

第10回 川崎医科大学 学術集会

日時：令和元年8月3日（土）10:30～15:30

会場：校舎棟 M-800 講義室（口頭発表）

7・8階学生・教職員ラウンジ（ポスター発表）

口頭発表 9題

ポスター発表 125題

川崎医科大学 115題

川崎医療福祉大学 4題、岡山県立大学 2題、福山大学 4題

開会の挨拶	10:30～
学長 福永 仁夫 川崎医学会 運営委員長 大槻 剛巳	
セッション1：	10:35～
特別推進研究・研究ブランディング事業（1題） 中央研究センター（RIエッセ）（1題）	
セッション2：（3題）	11:02～
昼休憩／川崎医学会総会・受賞講演（1題）	11:40～
ポスターセッション1：（Coffee Break）	12:40～
セッション3：（4題）	13:10～
ポスターセッション2：（Coffee Break）	14:00～
川崎医学会受賞講演（2題）・意見交換会	14:30～
表彰式	15:15～
閉会の挨拶	
学長補佐 石原 克彦	

第10回 川崎医科大学 学術集会 プログラム

セッション1 (2題) 座長：曾根 照喜・紅林淳一

	課題番号	時間	研究課題	研究代表者
1	30 特ブ-001	10:35-10:50	フレイルを予防し健康寿命を延伸する地域医療システム「倉敷モデル」の確立	高尾 俊弘

		時間	発表題名	発表代表者
1		10:50-11:02	RI ユニットにおける研究支援	赤木 和美

セッション2 (3題) 座長：上村史朗・瀧川 奈義夫

	課題番号	時間	研究課題	研究代表者
1	30 基-016	11:02-11:14	「軟らかい」核による心筋再生メカニズムの解明	橋本 謙
2	30 基-072	11:14-11:26	ゲノム編集による <i>Ad4BP/SF-1</i> 遺伝子の組織特異的機能の解明	嶋 雄一
3	30 基-069	11:26-11:38	血管内皮 PDK1 の糖代謝及び膵β細胞に及ぼす病態生理学的役割の解明	小畑 淳史

昼休憩 11:40-12:40 60分 川崎医学会総会・受賞講演 (1題)

ポスターセッション1 (67題) 12:40-13:10 30分

	課題番号	時間	研究課題	研究代表者
— 神経・運動器・生殖・循環 —				
P1	30 基-080	12:40-13:10	中枢神経系 GABA ニューロンの遠心性投射による嗅覚系神経回路調節	樋田 一徳
P3	30 ス-004	12:40-13:10	嗅球顆粒細胞層 GABA ニューロンの免疫組織化学的解析による分類	佐藤 慧太
P5	30 基-079	12:40-13:10	扁桃体から前梨状皮質への軸索投射様式：ウイルスベクターと逆行性トレーサーを用いた形態学的解析	中村 悠
P7	30 基-024	12:40-13:10	ヒト iPS-RPE 移植に資する 2 光子励起顕微鏡による移植細胞の動態観察	冨田 晃生
P9	30 基-056	12:40-13:10	Voxel-Based Specific Regional System for Alzheimer's Disease(VSRAD) を用いた全脳照射後の脳萎縮の定量評価	釋舎 竜司

	課題番号	時 間	研究課題	研究代表者
P11	30 基-044	12:40-13:10	家族性アミロイドポリニューロパチーTTR E61K の神経変性機序の研究	村上 龍文
P13	30 基-025	12:40-13:10	新規アデノシンアナログ COA-CI の脊髄損傷に対する治療効果とその作用機序－動物モデルを使った研究	宮本 修
P15	30 基-041	12:40-13:10	筋弾性蛋白質コネクチンを介した心臓調節機構の基礎研究	花島 章
P17	29 若-003	12:40-13:10	早産、感染における大脳皮質発生に関する解析	石田 剛
－ 消化器・代謝・腎 －				
P19	30 基-040	12:40-13:10	膀胱移行上皮細胞をモデルとしたフィトセラミド構造の機能解析	松田 純子
P21	30 基-028	12:40-13:10	スフィンゴ糖脂質代謝異常症の病態発症分子機構の解明＝スフィンゴ糖脂質代謝産物の細胞内動態解析技術の開発＝	郷 慎司
P23	30 基-061	12:40-13:10	バレット食道におけるバレット腺癌リスクマーカーの検討	村尾 高久
P25	30 基-013	12:40-13:10	過敏性腸症候群の病態と腸内微生物との関連に関する検討	塩谷 昭子
P27	30 基-077	12:40-13:10	コルチゾール合成・代謝・作用機構についての研究 －血中ステロイド分画同時測定による評価－	宗 友厚
P29	30 若－ 004	12:40-13:10	SGLT2 阻害薬投与に伴うエネルギー恒常性維持生体反応 ＝腎・消化管関連の解明＝	下田 将司
P31	30 基-049	12:40-13:10	機能的 MR imaging による早期糖尿病性腎症の画像的評価	山本 亮
P33	30 基-058	12:40-13:10	糸球体内皮細胞-上皮細胞連関におけるインフラマソーム活性化制御機構の解明	長洲 一
P35	30 基-062	12:40-13:10	SGLT2 阻害薬による急性期腎循環動態変化の解析	城所 研吾
P37	30 基-060	12:40-13:10	内皮機能障害による腎間質線維化の分子機序の解明	角谷 裕之
P39	30 基-032	12:40-13:10	尿路生殖器領域における難治性慢性炎症性疾患に対する創薬研究－慢性前立腺炎に対する indoleamine 2,3-dioxygenase(IDO)阻害による炎症抑制効果の検討－	大平 伸

	課題番号	時間	研究課題	研究代表者
— 腫瘍 —				
P41	30 基-048	12:40-13:10	肺扁平上皮癌における腫瘍存在位置による微小免疫腫瘍環境の検討	清水 克彦
P43	30 基-007	12:40-13:10	MRI-US 融合画像ガイド下前立腺標的生検を用いた前立腺癌の治療前悪性度評価法の確立	玉田 勉
P45	30 基-026	12:40-13:10	乳癌の再発・転移巣で出現する付加的遺伝子変異の解明	鹿股 直樹
P47	30 基-009	12:40-13:10	骨髄増殖性腫瘍における病因遺伝子変異解析と病態の解明	近藤 敏範
P49	30 基-019	12:40-13:10	骨髄増殖性腫瘍の遺伝子解析と新規治療薬候補の探索	北中 明
P51	30 基-066	12:40-13:10	遺伝子改変発癌マウスを用いた癌浸潤を制御する自然免疫（マクロファージ）の機能調節機構の解析	中村 隆文
P53	30 基-001	12:40-13:10	細胞癌標的治療薬としての DPP-4 阻害剤の分子生物学的解析	仁科 惣治
P55	30 基-065	12:40-13:10	悪性中皮腫に対する ROR1 阻害と殺細胞性抗がん薬の併用に関する基礎研究	瀧川 奈義夫
P57	30 基-094	12:40-13:10	抗がん化学療法での消化管粘膜障害に対するアミノレブリン酸による保護効果の可能性	高岡 宗徳
— 環境と生体反応 —				
P59	29 若-005	12:40-13:10	社会性昆虫クロオオアリにおける概日時計による社会的同調機構の解析	守山 禎之
P61	30 基-097	12:40-13:10	風邪診療の質指標の開発	桑原 篤憲
P63	30 基-035	12:40-13:10	分子シャペロンネットワーク制御による新規ウイルス増殖抑制法の開発	齊藤 峰輝
P65	30 基-042	12:40-13:10	感染行動のプロファイリングによるインフルエンザウイルスのヒトへの感染性獲得機構の解明	堺 立也
P67	30 基-071	12:40-13:10	自己免疫性水疱症における免疫再構築症候群のバイオマーカー探索	林 宏明
P69	30 基-064	12:40-13:10	エクソソームを用いた中皮腫早期診断系の確立	李 順姫
P71	30 基-076	12:40-13:10	ナノシート化合物の毒性影響およびオートファジー遺伝子との関連	西村 泰光

	課題番号	時間	研究課題	研究代表者
P73	30 基-074	12:40-13:10	覚せい剤の投与経路による血液・胃内薬物濃度比に関する研究	吉留 敬
P75	30 ス-002	12:40-13:10	アレルギー性鼻炎における嗅覚障害の発生メカニズム	濱本 真一
P77	30 若-001	12:40-13:10	好酸球欠損マウスを用いた低酸素条件下における好酸球の機能解析	雑賀 太郎
P79	30 基-082	12:40-13:10	BST-1/CD157 による B 細胞の新しい増殖／生存制御機構の解明	井関 将典
P81	30 基-053	12:40-13:10	TNF 受容体関連周期性症候群 (TRAPS) 新規遺伝子変異の炎症惹起・遷延化メカニズムの解明	平野 紘康
P83	30 基-052	12:40-13:10	マイオスタチン阻害によるマウス骨粗鬆症・筋萎縮に及ぼす影響の検討	向井 知之
— 新分子・新技術 —				
P85	30 基-083	12:40-13:10	新しい術中自己濃厚血小板浮遊液採取方法確立に関する臨床研究	種本 和雄
P87	30 基-088	12:40-13:10	脾洞の杆状内皮細胞の分化メカニズム解明	小野 公嗣
P89	30 基-086	12:40-13:10	サルコペニアを標的とした抗加齢医薬品の開発研究	砂田 芳秀
P91	30 基-089	12:40-13:10	鉄欠乏によるマイトファジー誘導機構の解明	原 裕一
P93	30 基-036	12:40-13:10	急性骨髄性白血病における FLT3,NPM1,CEBPA 遺伝子変異の同時検出法の開発	近藤 英生
P95	30 基-096	12:40-13:10	食道癌、消化器癌組織由来癌細胞の 3 次元培養法の確立および機能解析	林 次郎
P97	30 基-092	12:40-13:10	人工転写因子を用いた扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果の誘導および新規治療法開発	深澤 拓也
P99	30 基-043	12:40-13:10	何が最初に癌転移を惹起しているのかを解明する	山内 明
P101	29 基-018	12:40-13:10	高免疫原性 XAGE1 ペプチド領域の同定とその利用	大植 祥弘
P103	29 基-078	12:40-13:10	蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理と多光子レーザー顕微鏡を用いた NLRP3-Inflammasome 活性化/Caspase-1 活性化の動	柏原 直樹

	課題番号	時 間	研究課題	研究代表者
			態変化の解析技術の確立	
— 大学院 —				
P105	30 大-001	12:40-13:10	糖代謝阻害剤 2-Deoxy-D-Glucose 封入 PLG ナノ粒子を用いた肝細胞癌治療開発	日野 啓輔 (佐々木 恭)
P107	30 大-003	12:40-13:10	機能性ディスプレイに対するモサプリド及びアコチアミドの有効性に関する検討	塩谷 昭子 (勝又 諒)
P109	30 大-005	12:40-13:10	全身性エリテマトーデスの病態における SH3BP2 および TNF の役割の検討	守田 吉孝 (長洲 晶子)
P111	30 大-007	12:40-13:10	最新のラット精索静脈瘤モデルの妥当性の検討	永井 敦 (杉山 星哲)

	大学名	学部学科名	時 間	研究課題	研究代表者
— 川崎医療福祉大学・岡山県立大学・福山大学 —					
1	川崎医療福祉大学	医療技術学部 健康体育学科	12:40-13:10	暑熱環境下における運動が腸管機能維持と腸内環境変化に関する研究	松生 香里
2	川崎医療福祉大学	医療福祉学部 保健看護学科	12:40-13:10	ICU せん妄は平成 28 年度診療報酬改定基準における医療資源消費量を増加させる	古賀 雄二
3	川崎医療福祉大学	医療技術学部 臨床検査学科	12:40-13:10	拘束された同種個体に対するマウスの救助様行動の動機解明 ～精神疾患の原因解明を目指した基礎的研究～	上野 浩司
4	川崎医療福祉大学	医療技術学部 臨床栄養学科	12:40-13:10	アルギニンの摂取により伸張性収縮後の筋力回復が促進されるメカニズム	神崎 圭太
5	岡山県立大学	保健福祉学部 看護学科	12:40-13:10	乳幼児期に発症した 1 型糖尿病の子どもが小学校に入学する際の親の心配・困難とその対処	沖本 克子
6	岡山県立大学	情報工学部 人間情報工学科	12:40-13:10	ウェアラブルモニタへの応用を鑑みた橈骨動脈および指尖の脈波に基づく生理的ストレ	綾部 誠也

				ス評価の妥当性	
7	福山大学	薬学部 薬学科	12:40-13:10	生体のバランスに寄与する漢方薬と腸内細菌叢のクロストークの解明	高山 健人
8	福山大学大学院	薬学研究科	12:40-13:10	脳出血に関わる細胞接着分子クロロディン D1 の転写調節因子の解析	志摩 亜季保
9	福山大学	薬学部 薬学科	12:40-13:10	カテキン類が NPC1L1 を介した細胞内コレステロール蓄積に及ぼす影響	瀬尾 誠
10	福山大学	薬学部・薬学研究科	12:40-13:10	Styrene-maleic acid copolymer を用いた amphotericin B 製剤の開発	番匠谷 研吾
— 医学研究への扉 —					
			時 間	研究課題	研究発表者
1	平成 30 年度医学研究への扉		12:40-13:10	ジェネリック保湿剤の保湿機能は先発品と同じか？	北原 里恵
2	平成 30 年度医学研究への扉			統合失調症の新たな病態基盤としての海馬ミクログリア研究	森山 元気
3	平成 30 年度医学研究への扉			The Largest Protein in the Smallest Genome: フグ心室のコネクチン構造解析	辻 修平
4	平成 30 年度医学研究への扉			皮下投与時の覚せい剤の胃内移行に関する検討	中野 楓

セッション3 (4題) 座長：嶋 雄一・中田昌男

	課題番号	時 間	研 究 課 題	研究代表者
1	30 基-034	13:10-13:22	膵β細胞機能回復を見据えた2型糖尿病治療～高血糖毒性から見た新規糖尿病治療薬の探索～	金藤 秀明
2	30 基-005	13:22-13:34	網膜色素上皮裂孔治療に資する ROCK 阻害の細胞・基質間接着への影響	鎌尾 浩行
3	30 基-002	13:34-13:46	内分泌療法耐性乳癌細胞における細胞内シグナル伝達の変化に関する基礎的研究	紅林 淳一

	課題番号	時間	研究課題	研究代表者
4	30 基-014	13:46-13:58	石綿曝露下 CTL 免疫応答低下に及ぼす各種共刺激分子の役割	武井 直子

ポスターセッション 2 (55 題) 14:00-14:30 30 分

	課題番号	時間	研究課題	研究代表者
－ 神経・運動器・生殖・循環 －				
P2	29 若-004	14:00-14:30	嗅球におけるドーパミン代謝酵素の局在と遠心性入力の状態学的解析	堀江 沙和
P4	30 基-075	14:00-14:30	嗅球深層における顆粒細胞周囲のシナプス神経回路の状態学的解析	野津 英司
P6	30 基-067	14:00-14:30	網膜色素上皮細胞における色素量と貪食能の評価	桐生 純一
P8	30 基-018	14:00-14:30	ECT のうつ様症状改善効果と Ca ²⁺ 放出チャネルの変化との関係	丸山 恵美
P10	30 基-045	14:00-14:30	神経生検における無髄線維の簡便評価法の確立	西村 広健
P12	30 基-022	14:00-14:30	マイクロスフェア脳塞栓による認知症モデル動物の海馬の電気生理学的特性	氷見 直之
P14	30 基-037	14:00-14:30	鳥類の心臓ポンプ機能に関する細胞・分子レベルからの基礎的検討	氏原 嘉洋
P16	30 基-008	14:00-14:30	近赤外線蛍光顕微鏡による生体内心外膜側冠微小血管の ICG 冠動脈内投与による評価	矢田 豊隆
P18	29 基-034	14:00-14:30	帝王切開時の羊水曝露を最小化することによる羊水塞栓症発症メカニズムの解明とその臨床応用に関する検討	下屋 浩一郎
－ 消化器・代謝・腎 －				
P20	30 ス-003	14:00-14:30	nano LC-MS/MS を用いたショットガン比較プロテオミクスによるサポシン D 変異マウス脳の状態解析	渡邊 悦子
P22	30 基-011	14:00-14:30	リソソーム酵素活性の時間的・空間的評価法の開発	大友 孝信
P24	30 基-012	14:00-14:30	機能性ディスペプシアの状態と消化管微生物との関連に関する検討	大澤 元保
P26	30 基-050	14:00-14:30	炎症性腸疾患の状態と腸内微生物との関連に関する検討	石井 学

	課題番号	時 間	研究課題	研究代表者
P28	30 基-029	14:00-14:30	食欲と肥満を抑制的に制御する機能性脂質の新規生合成機構の解明	坪井 一人
P30	30 基-030	14:00-14:30	性差医療に向けた糖尿病性血管障害形成における血管機能の解明	竹之内 康広
P32	30 基-068	14:00-14:30	糖尿病性腎臓病における糸球体微小環境恒常性のバイオマーカーの検索 糸球体構成細胞のクロストークに着目して	佐々木 環
P34	30 基-059	14:00-14:30	Inflammasome 活性化制御による AKI-CKD transition 抑制効果の検討	春名 克祐
P36	30 基-057	14:00-14:30	Nrf2 活性化制御による蛋白尿誘発尿細管障害制御機構の解明	板野 精之
P38	30 基-063	14:00-14:30	尿毒素による腸管ディフェンシンの変容と腸内細菌叢変化の検討	佐藤 稔
— 腫瘍 —				
P40	30 基-090	14:00-14:30	マウス肥満関連大腸腫瘍発生におけるインターロイキン (IL) 6 受容体抗体による腫瘍抑制効果の機序の解明	松本 啓志
P42	30 基-017	14:00-14:30	乳腺良悪性境界悪性病変の意義に関する病理学的検討	森谷 卓也
P44	30 基-046	14:00-14:30	中咽頭癌における p16 蛋白の発現に関する臨床病理学的検討	伊禮 功
P46	30 基-010	14:00-14:30	骨髄異形成症候群から急性白血病へ移行する分子機構の探索：患者骨髄細胞から段階的に悪性化した細胞株のゲノム進化から見た解析	通山 薫
P48	30 基-020	14:00-14:30	骨髄異形成症候群における DNA メチル化阻害薬の作用機序の解明	辻岡 貴之
P50	30 若-002	14:00-14:30	新たな白血病治療法開発にむけた、低酸素環境下での解糖系阻害治療の研究	岡本 秀一郎
P52	30 基-093	14:00-14:30	肺癌、食道癌における PIK3CA 遺伝子の発現および標的遺伝子としての評価	羽井佐 実
P54	30 基-038	14:00-14:30	殺細胞性抗がん薬が EGFR-TKI 耐性に及ぼす影響に関する基礎的検討	越智 宣昭
P56	30 基-084	14:00-14:30	α 線放出核種 Ra-223 内用療法における Cancer Cell Repopulation の基礎的検討	犬伏 正幸
— 環境と生体反応 —				

	課題番号	時 間	研究課題	研究代表者
P58	30 基-070	14:00-14:30	からだの大きさを制御する分子メカニズムの解明	西松 伸一郎
P60	30 基-027	14:00-14:30	マンソン裂頭条虫 3 倍体クローン株 (Kawasaki triploid strain) を用いた新規代謝制御因子の統合的機能解析	沖野 哲也
P62	30 若-005	14:00-14:30	動物モデルを用いたインフルエンザ流行パターンを規定する要因の究明	後川 潤
P64	29 若-001	14:00-14:30	HTLV-1 の持続感染が免疫老化制御機構に及ぼす影響とその病因的意義の解明	瀬島 寛恵
P66	30 基-033	14:00-14:30	薬疹・水疱症発症に関与するヘルペスウイルスの病態解析	山本 剛伸
P68	30 若-003	14:00-14:30	発汗機能と皮膚マイクロバイオームに着目した外用剤の機序解明と治療法の確立	片山 智恵子
P70	30 基-006	14:00-14:30	アスベスト長期継続曝露ヒト T 細胞株における酸化リン酸化関連複合体の発現	大槻 剛巳
P72	30 基-081	14:00-14:30	金担持チタン酸ナノシート, 銀担持チタン酸ナノシートを用いた蛍光増強膜の開発	吉岡 大輔
P74	30 基-054	14:00-14:30	好中球膜タンパク質 NADPH oxidase 結合抗体の解析	栗林 太
P76	30 基-078	14:00-14:30	片側鼻腔閉鎖による鼻呼吸障害モデルマウスを用いた睡眠覚醒関連ケミカルメディエーターの変化	原 浩貴
P78	30 基-085	14:00-14:30	BST-1/CD157 の腸管-神経-免疫連関制御機構の基盤的解析	石原 克彦
P80	30 基-098	14:00-14:30	BST-1 と CD38 の腸管運動制御機構の解析	矢作 綾野
P82	30 基-051	14:00-14:30	炎症性骨破壊におけるアンジオテンシン II の役割の解明	守田 吉孝
— 新分子・新技術 —				
P84	30 基-039	14:00-14:30	抗原変異を伴うインフルエンザウイルスの未来流行株予測システムの開発	内藤 忠相
P86	30 基-003	14:00-14:30	角膜疾患と生理学的特性との関連の探索	藤本 久貴
P88	30 基-073	14:00-14:30	細胞分裂活性の維持により急速な胎児成長を可能にする胎盤・胎児循環の酸素運搬特性評価システムの構築	毛利 聡

	課題番号	時 間	研究課題	研究代表者
P90	30 基-087	14:00-14:30	筋疾患・心疾患の迅速診断に向けた新規バイオマーカーの開発	大澤 裕
P92	30 基-015	14:00-14:30	肺線維化における生理活性リゾリン脂質分解酵素の役割	岡本 安雄
P94	30 基-095	14:00-14:30	当科における原発性肺癌、胸膜中皮腫 organoid 作成のための基盤技術の構築	湯川 拓郎
P96	30 基-091	14:00-14:30	新規 AKT 阻害剤を用いた非小細胞肺癌に対する抗腫瘍効果の解析	山辻 知樹
P98	30 基-021	14:00-14:30	RNA 結合蛋白質の機能調節に着目した新規食道癌治療法の開発	増田 清士
P100	30 基-099	14:00-14:30	肺腺癌患者に対する XAGE1 長鎖ペプチドを用いたワクチン治療の安全性と免疫原性に関する試験（第 I 相臨床試験）における XAGE1 特異的免疫反応の解析	岡 三喜男
P102	29 基-038	14:00-14:30	神経障害性疼痛の痛みの機序解明と新たな治療の発見	中塚 秀輝
— 大学院 —				
P104	29 大-003	14:00-14:30	卵巣境界悪性腫瘍に対する細胞周期的バイオマーカーの研究	下屋 浩一郎 (羽間 夕紀子)
P106	30 大-002	14:00-14:30	電気刺激による脊髄再生亢進の可能性とそのメカニズムの解明	宮本 修 (林 範人)
P108	30 大-004	14:00-14:30	婦人科腹腔鏡手術における局所浸潤麻酔の術後疼痛管理への効果の検討	下屋 浩一郎 (杉原 弥香)
P110	30 大-006	14:00-14:30	尿路生殖器領域における難治性慢性炎症性疾患に対する創薬研究－慢性前立腺炎に対する PDE5 阻害剤投与による炎症抑制効果の検討－	永井 敦 (清水 真次朗)

14:30-15:15 40分 川崎医学会受賞講演(2題)・意見交換会

令和元年度川崎医学会賞

	時 間	受賞者	論 文
論文賞	12:20-12:40	乳腺甲状腺外科学 齋藤 互 (形態系分野)	甲状腺低分化・未分化癌細胞に対するヘッジホック阻害薬 GANT61 の抗腫瘍効果と癌幹細胞制御作用 川崎医学会誌 44 (2) : 95-106, 2018 doi : 10.11482/KMJ-J44(2)95

	時 間	受賞者	論 文
		腺腫瘍学)	
論文賞	14:30-14:50	泌尿器科学 大平 伸 (生理系分野 尿路生殖器病態 生理学)	精巣上体炎における indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の 役割に関する検討 川崎医学会誌 44 (1) : 1 – 10, 2018 doi : 10.11482/KMJ-J44(1)1
研究奨励賞	14:50-15:15	木田 潤一郎 (生化学系分野 病態検査学)	An MDS-derived cell line and a series of its sublines serve as an in vitro model for the leukemic evolution of MDS. Leukemia. 32(8):1846-1850. 2018.
論文賞		生理学 1 本田 威 (生理系分野 システム生理学)	Turtle spongy ventricles exhibit more compliant diastolic property and possess larger elastic regions of connectin in comparison to rat compact left ventricles Kawasaki Medical Journal 44(1) : 1– 17, 2018 doi : 10.11482/KMJ-E44(1)1

お知らせ

○参加者の先生方へ

1. 会場

口頭発表：医科大学校舎棟 8 階 M-800 講義室

ポスター発表：医科大学校舎棟 7・8 階 学生・教職員ラウンジ

懇親会・表彰式：医科大学校舎棟 8 階 学生・教職員ラウンジ

2. ポスター展示について（ポスター発表・口頭発表）

8月1日（木）8：00～8月5日（月）17：00

3. 受付

医科大学校舎棟 8 階 M-800 講義室前

※参加人数を確認するため、職員証（学生証）をお持ちください。

4. 顕彰

口頭発表・ポスター発表、それぞれの部門の優れた発表に対して、最優秀賞・優秀賞の表彰をします。

（表彰式は、学術集会終了後に行います。）

5. プログラム

オンライン閲覧となりますので、当日はタブレット端末（iPad・スマートフォン等）から閲覧いただくこととなります。

★今年度も医学会総会を学術集会の昼休憩時間に開催します。また、総会終了後および学術集会ポスターセッション2終了後に、医学会の受賞講演を行います。

会場：総会・医学会受賞講演（論文賞1） 医科大学校舎棟 8 階 M-800 講義室

医学会受賞講演（論文賞2、奨励賞） 医科大学校舎棟 8 階 学生・教職員ラウンジ

○座長の先生方へ

1. ご担当セッションの開始予定時刻 10 分前までに、会場内前方の次座長席にご着席ください。

2. 各セッションの演題発表時間等

時間のお知らせのため、アラームを鳴らしますので、時間厳守でお願いします。

◆セッション1

1 演題目 発表時間：10分・質疑応答：4分・予備：1分 計15分

（アラーム：開始後10分、終了1分前）

2 演題目 発表時間：8分・質疑応答：3分・予備：1分 計12分

（アラーム：開始後8分、終了1分前）

◆セッション2, ◆セッション3

発表時間：8分・質疑応答：3分・予備：1分 計12分

（アラーム：開始後8分、終了1分前）

○口頭発表演者の先生方へ

1. ご自身の発表時間 10 分前には、会場内前方の次演者席にご着席ください。

2. 各セッションの演題発表時間等

時間のお知らせのため、アラームを鳴らしますので、**時間厳守**をお願いします。

◆セッション1

1 演題目 発表時間：10分・質疑応答：4分・予備：1分 計15分

(アラーム：開始後10分、終了1分前)

2 演題目 発表時間：8分・質疑応答：3分・予備：1分 計12分

(アラーム：開始後8分、終了1分前)

◆セッション2, ◆セッション3

発表時間：8分・質疑応答：3分・予備：1分 計12分

(アラーム：開始後8分、終了1分前)

3. スライドデータについて

・スライドデータは、前日16時までに医大研究支援係(6階中央研究秘書室内)にUSBでお持ちください。難しい場合は、ご連絡の上、当日の朝9:00までに医大研究支援係(6階中央研究秘書室内)にお持ちください。

・セッション3の先生で、この時間に間に合わない場合は、12:30までに、必ず、受付までお持ちください。

・スライドデータのファイル名は、「**セッション番号(課題番号 先生のお名前)**」をお願いします。

★データは、当日、会場のパソコンデスクトップ上にセッションごとに分けたフォルダに入れておきます。

★データをお持ちいただいた際に、スライドの動作確認をお願いします。(当日のスライド試写はありません。)

4. 会場設置のパソコンについて

口頭発表会場に設置されているパソコンは、Windows7:Power point2013になりますので、Windows環境で動作チェックしたデータをお持ちくださいますようお願いいたします。

5. パソコンの持ち込み依頼をいただいている先生へ

発表前にパソコンをケーブルに接続しますので、**会場前方(次演者席前)のパソコン受付に発表開始15分前までに必ずお持ちください。**(次演者、次次演者まで、パソコンをケーブルに接続できますので、早目に接続してくださいますようご協力をお願いします。)

★Macを持ち込みされる先生は、**必ず、専用のアダプター**をお持ちください。

★当日のスライド試写は行いませんので、スライド試写が必要な場合は、教材教具センター長田課長(内線:37158)にご連絡くださいますようお願いいたします。(期限:8月2日(金)16時)

6. ポスター展示について

8月1日(木)8:00~8月5日(月)17:00

口頭発表も含めポスター展示をします。ポスターのサイズについては、「ポスター発表演者の先生方へ」をご覧ください。

○ポスター発表演者の先生方へ

1. 当日は、**セッションの時間に間に合うよう会場においていただき**、ポスター前に待機して、質疑応答をお願いします。

2. ポスター掲示について

7月30日(火) 10:00~21:00、7月31日(水) 8:00~14:00 までの期間に掲示が終了するようお願いします。

※ラウンジの開錠時間：7:30~22:00

※パネルの配置図は、会場入り口に掲示します。

※押しピン・金槌は、会場入り口にご用意します。

3. ポスター様式

パネルのサイズは縦210cm×横90cmです。

用紙の大きさは問いません。ただし、最上段左側にパネル番号 A5判(縦15cm×横21cm)を掲示しますので、スペースをあけてください。

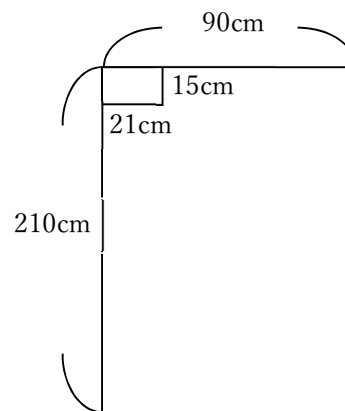
なお、バイオイメージングユニットでポスターを印字する場合は、ポスターのサイズは幅85cmとなります。

