

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.8 / December 2020

日本大学医学部総合医学研究所

Research Institute of Medical Science, Nihon University School of Medicine

目 次

COMMD5/HCaRG による腎尿細管保護メカニズムに関する検討	松田 裕之 他	1
自己免疫・アレルギー疾患の難治化におけるマスト細胞の役割の解明	岡山 吉道 他	9
術中迅速病理診断における遺伝子変異・マーカー分子簡易検出技術の実用化に向けた研究	羽尾 裕之 他	12
吸入療法支援のためのクラウド型在宅医療連携モデルに関する研究 (2)	伊藤 玲子 他	15
病理診断ガイドアプリケーションシステムの構築 第2報	中西 陽子 他	23
GOD-POD-UnaG 法を用いた血中アンバウンドビリルビン自動測定機器の開発	森岡 一朗 他	27
生体における新規ポリエチレングリコール化合物 PEG-B による抗腫瘍効果の検討	金田 英秀 他	31
高齢者バランス障害, ふらつき患者における動的客観的評価法の研究	野村 泰之 他	34
NOG マウスを用いたメソトレキサート関連リンパ腫の発症における EBV の関与の解明	北村 登 他	37
大動脈疾患や平滑筋腫瘍における細胞骨格蛋白関連分子 smoothelin の病態への関与	羽尾 裕之 他	40
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	照井 正 他	42
医学研究支援部門の利用に関する成果・業績等一覧.....		0

INDEX

Renal protective effects of COMMD5/HCaRG against acute kidney injury	Hiroyuki MATSUDA et. al	1
Elucidation of roles of mast cells in the pathogenesis of refractory autoimmune and allergic diseases	Yoshimichi OKAYAMA et. al	9
Development of new technology for intra-operative rapid pathological diagnosis	Hiroyuki HAO et. al	12
Study on home medical care cooperation system for inhalation therapy using the cloud type service (2)	Reiko ITO et. al	15
Construction of an application for efficient pathological diagnosis	Yoko NAKANISHI et. al	23
Development of the automated serum unbound bilirubin measurement instrument using GOD-POD-UnaG method	Ichiro MORIOKA et. al	27
Analysis of anti-tumor function of new polyethylene glycol derivative PEG-B in vivo	Hide KANEDA et. al	31
A study of the locomotive analyze for the balance disorder	Yasuyuki NOMURA et. al	34
The relation of EBV in development of methotrexate associated lymphoproliferative disease using hNOG mice	Noboru KITAMURA et. al	37
Pathological role of smoothelin for aortic diseases and smooth muscle cell tumor	Hiroyuki HAO et. al	40
Development of new therapeutic strategy and investigation of the pathogenesis of severe immunological and allergic diseases	Tadashi TERUI et. al	42
Lists of publication and results from Utilization in Medical Research Center		0

COMMD5/HCaRGによる腎尿細管保護メカニズムに関する検討

松田裕之¹⁾, 舩廣善和²⁾

Renal protective effects of COMMD5/HCaRG against acute kidney injury

Hiroyuki MATSUDA¹⁾, Yoshikazu MASUHIRO²⁾

要旨

COMMD5/HCaRGは、腎尿細管において虚血再還流障害により脱分化した上皮細胞の再分化を促進し、尿細管の修復を促す分子である。今回、新たにCOMMD5の腎尿細管保護メカニズムを明らかにするために、近位尿細管特異的COMMD5高発現マウス (COMMD5-Tg) を用いて薬剤性急性腎障害モデルを作製し、実験を行った。COMMD5-Tgマウスでは、シスプラチン投与後の腎機能障害や尿細管組織障害、アポトーシスが、野生型マウスに比べ有意に軽減されており、E-cadherinの発現も保たれていた。さらに、COMMD5は近位尿細管だけでなく、間質や遠位尿細管の障害も軽減していた。以上より、近位尿細管におけるCOMMD5は、障害後の尿細管修復を促進するだけでなく、E-cadherinの発現制御を介して、近位尿細管上皮細胞の細胞間構造を強固にし、尿細管上皮バリアを維持することで、腎臓が障害を受けた際に、尿のうっ滞や炎症細胞の浸潤を防ぎ、間質や遠位尿細管を保護することで、尿細管の恒常性を保ち、腎障害の発症や進展を抑制していると考えられた。

1. 緒言

本研究は、2018年度日本大学学術研究助成金 [総合研究] (No. 総18-013) を受け、2年間に渡りCOMMD5/HCaRGを中心に腎臓病の病態生理の解明と新規治療法の開発を目的に行われた。

我が国の血液透析患者数は、2017年に33万人を超えて増加の一途をたどっており、年間1兆6000億円に上ると推計されている医療費も社会的問題となっている。従来、急性腎障害 (AKI) は回復可能な治る病気と考えられていた。しかし、AKIは多臓器不全を伴うことが多く、その死亡率の高さや、糖尿病などの基礎疾患を持つ患者がAKIを起こすと、長期予後が著しく悪化することなどが広く認識されるようになり、AKIが慢性腎臓病 (CKD) に移行するメカニズムについて注目されるようになった。

COMMD5/HCaRGは、Montreal大学のTremblay教授らにより2000年に初めて報告された新規遺伝子で、高血圧自然発症モデル動物で高発現しており、細胞外カルシウム濃度により発現が誘導されることから、Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG) と名付けられた¹⁾。後に、C末端側の領域にcopper metabolism gene MURR1 (COMM) domainをもつというよく似たドメイン構造から、COMMDファミリータンパク質に分類された。COMMD5は、腎臓の尿細管に強く発現しており、細胞の増殖・分化・移動などに関与している。近位尿細管特異的COMMD5高発現遺伝子改変 (COMMD5-Tg) マウスを用いて作製した腎虚血再還流モデルの実験では、COMMD5はp21の発現を誘導し、障害を受け脱分化した尿細管上皮細胞の再分化を促し、尿細管

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

松田裕之: matsuda.hiroyuki75@nihon-u.ac.jp

の修復を促進し、腎機能及び生存率を改善した²⁾。このCOMMD5の間葉上皮移行を促す作用に着目し、癌細胞株と正常細胞株でCOMMD5の発現を比べたところ、癌細胞株でCOMMD5の発現が低下していることが分かった。次に、腎細胞癌患者の病理標本を用いてCOMMD5の発現を解析したところ、腎細胞癌だけでなく、腫瘍径が大きく予後不良であった患者の正常尿細管においてもCOMMD5の発現が低下していた(図1)^{3), 4)}。そして、正常尿細管のCOMMD5発現が高いグループほど、5年生存率が良いことも明らかになった。COMMD5を腎癌細

胞に高発現させると、癌細胞の分化が促され、細胞周期が抑制され、細胞死が誘導された。このCOMMD5高発現癌細胞をマウスの皮下に移植したところ、腫瘍増大や腫瘍血管新生が抑制された。メカニズム的には、正常尿細管上皮細胞から分泌されたCOMMD5が、腎癌細胞の上皮成長因子受容体の発現を抑制し、腫瘍細胞の生存・増殖の主要伝達経路であるMAPKやPI3K/AKTシグナルの活性化を抑制することが明らかになった。

これらの知見から、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病患者の腎臓は、慢性的なストレスに曝されて

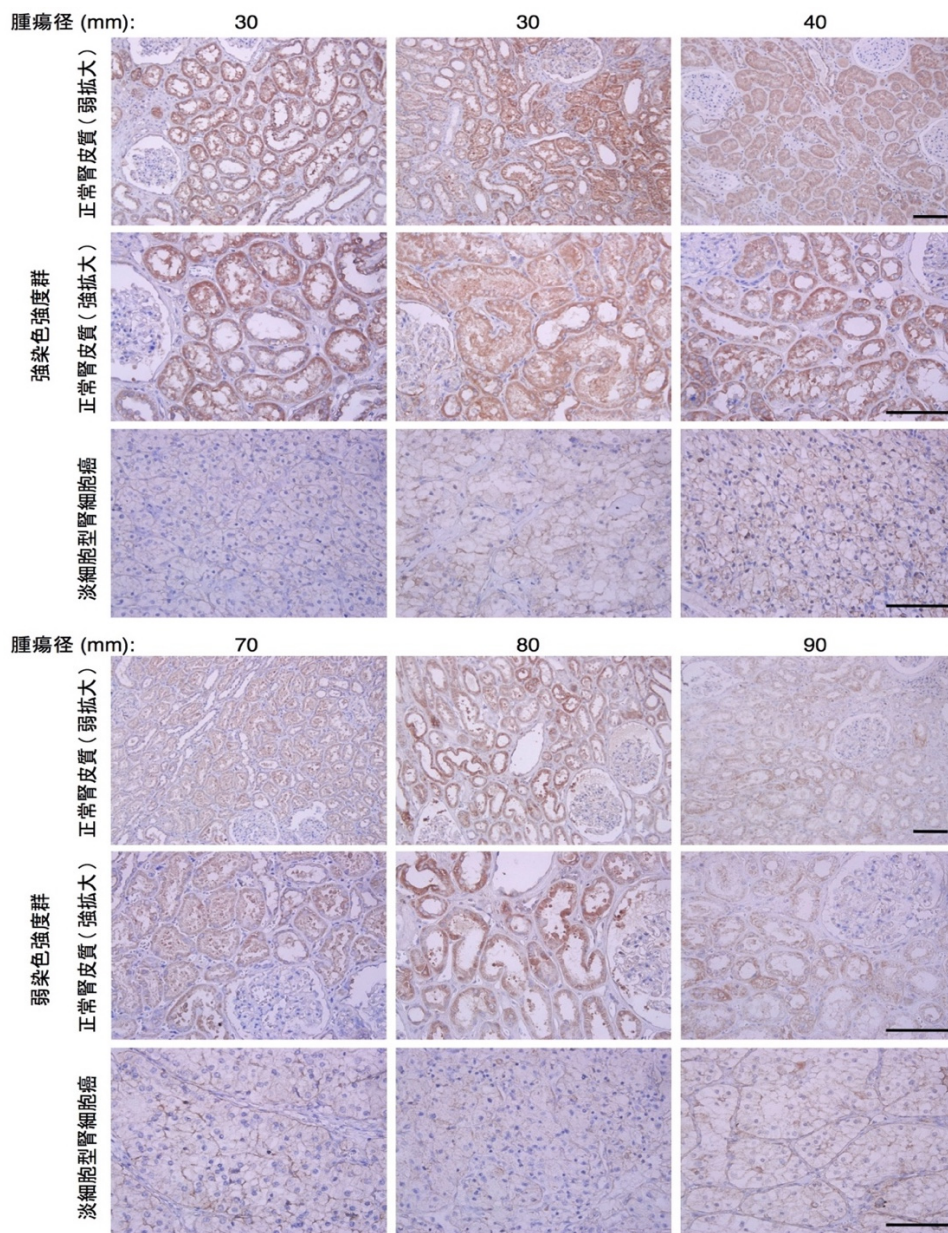


図1 淡明細胞型腎細胞癌患者の腎細胞癌と正常腎皮質におけるCOMMD5の免疫組織染色像。Scale bar = 0.1 mm。(文献4より引用)

おり、常に尿細管の保護と修復のため COMMD5 の発現が亢進しているのではないかと考えた。そして、AKIによる過度な尿細管障害で尿細管上皮細胞が脱落し、COMMD5の発現が著しく低下した場合に、腎尿細管上皮バリアが失われAKIからCKDに進展し、一部の障害細胞の癌細胞化が起こるのではないかという仮説を立てた。

2. 概要

これまでに明らかにしてきたCOMMD5のもつ障害後の尿細管修復作用に加え、COMMD5をターゲットとした腎臓病の新たな予防法や治療法を開発する目的で、COMMD5による腎保護メカニズムを明らかにしようと試みた。そこで、COMMD5による尿細管上皮細胞の間葉上皮移行の促進メカニズムと、腎尿細管上皮バリアの制御メカニズムの解明を目的とし、以下の実験を計画した。

2-1 COMMD5がE-cadherinの発現を亢進し、尿細管上皮細胞を保護する

虚血や薬剤暴露に曝された尿細管では、ミトコンドリア機能不全が引き起こされ、酸化ストレスが上昇し、尿細管上皮細胞が死に至る。そこで、COMMD5を高発現させた細胞や、ノックダウンした細胞に、抗癌剤であるシスプラチンの投与、または過酸化水素暴露による酸化ストレス刺激を行い、尿細管上皮細胞間の構造変化や、細胞内の恒常性維持機構としてオートファジーに着目し、COMMD5の尿細管上皮細胞保護メカニズムについて検討した。

2-2 COMMD5が腎尿細管上皮バリア機構を維持し、腎障害を抑制する

これまでに、COMMD5が尿細管の修復に関わっていることを、*in vivo* 実験を通じて明らかにしてきたが、障害を予防し、軽減する働きがあるのかどうかについては明らかになっていない。そこで、本研究ではCOMMD5-Tgマウスを用いて、薬剤性腎障害モデルであるシスプラチン腎症を作製した。近位尿細管に高発現したCOMMD5は、E-cadherinの発現制御を介して、近位尿細管細胞のアドヘレンス結合を強固にし、管腔側の細胞膜とタイト結合による尿細管上皮バリアを維持することで、尿細管が障害を受けた際に、尿のうっ滞や漏出を防ぎ、間質や遠位尿細管の障害を軽減し、腎障害の発症や進展を抑制しているのではないかと、仮説を立て検討した。

3. 方法及び結果

3-1 COMMD5はE-cadherinを介し、細胞間構造を維持する

これまでの研究において、COMMD5が上皮系マーカーであるE-cadherinの回復と、間葉系マーカーであるVimentinの低下を伴い、障害により脱分化した尿細管上皮細胞の再分化を促進し、尿細管上皮細胞の修復を促していることを報告している²⁾。本研究では、COMMD5によるE-cadherinの発現制御に着目し、培養ヒト尿細管上皮細胞株(HK-2)に薬剤暴露を行い、COMMD5の細胞保護メカニズムを検討した。コントロールのHK-2細胞では、シスプラチン暴露後2時間後にp21の発現を増強が見られ、同時にE-cadherinの発現ピークが観察された(図2)。p21の転写因子の一つであるFoxOタンパクについても、観察したところ、FoxO1のリン酸化が抑制され、FoxO1のタンパク量がp21の発現と同時に増加していた。siRNAを用いてCOMMD5を抑制したところ、核内FoxO1のリン酸化が亢進し、FoxO1が核外で分解され、p21の発現が低下し、E-cadherinの発現が抑制されていることが分かった。以上の結果から、COMMD5はFoxOを介して、E-cadherinの転写因子であるp21を誘導し、E-cadherinの発現を制御している可能性が考えられた。

これまでに、COMMD5がRab5との相互作用により、上皮成長因子受容体の細胞内輸送に関与していることを報告したが⁵⁾、COMMD5の相互因子や受容体の存在など、まだ明らかになっていない点が多くある。本研究では、COMMD5の関わる新たな伝達経路を明らかにする目的で、COMMD5の相互因子の探索を行った。ヒトCOMMD5のN末端、またはC末端にFlagタグを結合させた2種類のCOMMD5発現プラスミドを作製し、ヒト胎児腎臓由来のHEK-293細胞に遺伝子導入を行った。この遺伝子導入された細胞のタンパク質を用いて免疫沈降と質量分析を行ったところ、COMMD5の相互因子の候補として新たに23のタンパク質が同定された。これらの候補タンパク質の中には、COMMDファミリーであるCOMMD7やCOMMD9、細胞内輸送に関わるタンパク複合体、遺伝子制御に関わる核内分子などが含まれていた。これらの候補タンパクの中から、今回はE-cadherinのエンドサイトーシスに関わるタンパク複合体であるVPSsタンパク質に

注目し、検討を行った。COMMD5をノックダウンしたHK-2細胞にシスプラチン処理を行ったところ、E-cadherinの発現ピークと同時にVPS29の発現亢進が見られたが、コントロール細胞に比べ、シスプラチン処理前から処理後まで継続したVPS29の発現抑制が認められた(図2)。VPS29には、E-cadherinの細胞内リサイクリングに関与しているとの報告がある。

以上より、COMMD5のE-cadherin発現制御メカニズムとしては、①p21の誘導を介して、E-cadherinのmRNA発現を亢進している可能性と、②VPSタンパク質との相互作用により、E-cadherinのリサイクリングを促進している可能性が考えられた。

次に、タイト結合はE-cadherinが構成するアドヘレンス結合に依存しており、アドヘレンス結合が破壊されると、上皮バリアとして機能するタイト結合も破壊されることが知られている。そこで、HK-2細胞のタイト結合の機能を、Trans epithelial/trans endothelial electrical resistance (TEER) を用いて評価した。シスプラチン処理を行ったコントロールのHK-2細胞シートでは経時的にTEERが低下しており、上皮バリア機能が低下していると推測され

た。COMMD5をノックダウンすると、コントロールの細胞シートに比べ、さらにTEERが短時間で低下していることが分かった。これらの知見から、COMMD5は、E-cadherinの発現を亢進させることでアドヘレンス結合を強固にし、タイト結合を含む尿細管上皮バリア構造を維持することにより、腎障害を予防するのではないかと考えられた。

3-2 COMMD5はミトコンドリアの障害を軽減する

オートファジーは、栄養飢餓時にエネルギー産生のために、細胞内のタンパク質を分解し、アミノ酸を供給する目的で強く誘導されることが知られている。また、虚血や薬剤性腎障害において、傷害されたミトコンドリアなどの細胞内小器官や、変性タンパク質を除去する細胞内の恒常性維持機構として、尿細管保護に関与していることも知られている。一方で、オートファジー制御の破綻から生じる過剰なオートファジーは、臓器障害を進行させることも報告されている。今回、マウス尿細管上皮細胞(TCMK-1)にCOMMD5を高発現させ、酸化ストレス下における細胞死や、オートファジーに与える影響について検討した。TCMK-1細胞を0.03%過酸化水素に10分間暴露したところ、コントロール細胞

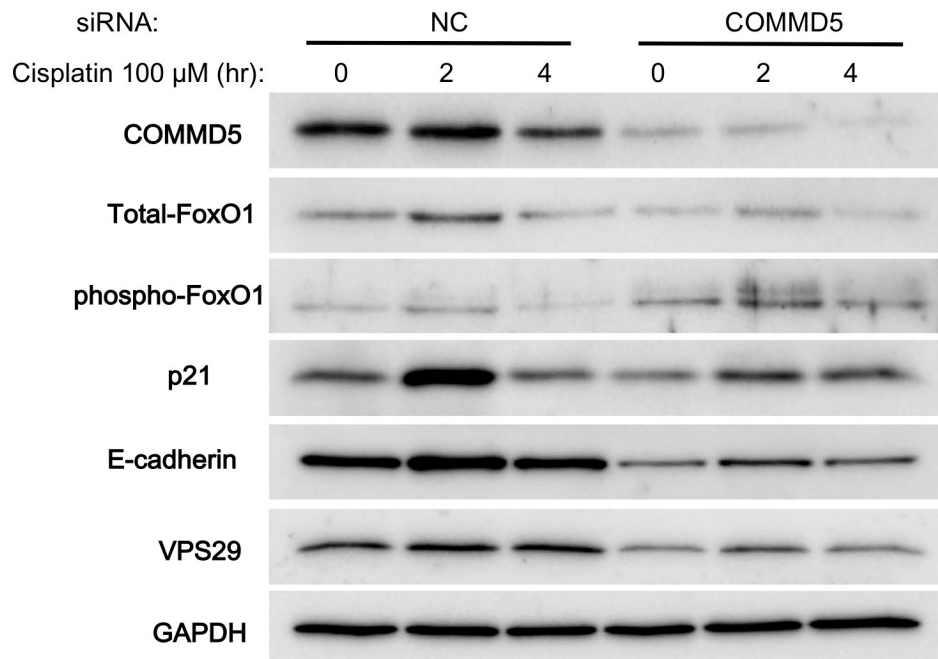


図2 尿細管上皮細胞(HK-2)にシスプラチン処理を行った際のWestern blot像。NC細胞(non-target controlを導入)とCOMMD5細胞(COMMD5標的のsiRNAを導入)を用いて経時的なタンパク発現の変化を比較した。(文献4より引用, 改変)

では暴露後12時間後までオートファジーが遅延し、アポトーシスが増加していた (図3A)。0.0003%過酸化水素に10分間暴露した低刺激においては、LC3B-IからLC3B-IIへの移行が3時間後には暴露前の状態に戻っており、0.03%過酸化水素の過度な障害が、JNKの活性化を伴う過剰なオートファジーを引き起こしていると考えられた。COMMD5高発現細胞では、0.03%過酸化水素に10分間暴露した刺激において、コントロール細胞に比べ活性酸素の増加が抑制され、ATP産生能も保たれており、ミトコンドリアの障害は軽度であった。オートファジーの反応は、過酸化水素暴露後3時間以内に終息し、アポ

トーシスは抑制されていた。0.03%過酸化水素に10分間暴露し、12時間後にTCMK-1細胞の細胞内小器官を、電子顕微鏡を用いて観察したところ、コントロール細胞ではミトコンドリアを含んだ2次リソソームとリポフスチン封入体が多く観察され、COMMD5高発現細胞に比べリソソームによる分解経路が停滞していることが分かった (図3B)。以上より、尿管上皮細胞では、過度な刺激によりミトコンドリアが障害され、過剰なオートファジーの遷延が起こり、リソソームによる細胞内消化経路が停滞し、細胞死が誘導されたと考えられた。COMMD5はミトコンドリアの障害を軽減し、オートファ

