1．2018年度　研究成果

A　冲中記念成人病研究所専任研究員による基礎的研究

ヒトLPL遺伝子の転写抑制機序の解明

雨宮 三千代

【要約】

リポプロテインリパーゼ（LPL）は血清脂質のクリアランスに重要である一方、マクロファージに発現するLPLは、動脈硬化における泡沫化の一因を形成すると考えられている。マクロファージLPLの転写調節機構を知ることは、動脈硬化における泡沫化抑制の手がかりを得る可能性がある。そこで、ヒトLPLプロモーターのレポータージーンを作成し、マウスのマクロファージであるRAW細胞に遺伝子導入をし、LPL遺伝子の転写抑制に関係する責任シス配列とトランス因子の同定を試みた。その結果、トランスフェクション及びフットプリント解析の結果から、転写開始点上流-584bpから-536bpに転写抑制に関わるシス領域が二つ存在することを発見した。そのうちの一つはOCTsのコンセンサス配列-580ATTTGCAT-573で、OCT-1およびOCT-2が結合した。もう一つは、-572 GAGACAAAAATTAGAAACT-553であり、ゲルシフト法による変異体競合阻害実験から、TTがDNA結合認識に重要であることが判明したが、トランス因子の同定には至っていない。

【目的】

ヒトLPL遺伝子調節領域-550bp付近にある二つのシス配列に着目し、マウスのマクロファージ系細胞であるRAW細胞を用いて、LPLプロモーターの転写抑制機構を解明する。

【方法】

①自己血ゲノムDNAからLPL遺伝子調節領域（-2.87k→+50bp）をクローニングし、レポータージーン（LPL-Luc）を作製した。RAW細胞にレポータージーンを遺伝子導入し、転写活性を測定した。②ゲルシフト法により、この領域に結合する転写因子を同定した。③LXR, RXRリガンドを加えたときのLPLmRNAの変化をRT-PCR法で測定した。

【結果】

1. シス領域の同定

-584bpから-536bpに結合する因子を理化学研究所データベース（TF bind）で検索したところ、OCTコンセンサス配列がヒットした（ATTTGCAT）。

2. ゲルシフト

（1）この領域を含むビオチンラベル化プローブ（5'-bio-LPL（-584/-536））とRAW細胞の核タンパクを反応させてゲルシフトを行った（**図1**）。移動度の遅いバンドaと、移動度の速いバンドbが検出された。種々のcold competitorsをラベル化プローブの100倍量添加し、競合阻害実験を行った。
バンドaは、-584～-570のcompetitorでバンドが消失した。この領域は、OCTコンセンサス配列を含む。一方、バンドbは、-572～-553と-572～-555のcompetitorでバンドが消失した。

（2）ビオチンラベル化プローブ（5'-bio-LPL（-575/-540））とRAW細胞の核タンパクを反応させてゲルシフトを行った（**図2**）。単一のバンドが検出され、-572～-553と-572～-555のcompetitorでバンドが消失し

た。当該単一バンドと**図1**のバンドbは、同一タンパクと考えられる。

(3) −582bpから−560bpの領域には、TAATTT−n_{11}−AAATTAという回文配列が存在する。5'側のAAをTTに変異させたcompetitor（584−570(m)）と、3'側のTTをAAに変異させたcompetitor（572−553(m)）を作成し、DNA結合親和性を検討した（**図3**）。

5'−bio−LPL（−584/−536）プローブを使用した場合、バンドaは、excess coldのcompetirtorsである−584〜−570でバンドが消失したが、−584〜−570(m)、−572〜−553、−572〜−553(m)で

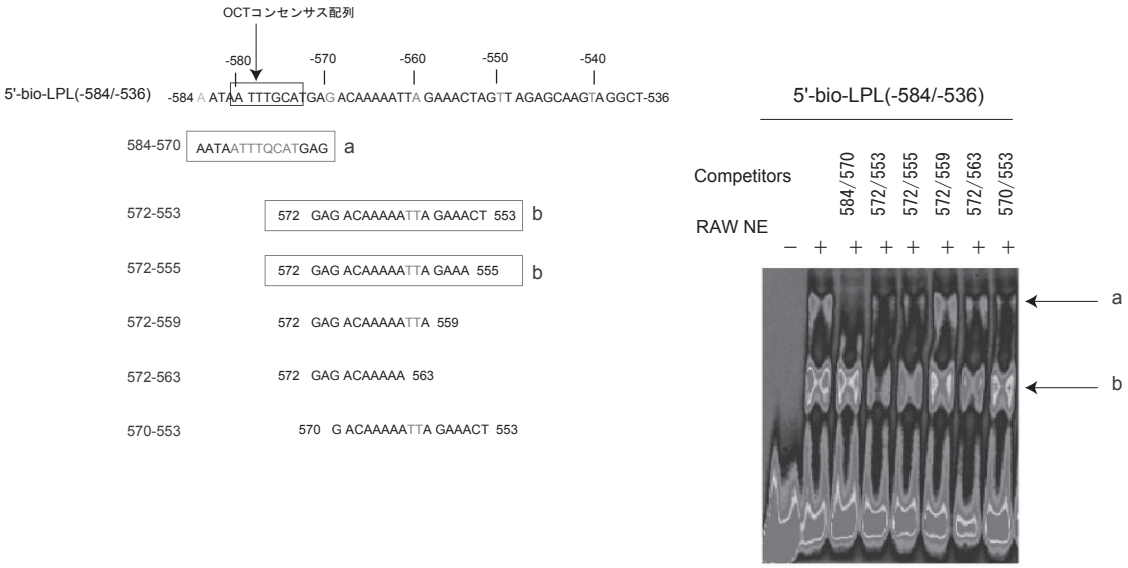


図1　EMSA：−584〜−536bp領域

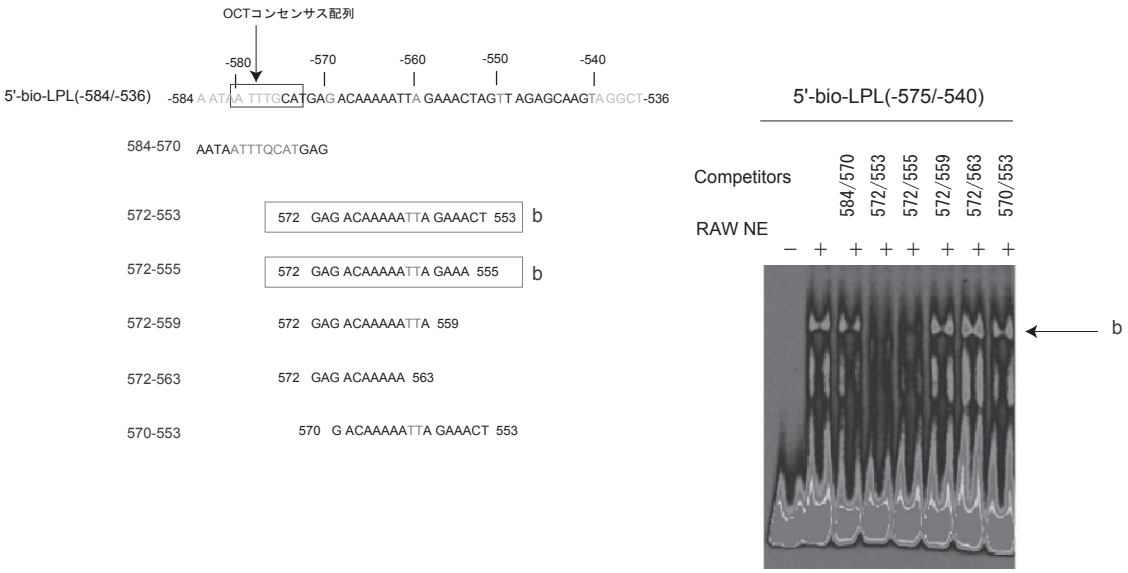


図2　EMSA：−575〜−540bp領域

はバンドは消失しなかった。バンドaは、OCTコンセンサス配列に結合すると考えられる。

一方、5'-bio-LPL(-575/-540)プローブを使用した場合、バンドbは、excess coldのcompetirtorsの-572～-553でバンドが消失したが、-584～-570、-584～-570(m)、-572～-553(m)では消失しなかった。バンドbは、-572 GAGACAAAAATTAGAAACT-553が結合部位であり、TTがDNA結合認識に重要であると考えられる。

次に、結合タンパクを同定するため、OCT1、OCT2の抗体を加えて、スーパーシフトを検討した（**図4**）。

5'-bio-LPL（-584/-536）プローブでは、バンドaはOCT1（12F11）抗体及びOCT2（H-3）抗体で消失あるいはやや上昇したことから、この領域には、OCT1, OCT2のモノマーかホモ若しくはヘテロダイマーが結合することを示唆する。

5'-bio-LPL（-575/-540）プローブでは、バンドbはOCT1およびOCT2のいずれの抗体でも消

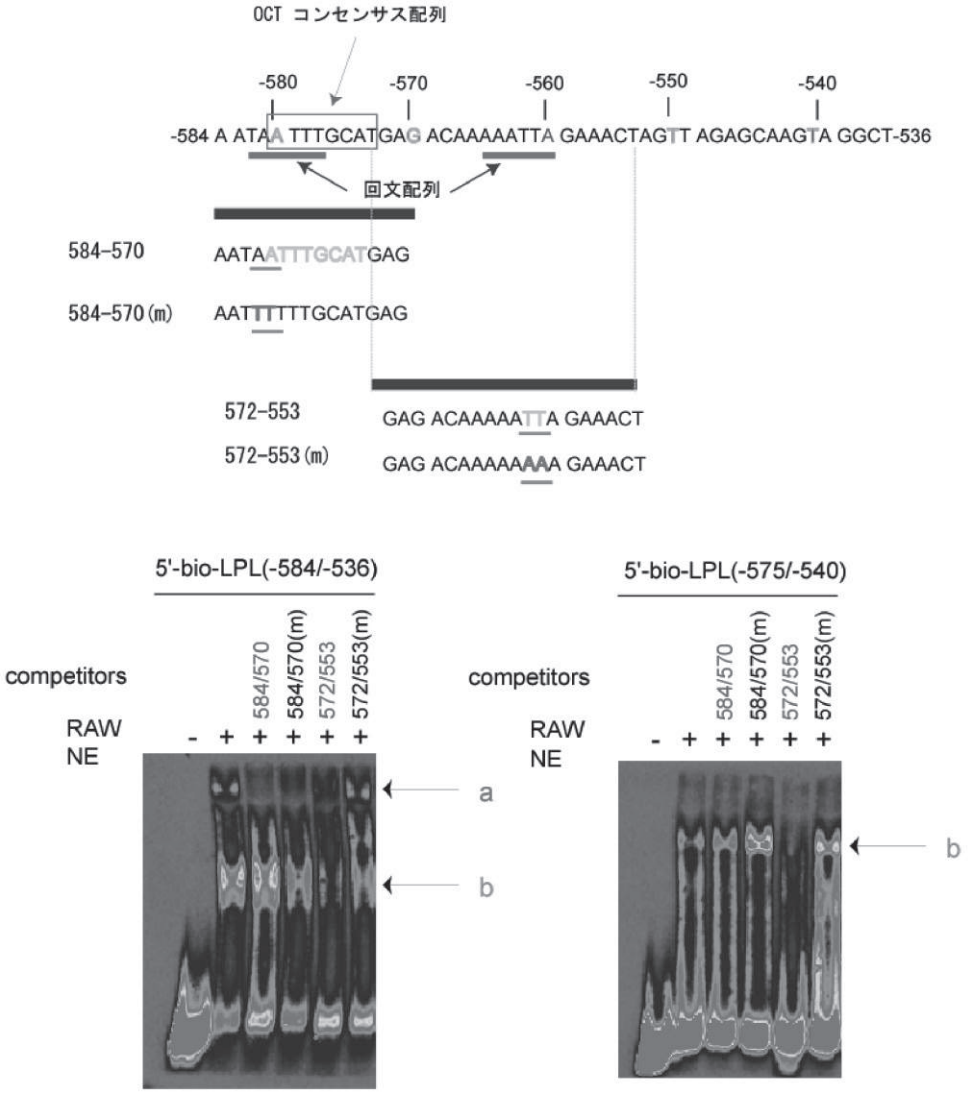


図３

失しなかったことから、OCTsの結合は否定される。

3. qPCR

LPLの発現制御を検討するため、化合物によるLPLmRNAの発現を半定量的PCR法により検討

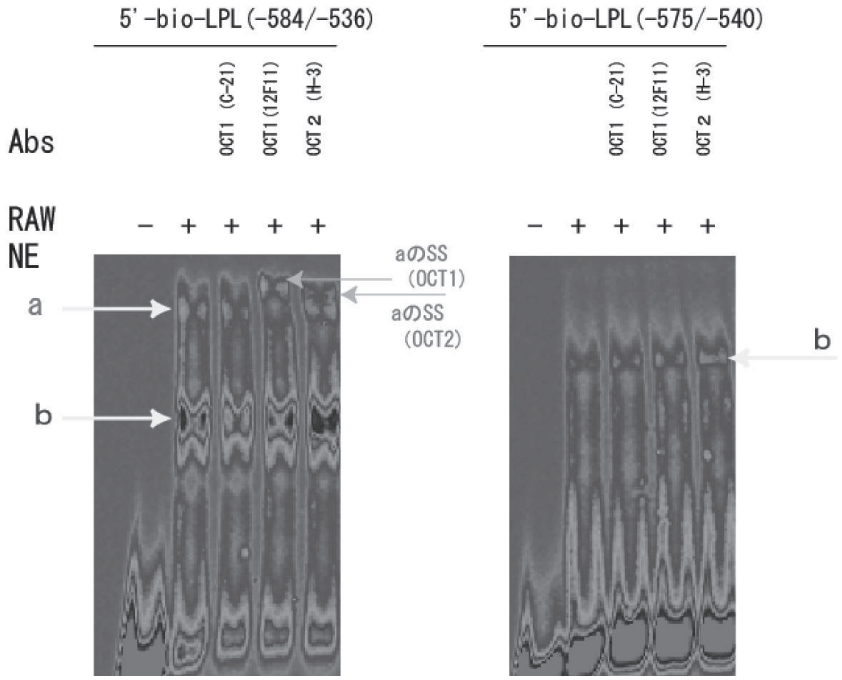


図 4

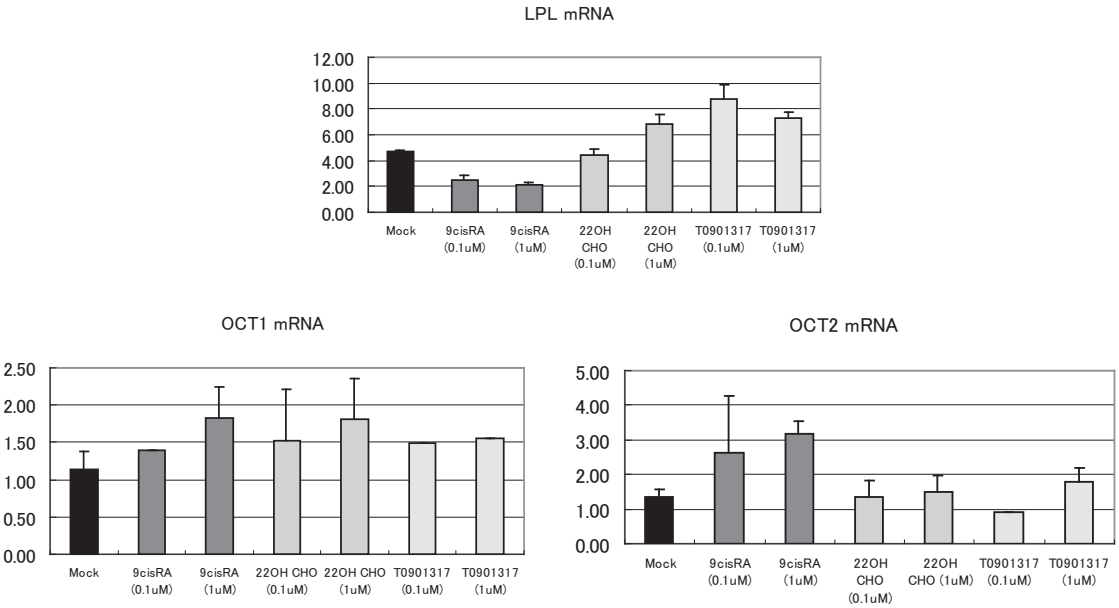


図 5

した。

RXR Ligandの9cis-レチノイン酸（9cisRA）、LXR Ligandの22-OHコレステロール（22-OH-Cho）及びT0901317をRAW細胞に投与し、48時間後にmRNAを抽出し、RT-PCRを行った。9cisRAでは、濃度依存的にLPLmRNA量が低下したのに対し、22-OH-ChoとT0901317は増加した（**図5**）。

これらの化合物の添加48時間後に抽出した核タンパクを用いてゲルシフトをした（**図6**）。

5'-bio-LPL（-584/-536）プローブでは、バンドaはコントロールに比し、9cisRA、22-OH-Cho、T0901317のいずれの添加でも、DNA結合量が増加した。

一方、バンドbは、9cisRA（1μM）で低下し、T0901317で増加した。

5'-bio-LPL（-575/-540）プローブでは、バンドbは上記同様、9cisRA（1μM）で低下し、T0901317で増加した。

【考察】

LPL遺伝子には、ATTTGCATという典型的なOctコンセンサス配列が2ケ所ある（-46～-39, -580～-573）。脂肪細胞では、-46～-39bpの配列はLPL遺伝子の活性化に関与することが報告されている[3)]。マクロファージ（RAW細胞）では近位のOctコンセンサス配列ではなくCT box-92 CCCTCCCC-83が転写活性化に寄与する（data not shown）。

我々は、LPLプロモーターのレポータージーンを作成し、RAW細胞に遺伝子導入して転写活性を測定したところ、-550bp以降を含むレポータージーンの転写活性が劇的に抑制されたことから、-550bp付近の領域は転写抑制領域であると考えた。

フットプリント解析から、-550bp付近にはDNA結合タンパクの存在が示唆された（data not shown）。また、ゲルシフト法では、-550bp付近に二つのDNA結合配列が存在した。

一つは、OCT配列（-580 ATTTGCAT-573）で、OCT1およびOCT2が結合することが判明した。Octmer transcription factor-1（Oct-1）は、POUドメインをもつ転写因子で、細胞周期、分

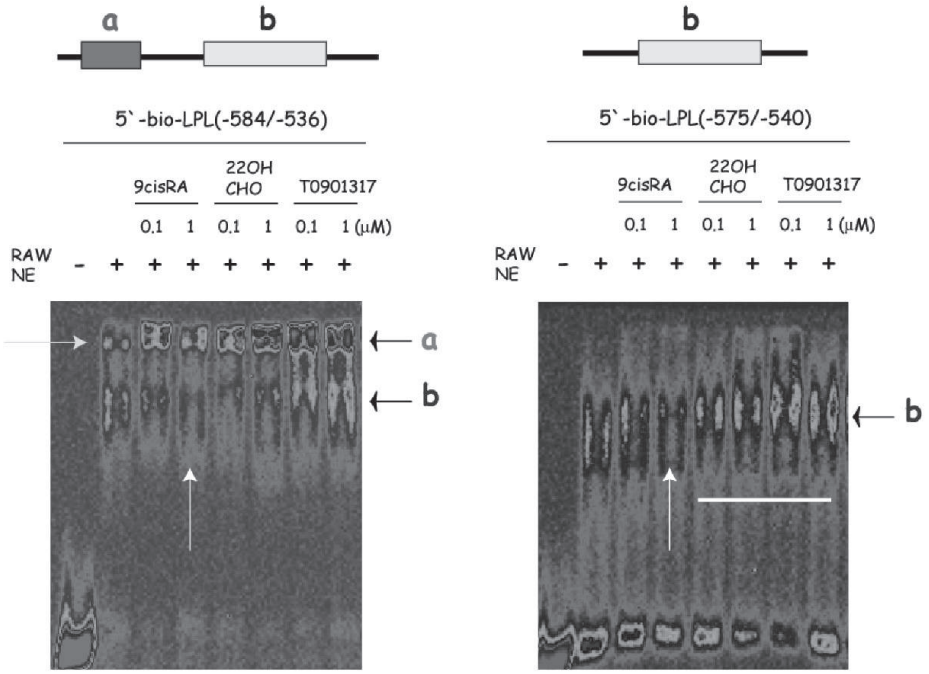


図6

化、ホルモンシグナル等に関連する遺伝子を調節する。

Oct-1は転写アクチベーターとしてだけではなく、転写リプレッサーとしても機能することが報告されている[1,2]。

もう一つは、-572 GAGACAAAAATTAGAAACT-553で、TTがDNA結合性に重要であることは判明したが、トランス因子は未だ不明である。

RAW細胞にRXRのLigand(9cisRA)とLXRのLigand(22-OH-Cho, T0901317)を投与すると9cisRAでLPL mRNAの発現が抑制され、22-OH-ChoとT0901317では増加した。このときのOct配列(-580 ATTTGCAT-573)に結合するタンパク(OCT1/2)は、いずれの場合もMockに比し増加しており、LPL mRNAの発現とは相関がなかった。一方、-572 GAGACAAAAATTAGAAACT-553に結合するタンパクは、9cisRAで低下し、22-OH-ChoとT0901317では増加したことから、LXRやRXRのリガンドによるLPLmRNAの増減は、-572 GAGACAAAAATTAGAAACT-553に結合するタンパクが関与している可能性がある。

この配列に類似する配列が、TNFαのプロモーター上に存在する[4]。κ3配列は、5'-CATGGGTTTCTCCACC-3'から成るが、活性化されたT細胞の核タンパク中のNFAT(nuclear factor of activated T cells)が結合することが報告されている。ゲルシフトでこの領域をプローブにすると2つのバンドが検出されるが、その一のバンドは5'-GGTGGAGAAAATTATG-3'という競合プローブで消失することから、NFATのサブタイプが、-572GAGACAAAAATTAGAAACT-553の領域に結合する可能性が示唆される。

また、Chucpiloは、IL4のプロモーターにもNFAT結合部位が存在し、当該部位はOCTコンセンサス配列と隣接しており、NFATはOCTと相互作用してIL4の転写を活性化する報告している[5]。したがって、NFATは未知のトランス因子の候補の可能性がある。更に、LPLプロモーター上には、LXRやRXRの結合部位が-274～-260bpに存在する。そこで今後はリガンドを加えた時のDNA結合状態を免疫沈降法で検討するとともに、-572～-553bpに結合するトランス因子との相互作用の有無についても検討する。

【文献】

1. Stephen M, et al.: DNA-dependent conversion of Oct-1 and Oct-2 into transcriptional repressors by Groucho/TLE. Nucleic Acids Res 33: 4618-4625,2005
2. Voleti B, et al.: Oct-1 acts as a transcriptional repressor on the C-reactive protein promoter. Mol Immunol 52: 242-248,2012
3. Ryan AK, et al.: POU domain family values: flexibility, partnerships, abd developmental codes. Genes & Dev 11: 1207-1225,1997
4. McCaffrey PG, et al.: The role of NFATp in Cyclosporin A-sensitive Tumor Necrosis Factor-a gene Transcription. J Biol Chem 269: 330445-30450, 1994
5. Chuvpilo S, et al.: Multiple Closely-linked NFAT/octmer and HMG I (Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. Nucleic Acids Res 21: 5694-5704, 1993

糖尿病と認知機能－8
－糖尿病ラットの認知機能障害のメカニズムについて－

新郷　明子

【要約】

今日では、インスリンは脳内でもつくられることが知られ、脳内に広く存在する受容体を介して、記憶学習機能に関与することが次第に明らかになってきた[1)]。このインスリンを介した情報伝達経路が障害されることにより、認知機能が低下すると考えられている。我々はこれまでに、グルコーストランスポーターを介してインスリン分泌を障害するストレプトゾトシン（STZ）を脳室内に投与して作製した“脳の糖尿病”モデルラット[2)]では認知機能が低下していること、これらのモデルラットの脳組織において、特に海馬歯状回堤部にアミロイドベータタンパクが著明に蓄積していること、また、これらの様相を示した海馬体内部回路の状態は、“脳の糖尿病ラット”の認知機能の低下には、大脳から海馬歯状回顆粒細胞への情報入力障害がまず先にあり、それからインスリン受容体情報伝達経路の機能低下に繋がる可能性があることなどを、明らかにしてきた。これらを背景に、認知機能低下には脳海馬内のインスリンの存在量が関与しているかの可能性を探るため、「末梢型」2型糖尿病ラット脳海馬内のインスリン存在量を測定した。

【目的】

生後2-3日齢の新生ラットの腹腔内にSTZを投与して作製した2型糖尿病ラット（DM2T）を用い、脳海馬に存在するインスリンの量の状態を検討することを目的とした。

【方法】

Portaらの方法[3)]に従い、Wistar系雄性ラット2-3日齢の腹腔内に、STZ 80mg/10ulを直接単回投与した。投与後4週後にMorrisの水迷路（MWM）を用い、行動科学的検索を連続10日間行い、認知機能の低下を確認した。コントロールにはSTZの溶解液であるPBSを等量投与したラットを用いた。行動実験後、これらラット

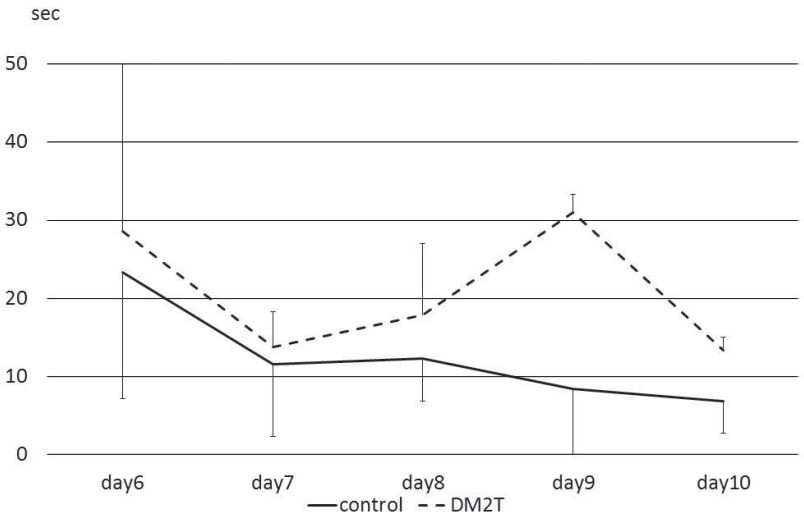


図 1a　ゴール到達時間（秒）

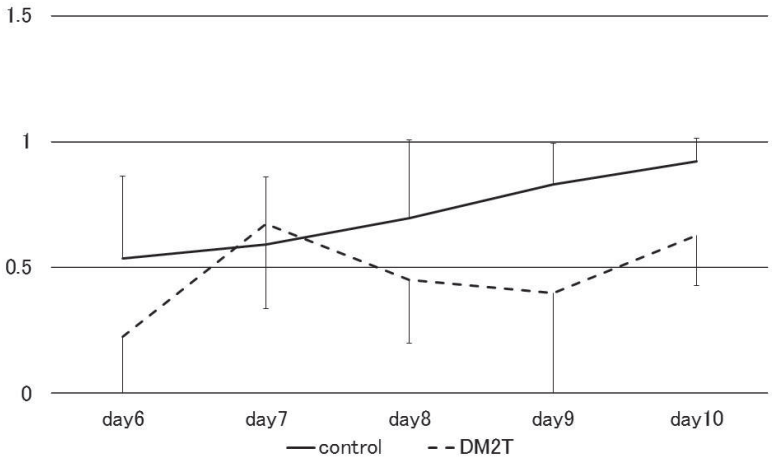


図 1b　行動効率

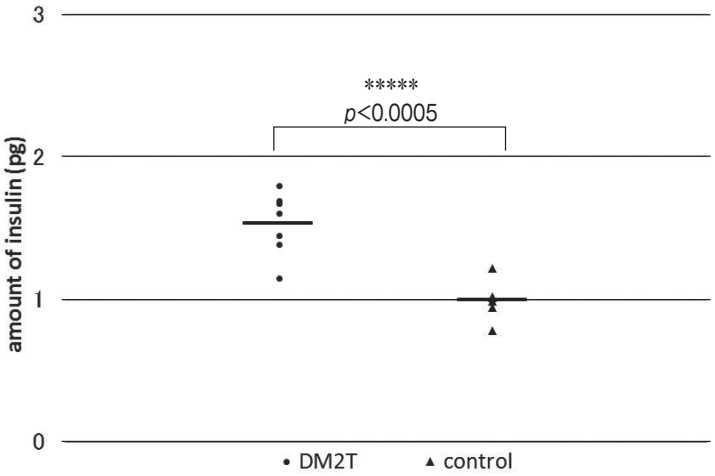


図 2a　1海馬当たりのインスリン量

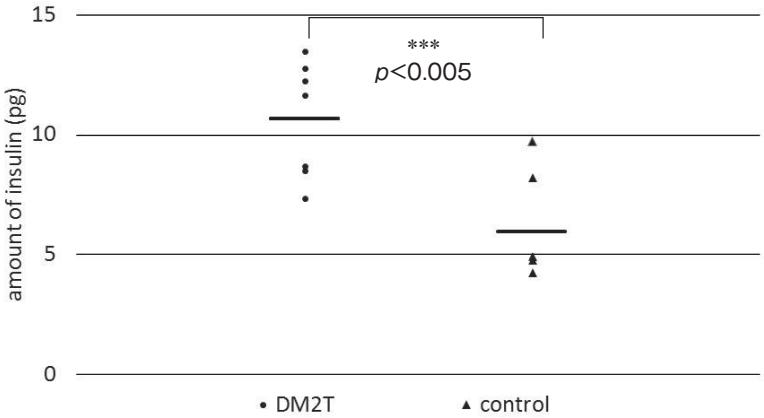


図 2b　海馬1mg当たりのインスリン量

の脳から海馬を単離し、Steinerの方法[4]に従って、インスリンを抽出した。測定にはレビス®インスリンーラット（U-Eタイプ）を使用し、全検体はtriplicateでの検出とした。尚、海馬内蔵インスリン量は超微量、且つ、一臓器＝一検体では検出感度以下となるため、5臓器（5海馬）を1検体として使用した。解析に用いた試料数は、コントロール群 N=5、n=25、2型糖尿病ラット N=5、n=25である。なお、用いた動物の血糖値は、DM2T群では250mg/dL以上を、コントロール群では低いもので145、高いもので190を示した。

【結果】

ゴール到達時間については、コントロールは日を追うごとに時間短縮がみられたが、糖尿病ラットについては有意に短縮しているとは認められなかった（**図1a**）。また、無駄のない行動を行うほど値1に近づく行動達成効率については、コントロールでは日を追うごとに上昇する一方、糖尿病ラットでは、ゴール達成時間と同様に、有意な上昇は認められなかった（**図1b**）。尚、コントロール、および糖尿病ラットの遊泳速度に差はほとんどなく、また、日を追っての速度変化も認められなかった。

海馬内に存在するインスリンを確認するために免疫染色を行ったが、検出感度以下であったため、ELISAによる方法で測定した。海馬ひとつあたりに内蔵されるインスリン量の増加は、コントロールに比して有意差が認められた。一臓器当たりでは約1.5倍、1mgあたりでは約2倍であった（**図2a, b**）。尚、それぞれの海馬の重量には差は認められなかった。

【考察】

これまでに行っていた“脳の糖尿病”ラットでは、行動学的評価において認知機能が著明に低下しており[5]、インスリン受容体シグナル伝達経路の一因子であるAkt、インスリン分解酵素（IDE）がともに低下しており、アルツハイマー病発症の一因子とされるアミロイドベータタンパク（Ab）の免疫活性が著明に増加していた[4]ことを明らかにしてきた。これらの現象は、“脳の糖尿病”ラット脳室内にインスリンを投与することによって改善を示した[6]ことから、脳室内STZ投与由来における脳の糖尿病状態には、脳内インスリンの量、またはインスリン受容体情報伝達経路が関係すると考えていた。また、大脳嗅内野と海馬体を貫通する貫通線維を介した情報伝達系に異常があるために、大脳から海馬歯状回顆粒細胞への情報入力に障害が生じ、それがインスリン受容体情報伝達経路の機能低下を引き起こし、認知機能障害として現れている可能性を示唆した[7]。

これらのことから、2型糖尿病における認知機能障害にも、脳内インスリンの存在、またはその量がこれらの現象を引き起こす可能性を検討するため、実験を行った。本実験結果では、2型糖尿病状態のラット脳内インスリンは、むしろ増加しており、インスリン量の低下は見られなかった。しかしながら、2型糖尿病モデルラットの認知機能は、「脳の糖尿病」ラット同様に低下していた。これらのことから、2型糖尿病では、末梢と同様に、脳内でもインスリン抵抗性が存在しており、このことが認知機能の低下に繋がっている可能性があり、と結論した。

【文献】

1. Schechter R, Abboud M: Neuronal synthesized insulin roles on neural differentiation within fetal rat neuron cell cultures. Brain Res 127: 41-49, 2001
2. De la Monte SM, Wands JR: Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. J of Diabetes Sci and Technol 2: 1101-1113, 2008
3. Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G: Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. Diabetes 23: 889-895, 1974
4. Steiner DF, Cho S, Oyer PE, Terris S, Peterson JD, Rubenstein AH: Isolation and characterization of proinsulin C-peptide from bovine pancreas. J of Biol Chem 246: 1365-1374, 1971
5. Shingo AS, Kanabayashi T, Murase T, Kito S: Cognitive decline in STZ-3V rats is largely due to dysfunctional insulin sig-

nalling through the dentate gyrus. Behav Brain Res 229: 378-383, 2012
6. Shingo AS, Kanabayashi T, Kito S, Murase T: Intracerebroventricular administration of an insulin analogue recovers STZ-induced cognitive decline in rats. Behav Brain Res 241: 105-111, 2013
7. Shingo AS, Mervis R, Kanebayashi T, Kito S, Muease T: The dendrites of granule cell layer neurons are the primary injury sites in the "Brain Diabetes" rat. Behav Brain Res 280: 78-83, 2015

B　研究助成者による研究

（1）血液疾患

GVHD予防でのミコフェノール酸モフェチルの有無による臍帯血移植の治療成績－若年者での検討－

内田　直之、谷口　修一

【要約】

臍帯血移植（CBT）の移植片対宿主病（GVHD）予防法として、ミコフェノール酸モフェチル（MMF）の有効性、特に生着前免疫反応（PIR）の抑制に有効であることが報告されているが、若年者への長期成績への影響は明らかではない。そこで当院でMMFを用いて臍帯血移植を行った急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群（MDS）、慢性骨髄性白血病（CML）の55歳未満の患者を対象に、MMFの移植成績に与える影響について検討した。AML 113例、MDS 14例、CML10例の計137例が対象となった。年齢中央値42歳（16-54歳）、非寛解期107例、HCT-CI>2点29例を含んだ。MMF投与群54例、非投与群83例の2群間で、生着達成率、累積非再発死亡率、累積再発率、全生存率に有意な差を認めなかった。多変量解析で、移植前PSが2（vs. 0-1）であることが、全生存率・非再発死亡に有意に関連する因子であった。再発率に有意な因子は同定されなかった。以上より、若年者においても、MMF投与により再発率や生存率に負の影響は認められなかった。今後、他の免疫抑制剤であるステロイドの総投与量や、患者背景を揃えたmatched pair analysisでさらに詳細な検討を行う予定である。

【目的】

CBTのGVHD予防法として、MMFの有用性が報告されている[1)]。我々はMMFでCBT後特徴的に見られるPIRを抑制し、高齢者で移植成績が向上することを報告した[2, 3)]。しかしながら、若年者での長期予後への影響は明らかではない。過剰な免疫抑制は、悪性の原疾患の再発を助長する恐れがある。そこで我々は、55歳未満の若年骨髄系腫瘍罹患患者に対するCBTを、GVHD予防にMMFの使用・非使用の2群間で比較し、MMF使用の臨床的アウトカムへの影響について検討することを目的とした。

【方法】

骨髄系腫瘍（AML、MDS、CML）に罹患し、2002年1月～2016年12月に初回同種移植としてCBTを実施された患者を後方視的に解析した。自家・同種移植歴を有する、ECOG PS≥3、移植時活動性感染症を有する例、GVHD予防でMTX使用例を除外した。

【結果】

1. 患者背景

137例が対象となった。女性53例、年齢中央値42（16-54）歳、AML 113例、MDS 14例、CML10例、ECOG PS2 16例、寛解期30例、非寛解期107例、HCT-CI 0-2 108例、骨髄破壊的移植前治療が69例、GVHD予防でtacrolimus使用が125例、MMF使用が54例であった。

2. MMF投与群・非投与群別背景

MMF投与群（N=54）と非投与群（N=83）の2群間に分け、背景を比較した（**表1**）。群間で年齢、性別、診断名、疾患病期、HCT-CI、ECOG PSで有意差はなかった。一方、移植時期（MMF投与群がより最近）、移植前治療（同、MACが多い）、GVHD予防法（同、全例Tac）で有意差を認めた。

3. MMF投与・非投与群別の臨床的アウトカム

1）生着率: MMF投与群で91.8%、MMF非投与群で84.0%であった（P=0.30）。

表 1　MMF投与・非投与別患者背景: MMF投与の有無によって2群に分け、背景を比較した。（MMF, mycophenolate mofetil；AML, acute myeloid leukemia；MDS, myelodysplastic syndrome；CML, chronic myeloid leukemia；HCT-CI, hematopoietic cell transplantation comorbidity index；ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status；MAC, myeloablative conditioning；RIC, reduced intensity conditioning；CsA, cyclosporine A；Tac, tacrolimus）.* Disease risk: Low=any complete remission in AML, blast count <5% in MDS, chronic or accelerated phase in CML. High=other than Low.

