

令和3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 17 グループ(平成 31 年度～令和 3 年度継続助成終了)

- ① 高 橋 秀 尚4
「新規の転写伸長制御因子 Med26 の機能解明」
- ② 藩 龍 馬9
「自己免疫疾患における形質細胞様樹状細胞の機能疲弊についての解析」

II わかば研究助成

- ① 杉 森 慎 (令和3年度).....15
「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」
- ② 雫 石 早矢佳19
「ナノルシフェラーゼ二分子技術を応用した肺炎球菌の細胞内ダイナミクスモニタリング法の開発」
- ③ 黒 羽 一 誠 (研究途中のため報告書掲載は令和5年度予定)
「精子幹細胞の運命決定に関わるエピジェネティクス関連分子の翻訳制御機構」
- ④ 金 口 翔23
「アンジオテンシン受容体機能調節因子による AKI-to-CKD の新規治療戦略」
- ⑤ 大 場 敬 義27
「ヒト iPS-関節オルガノイドを用いた新規変形性関節症モデルの開発」
- ⑥ 窪 田 瞬32
「神経変性疾患の凝集体形成における SGTA の機能解析」
- ⑦ 三 宅 茂 太36
「脳室内にホルマリン投与を追加するチール法変法による頭頸部解剖実習に適した固定法の開発」

III 医療技術研究助成

- ① 眞 鍋 千 恵40
「全身麻酔による概日リズムのずれに対するメラトニン受容体作動薬ラメルテオンの同調効果の検討」
- ② 田 中 瞳 (研究途中のため報告書掲載は令和5年度予定)
「高齢者療養型施設の誤嚥防止の取り組みと介護職が感じる困難についての実態調査」

- ③ 村 上 直 樹44
「SARS-CoV-2 感染症のスクリーニングにおける SARS-CoV-2 抗原試薬の有用性の評価」

IV 医学・医療関連事業助成

- ① 藤 本 久 江（学位審査中のため報告書掲載は令和5年度予定）
「妊婦の適切な栄養摂取を促進する個別教育プログラムを用いた介入効果」
- ② 佐 藤 純 人（研究途中のため報告書掲載は令和5年度予定）
「ストーマ保有者において非透明ストーマ袋が主観的ウェルビーイングに及ぼす影響に関する研究」
- ③ 西 井 鉄 平50
「COVID-19 流行下において集合型チーム医療研修をオンライン化する取組み」
- ④ 土 肥 眞 奈54
「多方面のアプローチを必要とするエンド・オブ・ライフ (EOL) 期を見据えた高齢心不全患者への専門・認定看護師による看護の実践」

V 指定寄附研究助成

がん研究

- ① 立 石 健 祐58
「BRAF 変異腫瘍に対する分子標的治療克服を目指したトランスレーション研究」
- ② 加 藤 真 吾64
「がんゲノム医療を補完する臓器横断的がん患者モデルパネルの開発」

VI 新型コロナウイルス感染症診療支援事業

- ① 古 谷 良 輔70
「地域障がい者支援施設や障がい者グループホームに向けた新型コロナウイルス感染症に関する出張勉強会」
- ② 奈 良 典 子78
「COVID-19 患者における血小板機能解析」

VII 先導的教育事業助成

- ① 飯 田 洋84
「国際認証(分野別認証評価)への対応、Institutional Research (IR) システム構築のための調査と準備」

VIII 学術講演会助成

- ① 中 村 幸 代87
「第 35 回神奈川母性衛生学会総会ならびに学術集会」

※目次の課題名等は原則研究助成申請時のものです。

<推進研究助成>

新規の転写伸長制御因子 Med26 の機能解明

高橋 秀尚

廣瀬 智威、鈴木 秀文

大学院医学研究科 分子生物学分野

われわれはメディエーター複合体のサブユニット Med26 が、転写伸長因子複合体 Super elongation complex (SEC) や Little elongation complex (LEC) を、それぞれ異なる遺伝子領域にリクルートし、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の転写速度 (伸長動態) を制御することを明らかとしてきた。【[Takahashi H, et. al. *Cell* 146\(1\), 2011](#)】【[Takahashi H, et. al. *Nat Commun* 6, 5941, 2015](#)】。

本研究の遂行によって、Med26 と SEC はポリ A のある mRNA の転写を制御し、Med26 と LEC はポリ A の無い遺伝子の転写を制御することを明らかとした【[Takahashi H, et al. *Nat Commun*, 11\(1\):1063, 2020](#)】。さらに最近、Med26 が LEC と共に、ポリ A 付加シグナルの前に Pol II を一時停止させ、転写を終結させることで、mRNA にポリ A が付加されないように制御することを明らかにした【[Suzuki H, Takahashi H \(責任著者\), et al. *Nat Commun*, 13\(1\):2905, 2022](#)】

<推進研究助成>

新規の転写伸長制御因子 Med26 の機能解明

高橋 秀尚

廣瀬 智威、鈴木 秀文

大学院医学研究科 分子生物学分野

1. 目 的

全てのタンパク質をコードする遺伝子や non-coding RNA 遺伝子は RNA ポリメラーゼ II (Pol II) によって転写される。近年、ゲノムワイドな ChIP (クロマチン免疫沈降) シークエンスなどの解析により、遺伝子によっては、転写開始後に Pol II がプロモーター近傍 (転写開始点から 20~50 塩基下流) で一時停止していることが明らかになり、遺伝子発現の制御において転写伸長や転写終結のプロセスが非常に重要な役割を果たしていることがわかってきた。Pol II のプロモーター近傍における一時停止の解除には、P-TEFb や ELL/EAF などの転写伸長因子の働きが必要である。

われわれはこれまでにメディエーター複合体のサブユニット Med26 が、その N 末端ドメイン (NTD) によって、転写伸長因子を P-TEFb や ELL/EAF を含む複合体 “Super elongation complex” (SEC) と結合し、c-Myc や Hsp70 などのがん関連遺伝子において、転写伸長を促進することを明らかにした【[Takahashi H, et al. *Cell*, 146\(1\), 92-104, 2011](#)】。さらに、申請者は Med26 の NTD と結合するもう一つの新規複合体 “Little elongation complex” (LEC) を同定した。解析を行ったところ、Med26 を含むメディエーター複合体は LEC と結合することによって、small nuclear RNA (snRNA) 遺伝子において転写伸長を促進することがわかった【[Takahashi H, et al. *Nat Commun* 6, 5941, 2015](#)】。

この時、Med26 が、遺伝子によって SEC と LEC を使い分ける意義やその機構に関して未知であり、本研究ではその解明を目指した。

2. 方 法

(1) SEC がポリ A のある遺伝子の転写を制御し、LEC がポリ A のない遺伝子の転写を制御するのかについて解明する。

・SEC や LEC によって制御される遺伝子を、ChIP-seq 解析や RNA-seq 解析によって網羅的に明らかにする。

(2) LEC がポリ A のない遺伝子の転写を制御するメカニズムを明らかにする。

・Med26 や LEC の機能を阻害することによって、転写が正常に終結されず、Pol II による Read through (読み過ぎ) が起こる遺伝子を Precise run on sequence 解析 (Pro-seq) によって網羅的に解明する。これまでの解析から、LEC は snRNA 遺伝子や複製依存的ヒストン遺伝子の転写終結点において、ポリ A 付加シグナルの前に転写を終結させ、さらに、RNA の 3'末端プロセッシングを促進する可能性が考えられた。そこで、本研究では LEC の機能は抑制した細胞を用いて Precise Run On-seq 解析を行い、LEC がポリ A の無い遺伝子においてポリ A 付加シグナルの前に転写を終結させ、ポリ A 付加を抑制するのかを解明する。さらに、LEC と結合する転写関連タンパク質を網羅的に同定する。

(3) Med26 が細胞増殖から分化への移行において果たす役割を解明する。

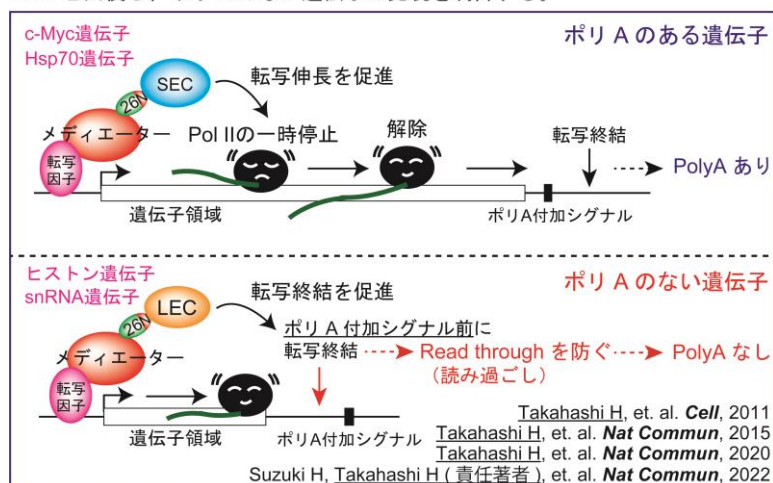
・Med26 は SEC や LEC を、細胞分化を制御するような遺伝子領域にリクルートすることによって、Pol II の一時停止を解除し、幹細胞の増殖維持から分化への移行 (スイッチ) を制御している可能性が考えられる。本研究では、Med26 コンディショナルノックアウトマウスと薬剤誘導型の Cre 発現マウスを用いて、各組織由来の幹細胞を単離後、薬剤誘導性に Med26 をノックアウトし、Med26 が各組織 (造血組織や肝臓, 脳, 腸管) における幹細胞維持やその分化への移行にどのような役割を果たすのかについて解析する。

3. 結 果

1. SEC はポリ A のある遺伝子の転写を制御し、LEC がポリ A のない遺伝子の転写を制御する。

MED26 による SEC と LEC の使い分けの細胞機能における意義を追求すべく、最初に SEC によって制御される遺伝子を網羅的に解明することを試みた。Med26 と SEC のサブユニット AFF4 をノックダウンした細胞を用いて RNA シークエンス解析を行った。すると、Pol II がプロモーター近傍で一時停

図 1: Med26 は SEC と共役し、ポリ A のある遺伝子の発現を制御する一方で、LEC と共役し、ポリ A のない遺伝子の発現を制御する。



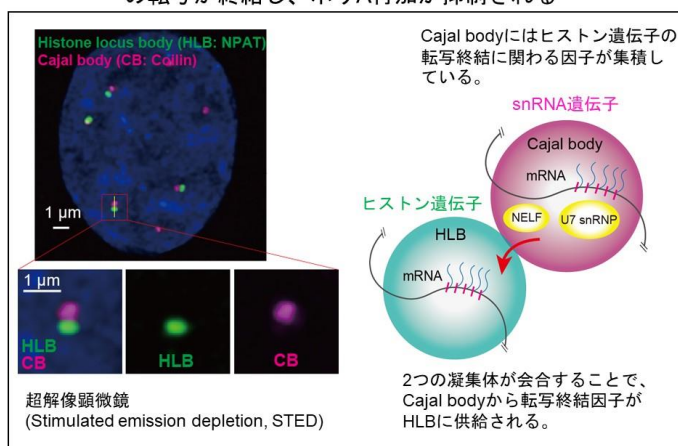
止しているような遺伝子の *c-Myc*, *Snail2*, *Hsp70* などの遺伝子の発現が特異的に低下することがわかった。このことから、Med26 と SEC は共役して、Pol II が一時停止しているような遺伝子の発現を制御することがわかった。次に Med26 と LEC のサブユニット

ICE1 をノックダウンした細胞を用いて RNA シーケンス解析を行った。すると、非常に興味深いことに、mRNA にポリ A が付加されないような複製依存的ヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子において、転写が正常に終結されずに Pol II がポリ A 付加シグナル領域を Read through (読み過ごし) し、mRNA にポリ A が付加されてしまうことが明らかとなった。このように、Med26 は SEC と LEC を使い分けることによって、それぞれ mRNA にポリ A のある遺伝子とポリ A のない遺伝子の発現を制御することが明らかとなった【Takahashi H, et al. *Nat Commun*, 11(1), 1063, 2020】(図 1 参照)。

2. LEC によるポリ A のない遺伝子の転写制御機構

MED26 と LEC が転写を制御するヒストン遺伝子と snRNA 遺伝子は、それぞれ細胞の核の中の“場”である核内凝集体 Histone locus body (HLB) と Cajal body (CB) において転写されており、CB と HLB はいつも隣り合って会合している。本研究によって、CB にはヒストン遺伝子の転写終結に関わる因子 (U7 snRNP や NELF など) が集積しており、ヒストン遺伝子を含む HLB に CB が会合することによって、転写終結因子が供給され、ヒストン遺伝子のポリ A 付加が抑制されることが明らかとなった。さらにこの時、Med26 は LEC と共に Pol II をポリ A 付加指令シグナル前に一時停止させることで、ポリ A 付加を抑制することも明らかとなった【Suzuki H, Takahashi H (責任著者), et al. *Nat Commun*, 13(1):2905, 2022】(図 2 参照)。

図2：CBからHLBに転写終結因子が供給され、ヒストン遺伝子の転写が終結し、ポリA付加が抑制される



3. Med26 の細胞増殖から分化への移行において果たす役割の解明

Med26 は SEC を *c-Myc*、*Snail2*、*Hox* 遺伝子などの細胞分化を制御する遺伝子領域にリクルートすることによって、Pol II の一時停止を解除し、幹細胞から分化細胞への移行を制御している可能性が考えられた。本研究においては、Med26 のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。現在、各種 Cre マウスと交配し、Med26 の造血組織や他の組織の幹細胞を単離し、Med26 が幹細胞の増殖から分化への移行に果たす役割の解明を目指す。

4. 考 察

SEC のサブユニットの ELL、AF4、AF9 や ENL の遺伝子は MLL (Mixed Lineage Leukemia) 遺伝子と高頻度に染色体転座を引き起こし、混合型急性白血病を発症させる。

最近の研究で、混合型急性白血病では、転座の結果生じる MLL 融合タンパク質が SEC を Hox 遺伝子などの白血病関連遺伝子領域に異常にリクルートすることで、それらの遺伝子の転写伸長を亢進させることが発症メカニズムであることが報告された。このように、SEC は小児の難治性リンパ性白血病の発症を引き起こす因子であり、国際的にも非常に活発に研究されている。また、メディエーターの他のサブユニット Med23 や Med12 の遺伝子変異がヒトの知的障害や子宮筋腫の原因となっていることが報告され、メディエーター複合体と疾患との関連も国際的に注目されている。

複製依存性ヒストン遺伝子の mRNA にポリ A が付加されると、細胞周期の DNA 複製期以降も mRNA が安定してしまい、ヒストンタンパク質が過剰に産生され、染色体の不安定性や腫瘍性疾患発症の引き金となることが明らかとなってきた。このようなことから、Med26 と LEC によるポリ A 付加の抑制機構の解明は、腫瘍性疾患の発症メカニズムに関与している可能性が考えられる。このように、Med26 による SEC や LEC のリクルート機構は、がんや白血病などの腫瘍性疾患の発症メカニズムに関わっている可能性が強く考えられ、この機構の解明は遺伝子発現制御機構の解明のみならず腫瘍発症のメカニズムを解明する上でも非常に重要である。

5. 論文及び学会発表

Takahashi H* (第一著者&責任著者), 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 I. K, Washburn P. M, Saraf A, Florens L, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway C.R, Conaway W.J*, Hatakeyama S*.: The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination. **Nat Commun.** 11(1):1063. 2020

Suzuki H[†], Abe R[†], Shimada M, Hirose T, Hirose H, Noguchi K, Ike Y, Yasui N, Furugori K, Yamaguchi Y, Toyoda A, Suzuki Y, Yamamoto T, Saitoh N, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway C. R, Conaway W. J, Takahashi H* (責任著者).: The 3' Pol II pausing at replication-dependent histone genes is regulated by Mediator through Cajal bodies' association with histone locus bodies. **Nat Commun.** 13(1), 2905, 2022

<推進研究助成>

自己免疫疾患における形質細胞様樹状細胞の機能疲弊についての解析

藩 龍馬

横浜市立大学大学院医学研究科・免疫学

形質細胞様樹状細胞（pDC）は I 型インターフェロン（IFN）を大量産生して抗ウイルス応答を担う一方で自己免疫疾患の病態形成にも関与する免疫細胞である。pDC の疲弊（機能低下）は慢性ウイルス感染における二次感染等を引き起こすが、自己免疫疾患では同じ疲弊状態なのか、またどのように病態形成に関与するかは不明である。本研究では、pDC において重要な役割を担う転写因子を軸に、自己免疫疾患に対する pDC 疲弊の作用を明らかにすることを目的とした。慢性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス（SLE）の患者検体の解析により、SLE の pDC では転写因子 IRF5 が過剰活性化状態にあることを示した。マウス SLE モデルの解析により、IRF5 は I 型 IFN 以外に酸化リン酸化関連の遺伝子発現を制御することで SLE 病態形成に関与することを明らかにした。さらに、マウス SLE モデルの pDC においてはミトコンドリアの機能異常が生じることで疲弊状態にある可能性を示した。今後 IRF5 が SLE の pDC 疲弊において疾患特異的な機能を有することが示されれば、その治療標的としての有用性が更に高まり、SLE の治療法に向けた研究開発が促進されることが期待される。

<推進研究助成>

自己免疫疾患における形質細胞様樹状細胞の機能疲弊についての解析

藩 龍馬

横浜市立大学大学院医学研究科・免疫学

1. 目的

形質細胞様樹状細胞 (pDC) は I 型インターフェロン (IFN) を大量産生して抗ウイルス応答を担う一方で、自己免疫疾患の病態形成にも関与する。pDC の疲弊 (機能低下) は慢性ウイルス感染における二次感染などを引き起こすが、自己免疫疾患では同じ疲弊状態なのか、またどのように病態形成に関与するかは不明である。本研究では、pDC において重要な役割を担う転写因子を軸に、pDC 疲弊に関わる自己免疫疾患の新たな病態形成メカニズムを解明する (図 1)。慢性ウイルス感染における pDC 疲弊については研究が進んでいるが、自己免疫疾患においては pDC 疲弊が病態形成に与える影響など詳細は不明であった。本研究では報告者らがこれまでに独自の知見や実験系を蓄積してきた転写因子 interferon regulatory factor 5 (IRF5) を中心に、疲弊 pDC における自然免疫応答と自己免疫疾患の病態形成を結び付ける。

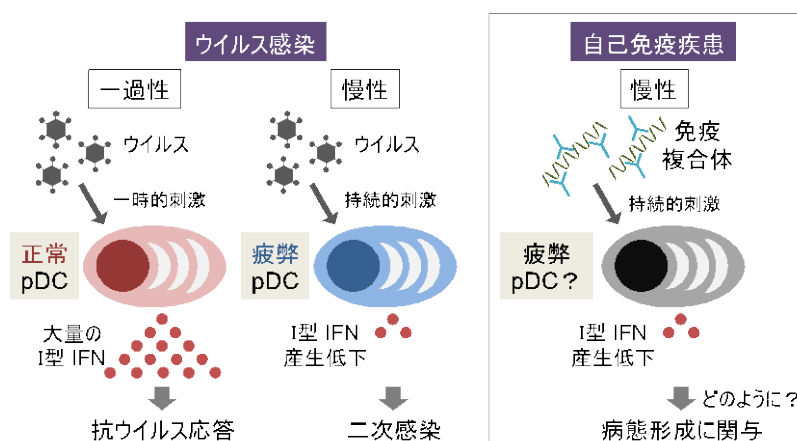


図1 本研究の概要：一過性のウイルス感染では、刺激された pDC が大量の I 型 IFN を産生することで抗ウイルス応答が誘導される (左)。慢性ウイルス感染では、持続的な刺激により pDC が疲弊して I 型 IFN 産生が低下しており、二次感染が成立してしまう (中央)。自己免疫疾患においては、慢性的に免疫複合体の刺激が入ることで pDC は I 型 IFN 産生機能が低下することが報告されているが、一方で pDC や I 型 IFN が SLE の病態悪化に関与することも示されている (右)。これらの一見矛盾する 2 つの事象を結びつけるために、本研究では代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) を対象に疲弊 pDC を解析する。

2. 方法

ヒト検体：本課題におけるヒト検体を用いた解析は、横浜市立大学ヒトゲノム・遺伝子研究等倫理委員会の承認を得て実施した（許可番号 A120322001）。採取した末梢血から単核球を分離した後、磁気細胞分離法やフローサイトメトリーにより pDC を単離した。

自己免疫疾患（SLE）モデルマウス：本課題における実験動物の解析は、横浜市立大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号 F-A-17-018 ならびに F-A-20-043）。NZB/W F1 マウスなどの広く用いられている SLE モデルマウスならびに野生型マウスを用い、脾臓細胞や骨髄細胞を調製した後、ヒト検体と同様の手法により pDC を単離した。SLE 病態は主に自己抗体（抗二本鎖 DNA 抗体をはじめとする抗核抗体）の血中濃度を指標に評価し、必要に応じて蛋白尿や腎臓切片から糸球体腎炎・糸球体 IgG 沈着を解析した。

pDC における転写因子の解析：SLE 患者や SLE モデルマウスの末梢血 pDC において、自己免疫疾患と自然免疫応答の両方に関与することが知られている転写因子（IRF5 など）の pDC における活性化状態について、核移行を指標に免疫染色により解析した。

pDC における機能解析：ミトコンドリアの活性評価はミトコンドリア内膜の膜電位感受性色素である tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) を用い、フローサイトメトリーにより解析した。

網羅的遺伝子発現解析：RNA シークエンシングにより網羅的な遺伝子発現解析を行った。SLE モデルマウスの末梢血 RNA を精製後、ライブラリー DNA を作製し、次世代シーケンサーにより配列データを取得した。得られた配列データは R 言語の EdgeR パッケージなどを使用してバイオインフォマティクス解析を行った。

3. 結果

自己免疫疾患に対する pDC 疲弊の作用を明らかにするために、難治性自己免疫疾患である SLE の患者検体解析を行った。pDC による I 型 IFN 産生には、自然免疫系転写因子ファミリーである IRF のいくつかのメンバーが重要である。報告者らや他の研究グループにより、IRF5 が SLE の病態形成に重要な役割を果たすことが明らかとなっている（Ban et al, *Immunity* 2016 等）。はじめに、蛍光免疫染色法によりヒト末梢血中の pDC における IRF5 の活性化について、核移行を指標に評価する実験系を確立した（図 1）。こ

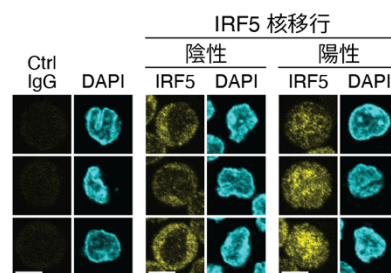


図 1. ヒト末梢血 pDC における IRF5 の活性化（核移行）評価方法を確立した。IRF5 核移行が陽性の pDC では、IRF5（黄）の局在が細胞質から核（DAPI で染色：シアン）に移っている。スケールバーは 5 μ m を示す。

の実験系を用い、SLE 患者の末梢血中の pDC における IRF5 の活性化を評価した結果、健常者と比較して SLE 患者の pDC では IRF5 が過剰に活性化していることが判明した (図 2)。

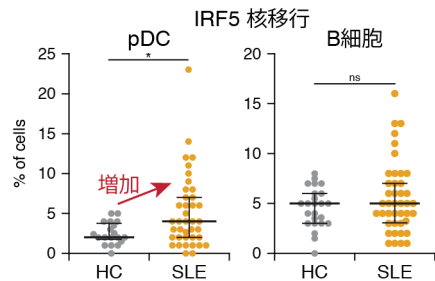


図 2. SLE 患者 pDC において IRF5 は過剰活性化状態にある。健常者 (HC) ならびに SLE 患者の末梢血中の pDC ならびに B 細胞における IRF5 の活性化を核移行解析により評価した。1 つの点は検体 1 例における IRF5 核移行が陽性の細胞のパーセンテージを表す。* $P < 0.05$ 。ns: 有意差無し。

SLE の病態形成において IRF5 がどのような作用を及ぼしているかについて検討を行った。SLE モデルの一つである *Lyn* 欠損マウスで I 型 IFN 受容体 (IFNAR1) の欠損と IRF5 の欠損を比較した結果、IFNAR1 欠損と比較して IRF5 欠損は、自己抗体産生や糸球体腎炎といった SLE 病態を顕著に抑制した。末梢血の RNA-seq を行い gene set enrichment analysis (GSEA) を行った結果、IRF5 が I 型 IFN 以外にも酸化的リン酸化の調節で重要な役割を担っている可能性が示された (図 3)。これらの結果から、IRF5 は I 型 IFN よりも優れた分子標的となることが示唆された。

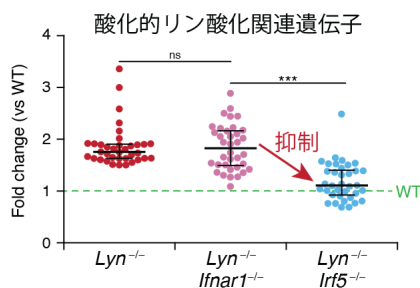


図 3. マウス SLE モデルにおいて IRF5 は酸化的リン酸化関連遺伝子を制御する。マウス SLE モデルの一つである *Lyn* 欠損 (*Lyn*^{-/-}) マウスにおいて、野生型 (WT) マウスと比較して酸化的リン酸化関連遺伝子が上昇しており、IFNAR1 欠損 (*Lyn*^{-/-} *Ifnar1*^{-/-}) と IRF5 欠損 (*Lyn*^{-/-} *Irf5*^{-/-}) による影響を検討した。各データポイントは末梢血 RNA から RNA-seq を行い解析した酸化的リン酸化関連遺伝子の発現量について、WT と比較した際の fold change を表す。*** $P < 0.001$ 。ns: 有意差無し。

末梢血のどの細胞種において酸化的リン酸化関連遺伝子の変化が生じているのかを検討するために、pDC のような少数細胞でも解析可能なフローサイトメトリーによるミトコンドリア膜電位の測定を行い、酸化的リン酸化関連遺伝子の変化の結果生じると考えられるミトコンドリアの機能異常を評価した。その結果、IRF5 はマウス SLE モデルにおける単球や pDC のミトコンドリアの機能異常に関与することが示された (図 4)。

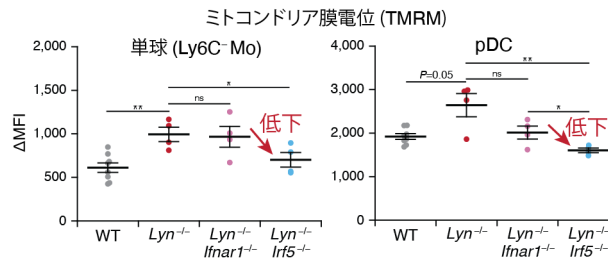


図4. マウス SLE モデルにおいて IRF5 は単球や pDC のミトコンドリア機能異常に関与する。*Lyn*^{-/-}マウスは野生型 (WT) マウスと比較して単球や pDC におけるミトコンドリア膜電位が上昇しており、*Ifnar1* 欠損 (*Lyn*^{-/-}*Ifnar1*^{-/-}) と *Irf5* 欠損 (*Lyn*^{-/-}*Irf5*^{-/-}) による影響を検討した。各データポイントはマウスの脾臓細胞を用いて TMRM 染色を行い測定した蛍光強度について非染色サンプルとの差 (ΔF/FI) を表す。**P* < 0.05、***P* < 0.01。ns: 有意差無し。

4. 考察

以上の結果から、SLE では IRF5 が pDC や単球において過剰活性化状態にあり、IRF5 による酸化的リン酸化関連遺伝子の発現制御が損なわれることにより pDC や単球におけるミトコンドリアの機能異常による疲弊が生じるモデルが考えられる。今後は SLE における pDC のミトコンドリア機能異常と疲弊状態との関係や、遺伝子発現制御メカニズム等について検討したい。IRF5 が SLE の疲弊 pDC において疾患特異的な機能を有することが示されれば、その治療標的としての有用性が更に高まり、SLE の治療法に向けた研究開発が促進されることが期待される。また、疲弊 pDC は慢性ウイルス感染における二次感染やがんの免疫回避にも関与しており、疲弊 pDC の研究成果はこれらの疾患の治療法開発に繋がる可能性もある。

5. 論文及び学会発表 (研究会を含む)

論文：

1. Ban T, Kikuchi M, Sato GR, Manabe A, Tagata N, Harita K, Nishiyama A, Nishimura K, Yoshimi R, Kirino Y, Yanai H, Matsumoto Y, Suzuki S, Hihara H, Ito M, Tsukahara K, Yoshimatsu K, Yamamoto T, Taniguchi T, Nakajima H, Ito S, Tamura T: Genetic and chemical inhibition of IRF5 suppresses pre-existing mouse lupus-like disease. *Nat Commun* 12: 4379, 2021.

