

画像診断による治療評価（Fusion 造影超音波、三次元造影超音波、画像ソフトなどによる治療前後での DICOM data を用いた三次元的な治療評価）が重要であると考えられる。

P2-18.

セラミド蓄積を伴うネクロシスは抗酸化剤またはカテプシン B 活性阻害剤によりレスキューされない

(医学部医学科 3 年)

○伊東 里奈、○金子奈穂美

(医学部医学科 5 年)

宮内 博基

(生化学)

森谷 昇太、風間 宏美、山根 基輝

これまで、細胞内セラミド (Cer) 含有量上昇とアポトーシスとの関係は多く報告されている。しかし、その上昇とネクロシスとの関係の報告は少ない。最近、高いサバイビン発現量を有することでカスパーゼ依存性アポトーシス過程が阻害されている A549 細胞を用いて、セラミド代謝阻害剤・2 剤併用により誘導されるパルミトイル (C16: 0)-Cer 含有量上昇とネクロシス過程の解析の報告が行われた。そこでは、2 剤併用系にて、Cer 合成酵素 5 の発現を伴う C16: 0-Cer 蓄積、cathepsin B の遊離、ライソソームのアルカリ性化、その後のネクロシスと急速なスフィンガニン (d18: 0) の合成・蓄積が起こった。この度の自主研究では、これらの現象が酸化的ストレスまたは Cathepsin B 活性に依存するかどうかを検討した。

【方法】 2 剤併用系として DL-PDMP 200 μ M と D-NMAPPD 65 μ M の同時添加を、2 剤併用系への効果を調べる為に、N-acetyl-L-cysteine または Cathepsin B 活性阻害剤 (CA074Me) の添加を行った。ネクロシスとアポトーシスの判定は 7-AAD と Annexin V による染色、ライソソームの安定性は acridine orange による染色と細胞質への cathepsin B の遊離から調べた。誘導・蓄積される Cers と d18: 0 含量は RPLC-APCI-MS にて調べた。

【結果】 2 剤併用系にて C16: 0-Cer 蓄積が顕著に起こり、添加 2-3 時間後には cathepsin B の遊離とライソソームのアルカリ性化が観察された。その後、

顕著なネクロシスと急速な d18: 0 の合成・蓄積が見られた。その系への N-acetyl-L-cysteine または CA074Me は何れも有意な効果を示さなかった。

【考察】 2 剤併用系におけるライソソーム膜透過性 (LMP) と C16: 0-Cer と d18: 0 の蓄積およびネクロシス誘導は ROS や Cathepsin B 活性に依存しない現象である。ミトコンドリア外膜におけるセラミドチャンネル形成と同様に、ライソソーム膜でも同様のチャンネル形成を想定することができるかもしれない。

P2-19.

Cord Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cell Function is Disrupted in Congenital Diaphragmatic Hernia

(社会人大学院博士課程 4 年分子病理学、国立成育医療研究センター周産期・母性診療センター新生児科、生殖・細胞医療研究部)

○藤永 英志

(国立成育医療研究センター生殖・細胞医療研究部)

藤永 裕子、梅澤 明弘

(国立成育医療研究センター周産期・母性診療センター 新生児科)

伊藤 裕司

(分子病理学)

黒田 雅彦

Vascular growth is necessary for normal lung development. Although endothelial progenitor cells (EPCs) play an important role in vascularization, little is known about EPC function in congenital diaphragmatic hernia (CDH), a severe neonatal condition that is associated with pulmonary hypoplasia. We hypothesized that the function of endothelial colony-forming cells (ECFCs), a type of EPC, is impaired in CDH. Cord blood (CB) was collected from full term CDH patients and healthy controls. We assessed CB progenitor cell populations as well as plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) and stromal cell-derived factor 1 α (SDF1 α) levels. CB ECFC growth kinetics, migration, nitric oxide (NO) production, tube formation, and mRNA expression of VEGF-A, fms-related tyrosine kinase 1 (FLT1), kinase insert domain

