43名)、2年生114名(男子学生72名、女子学生42名)である。調査項目は、障害者や福祉に関する経験や知識、障害者と接すること、障害のある方の暮らし、光の家について、コミュニケーション等に関する内容で、1年生実習前後、2年生実習後に自記式質問票への回答を依頼した(表1,2)。

調査票の回収率は、平成20年度1年生実習前95.3%、実習後92.5%、平成21年度1年生実習前98.2%、実習後94.5%、2年生実習後100%、平成22年度1年生実習前97.5%、実習後94.3%、2年生実習後89.4%であった。

今回は、実習前後ともに調査票の回収ができた1年生延べ312人、2年生延べ212人についてまとめ、性別・年度別に集計を行い、1年生実習前後の変化と2年生実習終了後の状況を比較した。

結果

1年生実習前の調査では、本学入学前の障害児者、

1) 地域医学・医療センター

2) 医学教育センター

3) 毛呂病院 光の家療育センター

福祉に対する経験や意欲についての調査を行った。同年代の障害児と一緒に遊んだり、勉強をしたことがある学生は48.4%，障害をもつ人の介助をしたことがある学生は21.8%，障害児者や老人の福祉施設でボランティアや実習をしたことがある学生は40.3%であった。これらは、3年度ともいずれも女子学生で高かった(図1)。

障害のある方が施設で暮らすことについては、とても良い・やむを得ない事情があればよいが合わせて95%以上を占めていた。そのうち、とても良いを選択した学生が1年生実習後では男子学生で50.5%から51.8%，女子学生で39.8%から54.5%と増加した。しかし、できることであれば家族と暮らすことが良いと考える学生が大半であった。

表 1. 1年生調査項目

1年生調査項目	調査時期
同年代の障害児と一緒に遊んだり勉強したことがあるか	実習前
障害をもつ人の介助をしたことがあるか	実習前
福祉施設でボランティアや実習をしてみたいと思ったことがあるか	実習前
福祉施設でボランティアや実習を実際にしたことがあるか	実習前
重症心身障害児施設光の家療育センターについて知っていたか	実習前
障害がある方が施設で暮らすことについて	実習前・後
障害者が地域で生活するために改善すべき課題	実習前・後
初対面の人とコミュニケーションをとるときの注意点	実習前・後
障害のある方とコミュニケーションをとるための工夫や配慮	実習前・後
今回の実習で障害児者と接して感じてしたこと	実習後
見学実習の内容や方法について	実習後
また福祉施設でボランティアや実習・仕事をしてみたいと思ったか	実習後
障害児と初めて接する時期	実習後
同年代の職員の方の仕事について感じたこと	実習後
働いている職員について感じたこと	実習後
光の家の医師の役割	実習後

表 2. 2年生調査項目

2年生調査項目 (実習後のみ)
今回の実習で障害児者と接して感じてしたこと (平成22年度のみ)
見学実習の内容・方法について (平成22年度のみ)
2年間にわたる光の家に関する実習でまた施設に来たいと思ったか
障害がある方が施設で暮らすことについて
障害者が地域で生活するために改善すべき課題
光の家で勤務する職員の仕事について
光の家の医師の役割
社会や地域における光の家の役割
将来障害児の医療に関わりたいと思うか

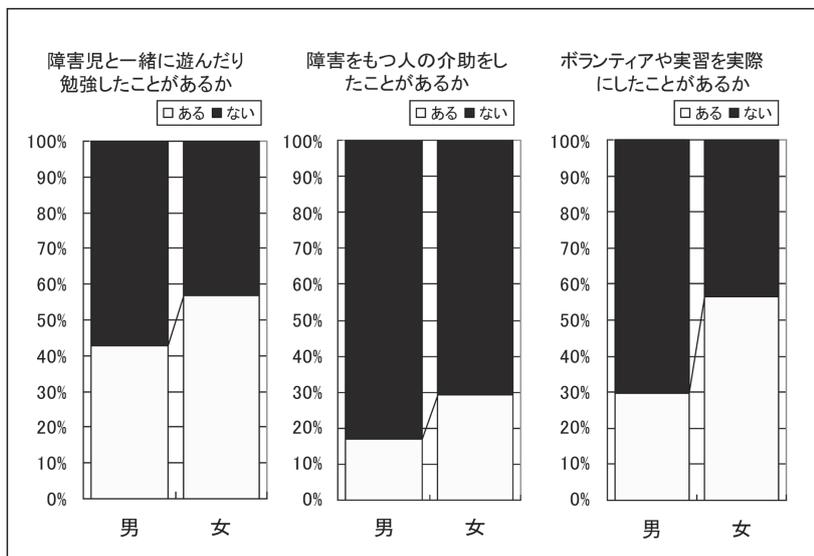


図 1. 本学入学前の障害児者、福祉に対する経験や意欲。

障害者が地域で生活するための課題としては、1年生実習前は健常者の意識が81.1%と最も高く、社会の整備64.4%、障害者のための社会の制度64.1%となったが、1年生実習後、2年生実習後では、ともに健常者の意識に加え施設の援助が増加した。