学会・研究会：

1. 藩 龍馬, 菊地 雅子, 佐藤 豪, 田村 智彦: 転写因子 IRF5 の遺伝学的手法および化合物による阻害はマウス SLE モデルにおいて治療効果を示す 第 17 回麒麟塾, 富士ソフトアキバプラザ (東京), 2022 年 7 月 23 日.
2. Ban T, Kikuchi M, Sato GR, Manabe A, Nishiyama A, Yoshimi R, Yanai H, Yamamoto T, Taniguchi T, Ito S, Tamura T: Therapeutic effects of genetic and chemical targeting of

- IRF5 on experimental SLE. 第 50 回日本免疫学会学術集会, 春日野国際フォーラム 薨 (奈良), 2021 年 12 月 10 日.
3. 藩 龍馬: 転写因子 IRF5 の阻害は自己免疫疾患 SLE の現行治療法の限界を克服した新規治療法となる可能性がある. 熊大・横市大・神戸大 交流研究会, オンライン, 2021 年 10 月 5 日.
 4. 藩 龍馬, 佐藤 豪, 菊地 雅子, 西村 謙一, 吉見 竜介, 桐野 洋平, 松本 佳子, 日原 裕恵, 伊藤 昌史, 塚原 克平, 中島 秀明, 伊藤 秀一, 田村 智彦: 全身性エリテマトーデスにおける転写因子 IRF5 の阻害は現行治療法の限界を克服した新規治療法となる可能性がある. 第 85 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, オンライン, 2021 年 5 月 22 日.
 5. Sato G, Ban T, Kikuchi M, Manabe A, Yoshimi R, Ito S, Tamura T: IRF5 activation persists in SLE patients undergoing standard therapies and a prototype IRF5 inhibitor restrains autoantibody increment in mouse SLE models. 第 48 回日本免疫学会学術集会, アクトシティ浜松 (静岡県浜松市), 2019 年 12 月 12 日.
 6. Ban T, Kikuchi M, Sato GR, Manabe A, Tagata N, Nishiyama A, Nishimura K, Yoshimi R, Kirino Y, Yanai H, Matsumoto Y, Hihara H, Ito M, Tsukahara K, Yamamoto T, Taniguchi T, Nakajima H, Ito S, Tamura T: IRF5 as a therapeutic target that overcomes the limitation of current therapies in SLE. 2019 NIH-Japan-JSPS symposium, Bethesda (USA), 2019 年 10 月 28 日.
 7. Ban T, Kikuchi M, Sato GR, Manabe A, Tagata N, Nishimura K, Yoshimi R, Kirino Y, Yanai H, Matsumoto Y, Hihara H, Ito M, Tsukahara K, Taniguchi T, Nakajima H, Ito S, Tamura T: IRF5 suppression exerts a therapeutic effect beyond type I interferon blockade on murine SLE. 7th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, Vienna (Austria), 2019 年 10 月 22 日.
 8. 佐藤 豪, 藩 龍馬, 菊地 雅子, 真鍋 昭雄, 田形 典子, 西村 謙一, 吉見 竜介, 桐野 洋平, 松本 佳子, 日原 裕恵, 伊藤 昌史, 塚原 克平, 中島 秀明, 伊藤 秀一, 田村 智彦: 転写因子 IRF5 を標的とした全身性エリテマトーデスの新規治療法開発. 第 84 回日本インターフェロンサイトカイン学会, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市), 2019 年 8 月 2 日.

内視鏡検体と新規マウスモデルを用いた十二指腸腫瘍の統合的解析

(報 告 者 名)

杉森 慎¹

(共同研究者名も併記)

澤田 敦史¹, 金子 裕明², 平澤 欣吾¹, 前田 慎²

(所 属 部 科 名)

1: 横浜市立大学附属市民総合医療センター 消化器病センター内科

2: 横浜市立大学附属病院 消化器内科

抄録 (5 0 0 字以内)

近年、十二指腸腫瘍の発見頻度は増加傾向を示し、難易度の高い手技ではあるものの内視鏡による治療が可能となってきた。しかしながら、腺腫病変あるいは腫瘍様病変が癌化ポテンシャルを有する病変か否かについては、十分なコンセンサスは確立されていない現状にある。本研究では、1)内視鏡的切除を実施された十二指腸臨床検体を用いた臨床病理学的、および網羅的ゲノム解析を行い、内視鏡治療を要する十二指腸腫瘍病変の特徴を明らかにすること、2)新規の十二指腸腫瘍マウスモデルを創出し、発癌メカニズムの解明と新規治療標的分子の同定すること、の2点を目的とした。内視鏡的切除を施行された十二指腸非乳頭部腫瘍 39 例の臨床検体の解析を行った結果、免疫組織化学染色によって胃型 7 例、胃腸混合型 4 例、腸型 28 例に分類可能で、胃型腫瘍は全例隆起型で近位十二指腸に認められた。CTNNB1 の核移行は、胃型 3/7 例(42%)、胃腸混合型 2/4 例(50%)、腸型 25/28 例(89%)で認められ、特に腸型腫瘍の発生には Wnt 経路の亢進が強く関与している可能性が示唆された。今後、現在解析中の次世代シーケンサー解析の結果を踏まえ、更なる詳細な十二指腸腫瘍病変の特徴を明らかにしたいと考えている。新規の十二指腸腫瘍マウスモデルの創出に取り組んだ結果、小腸癌の最多変異遺伝子の一つである *PIK3CA* 変異を導入することにより、十二指腸腫瘍マウスモデルの創出に成功した。また、同マウスモデル由来 3 次元オルガノイド十二指腸腫瘍細胞株を用いた検討により、PI3K 阻害薬 (Alpelisib) による治療可能性が示唆された。今後、腫瘍増悪に関わる分子異常を解明し、新規治療標的分子の同定に取り組みたいと考えている。

<わかば研究助成>

内視鏡検体と新規マウスモデルを用いた十二指腸腫瘍の統合的解析

(報 告 者 名)

杉森 慎¹

(共同研究者名も併記)

澤田 敦史¹, 金子 裕明², 平澤 欣吾¹, 前田 慎²

(所 属 部 科 名)

1: 横浜市立大学附属市民総合医療センター 消化器病センター内科

2: 横浜市立大学附属病院 消化器内科

本文には次の項目について記載して下さい。また、本文は(図表を含め) A 4 の用紙 3 枚程度にお願いします。

1. 目 的

近年の内視鏡技術の発達と検査体制の充実により、十二指腸腫瘍の発見頻度は増加傾向を示し、難易度の高い手技ではあるものの粘膜病変に対しては内視鏡的粘膜下層剥離術(Endoscopic Submucosal Dissection, 以後ESD)による治療が可能となってきた。しかしながら、腺腫病変あるいは腫瘍様病変が癌化ポテンシャルを有した切除を要する病変か否か、また、腺腫と癌の鑑別についても十分なコンセンサスは確立されていない現状にある。

本研究では、内視鏡的切除を行った十二指腸腺腫や腺癌の臨床検体を用いた臨床病理学的、および網羅的ゲノム解析を行い、十二指腸腺癌のドライバー変異の同定するとともに、内視鏡所見および免疫組織学的所見を統合し、内視鏡治療を要する十二指腸腫瘍病変の特徴を明らかにする。

また、未だ十二指腸非乳頭部の腫瘍マウスモデルは報告がない現状にあるが、本研究では、新規の十二指腸腫瘍マウスモデルを創出し、発癌メカニズムの解明と新規治療標的分子の同定を目的とした。

2. 方 法

1) 十二指腸腫瘍の臨床検体の解析

当院で内視鏡的切除を施行された十二指腸非乳頭部腫瘍 39 例を抽出し、これらの病理組織検体に対して胃型マーカーである MUC5AC, MUC6, 腸型マーカーである MUC2, CDX2, CD10, に対する免疫組織化学染色を実施し、胃型・腸型への分類を行ない、臨床背景との比較検討を行なった。また、TP53, Ki-67, CTNNB1 に対しても免疫組織化学染色を実施した。さらに、マイクロサテライト不安定性腫瘍の選別のため、MMR 蛋白 (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) に対する免疫組織化学染色での検討を実施した。

網羅的ゲノム解析のために、上記から選抜した 21 症例に対してレーザーマイクロダイセクションにより腫瘍組織を採取し、DNA 抽出を行なった。次世代シーケンサー解析には、illumina 社の iSeq100 を用いて Cancer Hot Spot panel v2 での amplicon sequence を実施した。

2) 新規十二指腸腫瘍マウスモデルの創出と解析

既報において十二指腸腺癌の最多変異遺伝子の一つとして、*PIK3CA* が報告されており、*PIK3CA* の変異 Hot Spot の一つである *Pik3ca* H1047R 変異を Cre 依存性に発現可能な *ROSA26-LSL-Pik3ca* H1047R マウスと、十二指腸粘膜にプロモータ活性を有する Cre マウスとの交配実験を行なった。また、形成した腫瘍組織に対して免疫組織化学染色を行い、その病理組織学的特徴を検討した。

3) 新規十二指腸腫瘍マウスモデルを用いた分子標的薬の有用性の検討

創出したマウスモデルの十二指腸腫瘍組織より 3 次元オルガノイド細胞株を樹立し、PI3K 阻害薬による増殖抑制効果を検討した。

3. 結 果

1) 十二指腸腫瘍の臨床検体の解析

胃型マーカーと腸型マーカーに対する免疫組織化学染色の結果、症例コホートは胃型 7 例(17.9%)、胃腸混合型 4 例(10.3%)、腸型 28 例(71.8%)に分類可能であった。これらの分類と臨床背景を表 1. に示すが、胃型腫瘍は全例隆起型で近位十二指腸に認められた。CTNNB1 の核移行は、胃型 3/7 例(42%)、胃腸混合型 2/4 例(50%)、腸型 25/28 例(89%)で認められた。TP53 は胃型 1 例、腸型 1 例の計 2 例で陽性であった。MMR 蛋白欠失については、胃型 1 例(MSH2/ MSH6 欠失)、腸型 1 例(MLH1/PMS2 欠失)の計 2 例で認められた。

次世代シーケンサー解析については、現在、係るデータを解析中である。

2) 新規十二指腸腫瘍マウスモデルの創出と解析

十二指腸粘膜にプロモータ活性を有する Cre マウスと *ROSA26-LSL-dTomato* マウスの交配実験を行ったところ、十二指腸球部に濃染する腺管集団を認め、特に十二指腸球部に強いプロモータ活性を有することが判明した(図 1.)。この Cre マウスと *ROSA26-LSL-Pik3ca* H1047R マウスの交配実験を行ったところ、約 2-4 ヶ月齢で管腔側の隆起性病変を生じ、約 8-12 ヶ月齢では粘膜下浸潤・腹膜播種を伴った十二指腸腺癌の発生を認めた。腫瘍腺管の粘液形質は MUC2 陽性、MUC5AC、MUC6 陰性であり、腸型であることが示唆された(図 2, 3.)。

3) 新規十二指腸腫瘍マウスモデルを用いた分子標的薬の有用性の検討

上述のマウスモデルの腫瘍組織より樹立した 3 次元オルガノイド十二指腸腫瘍細胞株は、免疫不全マウスへの移植が可能であった(図 4.)。PI3K 阻害薬(Alpelisib)による濃度依存的な増殖抑制効果を認め、Western blotting では濃度依存的な Akt のリン酸化阻害効果が確認された(図 5.)。

4. 考 察

臨床検体の解析では、腸型腫瘍において CTNNB1 の核移行を高率に認めたことから(胃型 3/7 例(42%)、胃腸混合型 2/4 例(50%)、腸型 25/28 例(89%))、腸型腫瘍の発生には Wnt 経路の亢進がドライバーとして働いている可能性が示唆された。今後、次世代シーケンサー解析の結果を踏まえて、他経路とのオーバーラップの有無等の詳細な検討を行う。さらに臨床背景や内視鏡所見との統合的な比較・検討を行うことで、内視鏡治療を要する十二指腸腫瘍病変の特徴を明らかにしたいと考えている。

今回、新規に PIK3CA 変異型十二指腸腫瘍マウスモデルを創出した。腫瘍組織から樹立した 3 次元オルガノイド十二指腸腫瘍細胞株を用いた検討により、PI3K 阻害薬(Alpelisib)による濃度依存的な増殖抑制効果と、Akt のリン酸化阻害効果を確認し、*PIK3CA* 変異型十二指腸腫瘍に対する PI3K 阻害薬の有効性が示唆された。同マウスモデルは管腔側の隆起性の初期病変から、経時的に浸潤、播種をきたす腸型腫瘍マウスモデルであり、その増悪過程の解析は極めて興味深い。今後、腫瘍増悪に関わる分子異常を解明し、新規治療標的分子の同定に取り組みたいと考えている。

5. 論文及び学会発表(研究会を含む)

- 1) 澤田 敦史, 平澤 欣吾, 前田 慎, 佐藤 博紀, 尾関 雄一郎, 西尾 匡史, 福地 剛英, 小林 亮介, 佐藤 知子. 表在型非乳頭部十二指腸上皮性腫瘍(SNADET)の形質別の免疫組織学的検討. 第 103 回日本消化器内視鏡学会総会, 口演, 2022 年 5 月.
- 2) 杉森 慎, 芝田 渉, 澤田 敦史, 平澤 欣吾, 三輪 治生, 金子 卓, 野崎 昭人, 杉森 一哉, 沼田 和司, 稲山 嘉明, 國崎 主税, 前田 慎. 新規 PIK3CA 変異型十二指腸腫瘍マウスモデルの創出と PI3K 阻害薬効果の検討. 第 94 回日本胃癌学会総会, 口演, 2022 年 3 月.

表1.

性別	年齢	部位	肉腫型	浸透度 (mm)	組織型	MUCSAC	MUC6	MUC2	CD10	CDX2	形質	
f	70	bulbs	1s	m	6	tub1	2	1	0	0	0	胃
m	66	bulb	1s	m	10	tub1	1	1	0	0	0	胃
m	79	bulb	1s	m	9	adenoma	0	2	0	0	0	胃
f	73	bulbs	1s	m	6	tub1	2	1	0	0	0	胃
m	86	bulbs	2a	m	11	tub1	1	1	0	0	0	胃
m	84	2nd	1s	sm	7	tub1	1	2	0	0	0	胃
f	70	bulbs	1s	sm	31	tub1,2	2	0	0	0	0	胃
m	71	bulb	1s	m	17	tub1	2	1	2	0	0	胃
m	67	bulbs	1s	m	10	tub1	2	2	2	0	0	胃
m	75	2nd	2a+1	m	29	tub1	1	0	1	1	1	胃
m	74	2nd	2a+2c	m	21	tub1	1	0	0	2	2	胃
m	55	bulb	1p	m	10	carcinoma in adenoma	0	0	1	2	2	胃
f	51	2nd	2c+2a	sm	8	tub1	0	0	1	2	2	胃
m	77	SDA	2a+2c	m	15	tub1,pap	0	0	0	2	2	胃
m	71	2nd	2a+2c	m	11	tub1	0	0	0	2	2	胃
m	68	2nd	1s	sm	8	tub1,2	0	0	2	2	2	胃
m	34	2nd	2a	m	10	tub1	0	0	1	2	2	胃
f	41	2nd	2a	m	11	tub1	0	0	0	2	2	胃
m	62	bulbs	2a	m	35	tub2,1	0	0	1	2	2	胃
m	59	2nd	2a	m	20	tub1	0	0	1	1	2	胃
f	69	3rd	2a	m	23	tub1	0	0	0	1	2	胃
m	60	IDA	2a+2c	m	14	tub1	0	0	1	2	2	胃
m	63	IDA	2a+2c	m	16	adenoma	0	0	1	2	2	胃
m	53	2nd	2a+2c	m	14	tub1	0	0	1	2	2	胃
m	62	2nd	2c+2a	m	6	tub1	0	0	0	2	2	胃
f	70	2nd	2a+2c	m	17	tub1	0	0	1	2	2	胃
f	66	3rd	2a+2c	m	20	tub1	0	0	1	2	2	胃
m	68	2nd	2a+2c	m	19	tub1	0	0	1	2	2	胃
m	45	2nd	2c+2a	m	14	tub1	0	0	1	2	2	胃
m	60	2nd	1s+2c	m	16	tub1,pap	0	0	0	2	2	胃
m	47	3rd	2a	m	22	adenoma	0	0	0	2	2	胃
m	82	bulbs	1s	sm	15	tub1	0	0	1	2	2	胃
m	49	2nd	2a	m	27	tub1	0	0	1	2	2	胃
m	59	3rd	2a	m	22	adenoma	0	0	0	1	2	胃
f	69	3rd	2a	m	18	tub1	0	0	0	2	2	胃
f	75	SDA	2c+2a	m	10	tub1	0	0	0	2	2	胃
f	58	IDA	2c+2a	m	20	tub1	0	0	1	2	2	胃
m	69	3rd	2c+2a	m	15	tub1	0	0	1	2	2	胃
m	71	2nd	2a+2c	m	18	tub1	0	0	1	2	2	胃

図1.

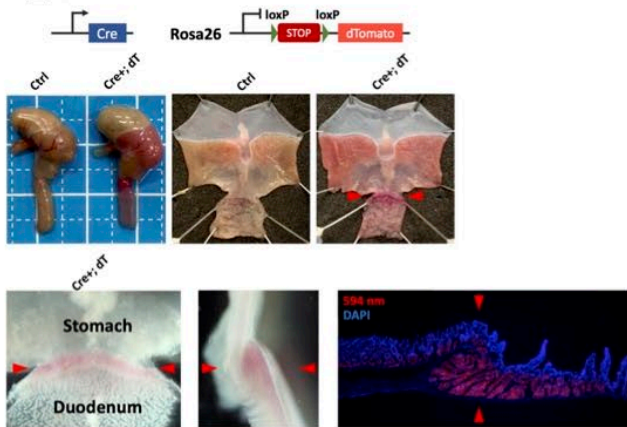


図3.

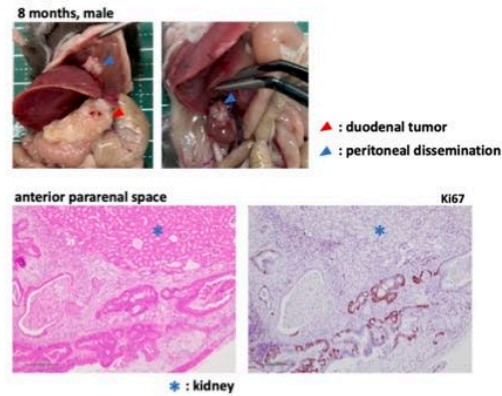


図5.

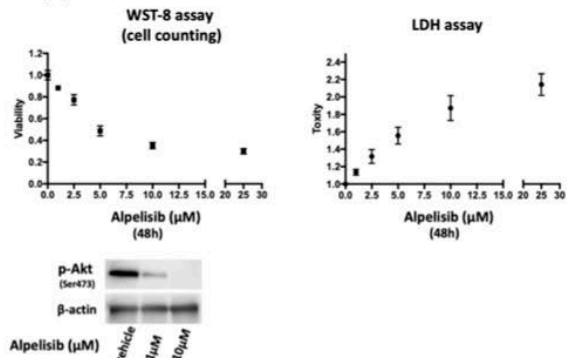


図2.

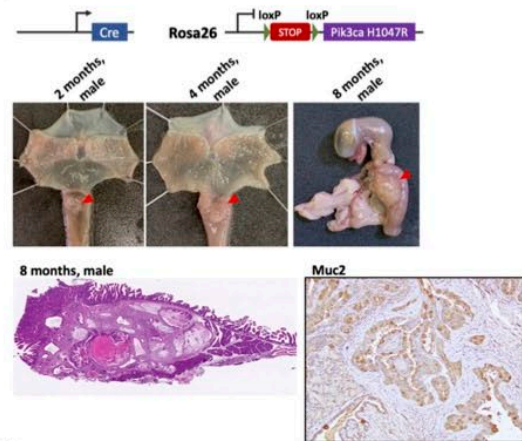
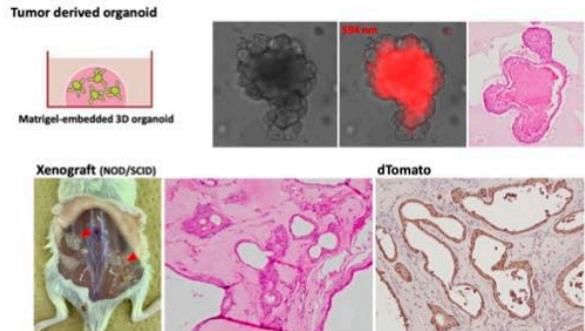


図4.



