

令和2年度財団助成

研究等報告書集

一般財団法人横浜総合医学振興財団

目 次

I 推進研究助成

第 16 グループ(平成 30 年度～令和 2 年度継続助成終了)

- ① 國 本 博 義 5
「炎症性サイトカインを介したクローン造血の拡大機序に基づく新規白血病予防法の創成」
- ② 阿 部 弘 基 12
「リハビリテーション促進薬の客観的臨床評価指標の開発」
- ③ 加 藤 真 吾 18
「ヒトオルガノイド細胞株を用いたがんクリニカルシーケンス意義不明変異の機能評価法の確立」

II わかば研究助成

- ① 東 條 健太郎 27
「敗血症に対する腸管上皮細胞特異的な低酸素誘導性因子活性化による腸管バリア保護の研究」
- ② 小豆島 健 護 32
「腎エネルギー代謝に着目した糖尿病性腎臓病の病態生理解明および新規治療法開発」
- ③ 佐 原 康 太 (特許出願予定のため掲載不可)
「AMPA受容体シグナル伝達系に着目した新規膵癌治療法の開発」
- ④ 伊 藤 悠 城 36
「マウス橋バリントン核内 CRH および ESR1 陽性ニューロンにおける排尿制御機構の研究」
- ⑤ 矢 島 康 治 40
「睡眠時無呼吸症患者の咽頭気道抵抗発生のメカニズムの解明」
- ⑥ 加 藤 真 吾 44
「心臓MRIの高次元画像特徴量と機械学習を用いた非虚血性心筋症の新たなリスク因子の探索」
- ⑦ 笠 原 由 佳 50
「歯状回顆粒細胞の GPR143 を介した樹状突起形成・発達制御機構の解明」
- ⑧ 土 屋 洋 省 54
「新規 PI3K 亢進型肝内胆管癌マウスモデルの構築と、PI3K 阻害薬の臨床応用に向けた基盤研究」
- ⑨ 杉 森 慎 (研究途中のため報告書掲載は令和4年度予定)
「内視鏡検体と新規マウスモデルを用いた十二指腸潰瘍の統合的解析」
- ⑩ 東 山 雄 一 58
「先進的脳画像解析によるパーキンソン病の認知機能低下予測バイオマーカーの開発」

III 医療技術研究助成

- ① 大澤 翔（令和元年度）..... 62
「看護師によるマスク換気におけるヘッドバンドの使用がマスクフィットに与える影響
－気道シミュレーターを用いたクロスオーバー試験－」
- ② 大浦 令未奈（令和元年度）..... 66
「学童期にある小児慢性腎臓病の子どもの治療アドヒアランスの実態とその関連要因」
- ③ 菅野 雄介（令和元年度）..... 70
「がん診療連携拠点病院におけるがん看護の質の維持・向上に向けた経年的評価システムの
構築に関する研究」
- ④ 宮森 真璃絵..... 74
「気腹装置の加温効果を妨げる因子の探索的横断研究」
- ⑤ 藤川 千啓..... 78
「プロポフォールはなぜ加温により血管痛が緩和されるのか
－血管内皮細胞に発現する疼痛関連受容体に着目したメカニズムの解明－」

IV 医学・医療関連事業助成

- ① 山中 弘行..... 82
「男性の妊娠活動(男の妊活)を啓蒙・応援する漫画パンフレットの作製」
- ② 藤本 久江（研究途中のため報告書掲載は令和4年度予定）
「LFD 児発生予防につながる妊娠中の食習慣のための栄養教育プログラム開発」
- ③ 小倉 果緒里..... 86
「助産師による産後1か月健診時のメンタルヘルスクリーニング実践への影響因子の探究と評価～
社会への普及に焦点を当てて～」

V 指定寄附研究助成

腎臓がん関係

- ① 河原 崇司..... 89
「超高齢化社会におけるサルコペニア評価；腎臓がんに対する適切な治療介入への試み」

腎臓内科学関係

- ② 佐々木 和教..... 92
「新規 aPKC 複合体が RAP1 の活性と局在を統御する分子機構の解明と腎疾患治療への展開」

VI 指定寄附研究助成(緊急助成)

新型コロナウイルス感染症対策関係

- ① 梁 明秀..... 97
「新型コロナウイルスに対する安全かつ迅速な機能性中和抗体評価法の開発」

VII 先導的教育事業助成

①原 悠.....	105
「オンライン Problem based learning(PBL)を用いた臨床実習の取り組み」	
② 飯 田 洋	110
「遠隔共用試験 (CBT 及び OSCE)実施に向けた調査と準備」	

※目次の課題名等は研究助成申請時のものです。

<推進研究助成>

炎症性サイトカインを介したクローン造血の拡大機序に基づく
新規白血病予防法の創成

國本 博義

横浜市立大学医学部 血液・免疫・感染症内科

抄録

本研究では **TET2** の機能喪失を介したクローン造血・骨髄系腫瘍のクローン拡大過程における炎症性サイトカイン **Interleukin 1 β** (**IL-1 β**)及び骨髄単球系サイトカイン **Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)**の影響を明らかにすることを目的に研究を行った。**In vitro** 培養系の検討から、賦形剤添加群に比べて **IL-1 β** 添加群で **Tet2** 欠失細胞の継代培養能の増強はみられず、**IL-1 β** は **Tet2** 欠失造血幹細胞の自己複製能を増強しないことが判明した。一方 **Tet2** 欠失細胞は野生型に比べて **GM-CSF** 刺激により著明なコロニー形成能と継代培養能の増強がみられることが明らかとなった。また **Tet2** 欠失細胞は野生型に比べて **GM-CSF** を加えても単球系細胞への分化やアポトーシスが誘導されにくいことが示唆された。以上から **TET2** 変異陽性細胞は **GM-CSF** 刺激に対する抵抗性を示して未分化性を維持することで結果的に骨髄単球系前駆細胞段階での分化停止、不死化を招き、白血病発症に寄与するのではないかと考えられた。

＜推進研究助成＞

炎症性サイトカインを介したクローン造血の拡大機序に基づく
新規白血病予防法の創成

國本 博義

横浜市立大学医学部 血液・免疫・感染症内科

1. 目 的

2009 年に AML を始めとする広範な血液腫瘍において機能喪失型の *TET2* 変異が初めて同定され (Delhommeau et al. N Engl J Med. 2009)、その後高齢者に多く白血病へ進展しやすいクローン造血においても高率に *TET2* 変異が同定された。これまでの我々の研究から、*TET2* の機能喪失は造血幹細胞または前駆細胞を増殖させて前白血病状態であるクローン造血を直接的に引き起こすことが明らかとなったが、その詳細な分子メカニズムは依然として不明である。最近の研究により、*Tet2* 欠失骨髄マクロファージは炎症性サイトカインである IL-18 を産生して炎症を惹起することが明らかとなった (Fuster et al. Science 2017)。そこで、まずは *Tet2* 欠失造血幹細胞の幹細胞機能に対する IL-18 シグナルの影響を解析し正常造血幹細胞の挙動との違いを明らかにすることを目的に研究を行った。また血球系列特異的 *Tet2* 欠失マウスもヒトと同様に単球系細胞の増加を伴う慢性骨髄単球性白血病様の病態を呈することから (Moran-Crusio et al. Cancer Cell 2011)、*TET2* の機能喪失は骨髄単球系列へ分化を誘導すると考えられる。そこで顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-colony stimulation factor, G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (Macrophage-colony stimulating factor, M-CSF) や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF) などの骨髄単球系サイトカインに対する *Tet2* 欠失細胞の挙動を明らかにすることを目的に研究を行った。

2. 方 法

IL-18 を含む炎症性サイトカインあるいは骨髄単球系サイトカインの *Tet2* 欠失造血幹細胞機能に与える影響を明らかにするため、まず炎症性サイトカイン(IL-18, IL-6, IFN γ)あるいは骨髄単球系サイトカイン(G-CSF, M-CSF, GM-CSF)存在下で野生型または *Tet2* 欠失骨髄細胞をメチルセルロース軟寒天培地で継代培養し、各継代で形成されたコロニー数及び継代培養可能回数を比較した。骨髄単球系サイトカインのうち GM-CSF については、GM-CSF 刺激による *Tet2* 欠失造血幹細胞の骨髄単球系列への分化、アポトーシス、細胞周期に与える影響を明らかにするため、GM-CSF 存在下で培養後の野生型または *Tet2* 欠失骨髄細胞を用いて、フローサイトメトリーによる細胞表面形質解析、Annexin V/DAPI 染色によるアポトーシス解析、および Ki67/DAPI 染色による細胞周期解析を行った。さらに、野生型または *Tet2* 欠失骨髄球系前駆細胞の細胞表面における GM-CSF 受容体 α 鎖の発現を比較するため、抗 GM-CSFR α 抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

3. 結 果

1. IL-18 刺激は *Tet2* 欠失造血幹細胞の自己複製能を増強しない

本研究では、*Tet2* 欠失骨髄マクロファージが産生する IL-18 により、正常造血幹細胞は幹細胞機能が低下して正常造血クローンが縮小する一方、*Tet2* 欠失造血幹細胞は幹細胞機能が維持又は増強され *Tet2* 欠失血球クローンが骨髄内で相対的に増殖するのではないかという仮説を立てた。本仮説を検証するため、まず *Tet2* 欠失造血幹細胞の幹細胞機能（自己複製能）に対する IL-18 シグナルの影響を調べた。賦形剤または IL-18 を 25ng/mL の濃度で添加してメチルセルロース軟寒天培地上で造血幹細胞を含む野生型または *Tet2* 欠失マウス骨髄細胞を連続継代培養したところ、賦形剤添加群に比べて IL-18 添加群で *Tet2* 欠失細胞の継代培養能の増強はみられなかった（図 1）。以上から、IL-18 刺激により *Tet2* 欠失造血幹細胞の幹細胞機能が維持又は増強されるという仮説は成立しないことが判明した。なお同じ炎症性サイトカインでも IL-6 は 25ng/mL の濃度で慢性刺激下でも *Tet2* 欠失造血幹細胞の幹細胞機能は維持され、IFN γ は 100ng/mL の慢性刺激では IL-18 と同じく *Tet2* 欠失細胞の継代培養能の増強はみられなかった（図 1）。

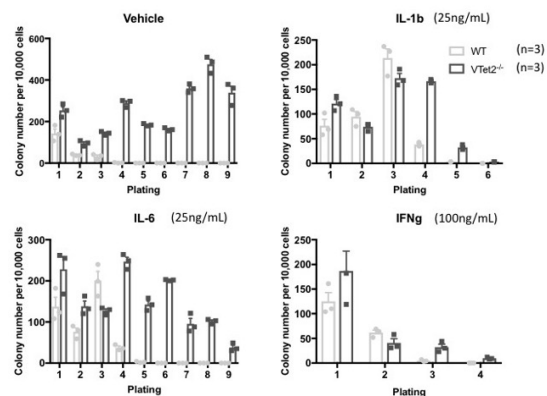


図 1. IL-1 β は *Tet2* 欠失造血幹細胞の自己複製能を増強しない

記載のサイトカイン存在下で野生型(WT)または *Tet2* 欠失(VTet2^{-/-})骨髓細胞 10,000 個を培養した際に形成されたコロニー数。横軸は継代培養回数を示す。

2. *Tet2* 欠失造血幹前駆細胞は GM-CSF 刺激に対して未分化性を維持する

ヒト *TET2* 変異は造血器腫瘍の中でも単球の増加を伴う慢性骨髓単球性白血病(chronic myelomonocytic leukemia, CMML)で変異頻度が高く(Smith et al. Blood 2010)、血球系列特異的 *Tet2* 欠失マウスもヒトと同様に単球系細胞の増加を伴う CMML 様の病態を呈することから(Moran-Crusio et al. Cancer Cell 2011)、TET2 の機能喪失は造血幹細胞の自己複製能を増強させるのみならず骨髓単球系へ分化を誘導すると考えられる。骨髓単球系への血球分化・成熟には顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (Macrophage-colony stimulating factor, M-CSF) や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF) が深く関与しているが、これら骨髓単球系サイトカインに対する *Tet2* 欠失細胞の挙動については不明な点が多い。

そこで我々は、骨髓単球系サイトカイン (G-CSF、M-CSF、GM-CSF) をそれぞれ単独で添加して野生型または *Tet2* 欠失マウス骨髓細胞をメチルセルロース培地上で連続継代培養を行なった。その結果、GM-CSF (10ng/mL) を添加した場合では、サイトカイン非存在下に比べて野生型細胞はコロニー形成能が減弱する一方、*Tet2* 欠失細胞はコロニー形成能・継代培養能が継代培養を重ねるごとに増強することが確認された (図 2)。以上より我々は、骨髓単球系サイトカイン GM-CSF が

Tet2 欠失造血幹細胞の自己複製能（幹細胞機能）を増強させるとともに、GM-CSF に対する感受性が異なるために野生型に比べて *Tet2* 欠失細胞は骨髄単球系へ分化がシフトしやすいのではないかと考えた。

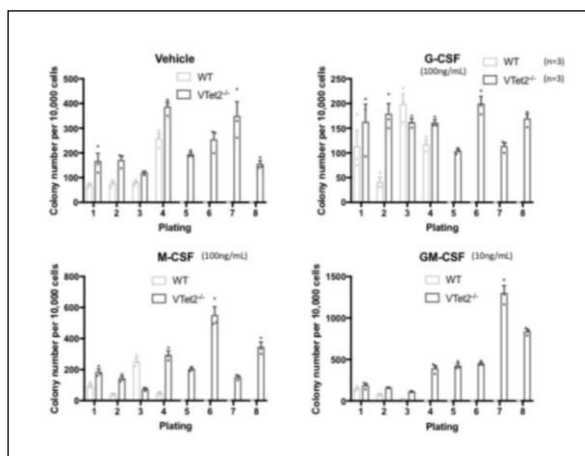


図 2. *Tet2* 欠失細胞は GM-CSF 慢性刺激で継代培養能が維持され、細胞増殖能が増強する記載の骨髄単球系サイトカイン存在下で野生型(WT)または *Tet2* 欠失(Vt2^{-/-})骨髄細胞 10,000 個を培養した際に形成されたコロニー数。横軸は継代培養回数を示す。

本仮説を検証するため、我々はまず同数の野生型または *Tet2* 欠失造血幹前駆細胞を賦形剤または GM-CSF 10ng/mL 存在下で培養し、培養後の CD11b 陽性単球細胞数、Annexin V 陽性アポトーシス細胞数及び各細胞周期(G0, G1, S/G2/M)に存在する細胞数をフローサイトメトリーで解析した。その結果、野生型では賦形剤添加群に比べて GM-CSF 添加群で CD11b 陽性単球細胞数の増加を認めたのに対して、*Tet2* 欠失細胞では GM-CSF を添加しても CD11b 陽性単球の増加はみられなかった (図 3) また野生型では賦形剤添加群に比べて GM-CSF 添加群で Annexin V 陽性アポトーシス細胞数や S/G2/M 期に誘導された細胞数が増加したのに対して、*Tet2* 欠失細胞では GM-CSF を添加してもこれらの細胞の増加はみられなかった (図 3)。以上から、*Tet2* 欠失造血幹前駆細胞は野生型に比べて GM-CSF に対する反応性が低下していることが示唆された。

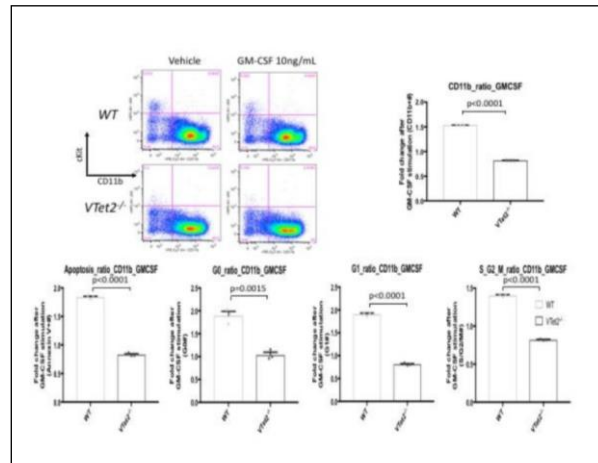


図 3. *Tet2* 欠失細胞は GM-CSF 刺激に対して抵抗性を示す

GM-CSF 存在下で野生型(WT)または *Tet2* 欠失(VTet2^{-/-})骨髄細胞を培養後に CD11b⁺骨髄単球系分画の増加率 (右上)、同分画のアポトーシス誘導率 (下段最左側)、各細胞周期分画の増加率 (下段右側 3 つ) を示す。p 値は Unpaired Student t-test 法で算出した。

野生型に比べて *Tet2* 欠失細胞で GM-CSF に対する反応性が低下するメカニズムを明らかにするため、我々は野生型または *Tet2* 欠失造血前駆細胞分画における GM-CSF 受容体 α 鎖 (GM-CSFR α)の細胞表面発現レベルをフローサイトメトリーで解析した。その結果、野生型と *Tet2*欠失細胞で GM-CSFR α の発現レベルに有意差はみられなかった。以上より、野生型と *Tet2* 欠失細胞の間の GM-CSF に対する反応性の相違は受容体の発現レベルの違いからではなく、受容体下流の GM-CSF シグナル活性が何らかのメカニズムで変化していることが原因として考えられた。

4. 考 察

これまでの研究結果から、*Tet2* 欠失細胞は野生型に比べて GM-CSF 刺激を加えても単球系細胞への分化やアポトーシスが誘導されにくいことが示唆され、*TET2* 変異陽性細胞は GM-CSF 刺激に対する抵抗性を示して未分化性を維持することで結果的に骨髄単球系前駆細胞段階での分化停止、不死化を招き、白血病発症に寄与するのではないかと考えられた。今後、野生型と *Tet2* 欠失細胞を GM-CSF で刺激した際に、JAK2/STAT5 や PI3K/AKT シグナルなどの GM-CSF シグナル活性に違いがみられるのかをウェスタンブロット法や細胞内リン酸化フローサイトメトリーで明らかにしていく。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

論文

1. **Kunimoto H**, Nakajima H. TET2: a cornerstone in normal and malignant hematopoiesis. Cancer Sci. 112:31-40, 2021
2. Murakami K, Kurotaki D, Kawase W, Soma S, Fukuchi Y, **Kunimoto H**, Yoshimi R, Koide S, Oshima M, Hishiki T, Hayakawa N, Matsuura T, Oda M, Yanagisawa K, Kobayashi H, Haraguchi M, Atobe Y, Funakoshi K, Iwama A, Takubo K, Okamoto S, Tamura T, Nakajima H. OGT Regulates Hematopoietic Stem Cell Maintenance via PINK1-Dependent Mitophagy. Cell Rep. 34(1):108579, 2021
3. **Kunimoto H**, Fukuchi Y, Murakami K, Ikeda J, Teranaka H, Kato I, Miyazaki T, Enaka M, Mitsuhashi T, Yamazaki E, Kameyama K, Murata M, Okamoto S, Nakajima H. Establishment of a high-risk MDS/AML cell line YCU-AML1 and its xenograft model harboring t(3;3) and monosomy 7. HemaSphere. 4(5):e469, 2020
4. **Kunimoto H**, Nakajima H. Clonal hematopoiesis: molecular basis and clinical relevance. Leuk Res. 98:106457, 2020

学会発表

1. **國本博義**・福地由美・村上紘一・池田順治・寺中寛・加藤生真・宮崎拓也・江中牧子・三ツ橋雄之・山崎悦子・亀山香織・村田満・岡本真一郎・中島秀明「3 番染色体転座と 7 番染色体欠失を有する高リスク MDS/AML からの細胞株と異種移植モデルの樹立」第 82 回日本血液学会学術集会、2020 年 10 月、WEB 開催
2. **國本博義**・村上紘一・池田順治・寺中寛・加藤生真・宮崎拓也・江中牧子・三ツ橋雄之・山崎悦子・亀山香織・村田満・岡本真一郎・中島秀明「忠実度の高いヒト高リスク MDS/AML モデルの構築」第 24 回造血器腫瘍研究会、2020 年 1 月、神戸

<推進研究助成>

リハビリテーション促進薬の客観的臨床評価指標の開発

報告者

阿部 弘基

共同研究者

宮崎 智之

中村 健

前野 豊

高田 薫子

所属部科名

公立大学法人 横浜市立大学大学院医学研究科 生理学

抄録

脳梗塞後のリハビリテーションによる運動機能の回復は、非障害脳領域における細胞・分子レベルでの可塑的变化による機能的再構築によって達成される。細胞・分子レベルでの可塑的变化はシナプス後膜のグルタミン酸興奮性 AMPA 受容体量によって規定される。本研究では脳梗塞片麻痺患者のリハビリテーションによる運動機能回復程度を AMPA 受容体密度の定量変化で代替できる、という作業仮説を検証するために、亜急性期脳梗塞片麻痺患者を対象とし、約 30 日間のリハビリテーション前後で^[11C]K-2 を用いた AMPA 受容体 Positron emission tomography (PET) イメージングを行った。6 例の脳梗塞患者の脳領域毎の変化を定性的に観察すると、良好な回復が見られた例では中心前回とその周囲の脳回で AMPA 受容体密度の増加を示し回復不良例では脳全体で低下していた。SPM では FMA の改善程度と最も高い相関を示すボクセルを含む領域の一つとして、病変対側の中心前回が示された。これらの結果は、リハビリテーションによる運動機能の改善程度が AMPA 受容体密度変化量で画像的に示すことができる可能性を示した。

<推進研究助成>

リハビリテーション促進薬の客観的臨床評価指標の開発

報告者

阿部 弘基

共同研究者

宮崎 智之

中村 健

前野 豊

高田 薫子

所属部科名

公立大学法人 横浜市立大学大学院医学研究科 生理学

1. 目 的

脳神経疾患の診療において、リハビリテーションが機能の回復・維持に重要な意義を持つことは経験的に知られており、日常診療や在宅介護の現場で幅広く行われている。特に脳卒中診療においてリハビリテーションは治療の中核にあるが、高い有効性と確固たる統計学的根拠を持つリハビリテーション方法は少ない。重介護者の4割以上が脳梗塞後遺症患者であることを鑑みれば、リハビリテーション診療の革新は喫緊の課題である。

リハビリテーションによる機能回復の過程は、代償神経回路が形成されていく可塑的变化の過程である。神経可塑性に中心的に関わる分子として AMPA 受容体(グルタミン酸受容体)が知られている。神経細胞同士は、シナプスを介して有意味な結合を形成する。報告者は過去に AMPA 受容体の経験依存的なシナプス移行によってシナプス結合が強化されることを明らかにした(Takahashi et al. Science 2003)。さらに AMPA 受容体のシナプス移行は失われた視覚機能が感覚によって代償されていく過程において重要であること(Jitsuki et al. Neuron

2011)、また AMPA 受容体のシナプス移行促進作用を持つ低分子化合物 edonerpic-malate がげっ歯類・非ヒト霊長類においてリハビリテーション促進効果を持つこと(Abe et al., Science 2018)を示してきた。こうした実験動物を用いた基礎研究によって AMPA 受容体リハビリテーションによる機能代償において重要な分子であることが示されているが、リハビリテーション診療において新たな治療方法・予後予測方法の開発を進めていくためには、ヒト生体脳でのリハビリテーション過程における AMPA 受容体の時空間的局在変化と機能回復の関係を明らかにすることは重要な課題といえる。この課題解決に向けて、申請者らが世界に先駆けて開発した AMPA 受容体 PET(positron emission topography)プローブ[11C]K-2(Miyazaki et al., Nature Med 2020)によるヒト生体脳 AMPA 受容体イメージング技術と横浜市立大学附属病院および横浜市立脳卒中・神経脊椎センター病院リハビリテーション科の脳卒中リハビリテーション診療を融合させ共同研究を行った(特定臨床研究 jRCT 31800070)。

2. 方 法

亜急性期脳梗塞患者を対象とし、約 30 日間のリハビリテーション前後で[11C]K-2 を用いた AMPA 受容体の Positron emission tomography (PET) イメージング([11C]K-2 PET)を行った。片麻痺の程度は Fugl-Meyer Assessment (FMA)で評価した。AMPA 受容体密度の定量は、[11C]K-2 PET で得られる Standard uptake value ratio (SUV; 参照領域は白質または全脳とした), non-displaceable binding potential (BP ND) を用いて行った。また 2 回のスキャン画像の差分画像を使用して Statistical parametrical mapping(SPM)を行った。

3. 結 果

2018 年 3 月から 2019 年 8 月にかけて 6 例の脳梗塞患者に対して上記介入を行った。すべての被験者は初発脳梗塞患者であった。脳梗塞発症前の modified Rankin Scale は 0 で発症前に生活に影響を及ぼす四肢運動障害はなかった(表 1)。脳梗塞発症から 28.7 ± 7.9 日(平均±標準偏差, 以下同)に 1 回目の[11C]K-2 PET イメージングを行った。その後、 29.5 ± 2.3 日のリハビリテーションを行なって 2 回目の[11C]K-2 PET を行った。投与放射線量は 1 回目が 381.6 ± 17.6 MBq、2 回目が 365.1 ± 11.6 MBq であった。すべての被験者に

Subjects (n=6)	
Age (years)	57.5 (13.6)
Sex	Male 3, Female 3
Infarct subtype	
Atherothrombotic	2 (33.3%)
Cardiogenic	0 (0%)
Lacunar	4 (66.7%)
Others	0 (0%)
Infarct location	
Corona radiata	5 (83.3%)
Internal capsule	1 (16.7%)
Brain stem	1 (16.7%)
mRS until stroke onset	
0	6 (100%)
1	0 (0%)
Vascular risk factor	
Hypertension	4 (66.7%)
Diabetes	3 (50%)
Dyslipidemia	2 (33.3%)
Current smoker	2 (33.3%)
MMSE	28.8 (1.8)

Data are means with SD or numbers with ratio (%).
mRS stands for modified Rankin Scale, which 0 means totally being independent.
MMSE: Mini-Mental State Examination.

表 1. 被験者の背景

重篤な有害事象は起きなかった。1回目、2回目の $[^{11}\text{C}]\text{K-2}$ PET前にFMAによる片麻痺の程度の評価を行ったところ、上肢・下肢項目の合計点は 64.2 ± 22.4 点から 73.7 ± 23.2 点に変化した (paired t-test, $p=0.036$)。FMA 上肢のみの得点、および Functional Independent Measure (FIM)の得点も1回目から

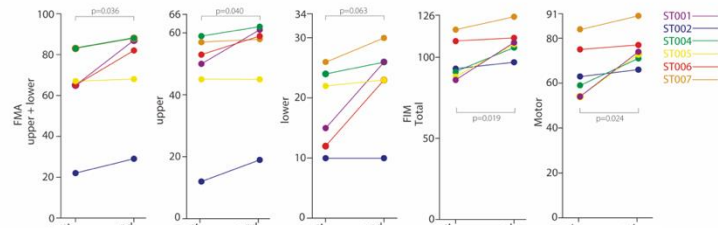


図 1. 1回目と2回目の $[^{11}\text{C}]\text{K-2}$ PET 撮像時点でのFMA, FIM

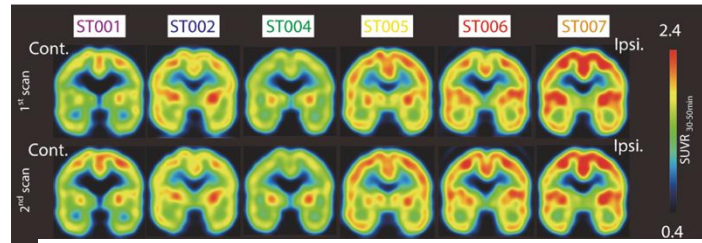


図 2. 1回目と2回目の $[^{11}\text{C}]\text{K-2}$ PET 画像 白質を参照としたSUVR

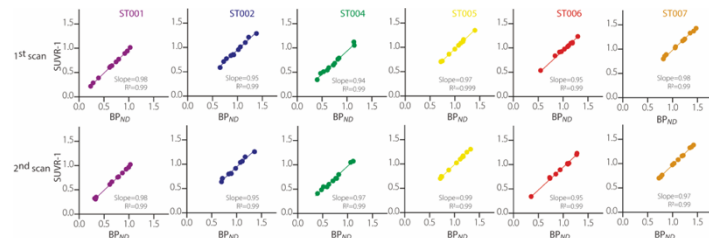


図 3. 1回目と2回目の $[^{11}\text{C}]\text{K-2}$ PET 画像のSUVRと BP_{ND} の相関関係

2回目にかけて有意な変化を認めた (図 1)。FMA の下肢項目のみにおいては有意な変化を認めなかったが改善傾向であった (図 1)。1回目と2回目の $[^{11}\text{C}]\text{K-2}$ PETの代表画像を示す (図 2)。各個体の11脳領域 (前頭葉, 頭頂葉,

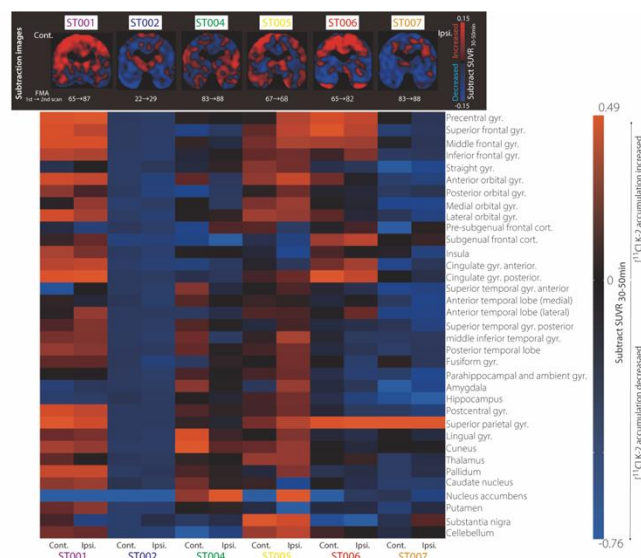


図 4. $[^{11}\text{C}]\text{K-2}$ PET 差分画像と ΔSUVR のHeatmap表示

後頭葉, 側頭葉, 帯状回, 扁桃核, 被殻, 尾状核, 視床, 海馬, 小脳) における $\text{SUVR} - 1$ (SUVR から1を引いた値)と BP_{ND} は1回目、2回目ともにいずれも高い相関係数を示した (図 3)。

2 回目の[11C]K-2 PET 画像から 1 回目の画像の subtraction 画像(差分画像)を作成した(図 4 上)。差分画像を作成する際は、差分処理を行う前処理として



1 回目、 2 回目 図 5. FMA 上肢・下肢項目と相関のあるクラスターの脳表への展開 (SPM 解析)

の PET 画像、MRI 画像を MNI 空間へ標準化しボクセルの解剖学的座標を確率的に同一となるようにした。図 4 では赤が濃くなるほど約 1 ヶ月間のリハビリテーションで AMPA 受容体密度がより増加したことを示し、青が濃くなるほど AMPA 受容体密度が減少したことを示している。得られた PET 画像は 3 次元情報であるため Heatmap 表現を用いて各脳領域における AMPA 受容体密度変化を可視化し(図 4 下)、定性的に観察した。FMA の改善幅が大きく最終的な麻痺の程度も軽度であった ST001、ST005 では中心前回とその周囲の脳回で増加を示し、FMA の改善幅が小さく最終的な麻痺の程度が重度であった ST002 では脳全体で低下していた。SPM では FMA 上肢・下肢項目の合計点の改善程度と最も高い相関を示すボクセルを含む領域として病変対側の中心前回が示された(False discovery rate < 0.05, Extended threshold 15816)(図 5)。

4. 考 察

病変側とは逆の脳皮質の運動野を含む複数の脳領域における AMPA 受容体量の増加がリハビリテーション効果と相関があることが示されており、今後、本研究のサブ解析を進めリハビリテーション予後予測ツールとしての[11C]K-2 PET の可能性を探索していく。また、本研究の後継研究として、失語症患者の 1 ヶ月間の言語聴覚療法前後において[11C]K-2PET を行い、言語機能の回復程度と AMPA 受容体脳内発現密度の関係を検証する試験を開始した(特定臨床研究 jRCTs031200289)。これらの研究を統合し、片麻痺や失語症といった脳卒中後遺症のリハビリテーション効果指標を得る手法として AMPA [11C]K-2 PET 画像法を確立し、報告者が開発を続けているリハビリテーション促進薬 edonerpic maleate 上市のための科学的基盤とする。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

Miyazaki M, Abe H, Uchida H, Takahashi T.

