

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.10 / December 2022

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

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	1
免疫性腎炎に対する DFAT 細胞療法の治療効果と作用機序の検討	阿部雅紀 他	6
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	13
重症アレルギー疾患患者に対する抗 IgE 抗体治療のコンパニオン診断薬の開発	岡山吉道 他	17
アトピー性皮膚炎・慢性特発性蕁麻疹における細胞外小胞による病態制御機構の解明	岡山吉道 他	26
病理標本の膜厚測定機器開発 — 膜厚標準化による標的分子評価と人工知能体系の適正化に関する研究 —	増田しのぶ 他	30
脱分化脂肪細胞 (DFAT) 調製用天井培養フラスコとゼノフリー培地の性能評価	松本太郎 他	34
固形癌に有効なキメラ抗原受容体遺伝子導入 (CAR) -T 細胞療法の開発	加藤侑希 他	40
羊膜上皮細胞における細胞間ミトコンドリア輸送イメージングと新たな培養条件の開発	高野智圭 他	42

INDEX

Development of new technology for intra-operative rapid pathological diagnosis	Hiroyuki HAO et. al	1
Evaluation of effects and mechanism of the dedifferentiated fat cell therapies for the immune-induced nephritis	Masanori ABE et. al	6
Development of the automated serum unbound bilirubin measurement instrument using GOD-POD-UnaG method	Ichiro MORIOKA et. al	13
Development of companion diagnostics for treatment of patients with severe allergic diseases with anti-IgE antibody	Yoshimichi OKAYAMA et. al	17
Elucidation of pathophysiological control mechanism in atopic dermatitis and chronic spontaneous urticaria	Yoshimichi OKAYAMA et. al	26
A study of development of a device to evaluate the tissue thickness of pathological sections: For adequate evaluation of biomarkers and basic platform for artificial intelligence systems by standardization of tissue thickness	Shinobu MASUDA et. al	30
Performance evaluation of ceiling culture flasks and xeno-free medium for the preparation of dedifferentiated fat (DFAT) cells	Taro MATSUMOTO et. al	34
Development of novel chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy for solid tumors	Yuki KATOH et. al	40
Visualization of intercellular mitochondrial transfer in human amniotic epithelial cells and development of new conditioned medium	Chika TAKANO et. al	42

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³⁾, 角光一郎³⁾, 相澤 信⁴⁾, 浅野正岳⁵⁾,
久山佳代⁶⁾, 末光正昌⁶⁾, 藤田博仁²⁾, 山田清香¹⁾, 右田 卓¹⁾, 八木千裕³⁾

Development of new technology for intra-operative rapid pathological diagnosis

Hiroyuki HAO¹⁾, Shinya HASHIMOTO²⁾, Atsuo YOSHINO³⁾, Koichiro SUMI³⁾, Shin AIZAWA⁴⁾,
Masatake ASANO⁵⁾, Kayo KUYAMA⁶⁾, Masaaki SUEMITSU⁶⁾, Hiroto FUJITA²⁾,
Sayaka YAMADA¹⁾, Suguru MIGITA¹⁾, Chihiro YAGI³⁾

要旨

腫瘍におけるゲノム解析は急速に進展し、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の病理診断への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

1) 日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野
2) 日本大学文理学部
3) 日本大学医学部神経外科学系神経外科学分野
4) 日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野
5) 日本大学歯学部
6) 日本大学松戸歯学部
羽尾裕之: hao.hiroyuki@nihon-u.ac.jp

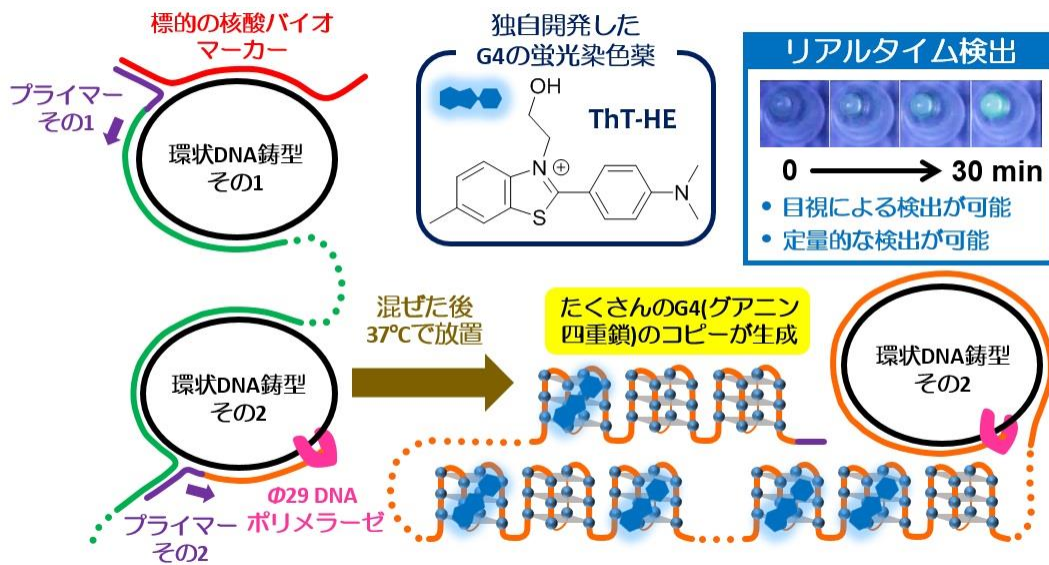


図1 Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes (SATIC) 法

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(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。

細胞診は、直接塗抹法や捺印法等種々の方法があるが、簡便に短時間で標本作製可能である。従って、SATIC法を細胞診に応用することができれば、病理診断の精度向上に期待できるものと考えられる。我々は細胞診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. 対象及び方法

・サンプル採取と固定

本学松戸歯学部教職員にて、研究同意を得られた本研究分担者がオーセレックス® ブラシ RT (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて口腔粘膜(歯肉)の擦過を行い研究用サンプルの採取を行った。採取検体は、直接塗抹法用とRNA抽出用の2回行った。直接塗抹法では、検体採取後速やかにスライドガラスに塗抹を行い細胞診固定液(95%アルコール)にて浸漬固定した。RNA抽出用の検体は、採取後速やかに細胞診固定液(95%アルコール) 5 mLにて24時間固定した。直接塗抹法用の検体は、固定後に通法に従いPapanicolaou染色を施行した。

・RNAの抽出

固定後は、10,000rpmで30秒遠心を行い、上清を取り除き50度で乾燥させた。その後、RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Thermo Fisher) を用いて通法に従いRNAの抽出を行った。抽出したRNA水溶液はQubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher) を使用し、Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher) にて濃度の測定、Qubit™ RNA IQ Assay Kits

(Thermo Fisher) にてIQ 値の測定を行った。

・ cDNA 作製

抽出した RNA を鋳型として用いて PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix (タカラバイオ) を使用して、cDNA を作製した。

・ qPCR

作製した cDNA を TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher) を用いて probe として GAPDH 用の 2 種類の probe primer (Hs02786624_g1, amplicon length 157, Hs02758991_g1 amplicon length 93) を用いて QantStudio 7 Flex リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher) を使用して Ct 値を求めた。

尚、本研究は本学松戸歯学部倫理委員会の承認も得て行っている (EC20-027 : SATIC 法の細胞診への応用を目指した研究)。

3. 結果および考察

細胞診への SATIC 法応用の可能性を明らかにする目的で、細胞診固定液にて固定した細胞診検体における RNA 保存状態を明らかにした。

採取されたサンプルから作製された直接塗抹法の細胞診スライドガラス標本には、細菌集塊を混在し好中球が主体の炎症性背景にオレンジ G 好性表層型角化細胞及びライトグリーン好性非角化型表層細胞が観察された (図 2)。

抽出された RNA は濃度 (全量) が 99 ng/μL (total 60 μL), IQ 値は 9.0 であった。リアルタイム PCR の結果 Δ CT 値は、GAPDH93 : 28.394, GAPDH157 : 30.921 となった。

短時間・低コスト・簡便な SATIC 法の特徴を最大限に利用し、細胞診断、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。本技術で細胞診検体や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。

SATIC 法は、様々な生体分子をターゲットとし検出することが可能になる技術である。現在は、in vitro での DNA や RNA といった核酸の検出が可能である。検出には、核酸の伸長反応と共に取り込まれる物質が蛍光を示すことを利用しており、検出限界

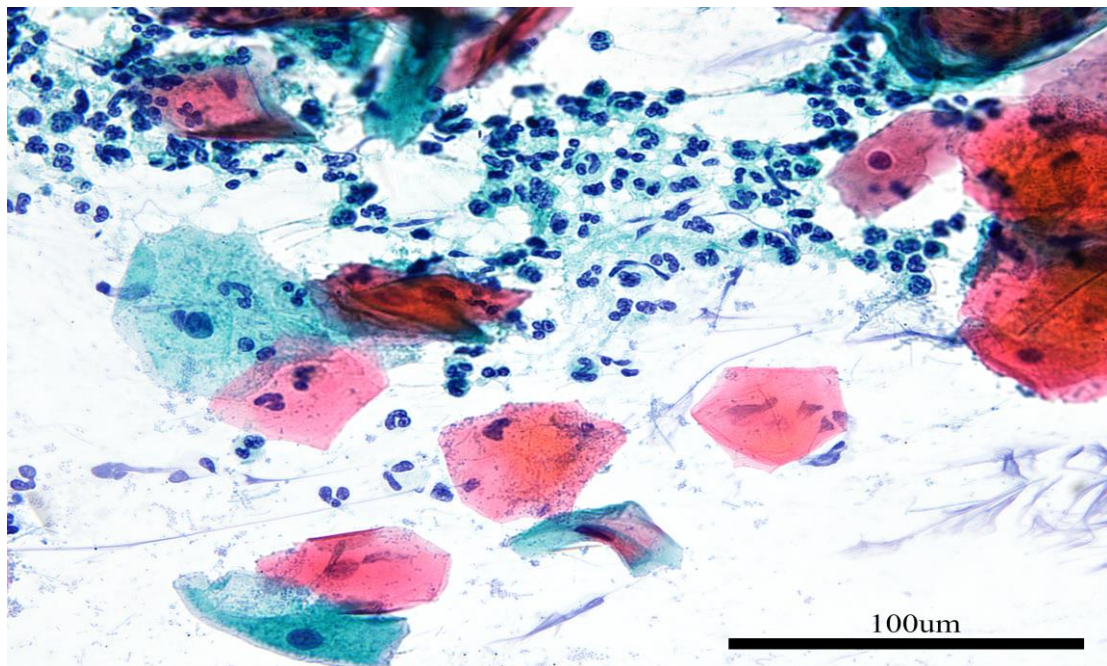


図 2 直接塗抹法の細胞診

は1反応液あたり約 10^8 コピーとされている。故に、理論上は細胞診において任意のRNA配列を検出できる可能性がある。日本臨床細胞学会では、がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針を公開し細胞診検体由来DNAの取扱いに関する種々のデータが明らかになっているが、細胞診検体由来のRNAについては不明な点が多い。

口腔細胞診におけるSATIC法での特定遺伝子配列の検出を目的として、はじめに口腔細胞診検体上でのGAPDH mRNAの検出を行った。本検出に用いる環状DNAと特異的primerの設計及び合成が終了しており、現在は試薬類の至適濃度の検討を行っておりターゲット濃度100 fMまでの検出を確認した。

細胞診固定液を用いた固定処理を行った後において、オーセレックスブラシ1本分から計5,940 ng (99 ug × 60 uL) のtotal RNAが抽出された。これらのtotal RNAは、図2で示した細胞像に鑑み、口腔粘膜上皮細胞、好中球を主体とした炎症細胞、細菌に由来するtotal RNAであると考えられる。また、検体採取後は核酸の変性等が生じる可能性があるが、Qubit 4 Fluorometerによって算出可能なsmall RNAとlarge and/or structural RNAとの比率 (IQ値、最大10、最小0) は9.0であり、固定による明らかな品質の低下は認められなかった。また、GAPDHのアンプリコンサイズ2種 (93bp, 147bp) で比較すると、アンプリコンサイズに依存してCt値が変化していた。GAPDHはハウスキーピング遺伝子であり、常に一定量の発現を認める遺伝子である。従って、翻訳後に分解代謝されている途中のmRNAが常に存在するため、アンプリコンサイズによるCt値の差が生じたものと考えられる。

SATIC法には、検出を試薬の反応によって生じた凝集物確認する方法と反応によって生じた蛍光物質を確認する方法とがある。tube内で行う場合には、いずれの方法も可能である。しかし、凝集物を確認する方法は検出ターゲットが空間を自由に移動可能な検出環境しか適用できず、細胞診や組織診等のスライドガラス上での検出には不向きである。従って、スライドガラス上での検出を念頭に置いてある病理診断への応用は、现阶段では反応によって生じた蛍光物質を確認する方法が最適であると考えられる。

また、SATIC法の検出感度については、前述の如く1pM～とされている。しかし、スライドガラス

上における検出の如くターゲット分子が自由に移動できない環境では、想定通りターゲット分子を検出できない可能性があった。そこで、検出感度を上げる目的でGAPDH mRNA検出の為の特異的環状DNA及びprimerの至適濃度の検討を行い現時点で前述の1pMを上回る100 fMの検出が可能であることを確認しており、スライドガラス上でのターゲット分子検出の期待が高まった状態となっている。

今後は種々の液状化検体細胞診固定液にてRNAの保存状態に加え、核酸の分解度を示す標準的値であるRNA integrity number値 (RIN値) についても明らかにする必要がある。

4. 今後の展望

細胞診検体にて遺伝子検索を実施する場合、スプリットサンプル法や液状化検体細胞診を利用することが予想される。従って、一般的な液状化検体細胞診固定液におけるRNA保存状況の検討も望まれる (図3)。

組織中からの遺伝子変異やマーカー分子の検出には、本学文理学部で研究・開発が進められているSATIC法を応用することにより、特定が可能と考えている。SATIC法は、分析対象物と検出試薬を混じて、等温下で放置するのみで、標的となる分析対象物の蛍光発色による検出が可能な測定系である (図4)。

迅速で簡便な手法であるため、新規バイオマーカーの検出に応用することができれば、腫瘍性疾患以外の非腫瘍性疾患のマーカー特定などに拡張でき、さらなる臨床での適用が可能となることが予測される。

将来的には発見したバイオマーカーを実臨床において簡便に用い、スクリーニング検査として使用できるようになれば、多くの患者からバイオマーカーを採取し、前向きにイベントの解析を行い、バイオマーカーの予測能をより詳細に評価でき、先駆的研究となりうると考えている。一方、結合組織病のように、身体所見や家族歴から難病疾患を予測できる患者以外にも、若年、かつ既往なく難病疾患を発症する患者が一定数存在する。このような患者を拾い上げるために、将来的には高校、大学の学校検診や会社健診などにバイオマーカー検査を導入し、ハイリスク患者を特定できるようにしたいと考えている。これらの研究に今後の研究成果を波及させ、研

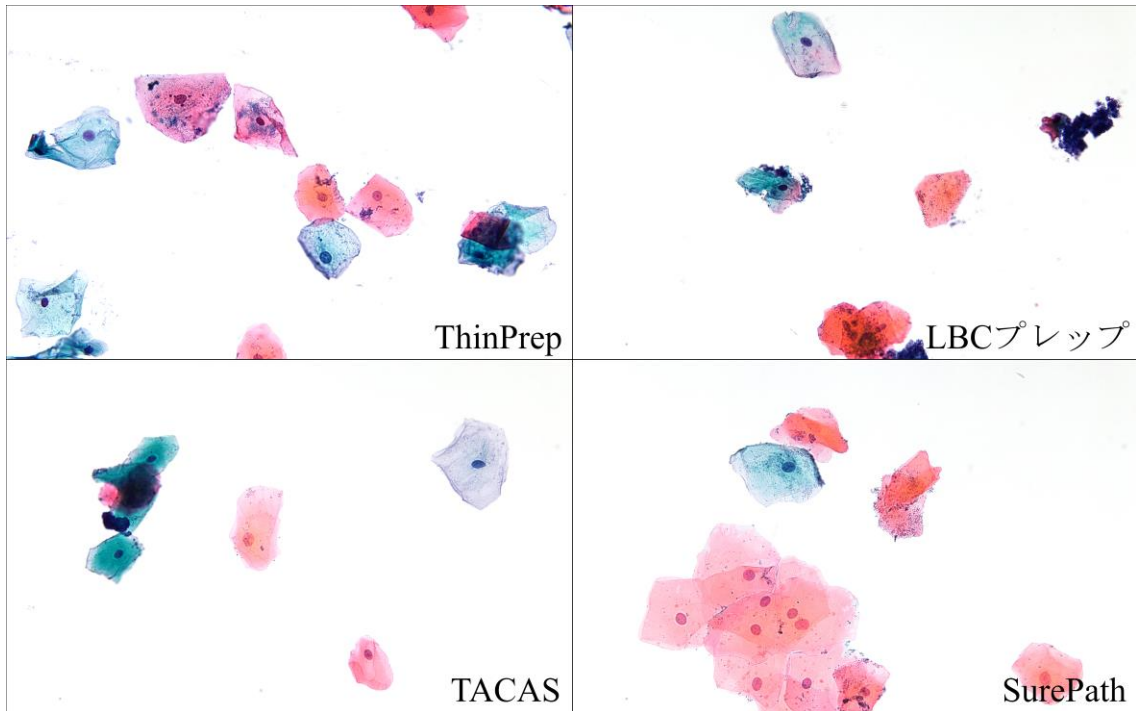


図 3 液状化検体細胞診

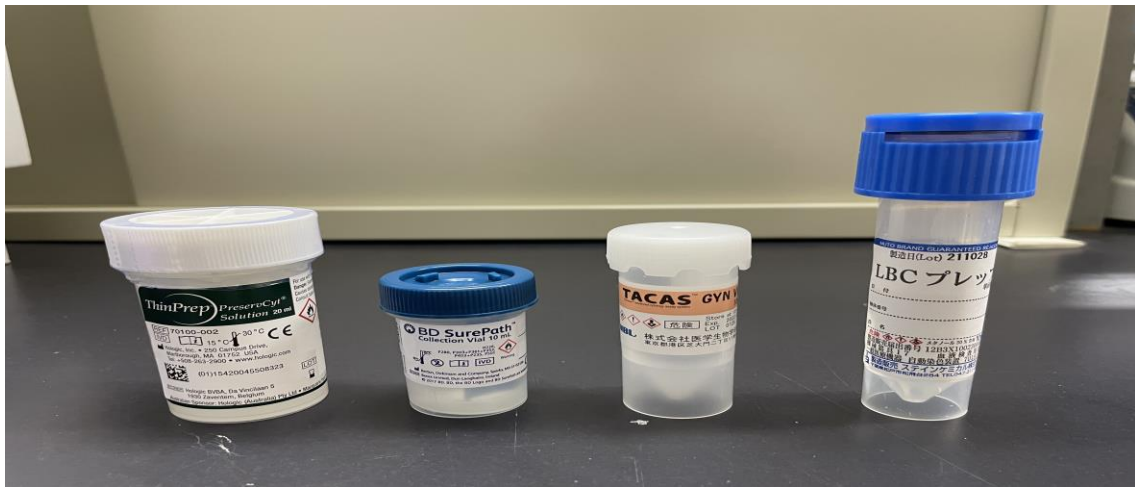


図 4 検出試薬

究成果の創出につなげていくことを切に希望している。

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.* 2016; 88:7137-7144, doi:10.1021/acs.analchem.6b01192
- 2) Fujita H et al. Specific light-up system for protein and metabolite targets triggered by initiation complex formation. *Sci Rep.* 2017; 7:15191, doi:10.1038/s41598-017-15697-8

免疫性腎炎に対するDFAT細胞療法の治療効果と作用機序の検討

阿部雅紀¹⁾, 丸山高史¹⁾, 逸見聖一郎¹⁾, 松本太郎¹⁾, 加野浩一郎²⁾

Evaluation of effects and mechanism of the dedifferentiated fat cell therapies for the immune-induced nephritis

Masanori ABE¹⁾, Takashi MARUYAMA¹⁾, Seiichiro HEMMI¹⁾,
Taro MATSUMOTO²⁾, Koichiro KANO³⁾