		GVHD prophylaxis		P-value
		MMF（+）	MMF（-）	
No. of patients		54	83	
Median age, years（range）		42（16-54）	42（17-54）	0.08
Female sex, n（%）		19（35）	34（41）	0.59
Diagnosis				0.92
	AML, n（%）	45（83）	68（82）	
	MDS, n（%）	4（7）	10（12）	
	CML, n（%）	5（9）	5（6）	
Disease status*				0.94
	Low, n（%）	12（22）	18（22）	
	High, n（%）	42（78）	65（78）	
HCT-CI				0.05
	<3, n（%）	38（70）	70（84）	
	>=3, n（%）	16（30）	13（16）	
ECOG PS				0.07
	0-1	51（94）	70（84）	
	2	3（6）	13（16）	
Year of transplant				0.015
	2002-2011	19（35）	47（57）	
	2011-2016	35（65）	36（43）	
Conditioning				0.0005
	MAC, n（%）	48（89）	51（61）	
	RIC, n（%）	6（11）	32（39）	
GVHD prophylaxis（CNI）				0.0036
	CsA	0	12（14）	
	Tac	54（100）	71（86）	

2）再発率: 生存者の観察期間中央値882（範囲54-5642）日で、2年再発率はMMF投与群23.5%、MMF非投与群24.3%であった（P=0.59、**図1**）。疾患病期の低い群（N=30）内での解析では、有意差は認めない（P=0.26）ものの、MMF投与群で33.3%、非投与群で16.7%であった。疾患病期の高い群（N=107）内では、MMF投与群で20.6%、非投与群で26.5%であったが、同様に有意差は認めなかった（P=0.23）。

3）非再発死亡率: 2年非再発死亡率は、MMF投与群23.0%、MMF非投与群26.8%であった（P=0.41）。

4）全生存率: 2年全生存率はMMF投与群60.8%、MMF非投与群51.2%であった（P=0.11、**図2**）。

5）多変量解析: 再発率に有意に影響する因子は同定されなかった。非再発死亡率には移植前のECOG PS2が有意な負の因子であった（HR 3.27、95%CI 1.51-7.07、P=0.003）。全生存率にも同様に移植前のECOG PS2が有意

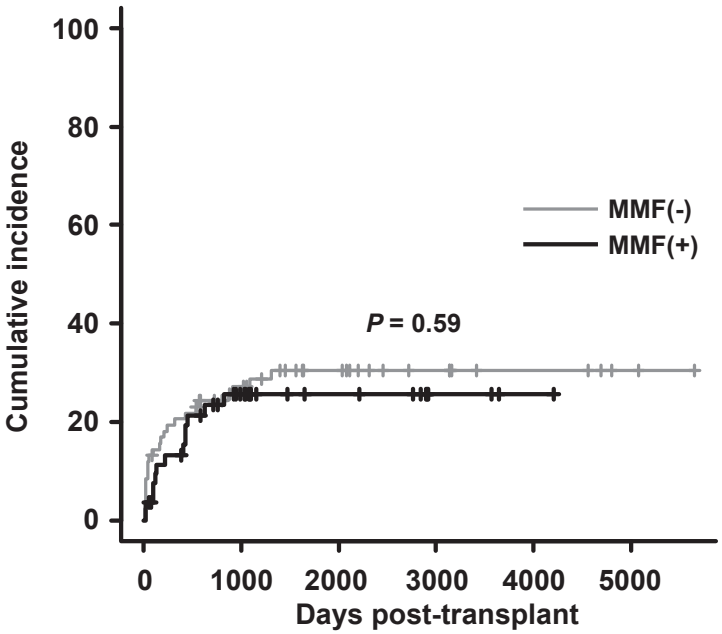


図１　MMF投与有無別累積再発率: MMF投与群と非投与群との間で全生存率に有意差は認めなかった。

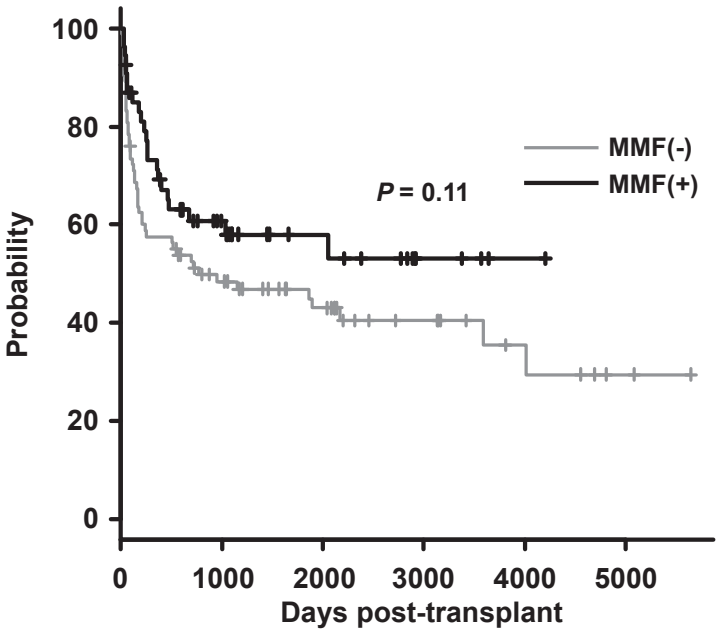


図２　MMF投与有無別全生存率: MMF投与群と非投与群との間で全生存率に有意差は認めなかった。

な負の因子であった（HR 2.12、95%CI 1.13-3.96、P=0.019）。

【考察】

今回の解析で、MMF投与の有無によって、生着率、再発率、非再発死亡率、全生存率に有意差

は認められなかった。MMFは*de novo*系プリン生合成経路のイノシンモノリン酸脱水素酵素を阻害して、主にT、Bリンパ球の増殖を抑制する。同種移植後の免疫反応の抑制に有利な一方、ステロイドでいわれることと同様に、Graft-versus-Leukemia（GVL）効果も抑制し、再発を助長することが懸念されたが、今回の結果からは有意な差は認められなかった。MMF使用により、同種免疫反応が適正にコントロールされることにより、さらなる免疫抑制剤の追加が減じた結果、GVL効果が維持された可能性が想定される。しかしながら、有意差はないものの、疾患病期の低い群ではMMF使用群で非使用群よりも再発率が高い傾向（33.3%、vs. 16.7%）があり、一方疾患病期が高い群ではMMF使用群で低い傾向（20.6% vs. 26.5%）が見られた。疾患病期が低い場合、安易にMMFを使用することが移植成績に負に働く可能性も否定できず、MMF使用には依然慎重な判断を要する。疾患病期が高い群は、MMF非使用を選んだ背景因子が結果に影響した可能性も想定される。

本研究は後方視的な解析であり、表面に現れない選択バイアスの存在から逃れられない。

今後、MMFの実際の投与量や他の免疫抑制剤であるステロイドの総投与量の影響の検討、さらに患者背景を揃えたmatched pair analysisで、MMFの影響度についてさらに詳細な検討を行う予定である。

【文献】

1. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, et al.: Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. Blood 110: 3064-3070, 2007
2. Uchida N, Wake A, Takagi S, et al.: Umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning for elderly patients with hematologic diseases. Biol Blood Marrow Transplant 14: 583-590, 2008
3. Uchida N, Wake A, Nakano N, et al.: Mycophenolate and tacrolimus for graft-versus-host disease prophylaxis for elderly after cord blood transplantation: a matched pair comparison with tacrolimus alone. Transplantation 92: 366-371, 2011

臍帯血移植後の類洞閉塞症候群／肝中心静脈閉塞症（SOS/VOD）についての後方視検討

髙木　伸介、湯淺　光博、景山　康生、梶　大介、西田　彩
山本　久史、山本　豪、森　有紀、内田　直之、谷口　修一

【要旨】

同種造血細胞移植後の類洞閉塞症候群／肝中心静脈閉塞症（SOS/VOD）は重要な移植後合併症である。腎不全や呼吸不全を伴う重症SOS/VODの場合、移植後100日の生存率は30％程度である。SOS/VOD発症の危険因子としては、busulfanや全身放射線照射を用いた移植前処置、複数回の移植、非寛解期での移植、HLA不一致移植、HCV感染の既往、などが挙げられる。臍帯血はドナーの負担がほとんどない上に凍結ストックから選択でき、さらにHLA不一致が許容できる移植細胞源である。そのため、血縁ドナーを得ることができない患者や迅速な移植治療を必要とする患者にとってこれを選択することは大きな利点となるが、そのため臍帯血移植の患者背景はSOS/VODの危険因子を多く含む。

昨年度の解析では同種造血細胞移植後のSOS/VOD発症の危険因子として、多変量解析において、1. busulfanの使用（HR 2.38, $p < 0.01$）、2. 複数回の移植（HR 2.02, $p < 0.001$）、3. 非寛解期での移植（HR 1.90, $p < 0.05$）が抽出された（**表1**）。これらの危険因子の中で調整可能な因子は

表１　SOS/VOD発症の危険因子

Risk factor		N	Univariate		Multivariate		
Age	≥ 53 vs. < 53	324 vs. 290	18.8% vs. 14.5%	p = 0.152	–	–	–
Performance status	2 vs. 0/1	95 vs. 519	16.8% vs. 16.8%	p = 0.931	–	–	–
Disease status	not in CR vs. in CR	458 vs. 156	19.7% vs. 8.3%	p = 0.000855	HR 1.90	1.05 - 3.43	p = 0.033
Previous HCT	≥ second vs. first	129 vs. 485	25.6% vs. 14.4%	p = 0.00205	HR 2.02	1.33 - 3.08	p = 0.00096
Conditioning intensity	MAC vs. RIC	477 vs. 137	16.8% vs. 16.8%	p = 0.848	–	–	–
Busulfan	yes vs. no	381 vs. 233	21.5% vs. 9.0%	p = 0.000103	HR 2.38	1.41 - 3.90	p = 0.0011

表２　移植前処置レジメン

Day	−7	−6	−5	−4	−3	−2	−1	0
FLU	30	30	30	30	30	30		
TBI	4							
MEL		40				40		
BU			2.4	3.2	0.8			
TAC							0.03	0.03
MMF							0−20	0−20
								CBT

FLU, fludarabine, mg/m^2；TBI, total body irradiation, Gy；MEL, melpharan, mg/m^2；BU, busulfan, mg/kg；TAC, tacrolimus, mg/kg；MMF, mycophenolate mofetil, mg/kg；CBT, cord blood transplantation

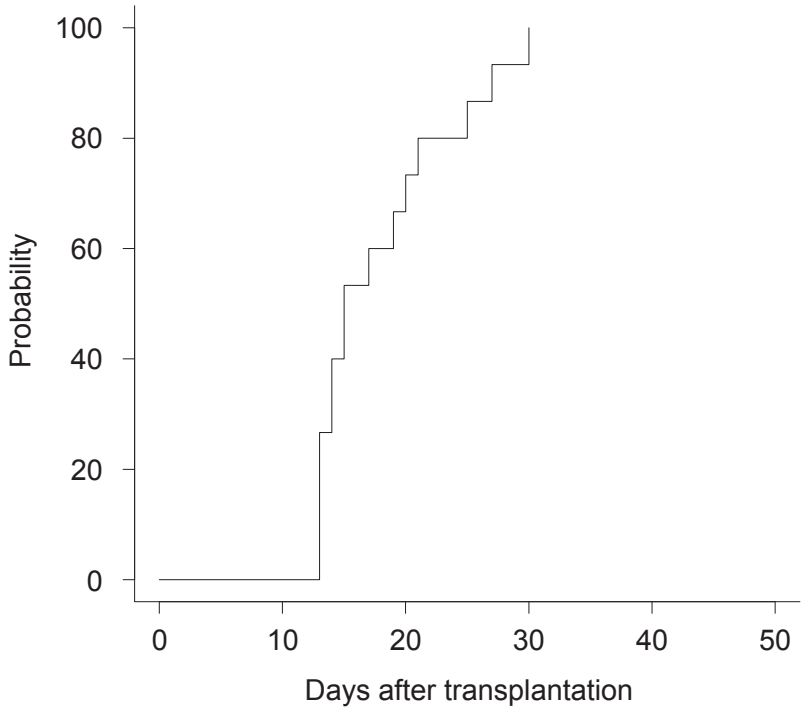

100
80
60
40
20
0
Probability
0
10
20
30
40
50
Days after transplantation

図 1

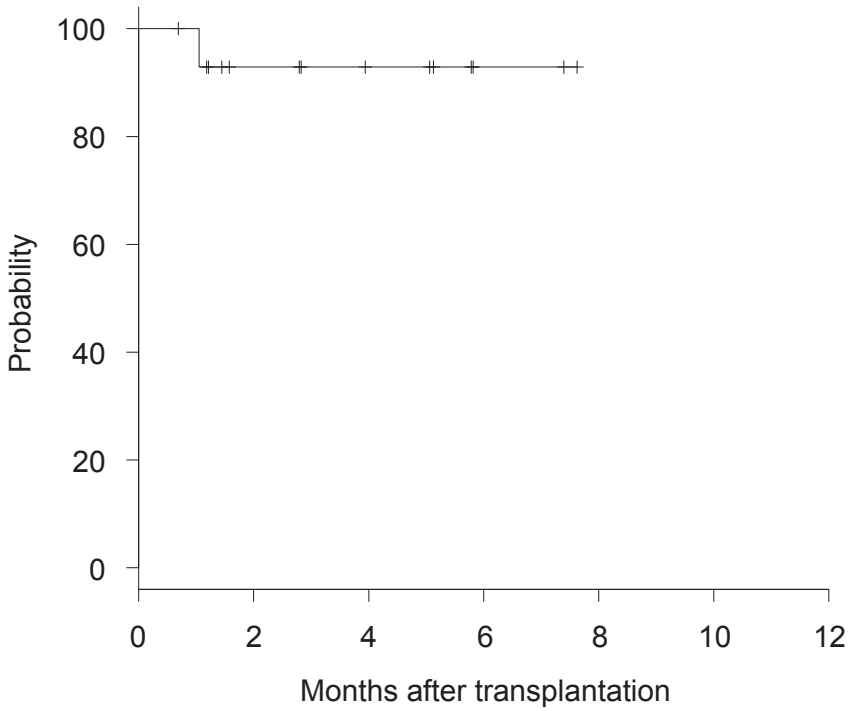

100
80
60
40
20
0
Probability
0
2
4
6
8
10
12
Months after transplantation

図 2

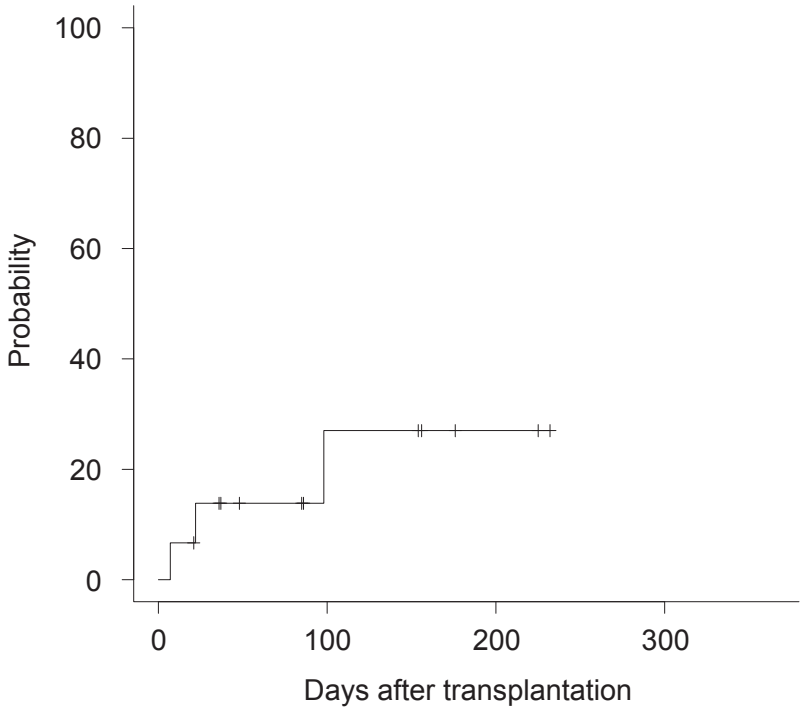


図３

busulfanの使用であるため、我々はbusulfanの投与量を12.8 mg/kgから6.4 mg/kgに減量した移植前処置を開発した。治療強度を保つ目的とドナー細胞の生着率を担保する目的で、busulfanの減量分は全身放射線照射（TBI）4 Gy/2Frで補った独創的な新規の移植前処置である。今回我々は、前述のようにSOS/VODの危険因子を多く含む臍帯血移植に着目し、後方視的解析を行なった。

【方法】

2018年から2019年に虎の門病院で行った臍帯血移植の症例のうち、移植前処置にfludarabine 180 mg/m^2, busulfan 6.4 mg/kg, melpharan 80 mg/m^2, TBI 4 Gy/2Frを使用した症例を抽出した。

【結果】

15症例を抽出した。全例が**表2**に示す方法で移植前処置を行っていた。患者背景を**表3**に示した。年齢中央値は64歳で移植対象患者としては比較的高齢だった。**図1**に現時点での好中球生着率、**図2**に現時点での全生存率、**図3**に現時点でのSOS/VODの累積発症率を示した。好中球生着の中央日は15日（範囲: 13 － 30）だった。全生存率は92.9％(95％信頼区間, 59.1－99.0)だった。SOS/VODの累積発症率は27％だった。発症した3例のうち2例がBaltimore基準で診断され、1例

表３　患者背景

年齢中央値	64歳（範囲: 47－70）
性別（男性: 女性）	7: 8
疾患	
急性骨髄性白血病	8
De novo	(1)
骨髄異形成症候群の既往	(3)
慢性骨髄単球性白血病の既往	(3)
原発性骨髄線維症の既往	(1)
骨髄異形成症候群	2
原発性骨髄線維症	1
再生不良性貧血	1
急性リンパ性白血病	3
病期（寛解期: 非寛解期）	6: 9
SOS/VOD発症の危険因子	11
非寛解期での移植	(9)
複数回の移植	(2)
イノツズマブ・オゾガマイシンの使用歴	(2)
骨髄増殖性腫瘍の既往	(2)

がEBMT基準で診断されたlate-onset SOS/VODだった。全例がトロンボモジュリン製剤で加療し、その後に回復を認めていた。

【考察】

症例数が少数で、観察期間も短いが、短期間の治療成績としては早期死亡が少なく有望と思われた。合併症による早期死亡は特発性肺炎症候群を発症した1例だった。好中球生着は非常に速やかで、全例が達成していた。全生存率は現時点では極めて良好である。SOS/VODの累積発症率は27％でやや高かったが、現時点でSOS/VODによって致死的な経過を辿った症例は認めなかった。今後も慎重な観察を行い、合併症の少ない新規移植前処置の開発に邁進したい。

同種造血幹細胞移植患者に対する予防接種の有効性の検討

森　有紀、梶　大介、景山　康生、湯浅　光博
西田　彩、高木　伸介、山本　久史、山本　豪
内田　直之、谷口　修一

【要約】

同種造血幹細胞移植後の感染対策の一環として、ワクチンで予防できる病気（VPD）に対する予防接種が推奨されている[1-4]。しかし、現在推奨されているワクチンの種類や接種時期・回数は、主に欧米や小児のデータに基づくもので、本邦の成人移植患者における情報はほとんどない。本研究では、成人移植患者に対する予防接種のデータを後方視的に解析することにより、免疫不全患者における弱毒生ワクチンの安全性及び有効性を評価した。計162例中、介入を要した副反応を認めたのは1例のみだった。麻疹及び風疹ウイルス抗体価は1回接種にて良好な上昇を認めたが、おたふくかぜ及び水痘･帯状疱疹ウイルス（VZV）抗体価は2回接種でも低い傾向にあった。発症を認めたのは帯状疱疹のみで、発症時期は予防接種前後問わず広範であり、移植後より早期から接種可能かつ有効性の高いサブユニットワクチンの必要性が示唆された。

【目的】

本研究は、本邦の成人同種移植患者におけるVPDの発症頻度と、予防接種の安全性・有効性を評価し、免疫不全患者における至適なVPD対策を確立することを目的とした。

【方法】

2010年4月～2018年8月に当院で同種造血幹細胞移植を施行され、移植後2年以上、免疫抑制剤中止後1年以上、かつ血漿成分輸血・グロブリン

表１　予防接種前のウイルス抗体価の推移

ウイルス	時期	中央値	陽性	発症予防レベル	感染予防レベル
麻疹	移植前	20.5	96.2%	96.2%	64.1%
	1年後	5.1	56.6%	56.6%	15.7%
	2年後	4.1	50.4%	50.4%	12.1%
風疹	移植前	18.2	89.1%	87.8%	67.3%
	1年後	4.2	50.9%	44.7%	28.3%
	2年後	3.0	45.4%	40.4%	26.2%
水痘・帯状疱疹	移植前	18.4	96.2%	94.4%	未決定
	1年後	3.8	47.8%	37.7%	未決定
	2年後	4.0	51.1%	42.0%	未決定
おたふくかぜ	移植前	4.1	54.5%	未決定	未決定
	1年後	0.8	10.1%	未決定	未決定
	2年後	1.1	7.0%	未決定	未決定

製剤投与終了後5カ月以上経過し、活動性の慢性移植片対宿主病（GVHD）がない成人患者を対象に、MR（麻疹風疹混合）ワクチン、麻疹ワクチン、風疹ワクチン、水痘ワクチン又はおたふくかぜワクチンを接種した[5)]。移植前、移植1年後、2年後と予防接種前後に、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、おたふくかぜウイルス及びVZVのIgG抗体価を、酵素結合免疫吸着法（ELISA）を用いて測定し、各時期における陽性率（≥4）、発症予防レベル（麻疹≥4, 風疹≥5, 水痘≥5, おたふくかぜ未決定）と感染予防レベル（麻疹≥16, 風疹≥12.5, 水痘及びおたふくかぜは未決定）の到達率、及び予防接種による抗体価の有意上昇率（≥2倍）を算出した。また、副反応の有無及び事象を評価した。

【結果】

少なくとも1回の弱毒生ワクチンの接種を受けた患者は計162例で、麻疹ウイルス、風疹ウイル

表２　予防接種前後のウイルス抗体価の変化

（1）1回接種

ウイルス	有意上昇率	時期	陽性	発症予防レベル	感染予防レベル
麻疹	60.3%	接種前	44.0%	44.0%	6.7%
		接種後	94.3%	94.3%	51.1%
風疹	70.0%	接種前	41.6%	36.9%	22.2%
		接種後	97.9%	97.1%	87.9%
水痘・帯状疱疹	27.4%	接種前	31.2%	16.5%	未決定
		接種後	51.6%	42.1%	未決定
おたふくかぜ	17.5%	接種前	3.1%	未決定	未決定
		接種後	22.8%	未決定	未決定

（2）2回接種

ウイルス	時期	有意上昇率	陽性	発症予防レベル	感染予防レベル
麻疹	接種前		59.4%	59.4%	6.3%
	1回後	31.3%	84.4%	84.4%	9.4%
	2回後	48.4%	90.3%	90.3%	38.7%
風疹	接種前		48.4%	38.7%	16.1%
	1回後	58.1%	93.6%	90.3%	67.7%
	2回後	80.0%	96.7%	96.7%	83.3%
水痘・帯状疱疹*	接種前		25.9%	6.9%	未決定
	1回後	16.7%	35.4%	20.8%	未決定
	2回後	30.9%	52.7%	38.2%	未決定
おたふくかぜ	接種前		3.5%	未決定	未決定
	1回後	7.9%	13.2%	未決定	未決定
	2回後	26.9%	33.3%	未決定	未決定

＊１回目接種後２回目接種前に発症した２症例を除外して解析。

ス、VZV、おたふくかぜウイルスの抗体陽性率は、移植前は96.2%、89.1%、96.2%、54.5%、移植1年後は56.6%、50.9%、47.8%、10.1%、2年後は50.4%、45.4%、51.1%、7.0%で、前三者の抗体陽性率は2年間でほぼ半減し、おたふくかぜウイルスでは10%を下回った。発症予防レベルの水痘ウイルス抗体価を有する割合は、移植前94.4%、移植1年後37.7%、移植2年後42.0%で、感染予防レベルの麻疹及び風疹ウイルス抗体価を有する割合は、移植前64.1%及び67.3%、移植1年後15.7%及び28.3%、移植2年後12.1%及び26.2%だった（**表1**）。

162例中、MRワクチン或いは麻疹又は風疹ワクチンを受けた患者は150例、水痘ワクチンが119例、おたふくかぜワクチンが129例だった。麻疹及び風疹ウイルス抗体価の1回接種による有意上昇率は60.3%と70.0%で、接種後の陽性率は94.3%及び97.9%、発症予防レベルの到達率は94.3%及び97.1%、感染予防レベルの到達率は51.1%及び87.9%と有効性が示唆される結果だった。一方、1回接種後のおたふくかぜウイルス抗体価の有意上昇率は17.5%と低く、接種後の陽性率は22.8%だった。VZVについては、1回接種後の有意上昇率は27.4%で、陽性率は51.6%、発症予防レベルの到達率は42.1%だった（**表2-(1)**）。

2回接種を受けた患者は、MRワクチン或いは麻疹又は風疹ワクチンが33例、水痘ワクチンが60例、おたふくかぜワクチンが86例で、いずれのウイルスにおいても2回接種後の有意上昇率、陽性率、発症予防レベル及び感染予防レベル到達率は1回接種と比較して改善していた（**表2-(2)**）。麻疹、風疹、おたふくかぜを発症した症例はなかったが、帯状疱疹については、予防接種前に18例、予防接種後に13例（1回接種後: 7例、2回接種後: 6例）の発症を認めた。

副反応については、水痘ワクチン接種8日後に左眉頭に2-3個丘疹を認め帯状疱疹を否定できないとして抗ウイルス薬の投与を行った1例以外は、局所の腫脹・疼痛・硬結4例、発熱3例、関連性が明らかでない体の痛み1例で、特別な処置や治療を要したものはなかった。

【考察】

本研究より、同種造血幹細胞移植患者では、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、VZV、おたふくかぜウイルスの抗体価は半数以上の症例で陰転化することが明らかとなった。この結果は、既報告同様[6]、同種移植患者を含む免疫不全患者に対する予防接種の必要性を支持するものと思われる。本邦の同種移植後の予防接種に関するガイドラインでは、弱毒生ワクチンの2回接種を推奨しているが[1]、その根拠となる具体的なデータは乏しい。本研究より、麻疹及び風疹ウイルスの抗体価は、1回接種後比較的高率に上昇し発症予防レベルに達するものの、VZV及びおたふくかぜウイルスについては、2回接種後も十分な抗体上昇が得られず抗体陽転率も低いことが明らかとなった。健常人においてもウイルス抗体価は経時的に減弱することから、免疫不全患者におけるブースト効果を期待してのワクチン2回接種は妥当と思われるが、2回接種後も抗体を獲得しづらいウイルス種があることは念頭に置く必要があると思われた。

本研究において、麻疹、風疹、おたふくかぜの発症は認められなかったが、帯状疱疹の発症が比較的高率に見られた。同種移植後は、VZVの再活性化による帯状疱疹のリスクが高いことから、抗ウイルス薬の長期予防投与（移植後1年以上かつ免疫抑制剤終了までなど）が広く普及している。しかし、抗ウイルス薬中止後の発症が以前より問題視されており、一方で水痘ワクチンは移植後2年経過しないと安全性が担保できないとされている。本研究において、帯状疱疹の発症は、抗ウイルス薬中止後予防接種開始前に多く認められたが、接種後十分な抗体上昇が得られない症例にも散見された。現行の水痘ワクチンよりも強力かつ移植後早期から接種可能なサブユニットワクチンの導入が切望される。副反応については、水痘ワクチン接種後に帯状疱疹を否定できない皮疹が出現し、抗ウイルス薬の内服にて速やかに改善した一例を認めた以外に特別な処置・治療が必要なものはなかった。以上より、本研究おいて同種移植後患者における弱毒生ワクチンの安全性が確認され、その有用性も十分に期待されるが、帯状疱疹に関しては、更なる工夫が必要と考えられた。

【文献】

1. 造血細胞移植ガイドライン予防接種（第3版）. 日本造血細胞移植学会ガイドライン委員会, 2018
2. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al.: Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. Biol Blood Marrow Transplant 15: 1143-1238, 2009
3. Ljungman P, Cordonnier C, Einsele H, et al.: Vaccination of hematopoietic cell transplant recipients. Bone Marrow Transplant 44: 521-526, 2009
4. Rubin LG, Levin MJ, Ljungman P, et al.: 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. Clin Infect Dis 58: e44-100, 2014
5. LONG-TERM FOLLOW-UP AFTER HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANT GENERAL GUIDELINES FOR REFERRINGPHYSICIANS（https: //www.fredhutch.org/content/dam/public/Treatment-Suport/Long-Term-Follow-Up/LTFU_HSCT_guidelines_physicians.pdf）
6. Ljungman P, Lewensohn-Fuchs I, Hammarstrom V, et al.: Long-term immunity to measles, mumps, and rubella after allogeneic bone marrow transplantation. Blood 84: 657-663, 1994

多発性骨髄腫患者における潜在的ウイルス再活性化についての前向き観察研究

山本　豪、谷口　修一

【要約】

多発性骨髄腫患者10名の治療開始前および治療開始後（2～3コース終了後）の血液検体を採取し、ヘルペスウイルス属をはじめとする13種類のDNAウイルス（HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, HHV-6, BK, JC, parvovirus B19, EBV, HHV-7, HHV-8, adenovirus, HBV）の再活性化をmultiplex PCRにて検査を行った。いずれの検査においてもウイルスは陰性であった。骨髄腫のコントロールが得られている患者においては、ウイルス活性化のリスクは比較的低い可能性が考えられた。

【目的】

化学療法中の多発性骨髄腫患者における潜在的ウイルス再活性化について、治療内容、病気の状態と再活性化の頻度、時期との関連を探索的に調べる。

【方法】

1. 対象患者: 多発性骨髄腫初発・再発に対して虎の門病院血液内科において化学療法を受ける患者（化学療法の内容は問わない）

   選択基準: 文書による同意が得られた20歳以上の成人患者

   除外基準: 当院で2コース以上の化学療法を施行できないと予想される患者
2. 予定被験者数の設定: 10人。探索的研究であるため予想される頻度に基づく被験者数設定ではなく、研究期間中に化学療法が開始されると予想される人数を設定した。
3. 非介入の観察研究であるが、通常の診療のために必要な血液検査にあわせて血液検体を採取して行う研究であるので人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に従い患者個人に対しての文書による同意取得を行う。
4. 研究内容

(1) 被験者の治療開始前および治療開始後（2～3コース終了後）に血液検体を採取する。血液検体を用いてヘルペスウイルス属をはじめとする13種類のDNAウイルス（HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, HHV-6, BK, JC, parvovirus B19, EBV, HHV-7, HHV-8, adenovirus, HBV）を検出する定性的multiplex PCRを院内において行う。

(2) 定性的PCRで陽性となった検体について、定量的PCRを院内で行う（定性的・定量的PCRの系はいずれも移植後の患者のウイルス再活性化のモニタリングとして系が確立している）。

(3) ウイルス再活性化がみられた場合、臨床症状を調べる。

(4) 各ウイルス再活性化の頻度、化学療法内容との関連を調べる。

(5) プロテアソーム阻害剤を含む治療では、帯状疱疹再活性化の頻度が高いとされており、抗ヘルペス薬（アシクロビルなど）の予防投与を通常の診療方針に従って行う。また、HBs抗原陽性者、HBc抗体and/orHBs抗体陽性者などのHBV再活性化のリスクが高いと考えられる患者においては、この研究とは別にHBV再活性化のモニタリングを行い、適切な対処を行う。このほか、保険承認された抗ウイルス薬のあるHSV, VZV, CMVなどに対してはウイルス血症確認後、臨床症状や他の検査結果を踏まえて抗ウイルス薬投与を判断する。

【結果】

多発性骨髄腫の患者10名から同意を得て検査を行った。10名は、年齢62-79歳（中央値70歳）、男性6名、女性4名、診断からの月数17-116月（中

央値47月）であり、全員が2次治療以降であった。研究参加時の治療は2-11ライン（中央値4ライン）目であり、投与歴のある治療として、ボルテゾミブ10名、レナリドミド9名、自家移植3名であった。研究時の治療としては、DaraBD（ダラツムマブ、ボルテゾミブ、デキサメサゾン）2名、BD（ボルテゾミブ、デキサメサゾン）2名、ポマリドミド2名、DaraRD（ダラツムマブ、レナリドミド、デキサメサゾン）1名、PanBD（パノビノスタット、ボルテゾミブ、デキサメサゾン）1名、IRd（イキサゾミブ、レナリドミド、デキサメサゾン）1名、KD（カルフィゾミブ、デキサメサゾン）1名であった。全員がアシクロビルあるいはバラシクロビルの内服投与を受けていた。

