

56巻 1号 目次

原著:

肺癌患者血清中における癌抑制遺伝子産物 pRB に対する抗体の検出
.....山本唯子他... 1

総説:

酸化ストレスと食品抗酸化物質寺尾純二 ... 13

アミノ酸尿症の分子遺伝学宮本賢一
瀬川博子 ... 19

メサンギウム細胞増殖に関する新たな制御因子と病変抑止に関する研究
.....土井俊夫 ... 25

投稿規定

Vol 56 , No .1 Contents

Original :

Y. Yamamoto, et al. : Detection of anti-pRB antibodies in sera of lung cancer patients 1

Reviews :

J. Terao : Function of dietary antioxidants on the protection against oxidative stress 13

K. Miyamoto and H. Segawa : Molecular biology of aminoacidurias 19

T. Doy : A novel mechanism of growth regulation on mesangial proliferation 25

原 著

肺癌患者血清中における癌抑制遺伝子産物 pRB に対する抗体の検出

山本唯子^{1,3}, 清水英治², 横田雅之¹, 曾根三郎³

¹徳島大学薬学部臨床薬理学講座

²鳥取大学医学部第三内科学教室

³徳島大学医学部内科学第三講座

(平成12年1月20日受付)

最近、様々なタイプの癌患者で癌遺伝子や癌抑制遺伝子が産生する物質に対する血清中の抗体が研究されている。多く研究がなされている癌抑制遺伝子産物 p53 に対する抗体は、いくつかの癌種で早期診断などに有用であると報告されている。今回、我々は癌抑制遺伝子のひとつである retinoblastoma gene の産物 RB タンパク質 (pRB) に対する抗体を肺癌患者血清中から検出し、臨床的因子との相関を検討した。

我が国の肺癌罹患率、死亡率は共に急増して1993年には男性での肺癌死亡数は胃癌死亡数を抜いて第1位を占めるに至っている。肺癌に対する治療は進歩しているものの、その治療成績の向上は遅々たるものがある。肺癌対策は一次予防の禁煙教育と二次予防の肺癌検診による早期発見である¹⁾。実際は X 線写真などで発見された肺癌はかなり進行している場合が多く、癌種によっては完治することが少ないものもある。

肺癌は組織型の違いで大きく分けて小細胞肺癌と非小細胞肺癌の2種類がある。小細胞肺癌 (SCLC; small cell lung cancer) は肺癌の15~20%を占めているが、進行が速く、早期より転移を有することが多いため、切除あるいは胸部照射のような局所療法のみでは予後の改善は得られないことが認められている。その後、SCLC は薬剤に対して高い感受性を有することが示唆され、現在治療の主体は化学療法と考えられているが、治療成績の改善は遅々として進んでいない²⁾。また、腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌は、まとめて非小細胞肺癌 (NSCLC; non-small cell lung cancer) として取り扱われている。日本人の NSCLC は、全原発性肺癌の約85%を占めている。一般的には臨床病期 I, II 期と一部の III A 期に対しては外科的切除術で切除可能である。しかし、大多数

の非小細胞肺癌は、不幸にも臨床的に切除不能の進行癌として発見される。このような進行癌に対しては、外科切除や放射線治療といった局所療法では不十分であり、効果的な全身化学療法を行う必要がある。しかしながら、NSCLC は化学療法に対してその感受性が低いという大きな問題点がある³⁾。肺癌の外来初診時に検査が可能なものは、胸部単純 X 線写真、胸部 CT スキャン、気管支鏡検査、血液検査などがある。血液検査における肺癌の腫瘍マーカーとしては CEA (全ての組織型)、NSE、proGRP (小細胞癌が疑われる場合)、SLX (腺癌が疑われる場合)、SCC、Cyfra21 1 (扁平上皮癌が疑われる場合) などがあり、疑われる組織型に応じて採血する⁴⁾。

RB 遺伝子は最初、小児の眼の癌である網膜芽細胞腫 (retinoblastoma) の原因となる遺伝子として発見されたので、この名がある。網膜芽細胞腫では、ヒトの第13染色体上の q14 辺りが短くなっていることが多く、この部分に存在するある遺伝子が失活すると癌になりやすくなるのではないかと推測されていた。1986年に Dryja と Weinberg のグループが共同研究で初めてクローニングに成功し⁵⁾、その後、急速な展開をみせた。

ゲノム遺伝子は27個のエクソンからなり、約200kbの大きな領域に広がって存在する。ヒト pRB は928個のアミノ酸からなり、分子量は約110kD である⁶⁾。pRB が DNA 腫瘍ウイルスの癌遺伝子産物、すなわちアデノウイルス E1A、ヒト・パピローマウイルス E7 や SV40 large T と結合して失活させられることはよく知られているが、その際、これらのタンパク質との結合に使われる領域は、ポケット A、B と呼ばれる2つの部分であるといわれてきた⁷⁾。pRB リン酸化部位は13~14カ所以上存在すると思われるが (図1)、これにはサイクリン D、E、A などをもつ数種類のキナーゼが関与すると考えら

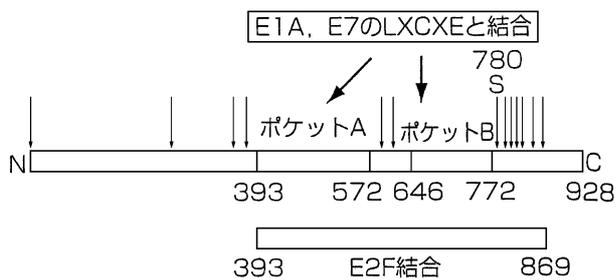


図1 RBタンパク質の構造
矢印は推定リン酸化部位

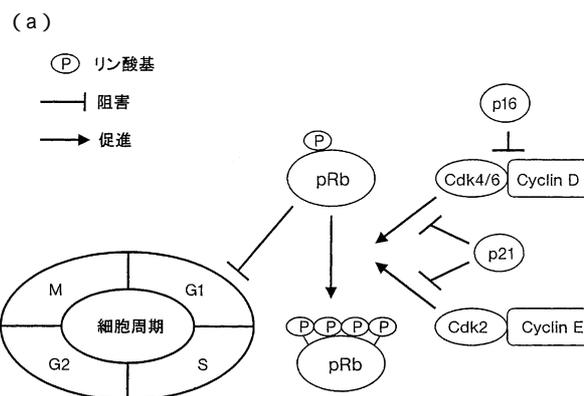
れている⁸⁾。

pRBは半減期が6時間以上の安定なタンパク質で、細胞内の量も多く、ほとんどの組織で発現している。pRBによる増殖抑制能は、主に転写因子E2Fと結合してその活性を抑えることによって発揮されると考えられる。その結合は、pRBとE2Fのリン酸化で調節されている。

また、一般的にpRBとCdkインヒビターであるp16が密接に関係していることが知られている。p16^{INK4a}遺伝子を正常なpRBを発現している細胞に導入するとpRBのリン酸化が抑制され、細胞周期がG1期で停止するが、pRBの機能が失活している細胞に導入しても細胞増殖を抑制することはできない。このことから、p16^{INK4a}はpRBを介して細胞周期を制御しているタンパク質であると考えられている⁹⁾(図2)。

網膜芽細胞腫の他に、肺小細胞癌、乳癌、膀胱癌などの癌でpRBの失活がみられ、これはたいていポケットAかBで起きる(図1)¹⁰⁾。pRBの失活だけなら癌全体の約20%であり、p53の失活(50%)よりも低いが、pRB失活のない癌のかなり多くでp16の失活がみられる。また、p16もpRBも失活していないものでは、サイクリンD1かCdk4の過剰発現などの変異がある場合が多い。したがって、p16サイクリンD1Cdk4pRB(図2)に至る経路のどれかが失活している割合は癌全体の約80%にも達する¹¹⁾。

最近、p16とpRBの発現とサイズの小さい初期の非小細胞肺癌の予後をKawabuchiらが臨床的に検討した報告がなされた。RB、p53、サイクリンD1のタンパク質発現とは相関を示さなかったが、不活化状態のp16と初期の非小細胞肺癌の予後不良に相関があり、RB-/p16-



(a)

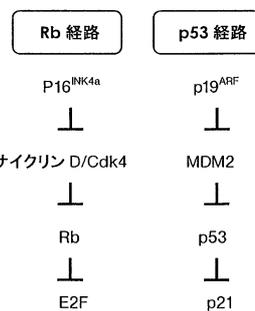


図2 RBタンパク質による細胞周期の制御(a)とRB経路およびp53経路(b)

は最も不良であったと報告している¹²⁾。また、Homuraらによるコホート調査では、pRBやp16のタンパク質発現と非小細胞肺癌患者の5年生存率には有意な差はないと報告されている¹³⁾。

最近、新しい癌の診断方法として、肺癌を含む数種の癌患者で癌遺伝子や癌抑制遺伝子の血清中の微量遺伝子断片による loss of heterozygosity (LOH) の検出^{14,15)}、p16癌抑制遺伝子プロモーター領域のメチル化¹⁶⁾などが検討されている。また、癌遺伝子産物や癌抑制遺伝子産物に対する癌患者血清中の自己抗体が研究されている。主に研究されている癌抑制遺伝子産物p53に対する抗体は早期診断のマーカーとなり、癌診断や経過をモニタリングする際の指標となりうるとの報告もある¹⁷⁻²¹⁾。しかし、ほとんどの報告はここ数年でなされたものであり、癌の種類や対象となる遺伝子が限られているため、今後さらなる検討が望まれている。血清や血漿などの体液を使用する研究が盛んに行われている理由としては、血液中の腫瘍マーカーによる癌診断の利点と同じように、被験者に対して心身の負担および経済的負担が少ないことがあげられる。

本学医学部第三内科では、以前から、大腸菌内で目的

のタンパク質を glutathione-S-transferase (GST) 遺伝子融合系にて発現させ、この組み換えタンパク質を患者血清と反応させる Immunoblotting により、肺癌患者血清中の癌遺伝子産物および癌抑制遺伝子産物に対する自己抗体を検出してきた²²⁻²⁴)。今までの報告では、ほぼ同一の肺癌患者血清を用いて、癌遺伝子産物に対する抗体の抗 L-Myc 抗体 (10%)、抗 c-Myc 抗体 (13%)、また、癌抑制遺伝子産物に対する抗体の抗 p16 抗体 (15%) を検討してきた。これらは健常人からは検出されなかったが、いずれも陽性率が低く、肺癌の診断や臨床的因子との相関性は得られなかった。しかし、患者血清中の複数の自己抗体を調べることで、現在使用されている腫瘍マーカーのように、肺癌の補助的診断、もしくは病状経過のモニタリングの指標として利用できるのではないかと考えられた。

そこで、今回は、肺癌患者血清中の癌抑制遺伝子産物である pRB に対する抗体を検出し、年齢、性別、組織型など臨床的因子との関連性の検討を行った。また pRB は p16 と関連性が深いため、抗 pRB 抗体は検討済みの抗 p16 抗体との関連性があるのではないかと推測された。そこで、抗 pRB 抗体、抗 p16 抗体の陽性率と肺癌患者の臨床的因子の関連性などを中心に検討を行い、臨床的有用性および自己抗体産生に対するメカニズム等を考察した。

材料・試薬および実験方法

患者と血清

肺癌患者血清は国立療養所刀根山病院、高知赤十字病院、徳島県立中央病院および徳島大学医学部附属病院の入院患者92人から採取した。健常人血清は徳島大学在籍のボランティア30人から採取した。また、SLE 患者血清は徳島大学医学部附属病院の入院患者12人から採取した。小細胞肺癌患者26人、非小細胞肺癌患者66人を評価した。事前に化学療法または放射線療法を施した患者は71人、施していない患者は21人であった。

GST 融合 RB タンパク質の発現と精製

GST 融合タンパク質調製用プラスミドの選択

pGEX 3 X, pGEX X 5 3 (wt.RB fusion plasmid), pGEX F 4 1 (mt.RB fusion plasmid) の3種の各プラスミドが組み込まれている大腸菌 (HB101) を LB BROTH BASE TABLETS (SIGMA, Saint Louis, USA)

に ampicillin (50 μ g/mL) を添加した培地にて37 $^{\circ}$ C で一晩振蕩培養した。以下、記す LB 培地には同様に ampicillin (50 μ g/mL) が添加されている。

一晩培養したプラスミド含有大腸菌を 1 : 10 になるように LB 培地にて希釈し、さらに37 $^{\circ}$ C で90分振蕩培養した。その後 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を最終濃度が0.2mM になるように添加し、さらに4時間振蕩培養した。培養した大腸菌を3,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10分間遠心し、上清をデカンテーションにて除去後、沈殿に4 $^{\circ}$ C に冷却した NETN buffer (20mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% Nonidet P 40) を加え、ピペティングにて懸濁した。大腸菌をエッペンドルフチューブに移した後、30秒間超音波処理し、14,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5分間遠心した後、上清のみ採取し -30 $^{\circ}$ C にて保存した。

GST 融合タンパク質の精製

-30 $^{\circ}$ C で凍結保存した GST 融合タンパク質を融解し、ブロッキング処理を施した Glutathione Sepharose 4B beads を25-50 μ L 添加した。その後、4 $^{\circ}$ C にて一晩ローテーションし、ビーズに GST 融合タンパク質を吸着させた。

ローテーション後、14,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10秒間遠心し、上清のみ除去した。沈殿したビーズに4 $^{\circ}$ C に冷やした NETN buffer を加え、ゆるやかに混合した後14,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10秒間遠心し、再び上清のみ除去した。さらに同様の操作を3-5回繰り返し、ビーズを洗浄した。最終的に buffer 部分を除去し、GST 融合タンパク質 + Glutathione Sepharose beads として4 $^{\circ}$ C にて保存した。

GST 融合タンパク質の精製と発現の確認

GST 融合タンパク質 + ビーズに x2 sample buffer [Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Canada), β -mercaptoethanol] を加え、7分間熱した後10% gel (READY GELS J, Bio Rad Laboratories) を用いて SDS-PAGE を行った。染色はクーマシーブルーを用いた。