要旨

今回我々は腎疾患の中でも特に生命予後の悪いANCA関連腎炎について、本学で開発され間葉系幹細胞の性質を有する脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell : DFAT) を用いた治療の効果と作用機序について検証した。その結果、生存率、採血・尿・組織所見の改善と安全性についても確認された。治療改善のメカニズムとして、免疫調整作用を有するTSG6の発現亢進がDFAT細胞移植後惹起され、ANCA関連腎炎の病因である自己免疫異常が改善されたためと考えられた。更にその後の検証から病態改善の機序として、DFAT由来のエクソソームによる病態改善の可能性が考えられ、今後臨床応用できる可能性が示唆された。現在までに得られた結果をまとめて以下に報告する。

1. はじめに

本学生物資源科学部の加野らは皮下成熟脂肪細胞を脱分化させDFATを得る技術を開発、特許化した(特願平10-378013)。DFATは再生医療の移植細胞原として骨、軟骨、筋、上皮および神経細胞などに分化転換させる技術の開発や間葉系幹細胞と同等の性質を有している事も解明してきた¹⁾。この間葉系幹細胞は他にも体内に障害が起きた際に障害部位に集積して障害部位を修復するのに寄与するという報告が散見されており、これを応用してこの間葉系幹細胞を体内に移植して様々な疾患を治療する試みが基礎実験のみならずヒトにおいても脳梗塞治療などに既に臨床応用され始めている。間葉系幹細胞は一般に骨髓細胞などから作製されるがその過程の侵襲も強くまた一度の処理で得られる間葉系幹細胞も限られたものである。これに対してDFATは間葉系幹細胞と同等の性質を持ちながら局所麻酔下に1gの脂

肪組織を採取出来れば細胞の性質上、その後大量調製が可能であるため、侵襲や組織破壊が非常に少なく、心不全や高齢患者からも採取・調製が可能である。さらにまた癌化などのリスクも他の移植細胞原と比べても格段に少なく、まとめると安価で安全かつ低侵襲の手技によって大量調整が可能であり、間葉系幹細胞による疾患治療の移植細胞原として非常に期待の持てる治療ツールである。腎臓疾患は一度罹患すると根治治療が難しく病態が慢性化する場合も珍しくない。高血圧や糖尿病、糸球体腎炎など腎臓病の原因疾患には様々な疾患があるが、それらをまとめて慢性腎臓病 (CKD : Chronic Kidney Disease) と呼ぶ。この疾患は現在1330万人の患者が本邦に存在して、都合国民8人に1人か何らかの腎疾患に罹患している事になるが根治療法が十分でないのが現状である。根治療法が十分でないため透析患者数の増加にもつながり医療費の高騰など社会問題

1) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

2) 日本大学医学部機能形態細胞再生・細胞移植学分野

3) 日本大学生物資源科学部

阿部雅紀 : abe.masanori@nihon-u.ac.jp

化している。腎疾患の増加は高齢化や様々な医療技術、治療の進歩の裏返しとも言えるが、このような現状から腎臓病に対する治療法の更なる発展、開発が期待されている。また一部の腎疾患においては透析導入といった問題にとどまらず生命の危機に関係する、つまり生命予後の悪い腎疾患も存在する。

そのような背景の中、慢性腎疾患の中でも特に生命予後の悪いANCA関連腎炎について、本学で開発された間葉系幹細胞の性質を有するDFATを移植する細胞治療の効果と作用機序について検証した。

これまで我々は平成27年～29年度の科学研究費(15K09280)助成事業「進行性腎障害に対するDFATを用いた細胞移植治療の開発」にて自己免疫性腎炎がDFAT移植により改善し、その作用機序として免疫抑制作用にTSG-6の発現が関与している事を見出した²⁾。更に平成30～令和2年度の科研費(18K08255)助成事業によりANCA腎炎がDFAT移植で改善する事を見出した。病態改善の更なる詳細な機序として抗炎症物質TSG6の発現やマクロファージのM1からM2へ形質転換による抗炎症物質産生等、移植による免疫調整作用が機序として考えられた。しかしDFAT細胞移植において静脈投与されたDFATは殆ど肺にトラップされ、障害臓器の腎臓への集積は確認されず、DFATと障害臓器である腎臓と直接の細胞間インターアクションがない環境で上記のような現象がどのように見られているのか、細胞分子レベルでは依然不明のままであった。

一方、興味深いデータとして我々の研究室のデータとして、このDFATの培養上清中に細胞間コミュニケーションに関与するエクソソームが高純度に確認され、その内部にTリンパ球の増殖抑制や制御性T細胞分化抑制に関わるとされるmiRNAが確認され、DFATの分泌するエクソソームは種々の免疫調整作用を有するという結果を得た。その内容としてT細胞の増殖を制御する作用が報告されているmiRNA-20a-5p, miRNA-17-5p, ナイーブT細胞から制御性T細胞の分化誘導するmiRNA-26a-5p, miRNA-100-5p, Th17細胞への分化誘導を抑制するmiRNA-20b-5pの発現をエクソソーム内に確認している。

このin vitroの結果から考えて、in vivoにおいてもDFAT移植がエクソソームという液性因子を通じて免疫調整を発揮する可能性は十分にある。本研究ではDFAT投与による病態改善の機序についてエクソ

ソームを含め改めて検証するとともに、抽出されたエクソソームのみの投与で細胞投与と同等に病態が改善するかを検証して、将来の慢性腎臓病治療の開発の一助となることを目的とする。

2. 対象及び方法

ANCA関連腎炎のモデル動物であるSCG/ThpNkcマウスにDFATを経静脈的に細胞移植を行い、その改善効果を再検証した。さらにDFAT細胞移植による腎炎改善の機序を解明するため、移植後マウス血液中のエクソソームを抽出してmiRNAの発現を網羅的に行い、腎炎を改善させるmiRNAの検討を行った。またDFAT培養上清中のエクソソームをSCGマウスに投与して同様に効果が得られるかを検証した。以下その具体的方法を簡潔に記す。

1) DFATの作製

ddyマウスの皮下脂肪を採取してコラゲナーゼで処理し、低速遠心で得られた均一成熟脂肪細胞を20%ウシ胎仔血清含有DMEMで満たした天井側で培養する。DFATのコロニーが形成される培養7日頃にフラスコを反転し、通常の付着培養を行うことによりDFATは急速に増殖し1週間後に凍結保存して後の実験用に保存する。

2) 実験に使用するSCG/ThpNkcマウスの繁殖

SCG/ThpNkcマウスは他のマウスと違い、生命力の弱いマウスである。発売元である、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所の疾患モデル小動物研究室は大阪にあり輸送が必要であった。そのため同マウスを輸送後は体力低下でそのまま死亡することもまれでなく、実験で使用する場合は輸送後、良好な環境におきその後繁殖した次世代マウスを使用することが必要になった。また繁殖後も本マウスは約8週齢より糸球体腎炎および血管炎を発症して雌親の授乳が困難であるため、健常マウスとしてddyマウスを同時期に同数交配し里親として使用した。5週齢のSCG/ThpNkcマウスを一週間の順化期間後、繁殖し、実験用マウスを作出した。繁殖では1回の繁殖で約5頭の出産が予想される事から、実験に使用する41頭を得るためにはメス9頭の交配が必要となった。

3) DFATの細胞移植

7週齢のSCG/ThpNkcマウスにddyマウス由来DFATをそれぞれ 1×10^6 個/頭、 1×10^5 個/頭、 $1 \times$

10⁴個/頭の割合で各4頭ずつ静脈より細胞移植を行った。更に移植後の体内分布を検討する為、PKH26GLでラベルしたDFATを10⁵個/頭の割合で移植した。

4) 移植後の評価項目

細胞移植後1カ月飼育した。その間1週間おきに体重測定、畜尿を施行した。1日尿蛋白量と定性試験にて潜血反応の経過を観察した。

5) 移植による治療効果、作用機序の検証

移植1カ月後、ddyマウス由来DFATを移植した群では生化学的検査として血液中のBUN, Cre, ANCA, ANA, WBC, CRP, IL-1, 6, 8, TNF- α , TSG-6濃度をELISA法で測定した。腎臓と肺についてReal-time PCR解析, Western blot法を用いて免疫制御分子としてTSG-6・IDOを, Th1-type cytokineとしてIFN- γ ・TNF- α を, M1マクロファージ関連サイトカインとしてMCP-1・IL-6・IL-12をM2マクロファージ関連サイトカインとしてCCL17・IL-4・IL-10・mannose receptorの発現の変化を観察した。これによりDFAT細胞移植が免疫系のどの部位に作用するかを考察した。

6) 移植による安全性の検証

移植後の代表的な副作用として、免疫毒性を機序とする移植片対宿主病 (GVHD) がある。この症状として代表的な皮膚病変 (手のひらや足の裏, 四肢や体幹の赤い斑点の有無, 全身の皮膚の赤色化や水ぶくれ, 脱落の有無), 消化器病変 (食欲低下, 嘔吐, 下痢等), 肝臓病変 (黄疸や意識障害) などが移植後の実験動物に診られないか注意深く観察した。以上の結果を踏まえて免疫性腎炎へのDFAT細胞移植療法について効果の有無や作用機序, 免疫毒性を中心とした安全性について多角的に判断した。DFAT投与細胞数, DFAT投与期間などの細胞治療としてのデータを蓄積し, DFAT移植の最適治療条件を確立した。

7) 更なる作用機序, エクソソームについての検証

DFATから分泌されるエクソソームについて実験計画について以下の通りとした。

in vitro の系としてDFATを培養してその培養上清中においてサイズ排除クロマトグラフィー法を用いてエクソソームの回収を行った。培養上清 (DMEM) 15mlを15ml tubeで4℃, 1500g, 15~30分遠心, 15ml tubeの上清2mlを2ml tube (1Sample 各9本)

へ移し, 4℃, 10000g, 10分遠心, Amicon限外濾過フィルター (Cut off100kDa) を用いて, MilliQ Water 15mlをいれて4000g, 10分遠心し, フィルターの前処理を行い, 100kDa Amicon Ultra-15にc) の15ml DFAT培養上清を加えた。以上より得られたDFAT培養上清濃縮液 0.5mlをqEVカラムの上から注入し抽出した。メイワフォーシス株式会社のナノ粒子マルチアナライザーを使用して培養上清, 血清中, 肺組織, 腎組織中のmiRNAについて測定を行った。

in vivo の系として以下のとおり施行した。移植1カ月後, メイワフォーシス株式会社製のqEVオートマチックフラクションコレクター (AFC) およびエクソソーム抽出キット (qEV) を用いて血液のエクソソームを抽出した。それがエクソソームであることを確認するために走査電子顕微鏡による観察と, ウェスタンブロット法によるエクソソーム特異的マーカーであるCD63のバンドについて確認した。エクソソームの存在を確認後, SeraMir™ Exosome RNA Amplification Kit (SBI, SeraMir) を用いてtotal RNAを抽出し, バイオアナライザ (Bioanalyzer RNA6000 Pico) でtotal RNAの解析, 並びにAgilent Technology社製のオリゴDNAマイクロアレイを用いてmiRNAについて我々の予備実験の結果を始め更に網羅的解析を行った。得られたmiRNAをリアルタイムRT PCR法を用いてその発現を確認した。

3. 結果

移植後のDFATの体内分について, PKH26GLでラベルしたDFATは投与後1時間においてDFATの肺でのトラップが確認され, その他の臓器への分布は認めなかった。間葉系幹細胞が傷害臓器に集積して傷害臓器が修復される内容の既報があるため, 腎臓の周囲または腎臓の内部にDFATの存在が見られることを予想していたが, 静脈注射されたDFATはほぼすべてが肺にトラップされている結果であった (図1)。肺の抹消血管径とDFATの細胞径は後者の方が大きく物理的に肺を通過することが理論的には不可能であるが, 既報では同様の実験で障害の腎臓に間葉系幹細胞が集積していると報告しているものが散見されるが, 我々の結果はその限りではなかった。その後1週間, 2週間と徐々に肺にトラップされDFAT数は減少していったが, この間その他の臓

器への移行は認めなかった。

移植細胞数については 1×10^5 個/頭の割合で投与した群が最も生存率、治療成績が良く今回の結果ではこの方法が最適と考えられた。以下データはDFATを 1×10^5 個/頭の割合で投与した結果について述べる。生存率についてはDFATを移植した群が治療4か月後100%だったのに対して移植しなかった疾患群が66%と低下しており、移植したことによる生存率の改善を認めた(図2)。蛋白尿については腎炎群よりもDFAT投与群の方が蛋白尿の改善を認めた。腎臓組織の評価として、組織GIS(糸球体障害指数)は腎炎群と比較し、DFAT投与群で有意な低下を認めた($P=0.018$)(図3)。一方、尿細管の障害度を表す指数であるTISでは腎炎群およびDFAT投与群において有意な差は認めなかった。腎機能の評価として、血清BUN値と血清Cr値について腎炎群とDFAT投与群で差を認めなかった。また

ANCA腎炎発症時に上昇する血清MPO-ANCA値は腎炎群と比較し、DFAT投与群で低下傾向であったが、有意な差は認めなかった。腎臓でのTSG-6のmRNA発現は腎炎群と比較し、DFAT投与群において有意な発現の亢進($P=0.041$)を認めた。TSG-6の発現を免疫組織学的に観察した。染色性は腎炎群とDFAT投与群で糸球体において同等であった。一方、腎間質でのTSG-6の染色性は、腎炎群と比較し、DFAT投与群において、近位尿細管と遠位尿細管の両方において亢進を認めた。またCD44の発現は、DFAT投与群で低下傾向であった。免疫調整物質であるIL-10の発現はDFAT投与群で増加傾向であり、PGE2の発現は、腎炎群と比較し、DFAT投与群で増加傾向であった。IL-1 β の発現は両群で差を認めず、TNF- α の発現は腎炎群と比較しDFAT投与群で低下傾向であった(図4)。またM1マクロファージのケモカインであるMCP-1の蛋白発現は、腎炎群

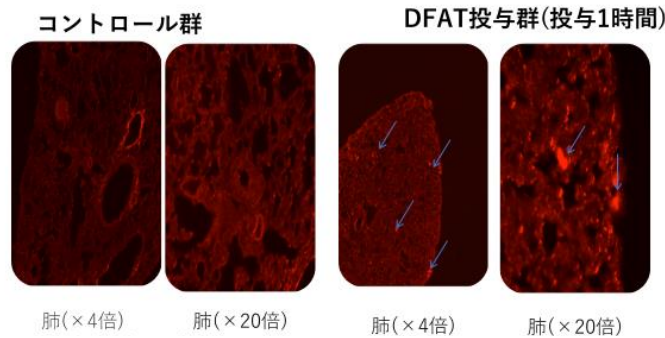


図1 移植されたDFATの体内分布

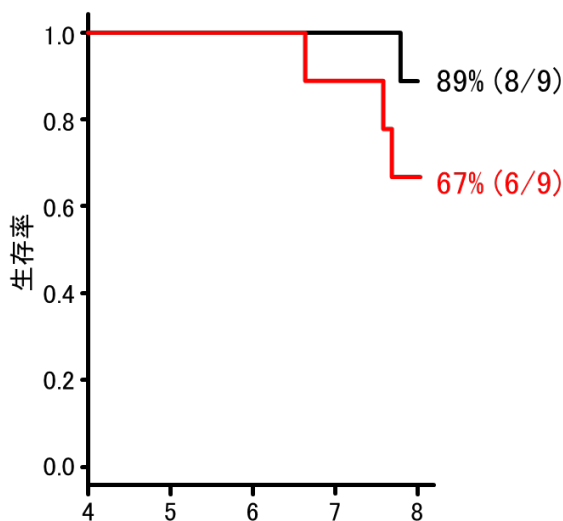


図2 DFAT移植後の生存率(赤；疾患群、黒；治療群)

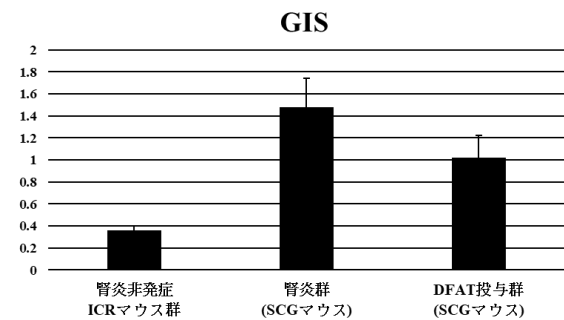


図3 治療後の糸球体障害指数 (GIS)

と比較し、DFAT投与群において有意な発現低下 ($P=0.04$) を認めた (図5)。M2マクロファージに発現するケモサイトカインであるCCL17の蛋白発現は、腎炎群と比較してDFAT投与群で有意な発現亢進 ($P = 0.04$) を認めた (図6)。real-time PCR 法でICAM, VCAMにおいては両群に優位な発現の差を認めず、脾臓細胞におけるActivated Tregの発現は両群に有意差を認めなかった。ここまでの結果をまとめると移植された間葉系幹細胞と類似するDFATが免疫性腎炎を改善する機序として、抗炎症作用をもつTSG-6の発現亢進と、M1マクロファージからM2マクロファージへの形質変換の誘導が病態の改善に関与していると考えられた。

またDFATについての催奇形性であるが、肺にはDFATがトラップされた後も肺への腫瘍形成などは認められず、現時点でのDFATによる催奇形性は認められなかった。

移植による免疫毒性の一種であるGVHDを考える手のひらや足の裏、四肢や体幹の赤い斑点の有無、全身の皮膚の赤色化や水ぶくれ、脱落の有無といった皮膚病変や、食欲低下、嘔吐、下痢等の消化器病変、黄疸や意識障害といった消化器病変などが移植後観察されることは無かった。

これらより、DFATの細胞移植が難治性の自己免疫性腎炎に治療効果、副作用の両面から考えても臨床応用が可能であることが示唆されたと考えた。

エクソソームについての結果を以下に記す。DFATの培養上清中や治療マウスの血清内にエクソソームについて検討した。SEC法による細胞外小胞抽出キット (qEV) でDFAT培養上清中のエクソソームを回収した結果、 6.38×10^9 個/mlの豊富なエクソソームが確認された。TSG6に関係あるmiRNAとして既報では、miR214-5p, miR-1247-3p, miR-326-5p,