10名全員に対して、治療前とおよそ2か月後の2回（のべ20回）血液検体を採取し、ウイルス検査を施行したが、検査を施行した13種のウイルスはいずれも陰性であった。

【考察】

多発性骨髄腫では、治療経過中に各種の日和見感染症を起こすことがある。多発性骨髄腫患者では、健常人に比べウイルス感染症の頻度は10倍と高く[1)]、特に、ボルテゾミブ治療においては、ヘルペスウイルス感染症に対する予防が推奨されている[2, 3)]。多発性骨髄腫には近年新規治療薬が次々と登場しており、プロテアソーム阻害剤（ボルテゾミブ、カルフィゾミブ、イキサゾミブ）、免疫調節薬（サリドマイド、レナリドミド、ポマリドミド）、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬（パノビノスタット）、抗体薬（エロツズマブ、ダラツムマブ）がこれまでに本邦で承認・発売されている。これらの薬剤による治療におけるウイルスの活性化のリスクについては十分明らかにはなっていない。

今回、治療ライン数の中央値が4ライン目と比較的治療歴の多い患者10名にウイルス検査を施行したが、いずれも陰性の結果となり、想定よりウイルス活性化の頻度が低いことが考えられた。新規薬剤の登場により、治療ライン数が多いものの骨髄腫のコントロールは比較的得られていたことが、ウイルス活性化がみられなかった理由かもしれない。今後、さらに症例を増やし、また、多発性骨髄腫の再燃時の患者も含めウイルス活性化の検査を行っていくことが必要と考えられた。

【文献】

1. Blimark C, et al.: Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients. Haematologica 100: 107-113, 2015
2. Teh BW, et al.: Changing treatment paradigms for patients with plasma cell myeloma: impact upon immune determinants of infection. Blood Rev 28: 75-86, 2014
3. König C, et al.: Incidence, risk factors, and implemented prophylaxis of varicella zoster virus infection, including complicated varicella zoster virus and herpes simplex virus infections, in lenalidomide-treated multiple myeloma patients. Ann Hematol 93: 479-484, 2014

臍帯血移植における至適移植前処置法の確立に関する研究

山本　久史、谷口　修一

【要約】

臍帯血移植（CBT）における至適前処置法は確立していない。本研究では、当院で多用しているFluBu4MelとFluBu4TBIレジメン用いたCBT成績を比較検討し、最適な前処置選択基準方法を確立することを目的とする。対象は非寛解期骨髄系腫瘍を有する233例、年齢中央値は61（19-74）歳であった。FBM群173例、FBT群 60例、2群間で年齢、疾患、移植時病期、HCT-CI、輸注臍帯血細胞数に有意差はなかった。好中球生着率、非再発死亡率、再発率、全生存率は2群間において有意差は認められなかった。サブグループ解析において、それぞれの前処置の優位性を示す集団は抽出されなかった。本研究は後方視的解析であり、データに表れにくい選択バイアスの可能性も否めない。今後、症例数を蓄積するとともに、患者背景を均一化したMatched pair解析を施行し、患者個別に対する至適前処置の選択方法を確立していきたい。

【目的・背景】

移植前処置はドナー細胞の生着や移植後の毒性および再発に関わる重要な因子である。従来、骨髄破壊的前処置が標準的方法とされてきたが、高齢者での骨髄非破壊的前処置（ミニ移植）の開発や新規前処置薬の導入など、移植前処置方法は多様化している。Fludarabine（Flu）/iv Busulfan（Bu）（12.8mg/kg）（FluBu4）は、毒性を軽減した骨髄破壊的前処置として、末梢血や骨髄を用いた移植において、近年急速に普及しつつある前処置である。一方、FluBu4を用いた臍帯血移植（CBT）においては、高い生着不全率が報告されている。当院における後方視的解析では、FluBuにtotal body irradiation（TBI）もしくはMelphalan（Mel）を加えることで安定した臍帯血生着が得られること、またFluBu4-basedレジメンは高齢者ハイリスク集団に対しても、非再発死亡を増やすことなく再発率を低下させる可能性が示唆されている[1, 2]。上記結果を踏まえ、当院においては、FluBu4にMel（80mg/m^2）もしくはTBI 4Gyを加えた移植前処置が主流となっているが、患者因子も踏まえた至適前処置の選択方法が確立したとは言い難い。本研究では、FluBu4MelとFluBu4TBIレジメンを用いたCBT成績を比較検討することにより、最適な前処置選択基準方法を確立することを目的とする。

【方法】

2007年5月～2016年6月の期間に、当院においてFluBuMel（Flu+ivBu（12.8mg/kg）+ Mel（80mg/m^2）；FBM群）もしくはFluBuTBI（Flu+ivBu（12.8mg/kg）+TBI 4Gy；FBT群）を用いたCBTを実施された非寛解期骨髄系腫瘍患者を対象とし、両前処置における移植成績を後方視的に比較解析した。同種移植歴を有する例、PS不良例（ECOG PS≥3）、移植時活動性感染症を有する例は除外した。

【結果】

1. 患者背景

患者背景を**表1**に示す。全対象は233例、年齢中央値61（19-74）歳、AML 201例、MDS 22例、MPD/CML 10例、全例が移植時に非寛解状態であった。FBM群は173例、FBT群 60例、2群間で年齢、疾患、移植時病期、HCT-CI、輸注臍帯血細胞数に有意な差はなかった。

2. 移植結果

(1) 好中球生着率: FBM群で90.2%、FBT群において93.3%であり、2群間で有意差はなかった（P=0.62、**図1A**）。

(2) 非再発死亡率: 生存例の観察期間中央値664日（範囲80-3311日）で、2年累積非再発死亡率はFBM群32.9%、FBT群40.7%であった（P=0.43、**図1B**）。

(3) 再発率及び全生存率: 2年累積再発率は、

表 1　患者背景（全対象、FBM群、FBT群）

	All (n=233)	FBM (n=173)	FBT (n=60)	P-value
Age (years)				
Median (range)	61 (19-74)	60 (19-72)	62 (31-74)	0.09
Diagnosis				
AML	201 (87%)	154 (89%)	20 (80%)	0.06
MDS	22 (9%)	12 (7%)	10 (17%)	
MPN/CML	9 (4%)	7 (4%)	4 (3%)	
Disease status				
PIF	58 (25%)	45 (26%)	13 (22%)	0.46
REL	71 (30%)	55 (32%)	16 (27%)	
Untreated	104 (45%)	73 (42%)	31 (51%)	
HCT-CI score				
0	24 (10%)	20 (12%)	4 (7%)	0.66
1	28 (12%)	19 (11%)	9 (15%)	
2	53 (23%)	42 (24%)	11 (18%)	
≥3	128 (55%)	92 (53%)	36 (60%)	
Number of TNC infused				
Median x 10^7/kg	2.61	2.61	2.62	0.82
(range)	(1.56-5.22)	(1.56-5.22)	(1.87-4.49)	
Number of CD34$^+$ cells infused				
Median x 10^5/kg	0.86	0.88	0.83	0.19
(range)	(0.26-2.97)	(0.26-2.97)	(0.47-2.29)	

FBM indicates fludarabine+iv busulfan (12.8mg/kg) + melphaln (80mg/m2) ; FMT, fludarabine+iv busulfan (12.8mg/kg) + TBI 4Gy; AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; MPN, myeloproliferative neoplasms; CML, chronic myelogenous leukemia; PIF, primary induction failure; REL, relapse; HCT-CI, Hematopoietic Cell Transplantation-Specific Comorbidity Index; TNC, total nucleated cells.

FBM群22.0%、FBT群25.3%であり、2群間で有意差はなかった（P=0.95、**図2A**）。

4）全生存率: 2年全生存率はFBM群47.3%、FBT群42.3%であり、FBM群でやや良好な傾向がみられたが、有意差はなかった（P=0.51、**図2B**）。

5）サブグループ解析

年齢、疾患、移植時病期などサブグループに分けて、FBM群とFBT群の移植結果を比較したが、いずれの集団においても2群間で有意差がみられず、各前処置がより至適と思われる集団の抽出は困難であった。

【考察】

本研究では、FluBu4MelとFluBu4TBIレジメンを用いたCBT成績を後方視的に比較検討した。2群間において、好中球生着率、非再発死亡率、再発率、全生存率に有意差は認められなかった。高齢者かつ非寛解期腫瘍を有する患者、いわゆる移植高リスク群が解析対象であったが、両群において約40%の生存率が示された。既報告と比しても極めて良好な成績であり、両レジメンを用いたCBTの有用性が示された。一方で、サブグループ解析においても、それぞれの前処置の優位性を示す集団は抽出されず、至適前処置の選択方法が確立しているとは言い難い。本解析では2群間

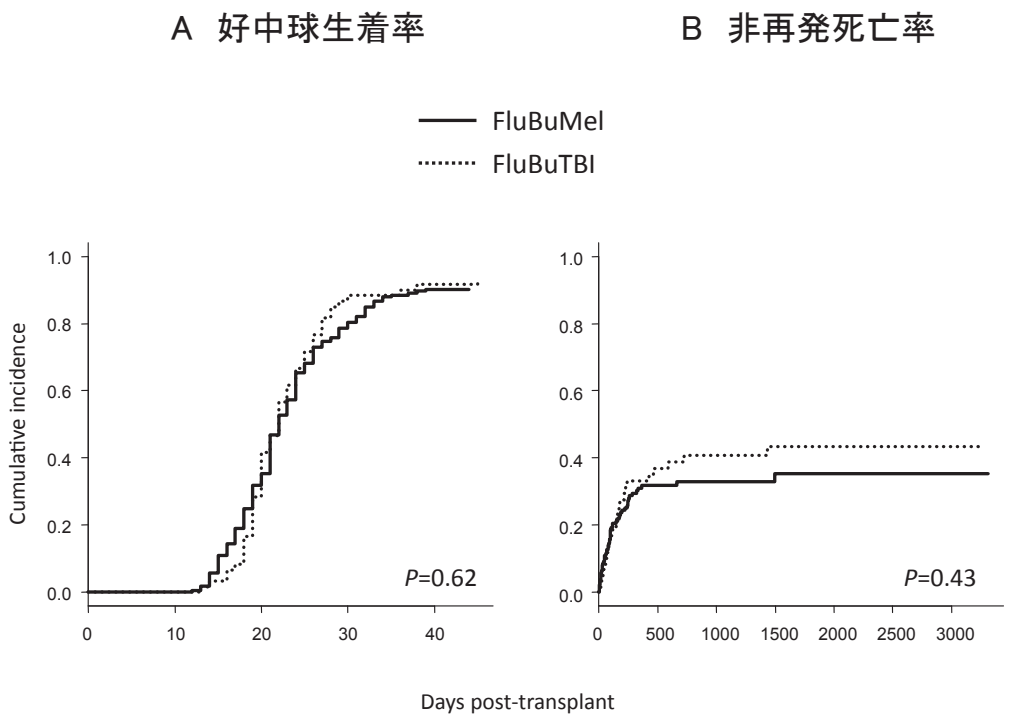


図 1　A: 好中球生着率（FBM群 vs FBT群）　B: 非再発死亡率（FBM群 vs FBT群）

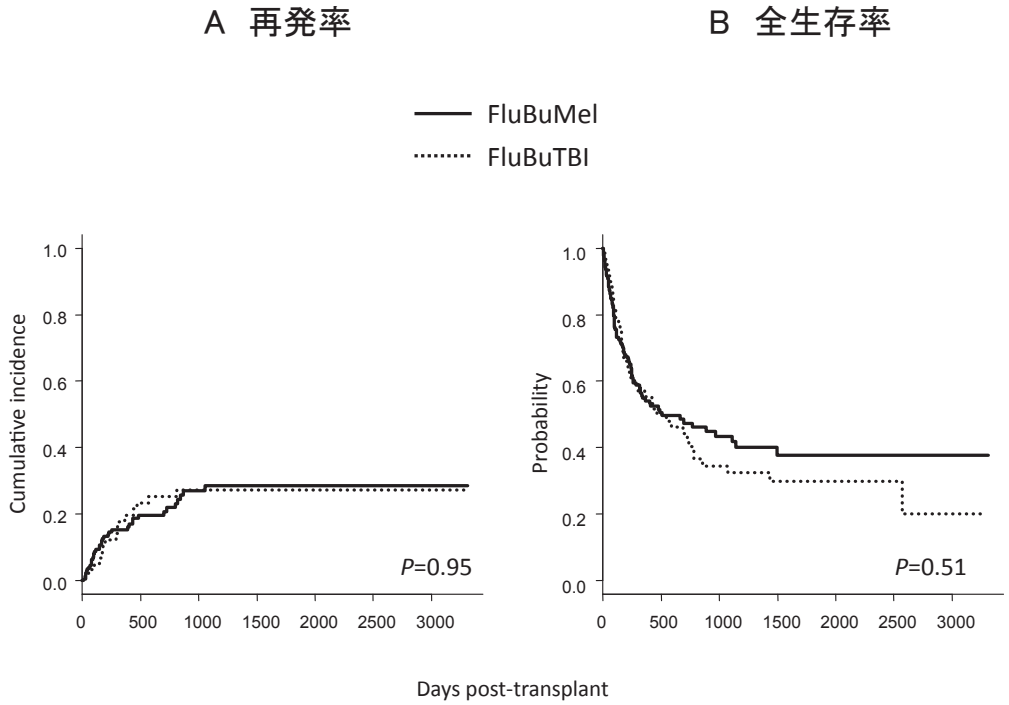


図 2　A: 再発率（FBM群 vs FBT群）　B: 全生存率（FBM群 vs FBT群）

で患者背景に有意差は認めなかったが、後方視的解析であり、データに表れにくい前処置選択バイアスの可能性は否めない（**図2A, 2B**）。今後、より症例数を蓄積するとともに、可能な限り患者背景を揃えたMatched pair解析などを施行し、患者個別に対する至適前処置の選択方法を確立していきたい。

【文献】

1. Yamamoto H, Uchida N, Matsuno N, Kon A, Nishida A, Ota H, et al.: I.v. BU/fludarabine plus melphalan or TBI in unrelated cord blood transplantation for high-risk hematological diseases. Bone Marrow Transplant 50: 607-609, 2015
2. Yamamoto H, Uchida N, Yuasa M, Kageyama K, Ota H, Kaji D, et al.: A Novel Reduced-Toxicity Myeloablative Conditioning Regimen Using Full-Dose Busulfan, Fludarabine, and Melphalan for Single Cord Blood Transplantation Provides Durable Engraftment and Remission in Nonremission Myeloid Malignancies. Biol Blood Marrow Transplant 22: 1844-1850, 2016

急性骨髄性白血病に対する造血幹細胞移植における染色体核型を用いた予後分類に関する研究

湯淺　光博、景山　康生、梶　大介、西田　彩
高木　伸介、山本　久史、山本　豪、森　有紀
内田　直之、谷口　修一

【要約】

2008年から2018年までに当院で初回同種移植を受けた急性骨髄性白血病の患者515名の内、治療関連急性骨髄性白血病の患者、ET/PMFから移行した急性骨髄性白血病の患者、活動性感染症を有する患者、PS3以上の患者、初発時染色体情報がない患者、寛解期で同種移植を受けた患者を除外し294症例を対象とし解析を行った。2017 ELN risk分類は非寛解における急性骨髄性白血病に対する同種移植後の予後予測としても有用であった。予後不良群の中で複雑核型およびMonosomal karyotype（MK）を有することが予後不良因子として同定された。複雑核型およびMKを有さない予後不良群の患者の移植成績は予後中間群と同程度であったため、同種移植により再発リスクの低減がはかれた可能性が示唆された。

【目的】

急性骨髄性白血病の初発時染色体核型は同種移植後の予後規定因子として最も重要な因子の一つであるが、これは主に寛解期を中心としたデータに基づいており、非寛解期における急性骨髄性白血病に対しては十分に検討されていない[1,2]。当院は非寛解期の移植症例が多い施設であり、当院での症例を検討する事によりこれらの点を明らかにする事を目的とする。

【方法】

2008年から2018年までに当院で施行された急性骨髄性白血病に対して初回同種移植を受けた515症例の内、治療関連急性骨髄性白血病の患者(n=32)、ET/PMFから移行した急性骨髄性白血病の患者(n=15)、活動性感染症を有する患者・PS3以上の患者(n=38)、初発時染色体情報がない患者(n=59)、寛解期で同種移植を受けた患者(n=77）を除外し、294症例を対象とし解析を行った。染色体異常は2017 ELN risk stratificationで分類したが、FLT3-ITD、NPM1などの遺伝子異常は多くの患者で測定されていないため、除外した。

【結果】

294症例を対象に解析した。197名が男性、97名が女性であった。移植時平均年齢は60歳（17-77歳)、HCT-CI score中央値は2（0-7）であった。AML-NOSが91名、AML with recurrent genetic abnormalitiesが31名、AML-MRCが172名であった。臍帯血移植が252名（86%)、血縁者間造血幹細胞移植術が22名（7%)、非血縁者間骨髄移植が20名（7%）であった。2017 ELN risk stratificationでの予後良好群は17名（6%)、中間群 192名（65%)、予後不良群 85名（29%）であった。生存者の平均観察期間は35ヶ月(1-122ヶ月）であった。全体での3年OS、3年PFS、3年RR、3年NRMはそれぞれ40.3%、36.3%、31.7%、32.0%であった。予後不良群では予後中間群・良好群と比較して高い再発率、低いPFSを示した（3年RR: 42.0% vs 27.7%（p=0.02)、PFS: 29.1% vs 39.1%（p=0.04))。

予後不良群の中で更に解析したところ、複雑核型かつMKを有する患者（42名）はそれらを有さない患者と比較し高い再発率、低いPFSを示した（RR HR: 2.29（1.13-4.65）(p=0.02)、PFS HR: 1.91（1.11-3.27）(p=0.02))。複雑核型かつMKを有する患者を除いた予後不良群の移植成績は3年PFS 44.5%、3年RR 30.4%であり、予後中間群の3年PFS 35.7%、3年RR 29.4%と同等であり、複雑核型かつMKを除く予後不良因

子は同種移植においては再発のリスクの低減が図れる可能性が示唆された。

【考察】

複雑核型かつMK患者ではTP53変異を有する患者が多いなど分子細胞学的特徴に関して近年知見が蓄積されつつある。同種移植におけるそれらの予後因子に関しては不明であり、今後遺伝子異常と同種移植成績の解析が待たれる。

また今回の解析では多変量解析では予後不良群でOSを改善させる有意な因子は見られなかったが、再発での多変量解析では臍帯血が再発を抑える有意な因子となった（HR 0.41（0.17-0.99），p=0.048）。臍帯血のNRMが克服されることになりOSをも改善し得ることが期待される。

【文献】

1. Döhner H, et al.: Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood 129: 424-447, 2017
2. Fang M, et al:. Outcome of patients with acute myeloid leukemia with monosomal karyotype who undergo hematopoietic cell transplantation. Blood 118: 1490-1494, 2011

【発表に関する事項】

1. 湯淺光博、景山康生、梶　大介、西田　彩、高木伸介、山本久史、山本　豪、森　有紀、内田直之、谷口修一: Allogeneic stem cell transplantation has improved clinical outcome of patients with adverse karyotype other than monosomal and complex karyotype in non-remission- a single institute analysis of 294 recipients. 第60回アメリカ血液学会総会（San Diego）

（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－4

大久保　実、村勢　敏郎

【要約】

ギリシャ人とカナダ人の糖原病Ⅲ型患者2例から*AGL*変異を同定した。本年度の解析でも、糖原病Ⅲ型の*AGL*遺伝子変異は極めて多様で、正確な診断のためには*AGL*解析が必要であった。

【目的】

糖原病Ⅲ型（glycogen storage disease type Ⅲ : GSD Ⅲ）は異常なグリコーゲンが蓄積し、肝障害や筋萎縮・心筋症、低血糖といった多彩な症状を示す先天性代謝異常症である[1)]。この疾患はグリコーゲン脱分枝酵素glycogen debranching enzyme（別名amylo-1, 6-glucosidase: 遺伝子シンボルは*AGL*）の欠損が原因であり、常染色体劣性遺伝をする[2)]。頻度は数十万人に一人である。グリコーゲンが肝臓と筋肉に蓄積するⅢa型が大部分であるが、肝臓のみに蓄積する亜型Ⅲb型も存在する。

私どもはこれまで、日本[3)]とさまざまなエスニックグループ[4－6)]の*AGL*遺伝子解析を報告してきた。本年度はギリシャ人とカナダ人の患者を検討した。

【方法】

肝腫大や低血糖の臨床症状から糖原病Ⅲ型が疑われた患者からDNAを調製し、既報の如く[3)]*AGL*遺伝子の35個のエクソンとエクソン－イントロン接合部の塩基配列を決定して変異を検索した。

【結果】

1. ギリシャ人患者では、*AGL*遺伝子のエクソン13に2塩基の欠失を同定した（c.1596_1597delTC）。患者は変異のホモ接合体であった（**図1上段**）。両親はヘテロ接合体で、血族結婚であった。この欠失により早期に終止コドンが出現し、正常な酵素が生成されないことが推測された。臨床的には筋症状を伴うⅢa型であった。

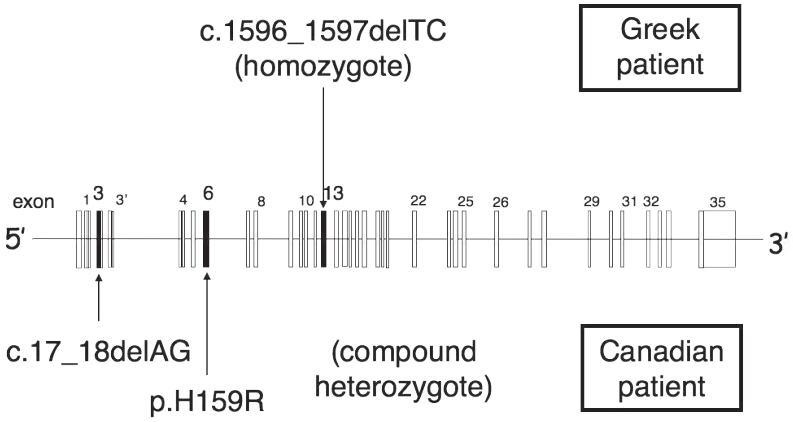


図1　本研究で同定した*AGL*変異
*AGL*のエクソンを矩形で示し、変異があったエクソンを塗りつぶした。

2. カナダ人患者では、エクソン3に2塩基欠失（c.17_18delAG）と、エクソン6にミスセンス変異（p.H159R）を同定した（**図1下段**）。患者はこの2つの変異の複合ヘテロ接合体であり、臨床的には筋症状を認めないⅢb型であった。

【考察】

糖原病Ⅲ型患者2例から*AGL*変異を同定した。ギリシャ人患者では、私どもが既にギリシャ人患者から報告した[7]エクソン7に生じた4塩基欠失（c.750_753delAGAC）とは異なる変異が見つかった。カナダ人患者は、エクソン3変異と新奇なミスセンス変異の複合ヘテロ接合体であった。筋症状を認めないⅢb型では、エクソン3に変異（c.17_18delAGまたはp.Q6X）がヘテロにあり、さらにもう一つ別の変異を有する複合ヘテロ接合体であることが報告されていた[8]。エクソン3の特定変異がⅢb型を惹起するメカニズムは現在も明らかではない。今回のカナダ人の解析結果ではc.17_18delAGが同定された。

本年度の解析でも、糖原病Ⅲ型の*AGL*遺伝子変異は極めて多様で、正確な診断のためには*AGL*解析が必要であった。

【文献】

1. 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
2. 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
3. Okubo M, et al.: Heterogeneous mutations in the glycogen-debranching enzyme gene are responsible for glycogen storage disease type Ⅲa in Japan. Hum Genet 106: 108-115, 2000
4. Endo Y, et al.: Egyptian glycogen storage disease type Ⅲ-Identification of six novel *AGL* mutations, including a large 1.5kb deletion and a missense mutation p.L620P with subtype Ⅲd. Clin Chem Lab Med 47: 1233-1238, 2009
5. 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
6. Rousseau-Nepton I, et al.: A founder *AGL* mutation causing glycogen storage disease type Ⅲa in Inuit identified through whole-exome sequencing: a case series. CMAJ 187: E68-E73, 2015
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
8. Shen J, et al.: Mutations in exon 3 of the glycogen debranching enzyme gene are associated with glycogen storage disease type Ⅲ that is differentially expressed in liver and muscle. J Clin Invest 98: 352-357, 1996

クッシング病におけるグルココルチコイド・ネガティブフィードバック抵抗性のメカニズム

竹下　章、右高　潤子[1]、荻久保 明香、戸来　孝
井下　尚子、西岡　宏、山田　正三、竹内　靖博
聖マリアンナ医科大学解剖学[1]

【要約】

背景: ACTH産生下垂体腫瘍が原因であるクッシング病は、ACTHの過剰分泌が副腎からの高コルチゾール血症を来たし、肥満・糖尿病・高血圧・骨粗鬆症・易感染性・心脳血管障害等を高率に合併する予後不良な疾患である。健常人では、コルチゾールが過剰になると下垂体からのACTHの分泌が抑制されるネガティブフィードバック（NF）機構が働くが、クッシング病ではNFが破綻しており高コルチゾール血症に関わらずACTHの持続的分泌が認められる。しかしながらクッシング病におけるNF破綻のメカニズムは不明である。

方法と結果: ACTH産生下垂体腫瘍から抽出したRNAのうち、ACTHの前駆体であるPOMC遺伝子の発現が高い腫瘍3例と、低い腫瘍3例を選び、DNAマイクロアレイを用いて両群での遺伝子発現プロファイルを比較したところ、POMC遺伝子の発現が高い腫瘍でコルチゾール代謝に関わるCYP3A4遺伝子発現が高かった。このため50例の腫瘍RNAを用いて定量リアルタイムPCRを行い検証したところPOMC mRNAとCYP3A4 mRNA発現量に正の相関が認められた。CYP3A4モノクローナル抗体を用いた免疫染色を計71例のACTH産生下垂体腫瘍で検討したところ、約50%は発現陰性であったが約35%が弱陽性、約15%が強陽性であった。またPOMC mRNAとCYP3A4免疫染色スコア、CYP3A4 mRNAとCYP3A4免疫染色スコアに正の相関が認められた。

考察: ACTH産生下垂体腫瘍の約半数にCYP3A4の発現が認められ、CYP3A4発現が高いほど、POMC発現も高いことから、CYP3A4による腫瘍細胞内コルチゾール代謝の促進がクッシング病におけるNF機構の破綻の成因のひとつに関与する可能性が示唆された。

【目的】

クッシング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。

健常人では、コルチゾールが過剰になると下垂体からのACTHの分泌が抑制されるネガティブフィードバック機構が働くが、クッシング病ではネガティブフィードバック機構が破綻しており高コルチゾール血症に関わらずACTHの持続的分泌が認められる。しかしながらクッシング病におけるネガティブフィードバック機構破綻のメカニズムは不明である。

2015年、エクソーム・シークエンスによる解析によりクッシング病下垂体腺腫の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[1, 2]。変異USP8がどのような機序で疾患を引き起こすのか、その分子機構はいまだ不明である。我々はUSP8変異を持つ腫瘍（MUT）は女性で2cm以下の小さな腫瘍に多くACTHの前駆体であるPOMC遺伝子の発現が高い、一方で野生型の腫瘍（WT）は周囲組織への浸潤性の強い大きな腫瘍に多く、POMC遺伝子発現は一般に低いことを報告した[3]。

昨年度までの研究で、POMC遺伝子発現が高

くUSP8変異陽性の腫瘍3例と、POMC遺伝子の発現が相対的に低くUSP8変異陰性の腫瘍3例を選び、DNAマイクロアレイを用いて両群での遺伝子発現プロファイルの異なる遺伝子を抽出後、50例の腫瘍RNAを用いて定量リアルタイムPCR（qPCR）を行って検証した。POMC発現を目的変数として、重回帰分析を行ったところ、2つの遺伝子が説明変数として選ばれた。そのうちのひとつCYP3A4に着目し、クッシング病下垂体腫瘍検体を用いたリアルタイムPCRと免疫染色によって、その発現を検討した。

【方法】

インフォームドコンセントを得、当院で2004年3月から2013年8月に手術したクッシング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[3)]。上記60例のRNAを用いてSYBR-Green法による定量リアルタイムPCR（qPCR）によりPIT1遺伝子発現を検討し、PIT1遺伝子発現が無視できる程度で正常下垂体の混在がないと判断した50例（MUT16例、WT34例）を用いて検討した。

マイクロアレイ解析はクッシング病下垂体腫瘍組織のうち6例（POMC遺伝子発現が高くUSP8変異陽性MUTのミクロ腺腫3例: MUT群とPOMC遺伝子の発現が相対的に低くUSP8変異陰性で周囲組織への浸潤性の強いマクロ腺腫の3例: WT群）からtotal RNAを抽出し、Affymetrix社のGeneChip® WT PLUS Kitで処理後Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrayを用いて2群間で遺伝子発現プロファイルを比較した。

WTとMUTで発現が有意に異なる遺伝子に関しては正常下垂体の混在を否定した50例（MUT16例、WT34例）の腫瘍RNAを用いてqPCRによりmRNA発現を評価した。qPCRはGAPDHを内部標準とし、mRNAの発現量を補正した。正常下垂体5例の各遺伝子発現量の平均を1として表示した。

免疫染色はCYP3A4抗体としてBio-Rad社のマウスモノクローナル抗体（PrecisionAb™ Monoclonal, VMA00117）を、発色はベクター社のImmPRESS Reagentを用いて行った。

【結果】

使用したマイクロアレイは53,981個のプローブを有し、24,670個の既知遺伝子の発現解析を行った。その結果、MUTでの発現量がWTに比べ有意に平均2倍以上（$p<0.05$）を呈した既知遺伝子は1,128個（POMC遺伝子も含む）、逆に1/2以下（$p<0.05$）の発現を呈した遺伝子数は288個であった。有意に変動する遺伝子数が多いため、倍率の高い遺伝子を40種、低い遺伝子を2種選び50例の腫瘍RNAを用いて計42の遺伝子について定量リアルタイムPCRを行ったところ28遺伝子でPOMC発現と$R>0.3$の相関を認めた。POMC遺伝子発現を目的変数として前進法によるステップワイズ重回帰分析を施行したところ、28遺伝子のうち2つの遺伝子（CYP3A4とMAP3K遺伝子のひとつ）の発現量が説明変数として選ばれた（$R=0.795$, $p<0.0001$）（**図1**）。一般にCYP3A4は肝臓や十二指腸・小腸に多く発現し、正常下垂体には発現は認められないことから、CYP3A4のモノクローナル抗体を用いて71例の

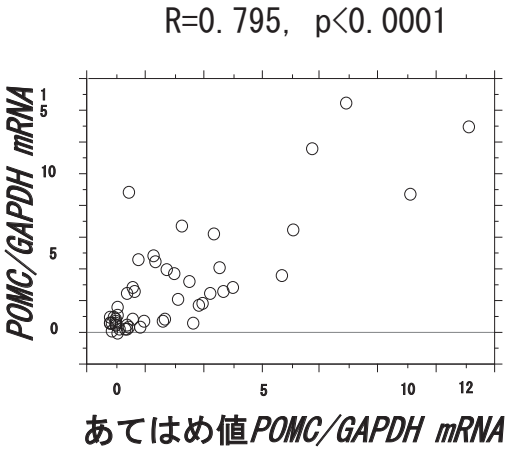


図1　重回帰分析によるPOMC遺伝子発現の予測値と実際値の関係
前進法によるステップワイズ重回帰分析により2つの遺伝子（CYP3A4遺伝子とMAP3K遺伝子のひとつ）の発現量がPOMC発現を予測する説明変数として選択された。mRNAはGAPDHの発現量で補正し、正常下垂体5例の発現量の平均を1として表示した。

クッシング病下垂体腺腫の免疫染色を行ったところ約50％に発現が認められ、約15％では強い発現が認められた（**表1**）。腫瘍のCYP3A4遺伝子のmRNA発現量と蛋白発現量（免疫染色スコア）には正の相関が認められ（R=0.588）（**図2A**）、CYP3A4遺伝子のmRNAとPOMC mRNA発現量（R=0.464）（**図2B**）、CYP3A4の蛋白発現量とPOMC mRNA（R=0.401）（**図2C**）にも、正の相関が認められた。

【考察】

本研究によりクッシング病の下垂体腺腫の約半数にCYP3A4の異所性発現が認められることが明らかとなった。重回帰分析によりCYP3A4発現とPOMC発現には強い関連性があり正の相関が認められた。

CYP3A4は主に肝臓や十二指腸・小腸に発現しているが、文献によると、免疫染色による検討で正常乳腺組織や乳癌組織にも発現が認められ、正常乳腺組織よりも乳癌組織に発現が多い傾向が認められるとの報告があるが、その意義については不明である[4)]。

CYP3A4は肝臓や十二指腸・小腸においてグルココルチコイドなどのステロイドホルモン代謝に関わる主要な酵素である。従ってクッシング病では腫瘍内のCYP3A4遺伝子の異所性発現により、腫瘍細胞内でのグルココルチコイドの代謝が亢進し、グルココルチコイド受容体を介したネガティブフィードバック機構が破綻することで、高コルチゾール血症に関わらずACTHの持続的過剰分泌が生じる可能性が考えられた。

表１　クッシング病下垂体腺腫71例のCYP３A４蛋白の発現
CYP３A４蛋白に対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行いスコアとして表示した。

スコア	0	1+	2+	3+
免疫染色	全て陰性	<5％で陽性	５～20％で陽性	>20％で陽性
数（n=39）	35	17	8	11
比率（%）	49.3%	23.9%	11.3%	15.5%

