

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.4 / December 2016

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の発行にあたって

今年度の「日本大学医学部総合医学研究所紀要」をお届けいたします。

この紀要は、医学に関する学理・技術についての総合的研究の成果や報告による外部情報発信を主たる目的とし、もって社会の要請に応じることを目指しています。この紀要に掲載されている内容は、日本大学医学部総合医学研究所に係る研究活動の成果であり、日本大学医学部だけではなく、日本大学全体における研究活動の一部でもあります。昨年に引き続き、今年度も医学研究支援部門による報告が充実した内容で掲載されており、その活動の多様性と専門性を知ることができます。例年のように、全ての研究を掲載・紹介するのは難しいですが、この紀要を通じて、日本大学医学部で実施されている研究活動の内容を一人でも多くの皆様に知っていただければ幸いです。

現在、この紀要は、ホームページ上で公開する形態となっています。原稿については、執筆者や著者の責任の下、その意思を尊重し、原則として査読を行わず、編集委員による体裁確認を経ることとしています。お忙しい中、執筆いただいたご関係の皆様には、この場をお借りして御礼申し上げます。

今後も継続して、研究所としての社会からの要請やニーズに応えられるように努めてまいります。この紀要が、日本大学医学部における研究活動内容の発信、各研究者の更なる研究進展に寄与することを願っております。

日本大学医学部総合医学研究所長 杉谷雅彦

目 次

ウイルス・細菌遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの解明と組み込みによる発癌機序の解明	森山光彦 他	1
疾患特異的ヒトマスト細胞のフェノタイプの解析とフェノタイプの変化の機序の解明	岡山吉道 他	8
慢性腎臓病に対する DFAT 細胞治療に関する研究	丸山高史 他	13
Del1 由来ペプチドによるがん遺伝子治療のメカニズム	北野尚孝 他	17
MMP9 を標的とした pyrrole imidazole polyamide による腎細胞癌細胞の浸潤能抑制	山口健哉 他	20
肝内胆管癌特異的融合遺伝子を標的とした PIP の開発	藤原恭子 他	22
脱分化脂肪細胞 DFAT における新規マーカーの探索	風間智彦	25
レーザーマイクロダイセクション法とレクチンアレイによる進行肺腺癌組織の糖鎖解析	中西陽子 他	28
パーキンソン病の罹病期間による STN-DBS の効果の違い	深谷 親 他	31
膵頭十二指腸切除後の脂肪肝の発生と制御.....	山崎慎太郎	33
口腔悪性腫瘍における IL-22 の関与	相澤(小峯)志保子 他	35
腕時計型脈波モニタリング機器による不整脈検出の検証に関する研究.....	笠巻祐二 他	38
TGF- β 1 に対する PI ポリアミドを用いた日大式ヒト iPS 細胞誘導法の開発.....	相馬正義 他	41
脳卒中後疼痛の治療：ドラッグチャレンジテストに基づく脳脊髄刺激療法.....	山本隆充 他	46
ブタ心外膜下脂肪組織に由来する脱分化脂肪細胞の特性解析.....	松本太郎 他	51
難治性免疫・アレルギー疾患の病態解明のための基礎的な検討.....	岡山吉道 他	54
実験計画法の概要.....	間崎武郎 他	61
中型実験動物用多機能型体重測定ユニットの開発とその活用法.....	藤田順一 他	66
医学分野におけるウェアラブルカメラ活用方法の検討.....	井上広一 他	72
医学研究支援部門の利用に関する成果・業績等一覧.....		77

INDEX

Analysis of rearrangement of viral integration in patients with gastric, liver, pancreas, colon, uterus cancer and its participant of development of these cancers.....	Mitsuhiko MORIYAMA et. al	1
Analysis of disease-specific human mast cell phenotype and investigation of mechanisms of the phenotypic changes	Yoshimichi OKAYAMA et. al	8
Study on cell transplantation of DFAT in chronic kidney disease	Takashi MARUYAMA et. al	13
The mechanism of cancer gene therapy with a Del1 fragment	Hisataka KITANO et. al	17
Inhibitory effects of pyrrole imidazole polyamide targeting MMP-9 for invasiveness of renal carcinoma cells	Kenya YAMAGUCHI et. al	20
Development of the PIP targeting intrahepatic bile duct cancer-specific fusion gene	Kyoko FUJIWARA et. al	22
Identification of novel markers for dedifferentiated fat (DFAT) cells.....	Tomohiko KAZAMA	25
Glycosylation analysis from lung biopsy using by laser microdissection and lectin array techniques	Yoko NAKANISHI et. al	28
Influence of duration of Parkinson disease on outcome of STN-DBS.....	Chikashi FUKAYA et. al	31
Postoperative liver steatosis in pancreatoduodenectomy: treatment strategy	Shintaro YAMAZAKI	33
A study on oral carcinogenesis and IL-22	Shihoko KOMINE-AIZAWA et. al	35
Detection of arrhythmias based on the pulse wave derived RR interval variability analysis by newly developed "watch-type" plethysmograph	Yuji KASAMAKI et. al	38
Establishment of the new method to induce iPS cell by using pyrrole- imidazole polyamide targeting TGF- β 1	Masayoshi SOMA et. al	41
Cerebrospinal stimulation therapy for post-stroke pain based on the results of drug challenge test	Takamitsu YAMAMOTO et. al	46
Characteristic analysis of porcine epicardial adipose tissue-derived dedifferentiated fat cells	Taro MATSUMOTO et. al	51
Basic research for understanding of the pathogenesis of severe immunological and allergic diseases	Yoshimichi OKAYAMA et. al	54
Overview of experimental design	Takero MAZAKI et. al	61
Development of the multi-function type body weight measurement unit for Medium-sized laboratory animals	Junichi FUJITA et. al	66
A preliminary analysis for application to the usage of Wearable Camera in Medical education and research	Koichi INOUE et. al	72
Lists of publication and results from Utilization in Medical Research Center		77

ウイルス・細菌遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの解明と 組み込みによる発癌機序の解明

森山光彦¹⁾, 楡井和重¹⁾, 松本直樹¹⁾, 中島典子¹⁾,
山本樹生²⁾, 黒田和道³⁾, 小森谷友絵⁴⁾, 高山忠利⁵⁾

Analysis of rearrangement of viral integration in patients with gastric, liver, pancreas, colon, uterus cancer and its participant of development of these cancers

Mitsuhiko MORIYAMA¹⁾, Kazushige NIREI¹⁾, Naoki MATSUMOTO¹⁾,
Noriko NAKAJIMA¹⁾, Tatsuo YAMAMOTO²⁾, Kazumichi KURODA³⁾,
Tomoe KOMORIYA⁴⁾, Tadatoshi TAKAYAMA⁵⁾.

要旨

微生物ゲノムの発癌例のヒトゲノムへの組み込み様式を解析した。方法は、癌切除組織を用いて、CMV, HPV16, HBV, HCVおよびHPのゲノム全長に対するprobeを合成しhybridizationを行い、得られた産物をNGSにて微生物由来ゲノムのPLC細胞およびヒトゲノムへの組み込みを検出した。この結果、シークエンスキャプチャー法は、目的ゲノムの組み込み様式の解析に有用であった。ヒトB型肝炎では、様々な部位にHBVゲノムの挿入が認められた。非癌部においてもHBVゲノムの挿入が認められた。以上よりHBVゲノムのヒト染色体上への組み込みは、HBVのreactivationおよび肝発癌に関与していることが推測された。

1. はじめに

わが国における癌死亡は年間30万人を超え、高齢化社会を背景として高齢者の発癌例の増加と共に疾患死亡率は増加傾向にある。したがって癌発生予知・抑止は重要な課題である。

癌はゲノム・エピゲノム異常が蓄積することによって多段階に発生・進行する遺伝子の疾患と現在では考えられている。2000年にヒトゲノム解析が終了し、その後登場した次世代シーケンサーによる急激なコストダウンとバイオインフォマティクスの発達によりゲノム解析技術が飛躍的に向上し、大規模で体系的な遺伝子の探索が可能となっている。

各臓器についてのゲノム解析は、米国癌ゲノムアトラス (TCGA) および国際癌ゲノムコンソーシアム (ICGC) により多数検体による報告がなされている。さらに各癌種のシークエンスデータを集積して

横断的な解析を行うことにより得られる統計パワーを利用して高感度なゲノム解析を行い、それらを比較解析することにより癌種を超えた癌サブタイプ分類についての知見を得ることが可能となっている。これらの機器を駆使した新しい概念と方法論により、様々な発癌要因の解析が進んでいる。その一方で、これらのビッグデータについては多数の施設より検体を収集するため連結不可能な匿名化がなされており、詳細な臨床情報と連結して変異シグネチャーなどのゲノム変化と癌の原因を検索することが困難であることも少なくない。

我々は、この発癌要因の一つとして、細菌および微生物ゲノムのヒト染色体上ゲノムへの組み込みによる、ヒト染色体上のゲノムの不安定性が、発癌へのプロセスとして重要であると考えている。

5大癌である乳癌・肺癌・胃癌・肝癌・大腸癌の

1) 日本大学医学部内科学系消化器肝臓内科学分野
2) 日本大学医学部産婦人科学系産婦人科学分野
3) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野
4) 日本大学生産工学部応用分子化学科
5) 日本大学医学部外科学系消化器外科学分野
森山光彦: moriyama.mitsuhiko@nihon-u.ac.jp

うち、細菌およびウイルスの感染が発癌の原因のひとつと考えられている癌は、肝癌・胃癌・大腸癌や5大癌以外で膵癌・子宮頸癌などが挙げられる。これらの発癌に関与する微生物は、hepatitis B virus (HBV), Epstein-Barr virus (EBV), cytomegaro virus (CMV), human papilloma virus (HPV), Helicobacter pylori (HP)などが推定されている。これらの感染症により発癌が励起される癌の場合、発癌の要因として感染源のゲノムのヒトゲノムへの組み込みによる種々の発癌に関与する遺伝子の不安定性が関与することが報告されている。現在までのところ、発癌の予防・予知にゴールドスタンダードとされる遺伝子やSNPは確認されていない。我々は、肝癌においてHBVゲノムの組み込みがヒトゲノムにランダムに観察されることを確認している。

本研究では、肝癌・胃癌・大腸癌・膵癌および子宮頸癌発生に関与しているとの報告がなされているHP, HBV, Hepatitis C virus (HCV), EBV, HPV, CMVについて、個々のゲノムの発癌例のヒトゲノムへの組み込み様式とその部位を、最近開発されたターゲットシーケンシング:シーケンシングキャプチャー法を利用して、さらに得られた産物から次世代高速シーケンサーを用いて多数検体を一度に処理・解析して、発癌に関与する候補遺伝子を検出して、非癌組織における微生物DNA挿入と、発癌との関係を明らかにするものである。この結果に立脚して、新しい癌発生の予知・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目的とするものである。

本研究により、各癌種についてヒトゲノム解析およびマッピング解析により、感染源のゲノムの組み込み部位を確定して、さらにHot spotの存在を確認することに成功すれば、これらのHot spotの簡便な検出法(real-time PCRシステムおよびアッセイ系)を開発することが可能であり、発癌の予知・予防に与える影響は大きい。

また、本研究の目的の一つとして、医学部という単独施設にて肝癌の臨床検体を収集し解析することにより、次世代シーケンサーにより得られたゲノム・エピゲノム異常と、板橋病院にある詳細な臨床情報をリンクさせて、肝癌のメカニズムをより詳細に明らかにすることを同時に行った。

2. 対象および方法

本研究は、平成27年度より28年度までの2ヵ年計画である。

平成27年度については、以下のごとく研究をおこなった。

1) 研究対象

対象は、2014(平成26)年度から2015(平成27)年度にかけて、インフォームドコンセントを得られた日本大学医学部附属板橋病院にて手術切除された、B型肝炎3例、C型肝炎20例、NBNC型肝炎10例、胃癌5例、大腸癌5例、子宮頸癌3例である。これらの症例について、癌部および非癌部組織を手術切除後直ちに採取した。また、既にHBVゲノムの組み込み部位が確定されているPLC細胞株について、我々の方法論によっても同様にHBVゲノムの挿入様式が検出されるのか、さらには新規の組み込み部位が確認しうるのかについて検討を行った。

2) 研究方法

(1) 各種mega probeの作製

各癌部においてヒトゲノムへの挿入が既に報告されているウイルス(CMV, HPV16, HBV, HCV)およびHPについて、SeqCap EZ library (Roche)を用いて、各微生物ゲノム全長に対するcapture用probeを合成した。HPはゲノム中に特異性の低い領域があるため、probeを作成できない領域が存在するが、基本的には解析対象微生物ゲノムの全領域を抽出できる各probeを合成した。このhybridizationに用いるSeqCap EZ probeは、Roche社のEZ probeシステムを用いて作製し、この各種probeに試料を識別できるadaptorを標識した。

(2) 検体の採取とDNAの抽出

肝癌、胃癌、大腸癌、膵癌、子宮頸癌について、手術切除された癌および非癌部組織を当日のうちにDNA抽出kitを使用して、各々からDNA6 μ g以上を抽出した。採取後直ちにQIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany)を用いてDNAの抽出を行い高純度のDNAを得た。

(3) DNAとのhybridization

癌部、非癌部および末梢血リンパ球より抽出したDNAを超音波破碎機(Covaris社)にて断片化後、

(1) で作製した各種probeとhybridizationを行った。Hybridization後にadaptor probeに標識されているビオチンを利用し、ビーズに固定されたストレプトアビジンと結合させ、probeとhybridizeしたDNAのみを回収した。サンプルの調節はTruSeq Nano DNA Sample Prep Kit (Illumina) を用いて行った。

(4) 次世代高速シークエンサーによる解析

(3) で回収されたDNAを、次世代高速シークエンサー (NGS) により解析した。平均1000以上のcoverageでシーケンスした。これは、既報の解析より、最低100depthを施行することにより、90%以上のヒトゲノムが検出されていることより決定した。シークエンサーはIllumina Hiseq2000を使用して行った。予備的実験で、100試料程度を1ランで解析可能であることが示された。次年度は、特に肝癌患者由来試料の解析を中心に行う予定であった。

(5) 各ウイルス・細菌由来DNAのヒトゲノムへの組み込みの有無の検索

得られた各readの塩基配列をヒトゲノムと微生物ゲノムに同時にマッピングを行った。微生物ゲノムに対してのみマッピングすると、微生物ゲノムに低いホモロジーのあるヒトゲノム由来配列が微生物ゲノムにマップされノイズとなる。

まず微生物ゲノムにマッピングされたpaired readの中から、片方のreadがヒトゲノムへマッピングされたものを抽出した。これらのreadは、微生物ゲノム由来DNAのヒトゲノム挿入部位に関する情報を提供する。

この作業を繰り返し、各癌に特有なCMV, HPV, HBV, HCV, HPのヒトゲノムへの挿入様式を解析した。マッピング解析ソフトはCLC genomics workbenchを用いた。

3. 結果

1) 次世代シークエンサーによるHBVゲノムの挿入様式の検出と解析

まず第1回目の検討として、B型肝炎例の癌部および非癌部肝組織5例、C型肝炎例の癌部および非癌部肝組織10例、胃癌2例、子宮頸癌2例、PLC細胞株について、抽出したRNAを用いて作製した各種微生物probeとhybridizationを行い、adaptor

probeとcaptureしたDNAのみを回収した。これらのcaptureしたDNAのみを回収して、第3世代高速シークエンサーを最低500depth以上にて施行した。次にmapping解析ソフトを用いて得られたシークエンスdataをヒトゲノムにmappingした。

2) PLC細胞の解析

最初に我々は、今回使用したターゲットシークエンス:シークエンスキャプチャー法のvalidationをも兼ねて、すでにHBVゲノムの挿入箇所が報告されているPLC細胞株における、HBVゲノムの挿入様式について検索した。

まず正確にHBVゲノムのprobeがcaptureされているかについて確認するためHBVのみをmapping解析した。

この結果ではHBVゲノムの全長よりgenotype Aであることが確認された。この事実より、正確に作製したprobeとDNAはcaptureされていることが確認された。この結果より、次世代シークエンサーによるHBVゲノムの挿入様式の解析を行った。

解析の結果では、HBVゲノムの挿入箇所は、両端が確認し得たのはChromosome3, 11, 12, 16, 17であった。Ch11はSNX15 gene, Ch12はMMAB, MVK Gene, Ch16はCLEC18A geneに、Ch17はCCDC17 geneの部位にHBVの一部の挿入を確認し得た。またCh3については、報告されていないgeneであった。

一方、片側のみHBVの組み込みが検出し得たのは、Ch5のTERT gene, Ch8のUNC5D geneの部位であった。またCh10については片側のみしか境界を検出出来なかった。

Watanabe, Bonilla GRらの既報と我々のdataを比較すると、ほぼ同様の検出結果であり、我々の使用したターゲットシークエンス:シークエンスキャプチャー法は、目的ゲノムの組み込み様式の解析に有用であることが確認された。

3) PCR and Sanger sequencing validation

次世代シークエンサーでintegrationが確認された各領域において、次世代シークエンサーではシークエンスしきれていない部分を、次世代シークエンサーで得られたシークエンス結果をもとにプライマーを作成し、PCRを行った。

PCRを行った後に電気泳動を行うと2本のバンドが確認された。この産物をクローニングし、サンガーシークエンス法を用いてその領域の配列を確認した。この結果、約3000bpの領域に見られるものが、HBVとヒトからなるintegrationが見られた領域であり、1000bpの領域にはヒトのみからなるwildの領域であった。

この手法を用いて、次世代シークエンサーでヒトゲノムとHBV DNAの境界が両側共に検出されたもの(Both side)のうち、Chr.3, Chr.11, Chr.17においてHBVとヒトの境界を両側ともに確認することが可能であった。

ヒトゲノムとHBV由来DNAの境界が片側のみ検出できたもの(One side)においては、シークエンスされたヒトゲノム上の上流にプライマーを設計し、改めてPCRを行ったが増幅されるものはみられなかった。Chr.8においては、次世代シークエンサーでシークエンスされたHBVゲノムとヒトの領域で、それぞれプライマーを作成することによって、その境界を検出することができた。

そこで、Alu-PCRと次世代シークエンサーによる解析においても、HBVとヒトの境界が片側のみしか検出されなかったため、遺伝子の転座の可能性を考慮した。また次世代シークエンサーでは読みきれなかったHBVゲノムの組み込み部分を、次世代シークエンサーでシークエンスされた領域をもとにプライマーを作成し、その両方でPCRを行ったところ、同じようなバンドが電気泳動で検出された。このPCR産物のクローニングを行い、Sanger Sequence(サンガーシークエンス)法で確認した。サンガーシークエンス法で確認してみると、ヒトゲノムにHBVがintegrateされた部分で遺伝子の転座が起こっていることが確認された。

以上、chromosomeの転座を検出して確認し得た。B型肝炎培養細胞株ではあるが、これらの転座は現在まで報告されておらず、我々の報告が世界で最初である。

近年肺癌など固形癌においても染色体の転座が報告されており、これらの転座の有無と生命予後との関連性が報告されている。このように非常に癌の進展との関係が注目されている染色体の転座を肝癌細胞株でも認められたことにより、ヒト肝癌組織においても染色体の転座が存在する可能性が高いことが

推測され、今後の研究に非常に有意な結果となった。

4) 転座の検証

染色体上に存在する転座の確認を行った。そこで4倍体でのQ-Band解析を行った(Fig.1)。解析した8細胞の1 cloneの染色体解析結果を以下に示す。

解析結果は、20個の分裂像を解析した結果、染色体数の分布は以下の通りであった。モダル数は88本であり、異数性が認められたが、モダル数付近の染色体本数がさらに倍化した分裂像はほとんど認められなかった。モダル数付近の染色体数の細胞では、解析に供した8細胞全てで非常に複雑な染色体の構造異常が認められ、共通した核型は認められなかった。

本細胞株は、7番染色体の長腕の末端に欠失が認められる染色体、14番染色体の短腕に由来不明の付加が認められる染色体、恐らく15番染色体の長腕の末端に14番染色体が転座した染色体(14番染色体の台座に配置)、15番染色体の短腕に由来不明の付加が認められる染色体及び3種類のマーカー染色体(M1, M2, M3)が、共通の異常染色体として認められた。

由来不明の異常染色体や由来不明な部分について、より詳細に調査する場合は、m-FISHによる解析が必要となるが、今後の検討課題とした。

以下に、解析した8細胞の染色体像及び染色体数のまとめを提示する。腫瘍細胞であるため、染色体は正常な細胞の形式とは大きく異なっている。また、Integration siteだけでなく、その他の染色体上でも転座を疑う部分が見られた。Q-Band解析では明らかな転座を証明する所見は見られなかった。

さらに、遺伝子の転座を確認するためにQ-band解析とFISH法で染色体の構造異常を確認した。Q-band解析においては非常に複雑な染色体の構造異常が認められ、その他のHBVのintegrationが確認されていない部分においても、遺伝子の転座や欠失がみられた。

PCR産物の解析より、Chr.の転座を確認し得ているが、さらに確証を得るためFISH法などを施行した(Fig.2)。しかしながら、FISH法では、明らかな転座確証は得られなかった。この理由としては、全ての細胞の染色体上に同様に転座している確率が

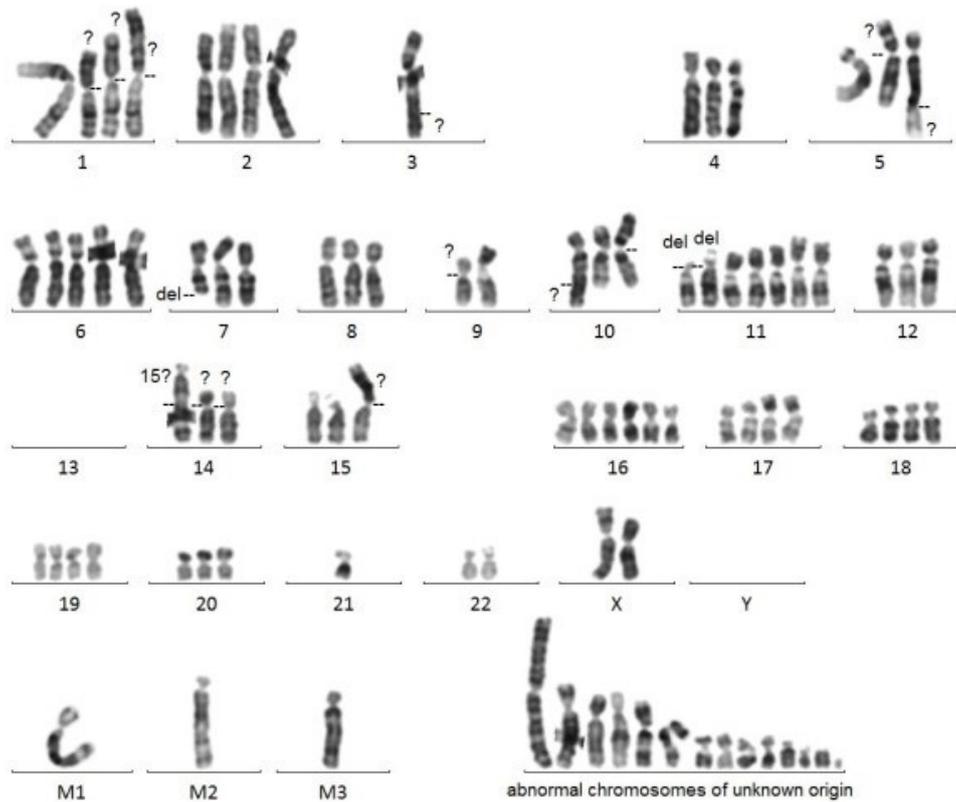


Fig. 1

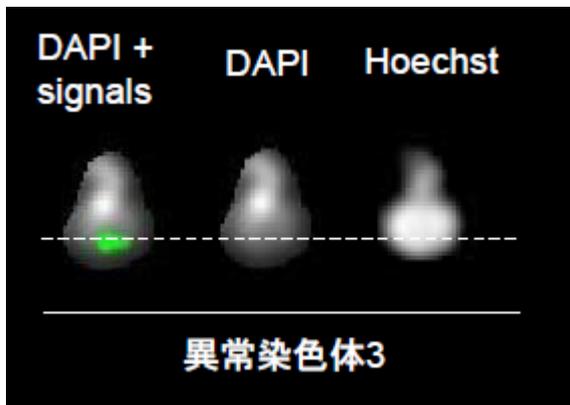


Fig. 2 Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いた転座の証明

低いと推定している。こちらもまた、今後の解析課題の一つである。

5) HBV nearly full genome の組み込みの検出

約2800塩基のHBVゲノムの挿入が認められた。このシーケンスを行い、組み込まれたHBV genome

の配列を決定した。

この結果、HBV genomeは、HBVのS regionを含み、X領域はほぼ含まれており、Precore、Core領域もほぼ含まれていた。

6) ヒト肝癌組織からのHBVゲノムの組み込みの検出

ヒトHBs抗原陽性肝癌およびHCV抗体陽性肝癌の癌部肝組織より、HBVゲノムの組み込みの有無について、同様にマッピング解析を施行して検索した。現在までの結果を以下に提示する。

- ① 癌部においては、Chr.1 ; RCC2, SYT14, Chr.2 ; CPS1, Chr.15 ; FAH, CERS3 部位に、いずれもHBVゲノムの挿入が認められた。
- ② 非癌部においては、Chr.2 ; FN1, Chr.5 ; PIK3R1, Chr.18 ; RP11-146N18.1の部位にHBVゲノムの挿入が認められている。
- ③ これらに関しては症例によって、HBVゲノムの挿入部位は異なっており、解析を継続している。

4. 考 察

以上今回の研究結果をまとめると、HBVゲノムのヒト染色体上への組み込みを確認することができた。PLC細胞の解析より、染色体上にHBVゲノムのほぼ全長に近いゲノムの組み込みを確認した。

組み込まれたゲノムは既報の組み込み部位以外にも認められた。HBVゲノムの組み込みと共に、染色体の転座を認めた。これらの結果より、HBVゲノムの染色体上への組み込みは、HBVのreactivationおよび肝発癌に関与していることが推測された。

今回の研究の成果の一つとして、我々は、染色体の転座を確認した。B型肝炎培養細胞株ではあるが、これらの転座は現在まで報告はされておらず、我々の報告が世界で最初である。

近年肺癌など固形癌においても染色体の転座が報告されており、これらの転座の有無と生命予後との関連性が報告されている。このように非常に癌の進展との関係が注目されている染色体の転座を肝癌細胞株でも認められたことより、ヒト肝癌組織においても染色体の転座が存在する可能性が高いことが推測され、今後の研究に非常に有意な結果となった。

さらに我々は、HBV nearly full genomeの組み込みを検出し得た。このシーケンス結果より、組み込まれたHBV genomeの配列を決定したところ、HBVのwhole S region (PreS1+PreS2+S領域)を含み、X領域はほぼ含まれており、DR1, DR2, core promoter領域をも含めたPrecore, Core領域もほぼ含まれていた。

X領域はcis/trans機能を有しており、HBVゲノムの複製や染色体上への組み込みには、発癌に重要な役割を果たしていることが推測されている領域である。この領域がほぼ全長組み込まれていることは非常に興味深く、また今後の機能解析が重要と考えられた。

またこの組み込みの欠失部位は、polymerase領域の下流域であり、ある意味では複製や組み込みなどには重要ではないと推測される。

さらにHBVの複製に重要とされている、covalently closed circle DNA (cccDNA)の領域もほぼ全長が含まれている。最近の報告では、HBVのreactivationには、細胞核内に存在しているcccDNAが関与していることを推定している。我々の検討から、染色体上にcccDNAの部位のゲノムが存在しているこ

とが確認されたが、この事実はHBVの細増殖機序を考える上で重要な発見であると考えている。

上述したが、X領域のcis/trans機能は発癌にも深い関与があることが知られている。このように染色体上に、X領域が組み込まれていたことは、HBV関連肝癌の発生および進展への影響は必ずあると考えられる。現在、染色体上に組み込まれたnearly full genomeの機能解析と、ヒト肝癌組織での検出を行っている。

以上今回の検討より、我々はターゲットシーケンス・シーケンスキャプチャー法がHBVのintegrationの検索に有用であることを確認し得た。

今回の研究より得られた結果の一つとして、これらの挿入されたHBV DNAは、HBV genomeの異なる場所から由来した断片が、様々の方向性で結合されたものであった。おそらくインテグレーションサイトは不安定であり、継代を重ねる間にそのサイトにさらに変異がおこり、ポリクローナルな細胞集団になったと考えられる。実際に肝細胞癌にも同じようなことが起こっていると思われる。また挿入されたHBV DNAはいずれも短い塩基配列のものが多数であった。この原因としては、HBV感染早期には、染色体上へ組み込まれたHBVゲノムは、比較的長い配列が多かったが、経時的に組み込み部位が生体反応によりクレープされて細胞死に至り、結果として短い塩基のものだけが、長期間にわたって存在し得たのではないだろうか。今後の課題の一つである。

最後に、HBV integrationの検出法についてまとめを以下に記す。

1) Alu PCR

- (1) 費用が安く、かつ手間が少ない。すなわちPCRおよびクローニング、さらにSanger Sequence法での確認が可能であること。
- (2) ただしintegration siteの片側しか検出が基本的にできない。さらに検出感度が次世代シーケンサーを用いた方法より劣る。

2) 次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer ; NGS)

- (1) 検出感度がAlu PCRより圧倒的に良好である。
- (2) 費用が高額となる。そのため多検体での検索が難しい。
- (3) 解析までの工程に手間が多い (NGSの行程が複

雑)。

(4) Sanger Sequence法でのPrimerの作成が難しい。

5. 今後の研究方針

現在少数例での検討にすぎないので、より多数例について検討を加える必要がある。また、PLC細胞の解析にて確認された、クロモゾームの転座およびほぼ全長に近いHBVゲノムの挿入の有無について、ヒト検体においても同様の所見が得られるかについて検討を加えている。

同様に胃癌検体からはHPゲノムの組み込み、子宮頸癌検体からはHPVゲノムの組み込みの有無をまず検出する。さらにこれらの微生物ゲノムの組み込み部位を確定して、発癌の候補遺伝子の異常に繋がるかについて検討を継続する。

最終的には、ドライバー遺伝子(発癌候補遺伝子)を確定して、これを末梢血より検出し得る、RTD-PCR系およびEIA assay系の確立を目指すものである。

謝辞

本研究は、平成27年度日本大学学術研究助成金(総合研究)(総15-009)により実施されたものである。

文 献

- 1) 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.
- 2) Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut*. 2005 Aug;54(8):1162-8.
- 3) 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.
- 4) Ding D, Lou X, Hua D, Yu W, Li L, Wang J, Gao F, Zhao N, Ren G, Li L, Lin B. Recurrent targeted genes of hepatitis B virus in the liver cancer genomes identified by a next-generation sequencing-based approach. *PLoS Genet*. 2012;8(12):e1003065.
- 5) Toh ST, Jin Y, Liu L, Wang J, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Ronaghi M, Toh HC, Chow PK, Chung AY, Ooi LL, Lee CG. Deep sequencing of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma patients reveals enriched integration events, structural alterations and sequence variations. *Carcinogenesis*. 2013

Apr;34(4):787-98.

- 6) 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. *Intervirolgy* 2009; 51: 352-361.

疾患特異的ヒトマスト細胞のフェノタイプの解析と フェノタイプの変化の機序の解明

岡山吉道¹⁾, 布村聡²⁾, 下川敏文¹⁾, 高橋恭子³⁾, 齋藤修¹⁾, 山本樹生¹⁾, 照井正¹⁾

Analysis of disease-specific human mast cell phenotype and investigation of mechanisms of the phenotypic changes

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Satoshi NUNOMURA²⁾, Toshibumi SHIMOKAWA¹⁾,
Kyoko TAKAHASHI³⁾, Shu SAITO¹⁾, Tatsuo YAMAMOTO¹⁾, Tadashi TERUI¹⁾

要旨

慢性蕁麻疹, アトピー性皮膚炎, 関節リウマチ病変部におけるマスト細胞のフェノタイプを同定し, その性状を解析した。マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え, 疾患特異的な活性化機構が存在している。重症の慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞はMrgX2を有意に高く発現している。上皮細胞由来サイトカインであるIL-33とthymic stromal lymphopoietin (TSLP) はその発現を増加させなかった。アトピー性皮膚炎のマスト細胞はFcεRI β鎖を高く発現している。その発現増加の機序としては上皮細胞から産生されるTSLPがその一因である。関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞はCOX1, COX2, LTC4S, TBXAS1を変形性膝関節症の滑膜マスト細胞と比較して有意に高く発現している。これら遺伝子の発現増強は滑膜組織の微小環境によるのではなくエピジェネティックな変化であると考えられた。ヒト脱落膜組織のマスト細胞の特徴を解析し, 脱落膜由来の培養マスト細胞を樹立した。

1. はじめに

我々は, 今まで皮膚, 肺, 扁桃腺および腸管のヒトマスト細胞の薬物に対する反応の多様性¹⁻³⁾ や組織マスト細胞のサイトカイン産生能の多様性^{4,6)} を報告してきた。また, 各組織のマスト細胞を分離培養して組織特異的な分子の発現を報告してきた。例えば扁桃腺組織などのリンパ節のマスト細胞にはOX40Lが発現しており⁷⁾, 肺マスト細胞では血小板活性化因子 (PAF) 受容体を, 皮膚マスト細胞ではMrgX2を発現していることを報告した⁸⁾。ヒトマスト細胞はinterferon-γに曝露されるとそのフェノタイプを変え, FcγRI⁹⁻¹²⁾, Toll様受容体4^{13,14)} や, NOD2¹⁵⁾ を発現することを報告したが, 関節滑膜マスト細胞では構成的にFcγRIを発現していることを報告した¹⁶⁾。また, マスト細胞のフェノタイプの変化に関して, マスト細胞から産生されるGroup III Phospholipase A2が線維芽細胞に働き, L型のprostaglandin (PG) 合成酵素の活性を上げ, その結果, 線維芽細胞から

PGD₂が産生される。そのPGD₂がマスト細胞のPGD₂受容体DP1を介してマスト細胞を成熟させることを我々は最近報告した¹⁷⁾。マウスでは粘膜型マスト細胞を結合織に移植するとマスト細胞のフェノタイプが変ることから, マウス細胞周囲の微小環境がフェノタイプの決定に重要であることが報告された¹⁸⁾。粘膜型マスト細胞を線維芽細胞と共培養すると, 結合織型マスト細胞に変化させる因子および成熟因子として膜結合型stem cell factor, thymic stromal lymphopoietin (TSLP) とIL-33が同定されている¹⁹⁻²²⁾。このように, それぞれの炎症性疾患においてマスト細胞が疾患特異的にフェノタイプを変えているのは, マスト細胞の存在する微小環境によって影響を受けているという仮説を立て, 関節リウマチ, 慢性蕁麻疹およびアトピー性皮膚炎のフェノタイプの変化の機序と病態への関与を明らかにし, 新規治療薬の開発に資する研究を行うことを目的とした。また脱落膜組織マスト細胞の特徴を解析した。

1) 日本大学医学部

2) 佐賀大学医学部

3) 日本大学生物資源科学部

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

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程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²³⁾。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, Pepro-Tech EC Ltd, London, UK) と IL-6 (50 ng/ml, Pepro-Tech EC Ltd) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium, Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada と Iscove's modified Dulbecco's medium [IMDM]) で培養した。42日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ IMDM で培養した。ヒト滑膜マスト細胞¹⁶⁾、肺マスト細胞^{7,8)} と皮膚マスト細胞^{7,8)} は、それぞれ滑膜組織、肺組織、皮膚組織と脱落膜組織から分離培養した。新鮮な滑膜組織、肺組織、皮膚組織と脱落膜組織を採取後ただちに 2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1% fungizone を含んだ IMDM に入れ、はさみを用いて 1mm³ 以下に細切した。collagenase と hyaluronidase を用いて細胞を酵素的に分散させた。赤血球を除去した後、SCF (200 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と IMDM) で培養した。42日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ IMDM で培養した。また、滑膜組織は酵素で細胞を分散後、培養し、プレートに接着した線維芽細胞を採取した。

RT-PCR：マスト細胞の総 RNA は RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて抽出し、精製した。500 µg/mL oligo (dT₁₂₋₁₈) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 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。COX1, COX2, LTC4S,

TBXAS1 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。

フローサイトメトリー：マスト細胞のフローサイトメーターによる解析はすでに報告した方法を用いて行った¹³⁾。以下の抗体を用いて細胞を染色した。PE あるいはビオチン標識抗 FcεRIα モノクローナル抗体 (クローン CRA1, eBioscience, San Diego, CA), ビオチン標識抗 chymase モノクローナル抗体 (クローン B7), 抗 tryptase モノクローナル抗体 (クローン G3, Chemicon International, CA), PE 標識抗 CD117 (クローン YB5.B8, BD Biosciences, San Jose, CA), 抗 MrgX2 モノクローナル抗体 (クローン 477533, R&D Systems, Minneapolis, MI)。PE/Cy5-streptavidin は Biolegend (San Diego, CA) から購入した。

免疫化学組織染色と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¹³⁾。滑膜組織、皮膚組織あるいは、細胞を固定して、膜の穴あけをした後、Alexa Flour 488 標識抗 tryptase 抗体、ビオチン標識抗 FcεRIα モノクローナル抗体 (クローン CRA1), Alexa Flour 555 標識抗 FcεRIβ 鎖抗体²⁴⁾、アイソタイプコントロールマウス IgG1 およびウサギ IgG とインキュベートした。ビオチン標識抗 FcεRIα 陽性細胞は、streptavidin-Cy3 (Biolegend) を用いて可視化した。FV1000 型共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, 東京) を用いた。

マスト細胞の活性化：IgE 感作したマスト細胞を 0.1, 1.0, 10 µg/ml の抗 FcεRIα 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 分間刺激した。FcγRI の架橋は、マスト細胞を 1.0, 10 µg/ml の抗ヒト FcγRI 抗体の F(ab')₂ fragments (F(ab')₂αFcγRI, clone 10.1, IDLabs, London, カナダ) で 30 分間刺激した。コントロールとしてマウス IgG1 の F(ab')₂ fragments (F(ab')₂m IgG1, Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA) で 30 分間刺激した。細胞を 1 度洗浄後 FcγRI を架橋させるため、抗マウス IgG F(ab')₂ fragments のヤギ F(ab')₂ fragments (gF(ab')₂αmF(ab')₂, Jackson Immune Laboratory) を添加しさらに 30 分間刺激した。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：臨床データの2群間の統計学的解析およびin vitroの実験の3群間の統計学的解析はMann-Whitney U testを用いて $P < 0.05$ を有意とした。in vitroの実験の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

疾患特異的マスト細胞のフェノタイプの同定

1) 慢性蕁麻疹：

重症の慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞はMrgX2を有意に高く発現していることと、MrgX2はsubstance Pの受容体であるのみならず、好酸球顆粒タンパクのなかでmajor basic proteinとeosinophil peroxidaseの受容体であることを報告した²⁵⁾。

2) アトピー性皮膚炎：

アトピー性皮膚炎と疾患コントロールである乾癬患者の皮膚組織のFcεRIβ鎖の発現を免疫組織化学染色にて調べたところ、アトピー性皮膚炎患者ではマスト細胞数が有意に増加しているのみならず、FcεRIβ鎖の発現が有意に増加していた。

3) 関節リウマチ：

関節リウマチ患者と変形性膝関節症の病変滑膜マスト細胞に発現している遺伝子をDNAチップで比較した。関節リウマチ患者マスト細胞はCOX1, COX2, LTC4S, TBXAS1を変形性膝関節症のマスト細胞と比較して有意に高く発現していた。Real-Time RT-PCRにてその結果を確認した。

4) 脱落膜組織マスト細胞：

ヒト脱落膜マスト細胞を酵素的に分散させる方法を確認した。ヒト脱落膜マスト細胞のフェノタイプはtryptaseおよびchymaseを持つMC_{trc} typeであった。ヒト脱落膜由来の培養マスト細胞を樹立した。

疾患特異的にマスト細胞がフェノタイプを変える機序の解明

1) 重症慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞におけるMrgX2の高発現の機序の解明：

ヒト上皮細胞由来サイトカインであるTSLPおよびIL-33は慢性蕁麻疹の上皮細胞で発現が上昇しているという報告²⁶⁾があるが、これらサイトカインはヒト皮膚マスト細胞表面のMrgX2の発現を増強

しなかった。皮膚マスト細胞を皮膚線維芽細胞と共培養する実験準備としてヒトの皮膚線維芽細胞の培養系を確立した。皮膚マスト細胞は、入手数が少ないため、臍帯血由来培養マスト細胞と皮膚線維芽細胞の培養実験を開始した。

2) アトピー性皮膚炎の皮膚マスト細胞におけるFcεRIβ鎖の高発現の機序の解明：

アトピー性皮膚炎の上皮細胞においてはTSLPが高発現していることが知られている。そこで、TSLPがヒトのマスト細胞のFcεRIβ鎖発現を増強するかどうかを調べた。TSLPをマスト細胞に添加し、5日間でFcεRIβ鎖タンパクの発現が増強された。しかしながらFcεRIβ mRNAの有意な発現増強はみられなかった。

3) 関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞におけるCOX1, COX2, LTC4S, TBXAS1の強発現の機序の解明：

