

# 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.5 / December 2017

日本大学医学部総合医学研究所

Research Institute of Medical Science, Nihon University School of Medicine

## 目 次

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	1
結核を中心とした感染制御のための新規ワクチン開発と免疫学的評価 .....	相澤(小峯)志保子 他	6
筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを用いた感覚ニューロンの解析 .....	吉川雅朗 他	12
間質性肺炎の病態形成におけるネクロプトーシスの役割 .....	水村賢司 他	15
乳腺小葉癌における <i>CDH1</i> 遺伝子異常の検討 ーデジタル PCR 法および2色 FISH 法の比較 .....	唐 小燕 他	18
進行肺腺癌における糖転移酵素遺伝子発現と予後の関係 .....	中西陽子 他	22
腫瘍特異的融合遺伝子を標的としたピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIP) の開発 .....	藤原恭子 他	25
膵癌 - 間質相互作用を標的にした創薬開発 .....	佐野 誠 他	29
心事故予測における心臓核医学における心筋虚血と SYNTAX score の関連 .....	依田俊一 他	31
下痢症ウイルスの分子疫学的研究 .....	Sheikh Ariful Hogue 他	34
ミトコンドリア病および類縁疾患の研究 .....	杉谷雅彦	39
機能神経外科におけるニューロモデュレーション .....	山本隆充 他	42
マウス急性移植片対宿主病モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果 .....	村井健美 他	46
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 .....	岡山吉道 他	49
がん種横断的ゲノム解析による発がん機構の解明に関する研究 .....	森山光彦 他	54
医学研究支援部門動物実験室に設置されたエックス線装置について .....	谷口由樹 他	63
医学研究支援部門による作業環境測定の目的と意義 .....	渡部和浩 他	68
画像保存についてセミナーを通して考えたこと .....	黒江裕子 他	72
医学研究支援部門の利用に関する成果・業績等一覧.....		75

## INDEX

Analysis of disease-specific human mast cell phenotype and investigation of mechanisms of the phenotypic changes .....	Yoshimichi OKAYAMA et. al	1
Novel vaccine development and evaluation of immune responses for mycobacterial infection .....	Shihoko Komine-AIZAWA et. al	6
Analysis of sensory neurons in ALS model mice .....	Masaaki YOSHIKAWA et. al	12
The role of necroptosis in the pathogenesis of interstitial pneumonia .....	Kenji MIZUMURA et. al	15
Examination of the CDH-1 gene in lobular carcinoma of breast- A comparative study between digital PCR and Dual-FISH methods .....	TANG Xiaoyan et. al	18
Correlation between glycosyl transferase gene expression and poorer outcome in advanced lung adenocarcinoma .....	Yoko NAKANISHI et. al	22
Development of Pyrrole-imidazole Polyamide (PIP) Targeting Tumor Specific Fusion Gene .....	Kyoko FUJIWARA et. al	25
Development of anticancer drugs targeting the pancreatic cancer-stromal interaction .....	Makoto SANO et. al	29
Prognostic Relationship between Ischemia Evaluation with Nuclear Cardiology and SYNTAX score .....	Shunichi YODA et. al	31
Molecular epidemiology of viral gastroenteritis .....	Sheikh Ariful Hogue et. al	34
Research of mitochondrial disease and related disorders .....	Masahiko SUGITANI	39
Neuromodulation in functional neurosurgery .....	Takamitsu YAMAMOTO et. al	42
Effect of dedifferentiated fat cell transplantation in a mouse model of acute graft-versus-host disease .....	Takemi MURAI et. al	46
Development of new therapeutic strategy and investigation of the pathogenesis of severe immunological and allergic diseases .....	Yoshimichi OKAYAMA et. al	49
Cross-sectional genomic analysis study of human carcinogenesis .....	Mitsuhiko MORIYAMA et. al	54
About X-ray device newly installed at Medical research support center, Laboratory for animal experiments .....	Yoshiki TANIGUCHI et. al	63
The purpose and significance of working environment measurement by Medical research support center .....	Kazuhiro WATANABE et. al	68
The idea of taking part in several seminars about image preservation .....	Hiroko KUROE et. al	72
Lists of publication and results from Utilization in Medical Research Center .....		75

# 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<sup>1)</sup>, 布村 聡<sup>2)</sup>, 下川敏文<sup>1)</sup>, 高橋恭子<sup>3)</sup>,  
齋藤 修<sup>1)</sup>, 千島史尚<sup>1)</sup>, 山本樹生<sup>1)</sup>, 照井 正<sup>1)</sup>

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

Yoshimichi OKAYAMA<sup>1)</sup>, Satoshi NUNOMURA<sup>2)</sup>, Toshibumi SHIMOKAWA<sup>1)</sup>,  
Kyoko TAKAHASHI<sup>3)</sup>, Shu SAITO<sup>1)</sup>, Fumihisa CHISHIMA<sup>1)</sup>,  
Tatsuo YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Tadashi TERUI<sup>1)</sup>

### 要旨

慢性特発性蕁麻疹および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。重症の慢性特発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。関節リウマチ患者の病変滑膜マスト細胞はCOX1およびCOX2を変形性膝関節症患者の滑膜マスト細胞と比較して有意に高く発現している。IgG依存性刺激においてPGD<sub>2</sub>産生量は関節リウマチ患者マスト細胞の方が有意に高かった。miR-199a-3pとPTGS2の発現量の相関を調べたところ、変形性膝関節症患者マスト細胞では相関がなかったが、関節リウマチ患者マスト細胞では負の相関がみられた。これら遺伝子の発現増強はマスト細胞周囲の組織の微小環境によるのみだけでなく、エピジェネティックな変化もあると考えられた。さらに、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、ヒト関節滑膜のマスト細胞がIgG受容体を発現し、関節リウマチ (RA) 患者では、免疫複合体の刺激によってマスト細胞が多量のTNF- $\alpha$ を産生すること<sup>1)</sup>、重症の慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞がGタンパク共役型受容体のひとつであるMas-related gene X2 (MrgX2) を高く発現しており、神経ペプチドや好酸球顆粒タンパクをリガンドとしてヒスタミンを遊離することを報告した<sup>2)</sup>。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PGD<sub>2</sub>が産生される。そのPGD<sub>2</sub>がマスト細胞の

PGD<sub>2</sub>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報告した<sup>3)</sup>。この機構によって肺マスト細胞はMrgX2を発現することを見出した。すなわち、MrgX2の発現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考えられることから、今回我々は、疾患特異的マスト細胞のフェノタイプの解析としてRAおよび慢性特発性蕁麻疹患者のマスト細胞と脱落膜マスト細胞を用いて解析し、さらに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。

### 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

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



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<sup>4)</sup>。ヒト末梢血より単核球を分離し、単核球から lineage negative 細胞 (CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD16<sup>-</sup>, および CD19<sup>-</sup>細胞) を分離したのち、臍帯血では CD34<sup>+</sup>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<sup>5)</sup>、皮膚マスト細胞<sup>2)</sup> および脱落膜マスト細胞は、それぞれ滑膜組織、皮膚組織および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、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 (dT<sub>12-18</sub>) 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<sup>6)</sup>。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<sup>6)</sup>。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), 抗 chymase 抗体、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<sup>-6</sup>M) 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')<sub>2</sub> fragments (F(ab')<sub>2</sub>αFcγRI, 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')<sub>2</sub> fragments (F(ab')<sub>2</sub>mIgG1, Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA) で 30 分間刺激した。細胞を一度洗浄後 FcγRI を架橋させるため、抗マウス IgG F(ab')<sub>2</sub> fragments のヤギ F(ab')<sub>2</sub> fragments (gF(ab')<sub>2</sub>αmF(ab')<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 産生, サイトカイン産生測定：**ヒス

タミン遊離とPGD<sub>2</sub>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) 慢性特発性蕁麻疹

重症の慢性特発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<sup>2)</sup>。

##### 2) RA

RAと変形性膝関節症(OA)患者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。RA患者マスト細胞は*COX1*, *COX2*, *LTC4S*及び*TBXAS1*をOA患者のマスト細胞と比較して有意に高く発現していることを発見した(未発表)。Real-Time RT-PCRにてその結果を確認した。一方、prostaglandin E synthase (PTGES)の発現量は低く、有意差は見られなかった。造血型prostaglandin D synthaseであるH-PGDSの発現量を測定したが有意差は見られなかった。IgE依存性刺激において、PGD<sub>2</sub>産生量はRA患者マスト細胞の方が有意に高かった。一方、LTB<sub>4</sub>産生量はOA患者マスト細胞で高い傾向にあった。IgG依存性刺激においてPGD<sub>2</sub>産生量はRA患者マスト細胞の方が有意に高かった。したがって、OAおよびRA患者マスト細胞は、異なった性質を有していることが明らかになった。

##### 3) 脱落膜組織マスト細胞

脱落膜組織の蛍光免疫組織化学染色法による観察ではマスト細胞は、母体面に多く存在していた。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。脱落膜CD117<sup>+</sup>FcεRIα<sup>+</sup>マスト細胞のフェノタイプは、tryptaseとchymaseの両者の発現を認めMCrc typeであった。妊娠初期ヒト脱落膜からマスト細胞を分離し、SCFとIL-6を用いて12週間培養す

るとほぼ100%の純度のマスト細胞が得られた。脱落膜分離直後のマスト細胞および培養マスト細胞の両者でIgE依存性の刺激で脱顆粒が惹起された。また、両者のマスト細胞を電顕で観察したところ顆粒の形態は類似して格子型をしていた。GeneChipで両者を比較解析中である。

#### 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) 重症慢性特発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

皮膚マスト細胞に、substance P, histamine, dexamethasone, histamine receptor 1 antagonist及びhistamine receptor 2 antagonistを添加し、MrgX2の発現を検討したが明らかな変化はなかった。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。皮膚組織は、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共培養実験を施行したが、臍帯血由来培養マスト細胞におけるMrgX2発現は構成的に高く有意な発現上昇は見られず、細胞表面上のMrgX2の発現の低い末梢血由来培養マスト細胞を用いて、皮膚線維芽細胞の培養実験を開始した。

##### 2) RA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

RA患者線維芽細胞においてPTGS1, PTGS2, *TBXAS1*及び*LTC4S* mRNAの発現量はOA患者線維芽細胞と同程度であった。またOAおよびRA患者線維芽細胞培養上清中のPGD<sub>2</sub>量を測定したがEIA検出感度以下であった。マスト細胞の顆粒成熟や細胞表面分子の発現は、微小環境に存在する線維芽細胞に影響を受けることが報告されている。これらの報告から、RAとOA患者マスト細胞の脂質メディエーター合成酵素発現の違いは、病態局所の滑膜を構成する線維芽細胞に依存しているという仮説を立てた。その仮説を検証するために、OA患者由来培養マスト細胞とRA患者由来線維芽細胞を共培養した。マスト細胞と線維芽細胞間の相互作用によってPTGS1, PTGS2, *TBXAS1*および*LTC4S* mRNAの発現量に変化があるかどうかを調べた。OA患者マスト細胞をRA患者線維芽細胞と共培養しても

PTGS1, PTGS2, TBXAS1及びLTC4S mRNAの発現量に変化は見られなかったことから、両マスト細胞の性質の違いは、線維芽細胞に起因しないことが示唆された。次に、遺伝子発現を制御する因子として、miRNAが重要な役割を担っていることが知られている。OAとRA患者マスト細胞に発現量の差がみられた遺伝子群を制御するmiRNAの発現を解析するために、OA3ドナーとRA3ドナーを用いてmiRNA chip解析を行った。その結果、OA患者マスト細胞の方が、RA患者マスト細胞より3倍以上発現量が高いmiRNAを20個見出した。これら20個のmiRNAのうちPTGS2の発現制御に寄与するmiRNAはmiR-199a-3pであった。実際にmiR-199a-3pの発現に、RAおよびOA患者マスト細胞間で違いが見られるかを検証するために、15ドナーのOA患者マスト細胞と9ドナーのRA患者マスト細胞におけるmiR-199a-3pの発現を定量的RT-PCR法で比較した結果、OA患者マスト細胞の方が、miR-199a-3pの発現が高い傾向にあったが有意差を認めなかった。しかしながら、miR-199a-3pとPTGS2の発現量の相関を調べたところOA患者マスト細胞では相関がなかったが、RA患者マスト細胞では負の相関がみられた(図1)。関節液中のPGD<sub>2</sub>量は、RA患者の方が有意に高かったのに対し、PGE<sub>2</sub>量は両群間に有意な差は見られなかった。

### 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

#### 1) 重症慢性特発性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞のMrgX2の病態への関与の解析

MrgX2は、substance Pのみならず、好酸球顆粒タンパクの中のmajor basic proteinとeosinophil cationic proteinの受容体であることを発見した。すなわち、好酸球炎症の場においてもマスト細胞が活性化されることを示唆している。また、neuropeptideであるhemokinin-1がMrgX2のリガンドであり、マスト細胞の脱顆粒を惹起することを見出した。慢性特発性蕁麻疹患者の血清中にhemokinin-1は、検出された。すなわち、MrgX2は慢性特発性蕁麻疹患者のマスト細胞に高発現することにより、症状の増悪に深く関与していることが示唆された。

#### 2) RA患者の病変滑膜マスト細胞におけるCOX1, COX2, LTC4S及びTBXAS1の病態への関与の解析

Fc受容体を介する刺激でRA患者の滑膜マスト細胞が、より多量のPGD<sub>2</sub>を産生することがRAの病態にどのように関与しているのかを検討している。RA患者の滑膜組織でのPGD<sub>2</sub>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。実際に関節液中のPGD<sub>2</sub>量を測定すると、RA患者で有意に高いことが分かった。PGD<sub>2</sub>受容体およびPGD<sub>2</sub>合成酵素の欠損マウスを用いた研究からPGD<sub>2</sub>、特にHPGDS由来のPGD<sub>2</sub>は炎症の抑制効果を持つことが示されている。その機序としては①PGD<sub>2</sub>が樹状細胞表面のDP1を介して

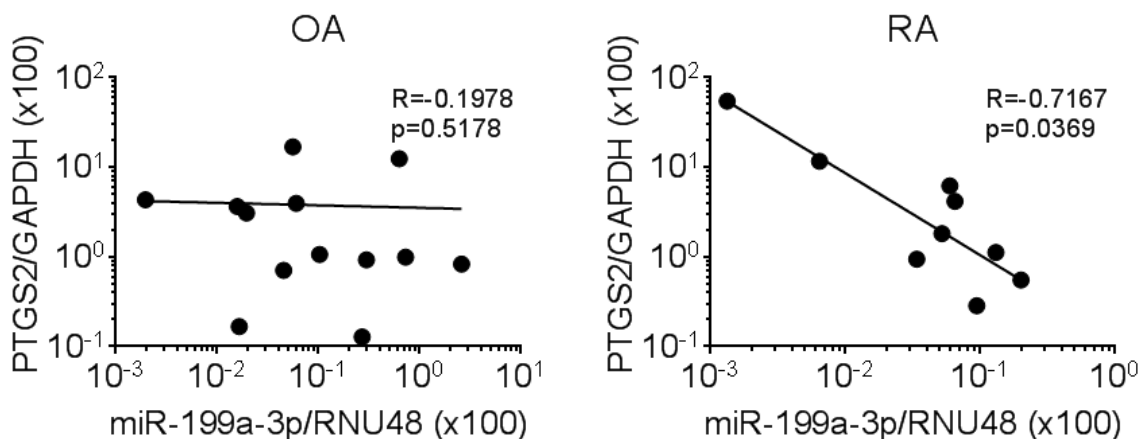


図1 OAとRA患者の滑膜マスト細胞におけるmiR-199a-3pとPTGS2発現量の相関

樹状細胞の遊走と機能を抑制し、結果としてT細胞機能を抑制すること、② PGD<sub>2</sub>の分解産物である15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) が peroxisomeproliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  依存性および非依存性の系を介して好中球の遊走を抑制することによって炎症を抑制すること、③ 炎症の際にT細胞とB細胞から産生されるIL-10を増加させ、マクロファージから産生される炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ を低下させることが示唆される。実際、関節炎マウスモデルにおいて、PGD<sub>2</sub>受容体の阻害薬、PGD<sub>2</sub>受容体欠損マウスを用いた報告からもPGD<sub>2</sub>は炎症抑制効果をもつことが示唆される。これらの報告と本研究の結果から、RA患者マスト細胞が免疫複合体の刺激によって過剰なPGD<sub>2</sub>を産生することにより、RAの炎症を抑制している可能性が示唆された。

#### 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た。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28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) 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 Fc $\gamma$  receptor I and Fc $\gamma$  receptor II. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):109-19.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Saito H, Kato A, Matsumoto K, Okayama Y. Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc.* 2006;1(4):2178-83.
- 5) Kan JI, Mishima S, Kashiwakura JI, Sasaki-Sakamoto T, Seki M, Saito S, et al. Interleukin-17A expression in human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Allergol Int.* 2016;65(Suppl):S11-16.
- 6) 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 Fc $\epsilon$ RI. *Blood.* 2003;102(7):2547-54.



## 結核を中心とした感染制御のための 新規ワクチン開発と免疫学的評価

相澤 (小峯) 志保子<sup>1)</sup>, 中西照幸<sup>2)</sup>, 早川 智<sup>1)</sup>, 江角眞理子<sup>1)</sup>, 須崎 愛<sup>1)</sup>, 本多三男<sup>1)</sup>

### Novel vaccine development and evaluation of immune responses for mycobacterial infection

Shihoko Komine-AIZAWA<sup>1)</sup>, Teruyuki NAKANISHI<sup>2)</sup>, Satoshi HAYAKAWA<sup>1)</sup>,  
Mariko ESUMI<sup>1)</sup>, Ai SUZAKI<sup>1)</sup>, Mitsuo HONDA<sup>1)</sup>

#### 要旨

結核の防御におけるBCGワクチンの限界が示唆されており、より効果的な結核ワクチンの開発・実用化が待たれている。さらに非結核性抗酸菌症の増加が問題になっている。我々は、抗原特異的細胞傷害性CD8陽性エフェクターT細胞を誘導させることを目的に、BCGに*Mycobacterium kansasii*のAg85Bを発現させた新規組換えBCGワクチン(rBCG85B)を作成し、マウスにおける免疫応答の解析を行った。さらに、rBCG85B免疫マウスに結核菌を感染させて結核防御能を解析した。その結果、BALB/c(H2<sup>d</sup>)マウスにおいて、結核菌由来のAg85Bに対する抗原特異的CD8陽性エフェクターT細胞を誘導する新規エピトープを発見した。*M.kansasii*, *M. leprae*由来のAg85BのCD8エピトープでも同様にCD8陽性エフェクターT細胞が誘導された。結核菌感染実験においては、rBCG85B/DNA85B免疫は、BCG免疫よりも臓器内の生菌数を低く抑えられた。rBCG85B/DNA85Bは効率よく結核特異的CD8エフェクター細胞を誘導できるため、新規結核ワクチンの有力な候補となりうる。さらに非結核性抗酸菌やらい菌のワクチンとしても有効である可能性が示唆された。

#### 1. はじめに

結核、HIV/AIDS、マラリアは三大感染症と称され、早急な国境を超えた対策が必要とされている。なかでも、結核は空気感染するため、感染防御対策が重要である。結核に対する唯一のワクチンであるBCGは、20世紀の初頭から、全世界で使用されており、安全性が高く、安価で安定供給できる。しかし、BCGは小児の結核の重症化予防には効果的であるが、成人においては十分な結核発症予防効果がないといわれている<sup>1), 2)</sup>。したがって、より効果的な結核ワクチン開発が求められており、多くの新規結核ワクチン開発が進められているが、実用化には至っていない<sup>3), 4)</sup>。結核菌は細胞内寄生菌であるため、有効な結核防御には特異的細胞性免疫の誘導が重要である<sup>5)</sup>。我々は、現行のBCGワクチンは結核特異的CD4陽性ヘルパーT細胞を誘導するが、CD8陽性細胞傷害性T細胞は誘導しないことを明ら

かにした。すなわち、既存のBCGは結核特異的CD8陽性細胞傷害性T細胞の誘導が不十分である可能性がある。そこで、効率の良い細胞性免疫誘導を目指して、結核菌が感染後早期に生体内で大量に分泌するタンパク質の一つであるAg85Bを標的抗原として、組換えBCGワクチン(rBCG85B)を開発した。本研究ではマウスモデルを用いて、このワクチンの有効性と感染防御機構の解析を行った。また、近年結核に類似の症状を呈する非結核性抗酸菌症患者が、日本を含む世界各国で増加している。Ag85Bはさまざまな抗酸菌に共通する分泌タンパクであるため、この組換えBCGワクチンの非結核性抗酸菌症予防への応用もあわせて検討した。

#### 2. 対象及び方法

##### マウス

BALB/c, C57BL/6J マウスをチャールズリバーか

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

相澤 (小峯) 志保子 : aizawa.shihoko@nihon-u.ac.jp

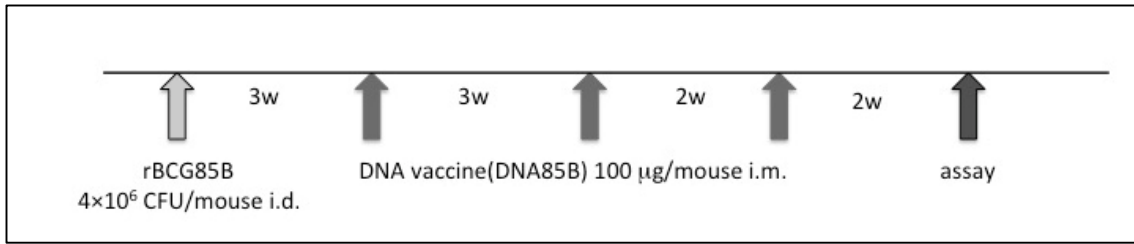


図 1 免疫スケジュール

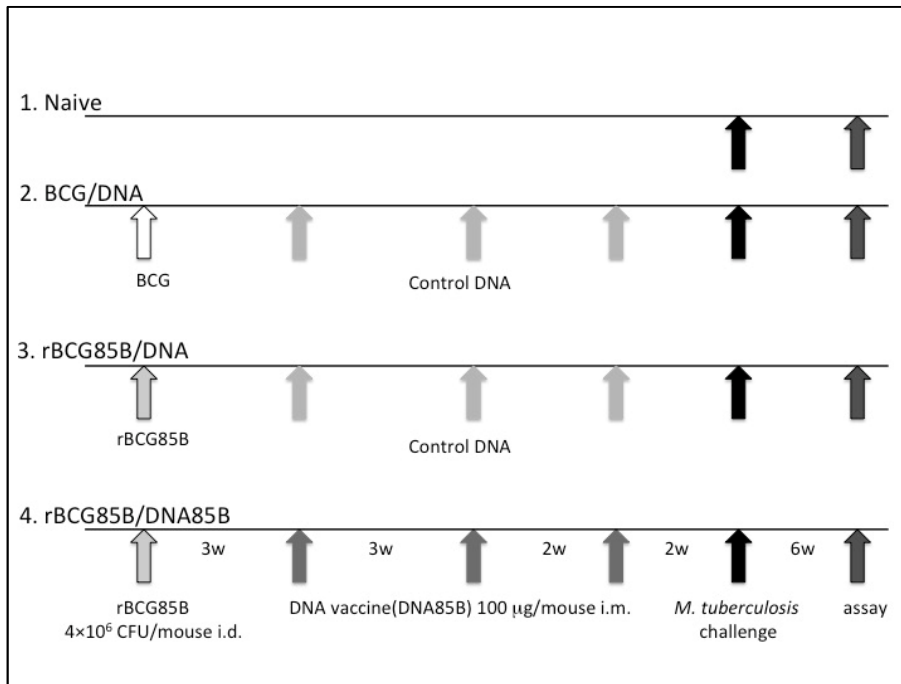


図 2 結核菌噴霧感染実験スケジュール

ら購入した。BALB/cとC57BL/6JのF1世代であるCB6F1/slcマウスを日本SLCより購入した。動物実験は日本大学動物実験委員会の承認を得て行った。

### エピトープマッピング

新規組換えBCGワクチン(rBCG85B)をマウス(C57BL/6J, BALB/c, CB6F1/slc)に接種し, Ag85BのDNAワクチン(DNA85B)を3回ブースト接種した(図1)。

最終接種の2週間後に解剖し, 脾細胞を*in vitro*にて結核抗原で刺激し, CD4陽性T細胞, CD8陽性T細胞それぞれが産生するサイトカイン(TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2など)をフローサイトメトリーで測定した。MHCのハプロタイプが異なる2つの系統のマウスで, *M.tuberculosis* Ag85B (*Mtb*85B)特異的T細胞の誘導が異なることが明らかとなった。すなわち,

C57BL/6J (H2<sup>b</sup>)では*Mtb*85B特異的CD4T細胞が誘導され, BALB/c (H2<sup>d</sup>)では*Mtb*85B特異的CD8T細胞が誘導された。そこで, オーバーラッピングペプチドを用いてエピトープマッピングを行い, CD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞それぞれの特異的な機能性エピトープを同定した。さらに, マウスのMHCクラスI分子にはH-2D, H-2K, H-2Lのサブクラスが存在するためこれらを発現させた細胞株と, blocking antibodyを用いて, 抗原提示に使用されているサブクラスを明らかにした。また, C57BL/6JとBALB/cのF1マウス(CB6F1/slc, H2<sup>b/d</sup>)でも同様に検討した。

### rBCG85Bの結核感染防御能の評価

マウス(C57BL/6J, BALB/c, CB6F1/slc)を①BCG接種群, ②rBCG85B単独接種群, ③rBCG85B/

DNA85B ワクチン群, ④対照群の4グループにわけた。rBCG85B/DNA85B ワクチン群ではrBCG85B ワクチン接種3週間後から booster としてDNA85B ワクチンを2週間隔で3回接種した。BCG ワクチン接種群とrBCG85B ワクチン単独接種群ではBCG ワクチン接種もしくはrBCG85B ワクチン接種3週間後からコントロールDNAを2週間隔で3回接種した。最終の接種から2週間後に結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* Erdman 株を噴霧感染させた。6週間後に解剖し、肺、脾臓をホモジナイズし、小川培地、もしくは7H10培地で培養し組織中の生菌数を検出した (図2)。本研究は日本BCG研究所、結核研究所との共同研究にて行った。

### rBCG85B の非結核抗酸菌症予防への応用

rBCG85B をマウス (C57BL/6J, BALB/c, CB6F1/slc) に接種し、DNA85B ワクチンを3回ブースト接種した (図1)。最終接種の2週間後に解剖し、脾細胞を *in vitro* にて *M.kansasii*, *M.leprae* 由来のエピトープペプチドで刺激しCD4陽性T細胞, CD8陽性T細胞それぞれが産生するサイトカイン (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2) をフローサイトメトリーで測定した。

## 3. 結果

### 3.1 新規組換え BCG ワクチン (rBCG85B) により誘導される免疫能の解析・エピトープマッピング

rBCG85B をMHCハプロタイプの異なるBALB/c (H2<sup>d</sup>) とC57BL/6J (H2<sup>b</sup>) に接種し免疫応答を解析した。rBCG85B もしくはBCG接種3週間後から booster としてDNA85B ワクチン, もしくはコントロールDNAを2週間隔で3回接種した。最終の接種から2週間後に脾細胞を *in vitro* において *Mtb85B* のプールペプチドで刺激し, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2を産生するCD4陽性T細胞, CD8陽性T細胞をフローサイトメトリーで検出した (細胞内サイトカイン染色)。なお, 2種類以上のサイトカインを産生するT細胞を polyfunctional effector T細胞とした。既存のBCG接種では, *Mtb85* 特異的 polyfunctional CD8陽性 effector T細胞は検出されなかった。一方, rBCG85B接種ではBALB/cにおいて *Mtb85* 特異的な polyfunctional CD8陽性 T effector細胞の誘導がみられた。一方, C57BL/6Jにおいては *Mtb85* 特異的な polyfunctional CD8陽性 T effector細胞が誘導されなかつ

た。次に, それぞれのマウスの系統においてエピトープマッピングを行った。その結果, C57BL/6Jにおける polyfunctional CD4陽性 effector T細胞を誘導するエピトープを見出し, 既知のCD4エピトープ (P25) と同一であることを確認した。しかし, BALB/cではこのCD4エピトープペプチド刺激による polyfunctional CD4陽性 effector T細胞の誘導はみられなかった。一方, BALB/cにおいては polyfunctional CD8陽性 effector T細胞を誘導可能である新規のエピトープを発見した。しかし, C57BL/6Jにおいては, このエピトープによるCD8陽性T細胞の誘導はみられなかった。したがって, これらのエピトープはH2ハプロタイプに拘束されていると考えられる。そこで, これらのマウスのF1世代であるCB6F1/slc (H2<sup>b/d</sup>) の免疫応答を同様に解析したところ, CD4, CD8共に *Mtb85* 特異的な polyfunctional effector T細胞が誘導された。特に, polyfunctional CD8陽性 effector T細胞に関しては, BALB/cよりも強い誘導がみられた。この結果から, 新規組換えBCGワクチンであるrBCG85Bは, 既存のBCGに比べて効率よく結核菌特異的細胞傷害性T細胞を誘導できることが明らかとなった。また, 抗原特異的CD8細胞の強い誘導には, 同一の抗原特異的CD4陽性ヘルパーT細胞の存在が重要であることが示唆された。

次に, マウスのH2 (MHCクラスI分子) にはH2-D, H2-K, H2-Lのサブクラスが存在するため, これらを発現させた細胞, もしくは blocking antibodyを用いて, 抗原提示に使用されているMHCクラスIのサブクラスを調べた。C57BL/6J由来の細胞 (H2<sup>b</sup>) であるC1498細胞株にH2-D<sup>d</sup>, H2-K<sup>d</sup>, H2-L<sup>d</sup>を発現させた細胞 (米国NIH Marglies博士より分与いただいた) にそれぞれCD8 エピトープペプチドを加え2時間培養した後洗浄し, rBCG85B / DNA85B を接種したBALB/cもしくはCB6F1/slcマウスの脾細胞を刺激した。その結果, H2-K<sup>d</sup> + CD8 エピトープペプチドで刺激した場合のみ, CD8陽性T細胞中にサイトカイン産生細胞を認めた。一方, H-2D<sup>d</sup>, H-2D<sup>d</sup>+H-2K<sup>d</sup>, H-2L<sup>d</sup>の blocking antibody存在下にrBCG85B/DNA85Bを接種したBALB/c, もしくはCB6F1/slcマウスの脾細胞をCD8エピトープペプチドで刺激した場合には, anti-H-2D<sup>d</sup>+H-2K<sup>d</sup> antibodyを加えた場合のみCD8陽性T細胞中のサイト

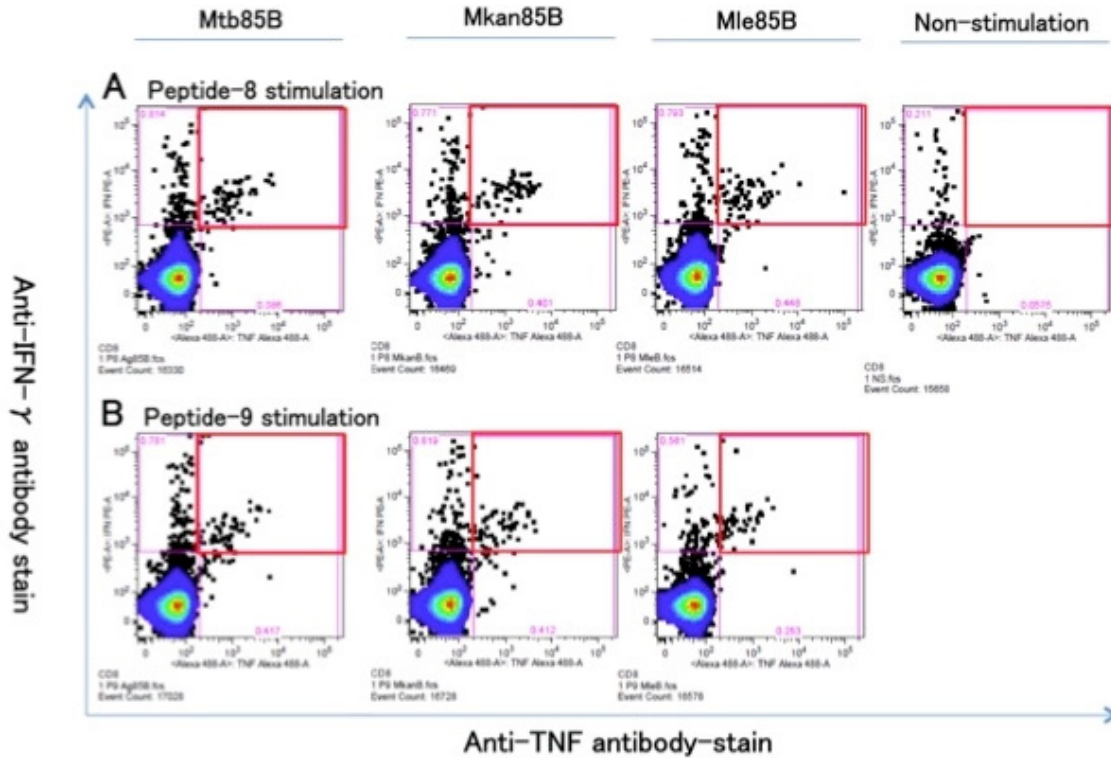


図3 rBCG85B/DNA85B免疫により *M.kansasii* 由来、*M.leaprae* 由来のAg85B特異的polyfunctional CD8陽性T細胞が誘導された

カイン産生細胞がみられなくなった。以上の結果から、我々が発見したCD8エピトープペプチドはH2-K<sup>d</sup>に抗原提示されることが明らかになった。

### 3.2 rBCG85Bの結核感染防御能の評価

マウス (C57BL/6J, BALB/c, CB6F1/slc) を①BCG接種群, ②rBCG85B単独接種群, ③rBCG85B/DNA85Bワクチン群, ④対照群の4グループにわけ、それぞれ免疫した。最終の接種から2週間後に結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* Erdman株を噴霧感染させた。6週間後に解剖し、肺、脾臓内の生菌数を検出した。全てのマウスの系統において、対照群よりもBCGワクチン接種群の組織内生菌数が抑えられた。BALB/cマウスとCB6F1/slcマウスにおいては、BCGワクチン接種群よりもrBCG85Bワクチン単独接種群とrBCG85B/DNA85Bワクチン群での組織内生菌数が低く抑えられた。BALB/cマウスではrBCG85Bワクチン単独接種群よりもrBCG85B/DNA85Bワクチン群でさらに組織内生菌数が低下した。一方、CB6F1/slcマウスではrBCG85Bワクチン単独接種でもrBCG85B/DNA85Bワクチン群

と同程度 ( $10^3$ CFU/lung程度) まで組織内生菌数が低下した。C57BL/6JマウスではBCGに対してrBCG85B/DNA85Bの優位性がみられなかった。この結果から、結核感染防御には結核菌特異的CD8陽性細胞傷害性T細胞とCD4陽性ヘルパーT細胞の両方が重要であること、rBCG-Ag85Bワクチンは既存のBCGワクチンに比較して、結核感染予防に優れていることが明らかになった。

### 3.3 rBCG85Bの非結核性抗酸菌症予防への応用

Ag85Bはさまざまな抗酸菌に共通する分泌タンパクであるが、菌種ごとにアミノ酸配列に多少の相違がみられる。我々が作成したrBCG85Bワクチンは *M.bovis* BCGに *M.kansasii* のAg85Bのプラスミドを組み込んでいるため、*M.bovis* BCGのAg85Bと *M.kansasii* のAg85Bを共に発現する系である。結核菌 *M.tuberculosis*と *M.bovis* のAg85Bのアミノ酸配列は、ほぼ同一であるが、*M.kansasii* のAg85Bとは89%程度の一致率である。一方、国内で多くみられる非結核性抗酸菌症の原因菌である *M.avium*, *M.intracellulare* の配列は *M.kansasii* とほぼ一致する。我々が



新規に発見したCD8エピトープの部分をも、*M. kansasii*の配列と比較すると、*M. tuberculosis*と*M. bovis*では2カ所の相違（前後入れ替わり）がみられたが、*M. avium*, *M. intracellulare*とは100%一致した。また、ハンセン病の原因菌であるらい菌*M. leprae*とでは1カ所の相違であった。そこで、rBCG85B/DNA85Bを接種したCB6F1/slcマウスの脾細胞を*M. tuberculosis*と*M. kansasii*, *M. leprae*のAg85B配列によるCD8エピトープペプチドでin vitroにて刺激し、細胞内サイトカイン産生をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、全てのAg85Bのエピトープペプチドで同様にpolyfunctional CD8 effector T細胞が誘導された（図3）。この結果から、rBCG85B/DNA85Bは結核菌のみならず、近年患者数の増加がみられている種々の非結核性抗酸菌症やらい菌のワクチンとしても有効である可能性が示唆された。

#### 4. 考 察

生体内に感染した結核菌の排除には免疫系が十分に働くことが重要である。細胞傷害性T細胞は結核菌に感染した細胞をperforinやgranzymesなどの細胞傷害性顆粒、またはFas-FasLの経路やTNFなどにより、apoptosisに陥らせる。apoptosisの状態になった感染細胞が未感染マクロファージに貪食されることにより、生体内から結核菌の排除が進む<sup>5)</sup>。抗原特異的CD8陽性細胞傷害性T細胞を誘導するためには、MHC class Iへの抗原提示、すなわち樹状細胞におけるクロスプレゼンテーションによる抗原提示が必要である。しかし、BCGは樹状細胞に貪食されても、クロスプレゼンテーションされにくいことが知られている<sup>2)</sup>。そのため、BCG免疫では抗原特異的CD4陽性ヘルパーT細胞は誘導可能であるが、CD8陽性細胞傷害性T細胞の誘導は弱いと考えられる。これまでも細胞傷害性T細胞を有効に誘導するワクチンを目指して、Ag85BをBCGに組み込むことにより、新たなワクチンを作成する試みがなされてきた<sup>3), 6), 7)</sup>。これらのワクチンは*M. tuberculosis*のAg85Bを単独で、あるいはAg85AやTB10.3などの他の抗原と同時にBCGに組み込む構造になっている。Ag85Bは抗酸菌で広く保存されており生体内で結核菌が感染早期に大量に産生し分泌するタンパクの一つであるが<sup>8)</sup>、*M. tuberculosis*と*M. bovis* BCG

のAg85Bのアミノ酸配列は相同で、*M. kansasii*の配列との相同性は89%である<sup>9), 10)</sup>。我々は、*M. kansasii*のAg85BをBCGに組み込んでrBCG85Bを作成した。rBCG85BはBCG自身のAg85Bに加えて、組み込んだ*M. kansasii*のAg85Bを大量に産生・分泌することを確認した。rBCG85Bに加えてAg85Bの遺伝子をコードしたプラスミドDNAをDNAワクチンとして追加接種することで、既存のBCGでは誘導が不十分であったMtb85B特異的polyfunctional CD8陽性T細胞を誘導可能であった。さらに2つのCD8エピトープを同定した。これらのエピトープは種々の抗酸菌で1~2アミノ酸の違いがあるが、結核菌と*M. kansasii*由来の配列のエピトープに加えて、らい菌由来の配列でも有効なCD8陽性T細胞エピトープとして機能した。近年、非結核性抗酸菌症患者が増加しているが、*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. ulcerans*などの非結核抗酸菌のエピトープ部分の配列は*M. kansasii*と相同である。したがって、rBCG85B/DNA85Bワクチンは結核のみならず、非結核性抗酸菌症やハンセン病の予防にも有効である可能性がある。

我々が新たに発見したCD8エピトープは、H2-K<sup>d</sup>に拘束されることが明らかになった。Ag85Bの既知のCD4エピトープ (P25) はH2<sup>b</sup>に拘束されることが報告されている<sup>11, 12)</sup>。そこで、BALB/c (H2<sup>d</sup>)とC57BL/6J (H2<sup>b</sup>)のF1世代のマウスであるCB6F1/slc (H2<sup>b/d</sup>)を用いて実験を行った。CB6F1/slcマウスでは、Ag85B特異的CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞が共に誘導された。興味深いことにAg85B特異的CD4陽性T細胞の誘導はC57BL/6マウスと同程度であったのに対し、BALB/cに比較して6倍程度のAg85B特異的CD8陽性T細胞が誘導された。このことから、細胞傷害性T細胞の誘導には、同一抗原を認識するヘルパーT細胞の存在が重要であることが示唆された。

結核菌感染実験においては、既存のBCGに比較してrBCG85B/DNA85B免疫は肺内の生菌数が低く抑えられた。これは、rBCG85B/DNA85B免疫によるMtb85B特異的CD8陽性細胞傷害性T細胞の誘導によるものと考えられる。

今後はrBCG85BとDNA85Bの接種量、接種から感染までの期間などについても検討を進める予定である。さらに、ヒトにおけるMHC (HLA)とマウス

のH2には対応がみられないので、ヒトにおいても我々が発見したエピトープが機能するか検討が必要である。

## 5. 結語

rBCG85B/DNA85B免疫は結核由来Ag85B特異的CD8陽性細胞傷害性T細胞を誘導可能であり、既存のBCGよりも優れた結核防御能を示した。rBCG85B/DNA85B免疫は新規結核ワクチンの有力な候補となりうる。さらに非結核性抗酸菌やらい菌のワクチンとしても有効である可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究の成果は、平成28年度日本大学学術研究助成金(総合研究)、JSPS科研費16K09946の支援によりなされたものであり、ここに深謝いたします。

## 文献

- 1) Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog* 2012;8:e1002607.
- 2) Ryan AA, Nambiar JK, Wozniak TM, et al. Antigen load governs the differential priming of CD8 T cells in response to the bacille Calmette Guerin vaccine or *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2009;182:7172-7.
- 3) Horwitz MA, Harth G. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 2003;71:1672-9.
- 4) Kaufmann SH, Weiner J, von Reyn CF. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *Int J Infect Dis* 2017;56:263-7.
- 5) Nunes-Alves C, Booty MG, Carpenter SM, Jayaraman P, Rothchild AC, Behar SM. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nat Rev Microbiol* 2014;12:289-99.
- 6) Radosevic K, Wieland CW, Rodriguez A, et al. Protective immune responses to a recombinant adenovirus type 35 tuberculosis vaccine in two mouse strains: CD4 and CD8 T-cell epitope mapping and role of gamma interferon. *Infect Immun* 2007;75:4105-15.
- 7) D'Souza S, Rosseels V, Romano M, et al. Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2003;71:483-93.
- 8) Karbalaee Zadeh Babaki M, Soleimanpour S, Rezaee SA. Antigen 85 complex as a powerful *Mycobacterium tuberculosis* immunogene: Biology, immunopathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design. *Microb Pathog* 2017;112:20-9.
- 9) Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Yamada T. Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular alpha antigen. *J Bacteriol* 1988;170:3847-54.
- 10) Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Terasaka K, Yamada T. Cloning and expression of the gene for the cross-reactive alpha antigen of *Mycobacterium kansasii*. *Infect Immun* 1990;58:550-6.
- 11) Tamura T, Ariga H, Kinashi T, et al. The role of antigenic peptide in CD4+ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int Immunol* 2004;16:1691-9.
- 12) Kariyone A, Higuchi K, Yamamoto S, et al. Identification of amino acid residues of the T-cell epitope of *Mycobacterium tuberculosis* alpha antigen critical for Vbeta11(+) Th1 cells. *Infect Immun* 1999;67:4312-9.