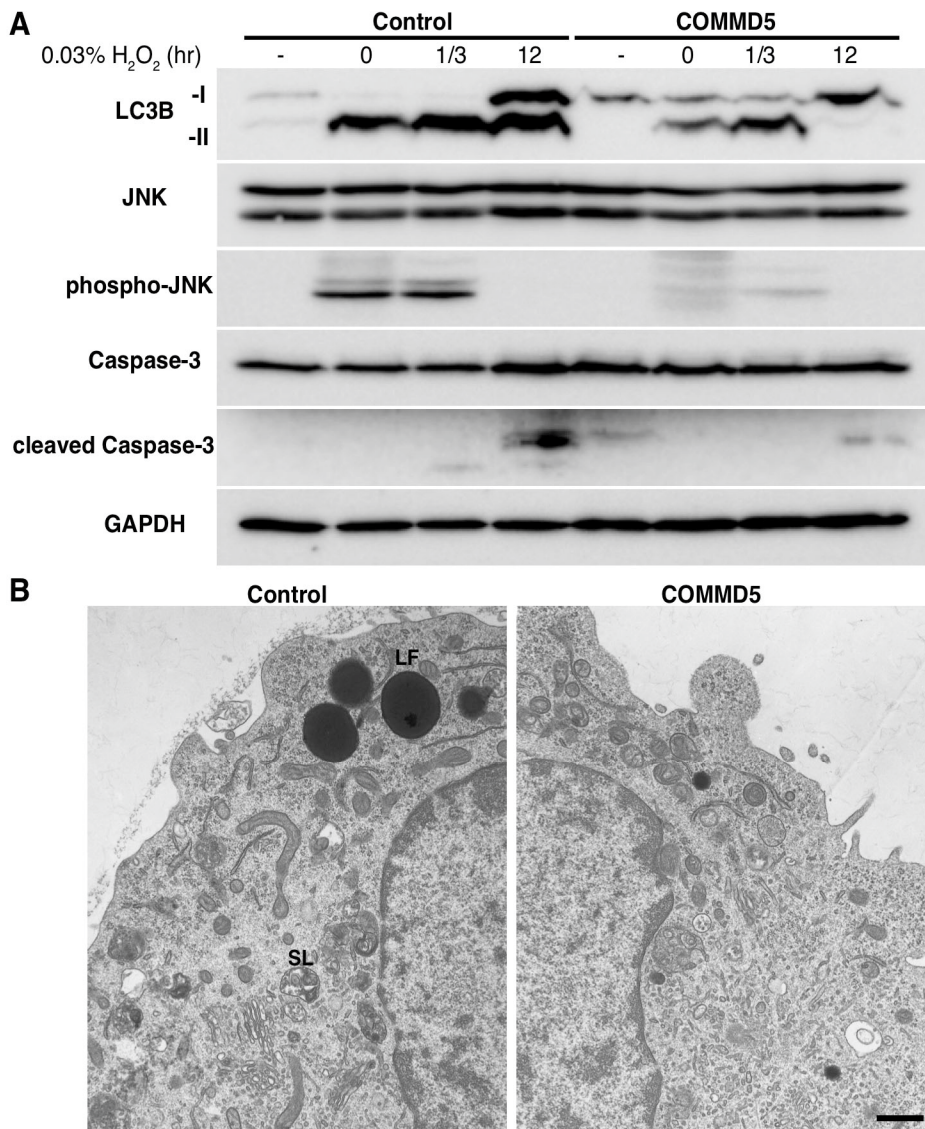


図3 (A) マウス尿管上皮細胞 (TCMK-1) に0.03%過酸化水素処理を行った際のWestern blot像。コントロール細胞 (Control) とCOMMD5高発現細胞 (COMMD5) を用いて経時的なタンパク発現の変化を比較した。(B) 過酸化水素処理12時間後の電子顕微鏡画像。SL:2次リソソーム, LF:リポフスチン。Scale bar = 500 nm。

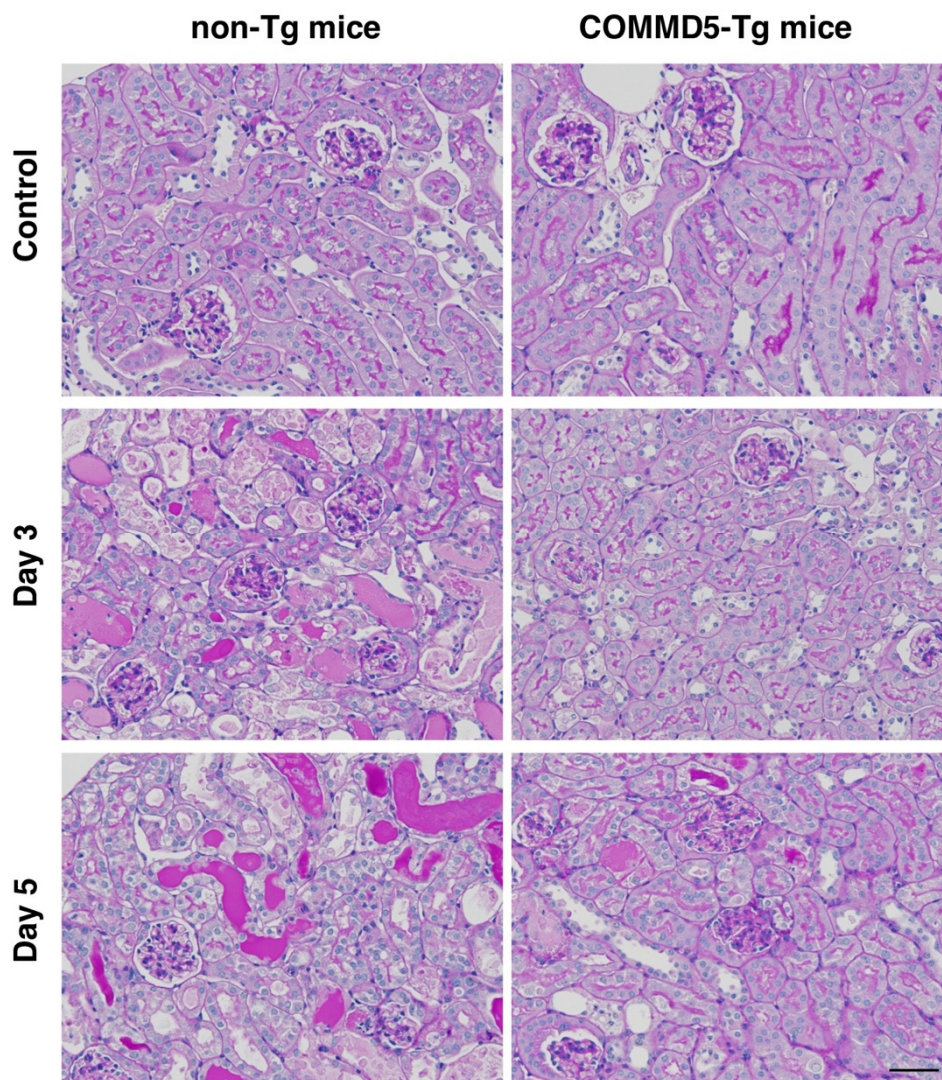


図4 COMMD5高発現遺伝子改変マウスを用いたシスプラチン腎症モデルの腎臓のPAS (Periodic acid-Schiff) 染色像。Scare bar = 0.1 mm。(文献4より引用)

ジーを速やかに終息させ、細胞保護に作用していると推測された。

3-3 腎尿細管上皮バリアによる腎保護効果

薬剤性AKIモデルとして、抗がん剤であるシスプラチンをCOMMD5-Tgマウスに腹腔内投与(20 mg/kg)し、腎障害の程度を確認した。シスプラチン投与5日後の血清クレアチニンは、COMMD5-Tgマウスで $0.70 \pm 0.34SD$ mg/dl、野生型(non-Tg)マウスで $2.73 \pm 0.96SD$ mg/dlと有意な低下が見られた。組織学的にもCOMMD5-Tgマウスでは、non-Tgマウスに比べ尿細管障害が軽減されており(図4)⁴⁾、アポトーシスやミトコンドリア障害も抑制されていた。

各尿細管セグメントのマーカーを用いて、尿細管障害の程度を各セグメント毎に評価したところ、

COMMD5-Tgマウスでは、non-Tgマウスに比べ近位尿細管の障害は軽減されており、遠位尿細管の障害は見られなかった。タンパク質発現を見てみると、non-TgマウスではCOMMD5が低下し、尿細管間質のエリスロポエチン産生細胞から分泌される造血因子であるエリスロポエチンが低下し、遠位尿細管由来の腎保護因子である α Klothoの分解が促進していた(図5)。non-Tgマウスでは、尿細管全体に障害が及んでいたが、COMMD5-Tgマウスでは、近位尿細管に障害が限局されており、COMMD5の発現が軽度低下していたが、エリスロポエチンや α Klothoの発現は保たれていた。また、E-cadherinは、non-Tgマウスではシスプラチン投与により分解されていたが、COMMD5-Tgマウスでは、非投与群に

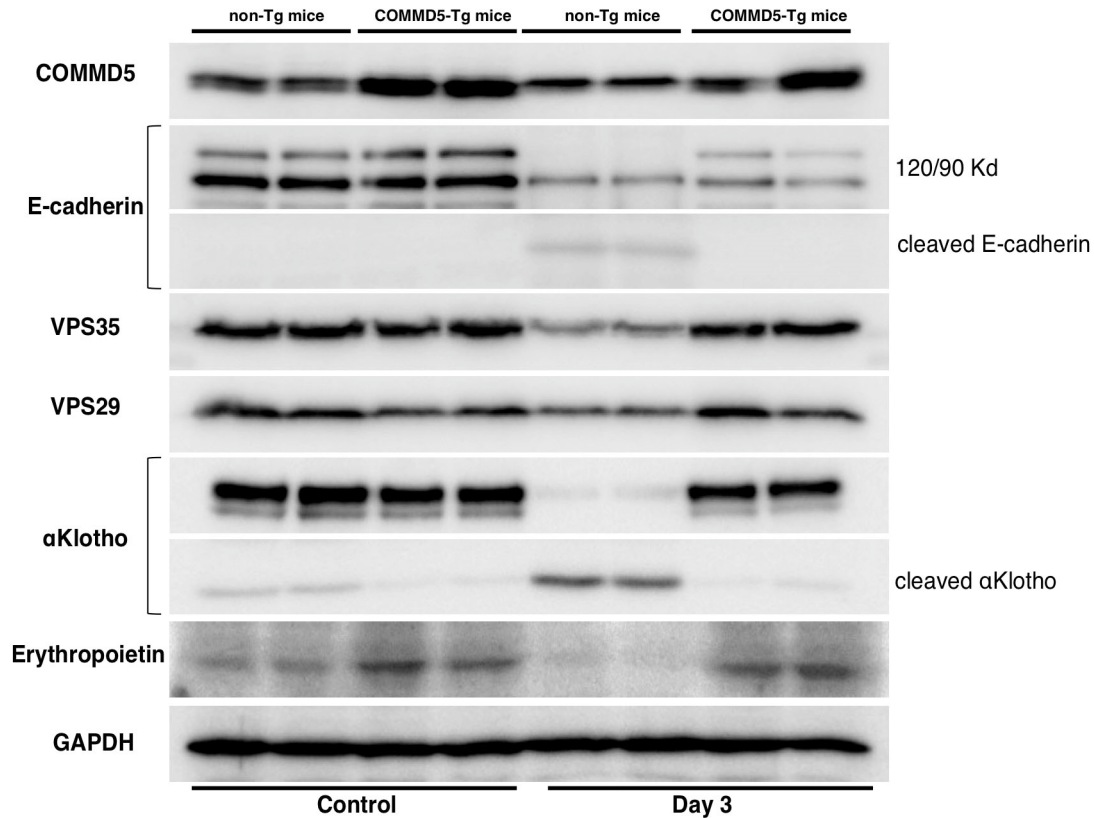


図5 COMMD5-Tgマウスを用いたシスプラチン腎症モデルのWestern blot像。非投与群（Control）と投与3日後（Day 3）において比較した。

比べ発現が低下していたものの、non-Tgマウスに比べ保たれていた。E-cadherinのエンドサイトーシスに関わるVPSのうち、non-TgマウスではVPS35と29の発現が低下していたが、COMMD5-Tgマウスでは発現が保たれていた。

以上より、近位尿細管におけるCOMMD5は、尿細管が障害を受けた際に、E-cadherinの発現を増強し、腎尿細管上皮バリアを維持することで、間質や遠位尿細管の障害を軽減し、AKIの発症やCKDへの進展を抑制しているのではないかと考えられた。現在、近位尿細管におけるCOMMD5コンディショナルノックアウトマウスの作製を、タモキシフェン誘導性Creを発現するNdr1-CreERT2マウスとCOMMD5 floxedマウスの交配により行っている。今後、近位尿細管のCOMMD5を特異的にノックダウンした際の、腎尿細管上皮バリア及び、遠位尿細管や間質の組織障害について評価する予定である。

4. 考 察

近年、AKI to CKD progressionという考えが提唱され、末期腎不全患者を減らすために、いかにCKDへの進行を食い止めるかということに注目が集まっている。最近、AKIにより障害された近位尿細管の不十分な修復や、脱落に伴う組織内の慢性炎症や低酸素などにより、周辺の繊維芽細胞（エリスロポエチン産生細胞）の形質転換や、間質の線維化といった遠位尿細管を含めた広範囲なネフロン障害を引き起こすことが、AKIがCKDに進展する成因のひとつではないかと報告されている⁶⁾。しかしながら、AKIからCKDに進展するメカニズムや、腎臓が再生するメカニズムについては未だ不明な点が多い。

今回我々は、近位尿細管におけるCOMMD5がE-cadherinの発現を亢進させ、細胞間接着構造を増強し、尿細管上皮バリアを強固することで、間質や遠位尿細管の障害を軽減している可能性を見出した。また、遠位尿細管が保護されることにより、遠位尿細管由来の腎保護因子が分泌され、近位尿細管と遠位尿細管の相互作用によりAKIの進展が抑制されて

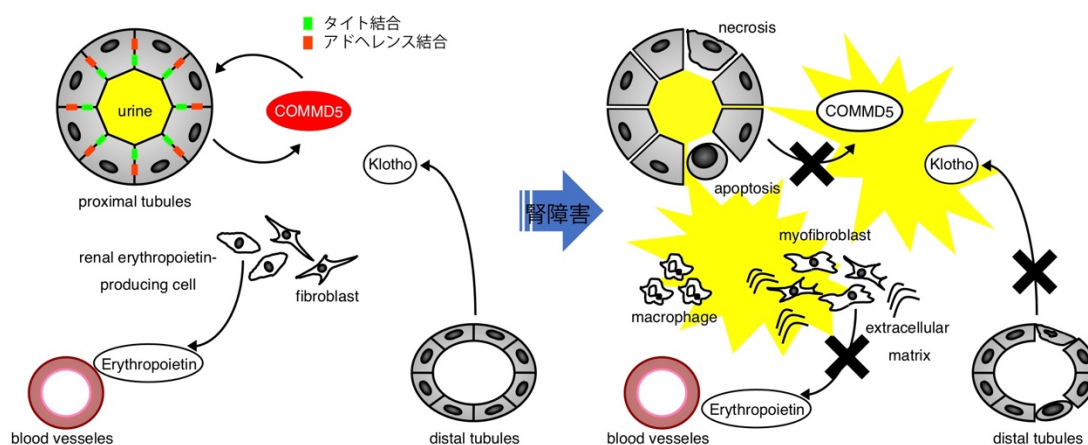


図6 COMMD5による腎保護メカニズム。COMMD5がアドヘレンス結合を強固にし、尿細管上皮バリアを維持することで、腎尿細管の障害を軽減しており、過度な障害によるCOMMD5の低下が、間質の線維芽細胞の形質転換や遠位尿細管の障害を引き起こし、CKDへの移行につながると考えられる。

いる可能性も示唆された(図6)。そして、細胞レベルでは、E-cadherinの発現増強による強固なアドヘレンス結合とタイト結合により、細胞刺激時のミトコンドリア障害が軽減され、過剰なオートファジーが抑制されることで、細胞の生存率が改善していると考えられた。このようなCOMMD5による腎尿細管バリアの維持が、腎障害の進展を予防しているのではないかと考えられ、今後新たな腎臓病の治療ターゲットとして臨床へ応用されることが期待される。

謝辞

本研究の共同研究者は日本大学医学部 内科学系総合診療学分野の池田迅先生、野底茉衣子先生、日本大学医学部 総合医学研究所 医学研究支援部門 地家豊治氏、八戸学院大学健康医療学部 人間健康学科の遠藤守人教授、佐々木研究所附属 杏雲堂病院の相馬正義先生である。また本研究は、日本大学学術研究助成金[総合研究](No. 総18-013)、JSPS KAKENHI Grant Number JP18K08226を受けて行われた。

文献

- 1) Solban, N., *et al.* HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 32234-32243.
- 2) Matsuda, H., *et al.* HCaRG accelerates tubular repair after ischemic kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 22: 2077-2089.
- 3) Matsuda, H. *et al.* HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017; 8: 69559-69576.
- 4) 松田裕之, 舩廣善和. 新規腎保護因子HCaRG/COMMD5を標的とした腎臓病及び腎癌の治療法の開発. *日本大学医学部総合医学研究所紀要* 2019; 7: 5-12.
- 5) Campion, C. G. *et al.* COMMD5/HCaRG Hooks Endosomes on Cytoskeleton and Coordinates EGFR Trafficking. *Cell Rep.* 2018; 24: 670-684.
- 6) Takaori K. *et al.* Severity and Frequency of Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27: 2393-2406.

自己免疫・アレルギー疾患の難治化における マスト細胞の役割の解明

豊島翔太¹⁾, 坂本朋美¹⁾, 黒澤雄介¹⁾, 葉山惟大¹⁾, 松田 彰²⁾, 渡部保男²⁾,
照井 正¹⁾, 高橋恭子³⁾, 斎藤 修¹⁾, 権 寧博¹⁾, 松本健治⁴⁾, 岡山吉道¹⁾

Elucidation of roles of mast cells in the pathogenesis of refractory autoimmune and allergic diseases

Shota TOYOSHIMA¹⁾, Tomomi SAKAMOTO-SASAKI¹⁾, Yusuke KUROSAWA¹⁾,
Koremasa HAYAMA¹⁾, Akira MATSUDA²⁾, Yasuo WATANABE²⁾,
Tadashi TERUI¹⁾, Kyoko TAKAHASHI³⁾, Shu SAITO¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾,
Kenji MATSUMOTO⁴⁾, Yoshimichi OKAYAMA¹⁾

要旨

マスト細胞 (Mast Cells: MCs) と2型自然リンパ球 (Group 2 innate lymphoid cells: ILC2) は、アレルギー症状の惹起のみならず、アレルギー症状の増悪化に重要な役割を果たしている。細胞が遊離する細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EVs) は、microRNA (miRNA) やタンパク質を内包し、受け手側の細胞の表現系や機能を制御することが明らかにされ、細胞間相互作用の新たな様式として注目されている。しかしながら、MCsとILC2の細胞間において、EVsを介する相互作用はまだ知られていない。今回我々は、IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されたEVsが、IL-33刺激によるILC2からの2型サイトカインのIL-5の産生を有意に増強させることを見出した。このEVsには、miR103a-3pの発現が特異的に増加していた。このmiR103a-3pは、ILC2内で、protein arginine methyltransferase protein 5 (PRMT5) の発現を抑制し、転写因子のGATA3の脱メチル化を促進することでIL-5産生を増強していた。さらに、アトピー性皮膚炎患者の血清EVs中のmiR103a-3pの発現は、アレルギー素因のない健常人と比較して有意に高かった。したがって、IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されるEVsは、IL-5産生を増強させ、好酸球性炎症を増悪化させていることが示唆された。

1. はじめに

IgE依存性に活性化したMCsは、ヒスタミンを遊離し、IL-5やIL-13などの2型サイトカインおよび脂質メディエーターなどを産生することによってアトピー性皮膚炎や気管支喘息などのIgE依存性のアレルギー疾患の発症・増悪に寄与することが知られている。^{1), 2)} ILC2も2型サイトカインを産生し、アレルギー疾患や寄生虫感染防御に寄与している。^{3), 4)} アレルギー疾患や寄生虫感染において、MCsが産生するサイトカインや脂質メディエーターが、ILC2の

機能を制御することが報告されている。⁵⁾ つまり、MCsとILC2の相互作用は、アレルギー疾患の発症や増悪化に重要である。ほとんど全ての細胞はmicroRNA (miRNA) を内包したEVsを遊離し、受け手側の細胞の表現系や機能発現に影響を及ぼすことが明らかになった。^{6), 7)} しかしながら、アレルギー疾患におけるIgE依存性に活性化したMCsが遊離するEVsの役割はまだ知られていない。

1) 日本大学医学部
2) 順天堂大学医学部眼科
3) 日本大学生物資源科学部
4) 国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部
岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

2. 目的

本研究ではIgE依存性に活性化したヒトMCsが遊離するEVsが、ILC2の機能にどのような影響を及ぼすかを検証することを目的とした。

3. 対象及び方法

3-1 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-150908-12およびRK-160112-2)。

3-2 ヒトマスト細胞の培養

ヒト滑膜マスト細胞は、変形性関節症の滑膜組織から分離培養した。滑膜組織を採取後ただちに2% FBS, 100 IU/mLのstreptomycin/penicillinおよび1% fungizoneを含んだIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) に入れ細切した。1.5 mg/mLのcollagenase type Iと0.75 mg/mLのhyaluronidaseを用いて37°Cで1時間反応させた。比重遠心によってマスト細胞の前駆細胞を単離し100 ng/mLのrecombinant human stem cell factor (rhSCF) および50 ng/mLのrhIL-6を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose mediumとIMDM) で培養した。

3-3 細胞外小胞の単離

ヒト培養滑膜MCsを刺激なし、100 ng/mLのIL-33, IgE感作のみ、およびIgE感作後、抗IgE抗体で24時間刺激し細胞上清を回収した。回収した細胞上清にExoQuick-TCを添加し、一晚反応させ、6,000 x g 30分遠心を行いEVsを単離した。

3-4 ヒトILC2の単離・培養

末梢血からLSMを用いて末梢血単核球から単離し、CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD16およびCD19 Microbeadsを用いてlineage陰性細胞を単離した。この細胞からLin⁻CD45⁺CRTh2⁺CD161⁺細胞(ILC2)をFACS Aria IIuで単離した。単離したILC2をマイトマイシン処理した末梢血単核球と100 IU/mLのIL-2存在下で培養した。

3-5 サイトカイン測定

ILC2の培養上清中のIL-5およびIL-13はELISAで測定した。

3-6 統計解析

3群以上の統計解析はtwo-way analysis of variance (ANOVA) およびTukey's multiple comparison test

もしくはone-way ANOVAおよびTukey's multiple comparison testで行った。臨床データの2群間比較は、Mann-Whitney U testで行った。p値が0.05未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 8 (MDF, Tokyo, Japan) を使用した。