それ以外の最上段に

- ①課題番号
- ②課題名
- ③研究代表者名
- ④研究分担者名

を必ずご記入ください。

<パネルサイズ>



4. 撤去時間

8月6日(火) 8:30~21:00、8月7日(水) 8:00~15:00

★期間内の撤去をお願いします。なお、撤去終了時間後に残っているポスターについては、廃棄させていただきますので、ご了承ください。

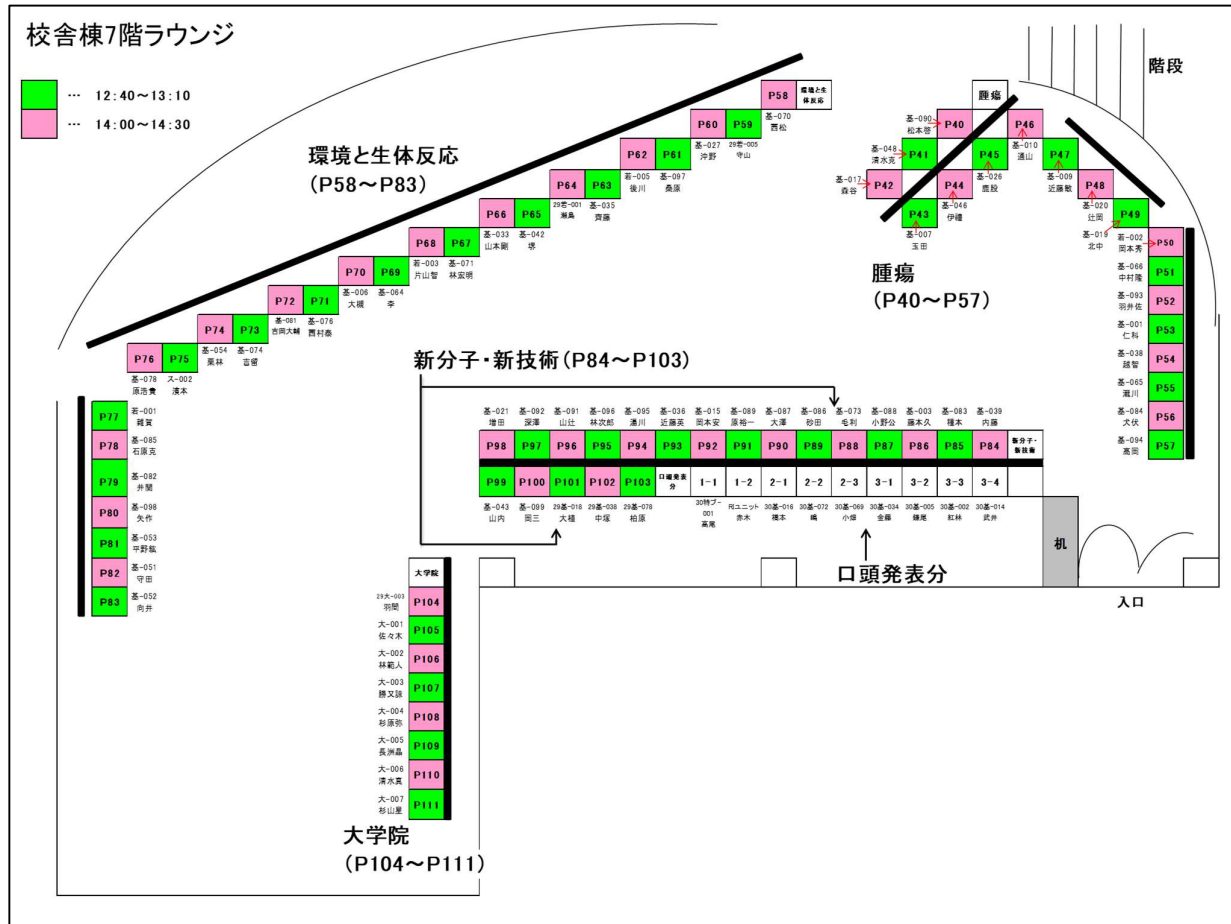
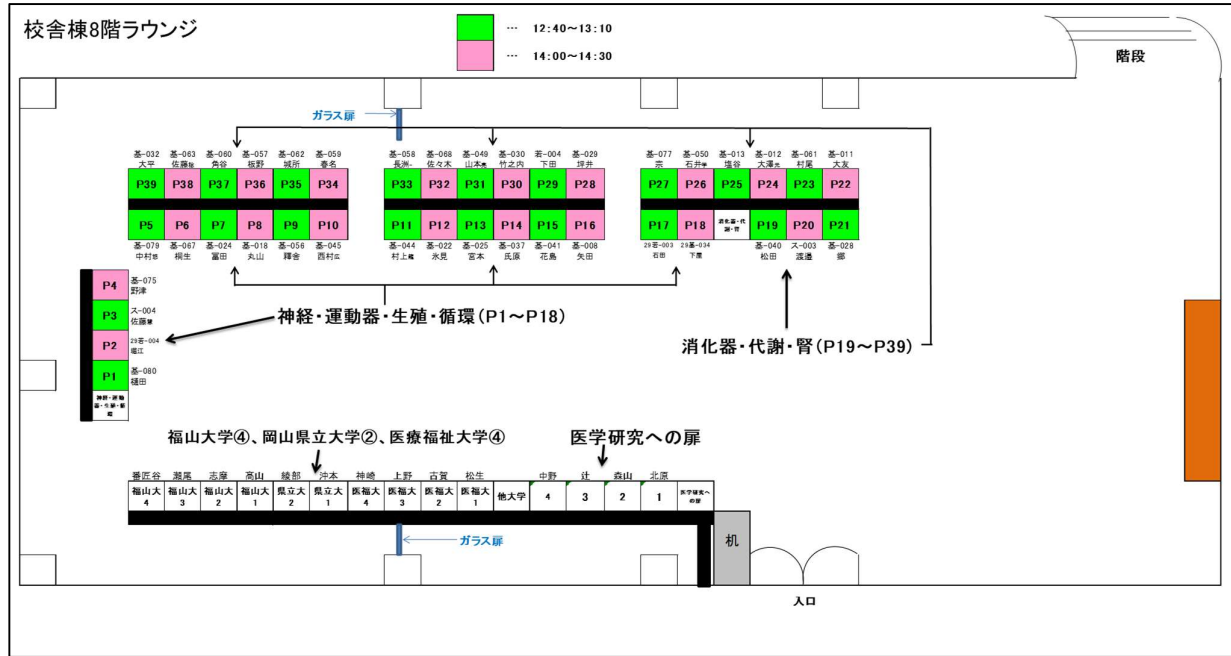
★総合医療センター勤務の先生につきましては、返却が必要な場合は、院内便にて返却しますので、事前にご連絡をお願いします。

5. ポスター展示について

8月1日(木) 8:00~8月5日(月) 17:00

口頭発表も含めポスター展示をします。

ポスター発表展示会場



I. 口頭発表の部

課題番号：30 特ブ-001

研究課題：フレイルを予防し健康寿命を延伸する地域医療システム「倉敷モデル」の確立

研究代表者名（所属）：高尾 俊弘（健康管理学）

本学は平成 26 年に倉敷市と地域包括連携協定を締結し、地域社会が抱える医療・福祉上の課題解決に取り組んできた。倉敷市は地方創生に向けて「温もりあふれる健康長寿のまち」を掲げており、平成 30 年からは包括協定の一環として倉敷市と共催で川崎学園市民公開講座を毎月開催している。現在までに「健康寿命 100 歳まで介護されない健康なからだ」、「ロコモー健康寿命を延ばすためにー」等の講座を開催した。このような背景を元に「フレイル」の原因となりうる骨粗鬆症、ロコモティブシンドローム（運動器症候群）と、サルコペニア・嚥下・認知機能障害及びメタボリックシンドロームの予防と重症化抑制法の構築を目指して、学長主導の下、全学をあげて以下の事業を計画した。1) 筋・骨量や認知・嚥下機能、運動習慣や生活習慣病などの包括的な評価・解析。2) 「フレイル」の予防・重症化抑制を目的とする包括的システムの確立。3)健康寿命を延伸する医療システムである「倉敷モデル」の構築。最終的に「倉敷モデル」を確立することで地域社会の健康寿命を延伸することが期待でき、長期的には大学の医療・研究をより社会のニーズに合致した方向性に導くとともに教育の面でも地域医療の実情を理解した医師を育成することができると考えられる。さらに今後「倉敷モデル」が機能すれば好事例として他地域にも展開されることが期待される。

発表題名：RI ユニットにおける研究支援

発表代表者：赤木 和美（RI ユニット）

【RI ユニットの概要】

当ユニットは放射性同位元素（RI）を使用した実験を行う共同利用施設である。学術研究だけでなく医療福祉大学診療放射線技術学科の学生に対する教育などにも利用されている。

使用する RI は少量であっても潜在的な危険性を持つため、「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」に基づいた厳しい規制を受けている。そのため、職員は法に則った施設管理が出来るよう日々業務を行っている。

また、近年 RI を利用した研究が従来の *in vitro* 研究から *in vivo* 研究へシフトしていく中、*in vivo* 研究に対応する研究機器が整備されずに、当ユニットの利用者は年々減少していた。しかし平成 31 年 3 月に小動物用 SPECT/CT が設置されたため、今後のユニット活性化が期待できる。

【業務内容】

他ユニットのような研究支援、受託業務といった業務とは異なり、主に法に基づく施設の維持、管理、報告等を行っている。

その他、設置機器のメンテナンスや環境整備も行っている。

【設置機器の紹介】

- ・小動物用 SPECT/CT（MILabs 社）
- ・マイクロフォーカス X 線 CT ELESCAN（日鉄エレクトクス社）

- ・バリアブルイメージアナライザ Typhoon9400 (GE ヘルスケア社)
- ・自動現像機 FMP-100 (富士フイルム社)

【今後の展望】

小動物用 SPECT/CT 装置の設置にともない、今後は動物の飼育に関する業務も増えると思われる。他ユニットとの連携を図りながら環境やマニュアル等の整備を進めていく一方で、今まで通り安心して利用して頂けるよう法に則った適正な施設管理を行いたい。

課題番号：30 基-016

研究課題：「軟らかい」核による心筋再生メカニズムの解明

研究代表者名 (所属)：橋本 謙 (生理学1)

哺乳類の心筋細胞は胎生期には活発に分裂するが、出生後は分裂を停止する。我々は最近、胎生期の低酸素環境から、出生後の肺呼吸開始による酸素濃度の増加が心筋分裂を停めることを突き止め、関連する二つの重要遺伝子 (Fam64a, Novex-3) を同定した。Fam64a は胎生期に高発現する分裂促進因子であり、その十分な発現とユビキチンリガーゼ APC/C による同分子の分解の両方が細胞周期の進行に必須である。本年度は、Fam64a の発現が減少する出生後に心筋特異的に発現が増強する過剰発現マウスを作製した。本マウスでは出生後も Fam64a 発現が維持され、期待通り新生児期、成体期での心筋分裂能の亢進が認められたものの、一方で加齢と共に心機能の悪化を来した。これは、分解系 (APC/C) を無視した Fam64a の過剰蓄積が原因と考えられる為、その機序を明らかにし、APC/C とのダブル過剰発現マウスによる心機能悪化防止を検討中である。一方、Novex-3 は筋節蛋白コネクチンの minor isoform であるが、胎生期には筋節だけでなく心筋細胞の核にも局在し、核膜ラミンの調節を介して核の柔軟性を増し、「軟らかい」核を実現しており、そのことが心筋分裂を促進している可能性を見出した。現在、本分子の KO マウスを作製中であり、複数系統のホモ動物を取得しつつある。今後は、心筋細胞の細胞周期 (Fam64a) と核の柔軟性 (Novex-3) の関連を検討し、将来的には胎内の最適な心筋分裂環境を成体心筋へ適用・導入することで再生医療の実現を目指す。

課題番号：30 基-072

研究課題：ゲノム編集による Ad4BP/SF-1 遺伝子の組織特異的機能の解明

研究代表者名 (所属)：嶋 雄一 (解剖学)

Ad4BP/SF-1 (NR5A1) は核内受容体型の転写因子であり、視床下部腹内側核 (Ventromedial hypothalamic nucleus, VMH)、下垂体ゴナドトロピン産生細胞、副腎皮質、生殖腺といった、生殖に関与する組織の発生を制御している。これまでに、胎仔副腎、VMH、下垂体、胎仔ライディッヒ細胞における組織特異的な発現制御領域 (エンハンサー) が同定されている。

CRISPR/Cas9 を用いて、*Nr5a1* 遺伝子の下垂体エンハンサー (Pituitary enhancer, PE) を欠損するマウス (Δ PE マウス) を作出した。 Δ PE オスマウスにおいては、胎仔期の雄性化に異常は認められなかった。一方、成獣オスマウスでは精巣が有意に小さく、外生殖器も低形成であった。一方、雌マウスでは卵巣が有意に小さく、黄体が認められなかったことから、排卵が障害されていると考えられた。以上の表

現型は LH β ノックアウトマウスと類似していたが、免疫染色の結果、 Δ PE マウスの下垂体ではコントロールと同程度の LH β の発現が認められた。この結果から、NR5A1 は LH β の産生ではなく、ゴナドトロピン産生細胞からの LH の放出に關与する可能性が考えられたため、現在、LH の放出に關与する NR5A1 の下流因子の同定を試みている。

課題番号：30 基-069

研究課題：血管内皮 PDK1 の糖代謝及び膵 β 細胞に及ぼす病態生理学的役割の解明

研究代表者名（所属）：小畑 淳史（糖尿病・代謝・内分泌内科学）

[背景]Phosphoinositide dependent protein kinase1(PDK1)は PI3K の下流にあり、インスリンシグナルにおいて重要な役割を果たす。我々は世界に先駆けて、血管内皮特異的 PDK1 欠損マウス(VEPDK1KO マウス)を作製した。通常食3ヶ月飼育で、随時インスリン値が有意に低値であったことに着目し、「血管内皮 PDK1 は膵 β 細胞機能に重要な役割を果たす」という仮説を立てた[目的]血管内皮 PDK1 の膵 β 細胞に及ぼす役割を解明する[方法]通常食3ヶ月飼育した VEPDK1KO マウスとコントロール(flox/flox)マウスを比較検討した[結果]VEPDK1KO マウスは腹腔内糖負荷試験でコントロールと比較して血糖値に違いがないものの、インスリン値は有意に低値であった。経口糖負荷試験では KO マウスで15分値血糖は有意に上昇していた。Ex-4 で前処置したところ、腹腔内糖負荷試験では KO マウスで有意に血糖は高値であった。グルコース応答性インスリン分泌は KO マウスで減弱しており、Ex-4 添加によりその差はより明瞭化した。単離膵島ではインスリン遺伝子やその転写因子など膵 β 細胞機能において重要な遺伝子発現が KO マウスで有意に低下しており、hif1 α 及びその下流遺伝子は KO マウスで有意に上昇していた。さらに KO マウスで有意に Pimonidazole 陽性 β 細胞が増加していた。単離膵島において、ER stress、炎症性サイトカインの遺伝子発現も亢進していた[結語]血管内皮 PDK1 は、膵島における血流維持にとっても重要で、膵島を虚血から保護し、ER stress や炎症の軽減を介して膵 β 細胞の機能・量の維持に極めて重要な役割を果たす

課題番号：30 基-034

研究課題：膵 β 細胞機能回復を見据えた2型糖尿病治療 ～高血糖毒性から見た新規糖尿病治療薬の探索～

研究代表者名（所属）：金藤 秀明（糖尿病・代謝・内分泌内科学）

膵 β 細胞はグルコース応答性にインスリンを生合成、分泌する細胞であるが、高血糖が持続すると β 細胞は疲弊して、インスリン生合成および分泌障害は低下する。この現象は高血糖毒性として広く知られている。このインスリンの発現を制御しているのは転写因子 MafA や PDX-1 であるが、申請者らは、高血糖毒性には MafA および PDX-1 発現の低下が深く關与すること、また高血糖を是正すればこうした因子の発現が回復することなどを報告している。今回の研究においては、各種小分子化合物ライブラリーを用いて、高血糖毒性で低下する MafA や PDX-1 発現を直接増加させる薬剤や因子を網羅的に検索しており、いくつかの因子が同定されている。膵 β 細胞株にて変化を認めた薬剤に関しては単離膵島にても同じ結果が得られることを確認済みである。

さらに申請者らは、現在糖尿病領域で注目されている SGLT2 阻害薬（尿糖排泄の増加を介して血糖降下作用を有する）によって、高血糖毒性による膵β細胞障害が回避できることを報告しているが、今回の検討では、どのようなタイミングで SGLT2 阻害薬を用いれば、よりその効果が高まるのか、MafA, PDX-1 などの発現が増加するのかを検討した。その結果、SGLT2 阻害薬は 2 型糖尿病の病態進行期に比べて早期の方がかなり大きい効果が得られることが明らかとなった。

課題番号：30 基-005

研究課題：網膜色素上皮裂孔治療に資する ROCK 阻害の細胞・基質間接着への影響

研究代表者名（所属）：鎌尾浩行（眼科学 1）

目的

網膜色素上皮裂孔は加齢黄斑変性の合併症で、網膜色素上皮（RPE）が欠損することで重篤な視力障害を引き起こされる疾患である。また、加齢黄斑変性に対する抗血管内皮増殖因子治療が導入されて以降、RPE 裂孔の報告が増えているにもかかわらず、現在これに対する治療方法はない。そこで上記の点を解決するために、in vitro における RPE 欠損モデルの創傷治癒に対する、ROCK 阻害剤の影響を評価した。

方法

ROCK 阻害剤である Y27632 を含有した培地で胎児 RPE を培養した。Y27632 による胎児 RPE への細胞毒性を LDH 活性、細胞接着と細胞増殖を発光試験、RPE 特有遺伝子の発現量を qRT-PCR、アポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリー（FACS）、創傷被覆率と細胞遊走性をタイムラプスイメージングで評価した。

結果

10μM Y27632 は胎児 RPE に対して、細胞毒性を認めず、細胞接着率は促進、RPE 特有遺伝子の発現は亢進、アポトーシス細胞の割合は抑制されたが、細胞増殖率には影響がなかった。一方、24 時間後の創傷被覆率はコントロールが 59.4%、Y27632 が 92.5%と創傷治癒が改善し、細胞遊走性はコントロールが 98.9、Y27632 が 203.4 と、10μM Y27632 により RPE の細胞遊走性が促進した。

結論

Y27632 は RPE の細胞遊走性を促進させることで、RPE 欠損モデルにおける創傷治癒が改善した。このことから、ROCK 阻害剤は網膜色素上皮裂孔の治療薬となる可能性が示唆された。

課題番号：30 基-002

研究課題：内分泌療法耐性乳癌細胞における細胞内シグナル伝達の変化に関する基礎的研究

研究代表者名（所属）：紅林淳一（乳腺甲状腺外科学）

我々は、乳癌の内分泌療法耐性獲得の分子メカニズムの解明を目指し、長年、基礎研究を継続している。昨年度からエストロゲン（E）感受性乳癌細胞株 MCF-7 を長期にわたり 1) 低酸素培養下、2) E 枯渴下、3) 抗 E 薬（4-OH-tamoxifen [4-OHT], fulvestrant [FUL]）処理下、4) これらの組み合わせ、合計 8 条件で細胞培養を行なった。培養開始後 2 カ月毎に、E・抗 E 薬に対する増殖反応性、エストロゲン受容体（ER）シグナル伝達経路、癌幹細胞（CSC）比率、CSC 制御因子であるヘッジホッグ（Hh）シグナル伝達の

関連因子の mRNA 発現を経時的に検討した。その結果、すべて条件下で経時的に E や抗 E 薬に対する反応性の低下が観察された。また、1) E 枯渇下処理により樹立された内分泌療法耐性乳癌細胞株と親株を比較したところ、E に対する hypersensitivity と ER- α の発現亢進、E 非依存的な ER- α の活性化や CSC 比率の増加がみられた。2) FUL 処理下で樹立された内分泌療法耐性乳癌細胞株と親株を比較したところ、Hh 伝達の関連因子の mRNA 発現の増加が認められた。これらの研究結果は、論文として掲載予定である。エストロゲン枯渇下で樹立された long-term estrogen deprived (LETD)細胞や FUL 耐性細胞が樹立され、親細胞との mRNA 発現をマイクロアレイで比較検討し、共通した遺伝子変化として、CXCR4, HER4 の発現亢進が抽出された。現在、これらの因子の拮抗薬を用い、内分泌療法耐性の克服が可能かどうかを検討中である。

課題番号：30 基-014

研究課題：石綿曝露下 CTL 免疫応答低下に及ぼす各種共刺激分子の役割

研究代表者名（所属）：武井 直子（衛生学）

石綿曝露は悪性中皮腫を引き起こすが、抗腫瘍免疫機能への影響は不明な点が多い。これまでに申請者らは混合リンパ球培養法を用いたアロ刺激分化誘導時の石綿曝露が、CD8+T細胞の増殖低下を伴い CTL 分化を抑制することを報告した。近年、IL-15 や種々の共刺激シグナルが、樹状細胞を介した CTL 分化誘導や分化後 CTL の生存・成熟・機能維持に重要であることが知られている。本研究の目的は、各種共刺激分子 CD28、4-1BB、あるいは OX40 からの刺激が石綿曝露下 CTL の免疫応答の抑制を解除するかを調べることである。はじめに、我々は、共刺激シグナルを誘導する為に抗 4-1BB 抗体を用いて、石綿曝露下 CTL 免疫応答低下の改善への影響を granzyme B レベルと細胞増殖能に注目して検討した。5 μ g/ml の白石綿添加/非添加培地中、予め CFSE 標識したヒト末梢血単核球 (PBMC) を放射線照射アロ PBMC と 7 日間混合培養した。培養開始 2 日目の白石綿添加培地中に抗 4-1BB 抗体を終濃度 10 μ g/ml になるように添加した。培養後回収した PBMC 中の CD8+T 細胞の granzyme B 産生と増殖有無を flow cytometry で測定した。抗 4-1BB 抗体の添加実験では、4 例中 4 例において、石綿曝露による CD8+T 細胞の細胞増殖低下の回復はみられなかった。また、CD8+T 細胞増殖の有無に関わらず granzyme B+細胞比率の回復もみられなかった。今後は、抗 4-1BB 抗体の添加条件を工夫するとともに、引き続き、他の共刺激分子からの刺激について、石綿曝露下 CTL の免疫応答の抑制を解除するかどうかを検討したい。

II. ポスター発表の部

課題番号：30 基-080

研究課題：中枢神経系 GABA ニューロンの遠心性投射による嗅覚系神経回路調節

研究代表者名（所属）：樋田 一徳（解剖学）

嗅球には、細胞体が嗅球内に内在する介在ニューロン、投射ニューロンの他に、他の脳領域からの投射ニューロンの存在が以前より分かっているが、投射経路が長く、錯綜する脳内ニューロン群の中での解析には困難があった。このため我々は遺伝子改変マウスとウイルスベクターを組み合わせた単一ニューロン標識法を確立し、これまでセロトニン、アセチルコリン、ノルアドレナリンニューロンの嗅球への遠心性投射について明らかにして来た。解析の過程で、嗅球へ投射するアセチルコリンの起始核の対角帯水平脚 HDB に存在する GABA 陽性ニューロンが嗅球へ投射する可能性が分かった。GABA ニューロンの遠心性投射は他の脳領域でも存在が示唆されているが、複雑なニューロン構成の中で解析が難しい現状にある。そこで本研究では、解析が進んでいる嗅球神経回路への GABA ニューロンの遠心性投射機構を明らかにすることを目的とした。

まず GAD67-GFP mouse において FluoroGold による嗅球からの逆行性標識により HDB に標識が見られ GABA ニューロンの嗅球への投射が確認された。次に parvalbumin-cre mouse に Adeno associate virus を定位脳的に注入したところ、HDB から嗅球への順行性標識が確認された。現在、嗅球へ投射する HDB における GABA ニューロンの空間的同定と形態学的解析を進めている。

課題番号：29 若-004

研究課題：嗅球におけるドーパミン代謝酵素の局在と遠心性入力 of 形態学的解析

研究代表者名（所属）：堀江沙和（解剖学）

匂いの情報は、1 次中枢である嗅球に送られる。嗅球では特異的に存在する出力ニューロンやその周囲に存在する介在ニューロンが嗅覚情報処理に関与している。一方、嗅球には脳の他の領域から遠心性のノルアドレナリン (NA) や、アセチルコリン (ACh)、セロトニン (5HT) ニューロンが投射していることが知られているが、その詳細は不明であった。そこで、本研究では、NA に注目し、嗅球内での局在や微細形態を明らかにすることを目的とした。

嗅球内に投射した NA ニューロンの形態学的解析を、これまで解析を行ってきた光学顕微鏡より詳細に微細構造を解析する為に超高压電子顕微鏡法 (UHVEM) を用いて行った。UHVEM では $0.2\mu\text{m}$ 以下の非常に細い線維の径まで解析でき、NA ニューロンの線維は ACh や 5HT とは異なる特徴的な varicosity 構造を形成していることがわかった。さらに嗅球内での NA ニューロンの線維は他の細胞とどのような関係があるのかを調べるために、免疫電子顕微鏡法を行い、NA ニューロンのシナプス部位の 3 次元立体構築を行った。その結果、NA ニューロンの線維は嗅球の外網状層では出力ニューロンである僧帽細胞とシナプスを形成していることが観察され、そのシナプス部位は NA ニューロンの varicosity 部分に存在することがわかった。

課題番号：30 ス-004

研究課題：嗅球顆粒細胞層 GABA ニューロンの免疫組織化学的解析による分類

研究代表者名（所属）：佐藤 慧太（解剖学）

GABA を発現する抑制性の介在ニューロン（GABA ニューロン）は、大脳皮質や海馬、小脳といった脳領域における神経ネットワークの、極めて重要な構成要素である。一方、これらの GABA ニューロンには、細胞間で GABA に対する免疫陽性反応の強度が大きく異なる「多様性」が存在する。このような GABA ニューロンにおける免疫陽性反応の多様性は、GABA ニューロンには共存する物質、あるいは細胞体と樹状突起の形態の違いによるサブポピュレーションと相関する可能性もある。しかしながら、このような多様性に着目した GABA ニューロンの解析はなされておらず、その機能的意義も不明なままであった。

嗅神経が受容した嗅覚情報は、嗅球において高次の脳中枢へ軸索を投射する投射ニューロンへと伝達される。嗅球には GABA ニューロンが浅層の糸球体層から深層の顆粒細胞層の各層に存在し、投射ニューロンの樹状突起にシナプスを形成することで嗅覚情報の修飾・情報処理に関わる。他の脳領域と比べ、これらの嗅球 GABA ニューロン間における免疫陽性反応の多様性は、近接した細胞間であっても顕著に見られる。そこで本研究ではマウス嗅球に着目し、GABA ニューロンの多様性とそのサブポピュレーションマーカーとの共存を、免疫組織化学的手法を用いて比較分類解析を行った。

課題番号：30 基-075

研究課題：嗅球深層における顆粒細胞周囲のシナプス神経回路の形態学的解析

研究代表者名（所属）：野津 英司（解剖学）

嗅球は嗅上皮からの嗅覚情報を受け、情報を処理し、より高次の中枢へ投射する領域である。嗅球での情報処理において重要な役割を果たすと考えられている種々の介在ニューロンについて、その神経回路の解析が進められてきた。それらの神経回路の解析は嗅球浅層で進んでおり、嗅球深層の神経回路については未だ不明な点が多い。我々は出力調節に関与すると考えられる内網状層(IPL)に位置し、カルシウム結合タンパクである calbindin に免疫陽性を示すニューロン(CB ニューロン)に焦点を当て、多重免疫染色法および電子顕微鏡連続切片法と montage 撮影法を組み合わせた大領域の三次元立体構築を行い、その形態およびシナプス結合を明らかにした。その結果、嗅球深層の CB ニューロンは軸索を持たない介在ニューロンであり、樹状突起から、嗅球の主要な介在ニューロンである顆粒細胞の樹状突起に対して抑制性のシナプスを形成していることを確認した。顆粒細胞は嗅球の投射ニューロンである僧帽細胞・房飾細胞に対して抑制性のシナプスを形成していることから、嗅球深層の CB ニューロンは顆粒細胞への抑制を介して、僧帽細胞・房飾細胞の脱抑制を行うことが示唆される結果が得られた。一方で、嗅球深層の CB ニューロンへ興奮性のシナプスを形成している神経要素については明らかではなく、その特定は今後の課題である。

課題番号：30 基-079

研究課題：扁桃体から前梨状皮質への軸索投射様式：ウイルスベクターと逆行性トレーサーを用いた形態学的解析

研究代表者名（所属）：中村 悠（解剖学）

梨状皮質前方部（APC）の背側部と吻側腹側部（APCvr）は、それぞれ嗅球出力細胞である僧帽細胞と房飾細胞から入力を受けている。逆行性トレーサー（FG）を APCvr へ注入したところ、扁桃体の一部（基底外側核（BLA）等）において、多くの神経細胞が標識されていた。扁桃体は嫌悪学習で中心的な役割を果たすことから、梨状皮質と扁桃体との神経連絡により、匂い情報と情動が結び付けられていることが伺える。本研究課題では、マウスの扁桃体にシンドビスウイルスベクターを圧注入し、扁桃体内の少数ニューロンを蛍光タンパク質で順行性に標識した。その後、免疫組織化学的に可視化し、標識細胞の形態を解析した。BLA のニューロンは、多数の樹状突起が放射状に伸展し、multipolar タイプの形態をしていた。樹状突起が細胞体の背側に展開する傾向が見られた一方、軸索線維は細胞体の腹側に多く分布していた。BLA 外では、軸索線維は線条体の内側部と尾部で多く観察された。その他、腹側淡蒼球、前交連後肢間質核、側頭連合皮質、体性感覚皮質にも投射していた。このニューロンは、APC には投射しないものの、多くの領域へ影響を与える可能性が示唆された。APC へ FG を注入した所見から、半数近くの BLA ニューロンは、APC へ投射しない可能性がある。引き続き注入を続け、APC へ投射するニューロンと、投射しないニューロンとの比較を進めていく。

課題番号：30 基-067

研究課題：網膜色素上皮細胞における色素量と貪食能の評価

研究代表者名（所属）：桐生 純一（眼科学1）

【緒言】網膜色素上皮(RPE)細胞は網膜の恒常性を維持するために重要な働きをしており、特に貪食能は必要不可欠な機能である。また RPE 細胞は色素を持つことが特徴的で、その色素は経時的に増加し、細胞成熟度と相関することが報告されている。これまで色素量と貪食能の関連について明らかにした報告はない。本研究では「高色素量の RPE 細胞で貪食能は亢進している」との仮説を立て検証した。

【方法】細胞はヒト胎児 RPE を使用した。細胞の透過率から色素を定量し、低色素量群（white 群）と高色素量群（black 群）の 2 群に分けた。貪食能は培養細胞における蛍光色素標識した polystyrene 蛍光ビーズの貪食率をフローサイトメトリーにて測定し、さらに貪食能マーカーである MERTK 遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR で測定した。また細胞老化マーカーとして IL-6 の分泌量と Senescence associated β -galactosidase(Sa- β g)活性を測定した。

【結果】培養細胞における蛍光ビーズの貪食率は black 群で有意に低い値であった。さらに MERTK の mRNA 量は black 群で低下していた。一方で IL-6 と Sa- β g は black 群で有意に高値を示した。

【結論】高色素量の RPE 細胞は、低色素量の細胞と比較して貪食能が抑制されていることが明らかとなった。また貪食能の抑制に対して細胞老化が関与している可能性が示唆された。

課題番号：30 基-024

研究課題：ヒト iPS-RPE 移植に資する 2 光子励起顕微鏡による移植細胞の動態観察

研究代表者名（所属）：富田 晃生（眼科学1）

目的

2 光子励起顕微鏡を用いて網膜色素上皮細胞（RPE）内に存在する自発蛍光を in vivo imaging することで、生体の RPE の形態学的評価を行う。

方法

アルビノラットの眼球を摘出し、superfix[®]にて眼球を固定後、2 光子励起顕微鏡（ニコン、A1RMP プラス FN）を用いて強膜壁から RPE の ex vivo imaging を行った。イメージの取得は、励起光 488 nm の single photon（DU4）で RPE の位置を把握後、励起光 800nm の two photon（IR NOD）で行った。次に同様の手技を用いて、麻酔下のアルビノラットの尾側結膜を切開後、眼球に制御糸をかけ眼球を鼻側に牽引後、赤道部付近の強膜壁より RPE の in vivo imaging を行った。

結果

ex vivo imaging において、核と細胞壁と思われる低蛍光領域が観察され、核と細胞壁の間に埋めるように顆粒状の蛍光物質が認められた。一方で in vivo imaging においては、呼吸による体動により ex vivo imaging ほど詳細なイメージではないが、細胞質中の蛍光物質および核と細胞壁の低蛍光領域を観察することができた。

結論

2 光子励起顕微鏡を用いて網膜色素上皮細胞（RPE）の in vivo imaging を行うことができた。

課題番号：30 基-018

研究課題：ECT のうつ様症状改善効果と Ca²⁺放出チャンネルの変化との関係

研究代表者名（所属）：丸山 恵美（生理学2）

うつ病は全世界人口の約 4%が発症しているごく一般的な疾患であるが、その発症メカニズムは解明されていない部分が多い。ECT（電気けいれん療法）は治療抵抗性のうつ病患者に対してその症状の改善効果の有効性は広く知られているが、効果の発現機序の多くは知られていない。

我々はうつ様モデルマウスを用いて ECT の作用機序を検討してきた。その過程で海馬におけるリアノジン受容体 (RyRs) のタンパク発現量の変化および ECS (電気けいれんショック) のうつ様改善効果に RyRs が関与していることを確認した。そこで今回は RyRs による細胞内 Ca²⁺濃度の調整機構がうつ様状態でどのように変化するかを調べるため、うつ様モデルマウスの海馬の Ca²⁺イメージングを取得、RyRs の機能的変化を調べることで、うつ様症状との関連を検討することを目的とした。RyRs の Ca²⁺放出機構に変化があるかを調べるために Ca²⁺イメージング計測システムを立ち上げた。うつ様モデルマウスは C57BL/6J (♂、8-12w) を拘束水浸ストレス負荷することで作成した。海馬スライスを作成し、Ca²⁺感受性蛍光色素である Oregon green 488 BAPTA-1 AM を導入し、正立蛍光顕微鏡下で人工脳脊髄液を灌流させながらチャンバー内にスライスをセットした。デジタル CMOS カメラにて蛍光画像を撮像、イメージングソフトウェア cellSens にて RyRs 刺激剤であるカフェインによる蛍光強度の変化を計測することで RyRs の Ca²⁺放出能がうつ様症状の程度によって変化するのかを調べた。

課題番号：30 基-056

研究課題：Voxel-Based Specific Regional System for Alzheimer's Disease (VSRAD)を用いた全脳照射後の脳萎縮の定量評価

研究代表者名（所属）：釋舎 竜司（放射線腫瘍学）

【背景】全脳照射後の有害事象である認知機能の低下は、海馬の萎縮が原因と推測される。

【目的】MRIを用い全脳照射後の海馬の萎縮を評価する。また、照射前後の認知機能を評価する。

【対象】A群：2008年4月-2017年3月までに当院で予防的全脳照射（PCI）を行い、照射前後のMRIで脳萎縮の評価を後方視的に行った13例。

B群：2016年4月-2019年3月までに当院でPCIを受け、VSRAD[®]を用いた前向き試験に参加の同意が得られた6例。

【方法】A群を対象に、MRIで内側側頭部の萎縮を視覚的に4段階に分類した。

B群を対象に、VSRAD[®]で海馬の「萎縮度」と「萎縮比」を算出した。

また、認知機能の評価に改訂長谷川式簡易知能評価スケール（HDS-R）と自覚症状で総合的に判定した。海馬の萎縮度と認知機能低下に相関があるか、カイ二乗検定で検証した。

【結果】A群では、脳萎縮はスコア0：2例、スコア1：5例、スコア2：2例、スコア3：4例であった。認知機能低下は2例に認め、スコア3の海馬萎縮と相関が見られた（ $p=0.0073$ ）。B群では、海馬に選択的な萎縮がある症例が存在したが、HDS-Rで認知機能の低下は認めなかった。

【考察】A群では海馬萎縮が認知機能低下と相関し、認知機能低下に先行していた。萎縮の進行をモニタリングすることで、認知機能低下を予見できる可能性が示唆された。今後はB群の結果も合わせ、海馬萎縮と認知機能の低下の相関をさらに検討する予定である。