上記の SDS-PAGE で得られたバンドが pRB であるという確認をするため、Western blotting を行った。電気泳動後のゲル上のタンパク質を nitrocellulose membrane に転写し、5% non-fat milk / 0.1% Tween 20 含有 phosphate buffered saline (PBST) にて室温2時間、または4 $^{\circ}$ C 一晩振蕩しブロッキング処理を行った。

その後、膜を一次抗体 purified mouse anti-human retinoblastoma protein (RB) monoclonal antibody (PharMingen International, Japan) または purified mouse anti-GST monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) を 1 : 1,000 になるように PBS で希釈したものに浸し、4 一晚振蕩した。PBST にて 5 分間 3 回洗浄後、二次抗体 anti-mouse IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep) (Amersham pharmacia biotech., USA) を 1 : 1,000 1 : 2,000 になるように 5 % non-fat milk / PBST にて希釈したものに浸し、室温 1 時間振蕩した。再び、PBST にて 5 分間 3 回洗浄後、暗室で ECL (Amersham International plc., England) 法にてフィルム (FUJI MEDICAL X-RAY FILM, FUJI PHOTO FILM CO., LTD., Japan) に現像した。

Western blotting による血清中の抗 pRB 抗体の検出

各 GST 融合タンパク質 + ピーズに x2 sample buffer を加え、7 分間加熱した後 10% gel を用い電気泳動を行った。電気泳動後のゲル上のタンパク質を nitrocellulose membrane に転写し、5 % non-fat milk / PBST にて室温 2 時間、または 4 一晚振蕩しブロッキング処理を行った。

その後、患者および健常人の血清を 1 : 100 になるように 5 % non-fat milk / PBST で希釈したものに膜を浸し、4 3 時間振蕩した。PBST にて 10 分間 3 回洗浄後、二次抗体 anti-human IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep) を 1 : 2,500 になるように 5 % non-fat milk / PBST にて希釈したものに浸し、室温 45 分間振蕩した。再び、PBST にて 10 分間 6 回洗浄後、暗室で ECL 法にてフィルムに現像した。

結 果

GST - pRB 融合タンパク質の発現の確認

本研究における GST 融合タンパク質の構造を図 3 に示した。X5-3 は野生型 pRB の 379 番目アミノ酸残基から C 末端側の 928 番目までを有し、F4-1 は X5-3 の 706 番目システインがフェニルアラニンに点突然変異を起こした変異型 pRB の構造を有する²⁵⁾ (図 3)。

GST 融合タンパク質を含有する大腸菌の whole lysates と比べ、グルタチオン樹脂にて精製後の GST-pRB は細胞タンパク質が除去されていることが確認された (図 4)。pRB に対するモノクローナル抗体を

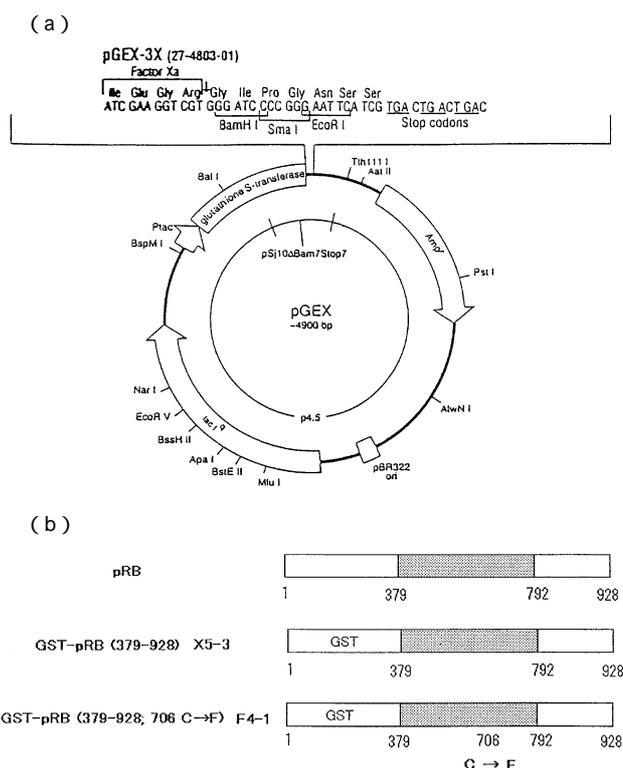


図 3 GST Gene Fusion System の大腸菌ベクター pGEX 3X (a) と GST-RB 融合タンパク質の模式図 (b) a.a. 379-792 は T/E1A-binding region

用いた Western blotting にて確認した結果 (図 5 A), 目的の分子量に GST-RB 融合タンパク質が存在した。

GST 融合タンパク質を用いた血清中の抗 pRB 抗体の検出

肺癌患者 92 人のうち 11 人 (12%) の血清中から GST-pRB に対する抗体が検出された (表 1, 2)。組織型別では小細胞肺癌患者 24 人中 4 人、非小細胞肺癌患者 68 人中 7 人が GST-pRB に対する抗体が陽性であった。対照の健常人 30 人の血清中から GST-pRB に対する抗体は検出されなかった。また GST-pRB に対する抗体陽性の肺癌患者血清中から抗 GST 抗体は検出されなかった。これらの結果から、肺癌患者血清中の GST-pRB に対する抗体は癌抑制遺伝子産物 pRB (アミノ酸残基 379 番目から 928 番目) に特異的な抗体であるといえる。抗原抗体反応の陽性例および陰性例を図 6 B に示した。陽性例の小細胞肺癌患者血清中には 91kD の位置に GST-pRB のバンドがみられるが、26kD の位置に GST のバンドはみられなかった。また、野生型の GST-pRB のバンドのみが検出された例が一例存在した。陰性例の

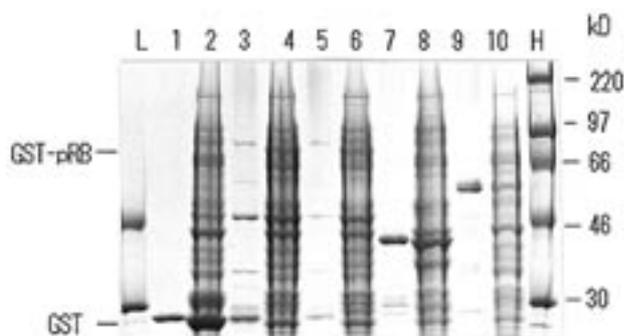


図4 GST Gene Fusion System による GST 融合タンパク質の精製と発現
GST Gene Fusion System によってタンパク質発現させた精製 GST-RB タンパク質, GST-p16タンパク質および GST-c-Myc タンパク質と各大腸菌細胞液を SDS-PAGE 後, クマシーブルーにより染色した像。

L: low molecular weight marker, H: high molecular weight marker
Lane 1 2 .GST (pGEX 3X) : Lane 3 4 .GST-wt.pRB (X5 3) :
Lane 5 6 .GST-mt.pRB (F4 1) : Lane 7 8 .GST-p16 :
Lane 9 ,10 .GST-c-Myc
Lane 1 3 5 7 9 .purified with Guluthione Sepharose beads
Lane 2 4 6 8 ,10 .whole bacterial lysates

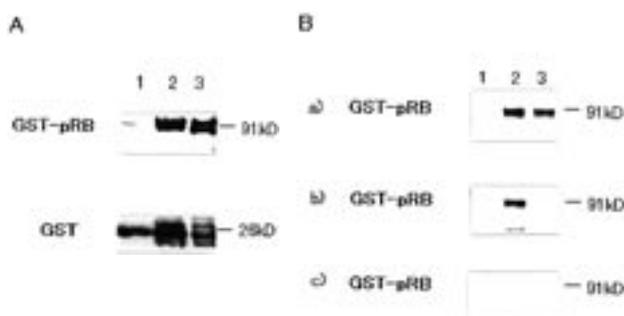


図5 GST-RB 融合タンパク質のモノクローナル抗ヒト pRB 抗体による Western blotting 像 (A) とヒト血清による Western blotting 像 (B)

Lane 1 .GST(pGEX 3X) Lane 2 .GST-wt.pRB(X5 3)
Lane 3 .GST-mt.pRB(F4 1)

(A) 一次抗体にpurified mouse anti-human retinoblastoma protein monoclonal antibody およびpurified mouse anti-GST monoclonal antibody を使用し, 二次抗体は anti-mouse IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody を使用し, Western blotting 後, ECL 法にて現像した。
91kD の位置に GST-RB 融合タンパク質, 26kD の位置に GST の存在が確認された。
(B) a)anti-GST-pRB Ab positive, b)only anti-GST-wt.pRB Ab positive, c)anti-GST-pRB Ab negative
肺癌患者および健康人血清を一次抗体の代わりに使用し, 二次抗体にanti-human IgG,peroxidase-linked species-specific whole antibody を使用し, Western blotting 後, ECL 法にて現像した。

肺癌患者血清, SLE 患者血清および健康人血清中には GST や GST-pRB のバンドはみられなかった。

抗 pRB 抗体と臨床的因子等との相関を調べたところ, Performance Status (PS) において有意に相関がみられた (表 2)。抗 pRB 抗体と抗 p16抗体の両方を測定済

表 1 抗 pRB 抗体と臨床的因子との関係

		Anti-pRB antibody		P-value ^a
		With	Without	
Age	20 70	9	49	0 .169
	> 70	2	32	
Gender	Man	10	61	0 .247
	Woman	1	20	
Performance status	0 1	10	44	0 .020
	2 4	1	37	
Histology	Ad ^b	4	34	(Sm vs other) 0 .408
	Sq ^c	3	22	
	Lg ^d	0	5	
	Sm ^e	4	20	
Stage	I	1	9	(I-III A vs III B-IV) 0 .713
	II	0	2	
	III A	3	14	
	III B	2	15	
	IV	5	41	
Smoking (B.I.)	0 599	3	32	0 .433
	> 600	8	49	
Prior chemo or radiotherapy	with	8	63	0 .708
	without	3	18	

^aFisher's exact probability test; ^bAd, adenocarcinoma; ^cSq, squamous cell carcinoma; ^dLg, large cell carcinoma; ^eSm, small cell carcinoma; 'B.I., Brinkmann index.

表 2 肺癌患者, SLE 患者および健康人血清中の抗 pRB 抗体陽性率

	Anti-pRB antibody		
	With	Without	Positive rate (%)
Normal Volunteer	0	30	0
Lung cancer patients	11	81	12
SLE patients	0	12	0

みの82人中11人が抗 p16抗体陽性であったが, 抗 pRB 抗体と抗 p16抗体共に陽性であった患者は2人であった。また, 抗 pRB 抗体, 抗 p16抗体いずれかが陽性であった肺癌患者は82人中20人 (24 .4%) であった (表 3)。抗 pRB 抗体と第三内科で確認済みの他の自己抗体につ

表3 抗 pRB 抗体および抗 p16抗体と臨床的因子の関係

		Anti-pRB Abs and/or Anti-p16 Abs		P-value ^a
		With	Without	
Age	20-70	14	37	0.408
	>70	6	25	
Gender	Man	14	50	0.317
	Woman	6	12	
Performance status	0-1	14	33	0.187
	2-4	6	29	
Histology	Ad ^b	8	25	(Sm vs other) 0.605
	Sq ^c	4	19	
	Lg ^d	2	3	
	Sm ^e	6	15	
Stage	I	1	8	(I-III vs III-IV) 0.957
	II	0	1	
	IIIA	5	10	
	IIIB	2	14	
	IV	12	29	
Smoking (B.I. ^f)	0-599	9	19	0.239
	>600	11	43	
Prior chemo ^g or radiotherapy	with	16	48	0.808
	without	4	14	

^aFisher's exact probability test; ^bAd, adenocarcinoma; ^cSq, squamous cell carcinoma; ^dLg, large cell carcinoma; ^eSm, small cell carcinoma; ^fB.I., Brinkmann index.

表4 肺癌患者血清中の抗 pRB 抗体と他の自己抗体

	Anti-pRB antibody		P-value [*]
	With	Without	
Anti-p16 Ab	With	9	0.531
	Without	2	
Anti-L-Myc Ab	With	0	0.367
	Without	7	
Anti-c-Myc Ab	With	0	0.331
	Without	6	
ANA	With	6	0.467
	Without	5	

Ab : antibody ; ANA : antinuclear antibody ; ^{*}Fisher's exact probability test.

