

## ヒト自閉症における syntaxin1 遺伝子異常の解析

赤 川 公 朗<sup>1</sup> 藤 原 智 徳<sup>1</sup> 小 藤 剛 史<sup>2</sup>  
古 賀 良 彦<sup>3</sup> 田 丸 政 男<sup>4</sup> 林 優 子<sup>5</sup>

<sup>1</sup> 杏林大学医学部細胞生理学

<sup>2</sup> 杏林大学医学部 R I 研究部門

<sup>3</sup> 杏林大学医学部精神神経科学

<sup>4</sup> 県立広島大学保健福祉学部コミュニケーション障害学科

<sup>5</sup> 県立広島大学保健福祉学部作業療法学科

Syntaxin family は真核細胞の細胞内小胞輸送を制御する因子群として知られている。とくに哺乳類の神経細胞や内分泌細胞における神経伝達物質、ホルモン等の開口放出過程は細胞内小胞輸送系の最終段階であり、この過程には2つの重複した類似遺伝子から発現する syntaxin1A(STX1A) 及び syntaxin1B(STX1B) が関与すると考えられている。我々は今までに、一部の自閉症様症状を含む特有の精神神経症状を呈する Williams 症候群患者の7番染色体微小欠損領域に STX1A 遺伝子があり、実際にその患者で半接合体欠失していることを明らかにしてきた。また STX1A 遺伝子ノックアウトマウスを作成して、*in vivo*, *in vitro* での解析をした結果、このマウスでは heterozygote, null mutant 共にセロトニン、ドーパミン等のモノアミン系の分泌過程が障害されており、おそらくその結果としてマウスに人間の自閉症に類似した行動異常や脳内のセロトニン蓄積を来すことを見出した。この結果から STX1A ノックアウトマウスが自閉症の動物モデルとなること、更には自閉症発症の少なくとも一部に、この遺伝子が関与している可能性が示唆された。本研究プロジェクトはこれらの知見に基づき、自閉症患者より得た STX1A およびそのホモログである STX1B 遺伝子について、それらの遺伝子構造等を解析することにより、これらの遺伝子が自閉症発症に何らかの関連を有する可能性を検討した。

インフォームドコンセントを得た後、18人の患者(1-18, 年齢6-23歳)および6人の正常人(A-F)から血液サンプルを採取し、RNAを抽出した。抽出RNAから逆転写によりcDNAを調整し、リアルタイムPCR法により白血球におけるSTX1A mRNAの定量を行った(図1)。解析の検量線作製のためには、ヒト海馬mRNAから調整したcDNAを用いた。図に示されるように、正常人におけるヒトSTX1A mRNAの発現変動は非常に少なかった。これに対して、興味あることに患者におけるSTX1A mRNA量は発現が増加しているグループと減少しているグループに分けられた。患者群には発現が変動しているものが多く、正常値を示す者があまり見られなかった。これは自閉症患者白血球では何らかのSTX1A発現異常がある可能性を示唆した。しかし、その変化が患者により一様ではないのか、あるいは同一個体内でも状況により変動するのかは不明である。STX1Aは他の多くの開口放出制御因子群と一定の比率で結合して複合体を作ることにより正常に機能することが知られている。従ってその発現量の変動は増大、減少共に、複合体形成に影響するので、全体として開口放出機能に変化を来す可能性がある。しかし、この発現量の変動が自閉症患者の中枢神経細胞内でも見られるかどうかについては今後の検討が必要とされた。一方、STX1B mRNAは白血球では全く発現していないのでRT-PCR法で

の解析は不可能であった。次に白血球より定法に従い Genome DNA を抽出した後、STX1A 遺伝子の exon1 ~ 10 含む領域、exon1 の上流 2kbp について解析を試みた。適当な primer を設定し、各部位を含む遺伝子 DNA 領域を PCR 法により増幅した。これを direct sequence 法により遺伝子配列を決定し、遺伝子変異の有無、SNPs site を検討した (表 1)。STX1B については同様に exon 内の SNP について解析した。その結果、STX1A では exon3 以外の exon に SNP や欠損は認められず、患者に共通した SNP、アミノ酸配列上の変異は現時点では見出されなかった。Intron 中には多くの SNP が存在したが、遺伝子の発現調節領域を含む上流 1 Kbp 以内には全く SNP は存在せず、非常に強く conserve されていた。従って患者白血球に見られた STX1A mRNA 発現の変動がいかなる原因によるものか現時点では不明である。また STX1B 遺伝子については、その exon 内には患者、正常コントロール両者共に全く SNP が存在しなかった。これらの研究結果から、調べた範囲での自閉症患者には STX1A 及び STX1B 遺伝子には蛋白質のアミノ酸配列を変えるような変異は存在しないが、その遺伝子発現量に何らかの変動がある可能性が示唆された。今後、更に例数を増やして検討する必要があると思われる。

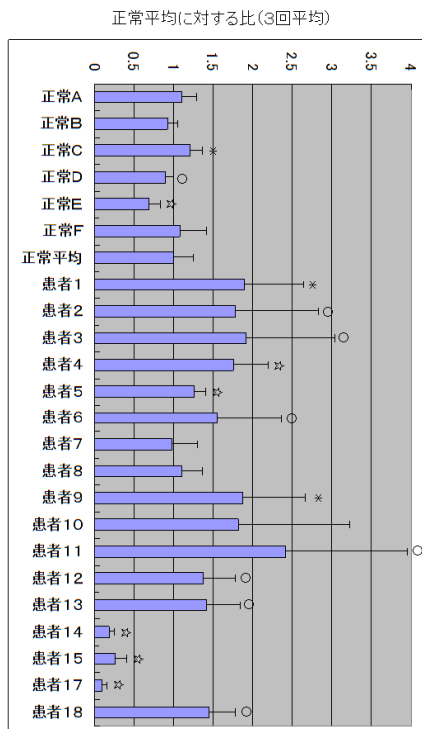


図1 患者白血球における Syntaxin1A mRNA の変動  
リアルタイム RT-PCR 法により白血球の mRNA 量を測定した。正常人 (A-F) では量の変動幅が非常に小さいのに比して、自閉症患者 (1-18, 16 は欠番) では増加群と減少群に 2 分され、正常範囲のものがあまり見られない。値は 3 回の測定平均値を表す。o, ☆, \*印は正常平均値との有意差が各々 P <0.05, 0.01, 0.001 を示す

