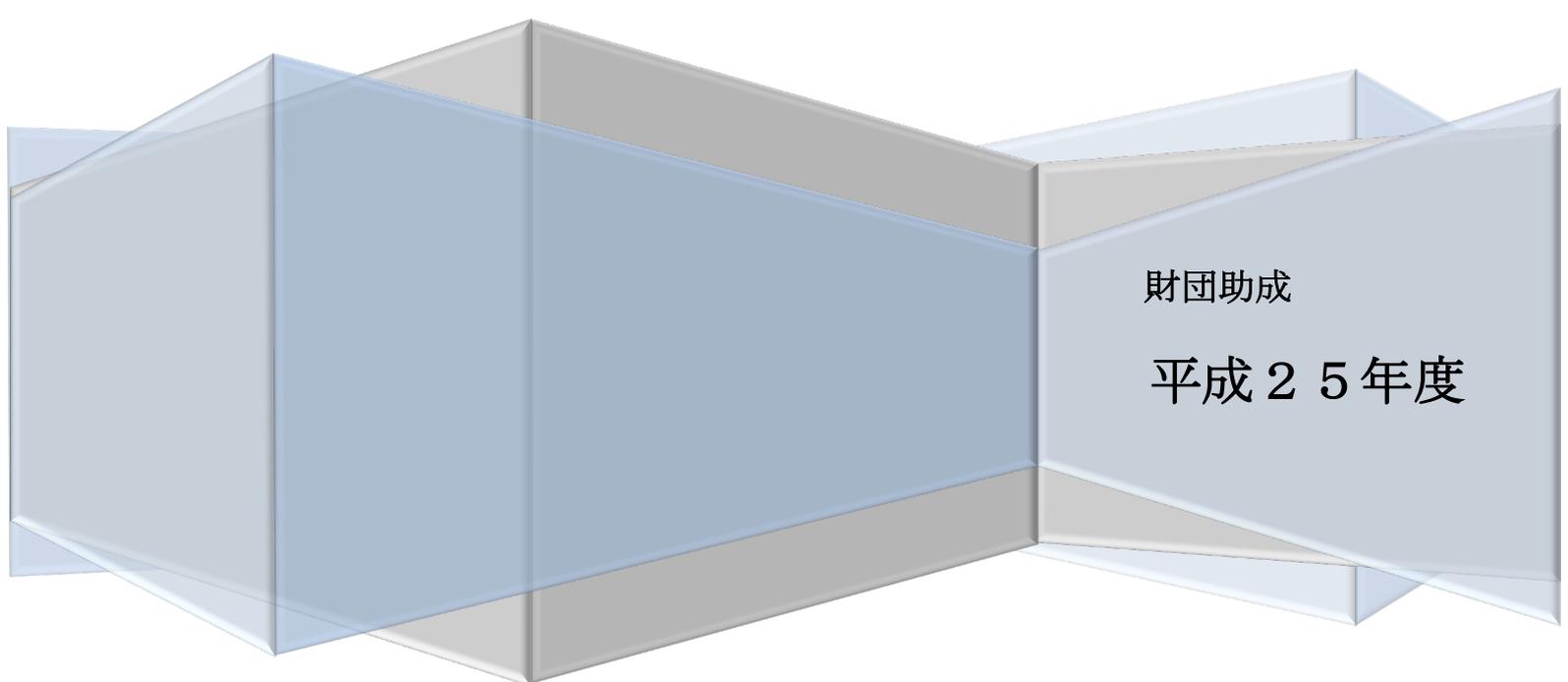


一般財団法人横浜総合医学振興財団

研究等助成報告書

(推進研究グループ 9・11 : 2011～2013 を含む)



財団助成

平成25年度

ホームページ掲載に当たって

助成対象研究の成果である報告書をまとめた平成25年度研究等報告書を財団ホームページに掲載いたしました。

前年度までは、「財団助成研究等報告書」及び「梅原基金による推進研究報告書」としてそれぞれを冊子で刊行していましたが、今回からこれらの報告書を「研究等報告書」にまとめ、提出された各研究報告書の抄録のみを冊子として刊行し、抄録及び本文の全文は財団ホームページに掲載することにしました。これは、研究成果をより広く周知すること及び経費節減を目的に行うものです。

なお、横浜市大教育等助成（学生海外研修助成など）については、従来どおりに冊子の形で刊行します。

推進研究助成は、梅原清氏御夫妻からの御寄附を財源として、相当の実績を有する研究者を対象として特に臨床応用が期待される優れた医学研究の推進を目的にしており、優れた研究に対しては3ヶ年度の継続助成を行っています。

梅原清御夫妻からは当初の梅原基金2億円に加えて平成25年度には基金追加として3千万円の御寄附が寄せられています。

また、3ヶ年度継続助成を行った研究のうち、特に優れた研究に対して「梅原賞」を授与しています。

平成25年度助成実績 13件（助成金 計1,070万円）

平成25年度梅原賞 1件

奨励研究助成は、中堅研究者の一層の発展を奨励することを目的としてある程度の研究実績を有する研究者が行う研究を助成しています。

平成25年度助成実績 10件（助成金 計460万円）

若手研究助成は、将来を担う医学研究者の育成を目的として大学院生を含む35歳以下の研究者が行う研究を助成しています。

平成25年度助成実績 11件（助成金 計300万円）

医療技術研究助成は、医師を除く医療従事者が行う実務的研究や業務改善の進捗を図ることを目的として医師を除く医療従事者が行う研究等を助成します。

平成25年度助成実績 9件（助成金 計119万円）

医学・医療関連事業助成は、医学領域における社会的課題に対する組織的活動の支援を目的とし、啓発や研修事業などの組織としての取組みに助成します。

平成25年度助成実績 7件（助成金 計307万円）

以上のとおり、平成25年度は従来規模での助成事業を行うことができましたが、助成財源の主要部分を占める財団経営売店の売上利益がコンビニエンスストアの影響を受けて激減したため助成規模を縮小せざるを得なくなりました。

平成26年度以降は、助成範囲を絞り若手研究者を中心に助成を続けて参ります。

今後とも、関係皆様方のご支援、ご指導を賜りますようお願い申し上げます。

平成26年11月

一般財団法人横浜総合医学振興財団
理事長 井出 研

目 次

I 梅原賞

第八グループ(平成22年度～24年度継続助成終了)

[軸索伸長促進物質LOTUSを利用した神経再生研究](#) 1

竹 居 光太郎

II 推進研究助成

1. 第九グループ(平成23年度～25年度継続助成終了)

[血管弾性線維形成の制御による大動脈瘤に対する新規薬物治療の開発](#) 3

横 山 詩 子

[心臓型アデニル酸シクラーゼを治療標的にした不整脈治療の可能性と臨床応用](#) 12

奥 村 敏

[消化器癌におけるバイオマーカーの探索と新規分子標的薬の開発](#) 16

大 島 貴

2. 第十一グループ(平成 25年度助成終了)

[ヘッジホッグ・シグナル伝達系の精緻な制御機構と整理的意義の解明](#) 21

廣 瀬 智 威

[脂肪酸持続投与による新たな大腸癌促進の分子メカニズムの解明](#) 26

遠 藤 宏 樹

[精巣幹細胞をモデルとした、エピジュネティクス制御を利用した成体型幹細胞増幅機構の解析](#) 32

大 保 和 之

III 奨励研究助成

[RNF213 遺伝子変異陰性もやもや病のエキソーム解析](#) 36

宮 武 聡 子

小分子 RNA による精巣幹細胞分化制御システムの解析(研究途中のため次年度掲載)

富 澤 信 一

[強度変調放射線治療 \(IMRT\) に最適化プログラムの開発](#) 40

幡 多 政 治

[口腔癌における IL-13R \$\alpha\$ 2 をターゲットにした分子標的薬と癌ワクチンの併用療法の開発](#) 43

中 島 英 行

[全身エリテマトーデスにおける炎症制御機構異常の解析](#) 47

吉 見 竜 介

<u>ベーチェット病と成人スティル病における M2 マクロファージの機能解析と臨床応用</u>	51
桐野 洋平	
<u>卵巣明細胞癌 (ovarian clear cell adenocarcinoma:OCCA) に対する新規細胞死誘導薬 (酸化ストレス誘導性ネクロシス) の開発</u>	55
山田 六平	
<u>KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌の分子病理学的特性 (S100 蛋白質の関与)</u>	58
禹 哲漢	
<u>EP4 シグナリングによる弾性線維の制御</u>	62
市川 泰広	
<u>Fluorescent patient-derived orthotopic xenograft を用いた膵癌微小環境の生体内リアルタイムイメージング</u>	65
廣島 幸彦	

IV 若手研究助成

<u>内在性 N g R1 アンタゴニスト LOTUS による嗅索側枝形成機構の解明</u>	69
池谷 真澄	
<u>エイコサペンタエン酸 (EPA) を用いた大腸癌化学予防</u>	74
日暮 琢磨	
<u>孔脳症の分子病理の解明</u>	78
小寺 啓文	
<u>模擬微小重力発生装置下での 3 次元共培養によるヒト iPS 細胞由来膵島の創出</u>	82
田中 慎	
<u>人工ヒト癌幹細胞モデルを用いた癌幹細胞特異的モノクローナル抗体の作成</u>	86
渡邊 夕紀子	
<u>過敏性腸症候群における認知・行動的要因の評価系整備および心理・生理学的メカニズム解明への応用</u>	90
菅谷 渚	
<u>寛解期潰瘍性大腸炎患者を対象としたテーラーメイド型服薬アドヒアランス向上プログラムの開発とその評価に関する前後比較試験</u>	94
川上 明希	
<u>がんの発生・進展における細胞極性タンパク質 PAR-3 の役割と分子メカニズムの解明</u>	98
佐々木 和教	
<u>C 型肝炎ウイルス (HCV) に対する抗 miRNA-33 薬の効果の検討</u>	102
留野 渉	
<u>経静脈的飽和脂肪酸投与による肝臓での lipotoxicity の検討</u>	106
小川 祐二	
<u>関節リウマチ (rheumatoid arthritis;RA) における骨構造解析と画像検査の臨床応用</u>	110
峯岸 薫	

V 医療技術研究助成

<u>血管内皮機能の日内変動とストレス変動及び、動脈硬化の 治療効果判定の有用性評価</u>	114
佐野友香	
<u>腹膜透析患者の腹膜炎・出口部感染発症の実態とその関連要因に ついての検討</u>	118
竹山志津子	
<u>頭頸部癌患者の化学療法・放射線療法同時併用療法における有害事象を モニタリングするための評価シートの導入</u>	122
山内加奈	
<u>密封小線源療法における最適なシード線減数の予測式作成</u>	126
村上朋史	
<u>リアルタイムPCR法によるEBウイルスDNA定量検査法の確立</u>	131
山西有紀	
<u>剖検例のパラフィン包埋組織を用いた侵襲性アスペルギルス症発症に 関与する遺伝子多型の解析</u>	135
安芸恭子	
大学病院における小児領域の院内研修の現状調査（研究途中のため次年度掲載）	
染谷奈々子	
心臓カテーテル検査を受ける幼児へのプレパレーションの効果 ～就学前の幼児の保護者へのアンケート結果から～（研究途中のため次年度掲載）	
中村祐子	
<u>糖尿病チーム医療における心理カウンセリングの導入効果および 今後の活用法の検討</u>	139
池田祥子	

VI 医学・医療関連事業助成

<u>新生児個別的発達ケアと評価プログラム（NIDCAP）による新生児看護ケアの トレーニング 2</u>	143
関和男	
<u>SNS(Social Networking Service)を用いた医学教育</u>	147
飯田洋	
<u>小児稀少腫瘍の病理組織カラーアトラス作成</u>	150
田中祐吉	
<u>首都圏公立総合大学における学生・教職員のメンタルヘルスマネジメント システムの開発</u>	156
河西千秋	
<u>ザンビア共和国での地域医療支援活動を通じた学生交流</u>	160
井上聡	
<u>早期胃癌に対するNBI併用拡大観察の有用性に関する多施設共同研究</u>	163
野中敬	
<u>セルフヘルプ効果を期待した乳がん体験者による小冊子作成</u>	167
蜂巣志乃	

VII 指定寄附助成

心臓疾患研究助成（24年度）

ヨーロッパと日本で急性大動脈解離の発生率が異なる理由

—大動脈壁の構造的な相違があるか—.....170

郷 田 素 彦

心臓疾患研究助成（25年度）

静脈グラフトの長期開存に関する研究.....174

安 田 章 沢

VI 学会開催助

第30回 日本ハイパーサーミア会178

藤 内 祝

第18回 ラテックスアレルギー研究会

Latex allergy フォーラム 2013179

相 原 道 子

第5回 日本静脈経腸栄養学会首都圏支部会学術集会180

望 月 弘 彦

IX 公開市民医学講座開催助成

第76回日本消化器病学会関東支部市民公開講座182

永 瀬 肇

<梅原賞>

軸索伸長促進物質LOTUSを利用した神経再生研究

竹居光太郎

横浜市立大学大学院生命医科学研究科，医学部生命医科学部門

抄録

本研究は神経回路形成因子LOTUSの生理機能を利用した神経再生医療技術の創成に向けた基盤構築を目的とした。そのために、平成22年度では、LOTUSの生理活性物質としての機能解析、および神経回路形成における生理機能に関する一連の研究を進め、LOTUSは“Nogo受容体に対する拮抗作用”と、それとは全く異なる機構による“神経突起伸長促進作用”の双方を有することが判明した。これらは何れも神経再生促進作用に奏功する。平成23年度では、LOTUSの神経回路形成機能に関する研究成果をScience誌に論文公表した (Sato et al., Science 333: 769, 2011)。また、LOTUSのC末端側約150アミノ酸残基を分子内機能ドメインとして同定し論文公表した (Kurihara et al., Biochem, Biophys, Res, Comm. 418: 390, 2012)。平成24年度では、LOTUSはNogo受容体の4種のリガンド (神経再生阻害因子) 全てに対して完全な拮抗作用を示すことが判明した (Kurihara et al., 投稿中)。また、LOTUS遺伝子欠損アウトマウス (LOTUS-KOマウス) を用いて脊髄損傷モデル動物を作製し、野性型マウスと比較検討したところ、マウスやラットなどの齧歯類が示す自発的な神経再生能がLOTUS-KOマウスでは欠如することが判明し、内在性の自発的神経再生能にLOTUSが深く関わるということが判明した。以上より、LOTUSの生理機能を利用した神経再生治療法の妥当性が検証され、治療技術創成の基盤を確立した。

1. 目的

我々は、発生期の嗅覚2次投射路形成を担う新規の生体機能分子Lateral Olfactory Tract Usher Substance (LOTUS)を発見し、更にその結合分子としてNogo受容体 (NgR1) を同定した。NgR1は4種の神経再生阻害因子の共通の受容体として働き神経突起伸長を強く阻害するため、中枢神経系の再生を困難にする主要因と考えられている。ところが、我々が発見したLOTUSはNgR1と結合し、NgR1のリガンドの一つであるNogoがもたらす神経再生阻害作用を完全に抑制する。本研究では、LOTUSのNgR1に対する拮抗作用を利用した新しい再生医療技術の構築を目的とし、LOTUSの神経再生に関連する細胞機能を詳しく解析し、脊髄損傷モデル動物においてLOTUSが誘起する神経再生能を精査・評価する。

2. 方法 (代表的な研究方法)

1) LOTUSのNgR1拮抗作用の検証: NgR1の4種のリガンド (神経再生阻害因子群: Nogo, MAG, OMgp, BLYS) とNgR1とのリガンド・受容体結合について、①COS7細胞にLOTUSおよびNgR1を強制発現させた実験系、②培養脊髄後根神経節細胞および培養嗅球神経細胞を用いた成長円錐の崩壊退縮応答実験系、並びに③同細胞を用いた神経突起伸長実験系においてLOTUSのNgR1に対する拮抗作用を解析し、LOTUSの強力なアンタゴニスト活性を検証した。

2) 脊髄損傷モデル動物の作製: C57BL/6マウスを背景にもつ野生型マウス、LOTUS-KOマウスを用いて脊髄損傷モデル動物を作製し、神経再生状態を比較検討した。麻酔下の成体マウスの脊髄を胸椎レベルで切除し、神経損傷後経時的に下肢運動歩行機能および組織学的・生化学的に神経再生状態を解析した。齧歯類における当該神経障害は、脊髄損傷後約3週間で部分的に回復する。LOTUS-KOマウスと野生型マウスとを比較検討した。

3. 結果と考察

我々が発見した生体機能分子LOTUSは、その結合分子NgR1の神経再生阻害作用を抑制する (内在性のNgR1拮抗物質として働く) ことから、“神経再生阻害因子に対する拮抗作用”を介して「神経再生を促進する」と考えられた (特許取得)。その生理機能を利用した神経再生医療技術の確立を目指し、平成22~24年度において以下の研究成果を得た。

[平成22年度]では、LOTUSの内在性拮抗物質としての機能解析、および神経回路形成における生理機能に関する一連の研究成果を進めた。予想外の結果として、培養皿底面にLOTUSをコーティングして神経細胞を培養すると著しい神経突起伸長促進作用が認められ、LOTUSは“神経再生阻害因子に対する拮抗作用”に加え、“神経突起伸長作用”の2つの異なった生理機能を有することが判明した。これらの生理機能は何れも神経再生の促進に奏功する。

[平成23年度]では、神経回路形成に関する一連の研究成果をまとめて論文公表した (Sato et al., Science, 2011)。続いてLOTUSの分子内機能ドメインを同定して論文発表した (Kurihara et al., BBRC, 2012)。LOTUSの各種ドメイン欠損変異体を作製してNgR1との結合能を解析した結果、C末端側約150アミノ酸残基 (以下、UA/ECドメイン) は上記の2種の生理機能の双方を有することが判明した。従って、LOTUSのUA/ECドメインは神経再生促進に関わるリコンビナント製剤として適用可能と考えられた (特許出願中)。

[平成24年度]では、LOTUSの拮抗作用について更に詳細な解析を行った。驚くべきことに、LOTUSはNogo受容体の4種のリガンド（神経再生阻害因子）全てに対して完全な拮抗作用を示し、非常に強力なNogo受容体拮抗物質として神経再生に奏功すると考えられた（Kurihara et al., *Science Signaling*, 投稿中）。次に、LOTUSの生体での神経再生における有用性を検証するため、LOTUSを欠損するノックアウトマウス（LOTUS-KOマウス）を用いて脊髄損傷モデル動物を作製して野性型マウスと比較検討した。マウスやラットなどの齧歯類は脊髄損傷後に部分的な機能回復を示すことがよく知られている。ところが、LOTUS-KOマウスではそのような機能回復が全く見られなかった（未発表）。このことは、齧歯類が有する内在的な自発的神経再生能にLOTUSが深く関わることを明確に示す。そこで、LOTUSを神経細胞で過剰に発現するトランスジェニックマウスを作製した。現在、このLOTUS過剰発現マウスを用いて同様の脊髄損傷モデル動物において解析中である。他方、外来性にLOTUSを投与適用する方法として、UA/ECドメインのリコンビナント製剤を作製し、外科的手法で神経再生を促進する実験を開始している。

以上より、LOTUSの生理機能を利用した神経再生治療法の妥当性が検証され、治療技術創成の基盤を確立することができた。当財団のご支援に深謝申し上げます。

4. 論文発表等（課題関連の発表に限る）

- 1) Kurihara, Y., Arie, Y., Iketani, M., Ito, H., Nishiyama, K., Sato, Y., Nakamura, F., Mizuki, N., Goshima, Y., Takei, K. The carboxyl-terminal region of Crtac1b/LOTUS acts as a functional domain in endogenous antagonism to Nogo receptor-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418 : 390-395 (2012).
- 2) Sato, Y., Iketani, M., Kurihara, Y., Yamaguchi, M., Arie, Y., Yamashita, N., Nakamura, F., Kawasaki, T., Hirata, T., Aizawa, S., Strittmatter, S.M., Goshima, Y., and Takei, K. Cartilage acidic protein 1B (LOTUS), an endogenous Nogo receptor antagonist for axon tract formation. *Science*, 333 : 769-773. (2011).

他) 学会発表：28報（内、招待講演5報），総説：6報，特許出願3件（内、取得1件，出願中2件）

<推進研究助成>

血管弾性線維形成の制御による大動脈瘤に対する新規薬物治療の開発

横山 詩子

共同研究者：中邨 智之、金 美花

横浜市立大学医学部循環制御医学

抄録

大動脈瘤は進行性致死性疾患であるにも関わらず、現在薬物治療は存在せず、大動脈瘤の進行自体を抑制する薬物治療の開発が切望されている。本研究で研究代表者らは、プロスタグランジン E 受容体 EP4 刺激が大動脈瘤の進行に関与し、EP4 拮抗薬が大動脈瘤の進行を抑制する可能性を、複数のマウス大動脈瘤モデルや EP4 欠損マウス、ApoE/EP4 ダブル欠損マウス、ヒト大動脈瘤組織を用いて示し、論文報告を行った。また、すでに進行したマウス大動脈瘤に対しても、EP4 拮抗薬が弾性線維の断裂とプロテアーゼである MMP9 の発現を抑制し、治療効果があることを示した。さらに、ヒト大動脈瘤組織からの分泌蛋白を質量分析で網羅的に解析し、EP4 拮抗薬が MMP9 の分泌を抑制することを見だし、ヒトでの有効性も示唆された。質量分析で得られた蛋白群のうち、3つの蛋白が患者血漿で優位に増加することも明らかとなった。これらの結果より、既に進行した大動脈瘤患者に対しても EP4 拮抗薬が有効である可能性を示すことができ、さらに治療効果判定の新規バイオマーカーの有力な候補を得ることができた。現在、第 I 相試験に向けてさらに研究を推進している。

1. 目的

動脈硬化症の重大な合併疾患である大動脈瘤の発生頻度は、65歳以上の男性人口の約5%であり、人口の高齢化と共に急上昇している。大動脈瘤は無症状のうちに経過し、突然破裂に至るが、破裂後の救命は困難なうえ、現在はすでに進行した動脈瘤に対する外科治療以外の治療が存在しない。つまり、大動脈瘤の進行自体を抑制するような根本的治療法が切望されている。大動脈瘤は、血管を支持する弾性線維が持続する炎症により破壊されるために血管壁が脆くなり、血圧負荷のため血管が拡大することで増悪する。研究代表者は、プロスタグランジンE₂ (PGE₂) 受容体の1つであるEP4が、血管弾性線維の形成を低下させるという結果を小児期の血管の研究から得ていたため、大動脈瘤の弾性線維形成の低下・疾患の進行にEP4シグナルが関与しているという仮説を立てた。本研究では、EP4シグナルが大動脈瘤の進行に寄与するか、さらにEP4拮抗薬が大動脈瘤の治療薬となりえるかを検証し、バイオマーカーの探索とともに大動脈瘤の治療法を開発することを本研究の目的とした。

2. 方法

2-1 ヒト大動脈瘤組織を用いたPGE₂-EP4シグナルの作用の検討

① ヒト大動脈瘤組織でのEP4発現の検討

横浜市立大学外科治療学の益田教授・鈴木准教授・郷田助教・安田助教の協力を得て、倫理委員会の承認のもとに（承認番号B130307001）8症例のヒト腹部大動脈瘤組織におけるEP4の発現を免疫組織染色とRT-PCRで検討した。

② PGE₂-EP4シグナルで制御される蛋白群の網羅的検討

7症例の大動脈瘤組織を、PGE₂またはEP4刺激薬で刺激し、その培養上清をトリプシン消化後にLTQオービトラップ質量分析装置を用いて分析し、データはProtein Discovererソフトウェアを用いて解析し、Swiss-Protデータベースを用いて蛋白質を同定した。質量分析は横浜市立大学国際総合科学研究科の平野研究室・荒川助教の支援を受けた。大動脈瘤組織または組織からの分泌物の質量分析は報告例があるが薬物刺激を加えた解析はこれまでに報告がなく、本研究の特色の一つである。

2-2 マウス疾患モデルを用いたEP4拮抗薬の大動脈瘤抑制・治療効果の検討

① ApoE欠損マウス+アンジオテンシンII大動脈瘤モデル

ApoE欠損マウス、またはApoE/EP4ダブル欠損マウスに4週間アンジオテンシンII (1μg/kg/day)を投与して大動脈瘤を作製し、大動脈瘤瘤径の計測と瘤組織でのMMP活性の測定、mRNAやタンパク発現の解析を行った。また、ApoE欠損マウスにアンジオテンシンIIを投与すると同時に、EP4拮抗薬を経口投与し、4週後に大動脈瘤形成抑制の評価を行った。治療効果の判定には、ApoE欠損マウスにアンジオテンシンIIを4週間投与して動脈瘤が完成した後に、EP4拮抗薬を4週間投与したマウスを用いた。

② 塩化カルシウム大動脈瘤モデル

EP4欠損マウス (global knockout) では、腹部大動脈周囲に塩化カルシウムを15分間塗布して閉腹したのち4週間後に形成される大動脈瘤の形成を評価した。

③ アンジオテンシンII+塩化カルシウム大動脈瘤モデル

Cre-loxP部位特異的組換えシステムを利用した血管平滑筋特異的EP4過大発現マウス (EP4^{loxP/-}/SM22-Cre) を独自に作製し、これらのマウスの腹部大動脈周囲に塩化カルシウムを塗布し、同時にアンジオテンシンIIの持続注入を行い、4週間後に大動脈瘤形成を評価した。

2-3 EP4シグナルによる弾性線維形成低下のメカニズムの検討

① ラット初代平滑筋培養細胞を用いた解析

EP4を内因性に高発現する血管平滑筋細胞 (ラット動脈管平滑筋細胞) を胎児ウシ血清1%・DMEMで2週間培養し、EP4刺激薬・拮抗薬を用いて単層培養における弾性線維形成をエラスチン蛍光免疫染色で評価した。これらの平滑筋細胞の単離・初代培養法と、弾性線維を形成させる培養法は研究代表者が世界に先駆けて独自に確立したものである (Yokoyama U, et al., *J Clin Invest* 2006, *Circulation* 2014)。

② 3次元平滑筋積層細胞による弾性線維形成の評価

研究代表者は、弾性線維の立体構造を観察できる実験系を独自に開発した (Ishiwata R and Yokoyama U,

et al., *Atherosclerosis* 2013)。平滑筋細胞表面にフィブロネクチンとゼラチンでナノレベルの薄膜を形成させ、1週間で7層になるまで積層させ胎児ウシ血清 1%・DMEM で培養し、層状の弾性線維を構築させた。培地に PGE₂ を 48 時間添加することで、PGE₂ の弾性線維形成への作用を組織学的に評価した。

2-4 大動脈瘤のバイオマーカーの探索

2-1 の実験より大動脈瘤の進行と関連することが予測された分泌蛋白群を 14 種類選出し、これらの蛋白について各々 ELISA を用いて患者 8 名と健常者血漿・血清 (4 名) で測定した。血液検体は横浜市立大学外科治療学の協力を得て、倫理委員会の承認のもとに集積・解析された (承認番号 B130307001)。

3. 結果

3-1 ヒト大動脈瘤組織・平滑筋細胞での EP4 の高発現

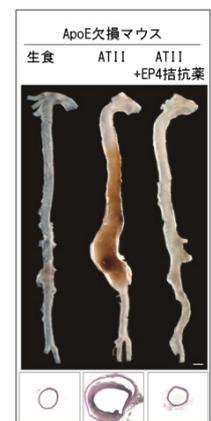
プロスタグランジン E 受容体のうち EP4 受容体は限られた組織にのみ発現し、特に正常の大動脈には発現が少ない。しかしながら、ヒト大動脈瘤組織 8 例の解析から、弾性線維の断裂の高度な部分に EP4 が過剰発現し、弾性線維の断裂と EP4 の発現強度には全症例で正の相関が認められた。さらに、大動脈瘤から単離した平滑筋培養細胞では、正常大動脈平滑筋細胞に比べて EP4 mRNA が 3 倍高発現していた。

3-2 EP4 欠損マウス・EP4 過大発現マウスでの大動脈瘤の形成

上記の結果から、EP4 が弾性線維の形成低下を介して大動脈瘤の進行に関与していることが示唆された。そこで、ApoE/EP4 ダブル欠損マウスにアンジオテンシン II を投与したところ、ApoE 欠損マウスで見られる大動脈瘤形成が 76% 抑制された。さらに異なる大動脈瘤マウスモデルである、塩化カルシウム負荷を EP4 欠損マウスに行ったところ、野生型で認められる大動脈瘤の形成が 73% 抑制された (*Yokohama U et al., PLoS ONE, 2012*)。ヒト組織の検討から、平滑筋細胞における EP4 の過大発現が確認されたことから、血管平滑筋特異的に EP4 を過大発現するマウスにアンジオテンシン II + 塩化カルシウム負荷を行ったところ、野生型マウスではわずかな動脈瘤形成しか認められないのに対し、これら遺伝子改変マウスでは、正常直径の約 2 倍にもなる高度な動脈瘤形成が認められた。

3-3 EP4 アンタゴニストの大動脈瘤の抑制・治療効果

EP4 シグナルの抑制が動脈瘤形成を抑制することが示唆されたため、EP4 拮抗薬 (ONO-AE3-208, 0.05mg/kg/day) を ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II 負荷したマウスに一日一回、4 週間経口投与したところ、生理的食塩水投与群に比べて著しい大動脈瘤形成の抑制が認められた (右図)。さらに、この疾患モデルで、4 週間のアンジオテンシン II 投与で形成された大動脈瘤に対する EP4 拮抗薬の治療効果を検討した。4 週間の EP4 拮抗薬投与では、生食群に対して弾性線維の断裂が有意に回復し、正常に近い弾性線維の構成が保たれていた。さらに MMP2、MMP9 の発現は EP4 拮抗薬で有意に抑制され、弾性線維形成に必須の酵素であるリシルオキシダーゼの発現が回復していた。疾患の活動性が高い進行した動脈瘤でも EP4 受容体の抑制が有効であったと考えられた。



3-4 PGE₂-EP4 シグナルの弾性線維形成抑制と分解のメカニズムの解明

EP4 が弾性線維の架橋に不可欠であるリシルオキシダーゼの発現を抑制するメカニズムについて、EP4 を高発現する動脈管平滑筋細胞で検証した。EP4 刺激は、ホスホリパーゼ γ -Src を介してリシルオキシダーゼをライソゾームで分解することで、その発現を低下させることが示され、(*Yokohama U et al., Circulation, 2014*) EP4 拮抗薬が弾性線維を再生させる可能性があることが示唆された。さらに、三次元平滑筋細胞積層体を構築し、PGE₂ を培地に加えて培養したところ、層状に形成された弾性線維が 48 時間以内に断裂し平滑筋層が部分的に薄く、脆弱になる様子が観察され、PGE₂ が弾性線維の分解を急速に促進することが証明された (*Ishiwata R and Yokoyama U, et al., Atherosclerosis* 2013)。

3-5 ヒト大動脈瘤組織の分泌蛋白の解析

大動脈瘤組織を PGE₂ または EP4 刺激薬とともに 48 時間培養し、その培養上清でウェスタンブロットとザイモグラフィを行ったところ、大動脈瘤の進行に伴い増加することが知られているインターロイキン 6 の産生と MMP2 活性の上昇が認められ、EP4 拮抗薬の刺激では、これらの反応の抑制が認められた。

そこで、さらに PGE₂-EP4 シグナルの作用を網羅的に調べるために、ヒト大動脈瘤組織 7 例を PGE₂ また

は PGE₂+EP4 拮抗薬で刺激し、その上清の質量分析を行い分泌蛋白の同定を行った。PGE₂ は前述以外でも、MMP9、カテプシン B、好中球活性化因子などを有意に増加させ、これらは EP4 拮抗薬で減少した。すなわち大動脈瘤で最も多い PGE₂ 受容体サブタイプである EP4 がヒト病変組織で弾性線維の分解に関わる蛋白群の分泌に関与し、その EP4 シグナルの抑制が治療に有効であることが期待される結果となった。

3-6 大動脈瘤のバイオマーカー探索

大動脈瘤は治療薬が存在しないため、治療効果判定に有効なバイオマーカーも存在しない。EP4 拮抗薬に治療薬として開発するためには、疾患の活動性や治療効果判定に有用なバイオマーカーが必要であるとの着想から、前述の質量分析の結果より大動脈瘤で多く分泌されているタンパクの選定を行った。

14 種類の蛋白に候補を絞り、これらについて大動脈瘤患者 8 例と健常者 4 例の血清・血漿で ELISA を行ったところ、フィラミン A、パーレカン、ミオシン重鎖 11 の 3 つで、大動脈瘤患者血漿で有意に蛋白が多く検出され、これまで報告のないバイオマーカー候補を見出すことができた。

4. 考察

本研究で着目した EP4 受容体は正常大動脈では発現が極めて少ない。すなわち、病的状態になると過剰発現する EP4 を標的とすることは、正常な組織に対して副作用が少ない効果的な治療となることが期待される。従来の大動脈瘤の薬物開発は受容体選択的ではないため臨床治験で失敗に終わっている。これに対して本研究は、副作用の少ない、受容体選択的な薬剤による大動脈瘤の治療を目指している点が特色であり、研究成果より EP4 拮抗薬が大動脈瘤の治療薬となる可能性を示すことができた。さらに大動脈瘤疾患進行予測に有用な新規バイオマーカー候補を得ており、数年以上をかけて進行する大動脈瘤の臨床治験に向けて飛躍的に前進することができた。また、大動脈の弾性線維形成のメカニズムや再構築を検討できる新たな二次元・三次元実験系を確立しており、大動脈瘤の更なる病態解明も期待される。

今後は、世界初の大動脈瘤の薬物治療が実現するよう、これら独自の実験系や血管平滑筋特異的 EP4 欠損・過大発現マウスを用いて、平滑筋細胞と免疫細胞とのネットワークに焦点をあてた病態解明を進めるとともに、疾患進行度の異なる患者血漿を集積し、疾患活動性予測の新規バイオマーカーの探索を推進する予定である。貴財団より助成を頂き、新学術領域（文部科学省）を 2 期と A-step（科学技術振興機構 JST,）を獲得し、製薬会社とも正式な薬剤開発プロジェクトとして第 I 相試験に向けて共同研究を行うに至った。本研究を大きく推進する機会を継続して与えていただいたことに深謝申し上げます。

5. 主な論文・学会発表（詳細は補足資料に記載）

■英文論文： 原著論文4編、総説1編

1. Ishiwata R, **Yokoyama U***, Matsusaki M, et al., Three-Dimensional Multilayers of Smooth Muscle Cells as a New Experimental Model for Vascular Elastic Fiber Formation Studies. *Atherosclerosis*, 233(2):590-600, 2014 *corresponding author
2. **Yokoyama U**, Minamisawa S, Shioda A, et al., Prostaglandin E₂ inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation*, 129(4):487-96, 2014
3. **Yokoyama U**, Iwatsubo K, Umemura M, et al., The prostanoid EP4 receptor and its signaling pathway. *Pharmacol Rev*. 65(3):1010-52, 2013 [Review]
4. **Yokoyama U***, Ishiwata R, Jin MH, et al., Inhibition of EP4 signaling Attenuates Aortic Aneurysm Formation. *PLoS ONE*, 7(5):e36724, 2012 *corresponding author
5. Matsusaki M, Kadowaki K, Adachi E, Sakura T, **Yokoyama U**, Ishikawa Y, Akashi M. Morphological and Histological Evaluations of 3D-Layered Blood Vessel Constructs Prepared by Hierarchical Cell Manipulation. *J Biomater Sci Polym Ed*. 23(1-4):63-79, 2012

■和文総説： 3編

1. **横山詩子** 「動脈硬化・動脈瘤病態形成におけるプロスタグランジン E₂ の役割」 血栓と循環 メディカルレビュー社 21(3), 29-33, 2013
2. **横山詩子**, 他 「動脈瘤と PGE₂」 遺伝子医学 MOOK メディカルドゥ社 2013 年 24 号 pp.296-300

■著書：2編

Yokoyama U*, Ishikawa Y., Reconstruction of elastic fibers in three-dimensional smooth muscle cells. *Nanomedicine and Nanotoxicology*. Springer, 2014 in press *corresponding author

■招請講演： 8演題

Yokoyama U, et al., Therapeutic Effect of EP4 Antagonist on Advanced Abdominal Aortic Aneurysm. The 86th Scientific Session, American Heart Association (2013.11.16-20, Dallas, USA)

■学会発表 21演題（うち国際学会9演題）

■特許 明石満、松崎典弥、石川義弘、横山詩子：三次元組織体及びその製造方法 特願 2013-212966

論文・学会発表補足資料

研究中間報告書 「血管弾性線維形成の制御による大動脈瘤に対する新規薬物治療の開発」

横山 詩子

横浜市立大学医学部循環制御医学

[英文論文] 原著論文 4 編、総説 1 編

1. Ishiwata R, **Yokoyama U***, Matsusaki M, Asano Y, Kadowaki K, Ichikawa Y, Umemura M, Fujita T, Minamisawa S, Shimoda H, Akashi M, and Ishikawa Y. Three-Dimensional Multilayers of Smooth Muscle Cells as a New Experimental Model for Vascular Elastic Fiber Formation Studies. *Atherosclerosis*, 233(2):590-600, 2014 *corresponding author
2. **Yokoyama U**, Minamisawa S, Shioda A, Ishiwata R, Jin MH, Masuda M, Asou T, Sugimoto Y, Aoki H, Nakamura T, Ishikawa Y. Prostaglandin E₂ inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation*, 129(4):487-96, 2014
3. **Yokoyama U**, Iwatsubo K, Umemura M, Fujita T, Ishikawa Y. The prostanoid EP4 receptor and its signaling pathway. *Pharmacol Rev.* 65(3):1010-52, 2013 [Review]
4. **Yokoyama U***, Ishiwata R, Jin MH, Kato Y, Suzuki O, Jin H, Ichikawa Y, Kumagaya S, Katayama Y, Fujita T, Okumura S, Sato M, Sugimoto Y, Aoki H, Suzuki S, Masuda M, Minamisawa S, Ishikawa Y. Inhibition of EP4 signaling Attenuates Aortic Aneurysm Formation. *PLoS ONE*, 7(5):e36724, 2012 *corresponding author
5. Matsusaki M, Kadowaki K, Adachi E, Sakura T, **Yokoyama U**, Ishikawa Y, Akashi M. Morphological and Histological Evaluations of 3D-Layered Blood Vessel Constructs Prepared by Hierarchical Cell Manipulation. *J Biomater Sci Polym Ed.* 23(1-4):63-79, 2012

[和文総説] 3 編

3. **横山詩子** 「動脈硬化・動脈瘤病態形成におけるプロスタグランジン E₂ の役割 (The role of prostaglandin E₂ in atherosclerosis and aortic aneurysm)」 血栓と循環 メディカルレビュー社 21(3), 29-33, 2013
4. **横山詩子**、金美花、石川義弘 「動脈瘤と PGE₂」 遺伝子医学 MOOK メディカルドゥ社 2013 年 24 号 pp.296-300
5. **横山詩子**、石渡遼、大島登志男、南沢享、石川義弘 「三次元血管モデルを用いた動脈硬化性疾患の機序解明 Elucidation of Molecular Mechanisms of Atherosclerosis by Three-Dimensional (3D)-Layered Blood Vessel Constructs」 科学と工業 大阪工研協会 2012 年 9 月号 86 号 pp.21-27

[著書] 2 編

1. **Yokoyama U***, Minamisawa S, Ishikawa Y. The multiple roles of prostaglandin E₂ in the regulation of the ductus arteriosus. *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*. Springer, 2014 in press *corresponding author
2. **Yokoyama U***, Ishikawa Y., Reconstruction of elastic fibers in three-dimensional smooth muscle cells. *Nanomedicine and Nanotoxicology*. Springer, 2014 in press *corresponding author

[招請講演] 8演題

1. **Yokoyama U.** PGE₂-EP4 signaling is a key regulator of cardiovascular stiffness and elasticity. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2014.3.16-18, Kagoshima) シンポジスト
2. **Yokoyama U.** Molecular mechanisms of the regulation of vascular elastic fiber formation and development of a new 3D vascular model. The 36th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (2013.12.3-6, Kobe) シンポジスト
3. **横山詩子**「血管弾性線維形成の機序解明に向けた三次元血管壁組織の開発」第2回三次元生体組織構築公開シンポジウムー世界基準へのチャレンジー (2013.11.28, 東京) シンポジスト
4. **Yokoyama U.**, Ishiwata R, Arakawa N, Suzuki S, Masuda M, Ishikawa Y. Therapeutic Effect of EP4 Antagonist on Advanced Abdominal Aortic Aneurysm. The 86th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2013.11.16-20, Dallas, USA) selected abstract
5. **横山詩子.**「プロスタグランジンEによる血管弾性線維の制御メカニズムと新たな三次元血管モデルの可能性」国立循環器病研究所セミナー、第18回NCVC 研究者交流会 (2013.9.27, 大阪) 講演
6. **横山詩子**「動脈硬化性疾患の機序解明にむけた三次元血管モデルの開発」三次元生体組織構築公開シンポジウムー世界基準へのチャレンジー (2012.11.28, 東京) シンポジスト
7. **横山詩子**「プロスタグランジン E シグナルと弾性線維形成ー動脈管閉鎖や大動脈瘤形成への関与」医学研究の基礎を語り合う集い Tokyo Heart Development Club (2012.6.25, 東京) 講演
8. **Yokoyama U.**, Shioda A, Ishiwata R, Suzuki S, Masuda M, Asou T, Aoki H, Sugimoto Y, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Molecular mechanism of the regulation of vascular elastic fiber formation. The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2012.3.29-31, Matsumoto) シンポジスト

[学会発表] 21演題 (うち国際学会9演題)

1. Ichikawa Y, **Yokoyama U.**, Ishikawa Y. Prostaglandin E2 receptor EP4 signaling in vascular smooth muscle cells decreases aortic elasticity. Experimental Biology Annual Meeting (2014.4.26-30, San Diego, USA)
2. **Yokoyama U.**, Ishiwata R, Yasuda S, Goda M, Suzuki S, Masuda M, Ishikawa Y. Innovative pharmacological therapy for Abdominal Aortic Aneurysm by inhibition of PGE₂-EP4 signaling. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2014.3.21-23, Tokyo)
3. Ichikawa Y, **Yokoyama U.**, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin E2 Receptor EP4 Signaling in Vascular Smooth Muscle Plays a Role in Arterial Elasticity. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2014.3.21-23, Tokyo)
4. Ishiwata R, **Yokoyama U.**, Ishikawa Y. Secretome-Based Identification of PGE₂-EP4-Inducible Factors in Human Abdominal Aortic Aneurysm. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2014.3.16-18, Kagoshima)
5. Ichikawa Y, **Yokoyama U.**, Ishikawa Y. Prostaglandin E2 Receptor EP4 Signaling in Smooth Muscle Cells Regulates Arterial Elasticity. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2014.3.16-18, Kagoshima)
6. **Yokoyama U.**, Ishiwata R, Arakawa N, Suzuki S, Masuda M, Ishikawa Y. Therapeutic Effect of EP4 Antagonist on Advanced Abdominal Aortic Aneurysm. The 86th Scientific Session, American Heart Association (AHA)

(2013.11.16-20, Dallas, USA)

7. Ichikawa Y, Yokoyama U, Iwamoto M, Yokota S, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin E₂ Receptor EP4 Signaling in Vascular Smooth Muscle Decreased Elasticity of the Aorta. The 86th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2013.11.16-20, Dallas, USA)
8. 石渡遼、横山詩子「大動脈瘤進展におけるプロスタグランディン E-EP4 の役割」第6回 大動脈分子病態研究会 (2013.8.22, 久留米)
9. 市川泰広、横山詩子、南沢享、石川義弘 「血管弾性線維におけるプロスタグランディン E 受容体 EP4 の役割の検討」第21回 日本血管生物医学学会学術集会 (2012.9.26-28, 大阪)
10. Ishiwata R, Yokoyama U, Jin MH, Masuda M, Asou T, Sugimoto Y, Aoki H, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin E₂-EP4 signaling inhibits vascular elastic fiber formation in the ductus arteriosus. The 7th TAKAO International symposium (2013.7.13-15, Tokyo)
11. Ichikawa Y, Yokoyama U, Jin MH, Ishikawa Y. Mouse Overexpressing Prostaglandin E Receptor EP4 in Vascular Smooth Muscle Cells Decreased Elasticity of the Aorta. The 7th TAKAO International symposium (2013.7.13-15, Tokyo)
12. 石渡遼、横山詩子「EP4 シグナル制御による大動脈瘤の治療開発」新学術領域「自然炎症」+「脂質マシナリー」若手ワークショップ (2013.7.3, 鳴門)
13. Ishiwata R, Yokoyama U, Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M, Ishikawa Y, Minamisawa S. Rat Smooth Muscle Cells within Three Dimensional Cellular Multilayers Exhibit Contractile Phenotypes and Layered Elastic Fiber. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research (2012.5.17-19, Seoul, Korea)
14. Katayama Y, Yokoyama U, Nemoto H, Kasama K, Suzuki S, Isomatsu Y, Uchida K, Imoto K, Ishikawa Y, Masuda M. The role of prostaglandin E (PGE) receptor EP4 in aortic aneurysm formation. the Aortic Symposium (2012.4.26-27, New York, USA)
15. 片山雄三、横山詩子、根本寛子、笠間啓一郎、鈴木伸一、磯松幸尚、内田敬二、井元清隆、石川義弘、益田宗孝「大動脈瘤形成におけるプロスタグランディン E 受容体 EP4 の役割の検討」第42回日本心臓血管外科学会学術総会 (2012.4.18-20, 秋田)
16. Ishiwata R, Yokoyama U, Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M, Ishikawa Y, Minamisawa S. 3D cellular multi-layers of rat smooth muscle cells has a potential as a novel ex vivo vascular model. The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2012.3.29-31, Matsumoto)
17. Yokoyama U, Jin MH, Kato Y, Ishiwata R, Suzuki S, Masuda M, Asou T, Aoki H, Sugimoto Y, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Inhibition of EP4 Signaling Attenuates Mouse Aortic Aneurysm Formation. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2012.3.16-18, Fukuoka)
18. 石渡 遼, 横山 詩子, 熊谷 駿, 金 美花, 加藤 優子, 鈴木 伸一, 益田 宗孝, 青木 浩樹, 杉本 幸彦, 南沢 享, 石川 義弘「EP4シグナル抑制による大動脈瘤治療」新学術領域研究「脂質マシナリー」若手ワークショップ (2012.2.2, 東京)
19. Minamisawa S, Yokoyama U. Prostaglandin EP4 Signaling Plays a Critical Role in Vascular Elastic Fiber Disruption in the Ductus Arteriosus. The 7th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (2011.9.11-14 Taipei)
20. Yokoyama U, Kato Y, Suzuki S, Masuda M, Asou T, Aoki H, Sugimoto Y, Nakamura T, Minamisawa S,

Ishikawa Y. Prostaglandin EP4 Signaling Negatively Regulates Vascular Elastic Fiber Assembly. The 2nd Molecular Cardiovascular Conference II (2011.9.2-4, Hokkaido)

21. Ishiwata R, Yokoyama U, Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M, Ishikawa Y, Minamisawa S. Three dimensional cellular multi-layer technology utilized evaluation of elastic fiber formation and phenotype of rat vascular smooth muscle cells. The 7th Japan-China-Korea Pediatric Heat Forum (2011.7.8, Fukuoka)

[特許]

明石満、松崎典弥、石川義弘、横山詩子：三次元組織体及びその製造方法 特願 2013-212966 2013.10.10

<推進研究助成>

心臓型アデニル酸シクラーゼ関連遺伝子群を治療標的にした不整脈治療の可能性と臨床応用

奥村 敏

鶴見大学歯学部生理学

【抄録】 心臓型(5型)アデニル酸シクラーゼ(AC5)とその下流に存在する新規 cyclic AMP (cAMP) 活性化因子 Epac (exchange protein activated by cAMP)の不整脈ならびに心不全発症にはたす役割について検討を行い、それら因子の新規治療標的としての可能性を検討した。

1) 心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害薬(ビダラビン)の抗不整脈薬としての有用性の検討

心臓型アデニル酸シクラーゼ欠損マウス(AC5K0)は、正常心機能を示し、様々な病態生理下で心筋保護作用を示すことから、「AC5 特異的抑制作用を有する抗ヘルペス薬(ビダラビン)は有用な不整脈治療薬になる」という仮説を立て、同薬剤の有用性を検討した。その結果ビダラビンはマウス心房細動モデルならびにカテコラミン誘発性心室性頻拍モデル(Galsequestrin 2 欠損マウス:Casq2K0)で誘発される一過性心房細動ならびに心室性不整脈を有意に減少させた。また同薬剤は心不全発症の抑制効果を有することも明らかにした。

2) 新規 cAMP 活性化因子 Epac1 の不整脈ならびに心不全治療標的の可能性の検討

Protein kinase A (PKA)とは独立した新規 cAMP 活性化因子 Epac1 の不整脈ならびに心不全発症にはたす役割について、Epac1 ノックアウトマウス(Epac1K0)を作成して検討したところ、Epac1 は心房細動持続時間を有意に減少させ、慢性カテコラミン、慢性圧負荷、加齢のいずれの方法で誘発される心不全の発症を抑制する効果を有することが明らかになった。

以上の結果から AC5 ならびにその下流に存在する Epac1 は不整脈ならびに心不全治療の有用な治療標的になる。

【目的】 申請者は心臓型アデニル酸シクラーゼ(AC5)欠損マウスの解析から、同酵素あるいはその下流に存在する新規 cAMP 活性化因子 Epac(exchange protein activated by cAMP)を選択的に阻害することで、心機能や呼吸機能抑制を起こさずにβ遮断薬と同等の不整脈治療ができるという仮説をたて、横浜総合医学振興財団推進研究助成(2011. 6-2014. 9)を受け、本仮説を検証した。

【方法】 1) マウス不整脈モデルの作成

(1)心房細動モデル: 食道ペースングカテーテルによる心房頻回刺激による心房細動モデル。

(2)心室性不整脈モデル: カテコラミン誘発性心室性頻拍モデルである Galsequestrin 2 欠損マウス(Gasq2K0)を用いた。

2) マウス心不全モデルの作成

- (1) 慢性カテコラミン刺激心不全モデル: イソプロテレノールの投与 (60mg/kg/day) を 7 日間行う。
 - (2) 慢性圧負荷刺激心不全モデル: 大動脈狭窄による慢性圧負荷刺激を 3 ないし 5 週間行う。
 - (3) 加齢心不全モデル: 2.5-3 年令の高齢雄マウス。
- 3) 東邦大学薬学部薬物学教室(田中光教授)との共同研究
- (1) 単離心筋細胞の細胞内カルシウム (Ca^{2+} : Calcium transient) を測定。
 - (2) 単離乳頭筋標本を用いた収縮・拡張機能の測定。
 - (3) 肺静脈心筋自動能の測定: 肺静脈心筋の自動能は心房細動などの不整脈を誘発する単離肺静脈心筋を用いて Epac1K0 の肺静脈心筋自動能を検討した。

【結果】 1) ビダラビンの抗不整脈薬としての有用性の検討 (基礎研究)

(1) マウス心房細動モデルを用いたビダラビンの心房細動発生予防効果

ビダラビンは β 遮断薬 (メトプロロール) と同程度に心房細動持続時間を有意に減少させた。

(2) 遺伝性不整脈モデル: カテコラミン誘発性心室頻拍 (CPVT) モデルである Casq2K0 を用いたビダラビンの心房細動発生予防効果

麻酔下マウスを用いてイソプロテレノール (1.5mg/kg) ならびにトレッドミル運動負荷で誘発される心室性不整脈の発症をビダラビンは有意に抑制した。

2) ビダラビンの抗不整脈薬としての有用性の検討 (臨床研究)

(1) 横浜市立大学附属病院での医師主導型臨床治験

1) 心臓術後発症した心房細動に対するビダラビンの有効性の検討

横浜市立大学附属病院倫理委員会にて臨床治験の承認 (B110512007) を得て、平成 24 年度後半より横浜市立大学附属病院心臓外科にて、心臓手術後発症した心房細動に対するビダラビンの有効性についての臨床治験が開始された。

【これまでの結果】 心手術後に心房細動が発症してビダラビンを投与した症例はこれまで 12 症例である。このうち 8 症例で有効性が確認された。内訳は投与後 4 時間以内に心房細動停止効果が確認された症例は 4 症例 (33%)、投与 8 時間以内に心房細動停止効果が確認された症例は 8 症例 (67%) であった。

3) 新規サイクリック AMP 活性化因子 (Epac1) の抗不整脈薬の新規治療標的の可能性 (基礎研究)

(1) Epac1K0 では心房細動持続時間は Wild type (WT) に比較して有意に減少していた。

(2) Epac1K0 から抽出した肺静脈心筋異所性自動能の測定。

肺静脈異所性自動能はベースラインでは Epac1K0 と WT で有意差を認めなかったが、ノルアドレナリン負荷刺激では、Epac1K0 では WT に比較して肺静脈心筋の異所性自動能の発生が有意に抑制されていた。

(3) 心不全マウスモデル: Epac1K0 では WT に比較して心不全誘発刺激に抵抗性を示した。

【考察】 心臓型アデニル酸シクラーゼとその下流の Epac1 は不整脈ならびに心不全発症の新規治療標的になることが示された。

[論文発表]

1. **Okumura S (corresponding)**, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, Jin H, Ohnuki Y, Tsuneoka Y, Kurotani R, Suita K, Kawakami Y, Hamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Tsunematsu T, Bai Y, Suzuki S, Hidaka Y, Umemura M, Ichikawa Y, Yokoyama U, Sato m, Ishikawa F, Izumi-Nakaseko H, Adachi-Akahane S, Tanaka H, Ishikawa Y : Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses.
***J Clin Invest* 124, 2785-2801, 2014 .**
2. Aoki R, Yokoyama U, Ichikawa Y, Taguri M, Kumagaya S, Ishiwata R, Yanai C, Fujita S, Umemura M, Fujita T, **Okumura S**, Sato M, Minamisawa S, Asou T, Masuda M, Iwasaki S, Nishimaki S, Seki K, Yokota S, Ishikawa Y. Decreased serum osmolality promotes ductus arteriosus constriction.
***Cardiovasc Res* (in press)**
2. Hachijo N, Kawai N, Mori H, Sano R, Ohnuki Y, **Okumura S**, Langenbach GE, Tanaka E : Effects of the masticatory demand on the rat mandibular development.
***J Oral Rehabil* 41, 581-587, 2014.**
3. Sato M, Hiraoka M, Suzuki M, Sakima M, Mamun AA, Yamane Y, Fujita T, Yokoyama U, **Okumura S**, Ishikawa Y : Protection of cardiomyocytes from the hypoxia-mediated injury by a peptide targeting the activator of G-protein signaling 8.
***PLoS One* 14, e91980, 2014**
4. Sato I, Umemura M, Mitsudo K, Nakashima H, Iwai T, Feng X, Oda K, Miyajima A, Makino A, Iwai M, Fujita T, Yokoyama U, **Okumura S**, Sato M, Eguchi H, Tohna I, Ishikawa Y : Hyperthermia generated with ferucarbotran (Resovist) in a alternating magnetic field enhances cisplatin-induced apoptosis of cultured human oral cancer cells.
***J Physiol Sci* 64, 177-183, 2014**
5. Ohnuki Y, Yamada T, Mototani Y, Umeki D, Shiozawa K, Fujita T, Saeki Y, **Okumura S (corresponding)** : Effect of protein kinase A on the phosphorylation status and transverse stiffness of cardiac myofibrils.
***J Pharmacol Sci* 123, 279-283, 2013**
6. Ohnuki Y, Umeki D, Cai W, Kawai N, Mototani Y, Shiozawa K, Jin HL, Fujita T, Tanaka E, Saeki Y, **Okumura S (corresponding)** : Role of masseter muscle β_2 -adrenergic signaling in regulation of muscle activity, myosin heavy chain transition, and hypertrophy.
***J Pharmacol Sci* 123; 36-46, 2013**
7. Umeki D, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Fujita T, Nakamura Y, Saeki Y, **Okumura S (corresponding)**: Effects of chronic Akt/mTOR inhibition by rapamycin on mechanical overload-induced hypertrophy and myosin heavy chain transition in masseter muscle.
***J Pharmacol Sci* 122; 278-288, 2013**
8. Bai Y, Tsunematsu T, Jiao Q, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Jin M, Cai W, Jin HL, Fujita T, Ichikawa Y, Suita K, Kurotani R, Yokoyama U, Sato M, Iwatsubo K, Ishikawa Y, **Okumura S (corresponding)** : Pharmacological stimulation of type 5 adenylyl cyclase stabilizes heart rate under both microgravity and hypergravity induced by parabolic flight.
***J Pharmacol Sci* 119:381-189, 2012**
9. Ichikawa Y, Yokoyama U, Iwamoto M, Oshikawa J, **Okumura S**, Sato M, Yokota S, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y : Inhibition of phosphodiesterase type 3 dilates the rat ductus arteriosus without inducing intimal thickening.
***Circ J* 76:2456-2464, 2012**
10. Yokoyama U, Ishiwata R, Jin MH, Kato Y, Suzuki O, Jin H, Ichikawa Y, Kumagaya S, Katayama Y, Fujita T, **Okumura S**, Sato M, Sugimoto Y, Aoki H, Suzuki S, Masuda M, Minamisawa S, Ishikawa Y : Inhibition of EP4 signaling attenuates aortic aneurysm formation. ***PLoS One* 7:e36724, 2012**
11. Iwatsubo K, Bravo C, Uechi M, Baljinnyam E, Nakamura T, Umemura S, Lai L, Gao S, Yan L, Zhao X, Park M, Qiu H, **Okumura S**, Iwatsubo M, Vatner SF, Vatner DE : Prevention of heart failure in mice by an antiviral agent that inhibits type 5 cardiac adenylyl cyclase.
***Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H2622-H2628, 2012**
12. Kurotani R, **Okumura S**, Matsubara T, Yokoyama U, Buckley JR, Tomita T, Kezuka K, Nagao T, Esposito D, Tayler TE, Gillette WK, Ishikawa Y, Abe H, Ward JM, Kimura S: Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by TGF β signaling down-regulation.
***J Biol Chem* 286, 19682-92, 2011**
13. Sato M, Yokoyama U, Fujita T, **Okumura S**, Ishikawa Y: The roles of cytochrome P450 in ischemic heart disease.
***Curr Drug Metab.* 12, 526-32, 2011**
14. Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, **Bai Y**, Kurotani R, Yokoyama U, **Okumura S**, Cismowski MJ, Lanier SM,

[目次に戻る](#)

Ishikawa Y: Identification of transcriptional factor E3 (TFE3) as a receptor-independent activator of $G\alpha_{16}$: Gene regulation by nuclear $G\alpha$ subunit and its activator. *J Biol Chem* **286**, 17766-76, 2011

[学会発表]

1. Suita K, **Okumura S** et al. Vidarabine, a selective cardiac adenylyl cyclase inhibitor, prevents ventricular arrhythmia in Calsequestrin 2 knockout mouse 第91回日本生理学会大会(3月16-18日 2014年 鹿児島大学)

2. Suita K, **Okumura S** et al. Vidarabine, a selective cardiac adenylyl cyclase inhibitor, prevents ventricular arrhythmia in Calsequestrin 2 knockout mouse 第78回日本循環器学会学術集会(3月21-23日 2014年 東京国際フォーラム)

3. **Okumura S** et al **American Heart Association Scientific Scission 2012** (November 3-7, 2012 Los Angeles)

「George E Brown Memorial Lecture and Molecular Mechanism of Heart Failure」

Disruption of Epac1 decreases phosphorylation of phospholamban and protects the heart against stress

[目次に戻る](#)

<推進研究助成>

消化器癌におけるバイオマーカーの探索と新規分子標的薬の開発

大島 貴

横浜市立大学附属市民総合医療センター消化器病センター

(共同研究者)

Nouri Neamati

ミシガン大学薬学部医薬化学科

山田 六平

神奈川県立がんセンター臨床研究所

安井 弥

広島大学大学院分子病理学

吉川 貴己

神奈川県立がんセンター消化器外科

抄録

われわれは、横浜市立大学の2病院で外科手術を施行した消化器癌患者の同意を得て、約10年間に集積した1200例を超える癌組織と近接正常粘膜のペアの凍結バンクよりmRNAを抽出してcDNAバンクを構築し、個別化治療を目指したバイオマーカーの検索と、新規ターゲットの検索を行った。DNAマイクロアレイを用いた解析等からバイオマーカーの候補として130遺伝子を選択し、定量PCR法にて各遺伝子の相対的発現量を測定して臨床データとの関係を検討した。その結果、大腸癌では、肝転移予測因子として10遺伝子、予後不良因子として10遺伝子を同定した。胃癌では、5-FU系抗癌剤の補助化学療法を施行したStageII/III胃癌の再発予測因子を同定し、これらを異なるコホート(神奈川県立がんセンター)を用いて検証した結果、SPARC, INHBA, HRBB2, VSNL1, KIAA1199の5遺伝子で再現性が認められた。このうちKIAA1199遺伝子の機能解析から、同遺伝子が癌の増殖能および浸潤能に強く関わり、5-FUに対する耐性因子であることを発見した。これらの研究成果を臨床応用して個別化治療を実現するため、StageII/III胃癌根治切除後の再発リスク層別化キット、およびKIAA1199を標的とした低分子抗癌剤の開発を進めている。

1. 目的

今後の消化器癌に対する治療戦略において、「バイオマーカーを用いた個別化治療の実現」と、「分子標的薬の使用による治療成績の改善」はきわめて重要な課題である。本研究は、2003年より横浜市立大学の2病院で手術を施行した消化器癌患者から同意を得て、1200例を超える癌組織と近接正常粘膜のペアの凍結バンクを確立し、これからmRNAを抽出してcDNAバンクを構築し、消化器癌の個別化治療を目指したバイオマーカーの検索と、新規ターゲットの検索を行い、さらに、これらを臨床応用して、胃癌の再発リスク層別化キットおよび低分子抗癌剤の開発を行うこと目的とした

2. 方法

術前化学療法などの前治療がなく、根治切除後5年以上経過した胃癌400例、大腸癌202例を対象とした。バイオマーカーの候補については、heterogeneityを考慮して病理学的かつ遺伝子学的に明確に分化型と未分化型に区別できる臨床病理的悪性度が高いStageIII, N3症例において、DNAマイクロアレイを用いて約3万遺伝子の癌組織/近接正常細胞の発現比を検討し、癌細胞で5倍以上過剰発現している遺伝子から選択した。さらにSAGE ライブラリーから抽出した遺伝子、前臨床段階を含む分子標的薬の標的とそのファミリー、抗癌剤の代謝酵素と標的遺伝子、多剤耐性因子およびその他の癌関連遺伝子などを加えた130遺伝子を選択し、上記cDNAバンクを用いて定量 PCR法にて各遺伝子の発現量を測定し、臨床データとの関係を検討してバイオマーカーを検索した。大腸癌では肝転移の予測因子と予後予測因子を検索した。胃癌ではStageII/III症例の根治切除後の227症例をtraining setとして再発予測因子を検索し、次に神奈川県立がんセンターの凍結検体173例をvalidation setとして用いて再現性を検証した。次にこれらの遺伝子の機能解析と新規ターゲット検索を目的として、6種類の胃癌細胞株を用いて各遺伝子をノックダウンし、増殖能、浸潤能および5-FUに対する感受性の変化を検討した。

3. 結果

大腸癌では肝転移の予測因子として、MMP2, MMP13, IGF-1R, FGF-R1, claudin-7, EphA4, EphB2, Per1, Bmal1, RegIVの10遺伝子が同定された。また予後不良因子としてMT1-MMP, TIMP-1, STC1, STC2, CCR7, Per2, IL24, REG4, PRL3, IGFBP3の10遺伝子が同定された。

胃癌ではStageII/III胃癌根治切除後の再発予測因子として38遺伝子を同定した。そこで異なるコホート(神奈川県立がんセンター)を用いて再現性を検討した結果、SPARC, INHBA, HRBB2, VSNL1, KIAA1199の5遺伝子において再現性が認められた。さらにこれらの遺伝子の機能解析を目的に各遺伝子をノックダウンしたところ、KIAA1199が増殖能および浸潤能に強く関わり、5-FUに対する耐性因子であることを発見した。KIAA1199は根治切除後に5-FU

系抗癌剤の補助化学療法を施行したStageII/III胃癌症例の再発予測因子でもあることから、新規ターゲットとして極めて有望であると考えられた。

4. 考察（本研究の展望）

本研究は、横浜市立大学の 2 病院において外科手術を施行した消化器癌患者から協力を得て、約 10 年間に集積した 1200 症例を超える癌組織と近接正常粘膜のペアの凍結バンクより cDNA バンクを構築し、これをもとに合理的に選択された 130 種類のバイオマーカーの候補遺伝子の発現量と各症例の臨床データとの関係を検討することで、臨床応用が期待される胃癌根治切除後の再発予測因子と、新規ターゲットを明らかにすることが出来た。これらの研究成果を臨床応用して個別化治療を実現するため、根治切除胃癌の再発リスク層別化キットの作成、および KIAA1199 をターゲットとした低分子抗癌剤の開発を進めている。

根治切除胃癌の再発リスク層別化キットの開発については、バイオマーカー検索の症例と異なるコホートの根治切除胃癌約 1000 症例から micro tissue array を作成し、再現性を有した 5 種類の再発予測因子について免疫染色を行う。染色強度によって 0, 1+, 2+, 3+ の 4 段階に分類し、3+ の染色強度を示した症例を発現陽性とする。各臨床病期(ステージ)において 5 種類の再発予測因子の発現陽性数で再発リスクの層別化の可能性を検討する。その 1 例であるが、例えば、5 種類の予後不良因子の発現について、① 0-1 個の因子数の発現陽性、② 2-5 個の因子数の発現陽性の 2 群に分け、それぞれ臨床病期(ステージ)において明確に再発リスクの層別化が出来るかを検討する。

KIAA1199 をターゲットとした低分子抗癌剤の開発については、共同研究者 Nouri Neamati 博士とともに、KIAA1199 蛋白の分子構造をもとに低分子抗癌剤の候補を約 1000 種類設計、作成し、これらの候補について、胃癌と正常細胞株を用い、MTT assay にて殺細胞効果と副作用の一次スクリーニングを行う。次に二次スクリーニングとして、選別した薬剤と既存の抗癌剤との相乗効果および至適投与法について、Chau and Talaly による薬剤併用の相乗効果の評価とフローサイトメトリーを用いた検討を行い、候補薬剤を絞り込む。三次スクリーニングでは、ヌードマウスを用いたヒト胃癌 xenograft モデルにて有効性と安全性の検討を行い、単剤の効果、および既存の抗癌剤との併用効果について検討するとともに、病理組織学的検討を行い臓器障害の有無について評価する。

横浜市立大学の手術検体を用いたバイオマーカー検索によって、本研究の目的の一つである根治切除胃癌に対する再発リスク層別化キットが開発できれば、胃癌のリスク層別に基づいた個別化治療による治療成績の向上が期待される。また、新規ターゲットとして同定された KIAA1199 を標的とした低分子抗癌剤が開発され、前臨床段階での有用性の検討を経て、臨床における単剤投与、あるいは既存の抗癌剤との併用投与の有用性が証明されれば、切除不能・再発進行胃癌への投与のみならず、根治切除後の補助化学療法としての使用による治療成績の向上が期待される。

5. 論文及び学会発表

論文発表

1. **Oshima T**, Yoshihara K, et al. Relation of INHBA Gene Expression to Outcomes in Gastric Cancer after Curative Surgery. *Anticancer Res* 34: 2303–9, 2014.
2. Yamada T, **Oshima T**, et al. Impact of overexpression of Sushi repeat-containing protein X-linked 2 gene on outcomes of gastric cancer. *J Surg Oncol* 109: 836–40, 2014.
3. Oo HZ, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Uraoka N, **Oshima T**, et al. Overexpression of ZDHHC14 promotes migration and invasion of scirrhus type gastric cancer. *Oncol Rep.* 32: 403–10, 2014.
4. Oo HZ, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, **Oshima T**, et al. Identification of Novel Transmembrane Proteins in Scirrhus-Type Gastric Cancer by the Escherichia coli Ampicillin Secretion Trap (CAST) Method: TM9SF3 Participates in Tumor Invasion and Serves as a Prognostic Factor. *Pathobiology* 81: 138–48, 2014.
5. Sato T, **Oshima T**, et al. Clinical significance of SPARC gene expression in gastric cancer. *J Surg Oncol* 108: 364–8, 2013.
6. Xu S, **Oshima T**, Neamati N, et al. Stabilization of MDA-7/IL-24 for colon cancer therapy. *Cancer Lett* 335: 421–30, 2013.
7. **Oshima T**, Masuda M. Molecular targeted agents for gastric and gastroesophageal junction cancer. *Surg Today* 42: 313–27, 2012.
8. Tamagawa H, **Oshima T**, et al. The Expression of the Phosphatase Regenerating Liver 3 Gene is Associated with Outcome in Patients with Colorectal Cancer. *Hepatogastroenterology* 59: 2122–6, 2012.
9. **Oshima T**, Takenoshita S, et al. Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer. *Oncology Reports* 25: 1439–46, 2011.
10. Tamura S, **Oshima T**, et al. Clinical significance of STC1 gene expression in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 31: 325–330, 2011.
11. Numata M, **Oshima T**, et al. Relationship between RegIV gene expression to outcomes in colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 104: 205–9, 2011.
12. Inagaki D, **Oshima T**, et al. Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene correlates with poor outcomes in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 30: 4127–30, 2010.
13. Yamada T, **Oshima T**, et al. Overexpression of MMP-13 gene in colorectal cancer with liver metastasis. *Anticancer Res.* 30: 2693–9, 2010.
14. Kanazawa A, **Oshima T**, et al. Relation of MT1-MMP gene expression to outcomes in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 102: 2010.
15. Sato T, **Oshima T**, et al. Overexpression of the fibroblast growth factor receptor-1 gene correlates with liver metastasis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 21: 211–6, 2009.
16. **Oshima T**, Neamati N, et al. Combination effects of SC144 and cytotoxic anticancer agents. *Anti-Cancer Drugs* 20: 312–20, 2009.

