

# 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.6 / December 2018

日本大学医学部総合医学研究所

Research Institute of Medical Science, Nihon University School of Medicine

## 日本大学医学部総合医学研究所紀要の発行にあたって

2018年度の「日本大学医学部総合医学研究所紀要」をお届けいたします。この紀要は、医学に関する学理・技術の総合的研究を行うことを目的としている日本大学医学部総合医学研究所に係る研究活動の成果を外部に情報発信して、社会の要請に応じることを目指しています。この紀要に掲載されている内容は、日本大学全体における研究活動の一部として医学部総合医学研究所で実施されたものです。代表的なプロジェクト研究の成果及び医学研究支援部門による報告が掲載されており、日本大学医学部で実施されている研究活動の内容を多くの皆様に知っていただければ幸いです。

現在、この紀要は、年に1回程度、ホームページ上で公開する形態となっています。原稿については、執筆者の意思を尊重し、原則として査読を行わず、編集委員による体裁確認のみでの掲載としています。お忙しい中、執筆いただいたご関係の皆様には、この場をお借りして御礼申し上げます。

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

日本大学医学部総合医学研究所長 槇島 誠

## 目 次

LDL 受容体 KO ブタにおける冠動脈不安定プラークのインターベンション後の治療戦略作成 .....	平山 篤志 他	1
乳癌と周囲脂肪組織の相互作用 .....	小沼 憲祥 他	12
がんゲノミクスによる腫瘍抗原と T 細胞受容体解析から腫瘍免疫をイメージする .....	糸井 充穂 他	15
大動脈瘤・大動脈解離の病理・病態解明に関する研究 .....	本間 琢 他	18
乳腺小葉癌における <i>CDH-1</i> 遺伝子異常の検討 ーデジタル PCR 法および <i>CDH-1</i> DNA シーケンシング法 .....	唐 小燕 他	21
喘息病態における気道上皮前駆細胞の役割 .....	丸岡秀一郎 他	24
心臓手術後の心房細動発生に影響を与える因子についての臨床研究 .....	瀬在 明 他	27
分子診断技術による貝および下水からの下痢症ウイルスの検出の研究 .....	Leera Kittigul 他	29
ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果 .....	松本 太郎 他	32
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	35
日本大学における動物実験委員会の概要について .....	谷口 由樹 他	41
医学研究支援部門生物化学系に設置されたリアルタイム PCR システムとマイクロプレートリーダーについて .....	渡部 和浩 他	48
電子顕微鏡室の業務紹介 .....	地家 豊治 他	51
医学研究支援部門の利用に関する成果・業績等一覧.....		56

## INDEX

The analysis of vascular response to the various type of stents on the vulnerable plaque of LDL-cholesterol receptor knock out pigs .....	Atsushi HIRAYAMA et. al	1
Interaction between breast cancer and adipose tissue .....	Noriyoshi KONUMA et. al	12
Imaging of tumor immunology based on genomics-derived tumor neoantigen and tumor-associated antigen TCR repertoire .....	Miho ITOI et. al	15
Histopathological examination for the pathogenesis of aortic aneurysm and dissection .....	Taku HOMMA et. al	18
Examination of the <i>CDH-1</i> gene in lobular carcinoma of breast- A comparative study between digital PCR and DNA sequencing .....	Xiaoyan TANG et. al	21
The role of bronchial epithelial progenitor cell in the pathogenesis of asthma .....	Shuichiro MARUOKA et. al	24
Clinical research for related factors in atrial fibrillation after cardiac surgery .....	Akira SEZAI et. al	27
Detection of diarrheal viruses in shellfish and sewage samples by molecular diagnostic techniques .....	Leera KITTIGUL et. al	29
Effect of dedifferentiated fat cell transplantation in a rat intervertebral disc degeneration model .....	Taro MATSUMOTO et. al	32
Development of new therapeutic strategy and investigation of the pathogenesis of severe immunological and allergic diseases .....	Yoshimichi OKAYAMA et. al	35
Outline of the animal care and use committee at Nihon University .....	Yoshiki TANIGUCHI et. al	41
Two newly introduced instruments to the Division of Biochemistry in the Medical Research Supportive Branch — Real-time PCR system and microplate reader — .....	Kazuhiro WATANABE et. al	48
Information about electron microscope laboratory .....	Toyoharu JIKE et. al	51
Lists of publication and results from Utilization in Medical Research Center		56

# LDL受容体KOブタにおける冠動脈不安定プラークの インターベンション後の治療戦略作成

平山篤志<sup>1)\*</sup>, 李 予昕<sup>1)</sup>, 大西 彰<sup>2)</sup>, 三角浩司<sup>2)</sup>, 梶川 博<sup>2)</sup>,  
大滝忠利<sup>2)</sup>, 浅野早苗<sup>2)</sup>, 春田裕典<sup>1)</sup>, 高山忠輝<sup>1)</sup>, 羽尾裕之<sup>1)</sup>

## The analysis of vascular response to the various type of stents on the vulnerable plaque of LDL-cholesterol receptor knock out pigs

Atsushi HIRAYAMA<sup>1)</sup>, Yuxin LI<sup>1)</sup>, Akira ONISHI<sup>2)</sup>, Koji MISUMI<sup>2)</sup>,  
Hiroshi KAJIKAWA<sup>2)</sup>, Tadatoshi OHTAKI<sup>2)</sup>, Sanae ASANO<sup>2)</sup>,  
Hironori HARUTA<sup>1)</sup>, Tadateru TAKAYAMA<sup>1)</sup>, Hiroyuki HAO<sup>1)</sup>

### 要旨

急性心筋梗塞等の虚血性心疾患の治療法として、冠動脈内腔を薬剤溶出性ステント (Drug-Eluting Stent: DES) で拡げる冠動脈インターベンションが標準的な治療法として行われている。しかしながら、慢性期のステント内新規動脈硬化による遅発性ステント血栓症と晩期再狭窄などの合併症が問題となった。このようなDESの重大な副作用があらかじめ見えなかった背景には、動物での適切なモデルがなかったことにある。

我々は低密度リポタンパク (Low density Lipoprotein: LDL) 受容体遺伝子をノックアウト (KO) したLDLR-/-ブタを作製した。LDLR-/-ブタへの高脂肪食負荷により、ヒトと極めて高い類似性を持つ冠動脈不安定プラークが形成された。本研究は不安定プラークを持つLDLR-/-ミニブタを用いて、不安定プラーク病変部位にDESおよび生体吸収性スキャホールドを留置後、留置部位における長期間の経時的血管反応を観察し、冠動脈インターベンションの最善の治療戦略を検討した。

### 1. はじめに

狭心症や急性心筋梗塞などの虚血性心疾患の治療法として、狭窄あるいは閉塞部の冠動脈内腔を経皮的にバルーン拡張する冠動脈形成術 (Plain Old Balloon Angioplasty: POBA) が1979年に初めてGruentzigにより開始され、瞬く間に広く行われるようになった<sup>1)</sup>。しかし、初期にはバルーン拡張後に急性冠閉塞が高頻度に起こることがわかり、これに対しては、抗血小板薬であるアスピリンの投与により改善がなされた。また、POBA施行後の3-6ヶ月に40-50%の頻度で再狭窄が起きることが明らかにされた<sup>2)</sup>。血管内超音波 (Intravascular Ultrasound: IVUS) によって再狭窄の機序が、①血管内膜の増殖と②バルーンの拡張による血管径の収縮 (Negative Remodeling) が原因であることが明らかにされ

た<sup>3)</sup>。後者の血管径が収縮する機序に対して最も有用な治療法は、ステント留置であり、これによって再狭窄率は激減した<sup>4,6)</sup>。しかし、ステント留置後にも急性血栓閉塞がおこることが明らかになり<sup>7)</sup>、これに対しては、アスピリンとチエノピリジン系の抗血小板薬の2剤併用療法 (Dual Anti-Platelet Therapy) により改善がなされた<sup>8-10)</sup>。しかし、3-6ヶ月後には約20%の患者で再狭窄が起こり、内膜増殖による再狭窄は克服されなかった<sup>5), 6), 11), 12)</sup>。この内膜増殖機序に対して、細胞増殖を抑制する薬剤であるシロリムスやタキソールなどの薬剤を塗布したDESが開発され、初期成績においては、再狭窄は克服されたかに見えた<sup>13-19)</sup>。しかし、2006年、このDESにおいて抗血小板薬の中止に伴う遅発性血栓症が起こることが報告された。BASKET試験の結

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

平山篤志: hirayama.atsushi@nihon-u.ac.jp

果、DESは再狭窄を減少させたが、遅発性血栓症が生じ、これまでの通常のステント（Bare Metal Stent: BMS）と比較して予後改善には至らないことが示され<sup>20)</sup>、DESに対する反省の機運が起こった。遅発性血栓症の原因は、薬剤により平滑筋増殖は抑制されるものの、内皮化が遅延するために血栓源性が常に病変にあること、さらに薬剤を保持するために用いられたポリマーが炎症を惹起することが挙げられた<sup>21-25)</sup>。このようなDESの重大な副作用が予測できなかった背景には、動物での適切なモデルがなかったことにある。これまで、新たに作製されたステントの評価には正常なブタ冠動脈が用いられていた。これは、ブタ冠動脈が形状と性質からヒト冠動脈とほぼ同一と考えられたからである<sup>26)</sup>。しかし、ブタの正常冠動脈にステントを留置して得られた結果と、ヒトの動脈硬化巣での結果が全く異なっていたことが、初期のBMSやDESでの血栓閉塞、さらにはDESの遅発性血栓症が予測できなかった理由であった<sup>27)</sup>。そこで、新たなステントの評価には、動脈硬化巣が生じたブタ冠動脈での留置が必要と考えられる。

我々は、遺伝子組換え技術と体細胞クローン技術との併用により、LDL受容体ノックアウト（LDLR<sup>-/-</sup>）ブタを作出し、4ヶ月間の高脂肪食負荷により、ヒトと極めて高い類似性を持つ冠動脈不安定プラーク

が形成されることを報告した<sup>28)</sup>。同時にスタチンを投与することで、プラークの不安定化が抑制されることを示した。しかし、このブタは、一般の家畜ブタを起源とするため、カテーテル検査が不能な体重に早期に達する問題があった。そのため、ミニブタ系統との交配により、長期間飼育しても体格の変動が小さいLDLR<sup>-/-</sup>ミニブタを作製した。この品種改良によって、動脈硬化巣におけるステント留置部の変化を長期的に観察することが可能となった。

本研究は不安定プラークを持つLDLR<sup>-/-</sup>ミニブタを用いて、不安定プラーク病変部位に最新の第3世代DESおよび最近開発されたBVS<sup>29)</sup>、<sup>30)</sup>を留置後、留置部位における長期間の経時的血管反応を観察し、冠動脈インターベンションの最善の治療戦略を検討した。

## 2. 対象及び方法

### LDL受容体KOミニブタの作製

家畜ブタより作製したLDLR<sup>-/-</sup>ブタをミニブタ系統（サクラココキ）と交配（人工授精）し、F2-F4世代のLDLR<sup>-/-</sup>ミニブタを作製した。また、LDLR<sup>-/-</sup>ミニブタより採血し、血算、生化学、血中脂質プロファイルを確認した。

遺伝子ノックアウトの確認は、出産直後のLDLR<sup>-/-</sup>ミニブタの耳刻みから組織小片を採取し、PCR解析により行った（図1）。遺伝子検定後、生後1ヶ月

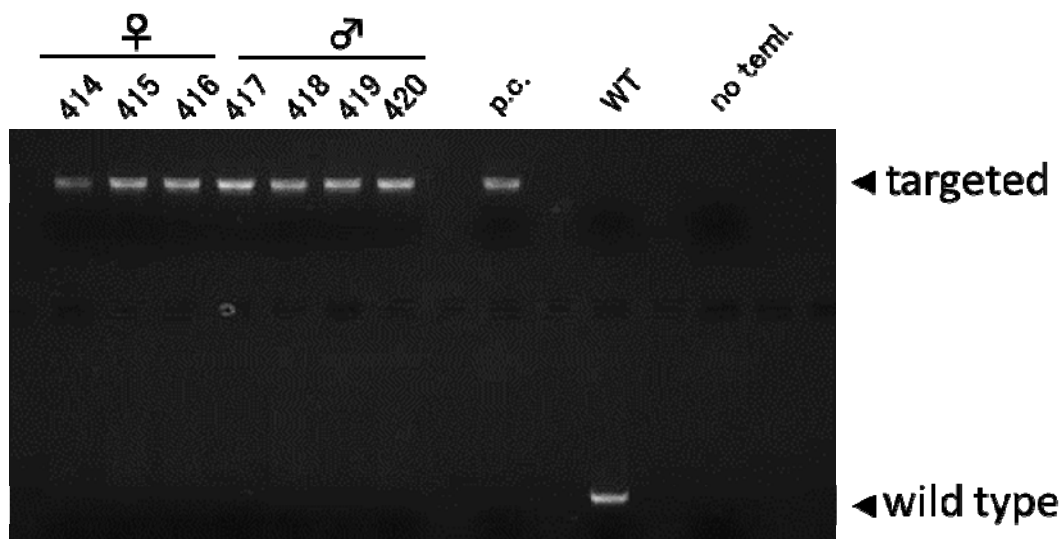


図1 ブタ耳小片から遺伝子解析

ブタ遺伝子解析：ブタの耳小片からDNAを抽出し、PCR法でLDL-C受容体の遺伝子を同定した。Wild Typeに対してLDLR<sup>-/-</sup>のブタで遺伝子変異が確認された。

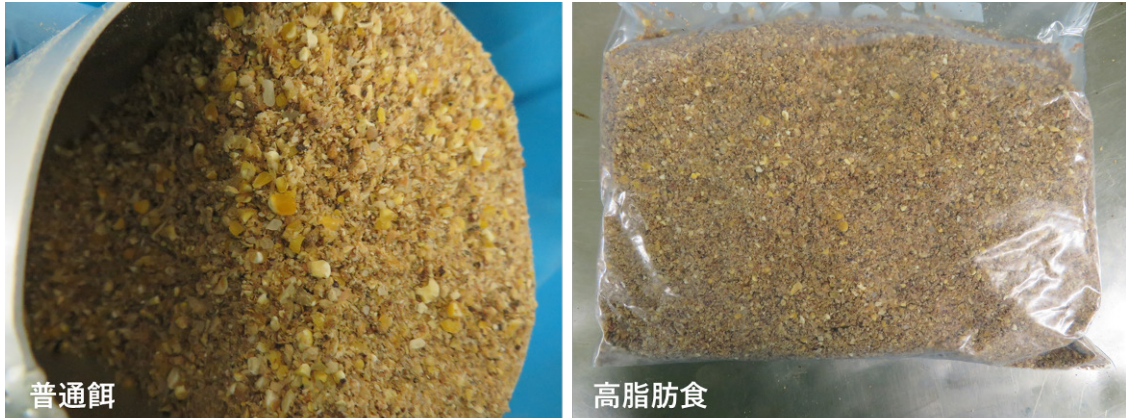


図2 通常食と高脂肪食  
通常の餌と1.5%コレステロールと15%牛脂を加えた高脂肪餌

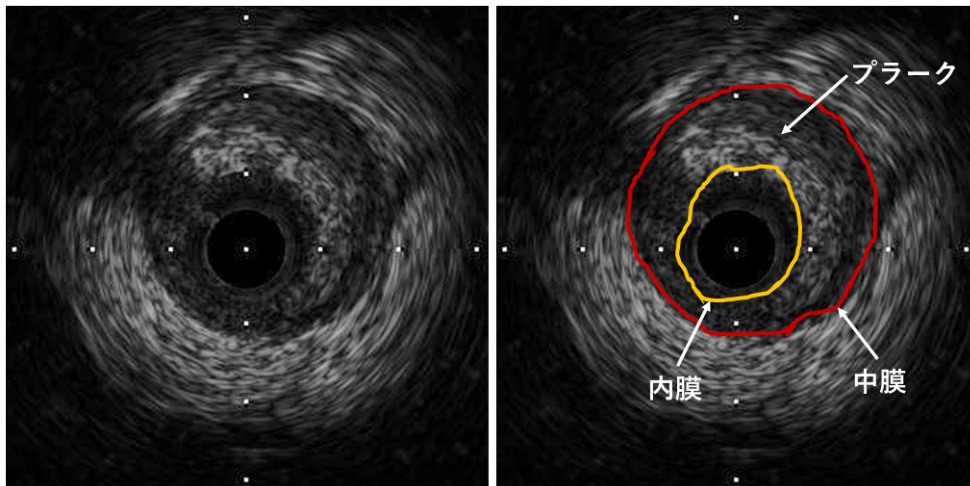


図3 血管内超音波画像 (IVUS)  
血管内超音波による血管径とプラークの解析方法。外弾性板の部分を追跡して血管断面積とし、内腔を追跡して内腔断面積とする。血管断面積から内腔断面積を引き算してプラーク断面積とした。

で離乳し、通常の子豚用エサを給餌した。生後2ヶ月に、養豚場から医学部研究支援部門のブタ飼育室に搬入した。静脈から採血検査を行った後、3ヶ月齢から1.5%コレステロールと15%牛脂を含む高脂肪食を1日1kgの量で4ヶ月間給餌した。当初、高脂肪食にアンジオテンシン、糖質、揚げ物などの添加物を混ぜて、酸化ストレスを促進させる予定だったが、予備実験で高コレステロールと高脂肪だけで、十分に動脈硬化プラークが作成できたので、1.5%コレステロールと15%牛脂を含む高脂肪食にした。また、不安定プラークの作成を加速するため、牛脂は電子レンジで20分加熱してから用いた。さらに、冷蔵庫に1ヶ月間保存することにより高脂肪

食を酸化させた(図2)。冠動脈プラークの評価は、冠動脈造影とIVUSにより行った(図3)。

#### ステント留置術

4ヶ月間の高脂肪食負荷後、LDLR<sup>-/-</sup>ミニブタをケタミン5mg/Kg筋注にて麻酔鎮静を図り、静脈ルートを確保し、カテーテル台に仰臥位に固定した。その後、気管挿管を行い、1回換気量10-15ml/Kg、20回/分にて呼吸管理をし、酸素50%と鎮静・鎮痛作用を有するセボフルラン1~4%を吸入させ全身麻酔とした。十分な鎮静と鎮痛を確認した後、大腿部または頸部のシース挿入部を剃毛・消毒を行い、局所麻酔(1%リドカイン10mlを皮下投与)下で、シースにて動脈穿刺を行い、動脈ラインを確保

表1 DESとBVSの類似点と相違点

	薬剤の塗布	材料	生体吸収性	留置後合併症
DES	あり	金属	血管内に恒久的に残る	内皮機能障害, ステンント内新規動脈硬化, 血栓症, 再狭窄など
BVS	あり	ポリラクチド	時間とともに分解し生体に再吸収される	まだ不明

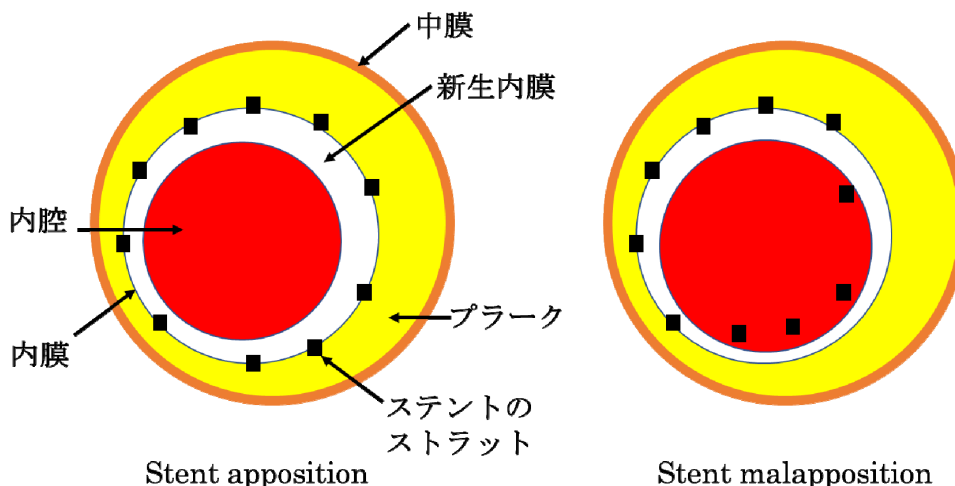


図4 ステンント留置後の観察項目

ステント留置後の観察項目：左：ステントの留置が適切に行われた場合 (Apposition) はステントのストラットを囲んだ部分から血管内腔に形成された部分を新生内膜とした。ステントの圧着が不十分な場合 (Malapposition) はステントのストラットが内膜に密着せず、血管内腔に浮いている状態である。

した。動脈圧ラインと心電図による血行動態監視下で、シースから挿入したカテーテルと血管内イメージングデバイスにより、冠動脈の観察を行った。

プラーク病変の特徴と部位を確認後、IVUSで病変部の血管内径を測定し、留置ステントのサイズを決めた。その後、ランダムにDESとBVSを選択し、同一個体の異なる冠動脈にDESとBVS両方を留置した。DESはアボット社のXIENCE Alpine, BVSはアボット社のAbsorb GT1 生体吸収性スキャフォールドシステムを用いた。両者の相違を表1に示す。

三枝冠動脈に2種類のデバイスを平均配分するように配し、ステント拡張後の外径と病変部血管内径は1.2:1とした。冠動脈カテーテル操作後、デバイス・シースを抜去し手動的に圧迫、止血を確認した後、麻酔より離脱し終了とした。血栓閉塞を予防するために、留置3日前から実験終了まで抗血小板薬としてアスピリン81mg/日とクロピドグレル75mg/日を経口投与した。デバイス留置手術施行中、活性凝固時間>300秒を達成するためにヘパリンも血管内投

与した。感染予防のため、カテーテル操作中に、点滴に抗生剤セファゾリン1gを入れた。ブタの冠動脈ではスパズムが起こりやすいので、造影上スパズムが起こり、また心電図上STが上がる場合には、即ちニトロールを経カテーテルで冠動脈内投与した。

#### ステント留置後の計測方法

ステント留置1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、また12ヶ月後、前述のように麻酔後、冠動脈カテーテルおよび血管内のイメージング観察を行った。冠動脈造影は東芝メディカルシステムズ社のX線アンギオグラフィシステムを用いて撮影し、CDに記録した。IVUSはボストン社のIVUSプローブカテーテルを毎秒0.5mmで機械式プルバックシステムを用いて自動的に引き抜いて撮像し、CDに記録した。光干渉断層 (Optical Coherence Tomography: OCT) は、セント・ジュード・メディカル社のカテーテルを用いて、造影剤で血管内腔をフラッシュしながら、毎秒1mmの速度で引き抜き、画像をハードディスクに



記録した。OCTとIVUSを用いて、ステント内の血栓、血管内膜変化を定性、また定量的に観察した。DESまたはBVS留置の密着性 (stent apposition / stent malapposition), 内腔面積/体積, 血管面積/体積, ステント面積/体積, 新生内膜またステント内新規動脈硬化面積/体積, 新生内膜またステント内新規動脈硬化の成分を評価した (図4)。

### 病理組織解析

冠動脈カテーテルおよび血管内のイメージング観察終了後、深麻酔下において脱血を行い安楽死させた。安楽死後は生理食塩水による灌流を行い、10%ホルマリン液による灌流固定を行い、組織を採取 (心臓, 腎臓, 上行~下行大動脈および頸動脈) し、病理組織学的に検討した。心臓は摘出後、冠動脈を剥離し、ステント留置部位以外の冠動脈を0.5cmずつ切り出し、パラフィン切片で組織病理学的に解析した (図5)。DES留置部位は樹脂包埋で組織病理学

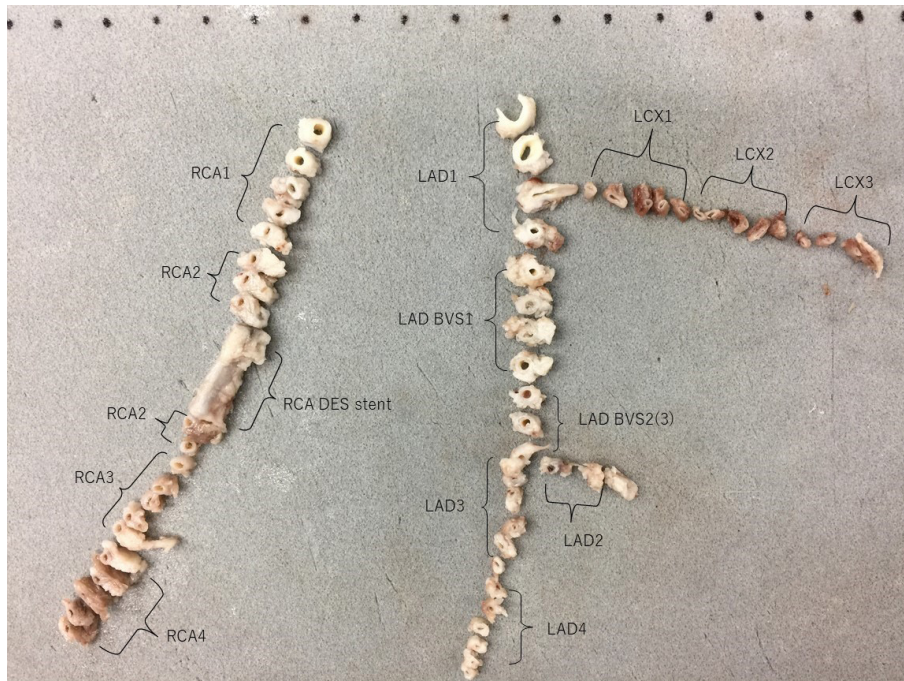


図5 冠動脈の摘出と切り出し  
LDLR-/-ブタの冠動脈の解剖所見：三枝にわたって粥腫が形成されている。

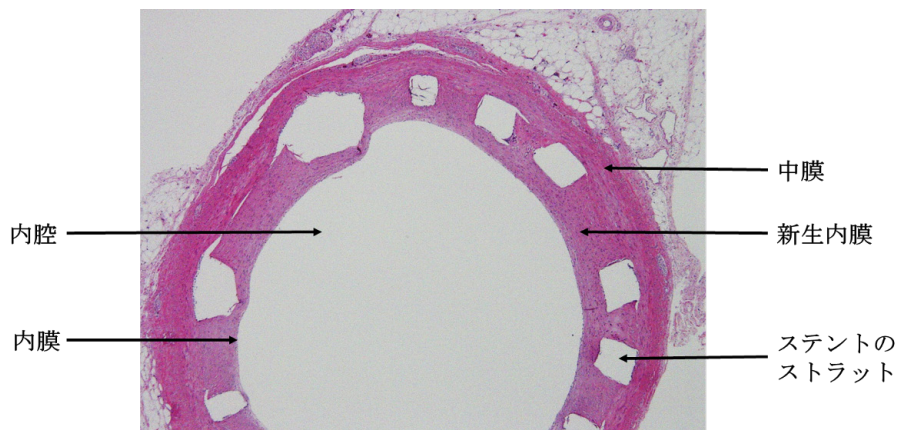


図6 冠動脈組織病理学の評価項目  
ステント留置後の冠動脈の病理組織標本 (HE染色) とその観察項目

的に解析した。BVS留置部位の冠動脈はパラフィン切片で組織病理学的に解析した。

組織病理学の評価項目は以下とした。DESまたはBVS留置の密着性、内腔面積、血管面積、ステント面積、新生内膜またステント内新規動脈硬化面積(図6)、ステント内新規動脈硬化の成分、線維被膜の厚さ、血栓量、血管内皮の損傷、平滑筋細胞の遊走及び増殖、ステント留置部位の栄養血管、DESまたはBVSストラットおよび血管内皮の損傷部位への血栓の付着、ステントストラット周囲のフィブリン蓄積、活性化した炎症細胞の浸潤、石灰化、粥種出血、壊死性脂質コア、細胞外基質の蓄積、各種サイトカイン、また、BVSの場合は吸収サイトの組織変化などの解析を行った。

### 3. 結果

LDL受容体KOミニブタの作製と血中脂質プロフィール

家畜ブタでは、1日1kgの餌で飼育すると、1ヶ月間で体重が15-20kg増加し、生後1年で体重200kgに達するのに対して、LDLR-/-ミニブタでは生後1年で体重100kg以下になり、長期間飼育しても体格の変動が小さいことが明らかになった。LDLR-/-ミニブタはLDLR-/-ブタと同様の血算、生化学、また血中脂質プロフィールを持っていた。通常食の給餌下では、血中トータルコレステロール濃度は

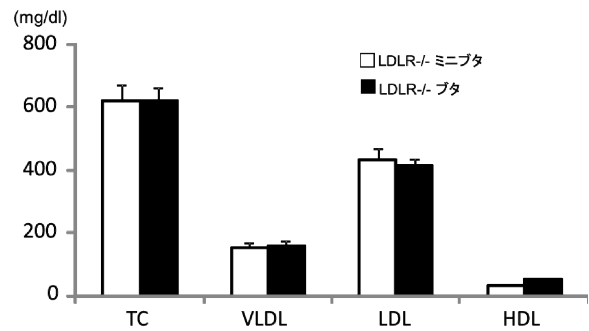


図7 LDLR-/-ブタとLDLR-/-ミニブタの血中脂質プロフィール

図7 LDLR-/-ブタとLDLR-/-ミニブタの血中脂質プロフィール

LDLR-/-ブタとLDLR-/-ミニブタの血中脂質プロフィール：ともに、総コレステロール(TC)とLDLコレステロール(LDL)値が高値である。

620mg/dl, LDLコレステロール濃度は430mg/dl(図7)、15%コレステロールと15%牛脂を含む高脂肪食を1日1kgの量で1ヶ月間食べさせると、血中コレステロール濃度は2倍以上増加した。

#### 冠動脈プラーク形成

3ヶ月齢のLDLR-/-ミニブタに1.5%コレステロールと15%牛脂を含む高脂肪食を1日1kgの量で4ヶ月間食べさせた。4ヶ月後、冠動脈造影の結果、冠動脈に狭窄は見られなかったが、IVUSにより冠動脈プラークの形成が全てのブタで確認できた(図8)。

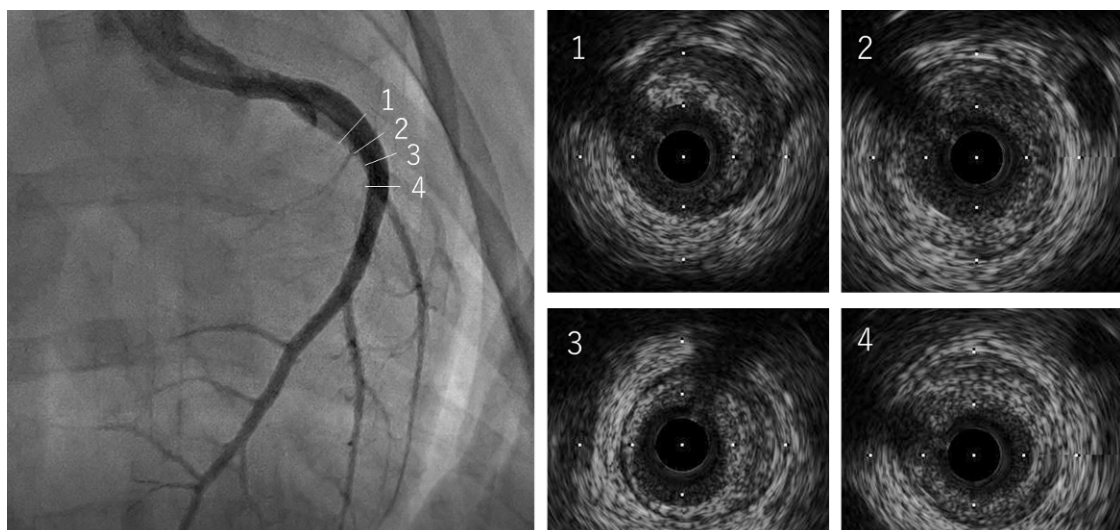


図8 LDLR-/-ミニブタにおける冠動脈造影とIVUSによるプラークの評価

LDLR-/-ミニブタにおける冠動脈造影とIVUSによるプラークの評価：冠動脈左前下枝の1-4の部分には冠動脈造影では狭窄を認めないが、IVUSで有意なプラーク形成を認めている。