**STX1A gene**

	database	A	B	C	D	E	F	FRQ %
1158312 (Intron1)	G	AAA	GAG	AAA	AAA	AAA	AAA	33.3
1158523 (Intron1)	A	GAA	GAA	GAA	AAA	GAA	AAA	33.3
1158607 (Intron1)	C	TCC	TCC	TCC	CAC	TTC	CAC	41.7
1156267 (Exon3)	T	CCT	TTC	CCT	CCT	CCT	CCT	41.7
1151377 (Intron7)	A	GAA	GAA	GAA	AAA	GAA	AAA	33.3
1150764 (Intron7)	C	TCC	CAC	TCC	CAC	TCC	TCC	33.3

	database	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	FRQ %
1158312 (Intron1)	G	GAG	GAG	GAG	GAG	GAG	GAG	AAA	AAA	GAG	GAG	GAG	AAA	AAA	GAG	AAA	GAG	AAA	AAA	38.9
1158523 (Intron1)	A	GAA	GAG	GAA	GAA	GAA	GAA	AAA	AAA	GAA	GAA	GAA	AAA	AAA	AAA	GAA	GAG	AAA	GAA	38.9
1158607 (Intron1)	C	TCC	TTC	TCC	TCC	TCC	TCC	CAC	CAC	TTC	TCC	TCC	CAC	CAC	TCC	TTC	TTC	CAC	TCC	38.9
1156267 (Exon3)	T	TTC	TTC	TTC	TTC	TTC	TTC	CAC	CAC	TTC	TTC	TTC	CCT	CCT	TTC	TTC	TTC	CCT	CCT	25.0
1151377 (Intron7)	A	GAA	GAG	GAA	GAA	GAA	GAA	AAA	AAA	GAA	AAA	GAA	AAA	GAA	AAA	GAA	GAG	AAA	GAG	44.4
1150764 (Intron7)	C	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	TCC	TTC	CAC	CAC	CAC	TCC	TCC	CAC	TCC	CAC	TCC	TCC	22.2

**STX1B gene**

	database	A	B	C	D	E	F	FRQ %
2234901 (5' upstream)	C	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	0

	database	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	FRQ %
2234901 (5' upstream)	C	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	AAA	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	5.6

図2 syntaxin1A 及び syntaxin1B 遺伝子に認められた SNP

各々 STX1A, STX1B gene の上段は正常人 (A-F), 下段は自閉症患者 (1-18) の data base と比較した SNP (赤字で表示) を表す。患者に特有の遺伝子変異および SNP は認められなかった。左端の数値はゲノム遺伝子上の位置を示す。右端の数値 (FRQ%) は出現頻度 (%) を表す。

## 肺癌幹細胞の同定と分子生物学的特質の研究 —耐性克服による新たな肺癌治療に向けて—

渡 邊 卓<sup>1</sup> 大 西 宏 明<sup>1</sup> 岸 野 智 則<sup>1</sup>  
大 塚 弘 毅<sup>1</sup> 呉 屋 朝 幸<sup>2</sup>

<sup>1</sup>杏林大学医学部臨床検査医学

<sup>2</sup>杏林大学医学部外科学

### 研究成果まとめ

本研究では、肺癌の薬剤耐性細胞株を用いて、幹細胞を高濃度を含むとされる SP 細胞分画を抽出し、ABCG2 等の薬剤耐性関連分子の発現等について検討を行った。

#### (1) 肺癌細胞株における薬剤耐性株の樹立

肺癌細胞株 4 株において、gefitinib と同一機序を持つ分子標的薬である AG1478, およびトポイソメラーゼ阻害剤である Hoechst33342 に対する耐性株を樹立した。薬剤耐性の確認には、MTS assay を用いた。PC-14AG50R, NCI-1650AG20R 11-18AG10R の 3 株は、AG1478 に対する IC<sub>50</sub> values が親株では 1 mM 未満であるところが、いずれも 10 mM 以上となっており、AG1478 に対する耐性を示した。また、NCI-H1975H5R は親株が 1 µg/mL の Hoechst33342 に対し感受性であったのに対し、3 µg/mL の Hoechst33342 に耐性であった。

#### (2) SP 細胞の抽出とその評価

上記耐性株およびその親株において、Hoechst33342 を用いてフローサイトメトリーにより SP 細胞分画を抽出した。SP 細胞の検出の際には、通常 verapamil による Hoechst 排出阻害を指標として用いるが、肺癌では必ずしも verapamil による阻害が生じないため、AG1478 を阻害剤として用いた。親株では、3.54 - 22.0 % の SP 分画が認められた。Hoechst33342 耐性 NCI-H1975H5R 株では、親株に対し著明に SP 分画が増加していた

(34.7% vs. 3.54%)。一方 AG1478 耐性株 PC-14AG50R, NCI-H1650AG20R および 11-18AG10R では、親株に比べ SP 分画は著明に減少していた。(0% vs. 6.67%, 0% vs. 15.0%, and 1.04% vs. 23.5%) (図 1)

#### (3) SP 細胞における薬剤耐性関連分子の検討

上記細胞株およびそこから抽出した SP 細胞において、Real Time PCR を用いて薬剤耐性関連分子 ABCG2, MDR, MRP1 の発現の変化を調べた。また、直接シーケンス法を用いて gefitinib 耐性に関連するとされる EGFR 遺伝子 T790M 変異の有無を検討した。ABCG2 は Hoechst33342 耐性 NCI-H1975H5R 株では、親株に比べ発現が亢進していたが、AG1478 耐性の 3 株では有意に発現が低下していた。これは、SP 細胞分画の変化と一致していた。MDR1 遺伝子は、いずれの細胞株でも発現は低値であった。MRP1 遺伝子の発現には、一定の傾向はみられなかった。EGFR 遺伝子 T790M 変異は、いずれの細胞株においても認められなかった。(図 2)

### 結果

上記の結果から、ABCG2 の発現および SP 細胞は肺癌細胞の耐性化と深く関与している可能性が示唆された。今後、チロシンキナーゼ阻害剤とトポイソメラーゼ阻害剤の併用による耐性克服について検討予定である。

