

(SLB) と超解像顕微鏡を用いた分子イメージング法による、CD155 結合における DNAM-1 と TIGIT および CD96 との競合関係の解明を目的とした。

【方法・結果】 抗原ペプチド + MHC (pMHC) と CD155 を提示させた SLB 上に T 細胞をのせ、それぞれの分子の挙動を解析した。DNAM-1 と TIGIT の凝集は、pMHC との結合により形成された TCR のクラスター (TCR-MC_s) と共局在したが、CD96 は TCR-MC_s から排除された。次に、SLB 上の CD155 の分子密度を変化させて検討した。TIGIT は CD155 の分子密度に関係なく DNAM-1 のクラスター形成を抑制しなかった。一方、CD96 は CD155 が 200 分子/μm² のとき DNAM-1 クラスター形成に影響を与えず、25 分子/μm² まで低下させると DNAM-1 のクラスター形成を阻害した。CD96 の抑制機能が CD96 の細胞内シグナルによるか、CD96 の細胞内領域欠失変異体 (CD96ΔCy) を用いて評価したところ、野生型 CD96 と同様に CD96ΔCy も DNAM-1 クラスターの形成を抑制した。

【考察】 以上の結果から、細胞表面上の CD155 の発現が比較的少ない腫瘍細胞において、CD96 は DNAM-1-CD155 結合を阻害することで抗腫瘍免疫応答を減弱させる可能性が示唆された。現在、生理的に CD96 が DNAM-1 を介した T 細胞活性化を抑制するか、生化学的手法および細胞の機能解析を用いて評価を進めている。

7-3.

RNA activation の分子機構の解明

(大学：分子病理学分野)

○立石 瑞萌、大野慎一郎、黒田 雅彦

microRNA (miRNA) は 21-25 塩基長の一本鎖 non-coding RNA であり、標的 mRNA の 3'UTR に結合し遺伝子発現を抑制することがよく知られている。一方で、核内の miRNA が転写を誘導する現象 (RNA activation (RNAa)) については報告が少なく、未だに分子メカニズムが不明である。したがって本研究は、RNA activation の分子メカニズムの解析を目的とした。RNAa は、プロモーターに相補的な塩基配列の短鎖 RNA (miRNA, siRNA) が転写/エピジェネティックレベルで標的遺伝子の発現を誘導する現象である。我々はこれまでに、miR-34a 複合体

(miR-34a-AGO2-TNRC6A) が癌抑制遺伝子 ZMYND10 プロモーターから発現する lncRNA に結合し、ZMYND10 の転写を誘導することを明らかにした。本研究においては miR-34a による ZMYND10 mRNA の発現誘導を RNAa の評価系として、RNAa に重要な転写活性化因子の同定を試みた。

核内 AGO2 および TNRC6A の両方に結合する転写活性化因子を解析した結果、DDX21 を同定した。DDX21 は CDK9 と複合体を形成し、転写を活性化することが知られている。DDX21 欠損細胞株および CDK9 shRNA 発現細胞株において miR-34a による ZMYND10 の発現誘導は顕著に抑制された。したがって、核内 miR-34a-AGO2 複合体は ZMYND10 のプロモーターから発現する lncRNA に結合し、CDK9-DDX21 複合体を介してプロモーター上で一時停止している RNA Pol II を解放することにより ZMYND10 の転写を誘導する可能性が示唆された。

7-4.

ミトコンドリア酵素ジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼは胎盤栄養膜細胞の融合を調節する

(大学院博士課程 2 年東京薬科大学：内分泌薬理学教室)

○吉田佳乃子、草間 和哉、安曇 麻奈

吉江 幹浩、田村 和広

(大学：産科婦人科学)

小島 淳哉、小野 政徳、西 洋孝

胎盤は、妊娠の維持に不可欠なホルモン産生器官である。胎盤の主構成細胞である栄養膜細胞は、分化・融合し、母体と胎児間での栄養交換や免疫バリアとして機能する。この細胞融合に異常が生じると妊娠高血圧症候群 (HDP) を発症することが知られている。我々は、最近、HDP 患者の胎盤において変化する因子群を RNA-seq 解析にて網羅的に探索した。その結果、Interferon (IFN)-induced transmembrane protein (IFITM) 発現の上昇、ミトコンドリアに局在するジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ (DHODH) 発現の減少を検出した。抗ウイルス活性を持つ IFITM は、栄養膜細胞の融合を抑制することが報告されている。また細胞融合には細胞膜脂質の構成によって変化する膜流動性も重要である。そこで、本研究では DHODH 活性を決定づけるミト