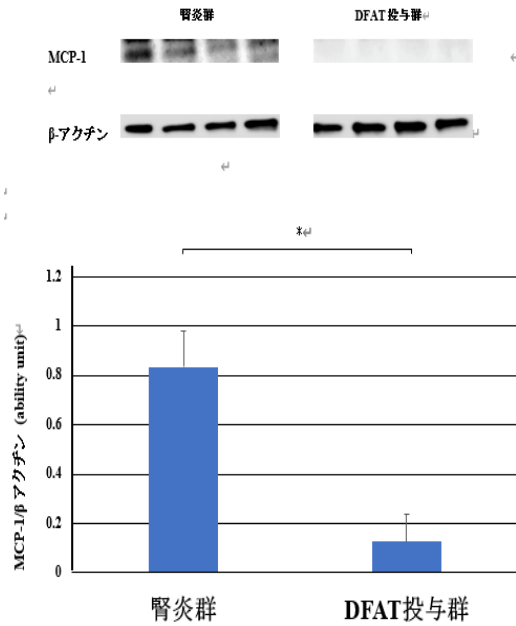


図5 移植後のMCP-1の発現

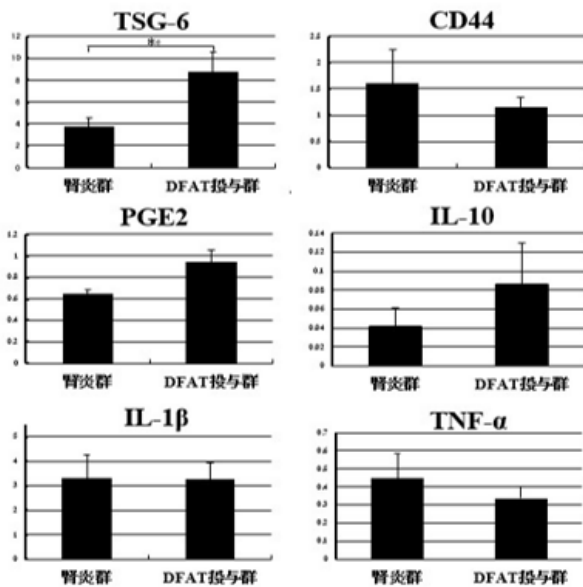


図4 移植後の各物質の発現

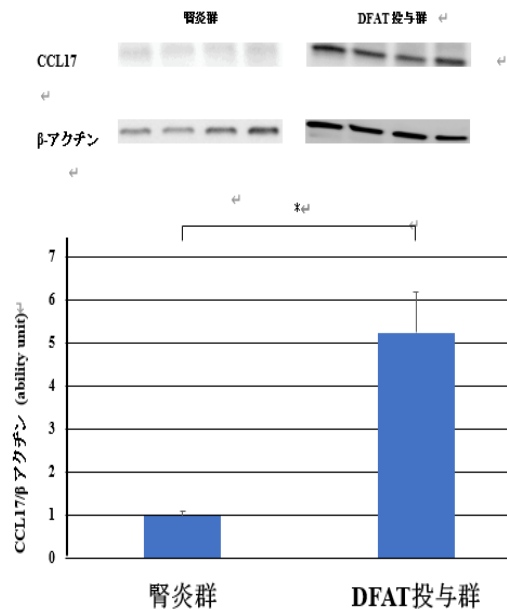


図6 移植後のCCL-17の発現

	解析 No.	Test(分子)	Control(分母)	$\Delta\Delta Ct$ (Log2 [Test/Control])	Fold Change ([Test/Control])	Reguration	
mmu-miR-23a-3p	G1	No5 kidney	No4 kidney	-0.92	1.89	1.89	up
	G2	No5 lung	No4 lung	-0.18	1.13	1.13	up
	G3	No6 kidney	No4 kidney	-0.89	1.85	1.85	up
	G4	No6 lung	No4 lung	-0.05	1.04	1.04	up
mmu-miR-30a-5p	G1	No5 kidney	No4 kidney	-0.65	1.57	1.57	up
	G2	No5 lung	No4 lung	-1.10	2.14	2.14	up
	G3	No6 kidney	No4 kidney	-0.55	1.46	1.46	up
	G4	No6 lung	No4 lung	-0.98	1.97	1.97	up
mmu-miR-181a-5p	G1	No5 kidney	No4 kidney	0.14	0.91	1.10	down
	G2	No5 lung	No4 lung	0.38	0.77	1.30	down
	G3	No6 kidney	No4 kidney	-0.18	1.13	1.13	up
	G4	No6 lung	No4 lung	0.26	0.84	1.20	down

図7 移植後のエクソソーム中のmiRNAの発現

miR204-3p, miR-23b-3pなどがある^{3,4)}。今回の我々の検証でもmiR-23b-3pはDFATおよび培養上清投与の両方において腎と肺、血清共に発現亢進を認めており既報どおりの結果である。つまり、同エクソソームがDFAT細胞移植によりまたはDFATの培養上清中に産生されそれが肺、腎臓に作用して、更にはTSG-6の産生亢進、組織修復に寄与した可能性があり得る。miR214-5pは既報ではその発現が低下してそれによりTSG-6が亢進すると報告されている。我々の結果では、DFAT移植により血清や腎臓でその発現が低下していたのは既報どおりであったが、肺においては発現が亢進していた。miR-326-5pは既報ではその発現が亢進するとされている。我々の結果では腎臓ではその発現が亢進し、一方肺では低下していた。miR204-3pも既報では亢進すべきであるが、我々の結果では血清、腎臓、肺共に低下を認め、既報とは逆の結果であった。miR-1247-3pは既報では亢進すべきmiRNAであるが、我々の結果では血清では亢進し、腎臓、肺ではその発現は低下していた。既報と違う点は今後検討の余地があるがmiR-23b-3pは我々の結果は既報と同一であり、TSG6を更新させるメカニズムとしてこのmiRNAが最も寄与している可能性があり、DFATを直接細胞移植しなくても培養上清中にこのmiRNAの発現が確認できれば、培養上清の投与でも効果が得られる可能性がある。

さらに既報には無いTSG6に寄与するmiRNAとして、DFATの治療を行った個体に比して無治療の個体よりもmiR-23a-3p, miR-30a-5pが肺、腎臓共に発現が亢進しており、miR-181a-5pが低下している結果が得られた(図7)。TSG6発現亢進につながる、

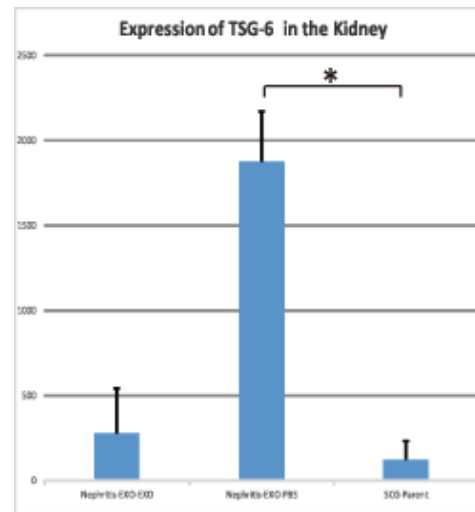


図8 エクソソーム注射後のTSG-6の発現

既報にはない新規のmiRNAの可能性のある注目すべき結果であり、今後頭数を増やして結果の蓄積を行っていく予定である。またDFATの培養上清中のエクソソームを疾患モデルに直接注射した後、腎臓でのTSG-6が疾患群より有意に上昇している現象が確認出来た(図8)。エクソソームを2回投与した場合、無治療群と同程度にこれが低下していた。TSG-6の前駆物質であるTNF α も同様の結果が得られた。

4. 考察

我々の結果ではDFAT細胞移植によりTSG-6の発現が亢進して、それが免疫抑制作用を示すことが腎障害改善のメカニズムの概略である。このTSG-6がどのような形で発現が亢進して更に免疫抑制につい

てどのような役割を担っているかはいくつかの報告があるが、まだ完全には解明できていない^{5,6)}。

また近年、間葉系幹細胞由来のエクソソーム分泌により種々の効果が得られることが報告されている^{7,8)}。

DFATの細胞治療において、当初は腎臓に直接投与を行い腎臓を改善することを想定していたため、腎動脈からDFATを直接投与することも行っていた。ある程度の効果はそれでも得られたが、ヒトにそれを行うことを考えると侵襲が大きくそこで静脈による全身投与を別に行った結果腎臓に直接投与するよりも治療成績が良好で、侵襲も腎臓に直接投与するよりもはるかに少なく、より臨床応用できる可能性が高いと考えられた。しかし投与されたDFATがほとんど肺でトラップされ腎臓に到達しないにも関わらず腎症が改善する機序の詳細が不明であり、臨床応用するためにはその探索は必要と考えて、DFATを静脈から投与することを前提に研究を継続した。過去の我々の経験では、細胞を静脈に投与した場合にDFATではその数によっては肺に塞栓が起きたためか、注射後すぐに死亡する動物モデルが観られた。間葉系幹細胞をヒトに投与して疾患を投与する場合、ヒトでも同様のことが過去にも報告されておりその安全性を担保することが臨床応用では必要である。そこで今回DFATから産生されるDFATよりはるかに微小で塞栓の可能性はほぼ皆無であるため、安全性が遥かに高いエクソソームによる治療を考えて今回の結果を得た。特定のエクソソームを今後作成する技術は現在無いが今回の我々の研究で例えばDFATの培養上清中に既報のmiR-23b-3pや今回我々が見出したmiR-23a-3p, miR-30a-5pが確認され、その培養上清中のエクソソーム注射を行えば抗炎症、免疫作用が得られて、それがTSG6の発現を亢進させて、細胞の直接投与よりも安全に治療が行える可能性が今回の研究で示唆されたものであると考える。今後エクソソームについては更なる検証の蓄積が必要である。

5. 結 語

DFATの細胞移植により腎障害を改善させて、また安全性を確認することができた。腎障害について今回は免疫を機序とする腎炎について行った。糖尿病や高血圧に起因する腎障害についても、間葉系幹

細胞の作用についての他の報告から障害を改善できる可能性がある。また細胞を直接投与しなくても細胞よりさらに微小な安全性の高いエクソソームを利用した治療に結び付けられる可能性があり、この治療法が腎障害に幅広く安全に行える可能性があることが示唆された。

(※この研究は、令和3年度日大学術研究助成金・総合研究の助成金交付により研究が遂行されたものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。今回研究の機会を与えて頂きました本学のすべての関係者の方々に心より感謝致申し上げます。)

文 献

- 1) Matsumoto T, Kano K, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008 ; 215 (1) : 210-22.
- 2) Maruyama T, Fukuda N, Matsumoto T, et al. Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene 6. *Stem Cell. Res Ther* 2015; 6 : 80. 1-16.
- 3) Yang Hu, Gaigai Li, et al. Upregulated TSG-6 Expression in ADSCs Inhibits the BV2 Microglia-Mediated Inflammatory Response. *Biomed Res Int.* 2018 ; 7239181.
- 4) Takashi Miyaji, Taro Takami, et al. Bone marrow-derived humoral factors suppress oxidative phosphorylation, upregulate TSG-6, and improve therapeutic effects on liver injury of mesenchymal stem cells. *J Clin Biochem Nutr.* 2020 ; 66 (3) : 213-223.
- 5) Sihyung Wang, Chanbin Lee, et al. Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein ameliorates chronic liver damage by promoting autophagy formation in mice. *Exp Mol Med.* 2017 ; 49 (9) : e380.
- 6) L Kui, G C Chan, et al. TSG-6 Downregulates IFN-Alpha and TNF-Alpha Expression by Suppressing IRF7 Phosphorylation in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Mediators Inflamm.* 2017 ; 7462945.
- 7) Donald G Phinney, Mark F Pittenger. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells.* 2017 ; 35 (4) : 851-858.
- 8) Kenji Tsuji, Shinji Kitamura, et al. Secretomes from Mesenchymal Stem Cells against Acute Kidney Injury: Possible Heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2018 : 8693137.

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ーペルオキシダーゼ (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)。2019年度に、Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせることで自動測定プロトタイプ機器が作成できた。2020年度は、実際の新生児血を用いて、本自動測定系の精度検証を行った。既存のUB値測定機器であるUBアナライザーのUB値と比較では、 $y=0.99x+0.01$, $R^2=0.9514$ で強い相関を確認した ($n=9$)。しかし、変動係数 (CV) が10~15%であり、精度に課題が残った。2021年度は精度の上昇をはかり、CVが10%を下回るところまでできた。今後、CVが5%程度になるようさらに改修を行い、国内の薬事承認に向けたプロセスを行っていく。

1. はじめに

新生児のビリルビンによる脳障害 (ビリルビン脳症) 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¹⁾。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ーペルオキシダーゼ (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上大きな問題があり普及には至っていない^{2), 3)}。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

合わせることで、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: 特許第6716108号, 2020年6月12日)^{2), 3)}。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。

本装置がPoint-of-careの体外臨床検査診断として実用化されれば、現在では見逃してしまうビリルビン脳症発症のハイリスク新生児が検出できるようになる。そして、世界中でビリルビン脳症という脳性麻痺や心身障害の発症抑制に大きく貢献できる。脳性麻痺や心身障害児は生涯に渡って療育や福祉支援が必要であり巨大な医療費や福祉費用がかかっている。その費用を減少させることができ、医療経済上、大きな効果となる。

2019年度は、アトムメディカル社および米国のノースカロライナ州にあるBaebies社を連携組織と

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

して進め、その結果、Baebies社の保有するDigital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせた機器の実現性ができた (Finder UB値)⁴⁾。2020年度には、実際の新生児血を用いて、精度の検証を行った。既存のUB値測定機器であるUBアナライザーのUB値 (Atom UB値) と比較では、 $y=0.99x+0.01$, $R^2=0.9514$ で強い相関を確認した (n=9)。しかし、変動係数 (CV) が10~15%であり、精度に課題が残った⁵⁾。

2. 方法

我々は、2019年度に、Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせることで自動測定プロトタイプ機器が作成できた⁴⁾。この自動測定機器は、UB (Finder UB値) 以外に、アルブミンおよび総ビリルビンと合わせて、すべてを50 μ Lの全血で測定できる。すべての測定は、使い捨てのDMFカートリッジで自動的に実行される (図1)。米国で開発研究が行われている。

測定系を調整し、その検証として、n数を増やし、

①血中UBをFinder UB値とAtom UB値の相関、②

血中UBの高値 (0.93 μ g/dL) と低値 (0.54 μ g/dL) で、同一検体を用いた繰り返し測定 (12回) を行い、CVを求めた。

③さらに精度の向上のため、以下の表に示す人工ビリルビン溶液 (bilirubin/albuminモル比として、0から1.0) を作成し、最も適切な反応 (Reaction, RxN) 時間を検討した。

3. 結果

①血中UBをFinder UB値とAtom UB値の相関

図2に左図示すように、n=20でほぼ $y=1.0x+0$ の直線に近づいているのがわかる。しかしながら、まだばらつきが存在している。

②血中UBの高値 (0.93 μ g/dL) と低値 (0.54 μ g/dL) のCV (n=12)

自動測定機器で測定した血中UBの高値 (0.93 μ g/dL) と低値 (0.54 μ g/dL) のCVは、各々9.7%と8.5%であった。

③最適な反応時間の検討

精度の向上のため、反応時間を再度検証し直し、最適な反応時間を23.5秒と決定した。



図1 UB測定のための自動測定プロトタイプ機器 (Finder UB値が測定できる)

表1 人工ビリルビン溶液

	Sol A	Sol B	Sol C	Sol D	Sol E	Sol F
B/A ratio	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
0.4 mM/0.4 mM B/A Stock Solution	0	0.1 mL	0.2 mL	0.3 mL	0.4 mL	0.5 mL
0.4 mM Albumin Solution	0.5 mL	0.4 mL	0.3 mL	0.2 mL	0.1 mL	0.0 mL
bilirubin, mg/dL	0	4.7	9.4	14.0	18.7	23.4
Albumin, g/dL	0	2.76	2.76	2.76	2.76	2.76

B/A, bilirubin/albuminモル比

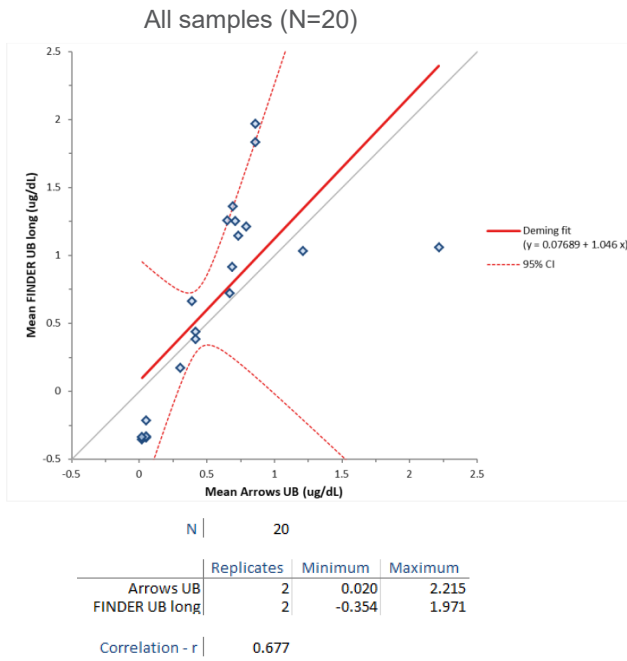


図2 血中UBをFinder UB値とAtom UB値の相関

表2 血中UBの高値と低値時のCV値

0.54 μg/dL	Mean	Repeatability SD	Repeatability CV
UB	0.57 (μg/dL)	0.055	9.7%

0.93 μg/dL	Mean	Repeatability SD	Repeatability CV
UB	0.93 (μg/dL)	0.079	8.5%

4. 今後の計画

国際共同産学連携社会実装開発研究のため、2020年度はCVが10～15%であったが、2021年度にカートリッジを種々の調整を重ね、CVが10%を下回るまでできた。相関は、 $y = 1.0x + 0$ の直線に近づいているが、まだばらつきが存在しているため、精度はCVが5%程度になるように検証や改修も含め、もう一息の工夫をおこなっている。さらに国内での社会実装のためには、まだ、薬事承認に向けたプロセスを行うことが残っている。

1) 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規定を順守し(2020年6月19日付承認, RK-200414-2), 日本大学医学部附属板橋病院総合周産期母子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100検体確保している(抱合型(直接)ビリルビンやヘモグロビン(溶血)含有検体は除く)。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。その一致率および相関関係を示す解析結果が、体外診断用医薬品の承認基準となることを確認している(厚生労働省医薬食品局長, 平成27年1月20日通知 薬食発0120第1号)。相関関係は、相関係数と相関式を求め、評

Tested the following reaction times

- 1.1s
- 5.8s
- 10.5s
- 23.5s
- 31.5s
- 65.8s

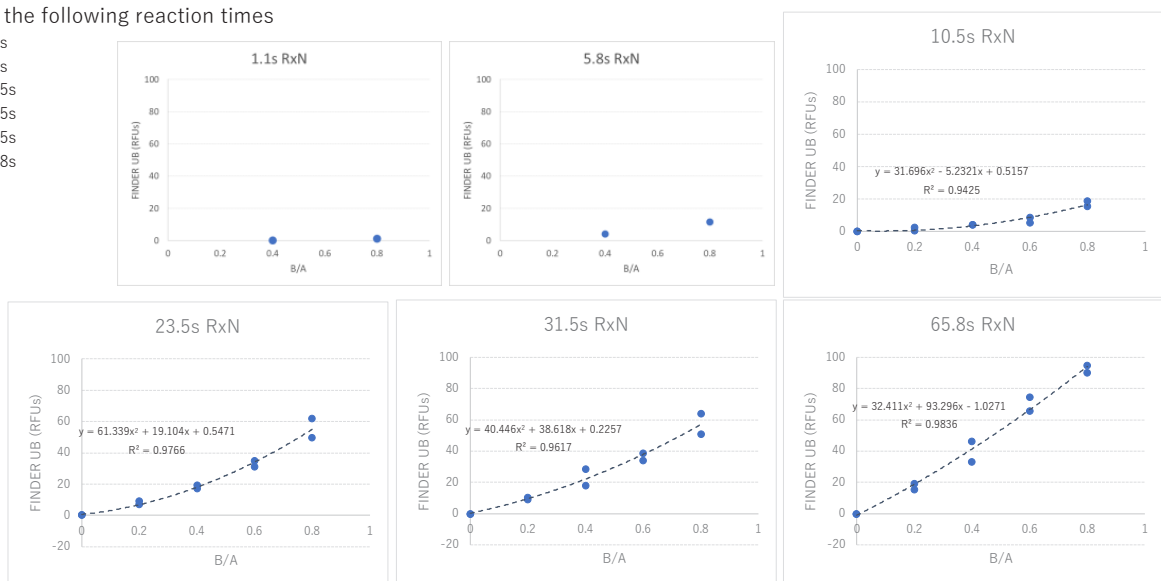


図3 最適な反応時間の検討

値は相関係数が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。

- 2) その他の解析として,
 - A) 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。CVは5%未満となることを目指す。
 - B) 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。
 - C) 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認させる。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。
- 3) 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

米国でDigital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせた新血中UB自動測定機器で、人工ビリルビン溶液や実際の新生児血を用いて精度の検証を続けている。今後、CVが5%程度になるよう改修を行う。その後、日本での検証を行い、体外診断医薬品・医療機器としての社会実装を目指す。

文 献

- 1) Morioka I, Nakamura H, Koda T, et al. Serum unbound bilirubin as a predictor for clinical kernicterus in extremely low birth weight infants at a late age in the neonatal intensive care unit. *Brain Dev.* 2015; 37: 753-757.
- 2) Iwatani S, Nakamura H, Kurokawa D, et al. Fluorescent protein-based detection of unconjugated bilirubin in newborn serum. *Sci Rep.* 2016; 6: 28489.
- 3) Iwatani S, Yamana K, Nakamura H, et al. A novel method for measuring serum unbound bilirubin levels using glucose oxidase-peroxidase and bilirubin-inducible fluorescent protein, UnaG: No influence of direct bilirubin. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 6778.
- 4) 森岡一朗, 長野伸彦, 桃木恵美子ら. 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. *日本大学医学部総合医学研究所紀要.* 2020; 8: 27-30.
- 5) 森岡一朗, 長野伸彦, 桃木恵美子ら. 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. *日本大学医学部総合医学研究所紀要.* 2021; 9: 10-12.

