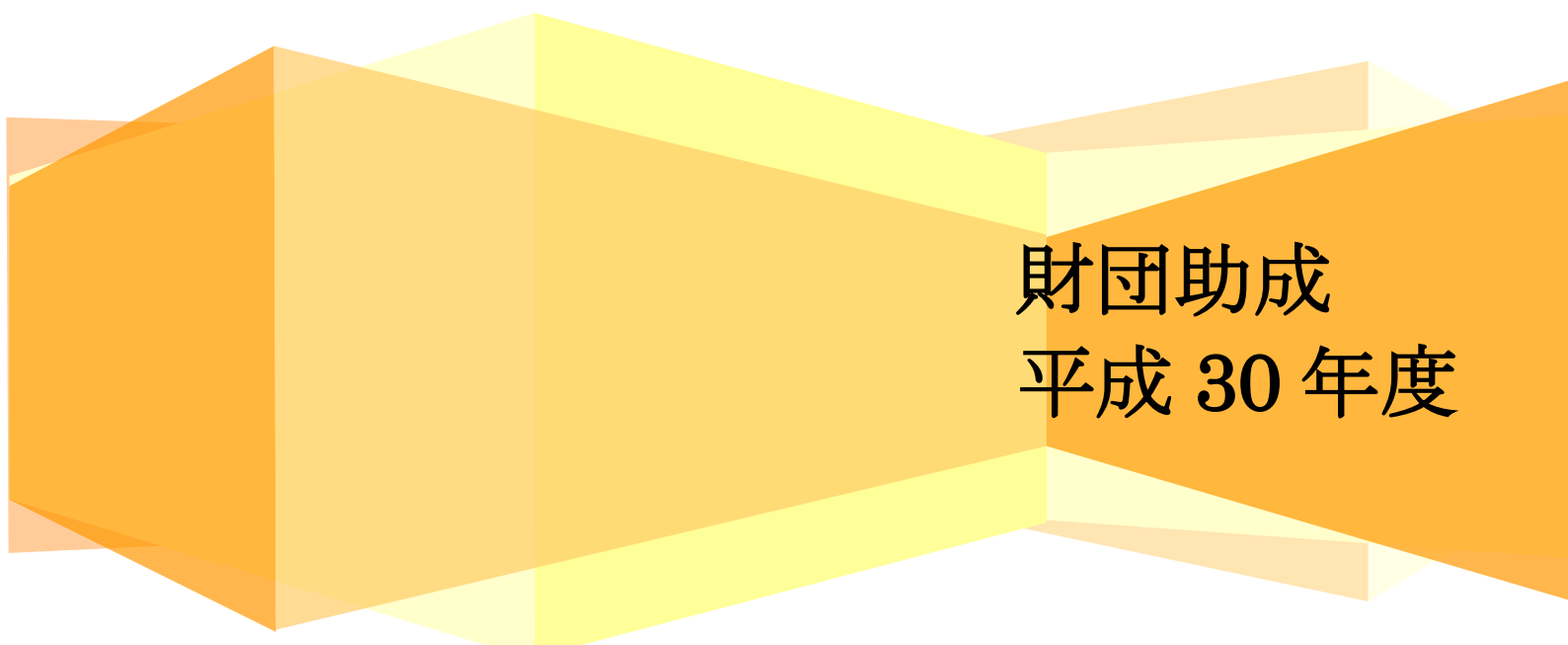


一般財団法人横浜総合医学振興財団

# 研究等報告書抄録集

学生自主的活動助成・学術講演会助成報告書掲載



財団助成  
平成 30 年度

## 目 次

### I 第8回 梅原賞受賞

単球・樹状細胞分化を制御する遺伝子発現制御機構の解明

[黒 滝 大 翼](#)

### II 推進研究助成

第14グループ(平成28年度～30年度継続助成終了)

アスピリンとメトホルミンの組み合わせによる大腸腫瘍の化学予防効果の検討

[日 暮 琢 磨](#)

新規急性インスリン抵抗性誘導モデルによる膵 $\beta$ 細胞、肝臓、脂肪組織の回復機構

[富 樫 優](#)

### III わかば研究助成

成人自己炎症性疾患の遺伝学的病態解明と治療法の開発

[土田 奈緒美](#)

先天性血小板減少症・止血凝固異常症の遺伝的病態の解明

[内 山 由 理](#)

血清プロテオミクスにより同定された soluble EGFR の糖尿病バイオマーカーとしての検討

[京 原 麻 由](#)

非アルコール性脂肪性肝疾患を背景にした新規肝癌モデルの検討

[本 多 靖](#)

うつ病治療の新たなターゲットとしての ATRAP の可能性

[小 林 竜](#)

全身性エリテマトーデスにおける TRIM21 の役割について

[神 山 玲 光](#)

腎尿細管における受容体随伴性プロレニン(RAP)系による、循環調節の解明

[木 野 旅 人](#)

若年者における「ボノプラザン・アモキシシリン7日・ボノプラザン・メロニダゾール・シタフロキサシン7日の sequential 治療」と「ボノプラザン・アモキシシリン・メロニダゾール 3 剤7日治療」のヘリコバクター・ピロリ除菌治療を比較するランダム化比較試験

[須 江 聡一郎](#)

コンディショナルノックアウトマウスを用いた ALS 責任遺伝子 UBQLN2 の機能解析

[窪 田 瞬](#)

結核菌感染症患者における CD4<sup>+</sup> T細胞での PD1 発現頻度と PDCD1 SNP との関連の  
検証による疾患感受性因子としての有用性の検討

[田 代 研](#)

胆膵領域がんにおける AMPA 受容体シグナル伝達系に着目した新規診断・治療法の開発

[長谷川 翔](#)

#### IV 医療技術研究助成

肥満皮膚創傷治癒遅延への新しいアプローチ

-酸化ストレスに着目したバイブレーションセラピーの効果とメカニズム解明-

[福 田 真 佐](#)

周麻酔期看護師が関与した手術麻酔の合併症

-周麻酔期看護師関与症例と非関与症例の比較-

[井 出 悠紀子](#)

肥満者における真皮エラスチン分解酵素の解析

-健やかな皮膚の維持を目指して-

[海 賀 一 早](#)

横浜地域在住の慢性疼痛患者における身体活動量の調査

[望 月 英 樹](#)

核医学診療における放射性同位元素による汚染時サーベイランス評価法の検討

[尾 川 松 義](#)

(平成 29 年度医療技術研究助成)

急性期病院に転職した中堅看護師の組織間キャリア発達の認識

[下 川 都 筆](#)

(平成 29 年度医療技術研究助成)

多職種チームで行う植込型補助人工心臓退院支援プログラムの作成

[鈴 木 姿 子](#)

#### V 医学・医療関連事業助成

早産児の新生児期における脳内代謝物濃度と就学時期における神経発達評価との関連性

[富 安 もよこ](#)

インターネットを活用した県内産科クリニックとの胎児心疾患動画像の共有による胎児心  
エコスクリーニング普及のための活動

[川 瀧 元 良](#)

ブラジル日系永住者巡回診療健診フィールドワーク

[水 嶋 春 朔](#)

神奈川県結核患者における疫学的特徴と分子疫学的解析に関する研究

[近内 美乃里](#)

(平成 29 年度医学・医療関連事業助成)

Senning 手術施行患者に対する遠隔期アンケート調査

[小林 真理子](#)

## VI 指定寄附研究助成

(心臓疾患)

収縮機能の保持された心不全におけるCa<sup>2+</sup>過負荷の病態への影響とその制御に関する検討

[上村 大輔](#)

中枢吻合“Pouch”を用いた遊離右内胸動脈(free RITA)の早期、遠隔期成績及び開存率の検討

[南 智行](#)

(腎臓がん関係)

FLCN ノックアウトマウスを用いた Birt-Hogg-Dubé (BHD) 関連腎癌の発癌機序の解明

[大竹 慎二](#)

(血液内科学関係)

急性骨髄性白血病における PRDM16 高発現症例に対する新規分子標的の同定

[柴 徳生](#)

(腎臓・循環器内科学関係)

肺高血圧症におけるドーパミン性神経伝達機構の解析

[橋本 達夫](#)

(胆のうがん関係)

新規治療薬開発に適したマウス胆嚢癌同所移植モデルの開発

[小川 祐二](#)

## VII 学生自主的活動助成

米国の大学・附属病院における重症・希少疾患患者に対する高度看護実戦と教育・研究に関する研修

[村松 さやか](#)

米国の大学・附属病院における重症・希少疾患患者に対する高度看護実戦と教育・研究に関する研修

[中村 郁海](#)

米国の大学・附属病院における重症・希少疾患患者に対する高度看護実戦と教育・研究に関する研修

[石塚 有希子](#)



第 107 回日本病理学会ポスター発表  
[松 元 加 奈](#)

ブラジル日系永住者巡回診療健診  
[立 入 仁 美](#)

ブラジル日系永住者巡回診療健診  
[橘 優 汰](#)

#### VIII 学術講演会助成

脳神経外科教育セミナー2018  
[山 本 哲 哉](#)

第 28 回日本病態生理学会大会  
[藤 田 孝 之](#)

第 5 回日本血管血流学会学術集会  
[石 上 友 章](#)

第 7 回神奈川婦人科臨床病理研究会  
[古 屋 充 子](#)

※目次の課題名等は研究助成申請時のものです。

<第8回梅原賞受賞>

単球・樹状細胞分化を制御する遺伝子発現制御機構の解明

黒滝 大翼<sup>1</sup>

( 共 同 研 究 者 名 )

中林 潤<sup>2</sup>、西山 晃<sup>1</sup>、田村 智彦<sup>1,2</sup>

( 所 属 部 科 名 )

<sup>1</sup>横浜市立大学大学院医学研究科免疫学

<sup>2</sup>横浜市立大学先端医科学研究センター

抄録

単球及び樹状細胞は免疫応答や組織恒常性維持に必須の血球細胞である。その過剰あるいは異常な産生・活性化は自己免疫疾患を含む様々な疾患の増悪化要因となる。そのためそれら疾患の病態を深く理解するためにも、単球・樹状細胞の分化制御の分子基盤を明らかにすることは極めて重要である。本課題において我々は単球・樹状細胞分化過程における細胞種特異的な遺伝子発現パターン形成機構について、転写因子によるエンハンサー制御の観点から解析を行った。その結果、単球及び樹状細胞に特異的な遺伝子のエンハンサーの大部分は前駆細胞の段階から徐々に活性化されるが、遺伝子発現は単球や樹状細胞に分化してから誘導されること、血球細胞の運命決定はカギとなる少数の転写因子がエンハンサーのエピゲノム変化を生じさせることにより誘導することなどを明らかにした。さらに本研究で得た合計 100 サンプル以上のエピゲノム・トランスクリプトームの網羅的解析データは全て公開し、過去に類を見ないデータベースを構築することもできた。以上の結果は、単球及び樹状細胞分化の分子メカニズムの理解を飛躍的に向上し、今後様々な疾患の治療戦略の創出に貢献すると考えられる。

<第8回梅原賞受賞>

単球・樹状細胞分化を制御する遺伝子発現制御機構の解明

黒滝 大翼<sup>1</sup>

(共同研究者名)

中林 潤<sup>2</sup>、西山 晃<sup>1</sup>、田村 智彦<sup>1,2</sup>

(所属部科名)

<sup>1</sup>横浜市立大学大学院医学研究科免疫学

<sup>2</sup>横浜市立大学先端医科学研究センター

目的

単球と樹状細胞 (dendritic cell, DC) は免疫応答に必須の役割を有している。これらの細胞は単核貪食細胞と呼ばれ貪食能や抗原提示能という共通の性質を有しているが、その一方でそれぞれに独自の機能を発揮することで、様々な病原体に対応する。骨髄に存在する造血幹細胞 (hematopoietic stem cell, HSC) は中間的前駆細胞段階であるリンパ球系多能性前駆細胞 (lymphoid-primed multipotent progenitor, LMPP)、顆粒球-単球前駆細胞 (granulocyte-monocyte progenitor, GMP)、単球-DC 前駆細胞 (monocyte-DC progenitor, MDP) に分化し、MDP が単球共通前駆細胞 (common monocyte progenitor, cMoP) に分化した場合には単球を産生、DC 共通前駆細胞 (common DC progenitor, CDP) に分化した場合には DC を産生すると考えられてきた(図1) (Murphy et al. *Annu Rev Immunol* 34, 93, 2016; Kurotaki et al. *J Interferon Cytokine Res* 36, 433, 2016)。しかし、単球と DC の分化過程における細胞種特異的遺伝子発現パターンの形成機構は不明な点が多い。

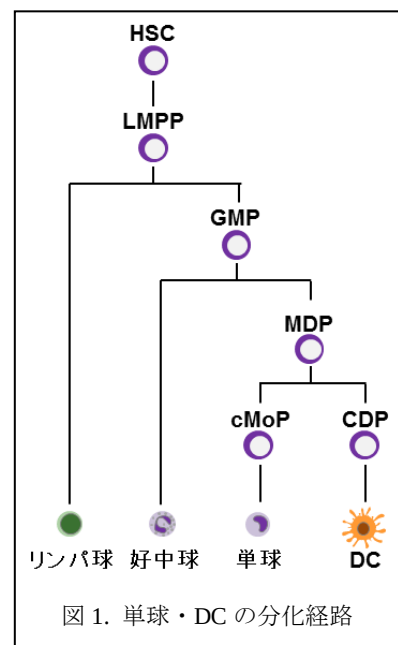
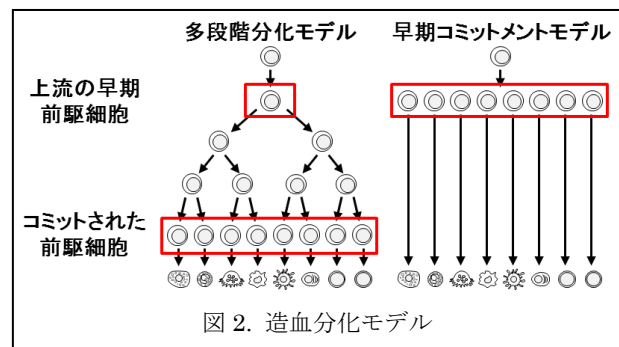


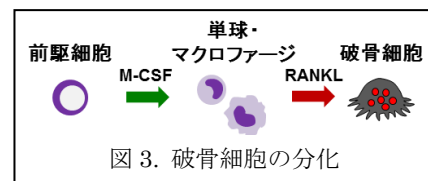
図1. 単球・DC の分化経路

また上述のような「多段階分化モデル」に対して、DC を含む血球細胞の運命

決定はHSCに近いLMPPのような上流の前駆細胞においても起こりうることをレンチウイルスを用いた細胞バーコーディング法によって示されていた(図2)(Naik et al. *Nature* 496, 229, 2013)。しかし、DCに運命決定されたLMPPはこれまでに同定されておらず、早期運命決定の分子メカニズムもわかっていない。

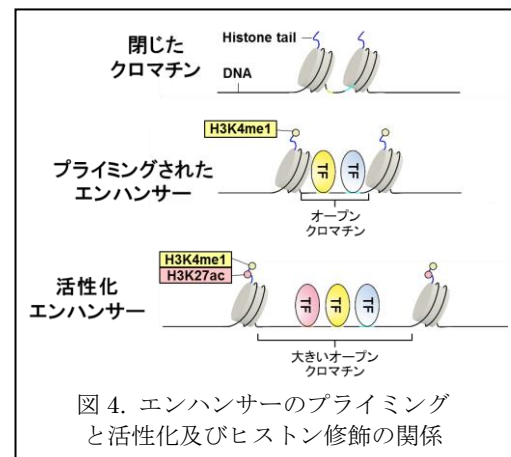


破骨細胞は成体では単球に由来し、骨代謝に重要なマクロファージ様細胞である(Kurotaki et al. *Int Immunol* 2017)。これらの細胞はRANKL依存性に単球・マクロファージから分化する(図3)。



しかし、破骨細胞の分化過程において転写因子がどのように破骨細胞特異的な遺伝子発現パターンを形成するのか不明である。

細胞種特異的な遺伝子発現パターンの形成にはプロモーター遠位のエンハンサーによる制御が重要であることが明らかになってきている(Heinz et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 144, 2015)。エンハンサーの状態はヒストン修飾によって区別できる(図4)。閉じたクロマチンに系譜特異的転写因子が結合することで、エンハンサーはプライミングされ、クロマチンはオープンになる。このときヒストンH3の4番リジンモノメチル化(H3K4me1)修飾が生じる。さらに転写因子が結合することでエンハンサーは活性化し、H3K27アセチル化(H3K27ac)が生じる。これにより遺伝子の発現が誘導される。しかし、単球・DC・破骨細胞の分化過程においてどのような転写因子によりエンハンサーが制御されるのか良くわかっていない。



このような背景を踏まえて本研究課題では以下の3つの目的で研究を進めた。

1. 単球とDCの分化過程におけるエンハンサーランドスケープの変化とその制御因子を同定する
2. DCに運命決定された分化上流の骨髄前駆細胞を同定し、早期運命決定のメカニズムを明らかにする
3. 単球・マクロファージから破骨細胞への分化過程におけるエンハンサーランドスケープの変化と転写因子の役割を解明する

## 方法

C57BL/6 マウス生体内から GMP、MDP、cMoP、CDP、単球、DC を単離し (図 1・図 5)、H3K4me1 と H3K27ac のクロマチン免疫沈降シークエンス (ChIP-seq) を行った。一般的な方法では  $10^6$  から  $10^7$  個程度の細胞数を必要とするが、我々は  $10^5$  個の細胞で ChIP-seq が可能なプロトコールを考案した。取得した ChIP-seq データはマウスの reference genome (mm10) にマッピングを行い、ChIP-seq ピーク領域を同定した。バイオインフォマティクス解析には Bowtie、Homer、R などのツールを用いた。

LMPP における遺伝子発現プロファイルの heterogeneity を理解するために、C1 システムによりシングルセル RNA-seq を行った。さらに LMPP 亜集団におけるエンハンサーの状態を調べるために Assay for Transposase-Accessible Chromatin Sequencing (ATAC-seq) を行った。ATAC-seq はトランスポゾンがオープンクロマチン領域に入りやすいことを利用した方法で、活性化した遺伝子発現制御領域等を全ゲノムで調べることができる (Buenrostro et al. *Nat Methods* 10: 1213, 2013)。 $10^2$  から  $10^4$  個程度の少ない細胞数で実施できる点が特徴である。

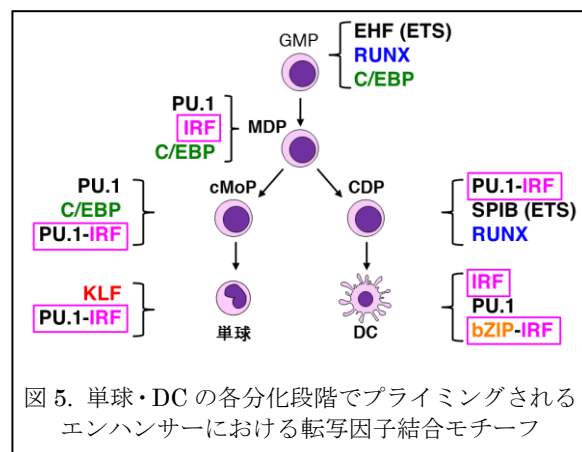
骨髄細胞を M-CSF 存在下で培養し、その後 RANKL を添加することで破骨細胞を分化誘導した (図 3)。破骨細胞におけるエンハンサーの活性化状態を調べるために H3K27ac や転写因子 PU.1 の ChIP-seq を行った。

## 結果

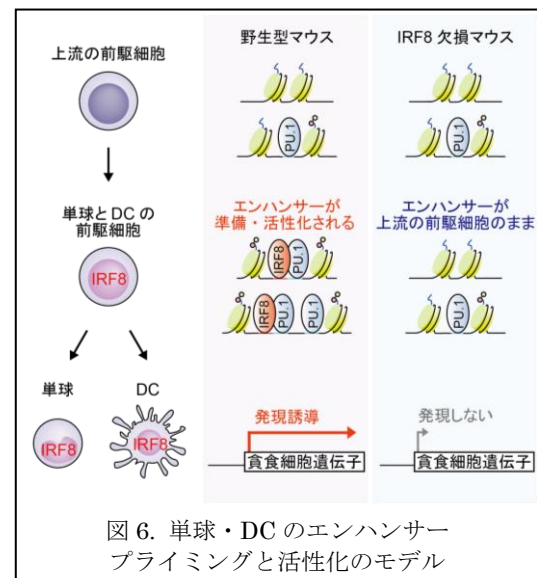
### 1. 単球・DC 分化のエンハンサーランドスケープ解読

Kurotaki et al. *Cell Rep* 2018

生体内における単球と DC のエンハンサーランドスケープを調べるために H3K4me1 と H3K27ac の分布を解析した。その結果、単球や DC に特徴的なエンハンサーの大部分は前駆細胞の段階から徐々にプライミング・活性化されるが、遺伝子発現は単球や DC に分化してから誘導されることがわかった。さらに前駆細胞におけるエンハンサー領域の *de novo* DNA モチーフ解析から、各前駆細胞段階で形成されるエンハンサーは PU.1、RUNX、C/EBP、IRF などいくつかの転写因子の組み合わせによって制御される可能性が示された (図 5)。特に単球・DC の共通の前駆細胞である MDP 以降でプライミングされるエンハンサーでは IRF の DNA 結合モチーフが高度に濃縮していた。9 つ



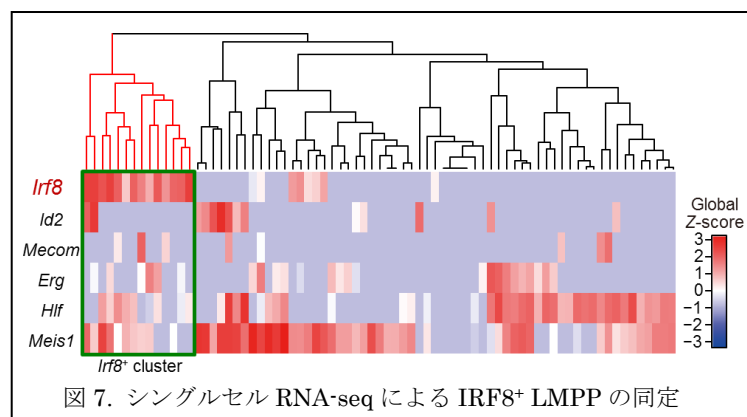
ある IRF ファミリー転写因子の中でも IRF8 が MDP 以降の前駆細胞で強く発現することから、我々は IRF8 に着目して解析を進めた。IRF8 欠損マウス前駆細胞におけるヒストン修飾や野生型マウスにおける IRF8 の ChIP-seq 解析から、IRF8 が実際に MDP や cMoP において多くのエンハンサーに結合しそのプライミングや活性化を誘導することがわかった。興味深いことに IRF8 欠損 GMP、MDP、cMoP のエンハンサーランドスケープは全て野生型 GMP と類似しており、MDP や cMoP の特徴が失われていた。一方で遺伝子発現に関しては野生型と IRF8 欠損前駆細胞で大きな変化はなかった。以上の結果は IRF8 が GMP から MDP そして cMoP へのエンハンサー形成に必須であることを示す (図 6)。また我々は IRF8 欠損マウスの MDP や cMoP が通常分化しない好中球へと分化してしまうことを見出しており、その前駆細胞の分化能は遺伝子発現よりもエンハンサーランドスケープに強く表現されると考えられる。



## 2. DC 早期運命決定機構の解明

Kurotaki et al. *Blood* 2019

次に我々は DC に分化能が制限された造血前駆細胞を同定し、早期運命決定の分子機構を理解するために、マウス LMPP を単離してシングルセル RNA-seq を行った。種々の unsupervised クラスタ解析を行ったが、DC に特徴的な遺伝子発現パターンを示す LMPP は同定できなかった。そこで LMPP と DC にコミットされた前駆細胞である CDP のマイクロアレイデータを比較し、有意に発現が異なる転写因子遺伝子を選択して解析を行った。その結果、転写因子 *Irf8* を発現し、*Hlf* や *Meis1* の発現が低い LMPP 亜集団が存在することを見出した (図 7)。さらに IRF8 タンパク質の発現を可視化できる IRF8-GFP キメラノックインマウスを解析した。IRF8 の発現は HSC や MPP (上流の





前駆細胞集団)では一切認められず、LMPPの段階から弱く発現し始めることが明らかになった。興味深いことに、 $\text{IRF8}^+$  LMPPは生体内においてDC(特にcDC1亜集団)に優先的に分化し、単球や好中球の産生能が低いことがわかった(図8左)。さらにLMPP亜集団を移植して早期に骨髄を解析したところ $\text{IRF8}^-$  LMPPの一部が $\text{IRF8}^+$  LMPPが分化することが明らかになった。一方、 $\text{IRF8}^+$  LMPPは $\text{IRF8}^-$  LMPPには分化しなかった。以上の結果はLMPP亜集団における階層性を示唆する(図8左)。

これまでの我々の研究からMDPなどの単核貪食細胞前駆細胞においてIRF8は単球やDC関連遺伝子のエンハンサーに結合し、エンハンサーのプライミング・活性化とその後の遺伝子発現誘導に必須であることを明らかにしている(前述のKurotaki et al. *Cell Rep* 2018)。そこで、LMPP亜集団におけるエンハンサーの状態を調べるために $\text{IRF8}^-$  LMPPと $\text{IRF8}^+$  LMPPを分離し、ATAC-seqを行った。 $\text{IRF8}^+$  LMPPに特徴的なオープンクロマチン領域には予想通りIRF8のDNA結合モチーフが有意に存在していた。この $\text{IRF8}^+$  LMPPに特徴的なオープンクロマチン領域近傍の遺伝子は $\text{IRF8}^-$  LMPPや $\text{IRF8}^+$  LMPPにおいてはほとんど発現せず、CDPやDCなどのDC系譜細胞で強く発現し、DCの分化や機能に重要な遺伝子であった。以上の結果や他の実験からLMPPにおいてIRF8はDCの分化に関連する遺伝子のエンハンサー領域に結合し、DC系譜への運命をエピジェネティックに制御すると考えられる(図8右)。

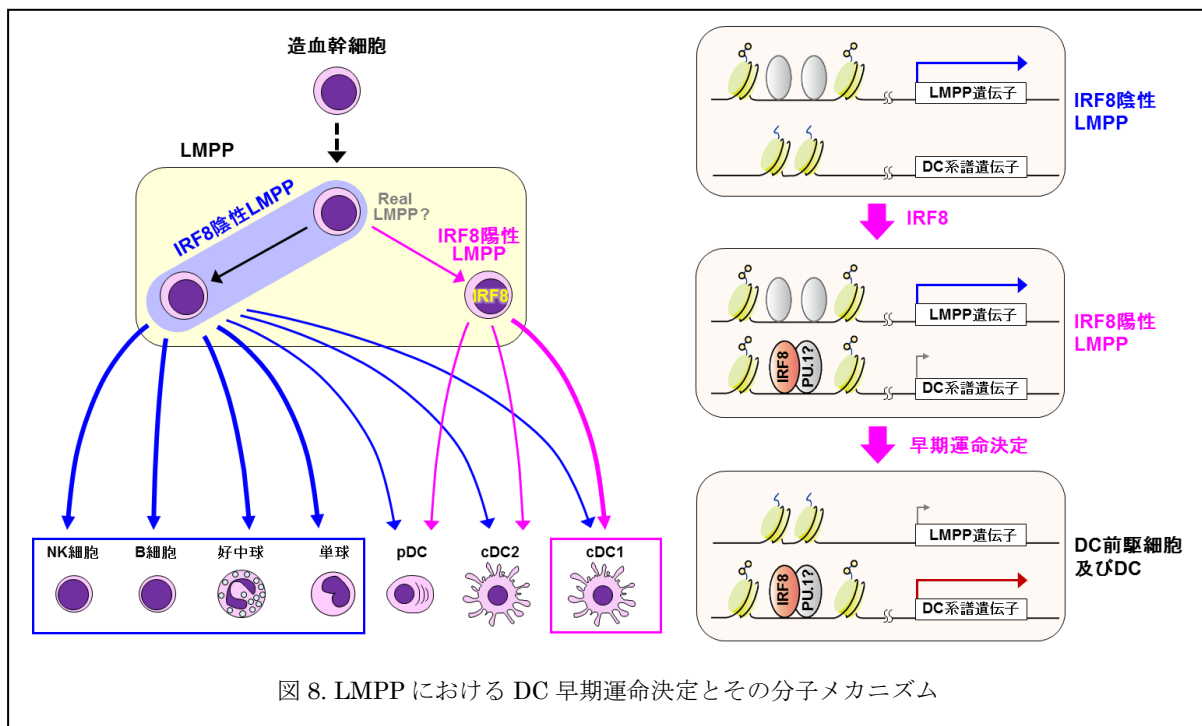
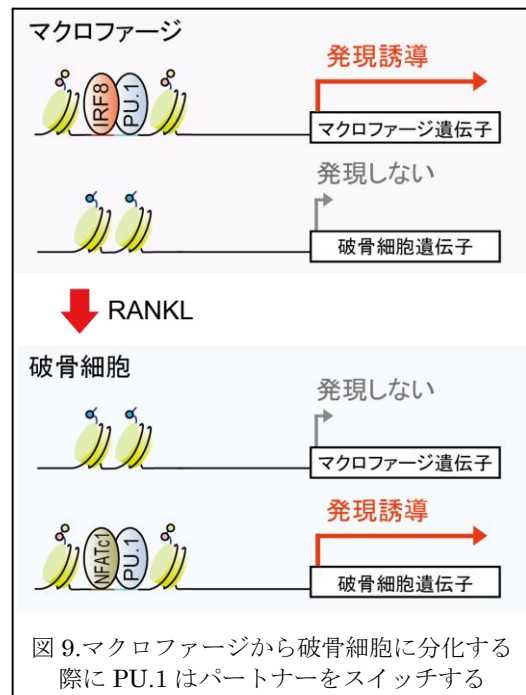


図 8. LMPP における DC 早期運命決定とその分子メカニズム

### 3. 破骨細胞分化における転写因子によるエンハンサー制御

Izawa\*, Kurotaki\*, Nomura\* et al. *J Bone Miner Res* 2019, \*co-first authors

次に我々は破骨細胞分化における活性化エンハンサーの変化を調べるために、骨髓由来マクロファージと破骨細胞において H3K27ac の ChIP-seq を行った (図 3)。マクロファージと破骨細胞の活性化エンハンサー領域には PU.1 の DNA 結合モチーフが有意に存在していた。その一方で、IRF の結合モチーフはマクロファージ特異的なエンハンサーに存在し、NFAT の結合モチーフは破骨細胞特異的なエンハンサーに選択的に存在していた。これに一貫して、マクロファージにおける RANKL 刺激により IRF8 の発現は低下し、NFATc1 の発現が強く誘導されることがわかった。そこで我々は PU.1、IRF8 及び NFATc1 の ChIP-seq を行った。マクロファージ特異的な PU.1 結合部位は IRF8 の結合と重複しており、破骨細胞特異的な PU.1 結合部位は NFATc1 結合部位と重なっていた。さらに IRF8 と PU.1 が結合する遺伝子はマクロファージで発現が高く、NFATc1 と PU.1 が結合する遺伝子は破骨細胞において発現が高いことがわかった。以上の結果から PU.1 は破骨細胞の分化に伴ってそのパートナー転写因子を IRF8 から NFATc1 にスイッチすることで破骨細胞分化を制御すると考えられる (図 9)。



### 考察

ここまでの解析で単球・DC さらに破骨細胞の分化過程におけるエンハンサーランドスケープ動態の詳細を明らかにすることができた。これによりこれら単核貪食細胞の分化機構の理解が大きく進んだと言える。本研究で用いた網羅的解析データは公共データベースである DDBJ Sequence Read Archive や我々独自のデータベースである Myeloid Chromatin Atlas (<http://immunol.med.yokohama-cu.ac.jp/chromatinatlas/>) において利用することができる。このように本研究課題によって関連分野に大きく貢献ができたと自負している。

本研究から転写因子 IRF8 がエンハンサーをエピジェネティックに制御することで、単核貪食細胞に特異的な遺伝子発現パターンの形成に関わることが明らかになった。さらに IRF8 と PU.1 の ChIP-seq データから、単核貪食細胞の分化



過程において IRF8 は主に PU.1 とヘテロダイマーを形成して、DNA に結合することがわかった。PU.1 は閉じたクロマチンに結合できるパイオニア転写因子であり、IRF8 は PU.1 と結合することによって閉じたエンハンサー領域にも結合できると考えられる。IRF8 がどのようなヒストン修飾酵素やクロマチンリモデリング因子をリクルートし、エピゲノム変化を誘導するのかに関しては全くわかっていない。今後は IRF8 と結合するタンパク質複合体を質量分析などの方法によって解析する必要がある。

我々は DC への運命決定が造血早期の前駆細胞である LMPP の段階で IRF8 により誘導されることを明らかにした。IRF8 は LMPP においてエピゲノムを変化させるが、この段階における遺伝子発現制御にはほとんど関わっていない。このような上流の骨髄前駆細胞におけるカギとなる転写因子によるエピゲノム変化を介した系譜決定制御機構は他の血球細胞にも当てはまる可能性があり、将来的にシングルセル RNA-seq や ATAC-seq 等を活用して解析を行う予定である。

IRF8<sup>+</sup> LMPP 経路を介した DC (特に cDC1 亜集団) 産生の免疫学的意義はわかっていない。IRF8<sup>+</sup> LMPP は IRF8<sup>-</sup> LMPP に比較して素早く DC を産生することから、IRF8<sup>+</sup> LMPP を介した DC 産生経路は感染防御に働くかもしれない。マラリア感染の際にはマスト細胞から Flt3L が分泌されて、DC 産生が増加することが知られている (Guermonprez et al. *Nat Med* 19, 730, 2013)。また結核菌やトキソプラズマのような細胞内寄生病原体感染時には IL-12 の発現が亢進し、DC の産生が増加することも報告されている (Tussiwand et al. *Nature* 490, 502, 2012)。そのため感染時に Flt3L や IL-12 により LMPP において IRF8 の発現が増加し、DC の産生を誘導することで病原体に対する免疫応答を強化している可能性がある。また cDC1 亜集団はクロスプレゼンテーションによって外来抗原を CD8<sup>+</sup> T 細胞に提示することで細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導し、抗腫瘍免疫において中心的役割を担う免疫細胞であることが知られている。そのため我々の研究をさらに発展させて DC 産生を人為的に制御できるようになれば、がんの新たな免疫療法へとつながる可能性がある。今後はこれらの観点を含めてさらに研究を発展させたい。

## 論文及び学会発表（研究会を含む）

### 英文論文

1. **Kurotaki D**<sup>†</sup>, Kawase W, Sasaki H, Nakabayashi J, Nishiyama A, Morse HC 3rd, Ozato K, Suzuki Y, Tamura T<sup>†</sup>: Epigenetic control of early dendritic cell lineage specification by the transcription factor IRF8 in mice. **Blood** 133:1803-1813, 2019.  
<sup>†</sup>**Corresponding authors. *Blood* 誌で最も優れた論文である Plenary Paper に選出**
2. Izawa N\*, **Kurotaki D**\*, Nomura S\*, Fujita T, Omata Y, Yasui T, Hirose J, Matsumoto T, Saito T, Kadono Y, Okada H, Miyamoto T, Tamura T, Aburatani H, Tanaka S: Cooperation of PU.1 With IRF8 and NFATc1 Defines Chromatin Landscapes During RANKL-Induced Osteoclastogenesis. **J Bone Miner Res** e3689, 2019 [Epub ahead of print]. \***Co-first authors.**
3. **Kurotaki D**, Nakabayashi J, Nishiyama A, Sasaki H, Kawase W, Kaneko N, Ochiai K, Igarashi K, Ozato K, Suzuki Y, Tamura T: Transcription Factor IRF8 Governs Enhancer Landscape Dynamics in Mononuclear Phagocyte Progenitors. **Cell Rep** 22:2628-2641, 2018
4. Haruhara K, Wakui H, Azushima K, **Kurotaki D**, Kawase W, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Ohki K, Kinguchi S, Ohsawa M, Minegishi S, Ishigami T, Matsuda M, Yamashita A, Nakajima H, Tamura T, Tsuboi N, Yokoo T, Tamura K: Angiotensin receptor-binding molecule in leukocytes in association with the systemic and leukocyte inflammatory profile. **Atherosclerosis** 269:236-244, 2018.
5. Saito E, Suzuki D, **Kurotaki D**, Mochizuki A, Manome Y, Suzawa T, Toyoshima Y, Ichikawa T, Funatsu T, Inoue T, Takami M, Tamura T, Inagaki K, Kamijo R: Down-regulation of Irf8 by Lyz2-cre/loxP accelerates osteoclast differentiation in vitro. **Cytotechnology** 69:443-450, 2017.
6. **Kurotaki D**, Sasaki H, Tamura T: Transcriptional control of monocyte and macrophage development. **Int Immunol** 29:97-107, 2017. (総説論文)

### 和文論文

1. **黒滝大翼**, 佐々木 悠, 田村智彦: 赤脾髄マクロファージの分化と機能. **細胞**, 49(4): 163-166, 2017.
2. **黒滝大翼**, 田村智彦: 血球系細胞のシングルセル解析のための細胞分取. **実験医学別冊 シングルセル解析プロトコール**: 80-90, 2017.

#### 招待講演

1. **黒滝大翼**: 転写因子 IRF8 によるミエロイド細胞分化のエピジェネティック制御. 第 148 回 NIH 金曜会, Bethesda, 2019 年 1 月 18 日.
2. **Kurotaki D**, Kawase W, Nishiyama A, Sasaki H, Nakabayashi J, Morse HC 3rd, Ozato K, Suzuki Y, Tamura T: Epigenetic control of early dendritic cell lineage specification by the transcription factor IRF8. NIH Genetics and Epigenetics of Development Affinity Group Meeting, Bethesda, 2018 年 11 月 29 日.
3. **黒滝大翼**, 中林 潤, 川瀬 航, 西山 晃, 田村智彦: 転写因子 IRF8 による単核貪食細胞分化のエピジェネティック制御. 第 14 回 麒麟塾, 東京, 2018 年 6 月 30 日.
4. **黒滝大翼**: 血球系前駆細胞における早期系譜決定のエピジェネティック制御. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017 年 12 月 6 日.
5. **黒滝大翼**: IPA を活用した血球細胞分化を制御する転写因子の研究. Ingenuity ユーザーミーティング, 東京, 2017 年 9 月 22 日.

#### 学会発表

1. **Kurotaki D**, Kawase W, Sasaki H, Nakabayashi J, Nishiyama A, Morse HC III, Ozato K, Suzuki Y, Tamura T: Transcription factor IRF8 epigenetically controls early dendritic cell lineage specification. EMBO Workshop Single Cell Biology (ポスター発表), 東京, 2019 年 5 月 20 日.
2. Nishiyama A, Ban T, Fushimi K, Nakabayashi J, **Kurotaki D**, Tamura T: Stepwise and mutual activation of enhancers and promoters during cell differentiation. 第 41 回日本分子生物学会 (口頭発表), 横浜, 2018 年 11 月 29 日.
3. 佐々木 悠, 西山 晃, **黒滝大翼**, 関田洋一, 木村 透, 田村智彦: 単核貪食細胞系における *Irf8* の発現に重要な新規エンハンサー領域の同定. 第 80 回日本血液学会学術集会 (口頭発表), 大阪, 2018 年 10 月 13 日.
4. 西山 晃, 藩 龍馬, 伏見健太郎, 堤 修一, 中林 潤, **黒滝大翼**, 油谷浩幸, 田村智彦: 遠位エンハンサーとプロモーターの段階的相互活性化が血球分化における系譜特異的遺伝子の発現を導く. 第 22 回造血器腫瘍研究会横浜シンポジア (口頭発表), 横浜, 2018 年 1 月 26 日.
5. Sasaki H, Nishiyama A, **Kurotaki D**, Tamura T: A novel distal enhancer responsible for *Irf8* expression in the mononuclear phagocyte lineage. 第 46 回日本免疫学会学術集会 (口頭発表), 仙台, 2017 年 12 月 14 日.
6. 西山 晃, 藩 龍馬, 伏見健太郎, 中林 潤, **黒滝大翼**, 田村智彦: 細胞系譜特異的な遺伝子発現における遠位エンハンサーと近位プロモーターの段階的相互活性化についてのゲノム規模解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ポスター発表), 神戸, 2017 年 12 月 6 日.
7. 川瀬 航, **黒滝大翼**, 中林 潤, 西山 晃, Herbert C. Morse III, Keiko Ozato, 鈴木 穰, 田村智彦: 転写因子 IRF8 は造血早期において樹状細胞系譜への分化をエピジェネティックに制御する. 第 1 回東京理科大-横浜市大合同シン

- ポジウム（ポスター発表），東京，2017年9月16日．
8. 川瀬 航，**黒滝大翼**，中林 潤，Herbert C. Morse III，Keiko Ozato，鈴木 穰，田村智彦：最も早期の樹状細胞前駆細胞の同定．第28回 日本生体防御学会学術総会（口頭発表），相模原，2017年7月1日．
  9. **Kurotaki D**，Nakabayashi J，Nishiyama A，Sasaki H，Kaneko N，Kawase W，Ozato K，Suzuki Y，Tamura T: Transcription factor IRF8 governs enhancer landscape dynamics during mononuclear phagocyte development. The Annual Meeting of the American Association of Immunologists 2017（口頭発表），Washington D.C.，2017年5月15日．
  10. **Kurotaki D**，Kawase W，Nakabayashi J，Morse HC III，Ozato K，Suzuki Y，Tamura T: Isolation and characterization of the earliest dendritic cell-primed progenitors. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease（ポスター発表），仙台，2017年2月16日．
  11. **黒滝大翼**，川瀬 航，中林 潤，Herbert C. Morse III，Keiko Ozato，鈴木 穰，田村智彦：単一細胞 RNA-seq による早期樹状細胞前駆細胞の同定．第21回 造血器腫瘍研究会（口頭発表），熊本，2017年2月17日．
  12. **Kurotaki D**，Kawase W，Nakabayashi J，Morse HC III，Ozato K，Tamura T: Single-cell RNA-seq reveals a novel dendritic cell-primed early progenitor population. 第45回日本免疫学会学術集会（口頭発表），宜野湾，2016年12月5日．**ベストプレゼンテーション賞受賞**
  13. **黒滝大翼**，中林 潤，Herbert C. Morse III，Keiko Ozato，鈴木 穰，田村智彦：単一細胞 RNA-seq による早期樹状細胞前駆細胞の同定．第78回日本血液学会（口頭発表），横浜，2016年10月14日．

＜推進研究助成＞

アスピリンとメトホルミンの組み合わせによる大腸腫瘍の化学予防効果の検討

日暮琢磨

（共同研究者名も併記）

芦莉圭一 小宮靖彦 松浦哲也 中島淳

（所属部科名）

肝胆膵消化器病学

抄録

特定の栄養素や薬剤を用いて疾病を予防するという概念があり化学予防と呼ばれている。メトホルミン、アスピリンは大腸腫瘍の抑制作用が報告されているが効果は弱く、またその機序は不明な点が多い。また両薬剤は腸内細菌叢を変化させる。そこで大腸腫瘍の新規予防法の開発に向けて、薬理、腸内細菌、代謝などを検討する基礎研究、臨床試験を行った。

大腸癌部から *Fusobacterium nucleatum* が多く検出され、腫瘍増殖に関わっていることが示唆された。*Fn*は口腔内常在菌であり、健常人の腸管で検出されることは少ない。大腸癌部の *Fn* と口腔内 *Fn* の菌株の相同性を検証すると、75%の症例で菌株の一致を認め、大腸癌の *Fn* が口腔内由来であることが示唆された。大腸癌患者より採取した検体から新規培養技術オルガノイドを用いて、アスピリン、メトホルミンの抗腫瘍作用を単独、組み合わせ投与で検証すると、2剤を組み合わせることにより抗腫瘍作用が増強された。1剤を増量するより低用量の薬剤を組み合わせることで副作用を抑えて目的効果を強くするという概念は既に高血圧や糖尿病診療では常識となっており、大腸腫瘍の化学予防法としても可能性を感じる結果であった。更なる発展が期待される。

## ＜推進研究助成＞

アスピリンとメトホルミンの組み合わせによる大腸腫瘍の化学予防効果の検討

日暮琢磨

（共同研究者名も併記）

芦荻圭一 小宮靖彦 松浦哲也 中島淳

（所属部科名）

肝胆膵消化器病学

## 1. 目的

大腸癌の死亡率、罹患率は増加傾向であり対策が求められている。健診や、内視鏡によるポリープ切除は大腸癌の死亡率を下げる事が報告されているが、大腸ポリープや癌の既往のある患者はその後にもポリープや癌の再発/新規発生が多いことが知られており問題となっている。特定の栄養素や薬剤を用いて疾病を予防するという概念があり化学予防と呼ばれている。これまでも大腸癌の化学予防を検討した臨床試験がいくつも行われてきたが、副作用や有効性の観点からこれまで確立した方法というものはない。

糖尿病の治療薬のひとつであるメトホルミン近年、疫学研究より癌抑制効果を多数の論文が報告している。我々は、このメトホルミンに注目し、大腸発がんモデルマウスに対し、AMP activated kinase (AMPK)を介し大腸発癌に対し抑制的に働くことを動物実験で証明し、(Cancer Sci. 2008;99(11):2136-41, Molecular Carcinogenesis. 2010;49(7):662-671) .さらに、大腸ポリープ（腺腫や早期癌）を内視鏡切除した患者を対象にメトホルミンとプラセボを用いた RCT を実施し 1 年間の介入で新規病変の出現をどれくらい抑制できるかを検証する第 3 相試験を行いメトホルミン服用により腺腫の再発が 40%低下するという結果をえた。メトホルミンを用いた大腸腫瘍の化学予防の臨床試験は世界で初であり、その取り組みは国内、世界で高い評価を受け、新聞にも取り上げられた。（Higurashi T, et al. **Lancet Oncol. 2016;17(4):475-83**）論文についてのコメントに、既存の薬剤との組み合わせ（特にアスピリン）にも更に期待を感じるといったものがあつた（Chan AT. Metformin for cancer prevention: a reason for optimism. Lancet Oncol. 2016;17(4):407-9）。実際、血圧の治療や糖尿病の治療では、単剤で用量を極量まで増やすよりも、作用機序の異なる複数の薬剤を少量で組み合わせる方が、副作用が少なく、薬効も高いことが知られている。そこで我々は今回、大腸腫瘍予防効果を認めたメトホルミンとすでに予防効果を認めるアスピリンを組み合わせ使用す



ることにより、更なる強い予防効果を示すかどうかを検証する臨床試験を実施し、機序に解明のために、基礎研究/臨床検体を用いた解析を実施した。

## 2. 方 法

### ・臨床試験①

メトホルミンやアスピリンは腸内細菌にも影響を及ぼすことが近年多く報告されている。また大腸癌のリスクとなる腸内細菌についても近年報告が増えている。そのため、アスピリン、メトホルミン服用者、大腸癌患者、非癌患者の腸内細菌叢を検討し、薬物の **Microbiota** への影響について次世代シーケンサーを用いて検討した。

### ・臨床研究②

大腸ポリープ切除予定患者とし、内視鏡切除前に下部消化管内視鏡検査を行い、直腸の ACF を測定する。アスピリン+プラセボ群、アスピリン+メトホルミンの 2 群に無作為に割り付けを行い、二重盲検化した状態でそれぞれメアスピリン 100 mg+メトホルミン 250 mg もしくはプラセボを内服する。内服開始して 2 カ月後に切除予定のポリープを内視鏡的切除を行い、その際に ACF 数を再度測定しその変化を検討する。同時にポリープ、正常上皮も採取し、上皮の増殖、アポトーシス、遺伝子発現などを検討しメトホルミンとアスピリンの大腸上皮に対する作用機序の解析を行う。

### ・基礎研究

ヒトから採取した大腸正常上皮、大腸腺腫、SSA/P、大腸癌からのオルガノイドを作成し、マトリゲル中で①継代培養、②増殖因子投与③メトホルミン投与の条件で増殖スピード、細胞増殖マーカー、蛋白/遺伝子発現を免疫組織学的、生化学的に解析を行う。続いて、作成したオルガノイドを用いて **xenograft model** を作成し、メトホルミン、アスピリンを単独もしくは組み合わせてマウスに経口投与し **in vivo** での解析も行う。

## 3. 結 果

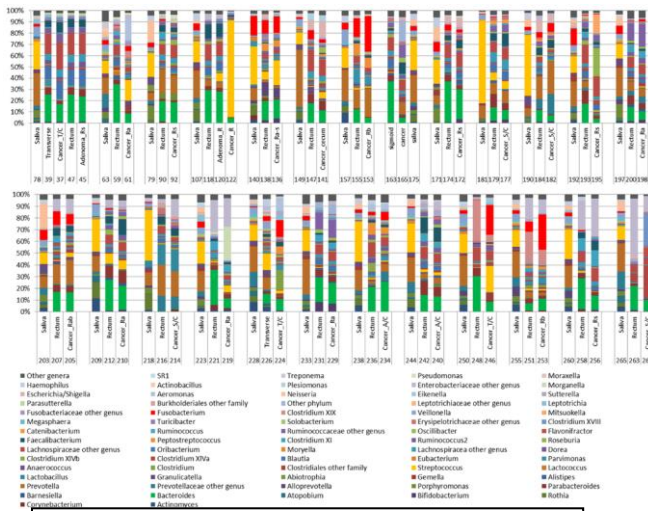
### ・臨床研究①

ヒト大腸癌患者 98 名の大腸癌部より生検検査を行い、また唾液を採取し、次世代シーケンサーによる菌叢解析を行った。(下左図)

この解析により、*Fusobacterium nucleatum* (**Fn**) というグラム陰性桿菌が大腸癌やヒト口腔内に多く存在していることを突き止めた。

この **Fn** は本来は口腔内常在菌であり、健常人の腸内ではあまり検出されないことに注目し、大腸癌の増殖に関わっている **Fn** は口腔内から由来しているのではないかと仮説をたてた。そこで、大腸癌と唾液から **Fn** を単離培養し、それぞれの株の同一性を検討したところ、大腸癌と口腔から単離培養できた **Fn** のうちなんと、75%が同一株であることが判明した。このことは、大腸癌の増殖因子と考えられる **Fn が口腔内から由来している**ことを強く示唆するものであった。(下右図) (Komiya Y, Higurashi T, et al Gut. 2018 .より)

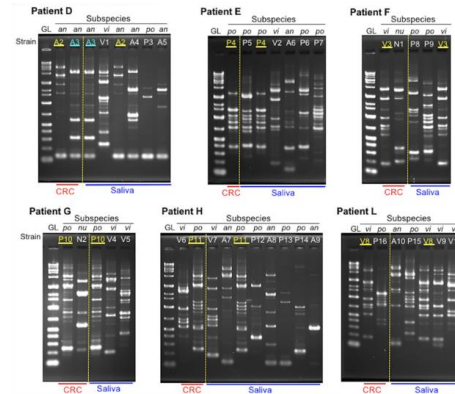




次世代シーケンサーの結果

## AP-PCR法による菌株ごとのバンドパターンの比較

**バンドパターンが一致した症例**



Komiya Y, Higurashi T et al. Gut, 2018

## ・臨床研究②

プロトコールは平成 28 年 11 月 24 日に横浜市立大学附属病院倫理委員会で承認【B161110002】され、プラセボも作成し試験を開始した。(UMIN000028259) しかし、途中で臨床研究法が施行となり、本研究は医薬品適応外使用の特定臨床研究に該当するため認定臨床研究審査委員会での審査対象となったことなどにより、当初の計画通りに組み入れを進めることができなかった。H31 年度末の時点で目標組み入れ数の 60% (36/60) までは組み入れが進んでいる。今年度末まで試験組み入れの終了を目指している。