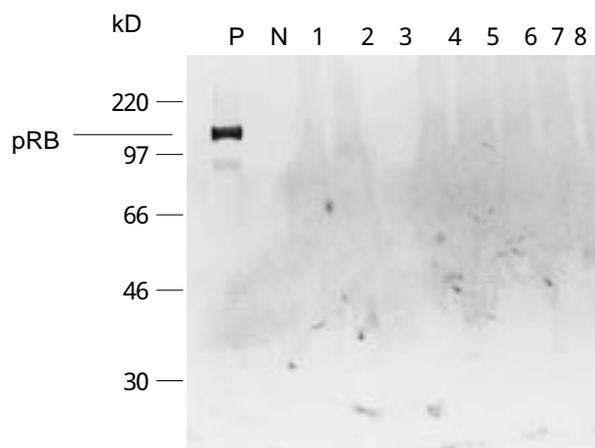


図6 ヒト血清中のRBタンパク質のWestern blottingによる検出結果

P : pRB positive control (non-small cell lung cancer , 50μg of Ma 31 cell lysate)

N : pRB negative control (small cell lung cancer , 50μg of N417 cell lysate)

Lane 1-8 : 10μL of sera from lung cancer patients

各レーンに肺癌患者血清を10μL アプライし、一次抗体に purified mouse anti-human retinoblastoma protein monoclonal antibody を使用し、二次抗体は anti-mouse IgG peroxidase-linked species-specific whole antibody を使用し、Western blotting 後、ECL 法にて現像した。しかし、患者血清中の RB タンパク質は検出できなかった。

いて検討したところ、有意な相関はみられなかった (表4)。

肺癌患者血清中における pRB 抗原の検出

肺癌患者末梢血中に循環している pRB 発現は purified mouse anti-human RB protein monoclonal antibody を用いた Western blotting にて検討した。ヒト pRB に対するモノクローナル抗体を用いて Western blotting を行った場合 positive control である非小細胞肺癌株 Ma 31 (タンパク濃度50μL) 中に存在する pRB は検出されたが、患者および健康人血清中からは血液循環している pRB を検出することはできなかった (図6)。また、条件を変え通常使用している濃度以上に抗体濃度を高くしたり、ECL 液の露光時間を長くしても血清中の pRB は検出されなかった。

考 察

これまで、本学医学部第三内科では、肺癌患者血清中における癌遺伝子産物 c-Myc, L-Myc に対する自己抗

体, および癌抑制遺伝子産物 p16 に対する自己抗体の検討を行ってきた²¹⁻²³⁾。今回は癌抑制遺伝子産物 pRB に対する自己抗体を肺癌患者血清中から検出し, 年齢, 性別, 組織型などの臨床的因子との相関や今までに同一患者血清で確認された自己抗体との相関などについても検討を行った。

GST-pRB 融合タンパク質を用いた血清中の自己抗体検出における検討

組み換えタンパク質の発現方法として用いた GST-Gene fusion system (GST 遺伝子融合系) は, 目的遺伝子 (今回は RB) をベクター上の GST 遺伝子配列の後ろにフレームを合わせて組み込み, IPTG 添加によってタンパク質の発現を誘導し, 大腸菌内で GST 融合タンパク質として大量に発現させる方法である。本研究におけるベクターは第三内科が所持する, 既に RB を組み込んである 2 種類のベクターを使用した (図 3)。実験方法は, 第三内科で以前検討された癌遺伝子産物 c-Myc, L-Myc, 癌抑制遺伝子産物 p16 に対する自己抗体の検出方法²²⁻²⁴⁾を参考にした。

本研究は pRB 自身を詳しく検討する目的ではなかったため, 大腸菌抽出液を調製し, Glutathione Sepharose 4B とサンプル溶液を混合する簡便なバッチ法にて GST 融合タンパク質の精製を行った。抗 pRB 抗体を用いて Western blotting を行ったところ GST-pRB 融合タンパク質発現を確認することができた (図 5 A)。

抗 pRB 抗体の有無を確認するために用いた ECL 法の現像条件は, 以前の自己抗体の検出を参考にして GST-pRB のバンドのみが強く検出されたサンプルを抗 pRB 抗体陽性と判定した。今回の抗 pRB 抗体の検出方法は, 今まで当研究室で検討された肺癌患者の自己抗体の検出方法と統一性を持たせた。また, 同一患者血清を用いた分においては他の自己抗体との関連性なども検討した。

このような血清中の自己抗体を測定するには今回の方法と同様 Immunoblotting を用いたり, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) を用いた報告がなされている²⁶⁾。ELISA 法は p53 タンパク質に対する自己抗体の報告に多い。最近の報告ではカットオフ値をどう設定するか論点を置いた報告もみられるが²⁷⁾, 判断基準は各研究者によってまちまちであるのが現状である。もし臨床的に有用な診断指標となりえるならば,

よりの確な判断基準作りも必要になると考えられる。今回は残念ながら, 肺癌患者血清中に抗 pRB 抗体が検出されるという報告にとどまっており, 判断に関する数値的な検討を行わなかった。

血清中の pRB 抗原の検出方法における検討

今回, Western blotting を用いて検討した結果, 患者および健常人の血清中から pRB 抗原は一例も検出されなかった。たとえ pRB が血清中に存在したとしても, pRB 抗原量がごく微量であったために検出限界外であったといえる。pRB はほとんどの組織の正常細胞中にも存在する安定なタンパク質であり, 最近では筋肉や血球系の細胞では細胞が分化すると pRB の発現量が増加するとの報告がある²⁸⁾。哺乳類や脊椎動物では筋肉の細胞分化が終了する際に, 細胞周期に入るために必要な遺伝子の発現を阻害する pRB が出現し筋細胞が細胞周期に再び入ることを制御する。このことから血清中に pRB が存在し検出できたとしても, 血球系や筋肉の細胞由来の pRB である可能性が推測される。健常人の対照と比較する場合も癌由来特異的な pRB が極微量であれば, それ自身を識別することは困難であると予想される。

疾患と自己抗体について

今回, 我々は肺癌患者血清中の癌抑制遺伝子産物 pRB に対する抗体を検出し, 年齢, 性別, 組織型など臨床的因子との関連性の検討を行った。

肺癌患者 92 人のうち 11 人 (12%) の血清中から抗 pRB 抗体が検出され, PS に有意な相関を示した。しかし, 健常人 30 人の血清中から抗 pRB 抗体は検出されなかった。また, 自己免疫疾患の代表として SLE 患者 12 人の血清を調べたが抗 pRB 抗体は検出されなかった。これらのことから, 抗 pRB 抗体は肺癌患者特異的であると推測される。また, 野生型 pRB にのみ反応した抗体が一例存在した。今回用いた変異型 pRB は点突然変異 (706, C F) を有することから, タンパク質の構造が変化しているために抗原と結合できなかったと考えられる。

肺癌患者血清 92 例のうち, 癌遺伝子産物 c-Myc または L-Myc に対する自己抗体を検討した血清が 64 例 (うち陽性 8 例), また p16 に対する自己抗体を検討した血清が 82 例 (うち陽性 11 例) であった。抗核抗体に関しては検査済みの 65 例中 29 例が陽性であった。しかし, これらの自己抗体と抗 pRB 抗体の間に有意な相関はみられ

なかった。

抗 pRB 抗体と抗 p16 抗体の両方を測定済みの82人中11人が抗 p16 抗体陽性であったが、抗 pRB 抗体と抗 p16 抗体共に陽性であった患者は2人であった。RB 経路 (pRB, p16, cyclin D1) について原発癌を免疫組織学的に調べると、小細胞肺癌は p16 を発現しているが pRB を欠損している例が多く、一方、非小細胞肺癌では RB タンパク質や cyclin D1 を発現しているが、p16 を欠損している、又はその発現が弱い例が多いことが知られている²⁹⁾。癌は RB 経路 (図2) のどこかに異常がある場合がほとんどであり、p16 または pRB のいずれか一方に抗体が産生されていることは十分考えられる。今回の82例の肺癌患者血清においては、p16 および pRB に対する抗体間に有意な相関はなく、これらの抗体を持つ患者と持たない患者間においても臨床的因子との相関はみられなかった。しかしながら、抗 p16 抗体陽性患者と抗 pRB 抗体陽性患者はほとんど重複しておらず、82人中20人 (24.4%) においてどちらかの抗体が陽性であり、単独の抗体を調べたときに比べ陽性率がほぼ2倍になった。このように複数の抗体について調べることで、診断等に利用できる可能性が示唆された。

現在、様々な癌患者において癌遺伝子、および癌抑制遺伝子などの自己抗体が検出されている。特に癌抑制遺伝子産物である p53 に対する自己抗体は大腸癌、乳癌、肺癌などで検討されている^{18, 22, 30)}。ELISA を用いて186人の肺癌患者血清中の抗 p53 抗体を調べた報告では、癌以外の疾患では抗 p53 抗体が検出されなかったが、136人の肺癌患者において16人 (11.8%) が陽性であり、また少数ではあるが検出され得た p53 遺伝子の変異と抗体陽性例では特異的な相関がみられた³¹⁾。また、Chun-Liang Lai らの報告によれば、抗 p53 抗体は肺癌患者の8% (125人中10人) に検出されたが、やはりコントロール血清中からは検出されなかった。抗 p53 抗体陽性例の方が陰性例に比べて生存率が低く、また癌性胸水を持つ51人中9人が抗体陽性であり、抗体の存在は癌性胸水や癌のステージの診断因子となりうるとしている³²⁾。また、抗 p53 抗体陽性肺癌患者16人と抗体陰性肺癌患者16人、計32人を30ヶ月モニターし治療効果との関係を調べた場合、治療中にこれらの抗体力価は急速に且つ特異的に減少しており、癌細胞の核内中のある一定の p53 タンパクレベルが体液性の抗 p53 反応に必要なことを示唆し、抗 p53 抗体が治療に対する反応を調べる有用なツールであると報告している³³⁾。

野生型の p53 をもつ細胞においては存在する p53 タンパク質の量はごく微量であるが、 γ 線や紫外線、あるいはアドリマイシン等の抗癌剤のように細胞の DNA にダメージを与えるものを作用させると、安定化されて量が増加してくる。そして、転写活性化能を持つようになり、G1 期停止かアポトーシスを誘導する。こういったことが引き金となり p53 に対する自己抗体が産生されたとの報告もある³⁴⁾。Zalcman らの報告³⁵⁾にもあるように、一定レベルの p53 量が癌細胞中に存在することが抗体産生と関係していることが考えられる。

さらに、癌患者の血清中の癌遺伝子産物に対する自己抗体発現についていくつかの報告がある。多くの癌では変異した癌遺伝子由来のタンパク質に対して自己抗体が産生されたとの報告がある。例えば、癌遺伝子 ras は特異的な点変異 (コドン12) によって活性化される癌に関係した遺伝子であるが³⁵⁾、大腸癌患者で ras タンパク質に対する抗体が存在するとの報告がある³⁶⁾。

また、乳癌、大腸癌、肺癌などで複数の変異スポットを含む異常な p53 タンパク質に対する抗体が患者血清中から検出されている^{18, 21)}。点変異の他にも、遺伝子の転位が免疫系の攻撃対象となるキメラタンパク質を産生している融解遺伝子の発現を引き起こすこともある。しかし、異常なタンパク質に対する免疫反応の引き金となるのは、根底にある遺伝子異常が原因であるのかということは一般的に分かっていない。Nicole らは肺癌の扁平上皮癌を用い、自己抗体の産生において遺伝子増幅がどのような役割を持っているのかを検討した。肺癌における染色体異常は主に chromosome 3 に位置していることが示され、肺扁平上皮癌の免疫反応性抗原の発現における機能の一つとして、遺伝子増幅があるという可能性が示唆された³⁷⁾。

自己抗体を産生するという点においては自己免疫疾患があげられる。臓器特異的自己免疫疾患は、本来トレランス (免疫学的寛容) になっているはずの、ある臓器にだけ発現している自己の抗原に対してそのトレランスが破綻し、それに対して免疫系が積極的に反応した結果であると考えられる。多くの臓器特異的自己免疫疾患で、臓器抗原特異的な自己抗体が検出されたり、障害臓器または末梢血に臓器抗原特異的な T 細胞が存在することが確認されている。一方、膠原病すなわち全身性自己免疫疾患がこのような免疫反応の延長線上にあるか否かはよく分かっていない。膠原病で検出される自己抗体の標的はほとんどが核内物質 (pRB も含む) や細胞質分子

なので、この場合自己抗体が直接臓器障害を起こしているとは考えにくい。膠原病では自己抗体産生が antigen driven による免疫応答で起こっていると考えられている^{38, 39)}。

今回の肺癌患者血清中の抗核抗体は65人中30人陽性(46.2%)と比較的高値であった。肺癌患者中に自己免疫疾患患者はいなかったため、この結果は高齢者が多いために高値になったと考えられる。自己免疫疾患は p53 や c-Myc と関係したアポトーシスと関連していることが知られている¹¹⁾。また、癌関連の分子に対する抗体で、かつ SLE に特異的な自己抗体としては抗 PCNA 抗体がある。ただし、出現頻度は < 3% であり、疾患との関係はまだ不明である。PCNA は細胞周期の late G1 期から S 期に特異的に核内に増加する分子量 34kDa のポリペプチドよりなる非ヒストン酸性核タンパクであり、このタンパク質が増殖細胞で高い発現を示すことから癌診断のマーカーとして広く用いられている⁴⁰⁾。今回、自己免疫疾患の代表として12人の SLE 患者血清中の抗 pRB 抗体を調べた。PCNA も pRB も細胞周期に深く関わるタンパク質という点では共通であったが、SLE 患者血清からは抗 pRB 抗体が検出されなかった。しかし、母集団を増やせば RB に対する抗体をもつ SLE 患者が存在することが考えられる。この場合、抗 pRB 抗体は癌特異的なマーカーとはなり得ないので、さらなる検討を要するであろう。

今回調査した92人の肺癌患者において臨床的因子と抗 pRB 抗体との関係を調べたところ、Performance Status (PS) と有意に相関を示した。PS が末期癌患者の生存率の主立った診断因子である^{41, 42)}ことから抗 pRB 抗体が生存率に関係することが考えられる。自己免疫疾患においては、年齢と共に発症率が上昇することから、成人の胸腺で少しずつ作られる T 細胞が、その分化の過程でネガティブセレクションが正常に機能しなくなる可能性も考えられる。また、多くの自己免疫疾患において性差がみられることが知られ、性ホルモンの影響が考えられているが、どのようにして発症に関わるのかは明らかにされていない⁴³⁾。しかし、今回の肺癌患者を対象にした抗 pRB 自己抗体の調査では性差において有意な相関がみられず、また年齢が低い患者で抗体陽性率が高い傾向がみられた。肺癌患者と自己免疫疾患患者での自己抗体産生メカニズムは異なると推測される。肺癌において PS および年齢が低い、つまり比較的元気な体を持って

いる患者は、年齢および PS が高い患者に比べて免疫機能が正常に働いていると考えられる。残念ながら今回、研究用に肺癌患者から癌組織を採取しておらず、血清中の抗 pRB 抗体陽性とした癌患者の組織中の pRB 量や RB 遺伝子の変異との関係などについては検討できなかった。しかしながら、抗 p53 抗体に関する報告を基に推測すると、過剰になった RB タンパク質が癌細胞破壊時に放出され正常な免疫系の T 細胞を刺激し、肺癌患者において抗体が産生された一つの仮説を立てることができる。主に小細胞肺癌では pRB が欠損しているといわれるが、全ての小細胞肺癌において pRB が欠損しているわけではないため、抗 pRB 抗体陽性であった小細胞肺癌では pRB が発現していた、もしくは小細胞肺癌以外の組織型を複数もつ癌であったと推測される。今後、原発癌のタンパク質および遺伝子異常等と抗体産生のメカニズムについてさらなる研究の発展が望まれるであろう。