4. 結果

抗IgE抗体刺激したヒトMCs由来のEVs (anti-IgE-EVs) は、IL-33刺激によるILC2からのIL-5産生を有意に増強させたが、IL-13産生には影響を及ぼさなかった。miRNAの網羅的解析を行ったところ、anti-IgE-EVs中では、miR103a-3pやmiR23b-3pを含んだ7個のmiRNAの発現が特異的に上昇していた。リアルタイムPCRで実際の発現を解析したところ、miR103a-3pおよびmiR23b-3pがanti-IgE-EVsで特異的に発現が上昇していた。この二つのmiRNAのうちanti-IgE-EVsと共培養したILC2においては、miR103a-3pの発現が有意に増強していた。miR103a-3pの過剰発現によって、ILC2からのIL-33刺激によるIL-5産生が増強された。miR103a-3pの標的となる遺伝子をin silicoで探索したところ、protein arginine methyltransferase protein 5 (PRMT5) が標的となることが明らかになった。anti-IgE-EVと共培養およびmiR103a-3pを過剰発現したILC2においては、PRMT5の発現低下が認められた。さらにmiR103a-3pの過剰発現のよってGATA3の脱メチル化も増強された。また、アトピー患者血清中EVsにおけるmiR103a-3pの発現レベルは、アレルギー素因のない健康人血清中のEVsにおけるmiR103a-3pの発現レベルよりも有意に高値であった。

5. 考察

IgE依存性の刺激によって活性化したマスト細胞は、miR103a-3pを含んだEVsを遊離し、ILC2がそのEVsを取り込むとPRMT5の発現が低下し、メチル化されたGATA3から脱メチル化されたGATA3へとなり、ILC2からのIL-5の産生を増強させることが唆された。さらに、EVs中のmiR103a-3pは、アトピー性皮膚炎の増悪化に関与している可能性が考えられた。

6. 結語

IgE依存性に活性化されたマスト細胞由来のEVs

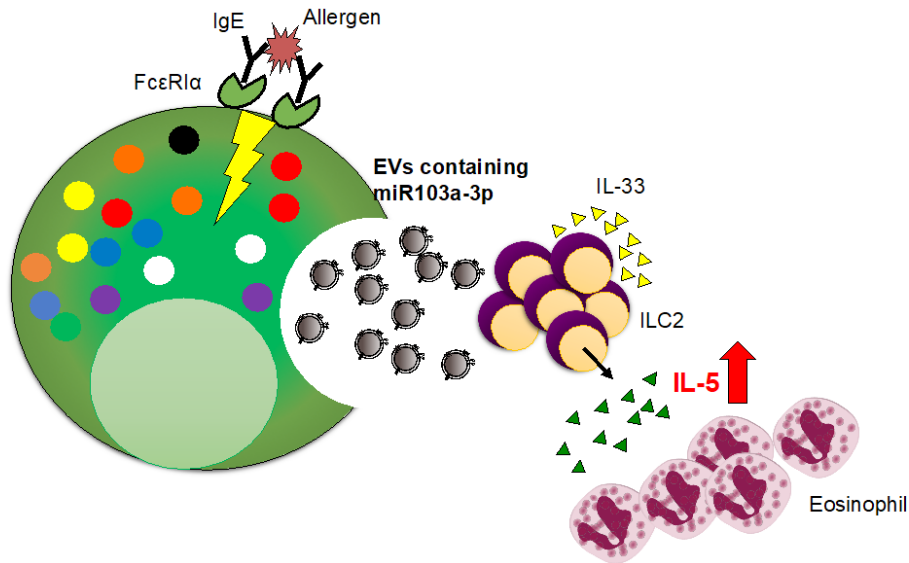


図1 IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されるEVsは、IL-5産生を増強させ、好酸球性炎症を増悪化させている

は、miR103a-3pを含有し、ILC2などのIL-5産生細胞からのIL-5産生を増強させることで好酸球性炎症の増悪化・難治化に寄与している可能性が考えられた(図1)。

謝 辞

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

文 献

- 1) Galli SJ, Tsai M: IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med.* 2012; 18: 693-704.
- 2) Liu FT, Goodarzi H, Chen HY: IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011; 41: 298-310.

- 3) Artis D, Spits H: The biology of innate lymphoid cells. *Nature.* 2015; 517: 293-301.
- 4) Mjösberg J, Spits H: Human innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; 138: 1265-1276.
- 5) Xue L, Salimi M, Panse I, Mjösberg JM, McKenzie AN, Spits H, Klenerman P, Ogg G: Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemottractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133: 1184-1194.
- 6) Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 654-659.
- 7) Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie G, Thery C: Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol.* 2019; 21: 9-17

術中迅速病理診断における 遺伝子変異・マーカー分子簡易検出技術の実用化に向けた研究

羽尾裕之¹⁾, 橋本伸哉²⁾, 吉野篤緒¹⁾, 角光一郎¹⁾, 相澤 信¹⁾, 浅野正岳³⁾,
久山佳代⁴⁾, 末光正昌⁴⁾, 藤田博仁²⁾, 山田清香¹⁾, 右田 卓¹⁾, 八木千裕¹⁾

Development of new technology for intra-operative rapid pathological diagnosis

Hiroyuki HAO¹⁾, Shinya HASHIMOTO²⁾, Atsuo YOSHINO¹⁾, Koichiro SUMI¹⁾,
Shin AIZAWA¹⁾, Masatake ASANO³⁾, Kayo KUYAMA⁴⁾, Masaaki SUEMITSU⁴⁾,
Hirotu FUJITA²⁾, Sayaka YAMADA¹⁾, Suguru MIGITA¹⁾, Chihiro YAGI¹⁾

要旨

腫瘍におけるゲノム解析は急速に進歩し、病理診断においてもゲノム情報の重要性は日増しに高まっている。このような背景から病理診断において、遺伝子変異やマーカー分子などの分子情報が短時間で得られれば、診断の精度向上や個別化医療・精密医療と言われている患者ごとに最も適切な治療が直ちに開始できることとなる。このことで患者が得られる利益は大きく、社会的にも重要な意義がある。現在の技術では採取した検体から手術中に短時間で遺伝子情報やマーカー分子の発現を検索することは基本的に不可能である。特に遺伝子変異の検索にはコストやスペースの問題から、一般的な普及は困難である。専用の計測機器や高度な専門技術を必要としない簡易検出技術は、病理検体処理を担当する病理検査室という様々な制約がある環境下でも実施が可能であり、診断における応用・普及の可能性が見込まれる。本学文理学部で開発が進められている Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes 法は標的分子の迅速な検出技術であり、本研究ではこの技術が病理診断へ応用を検討している。

1. 緒言

2003年にヒトゲノム計画が完了し、その後個人ゲノムの解読がなされた。さらには次世代型シーケンサーの登場によって全ゲノム解析が容易に行われるようになり、多くの腫瘍のゲノム情報が公開されている。ゲノム情報から、発癌のドライバー遺伝子変異に対する分子標的治療薬の適応を決める個別化医療の時代から、さらには一人の患者の変異遺伝子を網羅的に検出し、より適切な治療を選択する精密医療の時代へと突入しつつある。精密医療による治療を睨んだ病理検体からの情報解析が、今後さらに発展し盛んに行われることは間違いなく、さらに従来からの顕微鏡を用いたスライドガラスの観察によって得られる形態学的な情報と合わせて、分子生

物学的な解析結果により、より精度の高い病理診断が可能となった。しかし、現在の技術をもってしても、この遺伝子情報の解析には一定のコストと時間が必要である。

従来の検出法では標的の核酸鎖を認識し、何らかの方法でシグナルとして検出する過程を等温で 1 tube, 1 stepで行える方法は存在しなかった。Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes (SAT-IC) 法は1本のチューブ内で検体と環状DNA、プライマー、蛍光試薬を37℃で混入するとポリメラーゼによる複製反応が起こり、立体構造を持ったグアニン四重鎖が多数生成される反応を応用している。検体中に標的分子が存在していると蛍光試薬はグアニン四重鎖と反応し約20-30分で発色反応が起こる

1) 日本大学医学部

2) 日本大学文理学部

3) 日本大学歯学部

4) 日本大学松戸歯学部

羽尾裕之: hao.hiroyuki@nihon-u.ac.jp

(図1)¹⁾。この技術を用いることで、ゲノムDNA、mRNAなどの様々なバイオマーカーの検出が可能である。mRNAの検出感度の検討では1-5000 pMの濃度範囲で定量測定が可能である。さらに、miRNAなどの短いRNA鎖やその変異、タンパク質やメタボライトなどの検出が可能である²⁾。

SATIC法は5件の特許があり、うち3件はJSTの外国出願支援制度の審査を経て、出願支援が採択されPCT出願を行った。さらにそのうち1件は、指定国移行についてもJSTの支援審査を通過し米国に出願中である。PCT出願をした2件については順次支援申請を行う予定である。このことから本技術は独創的、先進的技術であることが分かる。SATIC法の病理診断への応用はこれまで試みられたことがなく、本研究で得られる成果が大いに期待される。今回我々は病理組織検体を用いて短時間・低コスト・簡便に遺伝子変異やマーカー分子の発現を検出する技術を開発し、病理診断においてより正確な診断や治療に直結するゲノム情報の提供を可能とする新技術の開発の検証を行っている。

2. 研究進捗状況

本年はSATIC法の検出感度の向上のための改良を行った。知的財産権や論文公表前の新規技術であるため現時点での詳細な公表は避ける。口腔内悪性

腫瘍において約半数で認められるp53遺伝子変異について、SATIC法での遺伝子変異の検出が可能かどうか、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株SAS, Ca9-22, HSC4を用いて変異の検出感度について検討している。今後は日本大学歯学部および松戸歯学部において、病理組織検体を用いてSATIC法による変異検出の検討を行う。また、脳腫瘍において生じる遺伝子変異の検出の可能性について検討するため、ヒト由来脳腫瘍細胞株T98G (p53変異型), A172 (p53野生型)を用いて、遺伝子シーケンスによる変異を確認している。脳腫瘍細胞株においてもSATIC法で遺伝子変異の検出が可能かを検討する。今後は手術で得られた脳腫瘍組織検体からSATIC法での変異検出の可能性を検討する。さらに、骨軟部腫瘍の遺伝子変異の検出として、骨巨細胞腫で高率に認められる遺伝子変異H3F3AのSATIC法による変異検出の可能性を検討する目的で、手術症例の選別とこれらの腫瘍の変異の有無について検討している。本腫瘍についてもSATIC法での病理組織切片上での変異の検出の可能性について検討を行う。

3. 考察

短時間・低コスト・簡便なSATIC法の特徴を最大限に利用し、術中迅速病理組織診断に応用した検討はこれまで世界的にも全く行われていない。本技

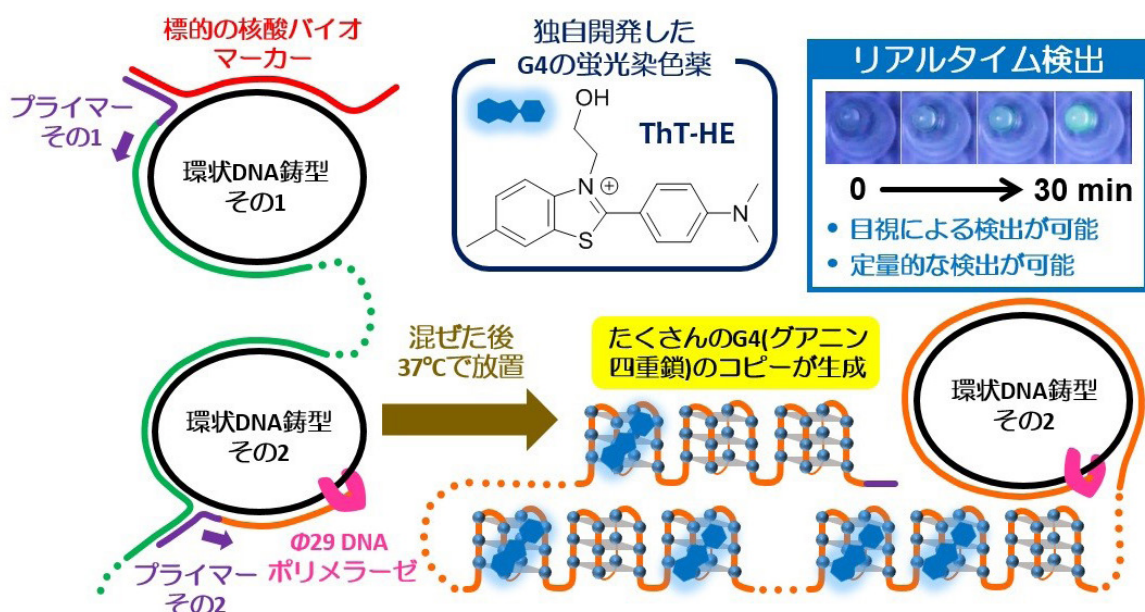


図 1

術の病理組織検体を用いた遺伝子変異の検出や標的分子の同定が可能となれば、遺伝子検査における新たなブレイクスルーとなりえる。さらに、本検出方法の装置化によって、低コストでゲノム・遺伝子変異・蛋白質やメタボライトなどの非核酸標的の検出が可能となる。本研究は医療診断分野において広く使われている、抗体を用いた免疫組織化学やポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）などの技術に匹敵する革新的診断技術開発の基礎となると考える。本学のスケールメリットを活かし、医学部、歯学部、松戸歯学部の医歯系の部科校および文理学部における先進的な分析化学の技術の応用によって、全く新しい診断技術の開発を行っている。

謝 辞

本研究は日本大学学術研究助成〔総合研究〕を受けて行われたものであり、謝意を表します。

文 献

- 1) Fujita H et al. Novel one-tube-one-step real-time methodology for rapid transcriptomic biomarker detection: signal amplification by ternary initiation complexes. *Anal Chem.* 88,7137-7144, doi:10.1021/acs.analchem.6b01192 (2016).
- 2) Fujita H et al. Specific light-up system for protein and metabolite targets triggered by initiation complex formation. *Sci Rep.* 7:15191, doi: 10.1038/s41598-017-15697-8 (2017).

吸入療法支援のための クラウド型在宅医療連携モデルに関する研究 (2)

伊藤玲子¹⁾, 権 寧博¹⁾, 丸岡秀一郎¹⁾, 肥田不二雄²⁾, 中川一人³⁾, 戸田 健⁴⁾

Study on home medical care cooperation system for inhalation therapy using the cloud type service (2)

Reiko ITO¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾,
Fujio KOEDA²⁾, Kazuto NAKAGAWA³⁾, Takeshi TODA⁴⁾

要旨

前年度の研究成果を踏まえ、喘息やCOPD (chronic obstructive pulmonary disease) 患者の吸入治療における問題を解決し、効果的な吸入治療の継続を可能とするツールの社会実装を目指した。通信型スパーサーの開発と吸入治療の継続支援に関するシステムを開発した。成果としては、加圧式定量噴霧吸入器 (pMDI: pressurized metered dose inhaler) 用新型スパーサーとマウスピースの開発、吸入流速のモニタリング、タブレット端末を使った吸入指導支援ツール (ウェブアプリ「吸入レッスン」kyunyu.com) のアクセス解析、吸入療法支援のための吸入指導病薬連携システム「吸入カルテ」データを用いた機械学習による予測とクラスター解析、吸入治療支援アプリケーション「わたしの喘息カルテ (ゼンカル)」開発である。これら研究成果は、社会実装により通院と通院の間の「治療の空白」を補う在宅医療連携システムとなる新たな可能性が示された。

1. はじめに

喘息, COPD (chronic obstructive pulmonary disease) 患者の吸入治療継続を支援することを目的に、平成30年度より医療とデザイン, ICTを使ったシステムの開発に取り組んできた。医学部, 芸術学部, 理工学部, 生産工学部に所属する日本大学の研究者が、問題解決のための社会実装を目指した社会実装研究であった。

前年度は1. 加圧式定量噴霧吸入器 (pMDI: pressurized metered dose inhaler) 用新型スパーサーのプロトタイプ開発。2. スパーサーを用いた吸入粒子のモニタリング。3. pMDIの吸入タイミングのモニタリング。4. 高齢者の吸入手技と認知機能に関する検討。5. タブレット端末を使った吸入指導支援ツ

ル (ウェブアプリ「吸入レッスン」kyunyu.com) のアクセス解析。6. 吸入療法支援のための吸入指導病薬連携システム「吸入カルテ」におけるデータマイニング。7. 吸入治療支援アプリケーション「わたしの喘息カルテ (ゼンカル)」開発を行い、その成果について報告した。本年度は、これら個別に行った研究を統合させることを目指し、以下の課題を解決する研究を行った。

①通信型スパーサーの開発。

②吸入治療を継続できないことにより、疾患コントロールが悪化する患者の支援に関する課題。

2. 研究成果と実装

前年度に作成した通信型スパーサーに装着可能なセ

1) 日本大学医学部
2) 日本大学芸術学部
3) 日本大学生産工学部
4) 日本大学理工学部
伊藤玲子: ito.reiko@nihon-u.ac.jp

ンサーユニットの開発を目的に、微圧差センサーを用いてpMDI吸入時の状態を吸入流速と薬剤の粒度分布のモニタリングを行った¹⁾。静電処理を行なったスプレーに微圧差センサ (SDP3x: センシロン株式会社製) を外気取り入れ口に装着 (Fig.1), 0.05秒ごとに差圧より換算した呼吸速度をリアルタイムで表示し、モニタリングをおこなった。吸入は治療時と同様の手順で行った。使用薬剤は練習用のプラセボ製剤を使用した。被験者 (20代女性) に1回目は深呼吸, 2回目は3~5秒かけて吸入する通常の吸入方法, 3回目はモニターを確認しながら目標吸入速度 (0.0003m³/s) で吸入するよう指示した。2回目の吸入では吸入速度にばらつきが見られたが、吸入時間は一定となった。3回目は目標速度に近い

値で推移することが確認された (Fig.2)。このことから、吸入の際に吸入速度を表示することの有効性が示唆された。体格や、呼吸機能に応じて、吸入速度を個別に設定し、表示することも本センサーを用いれば可能である。次に、スプレー内に噴霧された薬剤が容器内に残存する可能性について検討した¹⁾。pMDIを噴霧後、エアゾルを停滞させた後に吸引を行い、吸引流体内の粒度分布を想定した。測定には Aerodynamic Particle Sizer Model 3321 (TSI INCORPORATED) を用いた。薬剤の噴霧後、0, 3, 5秒後に薬剤を流出させると、0秒と比較し3秒では75%, 5秒では4%と粒子量の減少が見られた。このことより、スプレーを用いて吸入する際には噴霧後早期に吸入することが望ましいと考えられた。一

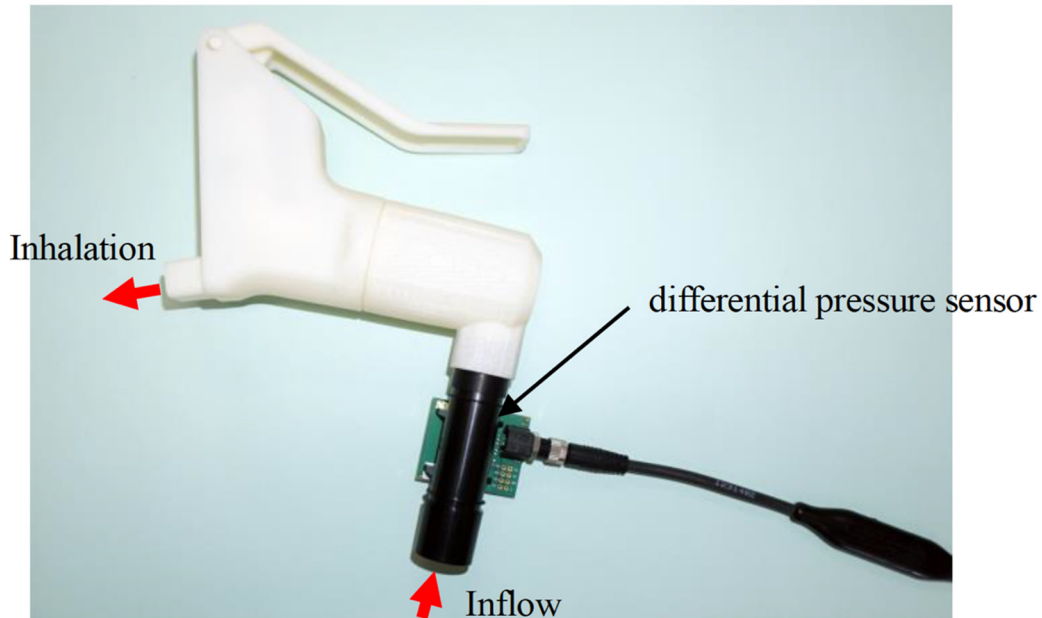


Fig. 1 Appearance of the built inhalation device and mounting position of the differential pressure sensor.

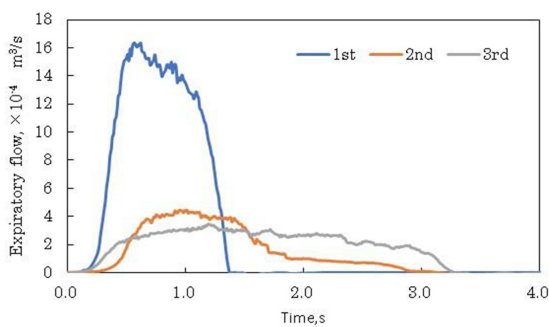


Fig. 2 Monitoring result of the inhalation situation.

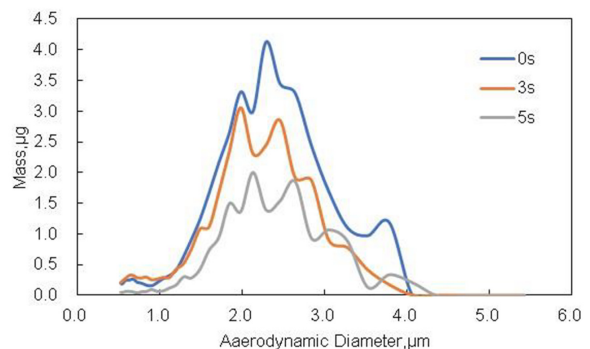


Fig. 3 Aerodynamic diameter distribution change of drug when using the inhalation.