# 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを用いた 感覚ニューロンの解析

吉川雅朗<sup>1)</sup>, 松川 睦<sup>1)</sup>, 大島秀規<sup>2)</sup>, 相澤 信<sup>1)</sup>

## Analysis of sensory neurons in ALS model mice

Masaaki YOSHIKAWA<sup>1)</sup>, Mutsumi MATSUKAWA<sup>1)</sup>, Hideki OSHIMA<sup>2)</sup>, Shin AIZAWA<sup>1)</sup>

### 要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動ニューロンが選択的に障害される疾患であるが、近年の報告から感覚系の障害が示唆されている。そこで、本研究ではALSモデルマウスを用いて、感覚ニューロンの変化を調べた。発症後と発症前のALSモデルマウスから脊髄神経節(DRG)を摘出し、RNAシーケンス解析を行った結果、神経損傷により発現が誘導されるATF3(発症後)とVIP(発症前)の発現上昇が示された。また、固有感覚ニューロンマーカーであるparvalbumin(発症後)と侵害受容ニューロンマーカーであるMrgpra4,6(発症前)の発現が低下していた。以上から、ALSモデルマウスにおいて、運動ニューロンだけでなく感覚ニューロンも障害されており、感覚ニューロンのサブタイプにより障害のされ方が異なる可能性が示唆された。

### 1. 背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動ニューロンが徐々に変性していくために筋肉の萎縮と筋力の低下を引き起こす神経変性疾患であり、その原因はほとんど分かっていない(Vinsant et al., 2013a)。ALSでは感覚障害がみられることはまれであることから、病態の主軸から外れる感覚系は、研究対象として取り上げられることはほとんどなかった。しかし、近年一部の症例で感覚障害を伴うことや、疼痛を経験する患者が多数存在することが報告されている(Iglesias et al., 2015)。また、モデル動物の解析で感覚神経線維の異常や感覚ニューロンのミトコンドリアの異常があるとの報告もある(Guo et al., 2009)。ALSは運動ニューロンを選択的に障害する疾患であるが、上記のように感覚系も障害されていると考えられる。しかしながら、これまでのモデル動物の解析は、感覚ニューロンの一般的なマーカーを用いた大まかなものであり、ニューロン数が有意に減少していないことは確認できるものの、その内

訳が変化しているかは不明である。そこで、本研究ではALSモデルマウスを用いて、感覚ニューロンの変化を詳細に調べた。

### 2. 方法

ALSモデルマウスであるG93A変異*SOD1*遺伝子組換えマウス(*SOD1G93A*マウス)は、生後90日(P90)付近で発症し、P140までに死亡する。本研究では発症後(P120)と発症前(P30)の野生型および*SOD1G93A*マウスを実験に用いた。なお、本研究は日本大学動物実験委員会の承認を得て行った。

イソフルランによる深麻酔下で、下肢領域の皮膚や筋に分布する腰髄レベルの脊髄神経節(DRG)を摘出し、RNAiso(タカラバイオ)に入れ凍結させた。RNAを抽出し、つくばi-Laboratory LLPにてRNAシーケンス(RNA-seq)を実施した(Morito et al., 2018)。その後、トランスクリプトーム解析を行った。

<sup>1)</sup> 日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野  
<sup>2)</sup> 日本大学医学部脳神経外科学系神経外科学分野  
吉川雅朗: yoshikawa.masaaki@nihon-u.ac.jp

表1 ALS発症後のDRGで発現上昇または低下した代表的な遺伝子

シンボル	遺伝子名	発現変動率
発現上昇		
Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb	65.83
Atf3	activating transcription factor 3	10.52
Apod	apolipoprotein D	2.98
発現低下		
Pvalb	parvalbumin	-12.63
Mal	myelin and lymphocyte protein, T cell differentiation protein	-2.32
Pmp22	peripheral myelin protein 22	-2.11

表2 ALS発症前のDRGで発現上昇または低下した代表的な遺伝子

シンボル	遺伝子名	発現変動率
発現上昇		
Vip	Vasoactive intestinal peptide	81.11
Trpc7	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 7	10.52
Hspb7	heat shock protein family B, member 7	2.98
発現低下		
Mrgpra6	Mas-related G-protein coupled receptor, member A6	-19.03
Mrgpra4	Mas-related G-protein coupled receptor, member A4	-4.46
Esr2	estrogen receptor 2 (ER beta)	-2.46

### 3. 結果

RNA-seqの解析により、発症後（P120）と発症前（P30）のDRGにおける発現変動遺伝子を同定した。発症後のDRGにおいて、細胞死を抑制し神経保護作用のあるGpnmbと神経損傷によって発現が誘導されるATF3の発現が上昇し、固有感覚ニューロンマーカーであるparvalbuminと細胞死に関わるMal, Pmp22の発現が低下した（表1）。発症前のDRGにおいて、神経損傷によって発現が誘導され神経保護作用のあるVIPの発現が上昇し、侵害受容ニューロンマーカーであるMrgpra4, Mrgpra6, Esr2の発現が低下していた（表2）。

### 4. 考察

本研究ではRNA-seqを用いて、ALS発症後と発症前のDRGにおける遺伝子発現の変化を明らかにした。ALS発症後、固有感覚ニューロンのマーカーparvalbuminの発現が低下していた。脊髄運動ニューロン死が起こっていることから、それに伴い固有感覚の神経回路にも異常が起こっていると考え

られる。また、細胞死や神経保護に関する因子（Gpnmb, ATF3, Mal, Pmp22）の発現変動が見られることから、他の感覚ニューロンも障害が起こっていることが示唆される。発症前のP30では運動ニューロンのミトコンドリアに異常が見られ、一部の速筋で脱神経が起こっているが（Vinsant et al., 2013b）、感覚ニューロンの異常は報告されていない。ALSでは異常が見られないとされている皮膚感覚、とくに侵害受容に関わる因子（Mrgpra4, Mrgpra6, Esr2）に変化が見られた。これらの因子は侵害受容ニューロンのサブグループであるため、ごく一部の感覚に異常が起こると予想される。また、神経保護作用のあるVIPの発現が上昇していることから、感覚ニューロンが運動ニューロンに比べて障害を受けにくい理由のひとつであると示唆される。

### 5. 結語

次世代シーケンサーを用いて、ALSモデルマウスの感覚神経節のトランスクリプトーム解析を行った。RNA-seqによる遺伝子発現解析の結果から、感



覚系も変異SOD1の影響を受け、多数の遺伝子発現に変化が起こることが明らかになった。今後、本研究で得られた発現変動遺伝子を詳細に解析することで、障害のされ方が異なる感覚ニューロンの特性が明らかになれば、ALSの病態を理解する上で新たな方向性を提案できるものと考ええる。

## 文 献

- 1) Guo YS, Wu DX, Wu HR, Wu SY, Yang C, Li B, Bu H, Zhang YS, Li CY. (2009) Sensory involvement in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Mol Med*. 41: 140 – 150.
- 2) Iglesias C, Sangari S, El Mendili MM, Benali H, Marchand-Pauvert V, Pradat PF. (2015) Electrophysiological and spinal imaging evidences for sensory dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open*. 5: e007659.
- 3) Morito N, Yoh K, Usui T, Oishi H, Ojima M, Fujita A, Koshida R, Shawki HH, Hamada M, Muratani M, Yamagata K, Takahashi S. (2018) Transcription factor MafB may play an important role in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 93: 54 – 68.
- 4) Sábado J, Casanovas A, Tarabal O, Hereu M, Piedrafita L, Calderó J, Esquerda JE. (2014) Accumulation of misfolded SOD1 in dorsal root ganglion degenerating proprioceptive sensory neurons of transgenic mice with amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int*. 2014: 852163.
- 5) Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Del Gaizo Moore V, Yoshikawa M, Hampton TG, Prevette D, Caress J, Oppenheim RW and Milligan C. (2013a) Characterization of early pathogenesis in the SOD1G93A mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain Behav*. 4: 335 – 350.
- 6) Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Del Gaizo Moore V, Yoshikawa M, Hampton TG, Prevette D, Caress J, Oppenheim RW and Milligan C. (2013b) Characterization of early pathogenesis in the SOD1G93A mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav*. 4: 431 – 457.

# 間質性肺炎の病態形成におけるネクロプトーシスの役割

水村賢司<sup>1)</sup>, 権 寧博<sup>1)</sup>, 黒田和道<sup>2)</sup>

## The role of necroptosis in the pathogenesis of interstitial pneumonia

Kenji MIZUMURA<sup>1)</sup>, Yasuhiro GON<sup>1)</sup>, Kazumichi KURODA<sup>2)</sup>

### 要旨

間質性肺炎の本体は胞隔炎であり、胞隔炎が線維化に至る過程は細胞死を主体とする肺上皮細胞の損傷に始まると考えられている。しかし、間質性肺炎の病態生理は不明な点が多く、治療効果は不十分である。今回、我々は、ネクロプトーシスという新規プログラム細胞死の間質性肺炎への関与を検討した。間質性肺炎を引き起こす要因の一つは喫煙と考えられているが、タバコ煙抽出液による肺上皮細胞死は、ネクロプトーシス阻害薬で抑制され、タバコ煙による肺上皮細胞死はネクロプトーシスで制御されている可能性が示唆された。また、タバコ煙暴露を行ったマウスの肺では、ネクロプトーシス関連蛋白である Receptor-interacting protein kinase 3 (RIP3) の発現増強が観察され、生体内でもタバコ煙によるネクロプトーシスの活性化の可能性が示された。本研究により、新規プログラム細胞死であるネクロプトーシスが、間質性肺炎の病態形成に関与していることが示唆された。今後は、ネクロプトーシスの肺線維化への影響についても検討していく予定である。

### 1. はじめに

間質性肺炎の本体は胞隔炎であり、胞隔炎が線維化に至る過程は細胞死を主体とする肺上皮細胞の損傷に始まると考えられている。しかし、間質性肺炎の病態生理は不明な点が多く、また、治療効果は不十分である。間質性肺炎の発端となる肺上皮細胞の細胞死は、アポトーシスについての検討は行われているが、他の新規プログラム細胞死については十分な検討が行われていない。

ネクローシスは長い間、「偶発的な細胞死」とされ、特異的な分子細胞学的イベントは必要ないと考えられてきた。しかし、最近となり RIP1 と RIP3 とよばれるキナーゼの活性依存的に誘導されるカスパーゼ非依存性のプログラムネクローシス（以降、ネクロプトーシス）が報告され、心筋梗塞や炎症性腸疾患など様々な病気の病態生理に関与していることが明らかとなってきた<sup>1)</sup>。間質性肺炎は、肺の慢

性炎症を特徴としているが、アポトーシスは DAMPs (damage-associated molecular patterns) を放出しない、非炎症性の細胞死である。一方、ネクロプトーシスは、DAMPs を放出する炎症性の細胞死であることが知られている<sup>2)</sup>。今回、我々は炎症性プログラム細胞死であるネクロプトーシスに着目し、間質性肺炎の病態形成への関与について検討を行った。

### 2. 対象および方法

#### 1) 細胞死実験

肺上皮細胞株 (BEAS-2B) をネクローシス阻害薬である Necrox-5 (Nex-5; Enzo Life Sciences) とネクロプトーシス阻害薬である Necrostatin-1 (Nec-1; Enzo Life Sciences) で1時間前処理後、タバコ煙抽出液処理を行った。生細胞と死細胞の決定は、LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular

1) 日本大学医学部内科学系呼吸器内科学分野

2) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

水村賢司: mizumura.kenji@nihon-u.ac.jp

Probes) を用いた。生細胞の染色は、生細胞の細胞膜を透過し、生細胞が持つ細胞内エステラーゼによって加水分解され、細胞膜不透過性の緑色蛍光物質カルセイン(最大蛍光波長: 515 nm)を生じるカルセイン-AMで、死細胞の染色は、死細胞の膜損傷部分から透過し、核内のDNAに入り込んで赤色蛍光(620 nm)を発するエチジウムホモダイマーで行った。フローサイトメトリーは、FACS Canto II (BD Biosciences) で測定し、FlowJo analytical software (Tree Star Inc.) で解析を行った。

## 2) タバコ煙暴露マウス

12-15 週齢の C57BL/6J マウスを用いた。全身タバコ煙暴露装置を用い、1日2時間、週5日、それぞれ3週間、3ヶ月間、6ヶ月間暴露を行った。肺組織を採取し、組織抽出液をウェスタンブロット法で解析した。抗体は、rabbit antibody against mouse RIP3 (AHP1797; AbD Serotec) を使用した。

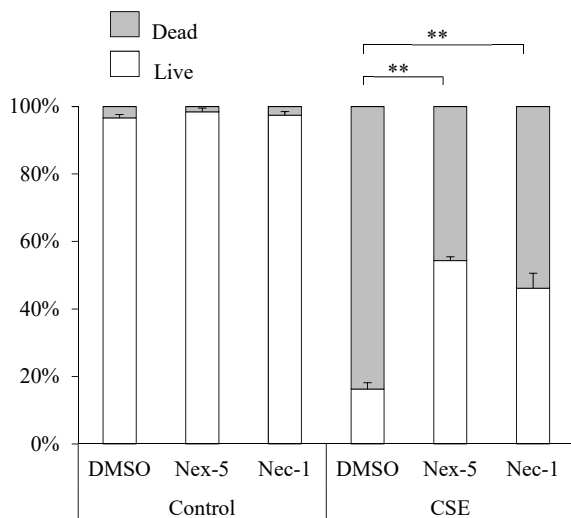


図1 タバコ煙抽出液による細胞死とネクロプトーシス

## 3. 結果

タバコ煙による肺上皮細胞死へのネクロプトーシスの関与を、ネクローシス阻害薬である Nex-5 とネクロプトーシス阻害薬である Nec-1 を用いて解析した。タバコ煙抽出液は肺上皮細胞死を有意に誘導した(図1)。また、タバコ煙抽出液による肺上皮細胞死は、ネクローシス阻害薬である Nex-5 とネクロプトーシス阻害薬である Nec-1 両剤ともで有意に抑制され(図1)、タバコ煙による肺上皮細胞死にネクロプトーシスが関与することが示唆された。

次に、肺へのタバコ煙暴露によるネクロプトーシス誘導を検討するために、全身タバコ煙暴露装置を用いマウスへのタバコ暴露を行い、ネクロプトーシス関連分子である RIP3 のマウス肺での発現を検討した。RIP3 発現はタバコ煙暴露3ヶ月をピークに上昇していた(図2)。

## 4. 考察

間質性肺炎の本体は胞隔炎であり、胞隔炎が線維化に至る過程は細胞死を主体とする肺上皮細胞の損傷に始まると考えられている。しかし、間質性肺炎の病態生理は不明な点が多く、また治療効果は不十分である。間質性肺炎の発端となる肺上皮細胞の細胞死はアポトーシスについての検討は行われているが、他のプログラム細胞死については十分な検討が行われていない。今回、我々は、新規プログラム細胞死であるネクロプトーシスの間質性肺炎への関与を検討した。間質性肺炎を引き起こす要因の一つは喫煙と考えられているが、本研究で、タバコ煙による肺上皮細胞死はネクロプトーシスで制御されている可能性が示唆された。また、タバコ煙暴露を行ったマウスの肺ではネクロプトーシス関連蛋白である

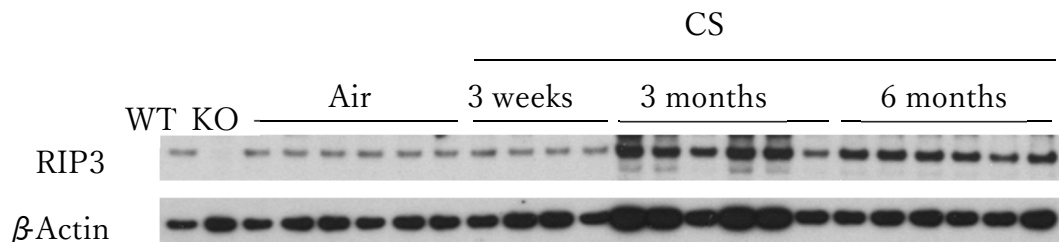


図2 タバコ煙全身暴露によるマウス肺におけるネクロプトーシス関連分子RIP3の発現

RIP3の発現増強が観察され、生体内でもタバコ煙は肺でネクロプトーシスを活性化することが示唆された。

しかし、間質性肺炎においては、肺上皮細胞の損傷の後に、異常な創傷治癒過程による線維化が起こることが知られているが、タバコ煙によるネクロプトーシスと線維化については明らかではない。ネクロプトーシスはアポトーシスとは違い、DAMPsを放出する炎症性の細胞死であることが知られており、持続喫煙によるネクロプトーシスが肺の慢性炎症を引き起こし、肺の線維化を誘導している可能性があり、今後検討を行う予定である。

## 5. 結 語

従来、間質性肺炎の病態形成にアポトーシスが関与していることが報告されていたが、本研究により、新規プログラム細胞死であるネクロプトーシスが、間質性肺炎の病態形成に関与していることが示唆された。間質性肺炎に対する新規バイオマーカーや治療ターゲットになる可能性があり、更なる検討が望まれる。

## 文 献

- 1) Linkermann A, Green DR. Necroptosis. N Engl J Med 2014; 370:455-65.
- 2) Pasparakis M, Vandenabeele P. Nature. 2015 Jan 15; 517 (7534): 311-20.



## 乳腺小葉癌における *CDH1* 遺伝子異常の検討 —デジタルPCR法および2色FISH法の比較

唐 小燕<sup>1)</sup>, 中西陽子<sup>1)</sup>, 増田しのぶ<sup>1)</sup>

### Examination of the *CDH-1* gene in lobular carcinoma of breast- A comparative study between digital PCR and Dual-FISH methods

Xiaoyan TANG<sup>1)</sup>, Yoko NAKANISHI<sup>1)</sup>, Shinobu MASUDA<sup>1)</sup>

#### 要旨

細胞接着蛋白E-Cadherin(E-Cad)の異常は、乳腺小葉癌の特徴のひとつであり、E-Cad免疫組織化学法(IHC)は、乳腺小葉癌と乳管癌の鑑別診断に有用な手法である。一方、E-Cad陽性の小葉癌も存在する。本研究は、E-Cad(IHC)陽性小葉癌におけるE-Cad遺伝子*CDH-1*(16q22.1)異常の特徴を探ることを目的とする。対象は2013～2016年の間当院にて行われた乳癌手術症例のうち、浸潤性小葉癌と診断された26例。症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、デジタルPCR法および2色Fluorescence in situ hybridization法を行った。結果として、E-Cad陰性・陽性小葉癌群間の比較では、染色体レベルでもDNAレベルでも*CDH-1*の量的な有意差は認めなかったため、*CDH-1*遺伝子変異や転写活性の異常が存在する可能性が示唆された。

#### 1. はじめに

乳腺小葉癌の特徴のひとつは、細胞接着蛋白E-cadherin(E-Cad)の発現低下である。E-Cad免疫組織化学法(IHC)は、乳腺小葉癌と乳管癌の鑑別診断に有用な手法であるが、E-Cad陽性の小葉癌も存在する<sup>1)</sup>。今回、われわれは、デジタルPCR(D-PCR)法および2色Fluorescence in situ hybridization法にて、E-Cad IHC陽性小葉癌におけるE-Cad遺伝子*CDH1*(16q22.1)異常の特徴を探ることを目的とした。

#### 2. 対象及び方法

2013年1月～2016年12月の間当院にて行われた乳癌手術症例のうち、浸潤性小葉癌と診断された26例(E-Cad陽性5例、E-Cad陰性21例)を対象とした。それら症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片(FFPE, 4  $\mu$  m, シランコートスライド)を用いて、以下の実験を行い、*CDH-1*遺伝子異常の特徴を検討した。

#### 2.1 2色Fluorescence in situ hybridization (Dual-FISH)法

FFPEスライドを脱パラフィン後、10mMクエン酸バッファ80°C55分にて前処理、0.01N HCL+80mg pepsin 37°C30分塩酸酵素処理を行った。*CDH-1*プローブ(*CDH-1* Fish Probe: RED 5-ROX, Empire Genomics, New York)を赤色で、16番染色体のセントロメアプローブ(CEP16, Spectrum Aqua Probe: Abbott Molecular Inc. Vysis, Tokyo, Japan)をSpectrum Aquaで標識した。以上のプローブ混合液をスライドガラスにのせ、83°Cで3分間変性させ、サーモライトで37°Cにて24～48時間ハイブリダイゼーションした後、洗浄し、DAPI IIで対比染色した。蛍光顕微鏡(Carl Zeiss Microscope, Tokyo, Japan)にて観察し、各症例に対して20個の細胞をカウントした。*CDH-1*欠損の判断基準は、*CDH-1*/CEP16 ratio  $\leq 0.8$ とした。また、20個の細胞のうち*CDH-1*シグナルが単体の細胞が占める率(single signal cell)が60%より多い場合は単独lossとした<sup>2)</sup>。

1) 日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野  
TANG Xiaoyan : tang.xiaoyan@nihon-u.ac.jp

## 2.2 デジタルPCR (D-PCR) 法によるCDH-1 DNA 定量解析

Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit にて、FFPE (Thermo Fisher Scientific Inc.) サンプルのDNAを抽出し、QuantStudio 3D デジタルPCRシステムにて、CDH-1 DNAの定量を行った。CDH-1 Probeは、TaqMan® Copy Number Assay (Assay ID: Hs0561677\_cn) ; Referenceは、TaqMan® RNase P Assay (Thermo Fisher社) を使用した。D-PCRのCDH-1欠損の判断基準は、CNV/RNase<0.5とした。

## 3. 結果

### 1) Dual-FISH法によるCDH-1遺伝子検討の結果

- CDH-1欠損は5症例、うちE-Cad IHC陽性1、陰性4症例であった。図1は、Dual-FISH法CDH-1欠損、E-Cad IHC陰性症例。
- E-Cad IHCの陽性・陰性症例に有意差はなし(図

2a, b)。

- CDH-1 single signalの頻度(%)は、CDH-1/CEP16比に有意に相関していた( $p=0.001$ )。

### 2) D-PCR法によるCDH-1 DNA定量解析の結果:

- D-PCR法によるCDH-1欠損症例は3例で、うち2例は、Dual-FISH法による欠損症例であった。いずれもE-Cad IHC陰性例であった
- E-Cad IHCの陽性・陰性症例に有意差はなかった(図2c)。

### 3) D-PCR法およびDual-FISH法の結果の相関解析

- D-PCR法によるCDH-1 DNA量(CNV/Rnase)とDual-FISH法のCDH-1/CEP16比に相関は認めなかった( $p=0.269$ )(図3a.)。
- D-PCR法によるCDH-1 DNA量とDual-FISH法のCDH-1 single signalの頻度(%)に相関傾向

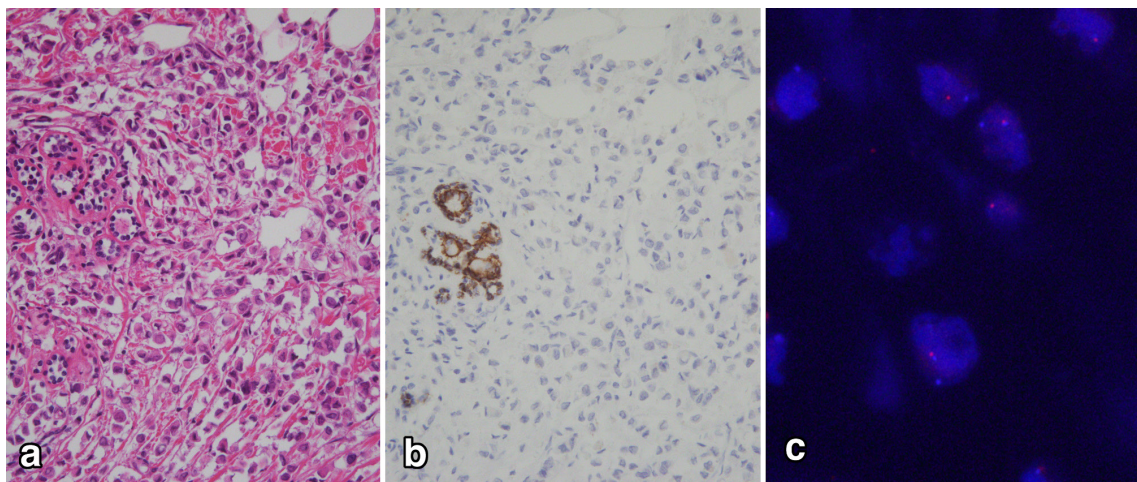


図1 浸潤性小葉癌。a. HE染色：癌細胞は結合性が弱く、乳管周囲に瀰漫性に浸潤増殖する。b. E-Cadherin IHC, 癌細胞は陰性で、残存する乳管上皮の膜に陽性。c. FISH: CDH-1/CEP16=0.7

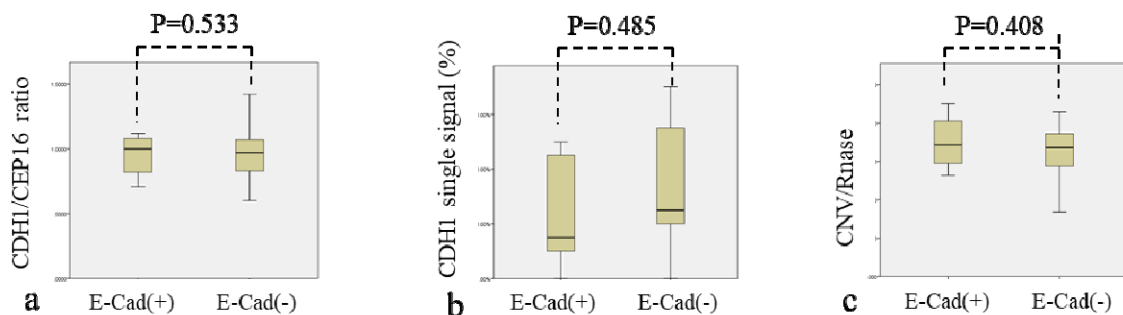


図2 E-Cad(+) VS E-Cad(-)症例のカイ2乗検定結果。a,bはDual-FISH法,cはD-PCR法

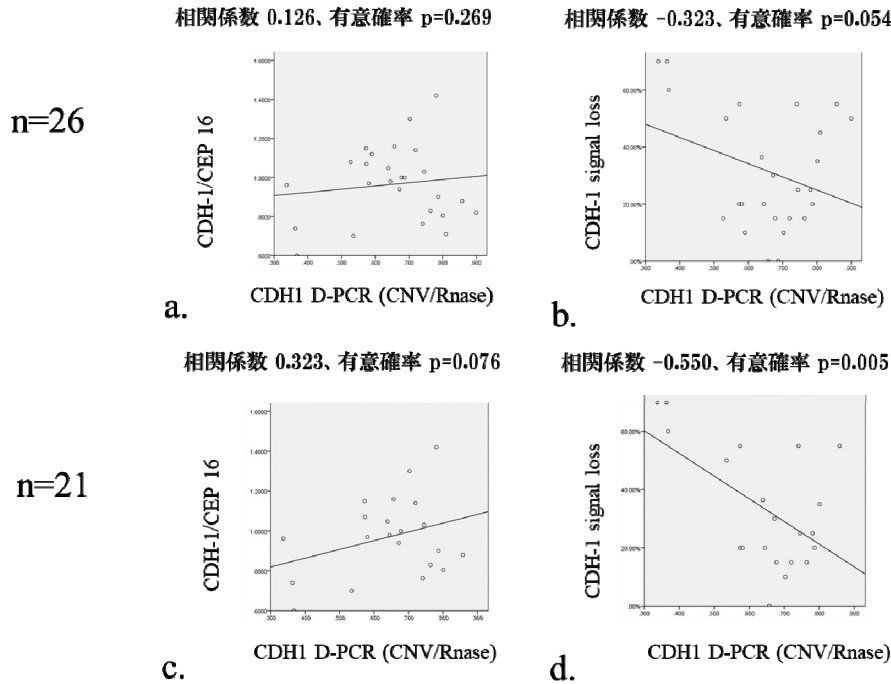


図3 デジタルPCR(D-PCR)によるCDH-1 DNA定量およびDual-FISH法の比較検定結果。a.b.はE-Cad陰性・陽性全例 ( $n=27$ ), c.d.はE-Cad陰性例 ( $n=21$ )

( $p=0.054$ , 図3b.)を示した。

- b. E-Cad (IHC) 陰性・陽性小葉癌群間の比較では、Dual-FISH法でもD-PCR法でもCDH-1の量的な有意差は認めなかった。
- c. E-Cad (IHC) 陰性群では、D-PCR法によるCDH-1 DNA量は、Dual-FISH法によるCDH-1 signal lossの頻度 (%) に有意に相関していた ( $p=0.005$ , 図3d.)。また、統計的有意差は出なかったが、D-PCR法によるCDH-1 DNA量はDual-FISH法のCDH-1/CEP16比に正の相関傾向 ( $p=0.076$ , 図3c.)を示した。

#### 4. 考 察

E-cadherin蛋白の異常を引き起こす原因として、E-cadherinの遺伝子CDH-1 (16q22.1)の変異、欠失、gene methylation, LOH, 或いは16番染色体長腕の欠失 (16q loss) などが挙げられる<sup>3)</sup>。その原因を調べる方法として、CDH-1 DNA定量, mRNA定量, CDH-1/CEP16のDual-FISH法などがある<sup>4)</sup>。今回の研究では、E-Cad IHC陰性・陽性小葉癌の2群の間で、Dual-FISH法のCDH-1/CEP16率あるいはDNA定量PCR法のCDH-1/Rnase値は、いずれも有意差は認められず、欠失以外の機序によるCDH-1

機能異常の喪失の割合がより高いと思われた。一方、D-PCR法によるCDH-1 DNA定量 (CNV/Rnase) とDual-FISH法のCDH-1/CEP16比に相関は認めなかったが、D-PCR法によるCDH-1 DNA定量とDual-FISH法のCDH-1シグナルが単体の細胞が占める率 (CDH-1 single signalの頻度) に相関傾向を示し、特にE-Cad (IHC) 陰性群では、有意に相関していた。その原因として、乳腺小葉癌は16番染色体の部分的lossやgainの発生頻度が高く、CDH-1/CEP16比よりも、CDH-1 single signalの頻度 (%) がより一致すると推測され、また、今回の研究に使った症例数が少ないことも一因として考えられる。

#### 5. 結 語

E-Cad陰性・陽性小葉癌では、CDH-1遺伝子の量的な差異は認められなかったため、欠失以外の機序によるCDH-1機能異常、或いはCDH-1遺伝子変異や転写活性の異常が存在する可能性があると考えられた。

#### 文 献

- 1) Canas-Marques R& Schnitt SJ. E-cadherin immunohistochemistry in breast pathology: uses and pitfalls. *Histopathology* 2016; 68: 57-69.

- 2) Perez EA, Roche PC, Jenkins RB, et al. HER2 testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positive by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc* 2002; 77:148-154.
- 3) Reed AEM, Kutasovic JR, Lakhani SR, Simpson PT. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and ' omics. *Breast Cancer Research* 2015; 17:12.
- 4) R Roylance, P Gorman, T Papior, et al. A comprehensive study of chromosome 16q in invasive ductal and lobular breast carcinoma using array CGH *Oncogene* 2006; 25: 6544-6553.



# 進行肺腺癌における糖転移酵素遺伝子発現と予後の関係

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

## Correlation between glycosyl transferase gene expression and poorer outcome in advanced lung adenocarcinoma

Yoko NAKANISHI<sup>1)</sup>, Ichiro TSUJINO<sup>2)</sup>, Mie SHIMAMURA<sup>3)</sup>,  
Noriaki TAKAHASHI<sup>2)</sup>, Shinobu MASUDA<sup>1)</sup>

### 要旨

肺癌の薬物治療では分子標的薬の進歩が著しいが、標準化学療法が選択される場合も多く、その効果予測因子は明確ではない。本研究では、薬剤耐性因子の一つとして細胞防御機構に関係すると考えられるタンパク質の糖鎖修飾の違いに着目し、予後との関係を明らかにすることを目的とした。進行肺腺癌患者の病理組織を用いたN型糖鎖修飾に関する糖転移酵素遺伝子発現解析を行った結果、糖転移酵素の発現は症例間に差があることが認められ、MGAT4aならびにMGAT5遺伝子転写産物の高発現は予後不良に関与する可能性が示された。

### 1. はじめに

肺癌は、進行状態で発見されることの多い予後不良な難治性疾患である。進行肺腺癌の診療においては分子標的治療の進歩が目覚ましく、さらなる標的分子の発見を目指した大規模遺伝子解析が国内外を問わず行われている。しかしながら、標的分子を有さず、分子標的薬以外の化学療法が選択される患者も多く、その効果にも個人差があることが知られている。本研究では、薬剤耐性因子の一つとして細胞防御機構に関係すると考えられるタンパク質の翻訳修飾の違いに着目した。今回、進行肺腺癌患者の病理組織を用いたN型糖鎖修飾に関する糖転移酵素遺伝子発現解析を行って、進行肺腺癌組織におけるN型糖鎖構造の違いと予後の関係を明らかにすることを目的とした。

### 2. 材料と方法

2009年-2011年に日大板橋病院を受診し、肺腺癌と診断された62例のホルマリン固定パラフィン包埋生検組織を対象とした(臨床研究承認番号RK-110610-2)。

レーザーマイクロダイセクション(LMD)法で回収した腫瘍細胞よりAGPC(Acid-Guanidium-Phenol-Chloroform)法でtotal RNAを抽出し、QuantiTect Reverse Transcription Kit(QIAGEN)を用いてcDNAを合成した。これらのcDNAを鋳型として、表1に示した各標的遺伝子に対するTaqMan® gene expression assay(Thermo Fisher Scientific)を用いた定量RT-PCRを行った。各標的遺伝子の相対発現量は、内因性コントロールとして測定したglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)の値による $\Delta\Delta Ct$ 法で求めた。

### 3. 結果

糖転移酵素遺伝子発現解析の結果、MGAT4a遺伝子とMGAT5遺伝子は各々7/62例(11.3%)、3/62例(4.8%)で検出された。MGAT4aあるいはMGAT5遺伝子発現の有無と臨床病理学的因子の関係は表1に示した通り、ECOG performance statusが高値の症例( $P < 0.05$ )、および予後不良例で陽性を示した( $P < 0.05$ )。年齢、性別、喫煙歴、病期、主要な遺伝子変異との間に有意な関係は認めなかった。MGAT4a

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

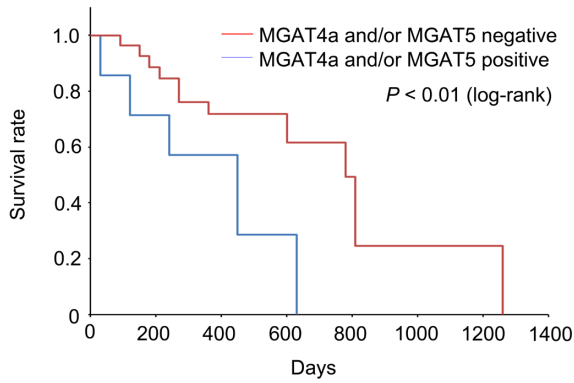


図1 生存分析

癌組織における *MGAT4a* および *MGAT5* 遺伝子発現の有無と予後の関係を Kaplan-Meier 法で分析した結果、*MGAT4a* あるいは *MGAT5* 遺伝子発現陽性症例では有意に予後不良であることが示された。

あるいは *MGAT5* 遺伝子発現の有無と予後の関係を Kaplan-Meier 法で解析した結果、陽性症例では有意に予後不良であることが示された (図1,  $P = 0.01$ )。

#### 4. 考察

手術適応のない進行癌の予後は薬物治療成績に依存するところが大きいため、薬剤耐性は癌治療の重要な問題として多くの研究が行われてきた<sup>1)</sup>。P糖蛋白質が、抗癌剤の細胞外排出を行う薬物輸送関連分子として癌細胞から発見されたように、細胞防御機構の点から薬剤耐性と糖鎖についても、種々の蛋白質の機能に影響を及ぼすエピジェネティックな異常として着目されてきた<sup>2)</sup>。肺癌患者の癌組織を用

表1 標的糖転移酵素遺伝子と使用した TaqMan® gene expression assay

Target	Name	Assay ID	Amplicon
MGAT3	mannosyl (beta-1,4)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyl-transferase	Hs02379589_s1	101 bp
MGAT4a	mannosyl (alpha-1,3)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyl-transferase, isozyme A	Hs00923405_m1	83 bp
MGAT5	mannosyl (alpha-1,6)-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	Hs00159136_m1	91 bp
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1	122 bp

表2 *MGAT4a* および *MGAT5* 遺伝子発現と臨床病理学的因子の関係

Factors		Gene expression of <i>MGAT 4a</i> and/or <i>MGAT 5</i>		P value
		Positive (n=9)	Negative (n=53)	
Age	Median (Min -Max)	64 (61-82)	67 (47-86)	N.S.
Gender	Male	6	36	N.S.
	Femail	3	17	
Smoking status	Never	2	14	N.S.
	Smoker	7	39	
Clinical stage	<3a	0	8	N.S.
	3b	2	11	
	4	7	34	
ECOG PS	0	3	17	< 0.05 *
	1	0	26	
	2	2	9	
	3	0	4	
	4	4	3	
Mutation status	<i>EGFR</i>	3	7	N.S.
	<i>ALK</i>	0	1	N.S.
	<i>KRAS</i>	1	9	N.S.
	<i>BRAF</i>	0	2	N.S.
3 years survival	Surviving	1	33	< 0.05 *
	Not surviving	8	20	

\*  $P < 0.05$  (カイ二乗検定)

いた糖鎖構造解析では、*N*型糖鎖修飾には多様性が存在する可能性が示されている<sup>3)</sup>。また、肺腺癌において*MGAT4a*あるいは*MGAT5*遺伝子が高発現して癌細胞の増殖促進などに関与している可能性も報告されている<sup>3,5)</sup>。

今回、我々の研究では、進行期の肺腺癌においても*N*型糖鎖修飾に関する糖転移酵素発現の状態は症例によって異なり、*MGAT4a*ならびに*MGAT5*遺伝子転写産物の高発現はPS不良や予後に関する可能性が示された。

## 文 献

- 1) Ferreira JA, Peixoto A, Neves M, et al. Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells: Adding glycosylation to the equation. *Drug Resist Updat.* 2016;24:34-54.
  - 2) Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976;455:152-62.
  - 3) Ruhaak LR, Taylor SL, Stroble C, et al. Differential N-Glycosylation Patterns in Lung Adenocarcinoma Tissue. *J Proteome Res.* 2015;14:4538-49.
  - 4) Gu J, Nishikawa A, Tsuruoka N, et al. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine: alpha-6-D-mannoside beta 1-6N-acetyl-glucosaminyl-transferase (N-acetylglucosaminyltransferase V) from a human lung cancer cell line. *J Biochem.* 1993;113:614-9.
  - 5) Takahashi M, Kizuka Y, Ohtsubo K, Gu J, Taniguchi N. Disease-associated glycans on cell surface proteins. *Mol Aspects Med.* 2016;51:56-70.
- 1) Ferreira JA, Peixoto A, Neves M, et al. Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells: Adding glycosylation to the equation. *Drug Re-*