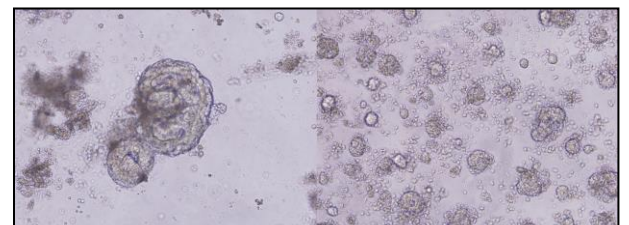
## ・基礎研究

ヒトから採取した大腸正常上皮、大腸腺腫、SSA/P、大腸癌からのオルガノイドを作成した。右図こちらに対して、メトホルミン、アスピリンを単独もしくは組み合わせて投与し、細胞増殖、遺伝子発現を検討した。

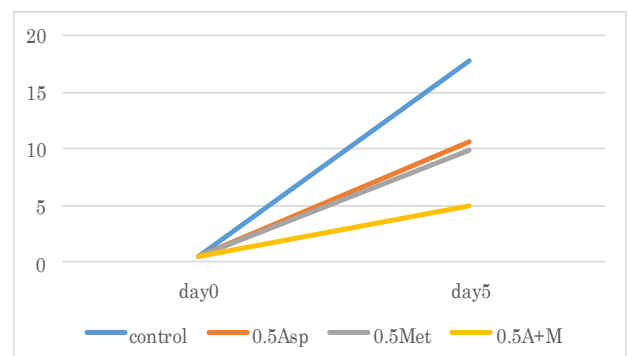
その結果、アスピリン単独、メトホルミン単独増殖抑制効果はあったが、**2つ組み合わせるとより強力に腫瘍増殖を抑制する**といった結果であった。(右図)

更に、 $\beta$ Catenin、mTOR といった大腸癌の増殖にかかわる遺伝子発現も組み合わせにより有意に低下していた。

現在は大腸癌オルガノイドをマウスに xenograft し、*in vivo*での抗腫瘍作用について検討を行っている。



ヒト大腸上皮から作成したオルガノイド (正常上皮)



#### 4. 考 察

大腸癌は増加傾向であり、その予防対策は非常に重要である。

今回の研究では、**臨床研究①**で腸内細菌の *Fn* に注目し、その由来が口腔内であることを**全世界で最初に突き止めた**。今後は歯科と協力し、口腔内の *Fn* を減らすことによって腸内細菌をコントロールさせることができるかを検討していきたいと考えている。**臨床研究②**は臨床研究法、特定臨床研究などの法改正のため、研究期間内に終了することができなかったが、先日の米国消化器病週間 2019 で紹介した際に、フロアから多数の質問があった。結果は全世界が注目しているところであり、今年度中の終了、報告をしたいと考えている。**基礎研究**では、新規培養技術であるオルガノイドを用いてメトホルミン/アスピリンの組み合わせによる大腸腫瘍への薬理作用をヒト由来の大腸癌オルガノイドで検討したところに非常に独創性がある。**オルガノイド**は 2009 年にオランダ Hubercht 研究所 Hans Clevers 教授、慶応大学 佐藤俊朗教授らのグループにより開発された新しい培養技術で、EGF や R-spondin といった幹細胞に必要な様々な増殖因子を培養液に補い立体培養することで生体内の組織と類似した構造を体外で形成させる技術である。この技術を用いて、ヒトから採取した正常上皮、腺腫、**Sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P)**、大腸癌からオルガノイドを作成し、薬物を投与し、発癌のどの段階でどのような機序で化学予防効果を発揮するのかを解明することができる。この方法が確立すれば、予防機序やその効果のエビデンスがまだ低い薬剤へと応用し、多種多様な候補薬に対して、スクリーニング的に化学予防効果を検証していくことができると考えている。

オルガノイドを用いて大腸の各発癌過程における薬剤の化学予防効果を検討する研究はこれまでになく、非常に革新的であり、本システムが確立できた際にはドラッグリポジショニングにつなげることができ、メトホルミン以外の種々の薬剤の予防効果が検討が詳細かつ迅速にできるようになりその意義は大きい。

また、化学予防の確立のために新規薬剤の開発や既存薬剤のドラッグリポジショニングが必要とされている。化学予防薬は抗がん剤と違い、ほぼ健常人に長期間投与することになるため、何より安全性が重要であるが、ドラッグリポジショニングでは薬剤の安全性データが揃っていることが多いため、安全性試験という薬剤開発でもっとも時間とコストがかかる部分を省略できるというメリットがある。

今後も大腸癌罹患率、死亡率を減らすために、化学予防や腸内細菌からのアプローチなど既存の内視鏡診療のみでなく、多角的なアプローチを続けていきたいと考えている。

最後に、本臨床試験にご参加頂いた患者様、ご家族、そして研究支援頂いた横浜総合医学振興財団に厚く御礼申し上げます。

## 5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

### 論文

1. Umezawa S, **Higurashi T**, Nakajima A. AMPK: therapeutic target for diabetes and cancer prevention. *Curr Pharm Des.* 2017;23(25):3629-3644.
2. Komiya Y, Shimomura Y, **Higurashi T**, Sugi Y, Arimoto J, Umezawa S, Uchiyama S, Matsumoto M, Nakajima A. Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut.* **2018**. pii: gutjnl-2018-316661.
3. **Higurashi T**, Nakajima A. : Metformin and Colorectal Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:622

### 学会発表

1. **Higurashi T** New prevention strategy for colorectal cancer ~metformin chemoprevention~ Colon Cancer - Free Paper Session UEGW2017 Oct. 30<sup>th</sup> 2017 Barcelona Fira Gran Via, Barcelona Spain
2. **Higurashi T** : Current status and new perspectives in chemoprevention of colorectal cancer. IASGO-ICUR-KSGC Joint symposium III . Cancer prevention and chemoprevention, Seoul(Grand Hilton Seoul Hotel) March 23, 2018（招待講演）
3. **Higurashi T** : Endoscopic CRC prevention: Screening using image enhanced endoscopy and colorectal ESD. IASGO & KSGC Session VI. Recent updates in colorectal cancer(CRC) prevention and careening, Seoul(Grand Hilton Seoul Hotel) March 24, 2018（招待講演）
4. 日暮琢磨、松浦哲也、加藤真吾、中島淳:アスピリンとメトホルミンの組み合わせによる大腸腫瘍の化学予防効果の検討. 第77回日本癌学会学術総会 ポスターセッション 大腸がん：その他（1），大阪,2018年9月29日.
5. **Higurashi T**, Matsuura T, Kato S, Nakajima A : THE CHEMOPREVENTIVE EFFECT OF COMBINATION TREATMENT OF ASPIRIN AND METFORMIN FOR COLORECTAL CARCINOGENESIS. UEGW Poster Session Other Lower GI Disorders III, Vienna, Oct 24, 2018

### プレスリリース

口の中の歯周病菌が大腸癌の発癌に関与 ～新たな治療法や予防法に繋がる可能性～ 2018.6.9 YCU 先端医科学センター

<https://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/news/20180622Higurashi.html>

＜推進研究助成＞

新規急性インスリン抵抗性誘導モデルによる膵  $\beta$  細胞、肝臓、脂肪組織における代謝障害からの回復機構

富樫 優

白川 純、田島 一樹、奥山 朋子

横浜市立大学 分子内分泌・糖尿病内科学

抄録

インスリン/IGF-1 両受容体の阻害薬である OSI-906 をマウスに 1 週間経口投与することにより、著明な高血糖と高インスリン血症、膵  $\beta$  細胞の代償性肥大、脂肪肝、脂肪萎縮を呈する新規急性インスリン抵抗性モデルを樹立した。

本推進研究にて、OSI-906 投与後に一過性に増加した膵  $\beta$  細胞増殖は元に戻り、脂肪肝および脂肪萎縮も回復する分子機序を報告した (Sci Rep. 7(1):4119, 2017.)。次に、本モデルに糖尿病治療薬である DPP-4 阻害薬 (Linagliptin) および SGLT2 阻害薬 (Luseogliflozin) を投与した。Linagliptin は OSI-906 投与マウスの体重、高インスリン血症、耐糖能、膵  $\beta$  細胞増殖、脂肪萎縮を変えず、肝脂肪化を改善した。OSI-906 による脂肪肝惹起は炎症反応等を介しておらず、Linagliptin による脂肪肝改善は新規経路を介することが想定された。一方、Luseogliflozin は体重、高インスリン血症、肝脂肪化、脂肪萎縮を変えず、耐糖能を改善し、膵  $\beta$  細胞の量と増殖能を亢進させた。この膵  $\beta$  細胞量増加は、インスリンシグナル非依存的に、FoxM1/PLK1/CENP-A 経路を介することが示された。以上より、DPP-4 阻害薬と SGLT2 阻害薬は、インスリン/IGF1 に非依存的な臓器特異的作用を有する可能性が考えられた。

## ＜推進研究助成＞

新規急性インスリン抵抗性誘導モデルによる膵  $\beta$  細胞、肝臓、脂肪組織における代謝障害からの回復機構

富樫 優

白川 純、田島 一樹、奥山 朋子

横浜市立大学 分子内分泌・糖尿病内科学

### 1. 目 的

インスリン受容体 (IR) および IGF-1 受容体 (IGF1R) を介したシグナルは、全身の糖代謝において中心的役割を果たし、これらの障害はインスリンの作用不足、すなわちインスリン抵抗性を惹起する。肥満や 2 型糖尿病において、膵  $\beta$  細胞の代償性肥大、脂肪肝、脂肪組織の萎縮および肥大が認められるが、これらが再び正常状態に回復する機序は不明である。我々は、新規抗癌剤 OSI-906 の投与により、一過性に IR、IGF1R の双方を阻害することにより膵  $\beta$  細胞、脂肪組織、肝臓の組織学変化を惹起し、休薬により各組織変化が正常に回復するモデルを見出した。本研究では、組織的にも機能的にも代謝障害に陥った臓器の正常状態への誘導を再び促すことによる治療法創出への応用を目標に、可逆的な組織の可塑的变化を誘発する OSI-906 投与モデルを用い、＜1＞ 増加した膵  $\beta$  細胞量が再び減少に転じる機構、＜2＞ 萎縮した脂肪組織が正常な組織量に回復する機構、＜3＞ 脂肪変性した肝臓が改善する機構を明らかにすることを目的とした。

### 2. 方 法

OSI-906 投与モデルマウスに、糖尿病治療薬である DPP-4 阻害薬 (Linagliptin) および SGLT2 阻害薬 (Luseogliflozin) を投与し、膵  $\beta$  細胞、肝臓、脂肪組織への影響を検討した。また、OSI-906 投与モデルでのサルコペニアの発症・改善機序も検証した。

### 3. 結 果

各代謝組織における IR および IGF1R の組織特異的な遺伝子欠損マウスにおける遺伝子欠損は半永久的であり、既存のモデルでは、各臓器がインスリン抵抗性に陥った後にそれが解除されると、どのように回復するかについては示す



ことはできなかった。IR/IGF1R シグナルは、悪性腫瘍の発生および進展とも密接に関与しており、IR および IGF1R シグナルを遮断する OSI-906 (Linsitinib) が経口抗腫瘍薬として開発され、ヒト固形癌患者に対し第 3 相臨床試験が実施されている。本研究は、抗癌剤として開発された IR、IGF-1 の双方を阻害する OSI-906 により、急速かつ可逆的に膵  $\beta$  細胞、脂肪組織、肝臓の組織学変化を惹起するモデルを用い、各組織の正常状態への回復過程に注目した糖尿病および肥満等の代謝異常疾患の研究を展開するという、既存の発症予防の概念とは異なる新たな側面を探究するものである。これらは、膵  $\beta$  細胞量調節機構の破綻、脂肪組織の機能不全、および脂肪肝 (NAFLD)・NASH へ病態が既に進行した状態から、各組織を再び正常組織へ回復させる分子基盤を提案し、治療への応用を目指すものである。

#### [1] Linagliptin によるインスリンシグナル非依存的な脂肪肝改善機序の解明

DPP-4 阻害薬である Linagliptin は OSI-906 投与マウスにおいて、体重、高インスリン血症、耐糖能、膵  $\beta$  細胞増殖および脂肪萎縮に変化をきたさなかったが、肝重量および肝内中性脂肪含量を有意に低下させ、肝脂肪化を改善した。興味深いことに、OSI-906 による脂肪肝惹起においては、TNF- $\alpha$ 、IL-6、CCL-2、PAI-1 などの炎症性サイトカイン等の遺伝子発現は上昇せずむしろ低下していた。さらに、Linagliptin 群の OSI-906 投与マウスでは、肝臓での PEPCK や G6Pase などの遺伝子発現に影響せずに、インスリンシグナルを介さない経路で脂肪肝を改善していることが示唆された。(投稿準備中)

#### [2] Luseogliflozin によるインスリンシグナル非依存的な膵 $\beta$ 細胞増殖促進機序の解明

Luseogliflozin は、OSI-906 投与マウスにおいて、体重、高インスリン血症、肝脂肪化、および脂肪萎縮に変化を与えず、耐糖能を改善させ、膵  $\beta$  細胞の量および増殖能を亢進させた。Luseogliflozin を投与した OSI-906 投与マウスの膵島では、FoxM1、PLK-1、CENP-A の発現は有意に上昇し、IRS-2 等のインスリンシグナルを構成する分子群の発現に有意な変化は認められなかった。これらの事より、Luseogliflozin は、インスリンシグナルに非依存的に FoxM1/PLK1/CENP-A 経路を活性化し、膵  $\beta$  細胞増殖を促進することが示された。(投稿準備中)

#### [3] 新規サルコペニア誘導モデルの解析

我々は、OSI-906 投与マウスでは、四頭筋 (QUAD)、前脛骨筋 (TA)、長趾伸筋 (EDL)、ヒラメ筋 (SOL) の組織重量およびマイクロ CT による筋肉量が、すべて約 20-30%以上有意に低下し、サルコペニアを呈していることを見出した。また、我々は OSI-906 投与後に、骨格筋において一過性に脂肪滴が蓄積していることを見出した。これより、OSI-906 投与により、骨格筋萎縮に加えて、骨

格筋の脂肪変性が生じていると考えられ、さらに、この脂肪滴蓄積は、OSI-906 休薬後に改善した。

#### 4. 考 察

本研究にて、OSI-906 投与モデルを用いて、インスリンシグナル非依存的な新規の脂肪肝改善機構および膵  $\beta$  細胞増殖促進機構の存在を示した。インスリン抵抗性は 2 型糖尿病患者の脂肪肝の進展および膵  $\beta$  細胞量調節機構の破綻に重要な役割を果たすため、今後これらのシグナルを解明することにより、インスリン抵抗性下でも脂肪肝の改善や膵  $\beta$  細胞量を増加させる治療法への応用が期待される。また、IR/IGF1R シグナルの遮断が骨格筋に及ぼす影響を明らかにした。本モデルがインスリン抵抗性下で生じるサルコペニアの病態解明および回復機構の解明に有用なモデルと考えられ、今後さらに詳細に検討を進める。

[1] OSI-906 投与による脂肪肝ならびに、Linagliptin による脂肪肝改善の機序解明のため、先端医科学研究センターとの共同研究により、肝臓タンパクのプロテオミクスを既に行っており、今後、プロテオミクス解析により得られた脂肪肝制御機構について検討を進める。

[2] 今後、Luseogliflozin を投与した OSI-906 投与マウスの膵島における遺伝子発現解析を行い、新規膵  $\beta$  細胞増殖機構の検討を進める。

[3] 今後、筋組織の萎縮を解析し、oxidative fiber と glycolytic fiber の割合を検証するとともに、AMPK や mTORC1 のタンパク発現およびリン酸化、IL-6 や GLP-1 の遺伝子発現について解析し、新規サルコペニアモデルの病態を検証する。さらに下大静脈からインスリン投与後の骨格筋におけるインスリンシグナルの経時的な解析も行う。また、骨格筋の脂肪変性について、OSI-906 投与後の各骨格筋の中性脂肪含量および脂肪酸トランスポーターや脂肪酸合成酵素の発現を解析していく。さらに、骨格筋における脂肪滴蓄積の改善における分子機構を、骨格筋の遺伝子発現変化から検討していく。

#### 5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

##### 論文

Tajima K, Shirakawa J, **Togashi Y**, Yamazaki S, Okuyama T, Kyohara M, Konishi H, and Terauchi Y. Metabolic recovery of lipodystrophy, liver steatosis, and pancreatic  $\beta$  cell proliferation after the withdrawal of OSI-906 **Sci Rep.** 7(1):4119, 2017.

##### 学会発表

後藤 希実、白川 純、奥山 朋子、田島 一樹、寺内 康夫. インスリンおよび IGF-1 両受容体阻害薬 OSI-906 による膵  $\beta$  細胞増殖における IRS-2 の役割. 第 32 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会. 2018. 名古屋



## <わかば研究助成>

成人自己炎症性疾患の遺伝学的病態解明と治療法の開発

土田奈緒美

共同研究者：桐野洋平、副島裕太郎、小林大介、小野寺雅史、新井勝大、石川尊士、田村英一郎、河合利尚、内山徹、田栗正隆、中島秀明、宮武聡子、松本直通

横浜市立大学大学院医学研究科 幹細胞免疫制御内科学

### 抄録

近年の遺伝子解析技術の向上により、自己炎症性疾患や膠原病に関連した遺伝子が同定され、病態解明が進められている。遺伝子診断は、病態理解・治療選択・合併症予測など臨床に有用な情報をもたらす。

本研究では、家系内に複数の罹患者を有するベーチェット病を 12 家系において、全エクソーム解析を用いて網羅的に遺伝子変異やコピー数多型を探索し、疾患責任遺伝子を明らかにすることを目的とした。結果、12 家系中の 2 家系（4 症例）において、A20 ハプロ不全症の責任遺伝子である *TNFAIP3* 遺伝子に病気の原因となる変異を認めた。単一遺伝子疾患である A20 ハプロ不全症と、多因子遺伝子疾患が想定されるベーチェット病の間には様々な類似点が知られている。そこで既報の A20 ハプロ不全症の患者と、横浜市立大学附属病院とその関連施設によるベーチェット病患者コホートの比較を行ったところ、A20 ハプロ不全症では、家族歴・若年発症・発熱発作・腸管病変が多く、眼病変の頻度が少ないことが示された。

コピー数多型解析を含めた網羅的な遺伝子解析は自己炎症性疾患の遺伝子解析に有効であり、希少疾患の責任遺伝子の同定・病態解明に寄与すると考えられる。

## <わかば研究助成>

成人自己炎症性疾患の遺伝学的病態解明と治療法の開発

土田奈緒美

共同研究者：桐野洋平、副島裕太郎、小林大介、小野寺雅史、新井勝大、石川尊士、田村英一郎、河合利尚、内山徹、田栗正隆、中島秀明、宮武聡子、松本直通

横浜市立大学大学院医学研究科 幹細胞免疫制御内科学

### 1. 目的

自己炎症性疾患は一般的には家族性・小児期発症が典型だが、類似した症候を呈する成人例も少なくない。成人の自己炎症性疾患の多くは、疾患遺伝子は同定されていないものの、自然免疫が病態に関わると推定されており、多遺伝子疾患と考えられている。近年、ベーチェット病の表現型を示す複数の家系発症例の全エクソーム解析から疾患原因遺伝子 *TNFAIP3* 変異が報告され、多因子性と考えられていた疾患群の一部に単一遺伝子変異による疾患が含まれていることが示唆された。

今回、我々は、複数のベーチェット病家系において、全エクソーム解析を用いて網羅的に遺伝子変異やコピー数多型を探索し、疾患責任遺伝子を明らかにすることを目的とした。

### 2. 方法

#### 1) ベーチェット病家系の遺伝子解析

ベーチェット病の 12 家系の発端者に対して、Sureselect Human All Exon V6 kit (Agilent) を用いてエクソームキャプチャーを行い、HiSeq2500 / Novaseq6000 (Illumina) で次世代シーケンスを行い、網羅的に遺伝子変異を検出した。さらに、全エクソーム解析データを用いたコピー数多型(CNV)の解析を行った。CNV 解析には、eXome-Hidden Markov Model (XHMM) [Fromer et al. 2012] と Nord らによる relative depth of coverage ratios [Nord et al. 2011] の 2 種類のプログラムを用いた。検出されたバリエーションは、サンガーシーケンスや定量 PCR で変異の確認や由来の確認を行った。

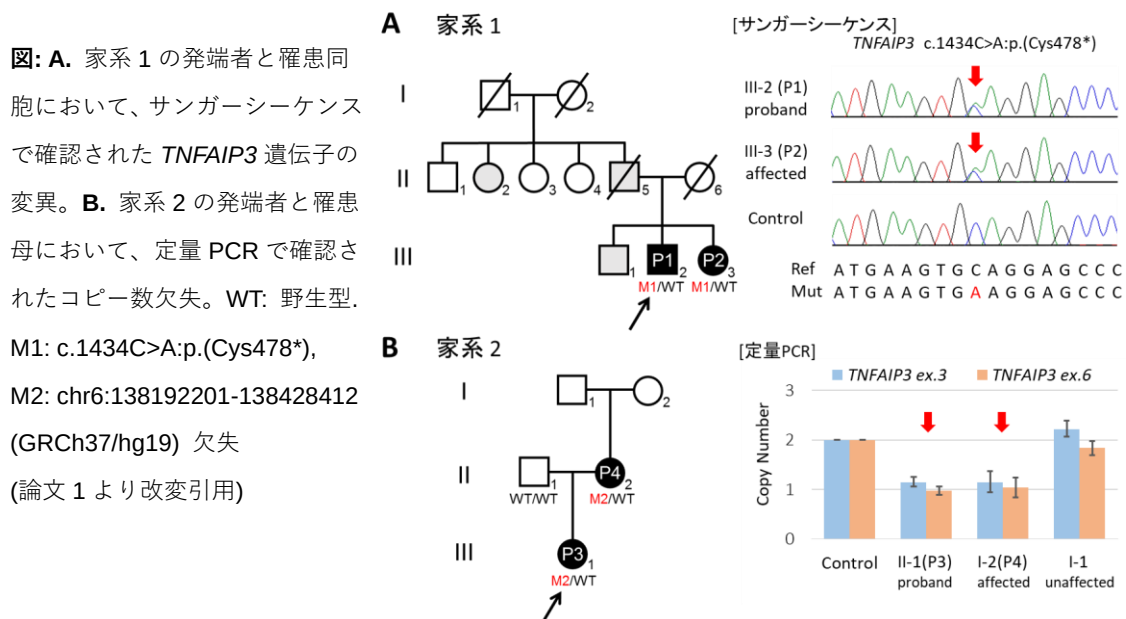
#### 2) A20 ハプロ不全症患者とベーチェット病患者コホートの比較

今回新規に同定した 4 人の罹患者を含め既報の A20 ハプロ不全症患者 54 人と、横浜市立大学附属病院とその関連病院による日本人のベーチェット病のコホート(520 人)の臨床像の比較を行った(SPSS version 22 (IBM Japan))。

### 3. 結果

#### 1) ベーチェット病家系の遺伝子解析 (図)

12家系25人のベーチェット病家系患者を集積し、そのうちの2家系よりそれぞれ *TNFAIP3* 遺伝子の新規変異を検出した(全体の家系のうち 16.7%)。家系1の発端者で c.1434C>A:p.(Cys478\*)を検出し、罹患の同胞でも同変異を認めた。家系2では、コピー数多型解析によって、発端者と罹患の母親で *TNFAIP3* 遺伝子を含む約 236kb の欠失が検出された。いずれの患者も小児期に発症し、口内炎・陰部潰瘍を認め、ベーチェット病と診断・治療されていたが、A20 ハプロ不全症の臨床徴候とも合致していた。



#### 2) A20 ハプロ不全症患者とベーチェット病患者コホートの比較 (表)

既報の A20 ハプロ不全症患者と当施設の成人ベーチェット病コホートの比較を行ったところ、いずれの疾患でも、繰り返す口内炎や陰部潰瘍・皮膚病変・腸管病変・筋骨格症状などは頻度が高く、これらの2疾患では類似した臨床像を呈していた。一方で、A20ハプロ不全症では、家系例が多く、発症年齢がより若年で、発熱発作や腸管病変を伴い、眼病変の合併は少なかった。

表: A20ハプロ不全症とベーチェット病の臨床像の比較

|                  | HA20<br>(n=54) | BD<br>(n=520) | p       | Odds<br>ratio | 95%CI  |         |
|------------------|----------------|---------------|---------|---------------|--------|---------|
| 発症年齢 (mean ± SD) | 6.0 ± 6.5 歳    | 36.4 ± 12.3 歳 | < 0.001 |               |        |         |
| 小児期発症 (< 15歳)    | 90.7 %         | 1.7 %         | < 0.001 | 545.07        | 175.63 | 1691.65 |
| 観察期間 (mean ± SD) | 15.5 ± 14.9 年  | 13.7 ± 12.0 年 | 0.37    |               |        |         |
| 男性               | 37.0 %         | 46.3 %        | 0.19    | 0.68          | 0.38   | 1.22    |
| 家族歴              | 60.0 %         | 5.7 %         | < 0.001 | 24.71         | 9.80   | 62.29   |
| 発熱発作             | 72.5 %         | 10.7 %        | < 0.001 | 22.02         | 10.99  | 44.30   |
| 口腔内潰瘍            | 88.5 %         | 99.6 %        | < 0.001 | 0.03          | 0.01   | 0.15    |
| 陰部潰瘍             | 65.4 %         | 71.5 %        | 0.35    | 0.75          | 0.41   | 1.37    |
| 眼病変              | 9.6 %          | 63.5 %        | < 0.001 | 0.06          | 0.02   | 0.16    |
| 皮疹               | 53.8 %         | 88.7 %        | < 0.001 | 0.15          | 0.08   | 0.27    |
| 関節炎              | 38.9 %         | 47.1 %        | 0.25    | 0.71          | 0.40   | 1.27    |
| 腸管病変             | 41.5 %         | 15.0 %        | < 0.001 | 4.02          | 2.21   | 7.31    |
| 血管病変             | 13.2 %         | 7.9 %         | 0.18    | 1.78          | 0.76   | 4.19    |
| 神経病変             | 9.4 %          | 11.0 %        | 0.73    | 0.85          | 0.33   | 2.21    |

HA20, A20ハプロ不全症; BD, ベーチェット病。

(論文1より改変引用)

#### 4. 考察

本研究では、ベーチェット病家系で新規の *TNFAIP3* 遺伝子変異を検出し、コピー数多型解析を含めた網羅的な遺伝子解析が有効であることを示した。単一遺伝子の変異による自己炎症性疾患の多くが小児発症例であるが、非典型例や軽症例などでは成人になって診断に至る場合もあり、成人を含めた自己炎症性疾患疑いの症例に対する遺伝学的解析のシステム構築が求められる。また、A20 ハプロ不全症の既報例とベーチェット病のコホートを比較することで、新たな臨床徴候の違いが明らかになった。これらの結果は、今後どのような症例に対して遺伝子検査を考慮すべきか検討する際に参考になるものである。

一方で、遺伝的機序が示唆される家系性の希少疾患においても、未だ原因特定に至らない症例も多く残っている。今後も引き続き希少疾患を集積し、責任遺伝子の特定に取り組んでいきたい。

#### 5. 論文及び学会発表

(論文)

1. Tsuchida N, Kirino Y, Soejima Y, Onodera M, Arai K, Tamura E, Ishikawa T, Kawai T, Uchiyama T, Nomura S, Kobayashi D, Taguri M, Mitsuhashi S, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Nakajima H, Miyatake S, Matsumoto N. Haploinsufficiency of A20 caused by a novel nonsense variant or entire deletion of TNFAIP3 is clinically distinct from Behçet's disease. *Arthritis Research & Therapy*. 4;21(1):137. 2019.

(学会発表)

1. 土田奈緒美, 桐野洋平, 田村真麻, 佐伯敬子, 小林大介, 杉山裕美子, 大野滋, 石川尊士, 田村英一郎, 河合利尚, 内山徹, 新井勝大, 小野寺雅史, 宮武聡子, 松本直通. 成人自己炎症性疾患における全エクソーム解析の試み. 第2回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会. 東京, 2019, 2.
2. Kirino Y, Tsuchida N, Soejima Y, Nakajima H. Comparative analysis of reported 54 HA20 cases and 520 Japanese Behçet's disease patients. 10th Congress of ISSAID, International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases. Genova, Italy. 2019, 3.

<わかば研究助成>

先天性血小板減少症・止血凝固異常症の遺伝的病態の解明

内山 由理

(水口 剛、松本 直通 )

( 医学研究科 がん総合医科学 )

抄録

小児期に発症する血小板減少症は、免疫原性の血小板減少症や造血器悪性腫瘍、骨髄不全症、先天性血小板減少症の鑑別が必須である。申請者は、全エクソーム解析により異なる2家系において、それぞれ *GFI1B* と *CYCS* に血小板減少を来す新規変異を見出した。世界的にも極めて稀少でそれぞれ9変異と3変異の報告があるのみである。うち *GFI1B* 異常に伴う巨大血小板減少症として既に報告した(Uchiyama et al. Br J Hematol 2018)。本研究の目的は、(A) *CYCS* の新規変異効果を分裂酵母の実験系で評価すること、(B) 原因不明の血小板減少症を呈する先天性止血・凝固異常症36家系に対し全エクソーム解析を用いて新規原因遺伝子の同定を行うことである。*CYCS* 血小板減少症の解析では、分裂酵母を使用したモデル細胞システムでは、当該遺伝子変異によりタンパク質の著明な発現低下を認め、機能喪失効果を証明、2018年Clinical Genetics誌に報告した。また、止血凝固異常症全体の遺伝子解析の一環として、血小板減少症11家系の解析結果をまとめ、2019年7月国際血栓止血学会にて報告した。この2点における研究成果を概説する。

<わかば研究助成>

先天性血小板減少症・止血凝固異常症の遺伝的病態の解明

内山 由理

( 水口 剛、松本 直通 )

( 医学研究科 がん総合医科学 )

1. 目的

小児期に発症する血小板減少症は、免疫原性の血小板減少症や造血器悪性腫瘍、骨髄不全症、先天性血小板減少症の鑑別が必須である。我々は、全エクソーム解析により異なる 2 家系において、それぞれ *GFI1B* と *CYCS* に血小板減少を来す新規変異を見出した。世界的にも極めて稀少でそれぞれ 9 変異と 3 変異の報告があるのみである。うち *GFI1B* 異常に伴う巨大血小板減少症として既に報告した (Uchiyama et al. Br J Hematol 2018)。本研究の目的は、(1) *CYCS* の新規変異効果を分裂酵母の実験系で評価すること、(2) 原因不明の血小板減少症を呈する先天性止血・凝固異常症 36 家系に対し全エクソーム解析を用いて新規原因遺伝子の同定を行うことである。

2. 方法

本研究で以下 2 項目を進めた。

A. 分裂酵母モデル細胞を用いた変異型 *cyc1* の機能評価

分裂酵母モデル細胞を用いてミトコンドリア呼吸鎖反応の異常の有無を評価し、変異型/野生型タンパク質及び mRNA の発現量を比較し、変異型 mRNA およびタンパク質の不安定性を評価する。

A-1: 分裂酵母モデル細胞の作成

内在性 *cyc1* 遺伝子の C 末端に PCR を使用して HA タグを付加、更に変異導入を行う。比較検証のため、野生型、及び変異型の両タンパク質を作成する。

A-2 変異型/野生型 *cyc1* タンパク質及び mRNA の発現量の比較

1-1 で作成した分裂酵母モデル細胞を使用し、通常の培養液、ミトコンドリア呼吸鎖誘導タイプの培養液を使用して分裂酵母の培養を行い、mRNA、タンパク質を抽出する。Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, Western blotting 解析を行う。ミトコンドリア呼吸鎖反応誘導の有無両者の条件で、野生型・変異型それぞれの mRNA 発現、タンパク質発現の変化を比較する。



## **B. 原因不明の家族性血小板減少症・止血凝固異常症の遺伝的原因解明**

現在までに横浜市立大学遺伝学教室には先天性止血異常症 36 家系が到着している。これら家系に対し、患者および両親を組み合わせたトリオの検体を用いて全エクソーム解析を行い、造血や止血機能に関連する新たな関連遺伝子の変異を検出することを試みる。このうち、臨床的に明らかな免疫原性血小板減少症は除外された慢性血小板減少症をきたす 11 家系(巨大血小板症 3 家系、間質性肺炎合併 1 家系、血友病合併 1 家系、無症候性 7 家系、全 11 家系全てにおいて以下の基準を満たしている：家族性の血小板減少症、先行感染を伴わない先天性あるいは成人発症の血小板減少症)について以下のように解析結果を検証した。全エクソーム解析は発端者に対して行い、病的バリエーションの同定ができなかった場合にのみ両親検体を加えたトリオベースの全エクソーム解析が追加施行された。バリエーションの病原性を評価するために、変異型タンパク質の結晶構造解析、免疫蛍光抗体法や分裂酵母によるモデル細胞システムを行った。

### **3. 結果**

#### **A. CYCS 異常に伴う血小板減少症家系における、発症機序の解明**

分裂酵母は、培地調整により様々な機能評価を行うことができる。

分裂酵母の一般的な解糖経路はピルビン酸を介しグルコースをエタノールとする発酵であるが、低栄養状態ではミトコンドリア呼吸鎖を利用した解糖系路を使用することが知られている。この特徴を利用し、培地のグルコースをグリセロールに置換することでミトコンドリア呼吸鎖を使用した解糖系へ誘導することができる。分裂酵母モデル細胞を用いて、野生型(WT)、野生型 *cyc1* に HA タグのみ付加したもの(*Cyc1*-HA<sup>WT</sup>)、変異型 *Cyc1* と HA タグを付加したもの(*Cyc1*-HA<sup>Lys105del</sup>)、*cyc1* 欠失株(*cyc1*Δ) 4 種類に対し、発酵が主体の解糖系、ミトコンドリア呼吸鎖が主体の解糖系へ誘導する培地の 2 種類で生育を比較した(図 1A, B)。図 1B に示す通り、酵母の解糖系が発酵主体のグルコース培地では 4 種類の株の生育に差は見られなかったが、グリセロール培地では欠失株の発育が著明に低下し、変異型株も同様の結果であった。一方で野生型、HA タグのみ付加された野生型株ではグルコース培地上の生育と変化はみられなかった。Western Blotting による *Cyc1* 発現の比較では、グルコース・グリセロール培地とも *Cyc1*-HA<sup>Lys105del</sup> の著明な発現低下を認めた(図 2A, C)。一方、RT-PCR を利用した mRNA 発現に差はみとめられなかった(図 2B)。これらのことから、mRNA の転写量に変化はないものの、変異により *Cyc1* タンパク質が不安定となり早期分解されることが予測された。

#### **B. 原因不明の家族性血小板減少症・止血凝固異常症の遺伝的原因解明**

6 家系(6/11, 54.5%) で *RUNX1*, *GFI1B*, *CYCS*, *TERT*, *MYH9* に病的バリエーションを同定した。血友病 A を合併した 1 家系では、*CYCS* と *F8* にそれぞれ病的変異を同定した。*GFI1B* バリエーションを認めた家系では、免疫蛍光抗体法を用いて血小板上に CD34 発現が残存することを確認した。分裂酵母細胞によるモデルシステムを使用することで、*CYCS* にみられたインフレーム欠失により著明な *Cyc1* の発現レベルの低下を確認し、このことから *CYCS* 異常に伴う

血小板減少症の発症機序は、機能喪失であることが示唆された(詳細は 1. CYCS 異常に伴う血小板減少症家系における発症機序の解明へ記載)。

#### 4. 考察

分裂酵母を利用したモデル細胞システムを利用することで、Cyc1 の p.Lys105del が機能喪失効果をもち、ミトコンドリア呼吸鎖反応の機能喪失をもたらすことを示した。このことにより、ヒト CYCS における p.Lys101del が機能喪失変異であり、このことが血小板減少症に影響を与えている可能性が示唆された。

臨床的にしっかりとした基準を設けて抽出した慢性血小板減少症の遺伝学的診断率は 54.5%であることから、このような慢性血小板減少症に対して全エクソーム解析による遺伝学的診断は強く考慮されるべきである。

図: 分裂酵母のタンパク質における *cyc1* バリエントの変異効果

図 1. Cyc1 野生型・変異型・欠失株における分裂酵母の発育の相違

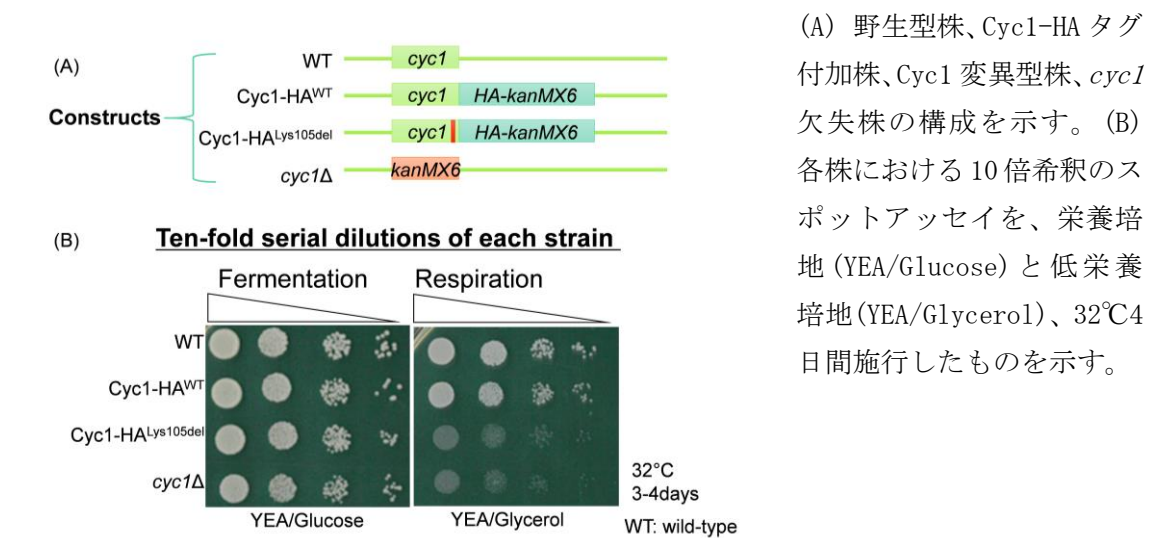
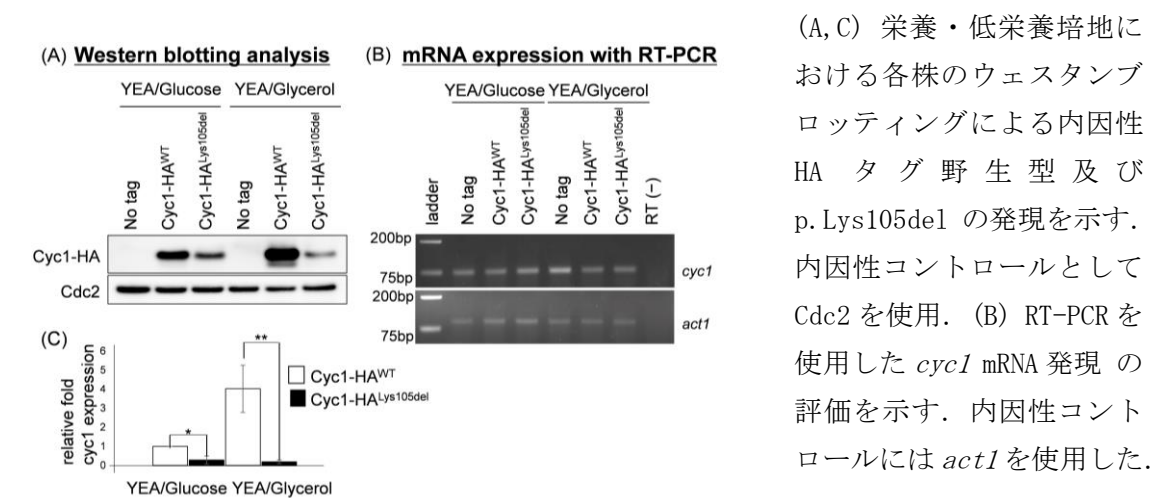


図 2. 分裂酵母モデルにおける変異型 Cyc1 発現とその効果



## 5. 論文及び学会発表

論文:

A novel *CYCS* mutation in the  $\alpha$ -helix of the CYCS C-terminal domain causes non-syndromic thrombocytopenia. (Clin Genet. 2018 Dec;94(6):548-553.)

学会:

日本人類遺伝学会 (10 月 10-13 日、横浜)

アメリカ人類遺伝学会 (2018 年 10 月 16-20 日、サンディエゴ)

アメリカ血液学会 (2018 年 12 月 1-4 日、サンディエゴ)

国際血栓止血学会 (2019 年 7 月 6-10 日、メルボルン)

## <わかば研究助成>

血清プロテオミクスにより同定された soluble EGFR の糖尿病バイオマーカーとしての検討

京原麻由      白川純      寺内康夫

横浜市立大学附属病院    内分泌・糖尿病内科

### 抄録

我々はこれまでに肥満糖尿病モデル db/db マウスの血清プロテオーム解析を行い、db/db マウス血清で低下しリラグルチド投与で上昇する Soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) と Adipsin を同定した。糖尿病バイオマーカーとしての意義を検討するため、本研究では2型糖尿病患者106例、非糖尿病患者47例、計153例の血清 sEGFR と Adipsin 値を測定、代謝関連パラメータとの相関を解析した。血清 sEGFR 値は HbA1c、空腹時血糖、HOMA-IR、T-chol、TG、LDL-chol、AST と正相関し、血清 Adipsin 値は、BMI、腹囲、血清インスリン、HOMA-IR、FIB-4 index と正相関した。またマウスにおいて EGFR 遺伝子は肝臓に高発現、Adipsin 遺伝子は脂肪組織に高発現し、db/db マウスでこれらの遺伝子発現は低下した。以上よりヘパトカインである sEGFR は肝臓、アディポカインである Adipsin は脂肪組織のインスリン抵抗性を反映し、各臓器の糖尿病病態を評価しうるバイオマーカーである可能性が示唆された。

## <わかば研究助成>

血清プロテオミクスにより同定された soluble EGFR の糖尿病バイオマーカーとしての検討

京原麻由 白川純 寺内康夫

横浜市立大学附属病院 内分泌・糖尿病内科

### 1. 目的

db/db マウスは著明な肥満・インスリン抵抗性を伴う高血糖を呈し、週齢とともに種々の糖尿病合併症を発症する。我々はこれまでに 1) 4, 8, 12, 24 週齢の db/db マウスおよび db/+ マウスの血清、2) GLP-1 受容体作動薬のリラグルチドもしくは生理食塩水を投与した db/db マウスの血清を用いたプロテオーム解析を行い、db/db マウス血清で db/+ マウスに対し低下し、リラグルチド投与で上昇する Epidermal growth factor receptor (EGFR, 血清中で可溶性 EGFR (soluble EGFR) として存在) と Adipsin を同定、血清 ELISA で同様の変化を確認した。我々は soluble EGFR がヒト・マウスにおいてインスリン抵抗性や糖尿病治療効果を反映する新規糖尿病バイオマーカー候補であることを報告した (Kyohara M, et al. *Endocrinology*. 2017)。本研究は、ヒト・マウスにおける soluble EGFR と Adipsin の糖尿病バイオマーカーとしての意義を検討することを目的とした。

### 2. 方法

横浜市立大学附属病院内分泌・糖尿病内科に入院もしくは外来通院中の、20 歳以上 70 歳未満の 2 型糖尿病患者 106 例と、肥満症や内分泌疾患など非糖尿病の患者 47 例、計 153 例の血清 soluble EGFR 値と Adipsin 値を ELISA 法で測定。BMI、腹囲、血糖、血圧、脂質など代謝関連パラメータとの相関を、多変量解析を用いて検討した。また、各種糖尿病モデルマウス (インスリン抵抗性モデルとして db/db マウス、ob/ob マウス、インスリン分泌不全モデルとして膵  $\beta$  細胞特異的グルコキナーゼ欠損マウス ;  $\beta$ Gck<sup>+/-</sup>マウス) の肝臓、脂肪組織、骨格筋における EGFR・Adipsin 遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により測定した。

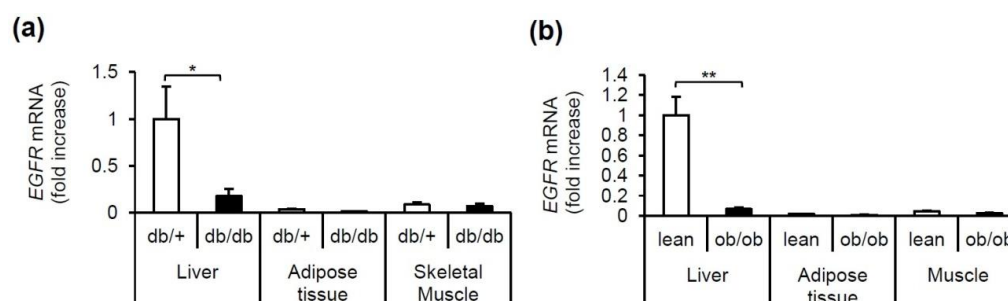
### 3. 結果

血清 soluble EGFR 値と血清 Adipsin 値の間に、有意な相関はみられなかった。年齢・性別補正後の多変量解析において、血清 soluble EGFR 値は、HbA1c、空腹時血糖、HOMA-IR と正相関を認めた (standardized  $\beta$  = 0.357,  $p$  < 0.001, standardized  $\beta$  = 0.299,  $p$  < 0.001, standardized  $\beta$  = 0.259,  $p$  = 0.004)。また、T-chol、TG、LDL-chol、AST とともに正相関を認めた (standardized  $\beta$  = 0.378,  $p$  < 0.001, standardized  $\beta$  = 0.275,  $p$  < 0.001, standardized  $\beta$  = 0.235,

$p = 0.004$ , standardized  $\beta = 0.202$ ,  $p = 0.014$ )。一方、血清 Adipsin 値は、BMI、腹囲、空腹時血清インスリン、HOMA-IR と正相関を認めた (standardized  $\beta = 0.532$ ,  $p < 0.001$ , standardized  $\beta = 0.475$ ,  $p < 0.001$ , standardized  $\beta = 0.383$ ,  $p < 0.001$ , standardized  $\beta = 0.342$ ,  $p = 0.003$ )。また、FIB-4 index (liver fibrosis index) と正相関し、eGFR と負の相関を認めた (standardized  $\beta = 0.264$ ,  $p = 0.013$ , standardized  $\beta = -0.352$ ,  $p < 0.001$ )。

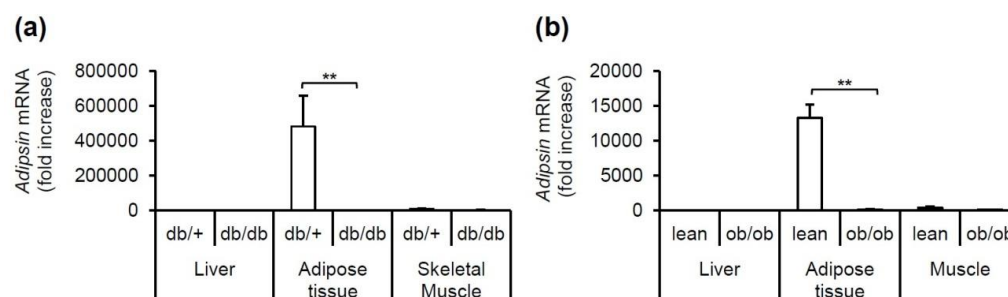
マウスの検討では、EGFR 遺伝子は脂肪組織・骨格筋と比較して、肝臓に高発現していた。また、db/db マウス、ob/ob マウスの肝臓では、それぞれコントロールマウスの肝臓と比較して、EGFR 遺伝子発現量が低下していた (図 1a, b)。 $\beta$ Gck+/-マウスの肝臓では、コントロールマウスの肝臓と比較して、EGFR 遺伝子発現量に有意差はみられなかった。

図 1 : db/db マウス、ob/ob マウスの肝臓・脂肪組織・骨格筋の EGFR 遺伝子発現



一方、Adipsin 遺伝子は肝臓・骨格筋と比較して、脂肪組織に高発現していた。また、db/db マウス、ob/ob マウスの脂肪組織では、それぞれコントロールマウスの脂肪組織と比較して、Adipsin 遺伝子発現量が低下していた (図 2a, b)。 $\beta$ Gck+/-マウスの脂肪組織では、コントロールマウスの脂肪組織と比較して、Adipsin 遺伝子発現量に有意差はみられなかった。

図 2 : db/db マウス、ob/ob マウスの肝臓・脂肪組織・骨格筋の Adipsin 遺伝子発現



#### 4. 考察

血清 soluble EGFR と血清 Adipsin は、ともにインスリン抵抗性を反映する、独立した糖尿病バイオマーカーであると考えられる。また、ヘパトカインである血清 soluble EGFR は高

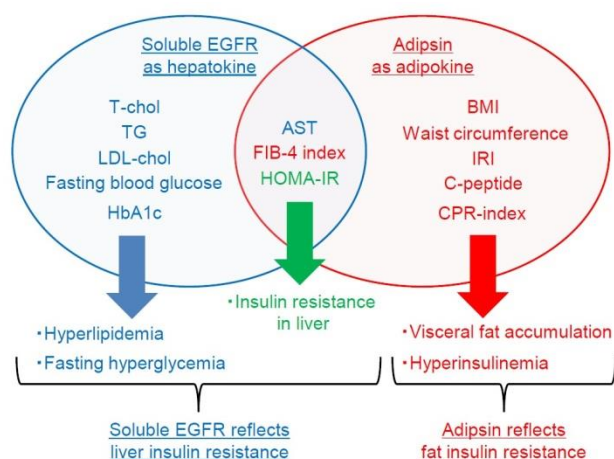


脂血症、空腹時高血糖とも関連し、特に肝臓におけるインスリン抵抗性を反映する可能性がある。一方、アディポカインである Adipsin は、内臓脂肪蓄積や高インスリン血症と関連し、特に脂肪組織におけるインスリン抵抗性を反映する可能性がある (図 3)。

なお、血清 Adipsin は eGFR と負の相関を認めたが、血中の Adipsin は糸球体で濾過され、近位尿細管で再吸収されることから、腎不全患者の血清 Adipsin は高値となる可能性がある。

以上より、血清プロテオーム解析により同定された soluble EGFR と Adipsin は、ともにインスリン抵抗性を反映する、独立した糖尿病バイオマーカーであるが、特に、ヘパトカインである soluble EGFR は肝臓のインスリン抵抗性、アディポカインである Adipsin は脂肪組織のインスリン抵抗性を反映し、各臓器の糖尿病病態を評価しうるバイオマーカーである可能性が示唆された。

図 3：ヒト血清 soluble EGFR・Adipsin と相関する代謝関連パラメータ



## 5. 論文及び学会発表

論文：

**Kyohara M**, Shirakawa J, Okuyama T, Kimura A, Togashi Y, Tajima K, Hirano H, and Terauchi Y.: Serum quantitative proteomic analysis reveals soluble EGFR to be a marker of insulin resistance in male mice and humans. *Endocrinology*. 158(12):4152-4164. 2017

学会発表：

**Mayu Kyohara**, Jun Shirakawa, Yasuo Terauchi

Soluble EGFR and Adipsin as new candidates of serum biomarkers for clinical diabetes

78th Scientific Sessions American Diabetes Association (2019 年 6 月)

## <わかば研究助成>

非アルコール性脂肪性肝疾患を背景にした新規肝癌モデルの検討

本多 靖

横浜市立大学大学院医学研究科 肝胆膵消化器病学

### 抄録

非アルコール性脂肪性肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD）は、飲酒歴がないにも関わらずアルコール性肝疾患に類似した組織像を呈し、非アルコール性脂肪肝から非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis ;NASH）、さらに NASH から進展した肝硬変、肝細胞癌までを包括する広範な疾患概念である。本研究では、NAFLD 病態を認める肝癌マウスモデルを新たに作成することを焦点に当てて研究を行う。NAFLD/NASH モデルについては、様々なマウスモデルが報告されているが、我々の中でも食餌負荷モデルである Amylin Liver NASH model（AMLN model）に着目している。非臨床試験における肝癌研究では、肝化学発癌剤であるジエチルニトロサミン（DEN : Diethylnitrosamine）が頻用されている。生後 6、7、8、10、11、12 週で、DEN を 45mg/kg の腹腔内投与し、生後 5 週より食餌負荷（BD（通常食）または AMLN）を行う。生後 36 週で解剖を行う。C57BL/6J マウスを用いて、Chen らのプロトコールで検討を行った（Y Chen, et al. 2016.）。BD 群では発癌率約 20%であったのに対して、AMLN 群の発癌率は 100%（平均約 6 個、最大径約 6mm）であった。AMLN 群は肝障害およびインスリン抵抗性を認め、病理学的に脂肪肝および肝線維化を認めた。

## <わかば研究助成>

非アルコール性脂肪性肝疾患を背景にした新規肝臓モデルの検討

本多 靖

横浜市立大学大学院医学研究科 肝胆膵消化器病学

### 1. 目的

非アルコール性脂肪性肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD）は、飲酒歴がないにも関わらずアルコール性肝疾患に類似した組織像を呈し、非アルコール性脂肪肝（nonalcoholic fatty liver : NAFL）から非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis : NASH）、さらに NASH から進展した肝硬変、肝細胞癌までを包括する広範な疾患概念である。近年、ウイルス性肝炎のない非 B 非 C 肝臓癌が増加しており、NASH 由来の肝細胞癌が原因と考えられている。NAFLD/NASH の病態は未だ不明な部分も多く、NASH 由来の肝細胞癌についても同様である。我々はこれまでに NASH のマウスモデルを用いて、NASH の薬物治療について検討を行ってきた。本研究では、NAFLD 病態を認める肝臓マウスモデルを新たに作成することを焦点に当てて研究を行う。

NAFLD/NASH モデルについては、様々なマウスモデルが報告されているが、我々の中でも食餌負荷モデルである Amylin Liver NASH model (AMLN model) に着目している。これまでに AMLN model を使用し、NASH に対する新規治療薬について検討を行ってきた (Honda, et al. 2017; Honda, et al. 2016)。AMLN model の特徴は、遺伝子の変異がなく、食餌負荷（高脂肪・高フルクトース・コレステロール添加食）のみで、肥満、インスリン抵抗性、肝脂肪化、肝線維化といったヒトに類似した NASH を発症する点である (Clapper, et al. 2013)。非臨床試験における肝臓研究では、肝化学発癌剤であるジエチルニトロサミン (DEN : Diethylnitrosamine) が頻用されている。Park らは、DEN と高脂肪食 (HFD : High Fat Diet) を使用し、肥満が肝発癌に関連することを報告している (Park, et al. 2010)。我々は、よりヒト NAFLD/NASH に近いモデルある AMLN model を用い、肥満、インスリン抵抗性、肝線維化を認める新たな肝発癌モデル (DEN+AMLN model) を作成し、その有用性を検討する。DEN の使用の際には様々なプロトコルが存在するが、生後 2 週で 25mg/kg を腹腔内投与する方法を、本研究では用いている。生後 2 週で DEN25mg/kg を腹腔内投与し、生後 4 週より食餌負荷、生後 24 週で評価を行い、肝発癌を認めた。肝発癌研究の困難さにおいて、その実験期間の長さは 1 つの問題とされる。Park らの報告では生後 36 週で肝発癌を認めているが、既存の報告より約 3 か月早い生後 24 週という期間で肝発癌が得られた。本研究では、DEN+AMLN model というヒトの病態に近い新規の肝発癌モデルを用いて、その有用性を検討する。

## 2. 方法

マウスは C57BL/6J を使用する。

- ① 生後 2 週で DEN を 25mg/kg を腹腔内投与し、生後 2 週で DEN25mg/kg を腹腔内投与し、生後 4 週より食餌負荷、生後 24 週で解剖を行う。
- ② 生後 6、7、8、10、11、12 週で、DEN を 45mg/kg の腹腔内投与し、生後 5 週より食餌負荷 (BD (通常食) または AMLN) を行う。生後 36 週で解剖を行う。プロトコールは Chen らの報告を参考とした (Y Chen, et al. The Journal of Nutrition. 2016.)

