

**P2-09****一酸化窒素の新規シグナル分子 8-nitro-cGMP  
による骨リモデリング調整の解明**

(八王子：歯科口腔外科)

○金子兎太郎、小川 隆

(口腔外科学)

近津 大地

**【目的】** 炎症で産生が亢進する一酸化窒素 (NO) は可溶性グアニル酸シクラーゼを直接活性化し、cGMP 依存的なシグナルを伝える。近年、NO の新規下流シグナル分子として、8-nitro-cGMP が発見された。我々は以前に、8-nitro-cGMP が成長板の軟骨細胞で生成され、骨伸長を促進することを報告した。骨伸長のみならず、骨の形成と吸収からなるリモデリングも NO によって調整されることが知られている。そこで我々は、8-nitro-cGMP の骨リモデリングにおける役割を骨芽細胞、破骨細胞を用いて解析した。

**【方法】** 初代培養マウス骨芽細胞 (OB) は、生後1日齢のマウス頭蓋骨より単離した。また、マウス骨髄細胞を M-CSF 存在下に3日間培養して誘導したマクロファージを、M-CSF および RANKL 存在下に3日間培養することで破骨細胞 (OC) 分化を誘導した。8-nitro-cGMP 特異抗体を用いた免疫染色により OB、OC における 8-nitro-cGMP 生成を検出した。8-nitro-cGMP を添加し OB の培養を行い、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性および石灰化物形成に及ぼす 8-nitro-cGMP の影響を解析した。また、OC への分化に対する 8-nitro-cGMP の効果を酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 活性で評価した。OB、OC ともに分化マーカーの遺伝子発現を定量 PCR で評価した。

**【結果】** OB、OC は、抗 8-nitro-cGMP 抗体によって染色された。培地に添加した 8-nitro-cGMP は、OB の増殖には影響を及ぼさず、ALP 活性の低下と石灰化を抑制した。cGMP の膜透過誘導体である、8-bromo-cGMP は逆に骨芽細胞分化を促進した。8-nitro-cGMP と反応・不活性化させる活性イオウ分子種の生成に必要な酵素 CARS2 をノックダウンしたところ、8-nitro-cGMP 添加と同様の結果が得られた。また、8-nitro-cGMP は OC への分化を有意に促進した。8-nitro-cGMP は、RANKL によって誘

導される破骨細胞分化と RANK の発現を促進した。

**【考察】** これらの結果は、NO 産生が亢進する炎症性の環境下で、8-nitro-cGMP が骨吸収促進と骨形成抑制による骨の脆弱化を引き起こす原因物質の1つである可能性が考えられた。今後、本研究が関節リウマチや歯周病など炎症性骨疾患の治療法の開発につながる可能性が考えられる。

**P2-10****Single molecule imaging reveals a distinct difference in Lck-dynamics between CD4+ and CD8+ T cells**

(免疫学)

○町山 裕亮、若松 英、秦 喜久美

矢那瀬紀子、古畑 昌枝、豊田 博子

横須賀 忠

CD4+ and CD8+ T cells conjugate with APCs and their TCRs recognize the cognate antigens on MHC. We previously demonstrated that clustering of TCRs at the T-APC interface upon antigen recognition, named a “TCR microcluster”, worked as a signalosome for T cell activation. In both CD4+ and CD8+ T cells, Lck associating to CD4 or CD8 translocates to TCR microclusters, and then phosphorylates TCRs and their downstream signaling molecules. It is still unclear whether Lck shows different contributions to TCR signaling in CD4+ and CD8+ T cells. To address this issue, we examined the dynamics of CD4, CD8 and Lck using TIRF microscopy and antigen-presenting lipid bilayers. We then found that CD8 and Lck together formed rigid clusters with TCRs in CD8+ T cells, whereas neither CD4 nor Lck showed specific localization with TCR microclusters in CD4+ T cells. Even in CD4+ T cells, constitutively active mutant Lck (Y505F) translocates into TCR microclusters, indicating that the localization and the dynamics of Lck appear to strongly contribute to TCR signaling. We therefore developed a new system that enables to simultaneously trace the movement of individual Lck molecules and the position of TCR microclusters. Individual Lck molecules showed different types of movement, which were freely mobile outside TCR microclusters or long-

term resident within them. We will quantitatively analyze the dynamics of Lck to be clear the relationship between Lck dynamics and TCR signaling and find the distinct signalosome of Lck contributing for the initiation of CD4+ or CD8+ T cell activation.

### P2-11

#### トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた筋萎縮治療薬スクリーニング

(病態生理学)

○川原 玄理、中屋敷真未、林 由起子

Muscle RING-finger protein-1 (MURF1) は筋萎縮マーカー分子であり、筋特異的 E3 ユビキチンリガーゼとして知られている。筋萎縮の仕組みを明らかにし、筋萎縮を制御可能な薬剤を見いだすため、ゼブラフィッシュ *murf1* の発現レベルを可視化評価可能な *zmurf1*-EGFP トランスジェニックフィッシュの作製を行った。

EGFP cDNA の上流にゼブラフィッシュ *murf1* プロモーター領域を挿入したベクターを、ゼブラフィッシュの受精卵に導入し、トランスジェニックフィッシュの作製を行った。得られたトランスジェニックフィッシュ (F0) を基に新規トランスジェニックゼブラフィッシュ (*zmurf1* Tg: EGFP) を確立した。このトランスジェニックフィッシュでは、心臓と筋肉組織特異的な発現が確認され、その *murf1* の発現パターンは各臓器、発生段階において導入した EGFP 遺伝子の発現パターンと一致しており、ゼブラフィッシュ *murf1* の発現を EGFP の発現でモニターできることが確認された。

また、我々が開発した *murf1* トランスジェニックフィッシュを用いて、筋萎縮を制御するのに有効な薬剤を見いだすため、*murf1* 遺伝子発現を制御する薬剤のスクリーニングを行った。薬剤スクリーニングを行なった結果、複数の *murf1* 遺伝子発現を制御する薬剤を見出した。これらのシース化合物は臨床応用や創薬への重要なヒントになり、筋萎縮の具体的な分子機序の解明にも有用であると考えられる。

### P2-12

#### miR-34 family co-transcriptionally regulates BLU tumor suppressor via binding to antisense novel lncRNA transcribed from promoter locus in non-small cell lung cancer

(分子病理学)

○大野慎一郎、老川 桂生、原田裕一郎  
黒田 雅彦

We focused on the genes whose expression is induced by miR-34a, a potent tumor suppressor miRNA in many cancer types including lung cancer and investigated to elucidate the mechanisms for the tumor suppressor function of miR-34a. As a result, we found that the miR-34a inhibits the proliferation of lung cancer cell through induction of the tumor suppressor BLU (also known as ZMYND10) expression. Interestingly, miR-34a/AGO complex binds to a novel lncRNA included two miR-34a binding sites and expressed from the divergent promoter of the BLU gene in the nucleus. Furthermore, siRNAs-targeting the lncRNA also induced BLU transcription. These results suggest that miR-34a/AGO complex led to induced transcription of tumor suppressor BLU through binding to the lncRNA and inhibits lung cancer development. This non-canonical miRNA pathway seems to control various biological phenomenon including cancer development. Addition, investigation of the phenomenon is important as a starting point for understanding the lncRNA expressed from divergent promoter.