<わかば研究助成>

ナノルシフェラーゼ二分子技術を応用した
肺炎球菌の細胞内ダイナミクスモニタリング法の開発

雫石 早矢佳

共同研究者: 小川道永 (国立感染症研究所)

(横浜市立大学大学院 医学研究科 微生物学教室)

抄録

肺炎球菌は主にヒトの鼻咽頭に常在し通常は無症候性であるが、小児や免疫力が低下した高齢者では敗血症や髄膜炎といった侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)を引き起こすことが知られている。IPD 発症には感染初期に肺炎球菌が鼻咽頭上皮細胞をはじめとした宿主細胞への侵入を経て、エンドソーム膜を損傷することで細胞内殺菌を回避する必要がある。そこで本研究では肺炎球菌の感染初期における病原性発揮のメカニズムを評価するために、バイオルミノアッセイ系を導入し宿主細胞への肺炎球菌の付着菌数、エンドサイトーシス経路による細胞侵入菌数、さらに肺炎球菌が誘導するエンドソーム膜損傷の程度を簡便かつ高感度に定量化するアッセイ系を構築した。さらに、このアッセイ系を用いて肺炎球菌の初期感染過程である付着、侵入、エンドソーム損傷に関与する病原因子の探索を行った。その結果、強力な細胞傷害性毒素であるニューモリシンによる無秩序なエンドソーム膜損傷を抑制する病原因子の同定にを行うことができた。

<わかば研究助成>

ナノルシフェラーゼ二分子技術を応用した 肺炎球菌の細胞内ダイナミクスモニタリング法の開発

雫石 早矢佳

共同研究者: 小川道永 (国立感染症研究所)

(横浜市立大学大学院 医学研究科 微生物学教室)

1. 目 的

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は α 溶血性のグラム陽性双球菌であり、鼻咽頭に常在する日和見感染菌であるが、小児や高齢者では菌血症や髄膜炎といった致死性の高い侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) を引き起こす。鼻腔に定着した肺炎球菌は、鼻咽頭上皮細胞内に侵入後、細胞内のさまざまな殺菌機構をかいくぐりながら、最終的に血中に到達し、IPD を引き起こす。最新の研究から、IPD 発症では感染門戸である鼻咽頭上皮層が、感染防御のための一次バリアとして機能していることが分かってきた。申請者らはこれまでに、宿主細胞内に侵入した肺炎球菌は「エンドサイトーシス」や「オートファジー」で分解されることを明らかにしている。しかし、肺炎球菌は、膜孔形成毒素ニューモリシン (Ply) をエンドソーム内で放出し、エンドソーム膜に膜孔を開けてエンドソームの酸性化を阻害することで、リソソーム酵素による殺菌を回避する。そこで我々は、肺炎球菌の宿主細胞への侵入からニューモリシンによるエンドソーム破壊までの初期感染プロセスが IPD に対する新規治療薬のターゲットになると考えた。しかし、肺炎球菌の細胞への付着、侵入、そしてエンドソーム破壊をハイスループットでモニターする方法は、いまだにないことから、ナノルシフェラーゼ二分子技術 (図 1) を応用し、肺新規治療薬の探索の基盤となる、これら 3 つの感染プロセスを簡便かつ高感度に定量化するアッセイ系の構築をめざした。

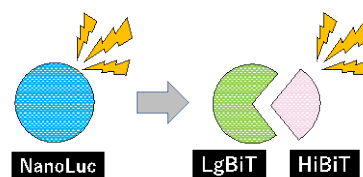


図1. ナノルシフェラーゼ二分子技術

2. 方 法

1、NanoLuc を用いた肺炎球菌の細胞付着アッセイ系の構築

1-1、NanoLuc 発現肺炎球菌の作製

実験には無莢膜株の実験室株である肺炎球菌 R6 株を用いた。R6 株のゲノム上のシュード

ジーンである莢膜合成遺伝子コード領域 (*cps*) に、5'側にプロモーターを、3'側に HA タグを付与した *nanoluc* 遺伝子を、クロラムフェニコール耐性遺伝子とともに挿入し、R6WT *cps::nanoluc-ha-Cm* 株(以下 Sp/NLuc と略)を作製した。

1-2、NanoLuc を用いた細胞付着定量化アッセイ

ヒト pIgR を安定発現させた BHK 細胞に Sp/NLuc を moi (multiplicity of index、1 細胞当たりの感染菌量)=100 で 15 分間感染させ、HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) で洗浄後、緩和条件下で細胞を剥離させ、化学発光アッセイに供した (図 2)。

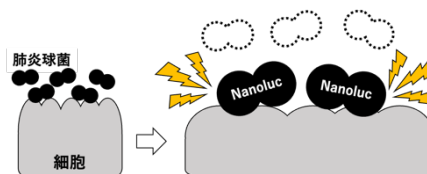


図2. 細胞付着アッセイ

2、NanoBiT を用いた肺炎球菌の細胞侵入・エンドソーム膜損傷定量化アッセイ系の構築

2-1、NanoBiT 発現肺炎球菌の作製

1-1 と同様の方法で、R6 株のゲノム上に、5'側にプロモーターを付与した HiBiT-Nanobody をコードする遺伝子を、クロラムフェニコール耐性遺伝子とともに挿入し、R6WT *cps::hibit-Cm* 株 (以下 Sp/HiBiTs と略) を作製した。Nanobody は GFP を認識する配列を用いた。

2-2、NanoBiT を用いた細胞侵入・エンドソーム膜損傷定量化アッセイ

1-2 と同様に、Sp/HiBiT-Nanobody を、GFP-LgBiT を安定発現させた BHK/pIgR 細胞に 15 分間感染させた。HBSS で洗浄後、さらに 45 分間培養し、菌を侵入させた後に、ゲンタマイシン入りの培地に置換し、細胞外の菌を殺菌した。その後、エンドソーム破たんを起こし、細胞質内で HiBiT-Nanobody と GFP-LgBiT が複合体を形成するまでの間一定時間培養した後に、細胞を剥離し、化学発光アッセイに供した (図 3)。

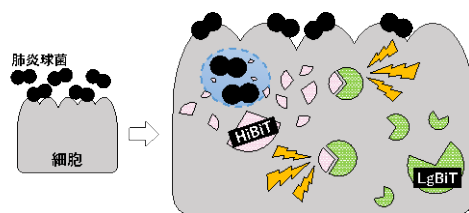


図3. 細胞侵入・エンドソーム膜損傷定量化アッセイ

3、本アッセイ系を用いた、感染初期過程に関与する病原因子の同定

上記 1、2 で構築した系において、肺炎球菌の主要な病原因子である Cbp (コリン結合性タンパク質) ファミリー、糖鎖分解酵素ファミリーを欠失させた変異株を用いて肺炎球菌の付着、侵入、エンドソーム破たん性に関与する病原因子の探索を行った。

3. 結 果

ルシフェラーゼである NanoLuc を発現する肺炎球菌を用いて、付着菌数を定量化した結果、宿主受容体 pIgR 依存的な発光強度の上昇が認められ、それは菌の保有する付着因子 CbpA の欠失により顕著に低下した (図 4)。続いて、LgBiT と HiBiT からなるスプリット型 NanoLuc である NanoBiT を利用し、HiBiT-Nanobody を発現する肺炎球菌と GFP-LgBiT を発現する培養細胞を用いて細胞内侵入菌数およびエンドソーム膜損傷を定量化した結果、宿主受容体

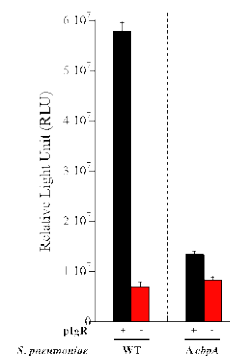


図4. 細胞に付着した菌数

pIgR 依存的な発光強度の上昇が認められ、それは菌の保有する付着因子 CbpA (図 5) やエンドソーム損傷に必須の毒素であるニューモリシンの欠失により著しく低下した。そこで、本アッセイ系を用いて肺炎球菌の初期感染過程である付着、侵入、エンドソーム損傷に関与する病原因子の探索を行った結果、強力な細胞傷害性毒素であるニューモリシンによる無秩序なエンドソーム膜損傷を抑制する病原因子の同定を行うことができた。

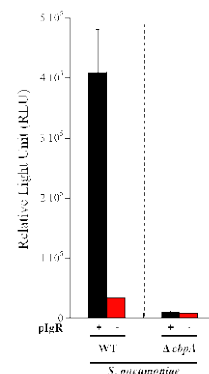


図5. 細胞に侵入した菌数およびエンドソーム膜損傷度合い

4. 考 察

本研究で構築した、細胞への付着、侵入、そしてエンドソーム破壊という3つの感染プロセスを簡便かつ高感度で定量化するアッセイ系により、肺炎球菌を①付着させない、②侵入させない、③エンドソーム膜を破らせない治療薬のスクリーニングをハイスループットで行うことが可能となり、将来的に新規治療薬の探索や、感染初期において機能する宿主因子の同定に非常に有用だと思われる。

論文及び学会発表 (研究会を含む)

ポスター発表

○雫石早矢佳、小川道永、明田幸宏、梁明秀、大西真

肺炎球菌の病原性解析へのルシフェラーゼ二分子技術の応用

第74回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀、令和4年6月28～30日

シンポジウム口頭発表 (細菌学若手コロッセウム)

ルシフェラーゼ二分子技術を応用して肺炎球菌の細胞付着・侵入菌数を定量化する方法の開発

○雫石早矢佳、小川道永、明田幸宏、梁明秀、大西真

第95回日本細菌学会総会、オンライン、令和4年3月29～31日

口頭発表 (選抜ワークショップ)

NanoBiT システムを応用した肺炎球菌の細胞付着からエンドソーム膜損傷までに関与する病原因子の探索

○雫石早矢佳、小川道永、明田幸宏、梁明秀、大西真

第95回日本細菌学会総会、オンライン、令和4年3月29～31日

ポスター発表

○雫石早矢佳、小川道永、明田幸宏、梁明秀、大西真

宿主細胞への細菌の付着・侵入効率を化学発光で定量的に評価する方法の開発

第94回日本生化学会大会、オンライン、令和3年11月3～5日

口頭発表

○雫石早矢佳、小川道永、明田幸宏、梁明秀、大西真

ルシフェラーゼ二分子技術を応用した肺炎球菌の細胞付着・侵入菌数モニタリングアッセイの構築

第104回日本細菌学会関東支部総会、オンライン、令和3年10月21日

<わかば研究助成>

(申 請 書 記 載 の 課 題 名)

アンジオテンシン受容体機能調節因子による AKI-to-CKD の新規治療戦略

(報 告 者 名)

金口 翔

(共同研究者名も併記)

田村功一、涌井広道、小豆島健護、熊谷知博

(所 属 部 科 名)

腎臓・高血圧内科

抄録 (5 0 0 字以内)

【目的】急性腎障害(AKI)から慢性腎臓病(CKD)への移行(AKI-to-CKD)の病態解明は、腎臓病の治療法開発につながる可能性がある。加齢腎は腎機能低下、腎萎縮や尿細管間質線維化に加え、組織修復能低下によって AKI への感受性が亢進している。そこで加齢腎モデルの作成を試みた。アリストロキア酸 (AA) は DNA 損傷性を有し、主に尿細管細胞を標的とする薬物である。AA 腎症 (AAN) は急速かつ慢性的な腎機能低下を引き起こす。AAN モデルが加齢腎モデルになりえることを検証した。【方法】C57BL/6 マウスを Vehicle 群と AA 群の 2 群に振り分け、AA 群では AA (3mg/kg)、週 2 回、4 週間腹腔内投与し、リモデリングとして投与後期間 4 週間を設けて解剖を行った。【結果】AAN モデルにおいて、腎機能低下に加え、腎萎縮、糸球体萎縮、尿細管間質線維化などの加齢腎の老化形質を惹起した。さらに、腎臓での細胞老化の惹起と、それに付随するミトコンドリア異常や酸化ストレスレベル上昇も示した。【考察】AAN モデルは加齢腎モデルになる可能性があり、今後さらに介入実験による検証が必要と考えられた。

<わかば研究助成>

(申 請 書 記 載 の 課 題 名)

アンジオテンシン受容体機能調節因子による AKI-to-CKD の新規治療戦略

(報 告 者 名)

金口 翔

(共同研究者名も併記)

田村功一、涌井広道、小豆島健護、熊谷知博

(所 属 部 科 名)

腎臓・高血圧内科

1. 目 的

急性腎障害(AKI)から慢性腎臓病(CKD)への移行(AKI-to-CKD) は、末期腎不全へ進行しうるため問題視されている。AKI-to-CKD の病態解明は、あらたな腎臓病治療の開発につながる可能性がある。臨床現場において、高齢者は AKI の感受性が高く、AKI 後の CKD 進展率が高いことが知られている。腎臓は酸素・エネルギー需要の多い臓器であり、多大なエネルギーの消費の場であると同時に、さまざまな機能をもつ細胞が複雑に構成し、血管も豊富に分布していることなどから加齢性変化に感受性の高い臓器とされ、老化を起こした腎臓は**加齢腎**と呼称される。AKI-to-CKD の病態解明のため、加齢腎モデルの作成を行うこととした。アリストロキア酸 (AA) は DNA 損傷性を有し、主に腎臓尿細管細胞を標的とする薬物である。AA 腎症 (AAN) は急速かつ慢性的な腎機能低下を引き起こし、病理学的に顕著な尿細管間質線維化と寡少な尿細管再生像を伴う急性尿細管壊死の所見を特徴とする (Luciano and Perazella, 2015; Jadot et al., 2017)。AAN は**加齢腎**の性質を兼ね備えている可能性があるが、これまでに AAN と腎老化の関連性について十分に検証した報告はない。今回、我々は AAN マウスモデルが**加齢腎モデル**になりえることを検証することにした。

2. 方 法

C57BL/6 マウス、8 週齢、オスを Vehicle 群と AA 群の 2 群に振り分け、1 週間の馴化期間を設けた後、AA を投与開始した。AA 投与方法は、AA (3mg/kg)、週 2 回、4 週間腹腔内投与し、リモデリングとして投与後期間 4 週間を設けて解剖を行った。投与観察期間中に体重や血圧などの生理学的データを取得し、解剖時の標本で腎機能、腎病理所見に加え、腎臓における細胞老化、酸化ストレスレベル、抗老化関連遺伝子発現について解析した。

3. 結 果

Vehicle 群と比較し、AA 群では体重は有意に低下したが、収縮期血圧と心拍数については両群で差は明らかでなかった。また、AA 群では腎重量/体重比は有意に低下した。AA 群では血漿クレアチニン濃度、血漿尿素窒素濃度は有意に上昇し、クレアチニンクリアランスは有意に低下した。腎臓の病理学所見として、AA 群において糸球体面積低下と尿細管間質線維化の所見を認めたが、動脈硬化病変や糸球体硬化所見は明らかでなかった。リアルタイム定量 RT-PCR 解析では、AA 群で腎臓における collagen I、collagen III や TGF- β の mRNA 発現上昇を認めた。さらに AA 群で腎臓における細胞老化指標 p16、p53、p21、glutaminase の mRNA 発現上昇と senescence-associated β -galactosidase 染色陽性が明らかであった。透過型電子顕微鏡観察では、AA 群の近位尿細管細胞においてミトコンドリア異常と、それに付随するオートファジー亢進所見を認めた。また、AA 群で腎臓における 4-hydroxy-2-nonenal レベルが上昇した。ウエスタンブロットを用いた抗老化遺伝子発現解析では、AA 群で腎臓における Klotho 発現は低下したが、nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) や sirtuin (SIRT) 1 発現は有意な変動を示さなかった。

4. 考 察

今回の我々の AAN マウスモデルにおいて、腎機能の低下に加え、腎萎縮、糸球体萎縮、尿細管間質線維化などの**加齢腎**の老化形質を一部惹起した。さらに、腎臓での細胞老化の惹起と、それに付随するミトコンドリア異常や酸化ストレスレベル上昇も示した。この検討から、AAN の尿細管間質線維化や尿細管再生能低下などの特徴的な性質は、細胞老化などの老化関連機序が基盤となることが示唆された。また、腎臓における Klotho 発現低下から、この AAN マウスモデルで表出した老化表現型は Klotho と関連する可能性を示唆するが、今回の結果からは SIRT1 を介した経路との関連性は示されなかった。本研究の腎病変とこれら老化機序との因果関係については依然として十分に明らかにされていないため、**加齢腎モデル**として十分な適性を検証するためには、さらなる介入実験などが必要と考えられる。それにも関わらず、この AAN マウスモデルでは簡便な操作で**加齢腎**形質と細胞老化などの腎老化病態を引き起こした。今回の研究結果はこの AAN マウスモデルが**加齢腎モデル**として検討される端緒となることを示した。

AKI-to-CKD の病態関連因子としてレニン-アンジオテンシン-アルドステロン

系(RAS)が重要な役割を担うことが報告されており、RASの主要な情報伝達系である1型アンジオテンシンII受容体(AT1受容体)情報伝達系の過剰活性化は、AKI-to-CKDモデル動物において、腎線維化を促進することで病態形成に寄与している(Cheng S. Y, et al. Sci Rep, 2016. Rodriguez-Romo R, et al. Kidney Int, 2016)。研究代表者らは、これまでにAT1受容体結合性低分子蛋白(AT1 receptor-associated protein; ATRAP)が、AT1受容体の生理的情報伝達系には悪影響を与えずに、病的刺激の持続によるAT1受容体下流の臓器障害と関連した情報伝達系の過剰活性化に対してのみ選択的な抑制作用を発揮できるという機能上の大きな利点をもつ分子であることを明らかにしている(Tamura K, et al. Curr Pharm Des, 2013)。また、全身性 ATRAP 欠損マウスを長期飼育すると、野生型マウスを長期飼育した場合と比較して、腎機能低下や腎線維化が増悪し、腎老化が促進していたことを報告している(Uneda et al., 2017)。以上のことから、「腎局所での ATRAP の発現あるいは活性が、AKI-to-CKD、腎線維化、腎老化に関与し、ATRAP の活性化により腎障害進展を阻止できる」との仮説をたてており、今後、今回作成した加齢腎モデルマウスの腎臓における ATRAP をはじめとする RAS コンポーネントの発現調節の解析、ATRAP 活性化分子投与による加齢腎への影響を検討していく。

5. 論文及び学会発表(研究会を含む)

論文

Urate S, Wakui H, Azushima K, Yamaji T, Suzuki T, Abe E, Tanaka S, Taguchi S, Tsukamoto S, Kinguchi S, Uneda K, Kanaoka T, Atobe Y, Funakoshi K, Yamashita A, Tamura K. Aristolochic Acid Induces Renal Fibrosis and Senescence in Mice. Int J Mol Sci. 2021; 22: 12432.

学会発表(海外)

1. Chronic Aristolochic Acid Administrations Induce Renal Senescence in Mice. American Society of Nephrology Kidney Week 2021.
2. Angiotensin II type1 receptor-associated protein deficiency attenuates sirtuin1 expression in an immortalised human renal proximal tubule cell line. American Society of Nephrology Kidney Week 2019.

学会発表(国内)

1. アリストロキア酸腎症の加齢性変化についての検討. 第63回日本腎臓学会学術総会, 2020年.
2. 薬剤を用いた加齢腎モデル作成の検討. 脳心血管抗加齢研究会 2019, 2019年.

<わかば研究助成>

ヒト iPS-関節オルガノイドを用いた新規変形性関節症モデルの開発

大場 敬義^{1,2}

稲葉 裕¹、谷口 英樹²

1. 横浜市立大学大学院医学研究科 運動器病態学教室

2. 横浜市立大学大学院医学研究科 臓器再生医学教室

抄録

本研究では、当研究室開発のヒト iPSC 関節オルガノイドを駆使して、関節疾患として最も頻度の高い変形性関節症モデルを構築することを試みた。

変形性関節症の誘発薬剤としてモノヨード酢酸を選択した。ラット膝関節へのモノヨード酢酸投与により変形性関節症を誘発し、活動量低下を回転カゴの回転数で検証した。

モノヨード酢酸の有効性確認後、同薬剤をヒト iPS 関節オルガノイドの裂隙部へ投与し、変形性関節症様変化を誘発した。モノヨード酢酸が投与された関節オルガノイドは組織学的解析により、関節面の不整および線維化が認められ、変形性関節症に近い像を示した。

今後検証個体数の追加を行い、ヒト iPS 関節オルガノイド-変形性関節症モデルの確立を目指す。将来展望として、当該モデルを用いた薬剤スクリーニングを実施し、変形性関節症に対する新規薬剤の開発を目指す。

<わかば研究助成>

ヒト iPS-関節オルガノイドを用いた新規変形性関節症モデルの開発

大場 敬義^{1,2}

稲葉 裕¹、谷口 英樹²

1. 横浜市立大学大学院医学研究科 運動器病態学教室

2. 横浜市立大学大学院医学研究科 臓器再生医学教室

1. 目 的

ヒト関節組織に損傷や炎症が生じると、軟骨組織の再生は誘導されず変形性関節症へと進行する。これは関節に存在する軟骨細胞が、コラーゲンなどの細胞外基質内に点在し隔絶されているため、血流が極めて乏しい環境にあることが原因であると推測されている。このような背景から、ヒト iPS 細胞 (iPSC) 等を用いた革新的な軟骨再生療法の開発が期待されている。しかしながら、関節は骨から軟骨へ順次移行する組織が、関節包によってシールドされている複雑な構造体であることから、単に軟骨組織を再生させるだけでは十分な治療効果が得られないことが判明している。

当研究室では、世界に先駆けて骨-軟骨移行部と関節包を有する、「ヒト iPS 細胞由来関節オルガノイド」の創出に成功している。ヒト iPSC 関節オルガイドは、従来のヒト iPSC 軟骨と比較して、骨-軟骨移行部による高い衝撃吸収能、薬剤投与可能な裂隙部、移植時に強固な生着能を持つ骨組織を有する点などにおいて従来法と比較して極めて優れている。

本研究では、この独自性の高いヒト iPSC 関節オルガイドを駆使して、関節疾患として最も頻度の高い変形性関節症モデルを構築することを試みる。変形性関節症は、骨組織から伝わる軸圧や関節軟骨同士による摩擦によって進行するが、骨-軟骨移行部・裂隙部・骨組織を有するヒト iPSC 関節オルガノイドを使用することにより、従来法よりも格段に病態再現性の高い新たな変形性関節症モデルを構築できることが期待される。

2. 方 法

ヒト iPS 細胞を中胚葉細胞から軟骨前駆細胞へ発生プロセスに沿った

分化誘導を行い、長管骨様軟骨と関節包を誘導する。3次元培養系を活用し両者を融合させ、組織間相互作用により *in vitro* 関節オルガノイドを創出する。関節表層は物理的刺激、骨組織への分化は血流が不可欠であるため、ラットの関節部に隣接するようにオルガノイドを移植する。骨組織と骨-軟骨移行部は約 1.5 ヶ月の移植期間で再構成される。

変形性関節症の誘発因子として、直接損傷を加える方法と薬剤投与の方法が挙げられる。前者では、一度移植したオルガノイドを取り出し再度移植しなければならないため、本研究においては後者の薬剤投与方法を実施する。関節炎症モデルに一般的に使用されているモノヨード酢酸 (MIA) をヒト iPSC 関節オルガノイドの関節腔内へ投与し、投与後 1 ヶ月毎に CT にて炎症に伴う骨びらんや骨の変形の有無を追跡観察する。また、ヒト iPSC 関節オルガノイドの裂隙部を穿刺し、関節液中の炎症性サイトカインの定量的検証を実施する。関節表面の変化については、炎症惹起後のサンプルを摘出し、組織学的評価を実施する。全ての評価を生理食塩水を投与したコントロール群と比較することにより、本モデルの有用性を確認する。

3. 結 果

・ラット膝関節への投与によるモノヨード酢酸 (MIA) の有効性検討

ヒト iPSC 細胞由来関節オルガノイドを用いた変形性関節症モデルを作成するために、オルガノイドの裂隙部にモノヨード酢酸を投与する。モノヨード酢酸が変形性関節症の作成に有効か否か確認するためにラットの膝を用いて検証を行なった 10 週齢の免疫不全ラット (F344/IL2 ノックアウト) の左膝関節に 1 mg モノヨード酢酸/50 μ l 生理食塩水を投与した。コントロール群には 50 μ l 生理食塩水のみを投与した。変形性関節症の効果判定として、回転カゴ付きのゲージ内に飼育し、投与前および投与後 1 ヶ月の回転数を計測した。コントロール群では投与前平均 606.1 $\pm$ 155.2 回転/日、投与後 1 ヶ月は 587.4 $\pm$ 174.7 回転/日だった。これに対し、MIA 投与群では、投与前 766.6 $\pm$ 147.7 回転/日、投与後 1 ヶ月は 510.6 $\pm$ 240.5 回転/日だった (図 1)。以上より、MIA の膝関節投与によりラットの活動量低下の傾向が示され、膝関節への炎症が示唆された。今後、検証個体数を追加し、統計学的な解析を行う方針である。

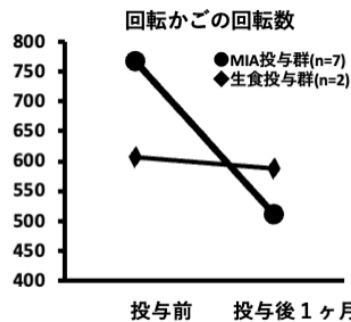


図1 MIA 膝関節投与によるラット活動量の検証

・ヒト iPS 関節オルガノイドを用いた変形性関節症モデルの作成

我々が開発に成功したヒト iPS 関節オルガノイドの裂隙部に 1 mg モノヨード酢酸/50 μ l 生理食塩水を投与し、変形性関節症様な病態再現が可能か否かを検証した。モノヨード酢酸が投与された iPS 関節オルガノイドは関節面の不整が認められ、軟骨マーカーである 2 型コラーゲンの消失および 1 型コラーゲンを有する繊維化構造が局所的に確認された (図 2)。

以上より、ヒト iPS 関節オルガノイドの変形性関節症様モデルの作成に成功した。今後、検証個体数の追加による統計学的解析、ヒト検体の変形性関節症組織像との比較検討を予定している。