冠動脈プラークの確認後、プラーク病変部位にランダムにDESまたはBVSを留置した。ステント拡張後の外径と病変部血管内径は1.2:1とした。ステント留置後、IVUSで拡張後の血管内径とステントと血管壁の密着性などを確認した。DESとBVSともに留置直後、ステントと血管壁は密着し、内腔の表在性血栓は認めなかった(図9)。

#### ステント留置後の血管反応

3ヶ月後、冠動脈造影では、ステント留置部位に軽度狭窄(25-50%)が認められた。IVUSで観察したところ、DESとBVSともにステントの内側に薄い新生内膜が観察されたが、血栓は認められなかった。新生内膜が薄かったため、成分は解析できなかった。深麻酔下において脱血を行い安楽死させ、還流固定後、心臓を摘出した。心臓の表面に虚血部位を認めなかった。冠動脈を摘出後、心臓を基底部から心尖部まで、0.5cm間隔で輪切りし、心筋を観察したところ、心筋梗塞巣を認めなかった(図10)。

冠動脈を摘出後、BVS留置部位の冠動脈をパラフィン切片、DES留置部位の冠動脈を樹脂包埋切片で染色(HE, EVG, MT染色)し、ステント留置後の血管反応を観察した。DESとBVSともに平滑筋細胞を主成分とした新生内膜が形成された。新生内膜の中に炎症性細胞浸潤、ステントのストラット周囲

のフィブリン蓄積、断片化された石灰化、泡沫状マクロファージなどが観察され、DESとBVS両群の間で新生内膜の成分が類似した。DESとBVS両群ともに、ステント内血栓は認められなかった(図11)。

#### 4. 考 察

本研究に使用するLDLR<sup>-/-</sup>ミニブタは商品化されていないので、共同研究施設からの譲渡により使用した。そのため、安定的にブタを入手することが困難であった。また、本研究は、高脂肪食を4ヶ月間給餌し、ステント留置後は3ヶ月から12ヶ月間の経過観察が必要となり、合わせて7ヶ月間から16ヶ月間の長期間飼育を要した。そのため、十分な飼育スペースが必要となるが、動物飼育施設のブタケージ数の制限もあり、現在の進捗状況は以下となる。3ヶ月間観察群の3頭の内2頭の実験が終了した。12ヶ月間観察群は3頭にステントを留置し、3頭とも2018年9月までに実験観察終了予定である。6ヶ月間観察群の3頭の内2頭は2018年5月にステント留置し、2018年12月までに実験観察終了予定である。本論文は研究の経過中の3ヶ月の時点での結果をまとめたものである。

BVSは、留置後2-3年の経過でステントそのものが消失することから、これまでの金属を用いたステントに比較して血管自体の本来の構造が保持される

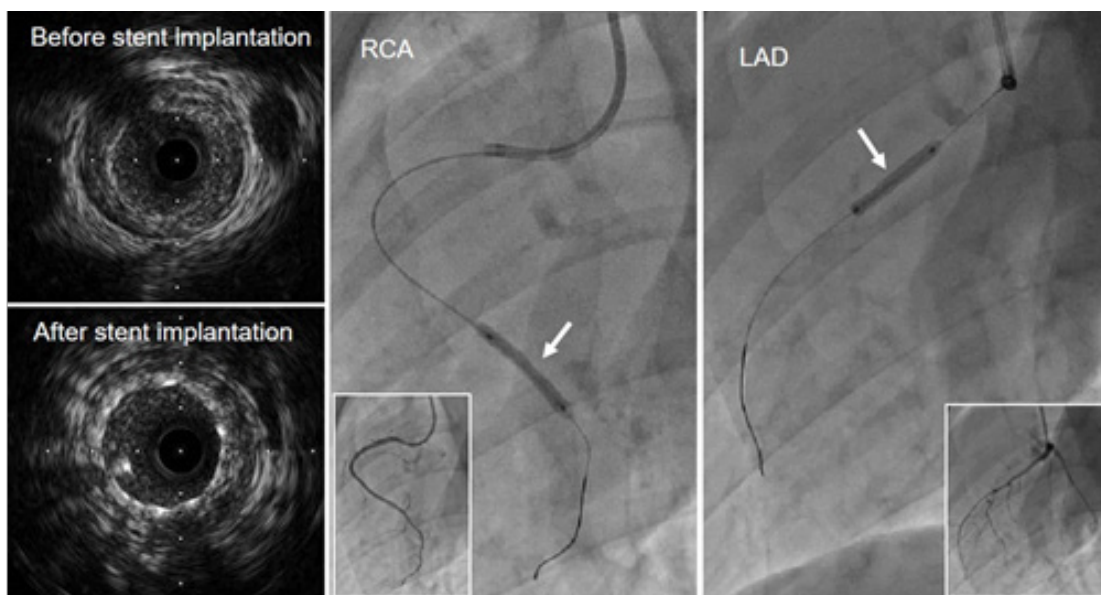


図9 冠動脈へのステント留置

LDLR<sup>-/-</sup>ミニブタにおけるステント留置の手技：右：左前下行枝(LAD)、中央：右冠動脈(RCA)にステントを留置している。左上はステント留置前の冠動脈のIVUS像、左下はステント留置後のIVUS像である。



図10 心臓と冠動脈摘出  
ステント留置3ヶ月後の摘出した冠動脈と心臓

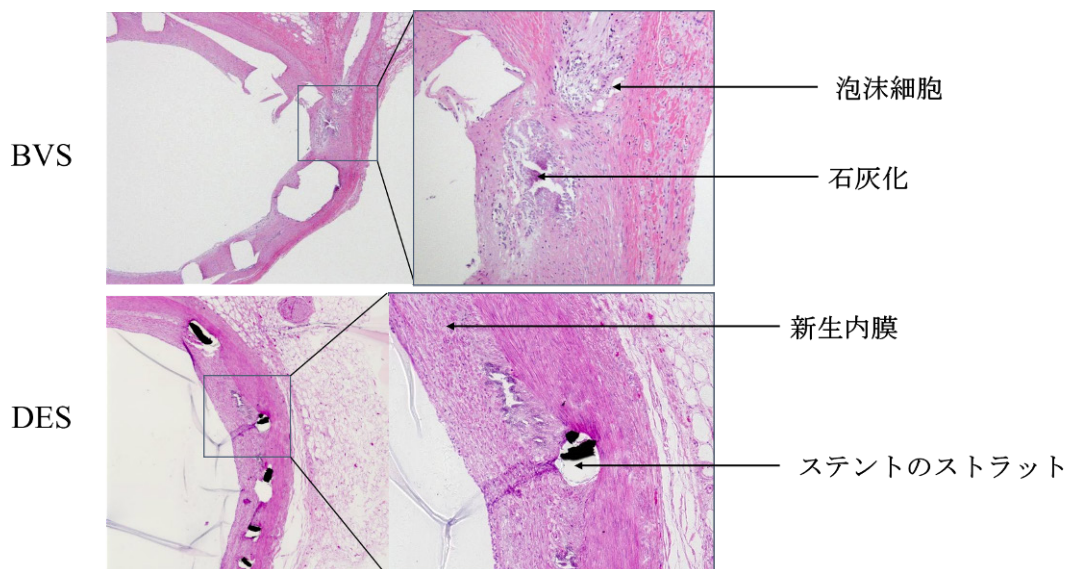


図11 ステント留置後の血管反応  
ステント留置3ヶ月後の冠動脈の病理切片：BVS(上)とDES(下)ともに、ステントのストラット周辺にフィブリン蓄積、断片化された石灰化、泡沫状マクロファージなどが観察されている。

こと、再度のインターベンションにも適応可能であることなどの利点から開発されたものである。短期的な局所の改善だけでなく長期的な予後改善を目指したステントであった。しかし、最近、留置後2-3年までにDESに比べて高頻度に血栓症が発症することが明らかになった。この原因としては、対象となったDESに比較してステントストラッドが厚かったために血流のタービュランスが起り、血流うっ滞はステント周囲に生じたことが挙げられる。また同時に、ステントの材質である $\alpha$ -ポリリジン(PLL)が分解される過程で、血栓源となり、血栓が生じやすくなるともいわれている。ステントストラッドが消失するまでに起こる高頻度の血栓症がコントロールできなかったため、BVSは現在では臨床的に使用できない状態にある。BVSの臨床上的の問題が明らかになるかどうかとも本研究の重要なテーマである。

留置3ヶ月後に比較した結果では、BVSのDESに対する非劣性が示された。また、ステント留置3ヶ月間の短期間内に、新生内膜に泡沫状マクロファージ、石灰化などのステント内新規動脈硬化所見が観察された。この時点では、BVSは分解されておらず、まだステントの構造も保持されている。さらに、血栓症を発症する1年以降の検討が必要となるであろう。しかし、このような短期間において、BVSおよびDESの両者の留置部に、経皮的冠動脈形成術(Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty: PCI)と同様の遅発性血管反応に相当する病変が認められた。このことは、冠動脈ステント内新生動脈硬化の大動物モデルが新たに作製できたことを意味し、新生内膜動脈硬化発症の機序を明らかにする点で大きな進歩となる。また、今後のステントの素材や薬剤を考慮する意味でも応用可能なモデルと考えられる。今後、このモデルを用いて6ヶ月と12ヶ月の観察結果を解析し、各種ステント留置後合併症の制御機構を解明する予定である。

## 5. 結 語

LDLR-/-ミニプタへの高脂肪食負荷で冠動脈不安定プラークモデルを作製後、不安定プラーク病変部位にDESおよびBVSを留置し、留置部位における長期間の経時的血管反応を検討した。留置3ヶ月後では、BVSとDESには有意な反応の相違は認められ

なかったが、両者ともステント留置部に新生動脈硬化病変の出現を認めた。これは、ヒトPCI後の特徴的な変化とされることから、ステント関連病変の解析を可能にするモデルが新たに開発されたと考えられる。今後、ステント留置後合併症の制御機構、留置後慢性合併症の予防治療法を検討予定である。

## 謝辞

本研究は、日本大学学術研究助成金によって行われたものである。ここに、研究者一同、謝辞を表す。LDLR-/-ミニプタの提供に対して分譲機関の国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、茨城県畜産センター、埼玉県農林総合研究センターに謝意を表すものである。本研究に甚大な協力をいただいた、研究推進室室長石井敬基教授、医学研究支援部門藤田順一様、谷口由樹様、高橋理恵様、本田元巳様、廣田成美様、細胞再生・移植医学分野松本太郎教授、人体病理学分野山田清香様、向山敏夫様、循環器内科奥村恭男教授、北野大輔先生、右田卓先生、内科学系先端心血管画像解析分野廣高史准教授、田代恵美様、総合内科佐野太一先生に改めて謝意を表すものである。

## 文 献

- 1) Gruentzig A. Results from coronary angioplasty and implications for the future. *Am Heart J.* 1982;103:779-83.
- 2) Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H and Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol.* 1988;12:616-23.
- 3) Nissen SE and Yock P. Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications. *Circulation.* 2001;103:604-16.
- 4) Betriu A, Masotti M, Serra A, Alonso J, Fernandez-Aviles F, Gimeno F, Colman T, Zueco J, Delcan JL, Garcia E and Calabuig J. Randomized comparison of coronary stent implantation and balloon angioplasty in the treatment of de novo coronary artery lesions (START) : a four-year follow-up. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:1498-506.
- 5) Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M and et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med.* 1994;331:496-501.
- 6) Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P and et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med.* 1994;331:489-95.
- 7) Serruys PW, Strauss BH, Beatt KJ, Bertrand ME, Puel J, Rickards AF, Meier B, Goy JJ, Vogt P, Kappenberger L and et al. Angiographic follow-up after

- placement of a self-expanding coronary-artery stent. *N Engl J Med.* 1991;324:13-7.
- 8) Cutlip DE, Leon MB, Ho KK, Gordon PC, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Fitzpatrick MM, Desjardin A, Popma JJ, Kuntz RE and Baim DS. Acute and nine-month clinical outcomes after "suboptimal" coronary stenting: results from the STent Anti-thrombotic Regimen Study (STARS) registry. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:698-706.
  - 9) Colombo A, Hall P, Nakamura S, Almagor Y, Maiello L, Martini G, Gaglione A, Goldberg SL and Tobis JM. Intracoronary stenting without anticoagulation accomplished with intravascular ultrasound guidance. *Circulation.* 1995;91:1676-88.
  - 10) Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schuhlen H, Blasini R, Hadamitzky M, Walter H, Zitzmann-Roth EM, Richardt G, Alt E, Schmitt C and Ulm K. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med.* 1996;334:1084-9.
  - 11) Gordon PC, Gibson CM, Cohen DJ, Carrozza JP, Kuntz RE and Baim DS. Mechanisms of restenosis and redilation within coronary stents—quantitative angiographic assessment. *J Am Coll Cardiol.* 1993;21:1166-74.
  - 12) Hoffmann R, Mintz GS, Dussaillant GR, Popma JJ, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Griffin J and Leon MB. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation.* 1996;94:1247-54.
  - 13) Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R and Lesions RSGRSwtS-CBVB-ESitToPwNNCA. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med.* 2002;346:1773-80.
  - 14) Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IM, Seixas AC, Staico R, Mattos LA, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ and Serruys PW. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation.* 2001;103:192-5.
  - 15) Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, Rensing BJ, Abizaid AS, Tanajura LF, Kozuma K, Van Langenhove G, Sousa AG, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ and Serruys PW. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation.* 2001;104:2007-11.
  - 16) Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O' Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE and Investigators S. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003;349:1315-23.
  - 17) Spaulding C, Henry P, Teiger E, Beatt K, Bramucci E, Carrie D, Slama MS, Merkely B, Erglis A, Margheri M, Varenne O, Cebrian A, Stoll HP, Snead DB, Bode C and Investigators T. Sirolimus-eluting versus uncoated stents in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1093-104.
  - 18) Grube E, Silber S, Hauptmann KE, Mueller R, Buellesfeld L, Gerckens U and Russell ME. TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions. *Circulation.* 2003;107:38-42.
  - 19) Silber S, Colombo A, Banning AP, Hauptmann K, Drzewiecki J, Grube E, Dudek D and Baim DS. Final 5-year results of the TAXUS II trial: a randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for de novo coronary artery lesions. *Circulation.* 2009;120:1498-504.
  - 20) Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, Rickenbacher P, Hunziker P, Mueller C, Jeger R, Bader F, Osswald S, Kaiser C and Investigators B-L. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:2584-91.
  - 21) Nakazawa G, Finn AV, Joner M, Ladich E, Kutys R, Mont EK, Gold HK, Burke AP, Kolodgie FD and Virmani R. Delayed arterial healing and increased late stent thrombosis at culprit sites after drug-eluting stent placement for acute myocardial infarction patients: an autopsy study. *Circulation.* 2008;118:1138-45.
  - 22) Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, Mihalec L, Tespili M, Valsecchi O and Kolodgie FD. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation.* 2004;109:701-5.
  - 23) Inoue K. Drug-eluting stents are not indicated for patients with acute coronary syndrome - should drug-eluting stents be indicated for patients with acute coronary syndrome? (Con) . *Circ J.* 2010;74:2232-8.
  - 24) Kotani J, Awata M, Nanto S, Uematsu M, Oshima F, Minamiguchi H, Mintz GS and Nagata S. Incomplete neointimal coverage of sirolimus-eluting stents: angioscopic findings. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:2108-11.
  - 25) Awata M, Kotani J, Uematsu M, Morozumi T, Watanabe T, Onishi T, Iida O, Sera F, Nanto S, Hori M and Nagata S. Serial angioscopic evidence of incomplete neointimal coverage after sirolimus-eluting stent implantation: comparison with bare-metal stents. *Circulation.* 2007;116:910-6.
  - 26) Sahni D, Kaur GD, Jit H and Jit I. Anatomy & distribution of coronary arteries in pig in comparison with man. *Indian J Med Res.* 2008;127:564-70.
  - 27) Tellez A, Krueger CG, Seifert P, Winsor-Hines D, Piedrahita C, Cheng Y, Milewski K, Aboodi MS, Yi G, McGregor JC, Crenshaw T, Reed JD, Huibregtse B, Kaluza GL and Granada JF. Coronary bare metal stent implantation in homozygous LDL receptor deficient swine induces a neointimal formation pattern

- similar to humans. *Atherosclerosis*. 2010;213:518-24.
- 28) 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 and Onishi A. Development of Human-Like Advanced Coronary Plaques in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Pigs and Justification for Statin Treatment Before Formation of Atherosclerotic Plaques. *J Am Heart Assoc*. 2016;5:e002779.
- 29) Moriyama N, Shishido K, Tanaka Y, Yokota S, Hayashi T, Miyashita H, Koike T, Yokoyama H, Takada T, Nishimoto T, Ochiai T, Tobita K, Yamanaka F, Mizuno S, Murakami M, Takahashi S and Saito S. Neoatherosclerosis 5 Years After Bioresorbable Vascular Scaffold Implantation. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:1882-1893.
- 30) Gogas BD, Benham JJ, Hsu S, Sheehy A, Lefer DJ, Goodchild TT, Polhemus DJ, Bouchi YH, Hung OY, Yoo SY, Joshi U, Giddens DP, Veneziani A, Quyyumi A, Rapoza R, King SB, 3rd and Samady H. Vasomotor Function Comparative Assessment at 1 and 2 Years Following Implantation of the Absorb Everolimus-Eluting Bioresorbable Vascular Scaffold and the Xience V Everolimus-Eluting Metallic Stent in Porcine Coronary Arteries: Insights From In Vivo Angiography, Ex Vivo Assessment, and Gene Analysis at the Stented/Scaffolded Segments and the Proximal and Distal Edges. *JACC Cardiovasc Interv*. 2016;9:728-41.

# 乳癌と周囲脂肪組織の相互作用

小沼憲祥<sup>1)</sup>, 土方浩平<sup>1)</sup>, 日高綾乃<sup>1)</sup>, 植草省太<sup>1)</sup>, 越永従道<sup>1)</sup>, 松本太郎<sup>2)</sup>

## Interaction between breast cancer and adipose tissue

Noriyoshi KONUMA<sup>1)</sup>, Kouhei HIJIKATA<sup>1)</sup>, Ayano HIDAKA<sup>1)</sup>,  
Shota UEKUSA<sup>1)</sup>, Tsugumichi KOSHINAGA<sup>1)</sup>, Taro MATSUMOTO<sup>2)</sup>

### 要旨

固形腫瘍とその周囲に存在する脂肪組織は相互作用を行うことで癌の増大や浸潤、転移に関与するとされている。我々は、脂肪細胞の運命追跡が可能なマウスを用い、マウス乳癌細胞株を皮下に生着させた。生着した乳癌細胞が増大したところで、乳癌組織を摘出し組織学的に検討した。癌組織内には、周辺に存在していた脂肪細胞が、脂肪細胞としての形態と性質を失って存在していた。これらの細胞は脂肪前駆細胞や間葉系幹細胞マーカーのSca-1が陽性であったため、より未分化な細胞であると考えられた。つまり、固形腫瘍の周囲にある脂肪細胞は、固形腫瘍からの作用を受け、より未分化な細胞へと変化し固形腫瘍へ作用していることが示唆された。

### 1. はじめに

脂肪組織は、エネルギーを蓄積する貯蔵器官である一方で、脂肪細胞はアディポサイトカインと総称される生理活性物質を活発に産生・分泌する生体内で最大の内分泌器官として多彩な生命事象に関与している。肥満の脂肪組織では、アディポサイトカインの産生調節に破綻をきたすため、メタボリックシンドロームの病態に関与すると考えられている。脂肪組織からの作用は固形腫瘍の周辺環境においても同様に起こり、腫瘍周囲に存在する脂肪細胞は、腫瘍本体と相互作用を行うことで、腫瘍の進展や転移に関与することが報告されている。乳腺は周囲を脂肪組織に囲まれており、脂肪細胞は乳房の重要な構成要素であるため、腫瘍と脂肪組織の相互作用は、乳癌において盛んに研究されている。乳癌では、肥満がリスクファクターとして知られ、肥満女性は通常女性に比べ乳癌発生リスクが増加するとされ、乳癌は周囲の脂肪組織に容易に浸潤しやすい。つまり、他の固形腫瘍と比較して脂肪と腫瘍が密接に関

与している。しかしながら、乳癌細胞と脂肪細胞の相互作用の検討は、培養による研究がほとんどであり生体内における直接的な関与は証明されていない。そこで、今回我々は、脂肪細胞特異的マーカー(Adipoq)を蛍光色素にて発色することで生体内の脂肪細胞の運命を追跡することが可能なトランスジェニックマウスを用いて乳癌組織における脂肪細胞の挙動を検討した。

### 2. 対象及び方法

生体内の脂肪組織が、外的な刺激(外傷や臓器欠損、炎症など)に応じ、脱分化することで再生や抗炎症に関与することを証明するため、脂肪細胞特異的マーカー(Adipoq)を追跡できるトランスジェニックマウス(Adipoq-Cre-ERT2/tdTomato-ROSA26マウス:以下Adipoq-Cre/Tomatoマウス)を用いた。このマウスは、エストロゲン刺激(腹腔内投与)を加えた時点で生体内にある脂肪細胞が赤い色素で発色し、この赤い脂肪細胞は分化もしくは脱分化した

1) 日本大学医学部外科学系小児外科学分野

2) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野  
小沼憲祥 konuma.noriyoshi@nihon-u.ac.jp



後も、赤い色素として検出することが可能である。つまり、生体内における脂肪細胞の挙動を赤い色素により追跡できるマウスである。今回我々は、この Adipoq-Cre/Tomato マウスを用い、乳癌組織周辺における脂肪細胞の挙動を検討した。方法は、この Adipoq-Cre/Tomato マウスに対して、マウス乳癌細胞株 (E0771;  $1 \times 10^6$  cells) を背部皮下に局所投与し、乳癌細胞を定着させる。その後、タモキシフェンの腹腔内投与 (1mg/100ul oil) を行い、生体内の脂肪細胞に蛍光色素を発色させる。腫瘍径が  $\phi 1\text{cm}$  以上になったところで、腫瘍の摘出を行い、組織学的に検討する。元々、Adipoq-Cre/Tomato マウスの脂肪細胞には tdTomato 遺伝子が組み込まれており、赤色に発色することから、腫瘍内の tdTomato 陽性細胞の形態学的変化を、Adipocyte マーカー (Perilipin A)、CAF (Cancer associated fibroblast) マーカー (FSP1, Fibronectin)、Pericyte マーカー ( $\alpha\text{SMA}$ , NG2)、Endothelial マーカー (CD31)、Preadipocyte, MSC (Mesenchymal Stem Cell) マーカー (Sca-1) とともに検出した。

### 3. 結果

まず、Adipoq-Cre/Tomato マウスの脂肪細胞に特異的に tdTomato が発現していることを確認した。Adipoq-Cre/Tomato マウスに対してタモキシフェンを5日間連続で腹腔内投与し、還流固定後、脂肪組織を含まない組織と、脂肪組織が含まれる組織に対して tdTomato 発現を確認した。結果、肺、肝、腎、脾には tdTomato 発現を認めず、脂肪組織を含む、腸間膜、皮下に tdTomato 発現を認めた (図1)。

次に Adipoq-Cre/Tomato マウスの皮下にて E0771 の生着と増殖を確認後、乳癌組織内における tdTomato 陽性細胞の確認を行った。Adipoq-Cre/Tomato マウスに対してタモキシフェンを5日間連続で腹腔内投与し、その後マウス乳癌細胞株の移植を行い、14日後、21日後、28日後で腫瘍塊を摘出し、組織学的に検討した。腫瘍内の tdTomato 陽性細胞は、脂肪細胞のマーカーである perilipin は陰性であった (図2)。また、CAF, Pericyte, Endothelial マーカーである FSP1, Fibronectin,  $\alpha\text{SMA}$ , NG2, CD31 も陰性であったが、Preadipocyte, MSC マーカーである Sca-1 は陽性であった (図3)。

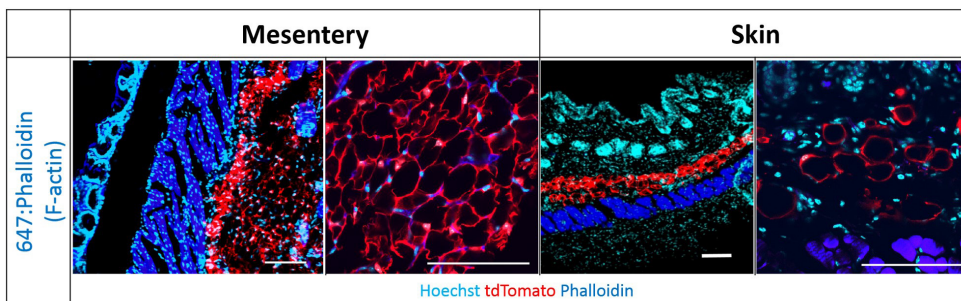


図 1

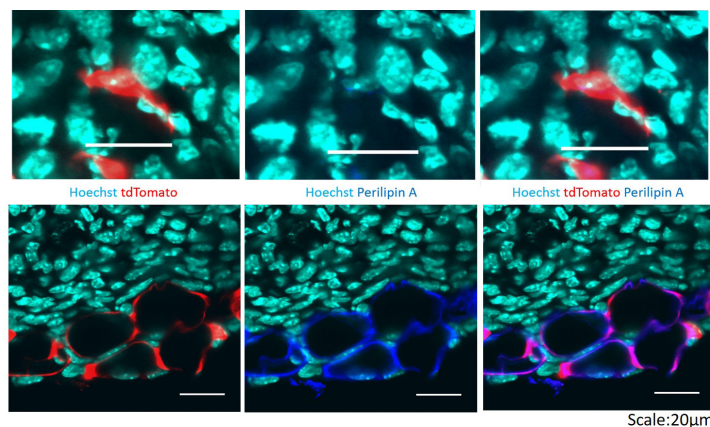


図 2

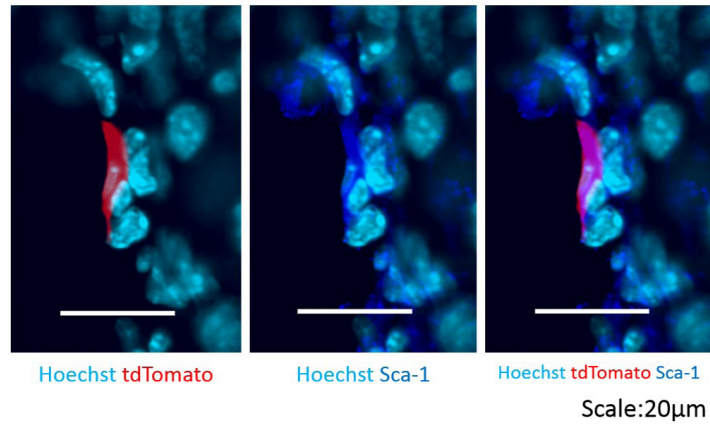


図 3

#### 4. 考 察

Adipoq-Cre/Tomato マウスの皮下に生着した乳癌組織内での脂肪細胞 (tdTomato 陽性細胞) は、脂肪細胞マーカーの発現が無くなっていたことから脂肪細胞ではない細胞に変化しており、FSP1, Fibronectin,  $\alpha$ SMA, NG2, CD31 が陰性であることから Cancer associated fibroblast や血管内皮、壁細胞には変化していない可能性が高いと考えられた。

そして Sca-1 が陽性となったことから、脂肪前駆細胞や間葉系幹細胞などの未分化な前駆細胞に変化している可能性が高いと考えられた。

#### 5. 結 語

乳癌組織周辺にある脂肪細胞は、癌組織が増大するに従い一時的に未分化な細胞へと変化している可能性が示唆された。

# がんゲノミクスによる腫瘍抗原とT細胞受容体解析から 腫瘍免疫をイメージする

糸井充穂<sup>1)</sup>, 井上亮太郎<sup>1)</sup>, 山口裕美<sup>2)</sup>, 江角真理子<sup>2)</sup>, 大荷澄江<sup>3)</sup>, 杉谷雅彦<sup>3)</sup>

## Imaging of tumor immunology based on genomics-derived tumor neoantigen and tumor-associated antigen TCR repertoire

Miho ITOI<sup>1)</sup>, Ryotaro INOUE<sup>1)</sup>, Hiromi YAMAGUCHI<sup>2)</sup>,  
Mariko ESUMI<sup>2)</sup>, Sumie OHNI<sup>3)</sup>, Masahiko SUGITANI<sup>3)</sup>

### 要旨

「非自己」として提示された腫瘍抗原(neoantigen)と、これを認識する腫瘍特異的T細胞の同定・特定は、がん免疫応答を利用した治療法に極めて重要である。我々は大腸癌組織の病理診断用ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた全エキソーム解析から大腸癌の抗原エピトープを予測した。また、同試料の癌部(リンパ球浸潤部位も含む)、非癌部及び周辺リンパ節から抽出したDNAを用い、癌部との距離を反映させたT細胞受容体多様性(レパトア)解析を行い、腫瘍特異的T細胞CDR3β配列を予測した。

### 1. はじめに

近年数々の免疫抑制分子が明らかとなり、腫瘍免疫が成立していることがわかってきた。これらの分子の阻害を解除する治療法や腫瘍抗原(neoantigen)を用いた腫瘍ワクチン、腫瘍特異的T細胞を用いた免疫賦活化治療が注目されている。癌の遺伝子変異は50-100個と数が多く、これらアミノ酸置換を伴う腫瘍特異的遺伝子変異がneoantigen候補となる。しかし、実際にどの体細胞変異ペプチドが非自己としてそのヒトのもつ主要組織適合遺伝子複合体(MHC, ヒトの場合にはHLA)に提示され腫瘍抗原として働くか、を明らかにするのは困難であった。最近NGSデータを用いたHLA遺伝子座位領域の解析やHLA-neoantigen候補の親和性解析が確立し、情報学的な手法の発達により、腫瘍特異的細胞傷害性(CD8<sup>+</sup>)T細胞エピトープ、neoantigen候補の同定ができるようになった<sup>1)</sup>。さらにT細胞受容体(TCR)の遺伝子の多様性解析(レパトア解析)では、シーケンズデータからT細胞の多様性を定量化でき、病理組織の場所によってclonal expansionした

TCR CDR (complementary determining region) 3β配列が腫瘍との関連で見つかり、腫瘍抗原に応答する特異的T細胞受容体のCDR3βを同定できる。腫瘍特異的遺伝子変異が多い(=neoantigenの種類が多い)がんほど、腫瘍免疫の誘導は高いと考えられ、このレパトア解析は最近注目を集めた新しい手法である<sup>2), 3)</sup>。これらの解析法はがん免疫プロファイリングとして、がんの種類及び個々の免疫学的特性を理解する手立てとして注目されている。

大腸癌組織における免疫イメージングを試みるには、大腸癌腫瘍抗原を決定する必要がある。免疫ゲノムプロファイリングが必須である。我々は大腸がんの腫瘍抗原候補を確定するため、大腸組織の非癌部及び癌部からDNAを採取し、全エキソーム解析の結果をもとに抗原エピトープを予測した。さらに、TCRレパトア解析は、従来の冷凍癌組織を用いる方法とは異なり、高い精度のレパトア解析が可能となるよう、薄切切片から癌部のみを採取し、癌部に高頻度で出現するT細胞受容体のCDR3β配列を特定した。

1) 日本大学医学部一般教育学系物理学分野

2) 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野

3) 日本大学医学部病態病理学系形態機能病理学分野

糸井充穂: itoi.miho@nihon-u.ac.jp

## 2. 対象及び方法

大腸組織の病理診断用ホルマリン固定パラフィン包埋組織から癌組織と非癌部組織をマクロダイセクションし、そのDNAを抽出して全エキソーム解析を行なった (SureSelect XT Human All Exon, HiSeq2500)。高頻度の腫瘍特異的遺伝子変異から、neoantigen候補を選定する。また、HLA配列の生データからHLA遺伝子型決定 (タイピング) をHLA-VBSeq (c) 2015, Tohoku University) を用いて解析した<sup>4)</sup>。また、NetMHCpanを用い、決定したHLAタイプに対し、変異でMHCクラスIと結合し親和性が上昇する9merの変異ペプチドを見つけ、neoantigen候補を割り出した<sup>5)</sup>。一方、腸管傍リンパ節 (201)・中間リンパ節 (202) から同病理診断用ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いてDNAを抽出し、上記癌組織、非癌部組織DNAとともに、TCR-CDR3β領域のレパトア解析を行なった (iRepertoire-HTBI-vj)。

## 3. 結果および考察

全エキソーム解析により、癌部DNAにおいて見られた体細胞ミスセンス変異は1291個であった。そのうち変異頻度0.1以上の変異遺伝子115個から、腸管で発現している遺伝子をpick upし、52個がネオアンチゲン候補を生み出す変異遺伝子であるとした。また、HLA領域のリードから、本検体のHLAのハプロタイプは (A\*31:01:02, A\*24:03:01), (B\*40:01:02, B\*15:01:01:01), (C\*15:02:01, C\*04:01:01:01) であった。

クラスIのHLAに提示される9merの抗原のうち、野生型 (wild) のペプチドが癌による変異 (mutant) によってHLAとの親和性が強くなると、そのペプチドがneoantigenになる可能性が高い。親和解析の結果、癌による変異で親和性が上昇したペプチドの種類は84種類であり、その中で親和性が著しく上昇したペプチドはHLA-A31:01に提示されるGNISVQILR (wild: GNISVQILG, Gene: FAT4) 及びSCYNCGVSR (wild: SCYNCGVSG, Gene: ZC-CHC2) であった。

癌部・非癌部及びリンパ節201及び202の4箇所について、TCRレパトアは以下のように観測された。uniqueなTCR CDR3β配列数/Read数は、癌部525/14935 (3.5%), 非癌部959/41509 (2.3%) である。

また、201/202リンパ節ではそれぞれ2175/87672 (2.5%), 2210/67952 (3.3%) であった。TCRβ鎖はV (可変) 遺伝子断片 52種類, D (多様性) 遺伝子断片 2種類, J (結合) 遺伝子断片 13種類の組み合わせで多様性が生み出される。全ての箇所を高頻度に観測されたCDR3βのV断片は、V27, V20-1, V6-3, V6-1, J断片はJ2-2, J2-3, J2-5, J2-7であった。

癌部浸潤リンパ球のみで観測されたCDR3β配列の個数は、433であった。癌部浸潤T細胞の多様性 (3.5%) と癌特異性 (82%) が示唆された。この中にclonal expansionした腫瘍特異的T細胞が含まれていると予想される。特に高頻度で観測されたCDR3βアミノ酸配列は、ASSHGLGETQY, ASSLSYWVLEQF, ASRLNGLASFDTQY, ASPGGPQRDTQY, ASSLRG-ANYGYT, ASSYQGGGANVLTであった。

201と202リンパ節のみに共通にみられるCDR3β配列の個数はたった14であった。またすべて4箇所観測された共通のCDR3β配列を持つT細胞の種類は14で、非癌部では観測されずリンパ節と癌部で観測されるCDR3β配列はASSLRGGAGNTQY, ASSPGTGRYEQY, ASSPARQETQY, ASSATGTSNYEQY, SARFGGRTGELF, ASKSRAGGLAAYNEQF, ASKY-GRGIHKNEQF, ASSVEGPGSGELFの8種類であった。このように、腫瘍特異的T細胞受容体のCDR3β配列を提示することができたが、レパトア解析で上げられるT細胞受容体配列にはCD4<sup>+</sup>やBystander T<sup>6)</sup>や制御性T細胞も含まれている。癌部浸潤リンパ球における細胞障害性T細胞を定量化するためには、CD8のほか、CD39, CD25などの多重染色が必要となるだろう。また、腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞が実際エピトープ予測したneoantigen候補と反応するかどうかは、テトラマーMHC-peptide (neoantigen候補) 及びCD8<sup>+</sup>T細胞を用いたアッセイやBiacoreを用いたTCR-p-MHCのアフィニティー測定が必須であり、これらは今後の課題である。

## 文 献

- 1) H. Hackl, P. Charoentong, F. Finotello & Z. Trajanoski. *Nature Reviews*. 2016, 17, 441-458.
- 2) B. Li, T. Li, J. Pignon, B. Wang, J. Wang, S. A. Shukla, R. Dou, Q. Chen, F. S. Hodi, T. K. Choueiri, C. Wu, N. Hacohen, S. Signoretti, J. S. Liu, X. S. Liu. *Nature Genetics*. 2016, 48, 725-732.
- 3) J. J. A. Calis, B. R. Roseberg. *Trends in Immunology*. 2014, 35, 581-590.