初対面の人とコミュニケーションをとるときに気をつける点では、実習後で相手の話をよく聞く、相手の表情・しぐさなどをよくみる、笑顔で接するよう気をつける、自分の視線に気をつける、相づちや頷きをする等の言語以外のコミュニケーションの重要性を感じた学生が増加していた(図2)。

障害のある方とのコミュニケーションをとるため

の工夫や配慮では、表情の変化に気づくが87.8%と最も多かったが、仕草や動作の変化に気づく、自分から声をかけるなど、進んで話しかける、発声の特徴に気づく、普段相手を理解している人から情報を得るが増加し、中でも相手に触れてみるが12.8%から52.2%と著増した(図3)。

光の家の医師の役割としては平成21年度2年生実習後では患者様とのコミュニケーションが84.5%と最も高く、家族の支援を選択する学生が63.6%であった。直接利用者との触れ合いのあった平成22年度では、治療が80.4%と最も高く、病気の悪化の予防が76.5%、治療方針の決定72.5%であった。

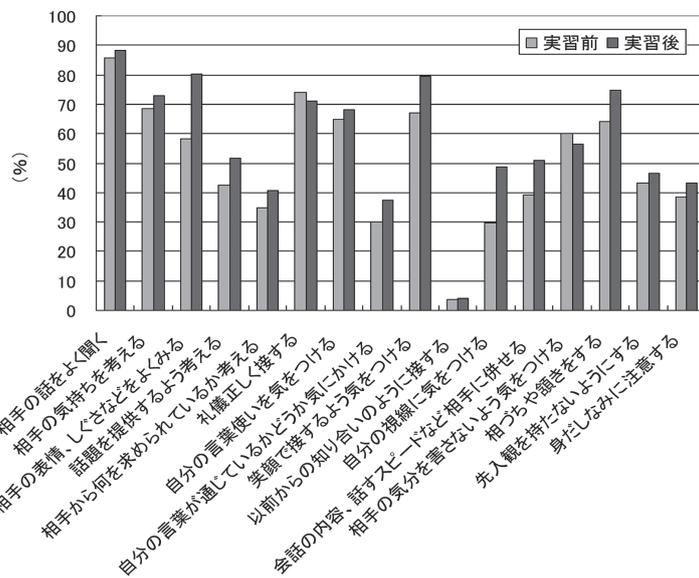


図2. 初対面の人とコミュニケーションをとるときに気をつけている点。

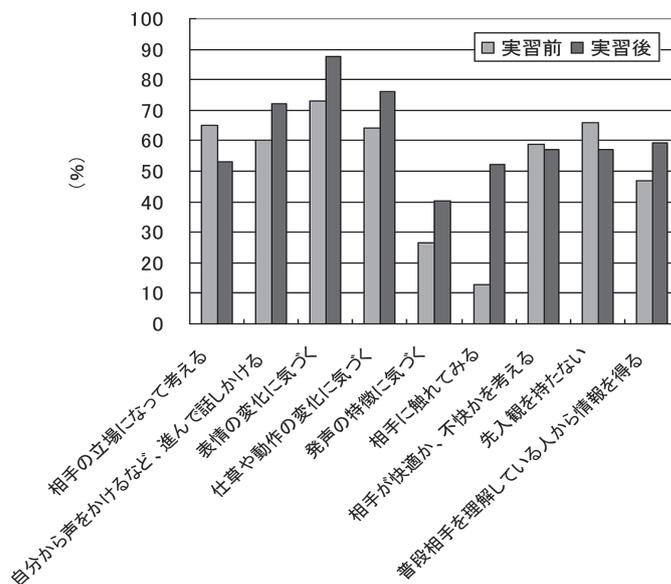


図3. 障害のある方とコミュニケーションをとるための工夫や配慮。

また光の家のような施設でボランティアや実習をしたいと思った学生は、1年生実習前後で54.7%から64.4%と増加が認められた。将来、障害児の医療に関わりたいと思う学生は平成21年度2年生実習後では50.0%(男子学生42.1%, 女子学生60.8%), 平成22年度では44.0%(男子学生34.4%, 女子学生58.9%)であった。

考察

実習前の障害児者との交流の体験は、女子学生で比率が高く、同じ医学生であっても、女子学生の方が障害児者・福祉に対する経験値が高いことが明らかになった。また、2年間の実習後に将来障害児医療に関わりたいと思った学生も、2年生の実習形態が異なった2年度ともに、男子学生より女子学生で高く、障害に対する認識に男女で差があると考えられた。これは、女性が持つ母性が関連しているのかもしれないが、今後更に検討を加えたい。