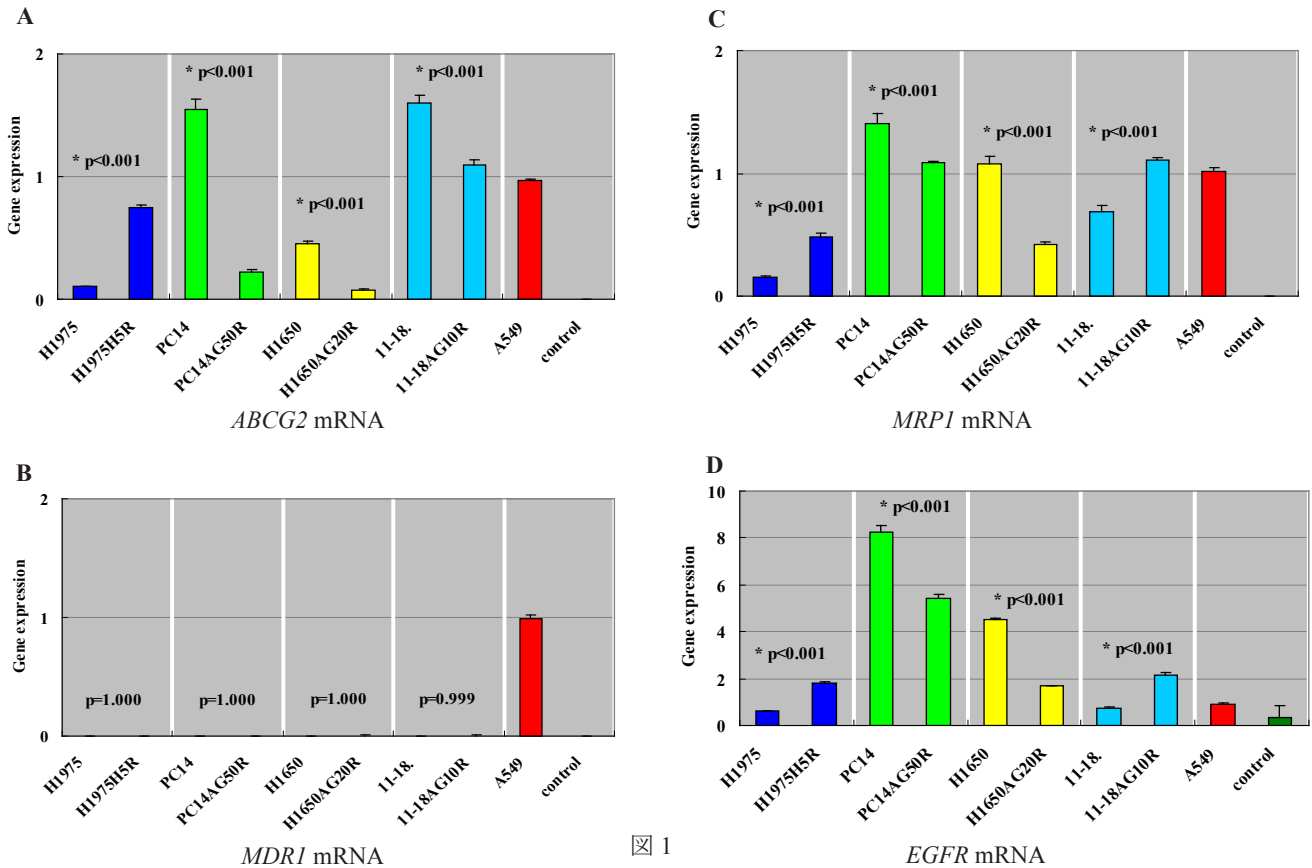


図 1

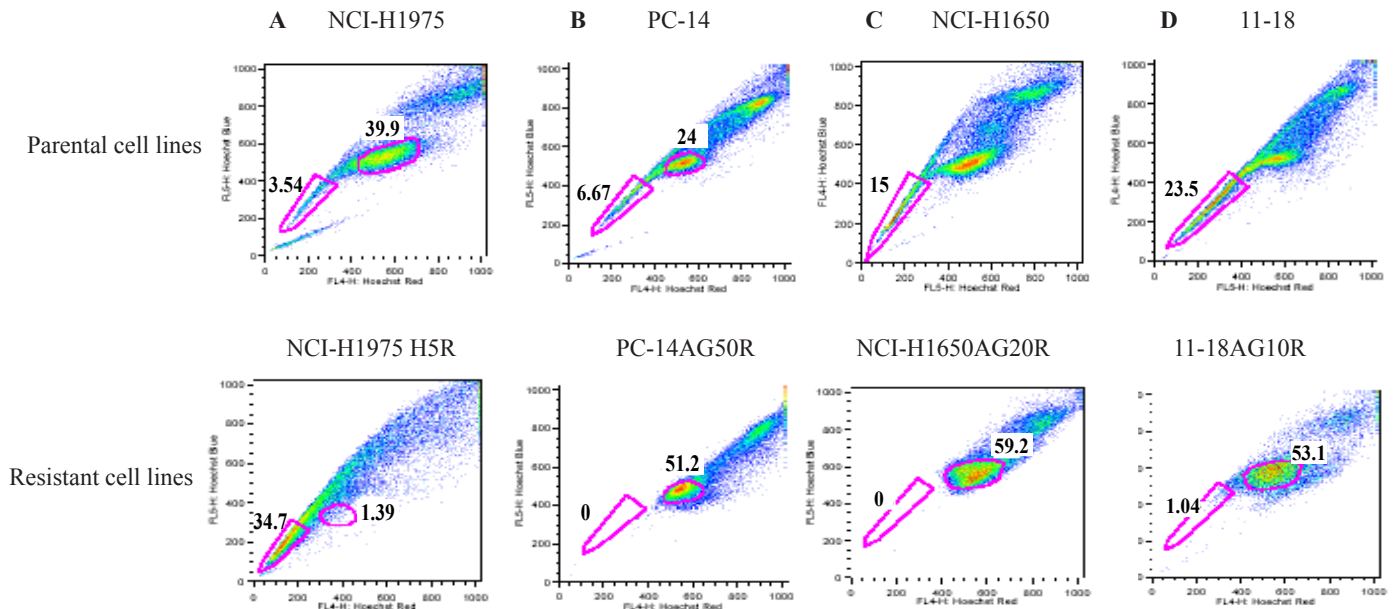


図 2

論文リスト

講演記録

- Ohtsuka K., Ohnishi H., Fujiwara M., Kishino T., Matsushima S., Furuyasshiki G., Takei H., Koshiishi Y., Goya T., Watanabe T., Abnormalities of epidermal growth factor receptor in lung squamous cell carcinomas, adenosquamous carcinomas and large cell carcinomas: Tyrosine kinase domain mutations are not rare in tumors with an adenocarcinoma component. Cancer 109:741-750, 2007

- Ohtsuka K., Ohnishi H., Morita K., Chiba M., Ogura W., Matsushima S., Kishino T., Goya T<sup>1</sup>, Watanabe T<sup>1</sup> (Department of Surgery, Kyorin University): Relationship between tyrosine kinase domain gene mutation of epidermal growth factor receptor and respiratory function in non-small cell lung cancer. 12<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer. Seoul, Sep.2-6, 2007.