- 4) N. Nariai, K. Kojima, S. Saito, T. Mimori, Y. Sato, Y. Kawai, Y. Yamaguchi-Kabata, J. Yasuda, M. Nagasaki. *BMC Genomics*. **2015**, 16 (Suppl 2) :S7
- 5) V. Jurtz, S. Paul, M. Andreatta, P. Marcatili, B. Peters, M. Nielsen. *The Journal of Immunology*. **2017**, 199, 3360-3368.
- 6) Y. Simoni, E. Becht, M. Fehlings, C. Y. Loh, S. Koo, K. W. W. Teng, J. P. S. Yeong, R. Nahar, T. Zhang, H. Kared, K. Duan, N. Ang, M. Poidinger, Y. Y. Lee, A. Larbi, A. J. Khng, E. Tan, C. Fu, R. Mathew, M. Teo, W. T. Lim, C. K. Toh, B. Ong, T. Koh, A. M. Hillmer, A. Takano, T. K. H. Lim, E. H. Tan, W. Zhai, D. S. W. Tan, I. B. Tan, E. W. Newell. *Nature*. **2018**, 557, 575-579.

# 大動脈瘤・大動脈解離の病理・病態解明に関する研究

本間 琢<sup>1)</sup>, 田中正史<sup>2)</sup>

## Histopathological examination for the pathogenesis of aortic aneurysm and dissection

Taku HOMMA<sup>1)</sup>, Masashi TANAKA<sup>2)</sup>

### 要旨

大動脈瘤破裂や大動脈解離の病因や病態はいまだ不明な点が多く、更なる研究成果が期待される分野である。血管壁の構成細胞として平滑筋細胞が重要であるが、我々は手術で採取されたヒト大動脈瘤・大動脈解離の組織を用いて、これらの大動脈疾患における平滑筋細胞の分化に関する検討を行った。大動脈疾患の血管壁では高分化な平滑筋細胞マーカーである smoothelin の発現が著明に減弱していた。血管平滑筋細胞の分化や smoothelin の発現・分布の制御が、これらの大動脈疾患の病態に関与している可能性が示唆された。

### 1. はじめに

大動脈瘤破裂や大動脈解離は致死性病態であり、中高齢者の死因のうち重要な位置を占め、今後も患者数の増加が予想されている。未破裂の大動脈瘤では根治的な外科的治療法の周術期の死亡率は非常に低く、良好な長期予後が得られている。また、近年では大動脈疾患に対する血管内治療として大動脈ステントグラフトが広く使われるようになり、非侵襲的な血管内治療の症例数は年々増加している。しかし、これらの疾患は、病態の進行過程では症状が認められにくく、瘤の破裂などの重篤な状態で初めて診断される症例が多い<sup>1)</sup>。

大動脈内膜から中膜に至る血管壁の亀裂により血流が偽腔内に流入する大動脈解離は、発症すると救命率は極めて低く、発症頻度は女性の約2-3倍男性に多い。マルファン症候群などによる遺伝性の結合組織病による大動脈解離を除くと、本疾患は60才以上で高率に起こり、高血圧歴と密接に関連していることが知られている。大動脈の脆弱性は病理学的には中膜の嚢状中膜壊死により惹起され、まれに

大動脈炎が関与することもある<sup>1)</sup>。しかし、これらの大動脈疾患の病因や病態、病変の進展メカニズムは、いまだ不明な点が多く、更なる研究成果が期待される分野である。

血管平滑筋細胞は、血管壁を構成する重要な細胞成分である。平滑筋細胞の分化の違いは、血管壁の収縮や拡張・壁の強度の保持・代謝・動脈硬化の進展などに重要な役割を果たしている。高分化な平滑筋細胞のマーカーとして、smooth muscle myosin heavy chain や SM22 $\alpha$  などとともに、近年、smoothelin が同定された。smoothelin は細胞質内で細胞骨格蛋白である actin filament と共発現しており、高分化な平滑筋に特異的なマーカーとして知られている<sup>2)</sup>。今回我々は、これらの大動脈疾患における平滑筋細胞の smoothelin の分布について検討した。

### 2. 対象および方法

日本大学医学部附属板橋病院にて研究期間中に人工血管置換術が施行され、手術の際に切除された大動脈解離13例および大動脈瘤17例の大動脈壁を用

1) 日本大学医学部 病態病理学系人体病理学分野

2) 日本大学医学部 外科学系心臓血管外科学分野

本間 琢: honma.taku@nihon-u.ac.jp

いた。大動脈壁は10%緩衝ホルマリンにて固定後に、パラフィン包埋にて病理組織切片を作製して、hematoxylin-eosin, Masson's trichrome, elastica van Giesonで染色を行って検鏡した。免疫組織化学で、抗smoothelin抗体（オランダ, Maastricht大学 Dr. van Eys Guillaumeより供与）を用いて、これらの大動脈疾患の平滑筋細胞の分化の程度について検討した。対照として研究目的の検体利用の承諾が得られた、剖検により採取された拡張や解離の認めない大動脈を用いた。

### 3. 結果

正常の大動脈中膜や動脈硬化を伴った大動脈（図1）で瘤や解離を認めない部位では、中膜に存在する $\alpha$ -smooth muscle actin陽性の平滑筋細胞は広い範囲でsmoothelin陽性を示した。動脈硬化を認める内膜においては、中膜平滑筋細胞と比較し発現の減弱が認められた。

一方で、粥状動脈硬化性大動脈瘤壁では、萎縮を伴った中膜の $\alpha$ -smooth muscle actin陽性を示す平滑

筋細胞において、著明なsmoothelinの発現の低下が認められ、免疫組織化学では陽性細胞の同定が困難であった（図2）。大動脈瘤同様に大動脈解離を発症した症例の大動脈中膜には、 $\alpha$ -smooth muscle actin陽性の血管平滑筋細胞の分布が広い範囲で認められたが、今回検討したいずれの症例においても、これらの細胞におけるsmoothelinの分布は、大動脈瘤壁の中膜同様に正常中膜や粥状動脈硬化を伴った大動脈の中膜と比較して著明に減弱していた。

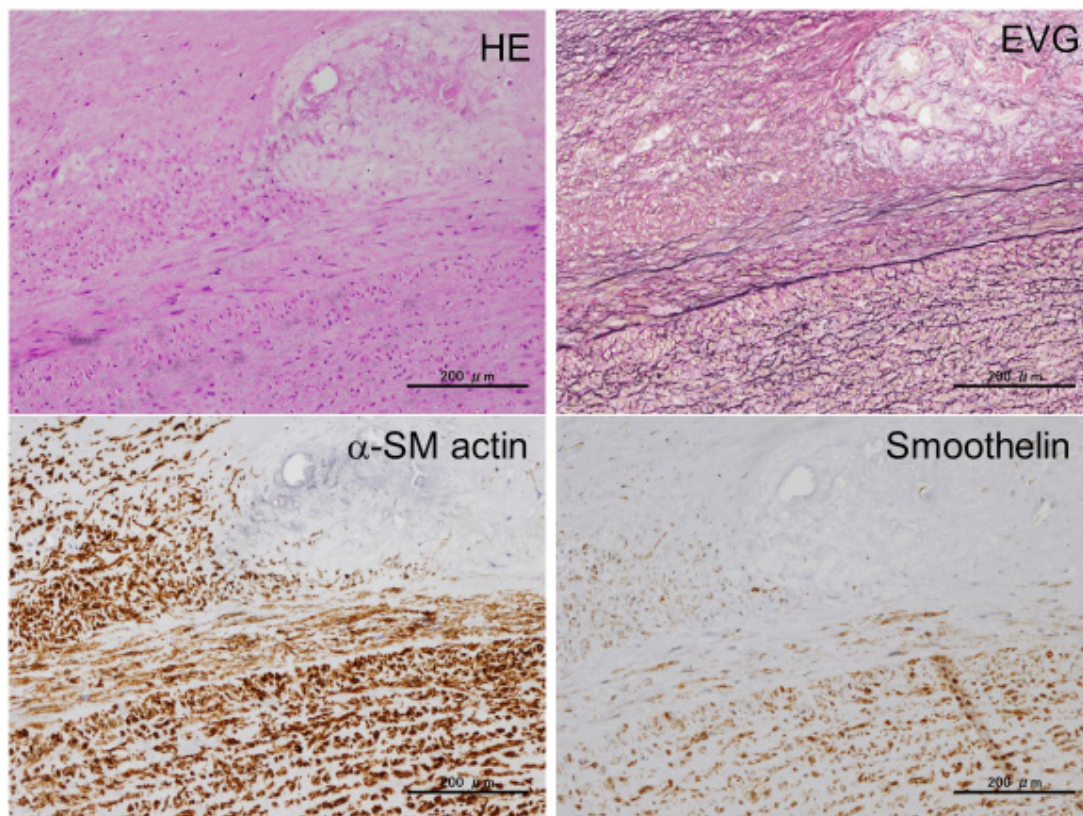


図1 動脈硬化を伴った大動脈壁における smoothelin の分布

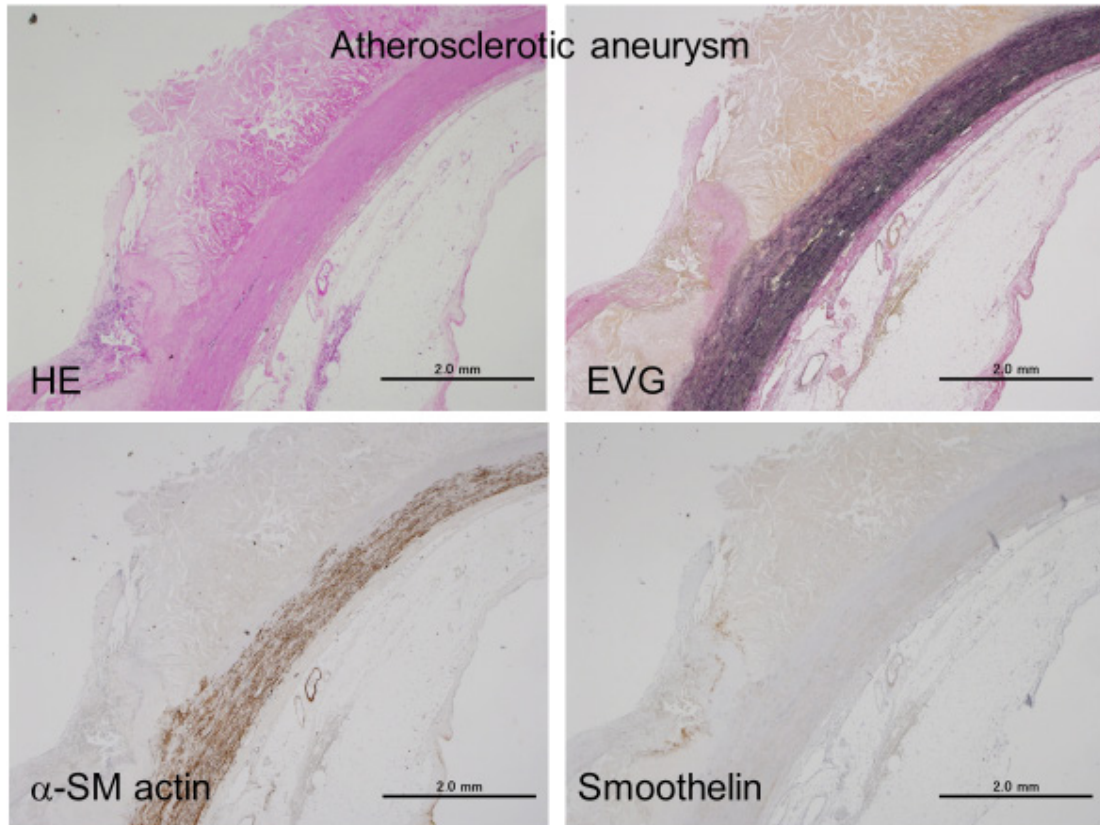


図2 大動脈瘤壁における smoothelin の分布

#### 4. 考 察

血管壁を構成している平滑筋細胞は、病態に応じて表現型の転換が起こることが知られている。動脈硬化の進展の過程では、収縮型平滑筋細胞は合成型へと形質転換が起こる。その過程で、smoothelinなどの高分化な平滑筋細胞のマーカー分子はその発現が減弱する。合成型平滑筋細胞は収縮型平滑筋細胞と比較して、高い増殖能や遊走能を有していることが知られている。また、大動脈瘤や大動脈解離の病態には、血管壁の脆弱性が関与していることが容易に想像できる。大動脈疾患の病態に平滑筋細胞の表現型の転換は重要な役割を果たしていると思われるが、これまでこのような視点からの研究はほとんど行われていなかった。

我々は手術で得られた大動脈疾患の検体を用いて、中膜平滑筋細胞の分化に注目し、最近同定された高分化平滑筋細胞のマーカーである smoothelin の分布を免疫組織化学で検討した。大動脈疾患の中膜では、 $\alpha$ -smooth muscle actin陽性の血管平滑筋細胞において smoothelin の発現が著明に減弱してい

た。これらの smoothelin 分子の制御が大動脈疾患の発症や進展に関与している可能性が示唆された。今後さらに培養細胞や動物モデルを用いた smoothelin 分子の機能解析や病態への関与の検討とともに、貴重なヒト手術材料や剖検症例から得られた大動脈検体から、遺伝子解析を含めて研究を進展させる計画である。

#### 5. 結 語

大動脈瘤や大動脈解離には、中膜血管平滑筋細胞の分化が関与しており、これらの形質の転換が病態の発症や進展に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) 羽尾裕之：大動脈瘤および大動脈解離の病理. 日本血管外科学会雑誌 2014; 23 : 957-963.
- 2) van Eys GJ, Niessen PM, Rensen SS. Smoothelin in vascular smooth muscle cells. Trends Cardiovasc Med. 2007; 17:26-30. DNA



## 乳腺小葉癌における *CDH-1* 遺伝子異常の検討 —デジタルPCR法および *CDH-1* DNAシーケンシング法

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 DNA sequencing

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

#### 要旨

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 (immunohistochemical, 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。本研究は、小葉癌におけるE-Cad遺伝子 *CDH-1* (16q22.1) 異常の特徴と組織形態学の関連性を探ることを目的とする。対象は2012～2016年の間日本大学医学部附属板橋病院にて行われた乳癌手術症例のうち、浸潤性小葉癌 (invasive lobular carcinoma, ILC) と診断された19例。対照としては浸潤性乳管癌 (invasive ductal carcinoma, IDC) 7例を使用した。以上26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 (digital-PCR, D-PCR) およびDNAシーケンシング法を行った。結果として、D-PCR法では、IDCとILC、E-Cad IHC陰性と陽性乳癌いずれも *CDH-1* DNA値 (*CDH-1/RNaseP*) に差を認め、一方でILC群内ではE-Cad IHC陰性と陽性ILCの間に差を認めなかった。DNAシーケンシング法による *CDH-1* DNA遺伝子変異解析では、多数の変異を認めたが、IDCとILCに特徴的な異常は見いだせなかった。乳腺ILCとIDCの組織形態学的特徴は、*CDH-1* DNA値に強く関連することが示唆された。

#### 1. はじめに

乳腺の浸潤性小葉癌は、浸潤性乳癌の中で浸潤性乳管癌の次に発生頻度の高い腫瘍である。臨床的には、浸潤性乳管癌と比較した場合、発症年齢はやや高く、乳腺内の腫瘍形成は不明瞭であり、発見時における腫瘍直径が大きい。予後は、診断より6年以内は良好であるが、さらなる長期観察では、遠隔転移、再発率および死亡率は高い傾向にある<sup>1)</sup>。そのため、浸潤性小葉癌と浸潤性乳管癌の鑑別診断は、患者の治療計画や予後予測において大変重要である。

一方、乳癌の組織診断では、浸潤性小葉癌および浸潤性乳管癌中の狭義的硬癌は、いずれも小型の細胞で短い一列並列の形態を示す場合が多く、その形態的鑑別診断は困難になる場合がある。鑑別診断法の一つとして、小葉癌の特徴である細胞接着蛋白E-Cadの機能喪失を利用した免疫組織化学法はよく

使われているが、E-Cad陽性の小葉癌も存在し、診断上問題になる場合がある。

E-Cadの異常を引き起こす原因として、E-Cad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>2)</sup>。その原因を調べる方法として、全ゲノムシーケンシング法、*CDH-1* DNAシーケンシング法、*CDH-1* DNA定量、mRNA定量、*CDH-1/CEP16*のDual-FISH法などがある<sup>3)</sup>。しかし、研究方法によって、*CDH-1* 遺伝子異常の率や種類は様々である<sup>2), 3)</sup>。また、遺伝子検査が直接病理学診断の補助手段として利用できるものが少ないのが現状である。

#### 2. 目的および意義

今回、われわれは、乳腺小葉癌におけるE-Cad遺伝子 *CDH-1* (16q22.1) 異常の特徴を探ること、また、

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

表 *CDH-1* 遺伝子変異解析用プライマー

target	Forword primer	Reverse primer
<i>CDH-1</i> exon 3	5'-tctgtgatttctgcctgca-3'	5'-tgccaacatacctgatgggg-3'
<i>CDH-1</i> exon 6	5'-ggccccttctcccattgtt-3'	5'-gaacaacacttggggcca-3'
<i>CDH-1</i> exon 7	5'-agtcccaagtgcagctgt-3'	5'-ctctgaccctgacctctc-3'
<i>CDH-1</i> exon 8	5'-cctggctcctgactgtgt-3'	5'-agaccttcttggaaacctc-3'
<i>CDH-1</i> exon 9	5'-gtcctgcagtacaagggtca-3'	5'-gccagtttctgcatctgcc-3'
<i>CDH-1</i> exon 10-1	5'-tgtttctctcttagggct-3'	5'-aagctctcggacactccac-3'
<i>CDH-1</i> exon 10-2	5'-aggtctctcaccacctcc-3'	5'-accagttgctgcaagtcagt-3'
<i>CDH-1</i> exon 13	5'-ttcctcccctggctcatca-3'	5'-gtcacttgccagctggactt-3'
<i>CDH-1</i> exon 15	5'-tctactcttactgtactcaact-3'	5'-atgcttggcttccacgtg-3'

日常の病理鑑別診断に使用できる *CDH-1* (16q22.1) 異常の検出方法を検討することを目的とした。

### 3. 対象及び方法

2012年1月～2016年12月の間日本大学医学部附属板橋病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19例 (E-Cad陰性16例, E-Cad弱陽性3例), 浸潤性乳管癌7例 (E-Cad陽性4例, E-Cad弱陽性3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。

#### 3.1 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。*CDH-1* DNA量は*CDH-1* DNAとReferenceのコピー数比、*CDH-1/RNaseP*, として定義した。

#### 3.2 DNAシーケンシング法による *CDH-1* DNA 遺伝子変異解析:

上記同様の方法にて、*CDH-1* DNAを抽出後、下記プライマーで通常DNAシーケンシングを行った。*CDH-1* DNA 全配列情報は[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG\\_008021.1?from=5001&to=103250&report=genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_008021.1?from=5001&to=103250&report=genbank)より取得。

## 4. 結果

### 4.1 D-PCR法による *CDH-1* DNA 定量解析の結果:

- ILCとIDCに有意差を認めた。Mann-Whitney法のU検定,  $p < 0.000$  (図a)。
- E-Cad IHCの陽性・陰性症例に有意差を認めた。Mann-Whitney法のU検定,  $p < 0.000$  (図b)。
- ILC群の中では、E-Cad IHCの弱陽性・陰性症例には有意差を認めなかった。Mann-Whitney法のU検定,  $p = 0.057$  (図c)。
- IDCとILC E-Cad IHCの弱陽性群に有意差を認めた。Mann-Whitney法のU検定,  $p = 0.017$  (図d)。
- IDC E-Cad IHCの弱陽性群とILC E-Cad IHCの弱陽性群に有意差を認めた。Mann-Whitney法のU検定,  $p = 0.050$  (図e)。

### 4.2 DNAシーケンシング法による *CDH-1* DNA 遺伝子変異解析の結果:

- 7例のIDC例のうち3例に異常を認めた。exon3 a→g, exon9 t del, exon7 t del。3例いずれもE-Cad IHCの陽性症例であった。
- 19例のILCのうち5例に異常を認めた。exon10 c→t, exon10 g→a, exon6 c→t, exon3 c→t, exon8 ca Ins。5例いずれもE-Cad IHCの陰性症例であった。
- それらの遺伝子異常は、いずれも異なった場所の単個核酸の変異、欠失、挿入であった。重複した遺伝子異常はなく、遺伝子異常とE-Cad IHCの陽性・陰性や組織型の違いに関連性は認めなかった。

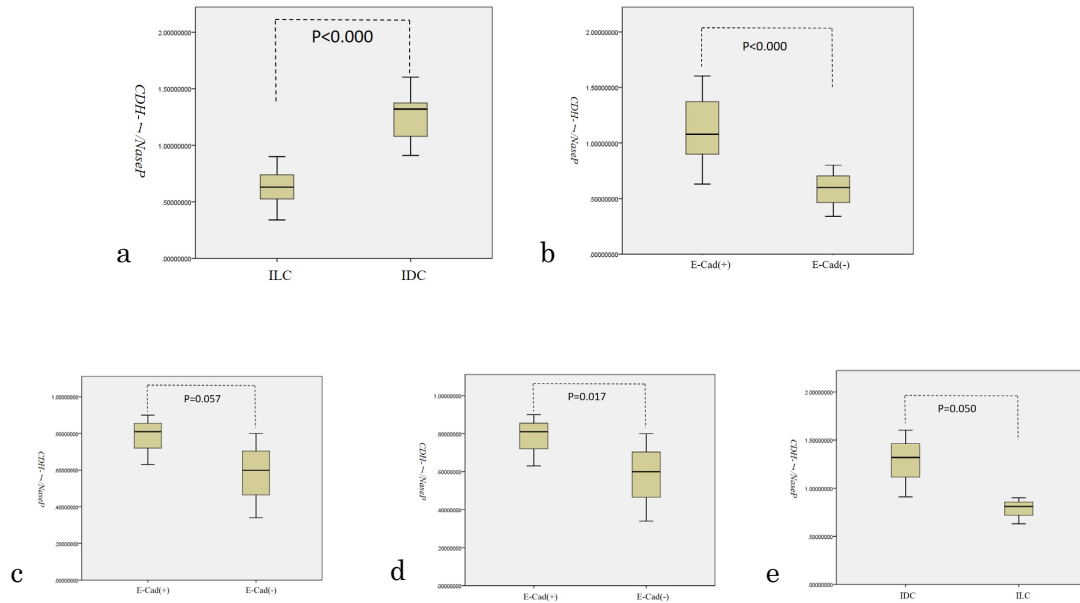


図 D-PCR法による  $CDH-1$  DNA定量解析の結果

a. ILCとIDCの比較。b. E-Cad IHCの陽性・陰性症例の比較。c. ILC群の中、E-Cad IHCの弱陽性・陰性症例の比較。d. IDCとILC E-Cad IHCの弱陽性群の比較。e. IDC E-Cad IHCの弱陽性群とILC E-Cad IHCの弱陽性群の比較。(ILC: invasive lobular carcinoma, IDC: invasive ductal carcinoma, E-Cad: E-cadherin, IHC: immunohistochemical)

## 5. 考察

今回の研究は、D-PCR法では、IDCとILC、E-Cad IHC陰性と陽性乳癌いずれも  $CDH-1/RNaseP$  に差を認め、一方でILC群内のE-Cad IHC陰性ILCと陽性ILCの間に差は認めなかった。その結果は、乳癌の組織形態学的特徴は、 $CDH-1$  DNA値に関連することを示唆された。DNAシーケンシング法による  $CDH-1$  DNA遺伝子変異解析では、多数の変異を認めたが、IDCとILCの特徴となる異常はなく、また、E-cad IHCの結果との関連性もなかった。それは、 $CDH-1$  遺伝子の点変異はE-cadタンパク発現への影響が少ない可能性を示唆され、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。

## 6. 結語

乳癌ILCとIDCの組織形態学的特徴は、 $CDH-1$  DNA値 ( $CDH-1/RNaseP$ ) に関連することが示唆され、D-PCR法は、IDCとILCの鑑別診断に利用できる方法の一つとなる可能性がある。

## 文献

- 1) Canas-Marques R& Schnitt SJ. E-cadherin immunohistochemistry in breast pathology : uses and pitfalls. *Histopathology* 2016; 68 : 57-69.
- 2) Reed AEM, Kutasovic JR, Lakhani SR, Simpson PT. Invasive lobular carcinoma of the breast : morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Research* 2015; 17:12.
- 3) 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.