また、今後も実習やボランティアをしたい学生が増加したことは、実際に実習やボランティア活動を行うかは別として、そのような意識を持った医学生が1人でも多く医師になっていくことが障害児者の医療や地域医療を進めていく上では大切なことであるといえる。

障害者が地域で生活するために改善すべき課題として健常者の意識が高かった理由としては、学生の記述にもあるが健常者はどこか障害者の方を敬遠しているところがまだあるといったことや、自らの考えに立ち返って障害者に対する偏見等を持たないようにしたいと思ったことなどが考えられる。実習後に施設の援助が増加した理由としては、光の家利用者の障害の重さと障害者に対する施設の専門家のケアの重要性を認識した結果ではないかと考えられた。

コミュニケーションツールとして実習後に非言語的コミュニケーションの重要性を感じた学生が多く、特に障害児者とのコミュニケーションでは、「気づき」、「積極性」、「情報収集」の重要性があげられ、特にボディタッチまで含めたコミュニケーションに気づいた学生が多かった。これは、医師になるために相手の立場に立って考えるためのコミュニケーションの多様性を体験できる良い機会になったものと考えられた。

以上のことから医学部入学早期における障害児者施設での実習により、障害者に対する意識の変容がみられ、非言語的コミュニケーションの重要性や、福祉施設における医師の治療以外の役割に気づくなど、早期体験実習としての効果が明らかになった。

謝辞

本研究は平成21年度埼玉医科大学学内グラント(21-3-2-12)の補助を受けて行われた。本研究の遂行に

あたり御協力頂きました光の家療育センターの関係者の方々、またご指導頂いた先生方に深く感謝致します。

文献

- 1) 浜田淳, 太田節子, 福嶋義光. 医学教育における早期体験実習の意義-主に介護の双方向性をめぐって学教育における早期体験実習の意義. 信州医学雑誌 2003;51(4):225-32.
- 2) 下見千恵. 重症心身障害児に対する看護学生の印象の変化とその関連要因についての考察(第1報). 広島県立保健福祉短期大学紀要 1997;3(1):31-8.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 佐藤真喜子, 柴崎智美, 荒木隆一郎, 鈴木洋通, 大野洋一, 宮崎孝, 羽生真由子, 山崎芳仁, 吉田喜太郎, 菅野義彦, 有田和恵, 森茂久, 別所正美. 医学部学生を対象とした重症心身障害児施設での臨床入門実習の評価, 第41回日本医学教育学会大会, 平成21年7月, 大阪
- 2) 佐藤真喜子, 柴崎智美, 荒木隆一郎, 羽生真由子, 宮崎孝, 大野洋一, 鈴木洋通. 重症心身障害児施設における臨地実習前後の意識変容調査-調査紙法による分析, 第68回日本公衆衛生学会総会, 平成21年10月, 奈良
- 3) 荒木隆一郎, 佐藤真喜子, 柴崎智美, 羽生真由子, 宮崎孝, 大野洋一, 鈴木洋通. 重症心身障害児施設における臨地実習後の意識調査-text miningによる分析, 第68回日本公衆衛生学会総会, 平成21年10月, 奈良
- 4) 佐藤真喜子, 柴崎智美, 荒木隆一郎, 鈴木洋通, 大野洋一, 宮崎孝, 羽生真由子, 山崎芳仁, 吉田喜太郎, 菅野義彦, 有田和恵, 渡辺修一, 持田智, 森茂久, 別所正美. 医学部学生を対象とした重症心身障害児施設での臨床入門実習の評価第2報, 第42回日本医学教育学会大会, 平成22年7月, 東京
- 5) 荒木隆一郎, 佐藤真喜子, 柴崎智美, 鈴木洋通, 山崎芳仁, 吉田喜太郎, 有田和恵, 森茂久, 渡辺修一, 間嶋満, 持田智, 別所正美, 鈴木郁子, 丸木和子. 重症心身障害児施設における医学部1年臨床入門(ICM)実習の振り返りレポート計量テキスト分析による評価, 第42回日本医学教育学会大会, 平成22年7月, 東京
- 6) 佐藤真喜子, 柴崎智美, 荒木隆一郎, 羽生真由子, 宮崎孝, 大野洋一, 鈴木洋通. 重症心身障害児施設における臨地実習前後の意識変容調査-調査紙法による分析, 第69回日本公衆衛生学会総会, 平成22年10月, 東京

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

BOLD MRIを用いた腎機能評価法の確立

研究代表者 井上 勉 (医学部 腎臓内科)

