

第 14 回 川崎医科大学 学術集会

日時：令和 5 年 7 月 29 日（土）10:00～15:20

会場：現代医学教育博物館 2 階大講堂、4 階展示室

スケジュール：

開催の挨拶 川崎医科大学 学長 砂田 芳秀	10:00～
セッション 1（4 題）	10:05～
休憩	11:00～
セッション 2（4 題）	11:10～
昼休憩	12:10～
川崎医学会総会（12:15～）	
ポスターセッション（53 題）	13:10～
休憩	14:10～
セッション 3（3 題）	14:20～
表彰	15:15～
閉会の挨拶 川崎医科大学 副学長 毛利 聡	

第14回 川崎医科大学学術集会 プログラム

セッション 1 (4題) 座長：樋田 一徳、金藤 秀明

	分野	課題番号	時 間	研 究 課 題	研究代表者
1	大学院	R04大-002	10:05～10:20	トリプルネガティブ乳癌における免疫チェックポイント分子の発現と免疫微小環境に関する解析	佐貫 史朗
2	神経・運動器・生殖・循環	R04基-094	10:20～10:35	nNOSによる筋委縮/筋ジストロフィー治療の基盤研究	大久保 浩平
3	環境と生体反応	R04基-037	10:35～10:50	慢性肉芽腫症の創薬ターゲットの探索	宮野 佳
4	医学研究への扉		10:50～11:00	熱帯熱マラリア原虫に対する放線菌抽出物の抗原虫活性検討	村田 雅佳

休憩 11:00～11:10

セッション 2 (4題) 座長：小賀 徹、山内 明

	大学名	学部学科名	時 間	研 究 課 題	研究代表者
5	川崎医療福祉大学	医療技術学部 臨床検査学科	11:10～11:25	標本作製原理は尿細胞診判定に影響を及ぼすか Liquid based cytology (LBC) 2法での高異型度尿路上皮癌判定-	有安 早苗
6	福山大学	薬学部 薬学科	11:25～11:40	リスペリドン内用液から茶カテキンによって生じる沈殿の定量NMRをもちいた解析	五郎丸 剛
7	岡山県立大学	保健福祉学部 栄養学科	11:40～11:55	血小板型12S-リポキシゲナーゼの肝線維化に及ぼす影響	戸田 圭祐
8	就実大学	薬学部 薬学科	11:55～12:10	HMGB1-LPS共刺激誘導性炎症応答を抑制するanti-DAMPsの新規同定	森 秀治

昼休憩 12:10～13:10 川崎医学会総会 (12:15～)

ポスターセッション 13:10～14:10

休憩 14:10～14:20

セッション 3 (3題) 座長：勝山 博信、松田 純子

	分野	課題番号	時 間	研 究 課 題	研究代表者
9	腫瘍	R04基-083	14:20～14:35	人工知能 (AI) による病理組織別の遺伝子発現パターン予測モデルを用いた高度進行大腸癌へのAI Precision Medicineの基盤作り	矢野 修也
10	消化器・代謝・腎	R04基-003	14:35～14:50	高トリグリセリド血症合併肝障害症例を対象とした実臨床下におけるペマフィブラートの肝障害改善効果の検討	下田 将司
11	新分子・新技術	R04基-025	14:50～15:05	SARS-CoV-2 変異株のスクリーニング法とゲノム解析	近藤 英生

— 神経・運動器・生殖・循環 —

	課題番号	発表時間	研究課題	研究代表者
P1	R04ス-002	13:10～14:10	ALSにおける液-液相分離形成に関わるIncRNAの探索	山崎 晃
P2	R04ス-005	13:10～14:10	長期鼻閉による嗅覚異常の解明 -嗅球THニューロンの形態学的解析	外村 宗達
P3	R04基-016	13:10～14:10	地上生活への適応に伴う脊椎動物の心臓進化	白居 優
P4	R04基-023	13:10～14:10	脳梗塞における疾患感受性遺伝子の探索	大山 直紀
P5	R04基-029	13:10～14:10	力学的過負荷が弾性蛋白質を介して心不全発症に至る分子機構	花島 章
P6	R04基-036	13:10～14:10	脳虚血後の各種運動療法によるマイオカイン群の変化および効果	氷見 直之
P7	R04基-041	13:10～14:10	コネクチンNovex-3ノックアウトマウスの心機能悪化機序の解析	橋本 謙
P8	R04基-052	13:10～14:10	サポシンD変異ニューロンの凍結セルバンク作成と解析	石塚 佑太
P9	R04基-054	13:10～14:10	下肢静脈瘤血管内レーザー焼灼術のレーザー波長・特性の違いによる有効性・安全性の比較検討	田淵 篤
P10	R04基-075	13:10～14:10	関節リウマチにおけるDNAメチル化ダイナミズムの解明とエピゲノム創薬に向けて	中野 和久
P11	R04基-082	13:10～14:10	サルコペニアに対する血中バイオマーカーの樹立	宗兼 麻美
P12	R04基-095	13:10～14:10	TGF- β を起点としたサルコペニアの分子発症機構の解明	大澤 裕
P13	R04基-101	13:10～14:10	嗅覚障害メカニズム解明の観点からの嗅覚神経回路の微細構造的解析	樋田 一徳
P14	R04若-002	13:10～14:10	GABA免疫陽性反応に注目した嗅球ニューロンの新規分類	佐藤 慧太

— 消化器・代謝・腎 —

	課題番号	発表時間	研究課題	研究代表者
P15	R01基-033	13:10～14:10	機能的MRIを用いた膵切除術後症例における残膵外分泌能の評価	林田 稔
P16	R04ス-001	13:10～14:10	高脂肪食負荷動脈硬化モデルマウスにおけるGLP-1受容体作動薬の抗動脈硬化作用の検討	真田 淳平
P17	R04ス-004	13:10～14:10	ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の抗動脈硬化作用の検討	伏見 佳朗

P18	R04基-006	13:10～14:10	ミトコンドリア作動薬イメグリミンの膵β細胞・動脈硬化に及ぼす影響の検討	金藤 秀明
P19	R04基-009	13:10～14:10	Weekly GLP-1受容体作動薬デュラグルチドとセマグルチドの実臨床における有効性と安全性の比較 Comparison of clinical efficacy and safety of weekly GLP-1 receptor agonists duraglutide and semaglutide	片倉 幸乃
P20	R04基-011	13:10～14:10	小腸粘膜内細菌叢と局所サイトカインプロファイルによるCrohn病の治療効果予測	半田 修
P21	R04基-028	13:10～14:10	2型糖尿病治療における効果的な運動指導を探索するための多面的検討：糖尿病専門施設との前向き観察共同研究	中西 修平
P22	R04基-030	13:10～14:10	画像強調処理LCI(Linked Color Imaging)を用いた胃癌発生高リスク群の内視鏡診断に関する研究	梅垣 英次
P23	R04基-044	13:10～14:10	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
P24	R04基-066	13:10～14:10	腹膜透析関連腹膜炎後の慢性炎症と腹膜劣化の関与について	角谷 裕之
P25	R04基-069	13:10～14:10	小腸の脂質吸収におけるフィトセラミド構造の機能解析	渡邊 昂
P26	R04基-002	13:10～14:10	NASHにおけるミトコンドリア品質管理が肝筋連関を介した運動抵抗性に及ぼす影響の検討	仁科 惣治

— 腫瘍 —

	課題番号	発表時間	研究課題	研究代表者
P27	30基-047	13:10～14:10	CAGE解析による子宮頸がん関連線維芽細胞の網羅的RNA転写開始点の解析ーリンパ節転移阻害剤の開発を目指して	村田 卓也
P28	R04基-022	13:10～14:10	術前薬物療法前後の乳癌組織の生物学的変化を用いた予後予測ツールの開発	山本 裕
P29	R04基-038	13:10～14:10	骨髄系腫瘍の遺伝子解析と発症に関与するシグナル分子の機能解析	北中 明
P30	R04基-088	13:10～14:10	癌性腹膜炎に対する新規治療法の開発	永坂 岳司
P31	R04若-001	13:10～14:10	小胞体ストレス応答と脂質メディエーターのクロストークによるがん悪性化機構の解明	北風 圭介
P32	R04基-072	13:10～14:10	悪性中皮腫リスク抽出診断方法の実用化に向けた基盤研究	伊藤 達男

— 環境と生体反応 —

	課題番号	発表時間	研究課題	研究代表者
P33	R04基-031	13:10～14:10	老化関連遺伝子p16コンディショナルノックアウトマウスを用いた肺線維化におけるマクロファージ老化の役割の解明	竹之内 康広
P34	R04基-045	13:10～14:10	炎症性皮膚角化症「乾癬」と脂肪肝炎との炎症相互連関の解明と新規治療戦略の探索	向井 知之

P35	R04基-047	13:10～14:10	マンソン裂頭条虫クローン株の各発育ステージにおける遺伝子発現パターンの比較解析	沖野 哲也
P36	R04基-048	13:10～14:10	マウスモデルを用いた単純ヘルペスウイルス感染における皮膚の役割と感染後の急性炎症を惹起するメカニズムの解析	山本 剛伸
P37	R04基-073	13:10～14:10	免疫細胞の疲弊・老化に焦点を当てたHTLV-1による発がん及び慢性炎症の病態解明	齊藤 峰輝
P38	R04基-076	13:10～14:10	全身性強皮症における皮膚病変の経時的総合評価ツールの検討	藤田 俊一
P39	R04基-098	13:10～14:10	悪性中皮腫の免疫チェックポイント阻害薬治療効果に関わる新規免疫機能遺伝子の探索	西村 泰光

— 新分子・新技術 —

	課題番号	発表時間	研究課題	研究代表者
P40	R04ス-003	13:10～14:10	インフルエンザウイルス・ヘマグルチニンの発現調節が持つ感染性・病原性への意義	三浦 未知
P41	R04ス-006	13:10～14:10	SARS-CoV-2 RNAゲノムに着目した抗ウイルス薬開発のためのプラットフォームの確立	清水 由梨香

— 大学院研究 —

	課題番号	発表時間	研究課題	研究代表者
P42	R04大-001	13:10～14:10	咽頭がんの特徴に関する臨床病理学的検討	森谷 卓也 (藤田 祥典)
P43	R04大-003	13:10～14:10	非小細胞肺癌における癌微小環境が免疫チェックポイント阻害剤併用殺細胞性抗癌剤の効果に与える影響の検討	中田 昌男 (野島 雄史)

— 川崎医療福祉大学・福山大学・岡山県立大学・就実大学 —

	大学名	学部学科名	研究課題	研究代表者	
P44	川崎医療福祉大学	医療技術学部 臨床検査学科	標本作製原理は尿細胞診判定に影響を及ぼすか Liquid based cytology (LBC) 2法での高異型度 尿路上皮癌判定-	有安 早苗	※
P45	川崎医療福祉大学	医療福祉学部 医療福祉学科	プラットフォーム型協議体によるソーシャルワーク 実習プログラムの検討	中尾 竜二	
P46	川崎医療福祉大学	医療技術学部 臨床栄養学科	骨格筋の抗炎症作用がDSS誘導性大腸炎モデルマウスの骨格筋の消耗を防ぐ	青木 孝文	
P47	福山大学	薬学部 薬学科	ビデオ会議システムを用いたスモールグループ ディスカッションに対する学生評価とその評価に対する改善策	猿橋 裕子	※
P48	福山大学	薬学部 薬学科	脳虚血再灌流障害に対する低体温の保護機構	渡邊 正知	
P49	岡山県立大学	保健福祉学部 栄養学科	血小板型12S-リポキシゲナーゼの肝線維化に及ぼす影響	戸田 圭祐	
P50	岡山県立大学	情報工学部 人間情報工学科	女子大学生の朝型・夜型指向性と身体活動、栄養 摂取状況および身体組成との関係	大下 和茂	※
P51	就実大学	薬学部 薬学科	HMGB1-LPS共刺激誘導性炎症応答を抑制するanti-DAMPsの新規同定	森 秀治	
P52	就実大学	薬学部 薬学科	インチューブ固相マイクロ抽出/LC-MS/MS法を用いたタバコ特異的ニトロソアミン類の高感度測定	石崎 厚	
P53	就実大学	薬学部 薬学科	胎生期葉酸削減マウスにおける社会性および記憶 学習能の低下	吉川 弥里	

課題番号	研究課題	研究代表者
— 神経・運動器・生殖・循環 —		
R04基-057	女児てんかん原因遺伝子PCDH19の局在・機能解析	林 周一
R04基-093	遠心性入力線維の受容体に着目したマウスの嗅覚情報処理に関わる神経回路の形態学的解析	堀江 沙和
R04基-099	心室拡張機能の進化：分子・細胞から臓器レベルまでの統合的検討	毛利 聡
R04基-013	脳浮腫モデルマウスに対する希少糖（D-allose）の効果	中村 丈洋
R04基-012	うつ状態でのリアノジン受容体と滑面小胞体の変化	丸山 恵美
R04基-046	自然発生白斑マウスにおける原因遺伝子変異の決定：ワールデンブルグ症候群の新規病態モデルマウスの提唱	松田 純子
R04基-055	光干渉断層法（OFDI）と血管内視鏡を用いた下肢閉塞性動脈疾患に対する血管外科治療における「健常」部位と治療対象部位の血管性状解析と治療成績	赤木 大輔
R04基-100	新型コロナワクチン接種による血清抗体価の変化とテストステロンの関連性に関する検討	大平 伸
R04基-081	デュシェンヌ筋ジストロフィーに対するペプチド医薬の実用化	砂田 芳秀
R04基-015	症候性頭蓋内動脈狭窄におけるプラーク安定化と脂質プロファイルの関連	八木田 佳樹
R04基-024	不妊症における免疫系システムとの関与に関する検討	下屋 浩一郎
R04基-102	全身性強皮症の皮膚硬化におけるエピジェネティックス異常誘導機構の解明	浅野 澄恵
R04基-033	網膜色素上皮細胞のメラニン合成から探る加齢黄斑変性の病態解明と新規予防薬の確立	鎌尾 浩行
R04基-086	睡眠呼吸障害と嗅覚障害の関連について	濱本 真一
R04基-087	内喉頭筋におけるMyostatin阻害は音声障害の新規治療となり得るか？	田所 宏章
R04基-058	単色X線を用いた生体内における寒栓物質の血管内動態の観察	林田 稔
— 消化器・代謝・腎 —		
R04基-039	マウスにおける薬剤誘導性上皮除去の試み	横西 哲広
R04基-032	抗肥満脂質を分解する酵素の役割と制御機構の解析	坪井 一人
R04基-065	腎臓病と骨格筋の連関機序と腎保護効果の解明	山本 稔也
R04基-063	糸球体内皮-上皮細胞連関におけるsGC活性化によるTRPC活性化制御機構の解明	長洲 一

課題番号	研究課題	研究代表者
R04基-064	細胞老化制御による腎寿命延伸を介した老化制御達成のための基盤研究	岸 誠司
R04基-068	腎間質線維化進展機序におけるsGC活性化の意義の検討	板野 精之
R04基-062	Keap1-Nrf2/TRPC6経路による糸球体濾過率（GFR）制御機構の解明	城所 研吾
R04基-067	eNOS/N0/PKG経路のwnt/ β -catenin経路制御機構を介した尿細管保護効果の検討	山内 佑
R04基-061	鉍質コルチコイド受容体拮抗薬による糖尿病性腎臓病の進展抑制効果の検討	近藤 恵
R04基-004	過敏性腸症候群の粘膜細菌叢および糞便中有機酸解析	塩谷 昭子
R04基-017	糞便移植による高脂肪食誘発肥満マウスに大腸腫瘍発生への影響	松本 啓志
R04基-019	消化管アレルギーと消化管粘膜関連細菌叢の関連性および粘膜免疫機序解明	大澤 元保
R04基-010	慢性腎臓病の診療支援システムの開発	神田 英一郎
— 腫瘍 —		
R04基-070	腫瘍関連マクロファージ（TAM）の機能を制御する分子の解析	山内 明
R04基-059	急性白血病に対する新規分化誘導剤開発研究	岡本 秀一郎
R04基-014	対向型DNA損傷に基づく炎症性発がんの理解	森脇 隆仁
R04基-018	分子標的薬耐性肺癌における活性酸素の役割	瀧川 奈義夫
R04基-092	PD-1/PD-L1共発現細胞株に対するPD-1阻害剤とPD-L1阻害剤の細胞増殖への影響に関する基礎研究	山根 弘路
R04基-091	殺細胞性抗がん薬による第3世代EGFR-TKI耐性誘導と克服に関する検討	越智 宣昭
R04基-105	RNA sequence を用いた肺癌オルガノイドにおける融合遺伝子の同定とactionable変異に対する抗腫瘍効果の誘導	山辻 知樹
R04基-104	疾患モデルとしての肺癌オルガノイドにおける癌不均一性の解析	深澤 拓也
R04基-097	高齢がん患者に対する免疫チェックポイント阻害薬の院内使用実態調査—SS-MIX2と院内がん登録を用いた大規模データ分析—	黒瀬 浩史
R04基-049	PET陰性を示した充実型肺腺癌の臨床病理学的特徴	清水 克彦
R04基-034	高齢乳癌患者に対する高齢者総合的機能評価スクリーニングツールの開発に関する研究	平 成人
R04基-077	JAK阻害薬が悪性腫瘍の進展・増大に与える影響の検討とその機序の解明	赤木 貴彦

課題番号	研究課題	研究代表者
R04基-040	リキッドバイオプシーによる食道癌再発高リスク群の評価と適切な薬剤選択法の確立	藤原 由規
R04基-084	末梢血リンパ球を用いた免疫チェックポイント阻害剤による胃癌治療に対する新規バイオマーカーの開発	谷岡 洋亮
R04基-035	前立腺癌の腫瘍検出における合成拡散強調像の有用性に関する後方視的研究：従来法との比較	玉田 勉
R04基-080	胃 MALT リンパ腫における放射線治療後の有害事象の検討とリアルタイムイメージングの開発：令和3年度からの継続研究	釋舎 竜司
R04基-021	骨髄異形成症候群細胞株の増殖動態の検討-L-グルタミンの重要性	辻岡 貴之
R04基-005	トリプルネガティブ型非浸潤性乳管癌の特徴に関する臨床病理学的検討	森谷 卓也
R04基-020	癌促進型スプライシングの分子機構解明と特異的介入法の開発	増田 清士
R04基-103	患者由来食道癌オルガノイドの樹立とライブラリの作製	羽井佐 実
— 環境と生体反応 —		
R04基-079	オオサンショウウオ在来種のミトコンドリアDNA解析	西松 伸一郎
R04基-043	新型コロナウイルスの感染予防抗体を誘導するユニバーサルワクチンの開発	内藤 忠相
R04基-078	HTLV-1関連脊髄症モデルマウスの改良に向けた基礎研究	和田 雄治
R04基-053	インフルエンザ再流行を阻止するためのHAワクチン改良方法の検証	後川 潤
R04基-060	DAMPsによる辺縁帯B細胞活性化機構および自己免疫疾患との関連	井関 將典
R04基-027	IL-18を介したオートファジー制御機構とVici症候群に対する新規治療法の開発	寺脇 正剛
R04基-074	リウマチ膠原病性疾患患者における生体防御免疫監視機構のバイオマーカー探索	守田 吉孝
R04基-085	小児睡眠時無呼吸症に外科的治療は必要か？	三宅 宏徳
— 新分子・新技術 —		
R04基-090	好中球NADPHオキシダーゼ活性の解析	栗林 太
R04基-026	線維化に応答する新規分子の機能解析	岡本 安雄
R04基-007	新規疾患MPSPSの治療薬探索（継続・発展研究）	大友 孝信
R04基-008	ヒアルロン酸を用いた気管支喘息における新規舌下免疫療法の研究開発-2-根治療法としての有効性の検討-	加藤 茂樹

課題番号	研究課題	研究代表者
R04基-071	骨髄巨核球の形態学的特徴を客観的に評価する新規診断法の開発	藤原 英世

	演題名	学生氏名
— 令和4年度 医学研究への扉 —		
優秀賞	認知症高齢者における臨床症状に関連する大脳皮質領域の検討	佐藤 美果
優秀賞	ホルモン受容体陽性乳がん細胞株(MCF-7)に対するequolの影響	福永 真子
優秀賞	RNA編集後のリンパ球における機能検証研究	久本 莉彩子
優秀賞	フィトセラミド欠損マウスの授乳期の小腸におけるスフィンゴ糖脂質の構造解析	宮崎 明子
優秀賞	細胞走化性を制御する因子の検討～癌転移の制御を目指して～	結城 柁崇
優秀賞	術野洗浄に有効な洗浄液の成分と濃度についての基礎的研究	中塩 愛唯
優秀賞	自己炎症性疾患関連KIF7遺伝子変異による炎症誘導機序の検討	山本 ひかり
優秀賞	転写因子Runx3によるマウス卵胞顆粒膜細胞における遺伝子発現制御の解析	名嘉山 雄介
優秀賞	小胞輸送異常におけるペキソファジーの観察	竹内 壯太郎
優秀賞	薬剤による上皮除去の試み	坂尾 嘉信
優秀賞	生命のスケッチ～NeuroLucidaによるノルアドレナリン作動性神経回路のデジタルスケッチ～	木村 真理子
優秀賞	ナノ金粒子標識免疫電子顕微鏡法による嗅球ニューロン細胞内におけるGABAの局在解析	今中 真緒
優秀賞	胃内溶液のpHと心臓血中のメタンフェタミン濃度に対する胃内溶液のメタンフェタミン濃度の比の関係	小谷 紗永
優秀賞	両生類アホロートルの酸素環境と肺呼吸の重要性に関する検討	加地 茉美
優秀賞	弱毒生インフルエンザワクチン開発に資する低温増殖型組換えウイルスの感染阻止効果	齋藤 奨
優秀賞	HA抗原カクテル化によるインフルエンザワクチン改良の試み	衣笠 行紀
優秀賞	線維化に関連するオーファンGタンパク質共役型受容体の発現解析	古賀 大輔
優秀賞	新型コロナウイルス感染症に対する新規治療薬FOXO1阻害薬の可能性	川本 一貴
優秀賞	頭蓋内外バイパス技術向上のための様々な材料をもちいたトレーニング法の検討	馬場 美夢
優秀賞	加齢マウスにおけるコカイン嗜癖行動の特性と成体海馬神経新生の関与	新井 啓仁
優秀賞	メディカルイラストレーション：理解して描くことの重要性	中島 悠

優秀賞	抗体作成を目的とした組換えタンパク質の発現と精製	高橋 亮香
優秀賞	オレキシンのグリケーションは睡眠に影響を与えるか？	上村 淳修
優秀賞	熱帯熱マラリア原虫に対する放線菌抽出物の抗原虫活性検討	村田 雅佳

※

【抄録集】

I. 口頭発表

— セッション1 —

1.

分野：大学院

課題番号：R04 大-002

研究課題：トリプルネガティブ乳癌における免疫チェックポイント分子の発現と免疫微小環境に関する解析

研究代表者名（所属）：佐貫 史明（形態系分野・検証病理診断学）

指導教授名：森谷 卓也

共同研究者名：三上 友香、西村 広健、野村 長久、藤田 祥典、平 成人

【背景】ヒトには本来、癌を攻撃する免疫機構が備わっているが、癌の中には免疫チェックポイント分子と呼ばれる蛋白を発現し、活性化T細胞等に発現する受容体と結合し免疫を抑制的に導くものもある。この機構は治療にも応用され、乳癌では切除不能、局所再発例のホルモン受容体陰性・HER2 陰性のトリプルネガティブ乳癌(TNBC)に免疫チェックポイント阻害剤の適応が拡大された。B7-H4, Indoleamine 2,3-dioxygenase 1(IDO1)は新たな治療標的の候補であるが、TNBCにおける病理学的検討は少ない。【方法】TNBCのFFPE組織検体を薄切しB7-H4, IDO1, PD-L1(28-8, SP142), CD8, FOXP3, AR, CK5/6に対する免疫組織化学的解析を行い、各マーカー発現や腫瘍免疫微小環境との関連を検討した。【結果】統計的に有意な特徴として、B7-H4は年齢と負の相関、増殖マーカーと正の相関を示した。また、組織学的グレードが高い群や腫瘍浸潤リンパ球が豊富なパターンを示す群に高発現し、腫瘍周囲のCD8+, FOXP3+T-cellや三次リンパ様構造の数と正に相関していた。IDO1は腫瘍浸潤リンパ球の割合と正の相関があった。ARを発現する群はB7-H4, PD-L1(28-8)の発現が低く、ARの発現が低い群の解析ではB7-H4とIDO1は逆相関であった。【考察】全体集団でB7-H4, IDO1, PD-L1は免疫的にHotな症例で発現する傾向にあった。ARを発現するサブタイプでは各免疫チェックポイント分子の発現が低いものと関連し、免疫的にcoldな傾向があった。【結語】TNBCのサブタイプや腫瘍微小環境は免疫チェックポイント分子発現との関係があり、将来的な治療選択の際に重要と考える。

2.

分野：神経・運動器・生殖・循環

課題番号：R04 基-094

研究課題：nNOSによる筋萎縮/筋ジストロフィー治療の基盤研究

研究代表者名（所属）：大久保 浩平（神経内科学）

共同研究者名：大澤 裕、西松 伸一郎、砂田 芳秀、白河 俊一

我々が作出したカベオリン-3欠損肢帯型筋ジストロフィー(LGMD1C)の疾患モデルマウスの骨格筋は萎縮し、カベオリン-3欠損により、その筋鞘膜の結合蛋白質であるnNOSの特定部位が過剰にリン酸化され、活性が亢進する。我々は、これまでに、カベオリン-3/nNOS二重欠損マウスでは、カベオリン-3欠損マウスより筋萎縮が増悪することを見出した。さらに、カベオリン-3欠損マウスと野生型マウスにおいて、運動や機械的負荷によって、リン酸化依存性にnNOS活性が上昇して筋線維が肥大することを発見した。本研究により、このリン酸化部位を常時活性化させたnNOSは、単核筋芽細胞のMyomakerやMyomergerによる細胞融合を介し、多核筋管細胞形成を促進する機構が明らかとなった。現在、nNOS常時活性化させたモデルマウスを作出し、その筋萎縮予防、筋肥大効果を検討している。nNOS活性化を起点とした筋ジストロフィーに対する疾患修飾療法の開発に向け突破口を開きたい。

3.

分野：環境と生体反応

課題番号：R04 基-037

研究課題：慢性肉芽腫症の創薬ターゲットの探索

研究代表者名（所属）：宮野 佳（自然科学）

共同研究者名：岡本 秀一郎

食細胞（好中球など）は、食胞膜に局在する膜タンパク質 Nox2-p22^{phox} 酵素複合体が生成した活性酸素を用いて、貪食した病原体を殺菌する。この Nox2-p22^{phox} 系の破綻は、幼少期より重篤な感染症を繰り返す遺伝性疾患である慢性肉芽腫症 (CGD, chronic granulomatous disease) を引き起こす。これまで p22^{phox} の遺伝子 *CYBA* の点変異が原因となる慢性肉芽腫症に関しては、その多くが症例報告のみにとどまっていた。本研究において、私は、p22^{phox} の遺伝子 *CYBA* のエクソン 3 に集中するアミノ酸置換を伴う点変異が、膜タンパク質生合成の場である小胞体において p22^{phox} 自身のタンパク質分解を促進し、結果として Nox2-p22^{phox} 複合体の形成に至らず、CGD を発症することを示した。さらに、p22^{phox} の分解は、小胞体関連分解の構成タンパク質 Derlin-1 との相互作用がキューとなることを明らかにした。この相互作用は、CGD で認められる複数のアミノ酸置換が集中する領域に存在するシステイン残基 (p22^{phox} の 50 番目の Cys⁵⁰) のチオール基の酸化還元により影響を受けた。実際、チオール基の酸化は、p22^{phox} と Derlin-1 との相互作用を遮断し、p22^{phox} の分解を抑制した。以上の結果は、Cys⁵⁰ のチオール基を標的として p22^{phox} 分解を抑制することにより、CGD をレスキューできる新規治療法を開発できる可能性を示唆する。

4.

演題名：熱帯熱マラリア原虫に対する放線菌抽出物の抗原虫活性検討

学生氏名：村田 雅佳

指導教員名：水上 修作、平山 謙二

【背景・目的】マラリアはマラリア原虫により引き起こされる蚊媒介性の熱性疾患である。世界中では年間 2 億人以上が感染し、60 万人以上が死亡している。ヒトに感染するマラリア原虫は 5 種類あり、その中でも熱帯熱マラリア原虫による感染は致死率が最も高い。2000 年以降、新薬開発や蚊の制御によって感染者数死亡者数共に減少していたが、新型コロナウイルスの感染拡大により薬や検査機材の供給が滞ったことも影響して、2020 年は前年より増加を示した。これまでに多くの抗マラリア薬が開発されてきたが、薬剤耐性マラリア原虫の出現や増加によって、未だに新薬は必要とされている。今回我々は、有望な新規抗マラリア薬候補を見出すことを目的として、候補サンプルの抗マラリア原虫活性の検討を行った。既存の抗生物質や生理活性物質の約 7 割が放線菌に由来することが知られているため、本研究ではその抽出物を候補サンプルとして使用した。

【方法】まず、熱帯熱マラリア原虫感染赤血球の培養液に、放線菌抽出物 (93, 94, 135, 143) を加え、これを混合ガス存在下の 37℃ インキュベーター内で静置した。48 時間後に原虫 DNA 量を測定し、抽出物を加えなかった際の結果と比較することにより、抗マラリア原虫活性を評価した。

【結果・考察】放線菌抽出物 94, 135, 143 に抗マラリア原虫活性が認められた。その中でも 143 は活性が最も強く、更に細胞傷害性試験においても良好な結果を示した。そのため、我々は放線菌抽出物 143 を有望な候補と考え、今後、更なる解析を進めていく予定である。

— セッション 2 —

5.

演題名：標本作製原理は尿細胞診判定に影響を及ぼすか

Liquid based cytology (LBC) 2 法での高異型度尿路上皮癌判定

研究代表者名：有安 早苗

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

【はじめに】

標本作製原理の異なる Liquid based cytology (LBC) の 2 法において、その違いが細胞形態および細胞診判定に影響するかを N/C 比、核クロマチン濃度を中心に検証した。

【方法】

組織学的に尿路上皮癌が証明された 30 症例を対象に Sure path 法（沈降法）と Cell prep 法（フィルター法）で標本作製し、標本中異型細胞の核・細胞質周長を画像解析ソフトで計測し N/C 比を算出、核クロマチン濃度は、異型細胞核と好中球核の光学濃度比として数値化した。2 法間の細胞形態に統計学的有意差があるか、The Paris system の異型細胞検出基準となる N/C 比 50%を超える異型細胞の出現率を比較し、診断への影響を検証した。

【結果】

N/C 比 ($p < 0.0001$)、核クロマチン濃度 ($p=0.007$) とともに 2 方法間に有意差を認めた。また、N/C 比 50%を超える異型細胞の出現率にも 2 方法間に有意差を認めた ($p=0.01$)。

【結語】

標本作製原理の違いは細胞形態に有意差を生じることが証明された。この形態差は、検出できる異型細胞数に繋がり、尿路上皮癌判定に影響することも示唆された。作製法の異なる標本での同一基準値を用いた診断には問題があり、作製法別基準値設定が今後課題と考える。

6.

演題名：リスペリドン内用液から茶カテキンによって生じる沈殿の定量 NMR をもちいた解析

研究代表者名：五郎丸 剛

所属（大学・学部・学科）：福山大学・薬学部・薬学科

【目的】統合失調症の第一選択薬であるリスペリドンは、カテキン類を多く含む飲料と混合すると沈殿が生じることが知られている。この沈殿は、主に ガレート型カテキン類である EGCg および ECg がリスペリドンと錯体を形成することにより生じることが我々はすでに報告している。現在、リスペリドン内用液は複数存在するが、その沈殿について統一的に解析した情報はない。そこで、リスペリドン内用液の各製品を緑茶と混合することによって生じる沈殿について定量 NMR (q NMR) を用いて調べた。

【方法・結果】リスペリドン (25 μmol) の酒石酸緩衝液 (pH 3.0) を緑茶に含まれるカテキン分画である Catechin Mixture (25 μmol) に加えると沈殿を生じた。この沈殿を測定溶媒である DMSO- d_6 に溶解し、DSS- d_6 を基準物質 (0 ppm) および内部標準物質 (トリメチル基による 9H) として q NMR で測定し、他のシグナルとの重なりがないリスペリドンの Hb プロトンシグナルの積分値より沈殿量を算出した。また、リスペリドン内用液の各製品 (1 mL、リスペリドン 1 mg 含有) を緑茶 (おーいお茶、伊藤園) 30 mL に加えることによって生じる沈殿を、同様の測定条件を用いて q NMR により定量した。その結果、リスペリドンの沈殿率は約 5 - 35%と製品により大きな相違が見られた。

7.

演題名：血小板型 12S-リポキシゲナーゼの肝線維化に及ぼす影響

発表者名：戸田 圭祐

研究代表者名：高橋 吉孝

共同研究者名：岡本 知子、津嘉山 泉、川上 祐生、山本 登志子

所属（大学・学部・学科）：岡山県立大学・保健福祉学部・栄養学科

12S-リポキシゲナーゼ (LOX) はアラキドン酸などの不飽和脂肪酸に 1 分子の酸素を部位特異的、立体特異的に添加して過酸化脂質を生成する酵素である。12S-LOX 生成物が非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に関与するという報告がされているが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。これまでに我々は、メチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食投与により作製した NASH モデルマウスの肝臓において血小板型 12S-LOX が上昇すること、この酵素が肝線維化において中心的な役割を果たす肝星細胞に局在することを明らかにしてきた。本研究では NASH 進行の過程で本酵素が線維化にどのように関わるか解明

することを目的とした。血小板型 12S-LOX ノックアウトマウスと野生型マウスに MCD 食を 8 週間給餌したマウスの肝臓の線維化レベルをシリウスレッド染色によって比較したところ、野生型マウスに比べ、血小板型 12S-LOX ノックアウトマウスでシリウスレッド陽性の面積率は有意に上昇し、線維化が進行している様子が観察された。同様の結果は、ノックアウトマウスと野生型マウスのそれぞれから、ヒトの NASH の病態モデルにより近いとされるストレプトゾトシン投与と高脂肪食負荷の NASH モデルを作製した場合にも得られた。さらに血小板型 12S-LOX を安定的に過剰発現させたヒト肝星細胞株の TWNT-1 細胞では *COL1A1*、*COL1A2* の発現が野生型 TWNT-1 細胞より有意に低下していた。以上のことから、NASH モデルマウスの肝臓において発現が上昇する血小板型 12S-LOX は線維化を抑制する方向に働くことが示された。

8.