# 喘息病態における気道上皮前駆細胞の役割

丸岡秀一郎<sup>1)</sup>, 権 寧博<sup>1)</sup>

## The role of bronchial epithelial progenitor cell in the pathogenesis of asthma

Shuichiro MARUOKA<sup>1)</sup>, Yasuhiro GON<sup>1)</sup>

### 要旨

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。本研究の目的は、気道上皮細胞の前駆細胞である基底細胞に着目し、喘息病態に関与する環境因子の代表であるウイルス感染による上皮バリアの脆弱化機序を解明し、喘息病態形成につながる分子病態を明らかにすることである。ヒト正常気管支上皮細胞 (NHBE) の初期段階および気道基底細胞株 VA10 に、ウイルス感染を模倣する dsRNA を刺激したところ、上皮バリアが減弱した。以上より dsRNA は基底細胞に作用し、気道上皮バリアを減弱させる。基底細胞へのウイルス感染が、その後の上皮バリア形成を減弱させ、喘息病態形成に関与する可能性が示唆された。

### 1. はじめに

喘息は、世界的に増加傾向にある呼吸器疾患であり、現行の治療に抵抗性を示す重症患者も少なくない。喘息病態にはいまだに不明な点が多く、新たな治療につながる病態解明は急務である。近年、喘息の病態形成に上皮細胞のバリア機能の脆弱性が注目されている<sup>1)</sup>。著者は、これまでヒト気道上皮細胞株を用いて喘息病態における気道上皮バリア機能形成、増強の機序を明らかにしてきた<sup>2), 3)</sup>。その研究過程で、様々な環境因子 (ハウスダストダニ抗原 (House Dust Mite:HDM) や細菌感染、ウイルス感染など) が気道上皮の分化及び上皮バリア機能形成の早期段階に影響することが、バリアの脆弱化の決定要因となっていることが推測された。気道基底細胞は、気道上皮細胞への分化能を有する前駆細胞であり、喘息のみならず、呼吸器疾患の発症に関与するといわれている<sup>4)</sup> が、喘息病態における上皮バリア脆弱化メカニズムについての詳細な検討はなされていない。

本研究の目的は、気道上皮前駆細胞である基底細胞に着目し、喘息病態に関与する気道上皮細胞バリア脆弱化の分子メカニズムを解明し、臨床的意義を見出す基盤となる成果をあげることである。今回はウイルス感染に焦点をあて、ウイルス感染を模倣する double-strand RNA (dsRNA) 刺激による上皮バリア形成に及ぼす影響についてヒト正常気管支上皮細胞 (NHBE) および気道基底細胞株 VA10 を用いて検討した。

### 2. 対象及び方法

#### 細胞および培養

NHBE, VA10 は Transwell 上で 3 日間培養液中で培養 (Liquid-covered culture: LCC) した後、気道上皮細胞への分化を誘導する培養系 Air Liquid Interface (ALI) を用いて培養した。

#### 気道基底細胞マーカーの発現確認

LCC 下の NHBE をスライドガラスに付着させ、

1) 日本大学医学部内科学系呼吸器内科学分野  
丸岡秀一郎: maruoka.shuichiro@nihon-u.ac.jp

4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後、基底細胞のマーカーである抗CK5抗体、抗CK14抗体を1次抗体、2次抗体を抗マウスIgG抗体 Alexa Fluor 488として蛍光免疫染色を行なった。また、確認のためVA10についても同様に行なった。

### 上皮バリア機能測定

上皮バリア機能はTrans Electric Resistance (TER)を用いて経時的に測定した。また、傍細胞透過率 (Apparent permeability coefficient : Papp) を測定した。

### 統計学的解析

データは、平均値±標準偏差値 (SD) で記載した。実験群間の統計的有意性は、2群の値においては Student's t検定を用いて評価し、多群間の比較においてはANOVA検定を行い、\* P < 0.05を有意とし

た。データはGraphPad Prism Software (La Jolla, California, USA) を用いて解析、作図をした。

### 3. 結果

LCCの3日間のみには dsRNA (poly (I:C) 10ug/ml) で刺激し、その後、poly (I:C) 非存在下のALIで上皮バリア機能を測定した (図1A)。LCC下でのNHBEは、基底細胞のマーカーであるCK5, CK14陽性細胞であった (図1 B)。このLCC下でのpoly (I:C) 刺激群はコントロール群と比較してALI培養下のNHBEのTER減弱を認めた (図1 C)。気道基底細胞株であるVA10は、CK5, CK14陽性細胞であり、LCC下でのpoly (I:C) 刺激群はコントロール群と比較してALI培養下のVA10のTER減弱および傍細胞透過率の亢進を認めた (図2 A, B)。

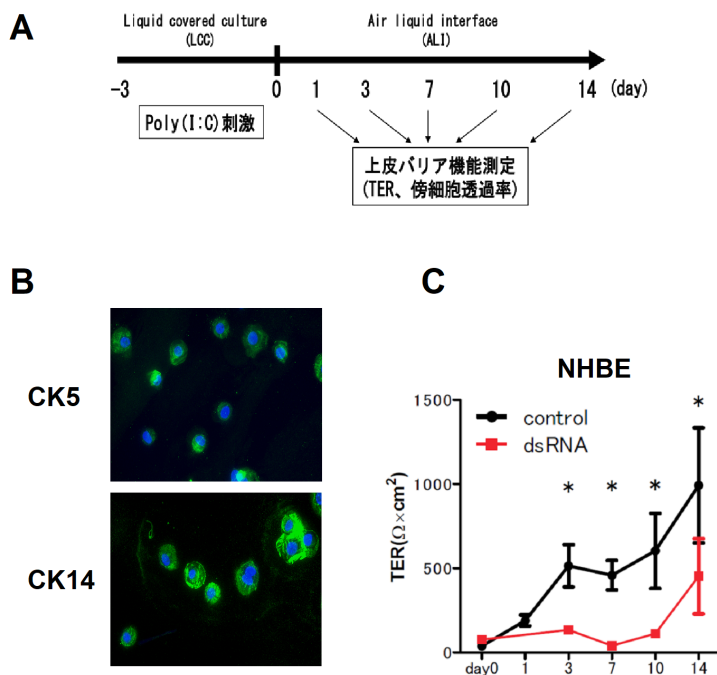


図1 NHBEの初期に存在する基底細胞へのdsRNA刺激は上皮バリア機能を脆弱化する

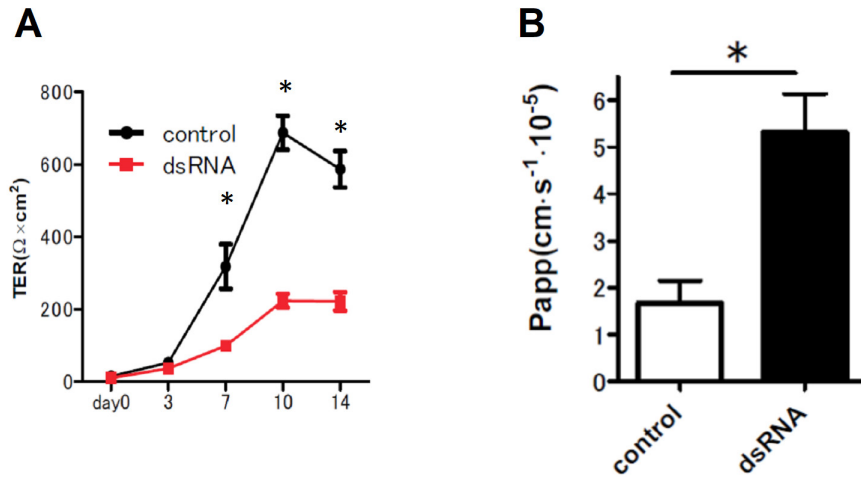


図2 気道基底細胞株 (VA10) への dsRNA 刺激は上皮バリア機能を脆弱化する

#### 4. 考察

以上より気道基底細胞への poly (I:C) 刺激は、上皮バリアの脆弱化を惹起することが証明された。

#### 5. 結語

dsRNAは気道上皮分化誘導前の基底細胞に作用し、気道上皮バリアを減弱させる。基底細胞へのウイルス感染が、その後の上皮バリア形成を減弱させ、喘息病態形成に関与する可能性が示唆された。

今後は、dsRNAによる上皮バリアの脆弱化の分子病態を解明するために、VA10におけるサイトカイン、ケモカインプロファイル解析、網羅的遺伝子発現解析などを行う。これにより、前駆細胞におけるバリア機能形成、上皮分化に関与する分子病態に関与する標的分子の同定を試みる。また、喘息病態形成に関与するその他の環境因子 (HDM, ATP, 細菌構造物質 (LPS, フラジェリン, CpG) など) についても随時解析を進めていく予定である。

#### 文献

- 1) Xiao C, Puddicombe SM, Field S, Haywood J, Broughton-Head V, Puxeddu I, Haitchi HM, Vernon-Wilson E, Sammut D, Bedke N, Cremin C, Sones J, Djukanovic R, Howarth PH, Collins JE, Holgate ST, Monk P, Davies DE : Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 128:549-556 e541-512, 2011.
- 2) 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:S56-58, 2016.
- 3) Shintani Y, Maruoka S, Gon Y, Koyama D, Yoshida A, Kozu Y, Kuroda K, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) regulates airway epithelial barrier integrity. *Allergol Int* 64 Suppl:S54-63, 2015.
- 4) Rock JR, Randell SH, Hogan BL : Airway basal stem cells : a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech* 3:545-556, 2010.

## 心臓手術後の心房細動発生に影響を与える因子についての臨床研究

瀬在 明<sup>1)</sup>, 田中正史<sup>1)</sup>, 宇野澤聡<sup>1)</sup>, 中井俊子<sup>2)</sup>, 平山篤志<sup>2)</sup>Clinical research for related factors in atrial fibrillation  
after cardiac surgeryAkira SEZAI<sup>1)</sup>, Masashi TANAKA<sup>1)</sup>, Satoshi UNOSAWA<sup>1)</sup>,  
Toshiko NAKAI<sup>2)</sup>, Atsushi HIRAYAMA<sup>2)</sup>

## 要旨

心臓手術後心房細動は最も多い合併症で、脳梗塞発生にも強く関係し、生命予後にも影響を及ぼす。単独CABG 1,200例を対象と、患者背景、術前、術中、術後因子と術後心房細動発生について検討した。院内死亡は2.7%、心房細動発生例は22%であった。脳梗塞を1.3%に認め、81.5%に心房細動が発生していた。術後心房細動発生の危険因子は75歳以上、慢性腎臓病、緊急手術、人工心肺時間180分以上、術中carperitide非使用、術中塩酸ランジオール非使用、術前ARB非使用、術後ARB非使用、術後β遮断薬非使用、術後アルドステロン拮抗薬非使用であった。本研究から心臓手術はレニンアンジオテンシン系や交感神経が亢進している状態であり、それらを抑制するためにRAS阻害薬やβ遮断薬が有効であることが新たに証明された。

## 1. はじめに

心臓手術後の心房細動は最も多い合併症であり、その発生率は生命予後にも影響を及ぼす。しかし、その発生は15～85%にも及び未だ解決できない<sup>1)</sup>。また、心房細動の発生は脳梗塞発生にも強く関係するため、術後心房細動の発生に影響を及ぼす因子や予防は重要な点であり、今回、当施設での冠動脈バイパス術症例における術後心房細動の要因、予防法などについて報告する。

## 2. 患者と方法

単独CABG 1,200例を対象とした。年齢は66.1±9.1歳、男性979例、女性221例、緊急は26%、体外循環使用は99%であった。糖尿病49%、高血圧72%、脂質異常症54%、低心機能22%、CKD 51%、透析11%、脳梗塞9%、頸動脈の有意狭窄6%、慢性心房細動2%に認めた。術前、術中、術後因子と脳梗塞発症について検討した。

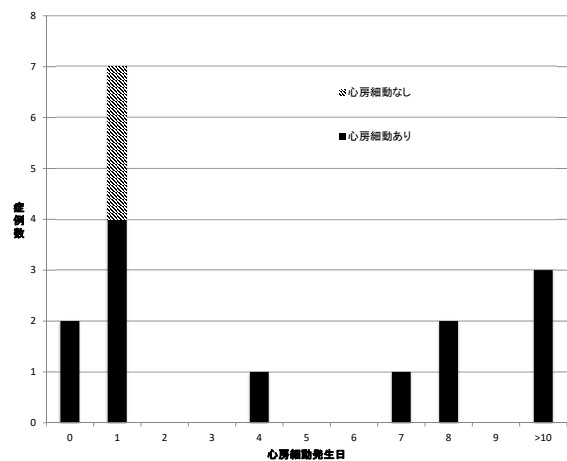


図1 心臓手術後の脳梗塞発生時期と心房細動の有無

結果、院内死亡は32例(2.7%)で、周術期に心房細動を発生した例は264例(22%)であった。脳梗塞を16例(1.3%)に認め、81.5%に心房細動が発生していた(図1)。術後心房細動発生の危険因子は多変量解析において、75歳以上、慢性腎臓病、緊急手

1) 日本大学医学部外科学系心臓血管外科学分野

2) 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野

瀬在 明: asezai.med@gmail.com

術、人工心肺時間180分以上、術中carperitide非使用、術中塩酸ランジオロール非使用、術前ARB非使用、術後ARB非使用、術後 $\beta$ 遮断薬非使用、術後アルドステロン拮抗薬非使用であった。脳梗塞発生の危険因子は70歳以上、大動脈遮断時間90分以上、慢性腎臓病、 $\beta$ 遮断薬非使用であった。

### 3. 考 察

本研究から、術後心房細動の発生には以前からいわれているように高齢者に多いことがわかった。高齢者は線維化が強く<sup>2)</sup>、循環器内科領域において心房細動と線維化の関連はいわれているが、心臓手術においても重要な因子であった。また術後心房細動発生には使用する薬剤が強く関係することが明らかにされた。心臓手術はレニンアンジオテンシン系や交感神経が亢進している状態で、レニンアンジオテンシン系を抑制するためにはcarperitideやARB、アルドステロン拮抗薬などのRAS阻害薬の使用は有効である。交感神経を抑制するためには $\beta$ 遮断薬が有効で、それらを術前、術中から使用す

ることで術後心房細動を予防できることが明らかにされた。また、高齢者は慢性腎臓病を高率に合併しており、術後腎機能の悪化を予防するためにcarperitideの使用は理にかなった方法であることもわかった。術後脳梗塞発生の81.5%に心房細動を合併しており、心房細動を予防することで脳梗塞を予防できると考えられた。

### 4. 結 語

心臓手術後心房細動の発生には高齢者、RAS阻害薬、 $\beta$ 遮断薬が強く影響することが明らかにされた。

### 文 献

- 1) Sezai A, Shiono M. Atrial fibrillation after cardiac surgery. *Circ J* 2013;77:2244-5.
- 2) Sezai A, Hata M, Niino T, Kasamaki Y, Nakai T, Hiramasa A, Minami K. Study of the factors related to atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting : a search for a marker to predict the occurrence of atrial fibrillation before surgical intervention. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:895-900.



# 分子診断技術による貝および下水からの 下痢症ウイルスの検出の研究

Leera Kittigul<sup>1), 2)</sup>, 早川 智<sup>1)</sup>, 牛島廣治<sup>1)</sup>

## Detection of diarrheal viruses in shellfish and sewage samples by molecular diagnostic techniques

Leera KITTIGUL<sup>1), 2)</sup>, Satoshi HAYAKAWA<sup>1)</sup>, Hiroshi USHIJIMA<sup>1)</sup>

### 要旨

2016年6月1日から7月1日まで日本大学医学部病態病理学系微生物学分野において、タイ国で採取された貝および下水から8つの下痢症ウイルスの検出を分子診断技法で行った。即ち26検体(7検体のリサイクル水[下水処理後の水], 9検体のリサイクル水後の残りの沈殿物, 10検体のカキ)に対してRT-PCRで下痢症ウイルスを調査した。全体でノロウイルスが65.4%, ポカウイルスが34.6%, アイチウイルスが11.5%, サボウイルスが7.7%, ロタウイルスが3.8%, エンテロウイルスが3.8%に認められた。ノロウイルス64.5%の中でGIとGIIがともに見出されたのは38.5%, GIIのみは23.1%, GIのみは3.8%であった。カキおよび下水中の下痢症ウイルスの存在から公衆衛生上の処理や監視の重要性が判明した。

### 1. はじめに

地球の温暖化現象によって、東南アジアで見られる感染症が、わが国でも増加している。さらに世界規模で様々な感染症の新規発生や再流行も見られる。タイ国ではウイルス性胃腸炎が感染症の大きな部分を占めている。これまでタイ国の小児を中心としたウイルス性胃腸炎のウイルス学的診断や疫学が報告されているが<sup>1)</sup>、環境中のウイルスを検出しヒトの感染症と比較した研究は少ない。今回、日本大学医学部で研究の機会を得、タイ国での貝や下水中のウイルス検出を行う機会を得たので、研究結果を報告する。

### 2. 対象と方法

タイ国バンコク近隣の1施設(公共の建物)のリサイクル水およびその水の下に残る沈殿物およびタイ国の南海岸で取れたカキを用いた。検体は定期的に採取した。リサイクル水はフィルター膜法、一方、10%に希釈した沈殿液の上清、カキの中腸線

のホモゲネートの10%希釈上清は吸着排出法で濃縮した<sup>2,3)</sup>。

キアゲンRNA抽出法によりウイルス遺伝子を得、その後逆転写酵素を用いウイルスcDNAを作った。尚この方法でDNAウイルスも同時に捕獲することが可能である。あらかじめマヒドン大学の倫理委員会とバイオセーフティー委員会の承認を得たうえで、抽出過程で感染力を喪失させたこれらのcDNAを研究材料として日本大学に輸送し研究を行った。A群ロタウイルス、アデノウイルス、ノロウイルスGI・GII, サボウイルス, エンテロウイルス, アイチウイルス, ヒトボカウイルス, サフォードウイルス遺伝子は我々が既に報告した方法によるRT-PCR法で増幅した。一部の陽性のウイルスはPCR産物を抽出しシーケンスの解析を行った。

### 3. 結果

表1に示すように7検体のリサイクル水からノロウイルス(3検体)が認められた。また9検体の沈

1) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

2) マヒドン大学公衆衛生学部微生物学教室

Leera Kittigul: leera.kit@mahidol.ac.th

表1 リサイクル水, その沈殿物, カキからの分子診断技法による下痢症ウイルスの検出

Type of Sample	Enteric viruses, No. / Total (%)							
	Boca virus	Noro virus	Aichi virus	Sapo virus	Rota virus	Entero virus	Saffold virus	Adeno virus
Recycle water	0	3/7 (42.9)	0	0	0	0	0	0
Sediment	9/9 (100)	9/9 (100)	3/9 (33.3)	2/9 (22.2)	0	0	0	0
Oysters	0	5/10 (50)	0	0	1/10 (10)	1/10 (10)	0	0
<b>Total</b>	<b>9/26 (34.6)</b>	<b>17/26 (65.4)</b>	<b>3/26 (11.5)</b>	<b>2/26 (7.7)</b>	<b>1/26 (3.8)</b>	<b>1/26 (3.8)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

殿物からはヒトボカウイルスとノロウイルスがすべての検体において、一部の検体では同時にアイチウイルス (3検体), サポウイルス (2検体) が見いだされた。しかしロタウイルス, エンテロウイルス, サフォードウイルス, アデノウイルスに由来するシークエンスは見いだせなかった。また10検体のカキからはノロウイルス (5検体), ロタウイルス (1検体) とエンテロウイルス (1検体) が検出された。全体をまとめるとノロウイルスが65.4%, ボカウイルスが34.6%, アイチウイルスが11.5%, サポウイルスが7.7%, ロタウイルスが3.8%, エンテロウイルスが3.8%に認められた。ノロウイルスの中でGIとGIIが見出されたのは38.5%, GIIのみは23.1%, GIのみは3.8%であった。

PCRによりウイルス種を同定した後, PCR産物の遺伝子解析を行った。その結果, 同一検体において複数のウイルスの遺伝子型が検出されることがあった。リサイクル水からはノロウイルスGII.3 (1検体) とGII.4 (1検体), GIで型不明 (2検体) がみられた。沈殿物からはノロウイルスGI.2 (2検体), GI.5 (2検体), GI.9 (2検体), GII.4 (1検体), GII.17 (8検体), サポウイルスGI.2 (2検体), ボカウイルス2A (5検体), 3 (4検体) が見いだされた。10検体のカキからはノロウイルスGI型不明 (1検体), GI.3 (1検体), GII.1 (1検体), GII.4 (1検体), GII.17 (2検体), A群ロタウイルスG2 (1検体), エンテロウイルスA2 (1検体) を検出できた。尚, GII.4はシドニー亜型であった。

#### 4. 考 察

タイ国では使用した生活水の浄化処理施設が十分に備わっておらず, 生活排水がそのまま河川に流れ込むことが多い。一方, 水道による供給やペットボトルで販売される飲料水は貴重なため, リサイクル水を飲用以外に用いることが一般的である。本研究ではリサイクル水およびその時に除かれる沈殿物並びに, プランクトンなどの餌と同時に河川から流入水を吸入するカキの消化管からウイルスが集積する中腸腺において下痢症ウイルスの有無を調べた。リサイクル水からはノロウイルス, 沈殿物からはノロウイルス以外にヒトボカウイルスやアイチウイルス, サポウイルスが高頻度に検出された。またカキからは, ノロウイルス, ロタウイルス, エンテロウイルスが見出された。ヒトボカウイルスはウイルス性下痢症とも関連するが健康人にも見られる。その役割は全く無害な不顕性感染症か, 逆に健康に積極的に役に立っているかは現時点では不明である。ノロウイルスは当時ヒトで流行しているGII.17やGII.4 (シドニー亜型) が見られた。今回の日本大学での研究は, 日本大学の開発した網羅的下痢症ウイルスの検出法<sup>4)</sup>を用いてタイ国での貝や環境物から下痢症ウイルスを検出することを目的とした。その結果, 従来の方法でも検出されたノロウイルス, ロタウイルス以外のウイルスも検出が可能であった。さらに, 帰国してからカキの検体数を増やしたところ日本滞在中に検出されなかった多様なウイルスも見いだされた。本研究の限界として小規模での研究であった点と, ウイルス量の定量がなされていない点がある。今後さらに地域を広げて, また時間経過を追って季節ごとの検体を数多く採取して研究を継続する予定である。本研究はあくまで遺伝子診断で

あり、ウイルスが生きていて宿主で増殖、さらに下痢症を発症可能かどうかは不明である。しかしながら、汚水混入水の飲用やカキの生食でしばしば下痢症を発症することから、これらの環境には発症可能な病原ウイルスが生存している可能性が高い。飲料水の消毒や海産物の加熱の必要性の警鐘を鳴らすという社会的意義のある研究成果と考えている。

## 5. 結語

タイ国での貝、環境物の下痢症ウイルスについて分子診断技法による検出を行った。ノロウイルスが多く認められたが、その他のウイルスも見いだされた。食環境の改善には食物、環境物中の人に経口感染可能なウイルス検査の必要性がある。

## 文献

- 1) Kittigul L, Ushijima H et al. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand. J Med Virol 2009; 81 (2) : 345-353.
- 2) Kittigul L, Ushijima H et al. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. Int J Food Microbiol 2008; 122 (1-2) : 204-210.
- 3) Kittigul L, et al. Detection and genetic characterization of norovirus in environmental water samples in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2012; 43 (2) : 323-332.
- 4) Thongprachum A, Hayakawa S, Ushijima H et al. Four-year study of viruses that cause diarrhea in Japanese pediatric outpatients. J Med Virol. 2015; 87 (7) :1141-1148.

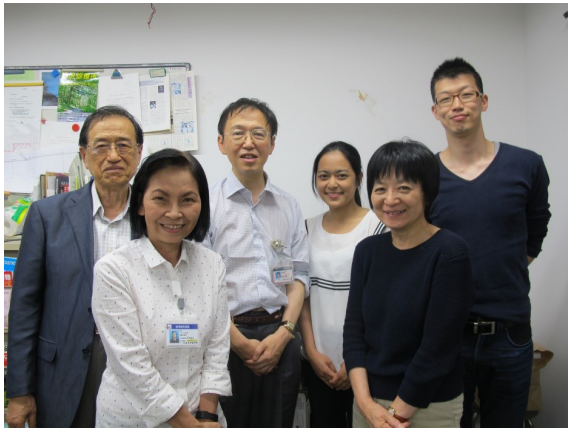


写真1 Leera KITTIGUL (左前)

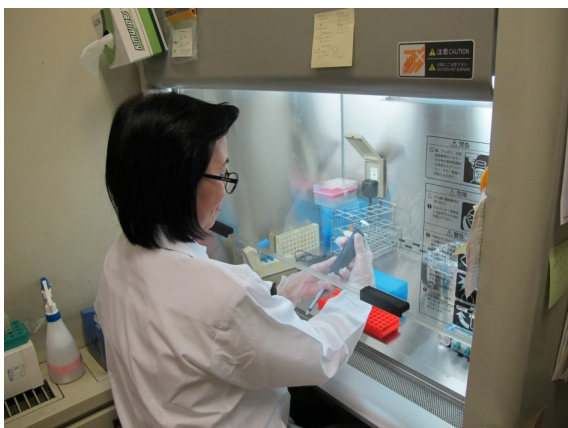


写真2 実験中の Leera KITTIGUL

## ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果

中山潤志<sup>1)</sup>, 風間智彦<sup>2)</sup>, 加野浩一郎<sup>3)</sup>, 徳橋泰明<sup>1)</sup>, 松本太郎<sup>2)</sup>

## Effect of dedifferentiated fat cell transplantation in a rat intervertebral disc degeneration model

Enshi NAKAYAMA<sup>1)</sup>, Tomohiko KAZAMA<sup>2)</sup>, Koichiro KANO<sup>3)</sup>,  
Yasuaki TOKUHASHI<sup>1)</sup>, Taro MATSUMOTO<sup>2)</sup>

## 要旨

腰痛の主原因である椎間板変性症は髄核細胞の不可逆的な変性によって起こる。近年、椎間板変性症に対して間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) などの細胞移植による再生医学的アプローチを用いた研究が行われている。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、ラット尾椎針穿刺による椎間板変性モデルに対し DFAT を椎間板内に投与し、その治療効果を評価した。その結果、DFAT 投与により、椎間板間隙の短縮が有意に抑制され、線維輪組織の一部に髄核様組織の再生が認められた。椎間板変性症に対する 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

椎間板変性症は、日本人に最も多い愁訴である腰痛症の主原因であり、椎間板を構成する髄核細胞の不可逆的な変性によって起こる。椎間板変性症に対する治療法として、鎮痛剤投与などの保存療法や、椎体間固定術などの手術療法が行われているが、現時点では根本的な治療方法はない。近年、椎間板再生を目指す再生医学的アプローチとして、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) を変性椎間板に移植する研究が行われ、その有効性がメタ解析<sup>1)</sup>等にて報告されている。一方、MSC はその採取に伴い比較的侵襲性の高い手技が必要であることや、ドナー年齢や基礎疾患に影響され必要細胞数が調製できない症例が存在するといった問題点が指摘されている。Matsumoto ら<sup>2)</sup> は、皮下脂肪組織から単離した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、ラット尾椎針穿刺による椎間板変性モデルに対し DFAT を椎間板内に投与し、その治療効果を評価した。

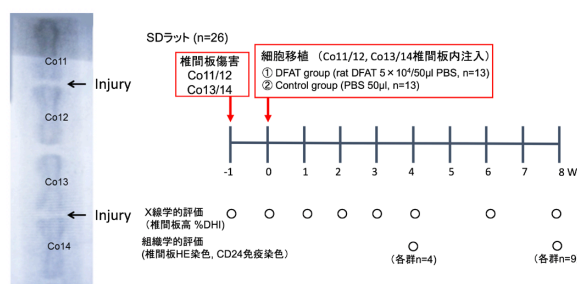


図1 実験プロトコール

## 2. 方法

尾椎針穿刺によるラット椎間板変性症モデルは、Issy らの既報<sup>3)</sup>を一部改変して作成した。雄性 SD ラットに対して、全身麻酔下に尾椎椎間板 Co11/

1) 日本大学医学部整形外科系整形外科学分野  
2) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野  
3) 日本大学生物資源科学部応用生物科学科  
松本太郎 : matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

Co12 及び Co13/Co14 を 21G 針にて、5 回 x 6 方向 穿刺を行い、椎間板傷害を作製した。傷害作製 7 日 後に傷害椎間板にラット DFAT ( $5 \times 10^4$  /頭、DFAT 群、n=13) または PBS (Control 群、n=13) を移植し た。移植後、経時的に X線撮影を行い、椎間板高の 変化 (% DHI) を算出し、両群を比較した。また移植 4、8 週間後に尾椎の切片標本を作製し、HE 染色お よび髓核細胞マーカー CD24 に対する免疫染色にて 組織学的評価を行った。また移植した DFAT の局在 や髓核細胞への分化の有無を検討するため、椎間板 穿刺 1 週間後に GFP ラベルした DFAT ( $5 \times 10^4$  / 頭) を傷害椎間板内に注射した。移植 4、8 週後に、 尾椎切片標本を作成し、抗 GFP 抗体及び抗 CD24 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。

### 3. 結果

尾椎穿刺による椎間板変性モデルラットに対する DFAT 移植の効果を検討した結果、X 線学的評価で は、DFAT 群は Control 群に比べ、Co11/Co12 では 移植 2 週間後より、Co13/Co14 では移植 3 週間後 より % DHI が有意に高値となり、この差は移植 8 週間後まで認められた。組織学的評価では、移植 4 週間後の Co11/Co12、Co13/Co14 において、両群 とも髓核構造は消失し、結合組織に置換されている 所見が認められた。DFAT 群の一部 (9 検体中 5 検 体) では、椎間板辺縁に不定形の腔胞をもつ髓核様 細胞塊が認められ、この組織の構成細胞は、髓核細 胞マーカー CD24 陽性を示した。一方、Control 群で はこのような所見は認められなかった。次に GFP

標識 DFAT を傷害椎間板に移植し、GFP と CD24 に 対する蛍光免疫染色を行った。その結果、移植 4 週 後および 8 週後の検体において、椎間板辺縁に出 現した髓核様組織には、CD24、GFP 二重陽性を示 す細胞が多数認められた。以上の結果より、DFAT 移植により椎間板間隙の狭小化が改善し、また移植 した DFAT が直接髓核様細胞に分化していることが 明らかになった。

### 4. 考 察

本研究では、DFAT を傷害椎間板に局所注入する と椎間板変性が抑制できる可能性が示された。既報 では髓核細胞や骨髄 MSC の椎間板再生効果は硫酸 化グリコサミノグリカンや II 型コラーゲンの産生増 加に起因することが示されている<sup>4), 5)</sup>。本研究の組 織学的検討結果から DFAT の椎間板変性抑制作用に 関しても同様の機序が考えられる。今後、再生椎間 板組織のプロテオグリカンや細胞外マトリックスの 定量評価を行い、作用機序の検証が必要である。

DFAT は、①組織採取に伴う侵襲性が低く高齢者 からも調製可能であること、②単離された成熟脂肪 細胞から調製される細胞であるため初代培養から高 純度の細胞が得られること、③少量の脂肪組織から 低侵襲性に大量調製できること、等の利点があるこ とから、椎間板変性症患者の大部分を占める高齢者 でも自家移植を可能とする治療用細胞として期待で きる。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。

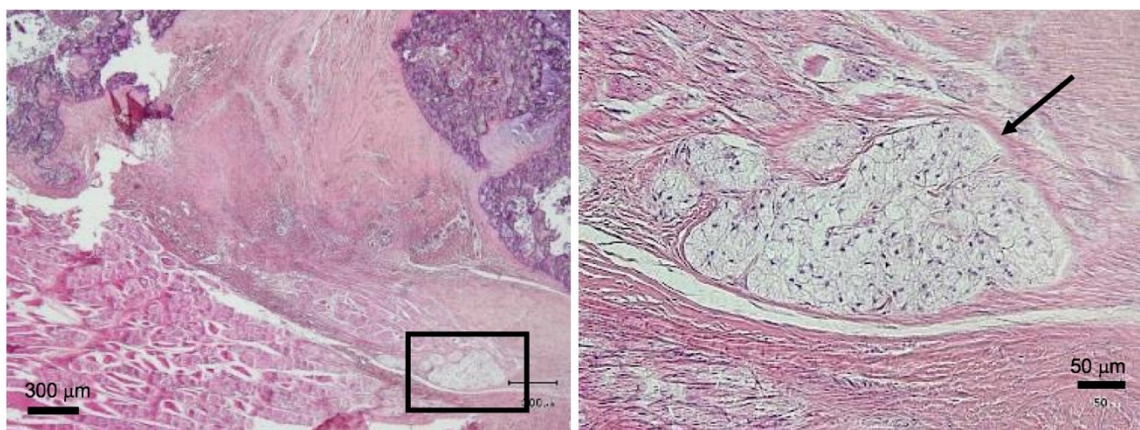


図 2 DFAT 移植群の傷害椎間板組織に認められた異所性髓核様組織

## 5. 結 語

椎間板穿刺によるラット椎間板変性症モデルの傷害椎間板にDFATを局所注射することにより、椎間板間隙の狭小化抑制が認められ、移植したDFATの一部は髄核細胞へ分化している所見が認められた。椎間板変性症に対するDFATを用いた細胞治療の可能性が示された。

## 文 献

- 1) Wang Z, Perez-Terzic CM, Smith J, et al. Efficacy of intervertebral disc regeneration with stem cells - a systematic review and meta-analysis of animal controlled trials. *Gene* 2015; 564 : 1-8.
- 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) Issy AC, Castania V, Castania M, et al. Experimental model of intervertebral disc degeneration by needle puncture in Wister rats. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46 : 235-244.
- 4) Sakai D, Mochida J, Iwashita T, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model : potential and limitation for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine* 2005; 30 : 2379-2387.
- 5) Feng G, Zhao X, Liu H, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in a degenerative disc model in rabbits : a comparison of 2 cell types as potential candidates for disc regeneration. *J Neurosurg Spine* 2011; 14 : 322-329.