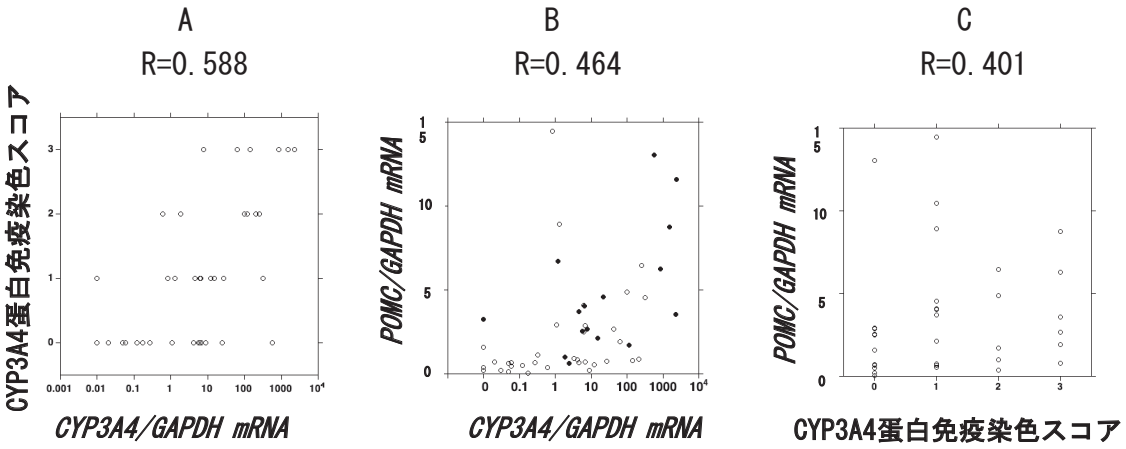


図２　CYP３A４遺伝子およびCYP３A４蛋白の発現とPOMC mRNA発現の関連性
mRNAはGAPDHの発現量で補正し、正常下垂体５例の発現量の平均を１として表示し、Spearmanの順位相関係数を用いて検定した。図中、白丸（○）はUSP８野生型を、黒丸（●）はUSP８変異陽性を表す。
A）CYP３A４ mRNAとCYP３A４蛋白発現量の相関
B）CYP３A４ mRNAとPOMC mRNA発現量の相関
C）CYP３A４蛋白とPOMC mRNA発現量の相関

【文献】

1. Reincke M, Sbiera S, Hayakawa A, et al.: Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. Nat Genet 47: 31-38, 2015
2. Ma ZY, Song ZJ, Chen JH, et al.: Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease. Cell Res 25: 306-317, 2015
3. Hayashi K, Inoshita N, Kawaguchi K, et al.: The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease. Eur J Endocrinol 174: 213-226, 2016
4. Kapucuoglu N, Coban T, Raunio H, et al.: Expression of CYP3A4 in human breast tumour and non-tumour tissues. Cancer Lett 202: 17-23, 2003

クッシング病術後の下垂体機能回復を規定する因子に関する探索研究

辰島　啓太、井下　尚子、竹下　彰
山田　正三、竹内　靖博

【目的】

ACTH産生下垂体腺腫が原因のクッシング病は高コルチゾル血症による様々な全身合併症（高血圧、糖尿病、中心性肥満、骨粗鬆症、易感染性、抑うつ状態）をきたす疾患である。腫瘍がACTHを過剰産生するため、正常下垂体からのACTH分泌は強力に抑制され機能停止の状態となっている。手術により腫瘍が全摘出されると腫瘍としては治癒に至るが、正常下垂体からのACTH分泌は通常すぐには回復せず、術後は中枢性副腎皮質機能低下に陥り、逆説的だが副腎皮質ステロイド剤の補充を要するようになる。このようにクッシング病では手術前後で高コルチゾル血症から副腎不全へと劇的な変化が生じるため、多くの患者に関節痛、全身倦怠感、情緒不安定などのステロイド離脱徴候が出現し、術後QOLが改善しないことが問題となっている[1)]。従って術後早期の正常下垂体のACTH分泌機能回復が望まれるが機能回復には個人差が非常に大きく、術後速やかに回復する症例もあれば、10年以上回復しない症例もある。また、その回復を予測する因子は未だ明らかではない。そこで本研究では当院で手術を受けたクッシング病患者の臨床データ、病理検体を後方的に解析し、術後の下垂体機能回復にどのような因子が寄与するのかを同定し、早期回復のために可能な介入方法を探索することを目的とする。

【方法】

本邦における「クッシング病の診断の手引き」に則りクッシング病と診断された患者で、2013年と2014年に当院で初回の内視鏡的経鼻的下垂体腫瘍切除術を受けた35例を対象とした。うち亜全摘2例、下垂体癌1例、寛解後再発1例、術後経過が不明な12例を除いた19例を解析対象とした。対象患者の診療録より下記の情報を収集した後方視的観察研究である。

1. 患者背景

年齢、性別、身長、体重、推定される罹患期間、術前の治療内容、術後機能回復に要した期間（ヒドロコルチゾン補充中止までの期間）

2. 血液検査

術前後のACTH、コルチゾル値、その他の下垂体前葉機能

3. 病理検体

正常下垂体のサイトケラチン（CAM5.2）染色パターン

(1) クッシング病患者の正常下垂体ではCrooke変性（CAM5.2染色でサイトケラチンが核周囲へ集簇している像）を認めることが多く、高コルチゾル血症との関連が示唆されている。CAM5.2染色パターンの解析は臨床経過を知らされていない病理専門医が行い、その染色パターンと術前後の臨床経過、下垂体機能との関係性を解析した。

(2) 術前の患者背景、経過、治療によって、術後の下垂体機能回復に違いがあるのかを解析した。

本研究は虎の門病院の臨床研究研究倫理審査委員会に承認された研究である（No. 1686）。

【結果】

対象19例のプロファイルを**表1**に示す。診断時の年齢の中央値は47歳で、推定罹病期間の中央値は約62ヶ月であった。5例で術前にメチラポンが投与され、血清コルチゾル値が低下していた。術後のACTH、コルチゾルの底値（中央値）は順に2.4 pg/mL, 2.3 μg/dLであった。術後全例が中枢性副腎皮質機能低下に陥りヒドロコルチゾンの補充を受けたが、術後の下垂体負荷試験にお

表１　対象の背景とグルココルチコイド補充の期間に関する解析

	全体 (n=19)	早期回復 (n=11)	長期補充 (n=8)	P 値
性別 (男性/女性)	3/16	3/8	0/8	–
診断時平均年齢(歳)	47.3	46.6	48.1	.83
推定罹患期間(月)	62	46	81	.24
術前メチラポン使用	5	3	2	–
術前ACTH(pg/ml)	82.7	85.5	78.8	.72
術前コルチゾル(μg/dl)	**23.2**	**20.2**	**27.2**	**.03**
術後ACTH底値	**2.4**	**3.9**	**0.3**	**.03**
術後コルチゾル底値	2.3	2.3	2.3	.97
ACTH, 9-12ヶ月後	15.5	23.2	1.7	<.001
コルチゾル, 9-12ヶ月後	6.2	9.3	0.7	<.001
観察期間 (月)	40	38	42	.44

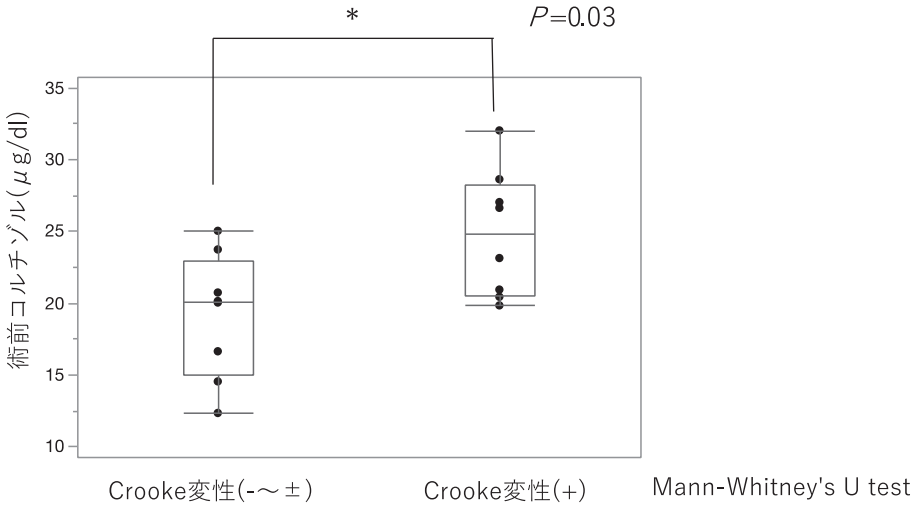


図１　正常下垂体のACTH産生細胞におけるCrooke変性と術前血清コルチゾル値の関係

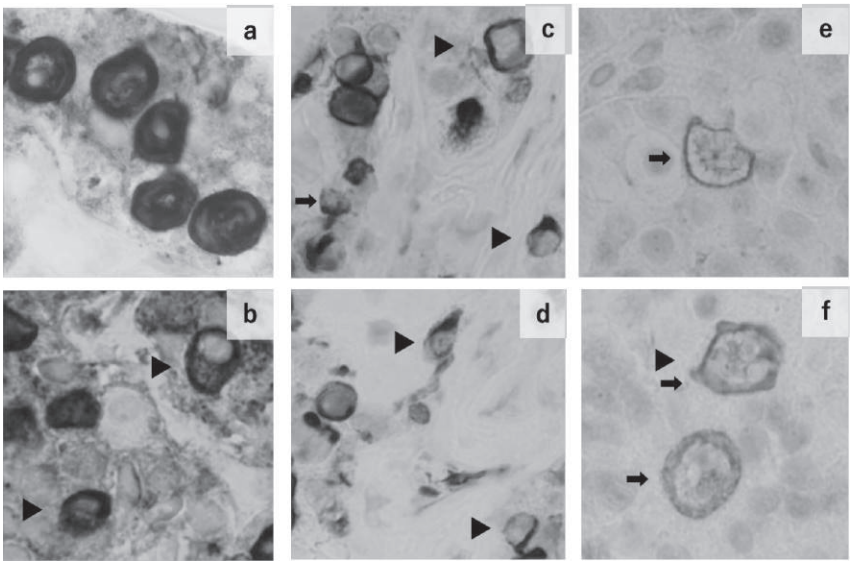
いてACTH以外のホルモンは全て正常機能であった。ヒドロコルチゾンの補充期間によって、早期回復群（術後2年以内にヒドロコルチゾン補充から離脱、補充期間の中央値12ヶ月、3-18ヶ月）、長期補充群（2年以上の補充を要したもの）に分けて解析を行った。ACTHの分泌が回復し早期に補充を離脱できた早期回復群では術前の血清コルチゾル値が低く（早期回復20.2μg/dL、長期補充27.2μg/dL、P値 0.03）、術後ACTHの底値が高い（早期回復3.9μg/dL、長期補充0.3μg/dL、P値0.03）傾向があった。

次に、血清コルチゾル値と正常下垂体のACTH産生細胞におけるCrooke変性の関係性について検討した（**図1**）。正常下垂体で強くCrooke変性をきたしている群は、Crooke変性の乏しい群に比べ有意に術前の血清コルチゾル値が高値であった。これら二つの結果は、手術を受ける時点での血清コルチゾル値が低い例において下垂体のCrooke変性が乏しく、ACTH分泌能が早く回復する事を示唆していると考えられた。

手術直前の血清コルチゾル値はクッシング病自体の重症度だけで規定されるものではなく、術前

表２　術前に血清コルチゾル値が低下した症例におけるヒドロコルチゾン補充とCrooke変性のパターン

年齢	低下理由	ACTH (pg/ml)	Cortisol (μg/dl)	ヒドロコルチゾン補充	前葉細胞のCrooke変性	前葉細胞のCAM5.2染色性
44	周期性	31.6	5.5	2週で終了	++	断片化、濃淡あり
66	メチラポン 84ヶ月, 3750mg	63.1	14.5	3ヶ月で終了	++	一部断片化
30	メチラポン 1ヶ月, 1500mg	135.5	20.4	15ヶ月で終了	+++	一部断片化
56	周期性	29.9	20.7	13ヶ月で終了	++	細胞質の辺縁
51	メチラポン 52ヶ月, 2000mg	58	23.1	15ヶ月で終了	+++	断片化、濃淡あり
60	メチラポン 2ヶ月, 500mg	38	25	36ヶ月時点で継続	++	細胞質の辺縁
56	メチラポン 5ヶ月, 750mg	78.7	27.8	54ヶ月時点で継続	前葉の検体なし	



a　典型的なCrooke変性（核周囲優位・リング状）
b–f　非典型的なCrooke変性（細胞辺縁→・リング状▶）

図２　Crooke変性の典型像と非典型像（CAM５.２染色）

の薬物療法や周期性の有無により変化するものである。よって、次に血清コルチゾルが低下した7例の特徴について検討を行った（**表2**）。少数の検討であること、また治療前の背景が異なることなどからコルチゾルが低下した例とそうでない例の比較はできないが、7例の中でも術前の血清コルチゾル値がより低い症例で早期に補充を終えていた。この結果より疾患の重症度とは無関係に、術直前のコルチゾル値が回復の規定因子の一つである可能性が示唆された。さらに、術前にコルチゾルが低下した症例では非典型的なCrooke変性の所見が散見された。典型的なCrooke変性は核

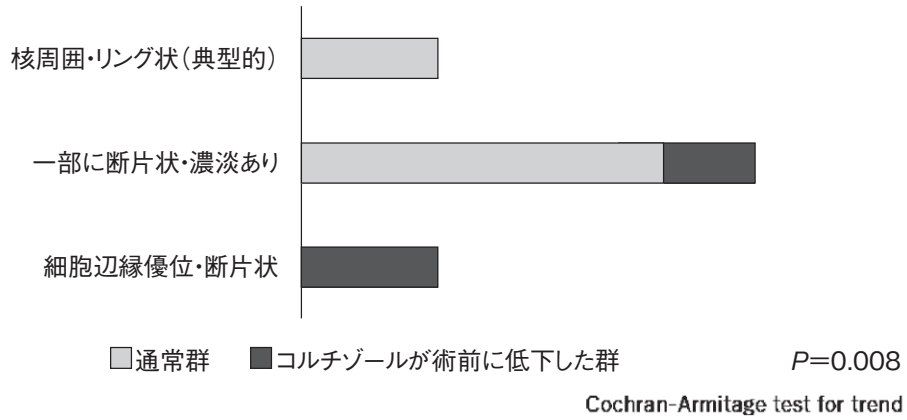


図３　Crooke変性のパターンとコルチゾル変化の有無についての関係

周囲優位にリング状にサイトケラチンフィラメントがCAM5.2染色陽性として確認される（**図2a**）。しかし、術前にコルチゾルが低下した症例の多くでは、サイトケラチンフィラメントの断片化やフィラメントが細胞辺縁に偏在化した像が目立った（**図2b–f**）。これらの特徴は解析対象19例で比較すると術前に血清コルチゾル値が低下した症例でより顕著であった（**図3**）。

【考察】

本研究ではクッシング病の術後、下垂体のACTH産生細胞の機能回復に関与する因子について検討を行い、下記の二つの結果を得た。クッシング病において、(1)術前の血清コルチゾル値が低い症例において前葉細胞のCrooke変性が少なく早期にグルココルチコイド補充を離脱した。(2)術前にメチラポン使用などで血清コルチゾル値が低下した症例では正常下垂体のACTH産生細胞で非特異的なCrooke変性を呈し、血清コルチゾル値が低い場合に早期にグルココルチコイド補充から離脱した。臨床的に軽症のクッシング病の方が術後正常下垂体の回復がはやいということは感覚的に理解しやすい事象であるが、術前の内科治療によって高コルチゾル血症を改善した例においても同様の傾向を認めた点は興味深い。

現在、クッシング病に対する術前メチラポン治療に関するガイドラインはなく、医師が重症と判断したクッシング病患者に対して対症療法的に使用されている。よってメチラポンの使用の有無で下垂体機能の回復を論じることは対象患者の重症度などが異なるため一般には困難である。しかし元々の重症度は様々でもメチラポンによって術前コルチゾルを低下させた方が、よりはやく下垂体機能が回復したという今回の結果は、術前メチラポン治療の有用性を示唆している。

今回の病理学的検討から、血清コルチゾル値と正常ACTH産生細胞の機能回復との関係の背景にはCrooke変性の状態が関与していると考えられる。Crooke変性は慢性的な過剰のグルココルチコイドが正常ACTH細胞に硝子化をもたらすことで生じる。変化の強さはコルチゾルと正相関[2]し、ステロイド投与によって医原性にも起こることが知られている。今回の検討で、術前に血清コルチゾル値が低下した症例において細胞が大型化したCrooke変性が確認でき、これは元々の重症度によってもたらされたものと考えられた。しかし、こうした症例の多くではサイトケラチンの染色が核周囲パターンではなく、断片状になり濃淡が出現し、さらには細胞質の辺縁に局在が変化した像が目立った。臨床経過と合わせて考えると、これらの非典型的な所見は過去不明とされていた正常下垂体におけるCrooke変性の退行、消失までの過程をとらえた可能性があると考えられた。

【結論】

クッシング病患者の血清コルチゾル値を低下させることは正常下垂体のACTH産生細胞に病理学的に証明できる形態変化を与え、術後のACTH分泌能の回復に寄与する可能性がある。

【文献】

1. Andela CD, et al.: Mechanisms in endocrinology: Cushing's syndrome causes irreversible effects on the human brain: a systematic review of structural and functional magnetic resonance imaging studies. Eur J Endocrinol 173: R1-R14, 2015
2. Oldfield EH, et al.: Crooke's changes in Cushing's syndrome depends on degree of hypercortisolism and individual susceptibility. J Clin Endocrinol Metab 100: 3165-3171, 2015

(3) 呼吸器疾患

肺扁平上皮癌におけるtumor spread through air spaces半定量法の検討

宇留賀 公紀、藤井　丈士、岸　一馬

【要約】

目的: Tumor spread through air spaces (STAS) は、肺癌細胞またはその小集塊が腫瘍周囲の肺胞領域に浮遊している所見である。STASを有する肺腺癌は術後再発率が高いことが報告され、肺癌のWHO分類2015年では新たな概念として導入された。その後、肺扁平上皮癌についてもSTASを有することが再発率を上昇させることが報告された。そこで今回、当院の肺扁平上皮癌の手術例でSTASの有無の評価、病理学的・臨床的背景の検討ならびに、予後への影響について検討を行うこととした。

方法: 2005年から2009年まで病理病期 I期の肺扁平上皮癌に対して完全切除を行った39例を対象とした。病変の周囲をすべて検鏡し、STASの存在を確認した。また、臨床病理学的所見とSTASの有無の関連、ならびに無再発生存期間に対するSTASの影響について統計学的解析を行った。

結果: STASは46.2%（18/39例）に認められた。性別、年齢、喫煙歴、病理病期、脈管侵襲などの臨床病理学的項目について、STASの有無による統計学的な有意差は認めなかった。無再発生存期間については、STASを認める症例では104.7カ月と認めない症例の145.5カ月より単変量解析では有意に短かったが、多変量解析では有意差を認めなかった。また、半定量法については浮遊している病変が少なく、評価を行えなかった。

結論: STASは完全切除された病理病期I期の扁平上皮癌において、約半数の症例に認められた。STASを有する症例では再発までの期間が単変量解析では短い傾向があったが、多変量解析では有意でなかった。半定量法については、扁平上皮癌では難しいと考えた。

【目的】

Tumor spread through air spaces (STAS) は、肺癌細胞またはその小集塊が腫瘍周囲の肺胞領域に浮遊している所見である。STASを有する肺腺癌は術後再発率が高いことが報告され[1)]、肺癌のWHO分類2015年では新たな概念として導入された。しかし、STASは1個の症例から多数認める症例まで様々であり、STASの量が予後に影響するかについては不明であった。そこで、われわれはSTASの半定量が肺腺癌のより細かい予後予測に有用であることを示した[2)]。その後、Kadotaらが肺扁平上皮癌についてもSTASを有することが再発率を上昇させることを報告した[3)]。そこで今回、当院の肺扁平上皮癌の手術例でSTASの半定量を行い、病理学的・臨床的背景の検討ならびに、予後への影響するかについて検討を行うこととした。

【方法】

本研究について虎の門病院 研究倫理審査委員会で承認を得た。2005年から2009年までに肺癌取扱い規約第7版 病理病期 I 期の肺扁平上皮癌に対して完全切除を行った39例を対象とした。腫瘍の存在するすべてのHE染色のスライドを検鏡し、STASの存在を確認した。また、リンパ管・血管侵襲、胸膜浸潤、壊死、角化などの詳細な病理所見、ならびに性別や年齢、喫煙歴などの臨床所見について検討した。STASの半定量は対物レンズ20倍においてSTASが最も豊富な部位を評価して、STASなしをgrade 0、1-4個をgrade 1、5個以上をgrade 2とした。統計はSPSS statistical software（version 18.0, SPSS

表１　症例背景とSTASの有無

		STASあり（n=18）	STASなし（n=21）	p値
年齢（70歳未満）		11	5	0.018
性別　男性/女性		17/1	20/1	1.000
喫煙（30 pack years以上）		14	20	0.162
術後補助化学療法		2	3	1.000
病理病期	IA	12	17	0.465
	IB	6	4	
リンパ管侵襲あり		13	12	0.328
血管侵襲あり		15	16	0.702
胸膜浸潤あり		4	5	1.000
壊死あり		18	20	1.000
角化あり		13	11	0.204

Inc., Chicago, IL）を用いた。STASの有無と症例背景については、カイ二乗検定を用いた。生存解析は、単変量解析は生存曲線をKaplan-Meier法により算出し、生存曲線の比較はLog Rank検定で行った。単変量解析でp=0.20以下の因子についてCox回帰分析を行い、p=0.05以下を有意とした。

【結果】

症例の背景は**表1**に示した。STASは18例（46.2%）に認め、年齢が70歳未満（p=0.018）と有意に相関していたが、喫煙歴や脈管浸潤とは有意差を認めなかった。

無再発生存期間はSTAS有り104.7ヶ月（95%信頼区間 71.8-137.2）、STASなし 145.5ヶ月（95%信頼区間 130.6-160.3）、と有意差を認めた（p=0.026）（**図1**）。5年での無再発生存率は、STASを有する症例で60.3%であったのに対して、ない症例で92.9%であった。多変量解析において、リンパ管浸潤がある症例において有意に無再発生存期間が短かったが（p=0.02）、STASの有無については有意差を認めなかった（p=0.06）。

【考察】

2011年のInternational Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Societyがmultidisciplinary lung adenocarcinoma classification[4]において肺腺癌の病理学的形態が予後と関連することが判明し、STASを有する肺腺癌は術後再発率が高いことが報告され[1]、肺癌のWHO分類2015年[5]では新たな概念として導入された。その後、Kadotaら[3]が216例の外科切除を行われたステージⅠ～Ⅳ期をすべて含む肺扁平上皮癌を解析し、87例（40.2%）にSTASを認め、リンパ節転移を有する、進行病期、リンパ管侵襲を有する症例においてSTASが多い傾向にあったと報告している。また、STASを有する症例で単変量・多変量解析ともに無再発生存期間が

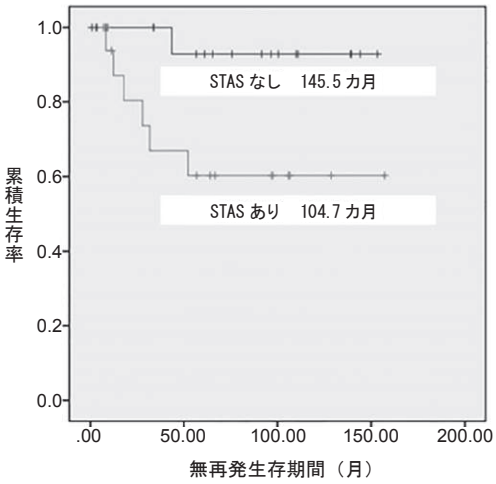


図１　STASの有無よるカプランマイヤー曲線

有意に短い傾向を示した。また、同論文内のステージⅠの症例のサブグループ解析でも、STASを有する症例の5年無再発生存期間が40%、STASがない症例が65%と同様の結果であった[3)]。しかし、本研究での無再発生存期間は単変量解析では有意であったが、多変量解析では有意差を認めなかった。この理由としては再発イベント数が少なったことにより、統計的なパワーが足りなかった可能性が考えられた。今後、より多くの症例で検討が必要であると考えられた。

肺腺癌における少量のSTASについては、われわれがSTASの半定量的評価により肺腺癌の予後予測に有用であることを示した[2)]。今回の研究では肺扁平上皮癌の症例についても同様の方法を試みたが、STASの病変が少ない症例が多く、評価は困難であった。これは肺扁平上皮癌の病理学的特徴と考えられ、半定量の評価は難しいと考えられた。

今回の検討では完全切除された病理病期I期の扁平上皮癌において、STASは約半数の症例に認められた。STASを有する症例では再発までの期間が単変量解析では短い傾向があったが、多変量解析では有意でなかった。半定量法については、扁平上皮癌では難しいと考えた。

【文献】

1. Kadota K, Nitadori J, Sima CS, et al: Tumor Spread through Air Spaces is an Important Pattern of Invasion and Impacts the Frequency and Location of Recurrences after Limited Resection for Small Stage I Lung Adenocarcinomas. J Thorac Oncol 10: 806-814, 2015
2. Uruga H, Fujii T, Fujimori S, et al: Semi-quantitative Assessment of Tumor Spread through Air Spaces (STAS) in Early-Stage Lung Adenocarcinomas. J Thorac Oncol 12: 1046-1051, 2017
3. Kadota K, Kushida Y, Katsuki N, et al: Tumor Spread Through Air Spaces Is an Independent Predictor of Recurrence-free Survival in Patients With Resected Lung Squamous Cell Carcinoma. Am J Surg Pathol 41: 1077-1086, 2017
4. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al: International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol 6: 244-285, 2011
5. Travis W, Brambilla E, Burke A, et al: WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th ed. International Agency for Research on Cancer, 2015

【発表に関連する事項】

1. Moriguchi S, Uruga H, Fujii T, et al: Transformation of EGFR T790M mutation-positive adenosquamous carcinoma of the lung to small cell carcinoma and large-cell neuroendocrine carcinoma following osimertinib therapy: Respirol Case Rep (in press), 2019

EGFR遺伝子変異陽性肺癌の長期予後とPD-L1発現に関する検討

森口　修平、宇留賀 公紀、藤井　丈士、岸　一馬

【要約】

進行期非小細胞肺癌の予後は、分子標的治療さらに免疫療法により大きく改善している。免疫チェックポイント阻害薬であるPD-1/PD-L1阻害薬は、腫瘍細胞のPD-L1発現例に有効例が多いことが報告されているが、*EGFR*変異陽性非小細胞肺癌におけるPD-L1発現に関する報告は少ない。2011年1月から2017年12月までに呼吸器センター内科に入院した進行/再発非小細胞肺癌のうち、生検により*EGFR*変異陽性と診断され、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI）による治療が行われた100例を対象とした。100例中60例では腫瘍細胞におけるPD-L1発現を検査した。男性49例、女性51例、non-smokerが55例、腺癌が96例であった。EGFR-TKIの奏効率は53％で、治療開始時のPS1以下（p=0.03）、胸郭外転移がない（p=0.015）、脳転移がない（p=0.022）症例などで全生存期間の有意な延長が示された。無増悪生存期間中央値は12.4か月、全生存期間中央値は35.5か月で、5年生存率は27.4％であった。PD-L1発現と全生存期間に有意差はなかった。

【目的】

従来、進行期非小細胞肺癌に対するプラチナ製剤併用化学療法の生存期間中央値は約1年であったが、分子標的治療さらに免疫療法の臨床導入により、その予後は大きく改善している。分子標的治療に関しては、2004年に*EGFR*変異陽性非小細胞肺癌に対してEGFRチロシンキナーゼ阻害剤（EGFR-TKI）が著効することが発見された。*EGFR*変異陽性非小細胞肺癌に対するEGFR-TKI治療により生存期間中央値は20から30ヶ月まで延長した[1]が、5年生存率に関する報告は僅かである。一方、免疫療法に関しては、PD-1/PD-L1阻害薬であるnivolumab、pembrolizumab、atezolizumab、durvalumabが承認され、長期生存が期待されている。特にpembrolizumabでは、腫瘍細胞のPD-L1発現例に有効例が多いことが報告されているが、*EGFR*変異陽性非小細胞肺癌におけるPD-L1発現に関する報告は少ない。本研究では、EGFR-TKIで治療された*EGFR*陽性非小細胞肺癌患者の5年生存率および予後因子を検討し、さらに*EGFR*変異陽性非小細胞肺癌におけるPD-L1発現について解析することを目的とする。

【方法】

2011年1月から2017年12月までに呼吸器センター内科に入院した進行/再発非小細胞肺癌のうち、生検により*EGFR*変異陽性と診断され、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI）による治療が行われた100例を対象とした。このうち60例では腫瘍細胞におけるPD-L1発現を22C3抗体による免疫染色で検査した。統計学的解析にはSPSSを用い、予後因子の解析にはt検定を使用し、Kaplan-Meier曲線を用いて5年生存率を算出した。

【結果】

性別は男性49例、女性51例であった。non-smokerが55例、腺癌が96例であり、*EGFR*変異の内訳はexon 19 deletion/exon 21 L858R/その他がそれぞれ47/50/3例であった。治療開始時のPSは0/1/2以上が25/51/24例、一次治療でのEGFR-TKIの使用が80例、96例がstage IVもしくは再発であった。治療開始時の胸郭外転移は57例で有しており、その内訳は肝臓/副腎/骨/脳が11/5/34/33例であった。PD-L1発現は高発現（50％以上）22％、低発現（50％未満）33％、陰性45％であった。使用薬剤はgefitinib/erlotinib/afatinibが23/71/6例で、全体の奏効率は53％であった。PD-L1高発現と低発現、無増悪生存期間が1年未満と1年以上での単変量解析による差は得られなかったものの、生存期

間1年未満と1年以上では治療開始時のPS1以下（p=0.03）、胸郭外転移なし（p=0.015）、脳転移なし（p=0.022）、初回EGFR-TKIの効果がCRもしくはPR（p=0.008）、総EGFR-TKI使用数が2以上（p=0.048）などで有意差が得られた。無増悪生存期間中央値は12.4か月、全生存期間中央値は35.5か月で、5年生存率は27.4%であった。PD-L1発現と全生存期間に関しては、有意な相関を認めなかった。EGFR-TKI後に免疫チェックポイント阻害薬を使用した6例ではPR/SD/PDがそれぞれ2/2/2例でPR33%、病勢制御率66.7%であった。

【考察】

EGFR-TKIは*EGFR*変異陽性肺癌に対し感受性があり、無増悪生存期間の中央値は約12か月、生存期間の中央値は約30か月、5年生存率は14.6%と報告されている[2)]。当科におけるEGFR変異陽性肺癌患者の無増悪生存期間中央値は12.4か月、生存期間中央値は35.5か月、5年生存率は27.4%であり既報告と同程度からやや良好であった。

進行非小細胞肺癌に対する二次治療として免疫チェックポイント阻害薬であるPD-1/PD-L1抗体とドセタキセルを比較したメタ解析が行われた。免疫チェックポイント阻害薬はドセタキセルよりも有意に生存期間を延長したが、*EGFR*変異陽性肺癌に対しては有意差を認めなかった[3)]。一方、未治療進行非扁平上皮非小細胞肺癌を対象としたIMpower150試験における*EGFR*変異陽性例のサブセット解析では、atezolizumab+carboplatin+paclitaxel+bevacizumab群がcarboplatin+paclitaxel+bevacizumab群よりも有効である可能性が示唆された[4)]。当科での*EGFR*変異陽性肺癌に対する免疫チェックポイント阻害薬単剤の使用成績は、限られた症例数ではあるものの、PR33%、病勢制御率67%と良好な効果を示した。今後症例を重ね検討する必要がある。

【文献】

1. Wu YL, et al.: Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced *EGFR* mutation-positive non-small-cell lung cancer. J Thorac Oncol: 556-565, 2016
2. Lin JJ, et al.: Five-Year Survival in *EGFR*-Mutant Metastatic Lung Adenocarcinoma Treated with EGFR-TKIs. J Thorac Oncol: 556-565, 2015
3. Lee CK, et al.: Checkpoint Inhibitors in Metastatic EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer-A Meta-Analysis. J Thorac Oncol: 403-407, 2017
4. Socinski MA, et al.: Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. N Engl J Med: 2288-2230, 2018

（4）消化器疾患

食道内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）後狭窄予防に対するポリグリコール酸（PGA）シートと自己フィブリン糊の有用性の検討

飯塚　敏郎

【要約】

目的: 表在食道癌に対する内視鏡治療（ESD）施行時において、偶発症の一つの狭窄に対する予防方法が確立していない。我々はこれまでPGAシートを用いて狭窄を予防することが可能であることを報告してきた。しかし使用する生物製剤であるフィブリン糊には、未知のウイルスの感染のリスクが少ないながらも存在し、使用できる量やコスト面に課題があった。近年自己血から自己フィブリン糊を作成することが可能となった。そこで、今回自己フィブリン糊を併用したPGAシートが、表在食道癌ESD後の狭窄予防策として有用かどうかを検討した。

方法: 2018年1月から表在食道癌に対しESDを施行した症例のうち、術前から広範囲切除になると想定され、自己フィブリン糊作成を行い、ESD後PGAシートの貼付と自己フィブリン糊散布が行いえた10例のうち、術後外科的手術が追加された2例を除く8例を対象とした。対照としてこれまでに施行した市販の生物学的製剤のフィブリン糊を使用した33例と比較検討した。

結果: 背景因子において、2群間で有意差は認められなかった。切除後の粘膜欠損も対象群、対照群の順に半周以上、3/4周未満が1例、8例、3/4周以上が7例、25例であった。狭窄発生率は25%と9.1%であり、統計学的な有意差は認められなかった。バルーン拡張回数と1週間目でのPGAシート固着率は、0.6回と1.2回、87.5%と69.7%であり、有意差は認められなかった。

結論: 今回の検討から、自己フィブリン糊を用いての食道ESD後狭窄予防は、十分市販のフィブリン糊と比較しても遜色のない有効性を出すことが確認された。

【目的】

表在食道癌が多く発見され、また内視鏡治療の進歩に伴い、大型の病変に対しても一括切除での内視鏡治療（ESD）が可能となった。こうした進歩の一方で、ESD後の偶発症の中で最も頻度の高い狭窄に対する予防方法が確立していない。ポリグリコール酸（PGA）を材料とした吸収性の縫合補強材であるPGAシート（ネオベール®）は、我々の検討でESD後の狭窄予防に有用である可能性が示唆された[1)]。PGAシートで人工潰瘍をシールドする場合フィブリン糊を使用するが、これまでは市販の製剤を使用していた。しかしヒトプール血漿を原料とするため、ヒトパルボウイルスB19[2)]、肝炎ウイルスおよびプリオン蛋白[3)]などの感染症やアレルギー反応[4)]の危険性が完全に排除できない。近年自己血漿から、フィブリン糊として用いるクリオプレシピテートとトロンビン液の両者を約1時間で調製できる医療機器が開発され、クリオシール®として使用することが可能となった。理論上感染やアレルギー反応のリスクがなくなるが、実臨床での有効性についてのデータは少ない。そこで、今回自己フィブリン糊を併用したPGAシートが、表在食道癌ESD後の狭窄予防策として有用かどうかを検討した。

【方法】

2018年1月から表在食道癌に対しESDを施行した症例のうち、術前から広範囲切除になると想定され、自己フィブリン糊作成を行い、ESD後PGAシートの貼付と自己フィブリン糊散布が行えた10例のうち、術後外科的手術が追加された2例を除く8例を対象とした。対照としてこれまで

に施行した市販の生物学的製剤のフィブリン糊を使用した33例と比較検討した。それぞれの群において、臨床的背景と狭窄発症率、バルーン拡張回数、ESD後1週間目におけるPGAシートの付着状態などを比較検討した。