研究分担者 小澤 栄人¹⁾, 岡田 浩一²⁾, 竹中 恒夫²⁾, 鈴木 洋通²⁾

緒言

慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) は進行して末期腎不全・透析に至る他に, 心血管病変の強力なリスク因子であることが明らかとなった。CKDの早期発見, 進行予防は, 透析患者数の抑制に留まらず, 心血管病変やその他, 全身の動脈硬化病変の発症予防の観点から急務とされている。我々は以前から慢性腎臓病の最終共通路である尿細管間質病変に注目して研究を続けてきた¹⁻³⁾。尿細管間質病変の形成・進行には種々のサイトカイン, 炎症細胞浸潤, 腎構成細胞の形質変化, 細胞外基質の蓄積などが関与するが, その原因及び結果として虚血・低酸素の関与が想定されている^{4,5)}。さらに, 尿細管間質病変の程度は残腎機能を規定するだけでなく, 腎機能予後とも相関が認められる。つまり, 尿細管間質病変や虚血・低酸素状態を評価する事が出来れば, 直接的なCKDの病態評価が可能となり, 加えて腎機能予後を予測可能になると考えられている。我々は, これまでの基礎研究の成果を臨床応用するため, *in situ*かつ非侵襲的に尿細管間質病変や腎虚血を評価する手段の開発を最終目標とし, MRI (magnetic resonance imaging) が使用可能か否か検討している。多くの健常コントロール, CKD患者を対象にした検討結果から, Diffusion-weighted (DW) MRIおよびBlood oxygenation level-dependent (BOLD) MRIが腎臓の病理・生理学的変化を評価しうるfunctional MRIとして応用可能であることが明らかとなった。

材料と方法

健常コントロール10名 (男性5名, 女性5名), 当院の腎臓内科および内分泌・糖尿病内科に通院中で, 顕性蛋白尿か腎機能低下が3ヶ月以上継続しCKDと診断された84名 (男性54名, 女性30名) を対象とした。

1) 医学部 放射線科
2) 医学部 腎臓内科

糖尿病腎症は, 糖尿病が診断されており, かつ顕性蛋白尿を認める事とした。CKDの原疾患は病歴, 血液検査および必要に応じて腎生検を施行して決定した。推定糸球体濾過量 (estimated-glomerular filtration rate: eGFR) は血清クレアチニン値から日本腎臓学会の推奨するMDRD式を用いて計算した。急性腎障害, 閉塞性腎症, 腎血管性高血圧症, ネフローゼ症候群の症例は本研究では対象から除外した。MRIは1.5-T imager (Sonata; Siemens, Erlangen, Germany) と six-channel body coilを用いて撮像した。通常の形態評価のために coronal proton density-weighted half-Fourier single-shot fast spin echo (PDWI), coronal T2-weighted half-Fourier single-shot fast spin-echo sequence (HASTE), coronal T1-weighted fast low-angle shot gradient-echo sequences (T1WI) を用い, 加えてDWI MRIとBOLD MRIを撮像した^{6,7)}。画像構成はMRIのコンソールで行い, 計測は画像解析ソフトOsiriXを用いた。測定 (関心) 領域 (region of interest: ROI) は腎皮質とした (ROI: 2.65-12.61 cm²; mean 5.56 cm²)。皮質髄質境界の判別にはPDWIを, 嚢胞やその他の腎実質病変の有無はHASTEとT1WIで確認した。数値の表記はmean ± SDとし, 2群間の比較にはunpaired t-testを, 多群間の比較にはOne way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Tukey's Honestly Significantly Different (HSD) testを用いた。eGFR, BOLD MRIにおけるT2*値, DWI MRIにおけるADC (apparent diffusion coefficients) 値は連続変数であり正規分布するものとしてPearson's product moment correlation coefficientを用いて相関を検討した。p < 0.05を統計学的に有意と見なした。すべての統計はJMP ver. 8 (statistics software; JMP Japan, 東京) で処理した。

結果

対象症例をtable 1にまとめた。糖尿病腎症は40症例, 非糖尿病腎症は44症例であり性別, 原疾患の内訳は示した通りである。両群の比較では糖尿病腎症群が

有意に高齢で有り, 蛋白尿が多かった. DWI MRIのADC値に関してeGFRとの相関を検討したところ, 糖尿病腎症, 非糖尿病腎症の両群でほぼ同様の値と傾向を示し, eGFRの低下に伴ってADC値も低下する傾向があり, 有意な相関をみとめた (Figure 1a). CKD stage別に比較すると, 糖尿病腎症, 非糖尿病腎症の両群でCKD stage 1, 2の平均は健常コントロールと有意差を認めなかったが, CKD stageが進行する毎にADC値の平均は減少し, CKD stage 4, 5では両群で健常コントロールの平均と比較して有意な減少を認めた (Figure 1b, 1c). 次にBOLD MRIのT2*値とeGFRの相関を検討した (Figure 2a). 非糖尿病腎症群では, ADC値と同様にeGFRの低下に伴ってT2*値も減少する傾向があり, 有意な相関を認めた. しかし, 糖尿病腎症群においてはeGFRが低下した症例でもT2*値が減少していない症例がある一方で, eGFRが保たれているのにT2*値が減少している症例も有り, eGFRとT2*値の間に有意な相関を認めなかった (Figure 2a). CKD stage別の検討で, 非糖尿病腎症群においてCKD stage 1, 2ではT2*値の平均は健常コントロー