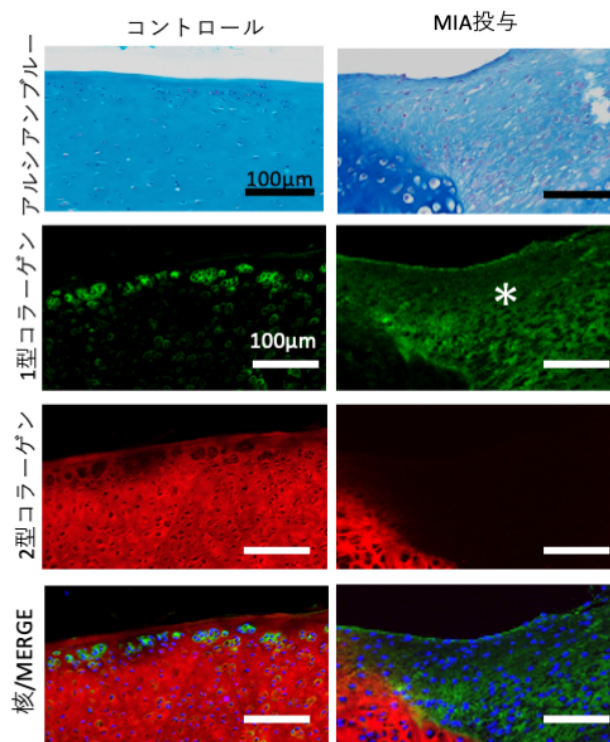


図2 ヒト iPS 細胞関節オルガノイドを用いた変形性関節症モデル

* 繊維化が示唆される部位

4. 考 察

モノヨード酢酸の有効性検討に使用したラットの活動量に個体差が大きかった。そのため投与前においても比較された2群に差があることが示唆された。これに対応するため、検証個体数の追加に加えて、変化量を比較するなど、個体差を考慮した比較方法が必要と考えた。

本報告では、世界初となるヒト iPS 関節オルガノイドを用いた変形性関節症モデルの作成に成功した。今後の課題は、検証個体数の追加による統計学的解析およびヒト検体との比較検討である。

ヒト iPS 関節オルガノイド・変形性関節症モデルの確立後は、当該モデルを用いた薬剤スクリーニングを実施し、変形性関節症に対する新規薬剤の開発を目指す。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

現在論文執筆中である。

<わかば研究助成>

神経変性疾患の凝集体形成における SGTA の機能解析

窪田 瞬

土井 宏、田中 章景

横浜市立大学附属病院 脳神経内科・脳卒中科

神経細胞内におけるタンパク質凝集体形成はポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病 (PD)、多系統萎縮症 (MSA) などの神経変性疾患に共通して見られる病理学的特徴の一つで、神経変性の分子病態、疾患の進行、発症に密接に関与していると考えられる。我々はポリグルタミン病モデル細胞において、凝集体の構成要素として small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein alpha (SGTA) を同定している。そこで、実際に神経変性疾患症例の剖検脳において免疫組織染色を行った結果、SGTA はポリグルタミン病の凝集体内だけでなく、MSA 症例の α シヌクレイン凝集体中にも蓄積が認められた。一方で同じ α シヌクレインからなる PD の Lewy 小体への SGTA 蓄積は認められず、細胞モデルで α シヌクレインとの共局在を認めなかった。SGTA はポリグルタミン病および MSA の分子病態メカニズムの修飾因子として作用する可能性、および MSA と PD の α シヌクレイン凝集体は性質が異なる可能性が示唆された。

<わかば研究助成>

神経変性疾患の凝集体形成における SGTA の機能解析

窪田 瞬

土井 宏、田中 章景

横浜市立大学附属病院 脳神経内科・脳卒中科

1. 目的

神経組織への凝集体タンパク質の沈着は、ポリグルタミン (polyglutamine: polyQ) 病、パーキンソン病 (Parkinson disease: PD)、多系統萎縮症 (multiple system atrophy: MSA)、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) などの神経変性疾患に共通して見られる最も重要な病理学的特徴の一つである。凝集体の構成分子はそれぞれの疾患に共通のものと特異的なものがあるが、異常タンパク質の凝集・蓄積は、神経変性の分子病態に共通した現象であり、この解明は神経変性疾患克服のための中核を成している。我々は、これまでの研究で polyQ 凝集体を形成するハンチントン病 (Huntington disease: HD) モデル細胞において、polyQ 凝集体の構成分子として、small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein alpha (SGTA) を同定していた。そこで、SGTA が実際に神経変性疾患症例の剖検脳において凝集体中に存在するかどうかを検討したところ、HD のみならず各種 polyQ 病に共通して凝集体内に蓄積を認め、さらに MSA 症例の凝集体にも存在することを明らかにした (Kubota S, *et al.*, *Mol Brain*, 2021)。すなわち、SGTA は複数の神経変性疾患の分子病態に関与する重要なキー因分子である可能性が示唆された。そこで、本研究を通じ、polyQ 病ならびに MSA の凝集体形成における SGTA の役割を分子レベルで解明し、将来の治療法開発の基盤を構築することを目的とした。

2. 方法

① 神経変性疾患症例の剖検組織に対する病理学的解析

ポリグルタミン病の一つである SCA1 症例剖検脳、PD ならびに MSA 症例剖検脳、ALS 症例剖検脊髄に対して、各疾患の凝集体責任タンパク質に対する抗体と抗 SGTA 抗体で蛍光免疫組織染色を行い、SGTA の神経組織内での局在ならびに神経細胞内凝集体と SGTA の共局在に関して組織学的な検討を行った。

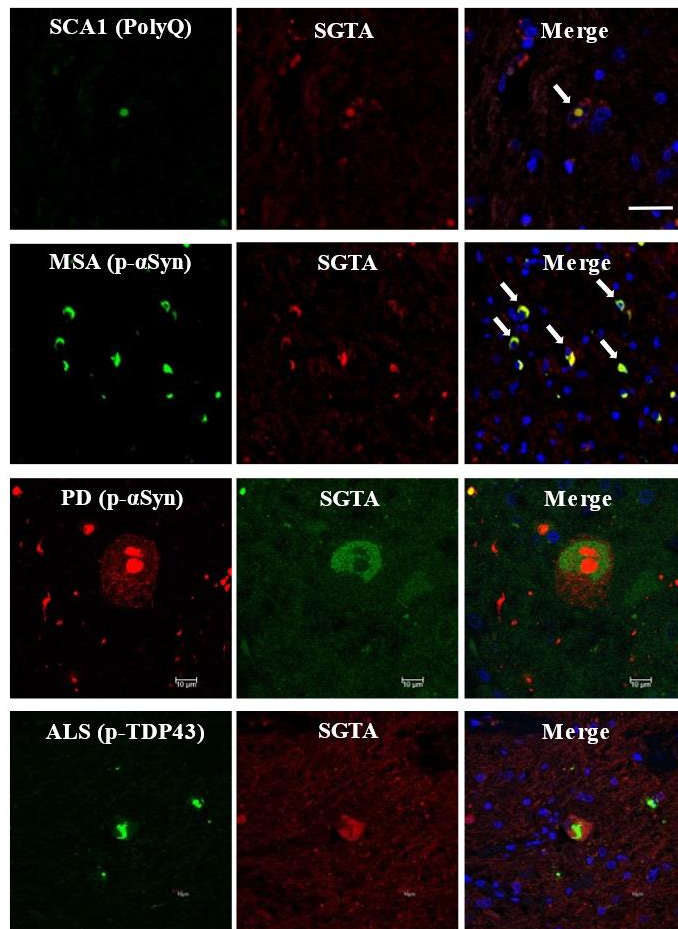
② 培養細胞系における凝集体と SGTA の共局在の確認

神経系の培養細胞株である Neuro2a 細胞に PD や MSA の凝集体構成因子である α シヌクレイン (α Syn) ならびに α シヌクレイン線維化タンパク質 (F- α Syn) を共発現させて α Syn 凝集体を形成させ、SGTA との共局在がみられるか免疫蛍光二重染色を行った。

3. 結果

・神経変性疾患神経組織に対する二重蛍光免疫組織染色

SCA1 の剖検脳では脳幹の神経細胞で polyQ によって構成される神経細胞核内封入体と



scale bar = 20μm

Fig.1 神経変性疾患症例に対する二重蛍光免疫組織染色
凝集体との共局在は確認されなかった (Fig. 2)。

SGTA の共局在がみられた。また MSA 症例の剖検脳では SGTA はリン酸化 α シヌクレイン (p- α Syn) から成るグリア細胞質内封入体と共局在がみられたが、PD 症例の剖検脳における神経細胞内封入体、ALS 症例の剖検脊髄における運動ニューロン内凝集体と SGTA の共局在はみられなかった (Fig.1)。

・培養細胞系における α Syn 凝集体形成実験

α Syn 発現プラスミドベクターならびに α Syn 線維化タンパク質 (F- α Syn) を transfection させた細胞では細胞質に α Syn 凝集体が形成された。 α Syn のみ発現させ、F- α Syn は加えなかった細胞では凝集体の形成はみられなかった。SGTA はいずれの細胞でも細胞質、核にびまん性に局在しており、

4. 考察

我々は SGTA が神経変性疾患症例の剖検脳において各種 polyQ 病ならびに MSA 症例の凝集体に存在することを過去に報告している (Kubota S, et al., *Mol Brain*, 2021)。もともと SGTA は細胞質内タンパク質品質管理に関わるコシャペロンであることが知られており (Leznicki P, et al., *J. Cell. Sci*, 2015)、細胞内で凝集体が形成される過程に影響を与えているものと考えられる。PD で形成される凝集体である Lewy 小体と MSA で形成されるグリア細胞質内封入体 (GCI) はいずれも α Syn を主成分とすることから PD と MSA は α シヌクレイノパチーと総称される。 α Syn から構成される凝集体が病理学的な特徴である

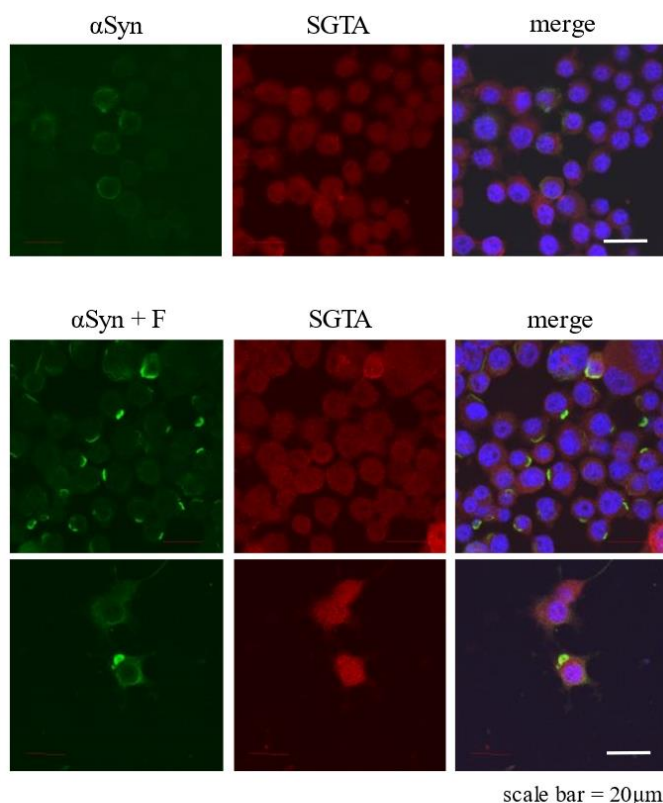


Fig. 2 Neuro2a 細胞を用いた α Syn凝集体発現実験

まず正常タンパク質に何らかの原因で立体構造の変化が起こり、異常な立体構造を持ったタンパク質を鋳型として自己重合を繰り返すことで小さなオリゴマーから次第にアミロイド線維状の凝集体が形成され、それがさらに折り重なっていき、周囲のタンパク質も巻き込んで成長していくことで最終的に不溶性の巨大な凝集体が形成されていくと考えられている。今回、神経系細胞株 (Neuro2a) に α Syn を強制発現させたが、 α Syn 単独の発現では凝集体は形成されず、 α Syn 線維化タンパク質 (F- α Syn) も加えた細胞で α Syn 凝集体を形成させることができた。しかし、今回の実験で形成された α Syn 凝集体中に SGTA は認められなかった。凝集体形成の過程において凝集体の特性は、鋳型となる異常タンパク質と凝集体が形成される周囲の細胞内環境の両者によって差異が生じると考えられており、Neuro2a で形成された α Syn 凝集体は Lewy 小体に特性が近く SGTA が共局在しなかった可能性が考えられる。今後、発現させる α Syn をより毒性の高い変異を持った α Syn に変更し、グリア系培養細胞株などを用いて同様の実験を行い α Syn 凝集体と SGTA の関連についてさらなる解析を行っていく予定である。

5. 論文及び学会発表 (研究会を含む)

Kubota S, Doi H, Koyano S, Tanaka K, Komiya H, Katsumoto A, Ikeda S, Hashiguchi S, Nakamura H, Fukai R, Takahashi K, Kunii M, Tada M, Takeuchi H, Tanaka F. SGTA associates with intracellular aggregates in neurodegenerative disease. *Mol Brain*. 2021 Mar 23;14(1):59.

という共通点があるものの PD と MSA の臨床経過は大きく異なっており、MSA はより経過が早く、臨床症状も重篤であるが、この差がどこから生じるかは分かっていない。近年、MSA と PD の凝集体はコンフォメーションや細胞毒性において異なる特徴を持っていることが報告され、2つの疾患の臨床像の違いを説明するものとして注目されている (Peng C, et al., *Nature*, 2018)。SGTA は GCI からのみ認められており、2つの凝集体の性質に差を与える因子である可能性が考えられる。本実験で SGTA と α Syn 凝集体のより詳細な機能解析を行うために培養細胞系で凝集体形成の再現を試みた。タンパク質凝集体が形成される分子メカニズムとしては、

＜わかば研究助成＞

脳室内にホルマリン投与を追加するチール法変法による頭頸部解剖実習に適した固定法の開発

三宅茂太

末永潤

横浜市立大学 大学院医学研究科 脳神経外科

抄録（５００字以内）

目的：TEIF（脳室内ホルマリン投与を用いた修正 Thiel 法）は脳室内にホルマリン投与を追加することで Thiel 法の弱点である脳の軟化を改良し手術と同様な脳の弾性を再現する新たな固定法である。本研究では、特に TEIF 固定後の脳の硬度の経時的な変化を明らかにすることを目的とし、至適な脳の硬度が得られるタイミングを同定することとした。さらに、固定された御遺体の解剖を通じて、大脳鎌周辺の静脈解剖を検証することとした。

方法：ラットに対し、TEIF 固定を行ない、固定後のラット脳の表面硬度測定を行なった。さらに、7 体の御献体から摘出した 14 側の大脳鎌について静脈の走行を評価した。

結果：ラットを用いた実験では、硬化の進行は約 3 日程度で飽和し、特に 24 時間から 48 時間が無固定の脳と同様の硬度であった。その後硬度は 2 ヶ月まで変化せず、硬度が維持されることが示唆された。

さらに大脳鎌周辺の静脈解剖の検討では、大脳鎌に直接流入する静脈は 7 本/14 側（50%）に認められた。また、大脳鎌の縦割は鈍的に実施可能で、その正中を横切る静脈構造は無く、大脳鎌内の静脈はそれぞれの固有硬膜内を走行することが明らかとなった。

結語：解剖学は今でも有意義な研究領域である。

<わかば研究助成>

脳室内にホルマリン投与を追加するチール法変法による頭頸部解剖実習に適した固定法の開発

三宅茂太 末永潤

横浜市立大学 大学院医学研究科 脳神経外科

1. 目 的

高度な外科手術の開発や安全性の向上には解剖実習が有用である。しかし頭頸部解剖実習においては固定法に伴う問題点が指摘されている。脳神経外科では、「脳、脳神経、血管を保護しつつ頭蓋骨を細小ドリルで掘削し、深部脳表面の髄膜のみを顕微鏡下に切開し脳実質へ至る」極めて精緻な技術が要求される。この技術の習得には頭蓋外（軟部組織の展開）と頭蓋内（深部・脳実質の展開）を連続して実習することが求められる。これに対し従来のホルマリン固定と Thiel 法固定には一長一短あり、特にホルマリン固定による脳の硬化と Thiel 法固定による脳の軟化という固定法の限界が頭蓋内の実習を制限してきた。

これに対し我々は、TEIF（脳室内ホルマリン投与を用いた修正 Thiel 法）を開発した（Shigeta Miyake. Et al., 2020）。TEIF は脳室内にホルマリン投与を追加することで Thiel 法の弱点である脳の軟化を改良し手術と同様な脳の弾性を再現する全く新たな固定法である。TEIF では、頭蓋外の軟部組織は Thiel 法の特徴を維持し、同時に頭蓋内の脳や血管の弾性を適切に固定することで、手術と同様の術野展開および頭蓋内操作が可能となると期待されている。

本研究では、特に固定後の脳の硬度の経時的な変化を明らかにすること (A) を目的とし、至適な脳の硬度が得られるタイミングを同定することとした。さらに、固定された御遺体の解剖を通じて、大脳鎌周辺の静脈解剖を検証 (B) することとした。

2. 方 法

A) 実験動物を用いた固定条件検討

ラットに対し、TEIF 固定を行なった。灌流固定は Thiel 法と同様に行ない、10%ホルムアルデヒドを側脳室前角に注入した。固定後のラット脳を取り出し、表面硬度測定を行なった。固定時間は 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 時間および、7, 28, 56 日とした。

B) 御献体における大脳鎌周辺の静脈解剖の検討

7 体の御献体から摘出した 14 側の大脳鎌について直接流入する静脈構造の有無及び、大脳鎌の縦割により大脳鎌内部での静脈の走行を評価した。

3. 結 果

A) 実験動物を用いた固定条件検討

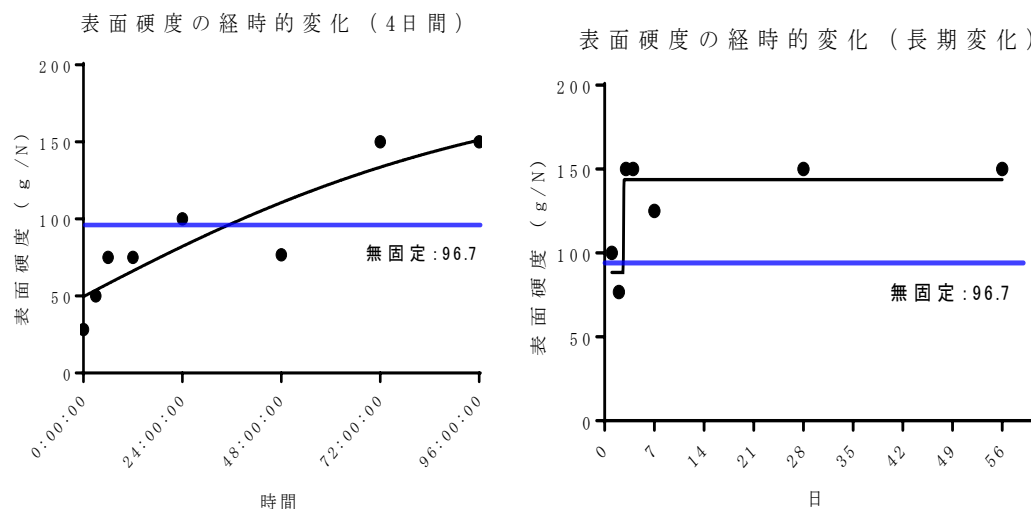


図1 Thiel 変法における脳室内へのホルマリン投与後の経時的変化

左：4 日間の短期的変化 右：2 ヶ月間の長期的変化

青線：先行研究から明らかとなった無固定（死後直後）の脳の硬度

脳室内ホルマリン投与後の脳の表面硬度の経時的変化を示した。ラットを用いた検討では投与開始から約 6 時間で線形に硬化し、その後 3 日間で徐々に硬化が進行した。24 から 48 時間が対照群と同様の硬度であった。その後硬度は 2 ヶ月まで変化せず、硬化の進行は約 3 日程度で飽和し、硬度が維持されることが示唆された。

B) 御献体における大脳鎌周辺の静脈解剖の検討

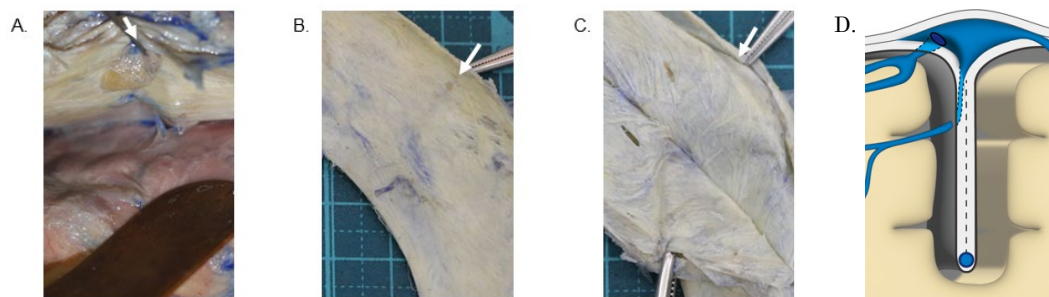


図2 大脳鎌に直接流入する静脈およびその大脳鎌における走行

A, B：大脳鎌に直接流入する静脈 C：大脳鎌の縦割像 D：イラスト

白矢印：ラムダ縫合の位置

大脳鎌に直接流入する静脈は 7 本/14 側（50%）に認められ、冠状縫合かラムダ縫合の直

下に存在した。大脳鎌の縦割は鈍的に実施可能で、左右の固有硬膜に分離可能であったが、その正中を横切る静脈構造は無く、大脳鎌内の静脈はそれぞれの側の固有硬膜内を走行すると考えられた。

4. 考 察

Thiel 変法における経時的な脳硬度の変化についての基礎的な研究結果及び、御献体の解剖を通じて大脳鎌周辺の静脈解剖に対して行なった検討について報告した。

Thiel 変法における脳硬度の経時的な変化は今までに報告が無く新たな知見である。本結果からは Thiel 変法では長期間保管においてもホルマリン固定よりも柔軟な脳を維持できる可能性が示唆された。今後、脳室内に投与する固定液の条件検討を行なうことで、長期保存に適し、長期間脳の硬度や柔軟性、膜構造を維持する固定法を確立することが研究課題となった。

さらに、大脳鎌に直接流入する静脈についての解剖学的検討では、上矢状静脈洞に直接流入せず、大脳鎌に直接流入する静脈の存在を明らかにし、かつそのような静脈が大脳鎌の内部で正中を超えずに片側の固有硬膜内を走行することを明らかにした。大脳鎌における静脈構造は falcine venous plexus として報告があったものの、固有硬膜内を走行することは新たな知見であった。この解剖学的特徴は、今まで固有の entity と考えられてこなかった”傍矢状部硬膜動静脈瘻”の臨床的特徴を的確に説明するものであり、臨床的な意義が大きいと考えられた。そのため、この解剖学的特徴と傍矢状静脈洞部硬膜動静脈瘻の臨床的特徴について、国際学会での発表及び査読付き英文誌への投稿を行なった。

解剖学は古い学問である一方で、臨床の進歩（診断・分類の変化や治療学の変化）によって新たな知見を生み出す可能性がある。固定法の検討と、臨床的に意義のある解剖学的検討を今後も継続する決意である。本研究に御協力いただいた皆様、特に御献体された有美会の皆様並びに御家族に心より感謝いたします。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

論文：Shigeta Miyake, Yasunobu Nakai et.al., Characteristic of Non-Sinus-type Parasagittal Dural Arteriovenous Fistulas: Clinical and Cadaveric Experiences. Neurosurgery Open. Under review

発表：Shigeta Miyake, Yasunobu Nakai. Parasagittal dural arterio-venous fistula as a new entity of non-sinus type dural arterio-venous fistula: Cadaveric and clinical evaluation. 16th Congress of World Federation of Interventional and Therapeutic Neuroradiology. Session: Oral 2-3 Specific Angioarchitecture. 2022/08/22, Kyoto

三宅茂太. Thiel 法における脳固定オプションの試み. 第4回 CST 研究会. 2021.11.3. 千葉大学

＜医療技術研究助成＞

全身麻酔薬セボフルランによる睡眠/覚醒サイクルの位相のずれに対する ラメルテオンの同調効果

眞鍋 千恵¹⁾

福田 真佑¹⁾、新倉 怜²⁾、宮崎 智之²⁾、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⁾ 横浜市立大学大学院医学研究科 麻酔科学

【背景】ヒトは概日リズムが同調され位相を正常に保つことで、健康的で規則的な日常生活を送ることができるが、全身麻酔により睡眠/覚醒サイクルの位相にずれが生じるといわれており、手術後の患者に睡眠障害が起きることがある。臨床現場で汎用されているラメルテオンは、睡眠/覚醒サイクルの位相のずれの再同調を促進する効果がある。そこで、全身麻酔薬セボフルランによる睡眠/覚醒サイクルの位相のずれに対して、ラメルテオンの同調効果を明らかにすることを本研究の目的とした。【方法】C3H/HeN マウスを対照群とラメルテオン投与群に分けた。恒暗環境での馴化後、セボフルラン麻酔下で対照群にはメチルセルロース、ラメルテオン群にはラメルテオンをそれぞれ皮下注射した。マウスの車輪走行活動のデータからアクトグラムと活動開始時刻求め、休息/活動サイクルの位相のずれを評価した。【結果】セボフルラン麻酔後1日目の車輪走行活動の開始時刻は、両群とも麻酔投与前日より早まったが、麻酔後14日目では、ラメルテオン群の活動開始時刻が対照群と比較して約1時間遅くなった。【考察】セボフルラン麻酔のメラトニン受容体への作用により活動開始時刻が早まった可能性がある。また、ラメルテオンはセボフルラン麻酔により前進した位相を正常な位相状態へと同調するように働くことが示唆された。今後、セボフルラン麻酔およびラメルテオン投与による時計遺伝子の発現変化を明らかにしていく必要がある。