重症アレルギー疾患患者に対する 抗IgE抗体治療のコンパニオン診断薬の開発

岡山吉道¹⁾²⁾, 丹羽悠介¹⁾³⁾, 坂本朋美¹⁾²⁾, 高橋恭子⁴⁾,
葉山惟大¹⁾³⁾, 木澤靖夫⁵⁾, 丸岡秀一郎¹⁾⁶⁾, 權寧博¹⁾⁶⁾

Development of companion diagnostics for treatment of patients with severe allergic diseases with anti-IgE antibody

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾²⁾, Yusuke NIWA¹⁾³⁾, Tomomi SAKAMOTO¹⁾²⁾, Kyoko TAKAHASHI⁴⁾,
Koremasa HAYAMA¹⁾³⁾, Yasuo KIZAWA⁵⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾⁶⁾, Yasuhiro GON¹⁾⁶⁾

要旨

重症喘息, 重症慢性特発性蕁麻疹および重症花粉症患者に対してomalizumabがわが国で使用されているが, 投与の適応を決めるbiomarkerや投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerは, はっきりしていない。既に私達は, omalizumabの投与中の薬剤効果の目安となるbiomarkerであるfree IgE値の測定系を実験室レベルで確立しており, 今回さらに感度が5倍高く安定した測定系(コンパニオン診断薬)を確立させた。omalizumabによる慢性特発性蕁麻疹の治療適応となるのは治療前のfree IgE値が368.6 ng/mL以上であることを見出した。さらにアレルギー性気管支喘息患者とは異なりomalizumab治療後の血清free IgE値が0に近くとも治療効果が見られない症例群が存在し, それら慢性特発性蕁麻疹患者群の病態にはIgEが関与していないことが示唆された。

1. はじめに

我が国の全喘息患者(300万人)のなかで高容量吸入ステロイド薬と長時間作用性β刺激薬等の長期管理薬の併用でも効果不十分な難治性喘息は, 約34~35万人いる。この患者の治療費は全喘息患者の治療費の七割を占めているため難治性喘息患者の医療費の削減が喫緊の課題である。難治性アレルギー性喘息患者の治療薬として使用されているヒト化抗IgE抗体(omalizumab)は, 日本での売上額は50億円であり, 患者の1カ月の医療費は30万円にもおよび, 投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerは存在せず年余に渡り投与されている。従って副作用の頻度も上昇する。さらに, 我が国で慢性特発性蕁麻疹と診断された患者の中で重症患者は5~6万人と推定されており, omalizumabは重症患者に

適応があり, その患者の約7000人に年余に渡り投与されており, その減薬方法は確立されていない。我が国にて2019年秋にomalizumabは, 既存薬で効果が不十分な重症花粉症の適応となり, その患者数は国内に200~300万人いると推定されている。既に私達は, omalizumabの投与中の薬剤効果の目安となるbiomarkerであるfree IgE値の測定系を実験室レベルで確立しており¹⁾, 今回さらに感度が高く安定した測定系(コンパニオン診断薬)を確立させ, 治療効果とfree IgE値との関係を調べた。

2. 対象及び方法

2.1 倫理的配慮

日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会に小臨床試験の新規申請をし, 承諾を得た(RK-

1) 日本大学医学部附属板橋病院アレルギーセンター
2) 日本大学医学部医学教育学分野
3) 日本大学医学部皮膚科学分野
4) 日本大学生物資源科学部
5) 日本大学薬学部
6) 日本大学医学部呼吸器内科学分野
岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

150908-12)。

2.2 対象

現在、日本大学医学部附属板橋病院皮膚科外来に通院中で omalizumab 治療予定の重症慢性特発性蕁麻疹患者61名および健常人4名を対象とした。末梢血 2ml を omalizumab 投与前後の2回採血させていただいた。

2.3 free IgE 測定 ELISA の最適化

2.3.1 プレートに固定化するリコンビナント可溶性 FcεRIα 鎖濃度の最適化

- (1) リコンビナント可溶性 FcεRIα 鎖をプレートに固定化するが、種々濃度のリコンビナント可溶性 FcεRIα 鎖 (0.03 ~ 0.50 μg/well) を含むコーティングバッファーを調製した。リコンビナント可溶性 FcεRIα 鎖は、CHO 細胞に FcεRIα 鎖を強制発現させて、その細胞上清を concentrator により濃縮後、抗 FcεRIα 鎖抗体 (clone CRA1) と affinity column を用いて精製した。ウエスタンブロッティング法で精製を確認した。²⁾
- (2) 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISA を実行した。
- (3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

2.3.2 ブロッキングバッファーの最適化

- (1) 種々のブロッキング溶液 (種々の濃度の FBS/PBS, BSA/PBS など) を調製した。
- (2) それぞれ等容量をプレートへ添加して、ELISA を実行した。
- (3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

2.3.3 サンプル濃度の最適化

- (1) サンプルのマトリックスに極力近い標準希釈液を調製した。
- (2) それぞれ等容量をプレートへ添加して、ELISA を実行した。
- (3) 標準曲線で適切なダイナミックレンジを確認し、サンプルの希釈直線を確認した。
- (4) スパイク回復または希釈直線試験を行った。マトリックス効果を示す干渉物質の除去を行った。

2.3.4 検出抗体濃度と酵素複合体の最適化

- (1) 種々の濃度の検出抗体 (種々の clone や polyclonal の HRP 標識抗 IgE 抗体) を含む標準希釈液を調製した。各基質に対する濃度範囲内の濃度に設定した。各種酵素複合体結合抗 IgE 抗体として clone 4F4, clone 1A2, clone 4C3, clone M94176, polyclonal 抗体を用いた。
- (2) 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISA を実行した。
- (3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

2.3.5 シグナル検出と希釈標準液の最適化

- (1) サンプル中の抗原想定量や、使用機器による抗原検出能力に基づいて、基質を選択した。
- (2) 作業溶液をプレートへ添加して、ELISA を実行した。
- (3) 抗原が全ダイナミックレンジにわたり確実に検出可能か検討した。
- (4) 種々濃度の酵素複合体を含む標準希釈液を調製した。各基質に対する濃度範囲に対応した濃度に設定した。
- (5) 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISA を実行した。
- (6) シグナルとバックグラウンドを確認した。

2.4 ELISA の分析法バリデーション

最適化した ELISA の分析法バリデーションを評価した。分析法バリデーション試験は以下の省令やガイドランスに従った。

- ・厚生省令第21号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」(平成9年3月26日、一部改正 厚生労働省令第114号 平成20年6月13日) 準用
 - ・「トキシコキネティクス (毒性試験における全身的曝露の評価) に関するガイドランスについて (平成8年7月2日薬審第443号)」 準拠
- 以下の項目について評価した。

2.4.1 検量線の作製

2.4.2 定量下限の決定

2.4.3 日差再現性

2.4.4 感度

2.4.5 確認アッセイ

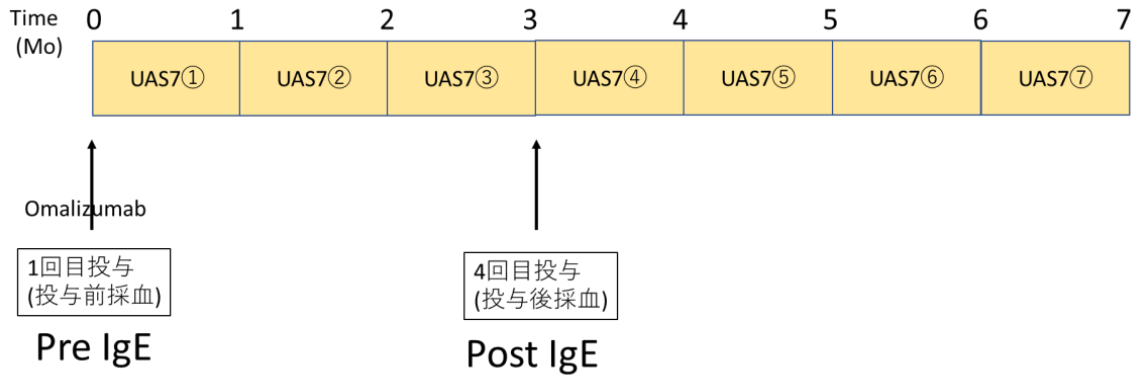


図1 採血のタイミングとomalizumab 治療プロトコール

2.5 omalizumab 投与前後の free IgE 値と total IgE 値と omalizumab 治療効果の関連に関する解析

2.5.1 採血のタイミングとomalizumab 治療プロトコール

前述の如く、omalizumab 治療予定の重症慢性特発性蕁麻疹患者61名の末梢血2mlをomalizumab投与前後の2回採血させていただいた。1回目は投与前、2回目は4回目投与时、すなわち1回目投与3か月後とした(図1)。omalizumabは1か月間隔で300mgを皮下注した。

2.5.2 omalizumab 治療効果判定方法

UAS7を用いた。omalizumab 投与間隔1か月の平均UAS7で評価した。図1のようにそれぞれUAS7①、UAS7②からUAS7⑦と記載した。平均UAS7が6以下をresponder, 6より大きい場合をnon-responderと定義した。

3. 結果

3.1 ELISAの最適化

3.1.1 プレートに固定化するリコンビナント可溶性FcεRIα鎖濃度の最適化

リコンビナント可溶性FcεRIα鎖の至適濃度は0.50 μg/well (PBSで希釈)であった。至適インキュベーション温度と時間は、4℃にて16時間であった。

3.1.2 ブロッキングバッファーの最適化

ブロッキングバッファーの最適条件は、PBS/0.5% Casein, Wash Bufferは、PBS/0.05% Tween-20と決定した。至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて16時間であった。

3.1.3 サンプル濃度の最適化

血清をSample Diluent (PBS/0.05% Tween-20, 0.5% Casein)で希釈し、オマリズマブ投与前は血清を40倍希釈。オマリズマブ投与後は血清を10倍希釈が至適条件であった。至適インキュベーション温度と時間は、4℃にて16時間であった。

3.1.4 検出抗体濃度と酵素複合体の最適化

検出抗体HRP標識マウス抗ヒトIgE抗体をPBS/0.5% Caseinで1/1000に希釈が至適条件と決定した。至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて1時間であった。

3.1.5 シグナル検出と希釈標準液の最適化

TBS (Sera Care, Milford, MA, USA)を用いて至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて30分であった。

3.2 ELISAの分析法バリデーションの評価

3.2.1 検量線の作製

検量線の作製にはヒトIgEを用いた、300 ng/mLから150 ng/mL, 75 ng/mL, 37.5 ng/mL, 18.75 ng/mL, 9.375 ng/mL, 4.688 ng/mL, 2.344 ng/mLと段階希釈して使用した(図2)。

3.2.2 定量下限の決定

定量下限は、検量線から2.344 ng/mLと決定した。

3.2.3 free IgE 測定値の日差再現性

表1は、1週間の間隔をあけて2回同一のサンプルのfree IgE値(IU/ml)を測定した結果である。N

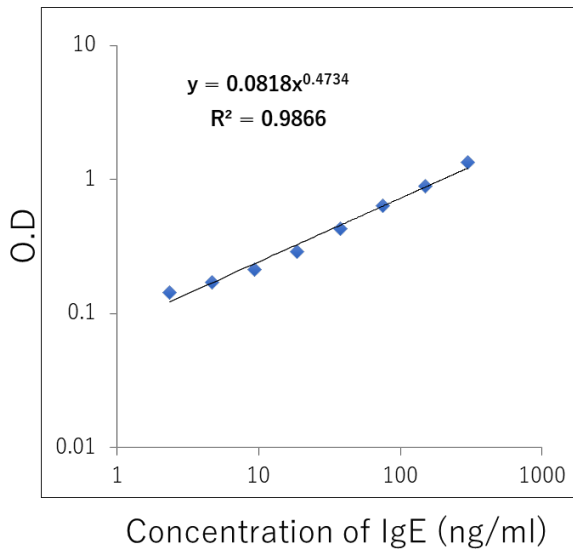


図2 free IgE ELISAの検量線

表1 free IgE 測定値の日差再現性

sample #	1回目free IgE測定値 (IU/ml)	2回目free IgE測定値 (IU/ml)
N96	102.89732	95.6919546
N99	207.93215	325.946815
N101	41.487436	47.3377897
N102	952.29925	1181.83206

はnormal healthy control (健常人)を指す。健常人4名において日差の再現性は確認できた。

3.2.4 感度

検量線スタンダードの最小値の1/2である1.17 ng/mLを感度とした。

3.2.5 確認アッセイ

omalizumab投与前の慢性特発性蕁麻疹患者のfree IgE値 (pre free IgE)は、血清IgE値に相当するので受託臨床検査会社であるエスアールエル株式会社 (SRL)に外注しその測定値 (pre total IgE)と比較したところ、図3の如く相関係数は0.8198であった。

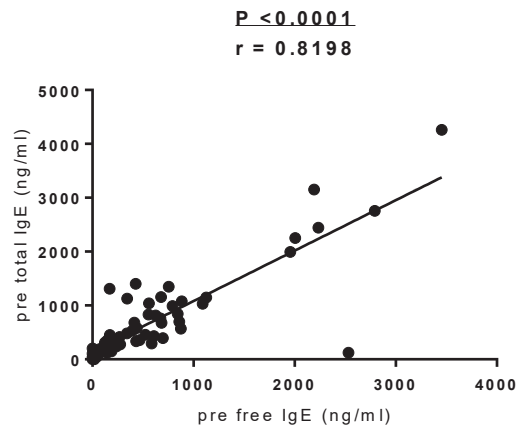


図3 pre free IgE値とpre total IgE値の相関

3.3 omalizumab投与前のfree IgE値 (pre free IgE)とtotal IgE値 (pre total IgE)とomalizumab治療効果の関連に関する解析

omalizumab投与間隔1か月間の平均UAS7で評価した。図1のようにそれぞれUAS7①, UAS7②からUAS7⑦と記載した。平均UAS7が6以下をresponder, 6より大きい場合をnon-responderとし, responderとnon-responderの2群間においてfree IgE値とtotal IgE値に有意差があるかどうか評価した。図4のようにpre free IgEはpre total IgEと比較してより早期にomalizumabの有効性を評価できた。図4cのresponderとnon-responderのデータからROC曲線を作成しカットオフ値を求めたところ (図5), omalizumabによる慢性特発性蕁麻疹の治療適応となるのは治療前のfree IgE値が368.6 ng/mL以上であった。また, pre free IgEとpre total IgEは両者とも3か月以降のomalizumabの有効性を評価できた。

3.4 post free IgEとpost total IgEの相関関係

post total IgEは, post free IgEとomalizumab-IgEの複合体の和であるので図6の如く, post free IgEが高ければpost total IgEは高くなるが, 相関係数は0.5059であった。

3.5 pre free/total IgEとpost free/total IgEの関係

free IgEはomalizumab治療によって有意に低下し, 一方, total IgEは有意に増加した (図7)。

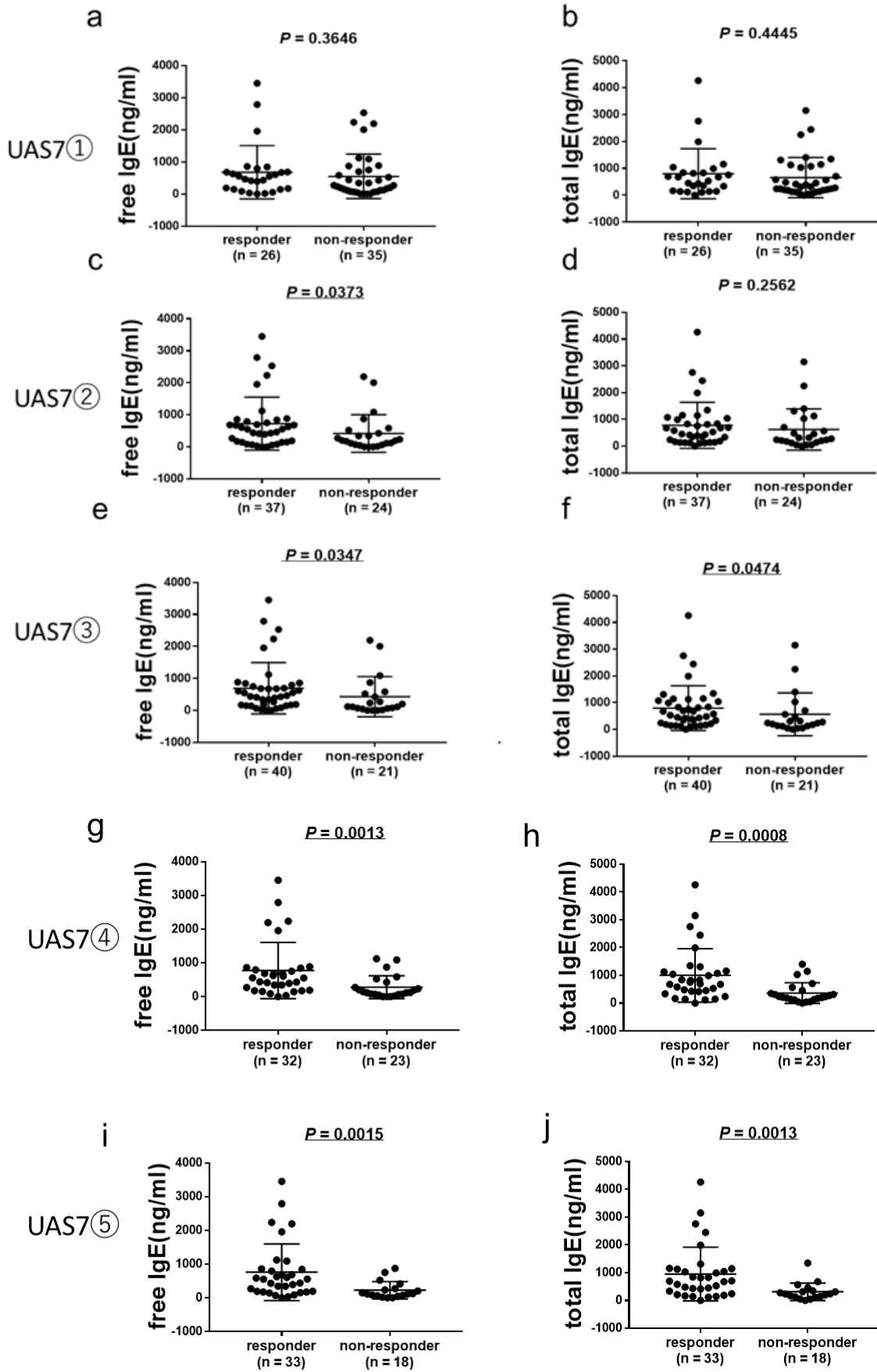


図4 responderとnon-responderの2群間においてfree IgE値とtotal IgE値の比較

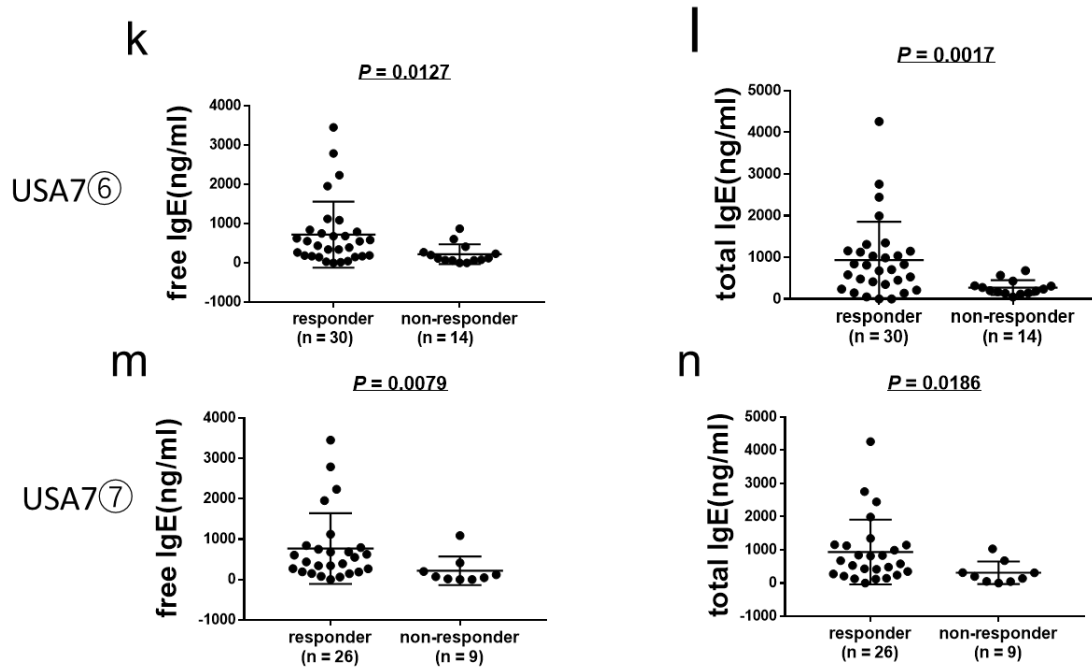


図4 responderとnon-responderの2群間においてfree IgE値とtotal IgE値の比較(続き)

