

日本大学医学部 総合医学研究所紀要

Bulletin of The Research Institute of Medical Science,
Nihon University School of Medicine

Vol.1 / December 2013

日本大学医学部総合医学研究所

Research Institute of Medical Science, Nihon University School of Medicine

日本大学医学部総合医学研究所紀要創刊にあたって

今回、日本大学医学部総合医学研究所紀要を創刊することになりました。日本大学医学部総合医学研究所紀要は医学に関する学理・技術の総合的研究の実践結果について、その諸報告及び成果等の外部情報発信を主たる目的とし、もって社会の要請に対応することに努めることを目的としています。形態としてはホームページを通じた完全公開とします。また、原則、査読なしとしますが、編集委員による体裁確認は行っています。場合によっては、当該専門分野の者に確認を依頼することもあります。今年度は、日本大学学術研究助成金、医学部助成金、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業等の各研究費における当該年度の各研究内容及び医学研究支援部門各系の研究報告を記載いたします。みなさまの御協力により論文形式のもの、活動報告など多様ですが、かなりのページとなっています。関係諸先生方にはお礼を申し上げます。

この紀要が医学部における研究内容の紹介、研究の発展に役立つことを期待しています。

日本大学医学部総合医学研究所長 山本 樹生

目 次

臍帯血, 臍帯組織幹細胞を用いた新規細胞治療の開発	他	1
ヒトマスト細胞活性化阻害によるアレルギー疾患の新規治療薬の開発	岡山吉道 他	8
肝細胞癌の術前画像解析による形態特徴量抽出の基礎的検討	中山壽之 他	18
HBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込み機序の解明と肝癌発生に与える影響の解明	松岡俊一 他	24
IgE を介した新たなマスト細胞活性化機構の解明	羅 智靖 他	32
肺癌の個別化治療のための肺生検からの遺伝子学的多様性解析	辻野一郎 他	39
心臓 MRI 遅延造影の 3 次元表示による致死性不整脈の予知	渡邊一郎 他	41
肝癌における B 型肝炎ウイルス遺伝子のヒト遺伝子への組み込み様式の解明	楡井和重 他	43
冠動脈不安定粥腫破綻の四次元的な観察	李 予昕 他	47
肺腺癌における GLUT-1 発現の臨床的意義	西井竜彦 他	50
在胎週数の短い新生児臍帯血中に存在する幹細胞の検討	松本太郎 他	53
レーザーマイクロダイセクション・プロテオーム解析を用いた, 椎間板変性の分子病態解析	江角真理子 他	55
C 型慢性肝疾患における宿主側因子 (IL28B) と肝病態の関連性の検討	松岡俊一 他	57
パーキンソン病における非運動症状と遺伝学的背景との関連	森田昭彦 他	60
低出生体重児における出生後の脂質栄養ミスマッチに関する研究 (継続)	宮下理夫 他	62
TRAIL/ ジアリルスルフィドによるメラノーマ治療の基礎的研究	鈴木良弘 他	64
自動縫合器による気管支断端処理の安全性について	石本真一郎 他	69
気道上皮透過性制御因子の同定	権 寧博	71
心臓超音波 integrated backscatter 法による心房筋線維化が心房細動アブレーション後の再発に及ぼす影響	奥村恭男 他	73
抗がん剤耐性の進行性膵管癌に対する新規抗体医薬の開発	佐野 誠	76
冠動脈造影中に冠静脈洞から脱血する透析療法—造影剤腎症の新しい予防的治療の開発	福島聖二 他	78
両心補助循環装置 (BVAD) における制御手法に関する研究開発	中田金一 他	81
冠動脈プラークの発展と退縮のメカニズムに関する研究	平山篤志	85
炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞医学	羅 智靖	88
インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌との相互作用の機序と呼吸器疾患重症化の病態の解明	山本樹生 他	94
ゲノム化学に基づく先進医療開発研究	福田 昇 他	99
Dual-lead SCS を用いた脳卒中後疼痛の治療	山本隆充 他	105
利用実態からみた形態系の役割とその変化	井上広一 他	111
Quattro Premire XE, Xevo TQ-S タンデム四重極型質量分析計性能比較	渡部和浩 他	115
高頻度経頭蓋磁気刺激による運動野刺激の効果: F 波の変化についての検討	山本隆充 他	129
日大医学部キャンパスにおける大気中放射性物質に関する研究	佐貫榮一 他	133
ラボラトリーアニマル系による医学研究支援の現状	藤田順一 他	136

INDEX

Development of novel cell therapies using stem cells in umbilical cord blood and cord tissue	Hideo Mugishima et. al	1
Development of new therapy of allergic diseases by inhibition of human mast cell activation	Yoshimichi Okayama et. al	8
Basic study of the morphological feature survey using preoperative imaging of hepatocellular carcinoma	Hisashi Nakayama et. al	18
Analysis of rearrangement of HBV integration in patients with HCC.....	Shunichi Matsuoka et. al	24
Elucidation for novel mechanisms of IgE-dependent mast cell activation	Chisei Ra et. al	32
Analysis of the genetic polymorphism from lung biopsy to decide personalized therapy	Ichiro Tsujino et. al	39
Prediction of Lethal Arrhythmia by 3-Dimensional Reconstruction of the Cardiac Magnetic Resonance Delayed Enhancement Imaging	Ichiro Watanabe et. al	41
Analysis of rearrangement of HBV integration in patients with HCC.....	Kazushige Nirei et. al	43
Four-Dimensional Observation of Unstable Plaque Rupture in Coronary Artery	Yuxin Li et. al	47
Clinical significance of the GLUT-1 expression in the pulmonary carcinoma	Tatsuhiko Nishii et. al	50
Study of cord blood stem cells from early gestational ages	Taro Matsumoto et. al	53
Molecular pathophysiology of intervertebral disc degeneration analyzed by proteomics of laser-microdissected samples	Mariko Esumi et al	55
Analysis of correlation between SNP of IL28B and pathogenesis in chronic hepatitis C	Shunichi Matsuoka et. al	57
Relationship between the non-motor complication and genetic background in Parkinson disease	Akihiko Morita et. al	60
Study of lipid nutrition mismatch after birth in low birth weight infants	Michio Miyashita et. al	62
TRAIL/diallyltrisulfide-induced apoptosis in human melanoma cells	Yoshihiro Suzuki et. al	64
The pressure resistance of mechanical sutures in the bronchial stump	Shinichirou Ishimoto et. al	69
Identification of regulatory factors in the airway epithelial permeability	Yasuhiro Gon	71
Impact of Atrial Fibrosis Derived From Integrated Backscatter on the Outcome of Catheter Ablation for Atrial Fibrillation	Yasuo Okumura et. al	73
Development of novel antibody drug to chemoresistant and advanced pancreatic ductal adenocarcinoma	Makoto Sano	76
Hemodialysis for Removing the Contrast Medium from the Coronary Sinus during Coronary Angiography — a Novel Approach to Prevent Contrast-Induced Nephropathy in a Swine Model.....	Seiji Fukushima et. al	78
Development of control algorithm for biventricular assist system	Kin-ich Nakata et. al	81
Mechanisms of plaque progression and regression in coronary artery atherosclerosis.....	Atsushi Hirayama	85
Cellular and Molecular Medicine of Refractory Immune and Allergic Disease	Chisei Ra	88
Study on the mechanism of exaggeration by both influenza virus and oral/respiratory tract bacteria and the pathogenesis of exaggeration for respiratory disease	Tatsuo Yamamoto et. al	94
Researches to develop advanced medicines based on the chemical genomics	Noboru Fukuda et. al	99
Dual-lead SCS for the treatment of post-stroke pain	Takamitsu Yamamoto et. al	105
Role of the Section of Morphology and Recent changes of User's needs	Koichi Inoue et. al	111
Performance comparison between tandem quadrupole type mass spectrometer Quattro Premire XE and Xevo TQ-S tandem	Kazuhiro Watanabe et. al	115
Changes of F-wave induced by rTMS of the motor cortex	Takamitsu Yamamoto et. al	129
Radionuclide in the air of Nihon University School of Medicine.....	Eiichi Sanuki et. al	133
Medical Research Activities Supported by the Section of Laboratory Animals.....	Junichi Fujita et. al	136

臍帯血，臍帯組織幹細胞を用いた新規細胞治療の開発

麦島秀雄¹⁾，松本太郎²⁾，藤井里奈¹⁾，谷ヶ崎博¹⁾，石毛美夏¹⁾，
小林寿美子³⁾，野呂知加子⁴⁾，鈴木 孝⁵⁾

Development of novel cell therapies using stem cells in umbilical cord blood and cord tissue

Hideo MUGISHIMA¹⁾，Taro MATSUMOTO²⁾，Hiroshi YAGASAKI¹⁾，Mika ISHIGE¹⁾，
Sumiko KOBAYASHI³⁾，Chikako NORO⁴⁾，Takashi SUZUKI⁵⁾

要旨

本研究では，種々の幹細胞マーカーを指標に臍帯に存在する幹細胞・前駆細胞のスクリーニングを行い，同定した細胞の形質解析，機能解析を行った。その結果，臍帯動静脈の内皮近傍や，臍帯動静脈筋層とWharton's jellyの境界部に異なった幹細胞マーカー発現プロファイルを示す細胞群が集族していることが明らかになった。これらの中からp75 neurotrophin receptor (p75NTR) 陽性で神経細胞やグリア細胞での分化能を示す神経堤幹細胞などが同定された。臍帯血や臍帯は分娩後，ほぼ無侵襲的に採取され，その利用に関しては倫理的な問題も少ないため，難治性神経疾患など多くの疾患に対する細胞治療への応用が期待される。

1. はじめに

臍帯血には，造血幹細胞以外にも間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) や，血管内皮前駆細胞といった幹細胞や前駆細胞が存在することが明らかになっている。最近米国において脳性麻痺の小児に自己臍帯血を移植して症状が改善されたことが報告され，日本でも臨床試験が開始されている。また臍帯や胎盤といった胎児付属物の中に存在する幹細胞・前駆細胞についても再生医療の細胞ソースとして研究が進められている。たとえば臍帯の結合組織であるWharton's JellyにはMSCが比較的豊富に存在し，骨，軟骨，脂肪といった間葉系に由来する細胞の他，神経系の細胞や肝細胞などへの分化能を有することが報告されている¹⁾。その一方でこれら胎児付属物に含まれる幹細胞・前駆細胞の種類や局在，特異的マーカーについては不明な点が多い。そこで本研究では，ヒト臍帯を種々の幹細胞マーカーを用いた免疫組織学的検討により幹細胞の局在解析を行った。そして神経堤由来細胞マーカーであるp75 neurotrophin receptor (p75NTR) を指標にした

免疫組織化学的検討や，神経堤に由来する細胞系列を追跡できる遺伝子改変マウスを用いた検討により，臍帯組織に神経堤由来未分化細胞が存在するか検索し，さらにその細胞の形質や分化能を検討した。

2. 対象および方法

(1) 実験動物

動物実験は日本大学医学部動物実験運営内規に従って行った。神経堤由来細胞特異的にGFP (green fluorescent protein)を発現するP0-Cre/Floxed-EGFPダブルトランスジェニックマウスは慶応大学医学部 岡野栄之博士より供与を受けた。遺伝子改変マウスの飼育・繁殖，実験に関しては，日本大学遺伝子組換え実験実施規程に定める学長の確認をうけて実施した。

(2) ヒト臍帯

ヒト臍帯は，横須賀市立市民病院，日本大学医学部附属板橋病院および愛和病院で妊婦から予め同意

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野
2) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野
3) 日本大学医学部内科学系血液膠原病内科学分野
4) 日本大学生産工学部応用化学科
5) 日本大学薬学部薬学科
麦島秀雄：mugishima.hideo@nihon-u.ac.jp

を得、妊娠36週から39週に帝王切開または経膈分娩に伴い生じた破棄予定の胎児付属物から採取した。採取した臍帯は生理食塩水内で保存し、採取24時間以内に実験に用いた。ヒト臍帯を用いたすべての実験は、横須賀市立市民病院倫理委員会および日本大学医学部附属板橋病院 臨床研究審査委員会の承認の下に行った。ヒト臍帯の写真と模式図を図1に示す。

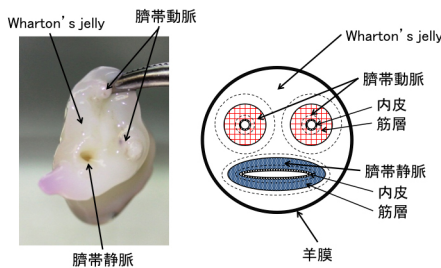


図1. 臍帯組織と模式図

(3) 免疫組織学的検討

ヒト臍帯組織は、4%パラホルムアルデヒドで固定後、OCTコンパウンドで包埋し、凍結組織切片標本を作製した。10%ヤギ血清、1%ウシ血清アルブミン (BSA) 含有 Tris buffered saline (TBS) を1時間作用させ非特異的結合をブロックした後、一次抗体としてマウス抗ヒト p75NTR (1:100)、マウス抗ヒト CD90 (1:100)、ウサギ抗ヒト CD105 (1:100)、ウサギ抗ヒト CD146 (1:100)、ウサギ抗ヒト PDGFレセプターβ (PDGFRβ, 1:100)、ウサギ抗ヒトネスチン (1:100)、ウサギ抗ヒト von Willebrand factor (vWF, 1:5000)、ウサギ抗ヒト NG2 (1:100)、ウサギ抗ヒト CD34 (1:100)、マウス抗ヒト平滑筋αアクチン (ASMA, 1:100) 抗体を4℃下に一晩作用させた。二次抗体として Alexa 488 ヤギ抗マウス IgG, Alexa 488 ヤギ抗ウサギ IgG, Alexa 594 ヤギ抗マウス IgG, Alexa 594 ヤギ抗ウサギ IgG (すべて 1:500) を室温下に1時間作用させた。5 μg/ml ヘキスト 33342 を室温下に15分間作用させ核染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus Fluoroview FV10i) を用いてマーカー陽性細胞の局在や発現プロファイルを評価した。また臍帯組織から臍帯動脈を機械的に剥離後、酵素処理 (コラゲナーゼ type I : コラゲナーゼ type II : ディスパーゼ = 5 : 5 : 2) により細胞を単離

し、サイトスピン法を用いてスライドグラスに付着後、上記一次抗体および二次抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、細胞の形質解析を行った。

(4) ニューロスフェアアッセイ

臍帯動脈から酵素処理をして単離した細胞を、ニューロスフェア培地に懸濁し、96 ウェル平底プレートに 1×10^4 / well の細胞密度で播種し、浮遊培養を行った。ニューロスフェア培地は B-27 supplement, 20 ng/ml 上皮成長因子 (EGF), 10 ng/ml 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2), 10 ng/ml 白血病阻止因子 (LIF) を添加した DMEM/F12 培地を用いた。培養7-10日目に形成されたスフェアを顕微鏡下に観察した。また形成されたスフェアをサイトスピン法を用いてスライドグラスに付着させた後、ネスチン, p75NTR に対する免疫細胞染色を行った。DAPIにて核染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像解析を行った。また形成したスフェアの DNA 合成能を調べるため、スフェアへの 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) の取り込みを検討した。EdUアッセイは Invitrogen 社製のキットを用い、付属のプロトコールに従って実験を行った。

(5) 神経分化誘導

神経細胞への分化誘導は、臍帯動脈由来スフェアを96ウェル平底プレートに播種し、1 mM 2-メルカプトエタノール 添加 Minimum Essential Medium α (MEM α) 培地にて5% CO₂, 37℃で24時間培養した。その後、10% ウシ胎児血清 (FBS), 35 ng/ml オールトランスレチナール 添加 MEM α 培地にて3日間培養した。そして誘導開始5日目にフィブロネクチンコート8ウェルチャンバースライドに培養細胞を移し、10% FBS, 5 μM Forskoline, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF-2, 10 ng/ml ヒト脳由来神経栄養因子 (BDNF) 添加 MEM α 培地で7日間培養した。4%パラホルムアルデヒドで4℃, 30分固定し、一次抗体としてマウス抗 microtubule associated protein 2 (MAP2, 1:100)、マウス抗 neurofilament 200 (NF200, 1:50)、マウス抗ヒトβIIIチューブリン (1:100)、マウス抗 oligodendrocyte marker O4 (O4, 1:50)、マウス抗ヒト glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:00) 抗体を4℃で一晩作用させた。二次抗体として Alexa 488 ヤギ抗マウス IgG, Alexa 594 ヤギ抗マウス IgG

(すべて1:500) を室温下に1時間作用させた。DAPIを室温下に30分間作用させ核染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像解析を行った。

(6) P0-Cre/Floxed-EGFPマウス胎仔血と臍帯の解析

雄性のP0-Cre/Floxed-EGFPマウスと雌性のCrlj:CD1 (ICR) マウスを交配し、妊娠15.5日 (E15.5) に胎仔を帝王切開で取り出した。2 mM EDTA添加 phosphate buffered saline (PBS) 1 mlが入った12ウェルディッシュに胎仔を入れ、臍帯を切断した。数分後、ディッシュに貯まった胎仔血をピペットで回収した後に臍帯を採取した。胎仔血は2mM EDTA添加PBS中に浮遊させ、溶血試薬を用いて溶血後、有核細胞を回収し、FACSCaliburフローサイトメーターとCellQuestソフトウェアを用いて、GFP陽性細胞の解析を行った。アイソタイプコントロールとして、ウサギIgG1を使用した。胎仔臍帯の免疫組織学的検討は、E15.5胎仔臍帯より凍結切片標本を作製し、抗原賦活後、1% BSA, 0.5% Triton X-100含有TBSにて透徹を行い、10%ヤギ血清, 1% BSA含有TBSにてブロッキングを行った。そして一次抗体としてウサギ抗GFP (1:1000) およびウサギ抗ラットp75NTR (1:5000) 抗体を4°Cで一晩作用させた。二次抗体としてAlexa 594ヤギ抗ウサギIgG (1:500) を室温下に1時間作用させた。ヘキスト33342を室温下に30分間作用させ核染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像解析を行った。

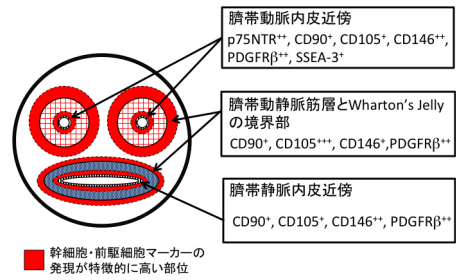


図2. 臍帯における幹細胞・前駆細胞マーカーの高発現部位

CD105, CD146, PDGFR β 陽性を示す細胞は臍帯動脈内皮近傍および筋層内に認められ、特にCD146およびPDGFR β 強陽性を示す細胞が臍帯動脈内皮直下に集簇していた。またWharton's jellyにおける幹細胞・前駆細胞の局在は、CD90, CD146陽性を示す細胞が、臍帯動脈筋層とWharton's jellyの境界部に偏在して検出された。一方、CD105はWharton's jellyを構成する大部分の細胞にびまん性に発現が認められた。臍帯組織から酵素処理により単離した細胞の形質解析を行った結果、MSCマーカーとして知られるCD90, CD105, CD146を共発現する細胞や、Multipotent-differentiating stress enduring (MUSE) 細胞のマーカーとして知られるCD105, SSEA-3を共発現する細胞などが同定された (図3)。以上の結果より、臍帯動脈およびWharton's jellyには、異なった局在や幹細胞マーカー発現プロファイルを示す、数種類の幹細胞・前駆細胞が存在することが示唆された。

3. 結果

(1) ヒト臍帯の免疫組織学的検討

ヒト臍帯組織より凍結切片を作製し、神経堤由来細胞マーカー p75NTRや、MSCマーカー CD90, CD105, CD146, PDGFR β の発現や局在を検討した。血管構造との位置関係を明確にするために、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞をそれぞれ抗vWF抗体および抗ASMA抗体を用いて共染色を行った。その結果、検討した幹細胞・前駆細胞マーカーが重複して高発現する部位は、臍帯動脈の内皮近傍および臍帯動脈筋層とWharton's jellyの境界部であった (図2)。p75NTR陽性を示す細胞は、臍帯動脈の内皮細胞直下のみに限局して認められた。CD90,

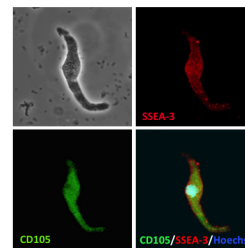


図3. 臍帯組織から単離・同定されたSSEA-3⁺ CD105⁺細胞

(2) 臍帯動脈p75NTR陽性細胞の形質解析

臍帯動脈内皮下に局在するp75NTR陽性細胞に注目して、MSCマーカー (PDGFR β, CD90, CD146)

や血管周皮細胞マーカー (NG2) の発現を免疫組織化学的に検討した。その結果、p75NTR陽性細胞は、PDGFR β 、CD90、CD146、NG2いずれのマーカーも共発現していることが明らかとなった。次にp75NTR陽性細胞の形質をより明確にするため、機械的に剥離した臍帯動脈から酵素処理により単離した細胞に対して蛍光免疫染色を行った。その結果、p75NTR陽性細胞の中には、小型球形でp75NTR強陽性を示す細胞と、それよりも大型で紡錘形のp75NTR弱陽性を示す細胞が存在することが明らかになった。いずれのp75NTR陽性細胞も、PDGFR β 、CD90、NG2陽性を示した。一方、これらの細胞は血管内皮細胞マーカーvWFや造血幹細胞マーカーCD34は陰性であった。以上の結果より、臍帯動脈内皮下に存在するp75NTR陽性細胞は、MSCや血管周皮細胞の形質を有していることが明らかになった。

(3) 臍帯動脈由来細胞のスフェア形成能および神経分化能の検討

次に臍帯動脈から単離した細胞が、神経幹細胞様の自己複製能と分化能を有するかを検討した。臍帯動脈より酵素処理により単離した細胞をニューロスフェア法にて浮遊培養を行った結果、培養2日目頃より、複数のスフェアが出現し、スフェアは徐々に増大し、培養7、8日目には直径約100 μ mに達した。スフェアを構成する細胞は細胞核に一致してEdUの取り込みが認められたことから、DNA複製能を有することが明らかとなった。スフェアの免疫組織染色を行った結果、スフェアを形成する大部分の細胞が神経幹細胞マーカーであるネスチンおよびp75NTRを発現していることが明らかになった。以上の結果より、臍帯動脈に由来する細胞にニューロスフェア形成能を有する神経幹細胞様の形質をもった細胞が存在することが明らかになった。形成されたスフェアをさらに神経分化誘導培地で培養した結果、神経細胞マーカーであるNF200、 β IIIチューブリン、MAP2陽性を示す双極性に長い突起を伸ばした細胞が認められるようになった。またグリア細胞分化誘導培地で培養を行った結果、アストロサイトマーカーであるGFAPやオリゴデンドロサイトマーカーであるO4陽性の紡錘型の形態を呈する付着細胞が誘導された。以上の結果より、臍帯動脈細胞に

由来するニューロスフェアが神経細胞およびグリア細胞への分化能を有することが示された。

(4) P0-Cre/Floxed-EGFPマウス胎仔を用いた神経堤由来細胞の局在解析

神経堤に由来する細胞をトレーシングできるP0-Cre/Floxed EGFPマウスの胎仔血を採取し、フローサイトメトリ解析を行った結果、胎仔血有核細胞中の約0.05%にGFP陽性細胞が検出された。また、P0-Cre/Floxed EGFPマウス胎仔の臍帯から凍結組織切片を作製し、抗GFP抗体にて免疫組織染色を行った結果、GFP陽性細胞が臍帯動脈内皮下に局在している所見が認められた (図4)。GFP陽性細胞の多くは内皮細胞に隣接するように存在していたが、内皮細胞にはGFPの発現は認められなかった。連続切片標本を用いた検討では、GFP陽性細胞の局在部位に一致してp75NTR陽性細胞が同定された。以上の結果より、出生直前のマウス胎仔血および臍帯動脈内皮下には、p75NTR陽性の神経堤に由来する細胞が存在することが明らかになった。

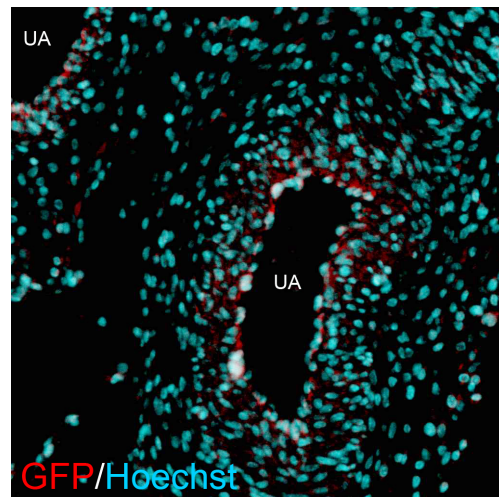


図4. 臍帯動脈内皮下に同定されたGFP+神経堤由来細胞 (UA: 臍帯動脈)

4. 考察

本研究では、免疫組織化学的検討により臍帯に存在する幹細胞・前駆細胞の形質と局在を明らかにした。MSCはプラスチックディッシュへの接着性と高い増殖能を有し、骨、軟骨、脂肪など間葉系細胞系列に分化できるという機能から定義された細胞である。国際細胞治療学会が定めたminimal criteria

では、MSCの陽性マーカーとしてCD105, CD73, CD90をあげている。この基準は培養MSCに当てはまるものであり、生体内に存在するMSCにこれらのマーカーがすべて発現しているとは限らない。今回の検討でも、各種幹細胞マーカーの局在部位は一致せず、それぞれ異なった分布を示した。このことから、臍帯組織には、その形質や発現マーカーが異なる複数の幹細胞・前駆細胞が存在することが示唆された。生体内におけるMSCマーカーとしてCD146²⁾やPDGFRβ³⁾が報告されている。PDGFRβはMSCの機能性マーカーとして有用であることも報告されている⁴⁾。p75NTRは神経堤由来細胞のマーカーとして知られているが、近年、生体内MSCマーカーとして有用であることも報告されている⁵⁾。今回の検討においてにおいて、p75NTR, CD90, CD105, CD146, PDGFRβといった複数のマーカーが陽性を示す細胞が観察された部位は、臍帯動脈内皮近傍と臍帯動脈筋層とWharton's jellyの境界部であった。臍帯動脈筋層とWharton's jellyの境界部ではCD90, CD105, CD146陽性の細胞が集簇していたが、その部位はhuman umbilical cord perivascular cell (HUCPVC)として同定されている細胞の局在部位に一致した。HUCPVCは、骨髄MSCと類似した形質を示すが、骨髄MSCより増殖活性が高く、免疫原性が低いことが報告されている⁶⁾。既報によると、ヒト臍帯には骨、軟骨、脂肪といったMSCに特徴的な分化能を示す細胞のみならず、皮膚⁷⁾や、血管内皮⁸⁾、神経系^{9,10)}、肝細胞¹¹⁾などに分化する細胞が存在することが報告されている。さら

に免疫寛容性を示す細胞¹²⁾や、造血幹細胞ニッチとしての機能を持つ細胞¹⁾の存在も報告されている。今後、幹細胞マーカーの発現プロファイルを指標にこれらの幹細胞群を選別、増殖させ、その特性や機能を明確にすることにより、様々な疾患を対象とした細胞治療に応用していくことが期待できる(表1)。近年、MSCの一部には、ストレス耐性でES細胞に類似した多能性細胞(MUSE細胞)が存在することも明らかになっている¹³⁾。本研究において、臍帯動脈内皮下にMUSE細胞のマーカーとして知られているSSEA-3, CD105二重陽性細胞が少数ながら同定された。この所見は、臍帯組織にもES細胞様の多能性を有した幹細胞が存在する可能性を示唆している。

臍帯組織の免疫組織化学的検討により、臍帯動脈内皮下に限局してp75NTR陽性細胞が検出された。p75NTRは神経堤由来細胞のマーカーとして知られており、この細胞が胎生期の神経堤に由来する未分化細胞であれば、神経疾患などに対する治療用細胞ソースとしての臨床応用が期待できる。本研究により、p75NTR陽性細胞は、PDGFRβ, CD90, CD146, NG2といったマーカーを発現しており、MSCや血管周皮細胞の形質を有していることが明らかになった。Crisanら³⁾は骨格筋、膵臓、脂肪組織、胎盤など多くの組織で、血管内皮下にMSC活性を持つ細胞が存在し、この細胞の特徴としてCD146, PDGFRβ, NG2を発現していることを報告している。p75NTRはcolony-forming unit fibroblast (CFU-F)活性が高い生体内骨髄MSCのマーカーとしても知られてい

表1. 臍帯由来幹細胞・前駆細胞を用いた細胞治療の可能性

細胞種	マーカー分子	対象疾患
神経堤由来細胞	p75NTRなど	脊髄損傷、パーキンソン病、脳性麻痺
間葉系幹細胞 (治療用免疫制御細胞)	CD146, PDGFRβ, CD105など	GVHD、慢性炎症性腸疾患
造血ニッチ細胞 (臍帯血移植生着促進細胞)	SDF-1, Jagged1, nestinなど	再生不良性貧血
ES様多能性細胞	Oct3/4, Nanog, SSEA-3*/CD105*など	重症心不全、糖尿病など

ることから, 今後, p75NTR陽性細胞を単離し, CFU-F活性やMSCのような多分化能があるか検討する必要がある。

神経堤由来細胞をGFPでトレースできるP0-Cre/Floxed EGFPマウス胎仔を用いて, 解析を行った結果, マウス出生直前の臍帯動脈内皮下には, 神経堤に由来する細胞が存在することが明らかになった。この遺伝子改変マウスの結果より, ヒト臍帯動脈内皮下に存在するp75NTR陽性細胞も, 神経堤に由来する未分化細胞である可能性が高いと思われる。今後, Pax3, Twist, Sox10, Wnt1などの神経堤マーカーの発現を評価し, この細胞が神経堤由来細胞であることを確認するとともに, どのような分化段階にあるかを明らかにする必要がある。最近, Nagoshiらは, マウス発生の途中において神経堤由来細胞がaorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域から遊走して血中に入り, 胎仔肝に運ばれさらに出生直前には多分化能を維持したまま骨髄に分布していくことを明らかにした¹⁴⁾。今回の検討では, どのような経路で神経堤由来細胞が臍帯動脈内皮下に到達したか明らかではないが, P0-Cre/Floxed EGFPマウス胎仔の胎仔血中にもGFP陽性細胞が検出されたことから, 末梢血中に入った神経堤由来細胞が, 血管内皮を介して内皮下に遊走し定着した可能性が示唆される。

臍帯動脈から単離した細胞の自己複製能と分化能を検討した結果, ニューロスフェアアッセイにてスフェアを形成し, さらに神経細胞やグリア細胞への分化能を有することが明らかとなった。神経堤に由来する未分化細胞は, 神経堤由来幹細胞 (neural crest-derived stem cell: NCSC) と呼ばれ, 自己複製能と神経堤由来細胞への多分化能を有するといった特性を持つ¹⁵⁾。NCSCは胎児組織に豊富に存在するほか, 成体組織においても, 骨髄, 毛包, 脊髄後根神経節, 腸管, 皮膚などに微量に存在することが明らかにされている。NCSCに特異的なマーカーは確定していないが, p75NTRはNCSCをプロスペクティブに判定する良いマーカーであると考えられている。今回の実験にて形成されたスフェアは, 神経幹細胞に特徴的なネスチンとともに, p75NTRを発現していた。この所見は, 臍帯動脈組織中にもNCSCが存在することを示唆している。神経堤由来細胞, 特にNCSCは, その発生学的特徴から, 神経再生医

療への応用が期待される。一方, 成体組織中に存在するNCSCは非常に少なく, また採取が可能な組織も骨髄や皮膚に限られている。今回, 臍帯組織に神経堤由来未分化細胞を同定したことは, 胎児付属物由来幹細胞を用いた再生医療を目指す上で非常に意義深いと思われる。臍帯は, 分娩後は不必要な組織であり, 検体の採取に侵襲や倫理的問題はほとんど生じない。母体由来細胞の混入がなく, 免疫寛容性が高い。成体組織よりも未分化で増殖活性の高いNCSCが採取できる可能性が高いため, 増幅培養が容易であると思われる。今後, 効率的な細胞単離法や, 至適培養条件を確立することにより, 体外増幅法が確立すれば, 神経再生医療の強力な新規戦略となる可能性がある。

5. 結語

ヒト臍帯組織の免疫組織化学的検討により, ヒト臍帯組織には異なった形質を有するMSCが存在することが明らかになった。また神経堤由来細胞を系譜追跡できる遺伝子改変マウスを用いた検討などにより, 臍帯動脈内皮下にp75NTR陽性を示す神経堤由来未分化細胞の存在が明らかになった。臍帯組織はその採取に際し, 侵襲や倫理的問題がほとんどないため, 難治性神経疾患など様々な疾患を対象とした再生医療や細胞治療に応用していくことが期待できる。

謝辞

本研究は, 日本大学学術研究助成金総合研究 (総11-017継続 総10-027) による助成を受けて実施したものである。

参考文献

- 1) Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif* 2011; **44 Suppl 1**: 60-69.
- 2) Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, *et al.* Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol* 2008; **36**: 1035-1046.
- 3) Crisan M, Yap S, Casteilla L, *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; **3**: 301-313.
- 4) Tokunaga A, Oya T, Ishii Y, *et al.* PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *J Bone Miner Res* 2008; **23**: 1519-1528.
- 5) Bühring HJ, Battula VL, Treml S, *et al.* Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann NY Acad Sci* 2007; **1106**: 262-271.

- 6) Ennis J, Sarugaser R, Gomez A, *et al.* Isolation, characterization, and differentiation of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs). *Methods Cell Biol* 2008; **86**: 121-136.
- 7) Schneider RK, Pullen A, Kramann R, *et al.* Long-term survival and characterisation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on dermal equivalents. *Differentiation* 2010; **79**:182-193.
- 8) Alaminos M, Perez-Kohler B, Garzon I, *et al.* Trans-differentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 2010; **223**: 640-647.
- 9) Fu YS, Cheng YC, Lin MY, *et al.* Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells* 2006; **24**: 115-124.
- 10) Zhang HT, Fan J, Cai YQ, *et al.* Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells. *Differentiation* 2010; **79**: 15-20.
- 11) Zhang YN, Lie PC, Wei X. Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy* 2009; **11**: 548-558.
- 12) Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, *et al.* Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* 2008; **26**: 2865-2874.
- 13) Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, *et al.* Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 8639-8643.
- 14) Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, *et al.* Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell* 2008; **2**: 392-403.
- 15) Nagoshi N, Shibata S, Nakamura M, *et al.* Neural crest-derived stem cells display a wide variety of characteristics. *J Cell Biochem* 2009; **107**: 1046-1052.

ヒトマスト細胞活性化阻害によるアレルギー疾患の 新規治療薬の開発

岡山吉道¹⁾, 照井 正¹⁾, 権 寧博¹⁾, 浅野正岳²⁾, 秋久俊博³⁾

Development of new therapy of allergic diseases by inhibition of human mast cell activation

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Tadashi TERUI¹⁾, Yoshihiro GON¹⁾,
Masatake ASANO²⁾, Toshihiro AKIHISA³⁾

要旨

FcεRI β鎖の発現が抑制されたマスト細胞ではFcεRIの架橋による脱顆粒, prostaglandin (PG) D₂産生, サイトカイン産生は統計学的有意に抑制された。β鎖の発現が抑制されたマスト細胞ではLynの細胞膜への移行が阻止されていることがわかった。Lynの細胞膜への移行を阻止するため, FcεRI β鎖のimmunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) のチロシン残基をリン酸化させたペプチドをマスト細胞へ導入するとIgE依存性の活性化が抑制された。FcεRI β鎖のITAM のチロシン残基をリン酸化させたペプチドは細胞内Lynに会合し, Lynが細胞膜へ移行するのを抑制していた。したがって, FcεRI β鎖とLynの会合を阻止することによってヒトマスト細胞のIgE依存性の活性化を抑制できることがわかり, β鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチドがアレルギー疾患の治療に有用であることが示唆された。

1. はじめに

マスト細胞は即時型のアレルギー反応を惹起するのみならず, マスト細胞の産生, 放出するケモカインやサイトカイン, ロイコトリエンなどのメディエーターにより, 遅発型のアレルギー反応および慢性炎症を惹起する, 炎症のコンダクターであり, マスト細胞の制御が治療の一つの鍵になる。現在のマスト細胞活性化阻害薬はげっ歯類のマスト細胞の活性化は抑制するが, ヒトマスト細胞の活性化に対する抑制効果はない。唯一, ヒト化された抗ヒトIgE抗体はIgEと高親和性IgE受容体FcεRIの結合を阻害し, ヒトマスト細胞の活性化を阻害するが, 極めて高価である。

我々の研究室ではマウスFcεRI β鎖の機能に関して詳細な検討を行っている。β鎖immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) には定型的なITAM (YXXLX₇₋₁₁YXXL) と異なり3つ目の非定型的なチロシン残基 (YEELNVYSPIYSEL) が存在す

る。細胞膜上に発現しているFcεRIが架橋される条件下では, β鎖ITAMのすべてのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した (FFF) マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) ではFcεRIの架橋による活性化Lynとβ鎖との会合, Syk, LAT, SHIP-1などのリン酸化が減少し, 脱顆粒および脂質メディエーターの産生能が野生型 (YYY) BMMCと比較して低下するが, 一方NF-κBの転写活性化能およびIL-6, IL-13, TNF-αの産生は顕著に亢進している¹⁾。ヒトのβ鎖の役割に関しては, NIH3T3細胞にヒトFcεRI α鎖とγ鎖を共発現した細胞とヒトFcεRI α鎖とγ鎖とβ鎖を共発現した細胞にさらにSykとLynを共発現させ, FcεRIの架橋によりFcεRI α鎖とγ鎖とβ鎖を共発現した細胞の方が, α鎖とγ鎖のみを共発現した細胞に比較してSykとLynのリン酸化の程度が大きいことよりβ鎖はシグナル情報伝達の増幅因子だと報告されている^{2,3)}。また, β鎖の欠損マウスにヒトα鎖を過剰発現させ, さ

1) 日本大学医学部

2) 日本大学歯学部

3) 日本大学理工学部

岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

らにヒト β 鎖を導入したマウスのほうがヒト β 鎖を導入しなかったマウスに比較してI型のアレルギー反応が大きかったことより、 β 鎖はシグナル情報伝達の増幅因子だと結論付けられている⁴⁾。シグナル分子は会合する蛋白により異なる細胞応答が誘導されることもあり、ヒトの β 鎖の役割を検討するには、 β 鎖が実際に発現しているヒトマスト細胞あるいは好塩基球での検討が必要である。また、マウスとヒトでは β 鎖の役割に種差があるかどうか不明のままである。その理由として、市販のヒトFc ϵ RI β 鎖に対する抗体は内在性のヒトのマスト細胞や好塩基球Fc ϵ RI β 鎖を捕らえることができなかったことが挙げられる。我々は感度が高く、特異性の高い抗体作成に成功した⁵⁾。この抗体を用いてアレルギー疾患患者（アトピー性角結膜炎および春季角結膜炎）および健常人の結膜のマスト細胞の $\alpha\beta\gamma_2$ と $\alpha\gamma_2$ の発現比率を免疫組織化学染色によって調べたところ、アレルギー患者でマスト細胞数が増加しているのみならず、 β^+ cells/ α^+ cellsの比率はアレルギー疾患患者(0.69 \pm 0.08)で健常人(0.07 \pm 0.16)に比較して有意に増加していた。また、 β^+ マスト細胞は上皮細胞周囲に局在していた⁶⁾。すなわちアレルギーと接触しやすい場所にFc ϵ RI β 鎖陽性マスト細胞は増加していることがわかった。

今回、我々はFc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドを細胞膜透過性ペプチドと結合させ、ヒトマスト細胞に導入すると、IgE依存性のヒトマスト細胞の活性化をほぼ完全に抑制することを見出した。

2. 対象及び方法

倫理的考慮:生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている。安全対策に関しては、日本大学遺伝子組換え実験実施規定に定める学長の確認を受けて実施した。

細胞: ヒト末梢血および臍帯血培養マスト細胞はすでに報告した方法を用いて樹立した⁷⁾。ヒト末梢血より単核球を分離し、単核球から lineage negative 細胞(CD4⁻, CD8⁻, CD11b⁻, CD14⁻, CD16⁻, およびCD19⁻細胞)を分離したのち、臍帯血ではCD34⁺

細胞を分離したのち、stem cell factor (SCF; 200 ng/ml, PeproTech EC Ltd., London, England), IL-6 (50 ng/ml, PeproTech EC Ltd.) およびIL-3 (1ng/ml, PeproTech EC Ltd.) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と Iscove's modified Dulbecco's medium) で培養した。42日目にPBSでIscove methylcellulose mediumを洗浄し、SCF (100 ng/ml) およびIL-6 (50 ng/ml) を含んだIscove's modified Dulbecco's mediumで培養した。

RT-PCR: マスト細胞の総RNAはRNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて抽出し、精製した。500 μ g/mL oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 5 x first strand buffer (Invitrogen), 0.1 M DTT (Invitrogen), SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) および RNase OUT (Invitrogen) を用いてcDNAに逆転写を行った。定量的RT-PCRは、TaqMan解析を用いた。Fc ϵ RI α の sense primerの配列は下記の通りである。(5'-TGGAATCCCCTACTCTACTGTGTGTA-3') antisense primerの配列は下記の通りである。(5'-CCTTAGGTTTCTGAGGGACTGC-3') また probeの配列は下記の通りである。(5'-FAM-CCTTACTGTTCTTCGCTCCAGATGGCGTGT-TRAM-3') Fc ϵ RI β , Fc ϵ RI γ およびGAPDHの primer と probeは Assays-on-Demand™ service (Applied Biosystems, 東京) のものを使用した。

遺伝子発現抑制: レンチウイルスベクターを用いた shRNA技術⁸⁾にてヒト末梢血由来培養マスト細胞Fc ϵ RI β 鎖およびLynの発現抑制をおこなった。Fc ϵ RI β とLynのコンストラクションに対する sense と antisense オリゴヌクレオチド配列のレンチウイルス発現プラスミドはSigma-Aldrichから購入した。

フローサイトメトリー: マスト細胞のフローサイトメトリーによる解析はすでに報告した方法を用いて行った⁹⁾。PEあるいはビオチン標識抗Fc ϵ RI α モノクローナル抗体(クローンCRA1), PE標識抗CD63(クローンH5C6, BD Biosciences, San Diego, CA), あるいは膜透過性モチーフ¹⁰⁾を含んだFITC標識

FcεRI β ITAM ペプチド, FcεRI β のNおよびC末端 (表1) を用いた。これらのペプチドは東レリサーチセンター (神奈川) で製作した。PE/Cy5-streptavidin は Biolegend から購入した (San Diego, CA)。

表1. FcεRI β 鎖のITAMのチロシン残基 (Y) をリン酸化させたペプチドおよびコントロールのペプチド

(1) YYY-FITC 標識
(2) YY (p) Y-FITC 標識
(3) Y (p) YY (p) -FITC 標識
(4) Y (p) Y (p) Y (p) -FITC 標識
(5) N 末端-FITC 標識
(6) C 末端 1-FITC 標識
(7) C 末端 2-FITC 標識
Y (p) ; phospho-Y

共焦点顕微鏡による解析: 共焦点顕微鏡による解析はすでに報告した方法を用いて行った⁹⁾。細胞を固定して、膜の穴あけをした後、ウサギ抗FcεRI β 抗体⁵⁾、マウス抗Lynモノクローナル抗体 (クローンLYN-01; Biovendor, Brno, Czech Republic), アイソタイプコントロールマウスIgG1, ウサギIgG, あるいはFITC標識FcεRI β ペプチド (東レリサーチセンター) とインキュベートした。次に細胞をrhodamine標識ヤギ抗マウスIgG (Millipore, Billerica, MA) あるいはAlexa Fluor 488標識ヤギ抗ウサギIgG (Invitrogen, Carlsbad, CA) とインキュベートした。FV500あるいはFV1000型共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, 東京) を用いた

イムノプロット: 細胞のライセイトとウサギ抗FcεRI β 抗体⁵⁾、抗FcεRI α 抗体, 抗FcεRI γ 抗体, 抗Lyn抗体および抗PLC γ 1抗体 (Upstate Biotechnology) および抗βアクチン抗体 (クローンC4, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) をインキュベートした。

プルダウンアッセイ: pre-cleared細胞のライセイトは、ビオチン標識FcεRI β ペプチド (東レリサーチセンター) とインキュベートした。次に streptavidin immobilized Sepharose ビーズ (GE Healthcare, Up-

psala, Sweden) を細胞ライセイトに加えそのチューブを4℃で2時間インキュベートした。ビーズを洗浄した後、回収されたタンパクをウエスタンブロット法を用いて解析した¹¹⁾。

マスト細胞の活性化: マスト細胞を0.01 ~ 30 μg/mlの抗FcεRI αモノクローナル抗体 (クローンCRA1) あるいはカルシウムイオノフォアA23187 (10⁻⁶M) で30分刺激し, ヒスタミン遊離とPGD₂産生を測定するためその細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。サイトカイン測定では6時間刺激後, 細胞上清を回収した。

脱顆粒, PGD₂産生, サイトカイン産生測定: ヒスタミン遊離とPGD₂産生は酵素免疫法, サイトカイン産生はELISA法を用いた。

統計解析: 2群間の統計学的解析はunpaired Student t-testを用いてP < 0.05を有意とした。

3. 結果

FcεRI β 鎖の発現抑制による細胞表面のFcεRIの発現とIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化への影響
FcεRIの架橋後の脱顆粒および脂質メディエーターの産生能, サイトカイン産生能におけるFcεRI β 鎖の役割を検討する目的にてレンチウイルスベクターを用いたshRNA技術にてヒト末梢血由来培養マスト細胞FcεRI β 鎖の発現抑制をおこなった。FcεRI β 鎖の発現が抑制されたマスト細胞では細胞表面のFcεRIの発現が有意に抑制された (図1A, B)。またFcεRIの架橋による脱顆粒, PGD₂産生, サイトカイン産生は統計学的有意に抑制された (図1C, D, E, F)¹²⁾。

FcεRI β 鎖がIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化を制御している機序の検討

FcεRIの架橋後にβ鎖はLynなどのSrc kinaseによってITAMのチロシン残基がリン酸化され, 同時にチロシンリン酸化されたβ鎖ITAMにLynが会合し, Lynが細胞膜へ移行するが, FcεRIβ鎖の発現が抑制されたマスト細胞ではLynの細胞膜への移行が阻止されていることがわかった (図2)。

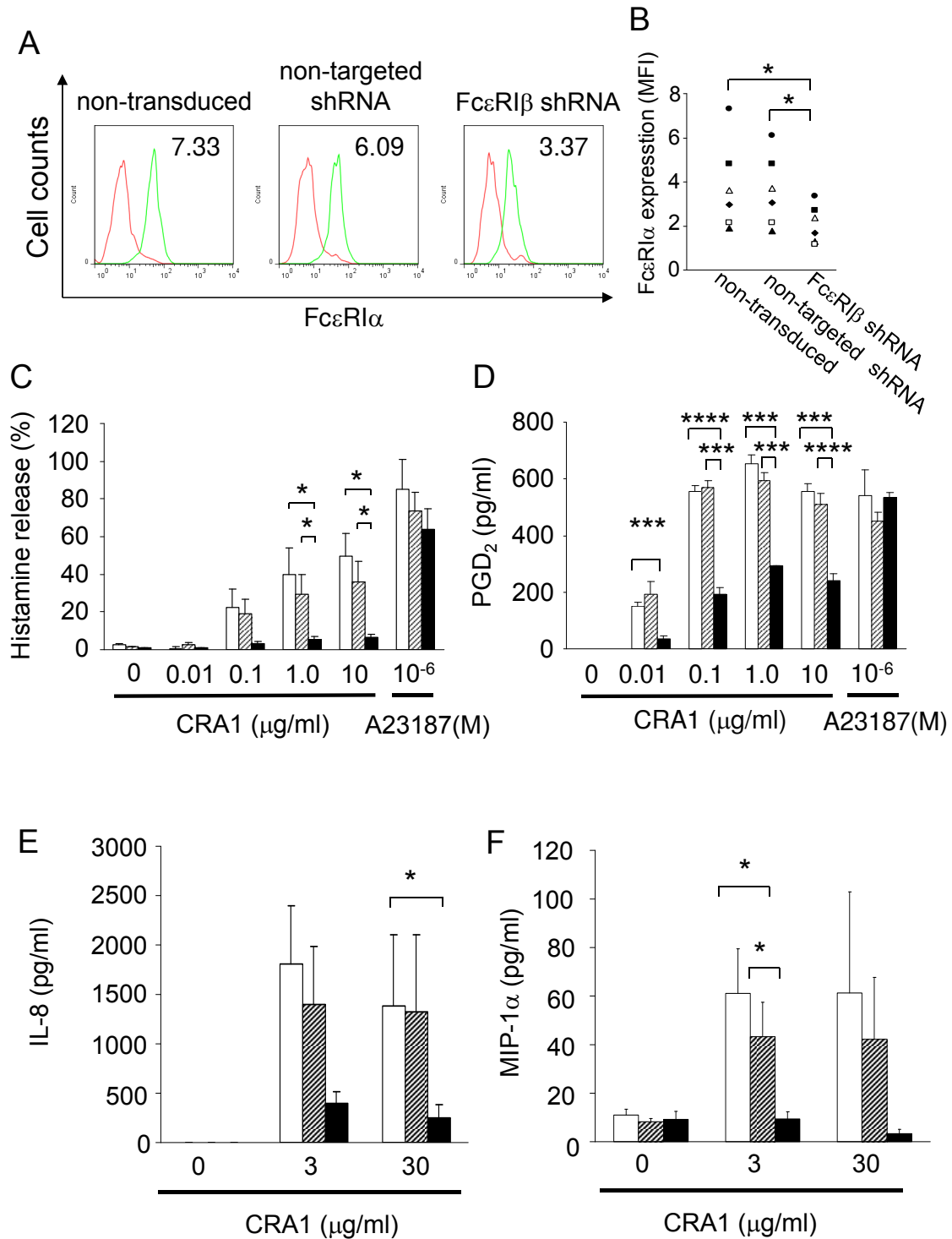


図1. FcεRIβ鎖の発現抑制による細胞表面のFcεRIの発現とIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化への影響
 A) FcεRIβ鎖の発現抑制による細胞表面のFcεRIの発現 (フローサイトメトリー解析) 赤線がアイソタイプコントロール, 緑線がFcεRIの発現
 B) はAの統計学的解析 (n = 6) MFIで解析. C-F) 白バーが非処理マスト細胞, 横線のバーがコントロールshRNAを導入したマスト細胞, 黒バーがFcεRIβ鎖shRNAを導入したマスト細胞 (文献12より引用)

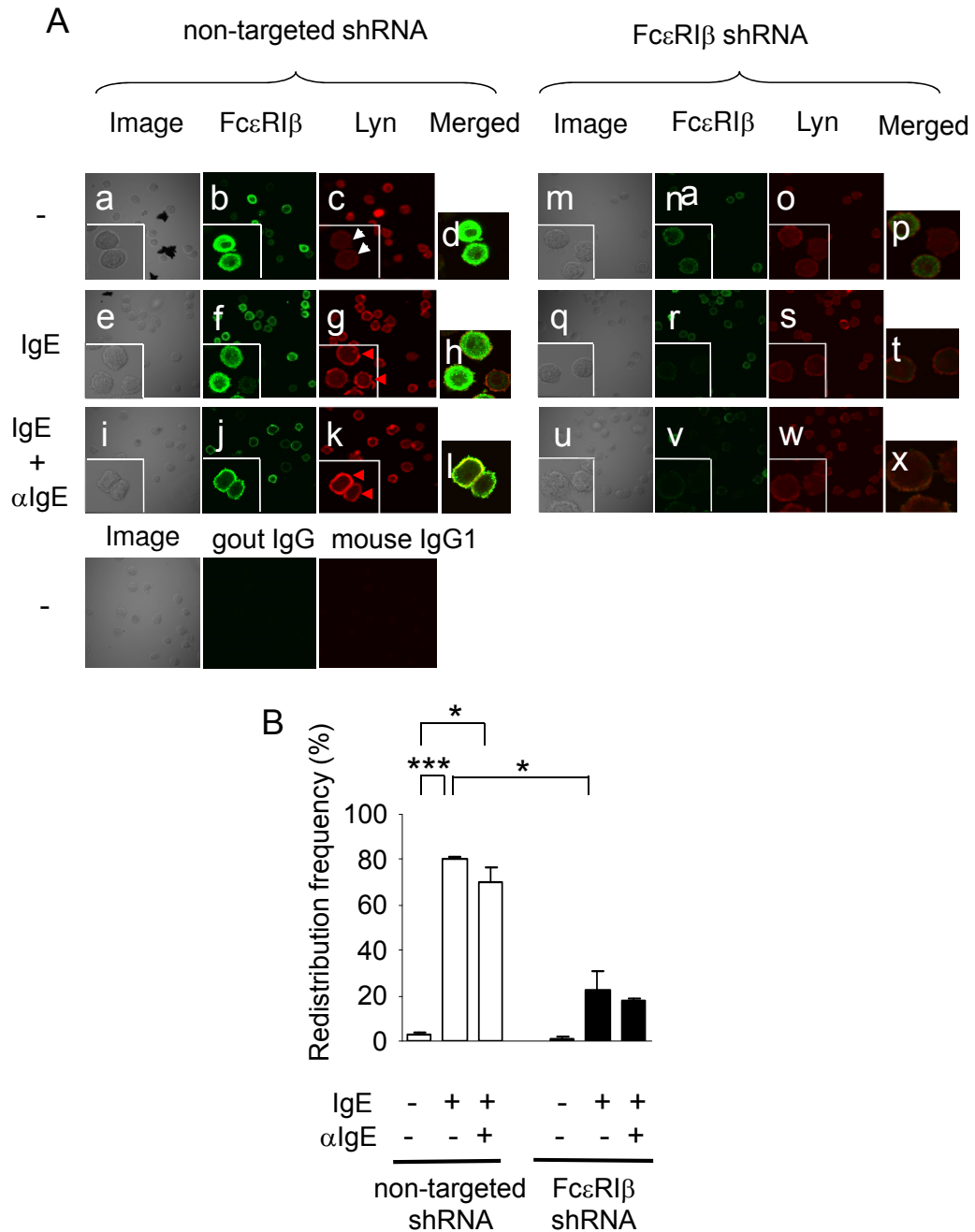


図2. マスト細胞活性化によるLynの細胞膜への移行へのFcεRIβ鎖の発現の抑制の影響

A) コントロールshRNAを導入したマスト細胞とFcεRIβ鎖shRNAを導入したマスト細胞の非刺激(-), IgE感作, IgE + 抗IgE抗体刺激後のFcεRIβ鎖とLynの細胞内局在。白矢印はLynが細胞質内に散在しているが赤矢印は細胞膜内へ局在していることを示す。

B) 赤矢印の細胞のようにLynがring状に細胞膜内へ移行した細胞を陽性細胞としてカウントした。(文献12より引用)

Lynの発現抑制によるIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化への影響

β 鎖の発現抑制されたマスト細胞 (Fc ϵ RI β shRNA) ではLynの細胞膜への移行がコントロール (control shRNAに見られる赤い環状の細胞) に比較して阻止されていた。したがってFc ϵ RI β 鎖がIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化を制御していることがこれらのデータから示唆され、Lynの細胞膜への移行を阻止することがIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化を抑制できるのではないかと考えレンチウイルス

ベクターを用いたshRNA技術にてヒト末梢血由来培養マスト細胞Lynの発現抑制を行いIgE依存性の脱顆粒を検討したところ、Lynの発現抑制によってIgE依存性のヒトマスト細胞の脱顆粒は有意に抑制された(図3)。

Fc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドのヒトマスト細胞の活性化への影響

Fc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基 (Y) をリン酸化させたペプチドおよびコントロールのペプチドを作

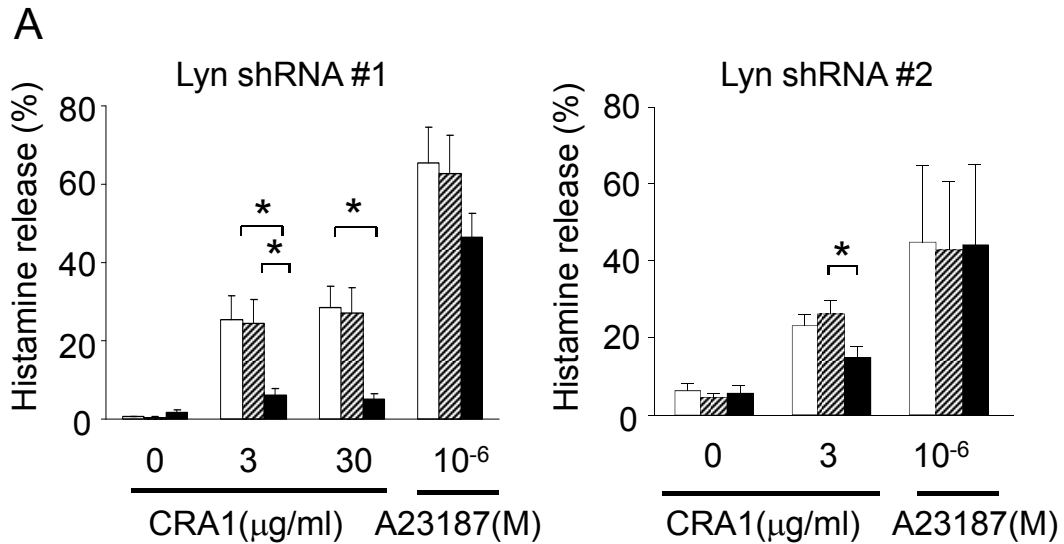


図3. Lynの発現抑制によるIgE依存性のヒトマスト細胞の活性化への影響
 白バーが非処理マスト細胞, 横線のバーがコントロールshRNAを導入したマスト細胞, 黒バーがLyn shRNAを導入したマスト細胞 (文献12より引用) #1と#2の2種類のLyn shRNAを用いた

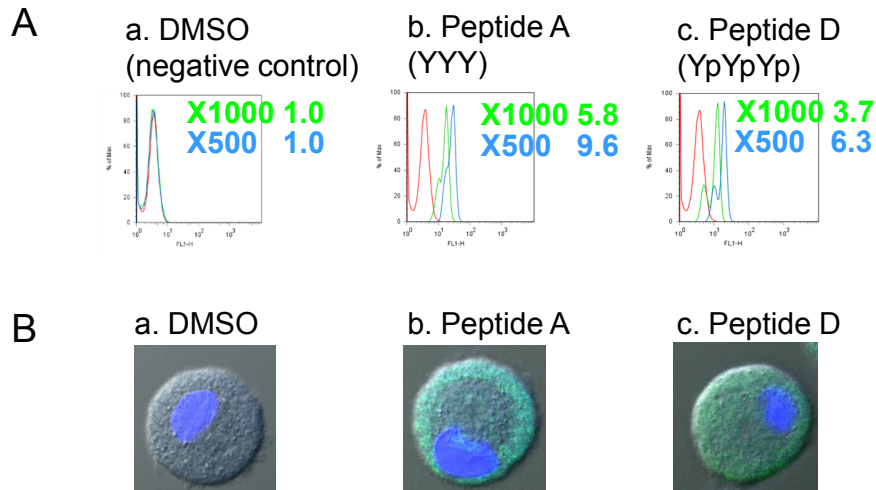


図4. ペプチドのヒトマスト細胞内への移行 (A) FACS解析と (B) 共焦点レーザー顕微鏡解析 (文献12より引用)

製した (表1)。N末端に膜透過性ペプチド (AAV-LLPVLLAAP), C末端にFITCを付けた。

これらペプチドのヒトマスト細胞内への移行を共焦点レーザー顕微鏡とFACSで確認した (図4)。このペプチドは細胞膜付近に存在することが分かった。次に β 鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチドはマスト細胞内のLynと会合することをプルダウンアッセイで確認した (図5A)。そこでヒトマスト細胞をヒトリコンビナントIgE ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) で24時間感作したのち、洗浄し、それぞれのペプチド $2\mu\text{M}$ と細胞を10分 37°C でインキュベートし、抗IgE抗体あるいはcalcium ionophore A23187で30分 37°C でインキュベートしたのちの細胞上清中に遊離されたヒスタミンを測定したところ β 鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチド [上記ペプチド (4)] および外側2つのチロシン残基をリン酸化したペプチド [上記ペプチド (3)] がIgE依存性の脱顆粒 (図5B) と PGD_2 産生 (data not shown) を統計学的有意に抑制した。我々はこの β 鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチドを特許申請した。

Fc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドのアレルギー患者の粘膜組織におけるヒトマスト細胞の活性化への影響

手術で得られたアレルギー疾患患者 (アトピー性角結膜炎および春季角結膜炎) の結膜切片を細切し、無血清培地で上記ペプチド (1) YYY-FITC標識, (4) Y (p) Y (p) Y (p) -FITC標識, (5) N terminus-FITC標識を加え30分間培養した。抗IgE抗体を加えインキュベートし、組織上清と組織中のヒスタミンを測定したところY (p) Y (p) Y (p) はIgE依存性の脱顆粒を抑制した (図5C)。

Fc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドがヒトマスト細胞の活性化を抑制する機序の検討

細胞内に移行した β 鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチドが細胞内のLynと会合するかどうかを調べる目的にて上記ペプチド (1), (4), (5) をヒトマスト細胞内に移行させた後、Fc ϵ RIを架橋

させLynの局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Fc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドは細胞内Lynに会合し、Lynが細胞膜へ移行するのを抑制していることが共焦点顕微鏡を用いた検討にて確認した。図6はペプチドが導入された細胞はペプチドをFITC標識しているため緑色に発色している。Lynは赤色に染色されている。コントロールペプチド (N末端) が導入されたマスト細胞ではマスト細胞をIgE + anti-IgEで活性化した後、約60%のマスト細胞のLynは細胞膜付近に移動し、ring様に赤く染色されるがFc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチド (YpYpYp) の入ったマスト細胞ではマスト細胞をIgE + anti-IgEで活性化した後、約20%のマスト細胞においてのみLynの細胞膜付近への移動が観察された。

Lynをもつマスト細胞、好塩基球以外の細胞における β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドの影響

U937セルライン (単球系のセルライン) をIFN- γ でインキュベートし細胞表面の高親和性IgG受容体Fc γ RIの発現を増加させたのち、Fc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドとITAMのコントロールペプチドを加え、ヒツジ抗マウスIgG抗体を用いてFc γ RIを架橋させた。24時間後に上清を回収し、IL-8産生に対する影響を比較検討した。2実験で (peptide D) YpYpYp-FITCは、ヒツジ抗マウスIgG抗体によるFc γ RIの架橋後の、IL-8産生に対して何ら影響を及ぼさなかった (data not shown)。

4. 考察

Fc ϵ RIの架橋後の脱顆粒および脂質メディエーターの産生能、サイトカイン産生能における β 鎖の役割を検討する目的にてレンチウイルスベクターを用いたshRNA技術にてヒト末梢血由来培養マスト細胞Fc ϵ RI β 鎖の発現抑制をおこなった。Fc ϵ RI β 鎖の発現が抑制されたマスト細胞ではFc ϵ RIの架橋による脱顆粒、 PGD_2 産生、サイトカイン産生は統計学的有意に抑制された。また、Fc ϵ RI β 鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドがアレルギー患者の粘膜組織におけるヒトマスト細胞

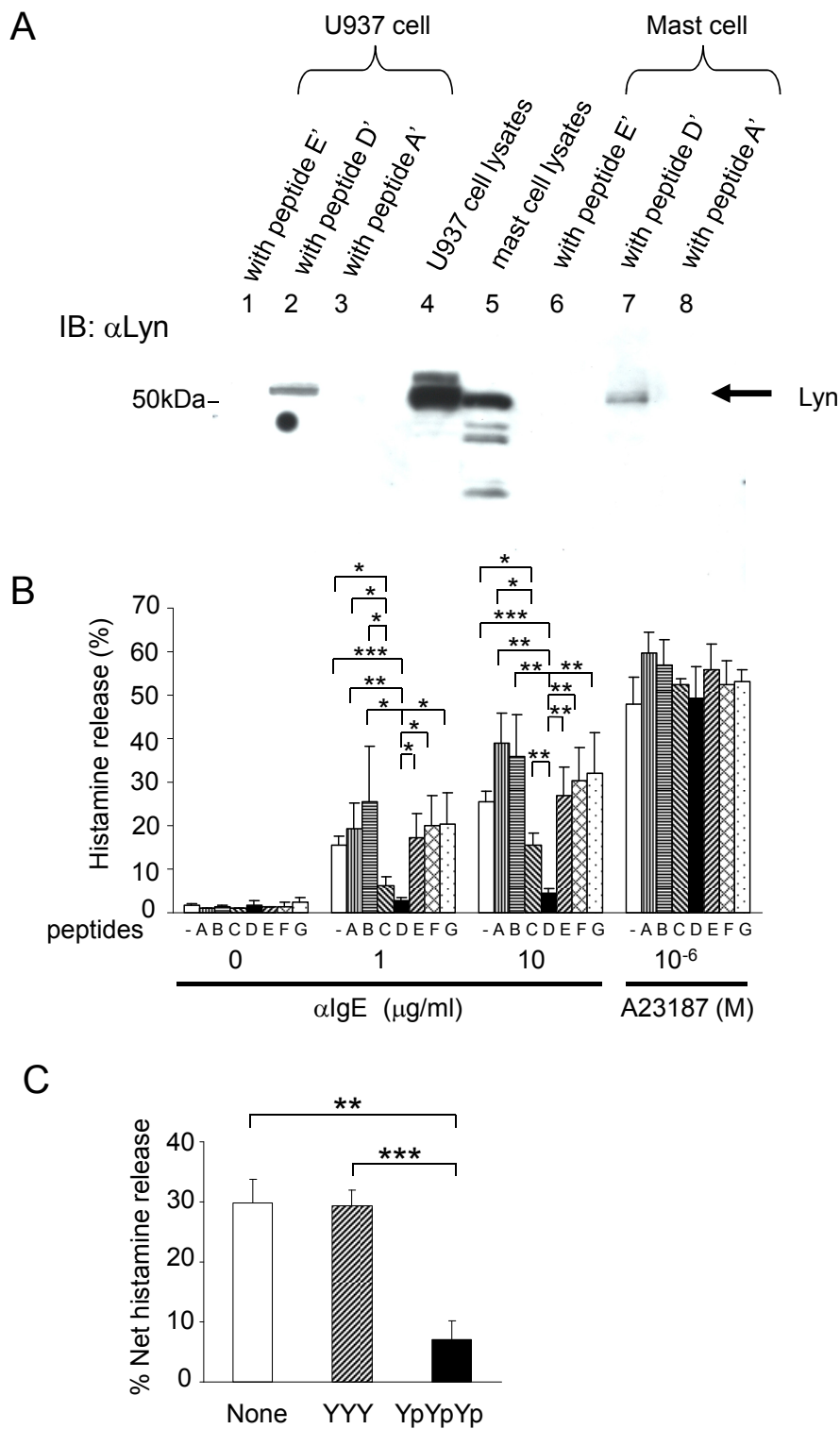


図5. FcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドのヒトマスト細胞の活性化への影響
 (A) β鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチドとマスト細胞内のLynとの会合（プルダウンアッセイ）。
 (B) FcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドのヒトマスト細胞の脱顆粒への影響。
 (C) FcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドのアレルギー患者の粘膜組織におけるヒトマスト細胞の脱顆粒への影響（文献12より引用）

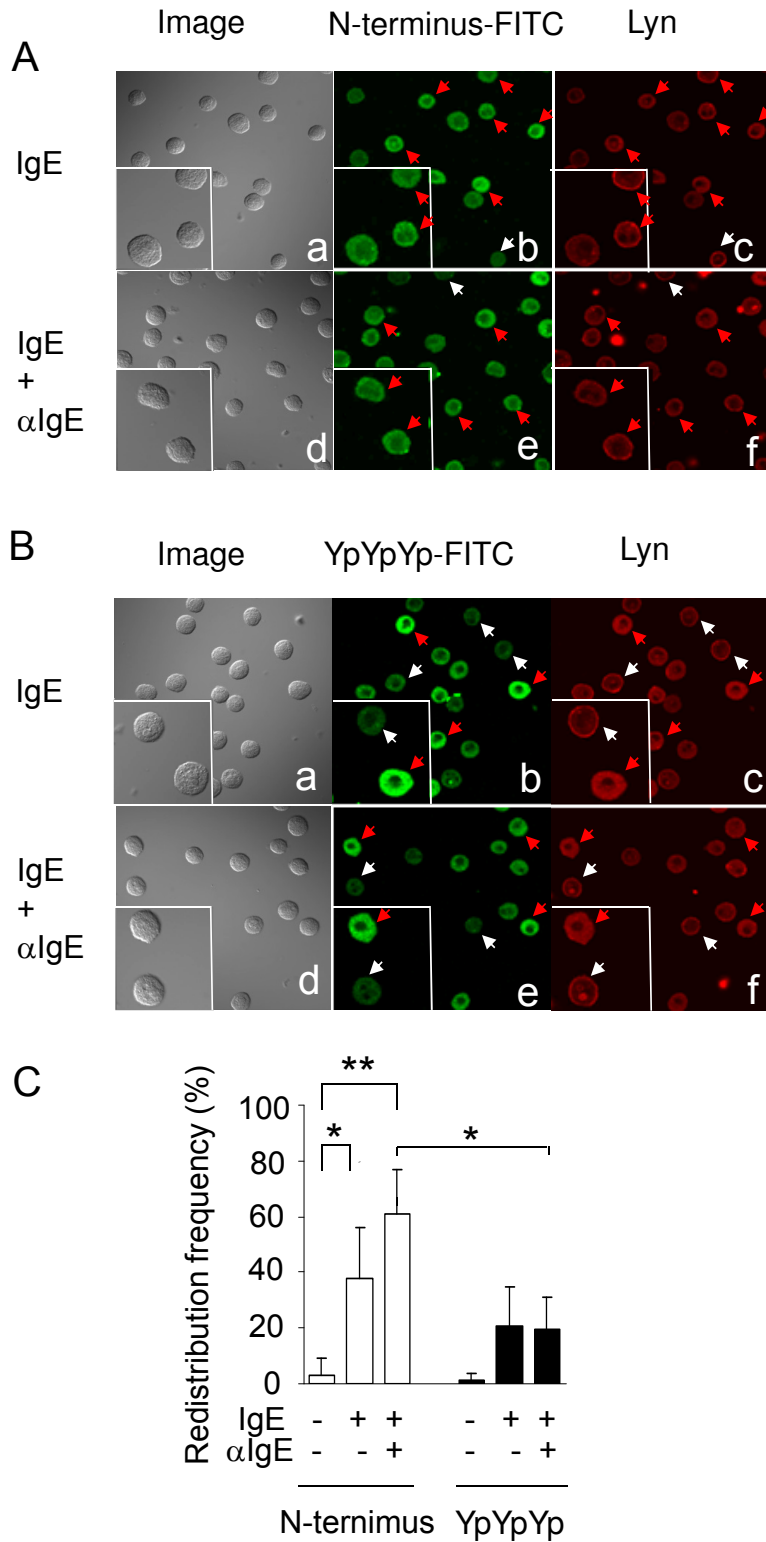


図6. マスト細胞活性化によるLynの細胞膜への移行に対するFcεRIβ鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドの影響

A) コントロールペプチド (FcεRIβ鎖のN末端) とFcεRIβ鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドを導入したマスト細胞をIgEで感作あるいはIgE + 抗IgE抗体刺激後のFcεRIβ鎖とLynの細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。赤矢印の細胞はペプチドが導入されている細胞で白矢印の細胞は導入されていない細胞。

B) Lynがring状に細胞膜内へ移行した細胞を陽性細胞としてカウントした。(文献12より引用)

の活性化を *ex vivo* で抑制した。β鎖の発現が抑制されたマスト細胞ではLynの細胞膜への移行が阻止されていることがわかった。Lynの細胞膜への移行を阻止するため、FcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドをマスト細胞へ導入するとIgE依存性の活性化が抑制された。FcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチドは細胞内Lynに会合し、Lynが細胞膜へ移行するのを抑制していることが共焦点顕微鏡を用いた検討にて確認した。したがって、ヒトのマスト細胞では、FcεRI β鎖とLynの会合を阻止することによってヒトマスト細胞のIgE依存性の活性化を抑制できることがわかった。自然免疫に重要な細胞である単球のセルラインであるU937細胞を用いて検討したが、この細胞でのIL-8産生はペプチドで抑制されなかった。他のLynを発現する細胞で大きな影響がなければ、このペプチドはヒトのアレルギー疾患の新規治療薬として、局所投与などの方法によって安全かつ有効であることが示唆された。

5. 結語

FcεRI β鎖とLynの会合を阻止することによってヒトマスト細胞のIgE依存性の活性化を抑制できることがわかり、β鎖ITAMのチロシン残基を3つリン酸化したペプチドがアレルギー疾患の治療に有用であることが示唆された。

謝辞

本研究の成果は、平成22～23年度日本大学学術研究助成金〔総合研究〕の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。

文献

- 1) Furumoto Y, Nunomura S, Terada T, et al.: The FcεRI β immunoreceptor tyrosine-based activation motif exerts inhibitory control on MAPK and IκB kinase phosphorylation and mast cell cytokine production. *J Biol Chem* 2004; **279**: 49177-49187.
- 2) Lin S, Cicala C, Scharenberg AM, et al.: The FcεRI β subunit functions as an amplifier of FcεRI γ-mediated cell activation signals. *Cell* 1996; **85**: 985-995.
- 3) Dombrowicz D, Lin S, Flamand V, et al.: Allergy-associated FcR β is a molecular amplifier of IgE- and IgG-mediated in vivo responses. *Immunity* 1998; **8**: 517-529.
- 4) Donnadieu E, Jouvin MH, Kinet JP: A second amplifier function for the allergy-associated FcεRI-β subunit. *Immunity* 2000; **12**: 515-523.
- 5) Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, et al.: High-affinity IgE receptor-β chain expression in human mast cells. *J Immunol Methods* 2008; **336**: 229-234.
- 6) Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, et al.: Hyperexpression of the high-affinity IgE receptor-β chain in chronic allergic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**: 2871-2877.
- 7) Saito H, Kato A, Matsumoto K, et al.: Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc* 2006; **1**: 2178-2183.
- 8) Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, et al.: Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**: 1137-1145.
- 9) Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, et al.: Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcεRI. *Blood* 2003; **102**: 2547-2554.
- 10) Jo D, Liu D, Yao S, et al.: Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat Med* 2005; **11**: 892-898.
- 11) Okayama Y, Tkaczyk C, Metcalfe DD, et al.: Comparison of FcεRI- and FcγRI-mediated degranulation and TNF-α synthesis in human mast cells: selective utilization of phosphatidylinositol-3-kinase for FcγRI-induced degranulation. *Eur J Immunol* 2003; **33**: 1450-1459.
- 12) Okayama Y, Kashiwakura JI, Matsuda A, et al.: The interaction between Lyn and FcεRI β is indispensable for FcεRI-mediated human mast cell activation. *Allergy* 2012; **67**: 1241-1249.

