

# 研究助成応募研究者による研究

## (1) 血液疾患

### 同種造血幹細胞移植における静注ブスルファン1日1回投与方法の安全性と有効性の検討

内田 直之、谷口 修一、松元 加奈<sup>1</sup>、森田 邦彦<sup>1</sup>  
同志社女子大学薬学部<sup>1</sup>

#### 【要約】

造血幹細胞移植前治療として繁用される静注ブスルファンは、効果と毒性が血中濃度に依存する。通常1日量が4分割で投与されるが、1日1回投与方法の安全性・有効性を前向きに検討した。これまで1名の登録に留まっているが、異常なPK変動は認めず、NCI CTCAE grade III以上の非血液毒性は認めなかった。従来の1日4回投与方法は深夜に急性副作用が発症する危険や、頻回投与による薬剤部・看護師・医師への過度な負担が問題であった。今後10名を目標にさらに検討を継続し、海外では一般的な1日1回投与方法の国内での確立に向けての基礎データを構築する予定である。

#### 【目的】

アルキル化剤であるブスルファン (Bu) は、白血病を始めとする造血器疾患患者の同種造血幹細胞移植前治療として、広く使用されている<sup>1)</sup>。Buの有効性、安全性は血中濃度依存性であるが、経口剤のBuは、消化管からの吸収の個人差が大きく予測困難だった。静注Bu (ivBu) が開発され、血中濃度の変動を小さくでき、より安全性が高くなった<sup>2)</sup>。Buの経口剤は、強力な催嘔吐作用のため1日量を4回に分割して内服する方法がとられ、静注剤もそれに倣い、1日量を4分割して投与する方法が保険収載されている。しかしながら、韓国を含む複数の施設より1日1回と4回投与方法の比較がなされ、両者の毒性に差がないことが報告されており<sup>3)</sup>、1日1回投与方法はテキストにも掲載され、一般的な投与方法となっている (Appelbaum FR, et al.: Thomas' Hematopoietic

Cell Transplantation Fourth Edition, Wiley-Blackwell, Chapter 22)。1日4回投与では、夜間の投与に伴い急性副作用の対処など緊急時対応の危険と、薬剤部、医師・看護師などの過度な負担による医療ミスなどの問題が発生しうる。1日1回投与によりこれらのリスクを回避し、より安全に造血幹細胞移植治療をおこなうことができると考えられる。そこで本研究では、ivBu 3.2mg/kgを1日1回3時間で投与し、毒性評価とPK測定により安全性を、全生存・無病生存率等により有効性を評価する臨床研究を計画した。

#### 【方法】

造血器疾患を有し、20-70歳で静注ブスルファン (ivBu) を含む移植前治療を予定され、研究参加の同意を文書で得られた患者を対象とした。ivBu 3.2mg/m<sup>2</sup>は、3時間かけて点滴静注され、その投与開始後約3時間 (終了直後)、4時間、6時間に血液3mlを採血した。血液検体は採血後直ちに4℃に維持され、8時間以内に血漿分離され-20℃以下で凍結保存された。凍結検体は同志社女子大学薬学部へ郵送された。検体は-20℃以下で保存され、HPLC法で測定された。

#### 【結果】

##### (1) 臨床試験の進捗

2014年8月に開始されたが、競合する前向き臨床試験が実施中であり、2015年夏まで患者登録ができなかった。また、2014年12月に文科省・厚労省より発令された「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」で、重篤な有害事象への対応の厳密化が規定され、観察期間の変更手続きを

要した。化学療法委員会の認可と病棟端末へのレジメン登録が完了し、2016年1月より患者登録可能となった。

## (2) 患者背景

これまでのところ1名の患者のみの登録に留まっている。30代の男性で、急性骨髄性白血病の第一寛解期にHLA一致血縁ドナーから同種末梢血幹細胞移植が実施された。移植前治療はivBu 3.2mg/m<sup>2</sup>/日を4日間、fludarabine 30mg/m<sup>2</sup>/日を6日間、Mel 40mg/m<sup>2</sup>/日を2日間投与され、GVHD予防はcyclosporineとmethotrexateが用いられた。

## (3) PKパラメーター及び毒性評価の結果

登録の1症例3ポイントでのPKパラメーターを算出した。血中濃度は投与開始後3時間、4時間、6時間でそれぞれ3428ng/mL、2396ng/mL、1348ng/mLで、AUC<sub>0-∞</sub>は4076μmol・min/hr、t<sub>1/2</sub>は2.25hr、CLは12.56L/hr、Vdは40.76Lであった。目標AUCである3600-6000μmol・min/hrの範囲に収まっていた。NCI CTCAE v.4.0を用いた移植後21日目までの毒性評価は、grade III以上の非血液毒性の発現は認めなかった。現段階（day 60）で、患者は退院され、無病生存中である。

## 【考察】

これまでのところ1名のみでの検討であるが、1日1回でのivBu投与が、安全に実施できた。血

中濃度上も、目標濃度に収まり、非血液毒性も重篤なものはなく、許容可能であった。京都まで郵送した上でのivBu濃度測定も、滞りなく実施可能であった。

今後、症例を積み重ね、ivBuのPKに影響する因子の抽出、PKパラメーターと臨床的アウトカム（治療関連毒性の程度）についてさらに症例を蓄積し、ivBuの1日1回投与法の安全性と有効性に関する臨床データを蓄積し、本投与法の国内での確立に向けての基礎データを構築する予定である。

## 【文献】

1. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, et al.: Marrow transplantation for acute non-lymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 309:1347-1353, 1983
2. Ciurea SO, Andersson BS: Busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 15:523-536, 2009
3. Ryu SG, Lee JH, Choi SJ, et al.: Randomized comparison of four-times-daily versus once-daily intravenous busulfan in conditioning therapy for hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:1095-1105, 2007

# 同種造血細胞移植後のリポソーマルアムホテリシンBの使用における血中濃度と副作用・臨床的効果の相関の検討

高木 伸介、松元 加奈<sup>1</sup>、内田 直之、湯淺 光博  
景山 康生、梶 大介、西田 彩、石綿 一哉  
山本 久史、山本 豪、森 有紀、伊豆津 宏二  
和氣 敦、森田 邦彦<sup>1</sup>、谷口 修一  
同志社女子大学薬学部<sup>1</sup>

## 【要約】

造血器疾患とそれに対する治療は深刻な免疫不全症をもたらし、特に好中球減少症は深在性真菌感染症の危険因子となる。リポソーマルアムホテリシンB (liposomal amphotericin B, L-AMB) はアスペルギルス症の標準的な治療薬のひとつであるとともに、接合菌症については本邦で唯一承認されている治療薬である。本研究ではL-AMBの血中濃度と安全性および有効性の相関について評価することを目的として、L-AMBを使用した12症例について血中濃度測定を行い、薬物動態に関するパラメーターを検討した。その結果から、L-AMBのクリアランスに大きな個体差があることに着目した。解析の結果、CRP値がクリアランスと正の相関を示すことが分かった。L-AMBは炎症組織によく移行する薬剤であることが知られているが、本研究で得られた結果はこれを裏付けるデータと考えられた。このように、薬物動態に関するパラメーターと臨床情報を統合して解析した報告は少ないため、貴重な知見と考えられた。

## 【目的】

L-AMBの血中濃度と安全性および有効性の相関について評価すること。

## 【方法】

2015年5月から2016年2月の間に、虎の門病院に入院中の造血器疾患を有する患者で、深在性真菌感染症に対してL-AMBを3日間以上使用した患者を対象として、文書で同意を得た。L-AMBの用量の規定は設けなかった。単独ルートから24時間おきに2時間かけてL-AMBを経静脈的に

投与した。投与直前 (trough) と投与直後 (peak) に採血を行い、血漿を分離・凍結し、同志社女子大学薬学部・臨床薬剤学研究室に送付し、総アムホテリシンB濃度を測定した。

## 【結果】

12症例について血中濃度測定を行い、解析した。年齢中央値は54歳 (範囲: 23-68歳)、男女比は6:6、原疾患は以下の通りだった。急性骨髄性白血病7例、急性リンパ性白血病2例、急性混合性白血病2例、慢性骨髄性白血病の急性転化1例。このうち9例が同種造血細胞移植後の症例だった。深在性真菌感染症は以下の通りだった。肺炎7例、中心静脈カテーテル関連血流感染2例、beta-Dグルカン上昇2例、脳膿瘍1例 (表1)。こ

表1 深在性真菌感染症 (感染巣と起炎菌)

Patient	Infected organ	Pathogen
#1	Bloodstream infection	<i>Candida parapsilosis</i>
#2	-(b-D glucan)	-
#3	Brain	<i>Aspergillus calidoustus</i>
#4	Lung	-
#5	Lung	<i>Aspergillus nidulans</i>
#6	Lung	-
#7	Bloodstream infection	<i>Candida parapsilosis</i>
#8	-(b-D flucan)	-
#9	Lung	-
#10	Lung	-
#11	Lung	<i>Aspergillus fumigatus</i>
#12	Lung	<i>Aspergillus fumigatus</i>

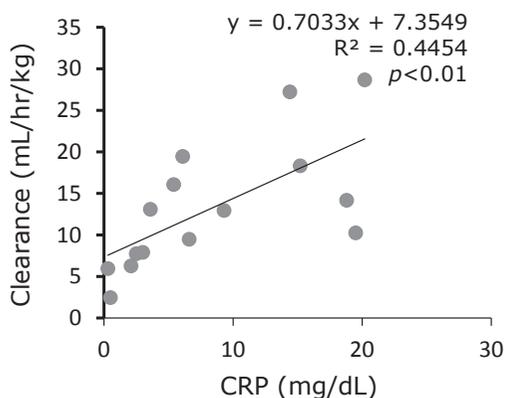


図1 クリアランスとCRP値の相関

のうち6症例で起炎菌が以下の通り同定されていた。*C. parapsilosis* 2例、*A. fumigatus* 2例、*A. nidulans* 1例、*A. calidoustus* 1例 (表1)。血中濃度測定前のL-AMBの投与期間中央値は8日 (範囲: 3-82日)、投与量中央値は $4.1 \pm 1.8$  mg (範囲: 1.07-10.85 mg/kg) だった。薬物動態に関するパラメーターは、Cmax  $29.5 \pm 25.6$   $\mu$ g/mL (範囲: 7.2-108.5  $\mu$ g/mL)、AUC<sub>0-24</sub>  $448 \pm 460$   $\mu$ g · h/mL (範囲: 104-1975  $\mu$ g · g/mL)、クリアランス (CL)  $18 \pm 9$  mL/h/kg (範囲: 3-30 mL/h/kg) で、いずれも個体差が大きかった。クリアランスに影響する因子について、年齢、性別、体重、腎機能 (eGFR値)、肝機能 (AST, ALT値)、脂肪乳化剤の使用の有無、炎症反応 (CRP値) との相関を検討した。その結果、CRP値のみがクリアランスと正の相関を示していた (図1)。炎症反応が高いほど、L-AMBのクリアランスが高いことが示された。

#### 【考察】

L-AMBの前身のアムホテリシンBは強い腎毒

性のため認容性に大きな問題があった。これを克服するため、L-AMBでは、アムホテリシンBをリポソームと呼ばれる脂質二分子膜中に封入し、薬剤が真菌に接するときのみ薬効を発揮できるように開発された。血液中では、総アムホテリシンB濃度のうち、約90%はリポソーム型、約10%は血漿蛋白結合型で存在する。その一方で、腎毒性を引き起こす遊離体 (フリー体) は約0.8%であり、このため安全性が高いとされている。

炎症反応により血管透過性が亢進した場合、L-AMBの炎症部位への移行性が高まり、炎症組織内 (感染巣) のL-AMB濃度が高まることが知られている<sup>1)</sup>。本研究で得られた結果はこれを裏付けるデータと考えられた。炎症反応 (CRP値) の上昇がL-AMBの体内分布の変化をもたらし、L-AMBの血中濃度が低下した (クリアランスが上昇した) と推測された。血中濃度が低下しても、炎症組織内 (感染巣) でのL-AMB濃度が高まることによって有効性が維持できると考えられた。

一般的に深在性真菌感染症の治療は長期間にわたることが多い。本研究の結果から、炎症の極期には炎症組織内濃度が上がり血中濃度が下がることが分かったが、炎症が治まった慢性期には炎症巣が縮小することにより血中濃度が上昇することが予測される。その場合に安全性が担保できるかどうかについてさらに研究を進めたい。

#### 【参考文献】

1. Watanabe A, Matsumoto K, Igari H, et al.: Comparison between concentrations of amphotericin B in infected lung lesion and in uninfected lung tissue in a patient treated with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Int J Infect Dis* 14 Suppl 3: e220-e223, 2010

# B細胞性リンパ腫の新規制御機構の解明

高村(赤司)祥子  
愛知医科大学 感染・免疫学講座

## 【要約】

悪性リンパ腫の中でもびまん性大細胞性リンパ腫 (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL) は最も頻度の高いリンパ腫であり、その発症原因は一部のEBウイルス感染以外不明であり再発や難治例も多い。われわれはToll-like Receptor (TLR) 会合分子でありかつ脂質会合分子でもあるMD-1が、B細胞腫瘍増殖を抑制している可能性を見出した。本研究期間ではMD-1が脂質会合分子であることに着目し脂質によるB細胞活性化へのMD-1による制御機構を検討した。

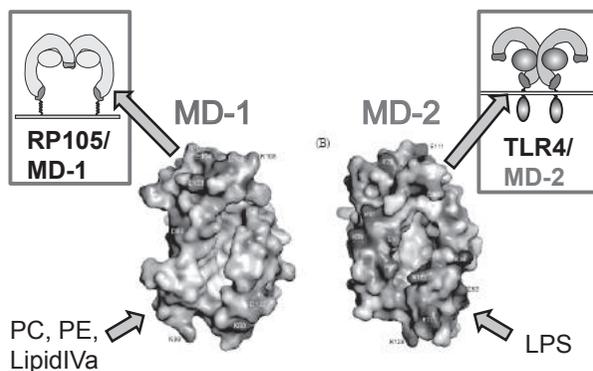
## 【目的】

TLRは病原体認識分子群として同定されヒトでもTLR1から10まで10種類存在し、それぞれ異なる病原体成分を認識し免疫防御機能を担っている。TLR4はLPSが結合するポケットをもつ分泌タンパクMD-2と会合しLPS受容体として機能する<sup>1-3)</sup>。いっぽう分泌タンパクMD-1はMD-2同様脂質結合ポケットをもち、同じく

TLR4と構造的に共通点をもつRP105と会合してB細胞表面に発現する。RP105に対する抗体でB細胞表面のRP105/MD-1複合体を架橋すると、B細胞が強力に活性化され紫外線やステロイド誘発性のアポトーシスに抵抗性となる。われわれはこれまでRP105/MD-1複合体によるB細胞の生存調節に関して機能に着目して解析を行ってきた<sup>4-5)</sup>。RP105やMD-1に関する関連疾患には以下のような報告がある。①RP105やMD-1が欠失したマウスでは高脂肪食でも肥満にならない。②RP105欠失マウスでは動脈硬化になりにくい。③自己免疫疾患の患者において、症状が増悪するとRP105のB細胞表面発現が消失した細胞が増え、治療改善に伴いRP105発現陽性細胞の割合が復活してくる。しかしながらこれらの現象に関するメカニズムもわかっていない。

われわれはまず自己免疫疾患とMD-1との関連を探るため、SLEモデルマウスであるB6/lprにMD-1欠失マウスをかけあわせてB6/lprMD-

## MD-1 binds to Phospholipids, MD-2 binds to LPS



(Harada H. Ohto U., et al. J.Mol.Biol. 2010, p843, Fig5) より改変

図1 MD-1 binds to phospholipids, MD-2 binds to LPS

1KOマウスを作製しフェノタイプを解析した。B6/lprマウスではFasの変異によるアポトーシスが起こらず異常T細胞の集積を認めたが、B6/lprMD-1KOマウスにおいてはむしろモノクローナルなB細胞増殖を認めB細胞性リンパ腫になりやすいという予想外の結果となった。このことからMD-1がB細胞性リンパ腫を制御している可能性を考えた。

#### 【方法】

このMD-1によるB細胞制御機構を探るにあたってMD-1が脂質に結合する分子である点にまず着目した。構造解析の結果では、MD-1には脂質が結合するポケットがあり多くのリン脂質・リゾリン脂質の脂質側が入り込むことが報告された<sup>6)</sup>。われわれもNative Pageという方法で多くの結合リゾリン脂質を認めた。今回の研究背景から、結合する脂質の中でもリンパ球機能やリンパ腫発症に最も関連のあるSphingosine 1-Phosphate (S1P) に着目して解析を進めた。

#### 【結果】

- (1) MD-1がS1Pをはじめ種々のリゾリン脂質とも結合することを、精製MD-1と脂質を用いたNative Page法にて見出した。
- (2) MD-1とのかかわりを調べるためS1P受容体欠失マウス<sup>7)</sup>で検討したところ、RP105抗体刺激やB細胞受容体刺激などによるB細胞の活性化や増殖反応がワイルドタイプに比べ減弱していることがわかった。またこのB細胞ではimmature B細胞が増加しmature B細胞が減少していたことから、S1PシグナルはB細胞の成熟分化にも関与することがわかった。なおS1P1アンタゴニストやスフィンゴシンキナーゼインヒビターによる結果でもS1P機能阻害によりB細胞活性化が抑制されるという結果を得た。以上よりS1PシグナルはB細胞活性化において重要であることがわかった。
- (3) B細胞受容体 (BCR) やS1P受容体に対する抗体を用いた免疫沈降結果から、BCRとS1P受容体とが会合していることが判明し、S1PシグナルがBCRシグナルを強める機能があると考えられた。

- (4) MD-1に関してはノックダウン細胞を用いた結果から、MD-1がS1P-S1P受容体との結合を負に制御していることが考えられた。
- (5) マウスMD-1に対するモノクローナル抗体を作製し、これらを用いてサンドイッチELISAの系を作った。これによりマウス血清中にも分泌されたMD-1タンパクが0.25-1.11  $\mu\text{g/ml}$ 存在することが判明した。

#### 【考察】

血清中に分泌されるMD-1はS1Pと結合することでS1P受容体への結合やシグナルを調節し、これによりS1P受容体を介したB細胞活性化の過剰反応を制御している可能性が考えられた。

#### 【文献】

1. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al.: MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189: 1777-1782, 1999
2. Tanimura N, Saitoh SI, Ohto U, Akashi-Takamura S, et al.: The attenuated inflammation of MPL is due to the lack of CD14-dependent tight dimerization of the TLR4/MD2 complex at the plasma membrane. *Int Immunol* 6: 307-314, 2014
3. Akashi-Takamura S: 敗血症性ショックに関与するToll-like receptorの機能. *化学療法の領域* 30: 40-47, 2014
4. Miyake K, Shimazu R, Kondo J, Niki T, Akashi S, et al.: Mouse MD-1, a molecule that is physically associated with RP105 and positively regulates its expression. *J Immunol* 161:1348-1353, 1998
5. 森田奈央子、高村祥子: TLR4応答におけるRP105/MD-1の役割. *臨床免疫・アレルギー科* 62: 217-222, 2014
6. Harada H, Ohto U, Satow Y: Crustal Structure of Mouse MD-1 with Endogeneous Phospholipid Bound in its Cavity. *J Mol Biol* 400: 838-846, 2010
7. 中島昭奈、高村祥子: スフィンゴシン1リン酸の生体における機能について. *エンドトキシン・自然免疫研究* 17: 49-52, 2014

【発表に関する事項】

1. Akashi-Takamura S, et al.: MD-1 influences a binding between S1P1 and BCR. 第88回日本細菌学会総会（岐阜）, 2015
2. Akashi-Takamura S, et al.: MD-1 is a valu-

able biomarker for inflammatory responses. Keystone Symposia (Immunometabolism in Immune Function and Inflammatory Disease) (Banff, Canada), 2016

# 慢性骨髄性白血病患者細胞由来iPS細胞を活用した白血病幹細胞特異的治療法の開発

吉見 昭秀、宮内 将、山崎 翔、本田 晃、片岡 圭亮  
熊野 恵城、田岡 和樹、荒井 俊也、黒川 峰夫  
東京大学大学院 医学系研究科

## 【要約】

慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia: CML) の長期予後はチロシンキナーゼインヒビター (tyrosine kinase inhibitor: TKI) の登場により劇的に改善したが、複数の研究からTKIのみによるCMLの根治は困難であることが示唆されている。その原因としてTKI耐性を示すCML幹細胞の存在が示唆されているが、極めて微小な細胞集団であるため解析が困難である<sup>1)</sup>。

上述の問題を克服するため、本研究では複数のCML患者骨髄検体からinduced pluripotent stem cells: iPSCsを樹立した。CML-iPSCsより分化誘導されたCD43陽性血液細胞のうち、未分化な細胞分画であるCD34陽性CD45陰性pre-hematopoietic progenitor cells (pre-HPCs) が多分化能を有しTKI耐性を示すCML幹細胞モデルとして利用出来ることが示唆された。

CML-iPSCs由来pre-HPCsのCML幹細胞モデルとしての有効性を検証するために、マイクロアレイ法を用いて網羅的遺伝子解析を行った。gene sets enrichment analysis (GSEA)において、CML-iPSCs由来pre-HPCsは造血幹細胞の維持およびイマチニブ耐性に関わることが知られている複数の遺伝子群がenrichされていることが明らかとなり、CML幹細胞のモデル分画として有効なプラットフォームとなりうることを示した。

## 【目的】

本研究ではCML患者の骨髄検体からCML-iPSCsを樹立し、CML幹細胞における病態解析のプラットフォームとして利用することで、CML幹細胞のTKI耐性機構を明らかにするとともに特異的治療法の開発を目的とした。

## 【方法】

### (1) 疾患由来iPSCsの樹立

導入細胞のゲノムに外来遺伝子の挿入が起こらないpCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL、pCXWB-EBNA1、episomal vectorを用いて遺伝子導入を行った<sup>2)</sup>。

### (2) CML-iPSCsの確認

患者検体より樹立したiPSCsを用いて、*BCR-ABL*に対する半定量Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) および染色体解析を行った。

### (3) iPSCsの血液分化誘導

iPSCsの血液分化誘導は、VEGFを添加した血液分化用培地を用いてC3H10T1/2とiPSCsの共培養にて行った。

### (4) CML-iPSCs由来pre-HPCsのイマチニブ感受性評価

CML-iPSCs由来血液細胞のうち、未分化なCD34陽性・CD43陽性・CD45陰性pre-HPCsと分化した細胞分画であるCD34陰性CD45陽性differentiated cells (DCs) のイマチニブ (第一世代TKI) 感受性評価を細胞増殖能評価、およびapoptosis解析を用いて行った。

### (5) CML-iPSC由来pre-HPCsの網羅的遺伝子発現解析

CML-iPSCs由来pre-HPCsおよびDCsに6時間イマチニブ2.5  $\mu$ Mを曝露したサンプルからRNAを抽出し、クラスター解析およびGSEA解析を含めた網羅的遺伝子発現解析を行った。

## 【結果】

### (1) 慢性骨髄性白血病患者検体由来iPSCsの樹立

複数の慢性骨髄性白血病慢性期患者の骨髄液からCD34陽性細胞を濃縮し、*OCT3/4*, *KLF4*,

*SOX2*, *L-MYC*, *EBNA1*, *LIN28*の導入とp53の knock downを併用することでiPSCs様コロニーを得た。iPSCs様コロニーは幹細胞遺伝子の発現を認め、奇形種形成能を持つことが示された。また外来遺伝子の挿入が無いことも確認され、CML患者検体からiPSCsを樹立することに成功した。

#### (2) 疾患由来CML-iPSCsの確認

CML患者検体由来のiPSCsにおいて、*BCR-ABL*融合遺伝子の遺伝子発現および染色体解析を行った。CML患者検体由来iPSCsには*BCR-ABL*を発現し、また患者検体と同様にt(9;22)(q34;q11.2)の染色体異常のみを有するCML-iPSCsが存在することが示され、以後の解析に利用した。

#### (3) CML-iPSCs由来pre-HPCsはイマチニブ耐性の細胞を含む

CML-iPSCs由来血液細胞のうちCD34陽性・CD43陽性・CD45陰性pre-HPCsの未分化性、イマチニブ感受性を評価した。Pre-HPCsは血球コロニー形成能評価にて多系統への分化能を有する未分化な細胞であることが示され、細胞増殖能評価およびapoptosis解析の結果イマチニブに対して耐性示すことが明らかとなった。

#### (4) CML-iPSCs由来pre-HPCsを用いたイマチニブ耐性遺伝子の検索

CML-iPSCs由来pre-HPCsをCML幹細胞モデルとして利用し、CML幹細胞におけるイマチニブ耐性の原因遺伝子を同定するため、CML-iPSCs由来pre-HPCsにイマチニブを曝露したサンプルを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。GSEA解析の結果、CML-iPSCs由来pre-HPCsでは、造血幹細胞の増殖および維持に重要であることが知られているHOXA9のtarget遺伝子群や造血幹細胞の維持およびTKI耐性に関わること

が知られているTGF- $\beta$ に関連したpathwayがenrichされていることを明らかにした。

#### 【考察】

本研究ではCML幹細胞の解析を行うプラットフォームとして、CML-iPSCsを利用することに着目した。CML-iPSCsから分化誘導した血液細胞の解析を行った。その結果、pre-HPCs分画がイマチニブ耐性CML幹細胞の解析に有効なプラットフォームであることが示唆された。

しかしながら、CML-iPSCsは一つの疾患モデルであり、他のモデルでの検証が必要不可欠である。複数のモデルを用いて慎重に検討を行うことで、CML幹細胞のTKI耐性に寄与する遺伝子が同定できる可能性が広がると考えられる。

#### 【文献】

1. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW, Druker BJ: Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest* 121: 396-409, 2011
2. Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, Goshima N, Yamanaka S: An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* 31: 458-466, 2013

#### 【発表に関する事項】

Kurokawa M, Yoshimi A, Miyauchi M, Sato T, Kumano K: Generation of iPSC from primary CML patient samples. 16th Annual John Goldman Conference on Chronic Myeloid Leukemia: Biology and Therapy (Philadelphia) 2014

## (2) 内分泌代謝疾患

### 糖原病Ⅲ型の遺伝子変異と機能に関する検討

大久保 実、村勢 敏郎

#### 【要約】

38人のトルコ人糖原病Ⅲ型患者から23種のAGL遺伝子変異を同定した。トルコ人では血族結婚が多く、多様なAGL変異のホモ接合体が糖原病Ⅲ型の原因になっていた。

#### 【目的】

糖原病Ⅲ型 (glycogen storage disease type III: GSD III) はグリコーゲン蓄積病の一つで<sup>1)</sup>、肝障害や筋萎縮・心筋症、低血糖など多彩な症状を示す常染色体劣性遺伝病である<sup>2)</sup>。糖原病Ⅲ型はグリコーゲン脱分枝酵素 (glycogen debranching enzyme: 遺伝子シンボルはAGL) の欠損によって起こる。私どもは世界で初めてAGL遺伝子変異を同定し<sup>3)</sup>、日本および諸外

国のGSDⅢ患者を分子遺伝学的に報告してきた<sup>4-7)</sup>。本年度は、トルコ人患者のAGL遺伝子変異を比較検討した。

#### 【方法】

Istanbul大学の患者 (主に出身地がトルコ東部) と、Ege大学の患者 (出身地はトルコ西部が多い) を検討した。既報の通り<sup>4)</sup>、35個のエクソンからなるAGL遺伝子を直接塩基配列決定して変異を検索した。AGLハプロタイプは、AGL遺伝子上の一塩基多型 (SNP) の組み合わせで判定した<sup>6)</sup>。

#### 【結果】

- (1) 38人のトルコ人糖原病Ⅲ型患者から23種のAGL遺伝子変異を同定した (図1)。
- (2) 変異の種類は多様で、欠失、挿入、スプライ

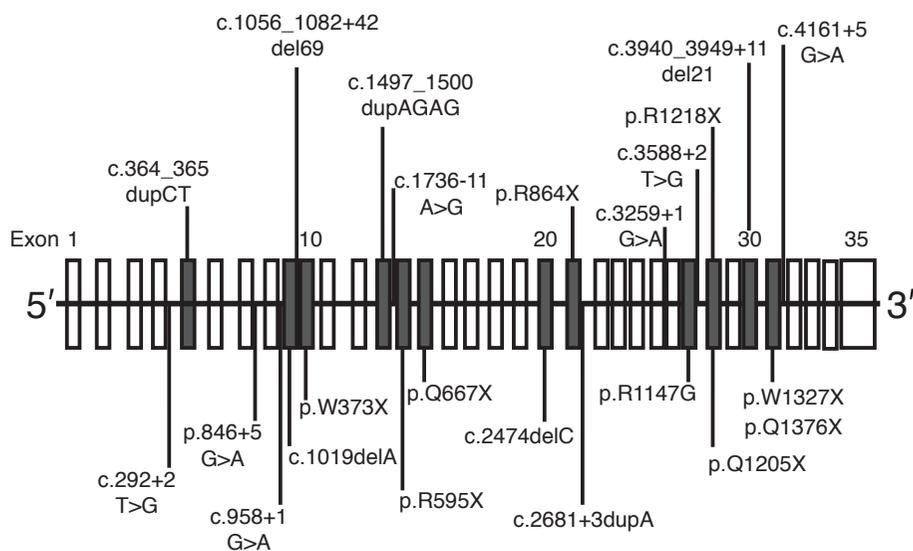


図1 トルコ人糖原病Ⅲ型患者で同定したAGL遺伝子変異  
AGL遺伝子のエクソンを矩形で示し、遺伝子変異があったエクソンは塗りつぶした。  
上部にEge大学の患者で同定した変異を、下段にIstanbul大学の患者で同定した変異を示した。

シング変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異が見られた。*AGL*上ではエクソン9-10, 13-15, 20-21, 27-31等に変異が起こっていた。

- (3) p.W1327Xを6人、c.1019delAを4人認めた。殆どが黒海沿岸地域出身者であった。それぞれの*AGL*ハプロタイプが一致することから、共通のトルコ人祖先から受け継がれた変異であることが推測された。
- (4) 問診上血族結婚が80%以上にあり、2例を除いた残り全員が変異のホモ接合体であった。

#### 【考察】

38人のトルコ人糖原病Ⅲ型患者から23種の*AGL*遺伝子変異を同定した。トルコは日本の約2倍の国土を持つ人口約7770万人(2014年)の国である。糖原病Ⅲ型の頻度は日本より多い。この理由は、トルコ人では血族結婚が多く多様な*AGL*変異のホモ接合体が糖原病Ⅲ型の原因になっているためと考えられた。

複数のトルコ人家系で同じ*AGL*変異を認めた。これが共通のトルコ人祖先に由来するのか、あるいは独立して起こった遺伝子変異であるかを調べるには、*AGL*ハプロタイプングが有用である<sup>6)</sup>。*AGL*ハプロタイプを調べた結果、同じ遺伝子変異のハプロタイプは一致した。したがって、トルコ人の中では創始者効果(founder effect)が特定の遺伝子変異で見られることが確認できた。この結果から、トルコ人糖原病Ⅲ型の遺伝子変異検索には、①第一段階として創始者効果のある変異をまず検索、②その変異が見当たらない場合には第二段階として、35個のエクソンとエクソン-イントロン接合部の全てを塩基配列決定する、という階層的方法が効率的であると考えられた。

#### 【文献】

1. 大久保実: グリコーゲン病(糖原病). 今日

の診断指針 第7版(医学書院): 1242-1244, 2015

2. 大久保実: 糖原病Ⅲ型. 日本臨牀 新領域別症候群シリーズ19: 47-50, 2012
3. Okubo M, et al.: A novel donor splice site mutation in the glycogen debranching enzyme gene is associated with glycogen storage disease type III. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 493-499, 1996
4. Okubo M, et al.: Heterogeneous mutations in the glycogen-debranching enzyme gene are responsible for glycogen storage disease type III a in Japan. *Hum Genet* 106: 108-115, 2000
5. Endo Y, et al.: Molecular analysis of the *AGL* gene: heterogeneity of mutations in patients with glycogen storage disease type III from Germany, Canada, Afghanistan, Iran, and Turkey. *J Hum Genet* 51: 958-963, 2006
6. Aoyama Y, et al.: Molecular features of 23 patients with glycogen storage disease type III in Turkey: a novel mutation p.R1147G associated with isolated glucosidase deficiency, along with 9 *AGL* mutations. *J Hum Genet* 54: 681-686, 2009
7. Okubo M, et al.: Phenotypical variability in glycogen storage disease type III with a recurrent *AGL* mutation c.750-753delAGAC. *Muscle Nerve* 43: 451, 2011

#### 【発表に関する事項】

Okubo M, et al.: Molecular and clinical delineation of 12 patients with glycogen storage disease type III in Western Turkey. *Clin Chim Acta* 439: 162-167, 2015

# 下垂体腺腫における薬物治療効果判定と効果予測の病理学的検討

井下 尚子、福原 紀章、西岡 宏、山田 正三

## 【要約】

下垂体腺腫には、外科的切除のほか、薬物治療や放射線治療などが行われる。アクロメガリーを呈する下垂体腺腫に使用される薬剤にソマトスタチンアナログがある。この治療効果を予測するために腫瘍細胞でソマトスタチンレセプターの発現を検索した。ソマトスタチンアナログの一つであるオクトレオチドはSSTR2Aに親和性が高いとされるが、術前オクトレオチド負荷試験の結果とSSTR2Aの発現の程度は相関し、SSTR5は相関しない。SSTR2Aは、GH産生腺腫のうちdensely typeに高発現しており、組織重型による発現の差があること、またSSTR5発現は組織型によらないことが示唆された。

## 【目的】

アクロメガリーを呈する下垂体腺腫の組織像は多彩である。今まで、電顕による分泌顆粒の大きさや量を基に、densely/sparsely、特異な微小構造から特殊型などに分類されてきた。現在では、これら電顕所見は、免疫染色法による既知の前葉ホルモンの確認や細胞内サイトケラチン（CK）分布パターン等の所見へと翻訳されて来た。しかし近年では形態学的分類に加え、治療効果予測の必要性が重視されることは、他臓器腫瘍と同様であり、古い分類にこだわらず、臨床に沿う新たな分類に変化していく必要がある。

アクロメガリーの原因であるGH産生腺腫の一部には、ソマトスタチンアナログ治療効果が期待できる。治療効果予測には、オクトレオチド負荷試験やオクトレオスキャンなどの臨床検査のほか、病理組織を用いた腫瘍細胞のソマトスタチンレセプター（SSTR）の発現などが有用とされる。今回、病理組織標本をSSTR免疫染色性やCKパターンを中心に再検討し、病理組織型分類と臨床的オクトレオチド負荷試験の関係を明らかにする。

## 【方法】

臨床的にアクロメガリーが指摘され、当院で手術摘出された下垂体腺腫のうち、今回の検討が可能な131症例を対象とした。これら腺腫の病理組織学的検索を行い、免疫染色学的手法により陽性となったホルモン、SSTR2A、SSTR5発現の状態（Volanteの分類を使用<sup>1)</sup>）、オクトレオチド負荷試験結果との関係などを検討した。

なお、腺腫組織型の分類では、GHなど前葉ホルモン染色パターン（>1%の細胞に染色された場合陽性とする）のほか、CAM5.2を用いたCK染色により細胞内フィラメントの分布パターンによる分類を用いた。CKパターンは、核周囲型（ドットパターン<20%の細胞、densely type）、中間型、ドット型（ドットパターン>80%、sparsely type）、陰性型（>80%でCAM5.2染色陰性）で分類した<sup>2)</sup>。

## 【結果】

病理所見上、いずれの腺腫もGH染色に陽性で、GH単独陽性腺腫59例、GH-PRL腺腫46例、その他26例であった。パターンは、核周囲型47例、中間型59例、ドット型16例、陰性型9例。なお、オクトレオチド負荷試験結果とSSTR2A染色スコアは相関していた。

これら群ごとの検討では、SSTR2A発現は、ホルモン種別で差はなく、CKパターンでは核周囲型、中間型で高スコア、ドット型、陰性型で低スコアであった。SSTR5発現は、いずれにも差は認めなかった。

## 【考察】

今回の検討でGH産生腺腫のソマトスタチンアナログ治療効果予測には、オクトレオチドとの関わりが強いSSTR2A発現にはCKパターンの関わりが示唆された。このことは、現在オクトレオチドで効果が期待される核周囲型CK染色性を示すdensely type GH産生腺腫で、病理検索によ

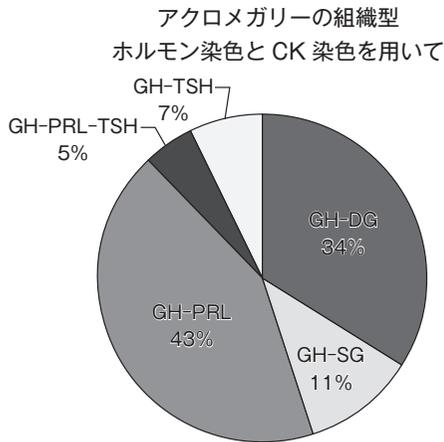


図1 当院におけるアクロメガリーを呈する下垂体腺腫の組織型分布

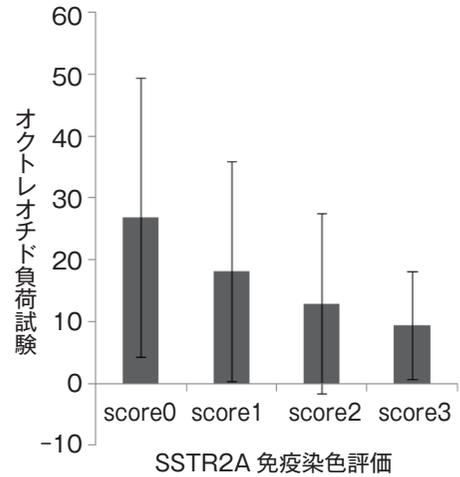


図2 術前オクトレオチド負荷試験と病理組織標本におけるSSTR2A染色の関係

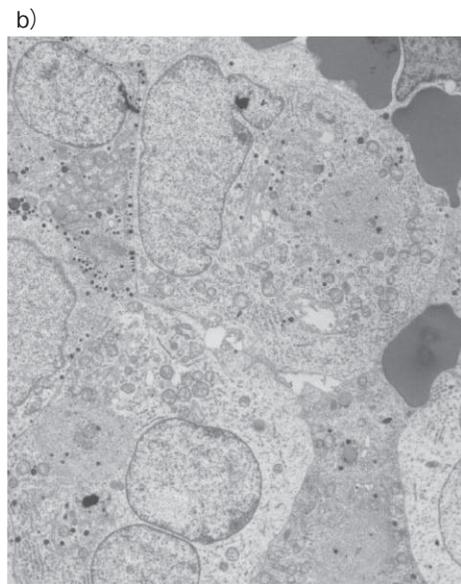
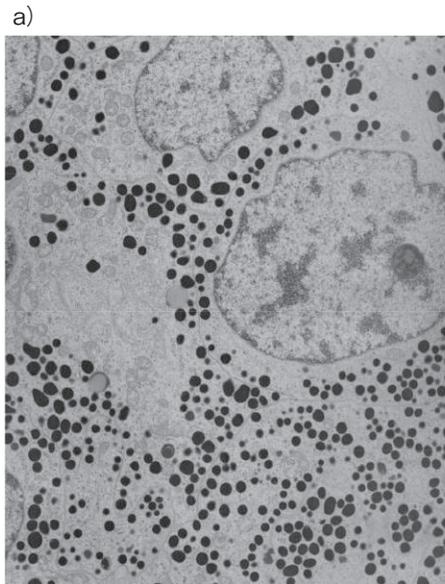