また、最近の報告にある SEREX (serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries) は血清中の IgG 抗体が認識する抗原について癌細胞 cDNA ライブラリーを患者血清でスクリーニングすることにより単利する方法で、細胞の中のタンパクを含めた DNA 発現クローニングである。癌細胞が破壊された場合、そこから遊離した分子に対する抗体もできるだろう、という意見を持つ免疫研究者もいる^{44, 45)}中で、こういった新しい方法により癌特異的な免疫反応を起こす新しい分子が検索され、免疫反応系における機構の解析などが今後さらに進展することが望まれる。

謝 辞

本研究にあたって、終始、御指導、御助言いただきました臨床薬理学研究室の皆様、並びに本学医学部第三内科の皆様から感謝いたします。

文 献

- (1) 西脇裕, 北條史彦, 大松広伸, 永井完: 特集 検診発見癌の特徴と治療の進歩「肺癌」. 癌と化学療法 25: 1486-1492, 1998
- (2) 上岡博, 平木俊吉: 特集 主要臓器進行癌治療「小細胞肺癌」. 癌と化学療法 25: 1655-1670, 1998

- (3) 根来俊一：特集 主要臓器進行癌治療「進行非小細胞肺癌の治療」. 癌と化学療法 25 : 1671-1679, 1998
- (4) 菊池功次, 小林紘一：診断のための検査計画「肺癌」. 臨床医 20 : 186-190, 1994
- (5) Friend, S.H., Bernards, R., Rogelji, S., Weinberg, R.A., et al.: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323 : 16-22, 1986
- (6) Weinberg, R.A.: Tumor suppressor genes. *Science* 254 : 1138-1146, 1991
- (7) Yamashita, T., Segawa, K., Fujinaga, Y., Nishikawa, T., et al.: Biological and biochemical activity of E7 genes. *Oncogene* 8 : 2433-2441, 1993
- (8) Taya, Y.: RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem. Sci.* 22 : 14-17, 1997
- (9) Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D.J., et al.: Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 375 : 503-506, 1995
- (10) Chow, K.N., and Dean, D.C.: Domains A and B in the Rb pocket interact to form a transcriptional repressor motif. *Mol. Cell Biol.* 16 : 4862-4868, 1996
- (11) 田矢洋一, 野島博, 花岡文雄：実験医学別冊 新用語ライブラリー「細胞周期」, 122-123, 1999
- (12) Kawabuchi, B., Moriyama, S., Hironaka, M., Fujii, T., et al.: p16 inactivation in small-sized lung adenocarcinoma: its association with poor prognosis. *Int. J. Cancer* 84 : 49-53, 1999
- (13) Hommura, F., Dosaka-Akita, H., Kinoshita, I., Mishina, T., et al.: Predictive value of expression of p16INK4A, retinoblastoma and p53 proteins for the prognosis of non-small-cell lung cancers. *Br. J. Cancer* 81 : 696-701, 1999
- (14) Sanchez-Cespedes, M., Monzo, M., Rosell, R., Pifarre, A., et al.: Detection of chromosome 3p alterations in serum DNA of non-small-cell lung cancer patients. *Ann. Oncol.* 9 : 113-116, 1998
- (15) Sozzi, G., Musso, K., Ratcliffe, C., Goldstraw, P., et al.: Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis. *Clin. Cancer Res.* 5 : 2689-2692, 1999
- (16) Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D., et al.: Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* 59 : 67-70, 1999
- (17) Crawford, L.V., Pim, D.C., and Bulbrook, R.D.: Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* 30 : 403-408, 1982
- (18) Rainov, N.G., Dobberstein, K.U., Fittkau, M., Bahn, H., et al.: Absence of p53 autoantibodies in sera from glioma patients. *Clin. Cancer Res.* 1 : 775-781, 1995
- (19) Lubin, R., Zalcman, G., Bouchet, L., Tredanel, J., et al.: Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nat. Med.* 1 : 701-702, 1995
- (20) Peyrat, J.P., Bonneterre, J., Lubin, R., Vanlemmens, L., et al.: Prognostic significance of circulating P53 antibodies in patients undergoing surgery for locoregional breast cancer. *Lancet* 345 : 621-622, 1995
- (21) Hammel, P., Leroy-Viard, K., Chaumette, M.T., Villaudy, J et al.: Correlations between p53 protein accumulation, serum antibodies and gene mutation in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 81 : 712-718, 1999
- (22) Yamamoto, A., Shimizu, E., Ogura, T. and Sone, S.: Detection of auto-antibodies against L-myc oncogene products in sera from lung cancer patients. *Int. J. Cancer* 69 : 283-289, 1996
- (23) Yamamoto, A., Shimizu, E., Takeuchi, E., Houchi, H., et al.: Infrequent presence of anti-c-Myc antibodies and absence of c-Myc oncoprotein in sera from lung cancer patients. *Oncology* 56 : 129-133, 1999
- (24) Namikawa, O., Shimizu, E., Sumitomo, K. and Sone S: Analysis of antibodies to p16INK4A tumor suppressor gene products in lung cancer patients. *Int. J. Oncol.* 14 : 681-685, 1999
- (25) Kaelin, W.G. Jr., Pallas, D.C., DeCaprio, J.A., Kaye, F. J., et al.: Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E 1 A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* 64 : 521-532, 1991
- (26) Regele, S., Kohlberger, P., Vogl, F.D., Bohm, W., et al.: Serum p53 autoantibodies in patients with minimal lesions of ductal carcinoma in situ of the breast. *Br. J. Cancer* 81 : 702-704, 1999

- (27) Hallak, R., Mueller, J., Lotter, O., Gansauge, S., et al.: p53 genetic alterations, protein expression and autoantibodies in human colorectal carcinoma: A comparative study. *Int. J. Oncol.*, 12 : 785-791, 1998
- (28) Schneider, J.W., Gu, W., Zhu, L., Mahdavi, V. et al.: Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/-muscle cells. *Science* 264 : 1467-1471, 1994
- (29) Yuan, J., Knorr, J., Altmannsberger, M., Goeckenjan, G., et al.: Expression of p16 and lack of pRB in primary small cell lung cancer. *J. Pathol.*, 189 : 358-362, 1999
- (30) Wollenberg, B., Jan, N.V., Pitzke, P., Reiter, W., et al.: Anti-p53 antibodies in serum of smokers and head and neck cancer patients. *Anticancer Res.*, 17 : 413-418, 1997
- (31) Wild, C.P., Ridanpaa, M., Anttila, S., Lubin, R., et al.: p53 antibodies in the sera of lung cancer patients: comparison with p53 mutation in the tumour tissue. *Int. J. Cancer* 64 : 176-181, 1995
- (32) Lai, C.L., Tsai, C.M., Tsai, T.T., Kuo, B.I., et al.: Presence of serum anti-p53 antibodies is associated with pleural effusion and poor prognosis in lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 4 : 3025-3030, 1998
- (33) Zalcman, G., Schlichtholz, B., Tredaniel, J., Urban, T., et al.: Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment. *Clin. Cancer Res.*, 4 : 1359-1366, 1998
- (34) Angelopoulou, K., Rosen, B., Stratis, M., Yu, H., et al.: Circulating antibodies against p53 protein in patients with ovarian carcinoma. Correlation with clinicopathologic features and survival. *Cancer* 78(10) : 2146-2152, 1996
- (35) Bos, J.: Ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.*, 49 : 4682-4689, 1989
- (36) Takahashi, M., Chen, W., Byrd, D.R., Disis, M.L., et al.: Antibody to ras proteins in patients with colon cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1 : 1071-1077, 1995
- (37) Brass, N., Racz, A., Bauer, C., Heckel, D., et al.: Role of amplified genes in the production of autoantibodies. *Blood* 93 : 2158-2166, 1999
- (38) 藁田清次: 特集 自己免疫疾患診療の最新情報「自己免疫疾患の病因と治療」. *内科* 83 : 127-140, 1999
- (39) 高崎芳成: 特集 膠原病診療の新しい展開「抗核抗体の対応抗原の分子生物学」. *内科* 80 : 15-33, 1997
- (40) Alvarado-de la Barrera, C., Alcocer-Varela, J., Richaud-Patin, Y., Alarcon-Segovia, D., et al.: Differential oncogene and TNF-alpha mRNA expression in bone marrow cells from systemic lupus erythematosus patients. *Scand. J. Immunol.*, 48 : 551-556, 1998
- (41) Allard, P., Dionne, A., and Potvin, D.: Factors associated with length of survival among 1081 terminally ill cancer patients. *J. Palliat. Care* 11 : 20-24, 1995
- (42) Ando, M., Ando, Y., Sugiura, S., Minami, H., et al.: Prognostic factors for short-term survival in patients with stage IV non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90 : 249-253, 1999
- (43) 小安重夫: 「自己免疫疾患とアレルギー」. 実験医学バイオサイエンス新T細胞のイムノバイオロジー. 羊土社, 東京, 1999 pp. 184-188
- (44) 河上裕: 特集 癌ワクチン療法「新しい癌抗原特異的免疫療法」. *Molecular Medicine* 35 : 1100-1119, 1998
- (45) Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., et al.: A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 1914-1918, 1997

Detection of anti-pRB antibodies in sera of lung cancer patients

Yuiko Yamamoto^{1,3}, Eiji Shimizu², Masayuki Yokota¹, and Saburo Sone³

¹ Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Science, The University of Tokushima, Tokushima, Japan; ² Third Department of Internal Medicine, The University of Tottori School of Medicine, Tottori, Japan ; and ³ Third Department of Internal Medicine, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan

SUMMARY

Recently, serum antibodies against the oncogene and tumor suppressor gene products have been studied in patients with various types of cancer. Antibody against p53 tumor suppressor gene product among these antibodies was suggested to be useful for early diagnosis and evaluation of prognosis of patients with some types of cancer. In this article, we review clinical significance of antibodies against product of retinoblastoma gene (pRB), one of representative tumor suppressor genes. We also describe methods of detection of antibodies in sera from patients with lung cancer by immunoblotting assays using glutathione-S-transferase (GST)-RB fusion proteins.

Key words : tumor suppressor gene, pRB, serum, autoantibody, lung cancer

総 説

酸化ストレスと食品抗酸化物質

寺尾 純二

徳島大学医学部栄養学科食品学講座

(平成12年1月19日受付)

食品由来の酸化ストレス防御物質として注目されているフラボノイド類について、その抗酸化活性と構造相関およびバイオアベイラビリティに関わる吸収代謝の経路を検討した。植物性食品に広く含まれているケルセチンは血漿中でグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体として存在すること、少なくともその一部は抗酸化活性を有することをラットを用いた実験で明らかにした。

1. はじめに

酸化ストレスとは生体の酸化 抗酸化平衡 (prooxidant-antioxidant balance) が乱れて酸化側に傾くことをいう¹⁾。生体内で発生する様々な活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) は食細胞の殺菌作用や細胞のレドックス制御などに働くが、酸化ストレス状態になると自らの組織や体液成分を攻撃する。このような酸化的障害が生活習慣病といわれる様々な疾病の発生や進行に関与することが明らかになってきた。一方、酸化ストレスを抑えるための生体内抗酸化システム (Fig. 1) には、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) などの抗

酸化酵素群や金属イオン結合タンパク質群とともに、ビタミンEやビタミンCをはじめとする低分子の抗酸化物質群が含まれる。ビタミンEやビタミンCは食品中の代表的な抗酸化物質であるが、私達が日常摂取する食品にはこれら以外にもカロテノイド類やフラボノイド類など様々な抗酸化物質が存在することが知られている。したがって、疾患予防・健康維持の観点から食品抗酸化物質を食生活に活用することが望まれる。そのためには、生体内抗酸化システムにおける食品抗酸化物質の役割を解明するとともに、食品として摂取した場合の有効性 (バイオアベイラビリティ) を実証する必要がある。われわれの研究室では日常摂取する植物性食品に含まれる成分としてカロテノイド類、フラボノイド類およびフィチン酸を主な研究対象として、これらの課題にチャレンジしている。その中からフラボノイド類に関する最近の研究成果を報告する。

2. 食品抗酸化物質の分類と反応機構

食品に含まれる抗酸化物質は抗酸化機構の面から①フリーラジカル捕捉剤、②一重項酸素消去剤 ③金属キレート剤に分類できる。ビタミンEやビタミンCが主にフリーラジカル捕捉剤として機能するのに対して、カロテノイドは一重項酸素消去剤として働くと考えられる。カロテノイドにもフリーラジカル捕捉活性はあるが、生体内で十分な活性を発揮するかどうかは不明である。一方、フラボノイド類の抗酸化作用はフリーラジカル捕捉と金属キレートの両方で説明される。しかし、溶液中でのフリーラジカル捕捉活性はビタミンEの1/10ないしそれ以下である²⁾。さて、ビタミンCが水溶性であるのに対してビタミンEやカロテノイド類は脂溶性である。したがって、酸化的障害の場として細胞膜やオルガネラ膜あるいは血漿リポタンパクを考えた場合、ビタミ

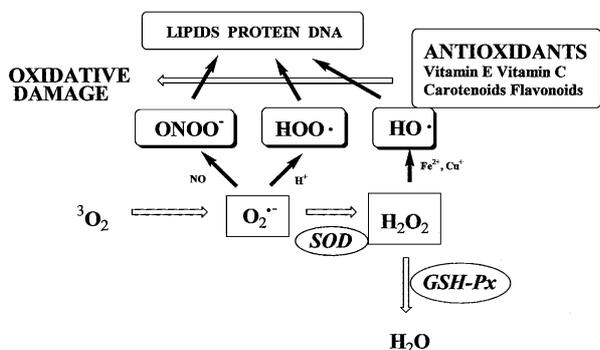


Fig. 1 生体内での活性酸素生成と食品抗酸化物質の役割

ンCは細胞質や血漿中に存在し、水相で発生するラジカル種を捕捉消去すると考えられる (Fig. 2)。脂溶性のビタミンEやカロテノイドは膜脂質二重層やリポタンパク内部に存在し、ラジカル連鎖反応の切断や一重項酸素の消去に関与する。しかし、フラボノイドはビタミンEほど脂溶性は高くないので、ビタミンEとは異なる位置で抗酸化作用を発揮するはずである。*In vitro*で生体膜や血漿リポタンパク質を酸化させると、フラボノイドは強い抗酸化活性を示すことが多い³⁾。これは、極性の高いフラボノイドは界面に存在しやすいために、脂質層内部に埋め込まれるビタミンEよりも界面において効果的に抗酸化活性を発揮するためであると考えられる⁴⁾。