変形性膝関節症の滑膜マスト細胞を関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞と共培養し、変形性膝関節症の滑膜マスト細胞におけるCOX1, COX2, LTC4S, TBXAS1の発現をReal Time RT-PCRで検討したが、これら遺伝子発現には関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞は、何ら影響を及ぼさなかった。また、変形性膝関節症の滑膜マスト細胞にTSLPを添加し、COX1, COX2, LTC4S, TBXAS1の発現をReal Time RT-PCRで検討したが影響はなかった。

疾患特異的にマスト細胞で発現している分子の疾患の病態への関与の解析

関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞におけるCOX1, COX2, LTC4S, TBXAS1の病態への関与の解析：

Fc受容体を介する刺激で関節リウマチ患者の滑膜マスト細胞がより多量のPGD₂を産生することが、関節リウマチの病態にどのように関与しているのかを検討した。FcεRI架橋およびFcγRI架橋の刺激による変形性膝関節症および関節リウマチ患者の滑膜マスト細胞からのPGD₂産生量を比較したところ、関節リウマチ患者の滑膜マスト細胞からのPGD₂産生量が有意に高いことが分かった。また、関節滑液中のPGD₂量を測定すると、関節リウマチ患者で有意に高いことが分かった。関節リウマチ患者の滑膜組織でのPGD₂産生細胞はマスト細胞のみでなく滑

膜線維芽細胞やマクロファージも産生細胞であるので、変形性膝関節症および関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞の培養上清中のPGD₂量を測定したが、その量はアッセイの感度以下だった。

4. 考 察

マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え、疾患特異的な活性化機構が存在している。疾患特異的にマスト細胞に高発現している遺伝子の発現増強機構は炎症組織の微小環境によるものとエピジェネティックな変化によるものがあると考えられた。

5. 結 語

マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え、疾患特異的な活性化機構が存在し、マスト細胞は炎症組織の微小環境によってそのフェノタイプを変化させるものとエピジェネティックな変化によるものがあることが示唆された。

謝辞

本研究の成果は、平成27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) Okayama Y, Benyon RC, Rees PH, Lowman MA, Hillier K, Church MK. Inhibition profiles of sodium cromoglycate and nedocromil sodium on mediator release from mast cells of human skin, lung, tonsil, adenoid and intestine. *Clin Exp Allergy*. 1992;22(3):401-9.
- 2) Okayama Y, Church MK. Comparison of the modulatory effect of ketotifen, sodium cromoglycate, procaterol and salbutamol in human skin, lung and tonsil mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;97(3):216-25.
- 3) Okayama Y, Matsuda A, Kashiwakura JI, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Shimokawa T, et al. Highly expressed cytoplasmic FcεRIβ in human mast cells functions as a negative regulator of the Fcγ-mediated cell activation signal. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(2):238-49.
- 4) Bradding P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, et al. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med*. 1992;176(5):1381-6.
- 5) Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol*. 1995;155(1):297-307.
- 6) Okayama Y, Petit-Frere C, Kassel O, Semper A, Quint D, Tunon-de-Lara MJ, et al. IgE-dependent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 in human lung mast cells. *J Immunol*. 1995;155(4):1796-808.
- 7) Kashiwakura J, Yokoi H, Saito H, Okayama Y. T cell proliferation by direct cross-talk between OX40 ligand on human mast cells and OX40 on human T cells: comparison of gene expression profiles between human tonsillar and lung-cultured mast cells. *J Immunol*. 2004;173(8):5247-57.
- 8) Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, Cruse G, Sagara H, Ohmori K, et al. Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1137-45 e6.
- 9) Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, FcγRI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-γ. *J Immunol*. 2000;164(8):4332-9.
- 10) Okayama Y, Hageman DD, Metcalfe DD. A comparison of mediators released or generated by IFN-γ-treated human mast cells following aggregation of FcγRI or FcεRI. *J Immunol*. 2001;166(7):4705-12.
- 11) Woolhiser MR, Okayama Y, Gilfillan AM, Metcalfe DD. IgG-dependent activation of human mast cells following up-regulation of FcγRI by IFN-γ. *Eur J Immunol*. 2001;31(11):3298-307.
- 12) Okayama Y, Tkaczyk C, Metcalfe DD, Gilfillan AM. 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(5):1450-9.
- 13) Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, Matsumoto K, Nakajima T, Saito H, et al. Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcεRI. *Blood*. 2003;102(7):2547-54.
- 14) Kobayashi R, Okamura S, Ohno T, Saito H, Mori M, Ra C, et al. Hyperexpression of FcγRI and Toll-like receptor 4 in the intestinal mast cells of Crohn's disease patients. *Clin Immunol*. 2007;125(2):149-58.
- 15) Okumura S, Yuki K, Kobayashi R, Okamura S, Ohmori K, Saito H, et al. Hyperexpression of NOD2 in intestinal mast cells of Crohn's disease patients: preferential expression of inflammatory cell-recruiting molecules via NOD2 in mast cells. *Clin Immunol*. 2009;130(2):175-85.
- 16) Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, et al. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcγRI and FcγRII. *Arthritis Rheum*. 2013;65(1):109-19.
- 17) Taketomi Y, Ueno N, Kojima T, Sato H, Murase R, Yamamoto K, et al. Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. *Nat Immunol*. 2013;14(6):554-63.
- 18) Sonoda S, Sonoda T, Nakano T, Kanayama Y, Kanaku-

- ra Y, Asai H, et al. Development of mucosal mast cells after injection of a single connective tissue-type mast cell in the stomach mucosa of genetically mast cell-deficient W/W^v mice. *J Immunol.* 1986; 137(4): 1319-22.
- 19) Piliponsky AM, Gleich GJ, Nagler A, Bar I, Levi-Schaffer F. Non-IgE-dependent activation of human lung- and cord blood-derived mast cells is induced by eosinophil major basic protein and modulated by the membrane form of stem cell factor. *Blood.* 2003;101(5):1898-904.
- 20) Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol.* 2007;179(4):2051-4.
- 21) Kaieda S, Shin K, Nigrovic PA, Seki K, Lee RT, Stevens RL, et al. Synovial fibroblasts promote the expression and granule accumulation of tryptase via interleukin-33 and its receptor ST-2 (IL1RL1). *J Biol Chem.* 2010;285(28):21478-86.
- 22) Han NR, Oh HA, Nam SY, Moon PD, Kim DW, Kim HM, et al. TSLP induces mast cell development and aggravates allergic reactions through the activation of MDM2 and STAT6. *J Invest Dermatol.* 2014; 134(10):2521-30.
- 23) Saito H, Kato A, Matsumoto K, Okayama Y. Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc.* 2006;1(4):2178-83.
- 24) Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, Yokoi N, Hamuro J, Walls AF, et al. Hyperexpression of the high-affinity IgE receptor-beta chain in chronic allergic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50(6): 2871-7.
- 25) Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, et al. Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(3):622-33 e9.
- 26) Kay AB, Clark P, Maurer M, Ying S. Elevations in T-helper-2-initiating cytokines (interleukin-33, interleukin-25 and thymic stromal lymphopoietin) in lesional skin from chronic spontaneous ('idiopathic') urticaria. *Br J Dermatol.* 2015;172(5):1294-302.

慢性腎臓病に対するDFAT細胞治療に関する研究

丸山高史¹⁾, 福田昇¹⁾, 松本太郎¹⁾, 加野浩一郎²⁾

Study on cell transplantation of DFAT in chronic kidney disease

Takashi MARUYAMA¹⁾, Noboru FUKUDA¹⁾,
Taro MATSUMOTO¹⁾, Koichiro KANO²⁾

要旨

我々は脱分化脂肪細胞を細胞移植するとラットの免疫性腎炎の病態が改善することを報告した¹⁾。細胞移植の方法として別の個体で事前に作成したDFATを尾静脈から注射する、つまり他家移植で行った。他家移植の場合に拒絶反応や感染症など安全性の面に不安が残るのも事実であるが、一方で細胞治療は他家移植こそ効果があるという説もある。そこで将来この細胞治療の臨床応用を見据えた場合に、他家移植よりも安全と考えられる自家移植でも移植の効果が得られるかを確認する必要があり検証を行った。今回その結果をここに報告する。

1. はじめに

脂肪組織は「贅肉」という言葉から想像出来るように余分なものとして考えられてきた。本当に余分であるかはさておき大量採取しても他の組織と違って人体の機能を大きく損なうことはない。そのため脂肪組織は細胞治療の細胞供給源として注目されている。

DFATの作成方法を示す(図1)。脂肪組織の約20~30%と最も多くを占める成熟脂肪細胞はたがいに疎に結合しあっているため脂肪組織から容易に単離することが出来る。単離した脂肪細胞はその浮遊性を利用して、培地を満たしたフラスコの天井測で天井培養という方法²⁾により、培養・増殖させることが可能である。脂肪細胞を天井培養する過程で、繊維芽細胞様の形態をもった細胞が出現してくるが、Yagi³⁾らはこの繊維芽細胞様細胞から成熟脂肪細胞に分化し得るマウス前駆脂肪細胞株を樹立し、脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)と名付けた。

DFATは高い細胞増殖活性を示すだけでなく、成

熟脂肪細胞マーカーであるリポプロテインリパーゼ、レプチン、GLUT4の発現が消失しており、成熟脂肪細胞の機能を失い脱分化していると考えられる。さらに、DFATは適切な分化誘導培地で培養すると脂肪細胞だけでなく、骨芽細胞、軟骨細胞など間葉系に由来する細胞系列へも分化することが示された⁴⁾。つまりDFATは前駆脂肪細胞より間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)に近い多能性をもつ細胞であるということである。またDFATは、MSCにほぼ一致した細胞表面抗原発現プロファイル(CD13⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD49d⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺)を示し、2006年国際細胞治療学会が定めたMSCのminimal criteria⁵⁾を満たす。またDFAT培養上清中に分泌される液性因子の分泌パターンもMSCとほぼ一致しており⁶⁾、DFATがMSCと同等のパラクライン機序を介した組織再生能を有すると考えられている。

DFATの特性を以下に述べる。微量の脂肪細胞が原料であるため性別や年齢を問わず低侵襲性に採取出来る。高い純度をもって調整が可能で、またiPS

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

丸山高史: maruyama.takashi@nihon-u.ac.jp

細胞のような全能性は示さないものの遺伝子操作やウイルスベクターを用いないため安全性にも優れている。低コストで大量調整やその後の維持管理も可能である。さらに外科手術時に大量廃棄される脂肪組織を利用することでバンキングシステムの構築が容易なのは明らかである。つまり低コストで安全性の高い再生医療を可能とする細胞源としてDFATは期待出来る。

一方透析患者の増加が続いており現在我が国では32万人以上とされている。また不可逆的な腎機能障害に陥った病態を総称してCKD (chronic kidney disease) と呼ぶようになったが、それに対する治療は一部の腎炎などの疾患を除き大半は食事療法や血圧や血糖、貧血、酸塩基平衡に対する対症療法が中心で、腎臓自体への根治治療がほぼ存在しない。そのため最も薬剤に対して患者の治療満足度は、当然であるが最も低い部類の疾患として慢性腎臓病は知られている。そのため新しい腎臓病の治療法の誕生が待たれており再生医療が注目されている。そこでDFATの細胞移植、つまり細胞移植が慢性腎臓病の新たな治療法になり得るかを検証すべく、慢性腎臓病の原疾患つまり慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎硬化症のそれぞれについて移植の治療効果を検証する必要がある、今回の報告はその一部つまり慢性糸球体腎炎に対する移植の結果である。

2. 対象及び方法

7週齢の雌性Wistar Ratから先に述べた方法(図1)でDFATを作製して凍結保存をした。次に単クローン抗体1-22-3を1mg/頭の用量で静脈注射して進行

性腎障害モデルを作製した。腎障害発症から1か月後に凍結保存をしておいたDFAT細胞移植を尾静脈からそれぞれの個体に行い、すなわち自家移植を施行して移植1か月後に効果を血液・尿・組織の所見から判定した。

3. 結果

得られた結果を以下の図2のグラフ1～5に示す。

血液・尿検査の結果においては血清尿素窒素、クレアチニンの濃度や尿蛋白の排泄については共に他家移植と同等に低下作用が示された(グラフ1,3)。組織所見においてもGISスコア、TISスコアから腎炎モデルラットより有意に組織改善効果が観られた(グラフ2)。DFAT細胞治療後、抗炎症性タンパク分子として知られるTSG-6 (Tumor necrosis factor stimulated genes 6) が血液中の濃度および組織での発現において有意に上昇、亢進していることが確認された(グラフ4,5)。

4. 考察

自家移植においてもDFATの細胞移植は他家移植で移植を行った結果と同等に腎症の改善効果が確認出来た。血液や組織においてもTSG-6の濃度や発現が亢進していた。TSG-6は抗炎症作用だけでなく免疫調整作用があることを大阪大学が報告している⁷⁾。TSG-6が直接的、間接的にT細胞上に存在して、接着因子であるCD44を抑制してT細胞活性化や細胞浸潤を抑制することで免疫調整作用を発揮するとされる。よってDFAT細胞治療により体内に分泌、発現されたTSG-6を中心とした免疫調整作用が腎炎改

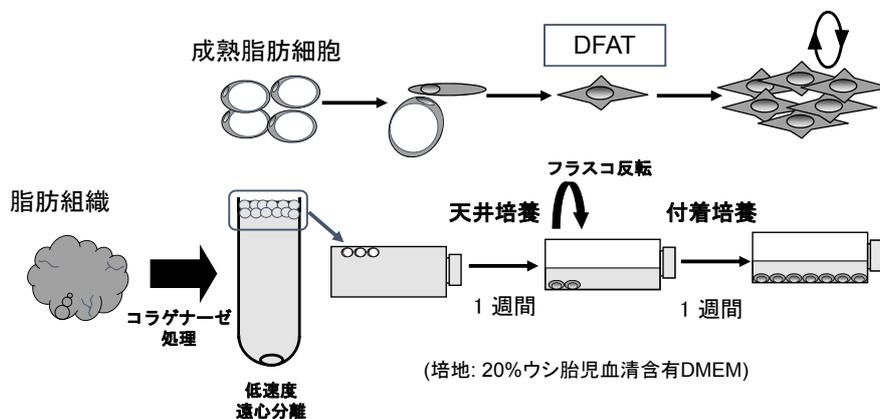


図 1

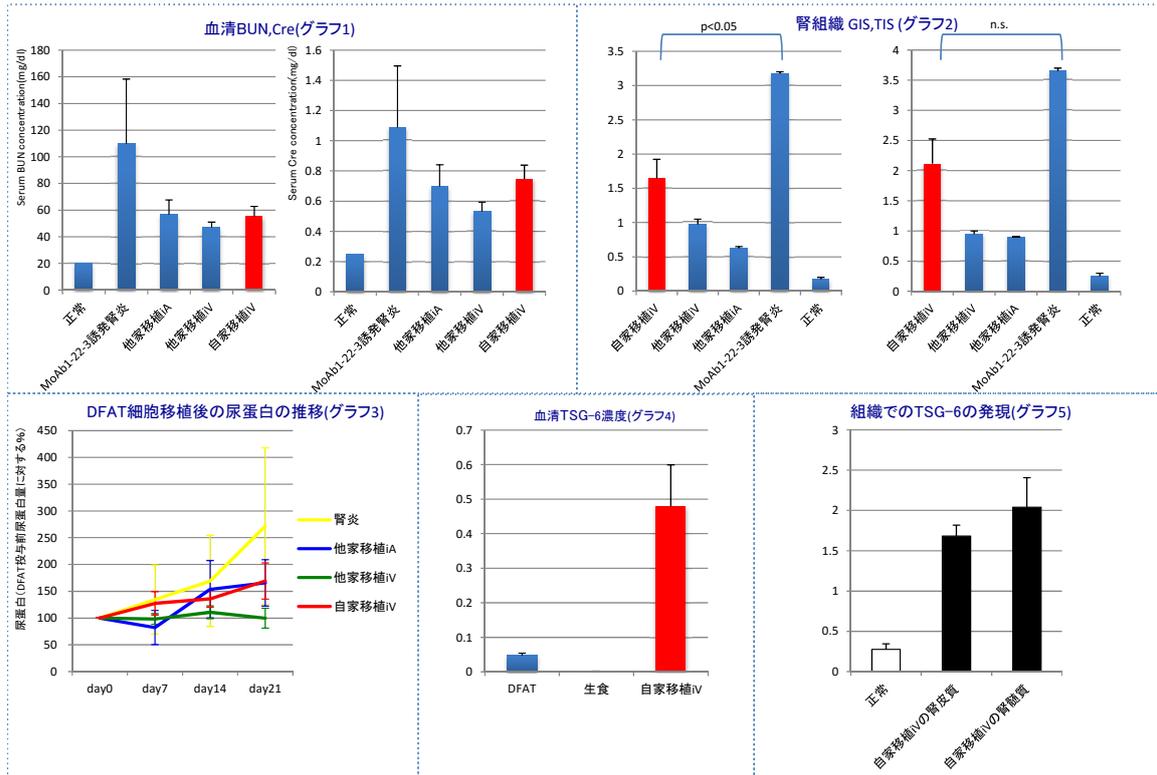


図 2

善の機序として考えられた。

5. 結 語

DFATの細胞治療においては他家移植のみならず自家移植でも同様に腎症改善効果が期待出来ることが示唆された。すなわち自家移植でより安全を期して細胞治療を行えることが可能であることを意味しており、自家移植による安全性や他家移植による治療までの準備期間の短縮など、病態の緊急度などに応じて治療方法を選択することが可能であると考えられた。

6. 今後の展望

前述した我々の報告¹⁾はラット特有の免疫性腎障害である。そこで臨床応用を目指すために免疫性腎炎の中でも予後不良でヒトの疾患にも存在する、ANCA関連腎炎の疾患モデルSCG/Kjマウスに対してDFAT細胞治療の検証を開始している。SCG/Kjマウスは30頭に繁殖することに成功した。畜尿により尿蛋白の排出を確認後DFAT細胞移植を行った。移植後の尿所見、血液検査、組織の改善の有無、移植されたDFATの局在などを中心に移植の治療効

果、機序の解明を平成28年12月にまで終了して別に結果を報告する予定である。

またTSG-6が免疫調整作用を発揮する際に作用点とされるCD44はスタンフォード大学や北里大学らの研究チームが糖尿病の原因物質でもともと米科学アカデミー紀要(電子版)に2012年4月10日報告している。これはDFAT細胞移植が、免疫異常を本態とする慢性糸球体腎炎のみならず糖尿病性腎症にも効果がある可能性も示唆されたものと考えている。また我々の研究室ではDFATがHGFを有意に産生するという結果も得ている。HGFは線維化抑制やアポトーシス抑制効果があるとされており、これは慢性腎臓病のもう一つの原疾患である腎硬化症の本態である線維化やアポトーシスをDFAT細胞移植により改善できる可能性を示唆しており、まとめると透析導入の3大原疾患である慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎硬化症のいずれもDFAT細胞移植で改善する可能性があるということである。それらの効果を検証して将来DFATの細胞移植を用いて慢性腎臓病を根治的に治す、全国に類を見ない、本学だからこそ可能な治療法を確立させるべく実験を遂行したいと考えている。

文 献

- 1) Maruyama T, et al. Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene 6. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6:80.
- 2) Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, et al. Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation* 1986; 31:42.
- 3) Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, et al. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321:967.
- 4) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; 215:210.
- 5) McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 2006; 24:1246.
- 6) Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Engineering Part A* 2013; 19:1792.
- 7) Kato, Taigo, et al. Adipose Tissue-Derived Stem Cells Suppress Acute Cellular Rejection by TSG-6 and CD44 Interaction in Rat Kidney Transplantation. *Transplantation* 2014;98:3.

Del1由来ペプチドによるがん遺伝子治療のメカニズム

北野尚孝¹⁾, 日臺智明²⁾, 國分眞一郎²⁾

The mechanism of cancer gene therapy with a Del1 fragment

Hisataka KITANO¹⁾, Chiaki HIDAI²⁾, Shinichiro KOKUBUN²⁾

要旨

Del1はN末端側の3つのEGFモチーフとC末端側の二つのディスコイディンドメインから構成される細胞外基質タンパクである。これまでに、Del1の有する機能はエンドサイトーシス亢進作用とアポトーシス誘導作用と細胞外基質沈着作用がある事が明らかになっている。また、Del1を利用したがん遺伝子治療においてin vivoの実験系で腫瘍縮小効果やマウスの生命予後を改善する効果があることが報告されている。その効果の機序を検討するために今回我々はヌードマウス移植腫瘍にE3C1による遺伝子治療を行い、腫瘍血管に与える影響を検討した。

その結果、E3C1の遺伝子治療により腫瘍の毛細血管は減少していた。さらに、血流の無い血管新生が起きており、血管周囲細胞にも影響を与えていた。

このことより、E3C1による遺伝子治療では腫瘍血管の血管新生や血管周囲組織に影響することにより腫瘍増殖を抑制しているのではないかと示唆された。

1. 背景

Del1はN末端側の3つのEGFモチーフとC末端側の二つのディスコイディンドメインから構成される細胞外基質タンパクである。二番目のEGFモチーフにはインテグリン結合ドメインのRGD配列がある。In vitroの実験では、三番目のEGFモチーフはエンドサイトーシス亢進作用と弱いアポトーシス誘導作用を示した。また、一番目のディスコイディンドメインには細胞外基質沈着作用を有し、高濃度に組織に蓄積する性質がある。

平成22年度よりin vivoの実験系においてマウスにSCCKN細胞(口腔内扁平上皮癌由来細胞株)の移植腫瘍を作り、mockおよびE3C1間で遺伝子治療効果を比較した。遺伝子導入には市販の非ウイルスベクター(in vivo-jetPEI, Polyplus transfection社)を使用し、一週間毎に腫瘍への局所注射を繰り返し、腫瘍サイズやマウスの生命予後に及ぼす効果を

検討した。治療開始後の腫瘍サイズを比較すると、E3C1群はコントロール群よりも小さくなっており、期待通りの腫瘍縮小効果を示した¹⁾。次に長期予後について比較した。コントロール群のマウスは49日目までに全て死亡した。その時点で、E3C1群は6匹中3匹が生存していた。生き残ったマウスのうち、E3C1群の2匹は腫瘍が完全に消失していた。さらに、E3C1群の腫瘍は腫瘍組織で出血性壊死を起こしていた²⁾。このことやDel1が血管内皮のECMであることから、E3C1は血管を制御することで腫瘍の増殖を抑制しているのではないかと考えられた。通常、血管新生は毛細血管が集約され変化していく。今回我々は、血管新生時にE3C1を加えると、さらに血管が集約され、毛細血管が存在しなくなるのではないかとこの仮説の下に本研究を行った。

1) 日本大学医学部耳鼻咽喉頭頸部外科学系歯科口腔外科学分野

2) 日本大学医学部生体機能医学系生理学分野

北野尚孝: kitano.hisataka@nihon-u.ac.jp

2. 材料および方法

in vivoの実験系において、ヌードマウス (nu/nu balb/c) 背部皮下にA431細胞 (扁平上皮癌由来細胞株) の細胞浮遊液 (10×10^7 個/100 μ l) を局所注射し移植腫瘍を形成させた。形成された移植腫瘍に対して、mockおよびpE3C1により遺伝子治療を行うことで腫瘍内の血管の状態や血管形成を比較した。遺伝子導入には市販の非ウイルスベクター (in vivo-jetPEI, Polyplus transfection社) を使用した。

1) ヌードマウス移植腫瘍の巨視的観察

一週間に1回の割合で3週間、移植腫瘍へmockまたはpE3C1遺伝子を10 μ g/100 μ lの濃度で局所注

射した。3回目の遺伝子治療が終了した翌週に、マウスの尾静脈よりインディアンインクを静脈内投与し10分経過観察を行い、安楽死させた。その後、腫瘍を一塊に摘出し顕微鏡で巨視的観察を行った。

2) ヌードマウス移植腫瘍の免疫染色

同様に3週間、遺伝子治療を行ったヌードマウスを3回目の遺伝子治療が終了した翌週に、マウスの尾静脈よりトマトレクチンを静脈内投与し10分経過観察を行い、安楽死させた。その後、腫瘍を一塊に摘出し、凍結切片を作成した。作製された標本をフォンウィルブランド因子抗体、ペッカム抗体および α スムースマッスル抗体で染色し観察した。

3. 結果

コントロール群のヌードマウスの移植腫瘍の腫瘍血管は毛細血管や太い血管が多く観察された。一方、pE3C1遺伝子で遺伝子治療を行ったヌードマウスの移植腫瘍の腫瘍血管は毛細血管がほとんど観察されなかった (図1)。

また、コントロール群ではトマトレクチンで染色された細胞はフォンウィルブランド因子抗体でも染色されていた。しかし、pE3C1群ではトマトレクチンで染色されない細胞がフォンウィルブランド因子

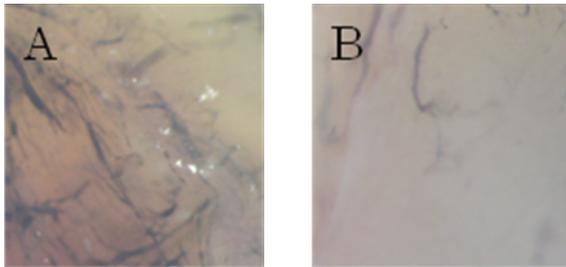


図1 ヌードマウス移植腫瘍の血管へのE3C1による遺伝子治療の影響
A: コントロール群, B: E3C1治療群

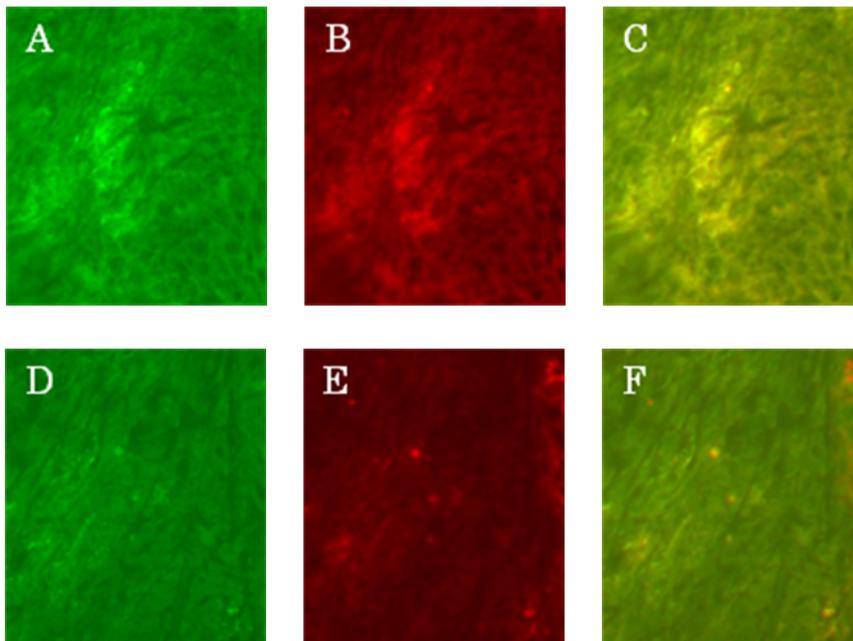


図2 E3C1による遺伝子治療での血管への影響
緑: トマトレクチン, 赤: フォンウィルブランド因子抗体
A, B, C: コントロール群, D, E, F: E3C1治療群

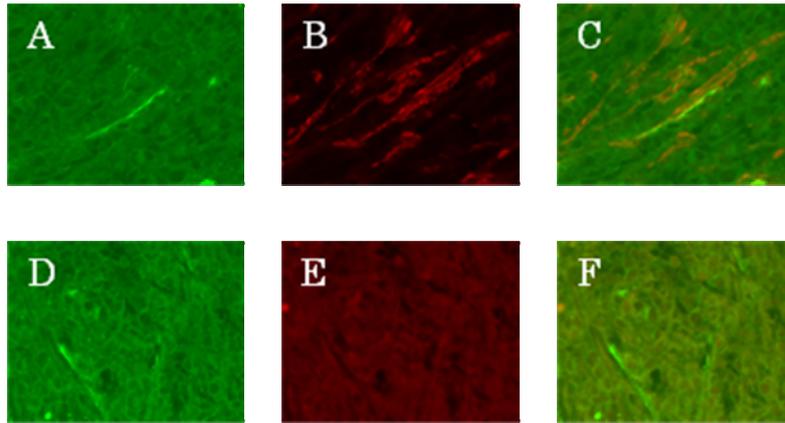


図3 E3C1による遺伝子治療での血管周囲細胞への影響
 緑：ペッカム抗体，赤： α スモースマッスル抗体
 A, B, C：コントロール群, D, E, F：E3C1治療群

抗体で染色されている所見が観察された(図2)。

さらに、コントロール群ではペッカム抗体で染色された細胞の周囲に α スモースマッスル抗体で染色された細胞を観察することができた。一方、pE3C1群ではペッカム抗体で染色された細胞の周囲に α スモースマッスル抗体で染色された細胞を観察することはできなかった(図3)。

4. 考 察

今回の研究においてE3C1による遺伝子治療は腫瘍血管の血管新生に影響を及ぼしているのではないかと考えられた。なぜなら、E3C1による治療群では巨視的観察で毛細血管がほとんど観察されなかったことやトマトレクチンで染色されなかった細胞でもフォンウィルブランド因子抗体で染色されていることより、血流の無い血管新生が起きていることが強く示唆された。また、E3C1による治療群ではペッカム抗体で染色された細胞の周囲に α スモースマッスル抗体で染色された細胞を観察することはできなかった。このことより、E3C1による遺伝子治療は血管周囲細胞であるペリサイトに影響を与えていることが明らかになった。

以上のことより、Del1のE3C1による遺伝子治療の腫瘍増殖抑制効果や腫瘍を移植したヌードマウスの生命予後の改善に及ぼす効果は、E3C1が腫瘍血管の血管新生や血管周囲組織に与える影響が強く関与していると示唆された。

文 献

- 1) Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Shinichiro Kokubun, Chiaki Hidai. A Del1 fragment improves the efficiency of FasL gene therapy with a non-viral vector in a mouse explanted tumor model, *Journal of Gene Medicine*, 2012 Nov;14(11):642-50. doi: 10.1002/jgm.2682.
- 2) Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Tomomi Ishikawa, Kayo Egoshi, Shinichiro Kokubun, Chiaki Hidai. Long-term gene therapy with Del1 fragment using nonviral vectors in mice with explanted tumors. *Oncotargets and Therapy*. 2016(9): 503-516, 2016. doi: 10.2147/OTT.S90801.

MMP9を標的とした pyrrole imidazole polyamide による 腎細胞癌細胞の浸潤能抑制

山口健哉¹⁾, 高橋 悟¹⁾, 川田 望¹⁾, 大日方大亮¹⁾, 前林俊也²⁾

Inhibitory effects of pyrrole imidazole polyamide targeting MMP-9 for invasiveness of renal carcinoma cells

Kenya YAMAGUCHI¹⁾, Satoru TAKAHASHI¹⁾, Nozomu KAWATA¹⁾,
Daisuke OBINATA¹⁾, Toshiya MAEBAYASHI²⁾

要旨

腎細胞癌ではMMP9の高発現と予後悪化の相関が報告されている。MMP-9遺伝子は20番染色体に存在し、その発現は転写調節因子であるNF- κ B・AP-1・Sp1を含む2.2kb上流の制御領域に支配される。これらの結合領域を標的とするピロールイミダゾールポリアミドを合成した。本研究では、ヒト腎細胞癌細胞株Caki-2を用い、MMP-9プロモーターのNF- κ B・AP-1を阻害するピロールイミダゾールポリアミドを投与し、MMP9の発現抑制・細胞増殖能低下・細胞浸潤能の低下を確認した¹⁾。

1. はじめに

ピロールイミダゾールポリアミド(以下PIP)は、配列特異的にDNAと結合し転写阻害を行うことが可能な化合物である。我々の研究室では今までいくつかのポリアミドを合成し、腫瘍の浸潤能・転移能を抑制することを確認し報告している²⁾。今回は腎細胞癌で発現が増加している遺伝子をターゲットとし、発現抑制することで抗腫瘍効果を得られるか確認した。

2. MMP9免疫染色強度と癌特異的生存率の解析

日本大学板橋病院で得た外科検体を用いて、Rabbit polyclonal MMP9 Antibody (Cell Signaling technology USA)を使用し、免疫染色を施行した。また、各症例の染色強度と癌特異的生存率を対比した。

3. MMP9 PIPの合成

本研究ではMMP9 NF- κ B PIPとMMP9 AP-1 PIPを使用した。MMP9 NF- κ B PIPはDNA配列にお

けるMMP9プロモーター領域のNF- κ B結合領域(-600 to -605)に合わせて合成し、MMP9 AP-1 PIPも同様にAP-1結合領域(-70 to -77)に合わせて合成した。これらのPIPはDimethyl sulfoxide (DMSO)を用いて10mMにストックソリューションを調整し、実験毎に希釈して使用した。

4. 細胞と培養環境

ヒト腎細胞癌細胞株Caki-2 (Dr.Cowell (Roswell Park Cancer Institute, NY, USA)より譲渡)を使用した。McCoy's 5A (Invitrogen Life Technologies, CA, USA)に100ug/mlストレプトマイシン・100units/mlペニシリン・10% FBS (McCoy's5A 10% FBS PS)を加えた培地を用い、37°C・5% CO₂の条件で培養した。

5. Real time RT-PCR

Caki-2のMMP9のmRNA発現量はreal time PCRにて確認した。Caki-2を6well dishに各々5000cellsまき24時間培養、コントロール群(PIP非投与群)

1) 日本大学医学部泌尿器科学系
2) 日本大学医学部放射線医学系
山口健哉 : yamaguchi.kenya@nihon-u.ac.jp

およびPIP投与群に分割した。PIP投与群は、MMP9 NF- κ B PIP 3 μ M・10 μ M, MMP9 AP-1 PIP 3 μ M・10 μ Mをそれぞれ投与した。投与後48時間培養後、RNAを抽出し、cDNAを合成した後real timePCRを実施した。real time PCRのプライマーはヒトMMP9 (forward, 5'-GAGACCGGTGAGCTGGATAG-3'; reverse, 5'-TACACGCGAGTGAAGGTGAG-3') と、ヒトGAPDH (forward, 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'; reverse, 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3')を使用した。

6. Matrigel invasion assay

24well培養プレートにBioCoat Matrigel Invasion Chambers (Becton Dickinson Labware社, MA, USA)をのせ、1 chamberに対して 3.0×10^3 個のCaki-2をまき、McCoy's 5A 10% FBS PSを500 μ l添加した。さらにMMP9 NF- κ B PIP 3 μ M・10 μ MをそれぞれBioCoat Matrigel Invasion Chambersに加え、外側のwellにはMcCoy's 5A 10% FBS PSのみを500 μ l添加した。その後48時間培養、浸潤していない細胞は綿棒にて除去し、浸潤した細胞はDiff-Quick溶液を用い染色した後、細胞数を計測した。

7. 結果

腎細胞癌臨床検体で、MMP9の高発現と予後悪化の相関を確認した。ヒト腎細胞癌細胞株Caki-2を用い、MMP-9プロモーターのNF- κ B・AP-1を阻害するピロールイミダゾールポリアミドを投与し、MMP9の発現抑制・細胞増殖能低下・細胞浸潤能の低下を確認した。

8. 結語

MMP-9プロモーターのNF- κ B・AP-1阻害による腎細胞癌細胞株の浸潤転移能抑制を確認した。これらの研究は腎細胞癌転移予防、転移癌治療につながる可能性がある。

文 献

- 1) Sato A, Nagase H, Obinata D, Fujiwara K, Fukuda N, Soma M, Yamaguchi K, Kawata N, Takahashi S: Inhibition of MMP-9 using a pyrrole-imidazole polyamide reduces cell invasion in renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2013.
- 2) Wang X, Nagase H, Watanabe T, Nobusue H, Suzuki T, Asami Y, Shinojima Y, Kawashima H, Takagi K, Mishra R *et al*: Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide. *Cancer Sci* 2009.

肝内胆管癌特異的融合遺伝子を標的としたPIPの開発

高木恵子¹⁾, 高山忠利¹⁾, 森口正倫¹⁾, 相馬正義²⁾, 藤原恭子²⁾

Development of the PIP targeting intrahepatic bile duct cancer-specific fusion gene

Keiko TAKAGI¹⁾, Tadatoshi TAKAYAMA¹⁾, Masamichi MORIGUCHI¹⁾,
Masayoshi SOMA²⁾, Kyoko FUJIWARA²⁾

要旨

近年、肝内胆管がん (ICC) 細胞のゲノム中に、特異的な融合遺伝子が存在することが知られるようになった。本研究では配列特異的にDNAに結合する性質を持つPIポリアミドにアルキル化剤を付加した化合物ChB-PIPを合成し、ICC特異的融合遺伝子FGFR2-BICC1を標的とした治療薬の開発を試みている。現在までに、高純度のChB-PIPの合成に成功し、この分子がFGFR2-BICC1融合部位のDNA配列に特異的に結合することを確認している。

1. はじめに

肝内胆管がん (ICC) は肝臓に生ずる悪性腫瘍の中で2番目に高い発生頻度を示すが、放射線療法や化学療法による治療効果は低く、外科的切除が困難な場合や再発した場合の有効な治療法は現時点では存在しない。近年、次世代シーケンサーを用いた解析が進み、腫瘍特異的な融合遺伝子が次々と発見されている。融合遺伝子は正常組織には存在しないこと、その転写産物が正常細胞の腫瘍性変換を促進する機能を持つことなどから治療標的として非常に有望であると考えられる。ICCにおいても最近、fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) が、BicC family RNA binding protein 1 (BICC1) やadenosylhomocysteinase-like 1 (AHCYL1) など、全く異なる遺伝子と融合した異常配列が複数発見されている¹⁾。これらの融合遺伝子を発現している腫瘍細胞ではFGFR2下流のシグナル伝達系が亢進していることから、FGFR阻害剤が治療薬として期待できるが²⁾、正常細胞への影響も懸念されるため、融合遺伝子そのものを標的とした治療法の開発が待たれている。そこで我々は配列特異的にDNAに結合するピロール・

イミダゾール・ポリアミド (PIP) とアルキル化剤を組み合わせた分子を作成し、融合遺伝子陽性の細胞のみを効果的に殺傷する薬剤の開発を企画した。PIPは高い親和性と特異性で二重らせんDNA副溝に結合する性質を持ち、細胞内に容易に取り込まれ、siRNAよりも安定であることから、新規のゲノム制御薬として有望な分子である³⁾。特定のDNA配列を認識するPIPと、DNA損傷を惹起するアルキル化剤を結合させることで、腫瘍特異的な変異配列だけを変性させ、腫瘍細胞のみを特異的に殺傷できる副作用の少ない薬剤の開発が可能となると考えた。本研究では、ICC特異的な融合遺伝子のうち、Araiらの報告において¹⁾、マウス繊維芽細胞株NIH3T3を腫瘍化させる機能が確認されているFGFR2-BICC1融合遺伝子を標的としたChB-PIPを合成し、その解析を行った。

2. 対象および方法

1) クロラムブシル付加PIPの合成

FGFR2-BICC1融合遺伝子の融合部分の配列を認識するPIPにアルキル化剤クロラムブシル (ChB) を

1) 医学部外科学系消化器外科学分野

2) 内科学系総合内科・総合診療医学分野

藤原恭子: fujiwara.kyoko@nihon-u.ac.jp

結合させた分子 (ChB-PIP) を設計し合成した (図1)。合成はペプチド合成器 PSSM8 を用いて行い、脱水縮重反応により ChB を付加した。HPLC による精製と質量分析機による確認の後、実験に使用する。

2) ChB-PIP と標的DNA 結合能のゲルシフトアッセイによる解析

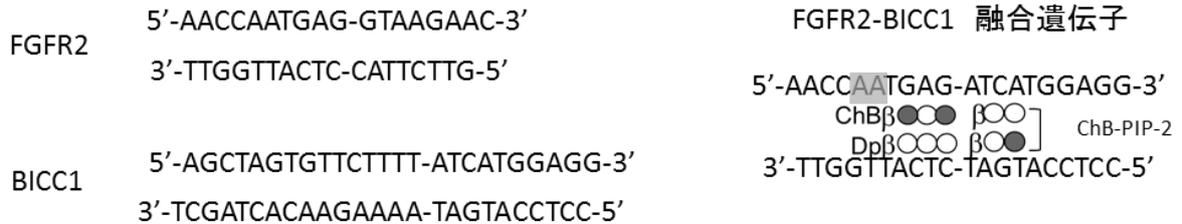
FGFR2-BICC1 融合部の配列を含む20塩基のオリゴ二本鎖DNAにFITC ラベルを付加した分子を作成した。ネガティブコントロールとして全く配列の異なるFITC付加DNAも作成した。これらのDNAと、ChB-PIP もしくはPIP部分の配列が全く異なるネガ

ティブコントロールChB-PIPをインキュベートし、20%のポリアクリルアミド1xTAEゲル中で電気泳動時を行った。LAS4000により画像解析を行い、バンドの移動度よりChB-PIPのDNAへの結合能を判定した。

3. 結果

1) FGFR2-BICC1 融合遺伝子認識 ChB-PIP の合成

HPLC による精製後、最終的に0.98mg の ChB-PIPを得た。HPLCによる純度の解析から、若干の不純物はあるものの、ChB-PIPが唯一の主要なピークであり、問題なく実験に用いることが出来ると考え、以下の解析を行った。



○=pyrrole, ●=imidazole, β=beta alanin, [=γ-diaminobutyric acid, Dp=Dimethylaminio)propyl, ChB=クロラムブシル
 ●○のペアはGCを、○●のペアはCGを認識し、○○はTAもしくはATを認識。
 β 及び [もTAもしくはATを認識する。
 灰色の塩基がクロラムブシル(ChB)によりアルキル化される。

図 1 融合領域認識 ChB-PIP の配列と DNA 認識様式

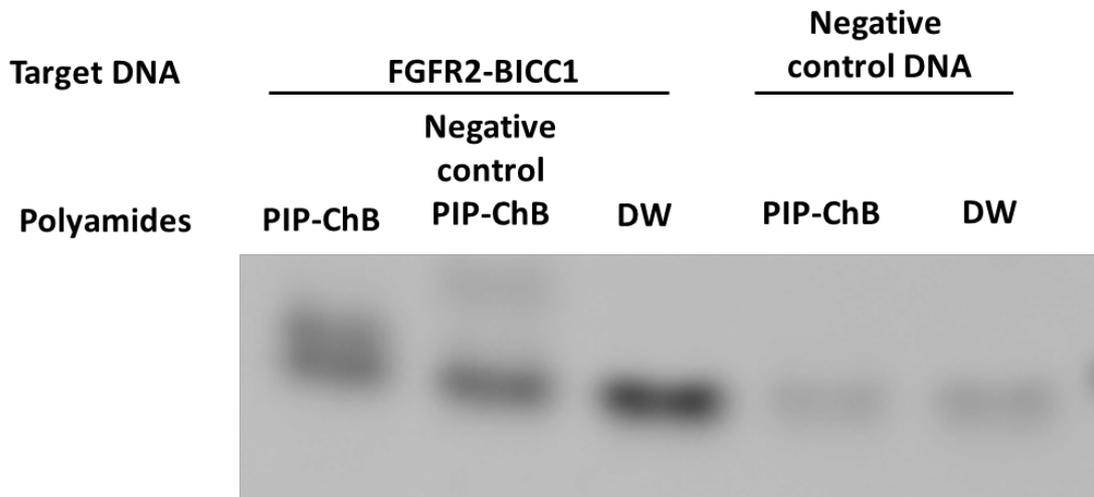


図 2 ゲルシフトアッセイによる ChB-PIP の標的DNA 結合能の検討

2) ChB-PIP と標的DNA 結合能の解析

合成したChB-PIPの標的DNAへの結合能をゲルシフトアッセイにより検討した。図2に示す通り、ChB-PIPとともに泳動したFGFR2-BICC1融合部配列DNAはコントロールと比較して明らかにシフトしていたが、ネガティブコントロールChB-PIPにおいてはシフトはみられなかった。また、ChB-PIPによる結合配列を含まないDNA配列に対しては、ChB-PIPは結合能を有さなかった。

4. 考察・今後の展望

以上の結果より、FGFR2-BICC1融合遺伝子の融合領域に特異的に結合するChB-PIPを合成できたことが判った。現在のところ、融合遺伝子陽性のICC細胞株が樹立されていないことから、FGFR2-BICC1の発現ベクターを導入したICC細胞株の樹立を試みている。この細胞株に対し、今回合成したChB-PIPを投与し、FGFR2-BICC1陽性細胞に対して特異的に抗腫瘍効果を示すかどうか検討を行う。

文 献

- 1) Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma. Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, et al. *Hepatology*. 2014 Apr;59(4):1427-34.
- 2) Integrated genomic characterization reveals novel, therapeutically relevant drug targets in FGFR and EGFR pathways in sporadic intrahepatic cholangiocarcinoma. Borad MJ, Champion MD, Egan JB, et al. *PLoS Genet*. 2014 Feb 13;10(2):e1004135.
- 3) Molecular recognition of DNA by small molecules. Dervan PB. *Bioorg Med Chem*. 2001 Sep;9(9):2215-35.

