

25. 脳微小血管内皮細胞由来の細胞外小胞表面に存在するフィブロネクチンはオリゴデンドロサイト前駆細胞への小胞取り込みに関与する

大澤 祥^{1,2}, 倉知 正², 山本 華子²

好本 裕平¹, 石崎 泰樹²

(1 群馬大院・医・脳神経外科学)

(2 群馬大院・医・分子細胞生物学)

【背景と目的】 我々はこれまでに大脳深部白質梗塞に脳微小血管内皮細胞 (MVEC; microvascular endothelial cell) を移植することによりオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC; oligodendrocyte precursor cell) が増加し、梗塞巣の縮小と運動機能が改善することを報告した。また、MVEC 由来の細胞外小胞 (EV; extracellular vesicle) が *in vitro* で OPC の生存・増殖を促進させることを報告した。今回、我々は MVEC 由来の EV (MVEC-EV) が OPC の生存・増殖に寄与する分子メカニズムを、タンパク質に着目して解析した。**【材料と方法】** MVEC は成体 (生後 8 週齢) ラットの脳皮質より分離した。OPC は生後 2 日齢のラット大脳皮質から immunopanning 法により調製した。EV は MVEC 培養上清よりエクソソーム分離試薬を用いて調製した。**【結果】** タンパク質量分析および ELISA による解析から、MVEC-EV 表面にフィブロネクチン (FN) が豊富に存在することが明らかになった。FN はインテグリンを介したシグナル経路により OPC の生存・増殖を促進することが知られているが、培養 OPC に RGD ペプチドを添加しても OPC に対する EV の効果に変化は認められなかった。近年、標的細胞における EV の取り込みに FN とともにヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) が関与している可能性が示唆されている。フローサイトメトリーおよびイメージ解析の結果、EV 表面の FN と OPC 表面の HSPG との結合を阻害することで OPC による EV の取り込みが減少し、OPC の生存・増殖促進効果が減弱することが明らかとなった。**【考察と結語】** MVEC-EV 表面の FN は OPC への EV の取り込みに関与し、インテグリンシグナル経路と独立して OPC の生存・増殖に寄与していると考えられる。

26. アデノ随伴ウイルスベクターを用いた神経細胞特異的 NSE プロモーターの解析

篠原洋一郎^{1,2}, 今野 歩¹, 大谷 理了¹

平井 宏和¹

(1 群馬大院・医・脳神経再生医学)

(2 群馬大院・医・眼科学)

【背景と目的】 Neuron-specific enolase (NSE) は神経細胞で特異的に発現している解糖系酵素であり、NSE 遺伝子上流 1.8 kb は神経細胞特異的にプロモーター活性をもつことが知られている。ウイルスベクターと NSE プロモーターを組み合わせることで神経細胞特異的な遺伝子発現が可能になる。しかし、1.8 kb の領域のどこがニューロン特異

性を決めているのか、どこがプロモーター活性に重要なかはよくわかっていない。今回我々はアデノ随伴ウイルスベクター血清型 9 型 (AAV9) ベクターを用いて、NSE プロモーターにおけるプロモーター活性および神経細胞特異性を調節している領域を検討したので報告する。**【材料と方法】** ラットゲノム由来の 1.8 kb NSE プロモーターを 5 末端より A (0.8 kb), B (0.7 kb), C (0.3 kb) の領域に分類し、さらにその下流にあるイントロン 1 の D 領域 (0.5 kb) を含めて様々な長さの NSE プロモーターを作成した。この NSE プロモーター制御下で緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する AAV9 ベクターを作成し、4-5 週齢の野生型マウスの小脳に直接投与して 3 週間後に観察した。**【結果】** オリジナルの 1.8 kb (ABC) プロモーターから A 領域を除いた 1.0 kb (BC) プロモーターはオリジナルの 6.2% のプロモーター活性であった。さらに B 領域を除いた 0.3 kb (C) プロモーターは 1.0 kb (BC) プロモーターと同程度の活性であった。そこで 1.8 kb (ABC) プロモーターから B 領域を除いた 1.1 kb (AC) プロモーターを検討したところ、活性は約 5.7% に減少した。D 領域はプロモーター活性に影響がなかった。免疫染色では 1.8 kb (ABC) プロモーターはプルキンエ細胞と介在ニューロンに GFP が発現していた。1.8 kb (ABC) プロモーターから A 領域、あるいは B 領域を欠損させるとほとんどの小脳領域でプルキンエ細胞への GFP 発現が消失した。一方、介在ニューロンへの GFP 発現は変わらなかった。**【考察と結語】** NSE プロモーターにおいて C 領域は介在ニューロンへの発現を支配しているシス作用領域を含んでいると考えられる。また、C 領域に A 領域および B 領域の両方を加えることでプルキンエ細胞への発現が劇的に上昇しており、A 領域と B 領域は相乗的にプルキンエ細胞への発現に関与していることが示唆された。