図3 a) densely type GH産生腺腫の電顕像。b) sparsely type。Fibrous bodyと呼ばれるフィラメントの塊があり、これが、CAM5.2染色でドット状に染まる。

るSSTR2Aスコアが高いことと合致する結果である。最近使用されるようになったパシレオチドは、SSTR5との親和性もあるとされているため、特にオクトレオチド効果が期待できないドット状CK染色性を示すsparsely type GH産生腺腫に対し、期待される薬剤である。しかし、パシレオチドは術前負荷試験に適した製剤がないため、症例

の蓄積によりどのような腺腫に効果が期待できるか前向きに検討しなければいけない。

CK染色は今までに、腺腫サイズや浸潤性などにも関わるとされてきた。sparsely type GH産生腺腫は、densely typeに比し、macroadenomaで、周囲浸潤性が高く、治癒切除が困難とされてきた。下垂体腺腫は薬物治療前生検が困難であるため、

症例に対する病理側面からの検討と臨床所見を対比させていることが重要と言える。下垂体腺腫の病理診断に未だCK染色はあまり重要視されていないが、組織分類に必須な染色と思われる。ホルモン染色とCKパターンを用いた分類は簡便で理解しやすいが、今回の結果、薬物治療効果予測の面からも、妥当と考えられる。

近年、ソマトスタチンアナログの効果予測には、SSTR染色のほか、AIP染色の重要性が示唆されている。これら組み合わせでの検討も、今後行う必要がある。

#### 【文献】

1. Volante M, et al.: Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod Pathol* 20: 1172-1182, 2007
2. 井下尚子、藤ヶ崎純子: トルコ鞍部腫瘍. 腫瘍病理診断プラクティス 脳腫瘍 (中山書店): 279-290, 2010

# 骨新生因子が仲介する骨-脂肪組織連関メカニズムの解明

高野 晴子

国立循環器病研究センター研究所

## 【要約】

私たちのグループはゼブラフィッシュ (ZF) の増殖心筋細胞が発現する因子として骨新生因子 (heart-derived osteogenesis inducer: HDOI) を同定した。HDOIはZF心臓に強く発現していたがマウスでは骨組織、特に骨膜の骨芽細胞が生成していることが示された。HDOIの発現部位は骨組織凸面側に限定的であったことから発現と荷重負荷の連関が予想された。トレッドミルによる短期運動負荷を行ったが、運動前後のHDOI mRNA量について変化を認めなかった。そこで、持続的過重負荷による制御の可能性を想定して免荷状態 (坐骨・大腿神経切除モデル) を作成して検討したところ、神経切除後8週のマウス骨膜のHDOIの発現低下を認めた。この結果から、HDOIは持続的機械刺激に応じて発現が維持されていると考えられた。

HDOI KOマウスに高脂肪食負荷を与えると、野生型に比較して体重増加を来し易い傾向を得たことから、血清アミロイドP成分 (SAP) プロモーター依存性にHDOIを過剰発現するトランスジェニックマウス (SAP-HDOI) を作成した。生後3ヶ月齢 SAP-HDOIでは、褐色脂肪組織 (BAT) や鼠蹊部白色脂肪組織 (iWAT) において褐色細胞マーカーの発現増加を認めた。一方で生殖腺 WAT (eWAT) ではBATマーカーの発現増加を認めなかったことから、HDOIはBATの褐色化とiWATのベージュ細胞化に関与している可能性が示唆された。

以上のことから、HDOIは骨組織が受容する機械刺激を脂肪組織へと伝播する仲介因子であり、脂肪組織制御を介して全身性の代謝を制御していると考えられた。

## 【目的】

運動は骨格筋からのマイオカインの分泌を促

し、脂肪細胞を貯蓄型から消費型へと変換させると共に、脂肪細胞の脂肪分解を促進することで肥満を抑制する。しかし運動は骨格筋だけでなく、骨にも物理的的刺激を与えるが、骨-脂肪の組織間連携は全く明らかにされていない。そこで、本研究では骨膜に高発現しているHDOIによる脂肪組織制御を解析することで骨-脂肪組織連関の存在を明らかにすることを目的とした。

## 【方法】

### (1) 遺伝子改変マウスの作成

ES細胞においてHDOI遺伝子座の中心部に位置するExon3をLacZに置き換えるターゲティングを行い、遺伝子改変マウス (HDOI<sup>LacZ/LacZ</sup>マウス) を作成した。このマウスではExon2の下流にストップ配列-IRES配列-LacZ遺伝子が挿入され、HDOIプロモーター依存的にHDOIの非常に短い配列とLacZが作られることになる。本マウスはHDOIの発現モニターマウスおよびHDOIノックアウトマウスとして用いた。また、血清アミロイドPプロモーター (SAP) 下で肝臓においてHDOIを過剰発現するマウスを作成した (SAP-HDOI)。

### (2) マウス運動負荷と免荷実験

短期運動負荷には9週齢C57BL/6♂マウスを各4匹用いた。トレッドミルは、角度15度、10m/minを3分間、12m/minを3分間、14m/minを3分間、16m/minを3分間走行させ、さらに18m/minを維持して合計で3時間走行させ、運動後に乳酸値の上昇を確認した。免荷手術は8-12週齢のHDOI<sup>LacZ/LacZ</sup>マウスを用いて、右足にのみ大腿神経切除と坐骨神経切除を行った。不動化モデルは神経切除後にさらにテープとワイヤーを巻き付けることで四肢の固定を行った。

### (3) qPCR

骨および脂肪組織を採取後、直ちに液体窒素に

て凍結し、氷上にて破碎作業を行った。RNA採取方法はLifetechnologies社推奨の方法に従い、さらにRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。cDNA 合成にはSuperscript III Reverse Transcriptase (Lifetechnologies) を用い、KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いてqPCRを

行った。

(4) LacZ 染色および透明化

PBSおよび4% PFA/PBSを用いて経心臓的に還流固定したマウスは、榎本らの方法に従ってX-gal染色を施行した<sup>1)</sup>。室温にて一晩染色を行った後PBSで洗浄作業を行い、DDWで1/2

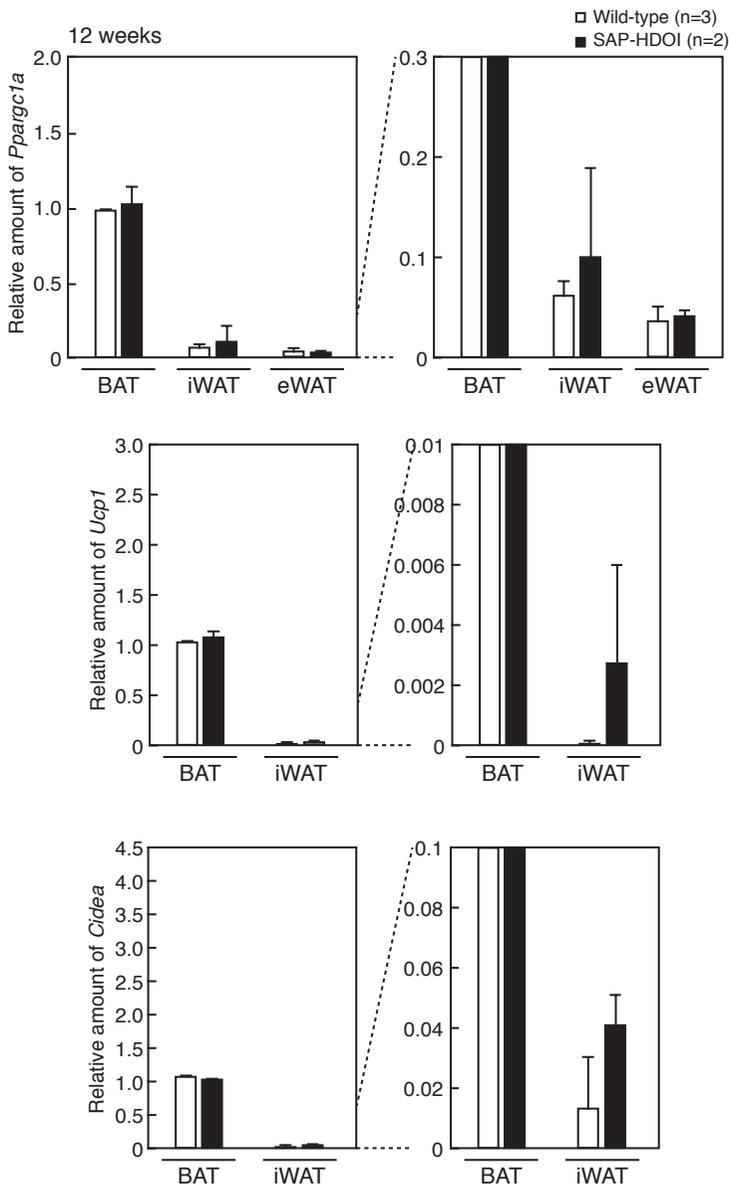


図1 SAP-HDOIにおけるBATマーカー (*Pparg1a*, *Ucp1*, *Cidea*) の発現解析  
各マーカーはSAP-HDOIのiWATで上昇傾向にある。

に希釈したCUBIC1【50% N,N,N,N-Tetrakis (2-hydroxypropyl) ethylenediamine (w/v), 50% Urea (w/v), 15% TritonX-100 (w/v)】にて37°Cで一晩平衡化し、さらに原液CUBIC1に移した後37°Cで一週間震盪した。

#### 【結果】

##### (1) LacZによるHDOIプロモーター活性の検出

胎生期および出生後のマウスにおいてHDOIは心臓ではなく、骨組織、特に遠位側骨に高発現していた。骨組織中の発現部位を骨切片により検討すると骨膜に発現を認めた。さらにLacZ陽性骨膜細胞は、骨芽細胞特異的発現遺伝子 (SP7、RUNX2) の発現が高く骨芽細胞と予想された。以上のことからHDOIは骨膜骨芽細胞に発現していることが明らかになった。

##### (2) 持続的機械刺激によるHDOIの発現誘導

HDOIが遠位側骨の骨凸面に限定的に発現していたことから、伸展ストレスとの関係性が予想された。そこで、過剰負荷を実現するために、レッドミルを用いて急性負荷刺激を行った。運動後のPGC-1 $\alpha$ 遺伝子の発現は、心臓、頸骨、大腿四頭筋において非運動群に比較して運動群で上昇していたが、HDOIの発現は、運動群と非運動群間で差を認めなかった。従ってHDOIは短期的な運動負荷によっては発現制御されないことが示された。

そこで重力を含む持続的物理負荷について検討するため、HDOI<sup>LacZ/LacZ</sup>マウスに大腿神経および坐骨神経を切除、さらにワイヤーによる不動化手術を施し軟部組織と骨膜との剪断応力を免除する手術を施した。施術した右足では神経切除および不動化手術後8週間のHDOIの発現が抑制された。したがってHDOIは、持続的機械刺激によって発現が誘導され、維持されていると考えられる。

##### (3) HDOIによる脂肪組織制御

HDOIの生理機能を明らかにするために作成した肝臓にてHDOIを過剰発現するマウスSAP-HDOIでは体長全体の伸長と椎骨の湾曲が認められた。脂肪組織との連関が想定されたため脂肪組織重量、脂肪組織像を解析したが、野生型とSAP-HDOIマウス間で顕著な変化を認めなかった。しかし、12、15週いずれのSAP-HDOIマウ

スのiWATにおいて、BATマーカー (Pparg1 $\alpha$ , Ucp1, Cidea) の発現上昇を認めた(図1)。一方で、eWATにおいてBATマーカーの発現上昇は認めなかった。iWATではeWATとは異なり、BAT様の細胞 (ベージュ細胞) が作られることが既に明らかにされている<sup>2)</sup>。従ってHDOIはiWATのベージュ細胞形成を促進している可能性が考えられた。

HDOIが内発的にも脂肪組織制御に関与しているかを明らかにするために、HDOI<sup>LacZ/LacZ</sup>マウスに高脂肪食を3ヶ月間与え体重変化を記録した。その結果、HDOI<sup>LacZ/LacZ</sup>マウスは野生型マウスに比較して体重増加を来し易い傾向を得た。すなわち、HDOIは内発的にも脂肪組織を制御し全身の代謝制御に関与している可能性が高いと考えられる。

#### 【考察】

宇宙飛行士や寝たきり患者で骨組織が脆くなることや、脂質代謝異常がしばしば観察されるが、荷重と代謝の連関機構は不明である。本解析から、HDOIが骨組織の骨膜にほぼ特異的に発現する分泌性因子、periosteokineであることが明らかになり、重力などの持続的物理負荷によって発現誘導される可能性が示唆された。したがって、本periosteokineは骨膜細胞が荷重という力学応答を代謝調節に変換する伝播因子として機能している可能性が考えられた。この生理作用を解析することで骨膜の新規機能の発見に繋がる可能性が考えられる。本解析の完成によって、高齢患者を対象とした新しい予防医療の創成にも繋がる可能性が期待できる。

#### 【文献】

1. Enomoto H, Heuckeroth RO, Golden JP, Johnson EM and Milbrandt J: Development of cranial parasympathetic ganglia requires sequential actions of GDNF and neurturin. *Development* 127: 4877-4889, 2000
2. Matthew H, Patrick S: Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine* 19: 1252-1263, 2013

# 膵β細胞の恒常性維持メカニズムの解明

西村 渉<sup>1</sup>、野田 光彦<sup>2,3</sup>、野田 泰子<sup>1</sup>

自治医科大学医学部<sup>1</sup>

国立国際医療研究センター研究所<sup>2</sup>

埼玉医科大学 内分泌・糖尿病内科<sup>3</sup>

## 【要約】

糖尿病における膵β細胞障害のメカニズムを解明する目的で、糖尿病モデルマウスの膵β細胞を系譜追跡実験 (lineage tracing study) により経時的に解析した。転写因子MafAのKOマウスや*db/db*マウスのβ細胞の多くは、インスリンの発現が低下あるいは消失したまま生存しており、その一部はグルカゴン陽性細胞に分化転換していた。それらのβ細胞では、分化過程で一過性に発現する転写因子など、通常発現が抑制されている分子群の発現が増強していた。以上より、MafAは膵β細胞の恒常性維持に重要であり、MafAの発現が低下した糖尿病モデルマウスのβ細胞は、脱分化することが示唆された。このようなβ細胞を治療により再分化できれば、インスリン分泌能の回復が期待される。

## 【目的】

膵ランゲルハンス島のβ細胞は、インスリンの分泌により糖代謝を制御している。糖尿病では、末梢のインスリン抵抗性増大に対応した過剰なインスリン分泌の結果、β細胞が「疲弊」し、インスリン分泌が低下するといわれている。この時、β細胞量は低下するといわれるが<sup>1)</sup>、多くの研究結果が示す通り、糖尿病モデルマウス膵臓のTUNELアッセイやCleaved Casp3染色で検出されるβ細胞のアポトーシスの比率は、多くても全β細胞の0.2%程度であり、β細胞量低下の分子メカニズムは十分に明らかではない。一方で、インスリン治療により厳格に血糖をコントロールすると、グルコース応答性インスリン分泌能が回復する事が知られている<sup>2)</sup>。

マウスおよびヒトの糖尿病早期の膵β細胞では、他の因子に先駆けて転写因子MafAの発現が

低下する事が知られている。そこで本研究では、MafA KOマウスならびに糖尿病モデルマウスのβ細胞を経時的に解析することにより、糖尿病におけるβ細胞障害のメカニズムを解明することを目的とした。

## 【方法】

MafA KOマウス、*db/db*マウス、低容量STZ投与マウスをバックグラウンドとして、ラットインスリンプロモーター (RIP) CreER;Rosa-YFPマウスを作製し、β細胞の系譜追跡実験を施行した。4週齢あるいは8週齢に、マウスにタモキシフェンを投与し膵β細胞にYFPを恒久的に発現させた後、12週齢で膵臓を解析した。

## 【結果】

MafA KOマウスの体重は野生型と変わらず、耐糖能異常を示したが、明らかな糖尿病を伴わなかった。MafA KOマウス膵島は、胎生期から生直後までは正常であったが、生後徐々にα細胞数に対するβ細胞数の減少を認め、また膵島のインスリン含有量の低下を認めたが、ほとんどの膵島細胞で内分泌細胞マーカーであるChgAとSypの発現は認められた。電顕では、β細胞内にインスリン顆粒の抜けた『empty vesicle』が多数認められた。またβ細胞死については、MafA KOマウスと野生型で有意差を認めなかった。

β細胞の系譜追跡実験では、4週齢で標識したMafA KOマウスのβ細胞の多くは、12週齢においてインスリンの発現が低下したまま生存していた。また、MafA KOマウスのβ細胞の一部は、グルカゴン陽性細胞に分化転換していた。MafA KOマウス膵島では、β細胞機能に重要なIns1、Glut2、ZnT8、Pcsk1、Ucn3の発現低下を認めた。また、成熟β細胞で通常発現が抑制されてい

るグルカゴンやMafAの発現増強と、胎生期の分化過程で発現が一過性に増強する転写因子であるMafB、Pax4、Ngn3、Sox9、Sox2、Nanogの発現再増強が認められた。

次に、MafAの発現が低下している糖尿病モデルマウスの $\beta$ 細胞の系譜追跡実験を施行した。その結果、MafA KOマウスと同様に、 $\beta$ 細胞におけるインスリン発現の低下とグルカゴン発現の増強を認めた。また、糖尿病モデルマウスの $\beta$ 細胞の35%以上に、転写因子MafBのプロモーター活性の再増強を認めた。糖尿病モデルの培養 $\beta$ 細胞株では、MafBプロモーターの一部に脱メチル化を認め、それがMafBプロモーター活性とmRNA発現の増強に寄与している事が示唆された<sup>3)</sup>。

以上より、MafAは成熟 $\beta$ 細胞の恒常性維持に重要であり、MafAの発現低下により $\beta$ 細胞は脱分化し、それが糖尿病早期における $\beta$ 細胞の機能低下のメカニズムに寄与する可能性があると考えられた<sup>4)</sup>。

#### 【考察】

MafAは、膵臓では成熟 $\beta$ 細胞特異的に発現する転写因子で、Pdx1、NeuroD1と相互作用しながら、協調してインスリンの発現を制御する。一方、同じMafファミリーの転写因子MafBは、分化過程の未熟な $\beta$ 細胞と、成熟 $\alpha$ 細胞に発現する。

近年、本研究と同様に系譜追跡実験を用いて、糖尿病モデルマウスにおける $\beta$ 細胞の脱分化や分化転換が報告されている<sup>5-7)</sup>。これらの研究により、MafAだけでなく、FoxO1、Pdx1、Pax6が成熟 $\beta$ 細胞の恒常性維持に重要であることが明らかになっている。いずれの検討においても、 $\beta$ 細胞のアポトーシスの亢進は認められていない。さらに、治療による糖尿病モデルマウスの血糖の正常化に伴って脱分化 $\beta$ 細胞が再分化し、インスリン分泌能が回復する事も報告されている<sup>8)</sup>。これらは、糖尿病の治療による $\beta$ 細胞の機能回復<sup>2)</sup>

のメカニズムとして注目されている。今後は、 $\beta$ 細胞の恒常性を維持し、脱分化 $\beta$ 細胞の再分化を促進するような、低分子化合物の開発が期待される。

#### 【文献】

1. Rhodes CJ: Type 2 diabetes—a matter of beta-cell life and death?. *Science* 307: 380–384, 2005
2. Kosaka K, Kuzuya T, Akanuma Y, et al.: Increase in insulin response after treatment of overt maturity-onset diabetes is independent of the mode of treatment. *Diabetologia* 18: 23–28, 1980
3. Nishimura W, Ishibashi N, Eto K, et al.: Demethylation of the MafB promoter in a compromised  $\beta$ -cell model. *J Mol Endocrinol* 55: 31–40, 2015
4. Nishimura W, Takahashi S, Yasuda K: MafA is critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice. *Diabetologia* 58: 566–574, 2015
5. Talchai C, Xuan S, Lin HV, et al.: Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic Beta cell failure. *Cell* 150: 1223–1234, 2012
6. Gao T, McKenna B, Li C, et al.: Pdx1 maintains  $\beta$  cell identity and function by repressing an  $\alpha$  cell program. *Cell Metab* 19: 259–271, 2014
7. Ahmad Z, Rafeeq M, Collombat P, et al.: Pax6 Inactivation in the adult pancreas reveals ghrelin as endocrine cell maturation marker. *PLoS One* 10: e0144597, 2015
8. Wang Z, York NW, Nichols CG, et al.: Pancreatic  $\beta$  cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy. *Cell Metab* 19: 872–882, 2014

# 転写因子を加味した非機能性下垂体腺腫の新たな組織型分類とその臨床病理像の解析

西岡 宏、山田 正三、井下 尚子

## 【要約】

非機能性下垂体腺腫は、組織学的に大きくサイレント腺腫とナルセル腺腫に二分され、前者はホルモン産性・分化能を有する腺腫、後者はそれらを欠く腫瘍とされる。従来の組織分類は主に前葉ホルモンの免疫組織化学により行われていたが、近年、各ホルモン系の分化誘導に関与する転写因子の発現検索が腺腫の組織分類にも有用であることが明らかとなってきた。今回、転写因子の発現を加味した非機能性腺腫の組織型分類を行いその臨床病理像を解析した。従来はナルセル腺腫とされてきたホルモン陰性腺腫の大多数(113/119例:95.0%)はホルモン分化能を有していることが明らかとなった。その多く(79/119:66.4%)はゴナドトロピン系への分化だったが、約1/4(32/119:26.9%)はACTH系への分化を示した。これらACTH陰性、Tpit陽性腺腫32例は、女性に多く臨床的にaggressiveな所見を示すなど、ACTH陽性のサイレントACTH腺腫と同じ臨床像を呈していた。転写因子の発現を加味した組織分類は臨床像ともよく相関し、ホルモン陰性腺腫の適切な診断に必須と考えられる。

## 【目的】

臨床的にホルモン過剰症状を呈さない非機能性下垂体腺腫はこれまで単一の腫瘍群として報告されることが多かったが、臨床像の異なる複数の組織型よりなることが明らかとなっている<sup>1-4)</sup>。組織学的にはナルセル腺腫(NA)とサイレント腺腫(SA)に大きく分けられ、NAはホルモン産生・分化能を欠く腫瘍、SAはホルモン産生・分化能を有する腫瘍とされている。従来の組織分類は下垂体前葉ホルモンの免疫組織化学に基づいて行われていたが、近年、各ホルモン分化能の同定に、分化誘導に関与する転写因子の発現検索が有用であることが明らかとなってきた<sup>1-3)</sup>。これにより

NAは「前葉ホルモンだけでなく、ホルモン産生細胞への分化誘導に関与する転写因子も陰性の腺腫」と定義されるようになった<sup>1,2)</sup>。今回、前葉ホルモンだけでなく転写因子の検索を追加した組織分類を行い、臨床像との相関を検討した。

## 【対象と方法】

過去4年間の非機能性下垂体腺腫 連続516例(男性268例・女性248例、平均53.8歳)を対象とした。同期間中の全下垂体腺腫の48.2%に該当し、115例(22.3%)は再手術例であった。前葉ホルモン(GH・プロラクチン・TSH・ACTH・LH・FSH)、サイトケラチン等と各ホルモン系転写因子の免疫組織化学を行った。転写因子はゴナドトロピン系(ER $\alpha$ 、SF-1)、GH・PRL・TSH系(Pit-1)、ACTH系(Tpit)。前葉ホルモンと転写因子による組織分類を行い、各組織型別に年齢、性別、MIB-1指数や巨大腺腫(>40mm)、海綿静脈洞浸潤(Knosp 4)などの頻度を比較検討した。

## 【結果】

非機能性下垂体腺腫516例中、ゴナドトロピン(LHまたはFSH)陽性腺腫が300例(58.1%)、ACTH陽性腺腫が51例(9.9%)、GH・プロラクチンまたはTSH陽性腺腫が46例(8.9%)認められ、前葉ホルモンが全て陰性だった腺腫は119例(23.1%)であった。前葉ホルモン陰性腺腫119例に転写因子発現を検索すると、ゴナドトロピン系、ACTH系、GH・PRL・TSH系への分化を各79例(66.4%)、32例(26.9%)、2例(1.7%)に認め、全ての前葉ホルモン・転写因子が陰性だったのは6例(ホルモン陰性腺腫の5.0%、非機能性腺腫の1.2%)のみであった(表1)。全てが陰性だった6例は、電子顕微鏡による検索では未分化な腺腫であり、MIB-1指数は高値ではなかったものの、内3例が再発例、2例

表 1 ホルモン陰性非機能性腺腫 119例の転写因子による細分類

Immunonegative adenomas	119
• SF-1 and/or ER positive ( <i>gonadotroph diff.</i> )	78
• Pit-1 positive adenomas ( <i>somatotroph diff.</i> )	2
• T-pit positive adenomas ( <i>corticotroph diff.</i> )	32
• True null cell adenomas	7
<hr/>	
Pituitary adenomas	1071
Nonfunctioning adenomas	516
Adenohypo. hormone-negative adenomas	119
(23.1% of NFomas)	
Transcription factors-negative adenomas	7
(1.36% of NFomas)	

は巨大浸潤性腫瘍であり、ややaggressiveな傾向を示す腫瘍と考えられた。GH・PRL・TSH系への分化、すなわちPit-1陽性腺腫の2例は再検査によりともにGHに対して淡く陽性を示しておりサイレントGH腺腫と診断された。一方、ACTHへの分化、すなわちTpit陽性腺腫の32例は、ACTH陰性ではあったがごく少数（1-2ヶ程度）のACTH陽性細胞が腺腫内に認められ、また電子顕微鏡では検索した30例中28例にhoneycomb golgi構造が認められた。またこれらACTH陰性、Tpit陽性腺腫32例は、ゴナドトロピン腺腫376例に比して女性(P<0.0001)、巨大腺腫(P=0.0019)、分葉状腺腫(P=0.0413)、

表 2 サイレントACTH腺腫(SCA)、ACTH陰性-Tpit陽性腺腫とゴナドトロピン腺腫の臨床像の相関

*Comparison between silent ACTH adenomas, ACTH-negative Tpit-positive adenomas, and gonadotroph adenomas*

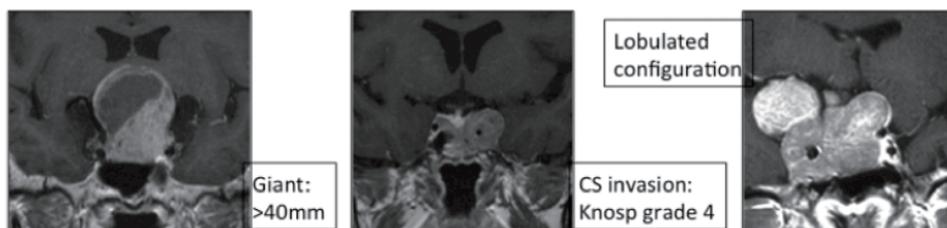
	SCA n=51	Tpit n=32	Gn n=376	P value (Tpit vs Gn)
Gender (m/f)	12/39	1/31	230/146	<0.0001
Age (ys)	23-81 (51±13)	27-78 (53±15)	18-83 (56±13)	nc
Previous recurrence	11 (21.6%)	8 (25.0%)	79 (21.0%)	nc

SCA : Silent ACTH adenomas, Tpit : ACTH-negative, Tpit-positive adenomas, Gn : (silent) gonadotroph adenomas

表 3 サイレントACTH腺腫(SCA)、ACTH陰性-Tpit陽性腺腫とゴナドトロピン腺腫のMRI所見・MIB-1指数の相関

	SCA n=51	Tpit n=32	Gn n=376	P value (Tpit vs Gn)
Giant	16 (31.4%)	7 (21.9%)	31 (8.2%)	0.0109
CS invasion	23 (45.1%)	11 (34.4%)	20 (5.3%)	<0.0001
Lobulation	20 (39.2%)	7 (21.9%)	38 (10.1%)	0.0413
MIB-1 (%)	0.5-12.5 (1.8±1.9)	0.5-5.0 (1.8±1.1)	0-7.5 (1.6±1.1)	nc

SCA : Silent ACTH adenomas, Tpit : ACTH-negative, Tpit-positive adenomas, Gn : (silent) gonadotroph adenomas



海綿静脈洞浸潤 (P<0.0001) が多く、これらの特徴はいずれもサイレントACTH腺腫51例と酷似していた (表2, 3)。

#### 【考察】

非機能性下垂体腺腫の中で、厳密な定義 (ホルモン産生・分化能を欠く) によるナルセル腺腫NAは稀であり、ホルモン陰性腺腫の大多数 (95%) はホルモン分化能を有していることが確認された<sup>3)</sup>。ホルモン陰性腺腫の多くはゴナドトロピン系分化を示す腺腫であったが、約1/4はACTH系への分化を示す腺腫であった。これらACTH陰性でありながらTpit陽性だった腺腫32例は、サイレントACTH腺腫と同様に女性に多くaggressiveな臨床像を呈していた<sup>3, 4)</sup>。すなわち前葉ホルモンに転写因子を加味した今回の組織診断は臨床像ともよく相関していた。非機能性腺腫の術後再発予測に最も重要な因子は術後残存腫瘍の有無であるが、増殖能の指標であるMIB-1指数とともに正確な組織診断も重要な因子であり、これには今回用いた転写因子を加味した組織診断法が少なくとも一部のホルモン陰性腺腫の適

切な診断に今後必須と考えられた<sup>3)</sup>。

#### 【文献】

1. Asa SL: Practical pituitary pathology. What does the pathologists need to know?. Arch Pathol Lab Med 132: 1231-1249, 2008
2. Mete O, Asa SL: Clinicopathological correlations in pituitary adenomas. Brain Pathol 22: 443-453, 2012
3. Nishioka H, Inoshita N, Mete O, Asa SL, Hayashi K, Takeshita A, Fukuhara N, Yamaguchi-Okada M, Takeuchi Y, Yamada S: The complementary role of transcription factors in the accurate diagnosis of clinically nonfunctioning pituitary adenomas. Endocr Pathol 26: 349-355, 2015
4. Nishioka H, Inoshita N, Sano T, Fukuhara N, Yamada S: Correlation between histological subtypes and MRI findings in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. Endocr Pathol 23: 151-156, 2012

# Cushing病における USP8 変異と臨床・分子病理学的特徴との関連性の検討

竹下 章、林 恭秉、井下 尚子、西岡 宏  
竹内 靖博、駒田 雅之<sup>1</sup>、山田 正三  
東京工業大学 大学院生命理工学研究科<sup>1</sup>

## 【要約】

**背景：**2015年、Cushing病の原因であるACTH産生下垂体腺腫の約1/3で、脱ユビキチン化酵素USP8遺伝子の体細胞変異が認められることが報告された。in vitroの解析で変異体がEGFRの脱ユビキチン化を促進し、EGFシグナルを介してPOMC発現を誘導することが明らかとなった。しかしながらUSP8変異の有無と患者の臨床的特徴や腫瘍の病理学所見との関連性について詳細は不明である。

**対象と方法：**Cushing病下垂体腺腫60例で内訳は女性47例と男性13例、ミクロ腺腫28例とマクロ腺腫32例。腫瘍のUSP8遺伝子解析と変異体の機能解析、臨床像の評価、qRT-PCRや免疫染色によるPOMC (ACTH)、EGFR、ソマトスタチン受容体 SSTR2およびSSTR5、ドパミン2受容体 (DRD2)、DNA 修復酵素 O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) の発現を検討し、変異の有無と臨床的特徴や分子病理学所見との関連性を検討した。

**結果：**USP8変異は、21/60例 (35%) に認められ、女性に多かった (女性:男性、20例:1例)。1cm以下のミクロ腺腫の割合が、野生型36%に対し変異体は67%と多く、USP8変異は浸潤性の強い腫瘍では認められなかった。治癒切除率も変異体が良好であった。in vitroの機能解析で、変異体では野生型に比べEGFRの脱ユビキチン化の促進が認められた。ところが実際の病理組織ではEGFR発現の有無や発現量はUSP8変異の有無と関連しなかった。一方、変異体の腫瘍は野生型に比しPOMC、SSTR5、MGMT発現が高かった。USP8変異の有無とSSTR2、DRD2発現に関連性は認められなかった。

**考察：**USP8変異は、女性でミクロ腺腫に多く、POMC発現が高いことから、典型的なCushing病の臨床的特徴を反映している。またUSP8変異陽性例はSSTR5発現強陽性例が多く、新規ソマトスタチンアナログのパシレオチドの効果が期待される。一方、腫瘍サイズが大きく浸潤性の強い腫瘍はUSP8変異の頻度が低く、MGMT発現が低い症例が多いことからアルキル化剤テモゾロミドの効果が期待される。USP8変異腫瘍におけるEGFシグナルの役割は今後の検討課題である。

## 【目的】

Cushing病は下垂体腺腫からのACTH過剰分泌による高コルチゾール血症が原因である。男女比が約1:4と女性に多く、30-40歳代を中心に比較的広い年齢層に発症する。ACTH産生腺腫の約8割はミクロ腺腫とよばれる1cm以下の小さな腫瘍が多いのが特徴である。一方、周囲組織に浸潤する大きな腫瘍は、低頻度ながら手術による摘出が困難で難治性である。手術による切除が治療の基本であるが、残存腫瘍がある場合は薬物治療の適応となる。ACTH産生腺腫を標的とする薬物療法としてはソマトスタチン受容体5 (SSTR5) に結合刺激活性の高いソマトスタチンアナログのパシレオチド、ドパミン受容体作動薬のカベルゴリン、異型性が強く浸潤性の腫瘍に使用されるアルキル化剤のテモゾロミドなどがある<sup>1)</sup>。

2015年にエクソーム・シークエンスによる解析によりCushing病下垂体腺腫の1/3~2/3の症例で、脱ユビキチン化酵素USP8 (Ubiquitin-specific peptidase 8) の体細胞性変異が相次いで報告された<sup>2, 3)</sup>。in vitroの解析で変異体が上皮成長因子受容体 (EGFR) の脱ユビキチン化を

促進し、EGFシグナルを介してPOMC発現を誘導することが明らかとなった<sup>2)</sup>。しかしながらUSP8変異の有無と腫瘍サイズ、浸潤度、手術成績など患者の臨床的特徴との関連性、EGFR発現との関連性、薬物治療効果と関連する蛋白発現との関連性について詳細は不明である。本研究では、それらを明らかにするため、60例のCushing病腫瘍組織を用いて検討を行った。

#### 【方法】

インフォームドコンセントを得、当院で2004年3月～2013年8月に手術したCushing病患者の腫瘍組織からRNA抽出が可能であった60例を対象とした。内訳は女性47例と男性13例、また腫瘍の大きさが1cm未満のミクロ腺腫は28例、1cm以上のマクロ腺腫は32例であった。

USP8遺伝子解析は腫瘍組織からtotal RNAを抽出しRT-PCRプロダクトを用いて変異のHot spotのダイレクトシーケンスを行った。臨床検査データの評価として血中ACTH値、コルチゾール値、MRIでの腫瘍最大径およびKnosp分類による評価、治癒切除率（術後コルチゾール<3 μg/dL）を行った。分子生物学的評価として腫瘍のtotal RNAからcDNAを合成し、SYBR-Green法にて定量リアルタイムPCR

(qPCR)によりmRNA発現を評価した。qPCRはGAPDHを内部標準とし、プロオピオメラノコルチン (POMC)、EGFR、ソマトスタチン受容体 (SSTR) 2、SSTR5、ドパミン受容体2型 (DRD2)、DNA修復酵素のO<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ (MGMT) mRNAの発現量を測定した。正常下垂体3例の各遺伝子発現量の平均を100%として表示した。病理学的評価としてルーチンのACTH等の免疫組織染色のほか、EGFR、SSTR2およびSSTR5、DRD2、MGMTの免疫染色を行い、評価はIRS (Immunoreactive Score) を用いて行った。IRSは陽性率 (0%:0、<10%:1、10～50%:2、51～80%:3、>80%:4) と染色強度 (no staining:0、weak:1、moderate:2、strong:3) をかけあわせ算出したもので、IRS (0～12:0、1、2、3、4、6、8、9、12) として表した<sup>4)</sup>。変異の有無と臨床的特徴や分子生物学的および病理学所見との関連性について検討した。

#### 【結果】

USP8変異は、60例中21例 (35%) に認められ、女性が47例中20例、男性は13例中1例と女性に高頻度であった。変異は既報と同様にS718delが9例、P720Rが6例と高頻度で1例に新規変

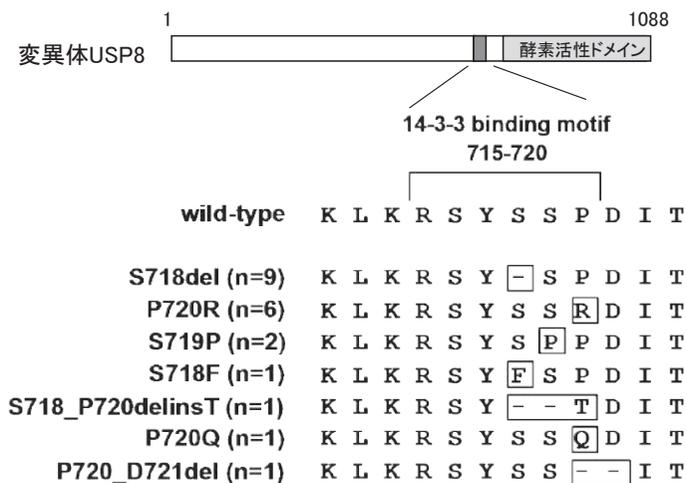


図1 Cushing病下垂体腺腫60例におけるUSP8変異  
60例中21例でホットスポットに変異が認められた。S718delとP720Rが高頻度、1例で新規変異 (S718\_P720delinsT) が認められた。

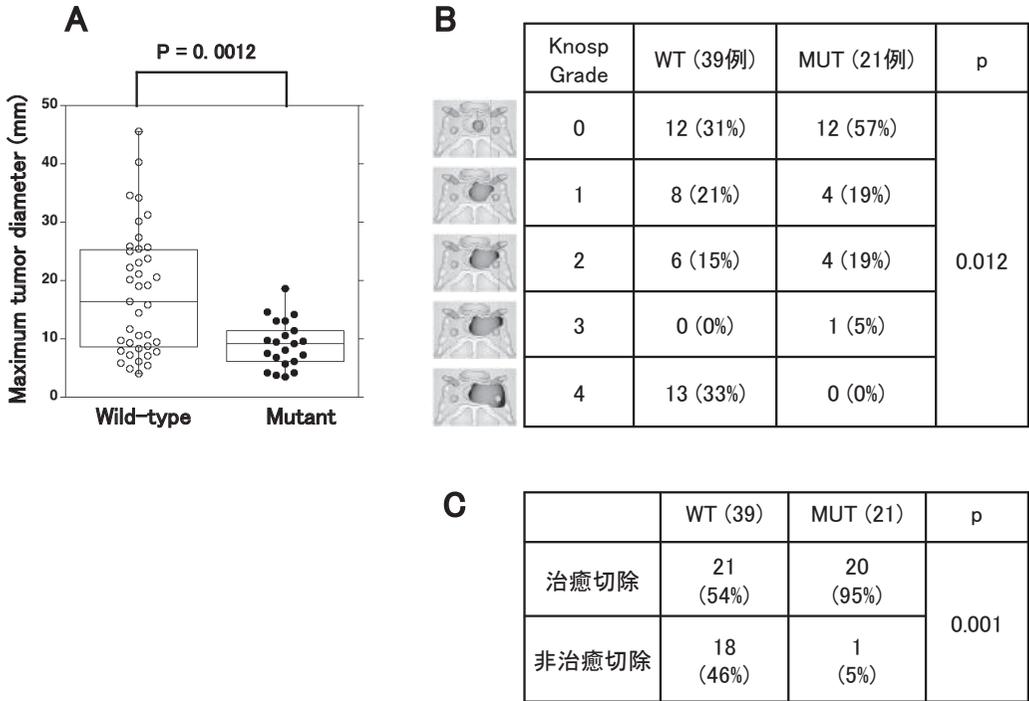


図2 USP8変異の有無と臨床像の関連性

- (A) USP8変異の有無と腫瘍長径の関係。Mann-Whitney U testにて検定。  
 (B) USP8変異の有無とKnosp分類。Mann-Whitney U testにて検定。  
 (C) USP8変異の有無と治癒切除率の関係。治癒切除は術後の血清コルチゾール値が $3 \mu\text{g/dL}$ 未満と定義した。Fisher's exact testにて検定。