狭窄の定義は、食道内腔の狭小化に加え、内視鏡（径9.2mm）が狭窄部を通過できない場合とした。PGAシートは、ESD直後の人工潰瘍部に内視鏡的に貼付し、全体を貼付し終えた後、自己フィブリン糊を全体に散布した。2日間の絶飲食後、経口摂取を再開とし、1週間目に同部のPGAシート残存状態を確認した。統計学的には、2群間同士の比較を行い、連続変数は、Mann-Whitney U testもしくはStudent t testで、カテゴリー変数は、χ^2 testまたはFisher's exact testで、STATA software（ver. 11, StataCorp LP, Texas, USA）を用いて行った。

【結果】

両群間の臨床的な因子を**表1**に明示する。年齢、性別、腫瘍局在、深達度においては、両群間で差は認められなかった。ESD後の粘膜欠損も自己フィブリン糊使用群で87.5%の症例で3/4周以上の粘膜欠損であり、市販のフィブリン糊使用群でも75.8%で3/4周以上の粘膜欠損であった（p=0.66）。primary endpointである狭窄発症は、それぞれ2例と3例で、25%と9.1%であった（p=0.25）。1週間目での観察時にPGAシートが十分残存していたのは、それぞれ87.5%と69.7%であった。市販のフィブリン糊使用群で、1週間目の時点でのPGAシート脱落例と狭窄発症の関連を見てみると、脱落例10例中3例で狭窄を発症したのに対し、十分残存していた23例では1例も狭窄を発症していなかった（p=0.021）。自己フィブリン糊使用群では、狭窄が認められた2例中1例は早期PGAシート脱落例であり、1例は残存していた。

【考察】

今回の検討では、自己フィブリン糊を使用した

表1　背景因子

	クリオシール使用群	市販フィブリノーゲン	
平均年齢（歳）	70.1±12.4	69.8±9.1	0.63
性別			1.00
男性	7	26	
女性	1	7	
病変の局在			0.66
頸部	0	0	
上部	2	5	
中部	5	19	
下部	1	9	
組織学的深達度			1.00
T1a	7	29	
T1b	1	4	
平均治療時間（分）	45.6±17.3	75.4±21.9	0.002
平均腫瘍長径（mm）	39±9.7	39.4±10.7	0.93
粘膜欠損			0.66
1/2≦　<3/4	1	8	
3/4≦　<全周	7	25	
筋層損傷	1	4	1.00
一括切除率（%）	100	100	1.00

食道表在癌に対するESD後の狭窄予防策は、市販のフィブリン糊使用時と比較して遜色なく、有用性があることが示された。これは、未知のウイルス感染や投与時のアレルギー反応のリスクをなくすことができる点で、使用を推奨する価値のある結果であった。自己フィブリン糊においては、牧野らの検討でフィブリノーゲンを2745mg/dl含有するのみならず、種々の凝固因子、TGF-β、VEGFなど種々の創傷治癒に関与する因子、局所感染の予防に関与する免疫グロブリンなどを多く含有していることが報告[5]されている。これは特に高周波を用いて形成された人工潰瘍の治癒過程においては、その修復過程で1週間内に起きると考えられている、創面の異物（凝血など）に対する好中球を中心とする炎症性細胞反応と肉芽組織による器質化・創傷周囲表皮細胞の増殖による肉芽組織表面の被覆・表皮下肉芽組織の増殖による欠損組織の充填[6]の程度を軽減することがあると考えられる。これが、ひいてはその後に生じる線維芽細胞の線維細胞への分化、膠原線維の収縮などを軽減し、狭窄予防につながると推測される。従って理論的にも十分狭窄予防に効をなすことが推測される。また1週間目でのPGAシートの残存の有無が、狭窄発症と関係する可能性が示され、如何に接着性を高めるかが課題であることが浮き彫りになった。自己フィブリン糊では、それに含まれる種々の因子の組成[5]から、高い接着性が期待される。

今回の検討のlimitationとして、症例数が少ないこと、自己血採血を行うためには、術前にHbが11.0以上あることが必要であること、観察期間が短いことなどが挙げられる。

結論としては、自己フィブリン糊を用いての食道ESD後狭窄予防は、十分市販のフィブリン糊と比較しても遜色のない有効性を出すことが確認された。

【文献】

1. Iizuka T, Kikuchi D, Yamada A, et al.: Polyglycolic acid sheet application to prevent esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection for esophageal squamous cell carcinoma. Endoscopy 47: 341-344, 2015
2. Kawamura M, Sawafuji M, Watanabe M, et al.: Frequency of transmission of human parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during thoracic surgery. Ann Thorac Surg 73: 1098-1100, 2002
3. Farrugia A, Ironside JW, Giangrande P: Variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission by plasma products: assessing and communicating risk in an era of scientific uncertainty. Vox Sang 89: 186-192, 2005
4. Beierlein W, Scheule AM, Antoniadis G, et al.: An immediate, allergic skin reaction to aprotinin after reexposure to fibrin sealant. Transfusion 40: 302-305, 2000
5. 牧野茂義、海堀いず美、吉井真司、他: 自己フィブリン糊の特性. 医学の歩み 231: 263-264, 2009
6. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al.: Pathologic basis of disease 8th ed. Saunders, 2010

膵がんオルガノイドモデルを用いた膵がん化学療法抵抗性機構の統合的解析

泉谷　昌志
東京大学医学部附属病院

【要約】

近年増加傾向にある膵がんの予後改善のためには、適切な疾患モデルとそれに基づいた臨床開発が必要である。マウス膵臓細胞の3次元オルガノイド培養ならびにこれらに対するレンチウイルスベクターを用いたKras, p53等の膵がん関連遺伝子の誘導、さらに免疫不全マウスへの皮下移植にて、ヒト膵がんに類似した多彩な組織像を有する腫瘍形成が可能であった。このモデルは、膵がん化学療法抵抗性機序の解明といった臨床的課題の解決に向け有用であると考えられる。

【目的】

代表的な難治性固形がんである膵がんの予後は極めて不良であり、その5年生存率は全体で9.1%、遠隔転移を伴うStage 4ではわずか1.6%となっている[1)]。近年膵がんにおいても化学療法の進歩がみられているが、5-FUを中心とした混合化学療法であるFOLFIRINOXでも無増悪生存期間（PFS）は6ヶ月程度にすぎない[2)]。ヒト膵がんのゲノム解析の結果が報告されており、*KRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *SMAD4*といった既知のがん関連遺伝子の頻度が高いことが分かったが、これらを即座に臨床応用することは困難である[3)]。これを補完するものとして疾患モデル、動物モデルがあり、膵がん研究においては主に遺伝子改変マウスを用いて研究が行われてきたが、臨床応用という観点からは動物モデルならではの欠点も存在する。近年3次元オルガノイド培養を用いた細胞培養技術が発展しており、培養細胞としての取り扱いやすさと由来臓器の基本的な形質を有したものとしてその有用性が期待されており、これを応用した膵がん研究の展開が考えられる。

【方法】

オルガノイド培養: マウス膵臓の初代培養については、安楽死したマウスより摘出した膵臓を5mm大に刻み、さらに酵素的に消化したのち、既報の通り培養した[4)]。すなわち、80μlのMatrigel（Corning）をwell底部に均一にコートした12-well plateにて37℃、CO_2 5%にてovernight培養したのち、浮遊した培地を除去、70μlのMatrigelでオーバーレイしMatrigelが固化したのち培地を加え培養を継続した。培地はAdvanced DMEM/F12（Thermo Fisher Scientific）に、必要にてmouse EGF（Peprotech), Noggin（Peprotech), Jagged-1（AnaSpec), Y27632（Wako）を添加した。細胞の増殖に伴い10-14日程度で1:1～1:3程度で継代を行った。

ウイルスベクター: CreリコンビナーゼまたはshRNAを組み込んだpLKO.1-puroベクターならびにViraPower Lentiviral Expression System（Invitrogen）を使用してウイルス粒子を作成した。

【結果】

以下の遺伝子改変マウスを単独または交配し、膵がんで代表的な遺伝子異常を持つマウスを得た: $Kras^{LSL\text{-}G12D/+}$（Creリコンビナーゼにて変異KrasG12Dを発現）; $Trp53^{flox/flox}$（Creリコンビナーゼにてp53をノックアウト）。

これらのマウス（3-5週齢）の膵臓を摘出し、3次元オルガノイド培養による初代培養を行ったが、その後無血清ならびに必要最小限度の因子（EGFならびにROCK阻害薬Y-27632）にて継続的なCK19陽性の膵上皮の3次元培養が可能であった。

これら「野生型」の膵オルガノイドにレンチウイルスベクターを用いてCreリコンビナーゼを導入し、変異Kras、p53ノックアウト、あるいは両者を有する膵オルガノイドを作成した。また、

膵がんで変異が報告されている腫瘍抑制遺伝子p16, smad4に対するshRNAの導入も行った。

腫瘍形成能を評価するために、膵オルガノイドをBALB/cヌードマウスの皮下に移植した。Kras変異単独膵オルガノイドの皮下移植にて（膵臓特異的な環境に依存せずに）腫瘍形成がみられ、組織学的には膵がんの前がん病変とされるpancreatic intraductal neoplasia（Pan-IN）に相当する像であった。一方で、Krasのほかp53ノックアウト、p16, smad4ノックダウンの組み合わせにて導入した遺伝子変異に応じて高～低分化の腺がんを認めた。

【考察】

遺伝子改変動物の個体を用いない形での3次元オルガノイド培養と免疫不全マウスへの移植を用いた膵発がんモデルにより、ヒトと同様の前がん病変（PanIN）から、がんに至る腫瘍の形成が可能であった。膵がんゲノム解析で報告のあるKras, p53をはじめとした数種類の膵がん関連遺伝子の正常膵臓オルガノイドへの導入や膵臓同所ではなくマウス皮下という異所への移植といった各種実験条件を制御しやすい実験手法を用い、比較的短期間にヒト膵がんに類似した病理組織像を持つ腫瘍が形成されたという本モデルの特徴は、従来の遺伝子改変マウスによる膵がんモデルとは違った形で本モデルの応用可能性を提示するものである。さらに、導入する遺伝子異常の数が増加するにつれ通常の遺伝子改変マウスではその困難さが急激に増加するが、本モデルでは比較的容易かつ実験に要するマウスの数も少なくて済む点も利点として挙げることができ、がんゲノム解析の結果を検証するプラットフォームとしても有用と言える。このモデルを用いた応用の一つとして、進行膵がんに対する化学療法抵抗性機序について検討中であり、化学療法耐性オルガノイドの誘導についての条件検討を重ねているが、今後は膵がんの生命予後の改善へとつながる研究へと展開していきたい。

【文献】

1. がん研究振興財団: がんの統計17
2. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al.: FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. N Engl J Med 364: 1817-1825, 2011
3. The Cancer Genome Atlas Research Network: Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Cell 32: 185-203, 2017
4. Onuma K, Ochiai M, Orihashi K, et al.: Genetic reconstitution of tumorigenesis in primary intestinal cells. Proc Natl Acad Sci USA 110: 11127-11132, 2013

三次元共培養系を用いた腸粘膜免疫における上皮・樹状細胞間の相互作用の検討

井原 聡三郎[1]、平田　喜裕[2]、引場　陽子[1]、山下　綾[3]
坪井　真代[3]、畑　昌宏[3]、小西　満[3]、鈴木　伸三[1]
崎谷　康佑[1]、木下　裕人[1]、早河　翼[3]、中川　勇人[3]
伊地知 秀明[3]、立石　敬介[3]、小池　和彦[3]
公益財団法人朝日生命成人病研究所消化器内科[1]
東京大学医科学研究所先端医療センター先端ゲノム医学分野[2]
東京大学大学院医学系研究科消化器内科学教室[3]

【要約】

炎症性腸疾患（IBD）は未だ原因不明の難治性腸疾患であり、その病態解明と治療への応用が求められる。我々は今迄に樹状細胞特異的遺伝子改変マウス（*CD11c-Cre Tgfbr2*$^{fl/fl}$）が腸内細菌叢の乱れを伴うIBD様腸炎を自然発症し、その機序に樹状細胞を介した腸上皮の分化異常（Notchシグナル過剰亢進）の関与を報告した[1)]。本研究では、腸オルガノイドと樹状細胞を共培養する系を用いて、樹状細胞と腸上皮の相互作用をより詳細に解析した。その結果、*CD11c-Cre Tgfbr2*$^{fl/fl}$マウス由来の腸炎惹起性の樹状細胞は、正常な腸オルガノイドに直接的に接着し、腸上皮のNotchシグナル亢進を伴う分化異常を招くことが分かった。さらに*CD11c-Cre Tgfbr2*$^{fl/fl}$マウスの腸管樹状細胞でE-cadherinをコードする遺伝子*Cdh1*が高発現している事に着目し、樹状細胞のE-cadherin発現を抑制したところ、共培養オルガノイドの分化異常が抑制された。さらに、*CD11c-Cre Tgfbr2*$^{fl/fl}$マウスにおいても樹状細胞のE-cadherinの発現抑制がIBD様腸炎や腸内細菌叢の乱れを抑制することが分かった。これらの結果から、樹状細胞のE-cadherinが腸上皮への接着によるNotchシグナルを介した腸上皮分化異常に関与し、腸炎を惹起した可能性が示唆された。本共培養系は樹状細胞と腸上皮細胞の相互作用を解析する良いツールであり、IBDの病態解明や治療応用につながる知見が得られると期待される。

【目的】

IBDにおける樹状細胞と腸上皮の相互作用が果たす役割を詳細に解析するため、腸オルガノイドと樹状細胞を共培養する系を確立した。さらに本共培養系を用いてIBDの病態に関与しうる分子を検討した。

【方法】

野生型マウスの小腸からオルガノイドを、*CD11c-Cre Tgfbr2*$^{fl/fl}$マウスの骨髄から骨髄由来樹状細胞（BMDC）を各々培養した。培養5日目に腸オルガノイドとBMDCを混合し、マトリゲル内で共培養を開始した。共培養4日目に顕微鏡観察と培養組織回収を行い、免疫染色やRNA解析を行った。フローサイトメトリを用いてBMDCのNotchリガンドの発現を解析した。*CD11c-Cre Tgfbr2*$^{fl/fl}$マウスおよびWTマウスの大腸から腸管樹状細胞を分離しRNAを抽出した。これらのRNAを用いて接着分子関連のPCRアレイを行った。*CD11c-Cre Tgfbr2*$^{fl/fl}$マウスおよびWTマウスの糞便からDNAを抽出し、16S rRNAシークエンスによる腸内細菌叢の解析を行った[2)]。

【結果】

CD11c-Cre Tgfbr2$^{fl/fl}$マウス由来BMDCは、腸管樹状細胞と同様に、Notchリガンドを高発現していた。BMDCと共培養したオルガノイドは異常に大きな嚢胞状の構造を呈し、Hes1発現亢進やMuc2発現低下などNotchシグナル亢進を伴

う分化異常を示した[2)]。これらの現象はトランスウェルやNotch阻害剤（DAPT）を用いた共培養オルガノイドでは見られず、樹状細胞と腸オルガノイドの直接的接着を介したNotchシグナル亢進が腸上皮分化異常を招くことが示唆された[2)]。接着分子関連のPCRアレイ解析では*CD11c-Cre Tgfbr2*$^{fl/fl}$マウスの腸管樹状細胞でE-cadherinをコードする遺伝子*Cdh1*が高発現していた[2)]。そこで本共培養系に抗E-cadherin抗体の投与、または*Cdh1*欠損BMDCを用いたところ、共培養オルガノイドの分化異常が抑制された[2)]。さらに、*CD11c-Cre Tgfbr2*$^{fl/fl}$マウスへの抗E-cadherin抗体の投与や、*CD11c-Cre Tgfbr2*$^{fl/fl}$ *Cdh1*$^{fl/fl}$マウスにおいてIBD様腸炎や腸内細菌叢の乱れが抑制された[2)]。これらの結果から、樹状細胞のE-cadherinが腸上皮への接着によるNotchシグナルを介した腸上皮分化異常に関与し、腸炎を惹起した可能性が示唆された。

【考察】

本共培養系は樹状細胞と腸上皮細胞の相互作用を解析する良いツールになり得る。本共培養系およびIBD腸炎マウスモデルを組み合わせることで、IBDの病態解明や治療応用につながる知見が得られると期待される。

我々は活動期のIBD患者の腸管樹状細胞においてE-cadherinの発現が上昇していることを報告した[2)]。本研究ではマウスモデルとオルガノイド共培養系を用いた解析を主体に行ってきたが、今後はIBD患者由来の樹状細胞と、健常人由来の腸オルガノイドを共培養する系を確立することで、IBDにおける樹状細胞のE-cadherinの役割について、ヒト検体を用いた解析を行いたい。

【文献】

1. Ihara S, Hirata Y, Serizawa T, et al.: TGF-β Signaling in Dendritic Cells Governs Colonic Homeostasis by Controlling Epithelial Differentiation and the Luminal Microbiota. J Immunol 196: 4603-4613, 2016
2. Ihara S, Hirata Y, Hikiba Y, et al.: Adhesive Interactions between Mononuclear Phagocytes and Intestinal Epithelium Perturb Normal Epithelial Differentiation and Serve as a Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Disease. J Crohns Colitis 12: 1219-1231, 2018

【発表に関する事項】

1. 井原聡三郎、平田喜裕、鈴木伸三、他: 炎症性腸疾患における樹状細胞・腸上皮間のNotchシグナルを介した相互作用. 第55回日本臨床分子医学会学術集会（京都）
2. Ihara S, Hirata Y, Suzuki N, et al.: Abrogation of TGF-beta Signaling in Dendritic Cells Leads to E-cadherin-mediated Adhesion between Dendritic Cells and Epithelium which Contribute to the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. Experimental Biology 2018（San Diego）
3. Ihara S, Hirata Y, Hikiba Y, et al.: Adhesive Interactions between Mononuclear Phagocytes and Intestinal Epithelium Perturb Normal Epithelial Differentiation and Serve as a Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Disease. J Crohns Colitis 12: 1219-1231, 2018

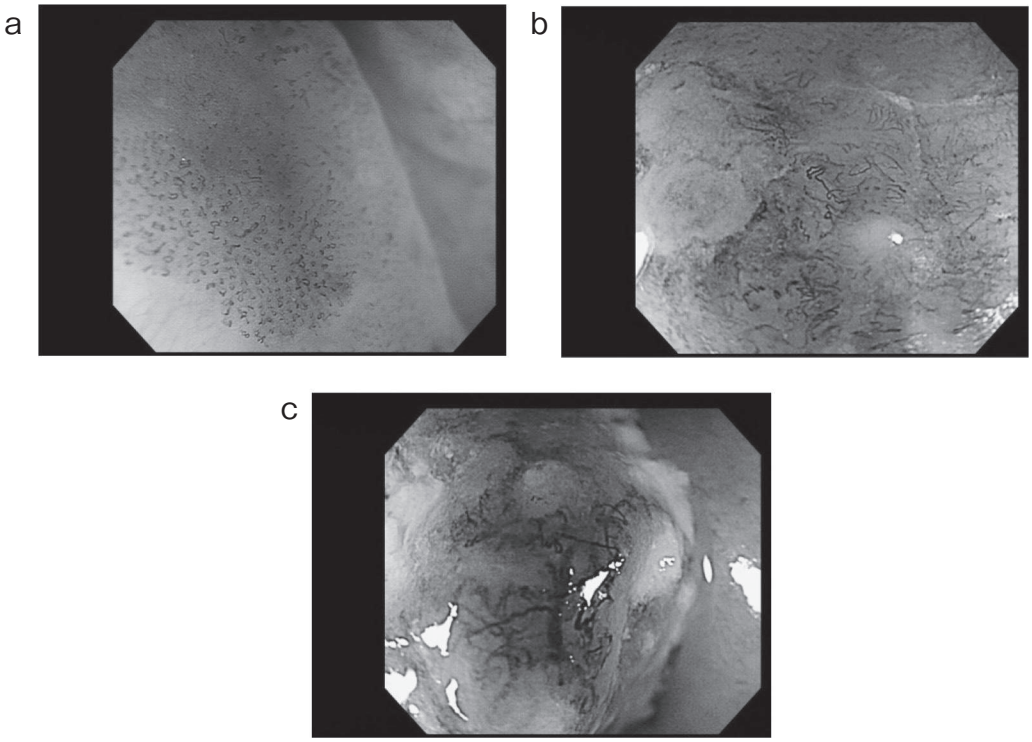
表在咽頭癌の深達度診断アルゴリズムの構築

菊池　大輔

【要約】

近年、Narrow band imaging（NBI）やBlue laser imaging（BLI）などの画像強調内視鏡と拡大内視鏡の技術の開発により多くの咽頭、食道の扁平上皮癌が早期に発見されている。従来の白色光内視鏡と比較すると病変を明瞭に認識することが可能であり、本邦からの多施設共同ランダム化試験でもその有用性が証明されている[1)]。またNBI拡大内視鏡を用いて血管構造を観察することで扁平上皮癌の深達度診断が可能であると報告[2,3)]され、近年では日本食道学会分類[4)]が広く用いられている。消化管悪性腫瘍の深達度はリンパ節転移との関連が強く、内視鏡治療かリンパ節郭清を含めた外科治療かの選別に非常に重要な情報である。

我々は以前より食道癌と同様の扁平上皮癌である咽頭癌においてもNBI拡大内視鏡で深達度が診断可能であると報告[5)]してきた。表在咽頭癌のリンパ節転移と深達度の関連は未だに不明であるが、近年の報告では上皮下浸潤（SEP）1000 μmがひとつのリスクであるとの報告が多くなされている。今回SEP 1000 μm以深の診断のための診



a. type B1血管。全ての血管のループ構造が保たれている。
b. type B2血管。ループ構造の消失した血管が認められるが拡張の程度は軽度である。
c. type B3血管。明らかに拡張した血管が認められる。

図 1

断アルゴリズムの構築を目指して検討を行った。

【方法】

1. 症例

2008年4月から2018年4月に当院で内視鏡的に切除がなされた表在咽頭癌の症例のうち、化学放射線療法を行われた症例や術前にNBI拡大観察を行われていなかった症例を除いた260症例401病変を対象とした。

2. 検討方法

対象病変の内視鏡画像をretrospectiveに2名の内視鏡医がreviewした。Reviewした内視鏡画像はすべて全身麻酔下に喉頭挙上を行った後の画像とした。白色光内視鏡所見、NBI拡大所見と病理所見との関連を検討した。NBI拡大における血管像は日本食道学会分類を用いて、B1、B2、B3血管に分類した（**図1**）。病理学的には基底層の保たれているものをCarcinoma in situ（CIS）とし、上皮下に浸潤をきたしているものをsubepithelial carcinoma（SEP）とした。浸潤距離は腫瘍最表層から最深部までの距離とした。今回浸潤距離が1000 μm未満をSEP1、1000 μm以上をSEP2とした。

【結果】

全260症例は男性246症例、女性14症例であり、平均年齢は67.5歳であった。病変部位は下咽頭が294病変、中咽頭が94病変、喉頭や口腔底などが13病変であった。ESDで切除されたものが363病変であり、内視鏡補助下に耳鼻科医が切除したものが38病変であった。

切除後の病理的な深達度は、CISが200病変であり、SEPが201病変であった。SEP病変のうちSEP1は154病変であり、SEP2は47病変であった。

内視鏡的には、白色光で肉眼形態が0-Ⅰ型成分を有するものが14病変、0-Ⅱa成分を有するものが106病変、0-Ⅱb病変が276病変、0-Ⅱc病変が5病変であった。0-Ⅰ成分を有する14病変ではSEP1が1病変であり、SEP2が13病変であった。NBIでB1血管のみであったものが324病変であり、深達度はCISが194病変、SEP1が120病変、SEP2が10病変であった。B2血管を60病変で認め、深達度はCISが6病変、SEP1が33病変、SEP2が21病変であった。B3血管を17病変で認め、深達度はSEP1が1病変、SEP2が16病変であった。病変内に0-Ⅰ成分かB3血管を有するか、隆起部にB2血管を認めることをSEP2の診断基準とすると、感度は74.5%（35/47）、特異度は94.4%（334/354）、正診率は92.0%（369/401）であった。

【考察】

表在咽頭癌に対する治療は、放射線療法、化学放射線療法、手術、局所治療などがありうる。放射線療法や手術は侵襲が大きいため近年は内視鏡治療を含めた経口的な局所治療が普及しつつある。特に内視鏡治療は従来の内視鏡的粘膜切除術（EMR）から内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）へと進歩したことにより従来は切除困難であった病変も内視鏡的に一括切除が可能となっている。我々は以前より咽頭癌に対してもESDを行っており、その有用性を報告[6, 7]している。しかしESDはリンパ節転移のリスクの少ない症例に対して行われるべきであり、治療前にリンパ節転移のリスクを把握することは非常に重要である。

従来咽頭癌は症状が出現してから発見されることが多かったが、近年はNBIなどの画像強調内視鏡の進歩、消化器内視鏡医の知識や認識の向上により内視鏡治療を行いうる表在咽頭癌が数多く消化器内視鏡検査により発見されるようになっている。また発見のみならず深達度診断もNBI拡大で可能であると報告され広く普及している。我々も咽頭癌の深達度診断におけるNBI拡大の有用性を報告しているが、従来はCISかSEPを分ける診断を行っていた。しかし、咽頭領域は病理学的には扁平上皮が覆っており食道に類似しているが、粘膜筋板が存在せず異なる点も存在している。食道領域では上皮内の癌（M1）もしくは粘膜固有層までの癌（M2）ではリンパ節転移のリスクがないと考えられ、食道癌治療ガイドラインでも内視鏡治療の絶対的な適応とされている。一方で粘膜筋板に接する癌（M3）ではリンパ節転移のリスクが生じるため内視鏡治療以外の手術やCRTも選択肢となりうる。この観点から、食道癌の深達度診断はM1/2かそれ以外を分けることが最も重要である。咽頭癌においてCISかSEP

を分けることは食道癌ではM1かそれ以外を分けることに相当し、必ずしもリンパ節転移のリスクの層別化に有益ではない可能性が考えられた。このため今回我々はリンパ節転移のリスクを層別化するための深達度診断としてSEP2か否かの診断アルゴリズムを検討した。

今回、SEP2の診断基準を以下の如く設定した。①白色光で丈の高い隆起成分（0-Ⅰ型）を有する、②NBIでB3血管を有する、③白色光で隆起部（0-Ⅰもしくは0-Ⅱa）にB2血管が出現すること。この診断基準を用いることで正診率が92%（369/401）と高い結果となった。つまり、まずは白色光で病変の全体を観察し、丈の高い隆起部が存在したらSEP2とその時点で診断が可能である。しかし、咽頭は軟骨やリンパ装置などのために隆起をなしていることが多いため、その隆起部の血管構造をNBI拡大で詳細に観察することは非常に重要である。つまり隆起部でも血管異型が存在しない場合は隆起を構成する成分が癌によるものではなく、正常な軟骨やリンパ装置などの可能性を考慮する必要がある。丈の高い隆起部が存在しない場合は、扁平隆起部を検討し、同部にB2血管が存在する際にはSEP2と診断が可能であると考えられた。

本検討にはいくつかのlimitationが存在する。まず単施設の後ろ向きの検討であることである。今後多施設の前向き試験を行いたいと考えている。また喉頭挙上した後での内視鏡画像のreviewであり、喉頭挙上により肉眼形態に変化が起こっている可能性は否定できない。しかし咽頭領域は反射や唾液などにより必ずしも術前の内視鏡では詳細に観察ができていない可能性があるためより詳細に観察した画像と病理所見との対比を行うために全身麻酔下に喉頭挙上をした画像をreviewするようにした。

結論であるが、表在咽頭癌の深達度診断は白色光内視鏡とNBI拡大内視鏡を用いることで正確に診断可能であると考えられた。

【文献】

1. Muto M, Minashi K, Yano T, Saito Y, Ono I, Nonaka S, et al.: Early detection of superficial squamous cell carcinoma in the head and neck region and esophagus by narrow band imaging: a multicenter randomized controlled trial. J Clin Oncol 28: 1566-1572, 2010
2. Inoue H, Honda T, Nagai K, Kawano T, Yoshino K, Takeshita K, et al.: Ultra-high magnification endoscopic observation of carcinoma in situ of the esophagus. Dig Endosc 9: 16-18, 1997
3. Arima M, Tada M, Arima H: Evaluation of microvascular patterns of superficial esophageal cancers by magnifying endoscopy. Esophagus 2: 191-197, 2005
4. Oyama T, Inoue H, Arima M, et al.: Prediction of the invasion depth of superficial squamous cell carcinoma based on microvessel morphology: magnifying endoscopic classification of the Japan Esophageal Society. Esophagus 14: 105-112, 2017
5. Kikuchi D, Iizuka T, Yamada A, et al.: Utility of magnifying endoscopy with narrow band imaging in determining the invasion depth of superficial pharyngeal cancer. Head Neck 37: 846-850, 2015
6. Iizuka T, Kikuchi D, Hoteya S, Yahagi N, Takeda H: Endoscopic submucosal dissection for treatment of mesopharyngeal and hypopharyngeal carcinomas. Endoscopy 41: 113-117, 2009
7. Iizuka T, Kikuchi D, Hoteya S, Nakamura M, Yamashita S, Mitani T, et al.: Clinical advantage of endoscopic submucosal dissection over endoscopic mucosal resection for early mesopharyngeal and hypopharyngeal cancers. Endoscopy 43: 839-843, 2011

表在性非乳頭部十二指腸腫瘍に対するNBI併用拡大内視鏡観察の有効性と内視鏡切除後偶発症予防に関する検討

布袋屋　修、岡本　陽祐、井下　尚子

【要約】

目的: 表在性非乳頭部十二指腸上皮性腫瘍（SNADET）に対する内視鏡的切除の技術的難易度は他臓器と比しはるかに高く、死亡に至る重篤な偶発症も報告されている。そのため、治療適応判断のためのNBI拡大内視鏡所見による術前悪性度診断能および内視鏡切除後の遅発性穿孔予防策について検討を行った。

方法: 当院にて内視鏡精査・治療を行ったSNADETに対するNBI拡大観察の診断能と遅発性穿孔予防のための内視鏡下縫縮術の成績について評価した。

結果: 最終病理診断にて低異型度腺腫（LGA）、高異型度腺腫（HGA）、早期癌（Ca）に分類し、NBI拡大内視鏡にて領域をもって表面微細構造に不明瞭化、癒合の所見があり腺窩辺縁上皮が不均一な所見をHGA以上とした場合の病理学的異型度の正診率は80.0%（120/150）であり、我々の既報より良好な成績であった。術後潰瘍底のクリップによる完全縫縮は77.6%で可能あった。全体の後出血率6.6%で縫縮不能例では全例保存的に改善したが、縫縮不能例における後出血率が17.6%に対し、縫縮例では0%であった。遅発性穿孔は縫縮不能例の5.9%に対し、縫縮例では0%であった。

結論: SNADETに対する内視鏡治療適応基準は確立されていないが、NBI併用拡大所見による組織学的悪性度予測が可能であることが示唆された。また、内視鏡切除後の重篤な偶発症予防には潰瘍底の縫縮が極めて有用であった。

【目的】

表在性非乳頭部十二指腸上皮性腫瘍(SNADET)は疾患頻度は低いものの、近年の内視鏡技術および機器の進歩、さらには内視鏡検診の普及によって発見率は徐々に増加している。しかし、疾患頻度の低さから、腫瘍の病理組織学的病態も解明されておらず、診断、治療法について確立されたものは存在していない。内視鏡診断において、その質的診断学は他の食道・胃・大腸などの消化管腫瘍に大きく遅れをとっており、病変を発見しても、その後どう診断したらよいのか、生検すべきか、治療適応をどう判断すべきかなど、臨床の現場では大きな問題となっている。さらに内視鏡治療となると、その解剖学的特徴から、技術的難易度は高く、合併症率の高さから内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）は一般的ではない上、内視鏡的粘膜切除術（EMR）においても、重篤な合併症や、死亡に至る偶発症も報告されているため、世界でもごく限られた先進施設でのみ行われている。一方で十二指腸腫瘍の標準外科術式である膵頭十二指腸合併切除の侵襲も多大であり、転移リスクの少ない腫瘍に対する診断的治療としての内視鏡切除の意義、とりわけ患者QOLにもたらすメリットは極めて大きく、安全で確実な治療戦略の確立が急務である。今回我々はNBI併用拡大所見の分類を新たに提唱し、組織学的悪性度と対比することで、術前診断への有用性を検討した。また、SNADETに対する内視鏡切除後の重篤な偶発症が問題となっている[1,2]が、当院で行っている術後偶発症予防としての潰瘍底縫縮術の有用性についても検討した。

【方法】

検討1: 2017年12月31日までに、当院で内視鏡的切除され、術前にM-NBIが実施されたSNADETで内視鏡的粘膜切除（EMR）または内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）を行った合計172病変中、隆起型腫瘍は除外し150例を解析対象とした。臨床病理学的情報をブラインドにし、3人の内視鏡専門医が内視鏡レポートシステムから抽出された対象病変の代表画像を読影した。領域を

もって表面微細構造に不明瞭化、癒合の所見がなく腺窩辺縁上皮が均一な場合、および異型血管が規則正しくmesh状に配列した場合をA typeとした。領域をもって表面微細構造に不明瞭化、癒合の所見があり腺窩辺縁上皮が不均一な場合はB typeとした。領域をもって表面構造が荒廃した所見が領域をもってみられる場合C typeとした。A typeを低異型度腺腫相当、B typeを高異型度腺腫相当、C typeを早期癌相当と想定し内視鏡診断を行った場合の正診率を検証した。また、B type以上を高異型度腺腫以上とした場合の正診率も併せて検証した。

検討2: 同時期にESDを完遂した76病変の治療成績（腫瘍・切除サイズ、治療時間、術中穿孔、後出血、遅発穿孔、完全一括切除率、担癌率）とESD途中で断念し、外科手術を行った2病変について報告する。当院では十二指腸ESDは外科のバックアップのもと、できるだけ全身麻酔下にて行い、状況に応じてスコープやデバイスを複数回変更することでより確実な一括切除を達成している。術中穿孔に対してはクリップ縫縮、術後は粘膜把持法などで可能なかぎり粘膜完全縫縮を行うことで偶発症対策を講じている。

【結果】

結果1: 患者背景は、男女104/46人で平均年齢60.5歳（32-89歳）であった。切除方法の内訳は、内視鏡的粘膜切除96例（64.0%）、cold snare polypectomy 1例（0.7%）、内視鏡的粘膜下層剥離術53例（35.3%）であった。平均腫瘍径は、14.4mm（2-60mm）であった。肉眼型は、Ⅱa/Ⅱb/Ⅱc/Ⅱa+Ⅱc: 82（54.7%）/1（0.7%）/49（32.7%）/18（12.0%）であった。病変の部位は、球部/上十二指腸角/下行部/下十二指腸角/水平部: 3（2.0%）/22（14.7%）/81（54.%）/31（20.7）/13（8.7%）であった。最終病理診断は、低異型度腺腫（LGA）/高異型度腺腫（HGA）/早期癌（Ca）: 39(26.0%)/65(43.3%)/46(30.7%)であった。A、B、C typeに分類した場合の病理学的異型度の正診率は60.7%（91/150）でB type以上をHGA以上とした場合の病理学的異型度の正診率は80.0%（120/150）であった（**表1**）。