脱分化脂肪細胞 DFAT における新規マーカーの探索

風間 智彦¹⁾

Identification of novel markers for dedifferentiated fat (DFAT) cells

Tomohiko KAZAMA

要旨

我々は、成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞 (DFAT) が、高い増殖能と間葉系幹細胞 (MSC) に類似した多分化能を示すことを明らかにし、新しい再生医療用細胞として実用化を目指した研究を行ってきた。本研究では、同一ドナーから皮下脂肪組織および骨髄組織の提供を受け、皮下脂肪細胞由来 DFAT (SC-DFAT)、脂肪組織由来幹細胞 (ASC)、骨髄脂肪細胞由来 DFAT (BM-DFAT)、骨髄由来 MSC (BM-MSC) を調製した。そして各細胞の細胞表面抗原発現プロファイルの検討、マイクロアレイ解析による発現遺伝子の網羅的解析を行い、DFAT を規定する新規マーカーの同定を試みた。その結果、DFAT では CD34 や HLA-DR の発現率が 0.1% 未満と著明に低く、これらが DFAT の品質を保証する陰性マーカーになり得る可能性が示唆された。また ASC や BM-MSC に発現せず SC-DFAT や BM-DFAT に特徴的に発現する遺伝子群の同定に成功した。これらの遺伝子は DFAT の品質や機能を規定する新規分子マーカーとなり得る可能性がある。

1. はじめに

近年、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) が高い増殖能と多分化能を有することが明らかにされ、骨、軟骨、脂肪、歯周組織などの再生医療における移植用細胞として有望な細胞と考えられている¹⁻⁴⁾。我々は、成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することにより得られる脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) が、MSC に類似した高い増殖能と多分化能を獲得することを明らかにした⁵⁾。DFAT は非常に少量 (約 1g) の脂肪組織から大量調製でき、他細胞の混入がほとんどなく (0.1% 以下) 均質な細胞群であること、ドナー年齢や基礎疾患に関係なく多分化能を有する細胞が調製できることから、低コストで実用性の高い治療用細胞として期待できる。一方、細胞治療の効果や安全性を担保するためには、製造された DFAT の品質や性能を確認できる適切なマーカーの同定が必要である。

本研究では、同一ドナーから皮下脂肪組織および

骨髄組織の提供を受け、皮下脂肪組織から皮下脂肪細胞由来 DFAT (Subcutaneous fat-derived DFAT: SC-DFAT) と脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell: ASC) を、骨髄組織から骨髄脂肪細胞由来 DFAT (Bone marrow fat-derived DFAT: BM-DFAT) および骨髄 MSC (Bone marrow MSC: BM-MSC) を調製した。そして各細胞の細胞表面抗原発現プロファイルの検討、マイクロアレイ解析による発現遺伝子の網羅的解析を行い、DFAT を規定する新規マーカーの同定を試みた。

2. 材料および方法

日本大学医学部附属板橋病院整形外科にて人工股関節置換術を受ける患者より同意を得た後、術後廃棄予定の皮下脂肪組織ならびに骨髄組織の提供を受けた (日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会承認: 整理番号 RK-121012-3)。皮下脂肪組織、骨髄組織より成熟脂肪細胞を単離し、既報⁵⁾

1) 日本大学医学部
風間智彦: kazama.tomohiko@nihon-u.ac.jp

に従い天井培養を行うことにより、SC-DFATとBM-DFATを調製した。また各組織のストローマ分画を付着培養することによりASCとBM-MSCを調製した。調製した4種類の細胞の各種細胞表面抗原発現をフローサイトメーターを用いて測定した。また、調製された各種細胞からtotal RNAを抽出・精製を行ない、cDNAを合成した。GeneChip® Hybridization Oven 645, GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix)を用いてハイブリダイゼーションを行い、GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix)を用いて、蛍光イメージの測定を行った。データの解析はオミックスデータ解析用ソフトウェアであるQlucore Omics Explorer (QLUCORE)を使用した。

3. 結果

フローサイトメトリー解析の結果、SC-DFAT, ASC, BM-DFAT, BM-MSCは間葉系細胞マーカー(MSC陽性マーカー)であるCD73, CD90の発現率がいずれも98%以上であった(図1)。間葉系細胞マーカーの一つであるCD105の発現率は、SC-DFAT, ASC, BM-DFATではいずれも98%以上であったが、BM-MSCでは94.2%と他細胞に比べ

や低率であった。MSC陰性マーカーであるCD34, CD45, HLA-DRの発現率は、SC-DFAT, ASC, BM-DFATではいずれも0.1%未満であったが、BM-MSCではCD34 0.14%, CD45 0.085%, HLA-DR 2.3%と他細胞に比べて高率であった(図2)。SC-DFAT, BM-DFATに共通して特異的に発現するマーカーの同定には至らなかった。

DNAマイクロアレイ解析の結果、SC-DFATとASC, BM-DFATとBM-MSCはそれぞれ、酷似した遺伝子発現プロファイルを示し、階層的クラスタリング解析でも非常に距離が近い群として分類された。ASCで発現が低くSC-DFATで特徴的に発現する遺伝子を解析した結果、49個の遺伝子が同定された。またBM-MSCで発現が低くBM-DFATで特徴的に発現する遺伝子を解析した結果、9個の遺伝子が同定された。一方、SC-DFATおよびBM-DFATに共通して特徴的に発現する遺伝子の同定には至らなかった。

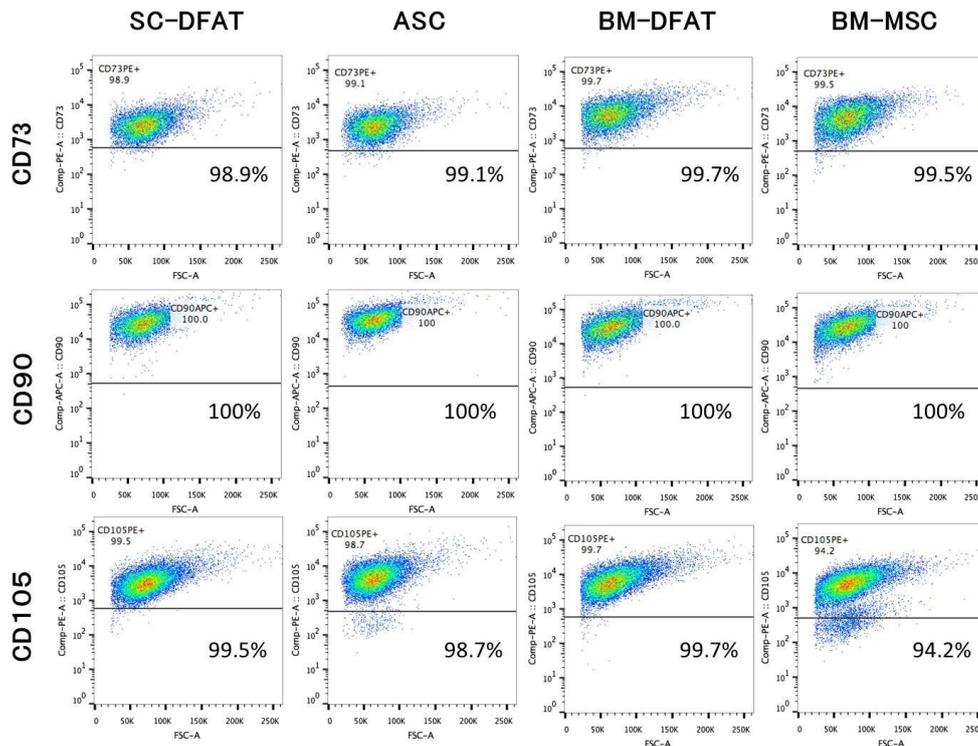


図1 各種細胞における細胞表面抗原の解析:MSC最小基準・陽性マーカー

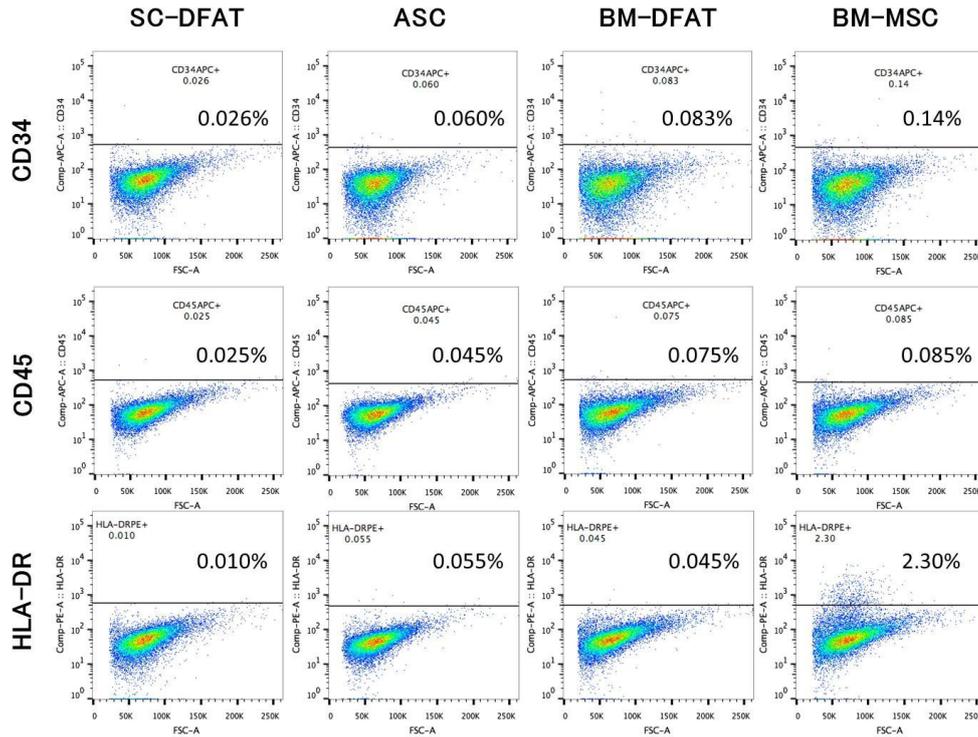


図2 各種細胞における細胞表面抗原の解析:MSC最小基準・陰性マーカー

4. 考察

今回、フローサイトメトリー解析の結果、SC-DFAT、BM-DFATに共通して特徴的に発現する細胞表面抗原マーカーの同定には至らなかった。一方、SC-DFAT、BM-DFATともにCD34、HLA-DRといった陰性マーカーの発現率が0.1%未満と非常に低いことが明らかになった。この所見は、血液細胞などの異種細胞の混入率が極めて低いことを示唆している。HLA-DRは免疫原性に大きく影響する主要組織適合抗原であるため、HLA-DRの発現が極めて低いことは、拒絶が起りにくく移植安全性が高いことを担保する所見であるといえる。したがってHLA-DRは、DFATの高い移植安全性を予測する上で有用な陰性マーカーとなることが示唆された。

またDNAマイクロアレイ解析の結果、SC-DFATやBM-DFATに特徴的に高発現する遺伝子群を同定することができた。今後、これらの遺伝子の機能解析を行い、DFATの品質や機能を規定する新規分子マーカーとして有用であるかを明確にしていく予定である。

文献

- 1) Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:413-419.
- 2) Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H et al. A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 313:503-508.
- 3) Matsubara T, Suardita K, Ishii M et al. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2005; 20:399-409.
- 4) Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*. 2004; 75:1281-1287.
- 5) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol*. 2008; 215: 210-222.

レーザーマイクロダイセクション法とレクチンアレイによる 進行肺腺癌組織の糖鎖解析

中西陽子¹⁾, 辻野一郎²⁾, 高橋典明²⁾, 四万村三恵³⁾, 増田しのぶ¹⁾

Glycosylation analysis from lung biopsy using by laser microdissection and lectin array techniques

Yoko NAKANISHI¹⁾, Ichiro TSUJINO²⁾, Noriaki TAKAHASHI²⁾,
Mie SHIMAMURA³⁾, Shinobu MASUDA¹⁾

要旨

肺生検よりレーザーマイクロダイセクション法(LMD)で回収した腫瘍細胞からレクチンアレイによる糖鎖解析を行って、進行肺腺癌組織における糖鎖構造の違いと化学療法の効果との関係について検討した。この結果、化学療法非奏功群では特定の糖鎖における異常分枝の伸長が顕著であり、レクチンの局在も非癌部から逸脱していることが示された。また、癌と非癌部ではなく、化学療法非奏功群と奏功群の間でレクチン発現の有意差が認められたことから、肺腺癌細胞の糖鎖構造の違いは化学療法の効果に関与する可能性が示された。

1. はじめに

非小細胞肺癌では上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子¹⁾やAnaplastic lymphoma kinase(ALK)融合遺伝子²⁾などのドライバー変異³⁾に対する分子標的治療の進歩が目覚ましい。一方、治療標的変異を有さず化学療法が適用される患者も多く、その効果にも個人差がある。今回、肺生検を対象として、レクチンを用いた糖鎖解析を行い、進行肺癌組織の糖鎖構造と化学療法の効果との関係を明らかにすることを目的とした。

2. 対象および方法

2009年-2010年に日大板橋病院で手術不能な肺腺癌として化学療法施行された29例の肺生検組織より化学療法奏功(PR)群3例、非奏功(PD)群3例と、対照の非悪性気管支上皮組織(N)2例を用い、LMD法⁴⁾で腫瘍細胞を回収した後、LecChipならびにGlycoStation Reader(グライコテクニカ)でレクチンアレイを行った。また、ビオチン標識レクチン(杉山産業化学研究所)を用いてStreptavidin-biotin(SAB)

法によるレクチン組織化学を行い、腫瘍組織内の局在を比較した。(臨床研究承認番号RK-110610-2)

3. 結果

10種類のレクチンでPD, PR, N群間の発現量の差を認め(図1)、癌と非癌部ではなく、PD群とPR+N群間で差が認められたことから、PD群では特定の糖鎖における異常分枝の伸長が顕著である可能性が示唆された。レクチン組織化学の結果(図2)では、PD群で正常細胞での局在から逸脱した局在が示された。

4. 考察

レクチンの発現量は腫瘍部-非腫瘍部間で異なるというよりも、化学療法非奏功群に対して奏功群は非腫瘍部に類似した傾向を示した。癌細胞における蛋白質の糖鎖付加異常は、細胞の運動性や浸潤能の亢進、蛋白質の機能障害、転移促進、免疫回避などの機能が知られている⁵⁾。さらに今回検討を行ったレクチンの局在から、腫瘍細胞では細胞質への糖鎖

1) 日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野

2) 日本大学医学部内科学系呼吸器内科学分野

3) 日本大学医学部外科学系呼吸器外科学分野

中西陽子:nakanishi.youko@nihon-u.ac.jp

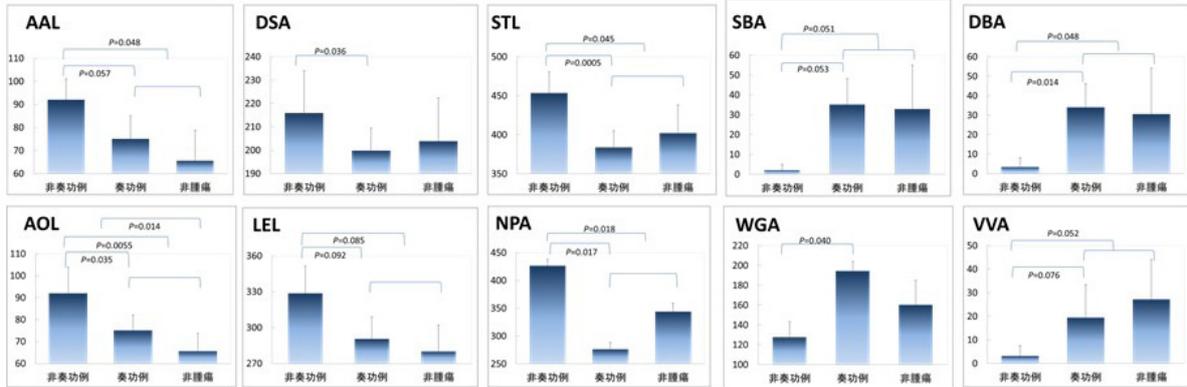


図 1 レクチンアレイにより差が認められたレクチンの比較。
 AAL: ヒドロチャワンタケ, DSA: ヨウシュチョウセンアサガオ, STL: ジャガイモ, SBA: ダイズ,
 DBA: ドリコスマメ, AOL: 麹菌, LEL: トマト, NPA: ラップズイセン, WGA: バンコムギ,
 VVA: ケヤハズエンドウ・ピロウドクサフジ・ヘアリーベッチ

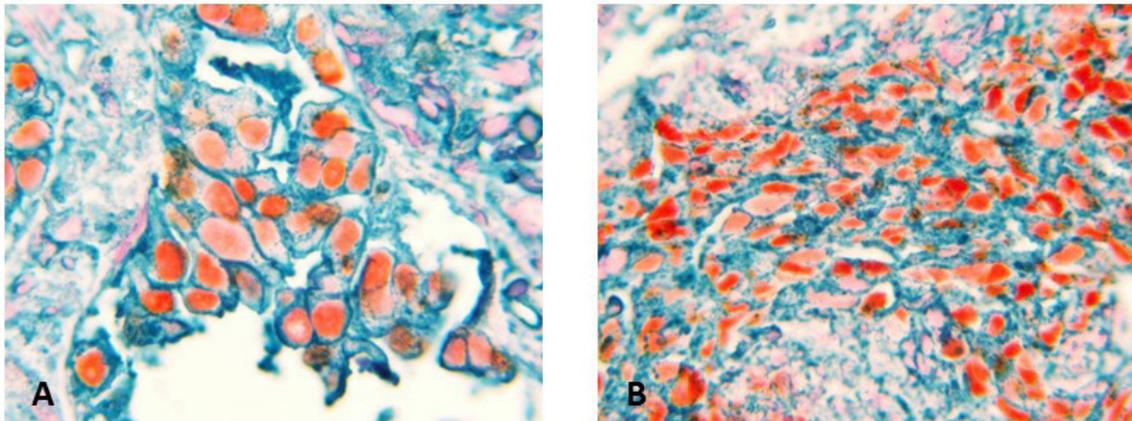


図 2 TTF-1免疫組織化学 (DAB 発色・茶) とビオチン化標識レクチン AAL (HistoGreen 発色・緑) の二重染色 (×100, 油浸)
 AALは、生存期間12か月以上の化学療法奏功例では細胞膜への発現の局在が見られた (A) が、生存期間が6ヶ月未満であった非奏功例では極性は見られず細胞質にドット状に発現していた (B)。

の異常な蓄積があり、抗癌剤への反応性に関与している可能性が示唆された。

5. 結語

肺腺癌細胞の糖鎖構造の違いは化学療法の効果に関与する可能性がある。

文 献

- 1) Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004; 304:1497-500.
- 2) Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007; 448:561-6.
- 3) Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*. 2011; 12: 175-80.
- 4) Nakanishi Y, Shimizu T, Tsujino I, Obana Y, Seki T, Fuchinoue F, Ohni S, Oinuma T, Kusumi Y, Yamada T, Takahashi N, Hashimoto S, Nemoto N. 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) Ferreira JA, Peixoto A, Neves M, Gaiteiro C, Reis CA, Assaraf YG, Santos LL. Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells: Adding glycosylation to the equation. *Drug Resist Updat.* 2016; 24:34-54.

パーキンソン病の罹病期間によるSTN-DBSの効果の違い

深谷 親¹⁾, 小林一太²⁾, 山下晶子³⁾

Influence of duration of Parkinson disease on outcome of STN-DBS

Chikashi FUKAYA¹⁾, Kazutaka KOBAYASHI²⁾, Akiko YAMASHITA³⁾

要旨

視床下核の脳深部刺激は、パーキンソン病に対する有効な治療法であるが、長期的にみると効果の程度にばらつきがある。我々は術後5年経過した後にも終日日常生活動作(ADL)が自立していた症例と自立していなかった症例を比較し、長期的に手術利益が得られる症例の特徴を検討した。その結果、手術時の年齢が若く、術前の認知機能が良好で術前off期のADLレベルが比較的良好に保たれている症例は、術後長期的に良好な状態が保たれることがわかった。

1. はじめに

パーキンソン病(PD)治療において視床下核の脳深部刺激療法(STN-DBS)が重要な治療選択肢の一つであることは、ここ数年の研究から明らかである。これまでの我々の研究では、PD発症後9年未満でSTN-DBSを導入した群の方が、9年以上の罹病期間を有する群より良好なPD症状の改善率が維持される傾向にあった。しかし、罹病期間が短いうちに手術に踏み切った症例であっても必ず長期予後が良好というわけではなく、他にも予後予測因子として重要な要因があると考えられる。本年度の研究では、視点を変え手術利益が長期に維持される症例の特徴という点から検討した。

2. 対象及び方法

当院にて両側STN-DBSを施行したパーキンソン病患者66例を対象とした。いずれもドバに対する反応性が保たれており、重篤な認知機能障害、精神症状や重大な全身性合併症のない症例である。

手術は定位脳手術にて行い、術中にはベンガン法を用いて3トラック同時のマルチトラックマイクロ

レコーディングを行って電極留置位置を決定した。術中には一時覚醒状態とし、試験刺激を行い刺激の有効性および低閾値で刺激副作用が出現しないことを確認した。術後には、当院の外来で刺激調整を行い術後5年以上follow-upされている。

これらの症例をSchwab & England scaleがoff時80ポイント以上で終日日常生活動作(ADL)が維持されているI(Independent)群($n=33$)と、80ポイント未満で維持されていないD(Dependent)群($n=33$)に分け、発症年齢、罹病期間、手術時年齢、術前の内服状況、術前のUPDRS total およびpart1~4の各スケール、LED、MMSE、HDS、S&Eスケールの違いについて検討した。2群間の比較にはMann-Whitney-U-testもしくはStudent's t-testを用い $p < 0.05$ にて有意と判断した。単変量解析で有意であった要因に対しては多重ロジスティック回帰分析を用いて有意な独立変数を検討した。

3. 結果

I群とD群で有意差の認められたものは、発症年齢($p=0.041$)と手術時年齢($p=0.002$)であった。い

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) 日本大学医学部脳神経外科学系神経科学分野

3) 日本大学医学部一般教育学系生物学分野

深谷 親 : fukaya.chikashi@nihon-u.ac.jp

表1 Results of multiple logistic regression analysis

Independent variable	Partial regression coefficient	Significance probability	Odds ratio	95% CI	
				Lower limit	Upper limit
Onset age (year-old)	-0.036	0.573	0.965	0.851	1.093
Age at surgery (year-old)	0.224	0.006	1.251	1.068	1.466
Preoperative UPDRS total off	-0.066	0.186	0.936	0.849	1.032
Preoperative UPDRS part I	0.102	0.678	1.107	0.684	1.793
Preoperative UPDRS part II on	-0.023	0.796	0.977	0.819	1.166
Preoperative UPDRS part II off	0.172	0.128	1.188	0.952	1.482
MMSE	-0.282	0.022	0.755	0.593	0.961
Preoperative S&E on	-0.005	0.864	0.995	0.935	1.058
Preoperative S&E off	-0.062	0.007	0.94	0.899	0.983

S&E: Schwab & England, CI: confidence interval

ずれも有意にI群の方が若かった。罹病期間には有意差はなかった ($p=0.24$)。術前のLEDやL-dopa内服量には有意差は認められなかった。術前UPDRSでは, total off ($p=0.035$), part I ($p=0.016$), part II on期 ($p=0.029$), off期 ($p=0.005$) に有意な差が認められた。その他MMSE (<0.001) とS&E scaleのon期 ($p=0.005$) とoff期 (<0.001) ともに有意差が認められた。

これらの要因を独立変数として行った多重ロジスティック回帰分析の結果では, 有意であったのは手術時の年齢 [odds ratio = 1.251 (95% CI: 1.068 - 1.466), $p=0.006$], MMSE [odds ratio = 0.755 (95% CI: 0.593 - 0.961), $p=0.022$], S&Eのoff期 [odds ratio = 0.94 (95% CI: 0.899 - 0.983), $p=0.007$] であった。

4. 考察

PDに対するSTN-DBSの効果を予測する方法としてはL-dopaに対する反応性がよく知られている¹⁾。しかし長期的な効果はL-dopaの反応性には必ずしも相関しないとの報告もあり²⁾, 一定の見解は得られていない。

これまでも予後予測因子に関する様々な報告がある。Ory-Magneらは³⁾, 我々の結果同様, 手術時の年齢が予後予測には重要であったと述べてる。また手術時の年齢は術後のアバシーやうつ発生の有意に相関することが報告されている⁴⁾。その他, ドパに反応しない体軸症状の存在や脳室拡大の存在, 術直後のジスキネジアの出現が予後と関係するという報告がある。

また, 最近の大規模な前向き研究では, 罹病期間の重要性が強調されているが⁵⁾, 我々の検討では有

意差は認められなかった。罹病期間には有意差がなかったにもかかわらず, 発症年齢と手術時の年齢には有意差が認められたことと関連づけて考えると, I群の症例はもともとが発症のはやい比較的進行の遅いタイプの病型であったとも考えられる。こうした点の解決をはかるためにも多数例での前向き研究が期待される。

5. 結語

PDに対するSTN-DBS後長期的に手術利益が得られる症例は手術時の年齢が若く, 術前の認知機能が良好で術前off期のADLが良好に保たれている症例であると考えられた。

文 献

- 1) Lyons KE, Davis JT, Pahwa R. Subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease patients intolerant to levodopa. *Stereotact Funct Neurosurg* 2007; 85: 169-174.
- 2) Piboolnurak P, Lang AE, Lozano AM, et al. Levodopa response in long-term bilateral subthalamic stimulation for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007; 22: 990-997.
- 3) Ory-Magne F, Brefel-Courbon C, Simonetta-Moreau M, et al. Does ageing influence deep brain stimulation outcomes in Parkinson's disease? *Mov Disord* 2007; 22: 1457-1463.
- 4) Jaggi JL, Umemura A, Hurtig HI, et al. Bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: surgical efficacy and prediction of outcome. *Stereotact Funct Neurosurg* 2004; 82: 104-114.
- 5) Deuschl G, Schade-Brittinger C, Agid Y. EARLYS-TIM Study Group: Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications. *N Engl J Med* 2013; 368: 610-622.

膵頭十二指腸切除後の脂肪肝の発生と制御

山崎 慎太郎¹⁾

Postoperative liver steatosis in pancreatoduodenectomy: treatment strategy

Shintaro YAMAZAKI¹⁾

要旨

膵頭十二指腸切除後の患者が数か月の間に肝の脂肪化が高率かつ急速に起こる現象に着目し、肝脂肪化の病態を突き止める。さらに同術式の欠点である周術期の栄養不良、脂肪肝の発生の機序を推論し、発生を予防する治療法を考察した。

1. はじめに

2015年までの研究において、膵頭十二指腸切除後の脂肪肝の発生と制御に関する検討を行ってきた。外科手術後の栄養障害は患者の予後に影響を与える因子と考えられ、近年では水分・食事制限などは可能な限り短期間とし、早期に栄養介入することで患者の状態を改善する取り組みが多く設けられている。特に膵切除は膵外分泌機能に影響を与え、消化酵素の分泌低下による消化吸収障害を引き起こす。そのため食事摂取量の確認と共に、消化吸収を促進する治療が必要になると考えられる。今回我々は膵切除後の患者に対して膵消化酵素薬である高力価膵酵素補充剤とアミノ酸を主成分とした経腸栄養剤の併用療法による栄養障害に対する有用性について検討したので報告する。

本研究により得られたデータより各種のアミノ酸代謝の変化が改善され、臨床データの向上および患者の栄養レベルの改善がおこる機序を推定する。

2. 対象・方法

○対象患者

2008年から2014年に日本大学医学部 外科学系

消化器外科学分野で肝胆膵悪性腫瘍によって膵頭十二指腸切除術を施行した患者。

○介入

高力価の膵酵素製剤(リパクレオン:1,800 mg)とBCAA(豊分枝鎖アミノ酸製剤:エレンタール:2P)を術後4日目より、少なくとも約1か月間投与し効果を判定する。

○計測項目

- 1) CT値の計測や膵実質と膵管径等の画像的变化
- 2) 血液検査 AST, ALT, 血清総蛋白, アルブミン値。

3. 結果

1) 肝のCT値の変化

2015年度報告の如く、術前のベースラインとなる肝CT値は[62 HU (37-75) vs. 63 (51-71), $p=0.80$]と介入の有無による背景の違いを認めなかったが、術後3か月時点では介入群のCT値は有意に改善していた。[56 HU (-13-73) vs. 64 (26-69), $p=0.0015$]。又CT値におけるliver to spleen(肝臓/脾臓比:L/S)比[1.16 (0.95-1.32) vs. 1.12 (0.98-1.38), $p=0.29$]。も有意に改善していた。

1) 日本大学医学部外科学系消化器外科学分野
山崎慎太郎:yamazaki-nmed@umin.ac.jp

2) 血液検査

血液検査における栄養状態の変化において介入群で有意差をもって、血清総蛋白およびアルブミン値に改善を認めた。また、AST値は両群間に有意差を認めないもののALT値は有意差をもって良好なトレンドを示した。

4. 考 察

本研究では膵頭十二指腸切除後にBCAA+高力価膵酵素製剤のコンビネーション治療により術後の栄養状態が改善されることが確認された。膵切除後には膵外分泌機能不全を呈することが報告されており、米国膵腺癌ガイドラインでは脂肪便・腹部仙痛・体重減少・栄養不良などの症状が認められる場合、膵酵素補充療法の推奨が記載されている。

また膵外分泌機能不全は脂肪成分の消化に影響を与えるため、脂肪を含まないアミノ酸製剤を主体とした経腸栄養は消化に負荷をかけない成分栄養剤であり、膵切除後の病態を考慮した栄養療法になると考える。

術後の患者の栄養改善と、脂肪肝への変化の抑制が認められた。本介入により患者の病態が改善された点より類推すると、膵頭十二指腸切除後の脂肪肝の本体は膵機能不全であり、従来の膵酵素剤の補充では不十分である可能性が示唆された。また、術後には完全消化態による早期かつ継続的な経腸栄養が患者の栄養状態を維持し、2次性の脂肪肝の発生を抑制するものと推測された。

膵切除後の脂肪肝の発生により術後化学療法の継続が困難になることなどがNAFLD/NASH診療ガイドライン2014においても謳われており、術後合併症の中でも対策が重視されている。膵切除後に脂肪肝が発生する明確な機序はまだ解明されていないが、想定される機序として下記2機序が挙げられる。
①膵切除後の膵外分泌機能不全により脂肪の消化障害と欠乏が起こり生体内で糖質からの脂肪合成が促進される。
②手術侵襲による糖の利用効率の低下を補うため、体内のタンパク質と脂質から糖新生が起こる。この糖代謝異常は利用効率の良いアミノ酸の過剰消費を引き起こし、アミノ酸インバランスの状態となる。

これら2つの機序による細胞内飢餓は肝細胞に脂肪を蓄積し脂肪肝への変化を助長することが推測さ

れた。本研究で得られた知見はJournal of Gastroenterology誌へ公表した。¹⁾

5. 結 語

膵頭十二指腸切除後の脂肪肝への進展をBCAA+高力価膵酵素製剤のコンビネーション治療で抑制し良好な結果を得た。

文 献

- 1) Yamazaki S, Takayama T, Higaki T, Moriguchi M, Yoshida N, Miyazaki T, Teshima Y. Pancrelipase with branched-chain amino acids for preventing nonalcoholic fatty liver disease after pancreaticoduodenectomy. J Gastroenterol. 2016;51(1):55-62.

口腔悪性腫瘍における IL-22 の関与

相澤 (小峯) 志保子¹⁾, 相澤聡一^{1), 2), 3)}

A study on oral carcinogenesis and IL-22

Shihoko KOMINE-AIZAWA¹⁾, Sohichi AIZAWA^{1), 2), 3)}

要旨

IL-22は主にCD4陽性T細胞, NK細胞, NKT細胞によって産生されるサイトカインである。近年, IL-22が胃癌や口腔扁平上皮癌の進展・浸潤に関連する可能性が報告されている。我々は以前に口腔扁平上皮癌の前癌状態である境界悪性型上皮異形成症の病変局所において, IL-22産生細胞頻度と異型細胞におけるIL-22レセプター発現が亢進していることを報告した。本研究ではIL-22が口腔悪性腫瘍に与える影響をin vitroの系で検討した。その結果, 口腔癌細胞株ではIL-22による細胞の遊走の促進はみられたものの, 明らかな細胞増殖の増強や浸潤の促進はみられなかった。

1. はじめに

異型細胞や癌細胞の除去や病態の進行にはNK細胞, T細胞をはじめとする免疫担当細胞が関与している。インターロイキン-22(interleukin-22, IL-22)は主にCD4陽性T細胞, NK細胞, NKT細胞によって産生されるサイトカインである。IL-22のレセプターは免疫担当細胞には存在せず, 皮膚, 気道, 腸管などの上皮細胞に発現する¹⁾。IL-22はこれらの上皮細胞から抗菌ペプチドの産生を促進し, 自然免疫系を活性化させる。また, IL-22は表皮角化細胞の増殖を誘導するが, 終末分化を阻害するため乾癬やアトピー性皮膚炎の病態に関わると考えられている²⁾。さらに, STAT3を介しBcl-2の発現を誘導することから, アポトーシス阻害による胃癌や口腔扁平上皮癌の浸潤に関連する可能性が示唆されている³⁻⁵⁾。我々はこれまでに口腔扁平上皮癌の前癌状態である境界悪性型上皮異形成症の病変局所において, IL-22産生細胞頻度と異型細胞におけるIL-22レセプター発現が亢進していることを報告した。本研究ではIL-22が口腔悪性腫瘍の浸潤に与える影響をin vitro

の系で検討した。

2. 対象及び方法

2.1 口腔癌細胞株

口腔癌細胞株Ca9-22とSASをJCRB細胞バンクより分譲を受け, 実験に供した。Ca9-22はminimal essential medium(GIBCO, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)に10%のFetal bovine serumとペニシリン, ストレプトマイシンを加えた培地で培養した。SASはDulbecco's modified Eagle's mediumとHam's F12 mediumを等量で混合し, 10%のFetal bovine serumとペニシリン, ストレプトマイシンを加えた培地で培養した。IL-22受容体の発現をanti-IL-22 receptor antibody (abcam, cambridge, UK)を用いて蛍光染色し, 確認した。

2.2 IL-22

Recombinant human IL-22をR&D systems (Minneapolis, MN, USA)より購入し, 実験に供した。1ng/mLから100ng/mLの濃度で実験に使用した。

1) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

2) 日本大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学系歯科口腔外科学分野

3) 独立行政法人地域医療機能推進機構横浜中央病院歯科口腔外科
相澤 (小峯) 志保子: aizawa.shihoko@nihon-u.ac.jp

2.3 細胞増殖試験

Cell counting kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて、細胞の増殖試験を行った。

2.4 Migration assay (細胞遊走アッセイ)

Ca9-22を24 wellプレートで培養し、コンフルエントになったところで、Scratch Stick (IWAKI, Tokyo, Japan) を用いてスクラッチし、IL-22を種々の濃度で加え48時間後に細胞の遊走の程度を観察した。

2.5 Invasion assay (細胞浸潤アッセイ)

Corning BioCoat Matrigel Invasion Chamber (Corning, Bedford, MA, USA) を用いてCa9-22の細胞浸潤にIL-22が与える影響を検討した。

3. 結果

3.1 IL-22はCa9-22とSASの細胞増殖に影響を与えない

IL-22無添加群(対照群)とIL-22添加群における細胞増殖の差はみられなかった。

3.2 IL-22はCa9-22の遊走を誘導する

Ca9-22を用いてmigration assayを行った。48時間後に細胞の遊走を観察したところ、IL-22無添加群(対照群)に比較して、IL-22を10ng/mLで添加した群で有意差をもって細胞の遊走が増加した($p < 0.05$) (図1)。

3.3 IL-22はCa9-22の浸潤能を増強する傾向がある

Ca9-22の細胞浸潤能におけるIL-22の影響を検討した。IL-22を10ng/mLで添加した群で対照群に比

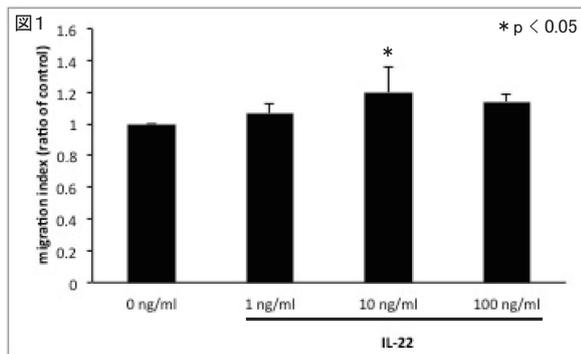


図 1

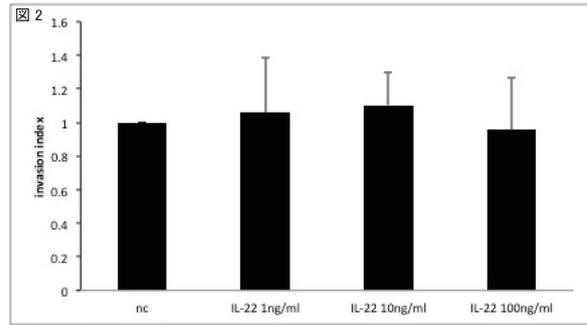


図 2

較して、浸潤能が増強する傾向がみられたが、統計学的有意差は得られなかった(図2)。

4. 考察

我々は口腔扁平上皮癌の前癌状態である境界悪性型上皮異形成症の病変局所において、IL-22産生細胞頻度と異型細胞におけるIL-22レセプター発現が亢進していることを以前に見出しており、IL-22が口腔癌の進展・浸潤に関わる可能性を本研究において検討した。胃癌においては、IL-22がSTAT3, ERKシグナル, AKT, MMP9に依存して癌細胞の浸潤を増強させることが報告されている^{4,5)}。しかし、我々が今回使用した口腔癌細胞株では細胞の遊走の促進はみられたものの、明らかな細胞増殖の増強や浸潤の促進はみられなかった。口腔内には多種多様な細菌が多数存在しており、口腔内の扁平上皮は常に多くの細菌に曝露されている。また、胃癌は腺癌であるが、口腔癌の多くは扁平上皮癌である。従って、細胞のIL-22に対する感受性が異なることが考えられる。

口腔癌は全ての悪性腫瘍の約2.2%の割合を占めており、近年患者数は増加傾向にある。口腔癌の治療法の第一選択は外科的な切除であるが、手術痕による顔貌の変形や摂食・嚥下障害、発語障害などが、手術後の患者のQuality of lifeを大きく低下させる。口腔癌のリスク因子として喫煙やHPV感染があげられる。今後はタバコに含まれるニコチンや、HPVの関連も含めてさらなる検討を進める予定である。

5. 結語

口腔癌細胞株ではIL-22による細胞の遊走の促進はみられたものの、明らかな細胞増殖の増強や浸潤

の促進はみられなかった。

文 献

- 1) Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB and Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3573-85.
- 2) Fujita H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J Dermatol Sci.* 2013;72(1):3-8.
- 3) Naher L, Kiyoshima T, Kobayashi I, Wada H, Nagata K, Fujiwara H, Ookuma YF, Ozeki S, Nakamura S and Sakai H. STAT3 signal transduction through interleukin-22 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2012;41(5):1577-86.
- 4) Fukui H, Zhang X, Sun C, Hara K, Kikuchi S, Yamasaki T, Kondo T, Tomita T, Oshima T, Watari J, Imura J, Fujimori T, Sasako M and Miwa H. IL-22 produced by cancer-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion via STAT3 and ERK signaling. *Br J Cancer.* 2014;111(4):763-71.
- 5) Ji Y, Yang X, Li J, Lu Z, Li X, Yu J and Li N. IL-22 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells via IL-22R1/AKT/MMP-9 signaling. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(7):3694-703.