ル群と有意差が無かったが, CKDの進行に伴ってT2*値は減少し, CKD stage 4, 5ではstage 3, stage 1, 2の両群と比較しても有意な減少を認めた (Figure 2b). 糖尿病腎症群では, どのCKD stageにおいてもT2*値の平均の減少は認められず, 健常コントロールと比較しても有意差が無かった (Figure 2c).

考 察

本研究で我々は, eGFRの低下に伴ってDWI MRIのADC値, BOLD MRIのT2*値が減少し, MRIの測定値が腎機能に有意に相関することを示した. また, 糖尿病腎症と非糖尿病腎症ではeGFRの低下に伴うADC値, T2*値の変化に差違があり, 両腎症の病態の相違を反映している可能性があった. 測定原理から考察すると, ADC値は腎線維化を, T2*値は腎虚血を捉えている可能性があり, ヒト生体内の腎臓を*in situ*, 非侵襲的に評価しうる, 謂わば腎のfunctional MRIとして両撮像法が有用である可能性が示された.

糸球体病変の重症度と同様に, 尿細管間質病変の重症度が残腎機能と高い相関を示すことが報告されてか

Table 1. Comparison of clinical and laboratory data in the non-DM and DM groups

Group	Non-DM (n = 44)	DM (n = 40)	
Sex			
male	23	31	
female	21	9	
Diagnosis			
Diabetic nephropathy		40	
Chronic nephritis	21		
Hypertensive nephrosclerosis	13		
Asymptomatic proteinuria	5		
Vasculitis	5		
Age (year)			
	54.6±15.5	62.0±9.7	p < 0.05
Estimated GFR (ml/min/1.73m ²)			
	42.5±24.9	43.4±26.8	p = 0.875
CKD stage (ml/min/1.73m ²)			
Stage 1, 2 (60 ~)	12	13	
Stage 3 (30 ~ 59)	18	11	
Stage 4, 5 (~ 29)	14	16	
Serum Albumin (mg/dl)			
	3.55±0.84	3.54±0.75	p = 0.965
Hemoglobin (g/dl)			
	12.6±2.4	12.7±2.4	p = 0.906
Hemoglobin A1c (%)			
	na	7.35±1.12	
Urinary protein (mg/g ·uCr)			
	1671.9±2094.3	4266.7±3405.2	p < 0.01

Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) associated renal limited vasculitis is described as "Vasculitis". There were no significant differences between the non-DM and DM groups, except for the extent of proteinuria and age.

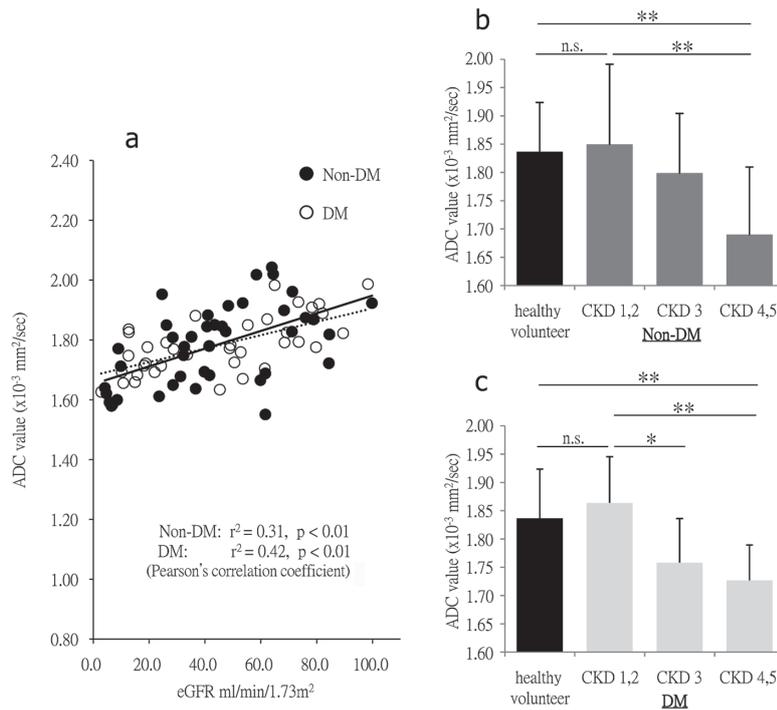


Figure 1. Relationship of ADC values with kidney function in CKD patients. Closed circles and solid lines depict individual subjects belonging to the non-DM group while regression line, open circles and the broken line depict those in the DM group in the correlation graph (a). Bar graphs show the averages and SD of ADC values represented by the CKD stage in the non-DM (b) and DM (c) groups. The data from healthy volunteers was acquired using the same MRI techniques. n.s.: no significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