結果2: ESD完遂した76病変の平均サイズ（病変/標本）は23.8/31.5mmであった。治療時間159.9±83.6分、術中穿孔は10.5%（8/76）で、1例（1.3%）のみ縫縮不能のため外科手術に移行した。77.6%（59/76）は完全縫縮可能であったが、球部や乳頭近傍は縫縮が不可能であった。全体の後出血率は6.6%（5/76）で全例保存的に改善したが、縫縮不能例における後出血率が17.6%（3/17）と高率であった（**表2**）。縫縮不能であった1例（1.3%）に遅発性穿孔を認め外科手術を要した。完全一括切除は97.4%（72/76）担癌率は48.7%（37/76）で、現在まで局所・遠隔再発例を認めていない。腫瘍内異所性膵の1例と進行

表 1　NBI併用拡大分類と病理組織の対比

Endoscopic type	A	BC	*P* value
Histological type			<0.001
LGA	22（62.8）	17（14.8）	
HGA	13（37.1）	98（85.2）	
Adenocarcinoma			

表 2　予防縫縮による遅発性合併症率

術後潰瘍底の縫縮術		
	あり（n=59）	なし（n=17）
後出血率	0%	17.6%（3/17）
遅発性穿孔率	0%	5.9%（1/17）

粘液癌の1例は術前診断できず、ESDを途中で断念した。

【考察】

SNADETに対するM-NBIの有用性に関する報告はまだ一定の見解に達しておらずSNADETの内視鏡像の多様性から診断の困難性が示唆される。十二指腸の特徴として絨毛の白色沈着物の存在などから異型血管の判別が困難となることも一つの要因として考えられる。HGAとCaの判別には課題が残されているが、表面の構造により着目した診断は、B type以上をHGA以上とした場合の病理学的異型度の正診率は80.0%と既報[3-5]より高く、切除適応判断に有用である可能性が示唆された。今後病理組織学的な検討を加え、免疫形質発現による悪性度診断が可能かどうか検討する必要がある。治療については様々な工夫を駆使することで難易度の高い十二指腸ESDも安全かつ根治性の高い治療が可能であった。しかし術前診断が困難で切除断念例があることも念頭に置く必要がある。術後合併症予防には予防縫縮が極めて有効であるが球部と膵臓側の縫縮不能例が今後の課題である。

【文献】

1. Hoteya S, Kaise M, Iizuka T, et al.: Delayed bleeding after endoscopic submucosal dissection for non-ampullary superficial duodenal neoplasias might be prevented by prophylactic endoscopic closure: analysis of risk factors. Dig Endosc 27: 323-330, 2015
2. Hoteya S, Furuhata T, Toba T, et al.: Endoscopic submucosal Dissection and endoscopic mucosal resection for non-ampullary superficial duodenal tumor. Digestion 95: 36-42, 2017
3. Tsuji S, Doyama H, Tsuji K, et al.: Preoperative endoscopic diagnosis of superficial non-ampullary duodenal epithelial tumors, including magnifying endoscopy. World J Gastroenterol 21: 11832-11841, 2015
4. Goda K, Kikuchi D, Yamamoto Y, et al.: Endoscopic diagnosis of superficial non-ampullary duodenal epithelial tumors in Japan: Multicenter case series. Digestive Endoscopy 26: 23-29, 2014
5. Kikuchi D, Hoteya S, Iizuka T, et al.: Diagnostic algorithm of magnifying endoscopy with narrow band imaging for superficial non-ampullary duodenal epithelial tumors. Digestive Endoscopy 26: 16-22, 2014

消化器疾患における炎症再生シグナルの役割に関する研究

谷口　浩二
慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室

【要約】

IL-6シグナルのエフェクターとしてJAK-STAT3経路が有名であるが、最近、著者は新たなエフェクターとしてSrc-YAP経路を発見し、腸の再生に重要であることを報告した。今回の研究では、消化器がんと消化器再生における炎症、Src-YAP経路とJAK-STAT3経路の活性化機構と役割を明らかにする事を目的とした。まず腸オルガノイドにおいてがん抑制遺伝子APCの欠損によりSrc-YAP経路とJAK-STAT3経路が活性化される事を発見した。さらにSrc-YAP経路とJAK-STAT3経路を阻害剤で同時に抑制する事で単剤投与に比べて大腸がん、膵臓がん、食道がん細胞の増殖をより効果的に抑制できる事が明らかとなった。Src阻害剤とJAK阻害剤はすでに一部が治療薬として他の疾患に承認されたり、治験が行われたりしている。そのため、今回の研究結果はヒトへの臨床応用も早期に行うことが可能と期待される。

【目的】

大腸がん、膵臓がんなどの消化器がんによる死亡率は依然として高く、早期であれば内科的治療や外科的切除が可能であるが、進行がんやがんの再発の場合は主に化学療法が行われ、その効果は限定的である。慢性炎症が多くのがんの発生や浸潤・転移に寄与している事がよく知られており、その中でも炎症性サイトカインIL-6が大きな役割を果たしている事が知られている。

IL-6シグナルのエフェクターとしてJAK-STAT3経路が有名であるが、最近、著者はSrc-YAP経路を発見し、腸の再生に重要である事を報告した。IL-6-gp130-Src-YAP経路は、「炎症」と「再生」をつなぐ新規シグナル伝達経路であると考えられる。

再生を促進するシグナルの多くはがんにおいても活性化している事が知られており、このシグナルががんにおいても活性化していれば、がんの新しい治療標的になる可能性がある。本研究では、消化器がんや消化器再生における炎症およびSrc-YAP経路の役割を明らかにし、新規のがん治療標的・治療法を発見して、新しい集学的治療を提唱する事を目的として研究を行った。

【方法】

1. 消化器がんにおけるSrc-YAP経路の活性化メカニズム・役割の解明

マウス腸オルガノイドやヒト食道がん細胞株（TE-1, TE-5, TE-8, TE-11）、ヒト膵臓がん細胞株（Panc-1とMiaPaCa-2）を用いて、Src-YAP経路やJAK-STAT3経路が活性化しているかをウエスタンブロット法にて検討した。また食道がん細胞株や膵臓がん細胞株の増殖に対するSrc阻害剤とJAK阻害剤の効果をMTT assayで検討した。具体的には、上記細胞株を96 wellプレートへ播種し、生細胞数測定試薬SFを使用し、細胞の増殖速度を比較検討した。Src阻害剤としてAZD0530とDasatinib、JAK阻害剤としてAZD1480を使用した。

2. 消化器再生におけるSrc-YAP経路の役割の解明

セルレイン誘発急性膵炎モデルを用いて、Src-YAP経路の活性化をタイムコースで検討した。8週齢のC57BL/6マウス（メス）にセルレイン50 μg/kgを1時間ごとに7回腹腔内注射で投与し、急性膵炎を誘導した。回収したサンプルを用い、ウエスタンブロット法と免疫組織化学染色法にて、Src-YAP経路やJAK-STAT3経路の活性化を検討した。

【結果】

1. 消化器がんにおけるSrc-YAP経路の活性化メカニズム・役割の解明

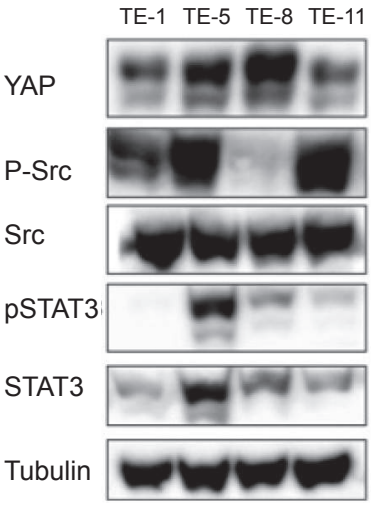


図 1

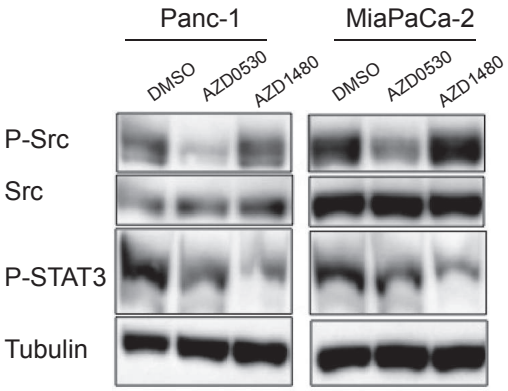


図 2

腸オルガノイドにおいて、Src-YAP経路とJAK-STAT3経路の同時活性化がが抑制遺伝子APC（adenomatous polyposis coli）の欠損により起こる事を発見した。さらにヒト食道がん細胞株や膵臓がん細胞株において、SrcとSTAT3の活性化とYAPの発現を認めた（**図1**，**図2**，**図3**）。Panc-1におけるYAPの発現はSrcに依存的であった（**図3**）。また膵臓がん細胞株でSrcとSTAT3の活性化をSrc阻害剤（AZD0530およびDasatinib）とJAK阻害剤（AZD1480）でそれぞれ抑制すると細胞増殖が抑制された（**図4**）。さらにその抑制効果はSrc阻害剤とJAK阻害剤の

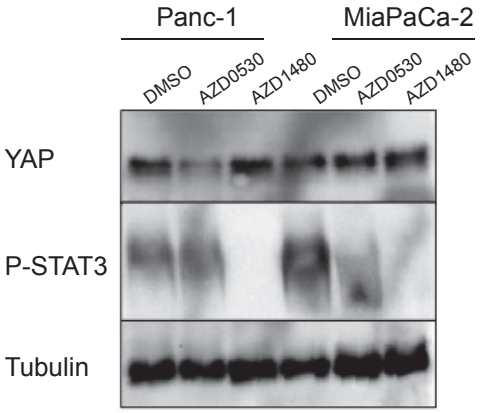


図 3

併用により増強した（**図4**）。また食道がん細胞株における阻害剤実験においても同様の結果が得られた（**図5**）。

2. 消化器再生におけるSrc-YAP経路の役割の解明

セルレイン投与により誘導された膵炎の膵臓サンプルにおいて、投与後早期からのSTAT3やSrcの活性化と後期からのYAPの発現上昇をウエスタンブロット法で確認した（**図6**）。またセルレイン投与後のYAPの発現上昇・活性化を免疫組織化学染色法で確認した（**図7**）。

【考察】

IL-6シグナルのエフェクターとしてJAK-STAT3経路が有名であるが、最近、著者は新たなエフェクターとしてSrc-YAP経路を発見し、腸の再生に重要であることを報告した。しかし、これらのシグナル伝達経路のがんでの役割や他臓器の再生での役割は検討されていなかった。

そこで今回の研究では、消化器がんと消化器再生における炎症、Src-YAP経路とJAK-STAT3経路の活性化機構と役割を明らかにする事を目的とし研究を行った。まず腸オルガノイドにおいてがん抑制遺伝子APCの欠損によりSrc-YAP経路とJAK-STAT3経路が活性化される事を発見した。さらにヒト膵臓がん細胞株や食道がん細胞株においても両経路は活性化していた。Src-YAP経路とJAK-STAT3経路は独立したシグナル経路であり、定常状態ではほとんど活性化されてお

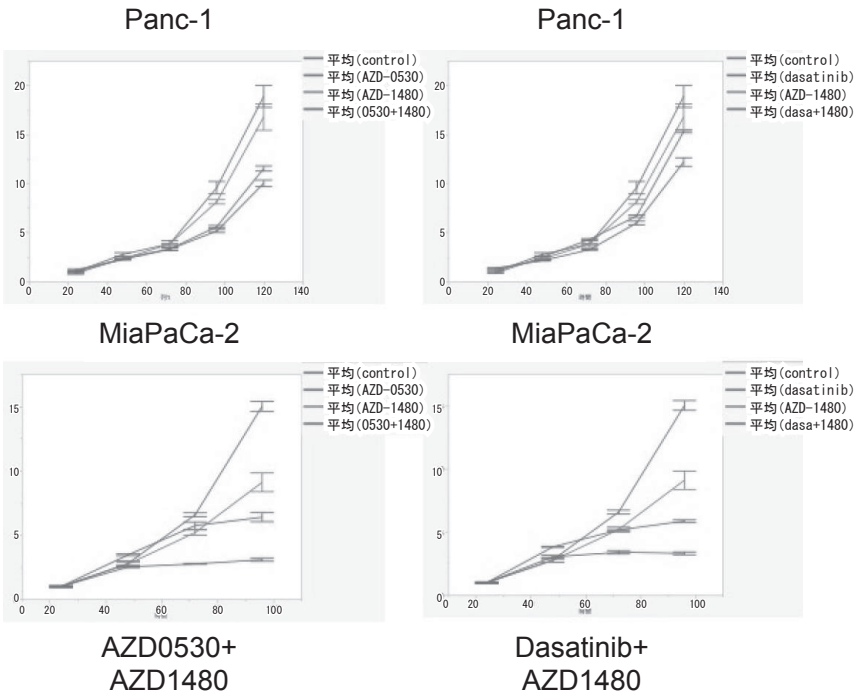


図 4　MTT assay

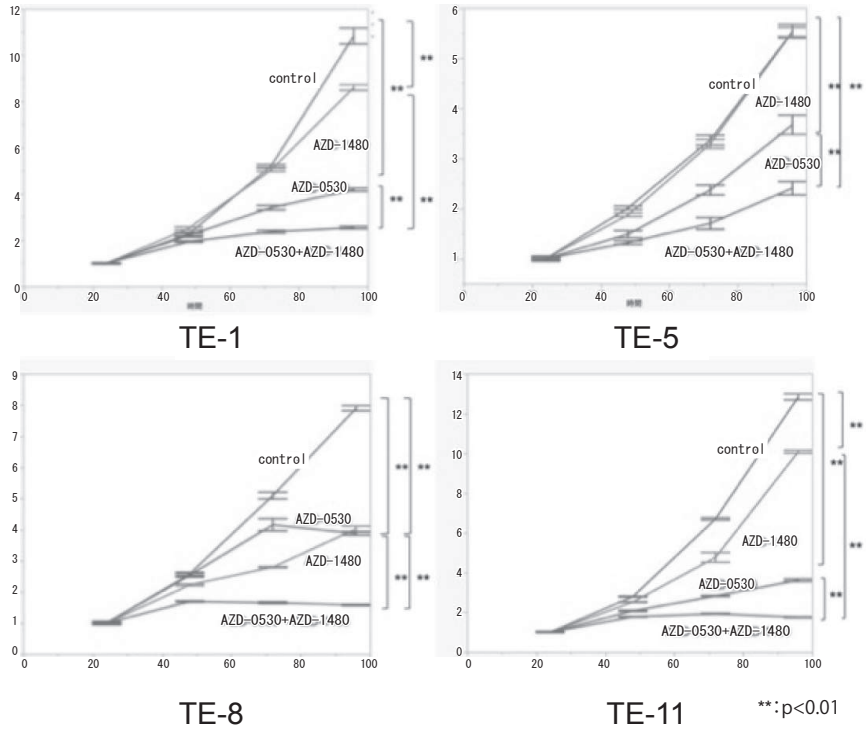


図 5　MTT assay

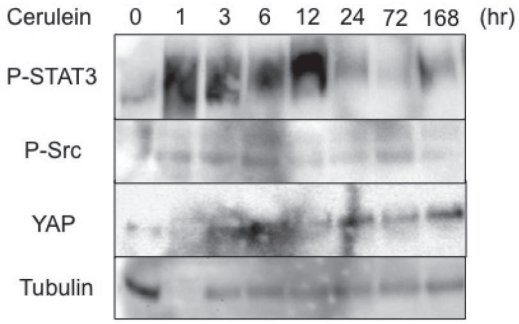


図６

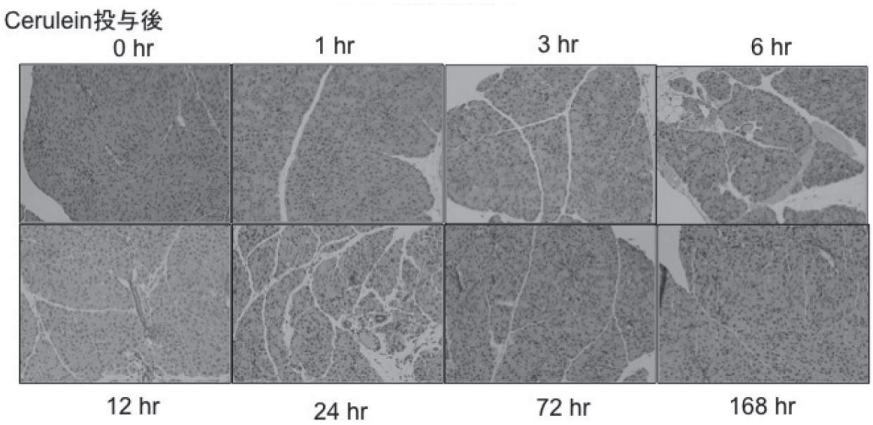


図７　YAP免疫染色

らず、がんや組織再生時において強く活性化が誘導される事がこれまでの研究から分かっている。そのため、がんにおけるよい治療標的と考え、Src阻害剤とJAK阻害剤の同時投与が単独投与よりもがん治療に有効ではないかとの仮説を立てた。実際、膵臓がん細胞株や食道がん細胞株の実験でSrc阻害剤とJAK阻害剤の同時投与は単独投与に比べてより効果的に腫瘍を抑制することを確認した。

また急性膵炎・膵再生のマウスモデルであるセルレイン誘発膵炎モデルにおいても、セルレイン投与によるSrc-YAP経路やJAK-STAT3経路の活性化を認め、これらのシグナル伝達経路が腸の再生のみならず膵臓の再生に寄与している可能性が示唆された。

以上の結果より、Src-YAP経路は様々な種類の消化器がんや再生に重要な役割を果たしており、消化器がんの新しい治療標的となる可能性が示唆された。

本研究を支援して下さった公益財団法人冲中記念成人病研究所の関係者の皆様に厚くお礼申し上げます。

【発表に関する事項】

学会発表

1. 谷口浩二: A Src-YAP module promotes colonic tumorigenesis. 第77回日本癌学会学術総会（大阪）
2. 谷口浩二: A Src-YAP module is a new potential therapeutic target in colorectal cancer.　第41回日本分子生物学会年会（横浜）
3. 谷口浩二: A gp130-Src-YAP module links inflammation to regeneration and cancer. 第47回日本免疫学会学術集会（福岡）

（5）肝疾患

直接作用型抗ウイルス薬併用療法の治療効果とHCV薬剤耐性ウイルスとの関連

芥田　憲夫、熊田　博光

【要約】

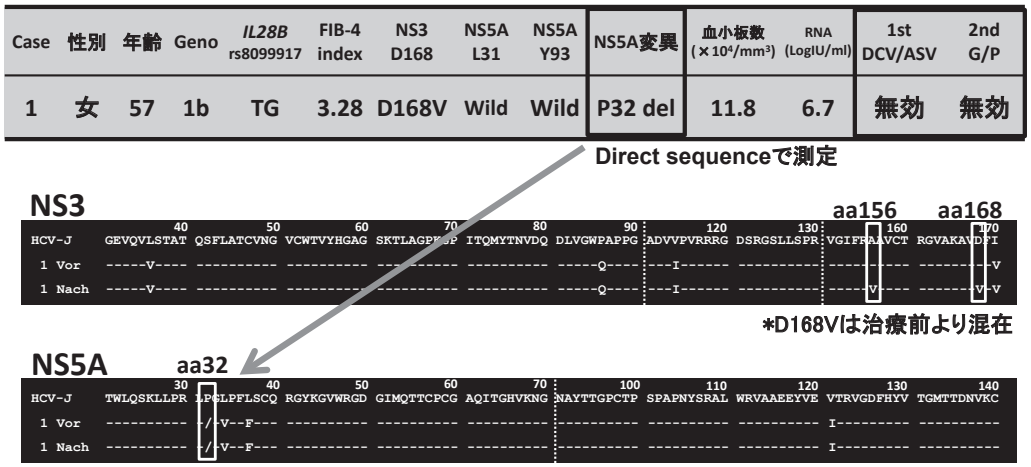
C型肝炎の直接作用型抗ウイルス薬（DAAs）不成功例に対するグレカプレビル/ピブレンタスビルは良好な成績を示した。Ultra-deep sequenceは薬剤耐性ウイルス動態の評価に有用であった。DAAs再治療にも関わらず、NS5A耐性L31/Y93の野生型の症例は他の部位のNS5Aアミノ酸変異も評価する必要がある。

【目的】

C型肝炎における直接作用型抗ウイルス薬（DAAs）併用療法は副作用も軽く、高い治癒率が期待される反面、不成功例では薬剤耐性ウイルスが問題となる[1)]。今回は、DAAs併用療法の治療効果とHCV薬剤耐性ウイルスとの関連を、微量な薬剤耐性ウイルスも検出可能な次世代シークエンス技術を用いて検討した[2)]。

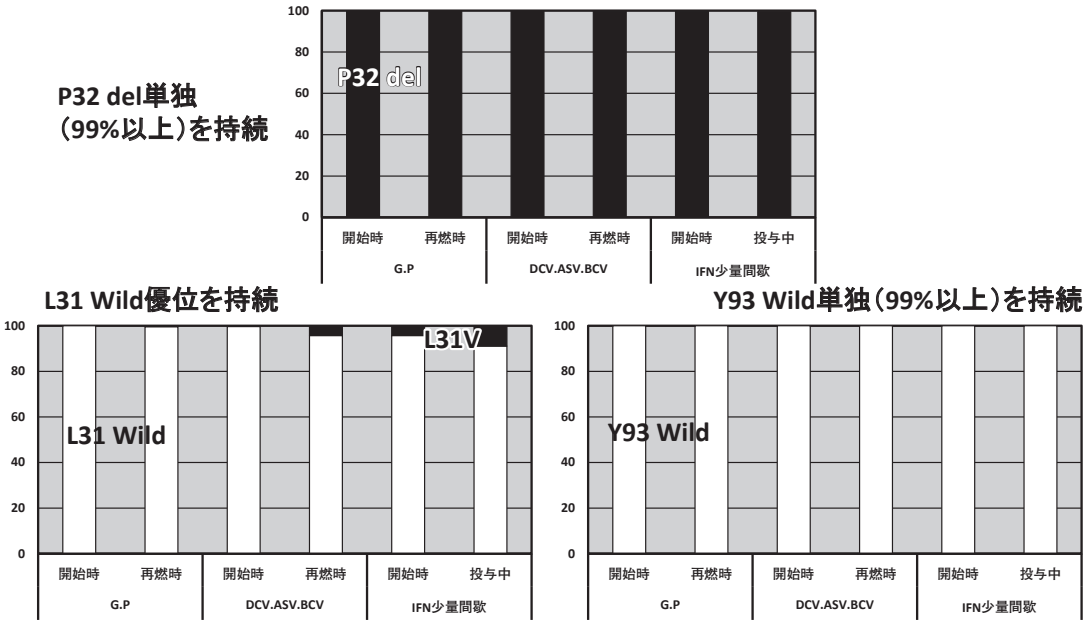
【方法】

虎の門病院でDAAs併用療法不成功後にグレカプレビル/ピブレンタスビル（G/P）12週間のDAAs再治療を行ったC型肝炎105例を対象とした。〔検討1〕DAAs再治療の治癒率（SVR率；治療終了後12週経過時点までHCV RNA陰性持続率）を検討した。〔検討2〕DAAs再治療不成功例における薬剤耐性ウイルスの推移を検討した。特に、薬剤耐性はNS3領域/NS5A領域の耐性変異（NS3領域の168番目、NS5A領域の30, 31,



初回DAAs無効, FIB4高値, P32 delの難治例を臨床治験で確認
（L31/Y93のDouble wild type）

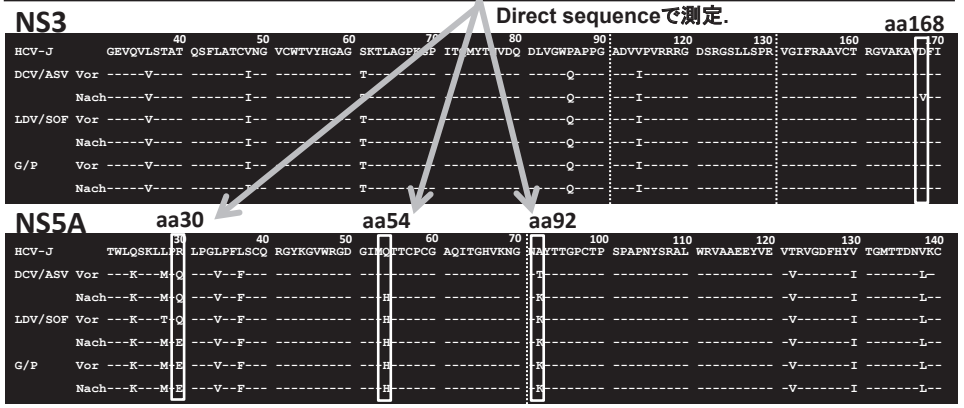
図１　虎の門病院でグレカプレビル/ピブレンタスビルを導入して不成功であったDAAs再治療の１例（治療前後のNS３・５A配列）（Case１）



2.5年経過でP32 del（99%以上）、Y93 Wild単独（99%以上）を持続

図２　虎の門病院でグレカプレビル/ピブレンタスビル（臨床治験）を導入して不成功であった１例（Ultra deep sequenceによる２.５年のNS５A耐性経過）（Case１）

Case	性別	年齢	Geno	*IL28B* rs8099917	FIB-4 index	NS3 D168	NS5A L31	NS5A Y93	NS5A置換	血小板数 (×10⁴/mm³)	RNA (LogIU/ml)	1st DCV/ASV	2nd LDV/SOF	3rd G/P
2	男	56	1b	TG	1.32	Wild	Wild	Wild	R30E Q54H A92K	32.5	6.0	BK	再燃	再燃



初回DAAsﾌﾞﾚｰｸｽﾙｰ, NS5A R30E, Q54H, A92Kの難治例を確認
（L31/Y93 Wild type）

図３　虎の門病院でグレカプレビル/ピブレンタスビルを導入して不成功であったDAAs再治療の１例（治療前後のNS３・５A配列）（Case２）

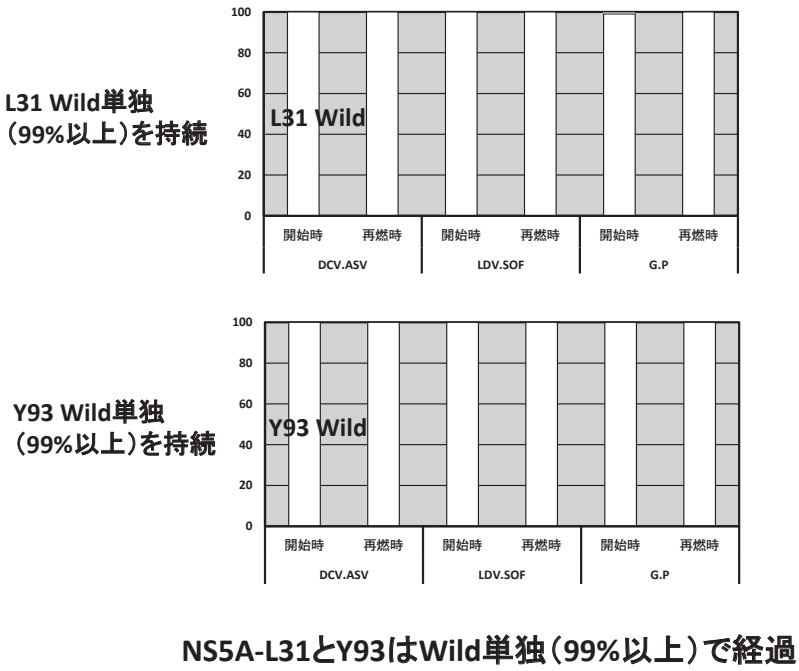


図４　虎の門病院でグレカプレビル/ピブレンタスビルを導入して不成功であった１例
（Ultra deep sequenceによる各種治療時のＬ31/Ｙ93耐性経過）（Case 2）

32, 54, 92, 93番目のアミノ酸変異）の経時的推移をDirect sequence（DS）、Ultra-deep sequence（UDS）、市販の測定系で評価した[3)]。Ultra-deep sequencerはIon PGM™（Life Technologies Japan）を用い、HCV Plasmid DNAの変異出現率を基準に0.1％以上を有意な変異とした。本研究は、虎の門病院研究倫理審査委員会で承認された研究である（研究番号1147-H・B）。

【結果】

検討1: DAAs再治療のSVR率は98％であった。不成功2例は何れもGenotype 1bであった。

検討2: 再治療不成功2例の特徴として、G/P開始時にDSでNS5A-L31/Y93のアミノ酸が何れも野生型であった。症例1はダクラタスビル/アスナプレビル（DCV/ASV）不成功後にG/Pを導入し、G/P開始時にDSでNS5A-P32 deletionが確認された。G/P開始後2.5年間の経過では、UDSでP32 deletion 99％以上とY93野生型99％以上を持続した（**図1, 2**）。症例2はDCV/ASVとレジパスビル/ソホスブビル（LDV/SOF）不成功後にG/Pを導入し、G/P開始時にDSでNS5A-R30E/Q54H/A92Kのアミノ酸変異が確認された。DCV/ASV導入後、UDSでL31とY93は何れも野生型99％以上で経過した。治療経過に伴いR30EとQ54HはUDSで99％以上に移行したが、A92Kは各治療再燃時に増加し時間経過に伴い減少する傾向を示した（**図3, 4, 5**）。

【考察】

DAAs併用療法難治かつ肝発癌リスクの高い症例を治癒に持ち込むことが日本の高齢化社会においては重要課題である。特に、DAAs併用療法難治例に対するDAAs再治療の成績に関する詳細な報告はこれまで存在しなかった。今回の検討でDAAs不成功例に対するG/PのSVR率は98％と良好な成績を示すことが確認された。

薬剤耐性ウイルスがDAAs治療中に如何なる推移をするかに関する詳細な検討はこれまで存在しなかった。今回の検討では、UDSが薬剤耐性ウイルス動態の評価に有用であることが確認された。特に、DAAs再治療にも関わらず、NS5A耐

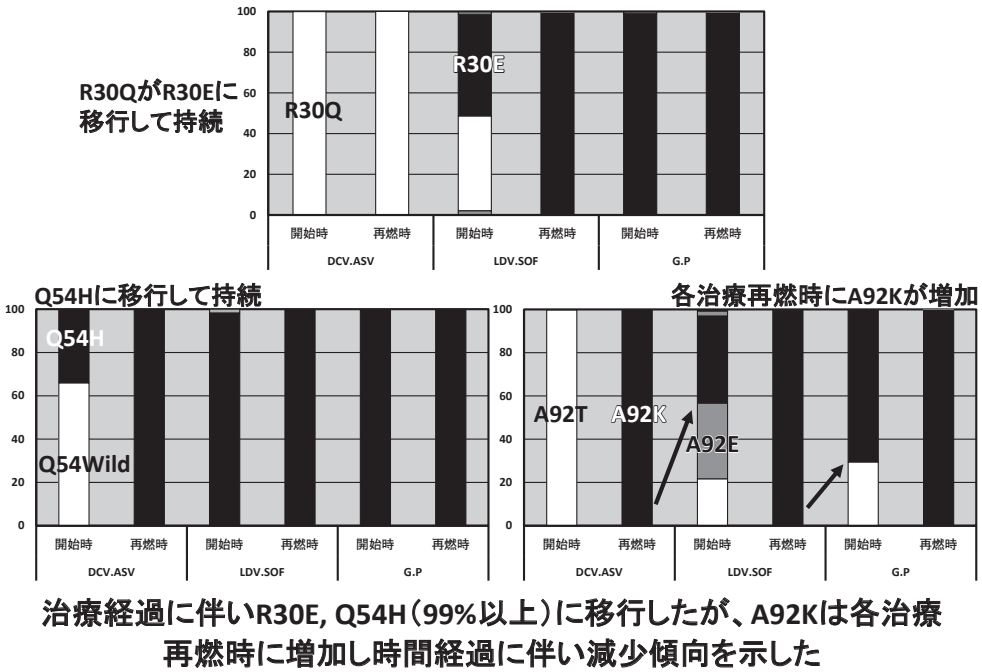


図５　虎の門病院でグレカプレビル/ピブレンタスビルを導入して不成功であった１例
（Ultra deep sequenceによる各種治療時のR30/Q54/A92耐性経過）（Case 2）

性L31/Y93の野生型の症例は他の部位のNS5Aアミノ酸変異も評価する必要があることが確認された。

将来的にはC型肝炎の薬剤耐性ウイルスの問題を解決し、HCV排除に伴う肝発癌抑制にまで繋げることが最終的な課題と言える[4)]。

【文献】

1. Akuta N, Sezaki H, Suzuki F, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Favorable efficacy of daclatasvir plus asunaprevir in treatment of elderly Japanese patients infected with HCV genotype 1b aged 70 and older. J Med Virol 89: 91-98, 2017
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. Pawlotsky JM: Hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral drugs in interferon-free regimens. Gastroenterology 151: 70-86, 2016.
4. Ogata F, Kobayashi M, Akuta N, Osawa M, Fujiyama S, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki Y, Suzuki F, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Outcome of all-oral direct-acting antiviral regimens on the rate of development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus genotype 1-related chronic liver disease. Oncology 93: 92-98, 2017

B型慢性肝疾患症例におけるHBs抗原陰性化に関する因子の検討～無治療例におけるウイルス側因子と生体側因子（遺伝子多型；SNPs）を含めた検討～

鈴木　文孝、熊田　博光

【要約】

B型慢性肝疾患の最終目標はHBs抗原の陰性化である。無治療例でのHBs抗原の陰性化に関係する因子について、ウイルス側因子とともに生体側因子であるIL28B、HLA-DPA1、-DPB1のSNPsを含め解析した。対象は当院にて10年以上経過観察されている無治療例176例である。無治療例の背景は、男性/女性 101/75、HBeAg+/- 27/149、HBV DNA 4.2(<2.6-9.1<)、HBsAg1685（0.5-129000）、genotype A/B/C 9/31/133、follow up期間16.8年（10-40.6）。生体側因子としてIL28B（rs8099917）、HLA-DPA1（rs3077）、-DPB1（rs9277535）の測定を行った。無治療例でのHBsAg陰性化は、経過観察中52例（30%）で認められた。生体側因子であるrs3077（GG）の症例ではAG/AAの症例よりも有意にHBsAgの陰性化が得られた（P=0.006）。rs9277535, rs8099917では、SNPsでの差は認めなかった。多変量解析では、開始時HBsAg100 IU以下（P=0.002）、年齢35歳以上（P=0.005）、血小板数15万以上（P=0.015）とともにrs3077（GG）（P=0.034）が関係していた。B型肝炎ウイルス感染例での長期経過観察におけるHBs抗原の陰性化にはウイルス側因子（HBs抗原低値）ともに生体側因子（HLA-DPA1の遺伝子多型、年齢）の関与が考えられる。このような状態を考慮したfollow upが必要である。