3. フラボノイド類の抗酸化に関する構造活性相関

フラボノイドはジフェニルプロパン構造 (C₆-C₃-C₆) をもつフェノール化合物の総称であり、4,000種以上の存在が知られている。野菜や果実など植物性食品に広く存在するが、その多くは糖が結合した配糖体 (グリコシド) であり、遊離の化合物 (アグリコン) で存在することは少ない。フラボノイドはA環とB環で挟まれたC環の部分の構造から、カルコン類、フラボン類、フラバノン類、フラバノール類、フラボノール類、アントシアニン類に分類できる。いずれにおいても、ラジカル捕捉活性あるいはキレート作用を発揮するのに最も重要な部分構造はB環の*o*-ジヒドロキシ構造 (カテコール構造)

であるといわれている⁵⁾。われわれは、代表的なフラボノールであるケルセチン (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) について、そのメチル化体や配糖体などの各種誘導体の抗酸化活性を溶液⁶⁾やリポソーム膜⁶⁾および血漿リポタンパク質^{7,8)}などの系で検討した。その結果、4'-位が置換された誘導体ではほとんど活性を失うことから、B環の*o*-ジヒドロキシ構造の重要性が確認された (Fig. 3)。一方、3-位が置換されるとラジカルとの反応性が減少するために、ラジカル捕捉活性がやや弱まることがわかった。

4. フラボノイドの生体吸収

フラボノイドの吸収には胆汁酸ミセルへの溶解性が重要であり、配糖体は水溶性のためにミセル化されず、小腸では吸収されにくい。ところが、大腸では腸内細菌の

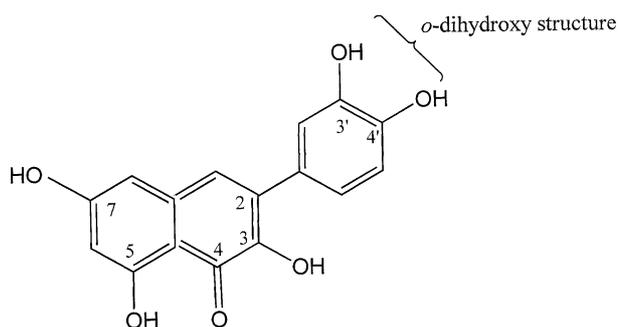


Fig. 3 ケルセチンの構造と抗酸化活性部位

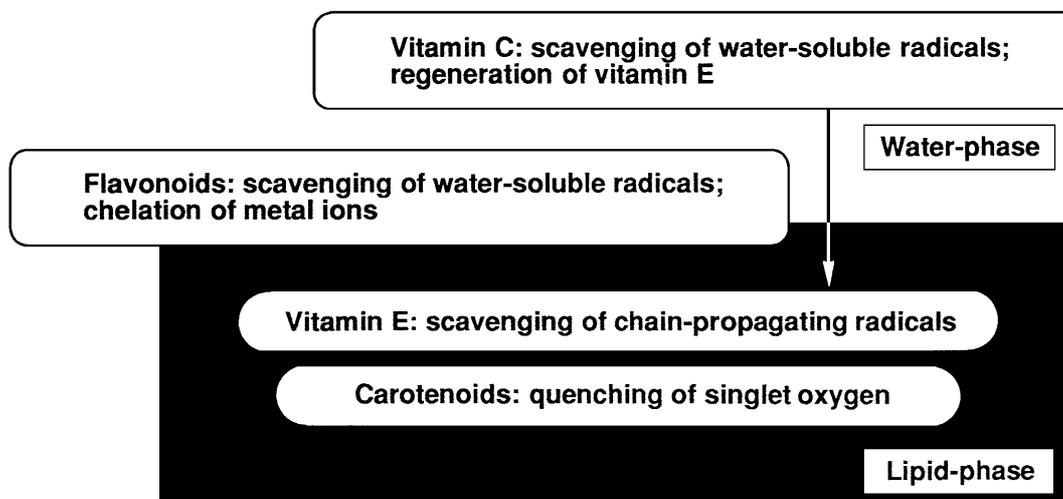


Fig. 2 食品抗酸化物質の抗酸化機構

もつβ グリコシダーゼにより加水分解され、アグリコンとなって脂溶性が高まるために吸収されるといわれる⁹⁾。事実ラットではケルセチンよりもその配糖体であるルチンの吸収は遅いことが示されている¹⁰⁾。しかし、ヒトではアグリコンよりもその配糖体の方が吸収されやすいとの考えがある¹¹⁾。通常の食事をしたヒトの血漿には0.5~1.6μMのフラボノイド配糖体が存在するという報告もある¹²⁾。そこでわれわれは、ごく普通の食品から摂取したフラボノイドの生体への吸収・蓄積量を明らかにすることを試みた¹³⁾。すなわち、ヒトボランティア7名を用いてケルセチン配糖体（主にケルセチン4'-グルコシドと3,4'-グルコシド）に富むタマネギの1週間連続摂取実験を行った（260~360g/day；68~94mgケルセチン相当量/day）。その結果、10時間絶食後において、抱合体加水分解酵素で処理した血漿には0.08~1.87μM（平均0.63±0.72μM）のケルセチンが存在することがわかった。したがって、ケルセチンに富む食事によりヒト血漿には0.1~1.0μM程度のケルセチンが蓄積すると結論した。さらに、ヒト血漿中のケルセチンは遊離型アグリコンや配糖体ではなく、代謝物である抱合体として蓄積することも明らかとなった。

5. フラボノイドの代謝変換経路

腸管から吸収されたフラボノイドは門脈あるいはリンパに移行し、肝臓でメチル化、水酸化などの変換反応とともに、硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体化反応を受けるとされている。ケルセチン、カテキン類、イソフラボン類では、ラットやヒトの血漿あるいは尿中にこれらの代謝物が存在することがすでに報告されている¹⁴⁾。抱合体の一部は肝臓から胆汁にも移行し、さらに十二指腸に排泄された代謝物は、大腸の細菌叢で加水分解や開裂反応を受けて、一部がさらに再吸収される（腸肝循環）。したがって、摂取したフラボノイドの相当量は腸肝循環により代謝物や分解物として血流に存在しうる。われわれは(-)エピカテキンを用いて、ラット各臓器での代謝酵素活性を測定し、メチル化酵素や硫酸抱合体化酵素の活性が肝臓で強いものに対して、グルクロン酸抱合体化酵素（UDP-glucuronyl transferase）活性は小腸や大腸で強いことを認めたと¹⁵⁾。したがって、通常摂取されたフラボノイドはまず小腸や大腸粘膜においてグルクロン酸抱合体へ代謝されたのち、肝臓に輸送されると思われる。次にわれわれはヒト結腸がん由来の培養細胞株であ

るCaco-2細胞を用いたケルセチンの代謝吸収実験を行い、ケルセチンが細胞にとりこまれると同時に抱合体化をうけることを確認した¹⁵⁾。また、ケルセチンアグリコンに比べてその配糖体では細胞にとりこまれにくいことも認めている。したがって、食品から摂取したフラボノイドの大部分は、腸管吸収の過程において、糖が遊離した後代謝変換されて生体内へ移行すると思われる（Fig.4）。

6. フラボノイド代謝物の抗酸化作用

食品として摂取されたフラボノイドの多くが吸収の過程で代謝され、抱合体などの代謝物として血漿中に存在することが明らかになってきた。したがって、フラボノイドの生体内酸化ストレス防御機能を明らかにするためには、吸収後の代謝物の活性を評価する必要がある。そこで、われわれはケルセチン（10mg/kgおよび50mg/kg体重）を投与したラットから血漿を採取し、代謝物の蓄積量と血漿抗酸化活性の変動を測定した¹⁶⁾。その結果、投与1時間および6時間後のラット血漿の銅イオン誘導脂質過酸化反応において、明らかにケルセチン投与量に依存した抗酸化活性の上昇がみられた。これらの血漿にケルセチンは存在せず、ケルセチンおよびイソラムネチン（3'-O-メチルケルセチン）の抱合体がケルセチン摂取量に応じて蓄積した。したがって、これら抱合体の少なくとも一部が血漿抗酸化活性の上昇に寄与したことが明らかである。また、同様の実験結果は(-)エピカテキンでも得られた¹⁸⁾。さらに、ケルセチン代謝物画分はヒト血漿リポタンパク質の銅イオン誘導酸化反応を抑制する作用があることを確認した⁸⁾。したがって、食品

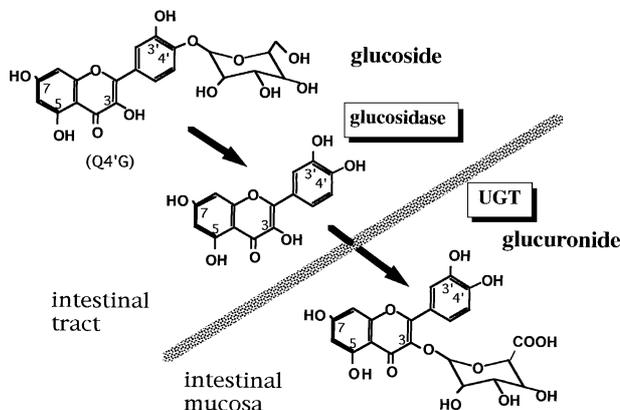


Fig. 4 消化管におけるケルセチン配糖体の吸収と代謝機構

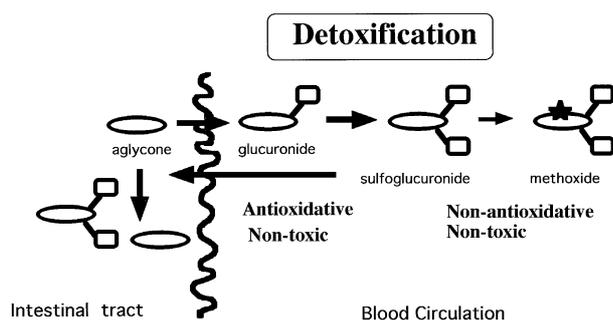


Fig. 5 フラボノイドの代謝変換と抗酸化活性

から摂取したフラボノイドによる生体内抗酸化システムへの寄与はその代謝物によるところが大きいであろう。上述の抗酸化に関する構造活性相関から考えると、B環の o -ジヒドロキシ構造が未変化のままの数種の抱合体が寄与すると推測される。現在、血漿中のケルセチン代謝物を構造解析中であるが、少なくとも2種類の o -ジヒドロキシ構造を有するグルクロン酸抱合体が存在することを認めている。

7. まとめ

フラボノイドは界面でのフリーラジカル捕捉作用や金属イオンキレート作用などユニークな活性をもつことから、酸化ストレスに対する防御機能が強く期待される物質である。食品成分として摂取された場合、その多くは代謝物に変換され最終的にはその活性が失われるであろう。しかし全ての活性が失われるのではなく、一部の抱合体は生体内で抗酸化機能を発揮すると思われる。抗酸化物質 (antioxidant) は酸化促進物質 (prooxidant) にもなりうる両刃の剣である。生体にとって抱合体化反応は生体異物の解毒過程であるが、フラボノイドの場合には活性を制御しつつ抗酸化物質として有効利用するための反応になると推測される (Fig. 5)。

文 献

- 1) Sies, H.: Oxidative Stress -Oxidants and Antioxidants. Academic Press, London, 1991
- 2) Terao, J., Piskula, M., and Yao, Q.: Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. Arch. Biochem. Biophys., 308 : 278-284, 1994
- 3) Terao, J., and Piskula, M.: Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. In: Flavonoids in Health and Disease. (Rice-Evans, C.A., and Packer L. eds), Marcell Dekker Inc. New York, pp 279-293, 1998
- 4) Terao, J., and Piskula, M.: Flavonoids and membrane lipid peroxidation. Nutrition, 19 : 790-791, 1999
- 5) Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G.: Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biol. Med., 20 : 933-956, 1996
- 6) Ioku, K., Tsushida, T., Takei, Y., Nakatani, N., and Terao, J.: Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta, 1234 : 99-104, 1997
- 7) Da Silva, E., Tsushida, T., and Terao, J.: Inhibition of mammalian 15 lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. Arch. Biochem. Biophys., 349 : 313-320, 1998
- 8) Yamamoto, N., Moon, J.H., Tsushida, T., Nagao, A., and Terao, J.: Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper-induced lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. Arch. Biochem. Biophys., 15 : 347-354, 1999
- 9) Bokkenheuser, V.D., Shackleton, C.H. and Winter, J.: Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from human. Biochem. J., 248 : 953-956, 1987
- 10) Manach, C., Morand C., Taxier, P., Agullo, G., et al.: Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin and quercetin. J. Nutr., 125 : 1911-1922, 1995
- 11) Hollman, P.C.H., Vries, J.H.M., and Van Leennen, S. D.: Absorption of Dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. Am. J. Clin. Nutr., 62 : 1276-1282, 1995
- 12) Paganga, G., and Rice-Evans, C.A.: The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. FEBS Lett., 401 : 78-82, 1997
- 13) Moon, J-H., Nakata, R., Oshima, S., Inakuma, T., and Terao, J.: Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after short-term ingestion of onion in women. Am. J. Physiol. (in press)