コンドリア機能および細胞膜流動性に着目して、DHODHの細胞融合とHDPにおける関与を検討した。

融合誘導薬 (Forskolin) を前処置した培養栄養膜細胞株 BeWo に、IFN α , β , γ およびミトコンドリア複合体 I 阻害薬 (ロテノン)、DHODH 阻害薬 (BAY-2402234) を処置した。その後、ミトコンドリア機能および細胞融合を各マーカー因子の発現にて評価した。また細胞膜流動性の変化を免疫染色を用いて解析した。

IFN α , β , γ 処置は、IFITM 発現を上昇させると同時に、細胞融合を抑制した。ロテノンおよび BAY-2402234 処置は、DHODH 発現を減少させると共に、IFITM 発現を上昇させ、細胞融合も抑制させた。IFN 処置は栄養膜細胞の細胞膜脂質の構成を変化させ、細胞膜流動性を減少させた。

以上、栄養膜細胞において、ミトコンドリア傷害は DHODH 活性を阻害し、IFITM 発現を上昇させることが示唆された。また、この時に、膜流動性の低下を伴って細胞融合が阻害されることも明らかにした。DHODH により IFITM が制御されるという報告もあることから、これらの発現変動が HDP 病態に関与していることが示唆された。

7-5.

The Role of Prostaglandin E₂-EP4 Signaling and Fibulin-1 in Intimal Thickening Induced by Vascular Injury

(社会人大学院博士課程4年細胞生理学分野)

○奥村 滋邦

(大学：細胞生理学分野)

奥村 滋邦、谷藤 章太、横山 詩子

(大学：救急・災害医学分野)

奥村 滋邦、本間 宙

(大分大学：医学部先進医療科学科)

加藤 優子

(大分大学：医学部薬理学講座)

佐々木隆子

【Introduction】 The molecular mechanisms of intimal thickening (IT) after percutaneous angioplasty-induced vascular injury (VI) were not fully elucidated. EP4 a Prostaglandin E₂ (PGE₂) receptor promotes IT in fetal

blood vessels via the secretion of multiple extracellular matrices (ECMs).

【Purpose】 We aimed to examine the roles of EP4 signaling and ECM, focusing on fibulin-1 in VI-induced IT.

【Materials & Methods】 We generated EP4 reporter mice (*Ptger4*-IRES-nlsLacZ), vascular smooth muscle-specific EP4 heterozygous deficient mice (*Ptger4*^{fl/+}; *SM22-Cre*), fibulin-1 deficient mice (*Fbln1*^{fl/fl}; *SM22-Cre*), and EP4 overexpressing mice (*Ptger4*-Tg). VI was induced by inserting a guidewire into the femoral artery. X-gal staining, immunohistochemistry, and western blotting were performed for evaluating protein expressions. Protein-protein interaction was assessed by a binding assay.

【Results and Discussion】 EP4 agonist increased fibulin-1 and ECM1 (extracellular matrix protein 1) expression in EP4 overexpressing smooth muscle cells (2.3- and 2.1-fold, $p < 0.05$). Binding of fibulin-1 to ECM1 was confirmed by using recombinant proteins. EP4, fibulin-1, and ECM1 were most abundantly expressed in IT 2 weeks after VI. *Ptger4*^{fl/+}; *SM22-Cre* and *Fbln1*^{fl/fl}; *SM22-Cre* mice had reduced IT area (0.62- and 0.51-fold, $p < 0.01$) at 2 weeks after VI compared to the control. *Ptger4*-Tg increased IT area (2.47-fold, $p < 0.01$) at 2 weeks. These results suggest that the fibulin-1-ECM1 complex induced by PGE₂-EP4 signaling promotes VI-induced IT via cell proliferation.

7-6.

喫煙喘息マウスの気道リモデリングに対するデキサメサゾンとロフルミラストの効果

(茨城：呼吸器内科)

○武田 幸久、中村 博幸、青柴 和徹

(シミックファーマサイエンス株式会社)

高橋 真樹、淵上 淳一

喫煙はステロイド抵抗性と喘息重症化をもたらすリスク因子である。重症喘息では気流閉塞を固定化する気道リモデリングが生じるが、その予防法は確立していない。本研究では、喫煙喘息マウスの気道リモデリングに対するデキサメサゾン (Dex) と PDE4 阻害薬ロフルミラスト (Rof) の効果を比較した。BALB/c 雌マウスを 1) 偽曝露、2) OVA 感作・