<医療技術研究助成>

全身麻酔薬セボフルランによる睡眠/覚醒サイクルの位相のずれに対する
ラメルテオンの同調効果

眞鍋 千恵¹⁾

福田 真佑¹⁾、新倉 怜²⁾、宮崎 智之²⁾、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⁾ 横浜市立大学大学院医学研究科 麻酔科学

1. 目的

ヒトをはじめとする生体がもつ地球の自転周期に従う生理機能の周期性を概日リズムという。ヒトの概日リズムの周期は 24.1～25.1 時間 (今井ら, 2021)で外界の 24 時間周期とずれが生じるが、生体に備わる概日リズムの位相 (周期の一時点) を外界の 24 時間周期の明暗位相に同調する機構 (川口ら, 2007)により位相が正常に保たれることで、ヒトは健康的で規則的な日常生活を送ることができる。概日リズムと最も深い関係を持つ生理機能は睡眠/覚醒サイクルであり、概日リズムの位相がずれることで睡眠障害が起きる。全身麻酔下手術後の患者には総睡眠時間の短縮、睡眠の断片化が起きる (高江洲ら, 2018)が、これは全身麻酔による睡眠パターンの変化と概日リズムの位相が正常に保たれないことによると考えられている。これまで、全身麻酔が睡眠/覚醒サイクルに与える影響は、様々な動物実験で検証されており (Ludin et al., 2021; Imai et al., 2020)、セボフルラン麻酔によりマウスの睡眠/覚醒サイクルの位相がずれることが明らかとなっている。臨床現場では、術後の睡眠障害に対して入眠困難改善薬であるラメルテオンが汎用されている。ラメルテオンはメラトニン受容体アゴニストで、既存の睡眠薬よりも副作用が少なく生理的な睡眠をもたらす効果がある (宮本, 2008)。また、ラメルテオンは、睡眠/覚醒サイクルの位相のずれの再同調を促進する効果がある (Hirai, 2005)ため、セボフルラン麻酔による睡眠/覚醒サイクル位相のずれをラメルテオンの投与により正常な位相に戻すことができるのではないかと考えた。以上のことから、本研究の目的は、全身麻酔薬セボフルランによる睡眠/覚醒サイクルの位相のずれに対するラメルテオンの同調効果を明らかにすることとした。

2. 方法

雄性 C3H/HeN マウス (22 週齢) (日本 SLC 株式会社、静岡) をラメルテオン投与群と対照群 (各 4 匹/群) に分け、温度 (23.5 ± 0.8 °C)、湿度 (61 ± 3.3 %) の環境下で飼育した。餌と水は自由に与えた。各マウスは走行車輪を備えた個別のケージ (15 × 25 × 15.3 cm) で 12 時間

明期/12 時間暗期の明暗条件に 4 週間馴化したのちに 24 時間暗期の恒暗条件に 2 週間馴化させた。すべてのケージはコンピュータ制御のデータ収集システムに接続して車輪走行活動を連続的に測定し、専用のソフトウェア(Actmaster4M、メルクエスト、富山)でデータを可視化及び分析した。各マウスの車輪走行の活動量を 1 分毎に記録し、5 分毎の集計結果をアクトグラム(縦軸は活動量、横軸は時間(48 時間；各段後半 24 時間と次の段の前半 24 時間は重複する))で記録した。恒暗条件における概日リズムは車輪走行活動によって定義した。先行文献 (Van Reeth et al., 1997)を基に車輪走行活動の開始時刻を circadian time (CT) 12 とし、次の車輪走行活動の開始時刻までを 24 分割することで CT0~23 を定めた。恒暗条件での馴化期間終了後、3 日間連続で、CT8~12 にセボフルラン(ヴィアトリス製薬、NY)を濃度 2.5%、酸素濃度 40%、流量 2L/分でマウスに吸入投与し、CT10 時点で 30mg/kg/mL のラメルテオン(Sigma-Aldrich、MO)を皮下注射した。対照群には同量のメチルセルロース(富士フイルム和光純薬株式会社、大阪)を投与した。投与は 3 ルクス以下の赤色灯下で行った。位相の前進や後退は、活動開始時刻から読み取った。

3. 結果

図 1 A に対照群、B にラメルテオン群のアクトグラムを示した。対照群 4 匹中先行研究に基づいて決定した活動開始の条件を満たさない 2 匹と、実験中に死亡したラメルテオン群 2 匹は除外した。麻酔および試薬投与期間はグレーの四角で

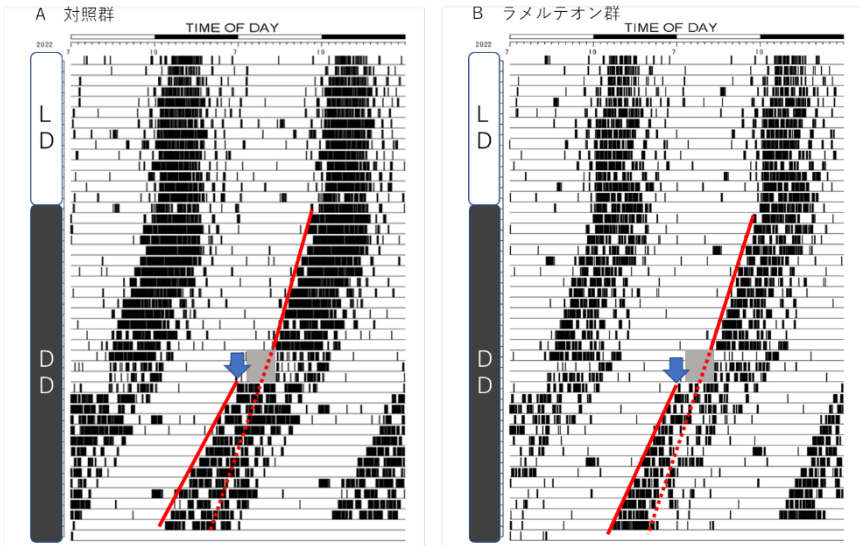


図1 2群のアクトグラム

示した。3 日間のセボフルラン麻酔後、両群の活動開始は早まった(図 1A、B 青矢印)。対照群は、麻酔投与後に位相の傾きが麻酔投与前よりも鈍化した(図 1A 赤実線および破線)。一方で、ラメルテオン群の位相の傾きは麻酔投与前後でほぼ同等であった(図 1B 赤実線および破線)。

表1 麻酔投与前後の活動開始時刻の変化

	対照群		ラメルテオン群	
マウス	A	B	C	D
麻酔投与前日	13:00	12:40	13:00	13:50
麻酔投与後 Day1	7:10	8:00	7:20	9:20
麻酔投与後 Day7	2:30	2:40	2:50	2:10
麻酔投与後 Day14	20:50	21:00	22:10	22:10

セボフルラン麻酔後 1 日目の活動開始時刻は、両群とも麻酔投与前日の活動開始時刻よりも早まり、最小で 4 時間 30 分 (表 1D)、最大でも 5 時間 50 分 (表 1A)早く活動を開始していた。麻酔投与後 7 日目では、両群の活動開始時刻はほぼ同様に、麻酔投与後 14 日目では、ラメルテオン群で活動開始時刻が対照群よりも約 1 時間遅くなった (表 1 赤枠)。

4. 考察

本研究ではセボフルラン麻酔後の位相のずれに対するラメルテオンの同調効果を調べた。実験の結果、セボフルラン麻酔により、両群とも活動開始時刻が早まることが明らかとなった。この結果は、セボフルランにより概日リズムの位相が後退した先行研究(Kadota et al., 2012; Ohe et al., 2011)とは異なっていた。しかし、先行研究は明暗条件 3 日、恒暗条件 3 日の馴化期間と比較し、本研究では馴化期間を十分に設け、マウスの概日リズムが完全に確立された状態で麻酔投与を行った。被験体数は少ないものの、個体差が大きい実験系において群間で類似した結果が得られたことは本実験系の信頼性の高さを示唆する。また、今回、ラメルテオンの同調効果を確認するため、メラトニンを生合成できる C3H/HeN マウスを実験に使用したが、Kadota ら(2012)および Ohe ら(2011)は、遺伝的にメラトニンの生合成ができないマウスを使用していた。メラトニン受容体のうち、メラトニン 2 型(MT2)受容体は概日リズムの位相を変位させる(前村, 2011)ため、セボフルランが及ぼすメラトニンあるいはその受容体への作用がの違いが、本実験と先行研究との結果の違いの要因となった可能性がある。

興味深いことに、麻酔投与後 7 日目時点では両群の活動開始時刻に差はなかったが、投与後 14 日目ではラメルテオン群の活動開始時刻は対照群よりも 1 時間遅れていた。ラメルテオンは、概日リズムの位相を変位させる MT2 受容体への親和性が高く、急激に前進させた明暗条件の再同調を促進する作用がある(Hirai et al., 2005)。そのため、ラメルテオンは、セボフルラン麻酔により急激に前進した位相においてもマウスの概日リズムの正常な位相に戻す同調作用を示すことが示唆されたと考える。

概日リズムは、脳内の視交叉上核に発現する時計遺伝子によって制御されている(今井ら, 2021)。本実験で認められたセボフルラン麻酔後の急激な位相の前進には、時計遺伝子の発現変化が関与している可能性も考えられる。先行研究 (Kadota et al., 2012; Ohe et al., 2011)では、セボフルラン麻酔により時計遺伝子 *Per2* の発現が抑制されることが明らかになっている。その一方で、吸入麻酔薬による時計遺伝子の発現変化が位相のずれを生じさせる直接的な根拠は乏しい(今井ら, 2021)ともいわれる。本実験では時計遺伝子の発現検証は行っておらず、先行研究と異なる結果となった要因について、今後、セボフルラン麻酔およびラメルテオン投与による脳内の時計遺伝子の発現変化を明らかにしていく必要がある。

5. 論文及び学会発表(研究会を含む)

本研究に関して、本調査終了後に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＞

SARS CoV-2 感染症のスクリーニングにおける SARS-CoV-2 抗原試薬の 有用性の評価

村上 直樹

和泉 彬彦

廣瀬 春香

海老名 俊明

横浜市立大学附属市民総合医療センター 臨床検査部

抄録（500 字以内）

【目的】新型コロナウイルス(以下、SARS-CoV-2)の抗原定量検査は、抗原定性検査と比べ感度が高く、リアルタイム RT-PCR 法(以下、PCR 法)の代用となる事が期待されているが、陽性と判定するカットオフ値は施設毎に異なっている。今回我々は電気化学発光免疫測定法(以下、ECLIA 法)の抗原定量検査が、新型コロナウイルス感染症(以下、COVID-19)のスクリーニングとして使用できるかを検討、評価した。【方法】PCR 法により SARS-CoV-2 を測定した検体を ECLIA 法にて測定し、判定一致率と Ct 値、COI を評価した。感染性を有する期間に採取した検体を希釈し、Ct 値と COI を比較した。【結果】発症 10 日目以内の検体において、カットオフ値 1.00 COI(メーカー設定値)とした場合の陽性一致率は 75.7%、さらに Ct 値 35.0 未満の検体において、カットオフ値を 0.90COI とすると 100.0%であった。感染性を有するがウイルス量の少ない検体の COI は、1.00 前後であり、検出可能であった。以上より、PCR 法と比して迅速性、処理能力に優れた ECLIA 法による抗原定量検査は、COVID-19 のスクリーニング検査として有用であることがわかった。

<医療技術研究助成>

SARS CoV-2 感染症のスクリーニングにおける SARS-CoV-2 抗原試薬の
有用性の評価

村上 直樹

和泉 彬彦

廣瀬 春香

海老名 俊明

横浜市立大学附属市民総合医療センター 臨床検査部

1. 目的

COVID-19 は 2022 年 9 月現在でもパンデミックの最中にある。SARS-CoV-2 は感染力が強く、集団感染を防ぐためには迅速な検査が求められており、様々な検査方法が開発されてきている。2021 年 3 月に ECLIA 法の SARS-CoV-2 抗原定量検査が保険適用となった。抗原定量検査は、抗原定性検査のイムノクロマト法と比して感度が高く、SARS-CoV-2 の RNA 遺伝子を増幅しウイルスを検出する PCR 法の代用となる事が期待されている検査である。PCR 法は、測定に 2~3 時間と長時間を要し、一定量の検体をまとめて処理するために、連続的に検査をすることが困難という欠点がある。対して、ECLIA 法の抗原定量検査は、検体の前処理後、装置による測定時間が 18 分と短時間であり、個々の検体を連続的に測定することが可能であり、より迅速に COVID-19 の診断ができると言われている。しかしながら、再検査を実施する基準や、陽性と判定するカットオフ値(メーカー設定値は 1.00 COI)は施設毎に異なっているのが現状である。今回、SARS-CoV-2 を PCR 法で測定した検体を、ECLIA 法の抗原定量検査試薬で測定し、COVID-19 のスクリーニング検査として使用できるかを検討・評価することを目的とした。

2. 方法

1) 対象

当院において PCR 法にて SARS-CoV-2 を測定した鼻咽頭ぬぐい液検体(輸送・保存培地はコパン UTM を使用)を対象とした。全 172 検体、陽性は 92 例、陰性は 80 例であった。

2) 測定試薬・測定機器

PCR 法：試薬「新型コロナウイルス検出キット-マルチ」(東洋紡株式会社)、機器「cobas z 480 analyzer」「LightCycler480 instrumentII」(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)。

ECLIA 法：試薬「エクルーシス試薬 SARS-CoV-2 Ag」、機器「Cobas 8000 e801 モジュール」(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)。

3) 用語解説

PCR 法の Cycle Threshold 値(以下、Ct 値)は、PCR 検査において陽性と判定するまでに必要とした、ウイルス中の核酸の増幅工程の回数(サイクル数)を示す数値である。ウイルス量が多い場合、Ct 値は小さくなり、ウイルス量が少ない場合、Ct 値は大きくなる。本研究における PCR 法の判定は、Ct 値が 40.0 以下のものを陽性とし、Ct 値は小数点第 2 位を切り捨てとした。

ECLIA 法のカットオフインデックス(以下、COI)は、抗原定量検査の結果値であり、数値が大きい程、抗原の量が多いことを示す。

4) 評価方法 1

PCR 法を基準とし ECLIA 法との判定一致率(ECLIA 法のカットオフ値：1.00 COI, 0.90 COI 各々)の算出とその Ct 値と COI を評価した。ROC 曲線による解析を行い、カットオ

フ値を検証した。

5) 評価方法 2

発症 2～4 日目の 3 症例から採取された検体をコパン UTM にて段階希釈し、PCR 法、ECLIA 法にて測定し、その Ct 値と COI を評価した。

3. 結果

1) 評価方法 1

PCR 法と ECLIA 法の全例における判定一致率は、ECLIA 法のカットオフ値を 1.00 COI とした場合、陽性一致率：50.0 %、陰性一致率：98.8 %、0.90 COI とした場合は、陽性一致率：57.6 %、陰性一致率：97.5 %であった(表 1)。次に、感染性を有する発症 10 日目以内の検体(37 例)を対象としたところ、カットオフ値 1.00 COI では、陽性一致率：75.7 %、カットオフ値 0.90 COI では、83.8 %(表 2)であった。カットオフ値を 0.90 COI とし、Ct 値別に算出すると、35.0 未満の検体では、陽性一致率は 100.0 %であった(表 3)。PCR 法陰性 80 例と発症 10 日以内かつ Ct 値 35.0 未満の陽性 29 例にて ROC 曲線による解析の結果、カットオフ値は 0.90 COI と算出され、感度は 100%、特異度 97.5%、AUC は、0.998 となった (図 1)。

表 1 全例の陽性一致率・陰性一致率

(A)カットオフ値：1.00 COI(メーカー設定値)

		PCR法	
		+	－
ECLIA法	+	46	1
	－	46	79

(B)カットオフ値：0.90 COI

		PCR法	
		+	－
ECLIA法	+	53	2
	－	39	78

A：ECLIA法のカットオフ値 1.00 COI の場合、陽性一致率(感度)：50.0 %、陰性一致率(特異度)：98.8 %

B：ECLIA法のカットオフ値 0.90 COI の場合、陽性一致率(感度)：57.6 %、陰性一致率(特異度)：97.5 %

表 2 発症 10 日目以内の ECLIA 法カットオフ値ごとの陽性一致率

	ECLIA法陽性	陽性一致率
カットオフ値 1.00 COI	28	75.7 %
カットオフ値 0.90 COI	31	83.8 %

*発症 10 日目以内の PCR 法陽性は 37 例

表 3 発症 10 日目以内・ECLIA 法カットオフ値 0.90 COI の Ct 値別の陽性一致率

Ct値	PCR法件数	ECLIA法陽性	陽性一致率
～ 24.9	13	13	100.0 %
25.0 ～ 29.9	7	7	100.0 %
30.0 ～ 34.9	9	9	100.0 %
35.0 ～ 40.0	8	2	25.0 %

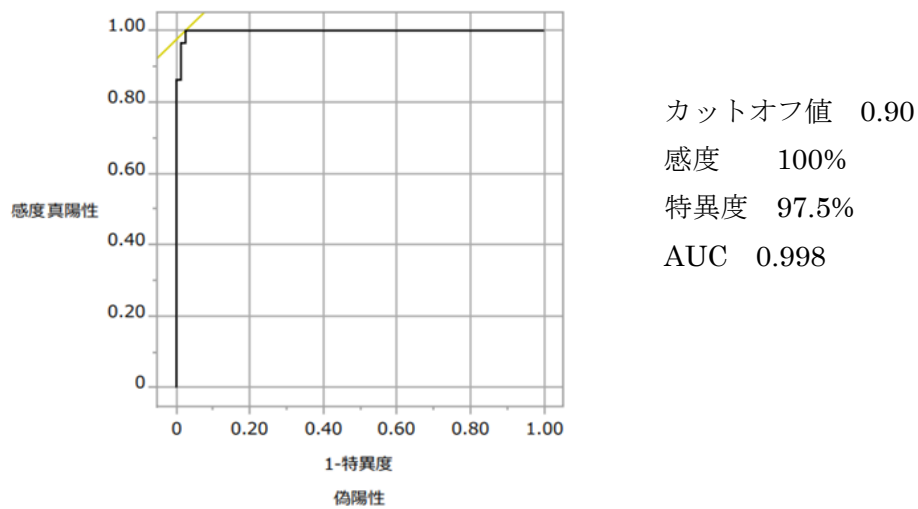


図1 発症10日目以内の検体のROC曲線

2) 評価方法2

感染初期の感染性を有するがウイルス量が少ない検体を想定し、3症例の検体各々を段階希釈し、2法により測定を行った。Ct値が35.0～36.2の検体の抗原定量検査のCOIは0.92～1.01であった(表4)。

表4 希釈した発症2～4日目に採取された検体の2法による比較

希釈倍率	症例1(発症2日)		症例2(発症3日)		症例3(発症4日)	
	PCR法 (Ct値)	ECLIA法 (COI)	PCR法 (Ct値)	ECLIA法 (COI)	PCR法 (Ct値)	ECLIA法 (COI)
×1	22.4	1979.00	23.5	915.00	31.7	4.57
×10	24.9	175.00	—	—	33.5	1.19
×100	28.4	14.20	—	—	36.2	0.92
×1000	31.7	2.26	32.3	1.44	—	—
×10000	35.0	1.01	35.5	0.98	—	—

*測定を実施していない箇所を「—」とした。

4. 考察

今回、COVID-19の診断のための検査のゴールドスタンダードであるPCR法に対して、抗原定量検査のECLIA法を評価した。評価方法1の全例を対象とした場合の陽性一致率は、カットオフ値を1.00 COI(メーカー設定値)とすると50.0%にとどまった。これは、発症から長期間経過し、感染性がないがPCR法では陽性と判定された検体を含んでいること

が考えられた。発症から 10 日目以内に採取された検体を対象とし算出したところ、陽性一致率は 75.7%(カットオフ値 1.00 COI)であった。さらに Ct 値 35.0 未満の検体に限定すると COI はすべて 0.90 以上であった。これは、発症から 10 日目以内、かつ Ct 値 35.0 未満のウイルス量を有する検体では、ECLIA 法のカットオフ値を 0.90 COI に設定することにより PCR 法と同様の判定が可能であることを示している。感染初期を想定した感染性を有する希釈検体を用い、2 法による測定をおこなった結果、Ct 値 35.0～36.2 の検体の COI は 0.90 以上であった。よって、ECLIA 法による抗原定量検査は、感染初期の少ないウイルス量であっても検出できることが示唆された。また、PCR 法陰性例および発症から 10 日目以内、かつ Ct 値 35.0 未満の陽性例を用い、ROC 曲線からカットオフ値を求めた結果、メーカー設定値より低値の 0.90 COI となったが、高い診断能力を有していることが示された。

ECLIA 法による抗原定量検査は、PCR 法の感度より劣り、陽性一致率は、Ct 値依存的事であることが報告されている¹⁾。今回、発症早期の検体に絞った評価を加えたことで、ECLIA 法が十分な検出能力を有していることが見いだされた。迅速性、簡便性、処理能力に優れた抗原定量検査は、COVID-19 の診断に寄与するものと考えられた。

本研究では PCR 法の既存検体を使用したため、導入時には検体採取部位・条件等に関して再度検証を追加予定である。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

第 69 回日本臨床検査医学会学術集会(栃木県総合文化センター、2022 年 11 月 17 日～20 日)で発表予定である。

6. 参考文献

- 1) Kolesova O, et al. Evaluation of ECLIA antigen detection tests as screening methods for COVID-19 in comparison with molecular analysis. Ir J Med Sci 2021 Nov 30;1-5

＜医学・医療関連事業助成＞

COVID-19 流行下において集合型チーム医療研修をオンライン化する取り組み

西井鉄平¹

佐藤 仁²、藤谷裕美²、勝亦秀樹²、菊地達也²

¹横浜市立大学医学部 医療情報学

²横浜市立大学附属市民総合医療センター 医療の質・安全管理部

抄録（500字以内）

新型コロナウイルス感染症(以下、COVID-19)の流行に伴い、従来は対面集合型で開催していた会議や研修会が実施不可能になり、診療のみならず学生や若手職員の教育を担う大学病院においては、教育活動の継続は立ち向かうべき大きな課題となった。また、多忙さと疲労ゆえに医療安全の潜在的な危険性が蓄積されることも懸念された。試行錯誤する中で従来は思いもつかなかった新たな試みに挑むことができたが、その一つが集合型チーム医療研修オンライン化の取り組みである。医療安全と質の高い医療の実現には、患者・家族をはじめとして医師、看護師など様々な職種が関わるチーム医療が必須である。チーム医療を可能にするためには日頃から安全文化の醸成に取り組む必要があり、従来からその基盤となる教育・研修活動に取り組んできた。COVID-19 をきっかけとした横浜市立大学附属市民総合医療センターにおけるチーム医療研修オンライン化の取り組みに関して、その手法習得からマニュアル作成の過程、開催実績を紹介するとともに、今後の課題と可能性について考察する。

＜医学・医療関連事業助成＞

COVID-19 流行下において集合型チーム医療研修をオンライン化する取り組み

西井鉄平¹

佐藤 仁²、藤谷裕美²、勝亦秀樹²、菊地達也²

¹ 横浜市立大学医学部 医療情報学

² 横浜市立大学附属市民総合医療センター 医療の質・安全管理部

【目的】

新型コロナウイルス感染症(以下、COVID-19)の流行に伴い、従来は対面集合型で開催していた会議や研修会、その他の催し物が実施不可能になったことは、職場や教育機関から地域社会に至るまで、社会生活を営む上で様々な困難をもたらした。大学病院は診療のみならず学生や若手職員の教育を担う場でもあり、教育活動の継続は立ち向かうべき大きな課題となった。また、医療従事者には職務上過度の負担が掛かり、多忙さと身体的、精神的疲労ゆえに医療安全の潜在的な危険性が蓄積されることも懸念された。横浜市立大学附属市民総合医療センター(以下、センター病院)においては、感染対策に配慮しつつ少人数での対面開催をせざるを得ない案件と、オンラインでも代用可能な案件とを切り分け、事業の継続に試行錯誤した。その成果として、従来は思いもつかなかった新たな試みに挑むことができたが、その一つが集合型チーム医療研修オンライン化の取り組みである。医療安全と質の高い医療の実現には、患者・家族をはじめとして医師、看護師など様々な職種が関わるチーム医療が必須である。チーム医療と言っても、それを可能にするためには日頃から安全文化の醸成に取り組む必要があり、以前から基盤となる教育活動に取り組んできた。チームワークを高めることで医療の質と安全性を向上させることを目指した米国発の集合型研修である「Team STEPPS®(チームステップス)」*は、座学のみならずグループワークを多く取り入れていることが特徴であるが、COVID-19 流行下において対面集合型での実施が不可能となった。しかしながら、COVID-19 流行に伴ってにわかに注目されることになった WEB 会議システムを有効活用することで実施が可能であることがわかり、センター病院でも取り組みを開始した。

*Team STEPPS : Team Strategies to Enhance Performance and Patient Safety (医療の成果と患者の安全を高めるためにチームで取り組む戦略と方法)