[目次に戻る](#)

17. Plasencia C, Grande F, **Oshima T**, Neamati N et al. Discovery of a novel quinoxalinhydrazide with a broad-spectrum anticancer activity. *Cancer Biol Ther* 8: 458-65, 2009.
18. **Oshima T**, Akaike M, et al. Over-expression of EphA4 gene and reduced expression of EphB2 gene correlates with liver metastasis in colorectal cancer. *International Journal of Oncology* 33: 573-577, 2008.
19. **Oshima T**, Akaike M, et al. Clinicopathological significance of the gene expression of matrix metalloproteinase-7, insulin-like growth factor-1, insulin-like growth factor-2, and insulin-like growth factor-1 receptor in patients with colorectal cancer: insulin-like growth factor-1 receptor gene expression is a useful predictor of liver metastasis from colorectal cancer. *Oncology Reports* 20: 359-364, 2008.
20. **Oshima T**, Kunisaki C, et al. Clinicopathological significance of the gene expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) in patients with colorectal cancer : MMP-2 gene expression is a useful predictor of liver metastasis from colorectal cancer. *Oncology Reports* 19: 1285-1291, 2008.
21. **Oshima T**, Kunisaki C, et al. Reduced expression of claudin-7 gene correlates with venousinvasion and liver metastasis in colorectal cancer. *Oncology Reports* 19: 953-959, 2008.

学会発表

- 46th ASCO, Expression of circadian genes correlate with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer. (2010年6月)
- JDDW2011 パネルディスカッション cDNAバンクを用いた消化器癌の転移および予後予測因子の検索. (2011年10月)
- 第84回日本胃癌学会 シンポジウム 胃癌化学療法への個別化に向けたbiomarker開発 (2012年2月),
- 第113回日本外科学会 シンポジウム 消化器癌のbiomarker検索と個別化治療への試み (2012年4月),
- 103rd AACR, Clinical specimen-based investigatory study of biomarkers for gastric cancer. (2012年4月),
- 48th ASCO, Investigatory study of biomarkers for gastric cancer based on a cDNA bank. (2012年6月),
- 第67回日本消化器外科学会 ワークショップ cDNAバンクを用いた胃癌のバイオマーカー検索. (2012年7月)
- 第9回日本消化管学会 シンポジウム 臨床検体を用いた消化管悪性腫瘍のbiomarker検索と個別化治療の展開 (2013年1月),
- 第85回日本胃癌学会 シンポジウム StageII/III胃癌のbiomarker検索と個別化治療への展開 (2013年2月),
- 第99回日本消化器病学会 シンポジウム StageII/III胃癌における新規biomarker検索 (2013年3月),
- 49th ASCO, Biomarkers of Stage II/III Gastric Cancer and Development of Individualized Therapy. (2013年6月)

< 推進研究助成 >

ヘッジホッグ・シグナル伝達系の精緻な制御機構と生理的意義の解明

廣瀬智威

横浜市立大学医学部分子生物学

I. 研究結果の抄録

ヘッジホッグ・シグナル伝達系は、正常発生における各種幹細胞の自己複製や細胞の運命決定において中心的な役割を果たす分子機構である。更に、特定の腫瘍発生や「がん幹細胞」の自己複製においても重要な役割を担う。これまでの解析から、ヘッジホッグ・シグナル伝達系の構成分子とそれらの機能が明らかにされているが、その精緻な活性調節機構には未解明の点が多い。

これまでに申請者は、終脳特異的 PAR3 欠損マウスの解析を進め、マウス神経幹細胞の自己複製制御におけるヘッジホッグ・シグナル伝達系の精緻な活性調節に PAR3 が関与する新たな可能性を見出していた。今回平成 25 年度推進研究の遂行により、ヘッジホッグ・シグナル伝達系の活性化に必要な **Smo のシリアへの局在を PAR3 が抑制的に制御する可能性**を得た。これは**終脳特異的 PAR3 欠損マウスでの結果を支持する新しい分子機構**である。更に、出産直前の終脳特異的 PAR3 欠損マウス胚を組織学的に解析し、**大脳組織本来の秩序立った層構造構築には PAR3 が必要**であることも確認した。

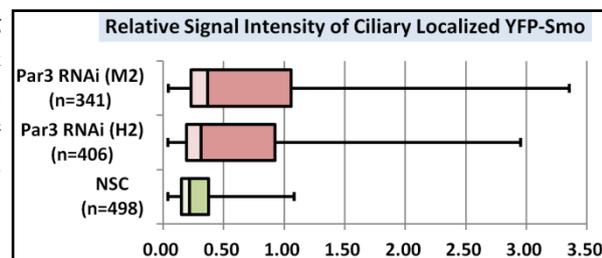
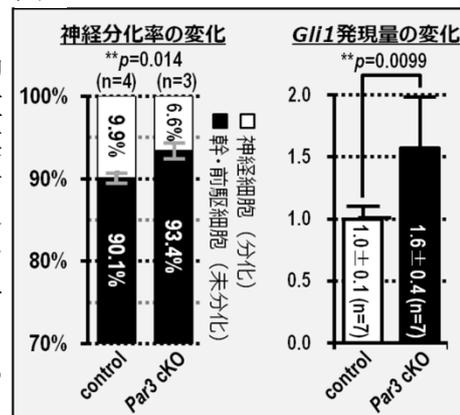
以上の結果を統合して因果関係を確認するため、PAR3 がヘッジホッグ・シグナル伝達系の精緻な活性調節を行うことにより、正常なマウス神経幹細胞の増殖・分化制御が行われている、という可能性の検証実験を遂行中である。

II. 本文

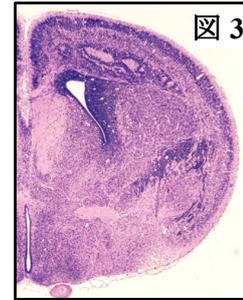
(1) 研究課題について現在までに行ってきた研究内容

昨年度の申請時まで申請者は終脳特異的 PAR3 欠損マウスの解析を進め、神経幹細胞の増殖亢進・分化低下を見出し(図 1、左)、この表現型を裏付ける分子機構の一つとして、ヘッジホッグ・シグナル伝達系の異常活性化が関与する可能性を見出していた(図 1、右)。更に、終脳特異的 PAR3 欠損マウスからの初代培養神経幹細胞を用いてこの表現型を再現することに成功し、この表現型がヘッジホッグ・シグナル伝達系の活性化因子である Smo に対する阻害剤で抑制されることも確認していた(未発表)。一方、PAR3 とヘッジホッグ・シグナル伝達系とを結びつける具体的な分子機構は不明であった。また、終脳特異的 PAR3 欠損マウスで観察される表現型とヘッジホッグ・シグナル伝達系の異常活性化との因果関係も不明であった。

図 1



ヘッジホッグ・シグナル伝達系の活性化において、**図 2** Smo がシリアに濃縮することが必須であるが、計画推進により樹立した YFP-Smo 安定発現細胞株では *Par3* RNAi によって YFP-Smo のシリア濃縮が促進されるという結果を得た (**図 2**、未発表)。これは、**本来 PAR3 がシリアにおける Smo の活性化に対して抑制的に働いていることを示唆**しており、**終脳特異的 PAR3 欠損マウスでの結果を支持する新しい分子機構**である。



Smo のシリア局在を抑制的に制御する分子として *Ptch1* が知られている。*Ptch1* はヘッジホッグ・シグナル伝達系の起点である液性因子 *Shh* の受容体であり、*Shh* の結合によって *Ptch1* が抑制されることにより、Smo 以降の活性化シグナル伝達が進行する。また、*Ptch1* はヘッジホッグ・シグナルが OFF の間はシリアに局在することも知られている。これまでに申請者が得ている PAR3 による Smo のシリア局在制御が *Ptch1* の局在制御を介している可能性を検討するため、*Ptch1*-YFP 安定発現細胞株を樹立した。現在 *Par3* RNAi によって *Ptch1*-YFP の局在制御に変化があるかを検討中である。

これまで発生初期の終脳特異的 PAR3 欠損マウスで観察していた神経幹細胞の増幅異常・分化異常が脳組織構築にどのように影響するのか、胎生 18.5 日のサンプルでも検討した (**図 3**)。脳組織本来の層構造は大きく乱れ、異所性に神経細胞の集団がロゼット様構造を呈することが観察された。この結果は、**PAR3 が正常な脳組織構築に必要**であることを示している。

終脳特異的 PAR3 欠損マウスで観察された神経幹細胞の増殖亢進・分化低下と、ヘッジホッグ・シグナル伝達系の異常活性化の因果関係を調べるため、神経幹細胞の培養系であるニューロスフィア培養を行った。マウス胚の終脳から得られる個々のニューロスフィアのサイズは、神経幹細胞の自己複製能力を反映するものである。また、ニューロスフィアから分化培養を行い、神経細胞を産生させることもできる。現在、終脳特異的 PAR3 欠損マウスからニューロスフィア培養を行い、*in vivo* で観察された神経幹細胞の増殖亢進・分化低下がニューロスフィアのサイズや分化能に反映されるかどうかを検討中である。同時に、Smo の阻害剤の有無によりその表現型が抑制されるのかも検討中である。これらの実験により、終脳特異的 PAR3 欠損マウスで観察される表現型とヘッジホッグ・シグナル伝達系の異常活性化との因果関係について明らかにできると期待される。

(2) 独創的な点など、研究の特色・成果

本研究計画の解析対象であるヘッジホッグ・シグナル伝達系は、各種幹細胞の自己複製制御機構であり、その活性制御における細胞内の基点は一次シリアであることが示されている (*Nat Rev Genet*, 11:331-344, 2010)。同様に、PAR-aPKC 複合体も進化的に保存された細胞運命制御機構であることが示唆されている (*Dev Cell*, 13:609-622, 2007) と同時に、一次シリアの成熟に PAR-aPKC 複合体が必要であることも報告されていた (*Curr Biol*, 14:1451-1461, 2004; *J Cell Biol*, 179:1133-1140, 2007)。これまではヘッジホッグ・シグナル伝達系と PAR-aPKC 複合体の関係については詳細な報告が殆ど無かった。しかし、上述の通り昨年度までの本研究計画の推進によって、**ヘッジホッグ・シグナル伝達系の主要活性化分子のシリアへの局在に対して PAR3 が抑制的な制御機能を担うことが示唆された**。PAR3 欠損マウスの表現型と併せると、この PAR3 の機能が神経幹細胞の自己複製と分化の正常なバランス制御に必要であると考えられる。

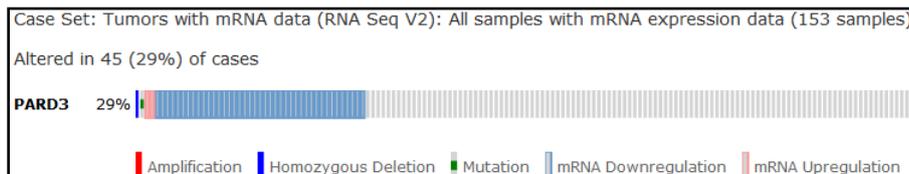
本研究計画で扱っている神経幹細胞と同様に、「がん幹細胞」におけるヘッジホッグ・シグナル伝達系の重要性を鑑みると、本研究計画の推進は**幹細胞生物学のみならず、がん生物学分野にも大きく貢献する可能性**が高い。

(3) 研究成果の臨床応用への展望

個体発生や組織の維持に必要な正常幹細胞の自己複製や運命決定における分子機構の解明は、腫瘍発生・「がん幹細胞」の分子機構解明につながっている (*Nat Rev Cancer*, 11:493-501, 2011)。本研究計画ではこのような分子機構のうち、ヘッジホッグ・シグナル伝達系と PAR-aPKC 複合体の機能的相互作用について解析することを通し、これまで以上に包括的な「がん幹細胞」の分子機構の理解に貢献できると考えられる。

一方、正常幹細胞の制御機構に基づく実際の抗がん剤開発では困難に直面することも多い。しかし、ヘッジホッグ・シグナル伝達系阻害薬を用いた第一相臨床試験では、基底細胞癌と髄芽腫における有効性と安全性が示されている (*Clin Cancer Res*, 17:2502-2511, 2011)。今後の臨床試験や、他の悪性腫瘍に対する有用性を絞り込んでいく上でも、ヘッジホッグ・シグナル伝達系の精緻な活性調節機構の解明は重要な課題である。本研究の推進は、この精緻な調節機構における PAR-aPKC 複合体の関与という新しい観点を与えることとなり、ヘッジホッグ・シグナル伝達系が中心的な役割を果たす悪性腫瘍に対するバイオマーカー同定・診断法開発・治療法開発への発展性が期待できる。

最近各種の癌における遺伝子発現プロファイルのデータベースが充実しつつある。終脳特異的 PAR3 欠損マウスは脳腫瘍様の異常な組織構造を呈することから、今回 PAR3 の遺伝子発現変化を伴う癌の候補を検索したところ、最も悪性度の高い脳腫瘍である多形神経膠芽腫 (*glioblastoma multiforme*) のデータセット 153 検体中の 45 検体において PAR3 遺伝子の変異や発現異常が認められた (下図)。その殆どが PAR3 遺伝子の発現低下であることから、未解明の点が多い 多形神経膠芽腫の発生に PAR3 の機能低下が関係するという新しい可能性が示唆された。この因果関係を追及する上で、終脳特異的 PAR3 欠損マウスを用いた分子レベルの解析は更なる示唆を与えることが期待できる。



cBioPortal for Cancer Genomics (<http://www.cbioportal.org/public-portal/>)

(4) 他研究者・機関との連携状況

現在、以下の研究者との連携により研究を推進している。

- 小野悠介博士 (永崎大学原爆後障害医療研究所)
骨格筋幹細胞における細胞極性制御因子の機能解析
- Dr. Sandra Iden (ケルン大学 CECAD)
皮膚特異的 PAR3 欠損マウスにおける皮膚がんモデルの解析
- 中山雅敬博士 (マックスプランク分子生物学研究所)
血管内皮特異的 PAR3 欠損マウスを用いた血管新生制御機構の解析
- 秋本和憲博士 (東京理科大学 薬学部)
乳腺特異的 aPKC λ 欠損マウスを用いた乳腺幹細胞制御機構の解析
- 西村栄美教授 (東京医科歯科大学 幹細胞医学)
皮膚特異的 aPKC λ 欠損マウスを用いた皮膚幹細胞運命決定における幹細胞ニッチの分子基盤解析
- 長田真一博士 (日本医科大学 皮膚科学)
皮膚特異的 aPKC λ 欠損マウスを用いた皮膚幹細胞維持機構の解析

(5) 研究の目的、方法等、今後行う研究内容の概略

これまでの結果から、マウス終脳における PAR3 の欠損は、1) 神経幹細胞の増幅異常・分化異常を起こすと同時に、2) ヘッジホッグ・シグナル伝達系の異常活性化も引き起こすことを明らかにした。今後は、2)が 1)の原因の一つとなっているかどうか、これらの因果関係を追及する必要がある。現在進行中の神経幹細胞をクローナルに増幅できるニューロスフェア培養法を用い、引き続き終脳特異的 PAR3 欠損マウス及びコントロールマウスに由来する**神経幹細胞の自己複製能を定量的に解析・比較**する。更に、この培養系に Smo に対する阻害剤を添加することにより、**自己複製能がどの程度ヘッジホッグ・シグナル伝達系に依存したものであるのかを評価**する。もし上記の因果関係が存在するならば、PAR3 欠損神経幹細胞はコントロールの細胞より高い自己複製能を示すが、それは一定量の Smo 阻害剤でキャンセルされるはずである。更に、ニューロスフェア培養から分化培養へスイッチする実験系も確立したので、PAR3 欠損神経幹細胞と Smo 阻害剤も組み合わせながら**神経幹細胞の分化能についても定量的に解析・比較**する。

PAR3 によるヘッジホッグ・シグナル伝達系の制御点は、シリアへの Smo の局在制御にあることを示唆する結果を得ている(図 2)。Smo の局在制御にはヘッジホッグ受容体の Ptch1 が重要であることが報告されているので、**PAR3 による Smo の局在制御は Ptch1 を介するものである可能性を検討**する。新たに樹立した Ptch1-YFP 安定発現細胞株と *Par3* RNAi と組み合わせ、引き続きこの可能性を検討する。

(6) 業績

発表年	著者・学会発表者名、論文題名、雑誌名/学会名、論文記載の巻、ページ、発刊・発表年
2014	<p>発表論文</p> <ul style="list-style-type: none"> Satoh D, Hirose T, Harita Y, Daimon C, Harada T, Kurihara H, Yamashita A, Ohno S. aPKCλ maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface. <i>J Biochem.</i> 2014 Aug; 156(2):115-128.
2013	<p>発表論文</p> <ul style="list-style-type: none"> Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Akimoto K, Hirose T, Ohno S, Hattori N, Nukina N. Loss of aPKCλ in differentiated neurons disrupts the polarity complex but does not induce obvious neuronal loss or disorientation in mouse brains. <i>PLoS One.</i> 2013 Dec 31;8(12):e84036. Nakayama M, Nakayama A, van Lessen M, Yamamoto H, Hoffmann S, Drexler HC, Itoh N, Hirose T, Breier G, Vestweber D, Cooper JA, Ohno S, Kaibuchi K, Adams RH. Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. <i>Nat Cell Biol.</i> 2013 Mar;15(3):249-60.
2012	<p>発表論文</p> <ul style="list-style-type: none"> Iden S, van Riel, WE, Schäfer R, Song JY, Hirose T, Ohno S, Collard JG. Tumor type-dependent function of the par3 polarity protein in skin tumorigenesis. <i>Cancer Cell.</i> 2012 Sep 11;22(3):389-403. 廣瀬智威 糸球体ろ過膜の維持機構異常から考える糸球体疾患の分子病態 横浜医学、横浜市立大学医学会、2012 Jan; 63(1):53-60 <p>一般発表 (ポスター発表)</p> <ul style="list-style-type: none"> Hirose T, Sugitani Y, Kusaka C, Noda T and Ohno S.

PAR3 Is Required For Restricting Symmetric Proliferative Divisions In Mouse Neural Precursor Cells

新学術領域研究「**神経細胞の多様性と大脳新皮質の構築**」第1回国際シンポジウム、
2012年3月12日

2011 一般発表(口頭発表)

- **廣瀬智威**、杉谷善信、日下智保、野田哲生、大野茂男

PAR3 is required for restricting symmetric proliferative divisions in mouse neural precursor cells.

第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日

- **廣瀬智威**

横浜市立大学医学研究奨励賞 (2010年度)

細胞極性制御因子による糸球体濾過膜の維持機構と糸球体疾患の関連解明

2010 発表論文

- Cong W*, **Hirose T***, Harita Y, Yamashita A, Mizuno K, Hirano H, Ohno S. (*同等貢献)

ASPP2 Regulates Epithelial Cell Polarity through the PAR Complex.

Curr Biol. 2010 Aug 10;20(15):1408-1414.

2009 発表論文

- **Hirose T**, Satoh D, Kurihara H, Kusaka C, Hirose H, Akimoto K, Matsusaka T, Ichikawa I, Noda T, Ohno S.

An essential role of the universal polarity protein, aPKCλ, on the maintenance of podocyte slit diaphragms.

PLoS ONE. 2009;4(1):e4194.

招待講演

- **廣瀬智威**

「腎糸球体ポドサイトのスリット膜維持における新しい分子機構」

お茶の水がん学アカデミア、2009年2月23日

<推進研究助成>**脂肪酸持続投与による新たな大腸発癌促進の分子メカニズムの解明**

遠藤宏樹

横浜市立大学附属病院 内視鏡センター

分担協力者の分担した分野及び役割

氏名	所属機関	分担した分野及び役割
日暮 琢磨	横浜市立大学内視鏡センター	マウス管理、発癌実験、マウス管理、分子機序解析
内山 詩織	横浜市立大学内視鏡センター	経内頸静脈的飽和脂肪酸持続投与、発癌実験、分子機序解析、病理学的解析
中島 淳	横浜市立大学肝胆膵消化器病学	分子機序解析

研究結果の抄録

大腸癌は近年世界的に増加し、リスクや予防についての研究が急務である。肥満・メタボリックシンドロームが悪性腫瘍のリスクとなるという報告が多くあり、大腸癌への関与はほぼ確実とされている(WHO;2003)が、肥満因子がどのような機序で大腸発癌を促進するのか未だははっきりしていないのが現状である。今回の研究では、肥満因子である飽和脂肪酸が Toll-like receptor (TLR) 4 を介した経路で JNK を活性化し、大腸細胞増殖を亢進していると仮定し、マウスへの経内頸静脈的脂肪酸持続投与という手法を使用し実証を試みた。右経静脈からカテーテルを挿入し、脂肪酸(パルミチン酸)の投与量、投与時間を変更し投与した。BudU labeling index を用いた大腸上皮細胞増殖評価、分子機序解析は大腸上皮蛋白を用いた Western blot 法、免疫染色を行った。600mM・0.2 μl/min で 24 時間、48 時間、72 時間投与、600mM・0.4 μl/min で 24 時間投与し検討を行った。24 時間、72 時間投与で p-JNK の上昇を認めたが、データのばらつきが大きく、有意差のあるデータは得られなかった。経静脈投与では n 数が確保できずデータのばらつきがあるため、n 数を増やすことのできる方法を模索し、Hua Shen らが確立した腹腔内投与にて 1 種類の血中脂肪酸濃度を上昇させる方法に注目した (Hua Shen et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013) マウスに脂肪酸を腹腔内投与し、蛍光 BrdU 染色、RNA、p-JNK を検討した。1 日 1 回、5 日間連続投与を行い、脂肪酸投与群で有意に cMyc、CyclinD1 が上昇しており、細胞増殖を引き起こしている可能性が示唆された。今後は腹腔内投与で、投与量、濃度を変更し細胞増殖が最大となる条件を検討し、その後 TLR4 KO マウス、JNK KO を使用し検討することで、分子機序についても解明を目指す。

【目的】大腸癌は近年わが国をはじめ欧米で急激に増加してきており、その対策は急務である。大腸癌の発生に関して、運動不足や欧米食摂取に伴う肥満・メタボリックシンドロームが大腸癌のリスクを押し上げるとする疫学・動物研究が数多く報告される一方で、これら肥満因子がどの

ような機序で大腸発癌を促進するのか未だはっきりしていないのが現状である (Endo et al. Gut. 2009;58:1169-70)。高脂肪食摂取が大腸発癌を有意に促進することが証明されているにもかかわらず、WHO 報告 (2003 年) で大腸癌との関連性「可能性あり」とされる飽和脂肪酸の大腸上皮への作用・分子機序を *in vivo* でアプローチした研究はこれまでない。今回の研究では JNK 活性化因子である飽和脂肪酸が Toll-like receptor (TLR) 4 を介した経路で JNK を活性化し、大腸細胞増殖を亢進しているとする仮説をマウスへの経内頸静脈的脂肪酸持続投与という全く新しい手法によって実証することを目的とした。脂肪酸の大腸発癌における役割解明は欧米食・肥満などの生活習慣を背景として増加している発癌促進機序を解明するもので、得られた結果のインパクトは極めて高い。また本研究アプローチはこれまでの遺伝子異常解析とは異なる極めて独創的なアプローチであり、未来の医療として我々が目指す大腸癌の化学予防の標的分子の同定、化学予防薬の創薬につながるものである。また大腸癌高リスク群の二次予防戦略へとつながる研究である。

【方法】 *In vivo* における脂肪酸に関する研究では乳化させた中性脂肪を投与する方法が行われてきたが、これは種々の遊離脂肪酸が血中で上昇し、さらには体内から誘導されたリポプロテインなどの交絡因子が重なり、現象に対する原因の特定が困難であった。しかし、乳化させたエチル化脂肪酸を経内頸静脈的に投与することで、血中ですばやく水酸化されて、1 種類の血中遊離脂肪酸を上昇させる江口らが確立した方法 (Eguchi et al. Cell Metab. 2012;15:518-33) を使用した。C57B6J マウスオスの右経静脈からカテーテルを挿入し、脂肪酸 (パルミチン酸) の投与量、投与時間を変更し投与した。BudU labeling index を用いた大腸上皮細胞増殖評価法で検討を行い、分子機序解析は大腸上皮蛋白を用いた Western blot 法、免疫染色を行った。

【研究内容・結果】

経静脈投与モデル

大腸上皮の増殖を BrdU で、またウエスタンブロッティングで JNK、p-JNK を検討した。まず、脂肪酸濃度を 600mM、速度を 0.2 μ l/min に固定し、投与時間を 24 時間(Figure1)、48 時間、72 時間(Figure2)で検討した。p-JNK は 24 時間、72 時間投与で上昇していたが、データのばらつきも大きく有意差は認められなかった。大腸上皮増殖についても BrdU 染色では明らかにならなかった。そのため、600mM で速度を 0.4 μ l/min に上げ、総投与量を増加し検討した(Figure3)。しかし、投与量を 2 倍にしてもあまりはっきりとした結果は得られなかった。

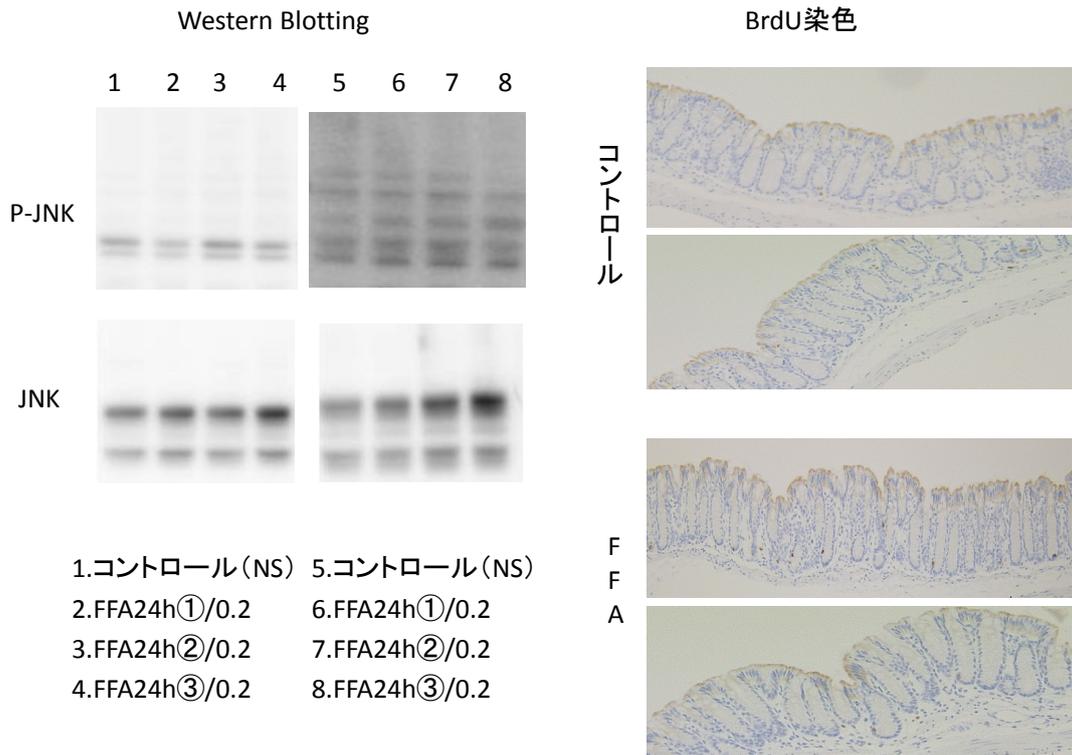
経静脈投与には 1 匹につき 1 ゲージ必要であり、n 数が確保できないということがあった。1 種類の血中遊離脂肪酸を上昇させることが可能な、n 数も確保できる他の方法を模索していたところ、Hua Shen らが確立した腹腔内投与で 1 種類の血中脂肪酸濃度を上昇させる方法に注目した (Hua Shen et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013)

腹腔内投与モデル

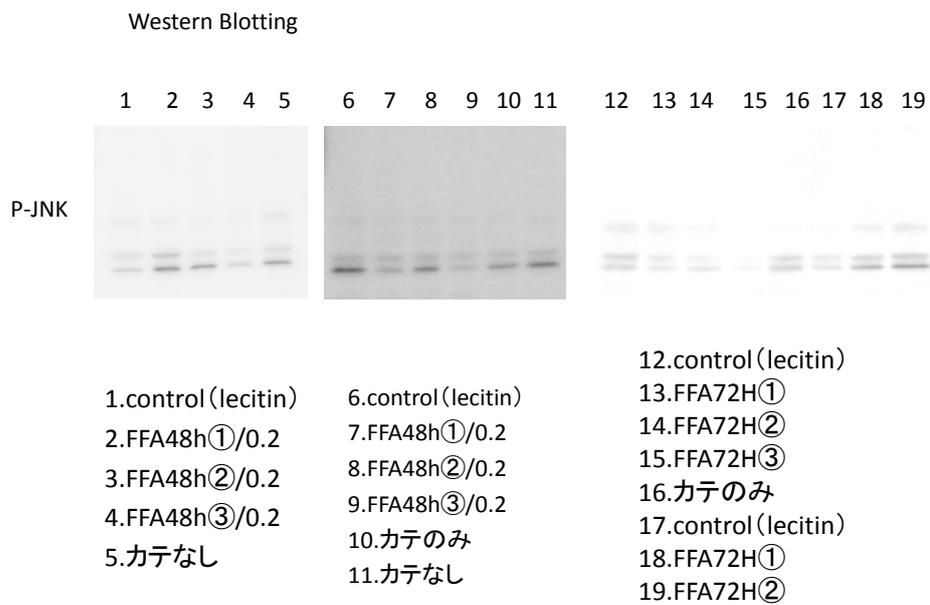
1 日 1 回、150mM のパルミチン 0.02ml/g を腹腔内投与した。5 日間連続投与を行い、脂肪酸投与群で有意に cMyc、CyclinD1 が上昇しており、細胞増殖を引き起こしている可能性が示唆された。

今後は経静脈持続投与から腹腔内投与に変更し、投与量、濃度を変更し細胞増殖が最大となる条件を検討し、その後 TLR4 KO マウス、JNK KO を使用し検討することで、分子機序についても解明を目指す。

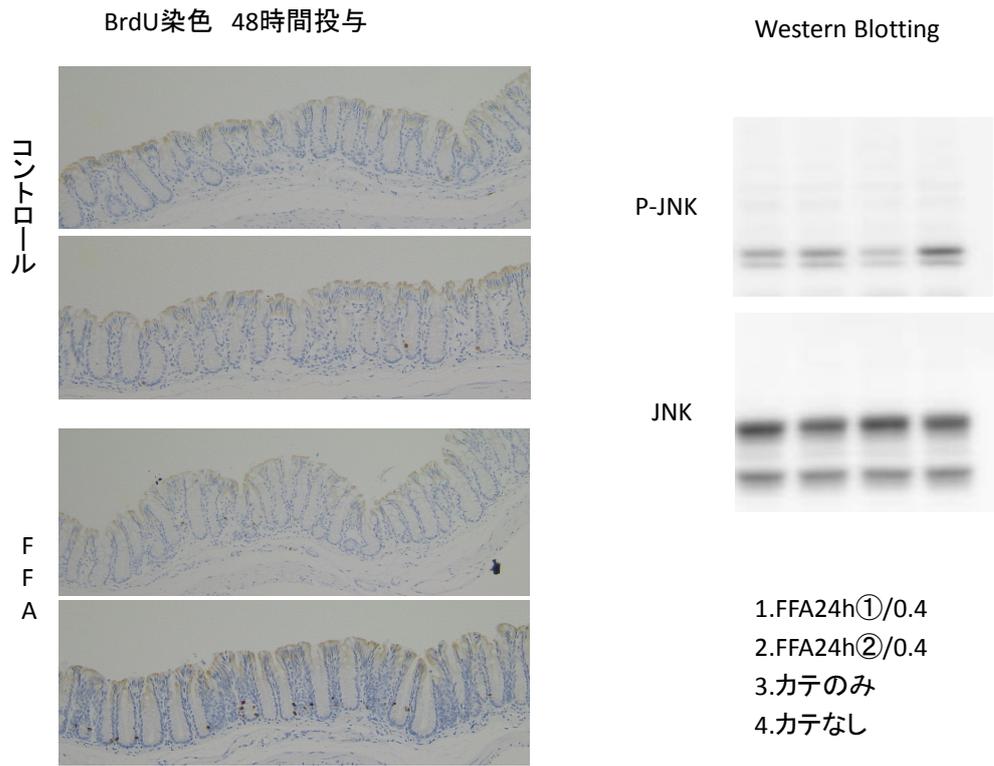
【Figure1】



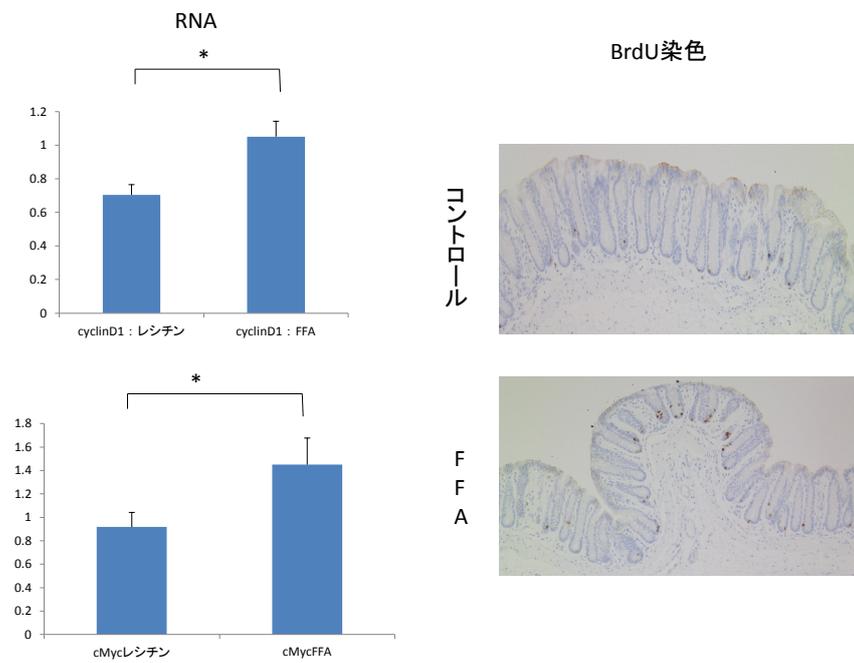
【Figure2】



【Figure3】



【Figure4】



【業績】

研究代表者：遠藤宏樹

1. **Endo H**, Hosono K, Uchiyama T, Sakai E, Sugiyama M, Takahashi H, Nakajima N, Wada K, Takeda K, Nakagama H, Nakajima A. Leptin acts as a growth factor for colorectal tumours at stages subsequent to tumour initiation in murine colon carcinogenesis. *Gut* 2011;60:1363-71.
2. **Endo H**, Fujisawa T, Takahashi H, Inamori M, Nakajima A. Author reply. *Gut* 2009;58:1169-70
3. **Endo H**, Hosono K, Fujisawa T, Takahashi H, Sugiyama M, Yoneda K, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Wada K, Nakagama H, Nakajima A. Involvement of JNK pathway in the promotion of the early stage of colorectal carcinogenesis under high-fat dietary condition. *Gut* 2009;58:1637-43.
4. **遠藤宏樹**、細野邦広、酒井英嗣、内山崇、高橋宏和、中島淳。【メタボリックシンドロームと大腸癌】アディポサイトカインと大腸癌。臨床消化器内科 2011;26:175-181.
5. Hosono K, **Endo H**, Takahashi H, Sugiyama M, Sakai E, Uchiyama T, Suzuki K, Iida H, Sakamoto Y, Yoneda K, Koide T, Tokoro C, Abe Y, Inamori M, Nakagama H, Nakajima A. Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2010;3:1077-83.
6. Hosono K, **Endo H**, Takahashi H, Sugiyama M, Uchiyama T, Suzuki K, Nozaki Y, Yoneda K, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Tomatsu A, Chihara T, Shimpo K, Nakagama H, Nakajima A. Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP-activated protein kinase. *Mol Carcinog*. 2010;49:662-71
7. Sugiyama M, Takahashi H, Hosono K, **Endo H**, Kato S, Yoneda K, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Wada K, Nakagama H, Nakajima A. Adiponectin inhibits colorectal cancer cell growth through the AMPK/mTOR pathway. *Int J Oncol* 2009;34:339-44
8. Takahashi H, Takayama T, Yoneda K, **Endo H**, Iida H, Sugiyama M, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Abe Y, Saito S, Wada K, Nakagama H, Nakajima A. Association of visceral fat accumulation and plasma adiponectin with rectal dysplastic aberrant crypt foci in a clinical population. *Cancer Sci* 2009;100:29-32
9. **遠藤宏樹**、細野邦広、高橋宏和、中島淳。【大腸癌の予防】高脂肪食制限による大腸発癌抑制の分子機序。消化器科 2009;49:438-443.
10. Fujisawa T, **Endo H**, Tomimoto A, Sugiyama M, Takahashi H, Saito S, Inamori M, Nakajima N, Watanabe M, Kubota N, Yamauchi T, Kadowaki T, Wada K, Nakajima A. Adiponectin suppresses colorectal carcinogenesis under the high-fat diet condition. *Gut* 2008;57:1531-8

研究分担者：日暮琢磨

1. Takahashi H, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, **Higurashi T**, Uchiyama T, Hosono K, Endo H, Nakajima A. Relationship of human rectal aberrant crypt foci and formation of colorectal polyp: One-year following up after polypectomy. *World J Gastrointest Endosc*. 2012 Dec 16;4(12):561-4.
2. **Higurashi T**, Hosono K, Endo H, Takahashi H, Iida H, Uchiyama T, Ezuka A, Uchiyama S, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Maeda S, Morita S, Natsumeda Y, Nagase H, Nakajima A. Eicosapentaenoic acid (EPA) efficacy for colorectal aberrant crypt foci (ACF): a double-blind randomized controlled trial. *BMC Cancer*. 2012 Sep 19;12(1):413.
3. **Higurashi T**, Takahashi H, Endo H, Hosono K, Yamada E, Ohkubo H, Sakai E, Uchiyama T, Hata Y, Fujisawa N, Uchiyama S, Ezuka A, Nagase H, Kessoku T, Matsuhashi N, Nakayama S, Inayama Y, Morita S, Nakajima A. Metformin efficacy and safety for colorectal polyps: a double-blind randomized controlled trial. *BMC Cancer*. 2012 Mar 26;12(1):118.[Epub ahead of
4. 中島淳、**日暮琢磨**、細野邦広、遠藤宏樹、高橋宏和。【大腸腫瘍性病変

- の診断】肥満と大腸癌（解説/特集）. 消化管の臨床 2012;17:3-15.
5. 遠藤宏樹、細野邦広、酒井英嗣、内山崇、**日暮琢磨**、高橋宏和、中島淳.
【消化器癌をめぐる栄養療法】食事摂取により増大する大腸癌：レプチンシグナルの関与. 消化器内科 2011;52:582-590.
 6. **日暮琢磨**、遠藤宏樹、中島淳：大腸腫瘍を増大させるレプチンシグナル：動物モデルを用いた検討. 第98回日本消化器病学会総会 シンポジウム9 (疾患モデル動物を用いた消化器病研究の最前線), 東京, 2012, 4.
 7. **日暮琢磨**、遠藤宏樹、酒井英嗣、大久保秀則、山田英司、高橋宏和、中島淳：大腸腫瘍を増大させるレプチンシグナル：Cre/flox動物モデルを用いた検討. 第71回日本癌学会学術総会 ポスターセッション (化学物質とがん予防), 札幌, 2012, 9.
 8. 高橋宏和、藤井徹朗、山田英司、大久保秀則、**日暮琢磨**、酒井英嗣、内山崇、細野邦広、遠藤宏樹、中島淳：大腸線種発症に寄与する肥満指標の検討. 第1回肥満と消化器疾患研究会 (日本消化器病学会 附置研究会) 一般演題 (3), 東京, 2011, 5.

< 推進研究助成 >

精巣幹細胞をモデルとした、エピジェネティクス制御機構による 成体型幹細胞増幅メカニズムの解析

大保和之

横浜市立大学医学部 組織学

I 研究結果の抄録

成体型幹細胞の自己複製機構を、エピジェネティクス、すなわちゲノム修飾の視点から解析し、その結果から幹細胞を増幅するシステムが構築できないか本提案で研究を行っている。申請者は、精巣の幹細胞が未分化性を失い分化する分水嶺に、DNA のメチル化と一部の抑制性ヒストン修飾が必要不可欠であることを見出し発表した (Development, 2013)。この分水嶺において、DNA メチル化酵素の発現、H3K9 メチル化修飾が大きく変わることから、昨年度は、DNA メチル化、H3K9me2 の修飾について、全ゲノムレベルで、かつ、個々の塩基のレベルで、どのような変化があるのか解析を開始した。これらの解析には、純度の高い材料となる細胞が必要である。そこで、精巣幹細胞、前駆細胞を含む精原細胞が GFP でラベルされる遺伝子改変マウスを用い、分水嶺で発現が変わる細胞表面蛋白 c-Kit に対する抗体を用いて、分水嶺の前後で、セルソーターを用い、約数ヶ月かけてマウス個体より、高純度に材料となる細胞を分取した。DNA メチル化は、Bisulfite 反応によるメチル解析法を用い、次世代シーケンサーを用いて全ゲノムレベル、かつ、1 塩基対レベルでの解析を終了した。検索したポイントは、生後直ぐの幹細胞活性がない前精原細胞と、幹細胞活性が出現する生後 1 週目の精原細胞および成体の精原細胞について、それぞれ分水嶺の前後（幹細胞活性がある分画と、喪失後の分画）の計 5 点である。現在、マッピングなど終了したところで今後詳細な結果の解析を行う。H3K9me2 の修飾については、クロマチン免疫沈降の実験を行い、次世代シーケンサーで解析するためのライブラリー作成を終了させた。現在、サンプルを共同研究先の基礎生物学研究所に送り解析待ちの段階である。また、Dnmt1、/Dnmt3a、/Dnmt3b のトリプルノックアウトマウスや G9a ノックアウトマウスは、現在、作成中、または、解析中である。

II 研究課題について現在までに行って来た研究内容

申請者は、成体型幹細胞の自己複製機構を、エピジェネティクス、すなわちゲノム修飾の視点から解析を行っている。具体的には、ゲノム修飾を指標に幹細胞を同定し、その結果を応用し、幹細胞を増幅するシステムの構築に繋がりたいと考えている。申請者は、これまでに、ゲノム修飾の視点から精巣で体細胞分裂をしている精原細胞を観察すると、幹細胞であると言われている最初の 1 個の細胞から 3、4 回分裂したところに、DNA のメ

チル化酵素の発現と一部の抑制性ヒストンの修飾が同時に大きく変化する“分水嶺”があることを見いだした (Development 2013)。ゲノムメチル化維持に必須と言われている分子 Np95 の欠損マウスを作成したところ、綺麗にこの分水嶺のところで細胞分化が障害され、それ以降の分化細胞は見られなくなったことから、この分化ステップには、DNA メチル化を中心とする分子機構が必須であることが分った (Development 2013)。さらに Np95 ノックアウトマウスでは、精巣の幹細胞分画が精細管の中で明らかに増殖している領域があり、DNA メチル化の抑制が幹細胞増殖と何らかの関連があることが示唆された。このことから、これらゲノム修飾が幹細胞からの分化調節機構に密接に関わっている事がわかる。また、この分水嶺は、以前から観察されていた、以下に列挙する様々な変化が起こる生物学的に興味深い分化段階に一致する。

- 1) c-Kit 陰性細胞が陽性細胞へと変化し、遺伝子発現パターンが大きく変化するところと同じポイントである。
- 2) c-Kit 陰性細胞と陽性細胞は、核が形態学的に異なり、それ故、それぞれ Aal 細胞、A1 細胞と異なる呼び名で呼ばれている。
- 3) 生理的活性の知見として、c-Kit 陽性化とともに幹細胞活性が完全に喪失する。
- 4) 精巣細胞分化に必須なレチノイン酸の作用点でもある
- 5) この分化ステップは以前から細胞分裂を伴わないことが知られていた。

特に我々の大きな質問の一つは、精原細胞は、このポイントで、どのようにして上記の 1)から 3)にあるような形質を、細胞分裂なしに大きく変えられるのか？ということにあり、この分水嶺におけるゲノム修飾の大きな変化こそが、細胞の性質を変える原因ではないか、と考えている。分水嶺は、8個から16個の繋がった精子形成細胞、即ち、最初の1個から3から4回分裂したところにあり、我々はこの分水嶺が、幹細胞と前駆細胞を分けるポイントであると推測している。これは、これまで半世紀言われてきた、最初の1個のみが幹細胞であるという“As 説”とは異なる場所であるため、申請者は現在、幹細胞はプールで存在するという“幹細胞プール説”を提唱している。

III 独創的な点など、研究の特色・成果

胎児型多能性幹細胞に近似する、iPS 細胞を用いての組織再生が主流となった最大かつ唯一の理由は、患者さん自身の体の成体型組織幹細胞の増幅が、体外では困難であるからである。もし、成体型組織幹細胞を、必要とする細胞数だけ容易に増幅できれば、それが最も自然な方法である。現在のところ、iPS 細胞から分化誘導法が確立している細胞の種類が限られていることを考慮すると、将来的には、組織再生は、これら胎児型、成体型の幹細胞を、それぞれの利点を生かし、補完する関係を保ちながら利用することになると思われる。申請者は、成体型の幹細胞システムにおいて、生理的な定常状態の幹細胞と、幹細胞活性を失った前駆細胞で何が本質的に異なるのか、エピジェネティクスの視点から比較研究しており、これらの解析は、将来、成体型組織幹細胞の増幅、分化制御に重要な情報をもたらすと考えている。それは、細胞が分化する際、一つの遺伝子の変化だけでは

不十分で、意味のある多くの遺伝子が同時多発的に変化することが必要であり、このような高次の遺伝子発現調節機構を行うのが、将にエピジェネティクスによる遺伝子発現制御機構であるからである。さらに精巣の細胞は、減数分裂が始まるまでは普通の体細胞分裂過程にあり、心臓や肝臓の細胞と何ら変わらない。これに加え、成体幹細胞研究のモデルとしては、

- (1) 分裂しても細胞同士が繋がっており、繋がっている細胞の数を数えれば、最初の1個から何回分裂したのか、分裂の履歴を容易に知ることができる。
- (2) 組織切片において未分化から精子に至るまで全ての分化段階の細胞を一望できる。
- (3) 移植法が確立しており、精原細胞を移植して幹細胞活性検定が可能である。
- (4) 他の成体型組織幹細胞に比べ、精巣幹細胞、前駆細胞は細胞数が比較的多く回収可能であり、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムレベルでのエピジェネティクス研究が可能である。

といった多くの利点があり、このような特徴を生かして研究を行っている。

IV 研究成果の臨床応用への展望

昨今、低分子化合物のスクリーニング研究の成果により、幾つものゲノム修飾酵素を制御可能な低分子化合物が開発され、*in vitro* や *in vivo* で用いられるようになっている。本研究で、組織幹細胞の、エピジェネティクスの視点から見た増殖、分化制御機構が明らかとなれば、これら低分子化合物を用いてゲノム修飾酵素を制御し、体外で幹細胞を培養・増殖させることが可能となるであろう。成体型組織幹細胞の増幅が体外で可能となれば、例えば、造血幹細胞、筋肉のサテライト細胞などに代表されるような成体の組織幹細胞を維持、増幅、遺伝子操作することが可能となる。これにより、例えば原因の明らかな疾患の場合は、幹細胞レベルでの原因遺伝子の修復が可能となるかも知れない。また、補給を目的とする（化学療法後の骨髄移植や、経時的に組織構築細胞が変性脱落する疾患での補充など）場合は、より少ない細胞を健常ドナーから採取し、体外で増幅、治療に用いる事ができるようになる。また、保存も容易になり、組織幹細胞の細胞バンク化も可能となる。

V 他研究者・機関との連携状況

次世代シーケンサーを用いたメチル組解析やクロマチン免疫沈降後のヒストン修飾部位の全ゲノムレベルでの解析について、本学医学部遺伝学講座の松本直通教授、九州大学生体防御研究所の佐々木裕之教授、基礎生物学研究所の重信秀治准教授とともにしている。

VI 研究の目的、方法等、今後行う研究内容の概略

申請者が発見した、体細胞分裂している精原細胞における、c-Kit 陰性細胞が陽性細胞へと分化する時期に相当する分水嶺において、ゲノム修飾の視点から何が起きているの

か徹底的に調べ、その結果が、幹細胞活性の喪失という事象とどのように結びつけられるのか考察したい。特に Np95 ノックアウトマウスでは、精巣の幹細胞分画が精細管の中で明らかに増殖している領域があり、DNA メチル化の抑制が幹細胞増殖と何らかの関連があることが示唆される。短期間の目標としては、DNA メチル化模様と、抑制性ゲノム修飾 H3K9me2/3 の修飾部位、これまでに得られている RNA sequencing による遺伝子発現パターンを重ね合わせ、変化が起こっている領域の変化が、幹細胞から前駆細胞へと移行する細胞形質の変化に關与する遺伝子群の発現の変化を説明できるか考察する。長期的には、今回の提案に加えて、DNA 脱メチル化、H3K27、H3K9、H3K4 などのヒストンの各種修飾、non-coding RNA の発現を調べ、これを全て重ね合わせることにより、変化している領域が、分水嶺における幹細胞活性に關わる遺伝子群の発現の変化にどのように關与しているのか、データを積み重ねて継続して調べていく予定である。

VII 業績

1. Glaser S., Lubitz S., Loveland KL., **Ohbo K.**, Robb L., Schwenk F., Seibler J., Roellig D, Kranz A., Anastassiadis K. and Stewart AF.

The histone3 lysine 4 methyltransferase, Mll2, is only required briefly in development and spermatogenesis

Epigenetics & Chromatin 2:5, 2009.

2. Takada Y., Naruse C., Costa Y., Shirakawa S., Tachibana M., Sharif J., Kezuka-Shiotani F., Kakiuchi D., Masumoto H., Shinkai Y., **Ohbo K.**, Peters A. H.F.M., Turner J. M.A., Asano M. and Koseki K.

HP1

links histone methylation marks to meiotic synapsis

Development, 138:4207-4217. 2011

3. Tokuishi K., Yamashita SI, **Ohbo K.**, Kawahara K.

Splice variant HE4-V3 expression is associated with favorable prognosis in pulmonary adenocarcinoma

Tumour Biol, 33:103-109. 2012.

4. Yamashita S, Tokuishi K, Moroga T, Yamamoto S, **Ohbo K.**, Miyahara S, Yoshida Y, Yanagisawa J, Hamatake D, Hiratsuka M, Yoshinaga Y, Shiraishi T, Iwasaki A, Kawahara K.

Serum level of HE4 is closely associated with pulmonary adenocarcinoma progression.

Tumour Biol. 33:2365-2370. 2012.

5. Shirakawa T., Yaman-Deveci R., Tomizawa S., Kamizato Y., Nakajima K., Sone H., Sato Y., Sharif J., Takada-Horisawa Y., Yoshida S., Ura K., Muto M., Koseki K., Suda T. and **Ohbo K.**

An epigenetic switch is crucial for spermatogonia to exit the undifferentiated state toward a Kit-positive identity.

Development. 140:3565-3576. 2013

6. Tomizawa, S., Shirakawa, T. and **Ohbo, K.**

Stem cell epigenetics: Insights from studies on embryonic, induced pluripotent, and germline stem cells.

Curr Pathobiol Rep., 2:1-9. 2014.