肝細胞癌の術前画像解析による形態特徴量抽出の基礎的検討

中山壽之¹⁾, 高山忠利¹⁾, 大久保貴生¹⁾, 檜垣時夫¹⁾, 伊藤彰義²⁾

Basic study of the morphological feature survey using preoperative imaging of hepatocellular carcinoma

Hisashi NAKAYAMA¹⁾, Tadatoshi TAKAYAMA¹⁾, Takao OKUBO¹⁾,
Tokio HIGAKI¹⁾, Akiyoshi ITOH²⁾

要旨

術前画像から肝癌形態を客観的に解析するシステムを検討した。腹部超音波検査, CT, MRIの各腫瘍径と切除標本腫瘍径における spearman 順位相関係数は超音波検査が最も高かった ($r=0.920$; $P<0.0001$)。腫瘍CT像をマニュアルトレースし腫瘍全周長, 腫瘍面積について異なる3人の検者の結果を測定し, Spearmanの相関係数 r は0.70~0.85に収束 ($P<0.001$), 検者間で有意差を認めなかった。腫瘍内部と腫瘍外部区別するプログラムを作成し腫瘍凹部の大きさ, 周囲長, 形状度を表す特徴量を決定できた。これら特徴量が増加すると病理学的脈管侵襲陽性率が増加していた。今回のシステムにより術前に患者予後予測できる可能性が示唆された。

はじめに

肝臓は人体で最も大きな実質臓器の一つであり, その役割りはエネルギーの産生貯蔵と解毒作用において重要な役割を果たしている。肝臓に発生する悪性新生物の中で最も高頻度にみられるものは肝細胞癌であり, B型肝炎やC型肝炎を基礎疾患とすることが多い¹⁾。本邦では肝細胞癌の約8割がC型肝炎由来と報告されている²⁾。また肝細胞癌は経門脈的に進展し高頻度に肝内転移を来すことが知られている³⁾。わが国では年間に3万人以上の死亡者があり, これまで世界をリードする様々な戦略が報告されてきた。診断の面からは多血性腫瘍である肝細胞癌の特徴を利用して造影CTが採用され⁴⁾, 治療の面からは肝機能を温存しつつ癌の根治的治療を求めた系統的亜区域切除が考案され⁵⁾, 病理診断の面からは癌細胞の脈管親和性を考慮し脈管侵襲や肝内転移の評価法が報告されてきた⁶⁾。一方, 肝癌の肉眼分類は癌の特徴を区別するだけでなく治療後の患者予後に関与することが示唆され, 国内外から様々な分類方法が登場してきた。最も古典的なのは1901

年発表の大型肝癌に対するEggle分類で100年以上汎用されてきた⁷⁾。病理解剖で得られた肝癌をその断面の形態から結節型, 塊状型, びまん型に3分類し特徴を報告した。しかし, 早期診断が発達した今日の肝癌診療においてはEggleが見たような巨大肝癌はごく限られた症例であり小型肝癌に接する機会が増加している。1987年にKanaiらは手術や病理解剖で得られた3cm以下肝細胞癌を断面の肉眼形態からearly hepatocellular carcinoma, single nodular type, single nodular type with extranodular growth, contiguous multinodular type, poorly demarcated nodular typeの5分類を提唱し広く受け入れられた⁸⁾。さらにこれらの分類に基づいて日本肝癌研究会では「臨床・病理 原発性肝癌取扱い規約」として全国統一の肉眼分類を提唱し, 小結節境界不明瞭型, 単純結節型, 単純結節周囲増殖型, 多結節癒合型, 浸潤型の5型を設定した⁹⁾。しかし, これらの分類はマクロ病理診断の一端として癌腫の最大径で断面を入れた状態で観察された肉眼形態である。一方, 近年の画像診断技術の向上により治療前の肝細

1) 日本大学医学部

2) 日本大学理工学部

中山壽之: nakayama.hisashi@nihon-u.ac.jp

胞癌形態を分類する試みが出現した。ソナゾイド造影超音波検査を用いて形態により悪性度が異なるとする分類¹⁰⁾、CTで描出された肝細胞癌の腫瘍辺縁の切れ込みとその角度に基づいた分類¹¹⁾などが報告されたが、いずれの分類も主観的な観察結果に基づくものであり公平性、普遍性にかけてという欠点が存在した。また、Kanai分類ではtypeによって肝切除後の生存率や病理学的脈管侵襲陽性率が異なることが報告され⁸⁾、Huiらは癌形態と病理学的門脈侵襲に関連例があることを示唆している¹²⁾。すなわち、肝癌の形態を的確に術前判定することができれば、治療方針決定、患者予後の改善、医療費削減などに貢献できる可能性がある。現在、肝癌の形態を術前画像から客観的に抽出し解析する方法は存在せず、われわれはそのシステム開発を行うことを目的に基礎的研究を開始した。

対象と方法

1. 検査法別の腫瘍最大径に関する検討

2008年から2010年の3年間に肝切除術を施行された肝細胞癌348例（CTまたはMRIで古典的肝細胞癌と同定できたもの。ただし良性腫瘍と鑑別が困難な症例やボーダーライン症例は除外した）を対象とし、腹部超音波検査、CT、MRIの各実施率、未施行の場合の原因を調査し、それぞれにおいて描出された肝癌の最大径を評価した。さらに画像診断による腫瘍径と切除標本を測定した腫瘍径を比較した。切除標本の計測は可能な限りCTと同様の水平面で腫瘍最大断面を含むように切り出され、扁平な腫瘍では腫瘍長軸に沿って測定が行われた。

2. 腫瘍輪郭の抽出に関する基礎的検討

2008年から2009年に肝切除を施行された肝細胞癌から比較的肝内脈管から距離が保たれて存在する症例を中心に100例を選択し腫瘍輪郭の抽出方法を検討した。撮影条件は非イオン性造影剤（イオメロン300、エーザイ、東京、日本、またはオムニパーク300、第一三共、東京、日本）600mgI/kgを経静脈的に自動注入器（デュアルショット、根本杏林堂、東京、日本）を用いて最大45g/30秒で注入、320列CTまたは16列CT（Aquilion、東芝、東京、日本）によりマルチスライス撮影した。動脈相の撮影タイミングはボラストラッキング法で大動脈のCT値が100HU上昇した時点で撮影開始し20秒、60秒、

120秒でスキャンを行った。スライス厚は全て1mmに統一した。撮影結果のDICOMデータから腫瘍内部、辺縁、非腫瘍部のCT値に基づくコントラスト比を測定し自動判別が可能か評価した。さらに腫瘍輪郭のマニュアル抽出についてペンタレット（Intuos4; PTK440、ワコム社、埼玉、東京）を用いて3人の検者がCT画像のトレースを行った。腫瘍全周長、腫瘍面積に関し3者の値を比較検討した。

3. 腫瘍輪郭における形態定量化の検討

上記2.で得られた腫瘍輪郭像を数値定量化するに際し測定可能な項目を検証した。CT値に基づくコントラスト比、画像ピクセルから構成した線分などを測定し腫瘍全周長、腫瘍面積以外に腫瘍の特徴を最も描出する項目の独立性を検討した。腫瘍形態を客観的かつ効率的に評価するため複数の評価項目が存在する場合は主成分分析¹³⁾を用いて項目の統合化を行った。

4. 腫瘍輪郭の特徴度と脈管侵襲の関連性

上記3.で得られた腫瘍形態特徴量から分離度の良いものを選択し、第一主成分得点を算出する。さらに得点分布と脈管侵襲との関連性について比較する。

5. 3D構築による腫瘍定量化

肝細胞癌CT画像における水平面と実際の腫瘍最大径との関連性を検討する準備段階として全て自動化により3D画像構築が可能か検討する。上記1.と同様の撮影条件で得られたDICOMデータからMicrosoft Windows（マイクロソフト、ワシントン州、米国）をOSとして搭載した汎用パソコンを用いて3D肝癌画像を描出するソフトを開発する。さらに構築された3D画像から腫瘍最大径とCT水平面との関連性を検討する。

結果

1. 検査法別の腫瘍最大径（表1）

対象の348例中、腹部超音波は全例に実施されたが36例で腫瘍描出できず、残り312例において腫瘍径の測定ができた（検出率89.7%）。特に肝segment 7やsegment 8の横隔膜直下に存在する腫瘍やsegment 1の深部を占居する小型肝癌は描出困難であった。また肝切除後の再発症例、経肝動脈化学塞栓療法後の症例は腫瘍境界を的確に把握できなかった。さらに腫瘍径15cm超の巨大肝癌症例では全体像の

描出が不可能であるなど測定に限界があった。造影CT検査が実施された346例(実施率99.4%)はすべて腫瘍径を測定できた。造影剤アレルギーの既往がある2例(0.6%)には造影CT検査を施行しなかった。当科ではMRI検査は選択的に施行されており実施率は276例(77.6%)にとどまった。CTと同様に死角のない全肝領域の検索がなされ、MRI施行例のすべてにおいて腫瘍径を測定できた。腫瘍径中央値は超音波、CT、MRIおよび切除標本で2.8、2.5、2.5および2.6cmと超音波検査の計測値が若干大きく、CT・MRI検査では小さく計測される傾向にあった。各々の測定結果と切除標本結果とのSpearman順位相関係数は超音波検査が最も高く($r=0.920$; $P<0.0001$), CT($r=0.903$; $P<0.0001$) およびMRI($r=0.887$; $P<0.0001$)と続いていた¹⁴⁾。

と有意な相関を認めた。3者間で有意差を認めないことより以下の検討では便宜的に1人の検者の結果を採用して評価に用いた。

表1 画像診断と切除標本との腫瘍径比較

	検査実施 (%)	腫瘍測定 (%)	腫瘍最大径(cm)
肝切除標本	348 (100)	348 (100)	2.6 (0.9-20.5)
超音波検査	348 (100)	312 (89.7)	2.8 (0.9-20.0)
造影CT検査	346 (99.4)	346 (100)	2.5 (0.6-20.0)
造影MRI検査	270 (77.6)	270 (100)	2.5 (0.7-22.0)

腫瘍径は中央値(範囲)で表示。文献 14)より引用。

2. 肝細胞癌形態分類の基礎的検討

本項の検討では便宜的に腫瘍最大径としてCT水平面の最大径画像を用いて評価した。まず、腫瘍輪郭の自動抽出が可能か検討した。前述の方法によりCTから得られたDICOM画像をピクセル単位で検討し腫瘍部と非腫瘍部のコントラストから画像的に判別を試みた(図1)。しかし、腫瘍辺縁には輪郭として構成される部分にある程度の幅があり症例ごとに輝度が異なっていた。全症例に統一した閾値を設定することは困難であり、複数の閾値設定を考案したが再現性が得られず輪郭の自動抽出は断念した。

次に腫瘍最大径をマニュアルで指定する方法を検討した。DICOM画像をjpeg画像に変換しペンタブレット上で腫瘍輪郭をマニュアルトレースした。トレース時の線分のサイズが1ピクセルを超えた場合には複数のピクセルを選択することになるため線分サイズは1ピクセルを採用した。腫瘍全周長、腫瘍面積について異なる3人の検者の結果を測定し、Spearmanの相関係数 r は0.70~0.85に収束し $P<0.001$

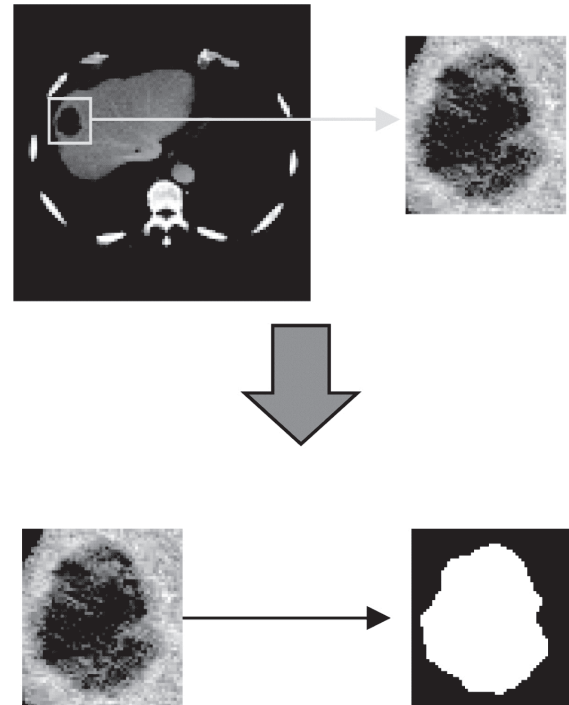


図1 CT画像より腫瘍像の自動抽出

腫瘍部と非腫瘍部とのコントラスト(閾値)により輪郭を抽出する。腫瘍輪郭にはある程度の幅が存在し輪郭幅内の閾値は一定ではない。病変部閾値を1、その他領域を0とし画像を2値化する。本例では輝度値0~60を1(白画素)、それ以外を0(黒画素)とした。

3. 腫瘍輪郭における形態定量化の検討

腫瘍内部と腫瘍外部区別するプログラムとして図形の凸凹判別性を利用した。任意の腫瘍内部と内部を結ぶ線分が輪郭線をまたがない場合は腫瘍内部、またぐ場合は腫瘍外部と判別し、腫瘍輪郭の凹部分をすべて埋めるプログラムを開発した(図2)。凹部分を埋めた図から元図を引き算し凹部分を取り出した。さらに凹部分の個数、形状度(底辺、深さ)、面積、周囲長を抽出し変数として採用した。変数の組み合わせから分離度を基準に凹部の大きさを表す特徴量を(凹部の画素数 s /腫瘍部の画素数 S)、凹部の周囲長を表す特徴量を(凹部の輪郭画素数 l /腫瘍部の輪郭画素数 L)、凹部の形状度を表す特徴量を(凹部の深さ d /凹部の底辺 t)とそれぞれ定義した。

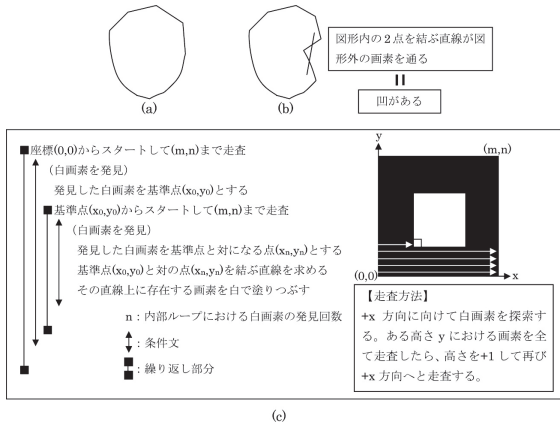


図2 腫瘍内外を認識し凹部を埋めるプログラム

4. 腫瘍輪郭の分類と脈管侵襲の関連性

上記3で得られた因子を3次元プロットし最も分離度の良い組み合わせとして $\frac{1}{S} \sum s_n$ と $\frac{1}{S} \sum s_n \frac{d_n}{t_n}$ を採用した (図3)。これらの値から主成分分析で第一主成分得点を算出し病理学的vpの発生頻度との関連性を検討した。分離度が良くvpが計測されていた71例を示すが得点が高くなるにしたがってvp陽性率は高くなる傾向にあった (図4)。

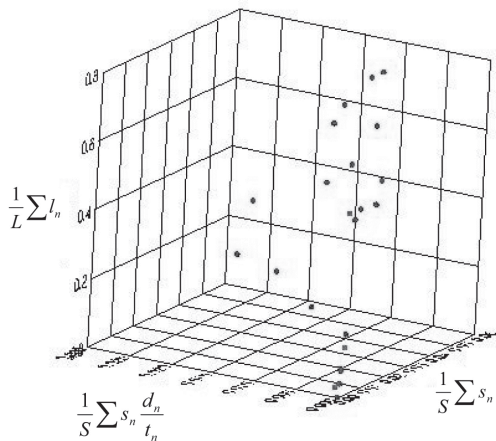


図3 腫瘍輪郭の形態的特徴を示す変数の3次元プロット
凹部の大きさを表す特徴量を (凹部の画素数s / 腫瘍部の画素数S), 凹部の周囲長を表す特徴量を (凹部の輪郭画素数l / 腫瘍部の輪郭画素数L), 凹部の形状度を表す特徴量を (凹部の深さd / 凹部の底辺t) と定義した。

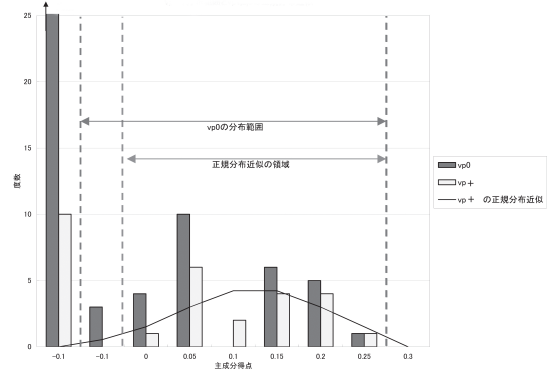


図4 形態特徴変数の第一主成分得点と病理学的脈管侵襲の頻度
横軸は主成分得点, 縦軸は脈管侵襲の頻度。vp0は組織学的脈管侵襲なし。vp+は組織学的脈管侵襲あり。

5. 3D構築による腫瘍定量化

肝癌の一外周をマニュアルで指定することにより, 腫瘍部位と非腫瘍部位とのコントラストを比較することにより腫瘍辺縁を自動追跡し3D画像構築するソフトの開発に成功した (図5)。画像処理に要する時間は約72時間であった。サンプルとして作成された3D画像 (n=5) から水平断面, 矢状断面, 前額断面を切り出し腫瘍最大径について観察したところ, 全例で水平面には存在せず何らかの傾きをもって腫瘍最大径が存在した。

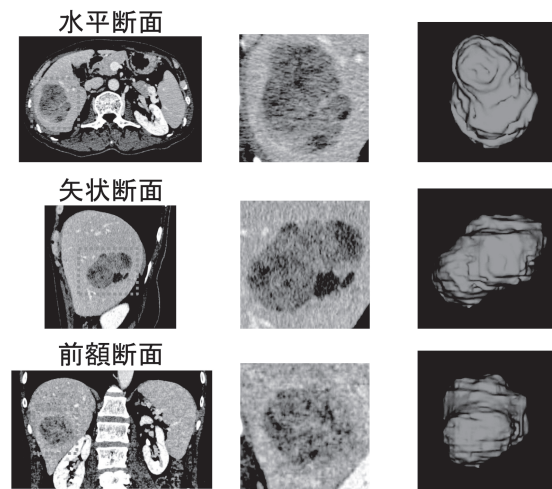


図5 3D構築された肝細胞癌画像
腫瘍最大径はCT水平面と一致していないことが視認できる。文献14)より引用。

考察

本研究関する疑問点の一つとして、従来の病理学的肉眼分類が腫瘍内部構造に注目しているのに、なぜ腫瘍の輪郭を評価項目に取り上げたかが挙げられる。肝細胞癌の形態的特徴として腫瘍周囲に被膜を形成すること、内部に隔壁を形成すること、隔壁で区切られた区域ごとに癌の分化度が異なる場合があることである。従来の肉眼分類の多くは病理診断医によって提唱されており^{6), 8)}、根本的に病理診断を支持する分類が考案されたと言える。すなわち、内部構造と癌細胞の分化度との関連性を検討した結果、Eggle分類やKanai分類が考え出されたともいえる。しかし、術前に画像診断する場合や外科切除の際の術中超音波検査による内部構造の把握は画像コントラストの違いを見分けることでしか対応できないのが現状である。肝細胞癌は腫瘍内部から外部へ膨張性発育するため、われわれは癌の悪性度によって腫瘍辺縁の発育形態が異なるのではないかと考えた。そこで、腫瘍の輪郭に注目し患者予後と関連付けて何らかの分類ができるのではないかと感じたのが研究開始の動機である。

次に腫瘍形態を評価するうえで立体的に発育した肝細胞癌をどのスライスで評価するかが問題となる。本邦における肝癌の大きさ測定に関する基準は『臨床・病理 原発性肝癌取扱い規約』⁹⁾ (以下、『肝癌取扱い規約』) に沿って定められている。外科手術で切除された標本の取扱いについては「腫瘍の最大断面が出るように前額断を加える。」とある。附記として「目的によっては画像診断法による画像に一致する方向で、手術材料あるいは剖検肝に切割を加えてもよい。」とある。われわれはCT画像と比較しやすいように水平断の切割を原則的に行っており、今回の研究でも便宜的にCT水平面で腫瘍最大径を評価に利用した。この利点は作業内容が均一であること、撮影されたCT画像を加工せず利用するためコストパフォーマンスに優れていることである。しかし腫瘍の形態的特徴が最もあらわれているのが最大径の断面とは限らないし、そもそもCT水平面が腫瘍最大径を含む面や最大面積を含む面であるとは限らない。われわれはこの疑問を解明する目的で3D構築された画像と腫瘍最大径を含む面の観察を行い、CT水平面と腫瘍最大径面の不一致を明らかにした(図5)。この解析の課題として取り扱う

データ量が膨大であるため72時間という長時間を要することである。われわれのプロトコール通り1mmスライスで肝臓を撮影した場合、約200枚の水平画像が得られ、これを短時間で3次元化するには超高性能のコンピュータを使用するかデータを間引するなどの工夫が必要となる。実臨床でスーパーコンピュータを用いることは現実的ではなく汎用パーソナルコンピュータ上で作業できることが望ましいと考えられる。現在、すべての画像データから近似値を用いて高速に3D構築する方法を検討中である。

次に、腫瘍輪郭像を客観的に評価するためには、どのような要素を選定するかが問題となった。一般的に形態を数値化するのに用いられるは長さ、角度、面積、頻度、位置などである。今回の研究では凹部分を抽出できたので、各々の凹部分について全周長、面積、底辺、深さを測定し総和することで全てを網羅した。それぞれを組み合わせながら3次元プロットし分離度の評価から $\frac{1}{S}\sum s_n$ と $\frac{1}{S}\sum s_n \frac{d_n}{r_n}$ が選択された。このような手法を臨床画像に用いた報告は皆無であり本研究の新規性を示す部分であると考えられる。また、総和されたデータを効率的に集約するため主成分分析が用いられ、代表値として第一主成分得点が採用された。画像特徴量として多くの項目がある場合にそれぞれの特徴量を失うことなく一つの得点にまとめることで他の因子との関連性が容易に行えるようになった。今回の研究では病理学的脈管侵襲との関連性が検討されたが未だ明確な因果関係は不明であり、さらに症例数を追加して検討することが必要である。

今回の基礎的検討の結果を用いてどのような臨床展開が考えられるか。肝細胞癌の術前診断において人の目では判定できないような腫瘍最大径が含まれる断面を表示し、その面を中心に腫瘍特徴量を算定できる可能性がある。さらに手術成績と患者予後との関連性を求めることで治療方針の決定に応用できる可能性がある。現在、症例数を追加して3D画像作成の時間短縮や臨床データとの関連性について検討を行っている。

謝辞

本研究は、日本大学学術研究助成金総合研究(総11-019及び総12-011)による助成を受けて実施したものである。

文献

- 1) Kanwal F, Hoang T, Kramer JR, et al. Increasing prevalence of HCC and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2011; 140: 1182-1188 e1181.
- 2) Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, et al. Comparison of resection and ablation for hepatocellular carcinoma: A cohort study based on a Japanese nationwide survey. *J Hepatol* 2013; 58:724-729.
- 3) Inoue Y, Hasegawa K, Ishizawa T, et al. Is there any difference in survival according to the portal tumor thrombectomy method in patients with hepatocellular carcinoma? *Surgery* 2009; 145: 9-19.
- 4) Takayasu K, Muramatsu Y, Mizuguchi Y, et al. CT Evaluation of the progression of hypoattenuating nodular lesions in virus-related chronic liver disease. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: 454-463.
- 5) Makuuchi M, Hasegawa H, Yamazaki S. Ultrasonically guided subsegmentectomy. *Surg Gynecol Obstet* 1985; 161: 346-350.
- 6) Nakashima T, Okuda K, Kojiro M, et al. Pathology of hepatocellular carcinoma in Japan. 232 Consecutive cases autopsied in ten years. *Cancer* 1983; 51: 863-877.
- 7) Eggel H. Ueber das primare Carcinoma der Leber. *Beitr z Path Anat u z allgem Pathol* 1901; 30:506-604.
- 8) Kanai T, Hirohashi S, Upton MP, et al. Pathology of small hepatocellular carcinoma. A proposal for a new gross classification. *Cancer* 1987; 60: 810-819.
- 9) Japan LCSGo. General rules for the clinical and pathological study of primary liver cancer. *3rd English edition. Tokyo: Kanehara, 2010.*
- 10) Tanaka H, Iijima H, Higashiura A, et al. New malignant grading system for hepatocellular carcinoma using the Sonazoid contrast agent for ultrasonography. *J Gastroenterol* 2013.
- 11) Wakai T, Shirai Y, Nomura T, et al. Computed tomographic features of hepatocellular carcinoma predict long-term survival after hepatic resection. *Eur J Surg Oncol* 2002; 28: 235-242.
- 12) Hui AM, Takayama T, Sano K, et al. Predictive value of gross classification of hepatocellular carcinoma on recurrence and survival after hepatectomy. *J Hepatol* 2000; 33: 975-979.
- 13) Ringner M. What is principal component analysis? *Nat Biotechnol* 2008; 26: 303-304.
- 14) Hisashi Nakayama TT. 診療ガイドラインに沿った肝癌治療の要点と盲点. 東京, 日本: 文光堂, 2012.

HBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込み機序の解明と 肝癌発生に与える影響の解明

松岡俊一¹⁾, 森山光彦¹⁾, 浅井 聡²⁾, 黒田和道³⁾
神野英毅⁴⁾, 田村彰教¹⁾

Analysis of rearrangement of HBV integration in patients with HCC

Shunichi MATSUOKA¹⁾, Mitsuhiko MORIYAMA¹⁾, Satoshi ASAI²⁾, Kazumichi KURODA³⁾,
Hideki KOHNO⁴⁾, Akinori TAMURA¹⁾

要旨

肝癌 (HCC) 発生とHBVとの関連性について検討した。1) 慢性C型肝炎患者468例をPCR法にてHBV DNAを検出した。2) B型; 3例, C型; 20例, NBNC型 (NB) HCC13例の組織内のHBV DNAおよびcccDNAの検出を行った。3) B型HCC4例のヒト染色体へのHBV遺伝子の組み込みを, 患者末梢血リンパ球を用いたFISH法にて検出した。HBV DNAは43.6%に検出され, 2例の全塩基配列を決定した。各クローンともにgenotypeはCで, SおよびX領域に特徴的な塩基変異を認めた。cccDNAは, B型; 100%, C型; 10%, NB型; 7.7%に検出された。B型HCC全例にヒトゲノムへのHBVゲノムの組み込みを確認した。その組み込みはランダムであった。HBV DNAはC型肝炎患者の約40%に存在し, HBs抗原が陰性なのはS領域のアミノ酸変異によることが示唆された。C型やNB型HCCでも, 肝組織よりcccDNAが検出されることより, HBVがHCC発生に関与していることが推測された。またHBVの組み込みはランダムではあったが全例に認めた。

1. はじめに

わが国における原発性肝細胞癌 (肝癌) 死亡は年間3万人を超え, 治療法の進歩により5年生存率は向上しているが, 高い再発率を背景としてどのような治療法を選択しても疾患死亡率は80%を超えている。したがって肝癌発生予知・抑止は重要な課題である。現在までのところ, 肝癌発生に関与している遺伝子やSNPsは多数報告されているが, いずれも確定的とされる原因遺伝子やSNPは今のところ確認されていない。我々は, 以前よりHBV感染が肝癌発生に重要な影響を与えていることを報告してきた。肝癌におけるHBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの有無については, 様々な検討が現在までなされてきた。現状では, HBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込み形式は, ランダムであり特定の部位への組み込みはないとされている。一方HCV関連肝癌においては, その血中よりHBV DNAが検出され

るOccult HBV感染が危険因子であることが既に報告されている。我々は既に, このOccult HBV感染がHCV関連肝癌発生の原因のひとつであることを報告している。

本研究では, 申請者らがこれまで長年にわたり蓄積してきた肝癌発生に関する研究, HCVとHBVの感染研究の成果に立脚し, 肝癌発生に関与しているHBVゲノムのヒトゲノムへの組み込み様式とその部位をFISH法を用いて検討し, 新しい肝癌発生の予知・予防の方法論を確立して, 臨床に応用可能な基盤的知見を得ることを本研究の目的とする。

本研究により, 肝癌におけるHBV遺伝子の組み込み部位を確定し, 簡便な検出法を開発することに成功すれば, 肝癌発生にHBV感染が関与していることを証明することが可能である。現状では肝癌発生の原因は確定されておらず, HBV感染が背景因子にかかわらず肝癌発生の原因のひとつとして確認す

1) 内科学系消化器肝臓内科学分野

2) 生体機能医学系薬理学

3) 病態病理学系微生物学分野

4) 生産工学部応用分子化学科

松岡俊一: matsuoaka.shunichi@nihon-u.ac.jp

ることができればユニバーサルワクチネーションをより協力的に推進することが可能となり、今後の本邦における肝癌発生の予防・抑止に果たす効果は絶大なものがある。

2. 対象および方法

本研究は、平成24年度より25年度までの2ヵ年計画である。平成24年度には、(1) まず慢性肝炎および肝硬変例の血中より高頻度にHBV DNAを検出し得る primer sets を用いたPCR法にてHBV DNAを検出して、Occult HBV症例の頻度を検索する。(2) この結果を基にして、Occult HBV関連肝癌症例の血中ないしは肝組織より同様にOccult HBV症例の頻度を検索する。(3) このうちHBV DNA検出例について、3.2kbの全塩基配列を増幅できるPCR法を開発してその全塩基配列を決定する。(4) 手術切除した肝細胞癌症例の肝組織より、HBV DNAとcccDNAをPCR法にて検出しHBVの関与を検索する。(5) HBV関連肝癌発生例のヒト遺伝子へのHBV遺伝子の組み込みの検出を、PCR産物をprobeとしたFISH法を用いて検討する。(6) この結果に立脚して次にHCV関連肝癌におけるHBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの有無を、HBV関連肝癌と同様にFISH法にて検出する。

研究対象と方法は以下に示すごとくである。

1) 1987年より当科にて肝生検術を施行され凍結血清が保存されていた、血中HBs抗原陰性の慢性C型肝炎患468例である。これらの症例は、2000年以後は肝生検時より6ヶ月以内に、我々が設定した高頻度にHBV DNAを検出するHBx領域の primer setを用いた nested PCR法にてHBV DNAを検出した。さらに今回2000年以前の症例についても同意が得られた症例について、凍結保存血清より一括して nested PCR法にてHBV DNAを検出した。これらの検出結果と臨床的背景について検索した。

2) 肝細胞癌における occult HBV 感染の検索。

次に我々は、B型肝炎細胞癌、C型肝炎細胞癌、NBNC(NB)肝細胞癌例について、本学消化器外科にて手術切除された癌部および非癌部より、nested PCR法にて組織内のHBV DNAおよびcccDNAの検出を行った。検索対象は、当院消化器外科にて2003年

より肝細胞癌の診断にて手術切除され、検体使用の許諾を得た36例である。内訳は、B型肝炎細胞癌;3例、C型肝炎細胞癌;20例、NBNC型肝炎細胞癌;13例である。これらの症例の癌部および非癌部の凍結組織より、通常の方法にてDNAを抽出後、nested PCR法にてHBx DNA(150bp)、PCR法にてHBV-DNA(3.2kbp)、cccDNA(500bp)、の検出を行った。

3) HBs抗原陽性肝細胞癌例のヒト染色体へのHBV遺伝子の組み込みの検出

HBV関連肝細胞癌例のヒト染色体へのHBV遺伝子の組み込みの検出を、患者末梢血リンパ球を用いたFISH法にて検出した。対象は、FISH法施行の同意が得られたHBs抗原陽性の肝細胞癌患者4例である。これらの症例よりヘパリン加試験管に全血15mlを採取して、このうち10mlをFISH法に使用した。残りの血液よりDNAを抽出して3.2kbpを増幅させるPCR法を行った。このうち3例に3.2kbpの増幅が得られた。この3例のPCR産物を精製してFISH法のprobeとして使用した。さらに精製したprobeを用いて試験的にFISHを行い、最もバックグラウンドの少なかった38Tをprobeとして用いて以下の実験に使用した。尚、分子系統樹解析では、38T株はHBV genotype Cに分類された。また検索した細胞数は各症例ともに20細胞である。

4) 次世代高速シーケンサーを用いたヒトゲノム解析

2症例について患者の同意を得て、末梢血リンパ球より次世代高速シーケンサーを用いて、ヒト全ゲノムの解析を行った。試薬類にかかるコストと委託費用などを勘案して、paired endで10 foldのシーケンスを施行した。次世代高速シーケンサー(Illumine Hisex 2000)のランの委託は、実績のある北海道システム・サイエンス社に委託した。

[方法]

①HBV DNAの検出方法

1. 肝がん患者より採取したヘパリン全血または10ml凍結保存血清100 μ もしくは凍結肝組織より市販のDNA抽出kitを用いてDNAを抽出する。
2. このDNAを用いて、HBx部位に設定した primer setsを用いて、nested PCR法を行う。

HBV DNA 検出プロトコール

- 1) 凍結保存肝組織より DNA を抽出する。ホモゲナイザーで肝組織を破碎後、キアゲン社製 DNA blood kit を用いて total DNA を抽出する。
- 2) 凍結保存血清 100 μ l より total DNA を抽出する。この DNA を用いて以下のごとく nested PCR にて HBV DNA を検出する。
- 3) Primers for 1st PCR
MD24 5'-TGC CAA CTG GAT CCT TCG CGG GAC GTC CTT-3'
MD26 5'-GTT CAC GGT GGT CTC CAT G-3'
- 4) Primers for 2nd PCR
HBX1 5'-GTC CCC TTC TTC ATC TGC CGT-3'
HBX2 5'-ACG TGC AGA GGT GAA GCG AAG-3'
- 5) PCR 条件
Primers 4 μ l, 10xEx Taq Buffer 5 μ l, dNTP 5 μ l, DNA 2 μ l, Ddd 34 μ l ExTaq 0.5 μ l, Total 50 μ l
- 6) 1st and 2nd PCR
94°C 2min / pre-heat, 94°C 30sec, 51°C 30sec,
72°C 1min// 35 cycles,
72°C 7min/ last extension, 4°C 保存

② HBV の組み込みの検出

- 1) 採取したヘパリン加全血 10ml を用いて行う。
- 2) 血球を分離して、プレパラート上に薄層に添付する。
- 3) このプレパラートを用いて、Fluorescence labeled in situ hybridization (FISH) 法により、染色体上への HBV の組み込みの検出を行う。
- 4) B 型肝炎患者さんの血清より PCR にて HBV 全長を増幅する。
- 5) この PCR 産物より probe を作製する。DNA 濃度を 1 μ g/ μ l に調整して 20 μ g を probe として使用する。

染色体解析用固定細胞作製

〈試薬〉

コルセミド溶液: ナカライ 09356-74 など, 低張液: 0.075M KCl など, 固定液: メタノール: 酢酸 = 3:1, 用時調製

〈染色体標本作成〉

- 1) 浮遊細胞の場合 10ml 程度の培地で、付着細胞の場合 10cm の Dish で継代後しばらく培養す

- る。
- 2) 対数増殖期の細胞に 0.02 μ g/ml になるようにコルセミドを添加し、適当時間培養を継続する。
- 3) コルセミド処理をした細胞浮遊液を 15ml チューブに回収し、1200rpm で 5 分間遠心して細胞をあつめ、上清を捨てる。コルセミド処理時間に影響するので迅速に行う。
- 4) 細胞にパスツールピペットで少量の低張液を加え静かにピペッティングして細胞を分散させる。細胞が分散したらさらに 1.5ml まで低張液を加え、ピペッティングにより再度細胞を分散させる。室温に 20 分間放置して低張処理をおこなう。
- 5) 総量が 10ml 程度になるようにゆっくりと固定液を加える。
- 6) 静かに全体をパスツールピペットで攪拌し細胞を固定する。
- 7) 1200rpm で 5 分間遠心し上清をすて、新たな固定液を数滴加え、ピペッティングにより細胞を分散させる。さらに 10ml 程度の固定液を加え全体を攪拌する。この作業をさらに 2 回行い完全に固定する。
- 8) 固定が完了したらチューブを固定液で満たし、-20°C で保存。

固定細胞 FISH プロトコール

〈試薬〉

FISH プローブ, ホルムアミド, エタノール

〈細胞の変性処理〉

- 1) 細胞標本を 70°C ホットプレート上で 2 時間ハードニング
- 2) 70°C の 70% ホルムアミド / 2 \times SSC 中 2 分間変性処理
- 3) 氷冷した 70% エタノールに 5 分浸漬
- 4) 別の 70% エタノールで洗った後 100% エタノールに 5 分浸漬
- 5) 風乾もしくは 37°C インキュベーターで乾燥

〈プローブの変性処理〉

- 6) 1 スライドあたり 10 μ l のプローブをチューブに入れ 75°C で 10 分変性
- 7) 5 分以上氷冷

〈ハイブリダイゼーション〉

8) 細胞標本にプローブをアプライしカバーガラスをかける

9) 37°Cで必要時間ハイブリダイズ

〈洗浄・検出 (ダイレクト蛍光標識プローブの場合)〉

10) 2×SSC中5分浸漬しカバーガラスを静かにはずす

11) 37°Cの50%ホルムアミド/2×SSC中20分浸漬

12) 1×SSCですすいだ後1×SSC中15分浸漬

〈洗浄・検出 (ハプテン標識プローブの場合)〉

i. 1% BSA/4×SSC溶液で希釈した抗体を100 μ lアプライしパラフィルムでカバーする

ii. 37°Cで1時間反応

iii. 0.1% Nonidet P-40 (0.05% Tween20) /4×SSCで10分×2回, 4×SSCで10分×1回洗浄

13) DAPI染色後マウント

14) 蛍光観察

組織切片 FISH プロトコール

〈試薬〉

FISH プローブ, ホルムアミド, エタノール, パラホルムアルデヒド, ペプシン

〈切片の前処理〉

(凍結切片)

1. 切片を室温に戻し, 氷冷4% PFA/PBSで30分固定 PBSで十分に洗浄

2. 0.02% ~ 0.5% ペプシン/0.1N塩酸溶液中で37°C, 1分~30分反応

3. PBSで洗浄 アルコールシリーズにより脱水・乾燥

(パラフィン包埋切片)

1. 脱パラ

2. 2×SSC中5分浸漬

3. 2×SSC中, 10分間電子レンジで加熱

4. PBS中で放冷 0.02% ~ 0.5% ペプシン/0.1N塩酸溶液中で37°C, 1分~30分反応

5. PBSで洗浄 アルコールシリーズにより脱水・乾燥

〈ハイブリダイゼーション〉

6. 切片にプローブをアプライしカバーガラスをかける

7. 凍結切片80°C, パラフィン切片80~90°Cのホッ

トプレート上で10分間加熱し変性処理する

8. 湿潤箱にて37°Cでovernightハイブリダイズさせる

〈洗浄・検出 (ダイレクト蛍光標識プローブ)〉

9. 2×SSC中5分浸漬しカバーガラスを静かにはずす

10. 50%ホルムアミド/2×SSC中, 37°C, 20分浸漬 (ヒトXYプローブ・ラットYプローブの場合46°C)

11. 1×SSC中15分浸漬

12. DAPI染色後マウントもしくはDAPI入りマウント剤でマウント

13. 蛍光観察

〈洗浄・検出 (ハプテン標識プローブ)〉

9. 2×SSC中5分浸漬しカバーガラスを静かにはずす

10. 50%ホルムアミド/2×SSC中, 37°C, 20分浸漬 (ヒトXYプローブ・ラットYプローブの場合46°C)

11. 1×SSC中15分浸漬

12. Blocking溶液にて30分間Blocking (5% milk または1% BSA in 4×SSCなど)

13. 蛍光標識avidinもしくは蛍光標識streptavidin/blocking溶液で30分~1時間反応

14. 0.1% Nonidet P-40 (0.05% Tween20) /4×SSCで10分×2回, 4×SSCで10分×1回洗浄

15. DAPI染色後マウントもしくはDAPI入りマウント剤でマウント

16. 蛍光観察

3. 結果

1) HBV DNAは204例 (43.6%) に検出された。HBV DNAの検出率は, F0; 25%, F1; 38.1%, F2; 45.9%, F3; 47.2%, F4; 56.9%であった。さらにHBV DNAは, HBc抗体陽性例71%, 陰性例22%に検出された。

2) これらのうち血清が使用可能であったHBV DNA陽性182例について, AMPLICOR HBV MONITOR法にてHBV DNA量を測定した。この結果では, HBV DNA量が検出感度以上は14例 (7.7%) であった。最高値が5.3 LC/mlであり, 以下2.0 LC/ml未満が12例, 2.0 LC/ml以上は2.1, 3.0, 5.3

LC/mlの3例のみであった。

- 3) 次に、HBV DNAが検出された204例よりバンドが鮮明に検出された例のうち、無作為に6例を抽出して、このPCR産物の塩基配列を決定した。さらにこの塩基配列より分子系統樹解析を行い、Genotypeを検索した。この結果では特徴的な塩基の変異は見られなかったが、6例共にgenotype C型に分類された。
- 4) HBV DNAが5.3 LC/mlの症例のPCR産物をクローニングして5クローンについてHBV genomeの全塩基配列を決定した。この結果クローン1; 2956bp / 3020bp (consensus sequence ; GQ205441) (97%), クローン2; 1548 / 1574 (98%), クローン3; 2944 / 3019 (97%), 2977 / 3019 (98%), クローン4; 2977 / 3019 (98%), クローン5; 2979 / 3019 (98%)であり、各クローンともにgenotype Cとの良好な相同性を示した。
- 5) 次にGQ205411との各クローン間のアラインメント解析を行った。この結果では、クローン1:塩基

- 配列に欠損が確認された。(モチーフ配列の421-440, 3020-3202bp部分) クローン2:塩基配列に大規模な欠損が確認された。(モチーフ配列の1-493, 1579-2053, 2453-3215bp部分) クローン3:塩基配列に欠損が確認された。(モチーフ配列の3020-3202 bp部分) クローン4:塩基配列に欠損が確認された。(モチーフ配列の3020-3202bp部分) クローン5:塩基配列に欠損が確認された。(モチーフ配列の3020-3202bp部分)
- 6) genotype Cのコンセンサス配列GQ205441と比較すると、S region; a determinant領域ないしX領域; nt.1652より特徴的な塩基の変異を認め、12塩基の挿入が認められた。またCoreないしPre-core部位にも多数の塩基の変異が認められた。以上をまとめると、Occult HBV感染はC型慢性肝炎、肝硬変の約40%に存在し、血中よりHBs抗原が検出されないのはS領域のアミノ酸変異によることが示唆された (Fig.1)。



Fig 1 前塩基配列のコンセンサス配列との比較

(2) 肝細胞癌における occult HBV 感染の頻度

- 1) この結果では HBx DNA は 43% に検出された。内訳は、HBx DNA は B 型肝細胞癌；3/3 (100%)、C 型肝細胞癌；6/20 (30%)、NBNC 型肝細胞癌；6/13 (46.2%) に検出された。このうち癌部/非癌部の検索では、B 型肝細胞癌；100/100%、C 型肝細胞癌；25/25%、NBNC 型肝細胞癌；38.4/38.4% であった。2) HBV DNA (3.2kbp) は、B 型では 3 例中 2 例 (66.7%) に検出可能であった。C 型においては全例で検出されなかった。NBNC 型肝細胞癌においては、17 例中の 1 例 (7.7%) に検出が可能であった。いずれの症例においても癌部よりのみ検出された。
- 2) このうち NBNC 型肝細胞癌より検出可能であった 1 例の PCR 産物より 3.2kb の全塩基配列を Auto Sequencer を用いた direct sequence 法にて決定した。この結果より、genotype C に分類された。この症例においては現在詳細を検索中である。
- 3) cccDNA は、B 型では 3 例全例に検出可能であった。一方 C 型では 20 例中 2 例 (10%) に検出された。NBNC 型では 13 例中 1 例 (7.7%) に検出された。癌部と非癌部の比較では、B 型は全例が両者より検出された。一方 C 型では、癌部 2 例 (10%)、非癌部 1 例 (5%) に検出され、NBNC 型では癌部/非癌部ともに 1 例ずつ (7.7/7.7%) に検出された。cccDNA の検出例はいずれも HBx DNA が検出されていた。また 3.2kbp の HBV DNA が検出された例からは、HBx DNA および cccDNA の両者も検出されていた。NBNC 型の 3.2kbp HBV DNA の検出例は、HBc 抗体陽性であり背景肝は F1 stage の CH であった。

以上より、HBs 抗原が陰性の肝細胞癌症例であっても、肝組織より HBV が検出されること、cccDNA が低頻度ではあるが検出されたことより、HBV が cccDNA の形態にて存在する症例が存在することが確認された。

(3) HBs 抗原陽性肝細胞癌例のヒト染色体への HBV 遺伝子の組み込みの検出

- 1) この結果、B 型肝細胞癌例 4 例全例に、ヒトゲノムへの HBV ゲノムの組み込みを確認した。これらの検索結果では、HBV ゲノムはヒト染色

体へ多数の組み込みが認められた。しかしながら、特定の部位への組み込みの集積、いわゆる hot spot は認められず、HBV ゲノムの組み込みはランダムであった。現在さらに詳細なる検索・検討中である。現在までに得られた結果をまとめると、1q32 (13)、2q36 (10)、3q24 (11)、6q22 (10)、9p21 (11)、14q31 (10)、15q21 (11) などに比較的多数の HBV ゲノムの組み込みが認められている。

- 2) 現在同一症例について、切除された癌部と非癌部肝組織についても、同一の probe を用いて FISH 法を検索中である。
- 3) HBs 抗原陰性かつ HCV 抗体陽性の肝細胞癌症例 1 例パイロットスタディとして、B 型と同様に FISH 法にて HBV genome の組み込みの有無を検索した。この結果では、B 型と同様に HBV genome のヒトゲノムへの組み込みが認められた。同様に ideogram をも提示する。現時点においては、残念ながら hot spot は検出されていない。

(4) 次世代高速シーケンサーを用いたヒトゲノム解析

次世代高速シーケンサー (Illumine Hisex2000) のランの委託は、実績のある北海道システム・サイエンス社に委託した。この data を感染症ゲノム実験室に設置してある高性能ワークステーションと解析ソフトウェアを用いて、HBV ゲノムの組み込み部位の同定を行った。しかしながら、現在までの検索では、HBV ゲノムの組み込み部位は認められていない。考察すると、10 fold の run では欠失が多く、100 fold 程度に読み込みを増加する必要があると思われる。可能であれば平成 25 年度に施行する予定である。

4. 考察

HBs 抗原陰性の Occult HBV 関連肝癌症例の肝組織より nested PCR 法にて HBV DNA を 43% に検出し得た。さらにこのうち 1 例については、クローニングを行い、3.2kb の HBV の全塩基配列を決定した。この結果では、多数の塩基ないしはアミノ酸変異、欠失変異が認められた。

この PCR 産物を精製して、FISH 法の probe とし

て使用した。

HBV関連肝癌の末梢血リンパ球を用いたFish法の結果では、多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められた。しかしながら、特定の部位への組み込みの集積、いわゆるhot spotは認められず、その組み込みはランダムであった。

一方、現在C型肝炎細胞癌についても、同様の方法にて末梢血リンパ球よりFISH法を行い、HBV genomeの組み込みを多数認めた。これらのHBVゲノムの組み込み様式も多彩であり、hot spotは現在のところ確認されていない。しかしながらC型肝炎細胞癌においてもHBV genomeの組み込みがヒト染色体上に多数認められることを確認し得た。今後は、組み込み部位と発癌に關与する遺伝子発現の有無など背景因子について、次世代高速シーケンサーを用いて、さらに検索する。

謝辞

本研究は、日本大学学術研究助成金総合研究（総12-012）による助成を受けて実施したものである。

文献

- Yamamoto T, Kajino K, Kudo M, et al. Determination of the clonal origin of multiple human hepatocellular carcinomas by cloning and polymerase chain reaction of the integrated hepatitis B virus DNA. *Hepatology* 1999; 29: 1446-1452.
- Matsuoka S, Nirei K, Tamura A, et al. Influence of Occult Hepatitis B Virus Coinfection on the Incidence of Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C. *Intervirology* 2009; 51: 352-361.
- Wang J, Lin J, Chang Y, et al. MCM3AP, a novel HBV integration site in hepatocellular carcinoma and its implication in hepatocarcinogenesis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2010; 30: 425-429.
- Tamori A, Yamanishi Y, Kawashima S, et al. Alteration of gene expression in human hepatocellular carcinoma with integrated hepatitis B virus DNA. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5821-5826.

HBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込み機序の解明と肝癌発生に与える影響の解明

Fig.1

381-Full genome sequence

```

CTCCAGCACTTCCAGCAACTCTTGAGATCCAGCAACTGAGCCTGTAGCTTCTCTGCTGGCTCCAGTTCAGCAACAGTACGCCCTGCTCAGAACTCTGT
CTCAGCCATATGCTCAATCTTATGAGAGACTGAGGACCTGCGCCGSAACATGAGAGCAATCCATCAGCACTCTAGGACCCCTGCTGTGTGATCAGAGGAGGCTT
TTTCTGCTGACAAAATCCACACATCCACAGAGTCTAGACTGCTGGTGGACTCTCTCAGTCTTCTAGGGGAAACACCCTGTGCTGTGGCCAAATTCOCA
GTCCAAAATCTGAGTACATCCAGCAGCTGCTGCTCTCCAAATTTGCTCTGGATTTAGCTGATGCTGAGGAGTGTGCTGGGAGTGTTCATCTCTGCTGGCT
ATGCTCCTCTCTGCTGTGCTGTGCTGGACTGAGGATGTGCTGGCTGTGCTGGCTGTGCTGGCTGTGCTGGCTGTGCTGGCTGTGCTGGCTGTGCTGGCTGTGCTGGCT
CAGCACTCTCTCAGGAAACTCTGCTCTCCATCATGCTGTGCTACAAAACCTAGGAGGAGAACTGCACTGCTATTCOCATCCATCATCTGGGCTTTCCG
AAATTCCTATGGAGTGGGCTCAGCCTGCTCTCTGGCTCAGGCTTTACTAGTGCATTTGCTCAGTGGTTCGTAAGGCTTTCCGCACTGTGCTGGCTTTCCAGT
TATATGAGTGTGCTGTATGGGAGCAACTCTGCTCAGCACTCTGGAGCTTTATGCGGCTGTATAGCAATTTTCTGCTGTGCTGGCTGTGCTGGCTGTGCTGGCT
CACAAAAGGAAAGATGGGAGATATCCCTTCACTTCATGGGATATGTAATTTGGAGTGGGAGCATACTGCAACAGCAATATTTGCCAAAATAAATCAATATGT
TTTGAAGAACTCTGCTGAACAGGCTATGATGGAGAAATATGCAAGCAATTTGGGCTTTTGGGCTTTGCTGGGCTTTTACGCAATGGGATATGCTGCTCT
TTAAAGCCATATATGATGATGATGAGGAGAAAGGCTTTTACCTTTCCGCAACTTATAGGCTTTTACCTGAGAACTGCTGAACTTTTCCGCTGCTCT
GGGAAAGGCTGCTGCTGCAAGTGTGCTGAGCAACCCCACTGGTGGGCTTGGCAATAGGCACTCAGGCACTGGTGGAACTTTGCTGCTCTCTGCTGCTG
CGATGCTACTGGGAGCTCTAGGCTGCTGCTGCTGAGCAAGCTGTGGAGGAACTATGCGGCTGAGAACTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TGGTTCCTCAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CGTTTGGGCTCTACCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CGTGTGACTTGGCTTCCAGCTCTCAGGCTTGTATAGAACTTGTAGAACTTGTATAGAGTGTACTCTCTTTTGGCTACTGACTCTATGCTGCTGGTGGAGCTCTAG
TGTGAGAGCCCTGCTGGGCTGCTGAGAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GGCAATAATGGTCTGCTCAGCACTCTGCAACTTTTCACTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GCTTTAGGACTGAGCAATGAGCTTATAGAAATTTGAGACTTCTATAGAGTGTACTCTCTTTTGGCTACTGACTCTATGCTGCTGGTGGAGCTCTAGTGTG
TATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
GCTTACACTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CGCTATCTTATGCACTCTGGGAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TCCAGAACTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTGATGGCAACTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TAAATTTATATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TCCAGCAACACATATTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AAGTCTACAGCAATGGAGTGGTCTTCCAACTCTGAAAGCTGAGGAGCAATCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TTCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GGAGAGGCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG

```

Fig.4

ID3 HBs Ag (+)

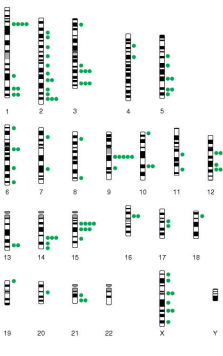
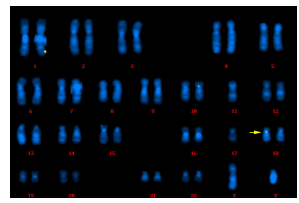


Fig.2

ID1 HBs Ag (+)

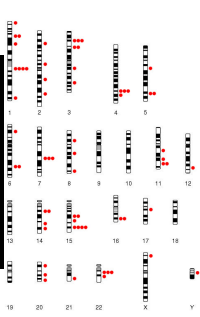
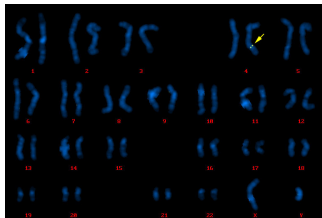


Fig.5

ID4 HBs Ag (+)

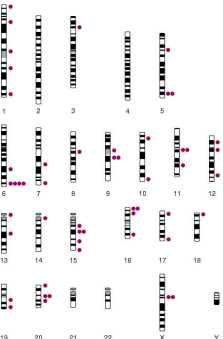
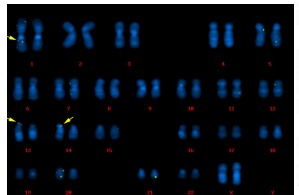


Fig.3

ID2 HBs Ag (+)

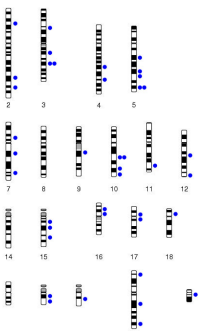
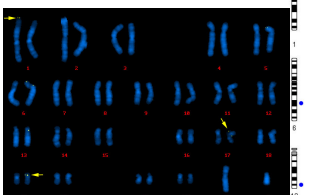
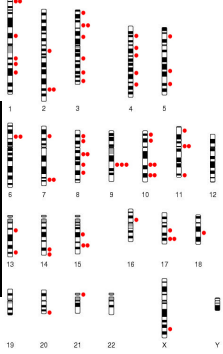
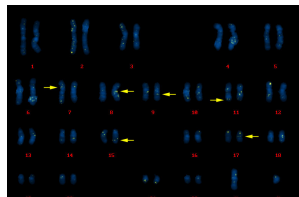


Fig.6

ID4 HCV Ab (+), Hbc Ab (-)



IgEを介した新たなマスト細胞活性化機構の解明

羅智靖¹⁾, 布村 聡¹⁾, 高橋恭子²⁾, 下川敏文¹⁾, 徳橋泰明¹⁾, 岡山吉道¹⁾

Elucidation for novel mechanisms of IgE-dependent mast cell activation

Chisei RA¹⁾, Satoshi NUNOMURA¹⁾, Kyoko TAKAHASHI²⁾, Toshibumi SHIMOKAWA¹⁾,
Yasuaki TOKUHASHI¹⁾, Yoshimichi OKAYAMA¹⁾

要旨

マスト細胞はアレルギー炎症を始めとする局所の炎症のコンダクターとして機能する。本研究では、免疫応答の盛んな粘膜組織に定着し、広く感染・炎症・免疫・アレルギーに、さらに組織の修復においてコンダクターとして機能する。本研究では、マスト細胞に焦点を絞り、マスト細胞の過剰な活性化の制御を原理とした新たなアレルギー治療法の開発を目指した。本研究プロジェクトの成果から、①ヒトのマスト細胞では、ヒトの好塩基球と異なり、IgE+を介したHRFによるマスト細胞の活性化がほとんど認められず、もしくは極めて活性化能が低い可能性が示唆された。また②FcεRIβ鎖が、γ鎖とは非依存性のシグナル伝達経路を持ち、特にLTC4の産生に寄与していることや、③β鎖のITAMペプチドは、マーモセットのマスト細胞の活性化を抑制することを初めて明らかにした。

1. はじめに

マスト細胞は殆ど全身の臓器、組織に分布するが、特に外界に接する皮膚や、気道、消化管などの免疫応答の盛んな粘膜組織の血管周囲に多数定着している。この位置取りは、細菌やウイルスなどの病原体や外来の異物に直接曝されることを意味し、感染時にはこれらの病原体を排除する自然免疫に携わる一方で、IgEやIgGと抗原の免疫複合体は、FcRを介してマスト細胞を活性化し、種々の炎症性メディエーターを放出させ、マスト細胞はアレルギー炎症を始めとする局所の炎症のコンダクターとして機能する。これに加えてマスト細胞の活性化によって細胞外へ放出された顆粒がTNF-αを含んだ状態で二次リンパ組織へ速やかに到達することにより、免疫系全体が賦活化されることが近年明らかにされた¹⁾。即ち、マスト細胞は単に即時相の反応を起動するのみではなく、遅発相における免疫応答の修飾に関与し、炎症の慢性化、増悪において中心的な役割を果たすことが類推される。例えば、繰り返す局

所の慢性刺激により、そこに形成された慢性アレルギー性炎症の“増悪サイクル”の制御因子はIgEとマスト細胞であり、花粉症の鼻粘膜、あるいは喘息の気管支粘膜などアレルギー炎症局所で、マスト細胞とB細胞、T細胞、樹状細胞などとの細胞接触型細胞間相互作用(OX40L-OX40, CD40L-CD40など)により、鼻粘膜や気管支粘膜局所におけるIgE産生の増幅が惹起されることが報告されている²⁾、そして、その増加したIgEによりマスト細胞や樹状細胞のFcεRI発現が増強し、今度はこれらの細胞の抗原に対する感受性、即ち過敏性と過剰な反応性が増幅される経路である。他の白血球と異なり、マスト細胞は、抗原が存在する限り何度でも活性化されることが、抗原非存在下であってもIgEのクローンによってはIgE分子単独でマスト細胞の活性化を惹起できることや、IgEがIgE+と呼ばれるアロタイプである場合にはHistamine Releasing Factor (HRF)に対する細胞応答性にも関与することが報告されており^{3,5)}、IgEとマスト細胞がこの増悪サイクルの制

1) 日本大学医学部
2) 日本大学生物資源科学部
羅智靖: ra.chisei@nihon-u.ac.jp

御因子たる所以である。活性化されたマスト細胞から産生、放出されたケモカインやサイトカイン、ロイコトリエンなどのメディエーターが、好塩基球や好酸球などの顆粒球、T細胞などの炎症細胞をアレルギー炎症局所へ動員することが明らかになって来ており、炎症のコンダクターとしてのマスト細胞の活性化制御が炎症の遷延化を防ぐ一つの鍵になることを示唆している。これらのことから、IgEによりマスト細胞から始まる炎症反応を制御する技法開発は、重要性が極めて高いと思われる。そこで本研究では、免疫応答の盛んな粘膜組織に定着し、広く感染・炎症・免疫・アレルギーに、さらに組織の修復においてコンダクターとして機能するマスト細胞に焦点を絞り、マスト細胞の過剰な活性化の制御を原理とした新たなアレルギー治療法の開発を目指した。具体的には①炎症増悪因子としてのIgEの新たな役割についての解析、②IgE系によるマスト細胞活性化シグナルとその制御分子(Fc ϵ RI β 鎖)の新たな機能についての解析、③新規ヒトマスト細胞活性化阻害ペプチドである、チロシンリン酸化したFc ϵ RI β 鎖ITAMによるマスト細胞の活性化阻害が、マスト細胞活性化に及ぼす影響について検討を行なった。これらの成果は、臨床試験に結びつく新たなアレルギー疾患治療薬の開発のみならず、近年マスト細胞の関与が明らかになりつつある自己免疫疾患などの治療への応用も期待される。