【方法】

国立保健医療科学院の指導を受けて手法の習得に努め、それを元に受講者マニュアルと事務局用運営マニュアルを作成して、一時的ではなく持続可能な取り組みとなるよう基盤整備に努めた。研修事務局においては、研修が円滑に進むように、まずはWEB会議システムの様々な機能を確認し、操作技術を習得することが課題であった。また、受講者側の懸念事項として、通信環境(有線なのかWiFiなのかを含めた通信の安定性)や使用するデバイス(スマートフォンは不向きでありPCを推奨、カメラやマイクの準備と設定)への配慮が必要であると考えた。また、根本的な課題はやはり慣れないWEB会議システムの操作であり、研修に支障を来たさないよう事前配布資料として通知するとともに、研修中も判りやすく伝える必要があった。2020年度は、作成したマニュアルを使用して綿密な試行を重ねることとした。まずは第一段階として、医療の質・安全管理部スタッフなど少数のコアメンバーで実施した。WEB会議ツールの操作確認を行うとともに、時間配分など作成したマニュアルの実用性を確認した。次いで第二段階として、安全対策委員会の一部委員にも参加を呼び掛け、実現可能性を検証した。さらに第三段階では、院内各部署職員を構成員とするリスクマネージャー会議にも参加を依頼し、繰り返して検証を行った。準備を重ねた上で、2021年度から本格運用に移行した。

【結果】

2021年7月より運用を開始し、第1回は計10名(医師4名、看護師2名、その他医療職2名、事務職2名)の参加を得た。以後、第2回は計18名(医師3名、看護師6名、その他医療職5名、事務職4名)、第3回は計14名(医師3名、看護師3名、その他医療職7名、事務職1名)、第4回は計25名(医師1名、看護師5名、その他医療職16名、事務職3名)と着実に参加者数を増やし、最終的な2021年度実績は計67名の参加であった。2022年度は8月からの開催を企画していたが第7波の影響により延期となり、社会的状況が落ち着いてからの再開を目指している。

【考察】

受講者からは集合研修と変わらない効果があるという感想が寄せられ、概ね好評を得た。今後、対面開催が可能となる日常を取り戻しても、本研修で得た知見を他の教育・研修に応用することが可能であると考えた。また、直接足を運ばずに参加することができることから他病院職員の参加もあり、病院間交流の有効な手段となること、院内にとどまらず地域医療という幅広いチーム医療の強化にも寄与する可能性がある。受講環境の整備が課題として残り、オンラインでの参加が不可能な場合を想定して、対面での参加も可能となるよう従来型との併用を考慮する必要もある。

【論文及び学会発表】

藤谷裕美，西井鉄平，小島昌徳，宮崎三恵子，石川佳世子，菊地達也，藤真知子，白尾かおり，佐藤 仁，大塚将秀：COVID-19 流行下における医療安全活動に関する工夫．第 16 回医療の質・安全学会学術集会（WEB 開催），2021，11．

＜医学・医療関連事業助成＞

多方面のアプローチを必要とするエンド・オブ・ライフ（EOL）期を見据えた高齢心不全患者への専門・認定看護師による看護の実際

土肥真奈

叶谷由佳、丸山幸恵、金田明子、南崎真綾

横浜市立大学医学部看護学科老年看護学領域

抄録（500字以内）

専門・認定看護師が行う EOL 期を見据えた高齢心不全患者への統括的な看護の実際を記述することを目的とし、老人看護専門看護師、慢性心不全看護認定看護師計 10 名を機縁法にて募り半構造化面接法を実施した。EOL 期を見据え高齢心不全患者を対象に意識している看護について等を尋ね、データは質的帰納的に分析した。

対象者の平均年齢は 46.4 ± 8.9 歳、女性 70.0% だった。心不全発症時は【呼吸困難緩和も目的に多職種で急性期治療を徹底して行う】等 5 カテゴリー、代償できず入退院を繰り返す時期においては【多職種で連携し ACP を行う】等 2 カテゴリー、重症心不全への移行時期においては【多職種で緩和ケアと急性期治療を並行して行う】等 3 カテゴリー、その他時期を問わず行う看護として【身体・精神症状緩和のため急性期治療・緩和ケア・精神的サポートを並行して行う】等 3 カテゴリーの計 13 カテゴリーが生成された。高度実践看護師は高齢心不全患者に対し時期に応じた看護を行っており、いずれも一般看護師が実践可能な取り組みであった。多忙な病棟においてもこれらの実践を意識し職種間で連携して取り組むことで、患者・家族が望む終末期の生活実現につながると考える。

<医学・医療関連事業助成>

多方面のアプローチを必要とするエンド・オブ・ライフ（EOL）期を見据えた高齢心不全患者への専門・認定看護師による看護の実際

土肥真奈

叶谷由佳、丸山幸恵、金田明子、南崎真綾

横浜市立大学医学部看護学科老年看護学領域

1. 目 的

高齢者の心不全は虚血性心疾患や弁膜症に起因し、急性増悪による入退院を繰り返しながら徐々に機能低下する一方、経過の中で大動脈解離等を発症し死に至る場合もある（厚生労働省，2017）。高齢心不全患者のこのような特徴に対し、早期からの緩和ケアや意思決定支援導入が重要視され、循環器領域の医療従事者には急性期治療に加え複雑なエンドオブライフケアが求められている。高齢心不全患者への対応についてはステートメントの作成など検討が進んでおり（日本心不全学会，2016；厚生労働省，2018）、その中で専門知識を有する専門・認定看護師の活躍が期待されている。

専門・認定看護師による高齢心不全患者への実践に関しては、緩和ケアのアプローチ、意思決定支援のアプローチなど1側面に着目した報告が多い（Gelfman 他，2017；前田，2020）。しかし実際高齢心不全患者に対しては多方面からのアプローチが必要であり、そのアプローチは患者の複雑な経過（厚生労働省，2017）と連動し、それぞれが関連しうる。そこで本研究では専門・認定看護師が行う EOL（end of life：終末期）期を見据えた高齢心不全患者への統括的な看護の実際を記述することを目的とした。

2. 方 法

老人看護専門看護師 5 名、慢性心不全看護認定看護師 5 名の計 10 名を機縁法にて募り、1 名あたり 60 分程度の半構造化面接法を実施した。緩和ケア認定看護師は緩和ケアに特化した対応が重点的に求められると考え除外し、患者に対し統括的な対応が求められる老人専門看護師、慢性心不全認定看護師を対象とした。インタビューでは以下 1) ～8) の項目を尋ね、得られたデータは質的帰納的に分析した。

- 1) EOL 期を見据え通常実施している高齢心不全患者への関りの振り返り
- 2) 印象に残っている EOL 期までの高齢心不全患者への関りの振り返り

- 3) EOL 期を見据え、高齢心不全患者を対象に意識して行っている看護について
 - (1) EOL や予後に関する患者・家族との話し合いに実施について
 - (2) コミュニケーション（ACP*、治療方針、延命措置の選択）の取り方・実施について
- 4) 症状管理（呼吸困難、痛み、うつ状態、不安、吐き気、疲労、不眠等）の実施について
- 5) 心理的サポート（傾聴などの患者支援、介護者支援）の実施について
- 6) ケアコーディネート（ホームホスピスの使用や社会資源の調整）の実施について
- 7) 多職種連携の実際について（カンファレンスの実態など）
- 8) 家族との関りについて

*ACP : advance care planning

3. 結 果

対象者の平均年齢は 46.4 ± 8.9 歳、平均経験年数 22.9 ± 9.7 年、心不全看護経験年数 12.1 ± 6.1 年、女性 70.0%だった。語りから 218 個のコード、45 個のサブカテゴリ、13 個のカテゴリが生成された。心不全発症時は【呼吸困難緩和も目的に多職種で急性期治療を徹底して行う】等 5 カテゴリが、代償できず入退院を繰り返す時期においては【多職種で連携し ACP を行う】【退院後の自宅生活を継続できるよう患者の気持ちに寄り添った生活指導を行う】の 2 カテゴリが、重症心不全への移行時期においては【多職種で緩和ケアと急性期治療を並行して行う】【多職種連携により在宅看取りを実現する】など 3 カテゴリが、その他時期を問わず行う看護として【身体・精神症状緩和のため急性期治療・緩和ケア・精神的サポートを並行して行う】【多職種で患者の状況予測や今後の希望を共有して関わる】等 3 カテゴリが示された。

4. 考 察

高度実践看護師は高齢心不全患者に対し時期に応じた看護を行っており、心不全発症時には症状緩和を目的とし多職種で連携し急性期治療を徹底して行うこと、またこれからの治療に向け治療遂行に必要な精神症状アセスメントし治療環境の工夫を行うなどの看護を行っていた。代償できず入退院を繰り返す時期においては必ずこの時期までで多職種連携し ACP を行うことが示された。重症心不全への移行時期においては多職種で緩和ケアと急性期治療を並行して行うことや多職種連携により在宅看取りを実現していることがわかった。

また期間を通じ症状緩和は急性期治療・緩和ケア・精神的サポートを並行して行うこと、多職種で患者の状況予測や今後の希望を共有して関わること、早期に ACP を行うことが示された。高度実践家が行っているこれらの看護は、いずれも一般看護師が実践可能な取り組みである。多忙な病棟においてもこれらの実践を意識し職種間で連

携して取り組むことで、患者・家族が望む終末期の生活実現につながると考える。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

International Journal of Nursing Studies(IF=6.612)での報告を目指し現在論文執筆中である。

【引用文献】

厚生労働省(2017):脳卒中、心臓病その他の循環器病に係る診療提供体制の在り方について.

<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000173149.pdf>. (参照日:2021年8月2日)

日本心不全学会(2016):高齢者心不全患者の治療に関するステートメント.

http://www.asas.or.jp/jhfs/pdf/Statement_HeartFailure1.pdf?iref=pc_rellink_01. (参照日:2021年8月2日)

厚生労働省(2018):循環器疾患の患者に対する緩和ケア提供体制のあり方について.

<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000347907.pdf>. (参照日:2021年8月2日)

Laura P Gelfman, Dio Kavalieratos, Winifred G Teuteberg, Anuradha Lala, Nathan E

Goldstein(2017): Primary palliative care for heart failure: what is it? How do we implement it?. Heart Fail Rev. 22(5), 611-20. doi: 10.1007/s10741-017-9604-9.

前田京子(2020):慢性心不全看護認定看護師が行った末期心不全患者への意思決定支援. 愛仁会医学研究誌. 51, 111-12.

＜指定寄附研究助成 がん研究＞

BRAF 変異高悪性度神経膠腫に対する分子標的治療克服を目指した トランスレーション研究

報告者：立石健祐^{1,2}

共同研究者：市村幸一³、河津正人⁴、笹目丈²、山本哲哉²

1 横浜市立大学大学院生命医科学研究科 創薬再生科学研究室

2 横浜市立大学大学院医学研究科 脳神経外科学

3 順天堂大学 脳疾患連携分野研究講座

4 千葉県がんセンター研究所 細胞治療開発研究部

抄録

本研究グループは、難治性悪性腫瘍である BRAF^{V600E} 変異高悪性度神経膠腫に対する治療法の開発を見据えた研究を行った。研究者らは、はじめに臨床での分子標的治療前後における腫瘍細胞内の分子レベルでの挙動を解析した。と同時に、分子標的治療前後で採取した検体から細胞・動物モデルを樹立した。細胞・動物モデルは患者検体の組織像、遺伝子異常、更には薬剤感受性をも高いレベルで再現するなど、臨床病態を広範囲に模倣することを見出した。これらのモデルを活用してトランスレーショナルアプローチによる詳細な検討を行った結果、分子標的治療後の主たる耐性機序は抑制系フィードバック機構の破綻であることを見いだした。また、耐性化を引き起こすシグナルに関連するタンパク質を制御する HSP90 を BRAF あるいは MEK とともに阻害することで強力な抗腫瘍効果が発揮されることを明らかにした。この相乗効果は細胞のみならず動物モデルでも発揮された。これらの結果、BRAF^{V600E} 変異高悪性度神経膠腫の分子標的治療に対する薬剤抵抗性機序を解明するとともに、薬剤治療抵抗性を克服する標的分子を見出した。これらの研究成果を臨床応用につなげるために、継続した研究を行う必要性を感じている。

＜指定寄附研究助成 がん研究＞

BRAF 変異高悪性度神経膠腫に対する分子標的治療克服を目指した トランスレーション研究

報告者：立石健祐^{1,2}

共同研究者：市村幸一³、河津正人⁴、笹目丈²、山本哲哉²

- 1 横浜市立大学大学院生命医科学研究科創薬再生科学研究室
- 2 横浜市立大学大学院医学研究科脳神経外科学
- 3 順天堂大学脳疾患連携分野研究講座
- 4 千葉県がんセンター研究所細胞治療開発研究部

1. 目 的

神経膠腫は最も頻度の高い脳腫瘍のひとつであり、悪性度が生命予後と密接に関連する。神経膠腫に対する診断・治療アプローチとして、外科手術による病変の摘出に始まり、術後は摘出した病変を用いて、病理組織学的診断と分子診断を組み合わせた診断を図る。これらの結果に基づき、術後放射線治療や化学療法の併用を行う。このような基本的治療法に加えて、近年では遺伝子異常をターゲットにした分子標的治療が新たな治療法として期待されている。しかしながら遺伝子異常を標的とした新たな治療法の開発は試みられているものの、現時点では脳腫瘍患者さんの治療成績の向上につながる画期的な治療法の確立には至っていない。

近年の大規模遺伝子解析により、人の悪性腫瘍の形成に関連する遺伝子異常が数多く見いだされている。中でも、細胞増殖に関わるタンパク質のひとつである BRAF において、*BRAF* 遺伝子のコドン 600 番目の点突然変異 (*BRAF*:c. 1799T>A p. V600E) は代表的な癌遺伝子として知られている。*BRAF*^{V600E} 変異が生じることで細胞内の B-RAF 分子の恒常的な活性化が生じ、悪性腫瘍の重要なシグナル伝達経路である MEK-ERK (MAPK) 経路が過剰に活性化し、腫瘍形成が促進すると考えられている。重要な点として *BRAF*^{V600E} 変異に対しては、BRAF 阻害剤や BRAF の下流に位置する MEK を標的とした阻害剤を用いた分子標的治療が既に多くの固形癌治療に用いられており、これまでに高い有効性の報告とともに、治療後耐性化の問題が指摘されている。*BRAF*^{V600E} 変異は一部の脳腫瘍にも存在することから、脳腫瘍患者さんの治療においても、*BRAF*^{V600E} 変異の有無に応じて治療法を個別に提唱することが期待されている。しかし、悪性度の高い神経膠腫では分子標的薬剤治療後の耐性化といった問題が指摘されており、また耐性化の原因については未だ不明な点が多く残っている。これらの問題を解

決すべく、本研究では *BRAF*^{V600E} 変異神経膠腫に対する薬剤治療後の耐性化、抵抗性の機序の解明を図るとともに、抵抗性機序を克服する分子機序の同定、さらには分子機序に基づく治療法の開発を目指した。これらの研究を遂行するために臨床像の再現性の高いモデルを確立することが重要と考えた。そこで分子標的の治療前後に採取したペア腫瘍検体から細胞株の樹立、およびヒト由来脳腫瘍マウスモデル (patient-derived xenograft, PDX) の作成を試みた。

2. 方 法

本研究成果を示すために以下の項目に関する研究を行った

1. *BRAF*^{V600E} 変異神経膠腫細胞株及びマウスモデルの作成
2. 分子標的治療後耐性化機序の検証
3. 分子標的治療後耐性化機序を克服する分子の同定
4. 動物モデルを用いた検証

3. 結 果

1. *BRAF*^{V600E} 変異神経膠腫細胞株及びマウスモデルの作成

研究者らのグループは、臨床検体を用いて遺伝子解析を常時行っており、脳腫瘍の統合診断化を図っている。今回解析した 217 例の神経膠腫のうち、7 例 (3.2%) の腫瘍から *BRAF*^{V600E} 変異が検出された。この中で再発時に *BRAF* 阻害剤 (dabrafenib) もしくは *MEK* 阻害剤 (trametinib) による分子標的治療を施行した症例を 2 例経験した。1 例目 (YMG62) は *BRAF* 阻害剤と *MEK* 阻害剤による併用治療を行ったが、有効な治療効果は得られなかった。2 例目 (YMG89) では *BRAF* 阻害剤による分子標的治療を行い、当初は良好な治療効果を得たものの、経過中に耐性化が認められた。網羅的遺伝子解析の結果、YMG89 において、治療後に耐性化をきたした検体 (YMG89R) では、*BRAF* が関連するシグナル伝達経路である *RAS*-*RAF*-*MEK*-*ERK* (*MAPK*) 経路を構成する分子をコードする *NRAS*, *MAP2K1* 遺伝子変異が検出された。しかしながら非常に低い変異率であったことから耐性の主たる要因とは考えにくい所見であった。そこで、分子標的治療前後で採取した腫瘍組織をタンパク質レベルで比較検討したところ、*MAPK* 経路や *AKT*-*mTOR* 経路、更には上流の receptor tyrosine kinase (*RTK*) 経路のリン酸化タンパク質の発現が分子標的治療後に高発現しており、これらのシグナル伝達経路が再発例では過剰に活性化していることが示唆された。次に、分子標的治療前後に採取した 2 種類の腫瘍細胞 (P; 治療前, R; 治療後) と分子標的治療後に採取した NGT41R 腫瘍細胞に対して細胞培養を行ったところ、細胞株として安定化が得られた。また、腫瘍細胞を免疫不全マウスの脳内に移植したところ、ヒト由来 *BRAF*^{V600E} 変異神経膠腫細胞株 (PDX) モデルの作成に成功した。これらのモデルは病理学的検討、分子遺伝学的な解析を通じて患者腫瘍の遺伝型、表現型を高いレベルで再現するモデルであることを確認した (図 1)。

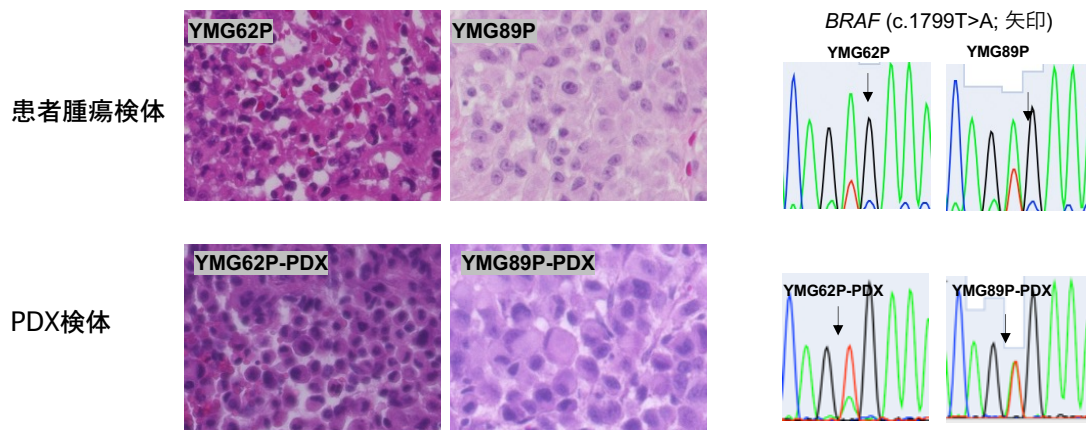


図 1 $BRAF^{V600E}$ 変異神経膠腫検体と再現性の高い PDX モデル（ヘマトキシリンエオジン染色と $BRAF^{V600E}$ 変異解析）

2. 分子標的治療後耐性化機序の検証

樹立した $BRAF^{V600E}$ 変異神経膠腫細胞株を用いて、細胞レベル、動物レベルで分子標的治療後の腫瘍細胞における細胞内シグナル挙動の検討を行った結果、BRAF 阻害剤や MEK 阻害剤に耐性化した腫瘍では、MAPK 経路や AKT-mTOR 経路のリン酸化タンパク質が分子標的治療後に高発現していることが明らかになった。このことから、 $BRAF^{V600E}$ 変異神経膠腫細胞における分子標的治療の耐性機序は RTK 経路、MAPK 経路や AKT-mTOR 経路のフィードバック機構による過剰な活性化が主たる要因であることが判明した。

3. 分子標的治療後耐性化機序を克服する分子の同定

様々な角度から検証したところ、 $BRAF^{V600E}$ 変異神経膠腫細胞の活性を抑制するためには MAPK 経路と AKT-mTOR 経路を同時に強力に阻害する必要性が判明した。そこで治療候補薬剤を探索するため、分子標的薬に耐性を示す YMG89R 細胞に対し、分子標的薬との併用効果について 1,280 種類の化合物を用いて網羅的に検証したところ、複数の HSP90 阻害剤が BRAF 阻害剤との併用効果を示した。このことから、HSP90 阻害剤は分子標的薬との併用効果を示す薬剤である可能性が示唆された。そこで、複数の $BRAF^{V600E}$ 変異神経膠腫細胞株において BRAF 阻害剤、MEK 阻害剤と HSP90 阻害剤 (BII021) との併用効果を検証した結果、単独での抗腫瘍効果は乏しく、一方併用治療により強い相乗効果が生まれることが判明した。このことから BRAF 阻害剤または MEK 阻害剤に HSP90 阻害剤を併用することで、MAPK 経路と AKT-mTOR 経路が同時かつ強力に抑制され、相乗的な細胞活性抑制が生じることが判明した。

4. 動物モデルを用いた検証

細胞レベルで得られた併用治療効果を動物モデルで検証するために、複数の $BRAF^{V600E}$ 変異神経膠腫細胞株をマウス皮下に移植した PDX モデルを作成した。その結果、細胞モデ

ルと同様に、MEK 阻害剤と HSP90 阻害剤の併用療法では腫瘍が退縮後に消失し、この所見は長期間にわたり維持された。また、マウス脳腫瘍モデルを用いて治療効果を検討したところ、皮下腫瘍モデルと同様に MEK 阻害剤と HSP90 阻害剤による併用療法により、MEK 単剤治療と比較して更に有意な生存期間の延長効果が確認された（図 2）。

このことから *BRAF^{V600E}* 変異神経膠腫に対する HSP90 阻害剤と MEK 阻害剤による併用療法は、動物モデルにおける皮下病変及び脳病変に対して有効な治療効果を発揮することが判明した。

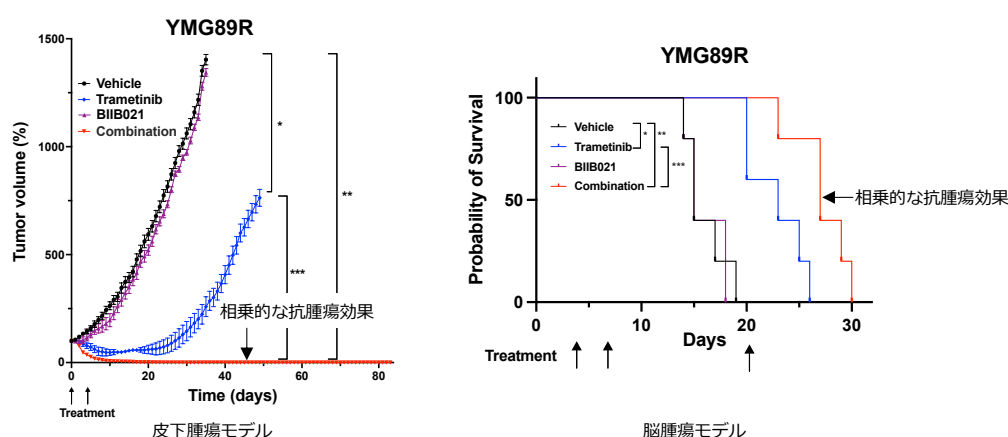


図 2 動物モデルを用いた MEK 阻害剤と HSP90 阻害剤併用による抗腫瘍効果の検証

4. 考 察

今回の研究では、分子標的治療前後の臨床情報を活用するとともに、臨床像を広く模倣する細胞株、動物モデルを樹立し、これらを研究に活用したことで、病態の解明や治療標的分子を探索するといった詳細な検討が可能となった。その結果、*BRAF^{V600E}* 変異高悪性度神経膠腫に対する分子標的治療後の主たる耐性化機序は、フィードバック機構による MAPK 経路や AKT-mTOR 経路の過剰な活性化であること、また HSP90 は BRAF、MEK を標的とした分子標的治療後の耐性化を克服する重要な標的分子であることが判明した。このことから、分子標的治療による効果が限定的な症例や耐性化を期待した症例では、HSP90 阻害剤を併用することで腫瘍抑制効果が得られることが期待される。一方、臨床応用に向けた課題として、血液脳関門を効率的に通過する薬剤の開発やドラッグ・デリバリー・システムの開発が挙げられることから、継続した研究が必要であると考えられる。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

論文

1. Sasame J, Ikegaya N, Kawazu M, Natsumeda M, Hayashi T, Isoda M, Satomi K, Tomiyama A, Oshima A, Honma H, Miyake Y, Takabayashi K, Nakamura T, Ueno T, Matsushita Y, Iwashita H, Kanemaru Y, Murata H, Ryo A, Terashima K, Yamanaka S, Fujii Y, Mano H, Komori T, Ichimura K, Cahill DP, Wakimoto H, Yamamoto

T and Tateishi K. HSP90 inhibition overcomes resistance to molecular targeted therapy in BRAFV600E mutant high-grade glioma. *Clin Cancer Res* 28(11):2425-2439. 2022.