<奨励研究助成>

RNF213 遺伝子変異陰性もやもや病のエキソーム解析

宮武聡子

横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学教室

抄録

もやもや病は、小児～若年成人に好発する進行性脳動脈閉塞症である。疾患感受性遺伝子 *RNF213* 遺伝子の R4810K 多型が発症に強く関与することが知られているが、本多型を持たない症例が約 20%存在する。R4810K 多型陰性例のもやもや病症例を対象に次世代シーケンサーを用いて新たな原因遺伝子単離を試みた。染色体構造異常を伴う 1 例の解析から 3 番染色体領域に約 4.8Mb のもやもや病の責任候補領域を同定した。そこで孤発性もやもや病患者と非罹患両親の 10 家系、及び孤発性もやもや病患者のみ 6 家系の全エキソーム解析を行った。新規の原因遺伝子は同定されなかったが、R4810K 多型陰性例でも *RNF213* 遺伝子に、健常人で認められないまれな variant を高率に有することがわかった。今後は症例を集積して *RNF213* 遺伝子の rare variant が持つ効果を検証したい。

もやもや病と先天性腎低形成を合併する 3 家系は、特異的な症状から疾患責任遺伝子を共有していると想定されたが全エキソーム解析では共通の新規責任遺伝子は同定されなかった。3 家系中 2 家系では *RNF213* 遺伝子の R4810K 多型を有しており、本多型が本症候群の発症にも関与している可能性が考えられた。

<奨励研究助成>

RNF213 遺伝子変異陰性もやもや病のエキソーム解析

宮武聡子

横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学教室

目的

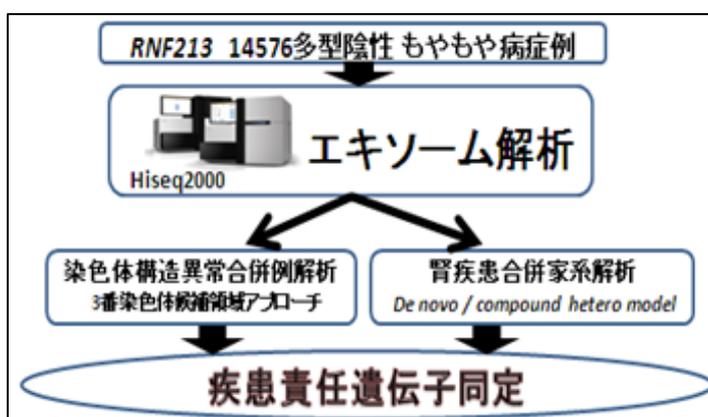
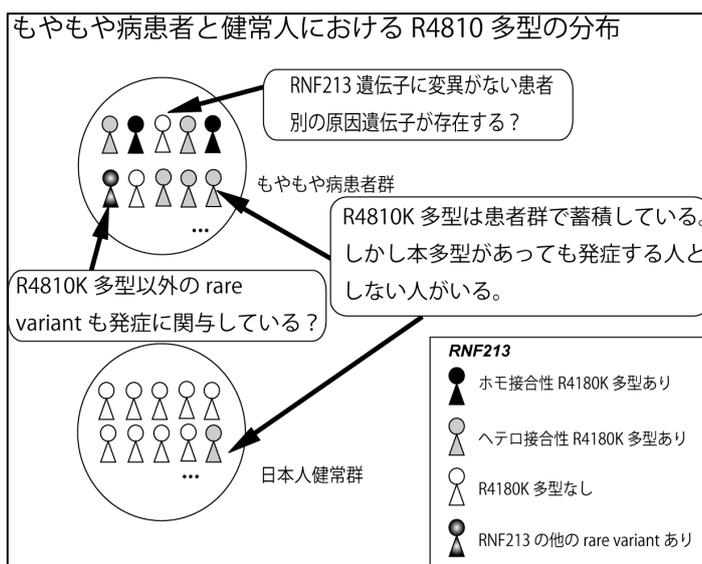
もやもや病は、小児～若年成人に好発する進行性脳動脈閉塞症である。疾患感受性遺伝子 *RNF213* 遺伝子の R4810K 多型が発症に強く関与することが知られているが、本多型を持たない症例が約 20% 存在する。このようなもやもや病症例を対象に、次世代シーケンサーを用いて新たな原因遺伝子単離を試みた。

方法

研究対象は *RNF213* 遺伝子 R4810K 多型陰性の染色体構造異常を伴う 1 例、孤発性もやもや病患者と非罹患両親の 10 トリオ、孤発性もやもや病患者のみ 6 家系 (7 人)、およびもやもや病と先天性腎低形成を合併する 3 家系である。染色体構造異常を伴う 1 例に関しては、microarray 法、Fluorescence *in situ* hybridization 法、および定量 PCR 法を用いて染色体の欠失部位を同定した。

RNF213 遺伝子 R4810K 多型はサンガーシーケンス法で確認した。

全エキソーム解析は、Agilent 社の SureSelect Human All Exon キットを用いて全ゲノムから exon 領域を濃縮し、Illumina 社の HiSeq2000 を用いて全エキソームシーケンスを行った。シーケンスデータのマッピングは Novoalign (<http://www.novocraft.com/>)、Variant 検出は Genome Analysis Toolkit (GATK) (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>)、アノテーションは ANNOVAR (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>)を用いて行った。



結果

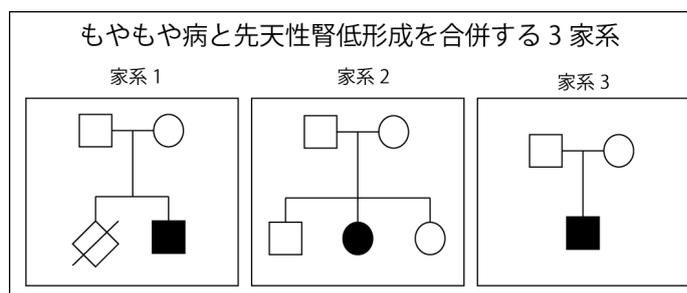
染色体構造異常を伴う 1 例のゲノム構造解析から 3 番染色体領域に約 4.8Mb のもやもや病の責任候補領域を同定した。

R4810 多型陰性孤発性もやもや病の 10 家系 (30 人) の全エクソーム解析を行い、各家系について 575 人の健常日本人集団での出現頻度が 1%未満 rare な *de novo* もしくは recessive variant を抽出した。共通の遺伝子、あるいは 3 番染色体責任候補領域上に生じた *de novo* / recessive variant はなかった。2 つの遺伝子において、1 家系で *de novo* variant、1 家系で母由来かつ健常コントロールには全く見られない rare missense variant が同定されたが、遺伝子の発現部位や遺伝子がコードするたんぱく質の機能から、病的意義は高くないと想定された。

3 番染色体候補領域上にあって、健常人になく患者で見られる variant は、4 遺伝子に 5 種類 (5 人) にあり、うち 1 遺伝子では 1 つは最終エクソンに存在するフレームシフト変異、1 つはミスセンス変異であった。

RNF213 遺伝子における common/ rare variant は 36 種類同定されたが健常集団と比べて患者で有意に出現頻度が高い variant はなかった。*RNF213* 遺伝子の rare variant のみについて検索すると、5 種類 (5 家系) のミスセンス変異が同定され、これらは健常集団では認めなかった。(5/16=0.313, 31.3%) 一方 429 人の健常集団中、頻度 1%未満の rare variant が 23 種類 (28 人) 見つかったことから (28/429=0.065, 6.5%)、患者群では *RNF213* の rare variant がより蓄積している可能性があり、今後症例を増やして解析を進めたいと考えている。

もやもや病と先天性腎低形成を合併する 3 家系 (罹患 3 人、両親 6 人、非罹患同胞 2 人) は、まず *RNF213* 遺伝子の R4810K 多型の有無を確認した。家系 1 は多型を持たず、家系 2 は母由来、家系 3 は父由来に多型を有していた。



家系情報より、*de novo* もしくは劣性遺伝性の変異が考えられたので、全エクソーム解析を行い、各家系から rare *de novo* / recessive variant を抽出した。この中に 2 家系以上で共通する遺伝子の variant は見られなかった。

先天性腎低形成はいくつかの責任遺伝子が報告されているが、これらの既知責任遺伝子の variant は見られなかった。

考察

今回の解析から、*RNF213* 遺伝子の rare variant が R4810K 多型陰性もやもや病患者において有意に蓄積している可能性が示唆されるので症例数を集積して解析を続けたい。

論文および学会発表

1. Miyatake S, Osaka H, Shiina M, et al. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. *Neurology* 2014;82:2230-2237.
2. Miyatake S, Tada H, Moriya S, et al. Atypical giant axonal neuropathy arising from a homozygous mutation by uniparental isodisomy. *Clinical genetics* 2014.
3. Miyatake S, Koshimizu E, Hayashi YK, et al. Deep sequencing detects very-low-grade somatic mosaicism in the unaffected mother of siblings with nemaline myopathy. *Neuromuscular disorders : NMD* 2014;24:642-647.
4. Yoshida K, Miyatake S, Kinoshita T, et al. 'Cortical cerebellar atrophy' dwindles away in the era of next-generation sequencing. *Journal of human genetics* 2014.
5. Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, et al. A *De Novo* deletion at 16q24.3 involving *ANKRD11* in a Japanese patient with KBG syndrome. *The American Society of Human Genetics, 63th Annual Meeting, Boston USA. 2013*
6. 宮武聡子、輿水江里子、林由起子、Gianina Ravenscroft、三宅紀子、土井宏、鶴崎美德、才津浩智、小坂仁、山下純正、大宅喬、増澤祐子、今村伸太郎、山下倫明、椎名政昭、緒方一博、西野一三、Nigel G. Laing、松本直通・ネマリンミオパチーの新規原因遺伝子 *KLHL40* の同定. 日本人類遺伝学会第 58 回大会、宮城. 2013 年
7. 宮武聡子、林由起子、輿水江里子、Gianina Ravenscroft、三宅紀子、土井宏、鶴崎美德、才津浩智、小坂仁、山下純正、大宅喬、増澤祐子、今村伸太郎、山下倫明、椎名政昭、緒方一博、西野一三、Nigel G. Laing、松本直通・ネマリンミオパチーの新規原因遺伝子 *KLHL40* の同定. 第 55 回日本神経学会学術大会、福岡. 2014 年

<奨励研究助成>

強度変調放射線治療 (IMRT) の最適化プログラムの開発

幡多 政治

横浜市立大学大学院 医学研究科 放射線医学
横浜市立大学大学院 医学研究科 がん総合医科学

抄録

近年、放射線治療の照射技術は大きく進歩し、その精度は飛躍的に高まった。中でも強度変調放射線治療 (Intensity-Modulated Radiation Therapy, IMRT) は、照射野の中に線量の強弱を付けることにより、理想的な線量分布を形成することができる。しかしながら、IMRT の治療計画は非常に複雑で、標準化された照射法はない。そこで、本研究では、前立腺癌をモデルに IMRT の線量を最適化する方法について検討した。照射条件を変えながら線量の最適化を行ったところ、前立腺全体に十分な線量を投与しつつ、リスク臓器の被曝線量・体積を許容範囲に抑えるには、少なくとも 5 門程度の X 線ビームが必要であった。また、門数の増加とともに、放射線障害で最も問題になる直腸の被曝線量・体積は減少した。一方、コリメータの回転は、必ずしも線量分布の改善に寄与しなかった。線量の検証では、計画通り高い精度で照射が行われていることが確認された。IMRT の最適化を行う普遍的なプログラムの開発には、異なる照射条件における膨大なデータを蓄積し、個々の特徴に応じた最適な照射プランの作成法を考案していく必要があると思われる。

【目的】

強度変調放射線治療 (Intensity-Modulated Radiation Therapy, IMRT) は、現在のところ、X 線を用いた放射線治療としては最新・最先端の治療法である。しかしながら、まだ歴史が浅く、照射法の標準化がなされていない。これは、従来の放射線治療とは異なり、治療計画に特殊なインバースプランニング (逆方向治療計画) を用いることに起因する。そこで、IMRT の照射条件を変更しながら線量の最適化を行い、最も良好な線量分布を形成する照射法について検討した。

【方法】

今回の実験では、近年、罹患率の増加が著しく、放射線治療の良い適応である限局性前立腺癌をモデルに解析を行った。まず初めに、三次元放射線治療計画装置 (XiO; Elekta) 上で、前立腺癌の 3 つのモデルケースを作成し、標的としての前立腺、リスク臓器としての直腸、膀胱、大腿骨をそれぞれ設定した。使用する放射線の線質は、リニアック (Clinac iX; Varian Medical Systems) の 6 MV の X 線とし、前立腺の中心を isocenter (線源-標的中心間距離 100 cm) として、照射ビームの設定を行った。骨盤内は比較的密度が均一であるため、治療計画の計算アルゴリズムには、均質媒体の計算に適した convolution 法 (計算ピッチ 2 mm) を用いた。それぞれのモデルケースにおいて、3 門 (0 度、105 度、255 度)、5 門 (3 門に 55 度と 305 度を追加)、7 門 (5 門に 155 度と 205 度を追加) の X 線ビームを設定し、コリメータを 0~10 度の範囲で調整しながら、5 mm リーフ幅の step and shoot 法で線量の最適化を行った。最適化の条件として、前立腺の最大、目標、最小線量をそれぞれ 77 Gy、76 Gy、74 Gy、前立腺に照射誤差を加味した計画標的体積 (Planning Target Volume, PTV) の最大、目標、最小線量を 76 Gy、74 Gy、74 Gy、直腸の V_{18} (18 Gy 以上照射される直腸全体における割合) $\leq 75\%$ 、 $V_{30} \leq 20\%$ 、 $V_{72} \leq 1\%$ 、膀胱の $V_{28.8} \leq 50\%$ 、 $V_{45} \leq 25\%$ 、 $V_{76} \leq 1\%$ 、大腿骨の $V_{45} \leq 1\%$ に設定し、weight を 40~120、power を 1.0~2.3 の間で調整した。最適化後、全てのプランにおいて前立腺の平均線量が 76 Gy になるように、処方線量を最終調整した。

放射線治療計画用 CT (Asteion; 東芝メディカルシステムズ) でファントムを 2 mm スライス厚で撮影し、その CT 画像データを治療計画装置に転送した。転送された画像データに最適化後の治療計画を当てはめ、算出された monitor unit 値に従ってファントムに照射を行い、isocenter および 100 % dose level での線量を測定し、精度の検証を行った (図 1)。

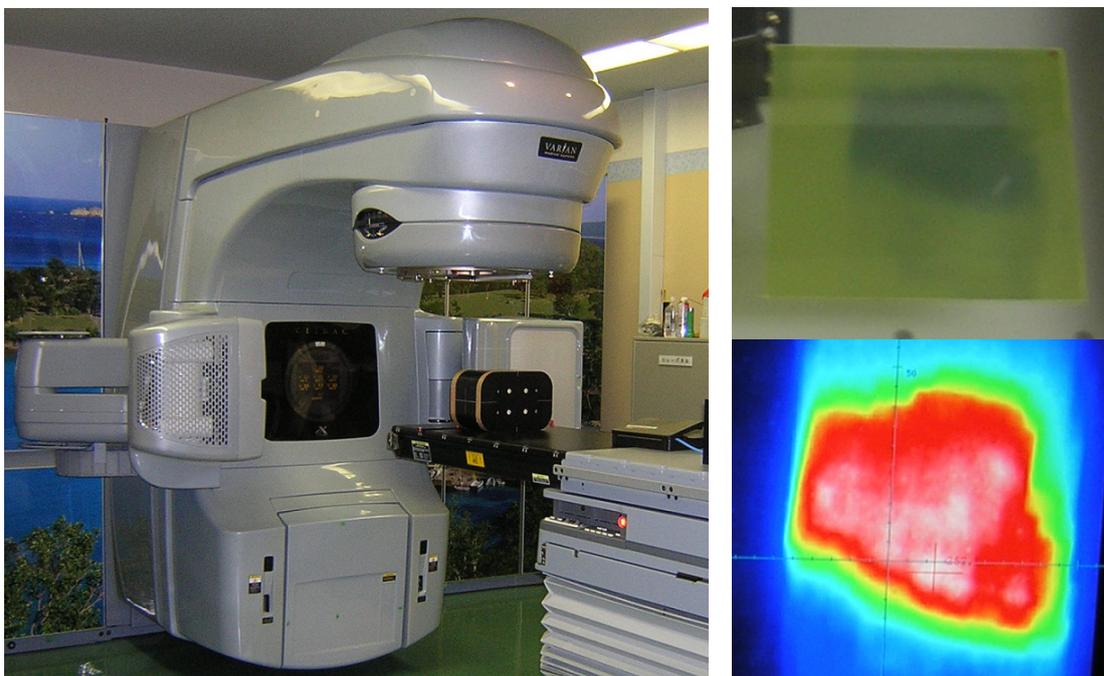


図 1 左 リニアックによるファントムへの照射風景
 右上 ファントム内に留置された照射後の検証用フィルム
 右下 フィルムから得られた線量分布図

【結果】

表 1 各臓器の照射線量と体積比

モデル	門数	前立腺		直腸		膀胱		大腿骨	
		最大-最小 (Gy)	D ₉₅ (Gy)	最大 (Gy)	V ₇₀ (%)	最大 (Gy)	V ₇₀ (%)	最大 (Gy)	V ₄₅ (%)
1	3	7810-7464	7510	7693	5.3	7809	2.4	5613	12.5
	5	7765-7387	7524	7581	3.6	7654	2.4	4413	0
	7	7749-7389	7476	7593	2.0	7745	2.4	3771	0
2	3	8110-7328	7391	8024	4.4	7966	12.6	5973	12.6
	5	8025-7341	7458	7985	5.4	7887	21.2	4839	0.1
	7	7997-7282	7415	7841	4.1	7877	14.1	3417	0
3	3	7873-7381	7496	7751	3.6	7829	15.3	5750	10.2
	5	7806-7436	7493	7782	4.2	7820	16.2	4232	0
	7	7855-7450	7499	7658	2.5	7797	16.4	3265	0

3つのモデルケースにおいて、前立腺の最小線量と D₉₅ (前立腺体積の 95%をカバーする線量) は治療に必要なレベルを満たしたが、3門のプランで一部、前立腺内に許容量を超えた高線量域が形成された (表 1)。また、直腸の V₇₀ は全てのケースにおいて、3門や5門に比べて7門で最低値をとり (7門に比べ3門で 1.1~2.7 倍、5門で 1.3~1.8 倍)、最大線量も7門で低く抑えられた。膀胱は入射ビーム数が減ることから、3門でも V₇₀ で良好な結果

が得られたが、最大線量は他の門数に比べて最高値となった。大腿骨では、45 Gy 以上照射される体積が 3 門の全てのケースで 10%を超えており、最大線量も 50 Gy を大幅に上回る結果となった。また、5 門のプランの一部でも、目標の 45 Gy 以内に抑えられなかった。

尚、線量計を用いた検証では、全てのモデルケースにおいて isocenter での誤差が 1.0~2.8% と少なく、フィルム法による測定でも、100% dose level の誤差が axial、coronal、sagittal とともに 0.3~2.6% の範囲内と、非常に高い精度で計画されていることが確認された。

【考察】

IMRT では、インバースプランニングによる特異な治療計画法を用いるため、ゴールを設定しにくい（最善のプランを断定できないと言ってもよい）。そのため、標的や各リスク臓器において、許容される線量や体積比を設定し、それがクリアできた時点でそのプランを採用するという方法が取られている。一般的に、門数が増えると照射時間も延長するため（セグメント数が同じ場合）、患者の負担は増加し、治療室のスループットも悪化する。そのため、実際の臨床では、より短時間で治療が行えるプランが求められる。

今回の実験では、前立腺癌を治療する場合、3 門では大腿骨の最大線量を耐容線量以下に抑えられないため、許容されないことが分かった。また、5 門では、3 門に比べて大腿骨の線量をかなり低めに抑えることができるが、直腸線量-体積比で 7 門より明らかに劣っていた。前立腺癌の放射線治療において、最も問題になる晩期障害は直腸障害（潰瘍や狭窄）で、直腸の線量-体積比と障害発生のリスクは相関することが分かっている。そのため、高線量にさらされる直腸の体積を極力低く抑える必要があるが、まだ安全性に関する詳細なデータに乏しい。

今回、コリメータを標的やリスク臓器の形状に合わせて調整し、リスク臓器の被曝線量の軽減を試みたが、一部の症例でむしろ悪化する結果が得られた。この辺りがインバースプランニングの難しさで、個々における様々な因子が複合的に関与するため、実際に最適化してみないと結果が予想できないことが少なくない。今後は、さらに照射条件を変更しながらデータの集積を続け、それぞれの特徴から、より簡便で質の高い照射法を選択できないか検討する予定である。また、前立腺に限らず他の臓器に関しても、引き続き調査していきたいと考えている。

【論文発表】

1. **Hata M**, Taguchi T, Koike I, Nishimura G, Takahashi M, Komatsu M, Sano D, Odagiri K, Minagawa Y, Inoue T. Efficacy and toxicity of (chemo)radiotherapy for primary subglottic cancer. *Strahlenther Onkol* 2013; 189: 26–32.
2. **Hata M**, Koike I, Miyagi E, Numazaki R, Asai-Sato M, Kasuya T, Kaizu H, Matsui T, Hirahara F, Inoue T. Radiation therapy for pelvic lymph node metastasis from uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2013; 131: 99–102.
3. **Hata M**, Koike I, Wada H, Miyagi E, Kasuya T, Matsui T, Kaizu H, Mukai Y, Ito E, Inoue T. Radiation therapy for extramammary Paget's disease: treatment outcomes and prognostic factors. *Ann Oncol* 2014; 25: 291–297.
4. **Hata M**, Inoue T. Iris metastasis from small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2014; 9: 1584–1585.
5. **Hata M**, Koike I, Wada H, Minagawa Y, Kasuya T, Matsui T, Suzuki R, Takano S, Inoue T. Radiation therapy for lymph node metastasis from extramammary Paget's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; 28: 873–877.
6. **Hata M**, Wada H, Ogino I, Omura M, Koike I, Tayama Y, Odagiri K, Kasuya T, Inoue T. Radiation therapy for angiosarcoma of the scalp: treatment outcomes of total scalp irradiation with X-rays and electrons. *Strahlenther Onkol*; in press.
7. **Hata M**, Kaneko A, Tomita N, Inoue T. Severe retinopathy following radiation therapy with a moderate dose for orbital mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Hematol Oncol*; in press.

<奨励研究助成>

口腔癌における IL-13R α 2 をターゲットにした分子標的薬と癌ワクチンの併用療法の開発

中島 英行

横浜市立大学大学院医学研究科顎顔面口腔機能制御学

抄録：

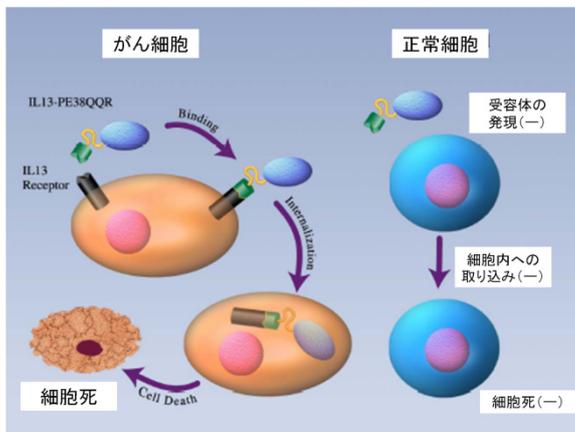
Interleukin 13 Receptor Alpha 2 (IL-13R α 2)は、脳腫瘍など様々な癌で高発現し、癌抗原の一つとして注目されている。我々は口腔扁平上皮癌においても、IL-13R α 2 が高発現していることを見出し、報告している (Kioi M et al, Int J Cancer, 2009)。我々は Interleukin 13 (IL-13) と緑膿菌外毒素 (PE) の 2 つのたんぱく質を遺伝子組み換え技術により融合させた分子標的薬である IL13-PE を開発し、その標的効果について研究を行ってきた。IL13-PE は、IL-13R α 2 を高発現する癌細胞に特異的に細胞死を引き起こす。今回我々は TGF-beta と PTEN のコンディショナルダブルノックアウトマウス (*Tgfbr1/Pten* 2cKO) に生じた頭頸部自然発生腫瘍における IL-13R α 2 の発現と IL13-PE の応用について検討を行った。*Tgfbr1/Pten* 2cKO に生じた自然発生扁平上皮癌は IL-13R α 2 が高発現しており IL13-PE が in vivo において腫瘍の縮小ならびに生存率の延長を示したことから、今後の口腔癌の臨床へ有効性が示唆された。

口腔癌における IL-13R α 2 をターゲットにした分子標的薬と癌ワクチンの併用療法の開発

中島 英行

横浜市立大学大学院医学研究科顎顔面口腔機能制御学

1. **目的**：進行口腔癌に対する治療は外科的療法が主体となるが、術後の機能・審美障害など抱える問題は多く、新たな治療法の開発が必要とされている。分子標的薬は近年臨床応用され、高い期待を集めているが、現時点で頭頸部癌に対して承認されているものはほんのわずかである。Interleukin 13 Receptor Alpha 2 (IL-13R α 2)は、脳腫瘍、頭頸部癌など様々な癌で高発現しているが、ほとんどの正常組織には認められない。最近我々は口腔扁平上皮癌においても、この IL-13R α 2 が高発現していることを見出し、報告している (Kioi M et al, Int J Cancer, 2009)。我々はインターロイキン 13 (IL-13) と緑膿菌外毒素 (PE) の 2 つのたんぱく質を遺伝子組み換え技術により融合させた分子標的薬である IL13-PE38 (以下 IL13-PE) を開発し、その標的効果について研究を行ってきた。IL13-PE は、IL-13R α 2 を高発現する癌細胞に高い親和性で結合し、細胞内に取り込まれた後、たんぱく合成を阻害することで細胞死を引き起こす。正常細胞は IL-13R α 2 受容体を発現していないため IL13-PE は結合せず細胞毒性は見られない (図 1)。今回我々は TGF-beta と PTEN のコンディショナルダブルノックアウト



(Tgfbr1/Pten 2cKO) マウスに生じた頭頸部自然発生腫瘍における IL-13R α 2 の発現と分子標的薬 IL13-PE の応用について検討した。

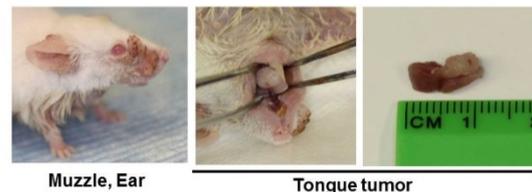
【図 1】 Schema:IL13-PE の腫瘍特異的に細胞死を誘導するメカニズム。

[目次に戻る](#)

2. **方法** : *Tgfr1/Pten* 2cKO マウス (tamoxifen 経口投与) に生じた自然発生腫瘍を採取し、免疫染色、ウェスタンブロッティング、RT-PCR を用いて *IL-13R α 2* の発現を検討した。初代培養細胞に対し、*IL-13* と緑膿菌外毒素 (PE) の 2 つのたんぱく質を遺伝子組み換え技術により融合させた *IL13-PE* (*IL-13R α 2* に対する分子標的薬) を投与し、抗腫瘍効果を観察した。また同マウスにおける *IL13-PE* の抗腫瘍効果を観察した。
3. **結果** : *Tgfr1/Pten* 2cKO マウスでは、100%の割合で頭頸部領域に自然発生腫瘍が観察された。初代培養細胞では *IL-13R α 2* が高発現し、*IL13-PE* を用いた cytotoxic assay にて抗腫瘍効果が認められた。また *IL13-PE* を投与したマウスでは、非投与群と比較して生存率の増加が観察された。

【図 2】 *Tgfr1/Pten* 2cKO マウスでは、100%の割合で頭頸部領域(Tongue, Lip, Muzzle, Ear) に自然発生腫瘍が観察された。

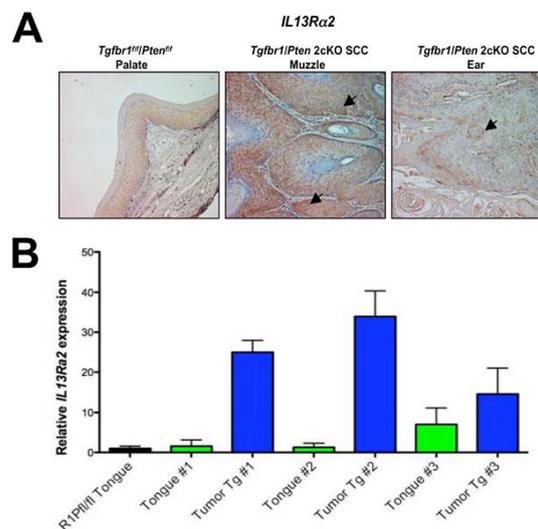
【図2】 *Tgfr1/Pten* 2cKO mice



【図 3】 *Tgfr1/Pten* 2cKO マウスから採取した腫瘍においては *IL13R α 2* が高発現していることが確認された。

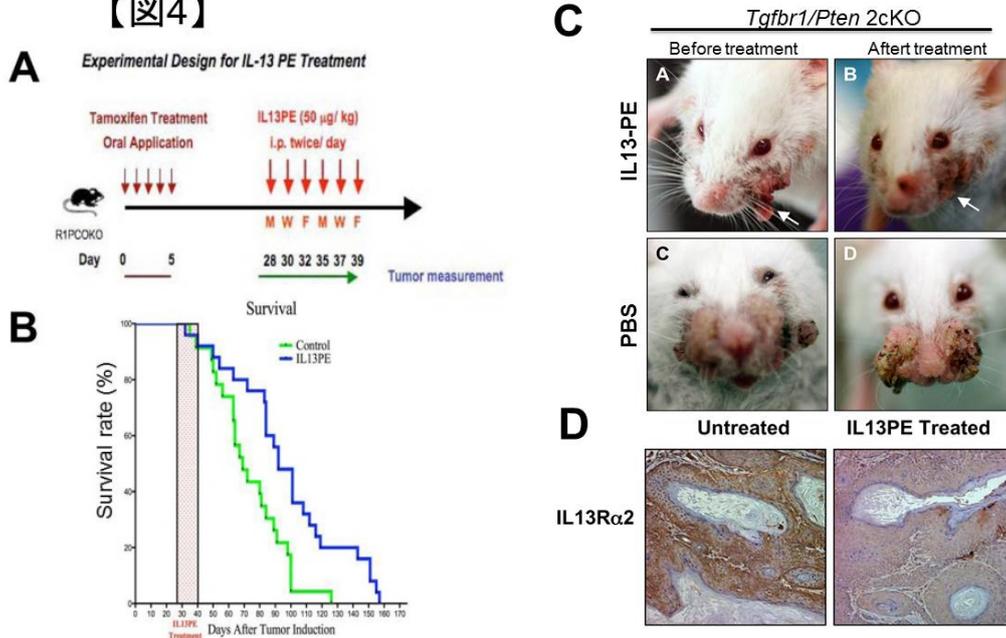
(A) Immunohistochemical analysis : normal palate epithelium と比較して、*Tgfr1/Pten* 2cKO で、*IL-13R α 2* の発現が認められた。(B) Real-time PCR : normal tongue tissue と比較し、3 匹の *Tgfr1/Pten* 2cKO マウスから採取した舌腫瘍で *IL-13R α 2* mRNA の増加が認められた。

【図3】



【図4】 (A) In vivo treatment schedule (B) IL13-PE の投与群において、PBS 投与群と比較し、有意に生存率の増加が確認された。(C) マウスの治療前後の頭頸部領域の腫瘍の変化 (PBS vs IL13-PE)。(D) Immunohistochemical analysis for IL13R α 2 in tumor. 治療後の腫瘍内には、IL13R α 2 の発現が非治療群と比較し、発現の低下を認めた。

【図4】



4. 考察: *Tgfr1/Pten 2cKO* は、ヒト扁平上皮癌に似た morphology を持つため、トランスレーショナルリサーチに対して有効であると考えられる。また *Tgfr1/Pten 2cKO* に生じた自然発生扁平上皮癌は IL-13R α 2 が高発現しており、ヒトにおける発現の割合と相関を認めた。IL-13R α 2 に対する分子標的薬である IL13-PE が in vivo において腫瘍の縮小ならびに生存率の延長を示したことから、今後の口腔癌の臨床へ有効性が示唆された。またこの分子標的治療は癌細胞に特異的に発現する分子をターゲットとするため、副作用を最小限に抑えることが可能となり、口腔癌での IL-13R α 2 をターゲットにした分子標的治療が期待できる。今回の実験では IL13-PE のみを使用し抗腫瘍効果を観察したが、今後は IL-13R α 2 を encode した DNA ワクチンとの併用療法についても検討を行っていく予定である。

5. 【学会発表】第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2013 年 10 月 11-13 日 福岡国際会議場、頭頸部自然発生腫瘍マウスモデルにおける分子標的薬の応用 ○中島英行、來生 知、佐藤 有紀、光藤 健司、藤内 祝

【論文】Hall B, Nakashima H, Sun ZJ, Sato Y, Bian Y, Husain SR, Puri RK, Kulkarni AB. Targeting of interleukin-13 receptor α 2 for treatment of head and neck squamous cell carcinoma induced by conditional deletion of TGF- β and PTEN signaling. J Transl Med. 11 (45), 2013

<奨励研究助成>

全身性エリテマトーデスにおける炎症制御機構異常の解析

吉見 竜介

(共同研究者: 岳野光洋, 上田敦久, 浅見由希子, 塚原利典, 神山玲光)

横浜市立大学医学部 免疫・血液・呼吸器内科学

抄録:

全身性エリテマトーデス (SLE) は全身性自己免疫疾患に属し, 自己免疫による炎症が原因とされるものの発症機序は不明である. 本研究では SLE 患者の血清中に検出される抗 SS-A 抗体の対応抗原である TRIM21 について, その SLE 病態における役割を解析した. その結果, SLE 群では健常者群と比較して TRIM21 mRNA および蛋白の発現が亢進していた. SLE 患者では I 型 IFN 誘導遺伝子の mRNA の発現が健常者と比較して有意に高い発現を示し, I 型 IFN の血中濃度の上昇が推測された. 一方, I 型 IFN (IFN- α , IFN- β) の mRNA 発現量は両群間で差はなかった. SLE 群, 健常者群ともに I 型 IFN 誘導遺伝子群の mRNA 量は TRIM21 mRNA 量と正の相関を示したが, I 型 IFN 自体の mRNA 発現量は健常者群では TRIM21 mRNA 量と逆相関した. これに対して, SLE 群では I 型 IFN と TRIM21 の mRNA 量間の逆相関は認めなかった. 以上から, TRIM21 は生理的には過剰な I 型 IFN の産生を抑制する働きを持つが, SLE 病態においてはその作用が不全な状態となっている可能性が示唆された.

全身性エリテマトーデスにおける炎症制御機構異常の解析

吉見 竜介

(共同研究者: 岳野光洋, 上田敦久, 浅見由希子, 塚原利典, 神山玲光)

横浜市立大学医学部 免疫・血液・呼吸器内科学

目的:

全身性エリテマトーデス (SLE) は“全身性自己免疫疾患”に属し, 自己免疫により引き起こされる炎症が原因とされるものの発症機序は依然として不明である. TRIM21 (別名 Ro52 あるいは SSA1) は SLE やシェーグレン症候群で血中にその対応抗体が出現する自己抗原のひとつであり, 血清抗 SSA 抗体濃度の測定は現在に至るまで診断上大きな役割を担ってきた. 近年, TRIM21 遺伝子の多型性がこれらの疾患の感受性に関連すること, SLE 患者の末梢血単核球 (PBMC) 中で TRIM21 の発現が亢進していることなどが明らかにされ, TRIM21 抗原自体も病態に関与している可能性がある(1,2). TRIM21 分子は N 末端側に RING, B-Box, coiled-coil の 3 つのドメインを有し (図 1), これら 3 ドメインを共通に有する蛋白群である“TRIM ファミリー”に属する. RING ドメインは E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つことが多く, TRIM21 も同活性を有することが *in vitro* で示されている(3). 申請者らや他のグループは TRIM21 が転写因子である IRF3 や IRF8 をユビキチン化することにより線維芽細胞でのインターフェロン(IFN)- β や IL-12p40 の発現を制御していることを細胞レベルで明らかにした(4,5). さらに, 申請者らは *Trim21* ノックアウトマウスを用いて, TRIM21 が転写因子 NF- κ B の活性に関与して炎症性サイトカインを抑制的に制御していることを明らかにした(6). 以上の知見を踏まえ, 本研究では患者検体を用いて TRIM21 の SLE 病態における役割を解析した.

方法:

寛解期の SLE 患者および健常者から PBMC を分離し, 定量 RT-PCR やウェスタンブロット法により TRIM21 mRNA およびタンパクの発現量を比較した. また, 各 IRF ファミリーや I 型 IFN, I 型 IFN 誘導遺伝子についても, SLE 群と健常者群の間で mRNA 発現量を比較した. さらに, 両群において TRIM21 mRNA と I 型 IFN mRNA の発現量の関連性について検討した.

結果:

1. SLE 患者の PBMC における TRIM21 の発現

まず, RT-PCR 法により SLE 患者の PBMC における TRIM21 mRNA の発現量を健常者の PBMC と比較した. その結果, TRIM21 mRNA は健常者と比較して有意に発現量が高かった. また, ウェスタンブロット法により TRIM21 蛋白の発現量を SLE 患者と健常者と比較したところ, SLE 患者で有意に発現量が高かった.

2. SLE 患者の PBMC における I 型 IFN の発現

次に、SLE 患者における IFN シグニチャーについて確認するために、I 型 IFN によって誘導される *MxA*, *IFI27*, *IFI44*, *SIGLEC1* の mRNA の発現を健常者と比較した。その結果、いずれの遺伝子の mRNA においても健常者と比較して SLE 患者では有意に高い発現を示した。このことから、SLE 患者では I 型 IFN の濃度が上昇していることが推測される。一方、I 型 IFN である IFN- α , IFN- β の mRNA 発現量は両群において差はなかった。以上から、SLE 患者では I 型 IFN の発現が亢進しているが、それを抑制する何らかの機構が働いている可能性が考えられた。

3. SLE 患者の PBMC における IRF ファミリーの発現

I 型 IFN の発現には転写因子である IRF ファミリーが関与することが知られている。そこで、RT-PCR 法により SLE 患者の PBMC における各 IRF ファミリー遺伝子の mRNA の発現量を健常者の PBMC と比較した。その結果、I 型 IFN 誘導遺伝子である IRF7 については SLE 患者で有意に高値であったが、IRF3, IRF5, IRF8 については両群間で有意な差を認めなかった。

4. PBMC における I 型 IFN と TRIM21 の関連

これまでに TRIM21 が IRF ファミリーのユビキチン化を介して I 型 IFN の発現を制御している可能性が細胞レベルやノックアウトマウスを用いた研究によって示唆されている。そこで、まず TRIM21 と I 型 IFN の mRNA 発現量の関連を解析した。その結果、健常者においては TRIM21 mRNA の発現量は IFN- α あるいは IFN- β の mRNA 発現量と逆相関することが分かった (図 1)。これに対して、SLE では健常者でみられた逆相関がみられなかった。以上から、TRIM21 は生理的には過剰な I 型 IFN の産生を抑制する働きを持つが、SLE 病態においてはその作用が不全な状態となっていることが推測された。

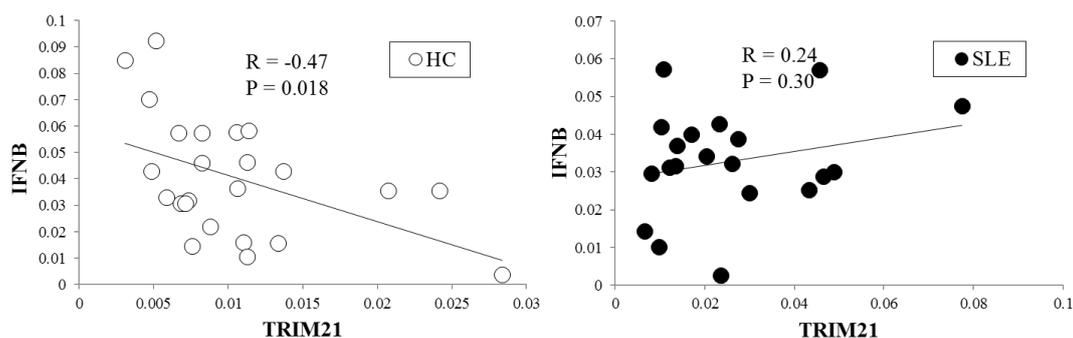


図 1 健常者 (HC) 群および SLE 群における TRIM21 と IFN- β の間の mRNA 発現量の関連性

考察:

今回の研究により、TRIM21 が生理的にもつ I 型 IFN 産生抑制作用が何らかの理由で不全状態になることが SLE 病態の一因となる可能性を見出した。TRIM21 が IRF ファミリーをユビキチン化する作用を持つことが示唆されていることから、SLE 病態では TRIM21 のユビキチン化能が直接的あるいは間接的に変化している可能性も考えられる。今後、さらに SLE 病態における TRIM21 の役割について解析を進めていく予定である。

参考文献:

- (1) Harley JB et al. *Nat. Genet.* **40**: 204, 2008, (2) Espinosa A et al. *J. Immunol.* **176**: 6277, 2006, (3) Wada K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**: 415, 2006, (4) Kong HJ et al. *J. Immunol.* **179**: 26, 2007, (5) Higgs R et al. *J. Immunol.* **181**: 1780, 2008, (6) Yoshimi R et al. *J. Immunol.* **182**: 7527, 2009.

論文及び学会発表:

学会・研究会発表

- (1) 渡邊玲光, 吉見竜介, 岳野光洋, 浜真麻, 岸本大河, 上原武晃, 浅見由希子, 井畑淳, 上田敦久, 石ヶ坪良明: 全身性エリテマトーデスではI型インターフェロンの発現制御機構が破綻している. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会: 京都, 2013, 4.
- (2) Ryusuke Yoshimi, Reikou Watanabe, Toshinori Tsukahara, Maasa Hama, Atsushi Ihata, Atsuhisa Ueda, Mitsuhiro Takeno, Herbert C. Morse III, Keiko Ozato, Yoshiaki Ishigatsubo: The E3 ubiquitin ligase TRIM21 forms a complex with p62 and TRAF6 and promotes degradation of TRAF6. *The American Association of Immunologists 100th Annual Meeting*: Honolulu, Hawaii, May, 2013.
- (3) Ryusuke Yoshimi, Toshinori Tsukahara, Reikou Watanabe, Maasa Hama, Atsushi Ihata, Atsuhisa Ueda, Mitsuhiro Takeno, Herbert C. Morse III, Keiko Ozato, Yoshiaki Ishigatsubo: The E3 ubiquitin ligase TRIM21 promotes degradation of TRAF6 via TRIM21-p62-TRAF6 complex formation. *The Joint International Meeting of The 78th Meeting of The Japanese Society of Interferon and Cytokine Research and The 21st International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages*: Tokyo, Japan, May, 2013.
- (4) Ryusuke Yoshimi, Reikou Kamiyama, Toshinori Tsukahara, Kaoru Minegishi, Maasa Hama, Yohei Kirino, Yukiko Asami, Atsuhisa Ueda, Mitsuhiro Takeno, Herbert C. Morse III, Keiko Ozato, Yoshiaki Ishigatsubo: Autoantigen TRIM21/Ro52 negatively regulates TRAF6 expression via TRIM21-p62-TRAF6 trimer formation. *12th International Symposium on Sjögren's Syndrome*: Kyoto, Japan, October, 2013.
- (5) 神山玲光, 吉見竜介, 國下洋輔, 岸本大河, 峯岸薫, 浜真麻, 桐野洋平, 浅見由希子, 上田敦久, 岳野光洋, 石ヶ坪良明: 全身性エリテマトーデスにおける自己抗原TRIM21の役割. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会: 東京, 2014, 4.
- (6) Reikou Kamiyama, Ryusuke Yoshimi, Toshinori Tsukahara, Atsuhisa Ueda, Mitsuhiro Takeno, Keiko Ozato, Yoshiaki Ishigatsubo: The dysfunction of the E3 ubiquitin ligase TRIM21 in systemic lupus erythematosus. *The American Association of Immunologists 101st Annual Meeting*: Pittsburgh, Pennsylvania, May, 2013.
- (7) 吉見竜介, 芳田祐子, 神山玲光, 吉居廣朗, 塚原利典, 尾里啓子, 石ヶ坪良明: 自己免疫疾患におけるTRIM21-IRF8系の役割. 第4回T-cell Camp: 小田原, 2014, 5.

<奨励研究助成>

ベーチェット病と成人スティル病における M2 マクロファージの機能解析と臨床応用

桐野洋平

岳野光洋 上田敦久 石ヶ坪良明

病態免疫制御内科学

抄録

近年、自然免疫の異常が病態の中心である疾患群を「自己炎症症候群」と分類する概念が提唱され、この中に成人スティル病(AOSD)とベーチェット病(BD)が含まれている。自然免疫ではマクロファージが重要であるが、炎症促進系の M1 型と抗炎症作用を持つ M2 型に分類され、その質的・量的異常が炎症性疾患の病態に寄与すると想定されている。助成金を基に、AOSD と BD において、M2 マクロファージの解析を試みた。まず健常人より末梢血単球を分離し、M2 マクロファージに高発現しているとされるハプトグロビン受容体 CD163 やヘムオキシゲナーゼ(HO)-1 の発現を定量した。次に M1/M2 マクロファージへの分化誘導を *in vitro* で行い、mRNA や蛋白質の発現パターンを解析した。さらに血清 HO-1 を BD にて再測定した。以前の報告通り CD163 や HO-1 は M2 マクロファージに有意に高発現していた。さらに、血清 HO-1 値は BD では低い傾向を認めた。現在さらに詳細な解析を推進しており、AOSD/BD における M2 マクロファージの機能を明らかにして、臨床応用を目指したい。

ベーチェット病と成人スティル病における M2 マクロファージの機能解析と臨床応用

桐野洋平

岳野光洋 上田敦久 石ヶ坪良明

病態免疫制御内科学

目的：近年、マクロファージ(M ϕ)は炎症促進系の M1 型と抗炎症作用を持つ M2 型に分類され、その質的・量的異常が炎症性疾患の病態に寄与すると想定されている。申請者らは M ϕ 活性化が顕著な血球貪食症候群や成人スティル病(AOSD)において、抗炎症蛋白、ヘムオキシゲナーゼ(HO)-1 が疾患マーカーとなることを報告したが (Kirino et al, *Arthritis Res Ther*, 2005)、その後、M2M ϕ が主な HO-1 発現細胞であることが明らかにされた。一方、同じ炎症性疾患でもベーチェット病(BD)では、疾患活動期の末梢血単球(PBMC)中の HO-1 発現は低下しており (Kirino et al, *Arthritis Res Ther*, 2008)、さらにゲノムワイド関連解析で同定されたケモカイン受容体 *CCR1* リスクアレルが、単球の *CCR1* 発現低下および単球遊走能低下に寄与すること (Kirino et al, *Nat Genet*, 2013) などを見出したことから、BD での M ϕ 機能不全が想定される。興味深いことに、これらの疾患の M ϕ 機能と NK 活性は鏡面像にあることから、M ϕ 、特に M2M ϕ と NK 細胞の機能バランス (BD : NK 機能亢進・単球機能低下、AOSD : NK 機能低下・単球機能亢進) が病態に寄与し、病像を規定するという仮説が想定される。本研究では AOSD、BD において血清マーカーや末梢血単核細胞の表面マーカーを用いて M1、M2M ϕ 、NK 比率を解析するとともに、それぞれの細胞サブセットの機能的解析を加え、まず、上記仮説の妥当性を検証し、M2M ϕ の機能調節による新規治療法の基礎を築くことを目的とする。

方法：本研究は本学附属病院倫理委員会の承認を得ている (承認番号 B131107009)。健康人より得たヘパリン加血を Ficoll により遠心分離して PBMC を得、MACS 法を用いて単球を単離した。ヒト組み換え macrophage colony stimulating factor (M-CSF) と granulocyte macrophage stimulating factor (GM-CSF) を R&D より購入し、それぞれ 5 μ g/ml, 10 μ g/ml の濃度で、10%FBS-RPMI にて 9 日間培養した。Real-time PCR は Applied Biosystems より CD163、HO-1、GAPDH のプライマーを購入して解析した。血清 HO-1 は Enzo より ELISA キットを購入して測定した。

結果：HO-1 は主に単球に発現している。現在、単球は CD14+CD16⁻である classical monocyte, CD14⁻CD16⁺の non-classical monocyte に主に分類される。そこで、HO-1 がどの単球サブセットに多いかを調べる目的で、CD16⁺単球を分離して、その他の細胞との発現比較を行った (図 1)。

図 1 ヒト末梢血 CD16 陽性単球と、その他の細胞群(CD16 陰性単球およびリンパ球)の CD16、HO-1、CD163 の mRNA 発現解析。いずれも内在性コントロール GAPDH での補正を行っている。RQ: relative quantity。P 値は t 検定。

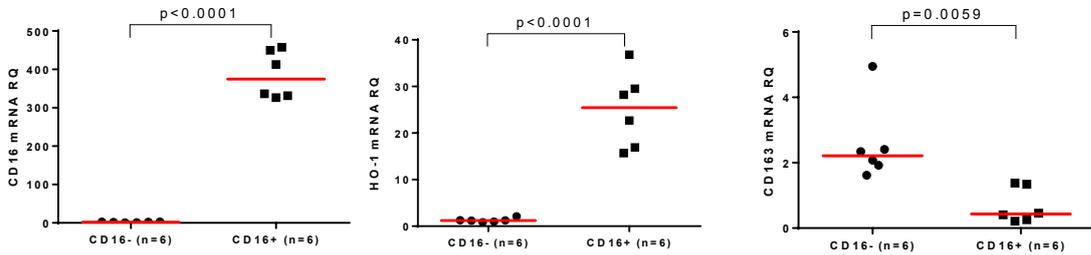


図 1 に示したように、CD16 の mRNA 発現は CD16 陽性細胞に多く、MACS 法の妥当性が分かる。CD163 は以前の報告通り、CD16-細胞に多く発現していた(Tippett et al, Plos one, 2013)。一方 HO-1 は CD16+細胞に多く発現していた。次に単球を培養して M1/M2 Mφ に分化誘導させて、CD163 などの発現変化を観察した。この実験では M1 に誘導する GM-CSF と、M2 に誘導する M-CSF 存在下で 9 日間培養して、mRNA の発現パターンを比較した (図 2)。

図 2 健康人マクロファージの HO-1、CD163 の mRNA 発現解析。いずれも内在性コントロール GAPDH での補正を行っている。RQ: relative quantity。P 値は t 検定。

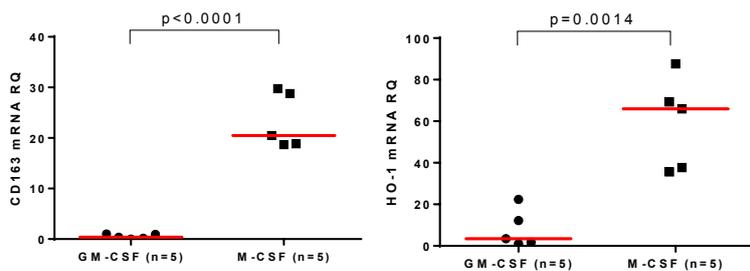


図 2 に示したように、HO-1 と CD163 は以前の報告通り、M2 Mφ である M-CSF 刺激細胞に多く発現していた(Tippett et al, Plos one, 2013)。さらに Western blotting にて HO-1 の蛋白発現を M1(GM-CSF 刺激) Mφ、M2(M-CSF 刺激) Mφ 間で比較した (図 3)。

図 2 ヒトマクロファージの HO-1 蛋白発現

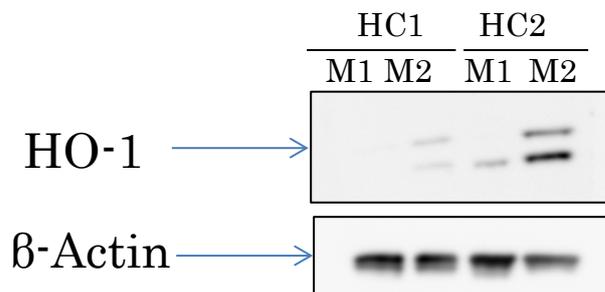
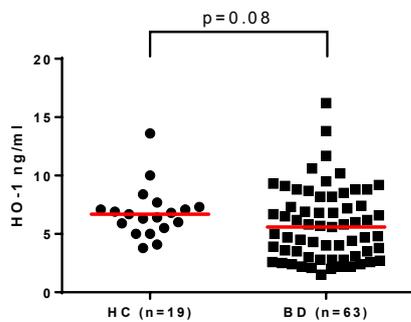


図3に示したように、HO-1の発現はM2M ϕ に多く発現していることが蛋白レベルでも確認された。以上の結果をまとめると、①単球ではCD163とHO-1の発現細胞が異なる。②M ϕ に分化するとCD163とHO-1はともにM2細胞に多く発現する、と言える。最後に血清中のHO-1の値をELISA法で測定し、健康人とベーチェット病患者で比較した(図4)

図4 健康人とベーチェット病患者の血清HO-1値。赤線は中央値を示す。p値はMann-Whitney検定。



結果、ベーチェット病患者で、血清HO-1の低い傾向を認めた。

考察：単球・マクロファージは自然免疫の中心的役割を担っているが、そのサブセットにより炎症反応の調節がなされていると考えられている。本研究では、以前から知られているように、単球やM ϕ のCD163やHO-1の遺伝子・たんぱく質発現の違いが確認できた。さらにベーチェット病患者血清においてM2M ϕ に発現するHO-1が低い傾向が再確認された。本研究では、今後いくつかの問題点を解決する必要がある。

- ① 単球とM ϕ のサブセットに、実際の機能的な差が確認できるか？以前より non-classical monocyteやM2M ϕ はIL-10などの抗炎症性サイトカインを産生するといわれているが、自分たちでも再現性を確認したい。
- ② ベーチェット病ではHO-1が低く、成人スティル病ではHO-1が高値であるが、HO-1の主要な発現ソースであるM2M ϕ を患者検体で解析したい。実際にM2M ϕ に分化させて質的・量的違いがでるか？CD163陽性細胞の比率の差など。
- ③ LPSなどの炎症刺激によるサイトカイン産生能を調べる。
- ④ さらにNK細胞とのクロストークや、HLA-Class Iや抗原提示能の変化も検討したい。これらの検討を続け、M2M ϕ を調節することが、実際に臨床に有用な手段となり得るか検討していく予定である。

論文及び学会発表：なし

謝辞：本研究は当教室大学院生の仲野寛人先生と、本学4年の東谷佳奈さんが行いました。

<奨励研究助成>

卵巣明細胞癌(ovarian clear cell adenocarcinoma: OCCA)に対する新規細胞死誘導薬
(ROS 誘導型ネクローシス)の開発

山田 六平

(共同研究者:宮城 洋平)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構

神奈川県立がんセンター臨床研究所がん治療学部

抄録:化学療法における抵抗性を示す予後不良の卵巣癌である卵巣明細胞腺癌(以下 OCCA)に対する新たな細胞死経路の解明をおこない、治療薬の開発を目的とした研究をおこなった。申請者らが創薬した新規化合物 Propynoic Acid Carbamoyl Methyl Amides(以下 PACMAs)の OCCA に対する殺細胞効果は IM-54(酸化ストレス(Reactive Oxygen Stress 以下 ROS))が誘導するネクローシスの特異的阻害薬)および MitoTEMPO(ミトコンドリア ROS 阻害薬)の介入により劇的に抑制されたことより、そのメカニズムは ROS 誘導におけるネクローシスである可能性が高い、と考えられた。また正常細胞に対する殺細胞効果はほとんど認められなかったが、OCCA 細胞株に対しては高い殺細胞効果を示し、PACMA の殺細胞効果ががん細胞選択的である可能性を示唆した。このようながん細胞に選択的かつ代替的な細胞死経路の分子機構をさらに解明することによって、新たな癌治療戦略の開発が進むことが期待される。

今後の課題は標的タンパクの同定、ROS 発生のメカニズム、ROS に誘導される細胞死のメカニズムを明らかにすること、および OCCA に特徴的な腹膜播種に対する PACMA の効果を動物実験で確認することである。

目的: OCCA に対する新たな細胞死経路の解明をおこない、治療薬を開発する。OCCA は化学療法における抵抗性を示す予後不良の卵巣癌である。本邦では OCCA の割合が高く、治療成績改善は喫緊の課題である。申請者らが創薬した Propynoic Acid Carbamoyl Methyl Amides(以下 PACMAs)の OCCA に対する殺細胞効果は IM-54(酸化ストレス(Reactive Oxygen Stress 以下 ROS))が誘導するネクローシスの特異的阻害薬)の介入により劇的に抑制されたことより、そのメカニズムは ROS 誘導におけるネクローシスである可能性が高い、と考えられた。このような代替的な細胞死経路の分子機構をさらに解明することによって、新たながん治療戦略の開発が進むことが期待される。

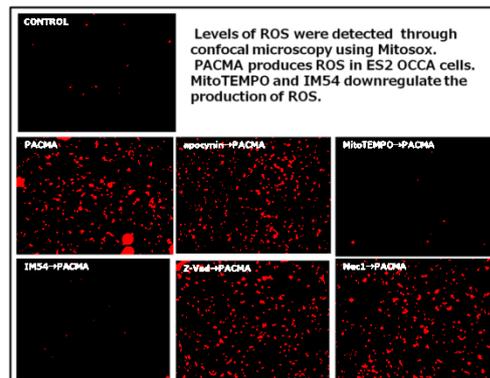
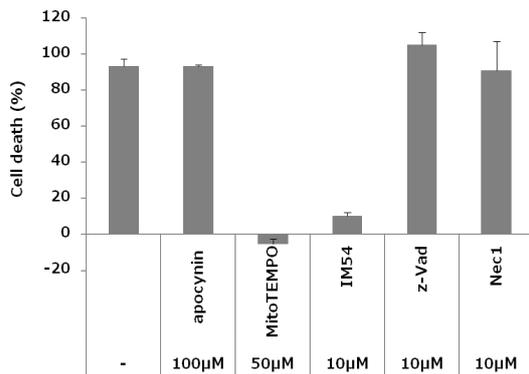
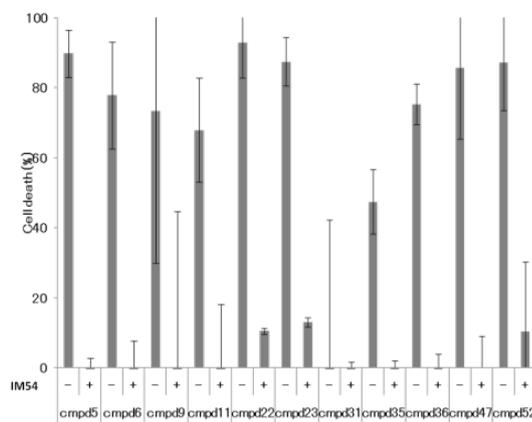
方法:①ROS 誘導型ネクローシスを最も強く誘導するアナログを決定する目的で、全て(11種類)の PACMAs の OCCA に対する殺細胞効果を IM-54 介入前後で比較する。②①で得られたアナログの標的タンパク質を同定する目的で、機能性ナノ磁性微粒子を PACMA と固定化し、標的タンパ

ク質の溶出、精製をし、HPLC による定量をおこない、標的タンパク質を同定する(FG beads (株) 多摩川精機)。③OCCA 細胞株を用いて標的タンパク質の発現阻害、活性阻害などをおこない、PACMA 投与時と同様な特徴を示す細胞死が誘導されるかあるいは標的タンパク質の強制的発現が PACMA の細胞死を阻害するか検討する。④標的タンパク質であることが確認された場合には、その細胞死のメカニズムの詳細を検討する。⑤この標的タンパク質が実用化できる抗癌剤の分子標的となりうるかについて検討するために、患者由来の癌組織および正常組織マイクロアレイにおける標的タンパク質の発現を解析する。癌組織における発現は投与対象の最適化に、正常組織(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、造血組織を中心に)における発現は、投与した際の致命的な副作用の発生を予測することにつながる可能性がある。

結果:①OCCA 細胞株に対する 11 の化合物の殺細胞効果(48 時間曝露)を MTS assay で判定。

また、ROS 誘導性ネクローシス阻害薬 IM54 前投与が与える殺細胞効果への影響を MTS assay で検討(右下)。阻害の程度、化学構造などを考慮し、compound5 を研究対象とした。②③上記方法で標的タンパクの同定を試みたが、同定には至らなかった。そこ

IM54 inhibits cell death induced by all PACMAs on RMG1 cell line



で未知の標的タンパクを探索する実験系の確立を試み、これに成功した(未発表)。

現在この系を用いて compound5 の標的タンパクの同定を試みている。

④ROS 発生のメカニズムおよび細胞死のメカニズムを明らかにする目的で、各阻害薬投与後の殺細胞効果を検討した。

阻害薬: apocynin (NADPH オキシダーゼ阻害薬), MitoTEMPO(ミトコンドリア ROS 阻害薬), IM54(ROS 誘導性ネクローシス阻害薬), z-Vad(アポトーシス阻害薬), Nec-1(ネクロプトーシス阻害薬)

上記の阻害薬前投与1時間後に PACMA1 μ M を投与し、24 時間後に殺細胞効果の判定をおこなった。細胞内の ROS はミトコンドリア呼吸鎖複合体あるいは細胞膜の NADPH オキシダーゼから発生することが知られている。PACMA の細胞死は MitoTEMPO と IM54 によってほぼ完全にキャンセルされ、NADPH 阻害薬、アポトーシス阻害薬、ネクロプトーシス阻害薬の介入による細胞死のキャンセルは認められなかった(上左)。さらに PACMA 投与 1 時間後の細胞内の ROS を Mitosox (ミトコンドリア ROS の蛍光色素) によって蛍光顕微鏡で観察したところ、細胞死がキャンセルされた 2 例においては ROS の発生がほとんど認められなかった(上右)。このことは PACMA による細胞死が、ミトコンドリア ROS 発生を起点としたネクローシスであることを示唆している。

⑤正常細胞への毒性を検討する目的で PACMA 投与 48 時間後の細胞死を MTS assay で検討した。正常細胞(HEK293T, Fa2N-4, RWPE-1, HUVEC, NuLi-1, RPEC/TERT1)に対する殺細胞効果はほとんど認められなかったが、OCCA 細胞株(RMG-1, JHOC5, OVTOKO, TOV21G, ES2)に対しては高い殺細胞効果を示した。

このことは PACMA の殺細胞効果ががん細胞選択的である可能性を示唆するものである。

考察: OCCA が示す抗癌剤抵抗性については、OCCA の低い増殖能、細胞内から薬剤を排出する ATP-binding cassette (ABC) transporter の ABCC3, ABCF2 の発現、薬剤解毒に関わる glutathione peroxidase3 (GPx3), glutaredoxin (GLRX), superoxide dismutase (SOD2) の発現や DNA 修復能の関与などが指摘されている(総説 Itamochi, et al. Cancer Sci 99: 653-8, 2008) が、未だに劇的に予後を改善する治療薬の開発には至っていない。

ROS は非特異的に生体高分子を攻撃・変性する毒と考えられたきたが、近年、特異的な転写活性化シグナルとしての機能が明らかとなってきた。例えば転写因子 Nrf-2(nuclear factor like-2)は ROS 応答において重要な役割を果たしているが、正常細胞ではストレス時のみ核内移行し、生体防御遺伝子群を活性化するのに対し、がん細胞では常に核内に蓄積し(Uruno, A.. et al.: Nitric Oxide, 25: 153-160, 2011), 抗がん剤、放射線に対する耐性の原因となり、(Ito K. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 236: 313-22, 1997.), さらにがん遺伝子そのものが Nrf-2 を活性化することも報告されている(DeNicola, G. M. et al: Nature, 475: 106-9, 2011)。今までの研究結果で PACMA の細胞死はがん細胞特異的に発生し、細胞内 ROS 発生を起点として誘導されるネクローシスである、ことが解明された。

このようにがん細胞に特徴的な代謝経路を理解することを通して、抗がん治療の分子標的を見出すという試みは意義のあることと考えられる。

今後の課題は標的タンパクの同定、ROS 発生メカニズム、ROS に誘導される細胞死メカニズムを明らかにすること、および OCCA の腹膜播種に対する PACMA の効果を動物実験で確認することである。

論文および学会発表

論文および学会発表は現在準備中である。

<奨励研究助成>

KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌の分子病理学的特性
(S100 蛋白質の関与)

禹 哲漢

(共同研究者 奥寺 康司)

済生会横浜市南部病院 心臓血管・呼吸器外科
(横浜市立大学 外科治療学教室 共同研究員)

【背景】KRAS 変異型肺腺癌では、目下有効な分子標的薬は存在せず、予後も不良である。我々の過去の解析では、KRAS 変異を伴い、且つ高い増殖活性を示す肺腺癌は、その中でも特に予後不良であった。このような状況の中、KRAS 変異型肺腺癌における下流分子の網羅的解析を通じ、その分子基盤の一端を明らかにすることは、今後の治療戦略を立てる上で重要な案件であると考えられる。【方法】我々は、2次元電気泳動を用いたプロテオーム解析を行い、翻訳後レベルで発現・修飾を受ける変異型 KRAS 下流分子の一群を同定した。今回、それら分子群の中で高発現を示した S100 A11 分子に着目し、肺癌術後検体を用いた臨床病理学的解析を行った。具体的には、過去に手術治療を行った StageI 肺腺癌 179 例を対象とし、S100 A11 の免疫組織学的な発現解析 (各腫瘍内での発現強度×面積でスコア化: 0-100)、および予後との相関解析を行った。【結果】S100 A11 スコアは、KRAS 変異(+)/高増殖活性群で、最も高い傾向が見られた ($P=0.133$)。一方、S100 A11 発現別の無再発生存解析では、Kaplan-Meier 法で有意に高発現群が不良であった ($P=0.040$)。【結語】S100 A11 は、KRAS 変異型肺腺癌の悪性度を規定する下流分子の一員であると考えられた。また、S100 A11 の腫瘍内での高発現は、肺線癌の予後不良因子の一つと考えられた。

KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌の分子病理学的特性 (S100 蛋白質の関与)