## Sox17 ヘテロ変異動物を用いた肝疾患モデルマウスの作成と解析

金 井 正 美

杏林大学医学部解剖学

Sox ファミリーは、哺乳類の精巣決定遺伝子 *Sry* の DNA 結合領域である HMG ボックスと高い相同性を示す一連の転写因子群である。申請者は当初マウス精巣に発現する新規 Sox 遺伝子として *Sox17* を同定、単離し (1)、*Sox17* 遺伝子欠損個体、null ES 細胞を用いたキメラ解析を行い、哺乳動物においても *Sox17* が胚性内胚葉への分化・維持に必須因子であることをすでに報告している (2)。現在までに、Sox 遺伝子群の先天性ヘテロ変異体における数々の遺伝病が報告されている。即ち、*Sox2* における Anophthalmia (無眼症)、*Sox4* における Osteopenia (骨形成不全)、*Sox9* における性転換を伴う Campomelic dysplasia、*Sox10* における Hirschsprung disease などである。*Sox17* 遺伝子は胚性 / 胚体外内胚葉に発現しているが、null mutant 表現系は胚性内胚葉の分化不全、それに伴う原始腸管形成不全と胎生致死である。そこで本研究では、胎生致死期以降の *Sox17* の機能解析を行うことを目的に、*Sox17* ヘテロ個体を材料として、*Sox17* 因子の役割とその疾患モデルとしての可能性を検討した。

まずは SoxF subgroup (*Sox7, 17, 18*) 間における機能相補について検討を行った。即ち、*Sox7, 18* 遺伝子が胚体外内胚葉や血管に発現しており、*Sox17* 遺伝子 mutant はそれらの組織では機能相補すること、ES 細胞 Drop culture

分化系を用いて、初期ステージでは胚体外内胚葉のみに特異的表現系が認められることを明らかにした (3,4)。

*Sox17* ヘテロ個体は 129 由来 ES 細胞を C57BL/6 桑実胚へ挿入することで作出した遺伝子変異体である。B6 に遺伝背景をバッククロスしたところ、5 世代からヘテロ個体が生後致死となる。その成因を肉眼所見にて検討したところ、肝臓変縁部のみの変性が観察され、肝重量は胎生期 15 日以降において有意差が認められた。辺縁部変性部位は PAS 染色陰性を呈した。この結果は同部位における肝細胞への glycogen 蓄積が消失することを意味する。更に Albumin, HNF-4 (共に肝細胞の分化マーカー) の組織化学的タンパク検出、並びに Real time PCR を用いた遺伝子発現量ともに有意な減少を示した。肝臓変性部位の TUNEL 染色による細胞死の検討を行ったところ、正常部位と有意差は認められなかったものの、変性部位の肝細胞は光学顕微鏡レベルでは ER ストレス (GRP78) マーカ陽性を示し、更に、電子顕微鏡的観察より変性肝細胞の ER 膨化が形態学的に観察された (Fig 1)。現在、その成因の分子メカニズムを同定するために肝細胞の正常部位との DNA array を行い下位遺伝子の変化を特定し詳細を解析中である。本研究結果から、少なくとも *Sox17* ヘテロ変異個体は新生児肝臓障害のモデルとして有効である可能性が示唆された。

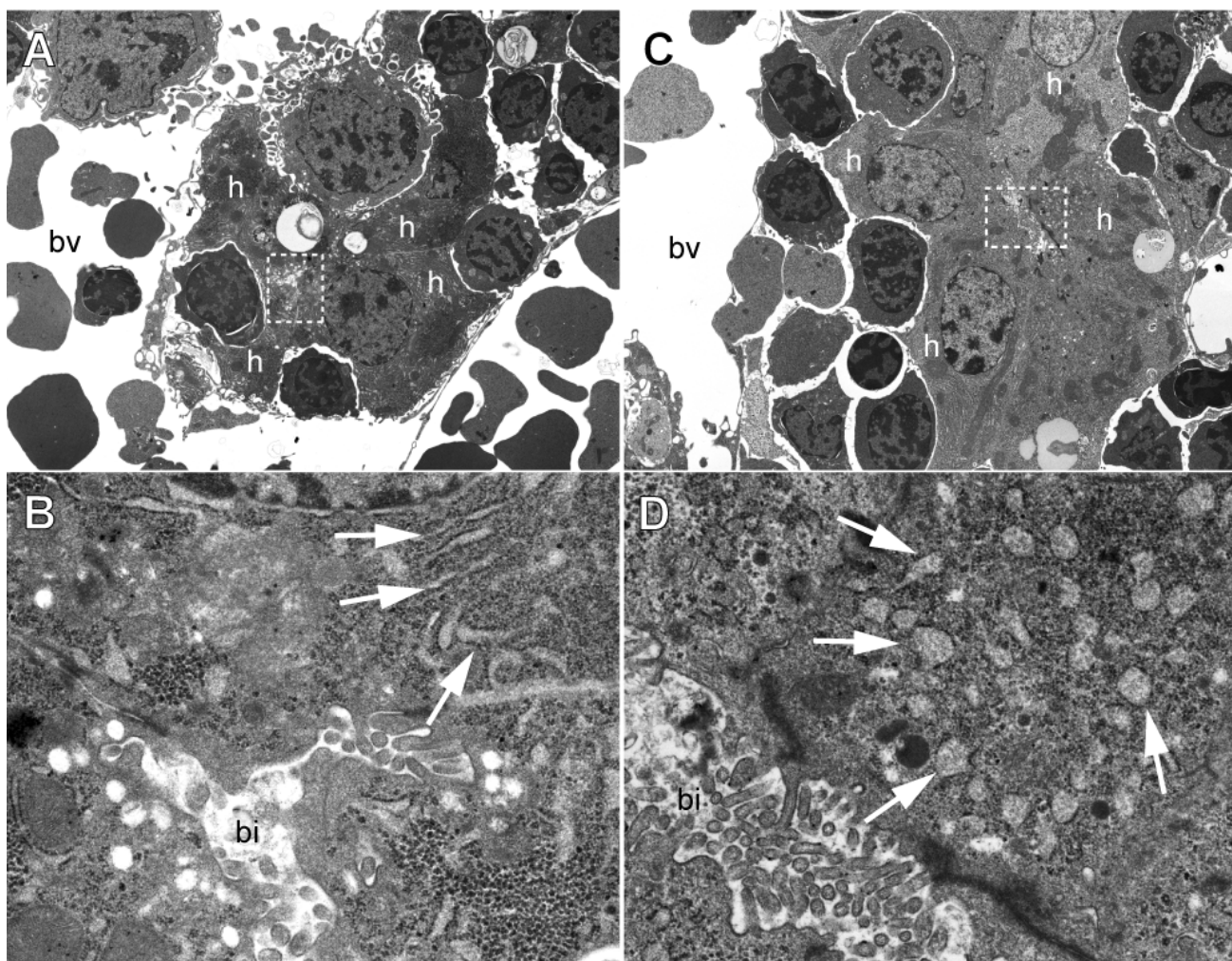


Fig1 マウス胎生17日齢 Sox17ヘテロ変異体及び正常個体肝臓の変性部位の電子顕微鏡像  
 A,B; 正常個体 (BはAの白波線内の高倍像), C,D; ヘテロ変異体 (DはCの白波線内の高倍像)  
 h; 肝細胞, bv; 毛細胆管, 矢印; ER