腕時計型脈波モニタリング機器による 不整脈検出の検証に関する研究

笠巻祐二¹⁾, 橋本賢一¹⁾, 中井俊子²⁾, 渡辺一郎²⁾,
平山篤志²⁾, 矢内 充¹⁾, 加藤公敏¹⁾, 相馬正義¹⁾

Detection of arrhythmias based on the pulse wave derived RR interval variability analysis by newly developed “watch-type” plethysmograph

Yuji KASAMAKI¹⁾, Kenichi HASHIMOTO¹⁾, Toshiko NAKAI²⁾, Ichiro WATANABE²⁾,
Atsushi HIRAYAMA²⁾, Mitsuru YANAI¹⁾, Kimitoshi KATO¹⁾, Masayoshi SOMA¹⁾

要旨

手首完結型の脈波計を作成し、計測された脈波信号の解析により不整脈検出が可能であるか否かを検討した。(1) 脈波RR間隔の変動について0.25～0.5Hz帯域のパワー変化とCVRRを指標に心房細動が検出できることを示した。(2) 148症例について、発作性心房細動の検出率が80%以上であった。(3) 発作性心房細動、持続性心房細動での評価では、脈による検出継続時間が、30分で感度：100%、偽陰性率：0%、偽陽性率：24.8%、45分で感度：94.7%、偽陰性率：5.3%、偽陽性率：17.1%、60分で感度：89.5%、偽陰性率：10.5%、偽陽性率：10.9%であり、脈乱れを伴う不整脈のスクリーニング用途の可能性が示された。(4) 手首完結型腕時計型脈波モニタリング機器にて脈波解析から不整脈が検出でき、簡便に日常生活上で不整脈のモニタリングが可能である。

1. はじめに

腕時計型脈波モニタリング機器は、日常生活での体動時においても他の脈拍計と比べて、ノイズによる影響が少なく脈拍数を計測することが可能である。不整脈患者において、日常生活での不整脈の検出および評価には通常、ホルター心電計あるいは携帯型心電計を使用しているが、そのモニタリング時間は前者で24時間～48時間であり、後者は非連続的である¹⁻⁴⁾。また電極や粘着テープによるかぶれや、配線の煩わしさなど長時間の装着に対して、ある程度の負担が患者に強いられている。一方、腕時計型脈波モニタリング機器は、日常生活上で簡易に装着可能なので長期の脈波の記録を解析することが可能であり、脈波の日内変動評価など患者の日常管理に用いることが可能である。したがって、脈波から心房細動等の不整脈の検出が可能となれば、不整脈患者におけるスクリーニングのみならず様々な胸部症状を訴える心疾患患者の日常管理が長期で簡便

に行える可能性がある。今回、手首で脈波信号を記録する腕時計型脈波計(HC1)を作成し、計測された脈波信号の解析により不整脈検出が可能であるか否かを検討した。

2. 対象及び方法

循環器外来患者を対象にセイコーエプソン社製の新たに開発された脈波モニタリング機器(HC1)とスズケン製の防水型心電計Cardy302Maxとを同時装着し、最大24時間の連続計測を行い、対比評価を行った。ホルター心電計で検出した不整脈検出箇所(発作性心房細動、持続性心房細動)の腕脈波データを解析して検出した不整脈箇所を比較評価して、腕脈波での不整脈検出率と、その継続時間の誤差および偽陽性率、偽陰性率を算出して評価した。なお、使用したHC1の概観を図1に示す。

被験者の構成は、男性97名、女性56名、計153名(平均年齢70.7歳)であった。

1) 日本大学医学部内科学系総合内科・総合診療医学分野

2) 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野

笠巻祐二：kasamaki.yuuji@nihon-u.ac.jp

脈波RR間隔による心房細動検出

RR間隔変動は、周波数解析によって周期的な信号と非周期的な信号に分離でき、非周期的信号はその周波数とパワーを対数変換すると、負の直線相関がある。

また、心拍変動解析により脈の乱れを検出し両者をクラスタリングすることで心房細動を検出する。

- (1) 心房細動発生時には相関は低くなり白色雑音状になることから、その変化を捉えやすい0.25～0.5Hz帯域のパワーを算出する。
- (2) 心拍変動係数 CVRR を求める。
- (3) 120分を1フレームとしてk-means法により周波数解析のパワーとCVRRをクラスタリング処理を行い心房細動を検出する。



図 1 腕時計型脈波モニタリング機器 (HC1)

3. 結果

実施症例数は153症例（内5症例は、初期の段階において脈波データの欠損が認められた）であり、解析可能症例は148例であった。心房細動症例数は19症例（発作性心房細動：7症例、持続性心房細動：12症例）であった。

(1) 発作性心房細動の発生箇所に対する検出結果

発作性心房細動検出時間が30分以上を陽性とした場合の検出評価については、手首脈波による発作性心房細動検出結果は83.3%となり、指脈波での検出結果である80%以上となった。

ホルター心電計と脈との検出時間割合の平均値は52.9%であった。

(2) 発作性心房細動と持続性心房細動の検出時間の結果

（発作性心房細動：7症例、持続性心房細動：12症例）被験者毎のホルター心電計での心房細動検出時間の合計に対する脈での検出時間の合計と、その時間割合の結果に関しては、心電図検出時間に対して発作性・持続性心房細動で各々51.7%，54.3%であった。

(3) 発作性心房細動と持続性心房細動の検出率、偽陰性率、偽陽性率の結果

（発作性心房細動：7症例、持続性心房細動（24時間）：12症例）被験者毎のホルター心電計での心房細動検出時間の合計に対し、脈での検出時間が継続

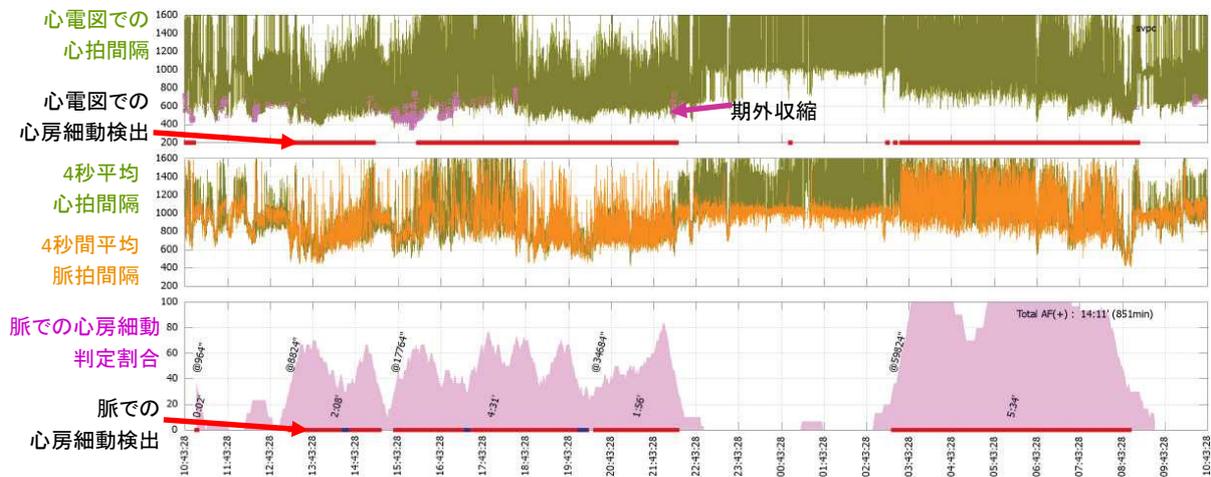


図 2 発作性心房細動検出例における脈波解析
—心電図での心房細動検出との対比—

して、30分以上、45分以上、60分以上の場合を検査陽性としたときの、検出率（感度）と偽陰性率、偽陽性率の結果は、各々下記であった。

脈による検出継続時間30分で感度：100%，偽陰性率：0%，偽陽性率：24.8%，45分で感度：94.7%，偽陰性率：5.3%，偽陽性率：17.1%，60分で感度：89.5%，偽陰性率：10.5%，偽陽性率：10.9%

(4) 発作性心房細動検出例

ホルター心電計での心房細動検箇所（上図赤線）に対して、脈波間隔を解析した脈での心房細動箇所（下図赤線）がよく合致している（図2）。

4. 考 察

脈波を手首で記録する脈波計（HC1）を作成し、計測された脈波信号の解析により不整脈検出が可能であるか否かを検討した結果、脈波RR間隔の変動について0.25～0.5Hz帯域のパワー変化とCVRRを指標に心房細動が検出できることが示された。また、発作性心房細動の検出率については80%以上と高い結果が得られた。発作性心房細動、持続性心房細動での評価では、脈による検出継続時間の結果からおおむね良好な精度で検出可能であり、脈乱れを伴う不整脈のスクリーニング用途の可能性が示された。結果としては、手首完結型で脈波が計測でき、不整脈が検出できることは、簡便に日常生活上で不整脈のモニタリングが可能なが確認できた。

しかしながら、心房細動検出に際しては、偽陽性の問題が残った。今回偽陽性例としては、上室性期外収縮が連続または多発しているものが8症例、また心拍変動が大きく連続または多発している場合が11症例、体動による影響（Artifact）で脈波検出が困難な箇所がある場合が7症例で、合計26症例確認された。したがって、今後の課題としては、心房細動の検出精度の向上を図ることが重要であり、現在新たな心房細動検出アルゴリズムを開発中である。

5. 結 語

手首で脈波信号を記録する腕時計型脈波計（HC1）を作成し、計測された脈波信号の解析により心房細動などの不整脈検出が可能である。今後は心房細動の検出精度の向上を図ることが重要であると思われる。

文 献

- 1) Edwards JD, Kapral MK, Fang J, et al. Underutilization of Ambulatory ECG Monitoring After Stroke and Transient Ischemic Attack: Missed Opportunities for Atrial Fibrillation Detection. *Stroke* 2016; 47: 1982-1989
- 2) Kimura T, Aizawa Y, Kurata N, et al. Assessment of atrial fibrillation ablation outcomes with clinic ECG, monthly 24-h Holter ECG, and twice-daily telemonitoring ECG. *Heart Vessels* 2016; Jul 6 Epub ahead of print
- 3) Anczykowski J, Willems S, Hoffmann BA, et al. Early Detection of Symptomatic Paroxysmal Cardiac Arrhythmias by Trans-Telephonic ECG Monitoring: Impact on Diagnosis and Treatment of Atrial Fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2016 June 3 Epub ahead of print
- 4) Rosero SZ, Kultyifa V, Olshansky B, et al. Ambulatory ECG monitoring in atrial fibrillation management. *Prog Cardiovasc Dis* 2013; 56: 143-152

TGF- β 1 に対するPIポリアミドを用いた 日大式ヒトiPS細胞誘導法の開発

齋藤孝輔¹⁾, 福田昇²⁾³⁾, 篠原憲一⁴⁾, 舩廣善和⁵⁾, 松本宜明⁶⁾,
青山隆彦⁶⁾, 花沢重正⁵⁾, 松田裕之⁷⁾, 藤原恭子⁷⁾, 相馬正義⁷⁾

Establishment of the new method to induce iPS cell by using pyrrole- imidazole polyamide targeting TGF- β 1

Kosuke SAITO¹⁾, Noboru FUKUDA²⁾³⁾, Kenichi SHINOHARA⁴⁾, Yoshikazu MASUHIRO⁵⁾,
Yoshiaki MATSUMOTO⁶⁾, Takahiko AOYAMA⁶⁾, Shigemasa HANAZAWA⁵⁾,
Hiroyuki MATSUDA⁷⁾, Kyoko FUJIWARA⁷⁾, Masayoshi SOMA⁷⁾

要旨

iPS細胞技術をヒトに対し臨床応用するためには、より安全かつ安価で簡便な作成技術の確立が求められる。iPS細胞の誘導過程においては、細胞の間葉系上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition:MET) が生じており、TGF- β 1の発現を抑制してMETを促進することにより、細胞のiPS化がより進むことが報告されている。そこで、本研究においては標的特異的DNA結合能を持つPIポリアミドを用いてTGF- β 1の発現を抑制し、iPS細胞の導入効率の改善を試みた。その結果、TGF- β 1抑制PIポリアミドは乳腺上皮細胞のMETを促進し、ヒト繊維芽細胞からのiPS細胞誘導効率を有意に上昇させることが判った。この結果はPIポリアミドを併用することで、より安全で効率の良いiPS細胞の誘導が可能となることを意味し、現在さらに誘導法の改良を進めている。

1. 背景

Induced pluripotent stem cell (iPS細胞) は、人工的に誘導された多能性幹細胞であり、自己複製能と体内のほぼ全ての細胞に分化し得る分化能を有する。iPS細胞は分化した体細胞に、多能性維持に必須である山中4因子等の少数の遺伝子を導入することにより作出できるため、再生医療の分野において甚大なポテンシャルを持つ技術である。現在、iPS細胞の臨床応用に向けた研究が活発に行われており、2014年には世界初の臨床試験として、iPS細胞より誘導した網膜細胞シートを用いた加齢黄斑変性の治療が開始され、現在経過観察が進んでいる。一方、iPS細胞技術を実用化する上で最も懸念される

のが、iPS細胞より分化誘導した細胞・組織が腫瘍化する可能性である。また、より広く一般的に実用化するためには、さらに効率的で安価な作成技術の開発も求められている。

近年、iPS細胞の誘導過程において間葉細胞の上皮化 (mesenchymal-epithelial transition:MET) が必須のステップであることが判ってきた。METは間葉系の細胞が細胞間の接着性を獲得し上皮様に形態変化する過程であり、胚発生の過程において重要な役割を果たすことが知られている。外部より導入したSOX2, OCT-4, KLF4, c-MYCなどの山中4因子は、体細胞の初期化の過程で細胞の上皮化を進行させ、間葉系細胞特異的な遺伝子の発現を抑制すること

1) Centre de recherche, Centre hospitalier de l' Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC, Canada

2) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

3) 日本大学大学院総合科学研究科

4) 千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍学

5) 日本大学生物資源学部応用生物科学科

6) 日本大学薬学部薬学科

7) 日本大学医学部内科学系総合内科学・総合診療医学分野

相馬正義: souma.masayoshi@nihon-u.ac.jp

で、初期化の効率を上げると考えられる。また、METと逆の過程である上皮間葉系転換 (EMT) を促進する作用がある Transforming growth factor β1 (TGF β1) を抑制すると、METが阻害されることが判っており、TGF-β1の阻害剤投与により、マウス繊維芽細胞からのiPS細胞の誘導効率が上昇することも報告されている¹⁾。そこで、本研究では我々が研究開発中のピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドを用いてTGF-β1の発現抑制を行い、ヒトiPS細胞の誘導効率への影響を調べる研究を企画した。

PIポリアミドは芳香族アミノ酸 *N*-methylpyrrole (Py) および *N*-methylimidazole (Im) で構成される低分子有機化合物であり、配列特異的にDNAに結合する性質を持つ。現在我々が開発対象としているPIポリアミドは、PyとImが鎖状につながった分子が中央部で屈曲したヘアピン型の形状をしており、この屈曲により分子内で向き合うPIポリアミドのペアごとに、認識するDNA塩基が決まっている。Py・PyのペアはATまたはTAを、Py・ImはCGをIm・PyのペアはGC塩基対を認識し、ImとPyの組み合わせ次第で多様な配列のDNAに結合させることが可能である。転写因子の結合を競合的に阻害し、下流の遺伝子発現を抑制する転写制御薬として用いることができる。特別なDrug Delivery Systemなしに細胞の核内に取り込まれ、核酸分解酵素やタンパク分解酵素による分解を受けず、生体内にて安定に存在できることから、PIポリアミドは新規の転写阻害剤として期待される分子である²⁾。

TGF-β1の発現抑制作用を持つPIポリアミドをiPS誘導時に用いることで、iPSの誘導効率が上がる

のではないかと考え、以下の研究を行った。

2. 対象・方法

1) TGF-β1抑制PIポリアミドGB1101

ヒトTGF-β1遺伝子プロモーターのFSE2 (転写開始点より-1383 ~ -1376の領域) を認識するようデザインされたPIポリアミドGB1101を用いた (図1)。この分子が標的DNAに特異的に結合し、TGF-β1の発現を抑制することを確認後³⁾、実験に用いた。

2) 細胞

乳腺上皮細胞MCF10AはDMEM/F12培地に5%馬血清、ヒドロコルチゾン (500ng/ml)、ヒトEGF (10ng/ml)、インスリン (5 μg/ml)、コレラ毒素 (100ng/ml) を添加した培養液を用いて培養した。ヒト繊維芽細胞株HDFは10%牛胎児血清を添加したDMEM培地を用いて培養した。

3) EMTの誘導とその解析

MCF10Aを6well培養プレートに播種し、コンフルエントになった時点でmitomycin Cを添加し、その2時間後にPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を添加し、EMTを誘導した。48時間後にピペットチップ先端で細胞の層をスクラッチして創傷を作成し、Wound healing アッセイを行った。このアッセイにおいて、創傷部が回復する速度の速さが遅いほどEMTの抑制/METの誘導が生じていると判定した。

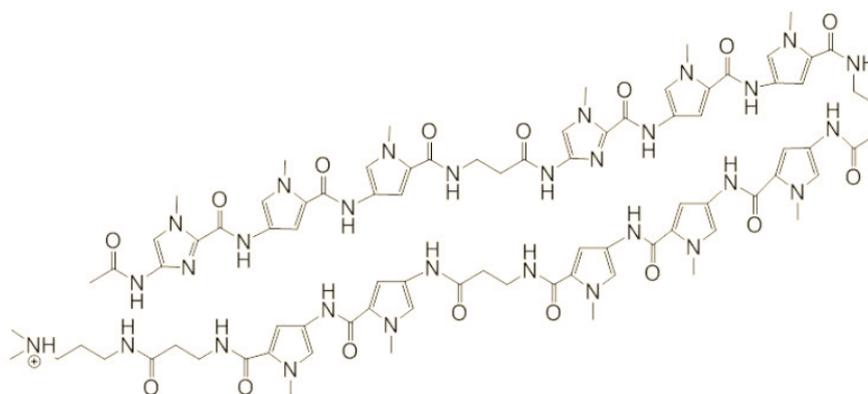


図 1 TGF-β1抑制PIポリアミドGB1101の構造式

4) iPS細胞の誘導と同定

CytoTune センダイウイルス・ベクターキット (DNAVEC, 茨城) を用いて, HDF細胞に SOX2, OCT4, KLF4, C-MYC を導入した。3日後に細胞を再播種し, mitomycin C 存在下で増殖を抑えたマウス胎児繊維芽細胞 MEF をフィーダー細胞として, 0.1%ゼラチンコートした 6well 培養プレートにて培養した。培地は DMEM/F12 に, 20% KnockOut serum replacement, 10mM MEM-NEAA solution, 55mM 2-メルカプトエタノール, bFGF (4ng/ml) を添加した培養液を用いて維持した。培地は3日おきに交換し, iPS 様のコロニーが出現するまで培養を続けた。出現したコロニーについては, 初期化した細胞に特徴的なマーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性を, ALP の発色性基質を添加することにより

検出し, iPS細胞の同定を行った。

3. 結果

1) GB1101による TGF-β1 および EMT 関連遺伝子の発現抑制

MCF10A細胞に PMA を投与すると EMT が誘導され, TGF-β1, SNAI1, Fibronectin, Vimentin の発現上昇と E-cadherin の発現低下といった EMT に特徴的な遺伝子の発現変化が起こる。ここに GB1101 を添加したところ, EMT 様の遺伝子発現パターンが抑制された。図 2A に示すように, PMA による E-cadherin の発現抑制は GB1101 により転写レベルおよび蛋白レベルで解除され発現上昇を示し, 一方 Vimentin の発現は GB1101 により抑制された。既存の TGF-B1 阻害剤 SB43152 によっても同様の効果が得

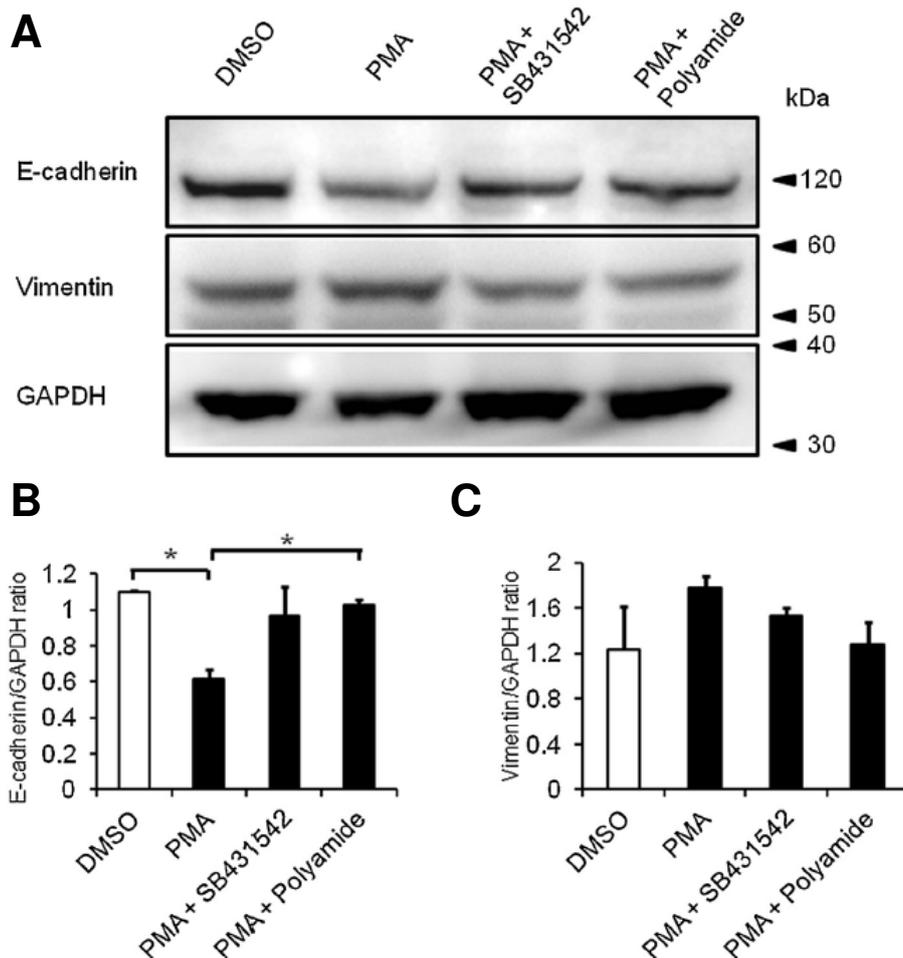


図 2 PMAによる EMT 誘導に対する GB1101 の抑制効果
MCF10A細胞に PMA を投与すると, E-cadherin の発現低下, Vimentin の発現上昇といった EMT に特徴的な変化が起こるが, GB1101 および SB431542 の存在下では, それらの変化が蛋白レベルにおいても (A), 転写レベルにおいても (B, C) 抑制された。

られた。

2) GB1101によるEMTの抑制

Wound healing assay によりGB1101によるEMTへの影響を調べた。通常はPMAを投与した状態で、細胞の層をスクラッチすると、細胞の遊走能がEMTにより亢進しているためPMA非投与細胞と比較して早い段階で創傷部分が細胞で満たされ、細胞層が回復するが、GB1101存在下では損傷部分の回復が遅かった(図3)。このことはGB1101がEMTの抑制/METの誘導を促進している可能性を示唆した。

3) GB1101によるiPS誘導効率の上昇

次に繊維芽細胞HDFよりiPS細胞を誘導する際にGB1101を添加し、誘導効率を比較した。HDFにSOX2, OCT4, KLF4, C-MYCを導入する際に、GB1101を添加し、その後iPS細胞が誘導されるまで、培地交換時には常にGB1101を添加し続けた。出現したALP陽性コロニー数を計測したところ、未処理群およびTGF-β1プロモーターを標的としないミスマッチPIポリアミド投与群と比較して、GB1101投与群で有意なコロニー数の増加を認めた(図4A)。GB1101存在下で誘導されたALP陽性コロニーは、iPS細胞に特徴的なNanogの発現を認め(図4B)、

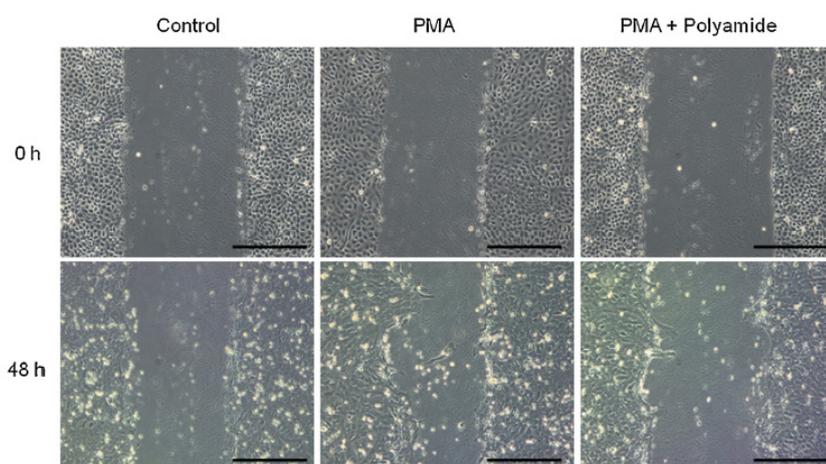


図3 GB1101による細胞遊走能の抑制
MCF10A細胞にPMAを投与すると、EMTの誘導により細胞遊走能が活性化するが、GB1101の添加により抑制された。

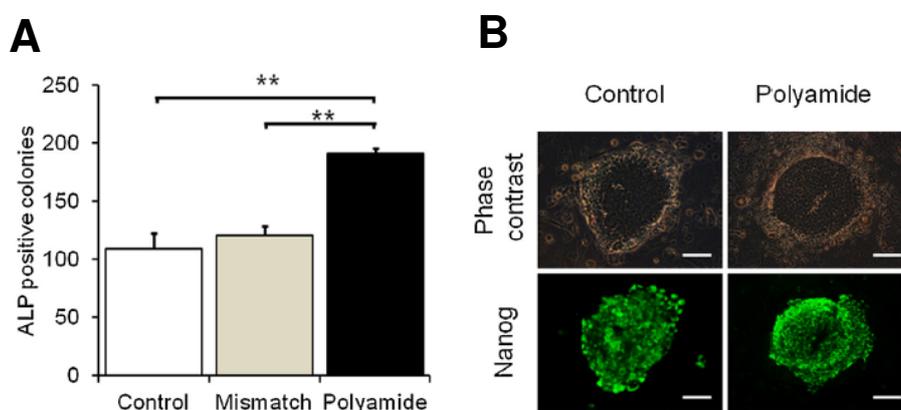


図4 GB1101によるiPS細胞の誘導効率の上昇
A. HDF細胞よりiPS細胞を誘導する際に、GB1101を投与すると、ALP陽性コロニー数が有意に増加した。B. 形成されたコロニーはコントロールと同様、GB1101投与条件下でもiPS細胞等のマーカーであるNanogを発現していた。

また網羅的遺伝子発現解析により、GB1101存在下で誘導したiPSの遺伝子の発現パターンは通常の方法で誘導したiPSと極めて類似していることを確認した。このことから、GB1101はiPS細胞の誘導効率を上昇させたと言える⁴⁾。

4. 考察・今後の展望

本研究の結果、GB1101がTGF- β 1発現を抑制し、それによりEMTの抑制およびMETの誘導を亢進させることが確認できた。さらにこのGB1101を従来法と併用することにより、iPS細胞の誘導効率が上昇することが証明できた。

この研究と並行して、我々の研究チームでは山中4因子をDNAではなく、タンパク質の形で導入する試みを続けている。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が、蛋白質を直接導入することにより、感染の危険性が無くなる。日本大学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蛋白を開発しており、この手法を用いて、山中4因子タンパク質を導入する試みを続けている。この手法と今回開発したTGF- β 1抑制ポリアミドを併用することで、安全でかつ効率の高いiPS誘導が可能になると期待できるため、引き続き開発を続けている。

文 献

- 1) Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem.* 2001;9(9):2215-35.
- 2) Li R1, Liang J, Ni S, Zhou T, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 2010 Jul 2;7(1):51-63.
- 3) Igarashi J, Fukuda N, Inoue T, Nakai S, Saito K, Fujiwara K, Matsuda H, Ueno T, Matsumoto Y, Watanabe T, Nagase H, Bando T, Sugiyama H, Itoh T, Soma M. Preclinical Study of Novel Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting Human TGF- β 1 Promoter for Hypertrophic Scars in a Common Marmoset Primate Model. *PLoS One.* 2015 May 4; 10(5): e0125295.
- 4) Saito K, Fukuda N, Shinohara K, Masuhiro Y, Hanazawa S, Matsuda H, Fujiwara K, Ueno T, Soma M. Modulation of EMT/MET process by pyrrole-imidazole polyamide targeting human transforming growth factor- β 1. *International Journal Biochemistry & Cell Biology* 66:112-120, 2015.7

脳卒中後疼痛の治療： ドラッグチャレンジテストに基づく脳脊髄刺激療法

山本隆充¹⁾, 深谷親¹⁾, 渡辺充²⁾, 小林一太²⁾, 大島秀規²⁾, 吉野篤緒²⁾, 関口真一³⁾

Cerebrospinal stimulation therapy for post-stroke pain based on the results of drug challenge test

Takamitsu YAMAMOTO¹⁾, Chikashi FUKAYA¹⁾, Mitsuru WATANABE²⁾,
Kazutaka KOBAYASHI²⁾, Hideki OSHIMA²⁾, Atsuo YOSHINO²⁾, Shinichi SEKIGUCHI³⁾

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治療法について報告する。脳卒中後疼痛症例にモルフィン、チアミラール、ケタミンを用いたドラッグチャレンジテストを行い、大脳皮質運動野刺激、脊髄刺激、経頭蓋磁気刺激による除痛効果と比較した。大脳皮質運動野刺激、脊髄刺激、経頭蓋磁気刺激の除痛効果は、いずれもケタミンテストの除痛効果と相関を認めた（Pearson's correlation coefficient test, Regression analysis）。一般に、脳卒中後疼痛に対する脳脊髄刺激療法の効果は不十分なことが多いと報告されている。しかし、ケタミンテスト有効例を選択して脳脊髄刺激療法を行えば良好な治療効果が得られることが明らかとなった。また、低用量ケタミン点滴療法を併用することで、さらに除痛効果を高めることができると考えられる。

1. はじめに

脳卒中後疼痛の出現率は、Andersonによると脳卒中発症後1か月後で4.8%、6か月後で6.5%、12か月後で8.4%と報告されている¹⁾。またBowsherによると、慢性期脳卒中患者における頻度は8/72例(11%)と報告されている²⁾。脳卒中後疼痛は難治性で、脳脊髄刺激療法の良い適応とならないという報告が少なからず認められる³⁾。しかし、脳脊髄刺激が有効であるという報告も数多く認められることから⁴⁾、脳脊髄刺激療法の適応となる患者選択の方法が最も重要であると考えられる。

著者らはドラッグチャレンジテストを臨床応用し、個々の症例における疼痛の薬理学的背景を明らかにすることが治療法の決定に重要であることを報告してきた^{5,6)}。本研究では、慢性植え込み装置を用いた大脳皮質運動野刺激、経頭蓋磁気刺激装置を用いた大脳皮質運動野刺激、脊髄刺激の効果をドラッグチャレンジテストの結果と比較し、脳脊髄刺

激療法の患者選択におけるドラッグチャレンジテストの有用性について検討した。

2. 対象ならびに方法

ドラッグチャレンジテスト

visual analogue scale (VAS) で痛みの評価を行い、薬物投与によるVASの変化を比較する。この評価法の特徴は、プラセボ投与から始め、少量ずつ段階的に薬物を投与するので、少量から連続的に多量投与までの効果を確認できることである。患者の訴える疼痛がどのような薬物にどの程度の投与量でどの程度反応するか、または全く反応しないかを明らかにすることができる^{5,6)}。

ケタラールテストは、5分間隔で生食を2回投与後、5分間隔でketamine hydrochlorideを5mg、合計25mgまで静脈内投与する（図1）。モルフィンテストは、同様に5分間隔でmorphine hydrochloride 3mgを合計18mgまで静脈内投与する。また、チア

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外科学分野

3) 医学研究支援部門医用電子室

山本隆充：yamamoto.takamitsu@nihon-u.ac.jp

ミラールテストは、同様に50mgのthiopental sodiumを、5分間隔で合計250mgまで静脈内投与し、途中で入眠した場合は、その時点で中止する。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有効例、40%以下のものを無効例としている^{5,6)}。

脳脊髄刺激療法

大脳皮質運動野刺激療法は、大脳皮質運動野の硬膜上に4連の円盤電極 (RESUME, Medtronic, Minneapolis, USA) を留置し、前胸部皮下に植え込んだ慢性植え込み型の刺激装置と結線して刺激を行った⁶⁾。刺激頻度は25Hz、刺激幅0.21msで刺激強度は2～5Vとした(図2)。経頭蓋磁気刺激には、MRIガイドシステム (Brainsight TMS, Rogue Research Inc, Montreal, Canada) と連動したMagstim super-rapid stimulator (The Magstim Com. Whiteland, UK) を用

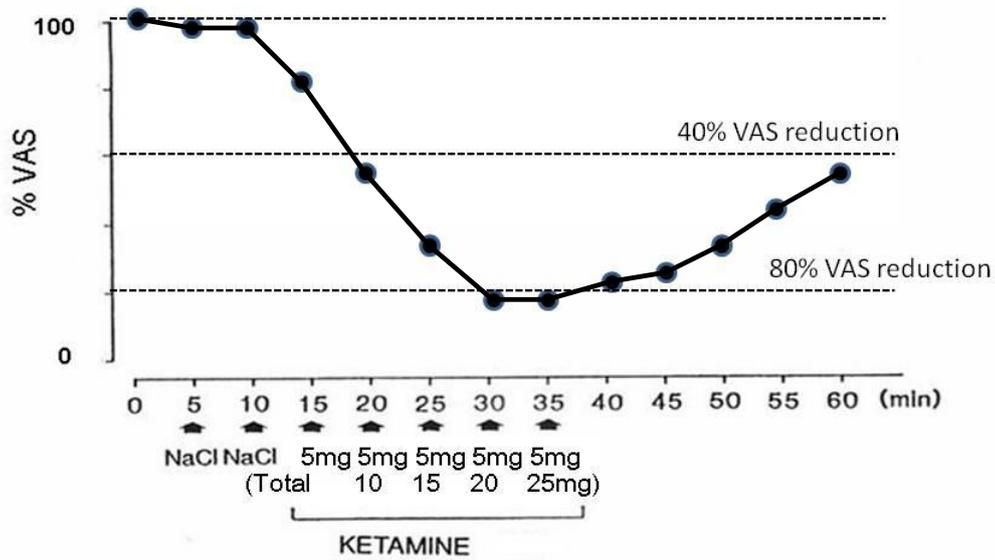


図1 ケタミンテスト

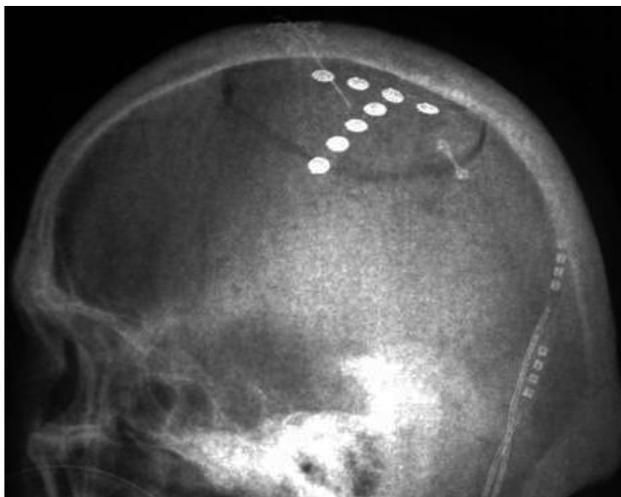


図2 慢性植え込み電極による大脳皮質運動野刺激

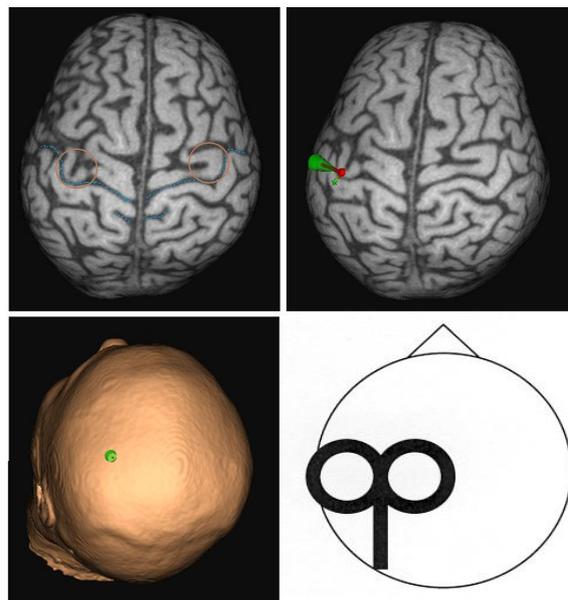


図3 経頭蓋磁気刺激装置による大脳皮質運動野刺激

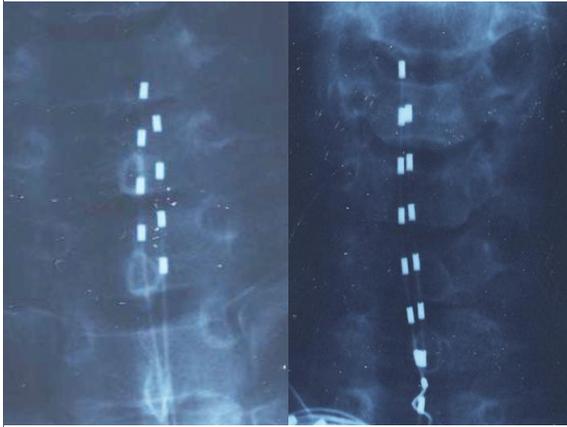


図4 dual-lead SCS, 4極×2 (左) と8極×2 (右)

いて、5Hzで500回の刺激を運動誘発閾値の刺激強度で行った⁷⁾(図3)。脊髄刺激は4極または8極のシリンドラー型電極(3487APISCES-Quad, 3777 PISCES-Octet; Mrdtronic Inc., Minneapolis, USA)を2本、平行に脊髄硬膜外腔に留置するDual-lead SCSを用いた⁸⁾。Dual-lead SCSでは、刺激によって疼痛部に刺激感覚(paresthesia)を誘発する刺激部位を選択し、刺激幅0.21ms, 刺激頻度は5~25Hzとした(図4)。

対象症例

対象はいずれも難治性の脳卒中後疼痛で、慢性植え込み電極による大脳皮質運動野刺激は39例(ケタミンテストは23例のみ)、男性25例、女性14例で、年齢は35~72歳(平均58.7歳)であった。経頭蓋磁気刺激は20例、男性12例、女性8例で、年齢は54~85歳(平均63.5歳)であった。脊髄刺激は22例、男性15例、女性7例で、年齢は42~73歳(平均61.4歳)であった。