禹 哲漢

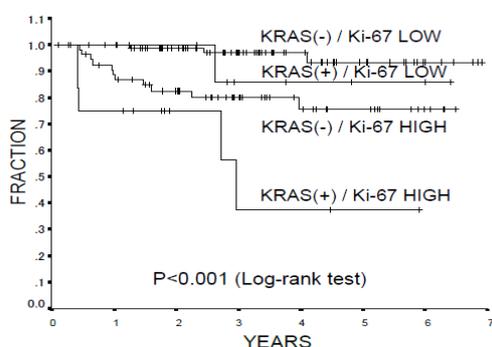
(共同研究者 奥寺 康司)

済生会横浜市南部病院 心臓血管・呼吸器外科

(横浜市立大学 外科治療学教室 共同研究員)

【目的】EGFR 変異型肺腺癌と比較し、KRAS 変異型肺腺癌では、目下有効な分子標的薬は存在せず、予後も不良である。我々の過去の解析では、KRAS 変異を伴い、且つ高い増殖活性を示す肺腺癌は、その中でも特に予後不良であった (図 1)。この様な状況の中、KRAS 変異型肺腺癌における下流分子の網羅的解析を通じ、その分子基盤の一端を明らかにすることは、今後の治療戦略を立てる上で重要な案件であると考えられる。

図 1. KRAS 変異/増殖活性別無再発生存曲線



KRAS 変異と増殖活性の組み合わせで肺腺癌を分類。増殖活性を Ki-67 抗原に対する免疫染色で評価し、標識率 10%以上を高増殖活性(Ki-67 HIGH)、10%未満を低増殖活性(Ki-67LOW)とした。KRAS 変異型/高増殖活性群は、最も高い術後再発率を示した。

(Woo T, Okudela K, et al. *Lung cancer* 2009)

【方法】我々は、変異型 KRAS 下流分子の網羅的 mRNA 解析に加え、2次元電気泳動を用いたプロテオーム解析を行い、翻訳後レベルで発現・修飾を受ける変異型 KRAS 下流分子の一群を同定した (表 1)。今回、それら分子群の中で高発現を示した S100 A11 分子に着目し、肺癌術後検体を用いた臨床病理学的解析を行った。具体的には、過去に手術治療を行った StageI 肺腺癌 179 例を対象とし、S100 A11 の免疫組織学的な発現解析 (各腫瘍内での発現強度×面積でスコア化: 0-100)、および予後との相関解析を行った。

表 1. 変異型 KRAS 下流で高発現/低発現を示した蛋白質群 (2倍以上)

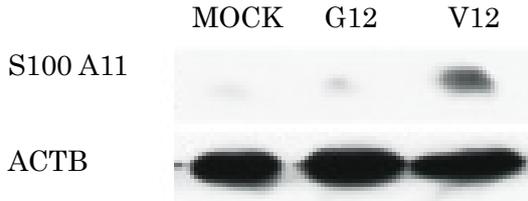
高発現

S100 A11、S100 A2、VIME、EEF2、GC、CTSL1、VCP、ENOA

低発現

CLIC4、TPM2、ITGA3、ATP5B

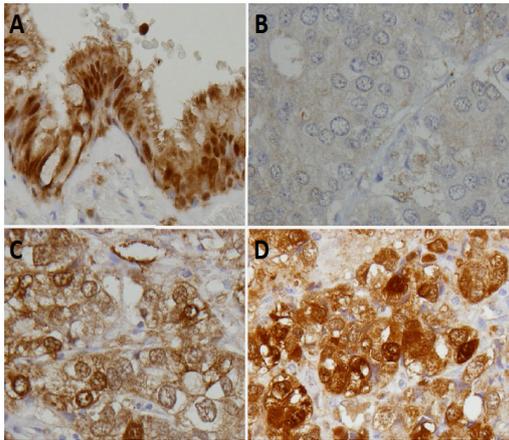
図2. ウェスタンブロット解析



不死化気道上皮細胞に空ベクター (MOCK)、野生型 KRAS(G12)、変異型 KRAS(V12)を導入し、S100 A11 蛋白質の発現を解析した。変異型 KRAS 導入細胞で、S100 A11 蛋白質の発現を認めた。

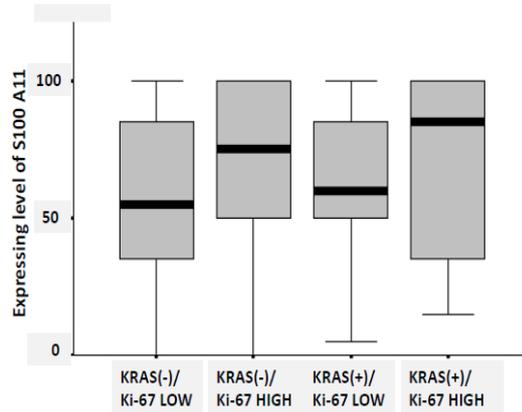
【結果】免疫染色を用いた代表的な S100 A11 発現例を下記に示す (図2)。S100 A11 スコアの中央値は 65 (0-100)。S100 A11 スコア (中央値) と KRAS 変異および増殖活性との相関は、KRAS 変異(-)/低増殖活性群 55、KRAS 変異(-)/高増殖活性群 75、KRAS 変異(+)/低増殖活性群 60、KRAS 変異(+)/高増殖活性群 85 であり、KRAS 変異(+)/高増殖活性群で、S100 A11 スコアが最も高い傾向が見られた ($P=0.133$) (図3)。一方、術後再発と S100 A11 スコア (中央値) との相関は、術後再発群 90、術後無再発群 65 であり、術後再発群で高い傾向が認められた ($P=0.059$)。また、ROC 解析 (AUC 0.638) で、術後再発に対する S100 A11 のカットオフ値を 67.5 と設定した場合、5年無再発生存率は、低発現群 93.1% vs 高発現群 78.4% であり、Kaplan-Meier 法で、有意に高発現群が不良であった ($P=0.040$) (図4)。

図2. 免疫染色を用いた S100 A11 の代表的発現例



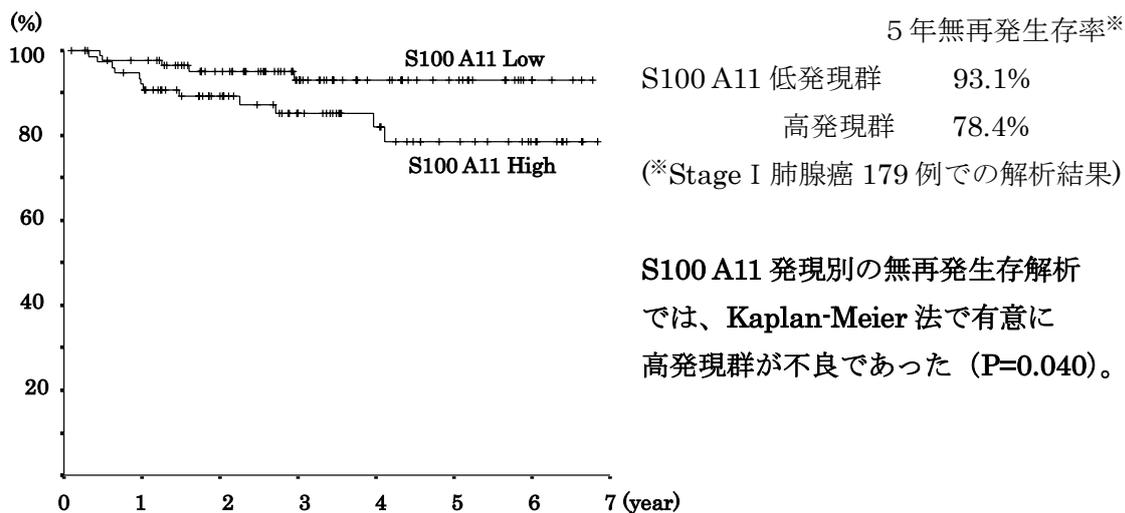
正常気道上皮(A)、肺腺癌(B-D)での発現 (B:低発現例、C:中発現例、D:高発現例) 同一切片上の正常気道上皮細胞での発現を internal control(中等度)とし、各腫瘍内での発現強度の評価を行った。

図3. KRAS 変異/増殖活性別にみた S100 A11 発現



S100 A11 は、KRAS 変異型/高増殖活性群で、高発現を示した (太線は中央値)。 (縦軸は、正常気道上皮細胞と比較して同～高発現を 1、低発現を 0.5、発現なしを 0 とし、腫瘍全体での割合(%)を乗じたもの)

図 4. S100 A11 発現別無再発生存曲線



【結論・考察】 S100 A11 は、KRAS 変異型肺腺癌の悪性度を規定する下流分子の一員であると考えられた。また、S100 A11 の腫瘍内での高発現は、肺腺癌の予後不良因子の一つと考えられた。現在まで、S100 A11 蛋白質は、肺癌の悪性度と関連するという報告が複数なされているが、KRAS 変異型・高増殖活性型肺腺癌（高悪性度肺腺癌）の、悪性度を規定する責任分子としての観点から論じた報告はなく、本研究結果の固有性・独創性は極めて高いものと考えられた。

【論文及び学会発表】

学会発表：

KRAS 変異型肺腺癌における下流分子の網羅的解析—S100 A11 への着目。

第 67 回日本胸部外科学会定期学術集会，2014.10.3，福岡。

論文発表：

(投稿準備中)

<奨励研究助成>

EP4 シグナリングによる弾性線維の制御

市川 泰広

横浜市立大学医学部循環制御医学

抄録

背景と目的：大動脈瘤や動脈硬化ではプロスタグランジン E の産生が亢進していることが知られており、我々はこれらの血管平滑筋でプロスタグランジン E 受容体 EP4 の発現が上昇していることを明らかにしてきた。弾性線維は血管の力学的特性を規定し、その形成低下は疾患の進行に関与することから、本研究では EP4 シグナルが弾性線維に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。方法：1. 平滑筋 EP4 過大発現が弾性線維形成を抑制することを検討した… EP4 過大発現マウスとコントロールマウスの大動脈を採取し mRNA を抽出した。2 種類のマウス由来の弾性線維を構成している分子（エラスチン、リシルオキシダーゼ、フィブリリン）の遺伝子レベルの発現量を測定した。

2. 平滑筋 EP4 過大発現が弾性線維分解を促進することを検討した…弾性線維の分解に関与しているのがマトリックスプロテアーゼ(MMP)であり、動脈硬化、大動脈瘤病変に関係している MMP-2,9 の酵素活性を中心に検討した。

結果：弾性線維の構成要素である Elastin、Lysyl oxidase、Fibrillin-1、Fibrillin-2 は EP4TG でコントロールマウスに比べて差はなかった。アンジオテンシン II を負荷した状態の大動脈ではコントロール群に比べて過大発現群で、MMP-2、MMP-9 の酵素活性が上昇していた。

結論：これらの結果より血管平滑筋の EP4 シグナルはアンジオテンシン II 存在下で弾性線維の分解が亢進することで血管弾性を低下させることが示唆された。

1. 目的

血管弾性線維は動脈の構造、機能を保つ上で重要な働きをしている。加齢や炎症により弾性線維が劣化・断裂すると、血管壁の弾力が失われ、「動脈硬化」「動脈瘤」などの血管疾患を生ずる。動脈硬化、動脈瘤部位にはプロスタグランジンが多く産生され、そのレセプターである EP4 シグナルが病変部の平滑筋層で上昇している。しかし病変部の大動脈において血管平滑筋 EP4 シグナルがどのように弾性線維の劣化・断裂に関与し、動脈硬化を進行させるかどうかは不明である。われわれは先行研究で血管平滑筋特異的 EP4 過大発現マウスを作

成し、このマウスの大動脈血管弾性を測定すると有意に弾性が低下していることがわかった。本研究では血管平滑筋特異的 EP4 過大発現マウスを用いて、血管平滑筋 EP4 シグナルが弾性線維を減少させるメカニズムを解明することを目的とする。

2. 方法

弾性線維が劣化する機序として弾性線維の形成の抑制、分解の亢進の 2 つの機序が考えられる。先行研究で明らかにしたことをさらに発展させ、以下のように研究を進めた。

1. 平滑筋 EP4 過大発現が弾性線維形成を抑制することを検討…EP4 過大発現マウスとコントロールマウスの大動脈を採取し、mRNA を抽出した。弾性線維を構成している分子（エラスチン、リシルオキシダーゼ、フィブリリン）の遺伝子レベル、タンパクレベルの発現量を RT-PCR、ウエスタンブロットを用いて測定した。

2. 平滑筋 EP4 過大発現が弾性線維分解を促進することを検討…弾性線維の分解に関与しているのがマトリックスプロテアーゼ(MMP)であり、これがターゲットとなる。具体的には EP4 過大発現マウスとコントロールマウスの大動脈平滑筋細胞の MMP 酵素活性をゼラチンザイモグラフィにより測定した。動脈硬化、大動脈瘤病変に関係している MMP-2,9,12 の酵素活性を中心に検討した。

3. 結果

形態的には Basal の状態では、弾性線維の性状、大動脈の径に関しては大きな違いはみられなかった。Basal の大動脈のマイクロアレイの結果から、弾性線維の構成要素である Elastin、Lysyl oxidase、Fibrillin-1、Fibrillin-2 は EP4TG でコントロールマウスに比べて差はなかった。

弾性線維の分解に関することに関しては、Basal の状態では過大発現群で MMP-2 活性が有意に上昇していた。アンジオテンシン II を負荷した状態の大動脈ではコントロール群に比べて過大発現群で、MMP-2、MMP-9 の酵素活性が上昇していた。また IL-6 をエライザを用いて測定するとコントロール群に比べて、過大発現群で上昇していた。

4. 考察

これらの結果より血管平滑筋の EP4 シグナルは弾性線維の形成には影響を与えないが、アンジオテンシン II 存在下で MMP-2 や MMP-9 の酵素活性を上昇させ、弾性線維の分解が亢進することで血管弾性を低下させることが示唆された。

5. 学会・論文発表

【論文】

1. Aoki R, Yokoyama U, **Ichikawa Y**, Kumagaya S, Ishiwata R, Fujita S, Umemura M, Fujita T, Minamisawa S, Iwasaki S, Nishimaki S, Seki Kazuo, Yokota S and Ishikawa Y Decreased serum osmolality augments the closure of ductus arteriosus in neonates., *Cardiovasc Res*, in press
2. Ishiwata R, Yokoyama U, **Ichikawa Y**, Umemura M, Fujita T, Minamisawa S, Matsusaki M, Akashi M, Ishikawa Y. Three-Dimensional Multilayers of Smooth Muscle Cells Is a New Experimental Model for Studies of Vascular Elastic Fiber Formation, *Arteriosclerosis*, 2014 ;233(2):590-600

【学会】

1. **Ichikawa Y**, Yokoyama U, Iwamoto M, Yokota S, Minamisawa S, Ishikawa Y, Prostaglandin E2 Receptor EP4 Signaling in Vascular Smooth Muscle Decreased Elasticity of the Aorta., **ダラス、2013年AHA**,

<奨励研究助成>

**Fluorescent patient-derived orthotopic xenograft を用いた
膵癌微小環境の生体内リアルタイムイメージング**

廣島 幸彦

横浜市立大学大学院医学研究科 消化器・腫瘍外科学

抄 録

膵癌微小環境 (Tumor microenvironment; TME) には CAF (cancer associated fibroblast) や TAM (Tumor associated macrophage) と称される活性化された線維芽細胞やマクロファージなどが存在し、癌の進展を多面的に促進させ、抗癌剤耐性にも関与している事が実証され、TME は癌治療の新たな標的として注目を集めている。我々は、膵癌患者から樹立したヒト癌組織ライン (Patient Derived Xenograft; PDX) の TME を蛍光タンパクで標識したモデル (fluorescent-PDX モデル) を開発した。本研究の目的は、fluorescent-PDX モデルを用い、TME の生体内における変化をリアルタイムに観察し、膵癌細胞と TME 間の相互作用を解明することである。本研究では、SMAD4 欠失型膵癌細胞株 (BxPC3) は、SMAD4 野生型 (MIAPaCa2) と比較し、有意に TGF β 1 の発現が上昇していることを証明した。さらに RFP ノードマウスへの同所移植モデルを用いることにより、マウスの生体内においてリアルタイムに腫瘍内の間質量を測定することが可能となった。そして BxPC3 において、RFP 発現間質が増生していることを証明した。同様に、SMAD4 欠失型 (PTAX52)、野生型 (PTAX70) の PDX を樹立し、fluorescent-PDX モデルを使用し、PDX モデルにおいても SMAD4 欠失型膵癌 (PTAX52) で RFP 発現間質が増生していることをリアルタイムに確認した。

Fluorescent patient-derived orthotopic xenograft を用いた 膵癌微小環境の生体内リアルタイムイメージング

廣島 幸彦

横浜市立大学大学院医学研究科 消化器・腫瘍外科学

1. 目的

膵癌微小環境 (Tumor microenvironment; TME) には CAF (cancer associated fibroblast) や TAM (Tumor associated macrophage) と称される活性化された線維芽細胞やマクロファージなどが存在し、癌の進展を多面的に促進させ、抗癌剤耐性にも関与している事が実証され、TME は癌治療の新たな標的として注目を集めている。我々は、膵癌患者から樹立したヒト癌組織ライン (Patient Derived Xenograft; PDX) の TME を蛍光タンパクで標識したモデル (fluorescent-PDX モデル) を開発した。本研究の目的は、fluorescent-PDX モデルを用い、TGF β R1 阻害薬による TME の生体内における変化をリアルタイムに観察し、膵癌細胞と TME 間の相互作用を解明することである。

2. 方法

(I) 膵癌細胞株同所移植モデル (SMAD4 野生型、欠失型) の作成。

SMAD4 野生型、欠失型膵癌細胞株を同定するため、数種類の膵癌細胞株における SMAD4、TGF β の発現量を Realtime PCR により測定した。SMAD4 野生型、欠失型、各々の膵癌細胞株 (GFP ラベルされた細胞) をヌードマウスの皮下に 1×10^6 cells 移植した。数週間後、成長した皮下腫瘍片を摘出、細分化し、RFP 発現トランスジェニックヌードマウスの膵尾部に移植した (同所移植モデル)。腫瘍の生着を確認後、麻酔下にマウスの膵尾部と腫瘍を露出し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV1000) にて Intravital imaging を行い、腫瘍内の間質量を観察した。

(II) Fluorescent-PDX モデルの作成。

SMAD4 野生型、欠失型、各々の膵癌患者から摘出された癌組織の一部を摘出後可及的速やかに免疫不全マウス (NOD/SCID or Nude mouse) の皮下に移植した。数週間後、成長した皮下腫瘍片を摘出、細分化し、RFP 発現トランスジェニックヌードマウスの膵尾部に移植した。腫瘍の生着を確認後、麻酔下にマウスの膵尾部と腫瘍を露出し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV1000) にて Intravital imaging を行い、腫瘍内の間質量を観察した。

3. 結果

(I) 膵癌細胞株同所移植モデル (SMAD4 野生型、欠失型) の作成。

4 種類の膵癌細胞株 (Panc1, MIAPaCa2, BxPC3, Hs766T) における SMAD4、TGF β 1 の発現を Realtime PCR により測定した (図 1)。

BxPC3, Hs766T において、SMAD4 の発現は認められず、BxPC3, Hs766T を SMAD4 欠失型膵癌細胞株と同定した。また、SMAD4 欠失型細胞株において有意に TGF β 1 の発現が上昇していた。

次に、BxPC3 を SMAD4 欠失型、MIAPaCa2 を SMAD4 野生型膵癌細胞株としてヌードマウスの皮下に移植し、さらに成長した皮下腫瘍片を摘出、細分化し、RFP 発現トランスジェニックヌードマウスの膵尾部に移植し、同所移植モデルを作成した。腫瘍の生着を確認後、麻酔下に Intravital imaging を行い、腫瘍内の間質を観察した (図 2)。

BxPC3 腫瘍では、MIAPaCa2 と比較し、RFP 発現間質が増生していた。

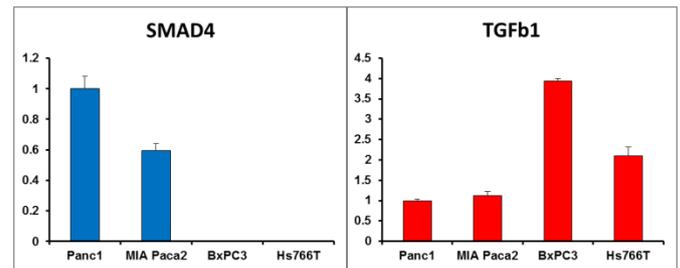


図 1 膵癌細胞株における SMAD4、TGF β 1 の発現

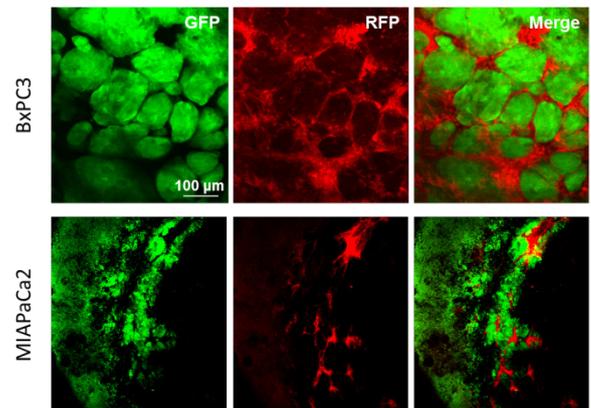


図 2 膵癌細胞株同所移植モデルにおける RFP 発現間質の観察

(II) Fluorescent-PDX モデルの作成。

上記のように、SMAD4 野生型、欠失型、各々の膵癌患者から摘出された癌組織の一部から PDX を作成し、組織学的に SMAD4 の発現を確認した (図 3)。

PTAX52 を SMAD4 欠失型、PTAX70 を SMAD4 野生型 PDX として RFP 発現トランスジェニックヌードマウスの膵尾部に移植し、Fluorescent-PDX モデルを作成した。腫瘍の生着を確認後、麻酔下に Intravital imaging を行い、腫瘍内の間質を観察した (図 4)。

PTAX52 腫瘍では、PTAX70 と比較し、RFP 発現間質が増生していた。

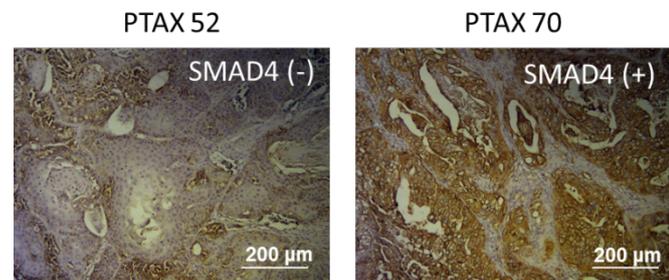


図 3 膵癌 PDX における SMAD4 の発現

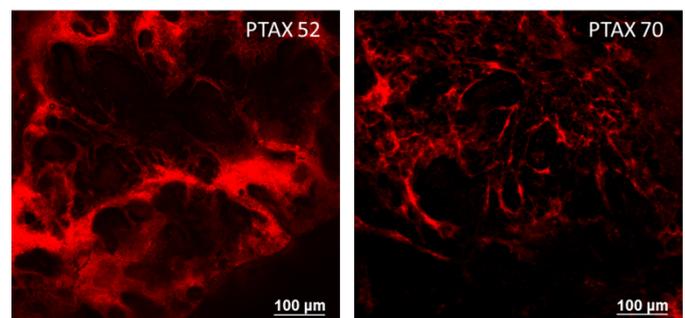


図 4 膵癌 PDX 同所移植モデルにおける RFP 発現間質の観察

4. 考察

TME の増生に重要な働きをしているのが Transforming growth factor-beta (TGF- β) である。

TGF- β は SMAD4 を介して上皮細胞の増殖を抑制している一方、膵癌組織において高発現し、TME を構築、膵癌の進展を促進させ、予後を増悪させている。(Bardeesy N et al.: Nature Rev.Cancer, 2, 897, 2002; Friess H et al.: Gastroenterology, 105, 1846, 1993) SMAD4 欠失膵癌では、TGF- β による増殖抑制作用を回避していると同時に、ポジティブフィードバックにより TGF- β の発現が上昇し、TME の増生を介して癌の進展を促進している可能性が示唆されている。本研究では、SMAD4 欠失型膵癌細胞株 (BxPC3) は、SMAD4 野生型 (MIAPaCa2) と比較し、有意に TGF β 1 の発現が上昇していることを証明した (図 1)。さらに RFP ノードマウスへの同所移植モデルを用いることにより、マウスの生体内においてリアルタイムに腫瘍内の間質量を測定することが可能となった。そして SMAD4 欠失型膵癌細胞株 (BxPC3) において、RFP 発現間質が増生していることを証明した (図 2)。同様に、SMAD4 欠失型 (PTAX52)、野生型 (PTAX70) の PDX を樹立し (図 3)、RFP ノードマウスへ同所移植し、PDX モデルにおいても SMAD4 欠失型膵癌 (PTAX52) で RFP 発現間質が増生していることをリアルタイムに確認した (図 4)。今後はこれらのモデルに TGF β 阻害薬を投与し、間質の変化とそれに伴うドラッグデリバリーへの影響などを検討していく予定である。

5. 論文 及び 学会発表

Efficacy of Salmonella typhimurium A1-R versus chemotherapy on a pancreatic cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX).

Hiroshima Y, Zhao M, Maawy A, Zhang Y, Katz MH, Fleming JB, Uehara F, Miwa S, Yano S, Momiyama M, Suetsugu A, Chishima T, Tanaka K, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM.

J Cell Biochem. 2014 Jul;115(7):1254-61. doi: 10.1002/jcb.24769.

Establishment of a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) model of patient cervical cancer

Yukihiko Hiroshima¹, Yong Zhang¹, Ali Maawy², Sho Sato³, Takashi Murakami³, Mako Yamamoto¹, Fuminari Uehara¹, Shinji Miwa¹, Shuya Yano¹, Masashi Momiyama³, Takashi Chishima³, Kuniya Tanaka³, Ali Maawy², Itaru Endo³, Robert M. Hoffman¹. **AACR annual meeting, April 5-April 9, 2014, San Diego**

The advantages of patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) of metastatic cervical cancer for individualized therapy compared to the PDX model

Yukihiko Hiroshima¹, Yong Zhang¹, Ali Maawy², Sho Sato³, Takashi Murakami³, Mako Yamamoto¹, Fuminari Uehara¹, Shinji Miwa¹, Shuya Yano¹, Masashi Momiyama³, Takashi Chishima³, Kuniya Tanaka³, Michael Bouvet², Itaru Endo³, Robert M. Hoffman¹. **AACR annual meeting, April 5-April 9, 2014, San Diego**

<若手研究助成>

内在性 NgR1 アンタゴニスト LOTUS による嗅索側枝形成機構の解明

池谷 真澄

横浜市立大学大学院 生命医科学研究科

嗅覚情報の2次投射伝導路である嗅索 (Lateral Olfactory Tract: LOT) の形成過程において、LOT usher substance (LOTUS) が Nogo 受容体(NgR1)のアンタゴニストとして働き、軸索の束化に寄与することが知られている。NgR1 とそのリガンドである Nogo は成体における神経再生阻害因子として知られているが、発生期における存在意義は不明な点が多い。LOTUS、Nogo、NgR1 が LOT の束化が完了した胎生 14 日目以降にも発現していることが明らかになった。そこで、本研究では LOT の形成過程において軸索束形成の後に起こる軸索側枝形成に注目し、LOTUS と NgR1 の相互作用が軸索側枝形成にどのように関わるかを明らかにすることを研究目的とした。LOTUS ノックアウト(KO)マウスの培養嗅球ニューロンにおいて軸索側枝の数が増加し、NgR1-KO マウスにおいては軸索側枝の数が減少した。また、Nogo の shRNA を用いたノックダウン実験においても軸索側枝の減少が観察された。更に、胎生 18 日目の LOTUS-KO マウスの LOT の軸索側枝を観察した所、側枝の数の増加が観察され、NgR1-KO マウスと LOTUS/NgR1-ダブル KO マウスにおいては減少が観察された。これらのことより LOTUS が Nogo-NgR1 シグナリングを通じた軸索側枝形成を制御することによって、LOT の軸索側枝形成に寄与しておることが明らかになった。

内在性 NgR1 アンタゴニスト LOTUS による嗅索側枝形成機構の解明

池谷 真澄

横浜市立大学大学院 生命医科学研究科

1. 目的

嗅覚情報の2次投射伝導路である嗅索 (Lateral Olfactory Tract: LOT) の形成過程において、LOT usher substance (LOTUS) が Nogo 受容体(NgR1)のアンタゴニストとして働き、軸索の束化に寄与することが知られている。NgR1 とそのリガンドである Nogo は成体における神経再生阻害因子として知られているが、発生期における存在意義は不明な点が多い。本研究では LOT の形成過程において軸索束形成の後に起こる軸索側枝形成に注目し、LOTUS と NgR1)の相互作用が軸索側枝形成にどのように関わるかを明らかにすることを目的とした。LOTUS と NgR1 の相互作用が嗅索側枝形成に関与することが明らかになれば、NgR1 の生物学的な存在意義の理解につながり、NgR1 が関与する神経変性疾患や脳損傷との関連性が明らかになる可能性がある。障害を受けた時に消失した神経機能の再建のための治療法の分子基盤を考える上でも有用である。

2. 方法

・免疫組織染色

胎生 14,16,18 日目のマウス終脳半球を取り出し、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定した後に

LOTUS, NgR1, Nogo に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

・shRNA 実験

胎生 14.5 日目のマウスから嗅球を取り出しトリプシン処理によって細胞を分散し、ポリ-L-リジンでコートしたガラスベースディッシュ上で 1 日培養 (37°C)、レンチウィルスを用いて Nogo の shRNA を細胞に導入し Nogo、その後 6 日間培養を行い、4%PFA で固定した後に Nogo に対する抗体を使った免疫染色によって Nogo のノックダウンを確認した。

・DiI トレーシング

胎生 18 日目のマウス終脳半球を取り出し、4%PFA で固定後に DiI を嗅球に埋め込み、そのまま PFA 内で 37°C、3 週間静置した後に、蛍光顕微鏡にて LOT の軸索側枝を観察した。

3. 結果

LOTUS、Nogo、NgR1 は LOT の束が形成される胎生 12 日目と 13 日目に存在することが我々の先行研究によって明らかとなっている(Sato et al. 2011)。束化が完了した胎生 14 日目以降に軸索側枝が形成されることが知られており、LOT マーカーである Nrp1 抗体を用いた免疫染色法によって軸索を可視化し、胎生 16 日目において軸索側枝を確認した(図 1A-E)。今回、胎生 14 日、16 日、18 日目のマウス終脳の染色を行ったところ、LOT の束化が完了した胎生 14 日目以降にも発現していることが明らかになった(図 1F-N)。また、

LOTUS においては軸索側枝にも発現が認められ、軸索側枝形成に関与していると予測された(図 1G2,H2)。

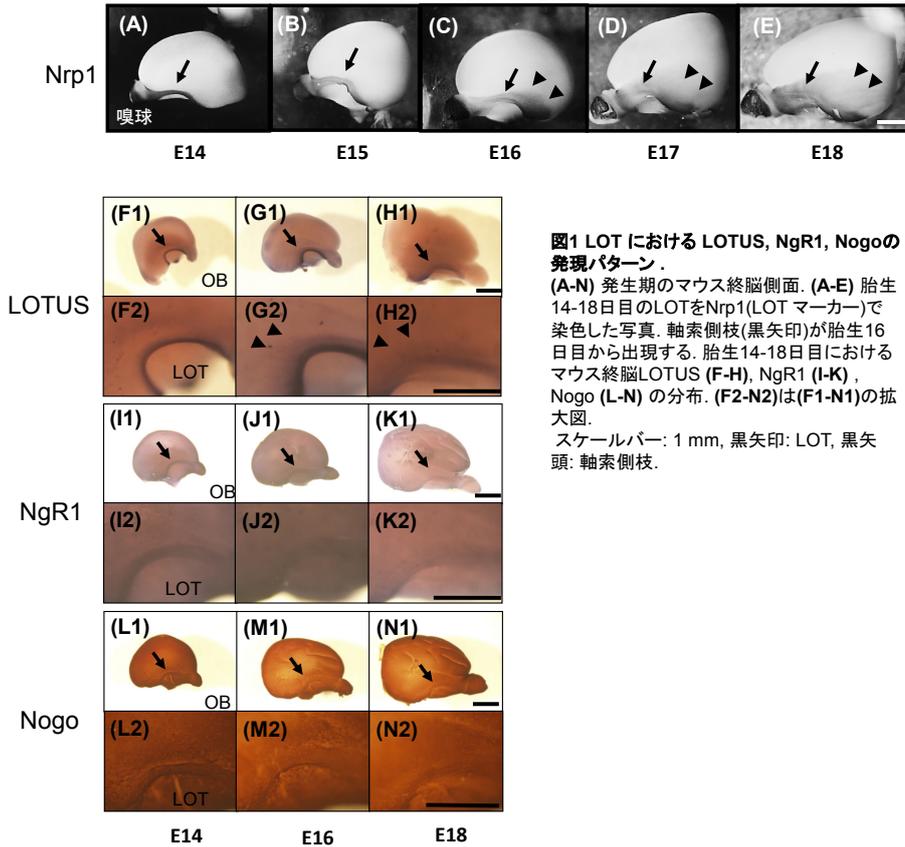


図1 LOT における LOTUS, NgR1, Nogo の発現パターン.
 (A-N) 発生期のマウス終脳側面. (A-E) 胎生14-18日目のLOTをNrp1(LOT マーカー)で染色した写真. 軸索側枝(黒矢印)が胎生16日目から出現する. 胎生14-18日目におけるマウス終脳LOTUS (F-H), NgR1 (I-K), Nogo (L-N) の分布. (F2-N2)は(F1-N1)の拡大図.
 スケールバー: 1 mm, 黒矢印: LOT, 黒矢頭: 軸索側枝.

先行研究において LOTUS が NgR1 シグナリングを抑制することが知られている(Sato et al. 2011)。そこで、LOTUS による NgR1 シグナリングの抑制が軸索側枝形成に関与しているかどうか培養嗅覚ニューロンの初代培養を用いて検討した。野生型マウスと比べて LOTUS ノックアウト(KO)マウスの培養嗅球ニューロンにおいては軸索側枝の数が

が増加し、NgR1-KO マウスにおいては軸索側枝の数が減少した(図 2A-E)。また、shRNA を用いた Nogo のノックダウン実験においても軸索側枝の減少が観察された(図 2A-E)。こ

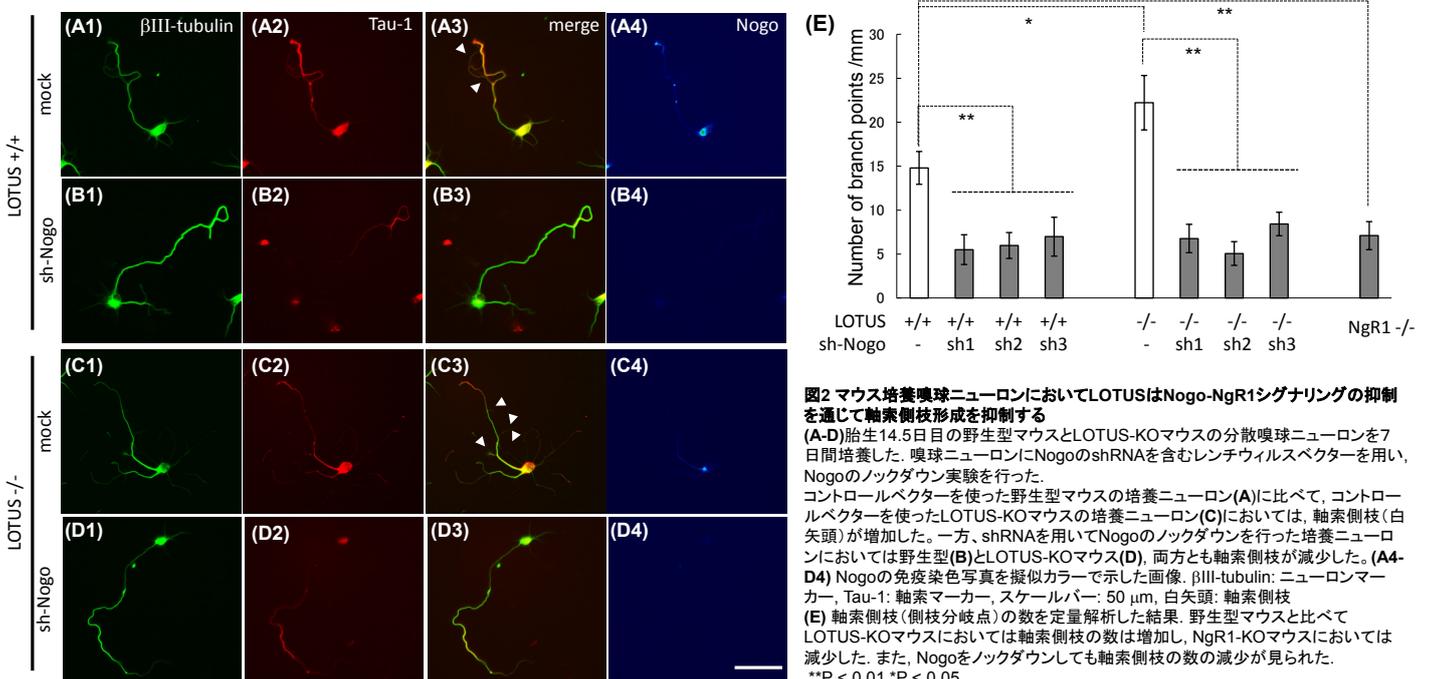


図2 マウス培養嗅球ニューロンにおいてLOTUSはNogo-NgR1シグナリングの抑制を通じて軸索側枝形成を抑制する
 (A-D)胎生14.5日目の野生型マウスとLOTUS-KOマウスの分散嗅球ニューロンを7日間培養した。嗅球ニューロンにNogoのshRNAを含むレンチウイルスベクターを用い、Nogoのノックダウン実験を行った。
 コントロールベクターを使った野生型マウスの培養ニューロン(A)に比べて、コントロールベクターを使ったLOTUS-KOマウスの培養ニューロン(C)においては、軸索側枝(白矢頭)が増加した。一方、shRNAを用いてNogoのノックダウンを行った培養ニューロンにおいては野生型(B)とLOTUS-KOマウス(D)、両方とも軸索側枝が減少した。(A4-D4) Nogoの免疫染色写真を擬似カラーで示した画像。βIII-tubulin: ニューロンマーカー, Tau-1: 軸索マーカー, スケールバー: 50 μm, 白矢頭: 軸索側枝
 (E) 軸索側枝(側枝分岐点)の数を定量解析した結果。野生型マウスと比べて LOTUS-KOマウスにおいては軸索側枝の数は増加し、NgR1-KOマウスにおいては減少した。また、Nogoをノックダウンしても軸索側枝の数の減少が見られた。
 **P < 0.01 *P < 0.05

のことより LOTUS が、Nogo-NgR1 シグナリングによって起こる軸索側枝の発生を LOTUS が抑制していることが明らかとなった。

最後に、胎生 18 日目の LOTUS-KO マウスの LOT の軸索側枝を蛍光色素 DiI によって可視化した所、生体内においても野生型と比べて軸索側枝の数の増加が観察され(図 3 C,F)、NgR1-KO マウスと LOTUS/NgR1-ダブル KO マウスにおいては減少が観察された(図 3 D,E,G,H)。これらのことより LOTUS が Nogo-NgR1 シグナリングを通じた軸索側枝形成

を制御することによって、LOT の軸索側枝形成に寄与していることが明らかとなった。

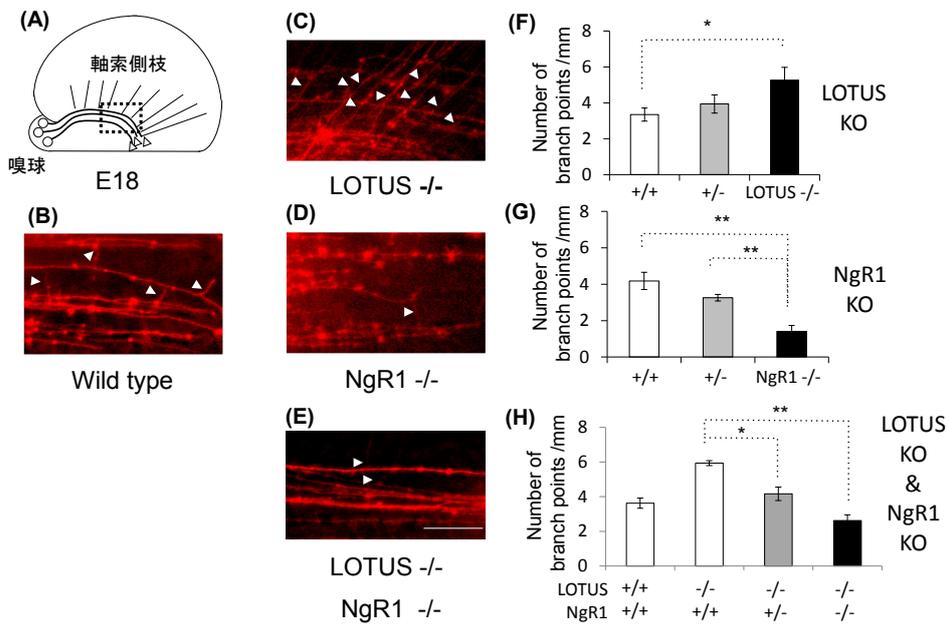


図 3 LOTUS と NgR1 は LOT の軸索側枝形成に寄与する。
(A) 胎生 18 日目マウス終脳側面の模式図。点線で囲んだ枠内を解析した。
(B-E) Lateral 胎生 18 日目の野生型マウス、LOTUS-KO マウス、NgR1-KO マウス、LOTUS/NgR1 ダブル-KO マウスの終脳側面。野生型マウス **(B)** に比べ LOTUS-KO マウス **(C)** では軸索側枝 (白矢頭) が増加し、NgR1-KO マウス **(D)**、LOTUS/NgR1 ダブル-KO マウス **(E)** においては減少していた。スケールバー: 50 μ m。白矢頭: 軸索側枝
(F-H) 軸索側枝の数の定量解析結果。 **(F)** 野生型、LOTUSヘテロ(+/-)、LOTUS-KO(-/-)マウスの比較。 **(G)** は野生型、NgR1ヘテロ(+/-)、NgR1-KO(-/-)マウスの比較。 **(H)** は LOTUS-KO(-/-)マウスを遺伝的背景とした NgR1 野生型(+/+), NgR1ヘテロ(+/-), NgR1-KO(-/-)マウスの比較 ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$

4. 考察
 今回、LOTUS が Nogo-NgR1 シグナリングの制御を通じて LOT

の軸索側枝形成に寄与していることが明らかとなった。LOTUS は唯一の内在性の NgR1 拮抗物質として見出されたものであり (Sato, et al. 2011)、未解明の部分が多い。LOTUS の結合相手である NgR1 は Nogo などの神経再生阻害因子の受容体として有名な分子だが (GrandPre, et al. 2002)、その生理機能はあまり知られていない。LOTUS は内在性の NgR1 アンタゴニストであるので、LOTUS と NgR1 の結合が NgR1 機能の ON/OFF を決める制御要因となる。このような観点から NgR1 の機能を推察する先行研究は無い。今回、発生期の軸索側枝形成に LOTUS と NgR1 の相互作用が関与することが明らかとなり、NgR1 の生物学的な存在意義の理解につながった。また、LOT の軸索側枝形成に関してはカルマン症候群関連分子である Anosmin-1 が存在し、軸索側枝形成と病態との関連性が報告されており (Soussi-Yanicostas et al. 2002)、同様に LOTUS と NgR1 の関係も関わる可能性がある。また、Nogo と NgR1 は中枢神経に広く局在している為、LOT 以外での LOTUS との相互作用も予想され、Nogo と NgR1 が関与する神経変性疾患や脳損傷との関連性が明らかになる可能性がある。最近、我々は Nogo 以外の NgR1 と結合する神経再生阻害因子も同

様に LOTUS が抑制することを発見しており (Kurihara et al. 2014)、これらを含めて、障害を受け消失した神経機能再建のための治療法を考える上で重要であると考ええる。

4. 論文及び学会発表

Kurihara Y, **Iketani M**, Ito H, Nishiyama K, Sakakibara Y, Goshima Y, Takei K. LOTUS suppresses axon growth inhibition by blocking interaction between Nogo receptor-1 and all four types of its ligand. Mol Cell Neurosci. 61, 211-218, 2014

＜若手研究助成＞

エイコサペンタエン酸（EPA）を用いた大腸癌化学予防

日暮琢磨

高橋宏和 遠藤宏樹 細野邦弘 酒井英嗣 大久保秀則

医学研究科 肝胆膵消化器病学

EPA はイワシなどの青魚に豊富に含まれる ω 3 脂肪酸のひとつであり，家族性腺腫瘍患者のポリープを縮小させたと報告されており，EPA による大腸腫瘍抑制効果の可能性がある．今回，我々は EPA の大腸腫瘍化学予防効果を検討するために，大腸腫瘍のサロゲートマーカーである直腸 ACF をターゲットとした無作為対照試験を実施した．

切除予定の大腸ポリープを有する 28 名が本試験に参加した．初回内視鏡時に直腸の ACF のカウント，ポリープ・正常大腸上皮より生検を行った．無作為に EPA 群とプラセボ群に割り付けを行った．EPA 群は EPA0.9 g を 1 日 3 回内服した．プラセボ群はオレイン酸 0.9 g を 1 日 3 回内服した．ポリープ切除までの 5 週間試験薬を内服後にポリープ切除を行い，初回内視鏡と同様の検査を行い検査前後，両群間で，ACF 数，細胞増殖・細胞死を比較検討した．

両群とも軽度の嘔気の他は重篤な副作用は認めず，脱落者はいなかった．EPA 群は ACF が前後で有意に低下したが，プラセボ群は変化を認めなかった．

本試験は EPA を用いたヒト ACF を対象とした世界初の二重盲検無作為対照試験である．今後の更なる臨床応用が期待される．

エイコサペンタエン酸 (EPA) を用いた大腸癌化学予防
日暮琢磨
高橋宏和 遠藤宏樹 細野邦弘 酒井英嗣 大久保秀則
医学研究科 肝胆膵消化器病学

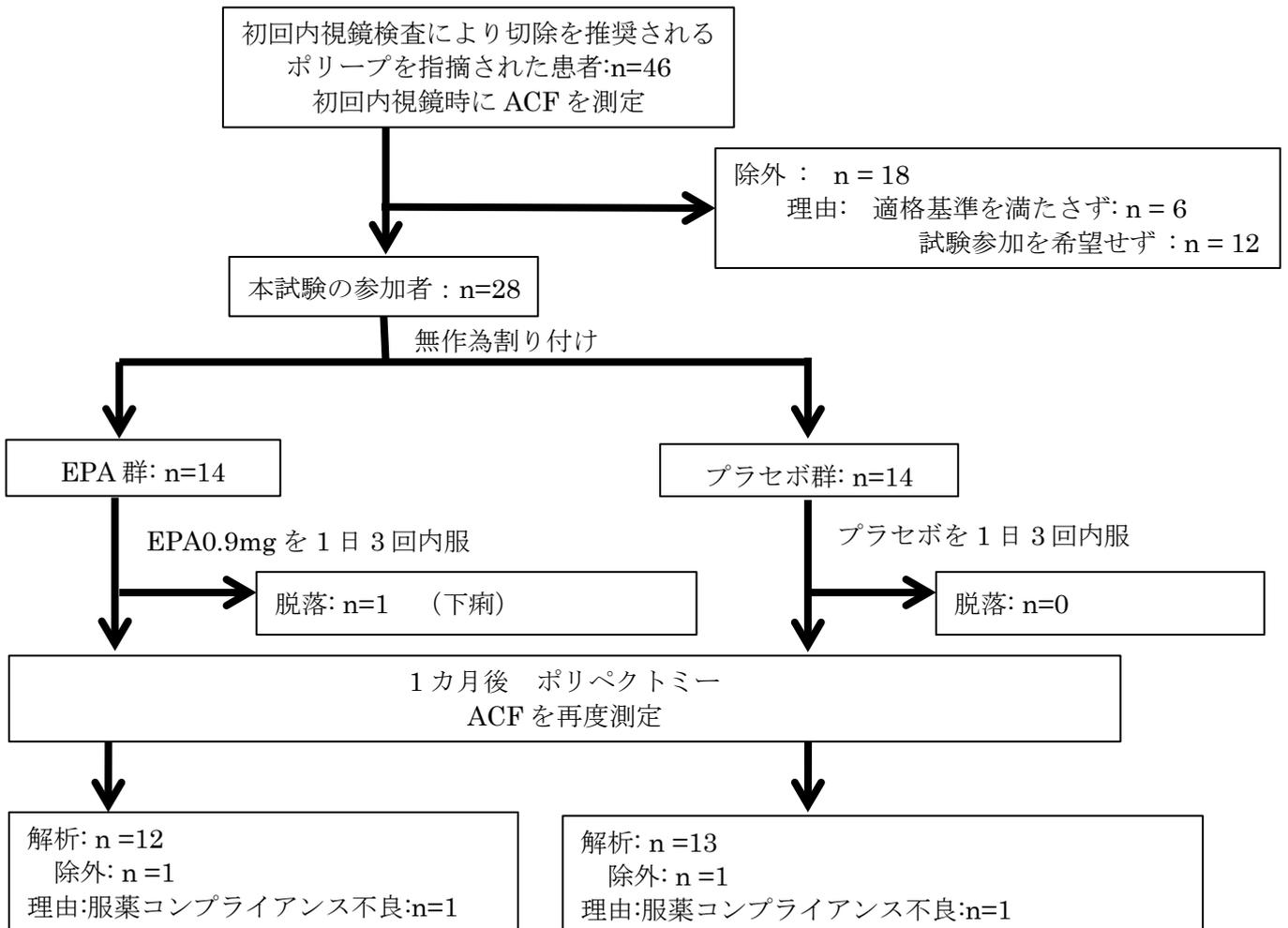
1. 目的

エイコサペンタエン酸 (EPA) はイワシなどの青魚に豊富に含まれる ω 3脂肪酸のひとつであり、大規模臨床試験 JELIS において冠動脈疾患を有意に予防し、すでに脂質異常症・閉塞性動脈硬化症などにおいて臨床応用されている。消化器領域においては、家族性腺腫瘍患者のポリープを縮小させたと報告されており、EPA による大腸腫瘍抑制効果の可能性がある。今回、我々は EPA の大腸腫瘍化学予防効果を検討するために、大腸腫瘍のサロゲートマーカーである直腸 ACF をターゲットとした無作為対照試験を実施した。

2. 方法

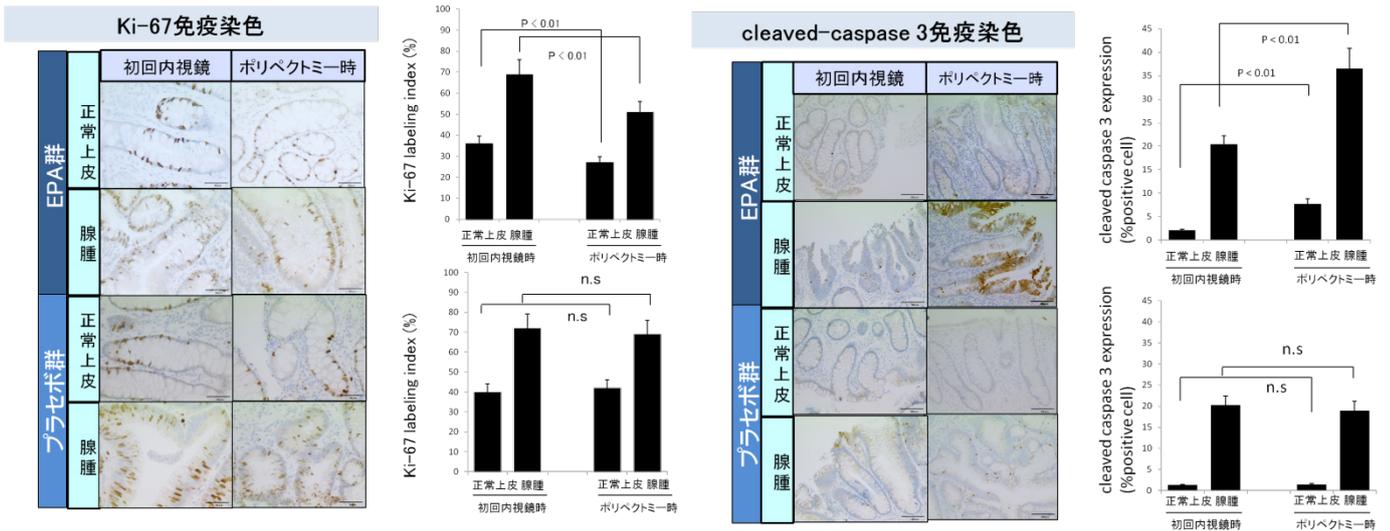
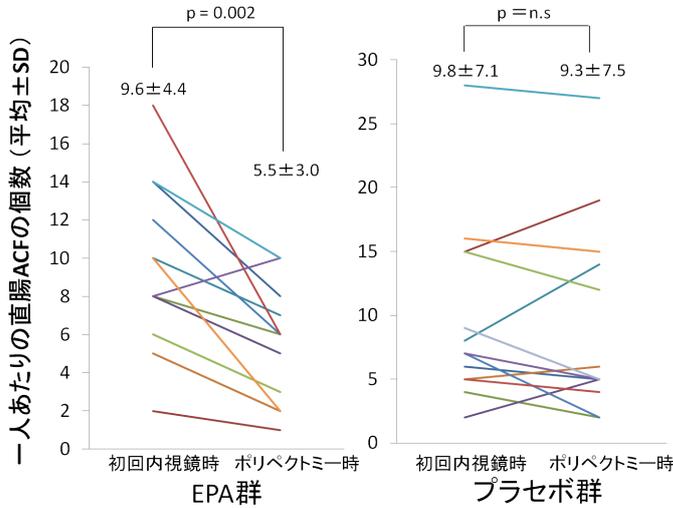
切除予定の大腸ポリープを有する 28 名が本試験に参加した。初回内視鏡時に直腸の ACF のカウント、ポリープ・正常大腸上皮より生検を行った。無作為に EPA 群とプラセボ群に割り付けを行った。EPA 群は EPA0.9g を 1 日 3 回内服した。プラセボ群はオレイン酸 0.9g を 1 日 3 回内服した。ポリープ切除までの 5 週間試験薬を内服後にポリープ切除を行い、初回内視鏡と同様の検査を行い検査前後、両群間で、ACF 数、細胞増殖・細胞死を比較検討した。

【本研究の流れ】



3. 結果

両群とも軽度の嘔気の他は重篤な副作用は認めず、脱落者はいなかった。EPA 群は ACF が前後で有意に低下したが（前 9.6 ± 4.4 , 後 5.5 ± 3.0 , $p=0.002$ ），プラセボ群は変化を認めなかった（前 9.8 ± 7.1 , 後 9.3 ± 7.5 , $p=n.s.$ ）。EPA 群では正常大腸上皮, ポリープで細胞増殖が抑制され, アポトーシスも増加していたが, プラセボ群では細胞増殖・細胞死の変化は認めなかった。



4. 考察

本試験はEPAを用いたヒトACFを対象とした世界初の二重盲検無作為対照試験である。EPAは正常大腸上皮・ポリープにおいて細胞増殖を抑制し、細胞死を増加させ、ACFを減少させた。EPAの化学予防効果の機序としては、アラキドン酸などの ω 6脂肪酸と競合的に作用しCOX-2の抑制する機序などがこれまで報告されている。また最近糖脂質の代謝を制御するG蛋白共役受容体120のアゴニストがEPAであることが報告され大腸化学予防のメカニズムとして注目されている。今後の更なる臨床応用が期待される。

5.論文

和文総説

エイコサペントエン酸（EPA）は大腸上皮の増殖を抑制し直腸ACFを減少させる：二重盲検無作為対照試験 横浜市立大学 日暮琢磨、内山詩織、山田英司、大久保秀則、酒井英嗣、遠藤宏樹、高橋宏和、中島淳 消化と吸収 Vol. 36 No.2 '13

学会発表

日暮 琢磨、中島 淳 エイコサペントエン酸（EPA）は大腸上皮の増殖を抑制しACFを減少させる：二重盲検無作為対照試験 2013年度日本消化器関連学会週間（JDDW 2013） パネルディスカッション3（消化吸収学会・消化器病学会合同）機能性食品や補助食品の消化器疾患における役割 平成25年10月9日 東京

<若手研究助成>

孔脳症の分子病理の解明

小寺 啓文

横浜市立大学大学院 医学研究科 遺伝学

抄録:孔脳症 (porencephaly) は、小児の脳性麻痺、特に片麻痺の主要な原因であり、長期にわたって生活に支障をきたす先天性の難治性疾患である。胎生期における梗塞や出血といった脳循環障害により発生すると推測されており、原因遺伝子として、基底膜の構成要素である IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 (COL4A1)、および当研究室で同定に成功した IV 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖 (COL4A2) の 2 遺伝子が報告されているが、その原因の多くは不明である。我々は集積した孔脳症を伴う 42 症例を対象に全エクソーム解析を施行し、病的変異のスクリーニングをおこなった。その結果、全 42 症例中 10 例 (23.8%) において COL4A1、あるいは COL4A2 に病的変異を認めた。さらに、COL4A1 変異においては、母親が体細胞モザイクで変異を有する 1 症例を認め、COL4A2 変異においては、両親のどちらかにも変異を認めた 2 症例が確認された。本研究の症例解析により、今後の病態解明と治療・予防法の開発につながることを期待される。

孔脳症の分子病理の解明

小寺 啓文

横浜市立大学大学院 医学研究科 遺伝学

1. 目的

孔脳症 (porencephaly) は、小児の脳性麻痺、特に片麻痺の主要な原因であり、長期にわたって生活に支障をきたす先天性の難治性疾患である。胎生期における梗塞や出血といった脳循環障害により発生すると推測されており、原因遺伝子として、基底膜の構成要素である IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 (*COL4A1*)、および当研究室で同定に成功した IV 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖 (*COL4A2*) の 2 遺伝子が報告されているが、その原因の多くは不明である。当研究室は、孔脳症および裂脳症の患者の約 2 割が *COL4A1* 変異を有し、同遺伝子異常が重要な決定要因であることを明らかにしたが、依然として症例の原因の多くが説明できず、孔脳症の治療、管理方針のためにはさらなる症例の解析が必要である。本研究では、全エクソーム解析を行うことにより、*COL4A1*、*COL4A2* 遺伝子の変異解析と新規孔脳症原因遺伝子の探索を並行して進めていき、孔脳症の遺伝的要因の全体像を明らかにすることを試みた。

2. 方法

患者および健常家族(両親および同胞)からのゲノム DNA は、末梢血白血球、だ液、または臍帯のいずれかより抽出した。まず、孔脳症を呈する集積された 42 例に対し、SureSelect Human All Exon v5 Kit (Agilent Technologies 社) を用いてエクソームキャプチャーを行い、HiSeq2000 (Illumina 社) にて、ペアエンドリード解析を施行した。その後、コールされてきた遺伝子変異群より、*COL4A1*、*COL4A2* の病的変異をスクリーニングした。同定された候補遺伝子変異については、患者および健常両親の検体に対してサンガーシークエンシングを施行し、偽陽性の確認、および患児で生じた遺伝子突然変異 (*de novo* 変異) か否かの確認を行った。さらに、親が体細胞モザイクで有する変異が児に受け継がれたと考えられる場合には、患者および両親の当該変異を含む領域を PCR で増幅し、その産物を MiSeq (Illumina 社) にて、平均 17 万リードの深さで配列を読み、モザイク率を求めた。*COL4A1*、*COL4A2* の病的変異を認めなかった症例においては、健常家族に対しても同様に全エクソーム解析を施行し、新規孔脳症原因遺伝子の探索を行った。

3. 結果

全エクソーム解析を施行した孔脳症症例 42 例において、7 例 (16.7%) に *COL4A1* に変異が認められ、その中で両親検体の入手できた 3 例については、2 例が *de novo* 変異、そして 1 例が母親由来の変異であることが確認できた (図 1)。さらに、当該母親のサンガーシークエンシングの結果から、母親の有する変異は体細胞モザイクであることが疑われたため、当該変異領域を含む PCR 産物に対してディープシークエンシングを施行したところ、母親の変異アリルの割合は 9% であり、およそ 18% の細胞が変異を有している体

細胞モザイクであることが確認できた。一方、全 42 例の 3 例 (7.1%) において、*COL4A2* に変異が認められ、その中で両親検体の入手できた 2 例の変異については、1 例が父親由来、もう 1 例が母親由来であった。最終的に、全 42 症例中 10 例 (23.8%) で *COL4A1*、あるいは *COL4A2* に病的変異を認めた。

COL4A1、*COL4A2* に病的変異を認めなかった症例のうち 7 例においては、健常家族に対しても同様に全エクソーム解析を施行し、新規孔脳症原因遺伝子の探索を試みたが、研究期間内での原因特定は達成できなかった。

4. 考察

本研究において、孔脳症全 42 症例中 10 例 (23.8%) で *COL4A1* (16.7%)、あるいは *COL4A2* (7.1%) に病的変異を認め、これは以前に当研究室が報告した「孔脳症および裂脳症の患者の約 2 割に *COL4A1* 変異を認めた」という報告とおおよそ同程度の結果であった。さらに、本研究において、特に親が *COL4A1* の変異を低頻度体細胞モザイクで持つ症例を 1 例認めた。本症例では 9% の低頻度体細胞モザイクであり、サンガーシークエンシングの波形からだけではモザイクか否かの判断が難しく、正しくモザイク率を求めるためには、ディープシークエンシングによる確認を行う必要があった。*COL4A1* 変異が引き起こす症状は、*COL4A2* 変異が引き起こす症状よりも、より重い表現型を呈すると考えられており、*COL4A1* 変異の多くは *de novo* 変異として同定されている。そのため、我々の 9% モザイク率の症例では、波形から体細胞モザイクであることを予想することができたが、さらに低頻度なモザイク率であった場合、サンガーシークエンシングだけでは *de novo* 変異と誤った判断をしてしまう可能性が高いと考えられる。そのため、遺伝子検査を行う場合には、常に体細胞モザイクの可能性を念頭に置く必要があるであろう。また、研究期間内に、新規原因遺伝子の特定までには至らなかったが、今後は全エクソーム解析の結果を詳細に検討し、各々の症例で候補に挙げられた遺伝子の機能の類似点、および他の類似した疾患の原因遺伝子との関連性などからも絞り込みを進めたい。以上の通り、本研究における症例の蓄積および解析により、今後の病態解明と治療・予防法の開発につながることを期待される。

5. 論文及び学会発表

1) I. Kutuk, M.S., Balta, B., Koder, H., Matsumoto, N., Saitsu, H., Doganay, S., Canpolat, M., Dolanbay, M., Unal, E., and Dundar, M. (2014). Is there relation between COL4A1/A2 mutations and antenatally detected fetal intraventricular hemorrhage? *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 30, 419-424.