演題名：HMGB1-LPS 共刺激誘導性炎症応答を抑制する anti-DAMPs の新規同定

研究代表者（発表者）名：森 秀治、渡邊 政博、豊村 隆男

所属（大学・学部・学科）：就実大学・薬学部・薬学科

【目的】代表的 DAMPs である HMGB1 は、終末糖化産物（AGEs）や LPS と直接的に相互作用して複合体を形成し、TLR4 等のパターン認識受容体刺激を介した炎症応答亢進や病態形成に働くことが知られている。一方、これらに影響を与える生体内因子については、殆どわかっていない。そこで、AGEs や HMGB1 と結合し、炎症応答に影響を与える未知因子の探索研究を行った。

【方法・結果】AGEs を特異リガンドとして担持させたアフィニティ担体を調製し、AGEs と結合する生体内因子を探索したところ、リボソーム構成因子（RPL9）が高い結合親和性を示すことが判明した。その後の解析で、RPL9 が HMGB1 と同様に敗血症モデルの血清中に出現してくること、HMGB1 と直接的に結合することも明らかとなった。組換え型 RPL9 を調製し、マクロファージ細胞を用いて解析したところ、RPL9 は LPS 共存下で TNF- α 発現応答を相乗的に増大しなかったものの、その一方で、HMGB1+LPS 共刺激によって誘導される TNF- α 発現亢進を有意に抑制することが明らかとなった。

【考察】リボソーム構成因子である RPL9 は、直接的相互作用を介して HMGB1 による炎症応答を抑制する anti-DAMPs 候補であることが示唆された。

— セッション 3 —

9.

分野：腫瘍

課題番号：R04 基-083

研究課題：人工知能（AI）による病理組織別の遺伝子発現パターン予測モデルを用いた高度進行大腸癌への AI Precision Medicine の基盤作り

研究代表者名（所属）：矢野 修也（臨床腫瘍学）

共同研究者名：永坂 岳司、谷岡 洋亮、岡脇 誠

1. 深層学習(Deep learning)による人工知能(AI)が判別可能かつ予後と関連する病理分類の構築

1-1. The Cancer Genome Atlas (TCGA)を用いて、大腸癌の病理組織像を腺管構造の癌細胞が多く占める分化型(D)、間質が多く占める間葉型(M)、未分化癌細胞が多く占める未分化型(P)、粘液成分を含む粘液型(Mu)の 4 分類とした。

1-2. これら 4 分類を AI による classification(画像分類)可能な学習モデル、ResNet104、miniVGG により学習させると、97%の正確さで分類可能であった。また、これら 4 分類を AI による detection(画像認識)可能な学習モデル VGG19+、efficient U-NET で検討した結果、画像認識が正確度 96%であった。

1-3. これら癌組織 4 分類に、筋細胞、リンパ球、正常細胞、脂肪組織など正常組織を加えた画像サンプルから VGG19、U-NET で画像認識させた後、転移学習を行うと、癌組織と正常組織を組織別に色分け

(semantic segmentation)することが可能になり、数値化が可能になった。

2. AI 病理分類別と遺伝子発現、シグナルカスケード別による大腸癌分類の構築

TCGA のデータベースから 16000 種に及ぶ遺伝子発現と 1600 種に及ぶシグナルカスケードを単純にクラスター解析するだけでは分類出来なかったが、上記の 4 種類の AI 病理組織分類別に遺伝子発現やシグナルカスケードをクラスター解析を行うことにより、D 型は細胞周期、DNA/RNA 合成亢進、M 型は TGF β 、間質増生、MMP、血管新生増生シグナルが亢進し、興味深いことに、P 型はこれら M 型のシグナルに加え、免疫シグナルが亢進していた。逆に、これらの遺伝子発現分類やシグナル分類から組織を類推出来た。

10.

分野：消化器・代謝・腎

課題番号：R04 基-003

研究課題：高トリグリセリド血症合併肝障害症例を対象とした実臨床下におけるペマフィブラートの肝障害改善効果の検討

研究代表者名（所属）：下田 将司（糖尿病・代謝・内分泌内科学）

共同研究者名：片倉 幸乃、中西 修平、金藤 秀明

【背景】近年、非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) 患者数が増加し、いかに NAFLD の病態進展を予防するかが課題の一つとなっている。Selective PPAR α modulator (SPPARM α) であるペマフィブラートは肝臓において PPAR α を介し脂肪酸 β 酸化を亢進させ、さらには NF κ B を競合阻害することで抗炎症作用をもたらす可能性が報告されている。

【目的】実臨床下において、高トリグリセリド (TG) 血症合併肝障害症例を対象にペマフィブラートの肝障害に対する有用性を後向きに検討する。

【方法】対象は、当院 糖尿病・代謝・内分泌内科外来を通院中でフィブラート薬を服用していない高 TG 血症合併肝障害症例のうち、ペマフィブラート投与開始後 6 ヶ月までの経過を追跡し得た症例とした。「肝障害有」の判定基準は男性 ALT ≥ 25 U/L、女性 ALT $17 \geq$ U/L を用いた。

【結果】研究対象者 30 例の投与開始前背景は、年齢 55 ± 13.3 歳、男性 67%、HbA1c $7.0 \pm 1.2\%$ 、随時血糖 141 ± 51 mg/dL、T-choL 197 ± 33 mg/dL、TG 289 ± 160 mg/dL、HDL-C 44 ± 11 mg/dL、LDL-C 106 ± 26 mg/dL、T-Bil 0.73 ± 0.43 mg/dL、 γ GTP 93 ± 82 U/L、ALT 50 ± 31 U/L、AST 38 ± 26 U/L、血清 Cr 0.87 ± 0.19 mg/dL であった。6 ヶ月時点でのペマフィブラート平均投与量は 0.18 ± 0.08 mg で、 γ GTP、ALT、AST は各々有意に改善した。その他、TG や HDL-C は有意に改善したが、T-choL、LDL-C、HbA1c、Cre は有意な変化がなかった。

【結語】ペマフィブラートは高 TG 血症合併肝障害症例において肝障害の改善に寄与し得る可能性が示唆された。

11.

分野：新分子・新技術

課題番号：R04 基-025

研究課題：SARS-CoV-2 変異株のスクリーニング法とゲノム解析

研究代表者名（所属）：近藤 英生（血液内科学）

共同研究者名：内田 圭一

【緒言】次々に流行する SARS-CoV-2 ウイルスの変異株毎に特徴が異なるため、変異株を迅速に推定することは、臨床上有用である。RT-qPCR での陽性検体に対し、各流行時の変異株を判別するためのスクリーニング RT-qPCR 設定し、当日中に結果が得られる体制の構築を目指した。

【方法・結果】S 遺伝子の各変異のうち、L452R 用は購入 (Takara RC346A)、F486S/P は文献より引用し作成、del69/70 は文献の配列を一部改変、R346T および N460K はプライマー、LNA プローブを設計した。ゲノム解析は MinION シーケンサにて解析した。なお、設定した RT-qPCR およびゲノム解

析は、臨床検査として実施した。第4派（デルタ株：SGTF）、第5派(BA.1.1：SGTF)、第6派(SGTP：BA.2)、第7派(BA.5：SGTF)の入れ替わりはSGTF/SGTPで判別可能であった。第8派からは、単一ではなく複数の変異株が同時に流行したため、R346T, N460K, F486S/P用を追加し、BF.7,BQ1.1,BN.1系統,XBB系統等を判別、一部を除き当日結果報告した。後日行ったゲノム解析結果と照合し、正しいことを確認した。

【考察】変異スクリーニング RT-qPCRにより当日中に結果が得られる体制を構築できた。今後も新たな変異株の出現にあわせて体制を修正していく予定である。

II. ポスター

— 神経・運動器・生殖・循環 —

P 1.

課題番号：R04 ス-002

研究課題：ALS における液-液相分離形成に関わる lncRNA の探索

研究代表者名（所属）：山崎 晃（衛生学）

共同研究者名：伊藤 達男、清水 由梨香

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS) 患者の運動神経細胞では、液-液相分離の一つであるストレス顆粒が持続的かつ異常に形成される。これに関与する long non coding RNA (lncRNA) を同定するため、本研究室がもつ広範な RNA を標的可能な CRISPR/dCas13 システムを用いて、ノックダウンによるスクリーニング系の構築を目的とした。本研究では、①標的 lncRNA ノックダウン用のガイド RNAs の設計と iPS 細胞への dCas13 系導入、②ALS 患者由来 iPS 細胞から運動神経細胞への分化誘導系構築、③ストレス顆粒検出系構築をおこなった。①では、ALS 患者で報告されている特有の RNA 発現パターンをもとに、発現量が有意に変動している lncRNA 293 種に対してガイド RNA を設計した。さらに、TDP-43 など RNA 結合タンパク質と相互作用することが知られている lncRNA についてもガイド RNA を設計した。また、健常人および ALS 患者由来の iPS 細胞に対して dCas13 ノックイン株の構築をおこなった。②では、ALS 患者由来の iPS 細胞から神経細胞への分化誘導を藤森らのプロトコルに従って実施し [Fujimori K, et al., Nat. Med. 2018]、汎神経細胞マーカーである β III tubulin の発現を免疫染色によって確認した。③では、ストレス顆粒のマーカーとして TDP-43 および FUS の免疫染色系を構築した。現在ヒ素処理によるストレス顆粒形成の条件検討を進めており、その後①で作成した標的 lncRNA ノックダウン株に対して②のプロトコルで iPS 細胞から神経細胞へ分化させ、ヒ素処理で形成されるストレス顆粒を③の検出系で評価する予定である。

P 2.

課題番号：R04 ス-005

研究課題：長期鼻閉による嗅覚異常の解明 - 嗅球 TH ニューロンの形態学的解析

研究代表者名（所属）：外村 宗達（解剖学）

鼻腔の嗅上皮から入った匂い情報は嗅球で処理され、上位中枢へと伝達され匂いとして認識される。嗅球内のニューロンは成体においてもターンオーバーを繰り返し、匂い刺激に応じて神経回路を再編成することで、嗅覚の機能調節に関与する。慢性副鼻腔炎等の長期鼻閉塞では、匂い刺激の遮断によって嗅球が萎縮し、鼻閉塞改善後も嗅覚障害が持続する中枢性嗅覚障害をきたす。特に匂い識別に関わる傍系球体細胞のドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH) 陽性ニューロンが、匂い物質の遮断によって低下し、中枢性嗅覚障害を引き起こすことが知られている (Baker et al., 1983)。しかし、匂い識別に関わる単一 TH ニューロンの嗅覚障害時における形態学的変化は不明な点が多い。

本研究では TH に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現した遺伝子改変マウス (TH-GFP マウス) を用いて長期鼻閉モデルマウスを作製し、嗅球内の単一 TH ニューロンを固定スライス標本と単一ニューロン標識法を用いて解析し、その形態学的変化を明らかにする。これまで、対象群の単一 TH ニューロンの形態学的解析を行い、その樹状突起やシナプス形成の場となるスパインの定量的な解析を行った。今後は長期鼻閉群の TH ニューロンの形態学的な解析を進めると同時に、新たに立ち上げる電気生理学的手法を用いた実験系と、本研究成果を統合させることで、TH ニューロンの機能形態学的な解析に発展させる。

P 3.

課題番号：R04 基-016

研究課題：地上生活への適応に伴う脊椎動物の心臓進化

研究代表者名（所属）： 臼居 優（生理学1）

【背景】生物は成長や環境変動といった内的あるいは外的要因により、新しい表現型を獲得し、種の存続や分断を行ってきた。脊椎動物の中でも両生類は、そのライフサイクルの中で変態により形態や代謝を大きく変化させる。また水中から陸上へと生活様式も変化する。そこで、両生類の変態に伴う生理機能の変容の解析を通じて、脊椎動物が低酸素の水中生活から酸素の豊富な上陸生活へどのように適応あるいは進化したのか明らかにしようと試みた。

【方法】アホロートルに対して 50nM 甲状腺ホルモン（T4）を投与し、任意のタイミングで変態を誘導した。心臓エコーにより、未変態個体と変態個体の房室流入血や駆出血の出現パターンを観察した。未変態個体と変態個体の心臓切片の観察を行った。

【結果】

アホロートルの血行動態は変化しなかった。房室流入血はいずれも心房収縮（A 波）のみを示した。一方、変態個体の心室の心筋量は、未変態個体に比べて増加していた。

【結論】

アホロートルは変態を通じて心臓リモデリングを生じるが、これは心臓機能を改変する程の変化ではなかった。

【今後の研究について】

赤血球の性質や血管形成について比較解析を進めていきたいと考えている。

P 4.

課題番号：R04 基-023

研究課題：脳梗塞における疾患感受性遺伝子の探索

研究代表者名（所属）： 大山 直紀（脳卒中医学）

共同研究者名： 八木田 佳樹、岩本 高典

これまで骨髄増殖性腫瘍患者において、JAK2V617F 遺伝子変異と脳動脈狭窄に関連性があることを報告してきた (in submission)。JAK2 遺伝子が脳梗塞の疾患感受性遺伝子であるとの仮説を立て、本研究では小血管病（SVD）あるいは脳動脈狭窄を有する脳血管障害患者における JAK2V617F 遺伝子変異の割合を調べ、その臨床的特徴を明らかにすることを目的とした。

本研究に登録された脳血管障害患者 234 名（平均 71 歳、男性 161 例）において、JAK2 遺伝子変異、脳梗塞の臨床病型、血管病変、採血データについて診療録よりデータ収集を行った。

脳血管障害 234 名のうち脳動脈狭窄は 114 例にみられ、脳梗塞は 217 例であった。脳梗塞の臨床病型は、SVD73 例、アテローム血栓性脳梗塞（ATBI）73 例、心原性脳塞栓症 16 例、その他の原因 15 例、原因不明 40 例であった。JAK2 遺伝子変異陽性は 6 例に認められ、全例脳動脈狭窄を有する脳梗塞症例であり、うち 5 例は ATBI で 1 例は原因不明であった。入院時採血において、血小板数の中央値は 62 万/ μ L（最小値 40.5 万/ μ L、最大値 93.4 万/ μ L）であり、6 例とも異常高値であった。

JAK2 遺伝子変異陽性は脳動脈狭窄と強い関連があることが示唆され、ATBI の 7%弱に認められ、SVD では認められなかった。また、JAK2 遺伝子陽性例では入院時の血小板数が異常高値を示すため、脳梗塞症例において JAK2 遺伝子検査を行う指標になりうると考えられた。

P 5.

課題番号：R04 基-029

研究課題：力学的過負荷が弾性蛋白質を介して心不全発症に至る分子機構

研究代表者名（所属）： 花島 章（生理学1）

共同研究者名： 毛利 聡、橋本 謙、臼居 優

心臓は高血圧などのメカニカルストレスに対して、心筋肥大によって適応するが、最終的には心不全を引き起こす。しかし、その根本的なメカニズムは未だ不明である。私たちは、心筋細胞サルコメアの巨大弾性

タンパク質 **Connectin** と核膜タンパク質 **Nesprin-1** に結合する新規タンパク質が、メカニカルストレスから心臓を保護する役割を担っていることを示唆した。新規タンパク質の **KO** マウス心臓では、**Connectin** の発現が亢進し、心筋細胞の肥大化が見られた。**KO** 心筋細胞では、**Serca2a** の発現量と **phospholamban** のリン酸化が増加し、筋小胞体の Ca^{2+} ハンドリングを上昇させ、**PI3K-Akt-Serca2a** のシグナル伝達経路が活性化することが示唆された。**KO** 心筋細胞のミトコンドリアは、配列と融合に異常が見られ、ATP 産生の増加によってストレスを受け、予備の呼吸能力を失っていた。さらに **KO** マウスは、大動脈狭窄術による重度の力学的過負荷をかけると致死的不整脈や急性心不全で突然死する一方、中程度の力学的過負荷でも心不全を発症した。新規タンパク質は重篤な圧力負荷による心不全発症時に核膜に局在しており、心不全発症を予防するためのメカニカルストレス応答である可能性が考えられる。

P 6.

課題番号：R04 基-036

研究課題：脳虚血後の各種運動療法によるマイオカイン群の変化および効果

研究代表者名（所属）：氷見 直之（生理学2）

共同研究者名：中村 丈洋、丸山 恵美

運動の種類による筋由来の栄養因子（マイオカイン）群の筋内濃度を比較中である。5 週齢の雄ラットに軽度な脳梗塞を誘発させ、無作為に①強制運動群（トレッドミル走行：10、20 および 30m/分×30 分）、②自発走行群（running wheel 付きケージにて飼育、平均 5,000m/日以上走行個体を採用）、③電気刺激群（下肢皮膚上の電極にて断続的に刺激）および④坐骨神経切断群（非運動群として比較対象とした）に分けた。それぞれ 14 日間の運動を終了後、記憶能を測定し（Barnes 迷路）、腓腹筋、ヒラメ筋および海馬を摘出、抽出し BDNF、IGF-1、irisin および cathepsin B を測定した。

R3 年度プロジェクト研究では運動開始 14 日後において運動群間でマイオカイン発現量に有意な差は見られなかったと報告したが、これは健常ラットで行った解析であったため、R4 年度は軽度脳梗塞モデルラットを用いてデータ採取に着手した。まだ n 数は不十分な段階ではあるが（各運動群 n=3）、電気刺激群で IGF-1 が有意に増加した。また腓腹筋よりもヒラメ筋で運動によるマイオカイン類の増加が顕著に見られたことから、筋特異性も考慮する必要があることが示された。記憶能については運動の種類や強度による差は見られなかったが、いずれの群も非運動群に比べると有意に回復していた。

P 7.

課題番号：R04 基-041

研究課題：コネクチン Novex-3 ノックアウトマウスの心機能悪化機序の解析

研究代表者名（所属）：橋本 謙（生理学1）

共同研究者名：毛利 聡、西松 伸一郎、花島 章、臼居 優

心筋の正常な発生には心筋細胞の分裂と分化という相反する二つのイベントが適切なタイミングで巧妙に調節されることが必須である。心筋細胞は胎児期には活発に分裂し、出生を境に分裂から分化へシフトする。Novex-3 は筋サルコメアに局在する巨大蛋白コネクチンの short isoform であるが、2001 年の発見以来、その生理機能は殆ど不明である。我々は最近、Novex-3 が出生前の胎児期には心筋細胞のサルコメアだけでなく核にも局在し、核に弾性を与えることで柔軟な核を実現し、このことが胎児心筋の分裂を促進している可能性を示した。本研究では、Novex-3 の生理機能を個体レベルで明らかにする為、ゲノム編集技術を用いてノックアウト（KO）マウスを作製し、その表現型を解析した。KO マウスでは、胎児期において心筋分裂が阻害されており、新生児期には心肥大の傾向を認めた。その後、成体期にかけて肥大が進行し、 Ca^{2+} ハンドリングの異常や収縮力低下を伴う心不全に移行し、生存率も低下した。心機能悪化の分子機序を解析したところ、KO マウス由来の心筋細胞では、核の周囲に微小管蛋白 α -tubulin の蓄積が見られ、核の弾性が低下し、硬化しており、このことが胎児期の分裂障害と関連があることが示唆された。一方、微小管と細胞分裂の両方に関与する中心体蛋白群、核ラミン、及びサルコメア蛋白の α -actinin や中間径フィラメント Desmin の分布に異常は認められなかった。以上より、発生早期における

Novex-3 の心筋分裂促進作用は心筋の分裂・分化の制御プログラムの一部を構成しており、正常な心筋の発生と成長に必要であることが分かった。

P 8.

課題番号：R04 基-052

研究課題：サポシン D 変異ニューロンの凍結セルバンク作成と解析

研究代表者名（所属）：石塚 佑太（病態代謝学）

共同研究者名：松田 純子、渡邊 昂

サポシンはリソソームにおけるスフィンゴ脂質の分解において加水分解酵素と共に必須のタンパク質であり、その欠損は重篤なリソソーム蓄積症を引き起こすことが知られている。近年、家族性のパーキンソン病 (PD) 家系にサポシン D (Sap-D) 領域の遺伝子変異が同定され、同様の変異を持つ Sap-D 変異マウスは黒質ドパミンニューロンの変性脱落や小脳プルキンエ細胞の細胞死、 α シヌクレイン蓄積などの PD 様症状を呈する。以上のことから、Sap-D 変異マウス由来のニューロンは PD の分子病態メカニズムを解明するための有用な細胞モデルとなる可能性が高い。そこで本研究では、Sap-D 変異マウス由来の初代培養ニューロンを安定して実験に用いるために、我々が開発したラットニューロンの凍結保存法 (Ishizuka & Bramham, 2020) をマウスに応用し、野生型および Sap-D 変異マウスからニューロンを調製・凍結保存することでセルバンクを構築した。Sap-D 変異ニューロンの初期発達における神経突起の伸長や樹状突起の分枝などを解析した結果、野生型と同等の成熟が見られた。一方、前駆体タンパク質であるプロサポシンや前頭側頭葉変性症の原因因子であるプログリンの細胞内蓄積などの注目すべき表現型を示した。本研究で構築した凍結セルバンクは、実験者の習熟度に関わらず初代培養ニューロンを使用可能にすること (Ready-to-use)、実験データの再現性 (Reproducibility) および信頼性のあるデータ (Reliability) を提供する点や他の遺伝子改変マウスに適用できる点で実用的である。今後は凍結セルバンクを活用し、Sap-D 変異が PD を引き起こす分子病態の解明に取り組む予定である。

P 9.

課題番号：R04 基-054

研究課題：下肢静脈瘤血管内レーザー焼灼術のレーザー波長・特性の違いによる有効性・安全性の比較検討

研究代表者名（所属）：田淵 篤（心臓血管外科学）

【目的】波長 1470nm および 980nm 下肢静脈瘤血管内レーザー焼灼術 (EVLA) の治療成績、有効性、安全性を比較検討する。

【対象、方法】1470nm EVLA：103 肢（2020 年 9 月－2022 年 12 月）および 980nm EVLA：1256 肢（2011 年 10 月－2019 年 12 月）を対象とした。術後 1 日、7－10 日、1、6、12 ヶ月の術後合併症、超音波検査所見による治療血管閉塞（治療成功）、血栓性合併症（深部静脈血栓症、Endovenous heat induced thrombus; EHIT）の有無、Venous Clinical Severity Score による自覚・他覚症状の改善および空気容積脈波検査による静脈機能の改善を両群間で比較検討し、有効性、安全性を評価した。

【結果】術後焼灼部疼痛 1470nm：11.7%、980nm：55.7%、皮下出血 1470nm：10.6%、980nm：26.0%に生じ、1470nm で有意に低値であった。EHIT class3 は 1470nm：0、980nm 1.1%、12 ヶ月の治療血管閉塞率は 1470nm：100%、980nm：98.1%であった。自覚・他覚症状、静脈機能は両群とも術後有意に改善し、両群間で有意差はなかった。

【結語】1470nm EVLA の治療成績、有効性、安全性は 980nm と同等以上で良好であった。

P 10.

課題番号：R04 基-075

研究課題：関節リウマチにおける DNA メチル化ダイナミズムの解明とエピゲノム創薬に向けて

研究代表者名（所属）：中野 和久（リウマチ・膠原病学）

共同研究者名：守田 吉孝、向井 知之

【目的】関節リウマチ（RA）の滑膜構成細胞である線維芽細胞様滑膜細胞（FLS）において、DNA メチル化ダイナミズムを担う DNA 脱メチル化酵素である TET ファミリーを軸に、炎症性サイトカインによる TET 分子の制御とヒストン修飾への関与、これらに基づく FLS の機能の変質を明らかにする。【方法】FLS を使用し、siRNA を用いて TET3 をノックダウンし、TNF 刺激の有無で、網羅的に発現遺伝子の差を評価した。

【結果】FLS において、TNF 刺激の有無、TET3 ノックダウンの有無による 4 群間で発現に有意差が示された遺伝子において、クラスター解析を行った。52 個の *TET3* 介在性 TNF 誘導性遺伝子が抽出され、好中球の遊走に関与する *CXCL8*, *CXCL5* などの CXC-ケモカイン、*MYOCD*, *CNN1*, *ITGB3* などの migration に関与する遺伝子、*LIF* や *IL1B* など炎症をさらに増幅させうる遺伝子、*KIT*, *RELB* などの proto-oncogenes、*IFI44L* や *OAS1*, *RSAD2* などの IFN 誘導性遺伝子、*TNFAIP3* や *FADS2* などの RA リスク SNP 遺伝子の他、*NEFM*, *SCG2*, *NTRK3* などの神経系に関与する遺伝子が見つかった。【結論】RA の FLS において、TNF- TET3 axis はパンプスの構成に重要な遺伝子群の発現調節を担うことが示された。

P 1 1.

課題番号：R04 基-082

研究課題：サルコペニアに対する血中バイオマーカーの樹立

研究代表者名（所属）：宗兼 麻美（神経内科学）

共同研究者名：砂田 芳秀、大澤 裕、西松 伸一郎

ミトコンドリア病 MELAS は、ミトコンドリア DNA のロイシン tRNA（UUR）のクローバーリーフ領域の A3243G 変異による。この変異によりロイシン tRNA ンチコドンの転写後タウリン修飾が障害され、「tRNA 修飾異常病」と捉えられている（Suzuki T, Nat Rev Mol Cell Biol 22, 375-82, 2021）。我々は、タウリン大量経口投与によって、MELAS 患者の末梢血白血球のタウリン修飾率が上昇・脳卒中様発作が抑制されることを報告し（Ohsawa, Sunada, JNNP 90, 529-536, 2019）、薬事承認を取得した。令和 3 年度プロジェクト研究では、MELAS 患者ばかりでなく、健康人においても、末梢血白血球タウリン修飾率が年齢依存性に低下する現象を見出し、老化バイオマーカー特許として権利化に成功した（WO 2017/170300 A1）。令和 4 年度は、ミトコンドリア DNA がコードする 13 種類の蛋白質のうちロイシン含量の最も多い ND6 蛋白質量について末梢血白血球で解析した。修飾率と同様に ND6 蛋白質量は年齢依存性に減少した。この結果は老化によるミトコンドリア機能障害を反映している可能性がある。今後は、老化による骨格筋量減少と相関を示すマーカーについて検索していく。

P 1 2.

課題番号：R04 基-095

研究課題：TGF- β を起点としたサルコペニアの分子発症機構の解明

研究代表者名（所属）：大澤 裕（神経内科学）

共同研究者名：砂田 芳秀、西松 伸一郎、白河 俊一

加齢性筋萎縮（サルコペニア）は、健康寿命ばかりか、寿命をも短縮させる。ところが、サルコペニアで保険適応を獲得している医薬品は、世界的にも皆無である。筋特異的な TGF- β 分子であるマイオスタチンは、筋量を負に制御する。我々はマイオスタチンのシグナル亢進から骨格筋萎縮が惹起される筋ジストロフィー病態を世界に先駆け報告した（Ohsawa, J Clin Invest 116, 2006）。次いで、このシグナル破綻に対し、マイオスタチンを含む複数の TGF- β 分子の膜受容体キナーゼを阻害する低分子化合物を開発し、その経口投与により骨格筋前駆細胞が活性化し、筋萎縮が改善する改善の分子細胞機構を見出した（Ohsawa, Lab Inv 92, 2012）。さらに、本研究では、この化合物を、サルコペニアモデルである長寿蛋白質 α -Klotho を欠損したマウスに投与した。投与により骨格筋の年齢依存性 TGF- β 活性亢進が抑制され、筋分化が促進してサルコペニアが改善、さらに寿命まで延長する驚くべき現象を見出した。そこで「TGF- β 活性亢進によりサルコペニアが誘発される」という新しい病態概念を提唱し、治療介入の POC

を得た。また、長寿蛋白質 α -Klotho が、複数の筋萎縮性 TGF- β 活性を抑制する機構を解明した。

P 1 3.

課題番号：R04 基-101

研究課題：嗅覚障害メカニズム解明の観点からの嗅覚神経回路の微細構造解析

研究代表者名（所属）：樋田 一徳（解剖学）

嗅覚神経回路の最もよく知られた調節系は匂い刺激で、匂い遮断は嗅覚一次中枢嗅球のニューロン構成に影響を及ぼす。本研究は匂い遮断による神経回路への影響について解析した。

外科的に外鼻孔の片側を縫合し匂い伝達を遮断し、鼻閉未処置・鼻閉両側の嗅球における tyrosine hydroxylase (TH) 陽性 GABA ニューロンにおける TH 免疫反応性と GABA のシナプス前部の機能マーカー GABA transporter VGAT の発現を、レーザー顕微鏡による蛍光強度の予備的解析に加えて、超高压電子顕微鏡による銀増感金粒子の細胞内微細空間内定量解析を行った。

鼻閉による TH 発現低下は既報より精度の高い所見が得られた。TH が減少する TH ニューロン内の GABA 発現について従来低下しないとされ、本研究でも著明な変化が見られなかったが、そのシナプス機能マーカーの VGAT は TH ニューロン内で著明な低下が認められた。

最近の研究から、TH ニューロンの TH と VGAT は estradiol 投与による著明な発現上昇がわかっており（下記論文 1）、匂い刺激遮断と内分泌変動による TH ニューロンの興味深い可塑的变化を示す。嗅覚障害は COVID-19 感染後遺症として注目されており、ウイルス感染による嗅覚障害は感染した鼻腔の嗅神経に止まらず、嗅球神経回路にも影響を及ぼしている可能性があり、脳神経回路変化と捉えるべきことが示唆される。

P 1 4.

課題番号：R04 若-002

研究課題：GABA 免疫陽性反応に注目した嗅球ニューロンの新規分類

研究代表者名（所属）：佐藤 慧太（解剖学）

嗅覚の一次中枢である嗅球深層の顆粒細胞層において、抑制性の神経伝達物質である GABA の免疫陽性反応強度には細胞間で大きな差が存在する。このような細胞間での GABA の免疫陽性反応強度の多様性は、新規の神経分類指標となる可能性もあるが、嗅球の一部での報告にとどまっており、既知の神経分類指標との比較、およびその機能的意義も不明である。本研究では、嗅球全層において、GABA 免疫陽性反応強度の多様性を定量的に明らかにし、既知の神経分類指標との比較解析を試みる。

まず、実験条件による変動が少ないと考えられる金粒子標識免疫電子顕微鏡法を用い、嗅球全層における GABA 免疫陽性反応強度を定量的に解析した。結果、既に報告されている嗅球深層の顆粒細胞層だけでなく、糸球体層、外網状層、僧帽細胞層といった嗅球全層において、細胞間の GABA 免疫陽性反応強度に大きな差が存在した。

嗅球の介在ニューロンは、数種類の細胞内に存在するタンパク質によって分類されている。例えば、嗅球浅層で嗅神経からの直接入力を受ける傍糸球体細胞は、チロシン水酸化酵素 (TH) を発現する。本研究では続いて、この TH ニューロンにおいて GFP を発現する TH-GFP マウスを用い、TH ニューロンにおける GABA 免疫陽性反応強度を定量解析した。結果、同じ TH ニューロンであっても、その GABA 免疫陽性反応強度に大きな差が存在した。

— 消化器・代謝・腎 —

P 1 5.

課題番号：R01 基-033

研究課題：機能的 MRI を用いた膵切除術後症例における残膵外分泌能の評価

研究代表者名（所属）：林田 稔（放射線診断学）

共同研究者名：神吉 昭彦、玉田 勉、外園 英光

【序章】

慢性膵炎の進行を予防する上で、形態学的な膵臓の損傷（線維化や腺房細胞・ラ氏島の喪失、膵管径の変化など）を早期に検出することは重要である。膵実質の線維化を高感度に評価できる定量的 MRI の有用性は十分に解明されていない。

【目的】本研究の目的は、膵臓の線維化評価における定量的 MRI の有用性を検討することである。

【方法】

2021 年 5 月～2022 年 4 月に膵臓切除術を予定された患者を前向きに登録し、計 10 名の患者を対象とした。3 テスラ MRI を用いて、プロトン密度脂肪率、T1 緩和時間、見かけの拡散係数および Intravoxel incoherent motion パラメーター（灌流率[f]、真の拡散係数[D]、疑似拡散係数[D*]）を 2 名の腹部放射線科医の合意のもとで腫瘍より膵頭部側の膵実質に関心領域を設定して測定した。また、切除縁に隣接する領域の病理組織学的な線維化の評価を、ImageJ を用いてアザン染色の画像から算出し、膵線維化スコアとした。スピアマンの順位相関係数により、定量的 MRI の指標と膵線維化スコアの関係性を解析した。

【結果】

膵線維化スコアは、T1 緩和時間（スピアマン係数=0.76、P=0.016）と正の相関関係、D（スピアマン係数=-0.76、P=0.016）と負の相関関係を示した。

【結語】

T1 緩和時間と真の拡散係数の測定は、膵臓の線維化評価に有用な可能性がある。

P 1 6.

課題番号：R04 ス-001

研究課題：高脂肪食負荷動脈硬化モデルマウスにおける GLP-1 受容体作動薬の抗動脈硬化作用の検討

研究代表者名（所属）：真田 淳平（糖尿病・代謝・内分泌内科学）

共同研究者名：金藤 秀明、下田 将司、木村 友彦、岩本 侑一郎、岩本 秀幸

【背景・目的】我々は高血糖誘発動脈硬化モデルマウスにおける Dulaglutide (Dula) の抗動脈硬化作用を 2021 年 Scientific reports にて報告した。しかし、Dula による血糖値改善が動脈硬化形成に影響を与えた可能性も考えられた。そのため、Dula による血糖非依存的な抗動脈硬化作用を検討するため動脈硬化誘発飼料を用いて検討を行った。

【方法】動脈硬化モデルであるアポ E 欠損マウスに 8～18 週齢まで動脈硬化誘発飼料（コレステロール 1.25%含有）を与え、10～18 週齢まで Dula または PBS を投与し大動脈弓プラーク面積、大動脈 mRNA 発現を評価した。

【結果】随時血糖値は介入終了時 Control 群と Dula 群で有意差はなかった。脂質評価は総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール値は両群で有意差はなかった。大動脈弓プラーク面積は Dula により有意に進展を抑制し、腹部大動脈での mRNA 発現は、炎症性サイトカイン、細胞接着因子、マクロファージマーカー、iNOS の発現は Dula 群で低下した。eNOS は Dula 群で増加傾向を示した。

【結語】Dula は動脈硬化誘発飼料を与えたアポ E 欠損マウスでも大動脈弓部のプラーク進展を抑制し、血糖非依存的な抗動脈硬化作用が示唆された。mRNA 発現の結果は高血糖誘発動脈硬化モデルマウスでの検討と概ね同じであった。

P 1 7.