#### 参考文献

- 1) Kanai Y, Kanai-Azuma M, *et. al.*, (1996) *J. Cell Biol.* 133: 667-681.
- 2) Kanai-Azuma M, *et. al.*, (2002) *Development* 129:2367-2379.
- 3) Matsui \*, Kanai-Azuma M, *et. al.*, (2006) *J Cell Sci* 119: 3513-3526.
- 4) Shimoda M, Kanai-Azuma M, *et. al.*, (2007) *J Cell Sci* 120:3859-3869.

## Radiosurgery が脳血管内皮細胞および脳循環に与える影響に関する研究

### Biological effect of radiosurgery on cerebral endothelial cells and cerebral blood flow

栗 田 浩 樹

杏林大学医学部脳神経外科学

Department of Neurosurgery, Kyorin University Faculty of Medicine

Hiroki KURITA, MD, PhD.

#### はじめに

定位的手法を用いて病変に限局した一回大量照射を行う Radiosurgery(定位的放射線治療)は近年脳神経外科領域で急速に普及し、従来の分割照射では治療し得なかった血管性病変にも臨床明らかな有効性が確認されている。特に小型の脳動静脈奇形に対しては従来の開頭手術にかわる低侵襲な治療として確立し、治療件数も飛躍的に増加しているが、その作用機序に関しては未だ解明されておらず、一回大量照射が正常脳に与える生物学的効果に関する基礎的知識は極めて乏しい。一方、治療件数の飛躍的増加に伴い、radiosurgery 後に病変周囲に高頻度に脳浮腫を生じ、時に重篤化する事が経験されているが、一回大量照射が脳循環に与える影響に関するデータは今まで皆無であり、特に中枢神経系に与える急性期障害、並びに慢性期に生じる血管内皮障害を中心とする vasculopathy の機序の解明が急務である。本研究は、ラットの頸動静脈吻合による脳動静脈奇形モデルを作成して radiosurgery を行い、血管が閉塞するまでの形態学的変化およびその分子機構の一端を明らかにし、それが急性期ならびに慢性期に与える影響を定量化して解析する事を目的とした。

#### 方法

体重 300g の雄 Wister Rat に顕微鏡下に内頸動脈と頸静脈を血管吻合して動静脈シャントを形成し (N=100),

一ヶ月後に手術傷を開いて脳動静脈シャントが開存しているものを脳動静脈奇形モデルとして採用し、LINAC により血管奇形部位を中心に 0,10,20Gy の局所一回大量照射 (radiosurgery) を 20 体ずつ行なった。照射 1 日後および 1,3,6,12,24 ヶ月後に sacrifice して灌流固定し、照射範囲内の神経膠細胞ならびに血管構築の変化を観察した。

#### 結果 1: 照射 24 時間以内の急性期における神経膠細胞の変化

従来 late responding tissue と考えられ、照射後急性期には形態学変化は生じないとされている中枢神経系であるが、今回の実験において、照射 24 時間以内に TUNEL 法において白質の神経膠細胞の一部が免疫染色され apoptosis に陥る事が確認された (Fig.1)。この反応は照射 4-8 時間に peak があり、標識率 (apoptotic ratio) は照射線量 (10Gy or 20Gy) に依存せず最大 4-5% であり、24 時間後には base line に戻った (Fig.2)。24 時間後に白質の神経膠細胞の密度を 5 つの部位で測定すると、無照射群と比して有意に細胞数の減少があり (Fig.3)、照射 24 時間以内に神経膠細胞が放射線により apoptotic cell death に陥る事が確認され、免疫組織学的にその神経膠細胞は oligodendroglia である事が判明した。神経膠細胞密度の減少は照射 24 ヶ月後まで遷延し、非可逆的变化である事が強く示唆された。

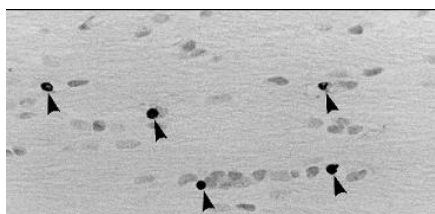


Fig.1

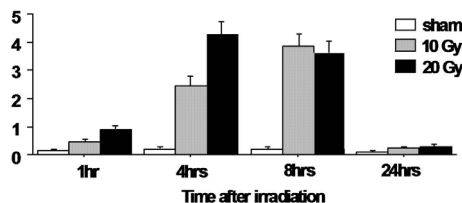


Fig.2

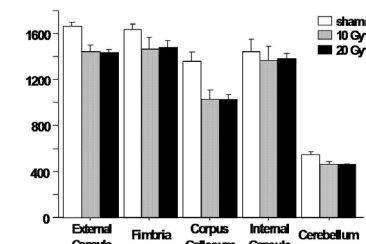


Fig.3

結果 2：照射 12-24 ヶ月後の慢性期における血管内皮細胞の変化

作成した脳動静脈奇形部位には、照射 12 ヶ月後から 24 ヶ月後にかけて、内皮および内皮下結合組織の有意な肥厚が認められ、硝子様変性によって lumen は狭小化し、一部は血栓性閉塞を認めた (Fig.4)。免疫組織学的に血管構築の変化をみると、内弾性板 (Fig.5: EVG 染色) や基底膜 (Fig.6: Collagen IV 染色) の破綻が確認され、血管支持組織の変性により、一部は動脈瘤様に拡大し (Fig.7)、血管周囲に hemosiderin の沈着をみとめ (Fig.8)、血漿成分ならびに血球成分が漏出している事が推測され、電子顕微鏡的に内皮細胞の tight-gap-junction の破綻が確認された (Fig.9)。