2. 材料および方法

試薬

マウスIgEは、BD Biosciences (San Diego, CA, USA) から購入した。ヒトIgE (HE1) およびヤギ抗ヒトIgE抗体は、それぞれDiatec Monoclonals AS (Oslo, Norway), DAKO JAPANから購入した。抗Gab2抗体は、ミリポアから (Billerica, MA, USA) から購入した。リコンビナントProtein L (PpL) はSigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。抗ヒトFc ϵ RI α 鎖抗体 (CRA1), ヒトIgE (SKO007), Histamine releasing factor (HRF) およびTNP-BSAは自分たちの研究室で調製した。実験に使用したヒトおよびマウスの各種サイトカインはPeproTech (Rocky Hill, NJ, USA) から購入した。全ての抗リン酸化抗体 (Syk, PLC γ 1, Gab2, ERK1/2, p38 MAPK) およびコントロール抗体はCell Signaling

Technology (Beverly, MA, USA) から購入した。

動物

FcR γ 鎖欠損マウス (C57BL6 background)⁶⁾, FcR β 鎖欠損マウス (C57BL6 background)⁷⁾, およびFcR β γ 鎖二重欠損マウスは、日本大学医学部 医学研究支援部門ラボラトリーアニマル系の動物飼育室において飼育された。一部の実験において、Lyn欠損マウスから採取された大腿骨が川上敏明博士 (La Jolla Institute of Allergy and Immunology) から供与された。C57BL6/J マウスは日本チャールズリバー社から購入した。全ての動物実験は、日本大学動物実験委員会からの承認を得た後に、運営内規に従って行なった。

細胞培養

ヒトマスト細胞は、インフォームドコンセントによる同意の下、採取した肺組織から分離した。ヒトマスト細胞の純度は、Flow cytometryによるFc ϵ RIとc-kitの細胞膜表面の発現量の解析により、純度の高いものであることを確認してから実験に使用した。マウスの培養マスト細胞は、既に報告されている通り、Nunomuraら⁸⁾の方法に従って、骨髓細胞をマウスIL-3 (5 ng/ml) および10% FBSを含有させたRPMI1640培地で6~8週間培養して、調製を行なった。コモンマーモセットのマスト細胞は、東海大学医学部免疫学教室 (亀谷美恵博士) において、骨髓細胞から分取されたCD34陽性細胞を、Nunomuraら⁹⁾の方法に従って、マウスのSCF (10 ng/ml) 存在下で10-12週間培養させて分化を誘導したマスト細胞を実験に使用した。

遺伝子導入法

遺伝子導入は、Nunomuraら¹⁰⁾により報告されている通り、レトロベクターを用いたウイルス感染により行なった。FcR γ YY, FcR γ FF, FcR β YYYおよびFcR β FFF cDNAを各々pMX-puroにクローニングし、パッケージング細胞PLAT-Eにトランスフェクションにした後に、産生されたレトロウイルスを回収した。レトロウイルスとポリプレンの存在下で24時間、骨髓細胞を培養し、ウイルスに感染した細胞をピューロマイシンで選択した。選択されたFcR γ トランスフェクタントはIL-3含有培地で、

FcR $\beta\gamma$ トランスフェクタントはIL-3およびSCF 含有培地でさらに数週間培養し、マスト細胞へと分化させた。

マスト細胞の活性化と脱顆粒能の検定

調製したヒト培養肺マスト細胞に、ヒトのIgE+のクローンであるHE-1 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とHRF (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、あるいはIgE-のクローンであるSKO007 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とHRF (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) との同時刺激を行ない、30分間刺激後、上清および細胞内のヒスタミン量を脱顆粒の指標として、EIA法で測定した。またPositive controlとして、抗Fc ϵ RI α 鎖抗体CRA1 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を使用した。マウスマスト細胞は、マウス抗TNP-IgE (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で16時間感作したのち、細胞をTNP-BSAあるいはバクテリア由来のIgE結合タンパク質であるPpLによって30分間刺激した。上清中に遊離された β -hexosaminase (β -hex) を脱顆粒の指標として、測定した。またPositive controlとして、calcium ionophore A23187 (1 μM) を使用した。また、マーモセットマスト細胞の場合は、ヒトIgE (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で16時間感作したのち、ヤギ抗ヒトIgE抗体 (1もしくは10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) あるいはA23187 (1 μM) を添加し、30分間刺激した。これらのマスト細胞上清中に遊離されたヒスタミン量を脱顆粒の指標とした。ITAMペプチドを用いた実験では、刺激の前に15分間ペプチド処理を行なった。

カルシウム動態の解析

IgE感作したマスト細胞を4 μM のカルシウム指示薬 (Fluo3-AM) で30分間処理し、PBSで洗浄した後に、刺激を行なった。刺激後のfluorescenceの経時的变化をflow cytometer を用いて200ミリ秒毎に計測し、細胞質内のカルシウムイオン ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) はmean fluorescence intensity (MFI) として表した。

ウェスタンブロット法

ウェスタンブロットは、刺激した細胞を1% NP40を含有するLysis bufferで可溶化し、12% SDS-PAGEでタンパク質を分離した後、Immobilon-P膜 (Millipore, Bedford, MA) に転写させた。膜を適切な一次抗体と二次抗体で処理を行なった後、ECL試薬 (GE Healthcare Biosciences) を用いてシグナルを検出した。

3. 結果

HRFとIgE+によるヒトマスト細胞活性化

HRFはIgEのタイプがIgE+ (HE1), IgE- (SKO007) に関わらず、ヒト肺由来マスト細胞からのヒスタミン遊離を惹起しなかった。抗Fc ϵ RI α 鎖抗体によるヒスタミン遊離は、遊離の程度が低いものであったが、明らかな遊離量であったために、HRFに対する不応答性は、マスト細胞の脱顆粒能の低下に起因するものではないと考えられた。これらの結果から、IgE+とHRFによる刺激は、少なくとも肺組織から分離・調製したヒトマスト細胞においては、末梢血から調製した好塩基球などですでに報告されているような著明なヒスタミンの遊離を引き起こすものではなく、好塩基球とマスト細胞でのHRFに対する応答性には大きな違いがある可能性が示唆された。

IgE依存性マスト細胞活性化シグナルの制御分子の解析

これまでの研究の結果から、脱顆粒やサイトカインの産生と異なり、Fc ϵ RI β 鎖がFc ϵ RI γ 鎖を介さずに、脂質メディエーター (LTC₄) の産生を惹起する機能を持つ可能性が示唆されるデータが得られてきたため、この β 鎖によるマスト細胞活性化機構の詳細な解析を行なった。 γ 鎖ITAMがFF型のマスト細胞 (FcR γ FF) では、Fc ϵ RI架橋によって誘導されるSyk, PLC γ 1, Gab2などの近位のシグナル伝達分子のリン酸化が顕著に低下していた (図1)。

しかしながら、興味深いことにERK1/2のリン酸化については、明らかな減弱は認められるものの、YY型 (FcR γ YY) と比較して、およそ50%程度のリン酸化反応はFF型のマスト細胞においてもFc ϵ RI架橋により誘導されてきており、この50%のERK1/2のリン酸化はFc ϵ RI γ 鎖ITAMに非依存性の機構により惹起されていると考えられた。一方、FF型およびYY型の細胞表面上のFc ϵ RI発現量に有意な差は認められなかった。 γ 鎖ITAM FF型のマスト細胞において、近位のシグナル伝達分子のリン酸化も完全には消失しないこと、②ERK1/2のリン酸化は、十分に認められることから、これらのFF型のマスト細胞で認められるシグナル伝達分子の活性化レベルが、LTC₄の産生にとって重要なファクターである細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇を

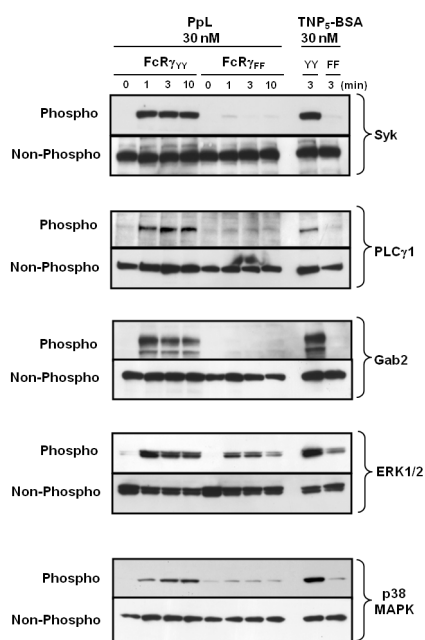


図1 FcεRI γ鎖ITAM非依存性のFcεRIシグナルの活性化

惹起しうるものであるのかを検討した。

その結果、FF型マスト細胞においても、YY型と比べて、変動のレベルは小さいものの、明らかな細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を認めることができた(図2)。

そこで次に、ERK1/2リン酸化と細胞内カルシウムイオン濃度上昇の、FF型マスト細胞のLTC4産生

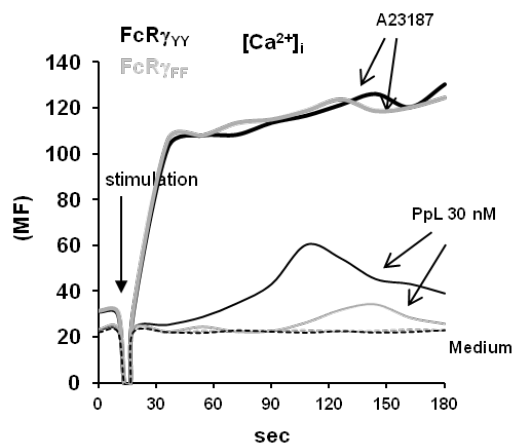


図2 FcεRI γ鎖ITAM非依存性のカルシウムシグナルの活性化

における重要性について詳細な検討を行なった。U0126 (MEK1阻害剤) 非存在下および細胞外カルシウムが十分に存在する条件下で認められるFF型のLTC4産生量は、U0126存在下および細胞外カルシウムをキレートした条件において、さらに減弱した(図3)。

これらの結果から、FF型マスト細胞において、認められたERK1/2リン酸化と細胞内カルシウムイオンの上昇は、FF型マスト細胞のFcεRI γ鎖ITAM非依存性のLTC4産生において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。そこで、FcεRI γ鎖ITAM非依存性のLTC4産生と、ERK1/2のリン酸化、

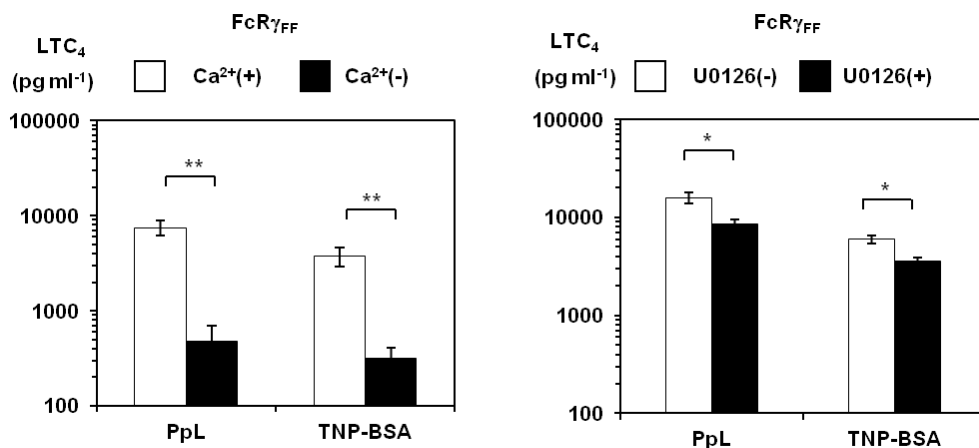


図3 FcεRI γ鎖ITAM非依存性のLTC4産生におけるカルシウムシグナルおよびERK1/2シグナルの重要性 (左) カルシウムをキレートした条件, (右) MEK1/2阻害剤 (U0126) の存在下でのLTC4産生。

細胞内カルシウムイオンの動態変化における, FcεRI β鎖ITAMの機能解析を行なった。この目的のために, FcεRI β鎖欠損マウスとFcεRI γ鎖欠損マウスを掛け合わせて, FcεRI βγ鎖の二重欠損マウスを作成した。この二重欠損マウスの骨髓細胞に変異型の遺伝子(β鎖ITAM YYY型; γ鎖ITAM FF型), (β鎖ITAM FFF型; γ鎖ITAM FF型)を導入した後, IL-3およびSCF存在下でマスト細胞へと分化させた。FcεRIは, 二つのFcεRIサブユニットが導入されないと発現しないため, 調製したマスト細胞から, さらにFcεRIを発現しているマスト細胞のみを分取し, 解析に使用した。YYY/FF型とFFF/FF型との比較により, YYY/FF型で産生されていたLTC₄は, β鎖ITAMがFFF型に置換されたことにより, ほとんど産生が認められなくなった(図4)。

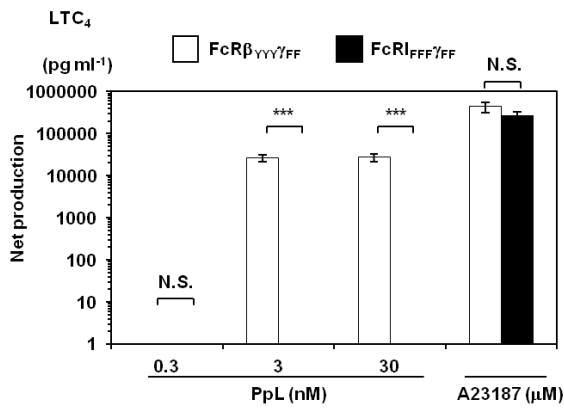


図4 β鎖ITAM依存性のLTC₄産生

この結果と一致して, ERK1/2のリン酸化, 細胞内カルシウムイオンの上昇も, FFF/FF型では完全に消失していた(図5)。

一方, FFF/FF型においても, FcεRIの発現レベルや抗原刺激によるFcεRIのエンドサイトーシスなどの機能については低下を認めなかった。以上の結果から, β鎖ITAMがγ鎖ITAM非依存性のマスト細胞活性化シグナルを伝達していることが, 初めて明らかとなった。今後は, β鎖ITAMによるγ鎖ITAM非依存性のマスト細胞活性化シグナルの制御機構の解析を中心に進めていく予定である。

FcεRI β鎖ITAMペプチドを用いたマウスおよびサルマスト細胞に対する効果の解析

マウスなどの実験動物に対する効果を検証する前に, マウスのマスト細胞に対するFcεRI β鎖ITAMペプチドの効果について検討を行なった。マウスFcεRI β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチド(YpYpYp; AAVLLPVLLAAP-KVPDDRLY(p) EELNVY(p) SPIY(p) SELEDKG)とITAMのコントロールペプチド(YYY; AAVLLPVLLAAP-KVPDDRLY(p) EELNVY(p) SPIY(p) SELEDKG)を作成し, B6マウスの骨髓から分化させた培養マスト細胞(BMMC)のFcεRIの架橋後の脱顆粒に対する2つのマウスペプチドの影響を調べたところ, β鎖のITAMのチロシン残基をリン酸化させたペプチド(Y(p)Y(p)Y(p))でも脱顆粒に対し抑

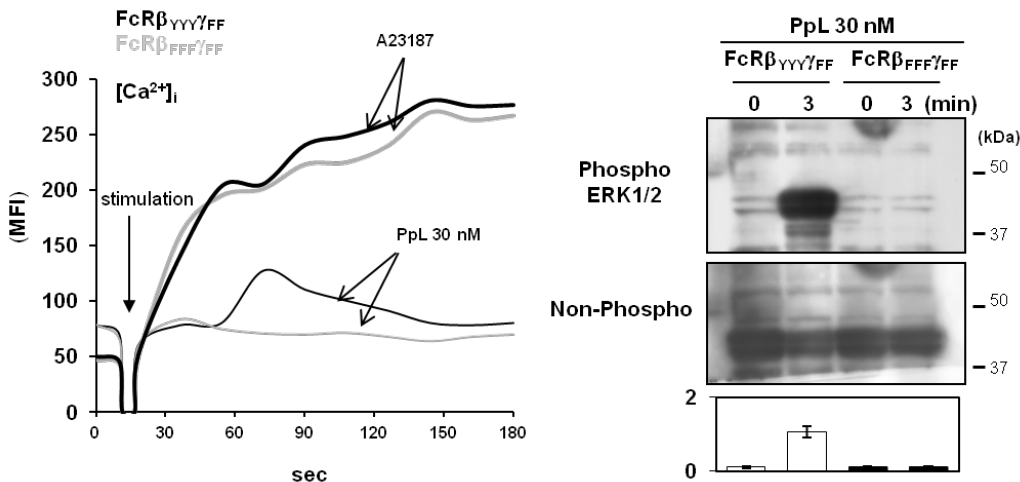


図5 β鎖ITAM依存性のカルシウムシグナルおよびERK1/2の活性化

制効果がみられなかった (図6左パネル)。またLynの欠損マウス由来BMMCでもFcεRIの架橋後の脱顆粒が抑制されないことから (図6右パネル), このペプチドは, B6マウスのマスト細胞の系では有効でないことが示唆され, 単純にマウスを用いたアレルギー性疾患モデルでの解析は, 容易ではないことが判明した。

これらの解析結果から, よりヒトに近い種の動物やマスト細胞を用いる必要性が示唆された。非ヒト霊長類であるコモンマーモセットのβ鎖のITAM motifのシーケンスはヒトと同じであることから, マーモセットのマスト細胞に対するヒトFcεRIβ鎖ITAMペプチドの効果を解析した。コモンマーモセットの骨髓細胞からCD34陽性細胞を分取し, マウスのSCF (10 ng/ml) 存在下で10-12週間培養させ

て分化を誘導したマスト細胞を実験に使用した。マスト細胞への分化は, トルイジンブルー/サフランin O染色 (図7左パネル), Flow cytometryによるIgE受容体およびc-Kitの発現により確認を行なった。マーモセットマスト細胞は, 1および10 μg/mlの抗ヒトIgE抗体によるFcεRI架橋により, 顕著なヒスタミン遊離能を示した。YpYpYpペプチドは1 μg/mlの抗ヒトIgE抗体によるヒスタミン遊離をほぼ完璧に抑制したが, 10 μg/mlの抗ヒトIgE抗体によるヒスタミン遊離に対しては, 抑制効果を認めなかった (図7右パネル)。

以上の結果から, FcεRIβ鎖ITAMペプチドのin vivoでの効果を検討し, 研究を進展させるための実験動物としてマーモセットが有用である可能性が示唆された。

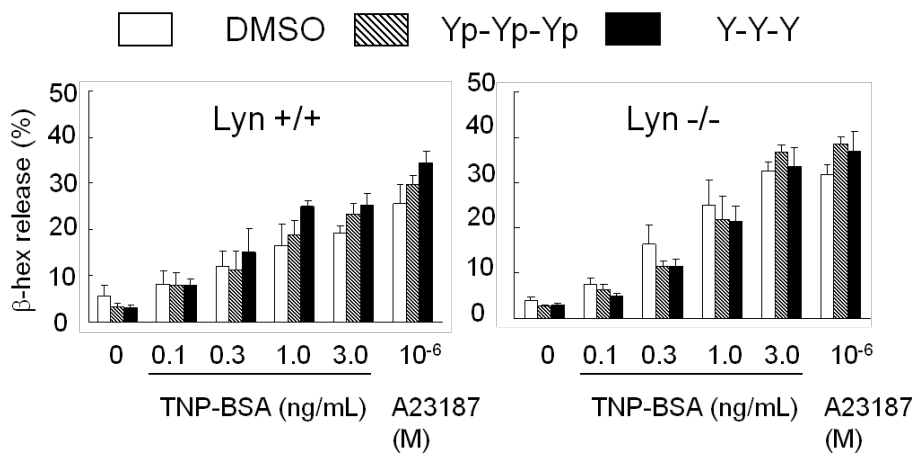


図6 マウスマスト細胞に対するマウスFcεRIβ鎖ITAMペプチドの効果

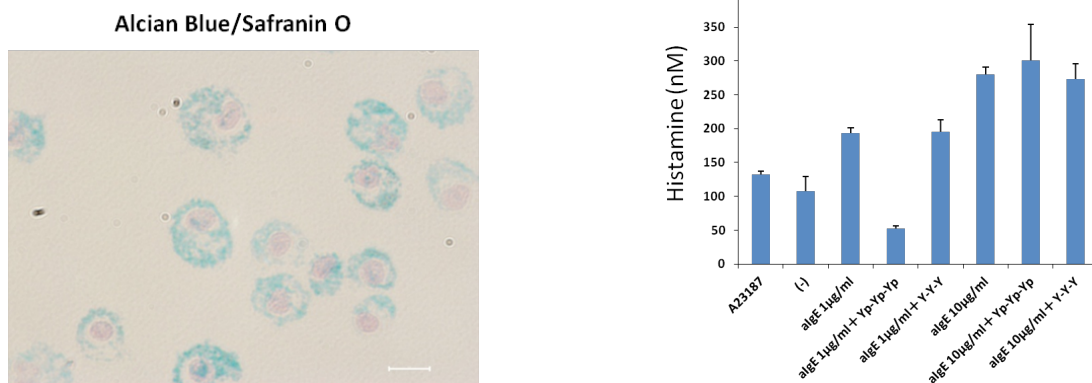


図7 マーモセットマスト細胞に対するヒトFcεRIβ鎖ITAMペプチドの効果 (左) 分化させたマーモセットマスト細胞のAlcian Blue/Safranin O染色。(右) ヒトFcεRIβ鎖ITAMリン酸化ペプチドによるヒスタミン遊離抑制。

4. 考察

今回の研究により、肺組織由来のヒトのマスト細胞では、ヒトの好塩基球と異なり、IgE+を介したHRFによるマスト細胞の活性化がほとんど認められず、もしくは極めて活性化能が低い可能性が示唆された。ヒトのマスト細胞は多様性を示し、組織から分離した場合、組織が肺などの粘膜組織や、皮膚や滑膜などの結合組織であるかによって、刺激に対する反応性や、遺伝子発現のプロファイルなどの性質が異なることや、末梢血中の前駆細胞と臍帯血に存在する幹細胞から分化・誘導させたマスト細胞間でも様々な性質が異なっていることが知られている¹¹⁾。本研究プロジェクトの期間内では、肺組織由来のマスト細胞の応答しか解析することができなかったため、今後は皮膚、滑膜や末梢血中の前駆細胞など起源の異なるマスト細胞を用いて、HRFに対するIgE+を介した反応性を解析する必要があると考えられる。IgE依存性マスト細胞活性化シグナルの制御分子の解析結果からは、FcεRI β鎖がγ鎖を介したシグナル伝達の調節分子として機能しているだけではなく、γ鎖とは非依存性のシグナル伝達経路を持ち、特にLTC4の産生に寄与していることが明らかとなった。この結果は、ヒトβ鎖ITAMペプチドのマスト細胞活性化抑制作用が、β鎖に結合する様々なシグナル伝達分子を競合的に阻害することで、①γ鎖シグナルの増強、②β鎖独自のシグナルの双方を減弱させている点にあることを示唆するものであり、β鎖ITAMペプチドの有用性をさらに高めるものであった。しかしながら、もっとも普遍的に用いられている実験動物であるマウスのβ鎖のITAMペプチドは、マウスのマスト細胞に対して、ヒトのマスト細胞で認められたような阻害効果を示さなかった。本研究により、マウスに替わり、非ヒト霊長類であるコモンマーモセットが、in vivoでのITAMペプチドのアレルギー反応に対する阻害実験を検討するための実験動物として有用である可能性が示唆された。マーモセットは、繁殖能がマウスに比べて低いために、霊長類ではない実験動物としてイヌの使用も視野にいられており、イヌについてもイヌマストサイトーマセルラインの細胞などを駆使してin vitroでの効果を検証し、in vivo実験が適応可能な実験動物の種類を拡大していく予定である。

謝辞

本研究の成果は、平成24年度 日本大学学術研究助成金 総合研究の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。

文献

- 1) Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:440-452.
- 2) Pawankar R, Okuda M, Yssel H et al. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the FcεRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest.* 1997; 99:1492-1499.
- 3) Inoue T, Suzuki Y, Yoshimaru T et al. Nitric oxide protects mast cells from activation-induced cell death: the role of the phosphatidylinositol-3 kinase-Akt-endothelial nitric oxide synthase pathway. *J Leukoc Biol.* 2008; 3:1218-1229.
- 4) Nunomura S, Gon Y, Yoshimaru T et al. Role of the FcεRI beta-chain ITAM as a signal regulator for mast cell activation with monomeric IgE. *Int Immunol.* 2005; 17:685-94.
- 5) Kashiwakura JC, Ando T, Matsumoto K, Kimura M, Kitaura J, Matho MH, Zajonc DM, Ozeki T, Ra C, MacDonald SM, Siraganian RP, Broide DH, Kawakami Y, Kawakami T. Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. *J Clin Invest.* 2012; 122:218-228.
- 6) Park SY, Ueda S, Ohno H et al. Resistance of Fc receptor-deficient mice to fatal glomerulonephritis. *J Clin Invest.* 1998; 102:1229-1238.
- 7) Kobayashi M, Nunomura S, Gon Y et al. Abrogation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation at the effector phase prevents contact hypersensitivity to oxazolone. *J Invest Dermatol.* 2010; 130:725-731.
- 8) Nunomura S, Yoshimaru T, Ra C. Na-Tosyl-Phe chloromethyl ketone prevents granule movement and mast cell synergistic degranulation elicited by costimulation of antigen and adenosine. *Life Sci.* 2008; 83:242-249.
- 9) Nunomura S, Shimada S, Kametani Y et al. Double expression of CD34 and CD117 on bone marrow progenitors is a hallmark of the development of functional mast cell of *Callithrix jacchus* (common marmoset). *Int Immunol.* 2012; 24:593-603.
- 10) Nunomura S, Gon Y, Yoshimaru T et al. FcεRI beta-chain ITAM amplifies PI3K-signaling to ensure synergistic degranulation response via FcεRI and adenosine receptors. *Eur J Immunol.* 2010; 40:1205-1217.
- 11) Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol.* 2010 ;3:111-128.

肺癌の個別化治療のための肺生検からの遺伝子学的多様性解析

辻野一郎¹⁾, 高橋典明¹⁾, 中西陽子²⁾

Analysis of the genetic polymorphism from lung biopsy to decide personalized therapy

Ichiro TSUJINO¹⁾, Noriaki TAKAHASHI¹⁾, Yoko NAKANISHI²⁾

要旨

増殖シグナル伝達経路の様々な遺伝子変異は、ドライバー変異として非小細胞肺癌(NSCLC)の進展に深く関与していることから、治療標的分子として着目されているが、個々の遺伝子変異が癌の悪性度や治療感受性に及ぼす影響については未だ不明である。そこで我々は、NSCLC進行例の経気管支鏡的肺生検を対象として腫瘍細胞の遺伝子変異解析を行い、増殖シグナル活性の指標となるリン酸化(p)ERKの発現強度と比較した。この結果、pERKの核内発現強度は、ドライバー変異の種類によって異なることが明らかとなり、予後と相関、治療奏功性と逆相関の傾向を示した。以上よりpERKはNSCLCの予後ならびに治療抵抗性予測因子として有用と考える。

1. はじめに

近年、癌細胞の増殖シグナルに関与するチロシンキナーゼ(TK)を恒常的に活性化するドライバー遺伝子変異¹⁾が次々に発見され、治療標的分子となっている。肺癌では上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)遺伝子変異²⁾あるいはanaplastic lymphoma kinase(ALK)融合遺伝子³⁾が代表的であるが、その対象患者の割合は多くはない。化学療法の奏功性も個人差は大きく、個別化治療のための新たな指標の探索は急務である。本研究では、RAS-RAF-MAP kinaseの活性化の指標としてERKのリン酸化に着目し、その強度とEGFシグナリング関連遺伝子変異との関係、さらに治療および予後との関係を進行非小細胞肺癌症例について明らかにすることを目的として、経気管支鏡的肺生検検体におけるpERKの蛋白発現と肺癌との関係が知られるドライバー変異の有無を検討した。

2. 対象及び方法

対象は2009年から2010年に呼吸器内科を受診し

非扁平上皮非小細胞肺癌と診断し得た110例(年齢 68 ± 9.7 歳, 男女比78:32, 喫煙91例, 病期ⅢB-Ⅳ期86例)のパラフィン生検組織とした。pERK蛋白発現は免疫組織化学によりallredスコアで評価した。遺伝子変異解析は、生検切片よりレーザーマイクロダイセクション法⁴⁾で回収した腫瘍細胞を用いてQuenching Probe法⁵⁾, リアルタイムRT-PCR法で行い、SPSS version 20 (IBM)を用い統計解析を行った。

3. 結果

pERK蛋白発現は110例中84例(75.9%)に陽性で発現強度には差を認めた。pERK発現強度と遺伝子異常の関係を検討した結果、EGFR変異例はpERK低スコア群に、KRAS変異例、BRAF変異例は中～高スコア群に見られる傾向が示された(図1)。pERK発現スコアと患者の生存期間中央値を比較すると陰性、低、中、高スコア群で各々480日、450日、210日、180日と逆相関の傾向を示し、生存分析でもpERK中～高スコア群で予後不良の傾向が示された(図2)。

1) 日本大学医学部呼吸器内科学分野

2) 日本大学医学部病理学分野

辻野一郎: tsujino.ichiro@nihon-u.ac.jp

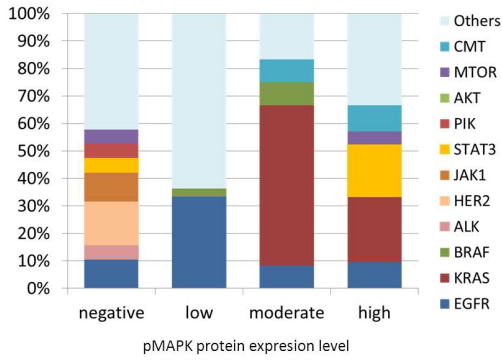


図1 Phospho ERK1/2発現レベルと遺伝子背景

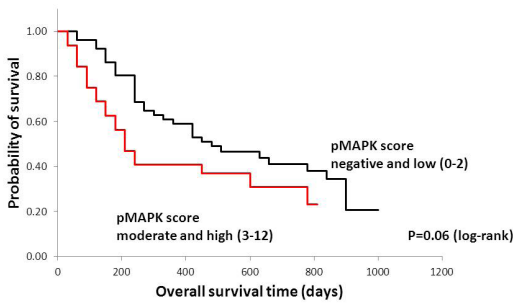


図2 Phospho ERK1/2の発現レベルと予後

pERK発現強度と標準化学療法の奏効率との関係は、pERK陰性、低、中スコア群で各々90.9%、73.6%、50.0%であり、スコアに応じて奏効率が低下した。

4. 考察

正常ではERKは増殖刺激によりリン酸化されるが、ドライバー変異によりERKが恒常的に活性化されシグナル伝達に関与する場合、免疫組織化学により腫瘍の核染色像が高度に見られることが示され

た。特にKRAS変異群はpERKが高発現で予後不良であったことから、pERK染色はKRAS変異例スクリーニングへの応用が期待される。現在、肺癌の保険診療ではEGFRおよびKRAS遺伝子検査の同時算定は認められず、TKI導入をめぐる保険診療上の問題の一つである。今回検討したpERK発現レベルは、ドライバー変異を示唆する上、治療耐性予測因子ともなり得ることから、日常測定可能な肺癌個別化治療の新たな指標として有用と考える。

5. 結語

進行非小細胞肺癌においてpERK発現強度はの癌のドライバー変異の種類で異なり、治療効果や予後と関係するため個別化治療の指標として有用である。

文献

- 1) Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2011;**12**:175-180.
- 2) Pao W, Miller VA. J. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol.* 2005;**23**:2556-2568.
- 3) Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; **448**: 561-6.
- 4) Nakanishi Y, Shimizu T, Tsujino I, et al. Semi-nested real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the successful quantitation of cytokeratin mRNA expression levels for the subtyping of non-small-cell lung carcinoma using paraffin-embedded and microdissected lung biopsy specimens. *Acta Histochem Cytochem.* 2013;**46**:85-96.
- 5) Ureshino N, Aragane N, Nakamura T, et al. A fully integrated and automated detection system for single nucleotide polymorphisms of UGT1A1 and CYP2C19. *Oncol Res.* 2011;**19**:111-4.

心臓MRI遅延造影の3次元表示による致死性不整脈の予知

渡邊一郎¹⁾, 奥村恭男¹⁾, 住友直方²⁾

Prediction of Lethal Arrhythmia by 3-Dimensional Reconstruction of the Cardiac Magnetic Resonance Delayed Enhancement Imaging

Ichiro WATANABE¹⁾, Yasuo OKUMURA¹⁾, Naokata SUMITOMO²⁾

要旨

ガドリニウムを用いた心臓MRI遅延造影法(ce-MRI)を用い、器質的心疾患症例における致死的不整脈発症の非観血的予知につき検討した。撮像した左心室ce-MRIの2.5 mm毎の短軸スライスを平均40画像作成し、まず、各スライス上での心筋線維化中心部位と境界部位を定量し、左室心筋全体に対する比率を計測した。更に、各スライスより、3次元左室画像を作成し、心筋線維化部位の分布を定性的に検討した。心室プログラム刺激で心室頻拍が誘発された症例では、心筋線維化境界部領域が非誘発例に対し、有意に大きかった。更に、カテーテル・アブレーションを施行した症例中、不成功に終わった症例では、心筋線維化領域が主に、心外膜側に存在した。

1. はじめに

ガドリニウムを用いた心臓MRIの遅延造影法により得た心室筋の線維化の程度及び分布を3次元表示することにより心室頻拍、心室細動発症の予知の可能性につき、心臓プログラム刺激での心室頻拍、心室細動の誘発性と比較検討した。更に心室頻拍、心室細動に対して、高周波カテーテル・アブレーションを施行する際の不整脈発生源を予測した。心室マッピングの部位及びアプローチ法を決定する際のガイドとしての有用性を検討する。

2. 対象及び方法

器質的心疾患症例(陳旧性心筋梗塞、心筋症等)20症例を対象とし、ガドリニウムを用いた心室MRI遅延造影法により左心室の4mm間隔の短軸画像を撮像し、ガドリニウムにより造影されていない正常心筋部位のMRI値の平均及び標準偏差値(SD)を算出し、平均値+3SD値よりもMRI値が高い値を示す部位をcore zone、平均値+2SDと平均値+3SDの間を示す部位をgrey zoneとして色を変えて表示

した。更にMATLABソフトウェアを用いて作成した3次元再構築画像を表示し、心筋線維化の3次元分布と心室プログラム刺激法による心室頻拍・心室細動の誘発性との関連性を比較検討し、更に、心室頻拍・心室細動の既往のある症例、心室頻拍・心室細動が誘発された症例においては、心内膜側及び心外膜側マッピングによる心室頻拍・心室細動の発生源と心筋線維化の3次元分布を対比することにより、非観血的に心室頻拍・心室細動の発生およびその起源の予測の可能性について検討した。

3. 結果

表に電気生理学的検査にて心室頻拍が誘発された症例と誘発されなかった症例における左心室線維化中心領域(core zone)と線維化境界領域(grey zone)の面積を%表示で示す。心室頻拍が誘発された症例では、core zoneの面積は非誘発症例との間に有意差は見られなかったが、grey zoneは心室頻拍誘発症例で有意に大きかった。図には陳旧性心筋梗塞症例における心筋梗塞巣の範囲の3次元再構築

1) 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野
2) 日本大学医学部小児科学分野
渡邊一郎: watanabe.ichirou@nihon-u.ac.jp

表 心室頻拍誘発症例と非誘発症例の心筋線維化中心領域と境界領域の比較

結果			
全体 (n=38)	VT誘発		P値
	あり(n=26)	なし(n=12)	
線維化中心領域(%)	11.4±1.9	16.2±2.9	0.1787
線維化境界領域(%)	41.2±1.8	23.6±2.8	<0.0001
心筋梗塞 (n=13)	あり(n=9)	なし(n=4)	
線維化中心領域(%)	10.4±2.1	11.5±3.2	0.7885
線維化境界領域(%)	41.7±3.7	28.5±5.6	0.0766
肥大型心筋症 (n=7)	あり(n=6)	なし(n=1)	
線維化中心領域(%)	9.17±3.1	3.0	N.A
線維化境界領域(%)	40.5±3.5	29.0	N.A

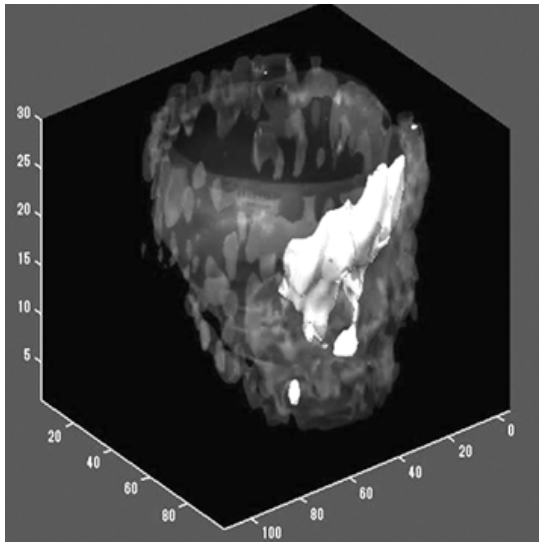


図 左室心筋の線維化の3次元表示

画像を示す。

4. 考察

心臓MRIのガドリニウム遅延造影の2次元定量評価にて、器質的心疾患における心室性不整脈発生基質の評価を検討した結果、心室筋線維化の中心領域の範囲ではなく、心筋線維化の境界領域の範囲が心室頻拍の誘発性との関連性を非観血的に評価することが可能であった。さらに、心筋の線維化を3次元表示することにより、心室頻拍に対する経皮的カテーテル・アブレーション治療を施行する際の心室へのアプローチ（心内膜、心外膜）を事前に選択することが可能と成り得る。

5. 結語

器質的心疾患症例において、心臓MRIのガドリニウム遅延造影の2次元定量評価、3次元定性評価は心室頻拍の予知および治療法の選択する上で、非侵襲的で簡便な方法として有用な検査法である。

文献

園田和正, 渡辺一郎, 奥村恭男, 他. CE-MRIを用いた Delayed Imageによる心筋梗塞後心室頻拍の特徴. 第27回日本不整脈学会, 横浜市, 2012

肝癌におけるB型肝炎ウイルス遺伝子のヒト遺伝子への組み込み様式の解明

楡井和重¹⁾, 森山光彦¹⁾, 黒田正道²⁾

Analysis of rearrangement of HBV integration in patients with HCC

Kazushige NIREI¹⁾, Mitsuhiro MORIYAMA¹⁾, Masamichi KURODA²⁾

要旨

肝癌(HCC)におけるHBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの有無については、様々な検討が現在までなされてきた。HCV関連HCCにおいては、我々は既に、Occult HBV感染がHCV関連肝癌発生の原因のひとつであることを報告している。今回の研究の目的は、HCC症例でOccult HBV感染例の全塩基配列を増幅するPCR法を行い、FISH法にてHBV遺伝子のヒト染色体への組み込み部位の検索を行い、real-time PCRシステムおよびアッセイ系を開発することである。対象は、2003年より肝細胞癌の診断にて手術切除され、検体使用の許諾を得た36例である。これらの症例の癌部および非癌部の凍結組織より、通常の方法にてDNAを抽出後、nested PCR法にてHBx DNA (150bp)、PCR法にてHBV-DNA (3.2kbp)、cccDNA (500bp)、の検出を行った。結果としては、HCCにおけるoccult HBV感染の頻度は、HBx DNAは43%に検出された。HBV DNA (3.2kbp)は、B型では3例中2例(66.7%)に検出可能であった。いずれの症例においても癌部よりのみ検出された。このPCR産物を精製して、FISH法のprobeとして使用することとした。

1. はじめに

肝癌(HCC)におけるHBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの有無については、様々な検討が現在までなされてきた。現状では、HBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込み形式は、ランダムであり特定の部位への組み込みはないとされている。一方HCV関連HCCにおいては、我々は既に、Occult HBV感染がHCV関連肝癌発生の原因のひとつであることを報告している。今回の研究の目的は、HCC症例でOccult HBV感染例の全塩基配列を増幅するPCR法を行い、そのPCR産物をProbeとして用いるFISH法にてHBV遺伝子のヒト染色体への組み込み部位の検索を行い、C型および非B非C(NBNC)型HCC例についてHBV遺伝子の組み込み部位を確認し、簡便な検出法(real-time PCRシステムおよびアッセイ系)を開発することである。

2. 対象および方法

対象は、当院消化器外科にて2003年より肝細胞癌の診断にて手術切除され、検体使用の許諾を得た36例である。内訳は、B型肝炎細胞癌；3例、C型肝炎細胞癌；20例、NBNC型肝炎細胞癌；13例である。これらの症例の癌部および非癌部の凍結組織より、通常の方法にてDNAを抽出後、nested PCR法にてHBx DNA (150bp)、PCR法にてHBV-DNA (3.2kbp)、cccDNA (500bp)、の検出を行った。

- ①高頻度にHBV DNAを検出し得るHBx領域の primer setsを用いたnested PCR法にてHBV DNAを検出した。
- ②HBV DNA検出例について、3.2kbの全塩基配列を増幅できるPCR法を用いてfull genomeの検出を行い、その全塩基配列をAuto Sequencerにて決定する。

FISH法による解析は、2011年に肝癌にて外科切

1)内科学系消化器肝臓内科学分野
2)病態病理学系微生物学分野
楡井和重：nirei.kazushige@nihon-u.ac.jp

除された、HBs抗原陽性5例とHBs抗原陰性かつHCV抗体陽性1例の末梢血リンパ球より、リンパ球ヒト染色体上のHBVゲノムの組み込みの検出を行った。

- ①HBV関連肝癌発生のヒト遺伝子へのHBV遺伝子の組み込みの検出を、3.2kbのPCR産物をprobeとしたFISH法を用いて検討した。
- ②PCR産物を精製して、FISH法に用いるProbeを作製する。

1. HBV DNAの検出方法は以下の如く行った。

- 1) 肝がん症例の全血10mlないしは凍結保存血清100 μ 、あるいは凍結肝組織よりDNA抽出kitを用いてDNAを抽出する。
- 2) 採取したDNAを用いて、HBx部位に設定したprimer setsを用いて、nested PCR法を行う。

2. HBVの組み込みの検出は以下の如く行った。

- 1) ヘパリン加全血10mlを血球を分離して、プレパレート上に薄層に添付する。
- 2) Fluorescence labeled in situ hybridization (FISH) 法により、染色体上へのHBVの組み込みの検出を行う。
- 3) B型肝炎患者の血清よりPCRにてHBV全長を増幅し、このPCR産物を利用してFISH法のprobeを作製する。DNA濃度を1 μ g/ μ lに調整して20 μ gをprobeとして使用する。

固定細胞FISHプロトコルを以下に提示する。

- 1) 細胞の変性処理を以下のごとく行う。
 1. 細胞標本を70 $^{\circ}$ Cホットプレート上で2時間ハードニング後、70 $^{\circ}$ Cの70%ホルムアミド/2 \times SSC中2分間変性処理した後、氷冷した70%エタノールに5分浸漬する。
 2. 70%エタノールで洗った後100%エタノールに5分浸漬後風乾もしくは37 $^{\circ}$ Cインキュベーターで乾燥する。
- 2) プローブの変性処理を以下のごとく行う。
 3. スライドあたり10 μ lのプローブをチューブに入れ75 $^{\circ}$ Cで10分変性して、5分以上氷冷する。
 - 3) ハイブリダイゼーションを行う。
 4. 細胞標本にプローブをアプライしカバーグラ

スをかける。この後37 $^{\circ}$ Cで必要時間ハイブリダイズする。

- 4) 洗浄および検出を行う。
 5. 2 \times SSC中5分浸漬しカバーガラスを静かにはずして、37 $^{\circ}$ Cの50%ホルムアミド/2 \times SSC中20分浸漬する。
 6. 1 \times SSCですすいだ後1 \times SSC中15分浸漬した後、DAPI染色後マウントし蛍光観察を行う。

3. 結果

(1) HCCにおけるoccult HBV感染の頻度

- 1) この結果ではHBx DNAは43%に検出された。内訳はHBx DNAはB型HCC; 3/3(100%)、C型HCC; 6/20 (30%)、NBNC型肝細胞癌; 6/13 (46.2%) に検出された。癌部/非癌部の検索では、B型HCC; 100/100%、C型HCC; 25/25%、NBNC型HCC; 38.4/38.4%であった。

- 2) HBV DNA (3.2kbp) は、B型では3例中2例(66.7%)に検出可能であった。このうち1例をFISH法のprobeとして使用した。Fig.1に全塩基配列を提示する。次に、C型においては全例で検出されなかった。NBNC型HCCにおいては、17例中の1例(7.7%)に検出が可能であった。いずれの症例においても癌部よりのみ検出された。

- 3) このうちNBNC型HCCより検出可能であった1例のPCR産物より3.2kbの全塩基配列をAuto Sequencerを用いたdirect sequence法にて決定した。この結果より、genotype Cに分類された。この症例においては現在詳細を検索中である。

- 4) cccDNAは、B型では3例全例に検出され、C型では20例中2例(10%)、NBNC型では13例中1例(7.7%)に検出された。

癌部と非癌部の比較では、B型は全例が両者より検出された。C型では、癌部2例(10%)、非癌部1例(5%)に検出され、NBNC型では癌部/非癌部ともに1例ずつ(7.7/7.7%)に検出された。

cccDNAの検出例はいずれもHBx DNAが検出されていた。また3.2kbpのHBV DNAが

38T-Full genome sequence

```

CTCCACCAGTTCACCAAACTCTCAAGATCCCAGAGTCAGGGCTCTGTACCTTCTGCTGGTGGCTCCAGTTCGGAAACAGTAAGCCCTGCTCAGAATACTGT
CTCAGCCATATCGTCAATCTTATCGACGACTGGGGACCCTGCGCCGAACATGGAGAACATCGCATCAGGACTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGCGGGGTT
TTTCTCGTTGACAAAAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAGTTTTCTAGGGGAAACACCCGTGTGCTGGCCAAAAATTCGCA
GTCCCAATCTCCAGTCACTACCAACCTGTTGCTCCTCAATTTGCTCCTGGTATCGCTGGATGTGCTGCGGCGTTTTATCATCTTCTCTGCATCCTGCTGCT
ATGCCTCATCTTCTGTTGGTCTTCTGACTATCAAGGTATGTTGCCGCTTGTCTCTAATTCAGGATCATCAACCACAGCAGGGACCATGCAAGACCTG
CAGACTCCTGCTCAAGGAACTCTCGCTCCATCATGTTGTTGTACAAAACCTAGGGACGGAACTGCACCTGTATCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGC
AAAATTCCTATGGGAGTGGGCTCAGTCCGTTTCTCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTGAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCACTGCTGGCTTTCAGT
TATATGGATGATGTGGTATTGGGGCCAAAGTCTGTACAACACCTTGAGACCCTTTATGCCGCTGTACCATTCTTGTGCTTTGGTATACATTTAAACCT
CACAAAACGAAAGATGGGGATTTCCCTTAACTTATGGGATATGAATGGGAGTGGGGCATTGCCACAGGAACATATTGCCCCAAAAATCAAATATGT
TTAGAAAACCTCCTGTAACAGGCTATTGATTGAAAGTATGTCAACGAATTTGGGCTTTTGGGGTTTGTGCCCTTTTACGCAATGTGGATATCCTGCT
TTAAAGCATTATATGCATGTATACAGGCAAAACAGGCTTTTACTTTCTCGCCAACTATAAGGCCCTTCTACGTCAACAGTATCTGAACCTTTACCCCGTTGCT
CGGCAACGGCTGGTCTGTGCAAGTGTGCTGACGCAACCCCACTGGTGGGGCTTGGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACTTTGTGCTCCTCTG
CCGATCCACTGCGGAACCTTAGCCCTTGTGTTGCTCGCAGCAGGTGGAGCCAACTCATCGGACTGACAATTTGCTCGTCTCCCGCAAATATACA
TCGTTTTCCATGGCTGTAGGCTGTGCTGCCAATCGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTACGTCCCGTGGCGCTGAATCCCGCGGACGCCCTCCCGGGG
CGTTTTGGGCTCTACCGCCGCTTCTCGCTGCCGTACCGACCCAGCCGCGGCGCACCTCTCTTACGCGGTCTCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGAC
CGTGTGCACTTTCGCTTACCTCTGCACGTTGCATGGAACCCCGTGAACGCCACCGGAGCCTGCCAAAGGTCTTGCATAAGAGGACTCTTGGACTTTTCAGCAA
TGTCAACGACCGACTTGAAGGCTACTTCAAAGACTGTGTGTTACTGAGTGGGAGGAGCTGGGGGAGGAGACGAGGTTAAAGGTCTTGTACTAGGAGGCTGTA
GGCATAAATGGTCTGTTCCACGACCTTGAACCTTTTCACTCTGCCTAGTCACTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCAAGCTGTGCCTGGGTG
GCTTTAGGACATGGACATTGACCCCTTATAAAGAATTTGGAGCTTCTATAGAGTTACTCTCTTTTTTGCCTACTGACTTCTATCCGTGCGGAGACCTCCTAGA
TACCGCGCTGCACTGTATCGGGACGCAATAGAATCCAATGAACATTGCTCACCTACCATACAGCAATCAGGCAAGCTATTGTGTGCTGGGGGAAAGTAAAGT
TCTAGCTTCTGGTGGTGGAAATTTACAAGATCCAGCATCCAGGATCTAGTGTGATGTTAAGCAATCAACATGGCCCTAAAGATCAGGCAATTTATGTTG
GTTTACATTTCTGCTTACTTTTGAAGAGAAGTGTGCTTGAATATTTGGTGTCTTTGGAGTGTGGATTGCGACTCCTCCTGCCTACAGACCACCAATGC
CCCTATCTTATCAACACTTCCGAAACTACTGTTGTTAGACGAGGAGGACGCTCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAAGGCTCAATCACCGG
TCGCAAGAAGATCTCAATCTCGGGATCCCAATGTTAGTATCCCTGGACTCATAAGGTGGGAACTTTACGGGGCTCTATTCTTACAGTACCTGCTTCAATC
CTGAATGGCAAACCTCTCTTTTCCAGACATTCATTTGCAGGAGGATATTGTTGATAGATGAAGCAATTTGTTGGACCACTTACAGTAAATGAAACCAAGGAG
TAAAATTAATGCCTGCTAGATTTTATCCTAAGGTTACCAATATTTACCCTTAGATAAAGGGATCAAACCTTATTATCCAGAGCATGTAGTTAGTCACTACT
TCCAGACAAGACATTTATGCATACTCTTTGGAAGGCGGGGATCTTATATAAAGAGAGTCAACACAGAGCGCCTATTCTGCGGGTACCATATTTGGGAAAC
AAGATCTACAGCATGGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGAAAGGCATGGGGACAAATCTTCTGTGCCCAATCCCAAGGATTTCTCCCGATCATCAGTTGGAC
CCTGCCTTCAAAGCAACTCAGAACTCCAGATTGGGACCTCAACCCACAAAGACAACCTGGCCGGACGCCACAAGGTGGGAGTGGGAGCATTGGGCCAGGG
TTCACCCCTCCCATGGGGACTGTTGGGTGGAGCCCTCAGACTCAGGGCATACTTACATCTGTGCCAGCAGCCCTCCTCCTGCCTCCCAATCGGCAGTCA
GGAAAGGACGCAACTCCCTATCTCCACCTCTAAGGGACACTCATCTCAGGCCATGCAGTGGAA
    
```

Fig1 38T株の全塩基配列

検出された例からは、HBx DNAおよびcccDNAの両者も検出されていた。

以上より、HBs抗原が陰性のHCC症例であっても、肝組織よりHBVが検出されること、cccDNAが低頻度ではあるが検出されたことより、HBVがcccDNAの形態にて存在する症例が存在することが確認された。

(2) HCC発生例のヒト遺伝子へのHBVゲノムの組み込みの検出

PCR産物をprobeとしたFISH法を用いて検討した。

この結果、B型HCC例4例全例に、ヒトゲノムへのHBVゲノムの組み込みを確認した。

これらの検索結果では、HBVゲノムはヒト染色体へ多数の組み込みが認められた。しかしながら、特定の部位への組み込みの集積、いわゆるhot spotは認められず、HBVゲノムの組み込みはランダムであった。

4. 考察

このPCR産物を精製して、FISH法のprobeとして使用した。

Fish法の結果では、多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められた。しかしながら、特定の部位への組み込みの集積、いわゆるhot spotは認められず、その組み込みはランダムであった。現在、組み込み部位と発癌に關与する遺伝子発現の有無など背景因子について、次世代高速シーケンサーを用いて検討中である。

文献

Yamamoto T, Kajino K, Kudo M, et al. Determination of the clonal origin of multiple human hepatocellular carcinomas by cloning and polymerase chain reaction of the integrated hepatitis B virus DNA. *Hepatology* 1999; 29: 1446-1452.

Matsuoka S, Nirei K, Tamura A, et al. Influence of Occult Hepatitis B Virus Coinfection on the Incidence of Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C. *Intervirology* 2009; 51: 352-361.

Wang J, Lin J, Chang Y, Li P, Yang Y. MCM3AP, a novel HBV integration site in hepatocellular carcinoma and

its implication in hepatocarcinogenesis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2010; 30: 425-429.

Tamori A, Yamanishi Y, Kawashima S, et al. Alteration of gene expression in human hepatocellular carcinoma with integrated hepatitis B virus DNA. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5821-5826.

冠動脈不安定粥腫破綻の四次元的な観察

李予昕¹⁾, 大西彰²⁾, 須藤晃正³⁾, 福島聖二³⁾, 林清飛¹⁾, 鈴木俊一²⁾, 淵本大一郎²⁾,
千本正一郎²⁾, 岩元正樹⁴⁾, 橋本径子⁴⁾, 春田裕典³⁾, 高山忠輝³⁾, 國本聡³⁾,
廣高史³⁾, 松本太郎⁵⁾, 三俣昌子³⁾, 杉谷雅彦⁶⁾, 斎藤颯¹⁾, 平山篤志³⁾

Four-Dimensional Observation of Unstable Plaque Rupture
in Coronary Artery

Yuxin LI¹⁾, Akira ONISHI²⁾, Mitsumasa SUDO³⁾, Seiji FUKUSHIMA³⁾, Qingfei LIN¹⁾,
Shunichi SUZUKI²⁾, Daiichiro FUCHIMOTO²⁾, Shoichiro SEMBON²⁾, Masaki IWAMOTO⁴⁾,
Michiko HASHIMOTO⁴⁾, Hironori HARUTA³⁾, Tadateru TAKAYAMA³⁾, Satoshi KUNIMOTO³⁾,
Takafumi HIRO³⁾, Taro MATSUMOTO⁵⁾, Masako MITSUMATA³⁾, Masahiko SUGITANI⁶⁾,
Satoshi SAITO¹⁾, Atsushi HIRAYAMA³⁾

要旨

冠動脈粥腫進展と破綻の原因はまだ明らかになっていない。本研究の目的はLDLコレステロール受容体ノックアウト (LDLR^{-/-}) ブタを用いて、ACSの患者と似ている冠動脈不安定プラークを持つ大動物モデルを確立し、長期間にわたり経時的に冠動脈を観察することにより、粥腫形成の初期段階の内膜肥厚から最終的に破綻に至るまでの自然進展の経過を把握することである。LDLR^{-/-}ブタに高コレステロール高脂肪食を負荷する事で、短期間に急性冠症候群の発症の原因となる不安定プラークを形成することに成功した。今後、さらに長期的に観察することより不安定プラークの破綻のメカニズムを解明し、プラークの易破綻性の正確な評価を期待している。

1. はじめに

冠動脈粥腫の破綻が急性冠症候群の発症の原因となることが明らかになっているが、破綻しやすい粥腫(不安定プラーク)の形成過程、また破綻の契機となる原因は未だ明らかになっていない。その大きな理由の一つは冠動脈粥腫形成、破綻の時間的経過を正確に捉えていないことである。一方、進歩した血管内イメージング法は不安定プラークを特徴づけ、急性冠症候群(acute coronary syndrome, ACS)の危険度を評価することができるが、実際の臨床の現場においては、破綻直前の不安定プラークを捉えることは極めて難しい。従って、冠動脈粥腫が破綻した後から破綻経過を遡及して、その機序を解明することは困難である。

本研究の目的はLDLコレステロール受容体ノックアウト (LDLR^{-/-}) ブタを用いて、ACSの患者と似ている冠動脈不安定プラークを持つ大動物モデルを確立することである。また、長期間にわたり経時的に冠動脈を観察することにより、粥腫形成の初期段階の内膜肥厚から最終的に破綻に至るまでの自然進展の経過を把握する。また、血管内イメージング法で得られた粥腫の三次元立体構造に時間軸も含め、四次元的に再現することより、粥腫不安定化の分子、組織、力学的多面的な要因を解明し、粥腫の破綻を未然に防ぐ治療法の開発の指針をもたらすことである。

1) 日本大学医学部内科学系先端心血管画像解析学分野
2) 独立行政法人農業生物資源研究所医用モデルブタ研究開発ユニット
3) 日本大学医学部内科学系循環器内科学
4) プライムテック株式会社
5) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野
6) 日本大学医学部病態病理学系病理学分野
李予昕: li.yuxin@nihon-u.ac.jp

2. 対象及び方法

ブタは生理学的, 解剖学的, および遺伝学的にヒトに比較的近い動物であるため, 近年疾患モデルとして遺伝子組換えブタの開発が急速に進んできている。本研究では平成23年に世界で初めて作成したLDLコレステロール受容体ノックアウトホモ接合体 (LDLR^{-/-}) ブタを用いた。LDLR^{-/-}ブタは急速に動脈硬化が進行し, まだ未成熟の6ヶ月齢で, 冠動脈は内皮の肥厚等の初期の動脈硬化の所見がえられた。粥腫の進展をさらに加速し, 特に不安定プラークの形成を促進するため, 3ヶ月齢からLDLR^{-/-}ブタに1.5%コレステロールと15%脂肪食を4ヶ月間与えた。

同一個体において長期間にわたり, 経時的に冠動脈造影を施行し, 血管内超音波 (IVUS), 血管内視鏡, OCTなどの血管内イメージングを行ってデータを収集した。収集された血管内イメージング画像で冠動脈プラークの組織性状を同定する。またIVUSとOCTの画像信号を三次元再構成ソフトウェアで, 三次元立体構造を解析する。実験終了時には各臓器と血管を取り出し, タンパク, mRNAを抽出し, 炎症関連因子を中心として分子生物学的解析を行った。また, 動脈プラークを持つ各血管組織を固定後, 血管内イメージング法で観察した冠動脈プラークと同一病変を免疫染色などにより, マクロファージ, 内皮, 平滑筋, アポトーシス, 炎症因子などさまざま

なプラーク不安定化に関連する因子を病理学的に検討した。

3. 結果

LDLR^{-/-}ブタの血中LDLは野生型ブタ (WT) の14倍以上, 総コレステロールも約8倍に増加し, またHDLは70%も減少した (図1)。

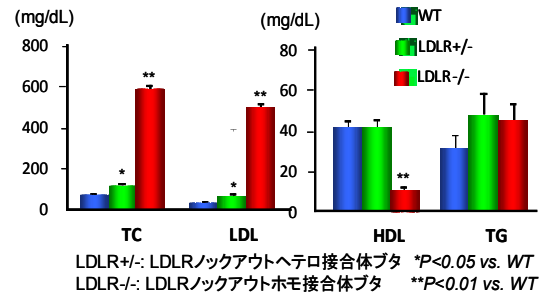


図1 血中コレステロール濃度

LDLR^{-/-}ブタに1.5%コレステロールと15%脂肪負荷食を継続して4ヶ月後, 冠動脈病変部に著明な血管径拡大 (positive remodeling) と大量のプラークを認めた (図2A, 左冠動脈回旋枝)。また, IVUS画像をiMap機能により組織性状を解析すると, プラーク内に大量の壊死コアを認めた (図2B, ピンクは壊死コア)。病変部位をHE染色すると, プラークの中には炎症細胞が侵入し, 破綻しやすい薄い線

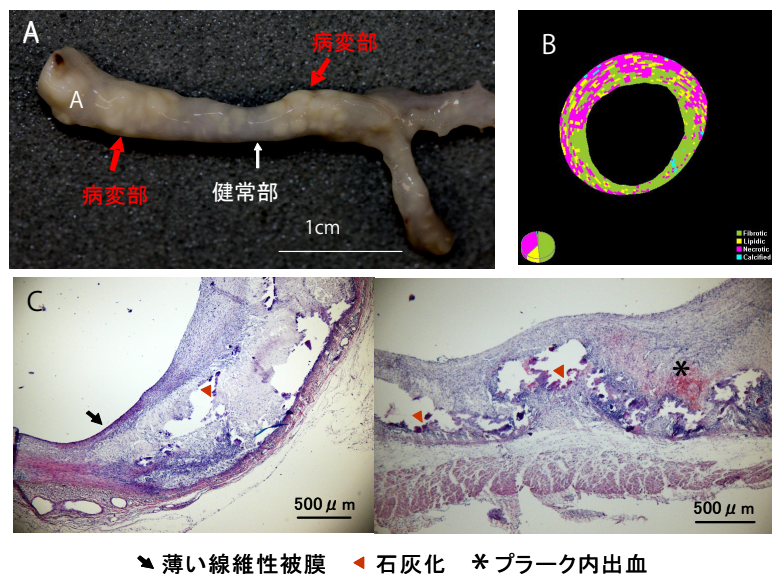


図2 冠動脈病変

維性被膜, 多量の脂質コア, 大量の石灰化, プラーク内出血などの不安定プラークの特徴を認めた (図2C)。

IVUS画像信号を三次元再構造ソフトウェアで解析すると, Lumen Volume は $8.71 \pm 1.43 \text{ mm}^3/\text{mm}$, Vessel Volume は $15.80 \pm 1.82 \text{ mm}^3/\text{mm}$, Plaque Volume は $7.10 \pm 0.45 \text{ mm}^3/\text{mm}$, Volumetric Plaque % は 42.47 ± 3.30 であった。

4. 考察

以上, LDLR^{-/-}ブタの血中コレステロール濃度は極めて高く, ヒト高コレステロール血症と類似し, また急速に動脈硬化が進行し, 若いうちに冠動脈にプラークが形成された。また LDLR^{-/-}ブタに高コレステロール高脂肪食を負荷する事で, 短期間に急性冠症候群の発症の原因となる不安定プラークが発展できた。この高コレステロール高脂肪食負荷 LDLR^{-/-}ブタは, 不安定プラークの形成と破綻のメカニズムを研究するための理想な大動物モデルになると考えられた。不安定プラークを持つ LDLR^{-/-}ブタを用いて, 経時的に観察することにより粥腫破綻のメカニズムの完全な解明や, 粥腫の易破綻性の正確な評価法が定まり, 粥腫の破綻を防ぐ新しい治療法の開発など全く新しい治療方法の開発に大いに役立つと思われた。

また肉用ブタより作出した LDLR^{-/-}ブタは, 体重が生後急速に増長し, 6ヶ月で100Kg, 1年で200Kg以上になり, 体型が大きすぎるため, 長期間の飼育,

観察と普及は不可能である。現在 LDLR^{-/-}ブタをミニブタ系統と交配, 選抜し, 体重30kg以内の LDLR^{-/-}ミニブタの開発を課題としている。

5. 結語

LDLR^{-/-}ブタに高コレステロール高脂肪食を負荷する事で, 短期間にヒトと類似した不安定プラークが発展できた。長期的に四次元的観察することより不安定プラークの形成と破綻のメカニズムを解明し, プラークの易破綻性の正確な評価を期待する。

文献

- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000; **289**: 1188-90.
- Ueda Y, Asakura M, Hirayama A, et al. Intracoronary morphology of culprit lesions after reperfusion in acute myocardial infarction: serial angioscopic observations. *J Am Coll Cardiol* 1996; **27**: 606-10.
- Hirayama A, Asakura M, Yamaguchi O, et al. Coronary angiography in ischemic heart disease *J Cardiol*. 2000; **35** Suppl 1: 57-60.
- Daisy Sahni, G.D. Kaur, Harjeet & Indar Jit. Anatomy & distribution of coronary arteries in pig in comparison with man *Indian J Med Res* 2008; **127**: 564-570
- Rapacz J, Hasler-Rapacz J, Taylor KM, et al. Lipoprotein mutations in pigs are associated with elevated plasma cholesterol and atherosclerosis. *Science* 1986; **234**: 1573-7
- Prescott MF, Hasler-Rapacz J, von Linden-Reed J, et al. Familial hypercholesterolemia associated with coronary atherosclerosis in swine bearing different alleles for apolipoprotein B. *Ann N Y Acad Sci* 1995; **748**: 283-93.