課題番号：R04 ス-004

研究課題：ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の抗動脈硬化作用の検討

研究代表者名（所属）：伏見 佳朗（糖尿病・代謝・内分泌内科学）

【背景】アルドステロンは血中濃度の明らかな上昇なしに、ミネラルコルチコイド受容体（MR）シグ

ナルの活性化を招き、高血圧症や酸化ストレスを全身の血管・組織に引き起こす。その活性化は高血圧とは独立した、動脈硬化進展の一因である可能性が示唆されている。これまで MR 拮抗薬であるエサキセレノンについては、腎保護作用や心保護効果の検討などはされているが、抗動脈硬化作用に関する検討はなかった。

【目的】糖尿病状態、非糖尿病状態における MR 拮抗薬の抗動脈硬化作用の分子機構について明らかにする。

【方法】糖尿病状態、非糖尿病状態の動脈硬化モデルマウスに対し、エサキセレノンを投与し各種代謝マーカー、大動脈における動脈硬化への影響について詳細に検討を行った。

糖尿病状態・非糖尿病状態のマウスいずれも 10 週齢からエサキセレノンを混餌投与した。その上で、薬剤介入群・コントロール群に分けて 8 週間介入を継続した。

【結果】どちらのモデルにおいて両群間で介入中に血糖値・体重・摂餌量に差はなかった。また血清脂質や介入前後の血圧に関しても両群間で差はなかった。

大動脈弓部のプラーク面積は糖尿病モデルにおいて、コントロール群と比較して薬剤介入群で有意に小さかった。mRNA は薬剤介入群において IL-6, IL-1 β などの炎症マーカーや CD68 といったマクロファージマーカーが有意に低く、エサキセレノンによる抗炎症作用が抗動脈硬化に作用したと考えた。

P 1 8.

課題番号：R04 基-006

研究課題：ミトコンドリア作動薬イメグリミンの膵 β 細胞・動脈硬化に及ぼす影響の検討

研究代表者名（所属）：金藤 秀明（糖尿病・代謝・内分泌内科学）

共同研究者名：下田 将司、木村 友彦、真田 淳平、岩本 侑一郎、岩本 秀幸

【目的】2 型糖尿病モデルマウスの膵 β 細胞への Imeglimin(Ime)の影響を検討する他、動脈硬化モデルマウスにおいて Ime が抗動脈硬化作用を有するか検討する。【方法】 β 細胞への検討に関しては db/db、KK-Ay マウスに対し Ime を 4 週間投与し、電子顕微鏡で膵 β 細胞内のミトコンドリア、インスリン顆粒を観察した。尿中 8-OHdG で酸化ストレスの評価、TUNEL 染色、realtime PCR でアポトーシス等の評価を行った。動脈硬化への検討に関しては高血糖を誘発したアポ E 欠損マウスに対し Ime を 8 週間投与し、大動脈弓部のプラーク面積や腹部大動脈の mRNA 発現を評価した。【結果】電子顕微鏡では Ime 群は膵 β 細胞内のミトコンドリア形態の膨化などを抑制し、インスリン顆粒数の維持や、良質な顆粒の割合増加を来した。尿中 8-OHdG は Ime 群で低下し、TUNEL 陽性細胞の減少やアポトーシス・炎症マーカーの発現量の減少が Ime 群でみられた。またアポ E 欠損マウスの大動脈弓部のプラーク面積は Ime 群で抑制傾向を示し、腹部大動脈の mRNA 発現量は Ime で炎症マーカーなどの減少がみられた。【結語】Ime は膵 β 細胞のミトコンドリア形態やインスリン顆粒数の維持など有益な効果を示した他、抗動脈硬化作用を有する可能性が示唆された。

P 1 9.

課題番号：R04 基-009

研究課題：Weekly GLP-1 受容体作動薬 デュラグルチドとセマグルチドの実臨床における有効性と安全性の比較

Comparison of clinical efficacy and safety of weekly GLP-1 receptor agonists duraglutide and semaglutide

研究代表者名（所属）：片倉 幸乃（糖尿病・代謝・内分泌内科学）

共同研究者名：木村 友彦、辰巳 文則、下田 将司、中西 修平、宗 友厚、金藤 秀明

【背景/目的】GLP-1 受容体作動薬は多面的効果から第一選択薬となりうる。本邦認可用量でのデュラグルチド(D)とセマグルチド(S)の前向き試験はなく、RCT でその有効性と安全性を明らかにする。

【方法】HbA1c 7%以上の 2 型糖尿病患者を D と S に割り付け、6 ヶ月間観察した。

【結果】対象 107 例の平均年齢 62.7 歳、罹病期間 13.9 年、BMI 29.3kg/m²、HbA1c 8.0%で群間差なし。24 週

後 HbA1c (7.4 vs 6.7%)と S 群で有意に低値, HbA1c 7%未満達成率は S 群で有意に高値(30.8% vs 70.4%). 前後変化は, D 群 vs S 群で HbA1c:8.1→7.4 vs 7.9→6.7%, BMI:29.2→28.8 vs 29.4→28.1 kg/m² と有意に改善. 肝脾 CT 値比 (肝脂肪含量の指標) は 1.00→1.01 vs 0.33→1.09 と S 群のみ有意に改善した. 重回帰分析では Δ HbA1c に対し D 群は年齢,性別, 罹病期間,開始時 BMI,HbA1c,CPI のいずれも有意でなく, S 群では開始時 HbA1c($t=-2.25$, $p=0.035$)のみ有意. 消化器症状は S 群に多く, DTR-QOL は痛みと消化器症状が D 群で優位であった.

【考察】本邦初の RCT から S は D に比し血糖,BMI 低下効果が強く,肝脂肪含量を低下させた.

P 2 0.

課題番号 : R04 基-011

研究課題 : 小腸粘膜内細菌叢と局所サイトカインプロファイルによる Crohn 病の治療効果予測

研究代表者名 (所属) : 半田 修 (消化器内科学)

共同研究者名 : 塩谷 昭子、梅垣 英次、松本 啓志、大澤 元保、松本 正憲、葉 祥元、三澤 拓、笹平 百世

【背景・目的】Crohn 病 (CD) の病態形成には腸内細菌叢を起点としたサイトカインプロファイルの変化が重要な役割を果たしていると考えられている。近年、新規の生物学的製剤が数種類登場したが、その選択基準は確立されていない。本研究では CD で、生物学的製剤投与前の粘膜関連細菌叢 (Mucosa-associated/adherent Bacteria, MAM) と腸管粘膜内のサイトカインを測定し、治療有効例と非有効例を比較し治療効果予測のバイオマーカーを確立することを目的とした。

【方法】2014 年 11 月から 2023 年 1 月の間に同意が得られた当院 CD 症例で、ブラシ鉗子による MAM 採取、生検、採血を行い、生物学的製剤有効例、無効例のそれぞれの MAM、血中サイトカインを比較した。

【結果】MAM においては潰瘍性大腸炎 (Osawa M et al. J Clin Biochem Nutr. 2023 in press) 同様に終末回腸の MAM 内の酪酸産生菌の占める割合が低下しており、特に腸管狭窄や手術歴のある CD 患者では顕著に低下していた。血中サイトカインについては微量であり、有意な結果は得られておらず、現在、生検検体中の mRNA の測定を検討中である。

【結語】CD の MAM では酪酸産生菌の占める割合が低下しており、腸管内の嫌気環境が保たれていないことが推察された。

P 2 1.

課題番号 : R04 基-028

研究課題 : 2 型糖尿病治療における効果的な運動指導を探索するための多面的検討 : 糖尿病専門施設との前向き観察共同研究

研究代表者名 (所属) : 中西 修平 (糖尿病・代謝・内分泌内科学)

共同研究者名 : 金藤 秀明、辰巳 文則

2 型糖尿病の治療は食事療法、運動療法を基盤とし、薬物療法を加える形で行われる。当院では端末内の加速度センサーが感知する歩数計や端末と同期するスマートウォッチ、家電量販店で廉価で入手可能な歩行強度計、また当科より貸与した歩数計を使用し、外来患者の運動のモニタリングに活用している。また、患者の筋力を簡便に評価する目的で握力測定を行い、結果を糖尿病の運動指導へ応用している。

今回これらのデータを複数の施設で蓄積させ、前向きに経過を観察する研究を開始した。現在症例蓄積が進んでおり、経過中の横断解析結果について、握力が腹囲・内臓脂肪と負の関連を認め、さらには糖尿病管理状況を示す HbA1c と正の関連を認めるという興味深い知見を得た。すなわち糖尿病診療において、患者の筋力を示す指標である握力が、糖尿病治療の規定因子になりうることを示唆している。この結果は日本糖尿病学会中国四国地方会第 60 回総会にて発表した。さらに、抗糖尿病薬の影響を除外するため薬物治療を受けていない患者に絞った検討を行ったところ、やはり同様の結果が得られた。したがって、2 型糖尿病患者の握力の評価が疾病管理に有用であることを強く示唆する結果と思われ、第 66 回日本糖

尿病学会年次学術集会で発表予定とした。今後、横断研究で得られた上記の関連が治療介入の影響をどのように受けるか詳細な検討を行う観察研究が必要であると考えられた。

P 2 2.

課題番号：R04 基-030

研究課題：画像強調処理 LCI (Linked Color Imaging) を用いた胃癌発生高リスク群の内視鏡診断に関する研究

研究代表者名（所属）：梅垣 英次（消化器内科学）

共同研究者名：塩谷 昭子、松本 啓志、半田 修、大澤 元保、松本 正憲、葉 祥元、三澤 拓、笹平 百世

H. pylori は胃癌のリスクファクターであり、さらに *H. pylori* 除菌後に出現する地図状の発赤胃粘膜は胃癌との鑑別が大変困難であり、除菌後胃癌のリスク因子であることも報告されている。除菌後に発生する発赤胃粘膜の腸上皮化生に関する組織学的検討および内視鏡による色値の特性を検討した。その両者の関連性を解明することにより、早期胃癌診断および癌発生リスクを予測することが可能になる。予防医学の観点からも、内視鏡観察による胃発がんのリスクを層別化することは極めて重要なことと考える。そこで、*H. pylori* 除菌治療後の胃粘膜に発生する領域性を有する発赤に対して以下の項目を検討した。

①消化管内視鏡健検査の通常白色光(WLI)および特殊光(LCI)で観察される色値、周囲粘膜との色差 ②発赤粘膜の生検材料より、組織構造〔組織炎症度(updated Sydney system)、腸上皮化生の種類、免疫組織化学染色〕の検討 ③内視鏡で得られる色値と組織構造の関連性

その結果、腸上皮化生の色値において、胃癌の既往のある患者とない患者、胃腸混合型腸上皮化生と腸型腸上皮化生において有意な差を認めた。また胃癌の既往のある患者では胃腸混合型腸上皮化生の占める割合が有意に高値であった。一般的に、胃腸混合型腸上皮化生は腸型腸上皮化生と比較して胃発がんのリスクが高く、この結果は胃がん高リスクを予測するマーカーに成りうる可能性が示唆された。今回の結果は第 28 回日本ヘリコバクター学会および第 27 回岡山リサーチパーク研究・展示発表会で発表し、研究継続中である。

P 2 3.

課題番号：R04 基-044

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）

共同研究者名：玉田 勉、檜垣 篤、木戸 歩、金藤 秀明、中西 修平、柏原 直樹、佐々木 環、長洲 一、板野 精之

Purpose: The purpose of this study was to identify the changes related to glomerular hypertension in multiparametric magnetic resonance imaging (MRI) findings for evaluating early diabetic nephropathy.

Methods and Methods: The study subjects (N=58) included 35 patients with early diabetic nephropathy (hyperfiltration stage) and 23 healthy volunteers. All subjects underwent non-contrast MRI using a 3-Tesla MRI machine. Measurements were made of the renal cortex and renal medulla T1 values, T2 values, blood oxygenation level dependent (BOLD) imaging (T2* values and R2* values), intravoxel incoherent motion (IVIM) imaging (ADC, f, D* and D values), arterial spin labeling (ASL) as well as optimal inversion time (TI) (= TI of maximum corticomedullary contrast ratio (CMR = signal intensity (SI) of cortex / SI of medulla)) and inverted TI value (value of TI that inverts the renal cortex and renal medulla SI) on steady-state free precession (SSFP) with inversion recovery (IR) pulse with multi TI (TI = 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800 msec). A total 21 parameters were

compared between healthy groups and early DN group.

Results : A significant difference between healthy groups and early diabetic nephropathy group was seen in T2 values of cortex (mean $\pm$ SD: 101.28 $\pm$ 9.59 msec vs. 107.76.0 $\pm$ 11.39 msec; p=0.041) and parameters derived from SSFP with IR pulse with multi TI, inverted TI (mean $\pm$ SD: 1240.9 $\pm$ 66.6 msec vs. 1278.6 $\pm$ 62.2 msec; p=0.029) and optimal TI (mean $\pm$ SD: 1395.5 $\pm$ 72.2 msec vs. 1437.1 $\pm$ 70.0 msec; p=0.019). No other 18 parameters showed significant differences between healthy groups and early DN group. There was no significant difference in renal cortical thickness, but it showed a large value in the hyperfiltration stage.

Conclusion : T2 value of cortex and parameters derived from SSFP with an ssIR pulse, inverted TI and optimal TI might sensitively capture the changes in glomerular hypertension related changes of the renal cortex in early diabetic nephropathy, can be used to evaluate early diabetic nephropathy non-invasively and in a short period of time.

P 2 4.

課題番号 : R04 基-066

研究課題 : 腹膜透析関連腹膜炎後の慢性炎症と腹膜劣化の関与について

研究代表者名 (所属) : 角谷 裕之 (総合老年医学)

共同研究者名 : 平野 憲、柏原 直樹

【背景】腹膜透析 (PD) 普及の障壁となるのは、長期継続に伴う腹膜機能低下・腹膜線維化、被嚢性腹膜硬化症 (EPS) を合併することである。近年の PD 液は、生体適合性に優れた中性液が幅広く使用されており、本邦における EPS は減少している。しかしながら、一定数の EPS 症例が報告されており、その原因の約 90% は PD 関連腹膜炎であることが判明した。すなわち腹膜炎発症自体が EPS への進展に影響を及ぼしている可能性が示唆されるが、その原因については不明である。

【目的】PD 関連腹膜炎発症後の慢性炎症にインフラマソーム活性化が関与しており、その後の腹膜劣化に影響を及ぼしている可能性について検討した。

【方法・検討項目】抗菌薬投与で臨床的に治癒した 5 症例と対象群として腹膜炎非発症の PD 患者 5 症例の PD 排液を採取した。また、PD 関連細菌性腹膜炎を発症した直後の PD 排液も採取した (3 症例)。インフラマソームが活性化することで放出される炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-18) の発現量を ELISA で評価した。

【結果】まず、PD 関連細菌性腹膜炎を発症した直後の PD 排液中の IL-1 β 、IL-18 は顕著に増加していた。興味深いことに、抗菌薬投与で臨床的に腹膜炎が治癒した 5 症例についても PD 排液中の IL-1 β 、IL-18 の発現量は腹膜炎発症極期と比較して減少しているものの高値を推移していた。

【結論】PD 関連腹膜炎発症後もインフラマソーム活性化が持続しており、EPS 発症に寄与している可能性が示唆された。

P 2 5.

課題番号 : R04 基-069

研究課題 : 小腸の脂質吸収におけるフィトセラミド構造の機能解析

研究代表者名 (所属) : 渡邊 昂 (病態代謝学)

共同研究者名 : 松田 純子

スフィンゴ糖脂質のセラミド骨格は、長鎖塩基と脂肪酸部分から構成され、それぞれに構造多様性がある。長鎖塩基の C4 位に水酸基が付加したフィトセラミド構造は、小腸・腎臓・膀胱の上皮に豊富に存在する。本研究では、Dihydroceramide:sphinganine C4-hydroxylase (DES2) のノックアウト (*Des2* KO) マウスを用いてフィトセラミド構造の欠損による小腸上皮の機能変化を解析した。まず、野生型マウスと *Des2* KO マウスの小腸組織から抽出したスフィンゴ糖脂質を TLC および LC-MS で解析した。その結果、野生型マウスにおいて、グルコシルセラミド、アシアロ GM1 (GA1)、フコシル GA1 に存在するフィトセラ

ミド構造が *Des2* KO マウスにおいてはその大部分が欠損し、ジヒドロセラミド構造に置き換わっていた。野生型マウスと *Des2* KO マウスに通常食と高脂肪食を給餌して比較した結果、通常食では両者に体重増加の差は見られなかったが、高脂肪食では *Des2* KO マウスは野生型マウスに比して体重増加が緩やかで、体脂肪や肝脂肪の程度も有意に減少していた。また、*Des2* KO マウスでは、血中コレステロールが低下し、インスリン抵抗性と肝機能障害が改善した。NBD-stearic acid を用いて脂肪酸の取り込みを比較した結果、*Des2* KO マウスの小腸上皮において有意に脂肪酸の取り込みが低下していた。これらの結果より、フィトセラミド構造は小腸上皮における脂質吸収に重要な役割があると考えられる。

P 2 6.

課題番号：R04 基-002

研究課題：NASH におけるミトコンドリア品質管理が肝筋連関を介した運動抵抗性に及ぼす影響の検討
研究代表者名（所属）：仁科 惣治（消化器内科学）

【目的・方法】非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は増加の一途であるが、いまだ有効な薬物治療が確立されていないため生活習慣の改善、とりわけ運動療法の重要性が高まっている。運動による健康増進効果の分子機構としてミトコンドリアで産生される活性酸素種がシグナル分子として機能する mitohormesis が明らかにされている。近年、運動の効果が十分に発揮されない、いわゆる運動抵抗性を引き起こす機構として肝臓で産生される selenoprotein P (SeP) が骨格筋における mitohormesis を抑制することが明らかにされている。そこで我々は NASH マウスモデル（DMBA 塗布+高脂肪食負荷マウス）を用いて、運動抵抗性が改善するか否かを明らかにした。

【結果】コントロールマウスと比べて NASH マウスでは肝臓での SeP 発現が亢進していたが、DFP 投与によりそれが低下した。また、NASH マウスではトレッドミル運動負荷に対する運動抵抗性（走行距離低下）を認めたが、DFP 投与によりそれが改善した。さらに、NASH マウスでは骨格筋（下腿三頭筋）の ROS 産生が低下していたが、DFP 投与によりそれが増強された。

【結論】NASH においては、肝臓での SeP 産生分泌による骨格筋の ROS 産生低下を介した運動抵抗性を来し、それに対して鉄キレート剤が肝臓からの SeP 産生を抑制し運動抵抗性を改善する可能性が示唆された。

— 腫瘍 —

P 2 7.

課題番号：30 基-047

研究課題：CAGE 解析による子宮頸がん関連線維芽細胞の網羅的 RNA 転写開始点の解析ーリンパ節転移阻害剤の開発を目指して

研究代表者名（所属）：村田 卓也（産婦人科学）

共同研究者名：下屋 浩一郎

【序論】がん関連線維芽細胞（以下、CAF と略す）はがん細胞の増殖、浸潤、転移、治療抵抗性に関与している。CAF がこうした性質を誘発するには、がん細胞により遺伝子発現が劇的に変化している可能性がある。そこで、CAGE 法による遺伝子発現解析を行い、がん細胞の共存下において CAF で強力に作動するエンハンサーとプロモーターを明らかにする試みを行ったので報告する。

【方法】子宮頸がん培養細胞の ME180 株と子宮頸がん患者由来の初代培養細胞である CCF-1 細胞を用いた。CCF-1 細胞を 2 次元培養し、チャンバー中で ME180 株を 3 次元コラーゲンゲル培養した。7 日間共培養し、CCF-1 細胞から mRNA を調製し、CAGE 解析を行った。対照として ME180 株非存在下の CCF-1 細胞の mRNA を解析した。それぞれ 3 検体の CAGE 解析を行った。

【結果】共培養 CCF-1 細胞および単独培養 CCF-1 細胞の合計 9 検体で十分な純度のある mRNA が得られた。解析の結果、共培養 CCF-1 細胞の 1 検体は対照と比較して統計学的に有意な差があると認められた。CXCL6 遺伝子のプロモーターが共培養 CCF-1 細胞で強く作動していた。

【結論】がん細胞の共存下において CAF の細胞内でプロモーター・エンハンサー強度が変化するのかわかひはさらなる検討が必要である。

P 2 8.

課題番号：R04 基-022

研究課題：術前薬物療法前後の乳癌組織の生物学的変化を用いた予後予測ツールの開発

研究代表者名（所属）：山本 裕（乳腺甲状腺外科学）

共同研究者名：小池 良和、森谷 卓也

目的：原発乳癌に対する術前薬物療法(NAC)は、適応が拡大してきている。NAC の効果の評価としては、病理学的完全奏効 (pCR)の有無が重要視されている。しかし、non-pCR 症例の予後は様々であり、予後を予測できる因子が確立すれば、術後の追加治療の必要性を判断できる。そこで、non-pCR 例の予後を予測する因子を解析した。

方法：当科で 2010 年 1 月～ 2019 年 12 月に NAC を受けた原発乳癌 141 症例 を後方視的に調査した。予後に影響することが予想される臨床病理学的因子で群分けし、無再発生存率 (DFS)、全生存率 (OS)を検証した。

結果：対象患者の年齢の中央値は 54 歳(28 -79 歳)、臨床病期は stage I 1 例、II 67 例、III 73 例、サブタイプは HR 陽性 /HER2 陰性が 58 例、HR 陽性 HER2 陽性が 13 例、HR 陰性 HER2 陽性が 27 例、HR 陰性 HER2 陰性が 38 例 で、アントラサイクリン薬剤 (A)単独使用が 10 例、A とタキサン系薬剤 (T) 使用例が 82 例、T 単独使用例が 1 例、抗 HER2 薬使用例が 38 例であった。全例における pCR は 22.7% (32/141) であった。Non-pCR 例における DFS の予測因子としては、単変量解析では NAC 前の臨床病期III、臨床的治療効果が NC/PD、NAC 後の遺残腫瘍の核異度 (NG)III、組織学的異型度 (HG) III、Ly 陽性、V 陽性が有意の再発危険因子であった。多変量解析の結果、NGIII、臨床病期III、臨床的治療効果が NC/PD が抽出された。NG I / II、臨床病期 I / II、治療効果 cCR/cPR の 22 症例の 5 年 DFS は、それ例外の症例に比べ有意に良好であった (95.0% vs. 61.2%, P = 0.0033)。OS の予測因子としては、単変量解析 では臨床的治療効果が NC/PD、NAC 後の遺残腫瘍の NGIII、HGIII、Ly 陽性、V 陽性、Ki67 標識率 10%以上、トリプルネガティブが有意の死亡危険因子であった。多変量解析では、NG III、臨床的治療効果が NC/PD が抽出された。NG I / II、治療効果 cCR/cPR の 59 症例の 5 年 OS は、それ例外の症例に比べて有意に良好であった (91.7% vs. 73.2%, P = 0.0006)。

考察：今回の解析結果により、術前薬物療法の術前臨床病期、臨床的治療効果、遺残腫瘍の NG を考慮することにより、pCR 症例と同等の予後を期待できる症例を絞り込むことが可能であることが示された。

さらに治療による乳癌組織の生物学的変化として、アポトーシス細胞比率 (TUNEL 染色)、癌幹細胞比率 (ALDH 染色)、epithelial-mesenchymal transition (EMT) (E-cadherin, Vimentin, ZEB1 染色) を、また間質組織の反応として、TILs とその分画 (CD8+, CD4+, FOXP3+) 等を免疫染色で検討し、予後との関連を探索的に解析して発表する。

P 2 9.

課題番号：R04 基-038

研究課題：骨髓系腫瘍の遺伝子解析と発症に関与するシグナル分子の機能解析

研究代表者名（所属）：北中 明（検査診断学（病態解析））

共同研究者名：通山 薫、辻岡 貴之、末盛 晋一郎

骨髓系腫瘍の病態解明を目的として、臨床検体の解析と新規治療標的分子の探索を継続している。今年度は、骨髓増殖性腫瘍 (MPN) の変異解析を中央検査部で実施可能とした。骨髓異形成症候群については、塗抹標本を用いた *SF3B1* 変異解析の精度が実用レベルにまで向上した。

基礎研究として、変異 *CALR* が *MPL* シグナルを活性化する機序について、*CALR* 変異導入 F-36P-MPL 細胞、293T 細胞を使用して、重要分子の同定を実施した。サイトカイン非存在下における *CALR* 変異導入 F-

36P-MPL 細胞の増殖を指標として、阻害薬を用いた解析を実施した結果、JAK2 とは異なったチロシンキナーゼである Src ファミリーの阻害薬が細胞増殖を抑制することを見出した。Src 特異的阻害薬 PP2、Bcr-Abl/Src 阻害薬ボスチニブは、ともに *CALR* 変異導入 F-36P-MPL 細胞の増殖を抑制した。また、レポーターアッセイ系に Src 阻害薬およびドミナント・ネガティブ変異体 *src* を導入したところ、*CALR* 変異による STAT5 の転写活性が抑制された。*CALR* 変異導入 F-36P-MPL 細胞において、Src ファミリーの 1 つである Lyn を特異的に抑制したところ、*CALR* 変異依存性の細胞増殖が抑制された。以上から、変異 *CALR* によって引き起こされる MPL を介した情報伝達機構に Lyn が重要な役割を果たしている可能性が示された。

P 3 0.

課題番号：R04 基-088

研究課題：癌性腹膜炎に対する新規治療法の開発

研究代表者名（所属）：永坂 岳司（臨床腫瘍学）

共同研究者名：谷岡 洋亮、岡脇 誠、矢野 修也

難治性癌性腹水を有する固形癌患者から説明同意を得て、腹水を採取し、腹水中のがん細胞、リンパ球細胞、および線維芽細胞の共培養を 2・3 週間行った後に、DAC をリンパ球細胞に連日投与（培地内の濃度は初期条件設定により 10uM と設定）を行った。現在まで収集されたのは、大腸癌患者 3 名、胃癌患者が 5 名である。腹水中のがん細胞、リンパ球細胞、および線維芽細胞の共培養は大腸癌患者では全例が問題なく培養可能であったのに対し、胃癌患者では 5 例中 3 例のみが培養可能であった。この培養が可能であった 6 例に関しては、驚くべきことに、DAC を投与したリンパ球細胞の *viability* はコントロールの未投与群に比べると平均 4 倍を得た。また、DAC を投与したリンパ球細胞は癌細胞に集簇する傾向を示し、抗腫瘍効果を強く認めている。また、DAC 投与前後のリンパ球の DNA を抽出し、Naive/Memory-associated と Effector-associated genes におけるメチル化の解析を行ったところ、Effector-associated genes の 1 つに T cell stage と相関する動向を示すメチル化の変動を認めた。この Effector-associated gene のメチル化の変動で、Naive/Effector/Exhausted といった T 細胞の Stage を予測することが可能になることが推測された。これまでの興味深い知見として、cold tumor の代表格である、non-MSI 大腸癌において、DAC 処理によるリンパ球の Exhausted→Effector への再活性化のみで、抗腫瘍効果が劇的に改善することが確認されている。また、この変動を予測するバイオマーカーの存在も確認できている。

P 3 1.

課題番号：R04 若-001

研究課題：小胞体ストレス応答と脂質メディエーターのクロストークによるがん悪性化機構の解明

研究代表者名（所属）：北風 圭介（薬理学）

【背景・目的】グリセロホスホジエステラーゼ（GDE）4 および 7 は小胞体に局在する脂質代謝酵素であり、がんの浸潤・転移などに関わる脂質メディエーターとして知られるリゾホスファチジン酸を産生する。最近、低酸素ストレス下で GDE7 発現が亢進する可能性が報告されたが、GDE4 発現を制御する機序は不明である。一方、小胞体ストレス応答（UPR）は PERK、IRE1 α および ATF6 の 3 経路を介して小胞体の恒常性を維持する適応応答機構である。以上をもとに、本研究では UPR 転写因子が GDE4 の発現を制御するという仮説を検証した。

【方法】ヒト前立腺がん細胞株にタプシガルギン（TG）を処理して UPR を活性化させ、GDE4 発現を評価した。また、TG と同時に PERK、IRE1 α あるいは ATF6 阻害薬を加えた場合についても検討した。また、ChIP-Atlas を用い、GDE4 のプロモーター領域に結合する転写因子を予測し、該当配列をゲノム編集で欠失させた。

【結果・考察】GDE4 発現は TG 処理により顕著に増加し、PERK 阻害薬を加えたときにのみ抑制された。データベース解析により PERK 経路下流の転写因子が見出され、ゲノム編集によりこの転写因子に対する結合配列の一部を欠失させたところ、GDE4 の発現レベルは野生型に比べて低下していた。以上の結果よ

り、UPR 転写因子が GDE4 の発現を亢進すると考えられた。

P 3 2.

課題番号：R04 基-072

研究課題：悪性中皮腫リスク抽出診断方法の実用化に向けた基盤研究

研究代表者名（所属）：伊藤 達男（衛生学）

共同研究者名：清水 由梨香、山崎 晃

【研究目的】

BAP1 症候群にて認められるがん抑制因子 BAP1（BRCA1 結合タンパク質 1）の体細胞変異が悪性胸膜中皮腫（MPM）の患者組織で高頻度に認められたことは重大な発見であった。BAP1 は緩慢ながん抑制因子であり、生殖細胞変異による家族性がん症候群として、アスベスト暴露を伴わない MPM も来す。当研究計画では BAP1 タンパク質のリン酸化と遺伝子損傷の関係を明らかにすることで、BAP1 症候群での発がんメカニズムの解明を目指した。

【研究結果】

- ・ 正常ヒト間葉系幹細胞 Met5A および MPM 細胞株 H-Meso において、BAP1 ノックダウンが DNA 損傷の増加と関連し、紫外線照射によるさらに DNA 損傷を増強することを見いだした。
- ・ 二本鎖 DNA 損傷により、H-Meso 細胞では BAP1 タンパク質の核発現が顕著になり、更に BAP1 タンパク質のセリン 395 でリン酸化されることがわかった。MPM 細胞でドミナントネガティブ BAP1C91W を発現する MPM 細胞では、DNA 損傷時に DNA-PKcs の強いポリユビキチン化が観察されたが、野生型 BAP1 存在下ではこのポリユビキチン化は観察されなかった。

【結論】 BAP1 は DNA 修復における役割を示し、BAP1 遺伝子変異は MPM がん化におけるドライバー変異である可能性を示した。

— 環境と生体反応 —

P 3 3.

課題番号：R04 基-031

研究課題：老化関連遺伝子 p16 コンディショナルノックアウトマウスを用いた肺線維化におけるマクロファージ老化の役割の解明

研究代表者名（所属）：竹之内 康広（薬理学）

共同研究者名：岡本 安雄

肺線維症はコラーゲンなどの細胞外マトリックスの過剰な沈着により引き起こされる予後不良の疾患である。また、様々な加齢関連疾患の発症や病態悪化において老化細胞の関与が強く示唆されている。これまでに我々は、ブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスの肺のマクロファージ（Mφ）と肺胞上皮細胞において、重要な老化誘導因子である p16 陽性の老化細胞を多く観察している。しかし、それぞれの細胞の老化が線維化に及ぼす影響は明らかになっていない。本研究では、Mφ 特異的に p16 発現を欠損したマウス（cKO）を用いて、Mφ の老化が肺の線維化に関与するか否かを検討した。cKO および対照マウスにブレオマイシンを気管内投与することにより肺線維症モデルを作製し、肺の摘出および気管支肺泡洗浄液（BALF）の回収を行った。肺線維化の指標である BALF 中の細胞数およびタンパク量はブレオマイシン投与により増加が認められたが、cKO は対照群に比べ高い値を示した。次に、肺組織切片を用いて HE 染色およびコラーゲンを染めるマッソントリクロム染色を行った。その結果、ブレオマイシン投与により cKO でも対照群でも間質や肺胞への細胞浸潤の増大およびコラーゲン蓄積が見られたが、対照群に比べ cKO の方がこれらの所見がより多く見られた。以上の結果から、ブレオマイシン気管内投与肺線維症モデルマウスにおいて、p16 を介した Mφ の老化は肺の線維化を抑制する可能性が考えられた。

P 3 4.

課題番号：R04 基-045

研究課題：炎症性皮膚角化症「乾癬」と脂肪肝炎との炎症相互関連の解明と新規治療戦略の探索

研究代表者名（所属）：向井 知之（免疫学）

共同研究者名：井関 将典、金藤 秀明、仁科 惣治

背景・目的：非アルコール性脂肪肝炎（NASH）と乾癬は、その発症率・重症度において双方向に関連することが臨床研究により示されている。しかし、その機序は明らかではない。本研究では、マウスモデルを用いて、NASH と乾癬の双方向の因果関係を解析した。

方法：生後 2 日目にストレプトゾトシンを注射し、高脂肪食を与えることで NASH を誘発した。乾癬はイミキモドの耳への局所塗布により誘発した。

結果：乾癬のある NASH マウスと無い NASH マウスでは、肝組織障害の程度に差はなかった。一方、NASH が存在すると、乾癬マウスの表皮過形成が有意に悪化した。乾癬マウスの炎症皮膚では炎症性サイトカインが発現し、特に *Il23a*、*Il1b*、*Il36g*、*Mip2* の遺伝子発現は NASH の併存により有意に増強された。血清 TNF- α と IL-17 レベルは、NASH と乾癬の併存によって上昇した。血清アディポネクチン値は、NASH マウスで減少していた。正常ヒト角化細胞培養において、TNF- α と IL-17A は相乗的に *CXCL1*、*CXCL8*、*IL1B*、*IL6* 遺伝子の発現を増強した。それらの遺伝子発現増強はアディポネクチン受容体アゴニストの投与により抑制された。

結論：NASH の併発は、乾癬性皮膚病変を増悪させた。炎症性サイトカイン上昇とアディポネクチン低下は、表皮角化細胞における自然免疫応答を促進したと考えられた。

P 3 5.