方、吸入速度を低下させた場合の吸入速度と吸入粒子量の関連を検討した。中央粒子径は0秒で $2.2\mu\text{m}$ 、3秒で $2.1\mu\text{m}$ 、5秒では $2.3\mu\text{m}$ と、滞在時間による違いは見られなかった (Fig.3)。

2-1 通信型スパーサーの開発：マウスピースの開発

吸入の際、口腔内を広くするために「ホ」の発音時のポジションで吸入すると口腔内の容積が拡大し、口腔内に付着する薬剤の量が減少することが報告されている²⁾。スパーサーを開発する過程で、吸入を介助するマウスピースの形状によって、舌を自然に下に下げることができれば、口腔内容積が増加し、気道への薬剤の到達がより確実になる可能性について発想をえた。そこで、pMDI製剤吸入時に自然に舌がマウスピースの下に保持され、「ホ」の発音時のポジションに近い、望ましい位置となる形状のマウスピースを2種類開発した。この新型マウスピース使用時に、舌の位置が低下しているか19名 (年齢22-77歳、男性12名、女性7名) の健常者を対象に検討を行った (Fig.4) (日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会承認 RK-190312-09)。口腔内の撮影は気管支内視鏡BF-P260 (オリンパス社製) を使用。マウスピースは3Dプリンターで作成し角度の異なった2種類 (マウスピース1:70度、マウスピース2:80度) を用いた。画像解析はImage Jを用いて、咽頭後壁の面積、軟口蓋と舌表面までの距離の変化を測定した。2群間の比較はF検定で等分散の有無を確認したのちStudent t検定、

またはMann-Whitney検定を用いた。その結果、マウスピース1を装着した時の咽頭後壁の面積を100%とした場合、マウスピースなしでは $46.6\pm 27.4\%$ 、2を装着したときを100%とした場合では、マウスピースなしで $41.2\pm 23.7\%$ と有意に変化していた ($p < 0.0001$) (fig.5)。また、軟口蓋と舌の距離も全例で増加し、マウスピース1では $52.4\pm 24.4\%$ 、マウスピース2では $41.2\pm 23.7\%$ から、100%に増加を認めた ($p < 0.0001$) (fig.6)。2つのマウスピース間に有意な差はなかった。このことから、吸入口に角度をつけたpMDI用新型マウスピースの使用により、舌の位置が低下し、咽頭後壁の面積が増加することが確認された。

2-2 吸入治療を継続支援に関する課題：ぜんそく管理アプリ「ゼンカル」

本課題に対しては当初、継続状態を自動で記録する通信型スパーサーと、症状を記録するアプリケーションを連動したクラウド型医療連携システムを医療現場に導入することを計画していた。そこで、喘息治療のモニタリングに従来より利用されている「喘息日誌」のアプリケーション版である「私の喘息カルテ (ゼンカル)」を製作した (Fig.7)。本年度は、アプリ上にピークフロー値 (自動でグラフ化)、症状アンケートの入力、主治医への質問などをメモできる機能を用いて記録し、一定期間のコントロール状況を患者端末に自動的にフィードバックするシステムを作成した。入力された情報は点数化され、利用者の端末に毎日フィードバックとして表示され

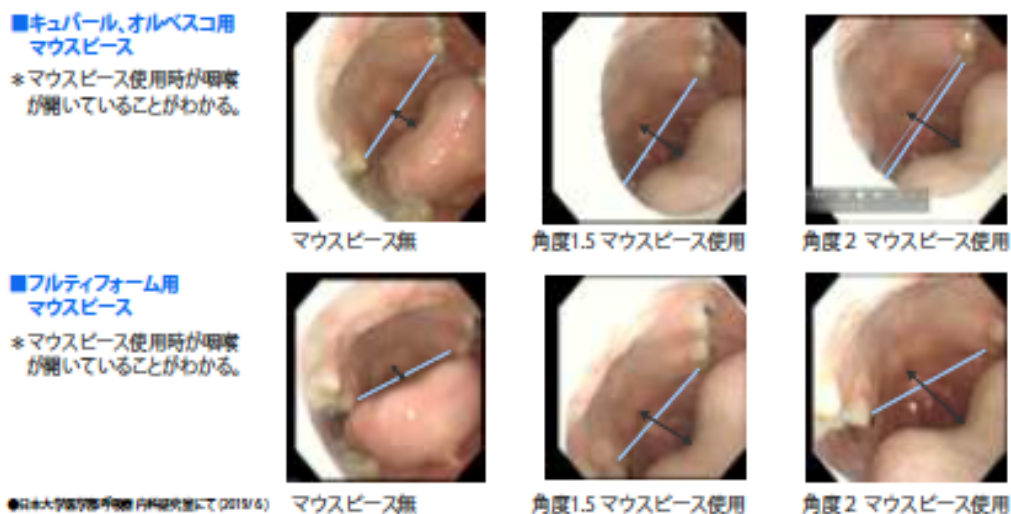


Fig. 4 マウスピース装着による口腔内の変化

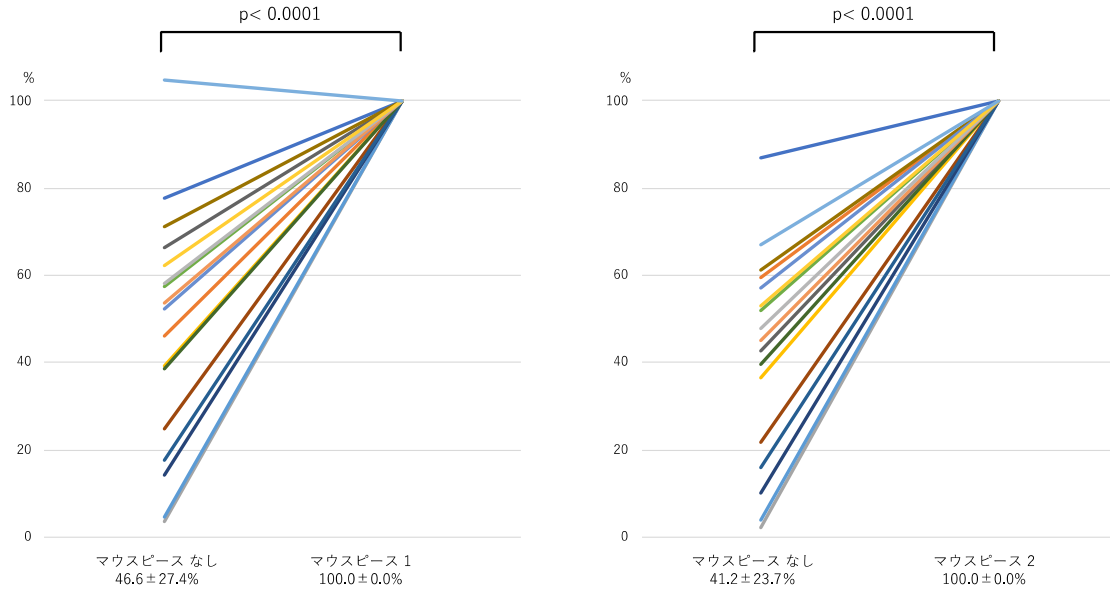


Fig. 5 Percentage of the accessible posterior pharyngeal wall area according to the mouthpiece.

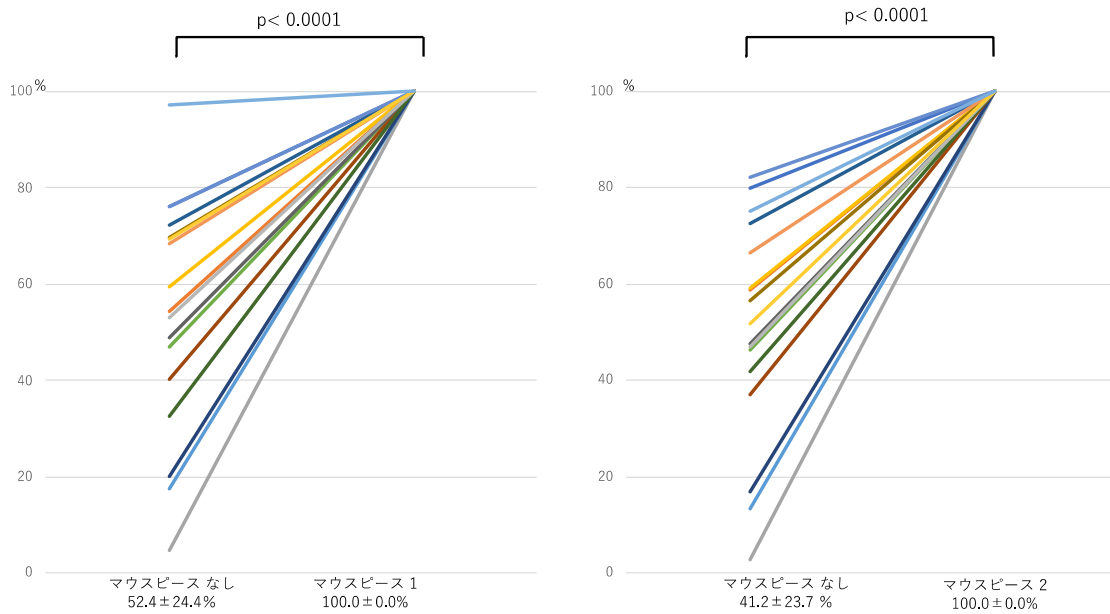


Fig. 6 Percentage of the accessible distance of the soft palate and the tongue according to the mouthpiece.

る。喘息患者の自己管理にモバイルヘルス (mHealth) を用いることにより、喘息に関連する QOL の改善が報告されている³⁾。一方、テキストメッセージやアプリを用いて、服薬順守を促進できた報告もある⁴⁾。喘息患者における本アプリケーション利用の継続性を検討するための臨床研究を、日本大学医学部板橋病院において、開始している (日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会承認 RK-190910-04)。その後、App Store に公

開し、実装する予定である。

2-3 吸入治療を継続支援に関する課題：ウェブアプリ「吸入レッスン」kyunyu.comの現状

多種類の吸入器の使用方法を理解して、指導できる医療者の数は十分とは言えない。また、吸入指導に要する時間が短くないことも吸入指導が十分に行われていない原因となっている。こういった課題を解決するために製作したウェブアプリ「吸入レッスン」を作成し、改訂してきた。本サイトでは我が国



Fig. 7 吸入治療支援アプリケーション「わたしの喘息カルテ (ゼンカル)」のインターフェイス

で処方可能なほぼ全ての吸入薬、30種類の吸入方法を説明した動画と、ピットフォールを復習テストの形式で確認することができる。2015年4月1日からWEB上に一般公開している。「喘息予防・管理ガイドライン2018」に吸入指導に有用なツールとして掲載された⁵⁾。「吸入レッスン」へのアクセスをGoogleのアクセス解析システムであるGoogle Analyticsを用いて調査した。2020年4月末までにのべ17万2821回のアクセスが日本全国からあった。一回のアクセスあたりの滞在時間は4分から5分程度であった。携帯端末からのアクセスが34.4%，タブレットからが36.5%，デスクトップからが29.1%であった。全体の58.4%が2回以上「吸入レッスン」にアクセスしていた。2020年には新型コロナウイルス感染拡大防止のため、対面での吸入指導が全国で控えられている中であっても本サイトへのアクセス数は減少せず、東京都を中心にスマートフォンやタブレット端末を使って、継続して利用されていることがうかがえた。

2-4 吸入治療を継続支援に関する課題

「吸入レッスン」と連動し、吸入指導の依頼と報告書作成を医療機関と調剤薬局間でペーパーレスに行うクラウドシステム「吸入カルテ」を作成した。既存のFAXを用いたやり取りで実装されていた機能に加え、クラウド上の吸入指導の履歴を他施設で

あってもアクセスが許可された医療者であれば閲覧が可能である。初年度に岐阜県東濃地区の医療機関と複数の調剤薬局間で試験導入を行い、システムの操作時間及び、エラー率ともに実用的許容範囲に収まることが確認された⁶⁾。吸入指導の依頼を受けた調剤薬局から、医療機関への報告書の返信率は既存のFAXを用いた方式(56%)と比較し、「吸入カルテ」で有意に上昇した(92%)。また、1年2カ月間の本クラウドシステムの運用で蓄積された吸入指導データを用いて解析を行った。吸入指導報告書のデータに対し項目間の相関特性が求められ、相関が高い項目に対し機械学習方法を用いて予測や患者の手技習得によるクラスタ解析も試みた⁷⁾。100項目以上の多次元データのうち、主要分析を用いて二次元に削減し、累積寄与率により評価した。次元削減後のデータから指導効果によるグループ分けを行う目的にクラスタ解析を行った。クラスタ数はエルボー法および、シルエット分析を用いて決定、クラスタ分析結果を評価した。その結果、4つのクラスタに分類されたがこのクラスタ分析からは各クラスタがどのような群であるか明確に判別することができなかった。そこで、各項目の相関係数0.5以上となる57項目で主成分分析によって、次元削減を行い、累積寄与率を求めたところ、31.9%となった。この項目でクラスタ解析を行ったところクラスタ数は3

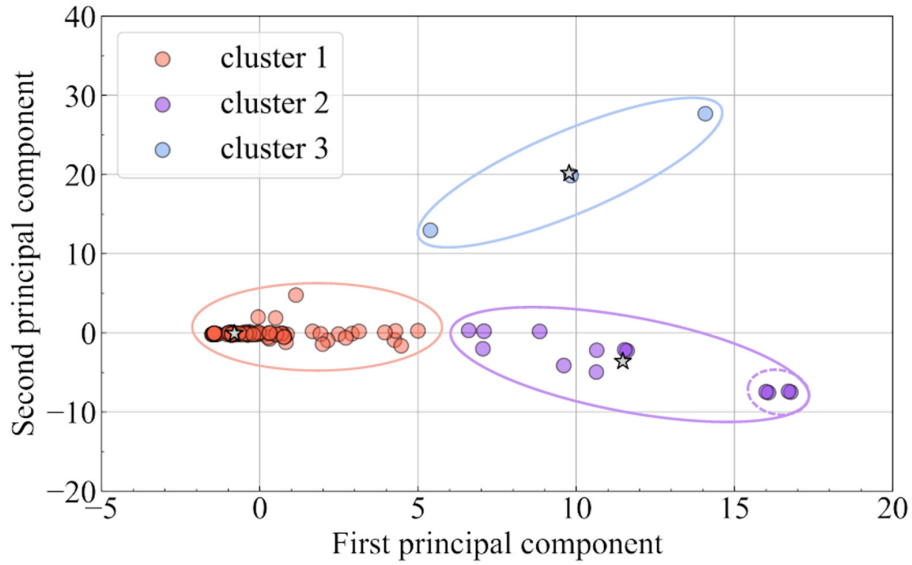


Fig. 8 依頼および報告データのクラスタ分析 Clustering of request and report

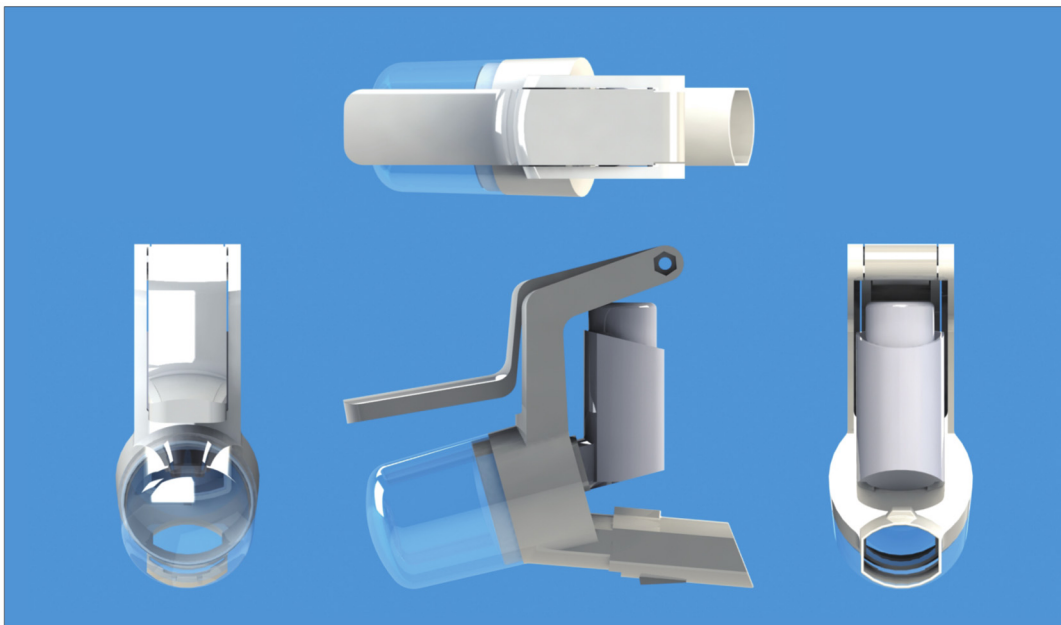


Fig. 9 新型スパーサーの実施形態完成図

個と求められた。(Fig.8) クラスタ 1は比較的簡単な薬剤で操作がうまくできた患者, クラスタ2は操作がうまくできなかった患者, クラスタ3は操作の複雑な吸入器で操作がうまくできなかった患者群であった。今後, さらにデータの蓄積により, 吸入指導の成果に関連する因子の予測が可能となる。

3. 考察

本研究は平成26年度から開始し, 平成27, 28年

度の2年間日本大学学術研究助成総合研究「医学とデザイン学の融合による次世代型呼吸器診療ツールの開発」を通して得られた知見の「呼吸器プロダクトの新たな可能性について」の分野を平成30年度より, 「吸入療法支援のためのクラウド型在宅医療連携モデルに関する研究」として継続してきた。呼吸器疾患における「治療の空白」を改善することを目指し, 研究成果の社会実装を目指した。前年度に行った, 吸入スパーサーの開発と吸入状況のモニタ

リング、吸入タイミングのモニタリング、高齢者吸入手技に関する検討の3つを統合し、通信型スパーサーの開発の課題に取り組んだ。これまでに、解決すべき課題として、①同調した吸入ができない。②握力が弱くpMDIのポンペがしっかり押せず、噴霧が不十分となる。③吸入手技が不適切であるため、効果的な吸入ができていない。の3項目が抽出されている。今年度は上記3項目を解決する取り組みとして、ユニバーサルデザインの視点からスパーサーをデザインした。本スパーサーに求められたのは握力が小さい高齢者であっても簡易に十分な噴霧ができ、同調吸入が不要であり、吸入の補助を介護者ができることであった。これまでのスパーサーとは全く違った発想により逆方向へ噴霧する形状とした。これにより、今までにない小型スパーサーとなった(Fig.9)。噴霧方向の変更により、吸入介助の困難さも解決された。噴霧を補助するグリップは、弱い力で薬剤噴霧を可能とし、握力の弱い高齢者や小児でも独力で噴霧吸入が行える仕様となった⁸⁾。

微圧差センサーをスパーサーに装着し、計測された吸入流速をモニターに提示して目標速度での吸入を試みた。この結果、被験者が目標に近い時間とスピードで安定した吸入が容易に行えることが明らかになった。患者ごとの呼吸機能や体格によって提示する吸入速度を設定しモニターに表示することが可能であり、患者ごとに、より効果的な吸入スピードを提示できる。また、吸入指導に応用すれば、吸入手技のみならず、医療者の指導を受けながら正しい吸入速度でトレーニングすることもできるであろう。今回の研究では微圧差センサーをスパーサーに設置したが、今後は薬剤ポンペの外筒に挿入する形状でのセンサーの設置を計画しており、スパーサーを利用しない場合であっても、計測できるツールとなる予定である。

吸入する患者側の問題点として、不十分な吸入では、口腔内に薬剤が残存し、治療効果の減弱のみならず、口腔カンジタの発症や嘔声、吸入時のむせ込みなどで、治療が継続できなくなることが挙げられた。吸入時に舌を十分下に下げ、「ホ」の発生時のポジションを取ることで口腔内残存薬剤が減少することが報告されている。そこで、啜めることで自然に舌が下げられるマウスピースを作成した。マウスピースを用いる利点は、吸入器の種類を選ばない、

訓練が不要、スパーサーと比べて、安価に製造でき、デザインの工夫で洗浄もできるため、清潔に利用できる点である。今回の検討では、マウスピースの底面を長くし、吸入口に角度をつけたマウスピースを使った場合、マウスピースなしと比較して、1例を除いてほぼ全例で舌が低下し、咽頭後壁の面積の増加が観察された。これは、マウスピースの長い下面を舌で下から保持しないと安定が悪くなるため自然と「ホ」の発音ポジションになったと考えられた。まさにデザインが医療の問題を解決した好例である。今後は、健常者と比較し、口腔内が狭くなっていることが報告されている肥満患者でマウスピース利用の効果を観察し、肥満患者で多い難治性喘息への関連についても検討する。医工連携での臨床導入を目指す。

前年度までに行った、効果的な吸入を継続するための吸入指導に関わる取り組み「吸入カルテ」と症状記録アプリ「ゼンカル」研究を、「吸入治療を継続できないことにより、疾患コントロールが悪化する患者の支援に関する課題」として統合した。「吸入カルテ」には「吸入レッスン」が内包されており、調剤薬局での吸入指導と病薬連携を想定したシステムとなっている。これまで医師の指示により調剤薬局で行った吸入指導の報告書を書面かFAXで指示した医師に返送した場合にのみ算定されていた、吸入指導料であったが、令和2年度の診療報酬改定により、医師の指示がなくても吸入指導を行う事ができ、吸入薬指導加算(30点)の算定が可能となった。これにより、調剤薬局を主とした吸入指導の拡大が期待され、クラウドを用いた吸入指導履歴活用の方が広がると考えられる。さらに、吸入指導件数が増加すれば、入力されたデータから、吸入手技の誤りに関連する因子のより詳しい解析が可能となる。

吸入指導支援ツールである「吸入レッスン」はアップデートを行って公開を継続中である。2020年になって、新型コロナウイルス感染症拡大防止のため、全国的に対面での吸入指導は控えられている。「吸入レッスン」は対面でなくとも、デジタルデバイスを使って、動画で吸入方法を視聴し、間違えやすい手技を復習テスト形式で繰り返し確認することができる。WEBサイトのアクセス解析結果からは、アクセス数の低下はなく、対面の吸入指導に代わって利用されていると考えられた。新型コロナウイルス