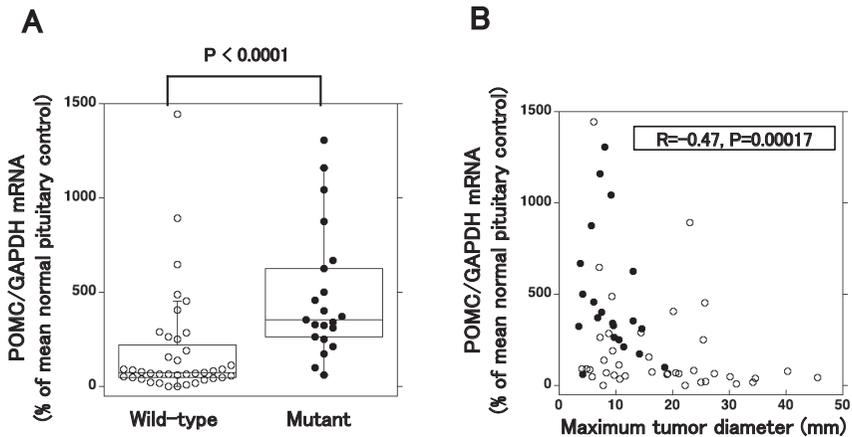


図3 Cushing病におけるPOMC発現

- (A) USP8変異の有無とPOMC mRNA発現量の関係。POMC mRNAをqPCRにより定量した。GAPDHを内部標準とし、正常下垂体3例の発現量の平均を100%として表示した。Mann-Whitney U testにて検定。  
 (B) POMC mRNA発現量と腫瘍最大径の関係。Spearman's rank correlation coefficientにて検定。

異 (S718\_P720delinsT) が見つかった (図1)。HeLa細胞を用いた機能解析で、変異体によるEGFRのダウンレギュレーションの抑制が確認された (他施設との共同研究)。

変異体の腫瘍は一般に小さく、最長径が1cm以下のマイクロ腺腫の割合は、野生型の36%に対し変異体は67%と多く、また変異体は全て2cm未満であった (図2A)。海綿静脈洞浸潤の頻度は両群で有意差は得られなかったが、内頸動脈を取り囲むようなKnosp分類Grade 4の腫瘍は変異例には認められず (図2B)、治癒切除率 (術後コルチゾール $<3 \mu\text{g/dL}$ ) も変異体が野生型に比して良好であった (95% vs. 54%) (図2C)。

変異体と野生型では血中のACTH及びコルチゾール濃度に有意差は認められなかった。しかしながら変異体の腫瘍は野生型に比しPOMC mRNA発現が有意に多かった (図3A)。腫瘍の最大径とPOMC mRNA発現量には負の相関が認められた (図3B)。

これまでの報告から<sup>2,3)</sup>、特に免疫染色におけるEGFR発現は、変異体が野生型に比べ高いと予想していたが、今回の我々の検討ではqPCR (図4A) および免疫染色 (図4B) のいずれの検討で

も両群間に有意差は認められなかった。また免疫染色では、60例中51例がスコア0または1の発現陰性例で、IRSの最大値はスコア6を呈した野生型2例であり全体に蛋白発現レベルは低スコアであった。

薬物感受性と関連するSSTR5とMGMTの発現はqPCRおよび免疫染色のいずれも変異体が野生型に比し有意に高値であった (図5, 6)。なおUSP8変異の有無とSSTR2, DRD2発現 (qPCRおよび免疫染色) に関連性は認められなかった。

まとめるとUSP8変異は、女性でマイクロ腺腫に多く、POMC発現が高いことから、典型的なCushing病の臨床的特徴を反映している。またUSP8変異陽性例はSSTR5発現強陽性例が多く、新規ソマトスタチンアナログのパシレオチドの効果が期待される。一方、腫瘍サイズが大きく浸潤性の強い腫瘍はUSP8変異の頻度が低く、MGMT発現が低い症例が多いことからアルキル化剤テモゾロミドの効果が期待される。USP8変異腫瘍におけるEGFシグナルの役割は今後の検討課題である。

#### 【考察】

変異体の典型的な表現型は、中年の女性に発

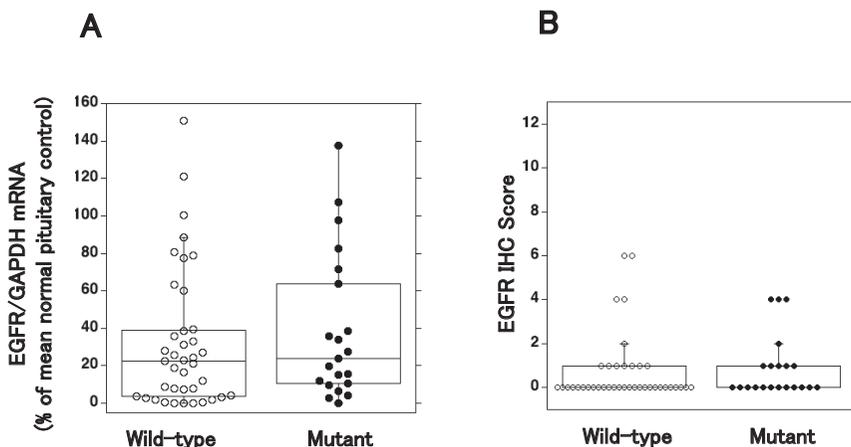


図4 Cushing病におけるEGFR発現

- (A) USP8変異の有無とEGFR mRNA発現量の関係。EGFR mRNAをqPCRにより定量した。GAPDHを内部標準とし、正常下垂体3例の発現量の平均を100%として表示した。Mann-Whitney U testにて検定。
- (B) USP8変異の有無とEGFR IRSの関係。免疫染色によるEGFR発現量をIRSで評価した。Mann-Whitney U testにて検定。

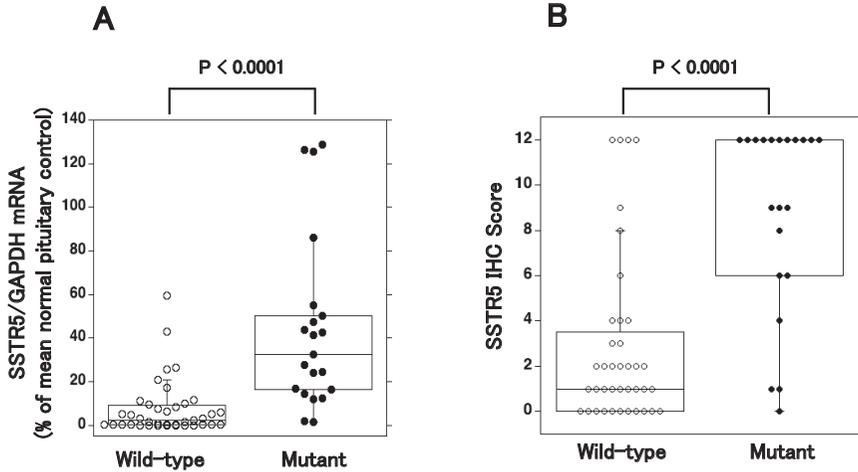


図 5 Cushing病におけるSSTR5発現

- (A) USP8変異の有無とSSTR5 mRNA発現量の関係。SSTR5 mRNAをqPCRにより定量した。GAPDHを内部標準とし、正常下垂体3例の発現量の平均を100%として表示した。Mann-Whitney U testにて検定。
- (B) USP8変異の有無とSSTR5 IRSの関係。免疫染色によるSSTR5発現量をIRSで評価した。Mann-Whitney U testにて検定。

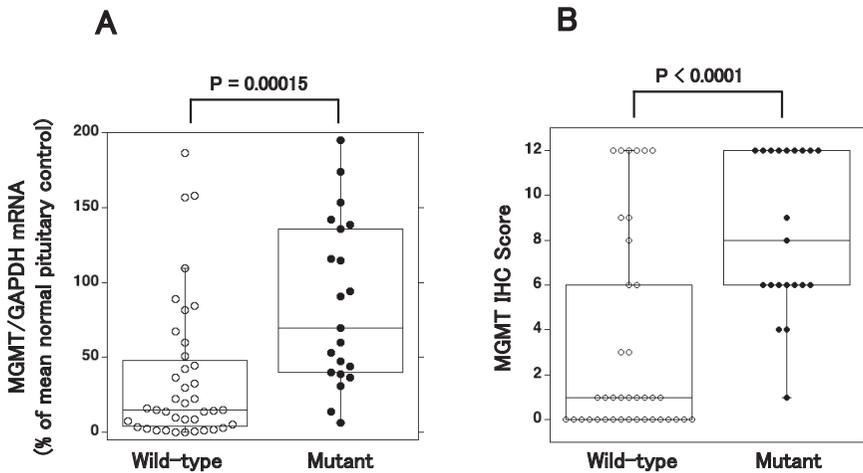


図 6 Cushing病におけるMGMT発現

- (A) USP8変異の有無とMGMT mRNA発現量の関係。MGMT mRNAをqPCRにより定量した。GAPDHを内部標準とし、正常下垂体3例の発現量の平均を100%として表示した。Mann-Whitney U testにて検定。
- (B) USP8変異の有無とMGMT IRSの関係。免疫染色によるMGMT発現量をIRSで評価した。Mann-Whitney U testにて検定。

症する1cm以下のミクログ腺腫であり、治癒切除率は変異体(95.2%)が野生型(53.8%)に比して高かった。USP8変異は60例中2例(35%)に

認められたが、1cm以下のミクログ腺腫の割合が、野生型の35.9%に対し変異体は66.7%と多かった。ミクログ腺腫の一般的な頻度は約8割であるが、

マイクロ腺腫のような小さな腫瘍はRNA抽出可能な検体数が少ない。このため対象にはバイアスがあり、検体60例中マイクロ腺腫は28例(47%)で、マイクロ腺腫の割合が実際の頻度よりも少ない。このことから実際の全体でのUSP8変異の頻度は35%よりも高い可能性がある。

我々の結果と同様に、中国のグループの報告では変異体はマイクロ腺腫の頻度が高かった<sup>3)</sup>。一方、ヨーロッパのグループは変異の有無と大きさに関連性はないと報告した<sup>5)</sup>。これらの結果の差異の原因は明らかではないが、我々や中国のグループの検体は単一施設で集められたものであるが、ヨーロッパのグループの検体は複数の施設で集められたものであること、また人種の違いなどが影響しているのかもしれない。

これまでの報告<sup>1, 5)</sup>及び、我々の共同研究で、*in vitro*ではUSP8変異体は野生型よりも高い脱ユビキチン酵素活性を有し、EGFRの膜における発現増加が観察されたが、我々の検討した免疫染色では変異体と野生型でEGFR発現に有意差は認められなかった。免疫染色に用いた抗EGFRモノクローナル抗体31G7は、臨床で広く用いられているバリテーション済みの抗体であり偽陰性の可能性は考えにくい。免疫染色によるEGFR発現について、これまでの報告を検討すると、ACTH産生下垂体腺腫では、EGFR陽性例が多いという報告<sup>6, 7)</sup>、他の機能性や非機能性腺腫に比べ発現量が少ないという報告<sup>8)</sup>、悪性例などアグレッシブな症例では発現が多いという報告<sup>8-10)</sup>など様々である。USP8変異を報告した中国のグループはUSP8変異例でEGFR発現陽性例が多い<sup>3)</sup>と報告しており、EGFR発現に関しては我々の結果と異なる結果が得られている。このためCushing病下垂体腺腫におけるUSP8変異とEGFR発現の関連性に関しては引き続き検討が必要と考えられる。また、これまでUSP8の基質候補としてEGFRのみが取り上げられてきたが、今後、EGFR以外のUSP8の標的基質についても検討が進み、Cushing病発症のメカニズムが徐々に明らかとなることが期待される。

ソマトスタチンアナログのパシレオチドはSSTR5に高親和性に結合し、Cushing病患者の

25-30%で尿中コルチゾール排泄を正常化する効果を持つ新規薬剤である<sup>1)</sup>。USP8変異陽性例はSSTR5発現強陽性例が多いことから、パシレオチドによる治療効果が高いことが予想される。一方、野生型の腫瘍は浸潤性のマクロ腺腫が多く治療切除率が低い薬物による追加治療が必要となることが多いが、SSTR5の発現量は一般に低くパシレオチド抵抗性が予想される。

手術・放射線治療・薬物治療をおこなっても効果が不十分で局所再発を繰り返す難治性の浸潤性下垂体腫瘍や下垂体癌は抗癌剤による化学療法が適応となる。最近まで有効な薬剤がなかったが、近年、アルキル化剤のテモゾロミドが有効なことが明らかとなった<sup>1)</sup>。DNA修復酵素のひとつであるMGMT発現が低い腫瘍ではテモゾロミドのようなアルキル化剤に対し治療感受性が高いことが報告されている<sup>11)</sup>。USP8変異のない野生型の腫瘍は、浸潤性のマクロ腺腫が多く治療切除率が低い、前述のようにSSTR5発現量が一般に低くパシレオチド抵抗性を示す症例が多いと考えられる。しかしながらMGMT発現は低い症例が多いことからテモゾロミドの効果が期待される。

#### 【文献】

1. Feelders RA, Hofland LJ: Medical treatment of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 98: 425-438, 2013
2. Reincke M, Sbierra S, Hayakawa A, et al.: Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. *Nat Genet* 47: 31-38, 2015
3. Ma ZY, Song ZJ, Chen JH, et al.: Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease. *Cell Res* 25: 306-317, 2015
4. Lupp A, Hunder A, Petrich A, et al.: Reassessment of sst (5) somatostatin receptor expression in normal and neoplastic human tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-4. *Neuroendocrinology* 94: 255-264, 2011
5. Perez-Rivas LG, Theodoropoulou M, Ferrau F, et al.: The gene of the ubiquitin-specific protease 8 is frequently mutated in adeno-

- mas causing Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 100: E997–E1004, 2015
6. Kontogeorgos G, Stefaneanu L, Kovacs K, Cheng Z: Localization of epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in human pituitary adenomas and nontumorous pituitaries: An immunocytochemical study. *Endocr Pathol* 7: 63–70, 1996
  7. Theodoropoulou M, Arzberger T, Gruebler Y, et al.: Expression of epidermal growth factor receptor in neoplastic pituitary cells: evidence for a role in corticotropinoma cells. *J Endocrinol* 183: 385–394, 2004
  8. Onguru O, Scheithauer BW, Kovacs K, et al.: Analysis of epidermal growth factor receptor and activated epidermal growth factor receptor expression in pituitary adenomas and carcinomas. *Modern Pathology* 17: 772–780, 2004
  9. LeRiche VK, Asa SL, Ezzat S: Epidermal growth factor and its receptor (EGF-R) in human pituitary adenomas: EGF-R correlates with tumor aggressiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 656–662, 1996
  10. Cooper O, Vlotides G, Fukuoka H, et al.: Expression and function of ErbB receptors and ligands in the pituitary. *Endocr Relat Cancer* 18: R197–R211, 2011
  11. Bengtsson D, Schroder HD, Andersen M, et al.: Long-term outcome and MGMT as a predictive marker in 24 patients with atypical pituitary adenomas and pituitary carcinomas given treatment with temozolomide. *J Clin Endocrinol Metab* 100: 1689–1698, 2015
- 【発表に関する事項】
1. Hayashi K, Inoshita N, Kawaguchi K, Ibrahim Ardisasmita A, Suzuki H, Fukuhara N, Okada M, Nishioka H, Takeuchi Y, Komada M, Takeshita A, Yamada S: The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease. *Eur J Endocrinol* 174: 213–226, 2016
  2. 竹下章、林恭乗、井下尚子、川口紘平、Ibrahim Ardisasmita Arif、鈴木尚宜、福原紀章、岡田満夫、西岡宏、竹内靖博、駒田雅之、山田正三: Cushing病におけるUSP8変異と臨床・分子病理学的特徴との関連性の検討. 第26回日本間脳下垂体腫瘍学会 (福島)

# 原発性副甲状腺機能亢進症における術後の骨密度上昇の 予知因子の解明

竹内 靖博、鈴木 尚宜、竹下 章

## 【背景と目的】

原発性副甲状腺機能亢進症は、副甲状腺ホルモンの自律的な過剰分泌により骨吸収が亢進することで高カルシウム血症をもたらす疾患である。その結果として、本症は骨密度低下とそれに基づく骨折リスクの上昇をもたらす疾患である。責任病巣となる副甲状腺腺腫あるいは過形成を外科的に摘除することにより、本症は内分泌学的な治癒が得られる。骨に対する治療効果は、術後1年で主に海綿骨を含む腰椎領域において骨密度の上昇を認めることで評価される。多くの症例で術後の骨密度上昇を認めるものの、その程度には個人差が大きく、また術後早期では骨密度の改善を認めない例も存在する。近年では骨粗鬆症を契機に高齢で原発性副甲状腺機能亢進症と診断される患者が増加しており、術後に適切な骨粗鬆症治療を開始する上で、術後早期における骨密度の改善効果を術前に推測することが必要となっている。本研究では、原発性副甲状腺機能亢進症患者の術前に得られた骨代謝マーカーや内分泌検査などの生化学的指標の中で、手術1年後の腰椎骨密度改善率の予知因子となるものを明らかにすることを目的に、調査と解析を行った。

## 【方法】

対象は当院で2011年4月から2014年3月まで手術した50歳以上の原発性副甲状腺機能亢進症患者で、術後半年の検査で治癒が確認され、術後1年での腰椎骨密度の再検が実施された23例である。以下の項目のいずれかに該当する場合は除外した。①術前3ヶ月以内に骨粗鬆症治療薬を投与された患者；②HbA1cが8%以上の血糖コントロール不良の患者；③CKDステージ4以上の腎不全患者。調査および測定項目は、年齢、性別、身長、体重 (BMI)、腰椎骨密度、血液検査：intact PTH、骨代謝マーカー (骨型ALP、オステオカ

ルシン、ucOC)、25水酸化ビタミンD、1,25水酸化ビタミンD、尿検査：骨代謝マーカー (NTX)とした。腰椎骨密度は術後1年目で再検査を行った。

## 【結果】

- (1) 術前の腰椎骨密度と相関を認める指標は、検討した項目の中には存在しなかった。
- (2) 手術1年後の腰椎骨密度変化率と最もよく相関した術前検査値は血中オステオカルシン濃度であり ( $R^2 = 0.410$ ,  $p < 0.01$ )、低カルボキシル化オステオカルシンであるucOCとも相関を認め ( $R^2 = 0.272$ ,  $p < 0.01$ )、いずれも正相関であった。
- (3) 術前血中オステオカルシンが基準値上限以下の7例中4例で骨密度の改善を認めるにすぎなかったが、基準値上限を超える16例では13例で改善を認めた。しかし、統計学的には有意差は認められなかった ( $\chi^2$ -test, n.s.)。
- (4) その他の生化学的指標は骨密度変化率との相関を示さなかった。
- (5) 術前の腰椎骨密度についても術後の改善率とは相関を認めなかった。

## 【考察と結論】

副甲状腺ホルモンは破骨細胞の活性化を介して骨吸収を促進することから、その過剰状態が副甲状腺手術により急激に改善されることにより、骨吸収が抑制される。副甲状腺ホルモンの低下自体には骨形成を促進する作用はないと考えられる。そのため、副甲状腺機能亢進症術後の骨密度改善は、副甲状腺ホルモン低下による骨吸収の抑制と、術前に認められる骨芽細胞の機能により規定されることが推測される。

骨芽細胞の機能はその分化段階に応じて発揮され、分化の早期にはI型コラーゲンを主体とする

骨基質蛋白を活発に合成・分泌する。骨芽細胞の早期分化マーカーの代表は骨型ALPである。骨芽細胞は成熟に伴い、骨基質の石灰化能を獲得する。オステオカルシンは成熟骨芽細胞の分化マーカーである。今回の結果からは、術前に血中オステオカルシンが高値で成熟骨芽細胞の活性が高い

ことが、術後の骨密度改善に貢献することが示唆される。従って、術前に血中オステオカルシンが低い症例ほど、術後の骨密度改善率が不良であり、早期に骨粗鬆症治療の開始が推奨されることが示唆される。

# 血管新生抑制因子 THBS1 の脂肪細胞の代謝活性における役割

井上 真由美  
京都大学大学院医学研究科

## 【要約】

われわれはすでに血管新生抑制因子 Thrombospondin 1 ノックアウトマウス (*Thbs1* KO) は高脂肪食負荷による肥満抵抗性を示し、インスリンへの反応性を維持することを報告してきた<sup>1)</sup>。そのメカニズムのひとつとして、白色脂肪細胞の細胞内代謝の亢進が見られるという仮説のもと、われわれは野生型と *Thbs1* KO マウスを比較検討した結果、血管新生抑制因子 THBS1 は脂肪細胞の代謝活性に重要な役割を有する可能性を見出した。

## 【目的】

肥満およびそれに続くインスリン抵抗性は今や先進国共通の国民病とも言われる。その肥満や糖尿病の治療ターゲットを見出すために、我々はそのメカニズムを明らかにしようとしている<sup>2-4)</sup>。

げっ歯類動物やヒトの胎児には通常の脂肪細胞 (白色脂肪細胞: White fat) のみならず、褐色脂肪細胞 (Brown fat) が存在し、細胞内のミトコンドリアにおける熱産生 (ミトコンドリア呼吸) が活発で全身の代謝に大きな影響を及ぼしている。

近年、その褐色脂肪細胞に似た構造を持つ褐色脂肪“様”細胞 (ベージュ脂肪細胞 Beige fat) が成人の白色脂肪組織の中にも存在し、その全身のエネルギー消費への影響が示唆され、肥満やインスリン抵抗性の新たな治療ターゲットとなる可能性が期待されている。

最近我々は血管新生抑制因子 Thrombospondin 1 (*Thbs1*) の遺伝子改変マウス (ノックアウトマウス、*Thbs1* KO マウス) が野生型のマウスに比べて高脂肪食負荷を受けても肥満抵抗性を示し、野生型に比べてインスリン反応性を維持しやすいことを見出した<sup>1)</sup>。その際に *Thbs1* KO マウスの白色脂肪組織にいわゆる褐色細胞様変化が見

られることを発見したことから THBS1 は白色脂肪細胞の褐色化に関連したメカニズムを介して肥満やインスリン抵抗性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。その詳しいメカニズムを明らかにし、肥満やインスリン抵抗性の新たな治療戦略を見出すために以下の検討を行った。

## 【方法】

(1) 脂肪細胞におけるミトコンドリア呼吸 (代謝) に対する THBS1 の役割の検討

われわれのこれまでの検討によると野生型のマウスに比べて *Thbs1* KO マウスは全身でのエネルギー消費量が亢進しており、ミトコンドリア関連遺伝子およびタンパクの発現量が亢進していた。われわれは細胞外フラックスアナライザーを用いて *in vitro* での脂肪細胞におけるミトコンドリア呼吸量の違いを検討した。

(2) 脂肪組織での血管新生における THBS1 の意義の解析

THBS1 は強力な血管新生抑制因子である。これまで、褐色脂肪細胞が“褐色”に見えるのはその組織周囲の豊富な毛細血管の血液の色のためだと言われてきた。そこで、われわれは野生型のマウスおよび *Thbs1* KO マウスの脂肪組織内での血管量の違いを免疫組織化学的手法を用いて検討した。

## 【結果】

*Thbs1* KO マウスと野生型マウスの脂肪組織から採取した脂肪細胞前駆細胞を脂肪細胞へ分化させ、細胞外フラックスアナライザーを用いて *in vitro* での脂肪細胞におけるミトコンドリア呼吸量を測定した結果、野生型マウスと比較して *Thbs1* KO マウスで有意にミトコンドリア呼吸が亢進していた。

また、*Thbs1* KO マウスと野生型マウスから採取した脂肪組織を免疫染色を用いて検討したとこ

ろ、血管新生抑制因子である THBS1 を欠損した *Thbs1* KO マウスでは野生型のマウスに比べて脂肪組織の毛細血管が有意に多く観察された。

#### 【考察】

以上の結果から、血管新生抑制作用をもつ細胞外マトリックスタンパク THBS1 が白色脂肪細胞の Brown/Beige 脂肪細胞化あるいは肥満時の脂肪細胞の脱褐色化（細胞内代謝の減少）への役割を持つ可能性、また、脂肪細胞における血管新生抑制作用をもち細胞内代謝に影響を及ぼす可能性が示唆された。

一方、共同研究では本邦でのヒトの脂肪組織における *Thbs1* 遺伝子発現と肥満との関連を検討しており、その結果、*Thbs1* は内臓脂肪組織で発現が高く、血清 THBS1 値は肥満度と有意な相関を示し、内臓肥満に起因する疾患への関与も示唆されている<sup>5)</sup>。この結果は、われわれの本研究を強く支持するものである。

今後、THBS1 の中和抗体やプロッキングペプチドを用いて肥満や代謝異常の治療に応用し、将来ヒトの肥満や糖尿病の治療につながるツールを発見することを最終目標として引き続き研究を進めている。

#### 【文献】

1. Inoue M, Jiang Y, Barnes RH, Tokunaga M, Martinez-Santibañez G, Geletka L, Lumeng C, Buchner D, Chun TH: Thrombospondin 1 Mediates HFD-induced Muscle Fibrosis and Insulin Resistance in Male Mice. *Endocrinology* 154: 4548-4559, 2013
2. Inoue M, Chiang SH, Chang L, Chen XW, Saltiel AR: Compartmentalization of the exocyst complex in lipid rafts controls glut4 vesicle tethering. *Mol Biol Cell* 17: 2302-2311, 2006
3. Inoue M, Chang L, Hwang J, Chiang SH, Saltiel AR: The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. *Nature* 422: 629-633, 2003
4. Chun TH, Inoue M: 3-D adipocyte differentiation and peri-adipocyte collagen turnover. *Methods Enzymol* 538: 15-34, 2014
5. Matsuo Y, Tanaka M, Yamakage H, Sasaki Y, Muranaka K, Hata H, Ikai I, Shimatsu A, Inoue M, Chun TH, Satoh-Asahara N: Thrombospondin 1 as a novel biological marker of obesity and metabolic syndrome. *Metabolism* 64: 1490-1499, 2015

### (3) 呼吸器疾患

## 肺Langerhans細胞組織球症における*BRAF*変異の検討

竹安 真季子、中村 信之、藤井 丈士、岸 一馬

#### 【要約】

Langerhans細胞組織球症（LCH：Langerhans Cell Histiocytosis）は、組織学的に組織球の単クローン性増殖と多臓器浸潤を特徴とする稀な全身性疾患である。肺Langerhans細胞組織球症（PLCH：Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis）はこのうち肺病変を主体とする場合の呼称である。*BRAF*変異は悪性黒色腫や肺癌などで報告されている癌の細胞増殖に関わる遺伝子変異であり、近年LCHにおいても*BRAF*変異が存在する事が知られる。この研究では、当院におけるPLCHの臨床的特徴および*BRAF*変異を調べる事を目的とした。PLCH患者11例全例に喫煙歴があり、1例は禁煙でも改善せずステロイド治療を施行された。*BRAF*変異の検索が可能であったPLCH患者5例の遺伝子型は全例が野生型であった。

#### 【目的】

PLCHは喫煙に関連するとされ、予後の良い例が多いが一部に緩徐に進行する例もある。近年悪性黒色腫の他、LCHやPLCHでも*BRAF*変異を認めるとする報告もあるが、稀少疾患であり本邦での報告は未だ乏しい。この研究では、当院におけるPLCHの臨床病理学的特徴を検討することを目的とする。

#### 【方法】

2000年～2015年に、胸腔鏡下肺切除術により、PLCH（または好酸球性肉芽腫症）と診断された患者を対象とした。検体にはホルマリン固定パラフィン包埋組織を用い、直接塩基配列決定法で*BRAF*<sup>V600E</sup>変異の有無を検索した。PLCH患者の年齢、性別、喫煙歴、症状、治療、経過、予後などを調べた。

#### 【結果】

対象患者は11例であった。性別は男性9例、女

性2例で、年齢中央値は47歳であった。11例全例に喫煙歴があり、喫煙指数の中央値は640であった。経過が記載されていた9例全例に対し禁煙が指示され、1例を除き不変または臨床的に明らかな改善を認めた。進行した1例に対してはステロイド治療が導入された。観察期間中央値は497日であった。1例が併存症である悪性腫瘍により観察期間中に死亡した。合併症として、1例に尿崩症、肺高血圧、2例に気胸、3例に悪性腫瘍を認めた。検体量十分な9例からDNA抽出を行い、PCR法を施行して5例でPCR増幅が得られた。直接塩基配列決定法により*BRAF*<sup>V600E</sup>変異の有無を検索した結果、全例（5/5）が野生型であった。

#### 【考察】

*BRAF*はセリン・スレオニンキナーゼで、mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達経路で重要な役割を担っている。遺伝子変異には13のGenotypeが報告されており、多くはV600E遺伝子変異とされる。*BRAF*<sup>V600E</sup>変異は悪性黒色腫などで報告されており、*BRAF*<sup>V600E</sup>変異を有する悪性黒色腫患者およびその他の疾患に対して、*BRAF*阻害薬の有効性が報告されている。*BRAF*<sup>V600E</sup>変異陽性のLCHと類縁疾患であるErdheim-Chester病18例に対する*BRAF*阻害薬の奏効率は43%とされる<sup>1)</sup>。稀少疾患であり本邦からの報告は殆どないが、海外の報告では、肺病変のみのPLCHでも、5/12例（41%）に*BRAF*<sup>V600E</sup>変異を認めたとするもの<sup>2)</sup>や、*BRAF*<sup>V600E</sup>変異陽性例（2/5例、40%）では同一患者の複数の肺結節で同じ遺伝子変異を認めたとするものもある<sup>3)</sup>。本研究では、*BRAF*<sup>V600E</sup>変異が評価可能であった5例で全例が野生型であった。既報との頻度の差の原因は不明である。人種による*BRAF*<sup>V600E</sup>変異の頻度の差や、予後、

重症度などの臨床像と*BRAF*<sup>V600E</sup>変異との関係は、今後の検討課題である。

【文献】

1. Hyman DM, Puzanov I, Sybbuah V, et al.: Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med* 20: 726-736, 2015
2. Sahm F, Capper D, Preusser M, et al.: BRAFV600E mutant protein is expressed in cells of variable maturation in Langerhans cell histiocytosis. *Blood* 120: e28-e34, 2012
3. Yousem SA, Dacic S, Nikiforov YE, et al.: Pulmonary Langerhans cell histiocytosis: profiling of multifocal tumors using next-generation sequencing identifies concordant occurrence of BRAF V600E mutations. *CHEST* 143: 1679-1684, 2013

# 血液疾患患者の肺病変に対する気管支鏡検体の網羅的リアルタイムPCRの有用性の検討

花田 豪郎、諸角 美由紀<sup>1</sup>、生方 公子<sup>1</sup>  
岩田 敏<sup>1</sup>、岸 一馬<sup>1</sup>  
慶應義塾大学医学部感染症学教室<sup>1</sup>

## 【要約】

血液疾患患者に伴う肺病変のうち呼吸器感染症は頻度、死亡率が高く、予後規定因子であるため、早期診断と早期治療が重要である。2014年4月～2016年2月に虎の門病院に入院した血液疾患患者のうち、肺病変を合併し、非侵襲的検査で診断が得られず、経験的抗菌薬治療によっても病状の改善がない25例に対して気管支鏡を施行し、気管支肺胞洗浄液（BALF）を用いて細菌6種、ウイルス16種のリアルタイムPCRを施行した。男性18例、女性7例で年齢中央値は59歳（42～80歳）、造血幹細胞移植は18例（72%）で施行されており、全例で気管支鏡前に広域抗菌薬が2日以上投与されていた。喀痰検査では全例で一般細菌、真菌、抗酸菌の培養が陰性であった。気管支鏡検査結果により18例（72%）が感染性疾患と診断された。BALFのリアルタイムPCRの結果、ウイルスを10例（サイトメガロ6例、アデノ2例、RS1例、ライノ1例）、細菌を2例（レンサ球菌、レジオネラ）で検出した。サイトメガロウイルス（CMV）陽性の6例は、全例で乾性咳嗽と胸部CT上すりガラス影を認め、CMV抗原血症検査が陽性だった。BALFのCMV陽性患者のウイルスDNA量は $8.0 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^6$  copies/mlだった。また、25例のうち7例（28%）はニューモシスチス肺炎を合併していたが、このうち3例はCMV陽性患者であった。CMV陽性患者に対する抗ウイルス薬の治療効果は全例で認めたが、3例が死亡した。

## 【目的】

血液疾患患者に伴う肺病変は、感染症の他に非感染性疾患として、薬剤性肺障害、原病の肺部分症などが報告されている。感染症の頻度は高く、その中でも細菌、ウイルス、真菌、抗酸菌などの

呼吸器感染症は頻度のみならず死亡率が高く、予後規定因子である<sup>1)</sup>。また、初期治療が奏効しない場合に予後不良となるため、早期診断と早期治療が重要である。呼吸器感染症を疑うものの非侵襲的検査で診断が得られず、経験的抗菌薬治療を行っても病状の改善がない場合に気管支鏡検査を施行することで治療方針の決定に寄与する臨床的価値の高い情報が得られる<sup>2,3)</sup>。リアルタイムPCRによる呼吸器微生物の遺伝子の網羅的検出は感度・特異度に優れ、迅速性もあり臨床的有用性が高いことが示されている<sup>4)</sup>。本研究では血液疾患患者の肺病変の気管支鏡検体を用いて、網羅的リアルタイムPCRにより病原微生物の検出を試みる。

## 【方法】

2014年4月～2016年2月に虎の門病院に入院した血液疾患患者のうち、肺病変を合併し、非侵襲的検査で診断が得られず、経験的抗菌薬治療によっても病状の改善がない25例に対して気管支鏡を施行し、気管支肺胞洗浄液（BALF）を用いて細菌6種（肺炎球菌、インフルエンザ菌、溶血性レンサ球菌、マイコプラズマ、レジオネラ菌、肺炎クラミドフィラ）、ウイルス16種（アデノ、インフルエンザA/B、RS A/B、パラインフルエンザ1/2/3、ライノ、エンテロ、ヒトメタニューモ、ヒトボカ、EB、サイトメガロ、HSV1/2）のリアルタイムPCRを施行した。同時に一般細菌・真菌・抗酸菌培養、抗酸菌PCR、ニューモシスチスPCRを施行した。

## 【結果】

男性18例、女性7例で年齢中央値は59歳（42～80歳）、基礎疾患は急性骨髄性白血病12例、悪性リンパ腫4例、成人T細胞白血病2例、急性

リンパ性白血病2例、骨髄異形成症候群2例、骨髄線維症2例、慢性骨髄性白血病1例であった。造血幹細胞移植は18例（臍帯血移植14例、骨髄移植2例、末梢血幹細胞移植2例）で施行されており、移植後日数の中央値は100日（30～1,200日）だった。全例で気管支鏡前に広域抗菌薬が2日以上投与されており、6例（24%）で呼吸不全を合併していた。喀痰検査では25例全例で一般細菌、真菌、抗酸菌の培養が陰性であった。気管支鏡検査結果により7例（28%）が非感染性疾患（器質化肺炎4例、原病の悪化2例、慢性好酸球性肺炎1例）と診断された。18例（72%）が感染性疾患と診断され、BALFのリアルタイムPCRの結果、ウイルスを10例（サイトメガロ6例、アデノ2例、RS1例、ライノ1例）、細菌を2例（レンサ球菌、レジオネラ）で検出した。サイトメガロウイルス（CMV）陽性の6例は、全例で乾性咳嗽と胸部CT上すりガラス影を認め、このうち3例で浸潤影、1例で粒状影を伴っていた。CMV抗原血症検査では6例全例が陽性だった。BALFのCMV陽性患者のウイルスDNA量は $8.0 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^6$  copies/mlだったが、CMV抗原血症検査での陽性細胞数とBALF中のウイルス量に明らかな相関は認めなかった。また、25例のうち7例（28%）はニューモシスチス肺炎を合併していたが、このうち3例はCMV陽性患者であった。CMV陽性患者に対する抗ウイルス薬の治療効果は全例で認めたが、3例が死亡した（原病の悪化1例、人工呼吸器関連肺炎1例、輸血関連急性肺障害1例）。気管支鏡検査を施行した25例について、検査後の呼吸不全の増悪や出血、気胸など重篤な合併症は認めなかった。

#### 【考察】

血液疾患患者に対する初期の経験的抗菌薬投与後の難治性肺炎では、診断のための検査を施行する際にいくつかの問題が存在する。第一に広域抗菌薬投与後のため病原体の分離培養が困難となるとともに培養結果が判明するまでに数日以上を要するケースが多い。第二に血清学的検査では原病による液性免疫の低下がある場合、その有用性が低くなる。これに対して細菌・ウイルスの網羅的リアルタイムPCRは高い感度・特異度に加え、数

時間で結果が判明する迅速性もあり、臨床的な有用性が高い<sup>4)</sup>。

本研究ではCMVを含むウイルスとニューモシスチスイロペチの検出率が高かった。CMV肺炎の診断にはウイルスの分離・培養や細胞・組織病理検査で標本内のCMV DNAを検出することが推奨されている<sup>5)</sup>が、感度が低く結果の判明に数日～2週間以上要することや患者の重症度や血球減少などの理由から生検による組織採取が困難な場合が多いことが問題となる<sup>6)</sup>。これに対してリアルタイムPCRは迅速にBALFのウイルス定量が可能となるが、わが国ではリアルタイムPCRは保険適応がなく、CMV感染の診断には、主にCMV抗原血症検査が普及しているのが現状である<sup>7)</sup>。BALF中のCMV陽性患者では同時期に測定したCMV抗原血症検査で全例が陽性だった。しかし、CMV抗原血症検査での陽性細胞数とBALF中のウイルス量に明らかな相関は認めなかった。この結果より肺内で増殖したCMV量と血液中に存在するウイルス量が異なる可能性が示唆された。原因としては症例によって局所のウイルスの増殖量とウイルス血症への波及の程度が異なることが考えられる。また、血液疾患患者では末梢血中の好中球が少ない場合や機能が低下している場合にCMV抗原血症検査の感度が低下する可能性があり、血液検査のみで肺内のウイルス量を予測することが困難である。以上よりBALFのリアルタイムPCRは有用性が高いと考えられるが、CMVを含むウイルスの場合、肺移植後のBALF検体の定量PCRの報告はいくつか存在するものの<sup>8-10)</sup>、既感染と活動性感染を鑑別するウイルス量のcut-off値が決まっておらず、診断のための標準化が今後の検討課題となる。

本研究では、CMV以外にアデノ、RS、ライノウイルスが検出し、いずれも臨床的に肺炎の原因と考えられた。これらの呼吸器ウイルス感染症の場合、抗ウイルス薬としてribavirin吸入やcidofovirなどの報告があるものの、わが国では使用できないものが多く、ribavirin経口薬や免疫グロブリンなどを併用しながら対症療法を行うため、治療に難渋する場合もある。また、院内感染の面からも早期に呼吸器ウイルス感染を診断し、

周囲への伝播の予防対策を行うことが重要となる。

本研究の結果から広域抗菌薬投与後の難治性肺炎を合併した血液疾患患者に対して早期診断・治療のため、気管支鏡検体を用いた網羅的リアルタイムPCRの有用性が示唆された。