課題番号：30 基-045

研究課題：神経生検における無髄線維の簡便評価法の確立

研究代表者名（所属）：西村広健（病理学）

【背景】神経生検の検索方法論は非常に複雑で、一般的な生検材料による病理学的検索とは大きく方法論が異なる。通常の病理診断で行われるホルマリン固定パラフィン標本（FFPE）による検索は、標本作製方法論的に末梢神経の軸索・髄鞘を破壊するために適応不可であり、グルタルアルデヒド固定材料を用いたエポン包埋1 μ m切片標本による顕微鏡観察と電子顕微鏡観察、ときほぐし標本による顕微鏡観察が検索の基本となるが、病理検査室での運用が難しい。特に無髄線維は髄鞘染色が適応できないため、電顕以外で評価できない。

【目的】病理ルーチン検査で行われるFFPE検体を用いた免疫染色で、軸索・髄鞘の評価、無髄線維脱落のスクリーニングができるか否か検討する。

【方法】神経生検例に対して、FFPE検体を用いた免疫染色で軸索（PGP 9.5, NF）、髄鞘（schwann2E）の評価を行い、エポン包埋切片と比較する。

【結果】1) 軸索染色と髄鞘染色で、各々の数とサイズ（小径か大径か）が把握できる、2) PGP 9.5は無髄を含めた軸索の描出ができ、schwann2E陽性の髄鞘数と比べると無髄線維の数・分布が把握できる、3) エポン包埋切片との比較ができる、ことが分かった。

[考察] 今後、症例数を増やし、電顕による超微形態との比較検討を加えて、有用性についてさらに検討する。

課題番号：30 基-044

研究課題：家族性アミロイドポリニューロパチー TTR E61K の神経変性機序の研究

研究代表者名（所属）：村上龍文（神経内科学）

トランスサイレチン(TTR)型家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)は感覚優位ポリニューロパチーと自律神経障害を示すがその神経障害機序は不明である。われわれは FAP TTR E61K で発症後 7 年にも関わらず腓腹神経内膜にアミロイド沈着が認められない孤発例を経験した。他施設より報告されている FAP TTR E61K 3 例でも神経内膜にアミロイド沈着は認められていない。

そこでその病態機序を明らかにするためまず E61K TTR 蛋白のアミロイド凝集能を調べた。Wild TTR, E61K TTR, V30M TTR の各組み換え蛋白を酸性条件で 37°C、72 時間静置しアミロイドを形成させ、チオフラビン T 結合測定を施行した。E61K TTR のアミロイド凝集能は TTR V30M より有意に低く、正常 TTR と同程度であった。

次に神経障害機序解明のため E61K TTR の神経細胞への影響を調べた。Wild TTR、E61K TTR、V30M TTR の各組み換え蛋白を、ラット初代後根神経節培養細胞に加え神経突起成長抑制効果を調べた。V30M TTR を添加した培養上清では神経突起成長が有意に抑制されたが、E61K TTR では抑制効果はなく、Wild TTR と同程度であった。

E61K TTR のアミロイド凝集能は軽度で、神経内膜にアミロイド沈着が認められない原因だと考えられた。本変異の感覚神経細胞障害機序についてはさらに検討が必要である。

課題番号：30 基-022

研究課題：マイクロスフェア脳塞栓による認知症モデル動物の海馬の電気生理学的特性

研究代表者名（所属）：氷見直之（生理学 2）

軽度な脳梗塞では運動障害を伴わず記憶能の低下が生じる。そのメカニズムを解明するために、マイクロスフェア(MS)脳塞栓モデルラット脳の神経細胞間の伝達効率の変化を電気生理学手法により示すことを目指している。

H29 年度プロジェクト研究にて、MS を 3,000 個注入し脳塞栓を生じさせたモデルラットでは運動障害を伴わず空間記憶能（モリス水迷路）が低下したが、その要因として MS 注入による海馬脳血流の低下 ($76.2 \pm 6.7\%$) による虚血が考えられた。このモデルを本研究にて引き続き使用した。脳塞栓ラットは、8 週齢の SD ラットの麻酔後頸部を切開し、外頸および翼口蓋動脈を一時的に閉止した状態で総頸動脈より MS (径 $45 \mu\text{m}$) を注入し作製した。sham 群は同様の手法で生理食塩水のみを注入した。

塞栓作製 7 日後の脳組織よりスライス標本を作成し、電気生理学的手法にて海馬ニューロンの活動を記録した。CA1 ニューロンのチャネル特性および CA3-CA1 シナプスにおける paired pulse facilitation (PPF) において MS 群と sham 群間に有意な差はなかった。一方シナプス伝達効率の変化を裏付ける生化学的データとして海馬の前シナプス (synaptophysin) および後シナプス (PSD95) の発現をウエスタン

プロットにて比較した結果、sham 群に比べ MS 群で PSD95 が有意に低下していた。

課題番号：30 基-025

研究課題：新規アデノシンアナログ COA-Cl の脊髄損傷に対する治療効果とその作用機序-動物モデルを使った研究

研究代表者名（所属）：宮本 修（生理学2）

【目的・背景】我々は、脳卒中モデル動物を使ってアデノシンアナログである COA-Cl の神経細胞保護効果とその作用機序について既に報告している。今回、COA-Cl の脊髄損傷に対する治療薬としての可能性について検討した。

【方法】8 週齢ラット（SD 系、♂）を麻酔後に脳・脊髄固定装置にセットして、椎弓切除後に脊髄 T8 へ 20g の重りを 25 mm の高さから落下し、そのまま 1 分間静置して脊損モデルを作製した。脊損ラットに COA-Cl を 6mg/kg の投与量で損傷直後から 1 日 1 回、4 日後まで計 5 回腹腔内投与した。コントロールとして生食投与群および Sham 手術群も同時に作製した。損傷から 4 週間に渡って運動機能（BBB スコアと傾斜台試験）を測定した。測定終了後に灌流固定、凍結脊髄切片を作製して HE 染色にて組織障害の定量解析を行った。また、損傷 1 週間後に同様に脊髄切片を作製して TUNEL 染色を行いアポトーシスの観察を行った。

【結果】運動機能について COA-Cl 投与群は対象群に比べて損傷 1 週間後には有意な改善が見られ、4 週間後においても機能回復が続いた。また、組織障害については、COA-Cl 投与群で空洞体積及び TUNEL 陽性細胞の減少が見られ、COA-Cl の脊損に対する治療薬としての可能性が示唆された。

課題番号：30 基-037

研究課題：鳥類の心臓ポンプ機能に関する細胞・分子レベルからの基礎的検討

研究代表者名（所属）：氏原 嘉洋（生理学1）

現生する鳥類の心臓は二心房二心室であり、臓器レベルの形態は哺乳類に類似している。一方、哺乳類の心筋細胞でみられる T 管膜構造が鳥類には存在しないなど、細胞レベルでは両者の間に大きな相違があることから、鳥類は哺乳類とは異なる仕組みで高い心臓ポンプ機能を発揮している可能性がある。そこで本研究では、鳥類の心臓を細胞・分子レベルで解析するための実験系を構築した。まず、ウズラの心筋細胞の単離方法の確立を行った。マウスやラット（哺乳類）と同様に、体内から取り出した心臓を大動脈からコラゲナーゼ、トリプシン、プロテアーゼを含む酵素液を逆行性にかん流することで、単离心筋細胞を採集できた。単离心筋細胞の形態を解析したところ、ウズラの心筋細胞の形態は、二心房一心室で心筋細胞に T 管膜のないミシシippアカミミガメ（爬虫類）に類似し、ラットやマウスと比較して細長かった。サルコメア長に関しては、ラットやマウスと同程度で、カメよりも短かった。電気刺激によって単离心筋細胞の収縮を惹起し、弛緩挙動を解析したところ、ウズラの心筋細胞はカメよりも弛緩スピードが速かった。Ca²⁺トランジェントを計測したところ、ウズラの心筋細胞は、カメよりも Ca²⁺排出スピードが速かった。以上のことから、ウズラの心筋細胞は、形態的にはカメに類似しているが、T 管膜に頼らずに弛緩能を向上させていることがわかった。

課題番号：30 基-041

研究課題：筋弾性蛋白質コネクチンを介した心臓調節機構の基礎研究

研究代表者名（所属）：花島章（生理学1）

心臓は血液循環を通して酸素や栄養を全身に供給しており、そのポンプ機能は血圧や血液拍出量など力学的環境に応じて最適化されている。この適応機構には力学的情報を感知するメカノセンサーが必要であるが、その実体はあまり解明されていない。そこで本研究では、心臓拡張時に受動的張力を発生させ、サルコメア構造を維持する役割を果たしているバネ蛋白質コネクチンがメカノセンサーとして働き、心臓の構造と機能を調節していることの解明を多角的な解析により進めた。まず、心臓で多く発現している機能が未解明な新規コネクチン結合蛋白質の KO マウス解析を開始し、その特徴を探ったところ、心臓の構造に大きな差が見られないが、心筋コネクチンの発現量が増加していること、及び心筋細胞のカルシウム回収に関わる蛋白質が増加していることを見出した。また、肺高血圧症による右心不全モデルラットを作製し、心臓力学特性変化によってコネクチンが長いバネ領域を持つアイソフォームに変化することを明らかにした。さらに、軟骨魚類心臓の構造とコネクチンについて比較生理学的解析を行った結果、軟骨魚類コネクチン弾性領域は遺伝子上、独自進化の領域を持つが、心臓においてはスプライシングにより取り除かれて、哺乳類や鳥類の成体心臓と類似した短いコネクチンとなっていることが明らかとなった。軟骨魚類と哺乳類の比較からメカノセンシング機能に重要な領域やその機能を推定中である。

課題番号：30 基-008

研究課題：近赤外線蛍光顕微鏡による生体内心外膜側冠微小血管の ICG 冠動脈内投与による評価

研究代表者名（所属）：矢田 豊隆（生化学）

【背景】 本研究は、indocyanin green (ICG)の蛍光輝度を増加させる血中アルブミンと有機溶媒 dimethyl sulfoxide (DCF)で ICG を混注後、冠動脈内投与し、冠動脈内で蛍光発光するか否かについて、また、内皮依存性過分極(EDH)を介した血管拡張反応について、腹腔鏡を応用開発した近赤外線 ICG 蛍光生体顕微鏡を用いて、明らかにした。

【方法】 1)ICG 単独群、2) ICG+アルブミン(alb,10g/50ml)群、3) ICG+DCF 群、4) ICG+alb +DCF 群で各群を注射器による蛍光発光輝度の比較を行い、麻酔開胸犬を用いてブラジキニン投与時の EDH を介した血管拡張効果を評価した。

【結果】 注射器内の ICG 単独群に比べ、ICG+alb 群、ICG+DCF 群、ICG+alb+DCF 群の順に、蛍光輝度の増加を認め、一方、犬生体内冠動脈内投与時、ICG 単独群では、血管内の蛍光輝度を認めず、他群では蛍光輝度の増加を認めた。内皮依存性血管拡張薬ブラジキニン投与時には、冠微小血管において血管拡張を認め、その反応は、EDH としての過酸化水素の分解薬であるカタラーゼ投与により、抑制された。

【結論】 近赤外線蛍光生体顕微鏡を用いて ICG 冠動脈内投与時には、alb と DCF の混注が有用であり、EDH としての過酸化水素の拡張作用が明らかとなった。

課題番号：29 若-003

研究課題：早産、感染における大脳皮質発生に関する解析

研究代表者名（所属）：石田 剛（産婦人科学 1）

【緒言】早産の原因の 8 割で母体における子宮内の局所感染が関与し、早産の児の神経障害の予後は感染症が重要な原因である。しかしそれが早産による未熟性によるのか、感染症によるものかは現在のところ分かっていない。

これまでの報告にある子宮内感染のモデルマウスを用いて、子宮内感染が胎児の神経発育にどのように影響するか検討を試みた。

【方法】妊娠 16 日目のマウスの子宮と卵膜の間に LPS を投与した。LPS の濃度によって流産率を調べ、流産をしない LPS の濃度を検討した。更にはその濃度において、LPS を投与した翌日の胎児マウスと、出生直後の新生児マウスの脳組織中の炎症反応の発現をリアルタイム PCR で測定した。

【結果】今回の実験では、これまでの報告よりも更に 100 倍以上希釈した量において流産しない境界があった。

流産しない上限の LPS 投与濃度を投与した翌日と、出生直後のマウスの脳組織中の炎症反応の発現をリアルタイム PCR を用いて測定したところ、LPS を投与した次の日は炎症反応が高いが、出生後はむしろ低下していた。

【考察】今回の研究で少なくとも LPS を投与した直後に炎症反応の上昇は確認されたものの、実際の早産症例の様に、慢性化した炎症反応上昇のモデルの確立が必要であると考えている。これにより、出生後の脳においても炎症反応の上昇が確認できれば、早産に至らない程度の炎症反応の上昇が神経発生に及ぼす影響を検討できると思われる。

課題番号：29 基-034

研究課題：帝王切開時の羊水曝露を最小化することによる羊水塞栓症発症メカニズムの解明とその臨床応用に関する検討

研究代表者名（所属）：下屋 浩一郎（産婦人科学 1）

【緒言】

周産期医療の進歩に伴って妊産婦死亡は年間 50 人以下になるまで改善してきているが、依然として重要な課題である。妊産婦死亡の 3 大要因は出血、産科的塞栓症、妊娠高血圧症候群である。羊水塞栓症発症には羊水の母体血中への流入が必要条件であり、流入した羊水が、血小板・白血球・補体の活性化などを来すことが病態として考えられている。羊水塞栓症のリスクを特に高める因子として帝王切開術があり、wound retractor (WR) 使用による母体ケミカル・イーター増加抑制の有無を明らかとし、羊水塞栓症発症予防の方策を見出すことを目的とした。

【方法】

十文書による同意が得られた未破水の予定帝王切開術症例を対象とし、同意を得られた症例を対象に WR 使用群と非使用群の 2 群間で以下の比較を行う。帝王切開術の際に術前、児娩出後 10 分、児娩出後 2 時間での母体採血を行い、血清保存を行う。血清中の凝固因子、補体系などのケミカル・イーターの測定を行い、WR 使用の有無による両群間の差異を統計学的解析を行う。なお、本研究は本学ならびに本学附属病

院の倫理委員会承認（課題番号 3203）により実施している。

【結果ならびに考察】

現在、症例を蓄積して解析を進行中である。本研究にて帝王切開前後における母体のケカルゲ イーターの活性化が wound retractor の使用によって軽減されることが明らかとなれば積極的に wound retractor を使用していく根拠となると考えられる。

課題番号：30 基-040

研究課題：膀胱移行上皮細胞をモデルとしたフィトセラミド構造の機能解析

研究代表者名（所属）：松田 純子（病態代謝学）

スフィンゴ脂質は細胞膜の外層に存在する膜脂質の一種で、脂質部分がセラミド骨格からなる。セラミド骨格はスフィンゴシン塩基と脂肪酸からなり、それぞれに構造多様性がある。小腸上皮細胞には、セラミド骨格のスフィンゴシン塩基の C4 位に水酸基が付加した「フィトセラミド構造」が特徴的かつ豊富に存在する。しかし、その生物学的意義は明らかになっていない。そこで、我々はフィトセラミド構造の合成に関わる酵素遺伝子 *Des2* のノックアウトマウス (*Des2*-KO) を世界に先駆けて作成し、その表現型解析に取り組んでいる。

本研究では、*Des2*-KO に水腎症が散見されることから、膀胱組織の表現型解析を行った。薄層クロマトグラフィー (TLC) および液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) による脂質分析の結果、野生型マウスの膀胱組織では、グルコシルセラミドが主要なスフィンゴ脂質で、その多くはフィトセラミド構造 (t20:0-h24:0) を持ち、*Des2*-KO では、それらが欠損し、d20:0-h24:0 に置き換わっていた。病理組織学的解析の結果、*Des2*-KO の膀胱組織では、移行上皮細胞の最表層に存在する Umbrella cell が、重症度および日齢と相関して著明に空胞化していた。Umbrella cell の頂端膜に発現し、膀胱の伸縮に必須とされる膜タンパク質 Uroplakin の免疫組織染色を行なったところ、*Des2*-KO では、その発現が消失していた。

以上の結果より、フィトセラミド構造は、マウスの膀胱に豊富に存在することが明らかになり、膀胱の伸縮を含めた膀胱移行上皮細胞の機能発現に必須である可能性が示された。

課題番号：30 ス-003

研究課題：nano LC-MS/MS を用いたショットガン比較プロテオミクスによるサポシン D 変異マウス脳の病態解析

研究代表者名（所属）：渡邊悦子（病態代謝学）

【背景と目的】サポシン (SAP-A, B, C, D) はスフィンゴ脂質のリソソームでの分解において、加水分解酵素と共に必要な疎水性糖タンパク質で、前駆体タンパク質のプロサポシン (PSAP) から生成される。ヒトでは、PSAP, SAP-A, B, C の各欠損症が知られており、いずれも小児期に重篤な神経症状を呈する。SAP-D 欠損症の報告はないが、PSAP の SAP-D 領域にアミノ酸変異 (Cys509Ser) を導入した SAP-D 変異マウスは、PSAP の神経細胞内蓄積を認め、多彩な神経病理学的変化を呈する。本研究では、SAP-D 変異マウスの神経病態を解明するために、SAP-D 変異マウスと野生型マウスの脳組織を用いてシ

ショットガン比較プロテオミクスを行った。

【結果】野生型マウスに比較して、SAP-D 変異マウスにおいて有意に変動するタンパク質を 34 個見出した。発現上昇するタンパク質には、CTSD や CTSB などのリソソーム関連因子、BIP や CANX などの ER シャペロンが同定された。発現低下するタンパク質には、Ca²⁺-ATPase である ATP2B と ATP2B3、皮質形成異常の原因遺伝子の 1 つである PI4KA、モータータンパク質である MYH10 が同定された。

【考察】SAP-D 変異マウスの神経病態にリソソーム機能障害、ER ストレス、カルシウム恒常性の破綻が示唆された。PI4KA、MYH10 の発現低下に関しては今後検討課題である。

課題番号：30 基-028

研究課題：スフィンゴ糖脂質代謝異常症の病態発症分子機構の解明 =スフィンゴ糖脂質代謝産物の細胞内動態解析技術の開発=

研究代表者名（所属）：郷 慎司（病態代謝学）

スフィンゴ糖脂質（糖脂質）は細胞膜外層の構成成分の一つであり、「糖鎖」と脂質である「セラミド」からなる両親媒性の分子である。細胞膜上において各糖脂質はそれぞれ固有のタンパク質群と機能性複合体：「ラフト」を形成し、様々な細胞機能を制御する。糖脂質の代謝は、「小胞体～ゴルジ体」を輸送されながら生合成され、「細胞膜」上で集積してラフトを形成して機能を発揮し、「リソソーム」にて分解されることで恒常性が保たれると考えられてきた。この一連の代謝の異常によって、がん、糖尿病、ライソゾーム病などさまざまな病気を発症することが知られている。本研究では、糖脂質代謝異に起因する病態発症機構を真に理解するため「細胞内における糖脂質代謝の流れを分子レベルで把握するための基盤技術の確立」を目指した。蛍光標識糖脂質（およびその中間産物の蛍光標識体）、生化学・細胞生物学的手法を用いて、細胞内の糖脂質代謝の流れ、代謝の場の可視化を目指した。蛍光標識糖脂質および蛍光標識糖の添加培養によって特定の糖脂質の細胞内局在がある程度可視化できた。生化学的な細部分画と組み合わせることによってより詳細な局在がわかったものの、脂質は通常の方法では固定できず流動的であるため、今後、固定法を含めた細胞の前処理法を検討する必要がある。

課題番号：30 基-011

研究課題：リソソーム酵素活性の時間的・空間的評価法の開発

研究代表者名（所属）：大友 孝信（病態代謝学）

リソソームは酸性の細胞小器官であり、内部のリソソーム酵素の働きで様々な基質を分解している。これまでリソソーム酵素の活性は、細胞をリソソーム膜もろとも破碎して酵素を遊離させたうえで、人工基質とともに酸性のバッファー内でインキュベートする人工的な系で測定されてきた。しかしこの方法では酵素活性の位置情報が失われるため、細胞内でのリソソーム酵素や基質の局在変化、酸性条件の変化などを反映出来ない問題がある。

まず我々は、4-Methylumbelliferone (4-MU) などの一般的な人工蛍光基質を用い、細胞を破碎する従来の方法でリソソーム酵素活性を網羅的に測定することを試みた。蛍光マイクロプレートリーダーを用いて 13 種類のリソソーム酵素活性の測定が可能となった。

次に、4-MU 基質と蛍光顕微鏡を用いてリソソーム酵素活性の空間的な情報を得ることを試みたが、細胞全体がびまん性に蛍光を発するのみで、特にリソソームの位置に合致した酵素活性の蛍光シグナルは認めなかった。これは 4-MU の拡散速度が非常に速いためであると推測され、今回我々の高感度の蛍光顕微鏡でも検出することは出来なかった。活性染色を行うことができる他の蛍光基質では酵素活性の空間情報を得ることが出来たため、4-MU で位置情報を得るためには修飾を施し生細胞内で局在を保持するか、より高感度なカメラを観察に用いる必要があると考えられた。

課題番号：30 基-061

研究課題：バレット食道におけるバレット腺癌リスクマーカーの検討

研究代表者名（所属）：村尾 高久（消化管内科学）

背景：我々は前回の研究でバレット食道が 3cm に満たないバレット食道 (Short Segment Barrett's Esophagus;SSBE) から発症した食道腺癌 (esophageal adenocarcinoma;EAC) の背景粘膜における *PDZK1* の発現量が対照群と比較し有意に高発現であることをつきとめた。*PDZK1* (Postsynaptic density 95/discharge/zona occludens domain-containing protein) は、消化管などの頂端に発現する PDZ ドメインタンパク質の一種で、癌の増殖、転移および薬剤耐性の調節に関与していることが報告されているものの、EAC 発症における *PDZK1* の役割は明らかとなっていない。

目的：EAC 細胞株における *PDZK1* の機能を *in vitro* で分析、評価し、EAC 発癌機構を同定することを目的とした研究を行うこととした。マイクロアレイのデータベースで食道腺癌の細胞株 (OE19,OE33) の遺伝子発現を検索したところ、*PDZK1* の恒常的な発現は認められるものの、他の癌腫と比較し有意な高発現を示していなかった。そこで *PDZK1* の強制発現によって EAC 細胞株にどのような生理的機能の変化を及ぼすかを解析した。

結果：*PDZK1* 過剰発現およびノックダウンプラスミドを構築し、OE33 細胞にトランスフェクトした。ウェスタンブロット分析で、空ベクターでトランスフェクションした B5 細胞と比較して、P4 細胞および P5 細胞株で *PDZK1* 発現が効果的に過剰発現されることを確認した。EZ-TAXIScan™ による細胞遊走能の評価を行ったところ、空ベクターを導入した B5 と比較し、*PDZK1* を発現させた OE33 の細胞株 B4、B5 はそれぞれ細胞の移動距離、移動速度が有意に向上した。アネキシン V-フルオロレインステイニングキットによるアポトーシス検出では、明らかなアポトーシスの増加は認められなかった。引き続き実験条件を変更しながら検証を重ねていく予定としている。また並行して細胞の増殖能の測定を現在実施しており、結果を解析中である。今後は細胞接着能や腫瘍感受性アッセイや慢性逆流性食道炎モデルを用いた動物実験への展開を検討している。

課題番号：30 基-012

研究課題：機能性ディスペプシアの病態と消化管微生物との関連に関する検討

研究代表者名（所属）：大澤元保（消化管内化学）

背景：機能性ディスペプシア (FD) は、症状の原因となり得る器質的疾患がないにもかかわらず、慢性的に心窩部を中心とする腹部症状を呈する疾患である。FD の病態は解明されていない部分が多く、遺伝

的要因、微小炎症、食物アレルギー、消化管内微生物等を含む消化管内環境の変化などの関与が推測されている。本研究はFDにおいて胃内の微生物が消化管に与える影響を検討する前研究として、*H. pylori*以外の胃内微生物の存在を検討するため、*H. pylori*感染者、健常者、*H. pylori*除菌後患者の胃粘液のメタゲノム解析を行った。

方法：通常の上部消化管内視鏡検査時に生検鉗子で胃粘膜を擦過し胃粘液サンプルを採取した。胃粘液のDNAを抽出し、NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kitを用いてMetagenomic Libraryを作成後、MiSeqでシーケンスを行った。ヒト由来の配列を除いたDNA配列をblastnで照合した。

結果：対象は*H. pylori*陽性者3例、*H. pylori*陰性健常者2例、*H. pylori*除菌後患者3例、*H. pylori*陽性胃癌および胃腺腫患者3例、*H. pylori*除菌後胃腺腫患者1例であった。各サンプルのトータルリード数の平均は4283468リードであった。ヒトとコントロールDNA(phiX)のリードを除いたリード数の平均は3066リードであり、全体の0.1%にしか満たなかった。ヒト由来の配列を除き、blastnで照合した結果、*H. pylori*、*H. canicola*、*H. parainfluenzae*、*H. influenza*、*E. coli*、*E. aerogenes*、*B. miyamotoi*が多くを占めていた。*H. pylori*陽性サンプルでは*H. pylori*が細菌構成比の大半を占めていた。*H. pylori*陰性サンプルでは細菌構成比に大きな隔たりはなかった。

課題番号：30基-013

研究課題：過敏性腸症候群の病態と腸内微生物との関連に関する検討

研究代表者名（所属）：塩谷昭子（消化管内科学）

対象・方法：下痢型過敏性腸症候群(IBS-D)の患者7例（平均年齢57.4歳、男性4名食物アレルギー陽性者2名）あるいは健常対照者5例（平均年齢58.4歳、男性3名）に対して、以下の研究を行った。通常の前処置の後に大腸内視鏡検査を行い、内視鏡下にブラシを用いて回腸末端粘液を採取した。DNAを回収し、MiSeqによる16Sリボゾーム遺伝子のV3-V4アンプリコンシーケンス解析を実施した。末梢血を採取し、17種の食物抗原を含むMAST-36と血清サイトカインプロファイルを評価した。サイトカインプロファイルは、Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Immunoassayを使用して測定した。血清サイトカイン値や、食物アレルギーの有無と腸内細菌プロファイルとの相関を、JMPを用いて評価した。結果： α 多様性に関しては、いずれの評価項目においても健常対象群とIBSD群に差は認めなかった。門レベルでの細菌構成に関しても健常対象群とIBS-D群はほぼ同様であったが、Lachnospiraceae科がIBS-D患者群で有意に少ない結果であった。食物アレルギーと腸内細菌の関連に関しては、食物アレルギー感作陽性IBS-D群はLachnospiraceae科が多く、Clostridiaceae科が少ない結果であった。サイトカインと腸内細菌の関連では、健常対象群においてLachnospiraceae科はIL-17の低値及びIL-6の高値と相関し、Clostridiaceae科はIL-4低値とIL-1 β 高値と相関した。結論：IBS-D患者において食物アレルギーの有無によって腸内細菌叢の変容が認められ、その変容は全身性の微小炎症とも関連している可能性が示唆された。

課題番号：30基-050

研究課題：炎症性腸疾患の病態と腸内微生物との関連に関する検討

研究代表者名（所属）：石井学（消化管内化学）

背景：近年の技術革新により腸内細菌叢解析は飛躍的な進歩をとげている。消化管内細菌叢は、管腔内だけでなく消化管粘膜上皮・粘液層にも存在する。腸内細菌研究の多くが糞便を用いた研究であるが腸管粘膜・粘液に付着している細菌叢（粘膜関連細菌叢）を検討した臨床研究は少ない。**目的：**消化管粘膜付着粘液サンプルならびに糞便サンプルを用いて潰瘍性大腸炎（UC）の腸内細菌叢の多様性と特徴を明らかにする。**方法：**通常の 2 リットルのポリエチレングリコールを用いた前処置を行った大腸内視鏡検査時に、ブラシを用いて S 状結腸粘膜より腸粘液を採取した。糞便は内視鏡検査日の朝採取した。各サンプルから DNA を回収し、16S リボゾーム遺伝子のシークエンス解析を実施した。QIIME を用いて実験上の分類単位（OUT）ごとに微生物の科ないし属レベルまでの同定を行い、細菌構成比について検討した。多様性について Shannon-Wiener Index、observed species、chao1、PD whole tree により検討し、*UniFrac-PCoA* 解析を行った。**結果：**対象は左側結腸型 UC 患者 7 名（平均年齢 49.3 歳、男性：女性=3：4）、健常者 13 名（平均年齢 50.9 歳、男性：女性=2：11）。粘液ブラッシングサンプルと糞便サンプルの細菌叢は異なる傾向を認めた。細菌構成比に両群間で有意な差を認め、UC 群において、粘液サンプルでは *Phascolarctobacterium* 属が少なく、便サンプルでは *Granulicatella* 属・*Actinomyces* 属・*Oscillospira* 属が多かった。粘液の細菌叢の多様性に有意な差を認めなかったが、便では UC 群で多様性が減少していた。

課題番号：30 基-077

研究課題：コルチゾール合成・代謝・作用機構についての研究—血中ステロイド分画同時測定による評価—

研究代表者名（所属）：宗 友厚（糖尿病・代謝・内分泌内科学）

コルチゾール(F)は、活性型グルココルチコイド(GC)の代表として、糖質のみならず脂質・蛋白質・核酸といった基本物質の代謝や循環調節を司る。その産生はフィードバック調節の代表である視床下部-下垂体-副腎系により巧妙に調節されるほか、 11β HSD タイプ 2 によるコーチゾン(E)への不活化や、 11β HSD タイプ 1 及び H6PD による F への再生(賦活化)、など受容体前の局所代謝も重要で、GC 作用の総体的把握には産生～代謝の各ステップを反映する指標が必要である。本研究は、交叉反応や測定誤差を克服できる LC-MS/MS 法を用いて、複数ステロイドの血中濃度を同時に定量し、各合成酵素活性 (product/precursor 比)や F～E 間代謝状態の指標も加え、様々な検討を進めることが目的である。耐糖能正常者に於ける検討では、 $DHEA < F < S < 17OHP5$ の順に強く ACTH と正相関し、酵素活性も 11β -hydroxylase $< 3\beta$ HSD $< 17,20$ -lyase の順に強く ACTH と負相関した。さらに収縮期・拡張期血圧は S や 21 -hydroxylase 活性と正相関、脂質系では HDL-C と F・PRA は正に相関、TChol・LDL-C・HDL-C は P4 と正相関、糖代謝系では FPG が $17,20$ -lyase 活性や 11 -oxoreductase 活性と負相関、FIRI・HOMA-R が F や 11 -oxoreductase 活性と負相関するなど、GC 作用の各ステップが血圧調節や糖脂質代謝と多様に関連することが判明した。下垂体機能低下症を含め様々な原因に起因する副腎皮質機能低下症や、副腎癌症例や再発を繰り返した Cushing 病症例の経過に於いても、合成酵素活性や血中濃度の総括的な把握が可能であった。今回は、Subclinical 及び顕性の副腎性 Cushing 症候群症例、典型的な Cushing 病症例、原因不明の ACTH 過剰症の計 4 例に於いて、合成酵素活性を見ることができ、診断や治療に際し極めて

有用な方法であることが確認された。

課題番号：30 基-029

研究課題：食欲と肥満を抑制的に制御する機能性脂質の新規生合成機構の解明

研究代表者名（所属）：坪井 一人（薬理学）

N-アシルエタノールアミン(NAE)は食欲抑制などの多彩な生物活性を示す機能性脂質であり、内因性の抗肥満物質である。その生合成においては、まず、膜リン脂質であるホスファチジルエタノールアミン(PE)に Ca 依存性 *N*-アシル転移酵素が作用して *N*-アシル-PE が生成する。我々は、本酵素がリン脂質であるホスファチジルセリンによって活性化されることを見出した。*N*-アシル-PE は *N*-アシル-リゾ PE に代謝された後、加水分解酵素グリセロホスホジエステラーゼ 7 (GDE7)の作用で NAE を遊離する。ヒト腎臓 HEK293 細胞に GDE7 を発現させたところ、膜画分の NAE 生成活性は μM オーダーの Ca によって活性化した。細胞染色の結果、GDE7 は小胞体に局在していたことから、GDE7 が小胞体内腔の Ca によって常時活性化されている可能性と、細胞質の Ca 濃度が上昇した時に活性化される可能性が考えられた。そこで、GDE7 の Ca 結合部位が小胞体膜の内腔側か細胞質側か、いずれを向いているか解析する目的で、細胞膜を選択的に可溶化する界面活性剤ジギトニンを用いて免疫染色を行うこととした。予備的検討の結果、ジギトニンの適正濃度などの詳細な条件設定が必要であることが分かったので、マーカー蛋白質に対する抗体を用いて現在検討中である。以上、本研究では NAE の生合成酵素の活性化機構について検討を行った。