Translational medicine of the glutamate AMPA receptor.

Proceedings of the Japan Academy Series B Physical and Biological Sciences.

2021, 97(1), 1-21

Pharmacological Enhancement of Stroke Rehabilitation.

Abe H, Jitsuki S, Takahashi T.

Stroke 2019, 50(11), 3323-3329 (Invited Review)

シナプス生理学に基づいた薬剤介入によるリハビリテーション促進薬の研究開発
ニューロリハビリテーションシンポジウム 2018「介入研究のフロンティア」, 東京 2018 年 11 月（招待口演）

<推進研究助成>

ヒトオルガノイド細胞株を用いたがんクリニカルシーケンス意義不明変異の
機能評価法の確立

加藤 真吾¹

共同研究者：鈴木 章浩²、佐藤 元一²、中島 淳²

1. がんゲノム診断科、2. 肝胆膵消化器病学

抄録

2019年6月、がんにおける遺伝子異常を解析し、この情報を元に標準治療以外の治療法の選択肢を検索する『がんゲノム検査』が本邦で保険承認された。臓器の枠を超えた新しい視点から治療法の検索が可能になる検査として期待されているが、現状では新たな治療法が検出される割合が約10%と限定的なことが課題である。薬剤検出症例が限定的な原因の一つに、意義不明遺伝子変異の存在が挙げられる。本研究では、患者由来がんオルガノイドという技術を用いて、この意義不明遺伝子変異の機能評価法の開発を目的とした。研究期間を通して、目的は概ね達成できたが、実際にオルガノイドを用いて、労力や資金の面からも現実的に運用可能な系を構築した場合、多くの問題点が出てくることも明らかとなった。そこで、研究期間内に解析系の最適化を行った。具体的には、解析のベースを正常組織オルガノイドから、がんオルガノイドに変更した。更に、プラスミドベクターをドナーDNAとして用いる遺伝子改変手法を取り入れることで、解析コストを大幅に削減することが出来た。今後、更に研究を発展させ、臨床応用可能な解析系の構築を目指したい。

<推進研究助成>

ヒトオルガノイド細胞株を用いたがんクリニカルシーケンス意義不明変異の
機能評価法の確立

加藤 真吾¹

共同研究者：鈴木 章浩²、佐藤 元一²、中島 淳²

1. がんゲノム診断科、2. 肝胆膵消化器病学

1. 目 的

本研究の目的は、がんゲノム検査の結果から得られた意義不明遺伝子変異の機能評価法を開発することである。2019年6月、がんにおける遺伝子異常を解析し、この情報を元に標準治療以外の治療法の選択肢を検索する『がんゲノム検査』が本邦で保険承認された。臓器の枠を超えた新しい視点から治療法の検索が可能になる検査として期待されているが、現状では新たな治療法が検出される割合が約10%と限定的なことが課題である。がんゲノム検査が一般臨床にも用いられるようになった今、検査の結果治療へ結びつけることが出来る症例（薬剤検出症例）を少しでも増やすことは、社会的要請が極めて強い課題である。

薬剤検出症例が限定的な原因の一つに、意義不明遺伝子変異の存在が挙げられる。がんゲノム検査において、遺伝子変異と対応薬剤は、通常変異の型まで限定されている。即ち、Aという遺伝子に対応薬剤Xが存在する場合、通常は遺伝子Aの特定の変異パターンにのみXは『適合』となる。このため、患者のがんにおいて、遺伝子Aに変異が認められた場合でも、この変異パターンでなければ、薬剤Xは推奨薬剤として報告されない。このような『変異のある遺伝子自体に対応薬剤は存在するものの、変異の型の違いにより、薬剤検出症例に該当しない』というケースは、実際のがんゲノム検査の現場で起きている事例である。

本研究では、患者由来がんオルガノイドという技術を用いて、意義不明遺伝子変異の機能評価法を開発する。そして、臨床で行われたがんゲノム検査の結果から新たな治療法が提示される患者の数を増加させることを目指す。

2. 方 法

2-1. ヒト正常組織由来オルガノイドの樹立

非悪性腫瘍患者に対し消化管内視鏡検査を施行する際、正常部消化管粘膜を採取し、オルガノイドを樹立する。オルガノイド樹立の手法は、既報（Onuma K et al., Proc Natl Acad Sci USA. 110(27): 11127-32. 2013.）を参考にした。手法の概要を以下に示す。

- ①6well plateにマトリゲル®（Corning、cat 354234）を薄く敷く。
- ②37℃で30分保温して完全にゲル化させる。
- ③検体を37℃で15分酵素処理（Accumax、ナカライテスク、17087-54）する。
- ④PBSで酵素を洗浄する。
- ⑤②のゲル状に撒き、CO2インキュベーターで一晩培養する。
- ⑥上清を捨て、マトリゲルを被せる。
- ⑦37℃で30分保温して完全にゲル化させる。
- ⑧培養液を入れる。

2-2. ヒトがん組織由来オルガノイドの樹立

がんゲノム検査を受ける予定の患者の内、組織採取を行う患者に対して、採取した組織からがんオルガノイドを樹立する。手法は2-1.と同様に行う。

2-3. ヒトオルガノイドの遺伝子編集

CRISPR/CAS9システムを用いて、オルガノイドにがんクリニカルシーケンス検査で検出された意義不明変異を導入する。Cas9タンパク質とsgRNAの導入には、ベクターによる導入法を用いる（Addgene #62987）。

2-3-1. 一本鎖DNAを用いた遺伝子改変

Guide-it™ Long ssDNA Production System v2（TAKARA 632666）を用いて、CRISPRによる遺伝子ノックインを行う。

2-3-2. single nicks in the target gene and donor plasmid (SNGD)を用いた遺伝子改変

Nakajima K et al. Genome Res. 2018 Feb; 28(2): 223–230.を参考に、プラスミドベクターを用いたCRISPRによる遺伝子ノックインを行う。

2-4. 遺伝子改変オルガノイドの表現型の評価

遺伝子改変オルガノイドと、元のオルガノイドを用いて、表現型の評価を行う。

2-4-1. 細胞増殖能試験

CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay（Promega）を用いて、細胞増殖試験を行う。

2-4-2. マイクロサテライト不安定性の評価

MMR（mismatch repair: MMR）遺伝子の表現型評価には、MSI statusを比較する。

3. 結 果

3-1. ヒト正常組織由来オルガノイドの樹立

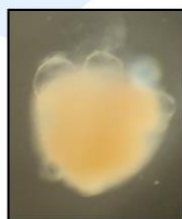
研究期間中に、ヒト正常胃上皮オルガノイド3例、大腸オルガノイド3例を樹立した。

3-2. ヒトがん組織由来オルガノイドの樹立

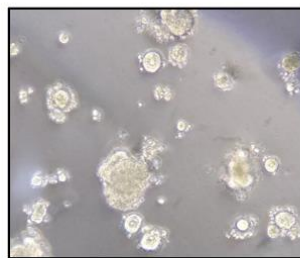
研究期間中に、ヒトがんオルガノイドを計9例樹立した。臓器別の内訳は胃癌1例、肺癌1例、大腸癌1例、大腸神経内分泌癌1例、乳癌1例、卵巣癌1例、膵癌1例、膀胱癌1例、胆管癌1例であった。樹立したオルガノイドは、患者のがんゲノム検査結果を元に、検査で得られた遺伝子変異が保存されているかを確認した（図1）。

図 1. 患者由来がんオルガノイドの樹立

- ①がん遺伝子パネル解析を予定している患者の組織採取時にオルガノイド樹立する。 ②オルガノイドを増やして凍結保存する。



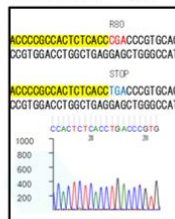
肝生検の組織片を無血清下、マトリゲル内で3次元培養する。



3次元培養を継続し、いったん凍結して保存。一部ゲノムを抽出し、解析へ。

- ③患者の検査結果から、元の組織と同一の変異を有している確認する。

CDKN2A R80*



TP53 E286Q



※上段：正常の配列、下段：がんオルガノイドの配列

以後の解析に関して、正常組織由来オルガノイドの方が、元のオルガノイドのゲノム変異が少ないという点で望ましかったが、培養の維持コストが高額となった。オルガノイドの培養液に加える増殖因子の中で、Wnt経路に関するものが特に高額であるが、正常組織由来オルガノイドはこれらの増殖無しには培養不可能であった。一方で、がん組織由来オルガノイドは、これらの増殖因子を除いても培養可能な株が多く、維持コストを大幅に削減できた。以後の遺伝子改変では、条件等にも多くの細胞を必要とすることから、維持コストの安いがん組織由来オルガノイドで以後の解析を進める方針とした。

3-3. ヒトオルガノイドの遺伝子編集

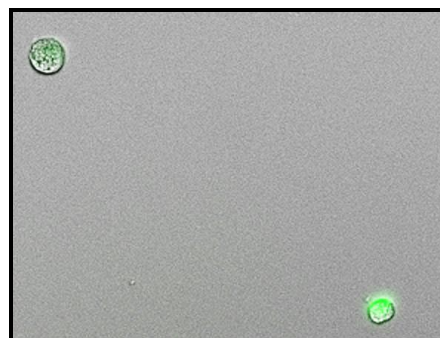
3-3-1. 一本鎖DNAを用いた遺伝子改変

樹立したがんオルガノイドの内、胃がんの細胞が最も維持コストが安価であったため、

以後、この細胞を用いて条件を検討した。まず標的薬剤が存在するという理由から、改変遺伝子をERBB2に設定した。この時点では、ノックインによる遺伝子改変は経験が無かったため、まず陽性コントロールとして、ERBB2遺伝子に導入する既知のoncogenic変異を導入する方針とした。CRISPR/CAS9システムでノックインによる遺伝子改変を行う際、改変遺伝子の再改変等、編集効率に影響する様々な問題が報告されている(Nature. 2016 May 5;533(7601):125-9.)。これらの問題を可能な限り避け、最も導入し易いと考えられた変異c.926G>C (p.G309A)を選択した。

Guide-it™ Long ssDNA Production System v2 (TAKARA 632666)を用いて、CRISPRによる遺伝子ノックインを行った。CRISPR/Cas9ベクターの導入は、Lipofectamine® 3000 (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。ベクターが導入後、GFP陽性細胞(図2)を顕微鏡下でマイクロチップにより採取し、濃縮した。その後、シングルセルクローニングを行い、一つ一つのクローンをサングーシーケンスによりタイピングすることで、目的の遺伝子改変クローンを得た。

図 2. GFP 陽性オルガノイド細胞株



3-3-2. single nicks in the target gene and donor plasmid (SNGD)を用いた遺伝子改変

上述の一本鎖DNAを用いる方法は、遺伝子改変効率が比較的高いとされているが、それでも50～100のクローンを解析して、ようやく目的のクローンが得られる程度の効率であった。一本鎖DNA作成のコストが高額となることから、他の手法も検討した。

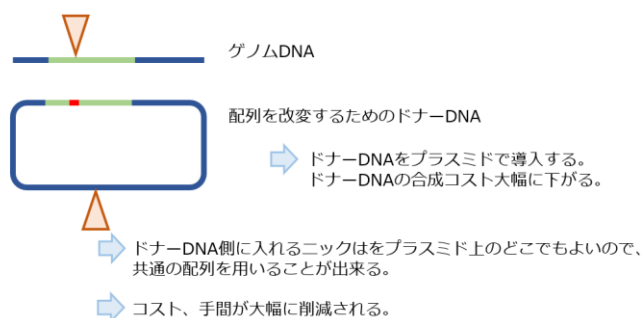
Nakajimaらは、プラスミ

ドベクターをドナーDNAとして用いるCRISPRノックイン手法を報告した(Nakajima K et al. Genome Res. 2018 Feb; 28(2): 223–230.)。この手法の優れている点は、ドナーDNAを簡便に増幅させることが出来る点である。ドナーDNAの構築コストが格段に下がり、多くの条件を安価に検討できるようになった。

図 3. SNGD

■ single nicks in the target gene and donor plasmid (SNGD)

■ ドナーDNAをプラスミドで導入する手法



3-4. 遺伝子改変オルガノイドの表現型の評価

3-4-1. 細胞増殖能試験

遺伝子改変オルガノイドと、元のオルガノイドを用いて、CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega)を用いた、細胞増殖試験を行った。解析自体は可能であったが、どの時点でどの程度の差がつくことを『OncogenicやPathogenic』と定義するのか、判定が困難であった。

3-4-2. マイクロサテライト不安定性の評価

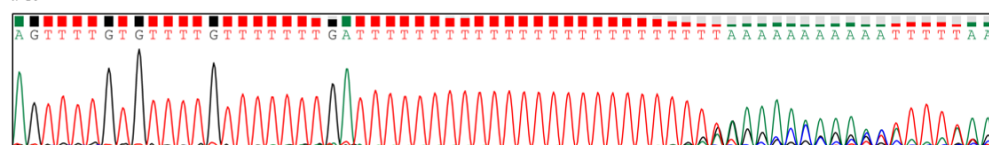
細胞増殖能だけでなく、MMR (mismatch repair: MMR) 遺伝子の表現型評価の系も確立した。MSI statusを確認するには、MSI検査を提出する方法も考えられるが、より安価に多くのクローンを解析するため、マーカー部位を直接サンガーシーケンスすることで評価する系を立ち上げた(図4)。しかし、MSI statusに関しても、変異導入後どの程度の期間培養してから評価すべきか、結果の解釈が困難であった。

図 4. MMR 遺伝子変異の機能解析

実際にがん遺伝子パネル検査で選られたMLH1のVUSの機能解析

- ➡ MLH1野生型、MSSのがん組織オルガノイドを用いる。
- ➡ MLH1 VUSを導入し、シングルセルクローニングにより目的の株を得る。
- ➡ シングルセルクローニング前後の株とMSI statusを比較する。
(コスト削減のため、サンガーシークエンスで比較する)

例) BAT25



4. 考 察

研究計画期間を通して、『ヒトオルガノイド細胞株を用いたがんクリニカルシーケンス意義不明変異の機能評価法の確立』という点は達成出来たと考える。しかし、実際にオルガノイドを用いて、労力や資金の面からも現実的に運用可能な系を構築した場合、多くの問題点が出てくることも明らかとなった。

がんクリニカルシーケンス検査の普及に伴い、意義不明変異の機能評価を行う系は、今後臨床的に間違いなく必要になると考えられる。この際に問題となるのは、何を優先するのか、という点である。結果が出るまでの速度を最優先するのであれば、細胞の維持も、変異導入も容易なマウス線維芽細胞株の 3T3 細胞などを用いて、レトロウイルスベクターにより遺伝子変異を導入し、*in vitro* の系のみで結果を出すことが最善である。

しかし、遺伝子変異導入実験によく用いられる 3T3 細胞は、元々遺伝子変異の導入により腫瘍形成能を獲得し易い細胞として樹立されてきた細胞株であり、その表現型がヒト細胞と同一であるかは判断が難しい。また、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入では、内在性の正常遺伝子が残存していること、プロモーターも含めて外来のものを導入することなど、生体のがんで起きている遺伝子変化とは根本的に異なる。

一方、ヒト細胞を使い、内在性のプロモーター下に遺伝子変異を導入しようとする本研究は、現実的に実行可能であれば、系としての信頼性は高い。しかし、実際に構築すると、労力やコストの面で、ハイスループットの系は運用困難と考えられた。本研究はあくまで実用的な解析系を構築することが目的であったため、研究期間内に、解析のベースを正常組織オルガノイドから、がんオルガノイドに変更した。がんオルガノイドは、維持コストも比較的安価であったため、解析ツールとして有用であった。加えて、SNGD 法による遺伝改変の導入により、遺伝子改変に必要なコストも削減することが出来た。以上から、がんオルガノイドと SNGD 法の組み合わせが、意義不明遺伝子変異の解析に最適であると結論付けた。

図 5. 解析ツールとして患者由来がんオルガノイドの有用性

■ ヒト正常組織オルガノイドと、がん組織オルガノイドの比較

	ヒト正常組織オルガノイド	ヒトがん組織オルガノイド
維持コスト	特に高額な <i>wnt</i> シグナル系の増殖因子が必須の場合がほとんどであり、培養液が 40ml で 10 万円近くなる。	<i>wnt</i> シグナル系の増殖因子を除いても維持可能な場合が多く、培養液の金額は正常組織オルガノイドの 1/5~1/10 程度に下げられる。
遺伝子変異導入後のシングルセルクローニング	シングルセルクローニングの負荷に耐えられず、培養できない場合が多い。	シングルセルクローニングの負荷に元々耐えられる場合が多い。
遺伝子変異解析ツールとして適正	正常ゲノムと持つと考えられ、解析可能であれば結果は信頼性が高い。	元から遺伝子変異を持つため、それを踏まえて解析結果を解釈する必要がある。

機能評価系の構築は、実験手技としては確立出来たが、得られた結果から『Oncogenic』や『Pathogenic』と結論付けるカットオフ値の設定が困難であった（次項図6）。この点に関しては、陽性コントロールを複数作成し、その表現型を解析することで、コントロール群の平均的な挙動が分かれば、判定可能であるとする。研究期間終了後の課題として取り組みたい。

がんゲノム検査の普及に伴い、意義不明変異の機能評価を行う系の必要性が増したといえる。臨床がんゲノム検査では、データベース上に情報が存在する変異以外は、患者にとって『有益な』情報とはならない。臨床がんゲノム検査は、進行がん患者が最後の希望を託して受ける検査であるため、得られた解析結果から出来る限りの情報を拾い上げることが重要である。今後、更に研究を発展させ、臨床応用可能な解析系の構築を目

指したい。

図 6. がん遺伝子変化機能解析の問題点

■ 『Pathogenic』 『Oncogenic』 の定義が難しい

➡ 特定の条件下でのみ悪性化に寄与する遺伝子変化もあるので、定義が難しい。

■ 解析結果のカットオフ値を決めることが難しい

➡ 『In vitroでの細胞増殖能が増える』という評価項目に関しても、どの程度増えれば『Oncogenic』として良いか、判断が難しい。

➡ MMR遺伝子の場合は、どの時点（何回継代した時点、など）でMSI statusを変化させれば『pathogenic』か、判断が難しい。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

1. Izumiya M#, **Kato S**# and Yoshitaka Hippo (#These authors contributed equally to this study). Recent Advances in Implantation-based Genetic Modeling of Biliary Carcinogenesis in Mice. *Cancers* 2021; 13:2292. <https://doi.org/10.3390/cancers13102292>
2. **Kato S***, et al. Precision modeling of gall bladder cancer patients in mice based on orthotopic implantation of organoid-derived tumor buds. *Oncogenesis*: 2021;10:33
3. **Kato S**, et al. Use of Biomarkers and Imaging for Early Detection of Pancreatic Cancer. *Cancers*: 2020; 12: 1965.
4. Yoshihara T, Oikawa Y, Kato T, Kessoku T, Kobayashi T, **Kato S**, et al. The protective effect of Bifidobacterium bifidum G9-1 against mucus degradation by Akkermansia muciniphila following small intestine injury caused by a proton pump inhibitor and aspirin. *Gut microbes*: 2020; 11: 1385 – 1404.
5. Kessoku T, Imajo K, Kobayashi T, Ozaki A, Iwaki M, Honda Y, Kato T, Ogawa Y, Tomeno W, **Kato S**, et al. Lubiprostone in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*: 2020; 15: 996-1007.
6. **Kato S**, et al. CA19-9 as a therapeutic target in pancreatitis. *Annals of translational medicine*: 2019; 7:Suppl 8.

7. **Kato S.** et al. Three-dimensional analysis of pancreatic fat by fat-water magnetic resonance imaging provides detailed characterization of pancreatic steatosis with improved reproducibility. **PloS one**; 2019; 14: e0224921.
8. Matsuura T, Maru Y, Izumiya M, Hoshi D, **Kato S.** et al. Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2019.
9. **Kato S***, et al. Multicenter experience with large panel next-generation sequencing in patients with advanced solid cancers in Japan. *Japanese journal of clinical oncology* 2019; 49: 174 - 182.
10. **Kato S.** et al. Possible Therapeutic Application of Targeting Type II Natural Killer T Cell-Mediated Suppression of Tumor Immunity. *Frontiers in immunology* 2018; 9 : 314.
11. Blockade of only TGF- β 1 and 2 is sufficient to enhance the efficacy of vaccine and PD-1 checkpoint blockade immunotherapy. Terabe M, Robertson F, Clark K, Ravin E, Bloom A, Venzon D, **Kato S.** et al. *Oncoimmunology*. 2017 Mar 31;6(5):e1308616.
12. 加藤真吾、鈴木章浩、中島淳、ポストがんゲノム時代を見据えたがんオルガノイドバンクの構築、Japan Digestive Disease Week 2020、神戸、2020 年 11 月 5 日～8 日
13. 加藤真吾、鈴木章浩、中島淳、ヒトオルガノイド細胞株を用いた意義不明遺伝子変異解析手法の開発、第 27 回日本遺伝性腫瘍学会学術集会、2021 年 6 月 18 日～19 日。

<わかば研究助成>

敗血症に対する腸管上皮細胞特異的な低酸素誘導性因子活性化による腸管バリア保護の研究

東條 健太郎

近藤 菜穂子

麻酔科学

抄録

敗血症は重症感染症によって、全身性の臓器障害を生じる疾患であり、免疫系の障害が一つの原因と考えられるが、複雑な病態であることから免疫細胞への介入には困難が伴う。これを踏まえ、本研究では腸管上皮細胞特異的な Von Hippel-Lindau (VHL) を介した低酸素誘導性因子 (HIF) の制御によって、免疫系への影響を回避した形での HIF を活性化が敗血症による腸管傷害へ与える影響を検討することとした。最初に Vil1-cre/ERT2 VHL flox/flox マウスにおいてタモキシフェンの投与によって腸管上皮特異的に VHL がノックアウトされ、HIF が活性化することを確認した。次に盲腸内容物懸濁液腹腔内投与による腹膜炎モデルを作成したところ、腸管上皮傷害および肝障害、腎障害が生じた。最終的に少ないサンプル数 (n=3) ながらも腸管上皮細胞特異的な VHL ノックアウトが敗血症に与える影響を検討したところ、有意ではないものの VHL ノックアウトにより腸管上皮傷害マーカーを含むいずれのマーカーも増加する傾向を認めた。今後、サンプルサイズを増やすとともに、その背景メカニズムの検討を進めていく予定である。

<わかば研究助成>

敗血症に対する腸管上皮細胞特異的な低酸素誘導性因子活性化による腸管バリア保護の研究

東條 健太郎

近藤 菜穂子

麻酔科

1. 目 的

研究課題の重要性や問題点を簡単に紹介し、この研究でどのような点の解明を目指したかを記載して下さい。

2. 方 法

簡明に解り易く記載し、特に独創的な又は新しい方法については説明を加えて下さい。

3. 結 果

何がこの研究の特色でそれをどこまでこの研究で明らかに出来たかなどを解り易く記して下さい。

4. 考 察

自己評価や今後の展望など、この研究成果の持つ意義について簡明に紹介して下さい。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

この研究に関連して発表した論文（タイトル、掲載誌）や発表学会（名称、開催日）を記して下さい。

1. 目 的

敗血症とは重症感染症によって、ショック及び全身性の臓器障害を生じる疾患である。過去には過剰な全身性炎症が原因であると考えられていたが、抗サイトカイン療法といった炎症を抑制する治療法は臨床的有効性を示すことができず、また強い炎症のみならず免疫機能障害による病原体の増殖、および病原体が引き起こす細胞傷害が病態に寄与していることが明らかになってきている。従って敗血症に対する免疫系への適切な介入は、非常に難しい課題であると考えられている。

一方で、生体は病原体、自己の過剰な炎症等によって引き起こされる傷害に対して細胞保護的なプログラムを有している。こういった機構は免疫系による病原体への抵抗（レシスタンス）と区別して、トレランスと呼ばれている。従って、免疫系への介入を行わなくとも、細胞のトレランスを促進するとことで、敗血症から臓器を保護できる可能性がある。敗血症では全身の様々な細胞が傷害を受けるが、中でも腸管への傷害は血中やリンパへの腸管内の細菌の流入によるさらなる炎症を増強することで敗血症のモーターとなっていると考えられている。以上から、腸管上皮細胞のトレランスを促進できれば敗血症への治療になる可能性がある。

低酸素誘導性因子（hypoxia-inducible factor: HIF）は生体の低酸素応答のマスターレギュレーターであり、低酸素や炎症といったストレス下の細胞において様々な遺伝子発現を制御しており、細胞のトレランスに関与すると考えられている。HIF は prolyl hydroxylase domain proteins (PHD)・Von Hippel-Lindau (VHL)系によって制御されており、低酸素下では α サブユニットが分解されなくなることで活性化するが、PHD もしくは VHL を阻害することで通常酸素分圧下でも活性化することが可能である。一方で、PHD-VHL-HIF は免疫系細胞の機能の制御にも関与しており、例えば全身性の PHD 阻害は LPS による炎症を抑制する一方で、細菌感染症モデルでは免疫機能障害による感染症の増悪をもたらすことが報告されている。

本研究では以上を踏まえ、Villin プロモーター下で腸管上皮細胞特異的に cre/ERT2 を発現する Vil1-cre/ERT2 マウスと VHL flox/flox マウスを掛け合わせることで、タモキシフェン投与下に腸管上皮細胞において特異的に VHL をノックアウトする誘導性コンディショナルノックアウトマウスを作成し、免疫系への影響を回避した形で HIF を活性化させることが、敗血症における腸管傷害およびそれ以外の臓器障害を軽減するか検討を行うこととした。

2. 方 法

(1) 腸管上皮細胞特異的 VHL ノックアウトマウスの作成

最初に、Vil1-cre/ERT2 マウス（慶應義塾大学薬学部生化学講座 長谷耕二先生より譲渡）とレポーターマウス（C57BL/6N-Gt(ROSA)26Sor<tm1(CAG-EGFP/tDsRed)Utr>/Rbrc 理化学研究所 BRC から譲渡）をかけ合わせ、4 日間の経口タモキシフェン投与下（コント

ロールはコーンオイル投与)に腸管上皮細胞特異的に loxP 配列で挟まれた領域の組み換えが生じるかを検討した。その後、Vil1-cre/ERT2 マウスと VHL flox/flox マウス（横浜市立大学医学部泌尿器科学講座 蓮見壽史先生より譲渡）をかけ合わせ Vil1-cre/ERT2 VHL flox/flox マウスを得た。4 日間の経口タモキシフェン投与から 7 日後の段階で、VHL, HIF 下流の VEGFA 及び GLUT-1 の mRNA 発現をリアルタイム PCR で、VHL タンパク量をウェスタンブロットで解析した。

(2) 敗血症モデルマウスにおける腸管およびその他臓器障害の評価

本研究では再現性の高い敗血症モデルマウスを作成するために、マウスの盲腸内容懸濁液 (Cecal Slurry: C/S) をグリセリンとともに冷凍保存し、モデル作成時に溶解、腹腔内に投与することによって腹膜炎を引き起こすモデルを作成した。8-10 週齢の C57BL6J マウスに対して C/S を 0.3mL 投与し、死亡率を確認するとともに、2, 4, 8 時間後の血中臓器障害マーカー（肝障害マーカー：ALT, 腎障害マーカー：cystatin C, 腸管傷害マーカー：I-FABP）の評価を行った。

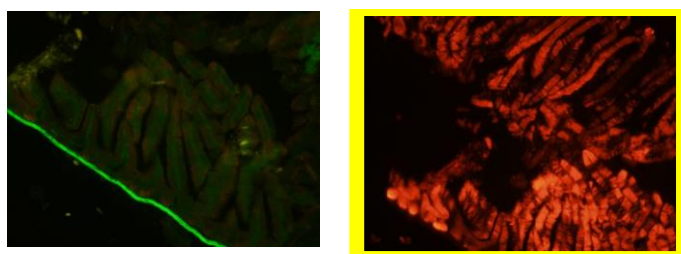
(3) 腸管上皮細胞特異的 VHL ノックアウトが敗血症性臓器障害に与える影響の検討

Vil1-cre/ERT2 VHL flox/flox マウスおよびコントロールとして同腹仔の VHL flox/flox マウスに対して、4 日間の経口タモキシフェン投与から 7 日後の段階で、(2)と同様の敗血症モデルマウスを作成し、8 時間後の段階の臓器障害マーカーを評価した。

3. 結 果

(1) 腸管上皮細胞特異的 VHL ノックアウトマウスの作成

Vil1-cre/ERT2 VHL flox/flox マウスにおいて 4 日間のタモキシフェン投与後に、下図のように腸管上皮細胞のみにおいて赤色蛍光が観察され腸管上皮細胞特異的な遺伝子組み換えが生じることが確かめられた。



さらに Vil1-cre/ERT2 VHL flox/flox マウスの腸管上皮ではタモキシフェン投与終了後 7 日の時点で、VHL の mRNA およびタンパク量の低下が認められ、HIF 下流遺伝子の VEGFA, GLUT-1 の mRNA 発現が亢進することが確かめられた。

以上から、Vil1-cre/ERT2 VHL flox/flox マウスではタモキシフェン投与によって腸管上皮特異的に VHL をノックアウト、HIF 経路の活性化を起こすことができていることを確かめることができた。

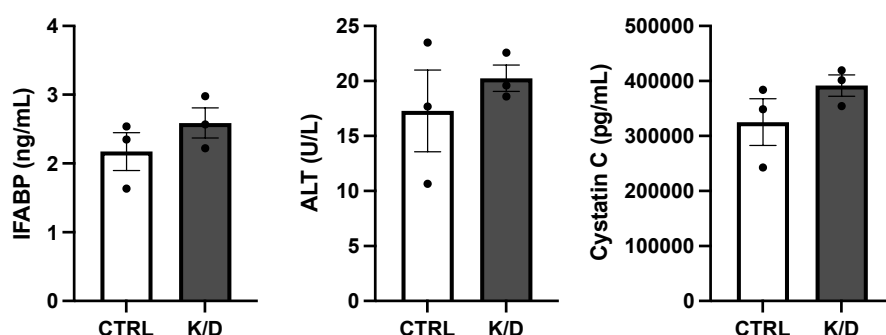
(2) 敗血症モデルマウスにおける腸管およびその他臓器障害の評価

C/S0.3mL を腹腔内に投与された腹膜炎敗血症モデルマウスの死亡率は 50%であった。

C/S 投与腹膜炎モデルでは投与後 ALT, Cystatin C, I-FABP がいずれも経時的に増加しており、8 時間後の段階で明らかな臓器障害が生じていることが明らかになった。

(3) 腸管上皮細胞特異的 VHL ノックアウトが敗血症性臓器障害に与える影響の検討

タモキシフェン投与後の Vil1-cre/ERT2 VHL flox/flox マウスおよびコントロールとして同腹仔の VHL flox/flox マウスにおいて C/S 投与 8 時間後の ALT, Cystatin C, I-FABP 濃度に有意な差は見られなかったが、Vil1-cre/ERT2 VHL flox/flox においていずれのマーカーも高い傾向が見られた。