3. 結果

ドラッグチャレンジテストの結果

ドラッグチャレンジテストの結果は、慢性植え込み電極による大脳皮質運動野刺激の症例は、ケタミンテスト有効例が11/23(47.8%)、モルフィンテスト有効例が8/39(20.5%)、チアミラールテスト有効例が22/39(56.4%)。頭蓋磁気刺激の症例は、ケタミンテスト有効例が10/20(50%)、モルフィンテスト有効例が3/20(15%)、チアミラールテスト有効例が7/20(35%)。脊髄刺激の症例では、ケタミンテスト有効例が12/22(54.5%)、モルフィンテ

スト有効例が5/22(22.7%)、チアミラールテスト有効例が12/22(54.5%)であった。また全症例の合計では、ケタミンテスト有効例が33/65(50.8%)、モルフィンテスト有効例が16/81(19.8%)、チアミラールテスト有効例が41/81(50.6%)であった。

ドラッグチャレンジテストと脳脊髄刺激療法による除痛効果の比較

脊髄刺激(Dual-lead SCS)によるVASの減少率とドラッグチャレンジテストによるVASの減少率の比較では、ケタミンが有効な症例と無効な症例との比較では、ケタミンが有効な症例で有意にDual-lead SCSによるVASの減少率がテスト刺激中($p=0.003$)と24か月後($p=0.018$)で高かった(Mann-Whitney's U test)が、モルフィンテストならびにチアミラールテストの有効例と無効例の比較では、有意差を認めなかった(図5)。また、ドラッグチャレンジテストとDual-lead SCSのVAS減少率の相関について比較すると、ケタミンテストでは有意の相関を求めた($r=0.670$, $p=0.001$, Pearson's correlation coefficient test)が、モルフィンテスト($r=0.327$, $p=0.172$)ならびにチアミラールテスト($r=0.291$, $p=0.227$)では有意な相関を認めなかった。

一方、慢性植え込み電極による大脳皮質運動野刺激開始12か月後の比較では、ケタミンテスト($r=0.711$, $p<0.001$)ならびにチアミラールテスト($r=0.752$, $P<0.001$)で相関を認めたが、モルフィンテスト($r=0.151$, $p=NS$)は相関を認めなかった。また、経頭蓋磁気刺激直後との比較では、ケタミンテスト($r=0.503$, $p=0.012$)、モルフィンテスト($r=0.526$, $p=0.009$)、チアミラールテスト($r=0.609$, $p=0.002$)で相関を認めた。

4. 考察

脊髄刺激(Dual-lead SCS)ではケタミンテストのみと相関を認め⁸⁾、慢性植え込み型電極による大脳皮質運動野刺激ではケタミンテストとチアミラールテストで相関を認めた⁶⁾。また、経頭蓋磁気刺激による大脳皮質運動野刺激ではケタミンテスト、チアミラールテストならびにモルフィンテストと相関を認めた⁷⁾。このように脳脊髄刺激療法の違いによって差を認めた理由は明確ではないが、評価の時期やそれぞれの刺激による除痛のメカニズムについて今

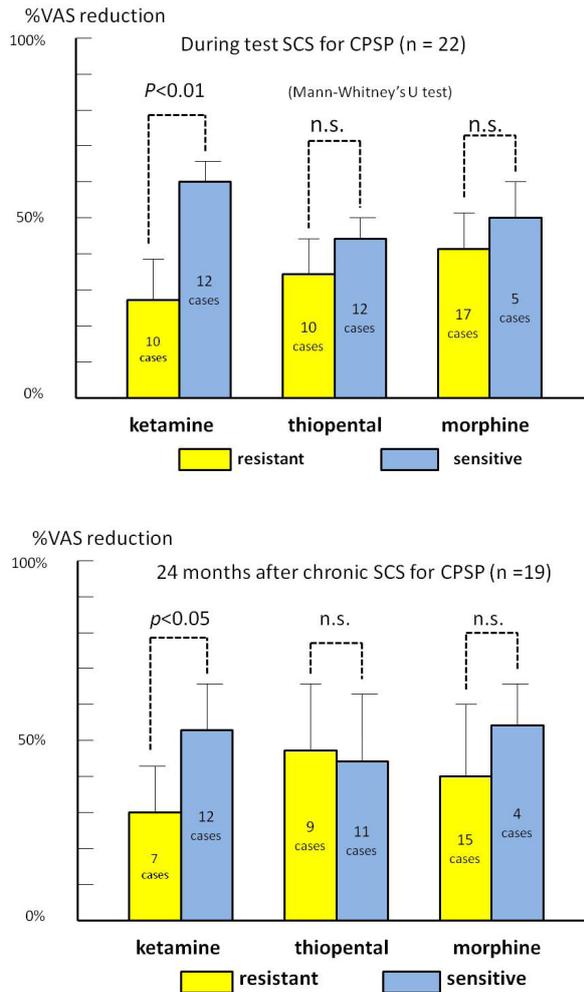


図 5 ドラッグチャレンジテストと Dual-lead SCS による VAS スコア減少率の比較 (文献 8 より引用)

後さらに検討する必要がある。しかし、ケタミンテストのみが脊髄刺激、慢性植え込み電極ならびに経頭蓋磁気刺激による大脳皮質運動野刺激の効果と相関を認めた事実は重要で、脳脊髄刺激療法の適応決定にはケタミンテストが最も重要と考えられた。チアミラールテストでは、テスト中に入眠することが多いが、入眠の直前までVASスコアが全く変化しない症例が約20%存在する。これまでの経験から、このような症例は脳脊髄刺激療法に全く反応しないことから、脳脊髄刺激療法の適応外としている⁹⁾。また、脳卒中後疼痛には運動麻痺に伴う関節の亜脱臼や関節拘縮が原因していることもあり、このような原因にはモルフィンテストが有効と考えている。

知覚求心路の切断後に中枢側ニューロンに過剰放電が出現することが、脊髄後根切断後に脊髄後角内

でニューロンの過剰活動を記録した Loeser ら¹⁰⁾ (1967年)の報告以来、脊髄後角、三叉神経核、視床、大脳皮質知覚野など多くの部位で確認されている。また、求心路遮断後に出現するニューロンの過剰活動に対して、NMDAレセプターのブロッカーであるケタミンの効果を確認され、臨床的にも求心路遮断後に出現する中枢性感作 (central sensitization) や ワインドアップ現象に対するケタミンの効果が報告されている¹¹⁾。

ケタミン有効例で脳脊髄刺激療法が有効な症例が多く認められる直接の理由は明確ではない。しかし難治性の脳卒中後疼痛症例では、少なくともモルフィン、ケタミン、チアミラールを用いたドラッグチャレンジテストで除痛効果が全く得られない症例においては、脳脊髄刺激療法の効果も望めないと考える。

脊髄刺激では脊髄後角内のGABAを増加させ、興奮性アミノ酸を減少させることが報告されており、NMDAレセプターのブロッカーであるケタミンの除痛効果との関係が想起される^{12,13)}。ドラッグチャレンジテストでケタミンが有効な55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低用量ケタミン点滴療法の結果を報告している⁹⁾。ケタミン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69%であったが、24時間以上持続するものも31%存在した。効果の持続時間が短い症例でも一度疼痛を軽減することが疼痛の管理には重要であり、これによって精神的な安定を得られるという症例が多い。また、中枢性感作の解除にも有効であると考えられる⁹⁾。ケタラールの持つ解離性麻酔薬としての性質から情動面の変化を呈する症例も存在したが、適切な投与量と投与時間を選択することによって、有効な治療効果を得ることができる。本邦でも使用可能となったガバペンチンやプレガバリンには、神経終末からの興奮性アミノ酸の遊離を抑制する作用が報告されており、ケタミンとの相乗効果も期待される。

今回の検討で難治性の脳卒中後疼痛に対しては、ケタミンが有効な症例を選択して脳脊髄刺激療法を行うことによって、良い手術成績が得られるものとする。さらに、ケタミンが有効な症例においては低用量ケタミン点滴用法を加えることができるメ

リットがあり、神経損傷部位から興奮性アミノ酸の遊離を抑制することが報告されているプレガバリンとの併用も有効と考えられる。これらの事実から、難治性の脳卒中後疼痛に対するドラッグチャレンジテストに基づく脳脊髄刺激療法は大変に有用であり、低用量ケタミン点滴療法やプレガバリンの併用によって、優れた治療効果が得られるものと考えられる。

5. 結 語

ドラッグチャレンジテストに基づく患者選択によって、脳卒中後疼痛に対する脳脊髄刺激療法の有効率を高めることができる。また、ケタミンが有効な症例に対しては低用量ケタミン点滴療法の併用が有効で、プレガバリンなどの内服薬を加えることで、さらに治療効果を高めることができる。

文 献

- 1) Andersen G, Vestergaard K, Ingeman-Nielsen M et al. Incidence of central post-stroke pain. *Pain*, 1995; 61: 187-193
- 2) Bowsher D: Stroke and central poststroke pain in an elderly population. *J Pain*, 2001; 2: 258-261
- 3) Cruccu G, Aziz TZ, Garcia-Larrea L et al.: EFNS guidelines on neurostimulation therapy for neuropathic pain. *Eur J Neurol* 2007; 14: 952-970
- 4) Aly MM, Saitoh Y, Hosomi K et al.: Spinal cord stimulation for central poststroke pain. *Neurosurgery* 2010; 67: 206-211
- 5) Yamamoto T, Katayama Y, Tsubikawa T et al.: Usefulness of the morphine/thiopental test for the treatment of deafferentation pain. *Pain Res*, 1991; 6: 143-146
- 6) 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
- 7) Matsumura Y, Hirayama T, Yamamoto T: Comparison between pharmacological evaluation and repetitive transcranial magnetic stimulation-induced analgesia in poststroke pain patients. *Neuromodulation*, 2013; 16: 349-354
- 8) Yamamoto T, Watanabe M, Obuchi T et al.: Importance of pharmacological evaluation in the treatment of poststroke pain by spinal cord stimulation. *Neuromodulation*, 2016; 19: 744-751
- 9) Yamamoto T, Katayama Y, Obuchi T et al.: Drug challenge test and drip infusion of ketamine for post-stroke pain. *Pain Res*, 2009; 24: 191-199
- 10) Loeser JD, Ward AA: Some effects of deafferentation on neurons of the cat spinal cord. *Arch Neurol*, 1967; 17: 629-636
- 11) Backonja M, Amdt G, Gombor KA et al: Response of chronic neuropathic pain syndrome to ketamine: a preliminary study. *Pain*, 1994; 56: 51-57
- 12) Smits H, Ultenius C, deumens R et al.: Effect of spinal cord stimulation in an animal model of neuropathic pain relates to degree of tactile allodynia. *Neuroscience*. 2006; 143: 541-546
- 13) Song Z, Ultenius C, Meyerson BA et al.: Pain relief by spinal cord stimulation involves serotonergic mechanism: an experimental study in a rat model of mononeuropathy. *Pain*, 2009; 147: 241-248

ブタ心外膜下脂肪組織に由来する脱分化脂肪細胞の特性解析

遠山一人¹⁾, 風間智彦²⁾, 加野浩一郎³⁾, 平山篤志¹⁾, 松本太郎²⁾

Characteristic analysis of porcine epicardial adipose tissue-derived dedifferentiated fat cells

Kazuto TOYAMA¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Koichiro KANO³⁾,
Atsushi HIRAYAMA¹⁾, Taro MATSUMOTO²⁾

要旨

脱分化脂肪細胞 (DFAT) は成熟脂肪細胞より調製される多能性細胞である。本研究では、ブタから心外膜下脂肪由来DFAT (EC-DFAT), および皮下脂肪由来DFAT(SC-DFAT) を調製し、心筋細胞などへの分化能を比較検討した。遺伝子発現解析では、EC-DFATはSC-DFATに比べ、心筋初期分化マーカーGATA4の発現が有意に高かった。ラット心筋細胞との共培養による心筋分化誘導の結果、EC-DFATはSC-DFATに比べ、心筋特異的転写因子Nkx2.5やトロポニンI陽性細胞の出現率が高く、心筋細胞と協調的拍動を示す細胞が多く観察された。以上よりEC-DFATが心筋細胞への分化指向性が高いことが明らかとなった。EC-DFATは心筋再生を目的とした細胞治療の新たな細胞ソースとなり得る可能性がある。

1. 背景および目的

薬物治療に抵抗性を示す重症心不全に対して、近年、細胞治療が注目されており、自家骨髄単核球や骨格筋芽細胞などを用いた臨床研究が開始されている。これら細胞治療の作用機序は移植細胞から分泌される液性因子のパラクライン効果によるものであることが明らかになっている。心筋症など心筋自体の変性に起因する病態の場合、心筋細胞に直接分化し心機能を改善させるポテンシャルをもつ治療用細胞が望まれる。Matsumotoら¹⁾は、成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することにより調製される脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell : DFAT) が、高い増殖能と間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) に類似した多分化能を獲得することを明らかにした。DFATは少量の脂肪組織より大量調製することが可能であることから再生医療の細胞資源として期待される。またDFATは心筋への分化能を有することが報告されている²⁾。脂肪細胞はその局在部位により機能が異なることが知られているこ

とから、DFATの分化指向性も脂肪組織の局在部位により異なることが示唆される。本研究では、ブタの心外膜下脂肪組織、及び皮下脂肪組織からそれぞれ脂肪細胞を単離しDFATを調製した。そして、心外膜下脂肪由来DFAT (Epicardial fat-driven DFAT: EC-DFAT), および皮下脂肪由来DFAT (Subcutaneous fat-derived DFAT : SC-DFAT) の心筋細胞などの分化能を比較検討した。

2. 方法および結果

ブタの皮下脂肪組織および心外膜下脂肪組織よりSC-DFATとEC-DFATを既報³⁾に従い調製し、脂肪、骨、軟骨、平滑筋へ分化誘導実験を行った。その結果、SC-DFAT, EC-DFAT共に脂肪、骨、軟骨、平滑筋への多分化能を有することが確認された。次にEC-DFATおよびSC-DFATにおける心筋、脂肪、軟骨初期分化マーカーの遺伝子発現をリアルタイムRT-PCR法で検討した。その結果、EC-DFATはSC-DFATに比べ、心筋初期分化マーカーGATA4の

1) 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野

2) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

3) 日本大学生物資源科学部応用生物科学科

松本太郎 : matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

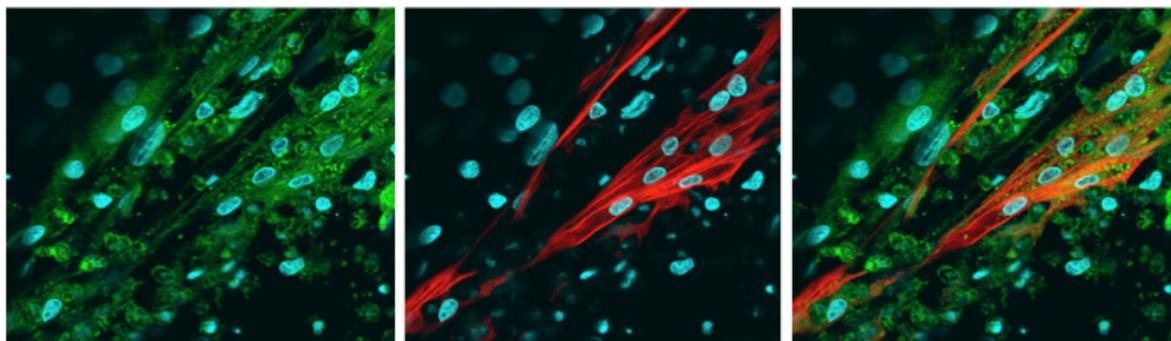


図1 ラット心筋細胞との共培養によるEC-DFATのトロポニンI発現

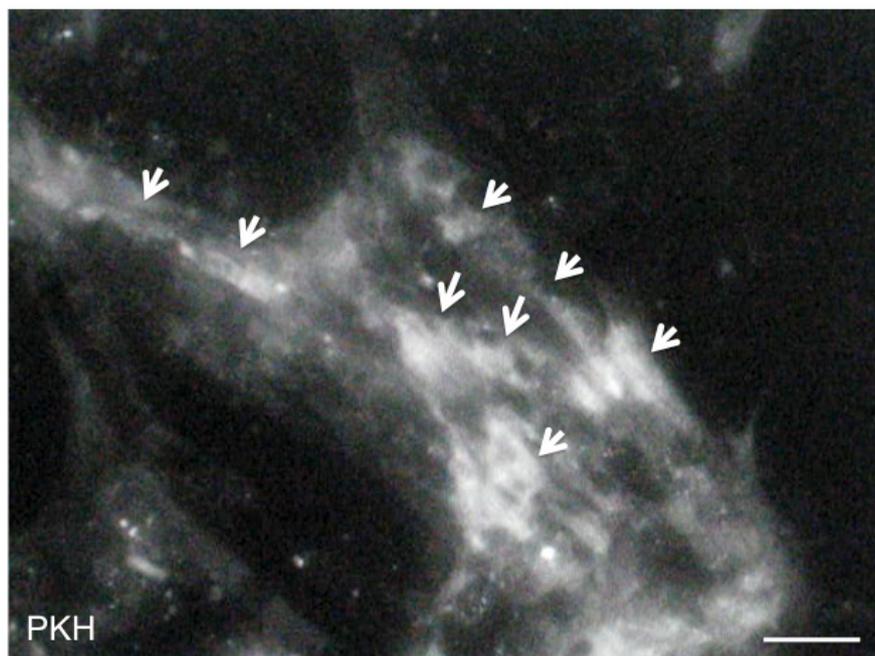


図2 ラット心筋細胞との共培養によるEC-DFATの協調的拍動像 (矢印は動画にて拍動を認めるDFATを示す。Scale bar 20 μm)

発現が高く、脂肪初期分化マーカーPPAR γ や軟骨初期分化マーカーSOX9の発現は低いことが明らかとなった。次にPKHで蛍光標識したEC-DFAT, SC-DFATをラット心筋細胞とともに7日間直接的共培養を行い、心筋特異的タンパク質の発現を免疫組織学的に検討した。心筋特異的転写因子Nkx2.5に対する免疫染色を行った結果、EC-DFATの一部に核に一致してNkx2.5を発現している細胞が認められた。心筋のギャップ結合タンパク質コネクシン43に対する免疫染色を行った結果、EC-DFAT間の細胞境界領域またはEC-DFATとラット心筋細胞との細胞境界領域にコネクシン43が顆粒状に発現している所見が認められた。また心筋特異的収縮蛋白

トロポニンIに対する免疫染色を行った結果、EC-DFATの一部にトロポニンI陽性の横紋構造を示す細胞が認められた。(図1)。

またEC-DFATでは、共培養3日目頃より隣接するラット心筋細胞と同期してPKH陽性のEC-DFATが協調的拍動する所見がしばしば観察された(図2)。これに対しSC-DFATでは、Nkx2.5発現細胞や、協調的拍動所見はまれにしか観察されなかった。

3. 考察

本研究ではDFATはMSCに共通の多分化を有しながら、採取部位近傍の間葉系組織への分化指向性を示すことが示唆された。Kimら⁴⁾は、皮膚線維芽

細胞由来iPS細胞では、血球細胞由来iPS細胞に比べ、造血関連遺伝子のDNA脱メチル化の程度が弱いことを示し、元の細胞のエピジェネティック修飾が初期化されても記憶されていることを報告した。DFATの採取組織による分化指向性の差異も、このようなエピジェネティック・メモリーが関与している可能性がある。

本研究ではEC-DFATは、心筋分化誘導にて心筋特異的転写因子Nkx2.5の発現やギャップ結合タンパク質であるコネキシン43の発現、トロポニンIを含むサルコメア構造の出現、心筋細胞との協調的拍動が確認された。これらの所見はEC-DFATが構造的、機能的に高い成熟度を示す心筋細胞へと分化する能力を有することを示唆している。現在、重症心不全患者に対しては、補助人工心臓や心臓移植が考慮されるが、いずれも経済的負担、厳しい適応基準と加療後の安全性が課題として存在する。EC-DFATは、高い心筋細胞への分化能に加え、少量の脂肪組織から安価に大量調製できるため、重症心不全に対する新たな細胞治療用ソースとして期待できる。

文 献

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, et al. (2008) Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *Journal of Cellular Physiology*, 215(1): 210–222.
- 2) Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama SI, Kano K, Kusumi Y, et al. (2009). Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47(5): 565–575.
- 3) Sugihara H, Yonemitsu N, Miyahara S, Toda S. (1987) Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture. *Journal of Lipid Research* 28(9):1038–1045.
- 4) Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, et al. (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467(7313): 285–290.

難治性免疫・アレルギー疾患の病態解明のための基礎的な検討

岡山吉道¹⁾, 布村聡¹⁾, 高橋恭子²⁾, 浅野正岳³⁾, 千島史尚¹⁾, 斎藤修¹⁾,
山本樹生¹⁾, 菅井和子⁴⁾, 松本健治⁵⁾, 村上誠⁶⁾, 藤澤大輔¹⁾, 柏倉淳一¹⁾,
葉山惟大¹⁾, 畠田優子¹⁾, 藤田英樹¹⁾, 坂本朋美¹⁾, 羅智靖¹⁾, 長澤洋介¹⁾,
岩田光浩¹⁾, 北村登¹⁾, 武井正美¹⁾, 丸岡秀一郎¹⁾, 権寧博¹⁾, 照井正¹⁾

Basic research for understanding of the pathogenesis of
severe immunological and allergic diseases

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Satoshi NUNOMURA¹⁾, Kyoko TAKAHASHI²⁾, Masatake ASANO³⁾,
Fuminao CHISHIMA¹⁾, Shu SAITO¹⁾, Tatsuo YAMAMOTO¹⁾, Kazuko SUGAI⁴⁾,
Kenji, MATSUMOTO⁵⁾, Makoto MURAKAMI⁶⁾, Daisuke FUJISAWA¹⁾, Jun-ichi KASHIWAKURA¹⁾,
Koremasa HAYAMA¹⁾, Yuko HATADA¹⁾, Hideki FUJITA¹⁾, Tomomi SASAKI-SAKAMOTO¹⁾,
Chisei RA¹⁾, Yosuke NAGASAWA¹⁾, Mitsuhiro IWATA¹⁾, Noboru KITAMURA¹⁾,
Masami TAKEI¹⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾, Tadashi TERUI¹⁾

要旨

1. 関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞はCOX1, COX2, LTC4S, TBXAS1を変形性膝関節症の滑膜マスト細胞と比較して有意に高く発現していた。中絶患者のヒト脱落膜組織のマスト細胞の特徴を解析し、脱落膜由来の培養マスト細胞を樹立した。
2. MIP-1 α が乳幼児初回喘鳴時における反復喘鳴を予測する鼻汁中バイオマーカーとして同定された。
3. 慢性蕁麻疹患者血清中の抗IgE自己抗体価は健常人と比較して有意に高かったが臨床的意義については現時点では不明である。
4. ヒト化NOGマウスを使用し、びらん性関節炎に重要な働きをする破骨細胞がこのモデルマウスでヒト由来であることを証明し、びらん性関節炎の発症にIL-6の関与が乏しいことを見出した。
5. ダニアレルゲン（HDM）刺激群は基底細胞における上皮バリア機能形成が脆弱化した。今後、脆弱化メカニズムを細胞外小胞（エクソソーム）などの新たな観点から解析を進め、アレルギー性気道炎症のメカニズム及び疾患バイオマーカーの同定を試みる。

I. はじめに

罹率が増加し社会問題にもなっている免疫・アレルギー疾患は、遺伝因子と環境因子が複雑に関与した多因子疾患である。近年、疾患モデル動物の解析により免疫・アレルギー疾患の病態の解明が進み治療法の開発が進んでいるが、未だに既存の治療法では効果が少ない難治例が存在する。難治例の病態

解明には、個々の疾病の臨床検体からの取り組みが必須である。本事業は、免疫・アレルギー疾患を扱う六つの臨床各科のベットサイドから得られた臨床検体を基に臨床医、免疫・アレルギー学者と生物学者が連携し研究拠点を形成し、難治性免疫・アレルギー疾患の予防と治療に資する研究を行うことを目的とした。

1) 日本大学医学部
2) 日本大学生物資源科学部
3) 日本大学歯学部
4) 国立病院機構福山医療センター小児科
5) 独立行政法人国立成育医療研究センター
6) 公益財団法人東京都医学総合研究所
岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp
照井 正: terui.tadashi@nihon-u.ac.jp

具体的な目的は、1. 免疫・アレルギー疾患の病態におけるマスト細胞の役割の解明 2. 感染による関節リウマチの発症と増悪の機序の解明 3. 疾患バイオマーカーの同定である。

また各分野の研究に際して倫理的配慮を行っている。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ている。

以下に各領域の研究の概要について述べる。

II. 整形外科/婦人科領域

免疫・アレルギー疾患の病態におけるマスト細胞の役割の解明

1. 背景

関節リウマチおよび流産の炎症の場におけるマスト細胞のフェノタイプの解析を行って、疾患特異的な分子の発現を解析する目的にて研究を進めている。病態に関連する分子（特に受容体）を同定し、その分子の発現や活性化を制御する機序の解明を行った。

2. 対象及び方法

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¹⁾。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, UK) と IL-6 (50 ng/ml, PeproTech EC Ltd) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium, Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada と Iscove's modified Dulbecco's medium [IMDM]) で培養した。42日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ IMDM で培養した。ヒト滑膜マスト細胞²⁾、肺マスト細胞と皮膚マスト細胞は、それぞれ滑膜組織、肺組織、皮膚組織と脱落膜組織から分離培養した。できるだけ新鮮な滑膜組織、肺組織、皮膚組織と脱落膜組織は採取後ただちに 2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1% fungizone を含んだ IMDM に入れ、はさ

みを用いてできるだけ細切した。collagenase と hyaluronidase を用いて細胞を酵素的に分散させた。赤血球を除去した後 SCF (200 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と IMDM) で培養した。42日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ IMDM で培養した。また、滑膜組織を酵素で細胞を分散後、培養し、プレートに接着した線維芽細胞を採取した。

RT-PCR：マスト細胞の総 RNA は RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて抽出し、精製した。500 µg/mL oligo (dT₁₂₋₁₈) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 5x 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。COX1, COX2, LTC4S, TBXAS1 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。

フローサイトメトリー：マスト細胞のフローサイトメーターによる解析はすでに報告した方法を用いて行った³⁾。以下の抗体を用いて細胞を染色した。PE あるいはビオチン標識抗 FcεRIα モノクローナル抗体 (クローン CRA1, eBioscience, San Diego, CA), ビオチン標識抗 chymase モノクローナル抗体 (クローン B7), 抗 tryptase モノクローナル抗体 (クローン G3 Chemicon International, CA), PE 標識抗 CD117 (クローン YB5.B8, BD Biosciences, San Jose, CA), 抗 MrgX2 モノクローナル抗体 (クローン 477533, R&D Systems, Minneapolis, MI)。PE/Cy5-streptavidin は Biologend (San Diego, CA) から購入した。

免疫化学組織染色と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³⁾。滑膜組織、皮膚組織あるいは、細胞を固定して、膜の穴あけをした後、Alexa Flour 488 標識抗 tryptase 抗体、ビオチン標識抗 FcεRIα モノクローナル抗体 (クローン CRA1), Alexa Flour 555 標識抗 FcεRIα 鎖抗体⁴⁾、アイソタイプコントロールマウス IgG1 およびウサギ IgG とインキュベートした。ビオチン標識抗 FcεRIα 陽性細胞は、streptavidin-Cy3 (Biologend) を用いて可視化した。FV1000 型共焦点

レーザー顕微鏡 (Olympus, 東京) を用いた。

マスト細胞の活性化：IgE感作したマスト細胞を0.1, 1.0, 10 $\mu\text{g/ml}$ の抗Fc ϵ RI 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^{-6}M)で30分間刺激した。Fc γ RIの架橋は、マスト細胞を1, 10 $\mu\text{g/ml}$ の抗ヒトFc ϵ RI抗体のF(ab') $_2$ fragments (F(ab') $_2\alpha$ Fc γ RI, clone 10.1)で30分間刺激した。コントロールとしてマウス IgG1のF(ab') $_2$ fragments (F(ab') $_2\text{mIgG1}$, Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA)で30分間刺激した。細胞を1度洗浄後Fc γ RIの架橋のため抗マウスIgG F(ab') $_2$ fragmentsのヤギF(ab') $_2$ fragments (gF(ab') $_2\alpha$ mF(ab') $_2$, Jackson Immune Laboratory)を添加しさらに30分間刺激した。ヒスタミン遊離とPGD $_2$ 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, PGD $_2$ 産生, サイトカイン産生測定：ヒスタミン遊離とPGD $_2$ 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：臨床データの2群間の統計学的解析およびin vitroの実験の3群間の統計学的解析はMann-Whitney U testを用いて $P < 0.05$ を有意とした。in vitroの実験の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

疾患特異的マスト細胞のフェノタイプの同定

1) 関節リウマチ：

関節リウマチ患者と変形性膝関節症の病変滑膜マスト細胞に発現している遺伝子をDNAチップで比較した。関節リウマチ患者マスト細胞はCOX1, COX2, LTC4S, TBXAS1を変形性膝関節症のマスト細胞と比較して有意に高く発現していた。Real-Time RT-PCRにてその結果を確認した。

2) 脱落膜組織マスト細胞：

ヒト脱落膜マスト細胞を酵素的に分散させる方法を確立した。ヒト脱落膜マスト細胞のフェノタイプはtryptaseおよびchymaseを持つMCTC typeであった。ヒト脱落膜由来の培養マスト細胞を樹立した。

4. 考察

マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え、疾患特異的な活性化機構が存在している。疾患特異的にマスト細胞に高発現している遺伝子の発現増強機構は炎症組織の微小環境によるものとエピジェネティックな変化によるものがあると考えられた。

5. 結語

マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え、疾患特異的な活性化機構が存在し、マスト細胞は炎症組織の微小環境によってそのフェノタイプを変化させるものとエピジェネティックな変化によるものがあることが示唆された。

Ⅲ. 小児喘息バイオマーカー領域

乳幼児初回喘鳴時における反復喘鳴を予測する鼻汁中バイオマーカーに関する検討

1. 背景

乳幼児期の気道ウイルス感染、特に、Respiratory Syncytial Virus (RSV) と Human Rhinovirus (HRV) は、欧米のハイリスク児のコホート研究から、反復性喘鳴や喘息発症、学童期以降の肺機能低下への関与が報告されてきた。しかし、乳幼児期早期の呼吸器感染における起因病原体、ウイルスの種類とその後の喘息発症との関係性は低いことが最近報告され、病原体同定のみで喘息発症予測は困難であることが示唆された。そのため乳幼児初回喘鳴時における反復喘鳴を予測する鼻汁中バイオマーカーの同定を試みた。

2. 対象及び方法

反復喘鳴発症を予測する指標の同定を目的に、2009年から下気道ウイルス感染に伴う初回喘鳴で国立病院機構横浜医療センター小児科に入院した乳幼児を対象に、2年半後の反復喘鳴有無とその予測因子に関し検討した (5)。2009年8月～2012年12月の間、喘鳴を初めて呈し下気道感染症にて入院した乳幼児 (82例, 中央値5.0ヶ月 0-50ヶ月)を対象とした。明らかな細菌感染による下気道感染症の児、ステロイド薬投与を行っている児、早産児は除外した。入院第1日目に、研究説明同意を行い、採血、鼻汁吸引物採取を行い、同時に、鼻汁スミアも作成

した。採取鼻汁は-80℃で保存後、RT-PCR法によりRSV (A, B型), HRV (A-C型) ヒトメタニューモウイルス, ヒトパラインフルエンザウイルス (1-4型), インフルエンザウイルス (A-C型), アデノウイルス, ヒトボカウイルスを検索, また鼻汁中の各種サイトカイン, ケモカインを一度に27種類のサイトカイン等が測定可能なBio-Plex®マルチプレックス分析システムもしくはEnzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (酵素結合免疫吸着法) にて測定した。さらに, 鼻汁中の総IgE, 抗RSV-IgE抗体, 抗RSV-IgG抗体, トリプターゼの測定を行った。初回喘鳴入院2年半経過後, 外来にて診察もしくは保護者に電話し, その後の喘鳴症状 (医師にて診察上確認されたもの) の確認をした。反復喘鳴の定義は, 2回以上の喘鳴とした。

統計解析: 臨床データの2群間の統計学的解析およびin vitroの実験の3群間の統計学的解析はMann-Whitney U testを用いて $P < 0.05$ を有意とした。in vitroの実験の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。鼻汁中のバイオマーカーに関しては, 変数減少法を用いた二項ロジスティック解析を行った。

3. 結果

初回喘鳴後, 対象児82例中49例に反復喘鳴がみられた⁵⁾。両親の喘息家族歴や患者本人の食物アレルギー, アトピー性皮膚炎有無によるその後の反復喘鳴の差はなかったが, 食物アレルギーを有する児で反復喘鳴をきたす割合が高い傾向がみられた($p=0.184$)。初回喘鳴児の入院時鼻汁スメアの細胞分画では, 好中球, 好酸球, リンパ球, 単球・マクロファージ全ての細胞の割合において, 入院後の反復喘鳴有無で有意差は認めなかった。初回喘鳴時の患者の鼻汁中からRT-PCR法を実施した60名における検出ウイルスにおいては, 93%の患者より何らかの呼吸器ウイルスが検出され, RSV, HRV, RSVとHRVの混合感染がその半数以上を占めていた。RSV, HRV各ウイルス陽性者, 陰性者間でその後の反復喘鳴発症率には差はなかった。初回喘鳴時の鼻汁中の主要なバイオマーカーの反復喘鳴発症有無で比較をしたところ, ウイルス感染それ自体で誘導されるインターフェロン (IFN), Th1サイトカインに関しては, IFN- γ , IL-2で有意に, 初回喘鳴後反復喘

鳴を呈した群で高値であったが, 強い抗ウイルス活性を持つIFN- α では有意差は認めなかった。気管支喘息において, 気道リモデリング, 気道炎症への関与が大きいとされ, 近年注目されている気道上皮由来のサイトカインであるThymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-33, IL-25は, いずれも有意差はなかった。また, IL-4, IL-5, IL-13といったアレルギーに大きく関与するTh2サイトカイン, マスト細胞からの化学伝達物質であるトリプターゼでも有意差はみられなかった。IL-9においても反復喘鳴児で有意に高値であったが, MIP-1 α , MIP-1 β において特に有意差が強く認められた。これら様々なバイオマーカーに関し, 変数減少法を用いた二項ロジスティック解析を行ったところMIP-1 α において, 初回喘鳴後の反復喘鳴因子として有意 ($p=0.015$) なオッズ比 (7.72) が得られた。

4. 考察

MIP-1 α は, マクロファージ, 樹状細胞, リンパ球など多くの細胞から産生されるケモカインの一種であり, 好酸球, 単球やリンパ球遊走に関与する。このMIP-1 α が高値であることは, 呼吸器ウイルス感染が, 気道炎症, 気道過敏性亢進, 気道リモデリングに影響を及ぼしていることが考えられる。乳幼児がウイルス感染による喘鳴をきたした場合, 現在までその後の反復喘鳴, 喘息発症における明確な予測因子はなかったが, 今回の研究結果でMIP-1 α が予測因子として有用である可能性が示唆された。しかし, 本研究は入院患者を対象としており, さらに, 明らかな閾値が得られたわけではない。喘息家族歴有無, 患者本人のアレルギー歴の有無など十分考慮し, 乳幼児においては, 反復喘鳴, 喘息発症に注意し, 喘息発症時には早期介入, 思春期までの寛解導入のため注意深く経過観察することが必要と考える。

5. 結語

MIP-1 α が乳幼児初回喘鳴時における反復喘鳴を予測する鼻汁中バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

IV. 皮膚科領域

慢性特発性蕁麻疹患者における抗IgE自己抗体と抗FcεRIα鎖自己抗体の臨床的意義

1. 背景

蕁麻疹は膨疹，すなわち紅斑を伴う一過性，限局性の浮腫が病的に出没する疾患であり，患者のQoLを著しく障害する。慢性特発性蕁麻疹（CSU）は蕁麻疹全体の半数以上を占めるが，CSUの明らかな原因は明確にされていない。CSU患者の一部で，自己血清皮内テスト（ASST）を行うと膨疹を形成する群があり，それらは自己免疫性蕁麻疹と呼ばれている。血清中に含まれている自己免疫成分としてIgEや高親和性IgE受容体（FcεRI）のα鎖に対する自己抗体が考えられており，実際にCSU患者で検出される⁶⁾。CSU患者において抗FcεRIα鎖抗体価が健常人と比較して高いという報告があるが，健常人や他の自己免疫性疾患で検出される場合があり，その臨床的意義については不明である。今回，我々は抗IgE自己抗体と抗FcεRIα鎖抗体とCSUの臨床症状との関連性を解析した。

2. 対象および方法

CSU患者121名，健常人56名の血清中の抗IgE自己抗体と抗FcεRIα鎖抗体を酵素免疫測定法（ELISA）で解析した。ROC曲線からカットオフ値を求めた。臨床的特徴との関連については，Mann-Whitney-U testまたはFisher's exact testで解析した。

3. 結果

ELISAで解析した抗IgE自己抗体価はCSU患者の方が健常人よりも有意に高かったが，抗FcεRIα鎖抗体価は，両群間で有意差がなかった。抗IgE抗体価のカットオフ値以上の群とカットオフ値未満の群で比較した場合，重症度や罹患期間等の臨床所見での有意な差はみられなかった。CSU患者においてASST陽性群が陰性群と比較して抗FcεRIα鎖抗体価が有意に高かった。

4. 考察

抗IgE抗体と臨床経過の関連性は明らかではないが健常人と比較して有意に高い。一方，抗FcεRIα鎖抗体価においては健常人と比較して有意差はなかったが，CSU患者においてASST陽性群が陰性群

と比較して抗FcεRIα鎖抗体価が有意に高かったことから，ASST検査の代替えとなりうる可能性がある。

5. 結語

抗IgE自己抗体と抗FcεRIα鎖抗体の臨床的意義は現時点でははっきりしていない。今後，さらに症例数を増やし，治療への影響なども解析していく予定である。

V. 血液膠原病内科領域

Epstein-Barrウイルスと関節リウマチ

1. 背景

免疫不全NOD-SCID（NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm-1Wjl/SzJ）（NOG）マウスに臍帯血由来ヒトCD34陽性細胞を移植し，ヒト化免疫マウスを作製し，Epstein-Barrウイルス（EBV）感染により関節リウマチ（RA）でも認められるびらん性関節炎モデルの作成に成功した^{8,9)}。これは，少なくとも動物モデルにおいては，EBVがRAに類似した関節炎を引き起こすことの初めての直接的証拠となった。本年度はこのような先行研究を進展させ，EBV感染ヒト化マウスが発症する関節炎をさらに詳細に解析して疾患モデルと確立することを目標とした。

2. 対象および方法

ヒト化NOGマウス：7週齢のメスNOGマウス（実験医学中央研究所）に $8 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ 臍帯血由来CD34陽性細胞（Lonza）を尾静脈から移植した。ヒトCD45陽性細胞の出現を末梢血で確認し，ヒト免疫化を確認した。末梢CD8陽性細胞のCD4陽性細胞の比率の逆転を確認し，マウスを解剖し，実験に使用した。

EBウイルス感染：ヒト化を確認し，尾静脈よりB95-8細胞株由来EBウイルス感染を行った。

IL-6の関与：EBウイルス感染後4週後よりヒト化抗ヒトIL-6受容体抗体：トシリズマブ（中外製薬）とラット抗マウスIL-6受容体抗体：MR16-1（中外製薬）を同時投与し，コントロールにヒトIgG（日本血液製剤機構）とラットIgG（Cappel）を同時投与した。

血清アミロイドAの測定：マウスSSA ELISA kit（Bio-source）を使用し，SpectraMax340PC384およびSoft-

Max Pro5 (Molecular Devices) で測定した。

ヒト破骨細胞の同定：解剖したマウスより得られた骨髄細胞をヒトM-CSF, ヒトRANKL含有培養液 OCGM SingleQuots (Lonza) で10日間培養した。多核巨細胞の出現を確認し, TRAP染色キット(Sigma), 抗ヒトカテプシン抗体 (Takara) と抗ヒトミトコンドリア抗体 (Novus Biologicals, Littleton Co) を使用し, EnVision/HRP mouse (Dako) を用いて酵素抗体法で組織染色を行った。

3. 結果

骨びらん部に誘導される多核細胞はマウスと交差しない抗ヒトカテプシンK抗体で染色された。また, このマウス骨髄単核球を分離し, ヒトRANKLとヒトM-CSFで刺激したところ抗ヒトカテプシンKで染色されるだけでなく, 抗ヒトミトコンドリア特異的抗体でも染色されヒト由来であることが証明された。ヒトとマウス特異的IL-6受容体抗体の投与でびらん性関節炎の発症に差がなく, IL-6が産生に重要な働きをするアミロイドAの血中濃度の上昇も認めなかった。

4. 考察

今後はヒトMHCクラスII遺伝子を導入し, ヒト化マウスのT細胞免疫応答を改善したうえでEBウイルスを感染させるか, *in vitro* で自己抗原反応性T細胞を誘導し, マウスに戻すことによって, RAの病態をより忠実に再現する。自己免疫疾患の発症と関連するMHCアレルを保有する臍帯血造血幹細胞をもちいてヒト化マウスを作成し, RA等自己免疫疾患の発症頻度を比較すると同時にその病態を解析する。

5. 結語

ヒト化マウスにおけるびらん性関節炎を形成する破骨細胞がヒト由来であることを証明した。マウスでヒト破骨細胞が誘導されたモデルは初めての報告となり, このマウスで誘導されたヒト破骨細胞がEBウイルスの感染により関節リウマチで起こる骨破壊を*in vivo*で起こすことが分かった。このマウスモデルでの破骨細胞の誘導にはIL-6の関与がほとんどないことが推察された。

VI. 呼吸器内科領域

喘息病態形成における気道上皮バリアおよび気道分泌型エクソソームの役割

1. 背景

近年, 喘息の発症機序のひとつとして気道上皮バリアの脆弱性が注目されている。我々はこれまで上皮バリア機能増強および減弱に關与する環境要因や調整遺伝子群を報告してきた。しかし, 喘息病態における上皮バリアの脆弱化メカニズムはいまだに不明な点が多い。今回, 我々は, 気道上皮前駆細胞(基底細胞)に着目し, HDMによる気道上皮分化, 上皮バリア形成への影響を検討した。また, mRNAやmiRNAを内包し, 細胞間情報伝達ツールとして注目されている細胞外小胞(=エクソソーム)についても着目し, 気道上皮の分化, バリア形成過程および動物モデルによる気道炎症の病態形成における役割を解明するために, マウス疾患モデルを用いたエクソソーム内RNAを解析する実験系の確立を試みた。

2. 対象および方法

基底細胞株VA10をTranswell上にて3日間培養液中で培養し, その後, Air Liquid Interface法で培養した。HDM刺激群とコントロール群で, Trans Electric Resistance (TER) を経時的に測定し, 上皮バリア形成を比較検討した。

動物モデルとして, HDMを用いたマウス喘息モデルおよびマウスLPS誘導性肺障害モデルを作製し, 気道および血清由来エクソソーム網羅的解析の測定系確立をおこなった。喘息モデルはHDMを第1, 8, 15日に経気道曝露させ, 第18日に, またLPSは気道曝露24時間後に肺胞洗浄液, 血清を採取し, エクソソーム由来RNAを抽出した。次世代シーケンサーを用いてRNA発現解析を行い, 肺組織, 洗浄液由来エクソソーム, 血清由来エクソソームのRNA発現プロファイルを比較した。

3. 結果

HDM刺激群はコントロール群と比較してVA10における上皮バリア機能形成が脆弱化した。マウス疾患モデルではLPS誘導性肺障害モデルにおいて洗浄液由来エクソソーム内でLPS刺激によるIL-1 β , MIP-1 α のmRNA発現増強を認め, 組織内および血

清由来エクソソーム内でも同様の結果であった。

9) Fujiwara S, Imadome K, Takei M. *Exp Mol Med.* 2015; 47: e135.

