

## 白血病細胞の分化およびアポトーシス誘導の メカニズムに関する研究

松元英理子  
坊垣美也子

杉山 育代  
松田 正文

【背景・目的】ヒト白血病細胞株 HL-60は TPA (12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate) 処理により単球/マクロファージ系に分化してディッシュに接着するが、このとき接着せずに浮遊している細胞の一部がアポトーシスを起こしていることが知られている。一方、TPA により分化した HL-60では、細胞周期促進作用を持つ cyclin D1 と抑制作用を持つ p21 の発現が共に亢進するが、これらについて接着細胞と浮遊細胞を区別した研究は見られない。今回、TPA 処理した HL-60細胞について、接着細胞と浮遊細胞における cyclin D1, p21 及び細胞周期抑制にはたらく p27 の発現について解析した結果を報告する。これらの遺伝子は細胞周期制御が主な機能であるが、アポトーシスへの関与も示唆されている。TPA 処理により分化する細胞としない細胞、アポトーシスを起こす細胞との差異を明確にすることは、白血病の分化誘導療法を理解する上での基礎的データとなる。

【方法】HL-60細胞を TPA 処理し、①吸光度測定による接着細胞定量 ②トリパンブルー法による浮遊細胞中の死細胞率 ③接着細胞と浮遊細胞を分離して cyclin D1, p21, p27 mRNA の発現解析 (GAPDH を内部標準としたリアルタイム PCR 法) を実施した。発現解析はコントロールを 1 とした相対値を求めた。また、④ ELISA 法および FCM によるアポトーシスの定量も試みた。

【結果・考察】HL-60を終濃度0.1~20nMの TPA で24時間処理すると、①細胞の接着は0.5nM から始まり2~20nM で最大となった。②浮遊細胞中の死細胞率は0.2nM から増加し5~20nM で最大となった。

次に20nMの TPA で3、6、12、24時間処理したところ、①②細胞の接着と浮遊細胞中の死細胞率は6時間後から24時間後まで増加した。③遺伝子発現は、TPA 処理3、6時間では接着細胞が少なく発現解析が実施できなかった。cyclin D1 の発現は浮遊細胞では3時間から増加し24時間後には4となり、接着細胞では24時間後で7であった。p21は3時間後から大きく増加し、24時間後の浮遊細胞で426、接着細胞で690となった。p27は TPA 処理による変化は見られず、接着細胞より浮遊細胞の方がやや高い値を示した。

今回の研究で、p21および cyclin D1 では、接着細胞、浮遊細胞共に細胞の接着に先立って発現亢進が見られ、その程度は接着細胞で大きいことが明らかになった。

アポトーシスの定量について2つの方法を試みたが、現在のところ信頼性の高いデータは得られておらず今後の課題である。

## 大学生における生活習慣と体内脂肪の関係

背景と目的：肥満者では内臓脂肪から分泌されるアディポネクチンの分泌不全が起こり、これが冠動脈疾患や2型糖尿病の発症と関連するとの報告がある。当大学での学内実習において普通体型学生にも拘らず超音波検査で肝腎コントラスト+ (脂肪肝が疑われる) の学生を散見する。そこで、①普通体型で内臓脂肪の多い学生の②超音波検査の肝腎コントラストの有無と内臓脂肪との関連性③食生活と内臓脂肪の関連性 について検討した。

対象と方法：学内女子学生51人を対象に体内脂肪の指標として6項目 (BMI 値・肝腎コントラストの有無・腹膜前脂肪厚・腹部脂肪レベル・体内脂肪率・VSR (内臓脂肪面積/皮下脂肪面積比)) を測定し、生活習慣のアンケートと合わせて検討した。機器は超音波検査機器 (Aloka 製) と体組成測定システム (YKCK 製) を使用した。内臓脂肪の推定として、超音波機器による腹膜前脂肪厚と体組成測定システムによる VSR を用いた。なお、内臓脂肪型肥満の診断基準としては腹部 CT による内臓脂肪面積  $\geq 100\text{cm}^2$  が採用されている (日本肥満学会) が、この値は超音波による腹膜前脂肪厚 8mm 以上に相当するとの報告を参考にした。

結果と考察：

1. 対象を、BMI 値18.5未満を痩せ体型、18.5~25.0%を普通体型、25.0%超を肥満体型として分類した。比率はそれぞれ21.6%、72.5%、5.9%であった。

2. 普通体型を、上記6項目中異常を示した項目数によって分けると、0項目異常群24.3%・1項目異常群32.4%・2項目異常群21.6%・3項目異常群13.5%・4項目異常群8.1%であり、5項目異常群は無かった。異常項目が多くなるに従って腹膜前脂肪厚が厚くなり、3項目以上に異常があれば全員が腹膜前脂肪厚  $\geq 8\text{mm}$  となった。VSR は全ての者が基準内であったが、異常項目が多くなるに従って高くなり、3項目以上異常群と0項目異常群とで比較すると3項目以上異常群で有意に高かった。

3. 全体の検討結果からすると、肝腎コントラストの有無だけでは内臓脂肪が多いと断定できないが、腹膜前脂肪厚の異常を加えることで内臓脂肪が多いことを指摘できると考えられる。なお、食習慣と腹膜前脂肪厚には有意差はなかった。

まとめ：

1. 超音波検査で肝腎コントラストを認めた場合、腹膜前脂肪厚を測定することにより、内臓脂肪が多いことを正しく指摘できると考える。
2. 普通体型の者の中に内臓脂肪の多い者が存在する。