4. 考 察

本研究では Vil1-cre/ERT2 VHL flox/flox マウスの作成によって腸管上皮細胞特異的に VHL をノックアウトすることができ、HIF 下流遺伝子群の発現が亢進することも確かめられた。敗血症モデルマウスでは腸管および肝、腎臓の傷害を認めた。腸管上皮細胞特異的な VHL ノックアウトの敗血症への影響は本助成期間内に十分なサンプル数を検討できず、有意な変化は見られなかったが、VHL ノックアウトされた動物においていずれの臓器障害マーカーも増悪する傾向を認めた。

HIF の腸管傷害に与える影響についての報告は腸炎モデルを中心にいくつかの報告があり、HIF が腸管に保護的に働くという報告と、炎症・傷害を増強するという報告がある。現時点では十分なサンプル数の検討を行うことができていないが、本研究の結果からは VHL 阻害による HIF の活性化は敗血症において炎症、あるいは低灌流によって生じる腸管傷害に明らかな影響を及ぼさないか、もしくは増悪させる可能性があることが示唆された。今後さらなるサンプル数で結果を確かめるとともに、その背景メカニズムの検討を進める予定である。HIF については抗腫瘍効果を狙った阻害剤の開発も進んでおり、それらの薬剤の敗血症への影響も含めて検討を進めたいと考えている。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

なし

＜わかば研究助成＞

腎エネルギー代謝に着目した糖尿病性腎臓病の病態生理解明および新規治療法開発

小豆島 健護

山地 孝弘, 鈴木 徹, 涌井 広道, 田村 功一

横浜市立大学医学部 循環器・腎臓・高血圧内科学

抄録

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease; CKD) の発症・進展に関わる新規機序の一つとして、腎臓におけるエネルギー代謝障害、特に脂肪酸酸化 (Fatty Acid Oxidation; FAO) 障害が重要な役割を担っていることが明らかになってきたが、糖尿病性腎臓病 (Diabetic Kidney Disease; DKD) における腎エネルギー代謝の意義を検討した報告は少ない。本研究は申請者が開発した DKD 抵抗型マウス (C57BL/6-Akita-ReninTG) と DKD 増悪型マウス (129/Sv-Akita-ReninTG) を用いて、DKD の発症・進展において腎エネルギー代謝障害、特に FAO 障害がどのように関わっているかを解明することを目的に行われた。DKD 増悪型マウスの腎臓では、ミトコンドリアにおける FAO 機能を反映している可能性がある偶数鎖アシルカルニチンの幅広い減少が見られるとともに、FAO 関連遺伝子の mRNA 発現が有意に変化していた。これらの変化はヒト DKD の特徴有する DKD 増悪型マウスでのみ見られ、DKD 抵抗型マウスでは認められなかった。本研究結果は、他の CKD の病態生理と同様に、FAO 障害に起因する腎エネルギー代謝の変化が DKD の進展に関連していることを示唆している。腎エネルギー代謝、特に FAO への介入は DKD を治療するための新しい治療候補となり得るため、今後さらなる研究が必要である。

<わかば研究助成>

腎エネルギー代謝に着目した糖尿病性腎臓病の病態生理解明および新規治療法開発

小豆島 健護

山地 孝弘, 鈴木 徹, 涌井 広道, 田村 功一

横浜市立大学医学部 循環器・腎臓・高血圧内科学

1. 目 的

糖尿病性腎臓病 (Diabetic Kidney Disease; DKD) は重大な糖尿病合併症の一つであり, 末期腎不全および透析導入の原疾患として最も多い。現在, 血圧・糖代謝・脂質代謝などへの包括的な管理が DKD に対して行われるようになっているが, その病態生理は未解明の部分が多く, DKD の発症・進展を抑制する治療法も極めて限られている (*Am J Physiol Renal Physiol* 309: 807-820, 2015.)。近年, 慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease; CKD) の発症・進展に関わる新規機序の一つとして, 腎臓におけるエネルギー代謝障害, 特に脂肪酸酸化 (Fatty Acid Oxidation; FAO) 障害が重要な役割を担っていることが明らかになってきた (*Nat Med* 21: 37-46, 2015. *Kidney Int* 95: 123-137, 2019.)。しかしながら, これまで DKD における腎エネルギー代謝の意義を検討した報告は少ない。本研究は, DKD の発症・進展において腎エネルギー代謝障害, 特に FAO 障害がどのように関わっているかを解明することを目的として行われた。

2. 方 法

これまでの DKD モデル動物はヒト DKD の早期特徴 (軽度アルブミン尿, メサンギウム領域拡大など) しか再現できず, モデル動物としての限界を指摘されてきた (*Nat Rev Nephrol* 14: 48-56, 2018.)。申請者はレニン-アンジオテンシン系 (RAS) および遺伝背景に着目することによって, ヒト DKD 後期に認められる特徴 (重度アルブミン尿, 結節性糸球体硬化, 腎間質障害など) を兼ね備えた DKD モデル動物の開発に成功した。C57BL/6 を遺伝背景とする 1 型糖尿病モデル Akita マウスのレニン-アンジオテンシン系を活性化 (肝特異的 Renin 高発現) するだけではヒト DKD の早期しか再現できなかったが (B6-Akita-ReninTG マ

ウス；DKD 抵抗型マウス)，同マウスの遺伝背景を 129/Sv へ操作することにより劇的なアルブミン尿の増加と腎組織像の増悪を認めた (129-Akita-ReninTG マウス；DKD 増悪型マウス)。本研究では B6-Akita-ReninTG マウスおよび 129-Akita-ReninTG マウス，そして各々の野生型対照マウス (C57BL/6 マウスおよび 129/Sv マウス) を 24 週齢の時点で代謝ケージを用いた蓄尿を施行した後解剖を行った。Metabolome 解析を用いて腎臓におけるエネルギー代謝変化をミトコンドリア FAO (アシルカルニチン) に焦点を当てて評価するとともに，PCR 法を用いて FAO 関連遺伝子発現の解析も行った。

3. 結 果

24 週齢の時点で，24 時間尿アルブミン排泄量は DKD 抵抗型マウス (B6-Akita-ReninTG) と比較して DKD 増悪型マウス (129-Akita-ReninTG) で著明に高値であった (80 ± 14 vs 1480 ± 562 $\mu\text{g/day}$, $P < 0.05$)。また，ミトコンドリア FAO 機能の指標である偶数鎖アシルカルニチンは，DKD 抵抗型マウスの腎臓において一部 (C6, C8 アシルカルニチン) 低下しているものの全体的な低下傾向は認めず，FAO エネルギー代謝の主要因子である Acetyl-CoA を反映する C2 アシルカルニチンはむしろ増加していた。一方で，DKD 増悪型マウスの腎臓では C2 アシルカルニチンを含めて大部分の偶数鎖アシルカルニチンが低下しており，ミトコンドリア FAO 機能障害の存在が示唆された (図 1)。

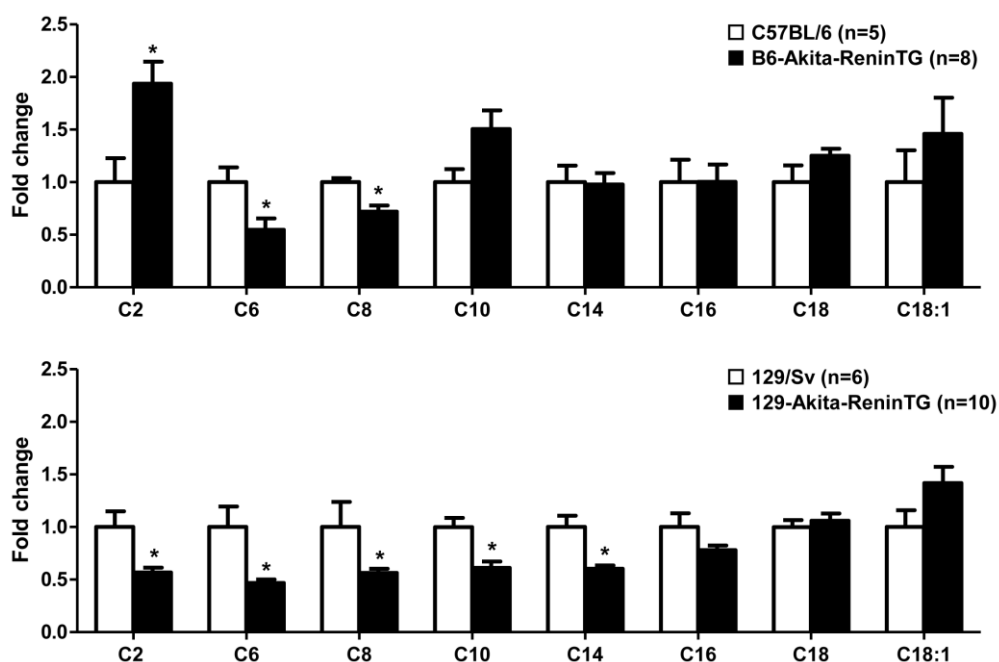


図 1. B6-Akita-ReninTG および 129-Akita-ReninTG マウスの腎臓における偶数鎖アシルカルニチンの分布。* $P < 0.05$, vs 野生型対照マウス (unpaired- t test)。

また、DKD 抵抗型マウスの腎臓における FAO 関連遺伝子 (CPT1, CPT2, PPAR- α , PGC-1 α) の mRNA 発現は野生型対象マウスと比較し明らかな変化がなかったのに対し、DKD 増悪型マウスではこれらの遺伝子の mRNA 発現が野生型対象マウスと比較して有意に変化 (増加) していた (図 2)。

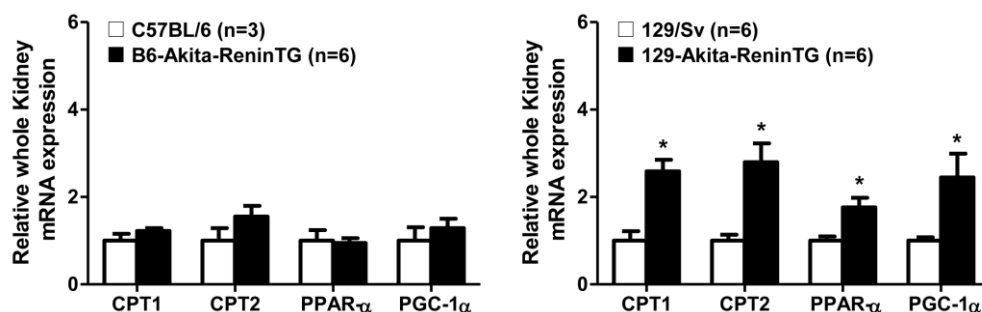


図 2. B6-Akita-ReninTG および 129-Akita-ReninTG マウスの腎臓における FAO 関連遺伝子発現. * $P < 0.05$, vs 野生型対照マウス (unpaired- t test).

4. 考 察

DKD 増悪型マウスの腎臓では、ミトコンドリアにおける FAO 機能を反映している可能性がある偶数鎖アシルカルニチンの幅広い減少が見られるとともに、FAO 関連遺伝子の mRNA 発現が有意に変化していた。特筆すべきは、これらの変化はヒト DKD の特徴有する 129/Sv バックグラウンドの DKD 増悪型マウスでのみ見られ、C57BL/6 バックグラウンドの DKD 抵抗型マウスでは認められなかった。本研究結果は、他の腎疾患の病態生理学と同様に、FAO 機能障害に起因する腎エネルギー代謝の変化が DKD の進展に関連していることを示唆している。腎エネルギー代謝、特に FAO への介入は DKD を治療するための新しい治療候補となり得るため、今後さらなる研究が必要である。

5. 論文及び学会発表 (研究会を含む)

【学会発表】

Azushima K, Kovalik JP, Ching J, Gurley SB, Coffman TM. Activation of the Renin-Angiotensin System Drives Renal Metabolic Abnormalities in Diabetic Nephropathy. Hypertension Scientific Sessions 2020, USA, September 2020.

<わかば研究助成>

マウス橋バリントン核内 CRH および ESR1 陽性ニューロンにおける
排尿制御機構の研究

伊藤 悠城

船越健悟 矢尾正祐 篠木理沙

横浜市立大学大学院医学部医学研究科 泌尿器科、神経解剖学

抄録

代表的な下部尿路機能障害として、排尿筋低活動（膀胱収縮不全）による尿排出機能障害と過活動膀胱による蓄尿機能障害とがあり、高齢化社会を迎えた先進国を中心に重大な健康問題となっている。本邦では、40 歳以上の年代層で 810 万人(12.4%)が過活動膀胱を呈し、また 2,500 万人もの人が尿勢低下といった尿排出機能障害を有しているとされている。今回我々は、光遺伝学および薬理遺伝学を用いた特異的神経操作により尿排出機能の主要神経核であるバリントン核に注目し機能解析を行い、その結果、排尿直前にバリントン核が発火すること、ならびに、畜尿期において、バリントン核の活動性と膀胱内圧が強く相関することを突き止めた。すなわち、これまで長い歴史の中で、排尿のみに関与していると考えられてきたバリントン核が蓄尿機能の制御も行っている可能性が明らかとなった。下部尿路症状は多岐にわたるが、一般的に尿排出障害を呈している患者には蓄尿機能障害を合併するケースが多く見られ、これらの一見複雑な病態生理をバリントン核の機能障害で一元的に説明でき得る可能性が出てきた。今後病態生理解明にバリントン核が極めて有望な標的部位になると思われた。

<わかば研究助成>

マウス橋バリントン核内 CRH および ESR1 陽性ニューロンにおける 排尿制御機構の研究

伊藤 悠城

船越健悟 矢尾正祐 篠木理沙

横浜市立大学大学院医学部医学研究科 泌尿器科

1. 目 的

代表的な下部尿路機能障害として、排尿筋低活動（膀胱収縮不全）による尿排出機能障害と過活動膀胱による蓄尿機能障害とがあり、高齢化社会を迎えた先進国を中心に重大な健康問題となっている。本邦では、40 歳以上の年代層で 810 万人(12.4%)が過活動膀胱を呈し、また 2,500 万人もの人が尿勢低下といった尿排出機能障害を有しているとされている。近年、 $\beta 3$ アドレナリン受容体刺激薬を始めとした蓄尿機能障害に対する治療薬の選択肢が増加する一方、尿排出機能障害に対する薬物治療開発は遅々として進んでおらず、その標準治療は未だに経尿道的カテーテルを用いた対処療法が主流である。尿排出機能障害は、今や国民に広く周知されている過活動膀胱（蓄尿機能障害）の影に隠れ長らくスポットライトを浴びることがなかった。現在我々は、尿排出機能障害には排尿機能を司る中枢神経系の異常が強く関与しているのではないかと仮説立てているが、これまでのところ中枢神経を標的とした排尿障害基礎研究は極めて稀である。

今回我々は、光遺伝学および薬理遺伝学を用いた特異的神経操作により尿排出機能の主要神経核であるバリントン核に注目し、同神経核に発現している副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH : Corticotropin releasing hormone）の機能解析を行い、その先に新たな創薬ターゲット探索ならびに新規治療方法確立を目指している。

2. 方 法

私はこれまで、標的微小神経細胞の選択的操作を可能とする、光遺伝学および薬

理遺伝学を用いて、マウスの排尿中枢機能解析を続けてきた。光遺伝学では、青色 LED 照射により開口する光駆動性陽イオンチャネルである、チャネルロドプシン 2 (Channelrhodopsin-2; ChR2) を標的神経細胞に発現させ、他方で、薬理遺伝学ではクロザピン N オキサイド (clozapine N-oxide; CNO) をリガンドとする、G タンパク質共役受容体の一種であるヒト M4 ムスカリン受容体 (hm4Di) を標的神経細胞に発現させる。その後、青色 LED ならびに CNO を用いて、それぞれの受容体を操作し、選択的に神経活動を興奮もしくは抑制することが可能である。最先端である両神経科学的手法を駆使しての排尿機能解析は極めて稀であり、高い独自性があると自負している。さらに光遺伝学および薬理遺伝学を用いた排尿中枢神経機能解析が、病態治療を主眼とした創薬ターゲット探索に応用された報告は世界でもなく、大変ユニークでありかつその意義は計り知れないと考えている。

バリントン核 CRH 陽性ニューロン (BarrCRH) に遺伝子組み換えタンパク質 Cre を発現させた CRH-Cre-ires ノックインマウス (2-3 か月齢) を購入 (Jackson Laboratory) する。同マウスに神経興奮を可能とする ChR2 ならびに神経抑制を可能とする hM4Di を組み入れた Cre 依存性アデノ随伴ウイルス (AAV2-EF1a-DIO-ChR2-mCherry および AAV2-hSyn-DIO-hM4Di-mcherry) を、ステレオタキシス下でバリントン核に直接注入し、BarrCRH 神経核の神経活動をコントロールしながら神経活動測定を行った。

3. 結 果

我々は、マウスの橋バリントン核神経活動を基に、神経回路シミュレーターの構築を行った。CRH 陽性ニューロンに DNA 組み換え酵素 Cre (cause recombination) を有する CRH-ires-Cre ノックインマウスのバリントン核に、Cre 依存性アデノ随伴ウイルス (AAV-EF1a-DIO-ChR2-mcherry) を注入した。光遺伝学的に同定したバリントン核 CRH 陽性ニューロン (BarrCRH) の神経活動をマルチチャネルプローブで測定した。BarrCRH 神経活動マルチチャネルレコーディングから明らかになった点として、1. BarrCRH 発火に伴う膀胱収縮は膀胱容量依存性で、排尿サイクル後期において増大 (BarrCRH 発火に対する Spinal gate の存在) 2. BarrCRH の発火が膀胱収縮を惹起する (畜尿期および排尿期いずれにおいても) 3. BarrCRH 発火頻度は、膀胱充満時に上昇し、やがて排尿を引き起こす 4. BarrCRH の神経活動の内因的な興奮性は、排尿サイクルを通して一定であり、外からの drive が BarrCRH の神経活動を制御している。以上

4 点に着目した。この測定結果に基づき神経回路シミュレーター NEURON (Hines ML, et al. 米 Yale 大学) および数理言語 MATLAB を用いて排尿支配の人工副交感神経数理モデルを構築した。NEURON を用いた副交感神経活動の数理モデル化ののち、*ex-vivo* モデル別実験系からのマウス膀胱求心路測定結果 (Ito H, et al. BJU Int. 2019) を MATLAB を用いて数理化し、最終的に膀胱-求心路-副交感神経活動を MATLAB で統合しモデルを作成した。

4. 考 察

今回の検討の結果、排尿直前に BarrCRH がバースティング発火すること、ならびに、畜尿期において、BarrCRH の活動性と膀胱内圧が強く相関することを突き止めた。すなわち、これまで長い歴史の中で、排尿のみに関与していると考えられてきたバリントン核が畜尿機能の制御も行っている可能性が明らかとなった。下部尿路症状は多岐にわたるが、一般的に尿排出障害を呈している患者には畜尿機能障害を合併するケースが多く見られ、これらの一見複雑な病態生理をバリントン核の機能障害で一元的に説明でき得る可能性が出てきた。今後病態生理解明にバリントン核が極めて有望な標的部位になると思われた。

5. 論文及び学会発表 (研究会を含む)

2020/12/23 第 108 回日本泌尿器科学会総会 総会賞受賞

神経回路シミュレーター NEURON を用いた排尿支配の人工副交感神経数理モデルの開発

<わかば研究助成>

睡眠時無呼吸症患者の咽頭気道抵抗発生のメカニズムの解明

矢島 康治

共同研究者名：北島 大朗，光藤 健司

所属部科名：横浜市立大学大学院医学系研究科顎顔面口腔機能制御学

抄 録

閉塞性睡眠時無呼吸症（Obstructive sleep apnea : OSA）は，睡眠時に気道の閉塞や狭窄を起こすことで無呼吸や低呼吸を呈する疾患であり，気道狭窄の解剖学的要因と，咽頭開大筋の弛緩による生理学的要因により発症すると考えられている．解剖学的要因である気道の閉塞や狭窄については，形態学的な研究は行われているものの，抵抗となる気道内の気流の挙動について行われた研究は少ない．そこでわれわれは数値流体力学（Computational fluid dynamics: CFD）を用いて，気流抵抗から OSA 発症のメカニズムを解明することを本研究の目的とした．

対象は口腔内装置（Oral appliance : OA）を用いて OSA の治療を行った患者とした．気道評価のために治療前後に撮影した CT 画像から上気道の 3 次元形態モデルを作製し，大気圧下気温 20℃での安静時吸気を想定した流体シミュレーションを行った．最狭窄断面積（ $A_{\min}$ ）と実質的な気道抵抗を意味する咽頭気道の圧力差（ ΔP_{PAS} ），抵抗の発生源となる咽頭壁面の壁面せん断応力（Wall shear stress: WSS）をそれぞれ算出した．

OA 装着により $A_{\min}$ は拡大し， ΔP_{PAS} と WSS は減少した．OA 装着前後の $A_{\min}$ と ΔP_{PAS} の関係は，先行研究である顎変形症における $A_{\min}$ と ΔP_{PAS} の関係と同様であり， $A_{\min}$ を 1cm^2 以上とすることが治療目標となる可能性が示唆された．

<わかば研究助成>

睡眠時無呼吸症患者の咽頭気道抵抗発生のメカニズムの解明

矢島 康治

共同研究者名：北島 大朗，光藤 健司

所属部科名：横浜市立大学大学院医学系研究科顎顔面口腔機能制御学

1. 目 的

閉塞性睡眠時無呼吸症（Obstructive sleep apnea : OSA）は、睡眠時に気道の閉塞や狭窄を起こすことで無呼吸や低呼吸を呈する疾患である。OSA は高血圧症，糖尿病，循環器疾患，脳血管障害などを発症する要因であり，生命予後の悪化をもたらす。また，集中力，記憶力，学習能力や感情のコントロール，作業能率を低下させ，産業事故や交通事故などの因果関係も指摘されている。

OSA は気道狭窄の解剖学的要因と，咽頭開大筋の弛緩による生理学的要因により発症すると考えられている。解剖学的要因である気道の閉塞や狭窄については，形態学的な研究は行われているものの，抵抗となる気道内の気流の挙動について行われた研究は少ない。その理由の 1 つに，気道内の気流の挙動を直接把握できていないことが挙げられる。そこでわれわれは気流の挙動を解析するため数値流体力学（Computational fluid dynamics: CFD）に注目した。

われわれは，これまでに顎変形症患者の手術前後の気道を対象に CFD を用いて流体解析を行ってきた。解析の結果，気道抵抗は咽頭部の最狭窄断面積に大きく依存し， 1cm^2 以下から急激に抵抗が上昇することを突き止めた。OSA 患者の気道でも同様の現象が起きている可能性があり，抵抗が急激に上昇する“閾値”が存在するのではないと仮説を立てた。そこで，本研究では OSA の治療前後の気道を CFD で気流の挙動を解析し，気流抵抗から OSA 発症のメカニズムを解明することを本研究の目的とした。

2. 方 法

対象は，横浜市立大学附属病院歯科口腔外科矯正歯科にて OSA に対し，口腔内装置（Oral appliance : OA）を用いて治療を行い，評価のため CT 撮影を行った患者とした。

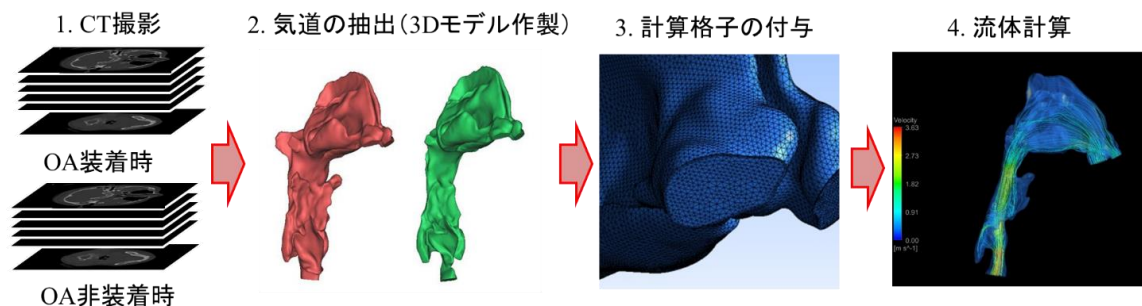


図 1. 流体解析の流れ

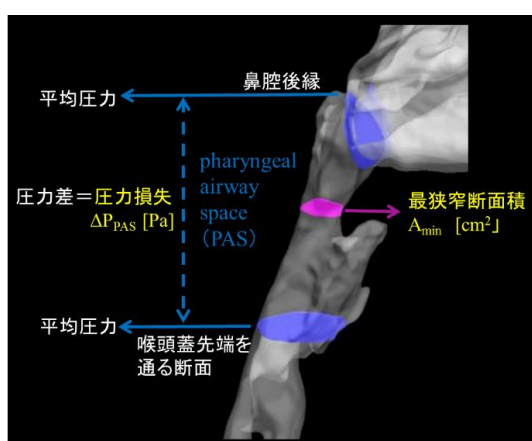


図 2. 圧力差 (ΔP_{PAS}) と最狭窄断面積 (A_{min})

OA 到着時と非装着時に撮影した CT 画像から 3 次元画像処理ソフトウェア (Mimics) を用いて上気道の 3 次元形態モデルを作製し pre-processor ソフトウェア (ICEM-CFD) にて流体解析用計算格子を付与し, 流体解析ソフトウェア (Fluent) を用いて大気圧下気温 20°C での安静時吸気を想定した流体シミュレーションを行った (図 1). 解析条件は, 密度 1.205kg/m^3 , 動粘性係数 $1.822 \times 10^{-5}\text{Pa} \cdot \text{s}$ の非圧縮性ニュートン流体とし, 乱流モデルとして低レイノルズ数型 k-epsilon モデルを用いた. 入口

境界条件は流量が 200ml/s となるよう境界面に流速を与え, 出口は自由流境界条件, 壁面は non-slip 境界条件とした. シミュレーション結果を post-processor ソフトウェア (CFD-Post) にインポートし, 最狭窄断面積 (A_{min}) と実質的な気道抵抗を意味する咽頭気道の圧力差 (ΔP_{PAS}) (図 2), 抵抗の発生源となる咽頭壁面の壁面せん断応力 (Wall shear stress: WSS) を算出した.

3. 結 果

CT 画像が CFD に適さないものなどがあり, CFD が行えたのは 1 例であった.

OA 装着により A_{min} は 0.361 cm^2 から 0.644 cm^2 に拡大し, ΔP_{PAS} は 25.9 Pa から 12.7 Pa に減少した. WSS は咽頭気道部の広範囲で減少を示し (図 3), 最大値は 0.618 Pa から 0.531 Pa に減少した.

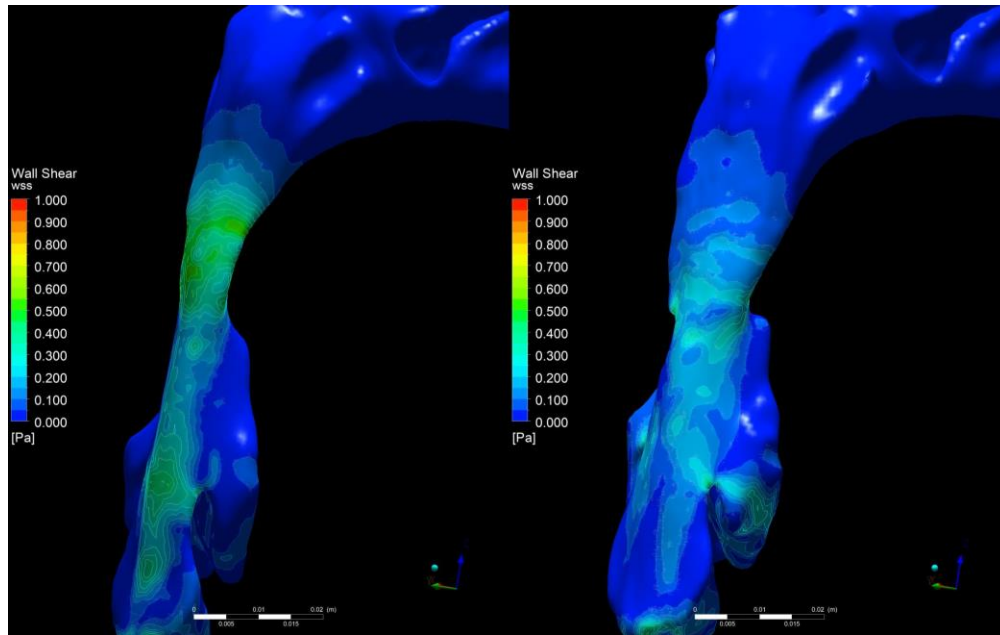


図 3. 咽頭気道の WSS (a)OA 装着前 (b)OA 装着後

4. 考 察

本研究結果と、これまでわれわれが行ってきた顎変形症患者を対象とした先行研究 (Yajima Y, et al. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 46: 839-844, 2017) との比較を図 4 に示す. OSA 症例の OA 装着前後の A_{min} と ΔP_{PAS} の関係は、顎変形症における A_{min} と ΔP_{PAS} の近似曲線上に位置していた. $AHI < 5$ であった患者の A_{min} は、平均 $1.08 \pm 0.37 \text{ cm}^2$ であったという報告 (Yu CC, et al. *J Craniofac Surg*; 23: 401-405, 2012.) もあり、OSA 患者においても A_{min} と ΔP_{PAS} の関係性は顎変形症患者と同様で、 A_{min} が 1 cm^2 以上であることが治療目標となる可能性が示唆された.

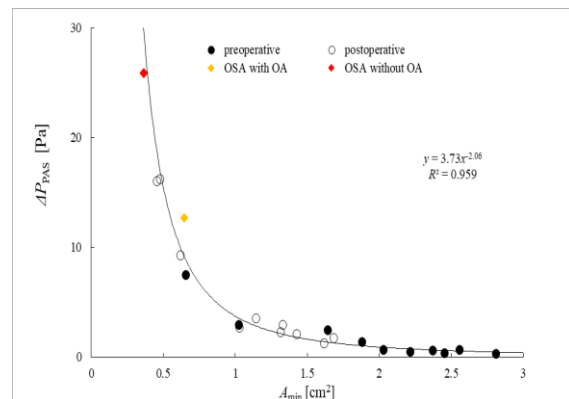


図 4. 先行研究との比較

COVID-19 の流行により症例が集まりにくい状況であったが、CT 画像から CFD を行う際に発生した工学技術的な問題を解決できず、サンプル数を増やすことができなかった. 今後は以前所属していた東京大学の研究室に助言を仰ぎ、問題解決を目指す予定である.

5. 論文及び学会発表

今後発表予定である.