肺腺癌における GLUT-1 発現の臨床的意義

西井竜彦¹⁾, 村松高¹⁾, 古市基彦¹⁾, 高橋典明²⁾

Clinical significance of the GLUT-1 expression in the pulmonary carcinoma

Tatsuhiko NISHII¹⁾, Takashi MURAMATSU¹⁾, Motohiko FURUICHI¹⁾, Noriaki TAKAHASHI²⁾

要旨

肺癌において、悪性腫瘍の発現に関与すると言われる Glucose transporter-1 (以下 GLUT-1) 発現を検索し、PET 検査での SUV max 値との相関があるかどうか、すなわち悪性度、病期との相関があるかどうかを検討した。当科で手術を施行され、承諾の得られた肺癌患者(腺癌15例、扁平上皮癌10例)を対象とした。すべての症例で GLUT-1 の発現がみられた。

腺癌と比べ扁平上皮癌が有意に高い染色性 (1.93 ± 0.73 vs 2.29 ± 0.81) を示したが、病期、腫瘍径との相関は認められなかった。また両者において、GLUT-1 と PET の SUV max 値との相関は認められなかった。

【緒言】

Glucose transporter-1 (以下 GLUT-1) は、GLUT family に属する膜貫通型蛋白で、ブドウ糖の能動輸送に関与し、腫瘍の悪性化に伴い高率に発現を示すことが知られており、実際、腫瘍細胞は正常細胞に比べグルコースの活性、代謝が高いことから、GLUT-1 発現と発癌、発育、さらに予後不良因子としての関与が示唆されてきた¹⁾。これまでに乳腺、脳、食道、大腸、皮膚、甲状腺、卵巣、子宮の腫瘍についての報告がみられるものの、肺癌に関する報告例は非常に少ない。また、悪性腫瘍においては 18F-Fluorodeoxyglucose (18F-FDG) -PET の最大 standardized uptake value (SUV max) が高いほど悪性度が高いことも示唆されている。そこで、今回肺癌の GLUT-1 発現を検索することで PET 検査での SUV max 値との相関があるかどうか、すなわち悪性度、病期との相関があるかどうかを検討した。

【対象】

平成21年10月から平成22年12月まで当科で肺癌

の手術を施行した患者のうち、術前に PET 検査が行われており、なおかつ研究の承諾を得られた腺癌患者15名を対象とした。比較のため扁平上皮癌患者10名を対象とした。糖尿病患者は除外とした。

腺癌は、男女比は10:5で、48歳から81歳(平均年齢71.9歳)、扁平上皮癌は、男女比は7:3で、55歳から79歳(平均年齢69.4歳)であった。その内、腺癌で PET 陰性例が3例みられたが、扁平上皮癌はすべて PET 陽性であった。病期は、腺癌で stage IA 6例、IB 4例、IIA 1例、IIB 1例、IIIA 3例、扁平上皮癌で IA 5例、IB 4例、IIA 1例であった。腫瘍径は、腺癌が 2.2 ± 1.25 cm、扁平上皮癌が 3.21 ± 1.71 cm で有意差は認めなかった ($P=0.11$)。

【方法】

病理組織診断後のパラフィンブロックを $5\mu\text{m}$ に薄切し、ACRIS ANTIBODIES GmnH 社製抗 GLUT-1 ポリクローナル抗体を用いて免疫染色した。Stain intensity の判定は、Higashi らの論文²⁾、Younes らの論文³⁾ に準じて、標本内の癌細胞500個について

1) 日本大学医学部心臓血管・呼吸器・総合外科

2) 日本大学医学部呼吸器内科

西井竜彦: nishiitatsuhiko@gmail.com

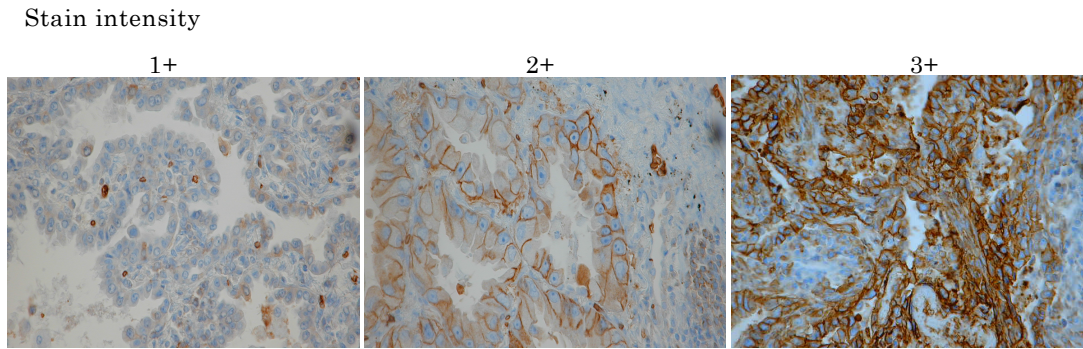


Fig.1

GLUT-1陽性細胞を百分率にて算出 (1+:10%以下, 2+:10-60%, 3+:60%以上) した (Fig.1)。

【結果】

すべての症例で、GLUT-1染色が陽性であった。Stain intensityは、腺癌では1+が4例、2+が8例、3+が3例であったが、扁平上皮癌では1+が1例あった以外はすべて3+で、組織別のGLUT-1のstain intensityは、腺癌症例 (n=15) が 1.93 ± 0.73 、扁平上皮癌症例 (n=10) が 2.29 ± 0.81 で、扁平上皮癌が有意に高い染色性 (P=0.006) を示した (Fig.2)。病期との検討では、腺癌、扁平上皮癌のいずれも染色性は特定の傾向は示さず、PETのSUV MAX値とGLUT-1の比較においても、腺癌でGLUT1 高染色群でSUV MAX値が高い傾向があったが有意な相関は認めなかった。

【考察】

今回の検討では、肺癌においてのGLUT-1の発現は病期、腫瘍径と相関は認められなかった。PETの

SUV MAX値は、腺癌 2.44 ± 2.26 、扁平上皮癌 8.91 ± 7.92 で有意に扁平上皮癌が高く (P=0.006)、また扁平上皮癌では、腫瘍径とPET間に相関があった (相関係数=0.83)。しかし、扁平上皮癌のGLUT-1の発現は、腫瘍径の小さい早期から高発現であることから、PETの値とは相関はみられなかった。一方、腺癌では早期の症例でもGLUT-1の高発現を示すものや、進行症例でも低発現を示す症例が認められるなど、一定の傾向を示さなかった。またPETの値とも相関を示さなかった。Stain intensityは肺腺癌の分化度すなわち腫瘍の悪性度に関与すると考えられるが、今後はGLUT-1が単独の予後因子なるうかの比較を行い、さらに原因を探求していきたい。

【まとめ】

①肺腺癌におけるGLUT-1発現の臨床的意義を検討した。②GLUT-1の発現は病期、腫瘍径と相関は認められなかった。③また、GLUT-1の発現とPETのSUV MAX間に相関は認められなかった。④GLUT-1の発現と予後に関してはさらなる検討が必要である。

謝辞

本研究にご協力を頂いた教室の呼吸器外科チームの諸兄に感謝の意を表します。

本研究は、日本大学医学部創立50周年記念研究奨励金 (共同研究) の助成を受け、実施致しました。記して謝意を表します。

文献

- 1) Yasuda M, Ogane N, Hayashi H, et al. Glucose transporter-1 expression in the thyroid gland: clinicopathological significance for papillary carcinoma. *Oncol Rep* 2005; 14: 1499-1504.
- 2) Higashi T, Tamaki N, Torizuka T, et al. FDG uptake, glucose transporter and cellularity in human pancre-

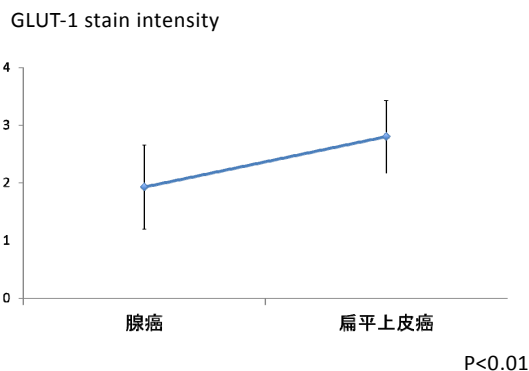


Fig.2

- atic tumors. *J Nucl Med* 1998; 39: 1727-1735
- 2) Younes M, Brown RW, Stephenson M, et al. Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* 1997; 80: 1046-1051.

在胎週数の短い新生児臍帯血中に存在する幹細胞の検討

松本太郎¹⁾, 谷ヶ崎博²⁾, 石毛美夏²⁾, 星野茂角³⁾, 麦島秀雄²⁾

Study of cord blood stem cells from early gestational ages

Taro MATSUMOTO¹⁾, Hiroshi YAGASAKI²⁾, Mika ISHIGE³⁾,
Mozumi HOSHINO³⁾, Hideo MUGISHIMA²⁾

要旨

在胎週数の短い新生児臍帯血は、満期産の臍帯血に比べ幹細胞が豊富に含まれている可能性があり、再生医療用の新たな細胞ソースとしての利用が期待できる。本研究では、在胎週数の短い臍帯血中に存在する幹細胞のスクリーニングを行い、その割合や形質、分化能を検討した。その結果、在胎週数39週未満の臍帯血では、有核細胞に占めるCD34陽性造血幹細胞の比率や、p75NTRを発現する神経堤幹細胞の比率が40週以上の臍帯血に比べて高いことが示された。臍帯血中のp75NTR陽性細胞は、ニューロスフェアを形成し、神経細胞およびグリア細胞への分化能を示した。在胎週数の短い臍帯血は、造血幹細胞移植のみならず、神経再生を目的とした細胞治療へ応用できる可能性がある。

1. はじめに

臍帯血中の幹細胞は胎児由来であり、成体内に存在する体性幹細胞に比べて増殖能や免疫寛容性が高く、また採取に際して侵襲性はほとんどなく、倫理的問題も少ない。このような特性から臍帯血幹細胞は再生医療用細胞ソースとして非常に魅力的である。在胎週数の短い新生児の臍帯血からは、より豊富に幹細胞が存在することが示唆されるが、いままですべて詳細な検討は行われていない。本研究の目的は、特に在胎週数の短い新生児の臍帯血中に存在する幹細胞のスクリーニングを行い、その割合や形質、分化能を検討することにある。そして臍帯血を用いた新しい細胞治療の可能性を模索する。

2. 対象および方法

日本大学臍帯細胞処理・保存施設にて分離処理、保存を行った臍帯血検体(N = 311)を在胎週数別(38週未満, 38-39週, 39-40週, 40-41週, 41-42週)に分類し、保存時に測定したCD34陽性細胞数、CFU-

GMコロニー数と採取量や有核細胞数との関連を比較検討した。また採取量不足などで不合格となった臍帯血を対象に、各種幹細胞マーカー抗体を用いて臍帯血細胞のフローサイトメトリー解析を行い、幹細胞マーカー陽性細胞の割合と在胎週数との関連を検討した。幹細胞マーカーとして、CD133, p75NTR, Nestin, SSEA-3などを検討した。

3. 結果

臍帯血中の有核細胞数、造血幹細胞/前駆細胞マーカーであるCD34陽性細胞数、CFU-GMコロニー数の絶対値は、在胎週数による明らかな差は認められなかった。一方、有核細胞数で補正したCD34陽性細胞率およびCFU-GMコロニー形成率は在胎週数40週以上の臍帯血に比べ、39週未満の臍帯血で有意に高値を示した(図1)。神経堤幹細胞マーカーであるp75NTRを発現する細胞の割合は、在胎週数40週以上の臍帯血に比べ、39週未満の臍帯血で有意に高率であった。臍帯血中のp75NTR陽

1) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野
2) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野
3) 日本大学板橋病院 臍帯血細胞処理保存施設
松本太郎: matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

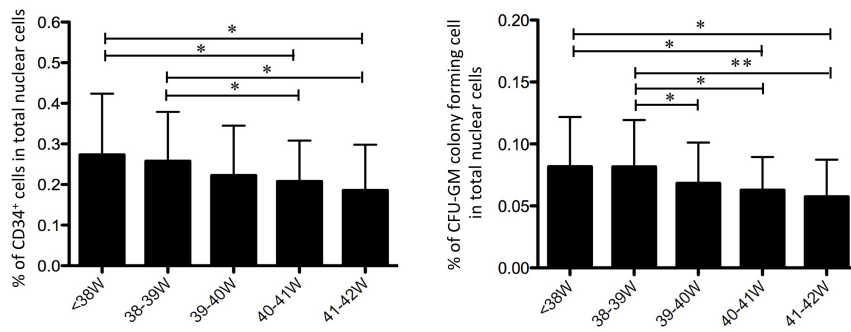


図1 在胎週数によるCD34+陽性細胞率およびCFU-GMコロニー形成率の変化 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

性細胞は、ニューロスフェア法にてスフェアを形成し、神経分化誘導培地にて培養することにより神経細胞およびグリア細胞への分化能を示した。

4. 考察

本研究により在胎週数39週未満の臍帯血では有核細胞に占める造血幹細胞の比率や神経堤幹細胞の比率が40週以上の臍帯血に比べて高いことが示された。神経堤由来細胞は、胎生期に組織間を遊走し全身の組織に分布していくことが知られているが、最近、マウス発生過程において神経堤由来細胞がaorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域から循環血液の中に入り、胎仔肝に運ばれた後、骨髄に分布するといった新たな動態が明らかになっている¹⁾。ヒト胎生期においても、造血幹細胞と同様に神経堤幹細胞

も循環血液を介した組織間移行が起こっており、その一部は新生児臍帯血中にも検出されるといった機序が示唆された。

5. 結語

在胎週数の短い臍帯血中には造血幹細胞や神経堤幹細胞が豊富に含まれていることが示された。臍帯血中p75NTR陽性細胞は、今後、神経再生医療への応用が期待できる。

文献

- 1) Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, et al. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker par. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 392-403.

レーザーマイクロダイセクション・プロテオーム解析を用いた、 椎間板変性の分子病態解析

江角眞理子¹⁾, 海老原貴之²⁾, 山口裕美¹⁾³⁾, 楠美嘉晃¹⁾,
黒田和道⁴⁾, 尾花ゆかり¹⁾, 徳橋泰明²⁾

Molecular pathophysiology of intervertebral disc degeneration analyzed by proteomics of laser-microdissected samples

Mariko ESUMI¹⁾, Takayuki EBIHARA²⁾, Hiromi YAMAGUCHI¹⁾³⁾, Yoshiaki KUSUMI¹⁾,
Kazumichi KURODA⁴⁾, Yukari OBANA¹⁾, Yasuaki TOKUHASHI²⁾

要旨

ヒト椎間板変性を病理組織学的に5つに分類し、各々のサンプルを顕微鏡下レーザーマイクロダイセクションにて採取した。各組織サンプルに存在するタンパク質をLC-MS/MS解析にて同定した結果、線維輪では変性に伴い、proteaseおよびprotease inhibitorなどが減り、collagen VIやperiostin (osteoblast specific factor)が特徴的に出現していた。髄核では変性に伴い、補体因子、血清たんぱく質など様々なタンパク質が出現し、一部の変性に免疫応答が関連することが示唆された。骨化変性部位では血液細胞浸潤、補体成分が特徴的に観察され、免疫応答や炎症反応が骨化変性に関わる可能性も考えられた。以上、特徴ある様々な椎間板変性像に特異的タンパク質の出現を同定できた。レーザーマイクロダイセクション・プロテオーム解析が、生体局所におこる病変の本態解明に有用な手段であることが示された。

1. はじめに

本研究ではレーザーマイクロダイセクションとプロテオミクスの融合技術(ここではマイクロプロテオミクスと呼ぶ)を使って、腰椎椎間板変性の病態をタンパク質レベルで起こる変化として解明する。我々は肝疾患病態をタンパク質レベルの変化から捉え、病態の機序や診断・治療・予防のターゲット分子を解明してきた。たとえば肝細胞癌の再発の難易に関わる分子や、肝炎ウイルス量の違いに関連するウイルス制御分子である。どちらもmRNAやタンパク質の発現変化を網羅的に解析し比較する「疾患オミクス」を導入している。が、これらの解析結果から、病態を捉える組織は思いのほか多様であり、オミクス解析にはより詳細な細胞の識別、組織中の局在、微小環境の把握が、重要であるとわかってきた。一方我々は、急増する高齢者運動器疾患にみられる軟骨組織変性機序について、組織学的分子生物学的研究を行っている。これらの組織は自然修復能

が乏しく、有効な薬物療法もないのが現状である。最近、健全と思われる腰椎でも場所により、また椎間板の内部(髄核)や外側(線維輪)によって、多少の変化や変性が起こっていることがわかってきた。限られた微量な試料だけに、タンパク質の量的変化を効率的にしかも包括的にとらえる必要がある。そこで本研究では、さまざまな変化を示す椎間板について、マイクロプロテオミクスを導入する。包括的にタンパク質発現の変化を捉えることにより、病態を分子レベルで明らかにし、予防・治療のターゲット分子候補を提案する。

2. 対象および方法

死後5時間以内のヒト剖検例15例を対象とした。5つある腰椎椎間板のうち上位と下位の2か所(L1/L2, L4/L5)を様々な年齢の症例から29か所採取した。固定・脱灰・包埋し、薄切後HE染色で変性の程度を評価した。椎間板周囲の線維輪(AF)と中央

1) 日本大学医学部病態病理学系病理学分野
2) 日本大学医学部外科系整形外科学分野
3) 日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野
4) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野
江角眞理子: esumi.mariko@nihon-u.ac.jp

の髄核 (NP)に分け、それぞれに起こる変性を組織学的に分類した。変性度 (severe/mild)によりAFs, AFm, NPs, NPmそしてOS (AF内層骨化変性)に分類した。各代表的部位を4検体ずつレーザーマイクロダイセクションで採取した。検体をRapiGestで溶解後にトリプシン消化を行い、ペプチドをLC-MS/MS解析した。タンパク質同定はMascot/Swiss-Protで行い、発現タンパク質の比較解析に Scaffold3を用いた。

3. 結果および考察

11300~14300のマスシグナル数から64~482個のタンパク質が同定された。全体にシグナルの割に同定タンパク質数が少ない。AFmとNPmでは同定タンパク質数は 142 ± 53 個と 157 ± 27 個とでほぼ変わらないが、肝臓組織 (32000シグナル数に対し2200個のタンパク質数)に比べるとかなり少ない。椎間板組織には糖鎖など修飾を受けたタンパク質が多く未同定のシグナルが残されている可能性、また限られたタンパク質の発現量が極めて多いため、他の組織に比べ発現タンパク質種が極度に少ないことが考えられた。さらに変性がひどくなると、AFsでは 99 ± 35 個、NPsでは 328 ± 50 個、OSでは 355 ± 86 個と同定タンパク質数の増減がみられた。AFsでは少なくとも、NPsおよびOSでは2倍に増えた。AFでは変

性に伴い、恒常性維持に発現していたと思われるタンパク質—特にproteaseおよびprotease inhibitorなどが減り、collagen VIやperiostin (osteoblast specific factor)が特徴的に出現していた。これらはAF変性関連分子として特徴づけられた。NPでは変性に伴い様々なタンパク質が出現した。中でも無血管野でありながら補体因子、血清たんぱく質などが出現し、一部の変性には免疫応答が関連することも示唆された。OSでは骨化変性に伴い周囲に血液細胞浸潤がみられ、補体成分など血清たんぱく質が意外にも特徴的に出現していた。免疫応答や炎症反応が骨化変性に関わるか、興味深いところである。

以上、特徴ある様々な椎間板変性像に特異的タンパク質の出現を同定できた。今後症例数を増やし、これらの分子が普遍的変性関連分子であるか証明する必要がある。本研究から、レーザーマイクロダイセクション・プロテオーム解析が、椎間板変性をはじめとして、生体局所におこる病変の本態解明に有用な手段であることが示された。

4. 学会発表

海老原貴之, 山口裕美, 江角真理子ほか, ヒト剖検例椎間板組織の多様性とそのプロテオミクス。第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月; 福岡。

C型慢性肝疾患における宿主側因子(IL28B)と 肝病態の関連性の検討

松岡俊一¹⁾, 森山光彦¹⁾, 田中寅彦²⁾

Analysis of correlation between SNP of IL28B and pathogenesis in chronic hepatitis C

Shunichi MATSUOKA¹⁾, Mitsuhiko MORIYAMA¹⁾, Torahiko TANAKA²⁾

要旨

C型慢性肝疾患患者のIL28βのSNPを検出し、肝組織所見およびPG-IFN+RBV療法の治療効果との関連性について検討した。[対象] 2000年より肝生検ないしはPEG-IFN+RBV併用治療を施行された、C型慢性肝炎・肝硬変・肝癌200例である。IL28β(rs8099917)のSNPの検出はreal time PCRにて行った。【結果】Majorは227例(81.9%)、Minorは54例(46.2%)であった。Gender, Age, F stage間、および検査所見では有意差は認められず、血小板数においてのみMinor群が有意に低値であった。)肝組織所見では、steatosisの程度がMinor群で有意に強く認められた。F stage進展年率は、Major群で0.094 stage/year、Minor群で0.051 stage/yearであり、Major群が速い傾向が見られた。IFN治療効果は、Major群がMinor群に比較してHCV駆除率が高い傾向が見られた。【結論】IL28βSNPにより血小板数と肝内のsteatosisに有意に差異が認められた。さらにF stageの進展速度にも差異が見られた。以上より、IL28Bの遺伝子多型はCHCの臨床病態に影響を及ぼしていることが推測された。

1. はじめに

C型慢性肝炎・肝硬変に対する中心的治療法は、ペグインターフェロン(PG-IFN)とリバビリン(RBV)療法である。この治療法は、従来の治療法に比較して大幅なHCV駆除率の向上をもたらしたが、HCV genotype1b型の高ウイルス量例ではHCV駆除率は50%前後である。2009年にほぼ同時期に世界各国より3つのIL28BのSNP(major homo)がこのPG-IFN+RBV併用療法の治療効果を規定することが報告された。IL28B遺伝子は19番染色体長腕に位置し、約1.5kと非常に小さいがその詳細な機能は不明である。このIL28B領域の4つのSNPs(rs8105790, rs11881222, rs8099917 and rs7248668)はPG-IFN+RBV併用療法の無効例に強く関連していた。すなわち、IFNの一種であるIL28B遺伝子及びその遺伝子周辺に存在する遺伝子多型(SNPs)に関して、その危険遺伝子(マイナーアレル)を持つ

HCV患者群は危険遺伝子を持たない(メジャーアレル)患者群に比較して、危険率30倍の確率でPG-IFN+RBV併用療法で無効例であること、さらに無効例はIL28B遺伝子発現レベルが有意に低いことが明らかにされた。最近では、肝線維化進展に関与することが報告されている。しかしながら、このIL28BのSNPが肝病態に与える影響については明らかではない。本研究はC型慢性肝炎ないしは肝硬変患者のIL28BのSNPを検出し、肝組織所見との関連性ないしはPG-IFN+RBV併用療法の治療効果との関連性について検討するものである。本研究を行うことにより、IL28BのSNPがC型慢性肝疾患の病態ないしは生命予後へどのような影響を与えているかについて、一部ではあるが明らかにすることが可能と考えられる。

1) 内科学系消化器肝臓内科学分野

2) 生体機能医学系生化学分野

松岡俊一: Matsuoka.shunichi@nihon-u.ac.jp

2. 対象および方法

対象症例は、2000年より当施設にて肝生検ないしはPG-IFN+RBV併用治療を施行された、C型慢性肝炎ないしは肝硬変・肝癌200例である。尚日本大学医学部倫理委員会にて、すでにIL28BのSNPの検出に関しては承認を得ている。また板橋病院臨床研究審査委員会においてもすでに承認を得ている。

I: IL28BのSNPの検出:

IL28B領域の4つのSNPs (rs8105790, rs11881222, rs8099917 and rs7248668)のうち、比較的日本人のPG-IFN+RBV併用治療効果と関連性が高いとされているrs8099917のSNPを検出する。検出方法は、ABI社にrs8099917のリアルタイムプローブの作製を依頼し、感染症ゲノムセンターにて7500 Fast Real time PCR systemなどの機器にて検出を行う。

II: 肝生検組織所見とIL28BのSNPとの関係:

対象症例を、IL28Bのrs8099917のmajor homo, minor homo, heteroの3群に分類する。次に肝生検組織所見を炎症性細胞浸潤の程度、F stage、肝細胞不規則再生の程度、steatosisの程度などについて検索し、全ての項目をスコア化する。次にこの組織スコアとrs8099917のSNPとの関連性について検討する。さらに解析を進め、IL28BのSNPによる肝組織所見の差異について詳細に検討する。肝組織所見の評価は以下のごとく各項目別にscore化して、Major群 (Major homo), Minor群 (Minor homo, hetero)の2群間で比較検討した。病理学的検索として、肝内炎症反応 [periportal (H1), parenchyma (H2), portal (H3), portal lymphoid reaction (H5)]及び、肝細胞不規則再生 (IR), portal sclerosis (PS), Bile duct Damage (BDD), perivenular fibrosis (PVF), pericellular fibrosis (PCF), Bridging necrosis (BN), steatosis (ST), の程度を0:noneから4:severeの5段階で評価した。

III: PG-IFN+RBV併用治療効果との検討:

1) PG-IFN+RBV併用治療を施行したC型慢性肝炎・肝硬変症例について、rs8099917のSNPと治療効果ないしは合併症の発生との関連性について検討している。本研究を行うことにより、IL28BのSNPがC型慢性肝炎ないしは肝硬変患者の病

態ないしは生命予後へどのような影響を与えているかについて、一部ではあるが明らかにすることが可能と考えられる。また今後肝細胞癌発生との関連性などについても検討することが可能になると思われる。

3. 結果

I: IL28BのSNPの検出:

1) について、real-time PCRを用いてIL28BのSNPの検出を行った。この結果、Majorは227例 (男性134例81.9%), Minorは54例 (男性25例46.2%)であった。

II: 肝生検組織所見とIL28BのSNPとの関係:

1) Gender, Age, F stage間で検討では2群間に有意差は認められなかった。PT, HPT, AST, ALT, γ -GT, ALP, LAP, T-Bil, TP, ALB, ICG15分値はいずれも両者間に有意差は見られなかったが、血小板数においてMinor群がMajor群に比較して有意に低値であった (P=0.0446)。

2) 肝組織所見の評価は以下のごとく各項目別にscore化して、Major群 (Major homo), Minor群 (Minor homo, hetero)の2群間で比較検討した。

この結果では、H1, H2, H3, H5, IR, PS, BDD, PVF, PCF, BNの各群では2群間に有意差は見られなかった。唯一steatosisのみがMajor homo群 (0.8)に比較してminor homo群 (1.328)が、有意に高値を呈した (P=0.0069)。

3) 肝生検施行時のF stageと輸血を受けた時から肝生検施行時までの期間で求めたF stage進展年率は、Major群で0.094 stage/year, Minor群で0.051 stage/yearであり有意差は認められなかったが、Major群で進展率が速い傾向が見られた。

III: PG-IFN+RBV併用治療効果との検討:

現在検討中であるが、IL28B Major群とMinor群の比較では、Major群がMinor群に比較してHCV駆除率が高い傾向が認められている。臨床背景因子との検討を現在行っている。

4. 考察

IL28B Major群とMinor群の比較では、血小板数と肝内のsteatosisに有意に差異が認められた。F

stageの進展速度は、Major群がMinor群に比較して速い傾向にあった。以上より、IL28Bの遺伝子多型はCHCの臨床病態に影響を及ぼしていることが推測された。

IL28BのSNPは、C型慢性肝炎および肝硬変のPeg-IFN+RBV治療効果に影響を与えていることや感組織所見に差異を認めていることより、個人の肝病態に影響を与えていることは確実である。今後は、IL28B SNPによる長期予後のうち、肝細胞癌発生の危険因子となりえるのかについて検証を加えたい。

文献

Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41: 1105-1109.

Iwasaki Y, Shiratori Y, Hige S, et al. A randomized trial of 24 versus 48 weeks of peginterferon alpha-2a in patients infected with chronic hepatitis C virus genotype 2 or low viral load genotype 1: a multicenter national study in Japan. *Hepato Int* 2009; 3: 468-478.

Stenkvist J, Sönnnerborg A, Weiland O. HCV RNA decline in chronic HCV genotype 2 and 3 during standard of care treatment according to IL28B polymorphism. *J Viral Hepat* 2013; 20: 193-199.

F-stage進展年率

n=94

	Major	SD	Minor	SD	P value
Total	0.1084	±0.168	0.0720	±0.079	0.145
F0+F1	0.0856	±0.1807	0.0722	±0.103	
F2+F3	0.1003	±0.0850	0.0718	±0.028	

輸血から生検までの年数

	Major	SD	Minor	SD	P value
Total	29.175	±11.502	31.128	±11.742	0.722
F0+F1	27.014	±11.477	29.984	±10.426	
F2+F3	30.930	±11.154	32.527	±13.038	

	〈Major〉	SD	〈Minor〉	SD	p-value
periportal	2.117	±0.738	1.922	±0.652	p=0.123
parenchyma	2.114	±0.686	2.118	±0.704	p=0.804
Portal lymphoid reaction	2.596	±0.576	2.451	±0.604	p=0.150
lymphoid reaction	2.040	±1.052	1.919	±1.148	p=0.346
portal lymphoid reactionSum	〈Major〉		〈Minor〉	Sum	p-value
リンパ濾胞あり	20 (90.9%)		2 (8.1%)	22	0.271
リンパ濾胞なし	145 (81.4%)		33 (18.6%)	178	
Sum	165 (82.5%)		35 (17.5%)	200	
	〈Major〉	SD	〈Minor〉	SD	p値
F-stage	1.852	±1.011	1.647	±0.925	p=0.1821
Portal sclerosis	0.753	±0.819	0.600	±0.819	p=0.1582
Peri-venular fibrosis	1.238	±1.001	1.256	±1.001	p=0.6637
Peri-cellular fibrosis	1.123	±0.995	1.040	±0.995	p=0.8996
Bridging necrosis	0.063	±0.260	0.020	±0.139	p=0.2575
Steatosis	0.932	±1.036	1.510	±1.089	p=0.0006
Bile duct damage	0.816	±1.001	0.733	±0.748	p=0.3228

パーキンソン病における非運動症状と遺伝学的背景との関連

森田昭彦¹⁾, 大石 実¹⁾, 中山智祥²⁾

Relationship between the non-motor complication and genetic background in Parkinson disease

Akihiko MORITA¹⁾, Minoru OISHI¹⁾, Tomohiro NAKAYAMA²⁾

要旨

日本人におけるパーキンソン病 (PD) の非運動症状に関する臨床情報と遺伝学的情報との関連を評価した既報はない。このため、PD患者120名を対象とし、既報でPDとの関連が指摘されている微小管結合蛋白質タウ遺伝子や α シヌクレイン遺伝子、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 β 遺伝子 (*GSK3B*) の遺伝子多型と臨床情報の関連を評価した。*GSK3B* 遺伝子の tag SNP である rs6438552 の dominant model と Behavioral Assessment of the Dysexecutive Syndrome の間に有意差を認め、日本人PD患者において *GSK3B* と遂行機能障害との関連が示唆された。

1. はじめに

パーキンソン病 (PD) は、黒質線条体ドパミン性神経細胞の変性ならびにLewy小体の出現を特徴とする神経変性疾患である。PDでは、無動、筋固縮、安静時振戦、姿勢反射障害などの運動症状のほか、自律神経障害や嗅覚障害のほか、睡眠障害、抑鬱、アパチー、アンヘドニアなどの精神症状、遂行機能障害を含めた認知機能障害などの非運動症状を呈することが知られている¹⁾。日本人における非運動症状に関する臨床情報と遺伝学的情報との関連を評価した。

2. 対象および方法

日本大学医学部附属板橋病院にて遺伝子解析について書面での同意が得られたPD患者120名を対象とし、Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)、Mini-Mental State Examination (MMSE)、Behavioral Assessment of the Dysexecutive Syndrome (BADS) などの臨床情報と脳波周波数解析結果、遺伝子多型との関連を評価した。脳波周波数解析は、従来報告してきた方法に準拠し²⁾、Neuro-

fax EEG-1100とQP-220A(日本光電)を用い高速フーリエ変換によるパワースペクトル分析を用いた。患者の白血球からゲノムDNAを抽出し、これまでにPDとの関連が指摘されている微小管結合蛋白質タウ遺伝子 (*MAPT*) や α シヌクレイン遺伝子 (*SNCA*)、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 β 遺伝子 (*GSK3B*) の tag SNP (single nucleotide polymorphism) である rs2435205 (*MAPT*)、rs356219 (*SNCA*)、rs6438552 (*GSK3B*) について、TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems Inc.) を用いて、遺伝子型決定を行った。統計解析には、SPSS (version 17.0, SPSS Inc.) を用い、連続変数に対して Mann-Whitney U test を行った (有意水準 $\alpha=0.05$)。

3. 結果

各遺伝子多型の頻度と臨床情報の関連では、rs2435205とrs356219と、年齢や罹病期間、UPDRS、MMSE、BADSの間に、各々、有意差を認めなかった。rs6438552と年齢や罹病期間、UPDRS、MMSEの間に有意差を認めなかった。しかし、rs6438552の dominant model とBADSの年齢調整後得点との

1) 日本大学医学部内科学系神経内科学分野

2) 日本大学医学部病態病理学系臨床検査医学分野
森田昭彦: morita.akihiko@nihon-u.ac.jp

間に有意差を認めた。各遺伝子多型の頻度と脳波周波数解析の関連では、rs2435205とrs356219, rs6438552と脳波変化の間に有意差を認めなかった。

4. 考察・結語

*GSK3B*は*MAPT*との遺伝子間相互作用が既に指摘されており³⁾、本検討においても*GSK3B*の認知機能への関与が示唆された。一方、PDと遂行機能との関連では、2010年にPD患者を対象とした検討からcatechol-O-methyltransferase遺伝子のVal (158) Met多型と認知機能、特に注意と遂行機能との間に有意な関連があることが報告されており⁴⁾、PDにおける認知機能障害の原因の1つとして多様な遺伝学的背景があることが示唆された。日本人PD患者において*GSK3B*と遂行機能障害との関連が示唆された。

文献

- 1) Aarsland D, Larsen JP, Lim NG, et al. Range of neuropsychiatric disturbances in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; **67**: 492-496.
- 2) Serizawa K, Kamei S, Morita A, et al. Comparison of quantitative EEGs between Parkinson disease and age-adjusted normal controls. *J Clin Neurophysiol* 2008; **25**: 361-366
- 3) Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, et al. GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005; **58**: 829-839.
- 4) Hoogland J, de Bie RM, Williams-Gray CH, et al. Catechol-O-methyltransferase val158met and cognitive function in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2010; **25**: 2550-2554

低出生体重児における出生後の脂質栄養ミスマッチに関する研究(継続)

宮下理夫¹⁾, 山本樹生²⁾, 岡田知雄¹⁾, 細野茂春¹⁾, 米沢龍太¹⁾

Study of lipid nutrition mismatch after birth in low birth weight infants

Michio MIYASHITA¹⁾, Tatsuo YAMAMOTO²⁾, Tomoo OKADA¹⁾,
Shigeharu HOSONO¹⁾, Ryuta YONEZAWA¹⁾

要旨

我々は、既に満期産児における臍帯血と新生児におけるリポ蛋白代謝について検討してきたが、今回低出生体重児として、早産児特にlate preterm infant (LPI) における長期予後として、その学童期における発達障害などの原因が、大脳の成長発達に影響すると予想される脂質栄養に問題が生じるためではないかと考えて、本研究を行った。本来これらの早産児は母体胎内にて定常的な栄養を胎盤を介して供給されるはずのところ、早期に離脱して外界に出生するため、妊娠末期における十分な体脂肪への栄養の蓄積なく、かつまたこの時期には、大脳皮質(灰白質)の脂質栄養も胎盤からの供給が途絶え、間欠的な哺乳による栄養供給に依存することになる。今回の検討において、LPIは満期産児と比べて、出生後のapoEリッチHDL-Cの中でもvery large, largeサイズのセグメントが大幅に脱落していることが発見された。このサイズのHDL粒子は大脳への脂質脂肪酸の運搬に関与すると推測されており、灰白質の成長に影響している可能性が示唆された。かような成績から、将来の大脳の成長に影響が予想される脂質栄養のあり方に関してこれらの早産児への対応として考慮することが重要となる。

1. はじめに

在胎34週から37週未満に出生した児(Late preterm infant; LPI)は満期産児(term infant; TI)と比べ、乳幼児期の神経発達の遅れや学童期の発達障害、さらに成人期の2型糖尿病や心血管病に罹病しやすいという問題を抱えている。その原因としてコレステロールや脂肪酸の供給不足が示唆されている。今回われわれは、コレステロールの供給不足の機構とその意義に関する考察を行った。

2. 対象及び方法

日本大学板橋病院の産科病棟において普通分娩あるいは帝王切開によって生まれた81人の適正体重児($10^{\text{th}} P < \text{出生体重} < 90^{\text{th}} P$) (50人の男児, 31人の女児)を対象とした。このうち25人はLPI, 残りの56人はTIである。出生児臍帯血と生後1か月との採血を行い、HPLC法による血清リポ蛋白を12成分

に分けてそれぞれの含まれるコレステロール(C)値やトリグセリド(TG)値を測定した。栄養方法の情報は、生後1か月時に各母親から得た。

3. 結果

LPIは臍帯血では、TIより有意にHDLのlargeとmediumのサブクラスのC値は高かった($p < 0.05$, $p < 0.01$)。しかし、生後1か月ではLPIはTIよりもHDLのlargeとmediumサブクラスのC値の増加が有意に低かった。またLPIは、生後1か月のvery large HDL-TGサブクラス濃度は、有意に低かった($p < 0.001$)。(図1)

4. 考察

出生後のHDLサブクラスのCとTG成分の変化は、TIに関する以前の研究と¹⁾、全く同じパターンであったが、LPIのその変化は全く異なるものである

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野
2) 日本大学医学部産婦人科
岡田知雄: okada.tomoo@nihon-u.ac.jp

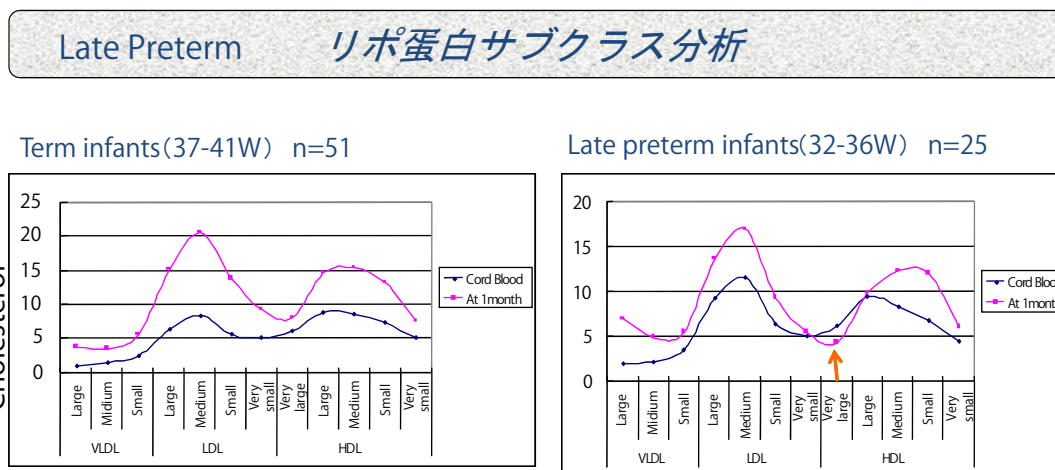


図1 Late preterm infants では、出生後のHDL大粒子サブクラスの増加が極端に低下している (矢印)

ことが知られた。臍帯血中の very large HDL-コレステロールは apoE 濃度に依存性であると考えられるが¹⁾、apo E リッチ HDL から供給されるコレステロールは、文献に述べられているように^{2,3)}、中枢神経の成長のためには必須であると考えられる。齧歯類の研究でも自己コレステロールの産生だけでは、ニューロンの成長は減少するとされ⁴⁾、胎児の神経系の成長のためには、十分な外因性のコレステロール供給こそが重要な役割を演じることが示されている。その他にも、very large HDL が胎児や新生児における機能的神経成長に貢献することが推測されている⁵⁾。特に HDL の大粒子サブクラスの低下は、胎盤の絨毛脈絡膜に由来する apoE のアクセプターの役割を担っており、この点 LPI の中枢神経成長への関わりからその影響が危惧される¹⁾。今回の我々の HDL サブクラスの成績は、LPI における HDL 成熟化障害を示唆しており、既に指摘されているように、LCAT 活性が低下しているために生じたと推測される⁶⁾。

5. 結語

LPI では TI と比べ、HDL の成熟化障害の可能性が示唆される。この機序としては、LCAT 活性の低下の存在が関連している。HDL の大粒子サブクラスが

胎盤絨毛脈絡膜に由来する apoE のアクセプターの役割を担っていることから、LPI における HDL 大粒子サブクラスの低下は、apoE の胎児への転送障害に影響し、中枢神経成長にも障害がおきやすいと考えられるので、LPI における脂質栄養に配慮することが重要である。

文献

- 1) Fujita H, Okada T, Inami I, et al. Heterogeneity of high-density lipoprotein in cord blood and its postnatal change, Clin Chim Acta, 2008; 389: 93-97.
- 2) Fagan AM, Bu G, Sun Y, et al. Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein. J Biol Chem. 1996; 271: 30121-5.
- 3) Stewart JE, Skinner ER, Best PV. Receptor binding of an apolipoprotein E-rich subfraction of high density lipoprotein to rat and human brain membranes. Int J Biochem Cell Biol. 1998; 30: 407-15.
- 4) Claudepierre T, Pfrieger FW. New aspects of cholesterol in the central nervous system. Med Sci (Paris). 2003; 19: 601-5.
- 5) Chapman S, Sabo T, Roses AD, et al. Reversal of pre-synaptic deficits of apolipoprotein E-deficient mice in human apolipoprotein E transgenic mice. Neurosci. 2000; 97: 419-24.
- 6) Morillas JM, Moltó L, Robles R, et al. Lipoproteins in preterm and small-for-gestational-age infants during the first week of life, Acta Paediatr, 1992; 81: 774-778.

TRAIL/ジアリルスルフィドによるメラノーマ治療の基礎的研究

鈴木良弘¹⁾, 村井真由美^{1,2)}, 西田 滋³⁾, 鈴木(唐崎)美喜²⁾, 羅 智靖¹⁾, 落合豊子²⁾

TRAIL/diallyltrisulfide-induced apoptosis in human melanoma cells

Yoshihiro SUZUKI¹⁾, Mayumi MURAI^{1,2)}, Shigeru NISHIDA³⁾,
Miki SUZUKI-KARASAKI²⁾, Chisei RA¹⁾, Toyoko OCHIAI²⁾

要旨

Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は、TNF サイトカインスーパーファミリーのひとつで、ガン細胞にアポトーシスを誘導するが、非形質転換細胞にはほとんど毒性を示さないことから腫瘍選択的抗ガン剤として期待されている。しかしながら、悪性黒色腫(メラノーマ)は、TRAIL に対しても抵抗性を示し、また TRAIL 感受性細胞も治療の過程で抵抗性を獲得する。したがって、悪性メラノーマの TRAIL による有効な治療には、この抵抗性を解除するような薬剤の併用が必要で、その分子標的の探索と薬剤の開発が早急に求められている。著者らはニンニク成分のひとつである有機イオウ化合物ジアリルスルフィド(DATS)がヒト悪性メラノーマ細胞の TRAIL 感受性を著しく増強し、その作用には小胞体を介したアポトーシス増幅経路が重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究の成果は、DATS の併用による悪性メラノーマに対する新たな TRAIL 治療法の開発につながることを期待される。

1. はじめに

悪性黒色腫(メラノーマ)は進展すると通常の化学、放射線、および免疫療法に非常に抵抗性であり、極めて予後が悪い。Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は、TNF サイトカインスーパーファミリーのひとつで、ガン細胞にアポトーシスを誘導するが、非形質転換細胞にはほとんど毒性を示さないことから腫瘍選択的抗ガン剤として期待されている。

TRAIL は、death receptor (DR) 4/TRAIL receptor (TRAIL-R) 1, DR5/TRAIL-R2, TRAIL-R3, および TRAIL-R4 に結合する^{1,2)}。DR4 および DR5 は、活性化されてアポトーシスを誘導するのに不可欠な death domain を細胞内に有するが、TRAIL-R3 および TRAIL-R4 はそれらが完全にまたは一部欠如しているために TRAIL とは結合するが、アポトーシスを誘導できない³⁾。TRAIL は、extrinsic pathway および intrin-

sic pathway を活性化してアポトーシスを誘導する^{1,3)}。しかしながら、悪性メラノーマは、TRAIL に対しても抵抗性を示し、また TRAIL 感受性細胞も治療の過程で抵抗性を獲得する。したがって、悪性メラノーマの TRAIL による有効な治療には、この抵抗性を解除するような薬剤の併用が必要で、その分子標的の探索と薬剤の開発が早急に求められている。

ジアリルスルフィド(DATS)は、ニンニクの臭気成分のひとつである有機イオウ化合物であり、グリア芽細胞腫、前立腺ガンおよび大腸ガン細胞にアポトーシスを誘導することが報告されている^{4,7)}。しかしながら DATS の TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞に対する生物活性はほとんど知られていない。本研究では DATS 単独または TRAIL 併用のヒトメラノーマ細胞株に対する抗腫瘍効果を調べた。

1) 日本大学医学部生体機能医学系分子細胞免疫・アレルギー学分野

2) 日本大学付属駿河台病院皮膚科学分野

3) 日本大学医学部一般教育化学分野

鈴木良弘: suzuki.yoshihiro@nihon-u.ac.jp

2. 材料と方法

ヒトメラノーマ細胞株および正常ヒトメラノサイトの培養, 細胞死の評価, Caspase-3/7/12活性化, ミトコンドリア膜電位測定, ウェスタンブロッティング, および統計処理はすべて既報⁹⁾のようにおこなった。

3. 結果

TRAILによるヒトメラノーマ細胞の細胞死を calcein-AM/EthD-1 染色を用いて測定したところ, TRAILおよびDATSは単独ではA375 (図1A), A2058細胞 (図1B) に細胞死をほとんど誘導しなかったが, 併用すると顕著な細胞死が観察された。一方,

正常ヒトメラノサイトではTRAILとDATSは単独でも併用でもほとんど影響を与えなかった (図1C)。同様の結果がannexin V/ PI二重染色法によるアポトーシス測定でも得られた (図1D)。DR5の特異的アゴニストモノクローナル抗体は単独で, 濃度依存的にアポトーシスを誘導するが, 抗DR4抗体は単独ではアポトーシスをほとんど誘導しなかった。DATSを併用すると, 抗DR5抗体, 抗DR4抗体のいずれでも相乗的にアポトーシスが增強された⁹⁾。DATSによるTRAILの細胞死の增強効果は, カスパーゼ活性全体の阻害剤であるz-VAD-fmkによりほぼ完全に抑制され, caspase-8選択的阻害剤 (z-IETD-fmk), ならびにcaspase-9選択的阻害剤 (z-LEHD-

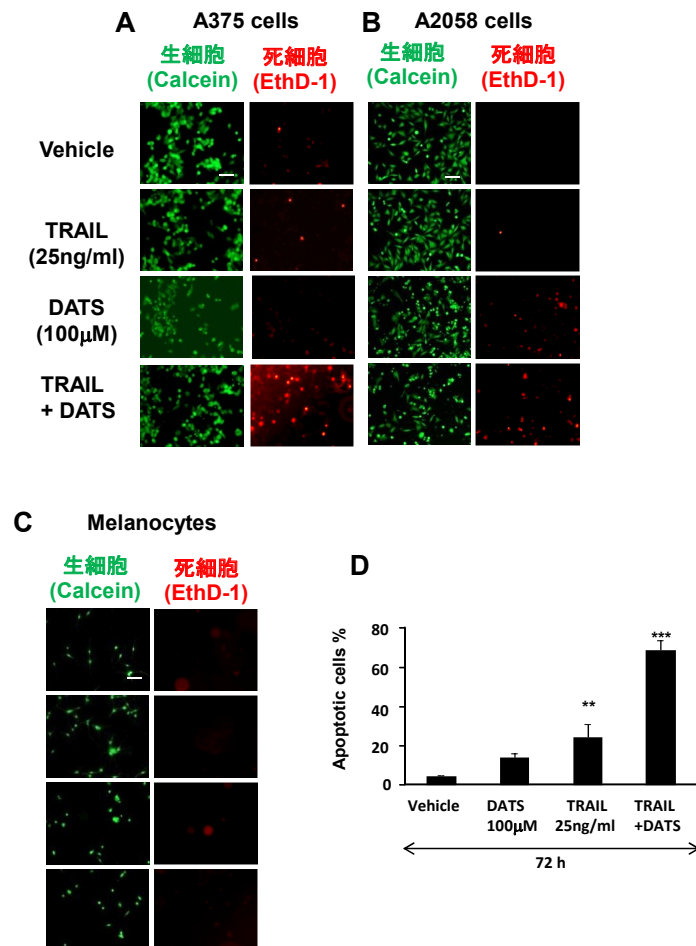


図1 (A-C) A375細胞 (A), A2058細胞 (B), 正常ヒトメラノサイト (C) を8穴チャンバースライドにまき, 25 ng/ml TRAILおよび100 μM DATS単独, または両方で24時間インキュベートした。上清を除去後, 細胞をcalcein-AMとEthd-1で二重染色し, 蛍光顕微鏡で観察した。生細胞はcalcein-AMで緑色に, 死細胞はEthd-1で赤色にそれぞれ染色される。Scale bar = 100μm. (D) A375細胞を24孔プレートにまき (1 × 10⁵/well), 上記と同様に処理した。細胞をアネキシンV/PI二重染色後にFACSCaliburで測定し, CellQuestソフトウェアで解析した。アネキシンV陽性細胞をアポトーシス細胞とした。n=3-9, **p<0.01; ***p<0.001。

fmk) で強い抑制効果が見られた (最大75%) のに対して, caspase-3/7 選択的阻害剤 (z-DEVD-fmk) の抑制効果はそれより常に弱かった (最大50%)⁹⁾。ミトコンドリア経路の関与をさらに確認するために, TRAIL 処理後ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) と caspase-3/7 活性を測定した。TRAIL は $\Delta\Psi_m$ の低下と caspase-3/7 活性化を濃度依存的, 時間依存的に誘導した。しかし, TRAIL (25 ng/ml) 72 時間インキュベーションではアポトーシスはほとんど増加しなかった。TRAIL と DATS の併用で, アポトーシスと相関して, 強い $\Delta\Psi_m$ の低下と caspase-3/7 の活性化がみられた⁹⁾。さらに, 抗 DR4 抗体は単独では caspase-3/7 活性, $\Delta\Psi_m$ にほとんど影響を与えないが, 抗 DR5 抗体は濃度依存的に caspase-3/7 活性化と $\Delta\Psi_m$ の脱分極を増強した。DATS は単独では caspase-3/7 活性, $\Delta\Psi_m$ にほとんど影響を与えないが, TRAIL, 抗 DR4 抗体, 抗 DR5 抗体による caspase-3/7 活性化, および $\Delta\Psi_m$ の脱分極を増強した⁹⁾。さらに, caspase-3/7 の活性化をウェスタンブロッティング法で調べたところ, 24 時間インキュベーション後, TRAIL (100 ng/ml) ならびに抗 DR5 抗体は単独で caspase-3/7 のプロセッシングを誘導したのに対して, アポトーシスと相関して, DATS は単独では caspase-3/7 のプロセッシングを誘導しなかったが, TRAIL, 抗 DR5 抗体による caspase-3/7 のプロセッシングを増強した⁹⁾。DATS と TRAIL が小胞体ストレス反応である unfolded protein response (UPR) を引き起こすかどうかを知るために, その分子マーカー GRP78, XBP1 の発現を調べた。TRAIL, ならびに抗 DR5 抗体は XBP-1 の発現を誘導し, DATS との併用で, GRP78 の発現は減少し, XBP-1 の発現は増強された (図 2A)。一方, 抗 DR4 抗体は単独でも DATS との併用でもほとんど影響を示さなかった (図 2A)。また陽性コントロールのタプシガーギン (Tg) では GRP78 の発現は増強したが, XBP-1 発現には影響がみられなかった (図 2A)。また, 72 時間処理後の DATS と TRAIL によるアポトーシスは, caspase-12 選択的阻害剤 (z-ATAD-fmk) で強く抑制されたが, caspase-4 選択的阻害剤 (z-LEVD-fmk) ではほとんど抑制されなかった (図 2B)。caspase-12 酵素活性は, TRAIL 単独で濃度依存的, 時間依存的に増加し (図 3A), DATS との併用で増強がみられた (図 3B)。抗 DR5 抗体は濃度依

的に caspase-12 を活性化し, その作用は DATS 併用で増強された。抗 DR4 抗体は単独では caspase-12 を活性化しなかったが, DATS との併用で有意な活性化が観察されたが, メラノサイトでは TRAIL, DATS は単独でも併用でも caspase-12 の活性化を誘導しなかった (図 3B)。また, 24 時間処理後の caspase-12 のプロセッシングをウェスタンブロッティング法で調べると, TRAIL, 抗 DR5 抗体は単独で caspase-12 のプロセッシングを誘導し, その作用は DATS により増強されたが, 抗 DR4 抗体は単独でも DATS との併用でも caspase-12 のプロセッシングは弱かった⁹⁾。

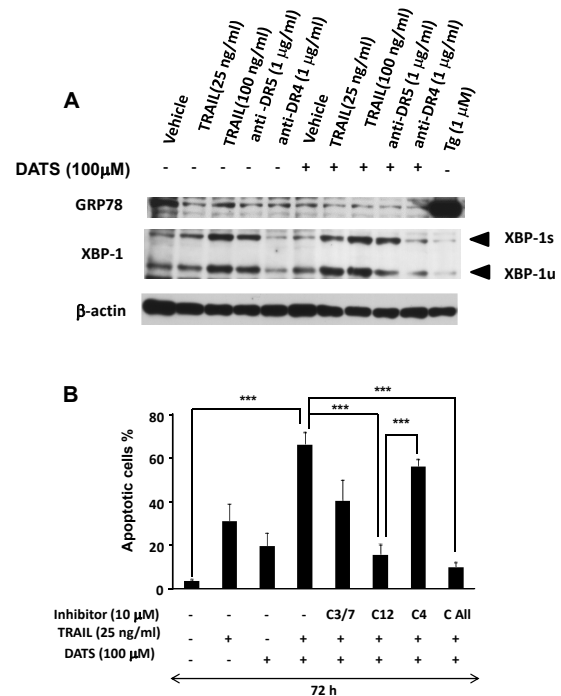


図 2 (A) A375 細胞を 6 穴プレートにまき (1×10^6 /well), 各濃度の TRAIL, 1 μg/ml 抗 DR5/DR4 抗体, および 100 μM DATS 単独, または両方で 37°C, 24 時間処理した。サンプルのタンパク質を還元条件下にて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後, PVDF 膜に転写した。PVDF 膜上の GRP78 または XBP-1 を特異抗体で検出した。また, 各サンプルのタンパク量が均一であることを確認するために, PVDF 膜を特異的抗 β-actin 抗体でリプローブした。(B) A375 細胞を 24 穴プレートにまき, 10 μM の各阻害薬 (z-DEVD-fmk; C3/7), z-ATAD-fmk (C12), z-LEVD-fmk (C4), または z-VAD-fmk (C All) 存在下で 25 ng/ml TRAIL, および 100 μM DATS 単独, または両方で, 37°C, 72 時間インキュベーションし, アネキシン V/PI で二重染色した。染色細胞は FACSCalibur で測定し, CellQuest ソフトウェアで解析した。アネキシン V-陽性細胞をアポトーシス細胞とした。n=3, ***p<0.001。

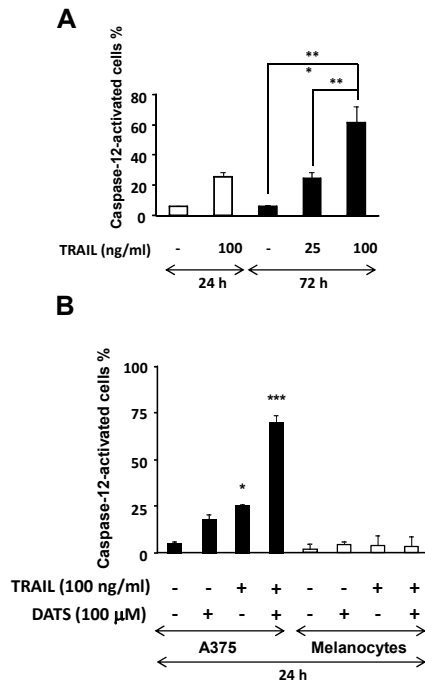


図3 (A) A375細胞を24穴プレートにまき、25または100 ng/ml TRAILで37℃、24または72時間インキュベーションした。Caspase-12活性化をCaspGLOW Fluorescein Caspase-12 Staining Kitを用いてFACSCaliburで測定し、CellQuestソフトウェアで解析した。n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001。(B) D,E) A375細胞またはメラノサイトを24穴プレートにまき (2×10^5 /well), 100 ng/ml TRAILおよび100 μM DATS単独、または両方で、37℃、24時間インキュベーションした。Caspase-12活性化をCaspGLOW Fluorescein Caspase-12 Staining Kitを用いてFACSCaliburで測定し、CellQuestソフトウェアで解析した。n=3, *p<0.05, ***p<0.001。

4. 考察

本研究でわれわれは、DATSがヒトメラノーマ細胞のDRを介するアポトーシスを増強することを示した。TRAILは腫瘍細胞のみにアポトーシスを誘導し、正常細胞には影響しないが¹⁰⁾、DATSによるアポトーシスも腫瘍細胞選択的であることが報告されている¹¹⁾。これらの報告と一致して、正常ヒトメラノサイトでは、TRAIL、DATSは単独でも併用でも、ほとんど細胞死を誘導せず、メラノーマ細胞のみに選択的に作用することが示された。DATSなどのアリルポリスルフィド化合物がグリオブラストーマ、前立腺癌、大腸癌、乳癌^{4-7, 12)}など様々な種類の腫瘍細胞にアポトーシスを誘導することがこれまでに報告されている。これらの報告では、10–100 μM

のDATSは24時間以内で十分な細胞死を誘導し、50 μM程度で完全な細胞死を誘導する。これに対して、本研究で使用した全てのメラノーマ細胞では100 μM DATSで24時間処理しても弱いアポトーシス (<20%)しか観察されないことから、メラノーマはDATSに対しても抵抗性であることが示された。

DATSによる細胞死の誘導^{4,7)}や、前立腺癌におけるTRAIL誘導性細胞死のDATSによる増強効果¹³⁾にはintrinsic pathwayが重要であると考えられている。本研究で見出されたDATSのTRAILによるアポトーシス増強効果にもintrinsic pathwayが関与していたが、caspase-9やcaspase-3/7の選択的阻害剤がDATSによるTRAIL増幅作用を完全に抑制しなかったこと、ミトコンドリア膜電位の減少とcaspase-3/7活性化はアポトーシスと必ずしも相関しなかったことからこの経路だけでは十分ではないと考えられる。intrinsic pathwayによるアポトーシスの誘導は、従来の化学療法の主なメカニズムとして考えられている。メラノーマが化学療法ならびにTRAILに抵抗性である¹⁴⁻¹⁷⁾ことは、intrinsic pathwayを増強するだけでは、メラノーマには十分な細胞死を誘導できないという考えを支持する。メラノーマ細胞において強いアポトーシスを誘導するためには、他のカスパーゼ依存性経路が重要な役割を果たすことが示唆された。そこで、extrinsic pathwayやintrinsic pathwayとは別のアポトーシス経路に着目した。ブドウ糖の欠乏、低酸素、小胞体内の変性タンパク質の蓄積、カルシウムホメオスタシスの乱れ、過剰な活性酸素産生などによる小胞体のストレスは、IREα, ATF6, Perkなどのストレスセンサー分子によって感知され、タンパク質合成の低下、タンパク質分解の促進、GRP78/Bipなどのシャペロンタンパク質の増加などのストレス適応反応UPRが誘導されて恒常性を保とうとする。しかし、小胞体ストレスがUPRによる適応機能を超えると、アポトーシスが誘導される^{18,19)}。XBP-1はDR5発現をアップレギュレーションさせ、アポトーシスを増強させることが報告されている²⁰⁾が、本研究でメラノーマ細胞においてTRAILがXBP-1を活性化し、DATSがこれを増強することが初めて明らかとなった。さらに、小胞体を介するアポトーシス経路で重要な役割を果たすcaspase-12²¹⁻²³⁾の関与が示された。以上から、DATSは、従来のミトコンドリア経路だけでなく、

小胞体ストレスによって誘導されるアポトーシス経路を活性化してTRAILの効果を増強することが示唆された。

5. 結語

本研究ではTRAILによるヒトメラノーマ細胞のアポトーシスをDATSが増強し、この増強効果には小胞体を介した新たなアポトーシス増幅経路が重要であることを明らかにした。今後、DATSの併用による悪性メラノーマに対する新たなTRAIL治療法の開発につながる事が期待される。

文献

- 1) Yerbes R, Palacios C, Lopez-Rivas A. The therapeutic potential of TRAIL receptor signaling in cancer cells. *Clin Transl Oncol* 2011; **13**: 839-847.
- 2) Wang S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene* 2008; **27**: 6207-6215.
- 3) LeBlanc, HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 66-75.
- 4) Das A, Banik NL, Ray SK. Garlic compounds generate reactive oxygen species leading to activation of stress kinases and cysteine proteases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Cancer* 2007; **110**: 1083-1095.
- 5) Kim YA, Xiao D, Xiao H et al. Mitochondria-mediated apoptosis by diallyl trisulfide in human prostate cancer cells is associated with generation of reactive oxygen species and regulated by Bax/Bak. *Mol Cancer Ther* 2007; **6**: 1599-1609.
- 6) Xiao D, Choi S, Johnson DE et al. Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. *Oncogene* 2004; **22**: 5594-5606.
- 7) Busch C, Jacob C, Anwar A et al. Diallylpolysulfides induce growth arrest and apoptosis. *Int J Oncol* 2010; **36**: 743-749.
- 8) Suzuki Y, Inoue T, Murai M et al. Depolarization potentiates TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells: Role for ATP-sensitive K⁺ channels and endoplasmic reticulum stress. *Int J Oncol* 2012; **41**: 465-475.
- 9) Murai M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M et al. Diallyl trisulfide sensitizes human melanoma cells to TRAIL-induced cell death by promoting endoplasmic reticulum-mediated apoptosis. *Int J Oncol* 2012; **41**: 2029-2037.
- 10) Ashkenazi A, Pai R, Fong S et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999; **104**: 155-162.
- 11) Powlony AA, Singh SV. Multitargeted prevention and therapy of cancer by diallyl trisulfide and related Allium vegetable-derived organosulfur compounds. *Cancer Lett* 2008; **269**: 305-314.
- 12) Lee BC, Park BH, Kim SY et al. Role of Bim in diallyl trisulfide-induced cytotoxicity in human cancer cells. *J Cell Biochem* 2011; **112**: 118-127.
- 13) Shankar S, Chen Q, Ganapathy S et al. Diallyl trisulfide increases the effectiveness of TRAIL and inhibits prostate cancer growth in an orthotopic model: molecular mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2008; **7**: 2328-2338.
- 14) Balch CM, Buzzaid AC, Soong SJ et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 3635-3648.
- 15) Dimberg LY, Anderson CK, Camidge R et al. On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene* 2012; **14**: 1-10.
- 16) Dyer MJ, MacFarlane M, Cohen GM. Barriers to effective TRAIL-targeted therapy of malignancy. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 4505-4506.
- 17) Hersey P, Zhang XD. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2001; **12**: 4-6.
- 18) Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP et al. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 2003; **22**: 8608-8618.
- 19) Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 363-373.
- 20) Liu H, Jiang CC, Lavis CJ et al. 2-Deoxy-D-glucose enhances TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells through XBP-1-mediated up-regulation of TRAIL-R2. *Mol Cancer* 2009; **8**: 122.
- 21) Hitomi J, Katayama T, Eguchi, Y et al. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and a beta-induced cell death. *J Cell Biol* 2004; **165**: 347-356.
- 22) Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H et al. An endoplasmic reticulum stress-specific Caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of Caspase-9 by Caspase-12. *J Biol Chem* 2002; **277**: 34287-34294.
- 23) Nakagawa T, Zhu H, Morishima N et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; **403**: 98-103.

自動縫合器による気管支断端処理の安全性について

石本真一郎¹⁾, 村松 高¹⁾

The pressure resistance of mechanical sutures in the bronchial stump

Shinichirou ISHIMOTO¹⁾, Takashi MURAMATSU¹⁾

要旨

自動縫合器のみで切離した気管支切除部の耐圧が実際にどのくらいあるかを切除肺を利用して検討した。対象は自動縫合器を用いて肺葉切除（気管支処理）をした11症例。自動縫合器は2種類使用し、ジョンソンエンドジョンソン社のエシロン（グリーンカートリッジ）およびコビディエン社のエンドGIA（ブラックカートリッジ）のうちどちらかを用いた。水没状態にした切除肺の気管支断端に18Gのサーフロ針を挿入、マンシエットによる加圧を行い、気管支断端からの気泡があった時点を最大耐圧とした。結果は測定した平均圧±標準偏差はエシロンが $104.8 \pm 4.7 \text{cmH}_2\text{O}$ 、エンドGIAが $107 \pm 7.0 \text{cmH}_2\text{O}$ であった。両者の耐圧に統計学的有意差を認めなかった。気道内圧は20-30mmHg（呼気時）である事を考慮すると十分な耐圧があった。

【はじめに】

近年、胸腔鏡手術の普及に伴い、気管支切除の処理は自動縫合器のみを使用して行われることが多い。しかし、これら自動縫合器での気管支切除部の耐圧試験データはなく、動物の消化管での耐圧試験データを代用しているのが現状である。そこで今回、自動縫合器のみで気管支切除部の耐圧が実際にどのくらいあるかを切除肺を利用して検討したので報告する。

【対象】

平成24年9月から平成25年3月において本検討に対し承諾を得られ、自動縫合器を用いて肺葉切除（気管支処理）をした11症例。年齢は50-75歳（平均年齢は67歳）。術前に化学療法、放射線療法等の治療をうけていた症例は除外した。自動縫合器は2種類使用し、ジョンソンエンドジョンソン社のエシロン（グリーンカートリッジ）およびコビディエン社のエンドGIA（ブラックカートリッジ）のうち

どちらかを用いた。

【方法】

水没状態にした切除肺の気管支断端に18Gのサーフロ針を挿入、マンシエットによる加圧を行い、気管支断端からの気泡があった時点を最大耐圧とした。統計処理はMann-Whitney U-test（GraphPad Prism ver. 5.0）を使用し、 $p < 0.05$ 以下を有意とした。

【結果】

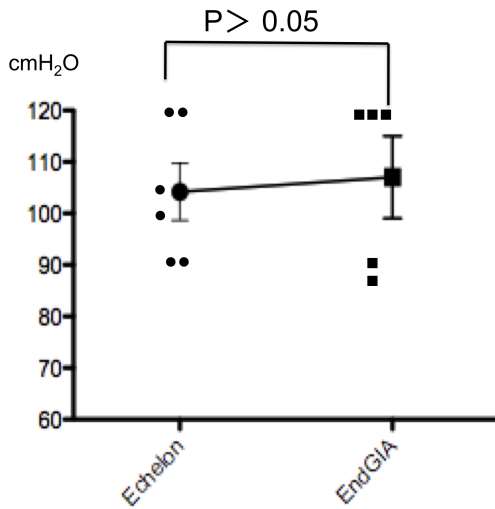
自動縫合器の種類はエシロンが6例、エンドGIAが5例。測定した平均圧±標準偏差はエシロンが $104.8 \pm 4.7 \text{cmH}_2\text{O}$ 、エンドGIAが $107 \pm 7.0 \text{cmH}_2\text{O}$ であった。両者の耐圧に統計学的有意差を認めなかった（次図）。

【考察】

自動縫合器は狭い開胸創でも取り扱いが簡便で、一定の正確な縫合ができる、異物反応が少ない等の

1) 日本大学医学部呼吸器外科
石本真一郎：ishimoto.shinichirou@nihon-u.ac.jp

結果



利点を有する。しかし気管支断端瘻は発症すれば重篤である。そのため当科では自動縫合器で切離した気管支断端部を全例追加縫合し補強している。通常、気道内圧は20-30mmHg (呼気時) である事を考慮すると十分な耐圧があり、必ずしも全例に対する追加縫合は不要なのではないかと示唆された。しか

し一方で、術前に化学放射線療法を施行された患者では手縫い縫合に比べて自動縫合器の方が気管支断端瘻の発生率が高かったとの報告も散見される^{1,2)}。自動縫合器では術者の手加減で自在に締め具合を調節するわけにはいかず、症例毎の適切な stapler の選択や stapling 前の気管支の圧挫も念頭に置くべきである。

【結語】

①自動縫合器による気管支断端処理の耐圧試験を切除肺をもちいて検討した。②各種自動縫合器は十分な耐圧をしめした。③適切な stapler の選択が重要であると思われた。④さらに症例によっては stapling 前の気管支の圧挫や追加縫合が必要な可能性がある。

文献

- 1) Gamel EIA, Tsang GM, Watson DC: The threshold for air leak: Stapled versus sutured human bronchi, and experimental study. Eur J Cardiothorac Surg 1999; 15: 7-10.
- 2) Vester SR, Faber LP, Kittle CF, et al: Bronchopleural fistula after stapled closure of bronchus. Ann Thorac Surg 1991; 52: 1253-1258.