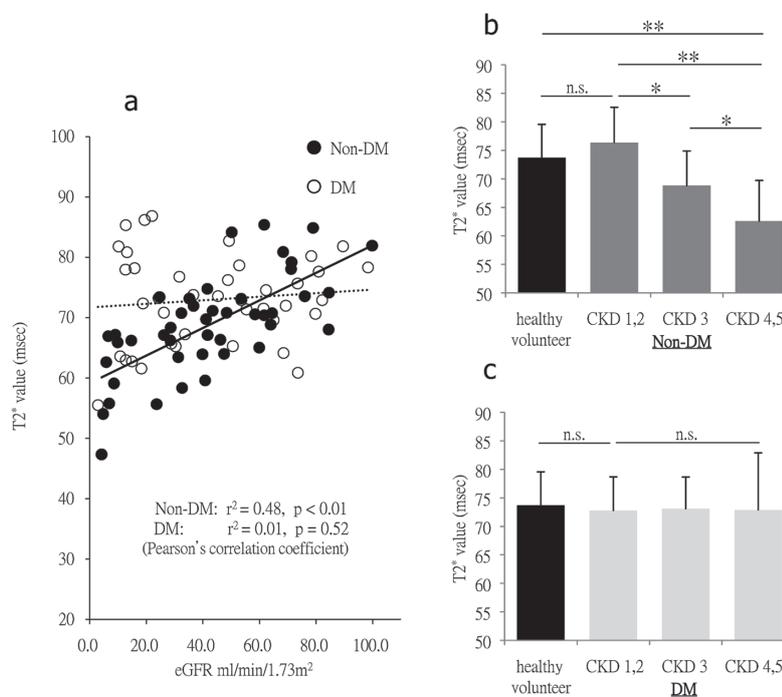


Figure 2. Relationship of T2* values with kidney function in CKD patients. Closed circles and solid lines depict individual subjects belonging to the non-DM group and regression line, open circles and the broken line depict those in the DM group in the correlation graph (a). Bar graphs show the averages and SD of T2* values represented by the CKD stage in the non-DM (b) and DM (c) groups. The data from healthy volunteers was acquired using the same MRI techniques. n.s.: no significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

ら40年余りが経過した⁸⁾。さらに、多くの糸球体疾患において、診断時の尿細管間質病変が、引き続く腎機能予後を予見することが種々の臨床研究から明らかとなっている。尿細管間質病変の進行機序には多くの仮説が存在するが、障害された糸球体から濾過される血清蛋白成分やサイトカイン類が、尿細管上皮を刺激・活性化し炎症細胞浸潤を生じる事が、初期の病変形成に重要であると考えられている^{1,3,9)}。しかし、多くの糸球体が障害され原尿が減少しても、腎障害の進行速度は遅延するどころか加速する印象さえある。CKDの初期から末期腎不全にいたるまで、CKDの進行に関与しているとされる有力な因子が虚血である⁴⁾。腎実質の虚血は尿細管間質病変を進行させ、病変の進行は新たな虚血を生み悪循環が形成される。生体内にあるがまま非侵襲的に虚血と線維化の程度が評価できれば、採血では得られない腎機能評価が可能になるばかりか、治療介入による腎機能予後の変化を予測可能となり、新たな腎臓病治療薬の効率的な開発にも有効であると考えた。

*In vivo*で非侵襲的に臓器の虚血を評価する手段は無いに等しい。理論的には酸化、還元ヘモグロビンの物理特性の差を利用すれば、両者の比の変化をモニターすることは可能である。脳神経科学の分野では、古くから脳の機能をMRIで画像化する手法の開発が盛んであり、形態を見る手法と区別してfunctional MRIと呼ばれている。Functional MRIの原理の一つに酸化・還元ヘモグロビンのT1, T2特性の差を利用して、両者の比の変化を評価する方法があり、BOLD MRIと呼ばれている。腎臓においてもBOLD MRIを撮像しながら水負荷を行ったり、利尿薬を投与することで、主に髄質の酸素需要量の変化がBOLD信号の変化として記録されたとする研究結果が複数報告されている^{10,11)}。著者らはCKDにおける腎虚血を、同様の方法で評価出来ないか検討した。はじめに健常コントロールおよびCKD患者の、糸球体濾過量(eGFR)とBOLD MRIのT2*値の相関を見たが、両者には有意な相関が認められなかった。しかしながらCKD患者群の原疾患を糖尿病腎症とそれ以外に分けたところ、非糖尿病腎症群でeGFRの低下に伴うT2*値の短縮、つまりは虚血状態の進行が明らかとなった。現在、広く臨床で利用されている1.5 Tの機器でもCKD stage 1, 2とstage 4, 5では明らかなBOLD信号の差違を認め、腎実質における酸化・還元ヘモグロビン比の違いを反映していると考えられた。