- 14) Terao, J. : Dietary flavonoids as plasma antioxidants on lipid peroxidation : Significance of metabolic conversion. *In* : Antioxidant Food Supplements in Human Health. (Packer, L., Hiramatsu, M., and Yoshikawa T., eds), Academic Press, San Diego, pp 255-268, 1999
- 15) Piskula, M., and Terao, J. : Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.*, 128 : 1172-1178, 1998
- 16) Murota, K., Shimizu, S., Kitayama, M., and Terao, J. : Absorption and metabolism of quercetin and its glucosides in Caco 2 cells. Abstracts of 2nd ICoFF Conference, pp 109, 1999
- 17) Da Silva, E.L., Piskula, M., Yamamoto, N., Moon, J-H, and Terao, J. : Quercetin metabolites inhibit copper-ion induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Lett.*, 430 : 405-408, 1998
- 18) Da Silva, E.L., Piskula, M., and Terao, J. : Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. *Free Radical Biol. Med.*, 24 : 1209-1216, 1998

Function of dietary antioxidants on the protection against oxidative stress

Junji Terao

Department of Nutrition, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan

SUMMARY

Daily foods contain a variety of minor components which possess antioxidative activity, such as vitamin E and vitamin C. On the other hand, it has been well known that reactive oxygen species (ROS) generating in the body cause oxidative damages in the tissues and fluids, resulting in the generation and progress of life style-related diseases. Therefore, it should be expected that dietary antioxidants are well introduced to individual food-style from the viewpoint of disease prevention and health promotion. However, there are two important subjects to be clarified, that is, the mechanism by which they exert the antioxidant activity *in vivo*, and the site at which they act as antioxidants *in vivo*. We are interested in common components present in foodstuffs, in particular, carotenoids, flavonoids and phytic acid, and are challenging to solve these subjects by use of carotenoids and flavonoids. Here we will discuss the result of our recent studies on dietary flavonoids. We have claimed that flavonoids are interfacial antioxidants whose activities appear at the interface between lipid-phase and water-phase. Nevertheless, little is known on the absorption and metabolism of flavonoids from diet. We recently investigated the absorption and metabolic pathway of quercetin, a representative flavonoid in plant foods, using rats, humans and cultured cell derived from human digestive tract. The result shows that a part of quercetin is absorbed from digestive tract and exclusively accumulates as conjugated metabolites in blood plasma. The antioxidative activity of quercetin exhibited in blood plasma is likely to be originated from conjugated metabolites. It is therefore implied that metabolic products largely contribute to the physiological function of flavonoids, when flavonoids are ingested from daily foods.

Key words : Antioxidants, flavonoids, lipid peroxidation, glucuronyl conjugates, quercetin

総説

アミノ酸尿症の分子遺伝学

宮本 賢一, 瀬川 博子

徳島大学医学部栄養化学講座

(平成12年1月20日受付)

はじめに

細胞膜には個々のアミノ酸を輸送するトランスポーターが存在し、アミノ酸が細胞膜を横断することを助けている。アミノ酸トランスポーターは、細胞への栄養供給のほか、小腸や腎尿細管でのアミノ酸の上皮輸送、中枢神経での神経伝達物質の取り込み、さらに細胞内酸化還元的環境の調節維持において重要な役割を果たしている。その異常により、シスチン尿症やリジン尿性蛋白不耐症をはじめとするアミノ酸尿症、興奮性アミノ酸による神経細胞死、酸化ストレスによる細胞死や免疫不全などが生じる。とくにアミノ酸尿症の原因遺伝子解明は、アミノ酸トランスポーターの同定につながるため、長年待ち望まれていた。本稿では、アミノ酸尿症の原因遺伝子解明までの道のりを紹介する。

シスチン尿症とリジン尿性蛋白不耐症

シスチン尿症は、腎尿細管および小腸上皮細胞における中性、二塩基性アミノ酸輸送の先天的欠損である(図1)。症例によりかなりの遺伝的異質性がみられ、シスチンおよび二塩基性アミノ酸輸送系の障害の程度により3型に分類される¹⁾。タイプ1では小腸からのシスチン、リジンおよびアルギニンの吸収が完全に障害され、これらのアミノ酸経口負荷により血中での濃度上昇が見られない。タイプ2では、小腸上皮でのシスチン吸収能はわずかに確認されるが、リジンやアルギニンの吸収能は見られない。また、アミノ酸経口負荷では同様に血中濃度の上昇が見られない。タイプ3は、小腸におけるアミノ酸吸収能はわずかに低下しているものの、経口負荷によりアミノ酸の血中濃度が正常に上昇する。また、これらの遺伝形式は複雑であり、不完全劣性遺伝形式をとることが報告されている。日本やアメリカでは2万人に一人、

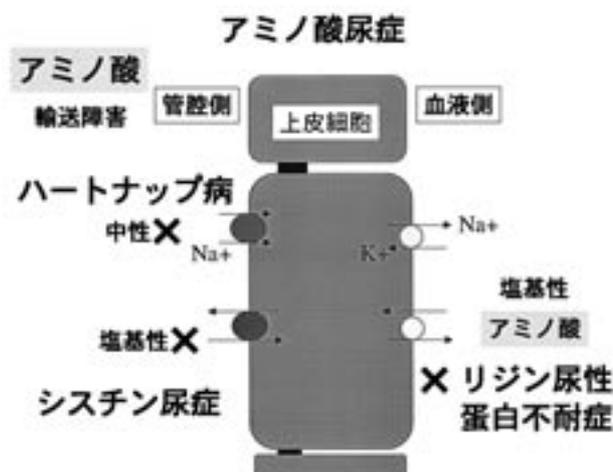


図1 上皮細胞におけるアミノ酸輸送系の異常と疾患
アミノ酸尿症の原因となる輸送系と病名を示した。シスチン尿症とハートナップ病は、上皮細胞刷子縁膜における塩基性および中性アミノ酸輸送の障害によりアミノ酸尿症を生じる。一方、リジン尿性蛋白不耐症は、基底膜における塩基性アミノ酸の輸送障害による。

ヨーロッパでは7千人(イギリス2千人に一人)に一人の割合で発症する。このようなシスチン尿症の複雑な病態は、シスチン輸送系が複数の輸送システムによって行われているか、あるいは一つの輸送系が複数の蛋白で構成されている可能性が考えられていた。

リジン尿性蛋白不耐症(LPI)も、腎尿細管や小腸上皮細胞において塩基性アミノ酸輸送障害により多彩な症状を示す疾患である。とくに、高アンモニア血症は本疾患の予後を悪化させる。シスチン尿症が、上皮細胞の刷子縁側のアミノ酸輸送系異常であるのに比べてリジン尿性蛋白不耐症では上皮細胞や肝細胞の基底膜に存在するアミノ酸輸送系 y⁺L の異常であろうと推察されていた。

シスチン尿症原因遺伝子の謎

ヒト腎尿細管でのシスチン輸送には2種類の輸送システム(高親和性システム($K_m=0.012\text{mM}$)および低親和性システム($K_m=0.55\text{mM}$)が存在し、シスチン尿症患者ではすべて高親和性システムが障害されていた。1992年から1993年にかけて、腎尿細管上皮細胞 mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させる方法を用い、シスチントランスポーター cDNA が3カ所の研究室よりクローニングされた¹⁾。それぞれ NAA-Tr/rBAT/D2 (以下 rBAT) と命名された遺伝子は、共通の蛋白質をコードし、推定膜貫通領域が1回、またC端側に他の蛋白と2量体を形成にするロイシンジッパーモチーフを有していた。これらの遺伝子は、卵母細胞で発現させると、ナトリウム非存在下でシスチンおよび中性/二塩基性アミノ酸の輸送を促進する $b^0,+$ システムに関与する遺伝子であった。しかしながら、膜貫通領域が1回という輸送担体はこれまで報告がなく、どのようにしてシスチン輸送を促進するか多くの問題が残されていた。

Calonge や我々のグループは^{2,3)}、スペイン人および日本人シスチン尿症患者の遺伝子解析を行い、rBAT のc端域に数カ所の変異を見出した。これらの変異のうち467番目のメチオニンがスレオニンへの変異は解析したシスチン尿症の40%に共通に見られる変異であった²⁾。一方、ポジショナルクローニングを進めていたグループは、シスチン尿症患者17家系の連鎖解析を行い、責任遺伝子が2番染色体の cen-D2 S391 D2 S119 cystinuria D2 S177 tel に存在することを明らかにしていた。そこで、rBAT の染色体座位が決定された結果、確かに2p16のD2 S119とD2 S117に存在していた。以上の事実より、rBAT 遺伝子異常は間違いなくシスチン尿症の原因であると考えられた。

II型膜糖蛋白とは

rBAT 遺伝子がクローニングされた際、その構造より推定される蛋白質はトランスポーターとは考えにくかった^{4,5)}。そこで類似の蛋白質を検索した結果、rBAT はII型膜糖蛋白質に属し、アミラーゼやマルターゼの構造と同様にN末端を細胞内に有し、C末端を細胞外に有する糖蛋白質であった。特に、4F2hc (CD98) と呼ばれる蛋白質の一部高いホモロジーを有していた。4F2hc は、human T-cell tumor line (HSB 2) の膜

に存在し、細胞増殖に関わる分子と考えられていた。4F2hc 遺伝子をもとにcRNAを合成し、卵母細胞で発現させると、ナトリウム非依存性の塩基性アミノ酸輸送システム (y^+ -like system) の促進が観測された。促進される輸送システムはrBAT が関与する $b^0,+$ とは異なり、卵母細胞に存在する内因性の輸送システムである。これらの結果より、rBAT および4F2hc などのII型膜糖蛋白質は、アミノ酸トランスポーターを活性化する因子であろうと考えられた⁴⁾。

II型膜糖蛋白を必要とするアミノ酸輸送担体の発見

rBAT の変異は、シスチン尿症患者の一部にしか見られない事実は、上述した仮説をさらに支持していた³⁾。つまり、多くの異常はアミノ酸トランスポーター本体にあると考えた。そこで、II型膜糖蛋白質により活性化されるアミノ酸トランスポーターの同定に着手した⁶⁾。

我々は、アミノ酸尿症の原因解明を複雑にしている要因として、これらのトランスポーターは複数のサブユニットを必要とし、それが単一因子のみを追跡する従来の方法でのクローニングを困難にしていると考えた。II型膜糖蛋白4F2hc (CD98) のcRNA とラットC6グリオーマ細胞 poly(A)⁺RNA の共発現による発現クローニングを試みた。それらの結果、4F2hc により活性化されるトランスポーター (LAT1 と命名) のcDNA を単離した^{6,7)}。LAT1 の活性発現には4F2hc が共存することが必須であり、LAT1 と4F2hc の共発現によって出現する機能は、クローニングの待たれていた古典的中性アミノ酸輸送系Lの機能そのものであることを明らかにした⁶⁾。これにより、輸送系Lは、二つのサブユニットからなるヘテロダイマー構造を持つことが示唆された。本クローニングの成功により、従来の単一因子を追跡するクローニング法でアミノ酸トランスポーターがクローニングされ得なかった理由が明らかになった。

原因遺伝子の解明

このような研究を足がかりに、II型膜糖蛋白を必要とする一群のアミノ酸輸送系が同定された。 y^+ LAT1, y^+ LAT2 は、塩基性アミノ酸輸送系 y^+ L を担当し、補助因子として4F2hcを必要とする⁸⁾。スペインのグループは、いち早く y^+ LAT1 の遺伝子解析を行いリジ



図2 アミノ酸尿症の原因遺伝子

II型膜糖蛋白 rBAT は、シスチントランスポーター-BAT1の機能発現に必須の補助因子である。I型シスチン尿症では rBAT 遺伝子が、II型シスチン尿症では ,BAT1 遺伝子異常がある。一方、4F2hc は、y+LAT1 の補助因子として機能する。リジン尿性蛋白不耐症では、y+LAT1 遺伝子に異常が見られる。

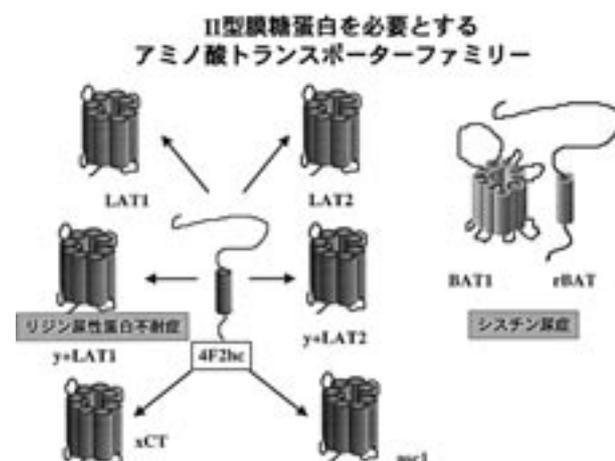


図3 機能発現にII型膜糖蛋白を必要とするアミノ酸トランスポーターファミリー

LAT1のクローニングをきっかけに、ヘテロダイマー構造を持つ一群のアミノ酸トランスポーターが同定された。LAT1, LAT2, y+LAT1, y+LAT2, xCT, asc1は、いずれも機能発現にII型膜糖蛋白4F2hcを必要とする。また、BAT1は、その機能発現に補助因子としてrBATを必要とする。これらのファミリーは、上皮細胞、ガン細胞、神経細胞、免疫細胞などで多くの必須アミノ酸輸送を担っている。

ン尿性蛋白不耐症患者における異常を見いだした⁹⁾(図2)。同定された部位は第4細胞外ループと第8膜貫通領域で、この遺伝子異常により機能は完全に消失した。一方、我々は長年待ち望まれていたrBATの相手方蛋白BAT1を同定した¹⁰⁾(図2)。同定したクローンは、やはり同じファミリーに属していた。BAT1は補助因子として4F2hcではなくrBATを必要とし、IIおよびIII型シスチン尿症の原因遺伝子であることが解明された¹¹⁾。