#### 【文献】

1. Girmenia C, Martino P, et al.: Pulmonary infections complicating hematological disorders. *Semin Respir Crit Care Med* 26: 445-457, 2005
2. Patel NR, Lee PS, et al.: The influence of diagnostic bronchoscopy on clinical outcomes comparing adult autologous and allogeneic bone marrow transplant patients. *Chest* 127: 1388-1396, 2005
3. Harris B, Lowy FD, Stover DE, Arcasoy SM: Diagnostic bronchoscopy in solid-organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Am Thorac Soc* 10: 39-49, 2013
4. Morozumi M, Nakayama E, et al.: Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J Clin Microbiol* 44: 1440-1446, 2006
5. Azevedo LS, Pierrotti LC, et al.: Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics (Sao Paulo)* 70: 515-523, 2015
6. Tan SK, Burgener EB, et al.: Molecular and culture-based bronchoalveolar lavage fluid testing for the diagnosis of cytomegalovirus pneumonitis. *Open Forum Infect Dis* 3: ofv212, 2016
7. Eizuru Y, Minematsu T, et al.: Rapid diagnosis of cytomegalovirus infections by direct immunoperoxidase staining with human monoclonal antibody against an immediate-early antigen. *Microbiol Immunol* 35: 1015-1022, 1991
8. Riise GC, Andersson RA, et al.: Quantification of cytomegalovirus DNA in BAL fluid: a longitudinal study in lung transplant recipients. *Chest* 118: 1653-1660, 2000
9. Chemaly RF, Yen-Lieberman B, et al.: Clinical utility of cytomegalovirus viral load in bronchoalveolar lavage in lung transplant recipients. *Am J Transplant* 5: 544-548, 2005
10. Schlischewsky E, Fuehner T, et al.: Clinical significance of quantitative cytomegalovirus detection in bronchoalveolar lavage fluid in lung transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 15: 60-69, 2013

# 頭頸部・食道癌の経過中に肺に出現した扁平上皮癌が転移性か異時性多発か鑑別できるか

藤井 丈士

## 【要約】

頭頸部・食道癌の経過中に新たに肺に扁平上皮癌が出現することがあるが、これが転移性か原発性（異時性多発）か組織学的にも鑑別したいことが多く、本研究では分子病理学的手法を用いて鑑別可能か検討した。

## 【目的】

頭頸部・食道扁平上皮癌では外科的・内視鏡的治療の進歩に伴って長期生存が可能となり、治療経過中に肺に出現した扁平上皮癌が胸腔鏡下に切除される症例も増えてきたが、切除された肺腫瘍が組織標本で転移性か異時性多発か鑑別できないという初歩的なジレンマが病理診断の現場ではしばしば経験されるようになってきた。本研究では古くから存在するが、日常診断レベルでは必ずしも解決されていない扁平上皮癌の clonality/molecular discrimination について分子病理学的方法を検討した。

## 【対象と方法】

2006年1月から2014年7月の期間に虎の門病院で頭頸部・食道扁平上皮癌に対する外科的切除または内視鏡的粘膜下層切開切除（ESD）を施行された症例のうち、経過中に肺に出現した扁平上皮癌に対して胸腔鏡下肺切除が施行された21名を対象とした。対象患者は男20名/女1名で年齢は59～80歳（中央値69歳）、頭頸部・食道原発巣の切除方法は食道切除12名、食道ESD 6名、咽喉頭生検・切除等 3名である。頭頸部・食道扁平上皮癌と胸腔鏡下切除肺腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックからゲノムDNAを抽出してp53変異解析やヒトパピローマウイルス（HPV）タイピングを行い、molecular discriminationに利用できるか否かについて検討した。HPVタイピングではFujinagaら<sup>1)</sup>のE6/E7領域コンセンサスプライマー

(pU-1M: TGTCAAAAACCGTTGTGTCC, pU-31B: TGCTAATTCGGTGCTACCTG, pU-2R: GAGCTGTCGCTTAATTGCTC) を用いてリアルタイムPCRを行い、増幅がみられた症例では直接塩基決定法を行って解析した。p53変異解析ではKrypuyら<sup>2)</sup>のプライマーを用い、p53 exon 5-8をPCR増幅して直接塩基決定法で解析した。

## 【結果】

食道病変と肺結節で増幅がみられた検体でPCR産物をシーケンス解析したところ、alpha satellite DNAなどヒトゲノムの非特異的な増幅と判明した。今回の対象症例にはHPV配列の増幅を認めなかった。なお、既知の子宮頸癌の肺転移（HPV16）と肛門腫瘍（HPV11）などの陽性コントロールでは増幅がみられ、シーケンス解析でも確認された。p53変異解析は報告時点で追加検討中であるが、図1に示す症例のように、いくつかの症例で変異を認めている。

## 【考察】

転移性か異時性多発かの鑑別は、基本的には clonality 解析に帰するものと考えられる。臨床検体での clonality 解析ではこれまでヘテロ接合性欠失（LOH）解析、ヒトアンドロゲン受容体（HUMARA）遺伝子のメチレーションに基づくX染色体不活性化解析（HUMARA; 女性のみ）、p53など癌抑制遺伝子/癌遺伝子変異解析、ミトコンドリアD-loop領域変異解析、HPVタイピング（扁平上皮癌の場合）、AmpliSeq cancer panel/whole genome sequencingなどさまざまな方法が用いられてきた。今回の検索では、食道の扁平上皮癌と肺腫瘍ではHPV配列の増幅がみられず、HPVタイピングは原発推定には必ずしも応用できないことが判明した。p53などの癌抑制遺伝子/癌遺伝子変異解析は有効だが、解析に要する手間と時間を考慮すると臨床応用には

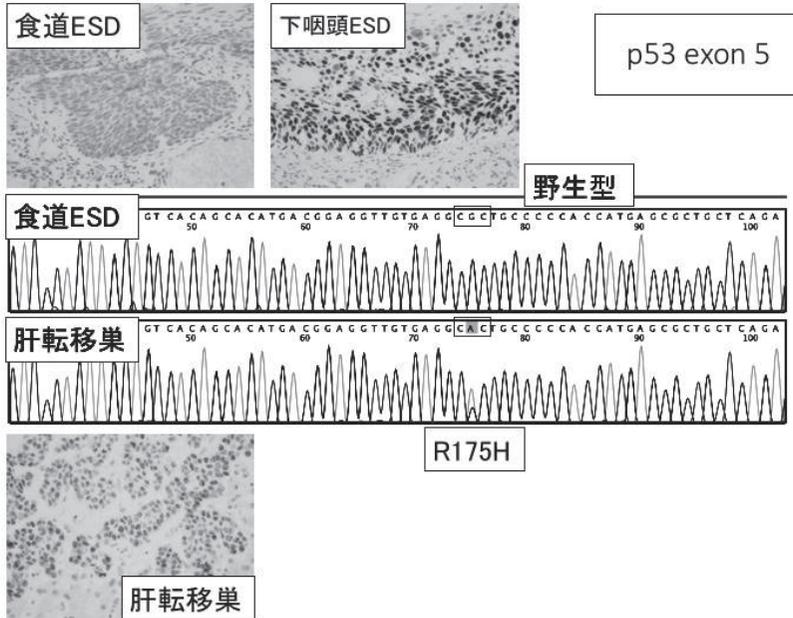


図 1 p53変異解析

77歳男性。下咽頭・食道粘膜下切開切除術（ESD）後の約3年後に扁平上皮癌の広範な全身転移を来して死亡した。食道ESD: Squamous cell carcinoma, 69×55mm, depth sm2, ly0, v0, margin negative; 下咽頭ESD: Squamous cell carcinoma, 35×16mm, depth m (CIS), ly0, v0, margin negative. 咽頭・食道ESDと肝生検のいずれもHPV陰性であった。免疫染色では食道ESDでp53陰性、下咽頭と肝転移巣でp53陽性を示した。p53変異解析では食道ESDと異なり、肝転移巣はexon 5に一塩基置換（R175H）を認めた（下咽頭ESDは検索中）。

Ampliseqなどのhigh throughputな現代的手法の導入が望ましい。

一般に扁平上皮癌は4つの生物学的群（basal, mesenchymal, atypical, classical）に分類されているが<sup>3)</sup>、これらのマーカーにはKEAP1/NFE2L2, SOX2/TP63, PIK3CA/EGFR, FGFR1/FGFR3, CCND1が挙げられる。将来的にはこれらマーカーの免疫染色やFISH法などが分子病理学的分類に応用可能か否か検討したい。

#### 【文献】

1. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, et al: Simultaneous detection and typing of geni-

tal human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. J Gen Virol 72: 1039-1044, 1991

2. Krypuy M, Ahmed AA, Etemadmoghadam D, et al: High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8. BMC Cancer 7: 168, 2007

3. Walter V1, Yin X, Wilkerson MD, et al: Molecular subtypes in head and neck cancer exhibit distinct patterns of chromosomal gain and loss of canonical cancer genes. PLoS One 8: e56823, 2013

## (4) 消化器疾患

### 胸部食道癌に対する機能温存手術に関する検討

上野 正紀、春田 周宇介、田中 毅、水野 文  
大倉 遊、小林 直、宇田川 晴司

#### 【要約】

食道癌根治術後の再建には胃を用いることが標準である。再建臓器としての胃は、右胃動脈・右胃大網動脈という壁外からの血流に加えて豊富な壁内血流もあり、かなりの距離の挙上が可能である。胃癌の重複や胃切除の既往があり、胃を再建に用いることができない時には、小腸や結腸による再建が選択される<sup>1-3)</sup>。手術後合併症としては縫合不全と吻合部狭窄、さらに逆流などがあげられる。食道癌患者は高齢者が多く、飲酒、喫煙による肺気腫と閉塞性換気障害のみならず動脈硬化、糖尿病など、全身的な併存症も多い。胃を温存して回結腸を再建に用いたところ、逆流防止効果に優れ、誤嚥性肺炎の頻度が減り、体重維持も期待できる。

#### 【目的】

食道癌手術は消化器手術の中でも侵襲が大きく、術後合併症も多い治療である。合併症の代表は縫合不全である。また、逆流から肺炎を起こす

ことも長期生存例の晩期合併症として無視できないものである。胃を代用臓器として用いるため胃の機能を犠牲にせざるを得ない。これが摂食状況を変化させ体重減少、体力低下へとつながる。食道術後の縫合不全は胃や大腸手術に比べ結腸再建では頻度が高く、さらに結腸は胃に比べて辺縁血管の伸展性が悪く、虚血やうっ血に対する耐性がないため縫合不全の発生率は高くなるといわれている。回結腸再建の、縫合不全に対する成績を検討する。また、逆流防止と胃機能温存を考え、代用臓器として回結腸を用いる胃温存回結腸再建を施行している。この術式の合併症と機能温存の効果と、通常の胃挙上再建例との成績を比較する。

#### 【方法】

胸部食道癌に対しては右開胸もしくは胸腔鏡下手術食道切除、3領域リンパ節郭清を標準としている。1990年から2015年6月、1274例の右開胸術もしくは胸腔鏡下手術による2、3領域リンパ節郭清を伴う食道癌切除術を行った。再建臓器は

表 1 結腸再建を行った症例の術前所見、手術内容

性	Male/female	167/14
年齢		62 (29-78)
局在	Ce/ Ut/ Mt/ Lt/ Ae-EG	1/19/ 103/ 45/ 13
組織型	scc/ adeno/ others*	165/ 9/ 7
リンパ節郭清範囲	2領域/ 3領域	45/ 136
使用した結腸部位	ileocolon/ascending/transvers	149/ 6/ 26
再建経路	皮下/ 胸骨後/ 後縦隔	2/ 166/ 13
血管吻合	super charge/ super drainage	1/ 0
吻合法	手縫い/ 器械	181/ 0
吻合部	頸部/ 胸腔内	181/ 0
胸腔鏡手術	+ / -	90/ 91

表2 選択結腸と縫合不全（前期と後期の比較）

	結腸選択	症例数(例)	縫合不全(例)	%	Major	Minor
1990-1997年 (n=55)	回結腸	26	4	15.4	0	4
	上行-横行結腸	4	0	0	0	0
	横行結腸	25	7	28.0	5	2
1998-2014年 (n=126)	回結腸	123	3	2.4	0	3
	上行-横行結腸	2	0	0	0	0
	横行結腸	1	1	100	1	0

表3 回結腸再建例の術後合併症（後期のみ）

症例数	縫合不全		吻合部狭窄	腸閉塞	腸閉塞 (手術)	逆流性 食道炎	下痢
	C-D I	II	C-D III a	C-D III a	C-D III b		
123 (1998-2015)	3 (2.4%)		1 (0.8%)	8	2	0	30(24.4%)

胃1087例、結腸181例、小腸3例、再建なし3例であった。このうち結腸を用いた181例について臨床所見、手術内容を検討した。特に縫合不全については回結腸再建を第一選択にしたところを境に前期・後期として、その成績を比較した。

1997年まで（前期）、回結腸から横行結腸の血管走行をみて術中の選択で使用結腸を選択していたが、1998年から（後期）は回結腸を第一選択としている。さらに2008年からは、胃温存回結腸再建術を積極的に行っている。2008年から行ってきた、胃温存回結腸再建術の成績を検討した。

#### 【結果】

前期と後期の縫合不全を比較すると、後期の縫合不全は少なく、回結腸症例でのMajor leakはなくすべて保存的に改善している<sup>4-5)</sup>（表1、表2）。

回結腸を挙上腸管の第一選択にした1998年以来2015年6月まで、右開胸もしくは胸腔鏡下で食道切除、2,3領域リンパ節郭清を行った症例のうち123例に回結腸再建を行った。Super charge, Super drainageを行った症例は1例のみだった。食道回腸吻合の縫合不全を3例（すべてClavien-Dindo I, II）に認め、縫合不全率は2.4%であった。術後バルーン拡張を要する吻合部狭窄（C-D III a）を1例（0.8%）に認めた。入院を要する腸

閉塞（C-D II, III a）を8例に認め、うち2例（1.6%）は手術を要した（C-D III b）。逆流性食道炎は内視鏡観察、症状ともに皆無である。下痢は胃挙上再建に比べ多い。Clavien-Dindoでは分類が難しいが、退院後、3回/日以上泥状～水様便のある状態とすると、30例（24.4%）に下痢を認めた。およそ3か月をめぐりに収まっていくことが多い。点滴を要する（C-D II）の下痢は経験していない（表3）。体重の変化について、胃管再建例と胃温存回結腸再建例を比較した。BMIを18.5未満/18.5以上かつ25未満/25以上、の3群に分類した。術前と比較して術後1年目の体重を比較してグループ間の下方移動のあった症例を、体重減少あり、と定義した。胃管再建例に比べて胃温存回結腸再建例では体重減少が少ない傾向があった（表4）。

#### 【考察】

食道癌は消化器がんの中でも治療成績が悪い疾患である。これまで治療成績向上のための様々な努力がなされてきた。本邦における3領域リンパ節郭清を代表とするリンパ節郭清の徹底化により治療成績の向上を得た。さらにその後の臨床試験により、術前化学療法を用いることや放射線治療の工夫でさらに治療成績は上がっている。これらの努力のおかげで、長期生存例も増えてきた。食

表 4 胃管再建例と胃温存回結腸再建例の比較

	Leakage		Anastomotic stenosis		ileus
胃管 (n=75)	6 (8.0%)		6 (8.0%)		0
胃温存回結腸 (n=64)	1 (1.6%)		0		5
	ns		P<0.05		P<0.05
	逆流		下痢		BW loss
	+	-	+	+	-
胃管 (n=75)	9	44	6	27	22
胃温存回結腸 (n=64)	0	48	15	13	25
	P<0.01		P<0.05		0.05<p<0.1

道癌の手術は切除・郭清範囲が広く、侵襲の極めて大きな術式である。食道切除後は再建が必要であり、再建には通常は胃を管状にして挙上する胃挙上再建術が一般的である。胃の血流の有利さや、胃の挙上性の良さなどがその理由である。胃切除の既往や胃癌の併発など同時切除が必要な時には、小腸や結腸を用いることになる。これまでの諸家の報告では、小腸や大腸は胃挙上再建に比べて、縫合不全が多いことが言われてきた。当院の結腸挙上再建例の成績を見ると、回結腸を選択した時にはむしろ縫合不全が少なく、かつ逆流が少ないことが分かった。逆流が少ないことで長期生存例に不利となる誤嚥性肺炎が少なくなることが期待された。

術後のQOLの維持を考慮し、2008年以降積極的に2もしくは3領域郭清を伴う胸腔鏡下食道切除術後の胃温存回結腸再建術を行っている。回結腸を再建に使うことで逆流防止を、胃を温存することで食事摂取量の確保、ダンピングの予防などを期待している<sup>4-8)</sup>。

今回の検討で胃温存回結腸再建例の成績を見ると、縫合不全、吻合部狭窄は少なく、逆流はない。これまで言われてきた、結腸再建における縫合不全が増えるという報告は、今回のわれわれの再建方法では胃挙上再建より少なかった。逆流症例がないことも、長期生存例の肺炎合併を考えると有利である。胃挙上再建例で5年経過し、再発転移がないと確認してからも、肺炎を起こし体力が低下し、慢性呼吸不全状態になる症例がいた。癌の

治療のために、ある程度の機能低下は受け入れざるを得ないのだろうが、この点に関しては、胃温存回結腸再建により克服可能であろう。回結腸再建においては腹部の手術範囲が広く、このために術後の腸閉塞が増える。2例は手術が必要であった。下痢に関しても、回結腸再建例に多い傾向であった。ともに胃挙上再建では同様なことはなく、さらなる工夫が必要と考える(表4)。

#### 【おわりに】

食道癌根治手術において、機能温存手術として胃温存回結腸挙上再建術を行っている。回結腸再建の逆流性食道炎ゼロは長期生存が期待できるようになった食道癌根治術後の晩期合併症の予防に有用である。術後の体重維持も期待される。治療成績を落とさず、合併症を減らし、術後のQOLを向上させることが我々の責務である。

#### 【文献】

1. Akiyama H: Reconstruction with colon, Surgery for Cancer of the Esophagus. Williams & Wilkins: 81-88, 1990
2. 宇田川晴司 他: 結腸による食道再建. 手術 53: 1559-1564, 1999
3. Mine S, et al: Colon interposition after esophagectomy with extended lymphadenectomy for esophageal cancer. Ann Thorac Surg 88: 1647-1654, 2009
4. 上野正紀 他: 食道切除後結腸再建術の合併症対策. 手術 69: 19-25, 2015
5. 上野正紀 他: 回結腸を用いた食道切除後再

建法. 消化器外科 38: 1039-1047, 2015

6. 安藤暢敏 他: 胸部食道全摘後の結腸による食道再建. 手術 46: 707-715, 1992
7. 猶本良夫 他: 食道切除再建術における胃機

能温存手術. 手術 58: 1799-1804, 2004

8. 山辻知樹 他: 食道切除後再建、結腸再建. 手術 64: 1381-1386, 2010

# Ⅲ期進行胃癌に対する術後S-1 + CDDP療法のfeasibility確認試験

尾崎 由記範、陶山 浩一<sup>1</sup>、田辺 裕子、高野 利実  
熊本大学医学部附属病院 がんセンター<sup>1</sup>

## 【要約】

**背景：**本邦におけるStage II、Ⅲ期の胃癌に対する標準治療は胃切除+術後化学療法である。術後化学療法としてはS-1の1年間投与が標準であるが、Ⅲ期における治療成績は不良である。このような再発高リスクであるⅢ期に対する術後化学療法としては、進行再発胃癌の標準治療であるS-1+CDDP (SP) 療法が一部で試されているが、その安全性と効果の報告は少ない。

**方法：**虎の門病院において2014年4月から2016年1月までの期間で、胃癌または胃接合部腺癌の根治手術がされ、術後の病理組織学的検索によりstageⅢ期と診断されている症例を対象とし、feasibilityを確認するphaseⅡ試験を計画した。1サイクル目はS-1を3週間投与、2週間休薬とし、2-4サイクル目でCDDP 60 mg/m<sup>2</sup> day 8投与を併用した。5サイクル目以降はS-1 4週間投与、2週間休薬とし、術後1年まで治療継続した。主要評価項目は3サイクルSP療法完遂割合、副次評価項目は試験治療完遂割合、無再発生存期間、全生存期間、有害事象とした。

**結果：**10例の症例が登録され、試験治療を行った。追跡期間中央値は11.2ヶ月(8.4-22.5)であった。男性6例、女性4例、年齢中央値は63歳(range 45-71歳)であった。stageⅢAは2例、ⅢB 3例、ⅢC 5例であった。主要評価項目であるSP療法完遂割合は60%であった。有害事象Grade 3/4は、好中球減少が50%、口内炎が10%、腸閉塞が10%であった。1年無再発生存率は80%(95%信頼区間; 45.9-94.9)、1年全生存率は80%(95%信頼区間; 30.9-97.3%)であった。

**結論：**今回の研究では、胃癌stageⅢ期に対する術後SP療法のfeasibilityは許容できるものであった。

## 【目的】

背景として、わが国における胃癌の年齢調整死亡率は1960年代から男女とも著しい減少傾向にあるが{1990年：男性49.5人、女性21.6人、2002年：男性35.3人、女性13.8人、(すべて人口10万対)}、2007年全がん死亡数の中では、男女ともに依然として第2位{男性33143人(16%)、女性17457人(13%)}を占める(がんの統計12：財団法人がん研究振興財団 2012)。また、stageⅣ胃癌の5年生存率は5%程度と予後不良であり、治療成績の向上が必要である。

Stage II、Ⅲ期の胃癌に対する標準治療は胃切除+術後化学療法である。本邦では2006年に有効性が示されたACTS-GC (Adjuvant Chemotherapy Trial of S-1 for Gastric Cancer) 試験の結果を元に、stage II、Ⅲ期の胃癌根治術後の標準治療として、S-1の1年間で内服が推奨される<sup>1)</sup>。本試験の追跡調査の結果、5年生存率は全症例で手術単独群61.1%に対し術後化学療法群 71.7% (HR 0.669; 95%CI, 0.540-0.828)であった。Stage別の解析結果では、Ⅱ期の症例で手術単独群 71.3%に対し術後化学療法群 84.2% (HR 0.509; 95%CI, 0.338-0.765)であり、ⅢA期の症例では手術単独群 57.3%に対し術後化学療法群 67.1% (HR 0.708; 95%CI, 0.510-0.983)、ⅢB期の症例では手術単独群 44.1%に対し術後化学療法群 50.2% (HR 0.791; 95%CI 0.520-1.205)であった<sup>2)</sup>。このサブ解析の結果が示すのは、stageⅢ期に対する術後化学療法としてのS-1療法が一定の効果を示しながらもⅡ期に対する効果と比べると不十分である可能性である(ただし、本試験におけるstage分類は現行の胃癌取扱い規約14版ではなく、13版である)。

また、CLASSIC試験はstage II、Ⅲの胃癌患者を対象として、術後療法としてXELOX療法と

手術単独を比較する無作為化第Ⅲ相試験であり、XELOX療法群の手術単独群に対する優越性が示された。5年無病生存率はXELOX群で68%、手術単独群で53% ( $p < 0.0001$ ) であった<sup>3)</sup>。この結果から、XELOX療法は胃癌術後療法として標準治療のひとつとなっている。サブグループ解析では、XELOX療法群の5年無病生存率は、stageⅡは80%、stageⅢAは58%、stageⅢBは52%であり、stageⅢは未だに予後不良である。

S-1療法とXELOX療法のどちらが優れているかを比較検証した試験はなく、いずれの標準治療においても、stageⅢの予後は不良である。S-1療法はかつてstageⅣ期に対しても本邦における標準治療と位置付けられていた<sup>4)</sup>。その後本邦で行われたS-1療法とS-1+CDDP療法（SP療法）を比較したSPIRITS試験によりCDDPの上乗せ効果が示され、現在では本邦におけるⅣ期の進行胃癌に対する標準治療はSP療法である<sup>5)</sup>。すなわち、Ⅳ期の進行胃癌についてはSP療法がより強力な治療として確立している。

SP療法をⅢ期の術後化学療法に適用し、より強力な効果を得ようとする試みがいくつかなされている。中でも63人のⅢ期症例に対してSP療法を施行した報告では、3年生存率で84.5%と有望な結果を示している<sup>6,7)</sup>。この検討では、当初はS-1+CDDP療法を3サイクル施行後にS-1療法を治療開始から1年後まで投与する方法を術後化学療法として採用していたが、1サイクル目での治療毒性が問題となり、1サイクル目はS-1療法を行い、毒性に応じてS-1を減量し、その後、2-4サイクル目にS-1+CDDP療法を行う方法へと変更された。このように、胃切除後ではS-1の毒性は強めに出ることが予想され、術後化学療法にSP療法を導入する際には慎重に行う必要がある。

そこで我々は現在の胃癌取扱い規約14版において、特に根治術後の再発のリスクが高いⅢ期(旧規約(胃癌取扱い規約13版)におけるⅡ期を除く)症例を対象に、術後化学療法としてのSP療法の安全性と効果を検証する第Ⅱ相試験を計画した。

本試験の目的は、Ⅲ期(旧規約Ⅱ期を除く)進行胃癌に対する術後S-1+CDDP療法の有効性と

安全性を評価し、その実行可能性を検討することを目的とする。

#### 【方法】

虎の門病院において2014年4月から2016年1月までの期間で、胃癌または食道胃接合部腺癌の根治手術がされ、術後の病理組織学的検索によりstageⅢ期と診断されている症例を対象とした。1サイクル目はS-1を3週間投与、2週間休薬とし、2-4サイクル目でCDDP 60mg/m<sup>2</sup> day 8投与を併用した。5サイクル目以降はS-1を4週間投与、2週間休薬とし、術後1年まで治療継続した。主要評価項目は3サイクルSP療法完遂割合、副次評価項目は試験治療完遂割合、無再発生存期間、全生存期間、有害事象とした。

#### 【結果】

10例の症例が登録され、試験治療を行った。追跡期間中央値は11.2ヶ月(8.4-22.5)であった。男性6例、女性4例、年齢中央値は63歳(range 45-71歳)であった。stageⅢA 2例、ⅢB 3例、ⅢC 5例であった。主要評価項目であるSP療法完遂割合は60%であった。SP療法を2サイクル投与した症例は0%、1サイクルは10%、CDDPを投与できなかった症例は30%であった。有害事象は、全Gradeでは好中球減少が70%、貧血が10%、食欲不振が50%、下痢が40%、倦怠感が20%、口内炎が40%、手足症候群が20%、発熱が10%、腸閉塞が10%、低Na血症が10%、味覚障害が10%、涙道障害が10%であり、Grade 3/4では、好中球減少が50%、口内炎が10%、腸閉塞が10%であった。1年無再発生存率は80%(95%信頼区間; 45.9-94.9)、1年全生存率は80%(95%信頼区間; 30.9-97.3%)であった。

#### 【考察】

今回の主要評価項目である術後SP療法完遂率は60%であった。胃癌stageⅢに対する術後SP療法の過去の報告では、完遂率は72%(プロトコル改定後は81%)であった。症例数が少ないため評価は困難であるが、今回の結果は過去のそれと比較すると低い傾向にあった。しかしながら、不完遂症例4例のうち、3例はCDDP投与回数が0回であり、その理由はS-1の毒性によるものであった。また、SP療法の毒性による中止は1

例のみであった。以上のことから、本研究におけるSP療法完遂率が低い傾向にあった理由として、S-1不耐症例が3例(30%)にみられたことが考えられる。S-1投与が可能であった7例のうち、CDDP投与を完遂できた症例は6例であった。有害事象は過去の報告とほぼ同等であり、発熱性好中球減少症や腎機能障害は認めなかった。したがって、術後SP療法のfeasibilityは許容できるものであったと考えられる。

観察期間が短いため、無再発生存期間中央値の評価はできていないが、1年無再発生存率は80%、1年全生存率は80%であった。症例数が少なく比較は困難であるが、過去の報告ではstageⅢA、ⅢBの3年無再発生存率はそれぞれ82.4%、65%であった。無再発生存期間や全生存期間の評価を行うためには、今後の長期追跡が必要であると考えられる。

結論として、今回の研究では、胃癌stageⅢ期に対する術後SP療法のfeasibilityは許容できるものであった。

#### 【文献】

1. Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, Kinoshita T, Fujii M, Nashimoto A, et al.: Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *The New England journal of medicine* 357: 1810-1820, 2007
2. Sasako M, Sakuramoto S, Katai H, Kinoshita T, Furukawa H, Yamaguchi T, et al.: Five-year outcomes of a randomized phaseⅢ trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stageⅡ orⅢ gastric cancer. *Journal of clinical oncology* 29: 4387-4393, 2011
3. Noh SH, Park SR, Yang HK, Chung HC, Chung IJ, Kim SW.: Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): 5-year follow-up of an open-label, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology* 15: 1389-1396, 2014
4. Boku N, Yamamoto S, Fukuda H, Shirao K, Doi T, Sawaki A, et al.: Fluorouracil versus combination of irinotecan plus cisplatin versus S-1 in metastatic gastric cancer: a randomised phase 3 study. *The lancet oncology* 10: 1063-1069, 2009
5. Koizumi W, Narahara H, Hara T, Takagane A, Akiya T, Takagi M, et al.: S-1 plus cisplatin versus S-1 alone for first-line treatment of advanced gastric cancer (SPIRITS trial): a phaseⅢ trial. *The lancet oncology* 9: 215-221, 2008
6. Takahari D, Hamaguchi T, Yoshimura K, Katai H, Ito S, Fuse N, et al.: Survival analysis of adjuvant chemotherapy with S-1 plus cisplatin for stageⅢ gastric cancer. *Gastric cancer* 17: 383-386, 2013
7. Takahari D, Hamaguchi T, Yoshimura K, Katai H, Ito S, Fuse N, et al.: Feasibility study of adjuvant chemotherapy with S-1 plus cisplatin for gastric cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 67: 1423-1428, 2011

## (5) 肝臓疾患

# HCC再発の腫瘍リスク因子および背景肝リスク因子となる lncRNA の同定とその臨床応用

野本 周嗣、園原 史訓、猪川 祥邦  
愛知学院大学歯学部外科学講座

### 【要約】

原発性肝細胞がん (HCC) は肝内転移、多中心性発生という特徴的な2つの再発様式をもつ。当教室ではこれまでにを行った肝切除例のうち、同時性、異時性に多発したHCCのゲノムパターンを調べ、多発した病変はそれぞれのゲノム型が異なる多中心性発生が、原発巣の転移であることよりもはるかに多く認められることを明らかにした<sup>1,2)</sup>。さらにHCCの発症に関して腫瘍の解析から予後関連因子を抽出するとともに、背景肝の検討から予後関連因子の抽出もおこなってきた<sup>1-4)</sup>。

ヒトゲノムプロジェクトによりゲノムの80%はRNAに転写されていることが判明したが、そのうち約2%しかタンパク質には翻訳されておらず、細胞内にはタンパク質に転写されないRNAが多数存在していることが明らかになった。このタンパク質に翻訳されない (non coding) RNAのうち、200塩基以上のものがlong non coding RNA (以下lncRNA) と呼ばれる。Micro RNAの機能的解析は進んできたのに対し、lncRNAはジャンクと考えられてきた。しかし近年、主に腫瘍組織と正常組織との比較で発現レベルの差や予後への影響、その分子機能が明らかにされつつある。

また、lncRNAは細胞内でのコピー数が多量であるため、発現の多いものは尿、血漿など採取しやすい体液で検出しやすく、より非侵襲的なマーカーになりうる点でも魅力的である。

HCCの発症や進展には、細胞内に多量に存在するlncRNAの影響は重要であると考えられる。さらに、少数の既報に見られるHCC腫瘍でのlncRNA

の変化を検討するだけでは不十分であり、背景肝におけるlncRNAの影響を明らかにすることが重要であるという考えに至った。

### 【背景と目的】

肝細胞がん (HCC) は治療切除後にもしばしば再発し、腫瘍因子と背景肝因子が予後に関わっている。分子生物学的ながんに対する研究の多くは、腫瘍そのものについての検討である。HCCは発生母地として背景肝の異常である肝障害が重要であり、腫瘍以外の背景肝における分子生物学的検討も重要である。我々は既にいくつかの遺伝子について、背景肝での発現がHCCの予後と関連していることを示してきた。

また近年のヒトゲノムプロジェクトにより、ゲノムの約80%はRNAに転写されるが、そのうち約2%しかタンパク質に翻訳されないことが判明している。したがって、細胞内には多量のnon coding RNAが存在することになるが、これらががんの発生や進展に関与することが報告されてきた。non coding RNAのうち、200塩基以上のものがlong non coding RNA (lncRNA) と呼ばれるが、近年分子機能が明らかにされつつある。

そこで、細胞内に多量に存在するlncRNAのうち、HCCの腫瘍および背景肝での発現がHCCの予後、進展に影響するものを見出すことが今回の目的である。

### 【症例と方法】

HCC背景肝 (CN: Corresponding Normal : T : Tumor (典型的HCC) n=1) と転移性肝癌の背景肝 (SN: Super Normal : n=11の混合) の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで網羅的に比較し、HCCの発症や進展に関連があると思わ

表1 マイクロアレイ結果

GeneSymbol	Fold change [Y-2] vs [A]	Regulation [Y-2] vs [A]	HCC 背景肝発現値 [Y-2]	正常肝発現値 [A]
UCA1	7.981	up	1.032	-1.964
TUG1	1.271	up	1.189	0.843
MALAT1	1.852	up	2.051	1.162
HULC	3.492	up	5.222	3.418
GAS5	1.286	up	3.779	3.416
MEG3	1.397	down	-0.172	0.310
LOH3CR2A	1.538	down	-2.714	-2.093
HOTAIR	1.924	down	1.718	2.662
C12orf27	1.230	down	-0.575	-0.276
H19	1.161	down	6.589	6.804
CRNDE	1.410	down	-3.510	-3.014

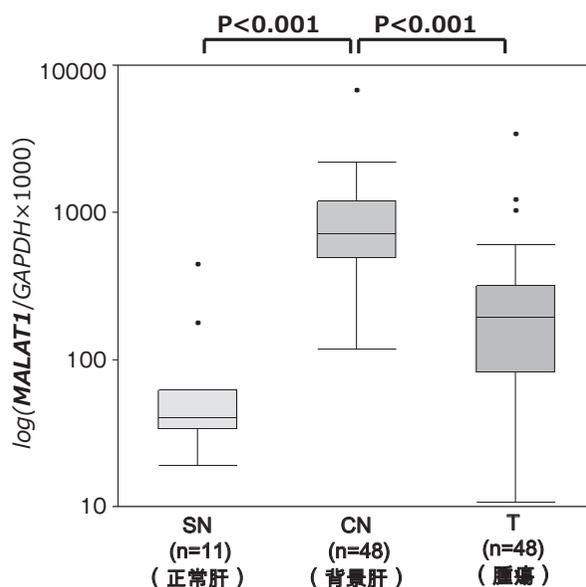


図1 肝組織でのMALAT1の発現 (定量RT-PCR)

れるいくつかのlncRNAを抽出した。予備実験として、予後の悪い24例と予後の良い24例をHCC切除標本から選択し、各分子について定量RT-PCR法を行った。正常肝：SN、背景肝：CNと腫瘍部：Tにおける発現について、各群間で比較検討し、差があった遺伝子でさらに検討を行うこととした。

【結果】

アレイで抽出されたlncRNA (表1)のうちMALAT1は、SNよりCNで有意に発現が上昇し ( $P < 0.001$ )、CNよりTは有意に発現の低下 ( $P < 0.001$ ) がみられた (図1)。HULCはSNよりCNで有意な発現上昇 ( $P < 0.001$ ) を認めたが、CNからTでは発現低下の傾向 ( $P < 0.117$ ) がみ

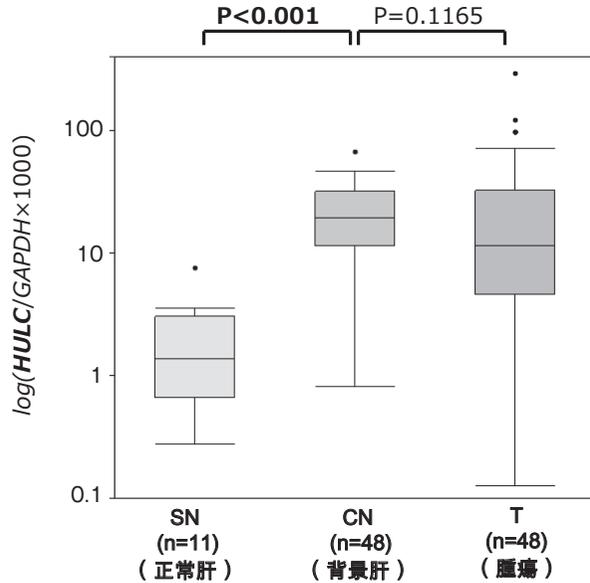


図2 肝組織でのHULCの発現 (定量RT-PCR)

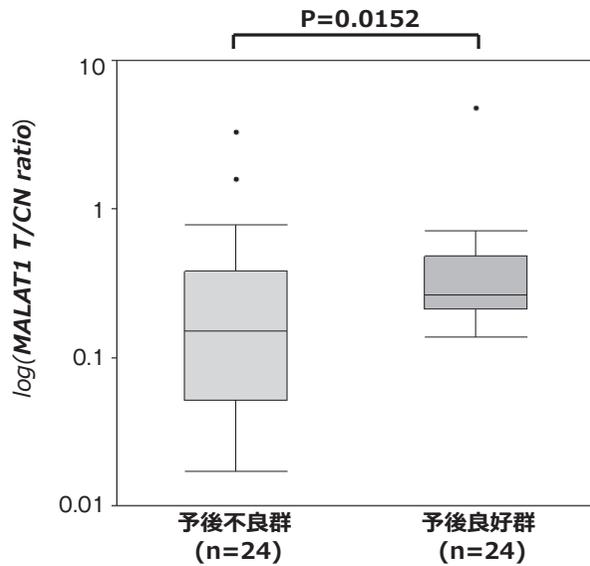


図3 MALAT1発現 T/CN比

られるのみであった (図2)。T/CN比の検討ではMALAT1は、予後不良であった症例で有意により低下 ( $P=0.0152$ ) していることが判明したが (図3)、HULCでは予後不良群で低下の傾向 ( $P=0.0666$ ) を認めた (図4)。

#### 【考察】

発現マイクロアレイでSNとCN間に差があったlncRNAについて、定量RT-PCRを行うと、MALAT1とHULCはCNでSNより有意に高く、予後良好群と不良群との比較でMALAT1のT/

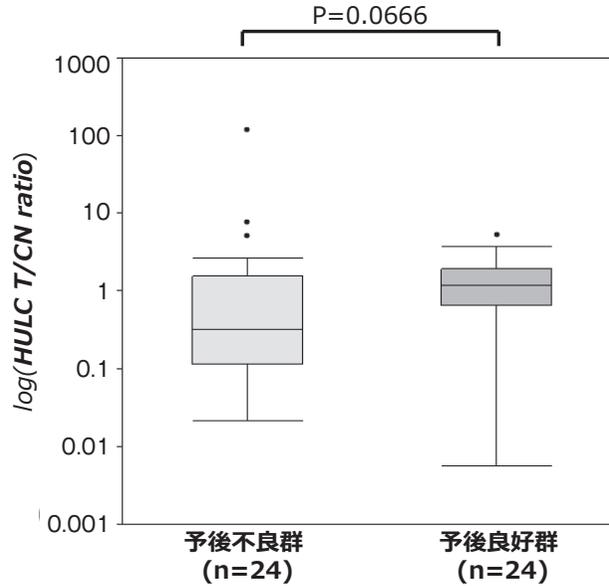


図4 HULC発現 T/CN比

CN比を比較すると、不良群で有意に低いことが判明した。背景肝でMALAT1、HULCが高いことからHCC早期発見のマーカーになる可能性があると考えられる。しかし予後因子としては今後臨床検体数を増やし、さらなる検討が必要である。