receptor (KDR), NO synthase 3 (NOS3), SDF1, and chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4) were also assessed. Compared with controls, CB ECFCs were decreased in CDH. CDH ECFCs had reduced potential for proliferation and migration. Their capacity for NO production was enhanced but response to VEGF was blunted. Total length of capillary-like structures in the tube formation assay was not significantly different between study groups. There was no difference in plasma VEGF and SDF1 α concentrations and ECFC mRNA expression of VEGF-A, FLT1, KDR, NOS3, SDF1, and CXCR4 between CDH and control subjects. In conclusion, CB ECFC function is disrupted in CDH, but these changes may be caused by mechanisms other than alteration of VEGF-NO and SDF1-CXCR4 signaling.

P2-20.

肺線維症に対する miR-29b 補充療法

(社会人大学院博士課程3年分子病理学)

○山田 侑子

(分子病理学)

高梨 正勝、上田しのぶ、黒田 雅彦

(動物実験センター)

須藤カツ子

【背景及び目的】 肺線維症は難治性疾患であり、その治療法は未だ確立されていない。現在までの低分子医薬、抗体医薬などの既存の治療法は患者のQOLが低く、革新的な治療法の開発が望まれている。近年、新たな分子標的医薬品として核酸医薬が注目されているが、生物学的な不安定性と、TLRを介した自然免疫応答の誘起を伴うこと等の問題点により、実用化には至っていない。

これまでの研究から miR-29b は TGF- β 下流の標的分子を抑制することで、肺線維症の治療効果を示すことが報告された。今回我々は、miR-29b を応用した肺線維症治療の実現化を考え、核酸医薬の問題点を克服するために特徴的な二次構造を持つ一本鎖 RNA の開発を行った。本研究では、肺線維症モデルマウスにこの核酸医薬を吸入投与することで、新規の治療法の実現化を目指す。

【方法】 はじめに *in vitro* での miR-29b の効果を調

べるために、マウス線維芽細胞である NIH/3T3 細胞に TGF- β を添加し、同時に miR-29b を遺伝子導入し、24 時間後に細胞を回収した。miR-29b の標的遺伝子である collagen 1a1、collagen3a1 は肺の線維化の評価に重要な遺伝子であり、これらの mRNA 発現を qRT-PCR で解析した。次に、ブレオマイシン誘導性肺線維症モデル動物を C57BL/6J マウスを用いて作成し、miR-29b を点鼻投与した。左肺からは RNA を抽出し、collagen 1a1、collagen 3a1 の mRNA 発現を qRT-PCR によって解析を行った。また、右肺より組織標本を作成し、HE 染色、マッソン・トリクローム染色にて線維症の治療効果を評価した。

【結果】 *in vitro* および *in vivo* での miR-29b 処理により、標的分子である coll1a1 mRNA の有意な発現低下がみられた。また、組織学的な線維化の改善が確認された。

【結語】 一本鎖 miR-29b は肺線維化に対し抑制効果があると考えられた。今後、従来の二本鎖 RNA と相違点に関して検討する予定である。

P2-21.

ゲノム編集技術を用いた、難治性疾患の分子機構解明に向けた検討

(大学院修士課程2年分子病理学、国立成育医療研究センター研究所再生医療センター細胞医療研究部)

○小林 広香

(国立成育医療研究センター研究所 再生医療センター細胞医療研究部)

佐藤 麗、豊田 雅士、梅澤 明弘

(国立成育医療研究センター研究所 システム発生・再生医学研究部)

山下 聡、原 聡史、高田 修治

(分子病理学)

黒田 雅彦

疾患 iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) 研究が著しく発展する中、難治性疾患の病態解明に向けた分子レベルでの研究としてゲノム編集技術が注目されている。毛細血管拡張性運動失調症 (AT) は、免疫不全症や耐糖尿異常、早老症、放射線高感受性、高頻度の腫瘍発生、多臓器にわたる障害が起り様々な