27. Quantitative Analysis of Different Chemical Structures of Retained Gadolinium in the Brain of Mouse

A. Adhipatria P. Kartamihardja¹,

Hirofumi Hanaoka¹, Satomi Kameo²,

Hiroshi Koyama² and Yoshito Tsushima¹

(1 Department of Diagnostic Radiology and Nuclear Medicine, Gunma University Graduate School of Medicine)

(2 Department of Public Health, Gunma University Graduate School of Medicine)

【Background & Objective】 Gadolinium-based contrast agents (GBCAs) are particularly useful for detecting aggressive or metastatic brain tumors and vascular lesions. However, recent studies demonstrated that the use of GBCAs, especially linear type, resulting in retained gadolinium (Gd) in various organs, including the brain.

Therefore, we investigated the chemical structure of the retained Gd in various parts of the brain after intravenously administering a single dose of GBCAs in normal mouse.

【Methods】 A single dose of clinically available GBCAs (Gd-DTPA, 5 mmol/kg or Gd-DO3A, 5 mmol/kg) were intravenously administered to five mice of each treated group. 5 mL/kg of saline was intravenously administered to mice of the control groups. Ten days later, samples of the dissected parts of the brain were obtained. Protein extraction reagent were added and further separation was done by chromatogram based on molecular size. Gd concentrations in each sample were quantified using mass spectrometry. **【Results】** After ten days, the residual Gd were found in many forms in both Gd-DTPA and Gd-DO3A group. Some residual Gd were likely in intact form of the administered Gd, while others were bound to different size of proteins. Total Gd concentration of Gd-DTPA and Gd-DO3A were similar. The trace of intact GBCAs was found mostly in the meninges. The exact complex and the Gd concentration from the pellet were not determined.

【Conclusion】 The retained Gd found in the mouse brain after a single dose administration of different type of GBCAs was observed in many forms, including the intact GBCAs. The intact form of GBCA may be slowly eliminated through the meninges and the glymphatic system while the other form may retained longer depend on the chemical structures. Thus, the chemical structure of the retained Gd are crucial for the elimination process of Gd from the brain.

28. 全身性強皮症に伴うレイノー現象・手指潰瘍に対する B 型ボツリヌス毒素局所注入療法の効果・安全性について：ランダム化容量比較試験による検討

関口 明子¹, 茂木精一郎¹, 上原 顕仁¹
藤原千紗子¹, 伊達 佑生², 中村 哲也²
石川 治¹

(1 群馬大院・医・皮膚科学)

(2 群馬大医・附属病院・臨床試験部)