<わかば研究助成>

心臓 MRI の高次元画像特徴量と機械学習を用いた 非虚血性心筋症の新たなリスク因子の探索

加藤 真吾¹

木下 美乃里¹、福井 和樹²、宇都宮 大輔¹

¹ 横浜市立大学大学院医学研究科 放射線診断科

² 神奈川県立循環器呼吸器病センター 循環器内科

抄録

113 名の非虚血性拡張型心筋症（平均年齢 63 ± 12 歳、男性 91 名、左室駆出率は $37 \pm 10\%$ ）を対象とし、心筋の T1 値の定量評価が可能な MRI 画像（native T1 マッピング）の有用性を評価した。画像のヒストグラム解析を行い、画素の信号値の平均値（T1-mean）とばらつきの指標である標準偏差（T1-STD）を計算した。

患者を T1-mean と T1-STD の中央値で 4 群にわけて比較をした。T1mean の中央値は 1062msec、T1-STD の中央値は 66.6msec であった。T1-mean と T1-STD がともに高い場合には、左室 reverse remodeling を示す患者が 12%（4/34）と他の 3 群と比較し統計学的に有意に低かった。左室 reverse remodeling の予測能は ROC 曲線下面積（AUC）が T1-mean が 0.757、T1-STD が 0.724 であり、T1-mean と T1-STD を組み合わせると AUC が 0.757 から 0.806 に上昇した。

T1 マッピングの評価において従来の画素の平均値に加え、不均一性を評価することで、非虚血性心筋症のより良いリスク層別化が可能であった。

<わかば研究助成>

心臓 MRI の高次元画像特徴量と機械学習を用いた 非虚血性心筋症の新たなリスク因子の探索

加藤 真吾¹

木下 美乃里¹、福井 和樹²、宇都宮 大輔¹

¹横浜市立大学大学院医学研究科 放射線診断科

²神奈川県立循環器呼吸器病センター 循環器内科

1. 目的

本邦において、高齢化が世界で類を見ないスピードで進行しており、心不全の有病率は急上昇し、慢性心不全患者は 2035 年には 130 万人にまで増加しピークに達すると予測されている (Okura Y. et al Circ J.2008)。このような心不全患者の爆発的な増加は「心不全パンデミック」と言われ、本邦の社会問題となる可能性が極めて高く、その予防から治療まで幅広い対策が必要である。心不全の主たる原因の一つの非虚血性心筋症は、冠動脈疾患以外が原因の心筋変性疾患であり、左心室内腔の拡大と収縮能の低下、左室心筋の線維化のために心不全を来す疾患である。ガドリニウム造影剤を用いた遅延造影 MRI は非侵襲的に心筋組織性状評価が可能な画像診断法である。非虚血性心筋症における遅延造影領域は病理学的な心筋線維化と一致し、メタアナリシスによると遅延造影の存在は全死亡、心不全入院、心臓突然死を予測可能であり、有意な予後予測因子とされている (S Kuruvilla et al. Circ Cardiovasc Imaging 2014)。しかしながら、遅延造影 MRI は造影剤投与を必要とし、腎機能障害の存在する患者やガドリニウム造影剤にアレルギーのある患者には撮影できない。非造影 T1 マッピング (Native T1 マッピング) は心筋組織の T1 値を定量評価可能なシークエンスである。Native T1 マッピングの非虚血性心筋症における有用性については議論があり、線維化を正確に評価できリスク層別化にも役立つという報告 (Vita T et al. JACC cardiovascular imaging. 2018) も存在する一方、値にばらつきがあり心筋線維化との相関が十分ではないとの報告もある (Reiter U et al. European Journal of Radiology. 2018)。これまで報告は、Native T1 マ

ッピンング画像から得られる信号値のみを評価しており、非虚血性心筋症の心筋における異常を十分に評価できていない可能性がある。

近年、コンピュータ支援診断を用いたテクスチャ解析が主に悪性腫瘍の質的診断の領域で用いられるようになってきている。テクスチャ解析によって病変のもつ大きさ、形状、濃淡、不均一さなどに関する高次元画像特徴量が得られる。例えば、Aerts らは、肺がんから抽出される高次元画像特徴量が特定の遺伝子発現パターンと関係することを報告した (Aerts HJ et al. Nature Communications 2014)。また、T2 強調画像と Fluid Attenuated Inversion Recovery (FLAIR) 画像を用いて grade II の glioma から予後に関連する IDH1 変異を推定する手法も報告されている (Yu J et al. European Radiology 2017)。循環器領域では、心サルコイドーシスにおいて活動性の炎症を表す 18F-FDG PET の集積の不均一性を表す HGRE が予後規定因子であることが示された (Manabe O et al. JACC Cardiovasc Imaging 2020)。このように、高次元画像特徴量は、各種疾患の診断、治療、リスク層別化において重要な役割を果たす可能性がある。本研究の目的は、非虚血性心筋症患者の非造影 Native T1 mapping 画像に対し、テクスチャ解析を行い、機械学習を用いて臨床的に意味のある高次元画像特徴量を抽出し、疾患重症度評価およびリスク層別化における有用性を検討することである。

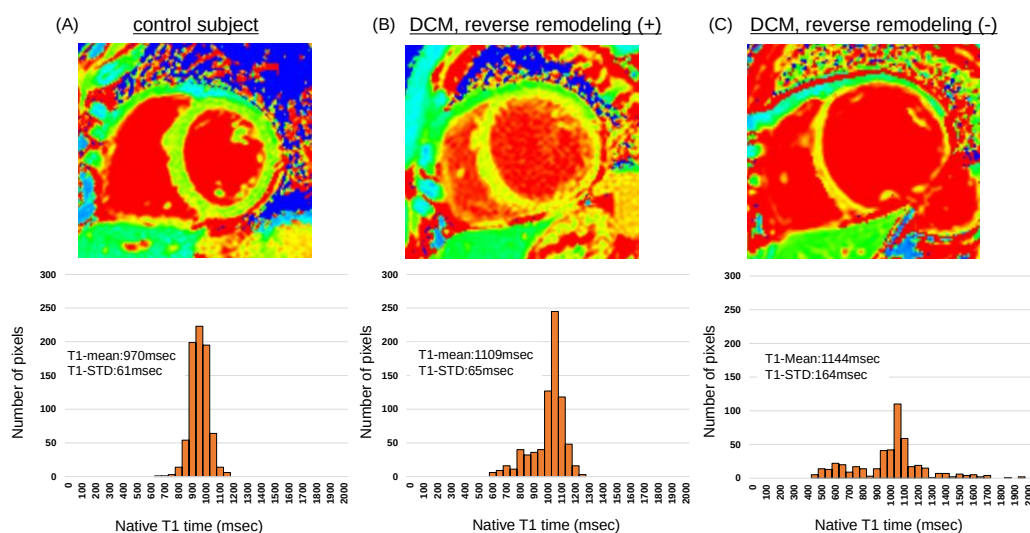
2. 方法

113 名の非虚血性拡張型心筋症 (non-ischemic dilated cardiomyopathy) の MRI 画像を解析した。患者の平均年齢は 63 ± 12 歳、男性 91 名、女性 22 名、平均の左室駆出率は $37 \pm 10\%$ であった。Native T1 マッピングの撮像には MOLLI (MODified Look Locker Inversion Recovery) をシークエンスとして用いた。画像のヒストグラム解析を行い、今回は画素の信号値 (T1 値) の平均値 (T1-mean) とばらつきの指標である標準偏差 (T1-STD) に着目し、各症例において計算を行った。心不全に対する薬剤であるベータ遮断薬やアンギオテンシン変換酵素阻害薬の治療効果として左室内腔の容積が縮小する左室 reverse remodeling が知られている。本研究では T1-STD と左室 reverse remodeling の関連性を検討した。なお、左室 reverse remodeling の定義としては、薬剤投与を開始し、12 か月後の時点で左室駆出率が 10% 以上上昇しかつ左室拡張末期容積が 10% 以上低下したものとした。

3. 結果

図1にMRI画像の比較を示す。(A)はコントロール、(B)は左室リバースリモデリングが観察されたNIDCMの患者、(C)は左室リバースリモデリングが観察されなかったNIDCMの患者のNative T1マッピング画像である。(A)と(B)を比較すると、T1-meanは(B)で異常高値であるが、T1-STDはほぼ同等の値である。それに対して(C)においてはT1-mean, T1-STDともに異常高値であり、画素の信号値のばらつきが大きいことがわかる。

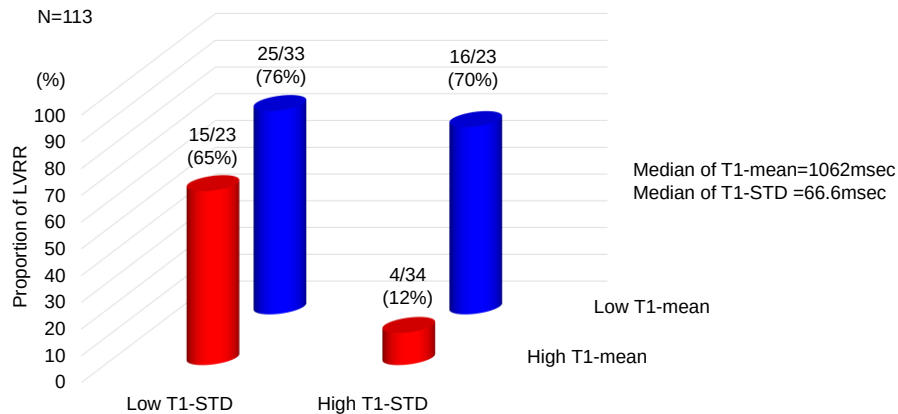
(図1) T1マッピングの解析



60名(53%)の患者に左室 reverse remodeling が観察された。患者を T1-mean と T1-STD の中央値で4群にわけて比較をした。T1meanの中央値は1062msec、T1-STDの中央値は66.6msecであった。図2の如く T1-mean と T1-STD がともに高い場合には、左室 reverse remodelingを示す患者が12%(4/34)と他の3群と比較し統計学的に有意に低い結果となった。

また、左室 reverse remodeling の予測能を ROC 解析で評価した。T1-meanの予測能はROC曲線下面積(AUC)が0.757(95%信頼区間: 0.663 – 0.850)、T1-STDでは0.724(95%信頼区間: 0.625-0.823)であった。また、T1-meanとT1-STDを組み合わせるとAUCが0.757から0.806に上昇した。

(図2) T1-mean, T1-STD によって分類した4群の左室 reverse remodeling の頻度の比較



4. 考察

本研究では Native T1 マッピングのヒストグラム解析におけるばらつき指標である T1-STD を従来から用いられている T1-mean に加えることによって薬物反応性の予測に役立つ可能性を示した。T1-STD は NIDCM における心筋組織の不均一性を示唆しており、組織の不均一性が治療反応性の不良に関連している可能性が示唆された。今後の展望としては前向き研究によって、死亡や心不全入院などの予後との関連性を検討する必要がある。前向き研究によって有用性が確認されれば、非造影で非侵襲的なリスク層別化が可能であると考えられ、治療方針の決定にも役立つものと考えられる。

5. 論文及び学会発表

1. Native T1 Heterogeneity for Predicting Reverse Remodeling in Patients with Non-ischemic Dilated Cardiomyopathy. Minori Kinoshita, Shingo Kato, Sho Kodama, Mai Azuma, Naoki Nakayama, Kazuki Fukui, Naka Saito, Tae Iwasawa, Kazuo Kimura, Kouichi Tamura, Daisuke Utsunomiya (投稿中)
2. Prognostic value of resting coronary sinus flow determined by phase-contrast cine cardiovascular magnetic resonance in patients with known or suspected coronary artery disease. Shingo Kato, Kazuki Fukui, Sho Kodama, Mai Azuma, Naoki Nakayama, Tae Iwasawa, Kazuo Kimura, Kouichi Tamura, Daisuke Utsunomiya. Journal of

Cardiovascular Magnetic Resonance. 2021;23:97.

doi: 10.1186/s12968-021-00790-9.

3. Assessment of Coronary Flow Reserve Improves Risk Stratification in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. Shingo Kato, Kazuki Fukui, Sho Kodama, Mai Azuma, Naoki Nakayama, Tae Iwasawa, Kazuo Kimura, Kouichi Tamura, Daisuke Utsunomiya. Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance in Press

<わかば研究助成>

歯状回顆粒細胞の GPR143 を介した樹状突起形成・発達制御機構の解明

笠原 由佳

増川 太輝、五嶋 良郎

医学研究科

抄録

海馬歯状回に存在する顆粒細胞は、成体期においても新生される稀有な神経細胞である。その神経新生能の低下は、うつ病発症への関連が示唆されており、新たな治療ターゲットとして着目されている。しかしながら、顆粒細胞の新生及び発達制御機構の詳細は不明である。申請者は、新たな関連分子として海馬に高発現する G タンパク質共役型受容体 GPR143 に着目し、GPR143 を介した顆粒細胞の新生及び発達制御機構について検討した。この結果、GPR143 の欠損により主に細胞増殖が抑制され、幼若期及び成体期の海馬歯状回における神経新生が減弱することを発見した。さらに、強制水泳試験により、GPR143-KO マウスで抑うつ行動の指標である無動時間が増加することを明らかにした。この無動時間の延長は、歯状回特異的に GPR143 を再発現させることで抑制された。以上の結果から、GPR143 は幼若期及び成体期の海馬歯状回における神経新生を制御し、うつ様行動の発現に関与すると示唆される。本研究は、今後の発達学の発展に貢献するとともに、うつ病や他の神経新生障害を伴う疾患の発症メカニズムの解明に繋がる可能性が考えられる。

<わかば研究助成>

歯状回顆粒細胞の GPR143 を介した樹状突起形成・発達制御機構の解明

笠原 由佳

増川 太輝、五嶋 良郎

医学研究科

1. 目 的

新生した神経細胞は、樹状突起という突起構造を伸長し、他の神経細胞との情報伝達の間であるシナプスを形成することで神経回路に組み込まれる。神経細胞の新生及び発達の異常は神経回路の変性に結び付き、うつ病などの精神疾患の発症に寄与すると考えられている (Anacker and Hen, *Nat Rev Neurosci.* 2017)。しかしながら、その詳細なメカニズムは依然として明らかになっていない。申請者は、幼若期だけではなく成体期においても神経新生能を保持する海馬歯状回に着目し、顆粒細胞の新生・発達機構を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。特に、海馬に高発現する G タンパク質共役型受容体 GPR143 に焦点を当て、「歯状回顆粒細胞における GPR143 を介した新生及び発達制御機構の解明」を目指す。

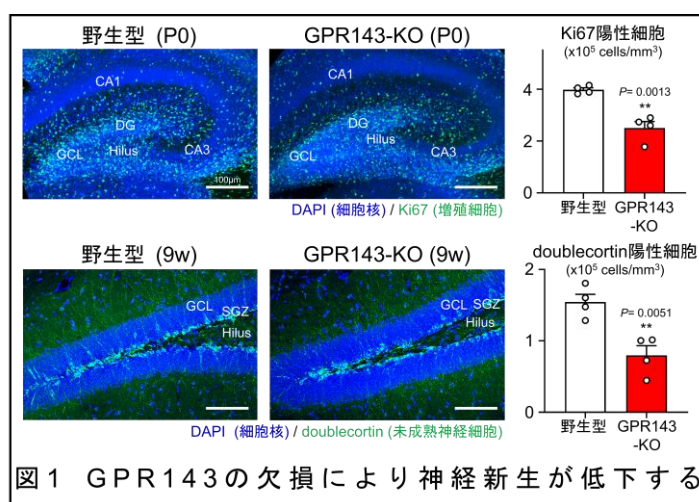
2. 方 法

GPR143 が顆粒細胞の新生及び発達に関与するか検討するため、当研究室で作製・保持している GPR143 遺伝子欠損 (GPR143-KO) マウスを使用した。まず、幼若期 (生後 0 日齢) 並びに成体期 (生後 9 週齢) における神経新生への影響について評価するため、細胞増殖マーカー (Ki67) 及び未成熟神経細胞マーカー (doublecortin) による免疫染色を行い、各マーカー発現細胞数を測定した。次に、GPR143 を介した神経新生の制御機構に GPR143 のリガンドの一つとして知られるドーパに関与するか検討するため、胎生 14 日齢の野生型もしくは、GPR143-KO マウスから神経幹細胞及び前駆細胞培養系を作製した。チミジンアナログである 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) により新生細胞をラベルすることで、神経幹細胞及び前駆細胞の増殖の程度が GPR143 の有無、ドーパの添加によって変化するか検討した。次に、GPR143 が顆粒細胞の発達に与える影

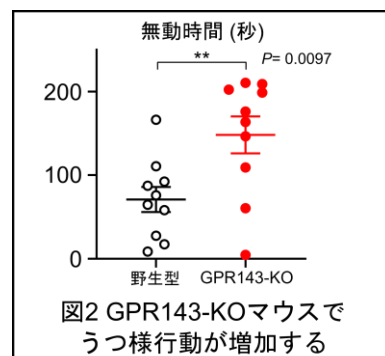
響について評価した。妊娠 15 日目のマウスに EdU を投与することで新生細胞をラベルし、生後 0 日齢の仔マウスから脳切片を作製、EdU、doublecortin、prox1 (成熟顆粒細胞マーカー) 陽性細胞数をそれぞれ測定することで、分化状態を観察した。また、生後 0 日齢の野生型もしくは、GPR143-KO マウスの海馬から初代培養系を作製し、顆粒細胞の樹状突起形成への GPR143 の欠損による影響を検討した。最後に、GPR143 の有無が海馬の機能に関与するか行動学的手法により検証した。特に、歯状回顆粒細胞の新生・発達との関連が報告されている認知機能及び抑うつ様行動に着目し、それぞれ位置認識試験、強制水泳試験により評価した。

3. 結 果

生後 0 日齢の GPR143-KO マウスの海馬歯状回において、Ki67 陽性細胞が減少した (図 1 上)。生後 9 週齢においても、歯状回に存在する doublecortin 陽性細胞が減少した (図 1 下)。これらの結果から、GPR143 の欠損



により幼若期及び成体期の海馬歯状回における神経新生が減弱したと示唆される。神経新生の低下は、GPR143-KO マウス由来の神経幹細胞及び前駆細胞培養系においても認められた。培養系に GPR143 のリガンドであるドーパを添加したところ、EdU 陽性細胞は野生型で増加したが、GPR143-KO で変化しなかった。この結果から、ドーパは GPR143 を介して細胞増殖作用を示すと示唆される。次に、妊娠 15 日目の親マウスに EdU を投与、生後 0 日目の仔マウスの歯状回に存在する EdU、doublecortin、prox1 陽性細胞数を測定した。各陽性細胞数は野生型に比べ、GPR143-KO マウスで同程度減少した。さらに、EdU 陽性細胞のうち prox1 を発現し、成熟した顆粒細胞の割合は野生型と GPR143-KO で差は見られなかった。また、GPR143-KO マウス由来の培養系において神経細胞の樹状突起の複雑性の低下する傾向が認めら



れた。以上の結果から、ドーパ受容体 GPR143 は神経新生における細胞増殖、分化及び成熟のうち、増殖の段階により深く関与すると考えられる。最後に、位置認識試験、強制水泳試験により認知機能及び抑うつ様行動への影響について評価した。位置認識試験において野生型と GPR143-KO マウスで差は認められなかった。一方、強制水泳試験では、GPR143-KO マウスで抑うつ行動の指標である無動時間が延長することが明らかになった (図 2)。さらに、アデノ随伴ウイルスを用いて歯状回特異的に GPR143 を再発現させたところ (図 3 左)、GPR143-KO マウスで見られた無動時間の延長、すなわち、うつ様行動の増加が抑制されることを発見した (図 3 右)。これらの結果から、GPR143 は幼若期及び成体期の海馬歯状回における神経新生を制御し、うつ様行動の発現に関与する可能性を明らかにした。

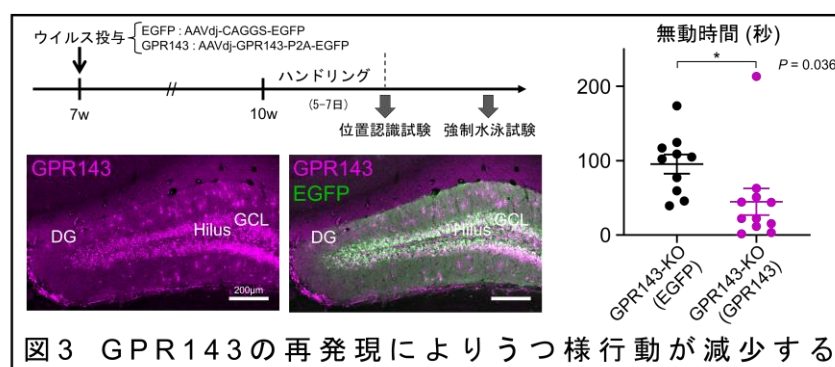


図 3 GPR143 の再発現によりうつ様行動が減少する

4. 考 察

本研究では、これまで未解明であった海馬歯状回の神経新生メカニズムに、GPR143 という新たな分子が関与することを発見した。加えて、既に臨床で使用されているドーパがリガンドとして、GPR143 による神経新生制御機構に関わり得ることを明らかにした点で意義深いと考えられる。現在、これらの研究成果を取り纏め、筆頭著者として論文投稿を行っている。本研究は、海馬における神経回路形成に関する研究に影響を与える重要な新知見であり、科学専門誌に学術原著論文として発表することで、今後の発達学の発展に貢献するとともに、うつ病などの神経新生障害を伴う疾患の発症メカニズムの解明に繋がる可能性をも秘めていると考えている。

5. 論文及び学会発表 (研究会を含む)

笠原由佳、五嶋良郎、Impairment of hippocampal neurogenesis during development in GPR143-KO mouse、第 43 回 日本神経科学大会、1P-006 (web 開催)、2020 年 7 月、ポスター発表

<わかば研究助成>

新規 PI3K 亢進型肝内胆管癌マウスモデルの構築と，
PI3K 阻害薬の臨床応用に向けた基盤研究

土屋 洋省

杉森 慎，杉森 一哉，前田 慎

消化器内科学教室

抄録

胆道癌は診断時には手術適応のない進行例であるケースが数多く見受けられる．これまでに進行胆道癌に対する GC（ゲムシタビン，シスプラチン併用療法）療法等の化学療法レジメンが開発されてきたが，生存期間中央値は 7-11 か月程度と未だ極めて予後不良で，新規治療法の確立は急務である．PI3K 経路は，細胞増殖やエネルギー代謝に深く関わる癌化経路の一つとして知られてきたが，最近，米国 Food and Drug Administration (FDA) において新規 PI3K 阻害薬の Alpelisib が乳癌に対して認可され，今後の Precision medicine の実装においては有望な治療標的の一つとして期待されている．

申請者らは，新規 PI3K 亢進型発癌マウスモデルの創出に取り組み，肝内胆管細胞においてプロモータ活性を有する Cre マウスを用いて，Pik3ca H1047R 変異 + Tp53 欠損，及び Pten 欠損 + Tp53 欠損の 2 系統のマウスモデルを創出した．4-5 ヶ月齢で肝内胆管癌を発生することを確認しており，段階的な発癌過程を再現しているものと考えられた．

<わかば研究助成>

新規 PI3K 亢進型肝内胆管癌マウスモデルの構築と，
PI3K 阻害薬の臨床応用に向けた基盤研究

土屋 洋省

杉森 慎，杉森 一哉，前田 慎

消化器内科学教室

1. 目 的

胆道癌は，解剖学的な複雑さも相まって早期診断が困難なことが多く，診断時には手術適応のない進行例であるケースが数多く見受けられる．これまでに進行胆道癌に対する GC 療法（ゲムシタビン，シスプラチン併用療法）等の化学療法レジメンが開発されてきたが，生存期間中央値は 7-11 か月程度と未だ極めて予後不良で，新規治療法の確立は急務である．

これまでに，胆道癌に対する大規模なゲノム解析が実施され，新規治療標的分子の同定が進められてきた．その変異パターンは大腸癌や膵臓癌などに比較すると複雑であるが，その中でも *PTEN*, *PIK3CA*, *PIK3R1*, *AKT*, *LKB1* 等の，PI3K 経路の亢進を導く遺伝子の変異や増幅を認めるケースが相当数（11.8- 22.2%程度）存在することが報告されている（Zou, S. et al., “Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma”, Nat. Commun. 5, 5696 (2014)）．PI3K 経路は，細胞増殖や生存に深く関わる癌化経路として知られてきたが，最近，米国 FDA において新規 PI3K 阻害薬の Alpelisib が乳癌に対して認可され，今後の Precision medicine の実装においては有望な分子標的薬の一つとして期待されている．

本研究では，新規 PI3K 亢進型発癌マウスモデルの創出に取り組み，これらのマウスモデル及び患者由来の肝内胆管癌オルガノイド細胞を用いて，PI3K 亢進型肝内胆管癌の分子基盤を明らかにするとともに，PI3K 阻害薬の臨床応用に向けた基礎的検討の実施を目的とする．

2. 方 法

肝内胆管細胞においてプロモータ活性を有する Cre マウスと ROSA26-Pik3ca H1047R マウス，Tp53 flox マウス，Pten flox マウスの交配実験を行い，新規 PI3K 亢進型発癌マウスモデル創出を試みる．

3. 結 果

Pik3ca H1047R 単独変異マウスモデルでは，4 ヶ月齢から脂肪肝が出現し，12 ヶ月齢まで

観察を行ったが、肝内胆管癌は発生しなかった。Tp53 単独欠損マウスモデルにおいても肝内胆管癌は認められなかった。Pten 欠損マウスモデルでは、12 ヶ月齢で肝内胆管癌を確認した。（図 1）

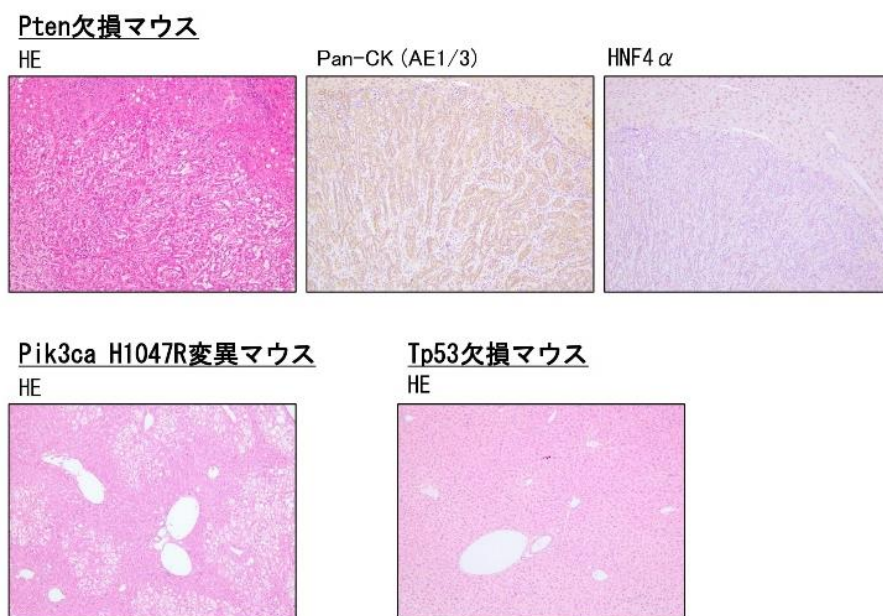


図 1

Pik3ca H1047R 変異 + Tp53 欠損、及び Pten 欠損 + Tp53 欠損の 2 系統のマウスモデルでは、4-5 ヶ月齢で肝内胆管癌が発生した（図 2）。いずれの系統も Tp53 欠損を並存させることにより 4-5 ヶ月齢で肝内胆管癌を発生することを確認しており、段階的な発癌過程を再現しているものと考えられた。

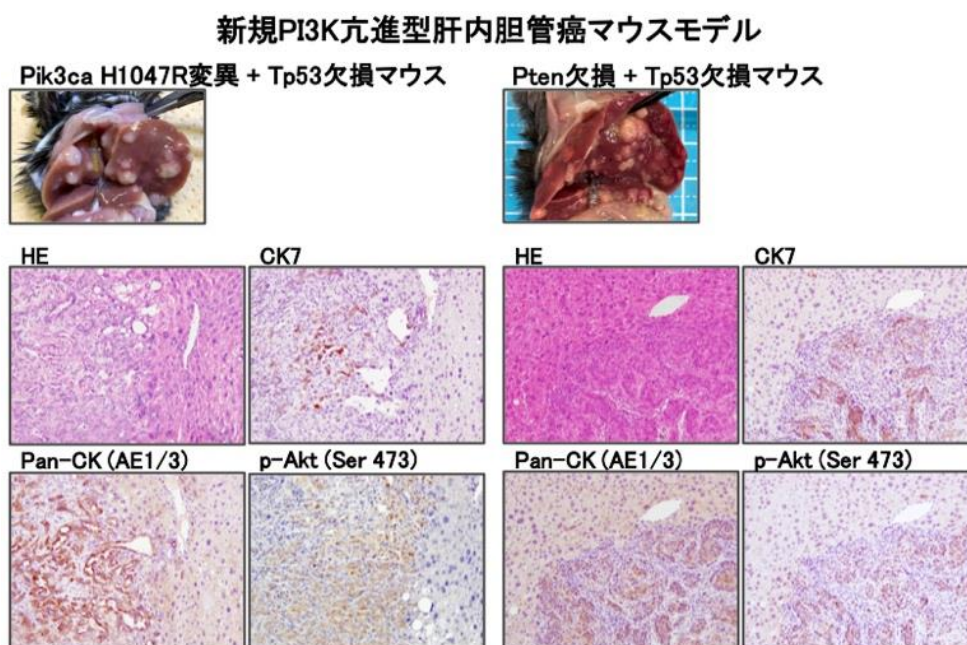


図 2

Pten 欠損 + Tp53 欠損マウスモデルでは、肝内多発腫瘍があり、上皮マーカーである Pan-CK, 及び肝細胞マーカーである HNF4 α に対して免疫染色を行なった。全ての腫瘍で Pan-CK 陽性であったが、HNF4 α に関しては陽性腫瘍細胞と陰性腫瘍細胞が確認された。(図 3) Pten 欠損+Tp53 欠損マウスモデルにおいては、肝内胆管癌及び混合型肝癌が同時に発癌している可能性が考えられた。Pik3ca H1047R 変異 + Tp53 欠損マウスモデルにおいても、肝内多発腫瘍があったが、いずれの腫瘍においても Pan-CK 陽性、HNF4 α 陰性の腫瘍であった。Pik3ca H1047R 変異 + Tp53 欠損マウスモデルでは、肝内胆管癌のみを生じている可能性が考えられた。

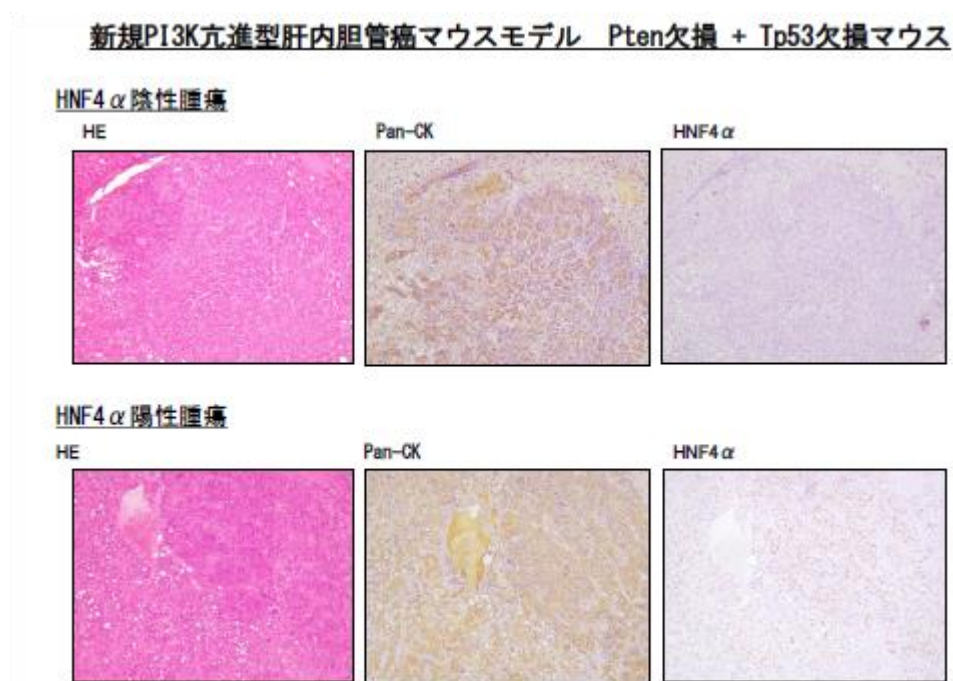


図 3

4. 考 察

Pik3ca H1047R 変異 + Tp53 欠損, 及び Pten 欠損 + Tp53 欠損の 2 系統のマウスモデル創出に成功し、PI3K 経路亢進による肝内胆管癌の発生が確認できた。今後は段階的な発癌過程が示唆されるマウス系統を比較・解析することにより、発癌に関わる分子基盤を明らかにし、新規治療標的分子の同定を目指す。

5. 論文及び学会発表

なし

<わかば研究助成>

先進的脳画像解析によるパーキンソン病の 認知機能低下予測バイオマーカーの開発

東山 雄一

田中 章景

横浜市立大学医学部 神経内科学・脳卒中医学

抄録

パーキンソン病は、振戦・筋強剛・無動などの特徴的な運動症状を呈する神経変性疾患であり、これまで認知機能は保たれると考えられてきた。しかし近年では、特徴的な認知機能障害を病初期より高率に合併することが明らかとなっており、認知症への進展は日常生活に支障をきたすことは勿論、生命予後を左右する大きな障害因子の一つであることが明らかとなっている。そこで我々は、最新の脳 MRI 画像解析手法である **fixel-based analysis (FBA)** を用い、軽度の認知機能障害を呈するパーキンソン病 (PD-MCI) 患者の画像的特徴を明らかにし、PPD 発症予測のための新規画像マーカーとしての応用が可能であるかについて検討を行った。

対象は、認知障害を伴わない PD 19 例と、PD-MCI 26 例、健常者 25 例。全例を対象に各種神経心理検査と MRI 解析を施行した。その結果、PD-MCI では、認知症を伴わない PD 及び健常者と比較して、右脳弓の線維密度が低下していることが明らかとなった。今後我々は、画像解析の結果と遺伝子検査など各種臨床指標との関連を検討することで、認知症進展予測のための新規画像マーカーの開発を行っていく。

<わかば研究助成>

先進的脳画像解析によるパーキンソン病の 認知機能低下予測バイオマーカーの開発

東山 雄一

田中 章景

横浜市立大学医学部 神経内科学・脳卒中医学

1. 目 的

パーキンソン病 (Parkinson's disease: PD)は、振戦・筋強剛・無動などの特徴的な運動症状を呈する神経変性疾患であり、2030 年には世界で 3000 万人が罹患すると予測される重要な疾患である。これまで認知機能は保たれると考えられてきたが、近年の研究から、特徴的な認知機能障害を病初期より高率に合併し、最終的に約 8 割が認知症に至るとも報告されており (Weintraub et al. *Mov Disord*, 2011), 介護負担の点でも大きな社会問題となっている。また、PD に伴う認知症 (PD with dementia: PDD)は日常生活に支障をきたすことは勿論、生命予後を左右する大きな障害因子の一つであることも明らかとなっており (Forsaa, et al. *Neurology*, 2010), 認知機能低下・認知症予測マーカーの開発は、適切な治療介入のタイミングを考える上でも極めて重要である。

PDD 進展のリスク因子として、高齢、重度の運動障害、早期からの注意機能障害、レム睡眠行動障害、嗅覚障害などが報告されているが、特に重度嗅覚障害を呈した症例では 3 年以内に約 40%の確率で認知症に移行すると報告され (Baba et al. *Brain*, 2012), この認知症予測マーカーに基づき PD を対象としたコリンエステラーゼ阻害剤による早期治療介入試験が本邦で進められている。また、遺伝子バイオマーカーとして、Gaucher 病の原因遺伝子であるグルコセレブロシダーゼをはじめとする lysosome storage disease 関連遺伝子、ミトコンドリア遺伝子、ドパミン代謝関連遺伝子などの変異・多型が、PD 発症のリスクとなることが報告されており、さらにこれらが PD の

認知症予測マーカーにもなりうる可能性が近年報告されている (Ignacio, et al. Mov Disord, 2016).