# 腫瘍特異的融合遺伝子を標的とした ピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIP) の開発

藤原恭子<sup>1)</sup>, 渡邊揚介<sup>2)</sup>, 石塚悦昭<sup>2)</sup>, 平野隆幸<sup>2)</sup>,  
長崎(前岡)瑛里<sup>2)</sup>, 越永従道<sup>2)</sup>, 福田 昇<sup>3)</sup>, 相馬正義<sup>1)</sup>

## Development of Pyrrole-imidazole Polyamide (PIP) Targeting Tumor Specific Fusion Gene

Kyoko FUJIWARA<sup>1)</sup>, Yosuke WATANABE<sup>1)</sup>, Yoshiaki ISHIDUKA<sup>2)</sup>,  
Takayuki HIRANO<sup>2)</sup>, Eri NAGASAKI-MAEOKA<sup>2)</sup>, Tsugumichi KOSHINAGA<sup>2)</sup>,  
Noboru FUKUDA<sup>3)</sup>, Masayoshi SOMA<sup>1)</sup>

### 要旨

染色体異常により生じる融合遺伝子は、がんの診断マーカーや治療標的として非常に有望である。我々はこれまでに、配列特異的にDNAに結合する性質を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)を用いて融合遺伝子を標的とした薬剤の開発を行ってきた。それらのうち、胞巣型横紋筋肉腫(ARMS)特異的融合遺伝子*PAX3-FOXO1*を認識するPIPにアルキル化剤クロラムブシル(ChB)を付加した化合物Rhab-ChB1が、培養腫瘍細胞に対して強い増殖抑制効果を持つ事を確認した。しかしながら、この作用は標的的特異的ではなく、融合遺伝子陰性の細胞に対しても同様の効果を示した。なお、Rhab-ChB1はChBの少なくとも100倍以上低い濃度で細胞障害性を示したことから、新規のアルキル化剤として応用できる可能性が考えられた。

### 1. 背景

がん細胞では、転座、逆位、欠失などの染色体異常の結果、全く異なる遺伝子が結合した融合遺伝子が形成される現象が知られている。正常細胞には存在せず、がん細胞の増殖や浸潤を促進する機能を持つ場合が多いことから、融合遺伝子は診断マーカーとしても治療標的としても非常に適した分子である。今日までに白血病や前立腺癌、ユーイング肉腫等、様々な腫瘍で融合遺伝子が同定され、EML4-ALK融合遺伝子の非小細胞がんに対してはALK阻害剤が実用化されている。

我々はこれまでに、配列特異的にDNAに結合する性質を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)を用いて肝内胆管がんや胞巣型横紋筋肉腫(ARMS)特異的な融合遺伝子を標的とした薬剤の開発を行ってきた。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<sup>1)</sup>。この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。

ARMSにおいては約55%のケースで、転写因子*PAX3*のN末端側と、同じく、転写因子である*FOXO1*のC末端側が融合した*PAX3-FOXO1*が観察される。ARMS全体の5年生存率が50%であるのに対し、*PAX3-FOXO1*陽性患者では8%と低いことも報告されている<sup>2)</sup>。*PAX3-FOXO1*配列を導入したマウスがARMSを発症する<sup>3)</sup>ことから、同融合遺伝子はARMS発症のドライバー遺伝子と言え、治療標的として非常に期待できると考えた。そこで我々は、*PAX3-FOXO1*の融合部を認識するPIPにアルキル化剤クロラムブシル(ChB)を付加したRhab-ChB1を合成し、その機能解析を行った。

1) 内科学系総合内科・総合診療医学分野  
2) 外科学系小児外科学分野  
3) 内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野  
藤原恭子: fujiwara.kyoko@nihon-u.ac.jp



## 2. 対象および方法

### 1) ChB付加PIPの合成

Rhab-ChB1のDNA認識様式と構造式を図1A, Bに示す。これに加え, ChBを付加していないPIP配列のみのRhab1も合成した。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, 実験に使用した。

### 2) ゲルシフトアッセイによるRhab-ChB1の標的DNA結合能の解析

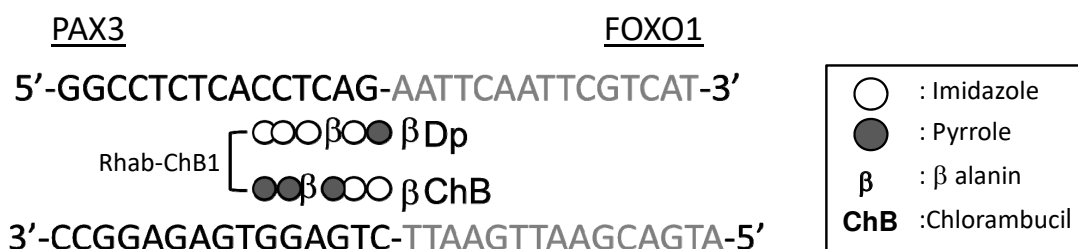
*PAX3-FOXO1*融合部の配列を含む20塩基の二本鎖DNAにFITCラベルを付加した分子を作成した。ネガティブコントロールとして, 全く配列の異なるFITC付加DNAも作成した。これらのDNAと, Rhab-ChB1またはRhab1を37°Cで1時間インキュ

ベートした後, 20%のポリアクリルアミド1xTAEゲル中で電気泳動時を行い, 移動度の違いを解析した。

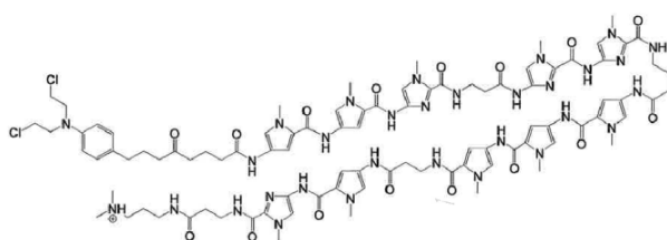
### 3) 細胞生存率の検討

細胞を1000細胞/wellの密度で96 well plateに播種し, 24時間後にRhab-ChB1, Rhab1またはChBのみを0.001 μM ~ 1 μMの範囲で投与した。細胞は, *PAX3-FOXO1*陽性細胞としてARMS細胞株のCRL2061およびNRS-1, 陰性細胞として胎児型横紋筋肉腫細胞株のRMS-YM および大細胞肺癌細胞株NCI H460の4種類を用いた。NRS-1以外の細胞株については, 6または7日目の時点でWST8 assayを行い, 細胞生存率を解析した。NRS-1については, 薬剤投与後14日目の時点で細胞数の計数を行った。

## A



## B



## C

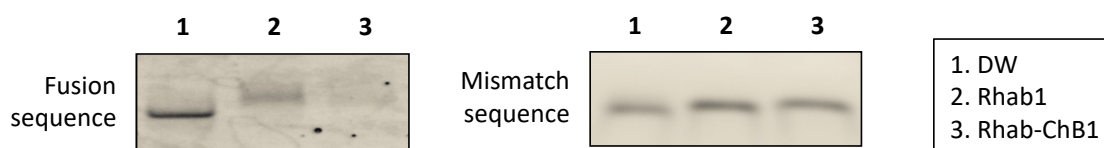


図1 Rhab-ChB1 の設計

A. *PAX3-FOXO1*の融合領域を認識するChB付加PIP (Rhab-ChB1) を設計した。

B. Rhab-ChB1の化学構造。

C. Rhab-ChB1の標的配列特異的なDNA結合能をゲルシフトアッセイにより確認した。

## 4) 細胞周期の解析

CRL2061細胞を $8 \times 10^4$ 細胞/wellの密度で6well plateに播種し、24時間後に $1 \mu\text{M}$  Rhab-ChB1, Rhab1またはChBを投与した。その後12,24,48時間目に細胞を回収し、エタノール中 $4^\circ\text{C}$ で12時間以上固定した。その後、Propidium Iodideを用いて核内DNAを染色し、フローサイトメーターにて細胞周期の分布を解析した。

## 3. 結果

## 1) Rhab-ChB1と標的DNA結合能の解析

ゲルシフトアッセイの結果、Rhab-ChB1もしくはRhab1とともに泳動したPAX3-FOXO1融合部配列DNAは、コントロールと比較して明らかな泳動度の遅れを示し、両PIPが標的DNAに対して結合することが判った。一方、PAX3-FOXO1融合部の配列を含まないDNAに対しては、どちらのPIPも結合能を示さなかった。

## 2) Rhab-ChB1投与後の細胞生存率の変化

Rhab-ChB1投与後の細胞生存率を解析したとこ

ろ、 $0.01 \mu\text{M}$ 以上の投与で顕著な生存率の低下を認めた。一方、ChBの付加されていないRhab1および、ChB単体の投与では生存率の変化は確認できなかった。なお、この結果はPAX3-FOXO1陽性細胞(図2A)、陰性細胞(図2B)いずれにおいても観察され、融合遺伝子特異的な効果ではなかった。

## 3) Rhab-ChB1の細胞障害性の機序の検討

Rhab-ChB1投与による細胞生存率の低下が細胞死の誘導によるものか、あるいは増殖抑制によるものかを確認するために、フローサイトメーターにて細胞周期の分布を調べた。解析の結果、Rhab-ChB1投与細胞では、G2/M期の細胞の割合が増えたが、死細胞画分であるsub-G1の割合には変化がみられなかった(図3)。

## 4. 考察

合成したRhab-ChB1は、PAX3-FOXO1融合部のDNA配列に特異的に結合することを確認した。Rhab-ChB1は、 $0.01 \mu\text{M}$ 以上の濃度で細胞の生存率を顕著に低下させること、また、それはG2/Mアレ

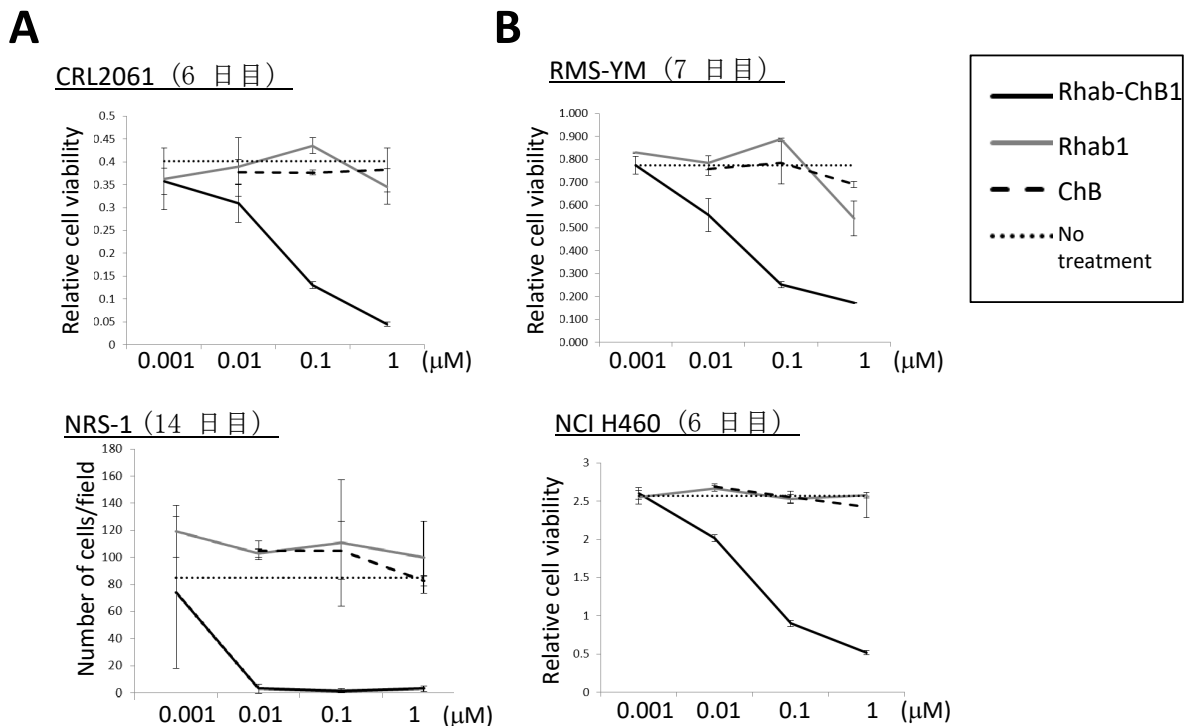


図2 Rhab-ChB1投与後の細胞生存率の解析

細胞に $0.001 \mu\text{M}$ ~ $1 \mu\text{M}$ の濃度のRhab-ChB1, Rhab1, ChBを投与し、6~14日目のいずれかの時点での生存率の検討を行った。PAX3-FOXO1融合遺伝子陽性細胞(A)および陰性細胞(B)いずれにおいても、Rhab-ChB1は $0.01 \mu\text{M}$ 以上の濃度で顕著な生存率の抑制効果を示した。

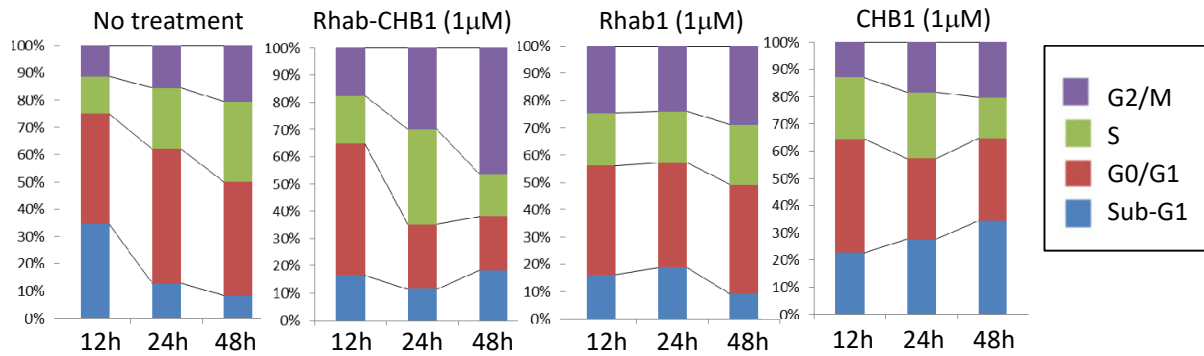


図3 Rhab-ChB1 投与後の細胞周期の検討

CRL2061細胞に1µMのRhab-ChB1, Rhab1, ChBを投与し, 12, 24, 48時間目の時点での細胞周期の状態をフローサイトメトリーにて解析した。Rhab-ChB1投与細胞においては, 死細胞画分(sub-G1)の上昇は見られなかったが, G2/M期の細胞の比率が顕著に上昇していた。

ストの誘導によるものであることが判った。しかしながら, Rhab-ChB1の効果は, *PAX3-FOXO1*融合遺伝子の有無にかかわらず, 調べた全ての細胞に対して観察され, 非特異的な現象であった。今後, 認識DNA配列をずらしたPIPを設計するなどして, 特異的な*PAX3-FOXO1*の再合成を試みる必要がある。なお, Rhab-ChB1はChB単体と比べて, 少なくとも100倍以上低い濃度で細胞障害性を発揮したことから, 配列特異性は無いものの, 従来ChBよりも効果の高いアルキル化剤として利用可能であるか, 検討を行っていく。

## 文 献

- 1) Dervan PB. *Bioorg Med Chem.* 2001; 9(9):2215-2235.
- 2) Sorensen PHB et al. *J Clin Oncol.* 2002; 20(11):2672-2679.
- 3) Keller C et al. *Cancer Research* 2005; 65(17):7530-7532.

## 膵癌-間質相互作用を標的にした創薬開発

佐野 誠<sup>1)</sup>, 市丸 嘉<sup>2)</sup>, 宮入伸一<sup>2)</sup>, 羽尾裕之<sup>1)</sup>

## Development of anticancer drugs targeting the pancreatic cancer-stromal interaction

Makoto SANO<sup>1)</sup>, Yoshimi ICHIMARU<sup>2)</sup>, Shinichi MIYAIRI<sup>2)</sup>, Hiroyuki HAO<sup>1)</sup>

## 要旨

当該研究においては、膵管癌に対して抗腫瘍効果を示す二種類のインディルビン誘導体を見出した。さらに、その作用機序としてp-CDK1とサイクリンB1の発現を抑制し、G2/Mアレストからアポトーシスを誘発することを明らかにした。

浸潤性膵管癌は膵癌全体の90%以上を占め、未だに早期診断・治療が困難な悪性腫瘍である。特に術後再発例や切除不能症例においては未だに予後不良であり、従来から用いられている抗癌剤とは作用メカニズムが異なり、癌のみならず間質をも包括的にとらえた創薬開発が必要と考える。そこで本研究においては、多様なチロシンキナーゼ阻害活性を有するインディルビンに着目し、癌と間質との相互作用を標的としてインディルビン誘導体の抗腫瘍効果を検討し、有用な抗腫瘍物質の同定を目的とした。

まず、本学薬学部の宮入が保有するインディルビン誘導体のライブラリーのなかから、膵管癌細胞と線維芽細胞とのスフェロイド形成(三次元凝集)ならびに細胞増殖を阻害する化合物をスクリーニングした。膵管癌細胞としては、膵管癌を自然発症する *Ptf1a-cre; LSL-Kras<sup>G12D</sup>; Trp53 flox; Ink4a flox* マウスの膵原発巣から樹立した悪性度の高い細胞株(170#3)を、また、線維芽細胞としては、マウス由来NIH/3T3細胞を用いた。その結果、NIH/3T3細胞のスフェロイド形成には影響を示さないが、膵管癌細胞単独培養ならびに膵管癌細胞と線維芽細胞との共培養におけるスフェロイド形成と細胞増殖を阻

害するインディルビン誘導体 indirubin 3'-oxime (Indox) と 5-methoxyindirubin 3'-oxime (5MeOIndox) を見出した(図1)。次に、BALB/cヌードマウス(6週齢、雄)の皮下にマウス膵管癌細胞株170#3(1 x 10<sup>5</sup>細胞)を移植した後、10, 20, 40 mg/kgのIndoxあるいは5MeOIndoxを腹腔内投与した。経時的に移植腫瘍の大きさを計測し、移植後12日目をエンドポイントとして腫瘍を摘出した。その結果、Indoxあるいは5MeOIndox投与群においては、コントロール(DMSO/PEG400投与)群と比較して濃度依存的な抗腫瘍効果が認められた(図2)。また、Indoxあるいは5MeOIndoxは膵管癌細胞におけるリン酸化CDK1とサイクリンB1の発現量を抑えることでG2/Mアレストを生じ、アポトーシスを誘発することを明らかにした。なお、これらの結果は英文誌に報告した(Sano M, Ichimaru Y, et al., Cancer Letters, 2017)。

1) 日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野

2) 日本大学薬学部有機化学研究室

佐野 誠: sano.makoto@nihon-u.ac.jp



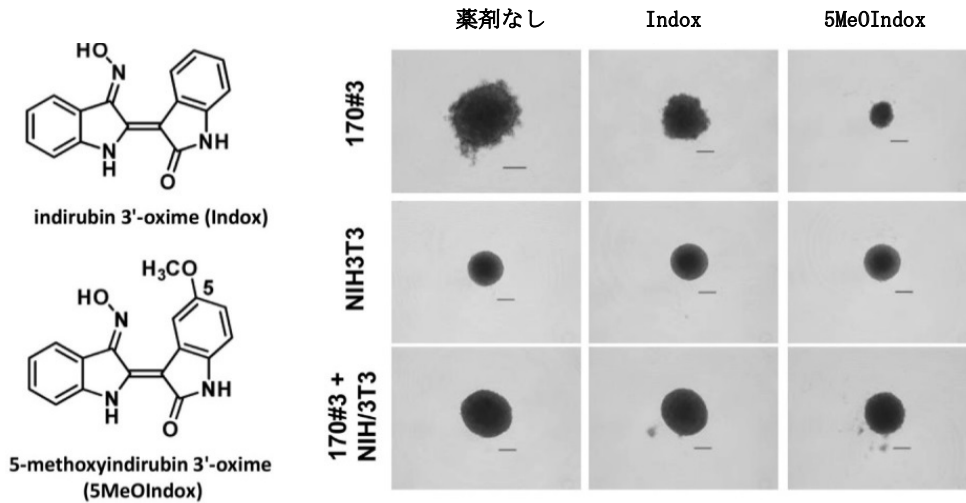


図1 スフェロイドに対するインディルビン誘導体の抗腫瘍効果

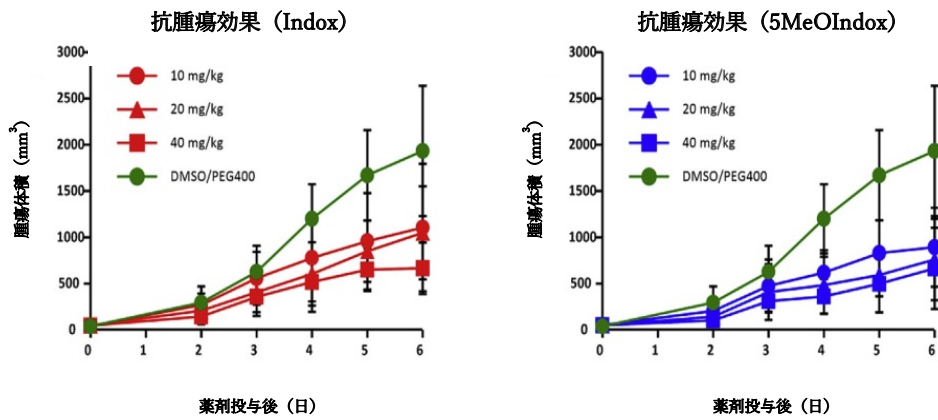


図2 移植腫瘍に対するインディルビン誘導体の抗腫瘍効果

文 献

Sano M\*, Ichimaru Y\*, Kurita M, Hayashi E, Homma T, Saito H, Masuda S, Nemoto N, Hemmi A, Suzuki T, Miyairi S, Hao H: Induction of cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma by indirubin 3'-oxime and 5-methoxyindirubin 3'-oxime *in vitro* and *in vivo*, **Cancer Letters**, 397: 72-82, 2017 (IF: 5.992). \*, contributed equally.

## 心事故予測における心臓核医学における 心筋虚血と SYNTAX score の関連

依田俊一<sup>1)</sup>, 早瀬未紗<sup>1)</sup>, 八田拓海<sup>1)</sup>, 堀 祐輔<sup>1)</sup>, 門野 越<sup>1)</sup>,  
峯木隆志<sup>1)</sup>, 鈴木康之<sup>1)</sup>, 松本直也<sup>1)</sup>, 平山篤志<sup>1)</sup>

### Prognostic Relationship between Ischemia Evaluation with Nuclear Cardiology and SYNTAX score

Shunichi YODA<sup>1)</sup>, Misa HAYASE<sup>1)</sup>, Takumi HATTA<sup>1)</sup>, Yusuke HORI<sup>1)</sup>, Koyuru MONNO<sup>1)</sup>,  
Takashi MINEKI<sup>1)</sup>, Yasuyuki SUZUKI<sup>1)</sup>, Naoya MATSUMOTO<sup>1)</sup>, Atsushi HIRAYAMA<sup>1)</sup>

#### 要旨

冠血行再建治療が成功した虚血性心疾患患者に対して SYNTAX score と核医学から得られる虚血改善量を用いて心事故リスクを検討した報告はない。そこで我々は安静時<sup>201</sup>Tl 負荷時<sup>99m</sup>Tc-tetrofosmin 心筋血流 SPECT を施行し、虚血の確認後 CAG/PCI が施行され且つ慢性期に SPECT を行った 445 例を対象として予後追跡調査を行った。追跡期間に 36 例に心事故が認められ、内訳は心臓死 ( $n=7$ ), 非致死的心筋梗塞 ( $n=2$ ), 不安定狭心症 ( $n=27$ ) であった。多変量解析の結果から  $\Delta$ SDS% と SYNTAX score が独立した心事故予測因子として抽出された。心事故発症予測における SYNTAX score の至適カットオフ値 15 と 5% 虚血改善の有無により有意な心事故リスクの層別化が示された。冠血行再建術成功後の心事故予測において、解剖学的重症度と虚血改善量のコンビネーションによる評価は心事故リスクの層別化に有用であった。

#### 1. はじめに

米国のマルチセンタートライアル<sup>1)</sup> で安定労作性狭心症患者において血行再建術 (PCI) 後に 5% 以上虚血が改善した患者では予後が改善すると報告されたが、我が国において冠血行再建術後の虚血改善と解剖学的重症度を示す SYNTAX score のコンビネーションによる心事故リスクの層別化について報告はないため検討を行った。

#### 2. 対象及び方法

虚血性心疾患の既往もしくは疑いにて、2004 年 10 月から 2013 年 11 月の間に当院にて安静時<sup>201</sup>Tl 負荷時<sup>99m</sup>Tc-tetrofosmin dual isotope 心筋血流 SPECT<sup>2,3)</sup> を施行し 5% 以上の虚血を確認後、冠動脈造影 (CAG) が施行され、冠動脈に 75% 以上の狭窄病変を有し、治療後慢性期に SPECT を再検査した 445 例を対象に 1 年以上の予後追跡調査を行った。全例 CAG の結果から SYNTAX score を算出した。20 歳以下の患者、肥大型・拡張型心筋症の患者、重篤な弁膜症

患者、NYHA III 以上の心不全患者、SPECT にて虚血が 5% 未満の患者、CABG の既往のある患者は対象から除外した。

**心電図同期心筋血流 SPECT** : 全例、安静時に<sup>201</sup>Tl (111 MBq) を投与し 10 分後に 16 分割心電図同期心筋血流 SPECT を撮像し、その後エルゴメーター負荷またはアデノシン負荷を施行し、<sup>99m</sup>Tc-tetrofosmin (740 MBq) を投与後、30 ~ 60 分後に 16 分割心電図同期心筋血流 SPECT を撮像した。SPECT 血流画像は 20 分割 5 段階評価にて視覚的にスコアリングし summed stress score (SSS), summed rest score (SRS) を算出し、SSS と SRS の差から summed difference score (SDS) を算出した。さらに SSS, SRS, SDS を 20 セグメントモデルの最大スコアの 80 で割り visual % myocardium を算出し、治療前後の SDS% の差から  $\Delta$ SDS% を算出した。

1) 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野  
依田俊一: Yoda.shunichi@nihon-u.ac.jp

予後追跡とエンドポイント：全例、慢性期SPECT後から1年以上（平均追跡期間30.0 ± 15.9月）の予後追跡を行い、エンドポイントは心臓死、非致死性心筋梗塞、不安定狭心症と定義した。

### 3. 結果

追跡期間に36例に心事故が認められ、内訳は心臓死（*n*=7）、非致死的心筋梗塞（*n*=2）、不安定狭心症（*n*=27）であった。心イベントの有無による患者背景の比較では年齢、性別、心筋梗塞の既往、リスクファクター、内服薬、CAG上の病変枝数、治療内容には両群間で有意差を認めなかった。心イベントの有無による核医学的虚血指標および心機能指標の治療前後の推移の比較を表1に示す。SSS%とSDS%は治療前後で両群間で有意に改善していたが、ΔSDS%はイベント非発生群で有意に大であった（9.5 ± 9.3 vs. 5.2 ± 8.1; *p* = 0.0034）。負荷時および安静時の心機能指標（EDV, ESV, EF）はイベント発生群では変化がなかったが、非発生群では有意な改善を認めた。SYNTAX scoreはイベント発生群で有意に大であった（17.6 ± 7.3 vs. 14.3 ± 7.4; *p* = 0.0177）。単変量解析の結果、血行再建の既往、eGFR、治療後のSSS%とSDS%、ΔSDS%、5%以上の虚血改善、安静時と負荷時の治療後のLVEF, LVEDV, LVESV, SYNTAX scoreが有意な心事故予測因子であり、多

変量解析の結果、ΔSDS%とSYNTAX scoreが独立した心事故予測因子として抽出された。ROC解析から得られた心事故発症を予測するSYNTAX scoreの至適カットオフ値15と5%虚血改善の有無での4区分でのカプランマイヤー解析の結果、SYNTAX score 15未満で5%以上の虚血改善を認めた群が最も予後良好であり、SYNTAX score 15以上で虚血改善が5%未満であった群が最も予後不良であった（*p* = 0.0030）。

### 4. 考察

我々の先行研究において日本人の虚血性心疾患患者において治療後に5%以上の虚血改善が得られた場合に予後改善効果を認め、核医学的虚血改善量であるΔSDS%の有用性を報告したが<sup>4)</sup>、本研究においてΔSDS%に加え、解剖学的重症度指標であるSYNTAX scoreが冠血行再建術後の独立した心事故予測因子であることが明らかになった。SYNTAXトライアルの5年後の成績が発表され<sup>5)</sup>、SYNTAXスコアが低い軽症例での心事故発生率はCABGとPCIは同等であったが、SYNTAXスコアが中等度以上の重症例での心事故発生率はPCI群はCABG群に比して有意に高率であった。こうした知見から、SPECT上の虚血量やSYNTAXスコアをガイドとした血行再建が予後改善に導く治療戦略と期待されるが、

表1 心イベントの有無による核医学的虚血指標および心機能指標の治療前後の推移の比較

	心イベント (+) N = 36		P value	心イベント (-) N = 409		P value
	治療前	治療後		治療前	治療後	
SSS%	18.3 ± 11.4	14.0 ± 11.2	0.0082	19.3 ± 10.9	10.0 ± 10.7	< 0.0001
SRS%	5.3 ± 7.0	6.2 ± 8.8	0.4238	4.7 ± 7.5	4.8 ± 8.1	0.6825
SDS%	13.0 ± 7.4	7.7 ± 8.8	0.0005	14.6 ± 7.9	5.2 ± 6.0	< 0.0001
0%	0	0%		0	0%	
1-4.9%	0	0%		0	0%	
≥ 5%	36	100%		409	100%	
LVEF						
安静時	52.1 ± 12.7	53.8 ± 13.1	0.3671	57.9 ± 14.2	60.6 ± 13.6	< 0.0001
負荷時	50.3 ± 13.3	50.5 ± 13.5	0.8744	55.3 ± 13.6	58.7 ± 13.1	< 0.0001
LVEDV						
安静時	102.6 ± 43.5	101.5 ± 42.7	0.8505	91.1 ± 43.0	87.8 ± 39.5	0.0018
負荷時	124.9 ± 48.7	118.2 ± 47.9	0.2884	108.3 ± 46.9	101.6 ± 43.7	< 0.0001
LVESV						
安静時	54.2 ± 35.7	51.9 ± 37.0	0.6460	43.2 ± 37.1	39.6 ± 33.6	0.0001
負荷時	68.5 ± 42.6	64.8 ± 42.1	0.4786	53.6 ± 40.6	46.5 ± 36.4	< 0.0001

SPECT上の虚血定量とSYNTAXスコアとの関連および心事故予測に関する報告は我が国では過去にないため、本研究結果が日常診療での冠血行再建治療に与える意義は大きいと考えられる。

## 5. 結 語

冠血行再建術成功後の心事故予測において、解剖学的重症度と虚血改善量のコンビネーションによる評価は心事故リスクの層別化に有用であった。

## 文 献

- 1) Shaw LJ, Berman DS, Maron DJ, Mancini GBJ, Hayes SW, Hartigan PM, et al. Optimal medical therapy with or without percutaneous coronary intervention to reduce ischemic burden: results from the clinical outcomes utilizing revascularization and aggressive drug evaluation (COURAGE) trial nuclear substudy. *Circulation* 2008; 117: 1283-91.
- 2) Berman DS, Kiat H, Friedman JD, Wang FP, Train KV, et al. Separate acquisition rest thalium-201/stress technetium-99m sestamibi dual-isotope myocardial perfusion single-photon emission computed tomography: A clinical validation study. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:1455-64.
- 3) Yoda S, Nakanishi K, Tano A, Hori Y, Suzuki Y, Matsumoto N, Hirayama A. Major cardiac event risk scores estimated with gated myocardial perfusion imaging in Japanese patients with coronary artery disease. *J Cardiol* 2016; 67:64-70.
- 4) Hori Y, Yoda S, Nakanishi K, Tano A, Suzuki Y, Matsumoto N, Hirayama A. Myocardial ischemic reduction evidenced by gated myocardial perfusion imaging after treatment results in good prognosis in patients with coronary artery disease. *J Cardiol*; 2015; 65: 278-84.
- 5) Morice MC, Serruys PW, Kappetein AP, Feldman TE, Stähle E Colombo A, et al. Five-year outcomes in patients with left main disease treated with either percutaneous coronary intervention or coronary artery bypass grafting in the synergy between percutaneous coronary intervention with taxus and cardiac surgery trial. *Circulation*. 2014; 129:2388-94.



## 下痢症ウイルスの分子疫学的研究

Sheikh Ariful Hogue<sup>1), 2)</sup>, 早川 智<sup>1)</sup>, 牛島廣治<sup>1)</sup>

### Molecular epidemiology of viral gastroenteritis

Sheikh Ariful Hogue<sup>1), 2)</sup>, Satoshi HAYAKAWA<sup>1)</sup>, Hiroshi USHIJIMA<sup>1)</sup>

#### 要旨

小児下痢症の原因となるウイルスを同時に検出する方法を開発し、わが国とバングラデシュにおいて再現性をもって患者糞便と下水、河川水など環境中のウイルスを検出することができた。特に、ロタウイルスワクチンは感染頻度を減らすのみならず、重症度を低下させることを明らかにした。

#### 1. はじめに

上下水道のインフラストラクチャが整っていない途上国では、細菌あるいはウイルスによる胃腸炎が大きな問題である。マラリアやジカ、デングなど節足動物媒介感染や性感染症と並び旅行者感染症の中で最も多くみられるが、現地人の間でも流行を繰り返し、とくに小児の場合にはしばしば生命にかかわることがある。ロタウイルスのように有効なワクチンが開発されても予防効果は完全ではなく、免疫学的に異なったウイルス株の流行を見ることも多い。本研究では、ロタワクチンによる集団の免疫応答の変化と、環境中における下痢症ウイルスの存在様式と頻度について分子疫学的研究を行った。

#### 2. 目的

##### 1) 2017年に流行したG8P[8]ロタウイルスに対するロタウイルスワクチンの効果

ロタウイルスは依然として急性ウイルス性胃腸炎の大きな原因となっている。通常は幼児期に感染し、下痢・嘔吐を示すが、加齢とともに免疫ができて症状は軽くなる。ヒトの場合はA群ロタウイルスが中心であるが、その中でもG1P[8], G2P[4],

G3P[8], G4P[8]とG9P[8]が原因となっている。その中でも特にG1P[8]が最も重要であるが、稀にG6, G8, G12が検出される。現在では、ロタウイルス胃腸炎による重症化をワクチンにより予防することを目的にRotarixとRotaTeqという1価と5価のワクチンが使用されている。しかし、これら2つのワクチンにはG8は含まれておらず、G8の感染予防が可能かどうかは不明である。本研究では、G8P[8]の流行時にワクチンの有無による症状の軽重を検討した。

##### 2) ダッカ市の下水中の腸管ウイルスの分子疫学的研究

近年、細菌性食中毒による死亡が抗菌薬の適切な投与で減少する一方、腸管ウイルスによるウイルス性食中毒は減少していない。現在140種以上のウイルスがヒトの腸管感染症に関係するとされており、主要なものとしてロタウイルス、ノロウイルス、A型肝炎ウイルス、アストロウイルス、アデノウイルスがあげられる。バングラデシュでは、小児下痢症患者にロタウイルス(33%)、ノロウイルス(28%)が多く見いだされるが、アストロウイルス(3%)、

1) 日本大学医学部

2) Cell and Tissue Culture Laboratory, Centre for Advanced Research in Sciences (CARS), University of Dhaka, Dhaka, Bangladesh

早川 智 : hayakawa.satoshi@nihon-u.ac.jp

アデノウイルス (2%) の報告もある。ロタウイルスの中では、G2 (46%), G1 (25%) が主要なウイルスサブタイプである。これらのウイルスは、食物、水、ヒトの糞便が付着した器物などから伝播するが、感染力の強ささと重篤性から、ノロウイルスが最も注目されている。ノロウイルス感染が蔓延する原因の一つは、小児期の免疫が保持されず大人でも感染を繰り返すことや有効なワクチンが存在しないためである。ノロウイルス、ロタウイルスを含め、糞便中に排泄された下痢症ウイルスは先進国においては下水として不活化処理される。しかしながらバングラデッシュなど途上国では下水は処理をされずに直接、川や排水路に流される。下水を含む河川水はしばしば灌漑、洗濯、水泳などに利用される。雨季には下水が洪水として家屋に流れてくることもある。バングラデッシュの下水の細菌汚染は既に調べられているが、ウイルスについては殆ど報告がない。本研究ではウイルス性下痢症で重要なロタウイルス、ノロウイルス、アデノウイルスの有無について住宅地および病院近辺の下水を調査した。

### 3. 対象と方法

- 1) 日本及びバングラデッシュにおいて倫理委員会と患者あるいは保護者の同意を得て、遺伝子検出法により下痢便検体からウイルスのスクリーニングを行った。A群ロタウイルス陽性の場合、遺伝子型、遺伝子配列をさらに調べた。G8P[8]陽性の場合にはワクチン使用の有無、Vesikariスコアを用い重症度の比較を行った。
- 2) 2017年2月から10月の全国6か所(北海道、東京、静岡、京都、大阪、佐賀のクリニック)の小児の322下痢便検体を用いた。ウイルスRNAを抽出した後、ランダムプライマーを用いてcDNAを作製し、11種のウイルスを4つのセットに分けてmultiplexあるいはmonoplex PCR法で行った。A群ロタウイルスのG遺伝子型(VP7)別、ノロウイルスの遺伝子型別は遺伝子解析を行った後、BLAST検索を用いて型を決めた。また、ロタウイルスのP遺伝子型(VP4)やI遺伝子型(VP6)は型別のmultiplex PCRを用いた。
- 3) 2016年2月から2017年4月までダッカの大学や住宅地付近の6か所の下水から毎月1回500mlをペットボトルに採取した。100mlをポリエチレン

グリコールで濃縮した後に、ウイルスRNAを抽出、cDNAの作製後、RT-PCRを行い、場合によってはNested PCR、遺伝子解析、リアルタイムPCRでの定量を行った。

## 4. 結果

### 4.1 小児下痢症の分子疫学と2017年に流行したG8P[8]ロタウイルスに対するロタウイルスワクチンの効果

- 1) 本研究において検討した322検体中97検体でノロウイルスGII (30%), 68検体でA群ロタウイルス (21%), 58検体でヒトパレコウイルス (18%), 19検体がエンテロウイルス (6%), 16検体がアデノウイルス (5%), 13検体がサポウイルス (4%), 10検体がアストロウイルス (3%)であった。
- 2) 1検体がノロウイルスGI, アイチウイルス, BおよびC群ロタウイルスは見いだされなかった。
- 3) A群ロタウイルス68検体中G8P[8]が78%, G3P[8]が9%, G2P[4]が3%, G9P[8]が9%に見られた。
- 4) ノロウイルスGII97検体中GII.4が83%, GII.2が7%, 9検体は遺伝子型が不明であった。GII.4はSydney\_2012でGII.Pe\_GII.4のリコンビナント型であった。
- 5) 静岡県の1小児科クリニックの2017年2月から7月までの80例の下痢便から58例にA群ロタウイルスを見出した。その中で53例がG8P[8]であった。G8P[8]以外の型との間で重症度には差がなかった。ワクチンを行うことによって重症例が少なくなった。(図1, 表1と2は文献1から引用)

### 4.2 ダッカ市の下水中の腸管ウイルスの分子疫学的研究

- 1) 下水検体延べ85検体中32検体でロタウイルス陽性、41検体がノロウイルス陽性、64検体がアデノウイルス陽性であった。
- 2) 陽性であった11検体を用いロタウイルスの遺伝子型検出を行った。multiplex PCRで遺伝子型を決定した。1検体から1種の遺伝子型を検出したものが4検体、2種のウイルスが5検体、4種の遺伝子型が2検体で検出された。しかし、遺伝子型は特定な型ではなく、G1, G2, G3, G8 および

G9が検出された。

- 3) ロタウイルスの遺伝子型はG3P[8], G9P[8], ノロウイルスはGII.4 (Sydney) であった。
- 4) リアルタイムPCRでロタウイルスが $10^5 \sim 10^7$ コピー数/ml, ノロウイルスは $10^2 \sim 10^3$ コピー数/mlの濃度で見られた。

5. 考 察

本研究の結果を要約すると以下のとおりである。

- 1) 2-6月にかけてG8P[8]という従来稀であった型が流行した。ロタウイルスが6月まで続いていたことは今後も季節との関連を含めて検討する必要がある。また、ノロウイルスは昨年GII.2の大きな流行がみられ、その後再びGII.4の流行と

なりつつあると思われ、2017年の冬の流行も緊急に検討する必要がある。

- 2) 現行のロタウイルスワクチンはG8P[8]症例の中で中等度以上の割合を少なくすることが可能であり、ワクチンとして使用した型以外にも有効であることが判明した。
- 3) バングラデッシュでは、一年を通して下水・河川水中に高頻度でヒトに感染を起こしうる濃度の下痢症関連ウイルスを検出できた。これらのウイルスが現地における小児下痢症、旅行者感染症の原因となると考えられた。

6. 結 語

臨床検体や環境検体を用いたPCRやダイレクト

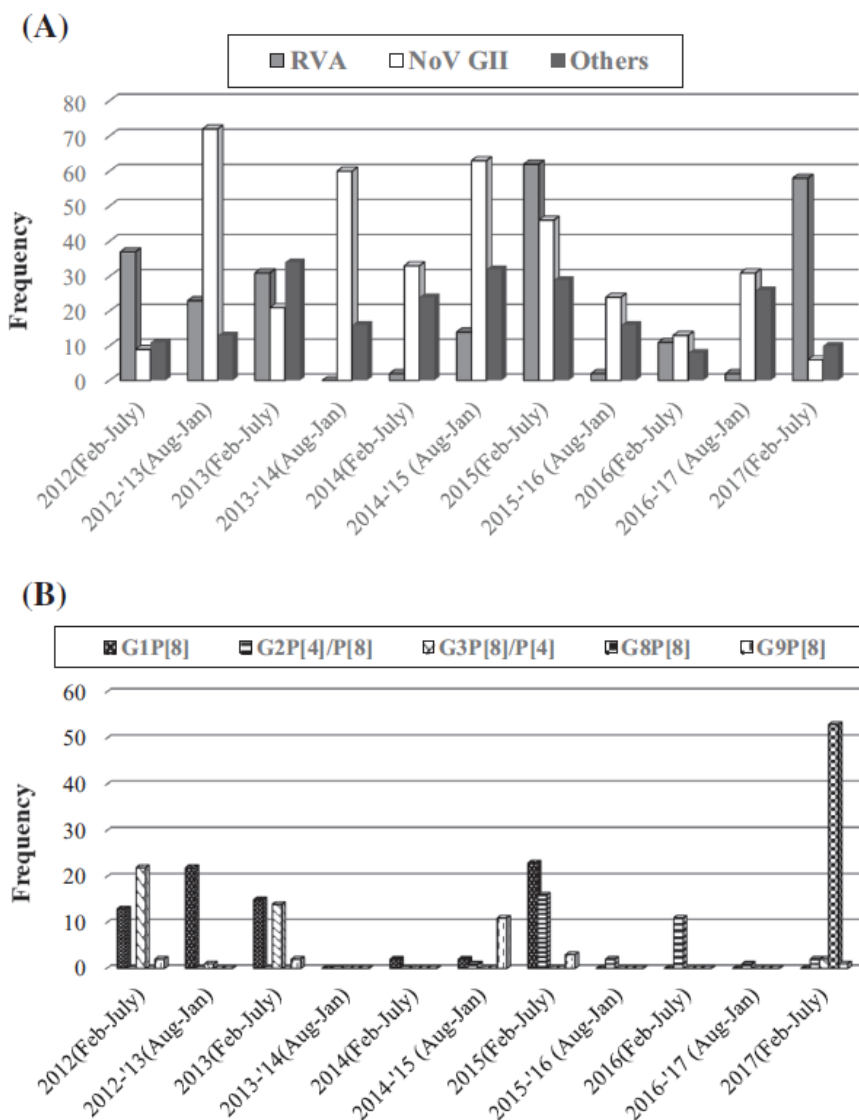


図1 小児下痢症糞便中のウイルス出現頻度

表1 感染者の背景

**Table 1**  
Characteristics of infections.

Characteristics <sup>a</sup>	RVA-positive AGE (n = 58)	RVA-negative AGE (n = 22)	P	G8P[8]-RVA-positive AGE (n = 53)	G8P[8]-RVA-negative AGE (n = 27)	P
Age: median, month (1st-3rd quartile)	28 (20-55)	25 (15-40)	0.15	28 (20-57)	26 (15-39)	0.10
Age group: n (%)						
0-12 m	5 (8.6)	2 (9.1)	0.83	4 (7.5)	3 (11.1)	0.80
13-24 m	18 (31.0)	9 (40.9)		17 (32.1)	10 (37.0)	
25-36 m	12 (20.7)	5 (22.7)		10 (18.9)	7 (25.9)	
37-48 m	6 (10.3)	2 (9.1)		6 (11.3)	2 (7.4)	
49-60 m	4 (6.9)	2 (9.1)		4 (7.5)	2 (7.4)	
>60 m	13 (22.4)	2 (9.1)		12 (22.6)	3 (11.1)	
Sex: n (%)						
Male	38 (65.5)	16 (73)	0.603	35 (66)	19 (70)	0.80
Female	20 (34.5)	6 (27)		18 (34)	8 (30)	
Vesikari score (mean ± SD)	9.53 ± 3.7	6.45 ± 2.9	0.001*	9.38 ± 3.6	7.3 ± 3.7	0.02*
Severity n (%)						
Mild	15 (25.9)	11 (50.0)	0.01	14 (26.4)	12 (44.4)	0.18
Moderate	18 (31.0)	9 (40.9)		18 (34.0)	9 (33.3)	
Severe	25 (43.1)	2 (9.1)		21 (39.6)	6 (22.2)	
Clinical features						
Max. number stools/day (median)	3 (1-5)	2 (1-3)	0.04*	3 (1-5)	2 (1-4)	0.47
Diarrhea duration (median)	4 (2-5)	2 (1-4)	0.002*	4 (2-5)	2 (1-4)	0.04*
Max. number Vomiting/day (median)	2 (0-3)	1 (0-2)	0.30	2 (0-3)	1 (0-3)	0.48
Vomiting duration (median days)	1 (0-2)	1 (0-1)	0.25	1 (0-2)	1 (0-1)	0.58
Temperature (mean ± SD)	38.2 ± 1.1	37.6 ± 1.1	0.03*	38.2 ± 1.1	37.6 ± 1.1	0.02*
Dehydration						
Yes (1-5%, >6%)	42 (34, 8)	9 (8, 1)	0.009*	38 (32, 6)	13 (10, 3)	0.04*
No	16	13		15	14	
Treatment						
Yes (rehydration, hospitalization)	43 (42, 1)	9 (8, 1)	0.005*	39 (38, 1)	13 (12, 1)	0.02*
No	15	13		14	14	

<sup>a</sup> Means were compared by Unpaired t-tests, medians were compared by Mann-Whitney U tests, groups were compared by Pearson Chi-square test. Asterisks indicate statistically significant values.