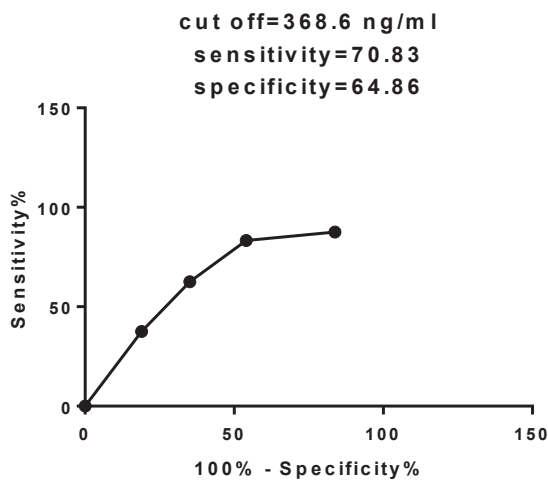


図5 図4cのresponderとnon-responderのデータからROC曲線を作成

3.6 omalizumab投与4か月目以降におけるpost free IgEおよびpost total IgEのnon-responderとresponder間の有意差検定

post free IgEおよびpost total IgEがomalizumab投与4か月目以降における治療効果を判定できるかどうか調べるためにnon-responderとresponderの2群間のpost free IgEおよびpost total IgEを比較解析した。post free IgEはUAS7 ⑦においてnon-responderで有意に低値であった(図8g)。post total IgEは、UAS7 ④と⑦においてnon-responderで有意に低値であった(図8bとg)。したがって、むしろpost free IgEが低いことがomalizumabの治療効果が無いことを示す結果となった。

4. 考察

私達はこのfreeのIgEの測定系を実験室レベルで確立しており,¹⁾今回、測定感度を5倍まで上げることに成功した。以上より高感度free IgE測定系(コンパニオン診断薬)は、確立できた。ヒト化抗IgE抗体(omalizumab)は、血清中のIgEを捕獲し、さらにマスト細胞や好塩基球の高親和性IgE受容体(FcεRI)に結合したIgEをも解離させ捕獲することを機序とした抗体療法である。³⁾omalizumabに結合

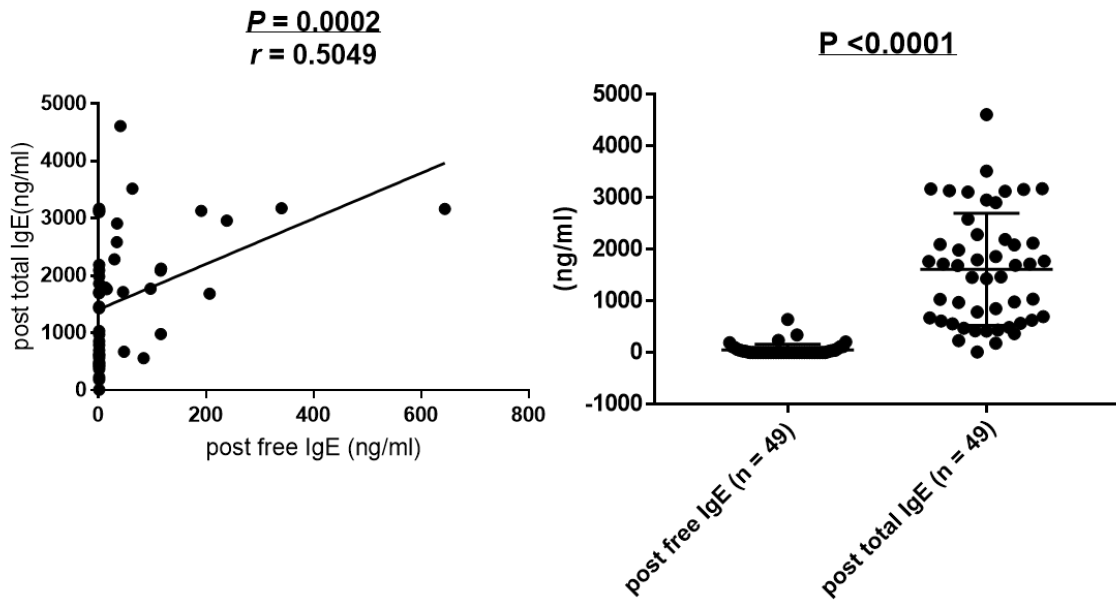


図6 post free IgE と post total IgE の相関関係

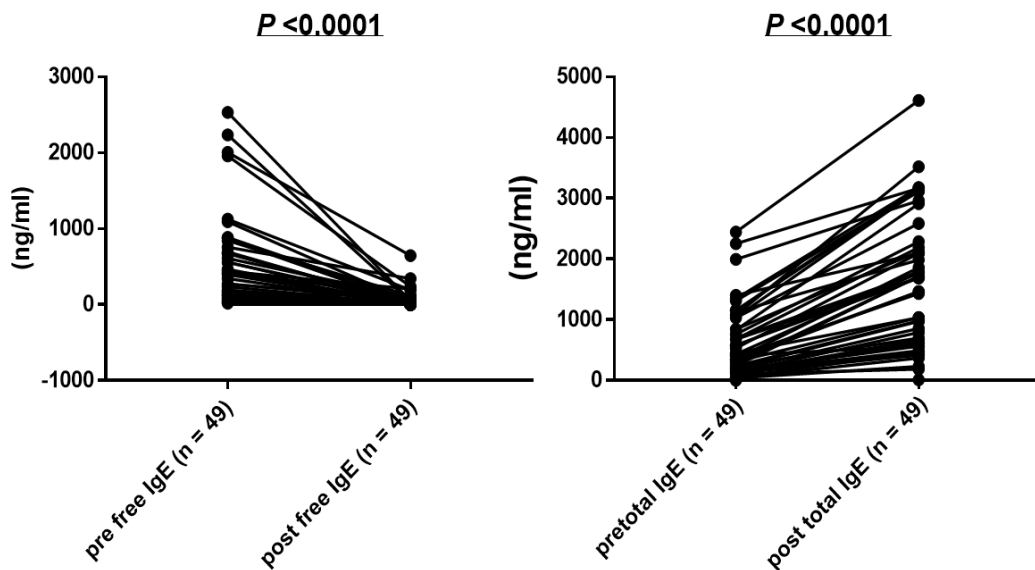


図7 pre free/total IgE と post free/total IgE の関係

していない free の IgE がアレルギー疾患の病態に関与しているので^{1,3,4)} 理論的には、この free の IgE を 0 とになれば治療効果がみられるはずである。しかしながら、慢性特発性蕁麻疹においては omalizumab 治療によって free IgE が 0 に近づいても治療効果がない群が存在し、その慢性特発性蕁麻疹患者群の病態には IgE が関与していないことが示唆された。

重症アレルギー性喘息においては、omalizumab

による治療後の血清 free IgE 値が 25 ng/mL 以下になる群が omalizumab の治療効果がみられる群であること⁵⁾ を私達も確認している。⁴⁾ 今後重症アレルギー性喘息患者において omalizumab による治療効果と治療後の血清 free IgE 値との関係を明らかにすることによって治療効果が有効となる free IgE 値が明らかとなり重症アレルギー性喘息への omalizumab 投与量を減らすことができ、患者の負担額と副作用の

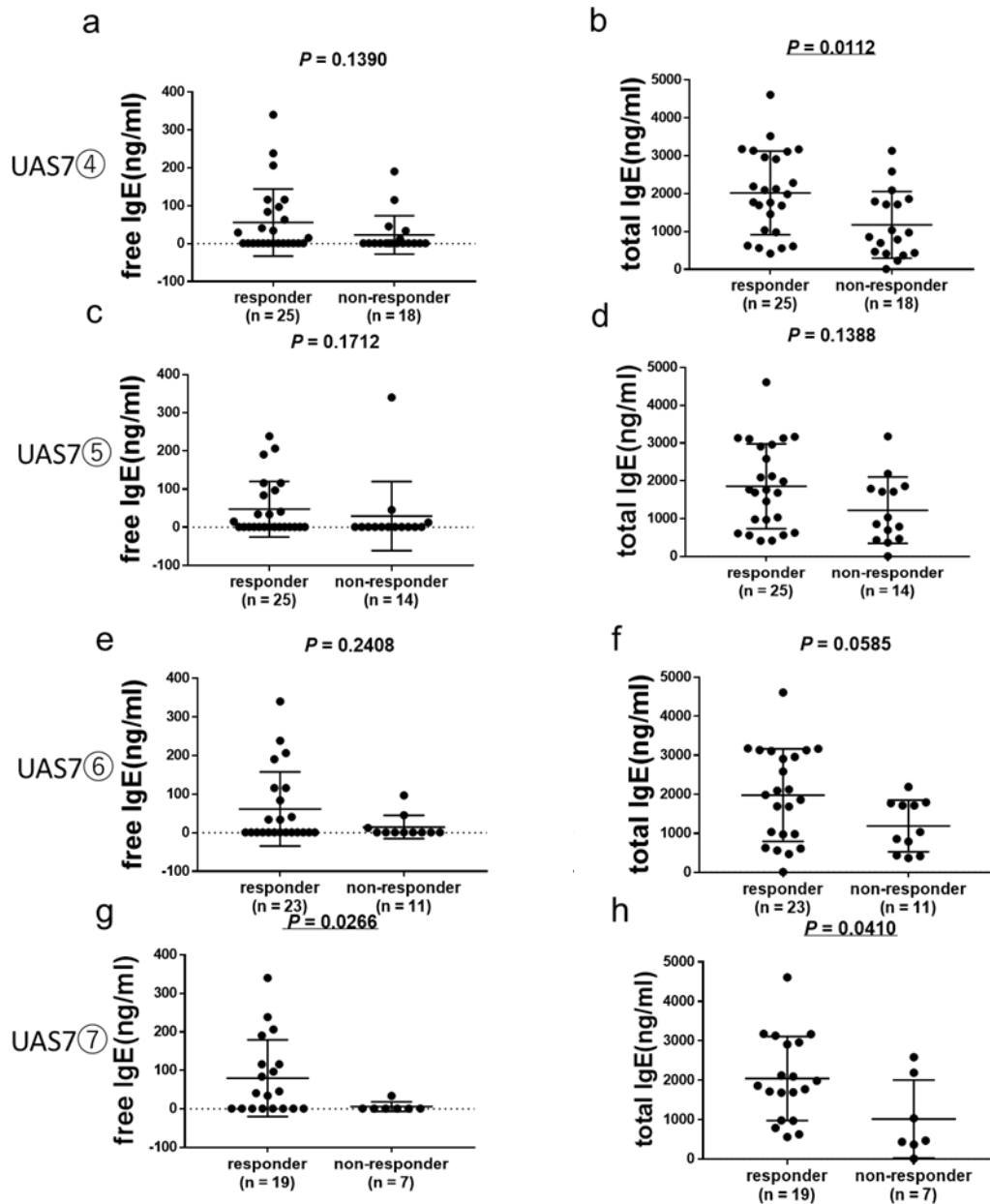


図 8 omalizumab 投与4か月目以降における post free IgE および post total IgE の non-responder と responder 間の有意差検定

頻度が減少できると思われる。

今回の私達の慢性特発性蕁麻疹患者での結果では、このコンパニオン診断薬によって慢性特発性蕁麻疹に対する omalizumab の早期の治療効果が判定できることが明らかになった。しかしながら慢性特発性蕁麻疹患者においては omalizumab 治療後の free IgE の測定によって omalizumab の投与量を漸減あるいは、中止できるかの判定はできないことが分かった。

5. 結 語

高感度 free IgE 測定系 (コンパニオン診断薬) は、確立できた。重症アレルギー性喘息においては治療効果が有効となる free IgE 値が明らかとなり今後重症アレルギー性喘息患者において omalizumab 休薬後の治療効果と omalizumab 休薬前の血清 free IgE 値との関係を明らかにすることによって重症アレルギー性喘息患者への omalizumab 投与量を減らすことができ、患者の負担額と副作用の頻度が減少でき

と思われる。慢性特発性蕁麻疹においては、omalizumab治療前のfree IgEを測定することによってomalizumabの治療効果を判定でき、omalizumab以外の治療法を選択することによって患者の負担額と副作用の頻度が減少できると思われる。

謝辞

本研究の成果は、令和2-3年度日本大学学術研究助成金〔社会実装〕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) Ito R, Gon Y, Okayama Y, et.al. Development of assay for determining free IgE levels in serum from patients treated with omalizumab. *Allergol Int.* 2014; 63 (Suppl 1) :37-47.
- 2) Ra C, Kuromitsu S, Hirose T, et.al. Soluble human high-affinity receptor for IgE abrogates the IgE-mediated allergic reaction. *Int Immunol.* 1993; 5:47-54.
- 3) Okayama Y, Matsumoto H, Odajima H, et.al. Roles of omalizumab in various allergic diseases. *Allergol Int* 2020; 69: 167-177.
- 4) Gon Y, Ito R, Maruoka S, et.al. Long-term course of serum total and free IgE levels in severe asthma patients treated with omalizumab. *Allergol Int.* 2018; 67: 283-285.
- 5) Odajima H, Ebisawa M, Nagakura T, et al. Omalizumab in Japanese children with severe allergic asthma uncontrolled with standard therapy. *Allergol Int.* 2015; 64: 364-370.

アトピー性皮膚炎・慢性特発性蕁麻疹における 細胞外小胞による病態制御機構の解明

岡山吉道¹⁾²⁾, 豊島翔太¹⁾²⁾³⁾, 坂本朋美¹⁾²⁾, 高橋恭子⁴⁾, 葉山惟大¹⁾⁵⁾,
木澤靖夫⁶⁾, 藤田英樹¹⁾⁵⁾, 李賢鎬⁷⁾, 丸岡秀一郎¹⁾³⁾

Elucidation of pathophysiological control mechanism in atopic dermatitis and chronic spontaneous urticaria

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾²⁾, Shota TOYOSHIMA¹⁾²⁾³⁾, Tomomi SAKAMOTO¹⁾²⁾,
Kyoko TAKAHASHI⁴⁾, Koremasa HAYAMA¹⁾⁵⁾, Yasuo KIZAWA⁶⁾,
Hideki FUJITA¹⁾⁵⁾, Kenkou Lee⁷⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾³⁾

要旨

ヒトマスト細胞からIgE依存性の刺激で特異的に分泌される細胞外小胞内のmiR103a-3pがILC2に取り込まれ、Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5)の発現を下げることによってGATA3のアルギニン残基の脱メチル化を起こし、IL-33存在下の2型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cell: ILC2)においてIL-5 mRNA発現を増強し、IL-5産生を増加させることを見出した。これによって好酸球性炎症を増悪されることが示唆された。

1. はじめに

生体の維持には細胞間のコミュニケーションが必須である。その方法としては、細胞同士の接着により刺激を伝達する機構やホルモン、細胞増殖因子、サイトカインや脂質メディエーターなどを細胞が分泌することに加え、細胞が遊離する数十～数百ナノメートルのサイズの細胞外小胞がある。¹⁾²⁾細胞外小胞は、遠隔の細胞間のコミュニケーションを媒介し、免疫応答や血液凝固などさまざまなプロセスに関与している。³⁾しかしながら、アレルギー・免疫疾患患者の血清中の細胞外小胞に含まれるタンパク質、核酸 (mRNA, microRNA [miRNA], ノン・コーディング RNA) や脂質が疾患の病勢によってどのようなダイナミックな変化を起こしているのかは、全く知られていない。今回、私達はヒトマスト細胞からIgE依存性の刺激で分泌される細胞外小胞内のmiR103a-3pが2型自然リンパ球 (group 2 innate lym-

phoid cell: ILC2)に取り込まれ、IL-33刺激によるIL-5産生を特異的に増強し、好酸球性炎症を増悪させること、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis; AD)患者では血清中の細胞外小胞内miR103a-3p発現が有意に増加していることを見出した。マスト細胞から分泌される細胞外小胞はマスト細胞特異的なマーカーを発現していることも見出した。

2. 対象及び方法

(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)。

(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

1) 日本大学医学部付属板橋病院アレルギーセンター

2) 日本大学医学部医学教育学分野

3) 日本大学医学部呼吸器内科学分野

4) 日本大学生物資源科学部

5) 日本大学医学部皮膚科学分野

6) 日本大学薬学部

7) 日本大学医学部整形外科学分野

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

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 (rh-SCF) 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) 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。

(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。

(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。

(6) miR103a-3p mimicおよびmiRNA mimic controlのILC2への遺伝子導入

miR103a-3p mimicおよびmiRNA mimic controlは, 10 nM, Sigma-Aldrich社製を用いた。ILC2への遺伝子導入は, MISSION siRNA Transfection Reagent Sigma-Aldrich社製を用いた。

(7) 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。

3. 結果

(1) ヒトマスト細胞からIgE依存性の刺激で分泌される細胞外小胞内のmiR103a-3pがILC2に取り込まれ, IL-33刺激によるIL-5産生を増強

IgE非依存性およびIgE依存性のアレルギー疾患におけるマスト細胞由来細胞外小胞中miRNAの特徴と役割を調べるために, ヒトマスト細胞を刺激なし, IL-33, IgEおよびIgEと抗IgE抗体で刺激し, 細胞外小胞を単離した。各々の細胞外小胞をIL-33存在下のILC2と共培養し, 細胞上清中のIL-5を測定

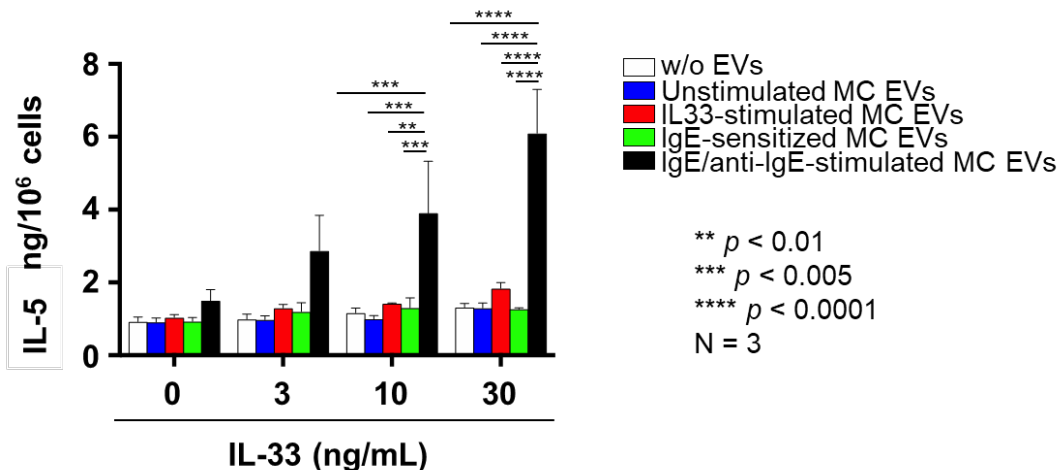


図1 IgEと抗IgE抗体で刺激したマスト細胞由来細胞外小胞は, ILC2のIL-5産生を有意に増強

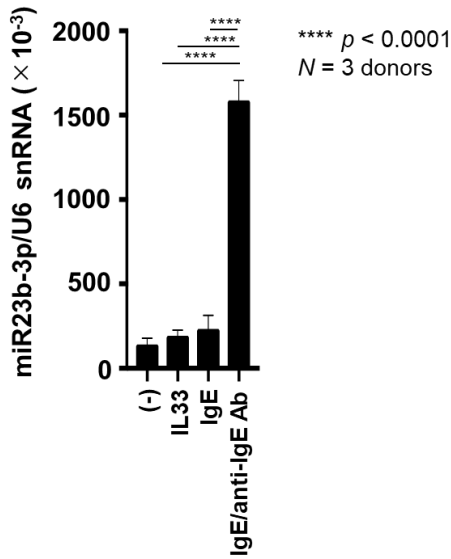


図2 IgEと抗IgE抗体で刺激したマスト細胞由来細胞外小胞中では、miR103a-3pの発現が有意に上昇

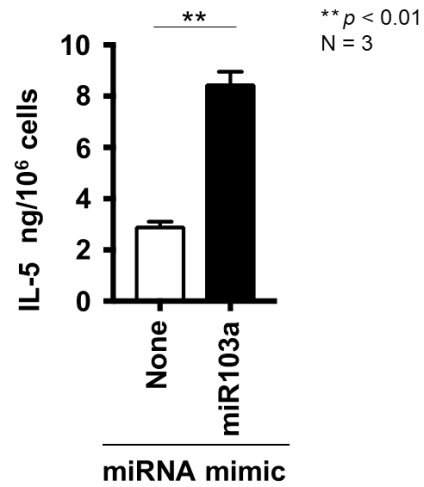


図3 miR103a-3p mimic 導入 ILC2 において IL-5 産生が増強

したところ、IgEと抗IgE抗体で刺激したマスト細胞由来細胞外小胞は、ILC2のIL-5産生を有意に増強させた(図1)。⁴⁾さらに、IgEと抗IgE抗体で刺激したマスト細胞由来細胞外小胞中では、miR103a-3pの発現が有意に上昇していた(図2)。⁴⁾