課題番号：R04 基-047

研究課題：マンソン裂頭条虫クローン株の各発育ステージにおける遺伝子発現パターンの比較解析

研究代表者名（所属）：沖野 哲也（微生物学）

共同研究者名：後川 潤、齊藤 峰輝

【背景・目的】我々は、イヌ・ネコを終宿主とするマンソン裂頭条虫（サナダムシ）のライフサイクルを実験室内で完成させ、世界で初めて単一クローン条虫株の増幅・維持システムを確立した (Okino et al, 2017)。本虫のクローン化の成功により、本虫のバイオリソース活用が可能となった。本研究の目的は、本虫クローン株の遺伝子発現パターン情報を網羅するための基になる全ゲノム情報を取得することである。【方法】マウス体内で維持していた幼虫から DNA を抽出し、ライブラリー調製とシーケンシング解析（受託解析）を行った。【結果・考察】PacBio Sequel IIe を用いてシーケンシングした結果、リード数 2,384,100、総塩基数 26,323Mp を得、ゲノムアセンブルで 4203Kb の N50 を含む 1017 の配列から構成される 997.99Mb のリファレンスゲノム配列を得た。これまでに、Kikuchi et al (2021) は、山口県産の野生のシマヘビ由来の幼虫の全ゲノム (PRJEB35375) を解読し約 8 億塩基対（遺伝子数 22,162 個）を、また、Bennett et al (2014) は、英国在住の中国人の脳由来のマンソン孤虫（幼虫）の全ゲノム (PRJEB1202) を解読し約 12 億塩基対（遺伝子数 39,039 個）を報告しており、本材料で得られた全ゲノムサイズは、約 10 億塩基対で両者の中間の値である。

P 3 6.

課題番号：R04 基-048

研究課題：マウスモデルを用いた単純ヘルペスウイルス感染における皮膚の役割と感染後の急性炎症を惹起するメカニズムの解析

研究代表者名（所属）：山本 剛伸（皮膚科学）

共同研究者名：青山 裕美、浅沼 由美子

単純疱疹は、単純ヘルペスウイルス (HSV) 感染により臨床的に小水疱を形成し、病理組織学的に表皮内にウイルス性多核巨細胞と周囲に多数の炎症細胞の浸潤を認めるが、その詳細な病態は不明である。

C57BL/6 マウスに様々な条件で HSV-1 を経皮的に感染させ、皮疹、発汗状態を血清抗 HSV-1 抗体とともに確認した。

HSV-1 接種部位に皮疹(びらん、潰瘍)を形成し、足底の発汗障害が認められた。感染後マウスに温熱負荷を行うと、さらに強い発汗障害が誘導された。組織学的に汗腺周囲にリンパ球様単核球を中心とする炎症細胞の浸潤と汗腺の管腔が拡大していた。HSV-1 感染で血清抗 HSV-1 IgG 抗体が確認されたが、再感染させると抗 HSV-1 IgG 抗体は強く誘導され、発汗障害や皮疹の形成が強く抑制された。また汗腺周囲の炎症細胞浸潤は軽度であった。HSV-1 感染と同時に抗 HSV-1 IgG 抗体含有マウス血清を皮下投与したところ、HSV-1 再感染時と同様の結果が得られた。

HSV-1 が表皮基底細胞に感染した後、接触している表皮細胞間の感染拡大をきたすとともに、神経を介して、神経節で潜伏感染の成立、足底の発汗障害を形成する。感染初期は非特異的免疫がウイルス感染拡大を阻止し、遅れて HSV-1 特異的免疫が誘導される。その中でも抗 HSV-1 IgG 抗体は HSV-1 感染に伴う発汗障害や皮疹形成(急性炎症)を抑制する。

P 3 7.

課題番号：R04 基-073

研究課題：免疫細胞の疲弊・老化に焦点を当てた HTLV-1 による発がん及び慢性炎症の病態解明

研究代表者名(所属)：齊藤 峰輝(微生物学)

共同研究者名：内藤 忠相

【目的】ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) は CD4+T 細胞に感染し、長い潜伏期を経て主に高齢者に成人 T 細胞白血病 (ATL) または慢性炎症性疾患の HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) を発症させる。HTLV-1 感染が CD4+T 細胞の老化を促進し、発症に寄与する可能性を検証する。

【方法】老化制御遺伝子 Menin, Bach2 について、HTLV-1 感染または非感染 T 細胞株、患者及び無症候性キャリアー (AC) の末梢血単核球 (PBMC) における発現動態を、mRNA 及び蛋白レベルでの発現定量、細胞増殖試験、免疫沈降法、蛍光免疫染色で解析した。

【結果】検討した 8 つの HTLV-1 感染 T 細胞株全てで Menin 蛋白質が発現していたが、Bach2 は 8 株中 5 株で発現を認めなかった。HTLV-1 感染者 (HAM 及び ATL 患者、AC) の PBMC では Menin, Bach2 双方の mRNA レベルが非感染健常人より有意に低下していた。Tax および HBZ はそれぞれ Menin, Bach2 の双方と蛋白レベルで相互作用した。Menin 阻害剤による細胞増殖抑制効果が異なる 2 つの HTLV-1 感染 T 細胞株では、Tax 及び HBZ の細胞内局在が異なっていた。

【考察】HTLV-1 感染により、細胞増殖を制御する Menin-Bach2 経路の Tax と HBZ を介した機能的変化が誘導され、HTLV-1 関連疾患の発症に関与する可能性が示唆された。

P 3 8.

課題番号：R04 基-076

研究課題：全身性強皮症における皮膚病変の経時的総合評価ツールの検討

研究代表者名(所属)：藤田 俊一(リウマチ・膠原病学)

共同研究者名：守田 吉孝、中野 和久、青山 裕美

【目的】全身性強皮症 (SSc) は、自己免疫異常、血管障害、線維化を特徴とする膠原病である。SSc の進行性皮膚硬化に対して、リツキシマブ (抗 CD20 抗体) が保険適応となったが、治療適応を考える上で皮膚病変の正確な評価が必要である。一方で、客観的に SSc の皮膚病変を評価可能な画像ツールは存在しない。今回、皮膚の血管構造を詳細に観察・評価可能な超音波イメージングシステムであるラスタースキャン型超音波メゾスコープ (RSOM) を用いて、従来の皮膚病変の評価法との相関性を検討する。【方法】川崎医科大学附属病院リウマチ・膠原病科および皮膚科通院中の SSc 患者を対象とする。RSOM 所見と従来の評価法 (スキンスコア、爪上皮所見など) を評価し、治療前後の血清のサイトカインの推移とともに皮膚内臓臓器病変との関連性を評価する。【結果】現在、SSc 症例 2 例と健常人 1 例に対して RSOM の評価を行った。リツキシマブ治療を 11 例に行い、観察期間 6 ヶ月以上の 6 症例中スキンスコアの改善例は 1 例のみ

であった。一方で、6 症例全てで新規皮膚潰瘍の出現はなかった。【結論】B 細胞除去療法であるリツキシマブ治療は、皮膚硬化の改善に至る症例は少ないものの、微小血管障害を改善させ、新規皮膚潰瘍の出現を予防できる可能性が示唆された。症例を蓄積し、RSOM 所見と皮膚病変、特に血管障害に注目し、リツキシマブ治療前後のサイトカインの推移を含めて検討する。

P 39.

課題番号：R04 基-098

研究課題：悪性中皮腫の免疫チェックポイント阻害薬治療効果に関わる新規免疫機能遺伝子の探索

研究代表者名（所属）：西村 泰光（衛生学）

共同研究者名：伊藤 達男、山内 明

免疫チェックポイント阻害薬であるニボルマブは悪性中皮腫にも適応され効果を示すが、治療効果は一様では無い。そこで、中皮腫患者の末梢血における免疫動態の解析を行い、関連する免疫機能遺伝子を探索した。悪性中皮腫患者採血よりソートされた CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、NK 細胞の培養上清中のサイトカイン産生プロファイルから、ニボルマブ治療 PR 症例における特徴が観察された。更に、ニボルマブ治療後の免疫動態について、PR 症例に注目して末梢血リンパ球の遺伝子発現解析を行った。PR 症例の CD8+ CTL では PDCD-1 と刺激後の UBE2E3 が、NK では NKp46 が、Th では刺激後の TNF- α が特徴的な発現量の変化として捉えられた。PR 症例ではニボルマブ治療より PDCD-1 を発現する疲弊 CTL が減少し、高い細胞傷害性を持つ CTL の分化誘導が促進されたと理解できる。UBE2E3 はユビキチン結合酵素 E2 の 1 つであることから、CTL におけるユビキチン・プロテアソーム系を介した細胞傷害性誘導の機序が示唆される。それらの特徴は主成分分析の結果からも PR 症例の免疫動態を象徴していると解釈でき、ニボルマブ治療効果の免疫動態における key event であることが分かる。リンパ球における PDCD-1、UBE2E3、NKp46、TNF- α の発現動態はニボルマブ治療効果を示すバイオマーカーとして寄与する可能性がある。

— 新分子・新技術 —

P 40.

課題番号：R04 ス-003

研究課題：インフルエンザウイルス・ヘマグルチニンの発現調節が持つ感染性・病原性への意義

研究代表者名（所属）：三浦 未知（微生物学）

インフルエンザウイルスは感染後、宿主の核内でウイルスゲノムを転写する。我々はインフルエンザウイルスの抗原分子ヘマグルチニンの mRNA が感染初期に宿主の核内に retention されることでタンパク質発現の調節を受けている根拠を見出した。このことから我々は 8 本に分節されたウイルスゲノムの各々が mRNA 核外輸送の段階において遺伝子発現のタイミングの調節を受け、これが感染性や病原性に有利に作用しているという仮説を立てている。核内における転写物の retention は transcription burst に対してタンパク質の量をコントロールする手段として近年注目を集めている。本研究では 8 本のウイルス mRNA の核外輸送速度を推定するための理論と実験系を構築した。本来 mRNA の核外輸送を測定するには数時間にわたり一定の時間間隔で測定を繰り返す必要があるが、インフルエンザウイルス感染においては mRNA とは別に cRNA も次第に合成され mRNA 特異的な検出が難しくなること、ウイルスタンパク質 NS1 によりウイルス mRNA に intrinsic な核外輸送が妨げられることが問題になる。本研究では感染から 2 時間後に細胞を固定し、この時点における mRNA 細胞内分布のばらつきから理論的モデルに従って核外輸送速度を推定した。この結果インフルエンザウイルスの抗原分子であるヘマグルチニンとノイラミニダーゼ mRNA の核外輸送が他のウイルス mRNA に比べて遅く、インフルエンザウイルスが抗原タンパク質の発現を遅らせ宿主免疫に認識されるまでの時間を稼いでいると考えられた。

P 4 1.

課題番号：R04 ス-006

研究課題：SARS-CoV-2 RNA ゲノムに着目した抗ウイルス薬開発のためのプラットフォームの確立

研究代表者名（所属）：清水 由梨香（衛生学）

共同研究者名：伊藤 達男、山崎 晃

背景：ヒト細胞における SARS-CoV-2 由来の 5' UTR を介した、翻訳活性を明らかにした前回の調査に続き、SARS-CoV-2 由来の 5' UTR RNA が ヒト細胞で豊富に発現した場合に脂質代謝に関わる因子が変化するかどうかを検討した。研究手法：SARS-CoV-2 由来の 5' UTR を融合したルシフェラーゼ遺伝子発現ベクターである、pGL3-5' UTR ベクター、もしくは pGL3-Promoter ベクターを HEK293T 細胞および肺上皮細胞株 A549 細胞に導入し、SARS-CoV-2 由来の 5' UTR の発現亢進に伴って増減する RNA 群の定量を行った。

結果：メバロン酸経路に濃縮されている ACAA、HMGCS、FADS2 遺伝子で mRNA 発現レベルの有意な変化が認められ、特に HMGCS の発現が大きく上昇した。

考察：メバロン酸経路とウイルス感染の関係についてはあまり報告がないが、HMGCS2 や ACAA2 の発現を抑制するとパピローマウイルスやポックスウイルスの感染を抑制できることが過去に報告されている。本研究で得られた結果を含め、HMGCS2 や ACAA2 の転写制御とそのシャペロンネットワークの解明は、多くの抗ウイルス薬開発の機会を提供する事が期待できる。

— 大学院研究 —

P 4 2.

課題番号：R04 大-001

研究課題：咽頭がんの特徴に関する臨床病理学的検討

研究代表者名（所属）：藤田 祥典（形態系分野 検証病理診断学）

指導教授名：森谷 卓也

共同研究者名：伊禮 功、佐貫 史明、原 浩貴、福田 裕次郎、秋定 健、宇野 雅子、下屋 浩一郎

ヒトパピローマウイルス（HPV）感染によって発癌する中咽頭癌の予後リスクの層別化は重要である。プロテアーゼ活性化受容体-1（PAR1）は、 α -アレスチンドメイン含有タンパク質 3（ARRDC3）によって制御され、発癌に関与している。また、腫瘍微小環境にも関与している。我々は、中咽頭癌、下咽頭癌、子宮頸癌患者において、PAR1、ARRDC3、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）スコアの予測能力を評価することを目的とした。

中咽頭がん 79 例、下咽頭がん 44 例、子宮頸がん 42 例について、HPV 感染の代替マーカーである p16、ARRDC3、PAR1 発現の免疫組織化学分析を実施した。TIL スコアを評価し、浸潤度により以下のグループに分類した：低：0%～10%、中：20%～40%、高：>50%。予後解析のため、3つのグループを低、中、高に分けるか、あるいは中央値をカットオフとして2つのグループに分けて評価した。

p16 陽性中咽頭癌は p16 陰性例と比較して、有意に予後良好であった。p16 陽性中咽頭癌例のうち、PAR1 陰性例は PAR1 陽性例と比較して有意に予後良好であった。

多変量解析の結果、p16 陰性中咽頭癌例のうち、ARRDC3 陽性例は有意に予後良好であった。

p16 陽性中咽頭癌患者のうち、PAR1 陽性例は有意に予後不良であった。

p16 陰性中咽頭癌例のうち、PAR1 陽性例は PAR1 陰性例と比べ再発率が 35 倍高かった。

TIL スコアの浸潤度は予後や再発に関して有意な結果が得られなかった。

P 4 3.

課題番号：R04 大-003

研究課題：非小細胞肺癌における癌微小環境が免疫チェックポイント阻害剤併用殺細胞性抗癌剤の効果に与える影響の検討

研究代表者名（所属）：野島 雄史（形態系分野 呼吸器腫瘍学）

指導教授名：中田 昌男

背景：我々は以前に PD-L1 発現と CD8+TIL 数で Type-I～IV に分類する腫瘍免疫微小環境 (TIME) 分類に、VEGF 発現 (A: 低発現/B: 高発現) を加えた Modified TIME 分類を考案し免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) 単剤治療の効果予測因子として有用であると報告した。今回我々は Modified TIME 分類と ICI 併用殺細胞性抗癌剤療法の治療効果との関連について検討した。

方法：2019 年 3 月から 2020 年 8 月の間に 2 施設で ICI 併用治療を施行した進行・再発 NSCLC 症例 30 例において臨床病理学および免疫組織学的検討を行った。

結果：組織学的に非扁平上皮癌 18 例、扁平上皮癌 10 例、NSCC が 2 例だった。レジメンは Pembrolizumab 併用 24 例、Atezolizumab/Bevacizumab 併用 6 例で治療効果は PR18 例、SD8 例、PD4 例だった。Modified TIME 分類で Type-IA/B 100%/66.7%、Type-IIA/B 50%/50%、Type-IIIA/B 66.7%/60%、Type-IVA/B 66.7%/- の奏効率が得られた。

結論：ICI 併用治療において Type-IA で高い奏効率が得られた。その他の Type においても 50% 以上の奏効率を示すため ICI 併用治療では Modified TIME 分類の有用性はないと考えられる。

— 川崎医療福祉大学・福山大学・岡山県立大学・就実大学 —

P 4 4.

演題名：標本作製原理は尿細胞診判定に影響を及ぼすか

Liquid based cytology (LBC) 2 法での高異型度尿路上皮癌判定

研究代表者名：有安 早苗

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

標本作製原理の異なる Liquid based cytology (LBC) の 2 法において、その違いが細胞形態および細胞診判定に影響するかを N/C 比、核クロマチン濃度を中心に検証した。

【方法】

組織学的に尿路上皮癌が証明された 30 症例を対象に Sure path 法（沈降法）と Cell prep 法（フィルター法）で標本作製し、標本中異型細胞の核・細胞質周長を画像解析ソフトで計測し N/C 比を算出、核クロマチン濃度は、異型細胞核と好中球核の光学濃度比として数値化した。2 法間の細胞形態に統計学的有意差があるか、The Paris system の異型細胞検出基準となる N/C 比 50% を超える異型細胞の出現率を比較し、診断への影響を検証した。

【結果】

N/C 比 ($p < 0.0001$)、核クロマチン濃度 ($p=0.007$) とともに 2 方法間に有意差を認めた。

また、N/C 比 50% を超える異型細胞の出現率にも 2 方法間に有意差を認めた ($p=0.01$)。

【結語】

標本作製原理の違いは細胞形態に有意差を生じることが証明された。この形態差は、検出できる異型細胞数に繋がり、尿路上皮癌判定に影響することも示唆された。作製法の異なる標本での同一基準値を用いた診断には問題があり、作製法別基準値設定が今後課題と考える。

P 4 5.

演題名：プラットフォーム型協議体によるソーシャルワーク実習プログラムの検討

研究代表者名：中尾 竜二

所属（大学・学部・学科）：川崎医療福祉大学・医療福祉学部・医療福祉学科

【目的】実習プログラムについて多角的な視点からの検討機能を有したプラットフォーム型協議体によるソーシャルワーク実習の構築を見据え、社会福祉士養成における実践・方法論を模索することを目的とする。

【方法】ソーシャルワーク実習受け入れ年数が異なる実習指導者 3 名を対象にインタビューを実施し

た。分析は定性的(質的)方法を用いた。

【結果】分析の結果、【学びあい】【不安の解消】【情報共有】【気づき】【実習内容への導入】【職場への協力の促し】の6つのカテゴリーが抽出された。また抽出されたカテゴリーにおいては、調査対象者の実習指導歴、受け入れ継続年数、所属組織の特性による見識の差異も見られた。

【考察】プラットホーム型協議体では、ソーシャルワーク実習の指導歴や所属機関の異なる参加者によって、多様な情報交流が生まれ、実習プログラムを中心に、学び合う場を形成することで、参加者にとって新たな気づきを得ることが分かった。また、現行実習指導内容への支持と自信をもたらす場にもなるなど、参加者にとっての学びと気づきを得る有意義な機会となり、かつ実習プログラム作成の向上につながっていると考える。プラットホーム型協議体は参加者が自身の所属職場において理解促進を図るきっかけや啓発にも影響をもち、さらにソーシャルワーカーとしての意識を高められる可能性もあったといえよう。

P 4 6.

演題名：骨格筋の抗炎症作用が DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの骨格筋の消耗を防ぐ

研究代表者名：青木 孝文

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

【目的】

無繊維食摂取マウスにおいて、DSS 誘導性大腸炎が骨格筋に及ぼす影響を明らかにすることとした。

【方法】

実験動物には8週齢の C57BL/6J 雄マウス (n=24) を用い、DSS を 0~1%濃度で飲料水に混ぜ、5日間の投与と5日間の休薬を3回繰り返し、大腸炎を誘導した。大腸炎誘導後に疾患活動指数(DAI)の測定、実験終了後に血漿中 LPS 結合タンパク質(LBP)濃度の測定、大腸および骨格筋の mRNA の解析を行った。

【結果および考察】

DAI、血漿 LBP 濃度、大腸炎症性サイトカイン (*Tnf α* 、*Il-1 β* 、*Il-6*) の mRNA 発現は 1%DSS 群で増加とタイトジャンクション分子 (*Zo-1*、*Occludin*、*Claudin-3*、*Claudin-7*) の mRNA 発現の減少が観察された。しかしながら、1%DSS 投与では、体重、腓腹筋重量、腓腹筋炎症性サイトカイン (*Tnf α* 、*Il-6*) とタンパク質分解マーカー (*Atrogin-1*、*Murf-1*、*Lc3a*、*Foxo3*) の mRNA 発現量は、変化しなかった。一方、抗炎症性サイトカインである *Il-10* の mRNA 発現量と *Il-10/ Il-6* 比の増加が認められた。以上より、無繊維食摂取マウスにおける 1%DSS の5日おき3回繰り返し投与は、軽度大腸炎を誘導するが、骨格筋 *Il-10* の代償的な増加により、大腸炎に伴う骨格筋の消耗からは保護される可能性が示唆された。

P 4 7.

演題名：ビデオ会議システムを用いたスモールグループディスカッションに対する学生評価とその評価に対する改善策

研究代表者名：猿橋 裕子

所属（大学・学部・学科）：福山大学・薬学部・薬学科

【目的】

学習方略のツールの一つとしてビデオ会議システムを有効に活用する為に、オンラインによるスモールグループディスカッション（以下 SGD と記載）にどのような利点や欠点があるかを明確にし、さらに SGD の評価に与える因子を検証し、現時点で教員の工夫で実施可能な改善策を考察する。

【方法】

薬学部3年生121名を対象に、「インフルエンザワクチンの小児への定期接種化について、どのようにすべきか？」というテーマで SGD をビデオ会議システム (Zoom Cloud Meetings を利用) で実施し、授業終了後にアンケート調査を実施した。「Zoom を用いた討議の評価点」を目的因子、「Zoom を

用いた討議の利点及び欠点の選択肢」を説明因子として単変量解析を行い、単変量解析で有意差のあった因子について重回帰分析を行った。統計学的解析には EZR (4.1.2) を使用し、 $p<0.05$ を統計学的有意差がありと定義した。

【結果・考察】

回収率は、90.1%であった。重回帰分析の結果、評価を上げる因子は、「緊張しない」、「効率的に進行する」及び「全員の表情が見やすい」、評価を下げる因子は、「効率的に進行しない」、「発言しにくい」、「パソコンの操作がストレスとなる」及び「操作が難しかった」であった。効率的な進行に係る因子は、評価を上げる因子、下げる因子の両方にあがっており、「効率的に進行しない」因子を網羅的に改善することが、今後の方策として重要であることが示唆された。

P 4 8.

演題名：脳虚血再灌流障害に対する低体温の保護機構

研究代表者名：渡邊 正知

所属（大学・学部・学科）：福山大学・薬学部・薬学科

低体温処置は、脳虚血再灌流障害に対して顕著な脳保護効果を示すことが知られている。一方、タンパク質翻訳後修飾の一つである small ubiquitin-related modifier (SUMO) 化修飾が、虚血再灌流障害に伴う梗塞巣拡大を抑制することが示唆されている。そこで本研究では、低体温処置による脳保護作用発現における SUMO 化修飾の役割を検討した。

実験には低体温耐性を有するシリアンハムスターを用い、一過性の両側総頸動脈閉塞 (tBCCAO) 処置を 30 分間行うことで虚血再灌流障害を惹起させた。BBB の機能は、エバンスブルーの透過性にて、遅発性神経細胞死は、tBCCAO 処置後の海馬切片の神経細胞数を計測することにより評価した。

虚血再灌流障害に対する体温の影響を検討したところ、低体温は再灌流後第二相の BBB 透過性亢進に対して保護的に作用し、遅発性神経細胞死を抑制することが明らかとなった。次に、体温と SUMO 化修飾の関連性を検討したところ、海馬組織の SUMO 化修飾は体温低下レベルに依存して誘導されることが明らかとなった。そこで、SUMO 化修飾阻害剤を用い低体温保護効果に対する影響を検討したところ、低体温の BBB 保護効果および遅発性神経細胞死抑制効果がいずれも減弱した。これらの結果は、低体温によって誘導される SUMO 化修飾が、BBB の機能保護を伴う脳保護作用発現に寄与していることを示唆する。

P 4 9.

演題名：血小板型 12S-リポキシゲナーゼの肝線維化に及ぼす影響

発表者名：戸田 圭祐

研究代表者名：高橋 吉孝

共同研究者名：岡本 知子、津嘉山 泉、川上 祐生、山本 登志子

所属（大学・学部・学科）：岡山県立大学・保健福祉学部・栄養学科

12S-リポキシゲナーゼ (LOX) はアラキドン酸などの不飽和脂肪酸に 1 分子の酸素を部位特異的、立体特異的に添加して過酸化脂質を生成する酵素である。12S-LOX 生成物が非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に関与するという報告がされているが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。これまでに我々は、メチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食投与により作製した NASH モデルマウスの肝臓において血小板型 12S-LOX が上昇すること、この酵素が肝線維化において中心的な役割を果たす肝星細胞に局在することを明らかにしてきた。本研究では NASH 進行の過程で本酵素が線維化にどのように関わるか解明することを目的とした。血小板型 12S-LOX ノックアウトマウスと野生型マウスに MCD 食を 8 週間給餌したマウスの肝臓の線維化レベルをシリウスレッド染色によって比較したところ、野生型マウスに比べ、血小板型 12S-LOX ノックアウトマウスでシリウスレッド陽性の面積率は有意に上昇し、線維化が進行している様子が観察された。同様の結果は、ノックアウトマウスと野生型マウスのそれぞれから、ヒトの NASH の病態モデルにより近いとされるストレプトゾトシン投与と高脂肪食負荷の NASH モデルを作製した場合に

も得られた。さらに血小板型 12S-L0X を安定的に過剰発現させたヒト肝星細胞株の TWNT-1 細胞では COL1A1、COL1A2 の発現が野生型 TWNT-1 細胞より有意に低下していた。以上のことから、NASH モデルマウスの肝臓において発現が上昇する血小板型 12S-L0X は線維化を抑制する方向に働くことが示された。

P 5 0.

演題名：女子大学生の朝型・夜型指向性と身体活動、栄養摂取状況および身体組成との関係

研究代表者名：大下 和茂

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

健康日本 21 では、若年女性における低体重者の高割合が指摘されており、将来的なサルコペニア予防から、若年女性を対象とした骨格筋指数（SMI）と各種生活習慣との関係が報告されている。しかし、十分な栄養摂取や身体活動を確保していても筋量獲得に繋がらない例が認められている。そこで本研究は、女子大学生の身体活動、栄養摂取状況および身体組成を、朝型・夜型指向性（クロノタイプ）で分けた検討を加えた。

女子大学生 100 名を対象に、栄養素摂取状況、平日の身体活動レベル（PAL）、多周波 BIA 法による身体組成、そして朝型-夜型質問表 自己評価版でクロノタイプを調査した。クロノタイプのスコアは、平均値と中央値の者を除いて、スコアの低い群（夜型傾向）と高い群（朝型傾向）で各測定項目を比較した。

クロノタイプにより体重や各種栄養素摂取量に有意な差は認められなかった。PAL は夜型傾向者より朝型傾向者で高い傾向を示したが、いずれも日本人の食事摂取基準で“ふつう”の範囲であり、大きな差ではなかった。しかし、朝型傾向者で体脂肪率は有意に低く、SMI は有意に高かった。

我々は最近、平日の PAL は社会的制約の影響でクロノタイプによる差が表れにくく、社会的制約の影響が小さい週末の PAL は、朝型者に比べ夜型者で低くなることを示唆した（Miyazaki ら、2022）。そのため、今後は平日だけでなく休日の PAL も調べる必要があり、さらに、食事時間や入眠・睡眠時間なども検討すべきかもしれない。

P 5 1.

演題名：HMGB1-LPS 共刺激誘導性炎症応答を抑制する anti-DAMPs の新規同定

研究代表者（発表者）名：森 秀治、渡邊政博、豊村隆男

所属（大学・学部・学科）：就実大学・薬学部・薬学科

【目的】代表的 DAMPs である HMGB1 は、終末糖化産物（AGEs）や LPS と直接的に相互作用して複合体を形成し、TLR4 等のパターン認識受容体刺激を介した炎症応答亢進や病態形成に働くことが知られている。一方、これらに影響を与える生体内因子については、殆どわかっていない。そこで、AGEs や HMGB1 と結合し、炎症応答に影響を与える未知因子の探索研究を行った。

【方法・結果】AGEs を特異リガンドとして担持させたアフィニティ担体を調製し、AGEs と結合する生体内因子を探索したところ、リボソーム構成因子（RPL9）が高い結合親和性を示すことが判明した。その後の解析で、RPL9 が HMGB1 と同様に敗血症モデルの血清中に出現してくること、HMGB1 と直接的に結合することも明らかとなった。組換え型 RPL9 を調製し、マクロファージ細胞を用いて解析したところ、RPL9 は LPS 共存下で TNF- α 発現応答を相乗的に増大しなかったものの、その一方で、HMGB1+LPS 共刺激によって誘導される TNF- α 発現亢進を有意に抑制することが明らかとなった。

【考察】リボソーム構成因子である RPL9 は、直接的相互作用を介して HMGB1 による炎症応答を抑制する anti-DAMPs 候補であることが示唆された。

P 5 2.

演題名：インチューブ固相マイクロ抽出/LC-MS/MS 法を用いたタバコ特異的ニトロソアミン類の高

感度測定

研究代表者名：石崎 厚

所属（大学・学部・学科）：就実大学・薬学部・薬学科

【目的】近年、有害物質の発生が少ないとされる加熱式タバコが普及し始めているが、その安全性に関する検討は十分とは言えず、厚生労働省でも健康被害の可能性を示唆している。本研究では、インチューブ固相マイクロ抽出（SPME）／LC-MS/MS によるオンライン自動分析システムを用いて、タバコ煙中の発がん関連物質であるタバコ特異的ニトロソアミン類（TSNAs）の高感度分析法を開発し、紙巻きタバコと加熱式タバコからの TSNAs の発生量を測定した。

【方法】タバコ煙に含まれる 4 種類の TSNAs を分析対象とした。プラスチック製の喫煙装置と電動吸引ポンプにより主流煙及び副流煙をそれぞれ水中に一定時間バブリングして捕集した。オートサンプラーバイアルにタバコ煙捕集溶液を取り、内部標準物質と水を加えて 1 mL とし、プログラムによりインチューブ SPME を行った。その後、LC-MS/MS へ導入し、ESI-ポジティブモードで MRM 測定を行った。

【結果・考察】紙巻きタバコ 5 種類と加熱式タバコ 3 種類で主流煙及び副流煙を測定した結果、紙巻きタバコ及び加熱式タバコのどちらからも TSNAs が 1 本あたり数 ng レベルで検出された。紙巻きタバコに比べて有害物質の量が少ないとはいえ、加熱式タバコからも微量の TSNAs が発生していることから、今後、本研究の手法がタバコによる健康影響を評価するために大きく寄与できると期待される。

P 5 3.