気道上皮透過性制御因子の同定

権 寧博¹⁾

Identification of regulatory factors in the airway epithelial permeability

Yasuhiro GON¹⁾

要旨

気管支喘息患者の気道上皮は、環境因子の暴露に対して脆弱性を有することが指摘されており、このような気道の脆弱性が、気管支喘息の発症要因と深く関係している可能性が指摘されている。気道上皮細胞は、抗原提示細胞である樹状細胞と緻密なネットワークを形成していると考えられており、喘息における気道上皮の脆弱性は自然免疫システムや気道構成細胞のホメオスターシスに干渉し、このネットワークを破綻させることで、獲得免疫系の異常を生じさせると考えられる。上皮バリアの脆弱性を改善する薬剤は、気管支喘息をはじめとする各種アレルギー疾患の治療に有用な治療薬となる可能性がある。本研究において、TLR9のリガンドであるCpGが気道バリアの促進する作用を有することを明らかにし、上皮バリア増強薬としての可能性があることを明らかにした。

1. はじめに

上皮細胞は、その頂端（アピカル）面と基底（ベール）面との境界を形成し、物質が双方向へ移動することを制限するバリアを形成する役割を果たしている。上皮バリア機能が破綻すると、気管支喘息等の疾患の発症あるいは症状の増悪を引き起こされる。これらの疾患の患者において、上皮バリア機能の修復を促進し、上皮バリア機能を増強することによって、疾患の治癒又は改善を図ることが可能になると考えられる。しかしながら、臨床的に応用可能な上皮バリア機能を増強するための手段は、一切知られていないのが現状である。

また、非メチル化CpG配列を含む核酸は、免疫活性を賦活化することが知られており、自然免疫を刺激する組成物、癌免疫療法や感染症に対する効率的なワクチンとして利用できる可能性が提案され、その有用性が確認されている。しかしながら、非メチル化CpG配列を含む核酸と、上皮バリア形成との関連は一切知られていない。

2. 対象と方法

経上皮電気抵抗の測定結果を、対照に対する相対値（% TER (compared to vehicle control)）とし、上皮バリアの指標とした。

3. 結果

経上皮電気抵抗の測定結果を、対照に対する相対値（% TER (compared to vehicle control)）により示す。TER測定において、上皮のバリアが形成されていくと、上皮細胞の頂端側と基底側との間の電気抵抗が上昇する。このような観察を通じて、単層細胞層のバリア機能を定量的に観察することができる。各CpG ODN添加培地で培養した細胞において、CpG ODNの濃度に依存して、TERが有意に上昇した（図1）。従って、上皮細胞をCpG ODNの存在下で培養を行うことにより、上皮バリア機能の増強が達成されたことが示された。

1) 日本大学医学部
権 寧博：gon.yasuhiro@nihon-u.ac.jp

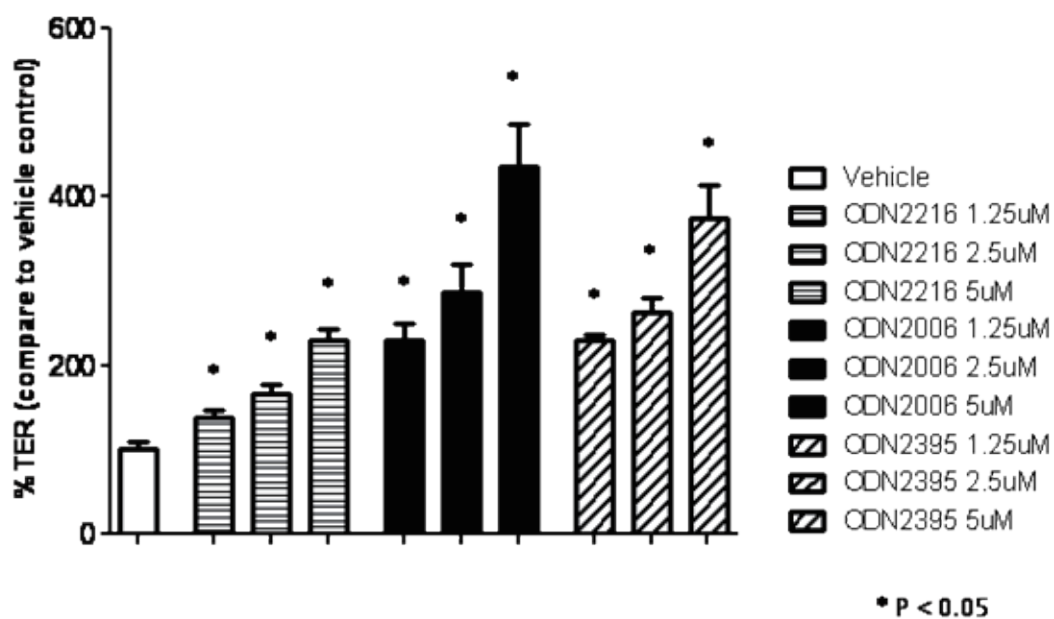


図1 CpGの気道上皮細胞のTERに及ぼす効果

4. 考察

CpGは細胞傷害をおこすことなく、上皮バリアの促進作用を示した。CpGは、気道上皮バリアを促進させる薬剤として応用できると考えられた。

心臓超音波 integrated backscatter 法による心房筋線維化が 心房細動アブレーション後の再発に及ぼす影響

奥村恭男¹⁾, 渡邊一郎¹⁾, 永嶋孝一¹⁾, 真野博明¹⁾, 園田和正¹⁾, 古川力丈¹⁾,
佐々木直子¹⁾, 大久保公恵¹⁾, 中井俊子¹⁾, 平山篤志¹⁾

Impact of Atrial Fibrosis Derived From Integrated Backscatter on the Outcome of Catheter Ablation for Atrial Fibrillation

Yasuo OKUMURA¹⁾, Ichiro WATANABE¹⁾, Koichi NAGASHIMA¹⁾, Hiroaki MANO¹⁾,
Kazumasa SONODA¹⁾, Rikitake KOGAWA¹⁾, Naoko SASAKI¹⁾, Kimie OHKUBO¹⁾,
Toshiko NAKAI¹⁾, Atsushi HIRAYAMA¹⁾

要旨

心房細動 (AF) カテーテルアブレーション (CA) 後の AF 再発は, 心房筋の線維化の進行が関与する。今回我々は, 心房筋の線維化の程度を心エコー図超音波後方散乱信号 (integrated backscatter: IBS) を用いて評価し, CA 後の再発との関連を評価した。当院で AF の CA を施行予定の 54 例に, 術前に IBS を測定した。観察期間 12.2 ± 4.6 か月で 23 人 (43%) が再発した。再発は, 女性, 非発作性 AF, 長期の AF 罹患期間, 左房 (LA) 容積の拡大, 左室駆出率の低値が関連していた。IBS は再発群で有意に高値を示した (-12.6 ± 3.4 dB vs. 非再発群 -16.9 ± 4.1 dB, P=0.0007)。多変量解析による調整後も, IBS は有意な再発予測因子であった。LA の線維化を非侵襲的に評価できる IBS 法は, CA 後の再発予測に有用である。

1. はじめに

心房細動 (AF) では, その持続及び病態の進行により, 心房リモデリングと総称される心房筋の脱落・線維化などの変化が起こることが知られている。¹⁾ 心房リモデリングの進行を反映する左房 (LA) 拡大は, カテーテルアブレーション後の AF 再発の予測因子として広く知られているが, アブレーションの適応を判断する指標としての有用性は限られている。従来, 心エコー図超音波後方散乱信号 (integrated backscatter: IBS) により, 心筋組織の線維化や変性を非侵襲的に推測可能であることが報告されている。^{2,3)} しかしながら, IBS が心房筋の線維化に代用可能であるか否かに関しては不明である。そこで今回我々は, 心房筋の輝度変化を IBS を用いて評価し, AF 再発との関連及びアブレーションの適応判断に関する有用性を検討する。

2. 対象及び方法

当院でカテーテルアブレーションを施行した薬剤抵抗性 AF 患者 54 例 (平均年齢 58.1 ± 9.3 歳; 男性 46 例, 女性 8 例; 発作性 AF 30 例, 非発作性 AF 24 例)。

カテーテルアブレーション

同側上下肺静脈 (PV) に二本の 10 極リング状カテーテル (電極間隔: 15mm lasso: 4.5mm 間隔, 20mm lasso: 6mm 間隔, Lasso, Biosense Webster, Diamond Bar, CA, USA) を留置し, 三次元マッピングシステム (CARTO/NavX) ガイド下に, 広範囲拡大肺静脈隔離 (PVI) を行った。アブレーションカテーテルは 3.5mm イリゲーションカテーテル (Celsius ThermoCool; Biosense Webster) (最大 20-30 W, 最高温度 41°C, イリゲーション生食流量 17 ml/min) を使用した。PVI 後に高頻度心房刺激で AF が 5 分以上持続する症例については, PVI 後に CFAE (分裂電位: AF 中に 5 ~ 8 秒間で記録した平均周期が 120ms 以

1) 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野
奥村恭男: yasuwo128@hotmail.co.jp

下で興奮する電位部位)を基調にLAへの焼灼を追加した。それでも停止しない場合はLA天蓋部或いはmitral isthmusへの線状焼灼を追加した。⁴⁾

経胸壁心エコー図検査

3.5 MHz transducer, vivid q (GE healthcare, Japan) システムを用い、標準的な超音波指標である左房径 (LAD), 左房容積 (LAV), 左室駆出率 (EF) を測定した。洞調律中に測定可能であった31例に関しては、左室流入血流速 (E vel, A vel), 流速比 (E/A), E波減速時間 (E DcT), 僧房弁輪部移動速度 (E' vel), 流速移動速度比 (E/E') も加えて計測した。

超音波組織性状診断: Integrated Backscatter (IBS)

解析ソフト (ECHOPACK version BT 11; GE healthcare, Japan) を用いて、傍胸骨長軸像の3心拍の動画で計測した。関心領域 (ROI) をLA後壁及びLA後壁側の心外膜に設置し、LA拡張末期のIBSを測定して、それらのIBSの差を補正值, corrected IBSとして求めた (図1)。

3. 結果

観察期間 12.2 ± 4.6か月で54人中23人 (43%) が再発した。単変量解析では、非再発群に比べ、再発群では女性および非発作性AFの割合が高く、AF罹患期間も有意に長かった。また心エコー指標では、

再発群でLAVは有意に拡大し、EFは低下していた (表1)。IBSは再発群で -12.6 ± 3.4 dB, 非再発群で -16.9 ± 4.1 dBであり、再発群で有意に高値を示した (P=0.0007) (図1, 表1)。これらのうち、非発作性

表1. 患者背景, 超音波指標と術後AF再発との関連

	非再発群 (n=31)	再発群 (n=23)	P value
年齢 (歳)	56.7 ± 8.9	59.8 ± 9.6	0.2307
性別 (男/女)	29/2	17/6	0.0446
AF罹患期間 (月)	36 [9-60]	60 [36-83]	0.0254
BMI (kg/m ²)	25.7 ± 5.0	25.3 ± 5.4	0.7947
発作性/非発作性	24/7	6/17	0.0002
高血圧症 (+/-)	22/9	13/10	0.2717
糖尿病 (+/-)	1/30	2/21	0.3856
脂質異常症 (+/-)	5/26	2/21	0.4213
慢性心不全 (+/-)	8/23	5/18	0.7296
超音波指標			
LAD (mm)	36.8 ± 5.7	40.6 ± 7.3	0.0395
LAV (ml/m ²)	40.7 ± 14.6	54.1 ± 21.3	0.0087
EF (%)	66.7 ± 13.0	58.3 ± 12.6	0.0212
E vel (cm/s)	76.3 ± 7.1	73.1 ± 8.6	0.5713
A vel (cm/s)	57.4 ± 8.1	52.5 ± 13.4	0.5306
E/A	1.4 ± 0.8	1.3 ± 0.7	0.7337
DcT (ms)	183 ± 62	166 ± 32	0.2768
E' vel (cm/s)	12.7 ± 2.5	11.5 ± 4.0	0.1976
E/E'	6.2 ± 2.0	7.3 ± 3.9	0.2143
Corrected IBS (dB)	-16.9 ± 4.1	-12.6 ± 3.4	0.0007

各値は平均値 ± SD あるいは 中央値 [IQR], A-vel and E/A: n=31

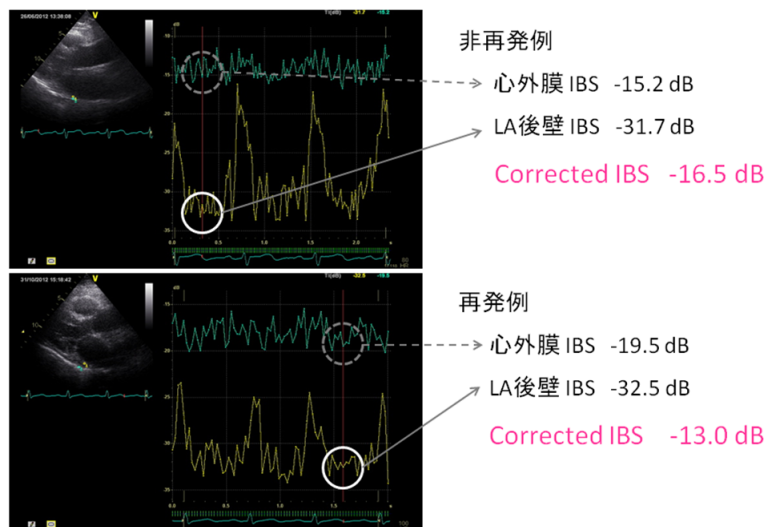


図1. Corrected IBSの測定法

AF, LAV, IBSの3項目を用い、ロジスティック回帰分析による調整を行った。非発作性AFがオッズ比 [OR] 11.91, 95%信頼区間(CI) 2.17-100.09 (P=0.0034), LAVがOR 1.05, 95% CI 0.99-1.15 (P=0.1059), IBSがOR 1.52, 95% CI 1.16-2.29 (P=0.0006)であり、非発作性AF, IBSの2項目が有意にAF再発の予測因子となっていた。

4. 考察

発作性AFの多くは、PVからの興奮がAF発症、維持に寄与しているため、PVIのみで70-80%の成功率が見込める。一方、心房リモデリングの進行した持続性、永続性AFでは、PV以外の心房筋そのものの受攻性が亢進するため、PVIのみでは根治困難であり、LA本体への焼灼を要する。また、術後成功率もばらつきがあり30～60%程度と報告されている。⁴⁾ 今回の検討においても発作性AFで80%と高い成功率を有しているが、非発作性AFでは29%と低かった。これは、非発作性AF症例のAF持続期間が長く、心房リモデリングが高度に進行した症例が多かったことが一因と考えられる。このように心房リモデリングの進行は、AFアブレーション後の再発に強く関連している。今回の検討においても、AF罹患期間、非発作性AF, LAV, EFなどが再発に関連していたが、これらは心房リモデリングを推測する一般的な指標として広く知られている。心房リモデリングの主体は、構造的には心房の間質組織増加、線維化、心房筋の脱落、肥大などが知られている。IBSは、心室筋の線維化の程度や微小構造の変化に相関していると報告されており、心房筋でも同様の報告がみられる。^{2,3)} LA拡大やAFの長期罹患な

どは、心房筋の線維化に伴う二次的な、或いは随伴する所見であり、心房リモデリングを直接反映していない症例も多く存在する。従って、IBSは、心房リモデリングの主体である線維化を直接定量化できる指標であると考ええる。実際に今回の検討でも、IBSは、LAVを含めた他の指標により調整後も独立したAF再発予測因子となっており、それを裏付けるものである。IBSは、非侵襲的に線維化を評価できる唯一の超音波指標であり、術前にAFの再発を予測できるだけでなく、AFアブレーションにおいて、PVIのみで行うか、左房本体への追加焼灼を要するかの治療法の推定にも役立つ可能性がある。

5. 結語

LAの線維化を非侵襲的に評価できるIBS法は、アブレーション後の再発予測やAF患者の治療法を決定する際の指標の一つとして有用である可能性が示唆された。

文献

- 1) Kumagai K. Catheter ablation of atrial fibrillation. -State of the Art-. *Circ J.* 2011; **75**: 2305-2311.
- 2) Picano E, Pelosi G, Marzilli M, et al. In vivo quantitative ultrasonic evaluation of myocardial fibrosis in humans. *Circulation.* 1990; **8**: 58-64.
- 3) den Uijl DW, Delgado V, Bertini M, et al. Impact of left atrial fibrosis and left atrial size on the outcome of catheter ablation for atrial fibrillation. *Heart.* 2011; **97**: 1847-1851.
- 4) Okumura Y, Watanabe I, Kofune M, et al. Characteristics and distribution of complex fractionated atrial electrograms and the dominant frequency during atrial fibrillation: relationship to the response and outcome of circumferential pulmonary vein isolation. *J Interv Card Electrophysiol.* 2012; **34**: 267-275.

抗がん剤耐性の進行性膵管癌に対する新規抗体医薬の開発

佐野 誠¹⁾

Development of novel antibody drug to chemoresistant and advanced pancreatic ductal adenocarcinoma

Makoto SANO¹⁾

要旨

浸潤性膵管癌は難治性悪性腫瘍であり、新たな治療薬の開発が望まれている。本研究においては、抗がん剤耐性の進行性膵管癌に対する新規抗体医薬の開発を目的とし、抗がん剤耐性のヒト膵管癌培養細胞株を抗原としてマウス・モノクローナル抗体を作製した。その結果、正常膵管上皮には反応性を示さないが、間質浸潤の強い中分化型から低分化型腺癌に反応性を示すハイブリドーマ (2G12/E7抗体) の作製に成功した。また、同抗体は脈管浸襲や術後再発といった悪性度との相関を示し、術後の生存曲線においても予後不良マーカーになることが判明した。現在、エピトープや抗腫瘍効果の解析を継続しており、抗体医薬としての実用化に期待している。

1. はじめに

浸潤性膵管癌は膵癌全体の90%以上を占め、未だに早期診断・治療が困難な悪性腫瘍である。膵癌登録報告2007¹⁾によれば、通常型膵癌の切除症例における5年生存率は10%強で、非切除症例においては1%未満と極めて予後不良である。一方、術後再発例を含む切除不能膵癌に対しては、化学療法の延命効果が証明され、ゲムシタピン (GEM) を中心とした化学療法が行われてきた。しかしながら、上野らの報告²⁾によれば、ゲムシタピン単独、あるいはその他の抗がん剤との併用療法においても2年生存率は10%前後と非常に低いことが分かる。そこで、本研究においては、抗がん剤耐性の進行性膵管癌に対する新規抗体医薬の開発を目指し、まず初めに膵管癌特異的なマウス・モノクローナル抗体の作製を試みた。

2. 対象および方法

ゲムシタピン処理した膵管癌細胞株を6週令

BALB/cマウスに免疫 (ip) し、感作脾細胞とマウス・ミエロマ細胞をポリエチレン・グリコール法により融合した (図)。作製したハイブリドーマのスクリーニングには、ティッシュ・アレイ法 (①免疫に用いた膵管癌細胞株、②ゲムシタピン耐性膵管癌組織、③非腫瘍性膵組織からなる免疫組織化学法) ならびにウェスタン・ブロット法を用いた。さらに、有望なハイブリドーマに関しては、膵管癌症例における発現動態を免疫組織化学的手法により詳細に解析した。また同時に、抗原となる分子量や構造を類推するために、膵管癌培養細胞株のライセートを酵素や試薬で処理した後、抗原性の状態をウェスタン・ブロット法により解析した。さらに、抗原の一部に糖鎖構造が含まれている可能性が示唆されたため、各種特徴的な糖鎖が固相化された糖鎖アレイを行った。

3. 結果ならびに考察

512クローンのハイブリドーマから、正常膵管上

1) 日本大学医学部病態病理学系病理学分野
佐野 誠 : sano.makoto@nihon-u.ac.jp

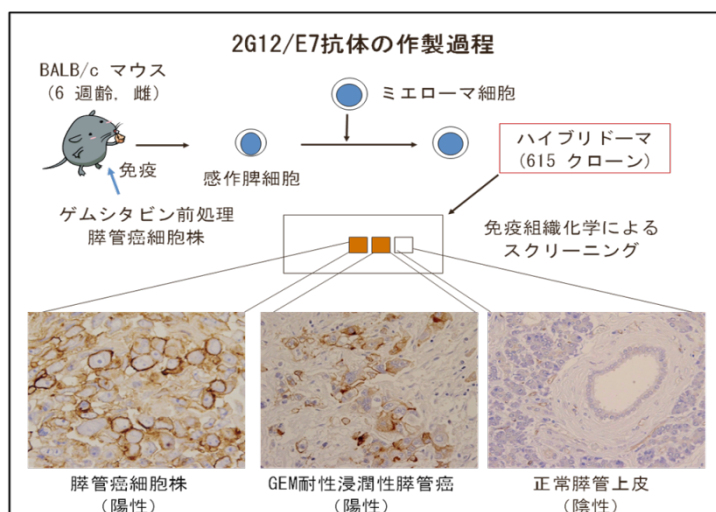


図 マウスモノクローナル抗体 (2G12/E7) の作製過程

皮細胞には反応性を示さず、膵管癌細胞に強い反応性を示すモノクローナル抗体 (2G12/E7) を得ることができた (図)。また、2G12/E7抗体は、浸潤性膵管癌のなかでも間質浸潤の強い中分化型から低分化型腺癌に反応性を示し、脈管浸襲や術後再発といった悪性度との相関が明らかとなった。さらに、Kaplan-Meier法による生存曲線においても、同抗体陽性の膵管癌患者群は陰性群に比べて、術後の予後が不良であることが判明した (Log-rank test; $p < 0.01$)。したがって、同抗体の抗腫瘍効果が確認できれば、抗体医薬としての実用化に向けて期待できるものと思われる。

一方、酵素や試薬処理による抗原性を解析した結果、2G12/E7抗体はO-結合型糖鎖を含む分子量約160 kDaの糖蛋白を認識している可能性が示唆された。しかしながら、各種糖鎖を固相化させた糖鎖アレイに対しては、2G12/E7抗体は結合性を全く示さなかった。このことは、すなわち、2G12/E7抗体が

糖ペプチドとして (糖鎖とペプチドにまたがって) 抗原を認識していることが強く示唆される。糖鎖やペプチド単独だけを認識する抗体は数多く市販されているが、病的意義を有し、糖鎖とペプチドの両者を認識する抗体は数少なく、貴重なシーズと思われる。引き続き、MS解析によるエピトープの同定ならびに抗腫瘍効果の解析を行うとともに、抗体医薬としての可能性のみならず、病理診断や腫瘍マーカーとしての有用性、さらに、がんワクチンや生体内イメージング (画像診断) への応用も検討予定している。

引用文献

- 1) 江川新一, 当間宏樹, 大東弘明, 他. 膵癌登録報告2007ダイジェスト. 膵臓, 2008; 23:105-123.
- 2) Ueno H, Ioka T, Ikeda M, et al. Randomized phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally advanced and metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study. J Clin Oncol. 2013; 31(13): 1640-1648.

冠動脈造影中に冠静脈洞から脱血する透析療法 — 造影剤腎症の新しい予防的治療の開発

福島聖二¹⁾, 永島正明²⁾, 李 予昕¹⁾, 三俣昌子¹⁾, 平山篤志¹⁾

Hemodialysis for Removing the Contrast Medium from the Coronary Sinus during Coronary Angiography — a Novel Approach to Prevent Contrast-Induced Nephropathy in a Swine Model

Seiji FUKUSHIMA¹⁾, Masaaki NAGASHIMA²⁾, Yuxin LI¹⁾,
Masako MITSUMATA¹⁾, Atsushi HIRAYAMA¹⁾

要旨

造影剤腎症の予防のために、冠静脈洞から脱血する透析療法（以下、CS透析）を開発している。腎不全モデルにてCS透析の造影剤除去率と腎障害を評価した。CS透析群の造影剤除去率（%）は55.2 (SD: 9.0) で、通常透析（SVC透析）群23.9 (1.7) より造影剤を除去できた ($p < 0.01$)。尿L-FABP (ug/g cr) は造影剤投与24時間後の変化量がCS透析群-12.6 (25.8), SVC透析群-3.3 (7.7), 透析を行わない対照群25.4 (38.1) で、CS透析は対照に比べ上昇を抑制した ($p < 0.05$)。CS透析は通常透析より効率よく造影剤を除去し、対照より尿L-FABPの上昇を抑えることができた。CS透析は造影剤投与後の急性腎障害を抑制でき、造影剤腎症を予防できる可能性が示唆された。

1. はじめに

造影剤腎症（CIN）は造影剤の投与後に出現する腎障害で、冠動脈造影（CAG）や経皮的冠動脈インターベンション（PCI）の重大な合併症である。また発症した場合、予後は不良である¹⁾。通常の透析でも造影剤を強力に除去できるためCINの予防のために用いられたが無効であった²⁾。一方、冠動脈に投与した造影剤は冠静脈洞を通る。これに着目し、我々は造影剤を冠動脈に注入と同時に冠静脈洞（CS）から脱血し透析する方法（以下、CS透析）を開発し、効率良く造影剤を除去できることを見出した。

本研究は腎不全モデルを作成し、CS透析の造影剤除去率と腎皮質への造影剤の残存、血清クレアチニンと急性腎障害マーカーである尿L-FABP (liver type fatty acid binding protein) を測定し、CS透析が

腎臓に与える影響を評価した。

2. 対象及び方法

メスのSPFブタ（40.4, SD: 2.3 kg）15頭に、Misraら³⁾の方法によりカテーテルを用いてガラスビーズを腎動脈に注入し3/4腎梗塞を作成した。

梗塞作成から2週間後に、左冠動脈に造影剤（イオパミドール370）を60分で180mlを注入した。その際にCS透析群（5頭）ではCSから脱血する透析を同時に行った。上大静脈から脱血し同時に透析する群（SVC透析群, 5頭）、透析せずに冠動脈に造影剤を投与する群（対照群, 5頭）とした。排出した透析液を回収し造影剤除去量をHPLC法にて測定した。

造影剤投与後、24時間毎に72時間まで血清クレアチニンと尿L-FABPを測定した。72時間後に腎臓

1) 内科学系循環器内科分野

2) 病態病理学系臨床検査医学分野

福島聖二: fukushima.seiji@nihon-u.ac.jp

を抽出しマイクロCTにて皮質のCT値を測定した。

3. 結果

ブタの血清クレアチニン値はbaseline 0.90 (0.17) mg/dlで、腎梗塞作成後2週間では2.44 (0.33) mg/dlであった。

透析による造影剤除去率は、CS透析群55.2 (9.0) %、SVC透析群23.9 (1.65) %であった ($p<0.01$)。

造影剤投与72時間後の腎皮質では造影剤の残留によるCT値の上昇を認めた。腎皮質のCT値は、CS透析群-16.6 (7.3), SVC透析群18.6 (6.8), 対照群57.7 (57.2) HU であった (CS透析群 vs. 対照群, $p<0.05$)。

血清クレアチニンは、3群間とも72時間までに有意な変化を示さず、群間差を認めなかった (図1)。

尿L-FABPは、対照群において造影剤投与24時間後で最も上昇する傾向があった (図2 a)。変化量では造影剤投与時と24時間後の差がCS透析群では対照群に比べ小さかった ($p<0.05$) (図2 b)。

4. 考察

CS透析はSVC透析よりも効率良く造影剤を除去し、24時間後の尿L-FABPの上昇を抑えることができた。

通常の透析 (SVC透析) では投与した造影剤の23.9 (1.65) %しか除去できなかったが、CS透析で

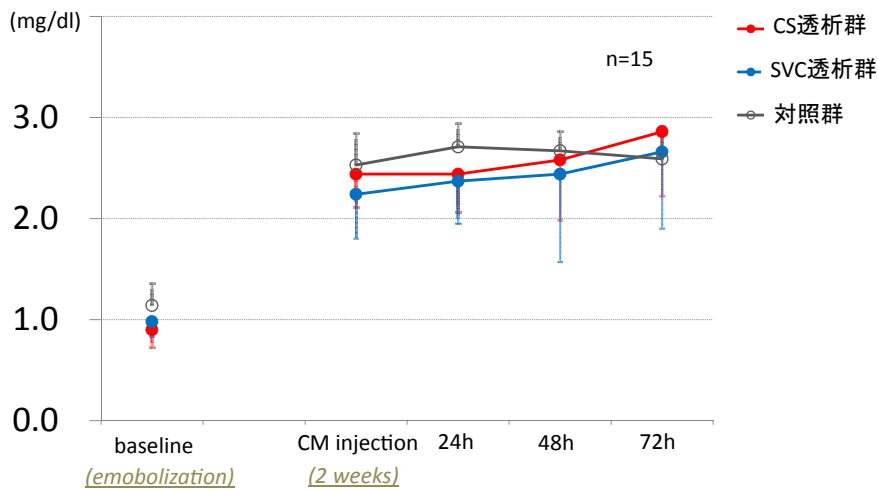


図1 血清クレアチニン

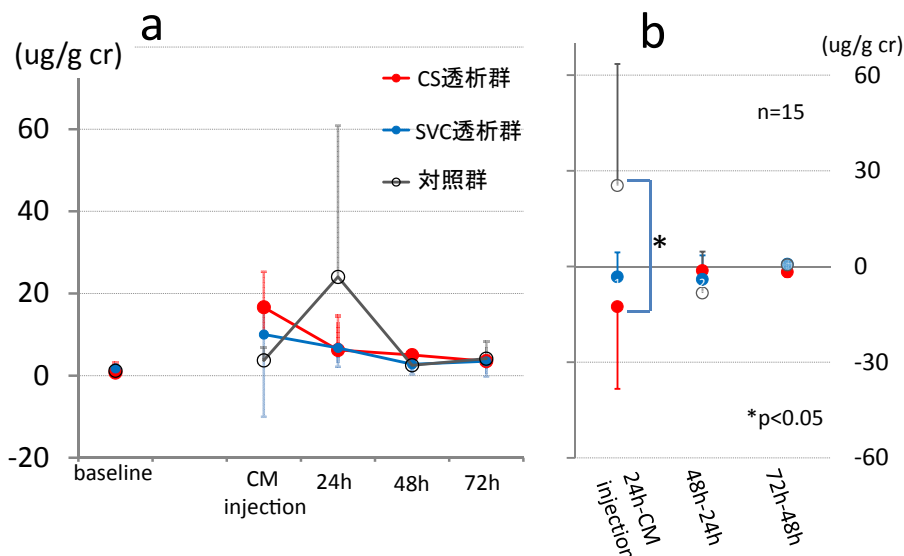


図2 a. 尿中L-FABP / creatinine, b. 変化量

は55.2 (9.0) %が除去できた。これは高濃度の造影剤を透析装置に導くことができるためである。その結果、腎臓から排出する造影剤量を減らすことができ、腎皮質への造影剤の残留を抑えることができた。造影剤の腎皮質への蓄積はCINの兆候という報告⁴⁾がある。

尿L-FABPの上昇をCS透析が抑制したことは、CS透析が造影剤投与後の腎髄質虚血を軽減できる可能性を示している。腎髄質の虚血は造影剤腎症の病態の一つである。また造影剤投与後の尿L-FABPのピークは24時間後であり、本研究の結果と合致する。尿L-FABPは造影剤による腎障害の鋭敏なマーカーとなる可能性が高いと言われている⁵⁾。

従ってCS透析は慢性腎臓病患者にCAGやPCIを行う際に同時に行うとCINが予防できる可能性がある。CS透析は造影剤を注入している間のみ行うので短時間ですみ、患者の負担が少ない。

5. 結語

我々が開発している冠静脈洞透析は効率よく造影剤を除去することができ、急性腎障害マーカーの上

昇を抑制した。冠動脈造影および経皮的冠動脈インターベンションによる造影剤腎症の予防に有用である可能性が示された。

文献

- 1) Gruberg L, Mintz GS, Mehran R, et al. The prognostic implications of further renal function deterioration within 48 h of interventional coronary procedures in patients with pre-existent chronic renal insufficiency. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1542-8.
- 2) Marenzi G. Prophylactic hemodialysis for the prevention of contrast-induced nephropathy after coronary angiography. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008; 4: 130-1.
- 3) Misra S, Gordon JD, Fu AA, et al. The porcine remnant kidney model of chronic renal insufficiency. *J Surg Res* 2006; 135: 370-9.
- 4) Yamazaki H, Oi H, Matshushita M, et al. Renal cortical retention of contrast medium on delayed CT and nephropathy following transcatheter arterial chemoembolisation in patients with high serum creatinine level. *Br J Radiol* 2002; 75: 874-8.
- 5) Bachorzewska-Gajewska H, Poniatowski B, Dobrzycki S. NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) and L-FABP after percutaneous coronary interventions due to unstable angina in patients with normal serum creatinine. *Adv Med Sci* 2009; 54: 221-4.

両心補助循環装置 (BVAD) における制御手法に関する研究開発

中田金一¹⁾, 瀬在 明¹⁾, 塩野元美¹⁾

Development of control algorithm for biventricular assist system

Kin-ich NAKATA¹⁾, Akira SEZAI¹⁾, Motomi SHIONO¹⁾

要旨

無拍動流型の左補助人工心臓は、その構造の単純性や小型化により広く普及するに至っている。しかしながら、左心補助のみでは全身循環が維持困難な症例もみられ、また重症の心不全では右心補助の追加を余儀なくされることも経験される。両心補助時の左右補助人工心臓の流量制御に関しては未だ確立された方法がないのが現状である。本研究では、両心室を無拍動流型補助人工心臓で補助した完全人工循環下での生体反応を検討し、将来的に無拍動流型完全置換型人工心臓による循環制御法の一助となりうる血行動態上のパラメーターを検討した。

Navier-Stokesの運動方程式から全身循環の数理モデルを作成し、これより大血管抵抗 (Ra: mmHg・sec/ml), 末梢血管抵抗 (Rp: mmHg・sec/ml), 血管のコンプライアンス (C: mmHg/ml), 血液慣性力 (L: mmHg・s²) を物理量として計算し、 δ オペレータシステムを用いて計測可能とし、ブタの実験モデルで両心補助循環下のパラメーター計測を行った。その結果、無拍動流化することにより脈圧とともに末梢血管抵抗Rpが有意に低下することが確認された。Rpの低下は、末梢循環動態の変調を来し、末梢組織に浮腫などの障害を惹起すると考えられる。今後さらに人工心臓装着時の各種循環動態を設定しながら、両心補助時の至適な制御方法を模索する手段としても有用なシステムになりうることを示された。同時に、両心補助時の末梢循環動態の維持が人工心臓の制御上重要であることが示された。

はじめに

重症心不全に対し植え込み型の無拍動流型左室補助人工心臓 (LVAD; left ventricular assist device) が普及し良好な成績がみられるようになってきているが¹⁾、左補助人工心臓植え込み後に心室細動や心停止を合併した場合などの両心不全状態では左心補助法 (LVAD) のみでは全身循環の維持は困難である²⁾。このような血行動態の破綻時には、左心補助に右心補助法 (RVAD; right ventricular assist device) を加えて両心補助法 (BVAD; biventricular assist devices) が行われる。しかしながら、両心補助法ではその左右同時補助の制御方法が確立されていない。本研究では、循環動態を支配する心血管系の生理学的および物理学的特性に注目し、BVAD施行時に必要な制

御パラメーターに関する検討を行い、さらに血行動態評価に定量的な指標を与え、安全かつ効果的な循環維持を可能にすべく制御因子の検討を行った。

方法

心血管系の特性を数理学的手法 (パラメーター同定) によって、大血管抵抗 (Ra: mmHg・sec/ml) と末梢血管抵抗 (Rp: mmHg・sec/ml), 血管のコンプライアンス (C: mmHg/ml) および血流の慣性力 (L: mmHg・s²) をパラメーターとし、Navier-Stokes運動方程式 (下式) を用いて循環動態の数理モデルを作成し、 δ オペレータを用いてこれらのパラメーターを物理量として計測した³⁻⁵⁾。

1) 心臓血管・呼吸器・総合外科学分野
中田金一: poohnakata@aol.com

$$-\frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial z} = \frac{\partial}{\partial t} V_z + V_r \frac{\partial}{\partial r} V_z + V_z \frac{\partial}{\partial z} V_z - v \left(\frac{\partial^2}{\partial r^2} V_z + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} V_z + \frac{\partial^2}{\partial z^2} V_z \right)$$

V_z : Velocity of Axial element
 V_r : Velocity of Radial element
 t : Time
 p : Pressure
 ρ : Density of Blood
 v : Coefficient of Dynamic Viscosity

動物モデルはブタ (40kg, 10頭) を使用し, 左室心尖部脱血-上行大動脈送血の無拍動流左心補助人工心臓 (LVAD) (GYRO pump, 京セラ社製) と右室流出路脱血-肺動脈送血の無拍動流右心補助人工心臓 (RVAD) (BP-80 Biopump, Medtronic 社製) を装着して両心補助が可能なモデル (BVAD) を作製した。LVAD 駆動を開始後, RVAD 駆動を追加し, それぞれ最大流量が得られるように両人工心臓の流量管理を行い, 駆動前後の血行動態の推移と各パラメータの変化を計測し, 統計学的処理を t 検定で行い, $p < 0.05$ を有意とした。

結果

1) 血行動態変化とパラメーター変化

人工心臓駆動前 (図1) と駆動後 (図2) の δ オペレータによる測定結果を示す。RVAD および LVAD による完全人工循環下では総血流量に変化はないが, 脈圧の低下とともに無拍動流化がみられた。

2) 人工心臓駆動前後のパラメーター変化値

人工心臓駆動開始前 (表1) および開始後 (表2) のパラメーター値を示す。両心補助人工心臓の駆動前後のパラメーター変化は, R_p 値が無拍動流化前後でそれぞれ 21.4 ± 8.5 mmHg-sec/ml, 5.82 ± 6.32 mmHg-sec/ml であり, 末梢血管抵抗 R_p , および脈圧 (pp ; pulse pressure) が有意に低下した ($p < 0.05$)。

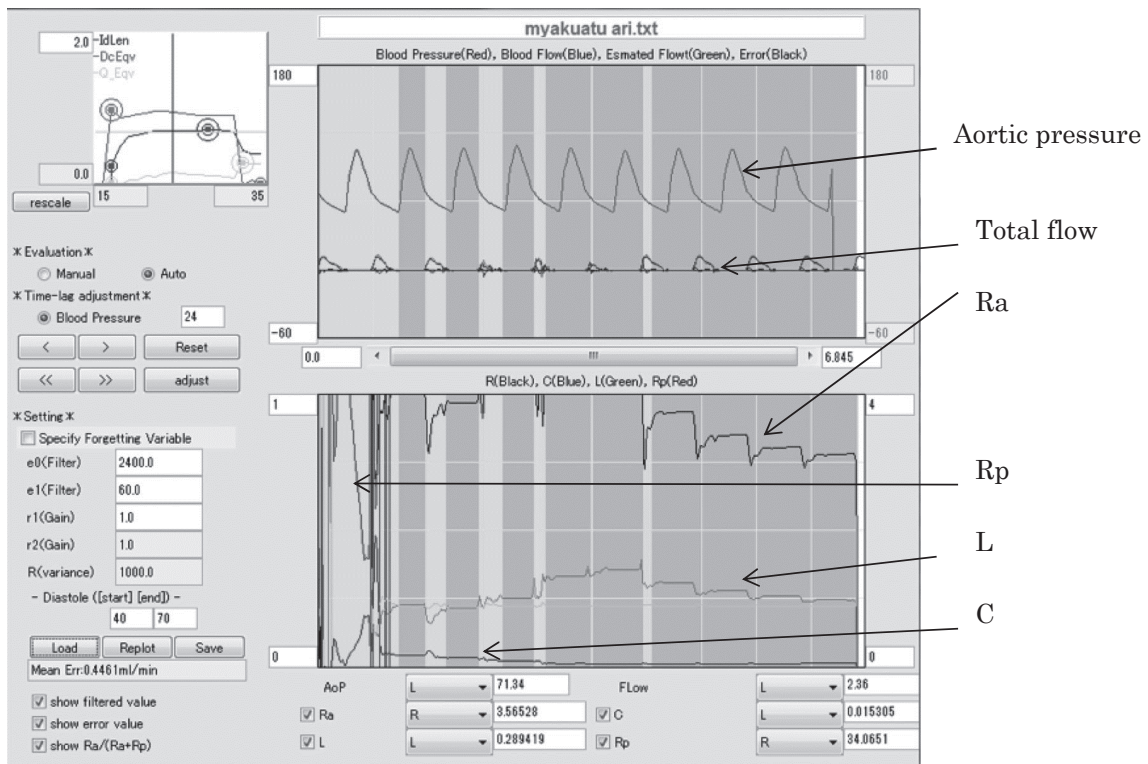


図1 δ オペレータによる人工心臓駆動前の各波形とパラメーター値

図下部に示された各パラメーターの数値を表1に示した。

大血管抵抗 (R_a : mmHg-sec/ml), 末梢血管抵抗 (R_p : mmHg-sec/ml), 血管のコンプライアンス (C : mmHg/ml) および血流の慣性力 (L : mmHg- s^2)

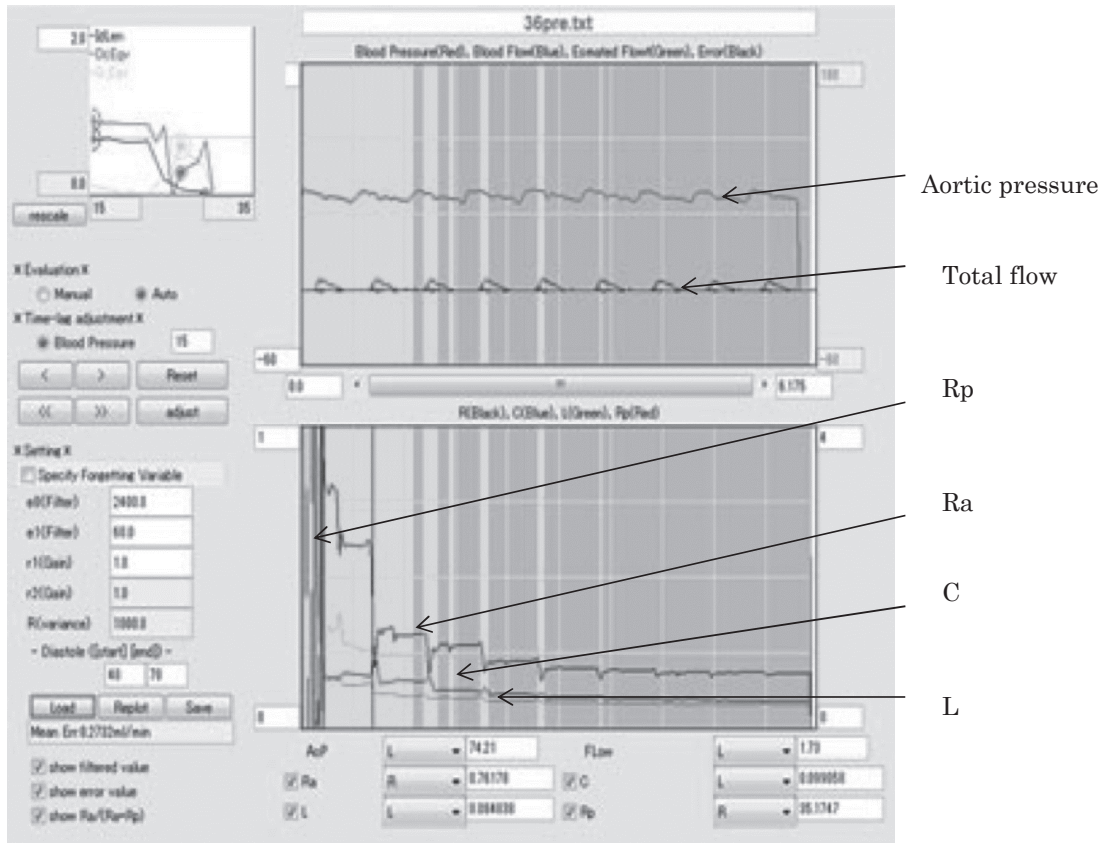


図2 δ オペレータによる人工心臓駆動後の各波形とパラメーター値
 図下部に示された各パラメーターの数値を表2に示した。
 大血管抵抗 (Ra: mmHg-sec/ml), 末梢血管抵抗 (Rp: mmHg-sec/ml), 血管のコンプライアンス (C: mmHg/ml) および
 血流の慣性力 (L: mmHg-s²)

表1 人工心臓駆動前の各パラメーター値

No.	Ra	Rp	C	L	AoP	Total flow	PP
1	1.10	12.80	0.016	0.20	69.20	4.65	68.70
2	0.76	35.17	0.090	0.08	74.50	2.10	32.00
3	2.29	21.95	0.069	0.09	67.60	2.85	36.70
4	52.20	23.40	0.020	0.23	52.20	1.28	48.90
5	1.84	22.20	0.004	0.48	69.01	2.05	67.80
6	1.18	19.50	0.059	0.07	57.30	2.99	21.00
7	1.10	18.50	0.018	0.34	67.90	3.70	55.60
8	0.47	35.10	0.090	0.08	74.20	1.73	14.10
9	2.50	11.13	0.093	0.05	78.54	5.35	32.00
10	0.87	14.40	0.036	0.60	121.70	7.20	66.70
mean	6.43	21.41*	0.049	0.22	73.22	3.39	44.35*
SD	16.05	8.50	0.034	0.60	18.76	1.00	20.03

AoP; aortic pressure, Total flow = LVAD flow + aortic flow, PP; pulse pressure

表2 人工心臓駆動後の各パラメーター値

No.	Ra	Rp	C	L	AoP	Total flow	PP
1	0.56	8.10	0.001	0.02	43.40	2.40	2.80
2	1.09	17.00	0.050	0.11	85.90	5.03	20.00
3	1.10	0.50	0.018	0.34	67.90	3.70	23.00
4	1.00	0.48	0.360	0.33	41.60	3.10	22.00
5	0.59	4.40	0.010	0.21	62.70	12.00	25.00
6	1.60	0.95	0.003	0.42	54.41	1.00	26.00
7	1.10	16.50	0.018	0.11	57.30	11.00	27.00
8	0.59	4.40	0.019	0.21	62.00	12.03	22.70
9	0.21	0.21	0.029	0.21	62.19	8.20	13.00
10	10.70	5.70	0.016	0.15	93.60	13.10	5.70
mean	1.85	5.82*	0.050	0.21	63.10	7.15	18.72*
SD	3.18	6.32	0.110	0.13	16.45	4.62	8.58

AoP; aortic pressure, Total flow = LVAD flow + aortic flow, PP; pulse pressure

考察, 結語

左心補助法単体での流量補助法はすでに基礎的ならびに臨床的研究が行われ、全身循環維持のために有効な循環補助法として臨床応用されている。しかしながら、重症心不全における両心不全状態、あるいは左心補助時の右心機能の障害、さらには両心補助時の肺循環に及ぼす影響に関しては未だ明らかではない。これらの課題を検討するために、循環動態の把握に数理モデルを適用し、実際の人工的な循環を行った際に、物理量として数種のパラメーターがどのように応用可能で、解釈できるのかを検討した。

有意差を認めたのは脈圧と末梢血管抵抗のみであり、無拍動流型の補助循環でバイパス流量が高くなるほど無拍動流化が強くみられ、駆動前後で脈圧が狭小化する。血液の流れやすさを示す血液慣性力Lと大血管抵抗Raは有意差を認めないことから、循環維持のためには無拍動流型人工心臓で十分であり、あえて拍動流型の人工心臓は必要ないと考えられる。しかしながら、無拍動流補助では末梢血管抵抗Rpは有意に低下した。この要因としては血管の伸展受容器反射が考えられ、拍動流に伴って動脈壁に分布する神経終末が脱分極してインパルスを発生するのが圧受容器のメカニズムとされている⁶⁾、無拍動流化によってこの反射が変調を来すことが考えられる。

今回、循環動態の数理モデルを使用して δ オペレータによるパラメーター評価を動物モデルで検討したが、これにより両心補助時には末梢血管抵抗が低下することが確認され、末梢循環障害を惹起して体液貯留などの原因にもなりうることが示唆された。また今回の検討では、数理モデルを駆使して循環動態の計測が可能であり、その結果の適切な評価によって様々な病態解明の糸口となり、至適な人工心臓駆動方法の確立に有益であることが示された。

文献

- 1) Nose Y, Nakata K, Yoshikawa M, et al.: Development of a totally implantable biventricular bypass centrifugal blood pump system, *Ann Thorac Surg*, 68: 775-779, 1999.
- 2) 許俊銳, 齊藤明, 赤池敏宏, 他: 人工臓器と再生医療の最先端医療2005, 先端医療研究所, pp 79-84, 2005.
- 3) Nakata K, Sankai Y, Akiyama K, et al.: Evaluation of a new device for the intraoperative assessment of coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 17: 160-165, 2011.
- 4) 小場隼人, 中田金一, 秋山謙次, 他: 血管系の数理モデルによる動脈抵抗の変化. *生体医工学会*: 49: 84-90, 2013.
- 5) Nakata K, Orime Y, Akiyama K, et al.: Novel device accurately measures graft resistance and compliance to ensure quality of coronary artery bypass. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 18: 438-443, 2012.
- 6) 入沢宏, 熊田衛: 新生理化学大系 医学書院, 東京: pp 348, 1991.

冠動脈プラークの発展と退縮のメカニズムに関する研究

平山篤志¹⁾Mechanisms of plaque progression and regression
in coronary artery atherosclerosisAtsushi HIRAYAMA¹⁾

要旨

我々の講座では、冠動脈プラークの発展と退縮のメカニズムに関して、長年にわたって臨床研究と動物実験を行っている。研究者を招へいすることにより、より早く研究を進める事が期待される。臨床研究では、カテーテル治療を受ける冠動脈疾患の患者から採血し、血管内イメージング検査で得られたプラークの特性とマルチバイオマーカーの相関を分析し、不安定プラークの予知とプラークの進展、改善を関連するバイオマーカーを探す。動物実験では、LDLR^{-/-}マウスを用いて、高コレステロール/高脂肪食の食負荷により、急性冠症候群の患者と似ている冠動脈不安定プラークを持つ大動物モデルを確立し、長期間にわたって観察することにより、不安定プラークの形成から破綻までの経過を把握し、破綻に関連する要因を検討する。

1. 招へい概要

我々の講座では、多種類の血管内イメージング法を用いて冠動脈プラークの発展と退縮のメカニズムに関して、長年にわたって臨床研究と動物実験を行っている。動物実験や画像解析、またサンプルの調整には多くの人員と時間が必要であり、招へい研究者により、実験や解析をより迅速に行って、より早く研究を進める事が出来る。

招へい研究者 林清飛

(中国福建省武夷山市立病院 循環器内科)

招へい者 (受入れ研究者)

平山篤志 (日本大学医学部内科学循環器内科分野)

招へい期間

平成24年6月1日～平成25年5月31日

研究日程・体制

日本大学医学部内科学循環器内科、および先端心血管画像解析学分野 (寄付講座) にて研究を行う。臨床研究では循環器内科平山篤志 (教授)、廣高史 (准教授)、高山忠輝 (准教授)、先端心血管画像解

析学分野李予昕 (助教) の指導の下で行う。基礎研究の動物実験は平山篤志と李予昕の指導の下で行う。定期的に、研究ミーティングを行い、研究の進捗を把握する (写真1, 研究ミーティングの様子)。

月、火、木曜日に臨床研究の血液サンプルを処理する。水、金、土曜日に血管内イメージングを解析する。また動物実験日は実験に参加して、組織の処



写真1

1) 日本大学医学部内科学循環器内科分野
平山篤志: hirayama.atsushi@nihon-u.ac.jp

理, 病理染色などの技術を習得する。

2. 研究目的と方法

冠動脈粥腫（プラーク）の破綻が急性冠症候群の発症の原因となることが明らかになっているが、破綻しやすい不安定プラークの形成過程、また破綻の契機になる原因はまだ明らかになっていない。我々はLDLコレステロール受容体ノックアウト（LDLR^{-/-}）マウスをすでに開発し、急性冠症候群の患者と似ている冠動脈不安定プラークを持つ大動物モデルを確立することにより、不安定プラークの形成から破綻までの経過を把握し、破綻に関連する要因を解明し、スタチンを初めとするさまざまな薬剤によるプラークの安定化と急性心筋梗塞にいたる破綻を防ぐ治療法を開発する。

臨床研究では、血管内超音波、血管内視鏡、OCT等冠動脈血管内イメージングの進歩は著しく、冠動脈プラークの器質の変化をより正確に検出することができるようになってきているが、血管内イメージングは侵襲的な検査であり、かつ高額の費用であるため、カテーテル治療をうける患者以外に施行することはできない。代謝異常、機能異常を反映しているバイオマーカーが冠動脈粥腫の性状を反映できるかはまだ分かっていない。我々は血管内イメージングで得られた冠動脈プラークの器質の変化とバイオマーカーから得られた代謝、機能の異常の変化の関連性を検討し、プラークの特性とバイオマーカーの相関性を証明し、バイオマーカーを複数用いることにより、プラークの特性と不安定プラークを予知する。

3. 研究実施内容

動物実験では、LDLR^{-/-}マウスを用いて、高コレステロール/高脂肪食の食負荷により、急性冠症候群の患者と似ている冠動脈不安定プラークを持つ大動物モデルを確立する。同一個体を長期間にわたって観察することにより、不安定プラークの形成から破綻までの経過を把握し、破綻に関連する要因を検討する。また、スタチン等の薬剤によるプラークの安定化と急性心筋梗塞にいたる破綻を防ぐ治療法を開発する。

臨床研究では、冠動脈造影とカテーテル治療を受ける冠動脈疾患の患者から採血し、様々なマルチバ

イオマーカーを測定する（写真2、血液サンプルを処理する様子）。また、血管内超音波、血管内視鏡、OCTなどの血管内イメージング検査を用いて、冠動脈プラークの特性を定性かつ定量的に解析する。経時的に3年後まで調査し、期間内に冠動脈造影が必要となった場合、上記の採血と血管内イメージング検査を施行する。プラークの特性、進展、改善とマルチバイオマーカーの相関を分析し、不安定プラークの予知とプラークの進展、改善に関連するバイオマーカーを探す。



写真2

4. 研究成果

動物実験では、3ヶ月齢のLDLR^{-/-}マウスに高コレステロールと高脂肪食を4ヶ月間食べさせた後、冠動脈に著明な血管径拡大（positive remodeling）と大量のプラークを認めた。プラークの中には炎症細胞が侵入し、破綻しやすい薄い線維性被膜、多量の脂質コア、大量の石灰化、プラーク内出血などの不安定プラークの特徴を認めた。この結果からは、LDLR^{-/-}マウスに高脂肪、高コレステロール食を負荷する事で、急性冠症候群を引き起こす不安定プラークを作ることに成功した。また、ピタバスタチン投与により、プラークのボリュームは50%まで減少し、炎症細胞の侵入、プラーク内出血も抑えることができた。スタチンは不安定プラークの形成を抑える作用があることがわかった。

臨床研究では、冠動脈責任病変の病変長は血中の総コレステロールと高血圧と相関している。血中IgE、HbA1Cレベルはプラークの量と相関していた。血中HDLレベルは病変の狭窄度とプラークの量と

逆相関し、さらに、血中ミオグロビンとトリグリセリドレベルはプラークの偏心性分布と相関していた。

5. 研究発表

- (1) Yuxin Li, Akira Onishi, Mitsumasa Sudo, Seiji Fukushima, Qingfei Lin, Shunichi Suzuki, Dai-ichiro Fuchimoto, Shoichiro Sembon, Masaki Iwamoto, Michiko Hashimoto, Hironori Haruta, Tadateru Takayama, Satoshi Kunimoto, Takafumi Hiro, Taro Matsumoto, Masako Mitsumata, Masahiko Sugitani, Satoshi Saito, Atsushi Hirayama. Pleiotropic effects of statin in stabilization of unstable coronary plaque – direct evidence from low density lipoprotein receptor knockout pig. Scientific Sessions 2013 of American Heart Association. November 16-20, 2013 Dallas, USA
- (2) Yuxin Li, Takafumi Hiro, Qingfei Lin, Tadateru Takayama, Yoshiharu Higuchi, Taro Kawano, Mitsumasa Sudo, Toshihiko Nishida, Satoshi Saito, Atsushi Hirayama. Identification of multiple biomarkers that predict the extent of plaque burden in coronary culprit lesions. Symposium Presentation. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March 21-23, 2014 Tokyo, Japan
- (3) Yuxin Li, Takafumi Hiro, Qingfei Lin, Tadateru Takayama, Yoshiharu Higuchi, Mitsumasa Sudo, Taro Kawano, Toshihiko Nishida, Satoshi Saito, Atsushi Hirayama. Identification of multiple biomarkers that predict the extent of plaque burden in coronary culprit lesions. 論文作成中

炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞医学

羅 智靖¹⁾

Cellular and Molecular Medicine of Refractory Immune and Allergic Disease

Chisei RA¹⁾

要旨

本紀要は、平成20年度から24年度の5年間に亘って、「炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞医学」という課題名で、日本大学医学部総合医学研究所に於いて実施された私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（研究拠点を形成する研究）についてのその研究成果を取り纏めたものである。事業の柱となった3つの研究プロジェクトにおいて①難治性免疫・アレルギー疾患である気管支喘息や関節リウマチ、糸球体腎炎の分子細胞病態から治療に迫る研究が、マスト細胞を中心に進展され、②脱分化脂肪細胞を用いた治療の試みからは、難治性免疫疾患のGVHDやIBDなどの動物モデルにおいて有効性が示された。また、③妊娠高血圧症候群における病態解明の面で、自然免疫系の亢進や、抗リン脂質抗体関与の新しい局面を明らかにした。現在、これらの新たな研究成果を基にし、さらなる研究を続行、展開して行く基盤が形成されつつある。

1. はじめに

先進工業国における免疫学的疾患患者の数が著しく増加して来ていることはよく知られている。特に、アレルギー疾患の有病率は50%を越えるとも言われ、一種の文明病の様相を呈している。過度の炎症とその修復過程の異常は、様々な慢性疾患の病理の根源であり、これを克服することは、医学研究における最重要課題のひとつである。アレルギー・炎症・修復は連鎖的なプロセスであり、複合的な高次生体応答の結果であることから、本研究プロジェクトでは、従来の基礎医学領域における従来の基盤研究組織に加え、領域横断的な融合的集学的研究により、アレルギー・炎症・修復についての有機的、統合的研究を推進する研究拠点を組織するに至った。本計画では、①医学において最も重要なテーマのひとつである「アレルギー・炎症・修復」に関する総合的な臨床・研究拠点を形成すること、②当該研究拠点から高い基礎医学知識と臨床能力を併せ持

ち、診療分野において臨床研究をリードする臨床研究者、先端的な医学研究を担う複眼的な視野を持つ研究者を広汎な臨床医学の諸分野に供給することを目的とし、基礎研究者と臨床研究者の領域横断的連携と融合的研究の場を提供することによって、研究成果の臨床応用へのトランスレーションの実現性を高め、ベンチからベッドサイド、さらには社会への研究成果の還元を効率的に遂行することにより、医学研究組織の社会的使命の実現の可能性をさらに高める効果を期待して実施された。本紀要において、平成20年度から平成24年度の5年間に亘って推進した研究活動の主な内容および成果を報告する。

2. 研究の成果

本研究プロジェクトは以下の三つのプロジェクトにより構成された。即ち、1.免疫細胞を標的にした炎症と免疫・アレルギーの分子細胞医学、2.難治性免疫疾患に対する細胞・遺伝子治療法の開発、3.生

1) 日本大学医学部
羅 智靖：ra.chisei@nihon-u.ac.jp

殖免疫である。

免疫細胞を標的にした炎症と免疫・アレルギーの分子細胞医学

I. アレルギー制御の分子標的の探索とその機能解析

アレルギー制御の分子標的を特にマスト細胞において探索した結果、FcεRIとGPCRによるマスト細胞の活性化の調節分子としてFcRβ鎖ITAMが重要であり、またマスト細胞上に発現するPAF受容体などもアナフィラキシーの分子標的になる事が初めて明らかとなった¹⁾。FcRβ鎖の機能についてさらに検討を加えた結果、ITAM以外のC末端領域にサイトカイン産生を制御する領域が存在することを見出し、FcRβ鎖はITAMを介して、FcRγ鎖非依存性にマスト細胞を活性化させる機能を有していることを報告した。FcRβ鎖ITAMの機能を競合的に阻害できるリン酸化型ヒトFcRβ鎖ITAMペプチドの開発に成功し、ペプチド処理によって効果的にヒトマスト細胞の活性化が抑制されることを明らかにした²⁾。プロジェクト2との共同研究であるFcεRIの発現制御機構の解析では、ヒトFcRγ鎖遺伝子(FCER1G)の翻訳開始点上流-101及び-87の2カ所(エレメントγ及びδ)にそれぞれSp1及びGABPとElf-1が結合し、FCER1Gの発現に関わっていること、またGABPがそのETSドメインを介してSp1と物理的相互作用をすることを明らかにした。

II. アトピー性皮膚炎とマスト細胞、好酸球の係わり、気管支喘息の病因、病態の分子細胞学的解析

可溶性FcεRIα鎖によるIgE-FcεRIを介したマスト細胞活性化の阻害がアレルギー性皮膚炎、好酸球浸潤の抑制に効果的であることを動物モデルにより初めて明らかにした³⁾。気道上皮細胞のバリア機能に関する解析では、上皮-樹状細胞間の相互作用による免疫応答に及ぼすバリア機能の影響を検討した結果、E-cadherinのバリア機能が破綻した細胞においては、RNAウイルスが宿主細胞に感染し、複製する際に生じるdsRNAに対するTLR3を介した応性が亢進し、IL-6、IL-18などの炎症性サイトカインやMCP-1、IP-10、fractalkine、i-Tacなどの樹状細胞の活性化に影響を及ぼすケモカインの産生が著しく亢進することを明らかにした。さらに、dsRNAが気道上皮細胞のタイトジャンクションを破壊することを

明らかにした。

III. 炎症反応時の環境因子と造血幹細胞増殖

骨髄および脾臓における造血微小環境によるマスト細胞造血の調節機構の解析結果からは、定常状態では骨髄および脾臓におけるマスト細胞造血は抑制系優位に調節されていたが、バイオストレス下などの環境変化をうけたマスト細胞の需要に応じて、骨髄では促進因子と抑制因子のバランスが促進系優位に転換するのに対し、脾臓においてはそのような転換は観察されず、この骨髄と脾臓のマスト細胞造血制御の違いは造血組織毎のストローマ細胞の役割が異なるためと考えられた⁴⁾。

IV. オキシステロール、脂肪酸、高グルコースなどのマスト細胞分化と活性化への影響および脂質応答性核内受容体によるマスト細胞機能調節機構の解析

生化学教室との共同研究で行なわれたマスト細胞における脂質核内受容体LXRの機能解析により、オキシステロールや合成リガンドによるLXRの活性化が抗炎症に働くことを初めて報告し⁵⁾、また高濃度のグルコース環境下ではマスト細胞の活性化が亢進されることも明らかにした。さらに高濃度のオキシステロールには、マスト細胞に対するアポトーシス誘導能があることを見出し、過度のオキシステロール負荷によって誘導される細胞内脂質代謝機構の破綻がその原因であることを明らかにした。

V. 関節リウマチ(RA)病態とEBウイルスの係わり、マスト細胞の関与の分子細胞学的解析と新たな治療法の探索

関節リウマチ(RA)病態へのEBウイルスの係わりについては、ヒト骨髄の移植によりヒト化免疫機構を有することが知られているNOD-SCIDマウスを使用し、ヒト臍帯血由来骨髄CD34陽性細胞分画をこのマウスに移植し、EBウイルスを感染させることにより、滑膜炎、パンヌスによる骨融解を起させる事に成功した⁶⁾。関節炎近傍の骨髄にCD4細胞の強い浸潤が起こり、関節リウマチの初期の病変としてMRIで検出される骨髄浮腫の再現にも成功した。この他に、RA患者滑膜からのマスト細胞培養法を樹立し、滑膜由来培養ヒトマスト細胞では、特

徹的に発現しているCD64を介して活性化が誘導されることを明らかにした。

VI. ヒト角膜構成細胞におけるCD40-TRAFシグナルおよびHCVとアポトーシスに関する解析

培養ヒト角膜上皮 (HCE) および角膜実質 (HCS) 細胞に発現するCD40を抗CD40抗体 (G28-5) で刺激すると、両細胞からGM-CSFとIL-8産生が、加えてHCS細胞からはPGE2産生も誘導された。これらCD40の機能はprotein tyrosine kinase依存性に発現した。慢性C型肝炎におけるHCV複製・増殖機構、およびHCVコア蛋白を用いてHCVコア蛋白が細胞増殖に与える影響と発癌に与える影響に関する研究では、HCVコア蛋白がheparin binding EGF-like growth factorの発現を亢進してAktの発現を亢進させ、炎症進展ないしは肝癌発生に関与することを報告し⁷⁾、IL28BのSNPおよびHCVコアのアミノ酸変異は肝病態の進展に影響を与えている可能性を示した。

2. 難治性免疫疾患に対する細胞・遺伝子治療法の開発

I. GVHD, 難治性自己免疫疾患に対する新規細胞治療法の開発

免疫抑制性細胞のスクリーニングを行った結果、脂肪細胞を天井培養することにより調製された脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell, DFAT) がMSCと同等の多分化能を有し、かつ強力なT細胞増殖抑制能を持つことを明らかにした⁸⁾。ヒトDFATの免疫調節作用についてさらに詳細な解析を行った結果、DFATはTリンパ球の増殖抑制の他、樹状細胞成熟抑制、制御性T細胞分化促進、Th17リンパ球誘導抑制、NK細胞活性抑制など多彩な免疫制御作用を有することが明らかになった。また、GVHD, 免疫疾患モデル動物に対する細胞治療の開発に係る研究では、2種類のマウス炎症性腸疾患 (IBD) モデルおよび骨髄移植にともなうマウス急性GVHDモデルを確立し、これらの疾患モデルにおけるDFATの移植効果を検討した結果、これらのモデルに対してDFAT移植は腸管炎症を軽減し、臨床スコアが改善することが明らかになった。また抗腎モノクローナル抗体 (1-22-3) 誘発性腎炎に対するDFAT移植の効果を検討した結果、DFAT腎動脈

内または静脈内投与による尿タンパク減少、組織学的スコアの改善効果が認められた。さらに免疫不全 (NOD-SCID) マウスを用いたヒト臍帯血生着不全モデルに対しDFATを移植しその効果を検討した結果、臍帯血・DFAT同時移植はヒト臍帯血の生着率を増加させることを明らかにした。これらの研究成果より、脂肪細胞に由来するDFATの難治性自己免疫疾患やGVHDに対する有効性や、臍帯血移植後の生着促進作用が示された。DFAT細胞治療の臨床試験に向けた研究においては、GMP基準に適合可能なDFAT調製用基礎培地 (CSTI303-MSC) の開発に成功した。またGMP基準に準拠した細胞調整を行なう専用無菌細胞調製施設を大学研究棟内部に整備し、閉鎖系システムによるDFAT調製法を確立するに至った。ヒトDFATの造腫瘍性の有無については、脱分化培養による染色体数の変化や異常、癌関連遺伝子のエピジェネティックな変化などは認められず、脱分化培養により腫瘍原性を獲得していないことを確認した。

