

観察された。また、出生後0~7日までの間にX-gal染色による青色は肺動脈と大動脈側で均等に薄くなり、生後14日の動脈管は青色に染まらなかった。さらに、出生後0~7日のマウスで冠動脈や肺静脈、心房の一部が青色に染色されたが、生後14日のマウスでは青色に染色されなかった。

【考察】胎生満期の動脈管にはEP4が多く発現しており、出生後数日間で減少することが示された。さらに出生後14日間で冠動脈や肺静脈、心房の一部でもEP4発現が変化していることが示唆された。

5-①-3.

腹部大動脈瘤形成におけるVersicanとヒアルロン酸の役割の検討

(細胞生理学分野、横浜市立大学医学部医学研究科救急医学教室)

○廣見 太郎

(細胞生理学分野)

谷藤 章太、横山 詩子

(横浜市立大学医学部医学研究科救急医学教室)

竹内 一郎

【背景】腹部大動脈瘤(AAA)の根本治療は外科的加療に限られ、破裂後に緊急手術となった場合の30日死亡率は28%といまだ高い。我々は血管平滑筋にプロスタグランジンE₂(PGE₂)受容体EP4を過大発現させると、AAAの破裂で全例マウスが死亡することを見出した。そこで、網羅的遺伝子解析を行ったところ、血管平滑筋細胞ではEP4刺激によりVersicanとヒアルロン酸合成酵素(HAS1)が著明に増加していた。Versicanは細胞外基質の構成成分でヒアルロン酸や免疫細胞と結合し、大動脈の弾性の減少や炎症の誘導に関与する可能性が報告されている。

【目的】Versicanとヒアルロン酸のマウスやヒトAAAでの発現を検討する。

【方法】Cre-loxPシステムを使用し血管平滑筋特異的にEP4を過大発現したEP4-TgマウスにアンジオテンシンII(Ang II, 1 µg/kg/min)を投与しAAA疾患モデルマウスとした。AAA疾患モデルマウスの大動脈組織、手術時に採取したヒトAAA組織や非AAA患者の剖検から採取した大動脈組織中のVersicanの発現量を免疫組織染色で評価した。EP4-

Tgマウスの大動脈から血管平滑筋細胞を初代培養し、Versican、Has1のmRNAの発現量を定量的PCRで評価した。

【結果】EP4-Tgマウスから初代培養した血管平滑筋細胞にONO-AE1-329(EP4 agonist)を投与すると時間依存的かつ容量依存的にVersican、Has1のmRNAの発現量が増加した。Sulprostone(EP1, 3 agonist)

とButaprost(EP2 agonist)の投与ではVersican、Has1のmRNAの発現量は増加しなかった。Ang IIを投与したEP4-Tgマウスの大動脈平滑筋層では、Versicanが高発現していたが、同様にAng IIを投与した野生型マウスやAng II非投与のEP4-Tgマウスでは、Versicanの発現は少なかった。またヒトAAA組織で非AAA大動脈組織に比較してVersicanの発現量の増加を認めた。

【結語】大動脈血管平滑筋におけるEP4シグナルは大動脈中膜細胞外基質におけるVersicanとヒアルロン酸を増加させる。この細胞外基質の変化が血管弾性を減少させ、炎症を誘導することによりAAA形成に関与する可能性が示唆された。今後、VersicanやHas1のAAA形成への作用をさらに検討したい。

5-①-4.

一分子動態解析法を用いた抗腫瘍免疫におけるCAR-T細胞活性化の分子基盤

(免疫学分野)

○町山 裕亮、若松 英、矢那瀬紀子

古畑 昌枝、豊田 博子、横須賀 忠

(Baylor College of Medicine)

Mamonkin Maksim, Brenner Malcolm K

がん治療における細胞療法への期待は近年益々高まっており、中でもB細胞リンパ腫に絶大な効果を示すキメラ抗原受容体CAR-T細胞療法は注目を集めている。CAR-T細胞療法は腫瘍細胞を特異的に認識して細胞内シグナルに変換できるように設計されたCAR分子を細胞障害性T細胞(CTL)に発現させる養子免疫療法である。CTLの場合、標的細胞上の抗原を抗原受容体TCRで感知すると、共受容体CD8との相互作用によりLckキナーゼがTCRに移動しTCRをリン酸化することが活性化の