COL4A1

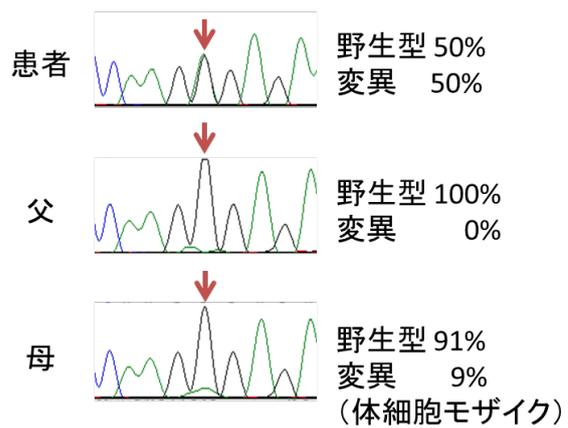


図 1. 母親に *COL4A1* の病的変異を体細胞モザイクで認めた症例

<若手研究助成>

模擬微小重力発生装置下での3次元共培養による膵島の創出

田中 慎

共同研究者：田中 寛康 関根 圭輔

臓器再生医学教室

抄録：糖尿病の患者は全世界で増加傾向であり、大きな問題となっている。近年、根本的な治療法として膵臓から膵島のみを分離し、患者の門脈内に移植する膵島移植が開発され、良好な臨床成績をあげてきているが、絶対的なドナー不足が問題となっている。このため、再生医学的アプローチに期待が寄せられており、人工多能性幹細胞（iPS細胞）からの膵β細胞の分化誘導法等の開発が盛んに試みられている。しかし、インスリン分泌能などの機能面で生体の膵β細胞には及ばず、臨床応用への道は遠いのが現状である。本研究では、生体のような細胞同士が相互作用できる環境での培養として、細胞挙動を制限している要素である重力の影響を最小限に留めることのできる模擬微小重力発生装置下で培養を行った。その結果、β細胞同志が集合し、インスリン分泌能の高い膵島を形成することに成功した。

模擬微小重力発生装置下での3次元共培養による膵島の創出

田中 慎

共同研究者：田中 寛康 関根 圭輔

臓器再生医学教室

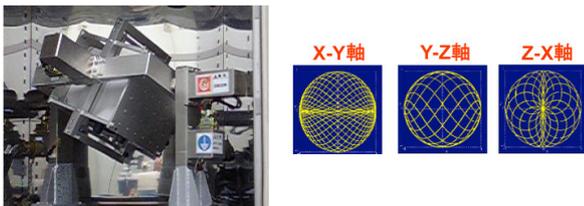
1. 目的

糖尿病の全世界の患者数は、2011年時点で推定3億6600万人、2030年には5億6600万人に達するとされる（国際糖尿病連合 糖尿病アトラス 2011年）。特に1型糖尿病は、インスリンを産生する β 細胞が破壊されることで血糖制御に異常が生じて高血糖状態に陥る疾患で、さまざまな合併症が引き起こされる。治療法として生涯にわたり毎日数回のインスリン自己注射を続ける必要があるため、QOLの低下や低血糖等の問題が生じる。近年、根本的な治療法として膵臓から膵島のみを分離し、患者の門脈内に移植する膵島移植が開発され、良好な臨床成績をあげてきているが、絶対的なドナー不足が問題となっている。このため、再生医学的アプローチに期待が寄せられており、ヒト膵 β 細胞株の樹立、胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)からの膵 β 細胞の分化誘導法等の開発が盛んに試みられている。一方、移植時の生着率向上には、細胞移植ではなく膵島として移植することが重要である。よって、臨床応用に目指す上で、膵 β 細胞から人為的に膵島を創出する方法の開発が急務である。

本研究では膵 β 細胞のモデル細胞としてマウス膵 β 細胞株(MIN6)を用い、人工膵島の大量創出を試みた。

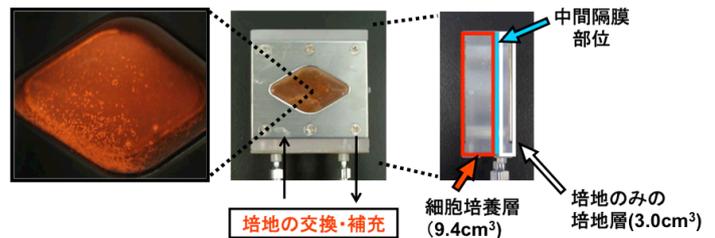
ヒト1型糖尿病治療の先行研究より、膵島のサイズは直径100-250 μ mが適していること、また、移植には約1万個の膵島が必要であることが示されており、これらを満たす膵 β 細胞スフェロイドの大量創出法を確立する必要がある。我々は膵発生の際、 β 細胞などの各種膵内分泌細胞が凝集しながら膵島を形成する点に着目した。この状態をin vitroで再現するためには、細胞挙動を制限している要素である重力の影響を最小限に留める工夫が必要と考え、模擬微小重力発生装置(クリノスタット)を用いて膵 β 細胞スフェロイドの形成を試みた。

図1. クリノスタット



直交する二軸により三次元的に対象物(試料)を回転させることにより、重力方向を連続的に変化させ、対象物が重力刺激を感受する前に方向を変えると共に、対象物にかかる重力ベクトルの合計を時間的にほぼゼロの状態にする。

図2. 培地交換システム



- ・クリノスタット内に設置され、培養液循環システムにより、常に新鮮な培地を細胞に供給可能。
- ・培地を循環させるため培養層と培地層が中間隔膜で分離されている。
- ・中間隔膜は細胞を通過させずに培養液のみを透過させる(孔密度 $10^5 \sim 6 \times 10^6$ pore/cm 2)。

2. 材料と方法

マウスβ細胞株(MIN6)を細胞密度 $2 \times 10^5 - 7 \times 10^6$ /mL にて培養容器に搭載し、クリノスタット(図1)で2日または4日間培養した(図2)。得られた膵βスフェロイドについて免疫組織化学染色、組織学的解析、定量PCRによるβ細胞関連遺伝子の発現解析、およびグルコース応答性を検討した。糖尿病モデルはC57Bl/6雄マウスにストレプトゾトシン(STZ)を150mg/kg投与により作成し空腹時血糖300mg/dl以上を糖尿病として用いた。糖尿病モデルマウス左腎皮膜下に膵βスフェロイドを移植し、空腹時血糖値の変化を測定した。

3. 結果

クリノスタット内で膵β細胞スフェロイド形成に必要な培養期間を検討したところ4日間培養することで、膵βスフェロイドを形成する条件を見出した。特に搭載細胞密度が 6×10^6 , 7×10^6 cells/mL の場合、1000個以上の大量の膵β細胞スフェロイドが創出された(図3)。また、この搭載細胞密度では、直径100–250μmの膵β細胞スフェロイドの比率も増大した(図3)。創出した膵β細胞スフェロイドを組織学的に解析すると、膵島と類似した構造が観察され、免疫染色により膵β細胞特異的タンパク質であるインスリンおよびC-ペプチドの発現も確認された。膵β細胞関連遺伝子の発現を検討した結果、静置培養群と比較して膵β細胞スフェロイドでは複数の膵β細胞関連遺伝子の発現上昇が見られた。さらに、グルコース応答性の有無を検討したところ、グルコース濃度に応じたインスリン分泌が確認された。以上のことから、膵島移植に適した膵β細胞スフェロイドを大量に創出する方法を確立した。また、創出した膵β細胞スフェロイドは静置培養群よりも機能的に優れていることが示唆された。

次に創出した膵β細胞スフェロイドの糖尿病治療効果を検討した。ストレプトゾトシン(STZ)投与により膵β細胞を破壊した糖尿病モデルマウスを対象とし、直径100–250μmの膵β細胞スフェロイドを左腎皮膜下に50–100個移植した。移植直後から、空腹時血糖が正常値まで大幅に改善し、高血糖状態からの脱却が認められた。また、移植24日後までの観察の結果、持続的な血糖降下作用が確認された。移植24日目に左腎とともに移植片を摘出すると再び高血糖状態に陥ったことから、血糖降下作用が移植した膵β細胞スフェロイドによるものであることが確認された(図4)。

図3. 搭載細胞密度の検討

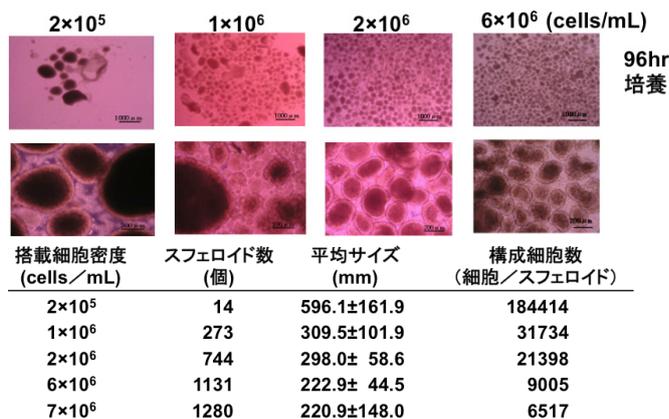
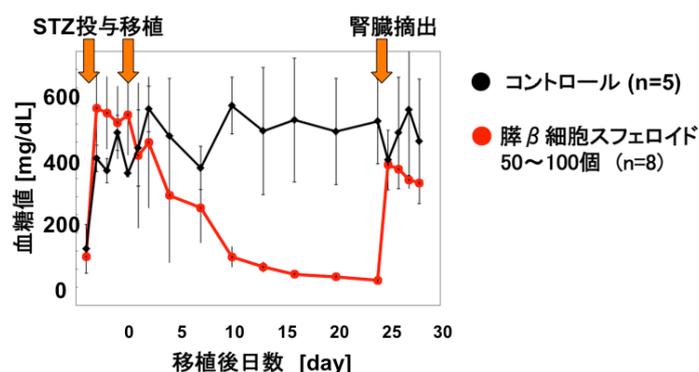


図4. 膵β細胞スフェロイドの移植による糖尿病モデルマウスの高血糖の改善



4. 考察

以上、本研究ではクリノスタットを用い、膵 β 細胞からヒト1型糖尿病治療に最適な100-250 μm の機能的な膵島様組織を大量に創出する方法を開発した。今後、ヒト膵 β 細胞株の樹立、あるいはES細胞/iPS細胞から β 細胞へ分化誘導が達成されれば、本研究により確立したクリノスタットによる三次元培養法と組合せることで、移植効果の高いヒト膵島様組織を大量に創出できると期待される。

5. 論文及び学会発表

Shin Tanaka², Hiroyasu Tanaka², Keisuke Sekine², Sayaka Kita, Ai Okamura, Takanori Takebe, Yun-Wen Zheng, Yasuharu Ueno, Junzo Tanaka, Hideki Taniguchi

² These authors contributed equally to this work.

The generation of pancreatic β -cell spheroids in a simulated microgravity culture system
Biomaterials, 34: 5785-5791, 2013

<若手研究助成>

人工ヒト癌幹細胞モデルを用いた癌幹細胞特異的モノクローナル抗体の作製

渡邊夕紀子

横浜市立大学 医学部 微生物学

抄録

現在、癌幹細胞を標的とする革新的癌治療薬開発が期待されている。我々はこれまでの研究で、ヒト不死化乳腺上皮細胞由来の癌幹細胞モデル(induced cancer stem cell: iCSC)の作製に成功した(Nishi et al. *Oncogene*, 2013)。本研究課題ではこの iCSC を用いて、癌幹細胞の膜抗原を特異的に認識し、癌幹細胞のニッチ形成や自己複製能、多分化能を抑制する癌幹細胞特異的モノクローナル抗体の作製、及び、癌幹細胞を標的とした新たな治療法・診断法の確立を目的とし、1. 癌幹細胞特異的抗体の作製、2. 癌幹細胞特異的発現因子の検証をおこなった。FACS 及びマイクロアレイ等の結果より、チロシンキナーゼ ABL1 が iCSC の細胞膜表面に高発現していることが明らかとなった。また、ABL1 に対する阻害剤または siRNA を投与した iCSC では、細胞の生存率および増殖能の低下が確認された。これらの結果より、癌幹細胞の自己複製能および多分化能の維持に ABL1 が重要な役割を果たすことが示唆された。

人工ヒト癌幹細胞モデルを用いた癌幹細胞特異的モノクローナル抗体の作製

渡邊夕紀子

横浜市立大学 医学部 微生物学

1. 目的

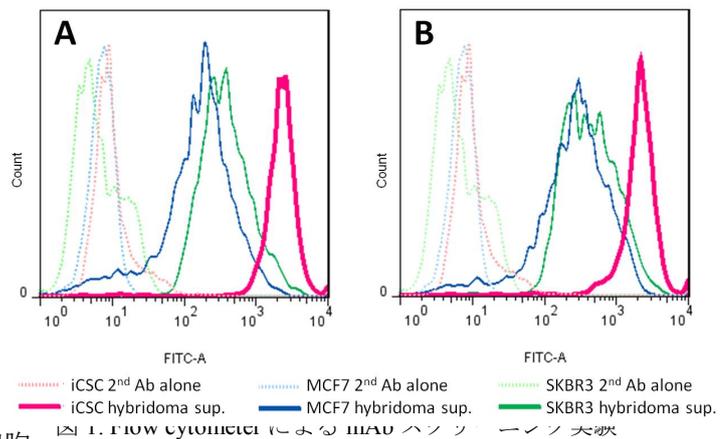
現在、癌幹細胞を標的とする革新的癌治療薬開発が期待されている。我々はこれまでの研究で、遺伝子変異の蓄積がきわめて少ないヒト正常細胞由来癌幹細胞を誘導する手法(特願 2010-238548 および 2011-118557)により、ヒト不死化乳腺上皮細胞由来の癌幹細胞モデル(iCSC-10A)の作製に成功した(Nishi et al. *Oncogene*, 2013)。本研究課題ではこの iCSC-10A を用いて、癌幹細胞の膜抗原を特異的に認識し、かつ癌幹細胞の自己複製能および多分化能を抑制する癌幹細胞特異的モノクローナル抗体(mAb)または薬剤を同定し、癌幹細胞を標的とした新たな治療法・診断法の確立を目的とする。

2. 方法および結果

2.1. 人工癌幹細胞を抗原としたモノクローナル抗体の作製

2.1.1. 免疫およびハイブリドーマ作製

我々の樹立した癌幹細胞(iCSC-10A)特異的 mAb を作製するため、WKAH/Hkm ラット(雌)に iCSC を投与し、5 回免疫(1st, 2nd, 3rd: 1×10^7 cells (i.p.), 4th, 5th: 1×10^6 cells (i.v.))をおこなった(図 2A)。二回目の免疫 9 日後及び 3 回目の免疫の 7 日後に採血し、Western blot (WB)法により iCSC 特異的抗体が発現していることを確認した。最終免疫の 2 日後、免疫ラットの脾臓を摘出し、マウス骨髄腫細胞(SP2/O)と 1:5 の割合で懸濁し、Polyethylene Glycol (PEG)を使用して融合させ、15 cm シャーレに播種した。細胞接着後、抗体を産生し、増殖能を有する融合細胞(hybridoma)のみを選択培養するために、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む HAT 培地で 2 週間培養した後、限界希釈法を用いて mAb の作製をおこなった。



2.1.2 Flow cytometer による癌幹細胞

特異的抗体の選定

免疫した抗原に対する抗体は hybridoma 上清中に分泌されるため、この上清を一次抗体(x1)とし、二次抗体に二次抗体に

A: hybridoma 上清 No.1A, B: hybridoma 上清 No.4H。一次抗体: hybridoma 上清(x1), 二時抗体: FITC 標識ラット抗体(x200)、細胞数; 4×10^4 個/sample。iCSC-10A でより特異的に反応を呈する二種類の上清を選別した。

FITC 標識された抗ラット抗体 (x200) を使用して、Flow cytometer によりスクリーニング実験をおこなった

4×10^4 個の乳がん細胞株及び iCSC-10A を比較し、蛍光強度の差を観察した。その結果、iCSC-10A でより特異的に反応を呈する二種類の細胞上清(1H, 4A)を選別することに成功した。

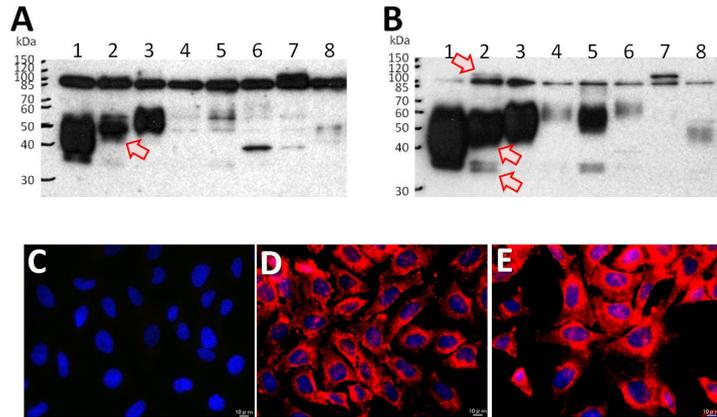


図 2. Hybridoma 上清の抗体の機能的検定

A, B: hybridoma 上清を一次抗体(x10)として使用した WB 法。

A: 1H, B: 4H。1. iPS, 2. iCSC-10A, 3. MCF-10A, 4. MCF-7, 5. MDA-MB-231, 6. SK-BR-3, 7. T-47D, 8. Hs578t

C-D: iCSC-10A 培養細胞における免疫染色。C: 二次抗体のみ。

D: 一次抗体: 1H, E: 一次抗体: 4A。一次抗体: hybridoma 上清(x1), 二次抗体: 蛍光標識抗ラット抗体(x200)。青: 細胞核(DAPI 染色)。赤: hybridoma 上清により細胞膜が染色された。

2.1.3. 選別された抗体の機能的検定

FACS によるスクリーニングで選別された二種類の hybridoma 上清が一次抗体として使用可能かどうかを検討する為、iCSC-10A および乳がん細胞株を用いて WB および培養細胞の免疫染色を行った。

WB 法では、10 倍希釈の hybridoma 上清を一次抗体とし、二次抗体として抗ラット抗体(x10,000)を使用したところ、iCSC-10A 特異的なバンドが確認された(図 3A,B 矢印)。

免疫染色では iCSC-10A 培養細胞をメタノールで固定後、1%ヤギ血清でブロッキングを行い、一次抗体として hybridoma 上清(x1)、二次抗体として Alexa 594 標識抗ラット抗体(x200)を使用した。また、DAPI 染色剤入りの封入材を使用し、細胞核の染色を行った。その結果、細胞膜での特異的な反応が確認された(図 2D E)。

以上の結果から、これらの hybridoma 上清は、FACS, WB, 免疫染色において一次抗体として使用可能であることが示された。

2.1.5 抗原の同定

223 種類の cancer/testis antigen を搭載したプロテインアレイを活用し、2 種類の抗体を添加し、反応するウェル中に存在する抗原タンパク質の同定をおこなった(株式会社セルフリーサイエンスに受託)。その結果、両サンプルともに Abelson tyrosine-protein kinase 1 (ABL1) を抗原として認識することが確認された。

2.2. iCSC-10A における ABL1 の機構解析

iCSC における ABL1 の機能を確認するため、Bcr-Abl チロシンキナーゼの代表的阻害剤である Imatinib (マルチキナーゼ阻害剤)による細胞への影響を検討した。iCSC-10A (4×10^4 個

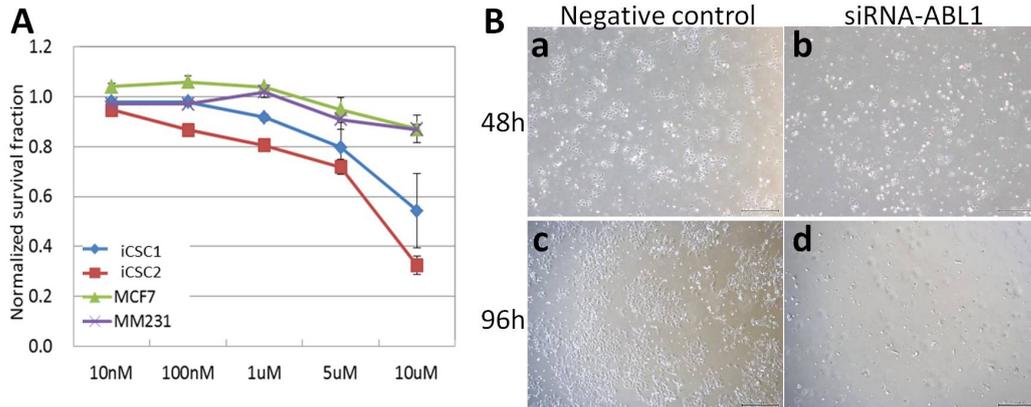


図 3. ABL 阻害による iCSC-10A の増殖および生存率の変化

A: Imatinib による細胞生存率の変化。10 μ M 添加時に乳がん細胞株(MCF-7, MDA-MB-231)と比較して iCSC-10A の細胞生存率に有意な減少が観察された。

B: iCSC-10A への ABL1siRNA の導入。a,c: negative control siRNA を導入。b, d: ABL1 siRNA を導入。96 時間培養後で ABL1 の siRNA を導入した群で細胞の増殖抑制が観察された。

/well)および乳がん細胞株(2×10^5 個/well)に Imatinib を濃度を変化させて添加し、37 度で 24 時間培養した際の細胞生存率を WST-8 assay により観察した。10 μ M を添加した際の iCSC-10A の細胞生存率が乳がん細胞株の細胞生存率と比較して有意な減少が観察された(図 3A)。また、siRNA 導入による細胞の変化を観察する為、ABL1 の siRNA (10 μ M)を iCSC-10A に導入し、37 度で培養し経時的変化の観察を行った。ABL1 発現抑制により、siRNA 導入 96 時間後でコントロール群と比較して細胞の増殖抑制が観察された(図 3B)。

3. 考察

ABL1 は慢性骨髄性白血病および一部の急性リンパ性白血病における 22 番染色体と 9 番染色体間での転座によって、c-abl と bcr という遺伝子が融合し、BCR-ABL 融合蛋白質として幹細胞レベルで細胞発癌に寄与することが知られている。一方で、ヒト乳癌の悪性度・浸潤度と Abl キナーゼ活性の亢進が関連しているという報告がある。

我々は細胞膜の透過処理をしていない細胞を使用した FACS 実験で本抗体を検出したが、これまでの研究で ABL は細胞核や細胞質等で主に発現していると報告されており、ABL の細胞膜上での局在という報告はまだない。今回 ABL が細胞表面で検出された理由として、新たなフェノタイプの可能性や、癌の転移に重要な役割を果たすエクソソームの一部である可能性等が示唆され、今後の研究において、同定された ABL1 について CSC 内での機能や活性化の機構についてさらなる検討を行う予定である。

我々の研究で得られた結果は癌幹細胞の性質を解明する重要な発見であり、今後癌幹細胞を標的とした新たな治療法・診断法に発展できると考えられる。

<若手研究助成>

過敏性腸症候群における認知・行動的要因の評価系整備および
心理・生理学的メカニズム解明への応用

菅谷 渚 水嶋春朔

横浜市立大学医学部社会予防医学教室

本研究では、Cognitive Scale for Functional Bowel Disorders (CS-FBD)およびIrritable Bowel Syndrome-Behavioral Responses Questionnaire (IBS-BRQ) の日本語版を作成し過敏性腸症候群 (IBS) における認知・行動的要因の評価系整備を行い (研究1)、CS-FBD および IBS-BRQ を応用して、IBS とかかわりの深い生理指標と認知・行動・感情との関連を探る (研究2)。研究1では、IBS の診断を受けた通院患者 100 名ほどを対象に、CS-FBD および IBS-BRQ の日本語版、非機能的態度尺度、Hospital Anxiety and Depression Scale、IBS Severity Index などを含めた自記式調査への回答を求め、得られたデータから信頼性・妥当性を検討する。研究2では、IBS 保有者 30 名を対象に、CS-FBD、IBS-BRQ、不安・抑うつ、一般的な認知傾向などについて自記式調査、2 日間連続で起床時および就寝前の血圧・脈拍測定と唾液採取 (コルチゾール、デヒドロエピアンドロステロンの測定) を行う。現在、研究1はデータ収集中であり、研究2は実施準備が整っている。本研究を進めることによって IBS に特化した認知・行動的指標を評価し、生理的状态との関連を探ることは、より正確な病態理解を深めることにつながると考えられる。

過敏性腸症候群における認知・行動的要因の評価系整備および 心理・生理学的メカニズム解明への応用

菅谷 渚 水嶋春朔

横浜市立大学医学部社会予防医学教室

1. 目的

過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome: IBS) は代表的な消化器系心身症であり、心理療法、特に考え方や行動に介入する認知行動療法が有効であることが知られている。しかしながら、本邦では IBS に特化した認知・行動的側面を評価する尺度がなく、認知行動的要因を含めた心理・生理学的メカニズムや介入効果の研究が遅れている。我々は IBS の認知・感情・行動のメカニズムや認知と副腎皮質ホルモンをはじめとした生理指標の関連を検討してきたが、IBS に特化した尺度を用いておらず、IBS に特徴的な現象を精緻にとらえるという点で限界があった。諸外国で開発された Cognitive Scale for Functional Bowel Disorders (CS-FBD) や Irritable Bowel Syndrome-Behavioral Responses Questionnaire (IBS-BRQ) は、IBS に特化した認知・行動的特徴を把握する上で有用であるが日本語版は開発されていない。このような適切なアセスメント方法が、IBS の臨床像をよりの確にとらえた心理・生理学的メカニズムの解明への貢献を可能とし、ひいては治療プログラム改善を促進することが期待できる。本研究の目的は、(1) CS-FBD および IBS-BRQ の日本語版を作成し、IBS における認知・行動的要因の評価系整備を行い、(2) CS-FBD および IBS-BRQ を応用して、IBS とかかわりの深い視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系指標をはじめとした生理指標と認知・行動・感情との関連を探ることによって、より臨床的意義の大きな IBS の心理・生理学的メカニズムを検討する。

2. 方法

【研究1】 IBS における認知・行動的要因の評価系整備

神奈川県内医療機関の消化器内科に通院する IBS の診断を受けた患者 100 名に対して、質問票への回答を求める。質問票の内容は以下のとおりである。

1) 性別・年齢

2) Rome III 成人質問票日本語版

世界的に用いられている Rome III 診断基準に基づいて作成された IBS の有無を確認するスクリーニング用の質問票である。

3) IBS Severity Index 日本語版 (Shinozaki et al., 2006)

腹痛および排便の状況から IBS の重症度を測定する。

4) 腹部症状の生活妨害度

1 項目 (0「全く妨害されていない」～10「完全に妨害されている」) で尋ねる。

5) CS-FBD (Toner et al., 1998) の日本語翻訳版

機能性腸障害の患者がもつ症状に関連した認知の程度を測定する。

6) IBS-BRQ (Reme et al., 2010) の日本語翻訳版

IBS に特化した行動反応を測定する。

7) 日本語版 Dysfunctional Attitudes Scale (DAS24-J, Tajima et al., 2007; Power et al., 1994)

抑うつスキーマを測定するために開発された質問紙である。24 項目から構成され、1 因子構造である。

8) 日本語版 Hospital Anxiety and Depression Scale (Zigmond et al., 1983; 1993)

身体症状を含まない項目によって不安と抑うつの程度を測定できるため、身体疾患を伴う対象者に適している。

9) Social Adaptation Self-evaluation Scale 日本語版 (SASS, 後藤ら, 2005 ; Bosc et al., 1997)

うつ病の社会適応状態の評価尺度として開発された尺度であり、3 因子構造(「対人関係」、「興味や好奇心」、「自己認識」) である。

【研究 2】 IBS の認知・行動・感情指標と生理指標の関連 (図参照)

神奈川県内の大学 (医学部) に所属する IBS 保有者 30 名ほどを対象とする。

スクリーニング調査にて IBS 様症状が認められ、実験参加協力の同意が得られた対象者に、自記式調査票 A (就寝・起床時刻、血圧・脈拍等、腹痛の記録) および B (研究 1 で用いる調査票のうち DAS24-J および SASS を除き、女性用に月経周期に関する項目を加えたもの) への記入、起床から就寝まで計 3 回の唾液採取と血圧・脈拍測定を連続した 2 日間実施してもらう。唾液採取および血圧・脈拍測定、質問紙記入は研究対象者が自身の自宅にて実施する。採取された唾液検体および記入済みの自記式調査票は宅配便にて研究責任者に送られる。研究者に送られた唾液は分析直前に解凍し、3000rpm で 15 分間遠心分離した後、唾液用 EIA キット (Salimetrics LLC) を用いてコルチゾールおよびデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) の濃度を測定する。

3. 結果 (進捗状況)

研究 1 および 2 はいずれも横浜市立大学内の倫理委員会の承認が得られた (研究 1 : B130905050、研究 2 : A140522013)。

研究 1 については、CS-FBD および IBS-BRQ を日本語訳し、英語および日本語に精通した米国在住の心理学者によってバックトランスレーションを実施済みであるが、現在協力者数が解析可能な人数に達していないため、調査を継続中である。研究 1 で標準化を進める CS-FBD および IBS-BRQ について回答時の支障がないことを確認したため、研究 2 の

実施準備を整えており、2014年10月から対象者の募集を始める予定である。

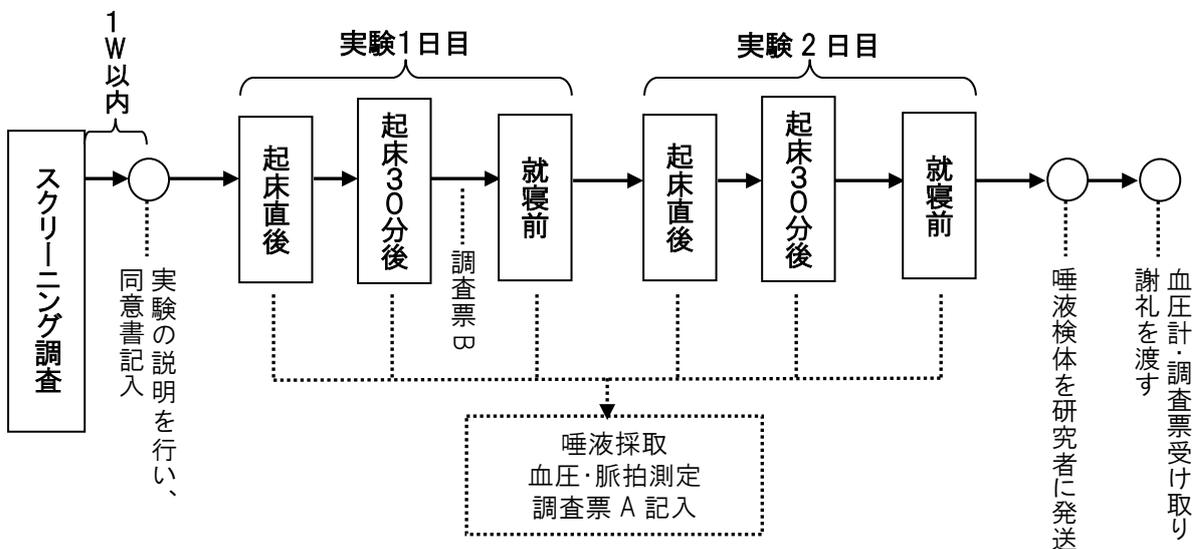
4. 考察

IBS は心身両面からのアプローチが必要な疾患であるが、心理・生理学的メカニズムの解明が不十分なまま、認知行動療法などの臨床現場における実践および介入研究がなされているのが現状である。本研究はこれまで不十分であった IBS の心理・生理学的メカニズムの解明に貢献するべく、IBS に特化した評価系の整備から始め、それを調査に応用するものである。

IBS では一般的なネガティブな認知・感情の強さを示すことは諸外国の研究においても知られている。しかしながら、IBS 保有者では症状に対するネガティブな認知や症状を恐れることによる回避行動が問題となることが多く、それがネガティブ感情や症状に関連する生理的変化につながる可能性があることから、そのような IBS に特化した心理的現象をとらえ、介入ポイントを探ることが重要である。このことから、本研究において、これまで本邦において不足していた、IBS に特化して開発された認知・行動的指標について日本語版の標準化を進めることは、より正確な病態理解を深めることにつながると考えられる。

さらに、コルチゾールは腹部症状に影響を与える免疫系の状態を強める一方、同じ副腎皮質ホルモンである DHEA は免疫系に対してコルチゾールと逆に作用する。したがって、IBS における副腎皮質ホルモンの測定を行う上で、コルチゾールと DHEA の両方を測定することが IBS 症状を引き起こす生理的状态をより反映すると考えられるが、現在のところ IBS における DHEA を測定している研究は我々の研究のみであり、本研究においてコルチゾールおよび DHEA の両方の測定を行うことは、インパクトのある研究となりうる。

図 研究2の実験手続き



<若手研究助成>

潰瘍性大腸炎患者を対象としたテーラーメイド型服薬アドヒアランス向上プログラムの開発

川上明希

横浜市立大学 消化器内科

横浜市立大学市民総合医療センター IBD センター

抄録

潰瘍性大腸炎患者において服薬アドヒアランスの低さが報告されているが、有効な支援策は確立されていない。本研究は、報告者らにより作成したテーラーメイド型服薬アセスメントツールに対応した支援策を検討し、プログラムを開発することを目的とした。支援策は、服薬支援に関する文献レビュー、潰瘍性大腸炎患者を支援する専門家へのインタビュー、患者が日常生活で行っている服薬アドヒアランスを高めるための習慣とアドヒアランス良好との関連検討をもとに集約した。結果、医療者が有効と考える支援は、以下等が挙げられた：食後にこだわらず内服して良いことを伝える；薬を飲み忘れた際は時間をずらして内服し、一日の帳尻を合わせて内服して良いことを伝える。また、アドヒアランス良好と有意な関連が認められた患者が実施する習慣は、以下等が挙げられた：「薬箱に1日分取り出して確認する (Odds Ratio=1.60 95%Confidence Interval=1.33-1.90)」, 「食事場所に置く (OR=1.22 95%CI=1.06-1.41)」. これらの結果を基に、支援の質と効率性確保の観点から、アセスメントツールに応じた支援の判断樹を作成しプログラム化した。今後は、作成したプログラムをもとに、外来での試用で実施可能性を検討し、効果を検証していきたい。

<若手研究助成>

潰瘍性大腸炎患者を対象としたテーラーメイド型服薬アドヒアランス向上プログラムの開発

川上明希

横浜市立大学 消化器内科
横浜市立大学市民総合医療センター IBD センター

1. 研究目的

潰瘍性大腸炎(Ulcerative colitis, UC)には、経口 5-aminosalicylic acid(以下, 5ASA)をはじめとする薬物療法が有効であるが, UC 患者の 30-45%が処方指示に対し 80%未満の内服であるアドヒアランス不良に該当し, アドヒアランス不良群は再燃のリスクを 2.3-5.5 倍高めることが報告されている。これまで, 海外ではアドヒアランス向上のために内服回数の簡略化や内服に関する知識提供を行う介入が報告されているが, その有効性は確立されていない現状にある。報告者らはアドヒアランス向上プログラム開発プロセスを検討してきた。その際, 先行研究の介入の限界一つに, 患者の内服に対するニーズを個別的に把握し, 要因に応じた支援が行われていないことが考えられたため, 報告者らは患者に応じたニーズを個別的に把握できるテーラーメイド型服薬リスクアセスメントツールを開発した(表 1)。本研究は, 報告者らにより作成したテーラーメイド型服薬アセスメントツールに対応した支援策を検討し, プログラムを開発することを目的とした。

2. 方法

- 1) 服薬リスクアセスメントツールの各項目に応じた支援策について, 他の慢性疾患患者に対する服薬支援方法を文献レビューで集約するとともに, 専門家へのインタビューを行い, 実践している服薬支援方法を集約する。
- 2) 既存のデータを用い, アドヒアランス良好と UC 患者が日常生活で行っている服薬習慣との関連をロジスティック回帰分析にて抽出する。
- 3) 1), 2)より, 支援策を集約して支援の判断樹を作成し, プログラム化する。

3. 結果

- 1) UC 患者の診療・支援を専門とする医師・看護師, 服薬支援を専門とする研究者などに, これまでアドヒアランス向上に有効と考えられた服薬支援方法について面接を行った。その結果, 主に以下の方法が有効であるとの発言が得られた: 胃に負担をかける薬ではないため, 食後にこだわらず内服して良いことを伝える; 薬

を飲み忘れた際は時間をずらして内服し、一日の帳尻を合わせて内服して良いことを伝える；患者に服薬状況を確認する際、内服できていることを前提に尋ねない(ことで患者が構えることなくとも解決策を考えることができる)；患者のライフイベントや悩みに合わせて薬種や処方回数を柔軟に変更する。

- 2) UC 患者 426 名に実施した質問紙調査の回答をもとに、処方指示量に対し 80%以上の内服ができているアドヒアランス良好群と、患者が実践している服薬習慣 12 項目との関連を単変量ロジスティック回帰分析にて検討した。その結果、アドヒアランス良好に有意に関連した工夫項目は、「薬箱に 1 日分を取り出して内服確認する(Odds Ratio=1.60 95%Confidence Interval=1.33-1.90)」、「外出に備え、カバンや会社・学校に常備する(OR=1.10 95%CI=1.01-1.20)」、「食事場所に置く(OR=1.22 95%CI=1.06-1.41)」、「飲み忘れないよう家族や周囲の人に声掛けしてもらおう(OR=1.10 95%CI=1.008-6.18)」であった。
- 3) 上記のもとに支援の判断樹を作成し、患者の回答に応じて支援指針が明確化されるようにプログラム化した。支援策の中には、年齢や仕事の有無など患者の特性に応じ適応が分かれるものも存在するため、特性に応じ支援策を細分化させた。

4. 考察・まとめ

先行研究の知見や専門家の意見、患者の経験をもとに服薬リスクアセスメントツールの項目に応じた支援策を検討し、プログラムを作成した。今後は、作成したプログラムをもとに、外来での試用で実施可能性を検討し、効果を検証していきたい。

5. 論文及び学会発表

- 1) Tanaka M, Kawakami A, Iwao Y, Fukushima T, Yamamoto-Mitani N. Coping strategies for possible flare-ups and their perceived effectiveness in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Nursing*. 2016; 39(2) (in press).
- 2) 川上明希, 田中真琴, 国崎玲子, 山本則子. 潰瘍性大腸炎患者が経口アミノサリチル酸製剤内服に際し実施する工夫とアドヒアランスとの関連. 第 8 回日本慢性看護学会学術集会 ; 2014 July 5-6; 久留米, 日本 ; 2014. P. A69.
- 3) 川上明希. 潰瘍性大腸炎患者さんの 5ASA 内服アドヒアランスの実態～国内多施設研究の結果からアドヒアランス向上に向けた取り組みへ～. 第 10 回日本消化管学会総会学術集会; 2014 Feb 14-15; 福島, 日本; p.97

表 1. テーラーメイド型服薬アセスメントツール

	Never	Rarely	Unsure	Somewhat	Definitely
Susceptibility					
I think it would be easy to flare up with my current adherence.	24	18	12	6	0
Severity					
I think that relapse would have an enormous impact on my daily life including work, school, or housework.	36	27	18	9	0
Benefits					
I think I will reduce the risk of relapse if I take it as instructed.	4	3	2	1	0
I think I will reduce the possibility to develop colon cancer if I take it as instructed.	4	3	2	1	0
Barrier					
I miss the scheduled time to take it when I am busy at work, school, or with housework.	0	1	2	3	4
I forget to carry it around when I go out.	0	1	2	3	4
I miss the scheduled time to take it when I eat meals at irregular hours.	0	1	2	3	4
I feel less need to have to take it.	0	1	2	3	4
I hesitate to take it in front of others.	0	1	2	3	4
I feel anxious that it may cause unpleasant side effects.	4	3	2	1	0
I feel anxious about long term-side effects.	4	3	2	1	0
I feel anxious about unpleasant side effects when my condition becomes worse.	4	3	2	1	0
It is difficult to take so many pills.	4	3	2	1	0
It is difficult to swallow such large pills.	4	3	2	1	0
It is difficult to take it so many times.	4	3	2	1	0
It is difficult to take it for a long time.	4	3	2	1	0
Cues to action					
I can talk to healthcare providers about my anxiety or worries about it.	4	3	2	1	0
I am encouraged by healthcare providers or my family to take it as instructed.	4	3	2	1	0
Healthcare providers or my family check whether I took it as instructed.	4	3	2	1	0
Visible bleeding	0.	Presence	10.	Absence	
Current thiopurines	0.	Presence	8.	Absence	
Daily number of aminosalicylate tablets	0.	9 or more	7.	8 or less	

The range of this model is from 0 to 153.

A patient whose scores more than 60 is at high-risk of non-adherence.

<若手研究助成>

がんの発生・進展における細胞極性タンパク質 PAR-3 の役割と分子メカニズムの解明

佐々木和教

横浜市立大学大学院医学研究科分子細胞生物学

研究分担者 中谷雅明

横浜市立大学大学院医学研究科分子細胞生物学

抄録

生体の上皮細胞は、アピカル-ベーサル極性(細胞極性)をもった3次元状の管腔を構築し、生理機能を発揮する。これまでに我々は、細胞極性タンパク質 PAR-3, aPKC, PAR-6 からなる PAR-aPKC 複合体が哺乳類上皮の細胞極性に必須な役割を果たすことを示してきた。本研究では、この複合体の下流で作動する経路の解明を目的とし、更ながんと関連を目指した。遺伝子発現の比較から、PAR-3 ノックダウンで顕著に発現が低下する遺伝子として、今回 Girdin を同定した(PAR-3/Girdin 系)。上皮管腔での役割を探るために、Girdin をノックダウンした MDCK 上皮細胞で3次元シストを形成させた。コントロール細胞と比べて、Girdin ノックダウン細胞はアピカル膜が異常なシストを形成した。この表現型は PAR-3 のノックダウンと類似していた。PAR-3 ノックダウン細胞に過剰発現で Girdin を戻すと、PAR-3 ノックダウン細胞が示すアピカル膜の異常が部分的に回復した。これらの結果は、Girdin が PAR-3 の下流で細胞極性に関わることを強く示唆する。更に、ある前立腺がん細胞で PAR-3 と Girdin の両方の発現が消失している事が分かった。がん化した上皮細胞で認められる細胞極性の崩壊との関連が予想された。今後、前立腺がんをモデルに、PAR-3/Girdin 系とがん病態との関連を探る予定である。

がんの発生・進展における細胞極性タンパク質 PAR-3 の役割と分子メカニズムの解明

佐々木和教

横浜市立大学大学院医学研究科分子細胞生物学

研究分担者 中谷雅明

横浜市立大学大学院医学研究科分子細胞生物学

1 目的

生体では、上皮細胞は3次元の管腔を構築し、生理機能を発揮する。この構造の上皮細胞は、アピカル-ベール極性(細胞極性)を形成し、内腔側にアピカル膜を、基質側にベール膜を確立する(図1)。多くのがんは上皮に由来し、がん化した上皮細胞では細胞極性が崩壊しており、正常な細胞極性はがんの発生・進行を抑制すると考えられる。そのため、上皮管腔の細胞極性を正常に調節する分子機構を解明することは、形態形成やがん疾患の理解へ大きく貢献する。これまでに我々は、細胞極性タンパク質 PAR-3 (Partitioning defective-3), aPKC (atypical protein kinase C), PAR-6 からなる PAR-aPKC 複合体を同定し、哺乳類の上皮管腔における機能解析を進めてきた。本研究では、PAR-3 による細胞極性制御の詳細な分子機構を明らかにすることを目的とした解析を進め、PAR-3 の下流で作動する新たな経路 (PAR-3/Girdin 系)を見出した。更に、この経路とがんとの間にどのような関連があるかを明らかにすることを目指した。

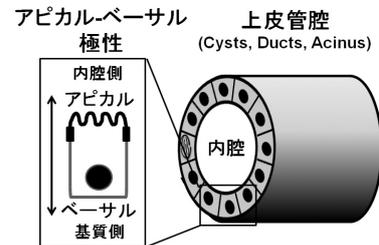


図1. 上皮管腔構造の模式図

2 方法

MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞及び前立腺がん細胞より抽出したトータル RNA を cDNA に逆転写し、定量的 PCR 法を行った。各種遺伝子をノックダウン又は過剰発現させた MDCK 細胞をコラーゲンマトリックス内に埋め込み、3次元状のシストを形成させた。

3 結果

(1) 細胞極性タンパク質 PAR-3 は Girdin の遺伝子発現を制御する。

細胞極性タンパク質 PAR-3 は aPKC と複合体を形成することで、アピカル-ベール極性を制御する (Horikoshi, Sasaki et al., J. Cell Sci. 2009)。そして、PAR-3 と aPKC の複合体形成は、がん抑制遺伝子 Lgl によって抑制される (Yamanaka et al., J. Cell Sci. 2006)。そこで、PAR-aPKC 複合体が制御する下流経路を特定するため、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析によって比較し、定量的 PCR 法による検証作業を行った。比較対象は、コントロール細胞と PAR-3 ノックダウン細胞又は Lgl ノックダウン細胞とした。PAR-3 ノックダウン細胞で発現が低下している一方で、Lgl ノックダウン細胞では PAR-3 と aPKC の複合体形成が促進されていることを考慮し、発現が逆に上昇している遺伝子を選択した。その結果、PAR-3 によって発現が制御される遺伝子として、Girdin (GIV/CCDC88a) を同定した。コントロール細胞に比べて、PAR-3 ノックダウン細胞では Girdin の mRNA 量が顕著に低下していた。RNAi 耐性な

PAR-3-EGFP コンストラクトを PAR-3 ノックダウン細胞に戻すと、Girdin の mRNA 量が回復した。EGFP 単独では、Girdin mRNA 量は回復しなかった。この結果は、PAR-3 が Girdin の遺伝子発現に関わることを示唆している。更に、PAR-3 と複合体を形成する aPKC λ との関連を検証したところ、aPKC λ のノックダウンにより Girdin の mRNA 量が低下した。一方、Lgl ノックダウン細胞では、PAR-3/aPKC 複合体の量がコントロール細胞よりも増加しており、それと相関して、Girdin mRNA 量も増加していた。これらの現象は、mRNA レベルだけでなくタンパク質レベルでも同様に観察された。以上の結果は、PAR-3-aPKC 複合体が Girdin の遺伝子発現に関わることを示唆する。

(2) Girdin は PAR-3 の下流でアピカル-ベーサル極性を制御する

上皮細胞の形態形成における Girdin の役割を探るために、上皮管腔や細胞極性のモデルとして世界中で汎用されている正常上皮 MDCK 細胞を用いて、上皮管腔への関与を検討した。コントロール細胞及び Girdin ノックダウン細胞を細胞外マトリックス(タイプ I コラーゲン)内に埋め込み、3次元状のシストを形成させた。コントロール細胞は、内腔とそれを取り囲む一層の細胞層からなる管腔状の正常なシストを形成した。一方、Girdin ノックダウン細胞は、シストのアピカル膜に異常を呈した。この表現型は、PAR-3 をノックダウンした場合と類似していた。上記(1)で述べたように、PAR-3 ノックダウン細胞では、Girdin 量が低下している。Girdin cDNA の過剰発現により PAR-3 ノックダウン細胞に Girdin を戻すと、PAR-3 ノックダウン細胞のシストが示すアピカル膜の異常が部分的に回復した。この結果は、Girdin が PAR-3 の下流でアピカル-ベーサル極性に関わることを強く示唆する。

(3) PAR-3 遺伝子が不活化した前立腺がん細胞では、Girdin の発現が低下している。

今後を見据えたがん種の絞り込みを目的とし、今回は前立腺がん細胞に着目した。前立腺がん細胞 LNCaP には、PAR-3 に遺伝子変異があり、PAR-3 の発現が不活化している (Kunnev et al., BMC Cancer 2009)。前立腺がん細胞 (LNCaP, PC-3, DU145) の間で Girdin の発現を qPCR 法並びにウエスタンブロット法で検討した所、PC-3, DU145 と比較し、PAR-3 が不活化している LNCaP 細胞において Girdin の発現が低下していた。

4 考察(自己評価、今後の展望など)

細胞極性は生理機能や管腔形成に必須であり、その異常は個体や組織の構築異常、がんなどの疾患を誘発する。そのため、細胞極性の分子メカニズムを解明することは、上皮組織の形態形成や上皮に由来する多くのがんの理解につながる。本研究では、細胞極性タンパク質 PAR-3 が上皮管腔のアピカル-ベーサル極性をどのように制御するかという観点で分子メカニズムの解明を目指した。従来の PAR-3 の研究動向は、PAR-3 が局在する細胞間接着部位での解析が大勢を占める。本研究では、これまでと異なる解析視点を導入し、細胞間接着部位と核とのクロストークにおける PAR-3 の役割に着目した。実際、PAR-3 の下流経路を遺伝子発現調節という視点で解析した試みは、世界的にも例はない。本研究の特色は、この着想をもとにした遺伝子発現の比較から、PAR-3 が Girdin の遺伝子発現を通じてアピカル-ベーサル極性を制御するという全く新しい知見(PAR-3/Girdin 系)を得た点にある。

上皮は多くのがんの発生源となる。細胞極性の破綻がどのようにがんを発生・悪性化させる

か、その分子実態は不明であり、今後の大きな課題である。これまでに、複数の癌腫で PAR-3、Girdin の異常発現が個別に観察され、PAR-3/Girdin 系の破綻とがんの発生・進展との関連が予想される (Jiang et al., *Cancer Res.* 2008; Kunnev et al., *BMC Cancer* 2009; Rothenberg et al., *Cancer Res.* 2010; Garcia-Marcos et al., *FASEB J.* 2011; Zen et al. *Oncogene* 2009)。今回、前立腺がん LNCaP 細胞において、PAR-3 とともに Girdin の発現も消失していることを見出した。そのため、このがん細胞では、PAR-3/Girdin 系を通じた細胞極性制御系が働いていない可能性が高い。今後は、前立腺がんをモデルに、腫瘍形成能、がん幹細胞の検出、免疫組織化学による臨床病理学的因子との相関という解析を通じて、PAR-3/Girdin 系の病態的意義を探ることが重要な課題となる。個別の診断マーカーや分子標的治療薬への展開が期待される。

5 論文及び学会発表(研究会を含む)

現在、上記の内容を含む成果を論文としてまとめ、国際誌 *Journal of Cell Science* に投稿している。

Kazunori Sasaki, Taku Kakuwa, Kazunori Akimoto, Hisashi Koga, and Shigeo Ohno
Regulation of epithelial cell polarity by PAR-3 depends on Girdin transcription and Girdin-Gai3 signaling.
J. Cell Sci. (submitted).

<若手研究助成>

C型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗 microRNA 33b 薬の効果の検討

留 野 渉

共同研究者：齊 藤 聡

横浜市立大学大学院医学研究科 肝胆膵消化器病学教室

【目的】C型肝炎の治療は経口抗ウイルス薬が登場し高い治療効果が期待されるが、多剤耐性獲得や合併症を有する症例への対応などの課題に対応するため治療選択肢を増やすことが求められている。C型肝炎ウイルス(HCV)はその生活環で宿主の脂質を巧みに利用している。膜結合型転写因子 SREBP と共に脂質代謝を調節しコレステロール恒常性を維持している microRNA 33b (miR-33b)を標的とした抗 HCV 作用を検討した。【方法】遺伝子型 1b の全長 HCV-RNA の複製を培養細胞内で再現できるレプリコンシステム, OR6 を用いた。OR6 からインターフェロンにより HCV を除去した OR6c をコントロールとした。OR6, OR6c に miR-33b と結合し拮抗阻害する miR-33b inhibitor, 内在性 miR-33b と同配列で作成した miR-33b mimic を導入し, HCV 複製効率を比較した。【結果・考察】OR6 に miR-33b mimic を導入すると HCV 蛋白発現が低下し, RNA 複製レベルも低下した。miR-33b mimic の投与による HCV 複製増殖阻害の機序について, 脂質代謝経路を介した作用, 及び標的部位への結合による直接的抗ウイルス作用の有無を検討していく予定である。

C型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗 microRNA 33b 薬の効果の検討

留 野 渉

共同研究者： 齊 藤 聡

横浜市立大学大学院医学研究科 肝胆膵消化器病学教室

1. 目的

C型肝炎に対する治療は経口抗ウイルス薬(direct acting antiviral agents: DAA)の登場により高い治療効果が期待されるが、多剤耐性獲得や合併症を有する症例への対応など、残された課題に対応するため治療の選択肢を増やすことが求められている。

C型肝炎ウイルスは肝細胞への感染(吸着, 侵入), 複製, 粒子形成, 放出などその生活環の多くのステップで宿主の脂質を巧みに利用している。microRNA 33b (miR-33b) は膜結合型転写因子 SREBP と協同してリポ蛋白質, 脂質代謝を調節し細胞内コレステロールの恒常性を維持している。HCV 複製増殖細胞に miR-33b 阻害剤を投与しウイルス複製の阻害効果を検討した。

2. 方法

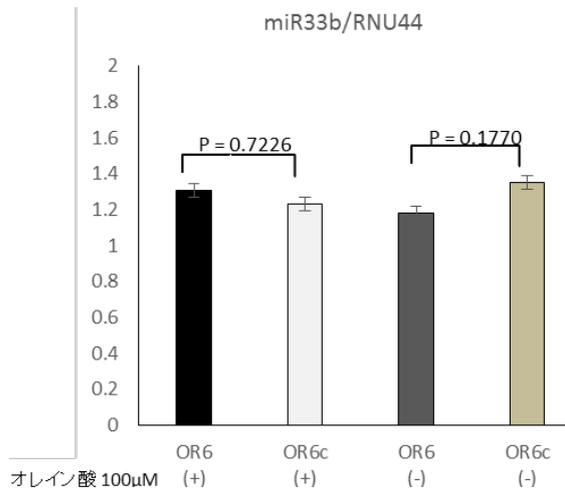
遺伝子型 1b の HCV-O 株から開発され, 全長 HCV-RNA の複製を培養細胞内で再現できるレプリコンシステム, OR6 を用いた。また OR6 からインターフェロンにより HCV を除去した OR6c をコントロールとした。OR6, OR6c にはレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子が含まれ, HCV-RNA 量とレポーター遺伝子産物であるルシフェラーゼ活性がよく相関するため, HCV-RNA の複製レベルをルシフェラーゼ活性の測定により簡便に測定できる。

まず①OR6 と OR6c との間, 及び C型肝炎患者の肝生検検体と肝移植ドナーの肝生検検体との間で, miR-33b の発現量をリアルタイム PCR で比較検討した。次に②OR6 に miR-33b と結合して拮抗阻害する核酸: 以下 miR-33b inhibitor, 内在性 miR-33b と同じ配列で作成された核酸: 以下 miR-33b mimic, およびコントロール核酸: 以下 miR-33b control をリポフェクション法で遺伝子導入し, 導入から 72 時間後に, それぞれの HCV 複製効率をルシフェラーゼアッセイ, リアルタイム PCR, ウェスタンブロットを用いて検討した。

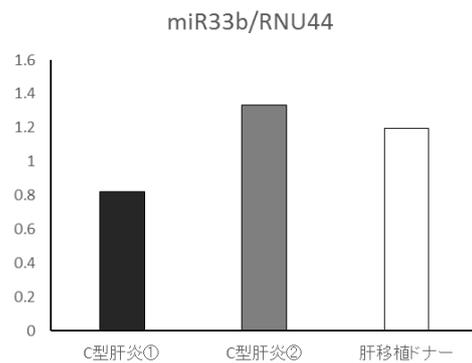
3. 結果

①miR-33b 発現量の比較

HCV 複製増殖細胞での検討



肝生検検体での検討

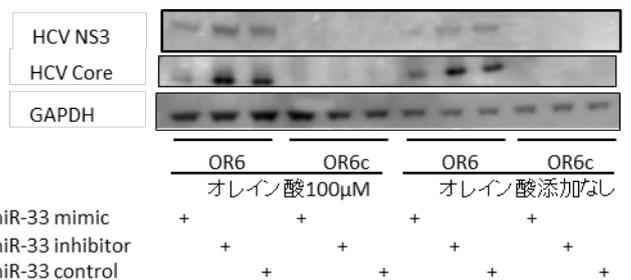
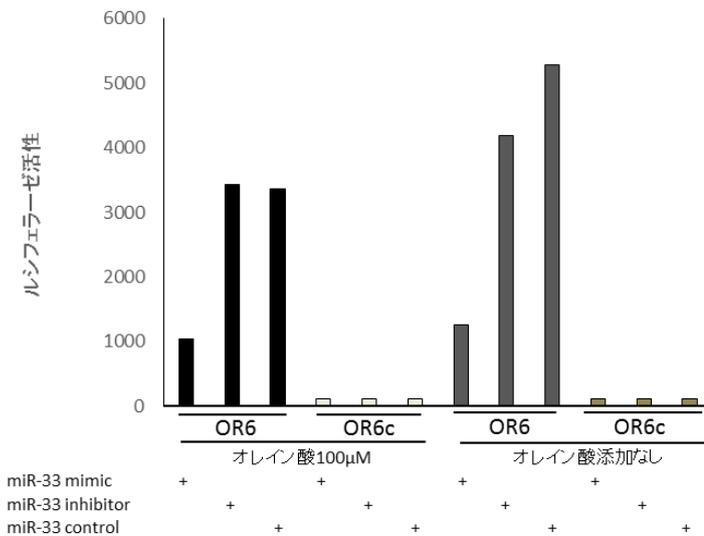


OR6 と OR6c との間で miR-33b の発現量に有意差を認めなかった ($p = 0.7226$). また生体内での脂質が豊富に利用できる状況を再現するためにオレイン酸 $100 \mu M$ を培地に添加し検討したがやはり miR-33b の発現量に有意差を認めなかった ($p = 0.1770$). 肝生検検体の検討では C 型肝炎患者 2 名は肝移植ドナー(炎症や線維化のないほぼ正常肝)に比較して miR-33b の発現量が一定の傾向を示さなかった.

②miR-33b inhibitor, miR-33 mimic 導入による HCV 蛋白発現と HCV 複製レベルの変化

ルシフェラーゼアッセイ

ウエスタンブロット



OR6 に miR-33b mimic を導入すると HCV 構造蛋白(Core), 及び非構造蛋白(NS3)とも発現が低下し, ルシフェラーゼ活性でみた培養細胞内の HCV 複製レベル

は顕著に低下した. オレイン酸添加の有無に関わらず同様の傾向であった. 一方で, miR-33b inhibitor を導入した場合には, コントロール核酸を導入した場合と比較して大きな変化は認めなかった.

4. 考察

miR-33b mimic の投与により培養細胞内での HCV-RNA の複製レベルは有意に低下し、さらに HCV 構造蛋白、非構造蛋白の発現も低下した。

miR-33b は SREBP1 と協同して脂質代謝を調節し細胞内がコレステロール不足になることを防ぐ方向に働くと考えられている。SREBP1 は HCV により発現が亢進することが報告されており、HCV の複製や粒子産生に有利な脂質が豊富な環境をつくるために miR-33b は SREBP1 とともに発現が亢進していることを研究開始前は予想していた。しかし今回の検討では、HCV 蛋白発現細胞(OR6)、および C 型肝炎患者の肝生検検体において、miR-33b はコントロールと比較して発現量に有意差はみられなかった。また miR-33b inhibitor の投与では HCV 蛋白発現および RNA 複製レベルに変化はみられなかったが、miR-33b mimic の投与で HCV 蛋白発現および RNA 複製レベルが低下したことは当初の予想とは異なるものの興味深い結果である。

今後は miR-33b mimic の投与による HCV 複製増殖阻害の機序について、脂質代謝経路を介した作用、及び標的部位に結合することによる直接的なウイルス阻害作用の有無について検討していく予定である。

5. 論文及び学会発表

(学会発表)

留野渉, 篠原義康, 斉藤聡. microRNA 33b を標的とした新規抗 HCV 作用についての検討.
第 50 回日本肝臓学会総会, 東京, 2014 年 5 月.

<若手研究助成>

経静脈的飽和脂肪酸投与による肝臓での lipotoxicity の検討

小川祐二

(共同研究者名) 本多靖, 結束貴臣, 今城健人, 馬渡弘典, 斉藤聡, 中島淳

所属部科名

肝胆膵消化器病学教室

抄録

飽和脂肪酸は全身での慢性炎症を引き起こし、それらは“lipotoxicity”と称される。我々は、飽和脂肪酸であるパルミチン酸を経内頸静脈的に持続投与した C57BL/6 野生型マウスが非アルコール性脂肪肝疾患 (Nonalcoholic Fatty liver Disease : NAFLD) に類似した病態を呈することを発見した。今回の研究では、この脂肪肝疾患モデルマウスを用いて、肝臓における飽和脂肪酸の lipotoxicity の検討を行った。パルミチン酸単独投与は、TLR4 を介した経路が key となってケモカイン産生による好中球遊走およびマクロファージ浸潤による ALT の上昇を引き起こした。NAFLD 病態では遊離脂肪酸による TLR4 を介した自然免疫経路が重要であると示唆された。

今回のモデルは、パルミチン酸というヒトの生理的状態でも暴露される外因性因子のみの投与で作成できることは重要性が高いと考える。そして、腸内細菌の是正が NAFLD を制御するという報告がある中で、今後は腸内細菌の是正と共に食事内容も加味した戦略が重要と考えられた。

経静脈的飽和脂肪酸投与による肝臓での lipotoxicity の検討

小川祐二

(共同研究者名) 本多靖, 結束貴臣, 今城健人, 馬渡弘典, 斉藤聡, 中島淳

所属部科名

肝胆膵消化器病学教室

1. 目的

飽和脂肪酸は全身臓器での慢性炎症, インスリン抵抗性の増悪, 動脈硬化の進展などを引き起こし, それらは“lipotoxicity”と称され世界中で大きな注目を浴びている. 我々は, 飽和脂肪酸であるパルミチン酸を経内頸静脈的に持続投与した C57BL/6 野生型マウスが非アルコール性脂肪肝疾患 (Nonalcoholic Fatty liver Disease: NAFLD) に類似した病態を呈することを発見した. 経内頸静脈的飽和脂肪酸持続投与による病態進展機序としては Toll-like Receptor 4 (TLR4) 経路に着目した. TLR4 は肝内炎症の key となることで知られており, リガンドとしてはエンドトキシンが広く知られているが, 他にも脂肪酸が挙げられる. 今回の研究では, *in vivo* において飽和脂肪酸であるパルミチン酸単独を投与することで肝臓における lipotoxicity についての検討を行った.