## 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>, 三嶋信太郎<sup>1)</sup>, 高橋恭子<sup>2)</sup>, 浅野正岳<sup>3)</sup>,  
李賢鎬<sup>1)</sup>, 齋藤修<sup>1)</sup>, 松本健治<sup>4)</sup>, 村上誠<sup>5)</sup>, 伊東真奈<sup>1)</sup>, 伊崎聡志<sup>1)</sup>, 西盛信幸<sup>1)</sup>,  
遠藤嵩大<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>, 都築広<sup>1)</sup>,  
長澤洋介<sup>1)</sup>, 岩田光浩<sup>1)</sup>, 入山規良<sup>1)</sup>, 北村登<sup>1)</sup>, 丸岡秀一郎<sup>1)</sup>, 八田善弘<sup>1)</sup>, 武井正美<sup>1)</sup>,  
徳橋泰明<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 KANEGAE<sup>1)</sup>, Shintaro MISHIMA<sup>1)</sup>,  
Kyoko TAKAHASHI<sup>2)</sup>, Masatake ASANO<sup>3)</sup>, Kenko Li<sup>1)</sup>, Shu SAITO<sup>1)</sup>, Kenji MATSUMOTO<sup>4)</sup>,  
Makoto MURAKAMI<sup>5)</sup>, Mana ITOU<sup>1)</sup>, Satoshi IZAKI<sup>1)</sup>, Nobuyuki NISHIMORI<sup>1)</sup>,  
Takahiro ENDO<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>, Hiroshi TSUDUKI<sup>1)</sup>, Yosuke NAGASAWA<sup>1)</sup>,  
Mitsuhiro IWATA<sup>1)</sup>, Noriyoshi IRIYAMA<sup>1)</sup>, Noboru KITAMURA<sup>1)</sup>, Shuichiro MARUOKA<sup>1)</sup>,  
Yoshihiro HATTA<sup>1)</sup>, Masami TAKEI<sup>1)</sup>, Yasuaki TOKUHASHI<sup>1)</sup>, Yasuhiro GON<sup>1)</sup>, Tadashi TERUI<sup>1)</sup>

## 要旨

## 1. 整形外科分野

関節リウマチ (RA) のマスト細胞が免疫複合体の刺激によって過剰な PGD2 を産生することにより, RA の炎症を制御している可能性が示唆された。

## 2. 皮膚科分野

慢性特発性じん麻疹におけるシクロスポリンの治療反応性のバイオマーカーとして自己血清皮内テスト (ASST) が陽性であること, 血清 IgE 値が低値であることが示唆された。

## 3. 血液膠原病内科分野

Dsatinib は NK 細胞の JAK-STAT 経路を活性化し perforin 発現を更新させる。  
HLA-DR-0405 (+) NOG マウスの EBV 感染びらん性関節炎発症を試みた。

## 4. 呼吸器内科分野

気道上皮バリア形成初期におけるウイルス感染が上皮バリアの脆弱化を惹起することを証明した。また, 特発性肺線維症の新規バイオマーカーとして抗 UBE2T 抗体を同定した。

## I. 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

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) 独立行政法人国立成育医療研究センター  
5) 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター  
岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp  
照井正: terui.tadashi@nihon-u.ac.jp

必須である。本事業は、免疫・アレルギー疾患を扱う4つの臨床各科のベットの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。

## II. 整形外科領域

### 関節リウマチにおける滑膜マスト細胞の特徴

#### 1. 背景

凝集IgGがFcεRIとFcγRIIを介してヒト滑膜マスト細胞を活性化しTNF-αを産生すること、さらに凝集IgG刺激による滑膜マスト細胞からのTNF-αの産生はIL-33によって相乗的に増加すること、凝集IgG刺激によって滑膜マスト細胞から産生されるsubstance Pは同時に分泌されるchymaseによって分解され炎症の抑制にもマスト細胞は働いていること、滑膜マスト細胞は関節リウマチ(RA)の滑膜組織でIL-17Aの主要な産生細胞ではないことを報告してきた。しかしながら、RAにおける滑膜マスト細胞の特徴は未だに明らかにされていない。

#### 2. 目的

RAの炎症の場におけるマスト細胞のフェノタイプの解析を行い、疾患特異的な分子の発現を解析する目的にてRAの病態に関連する分子を同定し、その分子の発現や活性化を制御する機序の解明を行った。

#### 3. 対象及び方法

**細胞：**ヒト滑膜マスト細胞は、RAおよび変形性関節症(OA)の滑膜組織から分離培養した。できるだけ新鮮な滑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、滑膜組織を酵素で細胞を分散後培養し、プレートに接着した線維芽細胞を採取した。

**マスト細胞の精製：**滑膜組織から酵素的に分散してマスト細胞の精製は以下の抗体を用いて細胞を染色した後FACS Aria IIu (BD Biosciences) を用いて行った。Alexa 647標識抗FcεRIαモノクローナル抗体(クローンCRA1, eBioscience, San Diego, CA)およびPE標識抗Kitモノクローナル抗体(クローンYB5.B8, BD Biosciences, San Jose, CA)である。

**RT-PCR：**マスト細胞の総RNAはRNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて抽出し精製した。500 μg/mL oligo (dT12-18) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 5 x first strand buffer (Invitrogen), 0.1 M DTT (Invitrogen), SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) およびRNase OUT (Invitrogen) を用いてcDNAに逆転写を行った。PTGS1, PTGS2, LTC4S, TBXAS1, HPGDS, miR-199a-3p, RNU48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。

**DNA chip解析：**OAマスト細胞とRAマスト細胞の発現遺伝子をDNA chipを用いて網羅的解析を行った。OAマスト細胞とRAマスト細胞からRNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いてtotal RNAを抽出し、前述の方法でcDNAに逆転写した。逆転写したcDNAとbiotin標識されたヌクレオチド三リン酸を用いて、ビオチン化相補的RNA (Biotin-cRNA) を合成した。Biotin-cRNAとHuman Genome U133 (Affymetrix) を45°Cで16時間反応させ、ハイブリダイゼーションした。その後、streptavidin-phycoerythrin (PE) と反応させ、Hewlett-Packard Gene Array Scanner (Palo Alto, CA, USA) を用いて蛍光強度を読み取った。各プローブの蛍光強度は、GeneChip Analysis Suite 5.0 (Affymetrix) で数値化した。数値化したデータをGenespring software (Agilent Technologies) を用いて解析し、RAマスト細胞における発現量がOAマスト細胞と比較して高かった遺伝子群を抽出



した。

**miRNAの網羅的発現解析：**OAおよびRAマスト細胞（それぞれ3ドナー）からmiRNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてmiRNAを抽出した。抽出したmiRNA(100 ng)に、miRNA Spile-In solution (Agilent Technologies [Santa Clara, CA, USA]), CIP Master Mixを添加し、37°Cで30分間反応させ脱リン酸化させた。その後、DMSOを添加し、100°Cで10分間反応させ氷上で冷却し反応を停止させた。脱リン酸化処理したmiRNA溶液にCy3を含んだLigation Master Mix (Agilent Technologies) を添加し16°Cで2時間反応させた。Cy3でラベルしたmiRNAを精製しmiRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies) と55°Cで20時間反応させハイブリダイゼーションさせた。その後miRNAを抽出した。miRNAの網羅的発現解析はヒトmiRNA Micro assay kit Release16.0 (Agilent Technologies [Santa Clara, CA, USA]) を用いて行った。

**マスト細胞の活性化：**IgE感作したマスト細胞を0.1, 1.0, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ モノクローナル抗体（クローンCRA1, eBioscience, San Diego, CA）あるいはカルシウムイオノフォアA23187 (10-6M) で30分間刺激した。Fc $\gamma$ RIの架橋は、マスト細胞を1, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ヒトFc $\epsilon$ RI抗体のF(ab')<sub>2</sub> fragments (F(ab')<sub>2</sub> $\alpha$ Fc $\gamma$ RI, clone 10.1) で30分間刺激した。コントロールとしてマウスIgG1のF(ab')<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1度洗浄後Fc $\gamma$ RIの架橋のため抗マウスIgG F(ab')<sub>2</sub> fragmentsのヤギF(ab')<sub>2</sub> fragments (gF(ab')<sub>2</sub> $\alpha$ mF(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。

**OAマスト細胞とRA線維芽細胞との共培養：**OAマスト細胞とRA線維芽細胞をcollagen coatingの24穴プレートを用いてマスト細胞培地で96時間共培養した。まずRA線維芽細胞をプレートに線維芽細胞培地とともに加え、48時間インキュベートしコンフルエントにした。その後培地をマスト細胞培地に置き換え、一穴につき3 $\times$ 105個ずつOAマスト細胞を加えた。96時間後マスト細胞のみ単離した。RA線維芽細胞は底面に張り付くため弱クピペティングするとOAマスト細胞のみ単離可能であった。

**脱顆粒, PGD<sub>2</sub>産生：**ヒスタミン遊離とPGD<sub>2</sub>産生は酵素免疫法を用いた。

**統計解析：**OAとRAの2群間の検定においては正規分布に従っていない分布の中心分布の差を検定するため、Mann-WhitneyのU検定を用いた。miR-199a-3pとPTGS2の発現量の相関はSpearmanの順位相関係数を用いて相関の強さを検定した。解析には、GraphPad Prism 6 (MDF, Tokyo, Japan) を用いた。p < 0.05を統計学的に有意差があるとした。

#### 4. 結果

DNA chipの結果、prostaglandin synthase 1 (PTGS1), prostaglandin synthase2 (PTGS2), thromboxane synthase 1 (TBXAS1), leukotriene C4 synthase (LTC4S) mRNAの発現量はOAマスト細胞と比較してRAマスト細胞の方が有意に高かった。

また、IgE依存性刺激においてPGD<sub>2</sub>産生量はRA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マスト細胞で有意に高かった。IgG依存性刺激においてPGD<sub>2</sub>産生量はRAマスト細胞のほうが有意に高かった。したがって、OAおよびRA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。RA線維芽細胞においてPTGS1, PTGS2, TBXAS1, LTC4S mRNAの発現量はOA線維芽細胞と同程度であった。OAマスト細胞をRA線維芽細胞と共培養してもPTGS1, PTGS2, TBXAS1, 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miRNA chipの結果、OAマスト細胞の方が、RA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miR199a-3pであった。miR-199a-3pとPTGS2の発現量の相関を調べたところOAマスト細胞では相関がなかったが、RAマスト細胞では負の相関がみられた。関節液中のPGD<sub>2</sub>量は、RA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。

#### 5. 結論

PGD<sub>2</sub>は各種炎症モデルで炎症の抑制効果を持つことが示唆されており、この報告と本研究の結果から、RA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の炎症を制御している可能性が示唆された。

### Ⅲ. 皮膚科領域

#### 慢性特発性蕁麻疹 (CSU) 患者のシクロスポリンの 治療効果の検討

##### 1. 背景

CSUとは、特定の誘発因子がなく、6週間以上の掻痒と膨疹の消褪を繰り返す皮膚疾患である。とされている。自己血清を皮内に注射するASSTは患者の一部で陽性となることから、血清中に誘発因子が存在すると考えられている。この原因として高親和性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) の関与が推測されているが、ASSTとこれら自己抗体の関係は不明である。抗ヒスタミン薬の治療に抵抗性である重症なCSU患者においてオマリズマブやシクロスポリンが投与される。オマリズマブの治療反応性のバイオマーカーとして血清IgEが高値であることや末梢血好塩基球のFcεRI発現高いことが報告されている。しかし、シクロスポリンの治療反応性のバイオマーカーは報告されていない。

##### 2. 対象および方法

###### (1) プロトコール

抗ヒスタミン薬の2倍量の加療にて効果不十分のCSU患者34名 (女性20人, 男性14人) を対象とした。シクロスポリンは3 mg/kg/dayで4週間の投与を行った。治療前後の蕁麻疹の重症度はUAS7を用いて評価した。治療後のUAS7が6以下を効果ありとした。ASSTの陽性群と陰性群の間の罹病期間, 血清IgE値, 末梢血好塩基球数, 抗核抗体陽性率, 抗サイログロブリン抗体陽性率, 抗マイクログローム抗体陽性率, 抗FcεRIα鎖自己抗体および抗IgE抗体自己濃度を比較した。

###### (2) 重症度 (Urticaria Activity Score 7; UAS7)

UAS7とは患者の痒みの程度と (0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe) 膨疹の数 (0 = none, 1 = 1~20, 2 = 21~50, 3 = 50以上) によるスコアを1日ごとに合計し (スコア: 0~6), さらにそのスコアを1週間分合計したものである (スコア: 0~42)。

###### (3) 自己血清皮内テスト (ASST)

静脈血を採取し15分静置した後, 3000 rpmで15分遠心分離し血清を回収した。1mLシリンジと27G針を用い, 血清50 μLを前腕屈側に皮内注射した。陰性コントロールとして血清注射部位から3~5 cm離れた部位に生理食塩水を50 μL皮内注射した。30

分後に判定し, 膨疹の直径が陰性コントロールより1.5 mm以上あるものを陽性とした。

###### (4) 抗IgE自己抗体濃度の測定

Ab-Rapid SPiN EXを用いて, 患者の血清からIgG分画を精製した。maxisorp plateに1 μg/mLのヒトIgE, myelomaを100 μL添加し, 4°Cで一晩静置して固相化した。洗浄液 (Tween 20を0.1%になるように加えたTBS) でプレートを4回洗浄した。非特異的な結合を防ぐため, 100 μLのブロッキング液 (FBSをPBSに溶解し10% FBSとした) を加え, 室温で1時間ブロッキングした。洗浄液でプレートを4回洗浄した。PBSで10倍に希釈した精製IgG分画を100 μL加え, 室温で2時間静置した。洗浄液でプレートを4回洗浄し, PBSで1万倍に希釈したhorseradish peroxidase (HRP) 標識マウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体を100 μL加え, 室温で1時間反応させた。洗浄液でプレートを4回洗浄した後, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) microwell peroxidase substrate systemを用い発色させた。2N H2SO4で反応を停止させ, Multiskan Go microplate spectrometerを用いて, 450 nmの吸光度を測定した。また定量的に行うために, ヒトIgGを倍々希釈し, HRP標識マウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体で検出された吸光度をもとに検量曲線作成し, 基準となる精製IgGに含まれる抗IgE抗体濃度をELISAで測定した。プレート間の補正のため, この基準となる精製IgGの抗IgE抗体で毎回検量線を作成し, 検体の精製IgGに含まれる抗IgE抗体濃度を算出した。

###### (5) 抗FcεRIα鎖自己抗体濃度測定

過去の報告の方法 (Pachlopnik JM et al. 2004. 22. 43-51) に従い精製IgGに含まれる抗FcεRIα鎖自己抗体濃度を測定した。Maxisorp platesに1 μg/mLのリコンビナント可溶性α鎖を100 μL加え, 4°Cで一晩静置し固相化した。固相化以降は, 抗IgE自己抗体濃度測定と同様の方法を用いた。検量曲線はヒト化抗FcεRIα抗体 (clone CRA2) を用いて作成した。

###### (6) 統計解析

統計学的解析は, GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan) を使用した。2群間の連続変数はMann-Whitney U test, 非連続変数は2-sided Fisher's exact testを行った。p値は, 0.05未満の場合, 統計学的に有意な差があると判断した。

### 3. 結果

シクロスポリン投与によってASST陽性群のUAS7  $\leq 6$ を達成率は、ASST陰性群よりも有意に高値であった ( $p = 0.0048$ )。ASSTの陽性群と陰性群では臨床的背景において有意差はみられず、また抗FcεRIα鎖自己抗体濃度および抗IgE自己抗体濃度も有意な差はみられなかった。ASST陽性群および陰性群においては、血清IgE値に有意差はみられなかったが、治療後のUAS7  $\leq 6$ 群では治療後のUAS7  $> 6$ 群と比較し、血清IgEが有意に低値であった ( $p = 0.0003$ )。ROC曲線から得られた最適なカットオフ値は88.5 IU/mLであり、その感度は81.0%、特異度は69.2%であった。

### 4. 考察

ASST陰性群よりもASST陽性群ではシクロスポリンは有効であることから、ASSTは治療を選択するバイオマーカーになると考えられる。また血清IgE値が88.5 IU/mL以下であることはシクロスポリンに反応性があるといえるASSTと血清IgE値の間に有意な関係はなかったことから独立したパラメーターであることが考えられた。今後この作用機序について検討を行う。

## IV. 血液膠原病内科領域

### ① Dasatinib 治療例におけるNK細胞のperforin発現の解析

#### 1. 背景と目的

Dasatinibは慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) など治療に用いられる tyrosine kinase inhibitor (TKI) である。Dasatinibが腫瘍免疫を増強させる機序を明らかにする。

#### 2. 方法

NK細胞内のリン酸化シグナル解析にはFACSのphospho-flow法を用いて行った。末梢血単核のCD3-CD56+分画をNK細胞と定義し、細胞内染色によりpJAK1, pJAK2, pSTAT1, pSTAT3およびperforinの発現強度を測定した。血清IFN- $\gamma$ とIL-2濃度はELISA法で測定した。

#### 3. 結果

40例のTKI治療中のCML患者 (dasatinib治療例23例, imatinib治療例11例, nilotinib治療例6例)を解析した。また、9例の無治療寛解期 (treatment free remission, TFR) CML患者の検体をcontrol検体

として用いた。

Dasatinib治療例のNK細胞のperforin発現は他のTKI治療例やTFR例よりも高値であった。Perforinの発現強度はpSTAT1, pSTAT3発現強度と有意に相関した。IFN- $\gamma$ はTKI治療例がTFR例よりも高値であった。IL-2はdasatinib治療例とTFR例は同等であったが、imatinib治療例とnilotinib例では低値であった。

### 4. 考察

Dasatinib治療例のNK細胞ではperforin発現が高く抗腫瘍活性が高まると考えられた。DasatinibはIL-2の抑制を伴わずFN- $\gamma$ の発現を増強し、NK細胞のJAK-STAT経路を活性化していると考えられた。

## ② Epstein-Barrウイルスと関節リウマチ

### 1. 背景

前回 (岡山吉道, 他. 日本大学医学部総合医学研究所紀要. 2017. 5. 49-53) ヒト化NOG (hu-NOG) マウスにEpstein-Barrウイルス (EBV) を感染させ、ヒト破骨細胞が関与する関節リウマチ (RA) 類似びらん性関節炎を発症するモデルの作製し、ヒトのreceptor activator nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) を産生することも証明した。本年はNOG-HLA-DR-0405Tg, I-AbのノックアウトマウスにHLA-DR-0405ヒト臍帯血を移植しヒト免疫化し、EBVを感染させ、遺伝的因子の特徴を再現したRAマウスモデルを確立し、びらん性関節炎発症とEBVとの関連性を検討した。

### 2. 方法

過去と同様の方法 (岡山吉道, 他. 日本大学医学部総合医学研究所紀要. 2017. 5. 49-53) でHLA-DR-0405ヒト化マウスを作製し、EBVを感染させた後、8~10週で解剖し、びらん性関節炎発症の程度やEBVの関与について検討した。

### 3. 結果

NOG-HLA-DR-0405Tg,I-AbのノックアウトマウスにHLA-DR-0405を保有するヒト臍帯血をCD34のpositive selectionかけて移植を試みたが、細胞数少なく生着不全を起こしたため、全血で移植したところ、急性GVHD類似の現象を確認した。いずれもEBVを感染させたが、びらん性関節炎は見られなかった。

### 4. 考察

今回はCD34の細胞数が少なく、生着不全を起こ

したが、今後移植細胞数を増やして移植後、EBVを感染させれば、よりRA類似の環境でびらん性関節炎を発症させる事が出来ると思われる。

## 5. 結語

HLA-DR-0405ヒト化マウスの作製を試みたが、生着不全を来し、EBV感染によるびらん性関節炎は証明出来なかった。今後CD34の細胞数の調整により、生着不全が改善される事で、EBV感染によるRA類似のびらん性関節炎が証明される事と思われる。

## V. 呼吸器内科領域

### 難治性炎症性呼吸器疾患の病態解明

#### 1. 背景

我々はこれまで難治性炎症性呼吸器疾患における気道上皮のバリア機能や免疫応答を中心に分子病態を解明してきた。今回着目したのは、気管支喘息(以下、喘息)の病態解明へのアプローチとして気道上皮前駆細胞である基底細胞による上皮バリア形成と、特発性肺線維症(IPF: idiopathic pulmonary fibrosis)の病態解明へのアプローチとして血中自己抗体である。これらの観点から本研究では、喘息病態形成につながる気道上皮バリアの脆弱化機序の解明と、IPFの新規バイオマーカーを同定し、臨床的意義を検証することを目的とした。そのために細胞レベルでは、初代ヒト気管支上皮細胞(NHBE)および気道基底細胞株VA10を用いて、ウイルス感染を模倣するdsRNA刺激による上皮バリア形成に及ぼす影響について検討した。また、患者レベルでは、IPFに特異的な新規血中自己抗体の探索を行い、バイオマーカーとしての有用性について検討した。

#### 2. 対象及び方法

NHBE, VA10はTranswell上で3日間培養液中で培養した後、気道上皮細胞への分化を誘導する培養系Air Liquid Interface (ALI)を用いて培養した。上皮バリア機能はTrans Electric Resistance (TER)を用いて経時的に測定した。NHBEに基底細胞が存在することを確認するために基底細胞マーカーであるCK5, CK14, p63の免疫染色を行なった。ALI前3日間のみdsRNAで刺激し、その後、dsRNA非存在下のALIでTERを測定した。

ヒトタンパク質マイクロアレイを用いて、IPF及び健常者の血清中に存在する9000種類の蛋白に対する自己抗体を探索し、患者群で抗ubiquitin enzyme

2T (UBE2T)抗体が有意に高いことを同定した。血清抗UBE2T抗体のEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)による測定系を確立し、健常者65例、IPF40例、またIPFの類似疾患である線維化性非特異性間質性肺炎22例、過敏性肺炎16例、サルコイドーシス16例、器質化肺炎1例の抗UBE2T抗体濃度を測定した。IPF肺組織におけるUBE2T発現を免疫組織染色で検討した。

#### 3. 結果

NHBEに基底細胞が存在することを確認した。dsRNA刺激群はコントロール群と比較してALI培養下のNHBEのTER減弱を認めた。VA10においても同様の結果が得られた。

血中抗UBE2T抗体の平均値(ELISA法)はIPF群が有意に高値であった。IPF肺組織におけるUBE2Tは、肺胞上皮細胞で高い発現が認められた。また、少数例での検討において、抗UBE2T抗体はIPFにおける呼吸器症状の出現や治療反応性と関連している可能性が示唆された。

#### 4. 考察

dsRNAは気道上皮分化誘導前の基底細胞に作用し、気道上皮バリア形成を減弱させると考えられた。基底細胞へのウイルス感染が、その後の上皮バリア形成を減弱させ、喘息病態形成に関与する可能性が示唆された。

IPF患者血清中で抗UBE2T抗体が特異的に上昇していることを発見した。血清中抗UBE2T抗体はIPFの診断・病勢のバイオマーカーとして有用である可能性がある。

#### 5. 結語

難治性呼吸器疾患の病態解明を気道上皮バリア機能、患者検体における自己抗体の側面から解析し、ウイルス感染による気道上皮バリアの脆弱化機構の存在および特発性肺線維症に特異的な新規血中自己抗体を同定することができた。今後は、気道上皮バリア形成初期へのウイルス感染が、どのような細胞内シグナル伝達経路を介しているのかを検証し、診断、治療につながりうる標的分子の探索を行う予定である。また、本研究で同定した抗UBE2T抗体のIPFにおける臨床的意義、UBE2Tとその自己抗体の線維化過程における役割を、肺胞上皮細胞を用いて検討する予定である。

# 日本大学における動物実験委員会の概要について

谷口由樹<sup>1)</sup>, 藤田順一<sup>1)</sup>, 原 弘之<sup>2)</sup>, 石井敬基<sup>3)</sup>

## Outline of the animal care and use committee at Nihon University

Yoshiki TANIGUCHI<sup>1)</sup>, Junichi FUJITA<sup>1)</sup>, Hiroyuki HARA<sup>2)</sup>, Yukimoto ISHII<sup>3)</sup>

### 1. 緒言

日本大学の動物実験は、「日本大学動物実験運営内規」により定められたルールに則り実施している。この内規は、「動物の愛護及び管理に関する法律」, 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省), 「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省) 及び「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議) に基づき, 科学的観点のもとより動物愛護及び環境保全の観点に加え, 動物実験等を行う教職員・学生等の安全確保の観点から, 本学における動物実験等を適正に実施するための必要事項を定めている。

また, 本内規第2条第2項には, 「動物実験等を行う際の原則である代替法の利用, 実験動物の使用数の削減及び苦痛軽減を考慮し, 適正に行わなければならない。」と記載されており, いわゆる3Rの原則である Replacement (動物実験の他手段への置換): 科学上の利用の目的を達することができる範囲において, できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること, Reduction (使用動物数の削減): 科学上の利用の目的を達することができる範囲において, できる限りその利用に供される動物の数を少なくすること, Refinement (麻酔, 鎮痛薬の使用や実験技術・精度の向上による苦痛の軽減): 利用に必要な限度において, できる限り動物に苦痛

を与えない方法によって行うこと<sup>1)</sup>, に則り実施することを規定している。

日本大学では, 動物実験の最終責任者である学長の諮問機関として日本大学本部に動物実験委員会を設置, 学長は一部審議の権限を各学部長に委任し, その諮問機関として各学部に動物実験委員会を設置し, 本学の適正な動物実験の遂行に努めている。

### 2. 日本大学における動物実験の実施体制

動物実験を実施するためには, 動物実験責任者が動物実験計画書を作成し, 動物実験委員会による審議を経て, 機関長である学長の承認を得なければならない。しかしながら本学は, 16学部の内8学部が動物実験を実施するため, 1つの委員会ですべての動物実験計画を審議することは物理的にも困難な状況である。そのため, 学長の権限の一部を各学部の長に委任し, 学部の長の諮問機関である動物実験委員会(以下学部委員会)を各学部に設置している。申請のあった動物実験計画書の適否を, 学部委員会において審議し, 学部の長がこれを承認することになる。

具体的には図1のように, 学長の諮問機関として, 日本大学動物実験委員会(以下本部委員会)が設置されている。学長は, 動物実験計画及び施設の承認等について一部権限を各学部の長に委任している。動物実験責任者からの申請を学部委員会が審議し,

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) 日本大学医学部機能形態学系 生体構造医学分野

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

学部長が承認の可否を行い、承認された動物実験の実施が可能となる。

その後、各学部で承認された動物実験計画及び施設等は、毎月開催される本部委員会で報告され確認

を受ける。本部委員会から出された意見は、各学部にフィードバックされる仕組みとなっており、各学部委員会における審査基準の標準化が図られるとともに、全ての実験施設及び実験計画は、本部委員会

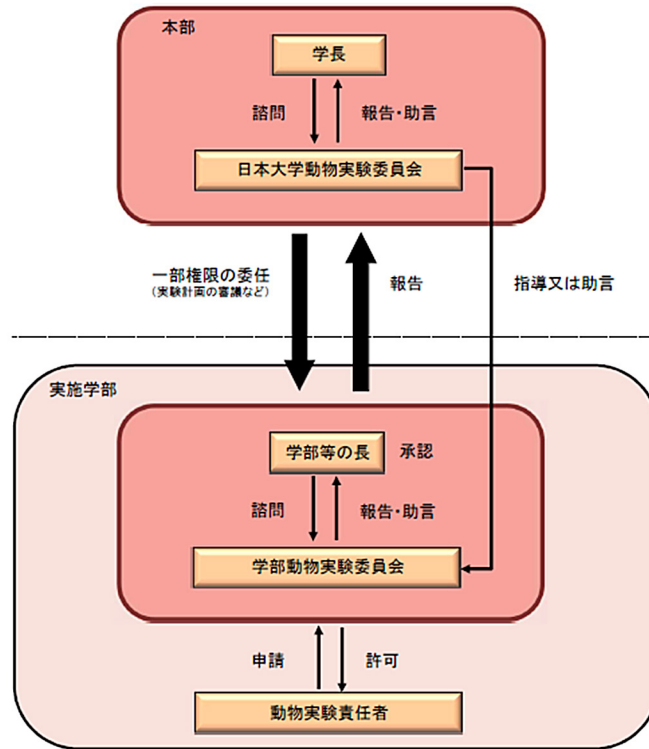


図1 日本大学における動物実験の実施体制

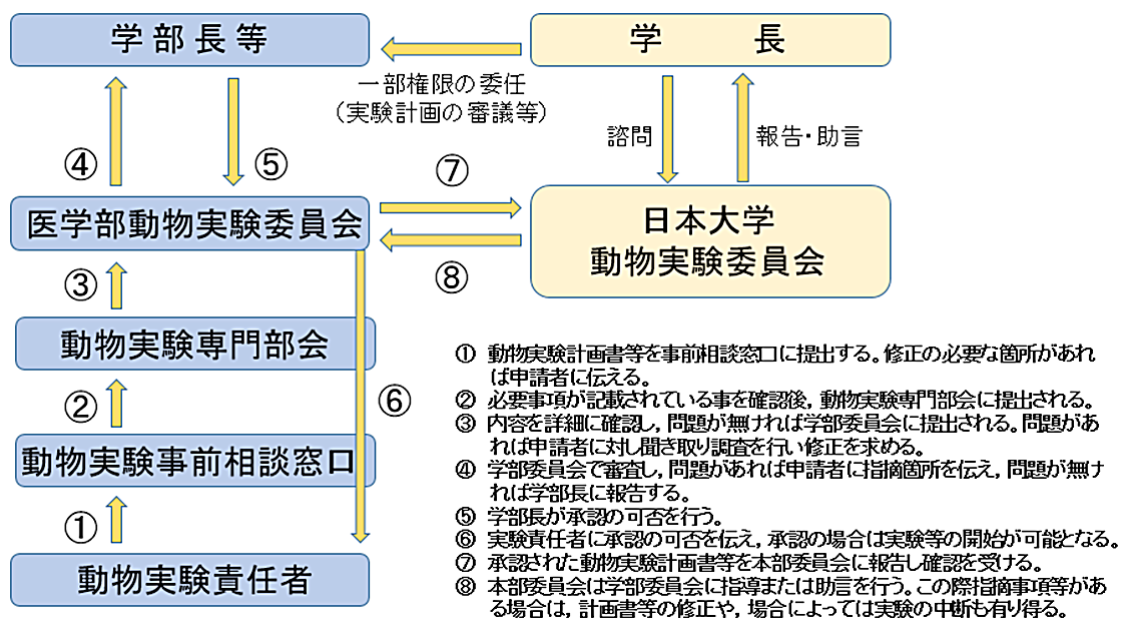


図2 医学部における審査の流れ

表1 日本大学における動物実験委員会の委員構成

日本大学動物実験運営内規 第8条第1項	第1号委員	第2号委員	第3号委員	合計
日本大学動物実験委員会	10名	7名	3名	20名
各学部動物実験委員会	57名	17名	35名	109名

- ① 動物実験等に関して優れた見識および経験を有する者
- ② 実験動物に関して優れた見識を有する者
- ③ その他学識経験を有する者のうち、学長が適当と認める者

表2 飼養保管施設設置要件の主たる判断基準（抜粋）

- ① 実験動物が逸走しない構造とし、実験動物が室内で逸走しても捕獲しやすい環境が維持されていること
- ② 排せつ物、血液等による汚染に対して清掃及び消毒が容易な構造であること
- ③ 常に清潔な状態を保ち、臭気、騒音、廃棄物等による周辺環境への悪影響を防止する措置がとられていること

と学部委員会のダブルチェックを受けることになる。そして、本部委員会での確認事項及び審議事項は、学長に報告される（図2）。

なお本部委員会における平成29年度の委員の構成は、文部科学省の「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づき構成されており、文部科学省区分①10名、②7名、③3名の合計20名となっている。学部委員会においては、委員総数109名（うち文部科学省区分①57名、②17名、③35名）となっている（表1）。

### 3. 飼養保管施設

実験動物の飼育管理を行う施設であり、その設置には本学内規に基づく承認が必要である。飼養保管施設は、実験動物管理者を配置し、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（環境省）に基づく実験動物の管理体制が必要である<sup>1)</sup>。

施設等管理者は、本部委員会が定めた「飼養保管施設設置要件の主たる判断基準」に基づき整備された施設であることを確認し、学部長に申請する。学部長は申請された施設等を学部委員会に調査させ、学部委員会の調査結果及び助言により承認の可否を決定する。学部委員会は、設置承認がなされた施設の維持管理状況を確認し、必要な場合はアドバイス

を行い、実験動物の適正な飼養保管施設として運用できるように指導を行う（表2）。

承認された申請内容に変更が発生する場合は、あらかじめ飼養保管施設等の変更届を申請し承認を受ける必要がある。施設等の設置承認期間は原則として3年目の年度末が期限となる。継続する場合は事前に更新を申請し承認を受ける必要がある。また飼養保管施設を廃止する場合も速やかに学部長へ届けなければならない。

遺伝子組換え実験、感染実験等を行う場合は、関連する法律等に基づく対応が必要である。

### 4. 動物実験室

設置承認に関しての手順は飼養保管施設と同様であり、「実験室設置要件の主たる判断基準」（表3）が定められている。要件以外には申請された実験室において、使用される動物種や実験室の設備等の記載が求められている。また変更や廃止についても飼養保管施設の場合と同様で、速やかに学部長へ届出が義務付けられている。

### 5. 動物実験計画書

先にも述べたが、日本大学において動物実験を行う場合、動物実験計画書を作成し申請をする必要が

表3 実験室設置要件の主たる判断基準(抜粋)

- ① 適切な温度、湿度、換気、明るさ等を保つことができる構造であること。
- ② 動物種、飼養保管数等に応じた飼育設備を有すること。
- ③ 床、内壁等の清掃、消毒等が容易な構造で、器材の洗浄、消毒等を行う衛生設備を有すること。
- ④ 実験動物が逸走しない構造及び強度を整備すること。
- ⑤ 臭気、騒音、廃棄物等による周辺環境への悪影響を防止する措置が取られていること。
- ⑥ 実験動物管理者が置かれていること。

表4 日本大学における動物実験計画書作成における記載内容一覧

1. 研究課題
2. 動物実験責任者
3. 動物実験実施者
4. 実施期間
5. 飼養保管施設および実験実施場所
6. 使用動物種、系統、性別、頭数、微生物学的品質、入手先
7. 研究目的、研究計画、実験方法
8. 特殊実験区分
  - BSL ( Biosafety Level) 分類
  - 有害化学物質の投与動物実験
  - 放射線物質の投与動物実験
  - 遺伝子組換え動物を用いる実験 (拡散防止措置区分)
9. 動物実験の種類 (試験・研究・教育等)
10. 動物実験を必要とする理由 (代替法の検討等)
  11. 使用する動物の苦痛レベル (苦痛のカテゴリー分類)
  12. 動物への苦痛軽減、排除の方法
  13. 安楽死の方法
  14. 動物死体の処理方法