第一段階となる。しかし、CAR・標的分子ともに Lck を引き寄せる機能はないため、CAR 分子が腫瘍細胞を認識してから CAR-T 細胞の活性化を引き起こす分子機構は解明されていない。本研究では抗原提示平面脂質膜と分子イメージングを融合して CAR-T 細胞と腫瘍細胞の接着面における分子ダイナミクスを高解像度で検出できる実験系を用いた。その結果、前回までに第二世代ヒト CD19-CAR-T 細胞が標的分子の CD19 を認識すると CAR 分子の凝集複合体の CAR マイクロクラスターを形成して CAR-T 細胞シグナルのシグナロソームとして機能していることを発表した。本発表では個々の CAR 分子のダイナミクスを追跡するために蛍光一分子イメージング法を用いて動態解析を行った。CAR マイクロクラスター以外では自由運動する一方で、クラスター内での運動は著しく制限されることが分かった。CTL の TCR も同様な挙動を示すが、運動が制限される持続時間が CAR のほうが極端に長いことを見出した。TCR も抗原との親和性が高い場合は共受容体の活性化への寄与が少ないことが分かっている。さらに Lck の挙動を解析すると CAR マイクロクラスターに停滞することを観察できており、CAR 分子の長い停滞時間により Lck の CAR への衝突確率が高くなり細胞内のシグナルへと変換できると示唆される。本成果は CAR 分子の停滞時間の制御により殺傷能が強すぎるといった弱点の克服への有効なエビデンスを示すことができた。

5-①-5.

低酸素周期的加圧培養によるヒト臍帯動脈平滑筋細胞を用いた人工血管の作製

(細胞生理学分野、横浜市立大学医学部産婦人科)

○小嶋 朋之

(細胞生理学分野)

横山 詩子

(横浜市立大学医学部循環制御学教室)

中村 隆、齋藤 純一、石川 義弘

(横浜市立大学医学部産婦人科)

宮城 悦子

【目的】 先天性心疾患の外科的治療では人工血管を用いることが多いが、人工材料は成長しないため、患児の成長に伴い移植部位が相対的に狭窄すること

が問題である。再手術を余儀なくされる患児に対し、成長する人工血管があれば理想的である。我々は血管平滑筋細胞に静水圧を加えることで、細胞から立体構造を構築するために必要なフィブロネクチンの線維形成を促進することを発見した。ラット平滑筋細胞では静水圧を加えることでラット大動脈に移植できる人工血管を作製することに成功したが、ヒト由来の細胞では十分な強度が得られなかった。本研究では静水圧の周期的加圧を低酸素下で行うことで移植に耐えられる人工血管を作製することを目的とした。

【方法】 ヒト臍帯動脈平滑筋細胞 (HUASMC) を播種し 24 時間静置し、低酸素下 (酸素分圧 60 mmHg) で周期的加圧 (110-180 kPa, 0.002 Hz) を加えて培養し、これを繰り返し多層細胞シートを作製した。細胞シートの特性を調べるために張力測定や組織染色を行い、ラットの腹部大動脈に移植した。また RNA シークエンシングや PCR 解析には、1 層の細胞シートを用いた。

【結果】 HUASMC に低酸素下で周期加圧を加えることでより破断応力の高い細胞シートを作製できた。細胞シートを移植したラットは移植後 3 週間、3 ヶ月、5 ヶ月で解剖した。移植した細胞シートの内腔は移植後 3 週間で完全に内皮細胞で覆われていた。ヒト由来細胞は移植後 5 ヶ月で完全に消失し、ラット由来細胞に置換された。また HUASMC を低酸素下で周期的加圧培養すると、低酸素のみや周期的加圧のみよりも乳酸代謝関連の LDHA や PGK1 といった遺伝子発現が亢進していた。さらに複数の TCA サイクルや細胞外基質に関連する遺伝子の亢進が見られた。

【結語】 HUASMC に低酸素下で周期加圧を加えることで、移植可能な細胞シートを作製することができた。HUASMC に低酸素下で周期加圧を加えることで解糖系や TCA サイクルが亢進する可能性が示唆されたが、より強い細胞シートの作製との関連についてさらなる研究が必要である。