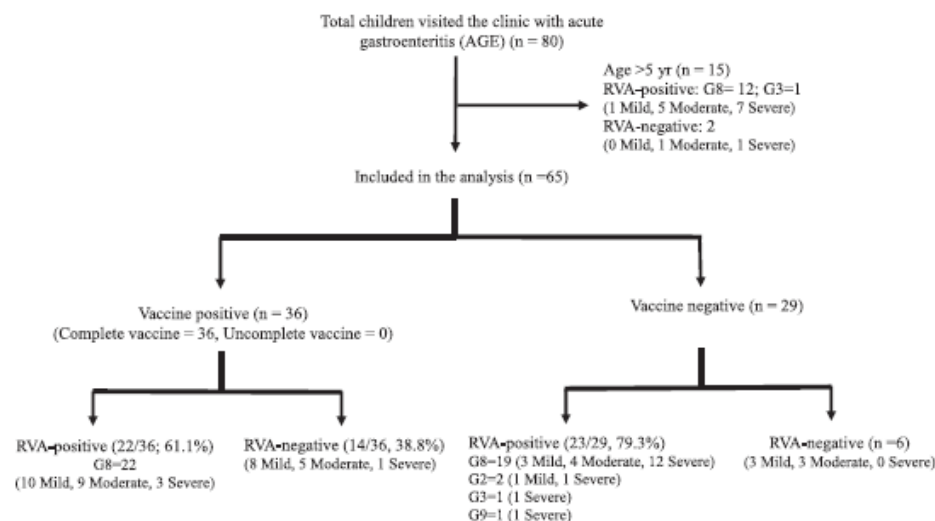


Fig. 2. A flow diagram showing the distribution of AGE in vaccinated and unvaccinated children. Abbreviation: Acute gastroenteritis (AGE); RVA, Rotavirus type A infection.

シーケンスによる分子遺伝学的解析は、ウイルス下痢症の病態並びに環境評価に極めて有用である。これらの方法論は他のウイルス感染症や人獣感染症、感染症学的な環境評価に応用が可能と考えられる。

文 献

1) Hoque SA, Kobayashi M, Takanashi S, Anwar KS, Watanabe T, Khamrin P, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H. Role of rotavirus vaccination on an emerging G8P[8] rotavirus strain causing an

outbreak in central Japan. Vaccine. 2018 Jan 2;36(1):43-49.

2) Thongprachum A, Khamrin P, Pham NT, Takanashi S, Okitsu S, Shimizu H, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Multiplex RT-PCR for rapid detection of viruses commonly causing diarrhea in pediatric patients. J Med Virol. 2017 May;89(5):818-824.

3) Khamrin P, Kumthip K, Supadej K, Thongprachum A, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Noroviruses and sapoviruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in Thailand: increased detection of recombinant norovirus GII.P16/GII.13 strains. Arch Virol. 2017 Nov;162(11):3371-3380.

表2 ロタワクチン接種と臨床造像

**Table 3**  
Comparison of clinical characteristics in vaccinated and unvaccinated RVA-positive AGE cases.

Characteristics <sup>a</sup>	RVA-positive AGE cases		P-value
	Vaccinated (n = 22)	Unvaccinated (n = 23)	
Vesikari Score (mean ± SD)	7.32 ± 3.4	10.9 ± 3.6	0.001*
<i>Clinical features</i>			
Max. number stools/day (median)	2 (1 – 3)	3 (2 – 6)	0.012*
Diarrhea duration (median)	3 (2 – 4)	5 (4 – 6)	0.009*
Max. number Vomiting/day (median)	1 (0 – 2)	2 (1 – 4)	0.108
Vomiting duration (median days)	1 (0 – 1)	1 (0 – 2)	0.195
Temperature (mean ± SD)	37.6 ± 1	38.6 ± 1.3	0.006*
<i>Dehydration</i>			
No	10 (45%)	6 (26%)	0.3
1–5%	11 (50%)	13 (57%)	
>6%	1 (5%)	4 (17%)	
<i>Treatment</i>			
No	9 (41%)	6 (26%)	0.4
Rehydration	13 (59%)	16 (70%)	
Hospitalization	0 (0%)	1 (4%)	

<sup>a</sup> Means were compared by Unpaired t-tests, medians were compared by Mann-Whitney U tests, groups were compared by Pearson Chi-square tests. Asterisks indicate statistically significant values.





## ミトコンドリア病および類縁疾患の研究

杉谷雅彦<sup>1)</sup>

### Research of mitochondrial disease and related disorders

Masahiko SUGITANI<sup>1)</sup>

#### 要旨

近年、細胞内小器官の一つのミトコンドリア機能が障害されて起こるミトコンドリア病が注目されるようになってきた。稀な難病で、確定診断は難しく、専門家は多くはない。平成28年度の50周年記念奨励金による外国人招へい研究者として、この領域の診断・研究業績を多数有するコロロンビア大学Pathology and Cell BiologyのTANJI Kurenai教授を招き、講演、研究指導をお願いした。さらに、ミトコンドリア病が疑われる症例の詳細な検討を行った。

#### 1. 招へいの経過

平成28年度日本大学医学部創立50周年記念奨励金による外国人招へい研究者として、神経筋疾患の病理診断と研究をご専門として活躍されている米国Columbia University Medical Center, Pathology and Cell BiologyのProfessor TANJI Kurenai, M.D., Ph.D.に来日いただき、日本大学医学部において、研究討議を行うと共に講演をいただいた。招へいの経過・内容を報告する。

Tanji教授は、近畿大学医学部卒業、同大学病理学講座に入局、1991年から1993年までの2年間で1995年以降継続して米国コロロンビア大学に勤務し、外国人永住権を有し、2013年にコロロンビア大学教授に就任された。Tanji教授は日本国籍であるが、50周年記念奨励金による外国人招へい研究者の対象が拡大され、選考されるにいった。

平成28年11月6日～平成28年11月12日の1週間、東京にご滞在いただいた。11月6日(日)午後成田国際空港へ到着され、11月7日(月)に高山医学部長・内山研究担当・早川研究副担当を表敬訪問(図1)、研究事務課において事務的説明を受けた。11月8日(火)には、米国で実際に長年勤務した経

験を通して、女性医師としての米国・日本における働き方やコロロンビア大学における医学教育の紹介を、主に病理医局員に対してお話しいただいた。また、CPCに参加し講評をいただき、さらに大学院特別講義として、大学院生・各科の研究者を対象として「Research and Pathology of Mitochondrial Encephalomyopathy」の演題で講演をいただいた。11月9日(水)には国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所を訪問し、CPC参加や研究討議を行い、11月10日(木)に医学部学生向けに病理学特別講義として神経病理の講義を、11月11日(金)には東京女子医科大学の病理学講座、神経内科学講座を訪問し、神経疾患の研究討議を行われた。11月12日(土)にはお別れのご挨拶に医学部研究事務課、薬理学分野、形態機能病理学分野を訪れられた。これらのスケジュールの他に、薬理学分野の浅井教授や筆者とほぼ毎日討議を行った。

#### 2. 研究的事項

Tanji教授はミトコンドリア病に関する多数の研究業績<sup>1)~3)</sup>を有している。その成果の一端を大学院特別講義としてお話しいただいた。予想外に参加

1) 日本大学医学部形態病理学系形態機能病理学分野  
杉谷雅彦: sugitani.masahiko@nihon-u.ac.jp

者が多く、熱心な質疑応答がなされ、好評であった。

ミトコンドリア病は30年程前より注目されはじめた疾患で、細胞内小器官のひとつでエネルギー産生を司るミトコンドリアの機能が障害される事により生じる。原因として、核DNA上の遺伝子の変異の場合とミトコンドリアDNA (mt DNA) の異常の場合があり、いずれも遺伝子上の変異が同定されている。ミトコンドリア病は中枢神経症状を呈することが多く、小児科や神経内科で見つかることが多いが、患者の症状は、神経・筋、眼、心、肺、肝、膵、腎、内分泌等多岐にわたり、症例は各科領域に及ぶ。我々の研究対象の肝臓においても、ミトコンドリア肝症の病態が知られているが、本邦では Mitochondrial Depletion Syndrome, Alpers Syndrome, Navajo Neurohepatopathy 等はまれである。Tanji 教授の協力を得て、この領域に着目し、研究を進めることにしている。診断に関しては「ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究班」の診断基準があり、それに則り、確定診断につながる生化学、病理学、遺伝子学的検索方法の整備が重要で、その上で日本における特徴的な所見、欧米やアジアの症例との差異を研究することを考えている。

Tanji 教授の日本滞在期間が一週間と短い期間であったことと、我々が目指すミトコンドリア肝症の

症例が見つからず、招へい時に系統的な実験には至らなかった。しかし、Tanji 教授は米国で実験研究のみならず神経筋症例の病理コンサルティング業務を行っており、筆者を通じて他施設の病理医よりミトコンドリア病との関連性が疑われた剖検症例のコンサルテーション依頼があり、その検討を行った。

### 3. 症例検討

症例は、遺伝性視神経萎縮を有し、中年期以降に認知機能低下、運動障害が出現した50歳代男性。主訴は、応答が乏しい。既往歴に鬱病あり、アレルギーなし、嗜好に喫煙・飲酒なし、家族歴に視神経萎縮の身内がいる。現病歴として、2年前から物忘れが強くなり近医にて若年性認知症と診断され、1年前に下肢筋力低下が出現、数ヶ月前には飲み込みが遅くなり、食事は全介助であった。認知機能はさらに低下し、誤嚥性肺炎を併発し、治療と精査の為に地域基幹病院に入院した。治療を受けるも死に至り、剖検が施行された。入院時の一般理学的所見、神経学的所見、血液生化学所見、MRI所見、脳波や針筋電図等の神経生理検査、剖検による組織病理所見、電子顕微鏡写真等が示された。臨床診断は、前施設での遺伝子診断の結果から、LHON (Leber's Hereditary Optic Neuropathy) 疑いであり、OPA1 遺



図 1

伝子変異によるDOA（優性遺伝性視神経萎縮症）との鑑別が議論された。ミトコンドリア病関連遺伝子に変異は認められなかった。

Tanji教授からは次のような意見があった。形態学的に観ると、一般に、LHON phenotypeは、*dystonia*や*cardiac pre-excitation syndrome*を伴うことはあっても、本症例のように高度の*myopathic change*を起こした例を文献上でも、直接的にも経験したことがなく、*Parkinsonism*を稀に伴う事は報告されているが、これも非常に例外的と考えられる。遺伝学的には、血縁女性二人が罹患していることから、*X-linked dominant trait*でない限り、*X-linked recessive*や*maternal inheritance*ではないわけで、*autosomal dominant* (AD, probably) か、*autosomal recessive* (AR, less likely) のパターンが考えられ、その場合、LHON mutations (mt DNA ND1, ND4, ND6) は可能性として、殆ど無いといってもいいのではないか。LHON susceptibility geneだけで*pathogenesis*は証明でき難いかと思われる。以上、本症例はLHONの可能性は低いと考えられ、この家族に観られる遺

伝的疾患は、それがnuclear DNA異常に伴う常染色体遺伝のものであったとしても、ミトコンドリア病に限らないと考えられ、その枠を超えた検索が必要だと考える。

現在、他大学の講座において、全ゲノム解析が進行中とのことであり、その結果が期待される。稀な難解症例に関する有意義な症例検討であった。

## 文 献

- 1) Tanji K, Gamez J, Cervera C, Mearin F, Ortega A, Torre J, Montoya J, Andreu AL, DiMauro S, Bonilla E. The A8344G mutation in mitochondrial DNA associated with stroke-like episodes and gastrointestinal dysfunction. *Acta Neuropathol.* 2003;105:69-75.
- 2) Tanji K, Bhagat G, Monzon BS, Bonilla E, Lefkowitz JH. Oncocytic hepatocytes; Are they a consequence of mitochondrial dysfunction. *Liver Int.* 2003;13:1-7.
- 3) Tanji K, Bonilla E. Light microscopic methods to visualize mitochondria on tissue sections. *Methods* 2008; 46(4): 274-280.

## 機能神経外科におけるニューロモデュレーション

山本隆充<sup>1)</sup>, 深谷 親<sup>1)</sup>, 渡辺 充<sup>1)</sup>, 小林一太<sup>1)</sup>, 大島秀規<sup>1)</sup>, 吉野篤緒<sup>1)</sup>, 関口真一<sup>2)</sup>

## Neuromodulation in functional neurosurgery

Takamitsu YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Chikashi FUKAYA<sup>1)</sup>, Mitsuru WATANABE<sup>1)</sup>,  
Kazutaka KOBAYASHI<sup>1)</sup>, Hideki OSHIMA<sup>1)</sup>, Atsuo YOSHINO<sup>1)</sup>, Shinichi SEKIGUCHI<sup>2)</sup>

## 要旨

ニューロモデュレーション技術が機能神経外科疾患の治療に臨床応用され、難治性疼痛、不随意運動、遷延性意識障害、運動麻痺などの治療において、新たな治療方法が開発されている。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た機能神経外科におけるニューロモデュレーションについて報告する。

## 1. はじめに

ニューロモデュレーション技術としては、脳深部刺激療法（DBS）、脊髄刺激療法（SCS）、経頭蓋磁気刺激療法（TMS）などがある（図1）。これらの技術を用いて、難治性の脳卒中後疼痛、不随意運動（パーキンソン病、本態性振戦など）、遷延性意識障害（vegetative state；VS, minimally conscious state；MCS）、脳卒中後運動麻痺の新たな治療法について検討したので報告する。

## 2. 対象及び方法

## 1) 難治性疼痛

脳卒中後疼痛に対してDual-lead spinal cord stimulation (Dual-lead SCS) を行い、長期効果について検討した<sup>1)</sup>。対象は27例で、ドラッグチャレンジテストを行い、Dual-lead SCS の効果と比較した。また、併用薬としてプレガバリン、抗うつ薬、抗不安薬に加えて、必要な症例には低用量ケタミン点滴療法を施行し、Dual-lead SCS との併用効果について検討した<sup>2)</sup>。

## 2) 不随意運動

これまで視床Vim核刺激が振戦の制御に有効であることが報告されているが、視床下部刺激との違いについて、難治性の本態性振戦と脳卒中後振戦の症例で比較した<sup>3)</sup>。また、パーキンソン病に対する脳深部刺激療法の術中に、視床下核の単一ニューロン活動を記録し、発火活動の周波数解析を行った。さらに、diffusion tensor imaging (DTI) を用いたSTN-DBSのターゲットングについて検討した<sup>4)</sup>。

## 3) 遷延性意識障害

VSならびにMCSに対して、auditory brainstem response (ABR), somatosensory evoked potential (SEP), Pain-related P250 と脳波連続周波数分析を用いた電気生理学的評価を行った<sup>5)</sup>。またMCSには脊髄刺激<sup>6)</sup>、VSには脳深部刺激<sup>7)</sup>を施行し、電気生理学的評価と刺激の長期的な効果について比較した。

## 4) 運動麻痺

脳卒中後の運動麻痺と疼痛を合併している症例を対象としてDual-lead SCSを施行し、通常の20Hzで

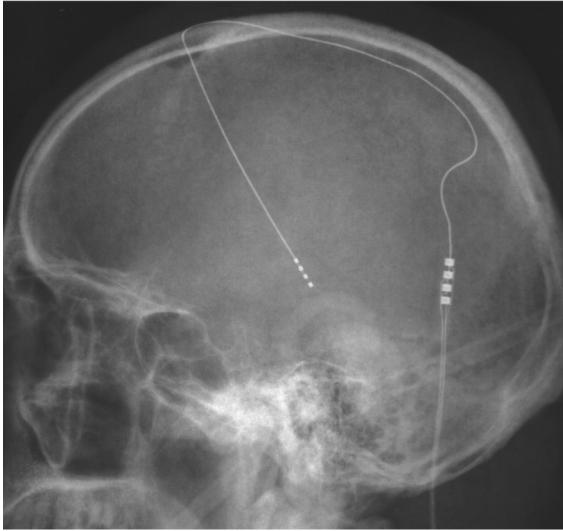
1) 脳神経外科学系神経外科学分野

2) 医学研究支援部門医用電子室

山本隆充：yamamoto.takamitsu@nihon-u.ac.jp



(A)



疼痛部位に刺激感覚 (paresthesia) を誘発する刺激に加えて5Hzでmuscle twitchを誘発する刺激を行い、疼痛ならびに運動機能回復について検討した<sup>8)</sup>。また、経頭蓋磁気刺激装置を用いた大脳皮質運動野刺激によるF波の変化を記録し、運動機能回復を目的とした慢性の大脳皮質運動野刺激の適応決定におけるF波記録の有用性について検討した<sup>9)</sup>。

#### 5) オンデマンド型脳深部刺激装置の開発

表面筋電図を用いて筋電信号を記録し、動作を開始して振戦が出現した時点 (振戦と同じ周波数のパワーが閾値を越えた時点) でDBSのスイッチがONとなり、振戦が停止しても運動の継続中は刺激が継続され、筋電信号の総パワーが閾値以下となった時点で刺激がOFFとなるオンデマンド型の振戦制御システムを作成した<sup>10)</sup>。また携帯が可能な小型の装置を作成し、日常生活での臨床応用について検討した。

(B)



### 3. 結果

#### 1) 難治性疼痛

Dual-lead SCSのテスト刺激によって、27例中21例 (77.7%) が慢性植込みに移行した。また12ヶ月以上のフォローアップで、21例中15例 (71.4) %で満足できる除痛効果が得られた。特に1本で8極の電極を用いてDual-lead SCSを行なうと、上肢、下肢、体幹に加えて顔面を含む広範囲に脊髄刺激によるparesthesia (刺激感覚) を誘発することができることを明らかにした。また、ドラッグチャレンジテストでケタミンが有効な症例において、脊髄刺激が有効な例が多く認められた<sup>1)</sup>。さらに、5Hzの刺激でmuscle twitchを誘発する刺激を加えることは運動機能

(C)

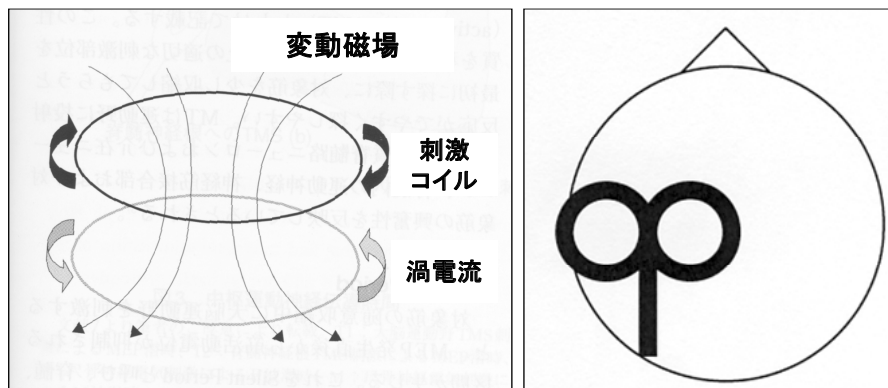


図1 脳深部刺激療法 (A)、脊髄刺激療法 (B)、経頭蓋磁気刺激療法 (C)



の回復に有効で、3か月後には握力、Fugl-Meyer Assessmentでの上肢機能、10秒間に何回グーパーができるか(10秒テスト)にて有意の改善を認めた。

## 2) 不随意運動

視床Vim核刺激と視床下部刺激の振戦抑制効果は同等であったが、視床Vim核刺激と視床下部刺激を同時に行うことが、最も効果的であることを報告した<sup>3)</sup>。術中のニューロン活動記録では、STN内背側部のニューロンおよび運動感覚ニューロンで放電頻度が著しく増加していた。また、パーキンソン病に対する視床下核の脳深部刺激療法では、ハミルトンうつ病評価尺度(HDS)ならびにミニメンタルステート調査(MMSE)にて有意の改善を認め、うつ症状ならびに認知機能の改善にも有効である結果が得られた<sup>11,12)</sup>。さらにdiffusion tensor imaging (DTI)を用いたターゲティングをSTN-DBSに臨床応用し、赤核を基準とした計測法と同等の精度であることを確認した<sup>4)</sup>。

## 3) 遷延性意識障害

いわゆるVSでは電気生理学的な評価を行い、その結果で視床CM-pf complexの刺激を行うことが有効であることを報告した<sup>7)</sup>。一方、MCSでは脊髄刺激が有効で、特にmuscle twitchを誘発する5Hzの頸髄レベルでの刺激では、脳血流が約20%増加するとともに、MCSから脱却した後の運動機能回復も良好であることが明らかとなった<sup>6)</sup>。VSならびにMCSに対する電気生理学的評価では、ABRのV波とSEPのN20を認め、Pain-related P250が7 $\mu$ v以上の振幅で記録され、脳波連続周波数分析でdesynchronization patternを呈する症例が脳脊髄刺激療法の良い適応となることを報告した<sup>7)</sup>。また、このような電気生理学的評価によって脳脊髄刺激療法の適応となる症例は、VSでは107例中16例(15%)であったが、MCSでは19例中14例(74%)と高率に適応となることが明らかになった。また、MCSでは運動機能の回復も良好で、脳脊髄刺激療法の良い適応となることを報告した<sup>6)</sup>。

## 4) 運動麻痺

対象は脳卒中後すでに1年以上経過している6例で、一日の運動野刺激が4時間以内の症例では全例で運動機能が改善し、3例では上肢のFugl-Meyer scaleが5から8点増加した。一方、刺激時間が7~9時間の長時間に及んだ2例では逆にFugl-Meyer scale

が減少したが、早い時期に刺激時間を強制的に4時間以内に制限することで、刺激開始前の状態に回復した<sup>13)</sup>。

経頭蓋磁気刺激装置を用いた大脳皮質運動野刺激によるF波の変化についての検討では、健常成人14例と脳卒中を発症後2年以上経過して痙縮を認める12例を対象とした。F波の出現率は、健常例に比較して脳卒中後の症例で有意に高値であり、脳卒中後の症例では高頻度経頭蓋磁気刺激後によってF波の出現率が有意に低下した。また、健常例に比較して脳卒中後の症例において有意にF/M比が高値であり、脳卒中後症例では高頻度経頭蓋磁気刺激後にF/M比が減少した<sup>9)</sup>。

## 5) オンデマンド型刺激装置の開発：

開発した装置を、企図振戦が著名な本態性振戦と書癱の症例において、システムが作動する精度をテストした。その結果、異なった振戦の症例においても、このシステムが正確に作動することを確認した<sup>10)</sup>。また、激しい企図振戦を認める本態性振戦の4症例で、振戦制御の効果についてessential tremor rating scale (ETRS)で評価した。ETRSの評価項目としては、上肢の振戦の程度を表すitems 5 and 6と上肢の運動機能を表すitems 11-14を用いた。その結果、ETRS score (items 5 and 6)は、オンデマンド型脳深部刺激装置の非使用時のスコアが3.75 $\pm$ 0.46、オンデマンド型脳深部刺激装置の使用時のスコアが0 ( $p < 0.001$ , Wilcoxon signed-ranks test)であり、明らかな改善を認めた。さらに、ETRS score (items 11-14)は、オンデマンド型脳深部刺激装置の非使用時のスコアが11.75 $\pm$ 0.46、オンデマンド型脳深部刺激装置の使用時のスコアが1.5 $\pm$ 0.53 ( $p < 0.001$ , Wilcoxon signed-ranks test)であり、明らかな改善を認めた。

## 4. 考 察

難治性疼痛では、ドラッグチャレンジテストに基づく患者選択とDual-lead SCSが脳卒中後疼痛の治療に有効であり、muscle twitchを誘発する刺激の併用は運動機能回復にも有用であることが明らかとなった<sup>1,14)</sup>。

不随意運動では、術中のニューロン活動記録で、STN内背側部のニューロンおよび運動感覚ニューロンで放電頻度が著しく増加していた事実は、STN

の背外側部は一次運動野からの入力を受け、運動感覚ニューロンはSTNの背側部に分布していることから、パーキンソン病の病態解明に重要な所見と考えられる。また、脳深部刺激療法において1か所のターゲットに限らず、複数のターゲットを選択する有用性を明らかにした<sup>3)</sup>。また、STN-DBSはパーキンソン病のうつ症状ならびに認知機能の改善にも有効であることを報告し、DTIを用いたSTN-DBSのターゲティング方法が新たな方法として利用することが可能であることを明らかにすることができた<sup>4, 11, 12)</sup>。

運動麻痺に対する5Hzでmuscle twitchを誘発する脊髄刺激の効果を報告したが、脊髄後索刺激でmuscle twitchを誘発する機序としては、後根へ電流がspreadして脊髄反射弓を刺激する、あるいは脊髄後角から後索へのファイバーを逆行性に刺激するものと考えられた<sup>8)</sup>。脳卒中後疼痛の症例では運動麻痺を合併していることが多いので、脊髄刺激によって疼痛部に20Hzでparesthesiaを誘発して疼痛を軽減することが可能である。同時に5Hzでmuscle twitchを誘発する刺激を加えることによって、疼痛と運動麻痺の治療を同時に行うことができることを明らかにした。このような方法は、脊髄刺激を用いた新たなニューロモデュレーション技術として、今後の発展が期待される。

オンデマンド型刺激装置として、今回の研究では表面筋電図を刺激のON-OFFのトリIGGERとして利用した<sup>10)</sup>。最近の研究では、パーキンソン病の術中ニューロン活動記録で、STNから記録されるlocal field potentials (LFPs)の $\beta$ 帯域のオシレーション活動が、パーキンソン病の無動と関係することが報告されている。今後はLFPsの $\beta$ 帯域のオシレーション活動にtriggerしてDBSのON-OFFを行うシステムの開発を計画している。

## 5. 結語

脳脊髄刺激装置、経頭蓋磁気刺激装置などを用いたニューロモデュレーション技術の進歩によって、疼痛、不随意運動、意識障害、運動麻痺などの治療が可能となったことから、これらの治療を総合的に行うことのできるニューロモデュレーションセンターは大変に重要な役割を担っている。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)に連携して設立された本学のニューロモデュレーションセンターの今後のさらなる発展に期待する。

## 文 献

- 1) 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: 744-75
- 2) Yamamoto T, Katayama Y, Obuchi T, et al: Drug-challenge test and drip infusion of ketamine for post-stroke pain. *Pain Research* 2009; 24: 191-199
- 3) Kobayashi K, Katayama Y, Oshima H, et al: Multitarget, dual-electrode deep brain stimulation of the thalamus and subthalamic area for treatment of Holmes' tremor. *J Neurosurg* 2014; 120: 1025-1032
- 4) Watanabe M, Sumi K, Obuchi T, et al: Application of diffusion tensor imaging (DTI) tractography as a targeting modality for deep brain stimulation (DBS) of the subthalamic nucleus (STN). *J Nihon Univ Med Associ* 74: 63-68, 2015
- 5) Yamamoto T, Katayama Y: Deep brain stimulation therapy for the vegetative state. *Neuropsychological Rehabilitation* 2005; 15: 406-413
- 6) Yamamoto T, Katayama Y, Obuchi T, et al: Spinal cord stimulation for treatment of patients in the minimally conscious state. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2012; 52: 475-81
- 7) Yamamoto T, Katayama Y, Kobayashi K, et al: Deep brain stimulation for the treatment of vegetative state. *Eur J Neurosci*. 2010; 32: 1145-1151
- 8) Yamamoto T, Watanabe M, Obuchi T, et al: Spinal cord stimulation for vegetative state and minimally conscious state: Changes in consciousness level and motor function. *Acta Neurochir Suppl* 2017; 124: 37-42
- 9) Wupuer S, Yamamoto T, Katayama Y, et al: F-wave suppression induced by suprathreshold high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in poststroke patients with increased spasticity. *Neuromodulation* 2013; 16: 206-211
- 10) Yamamoto T, Katayama Y, Ushiba J, et al: On-demand control system for deep brain stimulation for treatment of intentional tremor. *Neuromodulation* 2013; 16: 230-235
- 11) Fukaya C, Yamamoto T: Deep brain stimulation for Parkinson's disease: recent trends and future direction. *Neurol Ned Chir (Tokyo)* 2015; 55: 422-431
- 12) Fukaya C, Watanabe M, Kobayashi K, et al: Predictive factor for long-term outcome of subthalamic nucleus deep brain stimulation for parkinson's disease. *Neurol Ned Chir (Tokyo)* 2017; 15: 166-171
- 13) Yamamoto T, Katayama Y, Watanabe M, et al: Changes in motor function induced by chronic motor cortex stimulation in post-stroke pain patients. *Stereotact Funct Neurosurg* 2011; 89: 381-389
- 14) Matsumura Y, Hirayama T, Yamamoto T: Comparison between pharmacological evaluation and rTMS-induced analgesia in post-stroke pain patients. *Neuromodulation* 2013; 16: 349-354

## マウス急性移植片対宿主病モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果

村井健美<sup>1)</sup>, 石毛美夏<sup>1)</sup>, 風間智彦<sup>2)</sup>, 加野浩一郎<sup>3)</sup>,  
高橋昌里<sup>1)</sup>, 麦島秀雄<sup>4)</sup>, 松本太郎<sup>2)</sup>

## Effect of dedifferentiated fat cell transplantation in a mouse model of acute graft-versus-host disease

Takemi MURAI<sup>1)</sup>, Mika ISHIGE<sup>1)</sup>, Tomohiko KAZAMA<sup>2)</sup>, Koichiro KANO<sup>3)</sup>,  
Shori TAKAHASHI<sup>1)</sup>, Hideo MUGISHIMA<sup>4)</sup>, Taro MATSUMOTO<sup>2)</sup>

## 要旨

造血幹細胞移植において移植片対宿主病 (graft versus host disease: GVHD) はしばしば治療に難渋する重大な合併症である。近年、ステロイド抵抗性急性GVHDに対し、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) を用いた細胞治療の有効性が報告され、臨床応用が開始されている。脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) は成熟脂肪細胞を天井培養することにより調製されるMSC様細胞である。本研究では、マウス急性GVHDモデルに対しDFATを経静脈的に投与し、その治療効果を評価した。その結果、DFAT投与により、GVHDに伴う体重減少が抑制され、GVHDの臨床スコアを有意に改善することが明らかになった。急性GVHDに対するDFATを用いた細胞治療の可能性が示唆された。

## 1. 背景および目的

造血幹細胞移植に伴う重大な合併症として移植片対宿主病 (graft versus host disease: GVHD) がある。レシピエントの抗原提示細胞によるドナーT細胞の活性化により、免疫拒絶が惹起されて起こる病態である。治療としてステロイドや免疫抑制剤投与が行われるが、しばしば治療に抵抗性を示し、重篤な場合は死に至る。薬物治療に抵抗性を示す急性GVHDに対して、近年、細胞治療が注目されており、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) を用いた臨床応用が開始されている<sup>1)</sup>。Matsumotoら<sup>2)</sup>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実用性の高い細胞治療用ソースとして期待される。本研究では、マウス急性GVHDモデルにDFATを経静脈投与し、その治療効果を検討した。

## 2. 方法

MHC不一致の急性GVHDモデルは、Schroederらの既報<sup>3)</sup>に従い作成した。計30頭のマウスをControl群、GVHD群、GVHD+DFAT群の3群に分けた。Control群は、放射線照射後のレシピエントマウスにドナーマウス骨髄細胞を移植した。GVHD群は、放射線照射後のレシピエントマウスにドナーマウス骨髄細胞と脾臓CD3<sup>+</sup>細胞を同時移植した。GVHD+DFAT群は、放射線照射後のレシピエントマウスにドナーマウス骨髄細胞と脾臓CD3<sup>+</sup>細胞を

1) 日本大学医学部小児科科学系小児科学分野  
2) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野  
3) 日本大学生物資源科学部応用生物科学科  
4) 川越予防医療センター・クリニック  
松本太郎: matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

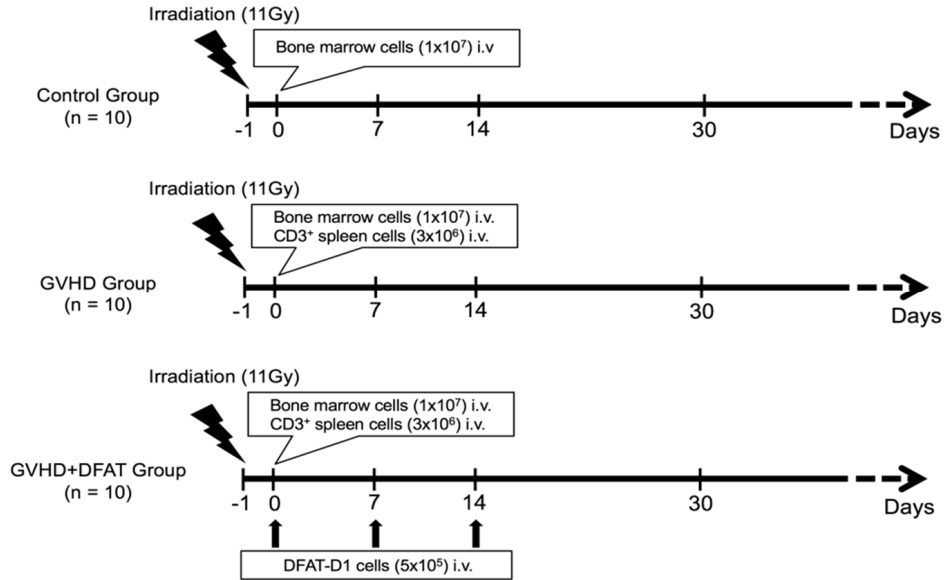


図1 実験プロトコール

同時移植し、マウスDFAT (5 x10<sup>5</sup>) を移植当日、7日後、14日後に尾静脈より投与した(図1)。各群の評価は、Kaplan-Meier 曲線による生存分析、体重の推移、GVHD 臨床スコア<sup>4)</sup>、移植21日後の大腸の組織学的検討にて行った。

### 3. 結果

各群の生存分析では、Control群は、移植後84日の観察期間中、死亡は10頭中2頭のみであった。GVHD群は、移植後20日目より死亡例が出現し、54日目には10頭全て死亡した。一方、GVHD+DFAT群は移植後24日目から死亡が認められたものの、84日目まで生存例が認められた。各群の体重推移の比較を図2に示す。GVHD群とGVHD+DFAT群はControl群に比べ、7日目より有意な体重低下を認めた。GVHD+DFAT群は全期間を通してGVHD群よりも体重減少が軽度であり、14、24日目の時点において両群間に有意差(p<0.05)を認めた。各群の臨床症状の比較では、移植21日以後GVHD+DFAT群はGVHD群に比べ、活動性の低下、亀背、脱毛の程度が弱い傾向があり、臨床スコアは有意に低下した。各群の大腸組織所見は、Control群がほぼ正常であったのに対し、GVHD群は腸管径の拡張、絨毛構造の破壊、著明な炎症性細胞の浸潤が認められた(図3)。一方、GVHD+DFAT群は炎症性細胞の浸潤は認めるものの、絨毛構造は比較的保持

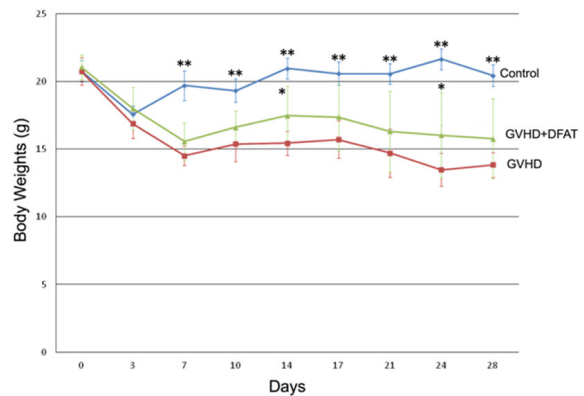


図2 各群の体重推移の比較  
(村井健美 他, 日大医学雑誌, 2017, 76 (4・5) :187-194より転載)

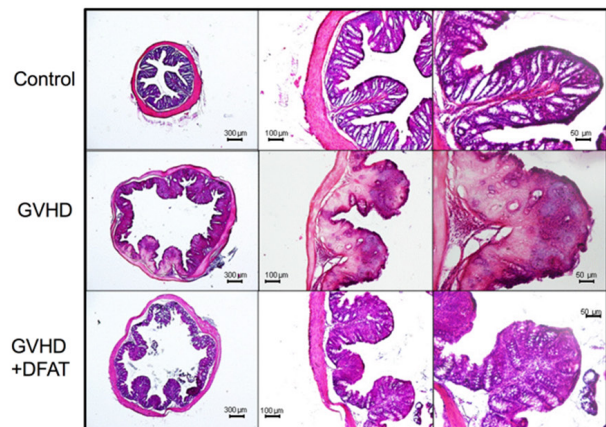


図3 各群の大腸組織像の比較



され腸管径の拡張も軽度であった。

#### 4. 考 察

本研究では、DFAT全身投与により急性GVHDが抑制できる可能性が示された。DFATはMSCと類似した液性因子の分泌プロファイルを示すことが報告されている<sup>5)</sup>。したがって、MSCで報告されているTGF- $\beta$ , HGF, NO, HLA-G, IDO-1といった免疫制御に関わる液性因子の分泌や、制御性T細胞の誘導促進作用を介して治療効果を示したと予想される。造血幹細胞移植後の急性GVHD患者では、骨髄MSCを採取することは困難であるため、同種他家MSC移植が行われている。DFATは少量の脂肪組織から低侵襲性に大量調製できることから、患者自身の細胞を用いた治療が可能となることが予想される。今後ヒトDFATを用いた前臨床試験を行い、有効性や安全性を検証することが望まれる。

#### 5. 結 語

マウス急性GVHDモデルに対しDFATを静脈内投与すると、GVHDに伴う臨床症状や病理所見を改善できることが明らかになった。急性GVHDに対するDFATを用いた新規細胞治療の可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371:1579-1586.
- 2) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J. Cell. Physiol.* 2008;215:210-222.
- 3) Schroeder MA, DiPersio JF. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis. Model. Mech.* 2011;4:318-333.
- 4) Fukui J, Inaba M, Ueda Y, et al. Prevention of graft-versus-host disease by intra-bone marrow injection of donor T cells. *Stem Cells* 2007;25:1595-1601.
- 5) 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 Eng Part A* 2013;19:1792-1802.