課題番号：30 若-004

研究課題：SGLT2 阻害薬投与に伴うエネルギー恒常性維持生体反応 = 腎・消化管連関の解明 =

研究代表者名（所属）：下田 将司（糖尿病・代謝・内分泌内科学）

【背景】Sodium glucose co-transporter 2(SGLT2)阻害薬は尿糖排泄促進により血糖値を改善し、体重を減少させる。一方、SGLT2 阻害薬投与後に食欲亢進を訴える患者が多くみられ、これはエネルギー恒常性維持のための防御機構の存在が示唆される。そこで、我々はそのエネルギー恒常性維持機構の一つとして、グルコースの体外排泄調節を担う『腎臓』とグルコースの体内流入調節を担う『消化管』の関係に着目し、SGLT2 阻害薬が消化管糖輸送担体 SGLT1、GLUT2 発現増加を介し糖輸送能を亢進させ、GIP や GLP-1 の分泌を増加させることを報告してきた。これまで肥満 2 型糖尿病モデル db/db マウスを用いて検討してきたが、SGLT2 阻害薬が消化管糖輸送を亢進させる機序として、血糖改善の影響は不明である。【目的】SGLT2 阻害薬が消化管糖輸送を亢進させる機序として血糖改善の影響を検討する。【方法】正常血糖モデルマウスを SGLT2 阻害薬 luseogliflozin 投与群、非投与群にわけ 2 週間介入後、消化管での糖輸送担体発現、糖輸送能やインクレチン分泌能を比較検討する。【結果】消化管での糖輸送担体発現、糖輸送能やインクレチン分泌能は luseogliflozin 投与群で非投与群に比し亢進していた。【結語】SGLT2 阻害薬は血糖低下とは独立して消化管糖輸送を亢進させる。

課題番号：30 基-030

研究課題：性差医療に向けた糖尿病性血管障害形成における血管機能の解明

研究代表者名（所属）：竹之内 康広（薬理学）

【目的】一般に血管機能障害のリスクは、女性は男性に比べ低いことが知られているが、糖尿病ではそれは逆転することが報告されている。これまでにストレプトゾトシン誘発 1 型糖尿病モデルマウスにおいて雌雄共に内皮依存性弛緩反応に障害を受けるが、その経路が異なることを報告している。本研究では、雌での障害に着目し、閉経前後での血管機能の変化を明らかにすることを目的とした。

【方法】雌性 ICR マウス 4 週齢で卵巣摘出手術を行い、5 週齢でストレプトゾトシン 投与により糖尿病モデルとした。その後 4 週または 6 週間経過したマウスの胸部大動脈および腎動脈を摘出し、マグヌス法により血管反応性を測定した。

【結果および考察】卵巣摘出を行った糖尿病モデルマウスは正常マウスに比べ、腎動脈のフェニレフリンに対する血管収縮亢進および胸部大動脈におけるアセチルコリンに対する弛緩の減弱が認められた。これは、女性の糖尿病患者で閉経後に血管収縮応答が亢進する現象と一致しており、閉経が糖尿病における血管機能異常に大きく関与することが明らかとなった。また、Rho kinase 阻害薬の前処置により卵巣摘出を行った糖尿病モデルの腎動脈での収縮の亢進は抑制された。このことから収縮時の Rho kinase の活性上昇がこの収縮亢進に関与していることが示唆され、この酵素活性をコントロールする事により糖尿病合併症の回避、および糖尿病病態時の閉経前後での適切な治療に繋がる可能性が考えられる。

課題番号：30 基-049

研究課題：機能的 MR imaging による早期糖尿病性腎症の画像的評価

研究代表者名（所属）：山本 亮（放射線診断学）

【目的】MRI を用いた機能的画像診断を応用することにより、非侵襲的に早期糖尿病性腎症の画像変化を解明し、早期診断の新たな指標としての有用性を検討することである。【対象と方法】糖尿病性腎症と診断された患者 5 症例に対し機能的 MRI 撮像法として T1 mapping＝線維化の評価、T2 mapping＝浮腫の評価、BOLD＝還元ヘモグロビン量、IVIM＝微小組織循環の評価、ADC＝線維化の評価、ASL＝循環血流量評価、Time-SLIP＝浮腫の評価をそれぞれ評価目的とした 7 種類の撮像を行った。【結果】現時点では症例数が 5 症例と当初予定していたよりも症例数が少ないため、結果を解析するには至っていないが、糖尿病性腎症ではより早期の段階で腎皮質の浮腫により T2mapping および Time-SLIP で変化が見られ、その後腎機能障害が進行するにつれ線維化の進行による T1mapping や ADC での変化が現れる傾向がみられた。【考察】糖尿病性腎症は近年増加傾向にあり、人工透析導入の原因疾患の第一位となっている重要な疾患である。しかし早期には症状がなく、検査所見上も変化に乏しいため診断の遅れが問題となっている。非侵襲的に外来で比較的短時間に施行できる機能的 MRI 診断法は、糖尿病性腎症の早期診断に貢献できる可能性が示唆された。

課題番号：30 基-068

研究課題：糖尿病性腎臓病における糸球体微小環境恒常性のバイオマーカーの検索 糸球体構成細胞のク

ロストークに着目して

研究代表者名 (所属) : 佐々木 環 (腎臓・高血圧内科学)

【目的】糸球体ポドサイト(足細胞)は、複雑な立体構造の維持、糸球体基底膜やスリット構成の蛋白を産生するため多くの ATP を必要とすることが推測される。糖尿病性腎症 (DM 腎症) における足細胞のミトコドリア (Mt) の大きさ・数・形態変化を観察し、細胞傷害像と他の糸球体構成細胞との関連の解析を試みた。【方法】2013-18 年の DM 腎症の腎生検例を対象に、電子顕微鏡により 10 個以上の足細胞の観察が可能であった症例を検討した。足細胞胞体の Mt 数・長径を計測し、超微形態像とあわせて観察した。【結果】正常な足細胞胞体では Mt は目立たない。DM 腎症は、細胞の胞体当たり 23.8 個(7 個から 92 個)の Mt が観察され、その長径は 396.5nm (288.7nm から 486.0nm) であった。長径の長い Mt が集積している足細胞は、細胞質延長、空胞形成、リソソーム拡大、基底膜病変を認めた。DM 腎症に抗 VEGF 抗体薬使用例の足細胞では断片化した多くの Mt が観察され、内皮細胞の消失した基底膜を被覆していた。【結語】Mt 数・形態異常を認めた足細胞は、大量の ATP 需要とする傷害過程との関連を疑わせた。

【今後の展開】足細胞の細胞小器官傷害像から、糸球体微小環境恒常性のバイオマーカーを検索に繋げたい。(倫理審査番号 3249 EM による糸球体上皮細胞喪失の観察 (研究期間~2020. 3. 31) 承認日 2018/10/12)

課題番号 : 30 基-058

研究課題 : 糸球体内皮細胞-上皮細胞連関におけるインフラマソーム活性化制御機構の解明

研究代表者名 (所属) : 長洲 一 (腎臓・高血圧内科学)

多くの糖尿病性腎臓病の基礎研究から糸球体上皮細胞障害が腎不全に至る糸球体硬化病変の形成に重要であることが判明している。また糸球体上皮細胞におけるミトコンドリアストレス蓄積が糸球体上皮細胞の脱落、糸球体硬化に関与する。このため糸球体内皮細胞から上皮細胞へ何らかの関与が想定されるが、糸球体上皮細胞におけるミトコンドリアストレス蓄積の機序に及び内皮細胞の関与に関しては不明である。その一つの機序として Inflammasome に着目した。近年、自然免疫システムの一つである Inflammasome が腎障害進展に関与することが種々の動物モデルで解明されている。

本研究ではストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデル作成し検討を行っている。使用動物は C57BL/6 で WT 及び eNOS 欠損マウス (eNOSKO) を用いた。両マウスに STZ を投与行い、WT-Con, WT-STZ, eNOSKO-Con, eNOSKO-STZ の 4 群を作成。高血糖確認後、4 週では WT-STZ で軽度のアルブミン尿増加を認めたが eNOSKO-STZ ではさらに増加していた。また、PAS 染色で糸球体病変の観察を行ったところ eNOS-STZ でのみ 4 週の時点で硬化糸球体が散見された。Inflammasome の評価を行うため単離糸球体を行い NLRP3 関連遺伝子発現を検討した。興味深いことに eNOS-STZ でのみこれらの遺伝子発現上昇と認めた。さらに、eNOS-ASC 二重欠損マウスに STZ 投与糖尿病モデルを作成し腎障害の検討を行った。eNOSKO-STZ で認めた糸球体硬化病変は eNOS-ASC-DKO-STZ では軽減されていた。これらの結果から内皮機能障害はインフラマソーム活性化を介して糸球体硬化病変形成を促進させていた。以上のことから Inflammasome 活性化制御が腎障害進展を抑制しうることが示された。

課題番号：30 基-059

研究課題：Inflammasome 活性化制御による AKI-CKD transition 抑制効果の検討

研究代表者名（所属）：春名 克祐（腎臓・高血圧内科学）

背景：急性腎障害（AKI）の病態解明と治療介入は、集中治療室領域を中心に重要な課題であった。AKI は短期的生命予後への影響のみならず長期的腎予後への影響がある。つまり AKI は CKD のリスクファクターであり、AKI to CKD transition の理解が重要である。この移行機序に関して Wnt 経路活性化の遷延化が重要であるとの報告があり注目を集めている。一方で我々は CKD 移行へのリスクファクターとして高血圧や加齢を報告しており、両者に共通して内皮障害が腎障害を進展させる。以上より内皮機能障害と AKI 進展、また CKD 移行の間には一定の関連があることが想定される。そこで作業仮説として「内皮由来 Nitric Oxide はその下流のシグナルを介して Wnt/ β Catenin 経路の活性化を抑制し障害増悪及び慢性腎臓病への進展を抑制する。」とした。

方法・結果：使用動物は WT(C57BL/6)及び eNOS 欠損マウス (eNOSKO) を用いた。両マウスに片腎摘出 2 週間後に虚血再灌流 (20min) を行った。WT-Con, WT-IRI, eNOSKO-Con, eNOSKO-IRI の 4 群を作成し、4 週間後に腎組織を解析した。腎線維化は WT-IRI では WT-Con と大きな変化認めなかったが eNOS-IRI では皮髄境界部中心に線維化を認めた。また、qPCR で線維化関連遺伝子発現は IRI2 週の時点で WT-IRI においても軽度上昇を認めたが 4 W では WT-Con と同様のレベルに下がった。しかし eNOS-IRI では 4 週でも有意に遺伝子発現が増加した。非常に興味深いことに Wnt-Catenin 経路の発現は WT-IRI では上昇認めなかったものの eNOS-IRI では継時的に増加を認めた。以上のことから eNOS-NO 経路の破綻が Wnt-Catenin 経路の亢進を促した。また、PDE5 阻害薬を Day7 (AKI 発症後) から投与することで CKD への移行が抑制された。

まとめ：eNOS-NO 経路の破綻は間質線維化を促し、AKI to CKD transition を促進させた。

課題番号：30 基-062

研究課題：SGLT2 阻害薬による急性期腎循環動態変化の解析

研究代表者名（所属）：城所 研吾（腎臓・高血圧内科学）

背景：SGLT2 阻害薬の腎症進展抑制機序は、糖尿病性腎症の初期から見られる糸球体過剰濾過の抑制が主要な機序と考えられている。SGLT2 阻害薬単回投与直後（急性期）に focus を当て、SGLT2 阻害薬投与後の血糖、尿中パラメーター変化と、単一ネフロン濾過量 (Single nephron GFR: SNGFR) を観察することにより、SGLT2 阻害薬の糸球体過剰濾過は正効果を検討した。

方法：8 週齢の雄性 Zucker Diabetic Fatty Rat (ZDF) を用い、ZDF+Vehicle、ZDF+SGLT2 阻害薬 Luseogliflozin (10mg/kg/day, garbage) で検討を行った。投薬前に両側尿管カニューレションを行い、投薬後 30 分毎に血糖測定、採尿を行った。検体採取時に二光子レーザー顕微鏡により各群の同一ネフロンの Single Nephron GFR (SNGFR) の評価を行った。

結果：投薬後 2 時間までの観察を行なった。投薬前 SNGFR は、コントロールと比較し ZDF にて有意に上昇していた。SGLT2 阻害薬投薬後 30 分の時点から血糖の低下、尿糖排出増加、尿中ナトリウム排泄の増加を認めた。同一ネフロン SNGFR は尿中ナトリウム排泄の増加とともに低下を認めた。

結語：SGLT2 阻害薬投与により糸球体過剰濾過は抑制され、その変化はナトリウム排泄増加の時間軸と

一致して認められた。

課題番号：30 基-057

研究課題：Nrf2 活性化制御による蛋白尿誘発尿細管障害制御機構の解明

研究代表者名（所属）：板野 精之（腎臓・高血圧内科学）

【背景】 糖尿病性腎症に代表されるネフローゼ症候群では蛋白尿増加は末期腎不全に至るリスク因子である。過酸化脂質と結合したアルブミンは尿細管で再吸収されミトコンドリア障害をきたす。このため活性酸素種の制御が尿細管保護に重要であると考えられているものの新規治療開発までは至っていない。一方で抗酸化遺伝子群を調節する転写因子である Nrf2 の活性化薬が糖尿病性腎症患者において腎機能を改善する事が報告されたが、詳細な分子機構は解明されていない。今回、腎不全モデルマウスを用い Nrf2 活性化による腎保護効果を検討した。

【方法】 3 週齢雄性 ICGN マウス (ICGN) を用い、Nrf2 活性化薬に RTAdh404(dh404 ; 10mg/kg/day, ゴマ油に溶解し経口から投与)を用いた。3 週間投薬した後に腎内炎症及び線維化とミトコンドリア機能を検討した。またヒト近位尿細管培養細胞を用いて In vitro の実験を行なった。

【結果】ICGN で尿中 NGAL、炎症関連遺伝子群の発現が増加し、尿細管間質線維化が顕著であった。同様に COX/SDH 染色でミトコンドリア機能障害を認め、透過電顕でミトコンドリア形態変化を認めた。これらの変化は RTAdh404 投与群で有意に軽減した。FFA 負荷アルブミン処理により尿細管におけるミトコンドリア活性酸素の上昇を認めミトコンドリア膜電位の低下を認めた。これらのミトコンドリア障害は Nrf2 活性化薬で改善した。

【結論】 RTAdh404 は、腎不全モデルにおいてミトコンドリア機能を保持することで腎保護作用を示す。

課題番号：30 基-060

研究課題：内皮機能障害による腎間質線維化の分子機序の解明

研究代表者名（所属）：角谷 裕之（腎臓・高血圧内科学）

【背景】 腎間質線維化は末期腎不全の final common pathway である。内皮機能障害は腎障害進展増悪因子であるが、腎間質線維化に与える影響は十分検討されていない。Wnt/ β -catenin 経路活性化が線維化に促進的に働くことが報告されている。「内皮 NO/PKG 経路活性化は、 β -catenin 経路を抑制的に制御し、本経路の破綻が腎線維化を促進する」と仮説を立て検討した。

【方法】 COS 細胞を用い、NO-PKG 経路を活性化し、 β -catenin のリン酸化、蛋白半減期の変化を検討した。また、eNOS 欠損マウス (eNOSKO)、野生型マウス (WT) に対し、GSK-3 β の阻害薬である炭酸リチウムを飲水投与し、腎組織変化を検討した。NO シグナル増強のため、sGC 刺激薬 Bay41-2272 (Bay) を投与し、腎組織変化への影響を検討した。

【結果】 NO-PKG 経路活性化により β -catenin のリン酸化は増加し、 β -catenin の分解が促進された。In vivo では、Li 投与により WT では変化を認めず、eNOSKO では β -catenin の蓄積が亢進し、線維化の増悪を認めた。この変化は Bay 投与により改善した。

【結語】 NO-PKG 経路は β -catenin 経路を抑制的に制御し、その破綻は腎線維化を促進させた。sGC 刺

激薬は β -catenin 経路抑制による腎線維化抑制効果が期待される。

課題番号：30 基-063

研究課題：尿毒素による腸管ディフェンシンの変容と腸内細菌叢変化の検討

研究代表者名（所属）：佐藤稔（腎臓・高血圧内科学）

腸内細菌叢は加齢や生活環境により変動し、健康状態や疾病に関与することが明らかとなっている。慢性腎臓病患者における腸内細菌叢の変化は、栄養障害、全身性または局所性の炎症惹起の他、インドキシル硫酸など尿毒素産生の一因になり得る。腎不全で悪化した腸内環境の改善が、慢性腎臓病の新規治療ターゲットとなる可能性がある。生体は感染防御のため、自ら抗菌物質を産生している。ヒトにおける抗菌ペプチドはディフェンシンと総称され、細菌、真菌など広範囲にわたり抗菌活性を持つ。このうち粘膜上皮の感染防御に関与しているのが α -と β -ディフェンシンである。 α -ディフェンシンは腸内細菌の組成を制御することによって腸内環境の恒常性を保っていることが明らかになっている。腸内細菌叢変化にディフェンシンの発現変化が関与していることが推測されるが、慢性腎不全病態におけるディフェンシン発現変化を検討した報告はない。我々は、「慢性腎不全では、尿毒素物質の増加により腸内ディフェンシン発現変化をきたし、腸内細菌叢が変化する」との仮説を立てた。腸内細菌叢の悪化がさらなる炎症惹起物質の増加を来し、腸管バリア機能を傷害し、腸管内で増加した尿毒症物質の体内吸収を阻止できず、血中尿毒症濃度の上昇を来すのではないかと考える。腸管バリア機能改善が尿毒症物質を低下させ、腎臓病進展阻止の有効な治療法につながると考える。

課題番号：30 基-032

研究課題：尿路生殖器領域における難治性慢性炎症性疾患に対する創薬研究 –慢性前立腺炎に対する indoleamine 2,3-dioxygenase(IDO)阻害による炎症抑制効果の検討–

研究代表者名（所属）：太平 伸（泌尿器科学）

慢性前立腺炎(chronic prostatitis: CP)は、前立腺肥大症の成因となり、現段階で明確な治療がない。Indoleamine 2,3-dioxygenase(IDO)は、必須アミノ酸であるトリプトファンに対するキヌレニン代謝経路の律速酵素であり、生体内の免疫反応に関与することが報告されている。近年、IDO 阻害による炎症抑制効果が報告されている。IDO は、前立腺に高く臓器発現しており、CP に対しても IDO 阻害による炎症抑制効果を認める可能性がある。我々は Wister ラット前立腺組織を前立腺抗原として、C57BL/6 マウスの肩部・尾部に皮下投与することにより、CP モデルマウスを作成した。モデルの妥当性を検証した後、IDO ノックアウトマウス(*Ido*^{-/-})群、野生株マウス(*Ido*^{+/+})群に分類して、同様の CP モデルを作成した。2群間の前立腺内における炎症性変化を比較することにより、IDO 阻害による炎症抑制効果を検討した。組織学的解析では、*Ido*^{-/-}群は *Ido*^{+/+}群と比較して、前立腺間質における炎症性変化および線維化が抑制されていた。網羅的サイトカイン・ケモカイン定量解析では、*Ido*^{-/-}群は *Ido*^{+/+}群と比較して、M-CSF・IL-1 β ・CCL2・CCL3・CXCL2・TIMP-1 の有意な低下を認めた。免疫組織学的解析においても同様の結果が得られた。IDO は前立腺におけるマクロファージ・単球系サイトカイン・ケモカインを介した免疫反応に関与しており、IDO 阻害により CP に対する間質を中心とした炎症性変化および線維化が抑制され

ると考えられた。IDO 阻害は CP に対する新規治療となり得る可能性が示唆された。

課題番号：30 基-090

研究課題：マウス肥満関連大腸腫瘍発生のインターロイキン(IL)6 受容体抗体による腫瘍抑制効果の機序の解明

研究代表者名(所属)：松本啓志(消化管内科学)

背景：本邦において、大腸癌の罹患率および死亡率は増加している。大腸癌のリスクとして肥満は重要である。しかし、肥満による発癌機序は未だ不明であり、予防方法も明らかではない。肥満による慢性炎症と大腸腫瘍発生を結びつける分子としてインターロイキン 6(IL-6)に着目した。

目的：高脂肪食誘発肥満マウス大腸腫瘍モデルにおける抗 IL-6 受容体抗体(MR-16)による大腸腫瘍への発生効果を検討する。

方法：Balb/c 雄マウスは生後 5 週目から 19 週目まで高脂肪食を摂取開始した。大腸腫瘍はアゾキシメタン(AOM)を腹腔投与(10mg/kg 週 1 回、6 回)して誘発した。マウス抗 IL-6 受容体抗体(MR-16)は 5 週から 13 週まで(週 1 回、計 9 回)腹腔内投与を行った。14 週目に腹部 CT 検査にて内臓脂肪面積の測定を行った。大腸腫瘍は、30 週で評価を行った。

結果：高脂肪食摂取によって肥満は誘発され、肥満マウスは通常マウスよりも大腸腫瘍の発生が有意に多かった(通常食 2.5 ± 1.6 個、高脂肪食 6.67 ± 3.6 個、 $P < 0.005$)。また MR-16 投与群は PBS 投与群と比較して通常食および高脂肪食誘発大腸腫瘍の数は有意に低下していた(PBS グループ 6.67 ± 3.6 、MR-16 群 1.6 ± 1.3 、 $P < 0.05$)。

結論：IL-6 は高脂肪食誘発肥満による大腸腫瘍において重要な役割を担っている可能性がある。

課題番号：30 基-048

研究課題：肺扁平上皮癌における腫瘍存在位置による微小免疫腫瘍環境の検討

研究代表者名(所属)：清水克彦(呼吸器外科学)

<背景>肺癌において、免疫チェックポイント阻害剤の効果を予測する因子(バイオマーカー)は腫瘍細胞の programmed cell-death ligand 1(PD-L1)発現とされる。我々は肺腺癌において PD-L1 発現に加え、腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞(CD8+TIL)を加えた分類がより免疫学的腫瘍微小環境を反映すると報告した。本研究では肺扁平上皮癌を中枢型・末梢型に分類し、臨床病理学的因子、免疫染色結果の相違を検討した。

<方法>2007 年から 2017 年の間に川崎医科大学附属病院で手術を施行した肺扁平上皮癌 118 例の切除組織のパラフィン包埋切片を用いて免疫組織学染色を行った。

<結果>中枢型は末梢型と比較してより進んだ病期のものが多かったが、生存曲線はほぼ同じであった。また、免疫学的腫瘍微小環境の検討では、末梢型は中枢型と比較して PD-L1 の発現が高い症例が多く、CD8 が発現している症例は少なかった。

<結語>同じ肺扁平上皮癌でも、中枢型と末梢型では免疫学的微小環境が異なる可能性がある。また、腺癌と比較して、扁平上皮癌は Hot tumor の割合が多く、Cold tumor の割合が少なかった。この原因とし

ては喫煙の関与が推測される。

課題番号：30 基-017

研究課題：乳腺良悪性境界悪性病変の意義に関する病理学的検討

研究代表者名（所属）：森谷卓也（病理学）

乳癌のほとんどは乳管ないし小葉内の乳管上皮から発生し、非浸潤性乳管癌（上皮内癌）を介して浸潤癌に進展する。しかし、非浸潤性および浸潤性乳癌には、核異型の度合い、ホルモン受容体発現、HER2 過剰発現などの状況により多様な腫瘍が含まれており、内因性サブタイプとして認識されている。異なる内因性サブタイプの癌は、異なる分化段階の乳管上皮に由来する可能性が指摘されている。境界悪性病変には乳管過形成、異型小葉過形成、平坦型異型が知られているが、いずれも乳癌発生のリスク病変としての意義が強く、前癌病変との証明は必ずしも十分にはなされていない。さらに、それらはいずれもホルモン受容体陽性（および HER2 陰性）乳癌、すなわち低異型度乳癌に関連付けられているものである。より悪性度が高く、多分化能を有する細胞に近い分化段階から発生すると目される HER2 陽性乳癌の前駆病変は不明である。トリプルネガティブ乳癌については、非浸潤癌に占める頻度は浸潤癌のそれよりも低い。Microglandular adenosis を含む特殊な、稀な病変との関係は指摘されてはいるが、全ての症例を説明するには無理がある。従って de novo 癌の可能性を探るとともに、腫瘍背景の乳腺実質の特性も含めたさらなる検討を要する。

課題番号：30 基-007

研究課題：MRI-US 融合画像ガイド下前立腺標的生検を用いた前立腺癌の治療前悪性度評価法の確立

研究代表者名（所属）：玉田 勉（放射線診断学）

目的：高 PSA 血症例に対する MRI-US 融合画像ガイド下前立腺標的生検の初期経験を報告する。

対象：この研究は、3T 装置で施行された前立腺マルチパラメトリック MRI 検査後に、MRI-US 融合画像ガイド下前立腺標的生検を受けた高 PSA 血症を伴った 12 症例（平均年齢 70 歳、PSA の中央値は 6.88 ng/mL）が含まれた。この中の 4 症例はその後、前立腺全摘術が施行された。前立腺生検は、Koelis 社製の UroStation を用いて行った。二名の放射線科医が合意により Prostate Imaging and Reporting Data System Version 2 (PI-RADS v2) を用いてマルチパラメトリック MRI を評価し、PI-RADS カテゴリーが 2 から 5 と診断された病変に対して標的生検（2 か所以上/病変）、その後従来の系統的生検（12 か所）を施行した。

結果：生検本数は、標的生検は系統的生検より有意に少なかった（6 vs. 12、 $P=0.003$ ）。また標的生検は系統的生検に比して、腫瘍検出率が有意に高く（26.1% vs. 6.9%、 $P=0.044$ ）、生検腫瘍長が有意に大きかった（ $52.2\% \pm 29.2\%$ vs. $27.5\% \pm 19.2\%$ 、 $P=0.021$ ）。加えて、術後標本の悪性度（グリーソンスコア）との一致率は、系統的生検が 25%（1/4 症例）であるのに対して、標的生検は 100%（4/4 症例）であった。

まとめ：この初期経験は、MRI-US 融合画像ガイド下前立腺標的生検が効率よく前立腺癌を検出することを示した。

課題番号：30 基-046

研究課題：中咽頭癌における p16 蛋白の発現に関する臨床病理学的検討

研究代表者名（所属）：伊禮 功（病理学）

中咽頭癌のなかでも、近年、HPV(ヒト乳頭症ウイルス)関連中咽頭癌の増加がみられている。HPV 関連遺伝子(E6,7)産物が Rb などの細胞周期の調節に関わる因子に対して、抑制性に働き、癌化をきたすとともに、過剰な p16 蛋白の発現を生むとされている。HPV 関連中咽頭癌の判定には、現在、p16 蛋白が代用マーカーとして、使用されているが、全国的には症例の蓄積も少なく、まだ、課題も多い。

本研究では p16 蛋白の発現状態を観察し、さらに臨床病理学的なパラメーターと比較検討し、その臨床病理学的な意義について、検討した。p16 蛋白は、多くは角化傾向に乏しく、異型性が弱く、単相な印象の強い高分化型の扁平上皮癌に高い発現がみられたが、角化型の扁平上皮癌にも高い発現が認められた。また、多くは癌周囲の間質反応に乏しいが、一部では、浸潤傾向が強く、T 因子、T3、N 因子 2b であった。尚、p16 蛋白の発現と癌の進達度との関連性は乏しかった。当施設での HPV 関連中咽頭癌は、これまでの報告例と異なる様相を示すものが含まれている可能性もあり、今後、他の診断法 (PCR 法、ISH 法) との比較検討による HPV 関連中咽頭癌の診断法の確立や、他の癌微小環境に関する因子の検討が必要かと思われる。

課題番号：30 基-026

研究課題：乳癌の再発・転移巣で出現する付加的遺伝子変異の解明

研究代表者名（所属）：鹿股直樹（病理学）

【背景】再発・転移病変で付加される遺伝子異常が、治療抵抗性の原因になっている症例が少なからず存在することが想定されるが、臨床応用を視野に施行された研究は乏しい。【目的】乳癌の原発巣組織と再発・転移巣組織をともに、NGS にて解析し、乳癌の治療抵抗性に関与しうる新規の遺伝子変異を探索することを目的とした。【方法】ホルマリン固定パラフィン包埋検体から DNA を抽出し、QIAseq Human Breast Cancer Panel (DHS-001Z, QIAGEN) にてライブラリを作成、NGS は MiSeq (Illumina) を使用した。【結果】正常組織、原発巣と再発・転移巣が同時に解析できたのは、11 症例であった。5 例(45.4%) では、原発巣では認識できなかった遺伝子変異を再発・転移巣で認めた。新たに検出した変異は ATR, BLM, CBFB, EP200, ERBB2, MUC16, PBRM1, PIK3CA, TP53 であった。局所再発よりも遠隔転移で有意に CNV 変化数が多かった(P=0.020)。【考察】再発・転移巣で新たに検出される遺伝子変化は決して少なくないことが明らかとなった。また、HER2 免疫染色陰性であるが、neratinib 感受性と思われる ERBB2 変異や、CDK 阻害薬、EGFR 阻害薬が有効と推定される症例を拾い上げることができた。

課題番号：30 基-010

研究課題：骨髓異形成症候群から急性白血病へ移行する分子機構の探索：患者骨髓細胞から段階的に悪性化した細胞株のゲノム進化から見た解析

研究代表者名（所属）：通山 薫（検査診断学）

難治性造血障害である骨髓異形成症候群 (MDS) では、急性骨髓性白血病への移行が生命予後を大きく

左右する。本研究の契機となった MDS 患者由来細胞株 MDS92 を継代中に、8 つの亜株を樹立することができた。MDS92 とその亜株は、MDS から急性白血病への流れをインビトロで再現した培養細胞モデルのラインアップである。これらの細胞株と、発端となった MDS 患者骨髄細胞を用いた全エクソームの比較解析によって、病型進展に関わる遺伝子変異を探索し、MDS の病型移行・病態悪化の分子機構の一端を解明し、それを阻止する新しい治療戦略への道を開くことが本研究の目的であり、継続的に取り組んできた。

これまでの解析の結果、元の MDS 患者骨髄細胞には *TP53* 変異に加えて約 9 % の分画に *CEBPA* 変異が検出された。その培養中に *N-RAS* 変異が付加され、細胞株樹立へつながったと推定された。また MDS92 から MDS-L へ移行する段階でドライバー変異と思われる *Histone1H3C* 変異(K27M)が見出されたが、*Histone1H3C* 変異(K27M)クローンの拡大は IL-3 依存性で、逆に IL-3 非存在下では同変異を有するクローンは縮小し、同変異のないクローンが存続することが確認された。この結果から、ドライバー変異を獲得した異常クローンといえども、増殖・拡大するためには至適な骨髄環境要因が必要であることが示唆された。

課題番号：30 基-009

研究課題：骨髄増殖性腫瘍における病因遺伝子変異解析と病態の解明

研究代表者名（所属）：近藤敏範（血液内科学）

【背景】これまでの研究で我々は *CALR* 変異を有する MPN 症例では好中球アルカリフォスファターゼスコア (NAP score) が正常から低値であり、好中球膜アルカリフォスファターゼ(ALP)発現レベル (sNAP)も *CALR* 変異群で有意に低く NAP score と相関すると報告した。その機序解明のため MPN 患者多核白血球における ALP mRNA 発現量を測定した。

【対象と方法】当院通院中の MPN 症例を対象に、FCM 法で末梢血白血球の sNAP を FITC 標識抗 ALP 抗体を用いて解析した。また、多核白血球における ALP mRNA 発現量を測定し、*JAK2V617F*変異群と *CALR*変異群について比較検討した。【結果】解析症例は 30 例、年齢中央値は 74.5 歳 (45-85 歳)、*JAK2* 変異例 24 例、*CALR*変異例 6 例であった。sNAP 平均値は *CALR*変異群の方が有意に低値であった ($P \leq 0.001$)。ALP の mRNA 発現量も *CALR* 変異群で有意に低値であった ($P=0.004$)。また、NAP score と ALP mRNA 発現量の間には有意な相関関係を認めた ($P=0.006$, $\rho = 0.486$)。【結語】*CALR* 遺伝子変異症例では ALP mRNA が抑制された結果 sNAP が低下していることが明らかになった。現在、ALP の転写因子とされる STAT3/5 のリン酸化の状態について検討中である。

課題番号：30 基-020

研究課題：骨髄異形成症候群における DNA メチル化阻害薬の作用機序の解明

研究代表者名（所属）：辻岡貴之（検査診断学（病態解析））

目的：DNA メチル化阻害薬は骨髄異形成症候群 (MDS) の治療薬として注目されているが、作用機序に不明な点が多いため in vitro の系を用いて検討した。

材料と方法：MDS 細胞株 MDS-L, MDS92 と白血病細胞株 HL-60, U937, K562 を DNA メチル化阻害薬

(decitabine ; DAC, azacitidine: AZA) で連日処理した。

結果：5つの細胞株の中で、特に MDS-L, MDS92, HL-60 で強い増殖抑制がみられ (DAC:IC50 は MDS-L: 16.0 ± 0.49 nM, MDS92: 74.3 ± 12.6 nM, HL-60: 145.0 ± 6.1 nM), アポトーシスによる細胞死が確認された。細胞周期の解析では、MDS-L を DAC で処理したとき、濃度依存性に G2/M 期の細胞が増加した。DNA マイクロアレイと全ゲノムを対象とした網羅的メチル化解析を行い DAC の作用機序に関わると予想される 13 個の遺伝子を抽出し特に,cholesterol 25-hydroxylase(CH25H)に注目した。定量 PCR を用いて *CH25H* の発現量を確認したところ、5 つの細胞株で DAC 処理により発現の上昇を認めた。MDS-L, HL-60 を用いた *CH25H* プロモーター領域のメチル化解析では健康人骨髄 CD34 陽性細胞と比較して顕著なメチル化を認めた。

考察：現在、急性白血病患者検体を用いて上記結果を検証中である。

課題番号：30 基-019

研究課題：骨髄増殖性腫瘍の遺伝子解析と新規治療薬候補の探索

研究代表者名 (所属)：北中 明 (検査診断学 (病態解析))