## 3. 結果

- ① 本研究の以前に同様の方法で発癌を認めた。しかしながら、個体数を増やして同様のプロトコールで行ったが、生後 2 週のマウスの入手が容易でないこと、個体間の体重差が著しいことなど、同方法の問題点が発覚した。より簡便な方法が必要であると判断し、Chen らのプロトコールにて再度検討を行う方針とした。
- ② C57BL/6J マウスを用いて、Chen らのプロトコールで検討を行った。BD 群では発癌率約 20%であったのに対して、AMLN 群の発癌率は 100% (平均約 6 個、最大径約 6mm) であった (図 1、図 2)。AMLN 群は肝障害およびインスリン抵抗性を認め、病理学的に脂肪肝および肝線維化を認めた (図 3)。

## 4. 考察

DEN の使用の際には様々なプロトコールが存在するが、生後 2 週で 25mg/kg を腹腔内投与する方法が頻用されている。しかしながら、生後 2 週のマウスを用いることは非常に難しく、困難なものであった。一方 Chen らのプロトコールは、36 週という長期間を要するものの、同プロトコールに AMLN 食を負荷すると、ヒトの NAFLD/NASH に類似した肥満、肝障害、インスリン抵抗性、脂肪肝、肝線維化といった要素を持った肝発癌モデルの作成が可能であった。非 B 非 C 肝癌が増加している今日、非 B 非 C 肝癌の病態の解明、治療方法の開発は急務である。本研究で使用したプロトコールを用いることにより、ヒト NAFLD/NASH に類したモデルで、非 B 非 C 肝癌の化学予防および治療方法の開発を行うことが今後の課題である。

## 5. 論文および学会発表

なし

図 1. 肉眼写真 (A : BD 群、B : AMLN 群、矢印 : 癌部)

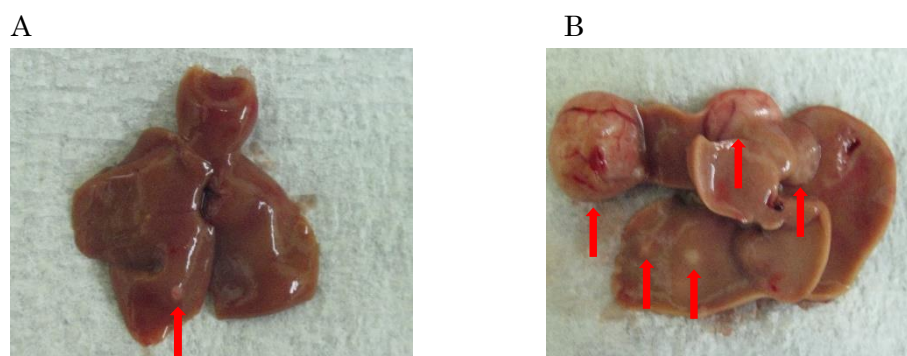


図 2. 腫瘍発生率、腫瘍数、腫瘍最大径

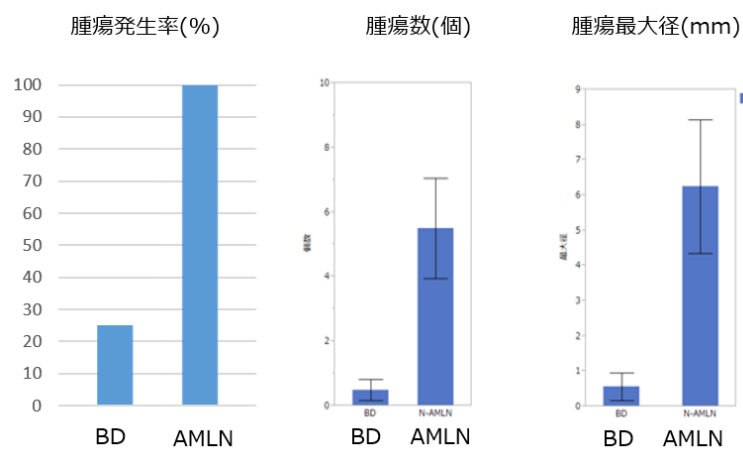
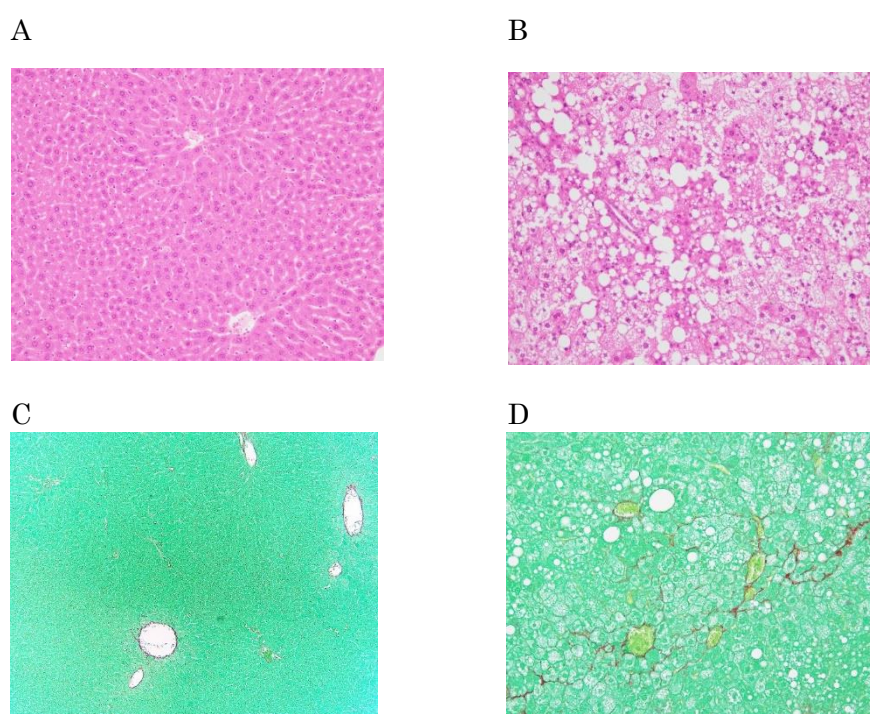


図 3. 病理写真

(A・B : HE 染色、C・F : Sirius Red 染色、A・C : BD 群、B・D : AMLN 群)



<わかば研究助成>

【課題】 うつ病治療の新たなターゲットとしての ATRAP の可能性

【報告者】 小林 竜

【共同研究者】 田村 功一、涌井 広道、畝田 一司、金口 翔

【所属】 横浜市立大学医学部 循環器・腎臓・高血圧内科学

【抄録】 うつ病の病態生理学は未だ明らかな点が多く、モノアミンの変化など伝統的な経路に焦点をあてた現在の治療法は部分的にしか有効ではない。うつ病治療における寛解率は伝統的な薬物療法で治療される患者の約 30%程度であり、複数の薬剤がしばしば適切なレベルの回復を達成するために必要とされる。近年、レニンアンジオテンシン系(R-A 系)がうつ病に関与していることが示唆されており、アンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACE 阻害薬)やアンジオテンシン受容体遮断薬(ARB)により R-A 系を阻害することがうつ病治療のメリットになるのではないかと考えられている。研究協力者の田村らは、AT1 受容体に直接結合する因子として ATRAP を世界で初めて単離・同定し、ATRAP は AT1 受容体系の生理的情報伝達系活性には悪影響を与えず、慢性的な病的刺激による AT1 受容体系の過剰活性化に対してのみ機能選択的な抑制作用を発揮できる特徴を有する。本研究では、うつ病の発症・進展における ATRAP の病態生理学的意義の解明、および ATRAP に着目した新規分子標的治療法の開発に向けた検討を行っている。(書式 2)



## <わかば研究助成>

【課題】 うつ病治療の新たなターゲットとしての ATRAP の可能性

【報告者】 小林 竜

【共同研究者】 田村 功一、涌井 広道、畛田 一司、金口 翔

【所属】 横浜市立大学医学部 循環器・腎臓・高血圧内科学

### 【目的】

うつ病の病態生理学は未だ明らかな点が多く、モノアミンの変化など伝統的な経路に焦点をあてた現在の治療法は部分的にしか有効ではない。うつ病治療における寛解率は伝統的な薬物療法で治療される患者の約 30%程度であり、複数の薬剤がしばしば適切なレベルの回復を達成するために必要とされる。近年、レニンアンジオテンシン系(R-A 系)がうつ病に関与していることが示唆されており、アンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACE 阻害薬)やアンジオテンシン受容体遮断薬(ARB)により R-A 系を阻害することがうつ病治療のメリットになるのではないかと考えられている。研究協力者の田村らは、AT1 受容体に直接結合する因子として ATRAP を世界で初めて単離・同定し、ATRAP は AT1 受容体系の生理的情報伝達系活性には悪影響を与えず、慢性的な病的刺激による AT1 受容体系の過剰活性化に対してのみ機能選択的な抑制作用を発揮できる特徴を有する。本研究では、うつ病の発症・進展における ATRAP の病態生理学的意義の解明、および ATRAP に着目した新規分子標的治療法の開発に向けた検討を行う。

### 【方法】

#### (1) うつ病モデル動物における R-A 系構成要素の検討

うつ病のモデル動物として、強制水泳試験を行う。強制水泳試験を行い、無動時間を抑うつ行動の指標とし、評価する。作製されたうつ病モデル動物において、うつ病の進展に伴う Na チャネルや R-A 系構成要素(アンジオテンシノーゲン、血漿レニン活性、ATRAP 発現など)や炎症性サイトカインなどの蛋白発現解析、尿中カテコラミンや腎交感神経活性、代謝ケージによる水電解質代謝の解析など多面的に検討し、うつ病の発症・進展における ATRAP の病態生理学的意義の解明、および ATRAP に着目した新規分子標的治療法の開発に向けた検討を行う。

#### (2) ATRAP 欠損がうつ病モデル動物に与える影響の検討

研究代表者らは、全身性 ATRAP 欠損マウスを作製し、数々のモデル動物における実験成果を報告している。野生型マウスでは、ATRAP は脳においても発現していることが示されており、ATRAP 欠損がうつ病モデルマウスにどのような影響(無動時間の変化など)を与えるか検討する。

### (3) 中枢での ATRAP 高発現がうつ病に与える影響の検討

研究代表者らは予備的検討において、Wister ラットへの慢性 Ang II 投与は、血圧上昇とともに、脳弓下器官 (subfornical organ, SFO)、視床下部室傍核 (paraventricular nucleus, PVN) において酸化ストレスを増大させ、同部位での ATRAP/AT1 受容体の発現比を低下させることを明らかにし、さらに、レンチウイルスウイルスベクターを用いて作製した FUGW-ATRAP を、Wister ラットの PVN に injection して高発現させることで、AngII 投与による血圧上昇が抑制されることを明らかにした(未発表)。うつ病モデル動物に中枢での ATRAP 高発現を行うことで、脳内酸化ストレス、交感神経活性が抑制されるかどうか、無動時間などの抑うつ症状が改善されるかを詳細に解析する予定である。

### 【結果】

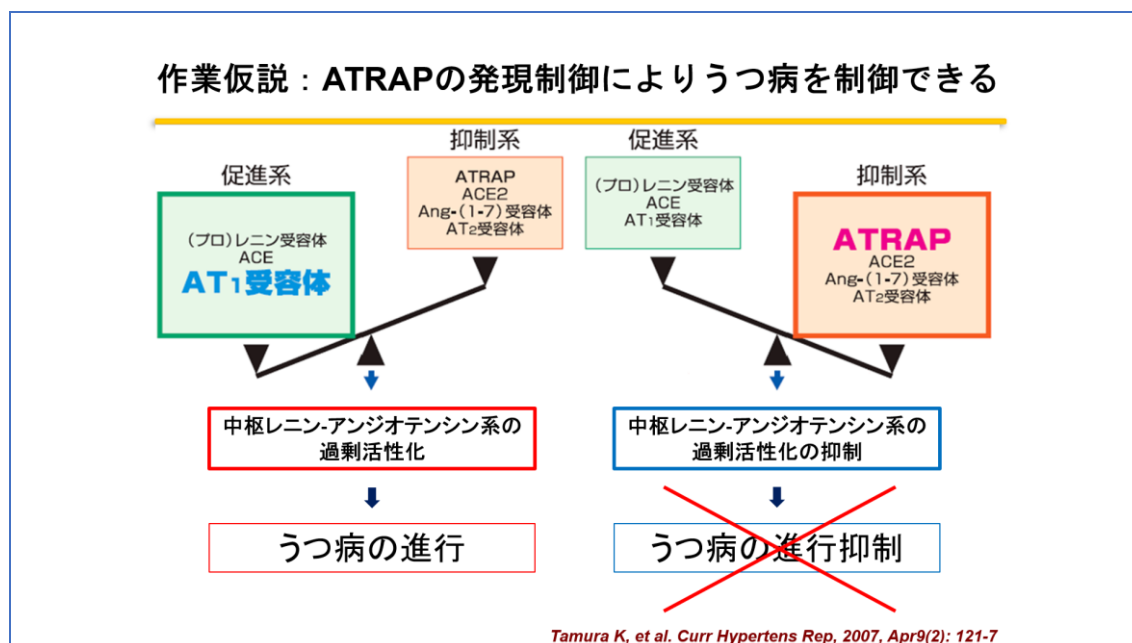
アンジオテンシン II 1 型受容体(AT1R)が脳内に存在することは十分に確立されており、AT1R がアンジオテンシン II(Ang II)の作用のほとんどを媒介し、ストレス応答の調節に関連する複数の経路に関与している。AT1R 刺激は、いくつかの神経変性疾患においても重要であることが示されている。うつ病の病態生理として、慢性炎症の関与が示唆されており、免疫応答の過剰または持続的な活性化は脆弱な個体における疾患のリスクを増大させていると考えられる。ACE 阻害薬や ARB などの R-A 系阻害薬は抗炎症効果に加えて良好な忍容性をもつものの、最近の心血管病高リスク患者や蛋白尿合併 2 型糖尿病・慢性腎臓病患者を対象とした複数の大規模臨床試験では、ARB と ACE 阻害薬の併用治療や、ARB あるいは ACE 阻害薬とレニン阻害薬との併用治療などの強力な R-A 系阻害は心血管病や腎機能障害などの予後改善には無効であり、逆に腎障害、高 K 血症、低血圧などの有害事象を増加させることが報告されている。(Parving HH, et al. N Engl J Med 367: 2204-2213, 2012; Fried LF, et al. N Engl J Med 369: 1892-1903, 2013) 本研究の特色は、既存の R-A 系阻害薬とは異なる機序を持つと考えられる ATRAP 活性化に着目している点である。ATRAP 活性化によるうつ病改善の可能性や脳活動指標としての ATRAP 定量の意義などが今後の研究課題である。しかしながら、本研究は研究途中であり、現時点で明らかに出来ている結果は乏しい。今後もさらなる研究を進めていく予定である。

### 【考察】

臓器の発生・形態形成や恒常的生理機能維持を担う AT1 受容体系の生理的情報伝達系活性の遮断を回避しつつ、同受容体系の病的な過剰活性化のみを選択的に効率的かつ安全に抑制することが重要と考えられる。本研究の意義として、ATRAP の活性化は既存の R-A 系阻害薬とは異なる作用を有しており、うつ病治療における新たな分子標的治療実現のための検討が可能となるのではないかと考えられる(図：作業仮説)。

【論文や学会発表】

本研究は、研究途中につき論文発表や学会発表は行っていない。今後、研究成果を発表予定である。



<わかば研究助成>

全身性エリテマトーデスにおける TRIM21 の役割について

神山 玲光

【共同研究者名】吉見竜介，國下洋輔

【所属部科名】横浜市立大学附属病院 血液・リウマチ・感染症内科

抄録

TRIM ファミリーは自然免疫と獲得免疫の両方において様々な役割を担っており、TRIM21 は IRF ファミリーの活性化に関与していることが知られているが、体内での動態や疾患への関与についてはまだ不明である。一方、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の血清では、抗 TRIM21 抗体が高頻度に認められること、B 細胞の過剰な活性化による自己抗体の産生が病態増悪に関与することが知られている。本研究では、このように SLE 病態において中心的な役割を担う B 細胞と TRIM21 に着目し研究を行った。結果、①ヒト検体において、TRIM21 が IRF のユビキチン化を抑制し SLE 病態に関与していること②マウスを用いた実験において、TRIM21 が SLE 病態の増悪に関与することを見出し、抗 TRIM21 抗体を有する SLE の B 細胞は過剰な活性化を来すことを明らかにした。これらの知見を踏まえて、今後は近年承認された B 細胞標的 SLE 治療薬であるベリムマブの最適化医療に抗 TRIM21 抗体測定が有用である可能性と、今後 TRIM21 とその標的である IRF が SLE 治療の新規治療ターゲットとなりうるのではないかと考え更なる研究を行っている。

## <わかば研究助成>

全身性エリテマトーデスにおける TRIM21 の役割について

神山 玲光

【共同研究者名】 吉見竜介, 國下洋輔

【所属部科名】 横浜市立大学附属病院 血液・リウマチ・感染症内科

### 1. 目的

TRIM ファミリーは N 末端側に RING, B-Box, Coiled-coil の 3 つのドメインを共通に有する蛋白質ファミリーであり, ヒトでは約 70 種類の蛋白が含まれる. TRIM21 (別名 Ro52 あるいは SSA1) は全身性エリテマトーデス (SLE) やシェーグレン症候群 (SS) の患者血清中にみられる抗 SS-A 抗体の対応抗原のひとつである. 申請者らは TRIM21 が IRF ファミリーの活性化に関与していることを細胞レベルで明らかにし, さらに *Trim21* ノックアウトマウスの生体内での IRF ファミリーのユビキチン化への重要性も示した. その後, TRIM21 の IRF ファミリーに対する同様の作用は他の研究グループによっても示されたが (Espinosa A et al. *J. Exp. Med.* 2009), 患者の生体内での動態についてはまだ不明である. SLE では末梢血単核球 (PBMC) において I 型インターフェロン (IFN) で誘導される遺伝子群の発現が亢進していることが知られている. この現象は“IFN signature”と呼ばれ, 末梢血中の I 型 IFN 濃度の上昇を反映していると考えられている. SLE 病態において何が IFN signature を誘導しているのかはまだ明らかではない. しかし, ウイルス性肝炎等の治療で I 型 IFN を使用した場合に自己抗体の産生や SLE 様の症状がみられることから, I 型 IFN の産生が SLE の病態に重要な役割を果たしている可能性が高い. I 型 IFN の産生を制御する転写因子として interferon regulatory factor (IRF) ファミリーが重要であり, IRF ファミリーに作用する TRIM21 が病態に関与している可能性は高い. また, 一方では SLE においては, B 細胞の過剰な活性化による自己抗体の産生が病態増悪に関与することも知られている. 近年, B 細胞の生存や分化, 抗体産生に必須の分子である可溶性 BAFF を標的とした生物学的製剤 belimumab (BLM) が SLE 治療薬として開発された. しかし, SLE において異常を来す免疫細胞の種類は多岐にわたり, 症状の発現様式も多彩であるため, BLM の効果は個々の症例で大きく異なる. 作用機序からは, B 細胞の過剰な活性化が主体となる症例で BLM の治療効果が期待できると考えるが, 主に B 細胞に異常を来す SLE を見分ける方法は未だなく, 新規のマーカーが必要とされている. 以上から, 申請者らは SLE の病態の二翼である IFN signature, B 細胞両者に関連が予想される TRIM21 に着目し研究を行った.

### 2. 方法

#### ① SLE 患者と健常者における TRIM21 の機能比較

SLE 患者および健常者から血液を採取し, 末梢血単核球 (PBMC) を分離, PBMC における TRIM21 の発現量の他, I 型 IFN 感受性遺伝子の発現量や IRF へのユビキチン能を調べ

た.

## ② TRIM21 の発現量および抗 TRIM21 抗体の存在と IRF5 発現量の関連性

SLE 患者および健常者から B 細胞を採取し, TRIM21, IRF5 の mRNA および蛋白発現量を調べ, SLE 患者と健常者および血清抗 TRIM21 抗体陽性患者と陰性患者の間で比較する. SLE 患者では健常者より B 細胞における IRF5 発現が増加しており, 特に抗 TRIM21 抗体陽性患者でより増加していると予想される. 次に, ヒト B 細胞系細胞株に TRIM21 発現あるいは shRNA 発現プラスミド (いずれも作成済) を導入して TRIM21 を高発現あるいは欠失させ, IRF5 のユビキチン化や発現との関連を調べる. また, TRIM21 高発現 B 細胞株に患者由来抗 TRIM21 抗体あるいは健常人由来 IgG を加えて培養し, 抗体存在下で IRF5 発現が低下するか検討する.

## ③ 抗 TRIM21 抗体の SLE 症状の発現様式と関連性

当院通院中の SLE 患者の血清抗 TRIM21 抗体の有無を ELISA 法により測定し, 加えて発症時もしくは再燃時の自己抗体プロファイルやその抗体価, イムノグロブリン濃度, SLE 疾患活動性スコア (SLEDAI), 末梢血中の B 細胞の割合などの検査データも後方視的に収集する. データを抗体陽性群と陰性群で比較し, 抗 TRIM21 抗体の SLE 表現型に与える影響を調べる.

## 3. 結果

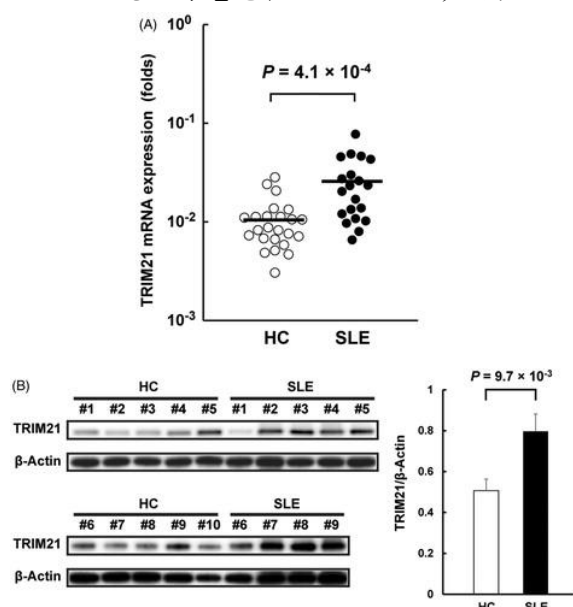
### ① SLE 患者と健常者における TRIM21 の機能比較

SLE 患者の末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cells: PBMC) において, TRIM21 の発現が健常者と比較して mRNA レベルでも蛋白レベルでも優位に亢進していることがわかった (図 1).

また, TRIM21 の発現量は, SLE の病勢との相関もあることがわかり, TRIM21 の SLE 病態への関連が強く示唆された. さらに, SLE 患者の PBMC では, 健常者のそれと比較し, IRF ファミリーのユビキチン化が抑制されていることも明らかにした (図 2).

IRF ファミリーは TRIM21 によるユビキチン化を受けることは現在までに報告されており, このことから SLE 患者では TRIM21 による IRF ファミリーへのユビキチン化が抑制されていると予想された. IRF ファミリーへのユビキチン化が抑制されると, 結果として I 型

IFN の過剰産生へのつながることとなり, これが SLE 患者において 'IFN signature' とよばれる病態を引き起こしていると考えられる.

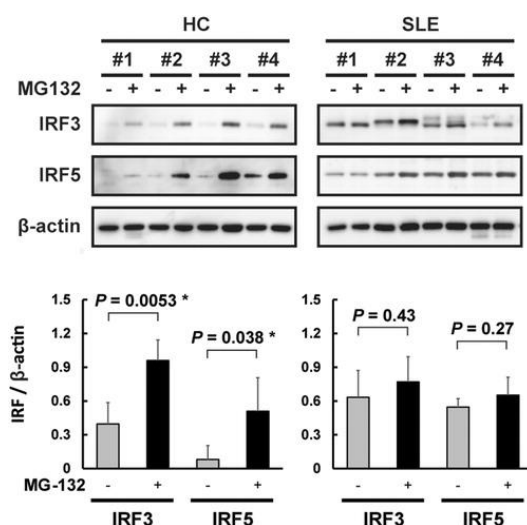


(図 1) TRIM21 の発現量は, SLE 患者由来の PBMC において増加している。

(A) qPCR によって TRIM21 の mRNA 発現量を測定し, SLE 患者の PBMC では健常者と比較し有意に発現量が増加している。

(B) ウェスタンブロッティング法によって TRIM21 の蛋白質発現量を測定し, SLE 患者の PBMC では健常者と比較し有意に発現量が増加している。





(図2) SLE患者では、IRFへのプロテアソーム依存性の分解が抑制されている

ウェスタンブロッティングによりMG132添加の有無でのIRFファミリーの発現量を測定した。健常者のPBMCではMG132添加後はIRF発現量の減少がみられたが、SLE患者では、抗TRIM21抗体陰性患者(#1、#2、#4)においても抗TRIM21陽性患者(#3)においても、MG132添加前後で発現量の違いは認めない。

興味深いことに、健常者のPBMCにおいてはTRIM21 mRNA量とI型IFN関連遺伝子群のmRNA量が相関するのに対し、SLE患者のPBMCにおいては同様の相関がみられなかった。特に抗TRIM抗体陽性の患者においてこの傾向が顕著であったことから、抗TRIM21抗体がTRIM21と細胞質内で会合し、IRFファミリーに対するユビキチン化によってI型IFN産生を抑制するTRIM21の作用を阻害していることが示唆された。

② TRIM21の発現量および抗TRIM21抗体の存在とIRF5発現量の関連性

③ 抗TRIM21抗体のSLE症状の発現様式と関連性

申請者らは、SLE病態においてTRIM21欠損がB細胞による病態増悪を来すことを明らかにし、また抗TRIM21抗体を有するSLEではB細胞の異常な活性化が生じることを初めて見出し、現在投稿に向けて準備中である(Kunishita et al. 現在投稿中)。

#### 4. 考察

これらの知見から、以前より臨床の間では馴染みの深かった抗SSA抗体の対応抗原であるTRIM21が、I型IFNの産生の調節にかかわることにより、SLE病態に保護的に作用しており、抗TRIM21抗体がTRIM21機能不全に関与していることが示唆された。申請者らの論文投稿中データの学会発表は複数の受賞を果たしており、注目されている。これらのことから、本研究におけるSLEのB細胞とTRIM21、IRF、抗TRIM21抗体の機能解析は、SLE病態の解明、理解と現治療薬の使用最適化、新規治療薬開発の重要な礎となる可能性が高いと考える。

#### 5. 論文及び学会発表

第5回 JCRベーシックリサーチカンファレンス (2018年11月, 優秀演題賞)、第63回 日本リウマチ学会総会・学術集会 (2019年4月, JCR2019 ICW Excellent Abstract Award)

## <わかば研究助成>

### 腎尿細管における受容体随伴性プロレニン(RAP)系による、循環調節の解明

木野 旅人

松沼 まり, 寺中 紗絵, 土肥 宏志, 杉山 美智子, 荒川 健太郎, 石上 友章

横浜市立大学大学院医学研究科病態制御内科学

#### 抄録

心腎連関の病態には、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン(RAA)系が強く関与しており、全身性 RAA 系から局所 RAA 系へパラダイムシフトしてきている。腎臓には尿細管 RA 系が存在し、ナトリウム(Na)再吸収を制御することで体液の恒常性の維持、循環制御に働いていると考えられる。近年、新たに(プロ)レニン受容体((P)RR)を中心とする、受容体随伴プロレニン(RAP)系が注目されている。マウス(P)RR 遺伝子を、尿細管特異的 Ksp1 プロモーターを用いて強制発現させたマウスは、高血圧症と微量アルブミン尿の増加を呈し、降圧薬であるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬(ARB)と直接的レニン阻害薬(DRI)で有意な降圧と微量アルブミン尿の改善が認められた。以上のことから、腎尿細管で水・電解質代謝に関与している可能性が示唆された。さらに今後、局所性 RAA 系で作用していると考えられる新規レニン(ARen)と(P)RR との相互作用による表現型の変化を解析することで、受容体随伴性プロレニン(RAP)系の生理的・病態生理的な役割を *in vivo* で検討し、明らかにしていく。

## <わかば研究助成>

### 腎尿細管における受容体随伴性プロレニン(RAP)系による、循環調節の解明

木野 旅人

松沼 まり, 寺中 紗絵, 土肥 宏志, 杉山 美智子, 荒川 健太郎, 石上 友章

横浜市立大学大学院医学研究科病態制御内科学

#### 1. 目的

心疾患と腎疾患には共通する病態があり、『心腎連関』と呼ばれている。慢性腎臓病(CKD)は、心血管疾患の強いリスクであり、急性心不全には高頻度に急性腎障害(AKI)を合併する。レニン・アンジオテンシン・アルドステロン(RAA)系や自律神経系がこの病態に深く関与しており、RA系阻害薬、アルドステロン拮抗薬、 $\beta$ 遮断薬が臨床応用されている。RAA系は、古典的な全身性RAA系による恒常性の維持、循環制御から局所性RAA系(血管内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞による局所でのオートクリン・パラクリン機序による、循環制御)へとパラダイムシフトしてきた。近位尿細管(PCT)で、固有のアンジオテンシノーゲンの発現・分泌が認められ、結合尿細管(CNT)にレニンの発現が認められたことから、腎臓においては全身性・局所性RA系とは独立した尿細管性RA系が存在し、ナトリウム(Na)再吸収を制御することで体液の恒常性の維持、循環制御に働いていると考えられる。近年、新たに(プロ)レニン受容体((P)RR)を中心とする、受容体随伴プロレニン(RAP)系が注目されている。局所性RAA系で作用していると考えられる独自の新規レニン(ARen2)と(P)RRとの相互作用による表現型の変化を解析することで、受容体随伴性プロレニン(RAP)系の生理的・病態生理的な役割を*in vivo*で明らかにし、そして『心腎連関』病態への関与を、遺伝子改変動物を対象にして分子レベルで解明することを目的とした。

#### 2. 方法

まず、(P)RR遺伝子導入マウス((P)RR TG)の生理学的機能について解析を行った。野生(WT)群(n=9)、(P)RR TG群(n=5)、(P)RR TG+アンジオテンシン II 受容体拮抗薬(ARB)群(n=4)、(P)RR TG+直接的レニン阻害薬(DRI)群の4群に分け、15~20週齢の雄性マウスを代謝ケージにて飼育し、体重、飲水量・尿量などの測定を行った。テイルカフ法にて血圧・心拍数の計測を行った。連日の尿検体を採取し、剖検時に心臓穿刺により血液を採取し、pHやレニン活性、腎機能など生化学的解析を行った。転写発現の解析として、腎臓から得られたmRNAに対して逆転写を行いcDNAを作成し、その後、各種プローブを用いて定量PCRを行い、レニンの転写活性や(プロ)レニン受容体の活性の量の解析を行った。続いて、(P)RR特異的な抗体を用いて免疫を行い、タンパク発現の分布を確

認し、レーザーマイクロダイセクションシステムを用いて特異的に組織を採取し、同様な遺伝子発現の解析を行った。タンパクの解析については、特異的な抗体を用いて免疫染色を行い、定性的に分布の解析を行った。続いて、(P)RR 直接的阻害薬 bafilomycin を用いて、同様の検討を行った。さらに、ARen TG マウスと (P)RR TG マウスの交配を行い、腎臓組織標本を作製した。

### 3. 結果

テイルカフ法による血圧測定の結果は、収縮期血圧は (P)RR TG 群で有意に上昇しており (WT 群  $95.9 \pm \text{mmHg}$ , (P)RR 群  $112.1 \pm \text{mmHg}$ ), その上昇効果は降圧薬である ARB と DRI で有意に抑制されたことが分かった ((P)RR ARB 群  $89.6 \pm \text{mmHg}$ , (P)RR DRI 群  $91.1 \pm \text{mmHg}$ )。代謝ケージで測定した飲水量や尿量の結果は、各群間で有意な差は認めなかった。血液・尿検査の結果は、(P)RR TG は全体的に尿中 pH (WT 群  $6.76 \pm 0.15$ , (P)RR 群  $7.80 \pm 0.16$ , (P)RR ARB 群  $7.75 \pm 0.17$ , (P)RR DRI 群  $7.66 \pm 0.18$ ) と尿中 Alb/Cre の上昇 (WT 群  $53.4 \pm 7.7 \text{mg/g}$ , (P)RR 群  $96.9 \pm 18.5 \text{mg/g}$ ), 尿中浸透圧の低下 (WT 群  $4043 \pm 398 \text{mOsm/kgH}_2\text{O}$ , (P)RR 群  $29210 \pm 186 \text{mOsm/kgH}_2\text{O}$ , (P)RR ARB 群  $2613 \pm 206 \text{mOsm/kgH}_2\text{O}$ , (P)RR DRI 群  $2719 \pm 269 \text{mOsm/kgH}_2\text{O}$ ), 血漿レニン活性の上昇 (WT 群  $9.8 \pm 1.2$ , (P)RR 群  $20.7 \pm 4.1$ ) を認めた。尿中 Alb/Cre は ARB/DRI 投与により低下 ((P)RR ARB 群  $63.9 \pm 10.5 \text{mg/g}$ , (P)RR DRI 群  $67.9 \pm 11.2 \text{mg/g}$ ) を、血漿レニン活性は DRI 投与により有意に低下を認めた ((P)RR ARB 群  $23.0 \pm 8.0$ , (P)RR DRI 群  $5.4 \pm 1.9$ )。

また、免疫組織学的解析として、Hematoxylin-Eosin 染色と Masson-Trichrome 染色を行ったが、どちらも群間で特異的な所見は認めなかった。(P)RR に特異的な FLAG 抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、遺伝子導入を行った (P)RR は主に腎臓の髄質に発現していることが分かった。遺伝子学的解析を行うために、皮質と髄質をレーザーマイクロダイセクションで切り分けた組織を用いて RT-PCR を行った結果、Ksp1 プロモーターを用いて導入した遺伝子は主に髄質で発現しているが、皮質でも発現していることも分かった。

続いて、(P)RR と構造を共にする Atp6ap2 阻害薬である bafilomycin を用いて、上記結果が変化するかどうかを検討した。血圧の結果は、(P)RR で認めた血圧上昇に関しては、bafilomycin で抑制されなかった (WT 群  $100.5 \pm 1.0 \text{mmHg}$ , (P)RR 群  $111.5 \pm 0.6 \text{mmHg}$ , (P)RR Baf 群  $113.6 \pm 1.0 \text{mmHg}$ )。さらに、新規レニンである ARen2 を遺伝子導入させたマウス

(ARen2 TG) と (P)RR TG マウスを交配させ、double transgenic マウスを作成した。そ

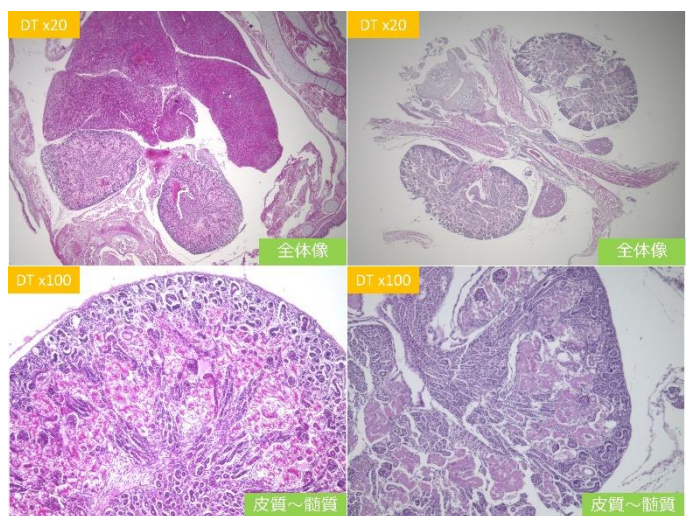


図3 ARen TG と (P)RR TG 交配マウスの組織標本(H.E. 染色)

のマウスの腎臓の組織標本は図 3 に示す。近位尿細管～皮質集合管と思われる部位に空胞形成を認めた。

#### 4. 考察

(P)RR 遺伝子は、2002 年に Nguyen らによってクローニングされた。その翻訳産物である全長型プロレニン受容体は 350 個のアミノ酸で構成された 1 回膜貫通型タンパクで、脳・心臓・腎臓など重要臓器に広く分布している。全長型プロレニン受容体は、Furin による切断を受けて、レニン・プロレニンと結合する可溶性(プロ)レニン受容体と、膜貫通領域および C 末端領域を含む Atp6ap2 と同じ遺伝子配列をもつものに切断される。(P)RR は当初想定されたレニン・プロレニン受容体としての機能については否定的になっており、プロトンポンプ・V-ATPase としての機能が中核的であるとする考えが支配的になりつつある。しかし、最近の腎尿細管特異的ノックアウトマウスを用いた研究により、腎尿細管における電解質(ナトリウム)・水代謝調節に関与する機能、尿 pH 調整機能といった体液の恒常性の維持を通じた循環調節に関与する機能が明らかにされており、(P)RR 研究は腎・尿細管を中心とした機能の研究に関心が高まっている。

マウス (P)RR の cDNA (AB192471.2) の配列を基に、腎尿細管特異的ベクター (Ksp1, テキサス大学 Igarashi 教授より御恵贈) にクローニングし、腎尿細管特異的 (P)RR 発現マウス (Ksp1-(P)RRTG) を作製した。今回の検討では、(P)RR TG 群/(P)RR で、野生型に比較して尿量や飲水量が増加し、尿 pH の上昇と尿浸透圧低下が認められた。(P)RR TG 群では、野生型に比較して血圧の上昇が認められた。(P)RR は、レニン・プロレニンを ligand とする signal transduction, およびプロレニンを non-proteolytic に活性化作用が期待される。したがって、ARB 投与 (feedback 作用によりレニン・プロレニンが上昇する) や DRI 投与 (直接レニンと結合し (P)RR との結合を阻害する) により、結果に差がでる可能性があった。しかし、(P)RR TG+ARB 群と (P)RR TG+DRI 群との間には有意な差は認めず、(P)RR TG 群と比較して ARB/DRI 投与群は同程度で有意な降圧作用と微量アルブミン尿改善作用を認めた。これまでに、RAP 系には①プロレニンの非酵素分解的活性化による AII 産生、②AII 非依存性にプロレニン・レニン受容体作用を介する ERK1/2, ROS の活性化、③V-ATPase の付属タンパク質としての役割 (Atp6ap2)、④N 末端側にあり furin により切断される可溶性 (P)RR による未知の作用など、多機能なタンパク質であるとされてきた。今回の検討より、①と②の作用は否定的であったが、高血圧・微量アルブミン尿の増加を呈し、降圧薬である ARB/DRI で有意な降圧・微量アルブミン尿の改善が認められることから、腎尿細管で水・電解質代謝に関与している可能性が示唆された。

Bafilomycin による (P)RR TG に関連した事象 (血圧上昇など) はリセットされなかったが、Bafilomycin 濃度など文献的に再調整して追加の解析を行う予定である。ARen と (P)RR TG との交配による Double TG マウスについては、近位尿細管～皮質集合管と思われる部位に空胞形成を認めた。この結果から、ARen が、(P)RR のリガンドとして働いた



結果、両遺伝子がともに発現している尿細管に、強い組織変化をもたらした可能性が示唆された。今後、代謝ケージによる生理学的特徴の解析や免疫組織学的解析を行い、腎内 RAP 系のリガンドとしての ARen の役割が明らかにし、腎内 RAP 系の循環調節における意義を解明することが期待される。

冒頭に述べたように、これまでに (P)RR の役割は、当初想定されたレニン・プロレニンの受容体として、non-proteolytic AII generation に関与するという見方については否定的で、主に VAPase の一部としてプロトンの排泄に関与しているという見方が定着してきている。我々の尿細管特異的 (P)RR TG マウスを使った解析からは、尿 pH・尿浸透圧の変化は、こうした考えを支持する結果が得られた。一方、(P)RR 尿細管特異的ノックアウトマウスと同様、血圧の上昇や微量アルブミンの分泌といった表現型は、(P)RR が VAPase 以外に、Na 代謝や RAP 系としての役割を果たしていることを示唆している。我々が発見した、細胞内レニン (alternative renin) を上皮細胞に強制発現させた ARen2 TG マウスと、Ksp1-(P)RR TG マウスとを交配したダブル・トランスジェニック・マウスは、多くが出生直後に死亡する。腎臓を取り出して、組織学的検討を行ったところ、上図のように (P)RR と ARen2 が共発現していると考えられる尿細管に一致して強い組織変化が認められたが、集合管・糸球体には変化が認められなかったことから、細胞内レニンが (P)RR のリガンドとして働いて、腎尿細管 RAP 系として機能している可能性が示唆された。

## 5. 論文および学会発表

前半の (P)RR の生理学的活性の Preliminary な結果を、ISN Frontier Meeting 2018 (Tokyo) で報告したが、その後の検討については論文および学会発表は行っていない。今後、Double Transgenic の結果を踏まえて学会発表、論文報告予定である。



<わかば研究助成>

若年者における「ボノプラザン・アモキシシリン 7 日・ボノプラザン・メロニダゾール・シタフロキサシン 7 日の sequential 治療」と「ボノプラザン・アモキシシリン・メロニダゾール 3 剤 7 日治療」のヘリコバクター・ピロリ除菌治療を比較するランダム化比較試験

須江 聡一郎

(所属部科名)横浜市立大学附属病院 消化器内科

抄録

目的 最新のメタ解析にて唯一 ITT で 90%以上を達成したキノロン含有 sequential 治療を改良 (PPI をボノプラザンに、キノロン薬 moxifloxacin を sitafloxacin としたボノプラザン・アモキシシリン 1 週間・ボノプラザン・メロニダゾール・シタフロキサシン 1 週間によるキノロン含有 sequential 治療を、日本国内の標準的に用いられているボノプラザン・アモキシシリン・メロニダゾール 1 週間による 3 剤治療を対象として比較評価すること。

方法 除菌歴のない *H.pylori* 感染の 20 歳以上 40 歳以下の男女に「sequential 治療 (VA7 日間-VMS7 日間治療)」もしくは「3 剤治療 (VAM7 日間治療)」を多施設共同研究として無作為に割り付けし、一次除菌としての各治療群の除菌率を除菌治療終了後 8 週間以上あけて便中ヘリコバクター・ピロリ抗原検査を用いて算出し、除菌率を比較する。「sequential 治療 (VA7 日間-VMS7 日間治療)」はボノプラザン (V) 20mg 1 日 2 回、アモキシシリン (A) 750mg 1 日 2 回を 7 日間、引き続きボノプラザン (V) 20mg 1 日 2 回、メロニダゾール (M) 250mg 1 日 2 回、シタフロキサシン (S) 100mg 1 日 2 回 7 日間での治療を行う。「3 剤治療 (VAM7 日間治療)」はボノプラザン (V) 20mg 1 日 2 回、アモキシシリン (A) 750mg 1 日 2 回、メロニダゾール (M) 250mg 1 日 2 回 7 日間での治療を行う。

結果 報告時において研究の登録、実施は行われているが、予定登録数の各群 95 例、全体で 190 例の登録は終了しておらず、集計・解析は今後行う予定。

結語 本研究助成に基づき研究の実施を行っているが、終了には至っていない。

<わかば研究助成>

若年者における「ボノプラザン・アモキシシリン 7 日・ボノプラザン・メロニダゾール・シタフロキサシン 7 日の sequential 治療」と「ボノプラザン・アモキシシリン・メロニダゾール3剤 7 日治療」のヘリコバクター・ピロリ除菌治療を比較するランダム化比較試験

須江 聡一郎

(所属部科名)横浜市立大学附属病院 消化器内科

1. 目的 最新のメタ解析にて唯一 ITT で 90%以上を達成したキノロン含有 sequential 治療を改良(PPIをボノプラザンに、キノロン薬 moxifloxacin を sitafloxacin としたボノプラザン・アモキシシリン1週間-ボノプラザン・メロニダゾール・シタフロキサシン1週間によるキノロン含有 sequential 治療を、日本国内の標準的に用いられているボノプラザン・アモキシシリン・メロニダゾール1週間による3剤治療を対象として比較評価すること。
2. 方法 除菌歴のない *H.pylori* 感染の20歳以上 40 歳以下の男女に「sequential 治療(VA7 日間-VMS7 日間治療)」もしくは「3 剤治療(VAM7 日間治療)」を多施設共同研究として無作為に割り付けし、一次除菌としての各治療群の除菌率を除菌治療終了後 8 週間以上あけて便中ヘリコバクター・ピロリ抗原検査を用いて算出し、除菌率を比較する。  
「sequential 治療(VA7 日間-VMS7 日間治療)」はボノプラザン(V) 20mg1 日 2 回、アモキシシリン(A) 750mg 1 日 2 回を 7 日間、引き続きボノプラザン(V)20mg1 日 2 回、メロニダゾール(M)250mg 1 日 2 回、シタフロキサシン(S) 100mg 1 日 2 回 7 日間での治療を行う。  
「3 剤治療(VAM7 日間治療)」はボノプラザン(V) 20mg1 日 2 回、アモキシシリン(A) 750mg 1 日 2 回、メロニダゾール(M) 250mg 1 日 2 回 7 日間での治療を行う。  
ボノプラザン、アモキシシリン、メロニダゾール、シタフロキサシンの使用用量は日本国内にて承認を得ている用量を用いた。また治療中に研究参加者に記入していただく副作用アンケートのスコアを用いて安全性を比較する。「3剤治療」の安全性に関しては発売後約 1 年の 211 例で前向きに副作用アンケートを評価した我々の論文で PPI/AMPC/MNZ と差を認めないことを示しており、本研究デザインにおける VAM 群に通常診療と比べ特別なリスクは存在しないとの評価した対照治療である。その一方「sequential 治療」は日本において新規治療であることに加え、海外の治療である酸分泌抑制薬をボノプラザンに変更し、キノロン系抗生剤を日本にて使用実績のあるシタフロキサシンに変更した新規治療である。本研究の薬剤費は両群共に本研究費で負担し、研究者の加入する保険の範囲内で、診療による対応を費用負担なしで行った。
3. 結果 予定登録数は各群 95 例、全体で 190 例であり、現在は研究登録・実施を継続している状態である。結果の解析はプロトコールに基づき、予定登録数の登録と全例の症例報告書