演題名：胎生期葉酸削減マウスにおける社会性および記憶学習能の低下

研究代表者名：吉川 弥里

所属（大学・学部・学科）：就実大学・薬学部・薬学科

【目的】葉酸は、胎児の正常な発育および発達に重要である。動物実験や臨床研究では、妊娠中の葉酸摂取が出生後の子供の脳の発達に影響を与え、精神疾患のリスクを低減させることが示唆されている。しかし、妊娠中の葉酸不足と子供の自閉症などの発達障害との関連については、まだ十分に分かっていない。そこで、本研究では胎生期の葉酸不足と仔の発達障害との関連性について明らかとするため行動学的検討を行う。

【方法】妊娠中の ICR マウスに、コントロール餌（葉酸 2 mg/kg 餌）または葉酸削減餌（葉酸 0.3 mg/kg 食）を妊娠 1 日目から出産まで与えた。これらの母親マウスから産まれた雄の仔マウス（7～10 週齢）を用いて、自発運動量、不安、繰り返し行動、社会性、記憶・認識の行動学的評価を行った。

【結果および考察】胎生期葉酸削減マウスでは、コントロールマウスと比較して、新奇環境下における自発運動量および不安、毛繕いの繰り返し行動に差は認められなかった。しかし、胎生期葉酸削減マウスは、3 チャンバー社会性試験において見知らぬマウスに対する社会性が低下し、さらに、Morris 水迷路試験における空間記憶および新規物体認識試験における物体認識記憶の機能も低下していた。これより、胎生期の葉酸不足は、社会性および記憶学習能の低下を特徴とする発達障害と関連することが示唆された。

Ⅲ. プロジェクト研究 抄録

— 神経・運動器・生殖・循環 —

課題番号：R04 基-057

研究課題：女児てんかん原因遺伝子 PCDH19 の局在・機能解析

研究代表者名（所属）：林 周一（解剖学）

PCDH19 関連症候群は、乳幼児期の女児でてんかんを発症する難病である。X 染色体上の細胞間接着因子プロトカドヘリン 19 (PCDH19) 遺伝子の変異または欠失によって生じる。女性では、発生過程で片方の X 染色体がランダムに不活性化されるため、PCDH19 を介したニューロン同士の接続が阻害され、てんかんを発症するという細胞干渉説が有力であるが、十分に検証されていない。本研究は、マウスを用いて Pcdh19 タンパク質の局在の解析と Pcdh19 遺伝子をモザイク状に欠損させた時の脳発生の変化を解析することにより、細胞干渉説を検証することを目的とした。

既存の抗体では、Pcdh19 タンパク質の詳しい細胞局在を調べることは難しい。そこで昨年度の研究では、Pcdh19 遺伝子の 3' 末端に HA と 3×FLAG タグをノックインしたマウスを作製した。Pcdh19 遺伝子の 3' 末端に対するガイド RNA と Cas9 タンパク質をエレクトロポレーションにより受精卵に導入し（医用生物研究ユニットに委託）、ノックインマウスを作製することに成功した。同マウスの脳切片をタグ抗体で染色すると、Pcdh19 タンパク質の局在を高感度で検出できることが確認できた。

さらに、海馬の歯状回にプラスミドを導入する系の確立を試みた。Ito et al., 2014 の手法を参考にして、生後 0 日のマウスの側脳室に DNA 溶液を注入し、電場をかけることにより、神経前駆細胞にプラスミドを導入することに成功した。現在、実験条件の最適化とゲノム編集による遺伝子欠損を組み合わせる系の確立を試みている。

課題番号：R04 基-093

研究課題：遠心性入力線維の受容体に着目したマウスの嗅覚情報処理に関わる神経回路の形態学的解析

研究代表者名（所属）：堀江 沙和（解剖学）

嗅覚情報処理をする 1 次中枢である嗅球は、糸球体において僧帽細胞へと情報が伝えられ、さらに高次中枢へと伝えられる。一方、嗅球へは脳の他の領域よりセロトニン (5HT)、アセチルコリン (ACh)、ノルアドレナリン (NA) などの遠心性の入力があることが知られており、これまで起始核から嗅球までの投射経路を明らかにしてきた。本研究では、これらの遠心性入力が嗅球内でどのような役割をしているのか調べるために、各種遠心性線維の受容体に着目し、その局在について検索をした。

NA ニューロン及び ACh ニューロンについては、これまで示してきた通り、それぞれ各種ある受容体のうち、アドレナリン α 1 受容体 (ADRA1B)、ムスカリン受容体 (m2R) が嗅球に広く発現していた。ADRA1B の局在は嗅球内に広く、びまん性に局在することが明らかとなった。一方、ACh の受容体は嗅球の糸球体周囲に存在する TH 陽性細胞に見られた。5HT においても、受容体の種類は数多く知られているが、このうち嗅球内ではセロトニン 2A 受容体 (5HT2A) の発現が見られた。嗅球内での発現は、糸球体層に最も多く見られ、傍糸球体細胞及びグリアに発現していることが明らかになった。また、糸球体内にも多くの発現が見られることから、糸球体内に樹状突起を伸ばす投射ニューロンに発現していることが示唆された。現在、各種受容体が発現する細胞の同定を目指して解析をしている。

課題番号：R04 基-099

研究課題：心室拡張機能の進化：分子・細胞から臓器レベルまでの統合的検討

研究代表者名（所属）：毛利 聡（生理学 1）

共同研究者名：橋本 謙、花島 章、臼居 優

全ての脊椎動物に共有される心房-心室型心臓において、心房への血液充填に骨格を含む心臓周囲の力学環境が果たす役割について検討した。魚類においては烏口骨や肩甲骨などから構成される「肩帯」と呼ばれる胸ビレ（上肢に相当）を支持する骨格構造内に心臓が収納されていた。ヤマメの心房への血

液流入速度をドップラーエコーにて計測したところ、心室収縮時に優位な波形を認め、心室収縮に伴う体積減少により生じる心臓周囲の陰圧が心房を拡張させて血液流入の駆動力となっていることが確認された。これらより心房-心室型の心臓は胸ビレを支える「肩帯」ともに共進化してきた可能性が示唆された。そこで胸ビレを獲得する以前の無顎類について調べたところ、高活動性のヤツメウナギは軟骨のカプセルを持ちヤマメと同様な仕組みで心房に血液を充填する一方、低活動性のヌタウナギは心臓周囲に硬組織を持たない代わりに複数の心臓を有しており、心臓外部の力学環境が血液ポンプ機能向上のための重要因子であることが明らかになった。

進化的に後発である哺乳類は、心室が能動的な血液吸引能を獲得することで心房の貢献度は低下し、ヤマメやヤツメウナギのような心房への血液充填システムを放棄している。哺乳類にはもはや心臓が「肩帯」内に位置するメリットは無く、心室拡張が容易な肺に囲まれる尾側位置移動したことが、陸上進出に伴い出現した有羊膜類が首を持つ契機となった可能性がある。

課題番号：R04 基-013

研究課題：脳浮腫モデルマウスに対する希少糖(D-allose)の効果

研究代表者名(所属)：中村 丈洋(生理学2)

共同研究者名：氷見 直之、丸山 恵美

【目的】脳浮腫は頭部外傷や脳出血、脳梗塞など様々な脳神経疾患に付随して発症する。一度発症すると重篤な後遺症が残り、重篤な場合死に至ることもあるにも関わらず、脳浮腫の治療法は未だ古典的療法が主で確立には至っていない。自然界にごく少量存在する希少糖の一つであるD-alloseは細胞内での活性酸素の発生を抑制することが知られている。脳浮腫は酸化ストレスで悪化することからD-alloseの脳浮腫に対する抑制効果について調べた。

【方法】CB57BL/6J(5~20w、♂)に体重の10%の滅菌蒸留水を腹腔内投与して水中毒による脳浮腫を誘発させた。D-allose投与群は脳浮腫誘発30分前にシリンジで経口投与した(0~800mg/kg、200 μ l/匹)。1時間後脳を摘出し、定温乾燥機にて120℃、96時間乾燥し、乾燥前の重量と比較して脳の水分含有率を算出した。さらに浮腫による脳の損傷度合いに変化があるかどうかを検討するため、アポトーシスの指標となるcaspase3と活性型であるcleaved caspase3の発現をwestern blot法にて調べた。

【結果】マウスの水分含有率は、5,8週齢ではそれぞれ50,100mg/kgで低下し、脳浮腫誘発の抑制効果が示唆された。14,20wのマウスにおいてはあまり効果が見られなかった。また、全週齢で高濃度投与で浮腫の増悪が見られた。一方至適濃度による損傷度合いの軽減は低週齢では損傷自体がさほど確認されなかったが、高週齢では損傷が抑制された。

【結論】D-アロースは脳浮腫形成の抑制効果があり各週齢で至適濃度が異なる可能性が示唆された。

課題番号：R04 基-012

研究課題：うつ状態でのリアノジン受容体と滑面小胞体の変化

研究代表者名(所属)：丸山 恵美(生理学2)

共同研究者名：中村 丈洋、氷見 直之

【目的】電気けいれん療法は難治性や薬剤抵抗性などのうつ病患者に最も有効性の高い治療法の一つであるが作用機序は不明な点が多い。我々はモデルマウスの海馬でCa²⁺放出チャネルであるリアノジン受容体(RyRs)が電気けいれんショック(ECS)の抗うつ効果発揮に重要であることを報告した。本研究ではRyRsの存在領域でありCa²⁺ストアである滑面小胞体に着目し、RyRsの発現量の変化との関連を形態学的及び生化学的に調べ、うつ状態およびECSによる滑面小胞体の形状や機能の変化を検討することを目的とした。

【方法】C57BL/6J(♂, 7w)に拘束水浸ストレス負荷で自然発症型うつ様モデルマウスを作成し、正常群、ストレス群、ストレス+ECS群の3群を比較検討した。ECSはモデル完成後1回/日、2週間施した。行動試験でうつ様状態を確認後海馬の電顕標本を作成、滑面小胞体の形状を比較検討した。さらにRyRsに対する免疫電顕標本の作成を試みた。また、海馬組織の小胞体すべてと粗面小胞体のタンパク量をそ

れぞれ western blot 法にて計測、そこから滑面小胞体のタンパク量を算出して比較検討した。

【結果】各群の滑面小胞体は海馬において形状や数に変化が見られなかった。また、滑面小胞体のタンパク量も差が見られなかった。一方、海馬歯状回門において ECS によってシナプス形成に変化が見られ、シナプス小胞が明らかに増加している様子が確認できた。

【結論】ECS の抗うつ効果にシナプスが関与している可能性を示唆した。

課題番号：R04 基-046

研究課題：自然発生白斑マウスにおける原因遺伝子変異の決定：ワールデンプルグ症候群の新規病態モデルマウスの提唱

研究代表者名（所属）：松田 純子（病態代謝学）

共同研究者名：渡邊 昂、石塚 佑太

Waardenburg 症候群 (WS) は神経堤細胞 (Neural crest cell: NCC) の異常により、眼や毛髪、皮膚の色素異常、難聴、Hirschsprung 病、脊髄髄膜瘤などを呈する遺伝性疾患である。現在までに NCC の形成、遊走、分化のいずれかの過程に関わる 6 つの遺伝子—*PAX3*、*MITF*、*SNAI2*、*SOX10*、*EDNRB*、*EDN3*—が WS の原因遺伝子として同定されている。我々は、偶然、腹部の白斑と四肢先端の色素脱失を呈する自然発生白斑マウスの家系を発見した。本研究では、WS の新規疾患モデルマウスの提唱と NCC の形成、遊走、分化の分子メカニズムの解明を目的として、自然発生白斑マウスにおける原因遺伝子 X の同定に取り組んだ。まず、白斑マウス同士を交配し、胎生 9.5 日の胎仔を解析したところ、約 25%の胎仔が高度の神経管閉鎖不全を呈して胎生致死であることを見出した。この結果から、白斑の親マウスは原因遺伝子 X の変異のヘテロ接合体で、神経管閉鎖不全を呈する胎仔はホモ接合体であると推定し、父、母および胎仔で全ゲノムトリオ解析を行った。C57BL/6J 系統の塩基配列をリファレンスとし、父と母がヘテロ、胎仔がホモで連鎖し、推定効果が High-Modifier である変異を絞り込んだ。さらに、胎生 8.5 日マウスの神経系組織を用いた Single cell RNA-sequencing の公共データベースを用いて、NCC に発現を認めない遺伝子を除外した。その結果、1 番染色体上にコードされる 36 の候補遺伝子の絞り込みに成功した。現在、ホモ接合体の cDNA を用いて候補遺伝子の塩基配列の決定に取り組んでいる。

課題番号：R04 基-055

研究課題：血管内イメージングを用いた下肢閉塞性動脈疾患に対する血管外科治療における「健常」部位と治療対象部位の血管性状解析と治療成績

研究代表者名（所属）：赤木 大輔（心臓血管外科学）

【研究目的・背景】血管病は全身病であり部位によらず動脈硬化性変化が認められる。「健常な部位」を判断し、それを基に血管内治療 (EVT) を含めた血管外科治療システムを構築することは容易でない。これは病変がびまん性で「健常」に定義がないためである。適切な「健常」血管の定義のため血管内イメージングデバイスに注目し、EVT 時の適正使用法の検討を目的とした。

【方法手法】浅大腿動脈閉塞性病変に対する EVT 施行時に血管内イメージング (IVUS, 血管内視鏡など) を施行された症例を後方視的に解析した。

【研究結果】1 例に EVT 術後再狭窄 (術後 11 カ月) が認められた。初回治療時の内腔所見は、IVUS 上扁平率 10%、プラークあり (プラークの内腔占有割合 10.8%) であった。肉眼的には内腔は平滑であり凹凸不整に乏しかった。

【考察・結論】プラークの存在がどの程度「健常」欠陥として許容されるかは今後のデータ修正機が待たれる。本研究では OFDI については検討できていないが、「健常」血管を治療システムに組み込むことを目的とした血管内視鏡のデータ蓄積と他のイメージングデバイスの応用については引き続き今後の課題である。また血管外科治療臨床にとどまらず、動脈硬化に関するトランスレーショナルリサーチ推進のためにさらなる基礎的データの蓄積は必要である。

課題番号：R04 基-100

研究課題：新型コロナワクチン接種による血清抗体価の変化とテストステロンの関連性に関する検討

研究代表者名（所属）：大平 伸（泌尿器科学）

【背景・目的】新型コロナウイルス感染症に関連した免疫反応には性差があることが報告されており、男性における免疫反応にはテストステロンが関連していることが推測されている。本研究では、男性における新型コロナワクチンによる免疫反応とテストステロンの関連性について検証を行った。【対象・方法】本学園で実施した新型コロナワクチン接種による抗体価の変化を検証する研究（承認番号：5159・5484）において、試料・情報の 2 次利用に同意された男性被験者 497 例を対象として、既承認研究での抗体価測定結果と残余血清を用いて測定した血清テストステロン値の関連について検証した（承認番号：5664）。

【結果】ワクチン初回接種（1・2 回目）時の年齢中央値（95%CI）は 47（24.9～69.1）歳、血清テストステロン値は 3.71（0.76-9.83）ng/mL であった。ワクチン初回接種前を基準とした接種 28（26～36）日後の幾何学的平均抗体価変化率（geometric mean titer ratio: GMR）は、85.6（16.4～200.3）であり、接種 192（96-246）日後では 0.44（0.26～0.78）%/day の低下がみられた。ワクチン追加接種（3 回目）前を基準とした接種 42（35～66）日後の GMR は 5.2（3.7～8.7）であり、接種 175（167-189）日後では 0.13（0.15～0.25）%/day の低下がみられた。初回接種前の血清を用いて測定したテストステロン値が高値であったものは、ワクチン初回および追加接種後の GMR が高い傾向にあった。【結論】新型コロナワクチンにおける免疫反応にテストステロンが関連していることが推測された。

課題番号：R04 基-081

研究課題：デュシェンヌ筋ジストロフィーに対するペプチド医薬の実用化

研究代表者名（所属）：砂田 芳秀（神経内科学）

共同研究者名：大澤 裕、西松 伸一郎、白河 俊一

デュシェンヌ筋ジストロフィーを対象に最近薬事承認されたジストロフィンのエキソンスキップ治療は、特定の欠失患者に適応が限定されるという欠点あり、全ての DMD 患者を対象とする革新的疾患修飾療法が待望されている。マイオスタチンは筋量を減少させ、その活性がデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)患者の車椅子移乗期を決める疾患修飾因子である(Flanigan, Ann Neurol 73, 2013)。我々は、マイオスタチン前駆体から活性阻害中心 (IC)を発見し阻害薬として特許を権利化した(Ohsawa, JCI 116, 2006; PLoSOne 10 e0133713, 2015; JMC 58, 2015; 特許 6143270 号:2017 年登録)。さらに IC より極めて高い阻害活性を示しリガンド-受容体結合を抑制する阻害ペプチドを同定した。このペプチドの最重症型 DMD モデルマウスへの皮下投与では、筋力低下を軽減・筋組織のジストロフィー変化を劇的に改善し有効性の非臨床 POC が取得できた。本研究では、皮下投与における有効域・安全域を、マウスへの用量漸増試験で決定し、実施すべき非臨床 GLP 試験の内容を策定した。2023 年 6 月 PMDA RS 対面助言を予定している。

課題番号：R04 基-015

研究課題：症候性頭蓋内動脈狭窄におけるプラーク安定化と脂質プロファイルの関連

研究代表者名（所属）：八木田 佳樹（脳卒中医学）

共同研究者名：大山 直紀、岩本 高典

【背景と目的】頭蓋内の脳主幹動脈狭窄を原因とする脳梗塞は再発リスクが高いことが知られている。適切な治療レジメを設定するうえで、狭窄部のプラーク安定化を評価することが必要であるが、その手法は未確立である。本研究は高解像度造影 3D-MRI を用いた vessel wall imaging (VWI)をその指標として用い、プラーク性状評価とともに治療効果判定に用いることができるかを検討した。

【方法と結果】まず VWI を施行した 20 例を対象として、脳梗塞発症時と再検時の VWI 所見を比較した。初回は全例で VWI 陽性であった。脳梗塞発症前からスタチンを内服していたのは 1 例のみであった。脳梗塞急性期治療として全例で抗血小板薬 2 剤併用とスタチンの投与を開始した。このうち非再発例 11 例で VWI の再検を行った。初回と 2 回目の検査間隔は中央値 101 日であった。造影効果比を比較

した結果、6例でプラーク安定化がみられた。脳梗塞再発時に VWI を再検した例は3例あり、いずれも初回より造影効果比が増強していた。この結果より VWI が頭蓋内動脈狭窄病変のプラーク安定化、治療効果判定に有用であることが示唆された。

【研究の現状と今後の展望】現在、前向き観察研究の患者登録を進めている。プラーク安定化マーカー候補を ELISA で測定するための血清サンプルを全例で採取し、凍結保存している。ELISA は順次進めている。VWI の変化とこれらのバイオマーカー、治療内容との関連を解析していく予定である。

課題番号：R04 基-024

研究課題：不妊症における免疫系システムの関与に関する検討

研究代表者名（所属）：下屋 浩一郎（産婦人科学）

共同研究者名：齋藤 渉、松本 良、松本 桂子、杉原 弥香

【緒言】我々はこれまで生殖領域において様々な免疫関連因子が男性生殖能力、排卵・受精・着床に関与していることを報告してきた。体外受精-胚移植において男性因子を評価する手法は確立されているとは言えず、精液中の免疫関連因子の有する機能および体外受精-胚移植における受精能等の評価指標として有用性を明らかにすることは不妊治療における進歩に寄与する可能性がある。

【方法】体外受精-胚移植の際に精子回収後に廃棄される精漿を用いて精液中のサイトカイン濃度（IL-17A, IL-1RA, IL-4）と精液所見および体外受精-胚移植治療成績との相関を検討し、不妊治療におけるこれらサイトカインの意義について検討した。精液所見の正常所見(WHO2021)を基準とし、精子濃度、運動率の正常群と異常値群に分類し、体外受精-胚移植の成績として受精卵から胚盤胞に 50%以上至った群(胚盤胞良好群)と至らなかった群(胚盤胞不良群)に分け検討した。〈倫理委員会 承認番号 5519-00〉

【結果】精液所見については精子濃度正常群が3例、精子濃度異常群が38例。運動率正常群が25例、異常群が16例であり、各サイトカイン濃度について有意差は認められなかった。また、胚盤胞良好群が17例、胚盤胞不良群が24例であり IL-4 のみが胚盤胞不良群に比べて胚盤胞良好群で有意に ($p=0.008$) 高値であった。

【考察】体外受精-胚移植の成績に男子の精漿中 IL-4 が有用な指標となりうる可能性が示され、今後さらに症例数を増やし解析を進めている。

課題番号：R04 基-102

研究課題：全身性強皮症の皮膚硬化におけるエピジェネティクス異常誘導機構の解明

研究代表者名（所属）：浅野 澄恵（リウマチ・膠原病学）

共同研究者名：守田 吉孝、中野 和久、青山 裕美

【目的】全身性強皮症(SSc)の発症には DNA メチル化異常が注目されているが詳細は不明である。本研究では SSc の皮膚硬化過程における、炎症性サイトカインや低酸素環境がもたらす表皮細胞のエピゲノム修飾と機能変質の分子基盤を明らかにする。

【方法】SSc 患者の皮膚硬化部および皮膚腫瘍切除患者の健常部(手術時余剰検体)より、凍結切片・ホルマリン固定パラフィン切片の作成と表皮細胞・線維芽細胞の単離を行う。DNA 脱メチル化酵素 TET1 の発現の比較のため、組織切片の染色を行う。

【結果】TET1 は、発症早期 SSc 患者の組織切片において明らかな発現亢進は認められなかった。表皮細胞・線維芽細胞の単離および初代培養に成功した。

【結論】今後はさらに DNA メチル化酵素や DNA メチル化状態を組織染色で検討し、染色された表皮細胞に対してレーザーマイクロディセクションを行い、メチル化 DNA 免疫沈降およびヒドロキシメチル化 DNA 免疫沈降、網羅的 mRNA 発現解析に提出、DNA メチル化/脱メチル化等に関与する重要な遺伝子を検索する。また、単離した表皮細胞における高サイトカイン環境および低酸素刺激下にて、これらの遺伝子の DNA メチル化状態を解析し、候補遺伝子を抽出する。この候補遺伝子を表皮細胞で高発現または発現欠損させ、線維芽細胞と共培養し、線維化マーカーおよび細胞外マトリクスの発現を解析

する。

課題番号：R04 基-033

研究課題：網膜色素上皮細胞のメラニン合成から探る加齢黄斑変性の病態解明と新規予防薬の確立

研究代表者名（所属）：鎌尾 浩行（眼科学 1）

【目的】抗酸化物質は加齢黄斑変性の予防効果が示されているが、酸化ストレスに対する網膜色素上皮細胞（RPE）のメラニンの役割は解明されていない。そこで RPE のメラニン生成に対する Hydroquinone（HQ）の影響を評価し、酸化剤誘導細胞死に対する効果を評価した。

【方法】胎児 RPE を異なる濃度の HQ（0、1、10、100 μ M）で 7 日間培養後、LDH 試験で細胞障害率を評価した。次に 10 μ M HQ で胎児 RPE を 1 週間培養後に色素量を透過率試験、24 時間培養後にメラニン形成特有遺伝子（MITF、TYR、TYRP1）の発現量を定量 PCR、1 週間培養後に酸化剤（tBHP）を添加し LDH 試験で細胞障害率を評価した。

【結果】Rapamycin 添加 1 日後の死細胞率は、添加なしが 0%、1 μ M が 0.8%、10 μ M が 1.2%、100 μ M が 0.3%と全ての濃度で細胞障害を認めなかった。RPE の透過率は添加なしと比較し、添加前は 100%、1 週間後は 121%と透過率は有意に上昇した。メラニン形成特有遺伝子の発現量は、MITF が 0.7 倍、TYR が添加 1 日後は 1.2 倍、TYRP1 は 1.1 倍と全て有意差を認めなかった。tBHP 添加による細胞障害率は、DMSO が 26.4%、HQ が 31.3%と有意差を認めなかった。一方、鉄キレート剤（DFO）を添加すると 6.2%を有意に減少し、鉄剤を添加すると 82.3%有意に上昇した。

【結論】HQ は RPE のメラニン形成特有遺伝子の抑制なしにメラニン量が減少させた。RPE の酸化剤誘導細胞死は鉄の濃度依存のためフェロトシスであり、メラニン量はフェロトシスに影響を与えなかった。

課題番号：R04 基-086

研究課題：睡眠呼吸障害と嗅覚障害の関連について

研究代表者名（所属）：濱本 真一（耳鼻咽喉・頭頸部外科学）

共同研究者名：三宅 宏徳、前田 祐一郎、若林 時生、田所 宏章、兵 行義、原 浩貴

嗅覚障害は鼻中隔彎曲などの鼻腔の形態異常、アレルギー性鼻炎や副鼻腔炎、頭部外傷や神経変性疾患、加齢などさまざまな原因で生じる。近年、閉塞性睡眠時無呼吸 OSA などの睡眠呼吸障害と嗅覚障害の関連性を示す報告も認める。OSA を合併した嗅覚障害におけるメタアナリシスでは、無呼吸指数 AHI の増加と嗅覚機能障害に相関が示されている。OSA は嗅覚障害の発生率が高く、嗅覚障害の程度は OSA の重症度と相関するとされる。しかし、OSA における嗅覚障害の誘因や病態については不明な点が多いままである。そこで、当科睡眠呼吸障害外来を受診した患者を対象として、睡眠呼吸障害に関連する症状アンケートを集計し嗅覚障害の合併について調査を行う。嗅覚障害を有する症例については睡眠時無呼吸検査の結果と、日常のにおいアンケート（日本鼻科学会）を用いた嗅覚障害の程度についても検討する。さらに、アンケート結果から患者背景や環境因子などの影響についても検討し、嗅覚障害に関連した QOL 調査を行う。今回の検討では、OSA に関連する嗅覚障害について、睡眠障害における各種パラメータの解析を進めることによってその関連性の解明を目的としている。

課題番号：R04 基-087

研究課題：内喉頭筋における Myostatin 阻害は音声障害の新規治療となり得るか？

研究代表者名（所属）：田所 宏章（耳鼻咽喉・頭頸部外科学）

共同研究者名：濱本 真一、原 浩貴、兵 行義

会話によるコミュニケーションは日常生活の根幹である。コミュニケーションの不良は認知機能の低下にも影響するため、超高齢社会の本邦では特に注意を払う必要がある。会話には良好なインプットとアウトプットが必要であり、聴覚障害と音声障害のいずれも患者の

Quality of life を低下させる。音声障害の中でも加齢に伴う声門閉鎖不良が原因の気息性嘔声は、高齢者に多くみられるが治療法は未だ確立していない。また声帯麻痺に伴う声門閉鎖不全が原因の気息性嘔声に対しては外科的治療が行われているが、その手技の専門性の高さから治療は十分に普及していない。そこで我々は、内喉頭筋を肥大させ声門閉鎖不全を解消させるとともに声帯筋の筋力を増強することで音声を改善させることを考えた。

本研究では筋肉の過形成を抑制する分子である Myostatin を過剰発現することで全身性に筋過形成を来す変異 Myostatin トランスジェニックマウス（以下変異 Mstn tg マウス）を用いて内喉頭筋を含む声帯の評価を行い、内喉頭筋の Myostatin 阻害による音声障害に対する新規治療の可能性について検討する。

課題番号：R04 基-058

研究課題：単色 X 線を用いた生体内における塞栓物質の血管内動態の観察

研究代表者名（所属）：林田 稔（放射線診断学）

共同研究者名：中村 博貴、福永 健志、山本 亮、玉田 勉

Purpose: イミペネムシラスタチン(IPM/CS)の in vivo での塞栓物質としての特性を解明すること。

Materials and Methods: 健康な日本白色家兔(約 3 kg)3 羽を対象とした。あらかじめ兔の片側耳介にはピシバニール(0.5 KE)を皮下注射し炎症モデルを作成した。微小血管の観察を必要とすることから SPring-8 の BL20B2 ビームラインで単色 X 線を用いて撮像、観察を行った。三種混合麻酔を使用し、すべての手技を麻酔下で行った。耳介動脈中間枝にエラスター針(26 G)を留置し、塞栓前の血管造影を施行。その後、非イオン性造影剤(5 ml)と IPM/CS(0.5 g)の混和物を塞栓剤として用いた。塞栓剤を耳介動脈中間枝から 2ml 注入した。塞栓時から塞栓後、10 分毎に血管造影(最大 90 分後まで)を行った。得られた画像から、塞栓される血管径、再開通時間(正常部位、炎症部位の比較)に関して評価を行った。

Results: 一時的に塞栓される血管径は平均 $267 \pm 58.35 \mu\text{m}$ 、range:174-363 μm であった。炎症部位の血管は塞栓後 90 分間の観察では再開通は認めなかったが、正常部位ではそれぞれ 70、90、50 分後に再開通を認めた。炎症部位と正常部位では血管塞栓後の経過が異なった。

Conclusions: IPM/CS の in vivo での塞栓物質としての特徴、塞栓される血管径や再開通時間(正常部位、炎症部位の比較)を解明した。

— 消化器・代謝・腎 —

課題番号：R04 基-039

研究課題：マウスにおける薬剤誘導性上皮除去の試み

研究代表者名（所属）：横西 哲広（解剖学）

【背景】塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium Chloride ; BC) は陽イオン界面活性剤として機能する第 4 級アンモニウムであり、消毒薬や点眼薬の防腐剤として医療応用されている。BC を含む点眼薬の長期間の使用により角膜上皮が傷害されることが知られている。そこで、BC が上皮傷害を引き起こす点に着目し、精細管内に BC を注入すると、精上皮が選択的に除去されることが分かった。また、膀胱内に注入すると濃度依存的に膀胱上皮が除去された (R03 基-009)。このことから、BC は様々な上皮を傷害しうることが示唆された。【目的】本研究では、マウスの腸管や腎臓の上皮細胞に対して BC を用いた薬剤誘導性上皮除去の可能性を探索した。【方法】生後 3 日齢の ICR 仔マウスから摘出した腸管や腎臓の組織片を 0~0.08%BC に反応させ、数日間培養したのちに回収した。上皮やその他の構造への影響を、HE 染色像、免疫染色像とウェスタンブロットを用いて検討した。【結果】BC によって腸管と腎臓の E-cadherin 陽性の上皮細胞が除去された。BC による上皮以外の間質細胞や神経、血管などの構造への影響について解析を行い、上皮特異的な濃度や反応時間を最適化する予定である。

課題番号：R04 基-032

研究課題：抗肥満脂質を分解する酵素の役割と制御機構の解析

研究代表者名（所属）：坪井 一人（薬理学）

共同研究者名：北風 圭介

N-アシルエタノールアミン (NAE) は長鎖脂肪酸とエタノールアミンが縮合した機能性脂質であり、食欲抑制・脂肪分解などの作用を示すことから肥満を抑制的に制御する。我々は以前に、NAE 酸性アミダーゼ (NAAA) と酸性セラミダーゼ (AC) の 2 つのリソソーム酵素が NAE を分解することを示した。これらの酵素の機能解析は肥満のメカニズムの解明に貢献すると考えられる。NAAA と AC の簡便な活性測定に有用な蛍光基質として、それぞれ PAMCA と LAMCA が知られている。しかしながら、両酵素が混在する生体試料の測定時には NAAA と LAMCA の反応性および AC と PAMCA の反応性が問題となることが予想されるため、以下の検討を行った。まず、LAMCA は市販されていないため、有機合成後に精製した。次に、FLAG タグを付加したヒト NAAA および AC を培養細胞に発現させ、培養上清から精製酵素を調製した。得られた精製酵素を PAMCA もしくは LAMCA と 37℃ で反応させ、蛍光強度の測定により酵素活性を定量した。その結果、PAMCA を基質とした場合、NAAA の活性が認められたが AC の活性はほとんどみられなかった。一方で、LAMCA を基質とすると、AC だけでなく NAAA にも活性が認められた。すなわち、PAMCA は NAAA に特異性を示すことが明らかとなった。一方、LAMCA は AC だけでなく NAAA によっても分解されたため、LAMCA を用いて生体試料中の AC 活性を測定する際には NAAA の共存に注意が必要であると考えられる。

課題番号：R04 基-065

研究課題：腎臓病と骨格筋の関連機序と腎保護効果の解明

研究代表者名（所属）：山本 稔也（総合老年医学）

共同研究者名：高須 将伸、岸 誠司、柏原 直樹

【背景】慢性腎臓病 (CKD) 患者では筋量と筋力の低下が起きやすいことが知られている。一方で、CKD に対する運動療法の見解は定まっておらず、むしろ腎血流を減らすため積極的に運動は推奨されていなかった。さらに、腎臓病の進展抑制を目的とした低タンパク食が現在の食事療法の主流となっているため、筋肉量維持が困難であり、サルコペニア合併 CKD が増加している。骨格筋の成長を負に制御するマイオスタチンの機能を欠失したマウスは、筋萎縮が予防され、腎機能障害が抑制されて敗血症からの生存率が高まることが示されており、筋腎関連の存在が示唆されているが、運動療法によるマイオカインの腎機能への影響およびその機序については不明である。

【目的】運動療法による筋腎関連を介した腎症進展抑制効果とその分子機序解明を本研究の目的とした。

【方法】C57B16 マウスを使用した。自発的車輪ランニングを 3 か月行う群と、通常飼育マウスの群において、急性腎障害（虚血再灌流モデル）時の腎障害の程度について評価した。

【結果】自発的車輪ランニングを行ったマウス群においては、非ランニング群と比較して虚血再灌流後の腎障害（血清クレアチニン、尿素窒素）・組織障害の程度が軽かった。

【結論】運動療法は、急性腎障害時の腎機能低下に保護的に働く可能性が示唆された。現在、変異マイオスタチン遺伝子高発現トランスジェニックマウスを使用し詳細な機序について検討中である。

課題番号：R04 基-063

研究課題：糸球体内皮—上皮細胞連関における sGC 活性化による TRPC 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）

共同研究者名：柏原 直樹、梶本 恵理子

背景：本邦における慢性腎臓病 (CKD) 患者は増加傾向にあり重要な医療問題である。早期の CKD 発症には内皮機能障害が重要であることを報告してきたが、多く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。このため糸球体内皮細胞から上皮細胞

胞への障害機序伝搬・クロストーク機序（内皮-上皮連関）が想定される。「内皮機能障害による eNOS-NO 機能不全が糸球体上皮細胞の sGC 活性化低下を介して、糸球体硬化病変形成を促進させる」との仮説を証明する。

方法：糸球体上皮細胞における sGC 活性化の意義を検討する。eNOS-NO 経路の破綻による糸球体上皮細胞 sGC 活性化不全の影響を検討するため糸球体上皮細胞特異的 sGC 欠損マウス (podo-sGC-KO) を作成した。本マウスにストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病モデルを作成し組織変化及び GFR へ与える影響を検討した。

結果：PAS 染色では podo-sGC^{f1/f1}-STZ ではメサンギウム基質の増加を認めた。糸球体上皮細胞の sGC タンパク発現を免疫染色で検討したところ糖尿病発症により有意な増加を認めていた。また podo-sGC^{f1/f1}-STZ では sGC タンパク発現は消失していた。また糸球体サイズを計測したところ糖尿病モデルマウスでは糸球体サイズの増大を認めるが podo-sGC^{f1/f1}-STZ では変化を認めなかった。

結語：糖尿病性腎臓病の糸球体上皮細胞における sGC 活性化は糸球体病変の形成に抑制的な役割を担っている。今後、さらなる検討を行う。

課題番号：R04 基-064

研究課題：細胞老化制御による腎寿命延伸を介した老化制御達成のための基盤研究

研究代表者名（所属）：岸 誠司（腎臓・高血圧内科学）

共同研究者名：高須 将伸、柏原 直樹

背景：老化に伴って臓器機能は低下する。腎臓は加齢とともに臓器機能が低下する代表的な臓器であり、長寿化が達成された一方で高齢での末期腎不全が増えている。

老化の定義およびその分子機構は明らかにはなっておらず、また、老化が始まるタイミングやその速度を決める機構も不明である。したがって現時点で老化をターゲットにした治療法は存在しない。これらの機序が明らかになれば老化を予防・診断したり治療することが可能となる。

方法：新しい老化のモデル動物である ICE (for Inducible Changes to the Epigenome) マウスを作成した (Cell. 2023 Jan 19;186(2):305-326. 慶應義塾大学早野博士との共同研究)。このマウスはタモキシフェンを投与する期間だけ I-PpoI と呼ばれるエンドヌクレースが DNA の突然変異を生じることなくマウス DNA を障害する。若齢期に 3 週間だけ DNA 損傷を誘導し、14 ヶ月齢のマウスから腎臓を採取し、腎臓のフェノタイプを評価した。

結果：ICE マウスの糸球体病変はコントロールマウスに比較してメサンギウム基質の増加や糸球体硬化を認める糸球体が多く認められた。一方で、尿細管の形態および間質線維化は ICE マウスとコントロール群では大きな差は認められなかった。

結語：DNA 損傷に対する感受性は腎臓内にあっても構成する細胞間で違いがあることが示唆された。尿細管においては病的障害に対する応答が変わっている可能性があるためさらに検討を進める。

課題番号：R04 基-068

研究課題：腎間質線維化進展機序における sGC 活性化の意義の検討

研究代表者名（所属）：板野 精之（腎臓・高血圧内科学）

共同研究者名：角谷 裕之、柏原 直樹

背景】慢性腎臓病は、内皮機能障害 (NO 産生低下) を随伴している。NO の受容体である soluble guanylyl cyclase (sGC) の刺激薬は、抗線維化効果を有していることが示唆されているが、末期腎不全の final common pathway である腎間質線維化に与える影響は十分検討されていない。一方で、細胞表面に存在する TRPC6 (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6) は、受容体活性型 Ca²⁺チャネルであり、その遺伝子異常は糸球体硬化症を来することが報告されている。sGC の下流に存在する cGMP- dependent protein kinase (PKG) が、TRPC6 チャネルをリン酸化することで TRPC6 下流のシグナルを抑制的に制御していることが報告されている。我々は「内皮 NO/sGC 経路が尿細管上皮 TRPC6 チャネルを介した活性酸素の生成を抑制的に制御しており、本経路の破綻が腎間質線維化を促進する」と仮説を立て検討した。

【方法】10 週齢の野生型マウス (WT)、eNOS 欠損マウス (eNOSKO) を用いた。腎間質線維化モデルである片側尿管結紮 (UUO) を作成し、2 週間後に屠殺し組織を採取した。また、一部の群においては、sGC 刺激薬として、Bay41-2272 を腹腔内投与した群も作成した。

【結果】WT-UUO マウスに比較して eNOSKO-UUO マウスでは、間質の線維化が顕著に増悪していたが、eNOSKO-UUO 群に Bay41-2272 を投与すると間質の線維化が抑制された。現在、近位尿細管特異的 GCAMP5 (蛍光 Ca^{2+} -センサー) 発現マウスを作成中であり、細胞内 Ca^{2+} ダイナミクスと腎循環を並行して in vivo imaging 下で評価する予定である。