4. 考 察

上皮形成早期におけるHDM曝露が、気道上皮バリアの脆弱化を惹起する可能性が示唆された。マウス疾患モデルを用いたエクソソーム内RNAを解析する実験系を確立した。気道および血清分泌型エクソソーム内のmRNAはLPSに対する肺組織の生体反応を反映しており、新たな疾患バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

5. 結 語

今後は、基底細胞から気道上皮への分化、バリア機能形成過程やマウス喘息モデル、臨床検体（喘息患者からの血清、喀痰）などを用いたエクソソーム解析を行い、喘息の新たなメカニズムの解明、臨床応用可能なバイオマーカーの探索を試みる。

謝辞

この研究は、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」による支援の一部であり、ここに深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Saito H, Kato A, Matsumoto K, et al. Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc.* 2006;1(4):2178-83.
- 2) Lee H KJ, Matsuda A, Watanabe Y, et al. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through Fc gamma RI and Fc gamma RII. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):109-19.
- 3) 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 FcepsilonRI. *Blood.* 2003;102(7):2547-54.
- 4) Matsuda A, Okayama Y, Ebihara N, et al. Hyperexpression of the high-affinity IgE receptor-beta chain in chronic allergic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(6):2871-7.
- 5) Sugai K, Kimura H, Miyaji Y, et al. MIP-1alpha level in nasopharyngeal aspirates at the first wheezing episode predicts recurrent wheezing. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(3):774-81.
- 6) Kaplan AP, Greaves M. Pathogenesis of chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 777-787.
- 7) Pachlopnik JM1, Horn MP, Fux M, et al. *J Autoimmun.* 2004; 22: 43-51.
- 8) Kuwana Y, Takei M, Yajima M, et al. *PLoS One.* 2011; 6: e26630.

実験計画法の概要

間崎武郎¹⁾, 渡部和浩²⁾, 嶋村政男²⁾, 石井敬基¹⁾

Overview of experimental design

Takero MAZAKI¹⁾, Kazuhiro WATANABE²⁾, Masao SHIMAMURA²⁾, Yukimoto ISHII¹⁾

1. はじめに

実験（研究）において実験計画ほど無視されるものはない。統計学的手法を用いてP値を計算する方法を学ぶことに熱心であっても、実験を適切に計画する方法を学ぶことはほとんどない。入念な実験計画は研究の質を担保するうえで必須である。実験計画法はイギリスの統計学者R.A.Fisher（1890-1962）が1920年代に農業実験に導入した方法であり、自然科学分野だけでなくすべての研究に共通する技術の総称である。今回この実験計画法を概説する。

2. Fisherの3原則

実験の場を適切に管理し、効率的に情報を得るための指針が実験計画法である。実験計画は以下に述べるFisherの3原則に基づいて構築される（表1）。

① 繰り返し（repetition, replication）

実験を繰り返すことで処理間の比較を十分に正確にすることを保証する；すなわち、1回の測定の場合それが水準の違いによるものか、誤差によるもの

か判別できない。2回以上繰り返すことで、より多くの情報を得ることができて実験で生じる誤差の大きさを評価することができる。

② 無作為化（randomization）

誤差には偶然誤差と系統誤差がある。系統誤差は、たとえば農業では地域・圃場環境、医療では年齢・性別・治療法のアンバランスなどのように、一方的な偏りを生じさせるような誤差である。このような系統誤差は、処理を実験単位に無作為に割り当てることによって偶然誤差に転化させることができる。

③ 局所管理（local control）

処理や反復が多い場合大きな系統誤差が生じる可能性がある。このとき実験全体を複数のブロックに分割し、系統誤差を取り除く方法を局所管理あるいはブロッキング（blocking）という。ブロック内では実験場を均一、無作為化する必要がある。

表1 Fisherの3原則

繰り返し (repetition, replication)	実験を繰り返すことで処理間の比較を十分に正確にすることを保証する
無作為化 (randomization)	処理を実験単位に無作為に割り当てること
局所管理 (local control)	実験全体を複数のブロックに分割し系統誤差を取り除く方法

1) 日本大学医学部医学研究企画・推進室

2) 日本大学医学部総合医学研究所 医学研究支援部門化学分析室
間崎武郎：mazaki.takero@nihon-u.ac.jp

3. 実験の処理

Fisherの3原則は実験の配置に関する指針と考えることができる。一方、実験の処理の選定も必要であり、以下に処理について概説する。

① 因子, 要因と水準

因子は、実験系で調査研究したい形質に影響を与えると想定している原因のことである。因子の効果を要因という。要因には、各因子の水準が変わることによって生じる主効果と複数の因子の組み合わせで生じる交互作用がある。水準とは因子を質的、量的に変える場合の各段階のことである。例えば、ある薬剤の濃度がマウスの活動に与える影響に興味がある場合、薬剤が因子になりその濃度が水準になる。

② 交互作用 (interaction)

2因子を考えたとき、一方の因子の効果が他方の因子の水準ごとに異なるとき、これら2つの因子間に交互作用が存在するという(図1)。交互作用が存在する場合、結果の解釈には注意が必要である。

③ 因子数による実験の分類

取り上げた因子の水準のすべての組み合わせを実施するものを完全実施要因計画 (full factorial designs) といい、一部の組み合わせしか実施しないものを一部実施要因計画 (fractional factorial design) という。1つの因子を研究する実験を一元配置実験とよぶ(表2a)。この場合交互作用は評価できない。取り上げる因子数により二元配置、三元配置などよび、2因子以上を総称して多元配置とよぶ(表2b)。多元配置実験では複数の因子を同時に調べられるので、一元配置実験に比較して観測数を節約できる利点がある。多元配置において、完全実施要因計画ではなく一部実施要因計画を行う場合は、各水準の組

み合わせを決定する際に直交表を利用するので直交配列表実験という。一元配置あるいは多元配置実験にし、因子の効果は平均値で表される;すなわち、因子の効果の差は平均値の差で評価される。

4. 乱塊法を用いた基本的な考え方

完全無作為化法 (completely randomized design) とは実験単位で処理を完全にランダムに配置する方法をいう。Fisherの3原則のうち、無作為化と繰り返しの2項目を満たす。この実験は完全無作為化一

表 2

a			
	A1	A2	A3
A ₁₁	A ₁₁	A ₂₁	A ₃₁
A ₁₂	A ₁₂	A ₂₂	A ₃₂
A ₁₃	A ₁₃	A ₂₃	A ₃₃
A ₁₄	A ₁₄	A ₂₄	A ₃₄

b			
	A1	A2	A3
B1	AB ₁₁	AB ₂₁	AB ₃₁
B2	AB ₁₂	AB ₂₂	AB ₃₂
B3	AB ₁₃	AB ₂₃	AB ₃₃
B4	AB ₁₄	AB ₂₄	AB ₃₄

- a. 一元配置実験。因子Aを3水準に設定し各水準で3回の繰り返し実験を行うとすると計12回の実験を要する。
- b. 繰り返しのない二元配置実験。因子Aを3水準、因子Bを4水準に設定し各組み合わせで1回ずつの実験を行うとすると計12回の実験を要する。なお、aでは因子A1の1番目のデータをA₁₁、bでは因子A1の1番目と因子B1の1番目のデータをAB₁₁と記している。

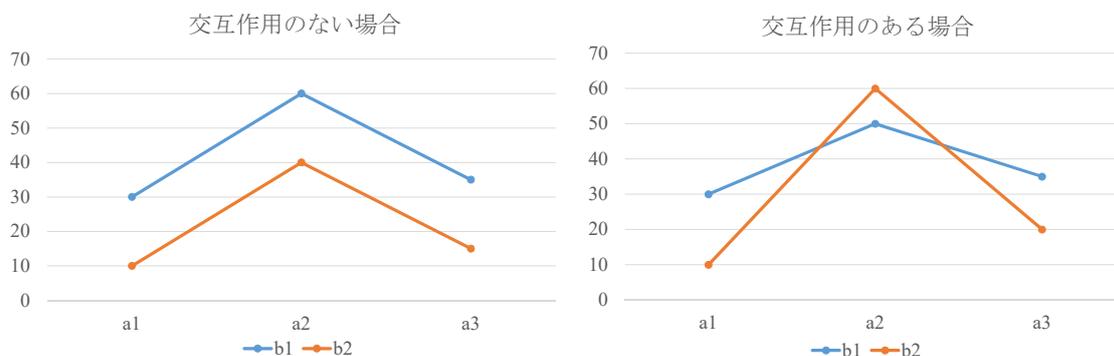


図 1 因子A (3水準) と因子B (2水準) の二元配置実験における交互作用の有無。交互作用がない場合は、各水準の効果は他の因子の水準間で同じであるため各折れ線は平行である。一方、交互作用がない場合、各直線は交差する。

元配置であり、統計学的解析方法は一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) を用いる。一方、乱塊法 (randomized block design) とは実験条件が同じブロックを作り、ブロック内で比較したい水準一揃いの実験をランダムに行うことをいい、Fisherの3原則をすべて満たす。たとえば、因子Aの3個の水準を3日間で3回行う実験を考える。しかし1日3水準の実験しか行えないとする。完全無作為化法では1日目にA₃が2回行われている (表3)。もし、“日”の違いが実験結果に影響を及ぼす場合、その効果が因子Aによって及ぼされたかのような誤解を生ずる。一方、乱塊法では“日”の違いも因子として取り上げ、1日の中で各水準をそれぞれ1回ずつ無作為に行う。これを3日間にわたり繰り返す。この場合、“日”がブロック因子であり統計学的解析方法は二元配置分散分析 (two-way ANOVA) となる (表3)。

5. 直交表実験

上の例では最も簡単な二元配置要因計画を考えたが、実際はさらに因子数と水準数の多い実験を計画する場合もある。ここで、2水準を因子A, B, C, Dと4つある場合を考える。水準すべての組み合わせは2⁴ = 16通りである。すべての組み合わせを1回以上

行う完全実施要因計画を行うことが望ましいが、因子数や水準数の多い場合は不可能である。このような場合は一部実施要因計画を実施し、その際に直交表を利用してどの水準の組み合わせで実験するか決定する。

直交表には2水準系, 3水準系, 多水準系などがある。最も簡単な2水準系の直交表であるL₈(2⁷)を例にとって考える (図2)。L₈(2⁷)直交表の一番上の列番1, 2, ..., 7は単なる列番号である; 一方, 各列が1つの実験に対応しており, 左の列の型番1, 2, ..., 8は単なる実験番号を表している (表4)。実験番号順に実験を行う必要はなく, 無作為に順番を決める。いま, この直交表の第2列と第5列を選ぶ (表5a)。第2列の1と2を因子Aの水準に, 第5列の1と2を因子Bの水準として1回目から8回目までの実験を表の組み合わせで行う。これを水準の組み合わせに整理すると表5bのようになり, これは二元配置実験である (図3)。さらに, 第6列の1と2を因子Cの水準として加えると実験の組み合わせは表6aのようになり, 水準ごとに整理すれば表の組み合わせになり, これは3元配置実験である (表6b)。このように8回の実験で効率的に実験が可能である。ここで注意すべきことは, A × Bの交互作用は上の直交表では第7列に表れるので, 因子Cを第6列では

表3 完全無作為化法と乱塊法実験

	1日目	2日目	3日目
完全無作為化法	A ₃ A ₃ A ₁	A ₁ A ₃ A ₂	A ₁ A ₂ A ₂
乱塊法	A ₁ A ₂ A ₃	A ₁ A ₃ A ₂	A ₃ A ₁ A ₂

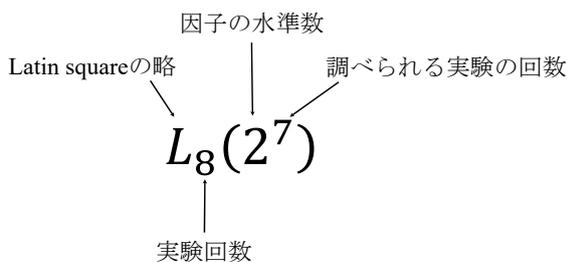


図2 直交表L₈(2⁷)の記号の意味

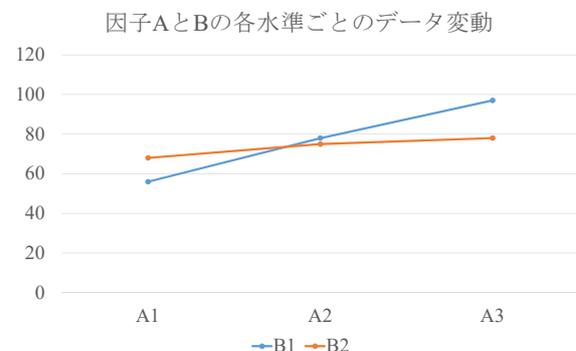


図3 水準B₁の場合, 因子Aの効果は増加傾向にある。一方, 水準B₂の場合, 因子Aの効果はなだらかな増加である。両直線は交差しており, 交互作用が認められる。

表4 $L_8(2^7)$ 直交表

		列番						
		1	2	3	4	5	6	7
型番	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	2	2	2	2
	3	1	2	2	1	1	2	2
	4	1	2	2	2	2	1	1
	5	2	1	2	1	2	1	2
	6	2	1	2	2	1	2	1
	7	2	2	1	1	2	2	1
	8	2	2	1	2	1	1	2

表5 因子AとBの水準の組み合わせ

a

実験番号	2	5
1回目の実験	A_1	B_1
2回目の実験	A_1	B_2
3回目の実験	A_2	B_1
4回目の実験	A_2	B_2
5回目の実験	A_1	B_2
6回目の実験	A_1	B_1
7回目の実験	A_2	B_2
8回目の実験	A_2	B_1

b

	B_1	B_2
A_1	1回目 6回目	2回目 5回目
A_2	3回目 8回目	4回目 7回目

表6 因子A, BとCの水準の組み合わせ

a

実験番号	2	5	6
1回目の実験	A_1	B_1	C_1
2回目の実験	A_1	B_2	C_2
3回目の実験	A_2	B_1	C_2
4回目の実験	A_2	B_2	C_1
5回目の実験	A_1	B_2	C_1
6回目の実験	A_1	B_1	C_2
7回目の実験	A_2	B_2	C_2
8回目の実験	A_2	B_1	C_1

b

		B_1	B_2
A_1	C_1	1回目	2回目
	C_2	6回目	5回目
A_2	C_1	3回目	4回目
	C_2	8回目	7回目

なく第7列に割り付けてしまうと因子Cと交互作用 $A \times B$ は交絡 (confounding) し区別がつかなくなる。

6. ANOVA

One-way ANOVAであれtwo-way ANOVAであれ、分散分析の原理はデータのばらつき (総平方和) を要因によるばらつき (水準間平方和) と誤差によるばらつき (誤差平方和) に分解し、水準間平方和が誤差平方和に対して有意かどうかをF検定で判断する。Two-way ANOVAで、因子Aを l 水準 ($i=1, \dots, l$)、因子Bを m 水準 ($j=1, \dots, m$)、繰り返し回数を r 回 ($k=1, \dots, r$)、観測値 x_{ijk} をとすると、総平方和

$$\begin{aligned} & \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^r (x_{ijk} - \bar{x}_{...})^2 \\ &= mr \sum_{i=1}^l (\bar{x}_{i..} - \bar{x}_{...})^2 + lr \sum_{j=1}^m (\bar{x}_{.j.} - \bar{x}_{...})^2 \\ &+ r \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^m (\bar{x}_{ij.} - \bar{x}_{i..} - \bar{x}_{.j.} + \bar{x}_{...})^2 \\ &+ \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^r (x_{ijk} - \bar{x}_{ij.})^2 \end{aligned}$$

と、分解できる。なお、右辺第一項は因子Aの主効果、第二項は因子Bの主効果、第三項は因子AとBの交互作用項、第四項は誤差平方和である。

2つの因子A (3水準), B (2水準) と3ブロックからなる乱塊法を考える。観測値 x_{ijk} とするとこのモデルは次の式

$$x_{ijk} = \mu + A_{ik} + B_{jk} + (AB)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

で表される。なお、 μ は全平均、 $A_i (i=1,2,3)$ は因子Aの主効果、 $B_j (j=1, 2)$ は因子Bの主効果、 $(AB)_{ijk}$ (ブロック $k=1, 2, 3$) は交互作用、 ε_{ijk} は誤差である。誤差は平均0、分散 σ^2 の正規分布に従うと仮定する。ここで重要なことは、ANOVAでは誤差の (1) 正規性、(2) 等分散性、(3) 独立性、(4) 線形性を仮定している点である。ANOVAは非正規性にも頑強であるが、解析前にそれらを検討することは重要である。注意すべき点は、交互作用が存在するときは主効果についてコメントはできないということである。

7. まとめ

簡単に実験計画の概要を述べた。実験計画はFisherの3原則に則って立案すべきである。完全実施要因計画には完全無作為化法と乱塊法がある。一部実施要因計画を実施するときは直交表を用いて効率的に実験を計画する。いずれの方法も統計学的解析はANOVAで行う。なお、ANOVAで仮定している4つの条件をpost-hoc analysisで検定することや、正規性が認められない場合に行うFriedman検定 (Friedman rank test) は割愛したので、成書を参照されたい。

文 献

- 1) 丹後敏郎ほか：医学統計学の辞典。朝倉書店、2012
- 2) 中村義作：よくわかる実験計画法。近代科学社、2013
- 3) 日本統計学会編：統計学。東京図書、2013
- 4) 森田浩：よくわかる最新実験計画法の基本と仕組み。秀和システム、2014

中型実験動物用多機能型体重測定ユニットの開発とその活用法

藤田順一¹⁾, 谷口由樹¹⁾, 高山世絵梨¹⁾, 松本 明²⁾,
荒島康友³⁾, 黒田和道^{1), 4)}, 石井敬基^{1), 2)}

Development of the multi-function type body weight measurement unit for Medium-sized laboratory animals

Junichi FUJITA¹⁾, Yoshiki TANIGUCHI¹⁾, Seena TAKAYAMA¹⁾, Akira MATSUMOTO²⁾,
Yasutomo ARASHIMA³⁾, Kazumichi KURODA^{1), 4)}, Yukimoto ISHII^{1), 2)}

1. 背景

現代社会において、医学研究、教育、創薬、生物学的製剤の製造等における実験動物の利用は必要不可欠である。特にマウスやラット等の実験用小動物は、ヒトの病気の発生機構の解明や治療法の開発等に多大なる貢献があり、今後も重要な役割を担うことは言及するまでもない。しかし、動物実験はその目的に合った動物種を選定することが重要であり、例えばヒトで行われる癌治療での外科療法と同等の治療法をマウス等で実施することは困難であり、外科の治療法の開発や医療技術のトレーニングを目的とする場合は、生理学的機能、解剖学的構成、サイズがヒトに近い中型動物の利用が適している。

とりわけブタについては、解剖学的・生理学的にヒトに類似しており、その外挿性の高さなどにより中型実験動物として最近様々な領域で利用され、疾患モデルブタの開発も進められている¹⁾。我が国では、公益社団法人日本実験動物協会が3年度毎に実験動物の年間総販売数調査を実施している。平成25年度調査結果によると、実験用ブタの販売数2,806頭（平成22年度調査の1,613頭に比べて74%増）、実験用イヌの販売数6,440頭（平成22年度調査の8,326頭に比べて22.7%減）であり、ブタの利用が増加する傾向にある。しかし、欧米では年間8～9万頭ものブタが実験に供されている。このことから、統計上の数値として、我が国は欧米と比べて実

験用ブタの普及が遅れている現状が分かる。この背景には、国内において実験用ブタの取扱いに関するマニュアルが殆ど無く情報が不足していることが挙げられる。また、専門の技術者も不足していることも挙げられ、各研究機関が試行錯誤により実践しているのが現状である。したがって、研究を進展させるために実験用ブタの普及を図るには、技術者の養成と施設間での情報共有が重要であると考えられる。

2. 目的

実験動物を取り扱う際、共通的に実施することとして、体重測定・保定・麻酔処置・実験処置がある²⁾。さらには、動物の愛護及び管理に関する法律（最終改正：平成26年5月30日、法律第46号）、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（最終改正：平成25年環境省告示第84号）及び、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議、平成18年6月1日制定）によれば、動物福祉の観点から動物本来の習性を引き出すことを目的とした飼育管理を実践することが求められている。その手段として、環境エンリッチメント及び順化の実施が挙げられる。

一方、小動物は利用頭数の多さから、術者がレクチャーを受ける機会が多く、取扱いが容易であり、関連する製品が多数販売されている。しかしながら、ブタのような中型動物は体が大きく力も強いこ

1) 日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門

2) 日本大学医学部医学研究企画・推進室

3) 日本大学医学部病態病理学系臨床検査医学分野

4) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

藤田順一：fujita.junichi@nihon-u.ac.jp

とに加え、仔豚は鋭い針のような乳歯があるなどにより、取扱いや管理には、術者にある程度の熟練が求められる³⁾。その一方で、日本大学医学部実験動物施設は建築後50年を経過するが、建築当初から家畜室を備えており、ブタ・ヤギ等の管理を行い、模索しながら実践してきた経験がある。

そこで、特に実験用ブタでの使用を目的として、体重を測定でき、簡単な実験処置が可能であり、さらに保定が容易であることを備えて、環境エンリッチメント効果の機能を有する装置「中型実験動物用多機能型体重測定ユニット」を開発したので、その概要を報告する。

3. 中型実験動物用多機能型体重測定ユニットの開発

ユニット全体は測定用ケージと電子秤から構成し、吊り幕式保定及び保定環の使用を可能とした。

(1) 測定用ケージ

中型動物の体長を考慮し、900W×600D×750Hのサイズとし、上面（二枚）、側面、左右の面に開閉式の扉を付け、すべての扉と床は・洗浄・保定・実

験処置等の使用を考慮して着脱を可能とした（図1a, b, c）。左右の扉は、開くことでなだらかなスロープとなる構造である（図1c）。また、材質は耐久性・洗浄・消毒を考慮しステンレス製（SUS304）とし、床面及び側面（スロープ部分）は四肢の滑り止めを目的としてアルミ縞鋼板、下部にウレタン製キャスター（100Φ）を取り付け、動物が入った状態での体重測定や移動を可能とした（図1d）。

(2) 電子秤（体重計）

体重を測定する電子秤は、A&D社製 車イス用体重計バリアフリースケールAD-6108（AC100V／電池式、目量100g（～150kg）、200g（～200kg）／秤量200kg）を用いた構造である。また、電子秤を使用しないときは、図2aに示すように立たせた状態での保管や、キャスターでの移動も可能である。さらに、液晶部分を保護するためにステンレス製ガードを取り付けた（図2b）。

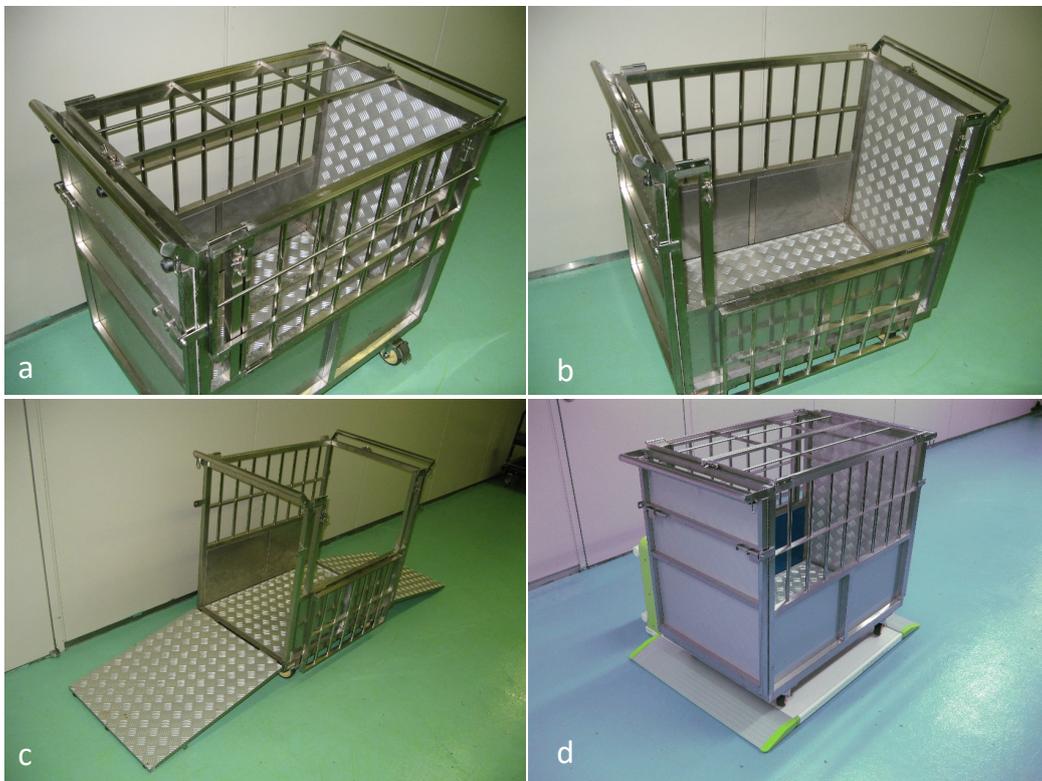


図 1 体重測定用ケージ

a：上面片側を開けた状態

c：左右のスロープを開いた状態

b：上面を外して側面を開けた状態

d：測定用ケージを電子秤に乗せた状態

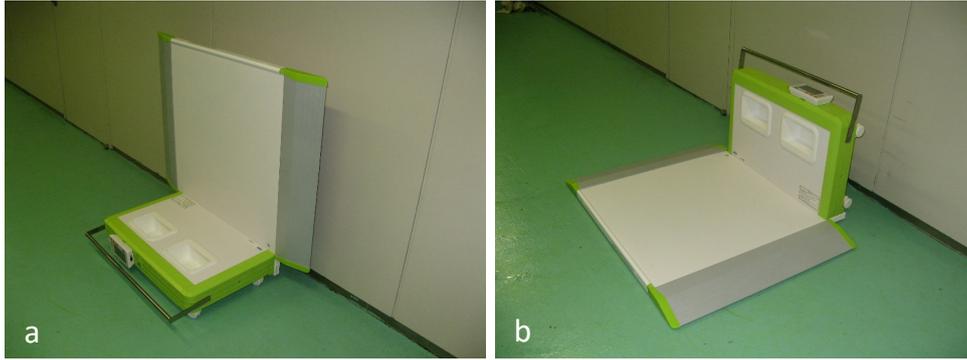


図 2 電子秤 (体重計)

- a: 使用しないときは立たせた状態で保管し、キャスターでの移動も可能。
- b: 液晶部分を保護するためにステンレス製ガイドを取り付けた。

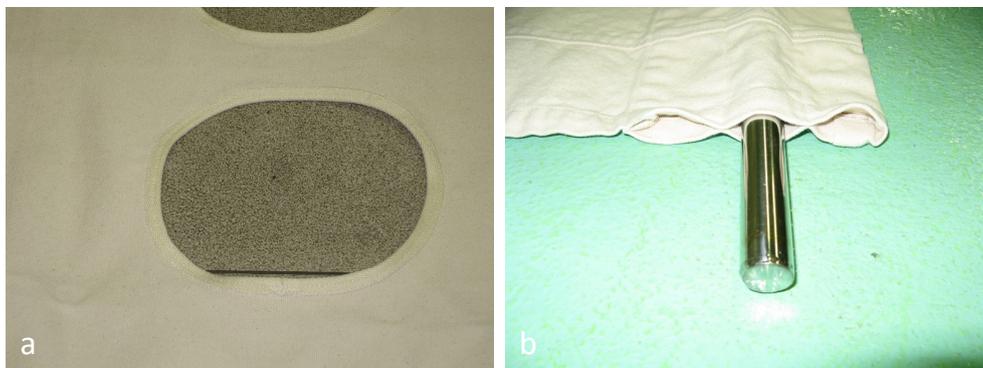


図 3 吊り幕式保定布の構造

- a: 四肢が入る穴は楕円構造となっている。
- b: 支柱を差し込む穴は左右三段階で調整可能となっている。

(3) 吊り幕式保定

保定は、測定用ケージに吊り幕を取り付け、動物の吊り幕式保定を可能とする構造とした。具体的には、四肢の位置に穴を開けた吊り幕式保定布を2本の支柱及び、ストッパーでケージ上部に取り付けた。また、四肢を通す穴は、体長や体重の違いに対応するため楕円形とした(図3a)。さらに、保定時の深さを調節するため、支柱を通す穴を左右三段階で調節可能となっている。ケージ上部には調節可能な支柱用ストッパーを取り付けた(図3b, 図5ab)。布については、洗浄及びオートクレーブ滅菌が繰り返し可能な材質である帆布を使用した。

4. 中型実験動物用多機能型体重測定ユニットの活用事例

(1) 体重測定, 導入麻酔, 実験室への移動

予め測定用ケージを電子秤に乗せ風袋 (tare) 設定をした。そして、ケージを移動し動物を入れる。

動物はスロープより誘導するか、あるいは術者が直接保定し側面の扉より中に入れる仕組みである。その結果、動物が入った状態でケージを電子秤に乗せることにより、体重測定が容易であった。測定後は麻酔量を決定し、導入麻酔としてケージ上扉片あるいは両側を開け、頸部または臀部に麻酔薬を筋肉内投与。あるいは鎮静薬投与後吸入麻酔を行い、そのまま移動することが可能であった(図4)。

(2) 吊り幕式保定の活用

まず、支柱及びストッパーの位置を設定する。保定の際は支柱を布の幅いっぱいまで広げ、布は動物を乗せ四肢が穴に入ると、体重により支柱の幅が狭くなり目的の深さとなった(図5a, b, c)。また、動物のサイズや処置に合わせて対応することが可能であり(図5d, e)、ビーグル犬でも同様に可能であった(図5f)。

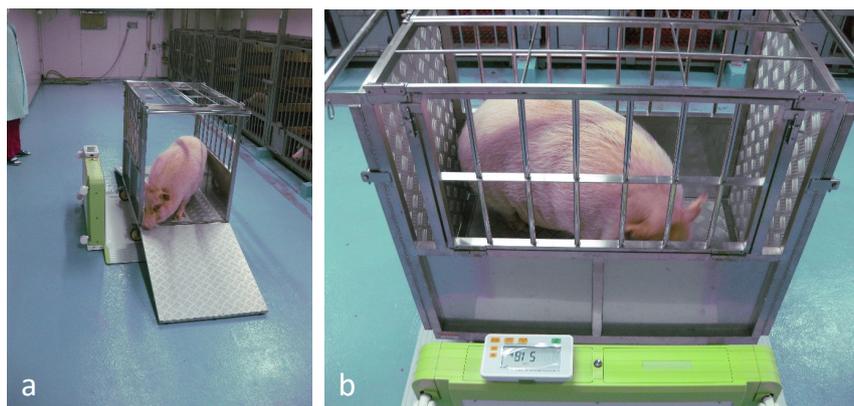


図 4 体重測定の実際

まず、図4aのようにスロープより誘導した後、両側のスロープを閉めて体重を測定する。

図4bは、Göttingen female を測定して51.8kgであった例である。



図 5 吊り幕式保定の活用例

最初にストッパーの位置を決めて (a)、支柱がストッパーの位置で止まる仕組みである (b)。

また、後肢から前肢の順で入れるとスムーズである (c)。様々な場合に対応可能である (例 d: サクラコユキ male 10kg e: サクラコユキ male 25kg f: beagle dog female 8.8kg)。



図6 保定環（鼻保定）の例

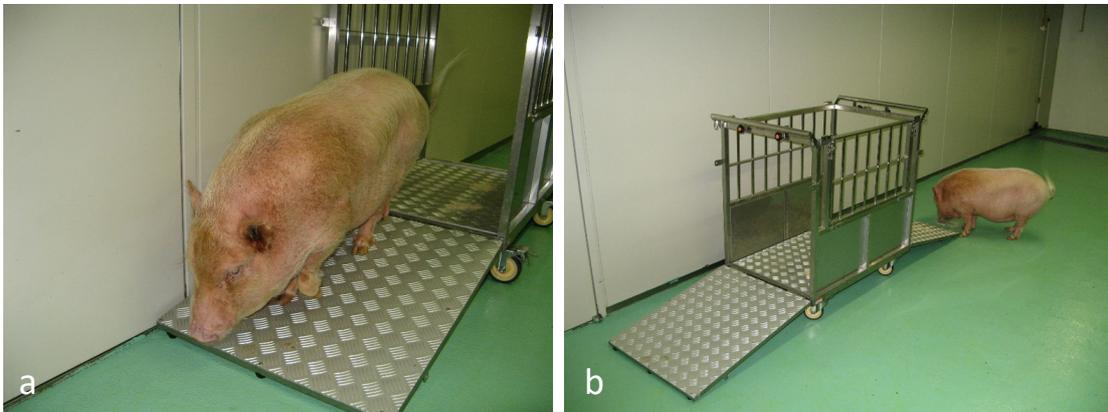


図7 環境エンリッチメント効果としての応用例

図は、Göttingen (female 51.8kg) による順化の事例である。図7aは、興味を持って往復し、段差にも馴れてきている様子である。また、図7bのように、においを嗅ぐような仕草も確認した。

(3) 保定環（鼻保定）

本ユニットを使用した場合、ケージ内で保定環による保定方法も可能であった。これは主に畜産で行われる技術であるが、苦痛軽減を図るためためのロープを使用し、必要な場合のみ熟練者による短時間の使用が条件となる。図6はロープを張らない状態であり、処置を行う際のみロープを張りケージ上部で固定している。

(4) 環境エンリッチメント効果

本ユニットを用いて様々な測定を行う過程において、測定用ケージに馴れさせるため、飼育室内にスロープを開放した状態で置いたところ、ブタは興味を持ち、鼻でこする、においを嗅ぐ、出入りを繰り返す等の行動が見られ遊び場となった。これは動物本来の習性を引き出すことを目的とした環境エン

リッチメント、更には施設への順化を目的として使用することができた（図7）。

5. まとめ

本ユニットは、体長90cm体重60kg程度までのブタや、ビーグル犬等の中型動物に対して体重測定が可能である。動物を測定用ケージに入れた状態での導入麻酔、実験処置、観察、移動が容易であり、体重25kg以下程度であれば、吊り幕式保定器として使用できることが明らかとなった。また、開発に当たり、本装置は中型動物用体重測定ユニットとして、2016年6月に日本大学産官学連携知財センター（NUBIC）より企業への技術供与により製品化された経緯がある。すなわち、飼育室内でのエンリッチメント製品としての使用のみならず、施設への順化を目的としても使用できることから、中型動物、特

にブタを扱う施設においては、幅広い目的での使用が可能であり、実験者および施設技術者への手助けとなる装置であることがいえる。今後、本ユニットを用いた活用範囲を模索していくことにより、更なる可能性について、検討を重ねていく予定である。

文 献

- 1) 谷口由樹, 藤田順一, 村井一郎. 医学研究と臨床トレーニングを目的とするブタの利用について. 日大医誌2009; 68: 344-345.
- 2) 谷川 学, 堤 秀樹, 二木力夫, 谷岡功邦, 石井一, 内田昌樹, 片桐公一, 熊谷栄二, 古賀哲文, 島津美樹, 田村淳子. ミニブタ実験マニュアル. エス・エル・エー研究所, 2000; 55-79.
- 3) M.E.Fowler (原著), 北 昂 (監訳). 動物の保定と取扱い. 文永堂, 1982; 156-157.