2. 方法

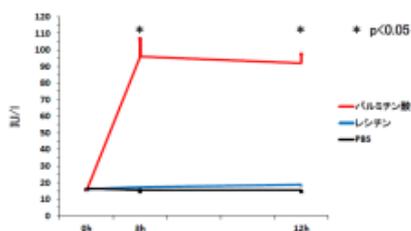
C57BL/6 の野生型マウス, TLR4 KO マウスを使用した. 実体顕微鏡下にマウスの右頸静脈よりカテーテルを挿入して, ethyl palmitate, グリセロール, レシチンより作成した乳化パルミチン酸を投与した. 対照群にはグリセロール, レシチンより作成したものを投与した群もしくは PBS 投与群とした. 投与開始時にボーラス投与し, その後は 3~12 時間少量持続投与として各種分子生物学的項目を解析した.

江口らは乳化させた Ethyl palmitate を経内頸静脈的に投与することで, これらが血中ですばやく水酸化されて血中遊離パルミチン酸を上昇させる方法を世界に先駆けて確立し, 膵臓における炎症惹起を介した β 細胞障害による lipotoxicity を証明した (Eguchi K, et al. Cell Metab. 15(4):518-533, 2012.). 我々は, この江口らの手法を導入することで, 世界に先駆けてパルミチン酸が引き起こす肝臓での lipotoxicity 解析を *in vivo* で行うことを可能とした.

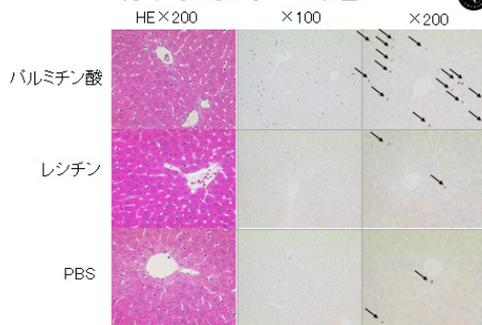
3. 結果

C57BL/6 野生型対照群の血清 ALT=20 前後 (n=5) に対して野生型パルミチン酸投与群は血清 ALT=90 前後 (n=5) と有意に上昇した。パルミチン酸投与群の肝臓 mRNA 発現において単球遊走因子 *cc12*, 好中球遊走因子 *cxcl2* が有意に上昇し, M1 マクロファージマーカーである NOS2 の上昇も認めた。病理学的検討では好中球エラスターゼ抗体, F4/80 抗体, α SMA 抗体陽性細胞数は有意に上昇し, 好中球遊走, マクロファージ浸潤, 星細胞の活性化が示唆された。タンパク発現解析では肝臓内の c-Jun 活性は亢進する傾向を認めた。TLR4 KO マウスでの検討では mRNA 発現の変化はキャンセルされる傾向にあった。

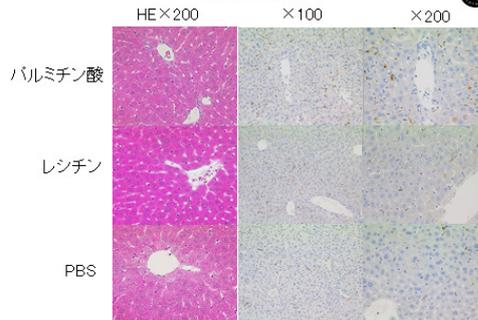
パルミチン酸単独投与による血清ALT



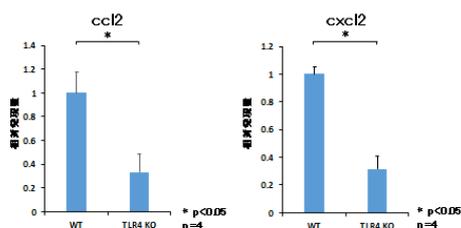
好中球エラスターゼ染色



F4/80免疫染色



WT vs TLR4 KO マウス *cc12*, *cxcl2* mRNA



4. 考察

普通食飼育下マウスへのパルミチン酸単独投与は驚くべきことに、TLR4 を介した経路が key となってケモカイン産生による好中球遊走浸潤及びマクロファージ浸潤による ALT の上昇を引き起こした。NAFLD 病態では遊離した飽和脂肪酸による TLR4 を介した自然免疫の活性化が重要であることが示唆された。

これまでの脂肪肝疾患モデルは、特殊食や様々な種類の脂肪酸を含有した高脂肪食を負荷する場合が多かった。これに対して我々のモデルは、パルミチン酸（飽和脂肪酸）というヒトの生理的状态でも暴露される外因性因子のみの投与で作成できる、他に類を見ない生理的な脂肪肝疾患モデルであり、重要性が高いと考える。特定の種類の脂肪酸で検討が行えることも重要な点である。

今回の研究において、パルミチン酸（飽和脂肪酸）の NAFLD 病態への関与を示すことができた。そして、腸内細菌の是正が NAFLD 病態を制御するという報告がある中で、今後は腸内細菌の制御と共に食事内容なども加味した治療戦略が重要と考えられた。

5. 論文及び学会発表

小川祐二，本多靖，結束貴臣，今城健人，米田正人，中島淳：肝臓におけるパルミチン酸が引き起こす lipotoxicity についての *in vivo* での検討。第 33 回アルコール医学生物学研究会学術集会一般演題 1，2014。

Yuji Ogawa, Yasushi Honda, Takaomi Kessoku, Wataru Tomeno, Kento Imajo, Hironori Mawatari, Masato Yoneda, Hiroyuki Kirikoshi, Shin Maeda, Satoru Saito, Koichiro Wada, Atsushi Nakajima, Analysis of lipotoxicity in liver induced by palmitate *in vivo*, Digestive Disease Week Poster Session. 2014.

小川祐二，今城健人，中島淳：パルミチン酸単独投与による肝臓における自然免疫応答についての検討。第 50 回肝臓病学会総会ワークショップ 10(肝疾患における自然免疫の役割ー最新知見と今後の展開ー)，2014。

小川祐二，本多靖，結束貴臣，留野渉，今城健人，馬渡弘典，斉藤聡，中島淳：パルミチン酸単独投与が引き起こす肝臓における自然免疫応答の検討。第 51 回日本消化器免疫学会総会ワークショップ，2014。

<若手研究助成>

関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)における骨構造解析と画像検査の臨床応用

峯岸 薫

横浜市立大学大学院医学研究科 病態免疫制御内科学

抄録

RA では、早期から積極的治療を開始し、厳密に疾患活動性の評価をしながら寛解を目指す。超音波画像(Ultrasonography; US)や核磁気共鳴画像(Magnetic Resonance Imaging; MRI)はその目的にかなう検査法として、有用性が国際的に高く評価されている。本研究では US や MRI に加え、陽電子放出断層撮影(FDG/NaF-Positron Emission Tomography; PET)を併用することで、滑膜炎と骨軟骨破壊の関連に焦点をあてた解析を行い、骨破壊や修復の予測因子としての画像検査の臨床応用についての検討を行った。

対象は生物学的製剤を新規導入した RA 患者 12 例。開始時の手の FDG-PET(CT)、NaF-PET(CT)所見と臨床像との関連を解析し、さらに、その後 6 ヶ月間の X 線所見の変化との関連を関節単位で解析した。

FDG は主に関節腔や腱鞘に、NaF は関節近傍の骨に集積していたが、個々の関節における FDG と NaF の集積強度は相関した ($r=0.65$)。NaF は腫脹関節だけでなく、骨棘など骨硬化病変にも集積し、その総和は疾患活動性に加え、US 所見や X 線での関節破壊とも相関を示した。FDG と NaF の両者の集積が強い関節で関節破壊の進展を認めた。

個々の関節における両核種の集積度は相関するが、集積パターンから、FDG は主に滑膜炎を、NaF は骨破壊・修復を反映し、炎症と骨変化が一連の病理変化である可能性が示された。

関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)における骨構造解析と画像検査の臨床応用

峯岸 薫

横浜市立大学大学院医学研究科 病態免疫制御内科学

1. 目的：関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)の病態は，滑膜炎と関節構造の破壊に要約される．超音波画像(Ultrasonography; US)や核磁気共鳴画像(Magnetic Resonance Imaging; MRI)はその目的にかなう検査法として，有用性が国際的に高く評価されている．本研究ではUSやMRIに加え，陽電子放出断層撮影(FDG/NaF-Positron Emission Tomography; PET)を併用して，病変における炎症，骨代謝の変化，骨破壊または修復に至るプロセスをマクロ的に解析し，その特徴を明らかにする．
2. 方法：2010 ACR/EULAR RA 分類基準を満たす患者で，生物学的製剤を変更または新規導入予定を対象とする．生物学的製剤開始時より，0，6か月後に両手関節より遠位の関節について，X線，US，MRI，FDG および NaF-PET・CT (各画像は±1週間以内で施行) の画像所見を解析する．X線は，正面，斜位の両手X線像を骨びらん，関節裂隙狭小化を Sharp score に基づき評価する．MRI 撮影は，Omeract による標準的撮影条件およびその評価法を用い，滑膜炎の有無，骨びらん，骨髄浮腫を評価項目とする．US 走査としては，全 PIP，MCP，手関節について標準的には背側より，また必要に応じて掌側から，縦断・横断面で網羅的に観察する．滑膜炎の有無については Gary scale(GS)，Power Doppler (PD)を半定量的にスコア化して解析し，びらんの有無も評価する．FDG-PET・CT は，血糖値を確認した上で，手関節関節より遠位を水平断，横断で撮影し，FDG 集積を SUVmax (皮膚との集積の比率) により算出する．NaF-PET・CT は，手関節関節より遠位を水平断，横断で撮影し，FDG 集積を SUVmax (皮膚との集積の比率)により算出する．これらの画像所見における異常所見が，同時期に他の画像モダリティでどう描出されるかを検討し，臨床所見との関連を検討する．
3. 結果：12例(女性10例，年齢 60.0 ± 15.9 歳，罹病期間 6.8 ± 7.3 年，新規導入9例，変更例3例，TNF阻害薬8例，非TNF阻害薬4例)の解析を行った．FDG は主に関節腔や腱鞘に，NaF は関節近傍の骨に集積していたが，個々の関節におけるFDG とNaF の集積強度は相関した($r=0.65$)．NaF は疾患活動性に加え，身体機能評価項目やUS のGS およびPD 所見

とも相関を示し、X線上の骨びらんの進行とも相関した。FDGとNaFの両者の集積を認める関節では、骨びらんの存在やその後の進行との関連を認めた(図1)。さらに、長期経過を追うことができた症例において、びらん修復部にもNaF集積が見られた(図2)。

4. 考察：個々の関節における両核種の集積度は相関するが、その関節内局在からFDGは主に滑膜炎の、NaFは骨破壊・修復を反映し、炎症と骨変化が一連の病理変化である可能性が示された。RAの疾患活動性や薬効評価にUSやMRIは既にその有用性が確立されているが、これらは炎症所見を描出できても骨代謝の変化を検出できない。本研究では、 ^{18}F を化合物に標識せずにフッ化ナトリウムの形で用いるNaFが、骨組織の構成成分であるhydroxyapatiteに結合する性質を利用し、骨代謝動態の評価に利用できる点に着目している。骨破壊や修復が亢進すると骨基質のhydroxyapatiteの産生が亢進するが、NaFはhydroxyapatiteの水酸基と置換しfluoroapatiteを形成するため、NaFがこのような病変部位に集積する。従来の臨床で用いられてきたX線、US、MRIに加え、炎症病変をより感度高く検出するFDG-PETとともにNaF-PETを組み合わせることで、炎症から骨病変形成に至るプロセスをマクロ的な視野で解析することが可能となり、より質の高い「寛解」を画像的に定義づけ、骨破壊や修復の予測因子としての画像検査の役割を明らかにすることを目的としている。今後は関節炎動物モデルでの解析を追加し、より詳細なメカニズムを解析していく。

5. 論文及び学会発表：

渡邊俊幸, 峯岸薫, 井畑淳, 須田昭子, 大野滋, 神山玲光, 浜真麻, 吉見竜介, 桐野洋平, 上田敦久, 岳野光洋, 石ヶ坪良明: FDG-PETとNaF-PETを用いた関節リウマチの骨破壊進展に関する検討. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2014.4

峯岸薫, 渡邊俊幸, 井畑淳, 浜真麻, 吉見竜介, 桐野洋平, 上田敦久, 岳野光洋, 立石宇貴秀, 石ヶ坪良明: FDG-PETとNaF-PETによる評価が関節リウマチの骨破壊進展を予測し得る. 第35回日本炎症・再生医学会, 沖縄, 2014.7

Toshiyuki Watanabe, Kaoru Minegishi, Atsushi Ihata, Maasa Hama, Ryusuke Yoshimi, Yohei Kirino, Shigeru Ohno, Ukihide Tateishi, Atsuhisa Ueda, Mitsuhiro Takeno, Yoshiaki Ishigatsubo: Prospective evaluation of ^{18}F -FDG and ^{18}F -NaF PET/CT: Imaging analysis of inflammation and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2014, Paris, 2014,6.

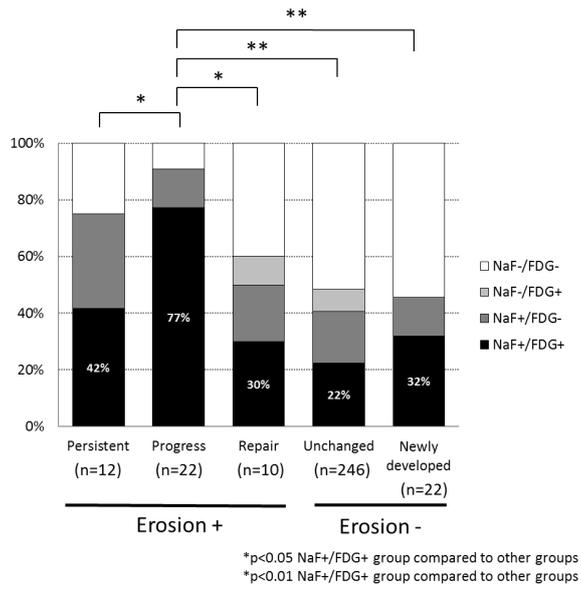


図 1. NaF および FDG の集積と骨びらんの変化

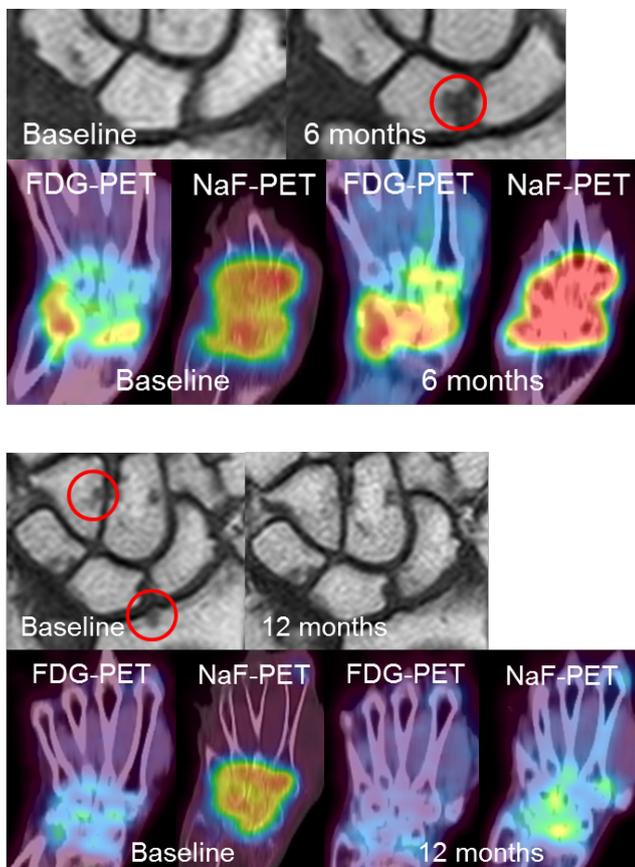


図 2. MRI・NaF/FDG-PET 所見の比較（上：骨びらん進行例，下：骨びらん修復例）

<医療技術研究助成>

血管内皮機能の日内変動とストレス及び、動脈硬化治療判定の有用性評価

佐野友香

横浜市大附属 市民総合医療センター 臨床検査部

渡辺雅子、田山慈、米澤広美、宮島栄治

横浜市大附属 市民総合医療センター 臨床検査部

秋山英一

横浜市大附属 市民総合医療センター 心臓血管センター

血管内皮機能障害は動脈硬化の初期段階であり、近年比較的簡便に測定できるようになった。しかし、交感神経の影響を受けやすいことが知られており、測定条件に注意しなければならない。また、海外でのカットオフ値が、本邦で適切か検討されていない。本研究では当院のカットオフ値を定めるため健常者のデータを収集し、血管内皮機能は様々な要因に影響されるため日内変動について検討比較を行う。健常者群及び疾患群(心血管疾患、糖尿病、脂質異常症)において7時(食前)、13時(食後)、18時(食前)、(±1時間)に検査を実施し健常者群と疾患群において日内変動を比較検討した。健常者(平均 RHI 値 朝 1.84 昼 2.31 晩 2.10)、疾患群(平均 RHI 値 朝 1.77 昼 1.75 晩 1.71)より、早朝空腹時の測定が最も安定した値と考えられる。AMI群のDMの有無の検討ではCV値に有意差が見られた。また、RHI値は健常者群とAMI群に比べAMI+心不全群は有意に低値となった。健常者のカットオフ値を決定するためにはさらに症例数を重ねる必要がある。本研究では、血管内皮機能の早朝空腹時測定および、日内変動測定は動脈硬化の早期発見に非常に有用であると考えられた。

血管内皮機能の日内変動とストレス及び、動脈硬化治療判定の有用性評価

佐野友香

渡辺雅子、田山慈、米澤広美、秋山英一*、宮島栄治

横浜市大附属 市民総合医療センター 臨床検査部、心臓血管センター*

1. 目的

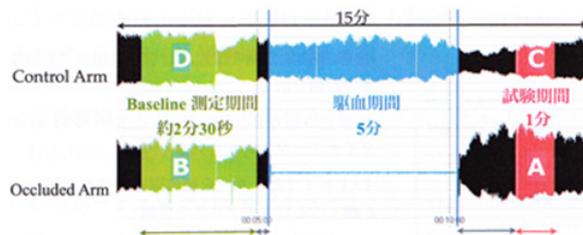
血管内皮機能障害は動脈硬化の初期段階であり、近年比較的簡便に測定できるようになった。しかし、交感神経の影響を受けやすいことが知られており、測定条件に注意しなければならず、特に外来患者の測定は困難とされている。また、海外のカットオフ値が、本邦で適切か検討されていない。本研究では、血管内皮機能について、まず当院のカットオフ値を定めるため健常者のデータを収集する。さらに、血管内皮機能は様々な要因に影響されるため、まず、健常者の日内変動について検討し、疾患群と比較を行う。また、種々のストレス要因や血管内皮機能測定における影響因子を検討する。

2. 対象及び方法

期間：平成 25 年 8 月 1 日～平成 26 年 8 月 31 日（研究終了予定：平成 27 年 8 月）

血管内皮機能測定装置 Endo-PAT2000(イタマーメディカル社)を使用し、血管内皮機能測定を行った。

測定方法及び原理：両手人差し指に PAT プロブを装着し、片腕に血圧帯を装着する。安静下で 5 分間測定、駆血を 5 分間、駆血解放後 5 分間測定を行い、末梢動脈圧の変化を測定する。駆血前後の脈波の増大を RHI 値として算出する。コントロール側を測定することで駆血解放後の変化を除き交感神経系の影響を排除する。Endo-PAT2000 は再現性が高く、非侵襲的、術者に依存することなく測定が可能である。RHI 値 (Reactive Hyperemia Index;反応性充血指数) 1.67 以下は血管内皮機能に障害があるとされている。



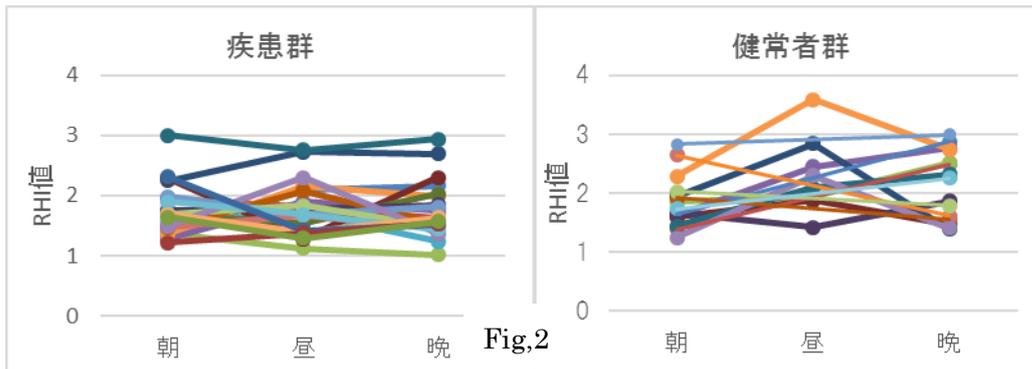
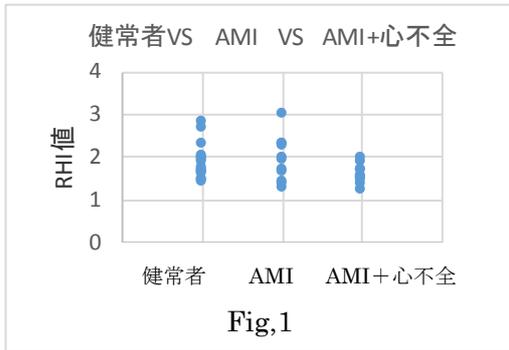
$$\text{RHI 値} = \frac{A}{B} / \frac{C}{D} \times \text{baseline correction factor}$$

- ① 健常者群 (16 例 男性 6 例 女性 10 例 平均年齢 38 ± 12.6 歳) 及び、疾患群(心血管疾患、糖尿病、脂質異常症 22 例 男性 22 例 平均年齢 65 ± 9.8 歳)において、早朝空腹時の RHI 値を比較する。また 7 時 (食前)、13 時 (食後)、18 時 (食前)、(± 1 時間) に検査を実施し健常者群と疾患群の日内変動と CV 値を比較検討した。
- ② 心血管疾患(94 例 男性 70 例 女性 24 例 平均年齢 69 ± 12.3 歳)において、早朝空腹時の RHI 値を性別・年齢について比較した。
- ③ 健常者(3 例 女性 3 例 平均年齢 22 ± 1.2 歳)において安静 15 分後 1 回目の測定を実施し、測定終了後 30 分間の安静後に 2 回目の測定を行い駆血の影響を検討した。

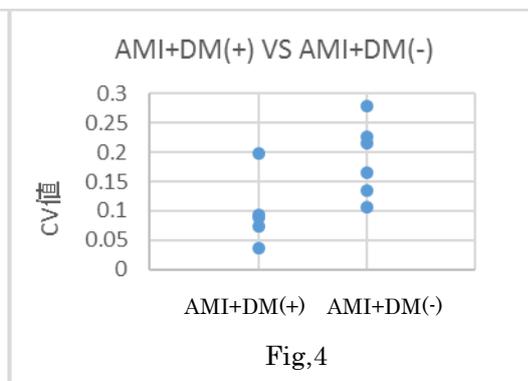
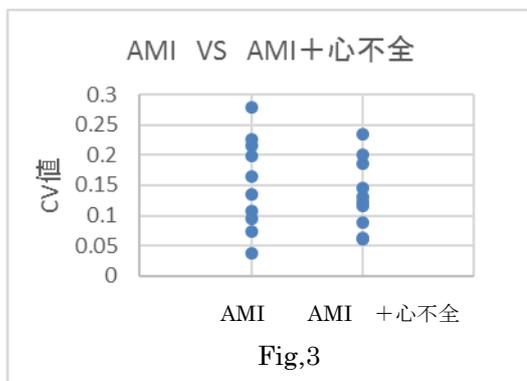
3. 結果

① 疾患群中の脂質異常症の有無により CV 値の比較を行ったが有意な差は見られなかった。

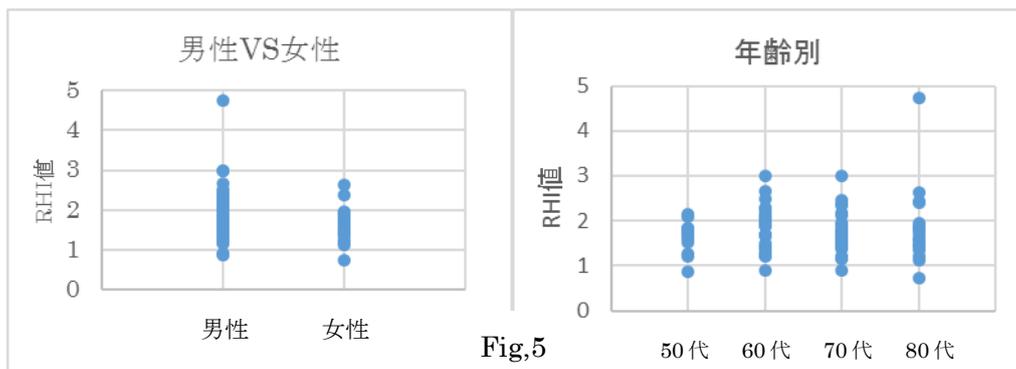
1.健常者群と 2.心筋梗塞群(以下 AMI 群、11 例 男性 11 例 平均年齢 62 ± 9.2 歳)、3.AMI に心不全を伴う群 (以下 AMI+心不全群、10 例 男性 10 例 平均年齢 65 ± 9.5 歳) の 3 群で比較を行うと AMI+心不全群は、健常者群、AMI 群に比べ有意に低値 ($p=0.04$) となった。(Fig,1)
 また、健常者(平均 RHI 値 朝 1.84 昼 2.31 晩 2.10)、疾患群(平均 RHI 値 朝 1.77 昼 1.75 晩 1.71)の両群間に明らかな差は見られなかった。(Fig,2)



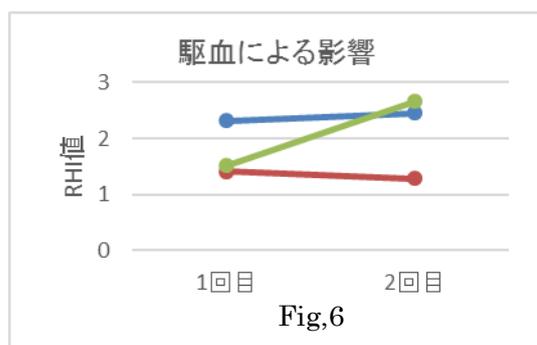
CV 値において疾患群を AMI 群(11 例 男性 11 例 平均年齢 62 ± 9.2 歳)と AMI+心不全群 (10 例 男性 10 例 平均年齢 65 ± 9.5 歳) に分け、比較検討したが有意な差は見られなかった。(Fig,3)
 しかし、AMI 群の中で糖尿病を伴う群(以下 AMI+DM+群、5 例 男性 5 例 平均年齢 69 ± 9.5 歳)と伴わない群(以下 AMI+DM- 群、6 例 男性 6 例 平均年齢 56 ± 8.7 歳)で比較したところ、有意差 ($p=0.04$)が見られた。(Fig,4)



② 心血管疾患例の RHI 値について、年齢、性別による有意差は見られなかった。(Fig,5)



③ 1回目(平均 RHI 値 1.75)と 2回目(平均 RHI 値 2.13)で比較を行ったが、駆血の影響は見出すことはできなかった。(Fig,6)



4. 考察及びまとめ

健常者(平均 RHI 値 朝 1.84 昼 2.31 晩 2.10)、疾患群(平均 RHI 値 朝 1.77 昼 1.75 晩 1.71)より血管内皮機能は交感神経・副交感神経の影響を受けるため、日内変動が大きく正確な血管内皮機能を測定するには早朝空腹時の測定が最も安定した値と考えられる。

AMI 群の DM の有無の検討では RHI 値には有意差は見られなかったが、CV 値は有意差 ($p=0.04$)が見られ、血管内皮機能障害が進むほど日内変動が低下することが示唆された。また、健常者群と AMI 群、AMI+心不全群の 3 群で比較を行うと健常者平均 RHI 値 1.87、AMI 群平均 RHI 値 1.92、AMI+心不全群平均 RHI 値 1.58 であり、健常者群と AMI 群に比べ AMI+心不全群は有意に低値となった。これは、心筋梗塞では心筋障害が短期間であるため血管内皮機能障害が進んでおらず、心不全では心筋障害以外にも心拍出量の低下や炎症による血管内皮機能の低下が考えられる。また、ストレスがかかる期間も関与していることが推察される。

健常者のカットオフ値を決定するためにはさらに症例数を重ねる必要があり、年齢や性差を考慮しつつ検討を継続する。

駆血による影響については、Endo-PAT ではコントロール測定により相殺されるため、少ないのかもしれないが、今回 3 例であるため有意な傾向を見出すことができなかった。症例数を増やし検討を継続する。さらに今後、カフェインや運動による影響の検討を行う予定である。

血管内皮機能の早朝空腹時測定および、日内変動測定は動脈硬化の早期発見に非常に有用であると考えられた。

5. 論文及び学会発表

第 79 回日本循環器学会学術集会にて、発表予定である。

[目次に戻る](#)

<医療技術研究助成>

腹膜透析患者の出口部感染の実態と関連要因

竹山 志津子

横浜市立大学附属病院 看護部 医学部看護学科 成人看護学 I 付け

分担研究者

岩崎 和子

(横浜市立大学附属病院 血液浄化センター)

森 みずえ、金嶋 祐加、渡部 節子

(横浜市立大学医学部看護学科 成人看護学 I)

抄録

腹膜透析患者の出口部感染の実態を把握し、出口部感染と出口部管理との関連を明らかにすることを目的とした。

外来通院中の腹膜透析患者の過去 2 年間の診療記録から、性別、年齢、透析導入疾患などの患者背景と外来受診時の身体状況をデータ収集し、感染群、非感染群に分けて関連要因について分析を行った。

対象者 16 人のうち、出口部感染を起こした患者（感染群）は 11 人（68%）であった。感染群 11 人中 7 人（64%）が就労や家事を行っており、非感染群 0 人であった。BMI において感染群 11 人中 9 人（82%）が 25 以上の肥満であった。固定方法については、出口部に機械的刺激を与えられないようカテーテルを出口部の下部に自然の向きでテープ固定するように指導されているにも関わらず、カテーテルの走行に反した向きで固定している患者が感染群に 2 人（18%）みられた。出口部周囲の皮膚の特性として、感染群 8 人（73%）が出口部周囲の乾燥やかゆみ、テープかぶれを訴えていた。

患者が指導された管理方法を実践できるように教育・指導すること、さらに腹部から出ている部分を短くするなど、今よりも患者負担を軽減できるような PD カテーテルの形状を検討する必要がある。

腹膜透析患者の出口部感染の実態と関連要因

竹山 志津子

横浜市立大学附属病院 看護部 医学部看護学科 成人看護学 I 付け

共同研究者

岩崎 和子

(横浜市立大学附属病院 血液浄化センター)

森 みずえ、金嶋 祐加、渡部 節子

(横浜市立大学医学部看護学科 成人看護学 I)

1. 目的

腹膜透析 (peritoneal dialysis ; PD) は、腹腔内への透析液の交通路としてシリコン製カテーテルを留置する。このカテーテルの出口部の皮膚は常に異物であるカテーテルと接しているため外圧による刺激や出口部付近に蓄積した浸出液などが細菌叢を増大させ、その結果として出口部感染を起こしやすく、腹膜炎の要因のひとつとなっている¹⁾。

出口部感染を起こした患者は、痛みを伴うだけでなく、出口部が感染している状態を自分自身で目視できることから腹膜炎になってしまうのではないかという不安感や出口部に不快感を生じる。さらに出口部の消毒や軟膏塗布などの処置を行う煩わしさにより日常生活活動性が下がることが多く、なかには、PD を選択したことを後悔する患者もおり、出口部感染を起こすことは患者の QOL を著しく低下させる原因となり得る。

本研究では、外来通院中の腹膜透析患者の過去 2 年間の診療記録を振り返り、出口部感染の実態を把握し、先行研究で示されている出口部感染のリスクファクター²⁾ について追試すると共に、出口部感染と出口部管理との関連を明らかにすることを目的とする。

2. 方法

1) 研究デザイン

実態調査

2) 研究対象

横浜市立大学附属病院に通院中の腹膜透析を受けている成人患者 16 人。認知機能障害等本人より研究参加の同意が取れない患者は対象外とする。

3) データ収集方法

研究対象者の過去 2 年間の診療記録 (電子カルテ、腹膜透析外来患者問診票) から、性別、年齢、BMI、透析導入疾患、出口部の位置、PD カテーテル手術日、術式、PD 導入日、既往歴、透析内容 (CAPD、APD)、研究対象の外来受診時の身体状況 (体重、出口部の状態、出口部感染の有無と治療の有無、血液データ (Hb、Tp、Alb、HbA1c)、出口部の処置方法、出口部洗浄方法、出口部付近の皮膚の特性、就労や家事をしているかなどの情報を収集した。

4) データ収集期間

平成 26 年 6 月 5 日～7 月 31 日

5) 倫理的配慮

横浜市立大学附属病院の倫理委員会の承認を受け（承認番号 B140508001）、調査対象には研究趣旨の説明を文書と口頭で行い、研究参加の同意を得た。

3. 結果

研究の同意を得られた患者は 16 人全員であった。（血液透析併用療法 1 人を含む）

1) 出口部感染の実態

対象者 16 人のうち、過去 2 年間に出口部感染を起こした患者は 11 人（68%）、出口部感染をおこさなかった患者は 5 人（32%）だった。出口部感染を起こした患者のうち、1 回のみ感染した患者は 2 人、2 回以上感染を起こした患者は 9 人で、最多は 8 回であった。また、出口部感染から波及し、皮下に挿入されているカテーテルに沿って感染おこすトンネル感染発症患者は 4 人みられた。出口部感染と診断され、外来で抗生剤内服投与され軽快した患者が 7 人、入院加療が必要となった患者が 4 人であった。そして、出口部感染は起こしていないが、腹膜炎を発症した患者が 1 人みられた。

2) 関連要因

出口部感染群（以後、感染群）と出口部非感染群（以後、非感染群）の患者背景を比較した。感染群の男女比は男性 4 人（36%）、女性 7 人（64%）で、非感染群は 5 人全員が男性であった。また、感染群は 7 人が就労や家事を行っており、非感染群 0 人であった。BMI において感染群は 9 人/11 人（82%）、非感染群は 3 人/5 人（60%）が 25 以上（標準以上）であり、30 以上は感染群 3 人（27.1%）、非感染群 0 人で肥満であった。（表 1）

表 1 患者背景

	感染群 11 人 (68%)	非感染群 5 人 (32%)
男/女 (人)	4 (36%) / 7 (64%)	5 (100%) / 0
年齢 (才, 平均値 最小値 - 最大値)	59.7 (40-78)	65.0 (46-82)
就労・家事をしている (人)	7 (64%)	0 (0%)
CAPD/APD (人)	7 (64%) / 4 (36%)	3 (60%) / 2 (40%)
SMAP 法 (人)	4 (36%)	1 (20%)
糖尿病性腎症 (人)	5 (45%)	3 (60%)
平均 HbA1c (% , 平均値 最小値 - 最大値)	6.3 (5.4-7.1)	6.1 (5.3-6.8)
平均 Alb (g/dL, 平均値 最小値 - 最大値)	3.5 (2.7-4.2)	3.5 (3.2-3.9)
平均 Hb (g/dL, 平均値 最小値 - 最大値)	10.9 (10.2-11.9)	10.9 (10.7-11.0)
平均 BMI (平均 最小値 - 最大値)	28.4 (23.9-36.5)	25.3 (24.3-26.8)

3) 出口部管理

まず消毒については、感染群も非感染群もカテーテル挿入術後1か月間は出口部が形成されていないため、消毒（グルコン酸クロルヘキシジン）するよう指導されており、患者は指導のとおりに行っていた。術後1か月以降は、原則として直接出口部にシャワーを当てて洗浄するオープンシャワーの方法が指導されており、出口部周囲に発赤などの感染兆候が見られた場合は、洗浄に加え消毒と抗生剤入りの軟膏塗布を適宜指示されていた。固定方法については、出口部に機械的刺激を与えられないようカテーテルを出口部の下部に自然の向きでテープ固定するように指導されていた。しかし、指導されているにも関わらず、カテーテルの走行に反した向きで固定している患者が感染群に2人（18%）みられた。非感染群では、固定を指導の通り行っていた。

出口部周囲の皮膚の特性として、感染群8人/11人（73%）が出口部周囲の乾燥やかゆみ、テープかぶれを訴えていた。そのため、「かゆくてついカテーテルを引っ張ってしまう」、また、「テープ固定が十分にできない」という訴えがあった。非感染群でも、出口部周囲の乾燥が見られていたが、皮膚かぶれをおこすほどの症状はみられなかった。

4. 考察

PDは、残存腎機能が維持できること、心血管への負担が少ないこと等の身体面だけでなく、血液透析に比べ時間的拘束が少ないことから患者のQOLが維持できるという生活面での利点もある。そのためPDを選択する患者は、就労や家事などを行っている活動量が高い方が多い。しかし、今回の結果では、対象が少数であるものの、就労や家事を行う患者に出口部感染が見られたことから、活動によってカテーテルが動きやすくなり出口部損傷のきっかけになっていると思われる。また感染群で82%がBMI25以上、そのうちBMI30以上の患者が27%であったことから肥満が多いことが分かった。臨床では、腹部の皮下脂肪があるためにカテーテルを固定しにくく出口部管理に難渋することがあるのだが、それを裏付ける結果となった。このような肥満患者の腹部の皮膚は脆弱であり、年齢や疾患の特性からも皮脂が欠乏しやすく乾燥傾向である。そこへ繰り返しテープ固定することは、かゆみやかぶれなどのトラブルを生じやすく、固定をしようにも十分にできない状況が考えられる。

今後は、これら出口部感染の要因をもつ患者にあった出口部管理方法を考え、それを実践できるような教育・指導が重要である。さらに、腹部から30cm以上も出ている現在のPDカテーテルを見直し、腹部から出ている部分を短くするなど、今より出口部のトラブルを減少させ、患者の負担を軽減できるようなPDカテーテルの形状を検討する必要がある。

文献

- 1) 坂口美佳, 今田聰雄: 臓器別のアプローチ 腎臓 腹膜透析の出口部感染, 臨床透析. 24(7): 943-944. 2008.
- 2) Bunnag S, Thanakitcharu P, Krairittichai U et al; Risk factors of infection peritonitis of CAPD patients in Rajavithi Hospital, J Med Assoc Thai. 94: 37-43, 2011.

<医療技術研究助成>

頭頸部癌患者の化学療法・放射線療法同時併用療法における
有害事象をモニタリングするための評価シートの導入

山内加奈、
横浜市立大学附属病院 9-3 病棟

渡邊恵美、藤田純、西原春花、玉井ゆう子、田口享秀
横浜市立大学附属病院 9-3 病棟

本研究は有害事象評価シートを用いて、治療中の患者の観察・情報を共有することで、有害事象の的確な把握および、医師との情報共有等における利点を明らかにし、導入の可能性についての示唆を得ることを目的としたものである。有害事象評価シートを用いることで、看護師の有害事象に対するアセスメント能力を高めることにつながり、結果として有害事象の軽減のための早期看護介入、重症合併症の予防、そして治療期の患者のQOL向上に繋がることを期待した。

結果、有害事象評価シートを用いることによる具体的な看護への活用性の示唆が得られたが、看護師のアセスメント能力の向上に繋がるという検証については、今後の課題となった。多くの抗癌剤による治療にも対応できるように薬剤に出現しやすい有害事象の項目を取り入れたGrade表（評価基準）および有害事象評価シートの作成を検討し、より幅広い化学療法・放射線治療による有害事象アセスメントに役立つように進めていきたい。

頭頸部癌患者の化学療法・放射線療法同時併用療法における 有害事象をモニタリングするための評価シートの導入

山内加奈

横浜市立大学附属病院 9-3 病棟

渡邊恵美、藤田純、西原春花、田口享秀

横浜市立大学附属病院 9-3 病棟

1. 目的

先行研究¹⁾において、ホスピス・緩和ケア領域で心身の状態・症状を評価する尺度である STAS-J²⁾ を使用したが、患者の有害事象とその苦痛自体を評価するのは難しかった。そこで、観察項目をより頭頸部癌の治療期の症状に焦点を合わせ、診療に使用される有害事象を評価する尺度である「有害事象共通用語規準 V4.0」³⁾ を基に、有害事象の Grade 表（評価基準）を提示し、有害事象評価シートを用いて、治療中の患者の観察・情報を共有することで、有害事象の的確な把握および、医師との情報共有等における利点を明らかにし、導入の可能性についての示唆を得ることを目的とする。

2. 方法

- 1) 調査対象者には有害事象評価シート^{表1)}と有害事象共通用語規準 V4.0 を用いた Grade 表（評価基準）^{表2)} を使用し、化学療法中の患者において以下の様に 2 週間のモニタリングを実施してもらった。
 - ・日勤担当看護師は 1 日 1 回、患者状態を観察し有害事象の Grade をシートに記入する。
 - ・医師はシートを閲覧し、確認する。
- 2) 有害事象評価シート使用後にアンケート調査を行った。

3. 結果

有害事象評価シート使用後の認識について、本シートの導入意志は質全員が肯定的であった（図 1）。次に、本シートを使用後の具体的な看護への活用性について、利点として 40-60%が選択していた項目は、「観察ポイントが明確になる」「漏れなく症状のモニタリングができる」「一週間の状態変化を把握しやすい」「より主観がなくなり正確な評価ができる」「患者状態が把握しやすい」であった。しかし、欠点として「別紙で煩わしい」「医師の閲覧忘れ」があり、さらに「電子カルテ上とシートでの評価が重なる」という意見が 8 名（44.4%）と多く、その中に医師 4 名が含まれていた（図 2）。

4. 考察

有害事象共通用語規準 V4.0 を基に作成した本シートを使用し症状の観察を行うことによって、看護師は、知識や判断がつくことや患者介入に役立つと認知していることがわかった。具体的には、観察ポイントの明確さや客観性、観察漏れのないこと、また症状変化の把握などにおいて有益であることを認識した看護師が多かった。これは、先行研究の STAS-J よりも評価内容において、治療中の患者における有害事象を網羅し、客観的・具体的に示しているためと考えられた。また、これらの観察・評価内容は、アセスメントが未熟な看護師において教育的な役割を果たすと考えられる。本シートを用いることで、新人や耳鼻科領域の経験年数が浅いスタッフがアセスメントする際の思考プロセスの補助や教育的側面での活用が期待できると考える。同じ客観的指標を用いた症状把握や共有は、カンファレンスでの活用も有用であり、そのことでより情報共有が円滑になることも期待できる。しかし、本研究では、シートを用いて患者状態の共有や医師への報告などはあまり実施されず、カンファレンス等で、活用されていないことが課題として上がっていた。今後は、紙上事例を用いたトレーニングや学習会を重ね、理解を深めていく必要があると考えられた。また、本シート使用による業務的負担については、臨床業務が電子カルテ記載であるのに対し、本シートは紙ベースであり二重に記録することが要因として考えられた。今後、電子カルテ上で本シートを活用できるようなシステム上の整備が必要であると考えられる。今回の研究では、本シートを用いることによる具体的な看護への活用性の示唆が得られたが、実際に看護師のアセスメント能力の向上に繋がるというかの検証については、今後の課題となった。

参考文献

- 1) 平井浩美他：頭頸部がん患者の治療期における症状緩和の検討～「STAS-J」を用いたスコアシートの作成と運用について～，日本看護協会，2010, 168
- 2) STAS ワーキング・グループ、STAS-J スコアリングマニュアル第3版、日本ホスピス・緩和ケア研究振興財団
- 3) 有害事象共通用語規準 V4.0 日本語訳 JCOG 版 <http://www.jcog.jp>

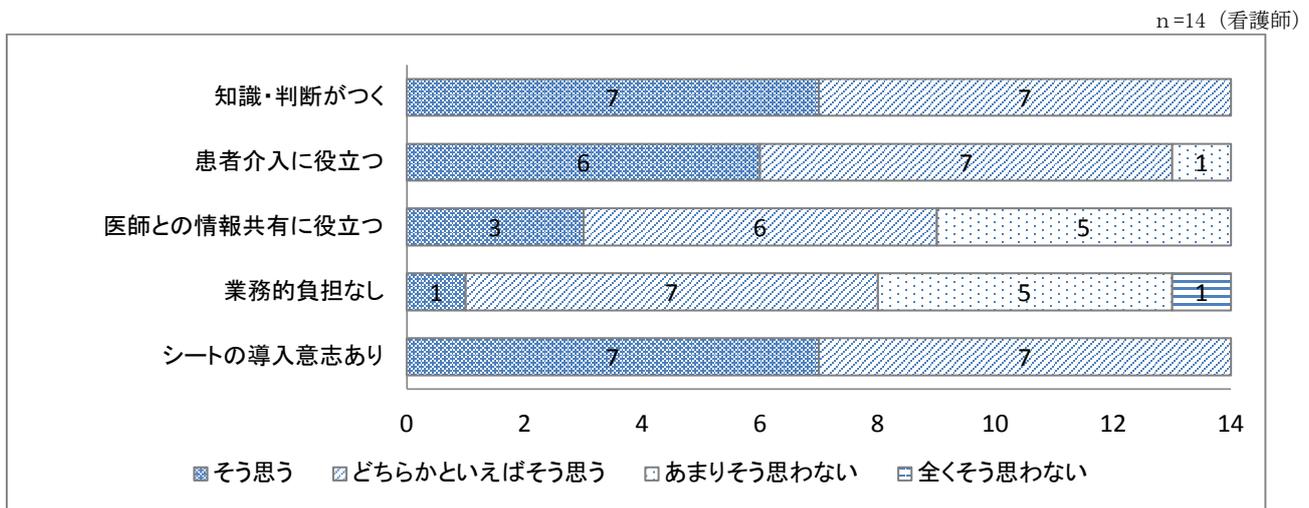


図1 有害事象評価シートを使用後の認識

図2 有害事象評価シート使用後の具体的な看護の活用性について

n = 18 (看護師 14 名・医師 4 名) 複数回答

	項目	名	%
利点	観察ポイントが明確になる	12	66.7
	漏れなく症状のモニタリングができる	10	55.6
	一週間の状態変化を把握しやすい	10	55.6
	より主観がなくなり正確な評価ができる	8	44.4
	患者状態が把握しやすい	8	44.4
	カンファレンスに活用できる	5	27.8
	次の治療の際に活用できる	4	22.2
	どんな看護介入がされたかわかりやすい	2	11.1
	アセスメントの参考になった。(自由記載)	1	5.6
	医師と共通認識しやすい(自由記載)	1	5.6
欠点	別紙で煩わしい	1	5.6
	医師の閲覧忘れ(自由記載)	2	11.1
	電子カルテ上とシートでの評価が重なる(自由記載)	8	44.4

<有害事象評価シート>

表1

日付	/	/	/	/	/	/	/
鎮痛剤 種類/mg/日							
屯用(昨日) 種類/回数							
放射線線量 (Gy)	Gy						
採血データ (検査日のみ)	CRP						
	WBC						
有害事象	Grade						
①咽喉痛							
②口腔粘膜炎							
③放射線性皮膚炎							
④悪心							
⑤便秘							
⑥下痢							
⑦発熱							
⑧精神障害							
⑨四肢浮腫							
Grade合計点							
評価者氏名							
医師サイン							

記載すべき事項追記
・鎮痛剤の変更や増量
・患者の状態変化
・看護介入
等があれば記載

Grade表(下段:説明)

有害事象共通用語規準V4.0引用

表2

	0点	Grade1(1点)	Grade2(2点)	Grade3(3点)	Grade4(4点)	Grade5(5点)
①咽喉痛	症状なし	軽度の疼痛 NRS1-3	中等度の疼痛;身の回り以外の日常生活動作の制限 NRS4-6	高度の疼痛;身の回りの日常生活動作の制限;嚥下の制限 NRS7-10	—	—
②口腔粘膜炎	症状なし	症状がない;または軽度の症状がある;治療を要さない 経口摂取に支障がない;食事変更を要しない	中等度の疼痛;経口摂取に支障がない;食事の変更を要する。 経口摂取に支障がない;食事変更を要する	高度の疼痛;経口摂取に支障がある 経口摂取に支障がある;経管栄養、中心静脈栄養*治療前よりそれらを使用している場合は除外	生命を脅かす;緊急処置を要する	死亡
③放射線性皮膚炎	症状なし	わずかな紅斑や乾性落屑 軽度発赤、乾燥	中等度から高度な紅斑;まだらな湿性落屑、ただしほとんどが顔や髪に限局している。中等度の浮腫 著明な発赤	顔や髪以外の部位の湿性落屑;軽度の外傷や摩擦により出血する。 浸出液・皮膚剥離	生命を脅かす;皮膚全層の壊死や潰瘍;病変部より自然に出血する;皮膚移植を要する 出血	死亡
④悪心	症状なし	摂食習慣に影響のない食欲低下 ムカムカするが、食事摂取量50%以上	顕著な体重減少、脱水または栄養失調を伴わない経口摂取量の低下 食事摂取量50%未満	カロリーや水分の経口摂取が不十分;経管栄養/TPN/入院を要する 食事摂取できず 点滴、経管栄養、中心静脈栄養挿入中*誤嚥が理由の場合は除外	—	—
⑤便秘	症状なし	不定期または間欠的な症状;便軟化剤/緩下剤/食事の工夫/洗腸を不定期に使用 便秘傾向だが下剤の使用なし	緩下剤または洗腸の定期的使用を要する持続的状態;身の回り以外の日常生活動作の制限 定期的な下剤の使用	排便を要する頑固な便秘;身の回りの日常生活動作の制限 洗腸や排便を要する頑固な便秘	生命を脅かす;緊急処置を要する	死亡
⑥下痢	症状なし	ベースラインと比べて<4回/日の排便回数増加;ベースラインと比べて人工肛門からの排泄量が軽度増加 3回以下	ベースラインと比べて4-6回/日排便回数増加;ベースラインと比べて人工肛門からの排泄量が中等度増加 4-6回	ベースラインと比べて7回/日異常の排便回数増加;便失禁;入院を要する;ベースラインと比べて人工肛門からの排泄量が高度増加;身の回りの日常生活動作の制限 7回以上	生命を脅かす;緊急処置を要する	死亡
⑦発熱	症状なし	38.0~39.0℃	>39.0~40.0℃	>40.0℃が≤24時間持続 >40.0℃が1日持続	>40.0℃が>24時間持続 >40.0℃が2日以上持続	死亡
⑧精神障害	症状なし	症状がない;または軽度の症状がある;臨床所見または検査所見のみ;治療を要さない 軽度の精神症状;不安定な言動 不眠により睡眠薬の開始または変更、増量	中等症;最小限/局所的/非侵襲的治療を要する;年齢相応の身の回りの日常生活動作の制限 中等度の精神症状;抗うつ薬使用 精神科併診、せん妄	重症または医学的に重大であるが、ただちに生命を脅かすものではない;入院または入院期間の延長を要する;活動不能/動作不能;身の回りの日常生活動作の制限 高度の精神症状;治療中断	生命を脅かす;入院を要する。緊急処置を要する 生命を脅かす;自傷他害の危険がある	死亡
⑨四肢浮腫	症状なし	四肢間の差が最も大きく見える部分で、体積または周長の差が5-10%;腫脹または四肢の解剖学的構造が不明瞭になっていることが診察で容易にわかる;皮膚のしわの消失;解剖学的な輪郭の異常が容易にわかる;身の回り以外の日常生活動作の制限 四肢浮腫あり	四肢間の差が最も大きく見える部分で、体積または周長の差が>10-30%;腫脹または四肢の解剖学的構造が不明瞭になっていることが診察で容易にわかる;皮膚のしわの消失;解剖学的な輪郭の異常が容易にわかる;身の回り以外の日常生活動作の制限 化学療法開始時から体重5kg以上の増加	体積の差が>30%リンパ漏;解剖学的な輪郭の異常が著名である;身の回りの日常生活動作の制限 歩行障害	—	—

<医療技術研究助成>

前立腺癌永久挿入密封小線源療法における

最適なシード線源数の予測式作成

村上 朋史

公立大学法人横浜市立大学附属病院放射線部

(共同研究者名)

臼井 淳之

公立大学法人横浜市立大学附属病院放射線部

小池 泉 糟谷 健夫 幡多 政治 井上 登美夫

公立大学法人横浜市立大学附属病院放射線科

抄録

目的：前立腺に挿入するシード線源は、Volume study 時の前立腺容積から、前立腺容積一投与総線量予測式をもとに購入する。また、術直前に再度治療計画を行い、挿入する線源数を決定する。しかし、前立腺容積は本治療の前後で変化することもあり、購入した線源数に過不足が生じることがある。また、挿入した線源数の適切性は、前立腺容積一投与総線量の関係だけでは評価できない。今回、前立腺容積から予測される線源数を術後治療計画の結果をもとに修正し、より最適な線源数の予測式を検討した。

方法：治療前後における前立腺容積の変化を抽出するため、Volume study、術直前治療計画及び術後治療計画における前立腺容積の関係を求めた。また、挿入した線源数の適切性を検討するため、放射線治療ガイドラインを参考に症例を 4 つの群に区分し、線源強度毎に前立腺容積と挿入した線源数との関係を求めた。

結果：volume study 時と術後治療計画時における前立腺容積の平均値の差は約 2cc であった。0.33mCi の線源を使用した症例では 4 群間に有意差は見られなかった。0.35mCi の線源を使用した症例では 4 群間に有意差がみられた。

結論：術後治療計画の結果を還元することにより、ガイドラインの目標値から外れる要因を除外し、予測線源数を修正することが可能であった。

前立腺癌永久挿入密封小線源療法における

最適なシード線源数の予測式作成

村上 朋史

公立大学法人横浜市立大学附属病院放射線部

(共同研究者名)

臼井 淳之

公立大学法人横浜市立大学附属病院放射線部

小池 泉 糟谷 健夫 幡多 政治 井上 登美夫

公立大学法人横浜市立大学附属病院放射線科

1. 目的

当院では、前立腺癌患者に対するヨウ素 125 永久挿入密封小線源療法を、年間 200 例程度実施している。前立腺に挿入するシード線源(以下、線源)は、治療の約 1 か月前に実施される経直腸的超音波断層法(以下、TRUS)にて前立腺容積を取得(以下、Volume study)し、前立腺容積一投与総線量予測式をもとに購入する。治療当日、術直前に再度 TRUS にて前立腺容積を取得し、治療計画を行い(以下、術前治療計画)実際に挿入する線源数を決定する。この前立腺容積は本治療の前後で変化することもあり、事前に注文した線源数に過不足が生じることがある。また、挿入した線源数が適切であったかは、前立腺容積一投与総線量の関係だけでは評価できない。

前立腺容積と実際に挿入する線源数を検討した報告は多く存在するが、施術の約 1 か月後に前立腺や尿道、直腸などへの線量指標を再検討する術後治療計画から予測線源数を評価した報告は少ない。今回、Volume study にて得られた前立腺容積から予測される線源数を術後治療計画の結果をもとに修正し、より最適な線源数の予測式を検討した。

2. 対象及び集計

2011 年 1 月より 2014 年 1 月までの 3 年間に治療を実施した症例のうち、体内線源移動症例、小線源・外照射併用症例、線源強度の異なる線源を複合して使用した症例を除く、212 症例を対象とした。

当院では、1 週間のうち、水曜日及び金曜日を本治療の実施日としており、原則、同一検定日の線源を異なる 2 日間で使用する。そのため、線源数の予測は、治療に使用する 0.33mCi (112 症例)と 0.35mCi (100 症例)の線源強度毎に集計を行った。

3. 方法

3-1. Volume study、術直前治療計画及び術後治療計画における前立腺容積

本治療の前後における前立腺容積の変化を抽出するため、Volume study、術直前治療計画及び術後治療計画における前立腺容積の関係を求めた。

3-2. 実際に挿入した線源数と術後線量評価

実際に挿入した線源数の適切性を比較検討するため、放射線治療ガイドライン 2012¹⁾に記載されている術後線量評価の目標値(表 1)を参考に、212 症例を 4 つの群(表 2)に区分した。群の区分は、目標値を満たす「Clear」、前立腺の D90 が 145Gy 未満、V100 が 95%未満となり、目標値下限を下回った「Low」、前立腺の V150 が 60%以上、直腸の V100 が 1ml 以上となり、目標値上限を上回った「High」、「Low」と「high」が混在する「Both」とした。

線源強度毎に術直前治療計画における前立腺容積と挿入した線源数との関係を求めた。これらの関係について 4 つの群間で有意差が見られるか共分散分析を行った。共分散分析にて有意差が認められた場合は、どの群間で有意差が生じたかを求めた。

表1. 放射線治療ガイドライン2012に記載されている術後線量評価の目標値

部位	指標
前立腺	D90>145Gy、V100>95%、V150<60%
直腸	V100<1ml

表 2. 術後線量評価の指標を参考にした群区分及び条件

群	条件
Clear	D90 \geq 145Gy、V100 \geq 95%、V150<60%、直腸V100<1ml。
Low	D90<145Gy、V100<95% またはその両方。
High	V150 \geq 60%、直腸V100 \geq 1ml またはその両方。
Both	D90<145Gy、V100<95% またはその両方。V150 \geq 60%、直腸V100 \geq 1ml またはその両方。

4. 結果

4-1. Volume study、術直前治療計画及び術後治療計画における前立腺容積

本治療約 1 か月前に施行される TRUS を用いた volume study 時の前立腺容積、治療当日の術直前治療計画における前立腺容積及び術後治療計画における前立腺容積の平均値はそれぞれ、26.55cc \pm 7.95cc (range 10.3cc~45.0cc)、27.31cc \pm 8.01cc (range 10.6cc~46.5cc)、28.41cc \pm 8.41cc (range 10.6cc~50.3cc)であった。volume study 時の前立腺容積と術後治療計画における前立腺容積の平均値の差は約 2cc であった。

表 3. Volume study、術直前治療計画及び術後治療計画における前立腺容積

	mean	(range)	SD
Prostate volume of volume study [cc]	26.59	10.3~45.0	\pm 7.95
Prostate volume of intraoperative preplanning [cc]	27.34	10.6~46.5	\pm 8.01
Prostate volume of postplanning [cc]	28.41	10.6~50.3	\pm 8.41

4-2. 実際に挿入した線源数と術後線量評価

0.33mCi の線源を使用した症例の術直前治療計画における前立腺容積(x)と挿入線源数(y)との関係は、「Clear」群で $y = 1.61x + 27.98$ $R^2 = 0.979$ 、「Low」群で $y = 1.59x + 27.98$ $R^2 = 0.943$ 、「High」群で $y = 1.62x + 28.09$ $R^2 = 0.928$ 、「Both」群で $y = 1.75x + 25.88$ $R^2 = 0.990$ であった。また、4 群間の共分散分析の結果、4 群間に有意差は見られなかった。4 群すべてを含めた術直前前立腺容積と

挿入線源数の関係は $y = 1.63x + 27.33$ であった。

0.35mCi の線源を使用した症例では、「Clear」群で $y = 1.44x + 28.74$ $R^2 = 0.953$ 、「Low」群で $y = 1.40x + 27.55$ $R^2 = 0.947$ 、「High」群で $y = 1.77x + 22.90$ $R^2 = 0.943$ 、「Both」群で $y = 1.53x + 25.64$ $R^2 = 0.977$ であった。また、4群間の共分散分析の結果、4群間に有意差がみられた。有意差は、「Clear」群－「High」群間、「Low」－「High」群間、「Both」－「High」群間において認められた。「High」群を除いた術直前治療計画における前立腺容積と挿入線源数の関係は $1.53x + 25.63$ であった。

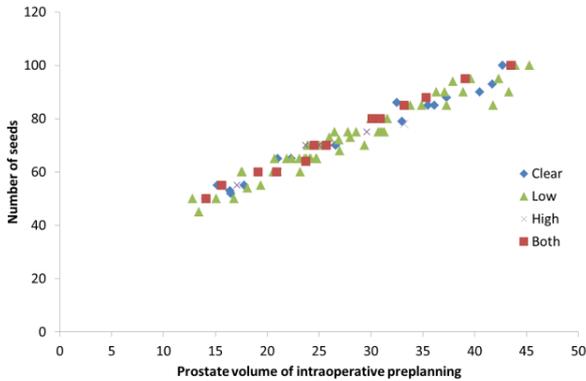


図 1. 4群における 0.33mCi 線源使用時の術直前前立腺容積と挿入線源数の関係

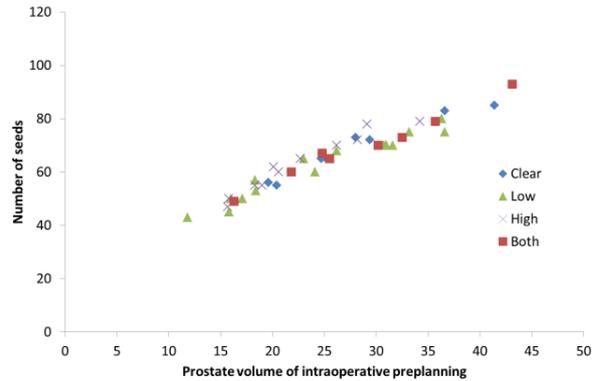


図 2. 4群における 0.35mCi 線源使用時の術直前前立腺容積と挿入線源数の関係

表 4. 0.33mCi 線源使用時の 4 群間の有意差検定

0.33mCi	平方和	自由度	平均平方	F値	F値境界
群間変動	5.64	3	1.88	2.13	< 2.69
群内変動	94.52	107	0.88		

表 5. 0.35mCi 線源使用時の 4 群間の有意差検定

0.35mCi	平方和	自由度	平均平方	F値	F値境界
群間変動	9.43	3	3.14	3.61	> 2.70
群内変動	82.65	95	0.87		

5. 考察

本治療では、TRUS を用いて得られた前立腺容積に必要な放射線量が投与されるように線源を挿入する。治療前後で前立腺容積が変化した場合、意図した線量分布が得られず、投与線量の過不足が生じる。volume study 時の前立腺容積と術後治療計画における前立腺容積の平均の差は約 2cc であったことから、治療前後の前立腺容積の変化は少なく、前立腺容積の変化が治療計画における線量分布に及ぼす影響は少ないと考えられた。