ス感染拡大時に、感染リスクを避けるため、外来患者らの通院抑制が起こった。このような状況下で予想外に発生した「治療の空白」を「ゼンカル」はサポートできる可能性がある。症状を記録し、ピークフロー値を入力して、日々変化するコントロール状態を患者自らが把握する事ができる。蓄積されたデータから受診のタイミングや、アクションプランが表示され、受診が促される事で重症化を未然に予防するための受診につながる事が期待される。データの蓄積が進んだ際には、気象情報や地理情報などと合わせて分析することで、今後出現する症状の増悪の予測も可能となる。今後は喘息患者の新型コロナ感染拡大時の自己管理ツールとして、体温や嗅覚の記録を追加した再開発を計画している。

4. 結 語

このような吸入療法の在宅服薬、治療管理モデルを構築し、広く医療現場に導入することができれば、新型コロナウイルス感染という、移動の制限をせざるを得ない状況下での在宅医療・居宅療養における「吸入治療の空白」を安全に補完する事が期待できる。本研究で開発したデジタルツールやデバイスを利用しながら、呼吸器疾患を持つ患者だけでなく、医療者が安心して医療サービスを提供する助けになれば幸いである。

※本研究は日本大学学術研究助成金【社会実装研究】(課題番号 社18-006)により行われた。

文 献

- 1) 中川一人, 肥田不二夫, 伊藤玲子. 微差圧センサを備えたpMDI (加圧式定量噴霧式吸) による吸入状態のモニタリングおよび吸入指導への応用. 日本機械学会2019年度年次大会公演論文集. 2019; 2019年9月: J24102.
- 2) Yoshida T, Kondo R, Horiguchi T. A comparison of posterior pharyngeal wall areas between different tongue positions during inhalation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2019;7 (2) :743-5.e1.
- 3) Khusial RJ, Honkoop PJ, Usmani O, et al. Effectiveness of myAirCoach: A mHealth Self-Management System in Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8 (6) :1972-1979.e8.
- 4) Virella Pérez YI, Medlow S, Ho J, Steinbeck K. Mobile and Web-Based Apps That Support Self-Management and Transition in Young People With Chronic Illness: Systematic Review. *Journal of Medical Internet Research*. 2019;21 (11) :e13579.
- 5) 日本アレルギー学会喘息ガイドライン専門部会監修: 喘息予防・管理ガイドライン2018. 協和企画, 東京, 2018.
- 6) 山内智史, 芳村賢士郎, 入江泰生, 梁島一哉, 戸田健, 大林浩幸, 伊藤玲子, 権寧博: 吸入療法支援のための病薬連携システムにおけるデータマイニングの試み—マシンラーニングを用いた吸入報告指導内容の予測可能性—. 第62回日本大学理工学部学術講演会, L-10, 2018年12月
- 7) 木村一貴, 戸田 健, 芳村賢士郎, 入江泰生, 梁島一哉, 大林浩幸, 伊藤玲子, 権 寧博: 病薬連携吸入指導クラウドシステム「吸入カルテ」における多変量解析を用いた指導効果の評価方法に関する一検討. 第63回日本大学理工学部学術講演会予稿集, p. 865, 2019年12月4日
- 8) 肥田不二夫: 呼吸器プロダクトの新たな可能性について (3). 日本大学芸術学部 紀要「論文編」第71号 47-53, 2020年3月

病理診断ガイドアプリケーションシステムの構築 第2報

中西陽子¹⁾, 五味悠一郎²⁾, 芳賀拓也³⁾, 根東義明¹⁾, 増田しのぶ¹⁾

Construction of an application for efficient pathological diagnosis

Yoko NAKANISHI¹⁾, Yuichiro GOMI²⁾, Takuya HAGA³⁾,
Yoshiaki KONDO¹⁾, Shinobu MASUDA¹⁾

要旨

医療の提供においても質の向上と普遍性や効率化は世界的な課題となっている。現代において加速度的に進歩するコンピューター技術は、医療分野への展開も目覚ましい。本研究では、医療のICT化として古くから着目されてきた臨床意思決定支援システム（Clinical Decision Support System: CDSS）の新たな活用法として、病理鑑別診断に必要な補助的情報を、患者の個人情報保護を遵守しながら簡便に検索することのできる病理診断ガイドアプリケーションシステムの構築を試み、実装した。

1. はじめに

分子生物学的知見の発展によって手術困難な進行がんや再発がんに対しても様々な治療が効果を示すようになってきたことから、がんの診断には、顕微鏡下の形態学的診断にタンパク発現や遺伝子情報を加えたより詳細な情報提供の必要性が生じている。しかしながら病理診断医が個人で全診療科および全臓器の情報を網羅し、アップデートしていくには負荷を要する。そこで本研究では、臨床意思決定支援システム（Clinical Decision Support System: CDSS）¹⁾の病理診断学分野における応用方法に着目した。形態学を基盤とする病理学の分野では顕微鏡画像を機械学習させる人工知能（Artificial Intelligence: AI）の検討が目覚ましい²⁾。しかし本研究では、患者の治療選択に直結する診断学において、まずは根拠に基づいた医療（Evidence based medicine: EBM）の機械的な実践の有用性を検討するため、病理組織診断における鑑別診断のための免疫染色ならびに遺伝子検査項目選択支援システムの開発を試みた。

2. 方法

病理診断学分野のCDSSを構築するにあたり、個人情報保護の遵守の徹底が求められる。本システムはネットワークフリーかつセキュリティレベルの低い環境下での運用を想定していたが、ローカルネットワーク下の高いセキュリティレベルを要する既存の診療システムとは切り離れたものとして設定した。次に、病理診断ワークフローの分析を行い、本システムによってICT化を試みる工程を明確化した後、鑑別診断アルゴリズムについての詳細な検討を行ってマスタファイルを設計した（Fig. 1）。

マスタファイルを作成するため、エビデンスレベルの高い資料とされている各種癌取扱い規約、診療ガイドライン、WHO、日本病理学会監修アトラスなどの非構造化テキストを用いた（参考資料）。テキスト単位の知識情報を切り出して抽出し、独自のコード付けを行って構造化されたマスタファイルを作成した。ユーザーインターフェースはWebフォームで構築して実装した。システムならびにサーバー

1) 日本大学医学部

2) 日本大学理工学部

3) サクラファインテックジャパン株式会社

中西陽子：nakanishi.youko@nihon-u.ac.jp

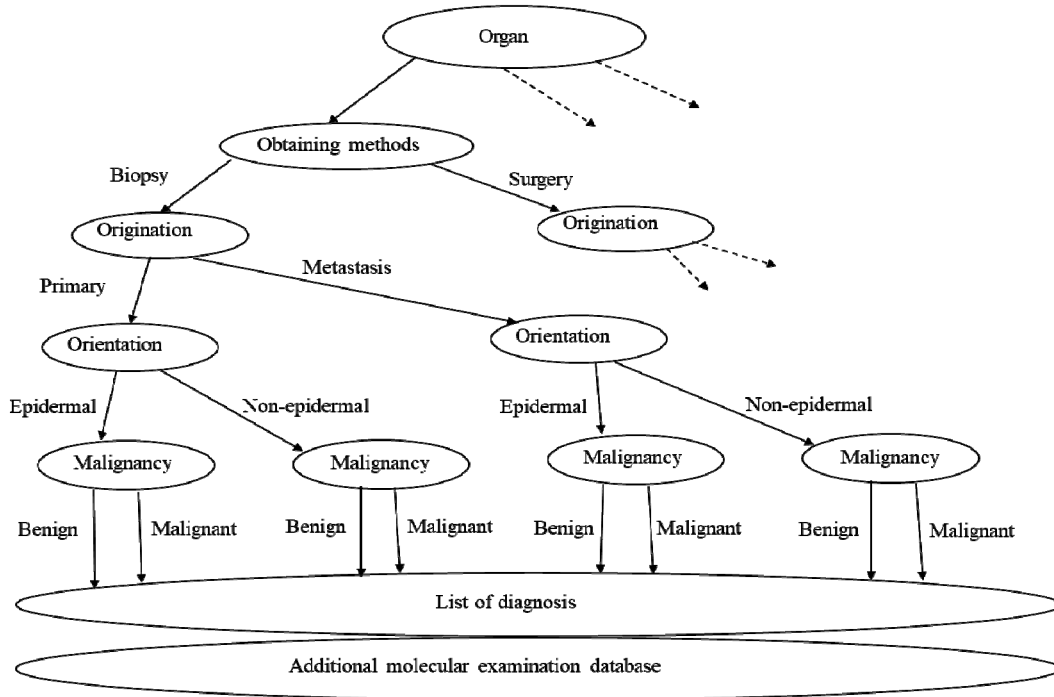


Fig. 1 Decision tree

の基本仕様は既報³⁾の通りであり、その上で試行と改良を重ねた。

昨年公開したベータ版に比較して、最も大きな改良点は、本システムの利用対象者の経験や知識の幅に対応させるためのフリーワード検索機能を追加したことである。このため、マスタ項目を見直し、必要最小限とすることで検索時のパフォーマンス性能の向上を図った。また、エビデンスとなる出典をより明確化するため、書籍名だけでなく、頁数とさらにその記載の根拠となっている文献情報を記載した。

3. 結果

試作品について内部テストを実施し、問題点を改良したベータ版を第108回日本病理学会で公開した。ここで利用者となる病理専門医より具体的な要望が得られたため、さらに改良を重ねた。インターネット環境の違いや利用端末の違いによる不具合も生じていないことが確認されたことから、2020年3月に病理診断ガイドアプリケーション eVico (<http://nsp.ce.cst.nihon-u.ac.jp/evico>) の本公開を開始した (Fig. 2)。

診断名の候補はあるが、それを支持するための免

疫染色項目や遺伝子検査項目がわからない、思い出せない場合の利用方法として、フリーワード検索ですぐに目的の情報が得られることを確認した。また、フリーワード検索では、様々な免疫染色項目はどのような診断に用いられているのかを調べるといふ利用法の可能性も示された。診断名が分からない場合は、病理診断科に提出された患者検体の臓器名から、通常の診断ワークフローに従って、候補の診断名を列挙させることができた。本システムでは、個人情報漏洩防止のため、すべては選択方式となっており、最終頁のワークシートでも文字入力できないが、ブラウザのお気に入り登録機能を用いることで、検索結果の保存と再読み込みが可能であった。

4. 考察

本システムは、不特定多数の利用ではなく、病理専門医または病理専門医を目指す医師に特化した専用アプリケーションとして開発した。個人の経験と専門性を問わず日常的な病理診断ワークフローの効率化と均てん化への貢献を目的としている。CDSSを活用した診断意思決定支援による診断業務時間の短縮もたらす患者の利益向上をめざすものである。特に、専攻医など経験の浅い病理診断医の教育

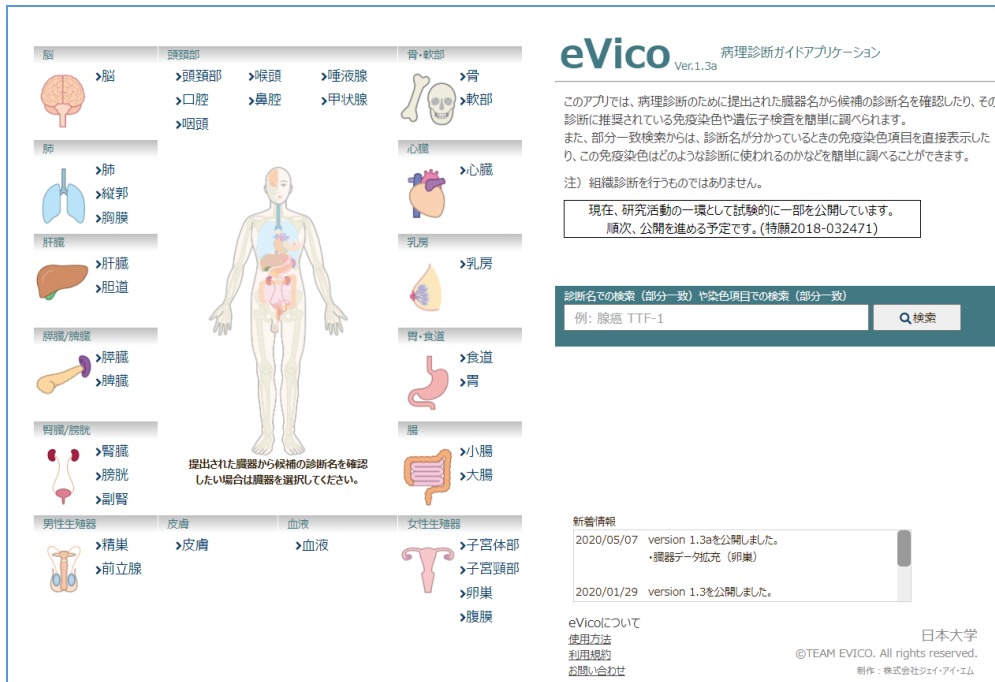


Fig. 2 Top page of the present system

と支援や、特定の臓器や領域に特化しつつある病理診断専門医における非専門臓器領域の診断業務支援および生涯教育 (On-the-Job Training) への有用性が期待される。

今回のCOVID-19のパンデミックにより様々な分野のデジタル化、オンライン化が急速に進み、今後さらに求められると考えられる。病理診断学は形態学を基盤としていることから、顕微鏡下のマイクロ画像を機械学習させる検討は多数行われている。また、本システムは、近年発展が目覚ましいAIのような深層学習^{4), 5)}による意思決定を行うものではなく、現代の医療において重要視されているエビデンスをもとに、意思決定理由のすべてが“見える”システムである点に特徴を有する。

本システムは、病理診断における意思決定支援として、全ての臓器と診療科を対象とした鑑別診断に必要な免疫染色ならびに遺伝子検査情報と、その情報がどこにあるかのエビデンスを簡便かつ明確に示すことで、個人の知識と経験に因らない病理診断ワークフローの部分的なInformation and Communication Technology (ICT) 化実現の可能性を示した。今後は、検索履歴のビッグデータ分析によるあらたな知見を発見するための追加機能を充実してい

きたい。

5. 結語

本研究では、CDSSの応用として、病理診断ワークフローの部分的なICT導入による効率化を目指すための病理診断ガイドアプリケーションを開発し、実装した。病理診断は患者の治療方針決定のために必須の医行為であり、高いエビデンスレベルが求められる。今回実装した本システムは、意思決定にいたるエビデンスとアルゴリズムを明示できるシステムであり、特定の専門領域に特化したICTの活用法として有用性が期待される。

謝辞

本研究を実施するにあたり貴重なご助言を頂きました名桜大学国際学群経営情報教育研究学系 大城真理子先生、日本大学本部知財部 井上典之氏に深謝申し上げます。また、研究期間中、日本大学理工学部の大学院研究ならびに卒業研究として、プロトタイプ作成に尽力頂いた高橋 遼氏、マスタデータ入力の効率化に尽力頂いた池上浩樹氏、データ作成作業を補助頂いた井上智章氏に感謝申し上げます。本研究は、平成30～令和元年度日本大学社会実装研究ならびに2018～2022年度科学研究費 (JP 18H03497) の助成により実施しました (特許出願中)。

参考資料

WHO Classification of Tumours of the Digestive System 4th edition
 WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart 4th Edition
 WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs 4th edition
 WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone 4th edition
 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 4th edition
 肺癌診療ガイドライン2018年版 第5版 日本肺癌学会
 胃癌取扱い規約 第15版 日本胃癌学会
 臨床・病理食道癌取扱い規約 第11版 日本食道学会
 大腸癌取扱い規約 第9版 大腸癌研究会
 整形外科・病理 悪性骨腫瘍取扱い規約 第4版 日本整形外科学会 / 日本病理学会
 子宮頸癌取扱い規約 第4版 日本産科婦人科学会 / 日本病理学会
 子宮体癌取扱い規約 第4版 日本産科婦人科学会 / 日本病理学会
 卵巣腫瘍・卵管癌・腹膜癌取扱い規約 病理編 日本産科婦人科学会 / 日本病理学会
 腫瘍病理鑑別診断アトラス肺癌第1版 文光堂
 腫瘍病理鑑別診断アトラス胃癌第2版 文光堂
 腫瘍病理鑑別診断アトラス大腸癌 文光堂

文献

- 1) Bright TJ, Wong A, Dhurjati R, et al. Effect of clinical decision-support systems: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2012; 157 (1) : 29-43.
- 2) Arevalo J, Cruz-Roa A, Arias V, et al. An unsupervised feature learning framework for basal cell carcinoma image analysis. *Artif Intell Med* 2015; 64: 131-45.
- 3) 中西陽子, 五味悠一郎, 根東義明, 増田しのぶ. 病理診断ガイドアプリケーションシステムの構築. *日本大学医学部総合医学研究所紀要.* 2019 ; 7 : 21-24.
- 4) Shortliffe EH, Sepúlveda MJ. Clinical Decision Support in the Era of Artificial Intelligence. *JAMA.* 2018; 320 (21) : 2199-2200.
- 5) Zihni E, Madai VI, Livne M, et al. Opening the black box of artificial intelligence for clinical decision support: A study predicting stroke outcome. *PLoS One.* 2020; 15 (4) : e0231166.

GOD-POD-UnaG法を用いた 血中アンバウンドビリルビン自動測定機器の開発

森岡一朗¹⁾, 長野伸彦¹⁾, 桃木恵美子¹⁾, 岡橋 彩¹⁾

Development of the automated serum unbound bilirubin measurement instrument using GOD-POD-UnaG method

Ichiro MORIOKA¹⁾, Nobuhiko NAGANO¹⁾, Emiko MOMOKI¹⁾, Aya OKAHASHI¹⁾

要旨

我々は新しくグルコースオキシダーゼ-ペルオキシダーゼ (GOD-POD) 法と非抱合型ビリルビンと特異的に結合して蛍光を発するタンパク質 (UnaG) を組み合わせることにより、微量血中のアンバウンドビリルビン (UB) を測定することができる画期的な方法を確立した (GOD-POD-UnaG法)。本研究では、このGOD-POD-UnaG法を用いた自動測定機器の開発を行っている。今回、Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせることで自動測定機器の実現可能性が見えてきた。

1. はじめに

新生児のビリルビンによる脳障害 (核黄疸) は脳性麻痺や心身障害の主要因の一つで、少子化時代の我が国において克服すべき疾患である。我々は、血中のアルブミンと結合していない非抱合型ビリルビン (アンバウンドビリルビン, UB) を測定すれば、この脳障害の発症を高率に予測できることを明らかにしてきた。現在のUB測定機器は、1980年代に開発された吸光度測定を用いたグルコースオキシダーゼ-ペルオキシダーゼ (GOD-POD) 法 (UBアナライザー, アローズ社, 大阪) である。しかし、このGOD-POD法を用いた血中UB測定は、抱合型 (直接) ビリルビンやヘモグロビン (溶血) の血液では誤値が生じるという臨床で大きな問題であり普及には至っていない。我々は新しくGOD-POD法と非抱合型ビリルビンと特異的に結合して蛍光を発するタンパク質 (UnaG) を組み合わせることにより、抱合型ビリルビンやヘモグロビンの影響を受けずに微量血中のUBを測定することができる画期的な方法を確立

した (GOD-POD-UnaG法: PCT/JP2016/060327, 特願2017-510081)。本研究では、このGOD-POD-UnaG法を用いた自動測定機器を開発し、実用化を行う。

2. 方法

我々の発案したGOD-POD-UnaG法を用いて、研究室でUBを測定することに成功している。本法を社会実装するために、取り組んだ。

研究室での具体的な測定方法 (図1)

- 1) 30℃の温度管理下で、グルコース含有緩衝液 1000 μ Lおよび血清 20 μ Lを混和させたものをペアで作る。
- 2) 一方には緩衝液、他方にはGOD-PODの酵素液をそれぞれ25 μ L加え、いずれも20秒後にアスコルビン酸555 μ Lを混和させる (総容量1600 μ L)。
- 3) 作成された2検体を、UnaGを用いて蛍光を測定する。
- 4) ビリルビン標準液を用いたビリルビン濃度と蛍光強度の検量線から、血清中のビリルビン濃度

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野
森岡一朗: morioka.ichiro@nihon-u.ac.jp

を算出する。

- 5) 2検体におけるビリルビン濃度の差から血清UB値が求められる。

また、GOD-POD-UnaG法では直接ビリルビンに影響を与えない予備実験データをすでに得ている(図2)。

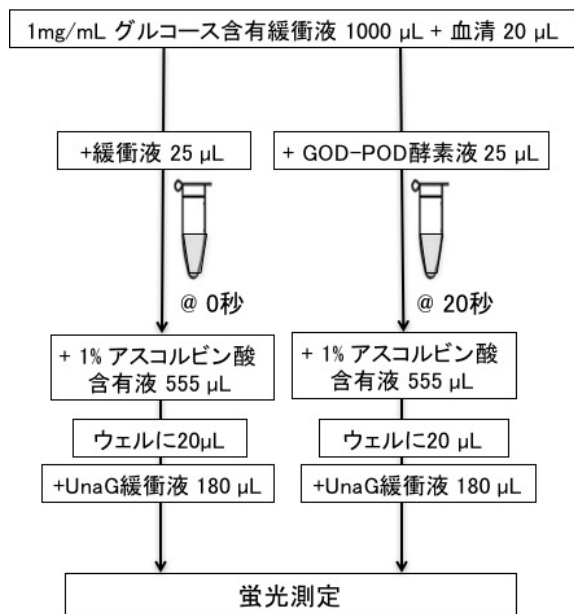


図1 GOD-POD-UnaG法

3. 結果

3-1 実現可能性試験

a. 米国のベンチャー企業であるBaebies社の保有するDigital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせることで自動測定機器を開発できるとの着想に至り、企業と開発を進め、実現可能性を確認した(図3, 4)。

b. 実現可能性試験で用いた方法で血中UB (DMF UB) 値の定量性の確認のため、既存のUB値測定機器であるUBアナライザーのUB (Arrows UB) 値と

