

P2-19.

胎生期海馬神経前駆細胞の移動解析

(組織・神経解剖学)

○篠原 広志、佐藤 享、戸田 恵子
石 龍徳
(昭和大学・医・解剖一)
塩田 清二

海馬歯状回の顆粒細胞層のニューロン新生は、大脳新皮質、小脳がそれぞれ胎生期、生後初期において新生を終えるのとは大きく異なり、成体期まで続く特徴がある。この海馬の生涯続くニューロン新生メカニズムは、胎生期からその特徴が続いていると考えられる。神経幹細胞の移動は、顆粒細胞層形成に重要なプロセスであるが、この移動の時空間的パターンはまだよく分かっていない。したがって本研究の目的は、胎生期海馬歯状回の顆粒細胞層における神経幹細胞の移動およびその制御機構を解明することである。具体的な方法としては、まず細胞の移動を可視化するために、子宮内電気穿孔法により、マウス胎児脳の前駆細胞原基周辺の細胞を蛍光タンパク質である GFP によって標識し、数日間発生の進んだ胎児脳固定切片を用いた手法により検討してきた。E14 にて GFP が導入された顆粒細胞原基周辺の細胞が、24h 後には神経前駆細胞のマーカである Tbr2 陽性となり、軟膜側に移動していた。この結果から海馬脳室面の細胞が軟膜側へと移動しながら神経細胞へと分化していくと考えられ、顆粒細胞層の神経細胞新生を担う細胞は脳室面にて誕生し、軟膜側に移動することを裏付けている。その一方で、Tbr2 陰性の radial glia 様の形態を示す細胞も確認された。さらに連続的な経過観察を行い、その結果を報告したい。

P2-20.重症筋無力症患者における末梢 CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞および Th17 細胞と治療効果との関連

(内科学第三)

○増田 眞之、内海 裕也

【目的】 MG 患者の末梢 Th 細胞における Th1、Th2 細胞、CD4⁺CD25⁺ Treg および Th17 細胞と治療効果との関連について検討を行った。

【方法】 対象 59 名：男性 21 名 女性 38 名 (58.4 ± 12.7 歳)。末梢血リンパ球を Th1 細胞が産生する IFN-g および Th2 細胞が産生する IL-4 の細胞内サイトカインをフローサイトメーターにて測定し、Th2 細胞の割合 (%) に対する Th1 細胞の割合 (%) の比を Th1/2 比とした。また、Th17 細胞が産生する IL-17 の細胞内サイトカインをフローサイトメーターにて測定し Th17 細胞の割合 (%) とした。CD4⁺CD25⁺ 細胞表面における GITR 発現量をフローサイトメーターにて測定し、CD4⁺CD25⁺ Treg 細胞の割合 (%) とした。さらに末梢血単核細胞 (PBMC) を分取し、Total RNA の抽出を行った。DNase 処理後、逆転写反応によって得られた cDNA を用いて PCR を行った。CD4⁺CD25⁺ Treg および Th17 細胞におけるマスター遺伝子の mRNA 発現量は $\Delta\Delta$ CT 法により解析した。治療効果判定は 12 ヶ月後に、抗 AChR 抗体価、Quantitative MG Score (QMG) 合計点の変化率を指標とした。

【結果】

1. CD4⁺ 細胞における Th1 細胞の割合は Th0 および Th2 細胞に比べ高値を示した。(p<0.0001) PSL+CaNI 群では、(-) 群と PSL 群に比べて Th1/Th2 比が高値を示した (p=0.04, p=0.03)
2. PSL 群では Th1/Th2 比と、QMG の間に正の相関が認められた。(p=0.012)
3. MG 患者は健常者と比べ Treg 細胞の割合が少なく、過形成胸腺 (p=0.02) あるいは胸腺腫例 (p=0.004) では正常胸腺の患者に比べ低値を示した。
4. Treg 細胞、QMG の間に負の相関が認められた。(p=0.03)
5. RORgt mRNA 発現量、Th1/Th2 比の間に負の相関が認められた。(p=0.014)

6. Th17細胞の増加と、抗AChR抗体価の減少傾向に正の相関が認められた。(p=0.01)

【結語】 CD4⁺CD25⁺T細胞の割合と、臨床症状の改善に正の相関が見られた。一方、Th17細胞はTh1/Th2細胞を介してB細胞における自己抗体産生に影響を及ぼす可能性が示唆された。

P2-21.