【まとめ】

HCCの腫瘍と背景肝におけるlncRNAは早期発見のマーカーや、予後因子として役立つ可能性があり、臨床検体数を増やして検討する予定である。

【文献】

1. Nomoto S, Yamashita K, Koshikawa K, Nakao A, Sidransky D: Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma. *Clin Cancer Res* 8: 481-487, 2002
2. Nomoto S, Kinoshita T, Kato K, Otani S, Kasuya H, Takeda S, Kanazumi N, Sugimoto

H, Nakao A: Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 97: 1260-1265, 2007

3. Nomoto S, Hishida M, Inokawa Y, Takano N, Kanda M, Nishikawa Y, Fujii T, Koike M, Sugimoto H, Kodera Y: Expression analysis of THOP1 in background liver, a prognostic predictive factor in hepatocellular carcinoma, extracted by multiarray analysis. *Ann Surg Oncol Suppl* 3: S443-S450, 2014
4. Sonohara F, Nomoto S, Inokawa Y, Hishida M, Takano N, Kanda M, Nishikawa Y, Fujii T, Koike M, Sugimoto H, Kodera Y: High expression of Janus kinase 2 in background normal liver tissue of resected hepatocellular carcinoma is associated with worse prognosis. *Oncol Rep* 33: 767-773. 2015

# 肝臓感受性遺伝子MICAのshedding制御による肝発癌予防法の開発

大塚 基之、岸川 孝弘、大野 元子、吉川 剛史、小池 和彦  
東京大学医学部附属病院 消化器内科

## 【要約】

我々は以前、ウイルス肝炎感染からの肝臓癌発生に相関する一塩基多型 (SNP) がMICA 遺伝子の上流に存在することを報告した。MICA 遺伝子は本来、ウイルス感染肝細胞や癌細胞に発現し免疫細胞を活性化して排除に向かわせる役割を担っているが、SNPによるその発現量の多寡が肝臓癌発生に相関していた。この結果に基づいて本研究は、microRNAを用いた転写後修飾によるMICA 遺伝子発現制御機構を明らかにしたうえで、その知見を利用した肝臓癌予防法・治療法の開発を目的としている。私たちは以前に、MICA 遺伝子の3'UTR内にはmicroRNA-92および-106bが標的としうる配列が2箇所存在し、実際にそのmicroRNAの機能を阻害すると、MICA 蛋白の発現量が増えることを確認した。しかしながらMICA 蛋白は、翻訳後の修飾によってN端が切断された後細胞外に放出され、これがMICA 蛋白のレセプターを飽和して病的細胞に発現するMICAと免疫担当細胞に発現するMICAレセプターとの相互作用を減弱させる働きがある。これにより、MICAが発現する感染・病的細胞の免疫学的排除が阻害されるため、病的細胞の効率的な排除のためには、単純にMICA 蛋白の発現を増やすだけでなく翻訳後の切断を抑える必要がある。本研究では、MICA 蛋白の切断を阻害する化合物の簡便なスクリーニング法としてレポーターアッセイで検討できる系を確立し、化合物ライブラリースクリーニングによって切断阻害化合物を同定した。MICA 蛋白の発現増強と切断阻害薬の併用によって、病的細胞の免疫学的排除の効率を上げられる可能性がある。

## 【目的】

私たちは以前、ゲノムワイドアソシエーションスタディ (GWAS) 解析によって、C型肝炎感染

から肝臓癌を発生しやすい宿主因子としてMICA 遺伝子の一塩基多型 (SNP) を同定し報告した<sup>1)</sup>。MICAは本来、ウイルス感染肝細胞に高度に発現し、natural killer 細胞やCD8+T細胞を活性化して感染細胞の排除に向かわせる役割を担っている。いっぽう、MICAの発現調節は、そのすべてをプロモーター活性に依存しているわけではなく、転写後のmRNA分解や翻訳抑制も重要であることが知られている<sup>2)</sup>。平成24年度の本研究助成によって、microRNAによるMICAの発現調節について検討をすすめ、microRNA 93-106bクラスターを細胞に導入するとMICAの発現を低下させること、反対にmicroRNA 93-106bのアンチセンス核酸を導入するとMICA発現を増やすことができることを見出し報告した<sup>3)</sup>。さらに平成25年度の本研究助成によって、bionanoparticle (BNC) を用いた核酸の効率的な肝細胞送達法を開発し報告した<sup>4)</sup>。今回は、それらによって発現が増えるMICAの翻訳後の切断を制御する化合物を探索し、細胞表面に表出するMICA 蛋白の量を増やすことで、病的細胞の排除を促進させる方法を検討する。

## 【方法】

- (1) MICAのN端にnano-luciferaseを連結したコンストラクトを樹立する。
- (2) (1)のコンストラクトを恒常的に発現する細胞を作製し、MICA sheddingに関わる化合物を網羅的にスクリーニングする。
- (3) FACSにより化合物投与でのshedding抑制による細胞膜表面のMICAタンパクの量の増強を確認する。

## 【結果】

- (1) MICAタンパクはN端側の細胞外ドメインが切断されsoluble MICAとして細胞外に分泌される。そこでMICAのN端側にluciferase

reporter 遺伝子を連結した融合蛋白を作るコンストラクトを作製した。その際、MICA 本来の高次構造や機能を損なわないように、luciferase の中でも最も小さい nano-luciferase (約 20kDa 程度) を用いた。

- (2) 1,280 種の化合物ライブラリーを用いて、MICA の shedding 阻害剤をスクリーニングした結果、molsidomine, metergolin で軽度の shedding 抑制作用があることを見出した。
- (3) その効果を細胞表面の MICA 蛋白量の変化で確認した<sup>5)</sup>。

#### 【考察】

MICA 蛋白の翻訳後切断を制御する化合物を探索した。標的細胞の MICA 蛋白の発現量を増やし、さらに shedding を阻害することで細胞表面に表出する MICA 蛋白を増やすことができれば NK 細胞を介した免疫療法の効果増強につながると考えられる。今回作成したスクリーニング法は、他の蛋白でも、簡便に翻訳後切断を修飾する因子の同定に適用できると考えられた。今後の核酸医薬開発とあわせて、細胞性免疫調節を利用した肝発癌の予防・治療への応用を目指し展開を続けていきたいと考えている。

#### 【文献】

1. Kumar V, et al.: Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for

HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 43: 455-458, 2011

2. Jinushi M, et al.: Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 43: 1013-1020, 2005
3. Kishikawa T, et al.: Regulation of the expression of the liver cancer susceptibility gene MICA by microRNAs. *Sci Rep* 3: 2739, 2013
4. Ohno M, et al.: Specific delivery of microRNA 93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA. *Oncotarget* 5: 5581-5590, 2014
5. Kishikawa T, et al.: Development of a screening method to identify regulators of MICA shedding. *Biochem Biophys Res Commun* 465: 764-768, 2015

#### 【発表に関する事項】

Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Sato M, Koike K: Development of a screening method to identify regulators of MICA shedding. *Biochem Biophys Res Commun* 465: 764-768, 2015

# Simeprevir併用療法における薬剤耐性ウイルスの検討

芥田 憲夫、熊田 博光

## 【要約】

HCVに対するSimeprevir併用療法不成功例からはNS3領域の薬剤耐性変異が出現し、治療終了後も長期間持続する症例が存在した。更にSimeprevir併用不成功例はDaclatasvir/Asunaprevir併用療法難治例でもあり、NS3領域の耐性変異が影響していた。C型肝炎難治例における薬剤耐性変異の問題を解決して肝発癌抑制まで繋げることが日本の高齢化社会における最終課題と言える。

## 【目的】

C型肝炎におけるSimeprevir (SMV)/Peginterferon (PEG-IFN)/Ribavirin (RBV)の3剤併用療法は高い治癒率が期待される反面、治癒しない症例では薬剤耐性が問題となる<sup>1)</sup>。今回は、SMV/PEG-IFN/RBVの治療成績と薬剤耐性検出の臨床的有用性について検討した。特に、Deep sequencerを用いた微量な薬剤耐性変異の検出が可能になったことから<sup>2)</sup>、従来のDirect sequenceとUltra-deep sequenceの両方を用いて薬剤耐性検出の臨床的有用性を検討した。

## 【方法】

SMV/PEG-IFN/RBV併用24週間治療を行ったHCV genotype 1b 99例の治療成績と薬剤耐性変異の経過を検討した。更に、SMV/PEG-IFN/RBV併用不成功15例に内服だけのDaclatasvir (DCV)/Asunaprevir (ASV)併用24週間治療を行った場合のウイルス動態と薬剤耐性変異の経過を検討した。代表的なSMV耐性変異(NS3領域のQ80K/R/H/G/LとD168A/V/E/G/N/T/Y/H/I)<sup>3)</sup>はDirect sequenceとUltra-deep sequenceで評価した。Deep sequencerはIon PGMTMを使用し0.2%以上を有意な変異とした。HCV Core領域の変異(aa70・aa91置換)<sup>4)</sup>はDirect sequenceもしくは市販の測定系で検討した。統計解析はFisher's exact probability test、Logistic

regressionを用いて行った。

## 【結果】

SVR12(治療終了後12週経過時点のRNA陰性)率は初回治療85%、前治療再燃81%、前治療無効35%。治療不成功例から検出されたSMV耐性変異を治療終了後2年まで経過観察した結果、D168Eの耐性変異が長期間持続した症例が確認された。SMV/PEG-IFN/RBV併用不成功でDCV/ASVを行った15例で治療中のウイルス動態を検討すると8例が治療中にも関わらずRNA量の再上昇する現象が確認され、特に8例中7例はSMV/PEG-IFN/RBV無効例(治療中にRNA陰性化しない症例)かつ治療前にSMV耐性変異を有する症例であった(図1)。Ultra-deep sequenceを用いてSMV耐性変異のQ80変異やD168変異の経時的推移を評価した結果、SMV耐性変異が残存することがDCV/ASV治療抵抗性に影響することが確認された(図2)。DCV/ASVのSVR12に寄与する要因を多変量解析で求めると、前治療歴としてSMV/PEG-IFN/RBV併用不成功例以外であることがSVR12に寄与する独立因子であった。

## 【考察】

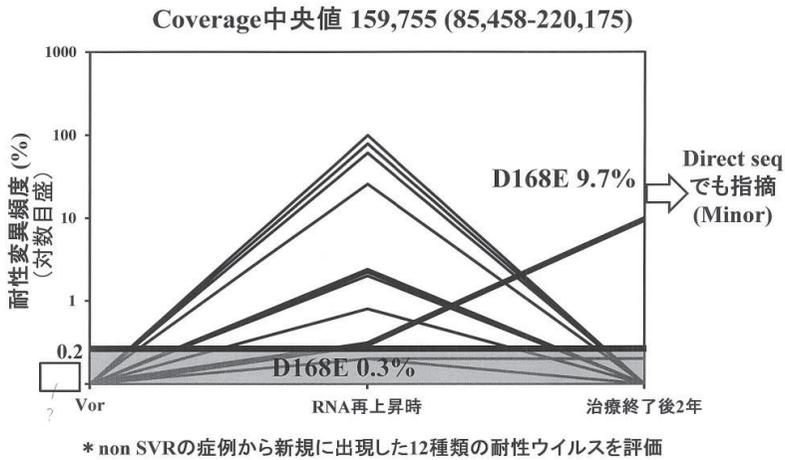
3剤併用療法で治癒しない症例では薬剤耐性変異が出現するため、治療効果予測因子の検討は耐性変異予測の為に重要である。今回の検討から、SMV/PEG-IFN/RBV併用不成功例からはNS3領域のSMV耐性変異が出現し、治療終了後も長期間持続する症例が存在した。更にSMV/PEG-IFN/RBV併用不成功例はDCV/ASV併用療法難治例であり、NS3領域のSMV耐性変異が影響していた。

Deep sequencingにより微量な薬剤耐性変異の残存を検討することが次なる追加治療を行うタイミングを決定する上でも重要である。この様な、deep sequencerを用いて微量な薬剤耐性変

症例	SMV 治療効果	治療前 耐性	Point	NS3耐性			NS5A耐性			DCV/ASV 治療効果
				QL80	R155	D168	L31	Y93	Y93H 定量	
1	無効	NS3	Vor	-	-	V	-	-	<1%	Breakthrough
			再上昇時	-	-	V	-	-		
2	無効	NS3	Vor	r	-	E/v	-	-	<1%	Breakthrough
			再上昇時	R	-	E	v	H		
3	無効	NS3	Vor	R	-	e	-	-	<1%	Breakthrough
			再上昇時	R	-	E	V	H		
4	無効	NS3	Vor	R	-	E	-	-	<1%	Breakthrough
			再上昇時	R	-	E	V	H		
5	無効	NS3	Vor	r	-	V/e	-	-	検出せず	無効
			再上昇時	r	-	T/n/a/e	-	-		
6	無効	NS3	Vor	-	-	a/h	-	-	<1%	無効
			再上昇時	-	-	V	V	H		
7	無効	NS3	Vor	R	-	E	-	-	<1%	無効
			再上昇時	R	-	E	V	H		
8	無効	NS5	Vor	-	-	-	m	-	<1%	無効
			再上昇時	R	-	E	M	H		

**Simeprevir無効かつNS3耐性変異を有する症例は治癒せず**

図 1 Simeprevir 併用非治癒後に Daclatasvir/Asunaprevir 併用療法を導入して治癒しなかった8例



**NS3領域の耐性変異の中に長期持続する症例が存在する**

図 2 Ultra-deep sequence で新規出現した Simeprevir 耐性変異の治療終了後2年までの経時的推移

異を検出することが実臨床で有用であるか不明であった。今回の deep sequencing による検討で、RNA 再上昇時に確認された耐性変異の大半は時間経過と共に消失することが確認された。Direct

sequencing では治療終了後1年間経過するまでに薬剤耐性変異が消失したことが報告されているが<sup>5)</sup>、deep sequencing による詳細な報告は存在しない。

3剤併用療法難治かつ肝発癌リスクの高い症例を絞り込むことが日本の高齢化社会において安全かつ効果的に治療を行うためには重要である。将来的にはC型肝炎の難治要因と薬剤耐性変異の問題を解決しながら、肝発癌抑制にまで繋げることが最終課題と言える。

【文献】

1. Kumada H, Toyota J, Okanou T, Chayama K, Tsubouchi H, Hayashi N: Telaprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-naive patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. *J Hepatol* 56: 78-84, 2012
2. Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Emergence of telaprevir-resistant variants detected by ultra-deep sequencing after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. *J Med Virol* 85: 1028-1036, 2013
3. Romano KP, Ali A, Royer WE, Schiffer CA:

Drug resistance against HCV NS3/4A inhibitors is defined by the balance of substrate recognition versus inhibitor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 20986-20991, 2010

4. Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Watahiki S, Sato J, Matsuda M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* 48: 372-380, 2005
5. De Meyer S, Dierynck I, Ghys A, Beumont M, Daems B, Van Baelen B, Sullivan JC, Bartels DJ, Kieffer TL, Zeuzem S, Picchio G: Characterization of telaprevir treatment outcomes and resistance in patients with prior treatment failure: results from the REALIZE trial. *Hepatology* 56: 2106-2115, 2012

# 肝炎ウイルス制御状態での肝癌発癌と再発予後

池田 健次、小林 万利子、熊田 博光

## 【要旨】

B型肝炎に対するエンテカビル投与を行うと発癌率は約40%に低下することに加え、エンテカビル投与中の発癌例は小型・単発症例が多く、根治的治療が選ばれる症例が多かった。根治治療を行っても治療1年後の再発率は高いが、その後の再発例では肝機能悪化が起こりにくく、反復治療が行いやすかった。C型肝炎に対する抗ウイルス治療でウイルス排除（SVR）が達成できた場合の肝癌発癌率の低下は1/10（慢性肝炎）から1/3（肝硬変）と幅が大きかった。SVR後の発癌例は、高齢・線維化進行・男性例が多かったが、HBV・鉄・代謝要因の影響は少なかった。

## 【はじめに】

B型肝炎では抗ウイルス療法継続によりHBVDNA低値維持が可能で、またC型肝炎では抗ウイルス療法によるウイルス排除（SVR）の達成により、発癌リスクが低下することが知られている。しかし抗ウイルス治療により安定化した肝炎状態の症例からの発癌は今も後を絶たず、発癌した症例に対して根治的切除を行っても再発を繰り返すことも多い。

これら肝炎ウイルス制御状態での肝癌発癌・再発予後の実態をB型肝炎・C型肝炎について検討し、肝疾患診療・肝疾患対策行政の在り方を検討した。さらに、B型肝炎・C型肝炎での肝癌発癌過程の違いも検討した。

## 【対象・方法】

### (1) B型肝炎

エンテカビル投与症例のうち1年以上経過している472例と、抗ウイルス薬を使用しなかった対照群のうち1年以上経過観察されている1143例を比較した。合計1615例のB型慢性肝疾患症例について、エンテカビルの「投与されやすさ」についてPropensity Scoreを作成し、背景要因をスコアで一致させた各316例についてコホートか

らの発癌率を比較した<sup>1)</sup>。

発癌した症例については、エンテカビル投与下で発癌した22例と、1995年以後の無治療（抗ウイルス治療を行っていない）100例での比較を行い、肝癌病態・治療介入・再発率・生存率について検討した。

### (2) C型肝炎

対象は1980年～2004年までの間に、当院で腹腔鏡・肝生検を施行し、慢性肝炎と診断した2166例と肝硬変と診断された885例とし、これらをretrospectiveに検討した。インターフェロン治療でSVRとなり長期経過観察した1565例について、その後の発癌リスク、ウイルス病態、病理学的観点から検討した<sup>2)</sup>。Occult B型感染、鉄過剰・代謝要因なども検討に加え、SVR達成群での高発癌群囲い込みの可能性についても検討した。発癌症例については、1990年以後SVRにはなっていない（HCVRNA陽性の）C型肝炎細胞癌との比較を行い、肝癌病態・治療介入・再発率・生存率を検討した<sup>3)</sup>。

## 【成績】

### (1) エンテカビル投与下に発癌したB型肝炎症例の病態

エンテカビル投与中に肝癌発癌に至った22例と、抗ウイルス治療を行っていない状態で発癌した100例（対照群）を比較した。エンテカビル群では投与期間が1年以内の症例は除外した。対照群は、ラミブジン・インターフェロンの治療歴がない症例で、初診時に肝癌であった症例は除外し、また当院での観察期間が1年以内の症例を除外した。

年齢・性別・総飲酒量・血小板数・最大腫瘍径には両群に差を認めなかった。しかしICG15分値の中央値はエンテカビル群12%、対照群20%でエンテカビル群が低値（ $P=0.036$ ）、AFP値はエンテカビル群5mg/L、対照群25mg/Lで有意

差 ( $P=0.023$ ) を認めた。また、エンテカビル群では単発症例が82%を占めたのに対し対照群では54%で、エンテカビル群で単発例が多かった ( $P=0.027$ )。

#### (2) エンテカビル投与下に発癌した肝癌症例の臨床経過

初発肝癌の治療法を肝切除・経皮的局所治療・肝動脈化学塞栓療法 (TACE) で比較してみると、エンテカビル群ではTACEを行った症例が18%であったのに対し、対照群では68%におよび、エンテカビル群では根治的治療が行われる頻度が高かった ( $P<0.0001$ )。

根治治療が行えた症例は、エンテカビル群18例、対照群32例であった。1年再発率はほぼ同様であったが、3年再発率はそれぞれ23.4%、43.1%、5年再発率はそれぞれ23.4%、52.0%で、エンテカビル群が低い傾向であった ( $P=0.34$ )。

根治治療を行ったエンテカビル群18例、対照群32例について、全生存率を比較すると、治療後3年までの生存率はほぼ同じで、それぞれ86.9%、82.9%であった。5年以後はやや差が大きくなりそれぞれ86.9%、79.0%であったが、統計学的有意差は認められなかった ( $P=0.58$ )。

#### (3) SVR症例からの肝癌発癌例と背景病態

SVR症例の中で発癌に寄与する独立要因をCox比例ハザードモデルで検討すると、(1) 肝硬変 (慢性肝炎に対するハザード比9.56、 $P<0.001$ )、(2) 男性 (ハザード比8.85、 $P=0.003$ )、(3) 高年齢 (55歳以上のハザード比4.95、 $P=0.001$ ) が挙げられた。

SVRとなった症例はほとんどが男性であったため、年齢・肝線維化程度を一致させた症例を行った。発癌例23例・10年以上非発癌を持続している対照28例の検討では、HBVDNA陽性率、フェリチン値、血糖、インスリン、HOMA-Rなどすべて差がなかった。

#### (4) SVRから発癌した症例の臨床経過

SVR達成後肝癌が発癌し根治的治療 (肝切除または経皮的治療) を行った症例は当院で40例あったが、累積肝癌再発率は、3年25.8%、5年40.8%、10年54.9%で、非SVR (HCVRNA陽性) の58.0%、74.1%、88.6%より有意に低かった ( $P<0.005$ )。

同様にこれら根治的治療を行った40例について全生存率を比較した。SVR後の発癌症例での生存率は、5年92.2%、10年78.5%、15年36.7%であり、非SVR症例の68.8%、34.0%、13.3%より有意に高かった ( $P<0.01$ )<sup>4)</sup>。

#### 【考察】

B型肝炎では、慢性肝炎での発癌率の低さから、エンテカビルを使用することでの発癌率低減効果は現時点で得られていないが、長期的に多数症例を観察すれば発癌抑制効果は確実に考えられる。ウイルス存在下ではあるが、エンテカビル投与中は肝機能の悪化が見られず、肝癌再発がある程度あるにもかかわらず、生存率が良いことが、目立つ。再発時にも肝機能が保たれているために、より根治的な治療や反復した治療が可能になっていることが大きい。

C型肝炎では肝線維化の軽度な時期にウイルス排除が成功した症例のほうが、発癌リスクから遠ざかることが明らかである。この集団でもウイルス排除後に肝癌発癌のリスクが残るため、どのような背景が発癌危険群であるかを検討したが、B型肝炎ウイルスの関与や鉄・代謝因子などの要因は明らかではなかった。C型肝炎でSVRに至っても15年たっても肝癌発癌を見る症例があり、また、SVRの発癌例で根治治療を行っても10年以上のちに再発してくる例もあることから、症例を集積してさらに再発リスクの検討をしていくことが必要である。

#### 【文献】

1. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, et al.: Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection. *Hepatology* 58: 98-107, 2013
2. Ikeda K, Arase Y, Kawamura Y, et al.: Necessities of interferon therapy in elderly patients with chronic hepatitis C. *Am J Med* 122: 479-486, 2009
3. Ikeda K, Kobayashi M, Seko Y, et al.: Administration of interferon for 2 years or longer decreases recurrence rate of an early stage of hepatocellular carcinoma after

radical ablation – A retrospective study of hepatitis C. *Hepatol Res* 40: 1168–1175,2010

4. Kunimoto H, Ikeda K, Kawamura Y, et al: Long-term outcomes of hepatitis C-infected

patients who had achieved a sustained virological response and subsequently underwent radical treatment for hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 2016 (in press)

# 分子標的療法時代における大腸癌肝転移に対する適切な治療アプローチと手術適応決定のための予後因子に関する検討

進藤 潤一、橋本 雅司

## 【要約】

奏効率の高い近代化学療法レジメンと multidisciplinary approach が一般的となった現在の大腸癌肝転移治療において、*KRAS* 遺伝子変異は最も重要な分子標的治療マーカーであり、患者予後と一定の相関があると考えられている<sup>1)</sup>。しかし、*KRAS* 遺伝子変異がもたらす臨床像の変化や、それが実際に予後に及ぼす影響についてはほとんど明らかにされていない。本研究では大腸癌肝転移に対する外科的治療において *KRAS* 遺伝子変異が患者予後へもたらす影響について解析を行い、実臨床における妥当な治療戦略の基礎的検討を行った。東京大学肝胆膵外科および虎の門消化器外科において肉眼的根治切除を施行された肝転移切除症例345例のうち、*KRAS* 遺伝子変異の有無が明らかにされた163例 (*KRAS* 野生型 89例、*KRAS* 変異型74例) を対象とした。*KRAS* 変異例では *KRAS* 野生型と比較して疾患特異的生存期間、無再発生存期間、切除不能再発までの期間が有意に短く、特に肺転移再発の頻度が有意に高かった。多変量解析では *KRAS* 変異はこれら予後指標のいずれにおいても有意な独立因子として抽出され、特に切除不能再発までの期間 (HR, 2.4; 95% CI, 1.5-3.9)、肺転移再発 (HR, 2.6; 95% CI, 1.5-4.3) との相関が目立った。切除不能までの中央値は *KRAS* 野生型で39.7ヶ月であったのに対し、*KRAS* 変異型では18.8ヶ月と有意に短く (P=0.001)、その原因の41%は多発肺転移に関連したものであった。また *KRAS* 変異による肺転移の頻度に関して原発巣の部位 (右側 vs. 左側、結腸 vs. 直腸) による差はみられなかった。以上より *KRAS* 変異型症例では原発巣の部位によらず切除不能肺転移再発が高頻度で見られ、それが予後悪化の一因となっていることが示唆された。

## 【目的】

近年の化学療法の進歩によって、手術療法のみでは制御困難であった大腸癌肝転移の大幅な予後改善が報告されている<sup>2)</sup>。様々な分子標的治療薬の登場とともに、以前は切除不能と判断されてきたような症例でも化学療法によって手術治療へ conversion し得るケースが多数経験されるようになり、腫瘍径や腫瘍数に基づいた従来の手術適応基準は現在ではその意義を失いつつある<sup>3)</sup>。日進月歩の大腸癌肝転移治療において、どのような状況下で手術に踏み切るべきであるか、現在の日常臨床に即した予後指標については未だ報告が少なく、実際の臨床判断に役立つような客観的指標がない。そこで本研究では、近代化学療法レジメンと multidisciplinary approach が一般的となった現在の大腸癌肝転移治療において、分子標的療法の重要なマーカーである *KRAS* 遺伝子変異の有無に注目した予後因子の再検討を行った。

## 【方法】

東京大学肝胆膵外科および虎の門病院肝胆膵外科において2008年以降に肉眼的根治切除を受けた大腸癌肝転移症例345例のうち、*KRAS* 遺伝子変異の有無が確認されている163例を対象とした。術後再発形式および長期予後に関する *KRAS* 遺伝子変異ならびに各臨床因子の影響を解析し、*KRAS* 遺伝子変異がもたらす臨床像の特徴と予後への影響の度合いに関して検討を行った。

## 【結果】

*KRAS* 遺伝子変異に関しては89例 (55%) が *KRAS* 野生型、74例 (45%) が *KRAS* 変異型であり、*KRAS* 変異を有するケースは、高齢、女性、右側結腸原発の症例に多い傾向を認めた。3年疾患特異的生存率は *KRAS* 野生型83.6% vs. *KRAS* 変異型59.8% (P=0.016)、3年無再発生存率は *KRAS* 野生型 20.2% vs. *KRAS* 変異型0% (P=0.069)

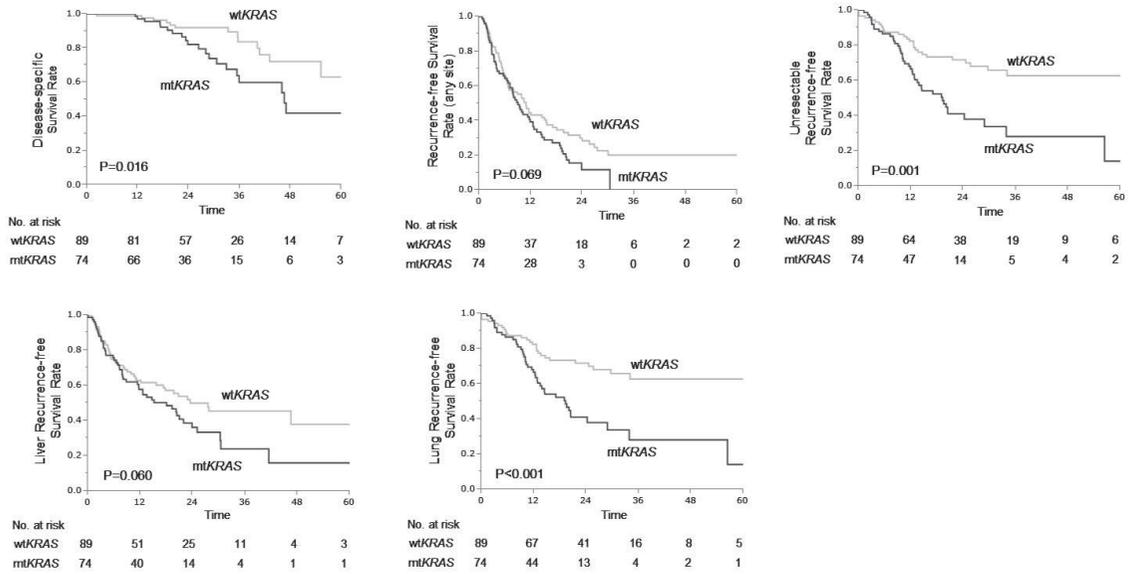


図1 KRAS遺伝子変異と大腸癌肝転移切除後の長期成績  
wtKRAS: KRAS野生型、mtKRAS: KRAS変異型

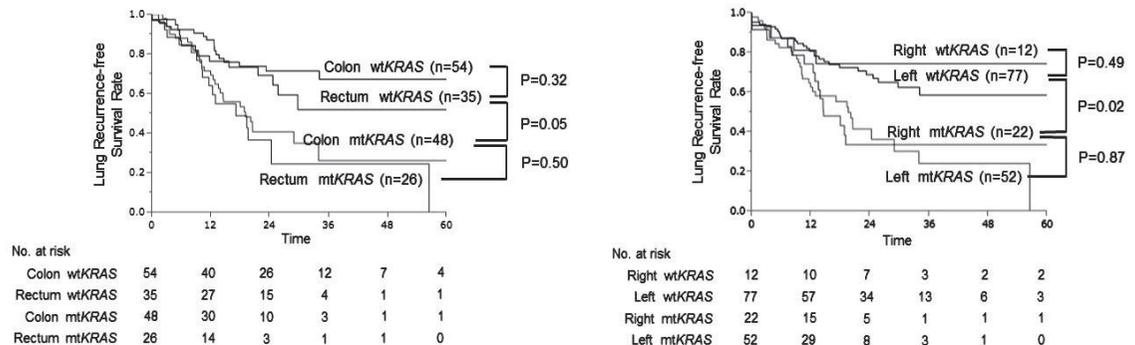


図2 原発巣の位置、KRAS遺伝子変異と肺転移再発の関係  
wtKRAS: KRAS野生型、mtKRAS: KRAS変異型

であり、切除不能再発までの中央値はKRAS野生型 39.7ヶ月に対しKRAS変異型 18.8ヶ月(P=0.001)とKRAS遺伝子変異を有する群で有意に短かった(図1)。多変量解析において、KRAS遺伝子変異は疾患特異的生存率(HR 2.9, P=0.006)、無再発生存率(HR 2.0, P=0.004)、切除不能再発(HR 2.4, P<0.001)、肝内再発(HR 1.7, P<0.001)、肺転移再発(HR 2.6, P<0.001)のいずれに対しても有意なリスクファクターとして抽出された。KRAS変異症例では原発巣の位置(結腸 vs. 直腸、

右側 vs. 左側)によらず肺転移再発が多く(図2)、経過中に切除不能肺転移を来した割合も41% vs. 18%(P=0.048)と高く、こうしたケースでは切除不能再発までの期間も短い傾向にあった(9.6ヶ月 vs. 14.0ヶ月, P=0.14)。

#### 【考察】

本研究において、KRAS変異は疾患特異的生存、無再発生存、切除不能再発、肝内再発、肺転移再発のいずれに対しても有意なリスクファクターであることが明らかにされた。KRAS変異症例では

原発巣の位置によらず肺転移が高頻度に認められ、多発肺転移再発を主とする切除不能再発のために患者予後が悪化する傾向が確認された。

従来大腸癌の肺転移は、大腸の血流ドレナージ形態の解剖学的特徴から原発巣の位置と強い相関があるものと考えられてきた。しかし本検討で示されたように肺転移再発は必ずしも原発巣の位置とは関係せず、腫瘍遺伝学的背景に強い影響を受け得ることが過去の報告でも示唆されている<sup>4,5)</sup>。右側結腸の癌でも systemic circulation に直接入るような主要な血流ルートがないにもかかわらず、肝転移と同時に肺転移が生じ得ることは実臨床においてはしばしば経験される現象であり、*KRAS*変異が右側結腸でより頻度が高いという特徴から考えても、右側結腸由来の肺転移は従来考えられてきたよりも高い可能性がある。事実、本研究において肺転移再発は*KRAS*遺伝子変異の有無によってきれいに層別化され、原発巣の位置の影響は確認されなかった(図2)。なぜ*KRAS*変異症例で肺転移が多いかに関しては具体的な分子メカニズムは不明であるが、*KRAS*変異は腫瘍細胞の移動、浸潤、細胞骨格の破壊、インテグリン発現など癌の転移メカニズムと深くかかわっていることが知られており<sup>6-8)</sup>、こうした分子メカニズムが特徴的な臨床像と深く関連している可能性がある。

本研究で明らかにされたように、*KRAS*変異は臨床上、切除不能再発までの期間と強い相関を示し、その原因の多くが多発肺転移再発であったことから考えても、*KRAS*変異は癌の腫瘍学的悪性度を規定する一つの強い因子であると云える。こうした臨床学的特徴から考えると、*KRAS*遺伝子変異症例こそ術後補助療法を積極的に考慮すべき population であり、肝臓のみならず肺も含めた慎重なフォローが望ましいと考えられる。

#### 【文献】

1. Brudvik KW, Kopetz SE, Li L, et al: Meta-analysis of *KRAS* mutations and survival after resection of colorectal liver metastases. *Br J Surg* 102: 1175-1183, 2015

2. Kopets S, Chang GJ, Overman MJ, et al: Improved survival in metastatic colorectal

cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J Clin Oncol* 27: 3677-3683, 2009

3. George B, Kopetz S: Predictive and prognostic markers in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep* 13: 206-215, 2011

4. Vauthey JN, Zimmitti G, Kopetz SE, et al: *RAS* mutation status predicts survival and patterns of recurrence in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 258: 619-626, 2013

5. Tie J, Lipton L, Desai J, et al: *KRAS* mutation is associated with lung metastasis in patients with curatively resected colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 17: 1122-1130, 2011

6. Pollock CB, Shirasawa S, Sasazuki T, Kolch W, Dhillon AS: Oncogenic K-RAS is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells. *Cancer Res* 65: 1244-1250, 2005

7. Schramm K, Krause K, Bittroff-Leben A, Goldin-Lang P, Thiel E, Kreuser ED: Activated K-ras is involved in regulation of integrin expression in human colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 87: 155-164, 2000

8. Serova M, Astorgues-Xerri L, Bieche I, et al: Epithelial-to-mesenchymal transition and oncogenic Ras expression in resistance to the protein kinase Cbeta inhibitor enzastaurin in colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 9: 1308-1317, 2010

#### 【発表に関する事項】

Shindoh J, Nishioka Y, Yoshioka R, Sugawara T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Hashimoto M, Kokudo N: *KRAS* mutation status predicts site-specific recurrence and survival after resection of colorectal liver metastases irrespective of location of the primary lesion. *Ann Surg Oncol* Jan, 2016

# B型肝炎症例に対する核酸アナログ製剤により出現した多剤耐性ウイルスに対するテノホビルの治療効果

鈴木 文孝、熊田 博光

## 【要約】

B型慢性肝疾患（HBV）に対する治療として核酸アナログ製剤が広く使用されその有効性が示されている。特にラミブジン（LAM）+アデホビル（ADV）、エンテカビル（ETV）治療では、多くの症例でHBV DNA量の低下が得られている。しかし一部症例では、長期投与にてもウイルス量が十分低下しない不応例が存在している。このような不応例のウイルス学的解析と新規治療薬であるテノホビル（TDF）の効果について検討した。LAM+ADV投与例では、DNA量3以上または他治療移行の症例は、3年目77例（21%）、5年目32例（11%）であった。このうち、5年目不応例31例にて耐性ウイルスを測定すると、LAM耐性ウイルス16例（52%）、ADV耐性ウイルス11例（35%）、ETV耐性ウイルス2例（6%）であった。ETV naïve例では、DNA量3以上または他治療移行の症例は、3年目20例（3.2%）、5年目13例（3.4%）であった。5年目不応例12例にて耐性ウイルスを測定すると、LAM耐性ウイルス4例、ETV耐性ウイルス4例、ADV耐性ウイルス1例、その他1例、wild type 2例であった。

このような核酸アナログ製剤不応例44例に対するTDF治療の抗ウイルス効果（DNA<2.1）は、1年目67%（23/33）、2年目87%（26/30）、3年目86%（19/22）であった。治療開始時LAM耐性ウイルスを16例、ETV耐性ウイルスを17例、ADV耐性ウイルスを7例認めていたが、2年目でDNA陽性（DNA≥2.1）であった4例の耐性ウイルスはrtA 181 Tが2例、L180M+S202G+M204Vが2例であった。また投与中viral breakthroughを2例に認めそれぞれrtA 181 T、L180M+S202G+M204Vのウイルス変異を認めた。

## 【目的】

B型慢性肝疾患に対する治療として核酸アナロ

グ製剤が広く使用され、その有効性が示されている。特にラミブジン（LAM）+アデホビル（ADV）、エンテカビル（ETV）治療では、多くの症例でHBV DNA量の低下が得られている。しかし一部症例では、長期投与にてもウイルス量が十分低下しない不応例が存在している<sup>1-3)</sup>。このような不応例のウイルス学的解析と新規治療薬であるテノホビル（TDF）の効果について検討した。

## 【方法】

対象はLAM+ADV治療540例、ETV治療1016例。LAM+ADV治療の背景は、年齢48（24-78）、男性422例、HBeAg陽性257例、genotype A/B/C；18/30/432、ETV治療の背景は、年齢49（17-83）、男性694例、HBeAg陽性403例、genotype A/B/C；33/143/732。投与中ウイルス量の低下（DNA 3 Log IU/mL以上）が得られない症例、ウイルス量の増加を認めた症例（不応例）で、HBV DNA polymerase 領域のreverse transcriptase（rt）領域をdirect sequence法にて遺伝子配列を検討した。さらに核酸アナログ不応例に対するTDF治療は、44例で施行した。年齢50歳（33-68）、男性35例、HBeAg陽性32例、DNA量4.4 Log copies/mL（3.0-9.0<）、投与期間156週（4-382）、genotype A/B/C/F；2/0/41/1である。TDFはLAMまたはETVと併用投与した。

## 【成績】

LAM+ADV投与例では、DNA量3以上または他治療移行の症例は、3年目77例（21%）、5年目32例（11%）、7年目21例（8%）であった。このうち、5年目不応例（DNA量3以上または他治療移行例）の31例で耐性ウイルスを測定すると、LAM耐性ウイルス16例（L180M+M204I/V 15例、M204I 1例）52%、ADV耐性ウイルス11例（A 181 T、M204I/VL ± L180M 7例、A 181 T/V 3例、A 181 T、N236T 1例）35%、ETV耐性ウ

表 1 核酸アナログ不応例 (n=44) に対する TDF の治療効果  
 - 投与 2 年目で HBV DNA 陽性例 (DNA $\geq$ 2.1 Log copies/mL) の検討 -