骨髄増殖性腫瘍 (MPN) の病態解析として、臨床検体の遺伝子解析と、疾患モデルを用いた新規治療薬候補の探索を実施した。

臨床検体を用いた検討として、平成 30 年度に、86 例の MPN (PV 12 例、ET 30 例、MF 7 例、その他 37 例)を対象に遺伝子解析を行い、解析した全症例の 40%(34/86)に JAK2V617F 変異が、10%(9/86)に CALR 変異が認められた。CALR 変異は、ET の 23%(7/30)、MF の 29%(2/7)に検出された。

変異 CALR の機能解析には、巨核球系分化増殖を観察可能な細胞株 (F36P-MPL) にヒトと相同的な *CALR* 変異を導入した *CALRmut*F36P-MPL 細胞を用いた。当該細胞を用いた検討の結果、JAK2 以外の PTK に対する阻害剤 **X** が CALR 変異依存性の増殖を抑制することを見いだし、具体的な PTK として **Y** を同定した。また、すでに臨床応用されている薬剤のうち、治療濃度域で **Y** を阻害しうる **Z** が CALR 変異依存性の増殖を抑制することを見いだした。また、*in vivo* の解析について宮崎大学との共同研究を行い、CRISPR/Cas9 システムを用いてマウスの内在性 *CALR* にヒト MPN のそれと同等の変異を導入した遺伝子改変マウスでは、ヒト ET に比べて緩やかな表現型を示すことが明らかとなった。

課題番号：30 若-002

研究課題：新たな白血病治療法開発に向けた、低酸素環境下での解糖系阻害治療の研究

研究代表者名 (所属)：岡本 秀一郎 (生化学)

急性白血病の高い再発率を克服するには、化学療耐性白血病に有効な抗癌剤を開発する必要がある。

申請者は、白血病細胞が耐性を獲得する原因の一つに骨髄微小環境が関与していると考え、骨髄内の低酸素環境に着目した。実際、低酸素環境下では既存の化学療法剤の感受性が低下している事を確認し、低酸素で有効性を発揮する新たな抗癌剤の探索を行なった。低酸素環境では、代謝リプログラミングによりグルコース代謝への依存度が増すと考え、グルコース代謝阻害剤による治療法の開発を試みたが、十分な治療効果は認められなかった。また、低酸素環境では細胞内代謝全般が低下し、ATP 消費量自体

が低下している可能性が示唆され、ATP 消費量の多いオルガネラであるリボゾームの総量を評価したところ、低酸素環境ではリボゾームが減少している事を確認した。そこで、リボゾーム合成を阻害する CX5461(選択的ポリメラーゼ I 阻害剤)により、さらにリボゾームの機能を抑制する事で低酸素での白血病治療が可能になるかを検討したが、治療効果は十分ではなかった。しかし、通常の酸素条件下では CX5461 の抗白血病効果が認められ、新たな白血病治療薬となる可能性が示唆された。そこで、CX5461 の抗白血病効果について検討を行い、濃度依存性の抗腫瘍効果、アポトーシス誘導能、オートファジー誘導能を明らかにした。通常酸素条件下ではあるが新たな白血病治療薬として有望であると考えられたため報告する。

課題番号：30 基-066

研究課題：遺伝子改変発癌マウスを用いた癌浸潤を制御する自然免疫（マクロファージ）の機能調節機構の解析

研究代表者名（所属）：中村隆文（産婦人科学1）

【目的】癌細胞の p53 遺伝子が腫瘍浸潤マクロファージの機能を制御して腫瘍の増殖進展に関与しているかを解析する。【方法】1) p53 欠損発癌マウスを作製するため、SV40 T 抗原を水晶体上皮に発現させて、上皮性未分化癌を発症する α T3 マウスと p53 欠損マウスを交配させ、Tail DNA を抽出して PCR 法で p53 遺伝子が欠損しかつ SV40 T 抗原を発現する p53 欠損 α T3 マウスを選択した。 2) p53 遺伝子がマクロファージの腫瘍免疫の機能に影響しているかを解析するために p53 欠損マウス、 α T3 マウスと p53 欠損 α T3 マウスの腹腔内マクロファージを採取しフローサイトメトリーを用いてマクロファージの IDO と PD-L1 発現を比較検討した。 3) p53 遺伝子欠損腫瘍細胞がマクロファージの機能に影響しているかを解析するために、 α T3 マウスと p53 欠損 α T3 マウスの腫瘍から培養細胞を作製した。正常マウス腹腔内マクロファージと各癌細胞と混合培養して免疫組織染色またはフローサイトメトリーを用いて正常マウス腹腔内マクロファージの IDO と PD-L1 の蛋白発現を比較検討した。【結果】1) p53 欠損 α T3 マウスは α T3 マウスより腫瘍の浸潤進展が有意に増悪した。 2) p53 欠損 α T3 マウスの腹腔内マクロファージは α T3 マウスと比較しても腹腔内マクロファージの IDO と PD-L1 の発現が増加は認められなかった。 3) α T3 腫瘍培養細胞、p53 欠損 α T3 腫瘍培養細胞と正常マウス腹腔内マクロファージを混合培養すると p53 欠損 α T3 腫瘍培養細胞と混合培養した正常マウス腹腔内マクロファージの IDO と PD-L1 の発現が α T3 腫瘍培養細胞と混合培養した場合より増加した。【結論】p53 欠損腫瘍細胞がマクロファージの IDO や PD-L1 の発現を誘導して腫瘍免疫を抑制している可能性が示唆された。

課題番号：30 基-093

研究課題：肺癌、食道癌における PIK3CA 遺伝子の発現および標的遺伝子としての評価

研究代表者名（所属）：羽井佐 実（学長付）

近年、肺腺癌における EGFR 遺伝子変異や EML4-ALK fusion に対する分子標的療法が、治療に欠かせないモダリティーとなっている一方で、肺扁平上皮癌に対する有効な標的治療法は確立されていない。また近年、免疫チェックポイント阻害剤の効果が報告されてきているが、その有効性は未だ限られてお

り、高額な薬価が医療財政を圧迫している。肺扁平上皮癌の増殖・進展における PIK3CA 遺伝子の関与が報告され(Yamamoto et al. Cancer Res. 68: 6913-6921. 2008)、また米国癌ゲノムアトラス研究ネットワーク (The Cancer Genome Atlas Research Network : TCGA) から肺扁平上皮癌の多くに PIK3CA 変異が認められることが報告された (TCGA Nature. 151: 543-50. 2014.)。特異的抗体を用いた Immunoblot 解析の結果から、PIK3CA 遺伝子変異型肺癌において AKT の高い活性化が認められた。また siRNA を用いた PIK3CA の silencing により、また肺扁平上皮癌 EBC2 の増殖が抑制された。このことから、当該遺伝子の抑制による扁平上皮癌に対する標的治療の可能性が示唆され、現在他遺伝子との共抑制による抗腫瘍効果の解析を行っている。

課題番号：30 基-001

研究課題：細胞癌標的治療薬としての DPP-4 阻害剤の分子生物学的解析

研究代表者名 (所属)：仁科惣治 (肝胆膵内科学)

【目的】今回我々は、NK 細胞のみならず T 細胞による抗腫瘍免疫細胞賦活化を介した DPP4 阻害剤による肝癌抑制効果についての基礎的検討も行った。

【方法】検討 1；根治的肝切除術を受けた HCC 患者 41 例を対象に、切除肝癌組織標本における CD26 染色強度と HCC 進展および腫瘍組織内の免疫細胞浸潤との関連性を検討。検討 2;リアルタイム細胞動態解析装置を用いて、走化性因子 CXCL10 存在下における肝癌細胞株への NK 細胞・T 細胞の走化性に対する DPP4 阻害剤の効果を検討した。

【成績】検討 1：ヒト HCC 組織において CD26 高発現群は低発現群と比べ、中低分化度・stage 進行症例が有意に多く、NK 細胞および T 細胞の腫瘍組織への浸潤が有意に少なかった。検討 2： DPP4 阻害剤は CXCL10 による NK 細胞・T 細胞の腫瘍細胞への走化性を亢進させたが、この効果は CXCL10 中和抗体によりキャンセルされた。

【結語】HCC 患者における CD26 発現強度は NK 細胞や T 細胞浸潤抑制と関連し、DPP4 阻害剤による治療標的となり得ると考えられた。また DPP4 阻害剤による HCC 抑制効果の機序として、DPP4 活性は CXCL10 を介した T 細胞・NK 細胞の走化性を阻害するが、DPP4 阻害剤はこれを抑制することで抗腫瘍効果を発揮すると考えられた。

課題番号：30 基-038

研究課題：殺細胞性抗がん薬が EGFR-TKI 耐性に及ぼす影響に関する基礎的検討

研究代表者名 (所属)：越智宣昭 (総合内科学 4)

【背景・目的】上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対する第 3 世代 EGFR-TKI(osimertinib)の新たな耐性メカニズムとして C797S 二次変異などが報告されているが、未だ多くの耐性機序は解明されていない。これまで我々はペメトレキセド(PEM)耐性非小細胞肺癌の研究を進めてきたが、その過程で PEM 耐性獲得により osimertinib 耐性を誘導することを発見し、その機序に関するさらなる検討を行った。

【方法】T790M 二次変異を有する非小細胞肺癌細胞株(H1975、RPC9)に PEM を長期曝露することに

より誘導し、それらの細胞株における EGFR-TKI 感受性、タンパク発現（ウエスタンブロット）、mRNA 発現（マイクロアレイ、RT-PCR）を検討した。

【結果】2種の細胞株では C797S 変異は認めず、いずれも PEM と osimertinib に対し高度耐性を示し、TS の高発現と EMT マーカーの発現を認めた。一方、H1975 の PEM 耐性株では EGFR 発現が低下していたが、その低下にはメチル化の影響は認められなかった。マイクロアレイによる網羅的解析の結果、遺伝子 X が osimertinib 耐性に関与する可能性が示唆された。

【結論】殺細胞性抗がん薬による第3世代 EGFR-TKI への耐性誘導についての新たな知見が得られており、引き続き解析を進めている。

課題番号：30 基-065

研究課題：悪性中皮腫に対する ROR1 阻害と殺細胞性抗がん薬の併用に関する基礎研究

研究代表者名（所属）：瀧川奈義夫（総合内科学4）

【背景・目的】私たちは、Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1（ROR1）発現が、正常肺や胸膜においては乏しいが、悪性中皮腫組織において亢進していることを報告している。今回、進行悪性中皮腫に対するキードラッグのひとつであるペメトレキセド（PEM）を併用した ROR1 標的治療の基礎的検討を行った。

【方法】4種類の悪性中皮腫細胞に siROR1 を導入し、細胞増殖抑制、コロニー形成能、アポトーシス誘導能（フローサイトメトリー）、タンパク発現（ウエスタンブロット、フローサイトメトリー）、mRNA 発現（マイクロアレイ、RT-PCR）、および PEM との併用効果を検討した。

【結果】siROR1 を導入した2株においては、顕著な増殖抑制とアポトーシスの誘導が認められ、pAKT および pSTAT3 の発現が抑制されていた。マイクロアレイ解析で siROR1 導入後に 50%以上抑制された6種類の mRNA を RT-PCR でその低下を確認し、それらがコードするタンパクの発現抑制も認められた。siROR1 を導入した細胞株では PEM に対する感受性はいずれも亢進し、active Caspase 3 および cleaved PARP は増加しアポトーシスが誘導されていた。

【結論】siROR1 導入悪性中皮腫細胞株においては PEM 感受性が増強しており、PEM 併用 ROR1 標的治療の有効性が示唆された。

課題番号：30 基-084

研究課題： α 線放出核種 Ra-223 内用療法における Cancer Cell Repopulation の基礎的検討

研究代表者名（所属）：犬伏 正幸（放射線核医学）

【背景】放射線治療中にも関わらず癌細胞が再増殖してくること（Cancer Cell Repopulation）が知られているが、治療抵抗性が少ないとされる α 線内用療法薬 Ra-223 においても生じるのではないかと考え、細胞培養実験の基礎的検討を調べた。

【方法】Ra-223 の骨芽細胞への影響を調べるために、マウス骨芽細胞株 KS483 に様々な濃度の Ra-223 を添加して培養し、分化の指標として細胞 ALP 活性を、活動性の指標として PINP と Ca 沈着量を調べた。また、Ra-223 の破骨細胞への影響を調べるために、ヒト破骨細胞前駆細胞株に Ra-223 を添加して

培養し、分化の指標として TRACP 5b を、活動性の指標として CTX を調べた。

【結果】骨芽細胞の培養実験では Ra-223 は ALP 活性を 400,800Bq,1600Bq/mL で用量依存的に抑制し、PINP と Ca 値を 800Bq,1600Bq/mL で用量依存的に抑制した。しかし、Ra-223 は PINP を 100Bq,200Bq/mL で、Ca 沈着量を 100Bq/mL で増加させた。破骨細胞の培養実験では Ra-223 は TRACP 5b を用量依存的に抑制したが、CTX には影響しなかった。

【結語】Ra-223 は高濃度では造骨性骨転移を抑制するが、低濃度ではむしろ活動性を刺激することが示唆された。溶骨性骨転移に対しては効果が期待できないことが示された。

課題番号：30 基-094

研究課題：抗がん化学療法での消化管粘膜障害に対するアミノレブリン酸による保護効果の可能性

研究代表者名（所属）：高岡 宗徳（総合外科学）

抗がん化学療法における有害事象の背景の一因として、抗悪性腫瘍薬による組織内での薬剤誘発性酸化ストレスの関与が指摘されている。酸化ストレス下において組織内でヘムオキシゲナーゼ-1(hemeoxygenase-1, 以下 HO-1)が誘導されると組織保護効果を認めることから、正常組織内で HO-1 誘導作用のある 5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid; 以下 5-ALA) を用いることで薬剤性消化管粘膜障害に対する腸管上皮保護効果が得られることが期待される。

この仮説を実証するため、マウス小腸上皮より分離培養したオルガノイドを用いた腸管上皮環境モデルを作製し、消化管粘膜障害を惹起することで知られる抗悪性腫瘍薬イリノテカン (CPT-11) の代謝産物 SN-38 および 5-ALA 共投与下での HO-1 の発現ならびにオルガノイド構成細胞の細胞障害および保護効果を検討した。

正常腸管上皮細胞においては、5-ALA による HO-1 誘導が認められ、SN-38 投与下において、5-ALA 非存在下では発現抑制される HO-1 が、5-ALA 投与により発現維持されることを確認した。

マウス小腸上皮より分離培養したオルガノイドを用いて同様の 5-ALA 投与を行うと、オルガノイド構成細胞に HO-1 発現が誘導された。SN-38 をオルガノイドに投与すると、オルガノイド構成細胞に細胞死シグナルが発現されるが、5-ALA 共投与下ではオルガノイドに細胞死がみられず、5-ALA 投与により HO-1 発現が誘導されることで、抗悪性腫瘍薬による腸管上皮細胞死が抑制されることが示唆された。

課題番号：30 基-070

研究課題：からだの大きさを制御する分子メカニズムの解明

研究代表者名（所属）：西松 伸一郎（自然科学）

ヒトもサンショウウオも、細胞が寄り集まってできた多細胞生物である。小児から大人に成長するにつれて、体格に合わせて臓器や器官のサイズは一定となるように調節されている。1965年に英国の Bullough は、「からだ全体のサイズに対して臓器や組織の大きさを一定に調節する仕組みが存在する」とする仮説を提唱したが、その仕組みは未だによくわかっていない。

オオサンショウウオは、世界最大の両生類である。われわれは、オオサンショウウオの表皮細胞が、同じ両生類のカエルやヒトの細胞のちょうど2倍の大きさに相当することを発見した。細胞のサイズが大

きいのは、表皮細胞に限らない。サンショウウオやイモリなど有尾両生類の赤血球は有核で、他の脊椎動物と比べて極めて大きい。

一般に細胞のサイズは、核の大きさと相関することが知られている。核と細胞質の比率（N/C比）は一定の値をとる傾向がある。オオサンショウウオのゲノム DNA 量は、ヒトの約 15 倍あることがわかっている。進化の過程で核内の DNA 量が増加したことにより、核が巨大化し、その結果として表皮細胞や赤血球が大型化したと考えられが、その実態は今のところ不明である。オオサンショウウオの全ゲノムを解読することにより、DNA 量が増加した原因を解明し、からだのサイズが大型化したメカニズムを明らかにする。

課題番号：29 若-005

研究課題：社会性昆虫クロオオアリにおける概日時計による社会的同調機構の解析

研究代表者名（所属）：守山 禎之（自然科学）

社会性昆虫（真社会性昆虫）では、個体間あるいはコロニー間の情報伝達による生体リズム同調の報告があるが、そのメカニズムは未解明である。本研究では、社会性昆虫クロオオアリ（*Camponotus japonicus*）を用いて、アリ類における社会的同調機構を明らかにすることを目指している。昨年度に引き続き活動リズムの基礎データの収集を行い、恒暗条件下で 24 時間より短い周期で自由継続するリズムを計測した。本年度はそれらの活動周期をワーカーのサイズ、齢期、コロニー間などで比較解析中である。また、in situ RT-PCR 法を用いてアリ脳内における時計遺伝子発現細胞の同定を試みている。アリ時計遺伝子 *period* を用いて in situ RT-PCR 法を行った結果、脳内背側と脳側方部に発色される細胞群が観察された。キイロショウジョウバエにおいても脳内の背側と側方部の類似の場所に時計遺伝子を発現する細胞が知られており、クロオオアリにおいても時計細胞の候補である可能性が考えられる。現在 in situ RT-PCR の条件を検討し、詳細な場所と細胞数を解析中である。

課題番号：30 基-027

研究課題：マンソン裂頭条虫 3 倍体クローン株（Kawasaki triploid strain）を用いた新規代謝制御因子の統合的機能解析

研究代表者名（所属）：沖野 哲也（微生物学）

マンソン裂頭条虫（*Spirometra erinaceieuropaei*）の幼虫は、成長ホルモン様因子などの生理活性物質を分泌して、実験的宿主（マウス）の代謝系に影響をおよぼすことが知られている。研究代表者らは、マンソン裂頭条虫の生活環を実験室内で完成させ、岡山県産の 3 倍体成虫を起源とする遺伝的に均一な 3 倍体クローン条虫株（Kawasaki triploid strain Kt 株）の樹立法を確立した（Okino et al.2017）。研究代表者らは、宿主（マウス）に及ぼす効果（体重増加）が異なる複数の Kt 株を用いて、条虫由来の生理活性物質、特に新規の代謝制御因子を同定し、その機能的意義を明らかにすることを目指しており、昨年、3 つめの 3 倍体クローン株（Kt-3 株）を作製した。これまでの Kt 株を Kt-1 株とし、両者の宿主への効果を比較するため、感染実験を行った。4 週齢の ICR マウス（♀）を 3 匹ずつ 3 群（コントロール群、Kt-1 株 1 条投与群、Kt-3 株 1 条投与群）に分け、3 週間にわたり体重測定し、マウスを剖検後、肝臓・脾臓・生

殖器周辺脂肪組織・前脛骨筋の湿重量を測定した。コントロール群に比べ両株投与群の方に体重増加傾向がみられた。脾臓の湿重量に関して、コントロール群より Kt-3 株 1 条投与群の方が有意に重かった。株間での詳細な比較は、今後検討していく予定である。

課題番号：30 基-097

研究課題：風邪診療の質指標の開発

研究代表者名（所属）：桑原 篤憲（総合臨床医学）

【背景】診療の質指標（QI：Quality Indicator）とは、標準的な検査又は治療が行われていることを数値化したものである。風邪診療の質を評価する QI は確立されていない。また、感冒に対する抗菌薬使用は約 45～66%と報告され、必ずしも感冒に対する診療の質が高いとは言えない。

【目的】川崎医科大学附属病院での風邪診療の実態を明らかにし、風邪診療における診療の質指標開発の基礎的データを収集すること。

【デザイン】記述研究

【セッティング】川崎医科大学附属病院救急外来

【対象】2014 年 1 月 1 日から 2016 年 12 月 31 日までに川崎医科大学附属病院救急外来を受診した患者のうち、“風邪”（風邪・感冒、急性上気道炎、急性咽頭炎、急性扁桃炎、急性気管支炎、急性副鼻腔炎）の病名がついた患者。ただし、救急科以外の受診、15 歳未満、救急搬送（救急車、ドクターカー、ドクターヘリ）された患者、診療時間内の受診は除く。

【調査項目】患者背景（年齢、性別）、抗菌薬投与の有無及び抗菌薬名

【結果】対象患者は、延べ 3880 人、年齢の中央値 34 歳（IQR 25-51）、男性 51.3%、女性 48.7%であった。このうち、抗菌薬を処方された患者は、延べ 1404 人（36.2%）であった。このうち、第三世代セフェム系 645 人（45.9%）、ニューキノロン系 339 人（24.1%）、マクロライド系 209 人（14.9%）、ペニシリン系 204 人（14.5%）であった。

【結論】当院救急外来で風邪に対して、抗菌薬を処方した患者の割合は既報よりも低かったが、まだ改善すべき状態であると考えられた。

【研究の限界】病名の精度の限界や単施設・大学病院での検討

課題番号：30 若-005

研究課題：動物モデルを用いたインフルエンザ流行パターンを規定する要因の究明

研究代表者名（所属）：後川 潤（微生物学）

【背景】インフルエンザウイルス感染により誘導される細胞性免疫は、抗原性が異なるウイルスに対しても交叉防御可能であるが、その詳細は不明である。我々は先行研究で、(1)宿主には、抗原性が異なるウイルスに応答して発症を抑制する免疫機構が存在し、CD8+細胞が重要な因子であること、(2)発症期のリンパ節（LN）中には CD4+CD8+（両陽性）細胞が高頻度に認められることを見出した。本研究では、インフルエンザ感染後の異なる時期および臓器から分離した CD8+細胞の交叉防御活性と CD4+CD8+細胞の機能的意義を調べた。

【材料と方法】C57BL/10 マウスにパンデミック 09 型ウイルス (pdm09) を致死量以下で感染させ、発症期と回復期にマウスの脾臓 (SPL) と LN から CD8+細胞を分離して別のマウスに移入した。移入 2 日後に pdm09 と抗原性が異なる、致死量のソ連型ウイルスをチャレンジ感染させ、体重変動を指標として移入 CD8+細胞による交叉防御活性を検証した。また、発症期 LN 中に出現する CD4+CD8+細胞のフェノタイプ等をフローサイトメトリーで解析した。

【結果と考察】発症期 LN 中の CD8+細胞は強い交叉防御活性を賦与できる場合とできない場合があり、非常に不安定であることが分かった。その理由は不明であるが、CD4+CD8+細胞の存在比や機能が要因の一つと考えられる。さらに詳細な解析を行う。

課題番号：30 基-035

研究課題：分子シャペロンネットワーク制御による新規ウイルス増殖抑制法の開発

研究代表者名 (所属)：齊藤 峰輝 (微生物学)

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 患者では、その末梢血単核球中の熱ショックタンパク質群 (Heat shock proteins:HSPs) の発現が、HTLV-1 非感染者および無症候性ウイルスキャリアーと比較して有意に高いことが近年報告された。HSPs は一般的に細胞増殖を亢進する働きを持つことから、HTLV-1 感染細胞中の HSPs 発現を抑制できれば、HAM の発症予防・治療につながる新薬の開発につながると考えた。そこで本研究では、HSPs のマスターレギュレーターである転写因子 Heat shock factor 1 (HSF1) に着目し、その活性を膜透過性リガンド Shield-1 および FKBP12 蛋白質変異体を用いた「プロテオチューナー法」により生理的条件下で制御することで、HSPs 発現を人為的に抑制できるか否かを検討した。

HSF1 ドミナントネガティブ体(HSF1-DN)を FKBP12 変異体に融合した発現プラスミド (FKBP-HSF1-DN)を構築した。これをヒト T 細胞白血病株 Jurkat に遺伝子導入し、Shield-1 添加によって FKBP-HSF1-DN 蛋白質を誘導発現させた結果、細胞内在性 HSF1 の転写活性化を抑制することができた。現在、HSF1 プロテオチューナーシステムを HTLV-1 感染細胞に導入することで、HSPs の発現抑制および感染細胞増殖の特異的抑制が可能かどうか検討中である。

課題番号：29 若-001

研究課題：HTLV-1 の持続感染が免疫老化制御機構に及ぼす影響とその病因的意義の解明

研究代表者名 (所属)：瀬島 寛恵 (微生物学)

近年、がん抑制遺伝子 men1 の転写産物 Menin が、免疫老化に伴うアレルギー疾患や自己免疫疾患の発症にかかわる転写抑制因子 Bach2 を標的として制御すること、HTLV-1 の転写制御因子 HBZ が Menin の機能を抑制することが相次いで報告された。そこで、HTLV-1 が Menin-Bach2 経路に及ぼす影響について解析した。

検討したすべての HTLV-1 感染 T 細胞株で Menin の発現を認めたが、Bach2 については発現している株としていない株があった。HTLV-1 感染 T 細胞株のうち、Menin のノックダウンによる Bach2 の発現低下が確認された細胞株でのみ Menin 阻害剤による増殖阻害効果が認められた。Menin と Bach2 は、いずれも HTLV-1 の転写制御因子である Tax および HBZ の双方と相互作用した。HTLV-1 感染細胞株で

Tax 遺伝子の発現をノックダウンしたところ Bach2 遺伝子の発現低下が認められたが、HBZ 遺伝子のノックダウンでは変化を認めなかった。HTLV-1 感染者の末梢血単核球における men1 遺伝子の発現は HTLV-1 感染細胞数（プロウイルス量）と逆相関した。

HTLV-1 は標的細胞である CD4 陽性 T 細胞に感染して Menin-Bach2 経路に影響を与えることで「免疫老化」による T 細胞機能異常をもたらし、HTLV-1 関連疾患の発症に関与する可能性が示唆された。

課題番号：30 基-042

研究課題：感染行動のプロファイリングによるインフルエンザウイルスのヒトへの感染性獲得機構の解明

研究代表者名（所属）：堺 立也（微生物学）

インフルエンザウイルスは、結合する受容体を交換することで細胞表面に沿って運動することができる。感染に最適な運動の様式（行動パターン）は宿主により異なることから、行動パターンはウイルス感染の宿主特異性を評価する新たな指標となる可能性がある。本研究では、行動パターンを指標としたウイルスのヒトへの感染性の評価のため、ヒトやミズドリを宿主とする各種のインフルエンザウイルスを対象に行動パターンの解析と分類をおこなった。ヒトウイルスは A 型 H1N1 亜型 2 株、A 型 H3N2 亜型、B 型 ヴィクトリア系統、山形系統の各 1 株、トリウイルスは A 型 H1N1 亜型と H3N2 亜型の各 1 株をもちいた。受容体として α 2,6 型シアロ糖鎖(6SG)あるいは α 2,3 型シアロ糖鎖(3SG)を結合したガラス表面を作製し、この表面でのウイルスの運動を反射干渉顕微鏡により観察した。ヒトウイルス 5 株中 4 株は、6SG 表面での運動性は低く、3SG 表面で活発に運動した。トリウイルスは、H1N1 亜型ウイルスは、ヒトウイルスと同様なのに対し、H3N2 亜型ウイルスは、3SG 表面で動かず 6SG 表面でよく運動した。インフルエンザウイルスはもともとミズドリのウイルスが、ブタなどの中間宿主を経ることでヒトへの感染性を獲得するとされている。しかし行動解析の結果は、すでにミズドリウイルスの中にヒトへの感染に適した行動をとるウイルスが存在することを示唆している。

課題番号：30 基-033

研究課題：薬疹・水疱症発症に関与するヘルペスウイルスの病態解析

研究代表者名（所属）：山本 剛伸（皮膚科学）

ヘルペスウイルスは 9 種類存在し、初感染後潜伏感染し、時々再活性化する。近年、薬疹、水疱症、膠原病の発症・経過中にヘルペスウイルスが関与することが示唆されているが、詳細は不明である。薬疹・水疱症に関与するヘルペスウイルスの病態をさまざまな観点から解析した。

重症薬疹の一種である薬剤過敏症候群とヘルペスウイルス再活性化の関連について解析した結果、臨床経過により、HHV-6、CMV、EBV の順に再活性化が証明された。培養ケラチノサイト内における HSV 複製について、サイトカインの役割を確認したところ、培地に IL-6、TNF- α を添加すると HSV-1 の複製効率が増加した。様々な疾患の治療に伴う EBV 感染細胞数の経過を測定した。薬疹、重症感染症、水疱症、膠原病の治療経過中、血清 IFN- γ 低下に一致して、血液中 EBV コピー数または EBV 転写産物 (EBER) が増加した。

薬疹、水疱症などではステロイド薬全身投与などの免疫抑制療法を主として行うが、経過中にさまざまなヘルペスウイルスの再活性化をきたす。原疾患の病勢に伴う炎症性サイトカインにより HSV 感染の増悪をきたす環境を形成し、治療経過中 Th1 バランスの低下または細胞性免疫の低下により EBV の再活性化が惹起される。本疾患群は、原疾患の病勢と宿主免疫状態のバランスによりヘルペスウイルスの再活性化が惹起される免疫再構築症候群の一種と捉えることができる。

課題番号：30 基-071

研究課題：自己免疫性水疱症における免疫再構築症候群のバイオマーカー探索

研究代表者名（所属）：林 宏明（皮膚科学）

自己免疫性水疱症に対する有効な免疫抑制療法導入後の合併症の多くが、ウイルス・細菌感染症で、免疫抑制状態ではウイルスの再活性化が生じても無症状であるが、急速なステロイド減量やパルス療法による免疫のゆらぎに続く免疫再構築を契機とする免疫再構築症候群（IRIS）として発症している。免疫再構築症候群は、HIV 領域で提唱された概念であるが、nonHIV 疾患には拡大していない。その要因として non-HIV IRIS を規定する臨床検査法や臨床診断項目が十分に認証評価されていないことがあり、現在われわれは検査法を含めた診断基準の適正化に取り組んでいる。

今回われわれは、DPP4 阻害剤内服後に生じた水疱性類天疱瘡（BP）が non-HIV IRIS の病態により発症するのではないかと仮説をたて検討することにした。その背景を示す。DPP-4 は CD26 と同義であり、CD26 は T 細胞の活性化マーカーである。その阻害剤は、現在糖尿病治療薬として汎用されている。DPP-4 阻害剤により治療中の糖尿病患者に炎症型水疱性類天疱瘡の発症頻度が高いことが知られているが、その発症病態は不明な点が多い。われわれは、DPP-4 阻害剤が CD4 活性を阻害することに着目し、内服中に自己免疫性疾患を誘導しやすかったり、IRIS と類似の免疫動態が生じているかしらべるために CD4 と制御性 T 細胞数を検討することにした。

方法 DPP4 阻害剤内服中に発症した BP 患者と内服していない BP 患者、および健常人の末梢血単核球分画の CD4, CD4+CD26+, Foxp3+CD26+, nTreg, iTreg, non Treg, の割合を解析した。

結果 現在解析中のため、抄録には、結果は記載しない。発表では、解析の中間報告を行う予定である。

課題番号：30 若-003

研究課題：発汗機能と皮膚マイクロバイオームに着目した外用剤の機序解明と治療法の確立

研究代表者名（所属）：片山智恵子（皮膚科学）

アトピー性皮膚炎患者皮膚では、基礎発汗の分泌障害が角層水分量の減少を誘導し、皮膚のバリア障害の一因になっている。そのため、アトピー性皮膚炎の外用療法が、基礎発汗にどのような影響を及ぼすか関心が高まっている。また、アトピー性皮膚炎では、細菌叢に黄色ブドウ球菌が検出され、それによる皮膚感染症が生じやすいという特徴がある。汗には抗菌ペプチドが含まれていることから、アトピー性皮膚炎の発汗障害が皮表の細菌叢を変動させている可能性も考えられる。

本研究の目的は、①アトピー性皮膚炎で汎用させるステロイド外用剤と保湿剤が基礎発汗を変動させるか観察する。②外用部位の基礎発汗の程度が細菌叢がどのように影響するか検討する。②については、

現在サンプルを収集途中のため、結果の公表ができない。そのため①について結果を報告する。

方法 我々は健康人と AD 患者を対象に Impression mold 法によりステロイド軟膏剤、高分子ヘパリノイド o/w クリーム(HC)の基礎発汗に対する影響を比較検討した。前腕に各種外用剤を 1FTU/3FTU、2 週間塗布し経時的に SSH、基礎発汗(発汗滴数/cm²、発汗滴総面積)、皮膚紋理(平均皮丘面積)を測定した。

結果、HC は用量依存性に皮溝の基礎発汗を他剤に比し有意に増加させた。皮溝の基礎発汗が増えると SSH が増加し皮膚紋理が緻密になった。健常人と AD には反応性に差がみられた。基礎発汗障害のある AD には、基礎発汗を促進する作用のある外用療法を選択することで、発汗障害を軽快させることができると考えた。

課題番号：30 基-064

研究課題：エクソソームを用いた中皮腫早期診断系の確立

研究代表者名(所属)：李 順姫(衛生学)

エクソソームは、細胞間コミュニケーションツールとして機能する、細胞が放出する顆粒状小胞である。近年、個別の癌ごとに特徴的なエクソソームが発見され、末梢血にも存在することからバイオマーカーとしての役割も注目されている。

中皮腫は石綿(アスベスト)曝露により引き起こされる非常に悪性度の高い癌である。中皮腫は読影などその鑑別診断に熟練を要し、診断に時間を要する上に、治療は難渋を極め、予後も悪い。我々は、中皮腫の発生および成長を遅らせられれば、天寿がんにすることも可能と考えている。我々はこれまでに、石綿が Treg の機能を亢進することで、宿主の抗腫瘍免疫を弱体化することを明らかにした。このような背景から、我々は、抗腫瘍免疫の減弱を示すエクソソーム含有因子があり、それが中皮腫のバイオマーカーになりうるのではないかと考えている。