研究目的：この研究が必要な理由、社会的意義等を記載

研究計画：研究計画の概要記載

実験方法：動物に加える処置、動物使用頭数の根拠、想定される苦痛のカテゴリーおよび苦痛の排除、軽減方法等を記載

ある。動物実験計画書の記載要綱として、①研究の目的、意義及び必要性を明確にすること、②代替法の利用を考慮して、実験動物を適切に使用すること、③動物実験等の目的に適した実験動物種の選定、動物実験成績の精度及び再現性を左右する実験動物の数、遺伝学的及び微生物学的品質並びに飼養条件を考慮し、実験動物の使用数削減に配慮すること、④実験動物の苦痛の軽減に配慮して、動物実験等を適切に行うこと、⑤苦痛度の高い動物実験等(致死的な毒性実験、感染実験、放射線照射等)を行う場合、人道的エンドポイント(実験動物を激しい苦痛から解放するための実験を打ち切るタイミン

グ)の設定を検討することなどが日本大学動物実験運営内規に書かれている。本内規の動物実験等の実施に当たっての基本原則として、「法及び飼養保管基準に基づき、動物実験等を行う際の原則である代替法の利用、実験動物の使用数の削減及び苦痛軽減を考慮し、適正に行わなければならない」と定められている。表4は動物実験計画書の必須記載事項であるが、特に研究目的、計画、方法等については詳細に記載することが求められ、かつ専門家以外にもわかりやすく記載されていることが求められる。実際の学部委員会ではこの部分については特に慎重に審議を行っている。



## 6. 動物実験計画書審査手順

動物実験を行う際に申請する実験計画書の審査について、日本大学では図1に示す概要で実施している。各学部は、この実施体制をもとにそれぞれの特性に合わせた体制をとっている。1例として医学部の場合（図2）、毎月1回学部委員会が開催され、新たな動物実験計画書が毎月10件前後提出される。申請の手順は、作成した実験計画書を「動物実験に関する問合せ・事前相談窓口」（以下事前相談窓口）に提出する。ここで、事務的な確認（誤字脱字、必要事項の記載不備、実験内容に不備がないかなどを確認）を行う。実験内容については、あくまでも必要事項、例えば使用する薬剤名や投与量、投与経路等が記載されているかなどを確認する。ここで特に重要なのが、関連する委員会の手続きを経ているかについて確認をすることである。関連する委員会とは、「遺伝子組換え実験安全委員会」「バイオリスク管理・運営委員会」「医学部倫理委員会」「板橋病院臨床研究倫理審査委員会」などがあり、例えば遺伝子組換え動物を使用する実験を行う場合は、日本大学遺伝子組換え実験実施規程に基づく学長確認が得られているか、感染性の病原体を用いた動物実験を行う場合はバイオリスク管理・運営委員会、臨床検体を用いた研究を行う場合は、板橋病院臨床研究倫理審査委員会、医学部倫理委員会などの承認が得られていることが、動物実験計画書を学部委員会に提出する条件となる。つまり動物実験は、関連する委員会の承認が得られていないと行うことができないシステムであるため、学部委員会は他の委員会と連携しながら、動物実験計画書の審査を行っている。

事前相談窓口において不備がないと確認されると、動物実験委員会専門部会（以下専門部会）へ送られる。専門部会では、部会開催の前までに申請された動物実験計画書について、専門部会構成メンバーにより個別検討を行う。そして専門部会当日、申請された動物実験計画書について、それぞれコメントを出し合い審査する。当初は専門部会や事前相談窓口が無かったため、申請された書類はそのまま学部委員会で審議されていた。この場合、審査・審議に膨大な時間がかかり、申請から承認までに長時間を必要とした。そのため、学部委員会で審査を行う前にこの2つの確認作業を行うことが必要と考え設置された。その結果、学部委員会での審議はかな

り効率化され、学部委員会において再審査の対象となる動物実験計画書は殆どなくなっている。

学部で承認された動物実験計画書は、本部委員会へ報告される。日本大学における実験動物の購入や飼育については、申請された動物実験計画書の承認が得られた時点で付与される承認番号によって管理されているため、実験責任者はこの時点で動物実験を開始することができる。しかしながら、本部委員会にて確認し、指導・助言があった場合は、直ちに計画の確認または修正が必要であり、場合によっては進行中の動物実験を中断させ、再度動物実験計画書について精査することになる。日本大学ではこのような流れを経て、動物実験を実施している。

## 7. その他の審査

承認を受けた動物実験の変更、更新、履行結果の報告等、新規申請以外に、学部委員会に申請が必要な手続きがある。以下が審査、確認の対象となる申請である。

## 8. 動物実験計画の変更

動物実験を実施中に、実験内容の軽微な変更（例えば動物の苦痛を軽減するため使用する鎮痛薬を、実験に影響を及ぼさない程度に追加するなど。ただし大幅な実験内容の変更は実験計画書を再提出し審査を受ける必要がある）、実験実施期間の変更、実験実施者の変更、使用する動物の頭数を変更するなど、計画の内容を変更する場合は、事前に承認を受ける必要がある。学部委員会では提出された変更について、その内容が妥当であるかを審査する。実験内容の変更については、科学的に妥当であるか、当初の研究目的から逸脱していないか等について確認をする。使用頭数の変更については、削減の場合は、その変更により統計学的に当初の目的を達成できるかなどについて確認し、追加の場合は、なぜ当初の予定頭数よりも増えるのか、その根拠を明記し、理由が妥当と判断された場合に承認される。実際に審査された例であるが、使用頭数を追加するにあたり、申請理由が「モデル作製の成功率が当初の予想よりも下回ったため」であった。これに関してはなぜ当初の予想よりも下回ったのか、その原因を追究しモデル作製方法についても再考をしなければ、使用頭数の追加は認められなかった。これは Reduc-

tion（使用頭数の削減）、Refinement（苦痛の軽減）にも繋がることであり、このように動物実験委員会では3Rの原則に基づき審査にあたっている。

## 9. 動物実験計画の更新

動物実験計画書の有効期限は原則として承認より2年間とされており、2年を超えて実験を継続する場合は、更に2年間の更新を申請し承認を受けることが出来る。審査では現在までの実験の進捗状況等を確認し、予定よりも実験の進捗が思わしくない場合等は、その理由について申請者に対しヒアリングを行い確認する。

## 10. 結果報告

動物実験が終了した際は、機関の長に実験の履行結果を報告する必要がある。動物実験委員会では提出された内容を確認する。報告内容は、使用した動物種や頭数、動物実験を行ったことにより得られた成果などである。動物実験委員会はその報告について、承認通り適正に実施されたかを確認する。また、当初の予想と違った結果であった場合においても、実験の成果が得られなかったということではなく、その結果を今後どのように生かしていくかを確認し、実験者側の意識を是正することを行っている。

## 11. 動物実験委員会の課題

日本大学動物実験運営内規が施行され、本学の動物実験委員会発足当初は、一部の研究者から、研究活動を阻害するものでしかないとの批判もあったが、最近はその声も聞かれなくなってきた。これは動物実験を行うにあたり毎年度の受講が必須となっている「動物実験に関する教育訓練」において、動物への不利益と動物実験を行うことにより得られる利益を考え実験計画を立案することの徹底や、動物愛護、動物福祉の重要性、動物実験の意義などを繰り返し説明することにより、研究者の意識も変わってきたためである。また学部生における動物を使った実習においてもその重要性を説き、動物実験に対する意識を身につけさせているため、若い研究者はこれらのことを当然のことと捉えている者が多い。

研究者の意識変化と同様に、動物実験委員会自体も変化し成長していかなくてはならない。具体的には、委員会の更なる質の向上を図らなければ、今後

さらに厳しい社会情勢のもとで行われる動物実験について、一般社会の理解を得ることが困難となる可能性があり、動物実験委員会に課せられる責任は大きいと考える。動物実験委員会は、単純に申請された動物実験計画書に対し審査を行うだけでなく、その動物実験が社会的に必要であるか、方法は適切であるか、また動物実験を行う研究者に対し、動物愛護、動物福祉に関する啓発、倫理的配慮を自覚させるという側面も担い、審査に当たる必要がある。このことが適正な動物実験の重要性を研究者及び一般社会に伝えることになるであろう。

本邦において、動物実験は各研究機関の機関管理（自主管理）により実施されるが、自主管理の信頼性・網羅性・透明性は、研究者による動物実験計画の立案、機関の動物実験委員会による審査、機関長による承認と自己点検評価、外部検証および情報開示によって担保される<sup>2)</sup>。このことは決して研究者に対しての研究を阻害するものではない。そのことを研究者自身に伝え、指導していくことは、動物実験委員会として重要なことである。

動物実験の妥当性は、動物に与える苦痛を考慮し、実験により得られる社会的意義が大きい場合に行われる。これらはいくまでも相対評価でしかないが、動物実験委員会としては、動物に与える苦痛を正しく理解し、その削減に努めることが重要な課題である。そのためには、まず動物の被る苦痛の程度を客観的に判断することが求められる。しかし苦痛の程度を客観的に評価することは難しいため、日本学術会議の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」には、SCAW（Scientists Center for Animal Welfare）の苦痛分類が参照例として挙げられている<sup>3)</sup>。このSCAWの分類は、久原<sup>4)</sup>によって日本語訳が紹介され、大学や研究機関において活用されており、日本大学においてもこの分類を参考に活用している。研究者および動物実験委員会はこれを参考に、動物に対し苦痛を与えていることを自覚し、またどのようにすれば苦痛を軽減させられるかを考える必要がある。特に苦痛の軽減方法は、研究者が真摯に受け止め、これに努めることが重要である。そのため動物実験委員会は研究者に対し、苦痛軽減の重要性、その具体的な方法（手技の向上や配慮・工夫）を指導することも重要となる。

その他の課題として、動物実験の妥当性を評価す

るために動物実験計画書を動物実験委員会が審査しているが、この審査に膨大な時間と労力が費やされることが挙げられる。現在の医学部における審査システムは先にも述べたが、申請者が動物実験計画書を事前相談窓口へ提出し、事前相談窓口では記載内容の確認を行い、不備がなければ専門部会にて実際の実験内容について審議する。その上で学部委員会にて審査を行うという流れになっているが、以前のように、申請された書類を学部委員会において直接審査すると、記載内容を事前に確認することなく、審議に入ることから、実験内容などの本質的な審議が深くできず、また審査終了後も動物実験計画書の修正作業に膨大な時間を費やすことになる。そのため事前相談窓口、専門部会を設置し作業を行っているが、それでも申請件数は多く、記載内容の確認など、動物実験計画書の対応に費やされる時間が多くなる。そのため平成30年4月より日本大学では、動物実験の申請と審査を効率的に行うため、実験計画等申請管理システム「NU-PRIS」が導入された。これは、申請手続きの効率化、記載内容の確認や審査の迅速化、また提出された動物実験計画書の審査漏れなどのヒューマンエラーをなくし、更には本学全ての動物実験委員会において審査時間を短縮し、重要な検討事項の審議時間を増やすことを目的とする。平成30年度より準備が整った学部からシステムが運用され、9月開催の本部委員会より全学部共通で運用が開始された。今後の動物実験計画書の審査において利点が多数あることを期待する。

## 12. おわりに

動物実験を行うには動物実験計画書の提出が求められる、適正な動物実験を行うことが研究者として当然の行為という認識が定着してきているが、それにより動物実験委員会の責務は大きくなっている。動物実験計画書の審査には、事務的な作業から実際的な審査など、多大な能力と労力が必要である。そのため審査の一部について、申請審査システムを導入することにより効率化を図り、動物実験計画書の本質的な審査機能を強化し、今後は動物実験委員会の審査能力の向上を進めていかななくてはならない。またそれ以外にも、実験動物のwell-beingの向上、更には動物実験が一般社会に理解されるためには、審査や実験計画書承認後の進捗状況の確認、飼養保管施

設、動物実験施設の確認 (postapproval monitoring, PAM)<sup>5)</sup> が重要であり、第三者である外部機関による検証や社会への透明性を示すための情報公開も引き続き必要であろう。動物実験は研究および教育に必要なツールであり、これをなくすことはできない。そのためには現在行われている機関管理 (自主管理) の更なる向上が重要であり、動物実験委員会はその重要性を認識し活動することが求められると考える。

## 文 献

- 1) 実験動物飼養保管等基準解説書研究会. 実験動物のための飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準の解説. アドスリー, 東京, 2017初版; 16-118.
- 2) 鍵山直子, 水島友子. 動物実験研究者必見 動物実験の倫理指針と苦痛度評価. 日薬理誌, 2013; 14 (3) : 141-149.
- 3) 片平清昭. 適切な動物実験の実施を行うためのポイント. Surgery Frontier, 2010; 17 (3) : 78-82.
- 4) 久原孝俊. 適正な動物実験実施のために: とくに動物実験の苦痛度分類について. 実験動物と環境, 2008; 16 (2) : 127-133.
- 5) 日本実験動物学会. 実験動物の管理と使用に関する指針 第8版 GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS Eighth Edition. アドスリー, 東京, 2011初版; 37-38.

## 医学研究支援部門生物化学系に設置されたリアルタイムPCRシステムとマイクロプレートリーダーについて

渡部和浩<sup>1)</sup>, 嶋村政男<sup>1)</sup>, 間崎武郎<sup>1), 2)</sup>, 石井敬基<sup>1), 2)</sup>

### Two newly introduced instruments to the Division of Biochemistry in the Medical Research Supportive Branch — Real-time PCR system and microplate reader —

Kazuhiro WATANABE<sup>1)</sup>, Masao SHIMAMURA<sup>1)</sup>, Takero MAZAKI<sup>1), 2)</sup>, Yukimoto ISHII<sup>1), 2)</sup>

#### 1. はじめに

医学研究支援部門 生物化学系には共同利用機器としてリアルタイムPCRシステム7500Fast (ライフテクノロジーズジャパン) 及びマイクロプレートリーダーARVO MX (パーキンエルマー) が設置されているが, 平成30年5月にリアルタイムPCRシステムQuantStudio3 (ライフテクノロジーズジャパン), 及びマルチ検出モードマイクロプレートリーダーInfinite 200 PRO M plex (Tecan Japan) に更新を行った。

今回導入された機種では測定時間の短縮化や任意の測定波長が選択可能など, 共同利用機器としての利便性は向上したものとなっている。そこで今回導入されたリアルタイムPCRシステム及びマイクロプレートリーダーについて紹介する。

今回導入された機器は, リサーチセンター2階に設置されている。



図1 QuantStudio3



図2 Infinite 200 PRO

#### 2. リアルタイムPCRシステムQuantStudio 3

QuantStudio 3リアルタイムPCRシステムは, コンパクトで誰にでも簡単に操作ができるように設計されたシステムである。クラウドベースの「Thermo Fisher Cloud」により, Webブラウザからデータにアクセス, 解析を行うことができる。

励起および蛍光フィルターを4枚ずつ搭載し, 光源として高輝度白色LEDを採用しており, ハイスループットの装置と同じ蛍光検出系を利用している。そのため高感度検出が可能であり, シングルプレックスでは1.5倍差の識別が可能である。またダイナミックレンジは10桁を実現している。

ヒートブロックは7500Fastと同様にFast PCRが可能なFast 96wellを採用している。この機種の特徴としてVeriFlexグラジエントブロックにより32ウェル×3分割で温度制御が可能である。これは今までのグラジエントブロックと異なり, それぞれの

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

表 1 Quantstudio3 と 7500Fast 比較

	Quantstudio3	7500Fast
光源	白色LED	ハロゲンランプ
蛍光フィルタ枚数	励起4枚、蛍光4枚	励起5枚、蛍光5枚
検出系	CCD	CCD
Veriflex	3ゾーン	なし
ポーズ機能	あり	なし
Melt curve所要時間	5分(Fast mode)	約30分

表 2 Infini 200 PRO M Plex 対応アプリケーション

アプリケーション	ELISA、核酸タンパク質定量	FI、TRF、TRET、TR-FRET	FI、TRF、TRET ELISA 核酸、タンパク質定量	ORAC Ca+測定 細胞内蛍光測定	蛍光偏光測定	レポーター遺伝子アッセイ(DRC)
	吸光	上方蛍光	吸光 上方蛍光	上下方蛍光	蛍光偏光モジュール	発光
Infinite 200 PRO M plex	●	▲ TR-FRETは対応不可	●	●	-	●

ゾーンが独立して制御されているためより正確な温度制御が可能である。温度条件の異なる複数のプロトコルを同時に走らせることが可能であり、これにより異なるアニーリング温度を持つプライマーの最適化が容易になった。

また Melt Curve 回収が 7500Fast では 30 分以上かかっていたのに対し、Quantstudio3 では Fast モードでは約 5 分で終了し、全体のラン時間も Fast モードでは約 50 分で終了することができる (表 1)。

### 3. マイクロプレートリーダー Infini 200 PRO M plex

Infini 200 PRO M plex は吸光度、蛍光 (上方・下方)、発光を測定できるマルチ検出モードプレートリーダーであり、6-384 ウェルプレートでの測定が可能である。Infini 200 PRO シリーズはこれまでに 1800 件以上の論文引用実績を持つ機種である。

測定方式としてモノメータを採用しており、これまでのフィルター方式とは異なり任意の波長で測定が行えるようになった。波長範囲は吸光度で 230-1000 nm、蛍光測定では励起波長が 230-850 nm、測定波長が 280-850 nm であり 1 nm 刻みで調整することができる。これにより吸光スペクトルや蛍光の励起・測定波長のスキャンも可能であり、いつでもアッセイの最適化が行える。

オプションとして NanoQuant plate と Te-Inject モジュールが設置されている。NanoQuant plate はわ

ずか 2 ul で核酸またはタンパク質を最大 16 サンプル同時定量できるプレートである。Te-Inject モジュールは 2 本のインジェクターにより試薬を分注しながら測定が行うことができ、ルシフェラーゼアッセイ・レポーターアッセイ・Ca<sup>2+</sup>イオンアッセイなどが可能である。

Infini 200 PRO M plex を用いて測定することができるアプリケーションを表 2 に示した。

### 4. まとめ

今回新たにリアルタイム PCR システムとマイクロプレートリーダーが導入された。これまでは、リアルタイム PCR では測定時間が長く使用の間で待ち時間が生じてしまっていたこと、マイクロプレートリーダーでは測定に対応するフィルターを所持していないため利用者のニーズに十分応えられない場面も見受けられた。今回の機器導入により、リアルタイム PCR では測定時間の短縮、マイクロプレートリーダーでは任意の波長での測定が可能となったことで利用の幅が広がった。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) Thermo Fisher Scientific, “QuantStudio® 3 リアルタイム PCR システム”, <[— 49 —](https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/pcr/real-time-pcr/re-</a></li>
</ol>
</div>
<div data-bbox=)

- al-time-pcr-instruments/quantstudio-3-5-real-time-pcr-system/quantstudio-3.html> (参照 2018-9-10)
- 2) Tecan, “マルチ検出モード マイクロプレートリーダー Infinite® 200 PRO”, <[http://www.tecan.co.jp/products/reader\\_washer/microplaterreader/infinite200/index.html](http://www.tecan.co.jp/products/reader_washer/microplaterreader/infinite200/index.html)> (参照 2018-9-10)

## 電子顕微鏡室の業務紹介

地家豊治<sup>1)</sup>, 井上広一<sup>2)</sup>, 羽尾裕之<sup>3)</sup>, 石井敬基<sup>3)</sup>

### Information about electron microscope laboratory

Toyoharu JIKE<sup>1)</sup>, Koichi INOUE<sup>2)</sup>, Hiroyuki HAO<sup>3)</sup>, Yukimoto ISHII<sup>3)</sup>

#### 1. はじめに

##### 電子顕微鏡室の研究支援業務紹介

医学研究支援部門 形態系 電子顕微鏡室では臨床検査技師および電子顕微鏡技術認定試験一級技士資格保有の担当者が主に電子顕微鏡を用いた超微形態観察に対応した研究支援を行っている。具体的には、観察目的にあわせた固定液や薬液の調整、試料標本作製、電子顕微鏡の調整、観察補助および撮影をサポートし、目的観察像が得られるまでの研究支援を行う。加えて光学顕微鏡観察のための標本作製、標準染色・特殊染色・免疫染色も可能であり、電子顕微鏡室内で光学顕微鏡観察から電子顕微鏡観察までの観察倍率をシームレスに形態観察研究を行うことができる。

#### 2. 透過電子顕微鏡観察

\* 設置機器 JEOL-1200 EX II 日本電子

- 分解能 0.2 nm (HC) 0.14 nm (HR)
- 観察倍率 ×800 ~ 600, 000
- 加速電圧 40 ~ 120kV \* 通常の組織観察時は 80kVにて使用

透過型電子顕微鏡観察については医学・生物学で行われる主な観察方法として病理光学顕微鏡標本と同様に観察目的にあわせた均等な厚みを持った組織切片を作製し、酢酸ウランと鉛による電子染色を施した標本を透過電子顕微鏡真空鏡体内にいれ標本を透過する電子から得られる陰影を観察する。

一般的に行われている光学顕微鏡観察のための標本切片厚は通常 4μm 前後であるが、透過電子顕微鏡観察のために必要な切片厚は 60 ~ 80nm である。光学顕微鏡用のパラフィン包埋と異なり透過電子顕微鏡用試料はより硬度のあるエポキシ樹脂に包埋することでこの電子線が透過できる超薄切片厚が得られるため観察対象の切片厚による組織像の重なりによる画像干渉が減少するために組織・細胞小器官が高倍率での観察が可能となる。

標本作製の作業工程はキット化・機械化がなされていないため観察対象の組織性状や観察目的にあわせて固定液・固定時間検討し、脱水・樹脂浸透を行う必要があり、超薄切標本作製の段階から文献と知識・経験から得られた技術を駆使し総てを手作業で行う必要がある。

観察像を得る仕組みとしても電子顕微鏡は電子を磁力により屈折をさせることで倍率を得る。したがって観察目的にあわせて電子線の加速電圧の選択や電子線の軸調整・批点補正の調整が観察の都度必要となる。電子顕微鏡室ではこれらの工程を担当技術員がすべてサポートしている。

研究支援として経験のある観察対象組織は人体病理組織、海洋生物や淡水魚・両生類を含む動物組織のみならず培養細胞の標本作製観察をおこなっており試料作製・観察経験は多岐にわたる。また、ウイルスや細菌・超微構造物、無機物の構造観察のためにネガティブ染色法やイオン液体を用いた金属錯

1) 日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門 電子顕微鏡室  
2) 日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門 中央写真室  
3) 日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門  
地家豊治: jike.toyoharu@nihon-u.ac.jp

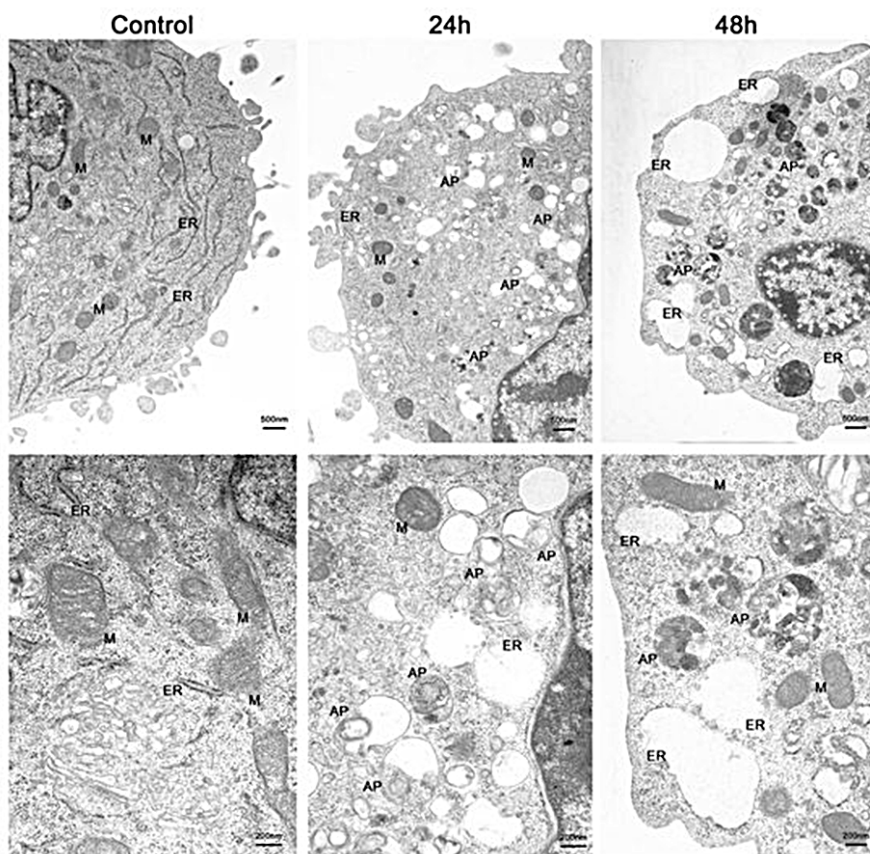


図 1 XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells より引用

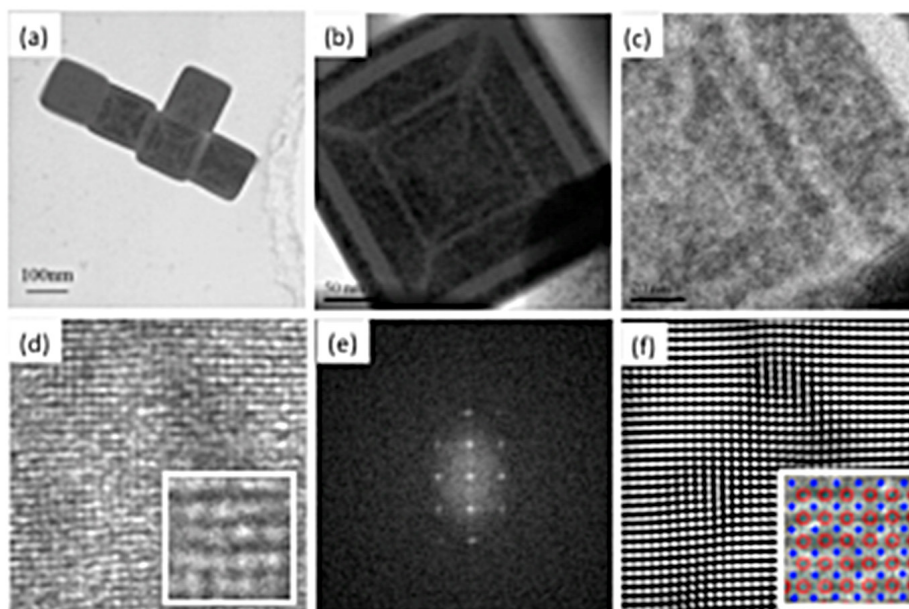


図 2 Direct Observation of Short-Range Structural Coherence During a Charge Transfer Induced Spin Transition in a CoFe Prussian Blue Analogue by Transmission Electron Microscopy より引用



体の構造観察など電子顕微鏡の調整や試料作製を工夫しながら現状の機器で可能な研究支援を行っている。

### 3. 走査電子顕微鏡観察

- \* 設置機器 S-4000形 日立走査電子顕微鏡
- 二次電子像分解能 1.5nm
- 観察倍率  $\times 20 \sim \times 300,000$
- 加速電圧 0.5 ~ 30kV \* 通常の組織観察時は 3kVにて使用

走査型電子顕微鏡観察にて得られる画像は虫メガネや実態顕微鏡の観察像のように標本の表面観察像を得るための顕微鏡である。通常の観察法では電子線の反射・放出を得るために観察試料に金属蒸着を施し観察を行うので虫メガネや実態顕微鏡のように組織透過光から内部構造の観察を行うことはできない。したがって観察目的部位を露出させるため組織の切断や切断後にオスミウム酸を用いた浸軟処理など観察目的にあわせた様々な処理を行うことで目的部位を露出させ観察を行う。

透過電子顕微鏡の観察利用とは異なり病理学的な貢献度は低くなる。しかし、培養細胞の形態、細胞同士の隣接・接着状態、摘出標本の構造観察、細菌の付着状態などに多く用いられる。

観察標本を傾斜・回転による観察が可能であり、走査電子顕微鏡の観察環境、ワーキングディスタン



図4 花粉の世界をのぞいてみたら  
— 驚きのミクロの構造と生体の不思議 —  
走査電子顕微鏡観察で得られた画像をわかりやすく着色し出版. 編集委員・執筆者として参加

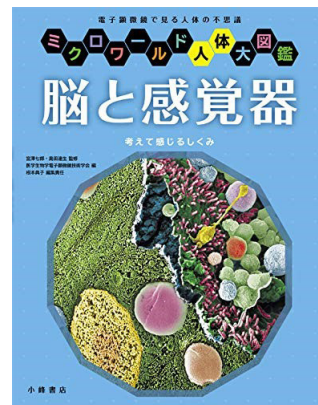
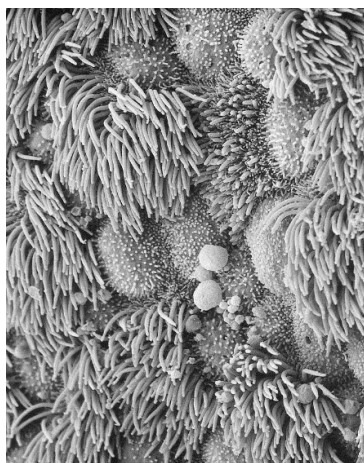
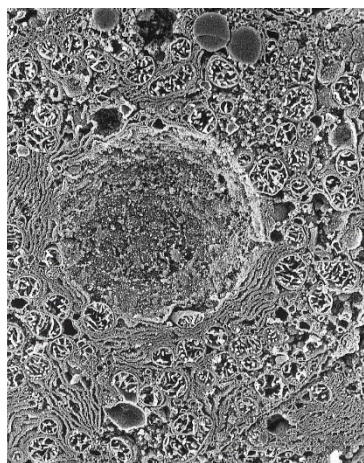


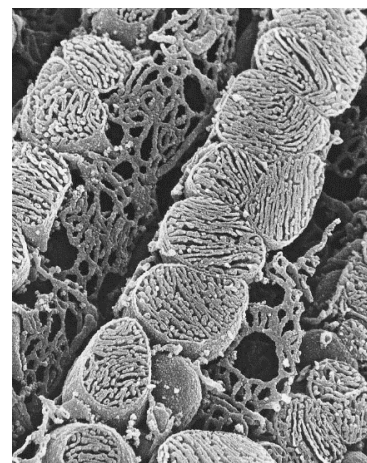
図5 ミクロワールド人体大図鑑  
脳と感覚器 考えて感じるしくみ  
走査電子顕微鏡観察で得られた画像をわかりやすく着色し出版. 編集委員・写真撮影・提供・画像処理として参加



気管上皮細胞  
通常観察



浸軟法により露出させ観察を行った  
細胞小器官の観察



浸軟法により露出させ観察を行った  
心筋細胞内のミトコンドリア

図3 走査電子顕微鏡を用いた様々な観察像 ミクロの不思議な世界 より引用

ス・加速電圧の設定を変更することで被写界深度の深い立体的な観察像を得ることができる。

透過電子顕微鏡を用いて高分解能な断面構造を確認し、走査電子顕微鏡で立体的な全体の構造を確認することで、より正確な形態の知見を得ることが可能となる。

#### 4. 光学顕微鏡標本作製

\* 設置機器 OLYMPUS BX61 落射蛍光顕微鏡

● 対物Lens UplanApo 10×, 20×, 40×, 100×

\* OLYMPUS BH2

● 対物Lens SPlanFL 2×, SPlanApo 4×, 10×, 20×, 40×

自動包埋装置は設置されていないが、手作業によるパラフィン包埋ブロックの作製が可能である。また、薄切・Hematoxylin-Eosin (HE) 染色・特殊染色及び免疫染色が可能である。観察試料を光学顕微鏡標本と電子顕微鏡標本を同時に作製し、光学顕微鏡標本を用いて広視野で分子生物学的な観察像からの知見を得て、電子顕微鏡で高分解能な細胞小器官観察などによってより正確な局在の知見を得ることができる。