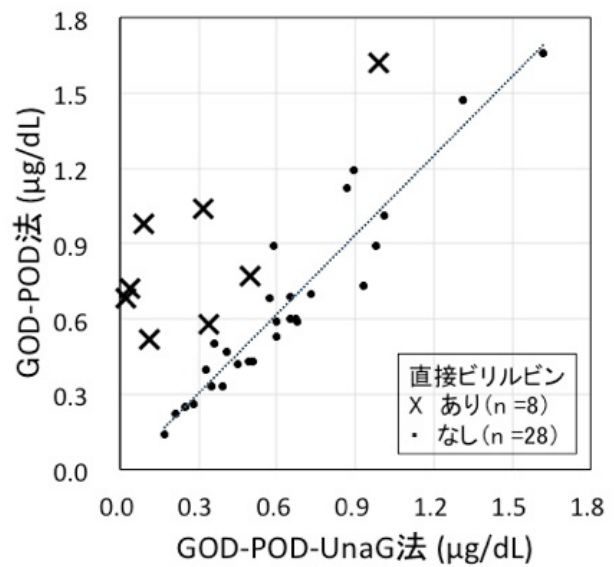


図2 GOD-POD法とGOD-POD-UnaG法で測定されたUB値の比較

直接ビリルビンの混在する血清では、GOD-POD法では偽高値を示し、GOD-POD-Una法では予測されるごおりの結果が得られる。

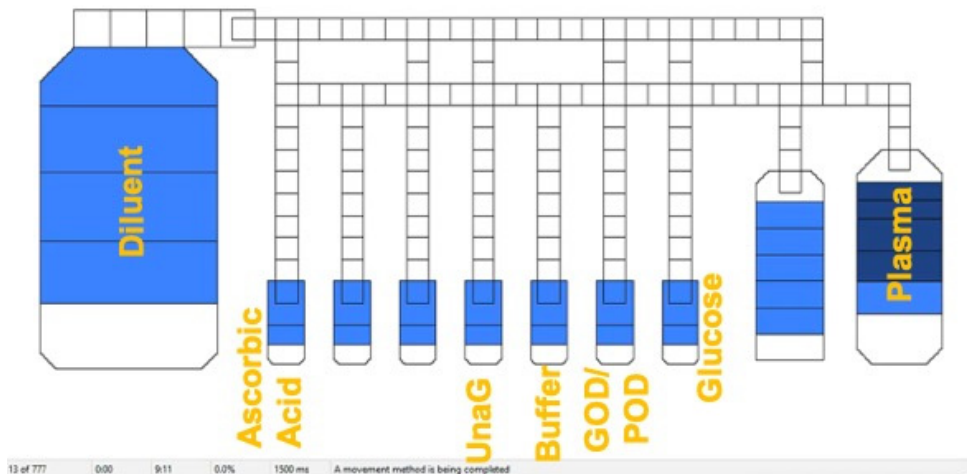


図3 GOD-POD-UnaG法とDigital Microfluidics技術を組み合わせ

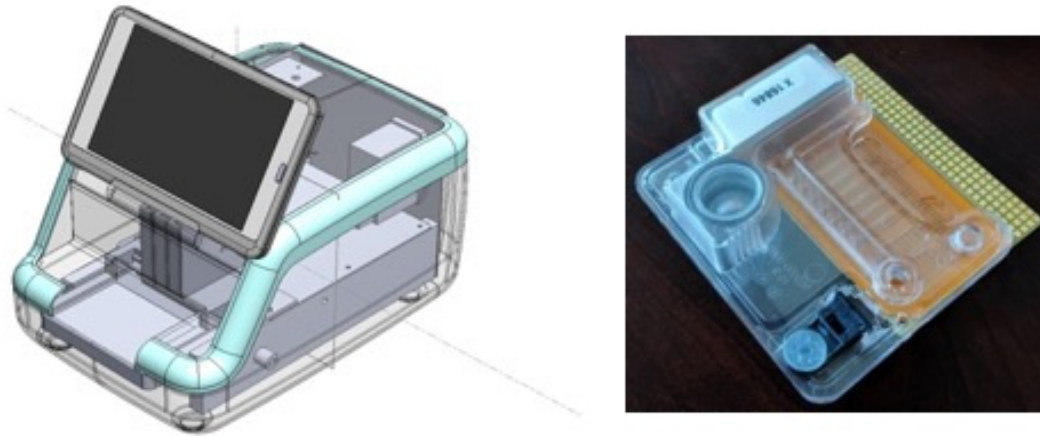


図4 完成図案（左：機器，右：カートリッジ）

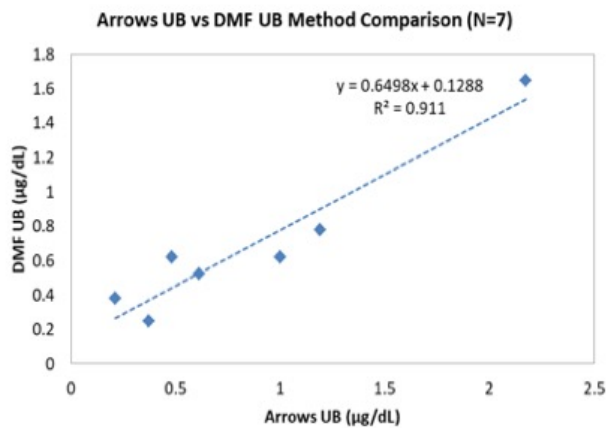


図5 既存のUB値とdisposable digital microfluidics (DMF)で測定したUB値の相関

比較した。図5に示すように、人工ビリルビン溶液のUB値との相関は、 $R^2=0.911$ で強い相関を確認した ($n=7$)。

4. 今後の計画

今回、Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせることで自動測定機器の実現可能性を示せた。次年度の計画を示す。

- 1) 2019年度に引き続き、新血中UB測定機器の完成に取り組む (Baebies社)。実装化を目指し、シノテスト社と共同開発しているUnaGの大量生産法を確立させる。
- 2) 医学部臨床研究審査委員会への申請・承認後、通常診療で測定され血中UB濃度がわかっている実際の新生児の血清を用いた定量性の確認を

行う。そのために、2020年3月20日に日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会へ申請書を提出した。2020年6月19日付で承認を得た (RK-200414-2)。日本大学医学部附属板橋病院総合周産期母子総合医療センターに入院した黄疸発症新生児の通常診療で採取された血清の残余を得る。その際、通常の保険診療で測定された血中UB濃度 (既存のUBアナライザー、GOD-POD法 [アローズ社、大阪]) で測定したデータも収集し、比較検討する。

- 3) 2)の結果をもとに、薬事承認の申請に必要な研究計画を立て、特定臨床研究法に則り、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得る。
- 4) 新血中UB自動測定機器で測定した血中UB濃度の精度を検証する。変動係数 (CV) は5%未満となることを確認する。
- 5) 日内変動分析および日間変動分析：同一検体を用いた繰り返し測定 (6回以上) を行い、CVを求める。
測定者によるばらつきの検討：医師、研修医、看護師、検査技師が繰り返し測定 (6回以上) を行い、CVを求める。
- 6) 抱合型 (直接) ビリルビンやヘモグロビン (溶血) 含まない血清検体を用いて、既存のUBアナライザーと新血中UB自動測定機器での血中UB濃度で相関関係を相関係数と相関式を求める。評価は相関係数が0.9以上、相関式は $y=1.0x + 0$ に近い結果となることで行う。

- 7) 既存のUBアナライザーの欠点である抱合型(直接)ビリルビンやヘモグロビン(溶血)含有の血清検体を新血中UB自動測定機器で測定し、測定値に影響がないことを確証させる。評価は、そのほかのパラメータである総ビリルビン/アルブミン比と比較することで確認できる。
- 8) 以上の成果に基づいて、アトムメディカル社とともに薬事承認申請を行う。体外診断医薬品・

医療機器として承認されれば、保険診療点数の確保のための申請を行う。

5. 結 語

今回、Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせた新血中UB自動測定機器の実現可能性が見えてきた。

生体における新規ポリエチレングリコール化合物PEG-Bによる 抗腫瘍効果の検討

長崎(前岡)瑛里¹⁾, 藤原恭子^{2,3)}, 大日方大亮⁴⁾, 石橋直也⁵⁾, 越永従道¹⁾, 金田英秀¹⁾

Analysis of anti-tumor function of new polyethylene glycol derivative PEG-B in vivo

Eri NAGASAKI-MAEOKA¹⁾, Kyoko FUJIWARA^{2,3)}, Daisuke OBINATA⁴⁾,
Naoya ISHIBASHI⁵⁾, Tsugumichi KOSHINAGA¹⁾, Hide KANEDA¹⁾

要旨

本研究では、神経芽腫における新規ポリエチレングリコール化合物PEG-Bの抗腫瘍効果を検討した。*in vitro*の解析から、PEG-Bはp21^{WAF1}を誘導して細胞周期を停止させ、神経芽腫細胞SK-N-ASの増殖を抑制していると考えられた。神経芽腫モデルマウスを作成しPEG-Bを週1回3週間尾静脈投与すると、有意差は認められないもののPEG-Bによる腫瘍増殖抑制傾向が認められた。以上の結果はPEG-Bが神経芽腫に対する新規治療薬として有望である可能性を示唆しており、今後は投与方法を変更し再検討する予定である。

1. はじめに

神経芽腫は胎生期の神経堤細胞に由来する腫瘍であり、脳腫瘍を除く小児悪性固形腫瘍で最も高頻度で認められる¹⁾。集学的治療を行っても高リスク群の5年生存率は50%である¹⁾ため、新規治療法の開発が切望される。

子囊菌由来ポリエチレングリコール化合物の誘導體として合成されたPEG-B(特許第5364532号, 図1A)は、培養系および動物実験において、膵癌などの悪性腫瘍に対して強い腫瘍増殖抑制効果を示す²⁾。このためPEG-Bは新規の抗腫瘍薬として期待できるが、神経芽腫における効果は未だ明らかでない。

本研究では、神経芽腫細胞株SK-N-ASに対するPEG-Bの抗腫瘍効果と作用機序を解析した。さらに、神経芽腫皮下腫瘍モデルマウスを作成し、PEG-Bの経尾静脈投与による腫瘍増大抑制効果を検討した。

2. 対象及び方法

神経芽腫細胞SK-N-ASにPEG-B 1 μ M添加し、24時間毎に1週間WST-8 assayを行い、細胞増殖能を検討した。グラフは、PEG-B添加前(day0)を1とした増殖曲線で示した。またPEG-B添加後の細胞周期関連遺伝子p21^{WAF1}の発現変化について、Real-time PCRで解析した。

さらに腫瘍モデルマウスを作成し、生体におけるPEG-Bの抗腫瘍効果を検討した。NOD/SCIDマウス(週令5, メス)の右側腹部皮下にSK-N-AS細胞を1頭あたり 2×10^5 個ずつ移植した。週1回、腫瘍の長径(a), 短径(b), 高さ(c)(mm)を計測し、腫瘍体積(V)(mm³)を以下の式で求めた: $V=1/2 \times a \times b \times c$ 。腫瘍容積が200mm³を超えた時点で、PEG-B(15mg/kg body weight)または溶媒(水)を週1回3週間経尾静脈投与した。最終投与日の1週間後に安楽死させ、剖検および腫瘍の摘出を行った。腫瘍増

1) 日本大学医学部外科学系小児外科学分野
2) 日本大学医学部内科学系総合診療学分野
3) 日本大学歯学部解剖学等I講座
4) 日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野
5) 日本大学医学部放射線医学系放射線医学分野
金田英秀: kaneda.hide@nihon-u.ac.jp

大率は、PEG-B投与開始時の腫瘍容積を1としたときの解剖時の腫瘍容積の比で算出した。

3. 結果

SK-N-ASにおいて、PEG-B 1 μ M添加後の細胞増殖能を解析すると、PEG-B添加後に細胞増殖は全くみられず、添加後1日目より非添加群との間に有意な差を認めた (図1B, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

PEG-Bの細胞増殖抑制効果が確認できたことから、細胞周期の停止に関与する $p21^{WAF1}$ の発現状態への影響についての検討を行った。Real-time PCRで解析した結果、PEG-B添加により $p21^{WAF1}$ の発現が亢進した (図1C, ** $P < 0.01$)。

さらに、神経芽腫のモデルマウスを作成し、生体

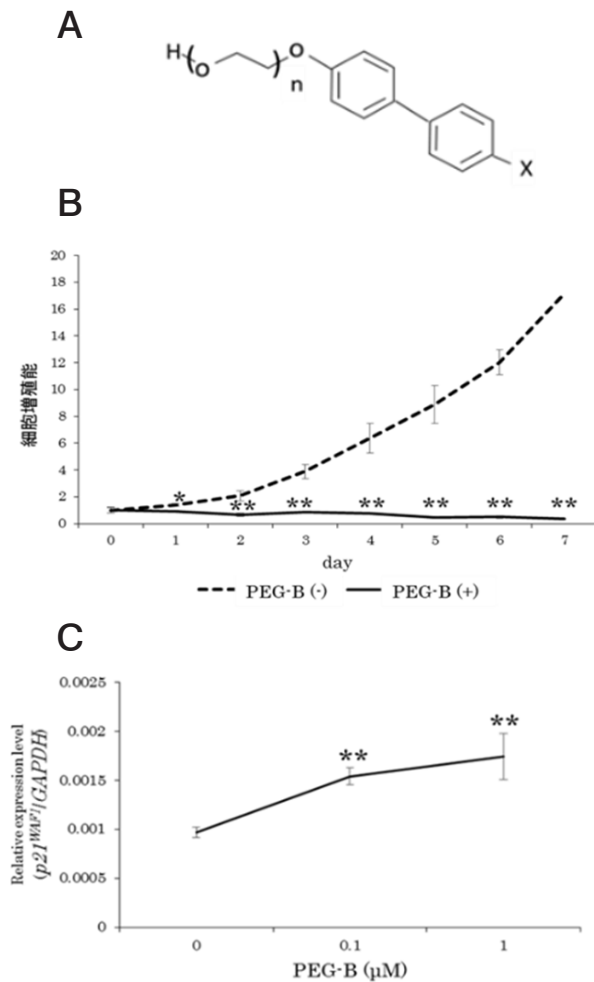


図1 PEG-Bは $p21^{WAF1}$ を誘導して神経芽腫細胞の増殖を抑制する (A) PEG-Bの構造. (B) SK-N-ASにおけるPEG-B添加後の細胞増殖能. (C) PEG-B添加後の細胞周期関連遺伝子 $p21^{WAF1}$ の発現変化.

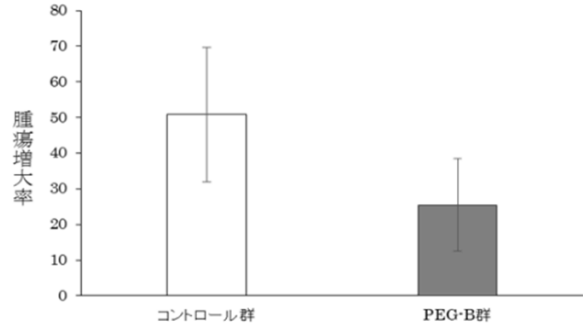


図2 in vivoにおいてPEG-B投与群では腫瘍増殖抑制傾向を認める

におけるPEG-Bの抗腫瘍効果を検討した。各群 $n=4$ で解析した結果、腫瘍増大率はコントロール群で 50.8 ± 18.8 、PEG-B群で 25.5 ± 13.1 であった。PEG-B群で腫瘍増殖抑制傾向が認められたが、有意差は認めなかった (図2, $P=0.069$)。またコントロール群、PEG-B投与群とも、肉眼的に肝、肺に転移は認めなかった。

4. 考察

PEG-Bは $p21^{WAF1}$ を誘導して細胞周期を停止させ、SK-N-ASの増殖を抑制していると考えられた。 $p21^{WAF1}$ の発現はがん抑制遺伝子p53により制御されているため、p53依存的な細胞周期の停止を媒介している可能性は考えられる。現在、Western blottingによるp53蛋白のリン酸化状態の変化の検討、およびフローサイトメトリーによる細胞周期の解析を進めている。

神経芽腫モデルマウスにおいてPEG-Bを経尾静脈投与すると、PEG-B群では有意差は認めないものの、腫瘍増殖抑制傾向が認められた。今後はPEG-Bの投与量を変更して再実験する予定である。

5. 結語

PEG-Bは神経芽腫に対し細胞増殖抑制効果を示したが、生体内における抗腫瘍効果については引き続き投与量を変更し、最適な投与条件を検討する必要がある。

文 献

- 1) Park JR, Bagatell R, London WB, et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: Neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2013; 60 (6) : 985-993.
- 2) Senka Pharmacy Co., Ltd. Polyethylene glycol derivatives and anticancer drugs containing them. JP5364532B2. 2013-12-11.

高齢者バランス障害，ふらつき患者における 動的客観的評価法の研究

野村泰之¹⁾，吉田行弘²⁾，兼板佳孝³⁾

A study of the locomotive analyze for the balance disorder

Yasuyuki NOMURA¹⁾，Yukihiro YOSHIDA²⁾，Yoshitaka KANEITA³⁾

要旨

高齢化社会で増加する加齢性障害やふらつきなどのバランス障害患者に対する測定法の開発をめざした。測定結果の確実性とモバイル性の両立を目指して設置型とモバイル型の複数の測定法を併合して測定した。カスタムメイドのモデルコース歩行路でパイロットスタディとして健常被験者を測定し頭部の安定性などの知見を得た。今後，確実性とモバイル性を併せ持った測定法の開発を目指し，さらに疾患群で測定していく予定である。

1. はじめに

高齢化社会にともない，ふらつきなどのバランス障害を訴える患者は多い。患者のみならず健康な高齢者でも加齢とともにふらつきを呈するようになり「加齢性平衡障害」という概念も用いられるようになった。また近年，リハビリテーション分野などで転倒予防の重要性が唱えられているが，ふらつきや加齢性平衡障害に対する客観的な評価測定法は確立されていない。

本研究はこのような高齢者のバランス障害やふらつきの病態を動的かつ客観的に解析し，治療の評価にも応用していく試みである。これまでも静的な検査・解析方法やアンケートを用いる主観的検証は散見されるが，動的客観的な評価法の開発は困難を呈しており，本研究はそのトライアルの端緒として幾つかの測定法を試みた。

2. 対象及び方法

2-1 対象

本研究はパイロットスタディの段階であり，対象は高齢者ではなく当該診療科医局員やスタッフを用いた。

2-2 方法

図1のようなモデルコースを室内に制作し，下記のプロトコールAおよびBを実施した(図2)。モデルコースは厚さ5cmのウレタンフォームとフォースプレートを交えた10mの歩行路とした。被験者身体各部位に赤外線反射マーカ―と小型加速度センサーを装着し，さらにビデオ撮影式姿勢歩行測定装置も用いて測定できる仕様とした。モデルコースの外縁には赤外線反射マーカ―測定用のモーションキャプチャーシステムと，ビデオ撮影式姿勢歩行測定装置を備えられるようにした。

①プロトコールA：障害物歩行

10mの歩行路を前進歩行するが，中間点に高さ30cmの踏み台を置きその上を踏み越えて反対端ま

1) 日本大学医学部 耳鼻咽喉・頭頸部外科学系 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野
2) 同，整形外科系 整形外科分野
3) 同，社会医学系 公衆衛生学分野
野村泰之：nomura.yasuyuki@nihon-u.ac.jp

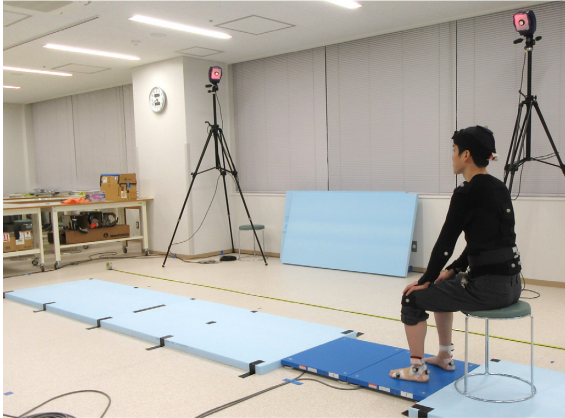
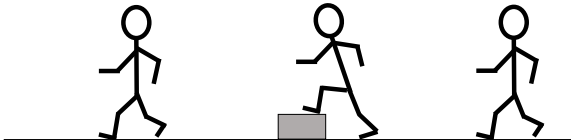


図1 モデルコースと身体各部位にマーカーを装着した様子

(プロトコルA)



(プロトコルB)

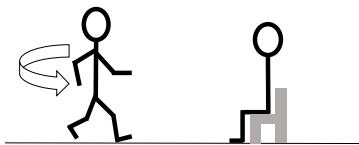


図2

で歩行する。

②プロトコルB：Times Up and Go Testの測定

「Times Up and Go Test」はリハビリテーション領域で用いられる検査法で、椅子から立ち上がり3m先の地点で180度ターンしてきて再び着席する所要時間を測定する検査である。モデルコースの途中で椅子を置いて設定した。

③身体の各部位に装着したセンサー、マーカーにより、起立、歩行、障害越え、ターン、着座、といった各動作における特徴を測定した。

3. 結果

3-1 モデルコースの作成について

5cm厚のウレタンフォームを歩行路として用い、床反力を測定するためのフォースプレートもコース内に設置した。フォースプレートとの段差はなく問

題なく設置できた。

3-2 各測定機器の有用性について

- ① 赤外線反射マーカーを用いたモーションキャプチャー装置：設置型の測定機器であり、身体各部位の動きの測定において最も正確である。しかし測定範囲が約5mと限定されるため、たとえば歩行路全体を測定することは出来ない欠点がある。また、設置と解析に手間と時間を要する欠点がある。
- ② 小型加速度センサー：身体各部位に直接装着するモバイル型測定である。無線通信でデータを取得するために測定範囲の制限は受けずモバイル性にも優れる。しかし重力軸のキャリブレーション設定にバイアスがかかりやすく、測定値の解釈に何らかの簡便なソフトウェアを用いるなどの改良を加えねばまだ実用的ではない。
- ③ ビデオ撮影式姿勢歩行測定装置：民生品で身体正面方向からの歩行姿勢を測定できる。反射マーカーが不要である。ただし解析ソフトの制限で歩行路の正面方向からの撮影となるため側面の撮影はできない。また解析ソフトの制限で頭頂部の動きの計測ができない。

3-3 プロトコルAおよびBについて

単純前進歩行、踏み台による段差障害乗り越え、着座位から起立、歩行、回旋ターン、着座、における身体各部位の測定を行った。本稿執筆現在、解析途中ではあるが以下の結果が得られている。

- ① 単純前進歩行において頭部の動揺が身体の他部位に比して少ない。
- ② 段差障害においても頭部の安定性は保たれている。
- ③ 起立、回旋ターンなどの動作において体幹と頭部の動作開始に差異がみられた。

4. 考察

高齢化社会におけるふらつきなどの平衡障害は幾つもの診療科が抱える問題である。診療科によって、その科に関わる臓器の測定はこれまでもおこなわれてきた。しかし加齢性平衡障害などは複合的な要因の絡み合った症候であるため身体全体を見据えた対応が将来的に必要なと考えられる。そこで本研究では、内耳前庭や運動器といった各科領域のみならず身体平衡全体をみすえた測定法の開発を

目指した。設置型の測定機器とモバイルの測定機器の相互性の可能性も求めている。

測定機器については、今回のパイロットスタディで身体複数個所の測定には従来のように設置型測定機器の方が安定した結果を得られた、モバイル型測定では重力軸に対するキャリブレーションの重要性が今回判明した。しかし今後のIT機器の発展や屋内屋外を問わず簡便な測定を行うためには引き続きモバイル型測定についても探索していく必要があると考える。

測定結果については、カスタムメイドに作成したモデルコースでの実地測定において頭部動揺の安定性が確認された。歩行動作時の頭部の安定性は、目標物に対する視線の安定を担保するために行われると考えられている。今後、身体の中の部位がその安定性に最も関わっているかを含めて、加齢による視力の低下、身体柔軟性の低下、筋力の低下、それらを複合した俊敏性の低下がもたらす影響を測定していく予定である。また単なる加齢性平衡障害のみならず個別疾患によるふらつき平衡障害患者をも測定することで、加齢性平衡障害の病態解明や治療効果判定の検査法としても進めれると期待できる。

5. 結 語

複数の測定法を用いて加齢性平衡障害などのふらつきに対する新たな測定法の開発を目指した。設置型測定とモバイル型測定をコンバインしてモデルコースを用いて測定したところ、障害歩行における頭部の安定性などの知見が得られた。今後、より簡便な測定機器の開発とともに疾患病態の解明と治療効果の測定を目指したい。

謝 辞

本研究において、東京工業大学工学院・金子寛彦教授、日本大学理工学部電気工学科・篠田之孝教授、同・山口達也先生、日本大学医学部附属板橋病院リハビリテーション科理学療法士・高橋龍介先生に多大なご指導を賜り深謝申し上げます。

文 献

- 1) 篠原勝夫(編). 姿勢制御の神経生理機構. 杏林書院, 東京. 2011.
- 2) 室伏利久. 加齢とめまい平衡障害. 新興医学出版社, 東京. 2013.
- 3) 石川和夫(編). 多様化する高齢者のめまい. ENTONI. vol.176. 2015.
- 4) 浅井友詞, 中山明峰(編). 前庭リハビリテーション. 三輪書店, 東京. 2015.
- 5) 野村泰之. スポーツ生理学・アスリートの運動機能と随意運動. JOHNS36 (5) 539-544, 2020.