PCRアレイを用いたmiRNA profilingの利点と問題点

(医学総合研究所)

○大槻 和重、大屋敷純子

(先端分子探索寄附講座)

梅津 知宏

(内科学第一)

大屋敷一馬

【背景と目的】 miRNAは長さ22塩基前後の短鎖ノンコーディングRNAで、対象mRNAに結合して切断の誘発や翻訳の阻害をすることで抑制的に作用し遺伝子の発現調節を行う機能性RNAである。また、疾患特異的miRNAが存在することから近年バイオマーカーとしても注目されており、本学においても文科省戦略的研究基盤形成事業「分子情報に基づく難病研究拠点形成」を通じて臨床共同研究を展開している。本研究では臨床材料を用いた解析の実用化を目指して、PCRアレイを用いたmiRNA profilingのプロトコル最適化を行った。

【方法】 TLDA (Taqman low-density miRNA array) はリアルタイムPCRシステムを使ったPCRアレイで384ウェルプレートにmiRNAプローブ、および内在性コントロールプローブが搭載されている。このアレイを用いて、推奨プロトコル通り鋳型の前増幅を行い、miRNA profilingを行った。

【結果と考案】 今回の解析では30 ngの鋳型から前増幅を行い、miRNA profilingを行うことが可能であった。しかしながら、内在性コントロール(RNU6B)の増幅は前増幅段階での持ち込み量に応じて増えるのに対してmicroRNAは必ずしも持ち込み量を反映していないこともあり、一部の症例では前増幅を行うことで望ましくないバイアスがかかることが明らかになった。少量の臨床材料を用いた解析では前述の点を考慮した上で解析結果を解釈する

必要があると考えられ、理想的には100 ngの鋳型から前増幅を行わずに解析を行う方がより正確なプロファイリングが可能と考えられた。

P2-22.

CRD (Component – resolved Diagnostics) を用いた口腔アレルギー症候群患者のアレルゲン解析

(専攻生：内科学第三)

○阿部 弘子

(内科学第三)

額賀 優江、新妻 知行、小田原雅人

食物アレルギーに対して現在一般的に行われている粗抽出抗原を用いたアレルギー検査は感度が高いが特異度が低いという欠点がある。アレルゲンコンポーネントに対する特異的IgE抗体測定を行うことによりアレルギー患者の感作状況や臨床病態の把握ができるようになってきている。食物アレルギーの一つである口腔アレルギー症候群(Oral Allergy Syndrome: OAS)患者13例についてImmunoCAP ISAC (Immuno Solidphase Allergen Chip)を用いて103コンポーネントの解析を行い、OAS患者の感作パターンを検討した。OAS患者13例中12例(92.3%)がシラカンバの主要アレルゲンBet v 1、ハシバミのCor a 1.0101に陽性、ハンノキのAln g 1に11例(84.6%)が陽性を示し、これらはPR-10 (Pathogenesis-Related Protein-10) 蛋白である。食物ではバラ科の果物であるリンゴのMal d 1に12例(92.3%)、モモのPru p 1に10例(31.5%)が陽性を示しこれらもPR-10蛋白である。またシラカンバのBet v 2に陽性を示した3例すべてにおいてオリーブのOle e 2、トウダイグサのMer a 1、ラテックスのHev b 8にも陽性を示し、これらはプロフィリンである。

ImmunoCAP ISACの結果よりOAS患者においてPR-10蛋白に感作されている群とプロフィリンに感作されている群に大別されることが示された。コンポーネントレベルで一度に網羅的にアレルゲンを検出できるImmunoCAP ISACは共通抗原性による感作パターンの把握が可能であり、適切な食物除去療法を行う上でも有用と考えられた。