#### 5. 超微形態観察の展望

電子顕微鏡観察では超微形態観察のためにグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムを用いて固定を行い、その後エタノールによる脱水を行い60℃での樹脂重合を経て標本作製を行う。このような作業工程により試料作製が行われるため、電子顕微鏡観察では分子生物学的な超微形態観察や物質の局在の証明は対応しがたい。

組織試料を急速に凍結させてそのまま超薄切片を作製する凍結ウルトラミクロトームが設置されれば細胞内小器官の分子生物学的観察に対応は可能である。これは光学顕微鏡標本のクライオスタット（凍結標本）で切片を得て蛍光色素でラベルを行い観察するのと同様な手法である。このように化学固定を行わずに超薄切片を得て目的物質のラベルを行い、観察を行えば細胞小器官のどの部分に蛋白などの物質が発現しているかが電子顕微鏡の高い分解能で観察が可能となる。

現在開発販売されている電子顕微鏡は記録がデジタルデータであるため銀塩フィルムの画像と異なり

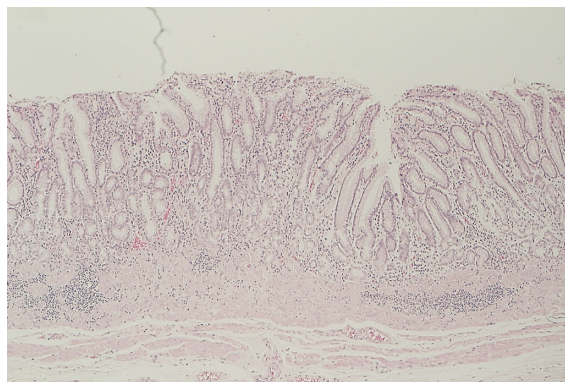


図6 ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

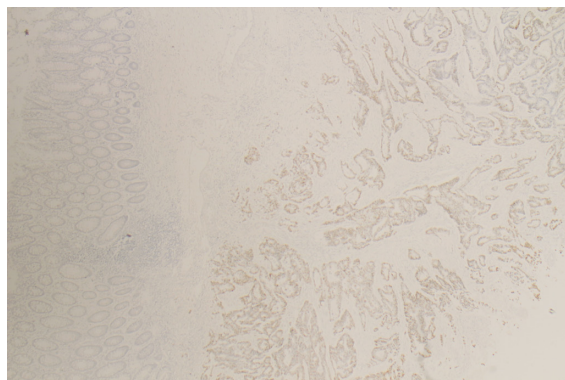


図6 DAB発色による免疫染色



図6 透明骨格標本 マウス前肢部

高倍率での広範囲のタイリングを行った画像取得や観察試料を傾斜させ画像を取得し、切片内の立体構造を得るなど従来の観察像では得られない知見が得られる。さらに、X線解析のセンサーを付加すれば細胞内の元素解析なども可能となる。試料観察室に収束ビーム照射装置やマイクロトームを設置し、走査電子顕微鏡で観察像を得たのちに、観察試料を切削し標本観察を繰り返すことで得られた画像データから立体構築を行う機器も開発販売されている。

光学・レーザー顕微鏡などで核や細胞内・細胞膜といった局在を確認することは可能であるが電子顕微鏡の細胞小器官を観察できる分解能には及ばない。分子生物学的な手法に対応できる機器を設置することは医学・生物学分野のさらなる発展に寄与する。

## 6. 現 状

2018年現在、医学研究支援部門には透過電子顕微鏡は二台設置されている。しかし、1987年設置の透過電子顕微鏡は故障し、メーカーサポートが終了のため2018年度で廃棄予定である。1992年設置の透過電子顕微鏡も2018年度末をもってメーカーサポートが終了し、修理対応外の機器となる。また画像取得のための銀塩フィルムの販売も2020年には終了する。走査電子顕微鏡も2002年に設置されたが、10年のメーカーのリース終了鏡体を購入したものであり、製造稼働からすでに26年が経過しており、製造メーカーから廃棄相当の機種に指定されている。医学部内には機能形態系生体構造医学分野に透過電子顕微鏡が1台設置されているが、医学研究支援部門設置の機種と同型同時期の鏡体であり、すでにメーカーサポートは終了している。

日本大学の他学部にも電子顕微鏡の設置はあるが、理工学部で運用している電子顕微鏡は医学・生物学の観察のための機器構成と異なる。現在、日本大学生物資源科学部や日本大学松戸歯学部からも試料作製・電子顕微鏡観察依頼をうけている。生物資源科学部や松戸歯学部には透過・走査電子顕微鏡の設置はあるが医学部設置の電子顕微鏡と同時期の機種でありメーカー修理終了の鏡体である。

正しい観察像を得るためには正確な標本作製が重要であり、高額・高機能な顕微鏡を用いても観察標本の作製に不備があれば正しい観察像を得ることはできない。医学部の電子顕微鏡による超微形態観察研究が約30年を経過する機器で対応できるのは、鏡体の調整・管理、正確な標本作製、観察像に対する知識と経験に大きく依存している。しかし、機器のメーカーサポートが終了し、画像記録に用いる銀塩フィルムの製造が終了すれば、現在の機器では超微形態観察・記録が不可能となる。

医学部設置の電子顕微鏡試料作製機器として重要なウルトラマイクロームもすでにメーカーサポートが終了し、他の関連機器も設置後30年を経過して

いる。現状を放置すれば、医学部・附属病院の教育・研究・診断のための超微形態観察が不可能になるばかりではなく、総合大学でありながら教育・研究に必須となる電子顕微鏡観察が生物資源科学部や松戸歯学部などの他学部においても不可能となる。電子顕微鏡で得られる分解能を持つ形態観察法は他にない、医学部としてまた日本大学として早期の機器・設備の更新が望まれる。

## 文 献

第22回医学生物学電子顕微鏡技術研修会「夏の学校」in 軽井沢テキスト 編集：第22回医学生物学電子顕微鏡技術研修会実行委員 2009年

- 1) Akihiro Kishino, Ken Hayashi, Chiaki Hidai, Takeshi Masuda, Yasuyuki Nomura, Takeshi Oshima: XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells, *Scientific Reports*, 7:4442. doi: 10.1038/s41598-017-02960-1, 2017.
- 2) M. Itoi, T. Jike, D. Nishio-Hamane, S. Udagawa, T. Tsuda, S. Kuwabata, K. Boukheddaden, M. J. Andrus, D. R. Talham. "Direct Observation of Short-Range Structural Coherence During a Charge Transfer Induced Spin Transition in a CoFe Prussian Blue Analogue by Transmission Electron Microscopy" *Journal of The American Chemical Society* (2015) 137, 14686 (8 page)
- 3) ミクロの不思議な世界 監修：宮澤七郎・島田達生 編集：医学生物学電子顕微鏡技術学会 株式会社メジカルセンス 2001年
- 4) 花粉の世界をのぞいてみたら - 驚きのミクロの構造と生体の不思議 - 監修：宮澤七郎・中村澄夫 編集：医学生物電子顕微鏡技術学会 株式会社エヌ・ティー・エス 2012年
- 5) ミクロワールド人体大図鑑 脳と感覚器 考えて感じるしくみ 監修：宮澤七郎・島田達生 編集：医学生物電子顕微鏡技術学会 株式会社小峰書店 2018年

## 医学研究支援部門の利用に関する成果・業績等一覧

### Lists of publication and results from Utilization in Medical Research Center

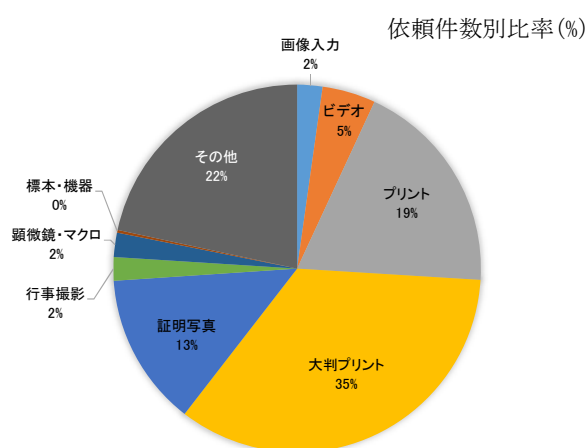
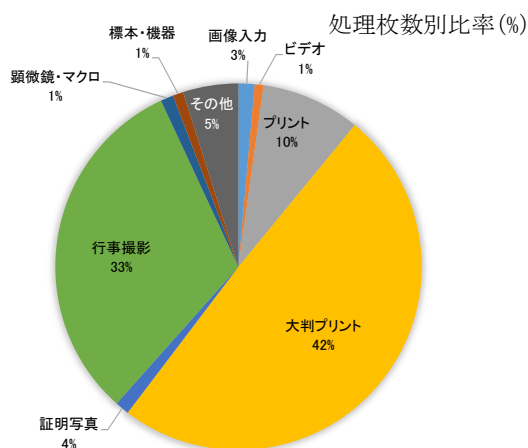
#### 形態系

##### 【中央写真室】

##### 平成29年度 年間処理枚数/依頼件数

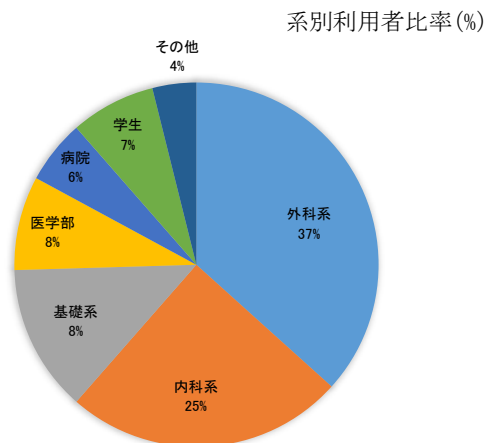
	画像入力	ビデオ	プリント	大判プリント	証明写真	行事撮影	顕微鏡・マクロ	標本・機器	その他	年間合計
処理枚数(枚)	247	133	1511	8539	214	5439	196	161	844	17284
依頼件数(件)	28	62	230	471	168	32	35	18	366	1410

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



##### 平成29年度 年間利用者数(人)

所属	外科系	内科系	基礎系	医学部	病院	学生	その他	合計
人数	311	210	111	71	48	64	33	848



[電子顕微鏡室]

論文

耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野

Akihiro Kishino, Ken Hayashi, Chiaki Hidai, Takeshi Masuda, Yasuyuki Nomura, Takeshi Oshima : XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells, *Scientific Reports*, 7:4442. doi : 10.1038/s41598-017-02960-1, 2017.

微生物学分野

Naoko Hirohata, Shihoko Komine-Aizawa, Muneaki Tamura, Kuniyasu Ochiai, Masahiko Sugitani and Satoshi Hayakawa: *Porphyromonas gingivalis* Suppresses Trophoblast Invasion by Soluble Factors. *Journal of periodontology*, 88 (12), 1366-1373, 2017.

学会発表

形成外科学分野

Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H : The Effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin reconstruction in burn wound management. 11<sup>th</sup> Asia Pacific Burn Congress. Taipei, 2017.4.3.

副島一孝, 樫村 勉, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明 : イブニングシンポジウム2 : 脱分化脂肪細胞の再生医療への応用 皮膚の再生医療における脱分化脂肪細胞 (DFAT) の有用性. 第16回 日本再生医療学会総会. 仙台, 2017.3.

副島一孝, 樫村 勉, 風間智彦, 松本太郎, 菊池雄二, 仲沢弘明 : シンポジウム1 臨床へはばたく基礎研究 熱傷創治療における脱分化脂肪細胞 (DFAT) の有用性. 第43回 日本熱傷学会総会学術集会 京王プラザホテル. 東京, 2017.5.26.

耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野

岸野明洋, 林 賢, 増田 毅, 野村泰之, 大島猛史 : 内耳感覚細胞における IRE1 $\alpha$ -mediated XBP1 mRNA スプライシングと小胞体ストレス誘導性オートファジー. 第118回 日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会. 名古屋, 2017.

Akihiro Kishino, Ken Hayashi, Chiaki Hidai, Yasuyuki Nomura, Takeshi Oshima : The regulation of autophagy through XBP1-FoxO1 interaction in auditory cells under ER stress. The 8th International Symposium on Autophagy. Nara Japan, 2017.

Akihiro Kishino, Ken Hayashi, Chiaki Hidai, Takeshi Masuda, Yasuyuki Nomura, Takeshi Oshima : XBP1 regulates ER stress-induced autophagy via FoxO1. The 121st American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO Experience. Chicago, USA, 2017.

岸野明洋, 林 賢, 野村泰之, 大島猛史 : 内耳感覚細胞における XBP1-FoxO1 相互作用による小胞体ストレス誘導性オートファジーの制御. 第27回 日本耳科学会総会・学術講演会. 横浜, 2017. (優秀ポスター賞受賞)

岸野明洋, 林 賢, 増田毅, 野村泰之, 嶋原俊太郎, 斎藤雄一郎, 大島猛史 : 内耳感覚細胞における小胞体ストレス誘導性オートファジー. 第76回 日本めまい平衡医学会総会・学術講演会. 軽井沢, 2017.

## 医用電子系

### 【医用電子室】

#### 論文

##### 神経外科学分野

石井智浩（日本大学松戸歯学部 有床義歯補綴学講座）、成田紀之、神谷和伸、平山晃康：一次性閉口ジストニアにおける咀嚼時顎筋活動の特性. 日本顎関節学会雑誌；(0915-3004) 29巻：Suppl. Page 127, 2017.

成田紀之（日本大学松戸歯学部 有床義歯補綴学講座）、神谷和伸、石井智浩、平山晃康：口顎ジストニア患者のQOLに対する反復経頭蓋磁気刺激の治療効果. 日本顎関節学会雑誌；(0915-3004) 29巻：Suppl. Page127, 2017.

##### 小児科学分野

石井和嘉子（日本大学 医学部小児科学系小児科学分野）、福田あゆみ、藤田之彦：起立性調節障害（OD）病態理解と診断・治療はどこまで進んでいるか 起立性調節障害における脳血流変化. 子どもの心とからだ；(0918-5526) 26巻2号：Page136, 2017.

## 生物化学系

### 【化学分析室】

### 【感染症ゲノム研究室】

#### 論文

##### IR・医学教育センター

Ueshima C, Kataoka TR, Takei Y, Hirata M, Hirokawa M, Okayama Y, Blumberg RS, Haga H：CEACAM1 long isoform has opposite effects on the growth of human mastocytosis and medullary thyroid carcinoma cells. *Cancer Med*; 6 (4)：845-56, 2017.

Okamura Y, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Toyoshima S, Kuroda K, Saito S, Tokuhashi Y, Okayama Y：The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. *Allergol Int*; 66S：S9-20, 2017.

Nunomura S, Ra C, Terui T, Okayama Y：Disulfide-linked dimerization of the FcR $\gamma$  chain is required for

positive and negative regulation of mast cell activation via Fc $\epsilon$ RI. *Allergol Int*; 66S：S41-3, 2017.

Shimanaka Y, Kono Y, Taketomi Y, Arita M, Okayama Y, Tanaka Y, Nishito Y, Mochizuki T, Kusuhara H, Adibekian A, Cravatt BF, Murakami M, Arai H： $\omega$ 3 fatty acid epoxides are autocrine mediators that ensure full activation of mast cells. *Nature Med*; 23：1287-97, 2017.

岡山吉道：IgE非依存性マスト細胞活性化による自然免疫と炎症の制御 アレルギーの臨床；37（3）：22-26, 2017.

岡山吉道：マスト細胞症 mastocytosis. アレルギー；66（6）：817-8, 2017.

岡山吉道：アレルギー学研究とマスト細胞研究の将来. アレルギー・免疫；24（8）：1009-10, 2017.

岡山吉道：薬物アレルギーとマスト細胞. 小児科臨床；70（12）：2073-7, 2017.

##### 呼吸器内科学分野

Gon Y, Maruoka S, Kishi H, Koza Y, Kazumichi K, Nomura Y, Takeshita I, Oshima T, Hashimoto S：NDRG1 is important to maintain the integrity of airway epithelial barrier through claudin-9 expression. *Cell Biol Int*; 41（7）：716-725, 2017.

Gon Y, Shikano S, Maruoka S, Mizumura K, Koza Y, Kuroda K, Tsuboi E, Takeshita I, Kishi H, Nomura Y, Oshima T, Hashimoto S：CpG oligodeoxynucleotides enhance airway epithelial barrier integrity. *Allergol Int*; 66S：S47-S49, 2017.

Gon Y, Maruoka S, Ito R, Mizumura K, Koza Y, Hiranuma H, Hattori T, Takahashi, M, Hikichi M, Hashimoto S：Utility of serum YKL-40 levels for identification of patients with asthma and COPD. *Allergol Int*; 66（4）：624-626, 2017.

Gon Y, Maruoka S, Inoue T, Kuroda K, Yamagishi K,

Kozu Y, Shikano S, Soda K, Lotvall J, Hashimoto S : Selective release of miRNAs via extracellular vesicles is associated with house dust mite allergen-induced airway inflammation. *Clinical & Experimental Allergy*; 47 (12) : 1586-1598, 2017.

Maruoka S, Gon Y, Mizumura K, Okamoto S, Tsuya K, Shikano S, Soda K, Naguro I, Ichijo H, Hashimoto S : Involvement of apoptosis signal-regulating kinase-1 in house dust mite-induced allergic asthma in mice. *Allergol International*; 66S : S50-S52, 2017.

#### 生理学分野

Hidai C, Fujiwara Y, Kokubun S, Kitano H : EGF domain of coagulation factor IX is conducive to exposure of phosphatidylserine. *Cell biology international*; 41 (4) : 374-383. 2017.

Kishino A, Hayashi K, Hidai C, Masuda T, Nomura Y, Oshima T : XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells. *Scientific reports*; 7 (1) :4442, 2017.

#### 臨床検査医学分野

K. Fujioka, A. Fujioka, M. Oishi, H. Eto, S. Tajima and T. Nakayama. Ultrasonographic findings of intradermal nodular fasciitis : A rare case report and review of the literature. *Clinical and Experimental Dermatology*; 42 : 335-336, 2017.

Nishida Y, Takahashi Y, Tezuka K, Takeuchi S, Nakayama T, Asai S : A Comparative Effectiveness Study of Renal Parameters Between Imidapril and Amlodipine in Patients with Hypertension : A Retrospective Cohort Study. *Cardiol Ther*; 6 (1) : 69-80, 2017.

Takahashi S, Suzuki M, Uchiyama M, Nakayama T : Replication study of de novo mutations of TAF13 in schizophrenia. *Psychiatry Res.*; 258 : 609-610, 2017.

Nakayama T, Nakazato T, Naruse H, Fu Z, Wang Z, Soma M, Hoshino T, Shimodaira M, Aoi N : Haplo-

type-based, case-control study of the receptor (calcitonin) activity-modifying protein (RAMP) 1 gene in essential hypertension. *Journal of Human Hypertension J Hum Hypertens*; 31 (5) : 361-365, 2017.

Fujioka K, Fujioka A, Oishi M, Eto H, Tajima S, Nakayama T. Ultrasonography findings of intradermal nodular fasciitis : a rare case report and review of the literature. *Clin Exp Dermatol.*; 42 (3) : 335-336, 2017.

Nishida Y, Takahashi Y, Tezuka K, Takeuchi S, Nakayama T, Asai S. Comparative Effect of Calcium Channel Blockers on Glomerular Function in Hypertensive Patients with Diabetes Mellitus. *Drugs R D.*; 7 (3) : 403-412, 2017.

Nishida Y, Takahashi Y, Tezuka K, Yamazaki K, Yada Y, Nakayama T, Asai S. A comprehensive analysis of association of medical history with airflow limitation : a cross-sectional study. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.*; 12 : 2363-2371, 2017.

#### 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野

Kshino A, Hayashi K, Hidai C, Masuda T, Nomura Y, Oshima T : XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells. *Scientific Reports*; 7 (1) : 4442. 2017.

#### 症例報告

##### 呼吸器内科学分野

Gon Y, Ito R, Maruoka S, Mizumura K, Kozu Y, Hiranuma H, Iida Y, Hikichi M, Shikano S, Hashimoto S : Long-term course of serum total and free IgE levels in severe asthma patients treated with omalizumab. *Allergol Int.*; pii : S1323-8930 (17) 30114-4, 2017.

#### 臨床検査医学分野

久野宗一郎, 山本樹生, 中山智祥 : 羊水染色体検査で確定診断が得られず慎重に対応した2症例. *医学雑誌*; (4-5) : 9-223.2017.

学会発表

IR・医学教育センター

岡山吉道, 下条直樹: シンポジウム2 宿主と共生細菌叢の相互作用による免疫学的恒常性の維持 司会のことば, 第66回 日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.

岡山吉道: アレルギー疾患に対する生物学的製剤による革新的な治療法 (シンポジウム21 各科に広がる生物学的製剤の現状と問題点—高価な薬剤の有効性と本当に効く患者とは—). 第66回 日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.

Okayama Y, Toyoshima S, Izaki S, Nunomura S, Kashiwakura J, Terui T, Ra C: Autoantibodies (AAbs) against the FcεRI α-chain and IgE in patients with chronic spontaneous urticarial (CSU) induced statistically higher abilities of FcεRI aggregation compared with non-atopic control (NC) subjects. Workshop 39 Aystemic autoimmune disease (3). 第46回 日本免疫学会総会・学術集会, 仙台, 2017.

Toyoshima S, Inoue T, Sakamoto-Sasaki T, Kanegae K, Ra C, Matsumoto K, Gon Y, Okayama Y: Comparison of microRNA in human mast cell-derived exosomes in innate and acquired immunity. Workshop 40 Granulocyte & Mast cells. 第46回 日本免疫学会総会・学術集会, 仙台, 2017.

三嶋信太郎, 柏倉淳一, 松本健治, 豊島翔太, 坂本朋美, 齋藤 修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ患者滑膜組織マスト細胞におけるmiR-199a-3pとPTGS2は, 有意な負の相関を示す (ミニシンポジウム20). 第66回 日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.

伊崎聡志, 豊島翔太, 西盛信幸, 柏倉淳一, 布村聡, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅智靖, 照井 正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹 (CSU) 患者における抗IgE自己抗体および抗FcεRIα鎖 (α鎖) 自己抗体の臨床的意義 (第一報) (ミニシンポジウム50), 第66回 日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.

伊崎聡志, 豊島翔太, 西盛信幸, 柏倉淳一, 布村聡, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅智靖, 照井 正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹 (CSU) 患者における抗FcεRIα鎖 (α鎖) 自己抗体の解析 (第2報) (ミニシンポジウム50). 第66回 日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.

山崎元美, 山本樹生, 豊島翔太, 坂本朋美, 柏倉淳一, 岡山吉道: ヒト妊娠初期脱落膜マスト細胞は高親和性IgE受容体FcεRIを発現している. 第66回 日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.

遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊崎聡志, 西盛信幸, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅智靖, 照井 正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹患者と健常人の好塩基球における抗FcεRIα鎖抗体 (CRA1) と抗IgE抗体刺激による反応性の比較, 第66回 日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.

松野孝幸, 豊島翔太, 柏倉淳一, 坂本朋美, 東 裕福, 松田 彰, 川名 敬, 山本樹生, 岡山吉道: ヒト妊娠初期脱落膜マスト細胞の特徴についての検討 アレルギー・好酸球研究会2017, 東京, 2017.

宮地裕美子, 菅井和子, 吉住正和, 吉原重美, 野田雅博, 木村博一, 岡山吉道: 乳幼児のRSウイルス感染後の反復喘鳴におけるTSLPの関与. アレルギー・好酸球研究会2017, 東京, 2017.

豊島翔太, 岡村祐己, 菅順一郎, 三嶋信太郎, 坂本朋美, 柏倉淳一, 李 賢鎬, 関 雅之, 齋藤 修, 羅智靖, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ (RA) における滑膜マスト細胞によるサブスタンス P (SP) 介在性炎症の増強と制御 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成28年度報告会, 東京, 2017.

菅順一郎, 三嶋信太郎, 坂本朋美, 柏倉淳一, 李賢鎬, 藤澤大輔, 関 雅之, 齋藤 修, 羅智靖, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ (RA) と変形性関節症 (OA) 患者滑膜組織マスト細胞におけるIL-17Aの発現と産生機構. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成28年度報告会, 東京, 2017.



李 賢鎬, 三嶋信太郎, 柏倉淳一, 豊島翔太, 菅順一郎, 関 雅之, 齋藤 修, 徳橋泰明, 松本健治, 岡山吉道: 関節リウマチ患者マスト細胞は変形性関節症患者マスト細胞に比較して有意に prostaglandin D<sub>2</sub> を産生する. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成28年度報告会, 東京, 2017.

伊崎聡志, 豊島翔太, 西盛信幸, 柏倉淳一, 布村聡, 鐘ヶ江加寿子, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅 智靖, 照井 正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹 (CSU) 患者における抗 IgE 自己抗体および抗 FcεRIα 鎖 (α 鎖) 自己抗体の臨床的意義. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成28年度報告会, 東京, 2017.

遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊崎聡志, 西盛信幸, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅 智靖, 照井 正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹 (CSU) 患者と健康人 (NC) の好塩基球における IgE 依存性刺激による反応性の比較. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成28年度報告会, 東京, 2017.

西盛信幸, 豊島翔太, 鐘ヶ江佳寿子, 坂本朋美, 柏倉淳一, 布村 聡, 遠藤嵩大, 藤澤大輔, 葉山惟大, 藤田英樹, 照井 正, 羅 智靖, 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹 (CSU) 患者において, hemokinin-1 はヒトマスト細胞の脱顆粒を惹起する. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成28年度報告会, 東京, 2017.

松野孝幸, 山崎元美, 坂本朋美, 豊島翔太, 村瀬隆之, 東 裕福, 川名 敬, 柏倉淳一, 山本樹生, 岡山吉道: ヒト脱落膜マスト細胞は高親和性 IgE 受容体 FcεRI を発現している. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成28年度報告会, 東京, 2017.

岡山吉道: 難治性免疫・アレルギー疾患におけるヒトマスト細胞活性化機構. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

李 賢鎬, 柏倉淳一, 齋藤 修, 徳橋泰明, 羅 智

靖, 岡山吉道: FcγRI および FcγRII を介した凝集 IgG による関節リウマチ患者由来ヒト滑膜マスト細胞の活性化. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

柳澤正彦, 柏倉淳一, 李 賢鎬, 坂本朋美, 岡村祐己, 齋藤 修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 免疫複合体刺激による培養ヒト滑膜マスト細胞からの TNF-α と IL-8 の産生に対する IL-33 の影響に関する検討. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

岡村祐己, 三嶋信太郎, 菅順一郎, 柏倉淳一, 坂本朋美, 豊島翔太, 李 賢鎬, 齋藤 修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ (RA) における滑膜マスト細胞によるサブスタンス P (SP) を介する炎症の制御機構. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

三嶋信太郎, 柏倉淳一, 豊島翔太, 菅順一郎, 関 雅之, 齋藤 修, 徳橋泰明, 松本健治, 岡山吉道: 関節リウマチ患者マスト細胞は変形性関節症患者マスト細胞に比較して有意に prostaglandin D<sub>2</sub> を産生する. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

菅順一郎, 三嶋信太郎, 坂本朋美, 関 雅之, 齋藤修, 羅智靖, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチと変形性関節症のヒト滑膜マスト細胞における IL-17A の発現. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

藤澤大輔, 柏倉淳一, 布村 聡, 紀太博仁, 菊川裕介, 藤谷靖志, 葉山惟大, 畠田優子, 坂本朋美, 照

井 正, 羅 智靖, 岡山吉道: 重症慢性特発性蕁麻疹患者の膨疹部における皮膚マスト細胞のMas-related gene X2の発現の増強. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

畠田優子, 葉山惟大, 柏倉淳一, 藤澤大輔, 照井 正, 羅 智靖, 岡山吉道: 抗dsDNA IgE抗体価の慢性蕁麻疹患者血中での有意な増加. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

伊崎聡志, 豊島翔太, 布村 聡, 鐘ヶ江佳寿子, 柏倉淳一, 中村亮介, 坂本朋美, 西盛信幸, 遠藤嵩大, 秋山晴代, 葉山惟大, 羅 智靖, 照井 正, 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹患者における抗IgE自己抗体および抗FcεRIα鎖自己抗体の臨床的意義. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

西盛信幸, 豊島翔太, 坂本朋美, 鐘ヶ江佳寿子, 遠藤嵩大, 藤澤大輔, 葉山惟大, 照井 正, 羅 智靖, 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹におけるHemokinin-1の役割. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊崎聡志, 西盛信幸, 葉山惟大, 坂本朋美, 鐘ヶ江佳寿子, 照井 正, 岡山吉道: CSU患者に対するオマリズマブの治療効果とCSU患者の好塩基球動態の関係. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

豊島翔太, 坂本朋美, 鐘ヶ江佳寿子, 井上寿男, 権寧博, 羅 智靖, 森田英明, 松本健治, 岡山吉道: マスト細胞が遊離するエクソソーム内マイクロRNAによる情報伝達. 平成29年度日本大学学部連

携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

張 昊, 豊島翔太, 羅 智靖, 松本健治, 岡山吉道: IgE依存的活性化におけるマスト細胞由来Exosome内microRNAの解析. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」, 東京, 2017.

松野孝幸, 豊島翔太, 柏倉淳一, 坂本朋美, 東 裕福, 松田 彰, 川名 敬, 山本樹生, 岡山吉道: ヒト妊娠初期脱落膜マスト細胞の特徴についての検討. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム「炎症性疾患の難治化における分子的機序の解明とそれに対する予防と治療戦略の確立」東京, 2017.

#### 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: LPS頻回投与における慢性炎症下の加齢様B細胞造血能低下について. 第122回日本解剖学会総会・学術集会. 長崎, 2017.

吉川雅朗, 相澤 信, 志賀 隆: 感覚および運動ニューロンのサブタイプ決定と軸索投射におけるRunxファミリー転写因子の役割. 第122回日本解剖学会総会・学術集会. 長崎, 2017.

#### 糖尿病代謝内科

小須田南, 田中 彩, 古川麻美, 堀田瑛子, 山名碧, 大塚雄一郎, 藤城 緑, 山口 賢, 石原寿光: 新規効率的遺伝子改変インスリン分泌細胞株作製法を用いた炭酸脱水素酵素の役割の解析. 第90回日本内分泌学会学術総会, 京都, 2017.

山口賢, 堀田瑛子, 山名 碧, 小須田南, 田中 彩, 古川麻美, 石原寿光: インスリン分泌におけるCit-ed4の役割. 第60回日本糖尿病学会年次学術集会, 愛知, 2017.

小須田南, 田中 彩, 古川麻美, 堀田瑛子, 山名

碧, 大塚雄一郎, 藤城 緑, 山口 賢, 石原寿光 : インスリン分泌MIN6細胞でのグルコース応答性インスリン分泌における炭酸脱水素酵素の役割. 第60回 日本糖尿病学会年次学術集会, 愛知, 2017.

小須田南, 田中 彩, 長澤瑛子, 山名 碧, 山口 賢, 石原寿光 : 新規効率的遺伝子改変インスリン分泌細胞株作製法を用いたインスリン分泌におけるミトコンドリア代謝の役割の解析. 第29回 分子糖尿病学シンポジウム, 大阪, 2017.

Ishihara H : Using recombinase-mediated cassette exchange to engineer MIN6 insulin secreting cells with a tetracycline-regulated expression system. The 53rd Annual meeting of the European Association for the study of diabetes. Portugal, 2017.

#### 呼吸器内科学分野

Takahashi M, Mizumura K, Maruoka S, Shimizu T, Morisawa T, Takahashi N, Gon Y, Hashimoto S : Features in Adult Patients with Anti-aminoacyl-tRNA Synthetase Antibody-positive Interstitial Lung Disease. American Thoracic Society International Conference, Washington D.C., USA, 2017.

Okamoto S, Maruoka S, Gon Y, Tsuya K, Mizumura K, Soda K, Naguro I, Ichijo H, Hashimoto S : Involvement of apoptosis signal- regulating kinase -1 in house dust mite-induced allergic asthma in mice. European Respiratory Society International Congress, Italy, 2017.

Maruoka S, Ito R, Nunomura S, Gon Y, Soda K, Ota S, Izuhara K, Ito M, Hashimoto S : Development of IL-33-induced asthmatic airway inflammation in human IL-3/GM-CSF/IL-5-transgenic NOG mice. European Respiratory Society International Congress, Italy, 2017.