【背景と目的】 全身性強皮症は指定難病であり、皮膚および内臓の線維化、血管障害を特徴とする。レイノー現象は、ほとんどの患者で生じ、指の小動脈の虚血再還流による色調変化と疼痛、痺れを来し QOL の低下をもたらす。手指の虚血が持続すると皮膚潰瘍に至る。我々は、レイノー現象を有する強皮症日本人患者に対して A 型ボツリヌス毒素を注入し、本邦で初めて安全性や有効性を確認した (J Dermatol 2016; 43: 56-62.)。しかし、これまでに B 型毒素の効果を検討した報告はない。そこで本研究では、強皮症に伴うレイノー現象・手指潰瘍に対する B 型ボツリヌス毒素の効果と安全性を検討することを目的とした。 **【材料と方法】** 45 人の患者を無投与群と B 型ボツリヌス毒素を片手全体

で 250 1,000 2,000 単位注入する群の 4 群にランダム化割り付けした (無作為化単盲検試験)。レイノースコア、痛み・痺れ (VAS スケール)、冷水負荷試験にて、治療開始前と 4, 8, 12, 16 週間後に評価した。 **【結果】** レイノー症状の重症度と痛み・痺れは、1,000 2,000 単位群において、無投与群、250 単位群と比較して、投与 4 週間後に有意に改善し、投与 12 週間後まで持続した効果が得られた。冷水負荷後の皮膚温度の回復度も 2,000 単位群において有意に上昇した。手指潰瘍数も 1,000 2,000 単位群にて、無投与群、250 単位と比較して有意な低下がみられた。軽度の筋力低下が 1 例みられたが重大な副作用はみられなかった。 **【考察と結語】** 世界で初めて B 型ボツリヌス毒素の安全性、有効性を示す結果を得た。特徴として、1 回の注射で 3~4 か月間の効果が期待できることが挙げられる。また、既存の治療とは異なる治療機序であり、既存の治療では難治な症例に対する治療効果が期待される。現在、本邦では、B 型ボツリヌス毒素は瘻性斜頸の治療に保険適応があるが、今後、詳細な臨床研究の蓄積によって適応拡大が望まれる。

29. 全身性強皮症の線維化における分泌蛋白質 MFG-E8 の病態的意義の解明

藤原千紗子, 茂木精一郎, 上原 顕仁
横山 洋子, 関口 明子, 荻野 幸子
鳥居 良子, 細井 真理, 石川 治

(群馬大院・医・皮膚科学)

【背景と目的】 分泌蛋白質 MFG-E8 は RGD 配列を介してインテグリン $\alpha V\beta 3/5$ と結合して、アポトーシス細胞の貪食促進作用や血管新生能を示す。本研究では、TGF- β シグナルにおける MFG-E8 の役割と全身性強皮症の線維化における病態的意義を解明することを目的とした。 **【材料と方法】** 強皮症患者由来線維芽細胞を用いて、rMFG-E8 や変異 MFG-E8 蛋白処理による TGF- β シグナルへの影響を検討した。強皮症モデルマウスであるプレオマイシン誘導線維化マウスと tight-skin マウスを用いて、in vivo の線維化に対する MFG-E8 の役割を検討した。 **【結果】** 強皮症由来線維芽細胞において、rMFG-E8 処理によって潜在型 TGF- β 刺激による I 型コラーゲン、CTGF, α SMA の発現亢進や Smad2 のリン酸化が抑制されることを見出した。さらに、RGD を RGE に変異させた MFG-E8 の処理では、潜在型 TGF- β 刺激による I 型コラーゲン等の発現亢進は抑制されなかった。これらの結果より、MFG-E8 がインテグリンとの結合を介して潜在型 TGF- β 刺激による線維化を抑制することが示唆された。MFG-E8 KO マウスではプレオマイシン投与による皮膚と肺の線維化が亢進していた。また、tight-skin/MFG-E8 KO マウスでは、tight-skin/MFG-E8 WT マウスと比較して皮膚と肺の線維化が亢進していた。強皮症患者と健康人の皮膚における MFG-E8 の発現を比較したところ、強皮症皮膚では血管周囲の MFG-E8 の発現が低下しており、また血清 MFG-E8 量も