医学分野におけるウェアラブルカメラ活用方法の検討

井上広一¹⁾, 黒江裕子¹⁾, 関川佑介²⁾, 杉谷雅彦³⁾, 石井敬基³⁾

A preliminary analysis for application to the usage of Wearable Camera in Medical education and research

Koichi INOUE¹⁾, Hiroko KUROE¹⁾, Yusuke SEKIKAWA²⁾,
Masahiko SUGITANI³⁾, Yukimoto ISHII³⁾

1. はじめに

最近のデジタルカメラには、動画撮影機能が備わっていることが多く、デジタル一眼レフカメラの動画クオリティーは、テレビ番組の制作現場でも使われる程である。また、スマートフォンにおいてもほとんどのモデルに静止画と動画の撮影機能が備わっており、中にはかなりハイレベルな撮影を行うことができるモデルもある。このように今日では、静止画だけでなく動画も身近な環境にあるといえる。その背景には、YouTubeやニコニコ動画、各種SNSで動画を簡単に公開することができ、ハード面でも簡単に扱えるようになってきたことが大きい。さらに近年、ウェアラブルカメラの登場により若者やスポーツ愛好家を中心にその人気が高まってきている。

そこで本稿では、中央写真室で導入した新たなウェアラブルカメラの概要を報告し、医学分野で活用するための方法について考察する。

2. ウェアラブルカメラとは

ウェアラブルカメラとは、身に着けられるほどの超小型デジタルビデオカメラに対する総称であり、アクションカムやスポーツカムなどの名称で呼ばれることもある。また、ウェアラブルカメラは、一般的なデジタルビデオカメラを小型軽量化しただけではなく、「高画質、広角、耐衝撃、耐水、防塵、耐低温、多機能」という特徴があり、モデルによって

備わっている機能が異なっている。加えて、頑丈でありながら高い映像クオリティーと便利な操作性により、一般市場においても普及率が高い。さらに、一般的なビデオカメラに比べて小型で衝撃に強く手軽に撮影ができることから、オフロードバイクやサーフボードに取り付けて迫力のある映像を楽しむ人も増えてきている。

また、耐衝撃・耐水・防塵・耐低温については、ハウジングを併用することでよりハードな使用に耐えられるモデルのほか、本体そのものが防水機能を備えているモデルもある。さらに、静止画撮影、インターバル撮影、GPS機能など様々な機能を搭載したモデルも登場している。

一方では、本体にモニターを搭載していない機種もあり、その場合は専用モニターまたはスマートフォンをモニターとして使用することとなる。しかし、このような機能は、カメラ本体にモニターを搭載しているモデルにおいても備わっている場合が多い。ウェアラブルカメラにおいて、カメラ本体とモニターが離れている場合、一般的にはBluetoothやWi-Fiでつながっていることが多く、スマートフォンからの遠隔操作も可能である。このため、モニターやリモコンは手元に維持しつつ、カメラを遠隔地に設置固定したり、移動物体に設置したりする活用方法もある。

このような、多くの可能性を持っているウェアラブルカメラは、各研究領域においても活用されてき

1) 日本大学医学部 総合医学研究所医学研究支援部門 中央写真室

2) 日本大学医学部 総合医学研究所医学研究支援部門 感染症ゲノム研究室

3) 日本大学医学部 総合医学研究所医学研究支援部門

井上広一: inoue.koichi@nihon-u.ac.jp

ている。例えば、行動科学の分野では、観光客の写真撮影支援に関する研究として篠田ら¹⁾の研究があり、ウェアラブルカメラを周囲の状況を捉えるセンサーとして扱い、個人の状況を推定して手持ちカメラと連携することで、個人の趣向に沿った写真撮影の可能性が検討されている。また、人間の歩行動作を推定するためにウェアラブルカメラを用いた研究²⁾、ウェアラブルカメラ映像を解析して路面上の平面部を検出することで弱視者向け視覚支援システムの構築を試みた研究³⁾などもある。ところで、人間の行動を視点映像として記録することは従来から行われていたが、ビデオカメラでの記録は手持ち撮影となるため、記録よりも撮影していることを意識してしまう傾向にある。しかし、ウェアラブルカメラでは、超小型・軽量という特徴から体へ装着することでハンズフリーとなり、以前よりも撮影を意識せずに記録することが可能であることがいえる。

一方で、図書館で利用者がウェアラブルカメラを装着し、記録した一人称視点映像から利用者行動を解析することで、新たな図書館サービスにつなげるための研究もある⁴⁾。医学分野においても、救急車内における搬送患者の状態を映像として確認するた

め、救急隊員と搬送先病院医師との連携を試みた研究もある⁵⁾。

3. ウェアラブルカメラの導入

ウェアラブルカメラは、人が装着して使用するのみならず、人が立ち入れない危険箇所の無人探査やドローンと組み合わせた空撮などにも用いられており、アイデア次第で使い方が無限に広がる可能性を持っている。ウェアラブルカメラ自体は超小型軽量であり比較的導入しやすい価格帯であることから、容易に導入できる側面もある。このことから、様々な研究の場面でウェアラブルカメラが導入されて、その活用による研究業績も蓄積されれば、研究活動における一つのツールとして定着することも考えられる。

そこで、中央写真室では、様々な分野における研究や事例を踏まえ、近年の動向や今後の研究支援を考慮し、3機種のウェアラブルカメラを導入した。具体的には、GoPro HERO4、Panasonic HX-A500、SONY FDR-X3000Rの各機種である。各機種の主な機能と特徴については、表1に示すとおりである。3機種ともに形状が異なるものの、いずれもポケットに入るサイズであり身体に装着しても気にならない

表1 中央写真室が保有するウェアラブルカメラ3機種の比較

	GoPro HERO4	Panasonic HX-A500	SONY FDR-X3000R
動画記録画素数	3840×2160(4K)	3840×2160(4K)	3840×2160(4K)
静止画記録画素数	1200万画素	1625万画素	1200万画素
動画記録方式	MP4 / MOV / AVCHD	MP4	MP4 / XAVC S
ブレ補正	—	電子式ブレ補正	空間光学方式
サイズ(mm)	59×40.5×30(カメラ) 69.5×70.5×39(ハウジング)	26.5×26.5×68.5(カメラ) 59.5×94.0×26.7(本体)	29.4×47×83(カメラ)
重量(g)	83 / 63(カメラ/ハウジング)	31 / 128(カメラ/本体)	89(カメラ)
主な特徴	耐衝撃・耐水性に優れている40m防水機	視線カメラとして使いやすい新二体型	ブレ補正に優れた60m防水機
実物写真			

重さである。また、3機種ともに4Kの高画質を有しており、画角についても左右ともに170度規模の超広角である。パンフォーカスであるためフォーカスエラーを起こすこともなく、狭い空間から広い空間までフォーカス調整することなく撮影ができる。被写体への接近撮影（最短路約50cm）から全景撮影までの撮影が可能な機種である。

今後、医学分野におけるウェアラブルカメラに対するニーズが高まることを想定し、中央写真室では、様々な教育・研究の場面において、教員・研究者及びその補助者が使用できる環境の整備を目的に機種選定した上で、表1に示す3機種の導入に至った経緯がある。したがって、各機種が有するそれぞれの特徴に基づき、ウェアラブルカメラを使用する場面によって機種を使い分けることも可能であるが、その可能性については今後の検討課題である。

4. 医学分野における活用方法の検討

(1) 医学教育分野

医学分野の教育においては、学生実習が重要であることは論を待たないが、一方で、同時に多数の学生が教員の手技や術野を間近で見確認することは難しいことと考えられる。従来、このような対処方法として、教室の教卓付近に書画カメラが設置されてきたこともあるが、実際には、ほとんどは上から見た映像しか映し出すことができず、撮影範囲には制約がある現状もある（図1）。そこで、この場合にはPanasonic HX-A500を用いて、教員がウェアラブルカメラを装着（図2）することで、教員目線の映像をモニターに映し出すことが可能となることから、学生は自席に着席した状態で教員と同様の視野を得られるため、学修効果の向上も期待される。

また、ウェアラブルカメラはモニターへの映像出力だけではなく、録画も可能であるため、教員自身が授業内容の再確認や今後の授業内容を検討する資料としても活用することができることから、FDを推進する上で一つのツールとしても有効に機能することが期待できる。

さらに、ワークショップやグループワークのような場面では、ウェアラブルカメラを装着した指導者が各グループを見廻りながら、あるグループで行われていることを他のグループのメンバーにモニターを通して見せることも可能である。このことから、

自分のグループ以外の様子について、自分が移動することなく見て確認することによって、短時間により多くの情報を得ることが可能となり、限られた時間の中での効果的な教育を可能にする一助となることも考えられる。

(2) 医学研究分野

ところで、ウェアラブルカメラはヘッドマウントと併用することにより、録画をしながらも両手が自由に使えるため、手技を伴う実験・実習においては、開始から終了までの間、実験・実習とその記録を同時に行うことができる。このことは、記録した映像は実験過程の再確認や次回への検討を行う際に有効であるのみならず、レポートや論文に必要な実験中の記録写真としても有効であることを示唆している。すなわち、録画した映像をもとに、任意のシー



図1 マルティメディア教室に設置された書画カメラ。反射光・透過光を使用できる一方で撮影範囲には制約がある。



図2 ヘッドマウント装着時のウェアラブルカメラ。ハンズフリーの目線カメラ（Panasonic HX-A500）を用いた場合

ンを任意のサイズの画像として切り出すことができるため、実験途中に手間をとって写真を撮影する必要がなくなるという大きなメリットもある。これまで、デジタルビデオの映像から静止画を切り出すこと自体は可能であったが、その画質は記録写真として使用して耐えうる解像度ではなかった。そこで、中央写真室が保有している3機種のウェアラブルカメラ(4K画質)を使用することにより、静止画として切り出しても高い解像度の画像を得ることができ可能となる。なお、4K画質とはフルハイビジョンの4倍の精細さを持つ画質のことであり、ここ数年で急速に普及してきている。

このほか、ウェアラブルカメラのインターバル撮影機能を活用すると、菌の培養や動植物の動きに対して、時間を短縮して見られるように撮影することも可能である。

(3) 教育研究に基づく臨床現場での応用

ウェアラブルカメラの耐衝撃・耐水性があれば、様々な臨床現場の映像を記録することも十分可能であると考えられる。すでに、臨床現場では手術スタッフ間の情報共有を目的として利用されている例として、手術室において執刀医がウェアラブルカメラを装着することにより、その映像をモニター越しに医師、看護師、コメディカルが手術状況を共通認識できるようになった報告⁶⁾もある。

こうした臨床現場における映像は、医学生にとっては、例えば執刀医のような目線を映像体験できる貴重な資料であるとともに、臨床実習前の医学生にとっては現実性の高い予習教材ともなり得る。また、医学生以外にも手術室で機械出しを担当する看護師目線の映像などは看護学生にとって有効であり、医師との連携をより実践に近い状態で学べる教材となることも考えられる。

さらに、剖検や司法解剖、救急現場においても記録と教材という二つの役割を果たすことが期待できる。例えば、具体的な救急搬送の場面では、その処置の過程において、救急車到着から処置が終わるまでを一貫して医師の目線カメラとして記録することが可能である。このため、医学生への教育目的のみならず、チーム医療に携わる全スタッフに対しても有効となり、一連の記録は一つの証拠資料となることも考えられる。

5. 考察

ウェアラブルカメラは、目線カメラとしてだけでなく様々なシーンを記録することができる。その記録映像には医師や看護師などの従事者による熟練した技術や知識が凝縮されている。したがって、学生時代から関連の技術や知識に触れられることは、卒後の技術向上を早めて高めることや技術の継承をもたらすものと考えられる。技術の継承に関しては、他分野でもウェアラブルカメラを活用する提案も既に報告されている⁷⁾。医学分野において、ウェアラブルカメラを活用することにより、臨床現場と医学教育現場の距離が近くなり、学生はより多くの情報を得られることが可能となる。そのためには、いつでも簡単に記録できるようウェアラブルカメラを活用できる環境を構築しておくことが必要であると考ええる。

一方、多くの活用方法が可能なウェアラブルカメラには、注意を要する課題もある。その一つには、カメラ本体とモニター間がBluetoothやWi-Fiのような無線LANであることから、一定のセキュリティを担保しているものの、必ずしも100%安全とはいえないことである。また、気軽に撮影できることから、撮影した膨大な記録データを適切に保管しておくことに加え、潜在的に情報漏洩の危険性があることも知っておかなければならない。さらに、カメラ本体が小型であるため、様々な場所に隠しカメラのように設置することも可能であり、撮影対象や目的によっては盗撮と誤解されることも考えられる。

6. まとめ

本稿では、ウェアラブルカメラをめぐる動向に着目して、中央写真室での導入により、医学分野における活用方法とその可能性について検討してきた。

中央写真室で導入した3機種は、耐衝撃に優れたGoPro HERO4、ヘッドマウントで目線カメラとして使いやすいPanasonic HX-A500、手振れ補正機能が優れているSONY FDR-X3000R、と様々なシーンに対応できるよう取り揃えており、今後はテストと試験運用を行って行く予定である。

また、記録された映像は用途に合わせて編集・整理されて初めて価値が生まれる。そこで、その映像を活用するためには学生や教職員が閲覧できる、映像ライブラリーなどの構築が必要であると考えられる。

ウェアラブルカメラを用いてインプットされた映像情報を映像ライブラリーや教室のモニターにアウトプットするまでのシステムを構築することにより、医学分野での教育・研究において有効な教材になると考えられる。

文 献

- 1) 篠田美香子, 酒田信親, 西田正吾 ポディウォークカメラと手持ちカメラの連携による撮影支援 電子情報通信学会技術研究報告. MVE, マルチメディア・仮想環境基礎2014; 114 (73); 99-100
- 2) 渡辺義浩, 畑中哲生, 小室孝他 単一のウェアラブルカメラを用いた人間の歩行動作推定 日本バーチャルリアリティ学会論文誌2012; 17 (3); 219-229
- 3) 富永啓太郎, 折居英章, 河野英昭他 ウェアラブルカメラ画像における人検出結果に基づく道路平面領域推定 ファジシステムシンポジウム講演論文集2011; 27; 1209-1212
- 4) 和田聖矢, 松村耕平, 角康之 複数人の視点映像を利用した図書館内の体験共有支援 電子情報通信学会技術研究報告. MoNA, モバイルネットワークとアプリケーション2014; 113 (495); 305-311
- 5) 山崎純一 救急医療支援のためのウェアラブルカメラとPTZカメラを併用した傷病者情報共有システム 奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科情報システム学専攻修士論文NAIST-IS-MT0951128 2011: 42p <http://yokoya.naist.jp/paper/datas/1207/jmthesis12.pdf>
- 6) 林優, 浅井哲, 池田仁恵他 産婦人科手術におけるウェアラブルカメラの有用性の検討 日本産科婦人科学會雑誌 2015; 67 (2); 868
- 7) 後藤一寿 ウェアラブルカメラを活用した篤農技術の映像化による技術継承研究の提案 生物工学会誌 2014; 92 (7); 347-349

医学研究支援部門の利用に関する成果・業績等一覧

Lists of publication and results from Utilization in Medical Research Center

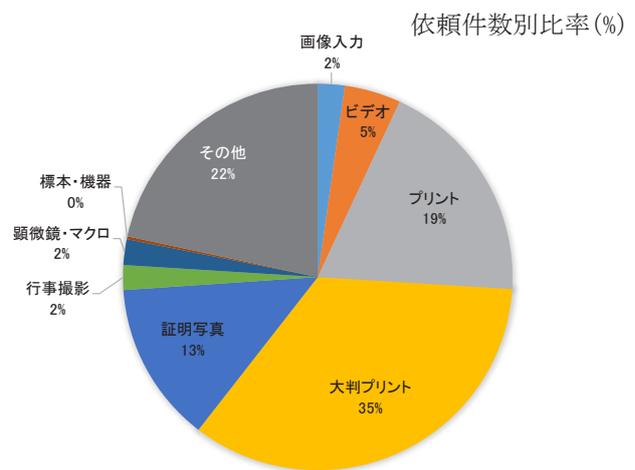
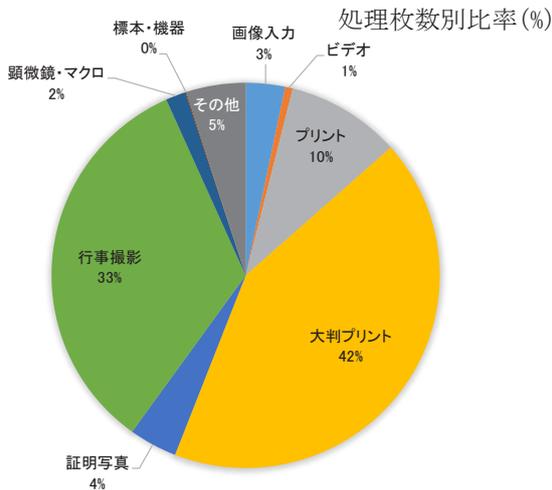
形態系

【中央写真室】

平成27年度 年間処理枚数/依頼件数

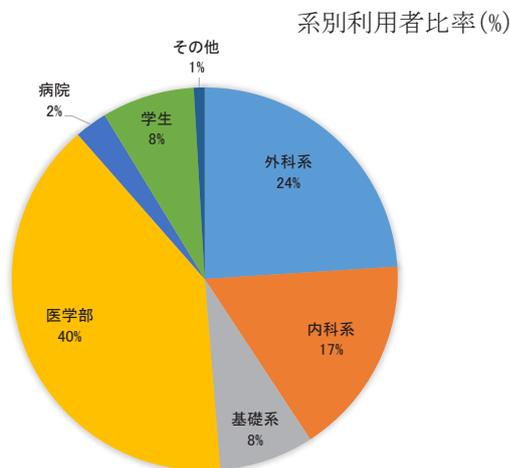
	画像入力	ビデオ	プリント	大判プリント	証明写真	行事撮影	顕微鏡・マクロ	標本・機器	その他	年間合計
処理枚数(枚)	539	104	1571	7002	661	5495	278	14	813	16477
依頼件数(件)	28	59	240	434	169	26	27	3	272	1258

※1「ビデオ」は処理時間30分を1枚として換算 104枚=52時間
 ※2「大判プリント」は料金単位 10cmを1枚として換算 7002枚=700.2m



平成27年度 年間利用者数(人)

所属	外科系	内科系	基礎系	医学部	病院	学生	その他	合計
人数	315	221	104	524	36	102	12	1314



【電子顕微鏡室】

論文

形成外科学分野

副島一孝, 榎村勉, 地家豊治, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: 特集 再生医療: 基礎と臨床 皮膚再建の再生医療. 日大医学雑誌 75 (2): 74-80, 2016.

学会発表

形成外科学分野

副島一孝, 松本太郎, 榎村勉, 風間智彦, 加野浩一郎, 仲沢弘明: シンポジウム「臨床応用に向けた新しい材料および医療機器の開発 (産学連携による開発を含む)」文科省大学発新産業創出拠点 (START) プロジェクト 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の臨床用細胞製造と細胞治療への応用. 第58回日本形成外科学会総会学術集会 京都, 2015.

副島一孝, 榎村勉, 藤原英紀, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: シンポジウム「再生医療の最前線」皮膚再生医療における脱分化脂肪細胞 (DFAT) の有用性に関する検討. 第24回日本形成外科学会基礎学術集会 岩手, 2015.

副島一孝, 榎村勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: シンポジウム「培養表皮移植の生着率向上をめざして」脱分化脂肪細胞 (DFAT) の再建真皮上への自家培養表皮生着促進効果に関する検討. 第41回日本熱傷学会総会・学術集会 名古屋, 2015.

微生物学分野

高田和秀, 廣畑直子, Quang Trinh, 相澤志保子, 早川智: 性ホルモンとToll-like receptorリガンドのHaCaT細胞における遊走及びEpithelial-Mesenchymal Transitionに対する影響. 第43回日本臨床免疫学会総会 神戸, 2015.

眼科学分野

山田愛, 立花敦子, 大西貴子, 原田奈月子, 加島陽二: 長期間留置された涙道チューブの電子顕微鏡による観察. 第4回日本涙道・涙液学会総会 大阪, 2015.

医学研究支援部門

馬場俊一, 地家豊治, 林利彦: 殞獣 (かいじゅう) マゴット うじうじなんかしてないよっ! - 見よ, この精悍な面構え-. 第12回城北地区皮膚科懇話会 2015.

医用電子系

【医用電子室】

論文

応用システム神経科学分野

山本隆充, セデキ・ジャンウフル, 深谷親, 渡辺充, 角光一郎, 四條克典, 大淵敏樹, 加納利和, 小林一太, 大島秀規, 吉野篤緒, 関口真一: 脊髄刺激療法を用いた minimally conscious state の治療. 日本大学医学部総合医学研究所紀要 (2188-2231) 3巻: 66-70, 2015.

深谷親, 山本隆充: パーキンソン病の罹病期間によるSTN-DBSの効果の違い. 日本大学医学部総合医学研究所紀要 (2188-2231) 3巻: 27-28, 2015.

総説・解説

応用システム神経科学分野

山本隆充, 深谷親: 磁気刺激の臨床応用と治療効果 機能神経外科における経頭蓋磁気刺激の臨床応用 (会議録). 臨床神経生理学 (1345-7101) 43巻5号: 394, 2015.

小林一太, 大島秀規, 深谷親, 吉野篤緒, 山本隆充: ニューロモデュレーションがもたらした新知見と新たな展開 脳深部活動記録による脳機能解析と病態把握 (会議録). 臨床神経生理学 (1345-7101) 43巻5号: 315, 2015.

山本隆充, 深谷親: Post-stroke pain の治療 (解説). Journal of Neurosciences for Pain Research (1342-1247) 18巻: 6-10, 2015.

深谷親, 渡辺充, 角光一郎, 大淵敏樹, 四條克倫, 加納利和, 小林一太, 大島秀規, 吉野篤緒, 山本隆充: DBSは本当に有用か? 運動障害に対するDBSの最近の考え方 (会議録). パーキンソン病・運動障害疾患コンgresプログラム・抄録集9回: 61, 2015.

深谷親, 渡辺充, 角光一郎, 大淵敏樹, 加納利和, 小林一太, 大島秀規, 吉野篤緒, 山本隆充: 脳血管障害後神経障害性疼痛に対する頸髄後索刺激療法下肢の痛みにも有効か? (会議録). PAIN RESEARCH (0915-8588) 30巻2号: 102, 2015.

山本隆充, 渡辺充, 大淵俊樹, 加納利和, 小林一太, 大島秀規, 深谷親, 平山晃康, 吉野篤緒: 合併する運動麻痺と振戦を考慮した脳卒中後疼痛に対する脳脊髄刺激療法 (会議録). PAIN RESEARCH (0915-8588) 30巻2号: 102, 2015.

藤田之彦: 不登校を伴う起立性調節障害 小心臓とPOTSの解析 (会議録). 子どもの心とからだ (0918-5526) 24巻2号: 144, 2015.

田中英高, 東佐保子, 飯山道郎, 石崎優子, 石谷暢男, 岡本直之, 梶浦貢, 梶原荘平, 数間紀夫, 神原雪子, 金泰子, 本多和雄, 汐田まどか, 竹中義人, 永井章, 中尾亮太, 藤井由里, 藤田之彦, 松島礼子, 村上佳津美, 山口仁, 吉田誠司, 増谷聡: 小児起立性調節障害診断・治療ガイドライン (改訂版) 一般外来向け (解説). 一般社団法人日本小児心身医学会ODワーキンググループ 子どもの心とからだ (0918-5526) 23巻4号: 408-444, 2015.

生物化学系

【化学分析室】

【感染症ゲノム研究室】

論文

呼吸器内科学分野

Kozu Y, Gon Y, Maruoka S, Kuroda K, Sekiyama A, Kishi H, Nomura Y, Ikeda M, Hashimoto S: Protocadherin-1 is a glucocorticoid-responsive critical regulator of airway epithelial barrier function. BMC Pulmonary Medicine. 2015 Jul; 3115:80.

Koyama D, Maruoka S, Gon Y, Shintani Y, Sekiyama T, Hiranuma H, Shikano S, Kuroda K, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S: Myeloid differentiation-2 is a potential biomarker for the amplification process of allergic airway sensitization in mice. Allergy International. 2015 Sep;64 Suppl:S37-45.

Shintani Y, Maruoka S, Gon Y, Koyama D, Yoshida A, Kozu Y, Kuroda K, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) regulates airway epithelial barrier integrity. Allergy International. 2015 Sep;64 Suppl:S54-63.

Gon Y, Ito R, Hattori T, Hiranuma H, Kumasawa F, Kozu Y, Endo D, Koyama D, Shintani Y, Tsuboi E, Soda K, Maruoka S, Hashimoto S: Serum eosinophil-derived neurotoxin: Correlation with persistent airflow limitation in adults with house-dust mite allergic asthma. Allergy and Asthma Proceedings. 2015 November/December;36(6): pp.e113-e120(8).

消化器肝臓内科学分野

消化器肝臓内科学分野

Nirei K, Matsuoka S, Nakamura H, Matsumura H, Moriyama M: Incidence of Hepatocellular Carcinoma Reduced by Phlidotomy Treatment in Patients with Chronic Hepatitis C. Internal Medicine 54(2): 107-117, 2015.

Hirotsu Y, Kanda T, Matsumura H, Moriyama M, Yokosuka O, Omata M: HCV NS5A resistance-associated variants in a group of real-world Japanese patients chronically infected with HCV genotype 1b. Hepatology International 9(3): 424-430, 2015.

Inami M, Fukushima A, Ueno T, Yamada T, Tsunemi A, Matsumoto Y, Fukuda N, Soma M, Moriyama M: Reduction of dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis by the novel gene regulator PI polyamide targeting transforming growth factor β 1 gene. Biological & Pharmaceutical Bulletin 38(12): 1836-1842, 2015.

血液膠原病内科学分野

Uchino Y, Iriyama N, Hatta Y, Takei M: Granulocyte colony-stimulating factor potentiates all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cell line HT93A. Cancer Cell Intentional 2015;15:30.

Iriyama N, Hatta Y, Takei M : ETV6/ARG oncoprotein confers autonomous cell growth by enhancing c - Myc expression via signal transducer and activator of transcription 5 activation in the acute promyelocytic leukemia cell line HT93A. *Leukemia & Lymphoma* 2015;56:2416 - 23.

Usui M, Fujikawa T, Osawa M, Hakii C, Ikumi N, Nozaki T, Kitamura N, Hatta Y, Fujiwara S, Takei M : Self - assembly formed by a short DNA probe pair: Application for highly sensitive mRNA species detection without reverse transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; 467:1012-8.

生理学分野

Kitano H, Mamiya A, Hidai C et al.: Coagulation factor IX regulates cell migration and adhesion in vitro. *Cell Biology International*, 39, 1162 - 1172, 2015.

生体構造医学分野

Harada T, Hirabayashi Y, Hatta Y, Tsuboi I, Glomm WR, Yasuda M, Aizawa S: Kinetics of hematopoietic stem cells and supportive activities of stromal cells in a three - dimensional bone marrow culture system. *Growth Factors*. 2015;33(5-6):347 - 55.

生化学分野

Watarai Y, Ishizawa M, Ikura T, Zacconi F, Uno U, Ito N, Antonio Mouriño, Tokiwa H, Makishima M, Yamada S: Synthesis, biological activities and X-ray crystal structural analysis of 25 - hydroxy - 25(or 26) - adamantyl - 17 - [20(22), 23 - diynyl] - 21 - norvitamin D compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015. 11.

臨床検査医学分野

Nara A, Nagai H, Shintani - Ishida K, Ogura S, Shimomura T, Kuwahira I, Shirai M, Yoshida K: Pulmonary Arterial Hypertension in Rats Due to Age - related Arginase Activation in Intermittent Hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 53:184 - 92, 2015.

Nagai H, Kuwahira I, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Nara A, Ogura S, Sonobe T, Inagaki T, Fujii Y, Yamaguchi R, Wingefeld L, Umetani K, Shimomura T, Yoshida K, Uemura K, Pearson JT, Shirai M: Pulmonary Macrophages Attenuate Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction via β 3AR/iNOS Pathway in Rats Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia. *PLoS One*. 2015.10 :e0131923.

小倉彩世子, 中山智祥, 下澤達雄: 血中CRP複合体のプロテオーム解析 日本大学医学部総合医学研究所紀要 Vol.3:46-48, 2015.

微生物学分野

Trinh QD, Pham NT, Fuwa K, Takada K, Komine - Aizawa S, Honda M, Ushijima H, Hayakawa S: High mobility group box 1 protein enhances HIV replication in newly infected primary T cells. *Clinical Laboratory* 2016. In press.

Komine - Aizawa S, Masuda H, Mazaki T, Shiono M, Hayakawa S, Takayama T: Plasma osteopontin predicts inflammatory bowel disease activities. *Int Surg*. 2015 Jan;100(1):38 - 43. doi: 10.9738/INTSURG - D - 13 - 00160.1.

医学教育企画・推進室

Nunomura S, Ohtsubo - Yoshioka M, Okayama Y, Terui T, Ra C: Fc γ promotes contact hypersensitivity to oxazolone without affecting the contact sensitization process in B6 mice. *Exp Dermatol* 24(3):204 - 8, 2015.

Nunomura S, Okayama Y, Terui T, Ra C: Treatment of murine mast cells with IgE κ and protein L enhances apoptotic cell death induced by IL - 3 withdrawal. *Biochem Biophys Res Commun* 456(2):700 - 705, 2015.

Ueshima C, Kataoka TR, Hirata M, Furuhata A, Suzuki E, Toi M, Tsuruyama T, Okayama Y, Haga H : The killer cell Ig-like receptor 2DL4 expression in human mast cells and its potential role in breast cancer inva-

sion. *Cancer Immunol Res* 3(8):871-880, 2015.

Ueshima C, Kataoka TR, Hirata M, Koyanagi I, Honda T, Tsuruyama T, Okayama Y, Seiyama A, Haga H: NKp46 regulates the production of serine proteases and IL-22 in human mast cells in urticaria pigmentosa. *Exp Dermatol*. 24(9):675-679, 2015.

Nunomura S, Okayama Y, Mastumoto K, Hashimoto N, Endo-Umeda K, Terui T, Makishima M, Ra C: Activation of LXRs using the synthetic agonist GW3965 represses the production of pro-inflammatory cytokines by murine mast cells. *Allergol Int* 64(Supple): S11-17, 2015.

学会発表

呼吸器内科学分野

権寧博, 丸岡秀一郎, 橋本修: エクソソームの疾患バイオマーカーとしての可能性. 第55回日本呼吸器学会学術講演会 東京, 2015.

伊藤玲子, 権寧博, 丸岡秀一郎, 服部知洋, 橋本修: フリーIgE測定と抗IgE抗体療法. 第55回日本呼吸器学会学術講演会 東京, 2015.

権寧博, 丸岡秀一郎, 井上寿男, 曾田香織, 神津悠, 鹿野壮太郎, 橋本修: アレルギー性気道炎症における気道分泌型exosomeの役割. 第55回日本呼吸器学会学術講演会 東京, 2015.

権寧博, 伊藤玲子, 丸岡秀一郎, 服部知洋, 平沼久人, 熊澤文雄, 神津悠, 橋本修: 血清EDNレベルはomalizumab治療における気流閉塞改善の指標となる. 第64回日本アレルギー学会学術大会 東京, 2015.

権寧博, 丸岡秀一郎, 黒田和道, 山岸賢司, 鹿野壮太郎, 曾田香織, 坪井絵莉子, 竹下郁子, 橋本修: マウス喘息モデルを用いた気道分泌型exosomeの解析. 第64回日本アレルギー学会学術大会 東京, 2015.

中川喜子, 高橋典明, 林健太郎, 飯田由子, 小山大

輔, 佐藤良博, 関山忠孝, 清水哲男, 権寧博, 橋本修: びまん性肺疾患に対する気管支肺胞洗浄(BAL)の合併症について. 第38回日本呼吸器内視鏡学会学術集会 東京, 2015.

権寧博: シンポジウム3 COPD研究の最前線. Overview: 第59回日本薬理学会 関東支部大会 千葉, 2015.

水村賢司, 丸岡秀一郎, 権寧博, 橋本修: 細胞死からみたCOPDの病態. シンポジウム: 「COPD研究の最前線」第59回日本薬理学会 関東支部大会 千葉, 2015.

Gon Y: *Clinical Allergy & Immunology. Epithelial biology in the pathogenesis of airway inflammation, 20th Congress of the Asia pacific Society of Respiriology, Kuala Lumpur(Malaysia), 2015.12.5.*

Shikano S, Inoue T, Maruoka S, Gon Y, Kuroda K, Yamagishi K, Soda K, Tsuboi E, Takeshita I, Hashimoto S: Exosomal messenger RNAs in the airway are potential biomarkers for acute lung injury in mice. *European Respiratory Society Annual Congress. 2015. 9.27. amsterdam, Netherland.*

Maruoka S, Gon Y, Shikano S, Shintani Y, Koyama D, Sekiyama A, Hiranuma H, Inoue T, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S: ExosomalMicroRNAs In The Serum Are Potential Real-Time Biomarkers For Allergic Inflammation In The Airway Of Mice. *European Respiratory Society Annual Congress. 2015. 9.27. amsterdam, Netherland*1 RMMFR

井上寿男, 権寧博, 丸岡秀一郎, 鹿野壮太郎, 黒田和道, 山岸賢司, 曾田香織, 橋本修: マウスLPS誘導性肺障害におけるBALF中エクソソームのRNA発現解析. 第55回日本呼吸器学会学術講演会 東京, 2015.

権寧博, 伊藤玲子, 丸岡秀一郎, 服部知洋, 平沼久人, 熊澤文雄, 遠藤大輔, 神津悠, 橋本修: 血清EDNレベルのomalizumab治療評価におけるバイオ

マーカーとしての有用性. 第55回日本呼吸器学会学術講演会 東京, 2015.

神津悠, 岸博介, 権寧博, 竹下郁子, 野村泰之, 水村賢司, 丸岡秀一郎, 大島猛史, 橋本 修: ウイルス感染による気道上皮バリア障害における mir-155 の役割. アレルギー好酸球研究会2015 東京, 2015.

権寧博, 井上寿男, 深野義人, 山岸賢司, 黒田和道, 鹿野壮太郎, 曾田香織, 水村賢司, 丸岡秀一郎, 橋本修: マウス喘息モデルにおける気道分泌型細胞外小胞RNAの網羅的発現解析. アレルギー, 好酸球研究会2015 東京, 2015.

津谷恒太, 岩男彩, 畑岡つかさ, 佐藤良博, 林健太郎, 中川喜子, 平沼久人, 清水哲男, 権寧博, 高橋典明, 橋本修: 胸部エックス線写真で同定困難であった気管支異物の一例. 日本大学医学会例会 東京, 2015.

神津悠, 岸博介, 権寧博, 竹下郁子, 野村泰之, 水村賢司, 丸岡秀一郎, 大島猛史, 橋本 修: ウイルス感染による気道上皮バリア障害における mir-155 の役割. アレルギー, 好酸球研究会2015 東京, 2015.

権寧博, 井上寿男, 深野義人, 山岸賢司, 黒田和道, 鹿野壮太郎, 曾田香織, 水村賢司, 丸岡秀一郎, 橋本修: マウス喘息モデルにおける気道分泌型細胞外小胞RNAの網羅的発現解析. アレルギー, 好酸球研究会2015 東京, 2015.

血液膠原病内科

Ikumi N, Kobayashi H, Kobayashi Y, Sugiyama K, Nagasawa Y, Nishiwaki A, Nozaki T, Inomata H, Karasawa H, Kitamura N, Matsukawa Y, Takei M: Cardiac Magnetic Resonance Imaging Reveals Myocardial Fibrosis and Inflammation in Polymyositis/Dermatomyositis Without Cardiac Manifestation: A Pilot Report.

Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) Roma 2015.6

Miura K, Konishi J, Miyake T, Masanori M, Hojo A, Masaki Y, Uno M, Ozaki J, Yoshida C, Niya D, Kitazume K, Maeda Y, Takizawa J, Sakai S, Nawa Y, Yano T, Yamamoto K, Sunami K, Hiramatsu Y, Aoyama K, Tsujimura H, Hatta Y and Sugano H: A New Prognostic Model for Elderly Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP American Society of Hematology (ASH) 57th Orlando. 2015.12.

Takahashi H, Kobayashi S, Miura K, Kurita D, Hatta Y, Sugitani M, Otake S, Nakagawa M, Sakagami M, Uchino Y, Kodaira H, Iriyama N, Kusuda M, Hojo A, Yagi M, Hirabayashi Y, Kobayashi Y, Nakayama T, Takei M: Clinical Significance of Co-Expression of MYC and BCL2 Protein in Advanced Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with a Dose-Intensified Immunotherapy. American Society of Hematology (ASH) 57th annual meeting Orlando. 2015.12.

糖尿病代謝内科学分野

Furukawa A, Tanaka A, Kosuda M, Otsuka Y, Yamaguchi S, Ishihara H: Screening by RMCE-based generation of MIN6 cell transfectants identifies novel genes important for glucose-stimulated insulin secretion. KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology. Kyoto, Japan.2015.10.26

長澤洋介, 井汲菜摘, 野崎高正, 猪股弘武, 北村登, 岩田光浩, 武井正美: ヒト破骨細胞によって引き起こされたEBV感染ヒト化NOD/Shi-scid/IL-2R^{null}マウスにおけるびらん性関節炎. 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会 愛知, 2015.

産婦人科学分野

春日晃子, 高橋英幹, 村瀬隆之, 山崎元美, 山本樹生: インフルエンザ感染による妊娠マウスでの母体および胎仔への影響. 第67回日本産婦人科学会学術講演会 神奈川, 2015.

生体構造医学分野

原田智紀, 壺井功, 平林容子, 平林幸生, 菅野純, 相澤信: 低酸素環境飼育による多血症マウスの赤血球造血動態について. 第77回日本血液学会学術集会

石川, 2015.

下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 岡山吉道, 羅智靖: 骨髄細胞分化におけるC/EBP β のC-末端領域の解析. 第64回日本アレルギー学会学術大会 東京, 2015.

下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 羅智靖: 好中球分化におけるC/EBP β C末端のGABP会合領域の解析. 第77回日本血液学会学術集会 金沢, 2015.

下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 羅智靖: 好中球分化におけるC/EBP β C末端の標的遺伝子特異的制御. 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会 兵庫, 2015.

生化学分野

石澤通康, 渡會友祐, 伊倉貞吉, Flavia C.M. Zacconi, Antonio Maurino, 常盤広明, 伊藤暢聡, 山田幸子, 榎島誠: 共役三重結合とアダマンチル基を導入したビタミンD誘導体の生物活性及びユニークな受容体結合様式. 第一回Neo Vitamin D Workshop 学術集会 滋賀, 2015.

臨床検査医学分野

小倉彩世子, 里村厚司, 星野忠, 荒島康友, 志方えりさ, 藤岡和美, 下澤達雄, 中山智祥: LC/MS解析による血中CRP複合体についての検討. 第40回医用マススペクトル学会 浜松, 2015.

小倉彩世子, 里村厚司, 星野忠, 荒島康友, 志方えりさ, 藤岡和美, 下澤達雄, 中山智祥: LC/MS解析による血中CRP複合体についての検討. 第47回日本臨床検査自動化学会 神奈川, 2015.

小倉彩世子, Wang Conghui, Liu BeiBei, Yeerbolati Alimila, Rehaman Latapati, 広浜大五郎, 丸茂丈史, 藤田敏郎: 睡眠時無呼吸症候群における食塩感受性高血圧のメカニズム解明. 第38回日本高血圧学会総会 島根, 2015.

Rehaman Latapati, 王聡慧, 広浜大五郎, 小倉彩世子, 森典子, 下澤達雄, 矢富裕, 藤田敏郎: 食塩負

荷慢性心不全および腎不全ラットに対するトラセミドvsフロセミドの抗アルドステロン作用の比較. 第38回日本高血圧学会総会 島根, 2015.

里村厚司, 藤田宜是, 高橋宏通, 小倉彩世子, 志方えりさ, 藤岡和美, 星野忠, 中山智祥: 機能的マンノース結合レクチンは維持透析療法中の患者の予後予測因子か. 第62回日本臨床検査医学会総会 岐阜, 2015.

小倉彩世子, Wang Conghui, Liu BeiBei, Yeerbolati Alimila, Rehaman Latapati, 下澤達雄, 藤田敏郎: 睡眠時無呼吸症候群における食塩感受性高血圧のメカニズム解明. 第19回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 兵庫, 2015.

Rehaman Latapati, 王聡慧, 小倉彩世子, 広浜大五郎, 下澤達雄, 矢富裕: 高血圧モデルでの利尿剤による腎保護効果. 第19回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 兵庫, 2015.

微生物学分野

相澤(小峯)志保子, 早川智, 松尾和浩, 本多三男: 哺乳類細胞で発現可能な新規組換えBCGワクチンの開発. 第85回実験結核研究会総会, 2015.

Komine - Aizawa S, Hayakawa S, Matsuo K, Honda M: rBCG/Ag85B confers enhanced levels of poly-functional CD8 $^{+}$ T cell induction by co-inducing antigen-specific CD4 $^{+}$ T cells. 第44回日本免疫学会学術集会 北海道, 2015.

総説・解説

呼吸器内科学分野

権寧博, 丸岡秀一郎, 橋本修: エクソソームの呼吸器疾患への応用. 呼吸と循環, 63 (2): 149-153, 2015.

権寧博, 丸岡秀一郎, 黒田和道, 山岸賢司, 橋本修: 細胞外顆粒内RNA情報の臨床応用. 呼吸と循環, 63 (6): 541-546, 2015.

丸岡秀一郎, 権寧博, 橋本修: ストレスとエピジェ

ネティクス：Respiratory Medical Research, 3 (3) : 181-184, 2015.

権寧博, 丸岡秀一郎, 黒田和道, 深野義人, 山岸賢司, 橋本修：気道分泌型エクソソーム, : 臨床免疫・アレルギー科, 64 (5) : 495-500, 2015.

血液膠原病内科

岩田光浩, 長澤洋介, 藤原成悦, 武井正美：EBウイルスと関節リウマチ. 臨床免疫・アレルギー科, 63 (1) : 96-101, 2015.

生体構造医学分野

下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 羅智靖：IgAレセプター発現と顆粒球分化の転写調節機構. 臨床免疫・アレルギー科, 63 (3) : 577-584, 2015.

医学教育企画・推進室

岡山吉道：アレルギー疾患の分子標的 アレルギー 64 (1) : 9-13, 2015.

岡山吉道：重症慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞におけるMas-related gene X2の高発現臨床免疫. アレルギー 63 (2) : 146-150, 2015.

岡山吉道, 布村聡, 羅智靖：ヒトマスト細胞における高親和性IgE受容体β鎖の役割. 化学と生物 53 (4) : 222-227, 2015.

岡山吉道：ヒトの皮膚アレルギー疾患におけるマスト細胞の役割. 獣医臨床皮膚科 21 (3) : 137-141, 2015.

岡山吉道：好酸球 診断と治療 103 (5) : 558-565, 2015.

特許申請

呼吸器内科学分野

山岸賢司, 見越大樹, 権寧博, 橋本修：次世代シーケンス解析を利用した新規転写産物抽出システム. NUBIC No.11969.

生理学教室

日台智明, 北野尚孝, 真宮淳：ホスファチジルセリンの細胞表面への表出促進剤又は表出抑制剤, および脂質ラフトのクラスター形成抑制剤. PCT出願 G1077WO 2015.

微生物学分野

相澤志保子, 本田三男, 早川智：ワクチン及びブライムブーストワクチン. NUBIC No.11887特開2016-094379.

著書

臨床検査医学分野

小倉彩世子, 下澤達雄：銅. これだけは知っておきたい検査のポイント第9集p286-287 医学書院, 2015.

ラジオアイソトープ・環境保全系

【R I 実験室】

論文

生化学分野

Isojima T, Ishizawa M, Yoshimura K, Tamura M, Hirose S, Makishima M, Kitanaka S: Hereditary 1, 25-dihydroxyvitamin D - resistant rickets (HVDRR) caused by a VDR mutation; a novel mechanism of dominant inheritance. Bone Reports, 2015.05.06.

Watarai Y, Ishizawa M, Ikura T, Zacconi F, Uno S, Ito N, Antonio Mouriño, Tokiwa H, Makishima M, Yamada S : Synthesis, biological activities and X-ray crystal structural analysis of 25 - hydroxy - 25(or 26) - adamantyl - 17 - [20(22), 23 - diynyl] - 21 - norvitamin D compounds. Journal of Medicinal Chemistry, 2015.11.