【結語】内皮機能障害存在下においても sGC 刺激薬は、間質線維化を抑制できる可能性が示唆された。

課題番号：R04 基-062

研究課題：Keap1-Nrf2/TRPC6 経路による糸球体濾過率 (GFR) 制御機構の解明

研究代表者名 (所属)：城所 研吾 (腎臓・高血圧内科学)

共同研究者名：角谷 裕之、柏原 直樹

背景：Keap1/Nrf2 経路は、抗酸化遺伝子発現の中心的な制御機構である。Nrf2 活性化薬は、糖尿病性腎臓病患者における GFR を増加させたが、その機序は不明である。Nrf2 活性化は糸球体細胞 (ポドサイト) の TRPC を介したカルシウム動態を制御することで、糸球体濾過面積を増大させ GFR を増加させる、と仮説を立て検証する。これまでの研究で、Nrf2 活性化は、Redox 感受性 TRPC5/6 からのカルシウム流入を抑制することが示されている。カルシウム動態変化に伴うポドサイトのアクチン変化を検証した。

方法：培養ポドサイトを用いて実験を行う。Tempol (3mM)、TRPC5 阻害薬 (AC1903:30 μM)、TRPC6 阻害薬 (BI749327:30nM)、Nrf2 活性化薬 dh404 (1 μM) による preincubation を行い、 H_2O_2 (100 μM) 刺激によるアクチン変化を蛍光 phalloidin 染色により評価する。またアクチン変化に重要な RhoA、cdc42、Rac1 活性を評価する。

結果： H_2O_2 刺激により培養ポドサイトのアクチン再配列が確認されたが、Tempol、AC1903、BI749327、dh404 により抑制された。また細胞中の RhoA 活性亢進も dh404 にて抑制された。

結語：Nrf2 活性化は、Redox 感受性 TRPC5/6 からのカルシウム流入を抑制することで、アクチン再配列を抑制することが示唆された。

課題番号：R04 基-067

研究課題：eNOS/NO/PKG 経路の wnt/ β -catenin 経路制御機構を介した尿細管保護効果の検討

研究代表者名 (所属)：山内 佑 (腎臓・高血圧内科学)

共同研究者名：角谷 裕之、長洲 一、柏原 直樹

【背景】腎間質線維化は末期腎不全の final common pathway である。内皮機能障害に起因する一酸化窒素 (NO) 産生低下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。近年、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。我々は「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、PKG inducer と 8Br-cGMP で 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、 β -catenin のリン酸化を制御している GSK-3 β の阻害薬である塩化リチウム (Li) を飲水投与し、腎組織変化を検討した。また、NO シグナル増強のため、sGC 刺激薬 (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：R04 基-061

研究課題：鉱質コルチコイド受容体(MR)拮抗薬による糖尿病性腎臓病の進展抑制効果の検討

研究代表者名(所属)：近藤 恵(腎臓・高血圧内科学)

共同研究者名：城所 研吾、立川 理絵、岩倉 主、柏原 直樹

背景：非ステロイド性 MR 阻害薬(MRA)の糖尿病性腎臓病(DKD)に対する腎保護効果が示されたが、その作用機序は不明である。DKD の糸球体障害進展には、ポドサイトにおける MR 活性化による酸化ストレスと Transient Receptor Potential Canonical(TRPC)の発現増加・活性亢進が関与する、と仮説を立て検証する。

方法：C57BL/6 マウス、糖尿病モデル Akita マウスを用いる。6 週齢で片腎摘(Nx)を行い、7 週齢から高食塩食(3%NaCl;HS)を与える。Control-Nx、AKITA-Nx、AKITA-Nx+HS、AKITA-Nx+HS+MRA (Finerenone 10mg/kg/day、8 週間)の群を作成し、15 週齢で屠殺、組織の解析を行った。

結果：AKITA 群では MRA による血圧、血糖の変化はなかった。AKITA-Nx+HS では尿中アルブミンの有意な増加、ポドサイト足突起の癒合が観察された。また *Ex vivo* 実験にて糸球体内 ROS 亢進、NO 低下、さらに *in vivo* imaging を用いた糸球体濾過評価では、糸球体からの著明なアルブミン漏出が確認された。MRA はこれらの変化を改善した。

結語：MRA は DKD の糸球体における酸化ストレスを軽減し、アルブミン尿を減少させた。MRA 投与によりポドサイト形態は維持されており、アルブミン尿の改善との関連が示唆された。

課題番号：R04 基-004

研究課題：過敏性腸症候群の粘膜細菌叢および糞便中有機酸解析

研究代表者名(所属)：塩谷 昭子(消化器内科学)

共同研究者名：梅垣 英次、松本 啓志、半田 修、大澤 元保

背景：過敏性腸疾患(irritable bowel syndrome:IBS)の病態に、腸管免疫を介して腸内細菌が関与していることが報告されている。腸管上皮の粘膜に付着している細菌叢、粘膜関連細菌叢(Mucosa-associated Microbiota:MAM)を検討し、下痢型 IBS (IBS-D)、便秘型 IBS (IBS-C)および健常者、の 3 群で比較検討した結果を報告した。**目的**：今回、症例数を追加し同様に 3 群で比較し、さらに便中の短鎖脂肪酸についても解析を加えた**方法**：大腸内視鏡検査の際に、ポリエチレングリコールを用いた前処置後に内視鏡下にブラシを用いて回腸、S 状結腸粘膜の粘液を採取した。各サンプルから 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。QIIME を用いて微生物の属レベルまでの同定を行い、細菌構成比、多様性について検討した。**結果**：対象は当院を受診した下痢型 IBS (IBS-D) 30 例、便秘型 IBS (IBS-C) 33 例および健常コントロール 23 例。 α -diversity は 3 群で有意な差を認めなかった。PCoA 解析において、Weighted、Unweighted とともに 3 群間で有意差を認めなかった。菌叢解析では属レベルで健常者と比較して、IBS-D および IBS-C に共通して Sigmoid で *Dorea* が有意に多く、回腸末端で *butyricicoccus*, *Lachnospira* が有意に少なかった。IBS-D において回腸末端および S 状結腸において *Megamonas* が多く、回腸末端で *Ruminococcus* が少なかった。IBS-C において回腸末端および S 状結腸に *Roseburia* が少なく、*Clostridium 4* が有意に多かった。回腸末端において *Parabateroides* および *Akkermansia* が有意に多かった。**結論**：対照群と比較して IBS-D と IBS-C の両群に共通して *Dorea* が多く、酪酸産生菌が有意に少なかった。

課題番号：R04 基-017

研究課題：糞便移植による高脂肪食誘発肥満マウスに大腸腫瘍発生への影響

研究代表者名(所属)：松本 啓志(消化器内科学)

【背景】大腸腫瘍発生リスクとして、高脂肪食(肥満)、運動不足があり、これらに腸内細菌叢が関与すると推測されている。**【目的】**高脂肪食(HFD)誘発マウスにおける大腸腫瘍発生に対して糞便移植治療(FMT)の有効性の検討を行った。**【方法】**Balb/c マウスに対してアゾキシメタン(AOM)誘発大腸腫瘍モデル

を作成した。糞便移植に用いる糞便は、普通食(ND)、ND+運動(ND+Ex)、HFD+Ex のものを用いた。ドナーマウスの運動は、トレッドミル運動(18m/min, 30 分/日、週 5 日)を行った。レシピエントマウスは 14 週間、週 5 回の FMT を受けた。26 週目に大腸切除、採血を行い、大腸腫瘍を計測した。大腸腫瘍内のサイトカイン発現、糞便内有機酸・胆汁酸解析を行った【結果】FMT は、血糖値を低下させたが、コレステロール値は変化しなかった。FMT は HFD 誘発肥満における AOM 誘発大腸ポリープ数を有意に抑制した。FMT によるポリープ抑制効果が一番強かったのは運動した普通食マウスの糞便を移植した(FMT(ND+Ex))群であった。FMT(ND)群は HFD 群と比較して、*Lactobacillus*, *Akkermansia* が有意に多く *Lachnospiraceae* は有意に低かった。FMT(ND+Ex)群は、*Bacteroides*, *Akkermansia* が有意に多かった。FMT(ND+Ex)群は HFD 単独群と比較して糞便中のコハク酸、プロピオン酸が有意に減少した。糞便中の酢酸が有意に増加していた。FMT(ND+Ex)群は ND 単独群と比較して糞便中の ω ムリコール酸が有意に増加、ヒオデオキシコール酸は有意に減少していた。【結果】運動したマウスの糞便の移植は、高脂肪食誘発肥満における大腸腫瘍の発生抑制効果を認めた。この抑制効果は、腸内細菌叢の変化及び糞便中有機酸の変化が関連している可能性が示唆された。

課題番号：R04 基-019

研究課題：消化管アレルギーと消化管粘膜関連細菌叢の関連性および粘膜免疫機序解明

研究代表者名(所属)：大澤 元保(消化器内科学)

【背景】好酸球性消化管疾患(eosinophilic gastrointestinal disorders; EGID)は、好酸球性食道炎(eosinophilic esophagitis; EoE)/好酸球性胃腸炎(eosinophilic gastroenteritis; EGE)に分類され、消化管粘膜上皮内への好酸球浸潤を主とする原因不明の慢性的な消化管アレルギー性疾患である。

【目的】EGID と消化管粘膜関連細菌叢(Mucosa-associated microbiota:MAM)との関連性を明らかにする。

【方法】20××年 月から 2023 年 3 月までに川崎医科大学附属病院に通院されている EGID 症例、下痢型過敏性腸症候群、コントロール症例を登録した。通常のポリエチレングリコール 2L を用いた前処置を行い、大腸内視鏡検査を行った。盲腸到達後、内視鏡を抜去しながら、内視鏡下にブラシを用いて腸粘液を採取した。サンプル採取する場所は、回腸末端、S 状結腸の 2 か所とした。同時に内視鏡検査時の朝の糞便を採取した。次世代シーケンサーで得られた粘膜及び糞便サンプルの 16SrRNA 遺伝子に基づく菌叢解析および PRCRUST を用いた機能特性を評価した。

【結果】今回の研究では、EGID 群 11 例(平均年齢 42.3 ± 14.4 、男性 6 例)、下痢型過敏性腸症候群 11 例(平均年齢 47.9 ± 16.4 歳、男性 7 例)、コントロール 9 例(平均年齢 49.0 ± 14.8 歳、男性 4 例)であった。3 群間での α -diversity(Observed, Chao1, Shannon index, Simpson)は有意差を認めませんでした。 β -diversity は Weighted UniFrac Distance は有意差を認めた($p < 0.021$)。コントロール群と EGID 群との腸内細菌叢の 2 群間比較では、EGID 群では、*Stanotrophomonas*, *Viellonella*, *Dorea*, *Gluconacetabacter*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* が有意に多かった。IBS-D 群と EGID 群の比較では、EGID 群で *Oribacterium*, *Faecalibacterium* が有意に多かった。

課題番号：R04 基-010

研究課題：慢性腎臓病の診療支援システムの開発

研究代表者名(所属)：神田 英一郎(学長付)

【背景】慢性腎臓病(CKD)患者では腎機能の低下に伴って末期腎不全および死亡が発生するリスクが高い。これらアウトカム発生の正確な予測は治療方針の策定に有用である。そこで複数の機械学習モデルによって临床上重要な指標を探索し、アウトカム発生の予測精度を比較した。

【方法】日常臨床で頻用される 22 の指標を用いた機械学習モデル[Random Forest (RF)、Gradient Boosting Decision Tree、eXtreme Gradient Boosting]を 26 種類開発した。CKD 患者のコホートデータ($n=3,714$)を解析し、1 年以内のアウトカム(末期腎不全または死亡)の発生を予測した。変数は予後に影響する順に臨床指標を選択し、モデルに組み込んだ。また、多様な患者群のデータを解析し予後予測精度(Area Under the Curve, AUC)をモデル間で比較した。

【結果】いずれの機械学習モデルでも推算糸球体濾過量、尿蛋白量、性別、リン吸着薬、ヘモグロビン、カルシ

ウム、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン阻害薬が CKD 進行の危険因子として上位にランクされた。RF モデルは、慢性腎臓病、糖尿病性腎臓病、非糖尿病性腎臓病、若年者、高齢者の患者群に於いて、他のモデルよりも高い予測能(AUC>0.9)を示した。アウトカム発生の予測確率が高くなればなるほど、発生リスクは高くなる傾向が認められた [スプライン付 Cox 比例ハザードモデル, ハザード比 20.1 (95%CI 7.4-54.6), $p<0.0001$]。

【結語】 本研究により CKD 進行に係る危険因子が明らかになり、機械学習による予後予測が多様な患者で適応できる頑強なものであることが示された。

— 腫瘍 —

課題番号：R04 基-070

研究課題：腫瘍関連マクロファージ (TAM) の機能を制御する分子の解析

研究代表者名 (所属)：山内 明 (生化学)

共同研究者名：岡本 秀一郎、宮野 佳

腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) は、腫瘍組織へ浸潤する細胞であり、抗腫瘍活性を示す免疫細胞 (キラーT 細胞等) を抑制する働きや癌の増殖・浸潤を促す働き、血管新生を亢進する働きなどが知られており、腫瘍促進的な作用を持つとされている。我々はこれまでの細胞走化性の研究から、TAM を制御することにより宿主の抗腫瘍免疫を向上させる方法を模索してきた。本研究では、TAM の機能制御を行うことを目指して、我々独自に開発してきた細胞動態アッセイによるマクロファージ様細胞のスクリーニング系の構築を試みた。

ヒト急性単球性白血病細胞株 THP-1 を用いて細胞動態を計測したところ、種々の骨髄系細胞の走化性惹起因子では遊走を起こさなかった。そこで、THP-1 をマクロファージ系へ分化させて遊走を起こすか否か検討したところ、既報で使用されていた PMA (ホルボールエステル)、ATRA (all-trans レチノイン酸)、活性化 vitamin D などでは十分な遊走を示す細胞まで分化させることはできなかった。さらに検討し、vitamin D、IFN γ 、HDAC インヒビターを組み合わせることで、ケモカイン MIP-1 α に対する強い遊走を示す細胞を誘導することができた。現在、分化後のマクロファージ系細胞を使用して走化性を制御する因子の探索を行っている。

課題番号：R04 基-059

研究課題：急性白血病に対する新規分化誘導剤開発研究

研究代表者名 (所属)：岡本 秀一郎 (生化学)

【目的】

急性白血病の治療法には、主に殺細胞効果のある抗癌剤治療と分化を誘導する分化誘導療法がある。分化誘導剤としては、レチノイン酸や亜ヒ酸などが臨床応用され治療成績の向上に寄与しているが、適応疾患が急性前骨髄性白血病 (APL) と限られている。APL 以外の白血病にも効果を発揮する分化誘導剤の開発を目指して研究を進めている。

【方法】

独自に開発した骨髄微小環境再現培養法で、複数の白血病細胞株が分化することを確認した。その培養環境で分化を誘導している因子を同定するため、透析膜を用いた分子量による分離や Bligh-Dyer 法による脂質成分の抽出などを進めて、分化誘導因子の分離精製を進めた。

【結果】

Bligh-Dyer 法で生成された画分に分化誘導因子が含まれていることを明らかにし、さらに分離精製を進めた結果、分化誘導因子が脂質メディエーターであることを明らかにした。

【結語】

更なる分化誘導因子の精製を進め、質量分析による同定を行う方針である。

課題番号：R04 基-014

研究課題：対向型 DNA 損傷に基づく炎症性発がんの理解

研究代表者名（所属）：森脇 隆仁（分子遺伝医学）

共同研究者名：大友 孝信、寺脇 正剛

対向型 DNA 損傷とは2つの DNA 損傷が同一塩基対内で対抗して存在する状態のことである。炎症は発がんとは密接に関連しており、全発がんの15%以上は何らかの感染による炎症が原因であると見積もられている。炎症部位では突然変異頻度が上昇することが知られており、これが発がんの原因と考えられているが、なぜ炎症部位で際立って高い頻度で突然変異が生じるのか、そのメカニズムについては明らかとなっていなかった。本研究では炎症における突然変異の原因を8-オキシグアニンとウラシルで構成される対向型 DNA 損傷であると仮説をたて、その修復や細胞応答の機序について解析を行っている。

本研究では細胞内に存在する対向型 DNA 損傷を認識するタンパク質の探索を行った。その結果、ウラシルの単独損傷を認識するタンパク質は一部対向型 DNA 損傷を認識することができることが示唆された。その一方で対向型 DNA 損傷に特異的なタンパク質の存在も確認された。また、対向型 DNA 損傷ではウラシルが優先的に除去されることがわかった。

以上のことから推測すると、対向型 DNA 損傷の修復を効率的に行うため、対向型 DNA 損傷では損傷を除去する順番が決まっており、ウラシルの除去を優先的に行うために8-オキシグアニンの修復酵素が結合できないように防ぐタンパク質の存在が想定された。今回の研究成果をもとに、炎症性発がんのメカニズムを解き明かし、臨床での応用につなげていきたい。

課題番号：R04 基-018

研究課題：分子標的薬耐性肺癌における活性酵素の役割

研究代表者名（所属）：瀧川 奈義夫（総合内科学 4）

共同研究者名：山根 弘路、中西 秀和、越智 宣昭

【背景】分子標的薬の中で、ALK 阻害薬耐性に関与する未知の蛋白の同定を目的としたプロテオーム解析の報告は我々の知る限り無い。【方法】ALK 陽性肺癌細胞株（ABC-11）とそのアレクチニブ耐性株（ABC-11/CHR2）の2次元ゲル電気泳動を行い、ピークが異なるものをMALDI-TOF 型質量分析システムを用いてプロテオーム解析を実施した。アミノ酸配列の同定には Mascot 検索システムの MS/MS Ion Search を用いた。superoxide dismutase (SOD) 1、AKT、PARP、および BRCA1 発現は Western blotting、細胞増殖抑制試験は cell count と MTT assay で行った。SOD1 阻害効果の検討には、siSOD1 と SOD1 阻害薬の LCS-1 を使用した。【結果】2次元ゲル電気泳動では約2000スポットにおいて発現量の差が認められ、耐性株に高発現している蛋白として SOD が同定された。Western blotting でも SOD1 の高発現が確認された。siSOD1 および LCS-1 はアレクチニブの増殖抑制効果を増強し、cleaved PARP の上昇、pAKT および BRCA1 の低下をもたらした。【考察】活性酸素を分解する酵素が SOD1 であり、アレクチニブ耐性機序のひとつとして SOD1 の過剰発現が想定され、SOD1 阻害薬による耐性克服の可能性が示唆された。

課題番号：R04 基-092

研究課題：PD-1/PD-L1 共発現細胞株に対する PD-1 阻害剤と PD-L1 阻害剤の細胞増殖への影響に関する基礎研究

研究代表者名（所属）：山根 弘路（総合内科学 4）

共同研究者名：長崎 康有、越智 宣昭、中西 秀和、瀧川 奈義夫

本邦および米国で研究開発された免疫チェックポイント阻害剤（以下 ICI）は数多くの悪性腫瘍において高い抗腫瘍効果が報告されている。一方で、ICI の投与時には急激に腫瘍の増大をきたす Hyper Progressive Disease（HPD）が数%頻度で発症することが確認され、その機序の解明が待たれるところである。我々は小細胞肺癌細胞株 SBC-3 に PD-1 と PD-L1 の双方が共発現していることを報告し、その後の研究で①nivolumab 投与により SBC-3 細胞株の増殖が促進すること。その際には②ERK/AKT などの細胞内シグナルのリン酸化が亢

進すること。などを事前実験で確認した。これらは PD-1/PD-L1 の系で細胞増殖調整が行われている可能性を示すものである。ニボルマブ存在下では細胞密度が 300-500 倍になった時点で細胞増殖が著名亢進することから、相対的な低酸素状態が細胞増殖メカニズムに関与している可能性を考え、SBC3 細胞培養上清における sPDL1 濃度を経時的に測定したところ、sPDL1 濃度の経時的な上昇を認めた。またニボルマブと同様にアテゾリズマブ存在下での細胞増殖を確認するとアテゾリズマブ存在下では細胞増殖の亢進は認められなかった。

これらのデータから、現在低酸素状態における細胞表面の PD-L1 の発現と HIF-1 α の発現と細胞増殖との関連性に注目して現在追加研究を行っている。

課題番号：R04 基-091

研究課題：殺細胞性抗がん薬による第 3 世代 EGFR-TKI 耐性誘導と克服に関する検討

研究代表者名（所属）：越智 宣昭（総合内科学 4）

共同研究者名：瀧川 奈義夫、山根 弘路、中西 秀和、長崎 泰有

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) 耐性機序は未だ解明が十分でない。我々は、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株 (H1975 細胞：L858R+T790M 変異) において Pemetrexed (PEM) 耐性獲得後に未知の機序による Osimertinib 耐性を誘導されることを見出した。これまでの検討からその耐性機序として YES1 遺伝子の関与が示唆され、特異的 YES1 阻害薬 (CH-XX) と Osimertinib による相乗効果も示された。また、EGFR 遺伝子変異 status の異なる RPC9 細胞株 (Ex19 欠失+T790M 変異) においても同様に PEM 耐性獲得による Osimertinib 耐性誘導を認めた。RNA シークエンスにより、H1975 と H1975/PEMR, RPC-9 と RPC-9/PEMR のトランスクリプトーム解析を行った。H1975 vs H1975/PEMR の比較では、2596 の遺伝子に有意な変動を認め、RPC-9 vs RPC-9/PEMR の比較では、566 の遺伝子に有意な変動を認めた。Enrichment analysis (TRUST database) により、2 種類の細胞系で共通して 3 つの転写因子 (RELA, NFkB1, SP1) が有意に変動していることが示された。

課題番号：R04 基-105

研究課題：RNA sequence を用いた肺癌オルガノイドにおける融合遺伝子の同定と actionable 変異に対する抗腫瘍効果の誘導

研究代表者名（所属）：山辻 知樹（総合外科学）

共同研究者名：深澤 拓也、湯川 拓郎

オルガノイドは解剖学的・機能的に生体内の器官に近い特徴を有し、現在正常組織のみならず、疾患組織由来のオルガノイドが樹立され、多岐にわたる研究に応用されてきている。また各臓器癌に由来するオルガノイドが、細胞株や遺伝子改変マウスに代わる新しい癌モデルとして、個別化医療や新規治療法の開発に用いられてきている。この中で申請者らは、肺癌切除組織からのオルガノイドの樹立を行い、肺癌オルガノイドのライブラリ化を進めてきた。我々は、whole exome sequence にてドライバー遺伝子の検出には至らなかった肺癌オルガノイドに対し、RNA sequence を行い、融合癌遺伝子の：TPM3-R0S1 が検出でき、選択的チロシンキナーゼ阻害による抗腫瘍効果が誘導できた症例につき報告した (Yokota et al. NPJ Precision Oncology 5, 29. 2021)。今回我々は、肺腺癌由来オルガノイド PDT-LUAD#99 および PDT-LUAD#119 に対し RNA sequence を行い、複数の融合遺伝子発現を確認した。特に後者においては、肺癌ドライバー遺伝子の一つである EML4-ALK 融合癌遺伝子 variant 3 を検出しており、現在 ALK tyrosine kinase 阻害剤への感受性を解析している。

課題番号：R04 基-104

研究課題：疾患モデルとしての肺癌オルガノイドにおける癌不均一性の解析

研究代表者名（所属）：深澤 拓也（総合外科学）

共同研究者名：山辻 知樹、湯川 拓郎

近年 3 次元培養技術が進歩から、生検サンプルや切除臓器を活用したオルガノイド研究が進められ

てきている(Lancaster MA et al. Science 345:1247125. 2014)。オルガノイドは、患者由来腫瘍組織からも作出することが可能であり、個人や特定の腫瘍に最適な臨床試験や新規治療法の開発が可能となってきた。2011年佐藤らは大腸癌オルガノイドが、患者癌の組織学的形態を反映しているばかりでなく、癌組織の複雑さ、癌の不均一性を忠実に再現していることを示し、癌研究における優れた疾患モデルであることを報告している(Sato T et al. Gastroenterology. 141: 1762-72. 2011)。申請者らは、2018年11月より肺癌切除組織からのオルガノイドの樹立を行い、現在ライブラリ化を進めている。肺癌オルガノイドにおける癌不均一性を解析するために動原体特異プローブを用いたFISH法による核型解析を行なった。肺癌オルガノイドを構成する個々の細胞で染色体数が異なり、不均一な細胞集塊であることが示された。また今回の検討においてオルガノイドの一部には作製条件によって明らかに染色体数の異なるものが観察されており、樹立における培地選択性があることが示唆された。

課題番号：R04 基-097

研究課題：高齢がん患者に対する免疫チェックポイント阻害薬の院内使用実態調査
—SS-MIX2 と院内がん登録を用いた大規模データ分析—

研究代表者名(所属)：黒瀬 浩史(呼吸器内科学)

共同研究者名：岡 三喜男、小賀 徹

【背景】免疫チェックポイント阻害薬(ICI)は、各種がん治療の標準薬として適応拡大している。しかし高齢者では効果の減弱や副作用の増加が懸念され、適切な治療対象を選別することが重要である。本研究では、院内でICI療法を実施した全患者の使用実態を明らかにし、高齢がん患者割合や臨床検査値、副作用、予後を解析し適切な治療対象を探索する。

【方法】2014年1月～2022年11月まで、SS-MIX2標準化ストレージを用いてICI療法を実施した当院全患者523例の病歴、薬歴、検査歴を収集し、使用実態を明らかにする。

【結果】患者内訳は、男/女=374/149例、年齢<75歳364例、≥75歳159例(≥85歳15例)、対象疾患は、肺癌182例(非小細胞肺癌157例、小細胞肺癌25例)、胃癌86例、食道癌41例、大腸癌15例、肝細胞癌40例、腎細胞癌29例、尿路上皮癌52例、頭頸部癌47例、悪性黒色腫36例、乳癌10例、ホジキンリンパ腫7例、悪性胸膜中皮腫4例、原発不明癌4例、MSI^{hi}固形癌3例、子宮癌2例であった。全身性ステロイドの使用割合は、<65歳21%、65-74歳15%、≥75歳14%で、若年に多い傾向であった。

【結論】院内ICI使用患者の実態を調査した。ステロイドは若年で投与頻度が高く、高齢者では免疫関連有害事象が少ない可能性がある。今後院内がん登録情報と統合し予後解析を追加していく。

課題番号：R04 基-049

研究課題：PET陰性を示した充実型肺腺癌の臨床病理学的特徴

研究代表者名(所属)：清水 克彦(呼吸器外科学)

共同研究者名：中田 昌男、杉山 華衣、野島 雄史

＜背景＞胸部CTにて肺結節が発見された場合、肺癌かどうかの鑑別が最も重要となる。肺癌の可能性が高いと考えられる場合には、基本的に生検を行うが、近年では診断と治療を兼ねた手術が行われることが多い。この際、肺癌であるかの判断は胸部CT所見とPET/CTでのFDG集積の程度等をもとに総合的に行われる。しかし、FDG集積を伴わない充実型肺癌症例がまれに経験される。今回該当症例をまとめ、臨床病理学的特徴を検討し、免疫組織染色学的な考察を行った。

＜方法＞川崎医科大学附属病院で2012年から2021年の間に手術を行った肺癌症例を対象とした。診療録より患者情報、画像所見、病理学的所見、予後情報を抽出し、臨床病理学的特徴を検討した。また、研究目的に腫瘍のEGFR遺伝子変異、PD-L1発現、腫瘍関連リンパ球浸潤(CD8+TIL)数、増殖因子(Ki-67)の検討を行った。

＜結果＞727例の肺癌切除症例中、腫瘍径1-5cmでFDGの集積が2以下であった症例は22例(3.0%)であった。これらの症例の特徴としては、粘液を産生する肺癌が多く、分裂能が低い傾向にあった。EGFR遺伝子変異、PD-L1発現、CD8+TIL数に相関は認めなかった。また、再発した症例はなく予後が非常に良

いと考えられた。

課題番号：R04 基-034

研究課題：高齢乳癌患者に対する高齢者総合的機能評価スクリーニングツールの開発に関する研究

研究代表者名（所属）：平 成人（乳腺甲状腺外科学）

臨床試験では、高齢者はしばしば適格基準から除外され、標準治療の恩恵とリスクのバランスを、高齢者にも適応できるかの判断に迷うことが多い。現状での治療原則は、可能な限り非高齢者同様の標準治療を実施することである。しかし高齢者では臓器機能低下・併存症・社会的な支援等の面で健康状態に個人差があるという問題がある。この解決策として、身体機能・併存症・認知機能・心理・社会支援・栄養・服用薬など、健康状態を多面的に評価し、治療選択や支援に利用する試みがある（高齢者機能評価、geriatric assessment：GA）。GA の評価は多岐にわたり、欧米では簡易な GA スクリーニングツールが開発・利用されている。しかし本邦では GA の評価はもとよりスクリーニングツールの開発はなされていない。

我々は高齢者を対象とした化学療法に関する先行研究から、無病生存期間および重篤な有害事象を予測するスクリーニングツール（RESPECT モデル）を開発した。RESPECT モデルの外的妥当性検証のため、2019 年より「高齢者総合的機能評価スクリーニングツール開発のための、高齢乳がん患者を対象とした多施設共同観察研究」を進行中である。2023 年 9 月までに 1000 例の登録を目標とし、2023 年 5 月 2 日時点で 822 例が登録された。また付随研究として、「高齢乳がん患者の認知機能に関する多施設共同前向き観察研究」を開始した。

課題番号：R04 基-077

研究課題：JAK 阻害薬が悪性腫瘍の進展・増大に与える影響の検討とその機序の解明

研究代表者名（所属）：赤木 貴彦（リウマチ・膠原病学）

共同研究者名：守田 吉孝、中野 和久、仁科 惣治、西村 泰光

【目的】関節リウマチの治療薬である JAK 阻害薬（JAKi）は、従来の生物学的治療に抵抗性を示す症例においても有効性を示し、今後の使用拡大が予想される。一方で、JAKi は悪性腫瘍の進展や増大に影響を与えることが懸念されている。JAKi が腫瘍の発育に与える影響について検討を行うため、がん転移モデルマウスの樹立を試みた。【方法】野生型マウス（C57BL/6）の尾静脈より、がん細胞株（肺癌細胞株；LLC1、メラノーマ細胞株；B16F10）を単回投与し、がん転移モデルマウスを作製する。がん細胞株を尾静脈から投与することで高率に肺に転移することが知られている。投与する細胞数を 1×10^4 cells/mL から 1×10^6 cells/mL まで条件を設定し、投与後 7、14、21 日後にがん転移の評価を行った。評価は、動物用 CT で肺結節の数を集計した後に肺を摘出し、肺表面の転移巣の有無で行った。【結果】LLC1 ならびに B16F10 において、 1×10^4 cells/mL から 1×10^6 cells/mL の投与では肺への転移はみとめられなかったが、 1×10^7 cells/mL で投与したところ、21 日後の評価では、CT 上では肺結節を認めなかったが、肉眼では肺表面の転移巣を認めた。【結論】がん転移モデルマウスを樹立することができた。このマウスを用いて引き続き、JAKi が腫瘍の発育に与える影響について解析を進める。

課題番号：R04 基-040

研究課題：リキッドバイオプシーによる食道癌再発高リスク群の評価と適切な薬剤選択法の確立

研究代表者名（所属）：藤原 由規（消化器外科学）

食道癌の悪性度は高く、手術後の再発率が高いことが知られている。CTC（循環腫瘍細胞）は、軽微な侵襲（リキッドバイオプシー）で検出が可能であり、術後再発高リスク群の手術前評価に利用できればその意義は大きい。本研究では CTC（循環腫瘍細胞）検出のための基礎実験を行った。（方法）1，健康人の血液 7mL を使用した。TE-1 細胞株（高分化型扁平上皮癌）を 5%、0.5%、0.05%、0% 混入させて CTC の検出を試みた。①SepMate50 を使用して血液より PBMC（末梢血単核細胞）を分離後に TE-1 混入さ

せる。②EasySep Human EpCAM Positive Selection Kit II を使用：EpCAM 抗体に磁気ビーズを付着させ、CTC 分離マグネットを使用し TE-1 を含む組織（リンパ球を含む）を分離する。③TE-1 を含む組織を回収し、FITCEpCAM, PECD45 で染色を行い、フローサイトメトリー（以下 FCM）で、CTC 細胞数の評価を行う。④EasySep HumanCD 45Depletion kit II を使用し CD45 陽性細胞を除去し、CTC 濃縮液を作成する。（結果）TE-1 混合率 0.5%でも CTC とリンパ球の分離が可能であった。臨床では、リンパ節転移を有する食道癌患者から CTC 検出は可能であったが、リンパ節転移陰性食道癌症例では、CTC は検出されなかった。（今後の展望）CTC 分離キットの有用性が明らかになり、臨床応用の前段階までの分析が可能となった。現段階では、CTC の検出は進行がんに限られるもののどのステージまでが検出可能かどうかは今後の課題である。また、CTC 検出不能症例に関しては、デジタル PCR による ctDNA の検出を検討中である。

課題番号：R04 基-084

研究課題：末梢血リンパ球を用いた免疫チェックポイント阻害剤による胃癌治療に対する新規バイオマーカーの開発

研究代表者名（所属）：谷岡 洋亮（臨床腫瘍学）

共同研究者名：永坂 岳司、岡脇 誠、矢野 修也

Background: The immune checkpoint inhibitors (ICIs) which can block PD-1 / PD-L1 interaction to restore T cell activity has emerged as a breakthrough therapy for malignant neoplasms including gastric cancer (GC). In this study, we evaluated pre-treatment PD-1+ lymphocyte ratio in peripheral blood obtained from unresectable GC patients under Nivolumab (NIVO) monotherapy.

Methods: We retrospectively evaluated 22 unresectable GC patients who received NIVO. Peripheral blood samples were obtained before NIVO monotherapy and analyzed PD-1+ lymphocyte ratio by multicolor flow cytometry.

Results: Of 22 patients, 16 (72%) were male and the median age was 70 years. The average of PD-1+CD4+ ratio before treatment was 0.37 in responders and 0.31 in non-responders, respectively ($p=0.18$). The average of PD-1+CD8+ ratio was 0.35 and 0.31, respectively ($p=0.20$).