0.33mCi の線源を使用した症例において、術直前前立腺容積及び挿入線源数の相関は高く、各群間に有意差は見られなかった。このことから、術直前前立腺容積から挿入線源数を推定することは可能であったが、術後治療計画の結果をもとに挿入線源数を修正することはできなかった。0.35mCi を使用した症例においては、術直前前立腺容積及び挿入線源数の相関は高く、「High」と「Clear」「Low」「Both」の群間に有意差が認められた。このことから「High」群を除いて線源数を推定することにより、過剰な放射線量を避ける線源数の推定が可能と考えられる。以上より、0.33mCi の線源強度を用いた症例における線源数は、 $1.63 \times [1.02 \times \text{「Volume study における前立腺容積」}] + 27.33$ 本、0.35mCi の線源強度を用いた症例における線源数は、「high」群を除いた $1.53 \times [1.02 \times \text{「Volume study における前立腺容積」}] + 25.63$

本による推定が妥当と考えられる。

今回、術後治療計画の結果から使用する線源強度毎に評価を行い予測線源数の検討を行った。術後治療計画の結果を還元することにより、放射線治療ガイドライン 2012 の目標値から外れる要因を除外し、予測線源数を修正することが可能であった。2014 年度より、挿入した線源位置を画像に反映させて計画を作成する interactive planning が可能となった。今後、これらの挿入法と術後治療計画の結果から予測線源数の検証を行うことでより精度の高い線源数の予測が可能になると考えられる。

<医療技術研究助成>

リアルタイム PCR 法による EB ウイルス DNA 定量検査法の確立

山西有紀

(共同研究者：田中春華、竹森美紀)

横浜市立大学附属市民総合医療センター 臨床検査部

抄録

EB ウイルスは伝染性単核症やリンパ性腫瘍をはじめ、様々な疾患と関連があることが知られている。リアルタイム PCR 法による EB ウイルスの定量検査は、無症候性感染との区別ができることから免疫抑制を行っている患者のモニタリングに有用である。本研究は、EB ウイルス定量検査法を確立することを目的とし、検出感度、再現性、直線性および外部委託検査結果との相関を検討した。今回使用した EB ウイルス定量試薬ではウイルスゲノムコピー数が 5 copies/test 以上から検出可能であった。再現性も良好であり、標準細胞を用いた希釈直線性も確認できた。しかしながら、EB ウイルスの測定結果は施設間差が大きいことが報告されており、外部委託検査との結果の乖離がみられた。その原因としては、DNA 抽出に用いた白血球数の不足と、ウイルス量の高い検体が少なかったためと考えられた。今後は血液量を増やし、定量値の保証される領域での解析を追加し、移植後リンパ球増殖症や慢性 EBV 感染症などの重篤疾患の鑑別および治療後のモニタリングが可能か検討したい。

リアルタイム PCR 法による EB ウイルス DNA 定量検査法の確立

山西有紀

(共同研究者：田中春華、竹森美紀)

横浜市立大学附属市民総合医療センター 臨床検査部

1. 目的

EB ウイルスは伝染性単核症やリンパ性腫瘍をはじめ、様々な疾患と関連があることが知られている。特に臓器移植患者は、免疫抑制剤を投与され、ウイルス感染症が発症しやすいため、迅速に診断可能な検査が必要である。従来、ウイルス抗体価が保険収載されているが、免疫抑制を行っている患者では抗体価による感染の診断は不可能である。近年では PCR 法によるウイルス DNA の検出が行われており、感度は非常に高いが、既往感染率の高い EB ウイルスの場合、ウイルスの有無のみでは臨床的な解釈が困難である。リアルタイム PCR 法は、ウイルス量を直接反映するウイルス DNA を定量するため、無症候性感染との区別ができ、さらに測定時間も短縮される。しかしながら、測定方法が標準化されていないため、実際に測定を行っている施設でもその方法や結果の報告様式は様々である。

当院では血液内科を中心に EB ウイルス DNA 定量の依頼があるが、保険収載されていないため病院負担または研究費で外部委託検査に依頼している。院内で実施した場合、安価で迅速な検査結果の提供が可能となり、早期の診断治療に貢献できる。

本研究では、院内導入を視野に入れ、検出感度、再現性、直線性の検討を行い、測定範囲を明確にし、診断に適した報告様式を選別し、EB ウイルス定量検査法を確立することを目的とする。

2. 方法

対象：EB ウイルス DNA 定量検査の依頼がある患者の EDTA-2K 加全血 23 件。

方法：検量線用のスタンダードを希釈し検出感度を求めた。標準細胞を 7.6×10^5 コ/200 μ l となるように PBS で調製後、10 倍段階希釈したもの 5 系列から DNA 抽出を行い、希釈直線性を求めた。標準細胞から抽出した DNA 溶液 1 濃度を用いて同時再現性を、3 濃度を用いて日差再現性を確認した。対象となる患者検体 23 件を DNA 抽出して測定後、外部委託検査の結果と比較した。

DNA 抽出は、対象検体については EDTA-2K 加全血 200 μ l、標準細胞については Namalwa 細胞(JCRB 細胞バンク)を PBS で溶解したもの 200 μ l から、QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて実施した。ウイルスの測定は EBV PPS Set (日本遺伝子研究所)の試薬キットを使用し、Light Cycler 480 System II (Roche Diagnostics)を用いてリアルタイム PCR 法にて検出した。

3.結果

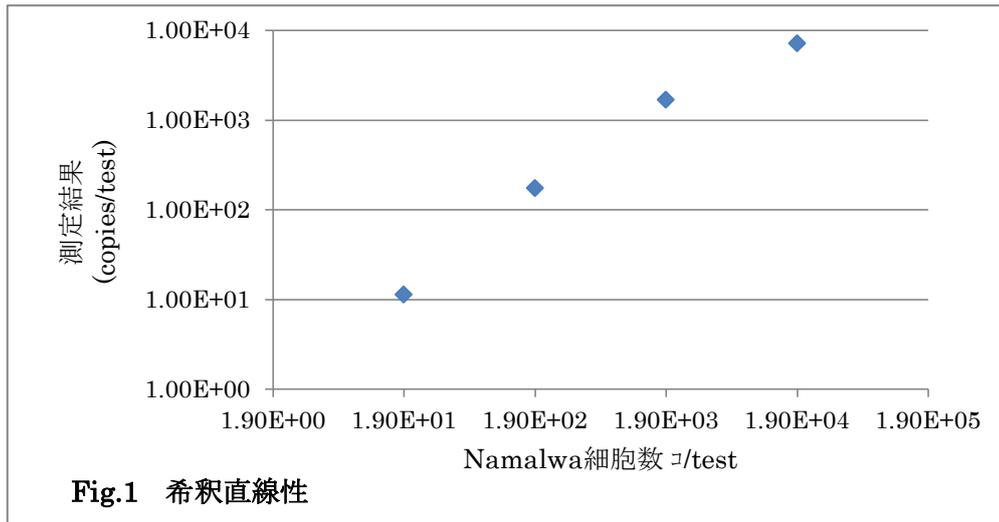
(1) 検出感度

検量線用のスタンダードを希釈し(50、25、10、5 copies/test)3重測定を実施した結果、5 copies/test まで検出可能であった。各々の濃度に対する測定結果は以下のとおりである。

	50copies/test	25copies/test	10copies/test	5copies/test
測定値 (copies/test)	5.84E+01	1.73E+01	8.38E+00	7.58E+00
	6.07E+01	3.49E+01	1.54E+01	6.50E+00
	4.56E+01	1.76E+01	4.74E+00	1.16E+00
平均	5.49E+01	2.3E+01	9.51E+00	5.08E+00
SD	6.64	8.23	4.42	2.81
CV(%)	12.1	35.4	46.5	55.3

(2) 希釈直線性

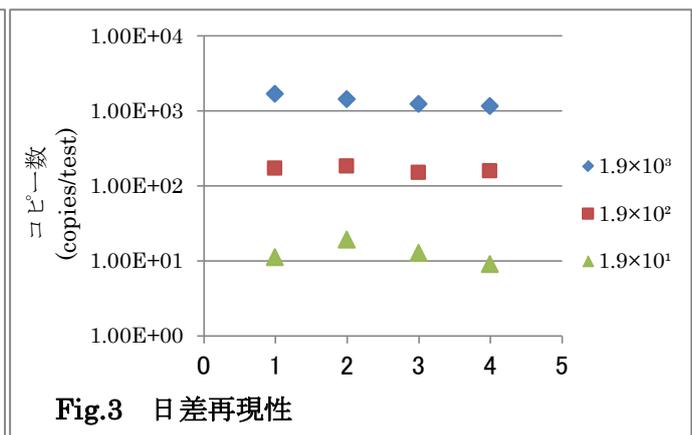
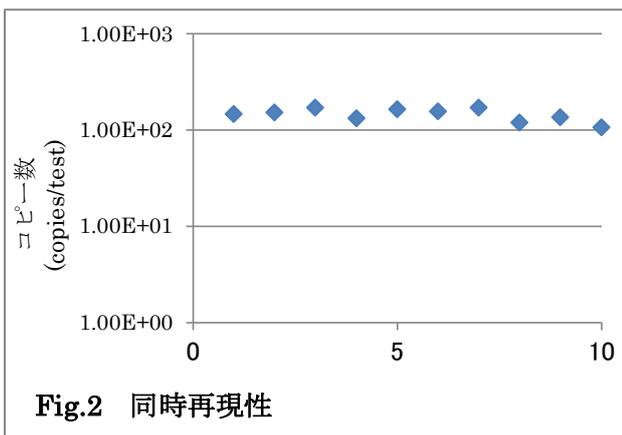
標準細胞(Namalwa 細胞)を段階希釈したものから DNA を抽出して希釈直線性を求めた結果、 $1.90E+01$ コピー/test から $1.90E+03$ コピー/test の範囲で直線性が得られた(**Fig.1**)。



(3) 再現性

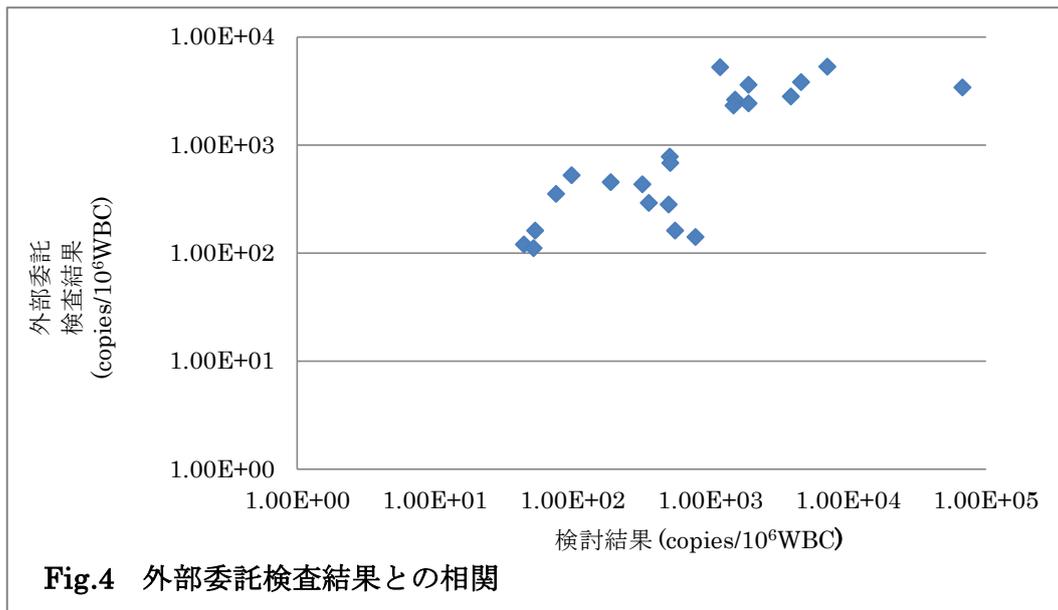
標準細胞から抽出した DNA(1.9×10^2 コピー/test)を同時に 10 重測定したところ、CV14.9%と再現性は良好であった(**Fig.2**)。

3濃度の標準細胞から抽出した DNA 溶液(1.9×10^3 、 1.9×10^2 、 1.9×10^1 コピー/test)をそれぞれ 4 日間 実施したところ、CVは 1.9×10^3 コピー/test で 16.9%、 1.9×10^2 コピー/test で 9.2%、 1.9×10^1 コピー/test で 33.5%と再現性は良好であった(**Fig.3**)。



(4) 外部委託検査結果との相関

外部委託検査結果と今回の検討の測定結果には相関は認められなかった(**Fig.4**)。



4.考察

今回使用した EB ウイルス定量試薬ではウイルスゲノムコピー数が 5 copies/test 以上は検出可能であることがわかった。また再現性も良好であり、標準細胞を用いた希釈直線性も確認できた。よって本試薬は、EB ウイルスの検出に優れたものであることがわかった。希釈直線性は、標準細胞の Namalwa 細胞株を 7.6×10^5 コ/200 μ l から 7.6×10^1 コ/200 μ l まで 10 倍希釈した検体から DNA 抽出を行った。各々測定に 5 μ l を用いて検出を行ったが、 1.9×10^0 コ/test は最小検出感度以下であり、検出されなかった。 1.9×10^1 コ/test から 1.9×10^3 コ/test までは直線性が確認できた。よって核酸の抽出においても回収効率が安定しているといえる。一方、 1.9×10^4 コ/test の検体は低値となった。核酸抽出を行う際に 7.6×10^5 コ /200 μ l を 1 カラムで抽出したことによる回収率の低下が示唆された。従来の報告では、健常人ではウイルスが検出されないため、 1×10^2 copies/10⁶WBC 以上で EB ウイルスが増殖している患者と健常人とを鑑別するとされており、本試薬においても定性検査として実施可能と考えられた。しかしながら、外部委託検査の結果との相関が認められなかった。病原体遺伝子を対象とした定量検査において、保険収載されている項目はごく一部であり、薬事承認を得た測定試薬が製造されている。EB ウイルスの定量は保険収載されておらず、外部検査センターにおいて、研究項目としてオリジナルの方法で測定されている。標準化されていない遺伝子定量検査では、施設間差が大きいことが報告されており、今回相関がみられなかったのは、抽出試薬、検出試薬が異なることがあげられる。さらに、今回用いた検体はウイルス量が少なく、ばらつきの生じやすい低コピー数の検体であるためと思われた。また、EB ウイルスのモニタリングが必要な患者は免疫抑制により白血球数が少なく、今回の研究のように 200 μ l の EDTA 加全血では測定に必要な量の DNA の採取が難しい。得られる DNA 量を増やすためには遠心操作により、白血球分画を高密度で回収し、DNA を抽出する必要がある。今後は DNA 抽出する白血球数を増やし、定量値の保証される領域で検出を行い、移植後リンパ球増殖症や慢性 EBV 感染症などの重篤疾患と緊急性の低い疾患との鑑別および治療後のモニタリングが可能か否か検討を行っていきたいと考えている。

5.論文及び学会発表

追加検討し、学会発表を予定している。

<医療技術研究助成>

剖検例のパラフィン包埋組織を用いた侵襲性アスペルギルス症発症に関与する遺伝子多型の解析

安芸 恭子、

東邦大学 医療センター 大森病院 病院病理部

学内共同研究者:

大久保 陽一郎, 篠崎 稔, 石渡 誉郎, 栃木 直文, 若山 恵, 根本 哲生, 渋谷 和俊、

学外共同研究者

(秋田大学): 南條博、増田弘毅

抄録

背景と目的: 侵襲性アスペルギルス症は免疫抑制患者に発症する重篤な深在性真菌症であり、その発症機序の解明は喫緊の課題である。近年欧州において、ヒト Toll 様受容体 (*TLR*) 4 遺伝子の一塩基多型 (Asp 299 Gly ならびに Thr 399 Ile) が発症危険因子であると報告されたが、邦人の詳細な検討はなされていない。本研究では既に包括同意を得た既存剖検例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を用いた後方視的臨床観察研究での遺伝子学的解析を企図した。**材料と方法:** 侵襲性アスペルギルス症と診断された剖検例の FFPE 肺組織を連結不可能匿名化処理した後、各 FFPE 肺組織より DNA を抽出し、PCR 法を施行後にシーケンス解析から当該一塩基多型の有無を検索した。**結果:** 症例集積の結果、27 例を得た。PCR 産物が得られた 10 例のうち、Asp 299 Gly は 9 例、Thr 399 Ile は 8 例の解析が可能であったが、全例において当該一塩基多型は認められなかった。**結論:** 邦人の侵襲性アスペルギルス症では当該一塩基多型の影響は極めて低いものと推測された。また、FFPE 組織を用いた後方視的臨床観察研究での遺伝子学的解析の有用性が示唆された。

剖検例のパラフィン包埋組織を用いた侵襲性アスペルギルス症発症に関与する遺伝子多型の解析

安芸 恭子、

東邦大学 医療センター 大森病院 病院病理部

学内共同研究者：

大久保 陽一郎, 篠崎 稔, 石渡 誉郎, 栃木 直文, 若山 恵, 根本 哲生, 渋谷 和俊、

学外共同研究者

(秋田大学)：南條博、増田弘毅

1. 目的

侵襲性アスペルギルス症は、免疫抑制患者に発症する重篤な深在性真菌症であり、その発症機序の解明は喫緊の課題である。近年欧州において、Toll-like receptor 4 (*TLR4*) 遺伝子の一塩基多型 (Asp 299 Gly ならびに Thr 399 Ile) が侵襲性アスペルギルス症の危険因子であると報告されたにも関わらず、未だ本邦において詳細な検討はなされていない。しかしながら同種の研究を新規に実施するには試料確保のために倫理的手続きを経て被験者を募る必要がある。そこで、本研究では既に包括同意が得た既存試料である剖検例のホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed, paraffin-embedded: FFPE) 組織を連結不可能匿名化の後に遺伝子学的解析に利用する後方視的臨床観察研究を企図した。

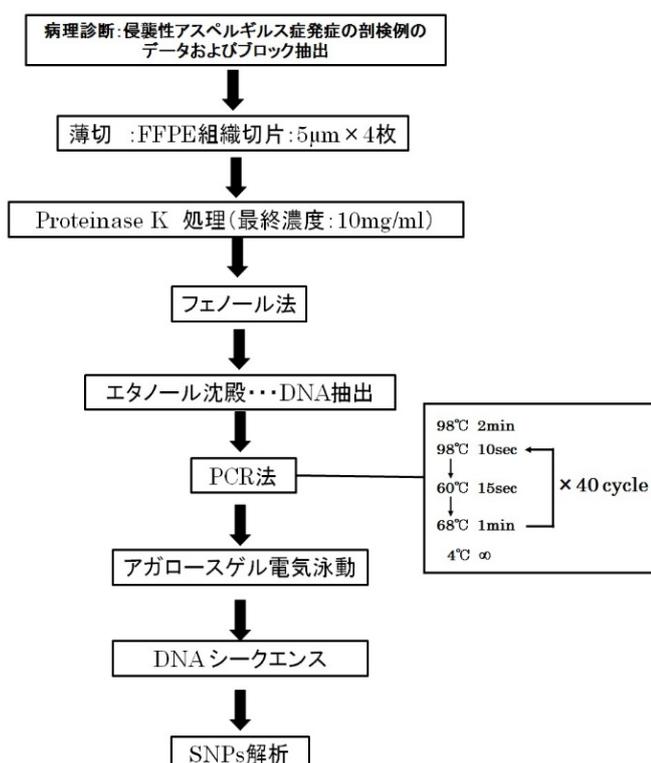
本研究の目的は FFPE 組織からの遺伝子情報の検出効率を明らかにするのみならず、本邦における当該一塩基多型の保有率ならびに侵襲性アスペルギルス症発症の危険因子としての関与を明確化することである。

2. 方法

東邦大学医療センター大森病院および秋田大学医学部附属病院で施行された剖検例で侵襲性肺アスペルギルス症と診断された症例の FFPE 肺組織を収集した。次いで、年齢のみ連結させた上で、患者 ID や病理組織診断番号等の個人情報の連結可能な符号を一切破棄し連結不可能匿名化処理を施した。尚、本研究は東邦大学医学部倫理委員会より承認を得ている (承認番号：25075)。

まず、各肺組織の切片 5 μ m, 4 枚を 1.5mL マイクロチューブに入れ、キシレン添加後に 5 分間静置した。遠心分離 (25 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 5 分) し、上清を除去後、同様の操作を 3 回行った。次いで、無水エタノールを添加し、5 分間静置後、遠心分離 (25 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 5 分) させ、上清をマイクロピペットで除去後、同様操作を 3 回行った。恒温槽 (37 $^{\circ}$ C) にてペレッ

Fig. 1 SNPs 解析の流れ



トを乾燥させ、糸状菌緩衝液 (200 mM Tris-HCl, 0.5% SDS, 25 mM EDTA, 250 nM NaCl) を 200 μ L 加え、10 mg/mL Proteinase K を 10 μ L 添加後、48 $^{\circ}$ C 恒温槽内で 12 時間静置した。これらに TE 飽和フェノール 200 μ L を加え、混濁後、遠心分離 (25 $^{\circ}$ C, 12,000rpm, 3 分) し、1.5mL マイクロチューブに上清を分注した後に同様の操作を 3 回以上行った。精製した上清に、5M NaCl を 8 μ L 添加し、-20 $^{\circ}$ C で冷却した無水エタノールを 500 μ L 加え、-20 $^{\circ}$ C で 2 時間静置した。遠心分離 (4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm, 20 分) 後、上清を除去した各試料を -20 $^{\circ}$ C で冷却した 70%エタノールで洗浄後、遠心分離 (4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm, 5 分) した。上清を除去後、恒温槽 (37 $^{\circ}$ C) にて抽出した DNA を乾燥させ、TE 緩衝液 (pH8.0) 30 μ L で溶解した後、PCR 法を施行した。その際、ハウスキーピング遺伝子であるヒト β -グロビン遺伝子プライマーを陽性コントロールとして使用し、Asp 299 Gly および Thr 399 Ile のプライマーも設計した (Table 1)。さらに、100 ng 鋳型 DNA, 1 \times PCR Buffer (Bio-Rad 社), 1.5 mM MgCl₂ (Bio-Rad 社), 0.2mM dNTP (Bio-Rad 社), 0.4 μ M プライマー, 1.25units iTaQ Polymerase を混濁させ、Thermal Cycler にて、98 $^{\circ}$ C で 2 分間経過後、98 $^{\circ}$ C 10 秒, 60 $^{\circ}$ C 15 秒, 68 $^{\circ}$ C 1 分の処理を 40 回繰り返した。PCR 産物の有無は、2.0 %アガロースゲル電気泳動にて確認した。さらに、PCR 生成産物は DNA シークエンサー (Applied Biosystems, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) にて解析を行った。加えて、本研究では一塩基多型のオンラインデータベースである国際 HapMap 計画 (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.ja>) を活用し、邦人における当該一塩基多型の保有率を調査した。

Table 1 プライマー情報

Specificity	name of primer	Sequence
ヒト β -globin 遺伝子	PC03	5'-ACACAACGTGTTCCTACTAGC-3'
	PC04	5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'
Asp 299 Gly	forward	5'-TGAAGAATCCGATTAGCATACTTAGA-3'
	reverse	5'-TGTGGGAAACGTTCCAAATTTACA-3'
Thr 399 Ile	forward	5'-TGAGTTTCAAAGGTTGCTGTTCTC-3'
	reverse	5'-AGGAATACTGAAAACCTACTCATTGTT-3'

3. 結果

症例集積の結果、自験例を含め 27 例を得た。これら 27 症例の試料の平均年齢は 62.0 歳であり、ヒト β -グロビン遺伝子の PCR 産物が発現したものは 10 例であった。また、「Asp 299 Gly」および「Thr 399 Ile」の検索が可能であったのは、それぞれ 9 例ならびに 8 例であり、いずれの試料においても当該一塩基多型は認められなかった (Table 2)。加えて、国際 HapMap 計画のオンラインデータベースで検索した所、本邦における当該一塩基多型の保有率はいずれも 0% [Asp 299 Gly; 0/45, Thr 399 Ile; 0/45] であった。

Table 2 遺伝子学的解析結果

	Asp 299 Gly	Thr 399 Ile	ヒト β -globin 遺伝子
PCR 成功率	9/27	8/27	10/27
変異率	0/9	0/8	—

4. 考察

本研究では FFPE 組織を連結不可能匿名化の後に遺伝子学的解析に利用する後方視的臨床観察研究を遂行した。具体的には、侵襲性アスペルギルス症の危険因子とされる一塩基多型 (Asp 299 Gly ならびに Thr 399 Ile) の有無について検索したが、狩猟し得た 27 症例の中で、遺伝子学的解析が可能な全ての症例において当該一塩基多型は認められなかった。また、国際 HapMap 計画でも邦人に対する当該一塩基多型保有率はいずれも 0% であった。以上の所見より、邦人の侵襲性アスペルギルス症発症において当該一塩基多型による影響は極めて低いものと推測された。

また、本研究において陽性コントロールとして用いた、ヒト β -グロビン遺伝子の発現率が約 30% (10/27) であったことから、既存 FFPE 組織を用いた後方視的臨床観察研究が遺伝子解析研究にも有用であるということ証明し得た。従来の遺伝子解析研究では、新たに試料の採取をするための倫理審査ならびに被験者の募集が必要であり、データ収集に多大な時間を要する。しかしながら本研究は、すでに包括同意が得られていた剖検例を対象に、連結不可能匿名化処理を施した後に FFPE 組織を用いる後方視的臨床観察研究を遂行した。そのため、データ収集に要する時間が大幅に削減することができたと同時に、比較的豊富な症例に対して当該一塩基多型を解析する事が可能であった。

今後、症例を重ねることで FFPE 組織からの遺伝子情報の検出効率を上げると同時に、本邦における侵襲性アスペルギルス症の危険因子の一端を解明したい。

5. 論文および学会発表

【学会】

1. 安藝恭子, 篠崎稔, 大久保陽一郎, 石渡誉郎, 栃木直文, 若山恵, 澁谷和俊. 本邦におけるアスペルギルス症発症に関与する遺伝子多型の解析. 第57回 日本医真菌学会総会・学術集会. 2013 (東京)
2. 安藝恭子, 大久保陽一郎, 篠崎稔, 石渡誉郎, 栃木直文, 若山恵, 根本哲生, 澁谷和俊. 我が国におけるアスペルギルス症発症に関与する遺伝子多型の解析. 第15回 日本医真菌症フォーラム. 2014 (東京)

【論文】

1. Aki K, Okubo Y, Nanjo H, Ishiwatari T, Nihonyanagi Y, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Fukutake K, Shinozaki M, Hori Y, Masuda H, Shibuya K: Genomic analysis using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks for susceptibility regarding invasive pulmonary aspergillosis. Jpn J Infect Dis (under review)
2. Ishiwatari T, Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Kobayashi J, Shinozaki M, Aki K, Sasai D, Yamamoto Y, Nakayama H, Shibuya K: Remodeling of the pulmonary artery induced by metastatic gastric carcinoma: a histopathological analysis of 51 autopsy cases. BMC Cancer. 14:14. 2014

<医療技術研究助成>

糖尿病チーム医療における心理カウンセリングの導入効果および今後の活用法の検討

池田祥子

(共同研究者：朝倉太郎、鶴居信昭、金城瑞樹)

鶴間かねしろ内科クリニック

糖尿病療養生活が困難な理由のひとつとして、ストレスにより望ましい生活習慣が妨げられることや、ストレス関連ホルモンによる血糖値への影響が考えられる。糖尿病のコントロールの手段としてストレスへの対処を行うことが有効であると考え。生活習慣病専門クリニックに通院中の糖尿病患者 18 名を対象に、心理療法を取り入れた支援介入により血糖コントロール改善が図れるか否か、また心理的サポートを目的としたカウンセリングの前後でどのような心理変化が生じるかを、二次元気分尺度 TDMS-ST を用いて調査した。対象者の背景は平均年齢 50.0±10.5 歳、平均 HbA1c 7.50±1.20%。カウンセリング前後における TDMS-ST の変化は、活性度、安定度、快適度が有意に ($p < 0.05$) 上がり、有意差は出ないが安定度が改善すると HbA1c が下がることが示唆された。カウンセリングを行うことで、患者の気分を、より活力があり安定していて、快適でポジティブに変えることができ、気分を安定させることが改善の一助となることが示唆された。

糖尿病チーム医療における心理カウンセリングの導入効果および今後の活用法の検討

池田祥子

(共同研究者：朝倉太郎、鶴居信昭、金城瑞樹)

鶴間かねしろ内科クリニック

1. 目的

心理療法を取り入れた支援介入により、糖尿病患者の血糖コントロール改善が図れるか否かを検討する。また、心理的サポートを目的としたカウンセリングの前後で、糖尿病患者にどのような心理変化が生じるかを、二次元気分尺度 TDMS-ST を用いて調査する。

2. 方法

対象：生活習慣病専門クリニックに通院中の糖尿病患者で、患者本人がカウンセリングを希望、または診察時に医師が、カウンセラーによる心理的サポートを提案し、了解した患者。

期間：2013年12月から2014年4月

方法：生活習慣病専門クリニックの常勤カウンセラーであり、日本糖尿病療養指導士(CDEJ)・管理栄養士の筆者が、個別カウンセリング(月1回、約1時間)を行う。治療の妨げにつながる様々なストレスについて傾聴し、課題の明確化や解決策について話し合う。カウンセリングの効果を測る指標として、介入開始時および各介入時に、HbA1c 値、血糖値および生化学データを得る。各介入時のカウンセリングの前後に TDMS-ST 二次元気分尺度による心理状態(気分)を調査した。

TDMS ~二次元気分尺度~

Two-dimensional Mood Scale

作成者：坂入洋右・征矢英昭・木塚朝博(筑波大学)2009年発行

- TDMSは、被検査者による心理状態(気分)のセルフモニタリングを通して、心の「活性度」と「安定度」を測る検査。
- 8項目の質問に答えることで、測定時の心理状態を数値化することができる。

【特徴】

- 測定結果を「快適度」と「覚醒度」を2軸とする「二次元グラフ」に示すことで、様々な場面における心理状態の特徴と変化を視覚的に理解することができる。
- 短時間(1分以内)で実施可能なため、心理状態の変化を経時的に繰り返し測定できる。

TDMS ~二次元気分尺度~

心理状態(気分)の成分である

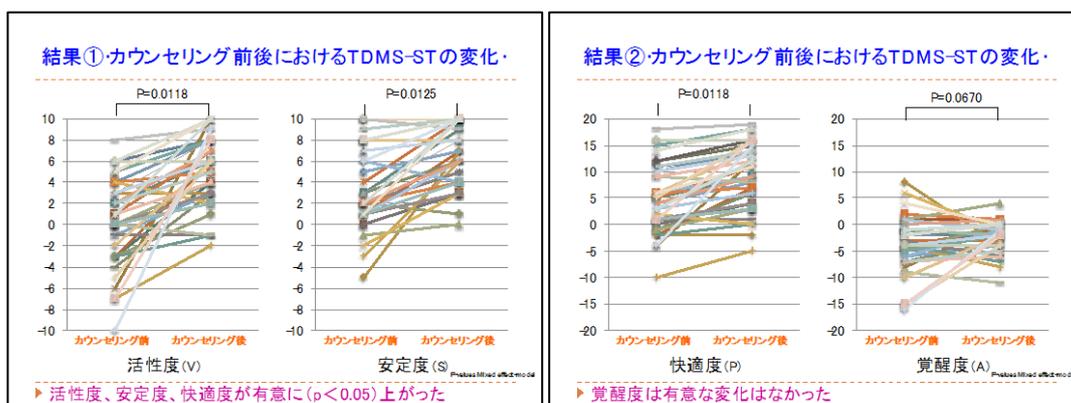
- 快適度(Pleasure)
- 覚醒度(Arousal)
- 活性度(Vitality)
- 安定度(Stability)

を測定する尺度(各4項目)から構成されており、8項目の質問に回答するだけで、これら4種類の心理状態を測定することができる。

3. 結果

期間中にカウンセリングを行い、TDMS-STを実施した糖尿病患者は18名(男性/女性=6/12名)。その18名のカウンセリング初回時の背景は、平均年齢 50.0±10.5 歳、平均 HbA1c 7.50±1.20% だった。

カウンセリング前後における TDMS-ST の変化は、活性度、安定度、快適度が有意に($p < 0.05$)上がり、覚醒度は有意な変化はなかった。



また、サブ解析としてカウンセリングによる各気分尺度の変化を、各指標が1変わるとに HbA1c がどれだけ変わるかをみたところ、統計学的に有意差は出ないが、安定度が改善すると HbA1c が下がることが示唆された。

カウンセリングによる各気分尺度の変化

	β (95%信頼区間)	age,sex-adjusted β (95%信頼区間)	age,sex,preHbA1c -adjusted β (95%信頼区間)
活性度 (V)	-0.015 (0.005~0.16)	-0.011 (-0.043~0.022)	-0.021 (-0.056~0.013)
安定度 (S)	-0.051 (-0.094~-0.007)	-0.061 (-0.12~-0.005)	-0.061 (-0.12~-0.006)
快適度 (P)	-0.015 (-0.05~0.02)	-0.011 (-0.043~0.022)	-0.021 (-0.056~0.013)
覚醒度 (A)	0.027 (-0.02~0.07)	0.033 (-0.014~0.08)	0.03 (-0.018~0.08)

↑ 各指標が1変わるとに HbA1c がどれだけ変わるかをみたもの。
統計学的に有意差は出ないが、安定度が改善すると HbA1c が下がることが示唆された。

4. 考察

心理的サポートを目的としたカウンセリングを行い、患者の悩みや不安等を充分傾聴し、その解決策について共に考えていくことで、患者の気分を、より活力があり、安定していて、快適でポジティブに変えることができる。

[目次に戻る](#)

カウンセリングにより、イライラして緊張した状態を、ゆったりと落ち着いた状態に安定させることが、血糖コントロール改善の一助となることが示唆された。

今後、症例数を増やして TDMS-ST の結果と血糖コントロールの関連の検討を行い、適切なカウンセリングの実施により、通院の継続や糖尿病の改善につながるよう、取組みを続けていきたい。

5. 論文及び学会発表

学会発表

○池田祥子, 林由美子, 原田美代子, 大塚洋, 山本千穂, 小野浩一, 朝倉太郎, 鶴居信昭, 金城瑞樹: カウンセリングによる糖尿病患者の心理変化～二次元気分尺度 TDMS-ST を用いて～
第 57 回 日本糖尿病学会年次学術集会, 大阪 2014,5.

<医学・医療関連事業助成>

新生児個別的発達ケアと評価プログラム(NIDCAP)による 新生児看護ケアの技術向上

関 和男

共同研究者：波木井 良子

市民総合医療センター 総合周産期母子医療センター NICU

抄録：NIDCAP(Newborn Individualized Developmental Care and Assessment Program:新生児個別的発達ケアと評価プログラム)は、H. AIs^{*1}が開発した新生児ケアの中心的内容であるディベロップメンタルケア(以下DC)である。DCには①光・音環境の調整②ポジショニング③ハンドリング④カンガルーケア⑤呼吸理学療法⑥ケアパターン調整⑦哺乳支援⑧家族指導などがあり、当院はDCの熟練者の育成をねらいNIDCAPを導入した。NIDCAPは、3つの基本的概念を基に児の状態・発達の緻密な観察と的確な個別のアセスメント、必要なケアをプランニングし実践評価するという臨床トレーニングで構成され、日本DC研究会が企画運営している。

研修修了者はトレーナーとして次のDC実践者を育成することができる。また、当院はDCが推進できるNIDCAP認定施設として、平成24年度は国内大学病院初の研修施設となり、マスタートレーナーであるグレチェン^{*2}講師を迎えた。平成25年度は日本DC研究会主催のセミナー、自施設でのトレーニングを継続、2名の研修生は2年課程の実践レポートを提出し修了する。今後、マスタートレーナーがトレーニングの評価を行いトレーナーとしての承認を受ける予定である。2年間の研修によるNIDCAPの成果をまとめる。

※1：米国H. AIs(Harvard Medical School, President of NIDCAP Federation International(NFI))が1980年代に開発した。

※2：Gretchen Lawhon：新生児専門看護師、NFI副会長、NIDCAP開発者のH. AIsの共同研究者

1. 目的

近年、早産児の発達予後として頭蓋内出血などの明らかな合併症による脳性麻痺や精神遅滞に加え、発達障害(広汎性発達障害・注意欠陥/多動性障害・学習障害など)が注目されている。これらは明らかな合併症がない児にも認められ、長期間の不良肢位での安静、頻回のケア介入、痛みを伴う処置、胎内とかけ離れた環境での療養などさまざまな要因が関係すると考えられている。特に超早産児は生後早期に頭蓋内出血を起こしやすく、長期人工呼吸管理を必要とする。そのような児が安静・安楽に過ごし、適切なケアを受けることは良好な体重増加、呼吸器合併症の予防と早期呼吸器離脱、早期経口哺乳確立、入院の短縮などに大きく寄与すると考えられている。

当NICUでは、ファミリーセンタードケア(家族中心のケア)を実践しており、ケアの中心の一つがDCである。2年間のNICAPのトレーニングにより熟達したDCが実践できる看護者の育成が目的である。NIDCAPの基本的概念である1つ目の「**共作用理論**」は児の神経行動発達を、自律神経系、運動系、意識状態、相互作用系の4系と相互の調整能力としてとらえ、神経行動と外環境の相互作用により発達が獲得される。2つ目は「**個別的ケア**」で、綿密に個別的な行動を観察し、児がどのようなケアや関わり、環

境の設定を求めているかを主観的に振り返る。指標は児の行動であり、児の成熟、発達、外界の適応と影響は行動に反映される。観察からその児に特有な行動の意図を読み取り、児の視点からケアプランを考える。3つ目は「**児と家族と看護者の関係性を重視した協力的な関わり**」である。児はケアの受手であり同時に積極的に参加する存在である。家族は子の生命と発達を支える中心者である。看護者は治療補助や直接ケアに加え、児の発達と親の子への愛情、親としての誇りや育児を支える。そのため出生早期から親子の関係性に焦点をあて、両親や家族を積極的にケアの中心に取込むことを試みる。

以上の3つの基本的概念を基に児の観察と個別のアセスメント、必要なケアが最適に実践されることが本研修のねらいである。

2. 方法

研修生は2年課程のトレーニングを受ける。10例以上の児を観察しベストケースレポートをマスタートレーナーに提出する。以下は2年間のNIDCAPの経過である。

日時	研修内容
平成24年 6月23・24日	NIDCAPとは、基本的概念、トレーニングの進め方等、 総論及び基礎情報の提供
6月24日	研修プログラム概要、日程と研修準備事項について
12月4～7日	NIDCAPの歴史的概要、意義、目的、効果について受講。 観察トレーニングの方法、レポート作成オリエンテーション。 施設コンサルテーション。病院長ほか病院管理者に環境改善の提案、 トレーニングの施設依頼と研修支援について意見交換。
12月14日	施設を変えてトレーニングの実際。
平成25年 1月～9月	対象となる児の親に研修協力の説明と同意を得て、綿密な行動観察を行う。 ①処置・ケア前20分・中・後10分の児の呼吸、全身状態、 身体の動きを2分毎に観察シートに記録。 ②保育器(コト)周囲にある全てについて観察。 ③家族を感じさせるものを含め、児の周辺の環境を観察。 ④観察レポートを作成。⑤医学的情報、ジャーナルページ、 テンプレートマニュアル(環境評価)の各レポートを作成。 ⑥観察レポートを児の親、看護者に提示しディスカッション。 ⑦英文レポートをマスタートレーナーに提出する。
8月10・11日	テーマ「早産児・低出生体重児とDC」生理発達・医学管理、神経系発達、家族発達等
12月9～11日	他施設研修、他施設コンサルテーション、ベッドサイドトレーニング
12月14・15日	テーマ「より良い早産児ケアを目指して」DCの施設改革、スタッフ教育、トレーニングの報告
平成26年	入院初期から観察を継続し退院後、家庭訪問により児の観察を行う。
7月26・27日	テーマ「早産児・低出生体重児とDC」NIDCAPモデルに基づくDC理論と実際、家族支援と退院支援等
10月25・26日	2年間の研修の報告
12月12～14日	研修修了、サーティフィケーション(トレーナーとしての承認)を受ける。

観察の指導を受けている



早産児のポジショング



3. 研修結果

NIDCAP 研修により得られた知識と情報を基に以下のような取組が行われている。

1) 観察により学んだこと

新生児がどのようなケアやかかわり、環境設定を求めているか、個別的な行動を観察する。指標は新生児の行動であり、成熟、発達、外界の適応と影響が行動に反映される。綿密な観察から、研修生はその新生児に特有な行動が感じ取れるようになり、また行動の意図を読み取り新生児の視点からケアプランを考えるようになった。

2) ケアの実践の変化

研修生が DC の概念を看護職員へ伝達講習し、ミニマル(最小限の)ハンドリングを実践、加えて家族にもミニマルハンドリングの協力を働きかけている。これまでは看護師のスケジュールを基に決まった時間にケアを行ったが、現在は家族面会の有無や児の状況をみてケア時間を変更している。観察により得られた新生児の行動と意図の読み取りより、一人一人の神経行動発達や発育状況を評価し、環境を含めてケアの方法や介入のタイミングを見極めるようになった。

家族とともにケアを考えるようになると、家族が児とのかかわりを積極的にもち、児の様子を看護師に話してくれるようになった。

カンガルーケアは修正週数 32 週以降が基本であったが、現在は週数に関係なく、急性期を脱した状態が安定している児であれば、輸液や人工呼吸器の使用に関係なく進めることを心掛けている。また、母乳口腔内塗布や母親の直接母乳は昼夜を問わず行う方向に進んでいる。



新生児が感じる「痛み」については、児の神経系が未発達な状態であっても痛み刺激を伝達、知覚、反応、記憶する能力が備わることを研修で知り「児の痛みのケア」に関する研究を進めている。

3) 環境に関する提案と調整

児の環境の視点から音響調査を行い、児が聞くことで不快に感じる環境音をできるだけ不用意に出さない工夫を行っている。

採光については、NICU ではできるだけ体内環境に近づける薄暗さを保ち、GCU では昼夜の照度を変更した。週数に応じて、アイマスクを使用している。観察時は照明が要らない手元ライトを導入した。

4) 他職種への提案と協働

研修で知り得た根拠を基に看護師・医師と合同学習を行った。修正週数 32 週以前の児へのカンガルーケアの早期導入が始まり、ケアパターンの変更とポジショニング・ホールディングを組み合わせた処置やケアが実践されるようになった。医師も痛みを伴う処置の際にホールディングを行っている。

4. まとめ

よりよい DC ケアの実践を進めるために、児と家族が心地よく過ごせる環境作り、観察レポートから知った個別の児の行動や反応をスタッフと共有する機会を多く持ち、NICU 全体の DC ケアの標準化と質を高めることが今後の課題である。

当院 NICU では、出生体重 1500g 未満の極低出生体重児の入院者数が年間約 70 例であり、神奈川県下で常に上位である。総合周産期母子医療センター70 施設の 1500g 未満の児の入院日数比較において

も本邦の上位であり、BFH の推進や DC を心掛けた治療・看護の成果も一助となっていると考える。今後は NIDCAP の導入により、個々の児に必要なケアをプランニングし実践・評価し、より個別性の高い子どもの発達とご両親の子育てを援助したい。

5. 論文及び学会発表

- 1) 共著：篠塚春奈・斉藤紀子, 新生児のストレス緩和：NICU におけるディベロップメンタルケア, 小児看護, 2014 年 7 月号

<医学・医療関連事業助成>

SNS (Social Networking Service) を用いた医学教育

飯田 洋

横浜市立大学医学部 医学教育学

【抄録】

インターネット上では、次々と新たなサービスが展開され、社会における情報流通やコミュニケーションのあり方も変化している。それは、横浜市立大学医学部学生においても同様である。

横浜市立大学医学部では、現在パソコンや携帯のメーリングリストといったオンラインツールを使用し、情報流通や交流の促進を行っているが、これでは単なる情報流通でしかない。今回 SNS を活用することで、学生たちは、この空間で小集団でのコミュニケーションや情報共有、議論などを行うと共に、「日記」などの形で意見や主張を個人として述べることもできる。そこで他人から評価や批判を受けたり、不適切な発言に対して注意や指導をされたり、他人の発言にコメントしたりする中で、失敗を重ねながら、パブリックな空間で発言するための基礎を身につける空間、という二重の意味での教育空間が、医学部 SNS 上に形成することで、教育の充実を図ることができる可能性がある。

今回、1年生の担任という立場から Facebook と LINE という SNS を使用し、教育現場で使った。SNS は移り変わりが早く、また通信環境も人それぞれ違うため、さらなる検討が必要と思われた。

SNS (Social Networking Service) を用いた医学教育

飯田 洋

横浜市立大学医学部 医学教育学

【目的】

2003年から2004年頃から、インターネット上でオンライン・コミュニティを形成する仕組み、もしくはコミュニティのあり方としてSNS (Social Networking Service) というコンセプトが注目され、様々な場面で導入されるようになった。そして今日では、そのコンセプトや仕組みは多様な展開を見せながら定着している。SNSの特徴は、「人と人との繋がり促進」、「コミュニティ型 Web サイト」、「会員制」が挙げられる。

2011年1月現在のSNS登録者数は2400万人にもものぼると報告されている(出典 総務省「ICTインフラの進展が国民のライフスタイルや社会環境等に及ぼした影響と相互関係に関する調査」平成23年)。その後もFacebookやLINEなどの普及や端末であるスマートフォンの普及で、この人数は増加していると推定される。

本邦では、従前から数多く存在していた「Web日記サイト」「グループウェアサイト」「インターネットコミュニティ」などの機能を上手に取り込みつつ、さらには各新聞社やマスコミの記事を取り扱うなど、一種のポータルサイトとしての機能も持っているものが見られる。企業・教育機関でも内部向けコミュニケーションから始まり、内定者や学校の卒業生の囲い込みなど、色々な用途に使われている。最近ではGREE、imapuなどでも携帯電話にも応用されており、さまざまな形でSNSは普及している。熊本県八代市が運営する「ごろっとやっちょろ」を皮切りに自治体や非営利団体・企業等が運営する地域型のサービスも各地で立ち上がっている。

SNSはコミュニケーション行動と親和性の高く、10代・20代の発信行為において、SNSへ書き込む割合が大きいなど、近年、注目を集めているサービスであるが、横浜市立大学医学部では、未だ教育にSNSを利用していないのが現状である。医学部生の担任制度のSNS利用を手始めに、講義における教員・学生の学習支援ツールとしてSNSを活用するシステム作りを目指す。

【対象と方法】

1年生の担任をしている関係上、まず私が担当するJグループの8人を対象とし、スマートフォン、パソコン環境、SNSの利用など聞き取り調査をした。

【結果】

担任である1年生8人中、入学時にスマートフォンであったものは6名であった。SNSは

全員利用していたが、Facebookの利用者は6名、LINEの利用者は8名であった。LINEについては、医学部1年生の全員が利用しており、パソコンのメーリングリストと共にLINEでメーリングリストを作成しているということもわかった。

以上より、6名とFacebookで、また8名全員とLINEでグループを作成し、利用をした。

【考察】

SNSの特徴として、緩やかな匿名性を保ったクローズドネットワークと、実社会でのつながりを可視化・セグメント化することができるという2点が挙げられる。

この2つの特徴を医学教育の場に活用したい。具体的には、

- ・問題生徒（行動）の早期の拾い上げ
- ・就職活動
- ・予習／復習、質問／回答の場を提供し、教育レベルを底上げする
- ・講義担当者が生徒の学習状況や生徒情報を共有し、学年ごとに均整の取れた授業を行う
- ・医師国家試験対策
- ・トラックバック機能
- ・悩みや進路相談などのサポート体制の充実で学校の付加価値を高める
- ・生徒同士のやり取りの場を作り、コミュニケーション能力およびモラルを育成
- ・課題発表や研究発表など、授業での学習支援ツールとして利用

来的にはこの教育空間に、教員、卒業生を含めたコミュニティを形成することで、①医学部内の情報流通の促進、②医学教育プロセスの可視化と蓄積、③医学部の仮想的教育空間としてのオンライン・コミュニティの形成を目指す。具体的には、SNSを活用することで、国家試験対策、問題生徒（行動）の早期拾い上げ、就職活動（横浜市立大学の医局宣伝を含む）、講義の予習／復習、質問／回答の場を提供する。そのことで①教育レベルの底上げ、②講義担当者が生徒の学習状況や生徒情報の共有し、学年ごとに均整の取れた授業を行う、③悩みや進路相談などのサポート体制の充実で学校の付加価値を高める。SNSを総合的な学習支援ツールとして利用することを目指す。

【おわりに】

今回、1年生の担任という立場からFacebookとLINEというSNSを使用し、教育現場で使った。SNSは移り変わりが早く、また通信環境も人それぞれ違うため、さらなる検討が必要と思われた。

【論文および学会発表】

なし

<医学・医療関連事業助成>

小児稀少腫瘍の病理組織カラーアトラス作成

田中祐吉

神奈川県立こども医療センター臨床研究所

要旨

小児腫瘍は全て稀少疾患であり、個々の病理診断医の診断機会が限られるため、これを補う病理組織アトラスの果たす役割が大きい。報告者の属する日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会（本委員会）は、約40年間にわたり小児腫瘍病理組織アトラスの制作・発刊・改訂を行ってきた。しかしこれまで対象となった腫瘍は、比較的頻度の高いものに限られており、より稀少、しかし重要な腫瘍の多くが顧みられてこなかった。本事業は、これまで取り上げられてこなかった各種小児稀少腫瘍の病理組織カラーアトラスを作ることを目的とし、本委員会を中心に全国的なレベルで8人の委員を選び、取り扱う臓器・組織と腫瘍を選考・討議して原稿制作を開始した。今回取り扱う腫瘍は、呼吸器腫瘍、縦隔腫瘍、頭頸部腫瘍、甲状腺腫瘍、副腎腫瘍（神経芽腫群腫瘍以外）、乳腺腫瘍、心臓腫瘍、消化管腫瘍、皮膚腫瘍、ならびに胚細胞腫瘍全般と胚細胞腫瘍以外の生殖器腫瘍である。さらにこれまでに蓄積された症例の再検討も同時並行で行い、同アトラス完成時に参考文献として挿入できるデータになり得るいくつかの新知見も得ることができた。同アトラスの完成・発刊は、2016年半ばを予定している。

小児稀少腫瘍の病理組織カラーアトラス作成

田中祐吉

神奈川県立こども医療センター臨床研究所

1 目的

小児腫瘍は、成人を含めたヒト腫瘍全体の数%以下を占めるのみであり、全て稀少腫瘍のカテゴリーに属する。しかし、近年の診療レベルの向上に伴い、悪性腫瘍であっても 5 年生存率は 70-80%に達し、**survivor** の多くは通常の社会生活を営むことが可能になってきている。生活の質をできるだけ落とさないことも踏まえた治療成績のさらなる向上には、それぞれの腫瘍の病理診断のレベルの向上とその普及が基盤の一つとして非常に重要である。その役割は、本邦ではこれまでの約 40 年にわたり、報告者もメンバーの一人である日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会（以下本委員会）が主に果たしてきており、主要な小児腫瘍については、改訂版も含めて十数巻の小児腫瘍組織アトラスを作成・刊行してきた。今回はこれまで取り扱われてこなかった臓器・組織の稀少腫瘍を中心に、世界でも例の少ない小児稀少腫瘍の病理組織カラーアトラスの作成に着手した。

2 方法

まず日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会のアクティブメンバーから 4 人、同委員会には入っていないが、小児腫瘍の病理診断経験の豊富な病理医 4 人からなる小委員会を編成した。小委員の所属施設の所在地は、東京都、神奈川県、静岡県、大阪府、岡山県、福岡県と関東以西の広い地域にわたり、小児医療専門施設勤務者 6 名、大学医学部勤務者 2 名であった。

病理学会時、ならびに随時のメール会議で、取り扱うべき臓器・組織を決定し、各自の担当臓器・組織を定め、それぞれに生ずる腫瘍のうち、小児にほぼ限定して生ずるもの、成人にも生ずるが小児では成人のものとは異なった性格を持つ傾向が強いものなど、小児腫瘍病理組織アトラスに掲載するにふさわしい腫瘍をリストアップした。その下案を、本委員会のメンバー（小委員会メンバーを兼ねている 4 人以外の 11 人）にも呈示して意見を求め、構成・内容について吟味した。また、これまで発刊したカラーアトラスで最も改訂から遠ざかっている胚細胞腫瘍と胚細胞腫瘍以外の生殖器腫瘍についても、同時に取り扱うこととした。

アトラスの内容を **up-to-date** にするべく、担当する臓器・組織の腫瘍で何らかの病理学的問題を残すものについては、病理組織標本の見返しや追加検索を行い、できるだけ新しい情報を盛り込むことができるように試みた。

3 結果

取り上げることが仮決定した臓器・組織と腫瘍の内訳は以下のとおりである。

I. 胚細胞腫瘍 Germ cell tumors

1. 単一型 Tumors of one histological type, pure forms

- a) ジェルミンオーマ/ディズジェルミンオーマ/セミンオーマ Germinoma/Dysgerminoma/Seminoma
- b) 胎児性癌 Embryonal carcinoma
- c) 卵黄嚢腫瘍 Yolk sac tumor
- d) 絨毛癌 Choriocarcinoma
- e) 奇形腫 Teratoma
 - 1) 成熟奇形腫 Mature teratoma
 - 2) 未熟奇形腫 Immature teratoma

2. 混合型 Tumors of more than one histological type, mixed forms

(混合胚細胞腫瘍 Mixed germ cell tumor : 多胎芽腫 Polyembryoma を含む)

II. 胚細胞腫瘍以外の生殖器腫瘍

- 1. 顆粒膜細胞腫 (若年型・成人型)
- 2. 莢膜細胞腫
- 3. セルトリ・ライディッヒ細胞腫
- 4. セルトリ細胞腫瘍
- 5. ライディッヒ細胞腫瘍
- 6. 硬化性間質腫瘍
- 7. 混合型または分類不能型
- 8. 性腺芽腫
- 9. 上皮性腫瘍 (小細胞癌を含む)

III 呼吸器腫瘍

- 1. Inflammatory myofibroblastic tumor
- 2. Pleuropulmonary blastoma
- 3. Pulmonary carcinoid
- 4. Mucoepidermoid carcinoma
- 5. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis/Mediastinal LCH
- 6. Congenital peribronchial myofibroblastic tumor
- 7. Infantile chest wall hamartoma
- 8. EBV-associated smooth muscle tumor

9. Fetal lung interstitial tumor

IV. 縦隔腫瘍

1. NUT midline carcinoma
2. Thymoma

V. 頭頸部領域の腫瘍

1. 先天性顆粒細胞腫 Congenital granular cell tumor
2. 唾液腺原基腫瘍 Salivary gland anlage tumor
3. 軟骨間葉性過誤腫 Chondromesenchymal hamartoma
4. 唾液腺芽腫 Sialoblastoma
5. 乳児黒色性神経外胚葉性腫瘍 Melanotic neuroectodermal tumor of infancy
6. 若年性喉頭乳頭腫症 Juvenile laryngeal papillomatosis
7. 粘表皮癌 Mucoepidermoid carcinoma
8. 腺房細胞癌 Acinic cell carcinoma

VI. 甲状腺腫瘍

1. 良性腫瘍

a) 濾胞腺腫 Follicular adenoma

特殊型 Variants

- 1) 好酸性細胞型濾胞腺腫 Follicular adenoma, oxyphilic cell variant
- 2) 明細胞型濾胞腺腫 Follicular adenoma, clear cell variant
- 3) 異型腺腫 Atypical adenoma

2. 悪性腫瘍

a) 乳頭癌 Papillary carcinoma

特殊型 Variants

- 1) 濾胞型乳頭癌 Papillary carcinoma, follicular variant
- 2) 大濾胞型乳頭癌 Papillary carcinoma, macrofollicular variant
- 3) 膨大細胞型乳頭癌 Papillary carcinoma, oncocytic variant
- 4) びまん性硬化型乳頭癌 Papillary carcinoma, diffuse sclerosing variant
- 5) 充実型乳頭癌 Papillary carcinoma, solid variant
- 6) 篩型乳頭癌 Papillary carcinoma, cribriform variant
- 7) その他

b) 濾胞癌 Follicular carcinoma

特殊型 Variants

- 1) 好酸性（膨大）細胞型濾胞癌 Follicular carcinoma, oncocytic variant
- 2) 明細胞型濾胞癌 Follicular carcinoma, clear cell variant

- c) 低分化癌 Poorly differentiated carcinoma
- d) 未分化癌 Undifferentiated (anaplastic) carcinoma
- e) 髓様癌 Medullary carcinoma
- f) その他

VII. 副腎腫瘍

1. 副腎腺腫 Adrenal cortical adenoma
2. 副腎皮質癌 Adrenal cortical carcinoma
3. 褐色細胞腫 Pheochromocytoma
4. その他

VIII. 乳腺腫瘍

1. 上皮性腫瘍
 - a) 分泌癌
2. 線維上皮性腫瘍
 - a) 線維腺腫
 - b) 葉状腫瘍
3. 腫瘍様病変
 - a) 若年性乳頭腫症
 - b) 思春期過形成

IX. 心臓腫瘍

1. Cardiac rhabdomyoma
2. Cardiac fibroma
3. Cardiac teratoma

X. 消化管腫瘍

1. Familial adenomatous polyposis
2. Juvenile polyp/polyposis
3. Peutz Jeghers syndrome
4. Gastrointestinal stromal tumor

X I . 皮膚腫瘍

以上の腫瘍を選択する過程で、各種の検索を行い、以下の新知見を得た。

1 これまでに報告のない ALK 関連キメラ遺伝子の形成を伴う肺の Inflammatory myofibroblastic tumor の 2 症例を見出した。同腫瘍は fetal lung interstitial tumor と部分的に類似した組織像を示すが、両者は全く異なる疾患単位であることが示唆された。

2 病理組織学的に酷似している Pleuropulmonary blastoma と腎臓の anaplastic sarcoma が共通の遺伝子異常を持つことを証明し、両者が発生臓器は異なるが、基本的に同一の腫瘍である可能性を見出した。

3 小児にほぼ固有の腫瘍である仙尾部の teratoma と yolk sac tumor の同時性・異時性発症について、新しい見解を見出した。

4 考察

この一年の活動で小児稀少腫瘍の病理組織カラーアトラス作成のアウトラインを作ると共に、これまでの症例を見返す過程でいくつかの新知見を得ることができた。アトラスの完成まではさらに 2 年近くが見込まれるが、この過程の中で参考文献に加えることができるような新たな知見を合わせて獲得していく予定である。

5 論文及び学会発表

アトラスの完成・発刊は 2016 年半ばを予定している。

<医学・医療関連事業助成>

「首都圏総合大学における学生・教職員のためのメンタルヘルス支援システム開発研究」

河西千秋

横浜市立大学医学群社会医科学系列健康増進科学（精神保健）

横浜市立大学保健管理センター

社会の様々な領域でメンタルヘルス問題が指摘されており、メンタルヘルス管理や支援のための効果的なシステムの構築が課題となっている。報告者は、横浜市立大学において、平成 24 年度から、保健管理センターを拠点に、メンタルヘルス不調者のスクリーニングと不調者への危機・早期介入、相談対応、そして関連部門との連携を含む包括的メンタルヘルス支援システムを構築し、運用しているが、本研究はその試みを伸長し、有効性を検証するために実施された。平成 25 年度は、前年に続き自殺念慮者への全例介入を含む早期介入を実施し、介入実施率の向上をみた。また、3 つのスクリーニング結果の関連性を解析しその有用性を明らかにした。さらに、学生支援のための研修会の実施、そしてラインケアの強化のための教職員管理職研修会などを実施するとともに、ウェブサイトや啓発ツールを用いてセンターの業務紹介や相談勧奨を行った。その結果、相談対応件数は、前年度より学生・教職員とも増加し、全学生・教職員数約 8700 名のところを延べ数で計 2469 件の相談件数に対応し(平均 3.9 回/人)、来談者に対して具体的な支援を実施した。

【目的】

日本社会の様々な領域でメンタルヘルス問題が指摘されており、教育機関や職域では、メンタルヘルス管理や支援のための効果的なシステムの構築が課題となっている。

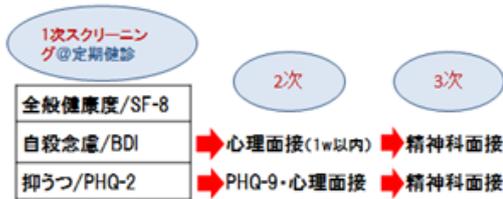
報告者は、横浜市立大学において、平成 24 年度から、保健管理センターを拠点とするメンタルヘルス不調者(学生・教職員)のスクリーニングと不調者への危機/早期介入、相談対応、および健康問題に係る関連各部署間の連携ミーティングを含む当事者支援のためのシステムを構築し、運用してきた。さらに、学生・教職員管理職それぞれを対象としたメンタルヘルス関連研修や、これらの保健管理センターの業務を周知するための様々な啓発・広報活動を実施してきた。本研究は、それらの有効性を検証するために目的に実施された。

【方法】

報告者の所属する横浜市立大学では、学内のさまざまなメンタルヘルス関連問題の発生とその対処における困難性などから、学生・教職員双方のメンタルヘルス支援の充実が中期計画の取り組み事項として掲げられ、その対策として、平成 23 年度より、健康管理統括組織としての保健管理センターの抜本改革が為され、併せて職種・人員等の充実が図られた(引用文献 1)。平成 24 年度に常勤臨床心理士が配置され、当該年度より、メンタルヘルス・スクリーニング、相談対応等の体制を新たに構築した。スクリーニングは、定期健康診断時に、国際的に汎用され、日本語版の妥当性も明らかにされている 3 つの評価尺度を用い(図 1)、1-3 次スクリーニングを開始した。また、相談対応については、従前から実施されていた、学務課非常勤心理士による学生相談(日時限定的で学生のみに対応)を廃止し、学生・教職員すべてを対象とし、かつすべてのキャンパスで実施の「キャンパス相談」を、保健管理センター統括下に新たに設置した。なお、キャンパス相談は、上記の 2 次スクリーニング面接を入口とする、継続面接をも含むこととした。この他、学生支援に関連して、関連部署間で、厳密な組織内守秘義務を負いつつ、健康問題が懸念される学生への早期介入を検討するための連携ミーティングを定例的に行うとともに、教職員管理職員を対象に、メンタルヘルス・リテラシーやメンタルヘルス支援スキルの向上を目指した各種研修会や、学生を対象とした、コミュニケーション・スキル向上を目的とする研修会