## 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

岡山吉道<sup>1)</sup>, 豊島翔太<sup>1)</sup>, 鐘ヶ江佳寿子<sup>1)</sup>, 布村 聡<sup>1)</sup>, 高橋恭子<sup>2)</sup>, 浅野正岳<sup>3)</sup>, 千島史尚<sup>1)</sup>, 斎藤 修<sup>1)</sup>, 山本樹生<sup>1)</sup>, 菅井和子<sup>4)</sup>, 松本健治<sup>5)</sup>, 村上 誠<sup>6)</sup>, 伊崎聡志<sup>1)</sup>, 西盛信幸<sup>1)</sup>, 遠藤嵩大<sup>1)</sup>, 藤澤大輔<sup>1)</sup>, 柏倉淳一<sup>1)</sup>, 葉山惟大<sup>1)</sup>, 藤田英樹<sup>1)</sup>, 坂本朋美<sup>1)</sup>, 羅 智靖<sup>1)</sup>, 長澤洋介<sup>1)</sup>, 岩田光浩<sup>1)</sup>, 北村 登<sup>1)</sup>, 武井正美<sup>1)</sup>, 丸岡秀一郎<sup>1)</sup>, 権 寧博<sup>1)</sup>, 照井 正<sup>1)</sup>

## Development of new therapeutic strategy and investigation of the pathogenesis of severe immunological and allergic diseases

Yoshimichi OKAYAMA<sup>1)</sup>, Shouta TOYOSHIMA<sup>1)</sup>, Kazuko KANEGAI<sup>1)</sup>, Satoshi NUNOMURA<sup>1)</sup>, Kyoko TAKAHASHI<sup>2)</sup>, Masatake ASANO<sup>3)</sup>, Fuminao CHISHIMA<sup>1)</sup>, Shu SAITO<sup>2)</sup>, Tatsuo YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Kazuko SUGAI<sup>4)</sup>, Kenji MATSUMOTO<sup>5)</sup>, Makoto MURAKAMI<sup>6)</sup>, Satoshi IZAKI<sup>1)</sup>, Nobuyuki NISHIMORI<sup>1)</sup>, Takahiro ENDO<sup>1)</sup>, Daisuke FUJISAWA<sup>1)</sup>, Jun-ichi KASHIWAKURA<sup>1)</sup>, Koremasa HAYAMA<sup>1)</sup>, Hideki FUJITA<sup>1)</sup>, Tomomi SASAKI-SAKAMOTO<sup>1)</sup>, Chisei RA<sup>1)</sup>, Yosuke NAGASAWA<sup>1)</sup>, Mitsuhiro IWATA<sup>1)</sup>, Noboru KITAMURA<sup>1)</sup>, Masami TAKEI<sup>1)</sup>, Shuuichiro MARUOKA<sup>1)</sup>, Yasuhiro GON<sup>1)</sup>, Tadashi TERUI<sup>1)</sup>

## 要旨

1. OAおよびRA患者の滑膜組織マスト細胞はIL-17Aの主要な産生細胞でないことを確認した。
2. ヒト妊娠初期脱落膜マスト細胞および培養脱落膜マスト細胞のプロテアーゼの発現パターンは, tryptasehighchymaselowのMCTCタイプであり, ヒスタミン産生能を有していた。
3. 慢性特発性蕁麻疹患者の血清において, 抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE自己抗体はFcεRIを架橋する能力を有していることから, 慢性特発性蕁麻疹の病態に関与していることが示唆される。
4. ヒトEBV感染hu-NOGマウスでは, EBV感染によりB細胞にヒトRANKL発現が誘導され, ヒト破骨細胞の分化および活性化が異常亢進し, 関節に骨びらんを形成することが示唆された。
5. Liquid covered culture したヒト気管支上皮細胞と気道上皮前駆細胞である基底細胞株VA10をdsRNA, ATPで刺激した結果, コントロールと比較してTrans Electric Resistanceを減弱させ, 傍細胞透過率を増加させた。

## 1. はじめに

罹患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ツ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。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, 気管支喘息の発症と増悪の

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

機序の解明である。

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。

## 2. 整形外科領域

### 関節リウマチ滑膜マスト細胞におけるIL-17Aの発現

**背景：**Interleukin (IL) -17Aは、関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) の病態においてreceptor activator for NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) の発現を誘導し破骨細胞の分化を亢進させ過剰な骨破壊を生じさせている。RAや変形性関節症 (osteoarthritis; OA) 患者の滑膜組織マスト細胞は、IL-17Aを発現していると報告されているが、そのIL-17Aの発現頻度は報告により様々である。また、ヒトマスト細胞からIL-17Aが産生されるという報告はあるが詳細は不明である。

**目的：**OAおよびRA患者の滑膜組織マスト細胞におけるIL-17Aの発現頻度について検討することと、各種刺激によって滑膜マスト細胞からIL-17Aが産生されるかどうかについて検討することを目的とした。

**方法：**RAおよびOA患者の人工膝関節置換術によって得られた滑膜組織を、免疫組織化学染色を行い共焦点顕微鏡で観察し陽性細胞数を数えた。RAおよびOA患者の滑膜組織から培養マスト細胞を樹立し、各種刺激後の滑膜培養マスト細胞におけるIL-17AのmRNAの発現とマスト細胞 (マスト細胞数を $10^5$ 個/100  $\mu$ lとした) からのIL-17Aの産生をそれぞれmicroarray解析および定量的reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) とenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で定量化した。

**結果：**全マスト細胞数中のIL-17A陽性細胞数頻度、全IL-17A陽性細胞数中のIL-17A陽性マスト細胞数頻度はOAとRA患者の滑膜において有意差を認めなかった。OAにおいて全IL-17A陽性細胞数中のIL-17A陽性マスト細胞数頻度は25%、RAでは8%であった。培養滑膜マスト細胞は、構成的に少量(10~20 pg/ml)のIL-17Aを分泌していたが、IgEおよ

びIgG依存性刺激、IL-33, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), complement component 5a (C5a), lipopolysaccharide (LPS), IL-23+IL-1 $\beta$ の刺激によってIL-17A産生の増加はみられなかった。

**結論：**滑膜マスト細胞は、RAにおけるIL-17の主な産生細胞ではないと考えられた。

## 3. 婦人科領域

### ヒト脱落膜マスト細胞の特徴と培養ヒト脱落膜マスト細胞の樹立

**背景：**母体にとって胎児は父親の抗原を有するsemi-allograftと考えられるが、胎児は拒絶されず妊娠は維持される。これには胎盤の母体側すなわち脱落膜で免疫寛容をはじめとする妊娠維持機構が成立していると思われる。脱落膜natural killer (NK) 細胞、マクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞は妊娠で重要な役割を演じていることが示され、子宮マスト細胞も着床、胎盤形成および子宮収縮に関与していることが、げっ歯類の研究で示唆されているが、ヒト子宮マスト細胞の妊娠における役割に関しては不明な点が多い。

**目的：**基礎的な検討としてヒト脱落膜組織におけるマスト細胞の特徴を解析し、脱落膜組織より培養マスト細胞を樹立することを目的とした。

#### 対象と方法：

##### (1) 妊娠脱落膜由来マスト細胞の分離

ヒト脱落膜由来マスト細胞は、妊娠初期では、妊娠初期の患者が人工妊娠中絶術を施行された際にその組織の一部から採取した。ヒト脱落膜マスト細胞の組織を酵素処理し細胞を分散した後、単核細胞層をパーコール比重遠心法にて回収した。

##### (2) ヒト脱落膜由来培養マスト細胞の樹立

採取したマスト細胞をSCFおよびInterleukin (IL)-6, 0.1% bovine serum albumin (BSA), Insulin-Transferrin-Seleniumを含んだIscove methylcellulose mediumに懸濁し、24穴プレート用いて37°C, CO<sub>2</sub> 5%の条件で培養した。2週間毎にSCF, IL-6, メチルセルロース無血清培地を追加した。6週目に細胞を50 ml tubeに回収し、液体培地に移して培養継続した。

(3) フローサイトメトリーによるマスト細胞の解析  
組織から抽出したマスト細胞を検索するため、フローサイトメトリーを用いて検討した。マスト細胞

の表面マーカーとしてCD117 (Kit) と高親和性IgE受容体 $\alpha$ 鎖 (Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ), 細胞内マーカーとしてtryptaseとchymaseを染色した。

#### (4) 蛍光免疫組織化学染色法

マスト細胞の局在とその数を調べるため, 脱落膜組織を蛍光免疫組織化学染色した。新鮮凍結切片を作製しHematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い, 脱落膜であることを確認した後tryptaseの染色を行った。

#### (5) 電子顕微鏡による観察

組織は, グルタルアルデヒドと四酸化オスミウム液で固定後エポキシ樹脂に浸透させ, 薄切片を作製し透過型電子顕微鏡を用いて観察した。分離したマスト細胞は固定後, サイトスピンを行い透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

#### (6) マスト細胞のhistamine遊離実験

細胞は1 wellあたり $5 \times 10^2$ 個の濃度で96穴プレートに加え, 抗IgE抗体, 陽性コントロールとして $10^{-6}$ MのA23187を添加し37°C, 30分間インキュベートした。培養上清中のhistamineの測定にはenzyme immunoassay (EIA) kitを用いた。histamine遊離率は, (放出されたhistamine量/未刺激のマスト細胞に含まれる総histamine量)  $\times 100\%$ として算出した。

#### 結果:

##### (1) ヒトの脱落膜の蛍光免疫組織化学染色

蛍光免疫組織化学染色法によって, tryptaseは細胞質に認められた。マスト細胞数は約25個/400倍視野であり, 母体面に多く存在していた。

##### (2) ヒトの脱落膜マスト細胞の分離

妊娠初期中絶検体12例より組織を採取した。採取した検体の妊娠週数は6週から9週であった。脱落膜組織は酵素を用いて細胞を分散した後, パーコールによる比重遠心法で単核細胞層を回収した。脱落膜組織1gあたりキムラ染色陽性マスト細胞数は $14.8 \pm 18.3 \times 10^5$ 個であった。

##### (3) 初期ヒト脱落膜マスト細胞の培養系の樹立

妊娠初期ヒト脱落膜からマスト細胞を分離し, 培養開始後, 12週間目にほぼ100%の純度のマスト細胞が得られた。

(4) 妊娠初期(6週~9週)脱落膜マスト細胞と培養脱落膜マスト細胞におけるtryptaseとchymaseの発現検討

マスト細胞の表面マーカーであるCD117 (Kit) とFc $\epsilon$ RI $\alpha$ に対する抗体を用いて, 妊娠初期脱落膜細胞のフローサイトメーターによる解析を行った。全細胞中のCD117+Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ +マスト細胞は $0.3 \pm 0.2\%$  (n = 11)であった。

脱落膜CD117+Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ +マスト細胞のフェノタイプを解析するため, 脱落膜CD117+Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ +マスト細胞にgateを設定し, CD117+Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ +マスト細胞におけるtryptaseとchymaseの発現を検討した。両者の発現を認めたがtryptase発現のMFIが $12.7 \pm 9.3$ に対して, chymase発現のMFIは $4.5 \pm 5.0$ であった。培養脱落膜マスト細胞においてもtryptaseとchymaseの発現は同程度であった。

(5) 妊娠初期(6週~9週)脱落膜マスト細胞と培養脱落膜マスト細胞の電子顕微鏡による観察

両者の細胞の顆粒は格子型が有意であった。

#### (6) 脱落膜組織マスト細胞の機能の検討

脱落膜分離直後マスト細胞および脱落膜組織培養マスト細胞に抗IgE抗体を添加すると濃度依存性にhistamineを遊離した

**考察・結論:** ヒト妊娠初期脱落膜マスト細胞および培養脱落膜マスト細胞のプロテアーゼの発現パターンは, tryptasehighchymaselowのMCTCタイプであった。顆粒も格子型でありMCTCタイプであった。また, IgEによるhistamineの遊離を検討したところ, 濃度依存性にhistamineの遊離が認められ, 脱落膜マスト細胞は培養および分離直後の両者でhistamine産生能があることが確認された。ヒトではhistamineはblastocyteの着床や絨毛の浸潤, 増殖, 接着因子を発現して胎盤の形成に関与しているとされるので, マスト細胞からのhistamine産生はこれらの機能を担うと推察される。本研究で脱落膜マスト細胞の長期培養系を樹立できたことから, この培養系の確立により脱落膜マスト細胞の着床や胎盤の形成, 早産・陣痛・分娩のメカニズムの解明や解析に役立つと考えられる。

## 4. 皮膚科領域

慢性特発性蕁麻疹患者における抗Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 鎖自己抗体および抗IgE自己抗体の機能解析

背景: 慢性特発性蕁麻疹 (CSU) は, 誘発因子が特定できず痒痒と膨疹の消退を6週以上繰り返す蕁麻疹である。CSU患者の血清中には, 皮膚マスト細



胞や好塩基球を活性化させる因子の存在が報告されており、その因子として高親和性IgE受容体(FcεRI)のα鎖およびIgEに対する自己抗体(抗FcεRIα鎖自己抗体, 抗IgE自己抗体)が知られている。このことから、CSUの発症には自己免疫学的な機序が関与している可能性が考えられている。しかしながら、抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE自己抗体は、健常者や他の自己免疫疾患患者からも検出されているため、実際にCSUの病態にどのように関与しているかは明らかにされていない。本実験では抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE自己抗体の機能を解析し、CSUにおける役割を明らかにすることを目的とした。

**対象および方法：**CSU患者114名、健常人(NC)55名の血清からIgGを精製し、抗FcεRIα鎖抗体濃度および抗IgE抗体濃度を酵素免疫測定法(ELISA)で測定した。改良型IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE)法を用い、抗IgE抗体および抗α鎖抗体によるFcεRIの架橋能を測定した。ROC曲線からカットオフ値を求めた。

**結果：**抗FcεRIα鎖自己抗体濃度および抗IgE自己抗体濃度はCSU患者の方がNC群よりも有意に高かった。抗IgE自己抗体によるFcεRIの架橋能はCSU患者群の方がNC群よりも統計学的に有意に高かった。ROC曲線から得られた最適なカットオフ値は1.153であり、その感度は70.3%、特異度は95.2%であった。抗FcεRIα鎖自己抗体によるFcεRIの架橋能もCSU患者群の方がNC群よりも統計学的に有意に高かった。ROC曲線から得られた最適なカットオフ値は1.283であり、その感度は57.9%、特異度は80.0%であった。抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE自己抗体の濃度とFcεRIの架橋能および臨床的なパラメーター(重症度、罹患期間、男女比、年齢など)とは有意な相関を認めなかった。

**考察：**CSU患者において、抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE自己抗体はFcεRIを架橋する能力を有していることから、CSUの病態に関与していることが示唆される。また、これら自己抗体のFcεRIの架橋能を測定することは、自己抗体が関与するCSUの診断予測に応用できる可能性が考えられる。今後、抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE自己抗体のFcεRIの架橋能が、CSUの治療にどのような影響を及ぼすかを検討し、CSUの診断・治療に資する研究

を行なって行く予定である。

## 5. 血液膠原病内科領域

### Epstein-Barrウイルスと関節リウマチ

**背景：**我々は、NOD/Shi-scid/γcnul (NOG)マウスに臍帯血由来ヒトCD34陽性造血幹細胞を移植し、免疫系をヒト化したヒト化NOG(hu-NOG)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)類似びらん性関節炎を発症するモデルの作製に成功した。我々はこれまでに、本マウスモデルにおけるびらん性関節炎の発症機序を検討し、骨びらん形成の主役がヒト破骨細胞であり、マウス骨髄に存在するヒト破骨細胞前駆細胞から破骨細胞が分化し、骨吸収能を持つ成熟破骨細胞に至ることを明らかにした。そこで本年度は、ヒト破骨細胞の分化・活性化機序を解明するために、破骨細胞の分化・活性化に必須となるreceptor activator nuclear factor-κB(RANK)シグナルを誘導するRANK ligand(RANKL)の供給細胞とEBVとの関係について検討を行った。

**対象および方法：**過去の報告に準じてhu-NOGマウスを作製し、EBVをマウス尾静脈から感染させた。EBVはB95-8細胞株あるいはAkata細胞株から産生されるウイルスを、既存の方法で力価測定を行い低力価で用いた。EBV感染後、びらん性関節炎の発症が認められる8~10週でマウス末梢血を採取し、RANKL発現および発現細胞の解析をflow cytometryにより行った。また、提供者の両親から同意を得て採取した臍帯血から分離した単核球とRamos(EBV-negative B-cell lymphoma cell line, ATCC)細胞をEBVと共にin vitroで培養し、マウス末梢血と同様手法によりRANKL発現について解析した。同時に、EBV DNA量をreal-time PCR法で測定した。

**結果：**EBV(B-95-8, Akata)感染hu-NOGマウスの末梢血にヒトRANKL発現が認められ、発現細胞のほとんどがEBVの第一標的となるB細胞であった。EBV未感染マウスではヒトRANKL発現は認められなかった。次に、EBV感染によりB細胞にRANKL発現が誘導されるかどうかを検討するため、臍帯血単核球およびRamos細胞にEBV(B95-8, Akata)をin vitroで感染させたところ、臍帯血のB細胞そしてRamos細胞にRANKL発現が誘導された。両細胞

からは高レベルのEBV DNAが検出され、臍帯血B細胞およびRamos細胞のEBV感染が確認された。

**考察：**以上の結果から、B細胞にEBV感染が成立すると、破骨細胞分化・活性化に必須なRANKLがB細胞に発現し、EBV感染RANKL陽性B細胞が破骨細胞を誘導し関節局所で骨びらんを起こす可能性が考えられ、EBVは破骨細胞の病的分化・活性化を誘導することでRAに関与する仮説が浮かび上がった。今後は、EBVのB細胞RANKL誘導にかかわるEBV関連遺伝子とシグナル伝達の検討を行うと共に、EBV感染hu-NOGマウスに発症するびらん性関節炎形成におけるRANKL陽性B細胞の重要性について検討を行う考えである。一方で、本モデルで、EBVがRA類似びらん性関節炎発症のtriggerとなることは証明できたと考えられるが、RAの自己免疫疾患としての特徴を再現するまでには至っていない。そこで今後、RAと相関を示すHLA-DR4遺伝子を導入したNOGマウスに、同DR4アリルを保有する臍帯血造血幹細胞を移植したヒト化マウスを作製し、EBVを感染させ、これまでのEBV感染hu-NOGマウスと比較を行い、関節炎の程度や自己抗体産生などのRA病態の再現性について検討を行う予定である。

**結語：**ヒトEBV感染hu-NOGマウスでは、EBV感染によりB細胞にヒトRANKL発現が誘導され、ヒト破骨細胞の分化および活性化が異常亢進し、関節に骨びらんを形成することが示唆された。

## 6. 呼吸器内科領域

### 喘息病態における気道上皮バリア調節機構の解析

**背景：**気管支喘息（以下、喘息）患者の気道上皮バリア機能は、健常者と比較して脆弱であることが証明され、喘息の病態形成に上皮バリア機能が重要な役割を担っていることがわかった。上皮バリア機能が形成される初期段階に脆弱化を決定する何らかの機序が存在することが推測される。ウイルス感染は、気道上皮細胞の傷害とそれに伴うバリア機能の破綻を誘導し、喘息を増悪させる。また、ダニアレゲン刺激で気道に産生される細胞外アデノシン三リン酸（adenosine triphosphate；ATP）は、喘息病態形成に関与する内因性の環境因子の一つである。これらの環境因子に対する防御機構である上皮バリアの形成に、気道上皮細胞への分化能を有する基底

細胞が重要な役割を果たしていることがわかってきた。

本研究の目的は、上皮バリア形成の初期段階への環境因子曝露が、その後のバリア脆弱化、さらには喘息病態形成につながりうる分子病態を明らかにすることである。そのために初代ヒト気管支上皮細胞（NHBE）と気道上皮前駆細胞である基底細胞株VA10を用いて、ウイルス感染を模倣するdsRNA刺激やalarminの一つであるATPによる気道上皮バリア形成に及ぼす影響について検討した。

**対象及び方法：**NHBE、VA10は、Transwellに培養液をカバーした状態で3日間培養（Liquid covered culture；LCC）した後、気道上皮細胞の分化を誘導する培養（Air Liquid Interface；ALI）とした。LCC期のNHBEに、基底細胞の形質を持った細胞が存在することを確認するために基底細胞のマーカーであるCK5、CK14、p63の免疫染色を行なった。LCC期のみならずALI期におけるバリア機能（Trans Electric Resistance（TER）、デキストランによる傍細胞透過率）を経時的に測定した。また、バリア形成関連分子であるE-cadherinおよびZO-1などの蛍光免疫染色を行い、dsRNA、ATP刺激によるバリア調節機構への影響も検証した。

**結果：**LCC期のNHBEにCK5、CK14、p63陽性細胞の存在を確認した。そのLCC期のNHBEに対するdsRNA、ATP刺激は、コントロールと比較してTERを減弱させ、傍細胞透過率を増加させた。VA10でも同様の結果が得られ、さらにE-cadherinおよびZO-1の細胞間結合部位での発現を減弱させた。

**考察：**dsRNA、ATPは基底細胞に作用し、気道上皮バリア形成を減弱させる可能性がある。上皮バリア形成の初期段階へのウイルス感染やダニアレゲン曝露が、バリアを脆弱化し、喘息病態の形成に関与する可能性が推測された。

**結語：**今後は、環境因子曝露による上皮バリア機能脆弱化の分子病態を詳細に解析するために、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行い、標的分子およびシグナル伝達経路を同定し、機能解析を進める予定である。



## がん種横断的ゲノム解析による発がん機構の解明に関する研究

森山光彦<sup>1)</sup>, 黒田和道<sup>2)</sup>, 杉谷雅彦<sup>3)</sup>, 増田しのぶ<sup>4)</sup>, 江角真理子<sup>3)</sup>,  
八田善弘<sup>5)</sup>, 橋本 修<sup>6)</sup>, 高橋昌里<sup>7)</sup>

## Cross-sectional genomic analysis study of human carcinogenesis

Mitsuhiko MORIYAMA<sup>1)</sup>, Kazumichi KURODA<sup>2)</sup>, Masahiko SUGITANI<sup>3)</sup>, Shinobu MASUDA<sup>4)</sup>,  
Mariko ESUMI<sup>3)</sup>, Yoshihiro HATTA<sup>5)</sup>, Shu HASHIMOTO<sup>6)</sup>, Shori TAKAHASHI<sup>7)</sup>

## 要旨

がんは、ゲノム・エピゲノムの変化が蓄積することにより発生するが、これらの変化は各がん種のみみにみられる特殊なものではなく、すべての臓器由来のがんについて頻回に認められるがん遺伝子、抑制遺伝子の変化であると考えられている。がん組織の次世代シーケンサーの解析により、各がん種に共通した抑制遺伝子が確認されてきている。本研究は、がん種横断的に遺伝子異常を解析することにより、これまで認識されなかった発がんメカニズムの解析を行い、バイオマーカー及び創薬に繋げることにある。各がん種に共通した発がん候補遺伝子の同定には至らなかったが、各がん種において腫瘍発生と進展に関わる遺伝子の異常を検出し得た。今後は、本研究により構築し得たシステムを通して研究者間において連携を取り合い、さらなる発がん・進展遺伝子の確定を行いたい。

## 1. はじめに

がんは、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である。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、大規模で体系的ながん遺伝子の探索が可能となっている。このように、がんはゲノム・エピゲノムの変化が蓄積することにより生じるが、これらの変化は各がん種のみみにみられる特殊なものではなく、すべての臓器由来のがんについて頻回に認められるがん遺伝子、抑制遺伝子の変化であると考えられる。がんの次世代シーケンサー (NGS) の解析により、例えば、*ARID1A* や *ARID2*<sup>1)</sup> などが各がん種に共通した抑制遺伝子であると認識されるようになった。このように、がん種

横断的に遺伝子異常を解析することにより、これまで認識されなかった発がんメカニズムの側面が見えてくる可能性がある。また、発がんやがん進展の liquid biopsy によるバイオマーカーの開発や創薬に繋がるのが推測される。

現在まで、各臓器についてのゲノム解析は米国人ゲノムアトラス (TCGA) および国際がん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、各がん種のシーケンサー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がん種を超えたがん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。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

1) 日本大学医学部内科学系消化器肝臓内科学分野  
2) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野  
3) 日本大学医学部病態病理学系形態機能病理学分野  
4) 日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野  
5) 日本大学医学部内科学系血液膠原病内科学分野  
6) 日本大学医学部内科学系呼吸器内科学分野  
7) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野  
森山光彦: moriyama.mitsuhiko@nihon-u.ac.jp

情報と連結して変異シグネチャーなどのゲノム変化とがんの原因を検索することが困難であることも少なくない。さらに、一方NGSによる解析では、施設により使うプローブや解析プラットフォームが異なるため、施設により解析結果が異なる。すなわち、それぞれのデータを統合するのが極めて困難であることが、TCGAおよびICGCが現在直面している障壁であり、Pan Cancer Projectの進捗を阻んでいる。

本研究は、単独施設でがん治療に携わる診療科の枠を越えて検体を収集し解析することにより、得られたdataと詳細な臨床情報をリンクさせて、がん種横断的に発がんのメカニズムを明らかにすることを目的とするものである。本研究にて使用される本学で得られる検体は、基本的な情報はもちろん薬剤の投与状況・年数まで把握しているため、薬剤感受性や発がんの影響までも詳細に検討することが可能である。さらに詳細な臨床情報とがん種横断的研究を組み合わせることにより、あるがん種で報告されている薬剤や併存疾患の影響を、他がん種において容易に観察することができる。

このように、現在世界的規模で行われているコンソーシアムの研究と比較して、絶対数では劣るものの詳細な臨床情報を利用することで、大規模組織では見落とされやすい、あるいは観察することのできない現象を見つげられる可能性が十分にあり、その点にも本プロジェクトの意義がある。

以上本研究は、病理科・消化器科・婦人科・呼吸器科・小児科・血液内科を含めて幅広く横断的に各がん種を解析するものである。これら多岐にわたる異なる診療科が協力して一つの研究に向かうことは、多施設共同研究では不可能なことである。国内でも有数の研究施設が併設されている日本大学医学部が、各診療分野の垣根を越えて、その特徴を最大限に生かしてPan Cancer Projectを遂行すれば、他のプロジェクトでは得られない知見が得られる。尚、各研究毎に当院倫理委員会の臨床研究の承認を得て実施する。

## 1. 肝がん (I)

### —マイクロゲノミクスからがんの発生進展と腫瘍抗原を探る—

がんゲノム変異解析から、がん heterogeneity が予想以上に示唆されてきているものの、何ががん発

生の driver mutation で、何ががん進展の driver mutation か、まだわかっていない。本研究では、これらがんゲノム進化を明らかにする目的で、症例毎に詳細なゲノム解析を実施した。具体的にはホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) を対象とし、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) により、多彩ながん組織像や前がん病変を個別に採取し、ゲノム解析を実施した。ここでは、これを「マイクロゲノミクス」と呼ぶ。さらに、明らかとなった変異を対象に腫瘍抗原 (neoantigen) 候補を推測し、腫瘍免疫の可能性を探った。

本研究では、以下の5つの独立したテーマについて研究を遂行した。以下のごとく結果を得た。

#### 1) ヒト早期肝細胞がんと前がん病変の全エクソーム解析 (WES)

12mmの早期肝細胞がん症例では、2箇所各々100を超えるアミノ酸置換変異が観察され、その6割は共通変異であった。隣接する dysplasia でもがん部と同じ変異が観察された。17mmの境界不明瞭な異型結節を伴う早期がん症例では、2箇所の dysplasia に各々100近いアミノ酸置換変異が観察され、その5-6割は両者に共通変異であった。以上より、腫瘍径2cm以下の早期肝細胞がんでも腫瘍結節内部でがん細胞クローンの進化が見られた。また、dysplasia においてもがん部同様の遺伝子変異が明らかとなり、前がん病変であることが遺伝子レベルで示された。

#### 2) ヒト肝細胞がん腫瘍抗原候補の推定

上記の早期肝細胞がんについて腫瘍抗原候補を検討した。WESの結果からHLAを決定し、アミノ酸変異を伴う63個の遺伝子変異を対象に、HLAタイプと9アミノ酸ペプチドとの結合親和性を検討した。変異に伴い親和性亢進が予測され、肝臓に発現が予想されるものが8個見つかった。これらの提示にはHLA-Cの関与が多く占めると予想された。今後、複合体形成の親和性亢進を生化学的に証明し、これら複合体と反応するT細胞の関与についても、T細胞受容体のレパトア解析からアプローチし、腫瘍免疫の成立の可能性と、治療への応用につなげていきたい。

### 3) ラット肝細胞がんの原発腫瘍と肺転移腫瘍の腫瘍結節クローン解析

Long Evans Cinnamon (LEC) ラット (銅輸送ポンプ *Atp7b* 遺伝子欠損による銅異常蓄積から発がんへ至る肝がんモデルラット) の肝細胞がんを全ゲノム解析した結果、6アミノ酸置換変異を見つけた。2変異は、複数の肝臓内腫瘍結節と複数の肺転移巣全てに共通であった。残りの4変異は肝臓内腫瘍のみ見られたが、肝臓内腫瘍結節ごとに、+1, +2, +4変異と変異の連続的蓄積、すなわちがんクローンの直線的進化が観察された。以上より、2変異がこの腫瘍の driver 変異であり、次々に新たな変異を獲得、heterogeneousな進化を起こしていると思われた。転移巣では同一の細胞集団を起源に複数の結節が形成されたと考えられた。

### 4) 肝細胞腺腫と関連肝細胞がんの遺伝子変異解析

HCAは肝臓の良性腫瘍で、WHO分類の3型には分類されない unclassified HCA (UHCA) がある。変異解析から、3型のいずれかに再分類される可能性を検討した。症例1では、inflammatory HCA (IHCA) に特徴的な変異遺伝子 *JAK1* と同様 *JAK/STAT* シグナリングに参与する *JAK3* の変異が見つかった。症例2では、*CTNNB1* 変異が30年後のHCCに見つかり、初発のUHCAにも見つければ、 $\beta$ -catenin activated type (bHCA) の可能性が出てきた。

### 5) 初発肝細胞がんと再発混合型肝がんの遺伝子変異解析

肝細胞がんと混合型肝がんを異時発生した再発肝がん症例について、遺伝子変異解析からがん発生の起源を検討した。3回目の混合型肝がんに見つかった変異は、2回目の肝細胞がんにはあったが初回の肝細胞がんにはなかった。従って、3回目の混合型肝がんは2回目の肝細胞がん起源と同じ可能性がある。

以上のように、良性腫瘍である肝細胞腺腫から、前がん病変を含めた早期肝細胞がん、そして肝細胞がんの再発を繰り返した混合型肝がんまで、マイクロゲノミクスを実施した。組織型の違いはもとより、同一患者の異時発生腫瘍や、同一腫瘍内の異なる腫瘍部位でも遺伝子変異の違いは観察された。腫瘍の進展にはhetero-cloneを生み出すことは間違いなく、そのheterogeneityが腫瘍生物学的にいかなる意味

があるかは、未知である。一方、一部には同一変異が保存される場合もみられ、異時発生でも起源は同じと考えられる。まさに driver mutation といえる。まだ解析半ばの状況であり、さらに解析が進めばクローン進化の様相とその意義は明らかになると思われる。特に、LCMを駆使したゲノム変異解析は、形態学的診断では境界領域であった異型病変について、遺伝子レベルで腫瘍といえる変異があることをはじめて示した。遺伝子変異の蓄積は、形態学的な異変を伴わなくとも既におこっているといえる。LCMでの正確な組織採取とその後の解析は、腫瘍生物学、腫瘍診断学に新たな道を切り開くと考える。

## 2. 乳がんについての検討

1) 細胞接着蛋白 *E-Cadherin* の異常は、乳腺小葉がんの特徴のひとつであり、*E-Cadherin* 免疫組織化学法 (IHC) は、乳腺小葉がんと乳管がんの鑑別診断に有用な手法である。*E-Cadherin* 蛋白の異常を引き起こす原因として、*E-Cadherin* の遺伝子 *CDH-1* (16q22.1) の変異、欠失、gene methylation, LOH, 或いは16番染色体長腕の欠失 (16q loss) などが上げられる。今回、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) された病理組織を用いて、Dual-FISH法、定量PCR法 (DNA)、定量RT-PCR法 (mRNA) により *CDH-1* 遺伝子を解析して比較を行った。その結果、固定条件の安定した新しい検体では各種解析結果も安定する傾向が示され、症例BおよびCでは、DNAレベルでの *CDH-1* 遺伝子の欠失による *E-Cadherin* 発現の消失があり、AではDNAレベルでの *CDH-1* 遺伝子の欠失等は認められないがmRNA発現は検出されない例も認められた。また、*CDH-1* 遺伝子変異の点突然変異は、浸潤性小葉がん (ILC) だけではなく、非浸潤性の小葉がん (LCIS) でも検出された。

2) 浸潤性乳管がん (IDC) における Ras homolog A (*RhoA*) 発現の意義をIHCと定量RT-PCR法で検討した結果では、腫瘍包巣内の部位による *RhoA* mRNA発現量の差は認められなかったが、IHCによる *RhoA* 蛋白発現は腫瘍包巣の中心部よりも進展部で高い傾向が示された。また、*RhoA* を介したF-actinの高発現による腫瘍の進展は、*HER2* mRNA発現量と高い相関を示したことから、特に *HER2* を高発現しているタイプの IDCにおける *RhoA* 発現の意義



が示唆された。

### 3. 大腸がんの検討

治療標的分子としての遺伝子変異について大腸がんの手術、生検検体からの *KRAS*, *NRAS* 変異解析法を検討した。現在、唯一の体外診断薬であり受託検査で行っている PCR+rSSO 法 (MBL) を A 法、研究用試薬としての Q probe 法 (ARKRAY) を B 法、BNA Extended RAS (RIKEN GENESIS) を C 法として比較した。

この結果、主要な変異である *KRAS* codon12/13 の変異は方法の違いに関わらず高感度に検出できることが示されたが、マイナー変異とされる変異は検出感度の低下が見られた。従って、セツキシマブに対するコンパニオン診断として大腸がん検体から RAS 変異解析を行う際は、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を良く鏡検して腫瘍細胞の含有量を高める注意が必要と考えられた。

### 4. 肺がん (I)

肺がんの *EGFR* 遺伝子検査も分子標的治療のコンパニオン診断として必須となっているが、進行期の肺がん患者では微小な生検検体または気管支洗浄液などの細胞診検体に限られる場合も多い。しかし現在では、肺がん診療ガイドライン上で検索しなければならぬ項目も増加しているため、検体量不足が懸念されている。そこで、診断のために各種染色を行った細胞診標本からの *EGFR* 遺伝子変異解析の可能性について検討した。

この結果、日常的に使用される染色法であるパパニコロウ染色、ギムザ染色、PAS 染色を行った標本のいずれにおいても *EGFR* 遺伝子変異は十分に検出可能であることが示された。

以上の検討により、今回検討を行ったがん種では、FFPE 検体からの分子病理学的解析によってがんの発生と進展に関与し、診断マーカーや治療マーカーとなる分子の検出が可能であった。生体内におけるがんの発生や進展様式を解明するために、個々の患者の病態を把握できる病理組織検体は、解析技術の発展に伴って、さらに高精度に解析が進むことが期待される。

### 5. 肺がん (II)

がん細胞は多様な遺伝子変異が生じることが知られているが、なかでも細胞内でエネルギー生産を担うミトコンドリアの機能低下を招く遺伝子変異は、多くのがん細胞に共通して生じていることが知られている。しかしながら、ミトコンドリアの機能低下とがんの発生、進行との関係は、今日、ほとんど分かっていない。近年、がん細胞は細胞外小胞であるエクソソームを細胞外に多量に排出し、がん細胞同士あるいは、がん細胞と宿主細胞間でエクソソームを分泌し交換することで情報伝達を行っていることが知られている。がん患者では、ミトコンドリアの遺伝子異常を有するがん細胞からエクソソームが多量に分泌され、血中に流出し循環していると考えられる。このようなエクソソーム内にみられるミトコンドリア遺伝子の変異を調べることで、血液を介してがん細胞の存在や病態を解析できないかどうかを検討した。

#### 1) エクソソーム内 RNA 発現解析

研究計画に関しては、日本大学医学部附属板橋病院から承認を得た。書面による同意を得て採取した小細胞がん患者の血清から Total exosome isolation kit (from serum) (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてエクソソームを単離した後、単離したエクソソームから RNA 抽出した。RNA 量およびサイズは Agilent RNA 6000 Pico Kit (agilent 社) を用いてバイオアナライザーで解析を行った。得られたエクソソーム RNA を Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてライブラリ調製した後、次世代シーケンサー (Ion PGM; Thermo Fisher Scientific 社) を用いて RNA 発現を行った。

#### 2) ミトコンドリア DNA 解析

小細胞がん患者の血餅から Puregene blood Core Kit B (Qiagen 社) を用いて DNA 抽出を行った。得られた DNA 量は Nanodrop (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて解析した。ミトコンドリア DNA の増幅は REPLI-g Mitochondrial DNA Kit (Qiagen 社) を用いて行った。得られたミトコンドリア DNA 量は Qubit® dsDNA HS assay kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて Qubit (Thermo Fisher Scientific 社) で解析を行った。ミトコンドリア DNA を Nex-