Conclusions: Observation of pre-treatment PD-1+lymphocyte ratio has the potential to predict the patients who receive the clinical benefit of NIVO monotherapy in GC patients

課題番号：R04 基-035

研究課題：前立腺癌の腫瘍検出における合成拡散強調像の有用性に関する後方視的研究：従来法との比較

研究代表者名（所属）：玉田 勉（放射線診断学）

共同研究者名：木戸 歩、児嶋 優一、山本 亮

目的：拡散強調像（diffusion-weighted imaging (DWI)）における従来法（native acquired DWI (nDWI)）と合成法（synthetic DWI (sDWI)）の前立腺臨床的有意癌（治療介入が必要な前立腺癌）の検出能を比較する。

方法：3.0T MRI 装置で検査が施行され、その後前立腺全摘術を受けた前立腺癌を有する 34 症例を対象とした。nDWI は b 値 2000 s/mm²、TR 6000 ms、TE 70 ms で取得し、自作の専用ソフトウェアを用いて b 値 2000 s/mm²、TR 1000 ms、TE 0 ms で設定した sDWI を作成した。画像評価は 3 名が独立して行った。前立腺を 8 領域に分け、各領域を PI-RADS v2.1 における DWI score (1 から 5) で評価した。DWI score ≥ 3 を臨床的有意癌陽性とした。

結果：DWI score を用いた臨床的有意癌の検出能は、ROC 解析から得られる AUC は、reader 3 において sDWI は nDWI に比して有意に高く (0.855 vs. 0.805、 $P=0.004$)、その他の reader は同等であった

($P=0.630$ 、 $P=0.728$)。診断特異度は reader 1 (0.758 vs. 0.608、 $P=0.003$) と reader 3 (0.900 vs. 0.683、 $P<0.001$) において sDWI は nDWI に比して有意に高く、reader 2 は差が無かった ($P=$

0.118)。診断感度はいずれも有意な差は無かった。

結論：sDWI は前立腺臨床的有意癌の検出において nDWI と同等以上の診断能を有し、特に sDWI における高い検出特異度は、MRI 検査後の不必要な生検を回避できるための有益性を有することが示唆された。

課題番号：R04 基-080

研究課題：胃 MALT リンパ腫における放射線治療後の有害事象の検討とリアルタイムイメージングの開発
発：令和3年度からの継続研究

研究代表者名（所属）：釋舎 竜司（放射線腫瘍学）

共同研究者名：勝井 邦彰、渡邊 謙太、河田 裕二郎、池田 尚生、清水 里紗、松本 啓志

【はじめに・目的】本研究の第2段階「画像誘導放射線治療を行うためのリアルタイムイメージング技術の開発」を行う予定であったが、世界的な半導体不足により、放射線治療機の納入が遅延したため遂行できなかった。そこで今回、第1段階（R03 基-065）で検討した「過去の胃 MALT リンパ腫における放射線治療後のリスク臓器への有害事象の検討」の結果をもとに、リスク臓器における有害事象の危険因子を、統計学的解析を加えて同定することを目的とした。【対象・方法】2014-2021年に当院で放射線治療を受けた Lugano 分類 I-II 期の胃 MALT リンパ腫 16 例を後方視的に検討した。治療前後の AST, ALT 値を CTCAE version 5.0 で、eGFR 値は Chronic Kidney Disease (CKD) 分類を用いた。肝、腎の計画標的体積、線量体積ヒストグラムの各線量曲線を比較し、年齢など既報であげられたリスク臓器障害の危険因子を統計学的に解析した。【結果】年齢中央値は 52.5 歳、総線量は 30-40Gy、観察期間中央値は 46.5 ヶ月。治療後 1 ヶ月で Grade2 の AST/ALT 値上昇を 1 例で認め、低線量域が広範であった。また、CKD 分類 Grade3a 以上の 4 例では、腎の耐容線量を超えず、低線量域も広範ではなかったが、年齢中央値が 75 歳と高く、多変量解析では年齢が有意な変数（有意水準： $p < 0.05$ ）であった。【考察】治療後早期に肝機能障害をきたす症例が認められ、肝の低線量域に注意する必要があると思われた。また、腎機能障害の危険因子として、治療時の年齢が統計学的にあげられた。

課題番号：R04 基-021

研究課題：骨髓異形成症候群細胞株の増殖動態の検討-L-グルタミンの重要性

研究代表者名（所属）：辻岡 貴之（検査診断学）

共同研究者名：通山 薫、北中 明、末盛 晋一郎

【背景】細胞のエネルギー代謝は TCA サイクルに依存している。L-グルタミン (Gln) はグルタミナーゼ (GLS) の作用でグルタミン酸に変換され、さらにグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) の作用によって α -ケトグルタル酸に変化し、TCA サイクルに入って代謝を回転させる。もしも、腫瘍細胞が Gln に依存して増殖しているならば、その供給を止めることによって、増殖を抑制できるのではないだろうか。

【目的】白血病細胞株を Gln(-) 培地で培養あるいは、GLS 阻害剤、GDH 阻害剤存在下で培養することによって増殖動態や細胞死誘導への影響を検討する。

【方法】骨髓異形成症候群細胞株 (MDS-L)、白血病細胞株 (HL-60) に上記処理を行い、MTT アッセイによる細胞増殖の評価、Annexin V/PI 染色によるアポトーシス細胞解析、PI 染色による細胞周期解析を行った。

【結果】MTT アッセイにおいて Gln 除去または CB839（グルタミナーゼ阻害薬）を添加したものは濃度依存性に増殖抑制効果を示した。Annexin V/PI 染色ではアポトーシス細胞の割合が増加した。細胞周期解析ではサブ G₁ 期の細胞割合の増加を認めた。

【考察】Gln 阻害による細胞増殖抑制効果はアポトーシスによるものが考えられる。MDS-L よりも HL-60 のほうが、グルタミン依存性が高いと考えられる。

課題番号：R04 基-005

研究課題：トリプルネガティブ型非浸潤性乳管癌の特徴に関する臨床病理学的検討

研究代表者名（所属）：森谷 卓也（病理学）

共同研究者名：山本 裕、西村 広健、三上 友香、佐貫 史明

細胞外マトリックス内にコラーゲンが異常沈着することにより癌細胞の浸潤・転移が促される可能性が示唆されている。コラーゲン代謝の主要な翻訳後修飾を担う prolyl-4-hydroxase (P4H) は、浸潤性乳管癌の悪性度や予後に関連する因子でだが、早期乳癌における発現の意義については不明な点が多い。そこで非浸潤性乳管癌 (DCIS) に対して P4H および低酸素ストレス関連マーカーに対する免疫染色を行いその意義を検討した。核異型中等度以上の DCIS101 例 (35~59 歳、平均 58 歳) を対象とし、P4H α サブユニット 1 と 2, HIF-1 α に対する免疫染色を行った。各マーカーの発現は H-score で判定した。核異型高度例は中等度例に比して有意に P4HA1、P4HA2 とともに有意に高スコアを示した。P4HA2 は、HER2 陽性例が陰性例より、ER 陰性例が陽性例よりそれぞれ有意に高スコアであった。内因性サブタイプ別には P4HA1 および P4HA2 とともに HER2 型が luminal A 型より有意に高スコアを示した。P4HA2 はトリプルネガティブ型も luminal A 型より有意に高スコアであった。さらに Spearman の順位相関係数では P4HA1、P4HA2、HIF1- α は互いにやや弱い正の相関を示した。浸潤性乳癌と同様 P4HA は悪性度の高い DCIS で高発現しており、低酸素環境マーカーとの関連も示唆された。

課題番号：R04 基-020

研究課題：癌促進型スプライシングの分子機構解明と特異的介入法の開発

研究代表者名（所属）：増田 清士（学長付）

スプライシング異常はがんの病態形成に深く関与しているが、詳細は不明である。当研究室ではこれまで、RNA 結合蛋白質である TIA1 のスプライシングパターンが食道扁平上皮がん (ESCC) の進行に伴い、細胞死誘導作用をもつ TIA1b から細胞増殖促進作用を持つ TIA1a にスイッチすることを見いだした。本研究では、このようなスプライシング異常がおこる機序を明らかにするために、疾患と関連が報告されているスプライシング因子 (SF3B1、snRNP70) について検討した。

食道がん細胞株で SF3B1 をノックダウンすると TIA1a (増殖促進型) が減少し、TIA1b (細胞死誘導型) が増加した。一方 snRNP70 をノックダウンすると TIA1a (増殖促進型) がやや増加し、TIA1b (細胞死誘導型) がやや減少した。TIA1 遺伝子の一部をクローニングしたミニジーンでも同様の結果が得られた。WST-8 を用いた検討で、SF3B1 ノックダウン細胞では細胞増殖が有意に抑制された。公共データベースに収載されているデータから、ESCC では約 20% の症例で SF3B1 遺伝子の増幅がみられること、Kaplan-Meier 法で有意差はないものの SF3B1 の発現が高い症例または snRNP70 の発現が低い症例では予後が悪い傾向があることがわかった。以上から、ESCC ではこれらのスプライシング因子の発現異常により TIA1 遺伝子のスプライシングパターンががん促進型にスイッチすることで、細胞増殖が促進する可能性が示唆された。

課題番号：R04 基-103

研究課題：患者由来食道癌オルガノイドの樹立とライブラリの作製

研究代表者名（所属）：羽井佐 実（学長付）

共同研究者名：深澤 拓也、山辻 知樹、浦野 貴至

近年、国内外において生検サンプルや切除臓器を活用したオルガノイド研究が進められてきている (Lancaster MA et al. Science 345:1247125. 2014)。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、これまで困難であった生命現象の解析が可能になってきた。さらにオルガノイドは、患者由来腫瘍組織からも作出することが可能であり、個人や特定の腫瘍に最適な臨床試験や新規治療法の開発が可能となってきた。この中で申請者らは、2018 年より川崎医科大学総合医療センターで手術を受けられた患者から癌オルガノイドの樹立を行なっている。今回我々は、患者由来食道扁平上皮癌由来オルガノイド PDT-ESSC#2 に対し、次世代シーケンスを行い、ゲノム解析を行うとともに、免疫不全マウスに作製した Xenograft の病理像を解析した。Whole Exome Sequence (WES) の結果から当該オルガノイドにおける主要な遺伝子変異が検出され、ま

たこれらは切除食道癌ゲノムからも検出された。さらに Xenograft における病理像は元腫瘍の病理学的特徴を反映していた。以上より、患者の腫瘍の特徴を反映した食道癌前臨床モデルが樹立されたことが示された。

— 環境と生体反応 —

課題番号：R04 基-079

研究課題：オオサンショウウオ在来種のミトコンドリア DNA 解析

研究代表者名（所属）：西松 伸一郎（自然科学）

共同研究者名：守山 禎之、小島 史也

オオサンショウウオ (*Andrias japonicus*) は、世界最大の両生類で、本邦では特別天然記念物に指定され学術的にも重要性の高い希少動物である。近年、京都府や三重県内の河川において外来種のチュウゴクオオサンショウウオと在来種の交配による交雑種が発見され社会問題となっている。岡山県では2017年より捕獲調査を行っており、岡山県と鏡野町教育委員会より委託を受け、野外で捕獲されたオオサンショウウオのDNA鑑定を行っている。

本研究では、2022年の調査で捕獲された岡山県内の河川と山口県岩国市内の河川に生息するオオサンショウウオ317個体より抽出したDNAを用いて、核ゲノムDNAとミトコンドリアDNAの解析を行なった。核ゲノムのマイクロサテライトを用いて解析した結果、生息する河川ごとに遺伝的差異が認められるとともに、吉井川と旭川に生息する集団は、それぞれの集団内においても遺伝的な多様性が維持されていることが判明した。また、高梁川に生息する集団は、山口県岩国市内を流れる錦川・宇佐川に生息する集団と遺伝的に近縁関係にあることがわかった。ミトコンドリアDNAの塩基配列を解析したところ、2種類のミトコンドリアDNAが混在するヘテロプラスミーであることが判明し、在来種のオオサンショウウオに共通する特徴である可能性が示唆された。ミトコンドリアDNAの全塩基配列の解析を進めている。

課題番号：R04 基-043

研究課題：新型コロナウイルスの感染予防抗体を誘導するユニバーサルワクチンの開発

研究代表者名（所属）：内藤 忠相（微生物学）

共同研究者名：齊藤 峰輝

【目的】新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の感染予防に資する新規組換えワクチンの開発を試みる。すなわち、安全性が担保された水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus: VSV) に、変異導入スクリーニングにより単離した「感染性はないが免疫原性を保持する SARS-CoV-2 の変異型スパイク抗原」を搭載させ、非増殖型組換え弱毒生ワクチンを作成する。

【方法】SARS-CoV-2 武漢株スパイク蛋白質の受容体結合領域 (Receptor binding motif: RBM) にアミノ酸変異を導入した変異型スパイク遺伝子ライブラリーを作製し、ACE2 受容体との結合および抗原変異に関与するアミノ酸部位の網羅的同定を試みる事で、組換えワクチンに搭載する変異型スパイク抗原候補を単離する。

【結果】スパイク蛋白質の RBM (71 残基) を構成する各アミノ酸をアラニン残基に置換した変異型スパイク遺伝子ライブラリーを合成し、動物培養細胞に変異型スパイク蛋白質を発現可能なプラスミドセットを作製した。現在、ACE2 に結合しない単一アミノ酸変異型スパイク蛋白質 (=感染性が失活している) の単離を進めている。今後は、変異型スパイク蛋白質を搭載する組換え VSV 粒子を作製し、市中流行株に対する新規ワクチンとしての有効性を調べる予定である。

課題番号：R04 基-078

研究課題：HTLV-1 関連脊髄症モデルマウスの改良に向けた基礎研究

研究代表者名（所属）：和田 雄治（微生物学）

共同研究者名：齊藤 峰輝

【目的】ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-1）は HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の原因ウイルスである。HTLV-1 はマウス細胞に効率よく感染しないため、実用的で広く利用できる HAM の小動物モデルは存在しなかった。本研究では、HAM に対する新規発症予防・治療法の開発に資するモデルマウスの確立を目指す。

【方法】HTLV-1 の腫瘍原性タンパク質 Tax を CD4 陽性細胞特異的に発現するトランスジェニックマウス（Tax-Tg）と実験的自己免疫性脳脊髄炎のモデルマウス（2D2-Tg）を交配させたダブルトランスジェニックマウス（2D2/Tax-Tg）の約 20% が脊髄の炎症に起因する下肢麻痺を発症した。本マウスの病態形成機序を解明するため、マウスの脾臓から CD4+T 細胞を単離して生物学的特徴を解析した。

【結果】下肢麻痺を自然発症した 2D2/Tax-Tg マウスの脾臓 CD4+T 細胞では、非麻痺マウスに比べ CD44^{low}CD62L^{low} 活性化エフェクター T 細胞集団の頻度と PMA/ionomycin 刺激による細胞内 TNF- α レベルが有意に高かった。

【考察】Tax によって継続的に刺激される中枢神経自己抗原特異的な CD4+T 細胞が、2D2/Tax-Tg マウスの脊髄炎症および下肢麻痺の発症に関与する可能性が示唆された。本マウスは、HAM の病態機序や発症予防・治療法の開発研究に有用と考えられる。

課題番号：R04 基-053

研究課題：インフルエンザ再流行を阻止するための HA ワクチン改良方法の検証

研究代表者名（所属）：後川 潤（微生物学）

共同研究者名：齊藤 峰輝

【背景】国内で承認されているインフルエンザワクチンは、その防御効果が主要抗原タンパク質であるヘマグルチニン（HA）の抗原性に左右される側面が大きく、ワクチン株と市中流行株の抗原相同性がずれた場合、ワクチンとしての有益性が損なわれる。本研究では抗原性のズレに対応できる HA ワクチンへの改良を目的として、HA の主要抗原部位のアスパラギン結合型（N 型）糖鎖に着目して N 型糖鎖プロファイル（組合せと数）と抗原性との関係を明らかにし、抗原カクテル化による HA ワクチンの改良とその有効性を検証した。【材料と方法】主要抗原部位の N 型糖鎖プロファイルが異なるように設計した HA 遺伝子を組み込んだプラスミドを構築し、HEK293T 細胞に導入してリコンビナント HA タンパク質（rHA）を発現させた。免疫沈降法で回収した N 型糖鎖プロファイルが異なる 3 種類の rHA を混ぜてカクテル HA 抗原とし、モルモットに免疫した。得られた抗血清を用いて赤血球凝集抑制試験等を行い、単一 HA 抗血清とカクテル HA 抗血清の性能を比較検証した。【結果と考察】カクテル HA 抗原によって得られた抗血清は、単一 HA 抗原によって得られた血清よりも広域かつ強い中和活性を示す傾向が認められた。今後はカクテル型 HA ワクチンの有効性を動物実験で検証し、抗原性のズレに対応可能な改良型 HA ワクチンの臨床応用を目指す。

課題番号：R04 基-060

研究課題：DAMPs による辺縁帯 B 細胞活性化機構および自己免疫疾患との関連

研究代表者名（所属）：井関 将典（免疫学）

共同研究者名：向井 知之

辺縁帯（marginal zone: MZ）B 細胞は脾臓リンパ濾胞周辺の MZ に存在する B 細胞亜集団である。Toll 様受容体 4（TLR4）刺激に反応し炎症性サイトカインを産生するという特徴を持ち、自己免疫疾患との関係も報告されている。我々は予備実験の結果、内因性の TLR4 リガンドとして機能する Damage-associated molecular patterns（DAMPs）刺激が MZB 細胞の増殖や活性化を誘導する可能性を見出した。その分子メカニズムの解明と疾患への関与について検討することを目的とし以下の実験を行った。野生型マウス脾臓から FACS Aria III を用いたソーティングによって MZB 細胞を純化し、LPS または DAMPs である S100 タンパク質、HMGB1 を加えて培養した。16 時間後の細胞生存率をフローサイトメトリによって解析したところ、DAMPs 刺激では LPS 刺激と異なり MZB 細胞の生存率の亢進は見られなかつ

た。また脾臓 B 細胞を LPS または DAMPs 刺激下で培養し、3 日後の細胞増殖を測定したところ DAMPs 刺激では LPS 刺激で見られるような細胞増殖は誘導されていなかった。これらの結果から、同じ TLR4 のリガンドであっても S100 タンパク質、HMGB1 は MZB 細胞を活性化できないことが分かった。今後は DAMPs を認識する別の受容体の関与を考慮する必要がある。

課題番号：R04 基-027

研究課題：IL-18 を介したオートファジー制御機構と Vici 症候群に対する新規治療法の開発

研究代表者名（所属）：寺脇 正剛（分子遺伝医学）

共同研究者名：大友 孝信、森脇 隆仁

Vici 症候群は脳梁欠損、心筋症など多臓器に異常を呈する先天性疾患であり、オートファジー関連遺伝子 *EPG5* の機能的欠損が原因である。一方、多面的な生理活性を持つサイトカイン IL-18 の欠損患者も Vici 症候群と非常によく似た臨床像を呈することから、IL-18 が *EPG5* を介したオートファジー分解系を制御している可能性が考えられた。

そこで名古屋市立大学より異なる変異を持つ Vici 症候群患者由来のリンパ芽球（LCL）2 検体の供与をうけ LC3 フラックスによりオートファジー活性を評価したところ、一方の患者の LCL ではオートファジー活性の低下はほぼ正常であったのに対し、もう一方の患者ではオートファジー活性が顕著に低下していた。これらの細胞を IL-18 で刺激した後同様にオートファジー活性を検討したが、IL-18 はいずれの LCL に対してもほとんどオートファジー亢進効果を示さなかった。

EPG5 に異なる変異を持つ患者の LCL 間でオートファジー活性に顕著な差が認められたことは、Vici 症候群の発症機序はオートファジー活性と関連がなく、*EPG5* が持つ別の機能が変異により影響を受けている可能性を示唆している。オートファジーに対する IL-18 の効果もほとんど見られなかったが、この *EPG5* の別の機能と相関しているのかもしれない。*EPG5* のさらなる機能解析が Vici 症候群の発症機序解明と治療法開発に必要であろう。

課題番号：R04 基-074

研究課題：リウマチ膠原病性疾患患者における生体防御免疫監視機構のバイオマーカー探索

研究代表者名（所属）：守田 吉孝（リウマチ・膠原病学）

共同研究者名：中野 和久、赤木 貴彦、西村 泰光

【目的】関節リウマチ（RA）において、JAK 阻害薬（JAKi）が使用されるようになり、高い治療効果を発揮している。しかし一方で、JAKi の使用が帯状疱疹の発症を増加させ、悪性腫瘍のリスクとなることが懸念されている。本研究では、JAKi がウイルスの再活性化やがん免疫監視機構に与える影響について検討を行った。【方法】JAKi 使用中の RA 患者より末梢血単核細胞を分離、フローサイトメーターを用いて、T 細胞と NK 細胞上のがん関連分子マーカー（PD-1、CTLA-4）や NK 細胞活性化受容体（NKG2D、NKp46/p44/p30）、成熟（CD57）や活性化（CD69）マーカーの表面発現を測定した。比較対照は、健常人（HC）ならび TNF 阻害薬（TNFi）を使用している RA 患者とした。また、TNFi 群と JAKi 群では、診療データ（疾患活動性、治療内容・期間など）との関連についても解析を行った。【結果】HC 群（n=9）、TNFi 群（n=5）、JAKi 群（n=13）で細胞表面マーカー発現を比較したところ、すべてのマーカーにおいて有意差は認めなかった。診療情報を含めた解析においても TNFi 群と JAKi 群の細胞表面マーカー発現に差は認めなかった。【結論】現段階においては、JAKi が末梢血 T 細胞や NK 細胞の成熟や活性化に与える影響は確認されなかった。引き続き、解析対象数を増やして検討を進めていく。

課題番号：R04 基-085

研究課題：小児睡眠時無呼吸症に外科的治療は必要か？

研究代表者名（所属）：三宅 宏徳（耳鼻咽喉・頭頸部外科学）

共同研究者名：濱本 真一、原 浩貴、兵 行義、前田 祐一郎、若林 時生

小児にとって睡眠は重要であり、身体の成長、情緒、脳の発達に重要であると言われている。以前から小児睡眠呼吸障害においては扁桃・アデノイド肥大が代表的な原因の一つであるが近年のアレルギー性鼻炎の低年齢化、若年層の有病率の増加に伴い、アレルギー性鼻炎と睡眠障害は注目をされている。

① 就学時検診児童に対するアレルギー疾患と睡眠 QOL 調査

岡山県浅口市、里庄町の教育委員会の協力のもと 2017 年から 6 年にわたり、就学時児童の疫学調査を行っている。その結果ではアレルギー性鼻炎を有する児童は 28.8%であり、気管支喘息 12.4%。アトピー性皮膚炎 13.2%と比較しても高かった。また、アレルギー性鼻炎を有する児童たちにおいて約 25%は睡眠 QOL 低下を示していることが分かった。つまり、アレルギー性鼻炎の早期のコントロールは重要であることが示唆された。

②小児睡眠呼吸障害手術症例を対象にアデノイド細菌叢

当院で扁桃・アデノイド切除を施行した 10 歳以下の睡眠時無呼吸患児 22 例を対象にアデノイドの細菌叢を検討した。その結果インフルエンザ菌 (63.6%) 肺炎球菌 (36.6%) モラクセラ菌 (18.2%) が検出された。その中でインフルエンザ菌を有する場合には自覚症状として鼻づまりがひどく、睡眠検査でも無呼吸指数の悪化を認めた。逆にインフルエンザ菌の検出がない場合ではダニアレルギーの抗体価が高かった。

— 新分子・新技術 —

課題番号：R04 基-090

研究課題：好中球 NADPH オキシダーゼ活性の解析

研究代表者名（所属）：栗林 太（生化学）

申請者らはこれまで様々な白血球系の培養細胞が、好中球やマクロファージ同様に活性酸素産生蛋白質複合体を持ち、活性酸素も生成することを明らかにしてきた。これらの細胞の産生する活性酸素と好中球とを比較検討しつつ新たな活性酸素測定方法を確立し、今回は更に高感度で信頼できる測定方法を開発したので報告する。具体的には、ルミノールを主体とした化学発光法に SOD（スーパーオキシド不均化反応酵素）やキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系の補助法を使用した。これらの方法によって、微量の活性酸素を産生する B リンパ球由来の活性を安定して測定することが可能になった。

課題番号：R04 基-026

研究課題：線維化に応答する新規分子の機能解析

研究代表者名（所属）：岡本 安雄（薬理学）

共同研究者名：坪井 一人、竹之内 康広、北風 圭介、石丸 浩靖

慢性的な炎症が発生すると、過剰な損傷修復反応により、筋線維芽細胞（活性化した線維芽細胞）から産生されるコラーゲンなどの細胞外マトリックスが沈着することで、線維化が進行する。線維化を起こした臓器は最終的に機能不全に陥ることから、線維化に対する画期的な治療法・治療薬の確立が望まれる。申請者らは肺線維化に応答して誘導されるオーファン G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である Gpr176 の線維化における役割について検討し、次の結果を得た。1. 検討したすべての線維化モデル（腎臓、肝臓、心臓）において Gpr176 の遺伝子発現の増加が観察された。2. ラット腎線維芽細胞株 NRK-49F を TGF- β 1 で刺激しても、Gpr176 の遺伝子発現に影響はみられなかった。3. Gpr176 を siRNA でノックダウンすると、筋線維芽細胞の分化マーカーである α SMA タンパク質の TGF- β 1 刺激による発現誘導が減弱した。以上の結果から、「Gpr176 が線維芽細胞の活性化を調節し、線維化を促進している」可能性が考えられた。Gpr176 はアゴニスト非依存的な基礎活性を有する特殊な Gz 共役型 GPCR であることが報告されており、Gpr176 の活性を抑制する逆アゴニストやアロステリックモジュレーターが筋線維芽細胞への分化を抑制し、線維化を改善できる可能性が考えられる。

課題番号：R04 基-007

研究課題：新規疾患 MPSPS の治療薬探索(継続・発展研究)

研究代表者名(所属)：大友 孝信(分子遺伝医学)

共同研究者名：寺脇 正剛、森脇 隆仁、Viktoriia Sofronova

Mucopolysaccharidosis Plus Syndrome (MPSPS) は、特徴的な顔貌や全身の骨変形などのムコ多糖症に類似した症状に加え、腎不全や造血不全を呈する新規疾患である。我々が 2017 年に原因遺伝子 *VPS33A* を報告し、その後の調査によって臨床経過が明らかとなった。生命予後は平均 20 か月と重篤であるが、根本的な治療法はまだない。

我々の研究から、患者の変異を持つ VPS33A タンパク質 (VPS33A_R498W) は機能を保持するものの安定性が低下していることが分かっている。そこで我々は、VPS33A_R498W にルシフェラーゼを結合して定常発現し、FDA 承認薬 1971 種類のライブラリから VPS33A_R498W タンパク質を安定化させる薬剤を探索した。さらに本疾患ではムコ多糖の代謝異常が特徴的であるため、細胞内ムコ多糖をハイスループットで定量する系を立ち上げ、これを改善させる可能性がある薬剤を FDA 承認薬から探索した。両パラメーターとも一定の閾値を設け、いずれにも該当する薬剤が本疾患の治療薬候補として有望であると結論づけた。

現在注目している治療薬候補は 18 種類であり、抗生剤・抗菌剤が 5 種類、シグナル伝達系薬剤が 5 種類、中枢神経系薬剤 2 種類、抗腫瘍薬が 6 種類であった。今後、選択された個々の薬剤につき細胞実験で治療効果を確認するとともに、モデルマウスに投与して生体における効果も確認し、将来の臨床研究の基礎データとしたい。

課題番号：R04 基-008

研究課題：ヒアルロン酸を用いた気管支喘息における新規舌下免疫療法の研究開発-2

-根治療法としての有効性の検討-

研究代表者名(所属)：加藤 茂樹(総合臨床医学)

共同研究者名：田中 仁美

(目的) これまでダニ誘発マウス慢性喘息モデルのアレルゲン特異的舌下免疫療法 (SLIT) における ヒアルロン酸 (HA) の作用増強剤としての有効性を証明し、国際特許を出願した。今回は、ダニ誘発マウス慢性喘息モデルにおける新規 SLIT の長期寛解誘導効果の検討を行う。

(方法) 既報の BALB/c マウスを用いたダニ誘発慢性喘息モデルに対してダニ溶液に HA を加えた SLIT を行う。SLIT は、1 日 1 回週 5 日 2 週施行する。その後、ダニアレルゲンを再投与し喘息反応を誘発する。今回は、さらに 6 週間無処置で経過観察し、7 週目にダニアレルゲンを経鼻的に再投与し、新規 SLIT の効果が持続し長期寛解が得られているかを検討する。治療効果の判定は、1:即時型喘息反応、2:気道過敏性試験、3:好酸球性気道炎症、及び 4:血中ダニ特異的抗体価で評価する。

(結果) 6 週間無治療で経過観察後にアレルゲンの再チャレンジを行ったが、1~4 の有意な改善は維持されていた。特に 1, 2 の生理学的検査に関しては正常化したままであった。

(考察) 今回の新規 SLIT は、少なくとも 6 週間は治療効果が維持できていた。経過観察後にアレルゲンの再チャレンジを行っても気道抵抗の上昇を認めなかったことから喘息は寛解したものと考えられた。喘息の根治療法として期待できる。

課題番号：R04 基-071

研究課題：骨髄巨核球の形態学的特徴を客観的に評価する新規診断法の開発

研究代表者名(所属)：藤原 英世(病理学)

巨核球は骨髄に存在する造血系細胞で、成熟巨核球は細胞質突起から血小板が分離し、末梢血内に分布する。赤芽球系・顆粒球系造血細胞とは大きく異なり、分化にあたって前巨核球以降での細胞質分裂が行われないため、分葉した核および豊富な細胞質を有する大型化した成熟細胞として、骨髄内で類洞周囲に観察され、光学顕微鏡で比較的容易に同定できる。造血器腫瘍も含めた血液疾患の診断に際し、骨髄

の組織学的評価は補助的に用いられることが殆どであり、組織学的所見の解釈に関しても確立された標準的手法を有していない。本研究は巨核球について新規の組織学的評価法を検討し、組織型診断の新たな鍵となる特徴的所見を明らかにすることで、日常の病理診断基準に還元していくことを目的としている。これまでの解析では、正常骨髓症例 46 例に関して針生検検体における検体長を計測し、合わせて光学顕微鏡を用いて目視で観察しうる全巨核球数の計数を行った。巨核球数の平均は $22.17 (\pm 19.01 \text{ SD})$ で、検体長は $9.72\text{mm} (\pm 4.31 \text{ SD})$ であった。検体長や細胞密度の個体差に対する懸念があったものの、性別や世代別での巨核球の有意な差は確認できなかった。細胞密度の個体差に関するバイアス等の課題が残るものの、今後は反応性の血小板増多を認める ITP や、腫瘍性の血小板増多を認める本態性血小板血症に関しても、引き続き症例の集積を進めていきたい。

IV. 令和4年度 医学研究への扉 優秀賞 抄録

演題名：認知症高齢者における臨床症状に関連する大脳皮質領域の検討

学生氏名：佐藤 美果

指導教員名：久徳 弓子、三原 雅史

【目的】認知機能低下と脳の構造的変化との関連を明らかにし認知症進行予防に係わる因子を探る。

【方法】2019年7月～2022年10月に本学附属病院脳神経内科外来を受診した患者のうちMMSE 20/30以上の40歳以上の患者101人（男性40人、平均年齢76.1±5.6歳）を対象とし年齢、性別、教育歴、認知機能、生活尺度、うつ、BPSD、介護負担度を評価しBPSDの有無（ABS：0 vs ≥1）を基に患者を2群に分け両群の臨床情報を比較した。同時期に測定したMRI 3DT1画像データを使用し2群間の灰白質容積の差を検討した。更に1年後に再検した患者の経時変化を確認した。（群間差は対応のないT検定、経時変化は対応のあるT検定、 $p < 0.05$ ）

【結果】生活尺度を評価するDASC-21と介護負担度を評価するJ-ZBIで有意差を認め、BPSDあり群では右頭頂連合野、右中前頭回、左前頭前野に灰白質容積低下を認めた。経時変化では両群とも認知機能の悪化は認めなかったがJ-ZBIで有意差を認めた。

【考察】BPSDの存在が認知症の生活障害と介護負担に影響し、視空間認知、注意、ワーキングメモリ、他者の心の状態を推測する機能の低下に関連している可能性が示された。BPSDを適切に評価することで認知症進行を予防できる可能性がある。

【倫理的配慮】本臨床研究は川崎医科大学・同附属病院倫理委員会の承認を得て実施された。

演題名：ホルモン受容体陽性乳がん細胞株(MCF-7)に対するequolの影響

学生氏名：福永 真子

指導教員名：平 成人、山本 裕

【研究の背景】エクオール（equol）は、大豆イソフラボンが腸内細菌によって代謝されて体内に取り込まれる成分である。エストロゲン受容体に結合し、更年期症状の軽減や骨密度の上昇といったエストロゲン様作用を示す。ホルモン受容体陽性乳癌患者が、内分泌療法薬によって引き起こされる有害事象を緩和させるため、equolを服用した場合、癌細胞が増殖しないかという懸念がある。そこでequolがホルモン受容体陽性乳癌細胞株にどのような影響を及ぼすのかを検討した。【材料と方法】ホルモン受容体陽性乳癌細胞株(MCF-7)を用いた。エストロゲン及びequolの5日間暴露後の細胞増殖に及ぼす影響は、セルカウンターで細胞数を計測した。エストロゲン及びequolの2日間暴露後の細胞周期およびアポトーシスに及ぼす影響をPropidium Iodide染色とAnnexin V染色を行いフローサイトメーターで解析した。【結果】細胞増殖は、equolの $1 \mu\text{mol/l}$ での低濃度暴露時、エストロゲンと同様に促進された。細胞周期の解析ではG1期が減少し、S期及びG2/M期が増加していた。一方、高濃度暴露時には、細胞増殖の抑制、 $80 \mu\text{mol/l}$ 暴露時には、G1期の増加とS期及びG2/M期の減少、sub G1期が増加していた。アポトーシスは高濃度暴露時に多量に誘導されていた。【考察】Equolのホルモン受容体陽性乳癌細胞株に及ぼす影響は濃度依存性であり、低濃度暴露では細胞増殖作用、高濃度暴露時には細胞増殖抑制作用、並びにG1-SチェックポイントでS期移行阻害、さらにアポトーシス誘導作用を示すことが明らかにされた。

演題名：RNA編集後のリンパ球における機能検証研究

学生氏名：久本 莉彩子

指導教員名：伊藤 達男、武井 直子

特許出願予定のため未掲載

演題名：フィトセラミド欠損マウスの授乳期の小腸におけるスフィンゴ糖脂質の構造解析

学生氏名：宮崎 明子

指導教員名：渡邊 昂、石塚 佑太、松田 純子

【緒言】スフィンゴ糖脂質は、親水性の糖鎖と疎水性のセラミド骨格から構成される両親媒性の膜脂質である。セラミド骨格には組織特異的に構造多様性があり、小腸にはセラミド骨格長鎖塩基の 4 番目の炭素が水酸化されたフィトセラミド構造が豊富に存在する。我々は、フィトセラミド構造の合成にかかわる酵素遺伝子 Des2 のノックアウトマウス (Des2-KO) が、小腸のフィトセラミド構造を欠損し、体重増加不良と消化管の形態異常を呈して、生後 12 日前後で死亡することを見出した。この結果はフィトセラミド構造が授乳期の小腸における栄養吸収に重要であることを示唆する。【目的】授乳期の Des2-KO の小腸におけるスフィンゴ糖脂質の構造変化とその代謝にかかわる酵素遺伝子の発現変化を明らかにする。