(2) マスト細胞由来細胞外小胞中miR103a-3pによる2型自然リンパ球, Th2細胞からのIL-5産生制御機序の解明

miR103a-3p mimicおよびmiRNA mimic control (10nM)をILC2に導入し、各濃度のIL-33存在下で3日間培養した後、IL-5とIL-13のELISAおよびmRNAのqPCRを行ったところmiR103a-3p mimic導入ILC2においてIL-5産生が増強した(図3)。⁴⁾

次にmiR103a-3p mimicおよびmiRNA mimic controlをILC2に導入し、Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5)およびPRMT8 mRNAの発現レベルが低下するかどうかを検証するために、PRMT5およびPRMT8のqPCRを行ったところmiR103a-3p mimic導入ILC2においてPRMT5 mRNAの発現レベルが低下した(図4)。⁴⁾

miR103a-3p mimicおよびmiRNA mimic controlをILC2に導入し、ILC2のGATA3のアルギニン残基の脱メチル化の程度を解析したところmiR103a-3p mimic導入ILC2においてGATA3のアルギニン残基の脱メチル化が促進されていた。⁴⁾

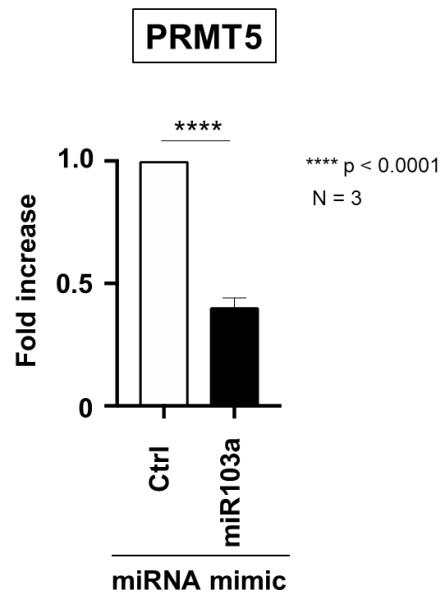


図4 miR103a-3p mimic 導入 ILC2 において PRMT5 mRNA の発現レベルが低下

4. 考察

以上の結果からIgE依存性刺激にてヒトマスト細胞から遊離させる細胞外小胞内miRNAは、刺激なしや他の刺激とは異なるmiRNAを含有し、免疫細胞機能を制御(この場合アレルギー炎症を増強)していることがわかった。実際にマスト細胞が活性化され

ているAD患者の血清中の細胞外小胞内miR103a-3pの発現が有意に増加していることを見出した。⁴⁾したがってAD患者では、患者ご自身の全身の皮膚において好酸球炎症を増強していると考えられた。

5. 結 語

ヒトマスト細胞からIgE依存性の刺激で特異的に分泌される細胞外小胞内のmiR103a-3pがILC2に取り込まれ、Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) の発現を下げることによってGATA3のアルギニン残基の脱メチル化を起こし、IL-33存在下のILC2においてIL-5 mRNA発現を増強し、IL-5産生を増加させることを見出した。これによって好酸球性炎症を増悪されることが示唆された。

謝 辞

本研究の成果は、令和3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) Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116:281-97.
- 2) Makeyev EV, Maniatis T. Multilevel regulation of gene expression by microRNAs. *Science*. 2008; 319:1789-90.
- 3) Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9:654-9.
- 4) Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Kurosawa Y, et al. miR103a-3p in extracellular vesicles from FcεRI-aggregated human mast cells enhances IL-5 production by group 2 innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2021; 147: 1878-1891.

病理標本の膜厚測定機器開発

— 膜厚標準化による標的分子評価と人工知能体系の適正化に関する研究 —

増田しのぶ¹⁾, 中西陽子¹⁾, 廣谷ゆかり¹⁾, 菊池加穂里¹⁾,
阿部 仁²⁾, 向井規浩³⁾, 西川喜久³⁾

A study of development of a device to evaluate the tissue thickness of
pathological sections:
For adequate evaluation of biomarkers and basic platform for artificial intelligence systems
by standardization of tissue thickness

Shinobu MASUDA¹⁾, Yoko NAKANISHI¹⁾, Yukari HIROTANI¹⁾, Kaori KIKUCHI¹⁾,
Hitoshi ABE²⁾, Norihiro MUKAI³⁾, Yoshihisa NISHIKAWA³⁾

要旨

本稿においては、社会実装研究を開始するに至った背景と動機ならびに目標を示した。すなわち、病理診断においては標本の厚み(膜厚)が重要であること、乳癌診療においてはバイオマーカーの免疫組織学的検討により治療方法が選択されていること、免疫染色は多段階的工程を経ているが、切片の薄切における膜厚が判定に影響を与えること、を示した。本研究では、複数の膜厚コントロールシステム案の比較を行い、既存システムとの比較において開発システムに求められる要件について考察した。

1. はじめに

[病理診断における組織切片の厚みの意義]

病理診断は、身体から採取された組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片 (formalin fixed paraffin embedded sections, FFPE) を用いて行なわれる。組織内の状態を適切に観察するための第一段階として、適切な検体取扱いとともに、適切な標本作製が重要となる。組織切片の厚み(以下、膜厚と称する)は、観察対象に応じて異なっており、例えば米国病理学会 (College of American Pathologist) のガイドラインでは、日常診療用 4~5 μ m, 腎生検 1~3 μ m, 骨髄検体 2~3 μ m, 組織化学用 6~15 μ m, アミロイド染色用 6~12 μ m が適切な厚みとされている¹⁾。

例えば、図1左のように適切な厚みであれば、腫瘍細胞の核所見の詳細が観察可能で病理診断が可能であるが、図1右のように厚すぎる検体では、核の重積により腫瘍細胞の詳細な所見を読み取ることが

できず診断ができない。このように、膜厚は病理診断の基礎となる条件である。

[乳癌診療における免疫染色結果の意義]

本研究開始の契機となった乳癌診療の薬物療法においては、バイオマーカーであるホルモン受容体 (エストロゲン受容体, ER; プロゲステロン受容体, PgR), HER2の発現状況と増殖活性マーカーである Ki67陽性率によって、治療法の選択が行われる (図2)。

すなわち、ER陽性症例には抗ホルモン薬が、HER2蛋白高発現あるいはHER2遺伝子増幅を伴う陽性には抗HER2抗体療法が、また、いずれも陰性の症例には、抗がん剤の適応となる。

HER2蛋白に対する免疫染色結果により抗HER2抗体療法の適応が決定されるため、その精度管理が重要となる。

以上の背景から、膜厚コントロールシステムの開

1) 日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野

2) がん研有明病院臨床病理センター

3) (株) 西川精機製作所

増田しのぶ: masuda.shinobu@nihon-u.ac.jp

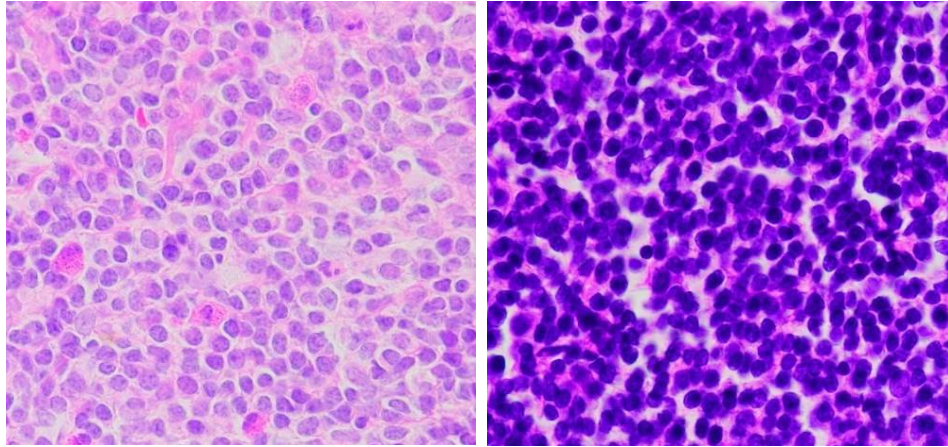


図1 慢性リンパ性白血病／小リンパ球性リンパ腫のHE染色所見
左：適切な膜厚による標本，右：膜厚が厚すぎる標本

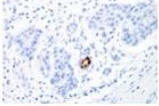
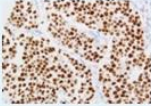
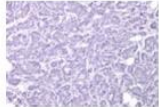
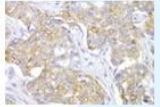
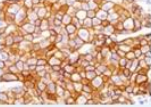
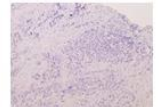
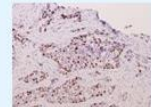
増殖刺激	受容体	陰性	陽性	治療方針
刺激: 卵巣ホルモン エストロゲン プロゲステロン	ER, PgR	陰性: 10%以下 	陽性: 10%以上 	抗ホルモン薬
刺激: 増殖因子 (EGF) (HGF)	HER2	陰性 Score 0, 1+ 	不明瞭 Score 2+  陽性 Score 3+ 	分子標的薬
増殖の程度	Ki67	陰性: 14%以下 	陽性: 14%以上 	抗がん剤

図2 乳癌診療におけるバイオマーカーの免疫染色結果と治療方針

発がんの課題であるとの認識に至り、本研究を開始することとなった。

[免疫組織化学的検討における標本作製、染色および評価過程]

病理標本作製工程は、図3に示すように臨床検体の固定、検体処理、薄切、染色、封入からなり、作製された病理標本が病理医により評価される。

免疫組織化学的検討は、可視化したい目的蛋白に対する抗原抗体反応をFFPE上で行い、観察する方法である。病理標本作製工程の染色の段階でさらに、多段階的な反応を行う。図2に示すように、脱

パラフィンの後、抗原性賦活化、抗原抗体反応（一次抗体、二次抗体）、発色、核染色を行い、評価される。重要な点は、免疫染色工程の前段階に薄切作業があり、この時の膜厚が判定結果にも影響を与える。

以上のように、病理診断、免疫組織化学的検討において、膜厚は重要な要素であるにもかかわらず、現在まで、十分な精度管理の対象となっていない。通常、ミクロトームを用いたFFPE薄切に際しては、厚みを設定することができる。しかしながら、薄切環境（湿度や温度）により影響を受けることが知られており、経験値の高い臨床検査技師によれば、暗黙知により調整が可能であるが、いつも適切

な膜厚で薄切されるとは限らないのが現状である。

2. 対象及び方法

本研究においては、膜厚コントロールのための要素検討を行う。

膜厚コントロールのための二つの案について、技術的課題の抽出および実用性について検討する。一つの案は、膜厚コントロール用標準物質を開発し、膜厚を計量線により判定する膜厚コントロールシス

テム案 (1) である (図4)²⁾。

もう一つの案は、FFPEの膜厚を測定する膜厚測定案 (2) であり、この場合には、既存の機器を用いた場合の課題と、本研究開発機器に求められる要件を抽出する。

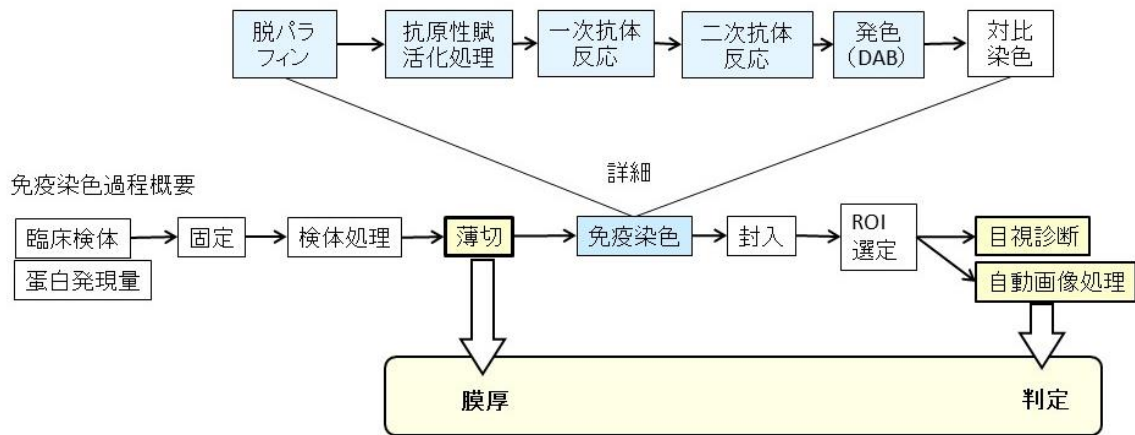


図3 標本作製過程と免疫組織化学的検討

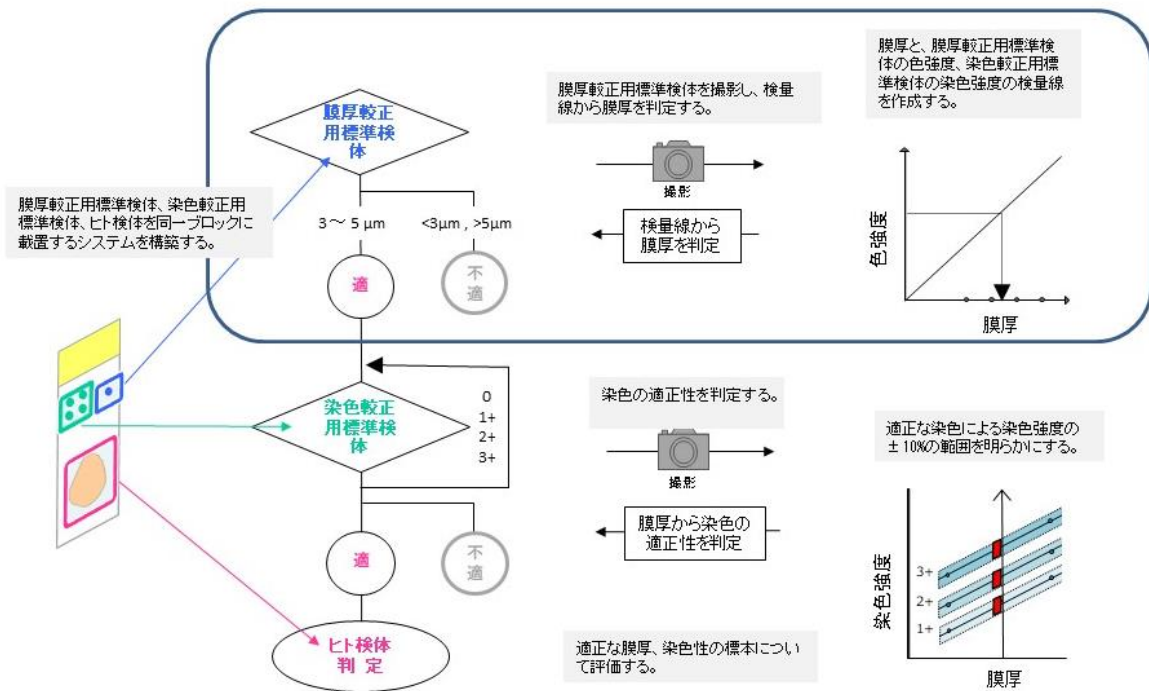


図4 膜厚コントロールシステム案 (1)

3. 結果

[膜厚コントロールのための二つの案に関する比較検討]

下表1に示すように、案(1)においては複数の実際の作業工程との整合性をとる必要があり、病理検査室の現場における実装性を鑑みるとやや難がある。一方、案(2)はより単純明快な目的志向性を有しており、案(2)を推進すべきとの結論にいたった。

4. 考察

[既存の方法を用いた膜厚測定]

現在、膜厚測定に使用可能な機器は存在しないが、工業用の非接触表面・層断面形状計測システム(光干渉方式初高精度表面形状計測)を利用して、膜厚測定を行った(図5)。

既存システムは、工業用で汎用的な用途に対応しており、高額で大型であり、手順が複雑である。これらの要素について、比較検討をおこない、開発システムに求められる要件を明らかにしていく。

5. 結語

本研究により、複数の膜厚コントロールシステム案の比較を行い、開発すべきシステムを考案し、既存システムとの比較において開発システムに求められる要件を明らかにすることができた。

謝辞

本研究は、日本大学学術研究助成金(社会実装研究)の助成をうけて行った。

文献

- 1) Lott RT, Sheppard J, Santiago E, et al. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. College of American Pathologists. 2018: 40-41
- 2) Masuda S, Suzuki R, Kitano Y, et al. Tissue Thickness Interferes With the Estimation of the Immunohistochemical Intensity: Introduction of a Control System for Managing Tissue Thickness. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2021; 29: 118-126

表1 膜厚コントロールのための二案についての比較検討

	膜厚コントロールシステム案(1)	膜厚測定案(2)
目的	標準物質を用いてコントロールするシステム	膜厚を測定する
課題	<ol style="list-style-type: none"> 1. 適切な標準物質を開発する。 2. 再現性の高い計量線システムを設定する。 3. 検体処理過程にどのように膜厚用標準物質を組み込むか。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 既存の測定機器で利用できるものはあるか。 2. 既存の測定機器と比較して、どのように優位性を持たせるか。

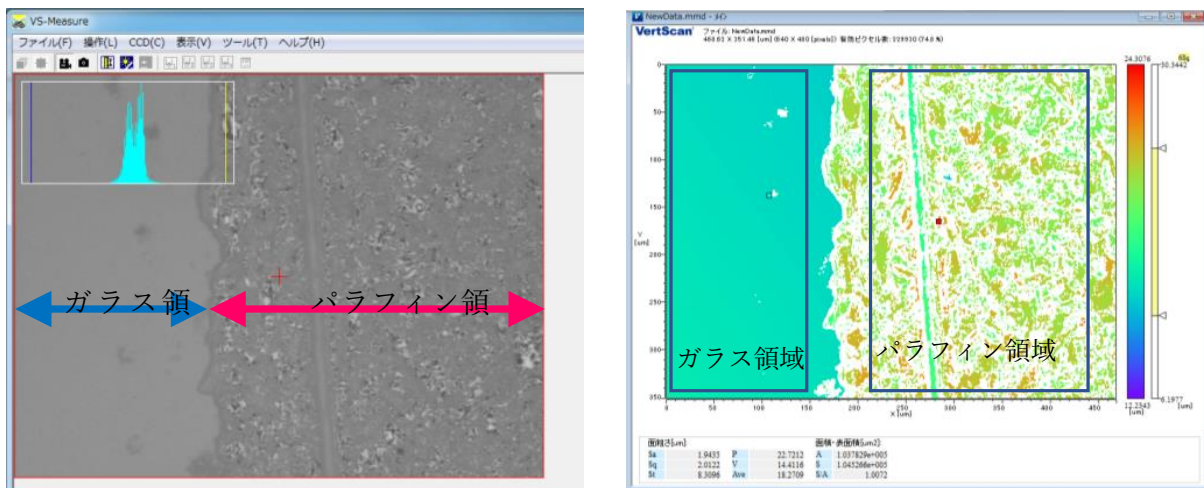


図5 非接触表面・層断面形状計測システムを用いた膜厚測定

脱分化脂肪細胞 (DFAT) 調製用天井培養フラスコと ゼノフリー培地の性能評価

松本太郎¹⁾, 副島一孝²⁾, 檜村 勉²⁾, 李予昕¹⁾,
風間智彦¹⁾, 萩倉一博¹⁾, 山元智衣¹⁾, 長岡悠紀¹⁾

Performance evaluation of ceiling culture flasks and xeno-free medium for the preparation of dedifferentiated fat (DFAT) cells