本実験では、Treg 様活性をもつ MT-2 細胞株の長期石綿曝露株(CB1 株)、および非曝露株 Org の培養上清からエクソソームを回収し、包含される miRNA を検討した。7 種類の miRNA が CB1 株培養上清で顕著に低下していることを見だし、細胞抽出液からの miRNA の結果と比較したところ、has-miR125a-5p が培養上清、細胞抽出液で共通して CB1 において低下していた。今後、中皮腫検体でのエクソソーム解析を行い、バイオマーカーとして実用できるか検討する。

課題番号：30 基-006

研究課題：アスベスト長期継続曝露ヒト T 細胞株における酸化的リン酸化関連複合体の発現

研究代表者名(所属)：大槻剛巳(衛生学)

アスベストのヒト T 細胞への継続長期曝露の観察の目的で、HTLV-1 不死化ヒト T 細胞株 MT-2 を用いクリソタイル(CH)およびクロシドライト(CR)による継続長期曝露亜株を樹立した。一過性高濃度曝露ではミトコンドリア系経路の活性化と活性酸素種の生成でアポトーシスが誘導されるが長期継続低濃度曝露(1年以上)では抵抗性を獲得する。親株と CH・CR 継続曝露亜株(CB1・CR1)で一過性高濃度曝露時の酸化的リン酸化関連複合体の発現を検討した。酸化的リン酸化関連複合体の発現は MILLIPLEX

MAP Human Oxidative Phosphorylation (OXPHOS) Magnetic Bead Panel - Cellular Metabolism Multiplex Assay を用いた。親株への曝露では CR 曝露時に Complex I が非曝露対照と比して減弱する以外に大きな変化はなかった。CB1 では、Complex III の発現低下、NNT (nicotinamide nucleotide transhydrogenase) の顕著な発現亢進、CR1 では Complex III と V の発現亢進と CB1 と同様に NNT の顕著な発現亢進が認められた。長期曝露株で高発現していた NNT をノックダウンし、活性酸素の発生量を Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Kit で測定した。CB1 で抗酸化分子 NNT が顕著に増加、MT-2 親株に比し ROS 量は減少していた。CB1 で NNT をノックダウンすると石綿曝露下における ROS の発生が CB1 に比べ顕著に増加した。石綿長期曝露株が獲得した石綿誘導性アポトーシス耐性は NNT の発現増加によるものである可能性が示唆された。

課題番号：30 基-076

研究課題：ナノシート化合物の毒性影響およびオートファジー遺伝子との関連

研究代表者名 (所属)：西村 泰光 (衛生学)

チタン酸ナノシート (TiNS) は極薄のチタン酸化物であり産業利用が期待されているが毒性影響は調べられていなかった。我々は、TiNS 曝露がヒト単球に著明な空胞形成を伴うカスパーゼ依存性アポトーシスを誘導すること、TiNS は空胞内部に存在し、リソソーム量が著増することを明らかにしてきた。そこで、ヒト CD14⁺単球を磁気分離し、合成した TiNS (菱形：縦横軸約 20 x 30 nm) または TiO₂-P25 (日本アエロジル社、粒子：粒径約 25 nm) 曝露下で単球を 2 または 7 日間培養し、オートファゴゾームの nucleation および elongation に働く 26 遺伝子および mTOR の遺伝子発現量を Realtime RT-PCR により調べた。TiNS 曝露により ATG101, Beclin-1, ATG12, ATG3 を含み 2 日後で 12 遺伝子、7 日後で 10 遺伝子発現量が増加しており、オートファジー機能の亢進を示した。しかし、アポトーシスはオートファジーを抑制する PI3K 阻害剤 wormannin では抑制されず、リソソーム機能低下に働く v-ATPase 阻害剤 Bafilomycin A1 により抑制され、空胞形成も抑制された。以上の結果は TiNS 曝露により単球のオートファジーは亢進するが毒性には関与せず、寧ろ v-ATPase 依存性のリソソームの異常な増大が TiNS が持つナノ毒性の機序であることを示す。

課題番号：30 基-081

研究課題：金担持チタン酸ナノシート、銀担持チタン酸ナノシートを用いた蛍光増強膜の開発

研究代表者名 (所属)：吉岡 大輔 (自然科学)

テトラエチルアンモニウムヒドロキシド (TEA-OH) のほか、ハロゲン化物塩などの種々のテトラエチルアンモニウム塩 (TEA-Cl など TEA-X と略す) を用いて、チタン酸ナノシート (TNS) の合成、TNS への金や銀の担持に及ぼす陰イオン (X⁻) の影響について検討を行った。

TEA-OH の半分を TEA-Cl などに置き換え TNS の合成を行ったところ、TEA-OH のみで合成した TNS よりもシートのサイズが小さくなっていた。また、TEA-Cl にすべて置き換えてしまうと前駆体が得られなかったことから、OH⁻ が TNS の合成において必要不可欠な陰イオンであることが分かった。

また、種々の TEA-X を用いて合成した種々の TNS に対して、金や銀の担持を行ったところ、陰イオン

ごとで担持量(ナノサイズの金や銀の局在表面プラズモン共鳴による吸光から判断)が異なった。X-のイオンサイズ、標準還元電位と担持量との相関についてそれぞれ検討を行ったが、直線的な相関は得られなかった。これらのほかにもいくつかの因子が、複雑に相互的に影響していると考えられる。

金担持 TNS ならびに銀担持 TNS を用いた蛍光増強膜の開発において、金や銀の担持量が蛍光タンパク質などの蛍光発光強度に影響を与えると考えられる。この研究結果により、金、銀の担持量の制御に陰イオンの選択が有用であることが分かった。

課題番号：30 基-074

研究課題：覚せい剤の投与経路による血液・胃内薬物濃度比に関する研究

研究代表者名(所属)：吉留 敬(衛生学)

覚せい剤など違法薬物の関与する犯罪においては、しばしば被疑者が友人より覚せい剤の混入した飲料を飲まされ、自らの意思で使用したことはないと主張する。しかし、この主張の真贋の鑑定のためにできることは、新しい注射針痕の観察や、実際に与えられたとする空ビンの鑑定などに限られ、確実性が低いのが現状である。

そこで、このような問題に解決を与えることを目的として、ラットを用いた動物実験によって、皮下投与時及び経口投与時の覚せい剤の胃内容濃度/血中濃度比(GB 比)について検討を行った。その結果、皮下投与時の GB 比の平均値は、投与後 0.5 時間で 1 を上回り、2 時間後～6 時間後に最大値を示し、その後低下した。一方、経口投与時の GB 比の平均値は時間経過とともに低下した。メタンフェタミン投与後 3 時間以内の GB 比は、皮下投与群で 0.484～32.2 であり、経口投与群で 244～5750 であった。

以上の結果より、覚せい剤は皮下注射を行なった場合であっても、胃内濃度が血中濃度を超えることから、単に胃内濃度が血中よりも高いということのみをもって、覚せい剤が経口的に摂取されたものであることを証明することはできないという事実が判明した。さらに、覚せい剤摂取の 3 時間以内であれば、覚せい剤の胃内濃度と血中濃度を比較することにより、その投与経路を推定することが可能であることを明らかとした。

課題番号：30 基-054

研究課題：好中球膜タンパク質 NADPH oxidase 結合抗体の解析

研究代表者名(所属)：栗林太(生化学)

病原微生物等の貪食など、細胞が刺激された時に、細胞休止期には細胞内に存在する蛋白質、p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} (phox は phagocyte oxidase の略) と Rac が、細胞膜に移行して膜蛋白質であるシトクローム b₅₅₈ (p22^{phox} と gp91^{phox} のヘテロダイマー) と結合することにより、食細胞 NADPH オキシダーゼは活性化される。この活性化型 NADPH オキシダーゼは活性酸素の 1 種であるスーパーオキシド (O₂⁻) を生成し、この O₂⁻ から派生した様々な活性酸素種は強力な殺菌作用を持つ。これらオキシダーゼ複合体を構成する蛋白質の 1 つでも遺伝的に障害されると、慢性肉芽腫症 (CGD) になり、重篤な感染症を繰り返す。これら活性酸素生成タンパク質の内、gp91^{phox} だけは性染色体にコードされているので、患者の 80% 程度は男児である。これまで、CGD の診断は申請者等が作成したモノクローナル抗体 (7D5) によ

り行って来た。この抗体は、gp91^{phox}を細胞外から認識する抗体であり、小児の全血 0.1mL 程度から診断が可能であり、非常に便利ではあったが、エピトープ (gp91^{phox}上の抗原) は不明のままであった。本研究の目的は、この 7D5 の抗原を決定することである。7D5 はヒトの gp91^{phox}には結合するが、マウスには結合しない (Yamauchi A et al., 2001)。そこで、まず我々は様々なキメラタンパク質を生細胞に発現可能なアッセイ系を構築した後 7D5 の結合実験を行った。更に詳細な結合マップを形成するために、様々な point mutation を gp91^{phox}に導入し解析したので、本会において報告させていただきたい。

課題番号：30 ス-002

研究課題：アレルギー性鼻炎における嗅覚障害の発生メカニズム

研究代表者名 (所属)：瀨本 真一 (耳鼻咽喉科学)

【はじめに】嗅覚障害を主訴として受診するアレルギー性鼻炎患者は少ない。嗅覚障害の自覚に乏しい、もしくはあっても見逃されることも少なくない。われわれは、以前よりスギ花粉症患者における眼・皮膚症状などの随伴症状について報告してきた。今回、飛散量の異なる 2 年間の花粉飛散期に、鼻症状 (くしゃみ, 鼻汁, 鼻閉) を主訴に受診した患者における嗅覚を中心とした随伴症状・QOL について検討した。

【対象・方法】2016・2017 年のスギ花粉飛散期の 1 か月間に、川崎医科大学附属病院および関連病院を未治療で受診した花粉症患者 287 例 (男性 115 例, 女性 172 例, 年齢 6-79 歳, 平均 35.9 歳) を対象として症状アンケートを施行した。アンケートは日本アレルギー性鼻炎標準 QOL 調査表 (JRQLQ), 鼻・眼以外の症状, 嗅覚症状を含む随伴症状について Visual Analogue Scale (VAS) を用いて評価した。

【結果】2016・2017 年の岡山県倉敷地区のスギ・ヒノキ花粉飛散量はそれぞれ 1690.9 個, 2553.6 個であり, 2016 年は過去の平均と比較し少量飛散年であった。初診時に嗅覚低下を自覚していた症例は 30.5% (88/287 例) であり, その内訳として女性が約 6 割 (56/88 例) を占めていた。嗅覚低下の自覚例では無自覚例と比較し鼻症状スコアの総和が高い傾向を示した。さらに, 嗅覚低下の自覚例の VAS は鼻症状スコアと相関を示した。花粉飛散量の影響についても検討を加え報告する。

課題番号：30 基-078

研究課題：片側鼻腔閉鎖による鼻呼吸障害モデルマウスを用いた睡眠覚醒関連ケミカルメディエータの変化

研究代表者名 (所属)：原 浩貴 (耳鼻咽喉科学)

【背景】アレルギー性鼻炎 Allergic Rhinitis (以下 AR) は産生された炎症性ケミカルメディエータによって睡眠・覚醒調整に関与しているとされているが, その点を明らかにした基礎研究は少ない。今回, 鼻呼吸障害モデルマウスを作製し, AR と睡眠障害の相関を検討した。

【方法】C57BL/6 (以下 B6) を用いて片側鼻腔閉鎖による鼻呼吸障害モデルを作製し, 運動量測定装置を用いて行動を解析した。また, AR モデルでも行動制限が出現するか, B6 と B6 よりも Th2 型炎症が強く発現する BALB/c を用いて検討した。

【結果】6 週齢マウスでは片側鼻腔閉鎖の処置によって有意に行動制限を生じたが, 14 週齢のマウスでは明らかな差は認められなかった。次に, AR によって活動性変化が生じるかを検討する目的で AR モデ

ルを用いて行動解析したところ、B6 では明らかな行動変化は認めなかったが、BALBc では行動制限が出現した。

【考察】若年マウスは酸素要求量が多いため有意に行動制限が出現すると考えられた。次に、BALBc を用いた実験から、アレルギー性炎症によって何らかの行動制限がみられ、活動性低下が生じたと考えられた。しかし、活動性が高まる時間帯は変化しないことから睡眠障害の出現は現時点では不明である。今後は血清ケミカルメディエータ測定も踏まえて検討をすすめていく。

課題番号：30 若-001

研究課題：好酸球欠損マウスを用いた低酸素条件下における好酸球の機能解析

研究代表者名（所属）：雑賀 太郎（耳鼻咽喉科学）

【背景】低酸素環境が好酸球を活性化させる、という報告があり、睡眠時無呼吸症候群で生じる二次的高血圧や心疾患の発症において好酸球が病態に関与している可能性が推測される。

【方法】まずは片鼻を外科的処置にて閉鎖し、持続的低酸素モデルを作製する。6 週齢の C57BL6 野生型マウスと好酸球欠損マウス Δ dblGATA を用い、運動量測定装置 ACTIMO にて行動解析を行った。

【結果】片鼻閉鎖による呼吸障害によって、野生型マウスでは有意に活動性が低下した。また、同一週齢の好酸球欠損マウスを用いて行動解析を行ったところ、明らかに活動量が少なかった。こちらも片鼻閉鎖処置を施行することによって野生型と同様に活動量は減少した。

【考察】片鼻閉鎖に伴う持続的低酸素によってマウスの活動量は減少したため、体内動脈血液ガスの確認を行う。また、低酸素環境を誘導することによって全身における免疫細胞分画が変化するかを検討するため、フローサイトメトリーを用いて複数の臓器（骨髄、末梢血、脾臓、鼻粘膜など）にて好酸球の増減を確認する予定である。

課題番号：30 基-085

研究課題：BST-1/CD157 の腸管-神経-免疫関連制御機構の基盤的解析

研究代表者名（所属）：石原 克彦（免疫学）

Bone marrow stromal cell antigen-1(BST-1)/CD157 は GPI アンカー型の ADP-ribosyl cyclase であり、NAD から産生される cyclic ADP-ribose は ryanodine 受容体を介して小胞体から Ca^{++} の放出を誘導する。腸管-神経-免疫関連制御分子としての BST-1 の機能を解析するため、SPF 飼育室にて DSS 誘発大腸炎マウス(3%DSS 5 日間、通常水 2 日)を作成した。また、同飼育室でのうつ用症状の指標となる尾懸垂試験(TST)後 DSS 誘発大腸炎を誘導した。

野生型における大腸炎の誘導は DSS 飲水 3 日後から血便、大腸内の出血の出現および末梢血ヘマトクリット値の低下を認めた。*Bst*IKO と野生型の経時的体重変化は野生型で通常水飲水後も体重減少を続けた一方で、*Bst*IKO は通常水飲水後維持された。7 日後の大腸病理所見では *Bst*IKO において炎症が軽症化し、野生型で見られた大腸内好中球増加は少なかった。SPF 飼育室における *Bst*IKO(n=6)の TST 無動時間の平均値は有意差はなかったものの、野生型(n=6)よりも 1.16 倍の延長を認めた。TST は DSS 誘発大腸炎の結果に影響を与えなかった。これらの結果から、大腸炎発症の差は、(1) 抑うつ様状態によるも

の、もしくは(2)大腸好中球遊走能のいずれかである可能性が示唆された。(599)

課題番号：30 基-082

研究課題：BST-1/CD157 による B 細胞の新しい増殖／生存制御機構の解明

研究代表者名（所属）：井関 将典（免疫学）

Bone marrow stromal cell antigen-1 (BST-1)/CD157 は ADP リボシルシクラーゼ活性を有する細胞膜外酵素である。我々は C57BL/6 背景の *Bst1* 遺伝子欠損マウス(KO)において I 型胸腺非依存性抗原 (TNP-LPS) に対する抗原特異的抗体産生が亢進していること、BST-1 が脾臓 B 細胞の亜集団である transitional type 2 B 細胞と辺縁帯(marginal zone: MZ) B 細胞に発現しており濾胞 (FO) B 細胞にはほとんど発現していないことを明らかにしてきている。野生型(WT)および KO 脾臓から磁気ビーズ法および FACS ソーティングによって純化した MZ B 細胞、FO B 細胞を用いて培養実験を行った結果、KO MZ B 細胞は LPS 刺激時の細胞生存が WT に比べて亢進していることが分かった。しかし細胞増殖および抗体産生細胞への分化は KO でも変化はなかった。従って KO MZ B 細胞の細胞生存の亢進が抗体産生細胞数の増加に繋がり、結果として TI-I 抗原に対する抗体産生亢進に繋がる可能性が示唆された。純化した MZ B 細胞から RNA を精製しマイクロアレイ解析を行った結果、様々な細胞死関連遺伝子のうち *Bax* 遺伝子の発現が KO MZ B 細胞で低下していることが明らかとなった。今後は BST-1 酵素活性やシグナル受容体としての機能に注目した解析を行い、より詳細な制御機構を解明する。

課題番号：30 基-098

研究課題：BST-1 と CD38 の腸管運動制御機構の解析

研究代表者名（所属）：矢作 綾野（免疫学）

Bone marrow stromal cell antigen-1(BST-1)/CD157 は、GPI アンカー型細胞膜外酵素であり、NAD からサイクリック ADP リボース (cADPR) を産生する ADP リボシルシクラーゼ活性を持つ。今回、2-3 ヶ月齢雌の 3 系統と対照の野生型マウスを用いて、BST-1 と CD38 の腸管運動制御を検討した。*ex vivo* にて生体内の蠕動運動を再構築し、蠕動に関係する収縮能を電気信号に変換し計測できるマグヌス法にて定常状態における自発運動およびアセチルコリン(ACh) に対する腸管収縮反応性を測定した。その結果、(1)自発運動のマウス系統差は認めなかった。(2) *Bst1KO*、*Cd38KO* の十二指腸および大腸は野生型と比較し、ACh に対する腸管収縮反応性が増強した。(3) DKO でも ACh に対する腸管収縮反応性の増強を認めたが、その反応性は *Bst1KO*、*Cd38KO* と同程度であった。(4)空腸、回腸ではマウス系統差を認めなかった。以上のことから、腸管部位により蠕動運動を制御する ADP リボシルシクラーゼが異なること、ACh に対する収縮反応性は少なくとも BST-1、CD38 のどちらか一方が存在すると機能を抑制することが示唆された。

課題番号：30 基-053

研究課題：TNF 受容体関連周期性症候群 (TRAPS) 新規遺伝子変異の炎症惹起・遷延化メカニズムの解

明

研究代表者名（所属）：平野 紘康（リウマチ・膠原病学）

背景：TNF 受容体関連周期性症候群（TRAPS）は、TNFRSF1A を責任遺伝子とする周期性発熱症候群である。我々は1家系2名から G87V/T90I 変異 TNFRSF1A を同定した。同変異が炎症病態に及ぼす影響を検討した。

方法：野生型（WT）、G87V、T90I、既知の T79M 変異 TNFR1 の発現ベクターを HEK-293 細胞に遺伝子導入し、細胞表面の TNFR1 発現をフローサイトメトリーで観察した。TRAPS 患者2名と健常人12名の末梢血単球細胞（PBMC）のミトコンドリア内活性酸素をフローサイトメトリーで評価した。また、TLR agonist 刺激後の PBMC 上清中サイトカインを、Multiplex アッセイを用いて網羅的に解析した。

結果：TNFR1 過剰発現細胞では、T90I 変異 TNFR1 は WT と同等の発現を呈する一方、T79M と G87V 変異 TNFR1 の細胞表面発現は低下した。患者 PBMC では、ミトコンドリア内活性酸素値は健常人と比較して有意に上昇した。FSL-1（TLR6/2 agonist）刺激後の IL-8 産生、LPS 刺激後の IL-6 と GM-CSF 産生は TRAPS 患者 PBMC で亢進した。

結論：G87V 変異 TNFR1 は、既知の T79M と同様の挙動を示した。患者 PBMC のミトコンドリア活性酸素が亢進しており、TRAPS の炎症性サイトカイン産生と関与する可能性が示唆された。

現在までの結果をまとめて、現在論文投稿中。

課題番号：30 基-051

研究課題：炎症性骨破壊におけるアンジオテンシン II の役割の解明

研究代表者名（所属）：守田吉孝（リウマチ・膠原病学）

【目的】アンジオテンシン II (Ang II) は、その受容体 (AT1R、AT2R) を介した血圧調節作用以外に、骨代謝に影響することが報告された。今回、関節炎を自然発症するヒト TNF トランスジェニック (hTNF-tg) マウスを用いて、炎症性骨破壊における Ang II の影響、またその受容体経路について検討した。

【方法】12 週齢野生型 (WT) マウス、hTNF-tg マウスの皮下に浸透圧ポンプを埋め込み、Ang II を 4 週間持続投与した。また、上記 Ang II 投与マウスに AT1R blocker、AT2R blocker を 4 週間、連日腹腔投与した。別途 AT2R agonist を持続投与する群も設けた。

【結果】Ang II の持続投与は、関節炎の程度には影響を及ぼさなかった。しかし、マイクロ CT・組織学的解析では Ang II 投与により距骨の骨びらんが有意に増強した。Ang II 投与 hTNF-tg マウスに AT1R blocker および AT2R blocker を投与したところ、AT2R blocker 投与時のみ Ang II の骨破壊増強効果が消失した。また、AT2R agonist 持続投与は Ang II 投与と同等に骨破壊が増強した。

【結語】Ang II 持続投与は関節炎の程度には影響を及ぼさず、骨破壊を増強させた。一方、AT2R blocker でこの増強作用が消失したことから Ang II の骨破壊増強効果は AT2R を介する可能性がある。

課題番号：30 基-052

研究課題：マイオスタチン阻害によるマウス骨粗鬆症・筋萎縮に及ぼす影響の検討

研究代表者名（所属）：向井知之（リウマチ・膠原病学）

【目的】マイオスタチンは TGF- β スーパーファミリー蛋白で、骨格筋量を負に調節する。最近、マイオスタチンが破骨細胞分化を促進させることが報告されたが、マイオスタチン阻害が骨粗鬆症病態に及ぼす影響は明らかでない。今回、マイオスタチン機能低下マウスを用いて、マイオスタチン阻害が骨粗鬆症モデルに及ぼす影響を検討した。

【方法】マイオスタチン機能低下モデルとして、マイオスタチンプロドメインが過剰となるマイオスタチン変異トランスジェニックマウス (Mstn 変異マウス) を用いた。骨粗鬆症モデルとして RANKL 誘導性骨量減少モデル、および尾部懸垂モデルを用いた。

【結果】RANKL 注射により野生型、Mstn 変異マウスで同程度の骨量減少を認め、血清 TRAP5b 値の上昇も両マウス間で差を認めなかった。尾部懸垂モデルでは野生型マウスで著明な骨量減少 ($45.2 \pm 10.6\%$ 減) を認める一方、Mstn 変異マウスでは骨量減少が軽減した ($13.7 \pm 11.2\%$ 減)。筋量減少率は野生型、Mstn 変異マウスで同程度だった。

【結論】マイオスタチン抑制は RANKL 誘導性骨粗鬆症モデルにおいて骨量減少への保護的効果を示さなかった。一方、廃用性骨量減少モデルである尾部懸垂モデルにおいては骨量減少を抑制した。マイオスタチン抑制の骨への作用は病的状態の違いに依存している可能性があり、その機序について更なる検討が必要と考える。

課題番号：30 基-039

研究課題：抗原変異を伴うインフルエンザウイルスの未来流行株予測システムの開発

研究代表者名 (所属)：内藤 忠相 (微生物学)

【目的】季節性 A 型インフルエンザウイルスは頻繁に抗原変異が起きるため、流行予測から選定したワクチン株と実際の市中流行株との間で抗原性が一致せず、ワクチン効果が著しく減弱する場合がある。その問題の解決のため、次シーズン以降の流行株に起きる抗原変異部位を事前に予測できるシステムを確立し、ワクチン開発研究に応用する。

【方法】①現在の流行株 A/(H1N1)pdm09 ウイルスを元株とした変異ウイルスライブラリー (変異ウイルスの集合体) を作出し、②野生株をモルモットに免疫して作製した抗ウイルス抗体とウイルスライブラリー反応させ、③反応後も感染能力を失わない免疫逃避株を単離する。そして、免疫逃避株の性状解析により未来流行株となりうる新型ウイルスを同定する。

【結果・考察】近年にヒトから分離された A(H1N1)pdm09 株の主要抗原であるヘマグルチニン (HA) およびノイラミニダーゼ (NA) を、低忠実性ウイルスポリメラーゼを導入した実験室株に組込み、培養細胞を用いて組換えウイルスを増殖させることで変異ウイルスライブラリーを作出した。プラークアッセイにより、本ライブラリーから免疫逃避株 (抗原変異株) の候補ウイルスを複数単離した。抗原変異候補株のゲノムシーケンス解析の結果、HA および NA のゲノムにこれまで報告例がない塩基変異を見出し、ウイルス増殖性および抗原変異への関与について調べている最中である。

課題番号：30 基-083

研究課題：新しい術中自己濃厚血小板浮遊液採取方法確立に関する臨床研究

研究代表者名（所属）：種本和雄（心臓血管外科学）

【目的】将来的な血小板製剤の供給不足打開策である術前自己血小板採取法について、人工心肺回路から体外循環開始早期に採取する方法を確立し、少子高齢化に伴う将来的な血液製剤不足に対する有力な対策とする。

【対象と方法】川崎医科大学倫理審査委員会の承認を得て、人工心肺を用いた心臓大血管手術を行った患者 72 例に対して、人工心肺開始早期に回路からヘモネティクス社製コンポーネントコレクションシステム L/N9000 を使用して自己血小板製剤の作成を行い、プロタミン中和終了後に返血し、血小板数および血小板凝集能の変化について検討した。採血は手術開始時 (A) ,プロタミン中和後 (B) , 自己血小板返血後 (C) の 3 回行った。

【結果】採取した自己血小板製剤は平均 $233.3\text{ml} \pm 43.5$ で、血小板数としては平均 5.5 単位 (3-16) の採取がされていた。(A) から (B) で血小板数は平均 $11.8 \text{万}/\mu\text{l}$ 減少し、(B) から (C) で平均 $3.0 \text{万}/\mu\text{l}$ 増加した。血小板凝集能は (B) から (C) で $\text{ADP} 1 \mu\text{M}$ 凝集では 4.3 ± 2.7 ポイント、 $\text{ADP} 3 \mu\text{M}$ 凝集では 8.7 ± 3.3 ポイント増加した。また $\text{collagen} 2.0 \mu\text{g}$ 凝集では 9.6 ± 9.5 ポイント増加した。

【結語】心臓大血管手術中人工心肺回路から有効な血小板凝集能を持った自己血小板を採取することが出来、それを返血することによって血小板数および血小板凝集能の改善が確認された。人工心肺回路からの自己血小板採取は、これらの手術での出血量減少および血液製剤使用量の削減についての効果が期待できる。

課題番号：30 基-003

研究課題：角膜疾患と生理学的特性との関連の探索

研究代表者名（所属）：藤本久貴（眼科学 1）

本研究により、カルシウム感受性色素による組織染色の系の安定的構築に成功した。ブタ角膜組織を切り出し、カルシウム感受性色素 Fluo4 で染色する。それにより角膜内皮をはじめ、角膜実質、上皮のカルシウム感受性色素による染色に成功している。そのうえで ATP などの細胞活性を刺激する薬剤負荷をおこない、内皮細胞の生理学的応答の計測に成功している。キシロカイン、塩化ベンザルコニウムなど臨床的に細胞障害性が知られている薬剤や、アルカリ負荷などの薬剤負荷をおこない、内皮細胞変性や脱落を観察することにも成功している。

角膜は外界との強いバリアを有し、薬剤を浸透させることは難しい。過去の報告された研究においては、上皮を剥離してカルシウム感受性色素などの薬剤負荷を行われてきたが、これらの方法では侵襲性が高い。今回の研究でナノ粒子化したカルシウム感受性色素を安定的に作成した。この手法を用いる事で、単純な点眼による角膜上皮および実質細胞の染色に成功した。この方法では溶媒に界面活性剤など上皮傷害性を持つ添加物の使用がほぼ不要であり、組織障害性を大きく低下できることも見出した。また、ナノ粒子化染色による角膜像を共焦点顕微鏡により観察し、実質および上皮細胞のカルシウム感受性色素染色像を観察した。リアルタイムに短い時間スケールで臨床的に問題となる角膜内皮変性を観察した例はなく、新たな病態理解を与える知見が得られつつあると期待される。

課題番号：30 基-088

研究課題：脾洞の杆状内皮細胞の分化メカニズム解明

研究代表者名（所属）：小野 公嗣（解剖学）

Ad4BP/SF-1 は核内受容体型の転写因子であり、ステロイドホルモン産生組織である副腎や生殖腺の発生に必須の因子であることが報告されている。我々は、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子の様々な組織特異的エンハンサー領域を探索・同定する過程で、*Ad4BP/SF-1* 遺伝子の脾臓エンハンサーを同定し、その欠損マウスの作製に成功した。Ad4BP/SF-1 が発現する脾洞の杆状内皮細胞は、これまで発生学的な観点からの解析はほとんどなされておらず、杆状内皮細胞の分化メカニズムは不明である。本研究では、脾臓エンハンサー欠損マウスを用いて、脾洞の杆状細胞における Ad4BP/SF-1 の発現制御を受ける下流因子を同定することにより、杆状内皮細胞の機能分化を制御する分子メカニズムを解明する。

エンハンサー欠損マウスの表現型を詳細に解析した結果、体重に占める脾臓の重量が減少していた。次に脾臓の HE 染色を観察したところ、欠損マウスにおいて白脾髄が実質の中心に融合して存在していた。また、欠損マウスでは血管の発達が悪い傾向にあり、白脾髄に中心動脈がほとんど認められなかった。走査型電子顕微鏡を用いた解析から、脾洞を構成する杆状内皮細胞の配列に異常が生じていた。さらに、欠損マウスでは、Howell-Jolly body を有する赤血球が有意に増加していた。今後は詳細な免疫組織学的解析により杆状内皮細胞の細胞特性について検証するとともに、mRNA-sequence 解析による下流因子の探索も行う予定である。

課題番号：30 基-073

研究課題：細胞分裂活性の維持により急速な胎児成長を可能にする胎盤・胎児循環の酸素運搬特性評価システムの構築

研究代表者名（所属）：毛利 聡（生理学 1）

高い酸素親和度を持つ胎児ヘモグロビンによる酸素運搬を行う胎児循環は、生理学・産科の教科書において酸素を効率良く運搬する性質を有すると解釈されてきた。一方、胎児循環で最も酸素分圧が高い臍帯静脈で～25mmHg、低い臍帯動脈では～20mmHg と大差ない低酸素濃度の血液が循環していることが報告されており、胎児循環の目的は母体側の酸素変化に対する胎児側の安定した低酸素環境維持であると考えた。この仮説を検証するために、本研究では酸素濃度に依存して発光寿命が変化するポルフィリンを血液中に投与し、Nd:YAG レーザーによる励起によるリン光の減衰を計測・解析することで、生体組織でガス交換を行っている毛細血管や内部血液を透過して観察できる細動脈や細静脈の酸素分圧を計測するシステムを構築した。まず計測信頼性を確認するためにポルフィリン投与が容易なサイズの動物の様々な血管で麻酔下に測定を行った。アフリカツメガエルでは、皮膚血管：50 mmHg、左心房：20 mmHg、右心房：10 mmHg と麻酔による肺呼吸停止に伴い皮膚呼吸によって体循環静脈系を介した酸素供給が行われていた。4 週齢ラット腎動静脈ではそれぞれ 90 mmHg、70 mmHg であった。現在、二次元スキャンにより臍帯動静脈の同時計測を可能にすべくシステム改良に取り組んでいる。

課題番号：30 基-086

研究課題：サルコペニアを標的とした抗加齢医薬品の開発研究

研究代表者名（所属）：砂田 芳秀（神経内科学）

健康寿命を短縮する加齢性筋萎縮（サルコペニア）に対する治療法の開発は、超高齢化社会を迎えたわが国の課題である。マイオスタチンは胎生前期には筋の原基である体節に、胎生後期から誕生後は骨格筋に特異的に発現する TGF- β 分子で、ノックアウトマウスの骨格筋量が、野性型マウスの約 2 倍に増加することから、骨格筋量を負に制御すると考えられている。われわれは筋ジストロフィーモデルマウスで、マイオスタチン活性亢進による筋萎縮の分子機構を世界に先駆け明らかとした（Ohsawa, et al., J Clin Inv 161, 2006）。本研究は、サルコペニアをマイオスタチン/TGF- β の恒常性破綻病態と仮説して、その阻害による医薬品の開発を目指した。本年度は、マイオスタチン活性阻害マウスと老化モデルマウスの交配によって、マイオスタチン活性阻害老化モデルマウスを作出した。このマウスでは、筋萎縮ばかりでなく、骨粗鬆症、腎硬化症が改善することを発見した。次年度は、作出したマウスの寿命と生理機能解析、骨格筋・骨・腎臓の組織生化学解析、併せてマイオスタチン/TGF- β を標的とした新規医薬品開発に取り組みたい。国民の健康寿命延伸のため、マイオスタチン/TGF- β を標的とした新規医薬品開発を本学から発信したい。