No.	年齢	性別	genotype	組織	開始時			耐性変異	2年後		
					ALT	DNA量	HBeAg		ALT	DNA量	併用薬
1	62	F	C	CH	53	4	positive	A 181 T, M204I	16	2.4	LAM
2	61	F	C	CH	34	6.8	positive	L 180M, S202G, M204V	25	2.5	LAM
3	44	M	C	CH	14	8.2	positive	L 180M, S202G, M204V	16	2.6	ETV
4	60	F	C	CH	34	6.6	positive	A 181 T	72	4.7	LAM

No.4 : Viral breakthrough

ウイルス 2 例 (L180M+T184L/T+M204I/V 2 例) 6%であった。

ETV naïve 例では、DNA量3以上または他治療移行の症例は、3年目20例 (3.2%)、5年目13例 (3.4%)、6年目10例 (3.7%) であった。5年目不応例 (DNA量3以上または他治療移行例) 12例にて耐性ウイルスを測定すると、LAM耐性ウイルス4例 (M204I 2例、L180M+M204V 1例、L180M+M204V, M204I 1例)、ETV耐性ウイルス4例 (L180M+S202G+M204V 2例、L180M+M204V+M250V 1例、L180M+T184I+S202G+M204V 1例)、ADV耐性ウイルス1例 (A181T)、その他1例 (A181S+T184A+M204I)、wild type 2例であった。全経過中9例でviral breakthroughを認めた (Kaplan-Meior法で5年1.2%、7年1.7%であった)。

このような核酸アナログ製剤不応例44例に対するTDF治療の抗ウイルス効果 (DNA<2.1) は、1年目67% (23/33)、2年目87% (26/30)、3年目86% (19/22) であった。治療開始時LAM耐性ウイルスを16例、ETV耐性ウイルスを17例、ADV耐性ウイルスを7例認めていたが、2年目でDNA陽性 (DNA $\geq$ 2.1) であった4例の耐性ウイルスはrtA181Tが2例、L180M+S202G+M204Vが2例であった。また投与中viral breakthroughを2例に認め、それぞれrtA181T、L180M+S202G+M204Vのウイルス変異を認めた。

#### 【考察】

長期核酸アナログ治療中の5年目ではLAM+ADV投与例で11%、ETV naïve 例で3.4%の不応例を認め、耐性ウイルスの出現が主な原因であ

った。TDFの核酸アナログ不応例に対する効果は高いが、rtA181T、L180M+S202G+M204Vのウイルス変異は効果が減弱する可能性がある。

#### 【結論】

現在の核酸アナログ製剤投与では、多くの症例で高い抗ウイルス効果を認めているが、長期投与にて耐性ウイルスの出現による不応例 (viral breakthrough 例も含む) も認められ、注意深い経過観察とウイルス学的検討が必要である。

#### 【文献】

1. Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H, et al.: Low risk of adefovir resistance in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir plus lamivudine combination therapy: two-year follow-up. *J Hepatol* 48: 923-931, 2008
2. Suzuki F, Hosaka T, Suzuki Y, et al.: Long-term efficacy and emergence of multidrug resistance in patients with lamivudine-refractory chronic hepatitis B treated by combination therapy with adefovir plus lamivudine. *J Gastroenterol* 49: 1094-1104, 2014
3. Ono A, Suzuki F, Kawamura Y, et al.: Long-term continuous entecavir therapy in nucleos(t)ide-naïve chronic hepatitis B patients. *J Hepatol* 57: 508-514, 2012

#### 【発表に関する事項】

鈴木文孝 他: B型慢性肝疾患の核酸アナログ治療における不応例の検討とテノホビルの治療成績. 第51回日本肝臓学会総会 (熊本)

# B型肝炎治療におけるHBs抗原陰性化に関する因子の解析

鈴木 義之、熊田 博光、小林 万利子

## 【要約】

B型肝炎に対する治療薬として核酸アナログ製剤は本邦で広く使用され、B型肝炎疾患で悩む患者の長期予後の改善とともにQOLの向上に果たしてきた意義は非常に大きな意味を持っている。しかしながら、2014年に4番目の核酸アナログ製剤が登場しながらも未だ確固たる中止基準は設定されておらず、また治療終了のゴールも明らかではない。このため当院でも中止を目指した取り組みとして、過去の症例の解析とともにsequential therapyを導入した症例の検討を行っているが、初期に導入した症例は5年の節目を迎えその長期予後を検討することで治療中止に関わる因子を検討したので報告する。

## 【目的】

B型肝炎に対する治療薬として核酸アナログ製剤は本邦で広く使用され、B型肝炎疾患患者の長期予後の改善に多大な貢献をしてきたことは異論のないところである。本疾患に対する治療はIFNと核酸アナログ製剤であり、臨床の間ではその状況に応じて選択を行い、時によっては繰り返し治療が行われている。また最終目標として掲げられているHBs抗原の陰性化についても十分な効果が示されているとは言えない。このような状況の中、長期化した核酸アナログ製剤の中止を目指して当院でも多くの取り組みがなされIFN sequential therapyが有効であることを昨年度までに報告してきた。この症例の中から2例のHBs抗原陰性化例を経験し、過去の症例の解析とともにsequential therapyを導入した症例の検討を行っている。本治療法が5年を超える時期に来院現在、その長期予後を検討することでこの治療の効果、適応を解析しHBs抗原陰性化を獲得し治療中止に関わる因子を検討したので報告する。

## 【対象と方法】

2009年より核酸アナログ製剤の中止を目的としてsequential therapyを導入している。本療法導入の条件は核酸アナログ投与中、HBe抗原は陰性で、肝酵素の正常化を維持し、HBV-DNAが感度以下(2.1 log copy/ml未満)もしくはHBcrAgが感度以下(3.0 log U/ml未満)を達成している患者とした。これまでに14症例に導入し、全例IFN投与を終了し経過観察期間(drug free)に入っている。それぞれの症例の中止理由、背景因子、その後の経過につき検討した。(検討(1))。さらにこのうちHBs抗原の陰性化を獲得した2例の症例を中心にsequential therapy治療前の背景因子(HBs抗原量、宿主因子など)が治療反応性にどのように関わっているかにつき検討した(検討(2))。また、HBs抗原陰性化をもたらす可能性が期待されて新規に登場した第四の核酸アナログ製剤であるテノホビル投与症例についても解析を行ったので報告する。

## 【成績】

Sequential治療導入症例の背景は表1に示した。男性12例(86%)、sequential therapy導入のためのIFN開始時年齢43.5歳(34歳~60歳)、使用していた核酸アナログはlamivudine(LMV)10例、entecavir(ETV)4例、投与期間は77.5か月(20~123)、genotypeはBが2例でCが12例であった(表1)。治療終了後のdrug free期間は中央値66か月(60~72)である。経過中のALTは治療終了後に一過性に上昇する症例も認められるもののその後は沈静化するケースがほとんどであったが、その後の再燃で再治療を導入した症例が4例認められた。図1に今回の14症例の経過を示した。10例にdrug freeを達成しこのうち2例はHBs抗原の消失まで得ることができた。再燃例、再治療例は4例存在したが、このうち3例は当初の目標である2年以上のdrug freeを

表 1 IFN sequential療法14症例の背景

年齢 (歳)	36.5 (25-57)	43.5 (34-60)
性別	男:女 12 (85.7%):2 (14.3%)	
AST (IU/L)	97.5 (29-1356)	19.5 (15-26)
ALT (IU/L)	192 (32-2412)	16.5 (12-26)
HBe抗原陽性	3例 (21.4%)	0例 (0%)
HBV DNA (log copy/ml)	7.4 (3.0-8.1)	2.1 > (検出せず-2.9)
HBV genotype	B; 2例 (14.3%), C; 12例 (85.7%)	
核酸アナログの種類	Lamivudine : 10例	Entecavir : 4例

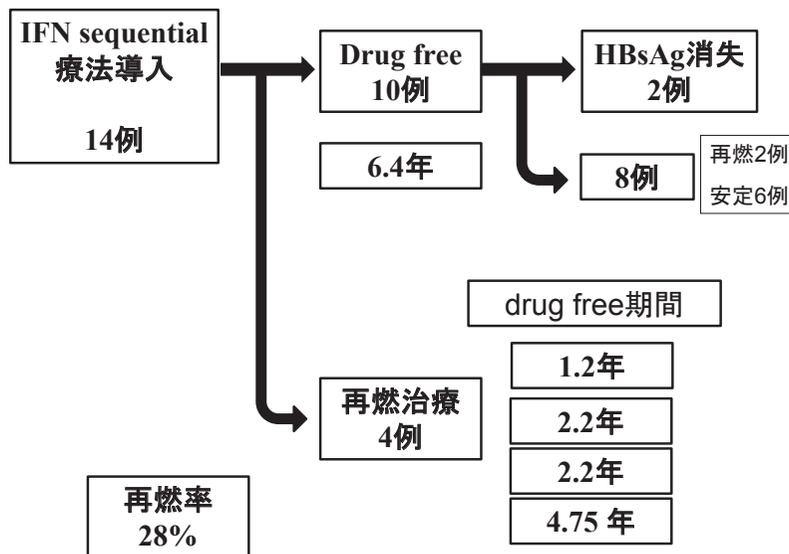


図 1 IFN sequential療法14症例の経過

達成している。単純中止例で当院が報告してきた再燃率68%に比べ本治療法の再燃率が28%と有意に低いことが示されている。経過中のHBV-DNAとALTの正常化率と陰性化率についてはALTはIFN開始後12か月目をピークにその後やや正常化率は低下するものの再治療に至らなかった症例では約3年後には100%安定という数字であった。一方DNAは感度以下を維持できている症例は少なく治療域には至らないものの2.1から4.0の範囲内で変動している症例が50%近く認められている。再治療となった3例の要因を解析するため経過中のHBcrAgの経過をみると、IFN終了直後は不安定であるが再治療に至らなかった症例は1例を除きすべて3以下まで低下し安

定していた。一方再治療を余儀なくされた3症例はいずれもHBcrAgが高いままで再治療を導入され2例は依然として高値を維持している。これをまとめると経過中HBcrAgが3.6以下の症例からは1例の再燃があったものの再治療にはいならず、再治療となった3例はHBcrAgが5.9が1例と6.8<が2例であった。このように本療法で効率よくdrug freeを獲得できることが明らかとなったが、このうちHBs抗原陰性化を獲得した2症例の背景因子を他の症例と比較したのが表2である。既報のごとくHLADPA1がGAでHLADPB1もGAの症例が2例ともHBs抗原の陰性化を獲得していた。また、今回sequential therapyとはやや異なるがIFNと核酸アナログで繰り返し治療

表 2 HBs抗原陰性化を獲得した2例の要因

No.	性別	年齢	genotype	NA種	期間	開始時 HBsAg	IL28	HLADPA 1	HLADPB 1	最終観察時	
							rs8099917	rs3077	rs9277535	ALT	DNA
3	M	60	C	ETV	100+16M	227	TT	GA	GA	17	—
13	M	53	C	LMV	123M	5.45	TG	GA	GA	18	—
4	M	43	C	LMV	76M	1910	TT	GA	GG	21	2.3
5	M	55	C	LMV	100M	119	TG	GA	GG	19	3.3
6	M	41	C	LMV	79M	916	TG	GG	GG	36	2.1
8	M	36	C	LMV	66M	785	GG	GG	GG	24	4.4
10	M	35	C	LMV	122M	6080	TG	AA	AA	20	5.1
11	M	44	C	LMV	98M	109	TT	GG	GG	39	1.5>
12	M	49	C	LMV	76M	1400	TT	GA	GA	20	3.3
14	F	34	C	ETV	20M	5740	TT	GG	GA	9	2.5
1	M	60	Bj	LMV	55M	1370	TT	GG	GG	528	5.4
2	M	41	C	LMV	94M	1390	TT	GG	GA	388	6.9
7	M	37	C	ETV	31M	6110	TT	GA	GA	980	7.8
9	F	59	Ba	ETV	38M	554	TT	GG	GG	114	8.9

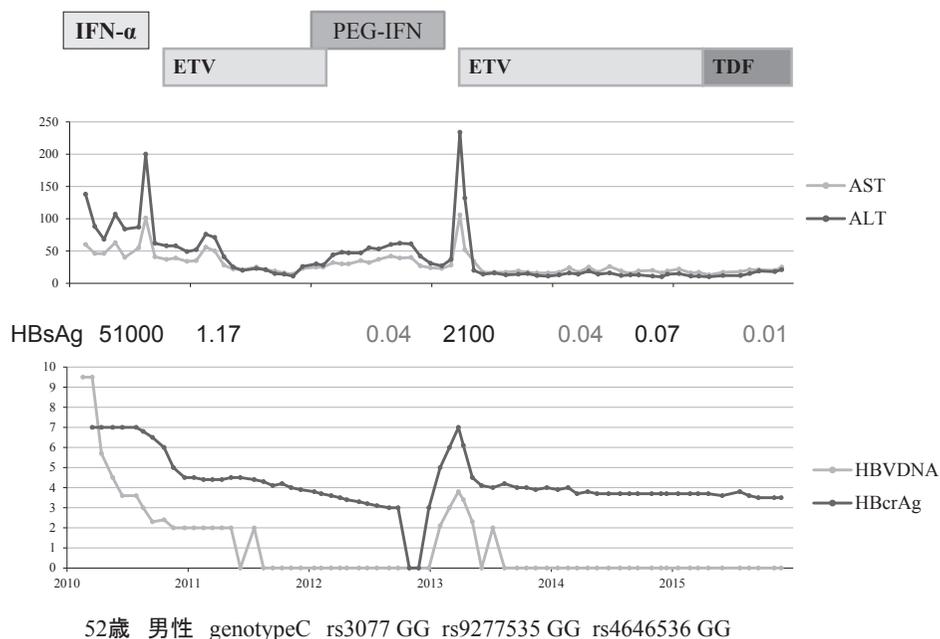


図 2 IFNと核酸アナログ投与を繰り返しHBsAgの陰性化が得られた症例の経過

することによりHBs抗原の陰性化を獲得した症例を示す(図2)。

この症例は52歳の男性で2種類のIFN治療と

2種類の核酸アナログを使用している。結局最後に使用したテノホビル(TDF)により持続的なHBs抗原の陰性化が得られた。このような経験か

表 3 TDF 投与症例の背景因子

	total	TDF 単独	TDF+LMV	TDF+ETV	
N	312	88	182	42	
年齢	52 (16-85)	42 (16-79)	55.5 (32-85)	51 (23-72)	
男：女	229:83	46:42	149:33	34:8	
AST	23 (11-685)	29 (13-685)	21 (11-252)	27 (14-332)	
ALT	23 (8-725)	33 (10-725)	20 (8-219)	34 (9-337)	
HBsAg	1015 (0.01-120000)	3000 (0.01-120000)	720 (0.07-42000)	1900 (71.65-44900)	
HBV-DNA	2 (0-9)	3.9 (0-9)	0 (0-9)	4.3 (0-9)	
HBcrAg	4.1 (0-9)	4.8 (0-7)	3.7 (0-7)	7 (0-7)	
genotype	A	7	1	5	1
	B	24	12	10	2
	C	266	69	162	35
	Others	8	2	3	3
	ND	7	4	2	1

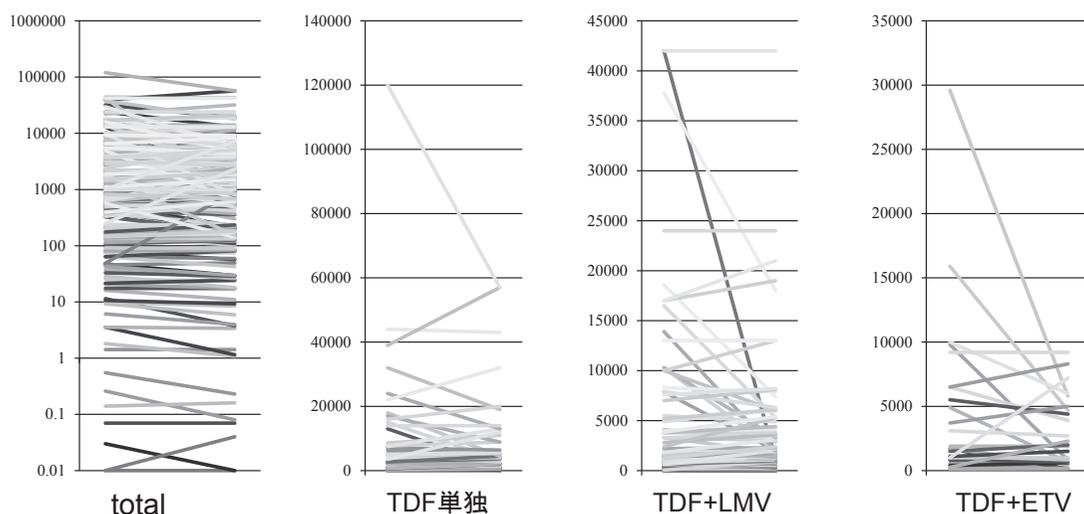


図 3 TDF 投与症例の併用薬剤別 HBs 抗原量の推移

ら今年度はまだ期間こそ短いものの TDF 投与症例の解析も行った。表 3 にその背景因子を示すが 312 例についての解析を行い、図 3 に示すように一部の症例に急激な HBs 抗原の低下が認められた。このような症例の特徴をとらえ、より有効な方法で HBs 抗原の陰性化を目指すことが今後に期待される治療法であると考ええる。

【考察】

従来の IFN 治療にとって代わるべく治療薬として登場した LMV は確かに画期的な治療薬であり、我々は、かつて LMV 投与において経年的に肝生検を行いその組織学的改善度につき報告してきた<sup>1, 2)</sup>。その中でも述べたように、抗ウイルス剤投与により肝炎の鎮静化を持続することができれば、肝臓の線維化についても改善が認められる

ことを示した。

また耐性ウイルスについての問題であるが、長期化する核酸アナログ投与においては特に第一世代のLMVではその頻度は高く年とともに増加している。このような耐性ウイルスの出現を来さないためにも核酸アナログを中止する方法が期待される場所である。また、現在の第一選択であるETVも耐性ウイルスの出現率こそ低く抑えられてはいるが、HBs抗原の陰性化率は低く、今後さらに治療が長期化していくことが懸念される。長期化すれば耐性ウイルスの問題だけではなく腎障害などの副反応も必ずや増えていくと考えられ、そのためにも本薬剤を中止する基準は是非とも必要と考える。そのため積極的な試みとして当科では、sequential therapyを開始しているが、治療終了後5年の経過では抗ウイルス効果の持続は十分とはいえないもののALT正常化率は高く、特にIFN開始時のHBcrAgが低値でありgenotypeB以外の症例においては良好な結果が得られ、有用な治療法であることが示された。特に核酸アナログ長期投与症例においては良好な結果

が得られ、drug freeを獲得するための有用な治療法であることが示された。さらにその中からHBs抗原の陰性化を獲得する症例も出現し、今年度は積極的にHBs抗原陰性化に向けた取り組みが可能であるかどうかの検討を行ってきた。宿主因子を考慮した選択と、まだ途中経過ではあるものの新規薬剤を組み合わせることにより安全にかつより有効な治療法が確立できるよう今後さらに検討を進めていくことが重要であると考えられる。

#### 【文献】

1. Suzuki Y, Kumada H, Ikeda K, et al: Histological changes in liver biopsies after one year of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B infection. *Journal of Hepatology* 30: 743-748,1999
2. Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, et al: Histological improvement after a three-year lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B in whom YMDD mutants did not or did develop. *Intervirology* 46: 164-170, 2003

## (6) 循環器疾患

### 心臓における自然炎症の制御機構の解明とその心リモデリングにおける役割の検討

東邦 康智

東京大学医学部附属病院 循環器内科

#### 【要約】

負荷に伴う心臓の構造的・機能的変化である心リモデリングの病態生理において、炎症反応が重要な役割を果たすことが示唆されているが、炎症の制御機構やその詳細な役割については明らかではない。本研究では、心臓での炎症反応の強度が神経系によるNLRP3インフラマソームの活性化により制御されており、転写制御因子IKB $\zeta$ による炎症反応の質の変化を通じて最終的に心不全を引き起こすことを明らかにした。

#### 【目的】

心不全は予後不良の病態であり、新たな治療法の開発にはその病態生理の解明が重要である。負荷が加わった心臓は、心リモデリングと呼ばれる構造的・機能的変化を起こす。この変化は心機能を維持するための代償反応として生じるが、持続的な負荷は非代償的变化を引き起こし、最終的に心不全に至る。近年、心リモデリングにおいて、自己由来内因性リガンドと病原体センサーとの相互作用により誘導される「自然炎症」が重要な役割を果たすことが示唆されている<sup>1,2)</sup>。本研究の目的は、心臓における自然炎症の制御機構及びその心リモデリングに果たす役割を明らかにし、心不全の新たな治療法の開発を目指すことである。

#### 【方法・結果】

これまで我々は、自然免疫受容体TLR2を介した炎症性サイトカインIL-1 $\beta$ の産生が心リモデリングに重要であることを報告した<sup>1)</sup>。このIL-1 $\beta$ の活性化にはカスパーゼ1が必要であり、そのカスパーゼ1の活性化には自然免疫受容体の一つであるNLRP3インフラマソームと呼ばれる蛋白複合体の活性化が重要であることが報告され

ている。そこで我々は、まずNLRP3インフラマソームに着目して、心臓における炎症誘導シグナルの制御機構の解明を試みた。

野生型マウスに大動脈縮窄術による圧負荷心肥大を誘導すると、心組織においてNLRP3の発現が誘導された。*Nlrp3*<sup>-/-</sup>マウスに圧負荷を加えると、術後14日目では野生型マウスと比較して心肥大及び心線維化が抑制されたが、心拡大及び左室収縮能の低下を認め、圧負荷に対する代償反応が障害されていることが分かった。骨髄移植実験を行うと、骨髄由来細胞ではなく、心組織に発現するNLRP3が心臓の表現型に重要であることが分かった。

NLRP3インフラマソームの活性化メカニズムの一つとして、細胞外ATPによるプリン作動性受容体P2X7の活性化が報告されている<sup>3)</sup>。心筋細胞及び非心筋細胞にATP及びTLR2特異的リガンドを負荷すると、相乗効果により心筋細胞肥大・非心筋細胞増殖を誘導し、その効果がP2X7の阻害やNLRP3のノックダウン、抗IL-1 $\beta$ 中和抗体処理により抑制されることが分かった。そこで、野生型マウスにおいて薬物による細胞外ATP除去やP2X7阻害を行うと、圧負荷後心臓におけるNLRP3インフラマソームの活性化が抑制され、代償性心肥大が障害された。以上から、心臓におけるNLRP3インフラマソームの活性化には、ATP/P2X7系が重要な役割を果たすことが分かった。

心臓における細胞外ATPの供給源として、我々は交感神経終末に着目した。ATPは神経伝達物質の一つであり、生理的作用を発揮する濃度で分泌される。ATPバイオセンサーシステムを用い

て、圧負荷後の心組織における細胞外ATP濃度の計測を行った結果、偽手術を行った野生型マウスと比較して、圧負荷を加えた野生型マウスの心組織では細胞外ATP濃度が上昇したが、左星状神経節切除や中枢性交感神経抑制薬であるクロニジン投与を行うと、圧負荷後の心組織における細胞外ATP濃度の上昇が抑制された。逆に、交感神経刺激薬であるプソイドエフェドリンを投与すると、心臓における細胞外ATP濃度が上昇することが分かった。以上から、圧負荷後心組織における細胞外ATPの主な分泌源は交感神経終末であり、実際にNLRP3インフラマソームの活性化に重要な役割を果たすことが分かった。

次に、心臓への圧負荷に伴う交感神経系の活性化機序について検討を行った。我々は、心臓からの求心性神経シグナルに着目して検討を行った。カプサイシンを用いて心臓からの求心性神経シグナルを障害した野生型マウスに圧負荷を加えたところ、圧負荷後の心組織における細胞外ATP濃度の上昇の抑制に加え、NLRP3インフラマソームの活性化の抑制及び代償性心肥大の誘導の障害を認めた。以上から、心臓への圧負荷後の交感神経系の活性化には、心臓からの求心性神経シグナルが重要な役割を果たしていることが分かった。

以上から、心臓における炎症誘導シグナルは心脳連関により制御されており、恒常性維持に重要な役割を果たすことが分かった。

これまでの検討から、自然炎症は心臓の恒常性維持機構に重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかし、一方で炎症反応は心不全を引き起こす。そこで、我々は、自然炎症が心臓の恒常性維持機構の破綻をもたらすメカニズムの解明を試みた。

まず、野生型マウスに圧負荷を加えて、心組織における炎症性サイトカインの発現を評価すると、代償期にはIL-6と比較してIL-1 $\beta$ の発現が優位に増加していたが、心不全期にはIL-6の発現がIL-1 $\beta$ の発現と比較して優位であった。この炎症の質の変化のメカニズムを明らかにするため、我々は転写制御因子であるI $\kappa$ B $\zeta$ に着目した。I $\kappa$ B $\zeta$ は、TLRシグナルにより活性化され

るNF- $\kappa$ Bシステムの多段階転写制御に関与する因子である。心組織におけるI $\kappa$ B $\zeta$ の発現を評価すると、圧負荷後の代償期と比較して心不全期においてI $\kappa$ B $\zeta$ の発現が有意に増加していることが分かった。そこで、I $\kappa$ B $\zeta$ のヘテロノックアウトマウスに圧負荷を加え、心臓の表現型を時系列で評価したところ、同マウスでは野生型マウスと同様に代償性心肥大が誘導されたが、心不全への移行は認めなかった。同マウスでの心組織における炎症性サイトカインの発現パターンを評価すると、IL-1 $\beta$ 優位の発現パターンであった。さらに、同マウスでは代償反応に重要な役割を果たすAktの活性化状態が維持されていることが分かった。以上から、転写制御因子I $\kappa$ B $\zeta$ の発現が心臓の恒常性維持機構の破綻に重要な役割を果たすことが分かった。

#### 【考察】

本研究では、心臓における炎症反応の強度が神経系により制御されており、時間軸に伴う炎症の質の変化が転写制御因子I $\kappa$ B $\zeta$ の発現により引き起こされることを明らかにした。この炎症反応の強度と持続時間の組み合わせにより、心リモデリングの表現型が決定されるものと考えられる。今後、神経系の活性及びI $\kappa$ B $\zeta$ の発現の制御により、心不全の新たな治療法の開発につなげたいと考えている。

#### 【文献】

1. Higashikuni Y, et al.: Toll-like receptor-2 mediates adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload through interleukin-1 $\beta$  upregulation via nuclear factor  $\kappa$ B activation. *J Am Heart Assoc* 2:e000267, 2013
2. Oka T, et al.: Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature* 485: 251-255, 2012
3. Schroder K, Zhou R, Tschoopp J: The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger?. *Science* 327; 296-300, 2010

## (7) 腎疾患

# 低骨量を呈する腎機能障害患者における完全ヒト型抗RANKL抗体 デノスマブの骨密度改善効果と血清スクレロスチンに与える影響

平松 里佳子、乳原 善文、高市 憲明

### 【要約】

**背景目的：**腎機能障害患者の骨粗鬆症治療においては薬物動態や蓄積性の点から通常の骨作動薬の投与が難しい。デノスマブ（プラリア<sup>®</sup>）は破骨細胞の機能調節に重要なRANKLを特異的に阻害し強力に骨吸収を抑制し閉経後女性骨粗鬆症患者において高い有効性が確認されている。利点として6カ月に1回という投与頻度の少なさによる患者負担の大幅な軽減とビスフォスホネート製剤と異なり骨への蓄積性が少ない点が挙げられる。デノスマブ（プラリア<sup>®</sup>）が腎機能障害患者において有効な骨粗鬆症治療薬となることが強く示唆される一方、腎不全患者は投与後低Ca血症の頻度が多いことも指摘され、安全性と有効性の評価には症例の蓄積が必要である。

**方法：**腎機能障害患者かつ骨密度がT-score<-2.5で骨粗鬆症の治療でデノスマブ（プラリア<sup>®</sup>）を投与予定であり本研究について文書による説明と同意が得られた患者で、血清補正Ca、P、PTHが日本透析医学会ガイドライン2012の定める適正值内に管理されていない症例を除外。デノスマブ（プラリア<sup>®</sup>）60 mgを6カ月に1回皮下投与（透析後投与）。全例で活性型ビタミンD製剤を併用し検討期間中の血清Ca濃度を定期的にモニタリングした。投与前、投与後の血清学的検査と骨代謝マーカーと骨密度を比較。

**結果：**11例にデノスマブ（プラリア<sup>®</sup>）を投与し6カ月観察した。骨密度は腰椎、大腿骨頸部に6カ月で有意に上昇を認めた。投与後、全例で血清Ca値は低下し、約7日目で平均Ca値は最低値をとった。低Ca血症は全例が無症候性であり炭酸カルシウムおよび活性型ビタミンD製剤によりCa値調整を行い、投与3カ月で全例がベ

ースライン値に回復。低Ca血症に伴い一過性のPTH上昇がみられた。投与3カ月時点で骨形成マーカーおよび骨吸収マーカーは有意に抑制され6カ月まで持続した。

**考察：**既報では腎不全患者は非腎不全患者と比較すると低Ca血症の頻度が多くなる点が指摘されている。本検討では活性型ビタミンD製剤を併用し、本剤投与後は頻回にCa値を測定しCa値の調整を行ったことでCa低下は軽度であった。ただしCa低下に伴う反応性の一過性PTH上昇を認めこれが骨代謝にどのような影響を与えるかについては今後の検討が必要であると考えられる。骨密度は全例で上昇し、透析患者の骨粗鬆症におけるデノスマブ（プラリア<sup>®</sup>）の有効性が示唆された。本結果はAmerican Journal of Kidney Disease誌に報告した。骨形成抑制因子血清sclerostinについて腎不全患者での測定値の解釈がまだ確立されておらず、再検討していきたいと考える。

### 【目的】

腎機能障害患者の骨粗鬆症治療においては薬物動態や蓄積性の点から通常の骨作動薬の投与が難しい。デノスマブ（プラリア<sup>®</sup>）は破骨細胞の機能調節に重要なRANKLを特異的に阻害し強力に骨吸収を抑制し閉経後女性骨粗鬆症患者において高い有効性が確認されている。利点として6カ月に1回という投与頻度の少なさによる患者負担の大幅な軽減とビスフォスホネート製剤と異なり骨への蓄積性が少ない点が挙げられる。デノスマブ（プラリア<sup>®</sup>）が腎機能障害患者において有効な骨粗鬆症治療薬となることが強く示唆される一方、腎不全患者は投与後低Ca血症の頻度が多いことも指摘され、安全性と有効性の評価には症例

の蓄積が必要である。

【方法】

本検討は当院の審査委員会で2014年度臨床試験的研究（2013年7月9日承認）として承認されている。

対象患者は20歳以上の腎機能障害患者で性別は問わず、骨密度が骨粗鬆症の診断基準であるT-score<-2.5であり骨粗鬆症の診療目的でデノスマブ（プラリア®）を投与する予定の患者。

デノスマブ（プラリア®）60mgを皮下投与（透析日は透析後）する。血清補正Ca、P値について

ては投与開始前、および低Ca血症を予防するため開始後7日目以内に必ず測定する。骨形成マーカー：intact PINP、BAP、ALP、OC。骨吸収マーカー：TRACP-5b、また、投与開始前（投与1ヶ月以内）、6、12、18、24、30、36ヶ月後に腰椎（L2-L4）、大腿骨（近位部と頸部）、前腕骨（橈骨遠位1/3）の骨密度をそれぞれ測定する。

【結果】

(1) 投与前患者背景

対象患者は計11例（女性10名、男性1名）、補正Ca値中央値は9.7 mg/dl、P値4.4 mg/dlで

表 1 デノスマブ（プラリア）投与患者背景

Case Number	Ca (mg/dL) *	nadir of Ca (mg/dL) *	iPTH (pg/mL)	iPTH levels at 1 month	P (mg/dL)	Calcium Carbonate (g/day)
1	9.3	7.4	128	503	3	0
2	10.7	8.4	81	1518	4.4	0
3	9.8	8.7	116	371	3.6	0
4	9.7	8.4	219	159	5.3	6
5	10.9	8.4	146	405	5.3	2
6	10.5	8.9	141	276	5.2	1
7	9.4	7.6	240	1938	3.9	3
8	9.5	6.8	142	485	5.3	0
9	8.9	7.6	211	320	5.1	0
10	9.4	8.4	147	576	3.5	2
11	10.1	8.3	125	277	2.9	2

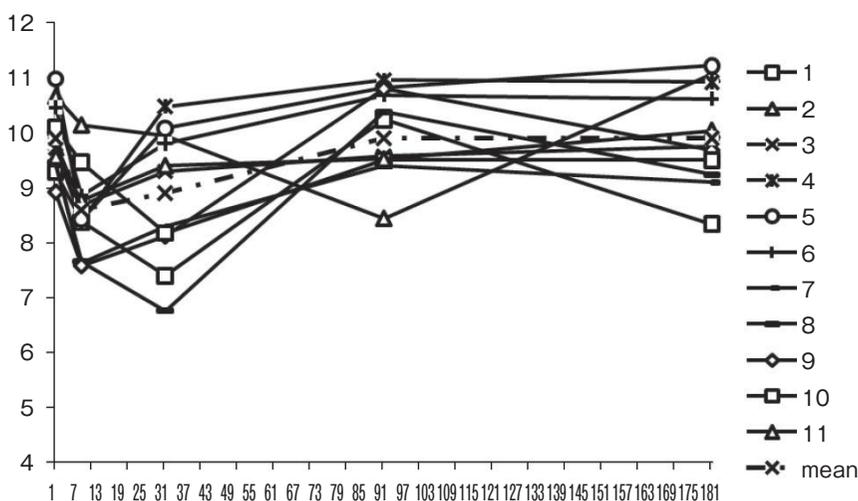


図 1 デノスマブ（プラリア®）投与後血清Ca値の変化

iPTH 142pg/mlで日本透析医学会が定めるガイドライン基準値内に管理されていた。骨密度は腰椎T-score -2.7、大腿骨頸部T-score -2.4、橈骨遠位端1/3T-score -3.8と著しく低値である(表1)。

(2) デノスマブ(プラリア®)投与後の血清Ca値とiPTH値の推移

デノスマブ投与後血清Ca値は低下し、投与後7日目付近で最低値をとる。投与後1カ月のiPTH

表2 デノスマブ(プラリア®)投与後各parametersの推移(\*p<0.05)

	Before treatment (n=11)	After treatment (n=11)	P
Age, years	66.0 (60 to 71)	-	
Dialysis period, years	11.0 (8 to 29)	-	
Female (%)	10 (91)	-	
Body-mass index*	20.3 (16.8 to 22.5)	-	
iPTH (pg/mL)	142.0 (125 to 211)	115.0 (97 to 151)	0.09
Corrected total Calcium (mg/dL)	9.7 (9.4 to 10.5)	9.8 (9.1 to 10.9)	0.8
Phosphate (mg/dL)	4.4 (3.5 to 5.3)	4.4 (3.9 to 5.5)	0.4
ALP (IU/L)	295.0 (255 to 412)	203.5 (182 to 361)	0.04
25-OHD (ng/mL)	15.0 (11.6 to 19.3)	15.1 (13.5 to 21.0)	0.13
1,25-(OH) <sub>2</sub> D (pg/mL)	11.6 (7.3 to 32.5)	19.8 (13.6 to 35.9)	0.31
BAP	20.0 (17.5 to 27.5)	11.2 (10.9 to 16.4)	0.01
Osteocalcin	100 (26.0 to 120)	23.0 (21.0 to 31)	0.008
intact-PINP	114.5 (88.4 to 222.3)	44.1 (29.7 to 80.8)	0.005
TRACP-5b	660 (540 to 1100)	299 (114 to 418)	0.003
BMD (T-score)			
Lumbar spine	-2.7 (-3.7 to -1.5)	-1.7 (-3.0 to 0.7)	0.006
Femoral Neck	-2.4 (-2.7 to -1.4)	-2.3 (-2.5 to -1.7)	0.007
1/3 distal radius	-3.8 (-4.5 to -2.2)	-4.1 (-4.5 to -3.0)	0.14
BMD (g/cm <sup>2</sup> )			
Lumbar spine	0.71 (0.61 to 0.85)	0.82 (0.68 to 0.90)	0.003
Femoral Nsck	0.55 (0.51 to 0.58)	0.55 (0.53 to 0.59)	0.003
1/3 distal radius	0.43 (0.35 to 0.51)	0.45 (0.40 to 0.48)	0.9
CaCO <sub>3</sub> dosage (g/day)	1.42 ± 1.8	1.29 ± 1.3	0.45
alfacalcidol dosage	0.25 ± 0.4	0.44 ± 0.4	0.31

Values are n (%) or medean (IQR, 1st-3rd percentile). Dosage of CaCO<sub>3</sub> and alfacacidol are expressed as means ± SD.