Taro MATSUMOTO¹⁾, Kazutaka SOEJIMA²⁾, Tsutomu KASHIMURA²⁾, Yuxin LI¹⁾,
Tomohiko KAZAMA¹⁾, Kazuhiro HAGIKURA¹⁾, Chii YAMAMOTO¹⁾, Yuki NAGAOKA¹⁾

要旨

脱分化脂肪細胞 (DFAT) は、成熟脂肪細胞を「天井培養」という方法で培養して作られる間葉系幹細胞 (MSC) に類似した多能性細胞である。DFATは少量の脂肪組織から均質な治療用細胞を大量に作ることができることから、実用性の高い再生医療の細胞源として期待できる。我々は、DFAT細胞治療を広く普及させるために、簡便・効率的にDFAT調製を可能とする「天井培養フラスコ」を開発した。またウシ胎仔血清 (FBS) 等の動物由来成分を含まず、DFATの調製を可能とする「ゼノフリー培地」の開発に成功した。本研究では、この「天井培養フラスコ」と「ゼノフリー培地」を用いて調製したDFATの形質や多分化能を検討した。その結果、これらの組み合わせで調製したDFATは、従来法に比べより簡便で高効率にDFATを調製できることが明らかになった。

1. はじめに

再生医療によく用いられる間葉系幹細胞 Mesenchymal stem cells (MSC) は患者自身の骨髓液や脂肪組織などから培養調製でき、未分化な状態で移植しても腫瘍形成せず安全性が高いため、多くの疾患に対して臨床応用が行われている。一方、MSCは患者の年齢や病状により細胞の品質にばらつきが生じやすく、均質性が低いといった問題点がある。また現在上市されているMSC製剤は保険償還価格が1,000万円を超え、非常に高額な治療となっている。MSCによる細胞治療を普及させるためには、簡便・安価に大量調製可能で、患者を選ばず均質で安定した性能を示すMSC製造技術の確立が望まれる。

Matsumotoら¹⁾は、成熟脂肪細胞を天井培養法という方法で培養することによって得られる細胞群 (脱分化脂肪細胞 Dedifferentiated fat cells: DFAT) が、MSCに類似した高い増殖能と多分化能を獲得

することを明らかにした。DFATは、①患者の年齢や基礎疾患に影響されず安定的に調製できる、②少量の脂肪組織サンプルから高効率に大量調製できる、③初代培養から均質な細胞が得られる、といった利点を有することから実用性の高い治療用細胞ソースとして有望であると考えられる。我々の研究グループでは、自施設内に設置された細胞加工施設 (CPF) においてアイソレータを用いた臨床グレードのDFAT製造法を確立し、2020年より重症下肢虚血患者を対象とした自家DFATを用いた血管再生細胞治療のFirst-in-Human臨床試験を実施中である。DFAT細胞治療を広く社会実装するためには、汎用性が高く、より安全、安価にDFATを調製する技術が求められる。既存のDFAT調製法には、①市販のT12.5フラスコを用いて天井培養を行うため、細胞播種等に高度な培養手技が必要、②DFATを誘導するために高濃度 (20%) のウシ胎仔血清 (FBS) を含

1) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野
2) 日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野
松本太郎: matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

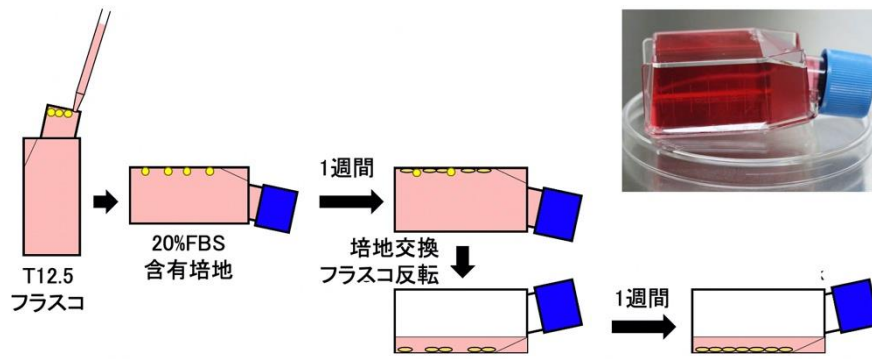


図1 既存のDFAT調製法の概略

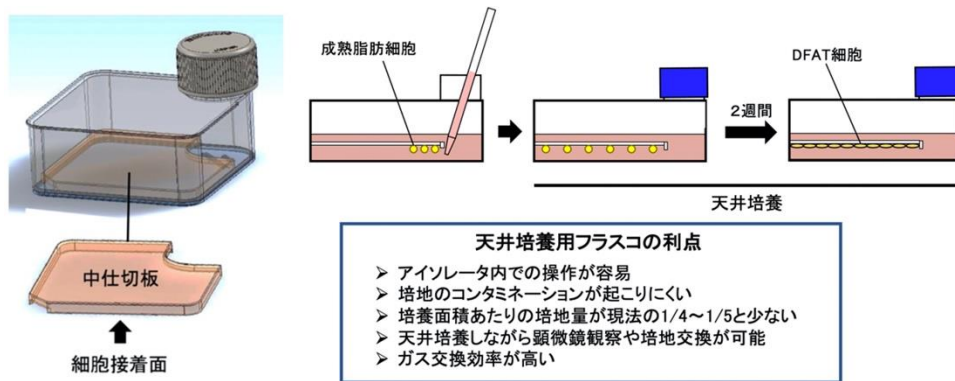


図2 天井培養フラスコの構造と利点

有した培地が必要、③最終製品が新鮮細胞懸濁液であるため、調製後24時間以内に移植しなくてはならない、といった問題点があった(図1)。

天井培養に用いるフラスコに関して、我々は、より簡便・効率的にDFAT調製を可能とする「天井培養フラスコ」を開発し、製品化した(図2, 国際特許取得:PCT/JP2016/082413)。

またDFAT調製用培地に関して、種々のFBSを使用しない培養条件を検討した結果、適切な濃度の血清代替物と基礎培地を組み合わせることにより、動物由来成分を含まず、生物由来原料基準に適合した「ゼノフリー培地」の開発に成功した(特許出願中)。本研究では、ヒト脂肪組織から「天井培養フラスコ」と「ゼノフリー培地」を用いて製造したDFATの特性解析や多分化能を検討した。

2. 対象及び方法

研究は、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て実施した(承認番号:

RK-160209-6)。ヒト脂肪組織は43歳女性から同意取得後、外科手術時に廃棄される脂肪組織の提供を受け実験に使用した。実験プロトコルの概要を図3に示す。

脂肪組織2mLをコラゲナーゼ(Liberase MNP-S GMP grade, Roche)にて37℃, 30分間処理後、セルストレーナーを用いて未消化組織を濾過した。その後、低速度遠心分離(135×g, 1分間)を行い、成熟脂肪細胞を浮遊層として単離した。天井培養フラスコに浮遊層100μL(成熟脂肪細胞 2×10^5 cells)を播種し、天井培養を行った。培養条件として、従来法である①20% FBS含有CSTI303-MS C培地(細胞科学研究所)、または新たに開発した②FBS不含有ゼノフリー培地を用いて、インキュベータ内(37℃, 5% CO₂)で培養した。天井培養7日後に培地交換を行い、14日後にPBSで2回洗浄後、細胞剥離液TrypLE™ Select Enzyme(Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞を剥離し、T-75フラスコに 1×10^6 cells/dishで播種し継代培養を行った。細胞形態

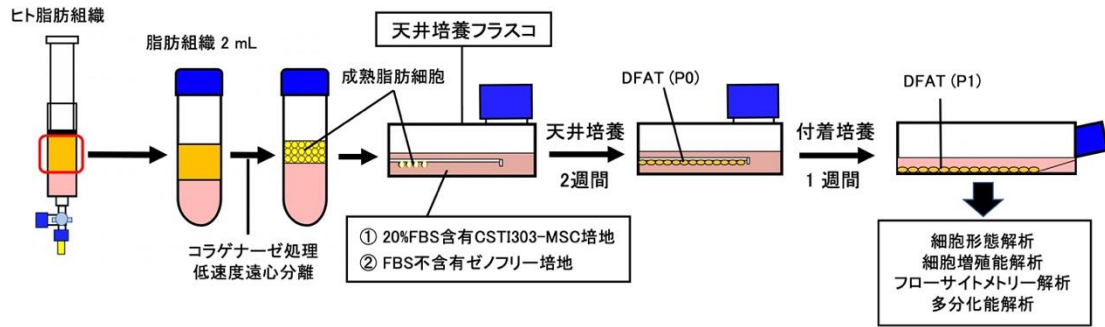


図3 実験プロトコール

の変化は経時的に位相差顕微鏡にて写真撮影を行った。

フローサイトメトリー解析は、第2継代細胞を用いて既報²⁾に従い実施した。抗体はPE標識抗ヒトCD73, CD90, CD105, CD31, CD45, HLA-DR抗体 (BD Biosciences) を用いた。死細胞を検出するため7-Aminoactinomycin D (7AAD, BD Biosciences) を各サンプルに添加した。細胞表面抗原の測定は、FACSAria™フローサイトメーター (Becton Dickinson) を使用し、フォワードスキャッター (FSC) およびサイドスキャッター (SSC) をゲーティング後、7AAD陰性分画をゲーティングし、生細胞のみを解析した。解析はFlowJoソフトウェア (FlowJo, LLC) を用いて行った。アイソタイプコントロールの蛍光強度とサンプルの蛍光強度を比較し、ヒストグラムを作成した。

脂肪、骨分化能の解析は、第2継代細胞を用いて既報²⁾に従い実施した。脂肪分化誘導は、細胞を24ウェルプレートに 6×10^4 cells/wellで播種し、脂肪分化誘導培地 (Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation medium 2, Promo Cell) で培養した。14日後に4%パラホルムアルデヒドで固定後、60% Oil red O染色液 (Sigma Aldrich) を室温で20分間反応させた。超純水で3回洗浄後、光学顕微鏡下に写真撮影を行った。骨分化誘導は、細胞を24ウェルプレートに 6×10^4 cells/wellで播種し、骨分化誘導培地 (Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation medium, Promo Cell) で培養した。14日後に4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.16% naphtol AS-TR phosphate (Sigma-Aldrich), 0.8% Fast Blue BB (Wako) を37°C, 1時間反応させ、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色を行った。また他のウェルでは、

1% Alizarin red S染色液 (Sigma Aldrich) を室温で3分間反応させ細胞のカルシウム沈着を可視化した。超純水で3回洗浄後、光学顕微鏡下に写真撮影を行った。

3. 結果

最初に天井培養フラスコとFBS不含有ゼノフリー培地を用いて、ヒト脂肪細胞の天井培養を行い、従来法と同様にDFATを誘導できるか検討した。細胞の形態変化を図4に示す。その結果、20% FBS含有培地、ゼノフリー培地ともに、天井培養4日後より紡錘型の脂肪滴を持たないDFATの出現が認められた。天井培養7日後には、DFATのコロニー形成がフラスコの各所に認められた。天井培養14日後には、両培養条件共にほぼコンフルエントに到達するまで増殖した。また継代培養後も両培養条件共に良好に増殖する所見が認められた。細胞の増殖速度は、20% FBS含有培地に比べゼノフリー培地で高い傾向にあった。また細胞形態は、20% FBS含有培地に比べゼノフリー培地でより小型で細長い形態を示した。天井培養フラスコで天井培養14日後に得られたDFATの細胞数は 2×10^7 cells/flaskであった。以上の結果より、天井培養フラスコとFBS不含有ゼノフリー培地を用いることにより、既存の方法に比べても良好な効率でDFATを調製できることが明らかになった。

次に上記培養条件で調製したDFATのフローサイトメトリーによる細胞表面抗原解析を行った。MSCマーカーおよびMSC陰性マーカーの発現プロファイルを図5に示す。20% FBS含有培地、ゼノフリー培地ともに、MSCマーカーであるCD73, CD90, CD105は90%以上陽性であり、MSC陰性マーカー

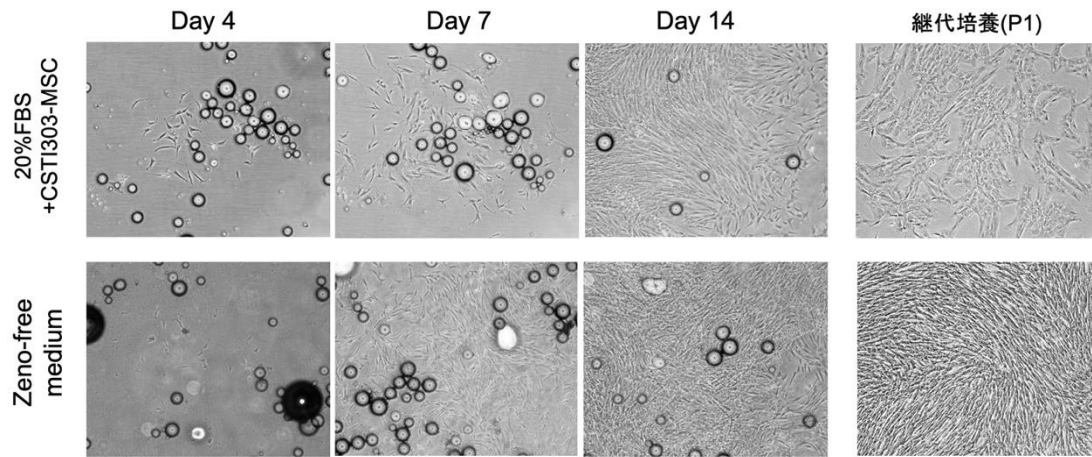


図 4 成熟脂肪細胞の天井培養および継代培養による形態変化

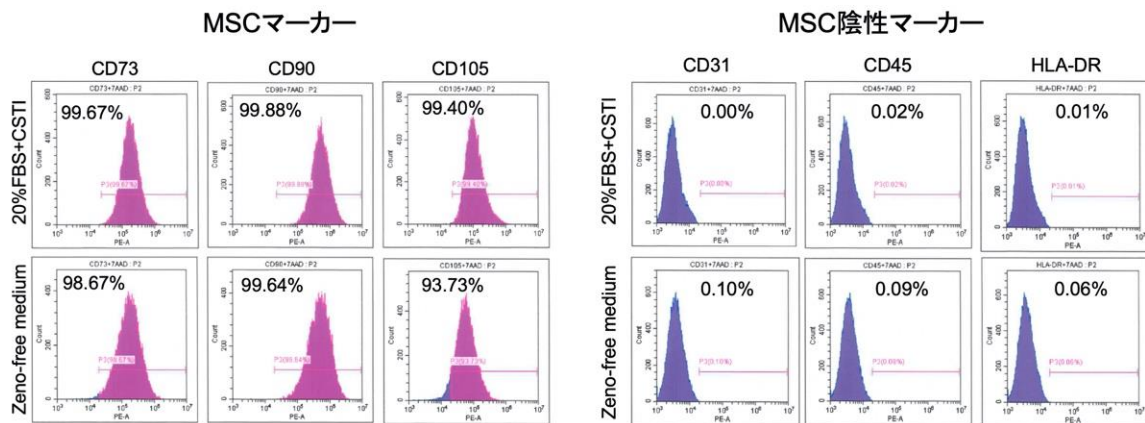


図 5 DFATのMSC陽性・陰性マーカーの発現プロファイル

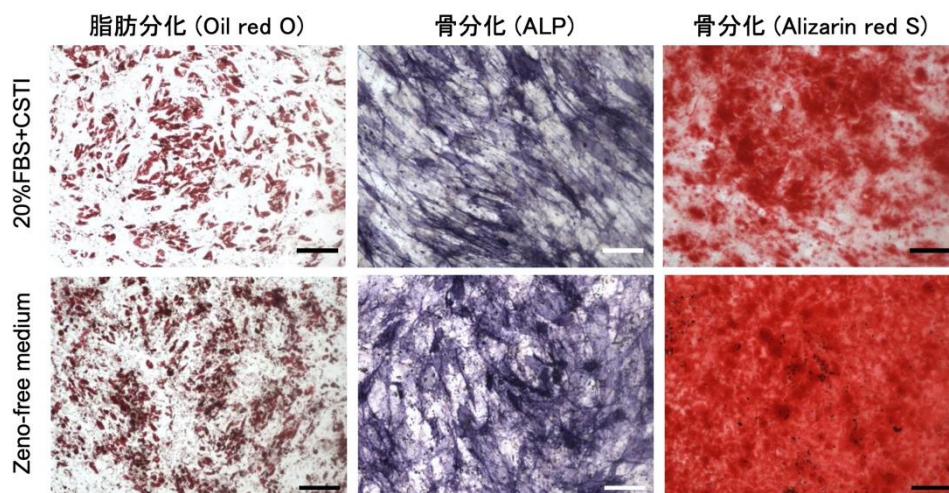


図 6 DFATの多分化能解析 (Scale bars: 200 μm)

であるCD31, CD45, HLA-DRの陽性率は0.1%以下であった。以上の結果より、FBS不含有ゼノフリー培地を用いた調製法でも、既存の方法と同等の均質性が高いMSCの形質を示すDFATが調製されることが示された。

次に上記培養条件で調製したDFATの多分化能解析を行った。結果を図6に示す。脂肪分化誘導14日後のOil red O染色像では、20% FBS含有培地、ゼノフリー培地ともに、Oil red O陽性の脂肪滴を有する脂肪細胞の出現が多数認められた。Oil red O陽性細胞の出現頻度は、20% FBS含有培地に比べゼノフリー培地で高い傾向にあった。

骨分化誘導14日後のALP染色像では、20% FBS含有培地、ゼノフリー培地ともに、大部分の細胞がALP陽性を示した。またAlizarin red S染色像でも同様に、両培地ともに大部分の細胞がAlizarin red S陽性を示し、カルシウム沈着した骨芽細胞への分化を示した。ALP陽性細胞、Alizarin red S陽性細胞の出現頻度は、20% FBS含有培地に比べゼノフリー培地で高い傾向にあった。以上の結果よりFBS不含有ゼノフリー培地を用いた調製法では、既存の方法と同等またはそれ以上の効率で多分化能を有するDFATが調製されることが明らかになった。

4. 考 察

本研究では高効率で簡便に臨床グレードDFATを製造するために開発した「脱分化培養フラスコ」と「ゼノフリー培地」を用いて、実際に多分化能を有するDFATが調製できるか検討した。その結果、このフラスコと培地の組み合わせにより、従来法に比べてより高効率に均質で多分化能を有するDFATを調製できることが明らかになった。DFATの誘導効率については、天井培養フラスコを用いることによ

り、播種細胞濃度 2×10^5 cells/flaskの脂肪細胞から2週間の培養で 2×10^7 cells/flaskのDFATが調製可能であった。これは従来法のT12.5フラスコを用いた調製法に比べ、約5倍高い調製効率であった。天井培養フラスコを用いることにより調製効率が高まった理由として、従来法に比べ気相が十分に確保できるためガス交換効率が高くなったこと、またDFATが増殖できるスペースが、フラスコ中仕切り板の天井面のみならず、フラスコ底面にも拡大したことなどが考えられた。従来の20% FBS含有培地と新たに開発したゼノフリー培地との比較では、両者ともMSCの最小基準³⁾を満たす細胞表面抗原プロファイルと多分化能を示すことが確認された。さらにDFATの増殖能や骨、脂肪への分化能は、20% FBS含有培地に比べゼノフリー培地で高くなる傾向が認められた。これはゼノフリー培地に含まれる血清代替物の生物学的活性がよりDFATの増殖能や多分化能に適したものである可能性が示唆された。今後、血清代替物の至適濃度を決定することにより、よりコストパフォーマンスに優れた製造法が確定すると思われる。現在開発を進めている治験用製品の製造工程を図7に示す。