の確定後に集計・解析を行い、結果を報告する予定である。薬剤は本研究資金にて購入し、本研究に同意を得て、登録した方にプロトコル治療の各薬剤をお渡しできている。研究の継続に影響を与えるような有害事象等の問題は発生していない。

4. 考察 若年者においてはクラリスロマイシン耐性が高いことに加え、メトロニダゾールも増加傾向にあることから、いずれの治療も ITT 解析において90%を超えるのか日本の若年者において明らかとすることは、今後日本の除菌において世界標準の治療を取り入れる必要があるのかどうかの答えとなる。報告者は横浜市大附属病院にて「ピロリ菌専門外来」を行っており、40 歳未満の除菌に関して紹介を受けており、引き続き本研究を実施していく。
5. 論文及び学会発表 予定登録数の実施、集計、解析後に学会発表、論文発表を予定している。

<わかば研究助成>

コンディショナルノックアウトマウスを用いた ALS 責任遺伝子 *UBQLN2* の機能解析

窪田 瞬

神経内科学・脳卒中医学

抄録

*UBQLN2* は家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)の責任遺伝子のひとつでユビキチン-プロテアソームシステムを含む多様な細胞機能に関わる事が知られている。しかし、疾患発症に関して病態機序は不明な点が多く、変異による毒性獲得 (gain of toxic function) によるものなのか、機能喪失 (loss of function) によるものなのかは未だ決着が着いていない。我々は FALS の病態形成における *UBQLN2* の役割を明らかにするために、全身および神経特異的コンディショナルノックアウトマウスの作成・解析を行った。行動解析で神経特異的ノックアウトマウスは対象群と比較して rotarod test、wire hang test で成績の低下がみられた。既報告では *Ubqln2* トータルノックアウトラット・マウスは無症状である事が示されているが、本研究では神経特異的ノックアウトマウスが運動機能低下をきたす事を示すことができた。*UBQLN* には複数のアイソフォームが存在しており、従来の全組織ノックアウトマウスではアイソフォームによる代償のため表現型を呈さなかった可能性がある。FALS の病態機構と *UBQLN2* の関連を調べるためにコンディショナルノックアウトモデルは有用なツールと考えられた。FALS の病態機序を解明するため *UBQLN2* のより詳細な機能解析を行っていく必要がある。

## <わかば研究助成>

コンディショナルノックアウトマウスを用いた ALS 責任遺伝子 *UBQLN2* の機能解析

窪田 瞬

神経内科学・脳卒中医学

### 1. 目的

*UBQLN2* は家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の責任遺伝子として同定され、その遺伝子産物である UBQLN2 はユビキチン-プロテアソームシステム (UPS) を含む多様な細胞機能に関与することが知られている。しかし、変異から疾患発症に至る病態機序は不明な点が多い。既報告で *Ubqln2* トータルノックアウトラット・マウスは無症状であることが示され、病態形成における UBQLN2 の機能喪失の可能性が一時期否定的となったが、近年 UBQLN2 変異によって、シャペロン結合性が低下し、凝集体処理能低下をきたすとの報告がなされたことより、機能喪失説がにわかに注目を集めている (Hjerpe R, *et al.*, *Cell*, 2016)。哺乳類において UBQLN は 1-4 のアイソフォームが存在し、特に UBQLN1 との相同性が高いことから、既報告のトータルノックアウトモデルでは Gene redundancy のため表現型が出現しなかった可能性があると考えられている。そこで、我々は Cre-*loxP* system を用いて、トータルノックアウトマウスおよび神経細胞特異的に *Ubqln2* を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作成・解析し、FALS の病態形成における UBQLN2 の機能喪失説を再検証することを目的に研究を行った。

### 2. 方法

#### ① *Ubqln2* コンディショナルノックアウトマウスの確立

全身または神経細胞での 2 系統のコンディショナルノックアウトマウスの作成を行った。genome 上の *Ubqln2* の前後に loxP 配列を組み込んだ *Ubqln2* flox マウスと① *Actb*-Cre マウスとの交配によるトータルノックアウト、② *Tubb3*-Cre マウスとの交配による神経特異的ノックアウトマウスを作成した。

#### ② *Ubqln2* コンディショナルノックアウトマウスの行動解析、病理学的解析

上述した 2 系統の *Ubqln2* ノックアウトマウスの行動解析、病理学的解析を行った。運動機能評価として各ノックアウトマウスとその litter mate に対して wire hang test, rotarod test を行った。また、各ノックアウトマウスの病理学的な評価を行い、ヒト ALS 病理でみられる神経細胞内凝集体の形成や神経細胞の変性・脱落が認められるかを検討した。

### 3. 結果

#### ・ *Ubqln2* コンディショナルノックアウトマウスの行動解析

*Ubqln2* flox マウスと *Actb*-Cre マウスとの交配で生まれた F1 マウスは *Ubqln2* ノックアウトの有無に関わらず、*Actb*-Cre が存在している個体で死亡率が高かった(データ未掲載)。*Actb* プロモーター下で全組織に Cre リコンビナーゼが発現する事自体が表現型に影響を及ぼしていると考えられ、以降の解析は神経特異的ノックアウトマウスを中心として行った。

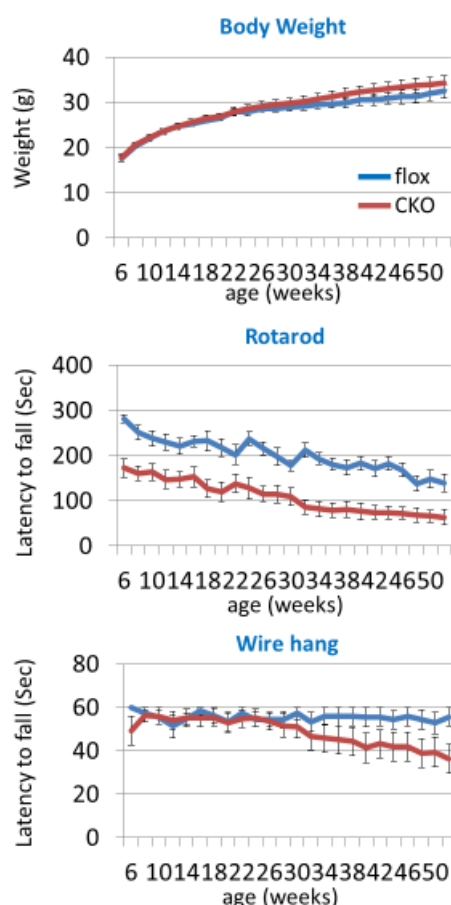


fig.1 神経特異的UBQLN2 ノックアウトマウスの行動解析

*Ubqln2* flox マウスと *Tubb3*-Cre マウスとの交配で生まれた神経特異的ノックアウトマウスと Litter mate マウスの行動解析の結果では、体重に有意差はないものの、rotarod test、wire hang test のいずれでも神経特異的ノックアウトマウスで有意に成績の低下がみられた (fig. 1)。

#### ・ 神経特異的 *Ubqln2* ノックアウトマウスの病理学的解析

神経特異的ノックアウトマウスと litter mate マウスに対して病理学的な解析を行った。各マウスの脊髄を採取し抗 UBQLN2 抗体を用いた免疫組織染色を行った結果、同一の条件で染色したノックアウトマウス脊髄切片は litter mate マウス脊髄切片と比較して UBQLN2 に対する免疫染色性の低下がみられた (fig. 2A)。ALS を含めた様々な神経変性疾患では罹患神経細胞で神経細胞内に凝集体が形成されることが知られている。また、疾患の進行と共に神経変性が生じ最終的に

神経細胞脱落が起こる。蛍光免疫組織染色を行いノックアウトマウスでの神経細胞内凝集体形成の有無を抗ユビキチン抗体、および抗 UBQLN2 抗体染色により確認したが明らかな凝集体形成は認められなかった。また、litter mate マウスと比較して明らかな神経細胞の減少、脱落は認められなかった (fig. 2B)。

### 4. 考察

*Ubqln2* は FALS 責任遺伝子のひとつであるが、その病態機序が変異による毒性獲得 (gain of toxic function) によるものなのか、機能喪失 (loss of function) によるものなのかは、いまだ明らかにされていない。本研究は *Ubqln2* を神経特異的に欠損させたマウスを作成・解析すること



で FALS 病態機序に対する UBQLN2 の役割を明らかにすることを目標とした。

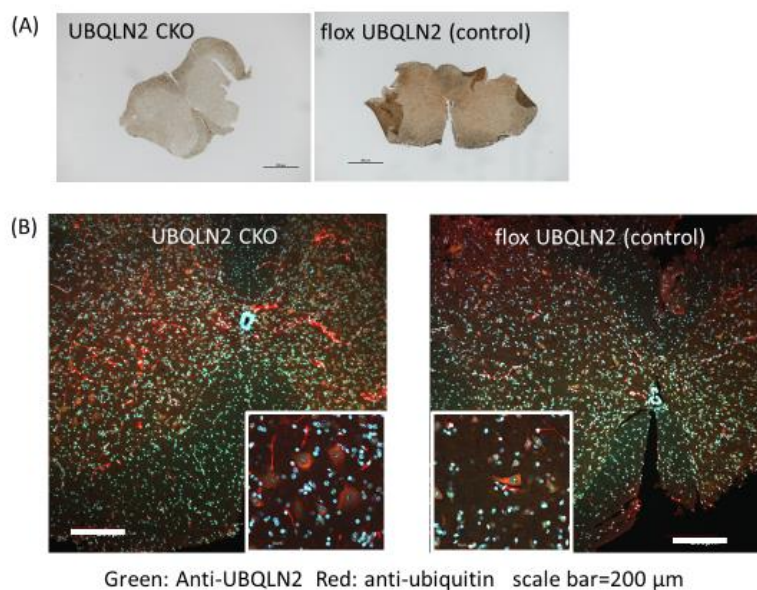


fig.2 神経特異的UBQLN2 ノックアウトマウスの病理学的解析

神経特異的ノックアウトマウスは対照群と比較して rotarod test、wire hang test でいずれも有意に成績の低下がみられた。病理学的解析では対照群と比較して神経細胞内凝集体の形成や神経細胞脱落は認められなかった。ALSの病

態機序における UBQLN2 の役割は不明な点が多く、2015 年に初めて発表された *Ubqln2* P497H 変異導入トランスジェニックラットでは 20 日齢で神経細胞内凝集体形成、130 日齢で高次機能障害、神経細胞脱落をきたした一方で、*Ubqln2* ノックアウトラットは 300 日齢が経過しても表現型も神経細胞脱落も呈しないと報告された (Wu Q, et al., *Acta Neuropathol*, 2015)。本研究での神経特異的ノックアウトマウスは先行のトータルノックアウトラットの研究と異なり、行動解析での運動機能低下が観察された一方で、病理学的な変化は認められなかった。つまり神経細胞脱落に至らない程度の神経細胞機能障害をきたしたものと考えられる。UBQLN には 1-4 までのアイソフォームが存在しており、先行研究の全組織ノックアウトラット・マウスでは他の UBQLN アイソフォームが UBQLN2 欠損を代償した結果、表現型を呈さなかったものと考えられている。本研究で作成した神経特異的ノックアウトマウスは、トータルノックアウトモデルと比較して他の UBQLN アイソフォームによる代償機構が働きにくかったため、表現型を呈した可能性が考えられる。しかしながらトータルノックアウトマウスほどでなくとも、ある程度の代償機構が作用した可能性があり、その結果病理学的な変化を引き起こすには至らない軽度の表現型にとどまった可能性も考えられる。神経細胞特異的欠損であっても、先天的に UBQLN2 が欠損した状態では、他の UBQLN アイソフォームによる代償が生じやすいと考え、今後、より代償が働きにくい条件下で UBQLN2 欠損の影響を検討する必要があると考えられる。現在、我々は薬剤誘発性に *Ubqln2* の発現を停止させる薬剤誘発性ノックアウトマウスを作成中であり、成長発達期を過ぎた後のより代償が困難な状況で後天的に UBQLN2 を欠損させ、UBQLN2 が FALS 病態に与える影響を引き続き解析していく予定である。

## 5. 論文および学会発表

なし(投稿準備中)。

<わかば研究助成>

結核菌感染症患者における CD4+ T 細胞での PD1 発現頻度と PDCD1 SNP との関連の検証  
による疾患感受性因子としての有用性の検討

田代 研,  
山本 昌樹, 金子 猛

所属部科  
横浜市立大学大学院呼吸器病学

抄録

結核菌感染症は全世界で HIV に次ぐ致死感染症である。HIV 感染や免疫抑制療法など易感染状態が結核菌感染症のリスク因子と考えられているが、正常免疫者での罹患リスクや治療反応性を決定する因子は明らかとなっていない。免疫チェックポイント受容体である PD1 は、T 細胞を始めとした免疫細胞の不活性化に重要な役割を果たしている。マウスを用いた実験では PD1 の欠損が結核感染症への寄与しており、ヒトにおける PD1 の発現状況と結核感染症の病態への関与について検討を試みた。今回、健常者において PBMC 中の CD4+ T 細胞および同細胞で PD1 発現頻度の FACS による計測、PBMC より分離した CD4+ T 細胞における *PDCD1* mRNA の qPCR での計測、PBMC より採取した DNA による *PDCD1* の real-time PCR での SNP genotyping を行い実験系の確立をおこなった。今後、結核患者血液検体を用い検討を行い、健常者との比較を行う予定。

## <わかば研究助成>

結核菌感染症患者における CD4<sup>+</sup> T 細胞での PD1 発現頻度と PDCD1 SNP との関連の検証  
による疾患感受性因子としての有用性の検討

田代 研  
山本 昌樹, 金子 猛

所属部科  
横浜市立大学大学院呼吸器病学

### 1. 研究の目的

結核菌感染症は全世界で年間 100 万人罹患し、40 万人が死亡しており HIV に次ぐ致死性感染症である。HIV 感染や免疫抑制療法など易感染状態が結核菌感染症のリスク因子と考えられているが、正常免疫者での罹患リスクや治療反応性を決定する因子は明らかとなっていない。

[結核菌感染症における PD1 の役割について]

免疫チェックポイント受容体である PD1 は、T 細胞を始めとした免疫細胞の不活性化に重要な役割を果たしており、PD1 阻害薬は腫瘍免疫を介した性腫瘍治療薬として使用頻度が増している。免疫反応による病原微生物の排除が必要な感染性疾患では、PD1 の役割が病原微生物によって異なることが報告されている。慢性 HCV 感染症への抗 PD1 抗体での PD1 機能抑制が HCV ウイルス排除を導く可能性が報告されている (Gardiner D, 2013 PlosOne)。

これに対して結核菌感染症では、PD1 欠損マウスが結核菌感染症に著しく感受性が高いことが先ず報告された (Lazar-Molnar E, 2010 PNAS)。次いで別グループより CD4<sup>+</sup> T 細胞における PD1 欠損が、体細胞・その他免疫細胞の PD1 発現に関わらず結核菌感染症への高感受性に関与することを報告している (Daniel L, 2011 J Immunol.)。以上から CD4<sup>+</sup> T 細胞における PD1 が結核菌の感染宿主内での制御には不可欠であることが示唆される。

[CD4<sup>+</sup>T 細胞での PD1 発現量と PDCD1 genotype について]

PD1 は *PDCD1* によりコードされるたんぱく質である。自己免疫疾患である I 型糖尿病 (T1DM) と *PDCD1* SNP との関連は報告されており (Lee YH, 2014 Z Rheumatol.)、本邦での T1DM 患者の内、自己免疫的機序で膵β細胞が破壊される I A 型糖尿病患者では CD4<sup>+</sup> T 細胞での PDCD1 発現量の低下がみられ、発現低下の要因が *PDCD1* 7785C/C genotype であることが報告されている (Fujisawa R, 2015 Clin Exp Immunol.)

マウスでの感染実験において、CD4<sup>+</sup>T 細胞における PD1 欠損が結核菌感染症への感受性の亢進や、致死性感染症への進展に強く関与することが報告された。しかし、人を対象とした結核菌感染症診断時の PD1 発現量と治療反応性や罹患リスクとの報告は未だなされてな

い。

*PDCD1* SNP の一部で CD4+ T 細胞上 PD1 発現低下が報告されているが、結核菌感染症患者における *PDCD1* SNP genotype の検証はなされていない。

そこで本研究では、結核菌感染症への治療導入が予定されている対象者の末梢血中の CD4+ T 細胞を分離し PD1 高発現細胞の頻度および *PDCD1* 発現量を測定し、治療経過や予後との関連を検証する。また結核菌感染症罹患患者での *PDCD1* SNP genotype の頻度を検証し結核菌感染症罹患リスクと *PDCD1* SNP の関与について明らかにする。

## 2. 方法

横浜市立大学附属市民総合医療センターおよび横浜市立大学附属病院で結核菌感染症の診断が確定した患者で文書による同意が得られたものを対象とする。抗結核薬での治療導入予定の場合には導入前に末梢血液検体の提供を得る。提供された血液検体より末梢血単核球細胞 (PBMC) を分離し、以下の項目について計測する。①PBMC 中の CD4+ T 細胞および同細胞で PD1 発現頻度の FACS による計測。②PBMC より分離した CD4+ T 細胞における *PDCD1* mRNA の qPCR での計測。③PBMC より採取した DNA による *PDCD1* の real-time PCR での SNP genotyping。

対象者の内、隔離入院となっている対象では隔離解除にむけ感染性の有無を確認するため定期的に喀痰検査を実施される。治療導入より喀痰抗酸菌培養検査陰性までの期間を治療反応性の指標として用いる。

治療導入前の PBMC 中の PD1 高発現 CD4+ T 細胞の絶対数や頻度、また CD4+ T 細胞における *PDCD1* mRNA 発現量が、喀痰培養陰性化までの期間に関連するかを検証する。

対象群における計測を行う前に健常者における発現を確認する。

[研究の特色 (独創的な点など)]

マウスの感染実験において、CD4+ T 細胞における PD1 欠損が結核菌感染症への感受性の亢進や、致死的感染症への進展に強く関与することが報告されているが人を対象とした結核菌感染症診断時の PD1 発現量と治療反応性や罹患リスクとの報告は未だなされおらず、また、*PDCD1* SNP の一部で CD4+ T 細胞上 PD1 発現低下が報告されているが、結核菌感染症患者における *PDCD1* SNP genotype の検証はなされていないことから本研究は、他の研究にない独創的な内容と考える。

## 3. 結果

### ・ *PDCD1* mRNA 産生量

健常者より、末梢血をヘパリン管に採取し、Ficoll-Paque PLUS (GE ヘルスケア・ジャパン) を用い、PBMC を分離した。5ml の末梢血に対して PBMC は  $1 \times 10^7$  程度得ることができた。

次に、得られた PBMC を Easy Sep (Veritis) を用い CD4+ T 細胞を分離した。

RNeasy minikit (Qiagen) を用い、RNA を抽出した。iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-rad)

をもちい cDNA を合成した。 *PDCDI* primer probe (Applied bio systems) をもちい Taqman 法で RT-PCR を行った。 健常者において *PDCDI* の遺伝子発現を確認できた。

- SNP genotype

健常者抹消血より同じ方法で PBMC を分離し、 QIAmp DNA Mini (Qiagen) をもちい、 DNA を分離した。 複数の Taqman SNP Genotyping Assay をもちい Taqman 法で *PDCDI* genotyping を行った。 健常者 (N=3) で行った結果では、 genotype に明らかな傾向はみられなかった。

- フローサイトメトリー

健常者 (N=1) より分離した PBMC を用い、 CD4、 PD1 でそれぞれ染色を行いフローサイトメトリーで陽性細胞を測定したが PD1 陽性細胞の割合は少なく測定できなかった。

#### 4. 考察

健常者血液検体を用いて行った。 Preliminary な検討において、 実験系を確立することができた。 今後結核患者血液検体を用いて、 実験を継続していく予定。 マウスの感染実験において、 CD4<sup>+</sup> T 細胞における PD 1 欠損が結核菌感染症への感受性の亢進や、 致死的感染症への進展に強く関与することが報告されている。 ヒトにおいても PD1 が結核感染症への病態への関与が今後の検討で示される場合、 結核患者における治療予後を予測できる可能性があり、 結核診療に役立つことが示唆される。

## <わかば研究助成>

胆膵領域がんにおける AMPA 受容体シグナル伝達系に着目した新規診断・治療法の開発

長谷川 翔

共同研究者：加藤真吾、宮崎智之、高橋琢哉、中島淳  
横浜市立大学医学部 肝胆膵消化器病学

### 抄録

AMPA 受容体はグルタミン酸受容体の一種であり、中枢神経系に広く分布し記憶や学習の大きく関与しているが、一部の癌細胞でも発現していることがわかっている。今回我々は、マウス膵癌オルガノイド皮下移植モデルを用いて、腫瘍での AMPA 受容体の発現の有無および AMPA 受容体拮抗薬投与を行い膵癌と AMPA 受容体の関係性について検討した。免疫染色を行い、マウス膵癌オルガノイド皮下腫瘍で AMPA 受容体発現を確認できた。皮下腫瘍モデルマウスに対して、AMPA 受容体拮抗薬を投与することで、コントロールと比較して腫瘍の増殖抑制効果を認めた。薬剤投与後の腫瘍細胞の Ki67 陽性率を蛍光染色で解析すると、AMPA 受容体拮抗薬投与群で Ki67 陽性率は有意に低く、AMPA 受容体を介して腫瘍増殖抑制効果があることが示唆された。今後さらなる解析を追加し、膵癌と AMPA 受容体の関連性のメカニズムを解明することで、新たな膵癌の病態解明および新規治療薬開発に有用性が期待できる。



<わかば研究助成>

胆膵領域がんにおける AMPA 受容体シグナル伝達系に着目した新規診断・治療法の開発

長谷川 翔

共同研究者：加藤真吾、宮崎智之、高橋琢哉、中島淳  
横浜市立大学医学部 肝胆膵消化器病学

1. 目的

$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA 受容体) は、グルタミン酸受容体の一種であり、中枢神経系に広く分布している。この受容体は、興奮性のシナプス伝達の根幹を担うイオン透過型のグルタミン酸受容体であり、記憶や学習に大きく関与している。AMPA 受容体は主に中枢神経系でしか発現が確認されていないため、癌化することで AMPA 受容体が発現する癌種があれば、AMPA 受容体拮抗薬など新規治療につながる可能性がある。本研究では特に診断・治療の難しい胆膵領域がんでは AMPA 受容体シグナル伝達系の機能解析を行い、新規診断・治療を開発することを目的とする。

2. 方法

2-1. 膵癌モデルマウスを用いた免疫染色での AMPA 受容体発現確認

腫瘍のモデルとしてはマウス膵癌オルガノイド皮下移植マウスを用いた。マウス膵癌オルガノイドは 3 次元培養により作成した野生型マウスの膵管オルガノイドにレンチウイルスを用いて恒常的活性変異型 K-rasG12D を発現させ、さらに CRISPR-CAS9 ベクターを用いて p53 をノックアウトしたオルガノイド細胞株である。同細胞をマウスの皮下に移植し膵癌皮下移植モデルマウスを作成した。皮下腫瘍に対して AMPA 受容体抗体 (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4, pan-AMPA) を用いて免疫染色で発現を確認した。

2-2. 膵癌モデルマウスに対する AMPA 受容体 Antagonist 投与による腫瘍増殖抑制実験

マウス膵癌オルガノイド皮下移植マウスに対して、AMPA 受容体 Antagonist である Talampanel (5mg/kg) を週 3 回 2 週間にわたり腫瘍内投与し、腫瘍径を計測しコントロール群と比較した。

2-3. 薬剤投与後の腫瘍に対する蛍光染色を用いた Ki67LI 解析

Talampanel もしくは Vehicle 投与後の皮下腫瘍に対して蛍光染色で Ki67 陽性かつ CK19 陽性細胞の比率を比較した。

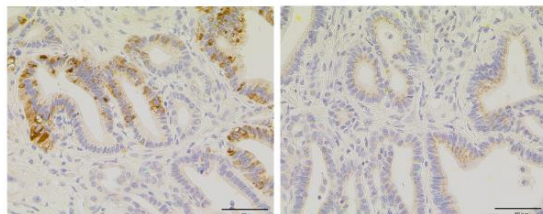
3. 結果

3-1. 免疫染色では、マウス膵癌オルガノイド皮下腫瘍の腫瘍細胞部において

GluR2, GluR4, pan-AMPA 抗体で染色され AMPA 受容体発現が確認できた。(図 1)

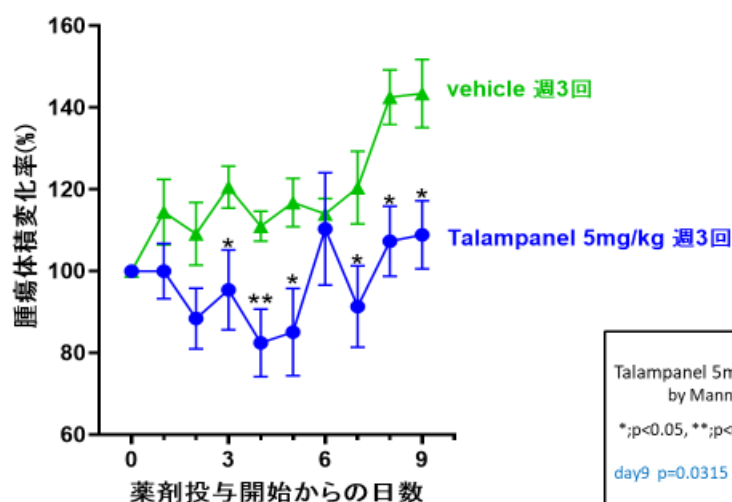
図 1

膵癌\_GluR4 (×40倍)      膵癌\_pan-AMPA (×40倍)



3-2. AMPA 受容体拮抗薬である Talampanel 5mg/kg 投与によって膵癌オルガノイド皮下腫瘍はコントロール群と比較して投与 7 日目で有意に腫瘍した。(図 2)

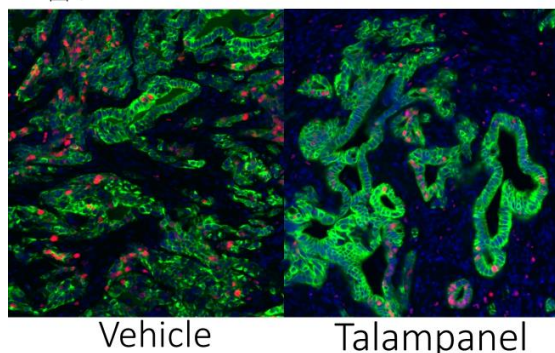
図 2



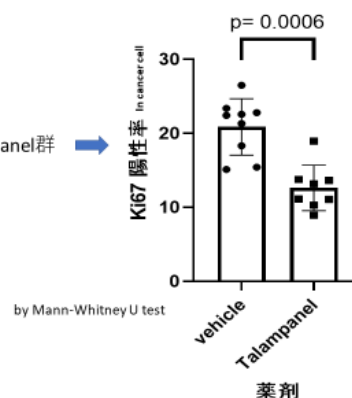
3-3. 腫瘍に対して蛍光染色で Ki67 および CK19 陽性細胞を同定し、Vehicle 群と Talampanel 群で陽性率を比較した (図 3)。Talampanel 群で有意に Ki67 陽性率は優位に低く、Talampanel 群で腫瘍の悪性度が低下していたことが示唆された (図 4)。

図 4 蛍光染色の解析結果

図 3



Ki67陽性/CK19陽性をvehicle群とTalampanel群で比較した



#### 4. 考察

膵癌オルガノイド皮下腫瘍モデルでは、AMPA 受容体発現を確認できた。同モデルに対しての AMPA 受容体 Antagonist 投与により腫瘍縮小効果を認め、Ki67 陽性率も低下していた。以上より AMPA 受容体 Antagonist は AMPA 受容体陽性膵癌に対する新規治療薬となりうる可能性が示唆された。今後はそのメカニズム解明を行うことを検討している。

#### 5. 論文および学会発表

今後、日本消化器病学会、日本癌学会などでの発表を予定している。

## <医療技術研究助成>

### 肥満皮膚創傷治癒遅延への新しいアプローチ —酸化ストレスに着目したバイブレーションセラピーの効果とメカニズム解明—

福田真佑  
赤瀬智子

横浜市立大学医学部看護学科 看護生命科学領域

【背景】現在、肥満者の創傷治癒遅延リスクに対する予防的看護ケアは確立されていないため、肥満の皮膚の創傷治癒に対するバイブレーションセラピーの効果を明らかにすることとした。これまで肥満の皮膚は脂肪組織の増大に伴う虚血や低酸素により酸化ストレス状態にあり、酸化ストレスは血管新生を阻害し創傷治癒遅延の要因となることが知られている。そこで本研究は振動の酸化ストレスへの影響を検証するため、振動による抗酸化酵素 *Hmox1* 遺伝子の発現変化についても解析した。【方法】TSOD マウス（糖尿病肥満モデルマウス）を対照群と振動群に分け、両群の背部皮膚組織にパンチバイオプシーによる創を作製した。マウスは 12 日間飼育し振動群には毎日振動刺激を行った。飼育 12 日目に安楽死したマウスの背部から創を含む皮膚組織を採取し、組織学的解析と遺伝子発現を行った。【結果】振動による明らかな創傷治癒促進効果は認められなかった。しかし抗酸化酵素 *Hmox1* の発現は対照群と比較して振動群で発現上昇する傾向にあり、組織学的解析では対照群に比べ振動群で創部への肉芽組織の侵入が認められた。つまり振動刺激には肥満皮膚の抗酸化能を高める可能性が示唆され、酸化ストレスによるコラーゲン線維の脆弱化が抑制され、結果として本研究では創部において肉芽組織の構成が促進されたと考えられた。今後は、振動による肥満皮膚への抗酸化作用についてより詳細に解析していく。

## <医療技術研究助成>

### 肥満皮膚創傷治癒遅延への新しいアプローチ —酸化ストレスに着目したバイブレーションセラピーの効果とメカニズム解明—

福田真佑  
赤瀬智子

横浜市立大学医学部看護学科 看護生命科学領域

#### 1. 目的

肥満は創傷治癒遅延の危険因子 (Guo, S. and Dipietro, L. A., 2010) であり、肥満者は創部離開や創傷感染の発生リスクが高い (Zuelzer *et al.*, 2010) ことが報告されている。しかし肥満者の創傷治癒遅延リスクに対する予防的看護ケアは確立されておらず、看護師は観察を中心とした術後ケアを行っているのが現状である。そこで肥満者に対する新たな術後ケアデバイスの一つとしてバイブレーションセラピーの効果に着目した。振動には褥瘡や糖尿病性足潰瘍に対する治癒促進効果があるが、肥満の皮膚創傷に対する創傷治癒促進効果は明らかになっていない。そこで、本研究の目的は肥満動物モデルの創傷治癒に対するバイブレーションセラピーの効果を明らかにすることとした。これまで肥満における創傷治癒遅延のメカニズムとして報告されている酸化ストレスに着目した解析を行った。

#### 2. 方法

##### 使用動物

肥満糖尿病モデルマウスである TSOD (Tsumura Suzuki Obese Diabetes) マウス、雄、10 週齢、20 匹を財団法人動物繁殖研究所 (茨城、日本) より購入した。振動刺激を行わない TSOD マウスを対照群、毎日振動刺激を行う TSOD マウスを振動群として 2 群に分けて、各群 10 匹とした。10 日間の馴化後、各群のマウスの背部皮膚にパンチバイオプシーにより直径 4mm の創を作製した。振動群には医療用マッサージ器リラウエーブ (グローバルマイクロニクス株式会社) を用いて振動刺激を毎日実施した。飼育 12 日目に安楽死させた全てのマウスから腸間膜脂肪を採取し、内臓脂肪量として測定した。

##### 創部の観察

創部の写真撮影を毎日行い、得られたデータから imageJ を用いて創面積を算出した。創部作製日と飼育 12 日目の創面積から創収縮率を求めた。2 群間の創収縮率の統計学的解析にはスチューデントの t 検定を用いた。

##### 創部の組織学的解析

飼育 12 日目に安楽死させたマウスから創部を含む背部皮膚を採取した。採取した皮膚はマイルドホルム (和光純薬株式会社、大阪) で固定後、パラフィン包埋し、薄切後に HE 染色を行った。

染色標本は光学顕微鏡（Olympus、東京）を用いて観察した。

### RT-qPCR 法

飼育 12 日目に安楽死させたマウスから創部を含む背部皮膚を採取した。採取した皮膚サンプルは RNA later (Invitrogen, CA.) に浸漬させ 4℃ で保存した。RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN, Germany) を用いて Total RNA を抽出後、Qiagen Quantitect reverse Transcription kit (QIAGEN, Germany) により cDNA を合成した。RT-qPCR 法により、創部における抗酸化酵素遺伝子である *Hmox1* の発現を定量した（各群 n=4）。得られた PCR 産物は内部標準遺伝子である *ACTB* で補正値を算出した。2 群間の統計学的解析にはスチューデントの t 検定を用いた。

## 3. 結果

### TSOD マウスの基本属性

今回実験に用いた TSOD マウスの基本属性を表 1 に示した。実験開始日（創部作製日）では対照群および振動群で体重に有意差は認められなかったが、最終日（飼育 12 日目）では、振動群の体重と腸間膜脂肪量に有意な減少が認められた。

表1. マウスの基本属性

|                | Control group | Vibration group | <i>p</i> |
|----------------|---------------|-----------------|----------|
| Initial BW (g) | 52.1 ± 2.6    | 50.9 ± 2.3      | 0.36     |
| Final BW (g)   | 48.2 ± 2.9    | 44.8 ± 2.8      | 0.04     |
| Fat (g)        | 1.5 ± 0.32    | 0.96 ± 0.27     | 0.002    |

¥¥

### 振動による創部周囲の皮膚組織の変化

HE 染色による対照群と振動群の創部周囲の皮膚組織を観察した（図 1）。

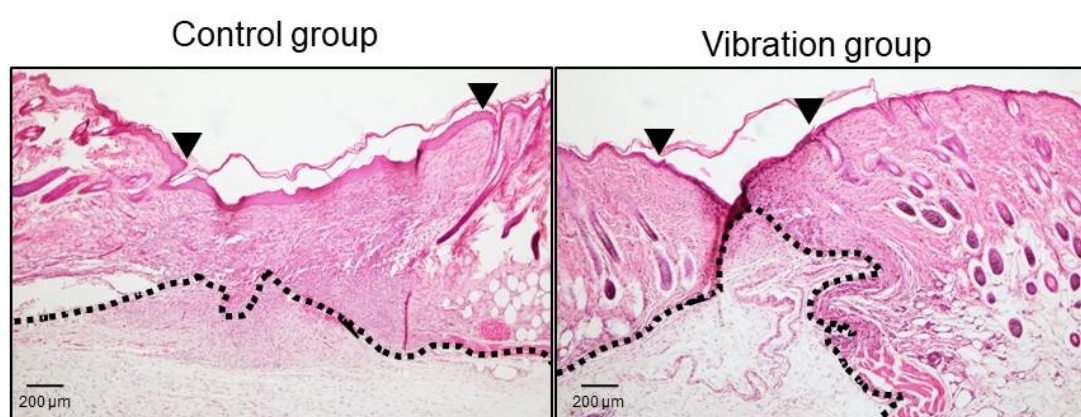


図1 創部皮膚組織の比較

▼は創部の両端、破線内は肉芽組織を示す

創部の両端の距離は対照群よりも振動群で短い傾向が観察された。対照群に比べて振動群では



創部上方への肉芽組織の侵入が観察された。

### 振動による創収縮率の変化

創部作製初日から飼育 12 日目までの創収縮率を図 2 に示した。創作製日および飼育 12 日目の創面積から算出した創収縮率は、対照群が 88.7 (±4.2) %、振動群が 90.7 (±3.7) %であった。振動群の収縮率は対照群よりも高い収縮率を示したが、有意差は認められなかった。

### 振動による創部皮膚における抗酸化酵素 *Hmox1* の発現変化

飼育 12 日目の創周囲の皮膚における抗酸化酵素 *Hmox1* の発現を解析した (図 3)。対照群の *Hmox1* 発現量は 0.19 (±0.096)、振動群の *Hmox1* の発現量は 0.29 (±0.176) であった。対照群と比べて振動群の *Hmox1* の発現は上昇傾向にあったが、有意差は認められなかった。

## 4. 考察

本研究は、マウスの肥満皮膚における創傷に対する振動の治癒促進効果について検証した初めての研究である。本実験結果からは肥満皮膚に対する振動による顕著な創傷治癒促進効果は認められなかった。しかし有意差は認められなかったものの、抗酸化酵素 *Hmox1* は対照群と比較して振動群で発現が上昇することや、組織学的解析では対照群に比べて振動群で創部へ肉芽組織が侵入することが明らかとなった。つまり、振動刺激には肥満皮膚の抗酸化能を高める可能性があることが示唆され、先行研究で報告されている酸化ストレスによるコラーゲン線維の脆弱化 (真田ら、2013; Ibuki *et al.*, 2012) を抑制する効果があると考えられる。本研究で確認された創部への肉芽組織侵入は、振動の抗酸化能が肉芽組織を構成する結合組織を強化したため起きた現象だと考えられる。また、振動群では、飼育 12 日目の体重と内臓脂肪量に有意な減少が認められた。このことは振動には脂肪減少効果を持つ可能性があることを示している。これまでに肥満糖尿病モデルマウスの皮下脂肪組織では、コラーゲン分解酵素 *Matrix metalloproteinase 2* (*Mmp2*)、*Matrix metalloproteinase 14* (*Mmp14*) の遺伝子発現が促進し、真皮の膠原線維束の菲薄化や膠原線維の密度、畳み込みの減少が起きることによって皮膚組織の機械的強度が低下することが明らかとなっている (Ibuki *et al.*, 2012)。今後は *Mmp2* などのコラーゲン関連因子や皮膚組織の機械的強度への振動の影響について解析していく。また、創傷治癒過程は①出血凝固期、②炎症期、③増殖期、④再構成期と進んでいくが、今回は再構成期における解析のみを行ったため、出血凝固期から増殖期にかけての経時的な変化についても解析を行っていく。

## 5. 論文および学会発表 (研究会を含む)

日本糖尿病肥満動物学会年次集会での研究発表を予定している。

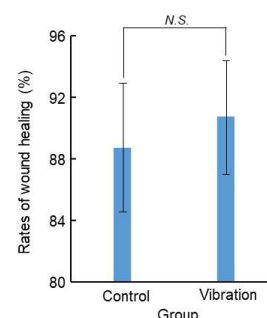


図2 創収縮率の比較

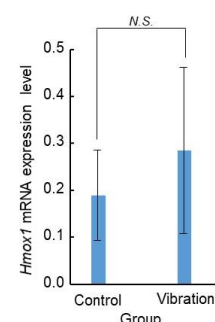


図3 2群間における*Hmox1*発現量の検討

<医療技術研究助成>

周麻酔期看護師が関与した手術麻酔の合併症  
-周麻酔期看護師関与症例と非関与症例の比較-

井出悠紀子

大山亜希子，田中菜奈子，後藤隆久

横浜市立大学附属病院 麻酔科

はじめに：周麻酔期看護師の関与と麻酔関連合併症との関連について検討する。

方法：施設内倫理委員会の承認を得た（B190100001）。2017年5月から2018年11月に当院にて手術麻酔を受けた患者で，本研究の除外基準に該当しない者を対象とした。周麻酔期看護師関与の有無で患者を二群にわけ，米国患者安全指標に基づく麻酔合併症，医原性気胸，術後の生理的異常・代謝異常や，術中の血圧低下などの頻度を，Mann-Whitney のU検定， $\chi^2$ 検定またはFisherの正確確率検定を用いて比較した。

結果：周麻酔期看護師の関与あり554例，関与なし3390例。麻酔合併症は関与あり14例（2.5%），関与なし106例（3.1%），医原性気胸は関与あり1例（0.2%），関与なし4例（0.1%），術後の生理的異常・代謝異常は関与あり15例（2.7%），関与なし73例（2.2%），血圧低下は関与あり2例（0.4%），関与なし14例（0.4%）であり，いずれも有意差は認めなかった。

結論：麻酔科医の監督下で周麻酔期看護師が麻酔管理に関与することは，麻酔関連合併症に統計学的に有意な差を生じない。

## <医療技術研究助成>

周麻酔期看護師が関与した手術麻酔の合併症  
-周麻酔期看護師関与症例と非関与症例の比較-

井出悠紀子

大山亜希子, 田中菜奈子, 後藤隆久

横浜市立大学附属病院 麻酔科

### 1. 目的

周麻酔期看護師<sup>1)</sup>が, 麻酔科医の監督下で麻酔管理に関与するようになり 7 年が経過した。各施設での活動報告<sup>2)3)</sup>は散見されるが, その安全性についての検討はまだ行われていない。本研究では, 周麻酔期看護師の関与と麻酔合併症との関連について検討した。

### 2. 方法

#### 1) 対象

2017 年 5 月から 2018 年 11 月に当院にて手術麻酔を受けた 18 歳以上の ASA-PS 2E 以下 (米国麻酔科学会による術前状態分類で術前合併症がない, または, 軽度の合併症を有する患者) の全患者のうち, 本研究の除外基準に抵触しない者。

#### 2) 主要評価項目

##### ① 入院中の麻酔関連合併症の発生頻度

- a. 麻酔合併症: 麻酔薬の有害反応や過剰投与, 気管チューブの位置異常
- b. 死亡率が 0.5% 以下の診断関連群での死亡
- c. 救命の失敗
- d. 医原性気胸
- e. 術後の生理的異常, 代謝異常
- f. 術後の呼吸不全
- g. 輸血による副反応

#### 3) 副次的評価項目

- ① 手術室での危機的偶発症<sup>4)</sup>の発生頻度
- ② 術中の経皮的酸素飽和度の低下の有無 (5 分以上持続する経皮的酸素飽和度  $\leq 90\%$ )

③ 術中の血圧低下の有無（5分以上持続する収縮期血圧 $\leq$ 70mmHg）

## 4) 分析方法

気道確保者が周麻酔期看護師である場合を周麻酔期看護師の関与ありとし、周麻酔期看護師関与の有無で患者を2群に分け、各評価項目について比較した。両群間の比較には Mann-Whitney の U 検定、 $\chi^2$ 検定、Fisher の正確確率検定を用いた。

## 5) 倫理的配慮

施設内倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号 B190100001）。

## 3. 結果

当該期間における周麻酔期看護師の関与症例（以下、関与あり）は 554 例、関与なしの症例（以下、関与なし）は 3390 例であった。

主要評価項目である入院中の麻酔関連合併症の発生頻度については、麻酔合併症の発生は関与ありで 14 例（2.5%）、関与なしで 106 例（3.1%）、医原性気胸は関与あり 1 例（0.2%）、関与なし 4 例（0.1%）、術後の生理的異常・代謝異常は関与あり 15 例（2.7%）、関与なし 73 例（2.2%）であり、いずれも統計学的有意差は認めなかった（表 1）。死亡率が 0.5%以下の診断関連群での死亡、救命の失敗、術後の呼吸不全、輸血による副反応については両群ともに発生は認めなかった。

副次評価項目については、術中の血圧低下は関与あり 2 例（0.4%）、関与なし 14 例（0.4%）であり、統計学的有意差は認めなかった（表 2）。経皮的酸素飽和度の低下、および、危機的偶発症の発生は両群ともに認めなかった。

表 1 主要評価項目の発生頻度

|                       | 関与あり<br>(n=554) | 関与なし<br>(n=3390) | p-value             |
|-----------------------|-----------------|------------------|---------------------|
| 麻酔合併症                 | 14 (2.5)        | 106 (3.1)        | 0.446 <sup>a)</sup> |
| 死亡率が 0.5%以下の診断関連群での死亡 | 0               | 0                | -                   |
| 救命の失敗                 | 0               | 0                | -                   |
| 医原性気胸                 | 1 (0.2)         | 4 (0.1)          | 0.531 <sup>a)</sup> |
| 術後の生理的異常・代謝異常         | 15 (2.7)        | 73 (2.2)         | 0.413 <sup>a)</sup> |
| 術後の呼吸不全               | 0               | 0                | -                   |
| 輸血による副反応              | 0               | 0                | -                   |

数(%)

a)  $\chi^2$ 検定または Fisher の正確確率検定

表 2 副次評価項目の発生頻度

|             | 関与あり (n=554) | 関与なし (n=3390) | p-value             |
|-------------|--------------|---------------|---------------------|
| 危機的偶発症      | 0            | 0             |                     |
| 経皮的酸素飽和度の低下 | 0            | 0             |                     |
| 血圧低下        | 2 (0.4)      | 14 (0.4)      | 0.605 <sup>a)</sup> |

数(%)

a)  $\chi^2$ 検定または Fisher の正確確率検定

#### 4. 考察

本研究は、周麻酔期看護師が関与した手術麻酔の合併症について検討した初めての研究である。本研究では、麻酔科医の監督下で周麻酔期看護師が手術麻酔に関与することは、麻酔関連合併症に統計学的に有意な差を生じなかった。また、危機的偶発症などの重篤な合併症も認めなかった。これは、周麻酔期看護師が周術期の医療従事者であったという背景、臨床実習を含む適切な教育プログラム、業務が麻酔科医の監督下であること、あるいは関与する症例の選択が適切であったことなどが関与していると考えられる。今後、患者の背景因子を調整した解析を行う予定である。

#### 5. 学会発表

日本麻酔科学会関東甲信越・東京支部第 59 回合同学術集会（開催日：2019 年 9 月 7 日）にて発表予定。

#### 引用・参考文献

- 1) 宮坂勝之, 片山正夫 (2012). 聖路加看護大学が目指す周麻酔期看護師. 聖路加看護学会誌, (16) 1, 35-37.
- 2) 吉田奏, 片山正夫, 宮坂勝之 (2018). 聖路加国際病院での周麻酔期看護師の活動. OPE nursing, (33) 8, 78-82.
- 3) 井出悠紀子, 小川知子, 馬場靖子, 後藤隆久 (2017). 横浜市立大学における周麻酔期看護師の役割と養成. 手術医学, (38) 2, 78-80.
- 4) 公益社団法人日本麻酔科学会  
[http://www.anesth.or.jp/med/pdf/post-5\\_guuhatsu01.pdf](http://www.anesth.or.jp/med/pdf/post-5_guuhatsu01.pdf) (2018.12.13)

<医療技術研究助成>

肥満者における真皮エラスチン分解酵素の解析  
ー健やかな皮膚の維持を目指してー

海賀 一早

( 共同研究者名 )

赤瀬 智子 榎原 弘子

( 所 属 部 科 名 )

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

皮膚の弾力性を担っているエラスチン線維は、加齢をはじめとする皮膚の老化により減少し、シワやたるみを引き起こすなど皮膚機能を低下させることが知られている。近年ではエラスチン線維の減少に関わる新たな知見として、肥満の影響を受けることが示唆されていることから、肥満を原因とする皮膚の弾力性の低下が引き起こされることが推察される。

本研究では、先行研究よりも肥満度が軽度である日本人女性の腹部の皮膚組織を用いて、エラスチン分解酵素 *Neprilysin* の局在および肥満による発現変動について調べた。まず、肥満者の皮膚組織でエラスチン線維が実際に減少しているかどうかを調べるため、エラスチカ・ワン・ギーソン染色を行った。その結果、肥満者の皮膚組織において、エラスチン線維の減少傾向が観察された。次に、*Neprilysin* の皮膚での局在を蛍光免疫組織染色により確認した結果、表皮での局在が確認された。さらに RT-qPCR 法を用いて皮膚組織での *NEP* 遺伝子発現量の解析を行った結果、BMI との間に相関関係は認められなかった。

今後は、表皮と真皮に分離し局在ごとの *NEP* 遺伝子発現量を定量していくほか、別のエラスチン分解酵素の発現についても検討していく。



<医療技術研究助成>

肥満者における真皮エラスチン分解酵素の解析  
ー健やかな皮膚の維持を目指してー

海賀 一早

( 共同研究者名 )

赤瀬 智子 榎原 弘子

( 所 属 部 科 名 )

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

皮膚は人体最大の臓器であり、外界からの保護という重要な役割を担っている。物理的な保護機能として重要な皮膚の弾力性は、真皮の細胞外マトリックスにより保たれており、中でも重要な役割を担っているのがエラスチン線維である。このエラスチン線維が変性あるいは減少することにより、皮膚の弾力性が低下しシワやたるみの形成を引き起こすことがわかっている。

皮膚の弾力性の低下による影響は、皮膚疾患のみならず、NANDA-I看護診断に分類される皮膚統合性障害の内的因子としても挙げられている。皮膚の弾力性の低下の一因となるエラスチン線維の変性や減少を防ぐことは、看護における皮膚ケアという観点からも非常に重要な課題である。

エラスチン線維の変性や減少は皮膚の老化によって引き起こされることが明らかにされてきたが、さらに近年では新たな知見として肥満による影響が考えられるようになった。BMI35以上のコーカソイド女性ヒト皮膚組織では、エラスチン線維が減少・断裂しているという報告があり、肥満を原因とする皮膚の弾力性の低下が引き起こされることが推察される。

エラスチン線維減少のメカニズムの1つとして、エラスチン分解酵素の関与が報告されている。紫外線の暴露による皮膚の光老化では、分解酵素の発現や活性が上昇し、エラスチンの分解に影響することが知られている。しかし、肥満者の皮膚組織においてはこれらのエラスチン分解酵素がどのように変化しているかは明らかになっていない。

我々の研究室ではこれまでに、肥満モデルマウスの皮膚組織においてエラスチン分解酵素 Neprilysin (NEP) の遺伝子発現が上昇することを報告した (Makihara *et al.*, 2017)。今回、ヒト皮膚組織を用いて、NEP の局在と遺伝子発現を定量することを目的とした。

## 2. 方 法

【対象】乳房再建術を受ける患者の手術時に生じた腹部の残余皮膚組織を解析に用いた。年齢による影響を排除するため 40-59 歳の患者を対象とした。除外基準は糖尿病、全身性皮膚疾患、感染症を有する者、BMI18.5 以下の者とした。上記の基準を満たす患者に、術前に書面及び口頭での研究説明に同意を得た。また、日本肥満学会の定義に基づき BMI25 以上を肥満とみなした。本研究は、横浜市立大学のヒトゲノム・遺伝子研究等倫理委員会の承認 (A170928016) を得て実施した。

【組織学的解析①】皮膚組織を 10%ホルマリン溶液で固定後、パラフィンブロックに包埋し、厚さ 5 $\mu$ m に薄切した。エラスチカ・ワン・ギーソン (EVG) 染色により、エラスチン線維を染色した。

【組織学的解析②】パラフィンブロックに包埋した皮膚組織を 5 $\mu$ m に薄切した。抗 CD10 抗体 (abcam, USA)を用いて NEP の蛍光免疫染色を実施した。

【遺伝子発現解析】RNA later に 4 $^{\circ}$ Cで一晩浸漬し、-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した皮膚組織から total RNA を抽出した。cDNA を合成後、NEPの発現量を RT-qPCR 法を用いて定量した。内部標準には *ACTB*を用いた。

【統計学的解析】各解析により得られた値は SPSS を用いて統計処理を行なった。2 変量の相関分析には Pearson の相関係数を用い、有意水準を 0.05 未満とした。

## 3. 結 果

【対象】基準を満たす ~~4033~~名の腹部皮膚組織を解析した。

【組織学的解析①結果】EVG 染色の結果、BMI 標準の対象者のエラスチン線維と比べ、BMI が高い対象者のエラスチン線維が減少傾向にあることが観察された。

【組織学的解析②結果】表皮に NEP のシグナルを観察した。さらに、BMI が高い対象者の皮膚組織で、シグナルが増強傾向にあることが観察された。次に NEP のシグナル強度の定量を試みたが、強度が弱く定量化が困難であった。

【遺伝子発現解析】皮膚組織中の *NEP* 遺伝子発現量を定量した結果、BMI との間に相関は認められなかった。一方で年齢との間に正の相関傾向が認められた。

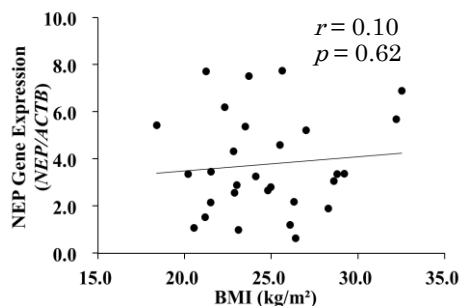


図 1a) *NEP* 遺伝子発現量と BMI の相関

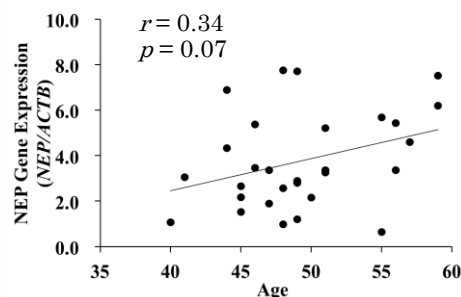


図 1b) *NEP* 遺伝子発現量と年齢の相関

#### 4. 考 察

本研究は、日本人女性の皮膚組織を用い、日本人に特徴的な比較的軽度な肥満において、エラスチン線維の減少と *NEP* の発現の関連を検証した初めての研究である。本研究の結果、比較的軽度な肥満でエラスチン線維が減少傾向にあることが示唆され、仮説と一致した見解が得られた。今後は画像解析ソフトを用いて、エラスチン線維の定量化を行う予定である。

皮膚組織での *NEP* 遺伝子発現量は BMI との間に相関を認めなかったが、これは皮膚組織の全層（表皮および真皮）を解析に用いたことが原因として考えられる。今後は、蛍光免疫組織染色で *NEP* のシグナルが強く観察された表皮のみなど、皮膚組織の各層別に遺伝子発現量を定量していく。さらに、*NEP* 以外のエラスチン線維分解酵素にも着目して発現変動を解析していく。

結論として、エラスチン線維の減少は皮膚の老化だけでなく、比較的軽度な肥満によっても起こることが示唆され、肥満者の皮膚では皮膚弾力性が低下する可能性が推察された。肥満者の皮膚に起こる変化の一部が本研究で明らかとなったことから、今後はメカニズムを追求することで肥満者の皮膚の予防的ケア方法の確立に繋げていく。

#### 5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

海賀一早，相内みなみ，榎原弘子，赤瀬智子：ヒト皮膚組織に局在するエラスチン分解酵素 Neprilysin の肥満による発現変動，第 41 回日本分子生物学会，横浜，2018.