## 地域在住高齢者における口腔機能向上プログラム効果と 舌筋力および体力との関連性

泉野 裕美  
澤田美佐緒  
福田 昌代  
畑山千賀子  
野村 慶雄  
重信 直人  
堀 一浩  
井上 誠

澤田 浩秀  
石黒 啓司  
山田 晃司  
西井 一宏

本研究は、舌運動・咀嚼能力・舌筋力 (舌圧) などの口腔機能と、体力との関連性を調査し、口腔の運動機能が低下している恐れがある高齢者の早期発見に繋がる可能性と、日常生活の中で実施可能な口腔機能向上プログラム効果について検討することを目的とした。

調査対象は大阪市内の高齢者支援施設を日常的に利用する60歳以上の高齢者29名 (男性10名、女性19名、平均年齢71.2 $\pm$ 7.3歳) とし、調査内容は体力測定5項目 (開眼片足立ち・動的バランス・長座体前屈・日常生活動作・握力)、口腔内診査、口腔機能評価5項目 (舌の左右運動・舌圧・反復唾液嚥下テスト・オーラルディアドコネシス・咀嚼能力) とした。さらに、口腔機能向上プログラムへの参加希望を表明した対象者13名 (男性3名、女性10名、平均年齢67.6 $\pm$ 4.9歳) に、自宅で行う健口プログラム (舌による頬の押し出しを左右5回・舌ブラシによる清掃・30秒間のぶくぶくがいがい) を指導し、11週間実施した後、再度同様の調査を行った。

結果、体力測定結果および口腔機能評価結果は年齢との相関が認められ、運動機能や口腔機能評価には年齢を考慮する必要があると考えた。また、舌の左右運動・オーラルディアドコネシス・咀嚼能力は、開眼片足立ち・長座体前屈・日常生活動作との相関が認められ、比較的高齢者が気づきやすい体力の低下から、口腔機能についての評価結果を推測できる可能性が示唆された。一方で、舌圧や反復唾液嚥下テストは体力測定結果との関連は認められず、対象者の嚥下機能に低下のみられない場合には変化しにくい項目であると考えた。また、口腔機能向上プログラム参加者13名の介入前後の結果は、舌の左右運動・舌圧・咀嚼能力の項目で有意差が認められ、今回実施した日常生活の中で実施可能な口腔機能向上プログラムは、舌筋力 (舌圧) や舌運動、咀嚼能力の維持向上に効果があることが示唆された。

## ハンチントン病における神経保護因子の発現に関する研究

ハンチントン病 (HD) は、常染色体優性遺伝形式をとる進行性の神経変性疾患であり、精神障害、知能異常、不随意運動などの症状を呈する。HD は、その原因遺伝子 (HD 遺伝子) の5' 領域のエクソン1に存在する CAG リピートが異常に伸長しているため、HD 患者では、それから翻訳される蛋白質であるハンチンチンの N 末端に存在するポリグルタミン鎖が異常に長くなっている。病理学的に、HD は線条体などの神経細胞が選択的に変性、脱落を起こし、神経細胞の核および軸索を含む細胞内に、ハンチンチン N 末端部分を含んだ凝集体が沈着する特徴をもっている。特に細胞核内において、伸長したポリグルタミンが転写因子等と結合するために転写障害が起き、これにより、HD では、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 等の神経栄養因子の発現が低下するなど細胞機能障害を引き起こすことが報告されてきた。研究代表者は、以前に、マウス HD 遺伝子のエクソン1に、ヒト患者由来の伸長した CAG 繰り返し配列を含んだ部分の遺伝子を組み込むことによって、ハンチンチンノックインマウスを作製した。このマウスは、約60週齢以降に、線条体などの神経細胞に抗ハンチンチン抗体陽性の凝集体が観察され、凝集体はマウスの週齢に依存して増加することを報告した。

今回の研究では、マウスの脳凍結切片を用いた免疫組織化学的手法により、ハンチンチンノックインマウスの線条体における神経細胞、アストロサイト、ミクログリアそれぞれに発現する神経栄養因子の変動について、正常マウスの発現と比較した。マウスのそれぞれの細胞における神経栄養因子等の発現を比較するため、各細胞のマーカー (神経細胞: Neu-N、アストロサイト: GFAP、ミクログリア: Iba-1) と神経栄養因子 (BDNF、glia cell line derived neurotrophic factor: GDNF) との二重染色を行い、共焦点顕微鏡 (LSM710, Carl Zeiss) を用い解析した。60週齢および100週齢のマウスについてそれぞれ解析したところ、BDNF および GDNF の発現は、神経細胞およびミクログリアで認められ、アストロサイトでは観察されなかった。これらの神経栄養因子の神経細胞およびミクログリアの発現について、正常マウスとノックインマウスでは明らかな変動は認められなかった。驚いたことに、60週齢のマウスでは、ノックインマウスのミクログリアの数は正常マウスと比較して減少した。

ハンチンチンノックインマウスの線条体神経細胞に凝集体が形成される時期にミクログリアが減少したことは、ポリグルタミンによる凝集が特にミクログリアに対して抑制的にはたらくている可能性があり、そのメカニズムについて解析する予定である。さらに、正常マウスとノックインマウスの間における神経栄養因子の発現の比較については、リアルタイム PCR も併用し総合的に検討する予定である。