II型膜糖蛋白を補助因子とするアミノ酸トランスポーターファミリー

アミノ酸尿症の原因遺伝子解明の福音は、さまざまなアミノ酸輸送系が同時に明らかにされたことである(図3)。LAT2は中性アミノ酸トランスポーターをコードし、主に小腸や腎における上皮細胞におけるアミノ酸輸送を担当する¹²⁾。やはり、機能発現には4F2hcを必要とした。asc1は、アラニン、セリン、シスチンを輸送するトランスポーターでシステムascをコードしていた¹³⁾。また、xCTはシスチン・グルタミン酸の交換輸送担体として同定され、やはり機能発現に4F2hcが必要であることが解明された¹⁴⁾(図4)。

このようにアミノ酸尿症の原因遺伝子解明により、研究の遅れていたアミノ酸トランスポーターの分野がここ

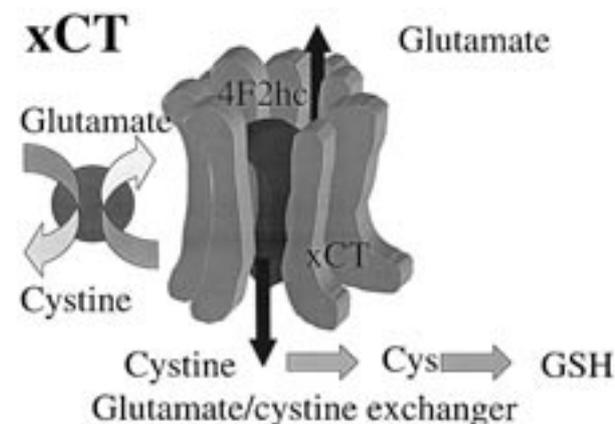


図4 シスチン - グルタミン酸アンチポーター xCT のアミノ酸交換機能

II型膜糖蛋白を必要とするファミリーとしてシスチン - グルタミン酸アンチポーター xCT が同定された。細胞内の重要なラジカルスカベンジャーであるグルタチオンは、グリシン、グルタミン酸、システインを前駆物質として合成されるが、システインの細胞への供給が合成の律速段階となっている。このようなシステインの輸送は、多くの細胞でシスチン - グルタミン酸アンチポーターを介して行われる¹⁵⁾。

1年で急速な展開を見た。その結果、II型膜糖蛋白という補助因子を必要とする一群のアミノ酸トランスポーターが新しく登場した¹⁵⁾。これらは、長年謎とされてきた様々なアミノ酸輸送系の本体であった。とくに、これらのファミリーにはグルタチオン合成の材料となる含硫アミノ酸を供給することにより酸化的ストレスに対する

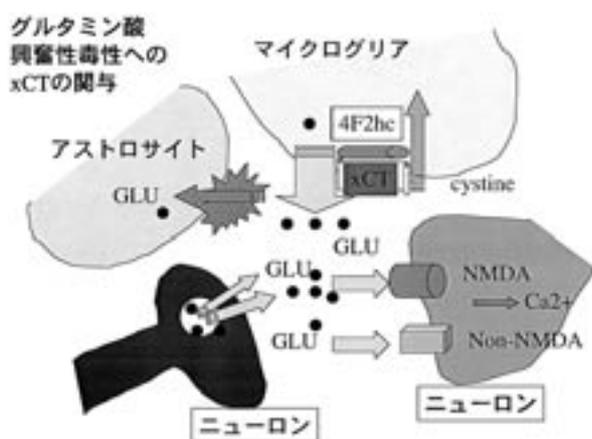


図5 xCTの神経細胞障害因子としての役割

xCTはそれを有する細胞にとってはシスチンの取り込みを行う点において酸化ストレスに対する細胞保護因子であるが、同時に細胞外へグルタミン酸を放出するため、神経組織において局所で過剰に機能すると細胞外グルタミン酸濃度の上昇を招き、神経細胞を惹起する。実際に脳梗塞の病巣周囲でこの状態が生じていると考えられる。xCTはマクロファージや神経組織のマイクログリアにその活性が高く、それらが集まる脳梗塞周辺部では、xCTを介して細胞外にグルタミン酸が放出される。これが、細胞外グルタミン酸濃度を維持するグルタミン酸トランスポーターの処理能力を超えると、グルタミン酸興奮毒性を発現し、脳梗塞周辺部での神経細胞障害を増悪させる¹⁶⁾。

細胞保護因子として位置付けられるシスチン・グルタミン酸交換輸送担体 xCT も含まれていた。このような分子の発見は、今後興奮性アミノ酸による神経細胞死、酸化ストレスによる細胞死や免疫不全などの病因解明に大きく貢献すると考えられた(図5)。

おわりに

栄養学を研究する上で、食物の消化と吸収は生体代謝のスタートに位置している。消化吸收の研究と言うと、一見世俗的で非科学的に聞こえるが、この問題を分子レベルで研究すると、大変おもしろい世界が見えてくる。とくにアミノ酸吸収の研究は、歴史が古く、多くの知識が蓄積されている。培養細胞や膜標本から得られた結果は、個々のアミノ酸に対して独自の輸送系があるのではなく、類似した側鎖をもつ複数のアミノ酸を輸送する数種の輸送系によって、アミノ酸輸送が行われていることを証明した。塩基性アミノ酸はナトリウム非依存性輸送系 y^+L , y^+ , $b^0,+$ により、酸性アミノ酸は Na^+ 依存性輸送系 X^-AG により輸送される。多くのアミノ酸が属する中性アミノ酸輸送は Na^+ 非依存性輸送系 L や Na^+ 依存性輸送系 A , ASC により行われる。アミノ酸尿症

の原因遺伝子解明は、これらアミノ酸輸送系の謎解きにつながった。小腸や腎などの上皮組織におけるアミノ酸トランスポーターの解明は、神経組織での神経伝達物質の再取り込み、細胞間相互作用における細胞機能の酸化還元的制御機構の手助けになると考えられる。さらに、血液脳関門を構成するアミノ酸輸送系も次第に明らかになった。現在、脳内への薬物輸送という観点で、アミノ酸輸送機構もさまざま勢いで、研究が進みはじめている。世俗的で非科学的な問題にこそ、次の新しいテーマが眠っているかもしれない。

謝 辞

これらの研究は、杏林大学医学部薬理学金井好克助教授、遠藤仁教授との共同で展開された。また、徳島大学医学部病態栄養の新居智子、岸田祐枝、谷圭子、竹谷豊助手、武田英二教授には共同実験者として多くの御支援をいただいた。シスチン尿症の研究は徳島大学医学部泌尿器科またリジン不耐症の研究は岐阜大学医学部小児科との共同研究である。本プロジェクトの共同研究者の方々に、心より感謝いたします。またアミノ酸輸送の研究のおもしろさを最初に教えていただいた、徳島大学医学部病態栄養学講座の故萩平博教授のご冥福をお祈りいたします。

参考文献

- 1) 宮本賢一: シスチン尿症, *Molecular Medicine* 32: 242-243, 1995
- 2) Calonge, M.J., Gasparini, P., Chillon, M., Gallucci, M., et al.: Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat. Genet.*, 6: 420-425, 1994
- 3) Miyamoto, K., Katai, K., Tatsumi, S., Sone, K., et al.: Mutation of the basic acid transporter gene associated with cystinuria. *Biochem. J.*, 310: 951-955, 1995
- 4) Miyamoto, K., Segawa, H., Tatsumi, S., Katai, K., et al.: Effects of truncation of the COOH-terminal region of a Na^+ -independent neutral and basic amino acid transporter on amino acid transport in *Xenopus oocytes*. *J. Biol. Chem.*, 271: 16758-16763, 1996
- 5) Segawa, H., Miyamoto, K., Ogura, Y., Haga, H., et al.: Cloning, functional expression and dietary regulation

- of the mouse neutral and basic amino acid transporter (NBAT). *Biochem. J.* 328 : 657-664, 1997
- 6) Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., et al. : Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.*, 273 : 23629-23632, 1999
- 7) Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P. J., et al. : Amino acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395 : 288-291, 1998
- 8) Pfeiffer, R., Rossier, G., Spindler, B., Meier, C., et al. : Amino acid transport of γ -L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.*, 18 : 49-57, 1999
- 9) Borsani, G., Bassi, M. T., Sperandio, M. P., DeGrandi, A., et al. : SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat. Genet.*, 21 : 297-301, 1999
- 10) Chairoungdua, A., Segawa, H., Kim, J.-Y., Miyamoto, K., et al. : Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 274 : 28845-28848, 1999
- 11) Feliubadalo, L., Font, M., Purroy, J., Rousand, F. et al. : Cystinuria consortium. Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, coding of a subunit (b⁰,+AT) of rBAT. *Nat. Genet.*, 23 : 52-57, 1999
- 12) Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., et al. : Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.*, 274 : 19745-19751, 1999
- 13) Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., Bannai, S. : Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.*, 274 : 11455-11458, 1999
- 14) Fukasawa, Y., Segawa, H., Kim, J. Y., Chairoungdua, A., et al. : Identification and characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter which associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J. Biol. Chem.* (in press)
- 15) Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J., Zorzano, A. : Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.*, 78 : 969-1054, 1998
- 16) 金井好克 : アミノ酸トランスポーターとその異常による疾患 . チャンネルとトランスポーター , (岡田泰伸, 清野進 編) , メジカルビュー社 , 東京 , 1997 , p.p.159-184

Molecular biology of aminoacidurias

Ken-ichi Miyamoto, and Hiroko Segawa

Department of Nutrition, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan

SUMMARY

The homologous proteins rBAT and 4F2hc have been identified as the heavy chains of family of heteromeric amino acid transporters in mammals. Six light subunits of 4F2hc (LAT 1, LAT 2, y⁺LAT 1, y⁺LAT 2, asc 1, and xCT) and one of rBAT (BAT 1) are known. These glycoprotein-associated amino acid transporters, which follow the 12 transmembrane topology model, form heterodimers with the corresponding subunit and then are expressed in the plasma membrane. 4F2hc and y⁺LAT 1 express system y⁺L transport activity. On the other hand, rBAT and BAT 1 express system b⁰⁺ activity. BAT 1 and y⁺LAT 1 have a tissue distribution and a chromosomal location that made them good candidate genes for cystinuria and lysinuric protein intolerance (LPI). Mutational analysis revealed cystinuria-associated mutations for BAT1 and LPI-associated mutations for y⁺LAT1. Transport defects have been shown for some of the BAT1 and y⁺LAT1 mutations. In addition, we focus on the animal members of the LAT cluster that form the family of glycoprotein-associated amino acid transporters.

Key words : amino acid, transporter, cystinuria, LPI

総 説

メサンギウム細胞増殖に関する新たな制御因子と病変抑止に関する研究

土 井 俊 夫

徳島大学医学部臨床検査医学講座

(平成12年1月25日受付)

1. はじめに

我が国における慢性腎不全の患者数の増加は医学上のみならず膨大な医療費という社会的問題でもあり、現在1兆円が腎不全医療に必要とされている。この腎不全患者の特徴は透析導入患者の高齢化と原因疾患としての糖尿病の増加である。従って、これらの患者は透析導入後も種々の合併症をきたしやすく、予後も非常に悪い。この腎不全において、その病態進行の機序を解明し、それを抑止する事は腎臓病学における最も重要な命題である。一般に、この進行性腎障害は病理学的に糸球体硬化症を呈し、末期腎不全に陥る。その腎病変の進行増悪にはメサンギウム細胞増殖、メサンギウム硬化症およびメサンギウム細胞の形質変化が重要な機序として働いていると考えられている^{1,2)}。これらの病態を解明し制御する事は、進行性腎障害の進展抑制における最も大切な手段である。この進行性腎障害の治療法確立を目指すにはその標的はメサンギウム細胞の増殖である。この報告では我々が見いだした新たな増殖因子である Growth Arrest Gene 6 (Gas 6) の腎障害進展における意義とメサンギウム細胞の増殖抑制を示すビタミンD誘導体の意義について報告する。

2. Growth Arrest Gene 6 (Gas 6)

Gas 6 は線維芽細胞の増殖を抑制させた時に強発現する因子として、クローニングされた。その構造は11 12 の γ -carboxylglutamate (Gla) 化ドメインがあり、Epidermal Growth Factor 様構造、Sex hormone-binding globulin (SHBG) 構造をもつビタミン K 依存性蛋白のひとつである。その構造は Protein S と類似性が報告されていた。この因子に対する受容体として最近同定された Axl, Rse, Mer という3つの異なるチロシンキナー

ゼの受容体があり、それらの Gas 6 に対する親和性は Axl が他の受容体と比較し非常に高いと報告されている。また、以前より腎炎にワーファリン治療が行なわれていたが、その詳細な機序は不明であった。ワーファリンはビタミン K 依存性で、Gla 化を特異的に阻害することより、その腎炎抑制の新たな機序にこの Gas 6 が関与しているか、又腎炎進展において Gas 6 が増殖因子として働いているかは興味ある事実である。本研究はメサンギウム細胞の増殖制御に関与する新たな因子である Gla 化蛋白である Gas 6 の役割を解明するものである。

3. Gas 6 の *in vitro* メサンギウム細胞における役割³⁾

樹立した培養マウスメサンギウム細胞を用い、その細胞培養上清中には Western blot 法で Gas 6 の存在を認めた。その受容体はメサンギウム細胞の細胞膜分画において Western blot 法で Axl の存在を認めたが、Rse は存在しなかった。従って、Gas 6 とその高親和性受容体である Axl がメサンギウム細胞において蛋白発現していることを証明した。

Gas 6 の添加 (500ng/ml) による Axl のリン酸化をみると、5分をピークに明らかな Axl のリン酸化を認めた。メサンギウム細胞の増殖を³H-thymidine incorporation (DNA 合成能) で調べると、Gas 6 の外来性の添加で濃度依存性に増殖亢進を認めた。またその Gas 6 による増殖活性は Axl の細胞外ドメイン (Axl-ECD) の添加で濃度依存性に抑制効果を認めた。次に Gas 6 による extracellular signal-regulated kinases (Erk) の活性化 (リン酸化) を検討すると、Gas 6 の添加により5分をピークに Erk のリン酸化がおこり、2 nd message の活性化がおこっている事が証明された。その Erk の活性化は Axl-ECD の添加で抑制効果を認めた。内因性の Gas 6 産生がおこり、メサンギウム細胞の増