学会発表

生化学分野

石澤通康, 渡會友祐, 伊倉貞吉, Flavia C.M. Zacconi, Antonio Maurino, 常盤広明, 伊藤暢聡, 山田幸子, 槇島誠：共役三重結合とアダマンチル基を導入したビタミンD誘導体の生物活性及びユニークな受容体結合様式. 第一回Neo Vitamin D Workshop 学術集会 滋賀, 2015.

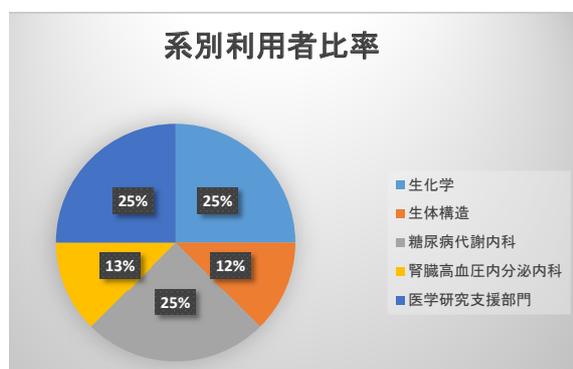
田村麻由子, 石澤通康, 磯島豪, 岡明, 槇島誠, 北中幸子: 禿頭をきたすビタミンD受容体遺伝子の新規変異の機能解析. 第49回日本小児内分泌学会学術集会 東京, 2015.

総説・解説

糖尿病代謝内科分野

山口賢, 大塚雄一郎, 石原寿光: グルカゴン分泌機構とその調節. 医学のあゆみ252巻5号: 395-401, 2015.

平成27年度 RI実験室登録者数			
内科系	基礎系	医学部	合計
3	3	2	8



平成27年度 作業環境測定の実績

作業環境測定の種類・場所・測定回数

	医学部	板橋病院	日本大学病院	合計
ホルムアルデヒド	4	10	7	21
キシレン	4	4	2	10
エチレンオキシド	2	2	0	4
合計	10	16	9	35

ラボラトリーアニマル系

【動物飼育室】

【動物実験室】

論文

血液膠原病内科学分野

Fujiwara S, Imadome K, Takei M: Modeling EBV infection and pathogenesis in new-generation humanized mice. *Exp Mol Med*. 2015 Jan 23;47:e135 査読有.

腎臓高血圧内分泌内科学分野, 細胞再生・移植医学分野

Mishra R, Watanabe T, Kimura M, Koshikawa N, Ikeda M, Uekusa S, Kawashima H, Wang X, Igarashi J, Choudhury D, Grandori C, Kemp C, Ohira M, Verma N, Kobayashi Y, Takeuchi J, Koshinaga T, Nemoto N, Fukuda N, Soma M, Kusafuka T, Fujiwara K, Nagase H. : Identification of a novel E-box binding PI polyamide inhibiting MYC-driven cell-proliferation. *Cancer Science* 06(4):421-429; 2015. 4.

Maruyama T, Fukuda N, Matsumoto T, Kano K, Endo M, Kazama M, Kazama T, Ikeda J, Matsuda H, Ueno T, Abe M, Okada K, Soma M, Matsumoto K, Kawachi H : Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene 6. *Stem Cell Research and Therapy*. 106(4): 421-429; 2015. 4.

Igarashi J, Fukuda N, Inoue T, Nakai S, Saito K, Fujiwara K, Matsuda H, Ueno T, Matsumoto Y, Watanabe T, Nagase H, Bando T, Sugiyama H, Itoh T, Soma M: Preclinical Study of Novel Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting Human TGF-β1 Promoter for Hypertrophic Scars in a Common Marmoset Primate Model. *PLoS One*. 10(5): e0125295. 2015.

Yoshizawa S, Fujiwara K, Sugito K, Uekusa S, Kawashima H, Hoshi R, Watanabe Y, Hirano T, Furuya T, Masuko T, Ueno T, Fukuda N, Soma M, Ozaki T, Koshinaga T, Nagase H: Pyrrole-imidazole polyamide-mediated silencing of KCNQ10T1 expression induces cell death in Wilms' tumor cells. *International*

Journal of Oncology. 47(1):115-121; 2015.7.

Saito K, Fukuda N, Shinohara K, Masuhiro Y, Hanazawa S, Matsuda H, Fujiwara K, Ueno T, Soma M: Modulation of EMT/MET process by pyrrole-imidazole polyamide targeting human transforming growth factor- β 1. International Journal Biochemistry & Cell Biology 66:112-120, 2015.7.

Inami M, Fukushima A, Ueno T, Yamada T, Tsunemi A, Matsumoto Y, Fukuda N, Soma M, Moriyama M: Reduction of dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis by the novel gene regulator PI polyamide targeting transforming growth factor β 1 gene. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 38(12):1836-1842, 2015. 12.

Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene 6. Journal of Stem Cell Research & Therapy. Vol.6 No.80, 2015.

循環器内科学分野

Haruta H, Hiro T, Mitsumata M, Takayama T, Sudo M, Li Y, Takahashi R, Taniguchi Y, Shiomi M, Hirayama A: Stabilization of atherosclerotic plaque by pitavastatin in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. A serial tissue-characterizing intravascular ultrasound study. J Cardiol. 2015 Jul 17. pii: S0914-5087(15)00142-2. doi: 10.1016/j.jjcc.2015.04.015. [Epub ahead of print]

消化器肝臓内科学分野

Nakajima N, Kozu K, Kobayashi S, Nishiyama R, Okubo R, Akai Y, Moriyama M, Kinukawa N: The Expression of IGF-1R in *Helicobacter pylori* Infected Intestinal Metaplasia and Gastric Cancer. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 59(1) 53-57, 2016.

Inami M, Fukushima A, Ueno T, Yamada T, Tsunemi A, Matsumoto Y, Fukuda N, Soma M, Moriyama M:

Reduction of dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis by the novel gene regulator PI polyamide targeting transforming growth factor β 1 gene. Biological & Pharmaceutical Bulletin 38(12), 1836-1842, 2015.

形成外科学分野

副島一孝, 檜村勉, 地家豊治, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: 特集 再生医療: 基礎と臨床 皮膚再建の再生医療. 日大医学雑誌 75(2):74-80, 2016.

Kashimura T, Soejima K, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: The Effect of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on a Dorsal Skin Flap Model. Journal of investigative surgery, 29巻1号, 2015, 6-12.

Asami T, Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Morioka K, Nakazawa H: Effects of combination therapy using basic fibroblast growth factor and mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin graft revascularization. J Plast Surg Hand Surg 49(4):229-33, 2015.

神経外科学分野

Yamamuro S, Okamoto Y, Sano E, Ochiai Y, Ogino A, Ohta T, Hara H, Ueda T, Nakayama T, Yoshino A, Katayama Y: Characterization of glioma stem-like cells from human glioblastomas. Int J Oncol. 2015 Jul; 47(1):91-6.

Yamamuro S, Sano E, Okamoto Y, Ochiai Y, Ohta T, Ogino A, Natsume A, Wakabayashi T, Ueda T, Hara H, Nakayama T, Yoshino A, Katayama Y: Antitumorigenic effect of interferon- β by inhibition of undifferentiated glioblastoma cells. Int J Oncol. 2015 Nov;47(5):1647-54.

眼科学分野

Shoji J, Nakanishi Y, Ishimori A, Sakimoto T, Inada N, Nemoto N: Involvement of Chemokines and a CD4-Positive T Cell Subset in the Development of Conjunctival Secondary Lymphoid Follicles in an Atopic Kerato-

conjunctivitis Mouse Model.
Int Arch Allergy Immunol 167:147-157, 2015.

Sakimoto T: Potential application of biological products for the treatment of ocular surface inflammation. Cornea 34 Suppl 11:S153-7, 2015.

皮膚科学分野

Nunomura S, Okayama Y, Matsumoto K, Hashimoto N, Endo-Umeda K, Terui T, Makishima M, Ra C: Activation of LXRs using the synthetic agonist GW3965 represses the production of pro-inflammatory cytokines by murine mast cells. Allergol Int. 2015, 64 Suppl:S11-7.

Nunomura S, Ohtsubo-Yoshioka M, Okayama Y, Terui T, Ra C: FcR γ promotes contact hypersensitivity to oxazolone without affecting the contact sensitization process in B6 mice. Exp Dermatol. 2015, 24(3):204-8.

生化学分野

Kitano H, Mamiya A, and Hidai C et al: Coagulation factor IX regulates cell migration and adhesion in vitro. Cell Biology International, 39, 1162-1172, 2015.

生体構造医学分野

Yoshikawa M, Hirabayashi M, Ito R, Ozaki S, Aizawa S, Masuda T, Senzaki K, Shiga T: Contribution of the Runx1 transcription factor to axonal pathfinding and muscle innervation by hypoglossal motoneurons. Developmental Neurobiology. 75: 1295-1314, 2015.

人体病理学分野

Hemmi S, Matsumoto N, Jike T, Yukari-Obana Y, Nakanishi Y, Soma M, Hemmi A: Proximal tubule morphology in rats with renal congestion: a study involving the in vivo cryotechnique. Med Mol Morphol, DOI 10.1007/s00795-014-0084-x, 2015.

細胞再生・移植医学分野

Hosokawa T, Konuma N, Ikeda T, Hashimoto M, Kaneda H, Ohashi K, Matsumoto T, Koshinaga T: Es-

tablishment of a new anal sphincter injury model in rats based on cardiotoxin. Jour Pedi Sur.2015; 50(8): 1352-8.

総合医学研究所 医学研究支援部門

谷口由樹, 藤田順一, 松本明, 黒田和道: 医学研究支援部門循環機能室に設置された, エックス線循環器診断システムの現状. 日本大学医学部総合医学研究所紀要3巻, 2015.

学会発表

血液膠原病内科学分野

長澤洋介, 井汲菜摘, 野崎高正, 猪股弘武, 北村登, 岩田光浩, 武井正美: ヒト破骨細胞によって引き起こされたEBV感染ヒト化NOD/Shi-scid/IL-2R γ^{null} マウスにおけるびらん性関節炎. 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会 愛知, 2015.

腎臓高血圧内分泌内科学分野, 細胞再生・移植医学分野

福田昇, 片川まゆみ, 家森幸男: タウリン摂取により血管内皮前駆細胞機能改善作用. 第1回国際タウリン研究会日本部会 兵庫, 2015.

丸山高史, 福田昇, 松本太郎, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高浩, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕: TSG-6を介したDFAT細胞移植の免疫性腎炎に対する改善効果. 第14回日本再生医療学会 神奈川, 2015.

齋藤孝輔, 福田昇, 上野高浩, 相馬正義: ヒトTGF- β 1PIポリアミドによるヒトiPS細胞誘導効率増加作用. 第14回日本再生医療学会 神奈川, 2015.

丸山高史, 福田昇, 阿部雅紀, 上野高浩, 松本太郎, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の腎症改善効果の検討. 第58回日本腎臓学会 愛知, 2015.

村田悠輔, 上野高浩, 常見明子, 田中翔, 岡村雅広, 逸見聖一朗, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 松本紘一, 福田昇, 藤田宜是, 相馬正義: SHR腎臓で発現し, 尿細管細胞にて概日リズムを示す生体内時計関連分

子の探索. 第58回日本腎臓学会 愛知, 2015.

根岸英理子, 福田昇, 片川まゆみ, 上野高浩, 阿部雅紀, 岡田一義, 遠藤守人, 松本紘一, 相馬正義: 高血圧自然発症ラット (SHR) の高血圧腎リモデリングにおける補体C3の役割. 第58回日本腎臓学会 愛知, 2015.

池田迅, 松田裕之, 福田昇, 相馬正義, Hamet Pavel, Tremblay Johanne: 正常尿細管に発現するHCaRGは尿細管の修復を促し, 腫瘍形成を抑制する. 第58回日本腎臓学会 愛知, 2015.

岡村雅弘, 上野高浩, 常見明子, 田中翔, 丸山高史, 阿部雅紀, 岡田一義, 遠藤守人, 松本紘一, 福田昇, 相馬正義: 高血圧モデルラット腎臓におけるACOX2発現の検討. 第58回日本腎臓学会 愛知, 2015.

Fukuda N, Negishi N, Katakawa M, Tsunemi A, Ueno T, Endo M, Soma M: Complement 3 Involved in the Hypertensive Endorgan Damages Through Activation of RAS and Dedifferentiation of Mesenchymal Tissues. 第38回日本高血圧学会シンポジウム 愛媛, 2015.

田中翔, 上野高浩, 村田悠輔, 常見明子, 小林洋輝, 畑中善成, 田平和宣, 羽毛田公, 福田昇, 相馬正義: 高血圧自然発症ラット副腎におけるSle12a6概日リズムの消失. 第38回日本高血圧学会 愛媛, 2015.

根岸英理子, 福田昇, 片川まゆみ, 上野高浩, 阿部雅紀, 岡田一義, 遠藤守人, 松本紘一, 相馬正義: 補体C3による組織レニン・アンジオテンシン系の活性化から高血圧病態形成. 第38回日本高血圧学会 愛媛, 2015.

小林洋樹, 上野高浩, 福田昇, 常見明子, 田中翔, 畑中善成, 羽毛田公, 相馬正義: 新規脂質吸収抑制薬であるSAR1B制御PIポリアミドの開発. 第38回日本高血圧学会 愛媛, 2015.

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: 健康人及びSHRにおけるタウリン・マグネシウム摂取による血管内皮前駆細胞 (EPC) 機能への効果の検討. 第38回日本高血圧学会 愛媛, 2015.

Tanaka S, Ueno T, Murata Y, Tsunemi A, Kobayashi H, Hatanaka Y, Tahira K, Haketa A, Fukuda N, Soma M: Diminished Circadian Oscillation of Slc 12a6m-RNA in the Adrenal Glands of SHR/Iam. 第38回日本高血圧学会 愛媛, 2015.

Negishi E, Fukuda N, Katakawa M, Tsunemi A, Ueno T, Endo M, Soma M: Activation of Tissue Renin-angiotensin System and Establishment of Hypertension by Complement 3. 第38回日本高血圧学会 愛媛, 2015.

丸山高史, 福田昇, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 阿部雅紀, 松本太郎, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の全身投与はTSG-6を介して免疫性糸球体腎炎を改善した. 第38回日本高血圧学会 愛媛, 2015.

根岸英理子, 福田昇, 遠藤守人, 片川まゆみ, 常見明子, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 相馬正義: 補体C3によるSHRの腎レニン・アンジオテンシン系の活性化から高血圧病態形成. 第51回高血圧関連疾患モデル学会 千里, 2015.10.

岡村雅弘, 上野高浩, 常見明子, 田中翔, 丸山高史, 阿部雅紀, 岡田一義, 遠藤守人, 松本紘一, 福田昇, 相馬正義: 高血圧モデルラット腎臓におけるACOX2発現の検討. 第51回高血圧関連疾患モデル学会 大阪, 2015.

村田悠輔, 上野高浩, 小林洋輝, 田中翔, 岡村雅広, 逸見聖一朗, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 福田昇, 藤田宜是, 相馬正義: SHR/Izm腎臓で発現が増加している生体内時計制御遺伝子の探索. 第51回高血圧関連疾患モデル学会 大阪, 2015.

田中翔, 上野高浩, 村田悠輔, 常見明子, 小林洋輝, 畑中善成, 田平和宣, 羽毛田公, 福田昇, 相馬正義:

高血圧自然発症ラット副腎におけるSlc12a6概日リズムの変化. 第51回高血圧関連疾患モデル学会 大阪, 2015.

田中翔, 上野高浩, 常見明子, 小林洋輝, 畑中善成, 田平和宣, 羽毛田公, 福田昇, 相馬正義: SHR/Izm, SHRSP/Iam, WKY/Iam腸内フローラの検討. 第51回高血圧関連疾患モデル学会 大阪, 2015.

田中翔, 上野高浩, 村田悠輔, 常見明子, 小林洋輝, 畑中善成, 田平和宣, 羽毛田公, 福田昇, 相馬正義: 高血圧自然発症ラット副腎における時計遺伝子発現変動の検討. 第51回高血圧関連疾患モデル学会 大阪, 2015.

田中翔, 上野高浩, 常見明子, 小林洋輝, 畑中善成, 羽毛田公, 福田昇, 相馬正義: 全ゲノム解析を用いたSHR/Izm生体内時計遺伝子変異の検索. 第51回高血圧関連疾患モデル学会 大阪, 2015.

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: SHRにおけるタウリン及びマグネシウム負荷が血管内皮前駆細胞(EPC)機能に及ぼす効果. 第51回高血圧関連疾患モデル学会 大阪, 2015.

根岸英理子, 福田昇, 片川まゆみ, 常見明子, 上野高浩, 遠藤守人, 相馬正義: 補体C3は腎髄質EMTによる組織RA系の活性化から高血圧病態を形成する. 第19回日本心血管内分泌代謝学会 兵庫, 2015.

根岸英理子, 福田昇, 上野高浩, 相馬正義: 補体C3は間葉組織を脱分化し組織レニン・アンジオテンシン系の活性化から塩分感受性高血圧発症因子である. 高血圧と冠動脈疾患研究会 東京, 2015.

丸山高史: TSG-6を介したDFAT細胞移植の免疫性腎炎に対する改善効果. 第14回日本再生医療学会 神奈川, 2015.

循環器内科学分野

春田裕典, 廣高史, 須藤晃正, 深町大介, 西田俊彦, 李予昕, 平山篤志, 高山忠輝: 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のメカニズム. 第63回日本心臓病学会 学術集会 神奈川, 2015.

須藤晃正, 廣高史, 高山忠輝, 三俣昌子, 平山篤志: 家畜ブタを用いた薬剤溶出性ステント留置後リパロキサバンによる抗血栓効果および新生内膜修復効果の検討. 第63回日本心臓病学会学術集会 神奈川, 2015.

Okumura Y, Watanabe I, Sonoda K, Kogawa R, Takahashi K, Iso K, Ohkubo K, Nakai T, Hirayama A: Impact of Hyperlipidemia on the Pulmonary Vein Refractory Period and Inducibility of Atrial Fibrillation in the Pig. 第79回日本循環器学会学術集会 大阪, 2015.

Yuxin Li, Onishi A, Sudo M, Haruta H, Qing-Fei Lin, Takayama T, Suzuki S, Fuchimoto D, Sembon S, Iwamoto M, Hashimoto M, Yoda S, Kunimoto S, Hiro T, Matsumoto T, Mitsumata M, Sugitani M, Saito S, Hirayama A: Is early statin treatment justified before formation of atherosclerotic plaques?. Scientific Sessions 2015 of American Heart Association. November 8-10, 2015 Orlando, Florida. Abstract 13244 Circulation. 2015; 132: A13244.

消化器肝臓内科学分野

Nakajima N, Tomita T, Kozu K, Kobayashi S, Nishiyama R, Akai Y, Moriyama M: The Expression of IGF1R in *Helicobacter pylori* Infected Intestinal Metaplasia and Gastric Cancer. The 8th International Gastrointestinal Consensus Symposium Tokyo 2015, 2.

中島典子, 大内琴世, 増田あい, 宮田隆, 中川太一, 大久保理恵, 西山竜, 絹川典子, 森山光彦: *Helicobacter pylori*による腸上皮化生, および胃癌の発生過程におけるインスリン様成長因子1-受容体の発現についての検討. 第46回日本消化吸収学会総会 千葉, 2015.

西山竜, 大内琴世, 増田あい, 久野木直人, 中川太

一, 大久保理恵, 小川眞広, 中島典子, 森山光彦: 寛解期潰瘍性大腸炎に対する経口5-ASA製剤1日1回投与の寛解維持効果についての検討. 日本消化器関連学会週間 (JDDW 2015) 兵庫, 2015.

樋口晃久, 福島暁子, 松村寛, 森山光彦: NASH発症ラットにおける肝臓および小腸鉄代謝関連遺伝子の検出. 第57回日本消化器病学会大会 東京, 2015.

高橋利実, 福島暁子, 森山光彦, 上野高浩: NASH発症ラットおよび生活習慣病発症ラットにおける腸内フローラの解析 (シンポジウム: 腸内細菌と消化器疾患). 第46回日本消化器学会総会 千葉, 2015.

樋口晃久, 福島暁子, 森山光彦, 上野高浩: NASH発症ラットにおける肝臓および小腸鉄代謝関連遺伝子の検出. 第46回日本消化器学会総会 千葉, 2015.

高橋利実, 福島暁子, 森山光彦, 上野高浩: NASH発症ラットおよび生活習慣病発症ラットにおける腸内フローラの解析 (シンポジウム: 腸内細菌と消化器疾患). 第46回日本消化器学会総会 千葉, 2015.

樋口晃久, 福島暁子, 森山光彦, 上野高浩: NASH発症ラットにおける肝臓および小腸鉄代謝関連遺伝子の検出. 第46回日本消化器学会総会 千葉, 2015.

糖尿病代謝内科学分野

Furukawa A, Tanaka A, Kosuda M, Otsuka Y, Yamaguchi S, Ishihara H: Screening by RMCE-based generation of MIN6 cell transfectants identifies novel genes important for glucose-stimulated insulin secretion. KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology. Kyoto, Japan 2015.10.26.

心臓血管外科学分野

石井雄介, 瀬在明, 中田金一, 大幸俊司, 八百板寛子, 有本宗仁, 畑博明, 塩野元美: 開心術における低用量carperitide持続投与の腎臓に与える影響. 第53回日本人工臓器学会 東京, 2015.

有本宗仁, 瀬在明, 中田金一, 大幸俊司, 八百板寛子, 畑博明, 塩野元美: 心臓手術後におけるV-A bypass症例の検討. 第53回日本人工臓器学会 東京, 2015.

形成外科学分野

副島一孝, 松本太郎, 樫村勉, 風間智彦, 加野浩一郎, 仲沢弘明: シンポジウム「臨床応用に向けた新しい材料および医療機器の開発 (産学連携による開発を含む)」文科省大学発新産業創出拠点 (START) プロジェクト 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の臨床用細胞製造と細胞治療への応用. 第58回日本形成外科学会総会学術集会 京都, 2015.

副島一孝, 樫村勉, 藤原英紀, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: シンポジウム「再生医療の最前線」皮膚再生医療における脱分化脂肪細胞 (DFAT) の有用性に関する検討. 第24回日本形成外科学会基礎学術集会 岩手, 2015.

副島一孝, 樫村勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: シンポジウム「培養表皮移植の生着率向上をめざして」脱分化脂肪細胞 (DFAT) の再建真皮上への自家培養表皮生着促進効果に関する検討. 第41回日本熱傷学会総会・学術集会 愛知, 2015.

樫村勉, 副島一孝, 仲沢弘明: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) のラット背部皮弁に対する血管新生作用の機序に関する検討. 第24回日本形成外科学会基礎学術集会 岩手, 2015.

Kashimura T, Soejima K, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: Contribution of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells to the skin allograft survival in swine. 16th European Burns Association Congress, 2015.

Kashimura T, Soejima K, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: Prolongation of skin allograft survival by the transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells. 10th Asia Pacific Burn Congress, 2015.

樫村勉, 副島一孝, 仲沢弘明: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) によるラット背部皮弁の血管新生に関する検討. 第7回創傷外科学会総会・学術集会 東京, 2015.

樫村勉, 副島一孝, 仲沢弘明: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) による凍結保存同種皮層移植片の生着期間延長の試み. 第7回創傷外科学会総会・学術集会 東京, 2015.

樫村勉, 副島一孝, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) 皮下注入によるラット背部皮弁の生着域拡大についての検討. 第3回日本大学幹細胞研究フォーラム 東京, 2015.

副島一孝: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の自家培養表皮生着促進効果に関する検討. 第14回日本再生医療学会 神奈川, 2015.

内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

丸山高史: TSG-6を介したDFAT細胞移植の免疫性腎炎に対する改善効果. 第14回日本再生医療学会 神奈川, 2015.

機能形態学系細胞再生・移植医学分野

風間智彦: 吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析. 第14回日本再生医療学会 神奈川, 2015.

風間智彦, 副島一孝, 加野浩一郎, 松本太郎: 吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞DFATの調製と機能評価. 第36回日本炎症・再生医学会 東京, 2015.

整形外科学分野

中山潤志: ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植の効果. 第44回日本脊椎脊髄病学会学術集会 福岡, 2015.

木下豪紀: 脱分化脂肪細胞の骨分化能に及ぼす副甲状腺ホルモンの効果. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会 富山, 2015.

小山公行: 受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける脱分化脂肪細胞 (DFAT) 静脈内投与の治療効果. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会 富山, 2015.

宮方啓行, 松本太郎, 風間智彦, 小山公行, 上井浩, 徳橋泰明: 受動喫煙によるラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植の効果. 第36回日本炎症・再生医学会 東京, 2015.

中山潤志, 風間智彦, 佐久間俊行, 加野浩一郎, 松本太郎, 徳橋泰明: ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植の効果. 第44回日本脊椎脊髄病学会 福岡, 2015.

神経外科学分野

福島匡道, 田原潤一, 田戸雅宏, 茂呂修啓, 森達郎, 前田剛, 川又達朗, 吉野篤緒, 片山容一: ラット脳挫傷モデルにおけるシロスタゾールの効果. 第38回日本脳神経外傷学会 徳島, 2015.

山本隆充, 渡辺充, 角光一郎, 大淵敏樹, 加納利一, 小林一太, 大島秀規, 深谷親, 吉野篤緒, 片山容一: 脊髄刺激療法による運動麻痺の治療, シンポジウム1「運動麻痺に対する機能神経外科」. 第54回日本定位・機能神経外科学会 東京, 2015.

大島秀規, 渡辺充, 角光一郎, 大淵敏樹, 小林一太, 市川忠, 深谷親, 山本隆充, 吉野篤緒, 片山容一: STN-DBS後のパーキンソン病の起立・歩行障害に対する脊髄刺激療法の効果. シンポジウム6「パーキンソン病治療における機能神経外科の役割 (1)」. 第54回日本定位・機能神経外科学会 東京, 2015.

深谷親, 渡辺充, 大淵敏樹, 加納利和, 大島秀規, 吉野篤緒, 山本隆充: PD治療におけるSTN-DBSの役割: 長期的に有効なのはいかなる症例か? シンポジウム7「パーキンソン病治療における機能神経外科の役割 (2)」. 第54回日本定位・機能神経外科学会 東京, 2015.

前田 剛, 森達郎, 川又達朗, 吉野篤緒, 片山容一, 永廣信治: 器質的頭蓋内疾患の既往と競技復帰における問題点, シンポジウム1B スポーツ外傷2 各種

スポーツ対応, 復帰基準. 第38回日本脳神経外傷学会 徳島, 2015.

茂呂修啓, 熊川貴大, 四條克倫, 前田剛, 片山容一, 吉野篤緒: ラット脳挫傷モデルにおけるグルオトランスミッター制御の効果, シンポジウム2 神経損傷の基礎研究最前線. 第38回日本脳神経外傷学会 徳島, 2015.

福島匡道, 田原潤一, 田戸雅広, 茂呂修啓, 森達郎, 前田剛, 川又達朗, 吉野篤緒, 片山容一: ラット脳挫傷モデルにおけるシロスタゾールの効果, シンポジウム2 神経損傷の基礎研究最前線. 第38回日本脳神経外傷学会 徳島, 2015.

下田健太郎, 前田剛, 田戸雅宏, 川又達朗, 吉野篤緒, 片山容一: 高齢者頭部外傷の転帰と外科治療: 日本頭部外傷データベースプロジェクトにおける888例の検討, シンポジウム2 高齢化社会と頭頸部外傷. 第38回日本脳神経外傷学会 徳島, 2015.

栗原淳, 影山悠, 吉野篤緒, 片山容一, 西本博: チタンメッシュによる頭蓋形成術後に軽微な外傷で生じた頭蓋陥没の一例, 特別企画2 小児の開頭法. 第43回日本小児神経外科学会 山口, 2015.

近藤裕子, 廣瀬倫也, 前田剛, 鈴木孝浩, 吉野篤緒: 帝王切開術における脊髄くも膜下麻酔中の母体脳組織低酸素に対する酸素投与の効果, シンポジウム1 神経集中治療. 第21回日本脳神経モニタリング学会 東京, 2015.

平山晃康, 荻野暁義, 茂呂修啓, 吉野篤緒, 片山容一: 脳血管障害に対する術中脳低温療法の再評価, シンポジウム2. 第18回日本脳低温療法学会 香川, 2015.

前田剛: 重症頭部外傷のデータと発見, シンポジウム 神経外傷における最新の知見. 第74回日本脳神経外科学会学術総会 北海道, 2015.

片山容一: ヒトの「こころ」を外科的に制御(コントロール)してよいか, 特別企画 脳神経外科と生

命・医療倫理. 第74回日本脳神経外科学会学術総会 北海道, 2015.

栗原淳: 脊髄脂肪腫に対する手術: 脊髄脂肪腫部分摘出の治療成績と問題点の検討, シンポジウム 小児脊髄脂肪腫の外科治療の将来. 第74回日本脳神経外科学会学術総会 北海道, 2015.

大塚朋之, 大島秀規, 渡辺充, 大淵敏樹, 小林一太, 吉野篤緒, 片山容一: パーキンソン病に合併した脊椎側弯・側屈に対する視床下核刺激療法の効果. 第54回日本定位・機能神経外科学会 東京, 2015.

小林一太, 渡辺充, 大淵敏樹, 加納利和, 大島秀規, 深谷親, 吉野篤緒, 山本隆充, 片山容一: パーキンソン病の視床下核単一ニューロン活動の分析. 第54回日本定位・機能神経外科学会 東京, 2015.

渡辺充, 角光一郎, 大淵敏樹, 四條克倫, 加納利和, 小林一太, 大島秀規, 深谷親, 吉野篤緒, 山本隆充, 片山容一: 神経刺激装置埋設術におけるSurgical Site Infection (SSI) の検討. 第54回日本定位・機能神経外科学会 東京, 2015.

須磨健, 梶本隆太, 太田隆, 平山晃康, 渋谷肇, 吉野篤緒, 片山容一: スーパー総合周産期センターにおける脳神経救急. 第20回日本脳神経外科救急学会 東京, 2015.

熊川貴大, 茂呂修啓, 前田剛, 平山晃康, 吉野篤緒, 片山容一: Talk and deteriorateの検討, 日本脳神経外傷学会頭部外傷データベースプロジェクト2009の結果から. 第20回日本脳神経外科救急学会 東京, 2015.

榎田浩一郎, 太田隆, 山室俊, 落合祐之, 角光一郎, 吉野篤緒: 造影効果が無いglioblastomaの一例. 第18回脳神経外科疾患の臨床と病理のJOINT CONFERENCE 東京, 2015.

渋谷肇, 梅沢武彦, 片桐彰久, 松崎肅統, 須磨健, 吉野篤緒, 片山容一: 経皮的頸動脈ステント留置術におけるSpider FXとProtegeの有用性. STROKE

2015 広島, 2015.

下田健太郎, 須磨健, 角光一郎, 松崎肅統, 渋谷肇, 吉野篤緒: 脳血管内治療における合併症発症時期の検討 – 入院期間の短縮を目指して –. STROKE 2015 広島, 2015.

須磨健, 下田健太郎, 角光一郎, 松崎肅統, 荻野暁義, 渋谷肇, 平山晃康, 吉野篤緒, 片山容一: 選択的に全身麻酔下で施行した頸動脈ステント留置術. STROKE 2015 広島, 2015.

平山晃康, 荻野暁義, 吉野篤緒, 片山容一: 脳血管障害患者に対する術中脳低温療法適応の再評価. STROKE 2015 広島, 2015.

片桐彰久, 松崎肅統, 須磨健, 梅沢武彦, 渋谷肇, 吉野篤緒, 片山容一: くも膜下出血を伴わない脳室内出血で再破裂した後大脳動脈瘤の1例. STROKE 2015 広島, 2015.

渡辺充, 角光一郎, 大淵敏樹, 四條克倫, 加納利和, 小林一太, 大島秀規, 深谷親, 吉野篤緒, 山本隆充, 片山容一: 神経刺激システム埋設術における Surgical Site Infection (SSI) の検討. 第29回日本ニューロモデュレーション学会 東京, 2015.

Fukushima M, Maeda M, Tado M, Yoshino A, Katayama Y, : Cilostazol attenuates blood – brain barrier disruption and subsequent secondary cellular damage following cortical contusion in rats. National Neurotrauma Society 2015. Santa Fe, June 28 – July 1.

榎田浩一郎, 山室俊, 落祐之, 太田隆, 荻野暁義, 吉野篤緒, 片山容一, 本間琢, 杉谷雅彦: 第3脳室に発生した Rosette-forming glioneuronal tumor の一例. 第33回日本脳腫瘍病理学会学術集会, 高松, 2015. 6.

太田隆, Ohgaki Hiroko, 吉野篤緒, 片山容一: Gemistocytic astrocytoma における 19q13 の遺伝子異常. 第33回日本脳腫瘍病理学会学術集会 香川, 2015.

本間琢, 太田隆, 三島一彦, 石澤圭介, 吉野篤緒, 佐々木惇: 毛様粘液性星細胞腫の組織像を呈した脳腫瘍3症例の臨床病理学的検討. 第33回日本脳腫瘍病理学会学術集会 香川, 2015.

栗原淳, 影山悠, 吉野篤緒, 片山容一, 西本博: 小児脳血管撮影の合併症に関する検討. 第43回日本小児神経外科学会 山口, 2015.

大塚朋之, 大島秀規, 渡辺充, 大淵敏樹, 小林一太, 吉野篤緒, 片山容一: パーキンソン病に合併した脊椎側弯・側屈に対する視床下核DBSの効果. 第40回関東機能的脳外科カンファレンス 東京, 2015.

平山晃康: 脳血管障害に対する術中脳低温療法の有効性について. 第74回日本脳神経外科学会学術総会 北海道, 2015.

落合祐之: Rivavirin による悪性グリオーマ細胞株に対する抗腫瘍効果. 第74回日本脳神経外科学会学術総会 北海道, 2015.

加納利和: 急性期脳梗塞に対する血行再建術. 第74回日本脳神経外科学会学術総会 北海道, 2015.

前島貞裕: 腰部脊椎管狭窄症に対する一側進入両側除圧術の長期治療成績. 第74回日本脳神経外科学会学術総会 北海道, 2015.

須磨健: スーパー総合周産期センターにおける脳神経外科救急診療. 第74回日本脳神経外科学会学術総会 北海道, 2015.

四條克倫: 外傷性脳損傷後の酸化ストレスに対する Sodium pyruvate の効果. 第74回日本脳神経外科学会学術総会 北海道, 2015.

渡辺充, 脳神経外科領域における Virtual Private Network (VPN) の応用. 第74回日本脳神経外科学会学術総会 北海道, 2015.

下田健太郎: 脳底動脈先端部動脈瘤に対する Yステント支援コイル塞栓術の効果. 第74回日本脳神経

外科学会学術総会 北海道, 2015.

熊川貴大：ラット脳挫傷モデルにおけるP2受容体拮抗薬MRS2179の効果. 第74回日本脳神経外科学会学術総会 北海道, 2015.

李相大, 吉野篤緒, 他：膜嚢胞との鑑別が困難であったラトケ嚢胞に内視鏡下経蝶形骨洞手術を施行した一例. 第128回(社)日本脳神経外科学会 関東支部学術集会 東京, 2015.

落合祐之, 佐野恵海子, 李相大, 榎田浩太郎, 山室俊, 角光一郎, 荻野暁義, 太田隆, 上田卓也, 岡本豊, 吉野篤緒：Rivavirinの悪性神経膠腫細胞株に対する抗腫瘍効果の検討. 第33回日本脳腫瘍学会学術集会 京都, 2015.

田中聡, 平尾順, 秋元治朗, 石川栄一, 井原哲, 岩立康男, 泉山仁, 植木敬介, 太田隆, 岡秀宏, 齋藤紀彦, 佐々木光, 高野晋吾, 永根基雄, 菱井誠人, 武笠晃丈, 山口文雄, 吉野篤緒：神経膠腫に対する新規承認薬の使用状況 東京脳腫瘍治療懇話会におけるアンケート調査. 第33回日本脳腫瘍学会学術集会 京都, 2015.

眼科学分野

崎元暢, 小野江元, 菊地善公, 渡辺純子, 菅谷哲史, 石森秋子：角膜炎症におけるJAK阻害薬点眼効果の検討. 第119回日本眼科学会総会 北海道, 2015.

小野江元, 菅谷哲史, 崎元暢：角膜炎症におけるTNF受容体1点眼効果の検討. 第119回日本眼科学会総会 北海道, 2015.

微生物学分野

相澤(小峯)志保子, 早川智, 松尾和浩, 本多三男：哺乳類細胞で発現可能な新規組換えBCGワクチンの開発. 第85回実験結核研究会総会 京都, 2015.

Komine - Aizawa S, Hayakawa S, Matsuo K, Honda M: rBCG/Ag85B confers enhanced levels of polyfunctional CD8+ T cell induction by co-inducing antigen-specific CD4+ T cells. 第44回日本免疫学会学術集会

北海道, 2015.

生化学分野

宇野茂之, Daniel W. Nebert, 榎島誠：CYP1A1による経口暴露BaPが誘導する脂肪肝の抑制作用. 日本薬学会第135年会 兵庫, 2015.

石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 池田和正, 榎島誠：成熟脂肪細胞の脱分化過程におけるビタミンD受容体の関与 発表学会. 平成26年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第3回日本大学幹細胞研究フォーラム 東京, 2015.

石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 池田和正, 榎島誠：発表タイトル：ビタミンDシグナルによる成熟脂肪細胞の脱分化抑制. 文部科学省私立大学戦力的研究基盤形成支援事業「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」平成26年度研究成果公開シンポジウム 東京, 2015.

石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 池田和正, 榎島誠：成熟脂肪細胞の脱分化過程及び脱分化後におけるビタミンD受容体の関与. 日本ビタミン学会 第67回大会 富山, 2015.

石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 池田和正, 榎島誠：マウス脱分化脂肪細胞の誘導におけるビタミンDシグナルの影響. 第348回脂溶性ビタミン総合委員会 東京, 2015.

生体構造医学分野

原田智紀, 壺井功, 平林容子, 平林幸生, 菅野純, 相澤信：低酸素環境飼育による多血症マウスの赤血球造血動態について. 第77回日本血液学会学術集会 石川, 2015.

細胞再生・移植医学分野

風間智彦：吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析. 第14回日本再生医療学会 神奈川, 2015.

風間智彦, 副島一孝, 加野浩一郎, 松本太郎：吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞 (DFAT) の調

製と機能評価. 第36回日本炎症・再生医学会 東京, 2015.

小児科学分野

大熊啓嗣：臍帯血生着不全モデルマウスを用いたヒト胎児付属物由来幹細胞の生着促進効果の検討. 第14回日本再生医療学会 神奈川, 2015.

谷川俊太郎, 大熊啓嗣, 金澤剛二, 西川英里, 下澤克宜, 平井麻衣子, 谷ヶ崎博, 高橋昌里, 風間智彦, 松本太郎：臍帯血生着不全モデルマウスに対する胎児付属物由来幹細胞移植の生着促進効果. 第36回日本炎症・再生医学会 東京, 2015.

総合医学研究所 医学研究支援部門

藤田順一, 高山世絵梨, 松本明, 榊原寿光, 大林茂男, 内田圭, 佐藤央爾, 金子岳, 石井敬基：実験動物の逸走防止と作業環境を考慮した小型床敷回収装置. 第49回日本実験動物技術者協会 静岡, 2015.

藤田順一, 谷口由樹, 高山世絵梨, 松本明, 石井敬基：日本大学医学部における実験用ブタ施設の現状と今後の課題. 第3回日本先進医工学ブタ研究会シンポジウム 東京, 2015.10.

博士課程

内科系 膠原病リウマチ学専攻

長澤洋介：Epstein-Barr Virus 感染によるNOD/Shi-scid IL2rgnullびらん性関節炎マウスモデルにおけるヒト接骨細胞の検討. 日本大学大学院医学研究科博士課程内科系膠原病リウマチ学専攻.

外科系 整形外科学専攻

中山澗志：ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植の治療効果.

内科系循環器内科学. 日本大学大学院医学研究科博士課程内科系膠原病リウマチ学専攻.

特許

微生物学分野

相澤志保子, 本田三男, 早川智：ワクチン及びブライムブーストワクチンNUBIC No.11887特開2016-094379

生化学分野

日台智明, 北野尚孝, 真宮淳：ホスファチジルセリンの細胞表面への表出促進剤又は表出抑制剤. および脂質ラフトのクラスター形成抑制剤 PCT出願 G1077WO, 2015.

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 杉谷雅彦
委員 石井敬基, 内山 真, 黒田和道, 嶋村政男, 原留弘樹, 間崎武郎,
村岡幸雄, 村上芳孝, 山本隆充
幹事 井上広一, 烏山芳織, 竹田亮介, 藤田順一

(50音順)

Editorial Board

Editor-in-Chief Masahiko SUGITANI
Associate Editors Yukimoto ISHII, Makoto UCHIYAMA, Kazumichi KURODA,
Masao SHIMAMURA, Hiroki HARADOME, Takero MAZAKI,
Yukio MURAOKA, Yoshitaka MURAKAMI, Takamitsu YAMAMOTO
Managing Editors Koichi INOUE, Yoshiori UYAMA, Ryosuke TAKEDA, Jun-ichi FUJITA

発行者 日本大学医学部総合医学研究所長 杉谷雅彦
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 Masahiko SUGITANI
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