<医療技術研究助成>

研究課題名：横浜地域在住の慢性疼痛患者における身体活動量の調査

望月英樹

所属：横浜市立大学附属市民総合医療センター リハビリテーション部

抄録：

慢性疼痛患者は、痛みによる恐怖で不活動になり、身体活動量が低下することで日常生活に支障をきたし、痛みがさらに慢性化していく悪循環がみられている。しかし、慢性疼痛患者の身体活動量に関する報告は少ない。今回の研究では、①当院リハビリテーション部に通院する横浜地域在住の慢性疼痛患者における身体活動量を計測し疾患や地域による特性を調査すること、②集学的治療の結果によって身体活動量に変化があるかを調査すること、を目的とした。

結果は、患者層は 50 代から 70 代、疾患や疼痛部位は多岐にわたっており、罹患期間も 9 か月から 40 年と幅が広がった。初期の歩数は全体平均が  $5198 \pm 2599$  歩、METs（日/分）は  $22.7 \pm 20.4$  とばらつきがみられた。介入前後では、No.1 は膝伸展筋力、歩行スピード、3 分間歩行に若干の改善が認められ、歩数と METs に大幅な改善が認められた。No.2 は握力、歩行スピード、SPPB、3 分間歩行に改善が認められたが、歩数と METs は減少した。

今回の報告はまだ十分なデータが集まっていない段階である。本研究は 2020 年末までを予定しており、今後はベースラインデータの蓄積と、身体活動量の変化と治療効果についての検証を行っていく予定である。

## <医療技術研究助成>

研究課題名：横浜地域在住の慢性疼痛患者における身体活動量の調査

望月英樹

所属：横浜市立大学附属市民総合医療センター リハビリテーション部

### 1. 目的

慢性疼痛とは、国際疼痛学会で「治療に要すると期待される枠を超えて持続する痛み、あるいは進行性の非がん性疼痛に基づく痛み」と定義され、**おおむね 3 ヶ月以上症状が持続する病態を指している**。慢性疼痛患者に対する治療は、生物医学モデルに基づく痛みそのものの治療ではなく、生物心理社会的モデルに基づく包括的なアプローチ（薬物療法、インターベンショナル治療、心理的アプローチ、リハビリテーション）が重要である。慢性疼痛患者は、痛みによる恐怖で不活動になり、身体活動量が低下することで日常生活に支障をきたし、痛みがさらに慢性化していく悪循環がみられている。したがって、慢性疼痛の対策では、心理的要因はもちろん、身体活動に着目する必要がある。しかし、慢性疼痛患者の身体活動に関する報告は地域在住高齢者を対象としたものは散見するが、重度な慢性疼痛を有する、ペインクリニック外来を受診している患者の活動量に関する報告はみられない。また、当院を受診する慢性疼痛患者は高齢者に限らず、青年期から中年期も含まれており患者層は幅広いが、このような患者の活動量に関する報告はない。

当院では平成 28 年 4 月からペインクリニック外来が集学的治療を開始し、リハビリテーション科・部も連携して慢性疼痛患者に対する運動指導を開始している。しかし、当院に通院する慢性疼痛患者は年齢や疾患が多岐にわたっており、患者によっては過活動が慢性疼痛の要因となっているものも散見する。また、日常的な身体活動は生活している地域によっても差があると考えるため、一概に既存の文献とも比較はできない。そこで、今回の研究では、①当院リハビリテーション部に通院する横浜地域在住の慢性疼痛患者における身体活動量を計測し疾患や地域による特性を調査すること、②集学的治療の結果によって身体活動量に変化があるかを調査すること、を目的とした。

### 2. 方法

研究対象は、当院倫理委員会許可日（2019 年 6 月 21 日）以降に当院ペインクリニック外来からリハビリテーション依頼があった慢性疼痛患者とした。

研究デザインは、侵襲・介入なしの単施設、前向き研究である。

リハビリテーション科の初回診察時に医師より研究概要の説明、研究の同意を取得後、活動量計（Omron 社製 Active Style Pro HJA-750C）を装着していただく。活動量計は、

睡眠時・入浴時以外に装着してもらい、初回リハビリテーション実施日までのデータ（歩数、METs [分/日]）をベースラインとして抽出する。活動量計は最終リハビリテーション実施日に回収し、最終リハ実施日を除く 1 週間分のデータをもとに結果を算出する。その他、身体機能（握力、膝伸展筋力、歩行スピード、SPPB、3 分間歩行）は初回・最終のリハビリテーション実施時に評価し、疼痛・心理・睡眠（NRS、PDAS、HADS、PCS、PSEQ、EQ-5D、アテネ不眠尺度、ロコモ 25）の評価はペインクリニック外来にて実施している評価を診療録より調査した。

### 3. 結果

本研究は、当院倫理委員会の承認後から測定したデータを用いた研究である。そのため、すべてのデータがそろっていない段階であるがパイロットスタディとして報告する。

患者層は 50 代から 70 代、男女比 3 : 4、疾患や疼痛部位は多岐にわたっており、罹患期間も 9 か月から 40 年と幅が広い（表 1）。

**表 1 基本特性**

|      | 年齢 | 性別 | BMI  | 疾患名                      | 疼痛部位            | 罹患期間<br>(月) |
|------|----|----|------|--------------------------|-----------------|-------------|
| No.1 | 68 | 男性 | 23.5 | 脊柱管狭窄症                   | 仙骨部、腰背部         | 20          |
| No.2 | 53 | 女性 | 29.3 | 臼蓋形成不全                   | 両膝、両股関節         | 9           |
| No.3 | 72 | 女性 | 19.6 | 右鼠径部痛                    | 右鼠径部            | 15          |
| No.4 | 69 | 男性 | 22.5 | 両肩関節周囲炎、<br>頸部脊柱管狭窄症、PMR | 腰、両肩、全身痛        | 535         |
| No.5 | 51 | 男性 | 24.1 | 左肩関節周囲炎、両側変形性股関節症        | 心窩部、<br>肩・肘・腰・首 | 17          |
| No.6 | 59 | 女性 | 23.2 | 慢性腰痛症                    | 腰、左殿部           | 299         |
| No.7 | 52 | 女性 | 29.7 | 後縦靱帯骨化症の術後障害             | 頸部、背中、前胸部       | 31          |

主要評価項目である身体活動量に着目すると（表 2）、初期の歩数は全体平均が 5198±2599 歩、METs（日/分）は 22.7±20.4 とばらつきがみられた。介入前後では、No.1 は膝伸展筋力、歩行スピード、3 分間歩行に若干の改善が認められ、歩数と METs に大幅な改善が認められた。No.2 は握力、歩行スピード、SPPB、3 分間歩行に改善が認められたが、歩数と METs は減少した。



表 2 身体機能評価

|      |    | 握力<br>(Kg) | 膝伸展筋力<br>(体重比%) | 歩行スピード<br>(m/S) | SPPB | 3 分間歩行<br>(m) | 歩数         | METs<br>(日/分) |
|------|----|------------|-----------------|-----------------|------|---------------|------------|---------------|
| No.1 | 初期 | 36.35      | 63              | 1.85            | 12   | 310           | 1923±1101  | 5.3±7.9       |
|      | 最終 | 31.95      | 69              | 1.9             | 12   | 317           | 4321±1406  | 24.1±12.6     |
| No.2 | 初期 | 27.1       | 38              | 1.41            | 11   | 244           | 10267±2000 | 61.5±6.4      |
|      | 最終 | 29         | 34              | 1.75            | 12   | 265           | 8423±2564  | 48.1±16.8     |
| No.3 | 初期 | 15.1       | 42              | 1.97            | 12   | 266           | 4406±1919  | 16.3±14.6     |
| No.4 | 初期 | 24         | 65              | 1.53            | 12   | 222           | 4676±1484  | 24±14.1       |
| No.5 | 初期 | 40.8       | 58              | 2.31            | 12   | 280           | 6979±3191  | 39.4±30.7     |
| No.6 | 初期 | 20.75      | 38              | 1.88            | 12   | 308           | 4729±1309  | 10±14.5       |
| No.7 | 初期 | 16.05      | 12              | 0.79            | 9    | 130           | 3407±1542  | 2.5±3.3       |

疼痛・ADL・心理評価では（表 3）、No.1 はリハビリ実施前後で PDAS、PCS、PSEQ、EQ-5D、ロコモ 25 の改善が認められた。

表 3 疼痛・ADL・心理評価

|      |    | NRS<br>(平均) | PDAS | HADS<br>(不安) | HADS<br>(うつ) | PCS | PSEQ | EQ-5D | アテネ<br>不眠尺度 | ロコモ 25 |
|------|----|-------------|------|--------------|--------------|-----|------|-------|-------------|--------|
| No.1 | 初期 | 6           | 32   | 4            | 9            | 21  | 11   | 0.446 | 16          | 34     |
|      | 最終 | 5           | 18   | 5            | 7            | 17  | 27   | 0.724 | 19          | 24     |
| No.2 | 初期 | 4           | 18   | 5            | 7            | 30  | 41   | 0.724 | 9           | 36     |
| No.3 | 初期 | 5           | 17   | 8            | 5            | 35  | 42   | 0.768 | 9           | 28     |
| No.4 | 初期 | 7           | 27   | 5            | 7            | 27  | 30   | 0.481 | 5           | 25     |
| No.5 | 初期 | 5           | 1    | 9            | 9            | 38  | 27   | 0.547 | 6           | 19     |
| No.6 | 初期 | 6           | 33   | 5            | 4            | 24  | 26   | 0.649 | 13          | 37     |
| No.7 | 初期 | 6           | 41   | 6            | 4            | 34  | 29   | 0.595 | 7           | 66     |

#### 4. 考察

一般に、健康的な生活を維持するためには身体活動を保つことが推奨されている。活動量の指標として、「健康づくりのための身体活動基準 2013」では身体活動の目標値が 23METs・時/週、もしくは強度が 3METs 以上の活動で 1 日当たり約 60 分、歩行中心の活動であれば 1 日当たり 8000～10000 歩、65 歳以上の高齢者では強度を問わず身体活動を 10 メッツ・時/週、もしくは毎日 40 分が推奨されている。Chen らの報告では、一般高齢者では歩数は平均 4500 歩、METs (分/日) は 37.8 分/日とされている。慢性疼痛患者では、斎藤らによると、福岡県太宰府市の高齢慢性疼痛患者では歩数は平均 5000 歩と報告されている。歩数に関しては、今回の研究報告と他の文献の報告とで大きな違いはないが、3Mets

以上の身体活動は一般高齢者より低値を示していることから、慢性疼痛患者では日常生活を低活動に過ごしている可能性が示唆された。

今回の報告はまだ十分なデータが集まっていない段階である。本研究は 2020 年末までを予定している。今後はベースラインデータの蓄積と、身体活動量の変化と治療効果についての検証を行っていく予定である。

## ＜医療技術研究助成＞

核医学診療における放射性同位元素による汚染時サーベイランス評価法の検討

尾川松義

瀧下啓介、望月秀一、臼井淳之

横浜市立大学附属病院 放射線部

核医学診療は放射性医薬品を患者に投与し、悪性腫瘍や虚血性心疾患、認知症など様々な疾患の診断に用いられている。また、放射線内用療法として甲状腺がんや骨転移、悪性リンパ腫などの治療にも応用されている。しかし、放射性医薬品による汚染のリスクがともなうため、臨床で使用可能な汚染箇所の評価方法を検討する事は重要である。

本研究では、臨床で利用されている放射性医薬品による汚染に対し、4種類の放射線サーベイメータを用いて汚染測定を行い、測定値から表面密度を求める換算式を算出し、法令で定められている表面密度限度（ $\alpha$ 核種:4Bq/cm<sup>2</sup>、 $\alpha$ 核種以外:40Bq/cm<sup>2</sup>）が評価可能であるか検証した。また、モンテカルロシミュレーションを用いて、測定値の推定が可能であるか検討した。

本研究において、最適な放射線サーベイメータを選択する事により、表面密度と測定値に直線性が得られ、測定値から表面密度の評価が可能である事が示唆された。ただし、汚染の分布状況により検出効率が変動し、実測値の過小評価がおこるため、汚染の分布を正しく評価する事が重要である。今後は、変動要因を考慮しシミュレーションの精度を向上させることで、汚染の状況に応じた換算係数の算出を可能とする。

## ＜医療技術研究助成＞

核医学診療における放射性同位元素による汚染時サーベイランス評価法の検討

尾川松義

瀧下啓介、望月秀一、臼井淳之

横浜市立大学附属病院 放射線部

### 1. 目 的

核医学診療は放射性医薬品を患者に投与し、体内分布の画像診断や悪性腫瘍への取り込みを利用して治療を行う放射線診療である。放射性医薬品を用いるため、放射性物質による汚染（以下、「汚染」）のリスクがあり、適切な除染および測定が必要である。しかし、汚染場所の評価を行うためには、高額な専用装置が必要であり、すべての施設で導入する事は難しい。また、使用する放射線は、 $\gamma$ 線や $\beta$ 線が主であったが近年、新規放射性医薬品の開発により、臨床で使用する薬剤の種類が増加し、 $\alpha$ 線を放出する核種も加わり、臨床における測定は煩雑さを増している。

本研究では、臨床で利用されている放射性医薬品、(Tc-99m 及び Sr-89、Ra-223) による汚染に対し、4種類の放射線サーベイメータを用いて測定を行い、測定値から表面密度を求める換算式を算出し、法令で定められている表面密度限度( $\alpha$ 核種:  $4\text{Bq/cm}^2$ 、 $\alpha$ 核種以外:  $40\text{Bq/cm}^2$ ) が評価可能であるか検証する。また、汚染の範囲が異なる場合の影響についてモンテカルロシミュレーションを用いて検討する。

### 2. 方 法

以下に示す3種類の放射性医薬品を用いて、4種類の放射線サーベイメータによる測定を行った。

|            |                                                           |
|------------|-----------------------------------------------------------|
| 放射性医薬品     | ① $\gamma$ 線放出核種であるTc-99m                                 |
|            | ② $\beta$ 線放出核種であるSr-89                                   |
|            | ③ $\alpha$ 線放出核種であるRa-223（崩壊時に $\gamma$ 線及び $\beta$ 線も放出） |
| 放射線サーベイメータ | ① GMサーベイメータ（以下、GM）                                        |
|            | ② ラギッドシンチレーションサーベイメータ（遮光膜一体型プラスチックシンチレータ：以下、ブラシン）         |
|            | ③ NaIサーベイメータ（以下、NaI）                                      |
|            | ④ $\alpha$ 線測定用サーベイメータ（ZnS(Ag)シンチレータ：以下、ZnS(Ag)）          |

### 1. 表面密度の換算式算出

直径 1cm の吸収材に放射性医薬品を吸着させ、汚染部を作成した。汚染濃度を  $4000\text{Bq}/\text{cm}^2$  及び  $400\text{Bq}/\text{cm}^2$ 、 $40\text{Bq}/\text{cm}^2$ 、 $4\text{Bq}/\text{cm}^2$  と変化させ、汚染部とサーベイメータ検出表面の距離を 5mm (Ra-223 は検出部の汚染防止のため 10mm) として、各サーベイメータによる測定を 5 回実施した。得られた測定値にバックグラウンド補正を行い Counts Per Minutes (以下、CPM) を求め、濃度 (以下、Dose) と CPM の近似直線を算出した。

### 2. 実測値とモンテカルロシミュレーションとの比較

方法 1 の幾何学的配置におけるモンテカルロシミュレーションを行うため Particle and Heavy Ion Transport code System (以下、PHITS) を用いて、検出器面に入射する 1 分間あたりの放射線量を算出した。得られたシミュレーション結果と測定値を比較し、換算比 (実測値/PHITS 算出値) を算出した。

### 3. 汚染条件の違いによる実測値とモンテカルロシミュレーションとの比較

Tc-99m のみを用いて、以下 3 通りの汚染箇所を作成した。汚染濃度は  $4000\text{Bq}/\text{cm}^2$  とし、サーベイメータによる測定を 5 回実施した。また、同様の汚染について PHITS を用いてサーベイメータ検出器面に入射する光子及び粒子数を求めた。得られた結果と測定値を比較し、換算値 (実測値/PHITS) を算出した。

|      |                                                           |
|------|-----------------------------------------------------------|
| 汚染箇所 | ①中心に直径1cmの円形の汚染が1ポイント (以下、1ポイント)                          |
|      | ②①に加え、中心から5cm離れた同一平面上に直径1cmの円形の汚染が4ポイントの計5ポイント (以下、5ポイント) |
|      | ③15cm×15cmの平面に1ポイント (以下、平面)                               |

## 3. 結 果

1. サーベイメータの測定値にバックグラウンド補正を行った CPM を Table 1-1 から 1-3 に示す。

Table 1-1 サーベイメータの測定値(cpm) (Tc-99m)

| 汚染濃度    | $4000\text{Bq}/\text{cm}^2$ | $400\text{Bq}/\text{cm}^2$ | $40\text{Bq}/\text{cm}^2$ | $4\text{Bq}/\text{cm}^2$ |
|---------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| GM      | 559                         | 56                         | 0                         | 0                        |
| ブラシン    | 88                          | 20                         | 6                         | 0                        |
| NaI     | 19572                       | 1920                       | 180                       | 0                        |
| ZnS(Ag) | 0                           | 0                          | 0                         | 0                        |

Table 1-2 サーベイメータの測定値 (CPM) (Sr-89)

| 汚染濃度    | $4000\text{Bq}/\text{cm}^2$ | $400\text{Bq}/\text{cm}^2$ | $40\text{Bq}/\text{cm}^2$ | $4\text{Bq}/\text{cm}^2$ |
|---------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| GM      | OverRange                   | 1217                       | 137                       | 19                       |
| ブラシン    | 14523                       | 1545                       | 162                       | 28                       |
| NaI     | 0                           | 0                          | 0                         | 0                        |
| ZnS(Ag) | 0                           | 0                          | 0                         | 0                        |

Table 1-3 サーベイメータの測定値 (CPM) (Ra-223)

| 汚染濃度    | $4000\text{Bq}/\text{cm}^2$ | $400\text{Bq}/\text{cm}^2$ | $40\text{Bq}/\text{cm}^2$ | $4\text{Bq}/\text{cm}^2$ |
|---------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| GM      | 401                         | 181                        | 80                        | 22                       |
| ZnS(Ag) | 26060                       | 3124                       | 399                       | 70                       |

Tc-99m の測定において、 $\gamma$  線放出のため ZnS(Ag) はカウントされなかったが、それ以外の 3 種類については濃度直線性が良好であり、Dose と CPM の関係は、以下の通りであった。

GM:Dose=7.122×CPM+16.425 ( $r^2=0.99$ ),

プラシン:Dose=47.176×CPM-233.529 ( $r^2=0.98$ )

NaI:Dose=0.204×CPM+5.013 ( $r^2=0.99$ )

Sr-89 の測定において、NaI は検出限界以下となり測定できなかった。GM 及びプラシンは濃度直線性が良好であり、Dose と CPM の関係は、以下の通りであった。

GM:Dose=0.330×CPM-3.274 ( $r^2=0.99$ )

プラシン:Dose=0.276×CPM-11.153 ( $r^2=0.99$ )

Ra-223 の測定において、ZnS(Ag) は濃度直線性が良好であり、Dose と CPM の関係は、以下の通りであった。

ZnS(Ag):Dose=0.155×CPM-35.388 ( $r^2=0.99$ )

2. 結果 1 で法定限度の測定が可能であったサーベイメータと PHITS より得られた CPM の比（実測値/PHITS×100%）を Table2-1 から 2-3 に示す。

Table 2-1 各測定における換算比（Tc-99m）

| 汚染濃度 | 4000Bq/cm <sup>2</sup> | 400Bq/cm <sup>2</sup> | 40Bq/cm <sup>2</sup> | 4Bq/cm <sup>2</sup> |
|------|------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| GM   | 0.45%                  | 0.44%                 | 0%                   | 0%                  |
| プラシン | 0.07%                  | 0.16%                 | 0.45%                | 0%                  |
| NaI  | 19.77%                 | 19.40%                | 18.18%               | 0%                  |

Table 2-2 各測定における換算比（Sr-89）

| 汚染濃度 | 4000Bq/cm <sup>2</sup> | 400Bq/cm <sup>2</sup> | 40Bq/cm <sup>2</sup> | 4Bq/cm <sup>2</sup> |
|------|------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| GM   | OverRange              | 11.39%                | 12.86%               | 17.60%              |
| プラシン | 13.60%                 | 14.46%                | 15.15%               | 26.40%              |

Table 2-3 各測定における換算比（Ra-223）

| 汚染濃度    | 4000Bq/cm <sup>2</sup> | 400Bq/cm <sup>2</sup> | 40Bq/cm <sup>2</sup> | 4Bq/cm <sup>2</sup> |
|---------|------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| GM      | 0.11%                  | 0.51%                 | 2.26%                | 6.21%               |
| ZnS(Ag) | 13.74%                 | 16.47%                | 21.01%               | 37.00%              |

Tc-99m において GM 及び NaI は測定可能範囲内において安定した換算比を示した。Sr-89 において GM 及びプラシンは測定可能範囲内において安定した換算値を示した。Ra-223 において GM 及び ZnS(Ag) は安定した換算値は示さなかった。

3. 汚染状態に対する換算比を Table 3 に示す。PHITS を基準とした測定値に対する検出効率は、1 ポイントと 5 ポイントを比較すると GM 及びプラシンの検出効率は安定していたが、NaI では 15.44%上昇した。また、汚染が平面に生じた場合は、検出効率が極端に低下した。

Table 3 汚染状態に対する換算比（Tc-99m）

| 汚染状態 | 1 ポイント | 5 ポイント | 平面    |
|------|--------|--------|-------|
| GM   | 0.45%  | 0.38%  | 0.02% |
| プラシン | 0.07%  | 0.07%  | 0.01% |
| NaI  | 19.77% | 35.21% | 0.96% |

#### 4. 考 察

臨床の汚染時サーベイランスでは、Tc-99m において GM は法定限度付近の測定は難しいが、プラシンや NaI は良好な測定値を示していた。また NaI は、直線性も良好なため、測定値から換算式を用いる事で、法定限度の評価が可能であ



る。しかし、汚染状況によっては検出器に入射する放射線の検出効率が低下するため、過小評価する可能性が PHITS を用いたシミュレーションより示された。Sr-89 において GM やプラシンは法定限度付近においても良好な測定値を示しており、直線性も良好なため、測定値から換算式を用いる事で、法定限度の評価が可能である。Ra-223 において GM や ZnS(Ag)は法定限度付近においても良好な測定値を示していた。また、Zn(Ag)は直線性も良好なため、測定値から換算式を用いる事で、法定限度の評価が可能である。しかし、Ra-223 は他の核種に比べ気体上に存在しやすく線量計の表面を汚染させる特徴があり、測定には注意が必要である。

本研究により、法定限度を評価するための最適なサーベイメータを示すことが出来た。これらは、モンテカルロシミュレーションとも一致しており、信頼性が示された。しかし、汚染の状況により実測値とシミュレーション値にズレが生じた。これは、検出器に入射する放射線の方向依存性の影響が測定値に強く影響したと考えられ、今後は変動要因を考慮しシミュレーションの精度を向上させ、汚染の状況に応じた換算係数の算出を可能とする。

## 5 .論文及び学会発表（研究会を含む）

放射線関連学会への発表を予定。

＜平成 29 年度 医療技術研究助成＞

転職経験のある中堅看護師の組織間キャリア発達の認識

下川 都筆<sup>1)</sup>

勝山 貴美子<sup>2)</sup>

1) 元横浜市立大学 大学院医学研究科看護管理学分野

2) 横浜市立大学 大学院医学研究科看護管理学分野

抄録

本研究は、転職経験のある中堅看護師が組織間キャリア発達をどのように認識しているかを明らかにすることを目的とした。研究デザインは質的記述的研究。300 床以上の病院に転職した中堅看護師 7 名を対象に、インタビューガイドを用いた半構成的面接を行った。

質的分析の結果、【転職の動機・要因】【自分を活かせる場の探し方・決め方】【転職による気づき】【気づきからの挑戦・対処】【転職者の欲しい支援】の 5 カテゴリーと 21 サブカテゴリー、45 コードが抽出された。

転職経験のある中堅看護師の組織間キャリア発達は【転職による気づき】の認識であり、今まで身を置いてきた《環境》や《人間関係》との違い、自身が持つ《引き出し》、改めて《看護が好き》と感じ、困難への【対処】方法や新たな【挑戦】方法を見出していることであった。そして《暗黙のルールの可視化》や同様な転職者の《教育へ活用》したいと次の成長の方向を見出していた。これは、転職した中堅看護師が持つ「柔軟性」や「しなやかさ」の中で培われたと考えられる（武村，2016）。今後、看護管理者には転職者の【気づき】を理解し、転職者の多様な能力、経験を活かす機会を構築する環境づくりが求められる。

## <平成 29 年度 医療技術研究助成>

### 転職経験のある中堅看護師の組織間キャリア発達の認識

下川 都筆<sup>1)</sup>

勝山 貴美子<sup>2)</sup>

1) 元横浜市立大学 大学院医学研究科看護管理学分野

2) 横浜市立大学 大学院医学研究科看護管理学分野

#### 1. 目的

病院看護実態調査（2017）によると、調査病院4,134病院のうち60.8%の看護部長が看護師不足を看護管理上の課題としてあげている。人材確保のために中途で採用される中堅看護師は、臨床実践力、自律度が高く（内藤ら，2004）、新人教育や即戦力として組織の活性化に対する期待が大きい。一方で、資格取得など成長の機会を得る、ライフイベントに伴う仕事と生活のバランス重視など様々なキャリア発達上の課題を抱えるが、彼らのキャリア発達を視野に入れた支援方法は十分に検討されていない。転職した中堅看護師に関する研究は、新しい職場で感じる「ギャップ」と職場適応に留まっております（伊東，2011；小西ら，2014）、転職前の経験や転職理由に合わせたキャリア発達を支援する方法については、明らかにされていない。

そこで、本研究は、転職経験のある中堅看護師が新しい組織で、異動前の経験や技術を踏まえ、看護師としての自己の仕事や経験、技術をどのように認識し、発達させているか、その組織間キャリア発達の認識を明らかにすることを目的とした。

#### 2. 方法

研究デザインは質的記述的研究。300床以上の病院に転職した中堅看護師7名を対象に、インタビューガイドを用いて、「転職前の経験や技術を活用し、発達したと感じた具体的事例」「キャリア発達を促進するために、効果的だと思う具体的な支援」などに関する半構成的面接を行った。得られたデータを質的記述的に分析した。

#### 3. 結果

研究対象者は7名。対象者の年齢は28～35歳（平均30.8歳）、転職前の経験年数は3～8年（平均5.2年）で、現在の組織での実務経験年数は1年～2年11か月（平均1年11か月）だった。看護職としての転職経験は4名が「1回」、3名が「2回」だった。研究対象病院は、高度な医療や専門性の高い医療を提供している300～700床代の3病院であった。

質的記述的分析を行った結果、【転職した動機・要因】【自分を活かせる場の探し方・決め方】【転職による気づき】【気づきからの挑戦・対処】【転職者の欲しい支援】の5つのカテゴリと21のサブカテゴリ、45のコードが抽出された。（表1）

#### 4. 考察

転職経験のある中堅看護師は、転職前の経験の中で培った価値や規範、看護実践と転職後の組織での違いにより、【転職による気づき】があった。先行研究（伊東，2011；小西ら，2014）では、新しい組織で感じた違いを「問題」と捉えているのに対し、本研究の対象者は自分自身が持つ《引き出し》が強みにもなりうると気づき、転職後の戸惑いや不安に対し〈自分の気持ち〉に《距離を置》き、〈わからないことは何でも聞く〉など《自分で対処方法》を見出していた点で異なる。グレッグら（2003）が中堅看護師を「困難に直面し、葛藤を持ったとしてもチャンスを活かす思考・行動力」を発揮し、「現状の肯定的な捉え方」で乗り越える強さを持つと述べるように、困難に対する克服の方法を自身で獲得していたと考えられる。さらに新たな組織で、《暗黙のルールの可視化》や同様な転職者の《教育へ活用》したいと次の成長の方向など新たな【挑戦】の方法を見出しているという特徴があった。これは、転職をした看護師が、武村（2016）が述べるように、過去の経験と、新しい経験の中での【気づき】をすり合わせ、柔軟に変化をさせながら現在の状況を自分なりに納得し、受け入れる努力をし、新たな組織の中で持てる力を発信したいという中で培われた柔軟性であり「しなやかさ」である。「しなやかさ」は、転職者の過去の経験を理解し、新しい経験を通して多くの気づきの中で養われることからその支援が望まれる。

多様な理由で転職した看護師は、個々の背景や経験、個別性を理解できる転職経験者の伴走（伊東，2011）を期待しているが、本研究では転職した看護師が自分で対処できない時に支援する《選択的なプリセプター》を組織の支援として必要としていることが特徴であった。本研究の対象者は、元々その組織にいた看護師には気づけない組織独自の判断基準である《暗黙のルールを可視化》や、組織の中では当たり前とする手順の可視化への期待である《役割・業務のステップを可視化》を、新しい組織に馴染み、その中で自身の課題に気づく上で重要な支援だと考えていた。さらに、次の参入者の支援すなわち《気づきを教育に活用》など【気づきからの挑戦】の意欲を持っていた。転職者にとってそのような機会を与えられることは「チャンスを活かす思考・行動力」を発揮する機会（グレッグら，2003）となり自身に繋がり、キャリア発達を促進する要素である。同時に、組織にとっても当然となっている常識を見直し、よりよい看護を実践するための業務改善のための病棟の課題を共有する機会にも繋がっていた。

転職した中堅看護師は、前組織で培った経験や技術を新しい組織でどのように活用し、転職という機会を活かしキャリア発達すべきか悩むことが多い。現在、組織を異動した看護師の看護実践力を評価する方法が検討されているが（日本看護協会，2016）、これは、看護師が今までの経験で培った看護実践能力を、転職によって新人同様の振り出しに戻さずキャリア発達支援をするための一つの方法である。本研究において、組織間キャリア発達の支援には、看護実践能力以外に、看護師の転職理由や背景、多様なキャリ

アアンカーや価値に合わせた【転職による気づき】の活用も重要な支援だと考える。転職した看護師は個々に異なる経験を持ち、転職理由も様々に多様性がある。その能力、経験を活かし転職者を活用し、キャリア発達を支援するためには、看護管理者や病棟スタッフが転職者の気づきに合わせた、声を聴く機会を設け、【転職による挑戦】に繋げる機会を広げられるよう、支援していくことのできる組織づくりが必要である。

こうして看護師のキャリア発達を一つの組織で完結せず、組織を異動しながらキャリア発達を促進することは、看護界全体で個人の持つ能力を活用し、ひいては看護の質を向上するために意義があると考ええる。

### 引用文献

グレッグ美鈴, 池邊敏子, 池西悦子, 他 (2003) : 臨床看護師のキャリア発達の構造, 岐阜県立看護大学紀要, 第3巻1号, 1-8.

伊東美奈子 (2011) : 中堅看護師が転職前に行う予測と転職後に遭遇する現実との相違の構造, 日本看護管理学会誌(15)2, 135-146.

小西由起子, 撫養真紀子, 勝山貴美子, 他 (2014) : 看護職における再就職者の組織社会化の様相, 日本看護管理学会誌(18)1, 27-35.

内藤理英, 佐藤紀子, 出口昌子, 他 (2004) : 看護師の臨床実践力の獲得状況 : 日本看護学会論文集, 看護管理, 35, 280-282.

日本看護協会 (2016) : 「看護師のクリニカルリーダー (日本看護協会版)」活用のための手引き 2. 導入・活用編,

<https://www.nurse.or.jp/home/publication/pdf/fukyukeihatsu/guidance02.pdf>.

(検索日2019年3月1日)

武村雪絵 (2016) : ミッションマネジメント 対話と信頼による価値共創型の組織づくり, P.104-108, 医学書院, 東京

山本寛 (2008) : 転職とキャリアの研究-組織間キャリア発達の観点から- (改訂版), 創成社, 東京.

### 5. 論文及び学会発表

- ・原田都筆: 転職経験のある中堅看護師の組織間キャリア発達の認識 (修士論文), 2019

表1 転職経験のある中堅看護師の組織間キャリア発達の認識

| カテゴリー            | サブカテゴリー                |
|------------------|------------------------|
| 転職の動機・要因         | キャリア目標に関連した経験や技術を深め広げる |
|                  | 人生と仕事の区切り              |
| 自分を活かせる場の探し方・決め方 | 転職サイトを利用               |
|                  | 家庭の事情や通勤の利便性           |
|                  | 同期や医師の意見               |
|                  | 雰囲気や体感                 |
|                  | やりたいことができる場            |
| 転職による気づき         | 新しい課題ややりがいに気づく         |
|                  | 引き出しに気づく               |
|                  | 環境の気づき                 |
|                  | 人間関係の気づき               |
|                  | 看護が好きという気づき            |
| 気づきからの挑戦・対処      | 気づいたことの発信の方法           |
|                  | 気づきを教育に活用              |
|                  | 距離を置く                  |
|                  | 自分での対処方法               |
| 転職者の欲しい支援        | 家庭との両立支援               |
|                  | 選択的なプリセプター             |
|                  | 個別性に合わせた既卒者用の教育計画      |
|                  | 役割・業務のステップを可視化         |
|                  | 暗黙のルールを可視化             |



＜平成 29 年度 医療技術研究助成＞

多職種チームで行う植込型補助人工心臓退院支援プログラムの作成

鈴木姿子

安川奈緒美、田中淳子、品田美緒、伊東尚規、岡村正嗣、清國雅義、郷田素彦

公立大学法人横浜市立大学附属病院

抄録

心臓移植の待機期間は平均 1310 日を超えるため、患者は、補助人工心臓（Ventricular Assist Device : VAD）を装着し在宅療養を行う。植込型 VAD を装着した患者や介護者は、機器管理やセルフケア、ドライブライン貫通部管理などの知識や技術の習得が求められる。研究の目的は、多職種チームで行う植込型補助人工心臓の退院支援プログラムの作成である。研究代表者・共同研究者らが所属する植込型 VAD 検討ワーキンググループにおいて、体外式 VAD 治療経験から課題抽出、文献検討を行い作成した。

退院支援プログラムとして、在宅復帰プログラムフローチャート、植込型補助人工心臓手帳等を作成した。植込型補助人工心臓手帳は、「植込型補助人工心臓とは」「ドライブライン皮膚貫通部のケア」「シャワー浴」「心臓リハビリテーション」「機器取扱いトレーニング」「日常生活について」「合併症」「外出・外泊トレーニング」等の項目で構成した。本プログラムの特徴は、多職種が介入する退院支援プログラム、プログラム内に ACP の考え方をういたこと、介護人への支援である。今後の課題は、本プログラムを施行し患者・家族への支援内容をより洗練させることである。

## <平成 29 年度 医療技術研究助成>

多職種チームで行う植込型補助人工心臓退院支援プログラムの作成

鈴木姿子

安川奈緒美、田中淳子、品田美緒、伊東尚規、岡村正嗣、清國雅義、郷田素彦

公立大学法人横浜市立大学附属病院

### 1. 目的

心臓疾患の終末像としての心不全患者数は、補助循環を必要とするような重症心不全患者も含め、増加の一途を辿る<sup>1)</sup>。重症心不全治療においてもっとも確立された治療法は心臓移植だが、国内の心臓移植実施施設は 9 施設、心臓移植の総施行数は 300 例程度という現状である。心臓移植待機期間は平均 1310 日を超え、補助人工心臓（Ventricular Assist Device : VAD）を用いた治療は心臓移植までの橋渡しとして不可欠な治療といえる。

植込型 VAD を装着した患者は自宅退院が可能である。しかし、機器管理やセルフケア、ドライプライン貫通管理などの知識と技術を身に付ける必要があり、介護者（Caregiver）となる家族にも同様の知識と技術が求められる。植込型 VAD 装着患者への退院支援内容は多岐に渡るため多職種が協働し患者・家族を支援することが望ましい<sup>2)</sup>。

本研究は、多職種チームで行う植込型補助人工心臓の退院支援プログラムを作成することを目的とした。

### 2. 方法

各職種から体外式補助人工心臓患者の治療・ケア経験からの植え込み型補助人工心臓治療やケアの課題を抽出、植込型 VAD の退院支援の文献検討を行い、当院の退院支援プログラムを作成した。本検討は、研究代表者・共同研究者らが所属する植込型 VAD 検討ワーキンググループにおいて、1 か月に 1 回程度実施した。

### 3. 結果

退院支援プログラムとして、在宅復帰プログラムフローチャート、植込型補助人工心臓手帳等を作成した。本稿では植込型補助人工心臓手帳について述べる。

植込型補助人工心臓手帳は A4 サイズ 49 ページで構成した。植込型補助人工心臓手帳の項目は「植込型補助人工心臓とは」「ドライプライン皮膚貫通部のケア」「シャワー浴」「心臓リハビリテーション」「機器取扱いトレーニング」「日常生活について」「合併症」「外出・外泊トレーニング」等である。次に特徴的な項目の内容について述べる。

「植込型補助人工心臓とは」は、多職種が行うプログラムである。本項目は、植込型 VAD 治療を受けるための要件や治療上の制約について記載した。また補助人工心臓治療を開始した時から病状が悪化した場合に備え、あらかじめ考えをまとめておく準備として、アド

バンス・ケア・プランニング（以下 ACP）に関する内容を追加した。

「シャワー浴」は、看護師が主に行うプログラムである。用意物品、部屋・脱衣所での準備、シャワー浴の実施という実際の手順に沿って記載した。使用機器により注意点が異なるため、当院採用予定の機器ごとに頁を作成した。

「心臓リハビリテーション」は、理学療法士が主に行うプログラムである。当院の心臓血管外科のプロトコルを参考に術前から段階を追ったリハビリテーション内容を作成した。

「機器取扱いトレーニング」は、臨床工学技士（人工心臓管理技術認定士）による患者、介護者を対象としたプログラムである。座学での講義を 3 回、確認テストの合格を得たのちに実習での講義を 1 回、最後に実技テストを行い、安全な危機管理のために必要な知識を習熟するプログラムを作成した。

「外出・外泊トレーニング」は、患者・家族が病院内で得た知識と技術を、生活の場で施行し、修正するプログラムである。外出トレーニングは、公共交通機関を利用し外出先でバッテリー交換を行う。外泊トレーニングは、退院後の生活のイメージを得るため自宅で機器の取り扱いやシャワー浴等を行う。

#### 4. 考察

本プログラムの特徴は下記の 3 点である：1 多職種が介入する退院支援プログラム、2 プログラム内に ACP の考え方をういたこと、3 介護人への支援。以下 3 点について考察する。

##### (1) 多職種が介入する退院支援プログラム

本研究では、医師、看護師、臨床工学技士、理学療法士等の多職種が介入する植込型補助人工心臓退院支援プログラムを作成した。また VAD 治療による経済的負担や社会保障制度への支援、在宅療養支援を円滑に行うため MSW がワーキンググループに参加した。多職種介入による集学的アプローチを用いることは、VAD 治療成績を向上させ<sup>3)</sup>、入院期間が 4 分の 1 となり医療費も削減される<sup>4)</sup>。人工心臓管理技術認定士を含めた多職種チームが本プログラムを提供することにより、患者・家族にあった効率的な VAD ケアの提供と入院期間の適正化につながると考える。

##### (2) アドバンス・ケア・プランニング

アドバンス・ケア・プランニングは、人生の最終段階の医療・ケアについて、本人が家族等や医療・ケアチームと事前に繰り返し話し合うプロセスである<sup>5)</sup>。植込型 VAD 治療においては、術前から終末期に至るまで、患者の人生観、価値観を共有する会話が必要で<sup>6)</sup>、細かな質問に対応し、より多くの情報提供を行う支援的な多職種チームが必要である<sup>7)</sup>。植込型 VAD 治療に携わる多様な専門家は、本手帳を用いて術前から患者・家族と人生観、価値観を共有しながら共に考え、様々な場面における選択を支援する役割があると考え。

##### (3) 介護人への支援

本手帳は、患者本人と介護者である家族へ向けて作成した。在宅療養に向けてのセルフ

ケアと管理事項は広範囲に及び、介護者への負担が大きい。介護者は、患者のセルフケアを支援する中でストレスや負担を抱えるため医療チームにおける長期的な支援の必要性が報告されている<sup>8)</sup>。一方で、介護者の経験は、患者の心不全悪化の時期から VAD 装着の時期、そして在宅移行の時期として段階を追って変化するが、実際の支援内容に関する報告は少ない<sup>9)</sup>。本プログラムを施行し、患者・家族への支援内容が適切であったのか、希望する支援は何かを明らかにすることが、今後の課題である。

#### 文献

- 1) Okura Y, Mahmoud M. Ramadan, Ohno Y, et al(2008)Impending Epidemic Future Projection of Heart Failure in Japan to the Year 2055.Circ J, 72, 489–491.
- 2) 許俊鋭,絹川弘一郎,遠藤美代子,柏公一,天尾理恵. (2014)補助人工心臓治療チーム実践ガイド.
- 3) 戸田宏一(2012)植込み型補助人工心臓時代のチーム医療. 人工臓器,41(1),72-75.
- 4) Murray MA, Osaki S, Edwards NM, et al(2009)Multidisciplinary approach decreases length of stay and reduces cost for ventricular assist device therapy. Interact Cardiovasc Thorac Surg 8: 84-8.
- 5) 木澤義之(2018)平成 29 年度厚生労働省委託事業 人生の最終段階における医療体制整備事業 これからの治療・ケアに関する話し合いアドバンス・ケア・プランニング. [https://square.umin.ac.jp/endoflife/shimin01/img/date/pdf/EOL\\_shimin\\_A4\\_text\\_04\\_16.pdf](https://square.umin.ac.jp/endoflife/shimin01/img/date/pdf/EOL_shimin_A4_text_04_16.pdf) (2019 年 10 月 1 日閲覧)
- 6) 中川俊一, 許俊鋭(2018)植込型 LVAD: 終末期医療・緩和医療 補助人工心臓治療チーム実践ガイド第 2 版.
- 7) Blumenthal-Barby J. S., Kostick K. M., Delgado E. D., et al. (2015) Assessment of patients' and caregivers' informational and decisional needs for left ventricular assist device placement:Implications for informed consent and shared decision-making, J. Heart Lung Transplant., 34(9), 1182–1189.
- 8) Kato N., Jaarsma T., Ben Gal T. (2014) Learning self-care after left ventricular assist device implantation, Curr. Heart Fail. Rep., 11(3), 290–298.
- 9) 永野 佳世, 神里 みどり(2017)在宅における補助人工心臓装着患者の介護者への療養支援の課題. 日本看護科学会誌,37,374-382.

## <医学・医療関連事業助成>

早産児の新生時期における脳内代謝物濃度と就学時期における神経発達評価との関連性

富安もよこ<sup>1,2</sup>

共同研究者：柴崎淳<sup>3</sup>、富田彩香<sup>4</sup>、相田典子<sup>1,5</sup>

所属部科名：1. 神奈川県立こども医療センター 放射線科、2. 量研機構 放射線医学総合研究所、3. 神奈川県立こども医療センター 新生児科、4. 亀田総合病院 新生児科、5. 横浜市立大学医学部放射線診断学講座

目的：早産児の新生児期における脳内代謝物濃度と、就学時での発達検査値（IQ）との関連性を調べ、神経学的発達の予後予測性を調べることである。方法：対象は56名の早産児〔在胎週数23-36、出生体重985g（445-1497）〕である。受胎後週数34-40にMRS（3T MRI, TE/TR=30/5000ms）を深部灰白質・半卵円中心から得て、定量解析によりN-アセチルアスパラギン酸、クレアチン、コリン、グルタミン酸・グルタミン、ミオイノシトールの濃度を得た。WISC-IV 知能検査により全検査IQと4つの指標得点を得て、それぞれ2群間（IQ > 85、≤85）の代謝物濃度を共分散分析（受胎後週数を共変量）により比較した。結果：受胎後週数の増加に伴う濃度増加がコリン以外の代謝物にみられた。全検査IQでは、[IQ > 85 n=39、IQ 95（86-126）；≤85 n=17、IQ 80（58-85）]であった。全検査IQと4つの指標得点のいずれも2群間で代謝物濃度の有意差はなかった。結論：新生児期の代謝物濃度増加は成長による変化と考えられた。就学時の発達について代謝物濃度の予後予測性は低いことが示唆された。

## <医学・医療関連事業助成>

早産児の新生時期における脳内代謝物濃度と就学時期における神経発達評価との関連性

富安もよこ<sup>1,2</sup>

共同研究者：柴崎淳<sup>3</sup>、富田彩香<sup>4</sup>、相田典子<sup>1,5</sup>

所属部科名：1. 神奈川県立こども医療センター 放射線科、2. 量研機構 放射線医学総合研究所、3. 神奈川県立こども医療センター 新生児科、4. 亀田総合病院 新生児科、5. 横浜市立大学医学部放射線診断学講座

【目的】早産児は予後において神経学的障害のリスクが高いことが報告されている[1]。一般に予後予測の早期指標として、脳 MRI 画像、神経学的症状また脳波などの電気生理学的検査などが用いられているが、新生児の病態は仮死などに代表されるように、幼児以降と大きく異なり、予後の予測は非常に困難であることがしばしば経験される。

プロトン MR スペクトロスコピー（以下、MRS と略す）は、多くの医療機関において画像診断に用いられている MRI 装置を用いて、複数種類の脳内代謝物濃度を非侵襲的に知ることができる手法である。神奈川県立こども医療センター（以下、こども医療と略す）では、臨床ルーチン脳 MR 検査の際に MRS データを収集、定量解析を行っている。MRS データから得られた脳内代謝物濃度を用いた早産児の新生児期における予後予測能について、4 歳までの発達に関する報告はあるが、それ以降の年齢については報告されていない。またそれぞれの代謝物濃度ではなく、代謝物ピーク比（NAA/Cr など）が用いられている[2-5]。本研究は、こども医療でこれまでに収集された MRS データを利用し、早産児の新生児期における脳内代謝物濃度値と、就学時の神経学的発達との関連性を目的とした。

【方法】対象：本研究は、後ろ向き研究である。対象は、2010 年 3 月から 2013 年 12 月に出生し、こども医療の新生児集中治療室に入院していた早産児である。被験者の選択基準は、以下とした：在胎週数 23-36 週、出生体重 1500g 以下、3T MR 装置によるルーチン脳 MRI および MRS 検査が受胎後週数 34-40 週に施行、WISC-IV による知能検査が就学時に施行



されている。2019 年 8 月の時点で 56 名（男子 30 名）である（出生体重 985g（中央値）、445-1497g）。脳 MR 検査：全ての MRI・MRS 検査は、臨床 3T MR 装置（シーメンス社、ドイツ）、32 チャンネルヘッドコイル（直径 22cm）を用いて行われた。MRS は、PRESS シーケンス[6]（TE/TR:30/5000ms, 積算回数 6-30）により、灰白質領域の深部灰白質（基底核と視床）および白質領域の半卵円中心からデータを収集した（選択体積 2.4-7.1 ml）。

脳内代謝物濃度定量化：定量解析ソフトウェア LCModel[7]を用い、選択領域の水濃度を 48.9M [8]とし、MRS データから 5 つの主要代謝物濃度を求めた：N-アセチルアスパラギン酸および N-アセチルアスパルチルグルタミン酸の総値（tNAA）、クレアチンおよびホスホクレアチンの総値（tCr）、グリセロホスホコリン（コリン含有の化合物含む）およびホスホコリンの総値（tCho）、グルタミン酸およびグルタミンの総値（Glx）、ミオ-イノシトール（Ins）。発達評価：6-7 歳時に臨床心理士により WISC-IV 知能検査が行われ、全検査 IQ と 4 つの指標得点（言語理解、知覚推理、ワーキングメモリー、処理速度）を得た。

統計解析：WISC-IV の結果 5 つ（全検査 IQ と 4 つの指標）について、それぞれ発達良好群（IQ>85）および発達遅滞群（IQ≤85）の 2 群に分け、2 群間の代謝物濃度を受胎後週数を共変量とした共分散分析により比較し、 $p < 0.05$  で有意とした。

【結果】早産児の MR スペクトルは 5 つの主要代謝物（tNAA、tCr、tCho、Glx および Ins）がはっきりと観測され、また乳酸のダブルピークもしばしば観測されている（図 1）。

56 名の対象者から、深部灰白質 55、半卵円中心 56 の MR スペクトルが得られた。受胎後週数の増加に伴う代謝物濃度の増加が、深部灰白質で tNAA、tCr、Glx、Ins、半卵円中心で tNAA、tCr にみられた。また、全検査 IQ では、発達良好群 [n=39、IQ 95 (86-126)、中央値(範囲)]、発達遅延群 [n=17、IQ 80 (58-85)] であった。代謝物濃度を以下に示す [全検査 IQ による発達良好群；発達遅延群、mM、中央値(範囲)]。深部灰白質 tNAA [3.88 (2.49-5.60)；

4.15 (2.38-5.50)]、tCr [6.23 (4.67-7.61)；6.40 (4.69-7.44)]、tCho [2.40 (1.57-2.79)；2.43 (2.20-2.73)]、Glx [7.01 (3.88-8.94)；7.36 (5.02-10.18)] Ins [7.67 (5.25-9.05)；7.93

(6.24-9.15)]、半卵円中心 tNAA [3.24 (2.13-5.09) ; 3.44 (2.25-5.42)]、tCr [4.57 (3.725-6.9) ; 4.54 (3.82-5.84)]、tCho [2.00 (1.49-2.65) ; 1.92 (1.66-2.24)]、Glx [6.74 (4.94-10.02) ; 6.72 (5.24-9.49)]、Ins [8.21 (6.75-9.70) ; 8.26 (6.71-9.29)]。全検査 IQ と 4 つの指標得点のいずれにおいても代謝物濃度は発達良好・遅延群間で有意差はなかった。

【考察】 受胎後週数と複数の代謝物濃度との相関は、新生児期の成長による変化と考えられ、先行研究と傾向が一致していた[9]。発達良好・発達遅滞 2 群間での有意差の無さから、新生児期の代謝物濃度を用いた年齢 6 歳時の発達についての予後予測性は低いことが示唆された。2019 年 12 月まで対象者は増える予定であり、また運動発達やてんかんの有無なども考慮に入れた検討も今後行う予定である。

#### 【学会発表】

1. 富安もよこ、相田典子ら他. 早産児の新生児期における脳内代謝物濃度／脳容積／DKI 解析値の発達の予後予測性の検討. 第 46 回日本磁気共鳴医学会大会. 金澤. 2018. 9. 8.
2. 富田彩香、富安もよこら他. 早産児における予定日相当の脳内代謝物濃度と 6 歳時知能検査(WISC-4)の関連性. 第 47 回日本磁気共鳴医学会大会. 熊本. 2019. 9. 21.