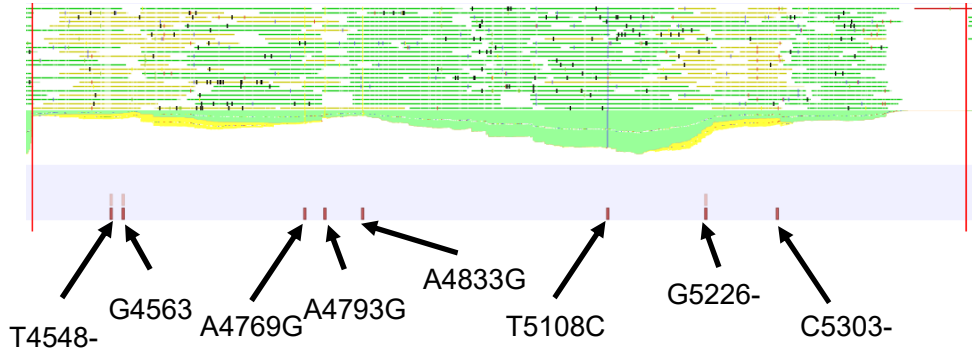


図1 MT-ND2の変異箇所の一例

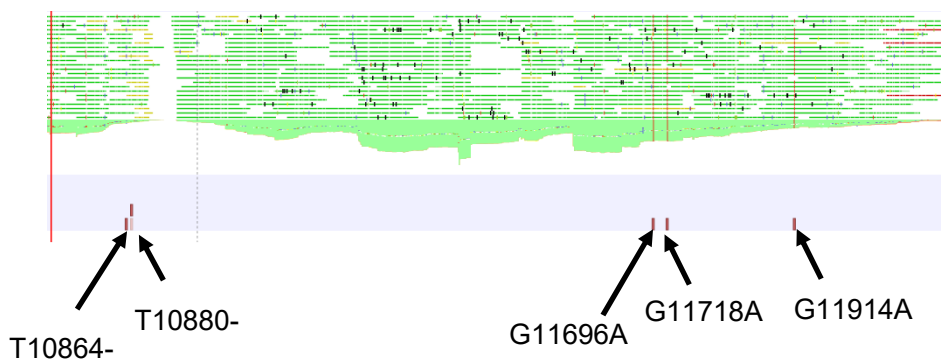


図2 MT-ND4の変異箇所の一例

tera DNA Sample Preparation Kit (illumina社) を用いてライブラリ調製した後、次世代シーケンス (Miseq; illumina社) 用いてDNA発現を行った。

### 3) シークエンスおよび変異解析

得られたシーケンスデータはCLC Genomics Workbench (Qiagen社) を用いて解析した。変異解析はIngenuity® Variant Analysis (トミーデジタルバイオロジー社) を用いて解析した。

この結果、小細胞がん患者の血清中エクソソーム内RNAのシーケンスデータのバリエーション解析した結果、ミトコンドリアに多数の変異が認められ、なかでもMT-ND2 (図1) およびMT-ND4 (図2) に多くみられた。健常者でもミトコンドリアDNAの変異がみられたが、健常者に比べて小細胞がん患者で変異箇所の増加する傾向がみられた。さらに、血餅から得られた増幅ミトコンドリアDNAでも同様の結果が得られた。血餅中ミトコンドリアDNA変異と比較して、エクソソーム内のミトコンドリアRNA変異は塩基の欠損によるものが多い傾向がみ

られた。

## 6. 肝がん (II)

肝がんにおける発がん原因の一つとして、ウイルス感染が推定されており、現在まで多数のGenomic, Epigenomic, Somaticな検討がなされている。今回我々は、HBV感染が引き起こすヒト染色体へのHBVゲノムの組み込み様式の検出と発がんとの関連について検討した。

1) 肝がん組織切片を用いて Fluorescence in situ hybridization (FISH) を行い、ヒト染色体に組み込まれたHepatitis B Virus (HBV) の検出を行った。FISHプローブはpBRHBadr72 (Fujiyama, A. et al., Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. Nucleic Acids Research. 1983. 11 (13) 4601-4610) を用いた。FISHプローブシグナルの検出およびデータの解析はLeica CW-4000サイトジェネティックワークステーションを用いた。

この結果では、HBVゲノムは肝細胞核内および細胞質内に検出された。HCV抗体陽性の肝がん例にお



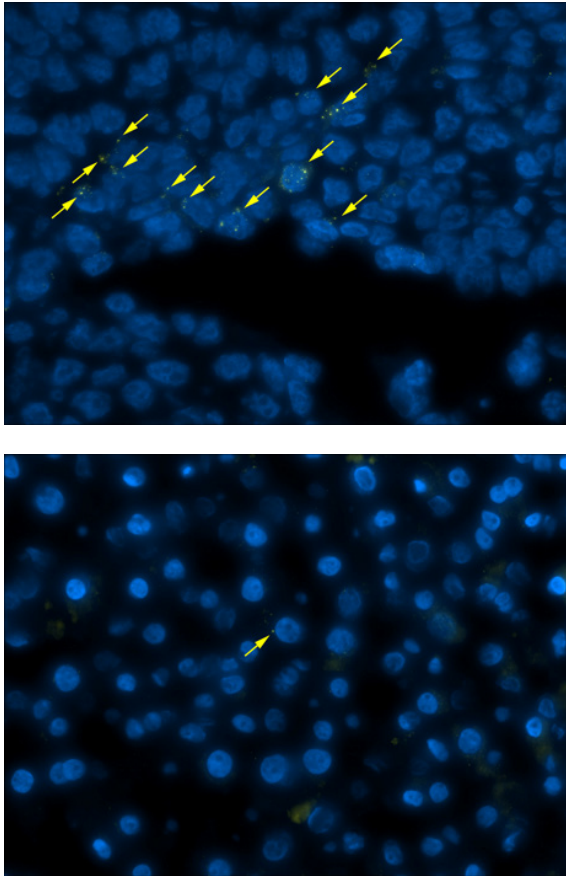


Fig.1

いても、肝細胞核内および細胞質内に検出された (Fig.1 矢印はHBVゲノムの蛍光を示す)。

Fig.1 上段は、HBV感染肝がんのがん部肝組織を用いたFISH法による、HBVゲノムの検出像を提示する。主にがん細胞核内および細胞質にHBVゲノムが認められる。

Fig.1 下段は、同一症例の非がん部肝組織を用いたFISH法による、HBVゲノムの検出像を提示する。肝細胞核内と細胞質内にHBVゲノムが認められた。

2) HBV感染肝がん症例の末梢血リンパ球より、次世代シーケンサーによるHBVゲノムの組み込みの有無を検出した。

本邦で発生数の多い乳がん・肺がん・胃がん・肝がん・大腸がん・子宮頸がんのうち、細菌およびウイルスの感染が発がんの原因の一つと考えられているがんは、肝がん・胃がん・大腸がん・子宮頸がんが挙げられる。感染症により発がんが励起される場合、その要因として感染微生物由来ゲノム断片のヒトゲノムへの組み込みによる種々の遺伝子の異常の寄与が推測されている。この挿入様式の解析には、

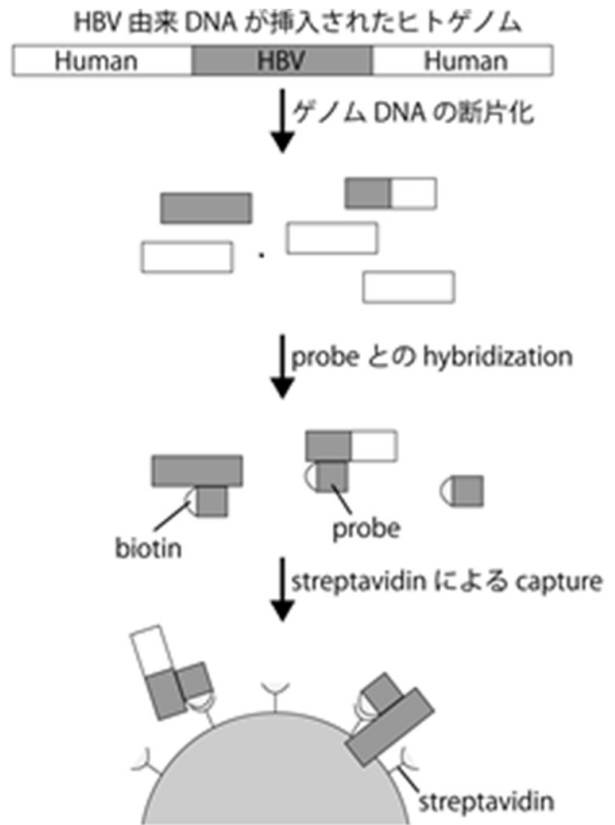


図3 シークエンスクャプチャー法の概要

次世代シーケンサーを用いた、がん組織由来ゲノムDNAの解析が有効である。

次に、肝がん・胃がん・大腸がん・膵がんおよび子宮頸がん発生に関与しているとの報告がなされている微生物には、*Helicobacter pylori* (HP), Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis C virus (HCV), Human papilloma virus (HPV), Cytomegaro virus (CMV)などが知られている。そこで、肝がん例でのHBVゲノムのヒトゲノムへの組み込み様式を、手術切除組織(がん部と非がん部)と末梢血白血球において検出した。これらの微生物由来ゲノムの組み込み検出法として我々は、シーケンスクャプチャー法(図3)を利用して、ハイブリダイゼーションにて得られた産物を、次世代シーケンサーを用いて組み込みの解析・検出を行う。微生物ゲノムをprobeとしたキャプチャー法を行うことで、100検体以上の臨床試料を1ランで問題なく解析できることを示す結果を得ており、次世代シーケンサーを用いた目的ゲノムの組み込み解析の劇的な低コスト化ができる。

これにより、統計的有意性を議論できるレベルの

多数検体の解析が可能となる。これまでも多数の微生物DNA挿入部位の解析が行われてきたが、がん細胞での挿入にのみ焦点が当てられて来た。本研究においても同様な情報を得ることが目的の一つであるが、そこに留まらず、非がん部組織並びに白血球での微生物ゲノムの挿入について特に注目した。

実際に次世代シーケンサーを用いた先行研究では、非がん部組織でのHBVやHPVゲノムの挿入が確認されている<sup>2)</sup>。非がん部組織および白血球への挿入は特異性が低く、多数検体の解析により統計的に意味を持つ発がんに関連する挿入が見出せると考えられる。

HBs抗原陽性肝がんおよびHCV抗体陽性肝がんのがん部肝組織より、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. がん部においては、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. 非がん部においては、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。

以上今回の研究より、末梢血よりHBVゲノムのヒト染色体上への組み込みを確認した。

## 7. 小児がん

成人がんと比較し、小児がんは以下のごとくいくつかの際立った特徴を有している。

1. 発症数が成人と比べて少数（年間発症数 2000）である。
2. ほとんどが上皮性ではなく肉腫で、組織型も多種にわたる。
3. 好発年齢があり、治療反応性や予後と関連している。
4. 後天的な遺伝子異常だけでなく、遺伝的な素因ががんの発症に関連している可能性が高い。
5. 多くが従来型の化学療法剤で治癒が期待できる。
6. 稀だが自然寛解する例がある。
7. 分化誘導療法や抗体療法、ワクチン療法が試みられ、一定の効果が報告されている。

小児がんの希少性からわが国では、中央診断が以前から実施され、診断とリスク因子の同定を目的とした遺伝子変異やゲノム異常についての研究が行われてきた。これとは別に当科では上記の4, 7に着目し、独自の研究を実施している。

### 1) 遺伝子解析

これまでに血小板減少を主たる症状とし、後に急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群に移行した姉弟例から*RUNX1*の胚細胞性変異を同定した（2011年の第16回ヨーロッパ血液学会、2011年の第114回日本小児科学会で発表）。同様の事例で*CEBPA*の点変異を同定しているが、現在、この変異について機能解析を実施中である（未発表）。また、全消化管に多発するリンパ腫と診断された女兒について、リステリア髄膜炎の既往歴から免疫不全症を疑い、*PI3Kδ*遺伝子の胚細胞性変異を東京医科歯科大学と共同して同定した（2014年の第56回日本小児血液・がん学会にて発表済み）。さらに、好酸球の異常増多（200000/uL）を示した症例では、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析により特発性好酸球増多症の原責任遺伝子の同定を試みている（未発表）。

稀な染色体転座を有する急性リンパ性白血病の症例では、RNAシーケンサーの手法を用いて、白血病関連新規融合遺伝子の同定を現在試みている（未発表）。

### 2) 抗体療法とエピゲノム異常

近年、チェックポイント阻害薬や抗体療法を含む分子標的治療が注目されているが、小児がんにおいてもその効果は検証されるべきである。このため、当科では病理学分野と共同し、いくつかの分子について、epigeneticな変化に着目した。ワクチン治療が開発されている*WT1*、チェックポイント阻害薬として様々ながん種に有効性が期待される*PDL1*とそのリガンド*PDL1*, *PDL2*、神経芽腫の抗体治療薬として開発された*GD2*である。*GD2*は神経芽腫だけでなく、多くの小児がんにも発現していることが報告されていることから、有望な治療標的と考えられる。

当院の臨床研究審査委員会の承認を得て開始された共同研究では、*GD2*に関して新たな知見が得られ

た（2017年の日本病理学会総会にて発表予定）。他の分子の発現と治療反応性、予後との関連を今後、明らかにしていく予定である。

## 8. 血液がん

### 8.1 未知のがん関連遺伝子の同定

われわれは特異な染色体転座を持つ複数の白血病、リンパ腫症例を経験し、これらはいずれも未知の融合遺伝子を持つと推測された。本研究でこれらの症例を対象に新たな融合遺伝子、または白血病やリンパ腫に関連する遺伝子の同定、病因の解明、新規治療の開発を目指した。いずれも凍結保存検体を用い次世代シーケンスで解析した。

#### 1) 芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍 (blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm *BPDCN*)

*BPDCN*は極めて予後不良であるが症例が少ないため、長らくその起源や発症に関与する遺伝子異常は不明であった。われわれは、特異な染色体転座を有する*BPDCN*を経験した。この転座は過去にも*BPDCN*で複数の報告があり*BPDCN*の発症または進展などに関与している可能性が高い。次世代シーケンスおよびサンガー法を用いて*myc*遺伝子と他の遺伝子との融合を確認した。今後*myc*の発現を類似症例を含めて検討予定である。

#### 2) バーキットリンパ腫

最近われわれは診断時に限局期であり、しかも高齢であるにもかかわらず化学療法で寛解を維持しているバーキットリンパ腫を経験した。この症例では体細胞に染色体転座が認められ、末梢血検体で転座の塩基配列を決定した。この転座に*myc*遺伝子の発現を抑制している遺伝子が含まれている可能性を見出した。

#### 3) 骨髄増殖性腫瘍

未知の染色体転座を伴う骨髄増殖性腫瘍を経験した。シーケンスで*PDGFb*の関連する融合遺伝子であることを確認した。今後、*PDGFb*の発現や*in vitro*でチロシンキナーゼ阻害薬による反応性を検討する予定である。(発表準備中)

### 8.2 骨髄腫細胞の細胞周期とオートファジーの研究

cyclin-dependent kinase (*CDK*) 4/6の阻害薬 abemaciclibの骨髄腫細胞への影響を検討した。Abemaciclibの濃度依存的に骨髄腫細胞の細胞周期G0/G1の増加、S-G2/Mの減少、アポトーシス、オートファジーが認められた。Abemaciclibとclarithromycinを併用すると骨髄腫細胞のアポトーシスが抑制されたことから、このアポトーシスはオートファジーによる細胞死と考えられた。本研究は骨髄腫に対する新たな治療戦略に結びつけられると考えている。

#### まとめ

わが国におけるがん死亡は年間30万人を超え、高齢化社会を背景として高齢者の発がん例の増加と共に疾患死亡率は増加傾向にある。本邦では、現状では2人に1人ががんを発症して、3人に1人ががんにて死亡する。現在までに多数の発がんに関連する遺伝子異常は報告されているが、依然として発がん候補遺伝子 (driver gene) は確定されていない。一方で発がん研究は個々のグループでの研究が大部分であり、大規模研究は数少ない。今回我々は、大学内での研究機構を通して、がん種横断的に候補遺伝子の検索を行い、発がんバイオマーカーの開発と創薬を最終的な目的として研究体制を構築した。

研究開始より1年間の短期間の検索では、未だにdriver geneは確立されていないが、検索方法もLMC, FISH, NGS, capture methodsなどの最新の手法と機器を使用して施行し得た。今後これらの得られたdataを解析して、がん種横断的なバイオマーカーの開発と、それを利用した創薬へと繋げていくことが期待される。

また、今回使用したこれら方法論の公開においても、学内には大きな成果が得られたと思う。この紀要を見た医学部内の研究者が、相談の上利用することも可能であろう。

本プロジェクトは平成28年度の1年に亘って日本大学医学部総合医学研究所において実施されたものである。その成果の一端を上記したが、多数の発がん候補遺伝子を検出して、発がんについて多くの新しい知見が得られたと自負している。これらの成果は、実際にプロジェクトに参加した研究者だけでなく、文部科学省および本学並びに医学部、さらに

関係共同機関の方々の長期に亘るプロジェクトに対する支援の賜物であります。支援いただいた皆様に心よりお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Kelso TWR, Porter DK, Amaral ML, Shokhirev MN, Benner C, Hargreaves DC. Chromatin accessibility underlies synthetic lethality of SWI/SNF subunits in ARID1A-mutant cancers. *Elife*. 2017 Oct 2;6. pii: e30506. doi: 10.7554/eLife.30506.
- 2) Ferber MJ, Montoya DP, Yu C, Aderca I, McGee A, Thorland EC, Nagorney DM, Gostout BS, Burgart LJ, Boix L, Bruix J, McMahon BJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI, Roberts LR. Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers. *Oncogene*. 2003 Jun 12;22(24):3813-20.



## 医学研究支援部門動物実験室に設置された エックス線装置について

谷口由樹<sup>1)</sup>, 藤田順一<sup>1)</sup>, 黒田和道<sup>1), 2)</sup>, 石井敬基<sup>3)</sup>

### About X-ray device newly installed at Medical research support center, Laboratory for animal experiments

Yoshiki TANIGUCHI<sup>1)</sup>, Junichi FUJITA<sup>1)</sup>, Kazumichi KURODA<sup>1), 2)</sup>, Motoyuki ISHII<sup>3)</sup>

#### 1. はじめに

医学研究支援部門、動物実験室（循環機能室）に設置してあるエックス線装置が昨年度更新された。今回導入されたエックス線装置は従来の機器に比べ画像が鮮明であり、またエックス線装置を使用する際の被曝線量も低減された機種で、その有用性は非常に高いものとなっている。そこで今回導入されたエックス線装置について紹介していきたい。

#### 2. エックス線アンギオグラフィ

1895年、ドイツの物理学者、ヴィルヘルム・レントゲンによるエックス線の発見により、生体を傷つけないで内部構造を知る手段を得た。そのためエックス線は骨折の診断にすぐ用いられ、心臓の大きさや形の診断にも応用されはじめた。そして造影剤が登場することにより、血管や腸の内部構造がよりはっきりと観察できるようになった。これらの技術は、今日では骨折の診断、歯科診断、胸腹部エックス線写真、造影エックス線写真として、現在の診断で欠かせないものとなっている。エックス線を用いた画像診断は、シネフィルムを用いたエックス線が誕生し、また多方向からエックス線を照射し、そのデータから横断面を、コンピューターを用い構築するというコンピューター断層撮影法、いわゆるCT装置も登場し、その診断技術は急速に発展し、今日の放射線診断学が発展することとなった。

エックス線アンギオグラフィを用いた診断およ



図1 新たに導入されたエックス線装置 INFX-8000F

び治療は、心臓領域、脳血管領域、一般血管領域に分けることができる。そのためエックス線装置は、各メーカーから目的に応じて多くの機種が販売されている。それぞれの用途の違いとして、例えば心臓血管領域では深い角度付けが必要とされるが、それ以外の血管では深い角度付けはさほど要求されない。また、一般血管領域では全身が透視できる必要がある。特に下肢撮影の場合、造影剤の流れに従って撮影位置を移動する必要がある。脳血管領域では、概観的な撮影はもちろん、頭蓋骨の特定の管や孔の精密撮影にはプロジェクションなどの高度な正確さが要求される<sup>6)</sup>。

#### 3. 東芝メディカルシステムズINFX-8000F

今回導入されたエックス線装置は、東芝メディカルシステムズのエックス線装置（INFX-8000F）で、

1) 日本大学医学部医学研究支援部門ラボラトリーアニマル系

2) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

3) 日本大学医学部医学研究企画・推進室

谷口由樹：taniguchi.yoshiki@nihon-u.ac.jp



表1 旧装置と新装置の比較

	旧装置	新装置
視野サイズ	9インチ円形（直径23cm）	12インチ正方形（一辺30cm）
検出器	I.I.（画像劣化あり）	FPD（画像劣化なし）
画質	普通	良い（Pure Brain）
モニタ	ブラウン管（CRT）	液晶モニタ（LCD）
拡張性	なし	3D撮影機能

このモデルは血管撮影装置として必要な機能をコンパクトにまとめたベーシックモデルである。この装置の基本性能として、視野サイズは8インチ（約20cm, 循環器領域）、12インチ（約30cm, 循環器, 頭部, 下肢領域）を選択でき、当施設には12インチが導入されており、循環器領域のみならず、他の領域でも使用しやすい仕様となっている。また検出器は従来のアナログフィルムから静止画用平面エックス線検出器（FPD：Flat Panel Detector）へ、透視装置ではI.I.（Image Intensifier）から動画用FPDへの置き換えが進んでいるように、当施設のエックス線装置もFPDを搭載している（表1-3）。I.I.とFPDを比較した場合、FPDの特徴として、(1)高画質デジタル画像、(2)高い量子検出効率による被曝量の低減、(3)幾何学ひずみおよび磁気ひずみのない画像、(4)小型、軽量化、などが挙げられる<sup>2)</sup>。また実際の透視画像を描出するモニタも液晶モニタとなり、従来のブラウン管に比べ画質も向上している。得られた画像は、医用画像機器間で通信・保存する方法を定めた国際基準規格であり、CTやMRIなどで撮影した医療用画像のフォーマットと同様のDICOM（Digital Imaging and Communication in Medicine）となっている（従来機はシネフィルム、VHSビデオテープでの保存となっていた）。またこのシステムのコンセプトとして、システムはどこかのコンポーネントが故障しただけで装置が完全に停止するのではなく、各コンポーネントは独立し運転しており、故障がシステム全体に及ばないかぎり運転を続けるという仕様になっているため、急な故障により実験が中止になるという事態は、完全ではないがかなりの部分で避けることができるようになっている。

その他にも東芝メディカルシステムズ独自の技術

表2 Cアームの可動域と稼働速度

	Cアーム回転	回転速度
RAO	120°	最大30° /sec
LAO	120°	最大30° /sec
CRA	50°	最大20° /sec
CAU	45°	最大20° /sec

表3 カテーテル寝台の性能

	Cアーム回転	回転速度
RAO	120°	最大30° /sec
LAO	120°	最大30° /sec
CRA	50°	最大20° /sec
CAU	45°	最大20° /sec

がINFX-8000Fには採用されており、その1つにPure Brain<sup>2)</sup>がある。東芝メディカルシステムズ独自の画像処理コンセプト、Pure Brainは、Super Noise Reduction Filter（SNRF）を追加し、残像の少ない透視像を提供する<sup>3)</sup>。SNRFは1画素ごとに必要な信号と不要なノイズをリアルタイムに計算し、信号を抽出していく画像処理技術のことで、ノイズ低減のためにエックス線量を増やすことなく残像のない画像を提供する。通常エックス線撮影の場合は、透視の線量率と比べると10倍ほど高いが、Pure Brainの画質であれば、撮影ではなく透視を記録画像として使用することができる場合もある。またパルス透視の際、パルスレートを落としても残像の影響が少なく、コマ落ち以外に画像が劣化したと感ずる部分がない。パルス透視は一般的に1秒間当たり30フレームの画像を表示するのが基本<sup>4)</sup>で、一般に30pulse/secのパルス透視は連続透視の線量とほぼ

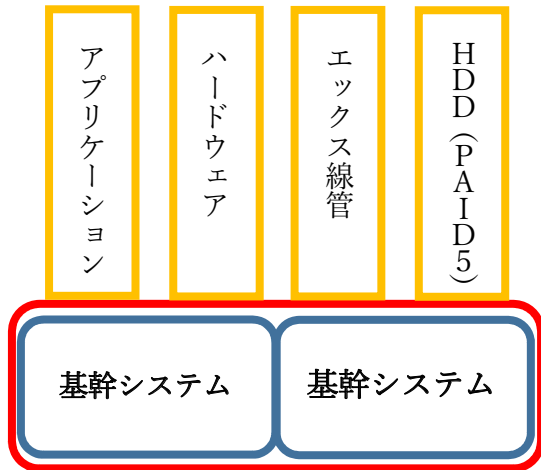


図 1 各コンポーネントは独立して運転しており、故障がシステム全体に及ばない限り運転を続ける

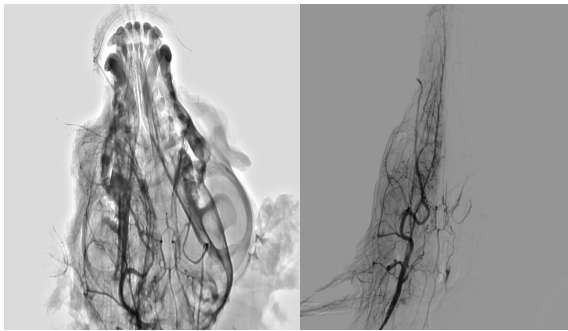


図 2 一般造影とDSAによる造影  
左図：一般造影 右図：DSA

同じに設定されている。パルス透視は少ないパルスを利用し照射線量の低減を図るが、残像やコマ落ちにより手技が妨げられないことが条件として挙げられる。またパルスあたりの照射線量を低減することで被曝をさらに軽減できるが、線量不足によるノイズ量の増大はデバイスが十分に視認できるところまでが条件となる<sup>5)</sup>。東芝メディカルシステムズのPure Brainは、超低線量でも手技を妨げない透視画像を得られることができ、照射線量は標準設定と比べ78%低減することができる<sup>5)</sup>。さらに30/20/15/10/7.5/5/3/2/1ppsとパルスレートを細かく設定することが可能で、先述のとおりパルスレートを落としても残像がほとんどない透視画像が得られる。またその他にもDSA (Digital Subtraction Angiography：デジタル差分血管造影法) が搭載されている (図2)。血管撮影装置の透視画像は、造影剤を流さないと血管を描出することができない。DSAはエックス線透視により得られた画像から血

管以外の骨などを差し引くことにより、血管のみをリアルタイムに描出する技術である。この技術により血管のみをクリアに描出でき、無用な撮影、造影剤の投与を少なくすることが可能となる。またこの技術により、診断能が向上するとともに検査時間も短縮した。検査時間が短縮するということは、単純にエックス線の照射時間が減るため、被曝線量も抑えることが可能となる。

東芝メディカルシステムズINFX-8000Fは、従来機に比べ被曝量の低減が図れる仕様となっているが、それ以外にも従来機にはない仕様がある。その1つに今後の拡張性がある。INFX-8000Fで得られるデータはすべてデジタルデータであるため、当該機種にワークステーションを組み込むことにより、さまざまな解析が可能となる。以下に今後の拡張性として導入を検討しているアプリケーションを紹介する。

(1) CV-3D™

PCI (Percutaneous Coronary Intervention：冠動脈インターベンション) 支援ツール。収集角度の違う複数枚の血管造影像から3Dを構築する。これまで2Dで行っていた定量解析だとForeshortening効果により、見かけ上長さが短く認識されることがあったが、この機能により病変部の適正な定量解析が可能となる。得られた3D画像を使い、画像上に留置予定のデバイス (ステント等) を仮想表示させることができる。これによりPCI経験の浅い術者に対しても有効な支援ツールとして活用することが可能となる。

(2) DTS (Dose Tracking System)

皮膚入射線量のモニタリング機能。術中に被写体に対する放射線量をモニタリングして、術中の入射皮膚線量を管理する。この機能により透視時間を少なくすることや撮影をなるべく省くことで被曝量を低減することや、一方向からの集中したエックス線照射を避け、照射方向を分散させる判断がPCI中にできるようになり、より安全な手技が可能となる。DTSの特徴として、被写体の入射皮膚線量の計算とカラーマップ化、入射皮膚線量の表示ができ、実験者の被曝への意識が高まることが期待される。

(3) Parametric Imaging, CCC (Color Coded Circulation)

Parametric Imagingは、撮影された血管造影画像から画像濃度の変化をカラー表示し造影剤の動態を

視覚的に表示するもので、CCCは造影剤の流れる方向を動画で表示する機能で、色情報を細かく変化させ、繰り返し動画表示する。色の変化を動画像で観察することにより、造影剤の流れる方向を直感的に理解しやすくしたものである。

## 5. 小動物での利用

従来の機種（KXO-80C）も実臨床でも使用されていた機種であり、その機能はヒトを対象とした設定となっていた。そのため管電圧（エックス線源内部の電子ビームの加速電圧の値。エックス線の透過率に関係があり、管電圧の値が高いほどエックス線が物質に吸収されにくい）の調整が広い範囲ですることができなかつたため、使用可能な対象動物も比較的大きな動物に限られていた。そのため小動物でエックス線装置を使用する場合、これもヒト用だが、比較的管電圧の調整範囲が広い、一般撮影用の装置を別に用意し対応していた。しかし一般撮影用なので動画の撮影はできず、必ずしも使い勝手の面では良くなかつた。INFX-8000Fを導入するにあたり、今回は一般撮影用エックス線装置の導入は行わなかつた。理由としてINFX-8000Fは、得られた像はすべてデジタルデータで処理されるためである。つまりINFX-8000Fで動画を撮影した場合、1秒間に最大30フレームの画像データを組み合わせたものが動画として記録される（1秒当たりのフレーム数は、30/20/15/10/7.5/5/3/2/1ppsと細かく設定することが可能）。そのため動画を撮影したとしても、スナップショットの画像の蓄積なため、その中のワンショットを一般撮影の静止画としての利用が可能なのである。また従来の機種に比べ、管電圧、管電流（フィラメントから発する電子ビームの電流値。エックス線の量を意味し、通常はこの値が大きいくほどエックス線透視画像が明るくなる。またエックス線画像固有のザラツキが改善することが多い）の設定域も広がっており、従来の機種と比較した場合、小動物での利用でも比較的満足のいく画像が得られるためである。参考までにラットの写真（図3）と血管造影の写真（図4）を示すが、特に血管造影においてはDSAを使用することにより、かなりクリアな血管像が得られることになった。

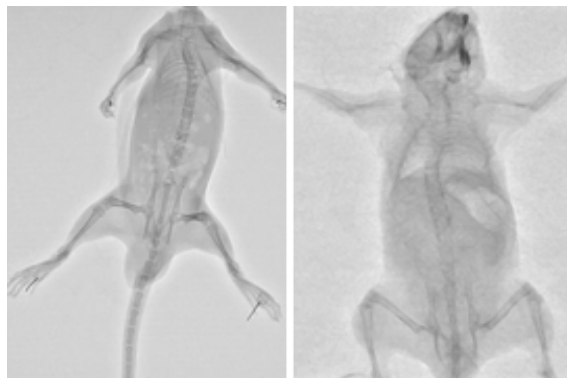


図3 小動物での全身写真  
左図：マウス 右図：ラット

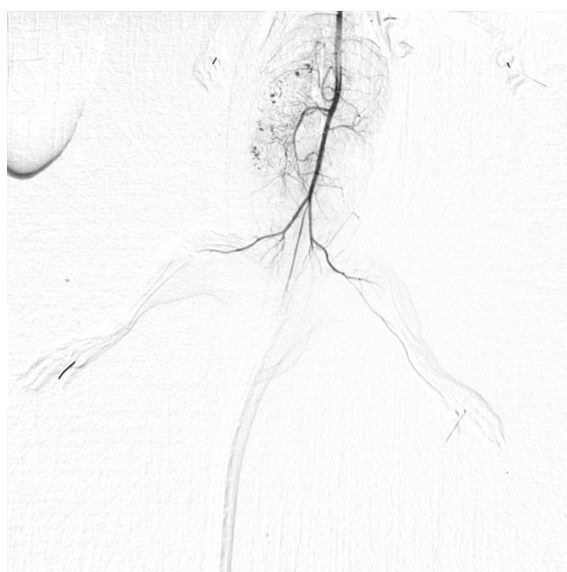


図4 ラット DSAによる造影

## 6. 提言

今回導入された東芝メディカルシステムズ製エックス線装置、INFX-8000Fについて述べた。INFX-8000Fは従来機に比べ画像の鮮明さやデータの解析、また利用者の被曝低減も実現しており、非常に有用な機種となっている。医療機器や診断機器は年々進化しており、導入時に最新と言われた機種も数年後には型落ち機種となり、研究者のニーズを継続的に満たすことは難しいといえる。INFX-8000Fは現行の主流機種の1つであり、実臨床においても利用されている機種なため、現時点においては利用者の研究ニーズに十分答えることのできる機種となっている。また今までにない解析システム（ワークステーション）を導入することにより、今までにない情報を得ることができると、様々な研究ニ-

ズに答えることができる機種となっている。また従来機種に比べ被爆線量もかなり低減され、利用者の負担も軽減されている。

## 7. まとめ

今回新たにエックス線透視装置が導入された。従来機種に比べ装置としての性能もよく、特に線量低減も実現されており、利用者のニーズには十分応えられる機種となっている。そのため学内の幅広い利用が望まれるところである。

## 文 献

- 1) 藤田晃年, 阿武秀郎: 画像診断装置の発展を支えるFPDとX線管: 東芝レビューVol.66, No.7, 24-28. 2011
- 2) 長岡秀樹: Angioの技術進歩と被ばく低減への取り組み—血管撮影装置の進化: Pure Brainが導く被ばく低減の試み. INNERVISION Vol.26, No.5, 56-59. 2011
- 3) 廣瀬聖史: X線循環器診断システム「Infinix Celeve-i」の到達点. INNERVISION. Vol.26, No.4, 32-33, 20011
- 4) 江口陽一: DF装置を使用する人が知っておきたいこと. 日本放射線技術学会雑誌 56巻11号, 1321-1331. 2000
- 5) 高橋 淳: 不整脈治療および末梢血管インターベンションにおける被ばく低減の試み. INNERVISION Vol.27, No.5, 118-119, 2012
- 6) 医用画像・放射線機器ハンドブック (社) 日本医用画像医療システム工業会 2007.03



# 医学研究支援部門による作業環境測定のための目的と意義

渡部和浩<sup>1)</sup>, 会田良行<sup>1)</sup>, 嶋村政男<sup>1)</sup>, 石井敬基<sup>1), 2)</sup>

## The purpose and significance of working environment measurement by Medical research support center

Kazuhiro WATANABE<sup>1)</sup>, Yoshiyuki AIDA<sup>1)</sup>, Masao SHIMAMURA<sup>1)</sup>, Yukimoto ISHII<sup>1), 2)</sup>

### 1. はじめに

医学研究支援部門ラジオアイソトープ・環境保全系では平成21年度より環境保全業務の一環として作業環境測定を行っている。当初はホルムアルデヒド、エチレンオキシドの特定化学物質のみの測定であったが、依頼者の要望により平成26年度からはキシレン等の有機溶媒系の測定も可能となった。特定化学物質、有機溶媒等の有害物質を使用する屋内作業場では定期的に作業環境測定を行うことが義務付けられており、医学研究支援部門への依頼件数も年々増加傾向にあるが、作業環境測定に対する理解と医学研究支援部門で測定依頼を受けていることの認知度は低いようである。そこで今回、作業環境測定の目的、測定と評価の方法、そして医学研究支援部門での測定実績について報告する。なお、測定にあたっては公益財団法人日本作業環境測定協会が発行するガイドブックがあり、本測定においてもこれを参考にした。(日本作業環境測定協会; 2007, 2013, 2012)

### 2. 作業環境測定の目的

作業環境測定は、労働衛生管理における「作業環境管理」を進めるための前提である。その職場で働く人が有害物質(有機溶媒、特定化学物質、粉塵、金属等)の暴露によって生じる健康障害を防止するため作業環境中に有害な因子がどの程度存在するか空气中濃度を測定することで職場環境が良好か、改

	物質名	管理濃度
6	エチレンオキシド	1 ppm
11の2	クロロホルム	3 ppm
28	ベンゼン	1 ppm
29の2	ホルムアルデヒド	0.1 ppm
35	アセトン	500 ppm
37	イソプロピルアルコール	200 ppm
39	エチルエーテル	400 ppm
45	キシレン	50 ppm
51	酢酸エチル	200 ppm
64	ノルマルヘキサン	40 ppm
67	メタノール	200 ppm

図 1 対象物質と管理濃度の一例

善が必要かを評価することである。労働安全衛生法第2条では、「作業環境の実態を把握するため空気環境その他の作業環境について行うデザイン、サンプリングおよび分析(解析を含む)」と定義されている。

作業環境測定の実施にあたっては、労働安全衛生法第65条では事業者は政令で定める有害な業務を行う室内作業場では定期的に作業環境測定を行いその記録を法定年数保存すること(第1項)、作業環境測定は厚生労働大臣の定める作業環境測定基準に従って行うこと(第2項)、有機溶剤などを扱う指定作業場では作業環境測定士が測定すること(第3項)が定められている。

つまり、特定化学物質や有機溶剤を扱う作業場所では6ヶ月以内に1回作業環境測定を行い、その記

1) 日本大学医学部医学研究支援部門  
2) 日本大学医学部医学研究企画・推進室  
渡部和浩: watanabe.kazuhiro13@nihon-u.ac.jp



録を3年間（特別管理物質については30年間）保存することが義務付けられており、特定化学物質では63種類、有機溶剤では37種類が測定対象物質として指定されている。

### 3. 作業環境測定の進め方

#### ①デザイン

作業環境測定における「デザイン」とは測定範囲と測定点を決定することである。まず労働者の行動範囲、有害物の分布、局所排気装置の稼働状況等に基づいて単位作業場所の範囲を設定し図面を作成する。次に環境空気中の有害物質の平均的な濃度を測定するために無作為に選んだ5点以上の「A測定点」と発生源に近接する場所で作業が行われる場合に環境空气中濃度が最も高くなると思われる場所と時間に測定する「B測定点」を設定し図面に書き加える。

#### ②測定

デザインに基づきA測定、B測定を行う。試料空気のスAMPLING方法として環境空気を捕集袋に直接捕集する直接捕集法、試料空気を捕集液体に通じて捕集する液体捕集法、活性炭やシリカゲルなどの固体物質に捕集する固体捕集法などがある。捕集された有害物質は抽出操作や発色操作等の適切な前処理を施し、吸光度分析等の比色定量法、高速液体クロマトグラフィー法（HPLC法）やガスクロマトグラフィー法（GC法）によって空气中濃度が求められる。また、化学反応による可視部領域の色の変化を利用して直接の空气中濃度を求める検知管法などがある。

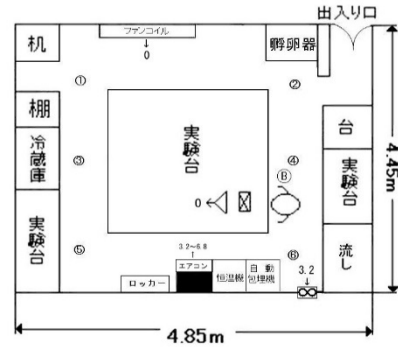


図3 デザイン例

#### ③評価

A測定の結果より幾何学平均値である第1評価値、算術平均値である第2評価値を算出する。このA測定の評価値とB測定による測定値及び有害物質ごとに定められた管理濃度に基づき、作業場所を第1～3管理区分に区分する。

第1管理区分は、作業場のほとんどの場所（95%以上）で空気中有害物質が管理濃度を超えない状態、第2管理区分は環境空気中の有害物質濃度の平均値が管理濃度を超えない状態、第3管理区分は環境空気中の有害物質濃度が管理濃度を超えている状態である。

