

423 ラット下垂体細胞における TRH 刺激による MAP キナーゼ活性化反応とプロラクチン分泌の検討

島根医大, 熊本大一薬理*

金崎春彦, 高橋健太郎, 宮崎康二, 福永浩司*, 宮本英七*

[目的] プロラクチン産生ラット下垂体細胞における種々の細胞内情報伝達物質の存在の有無について検討し, プロラクチン分泌機構における TRH 刺激による MAP キナーゼ活性化の役割を明らかにすることを目的とした。

[方法] ラット下垂体腫瘍由来の GH3 細胞を用い, TRH 刺激後の MAP キナーゼ活性は MBP を基質とする gcl 内リン酸化法で行った。また DNA 合成能は [³H] thymidine を用い, プロラクチン濃度は RIA にて測定した。

[成績] Immunoblotting にて GH3 細胞には MAP キナーゼの他, CaM キナーゼⅡ, NOS, カルシニューリンが存在した。MAP キナーゼ活性は TRH 刺激で5分後をピークに3倍上昇, 60分以上持続した。この活性化は MEK 阻害剤である PD098059 により 100%, PKC 阻害剤カルフォスチンCにて80%抑制された。また tyrosine キナーゼ阻害剤ゲニステイン, 細胞外 Ca²⁺ 非存在下にてそれぞれ30%程度抑制された。cAMP アナログである CPTcAMP は MAP キナーゼを上昇させた。PD098059 により MAP キナーゼ活性化は完全に抑制されたが, プロラクチン分泌は抑制されなかった。TRH 刺激により細胞の DNA 合成は有意に減少し, 細胞形態の変化をもたらしたが, この現象は PD098059 の同時投与で完全に抑制された。

[結論] TRH 刺激による MAP キナーゼ活性化反応は PKC が主に関与し, 一部 tyrosine キナーゼの関与があること, また MAP キナーゼの活性化は短時間でのプロラクチン分泌には関与せず, DNA 合成を抑制, 細胞形態の変化に関与していることが明らかとなった。

424 アデノウイルスベクターを用いた、モルモット胎仔への遺伝子導入の検討

東北大, 同遺伝病学*

妹尾 匡人, 松原 洋一*, 呉 繁夫*, 上原 茂樹, 岡村 州博, 成澤 邦明*, 矢嶋 聡

[目的] 遺伝子ベクターを用いた遺伝子治療は、成人に対しては臨床応用が開始されつつあるが、胎児への導入の検討はまだ十分に行われていない。そこで今回我々は組み換えアデノウイルスを用いて胎児への遺伝子導入が可能か否かの基礎的実験として、アデノウイルスを血流を介して投与することで外来遺伝子の導入と発現を行い、各臓器分布およびその発現量を検討した。[方法] 妊娠45～55日のHartley系モルモットの胎仔を対象とし、CAGプロモータの下流に*E.coli*の*lacZ*遺伝子を組み込んだE1A、E1B、E3欠失型5型アデノウイルスAxCALacZ(東京大学医科学研究所斎藤泉先生より供与)を臍帯静脈から1個体あたり 3×10^8 pfu投与した。投与後24時間で帝王切開により胎仔を娩出し、大脳、脳幹、心、肺、肝、腎、副腎、脾、小腸、筋肉、胎盤を摘出した。各臓器から凍結切片を作成し、X-galで組織化学的染色を行い、 β ガラクトシダーゼの発現を確認した。さらに、各臓器からDNAを抽出し、TaqMan PCR法で組み換えアデノウイルスDNAの増幅、定量を行った。[成績] 臓器のX-gal染色では、肝でもっとも発現が強く認められ、続いて副腎、脾、胎盤などでも発現がみられた。一方、肺、筋肉等では血管内皮を除きほとんど発現が見られなかった。TaqMan PCR法による導入遺伝子の定量でも同様の傾向が認められた。[結論] アデノウイルスベクターの臍帯静脈からの投与によって、胎児の例えば肝での酵素欠損症などに対する子宮内遺伝子治療の可能性が示唆された。