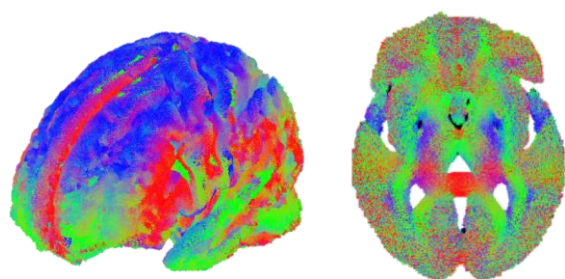
このように国内外で PDD 進展予測マーカーの開発が進められている一方で、脳画像と認知機能障害の関係に着目した研究は非常に少ない。そこで我々は、最新の脳 MRI 画像解析手法である **fixel-based analysis (FBA)**を用い、軽度の認知機能障害を呈する PD の画像的特徴を明らかにすることで、PPD 発症予測のための新規画像マーカーの開発を行う。

2. 方 法

■ **対象:** 国際診断基準に従って診断された認知障害を伴わない PD (PD with normal cognition: PD-NC)患者, 軽度認知障害を伴う PD (PD with mild cognitive impairment: PD-MCI)患者, 年齢を一致させた健常対照者 (healthy control: HC)を対象とした。対象の除外基準は, (1) 他の精神・神経疾患の既往, (2) 脳 MRI での明らかな異常所見, (3) 認知症の重症度分類 Clinical Dementia Rating (CDR)が 1 以上とした。

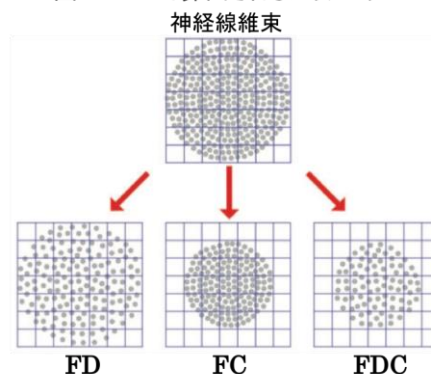
■ **方法:** 上記基準を満たす PD-NC, PD-MCI および健常者について, MMSE・MoCA-J などの認知スクリーニング検査, 注意・遂行機能, 言語, 記憶, 視空間認知機能など各認知ドメインに関する神経心理検査, Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)による運動障害度評価を施行した。さらに, 全例を対象に 3 テスラ MRI 装置を用いた 32 軸 DWI を撮像し, 画像解析ソフトである MRtrix 3.0 を用い, fibre density (FD), fibre cross-section (FC), および fibre density and cross-section (FDC)を算出し, PD-NC, PD-MCI, HC 群間でのグループ解析, および各種認知ドメインにおける認知機能低下や遺伝子変異を用いた相関解析を行い, 各臨床パラメータと関連した白質構造変化を検索した。

図1. MRtrixを用いた白質解析 (自験例)



70歳代健常例. 線維の走行方向により色を変えて表示.
本解析により全脳の白質解析が可能である.

図2. FBAで算出されるパラメーター

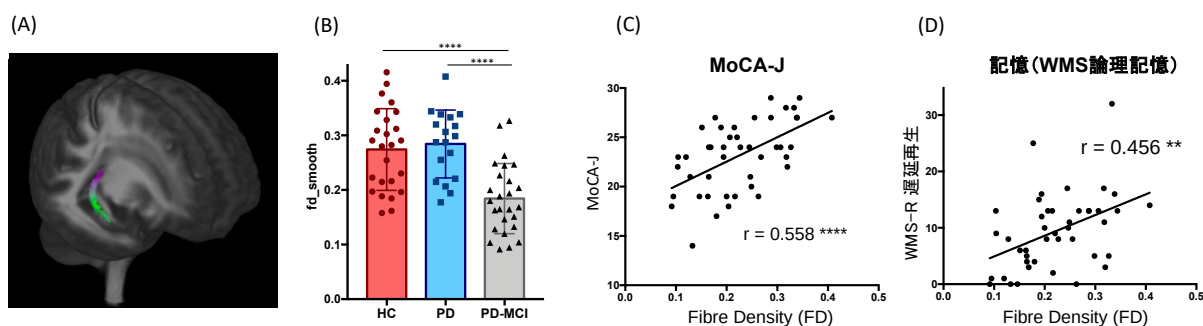


(Raffelt et al., 2017)

3. 結 果

PD-NC 19 例, PD-MCI 26 例, HC 25 例を解析対象とした. FBA を用いた全脳解析の結果, PD-MCI 群は他群と比較して, 右側頭葉内側から脳梁・帯状回へ至る, 脳弓の一部に有意な FD 値の低下を認めた (図 3A・B). また, この領域の FD 値は, 認知機能スクリーニング検査である MoCA-J や, 近時記憶の標準的な検査である Wechsler 記憶検査(WMS-R)の論理記憶課題と有意な相関を認めた (図 3C・D).

図 3. Fixel-based analysis の結果



(A) PD-NC と比較して PD-MCI で fibre density の低下を認めた白質領域 (FEW-corrected $P < 0.05$) ; (B) 同領域の各群の fibre density 値の分布. MD-MCI 群で有意な低下を認めた; (C), (D) 患者群における同領域の fibre density と MoCA-J, Wechsler memory scale revised -logical memory II との相関解析の結果.

4. 考 察

本研究結果より, 認知症の前段階である PD-MCI では, 認知症を伴わない PD 及び健康群と比較して, 右脳弓の線維密度が低下していることが明らかとなった. 脳弓は記憶に重要とされる Papez 回路を構成する脳領域であり, パーキンソン病患者の認知機能障害と関連して, 脳弓を含む前脳基底部領域に変性を認めたとの画像研究もなされている (Gargouri et al. Mov Disord, 2019).

本研究の結果から, FBA を用いた白質構造解析が, 認知症進展の前段階である PD-MCI を早期に検出する新たな臨床マーカーとして応用可能であることが示唆された.

今後我々は, 画像解析結果と遺伝子検査を含めた各種臨床指標との関連を検討することで, 本研究結果の妥当性を検証し, さらに白質変性の機序を明らかにしていく予定である.

5. 論文及び学会発表 (研究会を含む)

論文・学会発表の準備中である

＜医療技術研究助成＞（令和元年度）

看護師によるマスク換気におけるヘッドバンドの使用がマスクフィットに
与える影響—気道シミュレーターを用いたクロスオーバー試験—

大澤 翔^{1) 2)}

福田 真佑¹⁾・赤瀬 智子¹⁾

1) 横浜市立大学大学院 医学研究科看護学専攻 周麻酔期看護学分野

2) 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院 看護部

抄録

【目的】マスク換気は、緊急度の高い急変時などに用いられる技術である。しかし、マスク換気技術の修得は困難であることが報告されている。本研究は、看護師によるマスク換気にヘッドバンド（HB）を使用することの有効性を、換気量とマスクフィット圧力分布に着目し検証することを目的とした。

【方法】看護師 40 名を対象としてクロスオーバー法で調査を行った。対象者は従来用いられている E-C 法（親指と人差し指でマスクを保持し残りの指で下顎を挙上する方法、以下 C 法）と、E-C 法に加えて HB を使用する方法（以下 H 法）でのマスクフィットを気道シミュレーターに行った。換気量に加え、圧力測定シートを用いてマスクフィットの圧力分布を測定した。

【結果】換気量は H 法の方が有意に増加した。圧力値は、鼻部、右頬部、右口角部、左口角部で H 法が有意に高く、加圧面積は顎部以外の全ての部位で H 法が有意に高かった。更に、C 法と H 法の最大換気量の差には右口角部の加圧面積の差が最も影響していた。

【考察】看護師によるマスク換気に HB を使用することで、E-C 法よりも右口角部がカバーされ、換気量が増加する可能性が示唆された。

＜医療技術研究助成＞（令和元年度）

看護師によるマスク換気におけるヘッドバンドの使用がマスクフィットに
与える影響—気道シミュレーターを用いたクロスオーバー試験—

大澤 翔^{1) 2)}

福田 真佑¹⁾・赤瀬 智子¹⁾

1) 横浜市立大学大学院 医学研究科看護学専攻 周麻酔期看護学分野

2) 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院 看護部

1. 目的

マスク換気は最も基本的な気道・呼吸管理技術であり、看護師にとって適確なマスク換気技術の修得は必須と言える。しかし、マスク換気技術は修得が容易ではないことがこれまでに報告されており、特に不十分なマスクフィットはマスク換気困難の原因の約半数を占めている。

麻酔導入場面で使用されるデバイスの一つにヘッドバンド（HB）がある。HB は、マスクの両側から頭部を挟んで 4 点を固定し、顔面に多角的に圧力をかけることができる器具である。また、HB は先行研究で検討されてきたデバイスやマスク保持方法と併用でき、マスクフィットの改善に向けたデバイスといえる。しかし、これまでに HB の使用によるマスクフィットの改善効果は検証されていない。

また、これまでのマスクフィットの改善に関する先行研究では、換気量を主な評価指標としており、マスクフィットの圧力分布を直接可視化して評価した研究はない。マスク換気時のエアリークの改善要因を明らかにすることにより、マスクフィットの要点に関する根拠を踏まえた看護師教育や新たなデバイスの開発が行える可能性がある。

以上より、本研究の目的は、看護師によるマスク換気時の HB 使用の有効性を、換気量とマスクフィット圧力分布に着目して明らかにすることとした。

2. 方法

【研究デザイン】単施設層別無作為化クロスオーバー比較研究

【対象】A 県内の大学病院単施設の救命救急センター看護師のうち、BLS 受講歴があり、救命救急センターに所属して 1 年以上経過している者とした。

【調査方法】マスク換気に通常用いられる E-C 法を C 法、E-C 法に加えて HB を用いる方法を H 法とした（図 1）。気

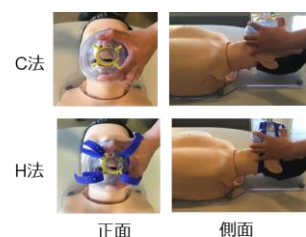


図1 マスクフィット方法
マスクフィットの方法
C法：E-Cクランプ法 H法：C法に加えてHBを使用する方法

道管理評価シミュレーターと人工呼吸器を用いて、換気回数 10 回/分、換気量 500 mL の条件下で換気量とマスクフィット圧力分布を各法 2 分間ずつ測定した。

マスクフィットの圧力分布測定には、プレスケール® 超微圧用（測定可能圧力 6.0～50.0kpa）をマスクと顔面に貼付して使用した。画像解析ソフト Image-J とプレスケール専用ソフトウェア FPD-8010 を用いて、プレスケールの赤色の濃淡を圧力値に換算した。

【解析方法】

- 1) 換気量及びリーク率を算出し 2 法間で比較した。
- 2) 圧力値を 1cm²毎のブロックに分割し、圧力分布マトリクスを作成した。目視で定性的に 2 法間の圧力分布の特徴を比較した。
- 3) プレスケールを鼻部・右頬部・右口角部・左頬部・左口角部・顎部の 6 部位に区分して、部位別に圧力値と加圧面積を算出し、定量的に 2 法間で比較した。
- 4) C 法と H 法の換気量の変化に影響した圧力分布の要因を明らかにするため、2 法間の最大換気量の差と各部位における圧力値の差・加圧面積の差について相関分析及び重回帰分析を行った。

【倫理的配慮】本研究は横浜市立大学ヒトゲノム・遺伝子研究等倫理委員会（A190500001）の承認を得て実施した。

3. 結果

看護師 73 名に研究説明を行い、同意を得られた 40 名が解析対象となった。
平均換気量は C 法 271.4 mL、H 法 370.8 mL、平均リーク率は、C 法 45.7%、H 法 25.8% であり、統計学的有意差を認めた ($p < 0.01$)。

表1 C法とH法の平均換気量の比較					
	マスクフィット法		P 値	平均値の差	95% 信頼区間
	C法	H法			
換気量 (mL)	271.4 (64.3)	370.8 (67.7)	< .001	99.4	73.7-124.9
リーク率 (%) ※	45.7 (13.5)	25.8 (12.9)	< .001	15.8	10.9-20.7

連続データ：平均（標準偏差）
対応のあるt検定
※リーク率：（送気量(500mL)－換気量）/送気量×100

圧力分布マトリクス（図 2）では、C 法では鼻部の加圧面積は左側に偏る傾向が見られたが、H 法では鼻部右側の加圧面積が拡大していた。更に、C 法と比較して、H 法では左右頬部付近の加圧面積が拡大する傾向がみられた。C 法では右側の頬部と口角部に該当する右側部位に変動が見られたが、H 法では圧力値が一定を保つ傾向にあった。

部位ごとの圧力値は、鼻部、右頬部、右口角

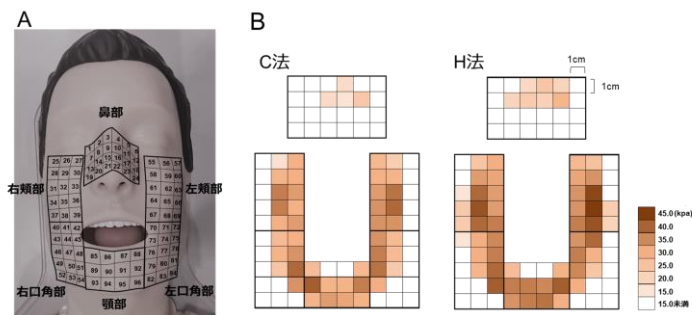


図2 圧力分布マトリクスによるC法とH法の比較
A：気道シミュレーターの顔面におけるプレスケール貼付部位を示した。プレスケールを1cm²毎に分割し、鼻部(1～24)、右頬部(25～39)、右口角部(40～54)、左頬部(55～69)、左口角部(70～84)、顎部(85～96)とした。
B：C法、H法それぞれについて、Aに対応する圧力の中央値をカラスケールに換算して圧力分布マトリクスとした。

部、左頬部でいずれも C 法よりも H 法で有意に高く、加圧面積の比較では、顎部以外の全ての部位で C 法よりも H 法で有意に増加していた。

最大換気量の差と各部位の圧力値の差及び加圧面積の差の相関分析では、最大換気量の差と右頬部の圧力値の差に有意な正の相関を認めた ($r_s=0.54, p<0.01$)。重回帰分析による圧力値の差の解析では、最も標準偏回帰係数が高かった部位は右頬部 ($\beta=0.31$) であったが、統計学的に有意な関連は認められなかった ($p=0.07$)。加圧面積の差の重回帰解析では調整済み $R^2=0.09, p=0.12$ となり、統計学的に有意なモデルとはならなかった。独立変数では、右口角部が $\beta=0.35$ と最も大きく、統計学的に有意な関連を認めた ($p=0.03$)。

4. 考察

看護師が気道シミュレーターに対して HB を使用してマスク換気を行った場合、通常の E-C 法と比較して平均換気量が有意に増加し、リーク率が約 20%減少した。更に、HB の使用により、顔面の多くの部位で圧力値と加圧面積が増加し、特に HB による換気量の増加には右口角部の加圧面積が影響している可能性が示唆された。以上のことから、看護師によるマスク換気における HB の有効性が示された。今後は、本研究で得られた知見を更に発展させ、看護師のマスク換気技術の向上を図ることによって、急変時における看護師の適確なマスク換気技術の提供を目指す。

5. 論文及び学会発表

- ・ 太澤 翔, 福田 真佑, 赤瀬 智子 : 看護師が行うマスク換気におけるヘッドバンドの使用によるマスクフィット圧力分布の変化—パイロットスタディー, 第 7 回看護理工学会学術集会, 沖縄, 2019.6
- ・ 瀧川 彩夏, 太澤 翔, 福田 真佑, 赤瀬 智子 : 看護師が行う EC クランプ法によるマスク換気時のマスクフィット圧力分布の傾向, 第 70 回日本救急医学会関東地方会, 前橋, 2020.1

<医療技術研究助成>（令和元年度）

学童後期にある小児慢性腎疾患の子どもの治療アドヒアランスの実態とその関連要因

大浦令未奈¹⁾²⁾

叶谷由佳³⁾、佐藤朝美²⁾

- 1) 横浜市立大学附属市民総合医療センター 外来
- 2) 横浜市立大学 大学院医学研究科小児看護学分野
- 3) 横浜市立大学 大学院医学研究科老年看護学分野

抄録

小児慢性腎疾患の自覚症状は乏しく、学童後期の子どもの病気と治療効果の関係を捉え、長期に渡って継続した治療を行うことが難しい。そこで、服薬・感染予防における理解と行動を「治療アドヒアランス」として実態調査した。2020年7月13日～12月31日に2施設の小児腎臓外来に通院中の学童後期の子どもへ無記名自記式質問紙調査を行い、42名の有効回答が得られた。

小児慢性腎疾患の子どもの治療アドヒアランスは、服薬理解、帰宅時の手洗い・含嗽、トイレ後の手洗い、外出時のマスク着用で高く、感染予防理解はやや低く、服薬行動は年齢とともに低下、食事前の手洗い・含嗽は低かった。関連要因は、具体的操作期で家族に関連が多く、形式的操作期では家族から医療者との関連に変化した。また、医療者の説明・指導と服薬行動が関連し、友人との関連が服薬・感染予防行動を低めていた。

以上より、家族の協力を得ながら医療者が発達段階に合わせて学童後期の子どもに理解しやすい説明・指導をして本人主体の管理を援助し、学校や友人関係のなかで発達する子どもたちが継続して治療に取り組み、良好な長期予後につなげられるような介入の必要性が示唆された。

＜医療技術研究助成＞（令和元年度）

学童後期にある小児慢性腎疾患の子どもの治療アドヒアランスの実態とその関連要因

大浦令未奈¹⁾²⁾

叶谷由佳³⁾、佐藤朝美²⁾

1)横浜市立大学附属市民総合医療センター 外来

2)横浜市立大学 大学院医学研究科小児看護学分野

3)横浜市立大学 大学院医学研究科老年看護学分野

1. 目的

小児慢性腎疾患は自覚症状が乏しく、学童後期の子どもの病気と治療効果の関係を捉え、長期に渡って継続した治療を行うことが難しい。小児慢性腎疾患では服薬・感染予防行動が重要であり、子どもが自分の病気や治療を理解し納得して行動することが大切と考えた。主体性を尊重した治療行動の考え方として「アドヒアランス (adherence)」(WHO, 2003) がある。本研究では服薬・感染予防における理解と行動を「治療アドヒアランス」とし、学童後期にある小児慢性腎疾患の子どもの服薬・感染予防の実態を調査し、関連要因を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

1) 研究対象

2 施設の小児腎臓専門外来において、①尿異常（特に蛋白尿）、画像診断、血液、病理で腎障害が存在した経験があり、②小児における後天性の糸球体疾患で免疫学的機序により発生する慢性腎疾患の患者、本研究開始時にステロイド、免疫抑制剤のうちいずれかまたは両方を内服中の患者、本研究開始時に学童後期（満 9～満 12 歳）にある患者を対象とし、腎代替療法施行中の患者は除外した。本研究は、横浜市立大学医学研究倫理委員会承認番号：B200500067、国立成育医療研究センター倫理審査委員会部会：2020-129 を得て実施した。

2) 研究方法 無記名自記式質問紙による横断研究

3) 調査期間 2020 年 7 月 13 日～12 月 31 日

4) 調査内容

(1) 小児慢性腎疾患の子どもの治療アドヒアランス

治療方針を「①服薬・感染予防」、服薬と感染予防の「②理解を問う質問」と「③行動を問う質問」に分類した。「①理解を問う質問」2 項目、「②行動を問う質問」6 項目で計 9

項目を設定した。これらに対し4段階で回答を求めた。

(2) 関連要因

国内外の学童後期を含む小児のアドヒアランス先行研究から要因を抽出し、患者に関連する要因、状態に関連する要因、治療に関連する要因、医療チームとシステム関連要因、社会的および経済的要因の5つに分類、自由記述欄も設けた。

(3) 対象者の属性

学童後期を含む小児のアドヒアランスに関連する国内外の先行研究から抽出し、性別、年齢など8項目を設定した。

5) 分析方法

小児慢性腎疾患の子どもの治療アドヒアランスを従属変数、属性と関連要因を独立変数として分析した。統計ソフトはSPSS statistics ver.27、有意水準 $p < 0.05$

3. 結果

50名の研究対象者に質問紙を配布し、44名回収した（回収率88.0%）。有効回答数は42名（有効回答率76.4%）であった。

1) 対象者の属性

結果は小児の発達段階の影響を考慮し、ピアジェの認知発達理論に基づき、9～10歳を具体的操作期、11～12歳を形式的操作期に分けた。男性（69.6；63.2%）、ネフローゼ症候群（73.9；68.4%）が多く、腎臓を理由とした入院回数は中央値（3；3）、最小値（1；1）、最大値は（17；22）であった。服薬期間は平均（61.4；67.4）ヶ月であった。

2) 小児慢性腎疾患の子どもの治療アドヒアランス

【薬の飲み忘れ】では具体的操作期が「忘れていない」60.9%、形式的操作期は「ときどき忘れた」52.6%が最も多かった。【食事前の含嗽】は「していない」が（78.3；42.1%）と最も多かった。

3) 関連要因

【治療の主体】では具体的操作期が「いつも」「していない」30.4%、形式的操作期は「だいたい」36.8%が最も多かった。【治療の嫌悪感】では具体的操作期が「ぜんぜんいやでない」52.2%、形式的操作期は「すこしいやだ」42.1%が最も多かった。

4) 関連要因と小児慢性腎疾患の子どもの治療アドヒアランスの関連

具体的操作期は、【家族との関係性】と【カゼのひきやすさ】（ $r=.533$ ）、【薬の飲み忘れ】（ $r=.502$ ）、【外出時のマスク着用】（ $r=.526$ ）に中程度の正の相関があった。【家族のサポート】と【薬の飲み忘れ】（ $r=.649$ ）、【帰宅時の手洗い】（ $r=.446$ ）に中程度の正の相関があった。

形式的操作期は、【医療者の説明・指導】と【薬の大切さ】（ $r=.523$ ）、【薬の飲み忘れ】（ $r=.596$ ）に中程度の正の相関があった。

4. 考察

1) 対象者の概要について

男性、ネフローゼ症候群が約 7 割を占めていた。日本の特発性ネフローゼ症候群の疫学調査 (Kikunaga, 2016) の男女比は 1.9:1 で、本研究はネフローゼ症候群の子どもが多い対象となった。

2) 小児慢性腎疾患の子どもの治療アドヒアランスの実態

本研究では食事前含嗽の実施率が低かった。Satomura らによる健康成人を対象とした研究 (2005) では、水うがいによって感冒発症が 4 割抑えられ、含嗽による上気道炎の予防効果が実証されている。予防の機序は未だ明らかになっていないが、帰宅後以外にも食事の前や掃除の後など、こまめな含嗽が感染予防として推奨される。

3) 小児慢性腎疾患の子どもの治療アドヒアランスと関連要因

具体的操作期のほうが家族に関連する項目が多く、形式的操作期では減少していた。これは、自己管理への移行によるものと考えられる。ARB/ACE-I 服薬中の小児腎疾患を対象とした服薬アドヒアランス研究 (森, 2018) では、学年が上がると自己管理の割合が高く服薬アドヒアランスの低下がみられ、本研究でも同様の結果になったと思われる。

形式的操作期では、「医師や看護師が病気についてわかりやすく教えてくれる」と認識しているほど薬の飲み忘れが少なかった。Kamei らによる小児期発症 IgA 腎症の長期予後の研究 (2016) では、発症時の重症度以上にその後の管理が必要とされている。学童期の慢性腎疾患児を対象とした入院生活への思いについての質的研究 (秋山, 2014) で「嫌な治療に対する理解」や「治療経過を理解した上での我慢」など「理解による前向きな治療への取り組み」が報告されている。医療者が子どもの年齢に応じたわかりやすい説明を行うことが重要であり、子どもの病気や治療に対する理解を深めることで、嫌悪感や面倒さを感じやすい服薬行動を実施し、良好な長期予後につながると考える。

<医療技術研究助成>（令和元年度）

がん診療連携拠点病院におけるがん看護の質の維持・向上に向けた
経年的評価システムの構築に関する研究

報告者

菅野 雄介¹⁾

共同研究者

畑 千秋²⁾、齋藤 幸枝²⁾、町永 弘美²⁾、小林 瑞穂²⁾、
今津 陽子³⁾、渡邊 眞理⁴⁾

- 1) 横浜市立大学医学部看護学科
- 2) 横浜市立大学附属病院看護部
- 3) 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科
- 4) 湘南医療大学保健医療学部看護学科

抄録

【目的】著者らは、がん看護の質の維持向上に向け、PDCA サイクルを効果的に、持続的に行うための教育体制の整備を行っている。本研究では、経年的に評価可能である調査項目を探索するため、がん患者の人生最終段階における Advanced Care Planning（以下、ACP）の障壁に対し看護師が評価可能な調査項目を検討した。

【方法】対象は、インターネット調査会社に登録され、がん患者の人生最終段階における ACP に携わった経験のある看護師 215 名とした。

【結果】がん患者の人生最終段階における ACP の障壁において、全項目で 75%以上の看護師が障壁を感じていると回答した。探索的因子分析では、2 因子に分かれ、医療者の障壁、患者の障壁、家族の障壁で構成される第Ⅰ因子「ACP の看護実践に関する障壁」（計 9 項目）、システムの障壁で構成される第Ⅱ因子「ACP の整備体制に関する障壁」（計 3 項目）と命名した。内的一貫性では、第Ⅰ因子の Cronbach の α 係数が 0.91、第Ⅱ因子が 0.85、全項目が 0.93 であった。

【結論】がん患者の人生最終段階における ACP の障壁に対し看護師が評価可能な調査項目として、因子妥当性及び内的一貫性が確認された。今後は、今回検討した調査項目を含め、ベースラインとなる調査を実施する予定である。

＜医療技術研究助成＞（令和元年度）

がん診療連携拠点病院におけるがん看護の質の維持・向上に向けた
経年的評価システムの構築に関する研究

菅野 雄介¹⁾、畑 千秋²⁾、齋藤 幸枝²⁾、町永 弘美²⁾、
小林 瑞穂²⁾、今津 陽子³⁾、渡邊 眞理⁴⁾

- 1) 横浜市立大学医学部看護学科、2) 横浜市立大学附属病院看護部
3) 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科、4) 湘南医療大学保健医療学部看護学科

1. 目的

近年、がん治療の高度化が進み、治療方法の選択や新たな有害事象対策など、患者や家族が直面する問題は更に複雑化しており、がん医療の場で看護師に求められる役割は大きくなっている。特に、がん患者やその家族は、がんの告知の段階から治療期、終末期、死別後まで、様々な苦痛を抱えており (Bubis LD, et al. J Clin Oncol. 2018; Murray SA, et al. BMJ 2017)、安楽で安心した療養生活を送るための質の高いがん看護を提供していく必要がある。がん看護教育において、Quality of Oncology Nursing Care Scale (Charalambous A, et al. BMC Nurs 2014) など看護実践を評価する尺度や看護師を対象とした、がん看護の知識や技術など包括的な教育プログラム (Truant T. Nurs Clin North Am. 2017) などが開発されている。これらのツールやプログラムをがん看護教育に効果的に活かしていくためには、PDCA サイクルを意識した教育体制を検討する必要がある。具体的には、所属施設のがん看護教育を想定した場合、がん看護の現状を踏まえ課題とされるテーマに関するがん看護教育の計画 (Plan) を行い、その教育を実施 (Do) し、教育内容の他、受講者の評価 (Check) を行い、評価の結果を踏まえ再検討 (Act) を行う。ただし、がん看護の質の維持向上を図るためには、PDCA サイクルを一時的に行うのではなく長期的に (経年的に) 行う必要がある。越野らは、大学病院一施設でがん看護に対する看護師の困難感について、2010 年と 2016 年に行った調査の比較から、がん看護の課題を抽出している (越野他. Palliat Care Res 2019)。この調査は、信頼性と妥当性が検証された「看護師のがん看護における困難感尺度」(小野寺他. Palliat Care Res 2013) を共通して尋ねているが、看護師が対応に苦慮している、がん患者の人生最終段階における Advance Care Planning (以下、ACP) の障壁については尋ねていない。著者らは、がん診療連携拠点病院におけるがん看護の質の維持向上に向け、PDCA サイクルを効果的に行うための教育体制の整備及び経年的評価の検討を行っている。経年的評価においては、看護師のがん看護における困難感尺度が参考になり、越野らの研究との比較も可能である。そこで、本研究では、困難感尺度の他、国策として進められている、がん患者の人生最終段階における ACP に着目し、その障壁に対し看護師が評価可能な調査項目を検討することを目的とした。