を実施した。さらに、WEB サイトの抜本改編や啓発ツールの作成も行き、メンタルヘルス支援を含む保健管理センターの業務紹介や相談勧奨について積極的に発信を行った。

図1. メンタルヘルス・スクリーニング概要



【結果】

横浜総合医学振興財団の助成を受けて実施された平成 25 年度の健康管理業務に基づく研究結果を以下に提示した。

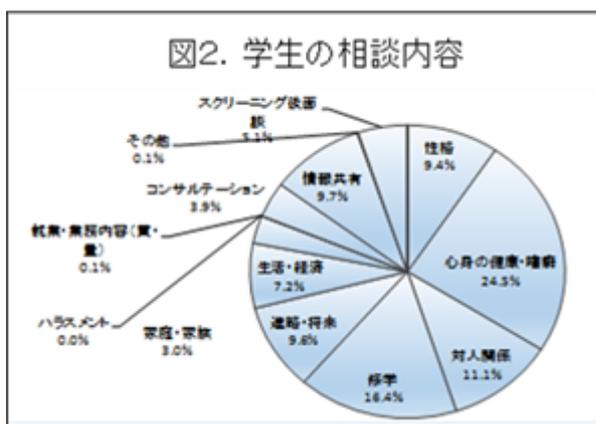
1. メンタルヘルス・スクリーニング

平成 25 年度の定期健診を活用し、4,112 名の学生から調査データが得られた。健康関連 QOL に関して、SF-8 の総スコアの平均値は、日本人標準値と比較して高値だった。抑うつ状態に関して、PHQ-2 陽性者は、全受診者の 7.9%で、自殺念慮項目 (BDI-II) 高リスク者は 6.4%だった。PHQ-2 陽性群は、陰性群よりも SF-8 の精神的健康度の平均値が有意に低値だった。また、自殺念慮項目高リスク群は、低リスク群に比べて精神的健康度の平均値が有意に低値だった。PHQ-2 得点と SF-8 の精神的健康度・身体的健康度、及びこれらの複数の下位項目との間にはいくつかの正の相関が認められた。

教職員については、2,716 名から調査データが得られた。SF-8 の総スコアの平均値は、日本人標準値と比較して低値だった。SF-8 の身体的健康度の平均値は、日本人標準値と比較して有意に高値だったが、精神的健康度は有意に低値だった。PHQ-2 陽性者は、全受診者の 9.8%で、自殺念慮項目高リスク者は 6.1%だった。PHQ-2 陽性群は、陰性群よりも SF-8 の精神的健康度・身体的健康度ともに平均値が有意に低値だった。また、自殺念慮項目高リスク群は、低リスク群に比べて精神的健康度の平均値が有意に低値だった。PHQ-2 得点と、SF-8 の精神的健康度・身体的健康度、及びこれらの複数の下位項目との間に正の相関が認められた。なお、本調査では、PHQ-2 陽性群と自殺念慮項目高リスク群に迅速危機介入を実施した。

2. 相談対応

平成 25 年度の学生におけるキャンパス相談利用状況は、全キャンパスで、実人数 242 人(前年度比 112.0%)、延べ人数 1061 人(前年度比 113.4%)だった。内訳は図 2 のとおりである。相談内容分類の上位 3 つは、「心身の健康・増進」に関するもの、「修学」に関するもの、「対人関係」に関するものだった。



教職員におけるキャンパス相談利用状況は、全キャンパスで、実人数 389 人(前年度比 112.4%), 延べ人数 1408 人(前年度比 152.9%)だった。なお、福浦キャンパス・附属病院, 市民総合医療センターにはそれぞれ、「健康管理室」が設置され、保健管理センター臨床心理士と担当医師・看護師が相談対応を行っており、利用状況には、これらの相談対応も含まれている。相談内容分類の上位3つは、「心身の健康・嗜癖」に関するもの(28.3%), 「就業・業務内容(質・量)」に関するもの(20.8%), 「休復職・制限勤務」に関するもの(14.2%)だった。

3. 情報共有の工夫

学生のメンタルヘルス支援については、毎月定例で、全学務系部署の指定担当者が定例的に集合し、また適宜、教員を交えて不調が懸念される学生に関して情報共有を行い(20 事例以上/回)、不調学生への早期介入と、対応技術について報告・検討を行ってきた。

4. 研修事業

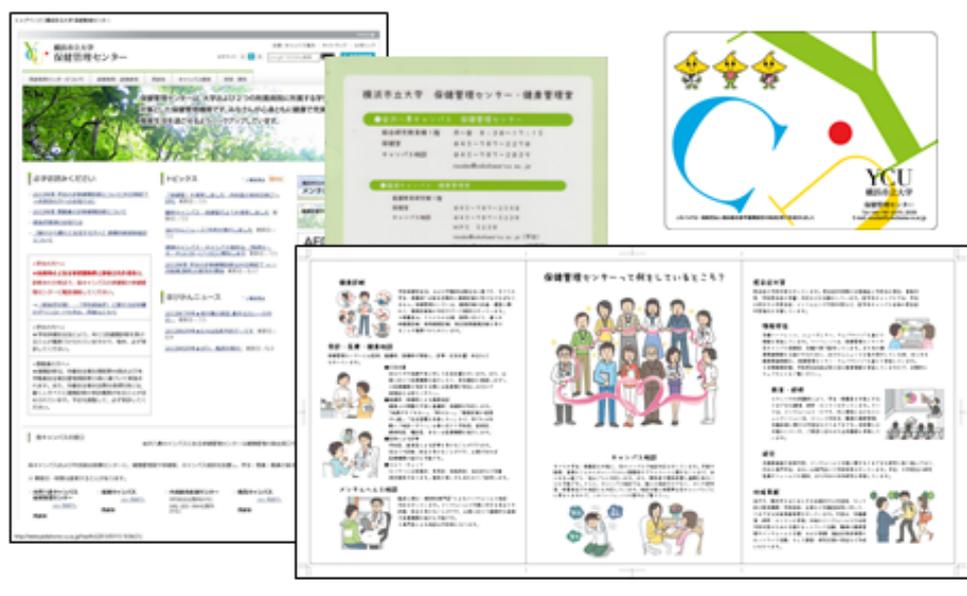
学生に対しては、平成 25 年度に初の研修事業を企画・実施(キャリア支援室との共催)した。対象は、対人関係やコミュニケーションの苦手とする学生で、内容は、双方向性の講義とグループ・ワークの形式によりアサーションに関する研修会を計 6 回開催し、43 名の参加者を得た。

教職員に対しては、平成 24 年度に引き続き、教職員管理職を主な対象とする研修会を行った。これは、平成 23-24 年度の数々の就業規定の改訂を踏まえ、そのコンセプトと運用を学ぶものであり(人事課企画担当との共催)、主要キャンパスで計 3 回の研修を実施し、54 名の参加者を得た。また、教員を対象に、ビデオ教材を用いて、発達障害のある学生への対応に関する研修会を企画・実施し、12 名の教員の参加を得た。

5. 健康管理に関する情報提供と、保健管理センターの利用を勧奨する啓発

図 3 に、平成 24 年度内に、あるいは平成 25 年度に横浜総合医学振興財団の助成により作成された啓発／情報提供ツールを提示した。

図3. 情報提供、および啓発の推進
(左より時計まわりに、ウェブサイト、クリアファイル、マウスパッド、及び、業務案内リーフレット)



【考察】

国内の多くの大学では、一般に健康管理部門から独立した学生相談室を設置し、学生の相談対応を行っている。相談内容は、必ずしも保健管理センターと共有されず、また、学務課と連携しないところも少なくないと聞く。また、教職員の健康管理は、健保組合と個人に任せられ、保健管理センターは、実質的に教職員の健康

管理をその業務対象としていないところが多い。

報告者が統括する横浜市立大学保健管理センターでは、これらの課題をすべて克服し、メンタルヘルス不調者を現実的に支援する目的で、上記の包括的なメンタルヘルス支援システムを構築した。上記の、効果検証可能なメンタルヘルス関連評価尺度の導入によるスクリーニングの実施と導入と危機介入の徹底は全国的にみて極めて稀な取り組みであるが、極めて高い実効性が示された。相談対応件数は昨年度より増加を示したが、これは、情報発信だけにとどまり、上記の包括システムの稼働による好循環がその要因であると示唆された。

今後、さらに上記のシステムから得られた情報を経年的に蓄積・解析し、メンタルヘルス支援システムの改善を図るとともに、保健管理センター業務を、さらに不調者対応のみならず健康増進対策へと拡張していくことができればよいと考えている。

【成果発表】

(論文・著書)

1. 横浜市立大学保健管理センター:公立大学法人横浜市立大学保健管理センター平成24年度業務報告書. 2014
2. 飛田千絵, 近藤智津恵, 金澤直樹, 岸本智美, 土井原千穂, 鈴木貴代美, 河西千秋:横浜市立大学における教職員の健康管理システムの構築. CAMPUS HEALTH, 2014;51:331-332
3. 金澤直樹, 岸本智美, 土井原千穂, 飛田千絵, 近藤智津恵, 大山寧寧, 鈴木貴代美, 河西千秋:横浜市立大学における教職員の健康管理システムの構築. CAMPUS HEALTH, 2014;51:553-554
4. 大山寧寧, 河西千秋, 平安良雄:医学教育における精神医学の知識習得と精神障害者に対する態度との関連. 精神医学, 2014;56:293-298
(学会報告)
5. 河西千秋(シンポジスト):医療分野における専門職のメンタルヘルス:医学部・病院を擁する総合大学におけるメンタルヘルス支援システムの構築. 第11回日本うつ病学会総会, 広島, 2014, 7
6. 土井原千穂, 岸本智美, 河西千秋:首都圏公立総合大学における学生・教職員のメンタルヘルス支援システムの構築. 第37回日本自殺予防学会, 秋田, 2013, 9
7. 岸本智美, 土井原千穂, 河西千秋:首都圏公立総合大学における学生・教職員のメンタルヘルス支援システムの構築. 第37回日本自殺予防学会, 秋田, 2013, 9
8. 飛田千絵, 河西千秋:首都圏公立総合大学における学生・教職員のメンタルヘルス支援システムの構築. 第51回大学保健管理研究集会, 岐阜, 2013, 11
9. 金澤直樹, 河西千秋:首都圏公立総合大学における学生・教職員のメンタルヘルス支援システムの構築. 第51回大学保健管理研究集会, 岐阜, 2013, 11
10. 岸本智美, 土井原千穂, 金澤直樹, 飛田千絵, 大山寧寧, 鈴木貴代美, 戸井田真木, 近藤智津恵, 佐藤紫, 河西千秋:職域メンタルヘルス支援従事者のストレスとネットワーク研修会の効果に関する検討(第1報). 第21回日本産業ストレス学会, 仙台, 2013, 11
11. 土井原千穂, 岸本智美, 金澤直樹, 飛田千絵, 近藤智津恵, 鈴木貴代美, 岸田郁子, 河西千秋:A大学教職員におけるメンタルヘルス評価システムの有用性の検討. 第11回日本うつ病学会総会, 広島, 2014, 7
12. 岸本智美, 土井原千穂, 金澤直樹, 飛田千絵, 近藤智津恵, 鈴木貴代美, 岸田郁子, 河西千秋:A総合大学学生におけるメンタルヘルス評価システムの有用性の検討. 第11回日本うつ病学会総会, 広島, 2014, 7

<医学・医療関連事業助成>

ザンビア共和国での地域医療支援活動を通じた学生交流

井上 聡

横浜市立大学医学部看護学科 看護生命科学

活動内容

1. ザンビア共和国における海外フィールドワーク（横浜市立大学医学部看護学科）
2. 薬剤耐性マラリアに関する疫学調査（ザンビア共和国）

1. 海外フィールドワーク（横浜市立大学医学部看護学科）

【目的】

本学看護学科生に海外での保健医療に関するコミュニケーションの機会を提供し、異文化交流能力に長けた人材の育成を行う

【方法】

平成25年度の横浜市立大学医学部看護学科3年次生7名と共にザンビア共和国を訪問した(平成26年3月15日～22日)。現地のコミュニティスクール(マテロナコミュニティスクール)を訪問、同校の小中学生対象に保健衛生指導(栄養、手洗い、歯磨き)を本学看護学科生が英語を使用して行った。医療施設{日本国際協力機構(JICA)、ザンビア大学医学部、附属教育病院}を訪問、担当者より説明を受け質疑応答も行った。ザンビア大学医学部でも学生間の交流を行い、また今後の共同研究についての話し合いを行った。

日程

日	月 日	曜日	行程	訪問都市	訪問施設など
1	3月15日	土	22:00 成田発 ドバイ経由	移動中	
2	3月16日	日	14:50 ルサカ着	ルサカ市	
3	3月17日	月	ルサカ滞在	ルサカ市	JICA 事務所表敬訪問、JICA プロジェクトサイト(ナコ リ・ヘルスセンター)
4	3月18日	火	ルサカ滞在	ルサカ市	マテロナ コミュニティス クール訪問、生徒との交流
5	3月19日	水	ルサカ滞在	ルサカ市	ザンビア大学附属教育病 院見学、在ザンビア日本大 使館表敬訪問
6	3月20日	木	21:20 ルサカ発	ルサカ市	フィールドワークの成果 の確認、レポート作成
7	3月21日	金	6:50 ドバイ着	移動中	
8	3月22日	土	17:20 成田着	成田	

【結果】

平成 26 年 3 月 17 日：首都ルサカ市郊外のカヴェにあるナコリ・ヘルスセンターを訪問
現地駐在の JICA 専門家により母子保健プロジェクトの案内をして頂いた。乳幼児健診に訪れた母子と交流する機会に恵まれ、学生たちも英語での会話が弾んでいた。現地施設は我が国より遅れていたが行われる健診内容は本学の母性看護、小児看護で学んだものと同じであり、国や文化、経済の違いの医療への影響を認識する良い機会であった。

平成 26 年 3 月 18 日：マテロナコミュニティスクールでの保健衛生指導

現地のコミュニティスクールを訪問し小中学生を対象に保健衛生指導（栄養、手洗い、歯磨き）を同校で栄養支援を行っている我が国のアライアンス・フォーラム財団との共催で行った。本学看護学科生たちは英語での発表を紙芝居形式で行い、また手洗い、歯磨きに関しては実践も兼ねて説明した。異文化交流を体験する非常に良い機会であった。

平成 26 年 3 月 19 日：ザンビア大学医学部薬学科、大学附属病院栄養不良病棟訪問

午前はザンビア大学医学部薬学科を訪問、本学学生が自己紹介、大学での専門などについて話し、ザンビア大学学生が質問を行うといった交流が行われた。午後はザンビア大学附属病院の小児栄養不良病棟を見学、経済発展が著しい発展途上国での保健医療における問題点について学ぶ機会を得た。

【考察】

現地滞在期間は 4 泊 5 日と短い期間であったが、参加した本学看護学科生は様々な異文化体験をすることが出来た。終了後の感想では「視野が広がった」「経済の医療分野への影響について学ぶことが出来た」「英語でのコミュニケーションに自信がついた」など参加者全員から本プログラムを評価する意見を聞くことが出来た。グローバル化が求められる現在、異文化交流体験は医学部教育にもっと取り入れる必要があると思われた。

2. 薬剤耐性マラリアに関する疫学調査（ザンビア共和国）

【目的】

マラリアの治療・予防に関する研究は過去数十年に渡り行われ、感染地域で実践されてきたが未だ絶滅されるに至っていない。90 年代に多くの犠牲者を出したが 2000 年代になり、新薬・早期診断法の開発や予防方法（家庭での殺虫剤スプレー、蚊帳の普及）の確立で罹患率の減少が見られた。しかしここ数年では新薬に対する耐性株が東南アジアから報告されており、今後中央アジアやアフリカに広がるのが懸念されている。本研究では薬剤耐性マラリアの有無についてのモニタリング調査がザンビア共和国で行われているかどうかの調査を行った。

【方法】

ザンビア国内 10 ヶ所に点在するマラリア診断・治療施設を訪れ、耐性マラリアについての対策状況（インフラ整備、診断・治療方法、薬剤効果のモニタリング施行の有無など）についての調査を行った。この研究は平成 23 年度から行っていたが 25 年度で国全体の調査が終了した。

各医療施設の訪問は同国の交通事情により運転手付のレンタカーを使用した（舗装されていない道路が多いので運転手を雇う必要がある）。

【結果】

国立マラリアコントロールセンターをはじめすべての施設で耐性マラリアのモニタリング調査が行われていないことが明らかになった。モニタリングを行う医療設備は整っていたが、それに従事する人員不足が顕著であり、更なる改善・支援が必要と思われた。

本年度中には論文として現在投稿中である。

【考察】

地球温暖化によりそれまで我が国とはあまり関わりのなかった疾患でも今後増えていく可能性も秘めており、熱帯感染症の研究も進めていく必要がある。また経済のグローバル化に伴い我が国のアフリカ諸国との関わりも増えていくことが予想され、本研究のような連携作業は研究のみならず学生教育のためにも発展させていく必要がある。

最後になりましたが今回の活動に対して助成金を提供して頂いた一般財団法人 横浜総合医学振興財団の皆様には深謝いたします。



<医学・医療関連事業助成>

【早期胃癌に対する NBI 併用拡大観察の有用性に関する多施設共同研究】

野中 敬
消化器内科

抄録

近年、消化器内視鏡診断にておいて狭帯域光観察(Narrow-band imaging ; NBI)に代表される画像強調内視鏡観察法(image enhanced endoscopy ; IEE) の登場により、組織型診断、病変範囲診断、深達度診断に関する有用性が多く報告されている。胃腫瘍に関しても精力的に研究がなされているが、胃酸の影響や形態、組織型の多様性から未だ確立されていない。多症例の画像集積が急務であるが一施設では限界があり、また内視鏡診断は主観的要素の影響を受けやすく、客観性ある読影を身に付けるためには複数の研究者間での検討が望まれる。本研究は横浜市立大学関連の医療施設間で内視鏡画像・医療情報を共有可能なシステム構築と、胃癌診断における IEE の有用性を多施設共同研究として検討する事を目的に計画された。

本年度は本学以外に関連施設 1 施設の研究参加が得られ、計 222 症例の IEE 画像が集積された。多施設研究者間での読影カンファレンスを定期的に行い、IEE 画像読影に関する認識の共有化も図る事が出来た。更に本システムを用いた画像解析において胃平坦隆起性病変における腺腫と腺癌を鑑別し得る IEE 画像所見抽出の試みがなされ、得られた結果は国際学会を初めとした多くの学会や研究会において発表する機会が得られた。

【早期胃癌に対する NBI 併用拡大観察の有用性に関する多施設共同研究】

野中 敬
消化器内科

【目的】

近年、消化管疾患における内視鏡診断にておいて、高解像度内視鏡の進歩また狭帯域光観察 (Narrow-band imaging ; NBI) に代表される画像強調内視鏡観察法 (image enhanced endoscopy ; IEE) の登場は新たな診断学の可能性をもたらし、その有用性に関して多くの検討が行われている。しかし、胃腫瘍に関しては胃酸の影響や形態、組織型の多様性から未だ IEE の有用性に関して不明な点も少なくない。また、単施設での研究では症例集積に限界があり、多施設での IEE 画像集積と共有、複数の評価者による集積画像の解釈や診断に関する教育が重要と考えられる。本研究は横浜市立大学関連の医療施設間で内視鏡画像・医療情報を共有するシステム構築と、集積された画像を用いた NBI 併用拡大内視鏡観察の胃癌診断における有用性の検討を目的として計画された。

【方法】

本研究に同意が得られた各施設内において IEE により撮影された画像データおよび患者臨床情報を連結不可能匿名化の上、独自に構築したサーバー内に集積し、登録した研究者間で集積した情報を共有化すると同時に、集積画像を読影するカンファレンスを定期的に行う事で IEE 所見の客観的読影力を身に付ける事を試みた。

また、胃腫瘍における IEE の有用性を検証する研究の一環として、平坦隆起型を呈する胃腫瘍に注目し、胃腺腫と早期胃腺癌を鑑別し得る IEE 所見の抽出を試みた。具体的には、内視鏡的粘膜下層剥離術により切除された平坦隆起性胃腫瘍に対して NBI 併用拡大観察が行われた症例を対象とし、NBI 拡大観察における微小血管像および微細表面模様 of 2 所見に関して、その形状と性状、密度、副所見、領域不整を遡及的に各症例毎に解析し、切除後病理診断における胃腺腫と早期胃癌症例とで比較検討する事により胃癌症例における特徴的な IEE 所見の抽出を試みた。

【結果】

本年度は本学以外に関連施設 1 施設の研究参加が得られ、倫理委員会と患者同意の元に計 222 症例の IEE 画像集積を行う事が出来た。また多施設での研究者間で読影カンファレンスを行う事により画像解釈の共有化、読影力の研鑽を積むことが出来た。

本システムを用いて解析した胃腺腫と早期胃癌を鑑別し得る IEE 所見抽出の研究に関しては、統計学的手法を用いて、微小血管構築像の形状における Wavy な形状、性状として拡張・延長・口径不同な血管像、微細表面模様の形状として villous, polygonal, amorphous な形状、性状として拡張した微細表面模様、また微小血管構築像・微細表面模様ともに領域不整の有無が早期

胃癌に特徴的な IEE 所見である事が抽出出来た。(図)

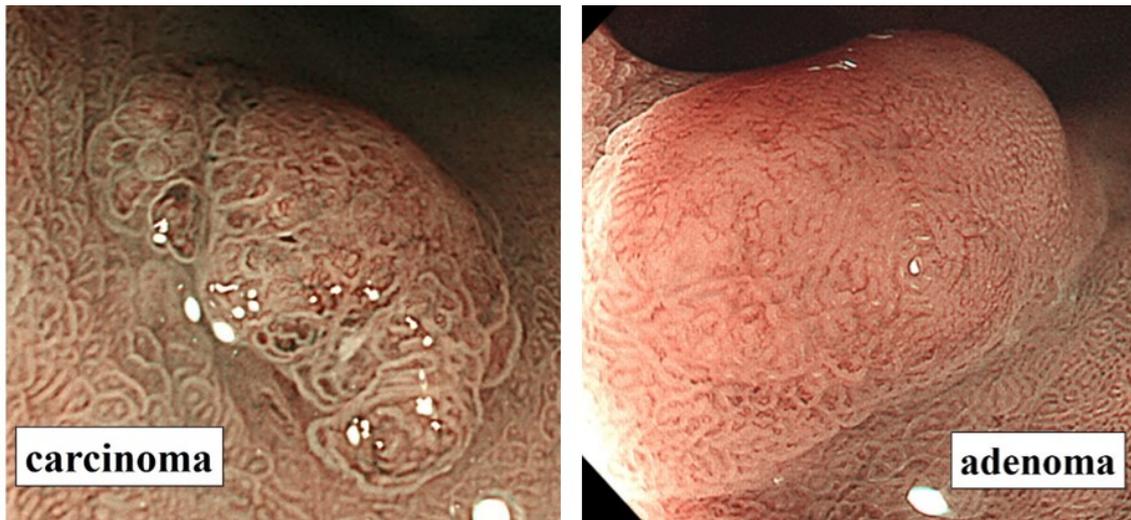


図.早期胃癌と胃腺腫に特徴的な NBI 併用拡大観察所見

【考察】

IEE 観察は通常ルーチン内視鏡検査では現状行われていないため、本システムの構築により多くの消化管腫瘍における IEE 画像を集積する事が可能となり、また得られた画像を多施設の研究者間で共有する事により読影力の向上に寄与するとともに、初学者への教育の点においても活用の可能な点で有用であると考えられた。更に今回は、本研究で集積された画像を解析する事により胃腫瘍における IEE の有用性を検討する事ができ、今後の画像解析研究への応用も可能である点で本研究は非常に有用な試みであると考えられた。

当初は Web 上での画像共有を計画していたが、セキュリティーの問題により本年度は実現出来なかった。今後、今回構築した内視鏡画像共有システムへの参加施設数を増やし、Web を用いた簡易な情報共有を目指すとともに、本システムを利用した画像解析研究が実践出来るように努めていきたい。

【論文および学会発表（研究会を含む）】

- ・第 58 回神奈川消化器病研究会「隆起型を呈する胃腺腫と胃癌の内視鏡的診断に関する研究」
- ・JDDW2013「平坦隆起性病変における NBI 併用拡大観察を用いた胃腺腫と胃癌の鑑別に関する検討」
- ・第 10 回消化管学会総会「平坦隆起性胃腫瘍における NBI 併用拡大内視鏡を用いた質的診断の検討」
- ・横浜消化器病 Summit「当院の ESD の現状」「平坦隆起性胃腫瘍の癌と腺腫を鑑別する内視鏡所見」

- ・第 87 回日本消化器内視鏡学会総会「The magnifying endoscopic findings for discriminating between adenoma and cancer of superficial elevated gastric lesions」
- ・第 100 回日本消化器病学会総会「胃平坦隆起性病変の内視鏡診断～通常観察と NBI 併用拡大観察における検討～」
- ・ DDW2014 「Can magnifying endoscopy with narrow-band imaging discriminate carcinomas from adenomas in gastric superficial elevated lesions?」
- ・ 論文名：「Evaluation of endoscopic findings for discriminating between early carcinomas and low grade adenomas in gastric superficial elevated lesions」 投稿中。

<医学・医療関連事業助成>

セルフヘルプ効果を期待した乳がん体験者による小冊子作成

蜂巢志乃

(横浜市立大学附属病院 外科外来)

共同研究者

加藤弘美 (横浜市立大学附属病院 看護部)

高橋優里 (横浜市立大学附属病院 8-1 病棟)

太田一郎 (横浜市立大学附属病院 薬剤部)

2012年1月に発足した乳がん患者院内患者会の「ハートマンマの会」は、月一回定期的に開催を継続している。今回「自己の体験を基に告知時や治療による副作用への対処や心の持ちよう工夫したことなどをまとめて小冊子を作製し、同じ病気の方々に役立てて欲しい」との希望があり、有志の参加者が集まり小冊子を作成した。小冊子原稿完成後参加者にアンケート調査を実施して、自己の体験を振り返り自分らしく病気と向き合う力を得られるか、また、小冊子を受け取った患者が治療中への対処に役立てられるかを検証した。

アンケート結果から編集に携わった患者の多くは、自らの体験の振り返り、その時々を感じた気持ちや工夫したことを表出しつつ、この冊子を受け取る対象の治療や環境が個々で違うことを配慮していた。小冊子を作り上げたことで大きな達成感があり、今後の治療の意思決定に前向きに取り組む姿勢が見られ自助効果が得られていると考えられた。今回、小冊子の完成までに時間を要したため、配布後受け手の患者が治療への対処に役立てられているかの検証までには至らず、今後の課題となった。

セルフヘルプ効果を期待した乳がん体験者による小冊子作成

蜂巢志乃

(横浜市立大学附属病院 外科外来)

共同研究者

加藤弘美 (横浜市立大学附属病院 看護部)

高橋優里 (横浜市立大学附属病院 8-1 病棟)

太田一郎 (横浜市立大学附属病院 薬剤部)

2012年1月に発足した乳がん患者院内患者会の「ハートマンマの会」は、月一回定期的に開催しており、毎回10人ほどが『語り合う』ことを目的に参加している。昨年行ったアンケート調査で参加者から「患者会に参加し、気持ちの共有が図れ、孤独感や不安感が和らぎ治療に前向きになれている」との回答が寄せられた。また、ある参加者から「自己の体験を基に告知時や治療による副作用への対処、心の持ちようや工夫したことなどをまとめて小冊子を作成し、同じ病気の方々に役立てて欲しい」との希望があり、賛同者が集い、小冊子作成チームが発足した。今回、この小冊子の作成・編集に携わった患者が、自己の体験を振り返り自分らしく病氣と向き合う力が得られたか、また実体験を基にした小冊子を読んだ患者が治療中への対処に役立てられるかを検証した。

2.方法

平成25年3月から平成26年7月までに約2ヶ月に1回の割合で有志の患者と報告者及び共同研究者が集まり、編集会議を行った。まずどのような小冊子にするかを話し合い

「既存の冊子類にない、実体験を基にして身近な創意工夫をまとめる事」となり、治療中に困った事、自分なりの対処とその結果をアンケート形式にして患者会参加者に意図を説明後配布し、賛同していただいた方から回収した。その回答結果を基に小冊子の構成及びページ数を検討した。構成は、「はじめに」で始まり告知後・手術のための入院・抗がん剤治療・ホルモン剤治療・放射線治療時の当院での様子と体験記及び創意工夫を、他に治療費用・院内施設の紹介・投稿の川柳・編集後記・表紙・裏表紙と決め、編集メンバーそれぞれに担当を割り当て、進めることになった。小冊子の形態は約20ページ程度でサイズはA5となった。3回目以降はそれぞれが担当してまとめた箇所を順番に検証し、小冊子に起用する内容を選別した。同時に文字のボリュームやイラスト掲載の内容も検討した。

平成26年7月に初稿原稿が完成し、編集メンバー及び医療関係者を含む多方面に内容の検証を依頼し、加筆修正後に印刷を依頼した。同時に小冊子作成チームメンバーに編集に携わったのお気持ちやその推移・感想及び小冊子の活用に期待する事をアンケート形式で記載を依頼し、回収後検証した。

3.結果

小冊子は「知恵袋～一人じゃないよ！体験者からのメッセージ」と題して20ページで完成

した。アンケートは、小冊子作成チームメンバー9名（内3名医療スタッフ含む）のうち、報告者を除く8名に配布し、7名分（内2名医療スタッフ）回収できた。編集に携わったことによる気持ちの変化については、「自身の体験を振り返りながらも人それぞれの環境や受け取り方も考慮した」「仲間がいる事を知ってほしい」「つらい治療を乗り越えた先に本来の自分を取り戻すことが出来る希望があるということを知らせたい」「自分が体験した中で知恵を残して助かる人がいればと思ったが、編集が進むにつれ他のメンバーの意見も入りモチベーションが下がった」などの記載があった。小冊子の活用への期待は、「何かのヒントになってほしい」「転ばぬ先の杖的に活用してほしい」「お守りのような存在であってほしい」「前に歩く後押しができればいい」「自身の今後の治療も自己責任で決定できるように心掛けたい」などの記載があった。医療スタッフからは、「医療者の意見でなく体験して乗り越えた冊子を作る患者さんを主体に出来るように参加した」「ひとりでも多くの患者さんの手に取ってもらうことで悩んでいることを解決する手助けになってほしい」などの記載があった。

4. 考察

編集に携わった患者の多くは、自らの体験の振り返り、その時々を感じた気持ちや工夫したことを表出しつつ、この冊子を受け取る対象の治療や環境が個々で違うことを配慮していた。小冊子を作り上げたことで大きな達成感があり、今後の治療の意思決定に前向きに取り組む姿勢が見られ自助効果が得られたと考える。また、医療スタッフも患者の体験を共有し、情報の修正や編集場所の設定や事務処理などをして、患者が自由に話し合いを出来るようにサポートしていた。今回は、小冊子の完成までに時間を要し、配布後受け手の患者が治療への対処に役立っているかの検証までには至らなかった。その点について今後の課題と考える。

<指定寄附助成 心臓疾患研究助成 24年度>

ヨーロッパと日本で急性大動脈解離の発生率が異なる理由

—大動脈壁の構造的な相違があるか—

郷田素彦

横浜市立大学附属病院 心臓血管外科

鈴木伸一、益田宗孝

横浜市立大学附属病院 心臓血管外科

Bart Meuris

Department of Cardiac surgery, University Hospital Leuven

抄録

背景：急性大動脈解離の疫学について、日本と欧米とで差異があるかは不明である。

方法：日本及びベルギーの施設においてスタンフォード A 型急性大動脈解離に対して緊急手術を施行した 487 例（日本 250 例、ベルギー 237 例、平均 61.9 才）を対象とし、術前の臨床データ、画像所見、理学所見および手術所見などを比較した。

結果：日本では患者の約半数が女性だったのに対し、ベルギーで女性の占める割合は約 3 分の 1 であった (48.8% vs 28.7%, $p < 0.0001$)。また日本人は BMI が低く (24.2 vs 26.4, $p < 0.0001$)、高血圧は少なかった (49.2% vs 65.8%)。DeBakey I 型はベルギーに多く (77.2% vs 48.4%, $p < 0.0001$)、DeBakey III 型からの逆行性進展は日本に多かった (38.7% vs 3.4%, $p < 0.0001$)。エントリーが上行大動脈か弓部大動脈にあった症例の割合はいずれもベルギーで多く (78.5% vs 58.5%, $p < 0.0001$ 、24.9% vs 13.7%、 $p = 0.0018$)、下行大動脈にあった症例とエントリーが見つからなかった症例の割合は日本で多かった (10% vs 3.4%, $p = 0.0034$ 、17.6% vs 0%, $p < 0.0001$)。

結論：急性大動脈解離の男女の比率、解離の型およびエントリーの位置で差異があった。特に日本人女性は欧米に比し急性大動脈解離発症のリスクが高いと考えられた。

ヨーロッパと日本で急性大動脈解離の発生率が異なる理由

—大動脈壁の構造的な相違があるか—

郷田素彦

横浜市立大学附属病院 心臓血管外科

鈴木伸一、益田宗孝

横浜市立大学附属病院 心臓血管外科

Bart Meuris

Department of Cardiac surgery, University Hospital Leuven

【目的】

虚血性心疾患の発症および死亡率は欧米と比較すると日本で有意に低率であることはよく知られた疫学的事実である (1-4)。一方で日本人はより多くの脳梗塞、とりわけ出血性梗塞の罹患率が欧米よりも高い (1-4)。これら虚血性心疾患と脳梗塞という 2 大動脈硬化性疾患の疫学には明らかな東西 (東アジアと欧米) 差があることが分かっている (1)。そしてこれらの違いは、欧米では高脂肪食が好まれ高脂血症が多いのに対し、東アジアでは高塩分食が好まれ高血圧が多いことに関係しているとされている (1-4) が、いずれの説明も推論の域を脱しないのが現状である。実際に日本の食生活は非常に欧米化しているにもかかわらず、この傾向は続いている。

急性大動脈解離スタンフォード A 型は生命にかかわる大動脈疾患である。IRAD (国際大動脈解離レジストリ) では主に欧米の大動脈解離に関する疫学調査などを行っているが、欧米とアジアの比較についてはいまだ報告がない。本研究の目的は急性大動脈解離スタンフォード A 型の患者の患者背景および解離の形式にヨーロッパと日本の症例で違いがあるかを明らかにすることを目的とした。

【方法】

日本及びベルギーの施設においてスタンフォード A 型急性大動脈解離に対して緊急手術を施行した 487 例 (日本 250 例、ベルギー 237 例、平均 61.9 才) を対象とし、術前の臨床データ、画像所見、理学所見および手術所見などを比較した。ベルギーの症例は 1986 年 1 月から 2011 年 9 月までにルーヴェン大学病院で、日本の症例は 2003 年 1 月から 2010 年 12 月までの期間に横浜市立大学市民総合医療センターでそれぞれ緊急手術を行った。大動

脈解離の診断は CT、MRI、エコーのいずれかあるいはいくつかの組み合わせで行なった。急性解離は発症後 14 日以内に受診した症例と定義し、スタンフォード A 型は上行大動脈に解離が及んでいるものと定義した。

統計学的な解析は StatView J-5.0 を使用した。連続変数は平均±標準偏差で示し student's t test で比較した。非連続変数は χ^2 検定で比較した。p<0.05 を統計学的有意とした。

【結果】

日本では患者の約半数が女性だったのに対し、ベルギーで女性の占める割合は約 3 分の 1 であった (48.8% vs 28.7%, p<0.0001)。また日本人は BMI が低く (24.2 vs 26.4, p<0.0001)、高血圧は少なかった (49.2% vs 65.8%)。 (Table 1)

DeBakey I 型はベルギーに多く (77.2% vs 48.4%, p<0.0001) DeBakey III 型からの逆行性進展は日本に多かった (38.7% vs 3.4%, p<0.0001)。エントリーが上行大動脈か弓部大動脈にあった症例の割合はいずれもベルギーで多く (78.5% vs 58.5%, p<0.0001、24.9% vs 13.7%, p=0.0018)、下行大動脈にあった症例とエントリーが見つからなかった症例の割合は日本で多かった (10% vs 3.4%, p=0.0034、17.6% vs 0%, p<0.0001)。 (Table2)

Table1. Demographics and patient history for Western European and Japanese patients.

Variables	Western Europe (n=237)	Japan (n=250)	p Value
Gender (Men/Women)	169/68	128/122	<0.0001
Age (yrs)	59.3 ± 12.7	63.3 ± 11.3	<0.0001
Age < 40 yrs	13 (5.5%)	5 (2%)	0.0416
Age ≥ 80 yrs	10 (4.2%)	19 (7.6%)	0.1151
Body Mass Index	26.4 ± 4.1	24.2 ± 3.7	<0.0001
Hypertension	156 (65.8%)	123 (49.2%)	0.0002
Known aortic aneurysm (≥ 4cm)	51 (21.5%)	149 (59.6%)	<0.0001
Bicuspid aortic valve	5 (2.1%)	1 (0.4%)	0.1008
Marfan syndrome	7 (3%)	7 (2.8%)	0.9192
Other connective tissue disease	2 (0.8%)	0 (0%)	0.1455
Pregnant	2 (0.8%)	0 (0%)	0.1455
Drug	2 (0.8%)	0 (0%)	0.1455
Trauma	1 (0.4%)	0 (0%)	0.3039
Iatrogenic	4 (1.7%)	0 (0%)	0.0391
Previous cardiac operation	15 (6.3%)	4 (1.6%)	0.0071
Post cardiac operation within hospital stay	3 (1.3%)	0 (0%)	0.0744
Post cardiac operation within 2 years	13 (5.5%)	1 (0.4%)	0.0008

Table2. Demographics by gender.

Variables	Western Europe	Japan	p Value
Men	n=169	n=128	
Age (yrs)	58.6 ± 11.8	61.1 ± 11.1	0.0607
Age < 40 yrs	8 (4.7%)	3 (2.3%)	0.2801
Age ≥ 80 yrs	6 (3.6%)	5 (3.9%)	0.8722
Length (m)	1.75 ± 0.07	1.68 ± 0.06	<0.0001
Weight (kg)	82.5 ± 14.1	72.2 ± 11	<0.0001
Body Mass Index	26.5 ± 3.9	25.5 ± 3.4	0.0166
Hypertension	107 (63.3%)	62 (48.4%)	0.0104
Women	n=68	n=122	
Age (yrs)	61.2 ± 14.5	67.6 ± 10.5	0.0006
Age < 40 yrs	5 (7.4%)	2 (1.6%)	0.0045
Age ≥ 80 yrs	4 (5.9%)	14 (11.5%)	0.2059
Length (m)	1.64 ± 0.08	1.54 ± 0.07	<0.0001
Weight (kg)	70.2 ± 13.6	54.5 ± 10.5	<0.0001
Body Mass Index	26.5 ± 3.9	25.5 ± 3.4	<0.0001
Hypertension	49 (72.1%)	61 (50%)	0.0082

【考察】

心血管疾患の発症には遺伝的要素、生活習慣、環境因子、併存疾患などが深くかかわっていることは明らかであり、したがって罹患率や死亡率に地域差が生じることは当然である。欧米と比較して日本での虚血性心疾患の罹患率が低く出血性脳梗塞の罹患率が高いことは疫学的によく知られた事実である。本研究において我々は急性大動脈解離スタンフォード A 型においても患者背景などに欧米と日本で差があることを明らかにした。

日本の大動脈解離症例においてベルギーに症例と比較して女性に割合が多いことは本研究における特筆すべき結果である。欧米からの報告では男女比はおおむね 2:1 であり、IRAD からの報告にも大動脈解離の男女比は 2:1 であることが記されている。しかしこの比率は東洋においてもあてはまるだろうか。本研究における日本人症例の女性が占める割合は

48.8%であった。またその他の日本の施設からの報告のうち80例以上の急性大動脈解離スタンフォードA型症例を含む報告では女性の比率は39.1~58.8%であった。同様に韓国からの最近の大動脈解離関連の報告では女性の割合は42.4~52.7%であった。このことから東アジアにおける大動脈解離の男女比は1:1に近く、欧米に比べて東アジアの女性は大動脈解離を罹患しやすいということが言えよう。OECDの発表によると心血管疾患で死亡する女性は日本では百万人当たり380人なのに対しベルギーでは940人と大きく日本を上回っている。このパラドックスはもしかしたら脳梗塞と虚血性心疾患で見られるような疫学的な違いなのかもしれない。また日本人女性の大動脈壁がより脆弱な構造であることが仮説として挙げることもできる。

実際の大動脈解離の発症率はどれほどであろうか。大動脈解離は突然死の原因となるため診断されずに亡くなる症例を鑑みると実際は報告よりも多いことが予想できる。教科書的には人口百万人当たり5~29.5例の発症とされているが、例えば欧米の報告はベルギー国内の統計では百万人当たり8.1例、IRADからの報告では4.1例、米国は2-8例とされている。ところが日本胸部外科学会からの報告では百万人当たり27.2例と欧米とは数倍の開きがあることは驚くべき事実である。

また大動脈解離の形態では、欧米の報告ではエントリーが上行大動脈に存在するDeBakey I型が60~68%とされており、本研究におけるベルギー症例でも同様の傾向が認められた。一方本研究における日本の症例ではDeBakey III型から逆行性に解離してスタンフォードA型化した症例が相当数認められ、これが日本の症例数が多い一つの理由とも考えられた。逆行性解離となりやすいのも動脈壁の脆弱性が関与している可能性がある。この動脈壁の構造的な違いの有無の解明が必要であると考えられた。

今後ベルギーの施設と本学とで引き続き大動脈壁の構造の違いに関して、分子生物学的解析、すなわち大動脈壁の瘤化もしくは解離に関わるプロスタグランジン受容体(EP-4)の発現の程度を比較や、生命工学的解析では動脈壁の強度を測定し比較するなど研究を進めていく予定である。

【学会発表】

郷田素彦, 南智行, 軽部義久, 内田敬二, 井元清隆, 片山雄三, 磯松幸尚, 鈴木伸一, 益田宗孝, Bart Meuris. 急性大動脈解離—日本とヨーロッパでの発生は同じか—. 第43回日本心臓血管外科学会学術集会, 東京, 2013, 2

Goda M, Minami T, Imoto K, Kakazu A, Fujikawa Y, Katayama Y, Isomatsu Y, Suzuki S, Masuda M, Meuris B. Acute aortic dissection-Western Europe vs Japan-. The 21st Annual Meeting of The Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery, Kobe, 2013, 4

Meuris B, Goda M et al. Epidemiology of acute aortic dissection-another East/West divide? 7th Biennial congress Heart Valve Society of America, the Society for Heart Valve Disease, Venice, Italy, 2013,6

<指定寄附助成 心臓疾患研究助成 25年度>

静脈グラフトの長期開存に関する研究

安田 章沢

横浜市立大学附属市民総合医療センター 心臓血管センター 外科

分担研究者

井元 清隆 内田 敬二

横浜市立大学附属市民総合医療センター 心臓血管センター 外科

益田 宗孝 郷田 素彦

横浜市立大学 外科治療学 心臓血管外科

1.本研究の目的

静脈グラフト(CABGを含む)の開存率が10年で6割まで下がってしまうことは様々な研究結果により明らかとなっているが、グラフト閉塞の主な原因として、移植後中期の中膜肥厚が指摘されている。術後1-5年に発生するグラフト内膜肥厚は、静脈グラフトが完全に信用され得ない主な原因であり、この間にグラフトの開存率は60%まで落ち込んでしまう。この第二のグラフトの開存率を向上させる研究は意義深いものであると思われる。

静脈グラフトの中膜肥厚を抑制する為、静脈グラフトに外ステントを巻く方法は動物実験としては一定の効果が認められている。しかし、外ステントは動物実験では効果が認められるものの実際に臨床応用されたものは希少である。人工的に静脈グラフト周囲の間葉系細胞を増殖させ、グラフト周囲に血管新生を惹起させれば静脈グラフト壁内の栄養血管が機能し、わざわざ人為的に外ステントを装着せずとも理想的な *surround tissue* が生成されるのではないかと仮定した。京都大学の研究から得られた Medgel®を徐放基材に用い、bFGFを徐放させて静脈グラフトの壁肥厚を抑制する実験モデルを考えた。

2.方法

ビーグル犬の頸動脈を結紮し、頸静脈で bypass する。頸静脈を harvest し、両側を動脈に7-0プロリン糸で端側吻合する。閉創前に Medgel®に bFGF を浸漬させたシートを巻きつける。術後2カ月で sacrifice し、内膜の厚み、Vasa Vasorum の数、血管平滑筋の活性化時に発現される物質の活性を測定し内膜肥厚が抑制されているかどうかを確認した。

3.結果

平成25年6月から9月にかけて、まず pilot study として4頭のビーグル犬に実験を行い、静脈そのものの検体に比較し、2か月間バイパスグラフトとして用いた静脈は中膜が非常に肥厚すること、さらに bFGF を Medgel に浸漬させ投与した場合中膜肥厚が抑制されていることが明らかとなった。しかし、Medgel はやや硬く、静脈グラフトに巻き付けるという手技は困難が伴い、実際の冠動脈バイパスに応用が利きづらいことも判明した。FGF の徐放材として生体の手術に頻用される Fibrin glue を使用し、現在実験を継続している。

静脈グラフトの長期開存に関する研究

安田 章沢

横浜市立大学附属市民総合医療センター 心臓血管センター 外科

分担研究者

井元 清隆 内田 敬二

横浜市立大学附属市民総合医療センター 心臓血管センター 外科

益田 宗孝 郷田 素彦

横浜市立大学 外科治療学 心臓血管外科

1.本研究の目的

静脈グラフト(CABGを含む)の開存率が10年で6割まで下がってしまうことは様々な研究結果により明らかとなっているが、グラフト閉塞の主な原因として、移植後中期の内膜肥厚が指摘されている。術後1-5年に発生するグラフト内膜肥厚は、静脈グラフトが完全に信用され得ない主な原因であり、この間にグラフトの開存率は60%まで落ち込んでしまう。内膜肥厚を抑制する方法は様々な方法が試みられてきたが(PREVENTIII trial等)、臨床応用されるには至っておらず成功しなかった。その要因として、内膜肥厚を惹起するcascadeはいくつもの種類があり、血管平滑筋の遊走を阻止するだけでは(その発現因子一つを抑制しても)上手くゆかない為である。CABGの患者群が重症化し多枝バイパスでの治療がますます重視される時代に、この第二のグラフトの開存率を向上させる研究は意義深いものであると思われる。

静脈グラフトの中膜肥厚を抑制する為、静脈グラフトに外ステントを巻く方法は動物実験としては一定の効果が認められている。外ステントが動脈圧のshear stressを受け止める壁、として働くことを期待し行われてきた方法であるが、様々な知見が得られる内、結果としてのadventitial neovascularizationの促進、外ステントに対する生体反応として産生される生理活性物質による血管平滑筋細胞の血管の外膜側への移動、神経支配の再構築の抑制等による作用が新生内膜の肥厚を抑制している、ということであった。しかし、外ステントは動物実験では効果が認められるものの実際に臨床応用されたものは希少である。Schoettlerらはナイチノールメッシュを静脈グラフトの外側に巻きつけたグラフトを作成し、臨床実験として開存率を検討したが、却って開存率を下げてしまうnegativeな結果であった(Int Cardiovasc Thorac Surg 2011;13:396-400)。彼らは外ステントの径をややrestrictiveにしていたのが失敗の原因とみているが、とりもなおさずこの実験は実臨床で静脈グラフトに外ステントを装着する煩雑さ、適切な径を選択する難しさを示している。さらに、Izzatらはブタの実験で外ステントの径について論じている(Circulation. 1996;94:1741-45)が、外ステントにより内膜肥厚は抑制されたものの、外ステントの径はjust sizeでもover sizeでも内膜肥厚の抑制の程度に有意差を認めなかった。これらの事実を総合すると、外ステントはshear stressを受ける壁としての役割より

も、周囲組織との channel として栄養血管の派生の助長、血管平滑筋の内膜側への移動の抑制等の効果により内膜肥厚を抑える効果があるのではないかと示唆される。以上の結果より、血流を流す導管として静脈グラフトを認識するのではなく、周囲組織と交通する『生体内血管』に戻すことが可能になれば理想的なグラフトになり得ると考える。では、人工的に静脈グラフト周囲の間葉系細胞を増殖させ、グラフト周囲に血管新生を惹起させれば静脈グラフト壁内の栄養血管が機能し、わざわざ人為的に外ステントを装着せずとも理想的な surround tissue が生成されるのではないかと仮定した。

FGF(Fibroblast Growth Factor)は血管新生因子としての歴史が最も古く、これまでに多くの研究がなされてきた。血管内皮細胞には FGFreceptor-1 が発現しており、in vitro では FGF2/FGFR-1 を介した細胞内シグナル伝達により血管内皮細胞の増殖、遊走、分化を誘導する。又、FGFR-1 は多種多様な細胞に発現しており、bFGF は血管平滑筋細胞等の間葉系細胞にも作用し得る、と言われている。しかし、bFGF は生体内では速やかに分解されてしまい、その効果を持続させることは難しい。京都大学の研究から得られた Medgel®はゼラチンベースの徐放性 DDS 基材であり、約二週間で完全に分解される（つまり二週間にわたり生理活性物質を徐放することが可能である）。この DDS 基材は既に様々な生理活性物質の徐放効果が検証されており(bFGF, TGF- β 1, HGF, PDGF-bb, etc…), 心筋梗塞ラットモデルでは Medgel に bFGF を合わせたものを梗塞部に注射し、血管新生を誘導した、という報告がある (J Thorac Cardiovasc Surg. 2002;24:50-6.)。このように Medgel 自体は現時点で非常に利用しやすく、購入可能なゼラチンゲルである。この gel を徐放基材に用い、bFGF を徐放させて静脈グラフトの壁肥厚を抑制する実験モデルを考えた。

2.方法

ビーグル犬の頸動脈を結紮し、頸静脈で bypass する。頸静脈を harvest し、両側を動脈に 7-0 プロリン糸で端側吻合する。閉創前に Medgel®に bFGF を浸漬させたシートを巻きつける。術後 2 カ月で sacrifice し、内膜の厚み、Vasa Vasorum の数、血管平滑筋の活性化時に発現される物質 (Thromboxane A₂, endothelin-1, serotonin, Platelet-derived growth factor, superoxide, platelet factorIV、MMP-2 と及び 9) の活性を測定し内膜肥厚が抑制されているかどうかを確認した。

3.結果

平成 25 年 6 月から 9 月にかけて、まず pilot study として 4 頭のビーグル犬に実験を行い、静脈そのものの検体に比較し、2 か月間バイパスグラフトとして用いた静脈は中膜が非常に肥厚すること、さらに bFGF を Medgel に浸漬させ投与した場合中膜肥厚が抑制されていることが明らかとなった。しかし、Medgel はやや硬く、静脈グラフトに巻き付けるという手技は困難が伴い、実際の冠動脈バイパスに応用が利きづらいことも判明した。さらに、Medgel を用いた実験はラットではあるが先行実験があることも判明した (Haraguchi T, et al. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2007;27:548-555.)。この為、別の徐放材を用いて FGF を投与する試みを行うこととした。FGF の徐放材として報告が多いのはフィブリノゲンとトロンビンを混ぜて用いる Fibrin glue であり、これは生体の手術に頻用されるものである。入手

も容易でありスプレー状に吹きかけることも可能である。この為実際に臨床応用が行いやすいという利点もある。ここまでの成果をまとめ、平成 26 年度文部科学省科学研究費助成事業に応募（若手研究（B）課題番号 26861113）、助成金を受け取ることが出来た。平成 25 年 12 月から 2 月にかけて合計 8 頭に実験を施行した。しかし、この実験は失敗に終わりグラフトの壁肥厚は却ってコントロール群より悪化する結果となった。又、手術に際し 2 頭が術死した。この原因として、創部の閉鎖の際に筋層の縫合を行わず浸出液が多くなってしまったこと、Fibrin glue の量が多くグラフトの外側に大量に塗布され、外側からの組織の派生、血管新生が逆に妨げられたことが考えられた。

この反省を踏まえ、平成 26 年 5 月から 9 月にかけて第 3 段階の実験を施行した。まず、予備実験として創部の閉鎖を厳重に行ったモデルを作成した。第 2 段階の実験では術翌日にほぼ全例が皮下に水腫を形成していたが、創部厳重閉鎖モデルでは形成は認められなかった。又、fibrin glue の量、組成も検討を加え、全体量を少なくし薄めに塗布、さらにトロンビン量を少なくし glue の目を粗くする方法を採用した。さらに、fibrin glue として臨床応用されているタコシール®も徐放基材になり得ると考え、FGF を浸漬させて使用することとした。又、FGF の量も検討を加え、2 種類の doze(100 μ g 及び 500 μ g)で実験を行った。改めて preliminary な実験に戻り、どういった方向性で実験を再構築すべきか検討することとした。しかし、この実験も（現時点では中途の状態であるが）bFGF に関しては目立った成果が出ていない。むしろ、実験の結果としては bFGF を使わない fibrin glue 単独群の方が何も使用していない control に比較しまだ壁肥厚が抑制されていると示唆されるような結果であり、これは前回の実験結果と類似のものであった。タコシール群は原因不明であるが術翌日や 2 週間後等に急死してしまい、検体採取が出来なかった。

4.考察

以上の結果を現時点で解析すると、

- ① bFGF は動脈硬化等で動脈壁が肥厚する際に大量に産生される。この為 bFGF は静脈グラフトの肥厚にも悪影響を与える可能性がある。先行実験や第一次実験での結果はたまたま色々な条件がかみ合った結果ではないか。
- ② fibrin glue の効果は、結果的には本実験の発想の大元である外ステントとして静脈グラフトの壁の圧力を受け止め分散する補強材としての役割を担っていたか？

という考察が現時点で考えられる。

これを立証する為、まずは統計学的に壁肥厚に有意差があるかどうか、第 2 シリーズ及び第 3 シリーズの検体を再検証することを近日中に行いたい。又、組織の shear stress についても今後実験モデルを作成し、検討してゆく方向である。

5.発表

本研究は未だ研究途上であるが、医局内の研究会(2013 年外科治療学セミナー、2013、横浜)にて途中の研究成果を発表した。

<学会開催助成>

日本ハイパーサーミア学会第 30 回大会

藤内 祝

横浜市立大学大学院医学研究科 顎顔面口腔機能制御学

会期：平成 25 年 8 月 30 日（金）、31 日（土）

会場：横浜シンポジア（〒231-0023 横浜市中区山下町 2 番地）

参加人数：290 名（招待者含む）

日本ハイパーサーミア学会第 30 回大会開催に際しまして、横浜総合医学振興財団「学会開催助成」の助成金交付していただき心から感謝申し上げます。

今回は 30 回の記念大会ということでテーマを「ハイパーサーミア 30 年の歩みと未来」とし、癌・肉腫治療の新たな展開を目指して、シンポジウム、招聘講演、教育講演、一般講演（口演、ポスター発表）が行われ、多くの研究者が研究成果を発表しました。

本学会は医学、物理学、生物学の研究者で構成され、本大会では基礎研究から臨床研究まで幅広い発表・討論が行われました。臨床系では内科、外科、放射線科、整形外科、婦人科、皮膚科、口腔外科などの多くの診療科の研究者が各種癌・肉腫に対する癌温熱療法の研究、成果につき報告しました。生物・基礎系では、熱の生物への影響や放射線や抗癌剤との併用などについて分子生物学、細胞生物学、放射線生物学、薬理学などの分野で研究が行われ、さらに物理・工学分野では加温装置や温度測定などの研究開発が行われており、研究成果が発表されました。さらに未来に向けた新たな癌治療として、各分野の研究者が研究成果の報告、討議を行われ、盛況のうちに終了いたしました。

<学会開催助成>

第 18 回日本ラテックスアレルギー研究会報告書

相原道子

横浜市立大学大学院・医学研究科・環境免疫病態皮膚科学

第 18 回ラテックスアレルギー研究会～ラテックスアレルギー・OAS フォロワーラム 2013 が本学大学院医学研究科・環境免疫病態皮膚科学の相原道子教授を会長として平成 25 年 7 月 28 日に横浜市中区の横浜シンポジウムで開催されました。

本研究会は 1996 年に医療現場でラテックスアレルギーの危険にさらされる患者や医療従事者をなくすべく発足した会であり、今回で 18 回目を迎えました。これまで本研究会ではラテックスアレルギーについての危険性を訴え、さらに医師や看護師などの医療従事者や基礎研究者が協力して基礎および臨床研究を重ねてきたことから、ラテックスアレルギーの研究と医療現場での安全確保の両面で大きく社会に貢献してきた研究会と認識されています。また、果物や野菜、大豆やナッツ類などのアレルゲンがラテックスや花粉のアレルゲンと交叉反応性を有するために生じる口腔アレルギー症候群 (Oral allergy syndrome: OAS) は、関連分野として 2005 年から同時に取り上げられることになり、共通抗原の解析に関する研究が進められています。

当教室では先代の池澤善郎教授の時代に 2000 年、2010 年と担当し、今回相原道子教授になって 3 度目の主催となり、過去最多となる 188 名の参加者を迎えました。特別講演では、ドイツの Osnabrueck 大学から Prof. Allmers をお招きし、”Hazards of natural rubber latex allergy powdered glove use”と題してご講演頂きました。シンポジウムでは「ラテックスアレルギーの現状と対策」をテーマとし、医療現場におけるラテックスアレルギー対策の現状を検証しました。OAS に関しても抗原解析と減感作療法にスポットを当てたシンポジウムを個別に企画し、現状と治療の展望を取り上げました。さらに近年、加水分解小麦含有石鹼の使用により小麦アレルギーが発症するというニュースが大きな社会問題となっているなど、ラテックスばかりでなく食物アレルギーの感作経路としても皮膚が重要視されていることから、教育講演ではアレルギー発症における経皮感作の重要性について取り上げました。

ラテックスアレルギーとそれに関連する OAS は皮膚科だけでなく耳鼻科、麻酔科、小児科、歯科、内科など複数の診療科の横断的関与が不可欠であり、さらには看護師を含むコメディカルや一般市民への知識の普及が安全管理の上で重要です。今回、本学および協力病院の皮膚科医のみでなく、本学手術部や看護部、歯科からも数多くの発表や参加があり、本学のラテックスアレルギーに対する取り組みが、全国的にも進んだものであることが示されました。

最後になりましたが、横浜総合医学振興財団を始めとした本学および関係者の方々から多大な御支援と御協力をいただきましたことを感謝申し上げます。

<学会開催助成>

第5回日本静脈経腸栄養学会首都圏支部会学術集会

望月弘彦

クローバーホスピタル 消化器科・NST チェアマン

学会名：第5回日本静脈経腸栄養学会首都圏支部会学術集会

開催地：藤沢市民会館

会期：平成25年5月18日

参加人数：620名

貴財団から助成金をいただき、5月18日に藤沢市民会館大ホール他の会場において、第5回日本静脈経腸栄養学会首都圏支部会学術集会を開催させていただきました。この学術集会は神奈川県と東京都で交互に開催されており、多職種からなるチームで栄養管理を行うNST(Nutrition Support Team)の活動を始めとした臨床栄養学について、毎回活発な討議がなされてきました。

今回、メインテーマを「NSTの地域連携と在宅NST」とし、高齢化社会や平均在院日数の短期化の中で求められている、リハビリテーションや慢性期医療、在宅医療、地域連携をいかに充実していくかを中心に論じていただきました。特別講演は北里大学病院患者支援センター部／亀田総合病院地域医療支援部の小野沢 滋先生に「高齢爆発に備えて今、私たちがしなければならないこと」で、要望演題12題、一般演題28題と多数のご応募をいただき、620名という多数の参加を得ることができました。

新しい試みとして2会場での講演としたことで質疑応答の時間を十分に取ることができ、活発な討論が行われました。会場の関係で、ランチョンセミナーは3会場に分散して開催し、520名分用意しましたがいずれのセミナーも満席で好評でした。企業展示を大ホール前の広場にテントを建てて行いました。天候が心配でしたが、天の配慮に恵まれ、学術集会参加者に加えて一般の市民の方も興味深げに覗いている姿もあり、賑わっていました。

民間病院のいち勤務医の立場でこのような大役を仰せつかり身に余る光栄であると同時に、身が細る思いでしたが、藤沢市民病院や藤沢市医師会をはじめとする同門の先生方に多大なご協力を賜り、神奈川や東京のNSTの仲間の助けもあり、無事に開催することができました。横浜総合医学振興財団におかれましては本学会開催への助成をしていただき、心より感謝しております。

[目次に戻る](#)

第一会場。発表後に活発な質疑応答が行われていた。



<公開市民医学講座開催助成>

第76回日本消化器病学会関東支部市民公開講座

永瀬 肇

横浜労災病院 消化器内科

テーマ：消化器がんの早期発見と治療に向けて―胆道、膵臓がん

日時：平成25年9月21日（土）13：30～16：00

会場：横浜市南公会堂：神奈川県横浜市南区花之木町3-48-1 南区総合庁舎内

共催：日本消化器病学会関東支部、横浜労災病院

後援：横浜市健康福祉局、神奈川県医師会、横浜市医師会、神奈川県看護協会
プログラム

司会	横浜労災病院消化器内科部長	永瀬 肇
開催挨拶	東海大学消化器内科主任教授	峯 徹哉
講演1. 胆道がん、膵臓がんの現状		
	横浜労災病院内視鏡部副部長	川名 憲一
講演2. 胆道、膵臓がんの診断―早期発見に向けて―		
	東海大学消化器内科准教授	川口 義明
講演3. 胆道・膵臓がんの最新治療		
	横浜市立大学消化器・腫瘍外科主任教授	遠藤 格
講演4. 胆道がん、膵がんの化学療法について		
	神奈川県立がんセンター消化器内科医長	上野 誠

参加人数 一般市民143名

1. 参加者とその内訳

参加者は一般市民143名で男女ほぼ半々、南区、港南区中心に港北区他、横浜市の広範囲、また藤沢市、平塚市、東京都など横浜市外や神奈川県外かの参加者もあった。年齢分布は男女とも70歳代が約35%と最多、以下60歳代約25%、50歳代約15%、80歳代約10%で、10歳代に至る幅広い年齢層の参加があった。

2. 参加のきっかけと広報方法の評価

参加のきっかけは約半数が医院・病院掲示のポスターであり、次いで横浜市広報32%、新聞折込チラシ7%、消化器病学会ホームページ6%の順だった。医療機関のポスター掲示、横浜市広報が安価で効果的な広報効果を認めた。

3. 講演に対する評価

4題の講演に引き続き質疑応答を行った。各講演とも65～75%の参加者が「わかり易かった」と評価、95%の参加者が「参加して良かった」との意見であり、横浜市大医局出身の胆膵系を専門とする各先生方による、分かり易く質の高い講演に好評価が得られた。今後の同様の市民公開講座参加希望意見もみられ、消化器癌に対する関心の高さが感じられた。