また各区分について事業者は次のような措置を講じることが求められている。

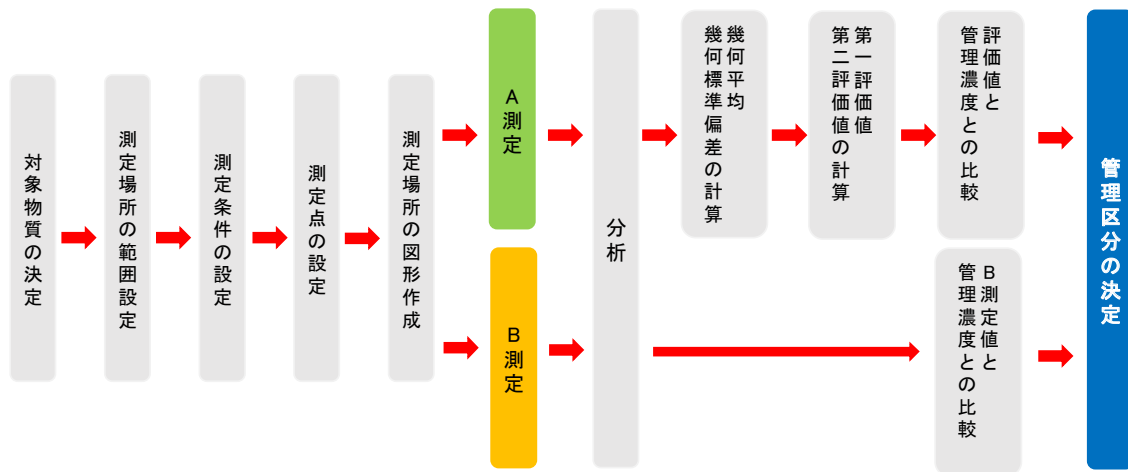


図2 作業環境測定の進め方

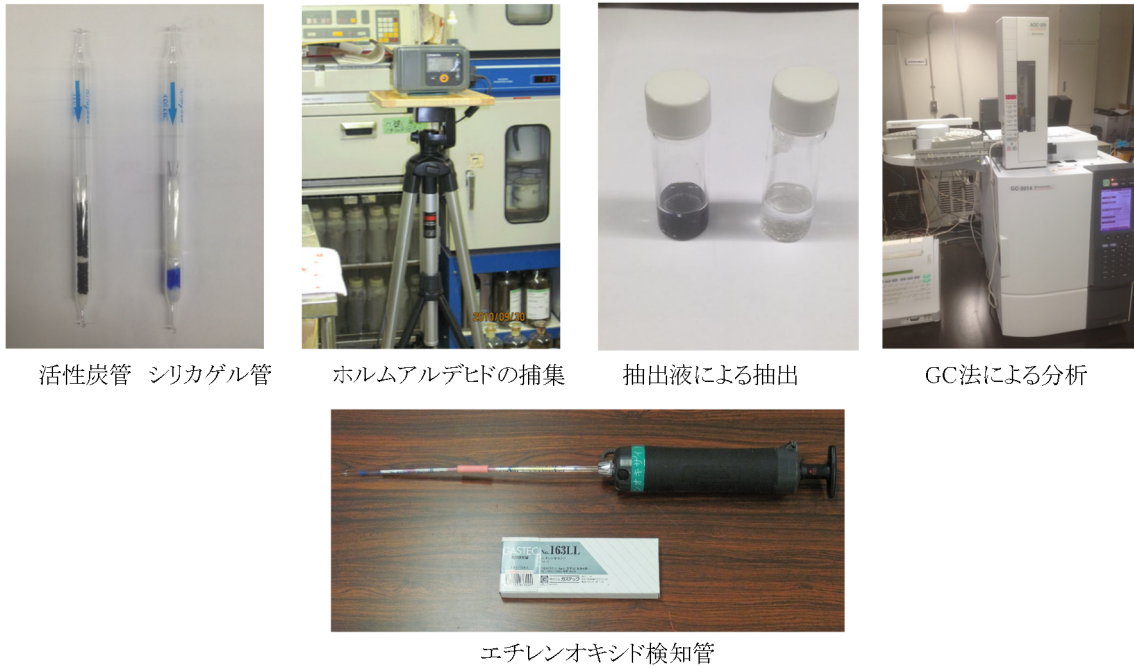


図 4 作業環境測定に用いる機器類

		A 測定		
		第1評価値 < 管理濃度	第2評価値 ≤ 管理濃度 ≤ 第1評価値	第2評価値 > 管理濃度
B 測定	B測定値 < 管理濃度	第1管理区分	第2管理区分	第3管理区分
	管理濃度 ≤ B測定値 ≤ 管理濃度 × 1.5	第2管理区分	第2管理区分	第3管理区分
	B測定値 > 管理濃度 × 1.5	第3管理区分	第3管理区分	第3管理区分

図 5 管理区分の決定

#### 4. 医学研究支援部門で行っている作業環境

医学研究支援部門ラジオアイソトープ・環境保全系では平成29年8月現在、第1種作業環境測定士(特定化学物質、有機溶剤)が1名在籍しており、主に日本大学医学部、板橋病院、日本大学病院の作業環境測定を年間約40件行っている。測定場所が医学部や病院などの関係上、病理組織の固定・切片作成に用いられるホルムアルデヒドやキシレン、器具滅菌に用いられるエチレンオキシドなどの化学物質の測定が多い。医学研究支援部門では作業環境測定の測定料として、外部作業環境測定機関への委託ではおよそ10万円かかる測定料をHPLC法とGC法では約1.5万円、検知管法では約5000円で行っている。平成28年度からは新しくイソプロピルアルコール

の測定も始め、またそれ以外にもアセトン、メタノール、ノルマルヘキサンなどの測定も可能である。上記の3種は現在測定料が設定されていないが今後設定予定である。また要望があれば測定物質を順次追加していく予定であり、医学部以外での作業環境測定も視野に入れている。

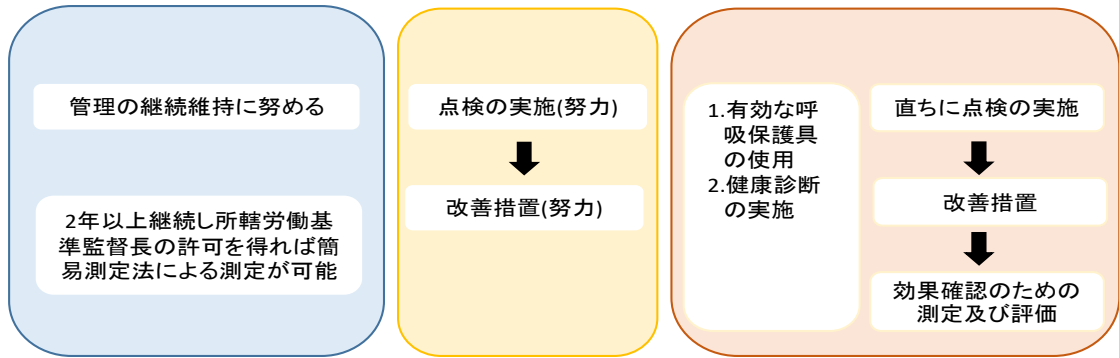


図 6 事業者の講じる処置

	医学部	板橋病院	日本大学病院	合計
ホルムアルデヒド	3	11	8	22
キシレン	4	4	2	10
エチレンオキシド	2	2	0	4
イソプロピルアルコール	0	2	0	2
合計	9	19	10	38

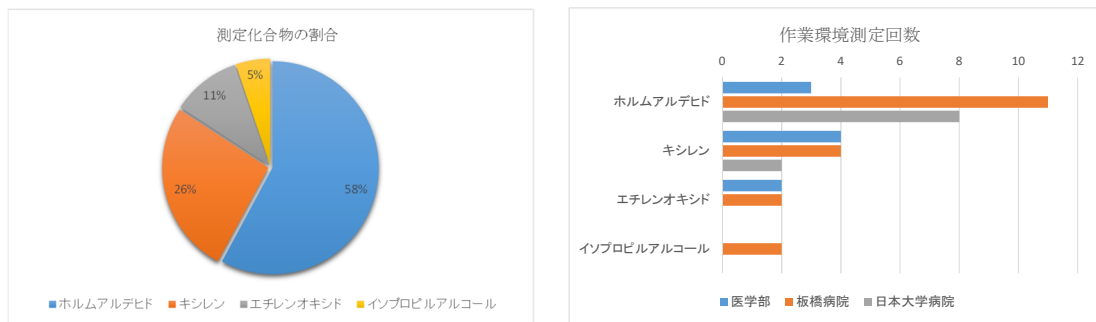


図 7 H28年度医学研究支援部門 作業環境測定業績

参考文献

- 1) 公益財団法人 日本作業環境測定協会編, 総論編 (作業環境測定ガイドブック0). 日本作業環境測定協会, 2007 ; 243p.
- 2) 公益財団法人 日本作業環境測定協会編, 特定化学物質 - 金属類を除く - (作業環境測定ガイドブック3). 日本作業環境測定協会, 2013 ; 381p.
- 3) 公益財団法人 日本作業環境測定協会編, 有機溶剤関係 (作業環境測定ガイドブック5). 日本作業環境測定協会, 2012 ; 300p.

## 画像保存についてセミナーを通して考えたこと

黒江裕子<sup>1)</sup>, 井上広一<sup>1)</sup>, 羽尾裕之<sup>2)</sup>, 石井敬基<sup>2)</sup>

### The idea of taking part in several seminars about image preservation

Hiroko KUROE<sup>1)</sup>, Koichi INOUE<sup>1)</sup>, Hiroyuki Hao<sup>2)</sup>, Yukimoto ISHII<sup>2)</sup>

#### 1. はじめに

フィルムカメラからデジタルカメラに移行し、医学研究支援部門中央写真室の業務内容も変化してきた。入職した2003年頃は臨床医学や基礎研究分野である標本や検体が主な撮影対象であり、それらをフィルムで撮影し印画紙にプリントするといった作業が大半を占めていた。業務のデジタル化に伴い記録媒体はフィルムからフラッシュメモリへと変わり、フィルム代や現像代、さらにモニター上の確認で済む処理についてはプリント作製も行わないためランニングコストを大幅に削減することができた。また、技術や作業過程の変化に伴い取り扱う業務が教育や広報などの分野へ広がり、幅広い技術や知識を得るため様々なセミナーに参加することが多くなった。それらのセミナーを通して画像保存について考える機会があったため本稿で記す。

#### 2. 画像記録の歴史

近年のデジタルカメラ技術はまさに日進月歩の進化を遂げており、肉眼では認識しにくい暗所もまるで昼間であるかのように撮ることが可能になった。また撮影後に好きな位置にフォーカスを合わせる機能もあり、その進化は目を見張るものである。

カメラの原型ともいえる手持ち式のカメラオプスクラは、15世紀頃絵を描く際のトレース用の道具として使われていた(図1)。そのカメラオプスクラがここまで進化を遂げてきた中で、大きな役割を果たしたのが記録媒体である。もし記録媒体がなけれ

ば、カメラオプスクラはトレース用の道具で終わっただかもしれないのである。

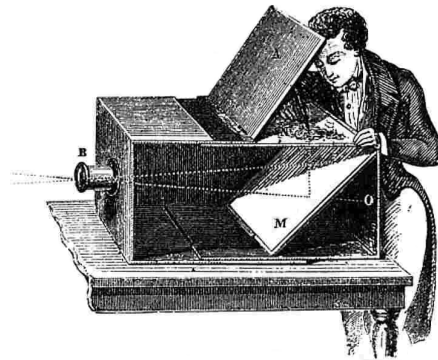


図1 カメラオプスクラを使用したトレースの様子

ジョセフ・ニセフォール・ニエプスがカメラオプスクラによって1827年に記録した画像(図2)は、金属板上のモノクロームポジであった。これが現存する最古の画像と言われている。



図2 「ル・グラの窓からの眺め」ジョセフ・ニエプス撮影

1) 日本大学医学部医学研究支援部門中央写真室

2) 日本大学医学部医学研究支援部門

黒江裕子: kuroe.hiroko@nihon-u.ac.jp



その最古の画像以後カロタイプやダゲレオタイプなどの写真技法を経て1925年発売のライカ市販一号機「ライカI」で使用したフィルムが35mmカートリッジ式フィルム（図3）の始まりと言われてい



図3 35mmカートリッジ式フィルム

その35mmカートリッジ式フィルムの登場から62年後の1988年に、富士フィルム社製の世界初デジタルカメラ、「DS-1P」機が登場する。その実用化が1991年の「DS-100」でありパソコン用の1MBメモリーカードが装着され、21コマの連続撮影が可能となった。そして今日のデジタル記録方式へとつながって行くのである。

2000年頃になると、一般カメラ市場において、フィルムカメラとデジタルカメラの占める割合が、ほぼ半々になったといわれている。そして2008年頃になるとデジタルカメラが一般市場の100%近くを占めるようになった。

記録媒体も35mmカートリッジ式フィルムから、コンパクトフラッシュやSDメモリーカードなど、フラッシュメモリと呼ばれる記録媒体に画像データとして記録している。これらの記録媒体は今後も進化を遂げることは明確であり、それに伴い規格変更も行われることが予測される。その場合、記録媒体を読み出す装置も新しい規格へと変わるため、現在主流となっている記録媒体も50年、100年後に直接読み出せるか否かは未知数である。

### 3. 画像保存とは

様々な媒体に記録されている画像の特徴を生かし適切な環境に保管することである。これが理想的な画像保存であろう。例えば、カラー写真プリントを高温多湿の場所に保管しておくとかビが発生し、長

期間直射日光にさらされ空気中のガスに触れていると画像が退色してしまう。美術品としての写真などは温湿度管理だけでなく災害に強い保管庫も必要となる。また、デジタル写真データの保存においても記録方式やサイズ、記録媒体など考慮すべき条件は数多く存在する。写真プリントとデジタル写真データは物理的に異なるものであるが、どちらも画像を定着（記録）している記録媒体という意味では同じである。

### 4. 中央写真室の画像保存状況

現在、中央写真室では撮影したデジタル写真データを一時的にHDDへ保存し、学部行事や要長期保存のデジタル写真データは光ディスクに保存している。デジタル化を開始した2004年から保存を開始、現在光ディスクは約600枚となり、それらを専用ファイルにて保存している。開始当初はCDを使用していたが、データ量が増えるとともに容量の大きいDVD、Blu-ray discへと記録媒体も変わっていった。デジタル化によりフィルムに比べ保存コストは減少したが、撮影カット数が増え、さらにデジタルカメラの高画質化に比例してデータ量も大きくなっていった。

大量のデジタル写真データの中から重要な記録を取捨選択することは最も時間を必要とする。念のためにと保存してしまうとカット数が増え結果として、検索・抽出が安易でなくなるからだ。現在は主に日付とタイトルから探し出しているが、効率の良い検索システムを構築することが必要であると考えている。

光ディスクのみの保存では、将来的に読み出しができなくなる可能性や物理的破損などのリスクも踏まえ、別のメディアやクラウドの利用も検討中であるが、クラウドの利用についてはセキュリティーについても十分に考慮しなければならない。

### 5. 写真を楽しむために

セミナーでは技術的な内容だけでなく、写真を身近なものとしてとらえ、「ものとして感じられないものはプリントにしよう」と提唱している写真家の講演などもあり、学生の頃に自分が向き合っていた写真とのかかわりを思い出させてくれた。当時から過ぎ去ってゆく日常を撮り続けているが、それは何



気ない日々の中にも素敵なことはたくさんあり、そんな時間の流れを大切に憶えていたいという思いからである。ハレの日のような特別な時間も何気なく過ぎてゆく時間も、同じくらい愛おしい一瞬の積み重ねだと感じている。そのため撮影後は必ずプリントし、いつでも見られるようにしていた。

今は、フィルムカメラからデジタルカメラにかわったが、日常を撮ることは続けている。しかしデジタルカメラになってからプリントにすることが減っており、最近では撮影時のプレビューを見ることで満足してしまうことが多くなった。一般的にも言えることだが、デジタルカメラでは撮影カット数が増え、プリント枚数は減る傾向にあり、一枚一枚の写真への思いが薄くなっているように感じられる。デジタル写真データのまま置いておくものとプリントにして手に残すものの大きな違いは「そこに存在すると認識すること」、「視覚・触覚として感じる」か否かではないかと思う。撮影したものの中から大切にしたいものを選び、プリントにすればそれは、特別なものにかかわると考える(図4)。

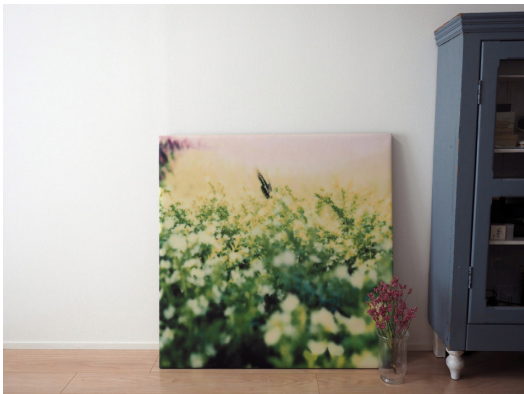


図4 Canon iPF9400にて出力(90cm×90cmパネル張り)

## 6. まとめ

いくつかのセミナー参加によって、画像保存を多角的に学ぶことができた。今後の業務においても検討すべき課題が明確となり、その一つ一つをクリアすることで、より安全で利便性の高い画像保存を可能にしなければ成らない。

プライベートではカメラがデジタルに変わっても、プリントすることを忘れずにいたい。なぜならプリントすることも画像保存の一つであり、それはそこに存在し、触覚としても感じられるからである。

日常業務においてはデジタルの効率や利便性、経済性などを優先するが、プライベートにおいては、ただ形あるものとして残すことも考え続けたい。

## 参考文献

- 1) 飯沢耕太郎 (2004)『デジグラフィ』中央公論新社
- 2) 飯沢耕太郎 (2004)『世界写真史』美術出版社
- 3) ベルトラン・ラヴェドリン (著) 白岩洋子 (訳) (2017)『写真技法と保存の知識』青幻舎
- 4) 井上広一他 デジタル化がもたらす環境変化と業務の拡張 日本大学医学部総合医学研究所紀要Vol3 (2015) 77-79.

## 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

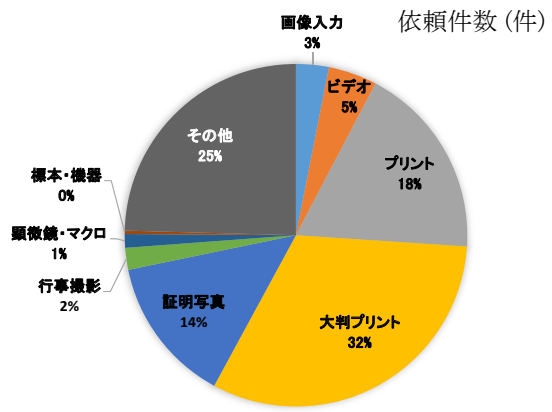
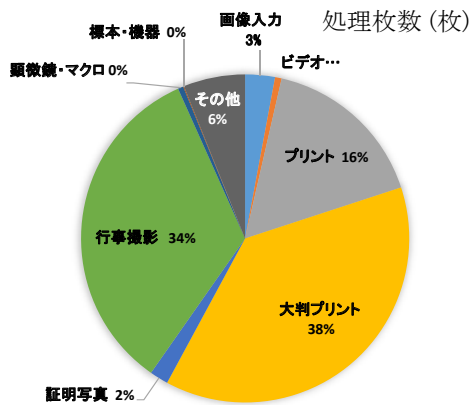
##### 【中央写真室】

##### 【医学研究支援部門 中央写真室統計】

##### 平成28年度 年間処理枚数/依頼件数

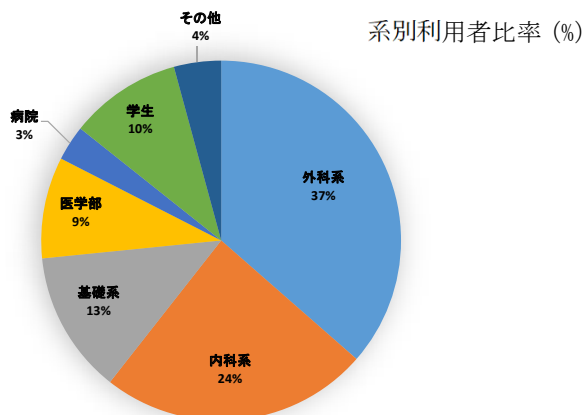
	画像入力	ビデオ	プリント	大判プリント	証明写真	行事撮影	顕微鏡・マクロ	標本・機器	その他	年間合計
処理枚数(枚)	704	154	3939	9114	440	8066	127	21	1462	24027
依頼件数(件)	48	71	284	493	214	32	20	5	380	1547

※1「ビデオ」は処理時間30分を1枚として換算 154枚=77時間  
※2「大判プリント」は料金単位 10cmを1枚として換算 9114枚=911.4m



##### 平成28年度 年間利用者数 (人)

外科系	内科系	基礎系	医学部	病院	学生	その他	合計
344	228	121	86	30	95	40	944



## 【電子顕微鏡室】

### 論文

#### 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

### 学会発表

#### 眼科学分野

山田愛, 大西貴子, 原田奈月子, 立花敦子, 加島陽二: 涙道チューブ挿入中に再閉塞をきたした2症例のチューブの電子顕微鏡観察. 第70回日本臨床眼科学会. 京都, 2016

#### 形成外科学分野

副島一孝, 檜村勉, 藤原英紀, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: シンポジウム1 培養表皮とアログラフトを用いた重症熱傷ハイブリッド治療 アログラフトにより再構築した真皮への培養表皮生着促進のための試み. 第42回日本熱傷学会総会学術集会. 東京, 2016

副島一孝, 檜村勉, 風間智彦, 松本太郎, 菊池雄二, 仲沢弘明: 自家培養表皮移植時の脱分化脂肪細胞(DFAT)併用療法による基底膜構築促進効果. 第25回日本形成外科学会基礎学術集会. 大阪, 2016

#### 物理学分野

川畑秀駿, 鈴木真也, 宮山勝: 元素置換による todorokite 型マンガン酸化物のマグネシウム二次電池正極特性の向上. 第54回セラミックス基礎科学討論会. 佐賀, 2016

#### 腫瘍病理学分野

中西陽子, 地家豊治, 楠美嘉晃, 唐小燕, 清水哲男, 辻野一郎, 高橋典明, 橋本修, 増田しのぶ: もどし電顕法を用いた肺生検検体におけるサイトケラチンの局在と肺癌の悪性度. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第32回学術講演会および総会. 東京, 2016

#### 生理学分野

石川友美, 地家豊治, 北野尚孝, 真宮淳, 藤原祐輔, 山本恵理, 日臺智明, 國分眞一郎: マウス皮下コラー

ゲン繊維の透過電子顕微鏡観察における Oolong Tea Extract(O TE) 染色の有用性. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第32回学術講演会および総会. 東京, 2016

#### 物理学分野

糸井充穂, 地家豊治, 浜根大輔, 宇田川誠一, 津田哲哉, 桑進, Kamei Boukhehdaden, Matthew J. Andrus AND Daniel R Talham: イオン液体を用いた光誘起相転移を示す分子性磁性体の電子顕微鏡観測. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第32回学術講演会および総会. 東京, 2016

#### 人体病理学分野

佐野誠, 地家豊治, 本間琢, 石毛俊幸, 廣谷ゆかり, 勝沼真由美, 根本則道, 逸見明博, 羽尾裕之: 線維芽細胞の活性化における超微形態学敵解析. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第32回学術講演会および総会. 東京, 2016

#### 微生物学分野

廣畑直子, 相沢(小峯)志保子, 早川智: P.gingivalis の培養上清は可溶性成分を介し trophoblast の浸潤に影響を与える. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第32回学術講演会および総会. 東京, 2016

### 受賞

#### 形成外科学分野

副島一孝

平成28年 第59回日本形成外科学会学術奨励賞受賞

Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting.

## 医用電子系

### 【医用電子室】

#### 論文

#### 神経外科学分野

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. PAIN RESEARCH (0915-8588)31巻1号; Page21-24.2016.

#### 総説・解説

#### IR・医学教育センター

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. 子どもの心とからだ (0918-5526)24巻4号; Page399-403.2016.

藤田之彦, 神保誌乃, 遠藤あゆみ, 吉野弥生, 小森暁子, 桃木恵美子, 石井和嘉子, 神山浩, 瀧上達夫, 高橋昌里: 起立性調節障害における起立テスト時Hyper-response型(血圧上昇型)の重要性. 日本小児科学会雑誌 (0001-6543)120巻2号; Page273.2016.

#### 小児科学分野

春日悠岐, 藤田之彦, 川口忠恭, 瀧上達夫, 稲毛康司, 高橋昌里, 石崎優子: 不登校を合併し小心臓を伴う起立性調節障害治療後に食後頭痛を呈した症例の解析. 子どもの心とからだ (0918-5526)25巻2号; Page160.2016.

#### 神経外科学分野

深谷親: (ブレインマシンインターフェース) DBSによる運動改善 DBSによるパーキンソン病の治療. Clinical Neuroscience (0289-0585)34巻2号; Page215-218.2016.

山本隆充: 痛みのClinical Neuroscience 進化する脊髄刺激療法(SCS). 最新医学 (0370-8241)71巻4号; Page848-851.2016.

## 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

Gon Y, Maruoka S, Inoue T, Mizumura K, Kuroda K, Fukano Y, Yamagishi K, Tsuboi E, Hashimoto S: Gene expression analysis in airway-secreting extracellular vesicles upon house dust mite exposure. Allergol Int; 65(Suppl): S53-5, 2016.

Gon Y, Maruoka S, Kishi H, Kozu Y, Kuroda K, Mizumura K, Nomura Y, Oshima T, Hashimoto S: DsRNA disrupts airway epithelial barrier integrity through down-regulation of claudin members. Allergol Int; 65(Suppl): S56-8, 2016.

Tajiri T, Matsumoto H, Gon Y, Ito R, Hashimoto S, Izuhara K, Suzukawa M, Ohta K, Ono J, Ohta S, Ito I, Oguma T, Inoue H, Iwata T, Kanemitsu Y, Nagasaki T, Niimi A, Mishima M: Utility of serum periostin and free IgE levels in evaluating responsiveness to omalizumab in patients with severe asthma. Allergy; 71(10): 1472-9, 2016.

#### IR・医学教育センター

Sugai K, Kimura H, Miyaji Y, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Sasaki-Sakamoto T, Matsunaga S, Yamada Y, Kashiwakura J-I, Noda M, Ikeda M, Kozawa K, Ryo A, Yoshihara S, Ogata H, Okayama Y: MIP-1 $\alpha$  level in nasopharyngeal aspirates at the first wheezing episode predicts recurrent wheezing. J Allergy Clin Immunol; 137(3): 774-81, 2016.

Kan J-I, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Seki M, Saito S, Ra C, Tokuhashi Y, Okayama Y: Interleukin-17A expression in human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Allergol Int; 65(Suppl):S11-16, 2016.

岡山吉道, 布村 聡, 下川敏文, 高橋恭子, 齋藤修, 山本樹生, 照井 正: 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. 日本大学医学部総合医学研究所紀要; Vol.4 : pp8-12, 2016.

#### 細胞分子薬理学部門

Kubota J, Mikami Y, Kanemaru K, Sekiya H, Okubo Y, Iino M: Whisker experience-dependent mGluR signaling maintains synaptic strength in the mouse adolescent cortex. *Eur. J. Neurosci*; 44: 2004–2014, 2016.

Mikami Y, Kanemaru K, Okubo Y, Nakaune T, Suzuki J, Shibata K, Sugiyama H, Koyama R, Murayama T, Ito A, Yamazawa T, Ikegaya Y, Sakurai T, Saito N, Kakizawa S, Iino, M: Nitric oxide-induced activation of the type 1 ryanodine receptor is critical for epileptic seizure-induced neuronal cell death. *EBioMedicine*; 11: 253–261, 2016.

Suzuki J, Kanemaru K, Iino M: Genetically encoded fluorescent indicators for organellar calcium imaging. *Biophys J*; 111: 1119–1131, 2016.

#### 歯科口腔外科

Kitano H, Mamiya A, Ishikawa T, Egoshi K, Kokubun S, Hidai C: Long-term gene therapy with Del1 fragment using nonviral vectors in mice with explanted tumors. *Onco Targets Ther*; 9: 503–516, 2016.

#### 神経内科学分野

Teramoto H, Morita A (Correspondence Author), Ninomiya S, Akimoto T, Shiota H, Kamei S: Relation between Resting State Front-Parietal EEG Coherence and Executive Function in Parkinson' s Disease. *BioMed Research International*; 2016:Article ID 2845754, 2016.

#### 血液膠原病内科

Iriyama N, Yuan B, Hatta Y, Takagi N, Takei M: Lyn, a tyrosine kinase closely linked to the differentiation status of primary acute myeloid leukemia blasts, associates with negative regulation of all-trans retinoic acid (ATRA) and dihydroxyvitamin D3 (VD3)-in-

duced HL-60 cells differentiation. *Cancer Cell International*; 16: 37, 2016.

Takahashi H, Miura K, Nakagawa M, Sugitani M, Amano Y, Kurita D, Sakagami M, Ohtake S, Uchino Y, Kodaira H, Iriyama N, Kobayashi S, Hojo A, Kobayashi Y, Hirabayashi Y, Kusuda M, Hatta Y, Nakayama T, Takei M: Negative impact of concurrent overexpression of MYC and BCL2 in patients with advanced diffuse large B-cell lymphoma treated with dose-intensified immunochemotherapy. *Leukemia & Lymphoma*; 13: 1-7, 2016.

Iriyama N, Hatta Y, Takei M: Direct effect of dasatinib on signal transduction pathways associated with a rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes. *Cancer Medicine*; 5(11): 3223-3234, 2016.

#### 生体構造医学分野

Tsuboi I, Harada T, Hirabayashi Y, Kanno J, Aizawa S: Differential regulation of lympho-myelopoiesis by stromal cells in the early and late phases in BALB/c mice repeatedly exposed to lipopolysaccharide. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; 39: 1939-1947, 2016.

Tsuboi I, Harada T, Aizawa S: Age-related functional changes in hematopoietic microenvironment. *The journal of Physical Fitness and Sport Medicine*; 5: 167-175, 2016.

#### 臨床検査医学分野

鳴瀬 弘, 中山智祥: Gitelman症候群の遺伝学的検査における Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法適用. *日本臨床検査自動化学会誌*; 41(2) : 203-209, 2016.

志方えりさ, 佐々木喜代子, 平塚ひとみ, 田島八重子, 中山智祥: 全自動輸血装置導入における不規則抗体スクリーニングの検証. *日大医学雑誌*; 75(3) : 113-117, 2016.

鳴瀬 弘, 中山智祥: 単一遺伝子疾患における遺伝

学的検査の受注システムの確定診断率調査. 日本臨床検査自動化学会誌; 41(3): 293-298, 2016.

Susa N, Nishida Y, Yada Y, Nakayama T, Asai S, Takahashi Y: Comparative effect of fixed-dose combination tablets of candesartan cilexetil/amlodipine versus olmesartan medoxomil/azelnidipine on laboratory parameters in patients with hypertension: a retrospective cohort study. *Clin Exp Hypertens*; 38(2): 173-9, 2016.

Kawamura H, Ozawa Y, Izumi Y, Kasamaki Y, Nakayama T, Mitsubayashi H, Ohta M, Ichimaru Y: Non-dipping blood pressure variations in adult Kazakhs are derived from decreased daytime physical activity and increased nighttime sympathetic activity. *Clin Exp Hypertens*; 38(2): 194-202, 2016

Shimodaira M, Yamasaki T, Nakayama T: The association of maternal ABO blood group with gestational diabetes mellitus in Japanese pregnant women. *Diabetes Metab Syndr. Apr-Jun*; 10(2 Suppl 1): S102-5, 2016.

Hoshino T, Hanai K, Tanimoto K, Nakayama T: Development and Evaluation of a New Creatine Kinase MB Mass Determination Assay Using a Latex Agglutination Turbidimetric Immunoassay with an Automated Analyzer. *Clin Lab*; 62(5): 877-85, 2016.

Takahashi H, Miura K, Nakagawa M, Sugitani M, Amano Y, Kurita D, Sakagami M, Ohtake S, Uchino Y, Kodaira H, Iriyama N, Kobayashi S, Hojo A, Kobayashi Y, Hirabayashi Y, Kusuda M, Hatta Y, Nakayama T, Takei M: Negative impact of concurrent overexpression of MYC and BCL2 in patients with advanced diffuse large B-cell lymphoma treated with dose-intensified immunochemotherapy. *Leuk Lymphoma*; 57(12):2784-2790, 2016.

Shimodaira M, Okaniwa S, Nakayama T: Investigation of the relationship between hemoglobin and serum iron levels and early-phase insulin secretion in

non-diabetic subjects. *Acta Diabetol*; 53(5): 783-9, 2016.

里吉彩華, 杉山貴大, 出野 健, 竹島秀美, 青木留美子, 山川道子, 武居宣尚, 荒木秀夫, 山舘周恒, 中山智祥: 富士ドライケムNX10Nによる血中アンモニア迅速測定の基礎的検討. 日本臨床検査自動化学会誌; 41(3): 356-362, 2016.

## 症例報告

### 呼吸器内科

Kozu Y, Gon Y, Takano Y, Noguchi T, Hayashi S, Kumasawa F, Mizumura K, Maruoka S, Hashimoto S: Time-course of Serum Pro-inflammatory Cytokines and Chemokines Levels Observed in Granulomatosis with Polyangiitis. A Case Report. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*; 33(4):407-412, 2016.

## 臨床検査医学

Nagano N, Yoshikawa K, Hosono S, Takahashi S, Nakayama T: Alveolar capillary dysplasia with misalignment of the pulmonary veins due to novel insertion mutation of FOXF1. *Pediatrics International*; 58(12):1371-1372, 2016.

## 学会発表

### 呼吸器内科

権 寧博: 特発性肺線維症の病態を反映する疾患特異的自己抗体の同定. 第9回日本大学先端バイオフォーラム. 東京都, 2016.

引地麻梨, 権 寧博, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 高橋麻衣, 森澤朋子, 大木隆史, 坪井絵莉子, 橋本 修: 特発性肺線維症における新規血中自己抗体同定の試み. 第56回日本呼吸器学会学術講演会. 京都, 2016.

田尻智子, 松本久子, 権 寧博, 伊藤玲子, 橋本修, 鈴川真穂, 大田 健, 金光禎寛, 長崎忠雄, 小熊 毅, 伊藤功朗, 新実彰男, 三嶋理晃: 成人重症喘息における血清ペリオスチン, free IgEとオマリズマブ反応性との関連. 第56回日本呼吸器学会学術講演会. 京都, 2016.

水村賢司, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 橋本 修: オートファジーからみた COPD の病態. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会. 京都, 2016.

権寧博: 喘息・COPD の病態とバイオマーカー. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会. 京都, 2016.

田尻智子, 松本久子, 権 寧博, 伊藤玲子, 橋本修, 出原賢治, 鈴川真穂, 大田 健, 金光禎寛, 長崎忠雄, 岩田敏之, 小熊 毅, 伊藤功朗, 新実彰男, 三嶋理晃: 成人重症喘息における血清 periostin 及び free IgE と omalizumab 反応性との関連. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 東京, 2016.

Hikichi M, Gon Y, Maruoka S, Morisawa T, Ooki T, Mizumura K, Ito R, Hiranuma H, Kumasawa F, Kozu Y, Tsuboi E, Hashimoto S: Identification of a New Specific Autoantibody of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. American Thoracic Society International Conference. USA, 2016.

丸岡秀一郎, 権 寧博, 津谷恒太, 岡本真一, 水村賢司, 井上寿男, 神津 悠, 新谷榮崇, 鹿野壯太郎, 坪井絵莉子, 曾田香織, 竹下郁子, 橋本 修: 喘息の病態形成に関与する気道上皮バリア脆弱化メカニズムの検討. 平成 27 年度私立大学戦略的研究基盤支援事業報告会. 東京, 2016.

井上寿男, 権 寧博, 丸岡秀一郎, 鹿野壯太郎, 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エクソソームの RNA 発現解析. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会. 京都, 2016.

鹿野壯太郎, 井上寿男, 権 寧博, 丸岡秀一郎, 黒田和道, 山岸賢司, 曾田香織, 橋本修: 急性肺障害モデルにおける exosome 由来 miRNA の発現解析. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会. 京都, 2016.

岡本真一, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 水村賢司, 神津悠, 新谷榮崇, 鹿野壯太郎, 津谷恒太, 竹下郁子, 橋本 修: ストレス関連遺伝子の上皮バリア機能形成に及ぼす影響. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演

会. 京都, 2016.

新谷榮崇, 権 寧博, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 熊澤文雄, 神津 悠, 竹下郁子, 曾田香織, 橋本 修: 気道上皮細胞におけるバリア機能及びサイトカン産生制御における NDRG1 の役割. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会. 京都, 2016.

津谷恒太, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 水村賢司, 神津悠, 新谷榮崇, 鹿野壯太郎, 岡本真一, 坪井絵莉子, 曾田香織, 竹下郁子, 橋本 修: ダニアレルゲンによる気道上皮分化過程の上皮バリア形成に及ぼす影響. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会. 京都, 2016.

神津 悠, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 橋本 修: ウィ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. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会. 京都, 2016.

神津 悠, 権 寧博, 水村賢司, 丸岡秀一郎, 橋本修: ウィ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. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 東京, 2016.

新谷榮崇, 権 寧博, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 熊澤文雄, 神津 悠, 竹下郁子, 曾田香織, 橋本 修: 気道上皮細胞におけるバリア機能及びサイトカン産生制御における NDRG1 の役割. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 東京, 2016.

岡本真一, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 水村賢司, 神津悠, 新谷榮崇, 鹿野壯太郎, 津谷恒太, 竹下郁子, 橋本 修: ストレス関連遺伝子の上皮バリア機能形成に及ぼす影響. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 東京, 2016.

#### 細胞分子薬理学部門

Iino M: In vivo Ca<sup>2+</sup> imaging to decipher the function of astrocytic assembly. Korea Institute of Science and Technology Seminar. Korea, 2016.

Iino M: Use of CEPIA indicators for the study of in-

traorganellar Ca<sup>2+</sup> dynamics. 14th International Meeting of the European Calcium Society. Spain, 2016.

Iino M: Analysis of neurovascular coupling using in vivo Ca<sup>2+</sup> imaging. Cold Spring Harbor Asia. China, 2016.

Iino M: Calcium signaling in the brain in health and disease. 14th National Conference of Chinese Pharmacological Society. China, 2016.

Iino, M: Astrocytic calcium signaling in health and disease. ASCEPT-MPGPCR Joint Scientific Meeting. Australia, 2016.

大久保洋平, 久保田淳, 三上義礼, 金丸和典, 関谷敬, 飯野正光: 成熟マウス大脳皮質における mGluR を介した経験依存性シナプス維持機構. 第134回日本薬理学会関東部会. 大田原, 2016.

関谷 敬, 北島奈美, 金丸和典, 田中健二, 飯野正光: In vivo visualization of the glial assembly: Techniques and applications. 第3回グリアアセンブリ Workshop. 山形, 2016.

大久保洋平, 久保田淳, 三上義礼, 金丸和典, 関谷敬, 飯野正光: 成熟マウス大脳皮質における mGluR を介した経験依存性シナプス維持機構. 生理研研究会「生体シグナルダイナミクス研究会」. 岡崎, 2016.

金丸和典, 太向勇, 北島奈美, 関谷 敬, 飯野正光: オルガネラ内腔 Ca<sup>2+</sup> インジケーターおよび Ca<sup>2+</sup> インジケーター発現マウスを用いた β 細胞 Ca<sup>2+</sup> シグナル解析. 第135回日本薬理学会関東部会. 浜松, 2016.

関谷 敬, 北島奈美, 金丸和典, 田中謙二, 飯野正光: アストロサイトを介した青斑核による脳血流制御. 第26回日本循環薬理学会. 松本, 2016.

#### 歯科口腔外科

Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Tomomi Ishikawa, Yuusuke Fuziwara, Eri Yamamoto, Shinichiro Kokubun, Chiaki Hidai. An EGF motif of del1 suppresses notch function and inhibits efficient angiogenesis in vivo. 5<sup>th</sup> International conference and Exhibition on Pathology. USA, 2016.

#### 生理学分野

山本恵理, 北野尚孝, 真宮 淳, 國分眞一朗, 日臺智明: 活性化凝固第IX因子は, 内皮透過性を調節する. 第93回日本生理学会大会. 札幌, 2016.

山本恵理, 北野尚孝, 真宮淳, 石川友美, 藤原祐輔, 吉田美昭, 日臺智明: Del1 由来のペプチドによるがん遺伝子治療は血流のない血管新生を介して予後を改善する. 第61回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会. 千葉, 2016.

#### 微生物学分野

相澤 (小峯) 志保子, 本多三男, 松尾和浩, 早川智: MHC Class I presentation by highly functional epitope peptides of M. tuberculosis shared among the antigen 85 complex. 第86回実験結核研究会総会. 東京, 2016.

相澤 (小峯) 志保子, 本多三男, 松尾和浩, 早川智: 抗結核 CD8T 細胞エпитープ分子の特性と組換えワクチン開発の試み. 第39回日本分子生物学会年会. 横浜, 2016.

相澤 (小峯) 志保子, 本多三男, 松尾和浩, 早川智: MHC Class I presentation by highly functional epitope peptide of M. tuberculosis shared among mycobacterial antigen 85 complex. 第45回日本免疫学会学術集会. 沖縄, 2016.

#### 血液膠原病内科

Iriyama N, Hino H, Moriya S, Hiramoto M, Hatta Y, Takei M, Miyazawa K: Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor abemaciclib exerts dose-dependent cytostatic and cytotoxic effects on multiple myeloma cells via autophagy. 58th American Society of Hematology.



San Diego, 2016.

Iwata M, Nagasawa Y, Kitamura N, Nozaki T, Ishizuka E, Imadome K, Fujiwara S, Takei M: Epstein-Barr Virus-Induced Expression of Receptor Activator Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand on B cells is Possibly Responsible for Erosive Arthritis in Epstein-Barr Virus-Infected Humanized Nonobese Diabetic/Shi-scid/ $\gamma$ cnnull Mice. American College of Rheumatology Annual Meeting. Washington DC, 2016.

長澤洋介, 井汲菜摘, 野崎高正, 猪股弘武, 吉田広人, 今留謙一, 北村 登, 岩田光浩, 藤原成悦, 武井正美: Epstein-Barr virus 感染による NOD/Shi-scid IL-2rgnull びらん性関節炎マウスモデルにおけるヒト破骨細胞の検討. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 27 年度報告会. 東京, 2016.

#### 生体構造医学分野

原田智紀, 壺井功, 内藤美智子, 古作和寛, 原 弘之, 相澤 信: 三次元骨髄培養モデルにおける造血支持特性. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 福島, 2016.

壺井 功, 原田智紀, 平林容子, 菅野 純, 相澤 信: LPS 頻回投与による造血系の加齢様変化におけるストローマ細胞機能低下についての検討. 第 39 回日本基礎老化学会. 伊勢原, 2016.

#### 臨床検査医学

Nakayama T, Naruse H: An investigation of definite diagnosis rate for monogenic diseases in the order receiving system of genetic testing. The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG). Kyoto, 2016.