まとめ

本研究により現在までに (1) 照射 24 時間以内に髄鞘の形成や維持に関わる oligodendroglia が選択的に非可逆的な atoptosis による細胞死に陥り、後の脱髄性白質障害や浮腫の形成に関与する可能性がある事、(2) 照射した脳動静脈奇形の血管構築の変化により周囲に血球や血漿成分の漏出を生じ、それは血管内皮細胞の tight-gap-junction の破綻による可能性が高い事などを明らかにする事ができた。今後も研究を継続し、照射後の protein kinase C (PKC) 活性の亢進によるサイトカインの産生増加、特に強い血管透過性亢進作用を有する vascular endothelial growth factor (VEGF) の産生を定量化し、照射線量や血管閉塞との関係を明らかにする事により、放射線による vasculopathy の機序の一端を解明する予定である。

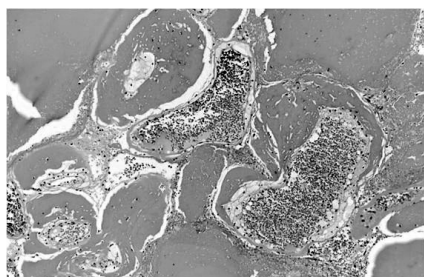


Fig.4

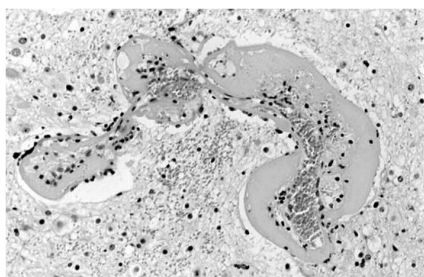


Fig.5

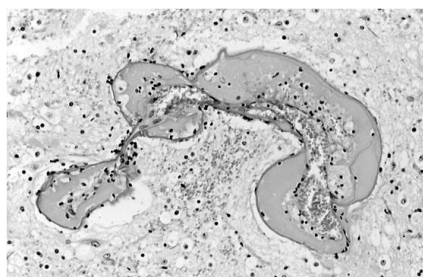


Fig.6

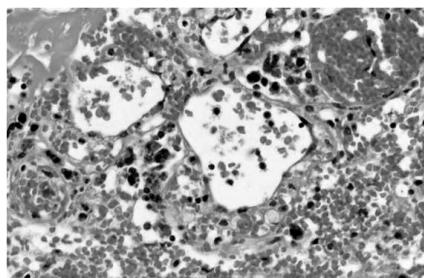


Fig.7

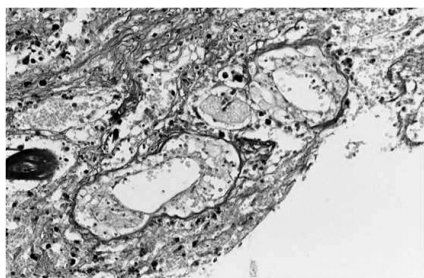


Fig.8

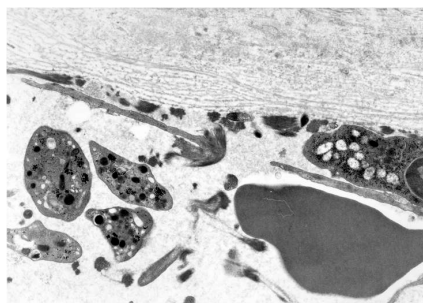


Fig.9



## Stapling technique による結腸直腸吻合と術後排便障害における 臨床生理神経学的検討

松 岡 弘 芳 正 木 忠 彦 杉 山 政 則

跡 見 裕

杏林大学医学部外科学

### 背景・目的

直腸癌術後の排便障害影響因子として、低位吻合、新直腸容量の減少などが主として報告されている。Stapling technique (ST) による腸管吻合は、直腸癌における括約筋温存手術で広く用いられているが、肛門からの挿入に伴う肛門括約筋の損傷や術後の便失禁が危惧される。直腸癌症例では、術後に多くの因子が排便に影響するため純粋に ST が術後排便にどの程度の影響を与えているか臨床的には未だ不明である。今回、我々は ST を施行した S 状結腸癌手術例を用いて、術後排便機能への影響を明らかにすることを研究の目的とした。

### 対象・方法

2007 年 12 月から 2008 年 12 月まで当科において術前・術後に臨床・機能評価を施行された ST 吻合 S 状結腸切除術を施行した 15 例 (ST 群) を対象とした。手術は自律神経を温存した S 状結腸切除術を行い ST 吻合を行った。臨床因子の評価は排便に関する患者質問票を用い、排便機能の評価は排便に関する患者質問票を用い、排便回数、性状、便失禁の有無などについて質問した。失禁スコアは Wexner's score を用い、直腸肛門内圧検査は StarMedical 社製のトランスジューサーを用いた。測定は water perfusion type カテーテルによる station pull through technique にて行なった。陰部神経伝導速度 (PNTML) は Dantec 社製 Nicolet Viking IV に St.Marks 電極にて計測し、肛門括約筋伸展に関する神経への影響を検討した。患者質問票、肛門内圧検査および PNTML は

術前、術後 1 ヶ月、6 ヶ月の時点で施行し、同時期に同様の機能評価を施行した手縫い吻合の S 状結腸切除例 (非 ST 群) 11 例と比較した。

### 結果

年齢・性別・腫瘍病期などの背景因子に関して両群で有意差を認めなかった。患者質問票における術後排便への主観的反応では術後 1 ヶ月・6 ヶ月の時点で両群で有意差ないものの、非 ST 群では 11 例中 9 例 (82%)、ST 群 15 例中 14 例 (93%) が排便に関して“満足”であるとの返答であった。一日排便回数は両群において術前と比べ有意に増加していたが (1 vs. 2/day:  $p<0.05$ )、便失禁の出現、排ガスとの区別、排便の保持可能に関しても両群で有意差を認めなかった。術後 1 ヶ月の肛門内圧検査では、ST 群と非 ST 群間において、平均安静時肛門内圧 (32 vs. 28 mmHg: n.s.)、最大収縮時肛門内圧 (92 vs. 83 mmHg: n.s.) で、術後 6 ヶ月目では平均安静時肛門内圧 (32 vs. 46 mmHg: n.s.)、最大収縮時肛門内圧 (116 vs. 75 mmHg: n.s.) と両群で有意差を認めず、経時的変化も有意なものとは認めなかった。PNTML では、ST 群と非 ST 群とも術前から術後 6 ヶ月まで、右側 PNTML 2.0~2.6 msec., 左側 PNTML 2.2~2.5 msec. と両群間で有意差および手術前後の変化も認められなかった (Table 1~4)。