課題番号：30 基-087

研究課題：筋疾患・心疾患の迅速診断に向けた新規バイオマーカーの開発

研究代表者名（所属）：大澤 裕（神経内科学）

われわれは、筋疾患と心疾患、とりわけ心筋梗塞超急性期に、血中に出現する蛋白質を見出して、JST 支援事業として学校法人川崎学園からその国際特許を出願した。本研究は、これをシーズとして、蛋白質の定量キットを作成して、心疾患と筋疾患の迅速診断における分析的妥当性を検証し、体外診断用医薬品としての POC 取得を目標とする。これまでに、定量キット作成のため、蛋白質の、3つの抗原決定基に対する抗体（9種類）を作成した。いずれの抗体も、①ウエスタンブロット解析で、哺乳類細胞発現リコンビナント蛋白質に反応、②マウス骨格筋粗分画に反応、③293 マウス腎芽細胞発現蛋白質には反応するが、反応性には差違あり、④免疫組織染色で染色性を認めた。したがって、定量キット構築が可能と判断され、現在、抗体を組み合わせ、それらの作成に取り組んでいる。

課題番号：30 基-089

研究課題：鉄欠乏によるマイトファジー誘導機構の解明

研究代表者名（所属）：原 裕一（肝胆膵内科学）

【目的】我々はこれまでに鉄キレート剤が非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）において抑制されたミトコンドリア選択的オートファジー（mitophagy）を回復させミトコンドリア機能を改善することで病態進展（肝脂肪化、肝発癌）を抑制することを報告してきた。さらに我々は鉄キレート誘導性 mitophagy の key molecule として mitochondria ferritin (FtMt) を同定した。今回鉄欠乏による mitophagy 誘導の分子機構とヒト NAFLD 組織における FtMt の意義について検討した。

【方法】Huh7, HepG2 細胞と鉄キレート剤 (Diferiprone: DFP) を用いて解析を行った。2014~2017 年に当科で肝生検を試行された NAFLD 患者の組織を用いて FtMt の発現と病態進展との関係について検討した。

【成績】DFP による mitophagy 誘導の際に FtMt 誘導されるが、ミトコンドリア鉄欠乏の際に転写因子 SP1 の FtMt プロモーター領域への結合増強が明らかとなった。FtMt のノックダウンにより mitophagy は抑制された。FtMt は標的分子とオートファゴソームを結合させるカーゴレセプターのひとつである nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4) 結合し、さらに FtMt と NCOA4 の結合部位も同定した。ミトコンドリア移行シグナルを持つ蛋白はミトコンドリア膜電位の低下によりミトコンドリア外膜に係留するが、FtMt も鉄欠乏により膜電位の低下したミトコンドリア外膜に係留していた。以上から FtMt は障害ミトコンドリア選択的に移行し、さらに外膜に係留することで NCOA4 と結合して mitophagy を誘導すると考えられた。DFP による mitophagy は PINK1/Parkin の系とは独立していた。マウスモデルのミトコンドリアを検討したところ DFP 投与群は ATP の産生能は増加していた。NAFLD 肝組織の電顕による検討では FtMt の発現は mitophagosome と正の相関を示し ($r=0.82, P<0.01$)、病態の進展とともに減少した。

【結論、考察】mitophagy の全く新しい分子機構を明らかにするとともに、ミトコンドリア品質管理は NAFLD 病態進展抑制のための治療戦略となる可能性が示唆された。さらに FtMt は NAFLD 線維化進展の新たなバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

課題番号：30 基-015

研究課題：肺線維化における生理活性リゾリン脂質分解酵素の役割

研究代表者名 (所属)：岡本安雄 (薬理学)

特発性肺線維症は不可逆的に肺の線維化が進行し、予測できない多様な臨床経過をたどる予後不良の疾患で、新たな治療法の開発は急務である。生理活性リゾリン脂質スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) とリゾホスファチジン酸 (LPA) が肺線維化において重要な機能を有していることが明らかになってきた。私たちは抗がん剤ブレオマイシン (BLM) 反復投与肺線維症モデルマウスの肺において、S1P と LPA の分解活性を持つ脂質リン酸ホスファターゼ 3 (LPP3) の遺伝子およびタンパク質発現が BLM 投与群で低下していることを見出した。以上の結果から、「線維化肺では、S1P と LPA の分解酵素 LPP3 の発現低下が S1P と LPA の蓄積を引き起こし、線維化を促進する。」と考えた。LPP3 の発現低下に関与する miR-184 と LPP3 発現増加に関与する転写因子 KLF2 を検討したところ、BLM 投与群の肺において miR-184 発現の増加および KLF2 遺伝子発現の低下が観察された。また、BLM 処理により細胞老化を起こした II 型肺胞上皮細胞株 A549 細胞において、miR-184 発現の増加、KLF2 遺伝子発現の低下、LPP3 遺伝子およびタンパク質発現の低下が観察された。今後、LPP3 遺伝子の発現制御メカニズムを明らかにし、薬理学的手法を用いた LPP3 遺伝子発現を促進する方法が肺線維症に有効な治療法となるか否かを明らかにする予定である。

課題番号：30 基-036

研究課題：急性骨髄性白血病（AML）における FLT3, NPM1, CEBPA 遺伝子変異の同時検出法の開発
研究代表者名（所属）：近藤 英生（血液内科学）

今回我々は、AML の新たな ELN リスク分類に組み込まれた遺伝子変異のうち重要かつ Indel 変異である FLT3, NPM1, CEBPA 遺伝子変異について、マルチプレックス PCR 法により同時に増幅、フラグメント解析を行う方法を検討した。細胞株由来 DNA をテンプレートとし、FLT3-ITD 変異、NPM1 変異、CEBPA (BZ 領域) の対象領域をはさむプライマーセット (Forward はそれぞれ 6-FAM, HEX, NED で蛍光標識) を第 1 セット、CEBPA (TAD1 領域)、CEBPA (TAD2 領域) の対象領域をはさむプライマーセット (Forward はそれぞれ 6-FAM, HEX で蛍光標識) を第 2 セットとし複数の条件で条件を検討した。また PCR 産物を ABI 3100 で測定、解析した。第 1 セットにて FLT3 363bp, NPM1 319bp, CEBPA 246bp、第 2 セットにて TAD1 326bp, TAD2 251bp および変異のフラグメントを確認した。また、昨年 12 月に FLT3 変異解析 ITD/TKD が保険収載されたが、結果を得るまで 1-2 週を要し、かつ保険算定は一生に 1 回に制限されているなどの問題がある。本法は自施設内で検査可能なため補完的な役割をもつことができる。今後倫理委員会へ申請の上、AML の患者検体を用いてマルチプレックス PCR の評価を進める予定である。

課題番号：30 基-095

研究課題：当科における原発性肺癌、胸膜中皮腫 organoid 作成のための基盤技術の構築

研究代表者名（所属）：湯川 拓郎（総合外科学）

2013 年ヒトの脳の細胞組織の形成を模倣した幹細胞由来の脳 organoid を培養するためのプロトコルが確立された (Chambers SM et al. Cell Stem Cell 13 : 377-8.2013)。Organoid は、臓器に特異的な種類の細胞の集合体であり、幹細胞または臓器前駆細胞から発生した細胞が自己組織化したものであり、臓器特異的な細胞型を有するとともに、臓器の特定の機能を再現している。現在、多数のヒト悪性腫瘍における organoid が報告されてきており、標的薬剤の効果予測や、耐性機序の解明に役立つことが分かってきた。今回我々は、マウス肺、気管組織を取り出し 3 次元培養を行うことで Organoid の形成そして、長期培養培養を行うことに成功した。またこれらの凍結保存を可能としている。これらの組織由来 Organoid は形態から複数種が観察されており、中枢から気道の複数の幹細胞由来の Organoid が存在することが示唆された。現在、この研究成果を踏まえ、ヒト肺癌 Organoid の樹立と培養条件の検討を行っている。

課題番号：30 基-096

研究課題：食道癌、消化器癌組織由来癌細胞の 3 次元培養法の確立および機能解析

研究代表者名（所属）：林 次郎（総合外科学）

近年、多能性幹細胞 (ES, iPS 細胞) や生検サンプル、切除臓器を活用し、ヒトを対象としたオルガノイド研究が隆盛をきわめつつある (Sasai Y et al., Nature, 493: 318-26, 2013)。ヒトオルガノイドは、解剖学的・機能的に生体内に存在する器官に近い特徴を示すことから、これまで研究対象とすることが困難で

あった生命現象の解析が可能になってきた(Lancaster MA et al., Science, 345: 1247125, 2014)。例えば、疾患オルガノイドを用いることで、臨床試験に至る以前にヒトにおける新薬の効果を予測する技術が確立されつつあり、また耐性機序の解明に役立てることができる。ヒト大腸癌や食道腺癌でのオルガノイドが長期培養できることが報告されてきている一方で、食道扁平におけるオルガノイドは、凝集塊形成まで可能であるものの、継代培養は困難であるのが現状である。今回我々は、FNB/N マウス由来食道粘膜組織を取り出し、コラゲナーゼ処理後、得られた細胞を3D 培養することで、食道オルガノイドの樹立に成功した。またこのオルガノイドはトリプシン処理を行い、細胞を分離したのち長期継代培養が可能であった。今後は食道癌をはじめとするヒト消化器癌でのオルガノイド樹立を行う予定である。

課題番号：30 基-091

研究課題：新規 AKT 阻害剤を用いた非小細胞肺癌に対する抗腫瘍効果の解析

研究代表者名（所属）：山辻 知樹（総合外科学）

成長因子またはサイトカインの1種である Midkine (MDK) は、多くの癌種でその発現が報告されており癌組織の発育に関与することが知られている。我々は、この Midkine に対する特異的阻害剤：iMDK の開発を行い、当該低分子化合物が PI3Kinase/AKT を阻害し、肺癌に対し抗腫瘍効果を誘導できること報告した(Yamatsuji et al. PLoS One. 8: e71093. 2013, Exp Cell Res. 335: 197-206. 2015)。今回我々は、新たに米国 San Diego にある Sanford-Burnham Medical Research Institute (SBMRI) との共同研究により iMDK (をリード化合物とする誘導体 (derivatives) の合成を行い、これらの抗腫瘍効果につき検討した。薬剤添加後 48 時間での cell viability assay の結果から誘導体 X および Y は PIK3CA 変異を持つ肺癌細胞株:H460 および HCC95 に対して、1.0mM 以下の濃度で、増殖抑制効果を示した。また Annexin V を用いた Flow cytometry 解析からこれらの化合物の、上記細胞株に対する apoptosis が観察された。これらの結果から iMDK derivative による肺癌に対する増殖制御および新規治療開発の可能性が示された。現在当該化合物の細胞死誘導機序につき解析を行っている。

課題番号：30 基-092

研究課題：人工転写因子を用いた扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果の誘導および新規治療法開発

研究代表者名（所属）：深澤 拓也（総合外科学）

我々は、肺扁平上皮癌・食道癌の系統維持型癌遺伝子として報告されている SOX2 に注目し(Bass AJ et al. Nat Genet. 41:1238-42. 2009)、当該遺伝子の発現を制御できる Zinc Finger 型人工転写因子を開発し、肺および食道扁平上皮癌に対して抗腫瘍効果を誘導できることを報告した (Yokota E, Fukazawa T et al. Oncotarget. 8:103063-103076. 2017)。本研究において我々は、生体内での免疫反応を惹起しにくい、recombinant adeno-associated viral vector による当該人工転写因子発現システム：AAV-ATF/SOX2 を作製した。特異的抗体を用いた Immunoblot 解析の結果から、SOX2 は肺および食道扁平上皮癌株に発現が認められた。AAV-ATF/SOX2 感染後、72 時間において肺扁平上皮癌株 EBC2 において濃度依存性に SOX2 発現の減少認められ、コントロール群と比較して有意な細胞数の減少が確認できた。このことから、扁平上皮癌に対する AAV-ATF/SOX2 を用いた標的治療の可能性が示唆された。現在他種扁平上皮

癌に対する抗腫瘍効果の解析を行っている。

課題番号：30 基-021

研究課題：RNA 結合蛋白質の機能調節に着目した新規食道癌治療法の開発

研究代表者名（所属）：増田 清士（医学部・学長付）

RNA 結合蛋白（RBP）ファミリー遺伝子は、mRNA の転写から翻訳に至るまでの様々な品質管理や発現制御（転写後調節機構）の中心的役割をハブ分子であり、その異常ががんを含む様々な疾患の病態形成に関与することが明らかになってきた。

これまでの研究で、RBP ファミリーに属する TIA1a が食道扁平上皮癌（ESCC）の発生と進行に伴い発現・局在に変化を生じ癌促進的に働くことを見出した（Oncotarget 2016）。TIA1a はヒンジ領域に蛋白質構造や機能を調節する disordered sequence を含んでおり、同部位のリン酸化修飾を介した局在調節の変化によって細胞質に分布することで、癌関連分子群に対する転写後調節機能を発揮し、癌化促進に働くと考えられる。上記のような背景を元に、ヒンジ領域に含まれる Ser/Thr を各々Ala に置換した非リン酸化型 TIA1a 発現プラスミドを作成し、細胞内局在を蛍光免疫細胞とウェスタンブロット法を用いて検討した。結果、特定の変異型 TIA1a で局在が細胞質から核へと変化した。さらに同アミノ酸を Asp に置換したリン酸化型 TIA1a 発現プラスミドを用いて同様の検討を行ったところ、細胞質のみに発現した。以上から TIA1a の細胞内局在は特定のアミノ酸のリン酸化によって制御されており、ESCC 細胞で見られる癌促進作用も同様の機構で制御されている可能性がある。今後、同リン酸化が ESCC 細胞動態に与える影響について解析していく。

課題番号：30 基-043

研究課題：何が最初に癌転移を惹起しているのかを解明する

研究代表者名（所属）：山内 明（生化学）

癌転移は予後に直接関わり、“リンパ向性転移”は早期から起こり病期分類や治療方針に影響を及ぼす。転移は血行性、リンパ行性および直接浸潤で起こるとされ、サイトカインをはじめ多くの分子が関与する。その中で我々は炎症組織で産生される S100 タンパク質群に注目し、S100 タンパク質が転移先で癌細胞を惹き寄せることを明らかにしてきた。しかし原発巣からリンパ組織に侵入する段階“リンパ向性転移”におけるリンパ起始部での癌細胞の侵入機構は多くが不明であり、癌細胞のリンパ向性転移はリンパ流によるドレナージ効果によるものか、それともリンパ組織と癌細胞の相互作用なのかは不明である。我々はこの問いに対して、リンパ向性転移に作用する分子を同定し、癌細胞がリンパ起始部に侵入する機序を解明することを目指している。

まず、リンパ起始部を形成するリンパ内皮細胞が癌細胞を惹き寄せているかどうかを検証したところ、ヒト皮膚由来リンパ内皮細胞 HDLEC が膀胱癌細胞株 BxPC3 の走化性を惹起する現象を見出した。さらに S100 タンパク質と HDLEC を共培養すると、BxPC3 細胞の HDLEC への走化性が亢進することを見出した。次に、S100 タンパク質刺激後の HDLEC におけるトランスクリプトームの網羅的解析を行った。本報告ではこれらの探索の結果を報告し、S100 タンパク質刺激によるリンパ向性転移惹起因子について

述べ、議論したい。

課題番号：30 基-099

研究課題：肺腺癌患者に対する XAGE1 長鎖ペプチドを用いたワクチン治療の安全性と免疫原性に関する試験（第 I 相臨床試験）における XAGE1 特異的免疫反応の解析

研究代表者名（所属）：岡 三喜男（免疫腫瘍学）

【背景】がん精巢抗原の XAGE1 は肺腺癌に高頻度に発現し、抗原性が強く、XAGE1 に対し抗体反応を有する患者の予後は良好である。その結果、XAGE1 は肺腺癌に対する抗原特異的な免疫療法の有望な標的抗原であり、長鎖ペプチドを用いた治療ワクチンの開発を行った。

【方法】XAGE1 タンパクに由来する 25 アミノ酸からなる 2 種類の長鎖ペプチドワクチンを合成し、進行期肺腺癌患者に皮下投与し、第一に安全性、第二に XAGE1 特異的な免疫反応の変化を検討した。ワクチンは 2 週間隔で 4 回投与し、用量は 500 μ g、1mg、2mg の 3 用量とした。

【結果】計 10 例に投与し試験完遂は 7 例、中止は 3 例（原病の悪化による）であった。主目的の安全性について、試験薬と関連が否定できない有害事象は 34 件、その内訳は皮膚硬結 9 例、発熱 6 例、注射部の疼痛 4 例、白血球増加 3 例、注射部位の掻痒、ALP 上昇 2 例、悪寒、悪心、筋肉痛、倦怠感、食欲不振、呼吸困難、頭痛、肺臓炎（Grade2）が各 1 例、すべて非重篤な有害事象であった。XAGE1 特異的抗体反応は、投与前に 10 例中 7 例が陽性、陽性症例 7 例のうち 5 例で抗体価の上昇を認めた。また陰性 3 例のうち 1 例に抗体価の上昇（陽転化）を認めた。

【考察】XAGE1 ペプチドワクチンの安全性と抗体反応上昇効果を確認した。今後、臨床効果や免疫チェックポイント阻害薬との併用治療などの可能性を検討する。

課題番号：29 基-018

研究課題：高免疫原性 XAGE1 ペプチド領域の同定とその利用

研究代表者名（所属）：大植祥弘（呼吸器内科学）

【背景】

肺腺癌において、XAGE1 抗原を標的とした創薬が有効である。本研究では、XAGE1 抗原の中でも高免疫原性領域を同定し、*in vitro* で、肺がん患者の末梢血リンパ球を高免疫原性領域のペプチドで刺激培養することで、抗原特異的な T 細胞応答が検出できるかどうかを検証する。

【方法】

XAGE1 抗体陽性患者の末梢血リンパ球を用い、XAGE1 抗原で刺激培養することによる抗原特異的な T 細胞クローンの誘導とエピトープ解析を実施した。明らかとなった高免疫原性領域ペプチドを用いて、患者末梢血リンパ球と刺激培養することで抗原特異的な T 細胞の誘導を試みた。さらに、患者末梢血 B 細胞を同様に刺激培養することで抗原特異的な免疫グロブリン産生の検討を行った。

【結果】

XAGE1 全長の中で、高免疫原性領域の SLP1 および SLP2 を同定した。XAGE1 抗体陽性患者の末梢血リンパ球を SLP1 および SLP2 で刺激培養した結果、抗原特異的な T 細胞の検出に成功した。樹立し

た SLP2 を認識する CD4 T 細胞クローンおよび SLP1 を認識する CD8 T 細胞クローンを樹立した。SLP1 および SLP2 を同時に使用する事で抗原特異的な免疫応答が増強されることが明らかになった。B 細胞も同様に刺激培養した後に培養上清中の XAGE1 特異的抗体を検出した結果、SLP1 と SLP2 を併用した場合に、XAGE-1-IgG が産生され、IgA の産生は認められなかった。

【結論】

XAGE1 抗原陽性患者に対する XAGE1 SLP1 および SLP2 ワクチンの併用療法は有用である。

課題番号：29 基-038

研究課題：神経障害性疼痛の痛みの機序解明と新たな治療の発見

研究代表者名（所属）：中塚 秀輝（麻酔・集中治療医学 1）

【背景】脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor: BDNF)は疼痛刺激により発現誘導され、脊髄後角において特異的な受容体であるチロシン受容体キナーゼ B(TrkB)と結合し、痛みのシグナル伝達を行う。我々は BDNF と TrkB の結合に競合する蛋白が痛みのシグナル伝達を阻害し疼痛抑制効果を得るという仮説を立てた。蛋白を作製し神経障害性疼痛モデルラットの脊髄くも膜下腔投与による有効性を評価した。

【方法】全身麻酔下に Wistar ラット(7 週齢、雄)の左 L5 神経を選択的に結紮し、神経障害性疼痛モデルを作製した。モデル作製 7 日後、ラットの脊髄くも膜下腔に作製蛋白(prot 群)もしくは生理食塩水(cont 群)を投与した。その後 von Frey test での 50%疼痛閾値(50%PWT)および熱刺激による逃避反応時間による評価を行った。(動物実験計画書承認番号 17-112)

【結果】prot 群は cont 群と比較し、投与 2 日後で有意に 50%PWT の上昇を認めた(10.0 vs 3.5、 $p<0.01$)。投与 5 日後には有意差を認めなかった($p=0.39$)。熱刺激による行動評価においても同様の結果が得られた。

【結論】神経障害性疼痛モデルラットの脊髄くも膜下腔に作製蛋白を投与することにより、von Frey test および熱刺激における疼痛閾値の上昇を認めた。

課題番号：29 基-078

研究課題：蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理と多光子レーザー顕微鏡を用いた NLRP3-Inflammasome 活性化/Caspase-1 活性化の動態変化の解析技術の確立

研究代表者名（所属）：柏原 直樹（腎臓・高血圧内科学）

背景：糖尿病性腎症の中核基盤病態に「慢性炎症」が関与しており、NLRP3-Inflammasome 活性化がその中心を担うことが判明しつつある。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理と多光子レーザー顕微鏡を駆使して、NLRP3 (NOD-like receptor) -Inflammasome /Caspase-1 活性を生体組織において可視化し検出する、新規の imaging 技術を開発することを目的とした。

方法：実験系確立のため、マクロファージ、ポドサイトの培養細胞を用いた。Caspase-1 活性の検出には、酵素切断部位を含んだ短鎖ペプチドの両端に、蛍光色素とクエンチャー（消光分子）を結合した短鎖ペプチドを用いた。また Inflammasome 活性化の際にみられる ASC aggregation (spec) を評価するため ASC-

eGFP fusion plasmid を作成した。NLRP3 Inflammasome 活性化を見るために LPS priming 後に ATP 刺激を行った。

結果：Caspase-1 FRET ペプチド添加後、LPS+ATP 刺激を行ったところ、Caspase-1 活性により切断された FRET ペプチドの細胞内での発色を確認した。また podocyte の実験では transfection された ASC-eGFP は細胞質全体に存在し LPS+ATP 刺激により spec 構造を構築する事が示された。この現象は LDH assay や IL1b の secretion と一致し Inflammasome 活性化を検出している事が確認できた。

結語：培養細胞内における Inflammasome 活性を FRERT ペプチド、および ASC-eGFP plasmid を用い Inflammasome 活性化を可視化し得た。今後 in vivo への応用を検討していく。

課題番号：29 大-003

研究課題：卵巣境界悪性腫瘍に対する細胞周期的バイオマーカーの研究

研究代表者名(所属)：下屋浩一郎、羽間夕紀子(組織培養・免疫系分野 周産期・生殖・腫瘍免疫学)

【緒言】卵巣癌の一種である性索間質性腫瘍は、ホルモン産生腫瘍として有名で顆粒膜細胞腫(以下 GCT)・莖膜細胞腫など、良性から悪性まで多岐にわたる。なかでも GCT は悪性性索間質性腫瘍の 70% を占め頻度は最多である。その臨床的特徴として、進行が緩徐で治療奏効率が悪く、5 年生存率は進行期で 59%と決して良好とはいえない。また、早期であっても非常に再発率が高く、10 年かけて再発病変が見つかることも稀ではない。これは、我々が研究を行ってきた卵巣明細胞癌(OCCC)と臨床的特徴が非常に類似していることから、GCT も OCCC と同様に腫瘍細胞に細胞周期の偏りが存在するのではないかと仮定し免疫組織学的に検討した。【研究方法】当院において手術がなされた GCT12 例を用い、免疫組織学的に G0 期以外で発現する Ki-67、G1 期初期～S 期にかけて発現する MCM7、G1 期のみを発現する Cdt1、S 期～M 期まで発現する Geminin の発現を検討した。【結果】仮説に反し GCT では他の 3 抗体と比較し MCM7 の発現が有意に上昇していた。血清 E2 値で発現に有意差は見られなかった。

【考察】GCT で MCM7 の発現が上昇していた原因については腫瘍内産生 E2 の関与が考えられた。OCCC と臨床的特徴は類似していても腫瘍内産生 E2 により細胞周期的特徴は相違している可能性が示唆される。*in vitro* で細胞周期の偏りを実際に検討した報告はなく、免疫染色で腫瘍細胞の細胞周期の偏りを確認したのは今回の検討が初めてである。今後の方針として顆粒膜細胞腫瘍内産生 E2 を測定するために 17β-HSD1 抗体と 17β-HSD2 抗体を測定する予定としている。

課題番号：30 大-001

研究課題：糖代謝阻害剤 2-Deoxy-D-Glucose 封入 PLG ナノ粒子を用いた肝細胞癌治療開発

研究代表者名(所属)：日野 啓輔、佐々木 恭(生化学系分野 肝胆膵病態生化学)

【目的】がん細胞代謝の特徴である嫌気性解糖の亢進が、がん微小環境における腫瘍免疫を抑制すると報告されている。2-deoxy-D-glucose(2DG)は解糖系を阻害し固形癌に対する抗腫瘍効果が報告されているが、高用量で有害事象を引き起こす。腫瘍組織への選択的集積性や徐放性に優れた生体適合性高分子である Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)ナノ粒子に 2DG を封入した 2DG-PLGA を開発し immuno oncology の観点から 2DG-PLGA の肝細胞癌に対する有効性を検討した。

【方法】2DG-PLGA が腫瘍免疫に及ぼす影響と抗腫瘍効果について in vitro ならびに in vivo で検討した。

【結果】2DG-PLGA は immunocompetent な肝発癌マウスにおいて有害事象なく T 細胞の浸潤を伴う強い抗腫瘍効果を認めた。また 2DG は濃度依存性に肝癌細胞株からの CXCL10 を増加させ、細胞走化可視装置 EZ-TAXIScan を用い T 細胞の走化性の亢進を確認した。更に 2DG-PLGA 投与下でのがん細胞と T 細胞の共培養実験では、がん細胞の糖の取り込みが低下し、対照的に T 細胞の糖の取り込みが亢進し T 細胞の走化性が亢進した。

【総括】2DG-PLGA は有害事象を伴わず肝細胞癌特異的に嫌気性解糖を抑制しがん微小環境の腫瘍免疫を活性化する。

課題番号：30 大-002

研究課題：電気刺激による脊髄再生亢進の可能性とそのメカニズムの解明

研究代表者名（所属）：宮本 修、林 範人（生理系分野 神経構造機能学）

【目的】近年、脊髄損傷後のトレッドミル運動が運動機能を改善し、その際、脊髄で神経栄養因子 BDNF がすることが報告されている。一方で骨格筋の収縮弛緩そのものが運動機能の改善に及ぼす影響は明らかではない。

【方法】Sprague-Dawley の雄ラット（8 週齢）の第 9 胸椎を椎弓切除し、重りを落下させ脊髄損傷（SCI）ラットを作製した。損傷直後から両下腿の前脛骨筋を経皮的に電気刺激（ES）した（10mA、2Hz、10 分/日×週 5 日×4 週間）。運動機能は BBB スコア、傾斜台試験、Rotarod 試験で評価した。損傷 4 週間後、損傷の程度を空洞体積、新生軸索を pGAP43 を用いて評価した。損傷 1 週間後、脊髄損傷中心のアポトーシス（TUNEL 染色）、脊髄と下腿骨格筋の BDNF の定量を行った。ラットは SCI、SCI+ES、Sham の 3 群を比較した。データは平均値±SEM で表し、空洞体積、TUNEL 染色は Mann-Whitney の U 検定、その他は Kruskal-Wallis（Steel Dwass 多重比較）で統計評価を行った。

【結果】損傷 4 週間後、ES 群の BBB スコア、傾斜台試験は優位に改善した。空洞体積は電気刺激群で減少し、pGAP43 は優位に増加した。損傷 1 週間後、ES 群の TUNEL 陽性細胞は減少し、BDNF 陽性細胞の密度と、脊髄及び骨格筋の BDNF の有意な増加があった。

【結論】脊髄損傷ラットに対する下肢骨格筋の経皮的電気刺激は、損傷 4 週間後の運動機能を改善した。運動機能の改善に BDNF の神経保護と軸索伸長作用が関与していることが示唆された。

課題番号：30 大-003

研究課題：機能性ディスぺプシアに対するモサプリド及びアコチアミドの有効性に関する検討

研究代表者名（所属）：塩谷 昭子、勝又 諒（形態系分野 消化管病態学）

背景：機能性ディスぺプシア（FD）患者に対し、5-HT4 作動薬であるモサプリドと、アセチルコリンエステラーゼ（AChE）阻害薬であるアコチアミドが主に使用されている。しかし、両者の有効性を比較した臨床試験は報告されていない。また、薬剤の有効性に関連する因子の検索も十分にはされていない。そのため、今回我々はモサプリドとアコチアミドの有効性及び安全性を比較し、両薬剤の有効性と関連してい

る因子を検索した。

対象と方法：RomeIV基準で診断されたFD患者に対し、オープンラベル前向きクロスオーバー試験を施行した。薬剤投与前後で消化器症状の指標であるGSRスコア及びQuality of Life(QOL)の指標であるSF-8スコアを評価した。薬剤投与前と比較して40%以上の消化器症状の改善を認めた例を有効群とした。

結果：51例が試験を完遂し解析可能だった。両薬剤共に、投与後に有意に消化器症状スコアとQOLスコアの平均値が改善し、有効率はモサプリドが37%、アコチアミドが33%であった。重篤な合併症は両薬剤共に認めなかった。*H.pylori*感染既往者の割合が、モサプリド有効群で有意に低かった(45.9% vs.14.2%, $p = 0.03$)。

結論：FD患者に対しモサプリドとアコチアミドは共に消化器症状及びQOLを改善させた。*H.pylori*感染がFDの病態に影響を与えている可能性が示唆された。

課題番号：30大-004

研究課題：婦人科腹腔鏡手術における局所浸潤麻酔の術後疼痛管理への効果の検討

研究代表者名(所属)：下屋浩一郎、杉原 弥香(組織培養・免疫系分野 周産期・生殖・腫瘍免疫学)

【緒言】近年内視鏡手術は術後疼痛の軽さ、美容上の利点から広く普及し、婦人科領域においても増加傾向となっている。本邦での局所浸潤麻酔薬による術後疼痛コントロールの検討は少ないのが現状である。そこで婦人科腹腔鏡手術症例における局所浸潤麻酔薬の術後疼痛管理に与える効果について検討した。

【方法】2015年から2017年の間に川崎医科大学附属病院ならびに関連施設で腹腔鏡手術を行う婦人科良性疾患および初期子宮体癌患者を対象とし、局所浸潤麻酔投与群(介入群)と対照群で無作為比較試験を行った。

【結果】294症例(介入群：147例、対照群：147例)集積した。腹腔鏡手術全体での解析では術後鎮痛剤使用量、術後鎮痛剤使用の有無、術後1時間のVAS、術後2時間のVAS、入院期間、初回鎮痛剤使用までの時間、いずれの項目でも介入群と対照群で有意差は認められなかった。TLHまたはTLH+PLDでは術後鎮痛剤使用量($p=0.003$)、術後鎮痛剤使用の有無($p=0.003$)において介入群で有意に改善を認めた。

【結語】今回の研究では、TLHまたはTLH+PLDで局所浸潤麻酔薬が効果を示した。従来の術後鎮痛に加えて局所浸潤麻酔薬を使用することは患者QOLの改善につながる。またメタ解析では局所浸潤麻酔薬の有効性が示されていた侵襲度の低い手術において、今回の研究では有効性を明らかにすることができなかった。今後腹腔鏡手術における局所浸潤麻酔薬の有効性を明らかにするために更なる研究が必要と考える。

課題番号：30大-005

研究課題：全身性エリテマトーデスの病態におけるSH3BP2およびTNFの役割の検討

研究代表者名（所属）：守田 吉孝、長洲 晶子（組織培養・免疫系分野 リウマチ分子病態解析学）

【背景・目的】全身性エリテマトーデス（SLE）は多彩な自己抗体を特徴とする自己免疫疾患である。我々は以前に SH3BP2 が TNF 産生を調節すること、関節炎マウスの自己抗体産生を調節することを報告した。今回 SLE モデルマウスの自己免疫現象・臓器病変進展における SH3BP2 の役割を解析した。

【方法】SLE モデルマウス（Fas^{lpr} マウス）を SH3BP2 機能獲得変異マウスと交配し二重遺伝子改変マウスを作成し、12 ヶ月齢まで観察した。臓器障害に関して、経時的尿蛋白測定および腎臓の組織学的解析を行なった。12 か月齢時に免疫担当細胞の subset を Flow cytometry で、血中自己抗体価を ELISA 法で評価した。

【結果】SH3BP2 機能獲得変異は Fas^{lpr} マウスにおける生存率、蛋白尿、腎硬化所見、血中抗 dsDNA 抗体価、自己反応性 T 細胞数増加を改善した。さらに二重変異マウスのリンパ節では creaved-caspas3 と TNF mRNA の発現が亢進していた。骨髄由来樹状細胞培養にて、SH3BP2 機能獲得変異による TNF タンパク・mRNA 両者の発現亢進を認めた。

【結語】二重変異マウスではループス様病態の改善を認めた。その機序として、Fas 非依存性 Apoptosis による自己反応性 T 細胞の除去が考えられ、SH3BP2 機能獲得変異による TNF 過剰発現が関与していることが示唆された。