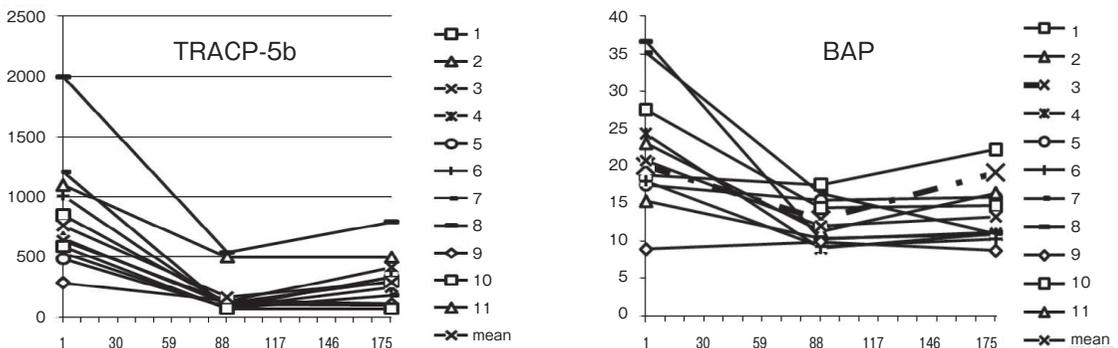


図2 デノスマブ(プラリア®)投与後の骨代謝マーカーの推移

値は全例上昇を認め、11例中2例がiPTH値が1000 pg/mlを超えた。iPTH値はCa値を調整により3カ月時点で投与前の値に改善した。なお、低Ca血症は全例無症候性でありCaCOFや活性型ビタミンD製剤投与量を調整し対応可能であった(図1、表1)。

(3) デノスマブ(プラリア®)投与後の各parameterと骨代謝マーカーの推移

投与後3カ月で骨形成マーカー(BAP、iP1NP、オステオカルシン)および骨吸収マーカー(TRACP-5b)は有意に抑制され6カ月まで持続した(図2、表2)。

(4) デノスマブ(プラリア®)投与後の骨密度の変化

BMDは腰椎0.71→0.82g/cm<sup>2</sup>、大腿骨BMD 0.55→0.55 g/cm<sup>2</sup>、橈骨遠位端1/3 0.43→0.45と上昇を認めた。腰椎T-scoreは-2.7→-1.7、大腿骨T-score -2.4→-2.3と腰椎および大腿骨はBMDおよびT-scoreともに有意に上昇した(図3、表2)。

【考察】

従来、骨粗鬆症治療に使用されてきた骨粗鬆症治療薬であるビスフォスホネート製剤は腎不全患者では蓄積性の問題から、非生理的な過剰な骨代謝の抑制によるfrozen boneの発症が懸念されていた<sup>1)</sup>。さらに、これらの薬剤では著しい

骨梁喪失を呈する骨構造の状態の改善や新たに骨梁を造成することはできない。デノスマブ(プラリア®)は抗RANKL抗体であり骨芽細胞が発現するRANKLと特異的に結合することでRANK-RANKL結合を阻害し、破骨細胞分化、活性化を抑制する<sup>2)</sup>。投与は6カ月に1回でありビスフォスホネート製剤と異なり蓄積性がない。腎不全患者におけるデノスマブ(プラリア®)使用の報告は限られている。デノスマブ(プラリア®)のAUCは腎機能の影響を受けないため非腎不全患者と同量投与が可能とされているが<sup>3)</sup>有意ではないものの低Ca血症の頻度が非腎不全患者と比較して多いと報告されている<sup>4)</sup>。特に、副甲状腺機能亢進症のような高代謝回転骨ではデノスマブ(プラリア®)による破骨細胞性骨吸収が抑制される。この場合、類骨の一時石灰化は続くので骨から血中への一方的なCaの流入が起これば重度の低Ca血症をきたすと考えられる<sup>5)</sup>。最近、副甲状腺機能亢進症透析患者にデノスマブ(プラリア®)が高Ca血症の管理に有用であったとする報告も出ているが<sup>6)</sup>、高度の低Ca血症は心不全等重篤な事態を引き起こしうるため副甲状腺機能亢進症でのデノスマブ(プラリア®)の使用では活性型ビタミンD製剤を併用し低Ca血症に十分注意する必要がある。現在の腎不全患者における骨代謝管理の考えにおいては食事療法、透

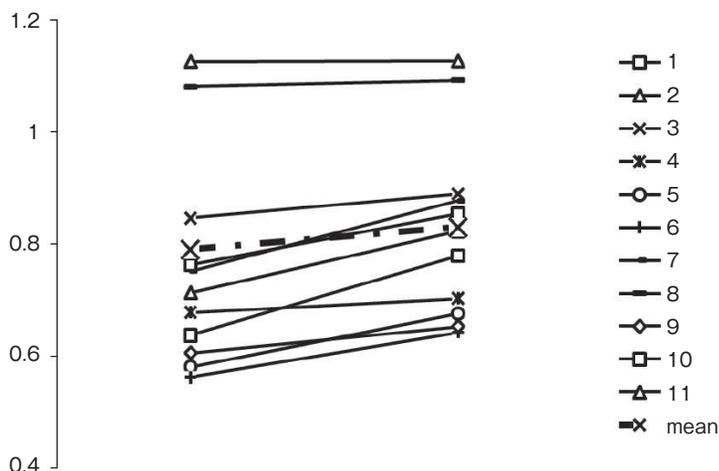


図3 腰椎骨密度の変化

析効率、またP吸着剤やシナカルセト塩酸塩の使用などにより血清Ca、P、iPTHを目標値内に管理することが優先される。本検討においても血清Ca、P値とiPTHが基準値内に管理されている症例をデノスマブ投与対象としている。すなわち重度の続発性副甲状腺機能亢進症患者は除外されている。また、活性型ビタミンD製剤を先行投与し入院管理下で血清Ca値の推移を頻回に把握したことにより低Ca血症は軽度であったと考えられる。一方、Ca低下に反応しiPTH上昇を認めた。iPTH上昇は一過性であるが1000pg/mlを超える症例も存在した。この反応性iPTH上昇が骨代謝に与える影響は今後検討の必要があると考えられる。本邦透析患者に対するデノスマブ（プラリア®）投与の報告は本検討が初である。本結果はAmerican Journal of Kidney Disease誌に報告した。今回、新たな骨評価指標として期待される血清sclerostin濃度にデノスマブの与える影響を考慮していたが、腎不全患者でのsclerostinの測定値の判定が不十分であることから有用な結果が得られなかった。今後の検討課題とする予定である。

#### 【文献】

1. Reagan P, Pani A, Rosner MH: Approach to diagnosis and treatment of hypercalcemia in a patient with malignancy. *Am J Kidney Dis* 63: 141-147, 2014
2. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S,

Christiansen C: Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 361: 756-765, 2009

3. Jamal SA, Swan VJ, Brown JP, Hanley DA, Prior JC, Papaioannou A, Langsetmo L, Josse RG: Kidney function and rate of bone loss at the hip and spine: the Canadian Multicentre Osteoporosis Study. *Am J Kidney Dis* 55: 291-299, 2010
4. Block GA, Bone HG, Fang L, Lee E, Padhi D: A single-dose study of denosumab in patients with various degrees of renal impairment. *J Bone Miner Res* 27: 1471-1479, 2012
5. McCormick BB, Davis J, Burns KD: Severe hypocalcemia following denosumab injection in a hemodialysis patient. *Am J Kidney Dis* 60: 626-628, 2012
6. Chen CL, Chen NC, Hsu CY, Chou KJ, Lee PT, Fang HC, Renn JH: An open-label, prospective pilot clinical study of denosumab for severe hyperparathyroidism in patients with low bone mass undergoing dialysis. *J Clin Endocrinol Metab* 99: 2426-2432, 2014

#### 【発表に関する事項】

Hiramatsu R, et al.: Denosumab for low bone mass in hemodialysis patients: A non-controlled trial. *Am J Kidney Dis* 66:175-177, 2015

# 糖尿病性腎症の結節性病変におけるコラーゲンの染色性と腎予後の検討

三瀬 広記<sup>1</sup>、上野 智敏、星野 純一、藤井 丈士  
高市 憲明、大橋 健一<sup>2</sup>、乳原 善文  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科<sup>1</sup>  
横浜市立大学 病理部<sup>2</sup>

## 【要約】

結節性病変は糖尿病性腎症の特徴的な病理所見の一つであるが、結節性病変におけるコラーゲンの染色性と腎予後との関連の報告はない。虎の門病院において腎生検にて糖尿病性腎症と診断され、結節性病変を有していた67例が対象。PAS・PAM・M-T・コラーゲンI、III、IV、V、VI染色を行い、結節性病変における染色性を比較検討した。エンドポイントは末期腎不全による透析導入とした。61%の症例において、PAS・PAMの染色性が明らかに低下している結節性病変(FASL: faintly-stained nodular lesion)を最低1つ有していた。FASLではコラーゲンIVの染色性が低下していた一方で、コラーゲンVIの染色性は強くなっていた。多変量Cox回帰分析の結果、FASLなしに対するFASLの存在のHRは2.83(95% CI: 1.20-6.68)であった。FASLは特徴的なコラーゲンの染色性を反映しており、有用な腎予後因子となる可能性がある。

## 【目的】

我々はこれまで、虎の門病院における腎生検で診断された糖尿病性腎症を、国際腎病理学会の提唱する病理分類<sup>1)</sup>に従い分類し、その病理組織所見と腎予後との関連について報告した<sup>2)</sup>。その結果、糖尿病性腎症の特徴的な病理所見の一つである結節性病変の存在が、臨床因子とは独立した強い予後不良因子であるということが分かった。この結節性病変に関して、古い文献でコラーゲンの染色性と臨床データの一部を示したものがあるが、少数例の報告にとどまり、その染色性と腎予後との関連を示した報告はない。本研究では、結

節性病変におけるコラーゲンの染色性の違いと腎予後との関連がどうなっているかを調べることを目的とする。

## 【方法】

1985年から2013年の間に虎の門病院において、上記の病理分類に従い糖尿病性腎症と診断された252例のうち、除外基準を満たさずかつ結節性病変を有する67例が対象となった。全ての症例において、Periodic acid Schiff (PAS)・periodic acid methenamine silver (PAM)・Masson trichrome染色の他、コラーゲンI、III、IV、V、VI染色を行い、結節性病変における染色性を比較検討した。また、エンドポイントを末期腎不全による透析導入と定義し、Cox回帰分析によってエンドポイントに対するハザード比(HR)、95%信頼区間(95% CI)を求めた。

## 【結果】

61%(46例)の症例において、PAS・PAMの染色性が明らかに低下している結節性病変(FASL: faintly-stained nodular lesion)を最低1つ有していた。このPAS・PAMの染色性が低下している病変では、コラーゲンIVの染色性が明らかに低下していたが、コラーゲンVIの染色性は非常に強くなっていた。一方、PAS・PAMの染色性が低下していない結節性病変においてはコラーゲンIV・VI双方の染色が確認された。また、腎生検時の年齢、性別、糖尿病罹病期間、eGFR、尿蛋白量、間質の線維化・尿細管萎縮のスコアで調整した多変量Cox回帰分析の結果、FASLを全く有さない集団に対するFASLを最低1つ有する集団のエンドポイントに対するHRは2.97(95%

CI: 1.24-7.07) であった。

**【考察】**

FASLは特徴的なコラーゲンの染色性を反映しており、有用な腎予後因子となる可能性があるため、評価されるべき病変と思われた。このコラーゲンの染色性の違いが生じるメカニズムの解明は、新しい治療ターゲットにつながるかもしれない。

**【文献】**

1. Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, et al.: Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 21: 556-563, 2010
2. Mise K, Hoshino J, Ubara Y, et al.: Renal prognosis a long time after renal biopsy on patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 29: 109-118, 2014

## (8) 感染症

### *Helicobacter cinaedi* (ヘリコバクター・シネディ) の 薬剤感受性に関する研究

荒岡 秀樹、馬場 勝、米山 彰子

#### 【要約】

私たちの先行研究では、*Helicobacter cinaedi* は当院において血液培養陽性例の2.2%を占めており、感染症の原因菌として重要な細菌である。当院のこの検出率は、日本における多施設共同研究と比較すると、高い傾向にある。*H. cinaedi* の感染経路は未だ明らかになっていない。本年度の研究目的は、今後薬剤感受性を検討するために、院内水平伝播により同じ遺伝子型を示す株があるかどうかを明らかにすることとした。2014年6月～12月の期間に、当院において*H. cinaedi* が血液培養から検出された（菌血症）患者の菌株を前向きに収集し、患者データとともに解析を行った。*H. cinaedi* は *gyrB*-targeted PCR を用いて同定し、パルスフィールド・ゲル電気泳動法 (PFGE) を用いて、菌株の相同性を評価した。期間中に15患者の血液培養から *H. cinaedi* が検出された。5患者が市中感染、4患者が医療関連感染、6患者が院内感染の定義を満たした。15菌株のPFGE解析中、14菌株が評価可能であった。14菌株は8種類の genotype に分けられた。5患者が1つの同じ cluster に属し、その中の3患者が同時期に同じ病棟に入院していた。しかしながら、他の cluster では明らかな患者間の水平伝播を示唆する関連性を認めなかった。今回の研究では、複数の genotype の *H. cinaedi* が感染を起こしていることが判明した。患者間の水平伝播を示唆する症例はわずかしかなかったが、一方で院内感染が起こりうる可能性が示唆された。

#### 【目的】

*Helicobacter cinaedi* は、1984年に米国においてホモセクシャルな男性の直腸から初めて分離された。主に免疫不全患者における感染症の原因菌

として認識されてきた。そのほとんどの症例において、本菌は血液培養から検出されることによって判明する（菌血症）。近年血液培養から本菌が分離される頻度が増加している。私たちの先行研究では、*H. cinaedi* は当院において血液培養陽性例の2.2%を占めており<sup>1)</sup>、感染症の原因菌として重要な細菌である。当院のこの検出率は、日本における多施設共同研究<sup>2)</sup>と比較すると、高い傾向にある。*H. cinaedi* の感染経路は未だ明らかになっていないが、いくつかの先行研究において、院内感染を示唆するものが報告されている<sup>3, 4)</sup>。*H. cinaedi* の薬剤感受性測定や侵入門戸の検討を行う前段階として、本年度の研究目的は、院内水平伝播により同じ遺伝子型を示す株があるかどうかを明らかにすることとした。

#### 【方法】

2014年6月～12月の期間に、当院において *H. cinaedi* が血液培養から検出された（菌血症）患者の菌株を前向きに収集し、患者データとともに解析を行った。市中感染、医療関連感染、院内感染の定義は従来通りの方法を用いた<sup>5)</sup>。血液培養システムはBACTEC 9240とBACTEC FX system (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA) を用いた。血液培養観察期間は7日間とした。*H. cinaedi* は *gyrB*-targeted PCR<sup>4)</sup> を用いて同定した。

パルスフィールド・ゲル電気泳動法 (PFGE) を用いて、菌株の相同性を評価した。PFGEは以下の条件で実施した。

制限酵素：Spe I と Sma I 20 unit の制限酵素で一晩反応、Spe I は37℃、Sma I は30℃。

電気泳動：電圧 6 V/cm、120° included angle、スイッチングタイム 2.9-17.4 seconds、泳動時

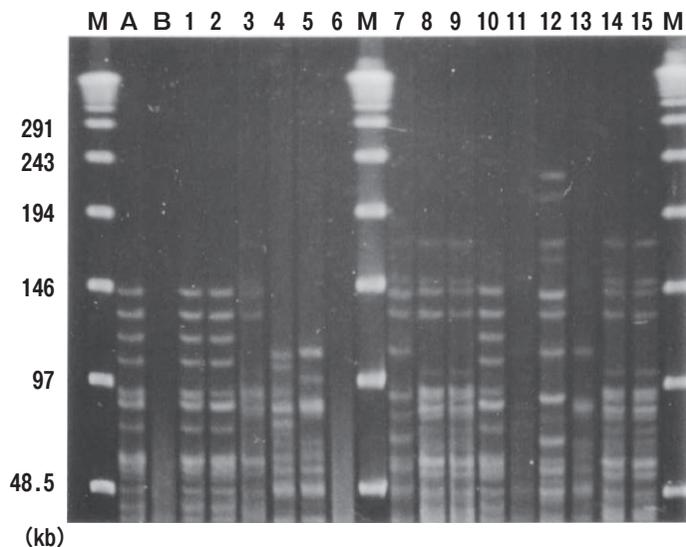


図 1 PFGE法で得られた結果 (Spe I)  
15株の解析を行った。AとBは本研究の研究期間外に得られた*H. cinaedi*菌株を対照として用いた。Mはサイズマーカー。

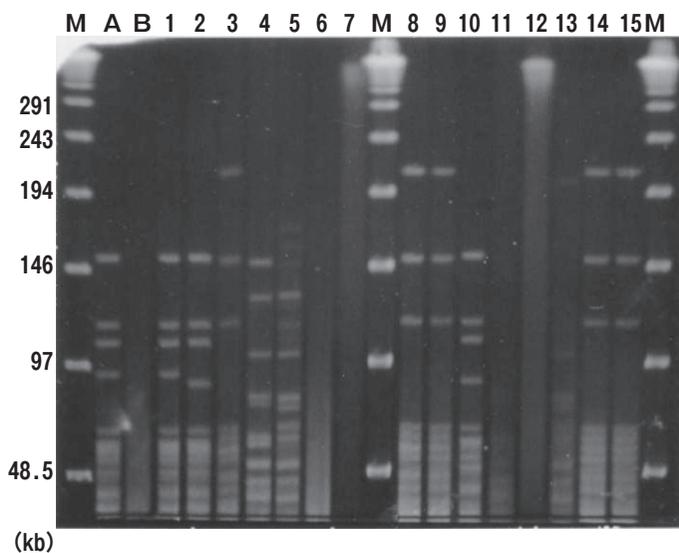


図 2 PFGE法で得られた結果 (Sma I)  
15株の解析を行った。AとBは本研究の研究期間外に得られた*H. cinaedi*菌株を対照として用いた。Mはサイズマーカー。

間27時間、1% agarose gels、0.5 × TBE buffer。

【結果】

6か月の研究期間で、15例の*H. cinaedi*による

菌血症が同定された。期間中、9,651セットの血液培養が採取され、うち何らかの微生物が陽性となったものが950セット、うち29セットから*H.*

表 1 患者の臨床的特徴と PFGE 解析結果のまとめ

Case	Age	Sex	CA/HA/N	Spe I	Sma I	Same ward
1	30	Male	HA	A	a-1	
2	81	Female	HA	A	a-2	
3	82	Male	CA	B-1	b	
4	80	Female	HA	C	c	
5	66	Female	N	D	d	
6	70	Female	CA	Not detected		
7	69	Female	CA	E	e	
8	79	Male	CA	B-2	b	‡
9	66	Female	N	B-2	b	‡
10	64	Male	HA	A	a-2	
11	82	Male	N	H	h	
12	87	Female	N	F	f	
13	63	Male	CA	G	g	
14	60	Female	N	B-2	b	
15	86	Male	N	B-2	b	‡

CA: community-acquired bloodstream infection, HA: health care-associated bloodstream infection, N: nosocomial bloodstream infection

Spe I : 14 *H. cinaedi* strains could be divided into 8 genotypes; type A, B (subtype B-1 and B-2), C, D, E, F, G, and H.

Sma I : 14 *H. cinaedi* strains could be divided into 8 genotypes; type a (subtype a-1 and a-2), b, c, d, e, f, g, and h.

*cinaedi* を検出した。

図1、図2にPFGE解析結果を、表1に患者の臨床的特徴も含めたまとめを示す。

5患者が市中感染、4患者が医療関連感染、6患者が院内感染の定義を満たした。15菌株のPFGE解析中、14菌株が評価可能であった。14菌株は8種類のgenotypeに分けられた。5患者が1つの同じclusterに属し、その中の3患者が同時期に同じ病棟に入院していた。しかしながら、他のclusterでは明らかな患者間の水平伝播を示唆する関連性を認めなかった。

#### 【考察】

今回の研究で、複数のgenotypeの*H. cinaedi*が当院において感染を起こしていることが判明した。一部で院内での水平伝播を示唆する知見が得られたが、これが患者-患者間の感染なのか、あるいは環境や医療従事者を介した感染なのかは明らかでない。多くの菌株はPFGE解析において異

なる遺伝子型を示したため、今後の研究の展望として以下を考えている。

#### (1) *H. cinaedi* 菌血症の発症様式の検討

これまでの先行研究で、腸管からのbacterial translocationによって菌血症を発症することが示唆されている。われわれの先行研究において、菌血症患者の半数以上で便からも*H. cinaedi*が培養されていることも、この仮説を支持している。これら同一患者から得られた便培養と血液培養の遺伝子型が一致するかを検討したいと考えている。

#### (2) *H. cinaedi* 感染症の治療法の検討

薬剤感受性の測定を行うべく、本年度に薬剤感受性測定のためのプレートを作製した。継続して実験を進めていきたい。

#### 【結語】

今回の研究では、複数のgenotypeの*H. cinaedi*が感染を起こしていることが判明した。患者間の水平伝播を示唆する症例はわずかしかなかった

が、一方で院内感染が起こりうる可能性が示唆された。

【文献】

1. Araoka H, Baba M, Kimura M, Abe M, Inagawa H, Yoneyama A: Clinical characteristics of bacteremia caused by *Helicobacter cinaedi* and time required for blood cultures to become positive. J Clin Microbiol 52: 1519-1522, 2014
2. Matsumoto T, Goto M, Murakami H, Tanaka T, Nishiyama H, Ono E, Okada C, Sawabe E, Yagoshi M, Yoneyama A, Okuzumi K, Tateda K, Misawa N, Yamaguchi K: Multicenter study to evaluate bloodstream infection by *Helicobacter cinaedi* in Japan. J Clin Microbiol 45: 2853-2857, 2007
3. Rimbara E, Mori S, Kim H, Matsui M, Suzuki S, Takahashi S, Yamamoto S, Mukai M, Shibayama K: *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* transmission in a hospital from 2008 to 2012. J Clin Microbiol 51: 2439-2442, 2013
4. Minauchi K, Takahashi S, Sakai T, Kondo M, Shibayama K, Arakawa Y, Mukai M: The nosocomial transmission of *Helicobacter cinaedi* infections in immunocompromised patients. Intern Med 49: 1733-1739, 2010
5. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, Clark C, MacFarquhar J, Walton AL, Reller LB, Sexton DJ: Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. Ann Intern Med 137: 791-797, 2002

## (9) 腫瘍性疾患

### 胃癌リスクバイオマーカーである trefoil factor3 の臨床的意義の検討 - ピロリ菌除菌による胃癌リスクバイオマーカーへの影響 -

貝瀬 満

#### 【要約】

ESDを行った胃がん334例をピロリ菌（HP）現感染155例とHP除菌後179例に分けて、HP除菌による胃がんリスクマーカーに対する影響を検討した。自治体検診で採用されているペプシノーゲン（PG）法陽性率は、現感染群71%に対して除菌群16%と著しく低下した。除菌後10年以上経過して発症した胃がんでの陽性率は0%であった。一方、血清trefoil factor3（TFF3）陽性率は現感染群54%、除菌群56%であり、除菌後5年以内・5-10年・10年以降群で各々56%、56%、61%であり、除菌の影響を受けないことが明確となった。HP除菌が広く普及し、除菌後胃がんが増加すると考えられており、血清TFF3は胃がんリスクマーカーの重要な選択肢となることが示された。

#### 【背景および目的】

血清TFF3は効率的な胃癌リスクバイオマーカーとなり<sup>1)</sup>、HP除菌による影響がPG法に比して少ないことを報告してきた<sup>2)</sup>。これまで行ったピロリ菌除菌に関する検討は、非胃癌症例（慢性

胃炎、消化性潰瘍）における除菌前後の変動に関するものであり、多数例を用いた胃癌患者での報告はなされていない。そこで、多数例の胃癌患者を対象にHP除菌のリスクマーカーである血清TFF3やPG法への影響を検討した。

#### 【方法】

2011-2015年の期間に、胃癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）を目的に虎の門病院に入院した患者を対象とした。正確なHP除菌歴が確認でき、HPの感染状態を血清HP抗体および便中HP抗原で評価し、血清TFF1・TFF2・TFF3・ペプシノーゲン（PG）I・PGIIを測定した。リスクありの判定は、PG陽性（PGI/II比<3かつPGI<50）、TFF3高値（TFF3 $\geq$ 7）で行った。

#### 【結果】

表1に示すように胃癌リスクマーカーとして自治体の胃癌リスク検診にも採用されているPG陽性率は、除菌後胃癌では16%と低く、特に除菌長期経過とともにその陽性率が著しく低下した。

血清TFF3陽性率はHP現感染ではPG法に劣

表1 各グループ別の胃癌リスクマーカー

	n	年齢	TFF1	TFF2	TFF3	TFF3>7	PG陽性率
HP現感染	155	68.7 $\pm$ 10.4	2.47 $\pm$ 2.25	4.37 $\pm$ 2.68	8.47 $\pm$ 7.84	54.2%	71.0%
除菌後胃癌	179	70.2 $\pm$ 9.4	1.08 $\pm$ 1.38	3.26 $\pm$ 2.14	8.42 $\pm$ 4.47	55.9%	16.2%
除菌5年以内	109	69.7 $\pm$ 9.7	1.17 $\pm$ 1.72	3.22 $\pm$ 2.45	8.37 $\pm$ 4.47	55.9%	22.0%
除菌5-10年	52	70.5 $\pm$ 9.8	0.91 $\pm$ 0.43	3.16 $\pm$ 1.07	8.43 $\pm$ 4.93	55.8%	10.6%
除菌10年以降	18	72.1 $\pm$ 6.4	1.03 $\pm$ 0.58	3.85 $\pm$ 2.79	8.67 $\pm$ 2.70	61.1%	0%
除菌後初発癌	93	67.6 $\pm$ 10.2	0.88 $\pm$ 0.54	3.09 $\pm$ 1.56	7.04 $\pm$ 2.93	36.6%	16.1%
除菌後異時多発癌	86	72.9 $\pm$ 7.7	1.30 $\pm$ 1.88	3.44 $\pm$ 2.63	9.90 $\pm$ 5.30	76.7%	16.3%

るものの、除菌後でも55%程度の感度を維持していた。この感度は除菌後長期経過しても変化しないことが確認できた。

HP除菌後胃癌を、「非胃癌疾患（慢性胃炎など）に対して除菌し除菌後に初めて胃癌が発症した初発癌」と「早期胃癌治療後に除菌し除菌後に別部位に胃癌が発生した異時多発癌」に分けて検討すると、初発癌では異時多発癌に比して優位にTFF3陽性率が低かった。初発癌では胃粘膜萎縮の中等度以下である率が高く、これが両群のTFF3の差となったと推測した。

#### 【考察】

HP除菌が広く行われるようになった現状では、自治体検診で採用されているPG法による胃癌リスクマーカーには感度低下の課題が明確となった。血清TFF3は除菌後も約55%の感度で胃

癌リスクマーカーなり得るが、萎縮の少ない場合に感度が低くなる課題が明らかとなった。

#### 【文献】

1. Kaise M, Miwa J, Tashiro J, et al.: The combination of serum trefoil factor 3 and pepsinogen testing is a valid non-endoscopic biomarker for predicting the presence of gastric cancer: a new marker for gastric cancer risk. *J Gastroenterol* 46: 736-745, 2011
2. Kaise M, Miwa J, Fujimoto A, et al.: Influence of *Helicobacter pylori* status and eradication on the serum levels of trefoil factors and pepsinogen test: serum trefoil factor 3 is a stable biomarker. *Gastric Cancer* 16: 329-337, 2013

# 新規治療法の開発に向けて：子宮間葉系腫瘍幹細胞の単離と生物学的特性

林 琢磨<sup>1, 2</sup>、市村 友季<sup>3</sup>、河野 弥季<sup>2</sup>、金井 弥栄<sup>4</sup>、塩沢 丹里<sup>1</sup>  
油谷 浩幸<sup>5</sup>、利根川 進<sup>6</sup>、八重樫 伸生<sup>7</sup>、小西 郁生<sup>8</sup>  
信州大学学術研究院医学系<sup>1</sup>、国際医療福祉大学成田医療学部<sup>2</sup>  
大阪市立大学医学部産婦人科<sup>3</sup>、慶応義塾大学医学部病理講座<sup>4</sup>  
東京大学先端科学研究センター<sup>5</sup>、マサチューセッツ工科大学生物学<sup>6</sup>  
東北大学附属病院<sup>7</sup>、京都医療センター<sup>8</sup>

## 【要約】

子宮平滑筋肉腫（子宮肉腫）は、再発・転移を繰り返す難治性腫瘍である。人種を問わず成人女性の多くに発症する子宮平滑筋腫（子宮筋腫）と子宮肉腫との鑑別が極めて難しく、子宮肉腫への治療法は外科的手法に限定されている。そのため、延命効果が認められる分子標的治療法の確立が要望されている。私達は、プロテアソーム構成因子LMP2の欠損マウスで、子宮肉腫が高頻度に自然発症することを報告した。そこで、私達は、病理ファイルより選別された各種子宮間葉系腫瘍の生検組織でのLMP2の発現状況について免疫組織化学染色により検討し、特異的に子宮肉腫でLMP2の発現が著しく減弱することを報告した。悪性腫瘍幹細胞は、通常の悪性腫瘍細胞より強い抗腫瘍剤耐性や放射線耐性を有するため、悪性腫瘍幹細胞の存在は、既存の抗腫瘍剤や放射線治療後の悪性腫瘍の再発の大きな原因と考えられている。現在、私達は、外科的に摘出されたヒト子宮肉腫組織より幹様細胞を単離して、子宮肉腫幹様細胞の生物学的特徴について検討を行っている。これまでの実験成果より、子宮肉腫細胞と比較して、子宮肉腫幹様細胞は、強い血行性転移能を有していることが明らかとされた。

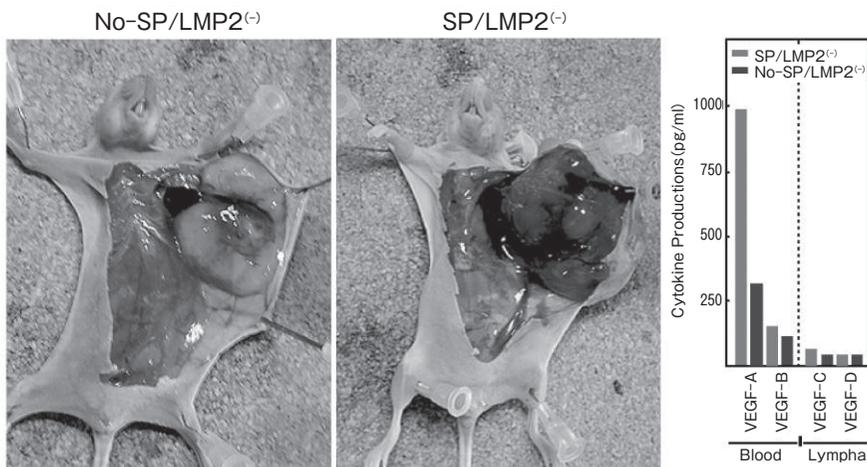
## 【目的】

子宮平滑筋肉腫（子宮肉腫）は、再発・転移を繰り返す難治性婦人科腫瘍であり、子宮肉腫の発症機序については不明な点が多い<sup>1, 2</sup>。臨床所見では、子宮肉腫は、子宮平滑筋腫（子宮筋腫）と

併発しており、子宮肉腫単独での発症は稀である<sup>3, 4</sup>。子宮肉腫と子宮筋腫に対する最善の治療法は外科的治療である。今日の社会的背景より、子宮温存が求められるため、これら子宮間葉系腫瘍に対する効果的な治療法の確立が必須である。悪性腫瘍幹細胞は、通常の悪性腫瘍細胞より強い抗腫瘍剤耐性や放射線耐性を有するため、既存の抗腫瘍剤や放射線治療後の悪性腫瘍の再発の大きな原因は、悪性腫瘍幹細胞の存在と考えられている。私達は、外科的摘出組織より正常ヒト子宮平滑筋細胞、ヒト子宮筋腫、ヒト子宮肉腫の3種の幹様細胞を単離して、各幹様細胞での生物学的特徴の差異について検討を行っている。そして、得られた研究成果を子宮間葉系腫瘍に対する新規治療法の開発に還元することが本研究の目的である。

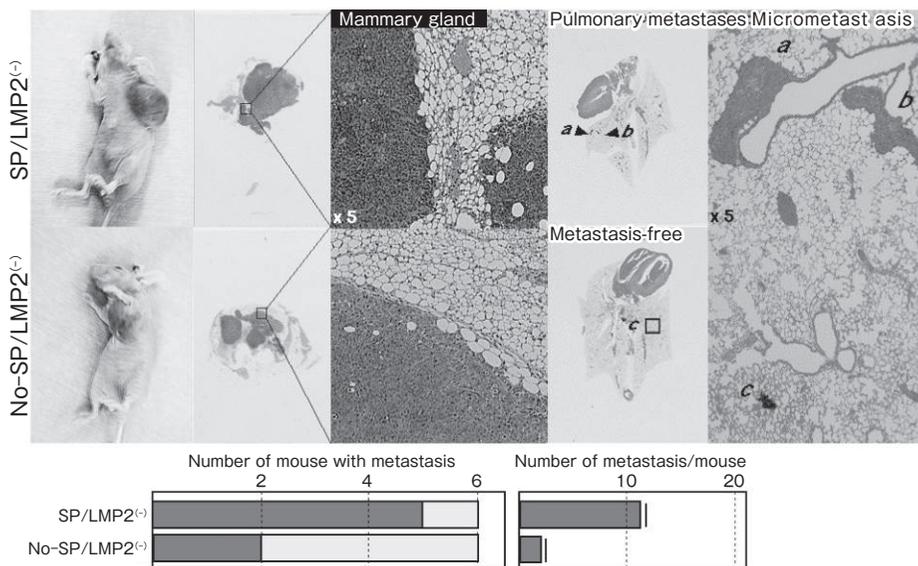
## 【方法】

特異的な幹細胞マーカー（CD133、CD34、CD44）やABC transporterの色素選択性を利用したside population（SP）が、腫瘍幹細胞の選択方法として広く活用されている。これまで、私達は、LMP2欠損マウスで自然発症した子宮肉腫が血行性転移能を有することを見出した（利根川進教授MITの研究協力）<sup>5-8</sup>。既報の方法により、ヒト子宮肉腫組織より樹立されたヒト子宮肉腫細胞SK-LMSより、さらにLMP2が発現されていない子宮肉腫細胞（SK-LMS/LMP2<sup>(-)</sup>）を単離する<sup>9, 10</sup>。SK-LMS/LMP2<sup>(-)</sup>から、side population法により子宮肉腫の幹様細胞（SP/



Xenografting: Intracutaneous injection with  $1 \times 10^6$  cells of SP/LMP2<sup>(-)</sup> or No-SP/LMP2<sup>(-)</sup> at Second mammary fatpad left site of 10weeks old-BALB/c nude mice under the standard maintenance condition. Date of Xenograft of SP or No-SP cells: February 18, 2013. Mice were sacrificed for pathological examinations at April 18, 2012. Date of the pathological studies: June 16, 17, 2015. ELISA with tumorextracts collected from BALB/c nude mice were performed using OptEIA™ Set, human VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D. (BD Pharmingen, CA, USA). Date of operation: ELISA, June 26-28, 2015.

図1 血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞にตอบสนองするSP/LMP2<sup>(-)</sup>とNo-SP/LMP2<sup>(-)</sup>由来の各種増殖因子を測定した結果、血管内皮細胞増殖因子VEGF-AがSP/LMP2<sup>(-)</sup>より著しく分泌されていることが明らかとされた。ヌードマウスを用いた移植実験より、造腫瘍能は、SP/LMP2<sup>(-)</sup>とNo-SP/LMP2<sup>(-)</sup>共に同一値で認められた。



Xenografting: Intracutaneous injection with  $1 \times 10^7$  cells of SP/LMP2<sup>(-)</sup> or No-SP/LMP2<sup>(-)</sup> at Second mammary fat pad left site of 10weeks old-BALB/c nude mice under the standard maintenance condition. Date of Xenograft: February 18, 2015. Mice were sacrificed for pathological examinations at April 18, 2015. Date of the pathological studies: June 16, 17, 2015.

図2 ヌードマウスを用いた移植実験より、造腫瘍能は、SP/LMP2<sup>(-)</sup>とNo-SP/LMP2<sup>(-)</sup>共に同一値で認められた。注目すべき点として、SP/LMP2<sup>(-)</sup>の移植マウスにおいて、肺胞組織内での微少転移巣が、有意に多く認められた(a, b)。子宮肉腫細胞と比較して、子宮肉腫幹様細胞は、新生血管形成の誘導能を有し、高い血行性転移能を有していることが明らかとされた。

LMP2<sup>(-)</sup> とその他の細胞 (No-SP/LMP2<sup>(-)</sup>) を分離する。SP/LMP2<sup>(-)</sup> と No-SP/LMP2<sup>(-)</sup> を免疫欠損マウス (BALB/c *nu/nu*) の第二乳腺内にそれぞれ移植し、SP/LMP2<sup>(-)</sup> の生物学的特性を検討する。

#### 【結果】

血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞に応答する SP/LMP2<sup>(-)</sup> と No-SP/LMP2<sup>(-)</sup> 由来の各種増殖因子を測定した結果、血管内皮細胞増殖因子 VEGF-A が SP/LMP2<sup>(-)</sup> から著しく分泌されていることが明らかとされた (図1)。ヌードマウスを用いた移植実験の結果より、造腫瘍能は、SP/LMP2<sup>(-)</sup> と No-SP/LMP2<sup>(-)</sup> 共にほぼ同一値で認められた。注目すべき点として、No-SP/LMP2<sup>(-)</sup> の移植マウスと比較して、微少転移巣が、SP/LMP2<sup>(-)</sup> の移植マウスの肺胞組織内で有意に多く認められた (図2)。

#### 【考察】

子宮肉腫細胞と比較して、子宮肉腫幹様細胞は、新生血管形成の誘導能を有し、高い血行性転移能を有していることが明らかとされた。これら子宮肉腫幹様細胞の特徴は、子宮肉腫に対する新規治療法・診断法の開発への糸口になる可能性があるため、私達は子宮肉腫幹様細胞の生物学的性質についてさらに詳細な検討を行っている。本研究助成は、難治性子宮間葉系腫瘍である子宮肉腫に対する新規診断法と治療法の確立を目的とした基礎及び臨床研究に役立てられた。

他施設共同研究事業 (信州大学、京都大学、東京大学、東北大学、大阪市立大学、国立がんセンター、慶応義塾大学、兵庫県立がんセンター、SIGMA-Aldrich 社)

#### 【文献】

1. Wu TI, Chang TC, Hsueh S, Hsu KH, Chou HH, Huang HJ, Lai CH: Prognostic factors and impact of adjuvant chemotherapy for uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol* 100: 166-172, 2006
2. Leitao MM, Soslow RA, Nonaka D, Olshen AB, Aghajanian C, Sabbatini P, Dupont J, Hensley M, Sonoda Y, Barakat RR, Anderson S: Tissue microarray immunohistochemical expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors in uterine leiomyomata and leiomyosarcoma. *Cancer* 101: 1455-1462, 2004

tochemical expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors in uterine leiomyomata and leiomyosarcoma. *Cancer* 101: 1455-1462, 2004

3. Kurma RJ: Pathology of the Female Genital Tract, 4th ed. Springer-Verlag 4: 499, 2001
4. Diagnostic Criteria for LMS, Adapted from 2003 WHO Guidelines. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press (France), 2003
5. Hayashi T, Faustman D: Development of spontaneous uterine tumors in low molecular mass polypeptide-2 knockout mice. *Cancer Research* 62: 24-27, 2002
6. Hayashi T, Kobayashi Y, Kohsaka S, Sano K: The mutation in ATP-binding region of JAK1, identified in human uterine leiomyosarcomas, results in defective interferon- $\gamma$  inducibility of TAP1 and LMP2. *Oncogene* 25: 4016-4026, 2006
7. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Nagase S, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Shiozawa T, Konishi I: Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy. *Scientific Reports* 1: 180, 2011
8. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Nagase S, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Shiozawa T, Tonegawa S, Konishi I: Potential role of LMP2 as an anti-oncogenic factor in human uterine leiomyosarcoma: morphological significance of calponin h1. *FEBS Letters* 586: 1824-1831, 2012
9. Hayashi T, Ichimura T, Yaegashi N, Shiozawa T, Konishi I: Expression of CAVEOLIN 1 in uterine mesenchymal tumors: no relationship between malignancy and CAVEOLIN 1 expression. *Biochem Biophys*

Res Commun 463: 982-987, 2015

10. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Ichimura T, Sudo T, Ishiko O, Yaegashi N, Aburatani H, Konishi I: Potential diagnostic

biomarkers: LMP2/  $\beta$  1 i and Cyclin B1 differential expression in human uterine mesenchymal tumors. TUMORI 100: 509-516, 2014

## (10) 口腔ケア

### 非血縁造血細胞移植患者の口腔ケアにおけるレバミピドの効果に関する研究

水谷(吉村)美枝子、杉崎 順平、内田 直之、谷口 修一

#### 【要約】

造血細胞移植患者の口腔粘膜炎の発生頻度や重症度に対するレバミピド含嗽剤の予防効果について検討した。レバミピドの薬剤特有の苦みの影響で継続できない症例もあったが、口腔粘膜炎に対する予防効果が示唆された。

#### 【目的】

造血細胞移植を受ける患者の75～80%に口腔粘膜炎が発生するとの報告がある<sup>1)</sup>が、現在のところ、その発生や重症化の予防に対し、明確なエビデンスのある薬剤はない。一方、胃粘膜保護薬として頻繁に使用されるレバミピドには、局所的粘膜保護作用があるとされ<sup>2)</sup>、近年は点眼薬としても用いられるようになってきた。化学・放射線療法患者に対し、レバミピドを含嗽や内服など、何らかの形で口腔粘膜に作用させたことにより口腔粘膜炎の発生や重症化を予防できたという報告がある<sup>3,4)</sup>。しかし、これらの報告はレバミピドにシロップやグリセリンを混和したものを使用しており、レバミピド単体ではない。また、造血細胞移植後に生じる口腔粘膜炎に対するレバミピドの効果も今のところ報告されていない。そこで我々は、非血縁造血細胞移植患者に対するレバミピドのみを滅菌水で溶解したレバミピド含嗽剤が口腔粘膜炎の発生頻度、重症度に与える効果をレバミピド含嗽剤を使用しなかった場合と比較することを目的とした。

#### 【方法】

2014年8月から2015年8月までの間に当院において非血縁造血細胞移植の予定で歯科外来を受診した成人患者で、研究内容を理解し、文書による同意を得たのち、実際にレバミピド含嗽剤を試し、協力が得られることを確認できた患者23名