NOG マウスを用いたメソトレキサート関連リンパ腫の 発症におけるEBVの関与の解明

北村 登¹⁾, 長澤洋介¹⁾, 都築 広¹⁾, 渡邊美遙¹⁾, 長塚靖子¹⁾, 岩田光浩¹⁾, 武井正美¹⁾

The relation of EBV in development of methotrexate associated lymphoproliferative disease using hNOG mice

Noboru KITAMURA¹⁾, Yosuke NAGASAWA¹⁾, Hiroshi TSUZUKI¹⁾, Miharuru WATANABE¹⁾,
Yasuko NAGATSUKA¹⁾, Mitsuhiro IWATA¹⁾, Masami TAKEI¹⁾

要旨

メソトレキサート（以下MTX）は関節リウマチ（以下RA）の第一選択薬として知られているが、MTX投与でリンパ増殖性疾患（以下LPD）が発症する事が報告されている。発症にEpstein-Barr virus (EBV) が関与していると言われていたが、直接証明したものは無い。今回EBV感染ヒト化免疫不全マウス（hNOGマウス）にMTXを投与しLPDが発症するか否かを検討した。MTXを投与したマウス3頭中2頭で脾腫を認め、うち1頭で組織学的にEBER (+) のLPDの発症を認めた。今後EBV感染hNOGマウスのLPD発症にMTXがどの様に関与するかを検討したい。

1. はじめに

免疫不全マウスであるNOD/SCID/IL2R γ nullマウス（NOGマウス）は、ヒト骨髄由来細胞移植によりヒト化免疫系を再構築することが可能である。我々はヒト臍帯血由来幹細胞をNOGマウスに移植し、ヒト免疫化マウス（hNOGマウス）を作成、そこにEpstein-Barr virus (EBV) を感染させる事でびらん性関節炎の発症を証明し、EBVと関節リウマチの関連性を証明した。また、EBV感染hNOGマウスはさらに高濃度のEBVを感染させるとリンパ腫を発症することが証明されている。

一方メソトレキサート（MTX）はRAの治療として世界中で最も使用されているが、MTX治療中にリンパ増殖性疾患（LPD）を発症する事が報告され、今ではMTX関連LPD（MTX-LPD）と言う概念が提唱されている。臨床的にはMTX-LPDの発症にEBVが関与していると言う報告がみられるが、MTX-LPD発症にEBVがどの様に関与しているかを直接

証明したものは存在しない。

本研究はEBVを感染させたhNOGマウスにMTXを投与し、LPDの発症の有無を確認し、MTXにLPDがどの様なメカニズムで発症するかをヒトの免疫系で検討する。

2. 対象および方法

2-1 hNOGマウスの作成

NOGマウスは、公益財団法人実験動物中央研究所（神奈川）より購入した。7週齢の雌NOGマウスに、市販されているヒト臍帯血由来CD34陽性造血幹細胞（Lonza, Basel, Switzerland）を 8.0×10^4 から 1.0×10^5 cell/頭で尾静脈から移植し、hNOGマウスを作製した。ヒト造血幹細胞移植マウスにおけるヒト免疫細胞再構築の確認は、末梢血全リンパ球におけるCD45（anti-human CD45 monoclonal antibody (BioLegend, San Diego, CA, USA)）陽性細胞の比率をflow cytometry（FC500, Beckman Coulter, Brea, CA, USA）で経時的に測定し、骨髄に生着したか否

1) 日本大学医学部
北村 登: kitamura.noboru@nihon-u.ac.jp

かを確かめる事でhNOGマウスが作成されたか否かを確かめた。

2-2 EBVおよびEBVの感染

EBVは、B95-8細胞を10% fetal bovine serum (FBS, Gibco/Thermo Fisher, grand Island, NY, USA), ペニシリンG, ストレプトマイシン (Invitrogen/Thermo Fisher, grand Island, NY, USA) を添加した Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用い培養し、培養上清を遠心濃縮し、0.45 μm membrane filter (Millipore/Thermo Fisher, grand Island, NY, USA) を通して精製した。精製ウイルスの力価測定は、臍帯血から単核球を分離し、精製したEBVウイルス液の10倍段階希釈で添加し、培養した。6週間後、リンパ球がtransformation (細胞塊の形成で判定) を起こしたwell数の割合から、50% transforming dose (TD₅₀) を算出した¹⁾。このウイルス液を、ヒト造血幹細胞移植後約12週経過したhNOGマウスの尾静脈から、ウイルス量として20 TD₅₀/100 μl/頭以上で投与しEBVを感染させた。

2-3 MTX投与

EBV感染と動時に、MTX (富士フィルム和光純薬 (株)) 20 μgを1mlのphosphate-buffered saline (PBS) に溶解し毎週腹腔内投与した。またコントロールとしてMTXを投与しないマウスには1mlのPBSを毎週投与した。

2-4 組織学的検討

EBV感染hNOGマウスを、末梢血リンパ球中のヒトCD8陽性細胞が増加し、比率がCD4陽性細胞を上回るEBV感染後8から10週間経過した後に解剖を行い、肝臓、脾臓、唾液腺、リンパ節等の各臓

器を摘出した。組織切片は、ホルマリン固定の後にパラフィンブロックとし、連続切片を作製した。各臓器の切片に対し、hematoxylin-eosin (HE) 染色を施行し、顕微鏡下で観察し、LPDの発症の有無について病理組織学的検討を行った。

2-5 EBVの検討

末梢血中のEBVDNAの定量はTaqmanシステム (Applied Biosystems) によるreal-time polymerase chain reaction (PCR) を用いて測定した²⁾。また組織中のEBVの証明にはEBV-encoded small RNA (EBER) のprobes (DAKO, Y5200) を用いたin-situ hybridizationを行った。

3. 結果

3-1 EBV感染hNOGマウスのリンパ球の推移

TD₅₀のEBVを感染と動時にMTXを投与した3頭と投与しない3頭の末梢血のリンパ球の推移を経時的に追跡した。MTXを投与した3頭のうちの2頭が経時的にCD3が上昇した。またCD4/8比はばらつきがあるがCD4が優位に推移した。MTXを投与しない3頭中2頭はCD3の上昇はわずかだった。

MTX投与hNOGマウスの摘出臓器の肉眼的所見 (図-1)

MTXを投与したhNOGマウス3頭のうちの2頭 (2-3, 2-4) で脾臓の増大を認めた。その他、肝、腎、胃、リンパ節には肉眼的に大きな差は認めなかった。

3-2 MTX投与hNOGマウスの摘出臓器の組織学所見 (図-2)

脾臓が増大していたマウス (2-4) のHE染色では異型性のある細胞のほとんどが大型~中型で、孤立



図1 MTX投与hNOGマウスの解剖臓器の肉眼像

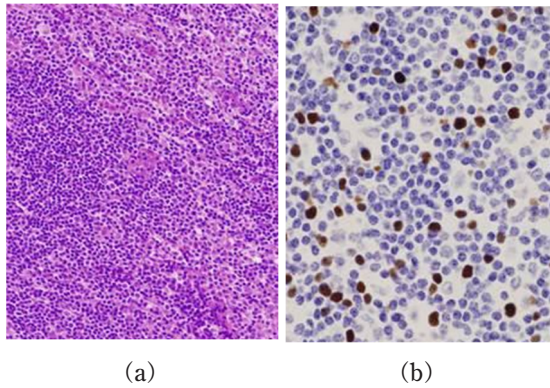


図2 LPDを発症したhNNOGマウスの脾臓の病理組織像
(a) HE染色, (b) EBER in situ hybridization

散在性に出現し、小型の成熟リンパ球も散見され、核のクロマチンは粗く、不規則な凝集を示し、LPDを疑わせる所見を認めた。EBERのISHを施行したところ異型性のある細胞の一部でEBERが染色された。

3-3 LPD発症マウスの末梢血のEBV-DNA定量

MTXを投与し、LPDを発症した2-4のマウスの解剖時のEBV-DNA量は $1 \times 10^3 / \mu\text{DNA}$ と上昇していたが、他の2頭、MTXを投与しなかった3頭からはEBV-DNAは検出出来なかった。

4. 考 察

MTXは現在のRA患者の第一選択薬と認識されている³⁾。しかし、MTXの投与中にLPDを発症した症例について報告され⁴⁾、それ以来、報告が徐々に増加し、2001年に造血腫瘍のWHO分類でMTX-LPDと言う概念が認識された⁵⁾。その後、MTX-LPDの臨床的な報告は数多く見られているが、LPDの発症にMTXがどの様に関与しているかを直接証明した報告はまだない。また臨床的にはIchikawaら⁶⁾が、

RA-LPDの病理組織のEBER陽性率を検討し、non-MTX-LPD (7/15, 46.7%)と比較しMTX-LPD (49/78, 62.8%)の方が、有意にEBER陽性率が高いことを報告しており、MTX-LPDの発症にEBVが関与している事が示唆されている。今回我々はhNNOGマウスにEBVを感染させ、さらにMTXを投与する事で、一部だが、LPDを発症させ、組織内にEBVが存在する事を証明し、さらに末梢血のEBV-DNAの上昇を確認した。

5. 結 語

本モデルは今後MTX-LPD発症の免疫学的機序を解明する可能性があることが示唆された。

文 献

- 1) Condit RC. Principles of Virology. Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. 5th ed. 2006, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- 2) Kimura H, Morita M, Yabuta Y, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. J Clin Microbiol 1999; 37:132-136.
- 3) Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, B, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. Ann Rheum Dis 2017; 76:960-977.
- 4) Ellman MH, Hurwitz H, Thomas C, et al. Lymphoma developing in a patient with rheumatoid arthritis taking low dose weekly methotrexate. J Rheumatol 1991; 18: 1741-1743.
- 5) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. World Health Organization classification of tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research of Cancer, 2017, p462-464.
- 6) Ichikawa A, Arakawa F, Kiyasu J, et al. Methotrexate/iatrogenic lymphoproliferative disorders in rheumatoid arthritis: histology, Epstein-Barr virus, and clonality are important predictors of disease progression and regression. Eur J Haematol 2013; 91: 20-28.

大動脈疾患や平滑筋腫瘍における 細胞骨格蛋白関連分子 smoothelin の病態への関与

van Eys Guillaume¹⁾, 山田清香²⁾, 原田 篤³⁾, 林 佑樹³⁾, 羽尾裕之²⁾

Pathological role of smoothelin for aortic diseases and smooth muscle cell tumor

van Eys Guillaume¹⁾, Sayaka YAMADA²⁾, Atsushi HARADA³⁾, Yuki HAYASHI³⁾, Hiroyuki HAO²⁾

要旨

高分化な平滑筋細胞に特異的に発現・分布することが知られている細胞骨格蛋白関連分子である smoothelin の、大動脈解離や平滑筋腫瘍における病態への関与を検討した。大動脈解離を来した中膜平滑筋細胞において、対照の非解離大動脈と比較し smoothelin は細胞質に逆説的に高発現しており、病態解析の新たな研究の方向性を見出した。また、良性の平滑筋腫では smoothelin の細胞質における分布が認められたが、悪性の平滑筋肉腫では一部の腫瘍細胞の核内発現が観察された。Smoothelin の細胞質から核内への移行が腫瘍の悪性化や細胞増殖に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

1. はじめに

Smoothelin は、高分化な平滑筋細胞に特異的に発現するといわれている細胞骨格蛋白関連分子である¹⁾。これまでの我々の検討で、大動脈瘤、大動脈解離などの大動脈疾患、平滑筋腫や平滑筋肉腫などの平滑筋腫瘍において smoothelin が病態に関与している可能性が示唆された。今回 smoothelin を世界で初めてクローニングし、本分子の生体における重要性を報告してきた van Eys 博士と、平成31年度日本大学医学部創立50周年記念外国人招へい研究者招へい助成により共同研究する機会を得たので成果の一部を報告する。なお今回検討で用いた anti-smoothelin monoclonal 抗体 (clone:R4A) は van Eys 博士から供与されたものを用いた。

2. 急性解離を来した大動脈の中膜平滑筋細胞における smoothelin の分布

smoothelin は、手術で得られた大動脈解離を来した血管壁の中膜平滑筋細胞では、病理解剖で得ら

れた非解離大動脈壁と比較して、smoothelin 陽性細胞面積 / α -smooth muscle actin 陽性面積で得られた smoothelin の中膜平滑筋細胞における陽性面積率が有意に高かった。また中膜を外膜側、中間、内膜側に3分割してそれぞれの smoothelin 陽性面積率を算出した結果、特に中膜の外膜側により多く発現していることが示された。解離群は非解離大動脈と比較して高分化な血管平滑筋細胞が逆説的に中膜の外膜側を主体として分布していると考えられた。

3. 平滑筋腫瘍における smoothelin の分布

子宮平滑筋腫瘍における smoothelin の分布パターンは良性の平滑筋腫と悪性の平滑筋肉腫で異なっていた。良性の平滑筋腫では、腫瘍細胞の細胞質に smoothelin の分布がみられた。一方、悪性の平滑筋肉腫では、細胞質陽性像とともに一部の腫瘍細胞において核内における分布が認められた。

本来 smoothelin は細胞骨格蛋白関連分子としてアクチン線維と共発現し、平滑筋細胞の収縮や弛緩

1) Department of Biochemistry, University of Maastricht, the Netherlands

2) 日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野,

3) 日本大学医学部外科学系心臓血管外科学分野

羽尾裕之: hao.hiroyuki@nihon-u.ac.jp



図 1 van Eys 博士 (右奥)

に関与していると考えられてきた。今回の検討で核内への smoothelin の移行が観察されたことは、本分子の生体内における新たな役割の解明につながると考えられ検討を続けている。

文 献

- 1) van Eys GJ, et al. Smoothelin in Vascular Smooth Muscle Cells. Trends Cardiovasc Med. 2007; 17 (1) : 26-30.

4. 結 語

大動脈疾患や平滑筋腫瘍の病態に細胞骨格蛋白関連分子である smoothelin が関与していることが明らかとなった。現在 van Eys 博士から供与された smoothelin 遺伝子欠損マウスや平滑筋腫瘍から分離した培養平滑筋細胞を用いてこれらの研究テーマを発展させており、大動脈解離における smoothelin の分布は現在英文原著論文を準備中である。

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¹⁾, 佐野有隆¹⁾, 豊島翔太¹⁾, 三木寿美²⁾, 武富芳隆²⁾, 坂本朋美¹⁾, 李賢鎬¹⁾, 齋藤修¹⁾, 村上誠²⁾, 田杭真帆¹⁾, 伊東真奈¹⁾, 遠藤嵩大¹⁾, 丹羽悠介¹⁾, 葉山惟大¹⁾, 藤田秀樹¹⁾, 高橋宏通¹⁾, 三浦勝浩¹⁾, 濱田岳志¹⁾, 中川優¹⁾, 飯塚和秀¹⁾, 内野慶人¹⁾, 入山規良¹⁾, 小池隆¹⁾, 栗原一也¹⁾, 都築広¹⁾, 長澤洋介¹⁾, 長塚靖子¹⁾, 岩田光浩¹⁾, 北村登¹⁾, 丸岡秀一郎¹⁾, 福田麻佐美¹⁾, 山田志保¹⁾, 黒澤雄介¹⁾, 伊藤亮治³⁾, 八田善弘¹⁾, 中山智祥¹⁾, 武井正美¹⁾, 徳橋泰明¹⁾, 權寧博¹⁾, 照井正¹⁾

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

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Yutaka SANNO¹⁾, Shota TOYOSHIMA¹⁾, Yoshimi MIKI²⁾, Yoshitaka TAKETOMI²⁾, Tomomi SAKAMOTO¹⁾, Kenko Li¹⁾, Shu SAITO¹⁾, Makoto MURAKAMI²⁾, Maho TAGUI¹⁾, Mana ITOU¹⁾, Takahiro ENDO¹⁾, Yusuke NIWA¹⁾, Koremasa HAYAMA¹⁾, Hideki FUJITA¹⁾, Hiromichi TAKAHASHI¹⁾, Katsuhiko MIURA¹⁾, Takashi HAMADA¹⁾, Masaru NAKAGAWA¹⁾, Kazuhide IIZUKA¹⁾, Yoshihito UCHINO¹⁾, Noriyoshi IRIYAMA¹⁾, Takashi KOIKE¹⁾, Kazuya KURIHARA¹⁾, Hiroshi TSUZUKI¹⁾, Yosuke NAGASAWA¹⁾, Yasuko NAGATSUKA¹⁾, Mitsuhiro IWATA¹⁾, Noboru KITAMURA¹⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾, Asami FUKUDA¹⁾, Shiho YAMADA¹⁾, Yusuke KUROSAWA¹⁾, Ryoji ITO³⁾, Yoshihiro HATTA¹⁾, Tomohiro NAKAYAMA¹⁾, Masami TAKEI¹⁾, Yasuaki TOKUHASHI¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾, Tadashi TERUI¹⁾

要旨

1. 整形外科領域

変形性関節症(OA)患者と比較すると、関節リウマチ(RA)患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。炎症の増悪が抗炎症性脂質メディエーターも増加させている可能性が示唆された。これら脂質メディエーターの中で5-HETE, 12-HETE, 8,9-EET, LXA4, PD1, 12-HEPE, 4-HDoHEおよび17-HdoHEは、RAとOAを区別するバイオマーカーとなることが示唆された。

2. 皮膚科領域

慢性特発性蕁麻疹(CSU)患者では、血漿中の炎症性脂質メディエーターである5-HETEおよびLTE4が健康人(NC)と比較し有意に高値である一方で、抗炎症性脂質メディエーターであるLXA4, PD1およびRVD2が有意に低値であった。炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常がCSUの病態に関与している可能性が示唆された。また、12-HETEとLXA4においては、CSUの重症度と有意な相関関係を認め、重症度を決定する有用なバイオマーカーになる可能性が示唆された。

3. 血液膠原病内科領域

- ①血管内B細胞リンパ腫(IVL)ではMYCの高発現が予後不良の原因である可能性がある。
- ②免疫系ヒト化HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid, IL-2R γ nullマウスを用いて、新たなxeno-graft versus host diseaseモデルを作成した。

4. 呼吸器内科領域

気管支喘息は、いまだに不明な点が多く、現行の治療に抵抗性を示す重症患者も少なくない。新規治療薬となる標的分子や新たな病態解明について研究を行なっている。

1) 日本大学医学部

2) 東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター健康環境医工学教室

3) 公益財団法人実験動物中央研究所

照井 正: terui.tadashi@nihon-u.ac.jp

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

I. はじめに

罹率が増加し社会問題にもなっている免疫・アレルギー疾患は、遺伝因子と環境因子が複雑に関与した多因子疾患である。近年、疾患モデル動物の解析により免疫・アレルギー疾患の病態の解明が進み治療法の開発が進んでいるが、未だに既存の治療法では効果が少ない難治例が存在する。難治例の病態解明には、個々の疾病の臨床検体からの取り組みが必須である。本事業は、免疫・アレルギー疾患を扱う4つの臨床各科のベットサイドから得られた臨床検体を基に臨床医、免疫・アレルギー学者と生物学者が連携し研究拠点を形成し、難治性免疫・アレルギー疾患の予防と治療に資する研究を行うことを目的とした。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