(予定)

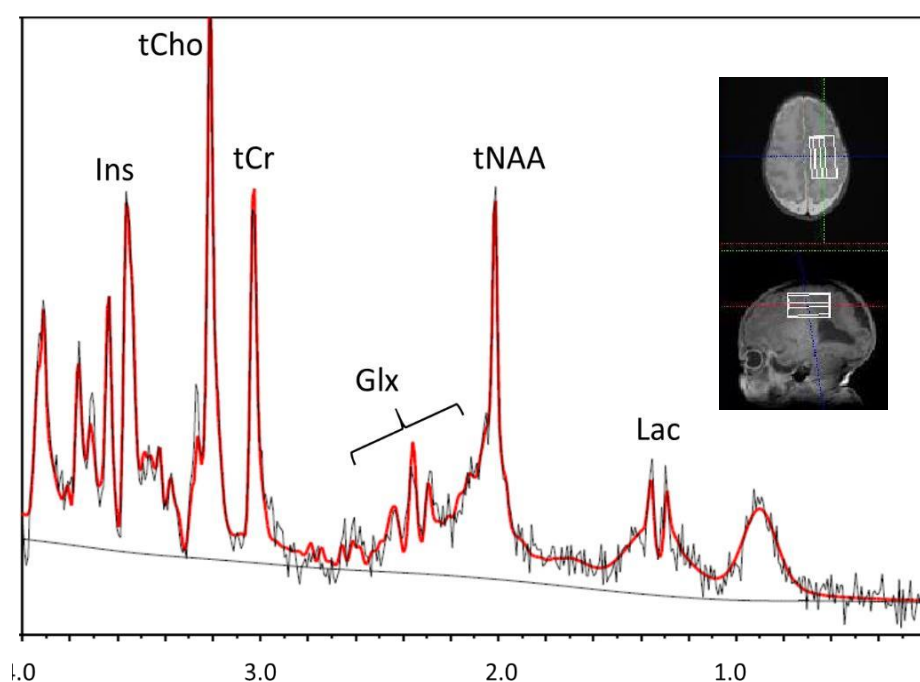


図 1. MR スペクトルフィッティングの一例. 新生児（受胎後週数 36 週齢）の半卵円中心領域（7.1 mL）。画像中の白いボックスが選択領域を示す。Lac, 乳酸。

【文献】

1. Larroque, B., et al., Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation: a longitudinal cohort study. *Lancet*, 2008. 371: p. 813-20.
2. Augustine, E.M., et al., Can magnetic resonance spectroscopy predict neurodevelopmental outcome in very low birth weight preterm infants? *J Perinatol*, 2008. 28(9): p. 611-8.
3. Van Kooij, B.J., et al., Cerebellar volume and proton magnetic resonance spectroscopy at term, and neurodevelopment at 2 years of age in preterm infants. *Dev Med Child Neurol*, 2012. 54(3): p. 260-6.
4. Kendall, G.S., et al., White matter NAA/Cho and Cho/Cr ratios at MR spectroscopy are predictive of motor outcome in preterm infants. *Radiology*, 2014. 271(1): p. 230-8.
5. Hyodo, R., et al., Magnetic resonance spectroscopy in preterm infants: association with neurodevelopmental outcomes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2018. 103(3): p. F238-F244.
6. Bottomley, P.A., Spatial Localization in Nmr-Spectroscopy Invivo. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1987. 508: p. 333-348.
7. Provencher, S.W., Estimation of Metabolite Concentrations from Localized in-Vivo Proton Nmr-Spectra. *Magnetic Resonance in Medicine*, 1993. 30(6): p. 672-679.
8. Williams, L.A., et al., Neonatal brain: Regional variability of in vivo MR imaging relaxation rates at 3.0 T-initial experience. *Radiology*, 2005. 235(2): p. 595-603.

9. Tomiyasu, M., et al., Neonatal brain metabolite concentrations: an in vivo magnetic resonance spectroscopy study with a clinical MR system at 3 Tesla. PLoS One, 2013. 8(11): p. e82746.

<医学・医療関連事業助成>

インターネットを活用した県内産科クリニックとの胎児心疾患動画像の共有による胎児心エコースクリーニング普及のための活動

川滝元良

神奈川県立こども医療センター新生児科

IT 技術の急速な進歩は、医療の世界にも大きなインパクトを与えている。近い将来普及する 5G の技術が導入されれば、品質、スピードの点で、さらに大きな恩恵を受けられると期待されている。しかしながら、日常診療においては、従来のペーパーと郵便という旧態以前とした仕組みがまだ踏襲されている。我々は、インターネットとテレビ会議システムを活用して、胎児異常症例を紹介いただいた県内の産科医との間で胎児心エコーの動画を共有する新しい取り組みを始めることにした。参加施設からの反応は極めて良好であった。この取り組みは胎児診断の普及、スクリーニング技術の向上に大いに寄与すると考える。簡単になったとはいえ IT 技術に心理的に高いハードルを持つ参加施設が多く、広く普及するのは簡単ではないと思われる。IT エンジニアのサポートを期待したい。

このような新しい取り組みには、病院全体、行政の物心両面でのサポートが必須である。今後、学会や行政に働きかける必要がある。今回の我々の試みは、現状に対する一石を投じるものとする。今後も、継続して取り組んでいきたい。

## <医学・医療関連事業助成>

インターネットを活用した県内産科クリニックとの胎児心疾患動画像の共有による胎児心エコースクリーニング普及のための活動

川滝元良

神奈川県立こども医療センター新生児科

### 1.事業の目的及び意義

重症心疾患の胎児診断により、救命が困難であった症例が救命できるようになった。しかし、今なお胎児診断率が低い疾患もあり、さらなる胎児スクリーニングの普及が待たれている。近年、インターネットなどのIT技術やテレビ会議システムが長足の進歩を遂げている。これらの技術を活用すれば、動画を含む複雑な情報をリアルタイムに紹介元の産科医と共有することが可能と考えられる。我々は、数年前から、IT技術を活用した遠隔医療を模索してきた。胎児スクリーニングには高度の技術が必要となる。動きのある心臓の胎児心エコー所見を書面で伝えることは必ずしも十分とはいえない。我々は、インターネットとテレビ会議システムを活用して、県内、国内、国外向けに数多くのセミナーを開催してきた。その経験を踏まえて、胎児異常症例を紹介いただいた県内の産科医との間で胎児心エコーの動画を共有する新しい取り組みを始めることにした。

### 2.方法

- 1)産科クリニック,病院産科との間でインターネット回線を接続する
- 2)テレビ会議システム(Vydio,または Zoom)を使って双方向性に接続する
- 3)胎児紹介いただいた症例の神奈川県立こども医療センター（以下 KCMC）で行った胎児心エコー精査の動画、胎児MRIなどの画像情報を産科クリニックに配信する。出生後の経過や画像についても、動画を交えて報告する。
- 4)質問に対してリアルタイムに答える
- 5)参加施設の要望があれば、疾患についての解説、胎児心エコーの操作法などの解説を行う
- 6)この活動についての感想意見などを聞き取り調査した。

### 3. 遠隔配信の仕組み

- 1)産科施設側で用意するもの

原則的には、各施設が自力で準備を行う方針とした

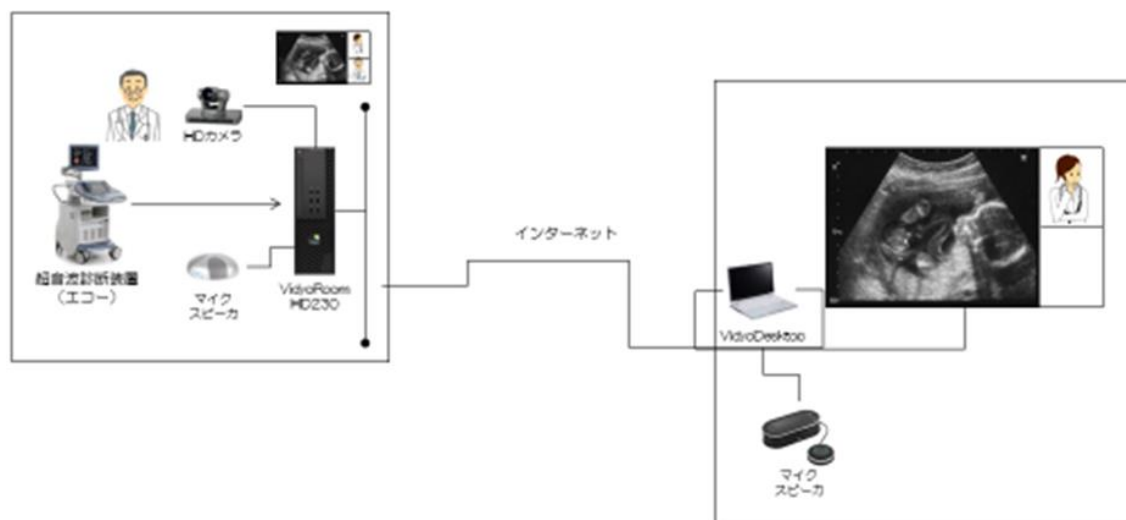
- (1)インターネット環境（できれば有線LAN、ない場合はwifi)
- (2)インターネットに接続可能なPC
- (3)マイクとスピーカー（PC内臓でも可）
- (4)テレビ会議システム用のソフト(Vydio または Zoom)のPCへのインストール



## 2)KCMC 側で用意するもの

- (1)インターネット環境（有線 LAN または無線 LAN）
- (2)インターネットに接続可能な PC
- (3)マイク,スピーカー,meeting camera, ビデオキャプチャーなどの周辺機器
- (4) テレビ会議システム（Vydio または Zoom）のライセンス

概念図は以下のとおりである。



## 4.結果

### 1) 実施施設

昨年 8 月から本年 7 月までの 1 年間に、延べ 50 施設と上記活動を行った。内訳は、神奈川県内の産科クリニックがのべ 35 回、神奈川県内の病院産科がのべ 5 回、神奈川県外の産科施設がのべ 10 回であった。

### 2) 実施時間帯、所要時間

原則的に、夕方の診療終了後に行った。1 回に要した時間は 15 分から 45 分、平均 30 分であった。

### 3) 通信環境の準備

原則的には、各施設が自力で準備を行う方針ではあったが、一部の施設では、ドクターや検査技師だけでは準備ができず、施設の IT に知識のある事務職員に手伝っていただくこともあった。どうしても自力で準備ができなかった施設では、著者が施設に出向いて、準備を手伝った。また、必要に応じて、IT エンジニアに遠隔でのサポートを受けた。2 回目以後はすべて自力で準備をすることができた。

### 4) 終了後の聞き取りによって、以下のような感想をいただいた。

- (1) 従来のペーパーによる報告に比べて、胎児エコー動画を見ながらのフィードバックにより、胎児エコーの詳細な情報を知ることができた。
- (2) 従来の報告は時間がかかりすぐに情報を得ることが難しい場合が多かったが、このシステムでは、出生後の時間をおかずにタイムリーに報告を受けることができた。

- (3) 遠隔は難しいものとの先入観をもっていたが、実際やってみると意外に簡単であった。
- (4) すべての施設で今後も継続したいとの希望をいただいた。
- 5) この活動によって以下の効果がえられた。
  - (1)紹介症例に対する報告を、従来にない新しい形で行うことができた。
  - (2)県内の産科施設との間で、従来以上に緊密な関係を構築することができた。特にあらたに開業された産科施設との関係を構築するうえで極めて有効であった。
  - (3)参加施設に勤める検査技師との個人的な関係を構築することができた。希望する検査技師には、KCMCでの研修を提供し、より効果的なトレーニングを積んでいただくきっかけになった。そのうち2症例について、技師さんによる学会発表にこぎつけることができた。
- (4)KCMCへの胎児紹介症例が増加した。特に、従来紹介症例のほとんどなかった施設からの紹介が増加した。胎児診断症例の増加は心臓外科手術件数の増加につながり、KCMCの収益に貢献した。
- (5)東北地方の産科施設や大学病院との間で同様の活動を行い、重症心疾患の胎児紹介につなげることができた。

## 5.考察

新しいフィードバックの試みを行い、参加施設からの反応は極めて良好であった。この取り組みは胎児診断の普及、スクリーニング技術の向上に大いに寄与すると考える。また、KCMCにとってもこの活動により胎児紹介症例が増加し、収益改善に寄与すると考える。

問題点は、簡単になったとはいえIT技術に心理的に高いハードルを持つ参加施設が多く、広く普及するのは簡単ではないと思われる。ITエンジニアのサポートを期待したい。

このような取り組みには、病院全体、行政の物心両面でのサポートが必須である。今後、学会や行政に働きかける必要がある。

IT技術の急速な進歩は、医療の世界にも大きなインパクトを与えている。近い将来普及する5Gの技術が導入されれば、品質、スピードの点で、さらに大きな恩恵を受けられると期待されている。しかしながら、日常診療においては、従来のペーパーと郵便という旧態以前とした仕組みがまだ踏襲されている。今回の我々の試みは、そのような現状に対する一石を投じるものとする。今後も、継続して取り組んでいきたい。

## 6.論文および学会発表

### 1) 第23回日本遠隔医療学会 ワークショップ2 周産期遠隔医療の現状と展望

インターネットを活用した県内産科クリニックとの胎児心疾患動画像の共有による  
胎児心エコースクリーニング普及のための活動

川滝元良

### 2) 日本検査技師学会

胎児スクリーニングにて経験した血管輪の一症例

塩野真弓 新横浜母と子の病院 検査科

川滝元良 神奈川県立こども医療センター 新生児科

3) 関東甲信越地方会

胎児スクリーニング検査に苦慮した右横隔膜ヘルニアの一例

塩野真弓 新横浜母と子の病院 検査科

川瀧元良 神奈川県立こども医療センター 新生児科

<医学・医療関連事業助成>

ブラジル日系永住者巡回診療健診フィールドワーク

水嶋 春朔

横浜市立大学医学群医学部

抄録

2018年に移民110周年を迎えた日系ブラジル人の人口は190万を超え、日本と食環境が大きく異なるブラジルでは、肉や砂糖の摂取量が増えた結果、肥満、糖尿病、虚血性心疾患、動脈硬化系疾患が多くなっている。森口エミリオ秀幸客員教授（南リオグランデ連邦大学医学部内科学・老年内科学教授、南日伯援護協会副会長）が実施している在ブラジル日系永住者（南部2州サンタカタリーナ州、南リオグランデ州）を対象とした巡回診療健診（7月）に医学部医学科6年有志2名と参加して、日本語による健診・保健指導のフィールドワークを行った。サンタカタリーナ州2ヶ所、南リオグランデ州6ヶ所での巡回診療健診（計2,200km走破）には、計156名が参加し、夜間尿（約8時間分相当）からの尿中ナトリウム排泄量測定、身体計測、血圧測定、心電図検査および問診を行った。日系移住者135名（男性71名、女性64名）を解析対象とした。肥満、高血圧、糖尿病、脂質異常症の割合が高かったが、喫煙率は男性16.9%、女性4.7%と国民健康栄養調査結果（男性30.2%、女性8.2%）より低く、飲酒率も低く、健康意識が高いことがわかった。

<医学・医療関連事業助成>

ブラジル日系永住者巡回診療健診フィールドワーク

水嶋 春朔

横浜市立大学医学群医学部

1. 目 的

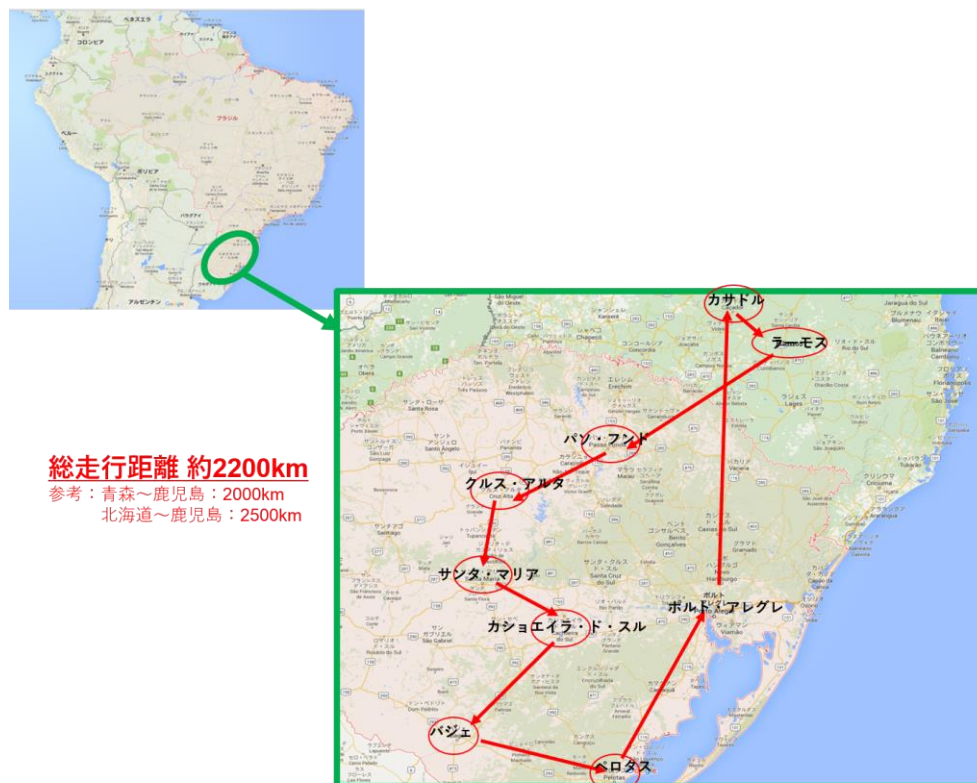
2018 年に移民 110 周年を迎えた今日、日系ブラジル人の人口は 190 万を超え、1 世 12%、2 世 31%、3 世 42%、4・5 世 15%からなる。日本と食環境が大きく異なるブラジルでは、肉や砂糖の摂取量が増え、野菜や魚の摂取量が減り、その結果、肥満、糖尿病、虚血性心疾患、動脈硬化系疾患が多くなっている。森口エミリオ秀幸客員教授（南リオグランデ連邦大学医学部内科学・老年内科学教授、南日伯援護協会副会長）が実施している在ブラジル日系永住者（日系 1 世が多い南部 2 州サンタカタリーナ州、南リオグランデ州）を対象とした巡回診療健診（7 月）に医学部医学科 6 年有志 2 名と参加して、日本語による健診・保健指導ならびに地域診断（集団のアセスメント）のフィールドワークを行い、医療機関へのアクセスが制限された集団における地域保健医療福祉のあり方について理解を深めることを目的とした。

これまで平成 21 年度 3 名（自主参加、学長奨励賞受賞）、22 年度 5 名（横浜市立大学海外 FW 支援プログラム採択）、23 年度 6 名（海外 FW）、24 年度 4 名（海外 FW）、25 年度 4 名（自主参加 2 名、海外 FW 2 名）、26 年度 7 名（海外 FW）の実績があり、大学 HP 広報にて紹介されるなど高く評価されている。

2. 方 法

ブラジル南部のサンタカタリーナ州 2 ヶ所、南リオグランデ州 6 ヶ所での巡回診療健診では、夜間尿（約 8 時間分相当）からの尿中ナトリウム排泄量測定（減塩モニタ®河野エムイー株式会社使用）、身体計測（身長・体重・腹囲）、血圧測定（OMRON Digital Blood Pressure Monitor HEM-907、3 分間の安静後 3 回測定し、2 回目と 3 回目の測定値を使用）、心電図検査（安静時およびマスターダブル負荷、三栄メディシス ECG-Explorer500A）および問診（特定健診の問診内容を含む）を担当し、データ入力集計、日本の国民健康栄養調査結果と比較した。巡回

診療健診用バス（11 席）の全走行距離は 2,200km（青森～鹿児島：2,000km）に及んだ。



### 3 .結 果

| 巡回診療健診地区  | 実施日       | 受診者数 | 日系移住者 | 会場 |
|-----------|-----------|------|-------|----|
| カッサドル     | 7月 16日    | 14   | 14    | 会館 |
| ラーモス      | 7月 17-19日 | 64   | 54    | 会館 |
| パッソフンド    | 7月 20日    | 16   | 12    | 民家 |
| クルツアルタ    | 7月 21日    | 3    | 3     | 民家 |
| サンタマリア    | 7月 22日    | 16   | 16    | 民家 |
| カショエイラドスル | 7月 23日    | 13   | 12    | 民家 |
| バジエ       | 7月 24日    | 5    | 5     | 民家 |
| ペロタス      | 7月 24-25日 | 25   | 24    | 会館 |
| 総計        |           | 156  | 140   |    |

サンタカタリーナ州 2ヶ所、南リオグランデ州 6ヶ所での巡回診療健診には、計 156 名が参加し、問診等の欠損値のない日系移住者 135 名（男性 71 名、女性 64 名）を解析対象者とした。



肥満（BMI25 以上：男性 45.1%、女性 32.8%）、腹囲基準値以上（男性 76.1%、女性 53.1%）、高血圧（基準以上あるいは服薬者：男性 47.9%、女性 62.5%）、糖尿病（基準以上あるいは服薬者：男性 32.4%、女性 23.4%）、脂質異常症（基準以上あるいは服薬者：男性 64.8%、女性 57.8%）の割合が高かった。尿中食塩排泄量の平均は男性 10.3g、女性 8.8g と同程度であった。喫煙率は男性 16.9%、女性 4.7%と国民健康栄養調査結果（男性 30.2%、女性 8.2%）より低く、飲酒率（男性 56.3%、女性 20.3%）も低く、また 1 日 1 時間以上の 3 メッツ以上の運動をすると回答した者の割合は男女ともに 70%と高く、健康意識が高いことがわかった。

#### 4. 考 察

肥満を背景にした高血圧、糖尿病、脂質異常症が多かった。低い喫煙率やアルコール摂取率、健康への高い関心に比して日系永住者で生活習慣病が多い理由の 1 つとして食生活の違いが考えられる。ブラジルの食生活の特徴として肉類の摂取が多いこと、甘味料や塩分などにより強めに味付けされる傾向がある。

#### 5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

特になし

<医学・医療関連事業助成>

神奈川県結核患者における疫学的特徴と分子疫学的解析に関する研究

近内 美乃里

横浜市立大学大学院医学研究科医学教育学 博士課程  
神奈川県平塚保健福祉事務所保健予防課

抄録

高齢者結核の主な要因に既感染からの発病である内因性再燃があるが、幼少期の結核罹患率により、その発病や結核菌株に違いがあることが考えられる。本研究では、結核患者を生まれた年で10年ごとに分類し、各群の結核罹患率の年次推移と結核菌株のクラスター形成率を検討することにより、結核感染の動向を明らかにすることを目的とした。対象は2007年1月1日から2016年12月31日に神奈川県内の対象保健所に登録された肺結核及び肺外結核患者4843例とし、326例で結核菌の遺伝子型検査を実施した。結核罹患率の年次推移では、1935年以前に生まれた群で年齢が高くなると結核罹患率の増加傾向が認められ、各群の平均結核罹患率に有意差が認められた。各群におけるクラスター形成率では有意差は認めなかったが、1906～1935年生と1936～2005年生ではクラスター形成率に有意差が認められた。1935年以前に生まれた群では、1936年以降に生まれた群よりもクラスター形成率が低い傾向にあり、平均結核罹患率も高いことから、内因性再燃の関与が考えられ、1940年代以降の日本の結核対策による結核罹患率の低下との関連が示唆された。

## ＜医学・医療関連事業助成＞

神奈川県結核患者における疫学的特徴と分子疫学的解析に関する研究

近内 美乃里

横浜市立大学大学院医学研究科医学教育学 博士課程  
神奈川県平塚保健福祉事務所保健予防課

### 1. 目 的

結核とは、結核菌がヒトからヒトに感染することでおこる慢性感染症であり、感染から発病に至るまでの期間の多くは6か月から2年とされるが、その後も発病の可能性がある。このことにより結核発病の主な要因として、既感染からの発病である内因性再燃と新たな感染からの発病である外来性感染が指摘されている。日本の新規登録結核患者は高齢者に多く、60歳以上が約7割、80歳以上が約4割を占めているが、高齢者の中でも罹患率（人口10万対）の世代間格差が指摘されており、2017年では60歳以上のうち、最も高い罹患率92.7（90歳以上）に対して最も低い罹患率9.5（60～64歳）と約9倍の差が報告されている。高齢者に結核が多い要因の一つとして、幼少期の感染による内因性再燃が指摘されているが、日本の結核死亡率は1940年代後半から減少し、結核罹患率も1950年代以降減少している。最近の感染からの発病では、同一の遺伝子型が疑われる集団（クラスター）を形成することがあり、その形成率を検討することで、最近の感染伝播かどうかの指標となりうる。本研究では、結核患者を生まれた年で10年ごとに分類し、その罹患率の推移と結核菌の遺伝子型についてクラスター形成率を検討することにより、結核感染の動向を明らかにし、今後さらに増加が予想される高齢者における結核発病や低まん延化にむけた結核対策を検討するうえでの基礎資料とすることを目的とする。

### 2. 方 法

2007年1月1日から2016年12月31日に対象保健所管内（人口352万人）で保健所の結核登録者情報システムに登録された肺結核および肺外結核患者4843例を対象とし、生まれた年により10年ごとに分類（G1：1906～15年生、G2：1916～25年生、G3：1926～35年生、G4：1936～45年生、G5：1946～55年生、G6：1956～65年生、G7：1966～75年生、G8：1976～85年生、G9：1986～1995年生、G10：1996～2005年生、G11：2006～2015年生）し、各群の罹患率（人口10万対）の年次推移について移動平均を算出、平均罹患率を分散分析で検討した。さらに、反復配列数多型解析法（variable numbers of tandem repeats, VNTR解析法）によりJATA12領域の結核菌

遺伝子型別を実施した 326 例（外国生まれを除く）について、各群におけるクラスター形成率をカイ二乗検定で検討した。なお、VNTR 解析法による遺伝子型別で解析した JATA12 領域で反復数が完全に一致したものをクラスターとした。

### 3. 結 果

罹患率（人口 10 万対）は、各症例が保健所に登録された年の各生年別の登録数を分子、該当年の保健所管内の生年別の人口を分母とし、人口 10 万人当たりとして求めた。罹患率の年次推移は、（Ⅰ）増加後に低下（G2 罹患率：78.3～108.7）、（Ⅱ）増加傾向（G3 罹患率：46.4～60.2）、（Ⅲ）一定（G4 罹患率：18.6～21.3、他）の 3 パターンに分類できた（図 1）。平均罹患率は G1:83.1、G2:93.5、G3:50.1、G4:19.9、G5:13.3、G6:11.1、G7:8.6、G8:10.5、G9:7.48、G10:0.77、G11:0.47 と各群間に有意な差が認められた。さらに、VNTR 法による JATA12 領域の結核菌遺伝子型検査を実施した 326 例は、男性 220 例のうち 80 例（36%）が 40 クラスター（クラスター数 2～12）、女性 106 例のうち 42 例（40%）が 23 クラスター（クラスター数 2～12）を形成した。各群別では、G1:1 例（50%）、G2:8 例（21%）、G3:27 例（33%）、G4:20 例（29%）、G5:21 例（48%）、G6:12 例（46%）、G7:13 例（54%）、G8:12 例（52%）、G9:6 例（40%）、G10:2 例（100%）がクラスターを形成し、G11 では結核菌が得られなかった（図 2）。各群のクラスター形成率についてカイ 2 乗検定を行ったが、有意差は認められなかった。また、平均罹患率の年次推移に増加傾向が認められた 1906～1935 年生（G1～G3）36 例（29%）と一定の傾向が認められた 1936～2015 年生（G4～G11）86 例（42%）のクラスター形成率についてカイ 2 乗検定を行ったところ、有意差が認められた。

### 4. 考 察

1940 年代の BCG 接種の実施、抗結核薬の開発をはじめ、1955 年の「結核予防法」の改正などの結核対策により、日本の結核罹患率は 1950 年代以降減少傾向にある。日本の高齢者結核の多くが、既感染からの内因性再燃が主な要因とされる一方、近年最近の感染からの発病とみられる高齢者結核の集団感染事例も報告されている。1935 年以前に生まれた群では罹患率の年次推移が増加傾向にあり、各群の平均罹患率に有意差が認められることから、結核罹患率が高い時期に幼少期を過ごしたこととの関連が示唆され、日本の結核対策により結核罹患率が低下するとともに既感染率が低下していることが考えられる。また、10 年ごとに生まれた年で分類した群によるクラスター形成率では有意差は認められなかったが、1935 年以前に生まれた群では、1936 年以降に生まれた群よりもクラスター形成率が低い傾向にあった。同一の結核菌による最近の感染伝播によりクラスターが形成されることから、1935 年以前に生まれた群では、既感染からの発病の割合が高いことが示唆された。本研究で用いた JATA12 領域による VNTR 解析法では、疫学的関連性が不明である場合、同一

の菌株でない菌株をクラスターと判定している可能性があるため、本来のクラスター形成率はより低い可能性がある。今後、結核菌の地域における感染伝播や感染動向を検討していくためには、さらに疫学的要因を集積していく必要があると考えられる。

## 5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

本研究は、第78回日本公衆衛生学会総会（2019年10月23日～10月25日）において発表する予定である。

図1：10歳生年別結核罹患率の推移

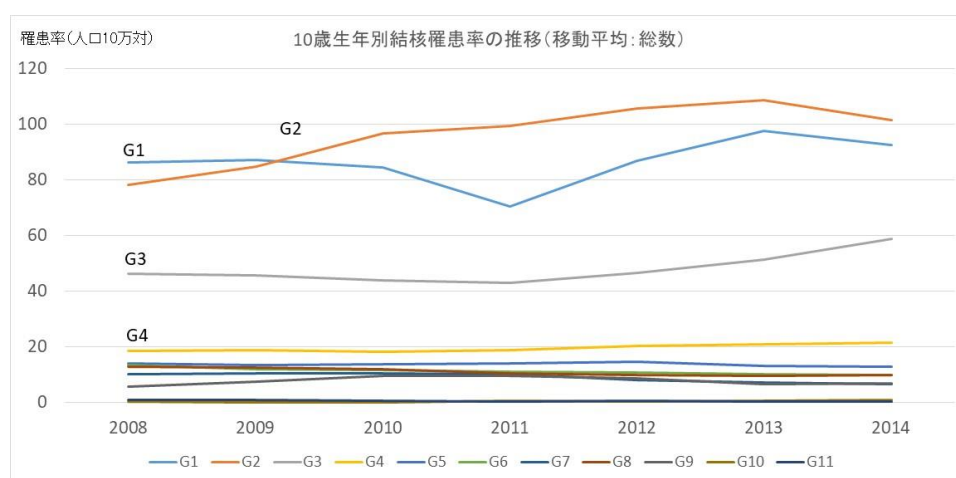
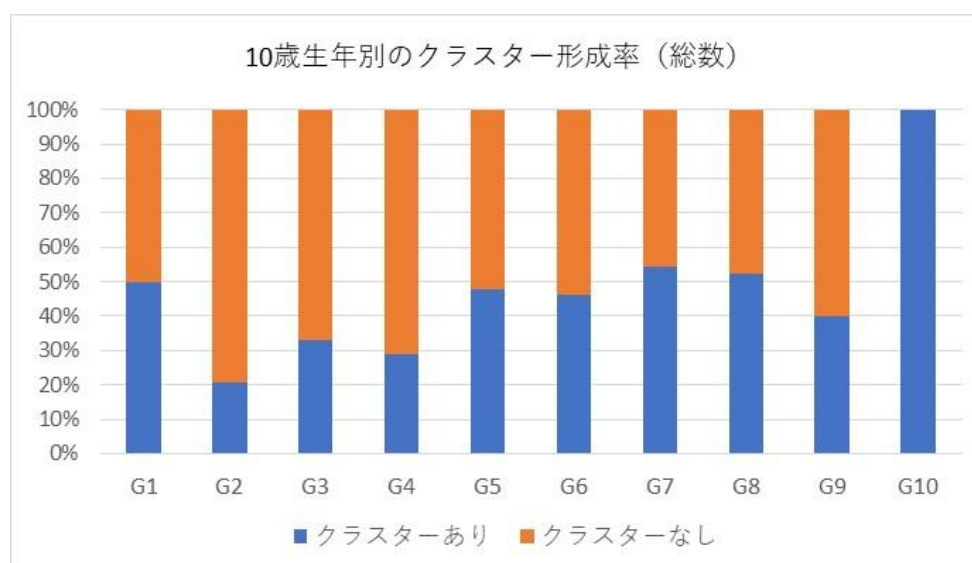


図2：10歳生年別のクラスター形成率



<平成 29 年度 医学・医療関連事業助成>

## Senning 手術施行患者に対する遠隔期アンケート調査

小林 真理子  
麻生 俊英

神奈川県立こども医療センター 心臓血管外科

抄録

【背景】動脈スイッチ手術(Jatene 手術)の登場以前は、心房スイッチ手術である Senning 手術が完全大血管転位症に対する一般的な術式であった。Senning 手術後患者の遠隔成績および生活状況や Quality of life (QOL)のアンケート (SF-36)調査にて評価することを目的とする。

【対象】1984 年～1988 年に同一外科医により施行された連続 Senning 手術 20 例が対象。手術時年齢は 10 カ月(2 カ月～7 歳)、体重は  $6.9 \pm 2.4$  kg。観察期間は 29.7 年(1 日～32.8 年)。

【結果】手術死亡 1 例。遠隔死亡 4 例。生存率は 30 年で  $71.3 \pm 10.9\%$ 。ペースメーカー (PMI) 回避率は 30 年で  $66.7 \pm 12.2\%$ 。遠隔期検査所見では CTR  $50.9 \pm 5.5\%$ 、TR moderate 以上はなし。アンケート調査では 8 名の回答が得られ、7 例が NYHA I 度。3 例が妊娠出産を経験。SF-36 では身体的 QOL は  $53 \pm 4$  であり国民標準値(50)に近似。

【まとめ】約 30 年の術後遠隔期において、PMI を必要とする不整脈はあるが、日常生活は支障なく送れ、健常人と同等の QOL で生活されていた。



## Senning 手術施行患者に対する遠隔期アンケート調査

小林 真理子

麻生 俊英

神奈川県立こども医療センター 心臓血管外科

### 1.目的

動脈スイッチ手術(Jatene 手術)の登場以前は、心房スイッチ手術である Senning 手術が完全大血管転位症(TGA (I 型))に対する一般的な術式であった。Senning 手術が施行され始めた 1970 年代からすでに 40 年以上経過し、体心室である右室の機能不全や三尖弁閉鎖不全(TR)、さらに上室性不整脈や心房内血流転換部位の狭窄などについて比較的良好な遠隔成績が報告されている。その一方で、遠隔期の実際の患者健康状態や内服状況等は報告がされていないのが現状である。当院においても、成人となり当施設から他施設へ紹介となった患者が多く、その後の経過が不明である。

当施設にて Senning 手術を施行した症例の記録をもとに周術期及び遠隔成績を評価するとともに、現在成人に達した症例を対象に健康状態についてのアンケート調査を行った。

### 2.方法

術者によるばらつきを排除するために 1984 年～1988 年に同一外科医により施行された Senning 手術、連続 20 例を対象とした。疾患は TGA (I 型) 17 例、TGA (II 型) 2 例、Criss-cross heart (CCH) 1 例。Senning 手術時年齢(中央値)は 10 カ月(2 カ月～7 歳)、体重は  $6.9 \pm 2.4$  kg。男児は 14 例(70%)。遠隔追跡期間(中央値)は 29.7 年(1 日～32.8 年)で 2 例のみ遠隔追跡不可であった。

周術期成績並びに生存率、ペースメーカー植え込み(PMI)回避率、遠隔期での心胸郭比(CTR)、心臓カテーテル検査での解剖学的右室拡張末期圧(RVEDP)、心エコー検査での三尖弁(TV)の評価、運動負荷試験の結果を当院記録から後方視的に調査。また、現在の内服状況、生活状況についてのアンケート調査や Quality of life (QOL)のアンケート調査(SF-36)をおこなった。SF-36 (MOS short-form 36Item Health Survey) は世界で広く使われている自己報告式健康状態調査法であり、特定疾患や症状などに特有な健康状態ではなく、包括的な健康度を調査する目的で使用される。対象年齢は 16 歳以上であり、0～100 点の範囲で得点が高いほど良い健康度を表すように得点化されている。

### 3.結果

手術死亡は右心不全による 1 例。遠隔死亡は 4 例で、原因は右心不全 1 例、肺炎 1 例、不整脈 2 例であった。Kaplan-Meier 法による生存率は 30 年で  $71.3 \pm 10.9\%$  (Figure 1)。術後再手術は遺残心室中隔欠損の閉鎖 1 例と CCH の右室流出路形成が 1 例で、心房内血流転換部位の狭窄は認めなかった。再手術回避率は術後 30 年で  $94.7 \pm 5.1\%$  であった (Figure 2)。PMI は術後  $12 \pm 7$  年後で 5 例。PMI 回避率は 30 年で  $66.7 \pm 12.2\%$  であった (Figure 3)。

CTR は術後  $23 \pm 5$  年で  $50.9 \pm 5.5\%$ 、RVEDP は術後  $10 \pm 8$  年で  $10.7 \pm 3.5$  mmHg、 $20 \pm 7$  年での TV 逆流は 0~trivial が 7 例、mild が 8 例、moderate 以上はなかった。術後  $12 \pm 4$  年で施行した運動負荷試験では、最大心拍数  $171.8 \pm 16.9$  bpm、最大酸素消費量は男児で  $39.2 \pm 9.11$  ml/kg/min (対正常比 73%)、女児は  $33.0 \pm 2.1$  ml/kg/min (同 77%) であった。

15 例の生存者のうち、電話連絡が可能であった 10 例に現在の状況に関するアンケート調査を配布した結果、8 名 (80%) の回答が得られ、7 例が NYHA I 度、1 例が II 度であった。3 例が結婚、3 例が妊娠出産を経験。3 例が 1 剤 (ACE 阻害剤または抗血小板薬) の投薬中であった。さらにこの 8 例に SF-36 の調査票を配布したところ、7 例 (88%) の回答がえられ、身体的 QOL は  $53 \pm 4$ 、精神的 QOL は  $54 \pm 7$ 、社会的 QOL は  $48 \pm 5$  であり、国民標準値 (50) に近似した結果であった。

Figure 1

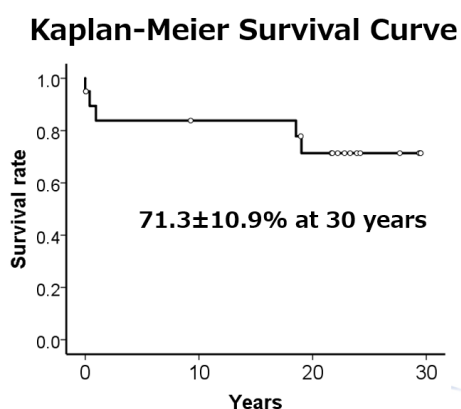


Figure 2

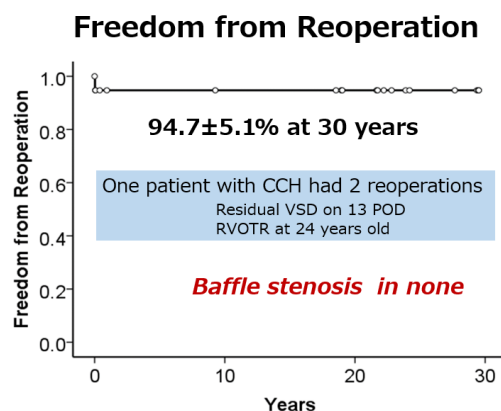
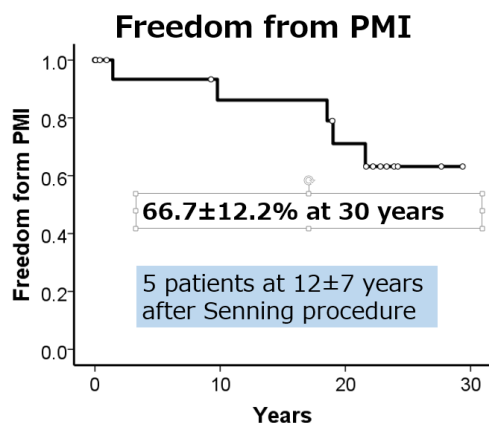


Figure 3



#### 4. 考察

術後 30 年の遠隔期において、PMI を必要とする不整脈の問題はあるが、危惧された右室機能不全、三尖弁閉鎖不全は問題となっておらず、日常生活は支障なく送れていた。術後 30 年経過した現在において、健常人と同等の QOL で生活されている。

Senning 手術の遠隔成績に関する報告では、2015 年のデンマークとスウェーデンとの合同症例報告では、観察期間中央値 26 年で Senning 術後の生存率は術後 20 年で約 65%（当施設 71%）であり、再手術回避率は 95%（当施設 95%）と良好であった。また、2003 年のトロントからの報告では観察期間の中央値 13 年の報告では、術後 10 年での生存率が 84%（当施設 86%）であり、再手術回避率は術後 10 年で 79%であり、その原因の約 50%は心房内血流転換部位の狭窄であった。当施設での心房内血流転換部位の狭窄に対する再手術はなく、当施設での良好な成績の理由には適切な右房や心房中隔切開ラインや丁寧な縫合が寄与したと考える。

当施設における良好な Senning 手術の遠隔成績と患者 QOL を含めた報告は、術式選択の見直しに貢献する可能性がある。術式の見直しについては、開発途上国の医療の現状を考えるとさらに現実味を帯びる。すなわち、動脈スイッチ手術は、その多くが TGA（I 型）で行われ、その至適年齢は生後 2 週間までとされる。しかし、開発途上国ではその多くが遅れて発見され（Late referral）治療が断念される事態となっている。一方、Senning 手術は生後 3 ヶ月が至適年齢であり動脈スイッチ手術非適応の Late referral の患者にとって福音となり、適応患者は飛躍的に増加すると思われる。先進国では、Senning 手術は動脈スイッチ手術の登場によって特殊な例を除いてはその役目を終えたが、開発途上国での新たな役目が浮上してきた。遠隔成績が懸念されてきたが、30 年前と異なり、心筋保護や術後管理の面では数段に進歩しているので急性期の成績も以前より数段向上すると予想できる。

#### 5. 論文及び学会発表

今後行う予定。

<指定寄附研究助成 心臓疾患研究>

収縮機能の保持された心不全における  $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷の病態への影響とその制御に関する検討

上村大輔

共同研究者：鈴木 徹， 涌井広道， 田村功一

所属部科名：循環器・腎臓・高血圧内科学

抄録：

心不全患者の約半数は収縮機能の保持された心不全（HFpEF）であり、現在までに十分な治療戦略が確立されていない。研究代表者は Dahl 食塩感受性ラット HFpEF モデルを用いて、このタイプの心不全では細胞内  $\text{Na}^{+}$ 濃度の上昇とそれに伴う心筋  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体（NCX）の  $\text{Ca}^{2+}$ 流入モード活性化による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が病態形成に関与している可能性を示してきた。本研究において我々は SGLT2 阻害薬が細胞膜上の  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ 交換体（NHE）の働きを阻害し細胞内  $\text{Na}^{+}$ の上昇および NCX を介した  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇を抑制することで、HFpEF の発症を抑制すると仮説を立てている。予備実験データでは、SGLT2 阻害薬の一つである Empagliflozin を投与された HFpEF モデルの心臓組織で、Type1 コラーゲンおよび BNP の mRNA が低下する可能性が示唆されており、仮説とした NHE および NCX を介した  $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷の軽減を介している可能性がある。確立された HFpEF 動物モデルを用いて、SGLT2 阻害薬の効果とメカニズムを検証する意義は大きく、今後の検討を継続していく予定である。

## <指定寄附研究助成 心臓疾患研究>

収縮機能の保持された心不全における  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷の病態への影響とその制御に関する検討

上村大輔

共同研究者：鈴木徹，涌井広道，田村功一

所属部科名：循環器・腎臓・高血圧内科学

### 1. 目的

心不全の約半数は左室収縮機能が保持され拡張機能障害を主体とする心不全 (HFpEF) であり、その頻度は増加傾向にある。また、収縮機能の低下した心不全 (HFrEF) は予後が改善しつつある状況とは反対に、HFpEF の予後は改善されておらず、これはこの病態に有効な治療戦略が十分に確立されていないことが原因である (Vasan RS, et al. J Am Coll Cardiol Img 11:1-11, 2018)。これまでに HFrEF に対して有効性がしめされた治療薬 (ACE 阻害薬、ARB、 $\beta$  遮断薬、アルドステロン拮抗薬など) は、HFpEF に対する大規模臨床試験で明らかな効果が示されず (Yusuf S, et al. Lancet 362:777-81, 2003; Cleland JG, et al. Eur Heart J 27:2338-45, 2006; Massie BM, et al. N Engl J Med 359:2456-67, 2008; Pitt B, et al. N Engl J Med 370:1383-92, 2014)、HFpEF の分子機序解明、新規治療標的発見が望まれている。

研究代表者は、これまでの検討において、ヒト HFpEF の病態モデルである、Dahl 食塩感受性ラット HFpEF モデルを用いて、このタイプの心不全では心筋細胞や心臓線維芽細胞において細胞内  $\text{Na}^+$  濃度の上昇とそれに伴う心筋  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体 (NCX) の  $\text{Ca}^{2+}$  流入モード活性化による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が病態形成に関与している可能性を示してきた (Kamimura D, et al. Eur Heart J 33:1408-16, 2012)。

大規模臨床試験において心不全の発症予防および予後延長効果があることが示唆されている SGLT2 阻害薬については In vitro の研究で心筋細胞膜上の  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換体の働きを阻害することで細胞内  $\text{Na}^+$  の上昇を抑制することが示されており、NCX を介した  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇も抑制されることが示唆されている。従って、今回の研究の目的は、収縮機能の保持された心不全における SGLT2 阻害薬の効果を検証して、そのメカニズムが  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換体の阻害による NCX を介した  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇の抑制に関与しているか検討するものである。

### 2. 方法

ダール食塩感受性ラットの HFpEF モデルにおいて 13 週齢 (代償性肥大型) より SGLT2 阻害薬である Empagliflozin を投与し、HFpEF 発症予防効果について検討する。プロトコルを段階的に以下のように設定した。

#### ① Empagliflozin の降圧効果の検討

Empagliflozin の投薬用量を 4 群にわけ (2.5mg/day, 5 mg/day, 10mg/day, 20mg/day) テールカフシステムを用いて 13 週齢から 17 週齢の 4 週間降圧効果を検討した。その際、17 週の回収時に左室心筋重量や肺重量、あるいは心検体を用いて BNP および Type1 コラーゲンの qPCR を施行した。

## ② Empagliflozin の降圧効果、循環血漿量に与える影響

テレメトリーシステムおよび Evans Blue 法を用いて①で選択した用量にさらに厳密な降圧効果および循環血漿量に対する影響を評価する。

## ③ Survival 試験

① で選択した用量の投与が無投薬群と比較して生存率を改善するかどうか検討する。

## ④ 病態生理を評価するための実験

① で選択した用量の投与により、心形態および機能に与える影響を心臓カテーテル、心エコー図などで評価する。さらに、心臓検体を用いて左室の肥大や線維化への影響、NHE や NCX を含めて Ca ハンドリング蛋白の蛋白量や mRNA 量などを適宜評価する。

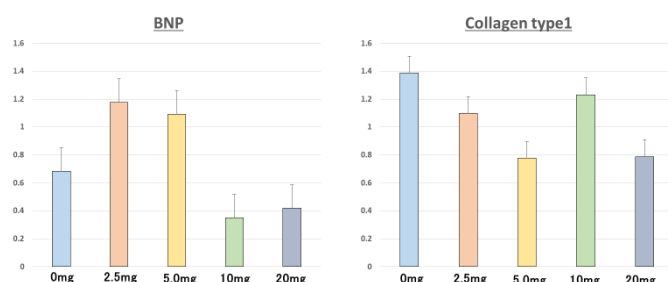
## 3. 結果

現段階では①の実験が終了した状況である。体重、血圧、脈拍および各種解剖結果を書きに示す。



|                                | Empagliflozin 0mg (n=2) | Empagliflozin 2.5mg (n=3) | Empagliflozin 5.0mg (n=2) | Empagliflozin 10mg (n=3) | Empagliflozin 20mg (n=3) |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Body weight (g)                | 316 ± 40                | 294 ± 34                  | 312 ± 11                  | 313 ± 22                 | 321 ± 15                 |
| LV weight/TL (mg/mm)           | 34 ± 3                  | 35 ± 2                    | 33 ± 1                    | 30 ± 2                   | 32 ± 3                   |
| LW/TL (mg/mm)                  | 47 ± 5                  | 59 ± 20                   | 51 ± 9                    | 38 ± 10                  | 47 ± 5                   |
| Right kidney weight/TL (mg/mm) | 41 ± 1                  | 44 ± 5                    | 45 ± 1                    | 41 ± 1                   | 42 ± 3                   |