2. 方法

1) 対象

調査時点で、看護師経験年数が1年以上でがん患者の人生最終段階におけるACPに携わった経験のある看護師200名を目安に抽出した。抽出対象はインターネット調査会社（株式会社インテージ）に登録したモニターである。

2) 調査手順

市場調査会社に登録し調査参加に同意した看護師に対し、2021年8月にインターネットを利用した質問紙調査を行った。調査会社が対象者の抽出と調査を行い、完全匿名化して調査データを作成した。

3) 調査項目

(1) 人生最終段階におけるACPに関する項目

まず、がん患者の人生最終段階におけるACPに携わった件数、内容の計2項目を尋ねた。次に、人生最終段階におけるACPの障壁について、先行研究を参考に4つの側面から尋ねた。具体的には、①医療者の障壁（3項目）、②患者の障壁（3項目）、③家族の障壁（3項目）、④システムの障壁（3項目）の計12項目について、「1.全くそう思わない」から「6.非常にそう思う」の6件法で尋ねた。最後に、がん患者の人生最終段階におけるACPに携わることに対する自信（1項目）について、「1.全くそう思わない」から「6.非常にそう思う」の6件法で尋ねた。

(2) 看護師背景に関する項目

看護師経験年数、所属施設の病院規模（病床数）、配属病棟（一般病棟、ホスピス・緩和ケア病棟）、専門看護師または認定看護師の資格の有無などについて尋ねた。

4) 解析方法

まず、各項目の記述統計を算出した。次に、がん患者の人生最終段階におけるACPの障壁に関する項目の因子妥当性を検討するために、最尤法、プロマックス回転による探索的因子分析を行った。次に内的一貫性を評価するために、Cronbachの α 係数を算出した。全ての統計解析には、SPSS ver.25を使用し、有意水準を0.05とした両側検定を行った。

3. 結果

本研究の有効回答数は215名であった。看護師背景では、看護師経験年数（平均±標準偏差）は20.8±8.9年、専門または認定看護師の有資格者は16名（7.4%）であった。また、がん診療拠点病院での勤務経験有りが89名（41.4%）、配属された病棟では一般病棟が148名（68.8%）、ホスピス・緩和ケア病棟が14名（6.5%）であった。

がん患者の人生最終段階におけるACPに携わった経験（件数）では、3件以上が175名（81.4%）、ACPの内容は、希望する治療方針に関することが81名（37.7%）、最期の療養場所に関することが71名（33%）であった。

がん患者の人生最終段階におけるACPの障壁において、全項目で75%以上の看護師が障壁を感じていると回答した（表1）。また、がん患者の人生最終段階におけるACPに携わる

ことに対する自信では、「全く自信はない」、「自信はない」、「あまり自信はない」の何れかを回答した看護師は 156 名（72.6%）であった。

表1 がん患者の人生最終段階におけるACPの障壁

障壁	項目†	%‡
医療者	あなたは、予後予測尺度などを活用し、予後を見積もることが難しいと感じる。	87.9
	あなたは、コミュニケーションが難しいと感じる。	85.5
	あなたは、職種間の違いを尊重し連携を強めることに難しいと感じる。	78.6
	あなたは、患者の認識や意向、希望を知り、支援することに難しいと感じる。	86.6
患者	あなたは、不安、否認、家族を守りたいなど患者の気持ちを尊重し、患者の気持ちの揺れに寄り添うことに難しいと感じる。	81.9
	あなたは、患者の意思決定能力の査定（アセスメント、評価）と支援を行うことに難しいと感じる。	87.9
	あなたは、家族の認識や意向、希望を知り、支援することに難しいと感じる。	87.9
家族	あなたは、不安、否認、患者を守りたいなど家族の気持ちを尊重し、家族の気持ちの揺れに寄り添うことに難しいと感じる。	84.6
	あなたは、代理意思決定者を同定すること、家族間の同意形成の橋渡しを行うことに難しいと感じる。	87.5
システム	あなたが所属する病院や病棟で、院内外の多職種で、患者・家族中心の話し合いを行う文化をつくることに難しいと感じる。	80.9
	あなたが所属する病院や病棟で、場所と時間を確保する体制をつくることに難しいと感じる。	82.9
	あなたが所属する病院や病棟で、患者の意向を記載する院内共通の場所（診療記録など）をつくることに難しいと感じる。	76.2

† 各質問項目に「がん患者の人生最終段階におけるACPを行うために」または「がん患者の人生最終段階におけるACPにおいて」を追記し尋ねた。

‡ 「ややそう思う」「そう思う」「非常にそう思う」の合計割合であり、割合が高いほど障壁を強く感じていることを意味する。

次に、がん患者の人生最終段階における ACP の障壁に関する項目の計量心理学的分析を行った。探索的因子分析では、2 因子に分かれ、医療者の障壁（3 項目）、患者の障壁（3 項目）、家族の障壁（3 項目）で構成される第Ⅰ因子「ACP の看護実践に関する障壁」（計 9 項目）、システムの障壁（3 項目）で構成される第Ⅱ因子「ACP の整備体制に関する障壁」（計 3 項目）と命名した。全項目の標準化回帰係数は 0.4 以上であったため、全項目採用した。内的一貫性では、第Ⅰ因子の Cronbach の α 係数が 0.91、第Ⅱ因子が 0.85、全項目が 0.93 であった。

4. 考察

がん看護の質の維持向上を図るために、経年的に評価可能である調査項目を探索するためインターネットを用いた予備的調査を行った結果、がん患者の人生最終段階における ACP の障壁に対し看護師が評価可能な調査項目として、因子妥当性及び内的一貫性が確認された。全 12 項目ある調査項目であるが、合計得点での評価の他、因子別に評価することが可能である。これは、がん患者の人生最終段階における ACP に関する教育研修を行った後の評価や臨床での自己評価に用いることが可能である。また、対象者背景との関連を探索することで、どの対象集団に、どの内容に重きを置いて説明する必要があるのかを検討することも可能である。今後は、今回検討した調査項目を含め、経年的に評価していくためのベースラインとなる調査を実施する予定である。

5. 論文及び学会発表

本研究に関しての学術的発表も含め、本調査終了後に関連する学会での発表及び学会誌への投稿を予定している。

<医療技術研究助成>

気腹装置の加温効果を妨げる因子の探索的横断研究

宮森 真璃絵

吉田 智 , 赤瀬 智子

横浜市立大学 大学院医学研究科周麻酔期看護学分野

抄録

【背景】腹腔鏡手術は、気腹用炭酸ガスによって開腹術よりも体温低下が起きやすい。近年、A病院では炭酸ガス加温調整機能を有する気腹装置が導入されたが、従来の気腹装置と比較した先行研究において体温維持効果は賛否両論である。そこで加温気腹装置使用症例において背景因子に着目し、その効果を妨げる因子を明らかにすることとした。

【方法】加温気腹装置を使用した腹腔鏡下大腸切除術を受けた 189 名を対象とし、患者基本・手術・麻酔・看護情報を収集した。手術開始時と手術終了時の体温の差を従属変数、背景因子を独立変数とした重回帰分析、また体温低下群・維持群に分類しロジスティック回帰分析を行った。

【結果】体温の差に関連を示した因子は、BMI・手術開始時体温・性別・年齢・小開腹時間・人工膠質液投与であった。このうち体温低下に影響のある因子は BMI 低値・女性・高齢患者であり、気腹装置の加温効果を妨げる因子であることが明らかとなった。これら因子を有する患者は、積極的な低体温防止策を講じる必要がある。また、人工膠質液投与は容量依存性に体温が維持される傾向が示された。ただし、これに関する先行研究は少ないため今後さらなる研究が必要である。

<医療技術研究助成>

気腹装置の加温効果を妨げる因子の探索的横断研究

宮森 真璃絵

吉田 智 , 赤瀬 智子

横浜市立大学 大学院医学研究科周麻酔期看護学分野

1. 目 的

腹腔鏡手術は低侵襲手術に位置づけられているが、腹腔が室内空気に曝されないにも拘わらず、多量の気腹用炭酸ガスを腹腔内に吹送するために開腹術よりも術中体温が低下しやすい (Madedern, G. *et al.*, 1996)。手術中の低体温は、シバリングの発生による酸素需要の増大・頭蓋内圧の上昇・創部痛の増悪 (甲田賢一郎ら, 2014)、薬物の代謝時間延長 (日本麻酔科学会, 2016)、凝固能低下による出血傾向 (Schmied H, *et al.*, 1996)、免疫機能低下による術後の創部感染率増加 (Kurz A, *et al.*, 1996)、心疾患のある患者は術後心臓への負担増加 (Frank SM, *et al.*, 1993) といった影響を及ぼすため、手術中の体温保持はとても重要である。

A 病院では、2017 年より炭酸ガス加温調整機能を有する気腹装置を導入している。しかし、従来の冷たく乾燥した炭酸ガスと加温された炭酸ガスを比較した先行研究において、体温維持効果は賛否両論である。そこで加温気腹装置使用症例において背景因子に着目し、その効果を妨げる因子を明らかにすることとした。

2. 方 法

2018 年 4 月から 2020 年 3 月に、ストライカー社のニューモシユア気腹装置を使用した腹腔鏡下大腸切除術を受けた 189 名を対象とした。後向き観察研究とし、患者基本 (年齢・性別・BMI・既往歴)、手術 (術式・手術時間・気腹時間・小開腹時間・出血量)、麻酔 (麻酔法・麻酔時間・輸液・薬剤・尿量)、看護 (体温管理) 情報を収集した。主要評価項目は膀胱温とし、手術開始時体温と手術終了時体温の差を従属変数、背景因子を独立変数とした重回帰分析、また体温低下群・維持群に分類し多重ロジスティック回帰分析を行った。

3. 結 果

【対象】基準を満たした者は 189 名 (女性 92 名、中央値 70.0 歳)、そのうち体温維持群が 61 名・体温低下群が 128 名であった。

【手術前後の体温の差に関連する因子】手術開始時と手術終了時の体温の差に関連する因子の探索のために重回帰分析を行った。その結果を表 2.に示す。体温の差に有意な関連を示した因子は、年齢・性別・BMI・小開腹時間・人工膠質液投与量・手術開始時体温であった。

表 2.手術前後の体温の差に関連する因子

	標準誤差	標準化回帰係数	有意確率	95% 信頼区間	
				下限	上限
(定数)	3.383		.000	5.658	19.012
年齢	.003	-.277	.000	-.020	-.007
性別《0:男性 1:女性》	.076	-.194	.007	-.357	-.057
BMI	.072	.233	.001	.106	.391
気腹時間 (分)	.001	.019	.795	-.001	.001
小開腹時間 (分)	.003	.235	.001	.004	.016
ヘアーハガー総使用時間率	.001	-.040	.547	-.003	.002
輸液総投与量 (ml/kg/hr)	.016	.000	1.000	-.033	.033
人工膠質液投与量 (mL)	.000	.161	.014	.000	.001
手術開始時体温	.093	-.246	.000	-.519	-.152
狭心症・心筋梗塞《0:無 1:有》	.187	.001	.989	-.366	.371
呼吸器疾患《0:無 1:有》	.121	-.062	.341	-.355	.123
脳血管・神経疾患《0:無 1:有》	.174	-.043	.511	-.459	.229
糖尿病《0:無 1:有》	.113	-.100	.142	-.388	.056
泌尿器・生殖器癌《0:無 1:有》	.175	-.021	.749	-.401	.288
緑内障《0:無 1:有》	.183	-.045	.488	-.488	.233

* 強制投入法 R^2 乗=0.327

【手術前後の体温の差に関連する因子の影響度】手術開始時と手術終了時の体温の差に関連する因子の影響度を評価するために多重ロジスティック回帰分析を行った。その結果を表 3.に示す。重回帰分析の結果より体温の差に有意な関連を示した因子の影響度は、影響の大きい順に BMI・手術開始時体温・性別・年齢・小開腹時間・人工膠質液投与量であった。

表 3.手術前後の体温の差に関連する因子の影響度

	回帰係数	有意確率	オッズ比	95% 信頼区間	
				下限	上限
BMI	.767	.038	2.154	1.042	4.451
手術開始時体温	-1.303	.015	.272	.095	.778
性別 《男性:0 女性:1》	-1.037	.006	.355	.168	.747
年齢	-.064	.000	.938	.907	.971
小開腹時間 (分)	.043	.005	1.044	1.013	1.075
人工膠質液投与量 (mL)	.002	.025	1.002	1.000	1.003
定数	49.314	.012			

* 強制投入法 Hosmer-Lemeshow検定 $p=0.583$ Nagelkerke R^2 乗=0.277 判別的中率74.1%

4. 考 察

手術前後の体温の差に関連を示した BMI・年齢・性別は「術中低体温防止のための臨床ガイドライン」においてリスク因子とされており、BMI が 1 増えると体温低下リスクは 0.77 倍低下し、年齢が 1 歳増えると 1.1 倍に増え（岩田香織ら,2014）、男性は女性よりも温度変化が有意に少ない（Luck A,*et al.*,1999）ことが報告されている。加温気腹装置使用下においても BMI 低値・高齢・女性患者で有意に体温低下することが示され、これらが気腹装置の加温効果を妨げる因子であることが明らかとなった。特に BMI は、体温低下に関連を示した因子の中で最も影響度が大きいことが示された。他の因子の有無に関わらず、BMI 低値患者は低体温リスクが高いことを認識する必要がある。さらに、手術開始時体温が高いことも体温低下に影響する因子として示されており、これは手術開始時体温が高いことで加温行動が遅れ、体温低下を抑制出来なかった可能性が考えられる。したがって、術前からの低体温リスクアセスメントの実施、そして上記因子を有する高リスク患者に対する術前加温等の積極的な体温管理の実施に向け、対策を講じる必要がある。

また、人工膠質液投与は容量依存性に体温が維持される傾向が示された。循環血液量を維持することで低体温症によって誘発される心筋機能障害と細胞内カルシウムイオンの蓄積が軽減されることが示されており（Nilsen,J.H.,*et al.*,2021）、人工膠質液投与は、膠質浸透圧作用による循環血液量増量効果・コロイドによる増量効果の持続で、低体温が患者に与える影響を軽減する可能性が考えられる。ただし、これに関連する先行研究は少ないため、この結果を示すためには今後さらなる研究が必要である。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

第 35 回日本手術看護学会年次大会（開催日 2021 年 10 月 16 日～11 月 24 日）での研究発表を予定している。

<医療技術研究助成>

プロポフォールはなぜ加温により血管痛が緩和されるのか
ー血管内皮細胞に発現する疼痛関連受容体に着目したメカニズムの解明ー

藤川千啓

赤瀬智子、福田真佑

横浜市立大学大学院医学研究科看護学専攻 看護生命科学分野

抄録

【背景】 静脈麻酔薬であるプロポフォールには副作用として静脈内投与時の血管痛がある。血管痛に対して加温ケアが検討されているものの、臨床現場で実践されておらず患者の苦痛は改善されていない状況である。そこで、本研究では作用機序が明確な看護ケアの確立を目指し、血管内皮細胞に発現する TRPA1 受容体に着目しプロポフォールによる血管痛のメカニズムを解明することを目的とした。【方法】 ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) をプロポフォール添加群、AITC 添加群、対照群に分け、各薬剤添加後の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇率を算出した。【結果】 薬剤添加後の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇率はプロポフォール群と対照群、AITC 群の 3 群間に有意差は認められなかった。しかし、プロポフォール群、AITC 群の両群は対照群と比較して、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇率が高値であったことから、プロポフォールは血管内皮細胞に作用し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、その機序には TRPA1 が関与する可能性が示唆された。今後は、プロポフォールの TRPA1 への作用について、TRPA1 選択的阻害剤の使用による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化について解析を行っていく。

<医療技術研究助成>

プロポフォールはなぜ加温により血管痛が緩和されるのか
ー血管内皮細胞に発現する疼痛関連受容体に着目したメカニズムの解明ー

藤川千啓

赤瀬智子、福田真佑

横浜市立大学大学院医学研究科看護学専攻 看護生命科学分野

1. 目的

静脈麻酔薬であるプロポフォールは、静脈内投与時に患者に注入時疼痛（血管痛）を生じさせる（プロポフォール静注 1% 20 mL「マルイシ」医薬品インタビューフォーム第 14 版）。これまで、臨床研究において局所加温にはプロポフォールによる血管痛は緩和する効果がある（Young et al., 2017; Jeong et al., 2016）ことが示されている。

しかしながら、臨床現場ではプロポフォール投与時の血管痛に対して局所加温が実施されていない状況があり、プロポフォール投与時に患者が感じる血管痛は十分な改善は図られておらず、介入すべき問題といえる。よって、臨床現場でプロポフォールによる血管痛に対する加温ケアを積極的に実施していくには、加温による血管痛の緩和効果のメカニズムを科学的に解明して客観的データを提示し、作用機序の明確な看護ケアとして確立していくことが重要と考えた。

静脈内に投与されたプロポフォールは、血管内皮細胞に発現する受容体に作用することが想定される。血管内皮細胞に発現する様々な疼痛受容に関わる受容体（疼痛関連受容体）は発現している。疼痛関連受容体のうち、イオン活性型受容体である一過性受容体電位アンキリン 1（TRPA1）は、プロポフォールにより直接活性化する（Nishimoto et al., 2015）が明らかとなっている。しかし、血管内皮細胞に発現する TRPA1 はプロポフォールにより活性化されることで血管痛の発生に関与しているかどうかは明らかとなっていない。

そこで、血管内皮細胞に発現する TRPA1 に焦点を当て、プロポフォールによる血管痛のメカニズムを明らかにすることを目指し、TRPA1 が活性化することで変化する細胞内 Ca^{2+} 濃度から解析することとした。

2. 方法

細胞培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUV-EC-C) (JCRB 細胞バンク, 大阪, 日本) は、100 $\mu\text{g/mL}$ ヘパリンナトリウム (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、50 $\mu\text{g/mL}$ 内皮細胞増殖因子 (CORNING, NY, USA)、1%ペニシリンストレプトマイシン (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)、10 %ウシ胎児血清 (Gibco, Waltham, MA, USA) を含む Ham's F-12K 培地 (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) で培養した。I 型コラーゲンでコーティングされた 100 mm ディッシュ (IWAKI, 静岡, 日本) に播種し、37°C、5%CO₂ 中で維持した。実験には継代数 34~36 の細胞を使用した。

細胞内 Ca²⁺濃度測定

I 型コラーゲンでコーティングされた 96 穴黒クリアボトムプレート (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に HUV-EC-C 細胞を 1.0×10^5 cells/mL で播種し、2 日間培養した。細胞内カルシウムイオンの測定には Calcium kit Fluo4 (同仁化学研究所, 熊本, 日本) を使用し、蛍光マイクロプレートリーダー (Wallac 1420 ARVO MX, Perkinelmer, Waltham, MA, USA) を用いて、試薬添加前後の細胞内のカルシウムイオンの蛍光強度を測定し、各群で比較した。各試薬の細胞への添加濃度は、プロポフォル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および TRPA1 のアゴニストであるイソチオシアン酸アリル (AITC) (ナカライテスク株式会社, 京都, 日本) は終濃度 100 μM 、プロポフォルの溶媒であるジメチルスルホキシド (DMSO) (ナカライテスク株式会社, 京都, 日本) は終濃度 0.01% とした。

細胞内 Ca²⁺濃度の変化は、各試薬の添加直前および添加後のピーク時の差を上昇率として算出した。

統計学的解析

実験は 3 回繰り返して実施し、各群における細胞内 Ca²⁺濃度の上昇率は平均 $\pm$ SD で示した。3 群間の細胞内 Ca²⁺濃度の上昇率は一元配置分散分析後、Dunnett の事後検定を行い、統計学的有意性を評価した。p 値は $p < 0.05$ を統計学的有意差とした。

3. 結果

プロポフォルによる細胞内 Ca²⁺濃度の変化

HUV-EC-C 細胞におけるプロポフォル添加後の細胞内 Ca²⁺濃度の上昇率を図 1 に示した。

プロポフォル添加群細胞内 Ca²⁺濃度の上昇率は 140.4% (± 33.5) で、対照群の上昇率 (116.1% (± 5.1)) よりも高値を示したが、有意差は認められなかった。また、TRPA1 ア

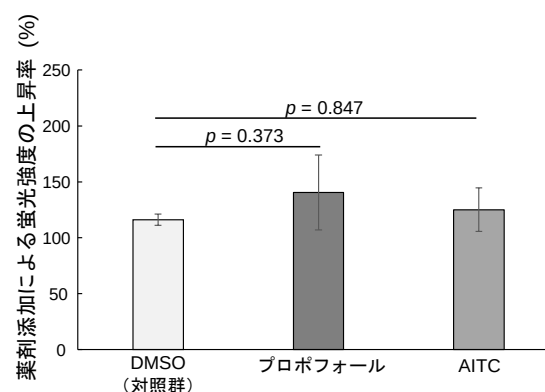


図1. 薬剤添加前後による細胞内Ca²⁺濃度の上昇率

ゴニストである AITC 群の上昇率 (127.2% (±22.2)) は対照群よりもわずかに高値であったが、ほぼ同等の値となった。

4. 考察

本研究は、プロポフォールによる血管痛のメカニズムについて、血管内皮細胞に発現する受容体である TRPA1 に着目し検証した初めての研究である。

今回、プロポフォール群と対照群における細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇率に有意差は認められなかった。TRPA1 の最も強力なアゴニストであり、細胞膜上に発現する TRPA1 を活性化 (Oguri et al., 2021) AITC の添加群も、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇率は対照群と有意差は認められなかった。これは、今回実験に用いた HUV-EC-C 細胞では TRPA1 の発現量が低く、AITC による TRPA1 の活性化に伴う細胞外からの Ca^{2+} 流入の程度が低かった可能性によるものと考えられる。プロポフォールは細胞膜上の TRPA1 のみならず、細胞小器官である小胞体やミトコンドリアに作用し、細胞小器官から Ca^{2+} を流出させる (Urabe et al., 2020)。対照群である DMSO は、細胞膜に一時的に水孔を形成し、 Ca^{2+} を流入させる (He et al., 2012) こと、細胞小器官から Ca^{2+} 放出を瞬間的に誘発すること (Morley and Whitfield, 1993) が報告されている。これらのメカニズムから、プロポフォールと DMSO はそれぞれ細胞内外から Ca^{2+} 濃度を上昇させると考えられる。しかし、本研究における HUV-EC-C 細胞上の TRPA1 の発現量は未解析であり、TRPA1 の発現量の程度によってはプロポフォールによる細胞外からの Ca^{2+} 流入が低く、DMSO によって細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、プロポフォールそのものによる Ca^{2+} 濃度上昇反応はわずかであった可能性がある。

HUV-EC-C 細胞では TRPA1 以外にも内在性のイオン活性型受容体が発現しており (Beddek et al., 2021; Ralevic, 2012)、プロポフォールは TRPA1 以外の受容体に作用する可能性がある。今後は、TRPA1 以外のイオン活性型受容体とともに、HUV-EC-C 細胞における TRPA1 の発現量の確認を行う必要がある。

本研究の限界として、プロポフォールによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と TRPA1 の関与の間接的な証明に留まった。そのため、今後は TRPA1 選択的阻害剤を用いて TRPA1 の直接的な関与について検証していく。また、今回は細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化のみの解析であるため、その下流のシグナル伝達経路について解析し、侵害受容に関わる物質の産生について検証を行っていく。

5. 論文および学会発表

今後、日本薬学会での発表を目指している。

<医学・医療関連事業助成>

男性の妊活を目的としたパンフレット・冊子を用いた啓蒙・受診奨励活動

山中弘行

大船中央病院泌尿器科 横浜市立大学医学部泌尿器科 客員研究員

抄録

わが国では10組に1組のカップルが不妊に悩んでいると言われており、50万近くのカップルが何らかの不妊治療を受けていると推測されている。不妊精査・加療は女性に対してのみ行われる事が多く、男性に対しての精査はあまり行われていない。

男性不妊への理解を深め、受診のハードルを下げる事、それは正しい情報を男性に知ってもらい、男性側に寄り添った啓蒙活動を行うため、「触れやすい媒体を用いて、触れやすい形で啓蒙する」事を提唱し、マンガを使った男性不妊の啓蒙を行った。

登場するキャラクターとして親しみやすさを持っていただくために人間は登場させず、日本最古のマンガと言われる「鳥獣人物戯画」をモチーフにカエルとウサギのカップルとしてマンガに登場させた。

パイロット版として作成した100部を元に各方面からのアドバイスを頂き、「男性不妊戯画」として300部を作製した。また、この内容を元に、SNS上で周知を図ったところ、良好な反応を得られた。

<医学・医療関連事業助成>

男性の妊活を目的としたパンフレット・冊子を用いた啓蒙・受診奨励活動

山中弘行

大船中央病院泌尿器科 横浜市立大学医学部泌尿器科 客員研究員

1. 目 的

WHO の不妊症原因調査では、男性のみ 24%女性のみ 41%男女とも 24%原因不明 11%と報告されており、不妊の原因は男女それぞれ半々ずつであることが統計的に示唆される一方、不妊治療はそのほとんどが婦人科で行われている。また、その精査・加療も女性に対してのみ行われる事が多く、男性に対しての精査はあまり行われていない。この事態を改善するために、男性に（男性不妊）外来を受診して頂く事が精査・治療への第一歩であると考えている。その方法として、マンガ等を使った男性不妊の啓蒙を考えた。

2. 方 法

「妊活」情報の多くは女性側に立ったものが多く、パートナーから入る情報にも限界がある。また公的機関等が用意している情報は堅苦しく、（興味のない）男性には読み進めるのが困難な印象であった。いくつか既存の資料と「刺さる」資料の違いを私なりに比べてみると、「タイトル・表紙が手に取ってもらいやすい」「話がコミカルで面白い事」「コマ割りなどの画力が高い事」「読み手が共感できる事」が挙げられる。また、自身の経験として「当事者（男性）が糾弾されている印象を与えない」事を意識した。作画に関してはプロ・もしくはプロ並みの実力を持つ方、画風に特徴があり男性から賛同を得られそうな方を探しては見たものの、プロレベルの方となると 1 ページ 2 万円程度&作成後の修正不可といったところが相場であった。このとき頭に浮かんだのは「フリー素材の活用」である。少年マガジンのマンガをフリー素材で組み合わせ無料公開する企画

<http://www.shonenmagazine.com/special/100maninochi-illustya/>

を以前目にしたことがあった私は、同様のアプローチでフリー素材を組み合わせることでコストを削減することとした。

また、登場するキャラクターとして、親しみやすさを持っていただくために人間は登場させず、日本最古のマンガと言われる「鳥獣人物戯画」をモチーフにカエルとウサギのカップルとしてマンガに登場させた。また、鳥獣戯画自体が「著作権が（ほぼ）フリーなうえに年齢層を問わず認知度の高い作品（パロディしやすい作品）」という事も私の目的と合致した。WEB 上で作者を検討し、ダ鳥獣戯画 <https://chojugiga.com/> を運営するダーヤマ氏にイラストの使用を依頼した（追加料金を支払いイラストの無限使用許可を取った）。

3. 結 果

当初、パワーポイントを用いたイラストの配置組みや切り取り機能で作業が事足りるのではないかと思われたが、作業は難航した。また、どうしても既存のイラストでは表現できないシーンも登場したため別途イラスト作成料金を支払いイラスト作成頂いたほか、私自身が **Adobe Illustrator** を自費導入し、作業効率の向上を図った。また、ダーヤマ氏のご厚意により吹き出し、枠配置、印刷業者の紹介を行っていただいた。最終的な色の調整や用紙の選択は自身で行い、コストを削減した。そうして完成したのが「男性不妊戯画」である。まず、パイロット版として 100 部を作成し周囲に配布した。そのうえで誤字・脱字や印刷ミスの部分を修正したのち 300 部を本出版分として作成した。作成された完成版は近隣の不妊クリニックや大船中央病院から配布した。また、不特定多数への周知・啓蒙を図るため本内容を **Twitter** 上にアップしたところ、90 万件近い閲覧数と 3000 件を超えるリツイート、5000 件を超える「いいね」の反応を得た。

https://twitter.com/saraly_man/status/1456845459700400133?s=20

また、一部メディアからの取材もいただき、**Twitter** に触れていない層への周知も得ることができた（神戸新聞社が運営するニュースサイト「まいどなニュース」など）。既存の男性不妊の啓発事業で、何も後ろ盾のないところから、大きな反応を得ることができたこと、公的な情報提供が一般的と思われた領域に、アイデアで勝負できたことは収穫であった。

4. 考 察

大きく分けて、2 点問題点があった。

1 つは「不妊外来へ来ない男性への訴求効果があったかどうかはまだ判断できない」という事である。配布先は知り合いのため、あまり厳しい意見が貰えなかった。この点に関しては自分の妻や友人の妻からの意見といった女性からの意見は大いに参考になった。その中で、「あくまで男性サイドに立った啓蒙」を意識し

ながらパートナー女性が抱えるストレスや葛藤を内容に織り込めたと考えている。同様に、泌尿器科外来で配布するのは外来通院中の男性患者であるため「そもそも外来に来てくれている層」からの意見はマンガとして面白いかどうか为中心となってしまった。Twitter 上での公開の際には、男女双方からの好意的な意見を頂けたので、一定のクオリティを持った作品を発表できたと感じている。

2 つ目は前述の内容と関連して「通院中の患者はもっと色々な情報も知りたい」ということである。配布時の感想として「医療情報もあると助かる」といった声が多かった。具体的には治療方法や公的補助の申請方法など、通院中の患者にとっても有益である内容を織り込む、という事である。確かに自身が患者になったつもりで検索をしてみるとサプリメントやクリニックのHPばかりにアクセスしてしまいフラットな情報にアクセスすることが非常に困難であった。今回の企画の中では予算/時間の関係上困難であったが、海外論文の Review 紹介など、利益相反の無い内容を織り込んだ冊子を、個人的に作成することを検討している。

4. 論文及び学会発表（研究会を含む）

なし



<医学・医療関連事業助成>

助産師による産後 1 か月健診時のメンタルヘルススクリーニング実践への
影響要因の探究と評価 ～社会への普及に焦点を当てて～

小倉 果緒里

元横浜市立大学大学院 医学研究科
看護学専攻 母性看護学分野 博士前期課程

抄録

周産期のメンタルヘルスの問題は今や周知の事実であり，その中でも産後うつ
の予防・介入は喫緊の課題である。横浜市でもその重要性は大きく認識され，
助産師によるメンタルヘルススクリーニングがルーチンワークとして実施され
ている。しかしその内情は，形ばかりのスクリーニングが先行し，メンタルヘル
スケアを必要とする母親を適切に把握し介入できていない。

本事業前に申請者が行った，助産師による産後 1 か月健診時のメンタルヘル
ススクリーニング実践と関連要因の探索研究の結果を基に，適切なメンタルヘル
ススクリーニング実践，および影響を及ぼす個人・組織要因に関する課題と，
実践に向けた提言についてまとめた自由使用可能なリーフレットを作成し，適
切なメンタルヘルススクリーニング実践の必要性が高い首都圏，主要都市の総
合・地域周産期母子医療センター，総合病院計 432 施設へ郵送した。さらに横
浜市立大学母性看護学研究会ホームページに掲載し，臨床の現場で働く助産師
の，メンタルヘルススクリーニング実践技術の充実・向上をはじめとした，社
会普及につなげた。

＜医学・医療関連事業助成＞

助産師による産後 1 か月健診時のメンタルヘルススクリーニング実践への
影響要因の探究と評価 ～社会への普及に焦点を当てて～

小倉 果緒里

元横浜市立大学大学院 医学研究科
看護学専攻 母性看護学分野 博士前期課程

1. 目 的

本事業の目的は、助産師による適切な産後のメンタルヘルススクリーニング実践のための明確化した課題、および影響要因について、広く社会に公表し社会普及を図ることである。

周産期のメンタルヘルスの問題は今や周知の事実であり、その中でも産後うつ病の予防・介入は喫緊の課題である。横浜市でもその重要性は大きく認識され、助産師によるメンタルヘルススクリーニングがルーチンワークとして実施されている。しかしその内情は、形ばかりのスクリーニングが先行し、メンタルヘルスケアを必要とする母親を適切に把握し介入できていない。つまり、的確な産後のメンタルヘルススクリーニングの実施なくして、産後うつ病の問題は解決しない。申請者は本事業前の研究として、助産師による適切な産後のメンタルヘルススクリーニング実践のための課題の明確化、ならび影響を及ぼす個人・組織要因を探索した。本事業では、次のステップである明確化した課題および改善案の提案、社会普及を行った。本事業の意義は、産後のメンタルヘルススクリーニングの課題や、影響要因を広く社会に公表し普及することで、ルーチン化される助産師のメンタルヘルススクリーニングそのものを効果的内容に改善し、産後うつ病の予防に貢献するものである。

2. 方 法

研究論文「助産師による産後 1 か月健診時のメンタルヘルススクリーニング実践と関連要因の検討」を基に、適切なメンタルヘルススクリーニング実践、および影響を及ぼす個人・組織要因に関する課題と、実践に向けた提言についてまとめた自由使用可能なリーフレットを作成し、適切なメンタルヘルススクリーニング実践の必要性が高い、首都圏、主要都市の総合・地域周産期母子医療センター、総合病院計 432

施設へ郵送した。また、横浜市立大学母性看護学研究会ホームページ
 <URL: [http:// www- user.yokohama -cu.ac.jp/~bosei/wordpress/](http://www.user.yokohama-cu.ac.jp/~bosei/wordpress/)>にもリーフレットを掲載し、自由に閲覧、使用できるようにした。

3. 結 果

作成したリーフレットの内容は以下の通りである。

- ① 産後のメンタルヘルススクリーニング実施の必要性
- ② メンタルヘルススクリーニング実施の意義
- ③ 主要な研究結果
- ④ 適切なメンタルヘルススクリーニング実践、および影響を及ぼす個人・組織要因に関する課題と、実践に向けた提言



4. 考 察

今回、研究論文を基に自由使用可能なリーフレットを作成し、さらにホームページに掲載したことにより、各医療施設におけるメンタルヘルススクリーニングの学習機会に活用できるような配慮ができ、臨床で働く助産師の実践に活かせるよう還元できたと考える。

5. 論文及び学会発表

(学会発表)

小倉果緒里, 飯田真理子, 竹内翔子, 篠原枝里子, 中村幸代. (2021年3月). 助産師による産後1か月健診時の褥婦のMSの実践と関連要因の検討. 第35回日本助産学会学術集会.