難治性自己免疫疾患に対する遺伝子治療法の開発

II. PIポリアミドの分子設計と合成および機能評価

プロジェクト1の解析結果を基に、ヒトFCER1G遺伝子と相同なマウスFCER1G遺伝子の転写制御領域内のEts familyのconsensus sequenceを含むエレメントに結合するPIポリアミドとして、FCERG-2とFCERG-3を分子設計し、HPLCで精製した後に99%純度のPIポリアミドを調製した。EMSAによる結合確認の後に、PIポリアミドの発現抑制効果を解析した結果、FCERG-2は濃度依存的にFcR γ 遺伝子発現を抑制したが、FCERG-3はコントロールのDMSOと比べ、有意差を認めなかった。FCERG-2に関してはFcR γ 鎖の遺伝子発現抑制を介してCD16/32 (Fc γ R) の発現を抑制することが確認された⁹⁾。また動物への投与を前提にした血中のPIポリアミドの測定法を確立した¹⁰⁾。

生殖免疫

I. 妊娠高血圧症候群 (PIH) におけるinnate immunityの亢進と胎盤形成障害メカニズムの解明、さらに抗リン脂質抗体による流産、胎児死亡のメカニズムの解明

妊娠高血圧腎症 (PE) の患者末梢血中のsoluble

Endoglin濃度を解析した結果、正常妊婦に比し高値であった。soluble Endoglin濃度の上昇の原因として従来の報告されている胎盤における低酸素に加え、PE患者の血清因子が関係していた¹¹⁾。抗β2-GPI抗体は、血栓を生じ胎盤機能を障害する他に、絨毛細胞からのPIGF産生を抑制して胎盤機能を障害し胎児発育を阻害する可能性を証明した。また、抗β2-GPI抗体陽性IgG添加により、絨毛癌細胞におけるNF-κB, STAT2, STAT3 (725) のリン酸化蛋白の増加が認められたことから、抗β2-GPI抗体は絨毛細胞に作用し反復流死産患者におけるinflammatory responseを増加する可能性が示唆された。抗β2-GPI抗体は、妊娠初期上毛のTLR mRNAの発現増加を誘導することも明らかにした。ステロイド合成系酵素の遺伝子多型と妊娠高血圧症候群の関連解析研究では、ステロイドホルモンの合成系酵素であるaromataseの遺伝子(CYP19A1)のrs700581において、PE群ではAG+GG genotypeを有する割合がcontrol群よりも有意に高く、G alleleを有する割合が高いこと、さらにrs7000518-rs4646で構築されるG-G haplotypeは、control群よりもPE群で有意に多くCYP19A1の遺伝子多型は、PEの有用な遺伝子マーカーであることを報告した¹²⁾。

II. 生殖器における粘膜免疫機構とSTI, 周産期感染

HIV母子感染の分子疫学的研究により、性行為感染によるHIV感染者において、治療の有無にかかわらずウイルスゲノムに特定の変異が集積し、宿主の細胞性免疫機構を逃れる方向に進化すること、母子感染においては特に特定の変異を有するウイルスが選択されること、母体が抗ウイルス療法を受けていなくても耐性変異が高い確率で生じることを世界で初めて明らかにした。次に、冬季の小児の感染症として重要なノロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、コブウイルスの分子疫学的解析の結果、我が国における複数の観測地点ならびにタイ、ラオス、ベトナム、バングラデシュなど東南アジアの医療機関における、年毎の変異の頻度を明らかにした。また胎盤を形成する絨毛細胞がHIVならびにインフルエンザにin vitroで感染すること、その感受性が分化依存性であることを明らかにし、インフルエンザウイルスの複製過程の可視にも成功した。一方、感染による妊娠免疫への修飾に

よる治療戦略として、世界で初めて寄生虫由来抗原rDiAgが免疫機序による流産モデルCBAXDBAマウスにおいて、妊娠成功率を4倍に高めること、その機序はIL-23とTNFの抑制によることを明らかにした¹³⁾。腫瘍抑制遺伝子であるp14/ARFとp16/INK4Aの発現を9種類のHTLV-I関連細胞株と11例のATL患者の臨床検体で検討した結果、p14/ARFは11例の臨床検体中6例で発現していなかったが、細胞株で発現していなかったのは1株のみ(OKM3T)だった。p16/INK4Aが発現していなかった細胞株ではメチル化の関与を確認した¹⁴⁾。細胞株MT2に脱メチル化剤Azacitidineを加えて培養すると濃度依存性にp16/INK4Aの発現の増強がみられた。MT2にAzacitidine添加で3日培養すると細胞の増殖が抑制された。

3. 考察

免疫細胞を標的にした炎症と免疫・アレルギーの分子細胞医学

今回の研究プロジェクトとして特に優れた成果としては、可溶性FcεRIα鎖がアレルギー性皮膚炎に有効である事が示されたこと、リン酸化型ヒトFcRβ鎖ITAMペプチドによりヒトマスト細胞の活性化を抑制することに成功したこと、ヒトRA患者由来の幹細胞の移植によりヒトRAモデルの作製に成功したことなどが挙げられる。これらの成果により、可溶性FcεRIα鎖やリン酸化型ヒトFcRβ鎖ITAMペプチド(特願2009-206324号)によるアレルギー性皮膚炎や鼻炎などに対する新たな治療法の開発、マスト細胞のPAF受容体の発現を標的にしたアナフィラキシーの予防法の開発につながった。新規のヒトマスト細胞リソースとしての滑膜由来培養マスト細胞の調製法の開発への応用が期待される。

またプロジェクト2との連携研究において、FCER1Gプロモーターに関し、PIポリアミドによる転写因子結合阻害を可能とする調節エレメントがスクリーニングされたことは、FcRγ鎖の発現制御機構をターゲットとした自己免疫疾患、アレルギー疾患治療薬の新たな開発を期待させ、疾患マウスモデルを用いてその有効性を検討する第一歩となる。しなしながら、炎症反応時の環境因子と造血幹細胞増殖の解析プロジェクトにおいて、ストローマ細胞の役割の違いがどの点になるのかを明らかにすること

ができなかったことや、関節リウマチ (RA) 病態と EB ウィルスの係わりに関するプロジェクトでは、患者由来 CD34 細胞の NOD-SCID マウス (ヒト化免疫機構モデルマウス) への移植で、関節リウマチのマウスモデルを作成することができなかったために、今後の検討課題となっている。

難治性免疫疾患に対する細胞・遺伝子治療法の開発

特に優れた研究成果として、①成熟脂肪細胞に由来する DFAT が多彩な免疫制御作用し、GVHD や IBD モデルなどの難治性免疫疾患に対する DFAT 移植の有効性を明らかにした。②IgG Fc γ 受容体に対する PI ポリアミドの作成に成功したことが挙げられる。①に関しては、少量の脂肪組織からドナー年齢に関係なく、簡便に大量調製が可能であるといった特徴がある。このような成熟脂肪細胞の脱分化技術を基盤とする細胞治療の試みは世界的に見ても非常にユニークな研究であるといえる。すでに臨床試験に適合した DFAT 調製法の確立や細胞の安全性に関する検討にも着手しており、早期の臨床応用が期待できる。②に関しては、PI ポリアミドはベクターやデリバリー試薬なしに細胞の核に取り込まれるため、様々な遺伝子をターゲットとして自由に分子設計が出来る等の従来の核酸医薬にはなかった利点が多々みられる。本研究成果により Fc γ 受容体の Fc γ RI, III および Fc ϵ RI の共通サブユニットであり、その細胞表面での発現に必須である FcR γ 鎖を抑制する PI ポリアミドを作成できたことは、新たな自己免疫疾患治療薬の開発を期待させるものである。今後の課題として、DFAT 調製法として、現法では、ウシ胎児血清 (FBS) を含有する増殖培地が必要であるが、FBS は異種タンパク質を大量に含むため臨床応用の際に安全上の問題となるために、DFAT 調製用の無血清培地の開発が挙げられる。また疾患モデルに対する DFAT 移植実験では、生理食塩水をコントロールとして有意な治療効果を明らかにしているが、他の細胞との比較が十分に検討できていない。今後、臨床応用を目指す上で既存の細胞治療に対する優位性を示す必要があるため、骨髄 MSC などとの比較実験を予定している。

生殖免疫

優れた成果として、末梢血中の soluble Endoglin

濃度の上昇の原因として、従来報告されている胎盤における低酸素に加え、妊娠高血圧腎症 (PE) 患者の血清因子が関係していることを示した点、抗 β 2-GPI 抗体が絨毛よりの PIGF 産生を抑制して胎盤機能を障害し胎児発育を阻害する可能性を証明した点、妊娠高血圧症候群の疾患関連遺伝子を明らかにした点などが挙げられる、また ATL は薬剤が効きにくい腫瘍であるが、脱メチル化剤が ATL 治療に有効である可能性を示した。今後の検討課題としては、PE 患者の血清因子の詳細な検討ができなかった点、抗 β 2-GPI 抗体の絨毛細胞上の作用部位が解明できなかった点である。また、我が国では HIV 垂直感染はゼロに近く、クラミジアや梅毒、HPV 感染も減少傾向にあり、十分な臨床検体が得られなかった。そこでベトナム (ホーチミン小児病院)、ラオス (セタテイラート病院)、タイ王国 (保健省) と共同研究を行い、可能な限りの技術移転による現地解析と安全な形での検体輸送を試みている。さらに、途上国においては特に第一線の医療機関で PCR や シークエンス解析が行うことができず、我々が開発しているイムノプロット法の感度、特異性を向上させ商業ベースにのせること、現地において適切な診断ができる専門家の育成が課題として挙げられる。ATL 治療において脱メチル化剤の抗腫瘍効果は認められたが、単独では十分ではなかった点があり、他の薬剤との併用が必要となる。

謝辞

長期に亘った我々の事業に御支援を賜りました文部科学省および本学並びに医学部、そして実際にプロジェクトの研究に参加し優れた成果を挙げて戴いた研究者各位、並びに事務方の方々に心より深謝申し上げます。

文献

- 1) Ra C, Nunomura S, Okayama Y. Fine-Tuning of Mast Cell Activation by Fc ϵ RI β Chain. *Front Immunol.* 2012; 3: 112.
- 2) Okayama Y, Kashiwakura JI, Matsuda A et al. The interaction between Lyn and Fc ϵ RI β is indispensable for Fc ϵ RI-mediated human mast cell activation. *Allergy.* 2012; 67: 1241-1249.
- 3) Kobayashi M, Nunomura S, Gon Y et al. Abrogation of High-Affinity IgE Receptor-Mediated Mast Cell Activation at the Effector Phase Prevents Contact Hypersensitivity to Oxazolone. *J Invest Dermatol.* 2009; 130: 725-731.
- 4) Hokari T, Tsuboi I, Harada T et al. Mast cell development and biostresses: different stromal responses in bone marrow and spleen after treatment of myeloab-

- lator, 5-fluorouracil, and inflammatory stressor, lipopolysaccharide. *Biol Pharma Bull* 2011; 34: 1533-1541.
- 5) Nunomura S, Makishima M, Ra.C. Liver X receptors and immune regulation. *Biomolecular Concepts*. 2010; 1:381-387.
 - 6) Kuwana Y, Takei M, Yajima M et al. Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. *PLoS ONE* 2011; 6: e26630.
 - 7) Nakamura H, Aoki H, Hino O et al. HCV core protein promotes heparin binding EGF-like growth factor expression and activates Akt. *Hepatol Res*. 2011; 41: 455-462.
 - 8) Matsumoto T, Kano K, Kondo D et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *Journal of Cellular Physiology* 2008; 215: 210-222.
 - 9) Kajiwara M, Ueno T, Fukuda N et al. Development of PI polyamide targeting Fc receptor common gamma chain for the treatment of immune-complex related renal disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2012; 35: 2028-2035.
 - 10) Kamei T, Aoyama T, Tanaka C et al. Quantitation of pyrrole-imidazole in rat plasma by high-performance liquid chromatography coupled with UV detection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012; 2012: ID715928.
 - 11) Aoki Y, Yamamoto T, Fumihisa C et al. Effect on the Production of Soluble Endoglin from Human Choriocarcinoma Cells by Preeclampsia Sera. *Am J Reprod Immunol*. 2012; 67: 413-420.
 - 12) Shimodaira M, Nakayama T, Sato I et al. Estrogen synthesis genes CYP19A1, HSD3B1 and HSD3B2 in hypertensive disorders of pregnancy. *Endocrine* 2012; 42: 700-707.
 - 13) Komine-Aizawa S, Izumi Y, Imai S et al. The therapeutic potential of the recombinant antigen from *Dirofilaria immitis* (rDiAg) for immune-mediated pregnancy loss. *J Reprod Immunol*. 2011; 92: 21-26.
 - 14) Uenogawa K, Hatta Y, Arima N et al. Azacitidine induces demethylation of p16INK4a and inhibits growth in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Mol Med*. 2011; 28: 835-859.

インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌との相互作用の 機序と呼吸器疾患重症化の病態の解明

山本樹生¹⁾, 黒田和道¹⁾

Study on the mechanism of exaggeration by both influenza virus and oral/respiratory tract bacteria and the pathogenesis of exaggeration for respiratory disease

Tatsuo YAMAMOTO¹⁾, Kazumichi KURODA¹⁾

要旨

2010年より開始された本プロジェクトも4年目を迎えた。インフルエンザの脅威は、2009年のブタより由来した新型インフルエンザの流行以降も収まっていない。H1N1 (2009) ウイルスによるパンデミックでは、高齢者の感染例は少なかったものの、発症高齢者における死亡率は高かった。次期パンデミックでの高齢者への被害が危惧される。2003年に始まったH5N1強毒トリウイルスによるヒトへの感染は致死率が高いまま今も続いている。本年(2013年)の春には、これまでヒトへの感染が知られていなかったH7N9ウイルス感染による死亡例(37名)が中国で報告され、注目を集めた。これが新たなパンデミックに繋がらない保証はない。このような状況下での本プロジェクト研究の重要性は明確であり、着々と成果を上げつつある。ここにこれまで得られた成果の概要をまとめた。

1. 研究プロジェクトの概要

高齢罹患率において、インフルエンザの重症化率・致死率が著しく高まることが知られている。インフルエンザ以外の呼吸器疾患においても高齢化の影響は大きい。したがって、世界史上かつてない高齢化社会を迎えている日本では、インフルエンザなどの呼吸器疾患に対する有効な対策の確立は喫緊の課題と考えられる。本プロジェクトは、インフルエンザを中心に呼吸器疾患の病態悪化の機構を解明することで、それらに対する有効な対策を提案することを目的として平成22年より開始されたものである。これまで、インフルエンザウイルスが、常在細菌叢の存在する鼻腔・口腔から感染することから、ウイルス・常在細菌・宿主の3者が動的生態系を形成する点に着目し、以下に大別される研究を行ってきた。

I. インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌および体液中ウイルス感染阻害因子との相互作用の解

明

II. インフルエンザ重症化の病態解明

III. 口腔管理(口腔ケア)のインフルエンザ対策としての有効性の検証

以下に、これまでのプロジェクト進捗状況の概要を紹介する。

2. 研究プロジェクト遂行の概要・進捗状況

本プロジェクト前半期における最重要課題は口腔・気道の細菌や体液中阻害因子がインフルエンザウイルス感染にどのような影響を与えるかを明らかにすることである。この目的は下記のようにほぼ達成された。インフルエンザ重症化のメカニズムに関しても重要な知見が得られつつある。

I. インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌との相互作用の解明

インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ(NA)はウイルスのHAが認識して吸着する細胞上

1) 日本大学医学部
山本樹生: yamamoto.tatsuo@nihon-u.ac.jp

のレセプターを破壊する酵素活性を持つ。これにより子孫ウイルスは感染細胞から遊離し、感染を新しい細胞に広げることができる。また、体液中に含まれるレセプター様物質を破壊する役割も担っている。現在広く処方されている、タミフルやリレンザなどはインフルエンザNAの特異的な阻害薬であり、これらの働きを抑えることにより抗ウイルス効果を発揮する。注目すべき点として、一部の細菌がインフルエンザNAと酵素学的に同様なノイラミニダーゼ活性を持つタンパク質を分泌することが挙げられる。この細菌NAのインフルエンザウイルス感染での役割を解明する目的で、まず、細菌由来NAが、NA阻害薬存在下でウイルスの増殖を回復することができるかどうかを検討した。

ノイラミニダーゼ分泌口腔・気道細菌の同定：

ヒト口腔および上気道に存在する13菌種33菌株の培養上清のノイラミニダーゼ活性を測定し、7菌種8菌株で活性を検出した。図1表1

Sample	Neuraminidase activity		Calculated original activity	
	Dilution	Signals* ± SD ^b	μunit/ml ^c ± SD ^b	Ratio to A/Udm
Arthro bacter ureofaciens neuraminidase (1 unit/ml)	×10,000	69,258 ± 1,262	1,000,000	2,300
Vibrio cholerae culture supernatant (RDE)	×100	25,592 ± 9,516	3,700 ± 1,400	8.5
Streptococcus pneumoniae culture supernatant	×1	89,954 ± 4,574	130 ± 6.6	0.30
Human saliva	×1	33,283 ± 1,994	48 ± 2.9	0.11
Bjohm-Hamburg/99 virus (1:10 HAU/ml)	×250	39,026 ± 1,230	14,000 ± 440	32
Kilidom/72(H2N2) virus (3:20 HAU/ml)	×10	30,303 ± 926	440 ± 13	1.00

*mean arbitrary units of luminescence signals.
^bSD, standard deviation.
^ccalculated using a standard curve obtained by purified Arthro bacter ureofaciens neuraminidase of known unit activity.
 doi:10.1371/journal.pone.0045371.t001

表1 Comparison of neuraminidase activities with those of A/Udm/72 virus.

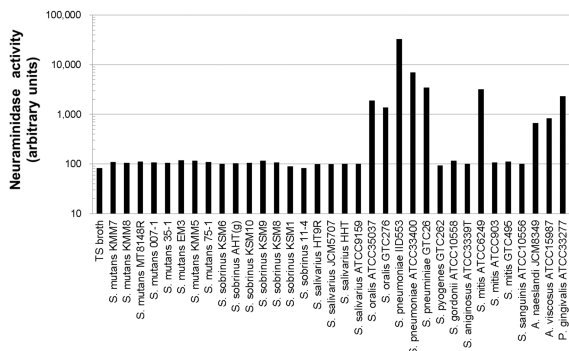


図1 Screening of neuraminidase -secreting oral and upper respiratory bacteria.

肺炎球菌では特に高く、インフルエンザウイルス感染細胞上清と同レベルのノイラミニダーゼ活性を示した。インフルエンザNA阻害薬ザナミビルはインフルエンザウイルスNAに非常に特異性が高く、IC50は、ウイルスNAに対しては1 nM前後、細菌由来ノイラミニダーゼに対してはその百万倍の1 mM前後であった。

細菌由来ノイラミニダーゼによるインフルエンザウイルスNAの代役：

ザナミビルは、感染細胞からの増殖ウイルスの放出に働くウイルスNA活性を阻害し、細胞から細胞へのウイルス感染の伝播を抑制する。その結果、ウイルス産生は抑制される。ここにザナミビルで阻害されない肺炎球菌由来ノイラミニダーゼを添加すると感染の伝播やウイルス産生が回復した。細菌ノイラミニダーゼがウイルスNAの代わりにウイルス放出に働くことが示された。

唾液中インフルエンザウイルス阻害物質：

ヒト唾液中にインフルエンザウイルスのHA活性および感染性を抑制する物質が存在すること、さらに、この抑制活性はノイラミニダーゼ処理感受性であり、ウイルスや細菌のノイラミニダーゼ活性により失活することを明らかにした。ウイルスNA活性が抑制されるザナミビル存在下では、唾液の感染性中和活性は薬剤非存在下に比べて著しく増強された。しかし、ザナミビルにより阻害されない細菌ノイラミニダーゼを加えると感染中和活性は著しく減少した。インフルエンザの治療に広く用いられているインフルエンザウイルスNA阻害薬の効果に、ウイルス放出阻害作用に加えて、唾液中中和活性の増強作用が寄与していることが示唆された。

インフルエンザウイルスNA阻害薬の効果に対する細菌由来ノイラミニダーゼの影響：

インフルエンザウイルスNA阻害薬存在下で細菌由来ノイラミニダーゼがウイルスNAの役割を果たし、ウイルスの増殖を助けることが明らかにされた。NA阻害薬の効果は細菌由来ノイラミニダーゼ存在下では著しく減弱することになり、薬剤投与時の口腔管理による細菌対策の重要性が示唆された。

鼻粘液の抗インフルエンザウイルス活性：

鼻粘液中にインフルエンザウイルスに対する赤血球凝集抑制活性および感染中和活性があることを明らかにした。これらは唾液中のものより約10倍活性が高く、ノイラミニダーゼ処理感受性で熱安定性であった。電気泳動により4種類のウイルス結合性タンパク質が検出された。

NAおよびHA遺伝子上の連動変異による機能的新型インフルエンザウイルスの出現：

一人のインフルエンザ感染患者の中で、通常HAに担われているレセプター結合活性がNAに担われている全く新しい型のウイルスが出現したことを明らかにした。NAはD151N変異によりレセプター結合能を獲得した。これに連動してHAにL221P変異が起こり、HAはレセプター結合能を喪失し、同時に粘液中のウイルス阻害物質に対する抵抗性を獲得した。このようなウイルス進化の原動力は細菌由来のノイラミニダーゼと粘液中のインフルエンザウイルス阻害物質であることが考えられた。

II. インフルエンザ重症化の病態解明

NS1 遺伝子点突然変異による弱毒性インフルエンザウイルスの強毒化：

インフルエンザウイルスを感染させた重度免疫不全NOGマウスでは、ウイルス増殖が長期間持続し、最終的に肺での増殖性を増大した変異ウイルスが出現し、マウスは致死に至ることが明らかとなった。この時いずれのマウス個体でも、ウイルス変異はNS1 遺伝子上に見いだされた。これらの変異は、宿主mRNA前駆体ポリA部位切断反応の抑制に係わるNS1のCPSF30結合ドメインに生じていた。このことはウイルスの増殖性や病原性がNS1により制御されていることを強く示唆している。

強毒インフルエンザウイルスによるサイトカイン産生の亢進：

重度免疫不全NOGマウスのインフルエンザウイルス感染において、強毒変異ウイルスの出現に伴ってサイトカイン産生の亢進が見られた。特にLIFとIL-12では顕著であった。強毒変異は宿主細胞の遺伝子の発現を抑制するウイルスNS1の機能喪失変異であることが示唆された。

選択的スプライシングの誘導：

インフルエンザウイルスのNS1がポリA部位切断反応を阻害することで選択的スプライシングを引き起こし、下流の遺伝子の発現を誘導することを見出した。この現象によりプリオン遺伝子の約20 kbp下流に位置するドッペル遺伝子の発現がインフルエンザウイルス感染により異常に亢進することが示された。

合併症：

インフルエンザ脳症の病態として、髄液中のIL10やTNF α の上昇を伴わないIL6の上昇が観察された。またインフルエンザ感染後に抗GQ1b抗体陽性を伴うミラー・フィッシャー症候群やオプソクロヌス・ミオクロヌス症候群の合併が新たに認められた。

タイトジャンクションの関与：

感染の重症化因子として、上皮細胞間のタイトジャンクションがTLR3/TRIF経路を介して障害を受けること、NDRG1の機能の変調がこの障害に関与することがわかった。逆にステロイドやTLR9リガンドがタイトジャンクション形成促進作用を持ち、治療に資する可能性が示唆された。

宿主応答：

感染応答遺伝子UBE2L6およびIFIT1の過剰発現によるインフルエンザウイルス増殖の抑制が示された。ウイルス感染でおこる小胞体ストレスに対する応答としてIntegrated stress responseがあるが、その活性分子候補としてZCCHC12を同定した。5FU, LPSなどによるバイオストレス存在下において骨髄と脾臓の肥満細胞造血が異なる反応を示し、ストローマ細胞による調節機構の違いが示唆された。絨毛系細胞において抗 β 2-GPI抗体に対するTLRによる過剰な応答を認め、流産や胎児発育不全などとの関連が示唆された。この際に、STAT系、NF κ Bなどの関与が示唆された。TLR4を介した子宮内膜症・PGE2による免疫抑制・骨盤腔感染症の悪循環経路が浮かび上がった。妊娠高血圧腎症においてsoluble endoglin高値とheme oxygenase 1活性低下、eNOS活性低下の関与が示唆された。

遺伝子発現変化：

マイクロアレイ解析から、喫煙において酸化ストレス応答・炎症・サーカディアンリズムに関連する遺伝子の変動が見られ、インフルエンザ重症化との関連が示唆された。VDRとI κ B α 発現などの関連が見られ、炎症性反応への関与が示唆された。

Ⅲ. 口腔管理（口腔ケア）のインフルエンザ対策としての有効性の検証

インフルエンザ罹患者の口腔内細菌：

インフルエンザ罹患者の咽頭ぬぐい液中のインフルエンザウイルスと細菌の解析を行った。ウイルス分離と細菌の総数および菌種のあいだに特定の相関は見いだせなかった。

口腔ケアによるインフルエンザ罹患率の減少：

口腔ケアにより口腔内細菌数が顕著に減少し、細菌数の減少とインフルエンザ罹患率の減少の相関性が特別養護ホームにおける連携疫学調査（日本歯科医師会日本歯科総合研究機構）で示された。

Ⅳ. その他の関連研究

カリン中ポリフェノール画分による新型インフルエンザウイルスの感染抑制効果：

カリンに含まれるポリフェノールが2009年に出現したブタ由来新型インフルエンザウイルスの感染抑制活性を持つことを明らかにした。

インフルエンザウイルスの動物種特異性：

HAタンパク質のB-loopの88番目のアミノ酸残基が種トロピズムに関与することを明らかにした。

ウイルス宿主相互作用：

インフルエンザウイルスM1タンパク質が、そのN末端領域中のループ構造を介して核内構造物ND10 (PML body, PODs) へ集積することを明らかにした。C型肝炎ウイルス (HCV) 非構造タンパク質4B (NS4B) がN及びC両末端領域の両親媒性ヘリックスを介して脂肪滴膜へ結合し、ウイルス粒子産生に重要な役割を果たすことが明らかになった。HCVゲノムマイナス鎖がタンパク質発現制御に関連する可能性が示唆された。また細胞膜セリンプロテアーゼTMPRSS2がHCV感染の制御に関与していることを明らかにした。HCV感染肝におけるウイル

ス量や発癌母地候補としての胆管増生などに関連するタンパク質群が同定された。HCV感染における鉄・亜鉛などの微量元素の影響を臨床的に検討するとともに、*in vitro* 実験系においてメカニズムを検討した。

以上述べたように多くの成果が既に得られているが、特に、細菌由来ノイラミニダーゼがインフルエンザウイルスのNAの働きを代行し得ることを明らかにしたことは特筆すべきと考えられる。これはウイルスの病原性にも関わり、また現在広く処方されている抗インフルエンザNA阻害薬を効果的に使用するために決定的に重要な知見である。さらに、細菌の減少を伴う口腔ケアがインフルエンザ対策になり得るウイルス学的な根拠になり、実用的な意義も大きい成果と考える。

3. 今後の展望 - 次年度に向けて -

今後行う必要がある重要な研究として、インフルエンザウイルス感染に対する細菌由来ノイラミニダーゼの効果を動物モデルで実証することがある。この点に関しても、既に予備実験を行っており、技術的な点では問題はないと考えている。その他の研究に関しても、現在の方向性でさらに研究を進展させるとともに、得られた知見を統合し、新たなインフルエンザ対策を確立することを目指したい。

本プロジェクトにおける研究の中から、ウイルス、細菌、宿主細胞の3者がお互いの遺伝子の発現に影響を与えながら共生関係を築いている様が見えてきた。今後はこのような3者の共生関係の解明に重点を置き、関係性の中で出現する感染症重症化の原因解明とその制御を目指した研究がさらに発展することが期待される。

4. 今年度の研究発表

(学会発表)

西川智子, 山崎元美, 長谷川 央, 豊澤恵子, 山本樹生, 池田 稔, 濱田良樹, 清水一史: インフルエンザウイルス増殖に対する細菌ノイラミニダーゼの影響, 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪国際会議場, 2012. 11

他 全126件

(論文)

Nishikawa T, Shimizu K, Tanaka T, Kuroda K,
Takayama T, Yamamoto T, Hanada N, Hamada Y.
Bacterial neuraminidase rescues influenza virus rep-

lication from inhibition by a neuraminidase inhibitor.
PLoS One. 2012; 7 (9): e45371.

他 全57件

ゲノム化学に基づく先進医療開発研究

福田 昇^{1), 2)}, 五十嵐潤²⁾, 齋藤孝輔²⁾, 藤原恭子²⁾, 上野高浩²⁾, 相馬正義²⁾

Researches to develop advanced medicines based on the chemical genomics

Noboru FUKUDA^{1), 2)}, Jun IGARASHI²⁾, Kosuke SAITO²⁾, Kyoko FUJIWARA²⁾, Takahiro UENO²⁾, Masayoshi SOMA²⁾

要旨

「ゲノム化学に基づく先進医療開発研究拠点」プロジェクトは、新規遺伝子制御薬ピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドの創薬開発プラットフォームを確立し、癌や腎臓疾患などの難治性疾患への治療法の開発研究として、PIポリアミドの合成法の開発、PIポリアミドの物性と薬物動態研究、毒性安全性試験を行っている。これまで進行性腎障害へTGF- β 1に対するPIポリアミドの前臨床試験を行い、癌疾患に対しMYCに対するPIポリアミド、融合遺伝子を抑制するPIポリアミドを開発している。またPIポリアミドを用いて日大式ヒトiPS細胞誘導法を開発している。今後、創薬開発をGMP、GLPレベルまで行える研究拠点とし、臨床第I相までの開発研究を目指している。

1. はじめに

日本の医療は世界最高水準であるが、癌や腎臓病など未だに治らない疾患は多く存在する。医学研究の目的はこれらの疾患に対し、新たな治療法を開発し、難治性疾患に苦しんでいる患者さんに光明を与え、人類を幸福にする事である。医学研究として基礎研究のみでは難治性疾患の治療開発は出来ず、基礎研究での成果を臨床応用するためには、動物実験、前臨床試験、GLP試験、臨床試験を繰り返し実用化に到達する必要があるが、この実用化へのトランスレーショナルリサーチに莫大な研究費と産学連携が必要であり、死の谷となっている。政府の成長戦略として研究開発から事業化までの死の谷を克服し、イノベーションの創出を促進する方針を掲げている。

2003年にヒトゲノム解読が完了し、ヒトのゲノム配列に相当するDNAの塩基配列が明らかになり、21世紀はポストゲノム時代に入りました。現在、解明されたヒトの設計図である塩基配列のゲノム情報解読が進められており、癌を中心に多くの疾病が

DNAレベルで理解されるようになってきている。ゲノム化学に基づいたゲノム創薬、遺伝子治療への応用が今後の医療で大きく期待されている。ゲノム化学とは、ゲノムに限らずプロテオミクスをも含む広い範囲のバイオロジーの分野において化学を活用する研究全般を指し、ゲノム創薬、遺伝子診断、バイオ材料など、今後の医療においても最重要分野である。今後発展するゲノム産業分野に大きく日本が関与するため、この分野の研究に我が国が全力を注がなければならない。残念ながら日本では「ゲノム化学」の分野の講座、研究室はほとんど無いのが実状であり、ゲノム産業創出に国際的に大きく遅れをとっている状況である。

このような背景のなか、日本大学医学部戦略的研究基盤形成支援事業「ゲノム化学に基づく先進医療開発研究拠点」プロジェクトは、日本大学に形成された創薬開発基盤とゲノム創薬の新しい手法を用いることで、新規薬剤候補を生み出す先進的創薬開発プラットフォームを確立することに基づいている。このプラットフォームで新規薬剤候補を医師主導で臨

1) 日本大学総合科学研究科

2) 日本大学医学部

相馬正義: souma.masayoshi@nihon-u.ac.jp

床応用に向けた迅速な対応がとれる基盤整備を行うことを本プロジェクトの主体にしている。すなわち遺伝子配列を認識する化合物の自動合成システムを国内外に先駆けて確立し、臨床前試験を行う系が学内に確立された。このことは、核酸医薬を含めたゲノム創薬分野で実際の応用に向けての問題点を克服する可能性を有する研究拠点と言える。

本研究拠点は平成23年度に文部科学省私立大学高度化推進事業プロジェクトとして開始され、総合内科、腎臓高血圧内分泌内科、消化器肝臓内科、呼吸器内科、消化器外科、小児外科、泌尿器科、整形外科、皮膚科等の教室が参画し、主に新規遺伝子制御薬ピロール・イミダゾールポリアミドの創薬開発研究を行っている。

2. ピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドについて

PIポリアミドは1996年カルフォルニア工科大学のDervanらにより発見された低分子有機化合物で、DNAのマイナーグループ(狭い溝)を認識していることが分かった^{1,2)}。京都大学杉山らは1996年に抗生物質であるデュオカルマイシンAとディスタマイシンAが協同的なDNAのアルキル化能を有していることを発見し、それに基づいてこれまでPIポリアミドを基盤とした様々な機能分子を設計している³⁾。合成されたPIポリアミドは、Py/ImペアがCG, Py/PyペアはATまたはTA, Im/PyペアはGC

を認識し、これにより任意の二本鎖DNAに塩基特異的に結合し、標的遺伝子を抑制することができる。PIポリアミドは遺伝子の転写調節領域に結合することにより、転写に関わる因子(基礎転写因子や転写制御因子)の結合を阻害し、遺伝子発現を制御する(図1)。

PIポリアミドは、あらゆる標的遺伝子に対して合成することができるため、阻害する転写因子を選択することで遺伝子の抑制効果を任意に調節することができる。また、既存のアンチセンスDNA, siRNAなどの核酸医薬と異なり、核酸構造を持たない低分子化合物であり生体内投与においてDDSを必要とせず、単独投与にて細胞の核、生体内でも臓器の核に効率よく長時間取り込まれる。またPIポリアミドはsiRNAと違い、遺伝子をロックダウンするのではなく、疾患の状態で転写活性が亢進した遺伝子発現を正常レベルまで戻す遺伝子制御であり、通常の転写活性にある場合には影響しないため、創薬での副作用の面での利点がある。

3. PIポリアミドの創薬開発

1) PIポリアミドの合成法の開発

今までPIポリアミドの最大の問題点は合成の難しさであった。そのためPIポリアミドの研究が行える施設は世界的にも極わずかであった。我々の研究グループはFmoc法による固相自動合成で、縮合活性化剤としてHCTUを用い、それに最も適切な

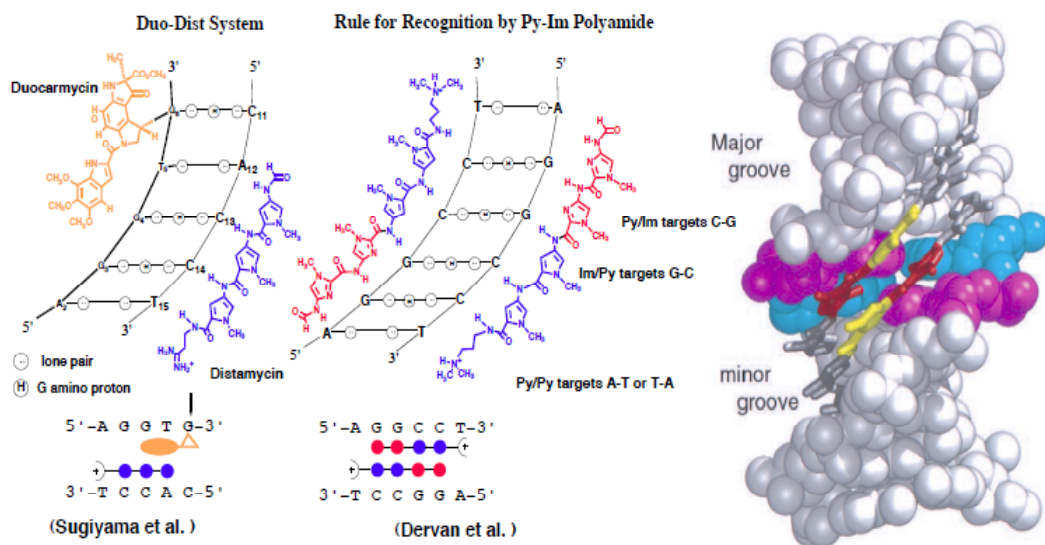


図1. PIポリアミドの二本鎖DNAのマイナーグループへの結合。

合成条件，合成機のセットアップを行った。また従来最も合成困難であったイミダゾールピロール配列に対しては，ピロール酸塩化物を用いた手合成法により定量的に合成することに成功した。この方法を基に，日本大学でさらに改良し，現在99%の純度で合成，精製し，1回に100mg以上の合成が可能となっている。またPIポリアミドの分子設計でのβリンカー挿入構造によりいかなる塩基配列に対しても，対応する分子の設計が可能となった。

2) PIポリアミドの物性と薬物動態研究

薬学部ではPIポリアミドのUV-HPLCでの定量系を確立し，薬物動態を検討としてPIポリアミドをラットに静注し，殆どが尿排泄で，一部胆汁排泄であり，分子量が大きくなると血清での減衰は緩やかであり，臓器に長期結合している事が明らかとなった^{7,8)}。

ラットでFITCラベルしたPIポリアミドを静脈より投与し14日後まで腎臓では尿管，糸球体の核に取り込みが見られた(図2)。大動脈では内皮や平滑筋層に取り込みが観察され，PIポリアミドは強力かつ長期の核への結合が認められた。肝臓，肺にも取り込みが見られたが，心臓，脳には取り込みが認められなかった。

3) PIポリアミドの毒性安全性試験

大量投与安全性試験としてPIポリアミドをマウ

スの静脈内に大量単回投与を行った。PIポリアミドをマウスに急速静脈内投与すると40 mg/kg以上では，PIポリアミドの粘性の為マウスは死亡した。投与量20 mg/kg以下では全く健康で，臓器障害もなかった。反復投与毒性試験では，大量のPIポリアミドをマウスに投与し，体重，摂餌量，飲水量，血液化学的検査，尿検査，組織学的検査を検討したが，特に副作用は認められず，薬として開発可能と考えられた。

4) TGF-β 1に対するPIポリアミドの創薬開発

TGF-β 1は細胞外基質の増生，線維芽細胞の遊走に関与し，腎炎，血管狭窄，肝硬変症，肺線維症などの線維性疾患の責任分子であるが，未だにTGF-β 1を抑制する実地薬剤は無い。そこで我々は，TGF-β 1に対するPIポリアミドを用いて，進行性腎障害や肝硬変，肺線維症，皮膚癬痕などの線維性疾患の遺伝子治療の目的で創薬開発を行った^{4,11)}。進行性腎障害のモデルラットである高食塩負荷のDahl食塩感受性ラットにTGF-β 1に対するPIポリアミドを2週間，静注投与すると著明に尿蛋白と腎内TGF-β 1 mRNA発現を抑制した(図3)。更に4週間投与を行ったところ，腎臓の組織障害の改善効果がみられた。TGF-β 1に対するPIポリアミドの前臨床試験として，ラットに長期投与したところ，体重や摂餌量には影響せず，血清でも通常の薬剤と同様な薬物動態を示した。これらの成績から疾患モデル

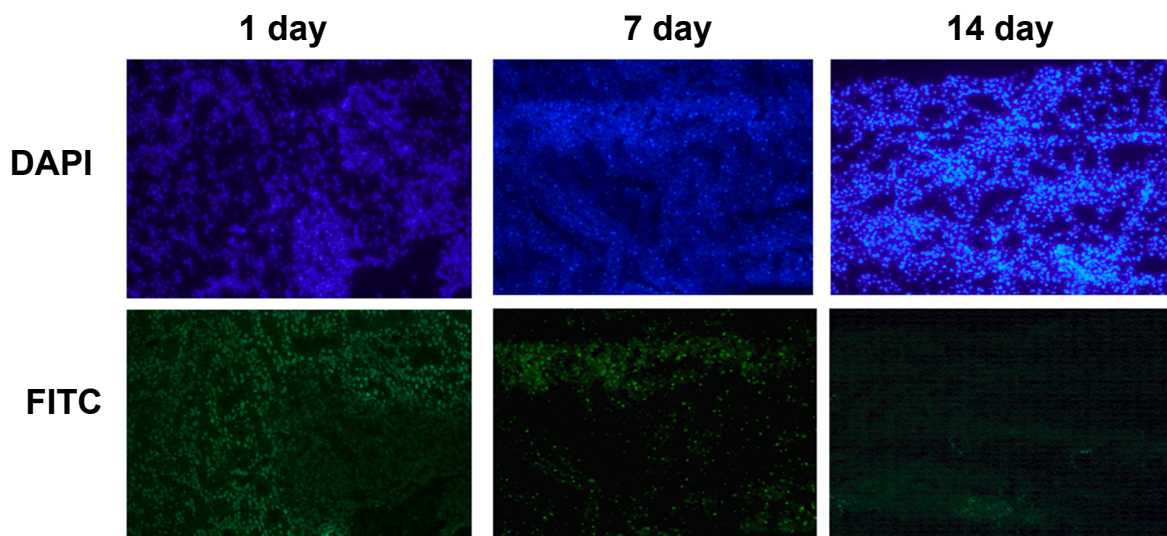


図2. FITCラベルPIポリアミドの静脈投与後の14日後まで腎臓尿管，糸球体での核への取り込み。

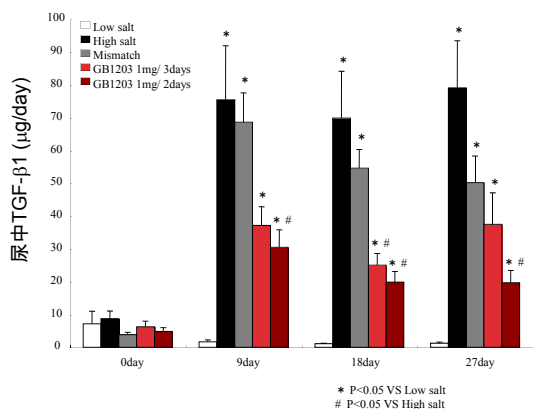


図3. Dahl食塩感受性ラットにTGF-β1に対するPIポリアミドを4週間、静注投与すると著明に尿中TGF-β1排泄を投与量依存性に抑制した。

においてPIポリアミドの遺伝子治療としての有用性が示唆された。

5) ヒトTGF-β1のPIポリアミドの前臨床試験

我々はヒトTGF-β1のプロモーターに対するPIポリアミドを7つ分子設計した。その中からヒト線維芽細胞培養系を用いて、TGF-β1 mRNA発現を最も強く抑制するリードPIポリアミドを選定した。我々はリード決定したヒトTGF-β1に対するPIポリアミドについて、ヒトゲノムと相同性の高い霊長類マーモセットを用いて前臨床試験を行う事とし

た。マーモセットは新世界猿に属し、その繁殖性の高さから、製薬会社を含め創薬開発前臨床試験で用いられる。日本大学内にマーモセット飼育施設がないため、平成24年度より川崎市にある公益法人実験動物中央研究所と日本大学との契約で、TGF-β1に対するPIポリアミドの創薬開発共同研究を開始した。マーモセットの皮膚にTGF-β1に対するPIポリアミドを局所注射して、切創を作成、42日後の皮膚肥厚性癬痕形成を評価した。PIポリアミドを注射した皮膚では肥厚性癬痕は殆ど出来なかった。また組織学的にも皮膚肥厚、線維化、ビメンチン陽性線維芽細胞浸潤を著明に抑制した(図4)。

さらに皮膚肥厚性癬痕に対しTGF-β1に対するPIポリアミドを医学部附属板橋病院薬剤部製剤室で軟膏化した。FITCラベルしたPIポリアミドを5種類(ワセリン、プラスチベース、親水軟膏、ソルベース、サンジェロース)の水性基剤と水溶性基剤と組み合わせで調合しサンプルを作製し、ラットの背部の皮膚癬痕に塗布し、皮膚への到達度を検討し、ソルベースを基剤としたPIポリアミドが最も皮膚へのデリバリーが高かった。

平成25年度には進行性腎障害のバイオ医薬として、TGF-β1に対するPIポリアミドの効果を検証するため、マーモセットにシクロスポリン腎症を作成し、PIポリアミドの効果を検証する計画である。

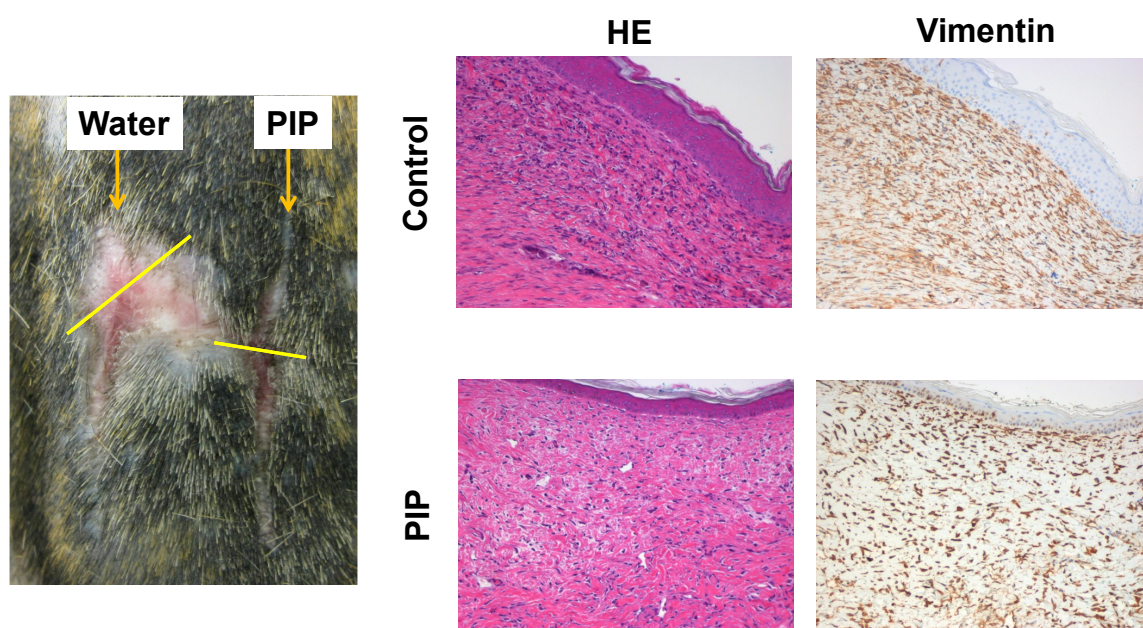


図4. マーモセット皮膚癬痕モデルに対するTGF-β1に対するPIポリアミド抑制効果。

6) 抗腫瘍効果を持つPIポリアミドの創薬開発

難治疾患治療開発グループではMYC結合E-box配列CACGTGを完全にまたは部分的に認識するPIポリアミドがヒト骨肉腫細胞株、慢性骨髄性白血病細胞株に対し増殖抑制効果を示す事を確認した。骨肉腫細胞株を用いた詳細な解析により、同ポリアミドがアポトーシスを誘導すること、マウス皮下腫瘍モデルにおいても抗腫瘍効果を示すことを確認した。泌尿器科のグループは前立腺癌においてアンドロゲン受容体に依存したTMPRSS2-ERG融合遺伝子の切断・転座を抑制するPIポリアミドを開発し、前立腺癌細胞増殖能と遊走能ともに抑制する事を認め、特許化し創薬開発を行っている。小児外科のグループでは、LIT1遺伝子プロモーター領域のCAAT boxに結合するよう作成したPIポリアミドが肝芽腫細胞株、腎芽腫細胞株で、LIT1遺伝子発現抑制と抗腫瘍効果を認めた。

7) サイクリックPIポリアミドの創薬開発

これまでのPIポリアミドの構造はヘアピン型で、Kd値は10-9Mであったが、2本鎖DNAへの結合が不安定になることが問題であった。サイクリックPIポリアミドはポリアミドの構造を環状にすることにより、2本鎖DNAに安定に結合し、理論上は100~10分の1の濃度で2本鎖DNAに結合するため、最終的な創薬に有利である。日本大学では京都大学との共同研究でサイクリックPIポリアミドの合成に成功した。そこでサイクリックPIポリアミドの薬効、薬物動態をヘアピンPIポリアミドに比較検討し、創薬開発を行っている。

8) TGF-β1に対するPIポリアミドによる日大式ヒトiPS細胞誘導法の開発

近年iPS細胞をソースとした再生医療実現化に向けて世界中で研究が行われているが、現時点では初期化因子の導入はウイルスを用いる手法が主流であるため安全性に問題がある。近年、山中4因子による転写レベルでのiPS誘導のメカニズムは、E-カドヘリンの増加とTGF-β1の抑制による、間葉細胞の上皮化(mesenchymal-epithelial transition:MET)によることが報告された¹²⁾。一方、生物資源科学部の舩廣らは蛋白を細胞内に高効率に導入するSutabilon蛋白を開発している。そこで我々は舩廣研究室

と共同研究としてヒトiPS細胞誘導時にSutabilon結合初期化因子を導入、さらにフィーダー細胞にリシードした時にTGF-β1に対するPIポリアミドを用いる事により、より安全な日大式iPS細胞法を開発している。

5. 今後の展望

現在の難治疾患に対する創薬は、候補物質からの実際の薬となる確率が32,500分の1である昨今、製薬会社が自社での化合物候補探索・研究から、大学のバイオ医薬候補に目を向け始めた。しかし、大学でのアーリーシーズを製薬会社がライセンス購入した場合、その後の開発費用が莫大となるため、製薬会社は大学独自で臨床第I相まで開発し、発癌、安全性などGLPで検証したシーズを求めている。そこで当研究プロジェクトのように大学研究機関のみで、これまで有効な薬剤の無かった難治性疾患に対し創薬開発を行い、臨床科におけるGMP、GLPレベルの検証まで行える研究拠点で、臨床第I相までの開発研究を行うことは、先駆的な研究を臨床応用という実践的研究に結び付けることを可能にする極めて意義深い試みと言える。この基盤形成に基づく研究体制が確立し、臨床応用への対応ができる体制が整えば、これを範として広く国内にゲノム化学、ゲノム創薬の新たな展開を切り開くことができ、ゲノム産業における国際的な形勢を本国が十分に逆転できる可能性もあると言って過言ではないと考えられる。

文献

- 1) Trauger JW, Baird EE, Dervan PB. Recognition of DNA by designed ligands at subnanomolar concentrations. *Nature* 1996; 382: 559-561.
- 2) Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem* 2001; 9: 2215-2235.
- 3) Sugiyama H, Lian C, Isomura M, et al. Distamycin A Modulates the Sequence Specificity of DNA Alkylation by Duocarmycin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14405-14410.
- 4) Lai Y-M, Fukuda N, Ueno T, et al. Synthetic pyrrole-imidazole polyamide inhibits human transforming growth factor-β1 gene expression. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 571-575.
- 5) Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Development of gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeted to the TGF-β1 promoter for treatment of progressive renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 422-432.
- 6) Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Transcriptional regulation of progressive renal disease by the gene

- silencing pyrrole-imidazole polyamide targeted to the TGF- β 1 promoter. *Kidney Int* 2011; **79**: 46-56.
- 7) Fukasawa A, Nagashima T, Aoyama T, et al. Optimization and validation of a high-performance liquid chromatographic method with UV detection for the determination of pyrrole-imidazole polyamides in rat plasma. *J Chromatograph B* 2007; **859**: 272-275.
- 8) Nagashima T, Aoyama T, Yokoe T, et al. Pharmacokinetic modeling and prediction of plasma pyrrole-imidazole polyamide concentration in rats using simultaneous urinary and biliary excretion data. *Biol Pharm Bull* 2009; **32**: 921-927.
- 9) Yao E-H, Fukuda N, Ueno T, et al. A novel gene silencer pyrrole-imidazole polyamide targeting TGF- β 1 inhibited restenosis and preserved endothelialization in the injured artery. *Cardiovasc Res* 2009; **81**: 797-804.
- 10) Washio H, Fukuda N, Matsuda H, et al. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer. *J Invest Dermatol* 2011; **31**: 1987-1995.
- 11) Ichida JK, Blanchard J, Lam K, et al. A small-molecule inhibitor of tgf-beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* 2009; **5**: 491-503.

Dual-lead SCSを用いた脳卒中後疼痛の治療

山本隆充¹⁾, 大淵敏樹²⁾, 加納利和²⁾, 小林一太²⁾, 大島秀規²⁾,
深谷 親¹⁾, 吉野篤緒²⁾, 片山容一²⁾

Dual-lead SCS for the treatment of post-stroke pain

Takamitsu YAMAMOTO¹⁾, Toshiki OBUCHI²⁾, Toshikazu KANO²⁾, Kazutaka KOBAYASHI²⁾,
Hideki OSHIMA²⁾, Chikashi FUKAYA¹⁾, Atsuo YOSHINO²⁾, Yoichi KATAYAMA²⁾

要旨

私立大学戦略的基盤形成支援事業の研究拠点を形成する研究（ニューロモデュレーションセンターの構築と医療連携）において、脳神経外科学系で行なっている脳卒中後疼痛の新たな治療法について報告する。これまで脳卒中後疼痛は脊髄刺激療法の適応外と考えられていた。しかし、複数の電極を平行に脊髄硬膜外に挿入して刺激を行なうDual-lead SCSを用いることによって、脳卒中後疼痛症例においても脊髄刺激が有効であることを明らかにした。さらに、Dual-lead SCSに抗うつ薬、抗不安薬、プレガバリンを投与し、低用量ケタミン点滴療法を併用することで、刺激の効果を増強することも可能であり、脳卒中後疼痛に対する治療法として期待される。

1. はじめに

私立大学戦略的基盤形成支援事業の研究拠点を形成する研究（ニューロモデュレーションセンターの構築と医療連携）では、慢性植込み型脳脊髄刺激装置、植込み型髄腔内薬液注入ポンプ、高頻度経頭蓋磁気刺激装置などを用いたニューロモデュレーション技術を用いて、難治性疼痛、不随意運動、運動麻痺、意識障害、痙縮、癲癇などの治療を行なう。さらに、ニューロモデュレーションセンターを構築し、新たな脳脊髄機能制御・再建のための研究拠点を形成することを目的としている。このため、脳神経外科学系、神経内科学、ペインクリニック、リハビリテーション医学、精神医学、泌尿器科学などの研究者が連携して研究をおこなっている。本稿では、脳神経外科学系で行なっている脳卒中後疼痛の新たな治療法について報告する。

脊髄刺激（Spinal Cord Stimulation）は、局麻下に脊髄硬膜外針を用いて経皮的に脊髄硬膜外腔に刺激電極を挿入することが可能であるので、脳深部に刺激電極を挿入する脳深部刺激療法（DBS）^{1,4)}や開頭

によって大脳皮質運動野上の硬膜外に刺激電極を留置する大脳皮質運動野刺激（MCS）^{5,8)}と比較して、容易に試験刺激を行うことができる利点があり、多くの難治性疼痛の治療法として、第一に選択されることが多い（図1）。脊髄刺激では、疼痛部に刺激によって誘発される感覚（paresthesia）を誘発し、非疼痛部にはparesthesiaを誘発しないように電極を留置するのが最良の方法である。しかし、これを達成するためには、脊髄硬膜外に留置した1本の刺激電極を用いる方法では限界があった⁹⁾。

最近の脊髄刺激装置の進歩によって、2本の刺激電極を1つの刺激装置と結線することが可能となり、2本の電極を平行に挿入することにより、電極間の刺激も可能となった（Dual-lead SCS）。これまでは電極の挿入方向に一致した縦方向の刺激のみが可能であったが、横方向の通電も可能となった。さらに、多数の刺激部位の組み合わせパターンを使用することも可能となった。

しかし、脳卒中後疼痛には難治性のものも多く、最新の脊髄刺激装置を用いても、脊髄刺激のみでは

1) 日本大学医学部脳神経外科学系応用システム神経科学分野、
2) 脳神経外科学系神経科学分野
山本隆充：yamamoto.takamitsu@nihon-u.ac.jp

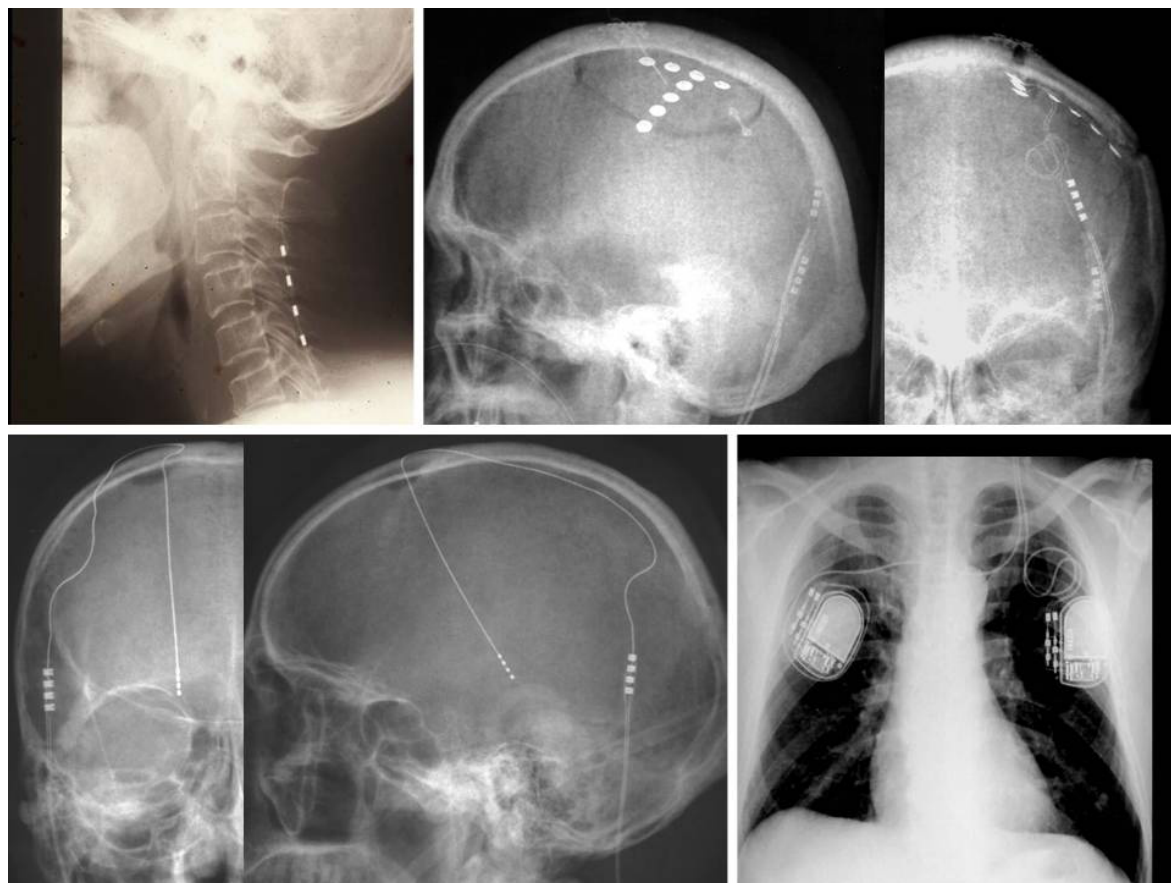


図1 各種脳脊髄刺激システム。

脊髄刺激（左上），大脳皮質運動野刺激（右上），脳深部刺激（左下），植込み型刺激装置（右下）

十分な除痛効果を得ることが困難な症例も存在する。我々は、脳卒中後疼痛には、抗うつ剤、抗不安薬、プレガバリンに加えて、低用量ケタミン点滴療法が有用であることを報告してきた¹⁰⁾。また、脊髄刺激の適応決定にはドラッグチャレンジテストが必要で、ケタミンテストによって除痛効果の得られる症例が良い適応となることを報告してきた¹¹⁾。そこで本研究では、ケタミンテストで除痛効果が得られる症例に対して最新の脊髄刺激装置を用いた脊髄刺激療法（Dual-lead SCS）を行い、抗うつ剤、抗不安薬にガバペンチンあるいはプレガバリンの投与に加えて、低用量ケタミン点滴療法の併用を行ない、長期の治療効果について検討した。

2. 方法

1) 新たな脊髄刺激装置

最新の脊髄刺激装置では、1個の刺激装置に2本の刺激電極を結線することができるので、1本の電

極に4か所の刺激点を有する刺激電極を2本用いることによって $4 \times 2 = 8$ 極、また1本の電極に8か所の刺激点を有する刺激電極を2本用いることによって $8 \times 2 = 16$ 極の刺激ができる。さらに、多数の刺激点を自由に選択できるので、多彩なプログラミング機能を用いることができる特徴がある。メドトロニック社製の3種の刺激装置（シナジー、プライムアドバンスト、リストアセンサー）を用いれば、いずれの刺激装置でもDual-lead SCSを施行することができる。シナジー刺激装置では、チャンネル1とチャンネル2で、合計2チャンネルで別々の刺激条件を選択し、2チャンネル同時の刺激が可能である。

一方、プライムアドバンストまたはリストアセンサーを用いれば、チャンネル1～4まで、それぞれのチャンネルで16極から刺激点の選択（陽極と陰極の複数の選択が可能）、刺激幅、刺激強度を選択することができる。ただし、周波数だけはチャンネル1～4で同一の設定となる。また、このチャンネル

1～4の設定をグループAとすると、刺激をグループAに指定することによって、設定したチャンネル1～4までの刺激を同時に行うことができる。さらに、同様にグループAからグループZまで26種類のグループを設定することができる。通常の刺激では、26種類の刺激をグループ設定することは稀であるが、脳卒中後疼痛では広範囲に疼痛を認めることが多いので、このような機能は大変に有用である(図2)。

2) ドラッグチャレンジテスト(日本大学脳神経外科)

ケタミンテストは、5分間隔で生食を2回投与後、同様に5分間隔でketamine hydrochlorideを5mg、合計25mgまで静脈内投与する。モルヒネテストは、同様に5分間隔でmorphine hydrochloride 3mgを合計18mgまで静脈内投与し、サイオペンタールテストは、同様に50mgのthiopental sodiumを、5分間隔で合計250mgまで静脈内投与している。サイオペンタールテストで入眠直前までVASが変化しない症例については、Dual-lead SCSの適応外としている。また、途中で入眠した場合は、その時点でテストを中止する。

Visual Analogue Scale (VAS) を連続的に測定し、(薬物投与後VAS ÷ 薬物投与前のVAS) × 100% = %VASとして、%VASが60%以下となったもの、す

なわち薬物投与前と比較して、VASが40%以上減少したものをケタミン反応例、40%以下のものをケタミン抵抗例とした¹²⁾。

3) 低用量ケタミン点滴療法

ドラッグチャレンジテストでケタミン反応例に対して、100mlの生食に20mgのケタラール®(0.33mg/Kg)を加え、約1時間かけて点滴する。本法については、通常は2週間ごとに外来で点滴投与を行なう。本研究については、日本大学板橋病院臨床研究審査委員会の承認を得て行なった。

また併用薬として、塩酸マプロチニン(Ludiomil®) 10～30mg/day、プロマゼパム(Lexotan®) 2～6mg/dayに加えて、プレガバリン(Lyrica®) 150～600 mg/dayを経口投与する(表1)。

表1 低用量ケタミン点滴療法(日本大学脳神経外科)。

1. 生食100ml + ケタラール® 20mg (0.33mg/Kg)
1時間かけて点滴、2週に1度(外来通院)
2. 塩酸マプロチニン(ルジオミール®) 10 - 30mg/day
3. プロマゼパム(レキソタン®) 2 - 6mg/day
4. ガバペンチン(ガバペン®) 600 - 2400 mg/day
または
プレガバリン(リリカ®) 150 - 600 mg/day

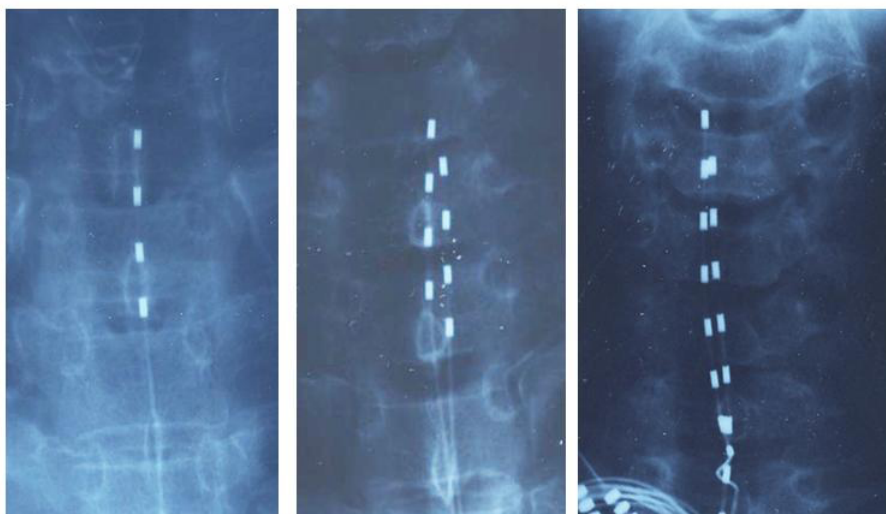


図2 Single-lead SCSとDual-lead SCS。
Single-lead SCS (左), 4×2のDual-lead SCS (中央), 8×2のDual-lead SCS(右)

4) 対象と効果判定

脳卒中後疼痛の症例で、ケタミンテストで疼痛の抑制を認め、Dual-lead SCSを施行して2年以上経過している12例について、長期効果を検討した。全例に抗うつ薬、抗不安薬、に加えてプレガバリンを投与し、必要例には低用量ケタミン点滴療法を併用している。年齢は42～73歳(63.4±9.4)で、男性6例、女性6例。Dual-lead SCSの前後でVASの減少率が60-100%の症例をExcellent、30-59%の症例をGood、0-29%の症例をFairとした。

5) Dual-lead SCSの方法

脊髄刺激電極は、レントゲン透視下に脊髄硬膜外針を用いて、経皮的に脊髄硬膜外腔に挿入した。2本の電極の合計8箇所(4×2)あるいは16箇所(8×2)の刺激点から複数の刺激点を選択し、最適の刺激部位を決定した。下肢の疼痛に対しては下位胸椎レベルのDual-lead SCS、上肢の疼痛には下位頸椎レベルのDual-lead SCS、また顔面を含む半身全部の疼痛に対しては、8極電極を2本上位頸椎レベル

から下位頸椎レベルをカバーするDual-lead SCSを行なった。

3. 結果

12例全例で疼痛部位に局限したparesthesiaを誘発することが可能であった。特に、第2頸椎レベルの刺激を行なうと、顔面にもparesthesiaを誘発することが可能であることが明らかとなった(図3)。Dual-lead SCSによる除痛効果について、2年以上の長期フォローアップの結果では、12例中4例がExcellent、6例がGood、2例がFairであった。

VASの減少率からDual-lead SCSの効果がFairと判定されたものが2例存在したが、これらの症例も含めて全例で低用量ケタミン点滴療法後には著しい疼痛の軽減を認め、Dual-lead SCSの効果増強も自覚することが出来た。

4. 考察

脳卒中後疼痛120例に対するケタミンテストの結果では、55例(45.8%)において自発痛が抑制され、

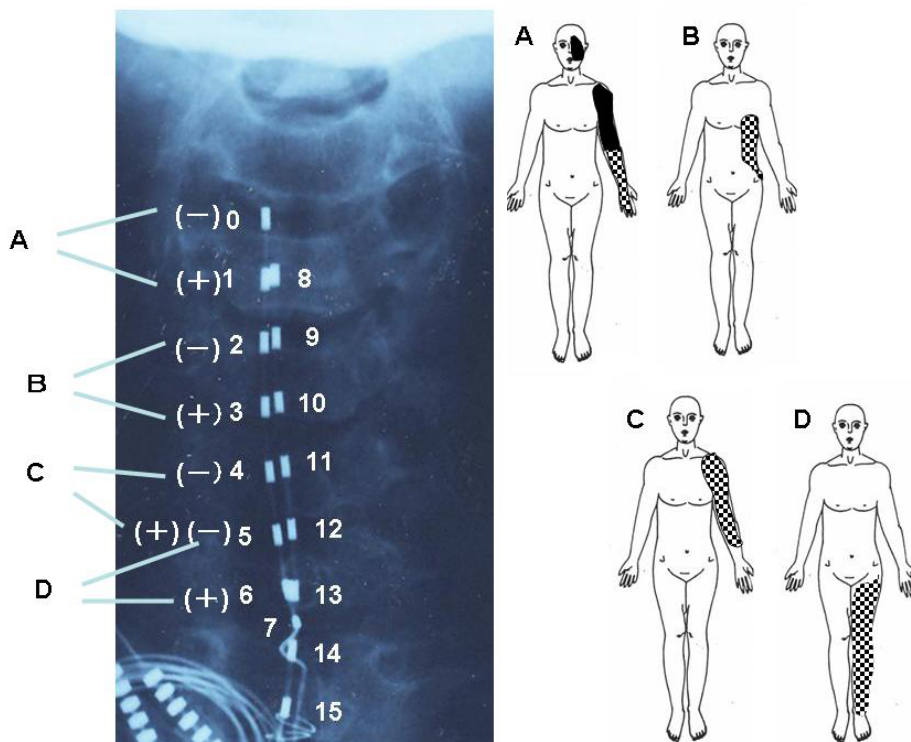


図3 顔面を含む半身のpost-stroke painに対するDual-lead SCS。

Aの組み合わせで刺激すると、1.0Vの刺激では右肘部、1.6Vでは右肘～前腕、2.1Vでは左顔面から左上肢にparesthesiaが誘発された。Bの組み合わせでは脇腹、Cの組み合わせでは上腕、Dの組み合わせでは下肢にparesthesiaを誘発することができた。

アロデニアなどの誘発痛を加えると、63例(52.5%)で疼痛が抑制された。また、ケタミン反応例では、ケタラール®20mgの静脈投与によってVASが70%以上減少し、それ以上の投与量を用いても明らかな変化を認めなかった。そこで、ケタミン投与量を20mg(0.33mg/Kg)に決定し、生食100mlに加えて1時間かけて点滴を行う低用量ケタミン点滴療法を行った。

これまでにケタミンが麻酔薬として使用される場合は、ケタミン1~2mg/kgを1分以上かけて静注、あるいは5~10mg/kgを筋注する方法が用法、用量として推奨されている。一方、低用量ケタミン点滴療法は、ケタミン0.33mg/kgを100mlの生食に加え、1時間かけて点滴投与する方法で、全く別の使用方法である。ケタミンの点滴中でも覚醒状態で患者さんの状態を確認し、精神状態ならびに疼痛の変化を確認することができる。また、脳卒中後疼痛では、この程度の投与量で十分な除痛効果を得ることができる^{10,11)}。

ケタミン点滴療法の明らかな除痛効果は数時間のことが多いが、その後も疼痛の改善を自覚することが多いことから、central sensitizationの解除に有効であると報告されている¹³⁻¹⁸⁾。疼痛が持続して難治性となっている症例においては、一時的であっても疼痛から開放される時間を提供することによって、増大した痛みをリセットすることができ、日常の生活も改善される。さらに、抗うつ薬、抗不安薬、プレガバリンの内服を併用することによって、持続的な除痛効果を得ることができ、患者さんの負担も少なく、日常の生活改善を図ることができる。

長期的に低用量ケタミン点滴療法を施行した26例の検討では、点滴後に明らかに疼痛が抑制される持続時間は1時間から6時間以内が最も多く、24時間以内が77%であったが、24時間以上持続するものも23%存在した。長期投与によるケタミン耐性の有無についての検討では、20mgで開始した26例中、6ヶ月後も20mgが19例、21~30mgが5例、10~19mgが2例で、モルヒネのような耐性は認めなかった^{10,11)}。ケタミンの投与では、不快な情動反応や気分不良などの副作用が問題となる。しかし、このような副作用の出現は、ケタミンテストによって疼痛が抑制されない症例に限られていた。低用量ケタミン点滴療法は、ケタミンによって疼痛が抑制される

ケタミン反応例に施行するので、副作用の頻度は僅かである。また、出現しても嘔気、頭重感などであり、副作用が出現しても、投与量ならびに投与時間の調整によってコントロールが可能であった¹⁹⁾。

これまでの脊髄刺激装置はアイトレル3が用いられてきたが、アイトレス3では接続できる脊髄刺激電極は1本で、最高でも選択できる刺激点は4箇所であった。また、電極の走行に沿った刺激のみが可能であった。一方、最新の脊髄刺激装置では、2本の電極の合計8~16箇所の刺激点を自由に選択可能であり、陽極と陰極を選択すれば2本の電極間での刺激も可能となった。2本の電極を用いて16箇所までの刺激点を、それぞれ陽極または陰極で刺激することが可能であり、これまでは不可能であった各種の刺激部位の組み合わせパターンを脊髄刺激による痛みの治療に応用することが可能となった。また、8極電極を2本用いて経髄レベルでDual-lead SCSを行なうことによって、顔面を含む半身全部にparesthesiaを誘発することができる事実を明らかにすることができた。

これまで疼痛に対する脊髄刺激療法の有効例はfailed-back pain, CRPS, 四肢の血流障害などに限られることが多かった。しかし、新たに使用可能となったDual-lead SCSを行なうことによって、脳卒中後疼痛症例においても疼痛部位を完全にカバーしながら非疼痛部位にはparesthesiaを誘発しない刺激を行うことができるようになった²⁰⁾。また、低用量ケタミン点滴療法を併用することによって多くの症例で十分に満足できる結果が得られた。これまで脊髄刺激の適応外と考えられていた脳卒中後疼痛症例においても、Dual-lead SCSに抗うつ薬、抗不安薬に加えてプレガバリンを投与し、低用量ケタミン点滴療法を併用することで、十分に治療可能であり、今後のさらなる発展が期待される。

文献

- 1) Mazars GJ: Intermittent stimulation of nucleus ventralis posterolateralis for intractable pain. *Surg Neurol* 1975; 4: 93-95.
- 2) Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, et al: Deafferentation pain and stimulation of thalamic sensory relay nucleus: clinical and experimental study. *Appl Neurophysiol* 1985; 48:166-171.
- 3) Kumar H, Toth C, Nath RK: Deep brain stimulation for intractable pain: A 15-year experience. *Neurosurgery* 1997; 40: 736-746.