重症関節リウマチ (RA) 患者の膝関節滑液中の炎症性および抗炎症性脂質メディエーターは、重症変形性関節症 (OA) 患者に比較して活性化が亢進している

1. 背景

関節リウマチ (RA) は、複数の遺伝的要因に環境因子が加わり自己免疫応答が惹起され、結果として慢性の炎症が複数の滑膜組織に生じ、進行性の破壊性関節炎に至る疾患と考えられている。エイコサノイド経路は、RAの病態において重要な役割を果たしている。RA患者の滑液中のPGD₂、PGE₂およびLTB₄は変形性関節症 (OA) 患者と比較して有意に高いこと¹⁾、PGE₂とLTB₄は炎症の増悪に関与していること^{1), 2)}が報告されている。RAの病態においては、cyclooxygenase (COX) と5-lipoxygenase (5-LO) の経路の過剰な発現が認められ、これらの過剰発現は、methotrexateなどのDMARDs、抗TNF- α 抗体治療やB細胞除去療法では、抑制できないこと

が報告されており^{3), 4)}、重臨床的な炎症や再発に関与していると示唆されている。また、抗炎症性脂質メディエーターの関節炎への関与が示唆されるが、DHAやEPA代謝物に関しては解析がほとんどされてなく、OA患者と比較した脂質メディエーターの網羅的比較解析はなされていない。

2. 目的

RAにおいて、関節液中の脂質メディエーターの量的、質的な変化をリポドミクス手法を用いて解析し、プロファイルを明らかにすることを目的とした。

3. 対象及び方法

3-1 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている (RK-160112)。

3-2 対象

人工膝関節置換術時に18例のRA患者の関節滑液と26例のOA患者の関節滑液を採取し、滑液をヒアルロニダーゼで処理した。

3-3 リポドミクス

関節液は20mM Tris-HCl (pH 7.4) にて10倍に希釈した。固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出した。4000Q-TRAP quadrupole-linear ion trap hybrid mass spectrometer (AB Sciex) と液体クロマトグラフィー (liquid chromatography [LC] ; NexeraX2 system; Shimadzu) を用いて網羅的に酸化脂肪酸を比較解析した。脂質メディエーター量は、multiple reaction monitoring (MRM) transitionのピークの下面積から算出した。標準量が手に入るものは絶対量を算出した。

3-4 統計解析

臨床データの2群間の統計学的解析は、Kruskal-wallis testを用いた。相関の評価には、Spearmanの順位相関係数を用いた。p値が0.05未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan) を使用した。

4. 結果

アラキドン酸由来の脂質メディエーターでは、PGF₂ α 、5-HETE、LTB₄、12-HETEおよび8,9-EETが、OA患者よりもRA患者において有意に高値であった。抗炎症性の脂質メディエーターであるAA由来

の脂質メディエーターでは、LXA4およびLXB4、DHA由来の脂質メディエーターでは、PD1、RvD2および10-HDoHE等が、EPA由来の脂質メディエーターでは、5, 8, および 12-HEPEs および LTB5がOA患者よりもRA患者において有意に高値であった。

5. 考 察

ROC曲線から特異度、感度を検定したところ17の脂質メディエーターがOA患者よりもRA患者において有意に高値であった。陽性尤度比が10以上を示す脂質メディエーターは、5-HETE, 12-HETE, 8, 9-EET, LXA4, PD1, 12-HEPE, 4-HDoHE および 17-HdoHEであった。これらの脂質メディエーターが重症RAの病態に関与していることが示唆された。OA患者と比較すると、RA患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。炎症の増悪が抗炎症性脂質メディエーターも増加させている可能性が示唆された。

6. 結 論

OA患者と比較すると、RA患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。これら脂質メディエーターの中で5-HETE, 12-HETE, 8,9-EET, LXA4, PD1, 12-HEPE, 4-HDoHEおよび17-HdoHEは、RAとOAを区別するバイオマーカーとなることが示唆された。⁵⁾

参考文献

- 1) Korotkova M, Jakobsson PJ: Persisting eicosanoid pathways in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2014; 10: 229-241.
- 2) Chen M, Lam BK, Kanaoka Y, et al: Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *J Exp Med*. 2006; 203: 837-842.
- 3) Korotkova M, Westman M, Gheorghe KR, af Klint E, Trollmo C, Ulfgrén AK, Klareskog L, Jakobsson PJ: Effects of antirheumatic treatments on the prostaglandin E2 biosynthetic pathway. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 3439-3447.
- 4) Gheorghe KR, Thurlings RM, Westman M, Boumans MJ, Malmström V, Trollmo C, Korotkova M, Jakobsson PJ, Tak PP: Prostaglandin E2 synthesizing enzymes in rheumatoid arthritis B cells and the effects of B cell depleting therapy on enzyme expression. *PLoS One*. 2011; 6: e16378.
- 5) Sano Y, Toyoshima S, Miki Y, Taketomi Y, Ito M, Lee H, Saito S, Murakami M, Okayama Y: Activation of inflammation and resolution pathways of lipid mediators in synovial fluid from patients with severe rheumatoid arthritis compared with severe osteoarthritis. *Asia Pacific Allergy*. 2020; In press.

Ⅲ. 皮膚科領域

リピドミクスを用いた慢性特発性蕁麻疹 (CSU) 患者血漿中の脂質メディエーターのプロファイル

1. 背 景

近年、リピドミクスを用いた解析によって、脂質メディエーターの量的・質的な変化が生体の恒常性やアレルギー疾患の発症に関与していることが明らかになってきている。

蕁麻疹とは、そう痒を伴う一過性の紅斑と膨疹が出没を繰り返す皮膚疾患であり、特定の誘因がなく6週間以上症状が続くものを慢性特発性蕁麻疹 (chronic spontaneous urticarial, 以下CSU) という。その重症度は、患者自身が膨疹の数と痒みの程度をスコア化することで決定されており、重症度を示す客観的なバイオマーカーは存在しない。

2. 目 的

リピドミクスを用いて、CSUにおける脂質メディエーターのプロファイルを明らかにし、病態や重症度に関連する脂質メディエーターを探索することを目的とした。

3. 方 法

3-1 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている (RK-15908-12およびRK-160112-2)。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。

3-2 対 象

CSU患者67例、健常人 (NC) 27例の血漿から固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出し、LC-MSを用いて脂質メディエーターの解析を行った。

3-3 リピドミクス

血漿は20 mM Tris-HCl (pH 7.4) にて10倍に希釈した。固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出した。4000Q-TRAP quadrupole-linear ion trap hybrid mass spectrometer (AB Sciex) と液体クロマトグラフィー (liquid chromatography [LC] ; NexeraX2 system; Shimadzu) を用いて網羅的に酸化脂肪酸を比較解析した。脂質メディエーター量は、multiple reaction monitoring (MRM) transitionのピークの下面積から算出した。標準量が手に入るものは絶対量を算出した。¹⁾

3-4 統計解析

臨床データの2群間の統計学的解析は、Mann-Whitney U test を用いた。相関の評価には、Spearmanの順位相関係数を用いた。p値が0.05未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan) を使用した。

4. 結果

CSUにおいては、アラキドン酸 (AA) 代謝産物の5-HETE, LTE4がNCと比較して有意に高値であった。また、PGF2 α , LXA4はNCと比較して有意に低値であった。エイコサペンタエン酸 (EPA) とドコサヘキサエン酸 (DHA) の代謝物では5-HEPE, PD1, RVD2がNCと比較して有意に高値であった。

12-HETEとLXA4ではCSUの重症度 (UAS7とUCT両者) と有意な相関関係が認められたが、12-HETEが高値ほど軽症であり、LXA4が高値ほど重症であった。5-HETEおよび12-HETEと末梢血好塩基球数との間には正の相関が認められた。

5. 考察

CSUで高値であったLTE4は、CysLT3受容体を介して気管支収縮作用や血管透過性作用を及ぼす炎症性脂質メディエーターである。またTh2細胞の活性化を増強し、好中球の機能を亢進させる。²⁾ 5-HETEは、IgE依存性の刺激で好塩基球およびマスト細胞が産生することが報告されている。³⁾ リポキシン (LX) は、好中球、好酸球の遊走抑制、樹状細胞における炎症性サイトカインの産生抑制等の抗炎症作用を持つ。⁴⁾ これらのことから、CSUでは、炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常が病態に関与している可能性が示唆された。

CSUの重症度と有意な相関があった12-HETEは、好塩基球数とも有意な正の相関関係があり、好塩基球数の減少 (basopenia) は重症であるとの報告⁵⁾があり、今回の私達の報告とも合致している。今後好塩基球数と12-HETEの関連について検討していく。

6. 結論

CSU患者の血漿においては、炎症性脂質メディエーターの上昇だけでなく抗炎症性脂質メディエーターの低下による炎症収束機能の異常がCSUの病態に関与している可能性が示唆された。また、12-HETEとLXA4においては、CSUの重症度と有意な

相関関係を認め、重症度を決定する有用なバイオマーカーになる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Sano Y, Toyoshima S, Miki Y, Taketomi Y, Ito M, Lee H, Saito S, Murakami M, Okayama Y: Activation of inflammation and resolution pathways of lipid mediators in synovial fluid from patients with severe rheumatoid arthritis compared with severe osteoarthritis. *Asia Pacific Allergy*. 2020; In press.
- 2) Taketomi Y, Murakami M: Immunological Regulation by Bioactive Lipids. *Yakugaku Zasshi*. 2017; 137: 503-515.
- 3) Warner JA, Peters SP, Lichtenstein LM, Hubbard W, Yancey KB, Stevenson HC, Miller PJ, MacGlashan Jr DW: 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *J Leukoc Biol*. 1989; 45 (6) : 558-571.
- 4) Seran C, Maddox J, Petasis N, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady H, Colgan S, Madara J: Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry*. 1995; 34: 14609-14615.
- 5) Magen E, Mishal J, Zeldin Y, Schlesinger M: Clinical and laboratory features of antihistamine-resistant chronic idiopathic urticaria. *Allergy Asthma Proc*, 2011; 32 : 460-466.

IV. 血液膠原病内科領域

難治性血液疾患の癌遺伝子解析とヒト化マウスを用いた慢性GVHDの自己免疫機序

1. 背景

血管内B細胞リンパ腫 (intravascular B cell lymphoma: IVL) は主に血管内に腫瘍性病変が局限するびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫 (DLBCL) の亜型である¹⁾。DLBCLではmyc遺伝子再構成やMYCタンパクの発現亢進が予後不良因子との報告があるが²⁾、IVLにおけるmyc遺伝子再構成やMYCタンパクの発現に関する報告はほとんどない。

近年、ヒト免疫系の研究ツールとしてヒト免疫化マウスの重要性が高まっている。特に2002年に作製された重症免疫不全マウスモデルNOD/SCID/IL-2R γ nullマウス (NOGマウス) は、ウイルス感染やアレルギー・自己免疫疾患の研究に役立ってきた³⁾。しかし、ヒト免疫化NOG (hNOG) マウスには液性免疫系の機能が不十分であるという欠点がある。⁴⁾ 重症免疫不全マウス (HLA-DR4 Tgマウス) にHLA-DR4陽性のヒト造血幹細胞を移植してヒト免疫化したマウスモデルでは液性免疫系が機能していることが報告され、hNOGマウスの欠点を補う新たなヒト免疫化マウスとして期待されている。⁵⁾

2. 目的

本研究ではIVL患者の臨床的特徴、予後、MYCタンパクの発現、myc遺伝子の再構成を評価する。

ヒト免疫化HLA-DR4 Tgマウスについて、造血幹細胞移植に関連する有害事象、特に移植片対宿主病graft versus host disease (GVHD) についてはまだ解明されておらず、今回の研究ではヒト免疫化HLA-DR4 Tg (hDR4) マウスに生じる生体反応を検討した。

3. 方法

当院の17例のIVLの臨床経過、Cell of Origin (COO) (CD10, BCL6, MUM1の発現)、Double-Expressor Lymphoma (DEL) (MYC, BCL2の発現) を評価した。また、一部の症例でc-mycのbreak apartをFISH法で解析しmyc遺伝子再構成を評価した。

HLA-DR4陽性凍結臍帯血を融解し、磁気細胞分離によりCD34陽性細胞を抽出した。生後8週のhDR4マウスに尾静脈から投与した(1頭あたり2~3×10⁵ cells)。移植後、マウスの体重や全身状態を観察し、移植26週後に解剖した。各臓器(皮膚、脾臓、肺など)の組織標本を作製し、移植hDR4マウス8匹、非移植hDR4マウス7匹で比較・検討した。

4. 結果

骨髄浸潤が76%に認められ、続いて脾臓、皮膚浸潤が多かった。中枢神経浸潤は29%に認められた。3年無病生存率51%、3年全生存率74%であり平均的なDLBCLと比較し予後不良の傾向であった。COOはすべてがnon-germinal center B-cell-like typeであり、CD5は27%に陽性、EBERはすべて陰性であった。MYC陽性率は82%の症例で≥40%の陽性率であり、BCL2も71%の症例で陽性で、DELに該当するものは53%であった。一部の症例でc-mycのbreak apartが認められた。

hDR4マウスでは体重減少や脱毛、円背などの全身状態不良の所見を認めなかった。組織所見ではhDR4マウスで皮膚真皮の肥厚と細気管支周囲に線維化を認めた。

5. 考察

本研究結果からIVLの大部分がMYCタンパク高発現であったことが確認された。IVLが予後不良である原因としてMYCタンパクが関与している可能性がある。また、MYCタンパクの高発現が組織浸潤性や中枢神経浸潤率に影響を与えており、IVLの

中枢神経浸潤率の高さにもMYCが関与しているかもしれない。

hDR4マウスでは体重減少や全身状態不良などの有害事象は見られなかったが、病理組織学的には皮膚真皮の肥厚が見られた。臨床では皮膚硬化性病変が慢性GVHDの診断的特徴とされており、今回見られた皮膚病変は慢性GVHD所見を示していることが示唆される。ヒトの慢性GVHDを証明したモデルマウスはまだ存在しないが、hDR4マウスがヒトのGVHD反応を引き起こしていることが証明されれば慢性GVHDの病態の解明につながる可能性があると思われた。

6. 結論

一部の症例でmyc遺伝子の再構成を示唆する結果が得られたが遺伝子レベルでどのようにMYCタンパクの発現に関与しているかは今後の検討課題である。

hDR4マウスでのGVHD反応を検討し、病理組織学的に皮膚真皮の肥厚がみられた。皮膚硬化性病変が慢性GVHDの診断的特徴とされており、GVHDの病態の解明につながる可能性があると思われた。

参考文献

- 1) Shimada K, Kinoshita T, Naoe T, Nakamura S: Presentation and management of intravascular large B-cell lymphoma. *Lancet Oncol.* 2009; 10:895-902.
- 2) Rosenthal A, Younes A: High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood Rev.* 2017; 31:37-42.
- 3) Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, et al: NOD/SCID/gamma (c) (null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood.* 2002; 100: 3175-3182.
- 4) Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, Shiokawa M, Ishii N, et al: The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac (null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int Immunol.* 2009; 21: 843-858.
- 5) Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M, et al: Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/γ cnull mouse. *Int Immunol* 2012; 24: 243-252.

V. 呼吸器内科領域

① ダニアレルゲン (HDM) によるマウス喘息モデルにおけるアンジオテンシン変換酵素2 (angiotensin converting enzyme 2; ACE2) の役割

1. 研究背景

気管支喘息 (以下, 喘息) の病態は, ハウスダストダニアレルゲン (house dust mite; HDM) に代表される環境因子により誘導されるアレルギー性気道炎症といわれているが, いまだに不明な点が多く, 現行の治療に抵抗性を示す重症患者も少なくない。新たな治療につながる病態解明は急務である。これまでHDM誘導性マウス喘息モデルを用いて, HDM感作によるアレルギー性気道炎症の増幅機序を解明してきたが¹⁾, 治療標的となりうる分子の同定には至っていない。

2. 目的

本研究の目的は, HDMによるアレルギー性気道炎症の増幅過程で発現が変動する分子群から, 新たな治療標的となりうる分子を同定し, 新規喘息治療薬を見出すことである。

3. 方法

C57BL/6JマウスにHDMを3回 (第0, 7, 14日) 経気道的に投与した。第0, 3, 7, 10, 14, 17日にマウス肺組織を採取し, そこから全RNAを抽出し, マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い, 発現が変動する標的分子を同定した。同様にHDMを3回経気道的に投与したC57BL/6Jマウスに, 同定した標的分子に作用する薬剤を第10~16日に腹腔内投与し, 第17日に解剖を行い, HDMによるアレルギー性気道炎症への影響を検証した。

4. 結果

マイクロアレイのチップに実装されている28944遺伝子から, 網羅的遺伝子発現解析を行い, 第17日のコントロール群とHDM群を比較し, 有意に変動している遺伝子を9293同定した。5倍以上発現が減少していた17遺伝子の1つとして, ACE2を同定した。ACE2はアンジオテンシンIIをアンジオテンシン(1-7)へ変換する酵素であり, アンジオテンシン(1-7)/Mas receptor経路を介して抗炎症作用や抗線維化作用を示す。^{2), 3)} ACE2の活性化物質であるdiminazene aceturate (DIZE)⁴⁾の腹腔内投与群は, コントロール群と比較してHDMによる気管支肺胞洗浄液中の好酸球浸潤を抑制し, 肺組織への炎症細

胞の浸潤や粘液産生細胞の過形成, 気道過敏性を有意に抑制した。また, DIZE投与群では, 気管支肺胞洗浄液中のHDM誘導性のIL-5, IL-13産生の増加およびIL-10の減少を抑制し, 肺組織のIL-33, CCL20産生の増加を抑制した。

5. 考察

本研究の結果から, ACE2はHDM誘導性気道炎症抑制に関与することが明らかになり, 活性化薬であるDIZEは喘息の新規治療薬となりうると考えられた。気道上皮細胞由来のIL-33およびCCL20の上昇をDIZEが抑制したことから, DIZEは気道上皮細胞に作用している可能性が推測された。また, 制御性T細胞から産生されるIL-10が増加していたことから, DIZEがアレルギー性気道炎症における獲得免疫系抑制機構を賦活化させる可能性も示唆された。

6. 結論

HDM誘導性マウス喘息モデルを用いて, 網羅的遺伝子発現解析から治療標的分子としてACE2を同定した。ACE2活性化薬であるDIZEが, HDM誘導性のアレルギー性気道炎症を獲得免疫系および自然免疫系を介して抑制していることを証明した。DIZEは喘息の新規治療薬となる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Koyama D, Maruoka S, Gon Y, et al: Myeloid differentiation-2 is a potential biomarker for the amplification process of allergic airway sensitization in mice. *Allergol Int.* 2015; 64 Suppl: S37-45.
- 2) Tan WSD, Liao W, Zhou S, et al: Targeting the renin-angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2018; 40: 9-17.
- 3) Simoes e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, et al: ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2013; 169 (3): 477-492.
- 4) Shenoy V, Gjymishka A, Jarajapu YP, et al: Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 187 (6): 648-657.

② ヒト化マウスを用いた難治性喘息モデルの開発

1. 研究背景

気管支喘息 (以下, 喘息) は慢性の気道炎症が主な病態であり, 吸入ステロイドは治療管理において有効な薬剤であるが, その一方でステロイド抵抗性を有する難治性喘息患者が約10%存在している。

そのため難治性喘息の分子病態を解明し、新規治療薬を開発することは本疾患の克服において重要な課題である。近年、気道上皮由来のサイトカインであるIL-33及びThymic stromal lymphopoietin (TSLP)が喘息の難治化(ステロイド抵抗性)に関与していることが報告され¹⁾、自然免疫を介した難治性喘息の分子病態が注目されている。

2. 目的

ヒトにおいて難治性喘息の病態を再現し、難治性気道炎症を経時的に解析することは非常に困難であるため我々はヒト免疫系細胞(好酸球, 好塩基球, マスト細胞など)を有するIL3/G-CSF/IL5トリプルトランスジェニックマウス(トリプルTgマウス)^{2), 3)}を用いて喘息モデルを構築し、ヒト免疫細胞の難治化病態を解明することを試みた。

3. 方法

トリプルTgマウスに、第1-3日にhIL-33及び、humanTSLP (hTSLP)を気管内投与、ステロイドを第0-3日に経腹腔内投与し、第7日に肺胞洗浄液中のヒト好酸球浸潤を検証し、ステロイド抵抗性の有無を評価した。

4. 結果

hIL-33単独投与により肺胞洗浄液中のヒト好酸球浸潤, 杯細胞過形成を認め、好酸球の気道炎症を再

現した。hIL-33投与による肺胞洗浄液中のヒト好酸球浸潤, 杯細胞過形成はステロイド投与によって抑制された。一方でhIL-33, hTSLP投与による肺胞洗浄液中のヒト好酸球浸潤は、ステロイド投与後も抑制されず、ステロイド抵抗性を示した。

5. 考察

hIL-33投与によってヒト好酸球由来の気道炎症を再現した。また、hIL-33及びhTSLP投与によってステロイド抵抗性を示し、ヒト化マウスを用いたヒト難治性喘息モデルを構築することができた。

6. 結論

ヒト難治性喘息の新たな分子病態の解明や新規薬剤開発に応用できる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Kabata H, Moro K, Fukunaga K, Suzuki Y, Miyata J, Masaki K, et al: Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. *Nat Commun.* 2013; 4: 2675.
- 2) Ito R, Maruoka S, Soda K, Katano I, Kawai K, Yagoto M, et al: A humanized mouse model to study asthmatic airway inflammation via the human IL-33/IL-13 axis. *JCI Insight.* 2018; 3 (21) .
- 3) Ito R, Takahashi T, Katano I, Kawai K, Kamisako T, Ogura T, et al: Establishment of a human allergy model using human IL-3/GM-CSF-transgenic NOG mice. *J Immunol.* 2013; 191 (6) : 2890-2899.

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, 嶋村政男, 西山博孝, 羽尾裕之, 早川 智,
原 弘之, 深谷 親
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, Masao SHIMAMURA, Hirotaka NISHIYAMA,
Hiroyuki HAO, Satoshi HAYAKAWA, Hiroyuki HARA, Chikashi FUKAYA
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