### 結語

ST は術後早期排便機能に影響しないと考えられた。

**Table 1. Background findings.**

	Hand-sewn (11)	DST (15)	p
Age (median)	67	68	n.s.
Sex (M/F)	6 / 5.	11 / 4.	n.s.
Depth of tumor invasion (TNM's T satage) T1/T2/T3/T4	2/1/7/1	3/1/11/0	n.s.
Lymph node metastasis	2	5	n.s.
Postoperative complications			
Anastomotic leak	0	0	n.s.
Anastomotic stricture	0	0	n.s.

n.s.: not significant

**Table 2. Clinical findings.**

	Hand-sewn (11)	DST (15)	p
Preoperative data			
Frequency of dauly bowel movement	1	1	n.s.
Soiling or urgency (no. of cases)	0	0	n.s.
Wexner's score	0	0	n.s.
Postoperative data (1 month)			
Frequency of daily bowel movement	2 *	2 *	n.s.
Soiling or urgency (no. of cases)	0	0	n.s.
Wexner's score	3 *	2 *	n.s.
Postoperative data (6 month)			
Frequency of bowel movement	2 *	2 *	n.s.
Soiling or urgency (no. of cases)	0	0	n.s.
Wexner's score	2 *	3 *	n.s.

\* : p&lt;.05 (vs. pre-operative values)

n.s.: not significant

**Table 3. Manometric findings.**

	Hand-sewn (11)	DST (15)	p
Preoperative data			
Mean resting pressure (mmHg)	39	40	
Mean squeezing pressure (mmHg)	91	92	n.s.
Sensory threshold (ml)	35	27	n.s.
Rectal capacity (ml)	132	91	n.s.
Postoperative data (1 month)			
Mean resting pressure (mmHg)	28	32	n.s.
Mean squeezing pressure (mmHg)	83	92	n.s.
Sensory threshold (ml)	18	25	n.s.
Neorectal capacity (ml)	97	110	n.s.
Postoperative data (6 months)			
Mean resting pressure (mmHg)	46	32	n.s.
Mean squeezing pressure (mmHg)	75	116	n.s.
Sensory threshold (ml)	27	23	n.s.
Neorectal capacity (ml)	153	120	n.s.

\* : p&lt;.05 (vs. pre-operative values)

n.s.: not significant

**Table 4. Pudendal nerve terminal motor latency.**

		Hand-sewn (11)	DST (15)	p
Preoperative data				
	Left (msec.)	2.4	2.5	n.s.
	Right (msec.)	2.6	2.3	n.s.
Postoperative data (1 month)				
	Left (msec.)	2.4	2.3	n.s.
	Right (msec.)	2.5	2.2	n.s.
Postoperative data (6 months)				
	Left (msec.)	2.0	2.4	n.s.
	Right (msec.)	2.2	2.5	n.s.

\* :  $p < .05$  (vs. pre-operative values)

n.s.: not significant

## ポドサイト細胞生物機能に関わる 中性アミノ酸トランスポーターファミリーの役割

楊 國 昌

杏林大学医学部小児科学

### 背景と目的

糸球体ポドサイトの細胞特性は、分裂増殖能を有しない高度に分化した上皮細胞として言及できるが、その詳細な細胞生物機能のしくみは未だ不明である。細胞機能の恒常性維持には、十分なエネルギーとともにタンパク合成系に必須なアミノ酸の存在が必要不可欠である。さらに最近、細胞内へのアミノ酸流入を契機とする細胞の肥大・増殖・分化を制御する新たな細胞内伝達系 (Mammalian Target of Rapamycin, mTOR1 and 2) の存在がクローズアップされてきている。本研究では、糸球体およびポドサイトにおけるアミノ酸輸送系の存在とその役割について検討することを目的とした。

### 方法と結果

検討対象のアミノ酸輸送系の分子は、その機能特性として基質選択性の広い輸送系 L アミノ酸トランスポーター (LAT) ファミリーとした。ヒト腎皮質とヒト腎からの単離糸球体を材料に、酵素抗体法による免疫染色、RT-PCR, Western blot 法を用いて、LAT1, LAT2, LAT3 の存在および局在について検討した。その結果、蛋白レベルで LAT1 は糸球体には存在しない、LAT2 はポドサイトとボウマン嚢上皮に発現、LAT3 は糸球体ポドサイトに特異的に発現することが判明した (図 1)。特に LAT3 の細胞内局在は、免疫電顕により、ポドサイト足突起のボウマン腔側細胞膜に同定された。そこで、各 LAT2 と LAT3 の糸球体での存在意義について各々仮説を立てて研究を進めた。まず LAT2 については、1) ボウマン嚢上皮での存在が明らかになったこと、2) LAT2 は近位尿管での強発現はすでに判明していること、3) ボウマン嚢上皮と近位尿管細胞の由来は同一であることから、難治性糸球体疾患である急速進行性腎炎の主病変すなわち半月体形成に関与するという仮説を立てた。そこで

紫斑病性腎炎と IgA 腎症での LAT2 とその機能リガンドである 4F2hc の発現を検討したところ、半月体部位での両分子の強発現を認めた。さらにラット半月体形成性腎炎を作成し、単離糸球体を材料に LAT2 とそのリガンド 4F2hc の mRNA と蛋白発現を RT-PCR と Western blot 法で各々検討した。その結果、半月体形成に先立つピークを示す明らかな両分子の発現増加を認めた (図 2)。興味深いことに、mTOR1 リン酸化はこの両分子の発現に先行してみられた。さらに、LAT2 強制発現細胞を用いた検討で、LAT2 依存性に mTOR1 signaling が誘導されることが明らかになった。次に LAT3 については、ヒト胎児腎での発現は、S-shape 期糸球体ですでに発現がみられた。Zebrafish での LAT3 antisense による knockdown morphant は、著しい糸球体基底膜の未熟性と相まって顕著な糸球体形成不全の像を呈した (図 3)。その機序を探るために、飢餓マウス糸球体での LAT3 の動向、mTOR2 を介するアクチン関連分子、ポドサイト形態について、摂食マウスと比較検討した。飢餓マウスのポドサイトでは、足突起の顕著なボウマン腔側への伸張とそれに伴う胞体の平坦化がみられた。これに伴い LAT3 の発現は増加し、アクチン関連分子 (シナプトポジン) の細胞膜から細胞質への変位がみられた。

### 考察と今後の課題

LAT2 は通常ではポドサイトとボウマン嚢上皮に発現しているが、その細胞膜停滞に必要なリガンド 4F2hc が殆ど存在しないため機能しないと推測された。半月体形成性腎炎では、糸球体基底膜構造の破綻による血漿成分のボウマン嚢上皮刺激が、まず mTOR1 リン酸化を介した LAT2 と 4F2hc の induction を促し、これが血漿分岐アミノ酸を同細胞内に輸送することにより、mTOR1 系をさらに促進し、結果的に細胞増殖へと進展させることが示