【方法】11 日齢の野生型と Des2-KO の小腸から脂質を抽出し、陰イオン交換 (DEAE) カラムで酸性脂質と中性脂質を分離し、弱アルカリ分解後に C18 カラムで精製し、薄層クロマトグラフィーで展開し、各種発色液および抗体で染色した。また、11 日齢と 14 日齢の野生型と Des2-KO の小腸から抽出した RNA を逆転写し、リアルタイム PCR で遺伝子発現を定量比較した。【結果】授乳期のマウスの小腸では野生型、Des2-KO ともに酸性脂質であるガングリオシドが豊富に存在し、Des2-KO マウスの小腸には、野生型には存在しない GM2 および GD2 と推定されるバンドが検出された。11 日齢の Des2 KO では野生型に比べ GM1 や GD1 の末端ガラクトースを加水分解する Glb1 の発現が上昇しており、分解の亢進によって GM2 および GD2 の発現上昇がもたらされていると考えられた。【考察】Des2-KO ではフィトセラミド構造の欠損に対する代償機構として、分解酵素の発現制御によりガングリオシドの糖鎖を変化させて膜の流動性を維持している可能性が示唆された。今後は GM2 および GD2 の小腸上皮細胞における局在を検討する予定である。

演題名：細胞走化性を制御する因子の検討～癌転移の制御を目指して～

学生氏名：結城 柊崇

指導教員名：山内 明

癌は未だに死者数が増えている病気である。「発癌」の原因の一つとして活性酸素の刺激が指摘されているが、「転移」と活性酸素の関連性はよくわかっていない。本研究の目的は癌細胞の特徴の一つ転移を制御するために活性酸素の役割を明らかにして癌細胞の走化性を制御し治療に活用することである。

方法として、細胞動態を観察するために TAXIScan を用いた。ヒト膵癌細胞をリガンドの方に走らせる実験系で、過酸化水素の有無による反応、さらに過酸化水素を水と酸素へ分解させるカタラーゼの有無による走化性の変化を評価した。また、ウェスタンブロッティングを行い、過酸化水素の細胞内シグナル伝達への影響を検討した。

結果は、TAXIScan では過酸化水素を入れるとコントロールよりも癌細胞の走化性は弱まり、カタラーゼを入れると走化性は回復した。よって過酸化水素により癌細胞の走化性は弱まることがわかった。また、ウェスタンブロッティングでは走化性因子受容体に結合してからアクチンまでの経路の途中である Akt のリン酸化状態を評価したが、過酸化水素を入れると P-Akt の量が減り、TAXIScan と同様にカタラーゼを入れたらリン酸化が回復した。

このことから、過酸化水素はヒト膵癌細胞 BxPC-3 の走化性を抑制すること、その機序の一つとして細胞内シグナルの Akt のリン酸化が抑制されていることがわかった。

この研究を医療に役立てようとする、活性酸素を DNA のある核内に侵入させることなく細胞内シグナルを制御することができれば、発癌を促進することなく癌の転移を抑制することができると考える。

演題名：術野洗浄に有効な洗浄液の成分と濃度についての基礎的研究

学生氏名：中塩 愛唯

指導教員名：山澤 隆彦、古澤 航平、田村 太志、栗田 憲明、柚木 靖弘、田淵 篤、金岡 祐司、種本 和雄

【背景】心臓外科領域の手術では手術創の十分な洗浄を行っているが、当院で今まで使用されてきた洗浄液に、ゲンタマイシン入り生食液 (生食 500ml + 40mg ゲンタマイシン注 1 Ampoule (A)) がある。今回、菌増殖抑制に必要な抗生物質の術野投与濃度を in vitro で検討する。【方法】N-broth 培養液で培養

した黄色ぶどう球菌 500 μ l と、濃度を変えたゲンタマイシン (1A、2A、5A、10A、50A、生食無し原液) 500 μ l を 5 分間接触させた。その後、抗生物質溶液を遠心分離にて除去し、チューブ底に分離された細菌ペレットを N-broth 培養液で懸濁後に 37°C で 24 時間培養した後、吸光度 (ABS=Absorbance, OD=600) を測定した。【結果】吸光度の中央値は、コントロール群 (ABS 0.733) と比較すると、ゲンタマイシン 1 A 入りが ABS 0.669、2A が 0.614、5A が 0.647 と有意差は認めなかったが、10A で 0.593 ($p < 0.05$)、50A で 0.32 ($p < 0.05$)、原液で 0.046 ($p < 0.05$) と吸光度の低下を認めた。【結語】生理食塩水 500ml 当たりに溶解するゲンタマイシンの濃度を現在の 1 A から 10A 以上に濃くして、ゲンタマイシン入り生食で洗い流すことで黄色ぶどう球菌の増殖の抑制に寄与する可能性が示唆された。

演題名：自己炎症性疾患関連 KIF7 遺伝子変異による炎症誘導機序の検討

学生氏名：山本 ひかり

指導教員名：向井 知之、井関 將典

【背景】我々は過去に自己炎症性疾患と診断した患者で KIF7 S456F (ホモ) 変異を同定した。同変異が自己炎症病態に関与しているかを検証するため、患者と同じ変異を有する Kif7 S456F 変異マウスを作成した。KIF7 は細胞内のモーター蛋白として機能するが、炎症病態との関連は報告されていない。今回、Kif7 変異マウス由来の細胞を用いて炎症病態との関連を検討した。

【方法】野生型マウス、Kif7 変異マウスの長管骨から骨髓細胞を回収し、Flt3L で刺激することで樹状細胞へ分化を誘導した。樹状細胞への分化の程度をフローサイトメトリーで評価した。骨髓由来樹状細胞を ODN1826 (TLR9 リガンド) で刺激して、炎症性サイトカイン産生を定量 PCR および ELISA で評価した。

【結果】Flt3L による形質細胞様樹状細胞 (B220 陽性 CD11c 陽性細胞) への分化は、Kif7 変異マウスで低下していた。Kif7 変異細胞では、TLR9 リガンド刺激による IL-6 産生が野生型に比して亢進していた。

【結語】KIF7 S456F 変異が樹状細胞分化に影響すること、また TLR9 刺激による IL-6 産生を亢進することが分かった。KIF7 は、炎症調節因子として機能している可能性があると考ええる。

演題名：転写因子 Runx3 によるマウス卵巣顆粒膜細胞における遺伝子発現制御の解析

学生氏名：名嘉山 雄介

指導教員名：小島 史也

転写因子 Runx3 は、Runx ファミリーに属する転写因子で、卵巣では卵巣顆粒膜細胞に発現している。Runx3 の遺伝子 (*Runx3*) を欠損させたノックアウトマウスは無排卵となり、卵巣における成長因子のアクチビンやインヒビンの遺伝子である *Inhbb* の発現量が低下している。しかし、*Inhbb* の発現制御への Runx3 の関与は不明である。

そこで本研究では、*Inhbb* 上流域に Runx3 が作用するのかを明らかにするため、レポーターアッセイを行った。

pGL3 Basic ベクターのもつルシフェラーゼ遺伝子上流に、マウスの *Inhbb* の上流-843 塩基対(bp) ~ +58 bp までの領域を組み込んだレポーターベクターを用いた。pcDNA3 ベクターのもつプロモーター領域の下流に Runx3 の cDNA 配列を組み込んだ発現ベクターを用いた。これらのベクターを、トランスフェクションにより OV3121 細胞内に導入し、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。

その結果、レポーターベクターに導入した *Inhbb* の-843/+58 bp の領域は転写活性を有していた。そして、Runx3 発現ベクターはその転写活性を上昇させた。

これらのことから、*Inhbb* の-843/+58 bp の領域内で Runx3 が促進的に作用すると推察できた。すなわち、マウス卵巣顆粒膜細胞において、Runx3 は *Inhbb* の発現制御を促進する転写因子であると考えられた。

演題名：小胞輸送異常におけるペキソファジーの観察

学生氏名：竹内 壯太郎

指導教員名：森脇 隆仁、寺脇 正剛、大友 孝信

ペルオキシソームは脂肪酸の酸化などの細胞の代謝機能を担う細胞小器官である。異常なペルオキシソームは生体内の不要なタンパク質や細胞小器官を処理するオートファジーによって分解されることで、細胞の恒常性が保たれている。この機構はペキソファジーと呼ばれ、オートファジー機構を介した分解に小胞輸送遺伝子が必須であることが分かっている。ペルオキシソームの異常は細胞機能の破綻を引き起こし、副腎白質ジストロフィーや Zellweger 症候群などのペルオキシソーム病の原因となる。また、小胞輸送関連遺伝子の一つである VPS33A に変異が認められるムコ多糖症プラス症候群はムコ多糖症に類似した病態を呈するが、これらの遺伝子異常がペルオキシソームにどのような影響を与えるかはよくわかっていない。そこで今回は、小胞輸送関連遺伝子の改変細胞を用いて小胞輸送の異常がペキソファジーへ与える影響を免疫染色、ウェスタンブロットティング(WB)によって解析した。その結果、WB において小胞輸送関連遺伝子を KO した細胞ではオートファジーの異常が認められた。免疫染色ではいずれの細胞でも PMP70 と LC3 が共局在したペキソファゴソームがごく僅かに観察されたが、オートファジーの異常によるペキソファゴソームの変化は見られなかった。今回の研究では、小胞輸送関連遺伝子の欠損によるオートファジーの異常とペキソファジーの明確な関連性は認められなかったが、免疫染色の結果が示すように、定常状態ではペキソファジーがあまり活発でなく、ペルオキシソームの変化を捉えづらいことが原因と考えられる。

演題名：薬剤による上皮除去の試み

学生氏名：坂尾 嘉信

指導教員名：横西 哲広

【背景】塩化ベンザルコニウム(Benzalkonium Chloride; BC)は陽イオン界面活性剤であり、消毒薬や点眼薬の防腐剤として医療応用されている。しかし、BC を含む点眼薬の長期使用により角膜上皮が傷害されることが知られている。そこで、BC が上皮傷害を引き起こす点に着目し、マウス精細管内に BC を注入すると、精巢上皮であるセルトリ細胞が選択的に除去された。このことから、BC は角膜だけでなく、様々な上皮を傷害しうることが示唆された。【目的】本研究では、腸管の上皮細胞機能不全疾患モデルや細胞移植治療の前処置として、薬剤誘導性上皮除去の可能性を探索した。【方法】生後 2～5 日齢の ICR 仔マウスから摘出した腸管の組織片を 0～0.08%BC に反応させ、数日間培養したのちに回収した。HE 染色像、免疫染色像とウェスタンブロットを用いて上皮やその他の構造への影響を検討した。【結果】BC の濃度に比例して腸管の上皮除去率は増加した。BC 処置群では、有意差はないものの腸管の平滑筋細胞が減少していた。【結語】BC は腸管上皮を除去した。今後は、BC の反応による上皮以外の細胞や神経、血管などの構造への影響の解析を進め、上皮が特異的に除去される至適濃度と反応時間を定め、成体への影響についても研究を進めてゆく予定である。本研究は令和 4 年度プロジェクト研究支援を受けた (R04 基-039)。

演題名：生命のスケッチ～NeuroLucida によるノルアドレナリン作動性神経回路のデジタルスケッチ～

学生氏名：木村 眞理子

指導教員名：堀江 沙和

ノルアドレナリン(NA)は、中枢神経系では、覚醒-睡眠やストレスとの関連や、注意、記憶や学習への影響が知られている。NA の合成は、橋にある青斑核(LC)でドーパミンからドーパミンβ-ヒドロキシラーゼ(DBH)によって合成される。LC から NA 作動性線維がほぼ脳全域に投射していると言われているが、従来の神経標識法では、単一ニューロンレベルでの投射経路の詳細については不明だった。そこで本研究では、NA の合成酵素である HDC の cre マウスを用いることで、単一ニューロンレベルでの NA 作動性神経の神経回路を明らかにすることを目的とした。特に今回は投射先として、小脳に注目して、その神経回路の解析を行った。方法として、成獣の DBH-cre マウスの LC に、アデノ随伴ウイルスを注入した。約 1 週間のサバイバルタイムの後、灌流固定を行い、50 μm 厚の連続スライスを作製し、神経細胞の可視化を行った。可視化された神経細胞を光学顕微鏡および、NeuroLucida を使ってデジタルトレースを行い、神

経回路を解析した。その結果、LC の NA 作動性線維は小脳脚より小脳内に入り、髄質より皮質の深層である顆粒細胞層、プルキンエ細胞層を経て分子層へ到達していることが明らかになった。

演題名：ナノ金粒子標識免疫電子顕微鏡法による嗅球ニューロン細胞内における GABA の局在解析

学生氏名：今中 真緒

指導教員名：佐藤 慧太

神経系において、 γ -アミノ酪酸 (GABA) を神経伝達物質とする GABA ニューロンは代表的な抑制性ニューロンである。嗅覚の一次中枢である嗅球内には、嗅覚情報処理に関わる GABA ニューロンが多数含まれる。この GABA ニューロンには、その神経終末だけでなく神経細胞体にも GABA が存在する。さらに、レーザー顕微鏡をはじめとした光学顕微鏡観察により、免疫組織化学的に可視化された GABA は、嗅球細胞の細胞質だけでなく細胞核の内部においても観察される。これは GABA が細胞内においても何らかの生理機能を担っている可能性を示唆している。しかしながら、GABA の嗅球細胞内での細胞質と核内での局在については解析がなされていない。

そこで本研究では、ナノ金粒子標識による電子顕微鏡法を用い、嗅球全層の細胞において GABA 免疫陽性反応を可視化し、細胞内での GABA の局在を定量的に明らかにすることを目的とした。

結果、GABA ニューロンが多く含まれる嗅球深層の顆粒細胞層、糸球体層の細胞において、細胞質と細胞核内にナノ金粒子、つまり GABA 免疫陽性反応が観察された。さらに、ナノ金粒子数の計測による定量的解析により、同じ細胞内の細胞質と核の GABA 免疫陽性反応強度を比較し、一部の細胞では、細胞質と細胞核のその免疫陽性反応強度に大きな差が存在することが明らかになった。本研究により、神経伝達物質である GABA が、嗅球神経細胞の細胞質だけでなく核内においても存在することが明らかになった。

演題名：胃内溶液の pH と心臓血中のメタンフェタミン濃度に対する胃内溶液のメタンフェタミン濃度の比の関係

学生氏名：小谷 紗永

指導教員名：吉留 敬

目的

覚せい剤 (メタンフェタミン: METH) は、投与経路が静脈注射であっても、胃内の METH 濃度は、血液中の METH 濃度と比較して大きいことが明らかとなっている。これまでの研究で、ラットに METH を投与し、緩衝液によって胃内の pH を 9.4 にしたモデルで実験を行ったとき、胃内 pH の低下と胃内 METH 濃度の上昇が認められたことから、胃酸の分泌に伴って METH が胃内に移行しているのではないかと考えられた。本研究では、生理食塩水を用いて胃内溶液の pH と心臓血中の METH 濃度に対する胃内溶液の METH 濃度の比 (GB 比) との間に何らかの相関関係があるかどうかを検討した。

方法

ラットに METH を皮下投与し、胃内を生理食塩水で満たして 30 分静置したのち、心臓血と胃内溶液を採取し、METH を抽出、ガスクロマトグラフ質量分析計によって分析し、GB 比と胃内溶液の pH との間にどのような関係がみられるかを調べた。

結果・考察

胃内溶液の pH が低くなるほど、GB 比が大きくなるという負の相関が認められた。このことから、皮下投与され血液中に存在していた METH の胃内移行は胃酸の分泌に伴うものであると考えられた。

演題名：両生類アホロートルの酸素環境と肺呼吸の重要性に関する検討

学生氏名：加地 茉美

指導教員名：橋本 謙、毛利 聡、花島 章、臼居 優、大平 桃子

【背景・方法】アホロートル (通称: ウーパールーパー) は四肢や心臓等の再生能力が高く、医療応用が期待される両生類であるが、その生態には不明な点が多い。アホロートルは水中で鰓・皮膚・肺の 3 つ

の呼吸様式を用いているが[水中型]、甲状腺ホルモン投与により変態を起こし、肺呼吸のみに依存する陸上型となることから、進化における陸上進出の過程を評価できる可能性がある。本研究では水中型個体を用い、1)肺の組織構造の観察、2)生体酸素計測系を用いた各呼吸様式の酸素摂取能力の評価、3)両肺切除個体の表現型解析を行い、肺呼吸の重要性を検討した。【結果】個々の肺胞の大きさはヒトより若干大きく、肺胞中隔は20倍以上厚く、肺胞密度は疎であり、酸素摂取能力は哺乳類より低いと考えられた。動脈血酸素分圧[PaO₂]は約25mmHg(哺乳類の約1/4)の低酸素環境であった。一方、酸素投与に対するPaO₂上昇反応は鰓、皮膚に比べて肺で迅速・強力であったことから、肺は鰓や皮膚と比べて十分な呼吸能力を持つと考えられた。両肺切除個体では、術後2週までは鰓収縮回数の増加等の異常が見られたが、以後は改善し、1ヶ月経過した現時点で全個体が生存している。【結論】水中型アホーートルは低酸素環境下で生きており、肺呼吸を完全に阻害しても鰓・皮膚の呼吸予備能、及び酸素消費の低減により適応生存が可能であり、この段階での肺への依存度は低いと考えられる。一方、肺は十分な呼吸能力を有しており、これは肺依存度が増す変態後の陸上適応の為の準備なのかもしれない。今後は、陸上型への変遷過程を検討予定である。

演題名：弱毒生インフルエンザワクチン開発に資する低温増殖型組換えウイルスの感染阻止効果

学生氏名：齋藤 奨

指導教員名：内藤 忠相、齋藤 峰輝

【背景】本邦では、インフルエンザワクチンとして弱毒生ワクチンは承認されていない。その理由として、日本独自の弱毒生ワクチンに応用できる低病原性の低温増殖馴化株(健常人体温36℃~37℃では増殖しない)が開発されていないことが挙げられる。

【目的】A型インフルエンザウイルスを用いた先行研究により、ウイルスポリメラーゼであるPB1蛋白質の471番目のLys残基をHis残基に置換することで、34℃以下でのみ増殖が可能となる低温増殖馴化ウイルスPB1-Lys471His株を単離している。本研究では、PB1-Lys471His株が弱毒生ワクチンに応用ができるかどうかを動物感染実験により検討した。

【方法】PB1-Lys471His株またはPBSを6週齢マウス(各群12頭)に経鼻接種し、4週間後に病原性がある野生株を再び経鼻接種する事でワクチン効果の検証を行った。具体的には、野生株を接種した後のマウスの体重変化、生存率および肺組織に含まれるウイルス粒子数を測定した。

【結果・考察】PBS接種マウス群に野生株を感染させた場合の生存率は50%であり、感染後4日目および7日目のマウス肺組織には体内で増殖したウイルス粒子が検出された。一方で、PB1-Lys471His株接種マウス群においては野生株の感染後に死亡することなく、肺組織からウイルス粒子は検出されなかった。本研究結果により、新規弱毒生ワクチンとしてのPB1-Lys471His株の有用性が見出され、今後は自然免疫応答の活性化を評価することで更なる感染阻止効果を調べる。

演題名：HA抗原カクテル化によるインフルエンザワクチン改良の試み

学生氏名：衣笠 行紀

指導教員名：後川 潤、齋藤 峰輝

【背景】日本のインフルエンザワクチンに含まれる抗原はインフルエンザウイルスの表面タンパク質であるヘマグルチニン(HA)である。HAの頭部には、複数のアスパラギン(N)結合型糖鎖修飾配列が存在し、N型糖鎖プロファイル(配置と数)はウイルスの抗原性多様化に影響すると考えられている。季節性influenza A virus(IAV)のうち、香港型(H3N2亜型)IAVはHAの遺伝子変異の頻度が高く、抗原性が多様化し易い。そのため、ワクチン製造株と流行株との抗原性のズレが生じ易く、HAの遺伝子変異はワクチン効果を減弱させる要因となっている。そこで抗原性のズレに対応できるワクチンの改良を目的として、N型糖鎖プロファイルが異なるHAを混ぜた「カクテル型HA抗原」を用いて抗血清(抗体)を作製し、その有効性を調べた。【材料と方法】HA遺伝子に変異を導入し、N型糖鎖プロファイルが異なる組換えウイルス株を作製した。ウイルス粒子からHAを抽出し、3種類のHAを混合したカクテル型HA抗原をモルモットに免疫し、血液から抗HA血清を分離した。得られた抗カクテルHA血清のウイルス中和活性を2022

／23 シーズンの抗 HA 血清(単一 HA 抗原由来)との比較で検証した。【結果と考察】カクテル型 HA 抗原によって得られた血清は、単一 HA 抗原由来のものよりも広域で強い中和活性を示す傾向が認められた。HA 抗原のカクテル化による改良は、現行の HA ワクチンの効果を向上させ得る可能性があることが示唆された。

演題名：線維化に関連するオーファン G タンパク質共役型受容体の発現解析

学生氏名：古賀 大輔

指導教員名：岡本 安雄、坪井 一人、竹之内 康広、北風 圭介

【背景・目的】慢性的な炎症が発生すると、過剰な損傷修復反応により、筋線維芽細胞（活性化した線維芽細胞）から産生されるコラーゲンなどの細胞外マトリックスが沈着することで線維化が進行する。心臓、肺、肝臓、腎臓など、脳以外のほぼ全身の主要な臓器で発生し、線維化を起こした臓器は、最終的に機能不全に陥る。最近、我々は肺、腎臓および心臓の線維化でオーファン G タンパク質共役型受容体（GPCR）である Gpr176 遺伝子発現の有意な増加を認めた。本研究では、Gpr176 の発現増加が臓器線維化に共通する現象であるかどうか明らかにすることを目的とし、四塩化炭素（CC14）反復投与モデルを用いて肝臓の線維化における Gpr176 の発現を検討した。

【方法】CC14 をマウス腹腔内に反復投与することで肝線維化モデルマウスを作製し、血漿と肝臓を採取した。血漿を用いて、肝障害の指標となる aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT) を測定した。肝臓組織を用いて、コラーゲン線維を染めるシリウスレッド染色を行い、線維化の程度を評価した。さらに肝臓の Gpr176 および線維化マーカーである α SMA 遺伝子発現の変化を RT-PCR 法で評価した。

【結果・考察】コントロール群と比較して、CC14 群ではシリウスレッド染色で線維化を認め、血中 AST 値および ALT 値も高値であった。しかしながら、 α SMA および Gpr176 遺伝子発現は両群間で差が認められなかった。肝臓では肝星細胞が活性化（ α SMA 陽性）し、コラーゲン線維を産生することで肝線維化の促進に寄与することが知られている。今回は、0.5 mL/kg 体重の CC14 の反復投与により軽度の線維化は認められたが、 α SMA の遺伝子発現の増加が観察されなかったことから、CC14 の投与量を増やし、再度検討する必要があると考えられた。

演題名：新型コロナウイルス感染症に対する新規治療薬 FOXO1 阻害薬の可能性

学生氏名：川本 一貴

指導教員名：伊藤 利洋、北畠 正大、王寺 典子、古川 龍太郎、西川 尚代、榊田 礼子

新型コロナウイルス感染症が今もなお猛威を奮っている。この感染症が難治するところは、重症化すると肺炎などを引き起こすことであり、その成因は炎症性サイトカインの暴走によるもので、「サイトカインストーム」と呼ばれている。これを防ぐ手段として、炎症性サイトカインを産生する主細胞であるマクロファージが、サイトカインを生成する際、転写因子 FOXO1 を介することに私たちは着目し、これを阻害することで「サイトカインストーム」を抑えることができれば、新型コロナウイルスの重症化を防ぐことができるのではないかと考えた。実験では、マウスのマクロファージ細胞株である RAW264.7 を FOXO1 阻害薬で処理した後、炎症誘導物質である LPS（TLR4 リガンド）ならびに poly(I:C）（TLR3 リガンド）を加え反応させ、これらの mRNA を抽出、cDNA 化、定量的 PCR を行うことで、FOXO1 阻害薬が炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6、TNF- α の産生量を抑えられるか検討した。その結果、FOXO1 阻害薬は LPS、poly(I:C) による IL-1 β および IL-6 の産生を有意に抑制する結果が得られた。以上のことから、サイトカインの種類によるが、FOXO1 阻害薬が炎症性サイトカイン産生を抑制できることが明らかとなった。今後は炎症性サイトカイン抑制の詳細なメカニズムを検討し、生体において炎症性サイトカインを抑制することで肺炎を防ぐことができるのかを、動物モデル等を用いて実験を進める必要がある。

演題名：頭蓋内外バイパス技術向上のための様々な材料をもちいたトレーニング法の検討

学生氏名：馬場 美夢

指導教員名：小野 成紀、三好 康之、福原 徹、目黒 俊成、濱内 祝嗣、多田 悠馬、谷口 美季

【目的】脳血管の手術の一つにバイパス術というものがある。これは脳神経外科医にとって必要手技である。今回は顕微鏡下で手羽先の生体血管を用いて実際に応用できる効率的なトレーニング法を検討する。

【方法】初めに人工血管を用いて血管縫合に慣れる。次に手羽先から生体血管を採取し縫い目の数、縫う位置、縫う時間を検証する。最後に食紅を使い縫合が完了しているかどうかを確認する。

【結果】6針縫い、縫い目の位置が等間隔でない場合は縫い目から食紅が漏れてしまった。6針縫い、縫い目が等間隔の場合は初めは縫い目から食紅は漏れなかったが圧がかかると漏れてしまった。8針縫い、縫い目が等間隔でない場合圧がかかると漏れてしまった。8針縫い、縫い目が等間隔の場合漏れなかった。6針縫うのに要した時間は121分から58分に減少した。8針縫うのに要した時間は83分から63分に減少した。

【考察】針の持ち方や縫う順番を変えることで時間短縮に貢献した。また、血管径に合わせて縫う針の数を検討することでも効率化が図れた。

演題名：加齢マウスにおけるコカイン嗜癖行動の特性と成体海馬神経新生の関与

学生氏名：新井 啓仁

指導教員名：神野 尚三、山田 純

薬物依存症は、薬物の効果が失われると、薬物に対する強い欲求が起こり、その欲求を上手くコントロールすることができずに薬物の使用に至る疾患である。近年、高齢者の薬物依存症は若齢者と比べて治療が難しく、薬物の再使用（再燃）が社会的な問題になっているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、若齢マウスと加齢マウスを用いて、コカイン嗜癖行動の病態基盤の差異を検討した。実験では、C57BL/6J系統の若齢マウス（8週齢）と加齢マウス（52週齢）に7日間のコカイン条件付けを行った。場所嗜好性試験によって、加齢マウスと若齢マウスでは、同程度のコカイン嗜癖行動を示すことを確認した。続いて、5日間の消去実験を行ったところ、加齢マウスでは若齢マウスより消去学習の成立が遅い傾向が認められた。また、コカイン再投与による再燃実験を行ったところ、加齢マウスでは若齢マウスに比べて嗜癖行動の再燃が強い傾向が認められた。免疫組織化学的解析では、加齢マウスではコカイン投与により海馬神経新生が促進されたのに対し、若齢マウスでは海馬神経新生が抑制された。以上の結果は、コカインに対する海馬の神経新生の反応性の違いが、加齢マウスにおける消去学習の遅れや再燃に関与している可能性を示唆するものである。

演題名：メディカルイラストレーション：理解して描くことの重要性

学生氏名：中島 悠

指導教員名：レオン 佐久間、森谷 卓也

【目的】現代医学教育博物館(MM)に展示されている肉眼臓器標本をメディカルイラストレーションで示し、解説を加えることによって、見学者の理解が深まることを目指す。【方法】最初に、鉛筆での描き方を学ぶために描画演習を行った。次に、肉眼臓器標本の中から肺アスペルギルス症、水腎症、脾梗塞の3点を選び、メディカルイラストレーションを作成した。鉛筆で書いた後に画像をパソコンに取り込んでPhotoshopで色を付け、病変部を分かりやすくした。さらに、肺アスペルギルス症に関しては、医学的な説明を加えたパネルを作成した。【結果】球体、正6面体、正12面体、組み合わせ画の描画演習を行った際は、鉛筆で濃淡を表現し、陰影が出るよう意識した。肉眼臓器は標本をよく観察し、複雑な構造を正確に描くよう心がけた。パネルは、見やすいレイアウトになるよう工夫した。【考察】疾患を正確に理解するためには、説明されている文章を読むだけではなく、メディカルイラストレーションでの図解が極めて有用である。今回メディカルイラストレーションに触れる機会を得て、正確な描写に加え、わかりやすく表現することの難しさを痛感した。また、見たままを描くのではなく、理解して描くことが大切であることがわかった。今回の貴重な経験は、今後の勉学に対する姿勢を見直す意味でも非常に役立つものであ

った。

演題名：抗体作成を目的とした組換えタンパク質の発現と精製

学生氏名：高橋 亮香

指導教員名：富澤 一仁、中條 岳志

ヒトの tRNA にはメチル化などの化学修飾が酵素により導入され、tRNA 修飾を担う酵素の破綻は知的障害や2型糖尿病などの疾患を引き起こす。熊本大学分子生理学講座では、tRNA メチル化酵素 TRMT10A のノックアウトマウスでは精巣の重量が野生型マウスの約半分に低下することを見出し（中條ら、未発表データ）、その発症機構の解明を目指している。基礎情報として TRMT10A が精巣のどの細胞種で顕著に発現しているかを調べたいが、マウス TRMT10A を免疫染色可能な市販の抗体が無く、本実習では、抗体作製の抗原に用いる組換え TRMT10A (His-TRMT10A) の取得を目的とした。

6×His タグを融合した TRMT10A (His-TRMT10A) 発現プラスミドで大腸菌 DE3 株を形質転換し、大腸菌の培養と IPTG による発現誘導を行った。菌体を超音波破碎し、遠心上清に His-TRMT10A が大量に含まれていることをゲル電気泳動と CBB 染色で確認した。次に、遠心上清に含まれる His-TRMT10A をコバルトビーズに結合させ、ビーズを洗浄し、His-TRMT10A をイミダゾールで溶出し、透析した。初回の精製では、溶出画分に不純物が多く含まれていたため、塩濃度を上げ、界面活性剤も加えて精製し直した結果、最終的に高純度な His-TRMT10A (0.95 mg) の取得に成功した。

演題名：オレキシンのグリケーションは睡眠に影響を与えるか？

学生氏名：上村 淳修

指導教員名：山本 靖彦

睡眠の量（時間）と質（ぐっすりと続けて眠れるか）、そして、睡眠のタイミングは、年齢とともに変化し、生活の質や様々な疾患と関連する。特に、睡眠障害は、精神疾患や生活習慣病などで認められるが、そのメカニズムについては明らかにはなっていない。精神疾患、特に統合失調症の脳内や、糖尿病では全身の代謝異常により、グリケーション反応性が極めて高いメチルグリオキサール (MG) が産生され、様々な生体分子に非酵素的な修飾を付加することで、機能障害や構造異常を引き起こしてしまう。今回、私は、睡眠・覚醒のスイッチング機能を担う脳内のペプチド性神経伝達物質であるオレキシン A と B が MG によるグリケーションを受けるかどうかを調べた。

精製ヒトオレキシン A と B（ともにペプチド研究所から購入）を MG（濃度 0-100 mM; Sigma から購入）と試験管内で反応させ、ゲルアクリルアミド電気泳動で展開し、その後、クマシーブリリアントブルー染色とウェスタンブロットを行った。使用した検出用抗体は、MG がアルギニン残基とすることで形成する 5-ヒドロ-5-メチルイミダゾロン (MG-H1) 構造を検出するものである。オレキシン A (5 μ g) は、MG 濃度依存的 (0-100 mM) にオレキシン A 分子内に MG-H1 形成が増加したが、オレキシン B (5 μ g) では MG-H1 の形成は確認できなかった。そして、MG-H1 形成におけるインキュベーション時間を検討すると 6 時間がピークであった。

今回はじめて、オレキシン A が MG によるグリケーションを受け MG-H1 が形成されることが分かった。なぜ、オレキシン B は反応しないのかは分子構造も含めて、今後更に検討が必要である。オレキシン A がグリケーションを受けることによる分子安定性や構造変化、受容体への結合など機能変化にも興味がある。そして、可能なら睡眠障害にどのように関わるのかの全容解明に挑戦してみたい。

演題名：熱帯熱マラリア原虫に対する放線菌抽出物の抗原虫活性検討

学生氏名：村田 雅佳

指導教員名：水上 修作、平山 謙二

【背景・目的】マラリアはマラリア原虫により引き起こされる蚊媒介性の熱性疾患である。世界中では年間2億人以上が感染し、60 万人以上が死亡している。ヒトに感染するマラリア原虫は5種類あり、そ

の中でも熱帯熱マラリア原虫による感染は致死率が最も高い。2000 年以降、新薬開発や蚊の制御によって感染者数死亡者数共に減少していたが、新型コロナウイルスの感染拡大により薬や検査機材の供給が滞ったことも影響して、2020 年は前年より増加を示した。これまでに多くの抗マラリア薬が開発されてきたが、薬剤耐性マラリア原虫の出現や増加によって、未だに新薬は必要とされている。今回我々は、有望な新規抗マラリア薬候補を見出すことを目的として、候補サンプルの抗マラリア原虫活性の検討を行った。既存の抗生物質や生理活性物質の約 7 割が放線菌に由来することが知られているため、本研究ではその抽出物を候補サンプルとして使用した。

【方法】まず、熱帯熱マラリア原虫感染赤血球の培養液に、放線菌抽出物（93, 94, 135, 143）を加え、これを混合ガス存在下の 37℃インキュベーター内で静置した。48 時間後に原虫 DNA 量を測定し、抽出物を加えなかった際の結果と比較することにより、抗マラリア原虫活性を評価した。

【結果・考察】放線菌抽出物 94, 135, 143 に抗マラリア原虫活性が認められた。その中でも 143 は活性が最も強く、更に細胞傷害性試験においても良好な結果を示した。そのため、我々は放線菌抽出物 143 を有望な候補と考え、今後、更なる解析を進めていく予定である。