(論文発表)

小倉果緒里, 飯田真理子, 竹内翔子, 篠原枝里子, 中村幸代 (アクセプト). 助産師による産後1か月健診時のメンタルヘルススクリーニング実践と関連要因の検討. 母性衛生. 63巻2号.

<指定寄附研究助成 腎臓がん関係>

超高齢化社会におけるサルコペニア評価；腎臓がんに対する適切な治療介入への試み

河原 崇司

矢尾正祐・上村博司・野口剛

横浜市立大学附属市民総合医療センター

抄録

背景：サルコペニアは、骨格筋量が少ないと定義されている。最近の研究では、サルコペニアはさまざまな癌の予後不良と関連していることが報告されている。本研究の目的は、限局性淡明細胞型腎細胞癌（ccRCC）患者の大腰筋量と無再発生存率との相関関係を評価する。

方法：2002年から2018年の間に根治的腎摘出術を受けた限局性 ccRCC の合計 316 人の男性患者を対象とした。大腰筋指数（PMI）は、軸方向 CT で腫瘍の反対側の大腰筋領域を正規化することによって計算した。これは、L4（mm²）を身長（m²）の 2 乗で割ったレベルで算出した。PMI の中央値（409.64mm² / m²）の上下で比較検討した。

結果：PMI の低いグループは、PMI の高いグループよりも無再発生存率（RFS）が低かった（ $p = 0.030$ ）。5 年間の RFS に関して、より低い PMI は再発の有意な予測因子であり（ $p = 0.022$ ）、多変量解析により、より低い PMI（ $p = 0.035$ ）、腫瘍サイズ > 4 cm（ $p = 0.044$ ）、および病期的病期 > 2（ $p < 0.001$ ）は、RFS 不良の独立した危険因子であった。

結論：サルコペニアの存在は、男性の ccRCC 患者の RFS 不良と関連していることがわかった。PMI は、患者の脆弱性の尺度として役立つ可能性があり、ccRCC の予後リスクの層別化に役立つ可能性が示唆された。

<指定寄附研究助成 腎臓がん関係>

超高齢化社会におけるサルコペニア評価；腎臓がんに対する適切な治療介入への試み

河原 崇司

矢尾正祐・上村博司・野口剛

横浜市立大学附属市民総合医療センター

1. 目 的

泌尿器科腫瘍は高齢者に多く、その治療をマネジメントは日本の健康寿命の延伸に直結する。高齢に伴い体の体幹筋肉量が低下する「サルコペニア」という概念が提唱され、近年癌の予後との関連が報告されている。横浜市大センター病院泌尿器科においても、サルコペニアを持つ群では術後合併症の割合が多く、癌の予後との相関を示すデータを報告している(PLoS One2019, BioMed Res 2018, BMC Urology 2017)。この傾向は治療の侵襲性が高いほど強く、治療選択におけるサルコペニアを指標とした治療選択の有用性が期待される。特に今まで高齢者という枠でのみ判断されていた腎臓がんの手術選択の基準が、サルコペニアを用いることでより患者個別の治療選択につながると思われる。

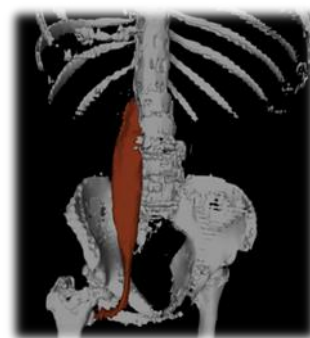
本研究では、臨床情報において泌尿器科腫瘍を持つ高齢者のサルコペニアと周術期合併症を解析し、サルコペニアの病態解明に向けて 200 例程度の SNPs 解析を行い分子メカニズム的にもアプローチしていく

2. 方 法

我々は、サルコペニアの指標とする腸腰筋の筋肉量を単純 CT から簡便に算出する方法を用いた。右図のように、単純 CT で L3 レベルの左側の腸腰筋の筋肉量を計測し、それを身長の高さの二乗で割った値を Psoas Muscle Index (PMI)としている。さらに、筋肉量だけではなく質を評価する目的として、PMI に腸腰筋の CT 値を乗じた PMI density (PMID) も併せて提唱し、より術後合併症を反映していると考えられた。

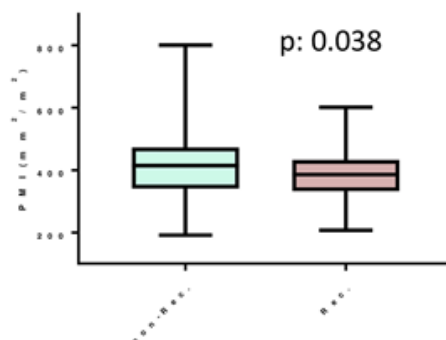


この指標は単純 CT と身長のみを用いるため、日常診療で簡便に測定できる一方で、3D 合成で腸腰筋の Volume を算出したもの（左図）と比べても、強い相関関係を持ち、十分に全身の骨格筋量を反映する指標であると考えられた。

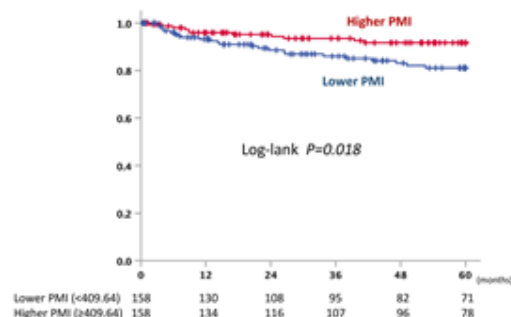


3. 結 果

PMI の低いグループは、PMI の高いグループよりも無再発生存率（RFS）が低かった（ $p = 0.030$ ）。



5 年間の RFS に関して、より低い PMI は再発の有意な予測因子であった。（ $p = 0.022$ ）、多変量解析により、より低い PMI（ $p = 0.035$ ）、腫瘍サイズ $> 4 \text{ cm}$ （ $p = 0.044$ ）、および病理学的病期 > 2 （ $p < 0.001$ ）は、RFS 不良の独立した危険因子であった。



4. 考 察

本研究から、サルコペニアが腎細胞がんの術後再発に関連する可能性が示唆された。サルコペニアが腎細胞がん以外の癌腫でも再発や予後に関連するとの報告があり、PS など含めた予後因子の可能性がありそうである。

また、近年周術期の合併症との関連も報告されており、サルコペニアの改善が予後の改善や合併症の低減にかかわるかなど検討の余地があると考えられる。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

PLoS One. 2020 Jan 2;15(1):e0226581. eCollection 2020.

Transplant Proc. 2018 Oct;50(8):2447-2450. Epub 2018 Mar 21.

Oncotarget. 2020 Sep 22;11(38):3526-3530. eCollection 2020 Sep 22.

＜指定寄附研究助成 腎臓内科学関係＞

新規 aPKC 複合体が RAP1 の活性と局在を統御する分子機構の解明と腎疾患治療への展開

佐々木和教^{1), 2)}

共同研究者：高橋秀尚¹⁾

¹⁾ 横浜市立大学大学院医学研究科分子生物学

²⁾ 順天堂大学大学院医学研究科老人性疾患病態・治療研究センター

抄録

上皮細胞の正常な生理機能の発揮には細胞極性の確立が必須であり、正しい場所での細胞間接着の形成によって細胞膜が仕切られ、細胞内のタンパク質が非対称に分布する必要がある。この細胞極性が崩壊すると、個々の細胞機能の異常から、腎臓のネフローゼ症候群などの器官障害に至る。近年、ネフローゼ症候群の病態には、低分子量 G タンパク質 RAP1 を活性化し、細胞間接着部位に局在化させる細胞極性の仕組みが関連することが分かってきた。本研究では、細胞極性制御の中心的なタンパク質 atypical protein kinase C (aPKC) のノックアウトマウスがネフローゼ症候群様の表現型を示すことを踏まえ、aPKC に結合するタンパク質を探索し、分子メカニズム解析に取り組んだ。そして、新たな aPKC 結合タンパク質として、RAP1 制御への関与が示唆される p200 を同定し、過剰発現系を用いたタンパク質結合実験から aPKC と p200 は複合体を形成すること、免疫染色から p200 が細胞間接着部位に局在することを見出した。これらの結果は、p200 が aPKC とともに細胞極性の制御に関与し、ネフローゼ症候群の病態メカニズムを解明する新たな解析視点となり得ることを示唆している。

＜指定寄附研究助成 腎臓内科学関係＞

新規 aPKC 複合体が RAP1 の活性と局在を統御する分子機構の解明と腎疾患治療への展開

佐々木和教^{1), 2)}

共同研究者：高橋秀尚¹⁾

¹⁾ 横浜市立大学 大学院医学研究科 分子生物学

²⁾ 順天堂大学 大学院医学研究科 老人性疾患病態・治療研究センター

1. 目 的

上皮細胞が正常な生理機能を発揮するためには、細胞間接着を正しい場所に形成して細胞膜を仕切り、細胞内のタンパク質を非対称に分布させ、細胞極性を確立することが必須となる。この細胞極性の破綻は、個々の細胞機能に異常をもたらし、腎臓のネフローゼ症候群をはじめとする種々の器官障害の原因となる。近年、ネフローゼ症候群の病態には、低分子量 G タンパク質 RAP1 を活性化し、細胞間接着部位に局在化させる細胞極性の仕組みが関連することが分かってきた。これまでに申請者は、細胞極性制御の中心的なタンパク質 atypical protein kinase C (aPKC) のプロテオミクス解析を進め、新たな aPKC 結合タンパク質 Shank2 (Sasaki et al., Cell Reports 2020) と p200 を見出し、aPKC が RAP1 の活性化と局在化を統御する可能性を得た。aPKC による RAP1 の活性と局在の統御機構が分かれば、ネフローゼ症候群を対象とする新たな治療薬の創薬や病態進行のバイオマーカーの開発が期待できる。本研究では、aPKC による RAP1 の統御機構とネフローゼ症候群の発症との関連性を解明することを目指し、細胞極性の制御における p200 の役割を解明することを目的とした。

2. 方 法

(1) aPKC と p200 の分子間相互作用の解析

HA タグ付き aPKC 及び FLAG-SBP タグ付き p200 の発現ベクターをトランスフェクションしたヒト胎児腎細胞 HEK293T から細胞抽出液を調整し、SBP タグを用いてアフィニティー精製を行った。細胞抽出液サンプルとアフィニティー精製サンプルを用いてウェスタンブロットを行った。

(2) 免疫染色による細胞内局在の解析

HA タグ付き p200 の発現ベクターをイヌ腎尿細管上皮細胞 MDCK にトランスフェクションし、細胞を固定後、抗体を用いて免疫染色を行った。

3. 結 果

(1) aPKC と p200 の分子間相互作用の解析

これまでに細胞極性キナーゼ aPKC に結合するタンパク質の精製と質量分析による同定作業を行い、新たな aPKC 結合タンパク質の候補として、RAP1 関連因子 p200 を見出している。この aPKC と p200 の分子間相互作用を検証するため、HEK293T 細胞での過剰発現を用いた結合実験を行った。HA-aPKC 及び FLAG-SBP-p200 を HEK293T 細胞に共発現し、SBP タグを用いて p200 をアフィニティー精製した。ウェスタンブロットの結果から、FLAG-SBP-p200 を精製した画分において、HA-aPKC のバンドが検出された (図 1)。この結果より、aPKC が p200 と確かに複合体を形成することが分かった。

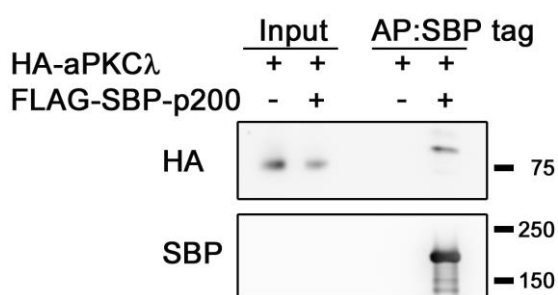


図 1. aPKC は p200 と複合体を形成する。aPKC と p200 を共発現させた HEK293T 細胞の細胞抽出液から、SBP タグを用いて p200 をアフィニティー精製し、ウェスタンブロット解析を行った。

(2) 免疫染色による細胞内局在の解析

p200 の細胞機能を探る一端として、上皮細胞における p200 の細胞内局在を検討した。HA-p200 を MDCK 細胞に発現させて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、p200 が細胞間接着部位にて ZO-1 と共局在することが分かり、p200 が細胞極性に関与する可能性が示唆された。

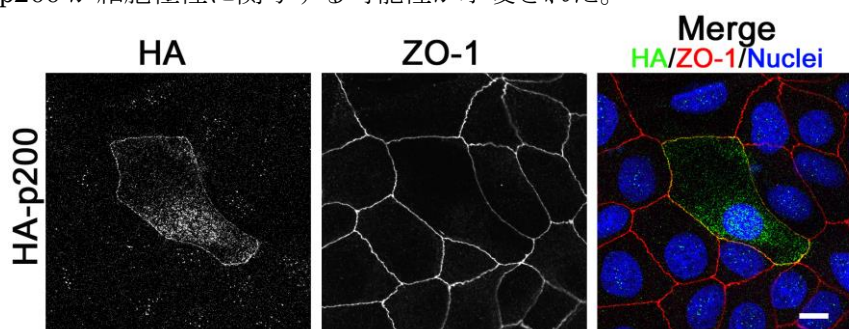


図 2. 上皮細胞における p200 の細胞内局在。HA-p200 を発現させた MDCK 細胞を固定し、HA タグ及びタイトジャンクションマーカーの ZO-1 に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

4. 考 察

近年、ネフローゼ症候群の一つである巣状糸球体硬化症の発症に、低分子量 G タンパク質 RAP1 の活性化と局在化機構の破綻が関与することが分かってきた。これまでに我々は、足場タンパク質 Shank2 が aPKC と複合体を形成し、活性化 RAP1 を細胞間接着装置に局在化させることを明らかにしている (Sasaki et al., Cell Rep. 2020)。さらに本研究から、新たに見出した p200 が aPKC と結合し、細胞間接着部位に局在することが分かった。aPKC や Shank2、p200 のノックアウトマウスは、RAP1 と同様に、巣状糸球体硬化症様の表現型を示すことが知られている。これらタンパク質が構成する分子間ネットワークの詳細を解析し、この仕組みの破綻と巣状糸球体硬化症との関連性を解明する事で、巣状糸球体硬化症に対する新たな創薬につながる可能性がある。

5. 論文及び学会発表 (研究会を含む)

論文発表

1. Miyake N*, Takahashi H, Nakamura K, Isidor B, Hiraki Y, Koshimizu E, Shiina M, **Sasaki K**, Suzuki H, Abe R, Kimura Y, Akiyama T, Tomizawa SI, Hirose T, Hamanaka K, Miyatake S, Mitsuhashi S, Mizuguchi T, Takata A, Obo K, Kato M, Ogata K, Matsumoto N*: Gain-of-Function MN1 Truncation Variants Cause a Recognizable Syndrome with Craniofacial and Brain Abnormalities. *Am J Human Genet*:106, 13-25, 2020.
2. Takahashi H*, Ranjan A, Chen S, Suzuki H, Shibata M, Hirose T, Hirose H, **Sasaki K**, Abe R, Chen K, He Y, Zhang Y, Takigawa I, Tsukiyama T, Watanabe M, Fujii S, Iida M, Yamamoto J, Yamaguchi Y, Suzuki Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Washburn MP, Saraf A, Florens L, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway RC, Conaway JW*, Hatakeyama S*: The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination. *Nat Commun*:11,1063, 2020.
3. Nozaki Y, Motomura H, Tamori S, Kimura Y, Onaga C, Kanai S, Ishihara Y, Ozaki A, Hara Y, Harada Y, Mano Y, Sato T, Sato K, **Sasaki K**, Ishiguro H, Ohno S, Akimoto K*: High PKC λ expression is required for ALDH1-positive cancer stem cell function and indicates a poor clinical outcome in late-stage breast cancer patients. *PLOS One*:15,e0235747, 2020.
4. **Sasaki K***, Kojitani N, Hirose H, Yoshihama Y, Suzuki H, Shimada M, Takayanagi A, Yamashita A, Nakaya MA, Hirano H, Takahashi H*, Ohno S*: Shank2 Binds to aPKC and Controls Tight Junction Formation with Rap1 Signaling during Establishment of Epithelial Cell Polarity. *Cell Rep*:31,107407, 2020.
5. Itai T, Hamanaka K, **Sasaki K**, Wagner M, Kotzaeridou U, Brösse I, Ries M, Kobayashi Y, Tohyama J, Kato M, Ong WP, Chew HB, Rethanavelu K, Ranza E, Blanc X, Uchiyama Y, Tsuchida N, Fujita A, Azuma Y, Koshimizu E, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Takahashi H, Miyagi E, Tsurusaki Y, Doi H, Taguri M, Antonarakis SE, Nakashima M, Saitsu H, Miyatake S, Matsumoto

N*: De novo variants in CELF2 that disrupt the nuclear localization signal cause developmental and epileptic encephalopathy. *Human Mut* 42,66-76, 2021.

6. Miyatake S, Kato M, Kumamoto T, Hirose T, Koshimizu E, Matsui T, Takeuchi H, Doi H, Hamada K, Nakashima M, Sasaki K, Yamashita A, Takata A, Hamanaka K, Satoh M, Miyama T, Sonoda Y, Sasazuki M, Torisu H, Hara T, Sakai Y, Noguchi Y, Miura M, Nishimura Y, Nakamura K, Asai H, Hinokuma N, Miya F, Tsunoda T, Togawa M, Ikeda Y, Kimura N, Amemiya K, Horino A, Fukuoka M, Ikeda H, Merhav G, Ekhilevitch N, Miura M, Mizuguchi T, Miyake N, Suzuki A, Ohga S, Saitsu H, Takahashi H, Tanaka F, Ogata K, Ohtaka-Maruyama C, Matsumoto N*: *De novo* ATP1A3 variants cause polymicrogyria. *Sci Adv* 7, eabd2368, 2021.

7. Motomura H, Ozaki A, Tamori S, Onaga C, Nozaki Y, Waki Y, Takasawa R, Yoshizawa K, Mano Y, Sato T, Sasaki K, Ishiguro H, Miyagi Y, Nagashima Y, Yamamoto K, Sato K, Hanawa T, Tanuma S, Ohno S, Akimoto K*: Glyoxalase 1 and protein kinase C λ as potential therapeutic targets for late-stage breast cancer. *Oncol Lett* 22, 547, 2021.

8. Sakamoto M, Sasaki K, Sugie A, Nitta Y, Kimura T, Gürsoy S, Cinletti T, Iai M, Sengoku T, Ogata K, Suzuki A, Okamoto N, Iwama K, Tsuchida N, Uchiyama Y, Koshimizu E, Fujita A, Hamanaka K, Miyatake S, Mizuguchi T, Taguri M, Ito S, Takahashi H, Miyake N, Matsumoto N: *De novo* ARF3 variants cause neurodevelopmental disorder with brain abnormality. *Human Mol Genet*, in press.

学会などでの発表

1. 佐々木和教, 高橋秀尚, 大野茂男 aPKC-Shank2 複合体と Rap1 シグナリングによるタイトジャンクション形成の調節 第 79 回日本癌学会学術総会 2020 年 10 月
2. 多森 翔馬, 野崎 優香, 本村 瞳, 翁長 朝太郎, 尾崎 綾栞, 佐々木 和教, 大野 茂男, 秋本 和憲 PKC λ 高発現は ALDH1A3 陽性乳癌幹細胞の非対称分裂能に関与する 日本薬学会 第 141 回年会 2021 年 3 月
3. 本村 瞳, 尾崎 綾栞, 多森 翔馬, 翁長 朝太郎, 野崎 優香, 和氣 由布子, 高澤 涼子, 吉澤 一巳, 真野 泰成, 佐藤 嗣道, 佐々木 和教, 石黒 斉, 宮城 洋平, 長嶋 洋治, 山本 紘司, 佐藤 圭子, 花輪 剛久, 田沼 靖一, 大野 茂男, 秋本 和憲 ステージ III-IV 乳癌における GLO 1 - PKC λ 共発現患者は予後不良である 日本薬学会 第 141 回年会 2021 年 3 月
4. 佐々木和教 細胞極性複合体と G タンパク質シグナリングによる上皮細胞極性の制御機構 お茶の水がんアカデミア 第 167 回集会 2021 年 5 月 (招待講演)

<指定寄附研究助成(緊急助成) 新型コロナウイルス感染症対策関係>

新型コロナウイルスに対する安全かつ迅速な機能性中和抗体評価法の開発

梁 明秀

共同研究者：宮川 敬、山岡 悠太郎

横浜市立大学大学院医学研究科 微生物学

抄録

新型コロナウイルスの感染拡大を制御するためには、臨床現場で即時かつ簡便に検査可能な抗原検査法の普及が重要である。既存の抗原検査キットには、**SARS**コロナウイルスに対するモノクローナル抗体が流用して用いられており、感度や特異度に関して、今後のウイルス変異に対して対応できなくなる等の懸念があった。そこで我々は、新型コロナウイルスにのみ反応し、**SARS**コロナウイルスを含む他のヒトコロナウイルスとの交差反応性を示さないモノクローナル抗体を樹立した。これらの抗体のエピトープを解析したところ、多数の臨床分離株の中で保存性が高い領域を認識しており、実際に、抗原性や伝搬性の増加が懸念されている**501Y.V1-3**変異株についてもプロトタイプ株と同等に検出可能であった。そして、これらの抗体を組み合わせることでサンドイッチ**ELISA**を構築し、本抗体が臨床検体中のウイルス抗原の特異的な検出に有効であることを明らかにした。さらに、これらの抗体を複数の企業に導出し、既存の検査キットよりも、性能に優れたキットを実用化することに成功した。また、**SARS-CoV-2**に対する中和抗体を迅速かつ安全に測定するアッセイ系を新規に構築した。本手法を用いることで、**COVID-19**回復者における長期的な液性免疫のフォローやワクチン接種者の各種変異株に対する中和抗体価の測定が簡便に実施可能となった。

<指定寄附研究助成(緊急助成) 新型コロナウイルス感染症対策関係>

新型コロナウイルスに対する安全かつ迅速な機能性中和抗体評価法の開発

梁 明秀

共同研究者：宮川 敬、山岡 悠太郎

横浜市立大学大学院医学研究科 微生物学

1. 目的

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の検査法のゴールドスタンダードは RT-PCR 法を中心とした遺伝子検査法である。遺伝子検査法は感度・特異度共に優れるものの、検出機器が必要なことに加えて、検出までに時間がかかるといったデメリットがある。臨床現場で即時に診断が可能な検査法として、ウイルス抗原を検出する抗原検査法を原理とした簡易迅速検査キットが各社から上市されている。抗原検出キットの性能は、特定のウイルス抗原を正確かつ高感度に検出できる高品質のモノクローナル抗体に大きく依存することが知られている。しかしながら、これまでに市販されている検査キットのほとんどは、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）だけでなく、SARS コロナウイルス（SARS-CoV）にも反応する抗体が流用されていた。そこで本研究では、新型コロナウイルスを特異的に検出するモノクローナル抗体を開発し、感度・特異度に優れた簡易迅速検出キットに応用することを目的とした。

また、本研究では、SARS-CoV-2 に対する中和抗体（nAb）を迅速かつ安全に測定できる新規アッセイ系を構築した。現在は、SARS-CoV-2 そのものやを用いたウイルス中和試験が多く用いられている。しかしながら、実施に感染力のある生ウイルスを使用するため、バイオセーフティレベル 3(BSL-3)設備を備えた特殊な実験室が必要であるほか、多検体の解析に危険が伴うなどの問題がある。また、試験期間が4~5日かかる低スループット性が問題となっている。一方、遺伝子組換えウイルスベクターを用いた中和試験（シェードウイルス法）が代替法として使用されているが、この手法でも判定に少なくとも2~3日かかるため、迅速性が低い。さらには、遺伝子組換えウイルスを使用するため、特別な実験室と熟練の検査員が必要となる。そのため、上記の中和試験に代わるハイスループットかつ安全な中和抗体検査を開発する必要がある。我々は、HiBiT タグ化したウイルス様粒子（VLP）に SARS-CoV-2 由来 SP を搭載させることで迅速かつ安全に中和抗体を測定できる手法の開発を目指した。

2. 方法

新型コロナウイルスのヌクレオカプシドタンパク質（NP）の内、他のヒトコロナウイルスとの相同性が高いN末端領域を欠損させたタンパク質（ Δ N-NP）をコムギ胚芽無細胞系により合成し、Niカラムにより精製した後、これを免疫源としてBALB/cマウスに注射した。免疫したマウスからリンパ球を回収し、ミエローマと融合させて144種類のハイブリドーマを作出した。作製したハイブリドーマについて、一次スクリーニングとして、間接ELISA、AlphaScreen、OctetRed96による親和性測定により解析し、二次スクリーニングとして、ウェスタンブロット法により各ヒトコロナウイルスのNPとの交差反応性を解析し、SARS-CoV-2と特異的に反応するクローンを選択した。抗体のエピトープを、欠損変異体を用いたELISA法により解析し、ホモロジーモデリングにより構築したNPの立体構造を用いてその局在を調べた。また、各抗体について、OctetRED96により解離定数を算出するとともに、培養ウイルスの免疫染色および剖検例の免疫組織化学染色への適用性を調べた。加えて、種々の臨床分離株におけるエピトープ配列の保存性を調べるため、NCBIデータベースからゲノム配列を入手してアラインメントし、各部位におけるシャノンエントロピーを解析した。抗体の組み合わせを検討し、抗原検出サンドイッチELISAを構築した。そして、サンドイッチELISAの検出限界を算出するとともに、呼吸器感染症を引き起こすウイルスとの交差反応性の有無を調べた。さらに、COVID-19の行政検査の残検体（PCR陰性72件、陽性72件）を供して、ROC曲線解析を行い、感度・特異度を調べた。各抗体を企業に導出し、簡易抗原検出キットの実用化を試みた。

中和抗体測定法の開発においては、HiBiTタグ化したVLPを用いて迅速かつ安全にSARS-CoV-2に対する中和抗体が測定できることを示した。実際の感染性ウイルスや遺伝子組換えウイルスを使用せず、ウイルスの殻だけからなるVLPを作製し使用することで、従来法と比較して極めて迅速かつ安全に、従来法と同程度の精度で中和抗体を測定できた。

3. 結果

1) 新型コロナウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体の作製

まず、抗原タンパク質として、NPの内、他のヒトコロナウイルスとの相同性が高いN末端領域を欠損させたタンパク質（ Δ N-NP）をコムギ無細胞タンパク質合成系により可溶性のタンパク質として大量に調製した。Niカラムにより精製した後、これを免疫源としてBALB/cマウスに注射した。免疫したマウスからリンパ球を回収し、ミエローマと融合させて144種類のハイブリドーマを作出した（図1A）。作製したハイブリドーマについて、一次スクリーニングとして、間接ELISA、AlphaScreen、OctetRed96による親和性測定により解析し、抗原との反応性と親和性の高い12クローンを選択した（図1B）。そして、二次スクリーニングとして、ヒトコロナウイルスのNPタンパク質との交差反応性をウェスタンブロット法により解析し、SARS-CoV-2とのみ反応する3つのクローン（#7, 9, 98）を選択した（図1C、

D)。

次に、SARS-CoV-2のNPの欠失変異体を作製し、間接ELISA法によるエピトープマッピングを行い、抗体の結合部位を解析した。その結果、今回開発した抗体は、NPの3つの異なる領域を認識し、#7は210-231aa、#9は335-348aa #98は382-397aaに結合した (図1E)。