唆された。また、LAT3 については、飢餓では血漿アミノ酸が増加することが判明しており、従ってボウマン腔のそれも増加することが推測される。飢餓では、増加したボウマン嚢内（原尿）のアミノ酸が、ポドサイト足突起細胞膜上の LAT3 を介してポドサイト内へ輸送されることが推測される。今回の飢餓での足突起の顕著な形態変化や、Zebrafish LAT3 morphant の結果から、アクチ

ン系の dysorganization によることは明らかである。これは、LAT3 を介したアミノ酸流入が、アクチン系制御作用を発揮すると判明している mTOR2 を刺激したことが強く示唆された。

(以上の結果の一部は、J Am Soc Nephrol 2009 Jul;20(7):1586-1596 に掲載された)

図1

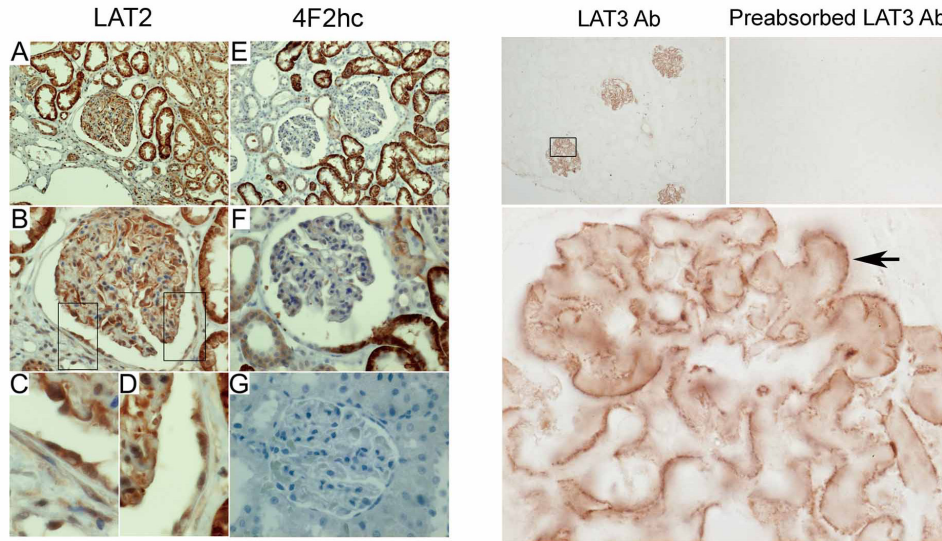
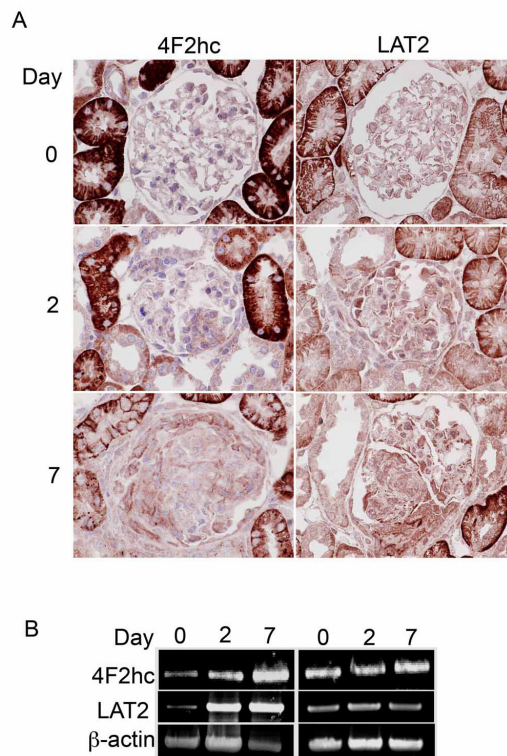


図2



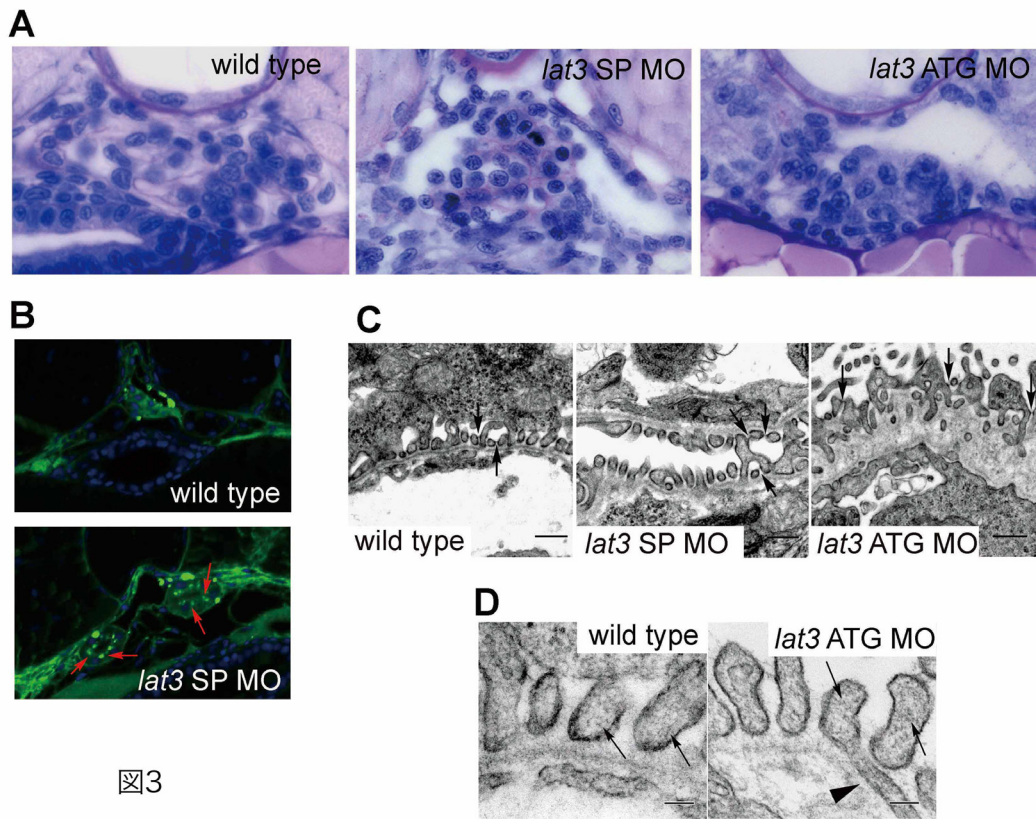


図3