殖に関与しているか検討すると、培養液中に Axl-ECD を添加する事により、増殖抑制が認められた。また、メサンギウム細胞にワーファリンを添加すると濃度依存性に増殖抑制効果を認め(図1)、その反応は Erk の活性化の抑制と一致していた。

これらの結果より *in vitro* メサンギウム細胞において Gas 6 が autocrine および paracrine 因子の増殖因子として働く役割をはじめて証明した。この効果はワーファリンの新たな作用機転に関与していることが判明した。

4 . Gas 6 の *in vivo* における役割

Gas 6 の *in vivo* における役割を解析するために、ラットに対して抗 thy 1 腎炎を作成した。このモデルは mesangiolytic がおこり 8 日目には典型的な糸球体腎炎(細胞増殖と糸球体硬化症)を呈するようになる⁴⁾。その腎炎 3 日, 5 日, 8 日, 15 日目の腎組織より糸球体を単離し、蛋白および mRNA を分離した。Western blot 法では糸球体の Gas 6 の発現は 8 日目をピークとして腎炎モデルで著明に増加しており(図2)、蛍光抗体法でもメサンギウム領域で増加発現していた。その Gas 6 の糸球体での発現は mRNA レベルでも増強していた。一方、その受容体である Axl の糸球体発現は Gas 6 と同様に 8 日をピークに著明に増加していた。これらの結果より、*in vivo* においても Gas 6 が腎炎の増殖因子としての役割を果たしていることが証明された。

ワーファリンの *in vivo* における効果を検討するために、抗 thy 1 腎炎に対して凝固異常をきたさない低濃度のワーファリンを投与した。その結果、ワーファリン治療群では蛋白尿減少と伴って明らかな病変改善効果を

Warfarin inhibits mesangial cell proliferation

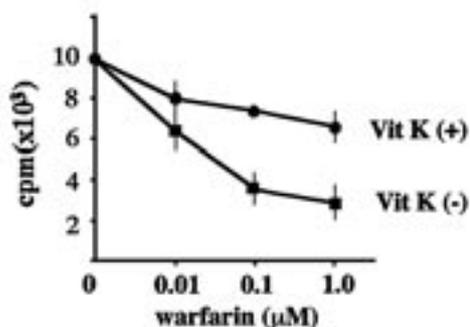


図1 . 培養メサンギウム細胞におけるワーファリン添加による増殖抑制とビタミン K による効果

Expression of Gas6 protein in the glomeruli of anti-thy 1.1 GN

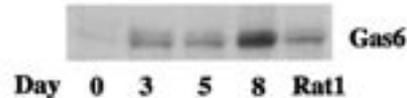


図2 . 抗 thy 1 モデルにおける糸球体の Gas 6 発現増強

認め、細胞増殖および糸球体硬化指数とも著明に低下した。また Axl-ECD の過剰を抗 thy 1 腎炎に投与すると、同様に組織病変の改善傾向を認めた。このように糸球体腎炎の発症・進展の制御機構における新たな増殖因子である Gas 6 の役割を *in vitro* および *in vivo* で解明し、その臨床における意義を明らかにした。その成果により腎炎の発症および進展の制御における新たな機構が明らかにされ、さらにヒト腎炎に対する臨床的意義を明白にした。

5 . ビタミン D 誘導体の *in vitro* メサンギウム細胞および *in vivo* モデルにおける意義

ビタミン D は平滑筋細胞の増殖抑制をしめす。しかしビタミン D は生体では高カルシウム血症や高リン血症、高リン尿症など腎疾患の進行において増悪因子として作用する。一方、ビタミン D 誘導体であるマキシカルシトールはこれら高カルシウム血症や高リン血症などの副作用を非常にきたし難い分子であり、強力な細胞増殖抑制を示す可能性がある。この分子の腎疾患における役割を *in vitro* および *in vivo* で解明し、その臨床における意義を明らかにした。

培養メサンギウム細胞に対しマキシカルシトールを添加すると、 10^{-8} M で明らかな DNA 合成の抑制を認めた⁵⁾。この分子を *in vivo* での検討を加えた⁶⁾。抗 thy 1 腎炎に対し、マキシカルシトールを投与した。その結果、8 日目および14日目ともに蛋白尿減少効果と糸球体細胞増殖の抑止および糸球体硬化症の著明な改善を認めた(図3)。そのマキシカルシトールの作用は硬化症における細胞外基質の重要な成分である I 型コラーゲンや IV 型コラーゲンの著明な減少を示した。また平滑筋 α アクチンの減少を示した。これらの蛋白発現の変化は Real time polymerase chain reaction (PCR) で検索した糸球体

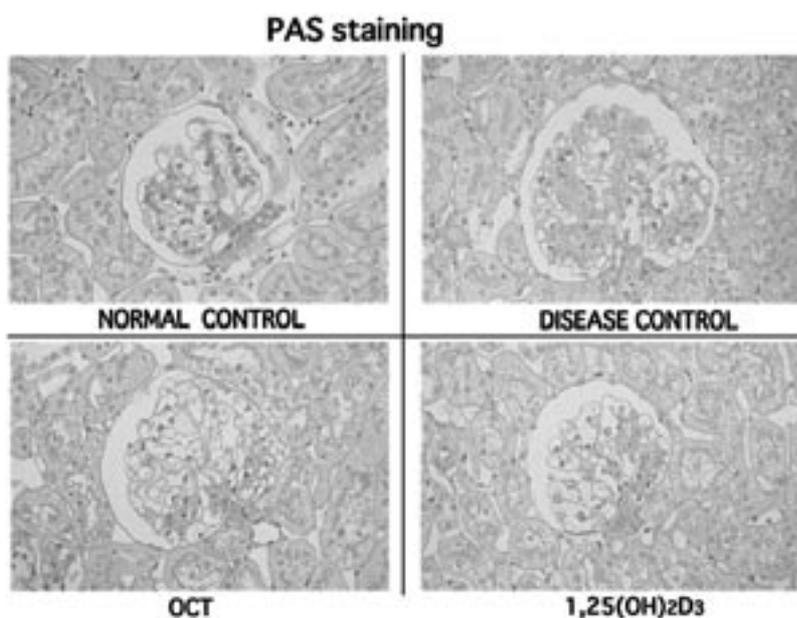


図3 . 抗 thy 1 モデルに対するマキシカルシトール投与の効果 (8 日)
 disease control : 抗 thy 1 腎炎, OCT : マキシカルシトール投与群, 1, 25 (OH)₂D₃ :
 活性型ビタミン D 投与群 (高カルシウム血症をきたし, 栄養失調に陥り, 著明な体重
 減少を認めた。)

mRNA レベルでの変化と相関していた。またこのモデルの硬化症進展には transforming growth factor- β (TGF- β) が関与している事を蛍光抗体法および上述した Real time PCR 法で確認した。またマキシカルシトール投与は TGF- β の発現を著明に抑制していた。このマキシカルシトールによる治療群では血中カルシウムやリンの異常を認めなかった。以上の事実よりマキシカルシトールが腎疾患の治療薬として新たな展開をもたらすと考えられる。

6 . おわりに

この発表では腎疾患の進展に関する新たな増殖因子である Gas 6 とその制御, また新たな細胞増殖の制御因子であるマキシカルシトールの腎疾患における役割を明らかにした。これらは実際の腎疾患治療に結びつく将来性

のある治療法として, 臨床検討も行っていく必要があると考えている。腎不全医療は透析療法で生命維持可能となったが, より重要なテーマはこの腎不全に陥る病態を解明し, 末期腎不全への進行を抑止することである。このことは今後の腎臓病学における最も大切な課題である。

文 献

- 1 . Klahr, S., Schreiner, G., and Ichikawa, I. : The progression of renal disease. N. Engl. J. Med., 318 : 1657 1666 ,1988
- 2 . Striker, L.J., Peten, E., Elliot, S., Doi, T., et al. : Heparin and peptide growth regulators. Effect on mesangial cell turn over. Lab. Invest., 64 : 446 456 ,1991
- 3 . Yanagita, M., Ishii, K., Ozaki, H., Arai, H., et al. : Mechanism of Inhibitory Effect of Warfarin on Mesangial Cell Proliferation. J. Am. Soc. Nephrol., 10 : 2503 2509 ,1999
- 4 . Sunamoto, M., Kuze, K., Tsuji, H., Ohishi, N., et al. : Antisense oligonucleotides against collagen-binding stress protein HSP47 suppress collagen accumulation in experimental glomerulonephritis. Lab. Invest. 78 : 967 972 ,1998
- 5 . Abe, H., Iehara, N., Utsunomiya, M., Kita, T., Doi, T. : A vitamin D analog regulates mesangial cell smooth muscle phenotypes in a transforming growth factor- β type II receptor-mediated manner. J. Biol. Chem., 274 : 20874 20878 ,1999
- 6 . Makibayashi, K., Tatematsu, M., Hirata, M., Fukushima, N., et al. : A Vitamin D Analog Ameliorates Glomerular Injury on Rat Glomerulonephritis, Submitted.

A novel mechanism of growth regulation on mesangial proliferation

Toshio Doi

Department of Laboratory Medicine, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan

SUMMARY

Mesangial proliferation is a common feature of many glomerular diseases, therefore, understanding the regulatory mechanism is important for the treatment of glomerular diseases. The present study showed growth arrest gene-6 (Gas6) is a new autocrine growth factor of mesangial cells and warfarin inhibited mesangial proliferation by inhibiting γ -carboxylation of Gas 6 *in vitro* and *in vivo*. We also found vitamin D analog (22-oxa-calcitriol) is a new growth regulator for mesangial cells *in vivo*. These results indicate that these compounds have considerable potential for use as therapeutic strategy in the treatment of progressive glomerular disease.

Key words : Gas 6, 22-oxa-calcitriol, mesangial proliferation, Warfarin, vitamin K

四国医学雑誌投稿規定

(1997年5月12日改訂)

本誌では会員および非会員からの原稿を歓迎いたします。なお、原稿は編集委員によって掲載前にレビューされることをご了承ください。原稿の種類として次のものを受け付けています。

1. 原著, 症例報告
2. 総説
3. その他

原稿の送付先

〒770 8503 徳島市蔵本町3丁目18-15

徳島大学医学部内

四国医学雑誌編集部

(電話) 088-633-7104 (内線2617); (FAX) 088-633-7115 (内線2618)

e-mail: shikoku@basic.med.tokushima-u.ac.jp

原稿記載の順序

- ・第1ページ目は表紙とし、原著、症例報告、総説の別を明記し、表題、著者全員の氏名とその所属、主任又は指導者氏名、ランニングタイトル(30字以内)、連絡責任者の住所、氏名、電話、FAX、必要別刷部数を記載してください。
- ・第2ページ目以降は、以下の順に配列してください。
 1. 本文(400字以内の要旨、緒言、方法、結果、考察、謝辞等、文献)
 2. 最終ページには英文で、表題、著者全員の氏名とその所属、主任又は指導者氏名、要旨(300語以内)、キーワード(5個以内)を記載してください。
- ・表紙を第1ページとして、最終ページまでに通し番号を記入してください。
- ・表(説明文を含む)、図、図の説明は別々に添付してください。

原稿作成上の注意

- ・原稿は原則として2部作成し、次ページの投稿要領に従ってフロッピーディスクも付けてください。
- ・図(写真)はすぐ製版に移せるよう丁寧に白紙または青色方眼紙にトレースするか、写真版としてください。図の大きさは原則として横幅が10cm(半ページ幅)または21cm(1ページ幅)になるように作成してください。
- ・文献の記載は引用順とし、末尾に一括して通し番号を付けてください。
- ・文献番号[1), 1,2), 1,3)…]を上付き・肩付とし、本文中に番号で記載してください。
- ・著者が5名以上のときは、4名を記載し、残りを[他(et al.)]としてください。

《文献記載例》

1. 栗山勇, 幸地佑: 特発性尿崩症の3例. 四国医誌, 52: 323-329, 1996
- 著者多数
2. Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., et al.: Regulation of food intake and obesity. Science, 156: 328-337, 1984
 3. 加藤延幸, 新野徳, 松岡一元, 黒田昭 他: 大腿骨骨折の統計的観察並びに遠隔成績について. 四国医誌, 46: 330-343, 1980
- 単行本(一部)
4. 佐竹一夫: クロマトグラフィー. 化学実験操作法(緒方章, 野崎泰彦 編), 続1, 6版, 南江堂, 東京, 1975, pp. 123-214

四国医学雑誌

編集委員長： 久 保 真 一

編集委員： 泉 啓 介 伊 東 進
齋 藤 晴比古 武 田 英 二
田 代 征 記 福 井 義 浩
馬 原 文 彦 門 田 康 正

発行元： 徳島大学医学部内 徳島医学会

SHIKOKU ACTA MEDICA

Editorial Board

Editor-in-Chief : Shin-ichi KUBO

Editors : Keisuke IZUMI Susumu ITO
 Haruhiko SAITO Eiji TAKEDA
 Seiki TASHIRO Yoshihiro FUKUI
 Fumihiko MAHARA Yasumasa MONDEN

Published by Tokushima Medical Association
in The University of Tokushima School of Medicine,
Tokushima 770 8503, Japan

表紙写真：アミノ酸尿症の原因遺伝子
(本号21頁に掲載)

四国医学雑誌 第56巻 第1号

年間購読料 3,000円（郵送料共）

平成12年2月15日 印刷

平成12年2月25日 発行

発行者：大西克成

編集者：久保真一

発行所：徳島医学会

〒770 8503 徳島市蔵本町3丁目18-15 徳島大学医学部内

電話：088 633 7104

FAX：088 633 7115

振込銀行：四国銀行徳島西支店

口座番号：普通預金 44467 四国医学雑誌編集部

印刷人：乾孝康

印刷所：教育出版センター

〒771 0138 徳島市川内町平石徳島流通団地27番地

電話：088 665 6060

FAX：088 665 6080