- 4) Yamamoto T, Katayama Y, Obuchi T, et al.: Thalamic sensory relay nucleus stimulation for the treatment of peripheral deafferentation pain. *Stereotact Funct Neurosurg* 2006; 84: 180-183.
- 5) Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, et al.: Chronic motor cortex stimulation in patients with thalamic pain. *J Neurosurg* 1993; 78: 393-401.
- 6) Katayama Y, Fukaya C, Yamamoto T, et al.: Post-stroke pain control by chronic motor cortex stimulation: neurological characteristics predicting a favorable response. *J Neurosurg* 1998; 89: 585-591.
- 7) Nguyen JP, Keravel Y, Feve A, et al.: Treatment of deafferentation pain by chronic stimulation of the motor cortex: Report of a series of 20 cases. *Acta Neurochir (wien)* 1997; 68: 54-60.
- 8) Saitoh Y, Shibaya M, Hirano S, et al.: Motor cortex stimulation for central and peripheral deafferentation pain: Report of eight cases. *J Neurosurg* 2000; 92: 150-155.
- 9) Kumar K, Toth C, Nath RK, et al.: Epidural spinal cord stimulation for treatment of chronic pain-some predictors of success: a 15-year experience. *Surg Neurol* 1998; 50: 110-120.
- 10) 山本隆充, 大淵敏樹, 小林一太, 他: Post-stroke painの特徴と治療, *ペインクリニック別冊* (山本隆充編 求心路遮断痛の診断と治療) 2008; 29:119-126.
- 11) 山本隆充, 大淵敏樹, 小林一太, 他: ケタミン点滴療法, *ペインクリニック別冊* (山本隆充編 求心路遮断痛の診断と治療) 2008; 29: 263-272.
- 12) Yamamoto T, Katayama Y, Hirayama T, et al.: Pharmacological classification of central post-stroke pain: comparison with the results of chronic motor cortex stimulation therapy. *Pain*, 1997; 72: 5-12.
- 13) Backonja M, Arndt G, Gombor KA, et al: Response of chronic neuropathic pain syndrome to ketamine: a preliminary study. *Pain* 1994; 56: 51-57.
- 14) Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, et al: Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 1993; 52: 259-285.
- 15) Davies SN, Lodge D: Evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in wind-up of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat, *Brain Res* 1987; 424: 402-406.
- 16) Gerber G, Randic M: Participation of excitatory amino acid receptors in the slow excitatory synaptic transmission in the rat spinal cord in vitro. *Neurosci Lett.* 1986; 70: 143-147.
- 17) Goldberg ME, Domskey R, Scaringe D, et al: Multi-day low dose ketamine infusion for the treatment of complex regional pain syndrome, *Pain Physician.* 2005; 8: 175-179.
- 18) Haley JE, Sullivan AF, Dickenson AH: Evidence for spinal NMDA receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat, *Brain Res.* 1990; 518: 218-226.
- 19) Yamamoto T, Katayama Y, Obuchi T, et al.: Drug-challenge test and drip infusion of ketamine for post-stroke pain. *Pain Research* 2009; 24: 191-199.
- 20) Holsheimer J, Nuttin B, King GW, et al.: Clinical evaluation of paresthesia steering with a new system for spinal cord stimulation. *Neurosurgery* 1998; 42: 541-549.

利用実態からみた形態系の役割とその変化

井上広一¹⁾, 地家豊治¹⁾, 黒江裕子¹⁾, 岡 宏¹⁾, 杉谷雅彦¹⁾

Role of the Section of Morphology and Recent changes of User's needs

Koichi INOUE¹⁾, Toyoharu JIKE¹⁾, Hiroko KUROE¹⁾, Hiroshi OKA¹⁾, Masahiko SUGITANI¹⁾

中央写真室

中央写真室では、「教育・研究・医療」の視覚情報に関わる業務を行っており、主な業務内容は「写真・ビデオの撮影」「グラフィック/データ処理」「各種メディア出力」となっています。

「写真・ビデオの撮影」では、生体記録・画像入力・マクロ・顕微鏡・検体のほか、行事・講習会・証明写真などと撮影状況は多岐にわたり、ここ数年では講習会ビデオ撮影が増えています。

これは、法規制などで受講を義務付けられる講習が増えたことに比例しており、また行事撮影に至っては、事業所で著作権を所有するという目的から主だった学部行事は必ず撮影を行います。

「グラフィック/データ処理」は、写真・ビデオ共にデジタル撮影であるため、撮影後のグラフィック/データ処理が必須となっており、さらに個人情報保護法に伴い写真やビデオの修正・加工など比較的手間のかかる編集作業が増えてきました。

「各種メディア出力」では、学会でのポスターセッションが増えたため、大判プリント（ポスター）出力が増えています。それに伴い用途に応じて普通紙から布タイプまで数種類のロール紙から好みの用紙を選択できるようにしています。

10年前までは、生体記録・マクロ・顕微鏡・検体の撮影依頼、及びプリント依頼が業務の中心であり、当時は「撮影はフィルム」「印画紙プリントは暗

室]で行っていました。

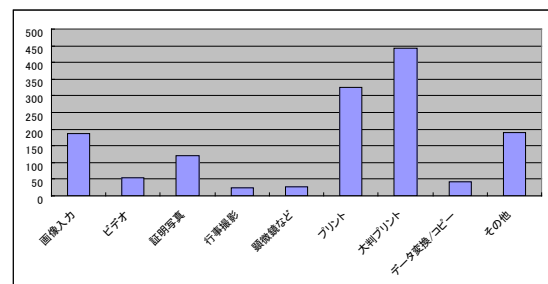
近年ではデジタルカメラの高機能化で撮影ミスが減少したことから、医療現場では医師自らが記録撮影を行ない、プリントはせずにデータ保管するケースが増えています。

このように、中央写真室の業務も時代とともに変わりつつあります。

フィルムカメラがデジタルカメラに代わり、印画紙を使ったプリント作業はプリンター出力へと代わったように、今後スチルカメラはムービーカメラの一部となり、2Dのプリンターに加え3Dプリンターの普及も予測されています。

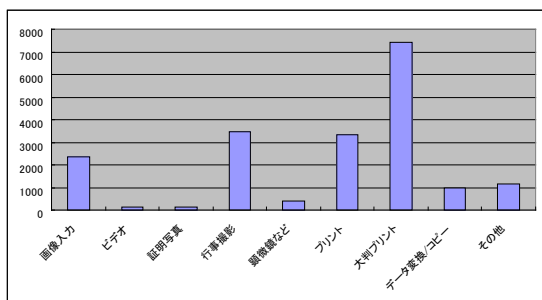
中央写真室もまた、より高度な視覚情報を提供できるようにしていきたいと思えます。

【資料】

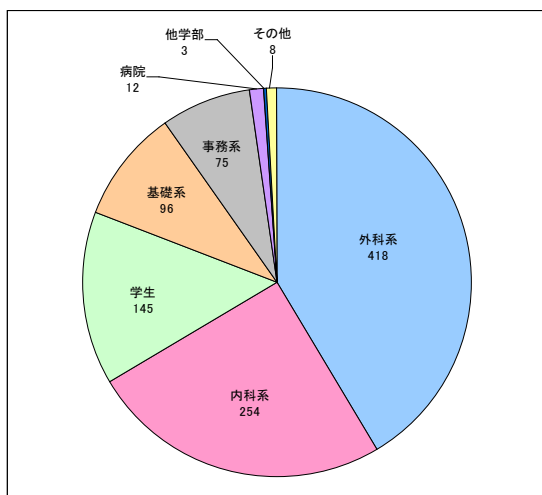


平成24年度作業別依頼件数 (件)

1) 日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門形態系
井上広一: inoue.koichi@nihon-u.ac.jp



平成24年度作業別処理枚数 (枚)
 ※ビデオ (撮影/編集/ダビング) は30分単位を「1」としています。
 ※大判プリントはロール (最大30m) のため、10cmを「1」としています。



平成24年度系列別依頼件数 (件)

電子顕微鏡室

電子顕微鏡室には医学・生物学分野における超微形態観察に対応するため、透過型電子顕微鏡・走査型電子顕微鏡また光学顕微鏡、その他の標本作製に必要な機器が設置されています。

当室は医学部における基礎研究・臨床診断および学生実習に活用されています。

様々な研究観察目的に応じ標本作製・観察の支援を行い、各々研究者の観察目的に最適な手技の選択、固定液・緩衝液の調整・試料作製・標本観察の補助に至るまで、すべての過程にわたり技術支援を行っています。医学・生物学分野における組織や培養細胞また微生物といった標本作製・観察はもとより物質の超微構造に至るまで様々な観察目的に対し確かな知識と技術、さらに豊富な情報と経験をもつ

て研究支援を行います。

主な設置機器

透過電子顕微鏡 2機

ウルトラマイクロトームにて作製した厚さ60nm～80nmの切片を観察する。観察倍率は800倍から60万倍、通常加速電圧80KVにて使用

日本電子 JEOL-1200EX

JEOL-1200EX II

走査電子顕微鏡 1機

試料標本の表面観察を行う。観察倍率は25倍～30万倍、通常加速電圧3KVにて使用

日立 HITACHI S-4000 FE-SEM

ウルトラマイクロトーム

透過電子顕微鏡観察標本の光学顕微鏡・電子顕微鏡切片作製に使用

Leica ULTRACUT UCT

臨界点乾燥装置

走査電子顕微鏡標本作製の乾燥の行程にて使用

日立 Critical Point Dryer HCP-2

イオン蒸着装置

走査電子顕微鏡標本作製のPt—Pd蒸着行程にて使用

日立 ION Sputter E102

自動免疫染色装置

研究用システム 30枚のスライドを染色処理する事が可能

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

ベンタナ XTシステム ディスカバリー

海外学会発表

一般教育学系 物理学分野

M. Itoi, I. Maurin, K. Boukheddaden, et al. Intrinsic Structural decay of Metastable states in Photo-Switchable Molecular Magnet K_{0.32}Co [Fe (CN)₆]_{0.77} 3.6H₂O

Phase transition and Dynamical properties of Spin Transition Materials (PDSTM) (フランス, パリ) 2012;5

国内学会発表

一般教育学系 生物学分野

大竹 伸一, イオン液体-マボヤ血球走査型電子顕微鏡観察への応用。

医学生物学電子顕微鏡技術学会第28回学術講演会(岩手) 2012;5

医学生物学電子顕微鏡技術学会誌 Vol.26 No.2 p.15~16

大竹 伸一, 地家 豊治, 松本 なつき, 他, 「凍結技法」の応用によるマボヤ (*Halocynthia roretzi*) 血球 電子顕微鏡観察の試み。日本大学医学部 一般教育研究紀要 第40号 2012;12 p.45-53

一般教育学系 物理学分野

糸井充穂, I. Maurin, K. Boukheddaden, et al, CoFeシアン錯体の準安定高温相スピン状態の構造とドメイン形成

日本物理学会2012年秋季大会(於:横浜国大) 2012,9

発表題目所属: 日大医, Ecole Polytechnique, ベルサイユ大, ESRF, フロリダ大

学部生

松岡 俊, 地家豊治, 泉 泰之, 他, Pgingivalis由来LPSがヒト血管内皮細胞に及ぼす形態的変化の検討。医学生物学電子顕微鏡技術学会第28回学術講演会(岩手) 2012;5

内科学系 循環器内科学分野

大矢 俊之・加藤 真帆人, 高山 忠輝, 他, 心不全における心筋細胞間隙の臨床的意義に関する研究. 第34回心筋生検研究会(長野) 2012;10

大矢俊之, 奥村恭男, 渡邊一郎, 他, 健康診断にて指摘されたARVCの症例。

第9回心臓病理フォーラム(東京) 2012;2

古川力丈, 他, (謝辞内 地家豊治)。多源性心性期外収縮により発症した不整脈源性右室心筋症の一症例。第7回循環器エキスパートミーティング(東京) 2012;2

学内発表・カンファレンス

第1回 日本大学医学部心筋生検 Clinical Pathological conference 平成23年11月10日

日本大学医学部 内科学系循環器内科学分野, 病理病態学系病理学分野, 医学研究支援部門

第2回 日本大学医学部心筋生検 Clinical Pathological conference 平成24年1月17日

日本大学医学部 内科学系循環器内科学分野, 病理病態学系病理学分野, 小児科系小児科学分野, 医学研究支援部門

第3回 日本大学医学部心筋生検 Clinical Pathological conference 平成24年3月6日

日本大学医学部 内科学系循環器内科学分野, 病理病態学系病理学分野, 小児科系小児科学分野, 医学研究支援部門

第4回 日本大学医学部心筋生検 Clinical Pathological conference 平成24年5月31日

日本大学医学部 内科学系循環器内科学分野, 病理病態学系病理学分野, 小児科系小児科学分野, 医学研究支援部門

第5回 日本大学医学部心筋生検 Clinical Pathological conference 平成24年9月13日

日本大学医学部 内科学系循環器内科学分野, 病理病態学系病理学分野, 小児科系小児科学分野, 医学研究支援部門

第6回 日本大学医学部心筋生検 Clinical Pathological conference 平成24年12月20日

日本大学医学部 内科学系循環器内科学分野, 病理病態学系病理学分野, 小児科系小児科学分野, 医学研究支援部門

心臓移植検討委員会 T.N.氏 平成24年10月15日

心臓移植検討委員会 K.I.氏 平成24年1月20日

書籍

耳鼻咽喉・頭頸部外科学系 耳鼻咽喉・頭頸部外
科学分野

増田 毅 (執筆者)

花粉の世界を除いてみたら -驚きのミクロの構
造と生態の不思議-

監修 宮澤 七郎, 中村 澄夫

編 医学生物学電子顕微鏡技術学会

株式会社エヌ・ティー・エス, 東京 2012;8 (初版)

総合医学研究所 医学研究支援部門 電子顕微鏡室

地家 豊治 (編集委員・執筆者)

花粉の世界を除いてみたら -驚きのミクロの構
造と生態の不思議-

監修 宮澤 七郎, 中村 澄夫

編 医学生物学電子顕微鏡技術学会

株式会社エヌ・ティー・エス, 東京 2012;8 (初版)

Quattro Premire XE, Xevo TQ-S タンデム四重極型 質量分析計性能比較

渡部和浩¹⁾, 嶋村政男¹⁾, 石井敬基^{1), 2)}

Performance comparison between tandem quadrupole mass spectrometer Quattro Premire XE and Xevo TQ-S tandem

Kazuhiro WATANABE¹⁾, Masao SHIMAMURA¹⁾, Yukimoto ISHII^{1), 2)}

はじめに

平成19年2月に学術フロンティア財源で癌遺伝学が購入し、日本大学薬学部設置されていたLC/MS/MS液体クロマトグラフィ質量解析機Quattro premier XEが平成23年4月医学部医学研究支援部門（以下支援部）へ移管されることが決まり、平成24年2月9日にリサーチセンターへの移設が完了した。しかし、近年の分析機器の発達は目覚ましく、支援部に移管・移設後臨床・基礎研究の検体測定における感度を検証する必要性が生じた。我々は機器トレーニング等を終了した後に、平成24年9月20日より分析開始し、凍結保存されていた図1のプロ

トコールにより採血した検体を用いて5FUおよびシクロホスファミドの血漿濃度の測定を行った。さらに、同一検体を最新のLC/MS/MS液体クロマトグラフィ質量解析機であるXevo TQ-Sを用いて両機の性能比較を行った。

【対象物質】

1. 5-FU (MW 130)
2. ニコチン酸 (内部標準物質 MW 123)
3. シクロホスファミド (MW 260)
4. イホスファミド (内部標準物質 MW 123)

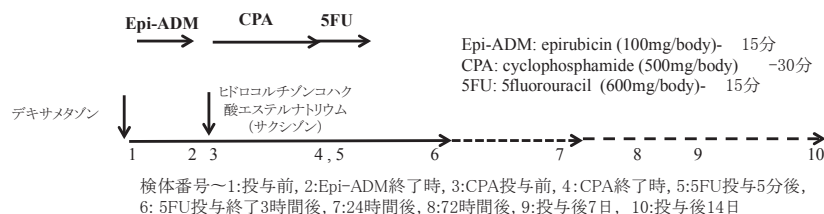


図1

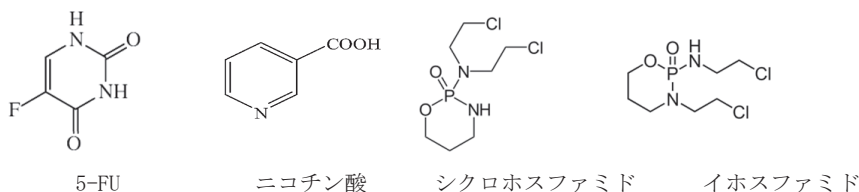


図2

1) 日本大学医学部医学研究支援部門生物化学系
2) 日本大学医学部医学研究支援部門部長
渡部和浩: watanabe.kazuhiro13@nihon-u.ac.jp

【試料調製】

血漿中 5-FU 測定

・検量線試料, サンプルの調製
 検量線試料には血漿 100 µl にメタノールで 500, 200, 50, 20, 5, 2 ng/ml に調製した 5-FU 溶液 100 µl を加えた。またサンプル試料には血漿 100 µl にメタノール 100 µl を加えた。これにメタノールで 200 ng/ml に調製したニコチン酸を 200 µl 加え, 12000 rpm, 5 min で遠心分離後, 上清 300 µl を回収し遠心エバポレーターで蒸発乾固した。10 mM 酢酸アンモニウム含有水に再溶解し, 12000 rpm, 5 min 遠心分離後 LC MS/MS で測定を行った。

血漿中シクロホスファミド測定

・検量線試料, サンプルの調製
 検量線試料には血漿 100 µl にメタノールで 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 1 ng/ml に調製したシクロホスファミド溶液 100 µl を加えた。またサンプル試料に

は血漿 100 µl にメタノール 100 µl を加えた。これにメタノールで 200 ng/ml に調製したイホスファミドを 200 µl 加え, 12000 rpm, 5 min で遠心分離後, 上清 300 µl を回収し遠心エバポレーターで蒸発乾固した。10 mM 酢酸-1 mM アンモニウム含有水に再溶解し, 12000 rpm, 5 min 遠心分離後 LC MS/MS で測定を行った。

【システム】

日本大学医学部 医学研究支援部門
 LC Acquity UPLC
 MS Quattro Premire XE タンデム四重極型質量分析計

Waters 依頼分析
 LC Acquity UPLC I-Class (FTN) システム
 MS Xevo TQ-S タンデム四重極型質量分析計

血漿中 5-FU 試料 Quattro Premire (日大)

【LC 条件】

- ・サンプル温度 4°C
- ・注入量 10 µl
- ・カラム ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1 mm i.d. × 100 mm, 1.8 µm)
- ・カラム温度 40°C
- ・移動相 A 3 mM 酢酸アンモニウム水溶液
- ・移動相 B 3 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール
- ・グラジエント

Time(分)	A(%)	B(%)	Curve	流速 (mL/min)
initial	99	1	-	0.3
4.0	80	20	6	0.3
4.1	5	95	6	0.3
5.0	5	95	6	0.3
5.1	99	1	6	0.3
10.0	99	1	6	0.3

※Curve 6=リニアグラジエント

【MS 条件】

MS tune

- ・イオン化モード ESI ネガティブ
- ・キャピラリー電圧 2.50 kV
- ・脱溶媒ガス 800 L/hr (400°C)
- ・コーンガス 50 L/hr
- ・イオン源ヒーター 120°C
- ・アルゴンガス流量 0.2 mL/min

MS 取り込み条件

MRM モード

化合物名	プレカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
5-FU	129	42	28	18
ニコチン酸 (IS)	122	78	24	15

血漿中 5-FU 試料 Xevo TQ-S (Waters)

【LC 条件】

- ・サンプル温度 5°C
- ・注入量 5 µl
- ・カラム ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1 mm i.d. × 100 mm, 1.8 µm)
- ・カラム温度 40°C
- ・移動相 A 3 mM 酢酸アンモニウム水溶液
- ・移動相 B 3 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール
- ・グラジエント

Time(分)	A(%)	B(%)	Curve	流速 (mL/min)
initial	70	30	-	0.2
3.0	70	30	6	0.2
3.1	5	95	6	0.2
5.0	5	95	6	0.2
5.1	70	30	6	0.2
10.0	70	30	6	0.2

※Curve 6=リニアグラジエント

【MS 条件】

MS tune

- ・イオン化モード ESI ネガティブ
- ・キャピラリー電圧 0.5 kV
- ・脱溶媒ガス 1200 L/hr (600°C)
- ・コーンガス 150 L/hr
- ・イオン源ヒーター 150°C
- ・アルゴンガス流量 0.15 mL/min

MS 取り込み条件

MRM モード

化合物名	プレカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
5-FU	129	42	2	12
ニコチン酸 (IS)	122	78	2	14

血漿中シクロホスファミド試料 Quattro Premire (日大)

【LC 条件】

- ・ サンプル温度 4℃
- ・ 注入量 5 μl
- ・ カラム ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1 mm i. d. × 100 mm, 1.8 μm)
- ・ カラム温度 40℃
- ・ 移動相 A 3 mM 酢酸アンモニウム水溶液
- ・ 移動相 B 3 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール
- ・ グラジエント

Time(分)	A(%)	B(%)	Curve	流速 (mL/min)
initial	60	40	-	0.2
5.0	30	70	6	0.2
5.1	5	95	6	0.2
6.5	5	95	6	0.2
6.6	60	40	6	0.2
10.0	60	40	6	0.2

※Curve 6=リニアグラジエント

【MS 条件】

MS tune

- ・ イオン化モード ESI ポジティブ
- ・ キャピラリー電圧 2.50 kV
- ・ 脱溶媒ガス 800 L/hr (400℃)
- ・ コーンガス 50 L/hr
- ・ イオン源ヒーター 120℃
- ・ アルゴンガス流量 0.2 mL/min

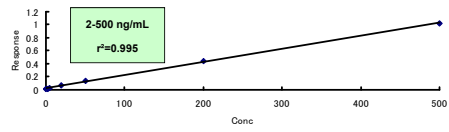
MS 取り込み条件

MRM モード

化合物名	プレカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
シクロホスファミド	261	140	35	23
イホスファミド(IS)	261	154	32	23

血漿中 5-FU 試料 Quattro Premire (日大)

5-FU 検量線



ng/ml	Area	IS	Response
0	10.62	966.477	0.011
2	19.352	1098.281	0.018
5	19.615	935.406	0.021
20	64.728	1007.539	0.064
50	128.017	950.566	0.135
200	421.338	943.313	0.447
500	968.87	948.904	1.021

5-FU サンプル

Sample 番号	Area	IS	Response	ng/ml
5	7991.743	957.133	8.35	3990.9
6	6.433	1021.871	0.006	0
7	6.532	1052.832	0.006	0
8	8.582	976.796	0.009	0

血漿中シクロホスファミド試料 Xevo TQ-S (Waters)

【LC 条件】

- ・ サンプル温度 5℃
- ・ 注入量 5 μl
- ・ カラム ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1 mm i. d. × 100 mm, 1.8 μm)
- ・ カラム温度 40℃
- ・ 移動相 A 3 mM 酢酸アンモニウム水溶液
- ・ 移動相 B 3 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール
- ・ グラジエント

Time(分)	A(%)	B(%)	Curve	流速 (mL/min)
initial	60	40	-	0.2
5.0	30	70	6	0.2
5.1	5	95	6	0.2
6.5	5	95	6	0.2
6.6	60	40	6	0.2
10.0	60	40	6	0.2

※Curve 6=リニアグラジエント

【MS 条件】

MS tune

- ・ イオン化モード ESI ポジティブ
- ・ キャピラリー電圧 0.5 kV
- ・ 脱溶媒ガス 1100 L/hr (650℃)
- ・ コーンガス 150 L/hr
- ・ イオン源ヒーター 150℃
- ・ アルゴンガス流量 0.15 mL/min

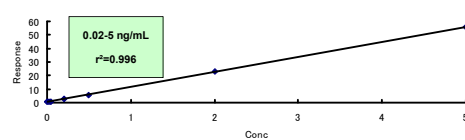
MS 取り込み条件

MRM モード

化合物名	プレカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
シクロホスファミド	261	140	30	22
イホスファミド(IS)	261	154	28	18

血漿中 5-FU 試料 Xevo TQ-S (Waters)

5-FU 検量線



ng/ml	希釈倍率	Area	IS	Response
0	100	25.517	1350.711	0.378
2	100	93.041	2415.951	0.77
5	100	44.435	856.236	1.027
20	100	186.881	1345.427	2.778
50	100	328.428	1128.161	5.822
200	100	1944.448	1685.189	23.077
500	100	5212.301	1877.998	55.509

5-FU サンプル

Sample 番号	希釈倍率	Area	IS	Response	ng/ml
5	100	83305.52	2761.247	603.391	5576
6	10	117.516	4370.51	0.538	0
7	10	88.253	4328.512	0.408	0
8	10	53.487	5094.329	0.408	0

【結果概略】

血漿中5-FU測定

Quattro Premire XEでは2～500 ng/mlの範囲で $r^2=0.995$ の検量線を得られた。一方、Xevo TQ-Sでは0.2～0.05 ng/mlの濃度で $r^2=0.996$ の検量線が得られ、感度はQuattro Premire XEの約100倍であった。血漿中5-FU測定では、検体番号5では血漿中に5-FUが見られるが、検体番号6以降5-FUは見られなかった。

血漿中シクロホスファミド測定

Quattro Premire XEでは1～1000 ng/mlの範囲で $r^2=0.996$ の検量線が得られた。一方、Xevo TQ-Sでは1～1000 pg/mlの濃度で $r^2=0.993$ の検量線が得られ、感度はQuattro Premire XEの約1000倍であった。血漿中シクロホスファミド測定では投薬後、検体番号6から検体番号8まで血漿中シクロホスファミドの減少が見られ、検体番号9以降では、Quattro Premire XEでResponse 0.008, 0 ng/ml, Xevo TQ-SではResponse 0.001, 1.4ng/mlであった。

検体番号6と検体番号7のサンプルでは測定値が作成した検量線から外れているため、同じサンプルであってもQuattro Premire XEとXevo TQ-S間でシクロホスファミド濃度に差が見られた。一方、検量線の範囲内である検体番号8のサンプルではQuattro Premire XEとXevo TQ-S間ほぼ同濃度のシクロホスファミドが得られた。

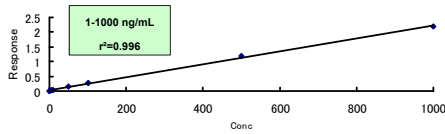
【考察】

5FUは消化器領域の癌のみならず、頭頸部癌、乳癌、肺癌などの治療に用いられ¹⁾、シクロホスファミドは乳癌、血液系腫瘍、泌尿器科領域腫瘍、婦人科領域癌などに広く使用されている²⁾。

感度の異なる両機器を比較して、検体番号6～10で5FUやシクロホスファミドがXevo TQ-S検出されるか否かはQuattro Premireの測定結果を検討する上で重要である。検体番号6でQuattro Premire検出されなかった5FUはXevo TQ-S(希釈倍率10)においても検出されなかった。5FUを用いた治療でおこなわれている急速静注後の持続投与の必要性を裏付ける結果であり³⁾、経口フッ化ピリミジン系抗癌剤であるS-1やカペシタビンが癌治療に効果的である背景をも示唆している^{4,5)}。検体番号9,10におけるシクロホスファミド濃度では両機に於ける検出限

血漿中シクロホスファミド試料 Quattro Premire (日大)

シクロホスファミド検量線



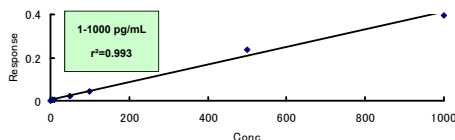
ng/ml	Area	IS	Response
0	866.466	167853.2	0.005
1	1431.879	160451.4	0.009
5	3443.787	155781.2	0.022
10	6055.971	160241.8	0.038
50	22194.16	157766.8	0.141
100	41818.24	157400.3	0.266
500	174380	146783.4	1.188
1000	318805.8	144982.3	2.199

シクロホスファミド サンプル

Sample 番号	Area	IS	Response	ng/ml
6	2371944	162843.2	14.566	6376.6
7	1395053	163116.2	8.553	3742.6
8	320464.5	161557.4	1.984	865.2
9	1223.135	159478.2	0.008	0
10	1260.261	158214	0.008	0

血漿中シクロホスファミド試料 Xevo TQ-S (Waters)

シクロホスファミド検量線



ng/ml	希釈倍率	Area	IS	Response
0	1000	53.019	25120.95	0
1	1000	173.44	24899.03	0.001
5	1000	460.578	16736.19	0.003
10	1000	1336.49	26771.26	0.005
50	1000	3218.935	14990.97	0.021
100	1000	11698.29	27042.56	0.043
500	1000	46394.23	19454.44	0.238
1000	1000	93689.34	23604.83	0.397

シクロホスファミド サンプル

Sample 番号	希釈倍率	Area	IS	Response	ng/ml
6	10000	216731.6	4457.167	4.863	11467.6
7	10000	146175.5	6259.431	2.335	5507
8	10000	13432.64	3747.211	0.358	844.7
9	1000	219.991	24376.78	0.001	1.4
10	100	2289.778	255311.7	0.001	1.4

界を示す結果であった。投与後3日目である検体番号8において、両機でシクロホスファミドが800ng/ml以上のほぼ同濃度となったことは、20mg/kg単剤投与時のCmaxが1,300ng/ml²⁾であることを考慮すると、5FUとの併用療法後における一定期間休薬の必要性を示唆する可能性があり興味深い結果であった。

Quattro Premireの測定感度はXevo TQ-Sにおよばない結果であり、分析機器の進歩を目の当たりにする結果であった。しかし、Quattro Premireによる薬物濃度測定は、臨床的意義や研究上必要とするレンジを考慮して測定を行えば価値あるデータが得られることが確認された。

参考文献

- 1) 5-FU添付文書 2009年6月 協和発酵キリン(株)
- 2) 注射用エンドキサン添付文書 2005年5月 塩野義製薬(株)。
- 3) 田村孝雄:大腸癌の標準的薬物治療の成り立ちと現状について-日本化学療法学会雑誌 VOL.54; No.3, 2006,5, p232-237.
- 4) TS-1添付文書 2004年12月大鵬薬品工業(株)。
- 5) XELODA添付文書 2011年11月 中外製薬(株)。

医学研究支援部門 生物化学系

化学分析室

化学分析室では、学部内の一般教育、基礎医学、臨床医学の各分野、時に学部外研究施設から依頼された研究目的の試料を対象に、当室に設置されている機器を用いて特定物質の定性および定量的分析を行っています。

設置している機器としては、HPLC・FPLC・GC・GC/MS・LC/MS/MSをはじめとするクロマトグラフ系の分析機器、細胞培養系実験機器および分子生物学的機器（DNAシーケンサー、バイオアナライ

ザー等）など、各種機器を用いた研究の支援業務を行っています。



DNAシーケンサー

感染症ゲノム研究室

感染症ゲノム研究室は、遺伝子組換え動物飼育室、P2・P3感染実験室、P2・P3感染動物実験室などの実験室を有し、遺伝子組み換え実験・感染性実験を行うことを目的とした施設となっています。

また、LC/MS/MSやMALDI TOF MSによるペプチドの同定、共焦点レーザー顕微鏡や蛍光顕微鏡による形態観察、リアルタイムPCRやマイクロアレイによる遺伝子発現解析など、各種機器を用いた研究の支援業務を行っています。



RI棟2階感染症ゲノム研究室



LC/MS/MS



リアルタイムPCR7500

H24年度 医学研究支援部門生物化学系 研究業績
論文業績

眼科

Hara Y, Shoji J, Hori S, Ishimori A, Kato H, Inada N, Sawa M: Evaluation of eosinophilic inflammation in a novel murine atopic keratoconjunctivitis model induced by crude *Dermatophagoides farinae* antigen. *Allergol Int*61:331-338, 2012

Sakimoto T, Sawa M: Metalloproteinases in corneal diseases: degradation and processing. *Cornea*31: S50-6, 2012

Sakimoto T, Sugaya S, Ishimori A, Sawa M: Anti-inflammatory effect of IL-6 receptor blockade in corneal alkali burn. *Exp Eye Res.* 97: 98-104, 2012

血液膠原病内科

Iriyama N, Yuan B, Hatta Y, Horikoshi A, Yoshino Y, Toyoda H, Aizawa S, Takeuchi J: Granulocyte colony-stimulating factor potentiates differentiation induction by all-trans retinoic acid and arsenic trioxide and enhances arsenic uptake in the acute promyelocytic leukemia cell line HT93A. *Oncology Reports*, 28: 1875-1882, 2012.

Iriyama N, Yuan B, Hatta Y, Horikoshi A, Yoshino Y, Toyoda H, Aizawa S, Takeuchi J: Granulocyte colony-stimulating factor potentiates differentiation induction by all-trans retinoic acid and arsenic trioxide and enhances arsenic uptake in the acute promyelocytic leukemia cell line HT93A. *Oncol Rep.*28: 1875-1882, 2012

呼吸器内科

Wilson RH, Maruoka S, Whitehead GS, Foley JF, Flake GP, Sever ML, Zeldin DC, Kraft M, Garantziotis S, Nakano H, Cook DN: The Toll-like receptor 5 ligand flagellin promotes asthma by priming allergic responses to indoor allergens.

*Nat Med.*18(11): 1705-10, 2012

Wilson RH, Maruoka S, Whitehead GS, Foley JF,

Flake GP, Sever ML, Zeldin DC, Kraft M, Garantziotis S, Nakano H, Cook DN : The Toll-like receptor 5 ligand flagellin promotes asthma by priming allergic responses to indoor allergens. *Nat Med.*18 (11): 1705-1710, 2012

Sekiyama A, Gon Y, Terakado M, Takeshita I, Kozy Y, Maruoka S, Matsumoto K, Hashimoto S: Glucocorticoids enhance airway epithelial barrier integrity. *Int Immunopharmacol.* 12 (2): 350-357, 2012

Shimizu T, Nakanishi Y, Nakagawa Y, Tsujino I, Takahashi N, Nemoto N, Hashimoto S: Association between Expression of Thymidylate Synthase, Dihydrofolate Reductase, and Glycinamide Ribonucleotide Formyltransferase and Efficacy of Pemetrexed in Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *ANTICANCER RESEARCH.*32: 4589-96, 2012

耳鼻科

Sekine H, Takao K, Yoshinaga K, Kokubun S, Ikeda M: Effects of zinc deficiency and supplementation on gene expression of bitter taste receptors (TAS2Rs) on the tongue in rats. *Laryngoscope.* 122 (11): 2411-7, 2012

Hirai R, Takao K, Onoda K, Kokubun S, Ikeda M: Patients with phantogeusia show increased expression of T2R taste receptor genes in their tongues. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 121 (2): 113-8, 2012

生化学

Ishizawa M, Ogura M, Kato S, Makishima M: Impairment of bilirubin clearance and intestinal interleukin-6 expression in bile duct-ligated vitamin D receptor null mice. *PLoS One.*7 (12): e51664, 2012

病態病理学系 微生物学分野

Komine-Aizawa S, Suzaki A, Trinh QD, Izumi Y, Shibata T, Kuroda K, Hayakawa S: H1N1/09 influenza A virus infection of immortalized first trimester human trophoblast cell lines. *Am J Reprod Immunol.*68 (3): 226-32, 2012

Trinh QD, Pham NT, Le Nguyen NT, Lam BQ, Le Phan KT, Truong KH, Le TQ, Nguyen HT, Tang TC, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Ushijima H, Hayakawa S: Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* in HIV-infected children in Vietnam. *J Infect Chemother.*, 2012

機能形態学 生体構造医学分野

Aisaki K, Tsuboi I, Harada T, Oshima H, Yamashita A, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S: Neopterin, inflammation-associated product, prolongs erythropoiesis suppression in aged SAMP1 mice due to senescent stromal-cell impairment. *Exp Biol Med (Maywood)*. 237 (3): 279-86, 2012

Tsuboi I, Harada T, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S: Age-related decline of mast cell regeneration in senescence-accelerated mice (SAMP1) after chemical myeloablation due to senescent stromal cell impairment. *Exp Biol Med (Maywood)*. 237(11):1289-97, 2012

病態病理学系 臨床検査医学分野

Fu Z, Ma Y, Xie X, Huang D, Yang H, Nakayama T, Sato N: A Novel Polymorphism of the CYP4A11 Gene is Associated With Coronary Artery Disease. *Clin Appl Thromb Hemost.* [Epub ahead of print], 2012, 2

Satomura A, Fujita T, Yanai M, Kumasaka K, Uehara Y, Okada K, Fuke Y, Nakayama T: Functional mannose-binding lectin levels in patients with end-stage renal disease on maintenance hemodialysis. *J Innate Immun.* 4(3):293-300, 2012

Kasamaki Y, Izumi Y, Ozawa Y, Ohta M, Tano A, Watanabe I, Hirayama A, Nakayama T, Kawamura H, Himi D, Mahemuti M, Sezai A: Relationship between status of plasma atrial natriuretic peptide and heart rate variability in human subjects. *Heart Vessels.* Epub ahead of print, 2012

Nishida Y, Takahashi Y, Nakayama T, Asai S: Comparative effect of angiotensin II type I receptor block-

ers and calcium channel blockers on laboratory parameters in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 17;11:53, 2012

Fu Z, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Kasamaki Y, Shindo A, Ohta M, Soma M, Aoi N, Sato M, Ozawa Y, Ma Y: Haplotype-based case-control study of CYP4A11 gene and myocardial infarction. *Hereditas* 149(3):91-8., 2012

Jiang J, Nakayama T, Shimodaira M, Sato N, Aoi N, Sato M, Izumi Y, Kasamaki Y, Ohta M, Masayoshi Soma, Matsumoto K, Kawamura H, Ozawa Y, Ma Y: A haplotype of the smoothelin gene associated with myocardial infarction in Japanese women. *Genet Test Mol Biomarkers* 16(9):1019-1026, 2012.09

Kato J, Araki H, Kimura M, Takahashi K, Ueda K, Iida R, Nakayama T, Ogawa S: Incidence and prognosis of persistent pain induced by venipuncture for blood sampling: an observational study over a 5-year period. *Pain Medicine* 13(12):1627-1630, 2012

Aoi N, Nakayama T, Soma M, Kosuge K, Haketa A, Sato M, Sato N, Asai S: The insulin-like growth factor-1 gene is associated with cerebral infarction in Japanese subjects. *Hereditas* 149(5):153-62, 2012

Jiang J, Nakayama T, Shimodaira M, Sato N, Aoi N, Sato M, Izumi Y, Kasamaki Y, Ohta M, Masayoshi Soma, Matsumoto K, Kawamura H, Ozawa Y, Ma Y: Haplotype of smoothelin gene associated with essential hypertension. *Hereditas* 149(5):178-85, 2012

Jiang J, Nakayama T, Shimodaira M, Sato N, Aoi N, Sato M, Izumi Y, Kasamaki Y, Ohta M, Masayoshi Soma, Matsumoto K, Kawamura H, Ozawa Y, Ma Y: Association of smoothelin (SMTN) gene with cerebral infarction in men: a haplotype-based case-control study. *Vascular Medicine* Oct;17(5):317-325, 2012

Shimodaira M, Nakayama T, Sato I, Sato N, Izawa N, Mizutani Y, Furuya K, Yamamoto T: Estrogen synthesis genes CYP19A1, HSD3B1 and HSD3B2 in hy-

pertensive disorders of pregnancy. *Endocrine* 42(3):700-7., 2012

Haketa A, Soma M, Nakayama T, Kosuge K, Aoi N, Hishiki M, Hatanaka Y, Ueno T, Doba N, Hinohara S: Association between SIRT2 gene polymorphism and height in healthy, elderly Japanese subjects. *Transl Res* 161(1):57-58, 2013.

Pan S, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Soma M, Aoi N, Ma Y: A Haplotype of the GOSR2 Gene Is Associated with Essential Hypertension in Japanese Men. *Clinical Biochemistry Clinical Biochemistry* 2013 in press

Shimodaira M, Nakayama T, Sato I, Sato N, Izawa N, Mizutani Y, Furuya K, Yamamoto T: Glucocorticoid synthesis related-genes: HSD11B1 and HSD11B2 in hypertensive disorders in pregnancy. *Gynecological Endocrinology* 2013 in press

産婦人科学分野

Aoki Y, Yamamoto T, Fumihisa C, Nakamura A, Asanuma A, Suzuki M: Effect on the production of soluble endoglin from human choriocarcinoma cells by preeclampsia sera. *Am J Reprod Immunol*. 67(5):413-20, 2012

Hayashi C, Chishima F, Sugitani M, Ichikawa G, Nakazawa-Watanabe T, Sugita K, Suzuki M, Nemoto N, Yamamoto T: Relationship between Toll-like receptor-4 and mPGES-1 gene expression in local lesions of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol*. 69(3), 2013

Nishikawa T, Shimizu K, Tanaka T, Kuroda K, Takayama T, Yamamoto T, Hanada N, Hamada Y: Bacterial neuraminidase rescues influenza virus replication from inhibition by a neuraminidase inhibitor. *PLoS One*. 7(9):e45371, 2012

微生物学

Sawai-Kuroda R, Kikuchi S, Shimizu YK, Sasaki Y,

Kuroda K, Tanaka T, Yamamoto T, Sakurai K, Shimizu K. A polyphenol-rich extract from *Chaenomeles sinensis* (Chinese quince) inhibits influenza A virus infection by preventing primary transcription in vitro. *J Ethnopharmacol*. 146(3):866-72, 2013

Tanaka T, Kuroda K, Ikeda M, Wakita T, Kato N, Makishima M. Hepatitis C virus NS4B targets lipid droplets through hydrophobic residues in the amphipathic helices. *J Lipid Res*. 54(4):881-92, 2013

Nishikawa T, Shimizu K, Tanaka T, Kuroda K, Takayama T, Yamamoto T, Hanada N, Hamada Y. Bacterial neuraminidase rescues influenza virus replication from inhibition by a neuraminidase inhibitor. *PLoS One*. 7(9):e45371., 2012

Okayama Y, Kashiwakura JI, Matsuda A, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Yokoi N, Ebihara N, Kuroda K, Ohmori K, Saito H, Ra C. The interaction between Lyn and Fc ϵ RI β is indispensable for Fc ϵ RI-mediated human mast cell activation. *Allergy*. 67(10):1241-9, 2012

Komine-Aizawa S, Suzaki A, Trinh QD, Izumi Y, Shibata T, Kuroda K, Hayakawa S. H1N1/09 influenza A virus infection of immortalized first trimester human trophoblast cell lines. *Am J Reprod Immunol*. 68(3):226-32, 2012

総説

眼科

庄司純：アレルギー性結膜疾患のバイオマーカーと涙液検査. *日大医誌* 71 : 215-218, 2012

庄司純：病態理解に役立つ新しい検査法 最近のアレルギー検査. *臨眼* 66 (オキュラーサーフェス診療アップデート) : 81-86, 2012

崎元暢：基礎研究と臨床とのつながり感染症と免疫 角膜実質融解における MMP. *臨眼* 66 (オキュラーサーフェス診療アップデート) : 341-345, 2012

庄司純：アレルギー性結膜疾患診断における自覚症状、他覚所見および涙液総IgE検査キットの有用性の検討 日本眼科学会雑誌 (0029-0203) 116巻5号 Page485-493, 2012, 5

呼吸器内科

権寧博, 橋本修：気管支喘息の最新の話題, 気道上皮のバリア機能, 呼吸と循環, 60 (2) : 145-149, 2012

権寧博, 橋本修：気管支喘息における気道構成細胞と炎症細胞の相互作用, 呼吸と循環, 60 (7) : 741-747, 2012.

権寧博, 橋本修：特集 II. 気管支喘息の病態機序解明の新展開. 気道上皮細胞と喘息病態. 臨床免疫・アレルギー科. 59 (1), 2013

権寧博, 橋本修：肺疾患と免疫抑制剤 Annual review of呼吸器 2012, 216-225, 中外医学社, 2012.

化学分野

西田滋, 石澤通康, 榎島誠：ビタミンD受容体の胆汁酸代謝調節と作用選択性胆汁酸アゴニスト 日本大学医学部一般教育研究紀要 2012年12月21-35頁

病態病理学系臨床検査医学分野

藤岡彰, 藤岡和美：チアジド含有配合降圧剤が引き起こした光線性白斑黒皮症 第31回蒲田医師会学術集談会誌 10-15 2012

藤岡彰, 藤岡和美：配合降圧剤(テルミサルタン/ヒドロクロロチアジド配合錠)による光線白斑黒皮症 大田区医学会誌 4:22-25 2012

藤岡和美, 大石実, 矢野希世志, 阿部修, 藤岡彰：頸動脈内 膜中膜複合体厚 (intima-media thickness:IMT) と血清尿酸値間の正相関 日本超音波医学会第85回学術集会プログラム・講演抄録集 39:S541 2012

藤岡彰, 藤岡和美：チアジド系利尿薬の副作用の

歴史-配合降圧剤の副作用の経験から-第113回日本医史学会総会抄録号 58:156, 2012

シンポジウム

化学分野

西田滋：メラニンの糖質・脂肪代謝への影響 メラニンによるインスリン作用の modulation - 糖尿病モデルラットを用いた研究 - 第4回抗加齢内分泌研究会学術集会 (東京) 2012, 9

西田滋, 石澤通康, 榎島誠：VDR欠損マウスにおける胆汁酸代謝遺伝子解析 第85回日本生化学会大会 (福岡) 2012, 12

病態病理学系臨床検査医学分野

中山智祥：遺伝子検査の今後。遺伝カウンセリング。第22回日本臨床検査専門医会春季大会 (山口, 宇) 2012, 3

下平雅規, 中山智祥, 佐藤直之, 山口舞, 伊澤 (青井) 則子, 菱木 (佐藤) 三佳乃, 泉洋一, 相馬正義, 松本紘一, 水谷吉宏, 古屋清英, 佐藤伊知朗, 山本樹生：ステロイド合成系酵素の遺伝子多型と妊娠高血症候群の関連解析研究 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業研究成果公開シンポジウム (東京) 日本大学医学部 2012, 3

Shimodaira M, Nakayama T, Sato I, Sato N, Izawa N, Mizutani Y, Furuya K, Yamamoto T: Glucocorticoid synthesis related-genes: HSD11B1 and HSD11B2 in hypertensive disorders in pregnancy. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業研究成果公開シンポジウム (東京) 日本大学医学部 2013, 2

病態病理学系臨床検査医学分野

藤岡和美, 大石実, 鈴木裕, 矢野希世志, 藤井元彰, 竹本明子, 高橋元一郎, 阿部修, 藤岡彰：Post-nitroglycerin brachial artery diameter (P-NTGD) と Waist 間の正相関 第31回日本画像医学会 (東京) 2012, 2

藤岡彰, 藤岡和美：チアジド含有配合降圧剤が引き起こした光線性白斑黒皮症 第31回蒲田医師会学術集談会 (東京) 2012, 2

藤岡彰, 藤岡和美: 配合降圧剤 (テルミサルタン・ヒドロクロロチアジド配合錠) による光線性白斑黒皮症 第四回大田区医学会 (東京) 2012, 3

佐貫栄一, 村井一郎, 竹本明子, 藤井元彰, 藤岡和美, 田中生恵, 阿部修: 日本大学医学部府億練馬光が丘病院の土壌の放射性物質 第510回日本大学医学会例会 (東京) 2012, 3

藤岡彰, 藤岡和美: チアジド含有配合降圧剤による光線性白斑黒皮症 第28回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術学会 (博多) 2012, 4

藤岡和美, 大石実, 矢野希世志, 阿部修, 藤岡彰: 頸動脈内 膜中膜複合体厚 (intima-media thickness:IMT) と血清尿酸値間の正相関 日本超音波医学会第85回学術集会 (東京) 2012., 5

藤岡彰, 藤岡和美: チアジド系利尿薬の副作用の歴史-配合降圧剤の副作用の経験から-第113回日本医史学会総会・学術大会 (栃木) 2012, 6

藤岡和美, 大石実, 矢野希世志, 阿部修, 中山智祥, 藤岡彰: Flow-mediated vasodilation:FMD と serum uric acid:SUA間の逆相関 日本超音波医学会関東甲信越地方会第24回学術集会 (埼玉) 2012, 10

藤岡和美, 大石実, 中山智祥, 藤岡彰: FMD と estimated glomerular filtration rate (eGFR) 間の正相関 第32回日本画像医学会 (東京) 2013, 2

藤岡彰, 藤岡和美: 木村病を合併した配合降圧剤 (テルミサルタン/ヒドロクロロチアジド配合錠) による光線白斑黒皮症 第32回蒲田医師会学術集談会 (東京) 2013, 2

藤岡彰, 藤岡和美: 木村病を合併した配合降圧剤 (テルミサルタン/ヒドロクロロチアジド配合錠) による光線白斑黒皮症 (東京) 第五回大田区医学会 2013, 3

Isobe E, Tie J, Isahai I, Uchigasaki S: Effect of seed saponins of *Thea sinensis* L. (Ryokucha Saponin) on ethanol absorption in small intestine. The 50th International Association of Forensic Toxicologist (hama-

matu) 2012, 6

ワークショップ, 特別講演, 招待講演, 受賞講演
病態病理学系 臨床検査医学分野

中山智祥: ランチョンセミナー 遺伝子関連検査の基礎的知識について—マイコプラズマ核酸検査に絡めて—, 第9回東京都医学検査学会, 東医健保会館, 2013, 2

中山智祥: 遺伝カウンセリングについて 講演埼玉協同病院講演会 (埼玉県) 2012, 10

中山智祥: 遺伝カウンセリングについて 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科講演会 (文京区湯島) 2012,9

学会発表 (一般演題)

眼科

崎元暢, 潭充: 角膜上皮におけるP2Y受容体を介した細胞外ドメインシェディングの検討. 第36回日本角膜学会総会 (東京) 2012, 2

庄司純, 及川亜希, 武信敦里, 稲田紀子, 加藤博司, 潭充: 眼表面疾患における眼表面ムチンの測定法. 第36回日本角膜学会総会 (東京) 2012, 2

中島基宏, 石森秋子, 稲田紀子, 庄司純, 潭充: 緑膿菌 exotoxinA点眼における結膜組織反応の検討. 第36回日本角膜学会総会 (東京) 2012, 2

崎元幡, 菅谷哲史, 石森秋子, 潭充: アルカリ外傷角膜実質中の炎症関連分子発現に対するIL-6受容体阻害効果. 第116回日本眼科学会総会 (東京) 2012, 4

Sakimoto T, Sugaya S, Ishimori A, Sawa M: Anti-inflammatory effect of IL-6receptor b lockade on cornea l a lka l i burn. ARV0, Fort Lauderdale, USA, 2012, 5

庄司純: タクロリムス点眼の使用効果と涙液での効果検討. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 (大阪) 2012, 5

原雄将, 庄司純, 崎元暢, 稲田紀子, 潭充: 炎症性角結膜炎疾患における涙液中炎症関連因子のパターン解析. 第46回日本眼炎症学会(神奈川) 2012, 7

吉田圭, 石森秋子, 稲田紀子, 庄司純, 潭充: β -D-グルカン点眼で誘導される結膜組織の免疫学的変化の検討. 第66回日本臨床眼科学会(京都) 2012, 10

野村真美: アレルギー性結膜疾患における涙液中 amphiregulin 値の検討. 第66回日本臨床眼科学会(京都) 2012, 10

庄司純: 涙液中ムチン測定からみたアレルギー性結膜疾患とドライアイ. 第66回日本臨床眼科学会(京都) 2012, 10

原田奈月子, 庄司純, 武信敦里, 石森秋子, 稲田紀子, 潭充: アレルギー性結膜疾患におけるムチンとその関連因子の検討. 第66回日本臨床眼科学会

原雄将, 庄司純, 堀寛輔, 石森秋子, 稲田紀子, 潭充: 実験的アトピー性角結膜炎モデルマウスにおける結膜組織内アレルギー炎症の検討. 第66回日本臨床眼科学会(京都) 2012, 10

血液膠原病内科

入山規良, 袁博, 八田善弘, 吉野雄大, 堀越昶, 豊田裕夫, 竹内仁: Aquaporin-9, a proposed new biomarker for APL in arsenic era, 第74回日本血液学会総会(京都) 2012, 10

呼吸器内科

Maruoka S, Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Zeldin D, Kraft M, Garantziotis S, Gon Y, Hashimoto S, Cook DN. The TLR5 Ligand, flagellin, promotes asthma by priming allergic responses to indoor allergens (English Mini Symposium). The 52nd Annual Meeting of Japanese Respiratory Society, Kobe, Japan, April 20 2012.

Maruoka S, Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Zeldin D, Kraft M, Garantziotis S, Gon Y, Hashimoto S, Cook DN. The TLR5 Ligand, flagellin, promotes

asthma by priming allergic responses to indoor allergens (English Session). The 62nd Annual Meeting of Japanese Society of Allergology, Osaka, Japan, Nov 30 2012.

Gon Y, Hashimoto S, Airway epithelial cells in pathogenesis of asthma. The 17 Congress of the APSR. Hong Kong. 2012. 12

Gon Y, Hashimoto S, Targeting airway inflammation for long-term control of asthma. 22th Congress of Interasthma Japan. Fukuoka. 2012. 7.

Gon Y, Kozu Y, Maruoka S, Takeshita I, Hashimoto S. Role of PCDH 1 on the epithelial barrier function in the airway. The East Asia Allergy Symposium and 2012 KAAACI Annual Congress South Korea 2012. 3

Kozu Y, Gon Y, Sekiyama A, Terakado M, Takeshita I, Matsumoto K, Maruoka S, Hashimoto S, The role of PCDH1 on innate immune response and barrier function in the airway. ERS. Austria 2012. 9

Ohta K, Ishihara K, Hashimoto S: Adult asthma treatment guideline and its application. The 22nd Congress of Interasma Japan/North Asia. Tokyo, Japan, 2012.7.

Hashimoto S: Current topics on asthma pathogenesis. 17th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. Hong Kong. 2012.12.14.

Mizumura K, Lam H.C, S. Cloonan S.M. An C.H, Hashimoto S, Ryter S.W, Choi A.M.K. Loss of PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) Exaggerates Cigarette Smoke Induced Cell death. American Thoracic Society International Conference. 2012.5.18. San Francisco. USA

Tsujino I, Nakanishi Y, Shimizu T, Obana Y, Ohni S, Takahashi N, Nemoto N, Hashimoto S: Correlation Between Differences in the Increase in MAPK (ERK1/2) Activity Due to Driver Mutations and

Prognosis in Non-small-cell Lung Cancer. The European Association for Cancer Research, Barcelona, Spain, 2012. 7. 10

橋本修, 権 寧博, 松本健, 丸岡秀一郎, 服部知洋, 伊藤玲子: 気道上皮と重症喘息. 重症喘息の背景と治療戦略. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 (大阪) 2012, 5

橋本修: 重症気管支喘息の病態解明と治療戦略. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 (大阪) 2012, 5

権寧博, 神津悠, 関山晶子, 寺門正裕, 竹下郁子, 松本健, 丸岡秀一郎, 橋本修: ウイルス感染による気道上皮バリア障害へのTLR3シグナルの関与. 第52回日本呼吸器学会学術講演会 (神戸) 2012, 4

神津悠, 権寧博, 関山晶子, 寺門正裕, 竹下郁子, 松本健, 丸岡秀一, 橋本修: 気道上皮の物理的・免疫学的バリアにおけるPCDH 1の役割. 第52回日本呼吸器学会学術講演会 (神戸) 2012, 4

小山大輔, 丸岡秀一郎, 新谷榮崇, 平沼久人, 関山忠孝, 松本健, 権寧博, 橋本修, Donald Cook: マウス気管支喘息モデルにおける口腔細菌由来リポ蛋白のアジュバント効果の検討. 第52回日本呼吸器学会学術講演会 (神戸) 2012, 4

新谷榮崇, 丸岡秀一郎, 小山大輔, 平沼久人, 関山忠孝, 松本健, 権寧博, 橋本修, Donald Cook: マウス気管支喘息モデルにおける細菌鞭毛構造蛋白フラジェリンの抗原性の検討. 第52回日本呼吸器学会学術講演会 (神戸) 2012, 4

小山大輔, 丸岡秀一郎, 新谷榮崇, 平沼久人, 関山忠孝, 権寧博, 橋本修, Donald Cook: マウス気管支喘息モデルにおける口腔細菌由来リポ蛋白のアジュバント効果の検討. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 (大阪) 2012, 11

新谷榮崇, 丸岡秀一郎, 小山大輔, 平沼久人, 関山忠孝, 権寧博, 橋本修, Donald Cook: マウス気管支

喘息モデルにおける細菌鞭毛構造蛋白フラジェリンの抗原性の検討. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 (大阪) 2012, 11

権寧博: 血中total-IgEとfree IgEによる抗IgE抗体療法のモニタリングの意義 東京 第2回Respiratory Disease Open Forum 2012. 7. 5

権寧博: アレルギー性気道炎症と気道上皮細胞 第30回呼吸器・免疫シンポジウム (東京) 2012, 10

橋本修: 「気管支喘息の病態; 気道上皮細胞を中心に」 第14回気道・肺胞分泌研究会 (大阪) 2012, 7

Maruoka S, Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Zeldin D, Kraft M, Garantziotis S, Gon Y, Hashimoto S, Cook DN. The TLR5 Ligand, flagellin, promotes asthma by priming allergic responses to indoor allergens (English Mini Symposium). The 52nd Annual Meeting of Japanese Respiratory Society, Kobe, Japan, April 20 2012.

小山大輔, 丸岡秀一郎, 新谷榮崇, 平沼久人, 関山忠孝, 松本健, 権寧博, 橋本修, Donald Cook: マウス気管支喘息モデルにおける口腔細菌由来リポ蛋白のアジュバント効果の検討 第52回日本呼吸器学会学術講演会 (神戸) 2012, 4

新谷榮崇, 丸岡秀一郎, 小山大輔, 平沼久人, 関山忠孝, 松本健, 権寧博, 橋本修, Donald Cook: マウス気管支喘息モデルにおける細菌鞭毛構造蛋白フラジェリンの抗原性の検討 (ミニシンポジウム) 第52回日本呼吸器学会学術講演会 (神戸) 2012, 4

Maruoka S, Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Zeldin D, Kraft M, Garantziotis S, Gon Y, Hashimoto S, Cook DN. The TLR5 Ligand, flagellin, promotes asthma by priming allergic responses to indoor allergens (English Session). The 62nd Annual Meeting of Japanese Society of Allergology, Osaka, Japan, Nov 30 2012.