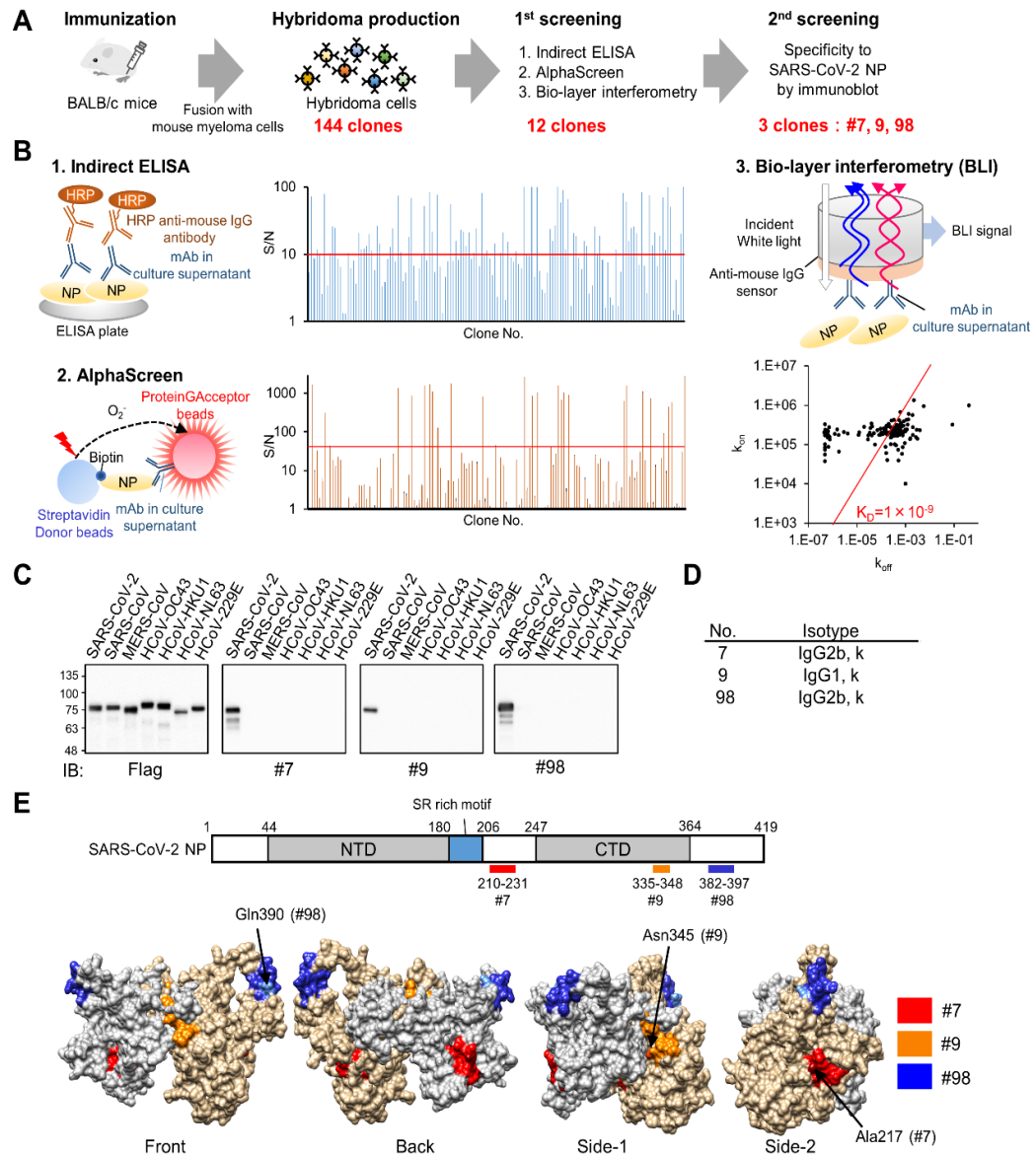


図1 NPに対するモノクローナル抗体の作製

(A) モノクローナル抗体の作製の概要 (B) 間接 ELISA、AlphaScreen、Bio-layer interferometry (BLI) による抗体のスクリーニング。赤線はスクリーニングのカットオフラインを示す、ELISA : S/N=10、AlphaScreen : S/N=40、BLI : $K_D=1.0 \times 10^9$ (C) ウェスタンブロットによる抗体の特異性解析 (D) 選択した抗体のアイソタイプ (E) SARS-CoV-2-NP のドメイン構造と抗体のエピトープの模式図。NTD: N-terminal ドメイン、LKR: フレキシブルリンカー領域、CTD: C-terminal ドメイン。SARS-CoV-2 NP の部分構造 (PDB ID.6yun, 6m3m) を用いたホモロジーモデリングにより構築した、全長の二量体を形成する NP の立体構造モデルにおけるエピトープの位置。

2) 抗体の性状解析

次に、選択した抗体についてNPとの解離定数 (K_D) をOctetRed96を用いて測定したところ、#7 : 4.4×10^{-10} 、#9 : 3.7×10^{-10} 、#98 : 1.6×10^{-10} であり、いずれも抗原と高い親和性を示した (図2)。

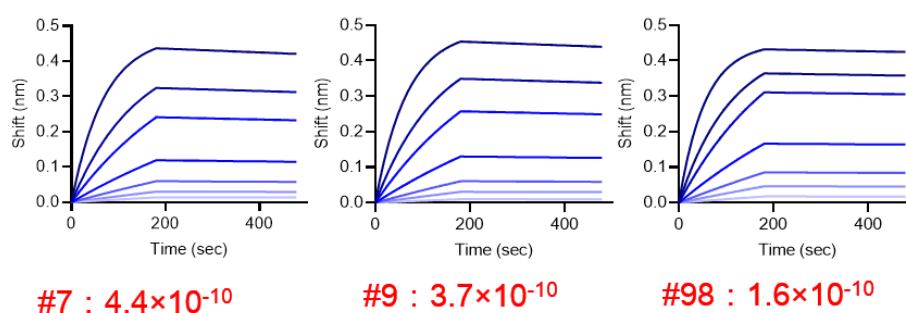


図2 各抗体の解離定数の測定

続いて、SARS-CoV-2を感染させたVero E6-TMPRSS2細胞を用いた免疫蛍光染色で、これらのmAbの適用性を検証したところ、#7と#98は、感染細胞のNP抗原を特異的に染色できた (図3A)。さらに、mAb #98は、COVID-19患者のパラフィン包埋肺組織を用いた免疫組織化学的解析により、感染細胞中のNP抗原を検出することができた (図3B)。

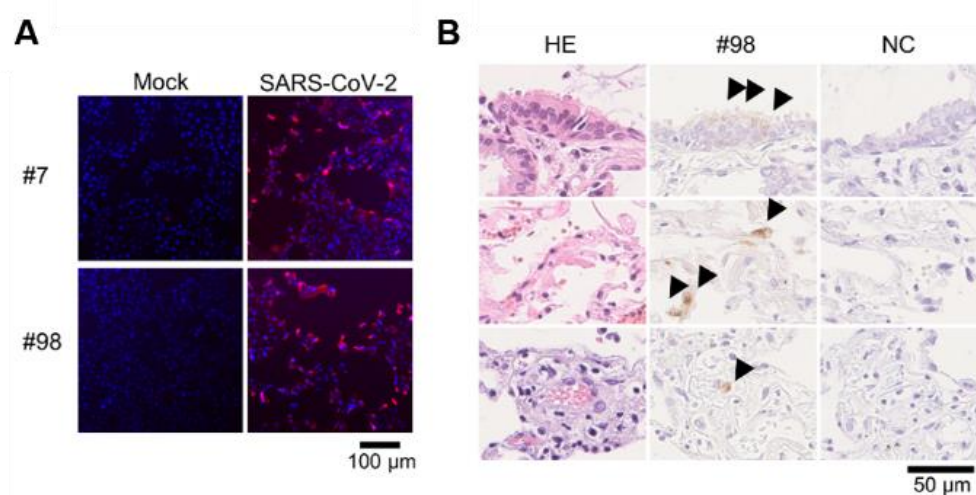


図3 抗体を用いた免疫染色/免疫組織化学染色によるウイルス抗原の検出

(A) VeroE6/TMPRSS2細胞にSARS-CoV-2に感染させ、各抗体 (赤) およびDAPI (青) で蛍光免疫染色した。(B) COVID-19の症例から採取したパラフィン包埋肺生検標本を、抗体を用いて免疫組織化学染色した。気管支上皮細胞 (上)、肺細胞 (中)、内皮細胞 (下) に陽性のシグナル (矢頭) が認められた。

3) 多様なSARS-CoV-2の分離株に対する抗体の反応性の予測

次に、種々の臨床分離株に対する抗体の反応性を予測するため、データベース上から約8,000のSARS-CoV-2のゲノム配列を入手し、NPの領域を抽出してアラインメントし、シャノンエントロピーにより各アミノ酸部位の保存性を調べた。その結果、各抗体が認識するエピトープ領域は変異が少なく、保存性が高い領域であった。加えて、抗原性や伝搬性の増加が懸念されている501Y.V1-3をはじめとする変異株においても、エピトープのアミノ酸配列は保存されていた（データ未掲載）。

4) 抗原検出サンドイッチELISAの開発

続いて、開発した抗体を組み合わせることで、NP抗原を検出可能なサンドイッチELISAを構築した。構築したELISAの検出限界を調べたところ、組換えNPタンパク質で3.2 pg/mL、培養ウイルスで 3.3×10^4 copies/mLであった。ヒトコロナウイルスや呼吸器感染症を引き起こすウイルスとの交差反応性を調べたところ、これらとは交差反応を示さず、SARS-CoV-2だけを特異的に検出可能であった（図4A）。一方で、501Y変異を有する3種類の変異株との反応性を調べたところ、構築したサンドイッチELISAで、いずれの変異株のウイルスも検出することが可能であった（図4B）。

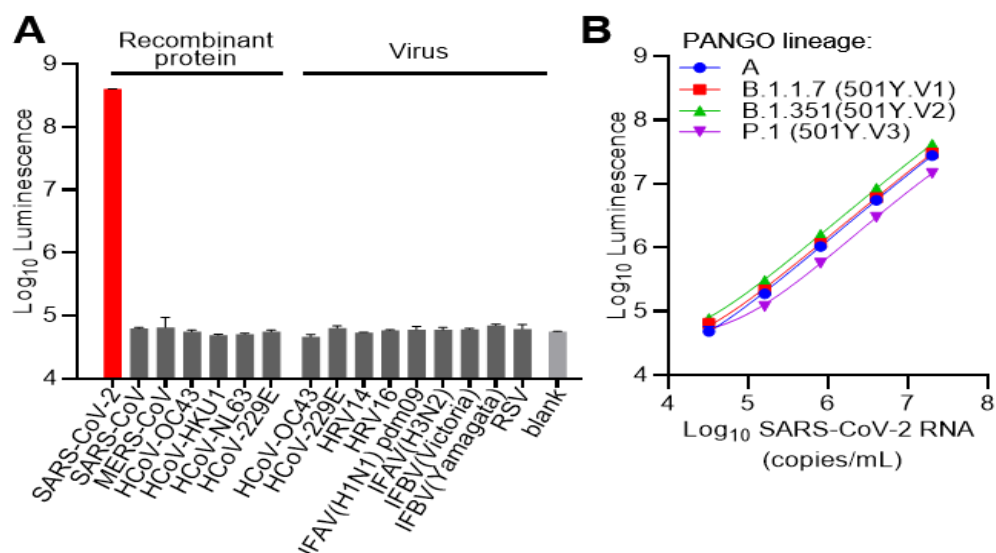


図4 開発した抗原検出サンドイッチELISAの特異性

(A) 各ヒトコロナウイルスの組換えNPタンパク質および、呼吸器感染症を引き起こすウイルスとの交差反応性 (B) 各変異株に対する反応性

次に、構築したELISAにCOVID-19の行政検査の残検体を供し、ROC曲線解析を行って感度・特異度を算出した。その結果、特異度は100.0%、感度は75.0%であった。また、各検体

について、遺伝子検査法で測定された各Ct 値での感度を調べたところ、Ct<28未満では100%、Ct:28-31では92.3%、Ct>31では32.0%であった。

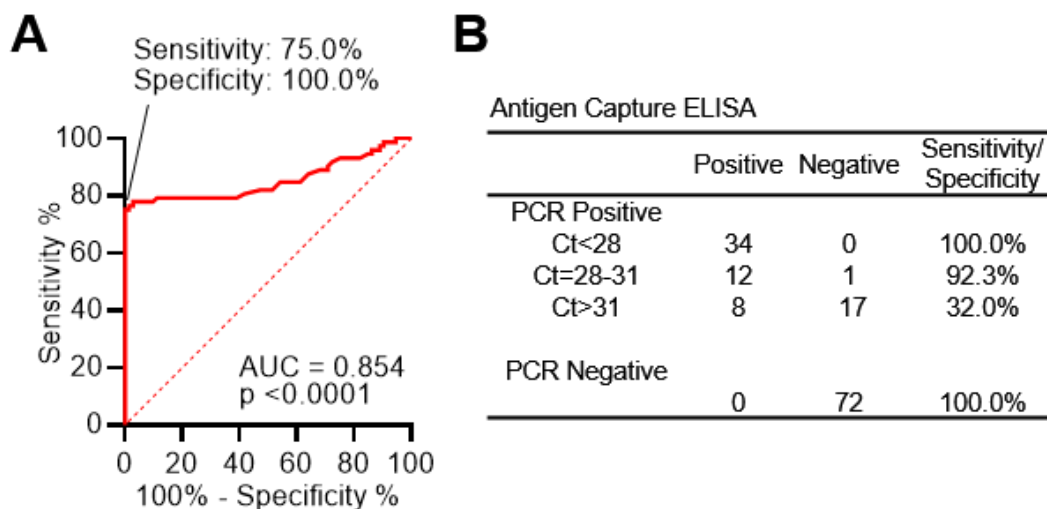


図5 開発した抗原検出サンドイッチELISAを用いた臨床検体の検出

(A) ROC曲線解析 (B) (B) RT-PCR法で判定された検体毎の感度・特異度

5) 抗体を用いた簡易迅速抗原検出キットの開発と実用化

これらの抗体を複数の企業に導出し、簡易迅速抗原検出キットの開発を試みた。これまでに、複数の企業に抗体を提供し、可能性検討を実施している。この内、富士フイルムとキャノンメディカルシステムズ株式会社については、既存キットよりも優れた性能を示すキットが開発できており、PMDAによる体外診断薬としての承認が得られている。

6) SARS-CoV-2中和抗体の迅速測定法「hiVNT (HiBiT-tagged Virus-like particle Neutralizing antibody Test)」の確立

本システムは、表面にSARS-CoV-2スパイクタンパク質を、HiBiTタグ付けされたVLPとLgBiTを安定的に発現するVeroE6/TMPRSS2細胞を組み合わせる。VLP表面上のスパイクタンパク質が、ヒト細胞のアンギオテンシン変換酵素-2 (ACE2) 受容体に結合すると、VLP膜と宿主細胞の膜が融合し、VLPを構成するカプシドタンパク質が細胞内に取り込まれる。その後、HiBiTとLgBiTが相互作用してNanoLuc発光酵素が形成される。したがってNanoLuc酵素の発光を指標に、わずか3時間でVLPの細胞侵入量の測定が可能となった。実際にCOVID-19の回復期患者血清11例を用いた検証では、すべての例でNanoLuc発光の顕著な減少が認められた。

4. 考察

これまでに市販されている抗原検出キットは、そのほとんどがSARS-CoV-2だけでなく、

SARS-CoVにも反応する抗体が使用されている。本研究では、抗原検査法への活用を目的として、SARS-CoV-2だけを特異的に、かつ高い親和性で結合するモノクローナル抗体の開発に成功した。本抗体のエピトープはNPの立体構造において分子表面に存在していることから、変性処理等を行うことなく、ウイルス抗原の検出が可能であると考えられた。また、本抗体のエピトープは、現在懸念されている変異株を含む種々の臨床分離株で保存されている領域であり、多様なウイルス株に対して広範に反応を示すと推察された。

これらの抗体を用いた抗原検出サンドイッチELISAは、他のヒトコロナウイルスを含む呼吸器感染症を引き起こすウイルスと反応しない一方で、臨床検体中のウイルス抗原を高感度に検出可能であった。実際に、本抗体を用いることで、既存の抗原検査キットよりも性能に優れた検査キットの実用化に成功した。以上から、本抗体は、抗原検出キットの開発に有効な性能を示すと考えられた。

また、本研究では、ハイスループット中和試験法hiVNTシステムを確立した。本手法は、症候性または無症候性COVID-19感染からの回復期血清中のSARS-CoV-2 中和抗体の迅速定量のための単純、ハイスループット分析システムとして活用できる。今後、本手法は防御免疫を持つ個人の同定、集団感受性研究に関する疫学的研究、治療効果やワクチン評価においても大いに役立つことが期待される。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

（論文）

Yamaoka Y, Miyakawa K, Jeremiah SS, Funabashi R, Okudela K, Kikuchi S, Katada J, Wada A, Takei T, Nishi M, Shimizu K, Ozawa H, Usuku S, Kawakami C, Tanaka N, Morita T, Hayashi H, Mitsui H, Suzuki K, Aizawa D, Yoshimura Y, Miyazaki T, Yamazaki E, Suzuki T, Kimura H, Shimizu H, Okabe N, Hasegawa H, Ryo A. Highly specific monoclonal antibodies and epitope identification against SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen for accurate diagnosis of COVID-19. *Cell Reports Medicine*. 2(6):100311, 2021.

Miyakawa K, Jeremiah SS, Ohtake N, Matsunaga S, Yamaoka Y, et al.: Rapid quantitative screening assay for SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using HiBiT-tagged virus-like particles. *J Mol Cell Biol*, 12(12):987-990, 2021.

＜先導的教育事業助成＞

オンライン Problem based learning (PBL) を用いた臨床実習の取り組み

原 悠

横浜市立大学大学院医学研究科 呼吸器病学

抄録

新型コロナウイルス感染症拡大に伴い、オンライン方式での医学教育の必要性は日々増しており、より効果的な医学教育の方略が模索されている。当教室では、ハワイ大学 (John A. Burns School of Medicine : JABSOM) において実践されている problem based learning (PBL) (JABSOM PBL) を病棟実習の一部として 2019 年度より導入しており、さらにコロナ禍において、オンライン方式に改良し、病棟実習の代替教育ツールとして実施している。本稿では、オンライン方式 JABSOM PBL の詳細と通常の PBL との相違点および今後の課題について概説する。

＜先導的教育事業助成＞

オンライン Problem based learning (PBL) を用いた臨床実習の取り組み

原 悠

横浜市立大学大学院医学研究科 呼吸器病学

1. 目 的

2020 年 4 月に新型コロナウイルス感染症拡大に伴い、本邦において緊急事態宣言が発出された。その感染症の拡大は、5 月中旬から 6 月初旬にかけて一時的に収束の傾向を認めたが、再び拡大傾向にあり、各医療機関における患者診療やそれに関連した院内感染対策の整備は急務となっている。その状況下において、院内感染対策の観点から、医学生のカンパイドにおける患者診察実習の実施も大きな制約を受けており、病棟実習の代替ツールとしてのオンライン方式医学教育の導入を行う大学医療機関が増えてきている。

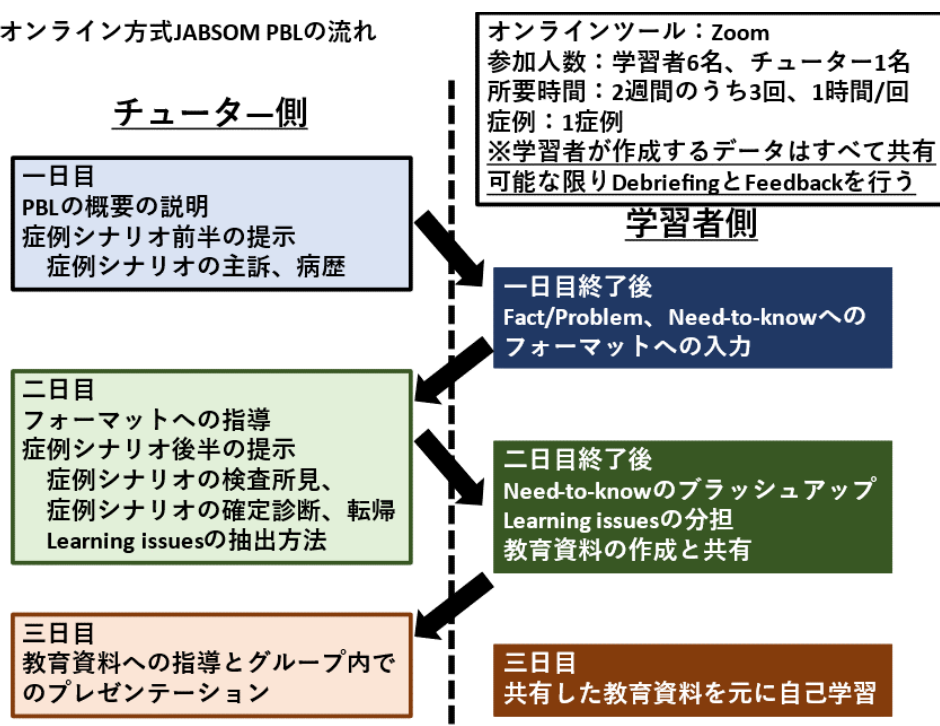
横浜市立大学大学院医学研究科呼吸器病学教室では、ハワイ大学 (John A. Burns School of Medicine : JABSOM) において実践されている problem based learning (PBL) (以下 JABSOM PBL とする) を、2019 年度より病棟実習の一部として導入しており、コロナ禍において、その教育技法をオンライン方式に改良し (以下オンライン方式 JABSOM PBL とする)、病棟実習の代替教育ツールとしての可能性を検証した。本稿では、オンライン方式 JABSOM PBL の詳細と通常の PBL との相違点および今後の課題についても検証した。

2. 方 法

臨床実習にてローテートする学生実習班ごとに、オンライン PBL を実施する。3 週間の実習期間内で 2 症例の PBL を行った。1 症例につき 3 回 (1 時間/回) の PBL レクチャーを行った。加えて、オンライン PBL

と通常の PBL の特徴に関する差を見出し、今後の教育ツールとしての有用性を検証した。なお、以下にオンライン PBL の方略を示す。

図. オンライン方式JABSOM PBLの流れ



3. 結 果

通常の PBL とオンライン JABSOM PBL 両者の相違点を表に示す。講義形式については、前者（通常の PBL）が対面での小グループ討論である一方、後者（オンライン JABSOM PBL）は、オンライン方式で行うため、講義回数は必然的に多くなる。討論の相手は、後者の場合、学習者のみならずチューターとの討論も加わるため、より多角的で、臨床に即した実質的な討論が可能となる。すなわち、後者では、学習者間のみならず学習者とチューター間の collaborative learning も重要となり、チューターは、通常の PBL で用いられる「徹底的討論法」に固執するのではなく、臨床現場で要求される、①蓋然性の高い鑑別診断の列举、②情報収集が比較的容易な検査と時間的、人的、侵襲度的に情報収集が難しい検査、③治療や治療後の経過観察における現実的対応等を、学習者に示すことで、臨床の現場感覚や臨場感をより正確に表現することが必要である。チューターはオンライン JABSOM PBL における指導的立場であるのみならず、実際の臨床現場での「指導医」としての役割も担う。学習効果については、前者の場合、学習へのモチベーションや医学知識の到達レベルの個人差が原因となり、学習効果に偏りが生じる可能性がある。これは、PBL において極めて重

要な学習の能動性の低下にもつながる。記憶の定着率については、後者の場合、教育資料作成を通じた学習のみならず、フォーマットを各自作成することから、前者より高いと考えられる。後者において注意すべきは、オンラインを通じたグループ討論であるため、学習の個別性が強調される可能性があり、チューターは常に collaborative learning を意識したマネージメントが要求される。チューターのエフォートは、後者で大きい。これは、フォーマット等の共有作業の負担のほか、メールなどを通じた学習者へのフィードバック時間なども要するため、PBL へかけるエフォートは必然的に高くなる。

表. 通常のPBLとオンライン方式JABSOM PBLの相違点

	通常のPBL	オンライン方式JABSOM PBL
講義形式		
講義回数	少	多
提出フォーマット	1フォーマット/グループ	1フォーマット/学習者
開催形式	小グループ討論	オンライン方式での小グループ討論
討論の相手	学習者同士>チューター	学習者同士=チューター※
学習効果		
教育効果の偏り	大	小
学習の能動性	小～中	大
学習の個別性	小	中
記憶の定着	中	大
臨床で向き合う学習環境との類似性	中	大
チューターのエフォート		
教材の作成の負担	中	中
フォーマット等共有作業	—	中
PBLにかかる時間	中	大

※チューターは学習における指導的立場であるのみならず、「指導医」としての役割も担う

4. 考 察

オンライン JABSOM PBL で目指すものは、通常の PBL で強調されている学習者間の collaborative learning に加え、臨床経験を有するチューターとの collaborative learning の要素も加わり、より実際の診療に近い臨床推論を展開することが可能となり、かつ、学習の偏りがない点で、学習効果の均一化も期待できる。通常の PBL における「徹底的検討法」とは異なり、蓋然性の高い鑑別診断への「仮説演繹法」を行うことで、臨床現場で活用可能な思考過程を身に付けることができ、検査結果の評価やその後の治療方針の決定等についても、「指導医」としてのチューターとの collaborative learning と効果的なメタ認知を通

して洗練されることで、病棟実習の代替教育ツールとして有効な方略として大いに期待できると考える。

オンライン方式 JABSOM PBL の方略については、一般社団法人日本呼吸器学会ホームページにて「学生臨床実習教育資材」

(https://www.jrs.or.jp/modules/guidelines/index.php?content_id=134) として取り寄せ可能となっており、コロナ禍における病棟実習の代替ツールとして汎用されることが期待される。なお、その教育効果、チューターのエフォートの観点での、通常の PBL との比較検証は今後の課題である。また、現在は 6 名/回の人数で実施しているが、ブレイクアウトルームなどのオンライン上でのグループ討論機能を用いた講義規模の拡大の実効性についても検証すべきである。PBL の利点は、教育対象や教育内容を自由に設定できることから、病棟実習の学生に限らず、医学生低学年あるいは初任実務研修医など幅広い対象への流用も可能であるが、学習者のみならず、チューターの指導も極めて重要であり、より体系的な指導法を通した普及が望まれる。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

（学会発表）

ヘルスケアワーカーキャリア学会ワークショップ（2020 年 8 月 23 日 web 開催）

（論文）

原悠、稲森正彦ら. 病棟実習の代替教育ツールとしてのオンライン方式 JABSOM PBL の実践～横浜市立大学医学部における試み～ 横浜医学. 2021. 72. 89-92.

＜先導的教育事業助成＞

遠隔共用試験（CBT 及び OSCE）実施に向けた調査と準備

飯田 洋

横浜市立大学医学部 医学教育学

【抄録】

臨床実施開始前（4 年生）の CBT と OSCE は、医師でない医学生がクリニカル・クラークシップで医行為を実施することが医師法第 17 条に抵触する可能性があり、その違法性を阻却するために必要な総括評価である。しかし、2020 年 3 月に新型コロナウイルス感染に関する緊急事態宣言が発出され、感染防御の観点、人的・物的資源難などから、従来通りの共用試験の実施が困難となった。2020 年 5 月 13 日に公益社団法人医療系大学間共用試験実施評価機構から「医学系共用試験実施における新型コロナウイルス感染症対応について」が発信された。新型コロナウイルス感染症に対応した共用試験の実施が特例として認めるといった内容であった。

横浜市立大学が首都圏にある大学であること、新型コロナウイルスの感染状況を考慮すると、三密（密閉・密集・密接）となる従来通りの共用試験（特に OSCE）の従来通りの実施は困難と考えられた。そこで本研究では、三密とならない遠隔共用試験（2020/11/12,13 CBT 及び 2020/12/6 OSCE）実施を検討し実施したので、考察を加えて報告する。

臨床試験実施前 OSCE について、まず検討した。各ステーション（医療面接、頭頸部、胸部、バイタルサイン、腹部、神経、外科系基本手技、救急）毎に、三密となる状況を確認した。その後、遠隔で実施可能であるか、実施可能であればどのような人的資源、物的資源（機器、シミュレーターなど）が必要かをステーション責任者・認定評価者と相談し、列挙した。実際に、医療面接であれば模擬患者と受験者は別の部屋におり、パソコン画面でオンライン医療面接を行った。評価者は別の部屋にて評価を行った。CBT においては、例年 1 日で実施していたところを、学生を 1/2（教室内の収容人数を 1/2 未満）として 2 日にわけて実施をした。OSCE、CBT とともに円滑に実施された。

このように共用試験を実施することで、新型コロナウイルスにおける感染防御に配慮した運営が可能となった。With コロナ時代において、これら感染防御に配慮した運営は新しい遠隔共用試験の実施方法として重要である。

＜先導的教育事業助成＞

遠隔共用試験（CBT 及び OSCE）実施に向けた調査と準備

飯田 洋

横浜市立大学医学部 医学教育学

【目的】

臨床実施開始前（4 年生）の CBT (Computer Based Testing) と OSCE (Objective Structured Clinical Examination) は、医師でない医学生がクリニカル・クラークシップで医行為を実施することが医師法第 17 条に抵触する可能性があり、その違法性を阻却するために必要な総括評価である。しかし、2020 年 3 月に新型コロナウイルス感染に関する緊急事態宣言が発出され、感染防御の観点、人的・物的資源難などから、従来通りの共用試験の実施が困難となった。2020 年 5 月 13 日に公益社団法人医療系大学間共用試験実施評価機構（以下機構）から「医学系共用試験実施における新型コロナウイルス感染症対応について」が発信された。新型コロナウイルス感染症に対応した共用試験の実施が特例として認めるという内容であった。

横浜市立大学が首都圏にある大学であること、新型コロナウイルスの感染状況を考慮すると、三密（密閉・密集・密接）となる従来通りの共用試験の従来通りの実施は困難と考えられた。そこで本研究では、三密とならない遠隔共用試験の実施を検討し、問題点を抽出の上、円滑な実施を目的とする。

【対象と方法】

知識試験である CBT について、例年であれば看護棟 4 階の情報処理室において 90 名を着席の上 1 日で実施していたが、社会的距離の確保が難しいことがわかった。CBT はパソコンを使用した試験であるため、学内で厳格実施可能な教室が福浦キャンパスにおいては、看護棟 4 階だけであることより、学生を 1/2 として 2 日にわけて実施する方向で検討した。

実技試験である臨床試験実施前 OSCE について、各ステーション（医療面接、頭頸部、胸部、バイタルサイン、腹部、神経、外科系基本手技、救急）毎に、三密となる状況を確認した。その後、遠隔で実施可能であるか、実施可能であればどのような人的資源、物的資源（機器、シミュレーターなど）が必要かをステーション責任者・認定評価者と相談し、列挙した。

【結果と考察】

大学内でよく検討の上、CBTは2日にわけて行うことが決定した。換気を行い、社会的距離をとり遮蔽版をおくなどの対策を、機構と相談し実施方法を決定した。

CBTを2020/11/12,13に学生を1/2（教室内の収容人数を1/2未満）として2日にわけて実施をした。CBTは学生が1人1台のコンピューターに向かい、画面に出てくる問題にコンピューターの操作によって解答するというものである。受験者の一人ひとりに無作為に抽出された問題を出題する方式なので、それぞれ異なる問題を解くことになるため、1日目に受験した学生と2日目に受験した学生に有利不利がないため、2日にわけて実施することが可能であった。

一方OSCEは本学の全学生が同じ課題を受験するため、情報漏洩対策のため、試験が終了した学生とこれから試験に臨む学生が接触しないよう導線を組んでおり、CBTのように学生1/2にして2日にわけるとするのは難しかった。3密を回避するために、換気のできる大教室を使用、評価者数を減らす、模擬患者を遠隔にする、できるだけシミュレーターを用いるといった基本方針を定め、機構と相談し実施方法を決定した。

OSCEを2020/12/6に実施した。医療面接ステーションでは、模擬患者と受験者は別の部屋において、パソコン画面でオンライン医療面接を行った。評価者は別の部屋にて評価を行った。頭頸部、胸部、バイタルサイン、腹部、神経、外科系基本手技、救急ステーションにおいては、大教室で行い、評価者数を減らし、シミュレーターを用いることで実施をした。

OSCE、CBTともに円滑に実施された。

【おわりに】

上記のように共用試験を実施することで、新型コロナウイルスにおける感染防御に配慮した運営が可能となった。With コロナ時代において、これら感染防御に配慮した運営は新しい遠隔共用試験の実施方法として重要である。

【論文および学会発表】

なし