今回性能評価を行った結果、天井培養フラスコやゼノフリー培地の使用により、脂肪組織5mLから約3週間の培養期間(第1継代細胞)で 5×10^8 cellsのDFATが調製できると試算される。今後より汎用性を高めるために、天井培養フラスコやゼノフリー培地に加え、最終製品梱包用の細胞凍結バッグや脂肪細胞単離用チューブなどを構成パーツとする「DFAT調製キット」を完成させる予定である。このキットの使用により一定の品質のDFATを多くの細胞加工施設で製造することが可能となり、また最終製品を複数バッグからなる凍結製品とすることに

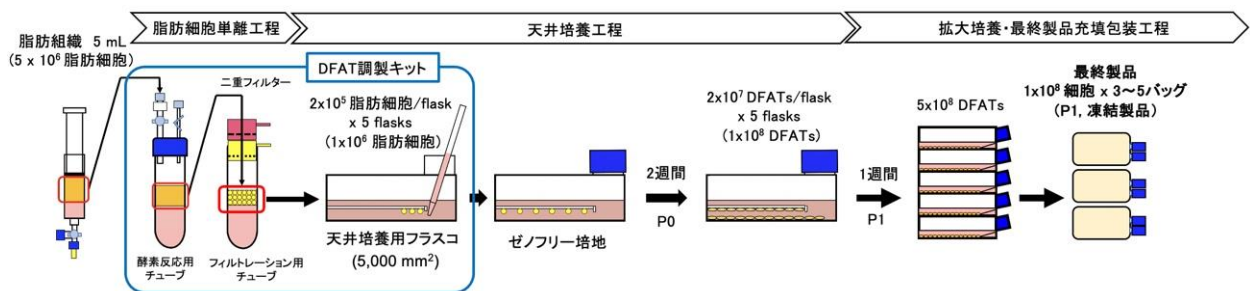


図7 治験用DFATの製造工程

より、長期間保存ができ複数回投与にも対応できるようになる予定である。

5. 結 語

本研究では治験用DFATを製造するために開発した「脱分化培養フラスコ」と「ゼノフリー培地」を用いて、実際に多分化能を有するDFATが調製できるか検討した。その結果、これらの組み合わせで調製したDFATは、従来法に比べより簡便で高効率にDFATを調製できることが明らかになった。このような製造法の改良により、汎用性や安全性が高く、安定した品質が担保された自家DFAT細胞医薬品の開発につながることを期待される。

謝 辞

本研究は令和3年度日本大学学術研究助成金（社会実装研究）を受けて行われたものであり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008; 215 (1) : 210-222.
- 2) Tanimoto K, Matsumoto T, Nagaoka Y, et al. Phenotypic and functional properties of dedifferentiated fat cells derived from infrapatellar fat pad. *Regen Ther.* 2022; 19: 35-46.
- 3) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8 (4) : 315-317.

固形癌に有効なキメラ抗原受容体遺伝子導入 (CAR)-T細胞療法の開発

加藤侑希¹⁾, 池田俊勝¹⁾, 加藤果野子²⁾, 杉 俊洸²⁾, 川名 敬²⁾, 平井宗一¹⁾

Development of novel chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy for solid tumors

Yuki KATO¹⁾, Toshikatsu IKEDA¹⁾, Kanoko KATO²⁾,
Toshihiro SUGI²⁾, Kei KAWANA²⁾, Shuichi HIRAI¹⁾

要旨

近年、免疫療法が悪性腫瘍に対する新たな治療法として注目されている。中でも特に、CAR-T細胞療法は、造血器腫瘍で8割以上の奏効率という優れた臨床効果を示し、固形癌への適応が期待されている。しかし固形癌では、腫瘍微小環境中の免疫抑制克服法が開発されていない、腫瘍特異的な標的抗原が見つかっていない、という2つの大きな課題が障壁となって未だに十分な臨床効果が得られていない。本研究では、著者らがこれまでの研究で同定した、免疫抑制分子Xおよび、標的抗原分子Yを標的とした治療の可能性を検討した。その結果、分子X阻害剤および抗分子Y-CAR-T細胞の併用により、固形癌に有効なCAR-T細胞療法が開発できる可能性が示された。

1. はじめに

固形癌では、前述の大きな課題が障壁となって未だに十分な臨床効果が得られていない。本研究では、著者らが独自に同定した分子を標的として¹⁾、これら課題に取り組み、固形癌に有効な新たなCAR-T細胞療法の開発を目指した。

2. 対象及び方法

まずは、抗分子Y-CAR-T細胞作製時の培養法の最適化を行った。具体的には、高いCAR遺伝子導入効率を得るために、様々なT細胞刺激試薬および導入時期を比較検討し、培養条件を確立した。次に、免疫抑制分子X阻害剤が抗分子Y-CAR-T細胞の抗腫瘍効果を増強するかin vitroで検証した。最後に、担癌マウスモデルにおいて、分子X阻害剤と抗分子Y-CAR-T細胞の併用効果を評価した。

3. 結果

まず、4種類のT細胞刺激試薬(抗CD3抗体, Concanavalin A, PMA, Ionomycin) および2種類の種類の導入時期(刺激後24h, 或いは48h)を比較検討し、これまでより安定して高効率にCAR遺伝子をT細胞に導入できるようになった。次に、分子X阻害剤が抗分子Y-CAR-T細胞の機能を増強するかをin vitroで評価した。その結果、細胞増殖能、細胞傷害性サイトカイン産生能および、がん殺傷能力を増強することを明らかとした。加えて、担癌マウスを、分子X阻害剤および抗分子Y-CAR-T細胞で治療すると、完全寛解を伴う著明な治療効果が認められた(図1)。

1) 日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野
2) 日本大学医学部産婦人科学系産婦人科学分野
加藤侑希 : kato.yuki@nihon-u.ac.jp

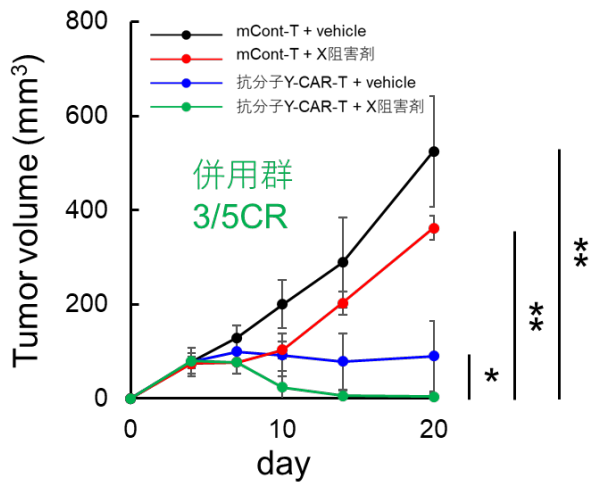


図1 担癌マウスを、X阻害剤、或いは、抗分子Y-CAR-T細胞で治療した。腫瘍体積の推移を示す。併用群では、完全寛解を伴う (3/5CR)、著明な抗腫瘍効果が確認された。

4. 考察・結語

本研究結果により、免疫抑制分子Xおよび、新たな標的抗原Yを標的とすることで、固形癌に有効なCAR-T細胞が開発できる可能性が示された。今後、単剤あるいは両剤併用による安全性の検証を行い、実臨床への応用の可能性を模索する予定である。

謝辞

本研究は、令和3年度 日本大学医学部 創立50周年記念研究奨励金 (共同研究) の支援を受けたものである。

文献

- 1) Kato D, Yaguchi T, Iwata T, et al. GPC1 specific CAR-T cells eradicate established solid tumor without adverse effects and synergize with anti-PD-1 Ab. eLife. 2020; 31; 9:e49392.

羊膜上皮細胞における細胞間ミトコンドリア 輸送イメージングと新たな培養条件の開発

高野智圭^{1,2)}, 生田 稜¹⁾, 林田真吾²⁾, 太向 勇³⁾, 加賀三鈴³⁾,
金丸和典³⁾, 小川えりか²⁾, 三木 敏生³⁾, 早川 智¹⁾

Visualization of intercellular mitochondrial transfer in human amniotic epithelial cells and development of new conditioned medium

Chika TAKANO^{1,2)}, Ryo IKUTA¹⁾, Shingo HAYASHIDA²⁾, Isamu TAIKO³⁾, Millei KAGA³⁾,
Kazunori KANEMARU³⁾, Erika OGAWA²⁾, Toshio MIKI³⁾, Satoshi HAYAKAWA¹⁾

要旨

多様な細胞間コミュニケーションのひとつとして、近年では細胞膜ナノチューブを介したミトコンドリア輸送という現象が知られているが、これを観察するにはミトコンドリアの可視化が必須である。本研究では胎盤由来幹細胞のひとつである羊膜上皮細胞を用いて、ミトコンドリアに赤色蛍光蛋白を発現する不死化細胞株を樹立した。この細胞を使って、共焦点顕微鏡による細胞間ミトコンドリア輸送のライブイメージング解析法、およびフローサイトメトリーによるミトコンドリア輸送の定量解析法を確立した。さらにはミトコンドリア機能障害、もしくは機能改善を及ぼす細胞培養条件の検討も行った。本研究で得られた成果をもとに、細胞間ミトコンドリア輸送に関わる分子機序の解明を目指す。

1. はじめに

ミトコンドリア病は未だ根本的治療が存在しない難治性疾患である¹⁾。新規治療法の開発として、機能不全に陥ったミトコンドリアを回復させる薬剤の他、健康細胞から抽出したミトコンドリアを病的細胞に直接あるいはナノカプセルを介して注入する等、様々な手法を用いた取り組みがなされている。細胞内小器官であるミトコンドリアを抽出し、その機能を保持したまま病的細胞に到達させることは容易ではないが、以前より細胞には細胞膜ナノチューブという細長い管を介してミトコンドリアを細胞間で直接受け渡す現象が観察されている^{2,3)}。もしもこの現象を制御でき、健康細胞(ドナー)が病的細胞(レシピエント)にミトコンドリアを輸送することでレシピエントのミトコンドリア機能を補うことが出来るとすれば、画期的な治療法の開発に繋がる可能性がある。

我々はこれまで、再生医療の新たなソースとして胎盤由来幹細胞のひとつであるヒト羊膜上皮細胞(amniotic epithelial cells: AEC)について研究してきた^{4,5)}。その中でAECが活発に細胞膜ナノチューブを伸ばし、近隣の細胞とコミュニケーションを取る現象をしばしば観察した。さらに前臨床研究として尿素サイクル異常症の疾患マウスを用いた検討では、原疾患により失われていた肝ミトコンドリア特異的な酵素活性が、AECの肝移植によって部分的に回復することを観察した。以上のことから、AECも自らが持つ健康なミトコンドリアを周囲のミトコンドリア機能が失われた細胞に輸送する能力を持つのではないかと考えた。

上記を検証するには、ミトコンドリアの時空間動態解析技術が必要である。そのためのツールとして、本研究では不死化AEC株(iAEC)にミトコンドリアを標識する蛍光蛋白を遺伝子導入し、AECの

1) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分

2) 日本大学医学部小児科学系小児科学分

3) 日本大学医学部生体機能医学系生理学分野

高野 智圭 : takano.chika@nihon-u.ac.jp

ミトコンドリア輸送を捉えるライブイメージング解析と、フローサイトメトリーによる定量解析を確立することを目的とした。さらにこれらの細胞を用いてミトコンドリア機能に影響を与える培養条件の検討を行った。ミトコンドリアに酸化ストレスによる障害を来たす過酸化水素⁶⁾、およびミトコンドリア機能を高める添加剤としては近年の実臨床で注目されている5-アミノレブリン酸⁷⁾を用いて、これらが*in vitro*でAECのミトコンドリアに与える影響を検討した。

2. 対象及び方法

不死化AEC株 (iAEC) にレンチウイルスで興味遺伝子を導入し、ミトコンドリアを5種類の赤色蛍光蛋白でそれぞれ標識した細胞株 (mito-RFP / iAEC) を樹立し、共培養実験における「ドナー細胞」とした。さらに細胞質を緑色蛍光蛋白で標識したヒト胎児腎細胞株 (cyto-GFP/HEK293) を作成し「レシピエント細胞」として共培養に使用した。細胞間ミトコンドリア輸送はプリズム分光型共焦点レーザー顕微鏡システム (Leica TCS SP8) を用いて観察した。ドナー細胞のミトコンドリアがレシピエント

細胞に輸送されると蛍光色素がひとつの細胞で共陽性になることを利用し、フローサイトメーター (BD FACS Aria) を用いてミトコンドリア輸送が起きた細胞集団の割合を定量解析した。さらにHEK293は過酸化水素を添加した培養液、iAECは5-アミノレブリン酸を添加した培養液を用いて、培養条件検討を行った。細胞の増殖能やミトコンドリアの膜電位、核DNAに対する相対的ミトコンドリアDNA量等の解析を用いて評価した。

3. 結果

はじめに、様々な赤色蛍光蛋白をミトコンドリアに発現させたiAECについて比較検討実験を行い、ミトコンドリアを可視化するのに最も適した蛍光蛋白を選出した。次にmito-RFP / iAECとcyto-GFP/HEK293を共培養し、共焦点顕微鏡を用いて細胞間に形成されたナノチューブとその内部に存在するミトコンドリア (図1矢印) を観察するライブイメージング系を確立した。上記結果は、英文学術雑誌に投稿中である。

フローサイトメトリーでは、レシピエント細胞 (mito-RFP / iAEC) 単独は図2A, ドナー細胞 (cyto-

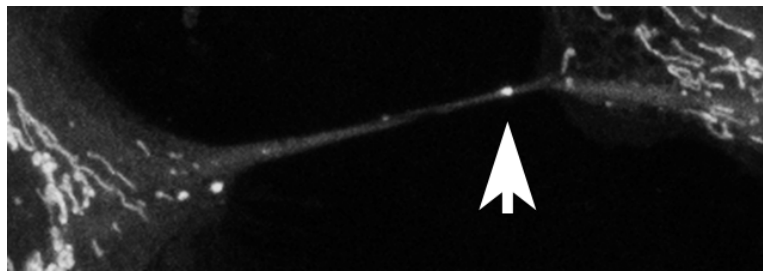


図1 ナノチューブの内部に存在するミトコンドリア

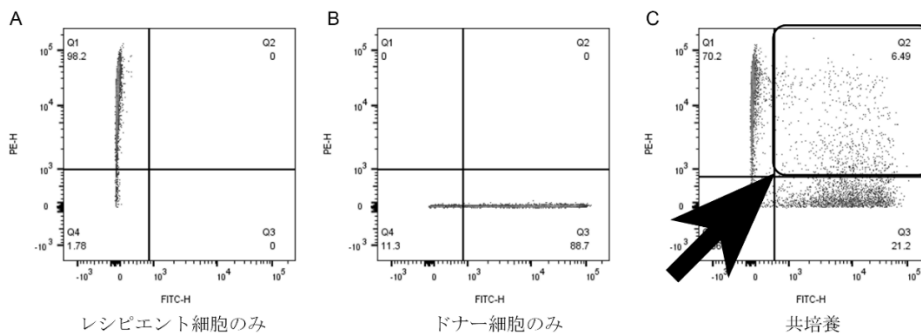


図2 フローサイトメーターによる解析

GFP/HEK293) 単独は図2Bのように検出されるが、共培養した細胞を解析すると図2C矢印部分のように、蛍光蛋白が共陽性となる細胞集団を観察することが出来た。観察に適した条件検討を繰り返し、評価系を確立した。

過酸化水素および5-アミノレブリン酸を用いた培養条件検討の結果は、学術論文に投稿予定である。

4. 考 察

本研究では胎盤由来幹細胞のひとつであるAECを用いて、細胞間ミトコンドリア輸送の評価系を確立することが出来た。プリズム分光型共焦点レーザー顕微鏡システムでは、高画質なイメージを3D構築することが可能であり、注目したミトコンドリアの位置を詳細に解析することが可能である。さらに生細胞のまま観察すること出来るため、タイムラプス機能を用い、細胞が細胞間ナノチューブを形成する様子、さらにその内部に存在するミトコンドリアをライブで評価することが可能となった。フローサイトメトリーでは、用いる抗体によって偽陰性が生じやすく、頻用されるMitoTracker®プローブは生細胞のミトコンドリアを電位に依存して標識することには極めて有用だが、共培養実験に使用するとプローブの伝播が起こるため、偽陽性が生じてしまう。本研究ではドナー細胞とレシピエント細胞のミトコンドリアを確実に識別することが必要であったため、遺伝子導入の手法を用いた。初代AECを用いることが出来ない点が研究の限界であるが、ミトコンドリアへの導入効率や発色の良い標識蛋白を選出出来たことは、今後多くの関連研究に役立つものと考えられる。

本研究に続く展望として、ミトコンドリア機能の高いドナー細胞とミトコンドリア障害を与えたレシピエント細胞を共培養することで、AECにおける細胞間ミトコンドリア輸送の詳細なメカニズムを追求したい。細胞間ナノチューブを介したミトコンドリア輸送が、細胞間の距離によって規定されるコミュニケーションではなく、ミトコンドリアの状態を反映した救済の目的で行われるコミュニケーションであるとすれば、これに関与する分子機序を解明することはミトコンドリア病の治療開発にも新たな可能性をもたらすと考えられる。

5. 結 語

細胞間ミトコンドリア輸送の時空間動態解析、および定量解析系の確立を、AECによるトランスレーションリサーチ、さらにはミトコンドリア病の新規治療開発に繋げたい。ミトコンドリア障害はミトコンドリア病のみならず、多様な疾患への関与が知られており、本研究の成果は医学部内連携のさらなる拡充と活性化にも貢献するものと期待される。

謝辞

本研究についてお力添えを頂きました日本大学学術研究助成に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Ng Y.S, Turnbull D.M. Mitochondrial disease: genetics and management. *J Neurol.* 2016; 263 (1) : 179-91.
- 2) Rustom A, et al. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science.* 2004; 303 (5660) : 1007-10.
- 3) Murray L.M.A, Krasnodembkaya A.D. Concise Review: Intercellular Communication Via Organelle Transfer in the Biology and Therapeutic Applications of Stem Cells. *Stem Cells.* 2019; 37 (1) : 14-25.
- 4) Miki T, et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells.* 2005; 23 (10) : 1549-59.
- 5) Takano C, et al. Clinical perspective on the use of human amniotic epithelial cells to treat congenital metabolic diseases with a focus on maple syrup urine disease. *Stem Cells Transl Med.* 2021; 10 (6) : 829-835.
- 6) Neustadt J., Pieczenik S.R. Medication-induced mitochondrial damage and disease. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52 (7) : 780-8.
- 7) Shimura M, et al. Effects of 5-aminolevulinic acid and sodium ferrous citrate on fibroblasts from individuals with mitochondrial diseases. *Sci Rep.* 2019; 9 (1) : 10549.

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, 西山博孝, 羽尾裕之, 原 弘之,
深谷 親, 森岡一朗
幹事 井上広一, 葛西玲広, 正田雅之, 藤田順一

(50音順)

Editorial Board

Editor-in-Chief Makoto MAKISHIMA
Associate Editors Yukimoto ISHII, Hirotaka NISHIYAMA, Hiroyuki HAO,
Hiroyuki HARA, Chikashi FUKAYA, Ichiro MORIOKA
Managing Editors Koichi INOUE, Reo KASAI, Masayuki SHODA, Jun-ichi FUJITA

発行者 日本大学医学部総合医学研究所長 槇島 誠
発行所 日本大学医学部
〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1 TEL.03-3972-8111
Publisher Makoto MAKISHIMA
Director, Research Institute of Medical Science,
Nihon University School of Medicine
30-1, Ohyaguchi-kamicho, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610 JAPAN
Phone +81-3-3972-8111