課題番号：30 大-006

研究課題：尿路生殖器領域における難治性慢性炎症性疾患に対する創薬研究 -慢性前立腺炎に対する PDE5 阻害剤投与による炎症抑制効果の検討-

研究代表者名（所属）：永井 敦、清水真次朗（生理系分野 尿路生殖器病態生理学）

Phosphodiesterase5(PDE5)阻害薬である tadalafil(TAD)は、泌尿器科領域において前立腺肥大症および勃起不全に対する治療薬として使用されているが、近年、Rho kinase 活性を抑制することで炎症抑制作用を示すことが報告されている。慢性前立腺炎(chronic prostatitis: CP)は明確な治療薬がないため難治例への移行が散見される。我々は Wister ラット前立腺組織を前立腺抗原として C57BL/6 マウスの肩部・尾部に皮下投与することにより、CP モデルマウスを作成し、TAD による炎症抑制効果を検証した。CP モデル作成後~12 週まで TAD 25µg/pure water 50µl/day（対照群: pure water 50µl）を経口投与した。前立腺内における炎症性変化について網羅的サイトカイン・ケモカイン解析を行い、代表的指標を選出した。選出した指標を用いて蛍光免疫染色による免疫組織学的解析、定量検査(ELISA 法)による生化学的解析を行った。組織学的解析において、TAD 群は対照群と比較して、前立腺内における炎症細胞浸潤および間質線維化が抑制されていた。網羅的サイトカイン・ケモカイン解析では、TAD 群は対照群と比較して、M-CSF・ICAM-1・TREM-1・IL-16・CCL2・CCL3・CXCL2・TIMP-1 の有意な低下を認めた。蛍光免疫染色および定量検査 (ELISA 法)においても同様の結果が得られた。PDE5 阻害薬は、慢性前立腺炎に対して前立腺内の炎症性変化および間質の線維化を抑制することが示された。PDE5 阻害薬は、慢性前立腺炎に対する新たな予防薬となる可能性がある。

課題番号：30 大-007

研究課題：最新のラット精索静脈瘤モデルの妥当性の検討

研究代表者名（所属）：永井 敦、杉山 星哲（生理系分野 尿路生殖器病態生理学）

【背景と目的】精索静脈瘤は男性不妊症の原因の約 30%を占めると言われている。現在、最新のラット精索静脈瘤モデルを用いた研究報告は多く存在するが、そのモデルの妥当性についての検討はない。今回、最新のラット精索静脈瘤モデルを作成し、その妥当性について検討した。【対象と方法】8 週齢、Sprague-Dawley ラットを用いた。精索静脈瘤モデルは最新の方法に準じて作成した。精索静脈瘤モデル群(n=5)と sham 群(n=5)に分け、12 週間後に評価を行った。評価項目は術前後の左精巣静脈径と、左精巣上体尾部から回収した精子を精子運動解析装置で解析した精子所見である。その結果からそれぞれの相関関係について検討した。【結果】静脈径は術前(V 群：0.55±0.03 mm ,S 群：0.52±0.03 mm)、術後(V 群：0.87±0.05 mm,S 群：0.73±0.05 mm)であった。V 群において術後の静脈径が拡大傾向であった。精子所見は精子濃度(V 群：5.4±2.4 10⁶/ml,S 群：22.0±5.2 10⁶/ml)、運動率(V 群：77.4±5.1%,S 群：83.7±5.2%)であった。術後の静脈径と運動率の間に負の強い相関関係を認めた (rs:-0.73)。【結語】最新の精索静脈瘤モデルは妥当であると考えられた。今後、このモデルを使用した精索静脈瘤の実態の解明が期待される。

演題名：暑熱環境下における運動が腸管機能維持と腸内環境変化に関する研究

研究代表者（発表者）名：松生香里

所属（大学・学部・学科）：川崎医療福祉大学・医療技術学部・健康体育学科

【背景】長距離・マラソン選手は、屋外のトレーニング時間が長いことから、夏期には暑熱環境への暴露時間も長く、長時間高強度の走行による腸管機能の悪化を訴える選手が多い。これらの現状から、適切な暑熱順化対策と現場的な対処策が重要な鍵になる。これらの現状から、適切な暑熱順化対策と現場的な対処策が急務と考えられる。

【目的】本研究では、長距離・マラソン選手を対象に、夏期強化合宿時におけるトレーニング中の腸内細菌叢変化を調べ、スポーツ現場の暑熱対策に役立つ基礎資料を得ることを目的とした。

【方法】被験者は女子陸上長距離・マラソン選手 11 名とした。合宿中のトレーニングは、東京都荒川河川敷 5km の折り返しコースで合宿前半と後半に 30km 走を実施した。腸内細菌は、各選手に合宿前半と後半の採便を依頼し、T-RFLP 解析と次世代シーケンス解析にて分析した。選手の採便と併せて便形状スケールの質問紙調査を行なった。

【結果と考察】T-RFLP 解析における選手 11 名の腸内細菌叢は、各選手で異なる菌叢のパターンを示した。選手 1 名において合宿前半と後半の腸内細菌叢に著しい変化を示した。便形状調査の結果、11 名中 9 名の選手に合宿前半と後半の変化がみられた。今後、環境変化に伴う腸管の適応と腸内細菌の相互関係から、各選手に合ったコンディション対策やパフォーマンス低下の防止策としてスポーツ現場に還元したい。

演題名：ICU せん妄は平成 28 年度診療報酬改定基準における医療資源消費量を増加させる

研究代表者（発表者）名：古賀雄二

所属（大学・学部・学科）：川崎医療福祉大学医療福祉学部保健看護学科

【目的】ICU せん妄発症と ICU 入室期間、入院期間、医療資源消費量の関連の検証。

【方法】国内 2 施設を対象施設とし、平成 28 年度診療報酬改定適応期間内に心臓血管系手術または食道がん切除術後に ICU 入室した患者全員を対象患者とした。

主要調査項目は ICDSC 最高得点、ICDSC4 点以上継続日数、ICU 入室期間、全入院期間、DPC データ D ファイルの診療行為に係る行為点数（以下、行為点数）とした。ICDSC 最高得点で 0 点群（以下、A 群）、1-3 点群（以下、B 群）、4-8 点群（以下、C 群）に群分けした。総行為点数、全入院期間、ICU 入室期間について 3 群間比較した。C 群の ICDSC 最高得点と行為点数・ICU 入室期間・全入院期間の相関係数を算出した。対象施設の研究倫理委員会の承認（承認番号 3147）を得た。

【結果】対象患者は 122 名（男性 80 名）、心臓血管系手術（心臓弁膜症 70 名、大血管疾患 36 名）、食道がん切除術（16 名）であり、A 群 32 人、B 群 38 人、C 群 52 人であった。

各測定項目の平均は、年齢 71.3(SD±10.85)歳、行為点数 507593.89±220319.02 点、ICDSC4 点以上継続日数 0.78±1.68 日、ICU 入室期間 5.5±3.52 日、全入院期間 33.2±23.72 日であった。A、B、C 群ごとの平均は総行為点数(374430.8±140882.30、461026.8±190147.00、623570.2±224529.20)、ICU 入室期間(3.4±2.14、5.4±3.37、7.0±3.67)、全入院期間(

25.1±11.36、29.0±18.66、41.2±29.76)であった。総行為点数では A 群 vsB 群、A 群 vsC 群、B 群 vsC 群であった(p<0.05)。ICU 入室期間では A 群 vsB 群、A 群 vsC 群であった(p<0.05)。全入院期間では A 群 vsC 群であった(p<0.01)。相関係数は総行為点数 0.499、ICU 入室期間 0.474、全入院期間 0.482 であった(P<0.01)。

演題名：拘束された同種個体に対するマウスの救助様行動の動機解明～精神疾患の原因解明を目指した基礎的研究～

研究代表者（発表者）名：上野 浩司

所属（大学・学部・学科）：川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床検査学科

向社会的行動とは、共感に基づき外的報酬を期待することなく他者のために行動することをいい、救助行動や協力行動などがある。自閉症や精神病質などで向社会的行動の欠如がみられることがある。しかし、この向社会的行動の欠如の原因解明、治療薬の開発は進んでいない。その原因の一つは主要な実験動物であるマウスやラットが向社会的行動を示さないと考えられ、実験が行われなかったためである。そこで、我々はマウスも向社会的行動を示すか調べた。チューブに同種個体を閉じ込め、テストマウスが助けるかを観察した。同種個体を拘束したチューブをケージ内に置き、そのケージにテストマウスを入れて自由に行動させた。チューブ内に拘束された同種個体をテストマウスが救出するか観察した。何度かの実施後、テストマウスは同種個体をチューブから解放し、救助様行動を示した。続いて、このマウスの救助様行動がどういった心理的要因によって行われているかを明確にするために、同種個体を麻酔で眠らせた場合、同種個体の代わりに毛糸玉を入れた場合、不透明なチューブにした場合、オキシトシンを投与した場合などで救助様行動の変化を調べた。本研究による発見は、共感に基づくと考えられている向

社会的行動の生物学的メカニズムの解明や、マウスを使用した高度な情動機能の研究の推進、精神神経疾患の新たな治療や予防方法の開発への臨床的応用が目指せる。

演題名：アルギニンの摂取により伸張性収縮後の筋力回復が促進されるメカニズム

研究代表者（発表者）名：神崎 圭太

所属（大学・学部・学科）：川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科

【背景】伸張性収縮は筋が引き伸ばされながら力を発揮する収縮様式である。他の収縮様式とは異なり、伸張性収縮には収縮終了後に筋力低下が数日間継続するという特徴がある。最近、我々はアルギニンの摂取により、伸張性収縮後の筋タンパク質分解や筋力低下が軽減されることを確認した。しかしながら、そのメカニズムは不明であった。

【目的】アルギニン摂取が伸張性収縮後の筋力回復を促進することに、一酸化窒素（NO）が関与するかを明らかにする。

【方法】ラットをコントロール（C）群、アルギニン（A）群、L-NAME（N）群、アルギニン+L-NAME（AN）群に分類し、0.4%アルギニン溶液か0.03% L-NAME（NO合成酵素阻害剤）溶液のどちらか一方、あるいは両方を自由飲水投与した。投与3日後に、200回の伸張性収縮を負荷した。反対脚は安静脚とした。収縮3日後に長趾伸筋と前脛骨筋を摘出し、筋力測定と生化学的分析にそれぞれ供した。

【結果】C群、N群、AN群では、固有筋力の低下がみられた。ジヒドロピリジン受容体の量には、C群でのみ低下がみられた。C群とA群では、トロポニンIにグルタチオニレイションの増加がみられた。また、C群とAN群では、NADPHオキシダーゼ（NOX2）の量に増加がみられた。

【考察】アルギニンから産生されるNOが筋原線維のCa²⁺感受性の増加等を介して、伸張性収縮後の筋力回復を促進することが示唆された。

演題名：乳幼児期に発症した1型糖尿病の子どもが小学校に入学する際の親の心配・困難とその対処

研究代表者（発表者）名：沖本 克子

所属（大学・学部・学科）：岡山県立大学・保健福祉学部・看護学科

乳幼児期に発症した1型糖尿病の子どもは、家族のサポートを受けながら療養生活を送っている。しかし、小学校入学に際しては、親が主体となって行っていた療養行動を自分で行なわなければならない、療養行動を行いつつ新たに友人関係を築く必要があるなど、生活の変化を迫られる。生活の変化に対して子どもはもちろん、親も心配や困難を感じている。本研究は、乳幼児期に発症した1型糖尿病の子どもが小学校に入学する際に、親がどのような心配や困難を感じ、どのように対処しているのかを明らかにすることを目的とした。

乳幼児期に発症した1型糖尿病の学童期前期（小1～小3）の子どもをもつ親を対象として、2017年10月～11月までアンケート調査を行った。アンケートを50部配布し、返信は5部で、回収率は10%であった。

親全員が感じていた心配や困難は、学校内での補食、友人関係、修学旅行や遠足などの校外研修、低血糖、病気の公表であった。給食とインスリン注射については、4人の親が心配や困難を感じていた。心配や困

難に対処するために、全員の親が担任や養護教諭との話し合いの場をもっていた。親は、医療従事者に対して、医療従事者、親、養護教諭や担任などの話し合いの場を設け、安心して学校に送り出せる環境を作ってほしい、相談に乗ってほしいなどの期待を寄せていた。

本研究は、アンケートの配布数が少なく、さらに回収率も低かったため、結果を一般化するには限界がある。

演題名：ウェアラブルモニタへの応用を鑑みた橈骨動脈および指尖の脈波に基づく生理的ストレス評価の妥当性

研究代表者（発表者）名：綾部誠也

所属（大学・学部・学科）：岡山県立大学情報工学部人間情報工学科

本研究は、橈骨動脈および指尖の脈波により得られた脈拍（Pulse Rate: PR）と脈拍変動（Pulse Rate Variability: PRV）について、心電図から得られた心拍数（Heart Rate: HR）と心拍変動（Heart Rate Variability: HRV）との比較からその妥当性を明らかにすることを目的とした。若年男性を対象に3条件下（座位安静条件、交感神経賦活条件、運動負荷条件）にて、心電図と脈波を計測した。全条件にて、呼吸性変動を除外するために呼吸数を規定した。HRは、心電図をII誘導法にて導出しR波を同定した。PRは、脈波形を光プレスティモグラフィと圧力センサにより導出しR波を同定した。HRVとPRVは、それぞれ、パワースペクトル解析から高周波成分（High Frequency: HF）と低周波成分（Low Frequency: LF）として評価した。HRとPRは、全ての条件下にて有意な高い相関性が認められた（ $r > 0.865$, $p < 0.001$ ）、間欠的運動負荷条件ではHRがPRに比べて有意に高い値を示した（ $p < 0.05$ ）。HF、LF、LF/HFは、全条件にて計測法間で有意な差が認められ（ $p < 0.05$ ）、計測法間には有意な相関性が認められた（ $p < 0.05$ ）。本研究の結果は、PRによるHRの推定として、日常生活で想定される間欠的行動における限界を示した。PRVとHRVの絶対値の不一致は、生理的な意義や背景も不明であり、計測技術や計測条件を含めた今後の検討課題である。これらの結果は、先行研究に支持されるものであり、ウェアラブル技術での呼吸循環評価、特に、PRVに基づく心臓自律神経活動の計測機器には引き続きの検討が必要であることを示唆する。

演題名：生体のバランスに寄与する漢方薬と腸内細菌叢のクロストークの解明

研究代表者（発表者）名：高山 健人

所属（大学・学部・学科）：福山大学 薬学部薬学科

漢方薬は数千年の年月をかけた莫大な臨床実績の上に確立された薬であり、現代医療においても西洋薬だけでは満足に改善できない症状などに対する効果が期待されている。また、漢方薬の効果は個人差（レスポnder、ノンレスポnder）のあることが知られており、東洋医学ではこのような個人差を「証」と定義し、漢方薬の処方指針として重要視している。しかし、漢方薬は複合成分系であることから、その薬効を科学的に説明することは困難を極めており、漢方薬の臨床効果における基礎研究は未だ十分とは言えない。

腸管内には約1000種類もの細菌が腸内細菌叢を形成しており、腸内細菌叢は漢方薬に含まれる多くの配

糖体の代謝変換に必須である。近年では、食事や薬物摂取により腸内細菌叢の構成異常 (dysbiosis) が生じることで、自己免疫疾患や精神神経疾患など様々な疾病の発症に関与することが明らかになり始めている。

以上のことから、漢方薬の薬効は漢方薬成分が腸内細菌叢により代謝されるだけでなく、漢方薬成分が腸内細菌叢の構成や機能に影響を及ぼすことで発現しているのではないかと考えた。すなわち、漢方薬成分と腸内細菌叢のクロストークの結果が漢方薬の薬効として発現し、さらに腸内細菌叢の違いが漢方薬のレスポンス、ノンレスポンスを決定づけていると仮説を立て、現在研究を進めている (Takayama K. et al., *Sci Rep.*, 2019)。

演題名：脳出血に関わる細胞接着分子クローディン D1 の転写調節因子の解析

研究代表者（発表者）名：志摩 亜季保

所属（大学・学部・学科）：福山大学大学院 薬学研究科

多細胞生物は、複数の細胞同士が接着することで臓器や組織を形成している。隣接する上皮細胞同士を機械的に接着するタイトジャンクションは、バリアを形成すると共に細胞間隙の透過性を制御することで栄養の吸収やイオン環境の保持などを制御し生体機能の恒常性に関与している。

ヒトにおける、タイトジャンクションの主要な構成分子として、27 種類のクローディンが同定されている。それらの発現分布は臓器や組織、疾患においても異なっていることが報告されている。クローディン D1 (CLDND1、CLDN25) は、脳（中でも小脳）に多く発現しており、実験的モデル動物における脳出血時において発現量の低下が明らかにされている。そのことから、脳出血と CLDND1 発現変動の関連性が疑われるが詳細は不明である。

我々は、CLDND1 の発現増加に影響する転写因子を探索した結果、ROR・核内受容体を得てきた(1)。しかし、複数の転写因子による相互作用が考えられたため、本研究では CLDND1 の転写調節機構に作用を示す新たな転写因子の同定を試みた。その結果、ルシフェラーゼレポーター解析やイムノプロット法などの発現解析により新たな転写因子の候補を見出した。

Matsuoka H, Shima A, et al. (2017) *J. Biochem.* **161**, 441-450

演題名：カテキン類が NPC1L1 を介した細胞内コレステロール蓄積に及ぼす影響

研究代表者（発表者）名：瀬尾誠

所属（大学・学部・学科）：福山大学薬学部薬学科

【目的】

コレステロール (Cho) は、小腸上皮細胞の Niemann-PickC1 like (NPC1L1) を介して吸収されることが知られている。本研究では、カテキン類が細胞内 Cho 蓄積に及ぼす影響を検討した。

【方法】

本研究では、エピカテキン、エピカテキンガラート、エピガロカテキン、エピガロカテキンガラート (EGCg) の 4 種類のカテキンを用いた。細胞内への Cho 蓄積実験については、ヒト大腸癌由来細胞 Caco-2 細胞を用い、 $[^3\text{H}]$ -Cho とカテキン類の共存下での細胞内の $[^3\text{H}]$ -Cho を測定した。またラット肝臓癌細胞

CRL1601 に NPC1L1-GFP を安定発現した (CRL1601-NPC1L1) 細胞を用い、カテキン類による NPC1L1-GFP の細胞内動態の変化を共焦点顕微鏡で観察した。

【結果及び考察】

Caco-2 細胞内への Cho 蓄積に対するカテキン類の影響は、EGCg のみが共存下において細胞内 Cho 蓄積を有意に減少した。また EGCg は、CRL1601-NPC1L1 細胞を用いた実験において、NPC1L1-GFP の細胞質移行を抑制した。EGCg の 24 時間前処理においては、前処理なしの場合と比べて細胞内 Cho 蓄積がさらに減少した。以上の結果より、EGCg は複数の作用機構により NPC1L1 を介した細胞内 Cho 蓄積を抑制することが示唆された。

演題名：Styrene-maleic acid copolymer を用いた amphotericin B 製剤の開発

研究代表者（発表者）名：番匠谷 研吾

所属（大学・学部・学科）：福山大学・薬学部・薬学研究科

深在性真菌症治療薬である amphotericin B (AmB) は難溶性のため製剤化の難しい薬物である。そこで我々は Styrene-maleic acid copolymer (SMA) に着目した。本研究では、SMA を用いた AmB の製剤化に関する検討を行った。検討項目として、SMA-AmB 共有結合体 (SMA-AmB)、SMA/AmB ミセル (SMA/AmB)、cholesterol 修飾 SMA/AmB ミセル (Cho-SMA/AmB) を作製・評価した。

SMA-AmB は約 40 w/w%、SMA/AmB 及び Cho-SMA/AmB は約 25 w/w% の AmB 含量が得られた。SMA/AmB は PBS 中では析出したが、SMA-AmB 及び Cho-SMA/AmB は析出しなかった。SMA-AmB は albumin と結合することが示された。SMA-AmB 及び Cho-SMA/AmB は高い血中滞留性を示したが、SMA/AmB は Fungizone と同程度の血中滞留性しか得られなかった。SMA/AmB は水中では安定して存在するものの、PBS 中ではミセルが崩壊し、ミセルから AmB が漏出することが示された。この崩壊現象が SMA/AmB の血中滞留性が低い要因の一つと示唆された。In vitro において、SMA-AmB は Fungizone と比較して薬効は 1/3 倍となったものの、毒性は 1/20 倍以下であった。Cho-SMA/AmB の薬効は Fungizone と同等であり、毒性は 1/3 倍であった。また、albumin と共存する場合、SMA-AmB 及び Cho-SMA/AmB の薬効に変化はなく、毒性は更に低下した。

以上より、SMA を用いた AmB 製剤は、albumin との相互作用により更に真菌選択性の高い高分子治療剤になり得ることが期待される。

（文字数：580 文字（ローマ字 2 文字で日本語 1 文字換算の場合））

発表演題：ジェネリック保湿剤の保湿機能は先発品と同じか？

発表者名：北原里恵（平成 30 年度医学研究への扉）

【背景】 近年ジェネリック保湿剤が多数販売されているが、先発品に比べ薬効が変動する懸念がもたれている。しかし、両者の効果を比較した臨床研究は報告されていない。

【目的】 保湿外用剤のうち同種基剤(O/W)のへパリン類似物質含有保湿クリーム先発医薬品 A (先発 A) とジェネリック医薬品 B(後発 B)の保湿効果を定量比較することを目的とした。

【方法】 健康人 5 名に対し先発 A と後発 B, 1FTU 及び 3FTU の塗布量を 1 日 2 回, 7 日間の外用を行

い、角層水分量、基礎発汗滴数・量・直径及び皮丘面積を測定し解析した。

【結果】無塗布と比較すると、先発 A は 1FTU、3FTU とともに角層水分量、基礎発汗が有意に増加したが、後発 B では増加しなかった。また皮丘面積(キメ)は、先発 A では 3FTU 量において有意に減少し、細かなキメが認められたが、後発 B では認められなかった。以上より、後発 B は先発 A と同等の機能を有していないことがわかった。

【考察】後発 B は基剤材料の違いにより保湿作用を十分に誘導できていない点が考えられる。さらに薬効の差異がありながら後発品として販売されているのは問題で、生物学的同等試験が不十分であるといえる。対策として、生物学的同等性評価の試験法と結果を添付文書に記載し、処方医に公開する必要がある。

【結論】ジェネリック医薬品の中には先発医薬品と同等の効果がない可能性があるため、使用には注意が必要である。

発表演題：統合失調症の新たな病態基盤としての海馬ミクログリア研究

発表者名：森山元気（平成 30 年度医学研究への扉）

統合失調症は幻覚や妄想などの陽性症状と感情鈍麻などの陰性症状に認知機能の障害を伴う精神疾患である。同疾患の治療にはドパミン D2 受容体拮抗薬が広く使われており、その病態はドパミン仮説で説明されることが多いが、病態や治療薬の作用が十分に理解されているとは言い難い。一方で近年、グルタミン酸伝達系の異常や神経炎症などが統合失調症の病態に関与している可能性に注目が集まっている。このため本研究では、NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬であるケタミンをマウスに投与することで統合失調症モデルを作出し、脳の免疫細胞とされるミクログリアのレスポンスを解析した。行動実験では、ケタミン投与によって自発運動量が一過性に増加し、プレパルス抑制が有意に低下する統合失調症様の行動異常が認められ、抗精神病薬リスペリドンの投与によってこれらの異常は改善された。免疫組織化学的解析では、ケタミン投与によって海馬のミクログリアの空間分布密度が増加していたが、リスペリドン投与によって密度の増加は抑制された。さらに、海馬のミクログリアの三次元再構築では、ケタミン投与によって突起長の伸展や分岐の増加などが認められたが、リスペリドン投与によってそれらの変化の一部は抑制された。本研究の結果は、海馬のミクログリアがグルタミン酸伝達異常を伴う統合失調症の病態に関わり、抗精神病薬の作用機転である可能性を示唆するものである。

発表演題：The Largest Protein in the Smallest Genome:フグ心室のコネクチン構造解析

発表者名：辻 修平（平成 30 年度医学研究への扉）

ヒトとフグはほぼ同数の遺伝子を持つが、ゲノムサイズではヒトが 30 億塩基対であるのに対しフグは 4 億程度と脊椎動物の中で最小である。ゲノム縮小のメリットや組織・臓器に与えた影響は不明であるが、生体内最大のタンパク質である横紋筋弾性タンパク質コネクチンはゲノム縮小による影響を受けやすいと考え、フグ心室コネクチンについて検討した。顕微鏡観察の結果、フグ心室には冠動脈がなく、心筋組織は哺乳類と比べて疎であった。また心筋細胞の断面積は平均して約 $15.12\mu\text{m}^2$ で哺乳類より小さく、電子顕微鏡像ではサルコメア間隔もマウスと類似して小さかった。免疫蛍光染色ではフグ心室のコネクチ

ンの N 末端はサルコメアの Z 線に局在していた。次にゲノム情報からコネクチン遺伝子を解析すると、遺伝子は 2 つあり、他の脊椎動物より小さかった。定量 PCR の結果、両方の遺伝子の発現割合は同程度であった。コネクチン弾性領域の一次構造を RT-PCR で解析し、ヒトの心筋コネクチンと比較した。また SDS-PAGE の結果、高分子量の位置にバンドが見られ、ウエスタンブロットでコネクチン抗体が反応した。SDS アガロースゲル電気泳動の結果、フグ心室のコネクチンはラット心室より小さかった。以上よりフグではゲノム最小化によってコネクチンを短くし、サルコメアを短縮して心機能を変化させた可能性が考えられる。残る期間で心機能についても検討する。

発表演題：皮下投与時の覚せい剤の胃内移行に関する検討

発表者名：中野 楓（平成 30 年度医学研究への扉）

覚せい剤メタンフェタミン(MAMP)は、静注の場合でも、胃内容物から高濃度に検出されるため、死者が生前に自ら静注したのか、あるいは他者によって摂取させられたのかを判別することは容易ではない。これまでに、MAMP の投与経路の判別を目的として、血液中と胃内容物中の MAMP の濃度変化が調べられてきた。今回、皮下投与時の比較的短時間での胃内への MAMP の移行について検討を行った。

ラットに 1mg/kg、10mg/kg となるよう MAMP を皮下投与した。その後、30 分または 1 時間後に屠殺し、その血液と胃内容物を試料として、液-液抽出を行い、ガスクロマトグラフ質量分析計によって MAMP 濃度を測定した。

結果、30 分、1 時間後の血液中濃度は、1mg/kg 投与群でそれぞれ 504 および 205ng/g、10mg/kg 投与群でそれぞれ 2620 および 2699ng/g であった。また、30 分、1 時間後の胃内容濃度は、1mg/kg 投与群でそれぞれ 1718 および 1211ng/g、10mg/kg 投与群でそれぞれ 2927 および 14987ng/g であった。

このことから、MAMP の胃内へ移行する速度には上限があり、1mg/kg 投与群では、30 分前後で、10mg/kg 投与群では、投与後 1 時間前後かそれ以降で最大に達していると推測された。

動物実験計画承認番号:17-078

II. 川崎医学会賞受賞講演の部

研究奨励賞：大学・研究委員会より

木田 潤一郎 先生

対象論文：An MDS-derived cell line and a series of its sublines serve as an in vitro model for the leukemic evolution of MDS

Leukemia 32 (8) : 1846~1850, 2018

An MDS-derived cell line and a series of its sublines serve as an in vitro model for the leukemic evolution of MDS

Leukemia 32 (8) : 1846~1850, 2018

Kida JI, Tsujioka T, Suemori SI, Okamoto S, Sakakibara K, Takahata T, Yamauchi T, Kitanaka A, Tohyama Y, Tohyama K.

【緒言】骨髄異形成症候群 (MDS: myelodysplastic syndromes) は、無効造血による血球減少を来し、急性骨髄性白血病 (AML: acute myeloid leukemia) へ移行する潜在性をもつ予後不良のクローン性造血障害である。MDS は基盤となる遺伝子異常 (founding mutation) が存在し、さらに遺伝子異常 (特にがん化に中心的な役割を果たす変異を driver mutation という) を追加しながら病勢が進行していくと考えられている。しかし、MDS から急性白血病への移行の分子機構は不明な点が多い。白血病への移行は MDS による死因の多くを占めており、その機序の解明は急務である。当教室では以前に MDS 患者から MDS92 細胞株が樹立された。MDS92 は成熟血球への分化傾向を保った細胞株であるが、その継代中に分化傾向が乏しくほぼ芽球からなる亜株 MDS-L が樹立された。MDS92 および MDS-L は interleukin(IL)-3 依存性であるが、さらに MDS-L を IL-3 存在下で継続培養し、増殖能力が亢進した MDS-L-2007 が、MDS-L を IL-3 非存在下で培養することにより IL-3 依存性が解除された MDS-LGF が樹立された。これらの変化は MDS から急性白血病への移行過程を in vitro で観察しているとみなし、我々は細胞株間での遺伝子変化を見いだすことで急性白血病への移行の分子基盤を探索することとした。

【方法】白血病移行の機序を探索するために、患者骨髄細胞および上記の細胞株に対して次世代シーケンサーを用いて全エクソームシーケンス (WES: whole exome sequencing) を行った。既報の一塩基多型およびサイレント変異 (アミノ酸置換を伴わない変異) を除外し、COSMIC (Catalogue of somatic mutations in cancer) に掲載の遺伝子リスト、MDS・白血病関連遺伝子の文献を参考に、候補遺伝子を抽出した。さらに変異の起源を調べるために患者骨髄細胞に対して ultra-deep target sequencing を行った。タンパク質の解析には免疫染色およびウエスタンブロットを行った。

【結果】WES および ultra-deep target sequencing の結果から以下が示された。(1) TP53 変異は患者骨髄細胞の全細胞に存在し、全ての細胞株に引き継がれた。(2) CEBPA 変異は患者骨髄細胞の一部に存在した。(3) NRAS 変異は培養途中で偶発的に出現した。(4) HIST1H3C (K27M) 変異 (Histone H3-K27M) (ヒストン H3 の 27 番目のリジン(K)がメチオニン(M)に置換される) は MDS92 から MDS-L への移行

過程で新たに出現し、MDS-L-2007 には認められたが、MDS-LGF には認められなかった。

H3-K27M 変異は小児の脳幹部腫瘍で高頻度に認められており、また最近 AML の一部にも発見されたため、我々はこの変異に注目した。MDS-L は H3-K27M を有する細胞（以後 H3-K27M 細胞と呼ぶ）と有さない細胞（以後 H3-wild-type(WT)細胞と呼ぶ）が混在していた。MDS-L を IL-3 存在下で培養すると H3-K27M 細胞が、IL-3 非存在下で培養すると H3-WT 細胞が優位となった。H3-K27M 変異の意義を見出すために、MDS-L からシングルセルクローニングを行い、4 つの H3-K27M クローン、7 つの H3-WT クローンを確保した。全ての H3-K27M クローンで H3-K27 メチル化の著明な減少を認め、7 つ中 6 つの H3-K27M クローンで腫瘍抑制因子である p16 の低下を認めた。H3-K27M クローンは IL-3 存在下では H3-WT クローンよりも早い増殖を認めたが、IL-3 非存在下では増殖は抑制された。H3-K27M クローンと H3-WT クローンの共培養実験では、IL-3 存在下では H3-K27M クローンが優位となったが、IL-3 非存在下では H3-WT クローンが比較的保たれていた。H3-K27 メチル化酵素である EZH2 の阻害剤（EPZ-6438）を投与すると、H3-K27M 細胞および H3-WT 細胞の増殖が抑制され、H3-K27M 細胞では p16 の発現が回復した。

【考察】WES および ultra-deep target sequencing の結果から、患者骨髄細胞中に存在した TP53 変異を有する細胞の一部に CEBPA 変異が加わり、さらに培養中に偶発的に NRAS 変異が加わり、MDS92 細胞株樹立に至ったと考えられる。さらに H3-K27M 変異を有する細胞と有さない細胞が混在する MDS-L は IL-3 存在下で H3-K27M 細胞優位となり MDS-L-2007 に、IL-3 非存在下で H3-WT 細胞優位となり MDS-LGF に移行したと考えられる。H3-K27M を有する細胞は IL-3 存在下で増殖優位性を獲得し、IL-3 非存在下で増殖が抑制されたことから、この変異は IL-3 経路を介した機序により増殖優位性をもたらす可能性が考えられる。また、EZH2 阻害剤の投与によって H3-K27M 細胞に腫瘍抑制因子である p16 の回復が認められたことから、p16 がこの変異の治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

【結語】ドライバー変異の蓄積が MDS 細胞株樹立に繋がったことが示された。H3-K27M 変異を有する細胞の増殖優位性が IL-3 の有無に影響されたことから、異常クローンの拡大はゲノム・エピゲノムの状態だけでなく、サイトカインなどの周辺環境中の因子にも影響を受けることが示唆された。この一連の MDS 細胞株は MDS から白血病への移行のインビトロモデルとして、病態解明や治療開発などの有益なツールとなることが期待される。

医学会誌論文賞：医学会・編集委員会より

本田 威 先生

対象論文：Turtle spongious ventricles exhibit more compliant diastolic property and possess larger elastic regions of connectin in comparison to rat compact left ventricles

Kawasaki Medical Journal 44(1) : 1-17,2018 (doi : 10.11482/KMJ-E44(1)1)

大平 伸 先生

対象論文：精巣上体炎における indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の 役割に関する検討

川崎医学会誌 44 (1) : 1-10,2018 (doi : 10.11482/KMJ-J44(1)1)

齋藤 互 先生

対象論文：甲状腺低分化・未分化癌細胞に対するヘッジホッグ阻害薬 GANT61 の抗腫瘍効果と癌幹細胞
制御作用

川崎医学会誌 44 (2) : 95 - 106, 2018 (doi : 10.11482/KMJ-J44(2)95)