Iida Y, Nakanishi Y, Takahashi N, Nishimaki H, Nishizawa T, Nakagawa Y, Shimizu T, Gon Y, Masuda S, Hashimoto S : A lung adenocarcinoma with a STRN-ALK rearrangement is poorly responsive to

Alectinib treatment. The IASLC 18th World Conference on Lung Cancer, Yokohama, 2017.

Iida Y, Takahashi N, Nakanishi Y, Nishimaki H, Nakagawa Y, Shimizu T, Mizumura K, Maruoka S, Gon Y, Masuda S, Hashimoto S : Negativity for thyroid transcription factor 1 is correlated with less neuroendocrine differentiation in small cell lung cancers. The IASLC 18th World Conference on Lung Cancer, Yokohama, 2017.

飯田由子, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 権 寧博, 清水哲男, 竹下郁子, 高橋典明, 橋本 修 : Sulforaphaneによる肺小細胞癌株に対するferroptosisの検討. 第57回 日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2017.

岡本真一, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 津谷恒太, 水村賢司, 曾田香織, 名黒功, 一条秀憲, 橋本 修 : ダニアレルゲン誘導性気道炎症におけるASK1の役割. 第57回 日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2017.

丸岡秀一郎, 伊藤亮治, 布村 聡, 権 寧博, 曾田香織, 太田昭一郎, 出原賢治, 伊藤 守, 橋本 修 : NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg マウスを用いたIL-33誘導型ヒト喘息モデルの開発. 第57回 日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2017.

飯田由子, 西澤 司, 中川喜子, 水村賢司, 清水哲男, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 高橋典明, 橋本 修 : Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) 陰性肺小細胞癌の臨床病理学的検討. 第40回 日本呼吸器内視鏡学会学術集会, 長崎, 2017.

岡本真一, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 津谷恒太, 水村賢司, 平沼久人, 曾田香織, 名黒 功, 一條秀憲, 橋本 修 : ダニアレルゲン誘導性気道炎症におけるASK1の役割. 第66回 日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.

岡本真一, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 津谷恒太, 水村賢司, 神津 悠, 坪井絵莉子, 曾田香織, 竹下郁子, 橋本 修 : dsRNAによる気道上皮前駆細胞のバリ

ア機能形成に及ぼす影響. 第66回 日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.

神津 悠, 権 寧博, 引地麻梨, 鹿野壮太郎, 古川典子, 伊佐浩紀, 桂 一仁, 降旗隆二, 赤星俊樹, 吉澤孝之, 赤柴恒人, 内山 真, 橋本 修: 閉塞型睡眠時無呼吸症候群患者を対象としたクラスター分析. 日本睡眠学会第42回 定期学術集会, 神奈川, 2017.

神津 悠, 権 寧博, 伊佐浩紀, 桂 一仁, 降旗隆二, 赤星俊樹, 吉澤孝之, 赤柴恒人, 内山 真, 橋本 修: 閉塞型睡眠時無呼吸症候群患者を対象としたクラスター分析. 第27回 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会, 宮城, 2017.

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: 特発性肺線維症に特異的な新規自己抗体の同定. IPF Academy in Itabashi, 東京, 2017.

水村賢司, 権 寧博, 丸岡秀一郎, ChoiAugustine, 橋本 修: COPDの病態形成におけるネクロプトーシスの役割について. 第91回 閉塞性肺疾患研究会, 東京, 2017.

永田善之, 権 寧博, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 岸博行, 野村泰之, 橋本 修, 大島猛史: 好酸球性副鼻腔炎の鼻茸腺導管上皮におけるIL-33, IL-25, TSLP発現の検討. アレルギー・好酸球研究会 2017, 東京, 2017.

飯田由子, 高橋典明, 中西陽子, 清水哲男, 西巻はるな, 中川喜子, 水村賢司, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 増田しのぶ, 橋本 修: 小細胞肺癌におけるThyroid transcription factor1の分子生物学的意義の解析. 第21回 東京呼吸病態研究会, 東京, 2017.

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: 特発性間質性肺炎の新規バイオマーカー. 日本大学 新技術説明会, 東京, 2017.

権 寧博, 山岸賢司, 井上寿男, 黒田和道, 坪井絵莉子, 木澤靖夫, 橋本 修: エクソソームの呼吸器疾患バイオマーカーへの応用. 平成28年度 日本大学学部連携研究推進シンポジウム, 東京, 2017.

豊島翔太, 坂本朋美, 鐘ヶ江佳寿子, 井上寿男, 権 寧博, 羅 智靖, 森田英明, 松本健治, 岡山吉道: マスト細胞が遊離するエクソソーム内マイクロRNAによる情報伝達. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム, 東京, 2017.

岡本真一, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 津谷恒太, 水村賢司, 神津 悠, 坪井絵莉子, 曾田香織, 竹下郁子, 橋本 修: ウイルス感染による気道上皮バリアの脆弱化機構の検討. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム, 東京, 2017.

高橋麻衣, 権 寧博, 引地麻梨, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 森澤朋子, 大木隆史, 坪井絵莉子, 橋本 修: 特発性肺線維症に特異的な新規自己抗体の同定. 平成29年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム, 東京, 2017.

#### 臨床検査医学分野

中山智祥, 鳴瀬弘: 先進医療により検出されたMEN1遺伝子原因バリエーション. 第90回 日本内分泌学会学術総会, 京都, 2017.

中山智祥, 鳴瀬弘: MEN1遺伝子診断先進医療体制の確立と検出された原因バリエーション. 第41回 日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 大阪, 2017.

中山智祥, 鳴瀬 弘: 当施設におけるMEN1遺伝子診断先進医療体制の確立. 第24回 日本遺伝子診療学会大会, 千葉, 2017.

藤田和博, 湯地晃一郎, 渡邊 淳, 中山智祥, 櫻井晃洋: 臨床検査学教育における遺伝医学卒前教育モデルカリキュラムの策定—日本人類遺伝学会教育推進委員会の活動報告—. 第12回 日本臨床検査学教育学会学術大会, 埼玉, 2017.

中山智祥, 鳴瀬 弘: 先進医療によるMEN1遺伝

子診断体制構築. 第49回 日本臨床検査自動化学会大会, 横浜, 2017.

星野 忠, 中山智祥: LタイプワコーCK-MB massと他社メーカーのCK-MB mass測定値の比較検討. 第57回 日本臨床化学会年次学術集会, 札幌, 2017.

志方えりさ, 佐々木貴代子, 平塚ひとみ, 田島八重子, 荒木秀夫, 高橋宏通, 小倉彩世子, 星野 忠, 藤岡和美, 里村厚司, 中山智祥: 当院における不規則抗体スクリーニングで検出された酵素法陽性LISS-IAT陰性例の頻度と検証. 第64回 日本臨床検査医学会学術集会, 京都, 2017.

中山智祥, 鳴瀬 弘: MEN1遺伝子診療体制構築—先進医療による—. 第64回 日本臨床検査医学会学術集会, 京都, 2017.

鳴瀬 弘, 久川 聡, 中山智祥: MEN1遺伝子原因バリエーション. 第62回 日本人類遺伝学会大会, 神戸, 2017.

五十嵐都志子, 真柴新一, 久川 聡, 志方えりさ, 石毛美夏, 小川えりか, 中山智祥: 診療報酬算定されたフェニルケトン尿症の遺伝学的検査を立ち上げた経験. 第35回 日本染色体遺伝子学会総会・学術集会, 奈良, 2017.

中山智祥: 遺伝子関連検査における人材育成—いま求められる認定とは—. 教育セミナーII. 第57回 日本臨床検査技師会近畿支部学会, 京都, 2017.

#### 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野

Kishino A, Hayashi K, Hidai C, Nomura Y, Oshima T: The regulation of autophagy through XBP 1-FoxO 1 interaction in auditory cells under ER stress. The 8th International Symposium on Autophagy, Nara, 2017.

岸野明洋, 林 賢, 増田 毅, 野村泰之, 大島猛史: 内耳感覚細胞におけるIRE 1 $\alpha$ -mediated XBP 1mRNA スプライシングと小胞体ストレス誘導性オートファジー. 第118回 日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 広島, 2017.

Kishino A, Hayashi K, Hidai C, Masuda T, Nomura Y, Oshima T: XBP 1regulates ER stress-induced autophagy via FoxO1. The 121st American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO Experience, 2017.

永田善之, 権 寧博, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 岸 博行, 野村泰之, 橋本 修, 大島猛史: 好酸球性副鼻腔炎の鼻茸腺導管上皮におけるIL - 33, IL - 25, TSLP 発現の検討. アレルギー・好酸球研究会, 東京, 2017.

岸野明洋, 林 賢, 野村泰之, 大島猛史: 内耳感覚細胞におけるXBP 1-FoxO 1相互作用による小胞体ストレス誘導性オートファジーの制御. 第27回 日本耳科学会総会・学術講演会, 横浜, 2017.

岸野明洋, 林 賢, 増田 毅, 野村泰之, 鳴原俊太郎, 齋藤雄一郎, 大島猛史: 内耳感覚細胞における小胞体ストレス誘導性オートファジー. 第76回 日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 長野, 2017.

#### 著書

##### 臨床検査医学分野

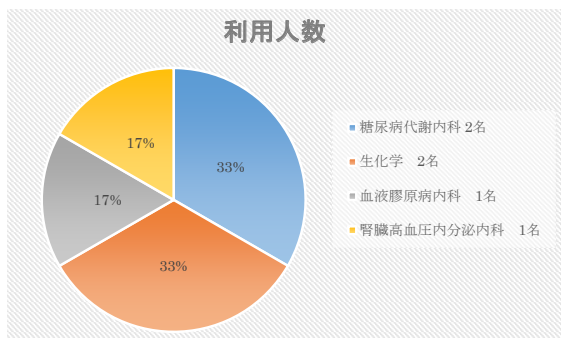
志方えりさ, 佐々木貴代子, 平塚ひとみ, 田島八重子, 中山智祥: Webによる「赤血球抗原情報検索システム」を利用した不規則抗体推定. 日本輸血細胞治療学会誌; 63 (1) : 1-2, 2017.

**ラジオアイソトープ・環境保全系**

**[RI実験室]**

平成29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

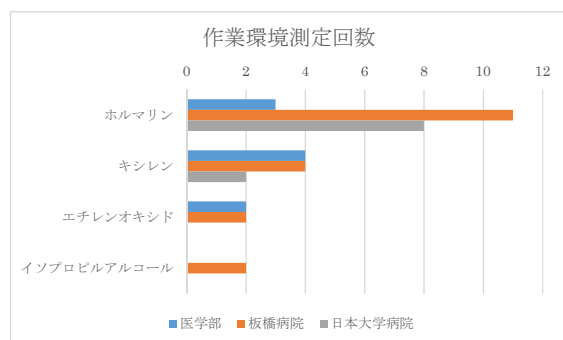
保有核種	<sup>3</sup> H	<sup>35</sup> S	<sup>14</sup> C
個数	1	1	1

平成29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



**論文**

**生化学分野**

Tamura M, Ishizawa M, Isojima T, Ozen S, Oka A, Makishima M, Kitanaka S:Functional analyses of a

novel missense and other mutations of the vitamin D receptor in association with alopecia.,Scientific reports, 7 (1), 2017

**ラボラトリーアニマル系**

**【動物飼育室】**

**【動物実験室】**

**論文**

**循環器内科学分野**

Sudo M, Li Y,Hiro T, Takayama T, Mitsumata M, Shiomi M, Sugitani M, Matsumoto T, Hao H, Hirayama A : Inhibition of plaque progression and promotion of plaque stability by glucagon-like peptide-1 receptor agonist : Serial in vivo findings from iMap-IVUS in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Atherosclerosis. Oct;265 : 283-291, 2017.

**腎臓高血圧内分泌内科学分野／日本大学総合科学研究所**

Hoshi R, Watanabe Y, Ishizuka Y, Hirano T, Nagasaki-Maeoka E, Yoshizawa S, Uekusa S, Kawashima H, Ohashi K, Sugito K, Fukuda N, Nagase H, Soma M, Ozaki T, Koshinaga T, Fujiwara K. Depletion of TFAP2E attenuates adriamycin-mediated apoptosis in human neuroblastoma cells. Oncology Reports 37 : 2459-2464, 2017. 2.

Miyamoto A, Aoyama T, Okamura M, Fukuda N, Ueno T, Abe M, Matsumoto Y:Development of a Method for Measuring Phytanic Acid as a Lifestyle-related Disease Biomarker in Rat Serum Using Ultrafast Liquid Chromatography-Ultraviolet Spectrophotometry Combined with a Modified 2-Nitrophenylhydrazine Derivatization Method. Analytical Science 33 (3) :365-368, 2017, 3

Tanaka S, Haketa A, Yamamuro S, Suzuki T, Kobayashi H, Hatanaka Y, Ueno T, Fukuda N, Abe M, Yoshino A, Soma M. Marked alteration of glycemic profile surrounding lanreotide administration in acromegaly : a case report. J Diabetes Investig. 2017 [Epub ahead of print]

Kitai M, Fukuda N, Ueno T, Endo M, Maruyama T, Abe M, Okada K, Soma M, Matsumoto K. The effects of a spleen tyrosine kinase inhibitor on the progression of lupus nephritis in mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 134 : 29-36, 2017, 5.

Matsuda H, Campion CG, Fujiwara K, Ikeda J, Cossette S, Verissimo T, Ogasawara M, Gaboury L, Saito K, Yamaguchi K, Takahashi S, Endo M, Fukuda N, Soma M, Hamet P, Tremblay J. HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 8 (41) :69559-69576. 2017.

Watanabe Y, Ishizuka Y, Hirano T, Nagasaki-Maeoka E, Hoshi R, Yoshizawa S, Uekusa S, Kawashima H, Sugito K, Shinohara K, Fukuda N, Nagase H, Soma M, Koshinaga T, Fujiwara K. ZAR1 knockdown promotes the differentiation of human neuroblastoma cells by suppression of MYCN expression. *Medical Oncology* 8; 34 (9) :158-175. 2017

#### 整形外科学分野

Nakayama E, Matsumoto T, Kazama T, Kano K, Tokuhashi Y : Transplantation of dedifferentiation fat cells promotes intervertebral disc regeneration in a rat intervertebral disc degeneration model. *Niochem Biophys Res Commun*. 18;493 (2) : 1004-1009, 2017.

#### 小児科学分野

村井健美, 松本太郎, 石毛美夏, 風間智彦, 加野浩一郎, 麦島秀雄 : 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治療効果. *日大医学雑誌* 76 (5) 187-194, 2017.

#### 人体病理学分野

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* (5.992), 397 : 72-82, 2017.

#### 総合医学研究所 医学研究支援部門

谷口由樹, 藤田順一, 黒田和道, 石井敬基 : 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 About X-ray device newly installed at Medical research support center, Laboratory for animal experiments. *日本大学医学部総合医学研究所紀要* Vol,5, pp.63-67, 2017.

#### 学会等発表

##### 循環器内科学分野

春田 裕典, 廣 高史, 高山忠輝, 深町大介, 李 予昕, 須藤晃正, 黒澤毅文, 村田伸弘, 平山篤志 : 糖尿病管理のスタンダード 血管内イメージングからみた糖尿病の動脈硬化の特性. 第65回 日本心臓病学会学術集会, 大阪, 2017

##### 腎臓高血圧内分泌内科学分野 / 日本大学総合科学研究所

丸山高史, 福田 昇, 松本太郎, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高浩, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内 裕 : TSG-6を介したDFAT細胞移植の免疫性腎炎に対する改善効果. 第16回 日本再生医療学会, 仙台, 2017.3.

田中 翔, 福田 昇, 松本太郎, 阿部雅紀 : iPS細胞から腎尿細管細胞への分化誘導による遺伝性腎尿細管疾患の診断法の確立. 第16回 日本再生医療学会, 仙台, 2017.3.

Chen L, Fukuda N, Negishi E, Mayumi Katakawa, Matsumoto T: Role of C3 in renin expression by mesenchymal stem cells differentiating into VSMCs. 第16回 日本再生医療学会, 仙台, 2017.3.

池田 迅, 松田裕之, 藤原恭子, 山口健哉, 高橋 悟, 遠藤守人, 福田 昇, 相馬正義, Pavel Hamet, Johanne Tremblay : 新規高血圧関連遺伝子HCaRGはErbB受容体に依存した腎細胞癌の腫瘍増大や血管新生を抑制する. *日本泌尿器科学会総会* 鹿児島県, 2017. 4.22.

田中 翔, 福田 昇, 羽田田公, 小林洋樹, 畑中善成, 阿部雅紀, 相馬正義 : 疾患特異的iPS細胞を用

いた偽性副甲状腺機能低下症の診断法の確立. 第90回 日本内分泌学会学術総会, 京都, 2017.4.22.

松田裕之, 池田 迅, 小笠原茉衣子, 矢内 充, 福田 昇, 相馬正義, Hamet Pavel, Tremblay Johanne: HCaRGはRenal tubular epithelial cell barrier機能を増強し急性腎障害を予防する. 第60回 日本腎臓学会学術総会, 仙台, 2017.5.26

池田 迅, 松田裕之, 福田 昇, 矢内 充, 相馬正義, Hamet Pavel, Tremblay Johanne: 近位尿細管でのHCaRGの発現低下は, 慢性腎臓病や腎細胞癌を進展させる原因となる. 第60回 日本腎臓学会学術総会, 仙台, 2017.5.26

根岸英理子, 福田 昇, 遠藤守人, 岡田一義, 阿部雅紀: SHRにおいて補体C3は腎尿細管上皮間葉化による組織RA系の活性化から塩分感受性高血圧を引き起こす. 第60回 日本腎臓学会学術総会, 仙台, 2017.5.26

堀越 周, 福田 昇, 根岸英理子, 森内正理, 大月伯恭, 上野高浩, 遠藤守人, 阿部雅紀: 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60回 日本腎臓学会学術総会, 仙台, 2017.5.26

田中 翔, 中村吉宏, 小林洋樹, 畑中善成, 羽毛田公, 上野高浩, 福田 昇, 阿部雅紀, 相馬正義: 腎臓に於ける臭覚受容体と本態性高血圧の関連. 第60回 日本腎臓学会学術総会, 仙台, 2017.5.26

大月伯恭, 福田 昇, 根岸英理子, 森内正理, 堀越周, 常見明子, 岡田一義, 阿部雅紀: 高血圧自然発症ラット由来間葉系組織での補体C3とTWIST-1の関係性の検討. 第60回 日本腎臓学会学術総会, 仙台, 2017.5.26

岡村雅弘, 上野高浩, 福田 昇, 宮本 葵, 松本宜明, 岡田一義: 阿部雅紀. 高血圧自然発症ラット(SHR)の高血圧における腎ACOX2の役割. 第60回 日本腎臓学会学術総会, 仙台, 2017.5.26

東 龍英, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 谷口由樹, 遠藤守人, 福田 昇, 松本太郎, 阿部雅紀: 脱分化脂肪細胞(DFAT)のANCA関連腎炎モデルマウスに対する細胞移植の効果. 第60回 日本腎臓学会学術総会, 仙台, 2017.5.27

田中 翔, 福田 昇, 羽毛田公, 小林洋樹, 阿部雅紀: iPS細胞から腎尿細管細胞への分化誘導による偽性副甲状腺機能低下症の診断法の確立. 第60回 日本腎臓学会学術総会, 仙台, 2017.5.27

村田悠輔, 上野高浩, 小林洋樹, 田中翔, 岡村雅弘, 常見明子, 逸見聖一朗, 梶原麻実子, 矢吹美奈, 福家吉伸, 福田 昇, 相馬正義, 阿部雅紀, 松本宜明: 腎臓における生体内時計の制御を受ける血圧制御遺伝子の同定. 第60回 日本腎臓学会学術総会, 仙台, 2017.5.28

福田 昇, 西山 成: SHRは補体C3の高発現が間葉組織脱分化から局所RAAS亢進による高血圧病態を形成している. 第40回 日本高血圧学会総会シンポジウム, 松山, 2017.10.20

堀越 周, 福田 昇, 根岸英理子, 森内正理, 大月伯恭, 上野高浩, 菱木三佳乃, 遠藤守人, 阿部雅紀: 糖尿病腎症の進展におけるTGF- $\beta$ 1の関与と新規遺伝子制御薬PIポリアミドの効果. 第40回 日本高血圧学会総会, 松山, 2017.10.20

田中 翔, 中村吉宏, 小林洋樹, 畑中善成, 羽毛田公, 菱木三佳乃, 上野高浩, 福田 昇, 阿部雅紀, 相馬正義: 高血圧自然発症ラットの腎臓におけるOlfactory receptor 活性化と高血圧性腎症バイオマーカーとしてのOlfactory receptor 59の可能性. 第40回 日本高血圧学会総会, 松山, 2017.10.20

大月伯恭, 福田 昇, 森内正理, 堀越 周, 常見明子, 阿部雅紀: 高血圧自然発症ラットにおける補体C3の発現亢進に対する転写因子TWIST1の関与. 第40回 日本高血圧学会総会, 松山, 2017.10.20

田中 翔, 中村吉宏, 小林洋樹, 畑中善成, 羽毛田公, 菱木三佳乃, 上野高浩, 福田 昇, 阿部雅紀,



相馬正義：SHR/Izmの内臓脂肪における生体内時計の異常。第40回日本高血圧学会総会，松山，2017.10.20

Lan Chen, Noboru Fukuda, Eriko Negishi, Mayumi Katakawa, Akiko Tsunemi, Kosuke Saito, Kyoko Fujiwara, Kazuhiro Hagikura, Morito Endo, Masanori Abe：Role of C3 in Renin Expression by Mesenchymal Stem Cells Differentiating Into VSMCs. 第40回日本高血圧学会総会，松山，2017.10.20

大月伯恭，福田 昇，根岸英理子，片川まゆみ，小松一俊，常見明子，上野高浩，阿部雅紀，真下知士：SHR/Izmの全ゲノムシーケンスでの補体C3構造とゲノム編集技術によるC3ノックアウトSHR/Izmの病態解析。第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会シンポジウム，福岡，2017.10.24

宇都宮 慧，丸山高史，深澤みゆき，常見明子，谷口由樹，遠藤守人，福田 昇，松本太郎，阿部雅紀：免疫異常に起因する進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の開発。第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会，福岡，2017.10.24

Lan Chen, 福田 昇：間葉系間細胞から血管平滑筋細胞への分化によるレニン発現に於ける補体C3の関与。第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会，福岡，2017.10.24

根岸英理子，福田 昇，小松一俊，片川まゆみ，遠藤守人，阿部雅紀，西山 成：SHRの塩分感受性高血圧は補体C3発現亢進による腎内RA系活性化に基づく。第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会，福岡，2017.10.24

大月伯恭，福田 昇，根岸英理子，森内正理，堀越周，常見明子，阿部雅紀：SHRの間葉系組織での補体C3の高発現に於ける転写因子TWIST1の関与。第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会，福岡，2017.10.24

森内正理，福田 昇，中井茂樹，井上貴史，峰重隆幸，大月伯恭，堀越 周，遠藤守人，阿部雅紀：マ-

モセットでの腎繊維化モデルの確立とヒトTGF- $\beta$ 1に対するPIポリアミドの創薬開発。第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会，福岡，2017.10.24

堀越 周，福田 昇，根岸英理子，森内正理，大月伯恭，常見明子，上野高浩，遠藤守人，阿部雅紀：糖尿病性腎症に於けるTGF- $\beta$ 1の関与と新規ペプチド医薬PIポリアミドの抑制効果。第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会，福岡，2017.10.24

堀越 周，福田 昇，遠藤守人，小林洋樹，森内正理，大月伯恭，上野高浩，阿部雅紀：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ポリアミドの抑制効果。心血管代謝週間CVMW2017(第21回日本心血管内分泌代謝学会学術総会)，大阪，2017.12.10

大月伯恭，福田 昇，森内正理，堀越 周，常見明子，深澤みゆき，阿部雅紀：高血圧自然発症ラットにおける補体C3と転写因子TWIST1の関係。心血管代謝週間CVMW2017(第21回日本心血管内分泌代謝学会学術総会)，大阪，2017.12.10

#### 形成外科学分野

副島一孝，樫村 勉，風間智彦，松本太郎，菊池雄二，仲沢弘明：熱傷創治療における脱分化脂肪細胞(DFAT)の有用性。第43回日本熱傷学会総会学術集会，2017.5

Kashimura T, Soejima K, Kazama T, Kikuchi Y, Matsumoto T, Nakazawa H The Effect of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat (DFAT) Cells on Ischemic Tissue. 17th European Burns Association Congress, 2017.9

#### 神経外科学分野

Noriyuki Narita, Kazunobu Kamiya, Tomohiro Ishii, Teruyasu Hirayama：Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation in Oromandibular Dystonia, Boston, USA. 2017.04.21

Furukawa Yuto et al：Effects of Apyrase in a rat model of cerebral contusion injury. Neuroscience

2017, 2017.11.13

平山晃康：脳神経外科領域でのてんかん治療の現況，教育講演，UCJ研修セミナー，東京，2017.2.20

平山晃康：外傷性頭頸部血管障害，教育講演，第40回日本脳神経外傷学会 脳神経外傷教育セミナー，東京，2017.3.11

平山晃康：本邦における脳神経外傷治療の現状と未来，P5-2 プレナリーセッション，指定発言：脳神経外傷，第37回日本脳神経外科コンgres総会，横浜，2017.5.12

平山晃康：急性虚血性脳卒中，教育講演，朝霞台ENLSコース，埼玉，2017.5.21

平山晃康：脳神経外科疾患とDOAC，開会の辞：城北地区 Expert meeting 2017，東京，2017.5.22

平山晃康，荻野暁義，福島匡道，須磨 健，吉野篤緒：血栓化大または巨大型動脈瘤の病理所見と治療選択，STROKE2017，大阪，2017.3.16.

福島匡道，荻野暁義，渋谷浩司，大島秀規，前田剛，平山晃康，吉野篤緒：横・S状静脈洞部硬膜動静脈瘻に対し外科治療を選択した1例：Labbe's veinの温存，STROKE2017，大阪，2017.3.16

福島匡道，荻野暁義，渋谷浩司，大島秀規，前田剛，平山晃康，吉野篤緒：基底核出血の血腫穿破によるくも膜下出血：静脈灌流の検討，STROKE2017，大阪，2017.3.18

福島匡道，四條克倫，渡辺 充，荻野暁義，島田貴史，須磨 健，大島秀規，平山晃康，吉野篤緒：頭蓋底外科におけるflat-panel detector cone-beam CTの応用意義：血管走行と骨構造の描出力，第29回日本頭蓋底外科学会，長野 2017.6.15

平山晃康，荻野暁義，五十嵐崇浩，四條克倫，茂呂修啓，福島匡道，大島秀規，須磨 健，吉野篤緒：治療困難な血栓化大または巨大動脈瘤に対する治療

戦略と成績，第76回日本脳神経外科学会学術総会，名古屋 2017.10.13.

福島匡道，荻野暁義，茂呂 修啓，大島秀規，前田剛，平山晃康，吉野篤緒：基底核出血の血腫穿破によるくも膜下出血：静脈灌流の検討：第76回日本脳神経外科学会学術総会，名古屋 2017.10.12.

須磨 健，梶本隆太，渡辺 充，荻野暁義，渋谷肇，平山晃康，吉野篤緒：中大脳動脈末梢部閉塞に対する血栓回収術の検討：第76回日本脳神経外科学会学術総会，名古屋 2017.10.12.

岩瀬正顕，奥寺 敬，池田尚人，黒岩敏彦，加藤庸子，松前光紀，平山晃康，浅井昭雄：PNLS (Primary Neurosurgical Life Support) 開催状況2017，第76回日本脳神経外科学会学術総会，名古屋 2017.10.13.

西野克寛，山口 卓，鈴木隼人，平山晃康，Milan Dimitrijevic:SCSとITBにより治療した末梢発症型線維筋痛症による難治性疼痛の1例，第76回日本脳神経外科学会学術総会，名古屋，2017.10.14.

須磨 健，渋谷 肇，片桐 彰久，梅沢武彦，平山晃康，吉野 篤緒：脳動脈瘤ステント併用塞栓術におけるNeuroform ATLASの使用経験，第33回日本脳神経血管内治療学会，東京，2017.11.24

平山晃康，荻野暁義，福島匡道，須磨 健，大島秀規，吉野篤緒：治療困難な未破裂血栓化大または巨大動脈瘤に対する血管内治療の長期成績，第33回日本脳神経血管内治療学会，東京，2017.11.24

平山晃康：生活習慣病と脳血管障害：脳卒中後疼痛に対する最新治療：第31回日大城東医会学術講演会，東京，2017.9.27

#### 整形外科学分野

小山公行，中山潤志，風間智彦，上井 浩，徳橋泰明，松本太郎：ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 静脈内投与による効果の検討，日本整形外科学会，沖縄，2017

### 眼科学分野

崎元 暢, 山上 聡: 実験的角膜実質炎症におけるインフラマソーム関連分子の発現. 第41回 日本角膜学会総会・第33回 日本角膜移植学会. 福岡, 2017.2

### 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野

原田英誉, 平井良治, 大島猛史: 下顎神経切断によるラット耳管開放症モデル確立の試み. 第27回 日本耳科学会総会・学術講演会 2017.4.

### 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: LPS頻回投与における慢性炎症下の加齢様B細胞造血低下について. 第122回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 長崎, 2017.3

### 生化学分野

Michiyasu Ishizawa, Makoto Makishima: Lithocholic acid selectively induces ileal CYP24A1 mRNA via Vitamin D receptor. Keystone Symposia, Bile Acid Receptors as Signal Integrators in Liver and Metabolism., 2017.

石澤通康, 風間智彦, 松本太郎, 榎島 誠: 成熟脂肪細胞の脱分化による性質変化に対するビタミンDシグナルの影響. 文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の臨床応用に向けた橋渡し研究」平成28年度 研究成果公開シンポジウム, 2017.

石澤通康, 風間智彦, 松本太郎, 榎島 誠: 成熟脂肪細胞の脱分化による性質変化に対するビタミンDシグナルの影響. 日本大学学長特別研究「成熟脂肪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28年度 研究成果報告会, 2017.

梅田(遠藤)香織, 梅田 直, 中島弘幸, 関 修司, 榎島 誠: 誘導性急性肝炎モデルマウスにおけるVDRの肝免疫調節作用. 第3回 Neo Vitamin D Workshop学術集会, 東京, 2017.8

梅田(遠藤)香織: ビタミンDの肝臓における免疫・炎症調節作用. ConBio2017(生命科学系学会合同年次大会) 第40回 日本分子生物学会年会・第90回 日本生化学会大会, 神戸, 2017.12

石澤通康, 榎島 誠: ビタミンD受容体の糞中胆汁酸代謝への関与. 日本レチノイド研究会第28回学術集会. 2017.11

石澤通康, 榎島 誠: 高脂肪食摂取マウスの胆汁酸代謝系におけるビタミンD受容体の関与. 第39回胆汁酸研究会. 2017.11

### 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, 本田元巳, ベゼハマリナ, 常見博子, 内田 圭, 大林茂男, 松本明, 石井敬基: イヌ飼育室から免疫不全ブタ飼育室への改装転用例 Example of conversion from dog rearing facility to immunocompromised swine rearing facility. 第51回 日本実験動物技術者協会総会, 山形, 2017.10.

### 著書

#### 腎臓高血圧内分泌内科学分野/日本大学総合科学研究所

福田 昇, 丸山高史, 松本太郎: 慢性腎不全に対する体性幹細胞療法. 特集号 腎代替療法-機械工学と再生医療, 最新医学 93-97, 2017, 12.

### 総合医学研究所 医学研究支援部門

藤田順一: ブタ・ミニブタ実験マニュアル-飼育管理から, 関連法規, 実験手技, 週術管理まで-. ブタ・ミニブタ実験マニュアル編集委員会編, 株式会社アドスリー, 2017.8. 編集協力

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, 國分眞一朗, 嶋村政男, 西山博孝,  
羽尾裕之, 原 弘之, 深谷 親, 間崎武郎  
幹事 井上広一, 葛西玲広, 藤田順一, 藤原宏樹

(50音順)

Editorial Board

Editor-in-Chief Makoto MAKISHIMA  
Associate Editors Yukimoto ISHII, Makoto UCHIYAMA, Shinichiro KOKUBUN,  
Masao SHIMAMURA, Hirotaka NISHIYAMA, Hiroyuki HAO,  
Hiroyuki HARA, Chikashi FUKAYA, Takero MAZAKI  
Managing Editors Koichi INOUE, Reo KASAI, Jun-ichi FUJITA, Hiroki FUJIHARA

---

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

---