【目的】

現在のB型慢性肝疾患の最終目標はHBs抗原の陰性化である。さらに核酸アナログ治療例では、安全に治療を中止するにはHBs抗原価が低値であることが推奨されている。HBs抗原の陰性化は、肝発がんの減少や肝病変の改善をもたらすが、無治療例でのHBs抗原の陰性化に関係する因子について、ウイルス側因子とともに生体側因子であるIL28B、HLA-DPA1、-DPB1のSNPsを含め解析した。

【対象と方法】

対象は当院にて10年以上経過観察されている無治療例176例である。無治療例の背景は、男性/女性 101/75、HBeAg+/- 27/149、HBV DNA 4.2（<2.6-9.1<）、HBsAg1685（0.5-129000）、genotype A/B/C 9/31/133、follow up期間16.8年（10-40.6）。生体側因子としてIL28B（rs8099917）、HLA-DPA1（rs3077）、-DPB1（rs9277535）の測定を行った。SNPsのアレル解析はTaqMan-PCRを用いた方法で行った。

【結果】

無治療例でのHBsAg陰性化は、経過観察中52例（30%）で認められた。生体側因子であるrs3077（GG）の症例ではAG/AAの症例よりも有意にHBsAgの陰性化が得られた（P=0.006）。rs9277535, rs8099917では、SNPsでの差は認めなかった。そのほかの因子では、HBs抗原量低値（<100 IU/mL）（P<0.001）、年齢35歳以上（P=0.001）、HBeAg陰性（P=0.004）、血小板数15万以上（P=0.010）が単変量解析でHBs抗原陰性化に寄与する因子であった。多変量解析では、開始時HBsAg100 IU以下（P=0.002）、年齢35歳以上（P=0.005）、血小板数15万以上（P=0.015）とともにrs3077(GG)(P=0.034)が関係していた。

【考察】

B型肝炎ウイルスの持続感染には、HLAの遺伝子多型が関係することが報告されてきた[1)]。さらに最近のgenome-wide association studiesを用いた解析では、B型肝炎ウイルスの持続感染にHLA-DP領域のSNPsが関係することが日本、タイ、韓国の症例を用いた解析で報告されてい

る[2,3]。さらにB型肝炎の持続感染例（キャリア例）からのHBs抗原陰性化にこれらのSNPsが関係することが、中国人や白人（ドイツ）の症例を用いた解析で示されている[4,5]。また、C型肝炎症例において自然経過でウイルス排除に関係すると報告されているIL28B（rs8099917）のSNPが、HBs抗原の陰性化に関係するという報告もある[4]。そこで当院における無治療で10年以上の長期経過観察を行っている症例におけるHBs抗原陰性化に関係する因子をこれらのSNPsを含めて解析した。その結果、感染例での長期経過観察におけるHBs抗原の陰性化にはウイルス側因子（HBs抗原低値）ともに生体側因子（HLA-DPA1の遺伝子多型、年齢）の関与が示された。本研究の特徴は、日本人症例での10年以上（中央値16.8年）の無治療の長期観察例を対象としたことである。過去の報告の経過観察期間は3-6年程度であり、HBs抗原陰性化の有無を観察するには経過期間が長いほどより正確なデータになる可能性が高い。また上記因子を認める場合は、安易に治療を行うのではなくHBs抗原の推移をみながらfollow upしていくことが必要である。

【文献】

1. Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, et al.: Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. N Engl J Med 20: 1065-1069, 1995
2. Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, et al.: A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. Nat Genet 41: 591-595, 2009
3. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, et al.: Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. PLoS One 7: e39175, 2012
4. Seto WK, Wong DK, Kopaniszen M, et al.: HLA-DP and IL28B polymorphisms: influence of host genome on hepatitis B surface antigen seroclearance in chronic hepatitis B. Clin Infect Dis 56: 1695-1703, 2013
5. Koukoulioti E, Fischer J, Schott E, et al.: Association of HLA-DPA1 and HLA-DPB1 polymorphisms with spontaneous HBsAg seroclearance in Caucasians. Liver Int 10: 14008, 2018

HBs抗原陰性化をきたす宿主側因子の解析

鈴木　義之、熊田　博光、小林 万利子

【要約】

B型慢性肝疾患に対する治療の目標がHBs抗原の陰性化であることが明確となった現在、様々な方法論が展開されている。しかしながらいずれの方法も確実なゴールを目指せているとは言い難く多くの課題が残されている。このため我々のグループでは、これまでに積み重ねてきた治療の中からその方法論を改めて解析するとともに、drug freeを達成しえたsequential therapyの症例を総括し、治療中止に関わる因子（特に免疫応答に関与する因子）を検討した。更にこの3年間の間に急速に広まった新規核酸アナログ治療薬であるテノホビル（TDFとTAF）の成績を検討し、短期間ではあるものの今後HBs抗原陰性化を目指すうえでこの薬剤をどのように使用すべきかについても考察を加えたので報告する。

【目的】

B 型慢性肝疾患に対する治療において目指すべきは、肝炎の病期進展をいかに抑え、発癌を最小限にすることにある。それにはHBe抗原を陰性化させ、さらにはseroconversionを獲得すること、HBV-DNA量を低下させ、肝酵素を基準値内に抑えることである。ラミブジンを皮切りに登場した核酸アナログ製剤は市販後まもなく20年を迎えようとしており、この間にB型慢性肝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。その結果、本疾患に対する治療の第一選択はIFNから核酸アナログ製剤へと移行してきたが多くの課題も残されたままである。耐性ウイルスの問題については近年では、ある程度克服されたところではあるが、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4例のHBs抗原陰性化例を経験し、こ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。さらに今年度はテノホビルの治療効果についても検討し、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】

当科では2009年より核酸アナログ製剤の中止とHBs抗原の陰性化を目的としてsequential therapyを導入し経過観察を行ってきた。本療法導入の条件は既報のごとくであるが以下に簡単に条件を述べる。B型慢性肝疾患患者に対する核酸アナログ投与中、経過が良好なものを対象としている。すなわち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。それぞれの症例の背景因子を解析するとともに、その後の経過につき検討した。さらにこのうちHBs抗原の陰性化を獲得した4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。また、保存血清を用いた検討ではTNF-α産生能についても解析を加えた。さらにはまだ期間が短いものの、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、第五の核酸アナログ製剤であるテノホビル（テノゼット、ベムリディ）投与症例についても解析を行った。

【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）、

表 1　IFN sequential療法症例の背景

No.	性別	年齢	genotype	NA種	期間	開始時 HBsAg	IL28 rs8099917	HLADPA1 rs3077	HLADPB1 rs9277535	最終観察時 ALT	最終観察時 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	―
5	M	55	C	LMV	100M	119	TG	GA	GG	19	―
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

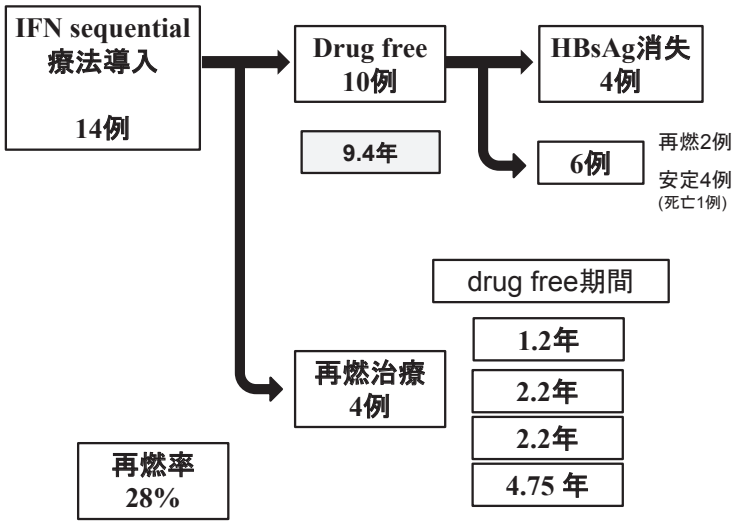


図 1　長期経過観察中のIFN sequential療法の経過

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、Cが12例であった。治療終了後のdrug free期間は中央値90か月（84 ～ 96）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4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

	再燃率	再治療率 (核酸アナログ再投与のみ)
単純中止例 62例	68% 42例	52% 32例
Sequential併用例 14例	28% 4例	21% 3例

図２　核酸アナログ中止例の経過

は当初の目標である2年以上のdrug freeを達成している。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。**図2**に当院で検討した核酸アナログ単純中止例と本治療法との、その後の経過を比較した結果を示す。このように本治療法によるHBV-DNAの陰性化率とALTの正常化率については特筆すべきものがあり、ALTはIFN開始後12か月目をピークに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年後以降には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いものの、ガイドラインでは治療域とはならない2.1から4.0の範囲内で変動している症例が多く認められている。再治療となった4例の要因を解析するため経過中のHBcrAgの経過をみてみると、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持続している。一方再治療とならなかった症例はIFN終了直後は不安定であるが1例を除きすべて3以下まで低下し安定していた。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たらず、再治療となった4例中3例はHBcrAgが5.9が1例と、6.8<が2例であった。また、TNF-αの測定をみてみると、再燃をきたした症例はTNF-αが高く炎症が持続する要因が示唆されている（**図3**、**図4**）。上記のような検討に加え宿主のHLAについて検討した結果が**表1**に示されている。このうちHBs抗原陰性化を獲得した4症例の背景因子を他の症例と比較しているが、上段のNo.3, 13, 4, 5がHBs抗原を陰性化した症例であるが、既報のごとくHLADPA1がGAは4例とも、それに加えてHLADPB1もGAの症例2例がHBs抗原の陰性化

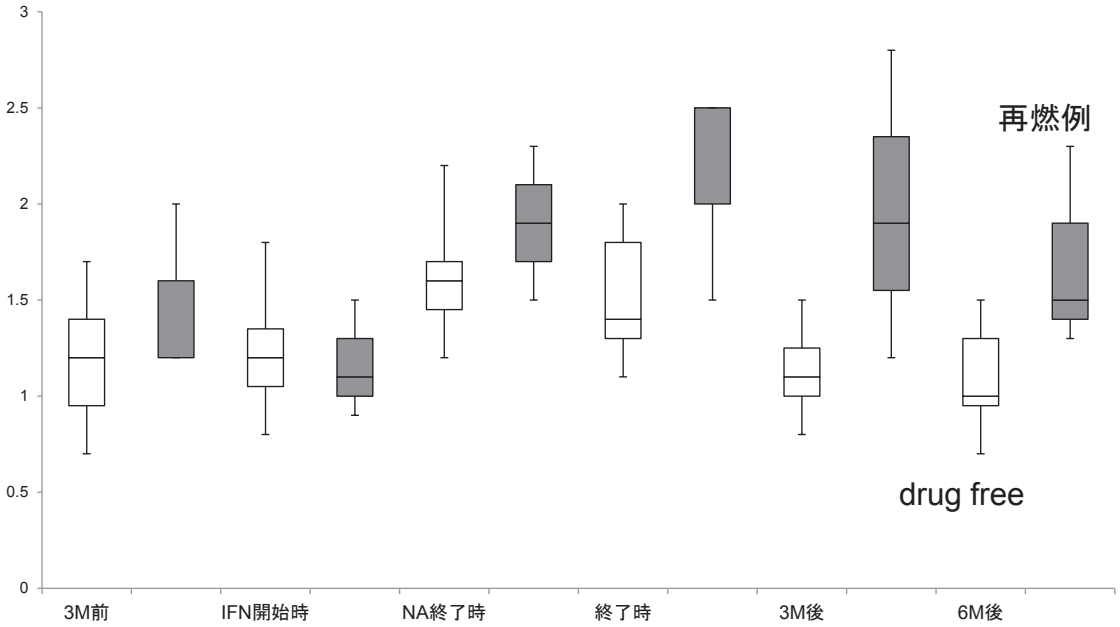


図３　IFN sequential療法中のTNF-αの変化

を獲得していた。最近登場したTDFによりHBs抗原の陰性化が期待されており、海外からは多くの報告が出されている。このため今年度は昨年度に引き続きTDF投与症例の解析も行った。**図5**にその結果を示すが409例についての解析を行った。Naïve症例は核酸アナログ製剤初回投与としてTDFを選択した症例であり、rescue症例は核酸アナログに対する不応症例でTDFに切り替え、またはadd onした症例である。Switch症例は他の核酸アナログで安定しているもののHBs抗原量のさらなる低下を目指してTDFに切り替えた症例である。図に示すように1.5年の経過では

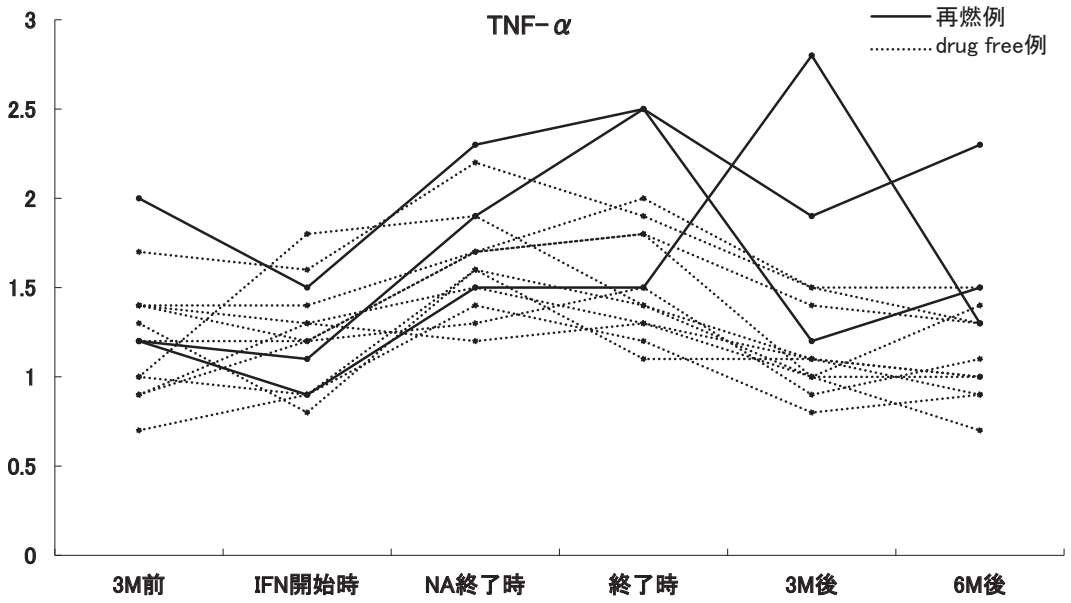


図 4　IFN sequential療法中のTNF-αの変化

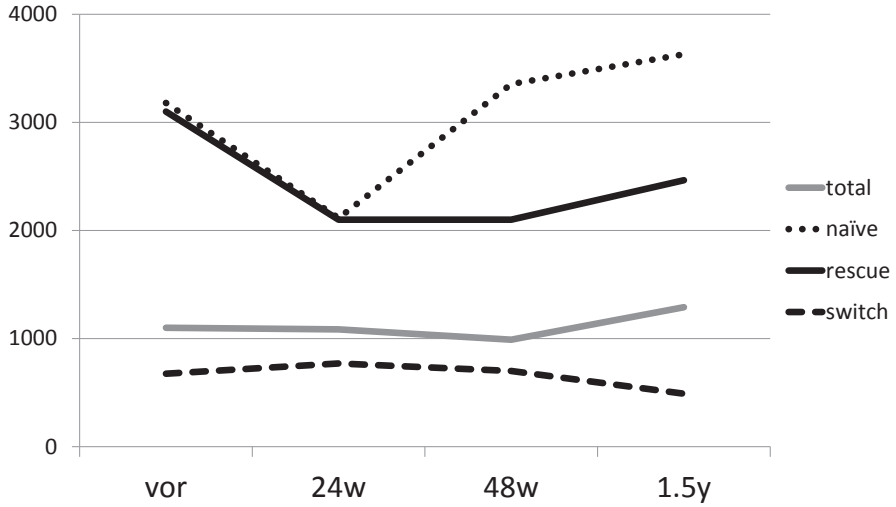


図 5　TDF投与症例の治療法別のHBs抗原量の推移

HBs抗原量の低下は未だ十分といえないものの、HBV-DNAの陰性化率は高く、いずれの群においても1.5年で80％以上の症例がHBV-DNAの陰性化を獲得しており今後のHBs抗原量の低下が期待されている。これらの中には一部の症例に急激なHBs抗原の低下が認められており、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る。

【考察】

2000年に登場した最初の核酸アナログであるラミブジン（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[1,2]。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。しかしながら、長期投与に伴い耐性ウイルスが出現しそれに伴う肝炎の再燃、重症化で難渋し、さらなる核酸アナログの開発でその問題を克服してきたことも事実である。その後、多くの核酸アナログが登場し、そのたびに期待が寄せられたがHBs抗原を明確に低下させる薬剤は見いだせていない。このような課題を解決するためには、HBs抗原を陰性化させることである。新たな薬剤の創薬にも期待したいところではあるが実臨床においては従来の薬剤の工夫でこの局面を打破することも必要と考える。これまでに行ってきたSequential therapyにおいては宿主の遺伝子を検討することで、HBs抗原消失の確率を向上させることができるかもしれない方法に一歩近づいたと言える。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。また、TDF投与症例の中には急激なHBs抗原低下をきたす症例が散見され、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今後のさらなる解析を行っていくべきと考える。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で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る。

【参考文献】

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: 164-178, 2003

C型慢性肝障害例に対するソホスブビルとレジパスビル併用療法における治療不成功例の臨床背景ならびにHCV遺伝子変異の特徴と治療終了後の経過の検討

瀬崎 ひとみ、鈴木　文孝

【要約】

C型慢性肝炎の治療はIFN freeの経口抗HCV薬併用療法が主流となったが、NS5A阻害剤を含む治療不成功例に対する治療効果は明らかにされていない。そこで、当院におけるソホスブビルとレジパスビル併用12週間の治療を受けた431症例のSVR12と各種薬剤耐性変異との関係を検討した。再治療例のSVR12は73.3%と低下しており、治療不成功に寄与する独立因子は、肝硬変、前NS5A阻害剤治療無効、*IL28B* genotype TG/GG、AFP50μg/L以上であった。またNS5A-P32欠失の症例は3例全例が治療不成功であった。今後は、線維化進行例や*IL28B* minorの症例の治療成績の向上およびNS5A-P32欠失の症例に対しても有効な治療法を確立していく必要があると考える。

【目的】

genotype 1型C型慢性肝疾患に対する経口抗HCV薬（DAAs）である、核酸型NS5Bポリメラーゼ阻害剤であるソホスブビル（SOF）とNS5A阻害剤であるレジパスビル（LDV）の併用12週間治療は、本邦における国内臨床試験において治療開始前にNS5A耐性変異を有している症例でも99%の治療効果が得られたと報告された[1)]。しかしながら、実臨床においては治療不成功となる症例を一定数経験しており、またNS5A阻害剤を含む治療不成功例に対する治療効果は明らかにされていなかった。そこで当院でSOF+LDV併用療法を行った症例で、治療不成功に関わる因子を明らかにし、さらに治療不成功前後のウイルス遺伝子変異の特徴とその後の臨床経過との関係を検討することを目的とした。

【方法】

SOF+LDV12週併用療法を行った症例の血清を用い、direct sequence法により治療開始前のHCV遺伝子のNS5A領域およびNS5B領域のアミノ酸変異の有無を決定し[2)]、背景因子を含めて治療不成功に関わる因子を多変量解析を用いて検討し、さらに治療不成功時のアミノ酸変異の特徴を検討した。

【結果】

HCVのアミノ酸変異を測定し得たのは431例であった。NS5A阻害剤未治療例のSVR12は95.5%であり、NS5A-L31、Y93にいずれも変異のない症例では98.9%であったが、L31単独変異は80.0%、Y93単独変異は93.0%、2種以上の変異は100%であった。一方、NS5A阻害剤既治療例のSVR12は全体で73.3%と低下しており、変異がなければ88.9%、L31単独変異で100%、Y93単独変異でも91.7%であったが、2種以上の変異は66.7%と低下し、特にP32欠失の症例は3例全例ウイルスの再燃を認めた。NS5A阻害剤未治療例の治療不成功に寄与する独立因子は、肝癌治療既往、治療前NS5A変異の存在であり、NS5A既治療例では肝硬変、前NS5A阻害剤治療無効、*IL28B* genotype TG/GG、AFP50μg/L以上であった。NS5A阻害剤未治療例の不成功であった15例の内、治療不成功時にNS5A-Y93変異2例、L31の変異2例、NS5B-S282変異1例の出現を認めたが、NS5A阻害剤既治療例の不成功例20例では治療前後でNS5A変異に新たな出現は認めず、S282変異を1例認めたのみであった。

【考察】

SOF+LDV併用療法の国内臨床試験の成績では、治療開始前にNS5A領域の耐性変異を有し

ていても99％の効果が得られると報告された[1)]。しかしながら、これはDAAs初回治療例における成績に限られており、DAAs既治療例に対する治療効果は不明であったため、再治療例に対する治療効果を明らかにする必要があった。本研究により、実臨床におけるSOF+LDV併用療法のDAAs未治療例に対する治療成績は、国内臨床試験とほぼ同等の結果が得られたが、DAAs既治療例における治療効果は依然として不十分と思われる結果が得られた。さらに、初回治療例においては治療開始前のNS5A RASの存在が治療不成功の要因として抽出され、再治療例においては前DAAs治療無効に加え、肝硬変であること、宿主の*IL28B* genotypeがminorであることが、治療不成功に寄与する要因であることが判明した。したがって、DAAs不成功例に対するDAAs再治療を検討する際には、以上の点をふまえて治療選択しなければならない。また、DAAs不成功例においては低頻度ではあるがNS5A-P32の欠失が出現する症例がある[3)]。このP32欠失を有する症例は、SOF+LDV併用療法では全例SVRに至っておらず、非常に難治な症例と考えられる。今後は、線維化進行例や*IL28B* minorの症例の治療成績の向上およびNS5A-P32欠失の症例に対しても有効な治療法を確立していく必要があると考える。

【文献】

1. Mizokami M, Yokosuka O, Takehara T, et al.: Ledipasvir and sofosbuvir fixed-dose combination with and without ribavirin for 12 weeks in treatment-naïve and previously treated Japanese patients with genotype 1 hepatitis C: an open-label, randomized, phase 3 trial. Lancet Infect Dis 15: 645-653, 2015
2. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, et al.: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. Proc Natl Acad Sci USA 87: 9524-9528, 1990
3. 小林万利子、芥田憲夫、鈴木文孝、他: NS5A-P32欠失を検出したC型慢性肝疾患 Genotype 1bにおける治療効果の検討. 肝臓 58: 671-673, 2017

B型慢性肝疾患に対するテノホビル療法における薬剤耐性変異と治療効果との関係

保坂　哲也、鈴木　文孝

【要約】

B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤（ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、テノホビル）は、肝内のHBV増殖を抑制する。しかし現在の核酸アナログ製剤でウイルス量が十分低下していない不応例や多剤耐性ウイルス出現例が存在することが知られており、このような症例に対してはテノホビル治療が推奨されているが、多剤耐性ウイルスの種類と治療効果については十分解明されていない。そこで本研究では核酸アナログ製剤の耐性出現例や不応例、およびウイルス再燃例における耐性ウイルスの解析と治療成績との関係を他剤効果不良例のためテノホビルを投与した88例で検討した。テノホビル投与開始時の薬剤耐性出現率は野生株19例、ラミブジン耐性株32例、アデホビル耐性株10例、エンテカビル耐性株23例、多剤耐性株4例であった。 いずれの株においてもHBV DNA陰性化率は64％～100％と良好であった。この結果は既報のin vitroにおける検討に一致するものであった。

【目的】

B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療が普及して約15年が経過する。核酸アナログ製剤（ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、テノホビル）は、肝内のHBV増殖を抑制することで、肝臓の炎症を軽減し、病期の進行を抑える治療薬である。核酸アナログ製剤は概ね治療効果が高いが、現在の核酸アナログ製剤でウイルス量が十分低下していない不応例（HBV DNA > 3 log copies/mL）や多剤耐性ウイルス出現例が存在することが知られており、このような症例に対してはテノホビル治療が推奨されている。この際、多剤耐性ウイルスの種類と治療効果については十分解明されていない。そこで今回当院における核酸アナログ製剤の耐性出現例や不応例、およびウイルス再燃例における耐性ウイルスの解析と治療成績との関係を明らかにする目的で本研究を立案した。

【対象と方法】

対象；2014年よりテノホビル治療を施行している症例のうち他剤効果不良（ウイルス学的不応もしくは再燃）のためテノホビル投与を行った88例を対象とした。HBV DNAの遺伝子配列は、polymerase領域のreverse transcriptase［rt］領域をPCR反応を用いてdirect sequence法にて測定した[1)]。

【成績】

1. 対象症例の臨床的特徴とテノホビル投与開始時の薬剤耐性出現率

HBe抗原陽性例59例、開始時HBV DNA量の中央値は4.4（log copies/mL）、rt領域のアミノ酸変異；野生株19例、ラミブジン耐性株（rtM204I/V）32例、アデホビル耐性株（rtA181T）10例、エンテカビル耐性株（rtL180M+T184G、rtS202G、M250V）23例、多剤耐性株（上記2カ所以上変異を持つもの）4例であった。

2. 薬剤耐性変異別のHBV DNA陰性化率（1年、2年）

ラミブジン耐性: 86％、93％、アデホビル耐性: 90％、75％、エンテカビル耐性: 64％、85％、多剤耐性: 75％、100％であり、テノホビルの抗ウイルス効果は良好であった。またエンテカビル耐性株における耐性部位によって抗ウイルス効果に違いは認めなかった。

【結論】

他剤効果不良例に対するテノホビル治療の抗ウイルス効果は良好であった。最近の報告[2, 3)]において、ラミブジン耐性株、アデホビル耐性株、エンテカビル耐性株に対するテノホビルのin vitroの抗ウイルス活性は良好で、野生株と遜色なかったと報告されている（IC50<2.5倍）。このこと

からテノホビルは既存の核酸アナログ製剤耐性株に対して強力な抗ウイルス活性を有し、今回の結果を示唆していると考えられる。

【文献】

1. Suzuki F, Kumada H, Nakamura H: Changes in viral loads of lamivudine-resistant mutants and evolution of HBV sequences during adefovir dipivoxil therapy. J Med Virol 78: 1025-1034, 2006
2. Murakami E, Tsuge M, Hiraga N, et al.: Effect of tenofovir disoproxil fumarate on drug-resistant HBV clones. J Inect 72: 91-102, 2016
3. Liu Y, Miller MD, Kitrinos KM: Tenofovir alafenamide demonstrates broad cross-genotype activity against wild-type HBV clinical isolates and maintains susceptibility to drug-resistant HBV isolates in vitro. Antiviral Res 139: 25-31, 2017

【発表に関する事項】

1. 保坂哲也、他: B型慢性肝疾患に対するテノホビル製剤（TDF、TAF）治療によるHBsAg量の変化と安全性. 第54回日本肝臓学会総会シンポジウム（大阪）

（6）腎疾患

嚢胞性腎疾患における遺伝子変異と変性尿細管（嚢胞の起源）の探究

関根　章成、星野　純一

【要約】

家族歴の明らかでない嚢胞性腎疾患患者のうち、腎生検と遺伝子解析により確定診断された、*PKHD1*遺伝子変異によるARPKD 1例、*NPHP4*遺伝子変異によるNPHP 1例において、変性した尿細管（つまり嚢胞の起源）がそれぞれ違うのかどうかを、腎生検病理標本に対して変性した尿細管を染め分けることで追究した。

【目的・方法】

嚢胞性腎疾患には、最も頻度の高い常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）の他に、常染色体劣性多発性嚢胞腎（ARPKD）、ネフロン癆（NPHP）とその類縁疾患、髄質嚢胞腎といった疾患がある。ADPKDの診断は家族歴の有無と画像（超音波・CT・MRI）所見による両側腎臓の嚢胞の個数のみで行なわれ、遺伝子検査や腎生検は必須とされていない[1)]。ADPKDと考えられる患者のうち、20-40％は明らかな家族歴が確認できない患者がおり、この家族歴の明らかでない嚢胞腎患者では典型的なADPKD患者と比べて遺伝的背景が異なると報告されている[2)]。実際、当院において、もともとADPKDと考えられていたものの家族歴が確認できないことから東京医科歯科大学との共同研究で遺伝子解析を行った62症例の検討で、約40％でADPKDの原因遺伝子である*PKD1*や*PKD2*の遺伝子変異が証明されなかった（**図1**）[3)]。このADPKDの原因遺伝子である*PKD1*や*PKD2*の遺伝子変異が証明されなかった症例のなかに、ネフロン癆（NPHP）やARPKDであると遺伝学的また腎生検にて診断された症例を認めた。これらの症例において、遺伝子変異タイプの違いにより、変性した尿細管（つまり嚢胞の起源）がそれぞれ違うのかどうかを、通常診療で施行された腎生検病理標本に対して変性した尿細管を染め分けることで追究した。

2015年5月以降2016年12月までに当院で腎

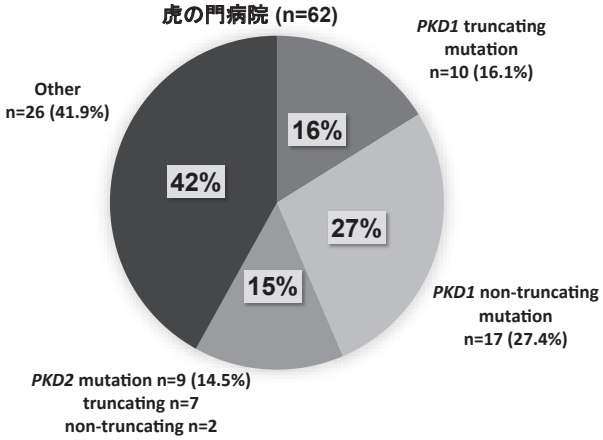


図１　家族歴の明らかでないPKD患者の遺伝子解析

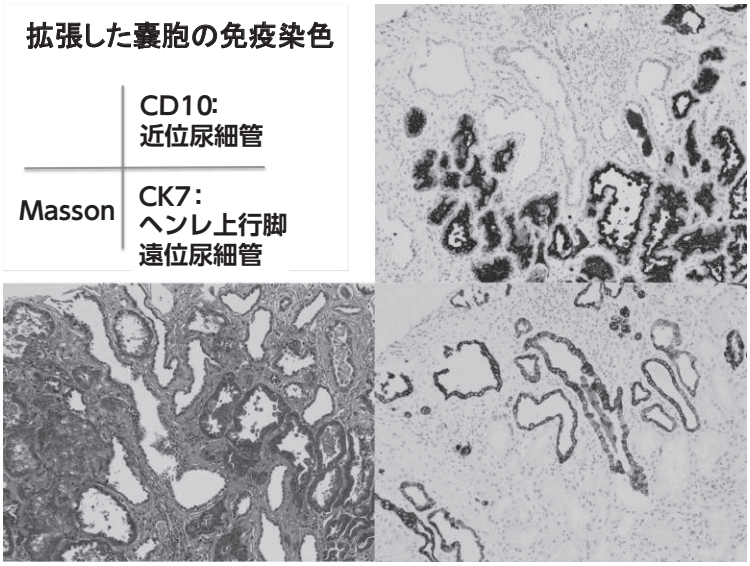


図 2-a　ネフロン癆（NPHP）患者の腎病理染め分け（CD10, CK7）

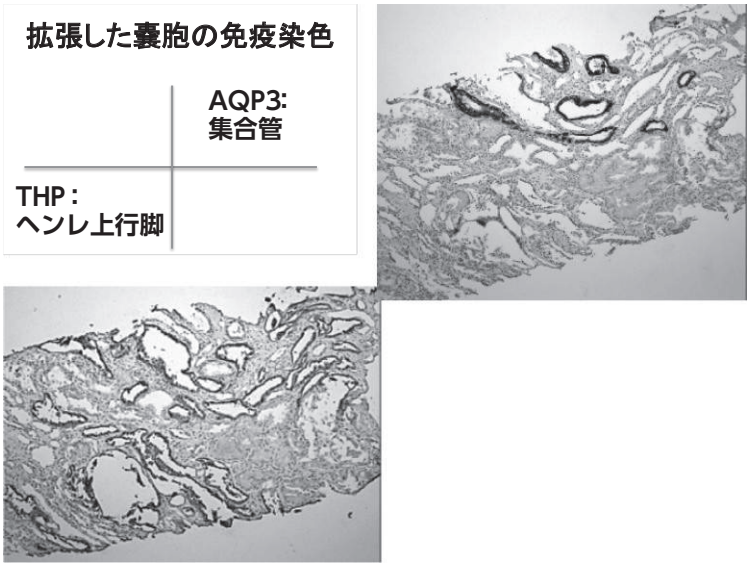


図 2-b　ネフロン癆（NPHP）患者の腎病理染め分け（THP, AQ3）

生検を施行された家族歴の明らかでない嚢胞性腎疾患患者のうち、*PKHD1*遺伝子変異によるARPKD 1例、*NPHP4*遺伝子変異によるNPHP 1例を対象とした。腎生検の腎病理組織未染標本に新たに染色を行った。具体的には、一次抗体として、近位尿細管をターゲットとした抗CD10抗体、ヘンレの上行脚～遠位尿細管をターゲットとした抗THP抗体、集合管をターゲットとした抗Aquaporin3抗体の染色を行い、二次抗体としてENVISIONを使用しDAB発色を行った。

【結果・考察】

infantile typeのネフロン癆（NPHP）患者の腎病理像は遠位尿細管の嚢胞性拡張病変が主体と報告されており[4]、adult-onset typeでの報告はな