学会発表

1. 立石健祐, 笹目丈, 池谷直樹, 棗田学, 岩下広道, 山中正二, 河津正人, 山本哲哉: BRAF 変異神経腫瘍耐性機序解明と HSP90 を標的とした治療法の開発. 第 40 回日本脳腫瘍病理学会学術総会(シンポジウム), 2022, 5, 川越.
2. 立石健祐: PCNSL の分子遺伝学的特徴と動物モデルを通じた治療標的に関する考察. Kurume PCNSL Web Seminar (招待演者). Online 形式. 2022. 4.
3. 立石健祐: PCNSL における NF- κ B 経路の重要性-マウスモデルを用いた検討-. 第 2 回 PCNSL Scientific Exchange Meeting (パネリスト). Online 形式. 2022. 1.
4. 立石健祐: トランスレーショナル研究のための脳腫瘍モデル. 日本脳神経外科コンgres 総会 (招待演者), 2022. 5, 大阪.
5. 立石健祐, 三宅勇平, 中村大志, 笹目丈, 大島聡人, 本間博邦, 池谷直樹, 末永潤, 村田英俊, 山本哲哉: 悪性脳腫瘍に対する橋渡し研究のためのプラットフォーム構築. 第 39 回日本脳腫瘍学会学術総会, 2021, 12, 神戸.
6. 立石健祐, 笹目丈, 山本哲哉: BRAF^{V600E} 変異高悪性度グリオーマに対する分子標的治療後獲得耐性の克服に向けたトランスレーショナル研究. 2021 年度新潟大学脳研究所 共同研究成果報告. 2021, 11, 新潟.
7. 立石健祐, 三宅勇平, 本間博邦, 河津正人, 佐々木重嘉, 吉井幸恵, 脇本浩明, 永根 基雄, 市村幸一, 山本哲哉: トランスレーショナルアプローチにて見えた中枢神経原 発悪性リンパ腫の進展機序と治療標的. 第 21 回分子脳神経外科学会学術総会, 2021, 9, 京都.
8. 立石健祐: PCNSL 症例に対するベレキシブル錠の使用経験. PCNSL web conference in Kanagawa (講演), 2021, 6, 横浜.
9. 立石健祐: BRAF 変異脳腫瘍の臨床像と分子標的治療の展望. 第 62 回日本神経病理学会 学術総会 (ワークショップ), 2021, 5, 東京.

＜指定寄附研究助成 がん研究＞

がんゲノム医療を補完する臓器横断的がん患者モデルパネルの開発

加藤 真吾¹

共同研究者：鈴木 章浩²、佐藤 元一²、豊田純也³、藤田真太郎⁴、中島 淳²

1. がんゲノム診断科、2. 肝胆膵消化器病学、
3. 消化器・腫瘍外科学、4. 運動器病態学

本研究では、横浜市立大学で創出されたシーズである『がん患者モデル』の対応臓器を拡張し、ポストがんゲノム時代に必要な臓器横断的がん動物モデルを開発することを目指した。方法は、1) 遺伝子改変技術の拡張、2) 対応臓器の拡張、3) 確立されたモデルを用いたシグナル解析、を行うこととした。1) 遺伝子改変技術の拡張では、FUS-DDIT3 融合遺伝子が特徴的な粘液型脂肪肉腫に着目した。FUS と DDIT3 遺伝子それぞれに対する CRISPR/CAS9 導入ベクターを作成後、マウス線維芽細胞である 3T3 細胞に導入し、目的の融合遺伝子の生成が確認できた。2) 対応臓器の拡張では、下部胆管癌の動物モデルの作成が完了した。3) 確立されたモデルを用いたシグナル解析は、今回の研究期間内には到達できなかったが、下部胆管癌と肝門部胆管癌のモデルが両方確立した段階で、同時に解析を始める予定である。以後の方針として、内在性の融合遺伝の生成に関しては、他の細胞や遺伝子に発展させる。肝外胆管癌のモデルに関しては、厳密に肝外胆管と言い切れるモデルは現在のところ報告されていないため、引き続き検討を進め、モデルを完成させたいと考えている。

＜指定寄附研究助成 がん研究＞

がんゲノム医療を補完する臓器横断的がん患者モデルパネルの開発

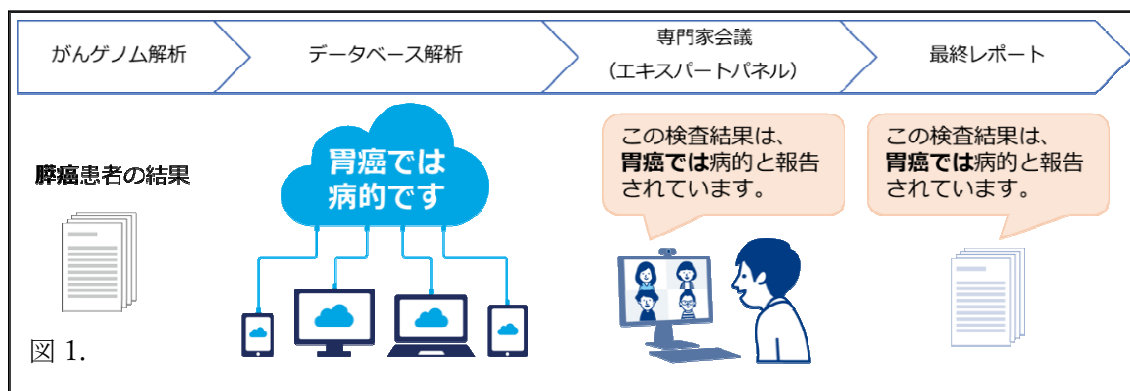
加藤 真吾¹

共同研究者：鈴木 章浩²、佐藤 元一²、豊田純也³、藤田真太郎⁴、中島 淳²

1. がんゲノム診断科、2. 肝胆膵消化器病学、
3. 消化器・腫瘍外科学、4. 運動器病態学

1. 目 的

2019 年より、がんゲノム医療が本邦でも本格的に導入された。がんゲノム医療では、患者のがんゲノム解析結果とデータベース上の情報を比較して、新規治療法の治療効果を予測する。しかし、比較する情報は、他臓器のがん種由来であることが多く、厳密な患者個人への最適化はがんゲノム検査だけでは難しい（図 1）。

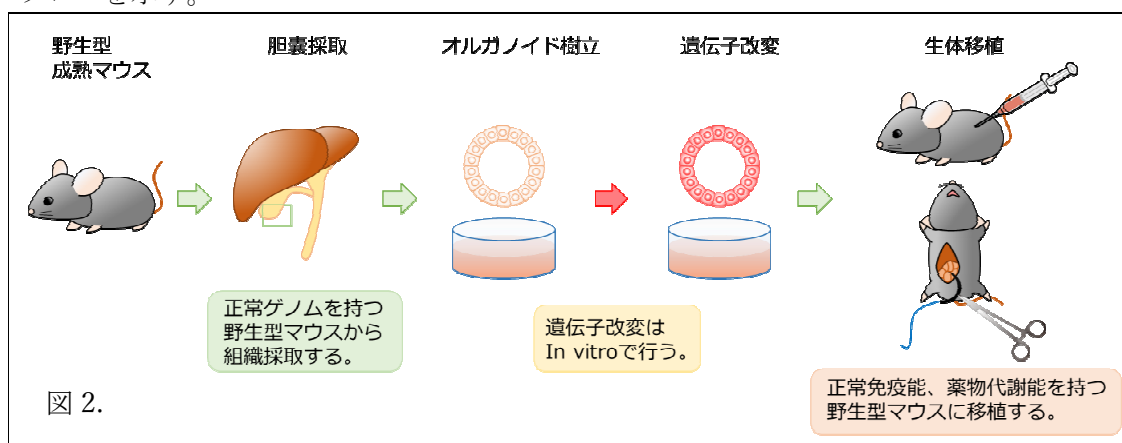


他臓器がんのデータから、患者個人のがんの薬剤感受性を推測することは出来るが、あくまで推測の域を出ない。より情報の精度を上げるためには、細胞株や動物モデルを用いた体外評価系が必要となる。これまでも様々な薬剤感受性体外評価系は開発されてきたが、がんゲノム解析の高度化と免疫チェックポイント阻害剤の登場により、既存の実験系では解析が困難となっている。本研究では、横浜市立大学で創出されたシーズである『がん患者モデル』の対応臓器を拡張し、このポストがんゲノム時代に必要な臓器横断的がん動物モデルを開発する。

2. 方 法

2-1. 遺伝子改変技術の拡張

『がん患者モデル』では、正常なマウスから細胞を取り出し、マウスの体外で遺伝子改変を行い、別のマウスの同所へ移植する。免疫能や薬物代謝能、個体のゲノムがすべて正常なマウスにがん細胞が生じる過程を模倣できるため、がん細胞ではなく患者全体を模しているという意味で『がん患者モデル』と呼んでいる。図 2 に胆嚢癌の場合で全体の作業フローを示す。



オルガノイドは生体より採取した組織を 3 次元培養するものである。平面培養細胞株に比較して継代による未知の遺伝子変異の蓄積が少ない点、元の組織の生理学的特徴を保持している点が実験ツールとして優れている。一方で、オルガノイドの遺伝子改変は技術的に難しい。

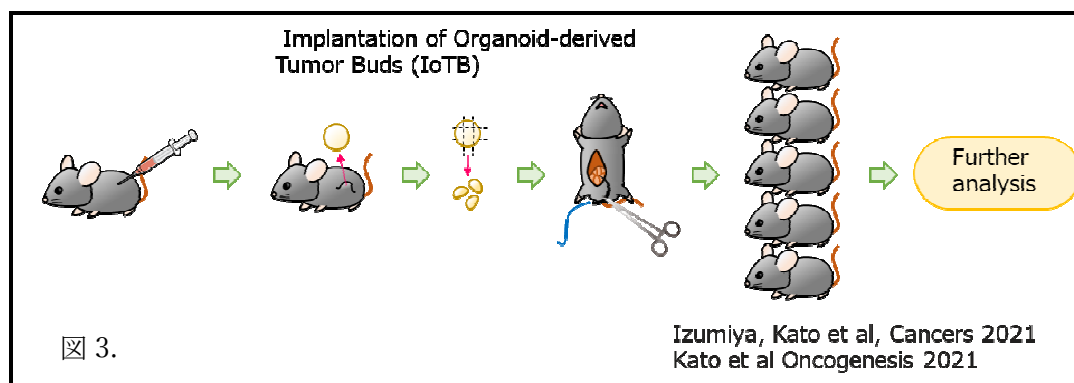
現状、本研究室ではオルガノイドを用いた遺伝子のノックアウトは理論上全ての遺伝子に対して可能となった。しかし、点突然変異の導入と、融合遺伝子の作成に関しては対応できていない。点突然変異や融合遺伝子は、レトロウイルスを用いて宿主ゲノム上に組み込む方法が一般的であるが、その場合、人工的なプロモーターと一緒に挿入する必要がある。これではがん化へ誘導する力が弱い遺伝子変異であっても、強力なプロモーターの影響で、表現型が増強される可能性がある。このため、**本研究では内在性のプロモーター下に変異を導入することを目指す。**具体的には CRISPR/CAS9 システムを用いて、点突然変異と融合遺伝子の導入を行う。技術的には平面培養細胞株では報告が多いものの、遺伝子編集効率の極めて悪いオルガノイドでは報告が少ない。表現型の明らかな代表的な遺伝子変異から条件検討を進める。

2-2. 対応臓器の拡張

現状、モデルとして完成している臓器は、膵臓、胆嚢である。これらの臓器では、同所移植法として、液体に懸濁した細胞を注入した場合、腹腔内や十二指腸内に液体が漏れて

しまうという問題があった。この問題に対し、申請者は、一度マウスの皮下で腫瘍を形成させ、それを小さく刻んだ腫瘍片を別のマウスの同所に移植するという手法 (Implantation of Organoid-derived Tumor Buds: IoTB) を開発した (図 3.)。この手法は極めて拡張性が高く、幅広い臓器に対応可能である。

本研究では、これまでにモデル作成が報告されていない肝外胆管癌、卵巣明細胞癌のモデル作成にまず取り掛かる。その後、上皮以外の腫瘍として、軟部腫瘍へ技術を拡張する。



2-3. 確立されたモデルを用いたシグナル解析

本研究では、臨床検査としてのがんゲノム解析に、付加する情報を得ることが目的である。このため、構築完了したモデルに関しては、予め必要な最低限のデータを取得しておく。臨床がんゲノム解析では、遺伝子変異のみならず、シグナル系の議論が行われる。このため、本研究では、構築したモデルに関しては網羅的遺伝子発現解析を行い、それぞれのモデルで有意に変動しているシグナル系を同定する。

3. 結 果

3-1. 遺伝子改変技術の拡張

CRISPR/CAS9 システムを用いた内在性のプロモーター下の融合遺伝子の導入を試みた。対象腫瘍として、典型的な融合遺伝子のある軟部腫瘍の粘液型脂肪肉腫を選択した。粘液型脂肪肉腫は、FUS-DDIT3 融合遺伝子が特徴的である。FUS と DDIT3 遺伝子それぞれに対する CRISPR/CAS9 導入ベクターを作成後、マウス線維芽細胞である 3T3 細胞に導入した。ベクター導入後、FUS の Forward プライマーと、DDIT3 の Reverse プライマーにより PCR を行い、融合遺伝子の生成を確認した。

PCR の結果、予想されるバンドが認められた。このバンドをゲル抽出し、サンガーシーケンスで配列を確認したところ、ガイド RNA を設計した部分 (ゲノム DNA の切断が起きて、融合が起こると予想される部分) での融合が認められた (図 4)。以上から、内在性プ

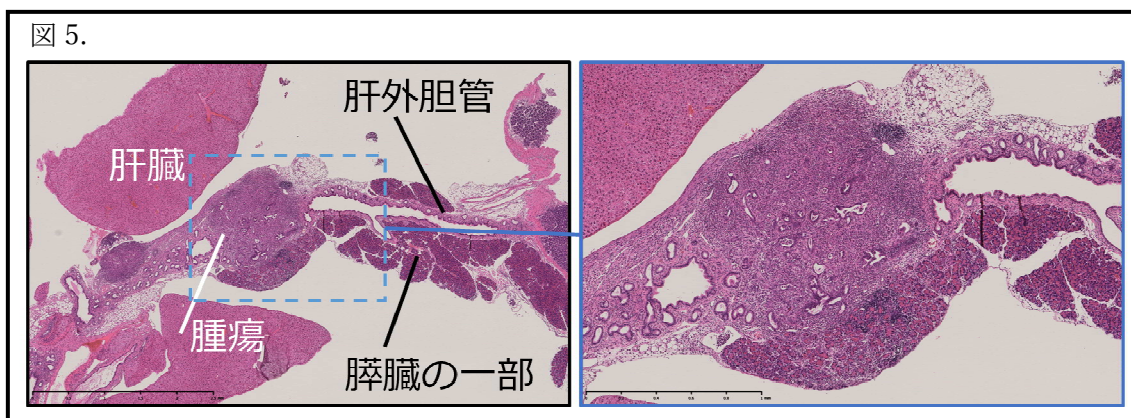
ロモーター下の融合遺伝子の生成に成功したと考えた。



3-2. 対応臓器の拡張

これまでにモデル作成が報告されていない肝外胆管癌の動物モデルの作成に着手した。肝外胆管癌に関しては、既報（Kato S, et al. *Oncogenesis*; 2021;10:33）と同様の方法で、モデルの作成が可能であった。

マウス肝外胆管を、下部胆管と肝門部胆管に分けて採取し、それぞれ変異型 **KRAS** の導入と **TP53** のノックアウトに成功した。更に、同所移植に関しても、下部胆管では成功した（図 5）。



3-3. 確立されたモデルを用いたシグナル解析

今回の研究期間内には到達できなかったが、下部胆管癌と肝門部胆管癌のモデルが両方

確立した段階で、同時に解析を始めたいと考えている。

4. 考 察

内在性の融合遺伝の生成に関しては、ベクター設計から始めたために時間を要したが、目的の結果が得られた。現状では野生型株が混ざっている状態のため、現在、融合遺伝子が導入されたクローンを得るためにシングルセルクローニングを行っている。融合遺伝子生成の手技は確立したので、今後は導入細胞を 3T3 からオルガノイドに変更することを試みたい。

肝外胆管癌のモデルに関しては、同所移植の手法の確立に難渋した。現在、肝門部胆管癌のモデル作成も試みているが、胆管閉塞が起き易く、検討が必要である。厳密に肝外胆管と言い切れるモデルは現在のところ報告されていないため、引き続き検討を進め、モデルを完成させたいと考えている。

5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

1. 加藤真吾、筆宝義隆 /局所免疫反応及び薬物応答の解析が可能な胆のうがん患者モデルマウスの構築、第 25 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2021 年 5 月 26 日、オンライン、ワークショップ、※優秀演題賞を獲得。

<新型コロナウイルス感染症診療支援事業>

(申請書記載の課題名)

地域障がい者支援施設や障がい者グループホームに向けた新型コロナウイルス感染症に関する出張勉強会

(報告者名)

古谷良輔¹⁾

(共同研究者名)

吉田敦²⁾、柏倉佐江子³⁾、深瀬史江⁴⁾、清水敦子⁴⁾

(所属部科名)

- 1) 独立行政法人国立病院機構 横浜医療センター 副院長・救命救急センター長
- 2) 同 統括診療部・救急救命士
- 3) 同 看護部外来看護師長・感染管理認定看護師
- 4) 同 看護部副師長・感染管理認定看護師

抄録（５００字以内）

【緒言】当院では、昨年度院内新型コロナ対策本部が中心となり、病院の立地である横浜市戸塚区や泉区における地域高齢者福祉施設を巡回して、施設職員向けの新型コロナウイルス感染症に関する勉強会を行なった。その結果参加施設からクラスターの発生は皆無であった。そこで本年度は同様の勉強会を地域の障がい者グループホームの管理者向けに行なった。

【方法】コロナ感染流行期における開催となったため、本年度は 10 施設程度の施設長を 1 か所に集めた集合研修とした。施設の特異性から時間は 2 時間とし、新型コロナウイルス感染症一般や感染予防に関する講義、個人防護具の着脱手技や手指衛生に関する実習、施設巡視の内容とした。また本年は施設職員が勤務中携帯できるようにポケットサイズで防水仕様の感染対策に関する小冊子も作成した。

【結果】出張勉強会と小冊子は非常に好評で、不安を抱えながら勤務している施設職員の不安軽減に大きく寄与した。結果的に参加施設からクラスター発生も認められなかった。

【考察】障がい者グループホームへの出張勉強会も施設職員の不安軽減、クラスター発生予防だけでなく、急性期医療機関の病床逼迫を防ぐうえで有用な対策である。

<新型コロナウイルス感染症診療支援事業>

(申請書記載の課題名)

地域障がい者支援施設や障がい者グループホームに向けた新型コロナウイルス感染症に関する出張勉強会

(報告者名)

古谷良輔¹⁾

(共同研究者名)

吉田敦²⁾、柏倉佐江子³⁾、深瀬史江⁴⁾、清水敦子⁴⁾

(所属部科名)

- 1) 独立行政法人国立病院機構 横浜医療センター 副院長・救命救急センター長
- 2) 同 統括診療部・救急救命士
- 3) 同 看護部外来看護師長・感染管理認定看護師
- 4) 同 看護部副師長・感染管理認定看護師

1. 目的

当院は横浜市南西端の行政区である戸塚区に立地しており、病床数 510 床、診療科 32 科規模の総合病院である。当院は国立病院機構病院ではあるが、横浜市南西部地域中核病院および災害拠点病院にも指定されており、救命救急センターや周産期医療センターも持つことから、主に戸塚区や隣接する泉区を中心として地域に密着した高度急性期・急性期医療全般を担っている。

当地域には横浜市各区と比較しても数多くの高齢者福祉施設が立地していることが特徴的である。当院では院内新型コロナウイルス感染症対策本部（以下コロナ対策本部）のメンバーが中心となり、2020 年に当地域の高齢者福祉施設約 20 か所に出張して、施設職員向けに新型コロナウイルス感染症の一般的な知識、個人感染防御具の着脱方法や感染者が発生した場合の初期対処方法や隔離方法など、感染制御について講義と実技指導を行ない、その結果出張指導した高齢者福祉施設における新型コロナウイルスの集団感染（以下クラスター）の発生をゼロにすることができた。

一方、同年横浜市内では、複数の障がい者支援施設や障がい者グループホームにおいて大規模なクラスターが発生し、その感染制御には非常に難渋した。したがって本年度は当院の立地する横浜市南西部地域の障がい者関連施設の職員向けに新型コロナウイルス感染症に対する感染制御に関する勉強会を企画した。

2. 方法

① 勉強会の開催方法

本年度は昨年の高齢者福祉施設へのお出張指導と同様に、障がい者が居住するグループホームの管理者向けにコロナ対策本部メンバーの感染管理認定看護師と救急救命士の計 2 名が出張し講習会を行うことにした。ただし昨年以上にコロナ流行下での出張指導となるため、感染予防について十分に協議する必要があった。

戸塚区および泉区内には、障がい者が居住しているグループホームがそれぞれ約 60 施設以上あり、それぞれの施設はほとんどが 1 棟につき 4－7 名程度の利用者と管理者 1 名といった小規模な構成であっ

た。また設備として個室の居住スペースと食堂や浴室、トイレなど共同利用スペースを備えていることなどほぼ共通した構造になっていた。高齢者福祉施設は利用者が数十人から 100 名規模で、施設毎に施設の広さ・間取り・設備等が全く異なっていたため施設毎に巡回指導するかたちをとったが、今回は各施設を巡回指導するのではなく、近隣 7-8 施設の管理者に会議室がある施設に集まってもらい、集合研修のかたちをとることにした。

② 勉強会の内容

障がい者グループホーム管理者、あるいは感染管理担当者が集合した研修となるため、各グループホームが管理者不在にならないことが必須である。したがって参加は各施設 1 名、講習会の時間は 2 時間までとした。指導内容としては昨年度行ったものと同等の内容、すなわち新型コロナウイルス感染症感染制御全般についての講義、個人感染防御具の着脱方法の実習、施設巡視をしながら感染者が発生した場合の初期対処方法や隔離方法についての双方向的ディスカッション、そして質疑応答とし、合計 2 時間以内で収めるようにした (Table 1)。

③ 冊子および動画の作成

昨年度の高齢者福祉施設における講習会では、スライドを用いたプレゼンテーションの際にハンドアウトの配布物を用意したが、今年度は施設職員が工作中に携帯可能で、必要な時すぐに感染制御の知識を確認することができるポケットサイズで防水仕様の小冊子の作成も試みた。さらに手指衛生、PPE 着脱手技、あるいはゾーニングの方法の指導場面などを納めた動画も作成する予定とした。

3. 結果

① 勉強会の開催について

障がい者関連グループホーム管理者に対する出張講習会は泉区で 1 回、戸塚区で 1 回行った。泉区は 1 事業者系列の複数のグループホームの施設長が 7-8 名、戸塚区では事業者が異なる障がい者グループホーム 10 施設の施設長が勉強会に参加した。参加者全員がこの勉強会の開催に肯定的であり、当院に届いた以下のメールが参加者の心情を端的に表しているので再掲する。「新型コロナウイルス感染症が蔓延して以来、感染予防に関しては自分なりに勉強しましたが、今まで一度も自施設について評価を受けたことがなかったので、それが本当に不安でした。今回の勉強会はとてもわかりやすく、自施設のこれからの課題も見え、参加してとても良かったです。コロナ禍のなか本当ためになる勉強会をありがとうございました。」

なお、今回の勉強会に参加した施設からクラスターの発生は皆無であった。

② 勉強会の内容について

当院救急救命士によって行われた講義内容は、新型コロナウイルス感染症に関する基本知識、事例を用いたクラスター発生施設における対応の紹介、感染予防策と陽性者発生時の対応についてであり、内容・時間ともに概ね高評価であった。感染管理認定看護師による実習指導は、個人防護具の基本着脱作法の実習、手指消毒剤の正しい使い方、手順を間違えた場合の対処法などであり、参加者に実際に着用をしてもらいながら指導した。参加者は際医療従事者ではないので、参加者が不安を抱えないように繰り返しポイントを伝えることを心掛けておこなった。最後の施設巡視では、陽性者発生時のエリア・ゾーニングの提案や、その際の移動導線の確認などを行った。また備蓄物品の把握と適切な使用方法のアドバイスや、参加者各施設で行う感染対策方法のディスカッションも行った。(Fig1,2)

③ 冊子について

今回作成した冊子は施設職員がいつでも確認できるように 3 つ折りのポケットサイズで防水仕様としたが、さらに文字のみのマニュアルにならないようイラストを多用してよりわかりやすくした。内容は

新型コロナウイルス感染症のみにとらわれず、あらゆる感染対策で重要と考える対策（WHO 手指衛生の 5 つのタイミング、個人防護具の着脱手順、ブリストルスケール）、さらに職員の体調管理についての職場連絡の目安についても掲載した。（図 3）

4. 考察

今回昨年の高齢者福祉施設に引き続いて障がい者グループホームに出張勉強会を行った。その結果勉強会参加施設からのクラスター発生はなく、本勉強会は当院や当地区にとって昨年に引き続き患者集中に伴う医療逼迫の回避に大いに貢献できたと考えられた。