小山大輔, 丸岡秀一郎, 新谷榮崇, 平沼久人, 関山忠孝, 権寧博, 橋本修, Donald Cook: マウス気管支

喘息モデルにおける口腔細菌由来リポ蛋白のアジュバント効果の検討(口演)第62回日本アレルギー学会秋季学術大会(大阪)2012,11

新谷榮崇,丸岡秀一郎,小山大輔,平沼久人,関山忠孝,権寧博,橋本修,Donald Cook:マウス気管支喘息モデルにおける細菌鞭毛構造蛋白フラジェリンの抗原性の検討(口演)第62回日本アレルギー学会秋季学術大会(大阪)2012,11

耳鼻科

田中真琴,関根大喜,高尾恭一,池田篤生,池田稔:抗悪性腫瘍役(パクリタキセル)によるラットの味覚受容体遺伝子発現の変化の検討第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演2012,5

田中真琴,高尾恭一,関根大喜,池田篤生,池田稔:ラットの味覚受容体遺伝子発現に対するパクリタキセルによる影響の検討第25回日本口腔・咽頭科学会総会学術講演会2012,9

関根大喜,高尾恭一,小野田恵子,池田篤生,池田稔:亜鉛と味覚障害:味覚受容体遺伝子(TAS2R)の発現に対する亜鉛欠乏の影響第23回日本微量元素学会学術集会2012,7

関根大喜,高尾恭一,池田篤生,池田稔:味覚受容体遺伝子の発現部位の検討第25回日本口腔・咽頭科学会総会学術講演会2012,9

池田篤生,関根大喜,田中真琴,高尾恭一,池田稔:ラットの舌有郭乳頭部における味覚受容体遺伝子発現の局在と亜鉛欠乏による変化の検討第23回日本微量元素学会学術集会2012,7

池田篤生,関根大喜,田中真琴,高尾恭一,池田稔:ラットの舌有郭乳頭部における味覚受容体遺伝子発現の局在と亜鉛欠乏による変化の検討第25回日本口腔・咽頭科学会総会学術講演会2012,9

生化学

石澤通康,小倉道一,加藤茂明,榎島誠:胆汁鬱滞モデルマウスにおけるビタミンD受容体の機能解析

日本ビタミン学会第64回大会2012,6

病態病理学系 微生物学分野

相澤(小峰)志保子,早川智:CBA/J×DBA/2J反復流産マウスモデルに対する新たな治療戦略と免疫学的解析第64回日本産婦人科学学会学術講演会(神戸)2012,4

病態病理学系 臨床検査医学分野

中山智祥,下平雅規,中川朋子,松本健,佐藤直之,相馬正義,青井則子:心筋梗塞とSLC6A18トランスポーター遺伝子との関連解析。第109回日本内科学会学術講演会(京都)2012,4

中山智祥,佐藤直之,常喜信彦,柳田靖子,田中友里,長谷弘記,相馬正義,青井則子:新しい変異が見出されたGitelman症候群の家系(第2報)。第85回日本内分泌学会学術総会(神戸)2012,4

松本健,権寧博,竹下郁子,中山智祥,橋本修:気道上皮透過性バリアとウイルス感染・免疫応答に関する検討。第52回日本呼吸器学会(神戸)2012.,4

中山智祥:臨床検査医学科での自費診療に特化した遺伝学的検査・カウンセリングの問題点。第36回日本遺伝カウンセリング学会学術集会(松本)2012,6

中山智祥,下平雅規,中川朋子,松本健,中里龍生,佐藤直之,相馬正義,青井則子:SLC6A18トランスポーター遺伝子と心筋梗塞との関連解析第19回日本遺伝子診療学会大会(千葉)2012,7

星野忠,中山智祥:ドライケミストリーを用いたCK活性測定におけるMacro CKの影響第52回日本臨床化学会年次学術集会(岩手)2012,9

中山智祥,Jiang Jie,下平雅規,佐藤直之,青井則子,佐藤三佳乃,泉洋一,笠巻祐二,太田昌克,相馬正義,松本紘一,河村博,小沢友紀雄,マーイートン:血管平滑筋蛋白であるSMTN遺伝子と心筋梗塞との関連解析第35回日本高血圧学会総会(名古屋)2012,9

中山智祥：マイコプラズマ核酸検査について。第44回日本臨床検査自動化学会 第13回遺伝子・プロテオミクス技術セミナー（横浜）2012, 10

中山智祥, 永沼高廣, 佐藤直之, 付真彦, 相馬正義, 伊澤則子：血管平滑筋蛋白SMTN 遺伝子と心筋梗塞との関連。第44回日本臨床検査自動化学会（横浜）2012, 10

中山智祥, Jiang Jie, 下平雅規, 佐藤直之, 青井則子, 佐藤三佳乃, 泉洋一, 笠巻祐二, 太田昌克, 相馬正義, 松本紘一, 河村 博, 小沢友紀雄, マー イートン：心筋梗塞と血管平滑筋蛋白であるSMTN 遺伝子との関連。第57回日本人類遺伝学会大会, 東京京王プラザホテル, 2012, 10

中山智祥, 下平雅規, 中川朋子, 松本健, 中里龍生, 佐藤直之, 相馬正義, 青井則子：心筋梗塞の遺伝子マーカーとしてのSLC6A18 トランスポーター遺伝子多型 第59回日本臨床検査医学会学術総会, 国立京都国際会館 2012, 11

中山智祥, Jiang Jie, 下平雅規, 佐藤直之, 泉 洋一, 相馬正義, 松本紘一, 小沢友紀雄, マー イートン：心筋梗塞に関連した血管平滑筋蛋白SMTN 遺伝子ハプロタイプと心筋梗塞第35回日本分子生物学会年会（神戸）2012, 12

先端心血管学

Li Y, Hiroi Y, Liu PY, Takayama T, Hiro T, Saito S, Hirayama A, Liao JK: Critical role of Rho kinase on Aortic Stiffness. 第76回日本循環器学会学術集会（福岡）2012, 3

Li Y, Kunimoto S, Takayama T, Hiro T, Saito S, Hirayama A, Liao JK: Critical role of Rho kinase on Aortic Stiffness. 第49回日本臨床分子医学会学術集会（京都）2012, 4

微生物学

芝田敏克, 豊澤恵子, 早川智, 山本樹生, 清水一史,

黒田和道：インフルエンザウイルスM1タンパク質と核内構造物ND10との相互作用の解析 第60回ウイルス学会学術集会（大阪）2012, 11

Rashid, 黒田和道, 吉田玲子, 津田祥美, 藤倉大輔, 宮本洋子, 喜田宏, 高田礼人：Modulatory effect of heat shock protein 70 (Hsp70) on influenza virus replicationManzoor 第60回ウイルス学会学術集会（大阪）2012, 11

田中寅彦, 黒田和道, 豊澤恵子, 槇島誠, 池田正徳, 加藤 宣之：C型肝炎ウイルスNS4Bと脂肪滴との相互作用の分子機構 第60回ウイルス学会学術集会（大阪）2012, 11

会議録

微生物学

治療ターゲットとしての脳虚血後の炎症T細胞と脳虚血後炎症

七田 崇（慶応義塾大学 医学部微生物学免疫学教室）, 大星 博明, 北園 孝成, 石井 哲郎, 黒田 和道, 三宅 健介, 審良 静男, 吉村 昭彦

脳循環代謝 (0915-9401) 23巻2号 Page65 (2012.09)

多職種連携による感染予防 インフルエンザ対策に求められる多職種連携 インフルエンザウイルスの性状と細菌との相互作用

黒田 和道（日本大学 医学部微生物学分野）

日本口腔感染症学会雑誌 (1346-9150) 19巻1号 Page38-39 (2012.06)

ヒト椎間板組織の多様性とそのプロテオーム解析 組織切片レーザーマイクロダイセクションサンプルの比較プロテオミクス

海老原 貴之（日本大学 医学部整形外科学系整形外科学分野）, 江角 真理子, 山口 裕美, 黒田 和道, 宗像 康明, 楠美 嘉晃, 高橋 理恵, 尾花 ゆかり, 沼口 俊平, 徳橋 泰明

Journal of Spine Research (1884-7137) 3巻3号 Page507 (2012.03)

高頻度経頭蓋磁気刺激による運動野刺激の効果： F波の変化についての検討

山本隆充, セデキジャン・ウフル, 松村祐平, 原 元彦, 関口真一, 石井敬基

Changes of F-wave induced by rTMS of the motor cortex

Takamitsu YAMAMOTO, Sidikejiang WUPUER, Yuhei MATSUMURA, Motohiko HARA,
Shinichi SEKIGUCHI, Yukimoto ISHII

要旨

大脳皮質運動野刺激によって脳卒中後の運動麻痺が回復する症例が報告されているが、症例ごとに効果に差を認めることも明らかとなっている。日本大学医学部医学研究支援部門医用電子系医用電子室で臨床研究に使用することができる高頻度経頭蓋磁気刺激装置を用いて、大脳皮質運動野刺激によるF波の変化を記録し、大脳皮質運動野刺激の適応決定のための有用性について検討した。脳卒中後の運動機能回復を目的として慢性の大脳皮質運動野刺激の適応となる症例を選択するには、高頻度経頭蓋磁気刺激を用いた大脳皮質運動野刺激を行い、F波の出現率とF/M比が著しく減少する症例を選択することが必要である。

1. はじめに

脳卒中後の運動麻痺が大脳皮質運動野刺激で改善することが報告され^{1,2)}、多施設共同研究でもその有用性が確認されている^{3,5)}。しかし、慢性の大脳皮質運動野刺激によって全例に運動機能回復が認められるわけではなく、症例ごとに効果に差を認めることも明らかとなっている。我々は、慢性の大脳皮質運動野刺激による運動機能回復について、運動野の刺激時間が重要で、1日に長時間にわたって大脳皮質運動野刺激を行なった症例では痙縮が増加し、逆に運動機能が障害されることを明らかにした。また、1日の刺激時間を3時間以内に制限することが運動機能回復に有効であるが、運動機能の回復程度には個々の症例においてかなりのバリエーションが存在することが明らかとなった²⁾。

F波は末梢運動神経の最大上電気刺激によるインパルスが求心性に脊髄に伝わり、再び遠心性に筋まで伝導して誘発され、その経路はいずれもアルファ運動ニューロンであり、下位運動ニューロンのみならず上位運動ニューロンの興奮性を反映することが報告されている^{6,7)}。また、上位ニューロン損傷後

の慢性期において痙縮が増加している症例においては、F波の出現率が正常群に比較して増加していることが報告されている^{8,9)}。

経頭蓋磁気刺激 (TMS) は、電磁誘導の原理を用いて頭皮上に置いたコイルに電流を瞬間的に流すことによって、皮膚や頭蓋骨などの影響を受けない誘導磁場を発生させる。これによって、コイルから数センチメートル離れた大脳皮質内に誘導電流を起こして、脳組織を刺激する方法である。医用電子系医用電子室にはMRガイド下に磁気刺激の部位を決定し、連続的な高頻度刺激が可能である経頭蓋磁気刺激装置を有しており、この装置を使用して、大脳皮質運動野の目的とする刺激部位を非侵襲的に刺激することができる (図1)。

本研究では、経頭蓋磁気刺激装置を用いた大脳皮質運動野刺激によるF波の変化を記録し、運動機能回復を目的とした慢性の大脳皮質運動野刺激の適応決定における有用性について検討した。

2. 対象及び方法

対象は右利きの健常成人14例と脳卒中を発症後2

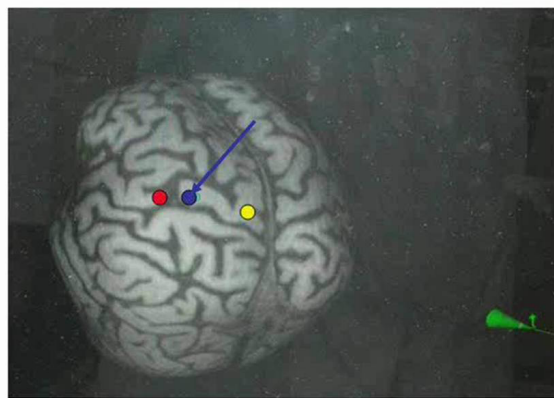


図1. フレームレス定位ナビゲーションシステム (Brainsight TMS) にて、運動野 (中心前回) の足の領域 (黄色)、手の領域 (青色)、顔の領域 (赤色) を同定したところ。

年以上経過して痙縮を認める12例とした。健常成人は男性12名、女性2名で、年齢の平均は 36.29 ± 11 歳。脳卒中後の症例は男性8例、女性4例で、平均年齢は 60.83 ± 5.65 歳であった。また、脳卒中後の症例におけるModified Ashworth Scale (筋緊張評価スケール) は2から4で、てんかんや頭蓋内金属の存在など経頭蓋磁気刺激の適応外となる症例は含まれていない。

脳卒中後の症例ではMRIを撮影し、フレームレス定位ナビゲーションシステム (Brainsight TMS, Rogue Research Inc. Canada) を用いて、中心前回のprecentral knob (手の領域) を同定し、直径70 mmの8の字コイルを磁気刺激装置 (Magstim Super

Rapid, The Magstim Company Limited, Whitland, UK) につないで刺激を行なった。脳卒中後の症例に対する高頻度経頭蓋磁気刺激の刺激強度決定には、健側の刺激によって運動を誘発する運動誘発閾値をそれぞれの症例ごとに決定し、この運動誘発閾値の110%の強度で患側の大脳皮質運動野 (手の領域) を刺激した。刺激は磁気刺激の安全ガイドライン (日本臨床神経生理学会) にしたがって、10Hzで1000発の刺激を行なった。

F波の記録には、表面電極を用いて刺激幅0.2 ms、刺激強度20-50 mAで、手首の部位で尺骨神経を刺激した。刺激強度は最大の複合筋電位 (CMAPs) が記録される120%の強度を用いて、50回の記録を行なった。記録は、第1背側骨間筋 (FDI) の筋腹に閾電極、第2中手骨頭に不閾電極を置き、刺激電極と記録電極の間に接地し、band pass 20 Hz - 5 KHzで、MEB-2208 (Nihon Kohden, Tokyo, Japaqn) を用いて記録した。健常人では右側からF波の記録のみを行い、脳卒中後の症例ではrTMS前とrTMS直後に麻痺側からF波を記録した。F波の変化については、1) F波の出現率、2) F波の振幅、3) 末梢神経を刺激したときにアルファ運動神経を介して興奮が順行性に筋までたどり着いて生じる活動電位であるM波とF波との振幅比 (F/M比) について検討した (図3)。

本研究は、日本大学板橋病院臨床研究審査委員会の承認を得て行なった。

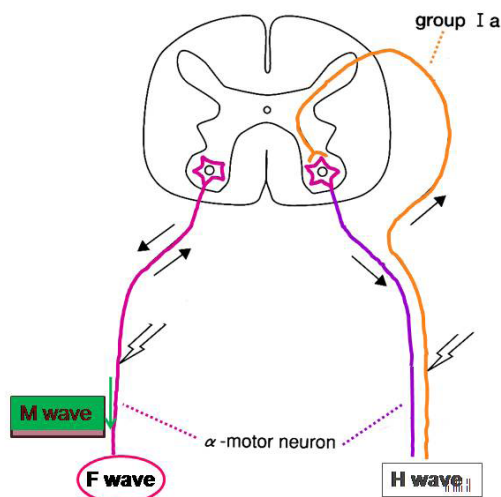


図2 F波、H波、M波の経路の違い

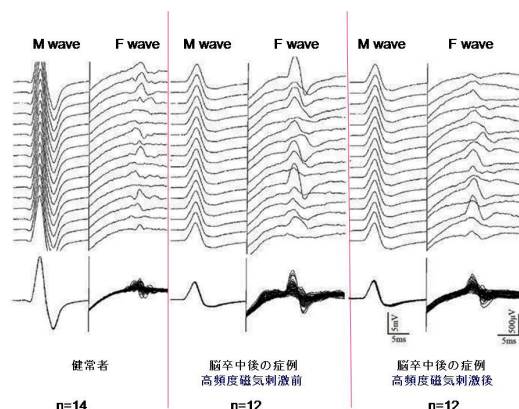


図3 M波とF波の記録波形。健常者 (左)、脳卒中症例の高頻度磁気刺激前 (中)、脳卒中症例の高頻度磁気刺激後 (右) の比較。下段は上段を重ね書きしたものである。

3. 結果

F波の平均振幅は、脳卒中後症例において高頻度経頭蓋磁気刺激前が $223.44 \pm 107.27 \mu\text{V}$ 、健常例で $151.97 \pm 60.98 \mu\text{V}$ であり、脳卒中後症例では高頻度経頭蓋磁気刺激前に比較して刺激後でF波の振幅低下を認めたが、個々の症例間の振幅にかなりの相違を認めたため、統計学的な有意差は認められなかった。

一方、F波の出現率は、健常例では $54.29 \pm 22.67\%$ 、脳卒中後症例では $86.5 \pm 14.35\%$ で、健常例に比較して脳卒中後の症例で有意にF波の出現率が高かった ($p < 0.001$, paired t-test)。また、脳卒中後の症例では高頻度経頭蓋磁気刺激後にF波の出現率が $76.17 \pm 19.62\%$ と有意に低下した ($p < 0.01$, paired t-test)。

F/M比は、健常例で 0.84 ± 0.45 、脳卒中後の症例においては高頻度経頭蓋磁気刺激前が 2.44 ± 1.69 であり、健常例に比較して脳卒中後症例において有意にF/M比が高値であった ($p < 0.01$, paired t-test)。また、脳卒中後症例では高頻度経頭蓋磁気刺激後にF/M比が減少した ($p < 0.05$, paired t-test) (図4)。

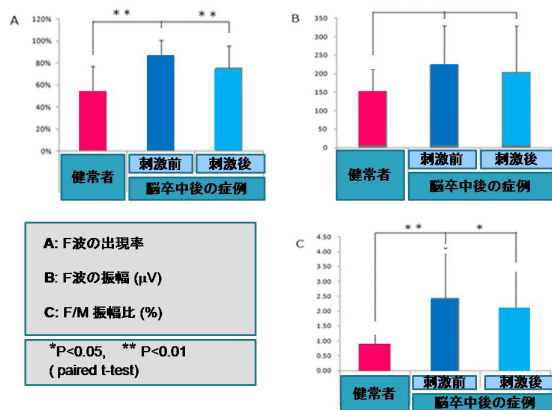


図4 健常者、高頻度磁気刺激前、高頻度磁気刺激後のF波の出現率、振幅、F/M比の比較

4. 考察

痙縮が認められる脳卒中後の症例では、健常例に比較してF波の出現率とF/M比が有意に増加していた事実は、上位ニューロン障害によってF波の出現率やF/M比が増加するとのこれまでの報告と一致する^{10,11)}。また、脳卒中後の症例に対する高頻度

経頭蓋磁気刺激によってF波の出現率とF/M比が減少することを明らかにしたのは、この研究が最初である。

脳卒中後疼痛 (Post-stroke pain) に対する大脳皮質運動野慢性電気刺激療法は、日本大学脳神経外科で開発された治療法である¹²⁾。現在は、世界各国で臨床応用され、その有効性が確認されるとともに、各種の神経障害性疼痛の治療に広く用いられるようになった¹³⁻¹⁶⁾。また、脳卒中後の運動機能回復の新たなニューロモデュレーション技術としての検討が行われている²⁵⁾。

慢性の大脳皮質運動野刺激は、バッテリー内蔵型の刺激装置を前胸部皮下に慢性植込みして、大脳皮質運動野上の硬膜外腔に留置した4連の円盤電極と結線して刺激を行なう方法であり、この方法では刺激のシステム全体が完全に体内植込み型となっており、イメージ的には心臓ペースメーカーの刺激電極が、頭蓋内に存在するような形になる。これまでに視床痛やワレンブルグ症候群などの脳卒中後疼痛の治療を目的として大脳皮質運動野刺激をおこなった症例の中に、四肢ならびに顔面の運動麻痺や発声が改善する症例を数多く存在することが報告されている^{1,2)}。また、海外では多くの多施設共同研究が行われ、有効例と無効例が混在していることが報告されている³⁻⁵⁾。

運動機能回復を目的とした慢性の大脳皮質運動野刺激の適応を決定するにあたっては、高頻度経頭蓋磁気刺激を用いた大脳皮質運動野の刺激によるF波の出現率とF/M比について検討することが有用である。また、高頻度経頭蓋磁気刺激によって、F波の出現率とF/M比が十分に減少する症例を選択して慢性の大脳皮質運動野刺激を行うことにより、手術成績を向上させることができるものと考えられる。

5. 結語

日本大学医学部医学研究支援部門医用電子系医用電子室で臨床研究に使用することができる高頻度経頭蓋磁気刺激装置を用いて、大脳皮質運動野刺激によるF波の変化について検討した。脳卒中後の運動機能回復を目的として慢性の大脳皮質運動野刺激の適応となる症例を選択するには、高頻度経頭蓋磁気刺激を用いた大脳皮質運動野刺激を行い、F波の出現率とF/M比が著しく減少する症例を選択するこ

とが必要である。

文献

- 1) Katayama Y, Fukaya C, Yamamoto T, et al.: Post-stroke pain control by chronic motor cortex stimulation: neurological characteristics predicting a favorable response. J Neurosurg 1998; 89: 585-591.
- 2) Yamamoto T, Katayama Y, Watanabe M, et al.: Changes in motor function induced by chronic motor cortex stimulation in post-stroke pain patients. Stereotact Funct Neurosurg 2011; 89: 381-389.
- 3) Brown JA, Lutsep HL, Weinand M, et al.: Motor cortex stimulation for the enhancement of recovery from stroke: a prospective, multicenter safety study. Neurosurgery 2006; 58: 464-473.
- 4) Levy R, Ruland S, Weinand M, et al.: Cortical stimulation for the rehabilitation of patients with hemiplegic stroke: a multicenter feasibility study of safety and efficacy. J Neurosurg 2008; 108: 707-714.
- 5) Harvey RL, Winstein CJ.: Design for the everest randomized trial of cortical stimulation and rehabilitation for arm function following stroke. Neurorehabil Neural Repair 2009; 23: 32-44.
- 6) Kimura J: F-wave velocity in the central segment of the median and ulnar nerves. A study in normal subjects and in patients with Charcot-Marie-Tooth disease, Neurology 1974; 24:539-46.
- 7) Rivner MH: The use of F-waves as a probe for motor cortex excitability. Clin Neurophysiol 2008; 119:1215-6.
- 8) Hara M, Kimura J, Walker DD et al.: Effect of motor imagery and voluntary muscle contraction on the F wave. Muscle Nerve 2010; 42:208-12
- 9) Taniguchi S, Kimura J, Yamada T, et al.: Effect of motion imagery to counter rest-induced suppression of F-wave as a measure of anterior horn cell excitability. Clin Neurophysiol 2008; 119:1346-52
- 10) Drory VE, Neufeld MY, Korczyn AD: F-wave characteristics following acute and chronic upper motor neuron lesions. Electromyogr Clin Neurophysiol 1993; 33:441-446.
- 11) Udby Blicher J, Nielsen JF: Evidence of increased motoneuron excitability in stroke patients without clinical spasticity. Neurorehabil Neural Repair 2009; 23:14-16.
- 12) Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, et al.: Chronic motor cortex stimulation in patients with thalamic pain. J Neurosurg 1993; 78: 393-401.
- 13) Yamamoto T, Katayama Y, Hirayama T, et al.: Pharmacological classification of central post-stroke pain: comparison with the results of chronic motor cortex stimulation therapy. Pain 1997; 72: 5-12.
- 14) Nguyen JP, Lefaucheur JP, Decq P, et al.: Chronic motor cortex stimulation in the treatment of central and neuropathic pain. Correlations between clinical, electrophysiological and anatomic data. Pain 1999; 82: 245-251.
- 15) Garcia-Larrea L, Peyron R, et al.: Electrical stimulation of motor cortex for pain control: a combined PET-scan and electrophysiological study. Pain 1999;

83: 259-273.

- 16) Saitoh Y, Shibata M, Hirano S, et al.: Motor cortex stimulation for central and peripheral deafferentation pain. Report of 8 cases. J Neurosurg 2000; 92: 150-155.

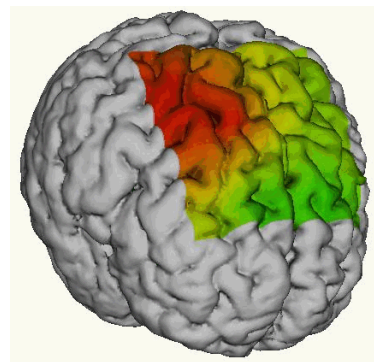
医用電子室

(人の生体電気現象等の計測と解析)

人間の電気生理に関する計測，解析を行っています。

計測用の生体アンプや刺激装置を多種類用意しており，得られたデータをデジタル変換し潜時計測，フィルター処理，FFT解析，マッピング解析などに応用することができます。

また，Visual Basicを利用した簡単な信号処理プログラムの関数ライブラリーをいろいろ用意しており，目的に応じたオリジナルプログラムを作成し効率のよい，幅の広い研究に利用することができます。



日大医学部キャンパスにおける大気中放射性物質に関する研究

佐貫榮一^{1, 2)}, 矢野希世志^{1, 2)}, 会田良行¹⁾, 宮本政憲¹⁾,
村井一郎³⁾, 坂口雅州²⁾, 原留弘樹²⁾, 阿部 修²⁾

Radionuclide in the air of Nihon University School of Medicine

Eiichi SANUKI^{1, 2)}, Kiyoshi YANO^{1, 2)}, Yoshiyuki AIDA¹⁾, Masanori MIYAMOTO¹⁾,
Ichiro MURAI³⁾, Masakuni SAKAGUCHI²⁾, Hiroki HARADOME²⁾, Osamu ABE²⁾

要旨 (abstract)

平成23年3月11日の東日本大震災に続く福島原発事故によると思われる大気中放射性物質が3月15日に東京でも検出され放射線障害防止法令七条に定める濃度限度を一時的に越えたが、3か月積算限度は越えなかった。また、皮膚吸収線量(換算)および預託実効線量も最大に見積っても、一般人の年度限度は1mSvの6000分の1以下で安心・安全な概算量であった。

(Although the radioactive material in the atmosphere considered to be based on the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Station Accident following the Great East Japan Earthquake on March 11 2012 exceeded temporarily the concentration limit which is detected in Tokyo on March 15 and provided in radiation injury prevention article 7 of a statute, the cumulated limit was not exceeded for three months. Moreover, even if it also estimated the skin absorption dose (conversion) and the depositary effective dose to be the maximum, the public fiscal year limit dose (1mSv) was safe at 1/6000 or less.)

1. はじめに

平成23年3月11日の東日本大震災に続く福島原発事故によると思われる大気汚染が懸念され、この4日後は平成23年3月15日に、病院で常時大気中の放射性物質を計測しているγ線ガスモニタの値が、放射線障害防止法令七条に定める濃度限度を越えた。

そこで我々は医学部の学生・教職員の安全を守るため大気中の放射性濃度を引き続き経時的に観察した。

2. 方法

大気中放射性物質の測定は、日本大学医学部附属日本大学板橋病院(以下、日大板橋病院と略す)に常設されたγ線ガスモニタDGM-151型モニタを用いた。

また日大医学部キャンパスの放射性物質はγ-survey meter TCS-161 (Aloka)などを同時に併用し

密着法で測定した。なおWell gamma system ARC-300 (Aloka)を適宜に使用した。

3. 結果

(1) 日大医学部キャンパスの大気中放射性物質

この濃度は測定・検出が不可能(以下、NDと略す)であったが、平成23年3月15日19時に最大 $44.7 \times 10^3 \text{ Bq/cm}^3$ (^{99m}Tc 換算)であった。

この最大値は、放射線障害防止法令に定める濃度限度である $6.00 \times 10^3 \text{ Bq/cm}^3$ の7倍であった。また、平均は $14.0 \times 10^3 \text{ Bq/cm}^3$ で2倍であった。

放射線障害防止法令に定める濃度限度は、3か月の平均と規程されている。そこで、経時的に観測・測定した。

(2) 医学部キャンパスの濃度分布

これら放射能の変動パターンは東京都における変動と同様であった。

1) 日本大学医学部 総合医学研究所 医学研究支援部門 ラジオアイソトープ・環境保全系
2) 日本大学医学部 放射線医学系
3) 日本大学医学部 総合医学研究所 医学研究支援部門
佐貫榮一: sanuki.eiichi@nihon-u.ac.jp

4. 考察

(1) モニターをおこなった理由

放射線障害防止はこれを取り扱う従事者および一般は公衆の方々の安全・安心を確保するように放射線障害防止法などで規定・厳しく管理されている。

放射性物質 (RN: Radionuclide) を取り扱う施設においては, RNが管理区域から外部に出ないように管理されている。このうち大気中に排出される放射性物質の濃度は放射線障害防止法令に定められている。

また, 学校法にも「学生・教職員の安全を守る」との定めがある。

(2) 測定方法について

各種放射性物質がそれぞれにどの程度の放射能を有するかを精密に測定するにはGe半導体検出器を用い, この γ 線スペクトロメトリーから算出する。

しかし, 本装置は当施設にはない。われわれは, 測定時にいくつかの点に留意し, エネルギー特性や基準線源との換算図をもちい, 井戸型計測を併用するなどの工夫によって, 一次スクリーニングおよびモニターリングはできると考え, 日本核医学会関東地方会で発表した¹⁾。

(3) 福島原発事故との関係

日大練馬光が丘病院, 日本大学量子医学研究所電子線利用研究施設LEBRA (Laboratory for Electron Beam Research and Application:

以下, LEBRAと略す) および東京都のモニタでそれぞれに観測した結果は同様のパターンを示していた。

また, 大気中の放射性物質の量・変動パターン・ヨードとセシウムの比率など (IAEA, 日本大学医学部附属日本大学板橋病院, 東京都が発表のデータ) から福島原発事故に起因するものと考えられた。

(4) 遠方にもかかわらずRNを検出した理由

福島原発の水素爆発に伴う大気中放射性物質が南下し, 同時刻に風向きが変わって東京の地表にも降下したものと思われた。

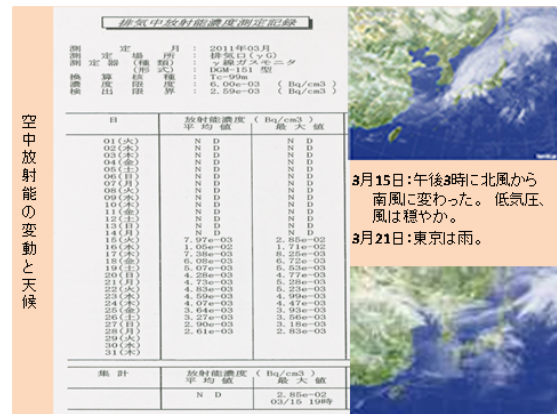


図1. 空中放射能の変動と天候
Radionuclide Fallout and The Weather



図2. 日本大学医学部キャンパスの放射性物質濃度
Concentration of radioactive material at the campus in
Nihon University School of Medicine
No hot spot in NUSM (Hot spot > 0.4 μ Sv/h)

5. 結語

日本大学医学部キャンパスにおける大気中の放射性物質は, 安心安全な量と考えられた。

6. 関連学会発表等

- 1) 佐貫榮一. 福島原発震災時の東京における空中放射能の変動・モニターリング. 第75回 日本核医学会 関東甲信越地方会, (東京) 2011.7.23
- 2) 佐貫榮一. セシウムも含めた放射性物質の人体への影響. 第18期 日本機械学会 公開講座, (千葉) 2012.3.10
- 3) 佐貫榮一, 矢野希世志, 会田良行, 宮本政憲, 村井一郎, 坂口雅州, 原留弘樹, 阿部修. 日本大学医学部キャンパスの土壌の放射性物質. 第510

回 日大医学会例会, (東京) 2012.3.24 (抄録: 日大医学雑誌:71巻, 3号, 231-232頁)

- 4) 佐貫榮一, 村井一郎, 竹本明子, 藤井元彰, 藤岡和美, 田中生恵, 阿部修. 日大練馬光が丘病院の土壌の放射性物質. 第510回 日大医学会例会, (東京) 2012.3.24 (抄録: 日大医学雑誌:71巻, 3号, 232頁)

ラジオアイソトープ・環境保全系

概要: RI実験室は平成4年にRI研究棟として竣工した。放射線障害予防規程に従って放射性同位元素(RI)を使用する実験が安全・安心して行える施設である。

このために、利用者の放射線業務従事の登録、健康診断、個人被曝線量測定、施設の放射線量、廃棄・排水の濃度限度などを管理している。また、学内の放射線安全管理に関する教育およびRI利用者に対する教育・訓練の実施、大学院生対象の講義および

微量放射能測定実験実習などを実施している。

研究においては、生化学、免疫・アレルギー学、内分泌のラジオイムノアッセイ、ゲノム解析関連におけるRIを用いた研究がおこなわれている。

また、医学部及び附属病院の作業環境測定も行っております。

主な実施事項:

- (1) 核内受容体や蛋白質の標式

DNAの標識および核内蛋白質のPAN結合活性の測定, GST-VDRと³⁵SをラベルしたCofactorとの相互作用, ビタミン受容体に対するリガンド結合との競合阻害の測定, 糖尿病におけるグルカゴン分泌異常の研究など。

- (2) 作業環境測定:

医学部・板橋病院・駿河台病院においてホルムアルデヒド・エチレンオキシドを測定。



RI 研究棟の正面玄関



放射線測定室



RI 排水設備



作業環境測定

ラボラトリーアニマル系による医学研究支援の現状

藤田順一¹⁾, 谷口由樹¹⁾, 石田和久¹⁾, 黒田和道¹⁾Medical Research Activities Supported by the Section
of Laboratory AnimalsJunichi FUJITA¹⁾, Yoshiki TANIGUCHI¹⁾, Kazuhisa ISHIDA¹⁾, Kazumichi KURODA¹⁾医学研究支援部門 ラボラトリーアニマル系
動物飼育室・動物実験室

実験医学研究棟外観



SPF ブタ飼育室

日本大学医学部の動物実験は、平成21年4月に定められた「日本大学動物実験運営内規」に則り実施されています。この内規は「動物の愛護及び管理に関する法律」, 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」, 文部科学省策定の「研究機

関等における動物実験等の実施に関する基本指針」, 及び日本学術会議作成の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に基づき, 科学的観点はもとより動物愛護及び環境保全の観点に加え, 動物実験での教職員・学生の安全確保の観点から, 本学における動物実験を適正に実施するための必要事項を定めています。

「日本大学動物実験運営内規」では, 「法及び飼養保管基準に基づき, 動物実験等を行う際の原則である代替法の利用 (Replacement), 実験動物の使用数の削減 (Reduction) 及び苦痛軽減 (Refinement) を考慮し, 適正に行わなければならない」とあり, 動物実験の実施に当たっては3Rの原則に則り実施することを規定しています。必要かつ十分な頭数の動物の使用で済むように, 動物実験の実施前に実験の適切性が厳しく審査されています。適切と判断された実験だけが, 本施設で実施されています。

ラボラトリーアニマル系は医学部の中心的な実験動物施設であり, 動物飼育室は実験医学研究棟に, また, 動物実験室は基礎教育研究棟1号棟に配置されています。

【動物飼育室】 実験医学研究棟 (動物飼育室) は, 日本大学医学部実験医学研究所として昭和41年6月に竣工しました。3階建ての独立棟で, 医学部内での研究・教育目的にあった実験動物の飼育管理と実験を行うための施設です。

本学の内規に則り, 施設等管理者・実験動物管理

1) 日本大学医学部 医学研究支援部門 ラボラトリーアニマル系
黒田和道: kuroda.kazumichi@nihon-u.ac.jp

者・飼養者（一級・二級実験動物技術者）を置き、実験動物の飼育管理及び動物実験の適正な遂行に努めています。

動物実験関係者は、毎年開催する「動物実験に関する教育訓練」を受講することが必須であり、受講者は施設利用登録手続き後IDカードによる入室が可能となっています。

【動物実験室】 各種動物実験を行う施設で、小動物を対象とした小動物実験室と中型動物を対象としたCアーム（エックス線装置）等の各種実験装置を備えた循環機能室があり、専任のスタッフにより実験をサポートしています。

【ラボラトリーアニマル系実験動物施設を使用している業績】

原著論文

内科学系 循環器内科学分野

Ichiro Watanabe, Yasuo Okumura, Kimie Ohkubo, Koichi Nagashima, Kazumasa Sonoda, Hiroaki Mano, Masayoshi Kofune, Atsushi Hirayama. Pharmacologic Atrial Defibrillation by Delivery Into the Temporarily Occluded Coronary Sinus A Canine Study. *International Heart Journal* 2012, 53 (2): 125-128.

Kimie Ohkubo, Ichiro Watanabe, Yasuo Okumura, Masayoshi Kofune, Koichi Nagashima, Kazumasa Sonoda, Hiroaki Mano, Toshiko Nakai, Satoshi Kunimoto, Yuji Kasamaki, Atsushi Hirayama. A Novel Technique for Improved Lesions in the Coronary Sinus Comparison of Bipolar and Unipolar Ablation. *International Heart Journal* 2012, 53 (2): 129-132.

外科学系 消化器外科分野

Naoko Kutsuna, Shintaro Yamazaki, Teruo Kaiga, Yoshinori Inagak, I, Yuki Hayashi, Shunji Okada, Akira Kanamoto, Tadatashi Takayama. Partially MHC-Matched Donor CD8+ T Cells are Indispensable for Switching to Splenocytic Chimerism. *Journal of Surgical Research* 2012, 175: 62-6.

Naoko Kutsuna, Shintaro Yamazaki, Teruo Kaiga, Yoshinori Inagak, I, Yuki Hayashi, Akira Kanamoto,

Shunji Okada, Tadatashi Takayama. Chimeric acceleration by donor CD4+CD25+T-reg depleted fraction in splenocyte transplantation. *Journal of Surgical Research* 2012, 178: 133-138.

外科学系 心臓血管・呼吸器・総合外科分野

高森達也, 折目由紀彦, 中田金一, 塩野元美, 古場隼人. 冠動脈バイパスにおけるグラフト流量波形分析に関する実験的検討. *日本冠疾患学会雑誌* 2012, 18 (1): 12-20.

Kinichi Nakata, Yukihiro Orime, Kenji Akiyama, Hayato Koba, Yoshiyuki Sankai, Motomi Shiono. Novel Device Accurately Measures Graft Resistance and Compliance to Ensure Quality of Coronary Artery Bypass. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2012, 18(5): 438-443.

脳神経外科学系 神経外科学分野

Takashi Eriguchi, Nobuo Kutsuna, Yuko Kondo, Jie Shi, Yoshihiro Murata, Hideki Oshima, Kaoru Sakatani, Yoichi Katayama. Influence of Stress Preconditioning on Hippocampal Cell Death Neurogenesis in Rat Cerebral Ischemia. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2012, 737: 57-61.

視覚科学系 眼科学分野

Yusuke Hara, Jun Shoji, Shinsuke Hori, Akiko Ishimori, Hiroyuki Kato, Noriko Inada, Mitsuru Sawab. Evaluation of Eosinophilic Inflammation in a Novel Murine Atopic Keratoconjunctivitis Model Induced by Crude Dermatophagoides farinae Antigen. *Allergy International* 2012, 61: 331-338

Tohru Sakimoto, Mitsuru Sawa. Metalloproteinases in Corneal Diseases: Degradation and Processing. *Cornea* 2012, 31; S50-S56.

Tohru Sakimoto, Satoshi Sugawa, Akiko Ishimori, Mitsuru Sawa. Anti-inflammatory effect of IL-6 receptor blockade in corneal alkali burn. *Experimental Eye Research* 2012, 97: 98-104.

機能形態学系生体構造医学分野

Kazuo Aisaki, Idao Tsuboi, Tomonori Harada, Hideki Oshima, Akiko Yamashita, Yoko Hirabayashi, Jun Kanno, Tohru Inoue, Shin Aizawa. Neopterin, inflammation-associated product, prolongs erythropoiesis suppression in aged SAMP1 mice due to senescent stromal-cell impairment. *Experimental Biology and Medicine* 2012, 237: 279-286.

Isao Tsuboi, Tomonori Harada, Yoko Hirabayashi, Jun Kanno, Tohru Inoue, Shin Aizawa. Age-related decline of mast cell regeneration in senescence-accelerated mice (SAMP1) after chemical myeloablation due to senescent stromal cell impairment. *Experimental Biology and Medicine* 2012, 237: 1289-1297.

機能形態学系 細胞再生・移植医学分野

Han Y, Fukuda N, Ueno T, Endo M, Ikeda K, Xueli Z, Matsumoto T, Soma M, Matsumoto K. Role of complement 3a in the synthetic phenotype and angiotensin II-production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension* 2012, 25(3): 284-289.

松村昌治, 松本太郎, 加野浩一郎, 麦島秀雄. 家兔下肢虚血モデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 自家移植の効果. 日大医学雑誌 2013, in press

Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, Kazama M, Kano K, Ryu J, Tokuhashi Y, Matsumoto T. Osteogenic effects of dedifferentiated fat (DFAT) cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy (OVX)-induced osteoporosis. *Tissue Engineering Part A* 2013, In press,

生体機能医学系 分子細胞免疫・アレルギー学分野

Satoshi Nunomura, Yuko Kawakami, Toshiaki Kawakami, Chisei Ra. The FcR β - and γ -ITAMs Play Crucial but Distinct Roles in the Full Activation of Mast Cells Induced by IgE κ and Protein L. *Journal Immunology* 2012, 188(8): 4052-4064.

R. Kawaguchi, S. Nunomura, N. Umehara, T. Nikaido,

B. Huppertz, T. Tanaka, C. Ra. Multiple injections of anti-mouse β 2glycoprotein 1 antibody induce FcR γ -dependent fetal growth restriction (FGR) in mice. *Placenta* 2012, 33: 540-547.

Mino Ohtsubo-Yoshioka, Satoshi Nunomura, Tatsuki R. Kataoka, Yoshimichi Okayama, Chisei Ra. Fc receptor beta chain deficiency exacerbates murine arthritis in the anti-type II collagen antibody-induced experimental model. *Mod Rheumatol* 2012, In Press.

病態病理学系 微生物学分野

相澤 (小峰) 志保子, 早川 智. CBA/J \times DBA/2J流産マウスモデルにおける“当归芍薬散”“柴苓湯”の効果. 産婦人科漢方研究会 産婦人科 漢方研究のあゆみ 2012, (29): 71-73.

学会発表

内科学系 循環器内科学分野

福島聖二, 大島暢, 古川力丈, 池田和也, 井上尊文, 八幡貴治, 田中俊行, 高木康博, 永島正明, 丸山範晃, 平山篤志. 造影剤腎症予防のための新しい透析療法の開発. 第507回日本大学医学会 2012, 2.

Mitsumasa Sudo, Yuxin Li, Akira Onishi, Seiji Fukushima, Suzuki, Daiichiro Fuchimoto, Shoichiro Sembon, Masaki Iwamoto, Michiko Hashimoto, Hironori Haruta, Tadateru Takayama, Takafumi Hiro, Taro Matsumoto, Masako Mitsumata, Masahiko Sugitani, Satoshi Saito, Atsushi Hirayama. Development of Hypercholesterolemia-induced Complex Unstable Atherosclerotic Lesions in a Novel Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Pig. *The 85th American Heart Association* 2012, 11.

内科学系 腎臓高血圧内分泌内科学分野

丸山高史, 福田昇, 松本太郎, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 遠藤守人, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕. 免疫性腎炎の進行性腎障害に対する脱分化成熟脂肪細胞 (DFAT) 移植の効果. 第11回日本再生医療学会 2012, 6.

丸山高史, 福田昇, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 松本太

郎, 山元智衣, 遠藤守人, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕. 脱分化成熟脂肪細胞 (DFAT) 移植による単クローン抗体1-22-3誘発腎炎の改善. 第55回日本腎臓学会総会2012, 6.

丸山高史, 福田昇, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 松本太郎, 松本紘一, 相馬正義. 脱分化成熟脂肪細胞 (DFAT) の慢性腎炎モデルへの移植. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013,1.

常見明子, 上野高浩, 福田昇, 杉山弘, 相馬正義. HDLコレステロールを上昇させるABCA1をターゲットとしたPIポリアミドの開発. 私立大学戦略的研究基盤形成事業 平成24年度成果公開シンポジウム「炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞学」, 東京, 2013, 2.

丸山高史, 福田昇, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 松本太郎, 遠藤守人, 松本紘一, 相馬正義. 免疫性腎炎に対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植による免疫抑制作用. 私立大学戦略的研究基盤形成事業 平成24年度成果公開シンポジウム「炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞学」, 東京, 2013,2.

北井真貴, 梶原麻実子, 上野高浩, 福田昇, 羅智靖, 松本紘一, 相馬正義. 免疫性腎炎に対するFc受容体PIポリアミドの開発とSyk阻害薬の作用. 私立大学戦略的研究基盤形成事業 平成24年度成果公開シンポジウム「炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞学」, 東京, 2013, 2.

福田昇, 上野高浩, 遠藤守人, 松本紘一, 相馬正義. 補体C3による尿細管上皮間葉化を介した腎内レニン・アンジオテンシン系の活性化. 私立大学戦略的研究基盤形成事業 平成24年度成果公開シンポジウム「炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞学」, 東京, 2013, 2.

常見明子, 上野高浩, 福田昇, 相馬正義. ABCA1発現増加PIポリアミドのリポ蛋白プロファイル改善作用とその機序. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「ゲノム化学に基づく先進医療開発拠点」平成24年度報告会, 東京, 2013, 3

内科学系 先端心血管画像解析学分野

李予昕, 大西彰. 高コレステロール症/動脈硬化症モデルブタの開発. 農業生物資源研究所公開シンポジウム-ゲノム育種技術と医用モデルの開発, 東京, 2012, 11.

小児科学系 小児科学分野

風間美奈子, 石毛美夏, 辻 孝, 麦島秀雄, 松本太郎. 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の臍帯血移植における造血幹細胞生着促進効果に関する検討. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

村井健美, 石毛美夏, 谷ヶ崎博, 麦島秀雄, 松本太郎. マウス急性GVHDモデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植の治療効果. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

村井健美, 石毛美夏, 谷ヶ崎博, 麦島秀雄, 加野浩一郎, 松本太郎. 造血幹細胞移植後のGVHD発症に対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植の効果. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

外科学系 小児・乳腺内分泌外科学分野

細川崇, 小沼憲祥, 石岡茂樹, 小宮山翔梧, 越永従道, 加野浩一郎, 松本太郎. 脱分化成熟脂肪細胞 (DFAT) のT細胞増殖抑制効果とマウス皮膚移植の急性拒絶期における免疫抑制効果. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

細川崇, 石岡茂樹, 小沼憲祥, 池田太郎, 越永従道, 加野浩一郎, 松本太郎. 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の炎症性腸疾患に対する移植効果と新規治療法の検討. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

細川崇, 益子貴行, 松本太郎, 小沼憲祥, 井上幹也, 杉藤公信, 池田太郎, 越永従道. ハブ毒障害からの小腸絨毛の再生過程における骨髄由来細胞の関与の検討. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

形成外科学系 形成外科分野

副島一孝, 下田勝巳, 檜村勉, 浅見崇, 仲沢弘明,

松本太郎, 風間智彦. 人工真皮移植時のbFGF・脱分化脂肪細胞 (DFAT) 併用療法による真皮様組織構築促進療法. 第21回日本形成外科学会基礎学術集会, 福島, 2012, 10.

樫村勉, 副島一孝, 浅見崇, 森玲子, 下田勝巳, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明. 脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植によるラット背部皮弁の生着域拡大効果についての検討. 第21回日本形成外科学会基礎学術集会, 福島, 2012, 10.

浅見崇, 副島一孝, 樫村勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明. 脱分化脂肪細胞 (DFAT) とbFGFの併用がラット全層植皮の血管新生に及ぼす影響. 第21回日本形成外科学会基礎学術集会, 福島, 2012, 10.

副島一孝, 樫村勉, 浅見崇, 風間智彦, 仲沢弘明, 松本太郎. 人工真皮移植時の脱分化脂肪細胞 (DFAT) とbFGFによる真皮様組織構築促進効果の検討. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

樫村勉, 副島一孝, 浅見崇, 下田勝巳, 仲沢弘明, 風間智彦, 松本太郎. 脱分化脂肪細胞移植によるラット背部皮弁の生着域拡大効果についての検討. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

浅見崇, 副島一孝, 樫村勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明. DFATとbFGFの併用がラット全層植皮の血管新生に及ぼす影響. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

副島一孝, 下田勝巳, 樫村勉, 森玲子, 浅見崇, 福田康裕, 仲沢弘明, 松本太郎. 人工真皮移植時のbFGF・脱分化脂肪細胞 (DFAT) 併用療法-ラット実験モデルによる検討-. 第38回日本熱傷学会総会, 東京, 2012, 5.

Kazutaka Soejima, Tsutomu Kashimura, Takashi Asami, Katsumi Shimoda, Tomohiko Kazama, Taro Matsumoto, Hiroaki Nakazawa. EFFECTS OF bFGF and

DFAT (DEDIFFERENTIATED FAT) CELLS IN CASES OF ARTIFICIAL DERMIS GRAFTS; RAT EXPERIMENTAL STUDY. *The 11th Japan-Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery* (Hyogo, Japan) 2012, 5.

Takashi Asami, Kazutaka Soejima, Tsutomu Kashimura, Tomohiko Kazama, Taro Matsumoto, Hiroaki Nakazawa. Synergy effect of dedifferentiated fat (DFAT) cells and bFGF on angiogenesis in skin grafts-rat experimental study-. *The 11th Japan-Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery* (Hyogo, Japan) 2012, 5.

Tsutomu Kashimura, Kazutaka Soejima, Yasuhiro Fukuda, Risa Ebana, Takashi Asami, Satoko Mori, Hiroaki Nakazawa, Katsumi Shimoda, Hiroaki Nakazawa. REGENERATION OF JEJUNAL MUCOSA FOLLOWING FREE JEJUNAL TRANSFER. *The 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies* (Yokohama Japan) 2012, 9.

Kazutaka Soejima, Tsutomu Kashimura, Takashi Asami, Katsumi Shimoda, Tomohiko Kazama, Taro Matsumoto, Hiroaki Nakazawa. EFFECTS OF DFAT (DEDIFFERENTIATED FAT) CELLS IN CASES OF ARTIFICIAL DERMIS GRAFTS; RAT EXPERIMENTAL STUDY. *The 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies* (Yokohama Japan) 2012, 9.

Takashi Asami, Kazutaka Soejima, Tsutomu Kashimura, Tomohiko Kazama, Taro Matsumoto, Hiroaki Nakazawa. EFFECTS OF DEDIFFERENTIATED FAT CELLS AND BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN CASES OF FULL THICKNESS SKIN GRAFTS-RAT EXPERIMENTAL STUDY. *The 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies* (Yokohama Japan) 2012, 9.

副島一孝, 下田勝巳, 樫村勉, 高橋宏実, 森玲子, 浅見崇, 福田康裕, 仲沢弘明. 人工真皮移植に際してbFGFと脱分化脂肪 (DFAT) を併用した真皮様組織構築促進療法. 第30回日本臨床皮膚外科学会学

術大会, ベトナム, 2012, 11.

副島一孝, 樫村勉, 浅見崇, 風間智彦, 仲沢弘明, 松本太郎. 人工真皮移植時の脱分化脂肪細胞 (DFAT) とbFGFによる真皮様組織構築促進効果の検討. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

樫村勉, 副島一孝, 浅見崇, 下田勝巳, 仲沢弘明, 風間智彦, 松本太郎. 脱分化脂肪細胞移植によるラット背部皮弁の生着域拡大効果についての検討. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

浅見崇, 副島一孝, 樫村勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明. DFATとbFGFの併用がラット全層植皮の血管再生に及ぼす影響. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

外科学系 心臓血管・呼吸器・総合外科学分野

飯田絢子, 折目由紀彦, 中田金一, 高森達也, 塩野元美, 谷口由樹, 古場隼人. IABPが冠動脈バイパスグラフト流量波形に及ぼす影響に関する実験的検討. 第28回日本冠疾患学会 2012, 12.

整形外科系 整形外科分野

山田知裕, 風間智彦, 小宮山翔梧, 加野浩一郎, 新井嘉則, 本田雅則, 松本太郎, 徳橋泰明. マウス大腿骨骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞 (DFAT) の骨形成促進効果. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

佐久間俊行, 風間智彦, 徳橋泰明, 松本太郎. 椎間板変性症に対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 治療の可能性. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

泌尿器科学系 泌尿器科学分野

村田保貴, 大日方大亮, 高橋 悟, 松本太郎. 新規腹圧性尿失禁モデルの作出と脱分化脂肪細胞移植の効果. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

大日方大亮, 高橋悟. ピロール・イミダゾールポリアミドを用いた新規前立腺癌治療薬の開発. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「ゲノム化学に基づく先進医療開発拠点」平成24年度報告会, 東京, 2013, 3

視覚科学系 眼科学分野

中島基宏, 石森秋子, 稲田紀子, 庄司純, 澤充. 緑膿菌 exotoxin A点眼における結膜組織反応の検討. 第36回日本角膜学会総会, 東京, 2012, 2.

崎元暢, 菅谷哲史, 石森秋子, 澤充. アルカリ外傷角膜実質中の炎症関連分子発現に対するIL-6受容体阻害効果. 第116回日本眼科学会総会, 東京, 2012, 4.

Tohru Sakimoto, Satoshi sugaya, Takako Ohnishi, Akiko Ishimori, Mitsuru Sawa. Anti-inflammatory effect of IL-6 receptor blockade on experimental corneal alkali burn. *ARVO, Fort Lauderdale, (USA)*, 2012, 5.

吉田圭, 石森秋子, 稲田紀子, 庄司純, 澤充. β -D-グルカン点眼で誘導される結膜組織の免疫学的変化の検討. 第66回日本臨床眼科学会, 京都, 2012, 10.

原雄将, 庄司純, 堀真輔, 石森秋子, 稲田紀子, 澤充. 実験的アトピー性角膜炎モデルマウスにおける結膜組織内アレルギー炎症の検討. 第66回日本臨床眼科学会, 京都, 2012, 10.

機能形態学系 生体構造医学分野

原田智紀, 壺井功, 古作和寛, 原弘之, 井上達, 相澤信. 加齢に伴う造血微小環境の機能低下がB細胞造血に与える影響について. 第55回日本腎臓学会総会 2012, 6.

原田智紀, 壺井功, 古作和寛, 原弘之, 井上達, 相澤信. 加齢に伴う造血微小環境の機能低下がB細胞造血に与える影響について. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

機能形態学系 細胞再生・移植医学分野

小宮山翔梧, 風間智彦, 加野浩一郎, 松本太郎. ウサギ下肢虚血モデルを用いた脱分化脂肪細胞移植による血管再生効果. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1.

山元智衣, 萩倉一博, 松本太郎. 大動脈外膜に局在する血管内皮前駆細胞の解析および血管新生に関する検討. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1

風間智彦, 加野浩一郎, 松本太郎. 創傷皮膚再生過程における脱分化脂肪細胞 (DFAT) の移植効果. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1

風間智彦, 加野浩一郎, 松本太郎. ラット皮膚欠損モデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) シート移植の効果. 私立大学戦略的研究基盤形成事業 平成24年度成果公開シンポジウム「炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞学」, 東京, 2013, 2.

松本太郎, 風間智彦, 石岡茂樹, 細川 崇, 小沼憲祥, 加野浩一郎. 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の免疫制御能と臨床応用に向けた展望. 私立大学戦略的研究基盤形成事業 平成24年度成果公開シンポジウム「炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞学」2013, 2.

小高美奈子, 松本太郎, 石毛美夏, 辻孝, 野呂知加子, 小林寿美子, 谷ヶ崎博, 鈴木孝, 麦島秀雄:放射線照射が骨髄ストローマ機能に及ぼす影響と臍帯血生着促進を目的とした新規細胞治療. (ワークショップ) 第34回日本造血細胞移植療学会総会, 大阪, 2012. 2. 25

石岡茂樹, 小沼憲祥, 池田太郎, 越永従道, 加野浩一郎, 松本太郎:脱分化成熟脂肪細胞 (DFAT) のT細胞増殖抑制効果とマウス皮膚移植の急性拒絶期における免疫抑制効果. (口頭発表) 第49回日本小児外科学会学術集会, 横浜, 2012. 5. 15

細川崇, 杉藤公信, 小沼憲祥, 石岡茂樹, 金田英秀,

細田利史, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 松本太郎, 加野浩一郎:脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cells: DFAT) を用いた炎症性腸疾患への治療検討. (ポスター発表) 第49回日本小児外科学会学術集会, 横浜, 2012. 5. 14

河内秀臣, 前田英明, 梅澤久輝, 服部努, 中村哲哉, 加野浩一郎, 松本太郎, 塩野元美:脱分化脂肪細胞を用いたブタ虚血肢に対する自家細胞移植療法の検討. (口頭発表) 第40回日本血管外科学会学術総会, 長野, 2012. 5

松本太郎:幹細胞に関する最近の知見と新しい再生医療用細胞ソースの開発 (教育講演) 第35回日本呼吸器内視鏡学会学術集会, 東京, 2012. 5. 31

福田昇, Zhou Xueli, 池田和也, 上野高浩, 松本太郎, 相馬正義:補体 C3a-C3a 受容体系は腎間葉系細胞脱分化および上皮間葉化減少 (EMT) に関与する. (口頭発表) 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012. 6. 13

丸山高史, 福田昇, 松本太郎, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 遠藤守人, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕:免疫性腎炎に対する脱分化成熟脂肪細胞 (DFAT) 移植による細胞療法の試み. (口頭発表) 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012. 6. 13

小高美奈子, 松本太郎, 石毛美夏, 辻孝, 麦島秀雄:脱分化脂肪細胞 (DFAT) の造血細胞生着促進効果に関する検討. (口頭発表) 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012. 6. 12

村井健美, 石毛美夏, 谷ヶ崎博, 小宮山翔吾, 加野浩一郎, 麦島秀雄, 松本太郎:マウス急性GVHDモデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植の治療効果. (口頭発表) 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012. 6. 12

風間智彦, 山元智衣, 加野浩一郎, 松本太郎:ヒト成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞 DFAT の形質解析. (ポスター発表) 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012. 6. 12

石岡茂樹, 小沼憲祥, 池田太郎, 越永従道, 加野浩一郎, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の炎症性腸疾患モデルマウスに対する移植効果の検討. (ポスター発表) 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012. 6. 12

手塚里奈, 松本太郎, 石毛美夏, 麦島秀雄: 臍帯動脈p75NTR陽性細胞の形質解析. (ポスター発表) 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012. 6. 12

山田知裕, 松本太郎, 風間智彦, 小宮山翔吾, 清水学, 徳橋泰明: マウス由来脱分化脂肪細胞 (DFAT) による骨形成促進効果の検討 マウス大腿骨骨折モデルを用いた評価. (ポスター発表) 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012. 6. 12

Li Yuxin, 廣井透雄, 高山忠輝, 廣高史, 松本太郎, 齋藤穎, 平山篤志, Liao Rongli, Liao James K: Cardiac repair following myocardial injury is mediated by notch1 signaling in mesenchymal stem cells. (ポスター発表) 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012. 6. 12

萩倉一博, Jonan Dexelius, Konstantin Gaengel, 松本太郎, Christer Betsholtz: c-Cbl, Cbl-bはマウス胎児肝臓の血管新生と肝内造血を調節する. (ポスター) 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012. 6. 14

山元智衣, 萩倉一博, 松本太郎: 大動脈外膜における血管内皮前駆細胞の局在と血管新生への関与. (ポスター発表) 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012. 6. 14

片川まゆみ, 福田昇, 常見明子, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 森真理, 家森幸男, 松本太郎, 相馬正義: 健康成人における血管内皮前駆細胞 (EPC) 機能に対するタウリンおよびマグネシウム摂取の効果. (ポスター発表) 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012. 6. 14

村田保貴, 大日方大亮, 井門祐一郎, 咲間隆裕, 松本太郎, 加野浩一郎, 福田昇, 高橋悟: 新規ラット

尿道傷害モデル作製の検討. (口頭発表) 第9回泌尿器科再建再生研究会, 大分, 2012. 7. 28

秋田大輔, 新井嘉則, 山中克之, 金子正, 諸隈正和, 斉藤瑛子, 真下貴之, 秋山祐子, 月村直樹, 加野浩一郎, 松本太郎, 磯川桂太郎, 本田雅規: 高気孔径PLGAブロックを使用した脂肪組織由来間葉系幹細胞による歯周組織再生. (ポスター発表) 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012. 7. 6

風間智彦, 山元智衣, 加野浩一郎, 松本太郎: ヒト成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞DFATの形質分析. (ポスター発表) 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012. 7. 5

手塚里奈, 松本太郎, 石毛美夏, 麦島秀雄: ヒト臍帯動脈組織に存在するp75NTR陽性細胞の形質解析. (ポスター発表) 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012. 7. 5

風間美奈子, 松本太郎, 石毛美夏, 辻孝, 麦島秀雄: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の臍帯血移植生着促進効果に関する検討. (ポスター発表) 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012. 7. 5

山元智衣, 萩倉一博, 松本太郎: 大動脈外膜に局在する血管内皮前駆細胞の検討. (ポスター発表) 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012. 7. 5

Ueno T, Tsunemi A, Tahira K, Matsumoto T, Fukuda N, Soma M: Pharmacological inhibition of heat shock protein 70 reduced actin fiber conformational change through cofilin phosphorylation in 3T3-L1 cells during adipogenesis. (ポスター発表) 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 福岡, 2012. 7. 20

Ueno T, Tsunemi A, Tahira K, Matsumoto T, Fukuda N, Soma M: Modification of insulin signaling to glucose transport in differentiated 3T3-L1 cells by the pharmacological inhibition of heart shock protein 70. (ポスター発表) 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 福岡, 2012. 7. 20

Tahira K, Ueno T, Fukuda N, Nagura C, Kitai M, Hatanaka Y, Tsunemi A, Matsumoto T, Fukuda N, Soma M: Effect of Ezetimibe on endothelial function and inflammation markers. (ポスター発表) 第44回日本動脈硬化化学会総会・学術集会, 福岡, 2012. 7. 20

村田保貴, 大日方大亮, 松本太郎, 井門祐一郎, 咲間隆裕, 加野浩一郎, 福田昇, 高橋悟: 膣拡張と卵巣摘除を併用したラット腹圧性尿失禁モデルの検討. (口頭発表) 第14回日本女性骨盤底医学会, 大阪, 2012. 7. 28

河内秀臣, 松本太郎, 加野浩一郎: 脱分化脂肪細胞を用いたブタ虚血肢に対する自科細胞移植治療の検討. (口頭発表) 日本血管外科学会地方会, 広島, 2012. 7. 28 (削除)

Asami T, Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: Effects of dedifferentiated fat cells and basic fibroblast growth factor in cases of full thickness skin grafts -rat experimental study-. (Poster) 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies, Yokohama, 2012. 6. 2

Soejima K, Kashimura T, Asami T, Shimoda K, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: Effects of DFAT (dedifferentiated fat) cells in cases of artificial dermis grafts, rat experimental study. (Poster) 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies, Yokohama, 2012. 6. 2

松本太郎, 上野高浩: 骨欠損および骨粗鬆症モデルウサギに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 自家移植の骨形成効果. (優秀演題賞候補セッション) 第54回日本老年医学会学術集会・総会, 東京, 2012, 6, 30

片川まゆみ, 福田昇, 常見明子, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 森真理, 家森幸男, 松本太郎, 相馬正義: タウリンおよびマグネシウム摂取による血管内皮前駆細胞 (EPC) 機能に対する効果の検討. (ポスター発表) 第35回日本高血圧学会総会, 名古屋, 2012, 9, 21

上野高浩, 福田昇, 常見明子, 羽毛田公, 池田友紀博, 田平和宣, 畑中善成, 松本太郎, 相馬正義: Heat Shock Protein 70の3T3-L1細胞脂肪蓄積過程におけるアクチンフォーメーション変化における役割. (ポスター発表) 第35回日本高血圧学会, 名古屋, 2012, 9, 21

丸山高史, 福田昇, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 松本太郎, 遠藤守人, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕: 免疫性腎炎の進行性腎障害に対する脱分化成熟脂肪細胞 (DFAT) 移植の効果. (ポスター発表) 第35回日本高血圧学会, 名古屋, 2012, 9, 21

山田知裕, 松本太郎, 風間智彦, 小宮山翔吾, 加野浩一郎, 新井嘉則, 本田雅規, 徳橋泰明, マウス大腿骨骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞 (DFAT) の骨癒合促進効果. (口頭発表) 第27回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 2012, 10, 27

佐久間俊行, 松本太郎, 風間智彦, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 脱分化脂肪細胞 (DFAT) を用いた椎間板変性症に対する治療法の検討. (口頭発表) 第27回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 2012, 10, 26

Hagikura H, Yamamoto C, Matsumoto T: Mature adipocyte derived multipotent cells differentiate into mural cells. (ポスター発表) 第20回日本血管生物医学学会, 徳島, 2012. 12. 6

Yamamoto C, Hagikura K, Matsumoto T: Localization and characterization of vascular resident endothelial progenitor cells in rat aorta. (ポスター発表) 第20回日本血管生物医学学会, 徳島, 2012. 12. 6

丸山高史, 福田昇, 松本太郎, 渡辺めぐみ, 河内裕, 免疫性腎炎の進行性腎障害に対する脱分化成熟脂肪細胞 (DFAT) 移植の効果. (口頭発表) 第16回循環器再生医療研究会, 東京, 2012, 11, 17

生体機能医学系 生化学分野

石澤通康, 小倉道一, 加藤茂明, 槇島誠, 胆汁鬱滞モデルマウスにおけるビタミンD受容体の機能解

析, 第64回ビタミン学会総会 2012, 1,

生体機能医学系 分子細胞免疫・アレルギー学分野

大坪 (吉岡) 美乃, 布村聡, 羅智靖, 接触過敏症におけるIgEおよびFc receptorの機能解析, 私立大学戦略的研究基盤形成事業 平成24年度成果公開シンポジウム「炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞学」, 東京, 2013, 2,

布村聡, 羅智靖, 高親和性IgE受容体 (Fc ϵ RI) β 鎖によるマスト細胞活性化機構の解析, 私立大学戦略的研究基盤形成事業 平成24年度成果公開シンポジウム「炎症と難治性免疫・アレルギー疾患の分子細胞学」, 東京, 2013, 2,

病態病理学系 微生物学分野

相澤 (小峰) 志保子, 早川智, CBA/J \times DBA/2J 反復流産マウスモデルに対する新たな治療戦略と免疫学的解析, 第64回日本産婦人科学会学術講演会, 神戸, 2012, 4,

相澤 (小峰) 志保子, 抗結核免疫応答における加齢の影響について, 同窓会60周年記念医学奨励金研究助成金 受賞者成果報告 2012, 12,

相澤 (小峰) 志保子, アロ免疫による流産マウスモデルに対する新たな治療戦略と免疫学的解析, 平成24年度内連携若手研究者ポスターセッション 2012, 12,

総合医学研究所難治疾患治療開発グループ

田口紋子, TGF β 抑制PIポリアミドによる脳腫瘍に対する腫瘍化抑制効果の検討, 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「ゲノム化学に基づく先進医療開発拠点」平成24年度報告会, 東京, 2013, 3

日本大学大学院総合科学研究科生命科学

福田昇, Zhou Xueli, 池田和也, 上野高浩, 松本太郎, 相馬正義, 補体C3a-C3a受容体は腎間葉系細胞分化および上皮間葉系 (EMT) に関与する, 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2013, 1,

総説

遠藤守人, 松本紘一, 福田昇, 丸山高史, 北井真貴, 上野高浩, 松本太郎, 慢性腎臓病に対する新たな治療戦略, 八戸大学紀要 2012, 45:79-87,

著書

松本太郎, 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の特性と細胞治療への応用, 医学のあゆみ (脂肪由来幹細胞の臨床応用への展開), 医歯薬出版株式会社, 東京, 2012, 7:242 (4): 326-331,

学位

内科学系 循環器内科

春田裕典, 遺伝性高コレステロール血症ウサギ WHHL-MIにおける HMG-CoA還元酵素阻害薬ピタバスタチンによる動脈硬化性プラーク進展抑制メカニズムの解明 -血管内エコー法を用いた経時的検討-

外科学系 心臓血管・呼吸器・総合外科分野

高森達也, 冠動脈バイパスにおけるグラフト流量波形分析に関する実験的検討

脳神経外科学系 神経外科学分野

江里口隆, ラット脳虚血モデルにおける海馬神経細胞の障害の研究 (ストレスと環境変化が与える影響) 2012,

共同・受託研究

社会医学系 法医学分野

内ヶ崎西作, 遺体衛生保全システムMC-06の法医学実務に与える影響についての検討

NUBIC技術移転

総合医学研究所 医学研究支援部門

石田和久, 藤田順一, 村井一郎, 吸入麻酔用マスク (動物用), 日本大学産官学連携知財センター (NUBIC) 2012, 2,

日本大学医学部総合医学研究所紀要
Bulletin of the Research Institute of Medical Science,
Nihon University School of Medicine

編集委員会

委員長 山本樹生
委員 石井敬基, 内山 真, 岡 宏, 黒田和道, 佐貫榮一, 杉谷雅彦,
平野雄二, 柳島 力, 山本隆充
幹事 井上広一, 烏山芳織, 平井孝政, 藤田順一, 藤原宏樹

(50音順)

Editorial Board

Editor-in-Chief Tatsuo YAMAMOTO
Associate Editors Yukimoto ISHII, Makoto UCHIYAMA, Hiroshi OKA,
Kazumichi KURODA, Eiichi SANUKI, Masahiko SUGITANI,
Yuji HIRANO, Chikara YANAGISHIMA, Takamitsu YAMAMOTO
Managing Editors Koichi INOUE, Yoshiori UYAMA, Takamasa HIRAI,
Jun-ichi FUJITA, Hiroki FUJIHARA

発行者 日本大学医学部総合医学研究所長 山本樹生
発行所 日本大学医学部
〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1 TEL 03-3972-8111
Publisher Tatsuo YAMAMOTO
Director, Research Institute of Medical Science,
Nihon University School of Medicine
30-1, Ohyaguchi-kamicho, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610 JAPAN
Phone +81-3-3972-8111