臓器の線維化を*in vivo*で数値化しようとする試みは、腎臓に限らず多くの臓器、腫瘍の分野で取り組まれている。腎臓に並ぶ代表的な「線維化する臓器」は肝臓である。肝臓は体表面にあり肋間走査で腹壁直下にアプローチできることから、超音波を用いた臓器硬度計が開発されている。Real-time Tissue Elastography

(日立メディコ, 日本)は、腹部走査用のリニアプローブに専用の圧迫板を装着し、肝臓を走査しながらプローブを体表に押しつけ、受動的に変形する肝臓の変形率を数値化することで肝線維化を評価する事が可能である。Fibroscan (Echosens, France)も同様に、超音波を用いて肝線維化を評価する。超音波を用いたこれらの装置は、基本的に標的臓器をプローブ直下に捉えることが必要であり、例えば直腸からのアプローチで前立腺を評価したり、体表から乳腺腫瘍を評価することは可能であるが、残念ながら腎臓の評価には不向きである。著者らは、DW MRIを用いて肝硬変の進行度を評価したとする研究報告¹²⁾を参考に、腎機能とDW MRIで得られる「見かけの(水分子の)拡散係数」= ADC値の相関を検討した。BOLD MRIと異なり原疾患を問わず、eGFRの減少はADC値の低下と有意に相関していた。腎生検は腎機能が正常の症例しか対象にならないため、生検組織における線維化程度とADC値を比較検討することは困難である。しかし、尿細管間質病変の程度は残腎機能に相関すると考えられており、ADC値は尿細管間質病変、すなわち腎線維化程度に相関している可能性がある。

我々の検討結果によれば、糖尿病腎症群においてはT2*値とeGFRが相関しなかった。糖尿病腎症と、それ以外の腎症における虚血の程度を定量的に比較した研究はこれまでに例が無く、本研究が初めて明らかにした注目すべき結果だと考えている。糖尿病群においてもT2*値が明らかに短縮している症例もあることや、平均HbA1c値を見ても、高血糖や糖尿病の存在そのものがMRIの検査値に影響しているとは考えにくい。実際、各症例のHbA1cとT2*値、ADC値は統計学的に有意な相関は認められなかった。一般的に、過去の動物実験や腎生検標本の免疫組織学的検討の結果から、間質線維化に伴う尿細管周囲毛細血管密度の減少が、腎機能や虚血に関与・相関するとされている。しかし、ラット糖尿病モデルでは、尿細管周囲毛細血管密度の減少が明らかでは無い時期から尿細管の虚血が証明されている。つまり、糖尿病腎症では構造的な変化(=線維化や毛細血管の減少)を伴わない機序で虚血が生じている可能性が想定されていたが、本研究は臨床的にその仮説を裏付ける結果となった。

結 論

腎機能障害のあるCKDは、原則的に腎生検が不可能な為、採血・採尿以外には有効な評価手段に乏しいのが現状である。超音波検査、核医学検査に加えて、DW MRI, BOLD MRIは、CKDの進行に関与する腎の虚血や線維化を非侵襲的に評価しうる手段であり、しかも、CKD stage 1から末期腎不全に至るまで、全経過に応用可能な検査法である。