LV weight/TL = left ventricular weight/tibial length, LW/TL = lung weight/tibial length



死亡個体がやや多かったため統計学的な処理は難しいが、得られたデータの中ではエンパグリフロジン 20mg/day 投与までの用量では降圧効果はなさそうであった。プロトコル①は降圧効果を見るのが目的であり、代償性肥大型後期で個体を **Sacrifice** しているので表現型は強くでない状況であるが、心重量や肺重量は投薬の用量が増えるとともに軽減している傾向にあり、また、心臓内での BNP および 1 型コラーゲンの mRNA 発現量も投薬の用量が多いほうが低い傾向を認めた(上図)。

#### 4. 考察

現段階では上記のように、**Empagliflozin** の投薬用量に対して降圧効果を検討している段階である。プロトコル①より **Empagliflozin 20mg/day** の投与が降圧効果の無い最大用量であり、今後この用量を用いてプロトコル②以降を施行したいと考えている。現段階でのデータでは予備実験段階ではあるものの、**Type1** コラーゲンの mRNA および BNP 値が高用量群で低値であり、仮説とした **NHE** および **NCX** を介した **Ca<sup>2+</sup>** 過負荷の軽減を介している可能性がある。もともとのモデルは高血圧モデルで収縮期血圧が **200-240mmHg** 程度まで上昇するため、経過中に死亡する個体が一定数ある。プロトコル①では比較的多くの個体が死亡しており、薬物の経管的な投与によるストレスが影響していた可能性があるため、今後の実験は餌に混合して投与することを検討している。

ヒトの非糖尿病 **HFpEF** 患者に対する **Empagliflozin** の効果をみる試験が現在進行中である。本研究は、数少ない確立された **HFpEF** 動物モデルを用いて、その効果とメカニズムを検証するものであり、その意義は大きく、今後の検討を継続していく予定である。

#### 5. 論文および学会発表

現段階では上記の通り、予備実験を終えた段階であり、学会発表および論文発表に関しては行っていない。



## <指定寄附研究助成 心臓疾患研究>

中枢吻合 “Pouch 法” を用いた遊離右内胸動脈 (free RITA) の早期、  
遠隔期成績及び開存率の検討

南 智行

(共同研究者)

|       |                                |
|-------|--------------------------------|
| 内田 敬二 | 横浜市立大学附属市民総合医療センター心臓血管センター診療教授 |
| 軽部 義久 | 横浜市立大学附属市民総合医療センター心臓血管センター准教授  |
| 益田 宗孝 | 横浜市立大学附属病院 心臓血管外科 主任教授         |

(所属部科名)

横浜市立大学附属市民総合医療センター心臓血管センター

### 抄録

#### 背景

中枢吻合 “Pouch 法” を用いた遊離右内胸動脈 (free RITA) の早期、遠隔期成績及び開存率を検討した。

#### 方 法

2013 年 4 月から 2018 年 4 月までに回旋枝 (CX) 領域に冠動脈バイパス術を施行した 181 例を対象とした。Pouch 法を用いた free RITA を使用した症例は 73 例、大伏在静脈 (SVG) を使用した症例は 108 例であり、2 群を比較検討した。

#### 結果

手術時間は fRITA 群  $487.3 \pm 82.7$  min、SVG 群  $405.8 \pm 90.1$  min であり有意に free RITA 群で長かった。CX 領域へのバイパス開存率は、術後 30 日では free RITA 群 77/80 (96.3%)、SVG 群 138/141 (97.9%) であった。一年後グラフト開存を確認した症例での CX 領域へのバイパス開存率は fRITA 群 60/63 (95.2%)、SVG 群 100/114 (87.7%) であり、有意差を認めないものの、やや fRITA 群がよい成績であった。

#### 結 論

free RITA 群と SVG 群では早期成績、生存率、一年後グラフト開存率に大きな違いは認めなかった。さらなる遠隔期の経過観察が必要である。

## <指定寄附研究助成 心臓疾患研究>

中枢吻合 “Pouch 法” を用いた遊離右内胸動脈 (free RITA) の早期、  
遠隔期成績及び開存率の検討

南 智行

(共同研究者)

|       |                                |
|-------|--------------------------------|
| 内田 敬二 | 横浜市立大学附属市民総合医療センター心臓血管センター診療教授 |
| 軽部 義久 | 横浜市立大学附属市民総合医療センター心臓血管センター准教授  |
| 益田 宗孝 | 横浜市立大学附属病院 心臓血管外科 主任教授         |

(所属部科名)

横浜市立大学附属市民総合医療センター心臓血管センター

### 1. 目的

近年、動脈硬化疾患が増加の一途をたどっており、また若年化が進んでいる。そのため若年で冠動脈バイパス術（以下 CABG）を受ける症例が年々増加しており、バイパスグラフトの長期開存率が重要となってくる。CABG における両側内胸動脈のグラフト使用は多くの報告により有用性が示唆されてきているが、一方で片側および両側内胸動脈の 5 年死亡率、心筋梗塞発症率、脳卒中発生率に差がなかったとする報告もあり、さまざまな議論がある。

右内胸動脈 (RITA) を使用する際であるが、その長さが問題となってくる。十分な距離がとれず、その結果左前下行枝 (LAD) への使用が多くなる。そもそも左内胸動脈 (LITA) の左前下行枝 (LAD) への吻合は **golden standard** であるが、RITA の使用によりこれを妨げてしまうこととなる。また RITA-LAD 吻合を施行すると心臓再手術の際にこれを損傷する可能性もある。一方遊離 (free) での使用方法もあるが、中枢吻合の場所が問題となってくる。中枢吻合を LITA にした場合は LITA を損傷してしまう危惧があり、また中枢吻合を大動脈とした際は RITA と大動脈吻合口の口径差による吻合困難および狭窄が問題となる。

当院では 2013 年より比較的若年患者に対して、回旋枝領域へのバイパスに free RITA を使用することとした。中枢吻合は大動脈とし、その大動脈吻合口の口径差を克服するために Pouch 法を施行している。今研究の目的は、大動脈を中枢吻合とした free RITA の遠隔期成績及び開存率の検討することである。

## 2.方 法

**Pouch** 法は当センターで開始した新しい手技であり、**free RITA** の大動脈中枢吻合側の吻合口形成法である。直径 2mm 程度の **RITA** をまず 10mm cutback する。その後先端片側の角と **heel** を合わせるよう折り返し、折り返した 5mm のラインを 7-0 プロリンで連続縫合する。こうして周囲 16mm 程度の **Pouch** 状の吻合口が完成する。仮に大動脈に直径 5mm の吻合口を作成すると周囲 15mm 程度となり、**Pouch** 状吻合口により口径差がなくなり、狭窄も起きにくくなることが予想され、結果長期開存率が期待できる。

当センターのデータベースから 2013 年 4 月以降の冠動脈疾患患者に対して、回旋枝(CX)領域にバイパスを施行した多枝単独 **CABG** 症例を抽出し、回旋枝領域に **Pouch** 法による **free RITA** を使用した症例と、回旋枝領域に大伏在静脈 (SVG) を使用した症例とに分け、早期治療成績を比較検討した。さらに当センターでは、冠動脈バイパス施行症例に対して術後 1 年後、その後 5 年毎に冠動脈 CT によるグラフト開存の有無を確認しており、それを用いて遠隔期グラフト開存率を比較した。

2013 年 4 月から 2018 年 4 月までに冠動脈疾患に対して単独 **CABG** を施行した症例は 299 例。このうち再手術を除き、CX 領域にバイパスを施行した多枝バイパス症例 181 例を対象とした。CX 領域に **Pouch** 法を用いた **free RITA** を使用した症例は 73 例であり、原則として 75 歳以下を適応とした。CX 領域に SVG を使用した症例は 108 例であり、この 2 群を比較検討した。



### 3.結果

RITA 群の平均年齢は  $61.2 \pm 10.0$  歳、SVG 群は  $71.2 \pm 8.4$  歳であり、有意差を認めた。CX 領域への吻合数は fRITA 群では 82、SVG 群では 146 であった。手術時間についてであるが、fRITA 群は  $487.3 \pm 82.7$ min、SVG 群は  $405.8 \pm 90.1$ min であり有意に fRITA 群で長かった。正中創の感染発生は fRITA 群 5 例、SVG 群 6 例であり有意差は認めなかった。病院死亡は fRITA 群で 1 例認めた。

CX 領域へのバイパス開存率は、術後 30 日では fRITA 群 77/80 (96.3%)、SVG 群 138/141 (97.9%) であった。一年後グラフト開存を確認した症例での CX 領域へのバイパス開存率は fRITA 群 60/63 (95.2%)、SVG 群 100/114 (87.7%) であり、有意差は認めなかったものの、fRITA 群のほうがやや良好な傾向を認めた。5 年追跡可能であった症例では、fRITA 群、SVG 群症例すべてで CX 領域へのバイパスは開存していた。

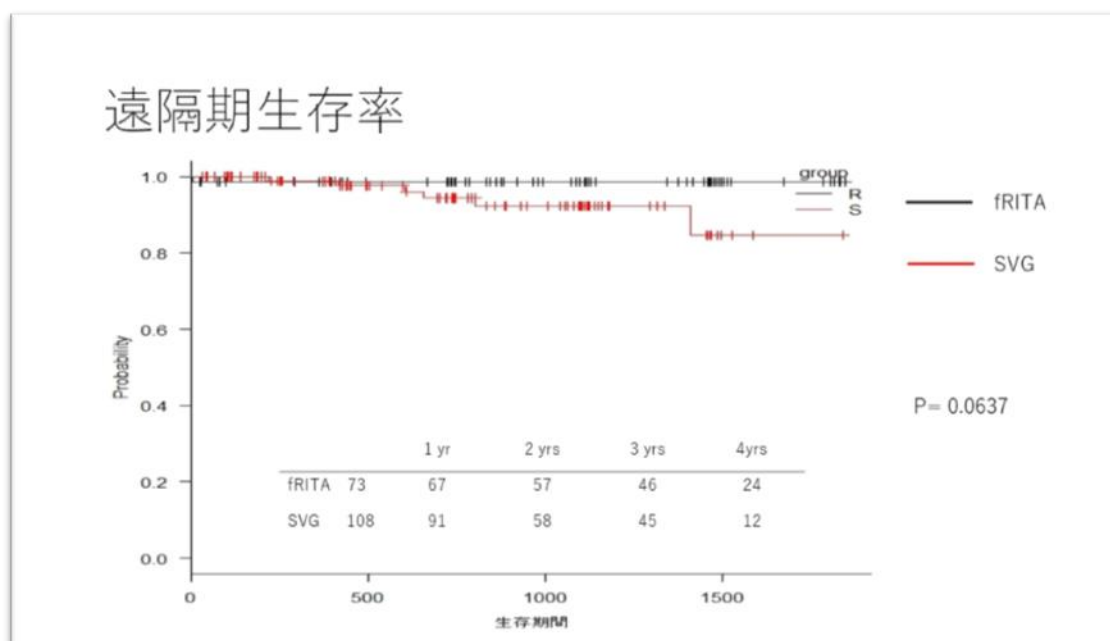
遠隔期全生存率は、2013 年からの成績であり最長 5 年の追跡であるが、2 群間で差は認めなかった。SVG 群が高齢であるため、生存率がやや低下していた。

#### LCX領域のバイパス開存率

|                | fRITA         | SVG             | P     |
|----------------|---------------|-----------------|-------|
| 術後30日(開存数/吻合数) | 77/80 (96.3%) | 138/141 (97.9%) | n.s   |
| 1年後(開存数/吻合数)   | 60/63 (95.2%) | 100/114 (87.7%) | 0.083 |
| 5年後(開存数/吻合数)   | 13/13 (100%)  | 8/8 (100%)      | n.s   |

### 4.結 論

fRITA 群と SVG 群では早期成績に違いは認めず、遠隔期生存率でも両群で有意差を認めなかった。一年でのグラフト開存率は有意差を認めないものの、fRITA 群のほうが良好な傾向を認めた。グラフト開存率については明確な差が出てくるのは少なくとも術後 10 年の計観察が必要と思われるため、長期にわたる経過観察が必須であると考えられた。



## 5.論文及び学会発表

Tomoyuki Minami, Keiji Uchida, Norihisa Karube, Tomoki Cho, Yusuke Matsuki, Kenich Fushimi, Naoto Yabu, Yoshihiro Kusida, Noritake Kikunishi, Mifa Chu, Munetaka Masuda. Early outcomes and 1-year results of free right internal thoracic artery graft with pouch technique. 第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会、東京 2018.10

南 智行、内田 敬二、軽部 義久、長 知樹、松木 佑介、根本 寛子、藪 直人、串田 好宏、菊西 啓雄、朱 美和、益田 宗孝：中枢吻合“Pouch 法”を用いた free RITA の早期、中期成績の検討。第 49 回日本心臓血管外科学会学術総会、岡山 2019.02

## その他

第 28 回アジア心臓血管外科学会 (28<sup>th</sup> Congress of the Asian Society for Cardiovascular & Thoracic Surgery ASCVTS 2020 February 7-10) に発表予定

<指定寄附研究助成 腎臓がん関係>

Birt-Hogg-Dubé (BHD)関連腎癌の発癌機序の解明

大竹慎二

軸屋良介・三留拓・蓮見壽史・矢尾正祐

泌尿器科

抄録

Birt-Hogg-Dubé(BHD)症候群は腎腫瘍、肺嚢胞、皮膚繊維性毛包腫を3徴とする遺伝性腎癌症候群である。原因遺伝子である *folliculin(FLCN)* はミトコンドリアの酸素代謝の制御を通じてエネルギー代謝に重要な役割を果たしており、腎癌の発癌抑制に関わる。しかしながら *FLCN* 欠損がどのように腎癌の腫瘍形成を引き起こすのかは未解明であった。今回我々は BHD 関連腎癌の発癌機序を明らかにすべく、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析と液体・気体クロマトグラフィー—質量解析を用いた代謝経路の解析を行った。全エクソン解析では、BHD 関連腎癌でのコピー数の変化は孤発性腎癌における既報とはかなりかけ離れていることが判明した。BHD 関連腎癌の体細胞においてはクロマチンリモデリング遺伝子の変異が高頻度で認められた(17/29tumors, 59%)。代謝経路の解析では、*FLCN* 欠損下でミトコンドリアにより産生された活性酸素を中和するように酸化還元反応が亢進していることが明らかとなった。。BHD 関連腎癌の分子特性は孤発性腎癌のものとは乖離していることが分かった。今後研究を続けていくことで、さらなる発癌メカニズムの解析と創薬への発展が期待される。

## <指定寄附研究助成 腎臓がん関係>

### Birt-Hogg-Dubé (BHD)関連腎癌の発癌機序の解明

大竹慎二

軸屋良介・三留拓・蓮見壽史・矢尾正祐

泌尿器科

#### 1. 目 的

BHD 症候群は肺嚢胞、皮膚繊維性毛包腫および嫌色素性腎癌やオンコサイトーマなどの組織型が混成した腎腫瘍を引き起こす遺伝性腎癌症候群である。2002年に BHD 患者において *FLCN* 遺伝子の変異が発見された。BHD 患者に発生する多発腎腫瘍の発生要因としては *FLCN* 遺伝子における second hit mutation が考えられている。*FLCN* は 2 つの *FLCN* 結合蛋白である folliculin-interacting protein1 および 2(FNIP1, FNIP2)と結合することで腎細胞の増殖を制御している。*FLCN* は FNIP1 及び FNIP2 を介して細胞内エネルギーを感知する蛋白である 5'-AMP-activated protein kinase(AMPK)に結合しているが、その欠失が mammalian target of rapamycin(mTOR)依存的な蛋白合成の亢進および peroxisome proliferator-activated receptor, gamma, coactivator 1  $\alpha$  (PCG1  $\alpha$ ) 依存的なミトコンドリア代謝の亢進を引き起こす。腎臓特異的 *FLCN* ダブルノックアウトマウスは嚢胞様腎過形成を生じ腎不全のため生後 3 週間前後で死亡するが、この嚢胞様腎過形成では前癌病変を認めるのみで癌の発生自体は認められなかった。*FLCN* 欠失腎細胞の癌化機構の解明には *FLCN* の変異に続く付加的なドライバ変異を探索する必要があると考えられた。

BHD 腎癌における付加的な変異をみつけることを目的として全エクソン解析を行った。また、BHD 関連腎癌における分子特性を同定すべく代謝経路の解析も行った。

#### 2. 方 法

横浜市立大学附属病院を受診した BHD 症候群と診断もしくは疑いの患者を対象とした。患者へは遺伝カウンセリングを受けた上で皮膚検査及び CT・MRI 検査を施行し臨床的診断を行った。腎摘除術もしくは腎部分切除術を施行し、摘出検体は 10%ホルマリン固定・パラフィン埋没の上で HE 染色・免疫組織学的染色を行い病理学的診断を行った。摘出検体のうち一部の癌組織と正常腎組織について



は液体窒素で凍結した後に分析までは-80℃保存とした。

BHD 関連腎癌、付随する正常腎組織、周囲リンパ球の全エクソン解析には SureSelect v.5+IncRNA kit(Agilent)及び Illumina HiSeq2000 platform を用いた。Base calling には RTA(Real-time-Analysis, Illumina)を、Demultiplex には CASAVA1.8.2(Illumina)を用いた。シークエンスデータは Burrows-Wheeler Aligner プログラムと Novoalign software により参照配列にマッピングした。Bam file は SRMA に変換した。正常腎組織と周囲リンパ球のシークエンスデータはほぼ同一のものであったため、正常腎・腎癌 pair bam file に対して Karkinos4.1.11 を用いてカットオフ値 0.05 で allele frequency の計算をした。代謝経路の解析には Metabolon, Inc. (Durham, NC, USA)の協力の下に液体・気体クロマトグラフィー質量解析(LC/MS, GC/MS)を行った。18 個の BHD 関連腎癌と 6 個の付随する正常腎組織を対象とした。Metabolon の抽出キットを用いて上清を回収した。LC/MS, GC/MS で得られたシグナル強度は Bradford protein assay を用いて蛋白濃度を測定し平均化した。288 種類の生化学物質が同定され、そのうち 91 個は BHD 関連腎癌において有意に多く、72 個については少なかった。

### 3. 結 果

15 人の BHD 患者から摘出した 29 個の腎腫瘍について全エクソン解析を行った。摘出検体の病理型は嫌色素型(chRCC)15、オンコサイトーマ/嫌色素型の混成(HOCT)5、淡明細胞(ccRCC)2、乳頭状(pRCC)2、それ以外のものという内訳であった。全エクソン解析では 29 腫瘍のうち 25 腫瘍において体細胞性の *FLCN* 変異が認められた。多くは frameshift であったが 4 腫瘍において G84C、W260L、L356P、L550R といった missense が認められた。これらの変異が FLCN 蛋白の腫瘍抑制に影響している可能性が示唆された。(Table1) HOCT・chRCC・オンコサイトーマは ccRCC・pRCC に比べてコピー数の変異が少なかった。また、孤発性 ccRCC で特徴的な 3 番短腕の欠損は BHD 関連 ccRCC では認められなかったことから両者の間では分子レベルでの違いがある可能性が示された。

体細胞変異について KarKinos4.1.11 を用いて解析した。孤発性 ccRCC・pRCC は chRCC・オンコサイトーマに比べて体細胞変異が多く認められるとの報告があるが、BHD 患者においてはそうした違いは認められなかった。(Table1) これも BHD 関連腎癌と孤発性腎癌との違いを示しているものと思われる。29 腫瘍において共通して認められる変異としてクロマチンリモデリング遺伝子変異は高頻度で認められた(59%)。(Fig1) クロマチンリモデリング遺伝子の変異は BHD 関連腎癌において、癌化の主要な driver mutation である可能性が考えられた。また、*FLCN*は代謝において重要な役割を果たしているため、代謝に関する遺伝

子変異についても解析したところ、ミトコンドリア経路・脂質代謝・解糖系に関する遺伝子変異が認められた(28、24、7%)。(Fig2) BHD 関連腎癌においてこれらの代謝経路に変化が生じている可能性が疑われた。

BHD 関連腎癌においてグルコースは上昇を認めたものの、グルコース 6 リン酸・フルクトース 6 リン酸・フルクトース 1,6 リン酸、ジヒドロキシアセトン、リン酸化 DHAP、3 ホスホグリセリン酸、2 ホスホグリセリン酸、ホスホエノールピルビン酸は低下していた。これは BHD 関連腎癌において、エネルギー産生のメインリソースが解糖系以外であることを示唆している。(Fig3)

#### 4. 考 察

体細胞における FLCN の second hit mutation はほとんどの BHD 関連腎癌において認められたが、これは FLCN が two hit で不活性化される古典的ながん抑制遺伝子であることを示している。VHL 複合体の変異や 3 番短腕の欠損およびクロマチンリモデリング遺伝の変異は孤発性 ccRCC においてしばしば認められるが、BHD 関連 ccRCC においてはそうした変異は認められなかった。これも BHD 関連腎癌と孤発性腎癌との違いを示しているものと思われる。

今回の研究により、BHD 関連腎癌のがん抑制遺伝子としての働きや発癌に至る分子メカニズム、孤発性腎癌との差異が示された。これらの知見の積み重ねがより優れた診断や治療法の発見に繋がっていくものと考えられる。

#### 5. 論文及び学会発表

Hasumi H, Furuya M, Tatsuno K et al; BHD-associated kidney cancer exhibits unique molecular characteristics and a wide variety of variants in chromatin remodeling genes, Human Molecular Genetics, 2018

Table1

| Patient No. | Tumor No. | Histology | Somatic second hit FLCN mutation | Mutation type      | Allele frequencies | Tumor size (mm) | Number of somatic variants |
|-------------|-----------|-----------|----------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|----------------------------|
| 1           | 4T3       | HOCT      | c.453_454delGT                   | Frameshift         | 0.26               | 25              | 16                         |
|             | 4T4       | HOCT      | c.165delC                        | Frameshift         | 0.30               | 12              | 22                         |
| 2           | 59T8      | HOCT      | c.1429C>T                        | Nonsense           | 0.23               | 32              | 18                         |
|             | 59T10     | HOCT      | c.1649T>G                        | Missense (p.L550R) | 0.19               | 10              | 7                          |
|             | 59T11     | HOCT      | c.278delC                        | Frameshift         | 0.24               | 10              | 13                         |
|             | 59T1      | chRCC     | c.1383C>T                        | Silent             | 0.34               | 43              | 20                         |
|             | 59T2      | chRCC     | c.779C>T                         | Missense (p.W260L) | 0.32               | 14              | 18                         |
|             | 59T3      | chRCC     | Undetectable                     | Undetectable       | NA                 | 8               | 8                          |
|             | 59T4      | chRCC     | c.1285dupC                       | Frameshift         | 0.27               | 9               | 11                         |
|             | 59T6      | chRCC     | c.250C>T                         | Missense (p.G84C)  | 0.13               | 17              | 11                         |
|             | 59T12     | chRCC     | c.1301delA                       | Frameshift         | 0.10               | 8               | 7                          |
|             | 59T14     | chRCC     | Undetectable                     | Undetectable       | NA                 | 14              | 15                         |
| 3           | 59T15     | chRCC     | c.1067T>C                        | Missense (p.L356P) | 0.21               | 19              | 92                         |
|             | 24T1      | chRCC     | c.1421delC                       | Frameshift         | 0.19               | 30              | 17                         |
|             | 35T1      | chRCC     | c.1234_1235insAG                 | Frameshift         | 0.21               | 10              | 29                         |
|             | 38T1      | chRCC     | c.346G>T                         | Nonsense           | 0.36               | 15              | 18                         |
| 6           | 42T1      | chRCC     | LOH                              | LOH                | NA                 | 30              | 21                         |
|             | 42T2      | chRCC     | c.812delA                        | Frameshift         | 0.33               | 13              | 21                         |
| 7           | 43T1      | chRCC     | c.673delG                        | Frameshift         | 0.14               | 24              | 17                         |
|             | 51T1      | chRCC     | c.1285dupC                       | Frameshift         | 0.26               | 20              | 17                         |
| 9           | 19T1      | Ho/chRCC  | c.398C>G                         | Nonsense           | 0.17               | 28              | 15                         |
|             | 19T2      | Ho/chRCC  | c.1422_1423insT                  | Frameshift         | 0.21               | 30              | 18                         |
|             | 19T3      | Ho/chRCC  | c.543C>A                         | Nonsense           | 0.37               | 13              | 42                         |
|             | 98T1      | Onc       | c.346C>T                         | Nonsense           | 0.36               | 41              | 14                         |
| 11          | 44T1      | ccRCC     | Undetectable                     | Undetectable       | NA                 | 40              | 9                          |
|             | 10T1      | ccRCC     | c.322G>T                         | Nonsense           | 0.41               | 50              | 49                         |
| 13          | 15T1      | pRCC      | LOH                              | LOH                | NA                 | 100             | 12                         |
| 14          | 76T1      | pRCC      | LOH                              | LOH                | NA                 | 140             | 22                         |
| 15          | 85T1      | Tub pap   | Undetectable                     | Undetectable       | NA                 | 95              | 13                         |

Figure1

| Pathway              | Patient No. |         | 1  |    | 2  |    | 3  |    | 4  |    | 5  |    | 6  |    | 7  |    | 8  |    | 9  |    | 10 |    | 11 |    | 12 |    | 13 |    | 14 |    | 15 |    |
|----------------------|-------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                      | Tumor No.   | History | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne |
| Chromatin remodeling | ARID1B      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | ARID3B      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | BAHCC1      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | BAZ1A       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | BAZ2B       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | CREBBP      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | DOT1L       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | ED1         |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | HIST1H1D    |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | HIST1H2AB   |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | HMOX8A      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | ING2        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | JARID2      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | MLL2        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | NCOR2       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | PRPF17      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | SAP130      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | SETD7       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | SMARCA1     |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | SMARCA3     |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | SUP17L      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | TOX3        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Chromatin remodeling | ZZZ3        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA methylation      | DPM2B       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA methylation      | GLY1H1      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | PDS5B       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | ATAD5       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | RAD51       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | RHNO1       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | PAAP100     |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | CREBBP      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | DFNA5       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | DTXSL       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | ERC2        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | HLTF        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | PLN1E1      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | MSH3        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | RAD23A      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | SMC1A       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | TEL2        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | TONSL       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | TOPBP1      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA repair           | UMC1        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Telomere regulation  | TERB1       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Telomere regulation  | RTKL1       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Telomere regulation  | TNKS        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Telomere regulation  | WRAP53      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Figure2

| Pathway               | Patient No. |         | 1  |    | 2  |    | 3  |    | 4  |    | 5  |    | 6  |    | 7  |    | 8  |    | 9  |    | 10 |    | 11 |    | 12 |    | 13 |    | 14 |    | 15 |    |
|-----------------------|-------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                       | Tumor No.   | History | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne | He | Ne |
| Mitochondria          | AC051       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Mitochondria          | AC064       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Mitochondria          | CB03        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Mitochondria          | HA08        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Mitochondria          | MSTO1_2P    |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Mitochondria          | NAB5        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Mitochondria          | P18M1       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Mitochondria          | SMCP        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Mitochondria          | SMC1B       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Mitochondria          | TOMM6       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Lipid metabolism      | ARC41       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Lipid metabolism      | ALOX12B     |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Lipid metabolism      | ATP11B      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Lipid metabolism      | BCL2        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Lipid metabolism      | CEB2        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Lipid metabolism      | CYP6A1      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Lipid metabolism      | ESY11       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Lipid metabolism      | GLA1L2      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Lipid metabolism      | PLA2G16     |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Lipid metabolism      | PNP4        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Lipid metabolism      | SLC27A5     |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Lipid metabolism      | ZNF35A      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Nucleus               | NOR1        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| NADPH                 | POR         |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Oxidative             | AC075       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Oxidative             | ENG1        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Amino acid metabolism | SCN1L1      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Amino acid metabolism | SLC14A      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Amino acid metabolism | SLC39A1     |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Amino acid metabolism | SLC7A6      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Amino acid metabolism | WDR59       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Autophagy             | C16orf1     |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Autophagy             | MAN2B1      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Autophagy             | NAB5        |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Autophagy             | TRAF3       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Autophagy             | UBQLN2      |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Autophagy             | VAMP1       |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

<指定寄附研究助成 血液内科学関係>

急性骨髄性白血病における *PRDM16* 高発現症例に対する新規分子標的の同定

柴 徳生

小児科

### 抄録

小児急性骨髄性白血病（AML）検体3群5例（*RUNX1-RUNX1T1*：2例、*NUP98-NSD1*：2例、*KMT2A-MLL*T3:1例）を用いてオープンクロマチン領域を推定する目的でAssay for transposase-accessible chromatin using sequencing (ATAC-seq)による解析を施行した。その結果、各遺伝子異常（融合遺伝子群）ごとにオープンクロマチン領域が異なることを確認した。遺伝子発現、メチル化解析から予想された通り、予後不良な *NUP98-NSD1*を有する2例では*PRDM16*および*HOX*遺伝子群は他の融合遺伝子症例に比べ、オープンになっていることを確認し、予想された結果と一致していた。また*PRDM16*遺伝子は脂肪分化のmaster regulatorであるPPAR $\gamma$ 遺伝子と強調し、脂肪分化に関与していることが知られている。PPAR $\gamma$ はmTORの下流に座位しており、我々の*PRDM16*高発現のAML細胞株（KG-1）を用いた薬剤感受性試験（96時間培養）で、脂質代謝関連の薬剤とmTOR阻害剤の併用で殺細胞効果を確認した。以上の結果から、*PRDM16*はAMLの治療標的になる可能性が示唆された。

<指定寄附研究助成 血液内科学関係>

急性骨髄性白血病における *PRDM16* 高発現症例に対する新規分子標的の同定

柴 徳生

小児科

### 1. 目 的

これまでの我々の解析から*PRDM16* および*MECOM* 高発現症例は有意に予後不良であり、これらの遺伝子の高発現症例では*HOXA9* をはじめとする*HOX* pathwayが活性化することがわかっているが、その病態が真に解明されているとは言い難い。そこで今回、プロテオーム解析を中心に遺伝子異常、遺伝子発現、DNAメチル化異常のデータを統合することでマルチオミックスな解析を進めることで、予後不良AMLである*PRDM16* 高発現症例の病態解明を進めることで分子標的の同定に繋がっていきたいと考えている。

### 2. 方 法

AMLの細胞株および臨床サンプルを用いて*PRDM16* の周辺にリクルートされているタンパク質を同定することを目的にATAC-seq法を用いた詳細な結合部位の同定を試みることで、病態解明および新規分子標的薬の開発につなげたいと考えている。

### 3. 結 果

#### ①ATAC-seqによるオープンクロマチン領域の同定

小児AML検体3群5例(*RUNX1-RUNX1T1*:2例、*NUP98-NSD1*:2例、*KMT2A-MLLT3*:1例)を用いてオープンクロマチン領域を推定する目的でAssay for transposase-accessible chromatin using sequencing (ATAC-seq)による解析を施行した。

施行した ATAC-seqの結果、各遺伝子異常(融合遺伝子群)ごとにオープンクロマチン領域が異なることを確認した(図1)。遺伝子発現、メチル化解析から予想された通り、予後不良な*NUP98-NSD1*を有する2例では*PRDM16*および*HOX*遺伝子群は他の融合遺伝子症例に比べ、オープンになっていることを確認し、予想された結果と一致していた。同様にオープンになっている遺伝子を複数同定しており、今後、これらの遺伝子のオープン領域の配列を確認し、関与していると考えられる遺伝子をモチーフ解析を用いて抽出を行っていく予定である。

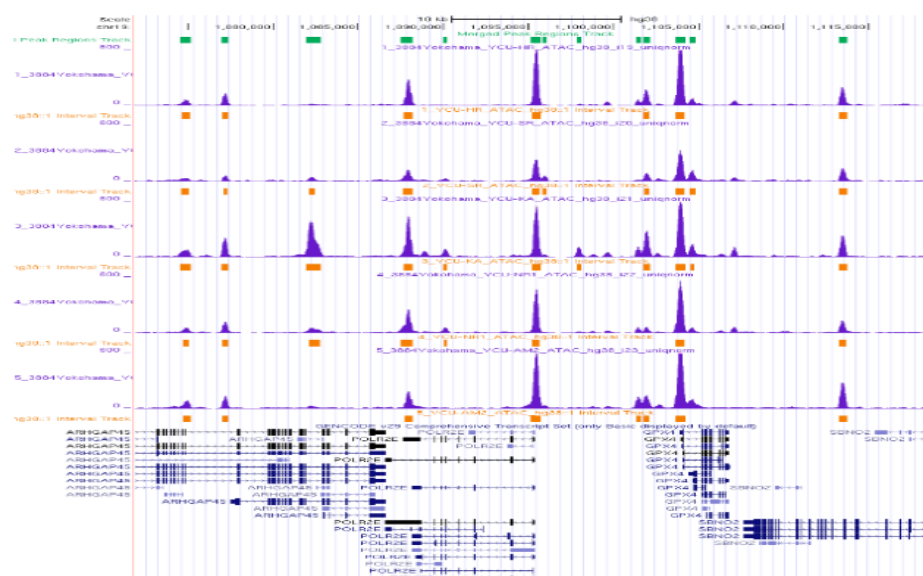
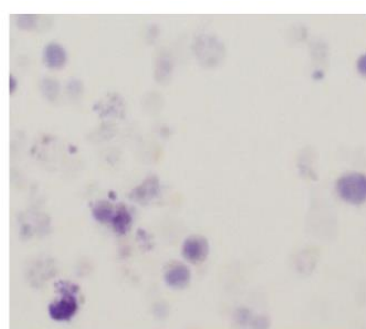


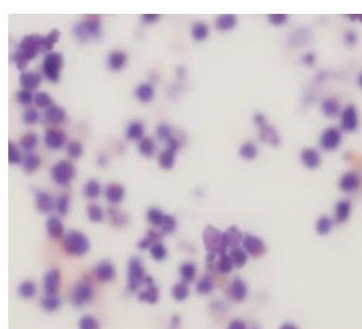
図 1. ATAC-seqによるオープンクロマチン領域

## ②新規薬剤候補の探索

また *PRDM16* 遺伝子は脂肪分化の master regulator である PPAR $\gamma$ 遺伝子と強調し、脂肪分化に関与していることが知られている。PPAR $\gamma$ は mTOR の下流に座位しており、我々の *PRDM16* 高発現の AML 細胞株 (KG-1) を用いた薬剤感受性試験 (96 時間培養) で、脂質代謝関連の薬剤と mTOR 阻害剤の併用で殺細胞効果を確認した (図 2)。



Evel+Y + R  
脂肪染色 very weak



Evel  
脂肪染色 medium

左 : Evelolimimus+薬剤 Y  
+ 薬剤 R  
右 : Evelolimimus 単剤

図 4. AML 細胞株 KG-1 を用いた脂質代謝関連薬剤と Evel.による殺細胞効果)

#### 4. 考 察

*PRDM16* 遺伝子は代謝、肥満研究では大きな注目を集めているが、がん、白血病領域では関連する文献は未だ少数にとどまっており、先行する肥満研究で使用されている解析手法を応用することが可能であると考えている。代謝・肥満研究においては、*PRDM16* 遺伝子は PPAR $\gamma$  の co-activator として白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞に分化誘導する分子として広く知られている[核内受容体スーパーファミリー](#)に属する[タンパク質](#)である。白血病においては[転写因子](#)としても機能しており、[マクロファージ](#)や血管[内皮細胞](#)などにも発現が見られる。近年、癌領域でも注目を集め始めている遺伝子であり、AML では白血病幹細胞の維持に重要な役割を果たしている。今回の ATAC-seq により同定されたオープンクロマチン領域は *PRDM16* 遺伝子と強調している遺伝子群を同定できる可能性があり、推定されるこれらの遺伝子群に対する薬剤感受性試験の結果からは、殺細胞効果が認められた。

今後は *PRDM16* 遺伝子を高発現させて白血病マウスを用いて、*vivo* での効果について検討をおこなっていくことを考えている。

#### 5. 論文及び学会発表（研究会を含む）

1. 日本小児白血病リンパ腫研究グループ血液腫瘍分科会夏季例会（2019 年 6 月、名古屋）
2. 日本小児血液・がん学会（2019 年 11 月予定、広島）



<指定寄附研究助成 腎臓・循環器内科学関係>

肺高血圧症におけるドーパ性神経伝達機構の解析

報告者 橋本達夫

共同研究者 水野 祐介・古賀 資和

所属部科 横浜市立大学医学部 分子薬理神経生物学・麻酔科学

抄録

本研究の目的は、ドーパ受容体 **GPR143-KO** ラットに肺高血圧モデルを行い、肺高血圧症の程度を比較することを通じて、ドーパの肺高血圧症への関与の有無を明らかにすることである。

モノクロタリン肺高血圧症モデルを行った。肺高血圧の程度は、右心重量、右室圧、肺動脈肥厚の組織学的解析で評価した。さらに、ラット単離肺動脈を用いてドーパおよびアドレナリン  $\alpha 1$  受容体との相互作用を、収縮力で評価した。

右室重量は野生型に比較して **KO** ラットで小さかった。また、右室圧は野生型に比較して **KO** ラットで低かった。単離肺動脈においては、ドーパはアドレナリン  $\alpha 1$  受容体との相互作用を介して血管収縮に関わっていることが判明した。野生型と比較して肺高血圧症の程度が軽いという新知見を得た。

本研究助成により、ドーパ・**GPR143** が肺高血圧症に重要な因子であることが判明した。詳細なメカニズムについては、さらなる検討が必要である。

## <指定寄附研究助成 腎臓・循環器内科学関係>

### 肺高血圧症におけるドーパ性神経伝達機構の解析

報告者 橋本達夫

共同研究者 水野 祐介・古賀 資和

所属部科 横浜市立大学医学部 分子薬理神経生物学・麻酔科学

#### 目的

肺高血圧症は稀な疾患であるが、早期診断および治療が困難である。その成因には、器質的肺動脈病変および肺動脈攣縮が大きく関与しているが、そのメカニズムは不明である。近年、いくつかの血管拡張薬が臨床応用されているが単独での改善効果に乏しく、さらに進行を阻止する薬剤は現在のところ存在せず、根治薬が待望されている。

L-DOPA（ドーパ）は、パーキンソン病治療における第一選択薬であるが、単なるドーパミンの前駆体であり、それ自体には生理活性はないと考えられてきた。申請者らは、ドーパ自体に生理作用を有する可能性を示し、ドーパ神経伝達物質仮説を提唱してきた。最近になり、GPR143 がドーパ応答を媒介する分子であることを同定し、GPR143 遺伝子欠損（GPR143-KO）マウスを樹立した。その表現型解析から GPR143 がアドレナリン  $\alpha 1$  受容体と機能的相互作用を示し、血圧調節を行っていることを明らかにした (Masukawa D et al, *J Clin Invest Insight*, 2017)。このことは、ドーパによるアドレナリン  $\alpha 1$  受容体を介した血管収縮を介した病態の存在を示唆する。さらに、GPR143-KO ラットも作製した。

本研究の目的は、GPR143-KO ラットに肺高血圧モデルを行い、肺高血圧症の程度を比較することを通じて、ドーパの肺高血圧症への関与の有無を明らかにすることである。

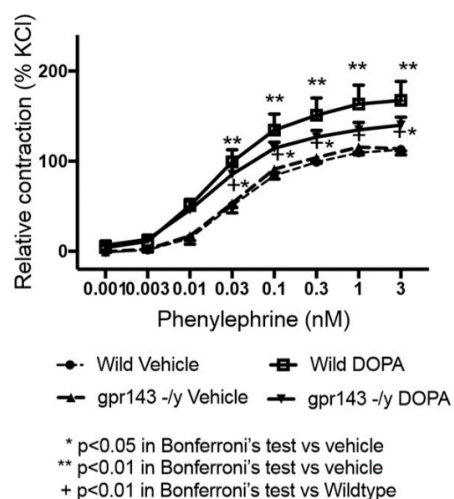
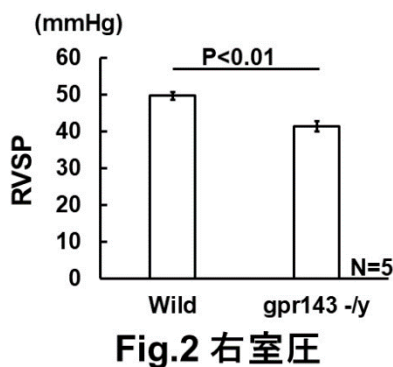
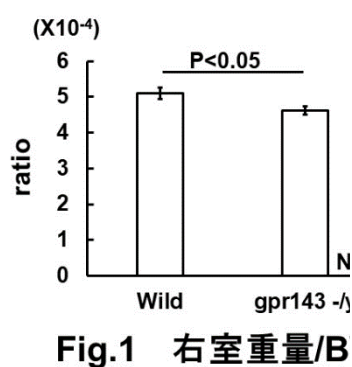
本研究は、肺高血圧症治療の新規ターゲット候補の解析である。本研究により、肺高血圧症治療の新規ターゲットを同定する可能性が高く、得られる知見は、未だ単独での有効な手立ての確立を見ない肺高血圧症に対する新たな治療法・診断法の創成に貢献することが期待される。

#### 方法

すでに繁殖・維持しつつある GPR143-KO ラットを用いて、モノクロタリン肺高血圧症モデルを行った。肺高血圧の程度は、右心重量、右室圧、肺動脈肥厚の組織学的解析で評価した。さらに、ラット単離肺動脈を用いてドーパおよびアドレナリン  $\alpha 1$  受容体との相互作用を、収縮力で評価した。これは、モノクロタリン投与後の肺動脈でも検討した。また、肺組織におけるドーパ含有量を HPLC で評価した。これらの実験は、本学麻酔科学と連携して研究を進めた。

## 結果

GPR143-KO ラットにモノクロタリン肺高血圧モデルを行い、野生型と比較して肺高血圧症の程度が軽いという新知見を得た。右室重量は野生型に比較して KO ラットで小さかった (Fig.1)。また、右室圧は野生型に比較して KO ラットで低かった (Fig.2)。単離肺動脈においては、ドーパはアドレナリン  $\alpha 1$  受容体との相互作用を介して血管収縮に関わっていることが判明した (Fig.3)。モノクロタリン投与後の肺動脈ではドーパによる収縮増強作用が減弱したため、ドーパ・GPR143 は肺高血圧症発症前の病態形成に関与している可能性が示唆された。また、肺組織におけるドーパ含有量は、野生型と KO ラットに有意な違いがなかった。ドーパ・GPR143 は肺高血圧症増悪作用を持つことを明らかにした。



**Fig.3 血管収縮**

## 考察

肺高血圧症の成因として器質的肺動脈病変および肺動脈攣縮が大きく関与しているが、そのメカニズムは不明である。モノクロタリン肺高血圧症モデルは、肺動脈の血管内皮細胞障害によるもので、ヒトの病態との類似性から広く用いられているモデルである。

本研究により、GPR143-KO ラットにモノクロタリン肺高血圧症モデルを行うことで、ドーパ・GPR143 が肺高血圧症に重要な因子であることが判明した。さらに、肺動脈においてもドーパがアドレナリン  $\alpha 1$  受容体との相互作用を介して血管収縮に関わっていることが判明した。

モノクロタリン投与後の肺組織を用いたプロテオーム解析の結果では、セロトニン合成の律速酵素の活性化に必要なたんぱく質である 14-3-3 蛋白の発現亢進が報告されている (Laudi S et al, Proteomics, 2007)。14-3-3 蛋白は、ドーパ合成の律速酵素の活性化作用もあるため、ドーパとセロトニン刺激の相互作用についても検討する必要があると思われる。

また肺高血圧症には、マクロファージや血小板などの骨髄由来細胞の関与も指摘されている。肺高血圧症における骨髄由来細胞の関与については、骨髄移植を行った検討も必要である。

本研究助成により、ドーパ・GPR143 が肺高血圧症に重要な因子であることが判明した。詳細なメカニズムについては、さらなる検討が必要である。

論文および学会発表

第 93 回日本薬理学会年会（2020 年 3 月）で学会発表予定

<指定寄附研究助成 胆のうがん関係>

新規治療薬開発に適したマウス胆嚢癌同所移植モデルの開発

小川 祐二

加藤 真吾

肝胆膵消化器病学

胆嚢癌は予後不良ながんであり、遠隔転移例では5年相対生存率1.9%と、臓器別で膵癌に次いで2番目に低い値である。胆嚢がんは、正確には胆嚢や胆嚢管に発生したがんを指す。希少がんである胆嚢癌では、治療薬開発のための大規模臨床試験の実施自体に限界があり、動物モデルなどを用いた基礎的な解析がより重要となる。しかし、治療薬開発に適した動物モデルは現状では開発されていない。本研究の目的は、マウス胆嚢癌モデルの開発である。既に樹立しているマウス胆嚢癌オルガノイド細胞株を用いて、同所移植モデルの開発を目指す。本モデルの開発・発表により、胆嚢癌の新規治療薬開発が促進されるものと期待される。

解析の結果、一度皮下移植で作った腫瘍を小さく刻み、別のマウスの胆嚢に縫い付けることで、**vivo** モデルを確立した。このモデルでは、胆嚢同所に腫瘍を形成することが出来、肝実質への浸潤も確認した。更に、このモデルを用いて、**Gemcitabine** を投与し、腫瘍縮小効果が確認できるかを解析した。2週間の投与により、腫瘍の縮小効果が認められた。胆嚢がんの治療薬開発に極めて有用な動物モデルを作成することが出来た。

## <指定寄附研究助成 胆のうがん関係>

### 新規治療薬開発に適したマウス胆嚢癌同所移植モデルの開発

小川 祐二

加藤 真吾

#### 肝胆膵消化器病学

## 1. 目 的

胆嚢癌は予後不良ながんであり、2006年から2008年の日本での『胆嚢・胆管がん』の5年相対生存率は男女計で22.4%と報告されている（国立がん研究センターがん情報サービス）。遠隔転移例では5年相対生存率1.9%と、臓器別で膵癌に次いで2番目に低い値である。

胆嚢がんは、正確には胆嚢や胆嚢管に発生したがんを指す。しかし、希少がんである胆嚢癌は大規模臨床試験を行うために十分な症例数を集めることが困難であり、肝内胆管がん、肝外胆管がんと共に『胆嚢・胆管がん』として分類され、統計解析・治療薬開発が行われてきた。厳密に胆嚢がんのみを対象とした臨床試験で、Best Supportive Careと化学療法が比較されたのは2010年の報告が初めてである（J Clin Oncol. 2010;28:4581-4586）。即ち、希少がんである胆嚢癌では、治療薬開発のための大規模臨床試験の実施自体に限界があり、動物モデルなどを用いた基礎的な解析がより重要となる。しかし、治療薬開発に適した動物モデルは現状では開発されていない。

本研究の目的は、マウス胆嚢癌モデルの開発である。既に樹立しているマウス胆嚢癌オルガノイド細胞株を用いて、同所移植モデルの開発を目指す。本モデルの開発・発表により、胆嚢癌の新規治療薬開発が促進されるものと期待される。

## 2. 方 法

### ①マウス胆嚢癌オルガノイド細胞株直接注入モデル

マウス胆嚢癌オルガノイド細胞株を、麻酔科に野生型マウスの胆嚢に注入する。パラメーターとして、注入細胞量、細胞溶解液の注入量、胆嚢頸部結紮の有無を検討する。マウス胆嚢は2mm x 4mm程度と非常に小さく、事前の検討では体積として10ul程度が無理なく注入できる量である。この量を超えると、胆嚢内圧が上昇し、注入部位の結紮を行わないと注入液が外部に漏れてしまう。また、胆嚢頸部の結紮を行わない場合、消化酵素を含む胆汁が胆嚢内に流入するため、胆嚢癌オルガノイド細胞株が生着できない可能性がある。

一方で、胆嚢頸部を結紮すると、胆嚢上皮を栄養している動脈が頸部から出ているので、胆嚢自体が壊死してしまう可能性もある。以上の背景から、注入細胞量、細胞溶解液の注入量、胆嚢頸部結紮の有無に着目して、本モデルの条件を検討する。細胞注入後、4週間後に解剖を行い、腫瘍細胞の生着を確認する。

## ②マウス胆嚢癌オルガノイド皮下腫瘍片同所移植モデル

①に加えて、一度皮下移植で作った腫瘍を小さく刻み、別のマウスの胆嚢に縫い付けるモデルを検討する。このモデルでは、①の直接注入モデルに比較して、注入液の漏れは考えなくてよいという利点がある。一方で、皮下移植後に未知の遺伝子変異が入ってしまう可能性があり、解析結果が安定しない可能性がある。

パラメーターとして、胆嚢内留置と胆嚢外に縫い付ける方法を計画する。腫瘍片を胆嚢内に留置することが最もモデルとしては自然な形であると考えられるが、胆汁により、腫瘍が生着できない可能性がある。また、マウス胆嚢の小ささから技術的に困難である可能性が高い。このため、胆嚢自体に針をかけ、胆嚢の外壁に腫瘍片を縫い付けるモデルも同時に検証する。この場合、腫瘍は胆嚢の外側から浸潤することになり、モデルとしては不完全な部分もあると考えられるが、現実的に解析に必要な検体数を揃えることは可能であると考えられる。

移植後 4 週間後に解剖を行い、腫瘍片の重量を測定し、移植前と比較することで増加率を解析する。

## ③総合評価と薬剤投与

①、②の結果を総括して、新規治療薬開発の観点から、マウス胆嚢癌モデルとして適したモデルを決定する。決定したモデルに胆嚢癌の抗がん剤である **Gemcitabine** を投与し、腫瘍縮小効果が確認できるかを解析する。

# 3. 結 果

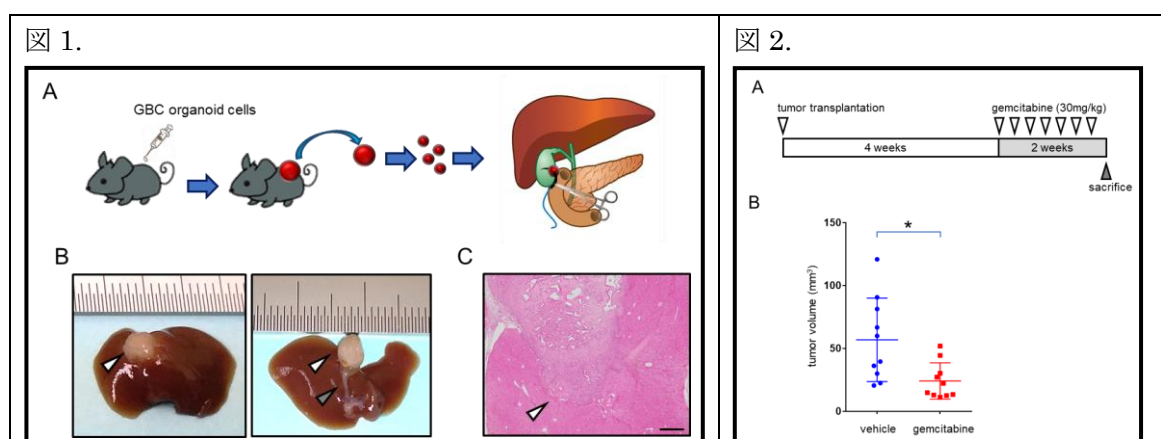
## ① マウス胆嚢癌オルガノイド細胞株直接注入モデル

本モデルに関して、注入細胞量、細胞溶解液の注入量、胆嚢頸部結紮の有無を変えて検討を行ったが、同所における腫瘍を形成できなかった。胆嚢頸部を結紮すると致死的な胆嚢炎を起こした。一方で、胆嚢頸部を結紮しないと、細胞が胆嚢内に留まらなかった。