を対象とした。含嗽剤は前処置開始時より使用開始とし、1日6回の含嗽を移植後28日目まで行うことを目標とした。口腔粘膜炎はクリーンルーム入室期間中にCommon Terminology Criteria for Adverse Events ver.3 (CTCAE ver.3)を用いて歯科医師が週一回評価した。調査期間内に当院で非血縁造血細胞移植を用い、レバミピド含嗽剤を使用しなかった患者(対照群)と口腔粘膜炎の発生と重症化を比較した。統計は $\chi^2$ 乗検定とマンホイットニーU検定を用いた。なお、当研究は虎の門病院の研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

#### 【結果】

研究への同意と協力が得られた23人(同意取得群)のうち、7人が嘔気を理由として中断し、残りの16人(施行群)は前処置開始日より含嗽を開始し、1日2-6回(中央値4回)含嗽を行い、移植後8-28(中央値17.5日)の間含嗽を行った。移植後28日まで含嗽を継続できた患者は1人のみであった。なお、レバミピド含嗽剤を中断した患者は、従来通りアズレンを用いた含嗽を行った。施行群の患者背景は、男性9名、女性7名、年齢は21-69歳(中央値52.5歳)であった。一方、対照群の患者背景は男性59名、女性41名、年齢は17-73歳(中央値52.0歳)であった。移植ソースはどちらの群においても臍帯血移植が多く、次いで非血縁者間骨髄移植、末梢血幹細胞移植の順であった。前処置は骨髄破壊の処置か骨髄非破壊的処置かで分類し、移植片対宿主病(Graft-versus-Host-Disease GVHD)予防でメトトレキサート(MTX)を用いたかどうかで分類した。同意取得群においてグレード3以上の口腔粘膜炎の発生はわずか1名にとどまり、グレード2の口

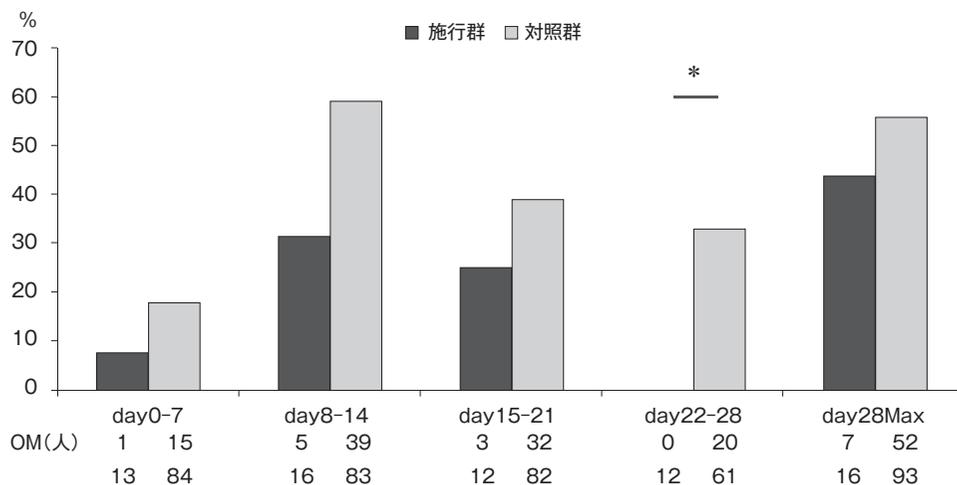


図1 Grade2以上のOMの発生率の比較

口腔粘膜炎の発生も全体の3分の1未満となった。対照群とグレード2以上の口腔粘膜炎の発生率の比較を行ったところ、同意取得群において口腔粘膜炎の発生率が低い傾向があり、特に移植後22日から28日までの期間においては有意に低い発生率だった(図1)。

【考察】

今回の研究では、あらかじめ試験的にレバミピド含嗽剤を使用したうえで研究に協力できるか確認していたが、レバミピドの薬剤特有の苦みにより、研究に対する同意は得られたものの辞退する患者が全体の約3分の1に至った。移植後28日目まで含嗽を継続できた例はわずか1例で、一旦協力が得られた患者であっても、苦みにより嘔気が誘発されるなどの理由で中断する例も多数認められた。一方、同意取得群ではグレード2以上の口腔粘膜炎はほとんど発生せず、対照群と比較して移植から28日目の中重度から重症の口腔粘膜炎の発生を減らす可能性があることが示された。今後は患者負担が少なく、苦みを軽減させるような含嗽剤の導入を検討し、更なる症例の蓄積と検討

を行いたいと思う。

【文献】

1. Sonis ST, Oster G, Fuchs H, Bellm L, Bradford WZ, Edelsberg J, et al: Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. J Clin Oncol 19: 2201-2205, 2001
2. 医薬品医療機器情報提供ホームページ <http://www.info.pmda.go.jp/>
3. 安田卓史 他: 口腔癌の化学・放射線療法による口腔粘膜炎に対するRebamipide含嗽液の使用経験. 癌と化学療法 35: 1157-1161, 2008
4. 鍋田いづみ 他: Anthracyclin系抗がん剤含有化学療法(乳腺領域)にともなう口内炎に対するrebamipideの予防効果. 日病薬誌 46: 1629-1634, 2010

【発表に関する事項】

水谷美枝子 他: 非血縁造血幹細胞移植患者におけるレバミピド含嗽剤の効果. 第38回日本造血細胞移植学会(名古屋)

## (11) 皮膚疾患

### 制御性T細胞欠損によって誘導される皮膚自己抗体の解析

氏家 英之<sup>1</sup>、村松 憲<sup>2</sup>

北海道大学病院皮膚科<sup>1</sup>

北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野<sup>2</sup>

#### 【要約】

水疱性類天疱瘡は高齢者に好発する最も頻度の高い自己免疫性水疱症で、表皮基底膜構成タンパクである17型コラーゲン (COL17) とBP230に対する自己抗体によって、全身に水疱と浮腫性紅斑が生じる。水疱性類天疱瘡の発症誘因は未だ不明であるが、制御性T細胞の関与が示唆されている。本研究では、制御性T細胞欠損によって発症するScurfyマウスとIPEX症候群患者の体内に誘導される皮膚自己抗体を解析した。蛍光抗体直接法ではScurfyマウスには表皮基底膜部に対する自己抗体が産生されていることが明らかとなった。1モル食塩水剥離皮膚を用いた蛍光抗体間接法ではIgGは表皮側に陽性を示した。次に、表皮側の表皮基底膜部タンパクであり、かつ水疱性類天疱瘡の標的抗原であるCOL17とBP230に対するScurfyマウス血清の反応性をウエスタンブロット法で調べたところ、一部のScurfyマウスではCOL17あるいはBP230に対する自己抗体が産生されていることが明らかとなった。次に、IPEX症候群の患者血清を用いて血清中の自己抗体の検出を行ったところ、一部の症例ではCOL17あるいはBP230に対する自己抗体が検出された。以上より、制御性T細胞の機能異常が水疱性類天疱瘡の標的抗原に対する自己抗体を誘導し得ることが、in vivoの系で明らかとなった。

#### 【目的】

水疱性類天疱瘡は自己免疫性水疱症で最も頻度の高い疾患で、高齢者に好発する。表皮基底膜構成タンパクである17型コラーゲン (COL17) とBP230に対する自己抗体によって、全身に水疱と浮腫性紅斑が生じる<sup>1)</sup>。治療は免疫抑制療法で

あるが、高齢者は副作用が生じやすく、しばしば治療に難渋する。自己抗体の産生が誘導・維持される機序は未だ不明であり、その解明は今後の疾患特異的治療法の開発に必要不可欠である。今回我々はその機序解明に向けて制御性T細胞に着目した。制御性T細胞は自己免疫応答を抑制する働きを持ち、末梢性自己免疫寛容の要と考えられている。制御性T細胞のマスター遺伝子はFoxp3であり、X染色体上に存在する。このFoxp3の遺伝子変異により制御性T細胞の機能不全が生じ、マウスではScurfyマウスとなり<sup>2)</sup>、ヒトではimmunodysregulation、polyendocrinopathy、enteropathy、X-linked (IPEX) 症候群となり<sup>3)</sup>、いずれも重篤な皮膚炎を呈する。ScurfyマウスとIPEX症候群の検体を用いることで、水疱性類天疱瘡における自己抗体産生と制御性T細胞機能不全の関連について検討することとした。本研究では、制御性T細胞欠損、すなわちScurfyマウスとIPEX症候群患者に誘導される皮膚自己抗体を解析する。

#### 【方法】

##### (1) Scurfyマウス血中自己抗体の解析

Foxp3遺伝子変異をヘテロで有するメスと、野生型マウスのオスを交配させることで、オスの仔の半数がScurfyマウスとして得られる。Scurfyマウスを生後21日目に処分し、血液と皮膚を採取した。皮膚はホルマリン固定ののち、H&E染色を行う。また、皮膚組織をOCTコンパウンドに包埋し液体窒素で凍結し、薄切して凍結切片を作製した。それをブロッキングしたのち、蛍光色素付きの抗マウスIgG抗体で1時間室温で染色した (蛍光抗体直接法)。

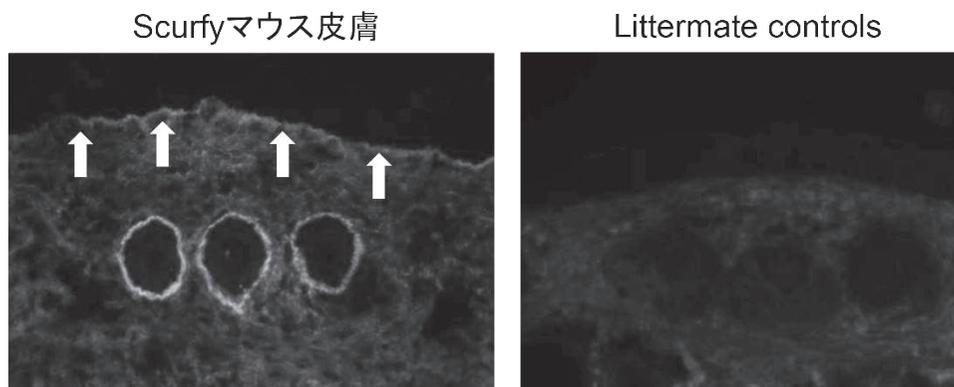


図1 蛍光抗体直接法。左：Scurfy マウス皮膚。IgG が表皮基底膜部に線状に沈着している（矢印）。右：Littermate control 皮膚。IgG の沈着は見られない。

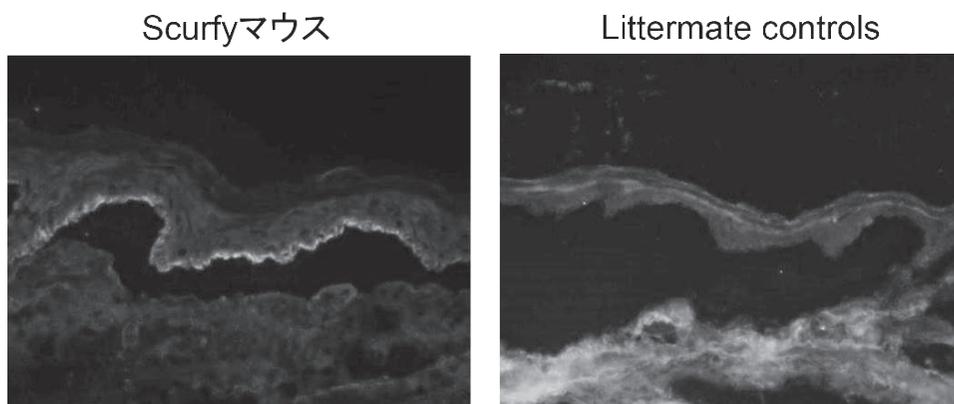


図2 1モル食塩水剥離皮膚を用いた蛍光抗体間接法。左：Scurfy マウス血清 IgG は表皮側に陽性。右：Littermate control 血清。IgG の沈着は見られない。

また、血液を遠心分離して血清を採取し、50倍希釈したものを正常マウス皮膚凍結切片にのせて1時間室温でインキュベートした。その後、蛍光色素付きの抗マウスIgG抗体で1時間室温で染色した（蛍光抗体間接法）。同様の染色を、1M食塩水剥離マウス皮膚を用いて行った（1モル食塩水剥離皮膚を用いた蛍光抗体間接法）。

次に、表皮基底膜部構成タンパクである、マウスCOL17リコンビナントタンパクを作製し、それを基質として、25倍希釈したScurfyマウス血清でウエスタンブロット（WB）を行った。また、同じく表皮基底膜部構成タンパクであるマウスBP230リコンビナントタンパクをBP230-1（N

末端）、BP230-2（Rod domain）、BP230-3（C末端）と3分割して作製し、COL17と同様にWBを行った。

#### (2) IPEX 患者血中自己抗体の解析

水疱性類天疱瘡自己抗原であるCOL17およびBP230のELISAキット（MBL社、名古屋）を用いてIPEX症候群患者の血清抗体価を測定した。

#### 【結果】

H&E染色ではScurfyマウスにはinterface dermatitisが生じており、蛍光抗体直接法ではマウスIgGは6/10匹で表皮基底膜部に線状に沈着していた（図1）。蛍光抗体間接法ではマウスIgGは11/11匹で同部位に陽性を示した。1モル食塩

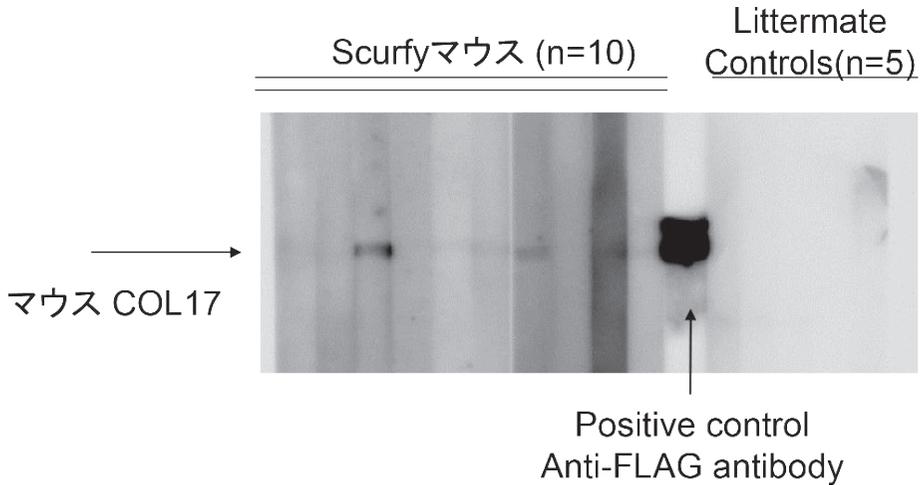


図3 マウスCOL17のリコンビナントタンパクを用いたウエスタンブロット法。Scurfyマウス血清は4/10匹で陽性であった。

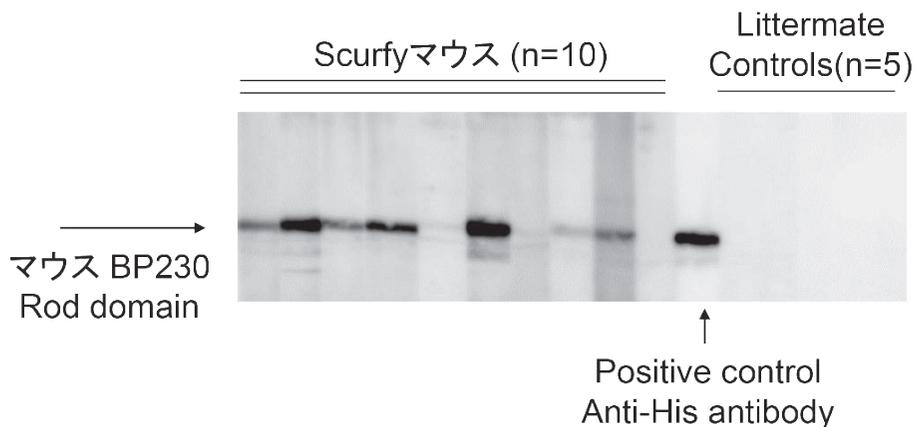


図4 マウスBP230のRod domainのリコンビナントタンパク質を用いたウエスタンブロット法。Scurfyマウス血清は9/10匹で陽性であった。

水剥離皮膚を用いた蛍光抗体間接法ではマウスIgGは11/11匹で表皮側に陽性を示した(図2)。以上の結果から表皮側の基底膜タンパクに対する自己抗体が生じていると考えられた。そこで、表皮側の基底膜タンパクであり、かつ水疱性類天疱瘡の標的抗原であるCOL17とBP230に対するScurfyマウス血清の反応性を調べた。マウスCOL17のリコンビナントタンパクを用いたウエスタンブロット法(WB)では4/10匹で陽性であった(図3)。またマウスBP230をBP230-1(N

末端)、BP230-2(Rod domain)、BP230-3(C末端)と3分割したリコンビナントタンパク質を用いたWBではそれぞれ4/10匹(BP230-1)、9/10匹(BP230-2)、0/10匹(BP230-3)で陽性であった(図4)。次に、IPEX症候群の患者血清を用いて血清中の自己抗体の検出を試みた。IPEX症候群の患者血清はCOL17NC16a(MBL)のELISAでは3/5例で、BP230(MBL)のELISAでは1/5例でcut offで陽性であった。

## 【考察】

制御性T細胞の機能不全が自己免疫疾患の発症に関わることはこれまで多数の研究で示唆されている。水疱性類天疱瘡においては、IPEX (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) 症候群患者に水疱性類天疱瘡が合併した報告や<sup>4)</sup>、水疱性類天疱瘡患者末梢血の制御性T細胞が減少しているという研究結果は<sup>5)</sup>、水疱性類天疱瘡発症における制御性T細胞の関与を示唆している。一方、水疱性類天疱瘡病変部皮膚の制御性T細胞を免疫組織化学染色で観察した研究では、制御性T細胞の増加<sup>6)</sup>や減少<sup>7)</sup> いずれの報告もあり、結果が一定していない。これまで水疱性類天疱瘡における動物モデルを用いた制御性T細胞の研究は報告されていない。

以前に、Scurfyマウスにおける皮膚の標的抗原としてケラチン14が報告されているが<sup>8)</sup>、ヒトにおいてケラチン14に対する自己免疫性皮膚疾患は報告されておらず、その病的意義は不明である。本研究の結果から、制御性T細胞の機能不全は、表皮基底膜部への自己抗体を誘導し、その標的抗原はマウスとヒトいずれにおいてもCOL17、BP230を含むことが明らかになった。よって、COL17とBP230に対する自己抗体の誘導、すわなち水疱性類天疱瘡の発症には制御性T細胞の機能不全が関与していることが示唆された。今後、水疱性類天疱瘡マウスモデルおよび水疱性類天疱瘡患者の制御性T細胞の機能解析を進め、発症機序の解明を目指す。

## 【文献】

1. Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shimizu H: What's new in bullous pemphigoid?. *J Dermatol* 37: 194-204, 2010
2. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, et al: X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27: 18-20, 2001
3. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD: The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27: 20-21, 2001
4. McGinness JL, Bivens MM, Greer KE, Patterson JW, Saulsbury FT: Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) associated with pemphigoid nodularis: a case report and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 55: 143-148, 2006
5. Quaglino P, Antiga E, Comessatti A, Caproni M, Nardò T, Ponti R, et al: Circulating CD4<sup>+</sup> CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T-cells are significantly reduced in bullous pemphigoid patients. *Arch Dermatol Res* 304: 639-645, 2012
6. Rensing-Ehl A, Gaus B, Bruckner-Tuderman L, Martin SF: Frequency, function and CLA expression of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in bullous pemphigoid. *Exp Dermatol* 16: 13-21, 2007
7. Antiga E, Quaglino P, Volpi W, Pierini I, Del Bianco E, Bianchi B, et al: Regulatory T cells in skin lesions and blood of patients with bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 28: 222-230, 2014
8. Huter EN, Natarajan K, Torgerson TR, Glass DD, Shevach EM: Autoantibodies in scurfy mice and IPEX patients recognize keratin 14. *J Invest Dermatol* 130: 1391-1399, 2010

## (12) 泌尿器疾患

### リンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌患者の有病率の推定およびその生物学的・病理学的特徴の検討

浦上 慎司、井下 尚子、美山 優、黒澤 和宏  
阪口 和滋、安食 春輝、永本 将一、岡 優  
木脇 圭一、藤井 丈士、岡根谷 利一

#### 【要約】

リンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌患者の有病率を推定し、その生物学的および病理学的特徴を検討した。腎尿管全摘を施行された105例の上部尿路上皮癌を対象とした。改訂ベセスダ基準を満たした症例は20%であった。MLH1, MSH2, MSH6, PMS2の4つのミスマッチ修復タンパクの免疫染色結果より、リンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌の有病率は5% (5例) と推定された。3/5症例は、上部尿路上皮癌が高齢で初発として発生しており、改訂ベセスダ基準を満たしていなかった。その他の臨床的特徴としては女性・尿管・低悪性度・低浸潤度が多く、MSH2/6欠失パターンを3/5例に認めた。病理学的には内反性乳頭腫に類似した異型の弱い尿路上皮癌や茎の細い、丈の高いvillousな乳頭状尿路上皮癌など特徴的な組織型を示すものが多かった。以上の検討により、リンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌の生物学的および病理学的特徴を把握することが可能となった結果、今後これら上部尿路上皮癌に対する有効な治療法や予防法やサーベイランスの確立につながる可能性がある。

#### 【目的】

リンチ症候群は (Lynch syndrome) はミスマッチ修復 (mismatch repair) 遺伝子であるMLH1, MSH2, MSH6, PMS2の4つの遺伝子のいずれかの生殖細胞系列変異を主な原因とし、ミスマッチ修復機構が損なわれる結果、大腸癌をはじめとする様々な臓器に悪性腫瘍が発生する常染色体優性遺伝性疾患である。このリンチ症候群関連腫瘍としては直腸結腸癌、子宮内膜癌、胃

癌、卵巣癌、膀胱癌、尿管・腎盂癌、胆道癌、脳腫瘍 (通常はTurcot症候群で見られる膠芽腫)、Muir-Torre症候群における皮脂腺腫や角化棘細胞腫、小腸癌が知られている。

リンチ症候群の診断は、家族歴や癌の既往歴やその発症年齢など臨床病理学的情報を元に作成された臨床診断基準である改訂アムステルダム基準や改訂ベセスダガイドラインを用いて、まず1次スクリーニングとしてそれに合致するかどうかを判断し、次に2次スクリーニングとして、腫瘍組織のマイクロサテライト不安定検査 (MSI検査) あるいはミスマッチ修復タンパク4種類の免疫組織染色を行って、リンチ症候群の候補を絞り込み、遺伝カウンセリングを行ったうえで、最終的に3次スクリーニングとしてミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列変異の遺伝子検索を行って、リンチ症候群の確定診断を行う。

リンチ症候群は、原因遺伝子が同定される以前、大腸癌以外の多臓器に発癌する特徴が知られるようになる前は、かつては遺伝性非ポリポシス性大腸癌 (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) と呼ばれていた。したがって、大腸癌における研究は古くから行われており、全大腸癌の約3%程度がリンチ症候群であることなど、臨床的および病理学的特徴はよく検討されている。

一方、リンチ症候群における上部尿路上皮癌の発生率は5-28%で、一般集団における発生率の約20倍高率であることが報告されているが<sup>1)</sup>、全上部尿路上皮癌におけるリンチ症候群の有病率は不明で、その臨床的、病理学的特徴についても

全く知られていない。そこで本検討では、リンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌患者の有病率を推定し、その生物学的および病理学的特徴を検討する。

#### 【方法】

本研究は虎の門病院審査委員会 (No. 915) の承認のもとで行われた。当院で手術を受け、上部尿路上皮癌と診断された患者情報を診療録より抽出し、改訂ベセスダ基準を用いて、後ろ向き解析によりリンチ症候群に対する1次スクリーニングを試みた。

さらに、同意が得られた患者では1次スクリーニングに関係なく、摘除組織内の腫瘍組織と正常組織を用い、リンチ症候群の原因遺伝子である MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 の蛋白発現の評価を、免疫組織学的染色にて行った。手術検体のパラフィン包埋ブロックを使用し、hMLH1、hMSH2、hMSH6 および hPMS2 がコードする4つのミスマッチ修復タンパクの発現を抗体による免疫組織染色により解析した。ホルマリン固定された上部尿路癌部を含むパラフィン包埋ブロックを4  $\mu$ m に薄切し、スライドガラスに貼り付けた後、60°C で24時間乾燥させた。キシレンにて15分間脱パラフィンし、100%エタノールから段階的に脱キシレン処理後、クエン酸バッファー (pH6.0) により105°C 10分間オートクレーブ処理し抗原性の賦活化を行った。さらに内因性ペルオキシダーゼ活性除去のため過酸化水素加メタノールを用いて、室温で15分間インキュベートした後、一次抗体と反応させた。各ミスマッチ修復タンパクに対する一次抗体として、MLH1; DAKO M3640、MSH2; Cell signaling #2017、MSH6; DAKO M3646、PMS2; DAKO M3647 を希釈して用いた。染色は、DAKO Envision (Agilent Technologies Dako, Glostrup, Denmark) を使用し、diaminobenzidine (SIGMA 社、St.Louis MO、USA) で発色させた。周囲の正常粘膜における核の染色性を internal control として上部尿路上皮癌部の染色性を独立した2名の病理医により評価し、明らかに腫瘍細胞の核で染色陰性、隣接正常粘膜および間質細胞で染色陽性の場合のみを染

色結果「陰性」とした。

また、免疫染色結果「陰性」症例を染色結果「陽性」と比較することで、臨床的特徴について検討した。さらに、泌尿器専門病理医により、染色結果「陰性」症例のHE染色標本を、染色結果「陽性」症例と比較して、染色結果「陰性」症例の上部尿路上皮癌に特異的な病理学的特徴があるかを詳細に検討した。

#### 【結果】

2006年から2014年の間に当院で腎尿管全摘を施行され、同意が得られた、105例を対象とした。年齢の中央値は71歳 (範囲: 47-92)。男72%、女28%で、左右比は1:1。腎盂癌52%、尿管癌48%であった。Gradeは1:12%、2:58%、3:30%であった。52%がpT2以上の筋層浸潤癌以上であった。13例に大腸癌、16例に胃癌を合併するなど21例 (20%) が改訂ベセスダ基準を満たしていた (表1)。

免疫組織学的染色を施行したところ5例 (5%) にミスマッチ修復タンパクの欠失を認めた (表

表 1 患者背景 (n=105)

年齢		71歳 (47-92)
性別	男	76 (72%)
	女	29 (28%)
患側	右	53 (50%)
	左	52 (50%)
部位	腎盂	55 (52%)
	尿管	50 (48%)
Grade	1	12 (12%)
	2	61 (58%)
	3	32 (30%)
pT	a	18 (17%)
	is	1 (1%)
	1	31 (30%)
	2	18 (17%)
	3	35 (33%)
	4	2 (2%)
第1スクリーニング (改訂ベセスダ基準)	合致	21 (20%)

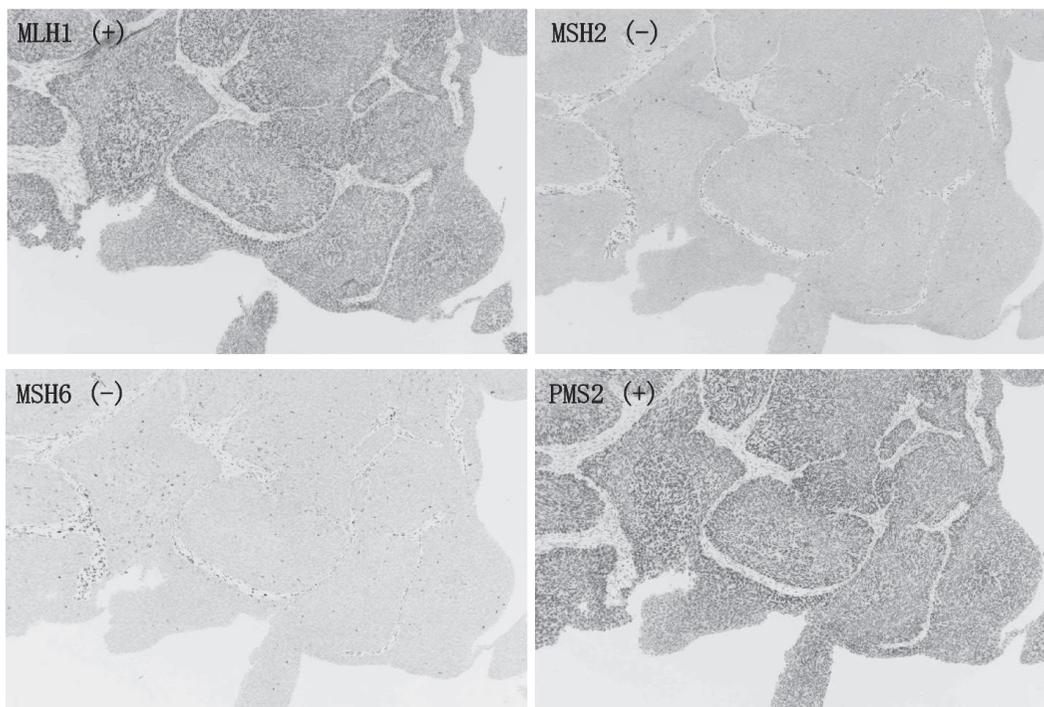


図1 代表的ミスマッチ修復タンパク欠失免疫染色例  
MSH2/6タンパクの欠失を認める。

表2 ミスマッチ修復タンパク免疫染色陰性症例一覧

症例	年齢(歳)	性別	患側	部位	Grade	pT	改訂ベセスダ基準	タンパク発現欠失	病理像
1	71	女	右	尿管	low	a	×	MSH6	Inverted growth pattern
2	72	男	左	腎盂	low	1	×	MSH2/MSH6	Villous growth pattern
3	76	女	右	尿管	low	1	×	MLH1/PMS2	Inverted growth pattern
4	61	女	左	尿管	low	1	○ 大腸癌	MSH2/MSH6	Inverted growth pattern + Villous growth pattern
5	77	女	右	尿管	low	1	○ 乳癌、胃癌、大腸癌	MSH2/MSH6	Villous growth pattern
	中央値 71歳	女 4/5	左右 同じ	尿管 4/5	All Low grade	pT2以上 0/5	ベセスダ基準 2/5	MSH2 or 6 欠損: 4/5	Inverted: 3/5 Villous: 3/5

2)。いずれかのMLH1/PMS2欠失1例、MSH2/MSH6欠失3例(図1)、MSH6単独欠失1例であった。これらのうち2例のみ大腸癌を合併してお

り改訂ベセスダ基準に合致していたが、他の3例は合致していなかった。内訳は女性4例、男性1例。上部尿路上皮癌の発生年齢は中央値71歳。左右

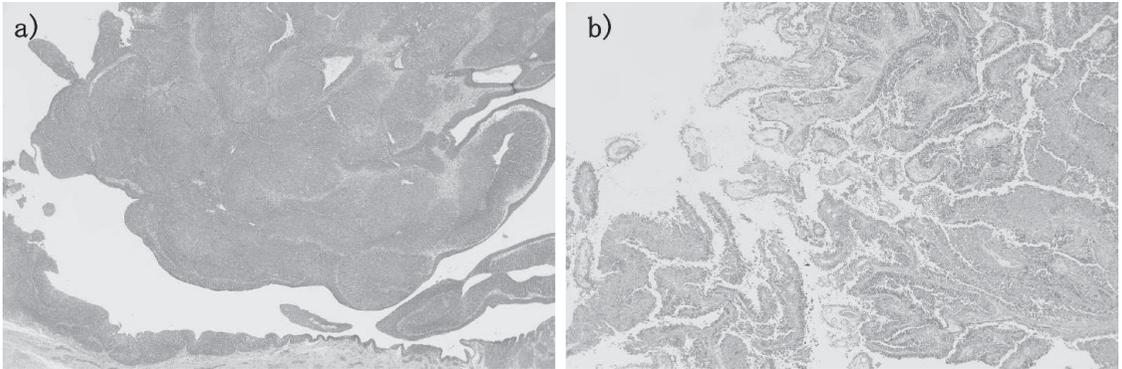


図2 代表的ミスマッチ修復タンパク欠失HE染色例  
 a) 内反性乳頭腫に類似した異型の弱い尿路上皮癌  
 b) 茎の細い、丈の高いvillousな乳頭状尿路上皮癌

比はなし。腎盂癌1例、尿管癌4例であった。全例low grade tumorであり、全例pT1以下の浸潤度であった。これらの染色「陽性」例でのHE染色の病理学的特徴としては、内反性乳頭腫に類似した異型の弱い尿路上皮癌を示すもの(図2a)が3/5例に、茎の細い、丈の高いvillousな乳頭状尿路上皮癌を示すもの(図2b)が3/5例に認め、通常の尿路上皮癌とは異なり、特殊な組織型を示していた。その他、8例にMMRタンパク発現のheterogeneityな欠失を認めた。なお、原因遺伝子の遺伝学的検査の同意は得られなかったため施行できなかった。

#### 【考察】

最近のFrench national databaseの解析において、遺伝性と考えられる上部尿路上皮癌は21.3%と比較的高率であると報告されている<sup>2)</sup>。今回我々の検討では、上部尿路上皮癌患者のうち改訂ベセスダ基準を満たした症例は20%であり、遺伝性と考えられる上部尿路上皮癌は思ったより高頻度である可能性がある。また、今回のミスマッチ修復タンパク4種類の免疫組織染色からは、リンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌の有病率は5% (5例) と推定された。遺伝子検査による確定診断は十分な遺伝カウンセリングをもとに、本人が希望した場合に施行することとしたが、今回は同意が得られず施行していない。したがって、あくまでこの有病率5%は推定であるが、欧米の

全大腸癌の約3%がリンチ症候群による大腸癌であるとする報告とはほぼ同程度であり、検討されていないだけで、全上部尿路上皮癌におけるリンチ症候群は比較的高率である可能性がある。しかしながら現時点では泌尿器科医師におけるリンチ症候群の認知度は極めて低いと言わざるを得ない。したがって本研究は、泌尿器科医に対するリンチ症候群の啓蒙につながるものと思われる。

また本検討では、リンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌には女性 (>男性)・尿管 (>腎盂)に多く認められた。これは、これまで報告されているリンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌の臨床的特徴に一致する<sup>1)</sup>。さらにリンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌は低悪性度 (>高悪性度)・低ステージ(>高ステージ)が多かった。実際、大腸癌においても、リンチ症候群を背景とする大腸癌は散発性大腸癌に比べ、低ステージの比率が多く、ステージをマッチした検討においても予後が良いことが知られており<sup>3)</sup>、我々の上部尿路上皮癌での所見に一致している。また免疫染色結果では、MSH2を含む欠失パターンが多かった。これは、過去の泌尿器癌における欠失パターンの報告とも合致しており<sup>1, 4, 5, 6)</sup>、リンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌の発がんには、他のミスマッチ修復遺伝子よりもMSH2遺伝子の生殖細胞系列変異が重要な役割を果たしていると考えられた。

リンチ症候群を背景とする大腸癌の病理学的特徴は、浸潤リンパ球、クローン様リンパ球反応、粘液性/環状細胞がん様分化、あるいは髄様増殖がよく知られており、60歳未満で診断され、上記の病理所見を呈する大腸癌であることが、改訂ベセスダ基準の一つにも組み込まれている。今回の病理学的検討では、リンチ症候群による上部尿路上皮癌において、尿路上皮癌では稀な内反性乳頭腫に類似した異型の弱い尿路上皮癌を示すものが3/5例、茎の細い、丈の高いvillousな乳頭状尿路上皮癌を示すものも3/5例に認められており、これらがリンチ症候群による上部尿路上皮癌に特徴的な組織型である可能性がある。実際にinverted growth patternを示したリンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌の報告がある<sup>7)</sup>。今後、症例を積み重ね、改訂ベセスダ基準にも組み込まれる上部尿路上皮癌の特徴的病理学的所見として確立する必要がある。

一方で、免疫染色結果「陰性」であっても、3/5の症例では、上部尿路上皮癌が高齢で初発として発生しており、改訂ベセスダ基準を満たしていなかった。リンチ症候群であっても、高齢で上部尿路上皮癌が初発として発生する可能性も考慮する必要がある。逆に8例の症例はミスマッチ修復タンパクのheterogeneousな欠失を認めており、これは後天的な散発性のMMR遺伝子変異を有する可能性があると思われる。いずれにしても今後は、十分なカウンセリング後、同意を取得した上で、ミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列変異の遺伝子検索による確定診断が必要である。

以上の検討により、リンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌の生物学的および病理学的特徴を把握することが可能となった結果、リンチ症候群を背景とする上部尿路上皮癌に対する有効な治療法や予防法やサーベイランスの確立につながる可能性がある。さらに大腸癌患者同様、上部尿路上皮癌患者からもリンチ症候群患者を正しく診断・把握することで、併発しうる他の悪性疾患の早期診断・治療につながるのみならず、その家系での癌の早期診断にもつながると考えられた。さらに、近年MSH2および6の欠失と膀胱癌および前立腺癌との関係も報告されており<sup>4, 6)</sup>、今後これら泌

尿器科癌とリンチ症候群との関連性（リンチ症候群関連腫瘍の一つとなり得るのか）も検討する予定である。

#### 【文献】

1. Mork M, Hubosky SG, Rouprêt M, Margulis V, Raman J, Lotan Y, O'Brien T, You N, Shariat SF, Matin SF: Lynch Syndrome: A Primer for Urologists and Panel Recommendations. *J Urol* 194: 21-29, 2015
2. Audenet F, Colin P, Yates DR, Ouzzane A, Pignot G, Long JA, Soulie M, Phé V, Bensadoun H, Guy L, Ruffion A, Valeri A, Cormier L, Droupy S, de La Taille A, Saint F, Faïs PO, Houlgatte A, Cussenot O, Rouprêt M: French Collaborative National Database on UUT-UC. A proportion of hereditary upper urinary tract urothelial carcinomas are misclassified as sporadic according to a multi-institutional database analysis: proposal of patient-specific risk identification tool. *BJU Int* 110: E583-E589, 2015
3. Stigliano V, Assisi D, Cosimelli M, Palmirotta R, Giannarelli D, Mottolise M, Mete LS, Mancini R, Casale V: Survival of hereditary non-polyposis colorectal cancer patients compared with sporadic colorectal cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 27: 39, 2008
4. Skeldon SC, Semotiuk K, Aronson M, Holter S, Gallinger S, Pollett A, Kuk C, van Rhijn B, Bostrom P, Cohen Z, Fleshner NE, Jewett MA, Hanna S, Shariat SF, Van Der Kwast TH, Evans A, Catto J, Bapat B, Zlotta AR: Patients with Lynch syndrome mismatch repair gene mutations are at higher risk for not only upper tract urothelial cancer but also bladder cancer. *Eur Urol* 63: 379-385, 2013
5. Joost P, Therkildsen C, Dominguez-Valentin M, Jönsson M, Nilbert M: Urinary Tract Cancer in Lynch Syndrome; Increased Risk in Carriers of MSH2 Mutations. *Urology* 86: 1212-1217, 2015

6. Rouprêt M, Yates DR, Comperat E, Cussenot O: Upper urinary tract urothelial cell carcinomas and other urological malignancies involved in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer (lynch syndrome) tumor spectrum. *Eur Urol* 54: 1226-1236, 2008
7. Hartmann A, Dietmaier W, Hofstädter F, Burgart LJ, Chevillat JC, Blaszyk H: Urothelial carcinoma of the upper urinary tract: inverted growth pattern is predictive of microsatellite instability. *Hum Pathol* 34: 222-227, 2003