中山智祥, 鳴瀬 弘: Gitelman 症候群の検査受託システムにおける現況. 第 89 回 日本内分泌学会学術総会. 京都, 2016.

中山智祥, 鳴瀬 弘: Gitelman 症候群の遺伝学的検査受託システム考察. 第 26 回日本病態生理学会大会. 金沢, 2016.

中山智祥, 鳴瀬 弘: 遺伝学的検査の受注システムにおける単一遺伝子疾患の確定診断率について. 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会, 神戸, 2016.

近岡知剛, 杉山貴大, 出野 健, 青木留美子, 山川道子, 永瀬昌史, 荒木秀夫, 中山智祥, 桜井錠治, 野崎順子: LPIA ジェネシス D ダイマー試薬の基礎性能評価と採血手技による測定値への影響. 日本臨床検査自動化学会第 48 回大会. 横浜, 2016.

中山智祥, 鳴瀬 弘: 遺伝学的検査としての Gitelman 症候群の確定診断率調査. 日本臨床検査自動化学会第 48 回大会. 横浜, 2016.

糸賀 栄, 横田浩充, 南木 融, 長田 誠, 松下一之, 野村文夫, 中山智祥: BCR-ABL1 mRNA 定量検査の外部精度管理報告 (第 4 回). 日本臨床検査自動化学会第 48 回大会. 横浜, 2016.

田辺大輔, 井上 満, 荒木秀夫, 中山智祥: 日本大学医学部附属板橋病院院内検査での習慣流産における染色体異常の実態調査. 日本臨床検査自動化学会第 48 回大会. 横浜, 2016.

中山智祥, 鳴瀬 弘: 遺伝学的検査としての Gitelman 症候群の確定診断率調査. 日本臨床検査自動化学会第 48 回大会. 横浜, 2016.

中山智祥, 鳴瀬 弘: 遺伝学的検査としての Gitelman 症候群の確定診断率調査. 日本臨床検査自動化学会第 48 回大会. 横浜, 2016.

中山智祥, 鳴瀬 弘: Gitelman 症候群の確定診断率調査. 第 39 回日本高血圧学会総会, 仙台, 2016.

中山智祥, 鳴瀬 弘: 単一遺伝子疾患における遺伝学的検査受託システム考察—Gitelman 症候群—. 第 56 回日本臨床化学会年次学術集会. 熊本, 2016.

星野 忠, 中山智祥: ドライケミストリー試薬を用いた CK-MB 活性測定におけるミトコンドリア CK の影響. 第 56 回日本臨床化学会年次学術集会. 熊本, 2016.

総説, 解説

呼吸器内科

権 寧博, 丸岡秀一郎, 橋本 修: 臨床検体の exosome 解析. アレルギーの臨床 36(13): 1259-1262, 2016.

権 寧博, 橋本 修: 【特集 呼吸器疾患におけるバイオマーカー(BM)】 COPD 重症化の評価に役立つバイオマーカー. 呼吸器内科 30(5): 383-388, 2016.

IR・医学教育センター

岡山吉道: 重症慢性蕁麻疹患者においては Mas-related gene X2 を発現している皮膚マスト細胞数が増加している. 小児科診療 79(10): 1355-1359, 2016.

臨床検査医学

山舘周恒, 中山智祥: 第62回学術集会シンポジウム 12: Global Standardization からみた我が国の標準法の現状と課題 (2) JSCC 常用基準法の課題. 臨床病理 64(5): 544-549, 2016.

シンポジウム

血液膠原病内科学分野

北村 登, 長澤洋介, 岩田光浩, 武井正美: EBV とリウマチ性疾患. 第60回日本リウマチ学会総会学術集会. 横浜, 2016.

ワークショップ

臨床検査医学

中山智祥: 第23回日本遺伝子診療学会大会大会長講演, 遺伝子診療のエキスパートを目指して. 第23回日本遺伝子診療学会大会. 東京, 2016.

著書

呼吸器内科

権 寧博, 伊藤玲子, 橋本 修: Omalizumab 治療における血清 free IgE モニタリング. Annual Review 呼吸器. 中外医学社: 150-157, 2016.

臨床検査医学

中山智祥: 遺伝子検査技術: 基礎編 第3章 臨床遺伝学的検査. 宇宙堂八木書店: pp. 167-183, 2016.

中山智祥: 医療に役立つ遺伝子関連 Web 情報検索 一手とり足とり教えますガイド. メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2016.

特許

微生物学分野

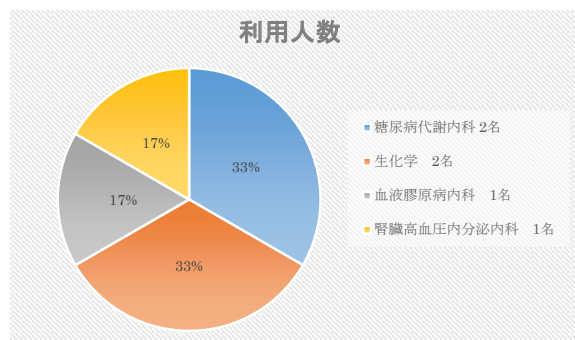
相澤 (小峯) 志保子: ペプチド及びその使用. 特願 2016-103744.

ラジオアイソトープ・環境保全系

【RI 実験室】

平成28年度 RI 実験室ガラスバッチ利用者数

分野	糖尿病代謝内科	生化学	血液膠原病内科	腎臓高血圧内分泌科
人数	2	2	1	1

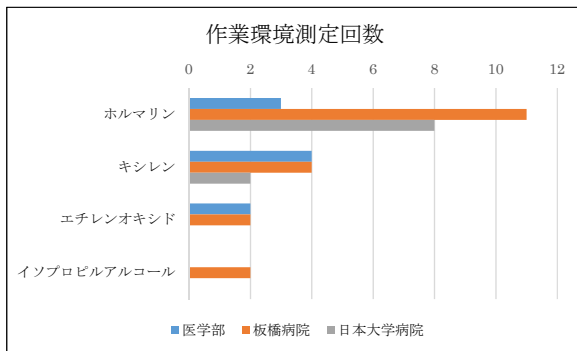


保有核種数

保有核種	<sup>3</sup> H	<sup>35</sup> S	<sup>14</sup> C
個数	1	1	1

平成28年度 作業環境測定の実績  
測定物質としてイソプロピルアルコールを追加  
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	3	11	8	22
キシレン	4	4	2	10
イソプロピルアルコール	0	2	0	2
エチレンオキシド	2	2	0	4
合 計	9	19	10	38



## ラボラトリーアニマル系

### 【動物実験室】

論文

#### 循環器内科学分野

Takahashi K, Okumura Y, Watanabe I, Nagashima K, Sonoda K, Sasaki N, Kogawa R, Iso K, Kurokawa S, Ohkubo K, Nakai T, Nakahara S, Hori Y, Nikaido M, Hirayama A: Anatomical proximity between ganglionated plexi and epicardial adipose tissue in the left atrium: implication for 3-D reconstructed epicardial adipose tissue-based ablation. *J Interv Card Electrophysiol*. Volume 47, Issue 2, pp 203–212. November 2016.

Li Y, Fuchimoto D, Sudo M, Haruta H, Lin QF, Takayama T, Morita S, Nochi T, Suzuki S, Sembon S, Nakai M, Kojima M, Iwamoto M, Hashimoto M, Yoda S, Kunimoto S, Hiro T, Matsumoto T, Mitsumata M, Sugitani M, Saito S, Hirayama A, Onishi A: Development of Human-Like Advanced Coronary Plaques in Low-Density Lipoprotein Receptor Knock-out Pigs and Justification for Statin Treatment Before

Formation of Atherosclerotic Plaques. *J Am Heart Assoc*. 18;5(4) : 1-15, 2016

#### 消化器肝臓内科学分野

Noriko Nakajima, Karina Kozu, Shun Kobayashi, Ryu Nishiyama, Rie Okubo, Yuichi Akai, Mitsuhiko Moriyama, Noriko Kinukawa: The expression of IGF-1R in Helicobacter pylori infected intestinal metaplasia and gastric cancer. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*; 59(1) : pp.53-57, 2016.5.

#### 腎臓高血圧内分泌内科学分野

丸山高史, 松本太郎. 腎疾患に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞移植治療. *臨床免疫・アレルギー科*, 65(6) : 593-598, 2016

#### 総合内科・総合診療医学分野

Obinata D, Takayama K, Fujiwara K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fukuda N, Nagase H, Fujimura T, Urano T, Homma Y, Aburatani H, Takahashi S, Inoue S. Targeting Oct1 genomic function inhibits androgen receptor signaling and castration-resistant prostate cancer growth. *Oncogene*. 2016 Dec 8;35(49):6350-6358

#### 形成外科学分野

Tsutomu Kashimura, Kazutaka Soejima, Yuji Kikuchi, Hiroaki Nakazawa. The Effect of Allogenic Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on Ischemic Tissue. 13 th Japan-Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery, 2016年

#### 整形外科分野

Shumpei Numaguchi, Mariko Esumi, Mika Sakamoto, Michiko Endo, Takayuki Ebihara, Hiroto Soma, Akio Yoshida, Yasuaki Tokuhashi: Passive cigarette smoking changes the circadian rhythm of clock genes in rat intervertebral discs. *Journal of Orthopedic Research* See comment in PubMed Commons below 34(1):39-47, 2016. [IF: 2.99]

Natsuhiko Takata · Miki Suzuki-Karasaki · Eiji Osaka · Yukihiro Yoshida · Toyoko Ochiai · Yasuaki Toku-

hashi · Yoshihiro Suzuki-Karasaki: Role of calcium in TRAIL resistance in malignant tumor cells: Implications of TRPV1. *International Journal of Molecular Medicine*, 2016 January

間世田優文, 徳橋泰明, 江角真理子: ヒト変性椎間板に関するプロテオーム解析. *日大医誌* 75(1): 16-21, 2016

#### 眼科学分野

Sakimoto T, Ishimori A: Anti-inflammatory effect of topical administration of tofacitinib on corneal inflammation. *Exp Eye Res* 145: 110-117, 2016.

#### 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野

Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Tomomi Ishikawa, Kayo Egoshi, Shinichiro Kokubun, and Chiaki Hidai. Long-term gene therapy with Dell1 fragment using nonviral vectors in mice with explanted tumors. *Onco Targets Ther.* 9: 503–516: 2016.

#### 人体病理学分野

Sano M, Driscoll DR, DeJesus-Monge WE, Quattrochi B, Appleman VA, Ou J, Zhu LJ, Yoshida N, Yamazaki S, Takayama T, Sugitani M, Nemoto N, Klimstra DS, Lewis BC: Activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling enhances pancreatic cancer development and the malignant potential via up-regulation of Cyr61. *Neoplasia*, 2016 Nov 24;18(12):785-794. 査読有 (IF 4.509)

#### 生体構造医学分野

Matsukawa, M., Imada, M., Aizawa, S. and Sato, T. Habitat odor can alleviate innate stress responses in mice. *Brain Research.* 1631: 46-52, 2016

Tsuboi I, Harada T, Hirabayashi Y, Kanno J, Aizawa S. Differential regulation of lympho-myelopoiesis by stromal cells in the early and late phases in BALB/c mice repeatedly exposed to lipopolysaccharide. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 39:1939-1947, 2016

Tsuboi I, Harada T, Aizawa S. Age-related functional

changes in hematopoietic microenvironment. *The Journal of Physical Fitness and Sport Medicine* 5:167-175, 2016

#### 細胞再生・移植医学分野

Kobayashi H, Haketa A, Ueno T, Suzuki R, Aoi N, Ikeda Y, Tahira K, Hatanaka Y, Tanaka S, Otsuka H, Abe M, Fukuda N, Soma M. Subtype prediction in primary aldosteronism: measurement of circadian variation of adrenocortical hormones and 24-h urinary aldosterone. *Clinical Endocrinology* 84(6):814-821, 2016, 6.

Saito K, Asai T, Fujiwara K, Sahara J, Koguchi H, Fukuda N, Suzuki-Karasaki M, Soma M, Suzuki-Karasaki Y. Tumor-selective mitochondrial network collapse induced by atmospheric gas plasma-activated medium. *Oncotarget* 7(15):19910-19927, 2016. 4.

Kusama-Eguchi K, Kawaguchi K, Yakubo S, Kitanaka S, Matsuzaki K, Takamiya T, Fukuda N, Masuko T, Hirose D, Makino M, Ueda Y, Ikegami F, Iijima H. Treatment of Saikokaryukotsuboreito during pregnancy protects rat neonates from maternal cannibalism and death in an experimental model of neurolethyrism. *Traditional and Kampo Medicine* 2016 (in press).

Obinata D, Takayama K, Fujiwara K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fukuda N, Nagase H, Fujimura T, Urano T, Homma Y, Aburatani H, Takahashi S, Inoue S. Targeting Oct1 genomic function inhibits androgen receptor signaling and castration-resistant prostate cancer growth. *Oncogene* 2016 (in press)

Katakawa M, Fukuda N, Tsunemi A, Mori M, Maruyama T, Matsumoto T, Abe M, Yamori Y. Taurine and magnesium supplementation enhances the function of endothelial progenitor cells through antioxidant in healthy men and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research* 2016 (in press)

Ikado Y, Obinata D, Matsumoto T, Murata Y, Kano K,



Fukuda N, Yamaguchi K, Takahashi S. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells for the treatment of vesicoureteral reflux in a rat model. *International Urology Nephrology*. 48:1951-1960, 2016, 2016, 12.

Ishige-Wada M, Kwon S, Eguchi M, Hozumi K, Iwaguro H, Taro Matsumoto T, Fukuda N, Mugishima H, Masuda H, Asahara T. Jagged-1 signaling in the bone marrow microenvironment promotes endothelial progenitor cell expansion and commitment of CD133+ human cord blood cells for postnatal vasculogenesis. *PLoS ONE* (in press) 2016.11.

Kobayashi H, Haketa A, Ueno T, Ikeda Y, Hatanaka Y, Tanaka S, Otsuka H, Abe M, Fukuda N, Soma M. Scoring system for the diagnosis of bilateral primary aldosteronism in the outpatient setting before adrenal venous sampling. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016 Nov 8.

Kobayashi H, Haketa A, Takahiro U, Otsuka H, Tanaka S, Hatanaka Y, Ikeda Y, Abe M, Fukuda N, Soma M. Plasma adrenocorticotropic hormone but not aldosterone is correlated with blood pressure in patients with aldosterone-producing adenomas. *J Clin Hypertens*. 2016 Dec 5.

#### 生化学分野

Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Tomomi Ishikawa, Kayo Egoshi, Shinichiro Kokubun, and Chiaki Hidai. Long-term gene therapy with Del1 fragment using nonviral vectors in mice with explanted tumors. *Onco Targets Ther*. 9: 503-516: 2016.

#### 総合医学研究所 医学研究支援部門

藤田順一, 谷口由樹, 高山世絵梨, 松本 明, 荒島康友, 黒田和道, 石井敬基: 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. *日本大学医学部総合医学研究所紀要* Vol.4:66-71, 2016.

#### 学会

##### 循環器内科学分野

高橋啓子, 奥村恭男, 渡邊一郎, 永嶋孝一, 古川力

丈, 園田和正, 佐々木直子, 磯一貴, 黒川早矢香, 大久保公恵, 中井俊子, 平山篤志: Spatial Relationship of Continuous Fractionated Atrial Electrogram with Regular Electrogram Interval and Low Voltage Zone in Patients with Atrial Fibrillation, 第80回日本循環器学会総会・学術集会, 仙台, 2016年3月

高橋啓子, 奥村恭男, 渡邊一郎, 永嶋孝一, 古川力丈, 園田和正, 佐々木直子, 磯一貴, 黒川早矢香, 大久保公恵, 中井俊子, 平山篤志: Additional Benefit of Cryoballoon-Based Atrial Fibrillation Ablation: Modification of Ganglionated Plexi, 第80回日本循環器学会総会・学術集会, 仙台, 2016年3月

高橋啓子, 奥村恭男, 渡邊一郎, 永嶋孝一, 古川力丈, 園田和正, 佐々木直子, 磯一貴, 黒川早矢香, 大久保公恵, 中井俊子, 平山篤志: Cryoballoon Temperature Monitoring During Pulmonary Vein Isolation as a Surrogate for Acute Procedural Success, 第80回日本循環器学会総会・学術集会, 仙台, 2016年3月

Keiko Takahashi, Yasuo Okumura, Ichiro Watanabe, Koichi Nagashima, Kazumasa Sonoda, Rikitake Kogawa, Naoko Sasaki, Kazuki Iso, Sayaka Kurokawa, Kimie Okubo, Toshiko Nakai, Atsushi Hirayama, Additional Benefit of Cryoballoon-Based Atrial Fibrillation Ablation: Modification of Ganglionated Plexi, *Heart Rhythm* 2016, San Francisco, USA, 2016, May.

Keiko Takahashi, Yasuo Okumura, Ichiro Watanabe, Koichi Nagashima, Kazumasa Sonoda, Rikitake Kogawa, Naoko Sasaki, Kazuki Iso, Sayaka Kurokawa, Kimie Okubo, Toshiko Nakai, Atsushi Hirayama, Cryoballoon Temperature Monitoring During Pulmonary Vein Isolation as a Surrogate for Acute Procedural Success, *Heart Rhythm* 2016, San Francisco, USA, 2016, May.

Keiko Takahashi, Yasuo Okumura, Ichiro Watanabe, Koichi Nagashima, Kazumasa Sonoda, Rikitake Kogawa, Naoko Sasaki, Kazuki Iso, Sayaka Kurokawa, Kimie Okubo, Toshiko Nakai, Atsushi Hirayama,

Dormant Conduction after Second-Generation Cryoballoon Ablation: Comparison with Automated Ablation Lesion Tagging (VisiTag™)-based Contact Force-Sensing Radiofrequency Ablation, Heart Rhythm 2016, San Francisco, USA, 2016, May.

Keiko Takahashi, Yasuo Okumura, Ichiro Watanabe, Koichi Nagashima, Kazumasa Sonoda, Rikitake Kogawa, Naoko Sasaki, Kazuki Iso, Sayaka Kurokawa, Kimie Okubo, Toshiko Nakai, Atsushi Hirayama, Comparison Between Unexcitable Ablation Lesions Around the Pulmonary Vein Orifice Created by Second-generation Cryoballoon Ablation and Contact Force-guided Ablation of Paroxysmal Atrial fibrillation, Heart Rhythm 2016, San Francisco, USA, 2016, May.

高橋啓子, 奥村恭男, 渡邊一郎, 永嶋孝一, 古川力丈, 園田和正, 佐々木直子, 磯一貴, 黒川早矢香, 大久保公恵, 中井俊子, 平山篤志: Impact of Atrial Fibrillation on the Vagal Response by Ganglionated Plexi Stimulation: Comparison Between Patients with and without Atrial Fibrillation, 第31回日本不整脈学会学術大会・第33回日本心電学会学術集合同学術大会, 札幌, 2016年7月

高橋啓子, 奥村恭男, 渡邊一郎, 永嶋孝一, 古川力丈, 園田和正, 佐々木直子, 磯一貴, 黒川早矢香, 大久保公恵, 中井俊子, 平山篤志: Impact of Atrial fibrillation on the Voltage of Bipolar Signals from the Left Atria, 第31回日本不整脈学会学術大会・第33回日本心電学会学術集合同学術大会, 札幌, 2016年7月

高橋啓子, 奥村恭男, 渡邊一郎, 永嶋孝一, 古川力丈, 園田和正, 佐々木直子, 磯一貴, 黒川早矢香, 大久保公恵, 中井俊子, 平山篤志: Comparison of the Radiofrequency ablation and Cryoablation Zone Demarcated by Pre- and Postprocedural Electroanatomic Mapping in Patients with Atrial Fibrillation, 第31回日本不整脈学会学術大会・第33回日本心電学会学術集合同学術大会, 札幌, 2016年7月

真野博明 (水谷博明), 中井俊子, 池谷之利, 古川力丈, 磯一貴, 高橋啓子, 永嶋孝一, 奥村恭男, 大久保公恵, 國本 聡, 渡辺一郎, 平山篤志: 左室ペーシングによるペーシング治療の実用性と安全性に関する検討 第8回 植込みデバイス関連冬季大会, 2016年

高山忠輝: Effect of Lipidmodifying Therapy on Coronary Plaque Characteristics in Japanese Patients with Coronary Artery Disease: A Metaanalysis of Clinical Studies with Intravascular Imaging Modalities. 第80回日本循環器学会学術集会. 仙台, 2016

#### 消化器肝臓内科学分野

石井大雄, 芝田敏克, 森山光彦: PLC/PRF/5細胞株におけるHBV挿入箇所と転座の同定. 第102回日本消化器病学会総会: 東京, 2016.4.

石井大雄, 芝田敏克, 森山光彦: PLC/PRF/5細胞におけるHBV由来遺伝子挿入の解析と遺伝子転座の発見. 第52回日本肝臓学会総会: 千葉, 2016.5.

樋口晃久, 福島暁子, 楡井和重, 松村 寛, 森山光彦: NASH発症ラットにおける肝臓での鉄代謝関連遺伝子の検討. 第27回日本微量元素学会学術集会: 京都, 2016.7.

Teruhisa Higuchi, Akiko Hukushima, Kazashige Nirei, Hiroshi Matsumura, Mitsuhiko Moriyama: The detection of iron metabolism related gene with the liver by NASH model rat. 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses: Kyoto, Japan, 2016.10.

Tomohiro Kaneko, Shouichi Sasaki, Tomotaka Ishii, Katsutoshi Shibata, Mitsuhiko Moriyama: Examination as the hepatocytes carcinogenesis model of the PLC/PRF/5 cell strain. 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses: Kyoto, Japan, 2016.10.

Tomohiro Kaneko, Tomotaka Ishii, Shoichi Sasaki, Toshikatsu Shibata, Akinori Tamura, Kazushige Ni-

rei, Shunichi Matsuoka, Mitsuhiko Moriyama : Analysis of HBV DNA integration in hepatocellular carcinoma. Asian Pacific Digestive Week 2016 : Kobe, Japan, 2016.11.

Shoichi Sasaki, Kazushige Nirei, Shuniti Matsuoka, Hitomi Nakamura, Mitsuhiko Moriyama : Incidence of hepatocellular carcinoma reduced by phlebotomy treatment in patients with chronic hepatitis C. Asian Pacific Digestive Week 2016 : Kobe, Japan, 2016.11.

Shoichi Sasaki, Akihisa Higuchi, Hiroshi Matsumura, Yasuo Arakawa, Kazushige Nirei, Masahiro Ogawa, Takuji Gotoda, Shunichi Matsuoka, Hiroshi Murayama, Mitsuhiko Moriyama : The clinical significance of serum Ornithine Carbamoyltransferase concentration in patients with chronic hepatitis C and liver cirrhosis. Asian Pacific Digestive Week 2016 : Kobe, Japan, 2016.11.

Yasuo Arakawa, Akiko Fukushima, Mitsuhiko Moriyama : Reduction of dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis by the novel gene regulator PI polyamide targeting transforming growth factor 1 gene. Asian Pacific Digestive Week 2016 : Kobe, Japan, 2016.11.

石井大雄, 芝田敏克, 森山光彦 : PLC/PRF/5細胞株における肝細胞発癌モデルとしての検討 (パネルディスカッション3 : B型肝炎 根治を目指して). 第41回日本肝臓学会東部会 : 東京, 2016.12.

#### 腎臓高血圧内分泌内科学分野

丸山高史, 福田昇, 松本太太郎, 東龍英, 深澤みゆき, 遠藤守人, 岡田一義, 河内裕, 阿部雅紀 : 免疫性腎炎に対する脱分化成熟脂肪細胞 (DFAT) 移植による改善効果. 第16回日本再生医療学会総会. 2016年3月16日.

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TSG-6を介した腎症改善効果. 第59回日本腎臓学会. 2016年6月18日.

丸山高史, 福田昇, 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TSG-6を介した免疫性腎炎の改善. 第39回 日本高血圧学会総会. 2016年9月30日.

#### 糖尿病代謝内科学分野

Yamaguchi S, Ishihara H. Establishment of efficient gene transfer system based on RMCE method in MIN6 cells and new findings of novel genes involved in insulin secretion. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016年5月

#### 乳腺内分泌外科学分野

安達慶太, 鈴木周平, 長島沙樹, 櫻井健一 : 炎症性腸疾患モデルにおけるIndoleamine 2,3-dioxygenase代謝関連蛋白の免疫抑制効果について. ポスター, 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 10/7(金), 2016.

#### 心臓血管外科学分野

有本宗仁, 中田金一, 折目由紀彦, 瀬在明, 大幸俊司, 河野通成, 林祐樹, 田中正史, 谷口由樹, 山海嘉之 : 無拍動型左心補助人工心臓が流体力学的に冠循環に及ぼす影響に関する実験的検討. 第69回日本胸部外科学会定期学術集会. 岡山, 2016

#### 形成外科学分野

樫村勉, 副島一孝, 仲沢弘明, 同種脱分化脂肪細胞によるラット背部皮弁の血流改善効果に関する検討, 第8回日本創傷外科学会総会・学術集会, 2016年

樫村勉, 副島一孝, 仲沢弘明 : 同種脱分化脂肪細胞 (DFAT) によるラット背部皮弁の生着域拡大効果に関する検討, 第25回日本形成外科学会基礎学術集会, 2016年

#### 神経外科学分野

熊川貴大, 高峰祐介, 根岸弘, 小林真人, 古川雄都, 四條克倫, 茂呂修啓, 前田 剛, 吉野篤緒 : ラット脳挫傷モデルにおけるP2受容体拮抗薬MRS2179の効果 日本脳神経外科学会 第75回学術総会 2016年9月30日

Kumagawa Takahiro, Shijo Katsunori, Moro Nobuhiro, Fukushima Masamichi, Maeda Takeshi, Yoshino Atsuo. Effects of P2 receptor blocker MRS2179 against experimental cerebral contusion injury in rat. *Neuroscience* 2016. 2016.11.14

#### 整形外科学分野

沼口俊平, 遠藤美智子, 海老原貴之, 相馬大鋭, 吉田明生, 江角眞理子, 徳橋泰明: 受動喫煙がラット椎間板, 肺および肝臓の時計遺伝子に与える影響について. 第45回日本脊椎脊髄病学会学術集会, 千葉幕張, 2016.4.14

中山渕志, 松本太郎, 加野浩一郎, 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 (De-differentiated fat cell: DFAT) 移植の治療効果. 第45回日本脊椎脊髄病学会学術集会, 千葉幕張, 2016.4.15

宮方啓行, 松本太郎, 徳橋泰明: 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45回日本脊椎脊髄病学会学術集会, 千葉幕張, 2016.4.15

富塚孔明, 風間智彦, 山口太平, 豊泉泰洋, 長尾聡哉, 長岡正宏, 徳橋泰明, 松本太郎: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) に由来するエクソゾームの解析と椎間板髄核細胞に対する作用. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 福岡, 2016.10.14

小山公行, 宮方啓之, 上井浩, 風間智彦, 松本太郎, 徳橋泰明: 受動喫煙ラットにおける椎間板変性への脱分化脂肪細胞 (DFAT) 静脈内投与の治療効果. 第15回日本再生医療学会総会. 大阪, 2016

#### 産婦人科学分野

松野孝幸, 岡山吉道, 山本樹生: ヒト脱落膜マスト細胞の分離と特徴. 第68回日本産科婦人科学会学術講演会. 2016

松野孝幸, 岡山吉道, 東裕福, 村瀬隆之, 千島史尚, 川名敬, 山本樹生: ヒト脱落膜マスト細胞の分布と培養マスト細胞の樹立. 第31回日本生殖免疫学会

総会・学術集会. 2016

#### 眼科学分野

崎元 暢: 角膜実質炎症の発症機序と抑制. 第120回日本眼科学会総会 シンポジウム: 角膜再生医療における実質の重要性. 仙台. 4.7.2016.

#### 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野

Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Tomomi Ishikawa, Yuusuke Fuziwara, Eri Yamamoto, Shinichiro Kokubun, Chiaki Hidai. An EGF motif of del1 suppresses notch function and inhibits efficient angiogenesis in vivo. 5<sup>th</sup> International conference and Exhibition on Pathology. 2016

#### 微生物学分野

相澤 (小峯) 志保子, 本多三男, 松尾和浩, 早川 智: MHC Class I presentation by highly functional epitope peptides of *M. tuberculosis* shared among the antigen 85 complex. 第86回実験結核研究会総会, 2016

相澤 (小峯) 志保子, 本多三男, 松尾和浩, 早川 智: 抗結核CD8T細胞エピトープ分子の特性と組換えワクチン開発の試み. 第39回日本分子生物学会年会, 2016

相澤 (小峯) 志保子, 本多三男, 松尾和浩, 早川 智, MHC Class I presentation by highly functional epitope peptide of *M. tuberculosis* shared among mycobacterial antigen 85 complex. 第45回日本免疫学会学術集会, 2016

#### 生体構造医学分野

Matsukawa, M., Imada, M., Aizawa, S. and Sato, T. Predatory odor induced stress responses can be allayed by habitat odor. 17<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Taste, 2016

壺井 功, 原田智紀, 平林容子, 菅野 純, 相澤 信: LPS頻回投与による造血系の加齢様変化におけるストローマ細胞機能低下についての検討. 第39回日本基礎老化学会, 2016



細胞再生・移植医学分野

福田 昇, 根岸英理子, 片川まゆみ, 上野高浩, 松本太郎: 補体C3は間葉系細胞脱分化および上皮間葉化現象(EMT)により心血管腎リモデリングを起す. 第15回日本再生医療学会, 大阪, 2016.3.

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: 腎障害モデルに対するDFAT細胞移植の効果とTSG-6を介したその機序の考察. 第15回日本再生医療学会, 大阪, 2016.3.

森内正理, 井上貴史, 福田 昇, 上野高浩, 阿部雅紀, 岡田一義, 相馬正義: マーモセットにおける進行性腎障害の確立と新規バイオ医薬ヒトTGF-β1に対するPIポリアミドの創薬開発. 第5回臨床高血圧フォーラム, 東京, 2016.5.

田中 翔, 中村吉宏, 小林洋輝, 畑中善成, 羽毛田公, 上野高浩, 福田 昇, 相馬正義: 副腎髄質に発現するK-Cl共役輸送体と血圧制御の関連. 第5回臨床高血圧フォーラム, 東京, 2016.5.

根岸英理子, 福田 昇, 上野高浩, 阿部雅紀, 岡田一義, 相馬正義: 補体C3は腎尿細管上皮間葉化による組織RA系の活性化からSHRの高血圧発症因子である. 第59回日本腎臓学会総会, 横浜, 2016.6.

森内正理, 井上貴史, 福田 昇, 上野高浩, 阿部雅紀, 岡田一義, 相馬正義: 進行性腎障害に対する新規バイオ医薬ヒトTGF-β1に対するPIポリアミドのマーモセットでの創薬開発. 第59回日本腎臓学会総会, 横浜, 2016.6.

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TSG-6を介した腎症改善効果. 第59回日本腎臓学会総会, 横浜, 2016.6.

Noboru Fukuda. Role of complement 3 in development of hypertension (Symposium). 17<sup>th</sup> International SHR Symposium. Tokyo, 2016. 9.

Eriko Negishi, Noboru Fukuda, Takahiro Ueno, Morito Endo, Kazutoshi Komatsu, Mayumi Katakawa, Akiko Tsunemi, Masanori Abe, Masayoshi Soma. Complement 3 induces the salt-sensitive hypertension by induction of dedifferentiation of mesenchymal tissues with activation of renal RA system in SHR. 17<sup>th</sup> International SHR Symposium. Tokyo, 2016. 9.

Masari Moriuchi, Noboru Fukuda, Takashi Inoue, Shigeki Nakai, Masanori Abe, Masayoshi Soma. Drug discovery of a novel gene silencer pyrrole-imidazole polyamide targeting human TGF-β1 for progressive renal dysfunction. 17<sup>th</sup> International SHR Symposium. Tokyo, 2016. 9.

Tomoyasu Otsuki, Noboru Fukuda, Eriko Negishi, Masari Moriuchi, Masanori Abe, Masayoshi Soma. Role of TWIST-1 on the increased expression of complement 3 in mesenchymal tissues from SHR. 17<sup>th</sup> International SHR Symposium. Tokyo, 2016. 9.

Shu Horikoshi, Noboru Fukuda, Eriko Negishi, Masari Moriuchi, Tomoyasu Otsuki, Takahiro Ueno, Masanori Abe, Masayoshi Soma. Contribution of TGF-β1 and effects of novel gene silencer PI polyamides to TGF-β1 in diabetic nephropathy. 17<sup>th</sup> International SHR Symposium. Tokyo, 2016. 9.

Takashi Maruyama, Noboru Fukuda, Takahiro Ueno, Taro Matsumoto, Masanori Abe, Masayoshi Soma. Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated immuno-induced glomerulonephritis with stimulation of TSG-6. 17<sup>th</sup> International SHR Symposium. Tokyo, 2016. 9.

Lan Chen, Noboru Fukuda, Eriko Negishi, Mayumi Katakawa, Akiko Tsunemi, Masanori Abe, Masayoshi Soma. The role of C3 in renin expression during the process of mesenchymal stem cell differentiating into vascular smooth muscle cell. 17<sup>th</sup> International SHR Symposium. Tokyo, 2016. 9.

福田 昇, 家森幸男: 高血圧性臓器障害への抗酸化薬剤および抗酸化食品による保存的再生医療の確立 (シンポジウム「高血圧性臓器障害と再生医療」). 第39回 日本高血圧学会総会, 仙台, 2016. 9. 第39回 日本高血圧学会総会, 仙台, 2016. 9.

田中 翔, 上野高浩, 小林洋輝, 村田悠輔, 畑中善成, 羽毛田公, 福田 昇, 阿部雅紀, 相馬正義. SHR/Izm全ゲノム解析から検討する腸内細菌叢と血圧の関連. (高血圧学会, SHR学会合同シンポジウム)

丸山高史, 福田 昇, 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TSG-6を介した免疫性腎炎の改善. 第39回 日本高血圧学会総会, 仙台, 2016. 9.

根岸英理子, 福田 昇, 上野高浩, 遠藤守人, 岡田一義, 阿部雅紀, 相馬正義: 補体C3はSHRで腎尿細管上皮間葉化 (EMT) により腎内RA系を活性化し塩分感受性高血圧を起こしている. 第39回 日本高血圧学会総会, 仙台, 2016. 9.

堀越 周, 福田 昇, 根岸英理子, 森内正理, 大月伯恭, 上野高浩, 阿部雅紀, 相馬正義: 糖尿病腎症におけるTGF- $\beta$ 1の関与と新規遺伝子制御薬PIポリアミドの効果の検討. 第39回 日本高血圧学会総会, 仙台, 2016. 9.

田中 翔, 上野高浩, 村田悠輔, 福田 昇, 阿部雅紀, 相馬正義: 高血圧自然発症ラットにおける異常な生体内時計とグルココルチコイド再活性系の亢進. 第39回 日本高血圧学会総会, 仙台, 2016. 9.

森内正理, 福田 昇, 井上貴史, 阿部雅紀, 岡田一義, 相馬正義: 進行性腎障害に対する新規バイオ医薬ヒトTGF- $\beta$ 1に対するPIポリアミドのマーモセットでの創薬開発. 第39回 日本高血圧学会総会, 仙台, 2016. 9.

大月伯恭, 福田 昇, 根岸英理子, 森内正理, 阿部雅紀, 相馬正義: 高血圧自然発症ラット由来間葉組

織に於ける補体C3高発現へのTWIST-1の関与. 第39回 日本高血圧学会総会, 仙台, 2016. 9.

根岸英理子, 福田 昇, 上野高浩, 遠藤守人, 阿部雅紀: 高血圧自然発症ラット (SHR) での塩分感受性高血圧への補体C3の関与. 第20回心血管内分泌代謝学会総会, 東京, 2016. 12.

#### 生化学分野

石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 池田和正, 槇島誠: 脂肪細胞の脱分化過程におけるビタミンD受容体の機能解析と今後の展望 日本大学学長特別研究「成熟脂肪細胞脱分化による組織再生メカニズムの解明と脱分化培養技術を用いた細胞治療開発」平成27年度研究成果報告会 2016年

石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 槇島誠: 脂肪脱分化過程におけるビタミンDの役割 第2回 Neo VitaminD Workshop 学術集会 2016年

石澤通康: 脂肪細胞の分化, 脱分化におけるビタミンD受容体の役割 日本レチノイド研究会 第27回学術集会 2016年

石澤通康, 槇島誠: 食事性肥満における胆汁酸組成変動とビタミンD受容体の関与 第38回胆汁酸研究会 2016年

石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 池田和正, 槇島誠: 脂肪細胞の脱分化過程におけるビタミンD受容体の機能解析と今後の展望 日本大学学長特別研究「成熟脂肪細胞脱分化による組織再生メカニズムの解明と脱分化培養技術を用いた細胞治療開発」平成27年度研究成果報告会 2016年

石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 槇島誠: 脂肪脱分化過程におけるビタミンDの役割 第2回 Neo VitaminD Workshop 学術集会 2016年

梅田 (遠藤) 香織, 中島弘幸, 関 修司, 槇島誠: 核内受容体LXR $\alpha$ の肝免疫細胞における脂質代謝及び炎症調節メカニズムの解明. 第2回Neo Vitamin D Workshop学術集会 2016年

高田伊知郎：「新規転写共役因子 DGCR14 ノックアウトマウスの解析」 第2回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会 2016年

石澤通康：脂肪細胞の分化，脱分化におけるビタミンD受容体の役割 日本レチノイド研究会 第27回学術集会 2016年

石澤 通康，榎島 誠：食事性肥満における胆汁酸組成変動とビタミンD受容体の関与 第38回 胆汁酸研究会 2016年

梅田直，梅田（遠藤）香織，中島弘幸，関 修司，榎島 誠：Con-A誘導性急性肝炎モデルマウスにおけるビタミンD受容体による肝免疫調節作用．第39回日本分子生物学会年会 2016年

高田伊知郎：「新規核タンパク質 DGCR14 の免疫系，骨代謝における機能解析」平成28年度日本大学学部連携ポスターセッション 2016年

Hisataka Kitano, Atsushi Mamiya, Tomomi Ishikawa, Yuusuke Fuziwara, Eri Yamamoto, Shinichiro Kokubun, Chiaki Hidai. An EGF motif of del1 suppresses notch function and inhibits efficient angiogenesis in vivo. 5<sup>th</sup> International conference and Exhibition on Pathology. 2016

#### IR・医学教育センター

布村聡，羅智靖，照井正，岡山吉道：FceRを介したマスト細胞活性化におけるFcR $\gamma$ 鎖S-S結合の役割 アレルギー・好酸球研究会2016，東京，2016.10.22

#### 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，内田 圭，大林茂男，佐藤央爾，金子 岳，石井敬基：ブタ・イヌ用多機能型体重測定ユニット．日本実験動物技術者協会第50回総会．川越，2016.

#### 著書

##### 神経外科学分野

熊川貴大：ラット脳挫傷モデルにおけるP2Y1受容体拮抗薬MRS2179の効果 修了年 2017年

#### 生体構造医学分野

佐藤孝明，松川 睦，古殿雄一，廣野順三，江村 誠：嗅覚を介するストレス緩和神経路と嗅覚代替センサの基盤技術．外池光雄（編著），香りと五感－香りで五感の機能と有用性を増進する－．フレグランスジャーナル社，2016 分担執筆

#### 特許

##### 総合内科・総合診療医学分野

名称：新規PIポリアミド，発明者：大日方 大亮，高橋 悟，藤原恭子，井上 聡，高山 賢一，出願人（特許権者）学校法人日本大学，国内特許登録番号：特許第6044935号，登録日：平成28年11月25日，国外出願：PCT/JP2014/056251，出願日：平成25年3月11日，出願国：ヨーロッパ，アメリカ

名称：新規PIポリアミド，発明者：大日方 大亮，高橋 悟，福田昇，藤原恭子，出願人（特許権者）学校法人日本大学，国内特許登録番号：特許第6044923号，登録日：平成28年11月25日

#### 微生物学分野

ペプチド及びその使用 特願2016-103744

#### NUBIC技術移転

##### 総合医学研究所 医学研究支援部門

藤田順一，高山世絵梨，石井敬基：中型動物用体重測定ユニット．日本大学産官学連携知財センター（NUBIC）2016,6.

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 槇島 誠  
委員 石井敬基, 内山 真, 大野修平, 岡田 努, 黒田和道,  
嶋村政男, 深谷 親, 間崎武郎  
幹事 井上広一, 烏山芳織, 工藤志保, 竹田亮介, 藤田順一

(50音順)

Editorial Board

Editor-in-Chief Makoto MAKISHIMA  
Associate Editors Yukimoto ISHII, Makoto UCHIYAMA, Shuhei OHNO,  
Tsutomu OKADA, Kazumichi KURODA, Masao SHIMAMURA,  
Chikashi FUKAYA, Takero MAZAKI,  
Managing Editors Koichi INOUE, Yoshiori UYAMA, Shiho KUDOH,  
Ryosuke TAKEDA, Jun-ichi FUJITA

---

発行者 日本大学医学部総合医学研究所長 槇島 誠  
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 Makoto MAKISHIMA  
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

---