## ② マウス胆嚢癌オルガノイド皮下腫瘍片同所移植モデル

一度皮下移植で作った腫瘍を小さく刻み、別のマウスの胆嚢に縫い付けるモデルを検討した (図 1.A)。このモデルでは、胆嚢同所に腫瘍を形成することが出来 (図 1.B)、肝実質への浸潤も確認できた (図 1.C)。





### ③ 総合評価と薬剤投与

②のモデルを用いて、Gemcitabine を投与し、腫瘍縮小効果が確認できるかを解析した。2 週間の投与により、腫瘍の縮小効果が認められた。

## 4. 考 察

本研究計画で予定していた治療薬の投与、解析まで行うことが出来た。本研究内容は Digestive Disease Week 2019 にて発表し、Poster of Distinction に採択された。

これまでに報告されている胆嚢がんのモデルマウスは、全身の上皮基底膜に HER2 を高発現させたマウスである。このマウスでは、胆がんマウス自体が大きく野生型と異なっているため、薬物投与による効果を解析することは困難であると考えられる。また、がん遺伝子変異のデータベースの一つである COSMIC (The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer; <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) で胆嚢がんのデータを抽出し、変異が多く認められる遺伝子の上位 10 個を解析すると、下表 1. に示した通りとなる。ヒト胆嚢癌で HER2 (ERBB2) に変異が起きている割合は決して高くはなく、KRAS+TP53 変異の方がより平均的なヒト胆嚢癌を模倣できる可能性がある。オルガノイド細胞株を用いた in vivo の胆嚢がんモデルはそれ自体が新しく、新規性があると考えられる。

表 1. 胆嚢がん 404 例の遺伝子変異 TOP10 (COSMIC)。遺伝子名 (変異の頻度) と表記。

|             |              |            |             |            |
|-------------|--------------|------------|-------------|------------|
| TP53 (38%)  | CDKN2A (18%) | KRAS (17%) | KMT2C (18%) | ERBB3 (9%) |
| PIK3CA (7%) | TERT (6%)    | ERBB2 (6%) | ARID2 (7%)  | FAT4 (7%)  |

## 5. 論文及び学会発表 (研究会を含む)

**Shingo Kato** DEVELOPMENT OF A NOVEL GALLBLADDER CANCER MOUSE MODEL USING ORGANOID CELL LINES, Digestive Disease Week 2019 Poster of Distinction. 2019 年 5 月

## <学生自主的活動助成>

米国の大学・附属病院における重症・希少疾患患者に対する高度看護実践と

教育・研究に関する研修を通して

村松さやか

横浜市立大学医学部看護学科 4 年

### 要約

テンプル大学 Cardiovascular Research Center（以下心臓血管研究所）では、トランスレーショナルリサーチの実験環境と実際について見学させていただきました。心筋梗塞モデルマウスの作製、細胞の培養環境・評価の方法、心筋梗塞モデルのピッグの作製とそのピッグに治療介入する実験を見学させていただきました。テンプル大学附属病院では、肺移植手術を受ける患者さんの術前術中術後にわたり見学させていただきました。また、移植手術を受ける患者さまに関する他職種でのカンファレンスに参加させていただきました。移植後、一人で暮らすことになりうる人に対してどうサポートしていくか、家族や周囲の援助は受けることができるかも話されていました。

ペンシルバニア大学看護学部では、学部内をまわり、どのような環境で講義や演習が行われているのか見学させていただきました。また、附属病院も見学させていただき、日本の病院との共通点や相違点を感じました。他に、看護師に対する支援として、看護師のリラクゼーションルームがありました。また、治療が終わった人や健康な人のフォローアップも徹底されており、今までに受けた健康診断などの結果をオンラインで患者さんが確認できるシステムが確立されていました。

## <学生自主的活動助成>

米国の大学・附属病院における重症・希少疾患患者に対する高度看護実践と

教育・研究に関する研修を通して

村松さやか

横浜市立大学医学部看護学科 4 年

### 1. テンプル大学

Cardiovascular Research Center（以下心臓血管研究所）では、トランスレーショナルリサーチの実験環境と実際について見学させていただきました。心臓血管研究所で使用しているほとんどの心筋梗塞モデルマウスの作製を担っている先生に実際の心筋梗塞モデルマウスの作製を見学させていただきました。また、幹細胞を用いた心筋梗塞の治療に関する研究のための実験、細胞の培養環境・評価の方法などを学ばせていただきました。特に、心筋梗塞モデルのピッグの作製とそのピッグに治療介入する実験を見学させていただいた際には、ピッグの手術でも人間に用いる医療機器と同じものが用いられており、ピッグを用いた実験を行うということがいかにヒトへの応用に近づいているのかということを実感しました。そのほかには、実験者の故意が入らないよう、実験者にはコントロールと介入の是非については隠されており、正確な実験を行うために様々な面において徹底的に管理することの必要性を痛感しました。新しい医療を開発し、臨床研究を経て、日常医療へ応用していくまでの一連の研究過程のうち、臨床で人に応用される前の細胞培養の実際や、マウスやピッグの実験の重要性を学ぶことができました。

テンブル大学附属病院では、肺移植手術を受ける患者さんの術前術中術後にわたり見学させていただきました。アメリカでは、Nurse Practitioner（以下 NP）が初期症状の診断、処方、投薬などを担っており（州によって担う範囲は異なる）、病棟に入院しているときには特に重要な存在であり、術前術後のラウンドでも担当の NP が同行して患者さんの状況を把握していました。患者さんに対しては、ドナーが出現し、移植手術が行われることが決定すると、基本的に臓器提供する人の個人情報伏せられますが、以前に刑務所で生活したことがあるなどのハイリスクとされる情報は必ず伝えられることになっていました。術中は、看護師が2～3名おり、手術器具を渡すなどする直介看護師と、清潔野以外のところで行動し援助する外回り看護師がおり、日本と同様に役割分担して援助をしていました。今回見学させていただいたような片肺の移植手術を受けた患者さんは、大きな問題がなければ、基本的に入院から退院まで 5 日間程度とのことで、在院日数の短さに大変驚きました。

手術見学だけでなく、移植手術を受ける患者さまに関する他職種でのカンファレンスに参加させていただきました。参加する職種は幅広く、医師、NP、ICU 看護師、病棟看護師、栄養士、呼吸療法士、ソーシャルワーカーなどが参加していて、病状や術後の経過だけで

なく、患者さんの生活のことにしても多くの時間を割いてカンファレンスを行っていた印象がとても強く残っています。移植後は薬の内服などが重要となるため、移植後、一人で暮らすことになりうる人に対してどうサポートしていくか、家族や周囲の援助は受けることができるかも話されていました。カンファレンスが頻繁に行われるようになってスタッフそれぞれの意見や考えを共有できるようになっているとのことで、手術の技術や術前後のケアだけでなく、患者さんの生活を入院前から把握して退院後の必要な支援につなげているからこそ短い在院日数が実現できるのだと感じました。

## 2. ペンシルバニア大学

看護学部では、学部内をまわり、どのような環境で講義や演習が行われているのか見学させていただきました。ディスカッションやグループワークを行うような講義が多いとのことで、大きな講義室は少なかったです。演習室は日本と同様大きな部屋にベッドが十数台ある部屋と、ベッドは数台の小規模な部屋がありました。学期外であったため、実際に学生たちの講義や演習の場面を見学することはできませんでしたが、案内してくれた先生の説明を聞きながら見学しました。

また、附属病院も見学させていただき、日本の病院との共通点や相違点を感じました。病室は一般病棟・ICU など関係なくとても広く作られており、多くは個室で、複数人の部屋はほとんど見ることはありませんでした。また、各病室にはその日の担当職員を明記するボードがあり、その他にも長期・短期の看護目標や直近のペインスケール、その患者さんが職員にどのように呼んでほしいかまで書かれており、日々更新されていました。日本でも担当職員や看護目標についての情報共有は行われていても、ボードに書いて患者さん自身とも常に共有することは見たことがなく、異なる点だと感じました。また、各病室には、患者さんを移動するためのリフトが設置されており、看護師の身体的負担が軽減され、より少ない人数で患者さんの移動ができるように設備が整っていました。他に、看護師に対する支援として、この病院独自かもしれないとの話でしたが、看護師のリラクゼーションルームがありました。マッサージチェアがあったり、ヨガやズンバダンスのクラスが曜日ごとに開かれていたり、看護師の疲労やストレスを軽減するための取り組みがなされていました。

外来で印象的だったのは、抗がん剤の外来治療で、個室の部屋が用意され、室内も広く、テレビや大きなソファが用意され、リラックスできる環境で治療時間を過ごすことができるようにされていました。また、治療が終わった人や健康な人のフォローアップも徹底されており、今までに受けた健康診断などの結果をオンラインで患者さんが確認できるシステムが確立されていました。内服薬もインターネットで要望すると郵送されたり、担当医や担当 NP にメールで相談すると、数日以内に返信があり、ちょっとでも気になることがあれば質問できる環境が整っていました。他にも、定期受診の前日には確認のメールがきたり、必要な検査をする提案のお知らせがくるようになっていました。患者さん・病院の利

用者が自分の生活のリズムの中に治療・医療をうまくとりいれるような環境が整っていて、医療者と協力して健康な生活を築いているということを学ぶことができました。

<学生自主的活動助成>

米国の大学・附属病院における重症・希少疾患患者に対する

高度看護実践と教育・研究に対する研修

中村郁海

横浜市立大学医学部看護学科4年

このたびアメリカフィラデルフィアにある **Hospital of the University of Pennsylvania** 及び **Hospital of the University of Temple** にて研修をして参りましたので、報告をさせていただきます。私は以前より海外での医療や看護活動に興味があり、今回の研修では2病院にて病棟内の見学や **Dr** と **NP (Nurse Practitioner)** による回診の実際、肺移植カンファレンスの様子、また手術室では肺移植手術と **CABG** の手術見学をさせていただき、米国の医療現場の実際や日本との違いについて学ぶことができました。また実際に米国で勤務しており現地で医療サービスを受けている日本人の方からもお話を伺うことができ、自宅にいながらでも入院・通院時のデータにアクセスできる **Online Check** サービスの存在など、患者の視点からも米国の医療について知ることができました。今回の病院実習や現地の方のお話を通して、日本と異なる医療現場の実際を知り、それぞれの利点・問題点についても考える機会となりました。今回の経験を今後の勉強やキャリアに活かしていきたいと考えております。

## <学生自主的活動助成>

米国の大学・附属病院における重症・希少疾患患者に対する高度看護実践と

教育・研究に対する研修

中村郁海

横浜市立大学医学部看護学科4年

### 1. 目的

米国における心臓・肺移植を含む重症疾患患者への手術室・集中治療室といった超急性期医療場面における看護師の高度看護実践、教育、および研究の重要性について学ぶ

### 2. 期間

平成30年8月9日～8月18日（10日間）

### 3. 実習先

Philadelphia（テンプル大学附属病院・心臓血管研究所、ペンシルバニア大学附属病院・看護学部）

### 4. 実習内容

現地実習ではテンプル大学附属病院見学、ペンシルバニア大学附属病院見学をメインに行いました。米国の病院と日本との大きな違いは専門職が分業しており栄養士、PA、RN、NP、Drなど役割分担、効率化がなされていたことです。食事の配膳は看護師が行わない、肺移植後のリハビリに関しては呼吸機能訓練員という専門の職種が行っていることで、それぞれの役職が「自分の職種しかできない仕事」のみに集中しており、結果としてケアの質の向上や職員のモチベーションにつながっていると考えました。米国でこれだけ多くの職種が関わっていることを、日本では医師、看護師、看護助手、クラークさんという少ない職種で行っており、また各職種の仕事内容が重複する場面があるためにそれぞれの仕事量が増えてしまっているのではないかと考えましたが、米国では職種が多い分人件費がかかり、医療費が増大するという側面もあることから、日本でこのような多職種導入はあまり現実的ではないのかなと思いました。また、ペンシルバニア大学附属病院のICUでは全ての病室に移動用リフトが設置されており、移動・移乗の負担が最小限となるようになっていました。日本の一般病棟において看護師が時間と労力を割いていることの一つは患者や物品を「移乗」「移動」することだと思いますが、それによって患者とじっくり向き合う時間が圧迫されているのではないかと考えたので、日本でも導入されたらなと思いました（介護老人保健施設などでは目にすることがありますが・・・）。実際に見学した同病院ICUの病室には「その日患者目標」などを毎日書き換えるボードがあり、一人の患者に対しての時間的ゆとりがあったと感じました。



テンプル大学附属病院では医師と NP の回診に同行し、肺移植後の手術患者のリハビリがどのように行われているかを見学させていただくことができました。医師、NP が患者の状態を一人一人じっくりと見極め、病棟看護師と共に意見を交換し合っている様子も印象的でした。NP は心臓・肺移植専門、VAD 専門など NP 内でも細かく分業化されており、それぞれが専門性と責任を持って意見を言い合いケアにあたっていました。その中で移植専門の NP にお話を伺ったところ、役割としては病棟をラウンドして患者の状態をアセスメントし、治療やプランを考える他職種とディスカッションすること、マネジメントを行うこと、コーディネートすることと仰っていました。州によっては NP が処方を行う州もあるそうです。肺移植カンファレンスにおいても NP は専門性を発揮し積極的に発言をしている様子がみられました。肺移植においては誤嚥による感染症が予後を左右するため、理学療法士が患者の食事摂取の状況（嚥下機能の評価）について把握しており、カンファレンスで食事形態を栄養士などと調整していくという多職種連携の場面を見ることができました。またペンシルバニア大学では看護師のための Wellness Center があり、全身マッサージチェアを 10 分受けられるリラックスルームや看護師のためのヨガの企画など、看護師が大切にされ、働きやすい環境づくりがなされていると感じました。

ペンシルバニア大学看護学部では日本と看護師の仕組みが異なる米国において、どのように看護師が育成されているのかを知ることができました。また予防医療の実際について知ることができました。私達がお話を伺った方は、自身の家族歴からとある病気の高リスクが高いと考え、食べ物に気を遣ったり、毎日通勤時に 40 分歩き 20 分自転車に乗るなど運動・食事の面から健康に気を遣っていました。このように健康意識が高く自身で健康行動をしている方がいる一方で、町には道端に新聞を広げ寝転ぶホームレスや電車内で物乞いをする人など健康とはほど遠いというような方も見受けられました。また米国での食事は美味しかったものの日本に比べて量が多く、高カロリーで高塩分なものが多いと感じたため（ピザ、バーガー、ターキーレッグ、甘い飲み物など）、このような食生活も様々な生活習慣病を生む原因だと考えます。そのような状況がある上で、健康行動を行うことができるのは所得や時間、精神的ゆとりなどがある人であり、どのようにすればこの健康格差を縮めることができるのだろうかと考えました。

Wister 研究所では研究所の見学に加え、米国で医療サービスを受けている日本人の方からお話を伺うことができました（ご本人は勤務されている大学の医療保険に加入しています）。自宅にいながらでも入院・通院時のデータにアクセスできる Online Check サービスの存在について教えていただき、具体的には、健康についての簡単な相談についてはオンラインで NP に相談することができること、また Dr も E-Mail で 24 時間対応可能な仕組みとなっているそうです。Online Check

サービスでは名前とパスワードを入れると電子カルテのような画面が表示され、今まで病院でいつどんな治療・検査を受けたかや、検査データの経時的な変化を見ることができます。また次の受診日や薬の案内もメールで届くシステムです。さらに、健診・予防接種といったメンテナンスの案内も必要な時期になるとメールで届くといった仕組みになっています。このようにオンラインで分かりやすく情報が管理されているため、受診した際に NP や医師がリマインドをかけることができ、患者の健診受診という行動につながっているそうです。日本では健診の呼びかけは主に行政や所属する企業が担い、健診受診率の低下も問題となっています。しかしこの米国のシステムのように病院から直接連絡が来れば患者の危機感も増し、健診受診行動へとつながるのではないのでしょうか。病気を重症化する前に発見するためには、このような個人の健康を管理する仕組みが日本にも必要であると考えます。自分が将来予防医療に携わることがあれば、今回学んだことを参考にしていきたいです。

## 5. 感想

私は海外での看護実践や予防医療というところに興味があるので、今回の研修の内容は大変有意義なものでした。特にテンプル大学で活躍されている日本人の心臓血管外科医の先生の手術や、全米トップの移植件数を誇る肺移植の手術を実際に見学させていただいた場面は印象的でした。普段は看護学生としてあまり手術見学をする機会はありませんが、そのような私から見ても、先生方の手術のスピードや正確さに感動したことはもちろん、執刀医や助手が何も言葉を発さずとも必要なタイミングで必要な器械出しをこなしていた手術室看護師のレベルの高い技術にも大変感動しました。今回の病院実習や実際に医療を利用している現地の方からお話を聞くことを通して、移植手術など米国で行われている高度看護実践の理解に加え、NP の存在やオンラインチェックサービスなど日本と異なる医療現場の実際を知り、それぞれの利点・問題点についても考える機会となりました。今回の経験を今後の勉強やキャリアに活かしていきたいと考えております。

最後に、このような貴重な経験と学びをさせていただきましたテンプル大学の豊田先生、重村先生、南方先生、砂川先生、実習の機会を与えてくださりましたテンプル大学、ペンシルベニア大学の皆様、本活動をご支援して下さった一般財団法人横浜総合医学振興財団の皆様に心より感謝申し上げます。



## 6. 収支

|    |                     |           |             |
|----|---------------------|-----------|-------------|
| 収入 | 横浜総合医学振興財団支援金       | 150,000 円 |             |
| 支出 | 航空券運賃               | 197,400 円 |             |
|    | 宿泊費                 | 64,427 円  |             |
|    | ペンシルバニア大学研修費（手数料含む） |           | 46,633 円    |
|    | 計                   | 308,460 円 | （差額は自費にて負担） |

<学生自主的活動助成>

米国の大学・附属病院における重症・希少疾患患者に対する高度看護実践と

教育・研究に関する研修 報告書

石塚有希子

横浜市立大学医学部看護学科 4 年

今回の研修では、米国の病院の見学を通して、日本との医療の違いや、働いている職種の違いなどを学ぶことができました。米国では職種ごとに役割が細分化され、分業されている印象でした。また、日本にはない職種である **Nurse Practitioner** が実際に活動している場面を見学し、日本の看護師とは全く異なる職種であるということを学びました。**NP** は **MD** と共に病棟をラウンドし、アセスメントから処置、コーディネート、プランニングなど患者に関するほとんどのことを管理していました。**MD** の診察前に **NP** が診察したり、患者の疑問に **NP** が回答したりすることが普通であり、看護職の一つであるが、日本では医師が行っていることの多くを行うことができる存在であることがわかりました。看護的な視点を持った医師のような存在である **NP** が日本に導入されれば、さらに円滑な治療が行われるのではないかと感じました。肺移植の見学では、手術、患者の術後の様子や肺移植カンファレンスを見学させていただきました。米国では **PHS** ハイリスクドナーと呼ばれる人々が多く、米国の移植医療はそのような米国の社会的背景や医療制度・文化と深く関連しているということを学び、より深めて考察したいと感じました。

## <学生自主的活動助成>

米国の大学・附属病院における重症・希少疾患患者に対する高度看護実践と  
教育・研究に関する研修 報告書  
石塚有希子  
横浜市立大学医学部看護学科 4 年

### 1) 目的

(1) 米国の病院を見学し、設備面や看護師の職種、各職種の役割の違いなど、日本の病院や看護体制と異なる部分を体感する。また、肺移植の手術から患者のリハビリまでの一連の流れを見学し、米国での移植医療から得た移植看護の視点で日本での移植看護の考察を行う。

(2) 米国の研究所を見学し、自身の卒業論文にて必要となる手技の見学を行う。また、基礎研究等が臨床に応用されていく流れなどを体感する。

(3) ペンシルベニア大学の看護学部を見学し、日本の看護を学習する環境との違い、日本にはない Nurse Practitioner や、Physician Assistant などの職種を育成するプログラムについてなどを知る。

(4) 留学している方や、米国で活動している日本人と交流を行い、留学体験の紹介、留学する際に必要なことや、米国で得られたことなどを聞くことで、今後の自身の留学や海外でのキャリア育成について考える。

### 2) 得た学びと考察

#### (1) 米国の病院見学

米国の病院を見学して感じた一番の違いは、病棟で働いている人の人数が多いことです。米国では職種ごとに役割が細分化され、分業されている印象でした。しかし、誰がどの職種であるのかはパッと見てわからず、職種を意識する必要がないと考えていて、何の職種かということではなくチームの中で「何をする役割の人」なのかということだけわかればいいというように考えていて、カンファレンスでの発言や情報共有の際に職種間の垣根がないように感じました。また、日本にはない職種である Nurse Practitioner が実際に活動している場面を見学し、日本の看護師とは全く異なる職種であるということを学びました。NP は MD と共に病棟をラウンドし、MD に患者の状態を報告するだけでなく、アセスメントから処置、コーディネート、プランニングなど患者に関するほとんどのことを管理していくことができるようになっていました。NP の中でも専門が細分化しているため、高度な医療が提供できていると感じました。看護体制も全ての病棟で 1 : 4 となっており、ICU などの重症度が高い病棟では 2 : 1 な



どの看護体制をとっているなど手厚いケアが可能になっていました。肺移植の見学では、手術自体の見学だけでなく、患者の術後の様子や肺移植カンファレンスも見学させていただきました。米国でのドナーは自殺や薬物中毒者など PHS ハイリスクドナーと呼ばれる人々も多く、しっかりとした検査が必要ではあるものの、そういったドナーの存在は移植医療に重要になっているということを知りました。米国の移植医療はそのような米国の社会的背景や医療制度・文化と深く関連しているということを学び、より深めて考察したいと感じました。肺移植カンファレンスでは、MD や NP、呼吸療法士や PT などのリハビリ職、薬剤師、SW、栄養士などの職種が参加し、術後の経過や今後の治療方針を共有していました。在院日数が短く、肺移植後 1 週間程度で退院するということを知り、大変驚きました。短い期間で退院するためには合併症を起こさないことが最も重要であり、そのためには肺移植後の誤嚥のリスクを最小にする必要があるため、その部分には看護職が介入している部分が多くあると感じました。

## (2) 米国の研究所

自身の卒業研究にて必要となる、マウスの心筋梗塞処理の手技について見学しました。また、豚の心筋梗塞処置などの見学も行い、人にとっても近い体の構造をしていることなどを学習しました。細胞レベルの基礎研究がマウスからだんだん人に近づき臨床に応用されていくことを実際に体験することでより深く理解することができました。

(3) ペンシルベニア大学看護学部の見学を通して、どのようにして NP や PA が育成されるのかなどを知ることができました。演習室や教室は日本の大学と大きな違いはないですが、小さい部屋が多く設置されており、学生同士でグループワークを行ったりすることがしやすい環境にあると感じました。NP は病院で急性期の医療を提供することだけでなく、プライマリーケアを提供する専門の分野の NP もおり、アメリカの医療体制の中に NP という存在が浸透していることを感じました。MD に診察される前に NP が診察したり、患者の疑問に NP が回答したりすることが普通であり、看護職の一つであるが、日本では医師が行っていることの多くを行うことができる存在であることがわかりました。日本では医師は疾患に関することを主に担当し、看護師は看護的な視点を持って、家族への支援や患者の精神的なケア、合併症を防ぐための教育などを行っていくように大まかに分かれているように感じていたので、看護的な視点を持った医師のような存在である NP が日本に導入されれば、さらに円滑な治療が行われるのではないかと感じました。

今回の研修で得た貴重な経験を今後の自身の看護に活かしていきたいと思いま

す。今回の研修に参加するにあたり、支援してくださいました横浜総合医学振興財団に深く感謝いたします。

#### 収支報告

収入 横浜総合医学振興財団からの助成 150, 000 円

支出 飛行機代金 197, 400 円

宿泊費 64, 427 円

ペンシルベニア大学研修費 46, 633 円

差額は自費で対応致しました。



<学生自主的活動助成>

第 107 回 日本病理学会におけるポスター発表

松元加奈

横浜市立大学 医学部医学科 5 年

要約

4 年生の 4 月～7 月までの間リサーチクラークシップという研究期間で、私は分子病理学教室で遺伝性平滑筋腫症—腎細胞癌症候群(Hereditary Leomyotoma renal cell carcinoma: HLRCC)という稀な疾患の研究に携わりました。HLRCC は、クエン酸回路で重要な *FH(Fumarate Hydratase)* 遺伝子の変異によって引き起こされる常染色体優性遺伝の疾患で、日本では現在 5 家系しか報告されていません。

今回、2018 年 6 月 22 日～24 日にロイトン札幌で開催された第 107 回 日本病理学会にて、HLRCC 関連腎細胞癌の新規変異を同定した症例をポスター発表しました。質疑応答では、多くの先生方から質問、意見をいただき、関心の高さを感じました。様々な先生方の発表や意見を伺えること、

全国の学生がどのような研究を行っているか知ることができ、今回とても有意義な経験となりました。このように、学生で研究を発表する機会があり援助が受けられることは、大変恵まれていると日々感じております。学会開催地である北海道に行くにあたり、経済的支援をいただいた横浜総合医学振興財団様、ご指導を賜りました先生方に感謝を申し上げます。本当にありがとうございました。

<学生自主的活動助成>

第 107 回 日本病理学会におけるポスター発表

松元加奈

横浜市立大学 医学部医学科 5 年

1.目的

4 年生の 4 月～7 月までの間リサーチクラークシップという研究期間で、私は分子病理学教室で遺伝性平滑筋腫症—腎細胞癌症候群(Hereditary Leiomyotoma renal cell carcinoma: HLRCC)という稀な疾患の研究に携わりました。HLRCC は *FH* (*Fumarate Hydratase*) 遺伝子の変異によって引き起こされる常染色体優性遺伝の疾患で、日本では現在 5 家系しか報告されていません。

今回、2018 年 6 月 22 日～24 日にロイトン札幌で開催された第 107 回 日本病理学会にて HLRCC 関連腎細胞癌の一例をポスター発表しました。

2.報告内容

症例は 32 歳男性。家族歴は父が肺がんで死亡、母と姉に皮膚症状・腎癌の報告は無く、特記事項はありません。現病歴は、不明熱と側腹部痛を主訴に当院を受診し、精査の結果左腎腫瘍を認めました。左腎摘出後に全身転移し、発症から 17 か月後に死亡しました。組織学的には、乳頭状腎細胞癌 type2 の組織型で、halo を伴う巨大な好酸性の核小体を認めました。免疫染色では、正常尿細管上皮で陽性となる FH が腫瘍細胞で陰性を示していました。

今回、組織学的には FH 欠損腎細胞癌である点、臨床学的には 30 代で腎癌が原因で死亡している点から、*FH* 遺伝子検索を行うことで HLRCC の可能性を検討しました。

本症例は胚細胞レベルで c.251\_267+7del.が生じており、HLRCC であることが証明できました。RT-PCR を行った結果、exon2 の skipping が生じており、western blotting によって正しい FH タンパク質が作られていないことが分かりました。

3.感想

HLRCC は世界では多くの報告があるものの、日本での報告は現在 5 家系であり、まだ認知度が高くありません。今回の質疑応答では、多くの先生方から質問、意見をいただき、関心の高さを感じました。HLRCC は、転移することが多い乳頭状腎細胞癌の組織型を示すことが多く、予後が悪い疾患です。本発表をきっかけに、少しでも HLRCC を知る人が増えれば嬉しいと思いながら発表していたので、その目標は果たせたのではないかと考えています。

また、遺伝性疾患に関するコンパニオンミーティングでは、乳頭状腎細胞癌以外の組織

型を示す HLRCC の発表を伺い、本疾患に対する知識を更に深めることができました。様々な先生方の発表や意見を伺えること、全国の学生がどのような研究を行っているか知ることができ、今回とても有意義な経験となりました。このように学生で研究を発表する機会があり援助が受けられることは、大変恵まれていると日々感じています。最後になりますが、学会開催地である北海道に行くにあたり、経済的支援をしていただいた横浜総合医学振興財団様に感謝を申し上げます。本当にありがとうございました。

#### 4.収支報告

| 用途      | 金額      |
|---------|---------|
| 宿泊費(2泊) | 14600 円 |
| 交通費     | 19480 円 |
| 合計      | 34080 円 |

＜学生自主的活動助成＞

ブラジル日系永住者巡回診療健診実習

立入仁美

医学部医学科 6 年

当実習では、南ブラジル日系永住者を対象とした巡回診療に参加させていただいた。本検診は、1年に1度南ブラジルに点在する日系コロニーをバスで巡回し、日本語による診療を行っているものである。現在巡回診療の中心となっている森口エミリオ秀幸先生は、ブラジルの大学病院で医師として活躍される傍らご自分の休暇を利用してこの巡回診療を行っていらっしゃる。ブラジル日系移民の歴史は100年を超えるが、特に日系1世や2世の方々の中には母国語で診療を受けられる巡回診療を心待ちにしている方も少なくないという。

私はこの巡回診療において問診や血圧、心電図測定など学生として出来る範囲で検診の工程をお手伝いさせていただきながら現地の日系移住者の方々と交流したり森口先生の診療の様子を見学したりさせていただいた。ハードなスケジュールの中一人一人の受診者と丁寧に向き合う森口先生の様子から医療者としてあるべき姿を考えたり、ブラジル日系移民という厳しくもたくましい時代を生き抜いてこられた方々と交流したりする貴重な体験となった。この場を借りて当実習の参加に際しご援助いただいた横浜総合医学振興財団に御礼申し上げたい。

## <学生自主的活動助成>

### ブラジル日系永住者巡回診療健診実習

立入仁美

医学部医学科 6 年

私は 2018 年の夏に本実習に参加させていただきました。この巡回診療は、ご自身も日系移住者としてのルーツをもち、普段はブラジルの大学病院で医師として活躍されている森口エミリオ秀幸先生が、ご自分の休暇を利用して毎年行われているものです。ブラジル日系移民の歴史は 100 年以上の長きにわたりますが、1 世や 2 世の方を中心に母国語である日本語による診療のニーズは高く、年に 1 度のこの巡回診療を心待ちにされている方も少なくありません。今回私はボランティアスタッフとして問診や血圧、心電図測定など検診の工程をお手伝いさせていただきながらブラジル南部に点在する日系コロニーを約 2 週間かけてバスで巡回し、現地の日系移住者の方々と交流したり森口先生の診療の様子を見学したりさせていただきました。

この 2 週間の実習を通していくつもの素晴らしい出会いを経験することが出来ました。

森口先生は慈愛とバイタリティに溢れた人格者とでもいうべき方でした。朝早くから時に深夜までかかる診療中先生は休みなく患者さんの対応をされています。一人一人の話をよく聞き、必要な時には患者さんを叱ることもいとわない姿勢からは患者さんのことを心から思っ診察にあたっていらっしゃることが感じられました。また、巡回のバス移動中にも携帯電話を利用して普段務めていらっしゃる病院に必要な指示を出したり、今までにかかわった患者さんから直接くる相談に対応されたりしている場面もありました。大きな熱量をもって目の前の患者さんと向き合うと同時に、現状をよりよくするために必要なことを考え行動出来る医師を私も目指したいと思いました。

また、巡回診療に参加していた現地の医療系学生とも交流する機会がありましたが、会話の端々から意欲的かつ真摯に医学と向き合っている姿勢が感じられ、自分ももっと頑張らなければいけないと思われました。

日系永住者のみなさんのお話を聞く機会をたくさんいただいたことも貴重な経験でした。それぞれの方に移民としての歴史があり、今日のブラジル日系社会が日系の皆さんお一人お一人の努力と創意工夫によって築かれてきた様子を垣間見ることが出来ました。現代の守られた環境で育ってきた自分には容易に想像の及ばないような体験を経てブラジルという日本から遠く離れた場所で大きな日系社会を作り上げたその努力や忍耐に尊敬の念を抱かずにはられません。

これから始まる医師人生の中で壁にぶつかったり道に迷ったりする日がきつとくと思

います。そんな時にこの実習での経験は、医療とは何か、自分はどんな医療者になりたいのか、といったことを思い出させてくれる基盤になってくれると感じています。

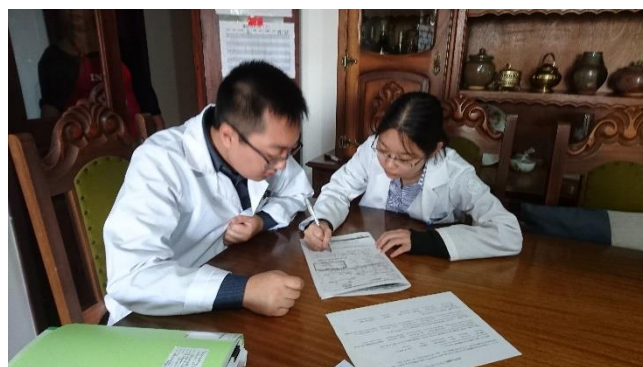
この場を借りて本実習の参加にあたりご援助いただいた横浜総合医学振興財団に御礼申し上げます。ありがとうございました。

＊経費内訳

海外航空運賃 239,000 円

燃油サーチャージ 24,240 円

ブラジル査証代 15,500 円



＜学生自主的活動助成＞

ブラジル日系永住者巡回診療健診

橘 優汰

横浜市立大学医学部医学科 6 年次

2018 年度のブラジル日系永住者巡回診療健診に参加させていただきました。

ブラジルにはかつて多くの日本人が海を越えて渡り未開の大地へと入植し開拓していきました。その日系一世は現在高齢化が進む中、現地の医療機関では言語の壁があり、母国語である日本語での診療が望まれています。リオグランデドスル連邦大学医学部教授の森口エミリオ秀幸先生は親子三代に渡って日系移民の診療に携わって来られた方です。毎年ブラジル南部の日系移住者の居住地を訪ねる巡回診療を続けられています。

今回の巡回診療ではブラジル南部を 10 日間かけて約 2200km 移動しました。森口先生の診察は朝から晩まで長時間に渡っていましたが、先生は疲れた顔一つ見せずに一人一人のお話をじっくりと傾聴されていました。森口先生の医師としての姿勢に一医学生（当時）として感銘を受けました。今や医学部を卒業し研修医となりました。医療現場には多くの外国人患者が受診・入院しており、言語の壁や風習の違いなどによって日々問題が発生しています。ブラジルでの経験を経たことで在日外国人の診療に積極的に取り組む必要性を感じています。



## ＜学生自主的活動助成＞

### ブラジル日系永住者巡回診療健診

橘 優汰

横浜市立大学医学部医学科 6 年次

2018 年度のブラジル日系永住者巡回診療健診に参加させていただきました。

ブラジルにはかつて多くの日本人が海を越えて渡り未開の大地へと入植し開拓していきました。その日系一世は現在高齢化が進み様々な健康問題を抱える中、現地の医療機関では言語（ポルトガル語）の壁があり、母国語である日本語での診療が望まれています。リオグランデドスル連邦大学医学部教授の森口エミリオ秀幸先生は親子三代に渡って日系移民の診療に携わって来られた方です。毎年ブラジル南部の日系移住者の居住地を訪ねる巡回診療を続けられています。

最初にこの活動を知ったのは学部 3 年次の水嶋春朔教授の社会医学の講義でした。巡回診療のプロモーション動画が上映されたのですが、そこに映るブラジルの広大な赤い大地と日系永住者の方々の姿を見て、いつか学年が上がったら自分もブラジルに行きたいと思ったのを覚えています。

今回の巡回診療ではブラジル南部を 10 日間かけて約 2200km 移動しました。移動中バスから見える景色はどこまでも広がる大地とそこに群生しているパラナ松（ブラジル固有種で放射状に枝を伸ばす巨大な松）が印象的でした。

どの町でも日系移住者の皆さまに温かく迎えていただきました。chimarrão（マテ茶のこと。アルゼンチン、パラグアイ、ブラジル南部などで愛飲されている。）を飲みました。ガウーショ（南米版カウボーイ）になった気分でした。

森口先生の診察は朝から晩まで長時間に渡っていましたが、先生は疲れた顔一つ見せずに一人一人のお話をじっくりと傾聴されていました。これは日本の医療現場ではなかなか難しいことであり、森口先生の医師としての姿勢に一医学生（当時）として感銘を受けました。

今や医学部を卒業し研修医となりましたが、毎日多くの外国人患者が受診・入院しています。言語の壁や風習の違い、医療費の支払いなど多くの問題が日々発生しています。現場の医師や医療従事者は必ずしも彼らに良い印象を持っていないというのが実情ではないでしょうか。現在日本の在日外国人は 250 万人を突破しており、これからもその数は増えていくことでしょう。超高齢化社会へと突入し人口減少が続く本邦が生き残るためには彼らの力を取り込みつつ共生していく他残されていません。ブラジルでの経験を経たことで在日外国人への診療に積極的に取り組む必要性を感じています。外国人の医療保険、生活保護受給の問題など法律面の整備が急がれますが、少なくともそれは政治家の仕事です。現

場の医療者として何ができるでしょうか。私自身の取り組みとして、中国人患者には外来や回診時に中国語で軽く会話するようにしています。言葉が通じる医療者がいると彼らも安心するようで心を開いてくれる...印象があります（気のせいかもしれませんが）。

最後に本活動を始めとして学部生時代に多大な助成を頂いた横浜総合医学振興財団に心から御礼申し上げます。貴財団と母校である横浜市立大学医学部の発展に一卒業生として微力ではありますが必ずや貢献し、恩返ししたいと思っております。また森口エミリオ秀幸先生を始めとする南日伯援護協会の皆さま、引率教員の水嶋教授にも御礼申し上げます。



日系コロニアの発展を願ってやみません。Muito obrigado!

#### 諸経費明細

航空費 ￥239,000

成田空港施設使用料・旅客保安料 ￥2,610

海外空港税 ￥7,540

燃油サーチャージ ￥24,240

発券手数料 ￥6,480

ブラジル査証代 ￥15,500

査証取扱手数料 ￥7,560

合計 ￥302,930

内、財団助成 ￥150,000

＜学術講演会助成＞

脳神経外科教育セミナー 2018

山 本 哲 哉

横浜市立大学大学院医学研究科 脳神経外科学

【日時】

平成 30 年 6 月 11 日(月) 18:30－20:30、

平成 30 年 6 月 18 日(月) 18:30－20:30、

平成 30 年 7 月 2 日(月) 18:30－20:10

【会場】

横浜市立大学 福浦キャンパス A649 室

【演題】

脳腫瘍の病理

6 月 11 日:神経膠腫

6 月 18 日:髄膜種、神経鞘腫、遺伝性腫瘍、胎児性腫瘍、胚細胞種、中枢神経原発悪性リンパ腫

7 月 2 日:神経細胞系腫瘍、松果体腫瘍、トルコ鞍近傍腫瘍

【講師】

澁谷 誠先生:東京医科大学八王子医療センター 病理部教授・横浜市立大学客員教授

【参加者】

各回 20 名程度

【講演内容】

世界保健機構(WHO)の脳腫瘍分類は 1979 年の初版以来改定を重ね、2016 年 5 月に WHO 分類第 4 版改訂版が出版された。この改訂版では、従来の組織学的分類に分子分類が初めて組み入れられるなど従来の考え方が大きく変更された。

今回の講義では、この改訂版を踏まえ最新の分子生物学的所見も解説頂き、病理所見に関してはほぼ全領域を網羅する充実の講義内容であった。また、当科の医師のみならず放射線科、病理部の先生方にもご参加を賜り非常に有意義な会となった。

<学術講演会助成>

## 第 28 回日本病態生理学会大会

### 健康と病気の間にあるもの

藤田 孝之 （横浜市立大学大学院 医学研究科 循環制御医学 ）

**会期** 平成 30 年 8 月 4 日（土）～平成 30 年 8 月 5 日（日）

**開催場所** 横浜市立大学 福浦キャンパス

〒236-0004 横浜市金沢区福浦 3-9

**大会長** 石川 義弘 （横浜市立大学大学院 医学研究科 循環制御医学 教授）

**事務局長** 藤田 孝之 （横浜市立大学大学院 医学研究科 循環制御医学 講師）

**大会 HP** <http://28th-pathophysiology.kenkyuukai.jp/>

**一般演題発表**

**講演会・シンポジウム等**

### ・病態生理企画シンポジウム

日時：大会第 1 日目 平成 30 年 8 月 4 日（土）9：00～11：00

テーマ：複眼的思考で循環にアプローチする

会場：横浜市立大学 医学部 福浦キャンパス ヘボンホール

座長：佐久間 康夫 （東京医療学院大学）

シンポ 01. 「G 蛋白活性調節因子による病態制御機構」

佐藤 元彦、Md. Junayed Nayeem、山村 彩、林 寿来（愛知医科大学）

シンポ 02. 「循環医学に関連したニューロパチーの病態生理」

三五 一憲 （東京都医学総合研究所）

シンポ 03. 「血管構造を作り出す細胞動態のロジック」

栗原 裕基，和田 洋一郎，時弘哲治（東京大学）

シンポ 04. 「心臓非神経性 ACh 産生システムの臓器間クロストークとその生理機能学的意味」

柿沼 由彦（日本医科大学）

### ・ランチタイムセミナー

日時：大会第1日目 平成30年8月4日（土） 12：15～13：15

会場：横浜市立大学 医学部 福浦キャンパス ヘボンホール

座長：岡田 隆夫（順天堂大学）

「頻脈、高血圧、糖尿病発症の基礎病態としての睡眠時無呼吸症候群」

田中 俊一（みなとみらいクリニック）

### ・ビジョナリーシンポジウム

日時：大会第1日目 平成30年8月4日（土） 13：20～14：35

会場：横浜市立大学 医学部 福浦キャンパス ヘボンホール

座長：井福 正隆（武田薬品工業）

「質量分析法に基づくプロテオミクス解析」

今見 考志（京都大学）

### ・特別講演

日時：大会第1日目 平成30年8月4日（土） 16：55～17：55

会場：横浜市立大学 医学部 福浦キャンパス ヘボンホール

座長：森田 啓之（岐阜大学）

「自然リンパ球と炎症」

小安 重夫（理化学研究所）

### ・教育講演

日時：大会第1日目 平成30年8月4日（土） 18：00～18：15

会場：横浜市立大学 医学部 福浦キャンパス ヘボンホール

座長：横山 詩子、齋藤 純一（横浜市立大学）

「こどもの不整脈に携わり50年」

新村 一郎（新村医院）

## 病態生理教育シンポジウム

日時：大会第2日目 平成30年8月5日（日）9：00～11：40

テーマ：全身循環と口腔が多臓器に及ぼす病態生理

会場：横浜市立大学 医学部 福浦キャンパス ヘボンホール

座長：奥村 敏（鶴見大学）

千葉 由美（横浜市立大学）

シンポ01：「病態生理に基づく全身・口腔への看護実践のポイント」

千葉 由美（横浜市立大学）

シンポ02：「口腔内の感染、口腔機能低下が全身に与える影響とは？」

大橋 伸英（横浜市立大学）

シンポ03：「歯周病ならびに不正咬合が心臓に及ぼす影響」

奥村 敏（鶴見大学）

シンポ04：「いわゆる「口腔と全身」に関する研究成果と歯科保健医療のこれから」

安藤 雄一（国立保健医療科学院）

シンポ05：「健康寿命の延伸を目指した咀嚼の観点からの食事の在り方」

柳沢 幸江（和洋女子大学）

シンポ06：「高齢者が咀嚼・嚥下しやすいパンを作る」

新井 映子（静岡県立大学）

## 細見記念講演

日時：大会第2日目 平成30年8月5日（日）11：45～12：45

会場：横浜市立大学 医学部 福浦キャンパス ヘボンホール

座長：高木 都（奈良県立医科大学）

『細見弘先生のあしあとと未来へのあしあと』

西田 育弘（防衛医科大学校）

**参加者 140名程度**

## 大会を終えて

横浜総合医学振興財団等から助成をいただき、横浜市立大学医学部福浦キャンパスにて上記大会を盛会裏に終了した。



全国から病態生理に関する最新の研究についての、40 演題を超える口述発表があり、加えて上記の各種講演会・シンポジウムを開催した。例年を上回る多数の方々にご参加いただき、各セッションでそれぞれ非常に有意義なディスカッションを持つことができた。医師のみならず、歯科医師、看護師、学生（大学院生、学部学生）など多くの方々にご参加いただき、医学に関連する多業種間のコミュニケーションの場としても貴重な機会を提供することができた。

<学術講演会助成>

第5回日本血管血流学会学術集会

公立大学法人横浜市立大学医学部循環器・腎臓・高血圧内科学

石上 友章

演題：変貌をとげる、日本の臨床研究

演者：桑島巖先生

NPO 法人 臨床研究適正評価教育機構 理事長

東京都健康長寿医療センター顧問

日時：平成30年11月17日（土）第5回日本血管血流学会学術集会特別講演

午前10時40分～午前11時40分

会場：医学部へボンホール（福浦）

共催：横浜医学会、横浜医学総合財団

内容要旨

本年度より、特定臨床研究法が施行された。特定臨床研究法とは、未承認・適応外薬品の臨床研究および製薬企業から資金提供をうけた医薬品の臨床研究について適用される。本法律は研究や学問の自由を束縛するものとして反対する研究者も少なくなかったが、わが国の臨床研究の信頼性の回復のために求められる法律として発効にいたったものである。そもそも本法律が発起された原因となった降圧薬バルサルタン（ディオバン）に関わる不正事件について、その経過と発生要因について解説したい。

本事件は1990年代におけるARBの激しい販売競争の中で発生した。JIKEI HEART Study、Kyoto Heart StudyなどARBディオバンの心血管合併症予防効果を非ARB治療群と比較した5つのランダム化比較試験の企画、統計解析などにおいて支援企業の職員が深く関与しており、その結果も一般常識からあまりにもかけ離れていたことから研究結果に疑義が抱かれたのである。本事件は真相究明のために厚労省による調査委員会が立ち上げられ、その結果ついには、立件、そして企業職員の逮捕、裁判にまで至るという前代未聞のできごととなった。本事件の原因は、まず研究費取得や実績といった科学とは関係のない不純な動機から研究企画が始まったことに由来するが、なにより研究責任者の臨床研究や統計に対する知識不足と軽視が大きく関わっている。本講演では、本事件をきっかけに変貌が求められる日本の臨床研究における研究者の医学研究に対する姿勢と、研究論文の適正評価について述べる予定である。

## 公立大学法人横浜市立大学医学部循環器・腎臓・高血圧内科学

石上 友章

平成 30 年 11 月 17 日（土）に、本学へボンホールにて、第 5 回日本血管血流学会学術集会（5<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society of Vascular Medicine and Rheology, JSVMR）を開催させていただきました。本学会は、血管・血流という生体の基本的な構造・機能に着目し、両者の緊密な結合だけではなく、調和を持った結合、健康長寿をめざした結合をめざす研究者が集う学会です。今回で 5 回目ですが、その源流は血管硬化(vascular stiffness)を対象として、2001 年（平成 13 年）以来、13 回に亘る開催の歴史を持つ(旧)日本 AS 学会(Japanese Society of Arterial Stiffness・JSAS・)と、血流と血管のハーモナイゼーションをめざした学術研究を推進し、7 回に亘る開催の歴史がある(旧)日本血流血管学会(Japanese Society of Haemoroheo-Vascular Harmonization)という二つの学会にあります。両学会が、2014 年(平成 26 年)に統合し日本血管血流学会として、より高いレベルでの血管血流研究を展開させていく目的で、新たに誕生したのが本学会です。したがって、本学会に集う研究者は、医学だけではなく、栄養学、臨床検査学、生体工学、運動生理学といった多領域にわたる学識と経験を持っております。本学術集会では、学会員が一堂に会することで、より高いレベルに血管血流研究を展開させていく使命を帯びております。ベテランの研究者から、フレッシュな若手研究者まで、老若男女問わず、日ごろの研究成果に真摯に向かい合って、開かれた討論の場として、光栄なことに、このたびの第 5 回学術集会を大会長として、開催する機会を得ました。

学会当日は幸いなことに、快晴の天候に恵まれ、懇親会までのプログラムを滞りなく遂行することができました。学会の企画として、シンポジウム『生活習慣病ガイドラインの現在・過去・未来』、特別講演『変貌を遂げる日本の臨床研究』（NPO 法人臨床研究適正評価教育機構 JCLEAR 理事長 桑島巖先生）ならびに、血管血流研究の登竜門として、公募による若手研究者研究発表企画、一般演題ならびに、会長講演（『高血圧症・動脈硬化症の源流に迫る・血管血流研究への新展開』）といった内容でした。本学会のスローガンを『国民の健康長寿の実現をサポートする血管血流研究の新展開』として、約 1 年間にわたって、学会長として学会の準備を進めてまいりましたが、無事に責任を果たすことができたのではないかと、安堵の気持ちでいっぱいです。往年の日本高血圧学会のように、一会場限定の学会の良さを指摘する声も聴くことができ、一層感慨を得ることができました。

本学会の開催にあたっては、本学会理事長である林潤一先生、学会事務局の渡辺圭一先生、次期学会長の原島敬一郎先生はじめ学会関係者のみなさま、横浜医学会、横浜医学総合財団ならびに、医局員・同門会の諸先生方、医局のスタッフの多大なるお力添えを賜りました、本紙面を借りて、心より感謝申し上げます。



＜学術講演会助成＞

第 7 回神奈川婦人科腫瘍病理研究会

古屋 充子

横浜市立大学医学研究科 分子病理学

- ・ 開催日：：2019 年 3 月 30 日
- ・ 場所：横浜市立大学附属病院 10 階小会議室
- ・ 参加者数：32 名

プログラムは以下の通り

開催のご挨拶：横浜市立大学医学部・分子病理 古屋充子先生

演題 1：術前に卵巣腫瘍が疑われた腹膜中皮腫の一例

聖マリアンナ医科大学産婦人科学 原田 賢 先生

演題 2：類内膜癌と明細胞癌の成分が併存した子宮体癌の一例

東海大学医学部基盤診療学系病理診断学 梶原 博 先生

演題 3：卵巣粘液性境界悪性腫瘍を背景に発生した粘液性癌と明細胞癌の混合性 腫瘍  
と考えられた一例

湘南鎌倉総合病院産婦人科 大沼 一也 先生

特別講演：子宮頸がん検診の行方 2019

横浜市立大学医学部産婦人科学 宮城悦子 先生

各演題につき 4-5 件の質疑応答があり、大変活発な研究会となった。また特別講演では最新の教育的知見と啓蒙活動、子宮頸がん検査の方向性を拝聴し、終了後はコアメンバーとして会運営を指南してくださっている上坊先生を囲んで長時間意見交換が行われた。

稀有症例・問題症例についての研究情報交換や、少数症例の県内での情報共有に活用し、神奈川県全体の婦人科腫瘍研究にも貢献する研究会に発展させていくことを確認した。