2020 年 2 月、ダイヤモンド・プリンセス号と共にわが国に上陸した新型コロナウイルス感染症は、本年になっても終息に向かうどころか、新規感染者数の周期的な増減を繰り返し、都度「感染第 X 波」と呼称するといった状況を繰り返している。ウイルスそのものは変異を繰り返し、大きな変異を起こすとワクチン接種により獲得された免疫力を巧みに回避する感染力を獲得するため、施設や事業所においてクラスターがたびたび発生することも特徴的である。そのため各施設においては、クラスターの発生予防や患者が発生した場合の適切な対応方法などの感染制御対策を実行し継続することが極めて重要になっている。

施設や各事業所における新型コロナウイルス感染制御対策については厚生労働省や内閣官房、あるいは各自治体などからインターネット等を通じてさまざまな情報や資料が示されているが、具体的にどのような対策をとるのかについては各施設に一任されている。そのため、施設の担当者やスタッフは自施設の感染制御対策に大きな不安を抱えながら運営しているというのが現実である。

特にクラスターが一旦発生すると重症化リスクが高い利用者が多い高齢者福祉施設や障がい者支援施設において、各施設の立地や環境、利用者の状況などに応じた感染防止対策のアドバイスや、感染症が発生した場合の隔離方法などについて第三者が助言やチェックをすることは施設スタッフの安心感に直接繋がり、結果的に医療逼迫の効果的な事前回避策となり得る可能性があることがわかった。

さらに今回は施設職員が勤務中携帯できるようポケットサイズの小冊子も作成した。医療従事者であれば、基本的な感染対策の繰り返しの学習が必要であるが、施設職員は非医療従事者であることに注意しなければならない。この場合、繰り返しの学習を強調するより、普段の工作中に携帯できて、必要な時にすぐに感染制御の知識を確認できるハンディな資料の必要度はより高いと思われ、さらに掲載内容はより実践的であることが必要だと思われた。そこで今回の冊子では手指衛生のタイミングや個人防護具の着脱手順に加え、下痢は感染制御の必要な症状であるため、ブリストルスケールで表現できるようにスケールを掲載した。さらに体調不良時に「このぐらいのことで欠勤してよいのか」と迷うことなく職場に連絡し職場上司と相談できるように、職場連絡の目安を明記することで職員の心理的負担を減らすようにした。

なお、今後の検討事項として、新型コロナウイルス感染症に関しては医学的な治療方法のみならず政府の対処方針も刻一刻と情報に変化する可能性がある。情勢に応じた資料改訂とそれに合わせた勉強会の継続開催が必要であることは言うまでもない。

障がい者グループホームへの出張勉強会は施設職員の不安軽減、施設の対応強化によるクラスター発生予防だけでなく、急性期医療機関の病床逼迫を防ぐうえで有用な対策である。

5. 論文及び学会発表

論文：なし

本研究と関連する学会発表：第 75 回国立病院機構総合医学会 2021.10.23

(表 1) 新型コロナウイルス感染症施設出張勉強会 スケジュール

時間	内容	担当者
5 分	オリエンテーション	施設担当者 救急救命士
45 分	講義 基本知識・予防策・発生時の対応	救急救命士
20 分	個人防護具着脱指導 着脱時のポイント、注意点	感染管理認定看護師
40 分	施設巡視 各施設の対応に対する助言	感染管理認定看護師 救急救命士
10 分	質疑応答	

(図1) 講義風景



(図2) 施設巡視





横浜医療センターの場合…

自分の体調管理

- ・ 37.0℃以上の熱はないか
- ・ 下痢などの体調不良はないか

あれば **》 出勤前に職場に連絡する**

同居者などに体調不良

同居者や2日以内に会食した人に
体調不良者が出た場合

》 出勤前に職場に連絡する

※同居者などがコロナのPCR検査をうけた場合、
結果が出るまで休職としています。

ブリストルスケール

便の形状・色・硬さで7段階に分類
便秘や下痢の診断項目

非常に遅い
(約100時間)

消化管の
通過時間

非常に早い
(約10時間)

- | | | | | |
|---|-------------|--|---------|---------------------------------|
| 1 | コロコロ便 | | べん
ぴ | 固くてコロコロの
兔糞状の便 |
| 2 | 硬い便 | | | ソーセージ状では
あるが硬い便 |
| 3 | やや硬い便 | | | 表面にひび割れの
あるソーセージ状
の便 |
| 4 | 普通便 | | | 表面がなめらかで
柔らかい、とぐるを
まくような便 |
| 5 | やや
柔らかい便 | | | はっきりとした
しわのある半分固形
の便 |
| 6 | 硬い便 | | げ
り | 境界がほぐれて
ふにやふにゃの便 |
| 7 | 水様便 | | | 水様で固形物を
含まない液体便 |



新型コロナの
新たな変異株が拡大しても、
わたしたちひとりひとりの、
感染対策はかわりません。

横浜医療センター 新型コロナウイルス対策本部 作成 2022.5

手指衛生 5つのタイミング



PPE着用手順



PPE脱衣手順



＜新型コロナウイルス感染症診療支援事業＞

COVID-19 患者における血小板機能解析

奈良典子

工藤洋祐, 山本正博, 城倉健

横浜市立脳卒中・神経脊椎センター 脳神経内科

COVID-19 感染に基づく血栓・炎症反応の発現に、活性化血小板が深く関与していることが共通認識としてあるが、その解析の煩雑さから、感染初期から慢性期にかけて縦断的に血小板機能を解析した研究は存在しない。そこで簡便かつ迅速に血小板凝集能を検出する全血を用いた血液自動分析装置を使用することで、COVID-19 患者の血小板凝集能を経時的に解析した。その結果、COVID-19 患者においては、急性期のみでなく、入院から 40 日が経過した慢性期においても、依然として血小板凝集能が亢進していることが明らかとなった。この時点では、ほとんどの患者で白血球数、CRP、IL-6 などの炎症マーカーが正常化しており、急性炎症が治まった後にも、血小板は生体内で何らかの刺激にさらされ続けていることが示唆された。慢性持続性の血小板凝集能亢進は、心血管および脳血管障害のリスク上昇に寄与する可能性がある。

＜新型コロナウイルス感染症診療支援事業＞

COVID-19 患者における血小板機能解析

奈良典子

工藤洋祐, 山本正博, 城倉健

横浜市立脳卒中・神経脊椎センター 脳神経内科

1. 目 的

COVID-19 感染に基づく血栓・炎症反応の発現には, 血小板の過剰な活性化が関与していることが先行研究により明らかになっている. 実際, 血小板機能が亢進している患者は, そうでない患者に比べ, より重症の肺炎や血管系イベントの発生率が高いことが報告されている. しかし, COVID-19 感染における血小板機能に関する研究は, 感染初期の横断的なものに限られており, 一度活性化した血小板がどの程度持続するかは不明である. Long COVID の病態解明が注目されている現在, 発症から慢性期までの経時的な血小板機能の解析は, 本疾患の病態解明に非常に有用なヒントになると考える.

これまで COVID-19 患者における血小板機能解析が十分に行われてこなかった大きな理由は, 従来の解析法が非常に煩雑であり, ランニングコストが高いことにある. 我々はこれまでに, 脳梗塞や閉塞性睡眠時無呼吸症候群の患者において, 従来の血液分析装置 (Abbott CELL-DYN 4000[®]; Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) を用いて, 簡便かつ迅速に血小板凝集能異常を検出する方法を報告してきた (J Stroke Cerebrovasc Dis 2019;28:1001-1006 / J Stroke Cerebrovasc Dis 2020;29:104496). そこで, COVID-19 患者に対しても同様の方法を適用し, 発症から 40 日間の血小板機能を経時的に解析することにした.

2. 方 法

2021 年 3 月から 2021 年 10 月に当院に入院した COVID-19 患者連続 63 名を対象に前向き観察研究を行なった. 除外基準は, 18 歳未満, 既知の血小板機能障害, 腎機能障害 (糸球体濾過量 < 40ml/min), 既知の感染症, 活動性の悪性腫瘍, 経口避妊薬の服用, 妊娠とし, これに加えて, 施設入所などの理由で外来でのフォローアップができない患者も除外した. 各患者から, 入院日から数えて 1 日目, 5 日目, 10 日目, 40 日目 (±10 日) に血液サンプルを採取した. また患者と age match させた健常者 65 名からも採血し, 血小板凝集能の基準範囲を設定した. 採取した血

液を, 3.14%クエン酸ナトリウムおよび EDTA 二カリウム粉末を含む採血管に注入し, 両採血管を, 多角度アルゴンレーザー光散乱を用いる全自動血液分析装置にセットし血小板機能解析を行なった. スキャッタグラム上の白血球分画において EDTA 血で凝固塊を認めず, クエン酸血で凝固塊を認めた場合に血小板凝集陽性とし, その程度を四段階評価した (図 1). この方法は全血で分析可能な為, 血小板に人為的操作を加えるステップが少なく, より生体に近い環境で血小板機能を解析でき, 検者間で生じる測定誤差もなく, 検者へのウイルス暴露は最小限に抑えられる.

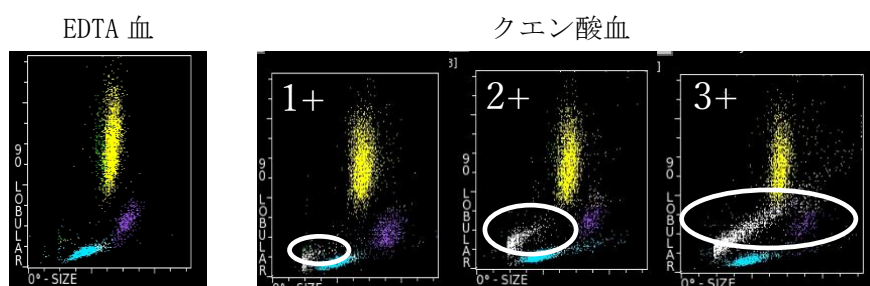


図 1 : EDTA 血で凝固塊を認めず, クエン酸血で凝固塊を認めた場合に血小板凝集陽性とし, その分画の延長距離により凝集能を-, 1+, 2+, 3+の四段階に分類した.

3. 結 果

COVID-19 患者の平均年齢は 52.6 ± 15.5 歳, 男性が 61.9%を占め, 生活習慣病の保有率は高血圧症が 23.8%, 脂質異常症が 54.0%, 2 型糖尿病が 30.2%であった. 最大酸素需要量は, 1~6L/min が 68.3%, 人工呼吸器装着を含む 7L/min 以上が 17.5%, 酸素必要なしが 14.3%であった. 流血中の血小板凝集能は, 入院 10 日目までの急性期において, 健常者と比較して COVID-19 患者で亢進していた (図 2). この結果を酸素需要量で層別化すると, 酸素を 7L/min 以上必要とする重症者では, 酸素需要のより少ない患者と比較して血小板凝集能が亢進しており (図 4), また酸素投与を必要としなかった軽症の患者においても, 健常者と比較すると血小板凝集能が有意に亢進していた (図 5). そして入院から 40 日が経過した慢性期においても, 炎症マーカーである IL-6 や CRP が陰性化しているにもかかわらず, COVID-19 患者の約 70%に血小板凝集能の亢進が残存していた (図 2, 図 3).

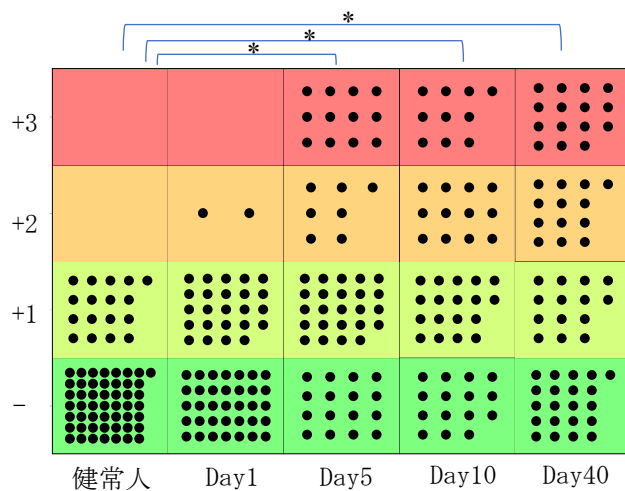


図 2. 入院 1, 5, 10, 40 日目における血小板凝集塊の出現頻度.
*:Mann-Whitney 検定による
健常人との差 $p < 0.01$

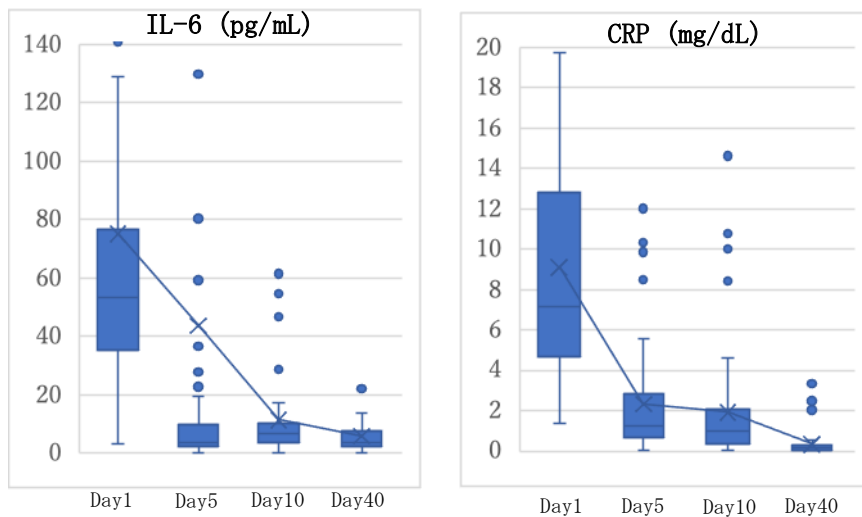


図 3
血清 IL-6 と CRP の経時的変化

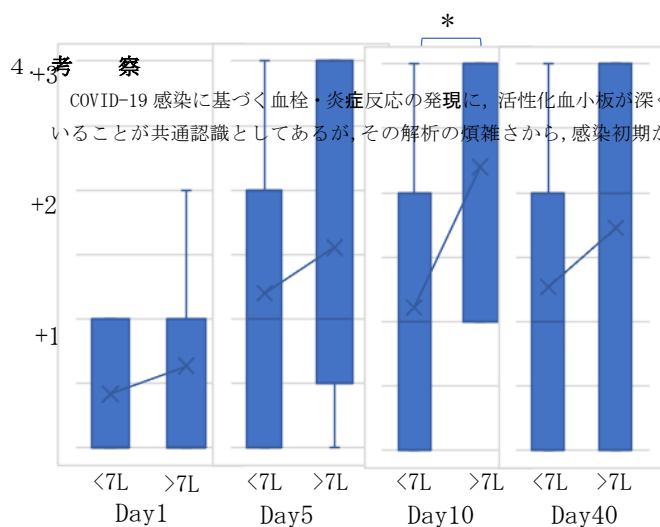


図 4 酸素必要量の違いと血小板凝集能.
酸素 7L/min 以上必要だった重症患者は、
そうでない患者と比べて、血小板凝集能
が亢進する傾向にあり、入院 10 日目
においては有意差が認められた.
*Mann-Whitney 検定 $p < 0.05$

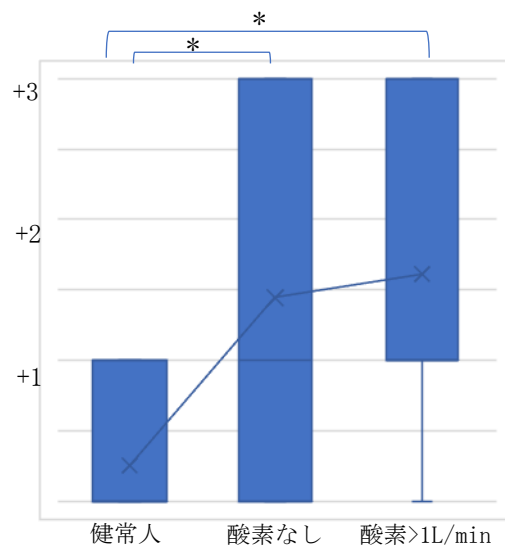


図5 軽症者における血小板凝集能.

入院1~10日の急性期における最大血小板凝集能を示す. 酸素需要のない軽症者においても, 血小板凝集能は健常者と比較して亢進していた. Scheffe 法による多重比較検定 * $p<0.01$

4. 考 察

COVID-19 感染に基づく血栓・炎症反応の発現に, 活性化血小板が深く関与していることが共通認識としてあるが, その解析の煩雑さから, 感染初期から慢性期にかけて縦断的に血小板機能を解析した研究はない. 今回, 全血を用いた血液自動分析装置を使用することで, 簡便かつ生体内により近い環境で血小板凝集能を解析した結果, COVID-19 患者においては, 急性期のみでなく, 入院から40日が経過した慢性期においても, 依然として血小板凝集能が亢進していることが明らかとなった. この時点では, ほとんどの患者で CRP や IL-6 などの炎症マーカーが正常化し, 病原体の排除に向けた一連の急性期反応は落ち着いていた. このことは, 急性炎症が治まった後にも, 血小板は生体内で何らかの刺激に曝露され続けていることを示唆する. 最近, いくつかの研究により, 血管内皮障害が COVID-19 感染後の慢性期にも残存することが示唆されており, 血流中の血小板が損傷した血管内皮との接触により, 絶えず刺激されて活性化し, 凝集能を維持している可能性が考えうる. 今後, 血管内皮障害との関係性を含め, 慢性期における血小板活性化の原因解明が課題となる. また血小板の持続的な活性化は, その後の COVID-19 感染者における心血管および脳血管のリスク上昇に寄与する可能性があり, COVID-19 感染者を長期間に渡り追跡する必要があると考える.

5. 論文及び学会発表

- ・奈良典子ら, 脳梗塞を発症した COVID-19 患者の血小板機能解析, 第 63 回神経学会総会, 東京, 2022 年 5 月 18～21 日.
- ・論文については準備中である.

<先導的教育事業助成>

課題名

国際認証（分野別認証評価）への対応、Institutional Research（IR）システム構築のための調査と準備

報告者名

飯田 洋

所属

横浜市立大学医学部 医学教育学

【抄録】

国際認証（医学教育分野別認証評価）への対応が契機となり、教育活動の質保証システムとして Institutional Research（IR）の必要性が論じられるようになった。IR 活動は大学の経営改善や学生支援、教育の質向上のためのプログラム評価など多岐にわたる。

IR とは組織全体のデータを収集・分析し、情報として可視化した上で、その結果を教育や研究・管理・運営に役立てるものである。医学教育では主に教育・学習に関するデータを扱う教学 IR と位置付けられる。

医学教育に関する情報を収集、蓄積するシステムが本学には未だないのが現状である。このシステムを構築することは、国際認証に対応するためだけでなく、カリキュラムや目標の見直しに役立てることでより質の高い教育に繋がる。

国際認証への対応が契機となり、本学でも 2018 年から医学群教学 IR 検討ワーキングが始動している。例えばデータ収集では、成績不良の学生・留年生はどんな傾向があるか分析し、整理・解釈した。入学者の出身県・出身高校、就職先にはどんな傾向があるか分析し、整理・解釈をおこなった。

しかし、本学ではデータが様々な場所に散在している。例えば学生の成績は学務や各教室、入学時の成績や面接情報はアドミッションセンター、卒業生の進路は俱進会、専門医の取得状況は各教室や学会などである。これらの情報を的確に収集し、蓄積するシステムを構築することが本計画である。関係部署から個人情報に配慮した形で情報を、集積・蓄積する安全なネットワークをどのように構築したら良いかを調査し、準備を行った。

令和 5 年度に本受審を予定している医学教育分野別認証評価に向けて、引き続き優先順位をつけて行っていく。

＜先導的教育事業助成＞

課題名

国際認証（医学教育分野別認証評価）への対応、Institutional Research (IR) システム
構築のための調査と準備

報告者名

飯田 洋

所属

横浜市立大学医学部 医学教育学

【目的】

国際認証（医学教育分野別認証評価）への対応が契機となり、教育活動の質保証システムとして Institutional Research (IR) の必要性が論じられるようになった。IR 活動は大学の経営改善や学生支援、教育の質向上のためのプログラム評価など多岐にわたる。

IR とは組織全体のデータを収集・分析し、情報として可視化した上で、その結果を教育や研究・管理・運営に役立てるものである。医学教育では主に教育・学習に関するデータを扱う教学 IR と位置付けられる。

医学教育に関する情報を収集、蓄積するシステムが本学には未だないのが現状である。このシステムを構築することは、国際認証に対応するためだけでなく、カリキュラムや目標の見直しに役立てることでより質の高い教育に繋がる。

【対象と方法】

国際認証への対応が契機となり、本学でも 2018 年から医学群教学 IR 検討ワーキングが始動している。例えばデータ収集では、成績不良の学生・留年生はどんな傾向があるか分析し、整理・解釈した。入学者の出身県・出身高校、就職先にはどんな傾向があるか分析し、整理・解釈をおこなった。

しかし、本学ではデータが様々な場所に散在している。例えば学生の成績は学務や各教室、入学時の成績や面接情報はアドミッションセンター、卒業生の進路は俱進会、専門医の取得状況は各教室や学会などである。これらの情報を的確に収集し、蓄積するシステムを構築することが本計画である。関係部署から個人情報に配慮した形で情報を、集積・蓄積する安全なネットワークをどのように構築したら良いかを調査し、準備を行った。

【結果と考察】

想定通り情報は様々な部署に散在していた。解析すべき項目について、個人情報に配慮した形でデータを一つのネットワークに集めることとした。下記について解析した。

(1) 国家試験不合格者の要因分析と対策（医学科）

・国家試験不合格者は入試段階でのセンター試験成績が下位の傾向がみられる。9割は男性である。

・4年時のCBT成績と国家試験の相関が高い。

(2) リサーチマインドの涵養のためのデータ調査・評価（医学科）

・表彰制度、過去の表彰者、卒業後の動向を確認した。

(3) 遠隔授業に関する学生の意向（医学科）

・在学生にアンケート実施（有効回答数440名）。75%の学生が遠隔授業の継続を希望、授業の理解は対面と遠隔が同じ57%、対面の方が理解できる22%、遠隔の方が理解できる20%であった。

(4) 学生の出身地、出身校、初期研修など（医学科）

・出身高校は、東京神奈川に集中（8割超）、中間一貫の私立学校が大半を占める。

・卒業生の初期臨床研修先は、65%が県内病院、31%が県外病院であった。

・附属2病院にマッチングした80名のうち8割が横浜市立大学医局に入局していた。

【おわりに】

医学教育分野別認証評価基準において、教育プログラムのモニタと評価が求められている。教育プログラムのモニタとはカリキュラムに含まれるものについて定期的なデータ収集を行うことを指し、それらのデータを解析することによって評価を行う。

医学教育分野別認証評価で卒業生を対象としたデータ収集が強く求められているが、網羅的なデータ収集は困難で、個人情報の観点からも難しい。入手可能なデータだけでも継続して系統的に収集しておき、必要時に引き出せるようにしておくことで対応したい。学内のデータについては扱うシステムが定まっているが、卒業生のデータに関しては、データ保管場所等、アクセスのしやすさとセキュリティの両面から継続して検討が必要である。

【論文および学会発表】

なし

< 学術講演会助成 >

令和 3 年度 学術講演会助成 報告書

中村 幸代

横浜市立大学医学部看護学科 母性看護学領域

第 35 回神奈川母性衛生学会総会ならびに学術集会

- ・開催日：2022 年 2 月 5 日（土）9:20～17:40
- ・開催方法：オンライン
- ・メインテーマ：母子とともにあるプロフェッショナルリズムの発展
- ・参加者数：150 名

プログラムは下記の通りである。

時 間	項 目	
9:20～9:25	開会挨拶	
9:25～10:10	一般演題 第Ⅰ群「優秀演題賞候補」	
10:10～10:40	会長講演「冷えを科学する」 中村幸代（横浜市立大学医学部看護学科 教授）	
10:45～11:45	特別講演「オキシトシンを手がかりに周産期ケアを創る」 堀内成子（聖路加国際大学 学長・特命教授）	
12:50～13:35	一般演題 第Ⅱ群 「妊娠期」	一般演題 第Ⅳ群 「母乳育児・子育て支援」
13:35～14:20	一般演題 第Ⅲ群 「分娩期・産褥期」	一般演題 第Ⅴ群 「ウィメンズヘルス・教育」
14:25～15:55	教育講演① 「日本における多様性のとらえ方～LGBT の視点から～」 玉津理沙（一般社団法人 CialFrame 認定講師）	
16:00～17:30	教育講演② 「新型コロナウイルスが周産期医療に与える課題」 倉澤健太郎（横浜市立大学医学部産婦人科学教室 准教授）	
17:30～17:40	表彰式・閉会の挨拶	

各演題につき複数の質疑応答があり、大変活発な学術集会となった。参加者は学生、周産期医療に携わる医師、看護職、研究者等と幅広く、神奈川県内だけでなく、全国から 150 名の参加があった。また一般演題数は過去 5 年で最多の 30 演題となり、2 会場に分かれて実施した。本学術集会での意見交換を通して、プロフェッショナルリズムの視点から参加者の知識や技術の向上につながった。また学会として、今後も神奈川県母性衛生分野の発展・普及に貢献していくことを確認した。