謝 辞

研究計画立案当初に貴重な統計学的御意見を頂いた本学地域医学医療センターの大野洋一先生、荒木隆一郎先生に深謝いたします。腎機能正常、軽度低下例に関しては本学内分泌・糖尿病内科の片山茂裕先生、犬飼浩一先生に数多く御紹介頂きました。また、本共同研究(腎臓内科・放射線科)が実現いたしましたのは本学放射線科の田中淳司先生の御高配の賜です。さらに、多くの貴重な時間を割いて頂き、時には放射線技師として、時には健康コントロールとして健康な腎臓を撮像させて頂いた、本学放射線科の技師の皆様にご心より御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Inoue T, Takenaka T, Hayashi M, Monkawa T, Yoshino J, Shimoda K, et al. Fibroblast expression of an IkappaB dominant-negative transgene attenuates renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:2047-52.
- 2) Inoue T, Okada H, Kobayashi T, Watanabe Y, Kikuta T, Kanno Y, et al. TGF-beta1 and HGF coordinately facilitate collagen turnover in subepithelial mesenchyme. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:255-60.
- 3) Inoue T, Okada H, Kobayashi T, Watanabe Y, Kanno Y, Kopp JB, et al. Hepatocyte growth factor counteracts transforming growth factor-beta1, through attenuation of connective tissue growth factor induction, and prevents renal fibrogenesis in 5/6 nephrectomized mice. *FASEB J* 2003;17:268-70.
- 4) Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:17-25.
- 5) Fine L, Norman J. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney Int* 2008;74:867-72.
- 6) Juillard L, Lerman LO, Kruger DG, Haas JA, Rucker BC, Polzin JA, et al. Blood oxygen level-dependent measurement of acute intra-renal ischemia. *Kidney Int* 2004;65:944-50.
- 7) Thoeny HC, Zumstein D, Simon-Zoula S, Eisenberger U, De Keyser F, Hofmann L, et al. Functional evaluation of transplanted kidneys with diffusion-weighted and BOLD MR imaging: initial experience. *Radiology* 2006;241:812-21.
- 8) Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet* 1968;2:363-6.
- 9) Okada H, Kikuta T, Kobayashi T, Inoue T, Kanno Y, Takigawa M, et al. Connective tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:133-43.
- 10) Schachinger H, Klarhofer M, Linder L, Drewe J, Scheffler K. Angiotensin II decreases the renal MRI blood oxygenation level-dependent signal. *Hypertension* 2006;47:1062-6.
- 11) Epstein FH, Prasad P. Effects of furosemide on medullary oxygenation in younger and older subjects. *Kidney Int* 2000;57:2080-3.
- 12) Boulanger Y, Amara M, Lepanto L, Beaudoin G, Nguyen B, Allaire G, et al. Diffusion-weighted MR imaging of the liver of hepatitis C patients. *NMR Biomed* 2003;16:132-6.

研究成果リスト

論文

- 1) 井上勉, 小澤栄人, 竹中恒夫, 鈴木洋通. 【慢性腎臓病CKDの新たなパラダイムを求めて】CKDの診断と評価CKDの画像診断 新たな試み. *内科* 2011;107:214-7.
- 2) Inoue T, Kozawa E, Okada H, Inukai K, Watanabe S, Kikuta T, Watanabe Y, Takenaka T, Katayama S, Tanaka J, Suzuki H. Noninvasive evaluation of kidney hypoxia and fibrosis using magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol* 2011 (in press)

学会発表

- 1) 井上勉, 小澤栄人, 渡部進一, 渡辺裕輔, 菊田知宏, 佐藤貴彦, 津田昌宏, 新井鐘大, 小林和裕, 池田直史, 岡田浩一, 竹中恒夫, 田中淳司, 鈴木洋通. 腎機能評価におけるBOLD (blood oxygenation level dependent) MRIの有用性, 第52回日本腎臓学会学術総会, 平成21年6月, 横浜
- 2) 井上快児, 小澤栄人, 佐藤洋一, 井上勉, 鈴木洋通, 木村文子, 田中淳司. MRI拡散強調画像のADC値を用いた慢性腎臓病に関する有用性の評価検討, 第69回日本医学放射線学会学術集会, 平成22年4月, 横浜
- 3) 井上勉, 小澤栄人, 菊田知宏, 佐藤貴彦, 大野洋一, 渡辺裕輔, 岡田浩一, 竹中恒夫, 田中淳司, 鈴木洋通. MRI拡散強調画像は分腎機能評価に有用である, 第107回日本内科学会総会, 平成22年4月, 東京
- 4) 小澤栄人, 井上勉, 井上快児, 西直子, 水越和歌, 鈴木洋通, 田中淳司. 腎機能評価の拡散強調画像によるADC値のb値の相違による評価検討, 第38回

- 日本磁気共鳴医学会, 平成22年5月, 筑波
- 5) 井上 勉, 小澤 栄人, 渡辺 裕輔, 犬飼 浩一, 岡田 浩一, 渡部 進一, 菊田 知宏, 佐藤 貴彦, 津田 昌宏, 大野 洋一, 竹中 恒夫, 片山 茂裕, 田中 淳司, 鈴木 洋通. Functional MRIを用いた非侵襲的腎評価法の検討, 第53回日本腎臓学会学術総会, 平成22年6月, 神戸
- 6) Tsutomu Inoue, Eito Kozawa, Hirokazu Okada, Kouichi Inukai, Tsuneo Takenaka, Yusuke Watanabe, Junji Tanaka, Hiromichi Suzuki. Different contribution ratio of hypoxia to renal insufficiency, comparison between diabetic and non-diabetic nephropathy, ASN's annual meeting 2010 (アメリカ腎臓学会総会), 平成22年11月, Denver, USA