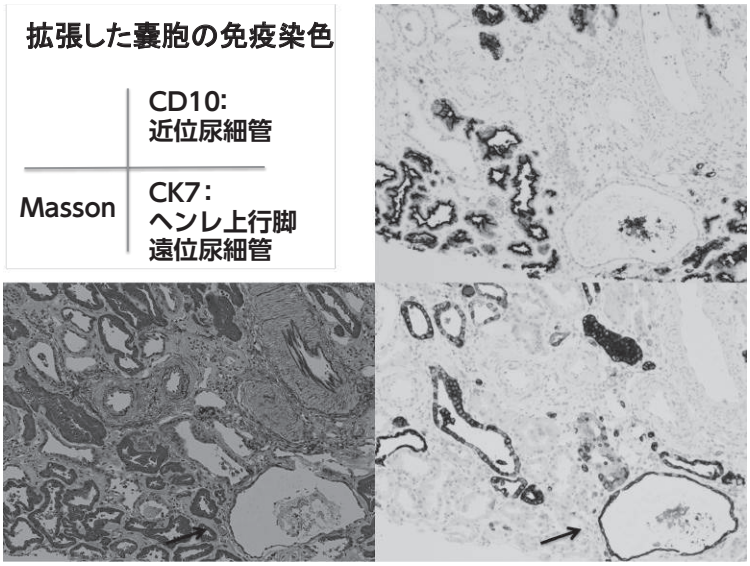


図 3-a　ARPKD患者の腎病理染め分け（CD10, CK7）

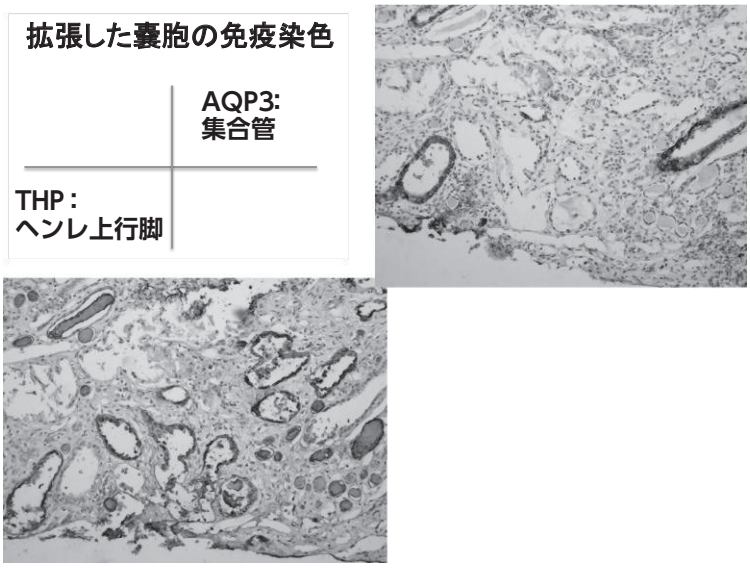


図 3-b　ARPKD患者の腎病理染め分け（THP, AQ3）

いが本研究の症例において、infantile type同様に病変の主座がヘンレの上行脚から遠位尿細管にある可能性が示唆された（**図2-a, -b**）。

またinfantile typeのARPKD患者の腎病理像は集合管の嚢胞性拡張病変が主体と報告されているが[5] adult-onset typeでの腎病理に関しては今まで報告がなく、本研究の症例において病変の主座がヘンレの上行脚から遠位尿細管にある可能性が示唆された（**図3-a, -b**）。この結果は、既存のinfantile typeでの報告と異なっており、緩徐進行型のadult-onset ARPKDは重症型のinfantile ARPKDと異なる病態である、という新たな知見となる可能性がある。今後は、症例数を増やして、嚢胞性腎疾患における遺伝子変異と変性尿細

管（嚢胞の起源）の探究を継続していきたい。

【文献】

1. エビデンスに基づく多発性嚢胞腎（PKD）診療ガイドライン 2017, 東京医学社
2. Hwang YH, Conklin J, Chan W, et al.: Refining Genotype-Phenotype Correlation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. J Am Soc Nephrol 27: 1861-1868, 2016
3. Sekine A, Fujimaru T, Hoshino J, et al.: Genotype-Clinical Correlations in Polycystic Kidney Disease with No Apparent Family History. Am J Nephrol 49: 233-240, 2019
4. Salomon R, Saunier S, Niaudet P: Nephronophthisis. Pediatr Nephrol 24: 2333-2344, 2009
5. Kissane JM: Renal cysts in pediatric patients. A classification and overview. Pediatr Nephrol 4: 69-77, 1990

腎不全患者におけるデノスマブによる骨密度改善効果の検討

星野　純一

【要約】

目的: 慢性腎不全患者は骨粗鬆症による脆弱性骨折のハイリスク集団であるが、薬剤蓄積性の懸念等から有効性が証明されていない薬剤が多く、治療選択肢は限定されている。近年開発された完全ヒトRANKL抗体製剤デノスマブは、薬物動態が腎機能非依存的であることから腎不全患者における治療効果が期待されている。今回、腎不全患者におけるデノスマブの骨密度改善効果を検討した。

方法: 2013年以降に当科にて骨粗鬆症治療を目的としてデノスマブが使用された症例を対象とし、透析の有無における投与1年後の腰椎・大腿骨近位部・橈骨骨密度（BMD）変化率を比較検討した。

結果: 観察期間内に透析121例（平均年齢66.7±10.6歳、透析歴中央値13年）、および非透析203例（71.2±10.9歳、eGFR中央値61 ml/min/1.73 m^2）にデノスマブ治療が行われた。高カルシウム血症例を除き、デノスマブ投与時に非透析例ではカルシウム/マグネシウム/天然型ビタミンD、透析例では活性型ビタミンDの開始/増量が行われた。1年後の腰椎BMDは透析群、非透析群でそれぞれ6.7±11.1%、7.5±10.2%と有意に増加した（ともに$p<0.01$（vs baseline））。大腿骨近位部BMD変化はそれぞれ4.3±7.9% vs 3.1±9.5%、橈骨遠位部BMD−0.5±6.4% vs 0.2±13.0%であった。これらの変化率は治験時における健常人のBMD変化率（腰椎6.6%, 大腿骨近位部2.8%, 橈骨遠位部0.2%）と同等であり、デノスマブの骨密度改善効果は腎機能に影響を受けないと推察された。一方、今回の検討により、透析例では低カルシウム血症を呈することが多いことも明らかとなった。

結語: デノスマブは透析患者においても保存期CKD患者や健常人と同等な骨密度改善効果を期待できる可能性がある。一方で透析例/重度腎障害例では投与後の低カルシウム血症に注意を要する。

【目的】

慢性腎不全は骨粗鬆症および脆弱性骨折のhigh risk集団であることが明らかになっている。骨粗鬆症治療における第一選択薬であるビスホスホネート製剤は腎排泄性薬剤であり腎不全患者では薬剤排泄速度の低下による蓄積が懸念される。完全ヒト型抗RANKL抗体のデノスマブ（プラリア®）は破骨細胞の機能調節に重要なRANKLを特異的に阻害する生物学的製剤で、骨吸収を抑制することで高い骨密度改善効果と骨折リスク低下が期待できる。腎不全患者に対する蓄積性も問題ないと考えられており[1)]、今後の腎不全患者に対する効果が期待されている。

近年我々は腎不全患者における同剤の短期有用性を報告したが[2)]、実際にどのような患者群が最も治療効果を期待できる集団であるのかは明らかでない。今回、腎不全患者におけるデノスマブの治療効果の検討を目的とした。

【方法】

2013年以降に当科で骨粗鬆症治療目的にデノスマブを使用し、投与後少なくとも4週間以上経過が追えた患者を対象とした後ろ向き観察研究を行った。腹膜透析施行例、腎移植例、高度な高カルシウム血症を有する症例（cCa>12 mg/dL）は除外した。

透析群および非透析群に2群し、両群における治療開始前および1年後の腰椎・大腿骨・橈骨骨密度をDEXA法によって評価し、その年間変化率（%/year）を比較した。また治療開始時の年齢、性、CKD stage、透析歴などの患者情報、および経時的な血清Ca, P, ALP, iPTH、total P1NP, TRACP−5b, 骨型ALP, オステオカルシン, 25OH

ビタミンDなどの検査データを集め、特に両群における投与後のカルシウム濃度変化や、骨代謝マーカーの推移を評価した。

低カルシウム血症はCommon Terminology Criteria for Adverse Events, version 4.0に基づき、アルブミン補正カルシウム値（cCa）8.5 mg/dL未満とした。低カルシウムイベントは、低カルシウム血症の発症またはカルシウム製剤またはビタミンD製剤の新規開始または増量と定義した。

連続変数の比較はMann-Whitney U-testまたはstudent's t testを、カテゴリー変数の比較はカイ二乗検定を用いた。デノスマブ投与開始から低カルシウム血症イベント発症までの期間をKaplan-Meier法, Log-rank testにて比較した。解析は全てStata Special Edition Version 14（Stata Inc., USA）を使用した。

【結果】

1. 患者背景

透析例121例、非透析例203例の合計324名が研究対象となった。両群の患者背景を**表1**に示す。平均年齢は透析群66.7±10.6歳、非透析群 71.2±10.9歳、透析群の透析歴中央値13年、非透析群のeGFR中央値は61 ml/min/1.73m^{2}であった。

2. 骨密度の推移

透析群83例、非透析群137例が投与前および1年後の骨密度評価（DEXA法）を行った。一年後の両群の骨密度変化率は、腰椎では6.7±11.1% vs 7.5±10.2%と同等に治療前より有意に上昇していた（**図1**）。また大腿骨頚部では4.3

表 1　患者背景

	HD（n=121）	Non-HD（n=203）	p-value
Age（y）	66.7±10.6	71.2±10.9	<0.001
Female sex（%）	60.3%	85.0%	<0.001
eGFR（ml/min）		61［43-74］	
CKD G1:2:3a:3b:4:5（%）		11:39:22:17:8:2	
Dialysis vintage（years）	13［5-22］	－	
Corrected Calcium	9.9±0.8	9.6±0.4	<0.01
Serum Phosphate	4.6±1.2	3.5±0.5	<0.001
Alkaline phosphatase（IU/L）	323±218	241±92	<0.001
BAP（μg/L）	19.6±12.4	14.4±6.4	<0.001
total P1NP（μg/L）	141［73-283］	41［24-65］	<0.001
Intact PTH（pg/mL）	132［56-217］	54［39-74］	<0.001
TRACP-5b（mU/dL）	496［299-797］	354［254-481］	<0.001
Bone Mineral Density（DEXA）			
Lumbar Spine （T score）	-2.12±1.59	-2.09±1.69	0.91
（BMD（g/cm^2））	0.79±0.19	0.76±0.33	0.41
Femoral Neck （T score）	-2.45±1.00	-2.36±1.17	0.46
（BMD（g/cm^2））	0.54±0.12	0.54±0.13	0.90
Distal Radius （T score）	-2.81±2.24	-2.54±2.27	0.40
（BMD（g/cm^2））	0.53±0.13	0.52±0.16	0.73

±7.9% vs 3.1±9.5%、橈骨遠位部では0.5±6.4% vs 0.2±13.0%であり、両群における骨密度改善効果は同等であった。これらの結果は、健常人を対象とした国内第Ⅲ相臨床試験における骨密度変化率（腰椎6.6%、大腿骨頚部2.8%、橈骨遠位部0.2%）と極めて類似した結果であり[3)]、透析患者、非透析CKD患者、健常者いずれも同等な骨密度変化を示したことから、本剤の骨密度改善効果は腎機能によらないと考えられた。また骨吸収マーカーであるTRACP-5b、骨形成マーカーである骨型ALPの推移も透析群、非透析群は同等であった。

3. 低カルシウム血症の頻度

デノスマブ投与後の低カルシウム血症

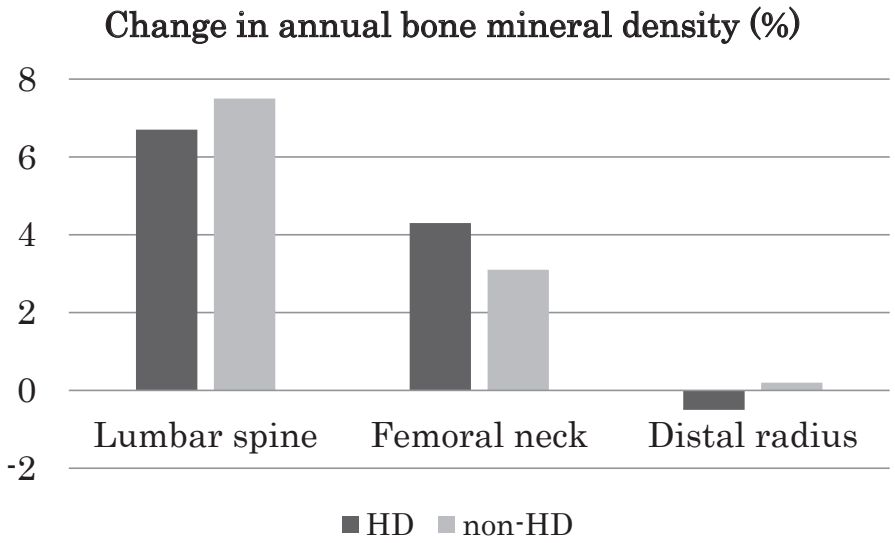
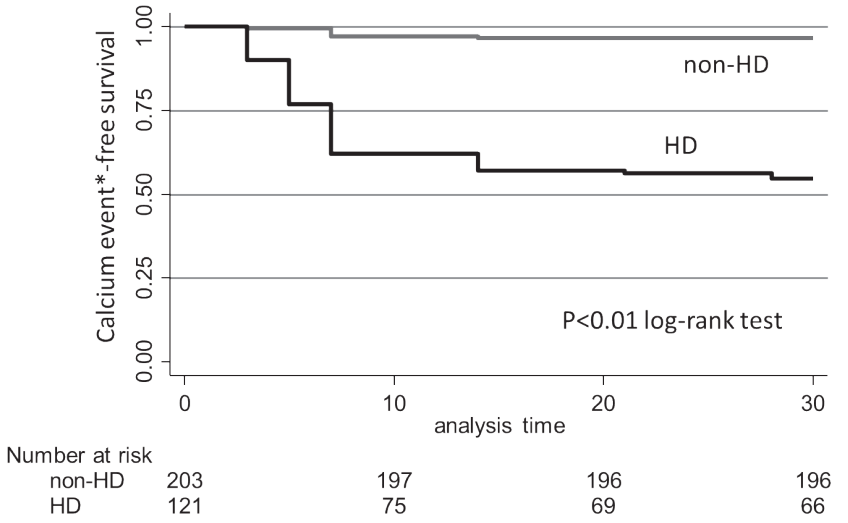


図１　透析群、非透析群における骨密度変化（%/year）の比較



低カルシウム血症イベント：血清補正カルシウム<8.5 mg/dLまたはカルシウム製剤・ビタミンD製剤の新規開始または増量

図２　透析群（HD）、非透析群（non-HD）における低カルシウム血症イベント

（cCa<8.5mg/dl）は、透析群の43名（35%）、非透析群の11名（5%）に認め、有意に透析群で多かった（p<0.01）。またカルシウム製剤・ビタミンD製剤の新規開始または増量を含めた低カルシウムイベントをアウトカムとすると、殆どの症例が投与開始後10日以内に低カルシウムイベントを生じていた（**図2**）。透析患者では少なくとも投与後2週間程度は低カルシウム血症の発症に十分注意し、カルシウム製剤やビタミンD製剤を適宜増量する必要があると考えられた。

【考察】

透析患者を含むCKD患者は骨折のハイリスク患者であるが、特に透析患者においては有効な確立した治療法は存在せず、その対策が急務であった。例えば通常の骨粗鬆症治療ガイドラインで推奨されているビスホスオネート製剤も透析患者での有用性は示されておらず、CKD患者を対象にしたメタ解析でも健常人のような効果は期待できないことが報告されている[4)]。抗RANKL抗体であるデノスマブは、透析患者においても健常人と同様な薬物動態を示し、その有効性が期待されている薬剤である。今回の我々の多数例の検討において、透析患者やCKD患者においても治験データと同等に優れた骨密度改善効果を有することが明らかになった。一方で、透析患者の場合、投与後に一過性の低カルシウム血症を高頻度に認めることも明らかになり、今後更に安全に使用していくための臨床上の未解決課題が浮き彫りになる結果となった。今後は低カルシウム血症を予測する因子の検討や、低カルシウム血症を生じないための予防投薬指針の作成などを行っていく必要がある。また、今回の検討にて認めた骨密度上昇が、実際の骨折抑制に繋がっているかどうかの検討も望まれる。

【文献】

1. Block GA, Bone HG, Fang L, Lee E, Padhi D: A single-dose study of denosumab in patients with various degrees of renal impairment. Journal of bone and mineral research 27: 1471-1479, 2012
2. Hiramatsu R, Ubara Y, Sawa N, et al.: Denosumab for Low Bone Mass in Hemodialysis Patients: A Noncontrolled Trial. Am J Kidney Dis 66: 175-177, 2015
3. Nakamura T, Matsumoto T, Sugimoto T, et al.: Clinical Trials Express: fracture risk reduction with denosumab in Japanese postmenopausal women and men with osteoporosis: denosumab fracture intervention randomized placebo controlled trial (DIRECT). The Journal of clinical endocrinology and metabolism 99: 2599-2607, 2014
4. Wilson LM, Rebholz CM, Jirru E, et al.: Benefits and Harms of Osteoporosis Medications in Patients With Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. Ann Intern Med 166: 649-658, 2017

顕性蛋白尿を呈さずに腎機能低下を来す糖尿病性腎臓病（Nonproteinuric Diabetic Kidney Disease）患者の腎組織、腎・生命予後の検討

山内　真之、星野　純一、乳原　善文、高市　憲明

【要約】

1型糖尿病患者の既存の疫学研究から、古典的糖尿病性腎症（Proteinuric Diabetic Kidney Disease、以下、Proteinuric DKD）は正常アルブミン尿、微量アルブミン尿、顕性蛋白尿の時期を経て糸球体濾過率が低下していくと考えられていた。また、腎病理組織は結節性病変に代表される変化が見られ、腎機能低下は進行性で最終的には末期腎不全となると考えられていた。しかしながら、昨今、2型糖尿病患者の横断研究によると、顕性蛋白尿を呈さずに腎機能低下を来している糖尿病性腎臓病、いわゆるNon-proteinuric diabetic kidney disease（以下、Non-proteinuric DKD）の症例が4割程度存在することがわかってきた。しかしながら、これらNon-proteinuric DKD患者の腎病理像や腎予後および生命予後というものは明らかになっていなかった。本研究では、全国18施設からの2型糖尿病患者で腎生検にて腎機能低下（eGFR ＜60mL/min/1.73m^2）を来しているDiabetic Kidney Diseaseと診断された526名を対象とし、Non-proteinuric DKDの腎病理像と腎予後・生命予後をProteinuric DKDの

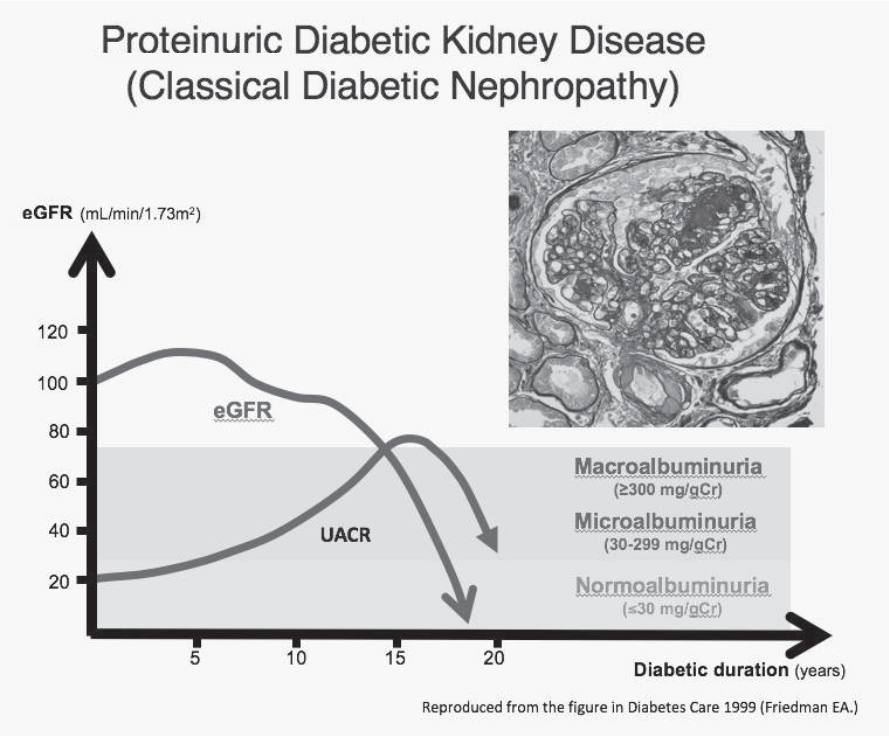


図 1

【結果】

82名のNon-proteinuric DKD（尿中アルブミン量<300mg/g）は、164名のProteinuric DKD（尿中アルブミン量<300mg/g）が対象となった。プロペンシティスコアマッチング前後の患者背景を（**表1**）に示すが、Non-proteinuric DKD群はProteinuric DKD群と比較して、収縮期血圧が低く、腎組織障害度も軽度であった（$p<0.001$）。中央値1.9年の追跡期間において、Proteinuric DKDの5年腎生存率は30.3%（95% CI, 22.4-38.6）に対して、Non-proteinuric DKDのそれは86.6%（95% CI, 72.5-93.8）と腎予後は良好であった（log-rank test $p<0.001$）（**図3**）。サブ解析でも一貫してNon-proteinuric DKDの方がProteinuric DKDと比較して腎予後が良好であった（**表2**）。生命予後に関しても同様の結果が得

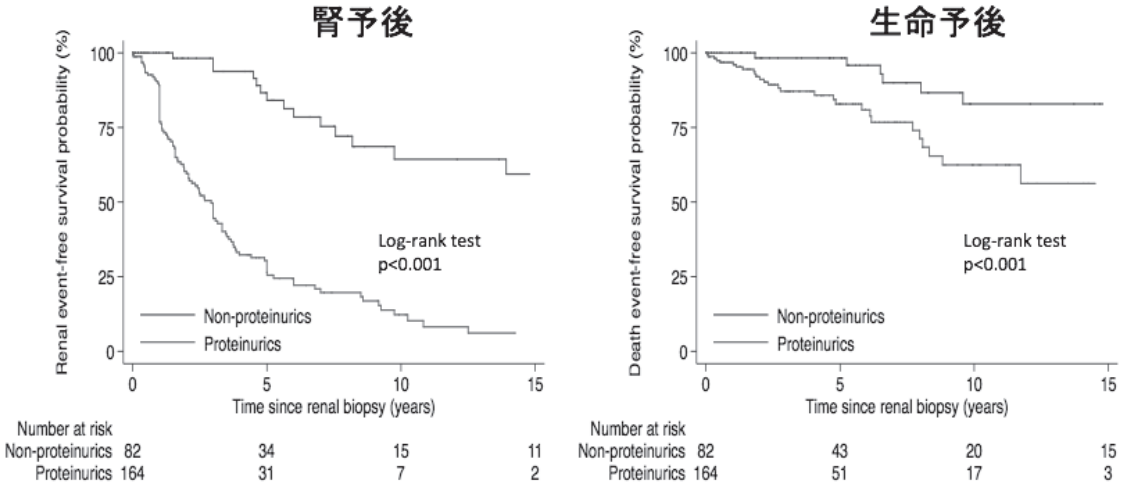


図３

表２

Characteristics	Non-proteinuric (n=82)			Proteinuric (n=164)			Adjusted HR (95% CI)	*p*-value
	Events	PY	IR (95% CI)	Events	PY	IR (95% CI)		
Overall	15	498	30 (18-50)	110	477	231 (191-278)	0.13 (0.08-0.24)	<0.001
Elderly	4	131	31 (11-81)	48	207	232 (175-308)	0.11 (0.04-0.31)	<0.001
Male	11	349	32 (17-57)	79	318	248 (199-309)	0.13 (0.07-0.26)	<0.001
Obesity	5	183	27 (11-66)	41	195	210 (155-285)	0.10 (0.04-0.26)	<0.001
Retinopathy	5	113	44 (18-107)	38	190	200 (146-275)	0.23 (0.09-0.61)	<0.001
Smoking	4	80	50 (19-134)	36	172	210 (151-291)	0.15 (0.05-0.45)	<0.001
RAAS	4	77	52 (19-138)	54	227	238 (183-311)	0.13 (0.04-0.42)	<0.001
Hypertension	8	229	35 (17-70)	88	336	262 (213-323)	0.14 (0.06-0.28)	<0.001
Dyslipidemia	10	449	22 (12-41)	95	397	239 (196-293)	0.10 (0.05-0.20)	<0.001
Poor glycemic control	7	249	28 (13-59)	44	208	212 (158-284)	0.12 (0.05-0.29)	<0.001
eGFR <45	6	336	18 (8-40)	48	306	157 (118-208)	0.13 (0.05-0.33)	<0.001
Fioretto Classification (C Ⅰ)	7	344	20 (9-43)	16	168	95 (58-156)	0.17 (0.06-0.46)	<0.001
Fioretto Classification (C Ⅱ)	4	70	57 (22-153)	75	244	308 (245-386)	0.17 (0.06-0.47)	<0.001
Fioretto Classification (C Ⅲ)	4	84	47 (18-126)	19	65	291 (186-457)	0.10 (0.03-0.36)	<0.001
Tervaert Classification (≥Ⅲ)	6	128	47 (21-104)	66	197	335 (264-427)	0.14 (0.05-0.35)	<0.001

られた（**図3**）。

【考察】

Non-proteinuric DKD患者は、腎障害度も軽微であり、腎・生命予後も良好であることが示唆された。今後、Non-proteinuric DKDのメカニズムについての研究が必要と考えられた。

【文献】

1. Viberti GC, Jarrett RJ, Keen H: Microalbuminuria as prediction of nephropathy in diabetics. Lancet 2: 611, 1982
2. Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E: The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. Diabetes 2: 64-78, 1983
3. Mogensen CE, Christensen CK: Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. N Engl J Med 311: 89-93, 1984
4. Kimmelstiel P, Wilson C: Intercapillary Lesions in the Glomeruli of the Kidney. Am J Pathol 12: 83-98, 1936
5. Olson JL, Laszik ZG: Diabetic Nephropathy: Heptinstall's pathology of the kidney 7th ed. Wolters Kluwer: 897-949, 2015
6. Kramer HJ, Nguyen QD, Curhan G, Hsu CY: Renal insufficiency in the absence of albuminuria and retinopathy among adults with type 2 diabetes mellitus. JAMA 289: 3273-3277, 2003
7. MacIsaac RJ, Tsalamandris C, Panagiotopoulos S, Smith TJ, McNeil KJ, Jerums G: Nonalbuminuric renal insufficiency in type 2 diabetes. Diabetes Care 27: 195-200, 2004
8. Yokoyama H, Sone H, Oishi M, Kawai K, Fukumoto Y, Kobayashi M: Japan Diabetes Clinical Data Management Study Group. Prevalence of albuminuria and renal insufficiency and associated clinical factors in type 2 diabetes: the Japan Diabetes Clinical Data Management study (JDDM15). Nephrol Dial Transplant 24: 1212-1219, 2009
9. Thomas MC, Macisaac RJ, Jerums G, Weekes A, Moran J, Shaw JE, Atkins RC: Nonalbuminuric renal impairment in type 2 diabetic patients and in the general population (national evaluation of the frequency of renal impairment cO-existing with NIDDM [NEFRON] 11). Diabetes Care 32: 1497-1502, 2009
10. Mottl AK, Kwon KS, Mauer M, Mayer-Davis EJ, Hogan SL, Kshirsagar AV: Normoalbuminuric diabetic kidney disease in the U.S. population. J Diabetes Complications 27: 123-127, 2013
11. Bash LD, Selvin E, Steffes M, Coresh J, Astor BC: Poor glycemic control in diabetes and the risk of incident chronic kidney disease even in the absence of albuminuria and retinopathy: Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Arch Intern Med 168: 2440-2447, 2008

（7）循環器疾患

心房細動治療におけるカテーテルアブレーションが引き起こす心臓自律神経機能の修飾について

菊地　隆司、三谷　治夫、児玉　隆秀、石綿　清雄

【要旨】

肺静脈隔離術（以下PVI）に伴う心臓自律神経機能の低下が報告されているが、その後の変化はよく知られていない。本研究はPVI後長期的観察から心臓自律神経機能の可塑性の有無を調査した。対象は初回PVIを受けた49例（男性42

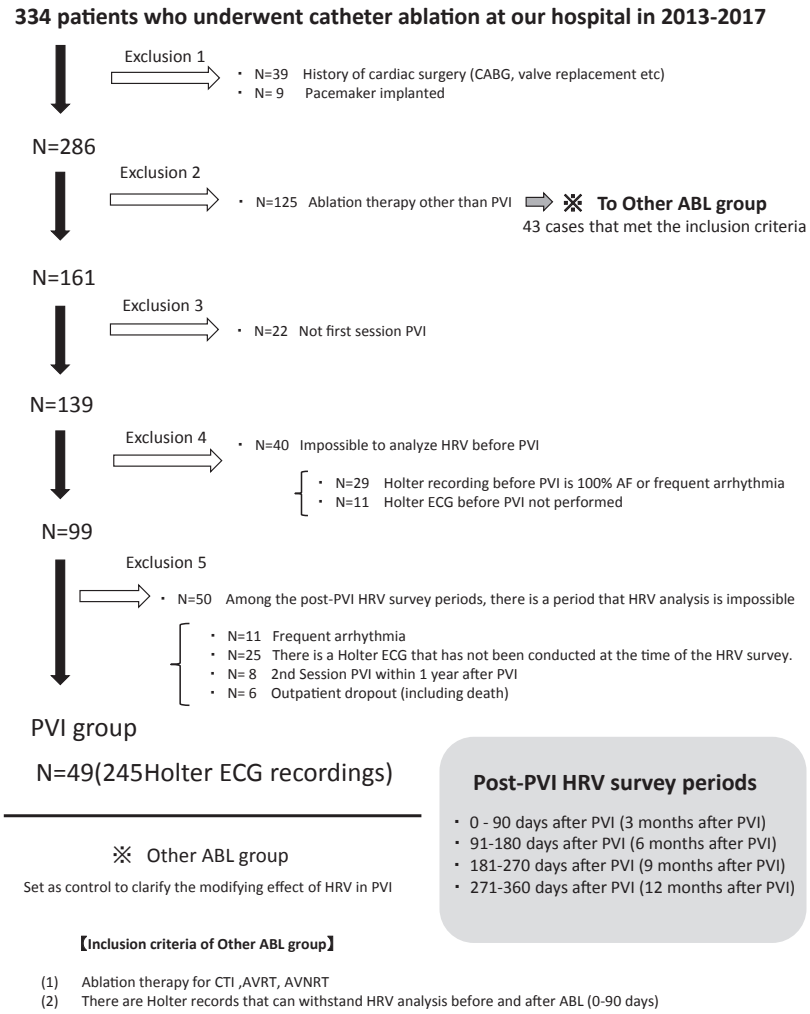


図１　Study subjects registration method

例, PVI時62 ± 11歳, 左心房径37.2 ± 4.5mm, 左室駆出率67.4 ± 9.7%)。定期に実施したHolter心電図（PVI前、後0-90、91-180、181-270、271-360日）のHeart rate variabilityから心臓自律神経機能を評価した結果、PVI後0-90日に有意な低下（以下dip）を示した後、上昇しPVI後91-180日で周波数領域は全指標がdipに比べ有意な上昇を示した。以上から本研究結果は心臓自律神経機能の可塑性を示唆する。

【背景】

肺静脈隔離術（以下PVI）は心房細動（以下AF）に対する非薬物療法として確立されているが副作用の一つに心臓自律神経障害がある。これはアブレーションの標的（肺静脈周囲心房筋）にganglionated plexusや、そこから延びる自律神経線維が局在[1]するため、心房筋ともに障害されることによる。自律神経の再神経支配という観点においては、心移植後に再神経支配を示唆する報告[2]やPVI後のHeart rate variability（以下

表 1　HRV before and after ABL（comparison of PVI group and Other ABL group）

HRV / before ABL (Baseline)			
	PVI , N=49	Other ABL , N=43	P
Time domain			
HR, bpm	67.6 [62.8-72.9]	75.4 [69.7-81.0]	**<0.001**
ΔHR, bpm	16.2 [12.1-21.5]	10.4 [5.5-16.1]	**0.002**
SDNN, ms	124.4 [101.3-150.5]	126.3 [103.8-149.0]	0.969
SDANN, ms	103.1 [82.3-125.9]	112.6 [89.5-132.1]	0.563
SD mean, ms	62.5 [54.9-76.1]	60.3 [49.6-68.2]	0.224
CVRR, %	13.5 [11.9-16.4]	15.6 [13.4-18.2]	0.055
r-MSSD, ms	22.8 [16.5-27.1]	20.6 [15.2-27.9]	0.573
Frequency domain			
TF, ms^2	4694 [3887-7220]	4587 [3802-6024]	0.544
ULF, ms^2	3210 [2553-4742]	3151 [2461-4095]	0.376
LF , ms^2	262 [157-461]	283 [164-440]	0.981
HF, ms^2	92 [46-136]	79 [46-200]	0.846
LF/HF	4.8 [3.1-6.2]	4.4 [3.4-6.2]	0.680
HRV / 0-3rd months after ABL			
	PVI , N=49	Other ABL , N=43	P
Time domain			
HR, bpm	73.8 [65.0-78.8] **	76.4 [68.6-81.6]	0.143
ΔHR, bpm	11.7 [4.6-15.8] **	10.6 [3.7-16.5]	0.523
SDNN, ms	93.9 [74.7-113.1] **	128.4 [108.6-151.5]	**<0.001**
SDANN, ms	84.1 [66.9-104.1] **	111.1 [97.1-127.4]	**<0.001**
SD mean, ms	39.4 [30.2-48.7] **	58.7 [49.1-72.5]	**<0.001**
CVRR, %	11.1 [9.4-13.1] **	16.1 [14.5-18.1]	**<0.001**
r-MSSD, ms	13.9 [10.8-18.9] **	20.5 [14.6-25.5]	**<0.001**
Frequency domain			
TF, ms^2	1906 [1258-3079] **	4198 [3237-6274]	**<0.001**
ULF, ms^2	1378 [1064-2311] **	2849 [2086-4204]	**<0.001**
LF, ms^2	59 [24-113] **	259 [177-467]	**<0.001**
HF, ms^2	28 [18-42] **	74 [43-145]	**<0.001**
LF/HF	2.1 [1.4-4.7] **	4.5 [3.0-6.2]	**<0.001**

* : P<0.05 ,　** :　P<0.001　Wilcoxon signed rank test between HRV at before procedure(Baseline) and HRV at 0-90 days after ABL.　The Mann-Whitney test was used to compare the PVI group with the Other ABL group (P).

【 Time domain 】
CVRR : Coefficient of variation of R-R interval
⊿HR : Intrinsic heart rate:117.2-(0.53xAGE))– real heart rate
SDNN : Standard deviation of all normal RR intervals
SDANN :Standard Deviation of Sequential Five-Minute R-R Interval Means
SD mean :Average value of NN interval standard deviation for every 30 minutes over 24-hour
r-MSSD :Square root of the mean of the sum of the squares of differences between adjacent normal RR intervals
【 Frequency domain 】
TF : Total frequency (0.0001-0.5 Hz)
ULF : Ultra low frequency (0.0001-0.003 Hz)
LF : Low frequency (0.04-0.15 Hz)
HF : High frequency (0.15-0.4 Hz)

HRV）回復を示唆する報告[3]が散見されるが詳細はよく研究されていない。

【目的】

PVIにより障害された心臓自律神経機能を約1年間観察しその可塑性の有無を調査すること。

【対象】

対象の選抜方法: 当院にて2013年～2017年度の経皮的カテーテルアブレーション療法（以下ABL）をうけた334例のうち、**図1**に示す除外基準（Exclusion 1 ～ 5）に抵触しない49例を対象とした（以下PVI群）。またExclusion 2に抵触した128例のうちInclusion criteria（**図1**下段「Other ABL group」を参照）を満たした43例を対照とした（以下Other ABL群）。本研究は虎の門病院研究倫理審査委員会（受理番号: 1734）に承認され、被験者に対するインフォームドコンセントは虎の門病院治験センターホームページ上の情報開示にて実施した。

【方法】

心臓自律神経機能の評価: ホルター心電図記録（以下Holter）から取得したHRVを心臓自律神経機能の指標とした。HolterはNASA、modified CM5誘導にてRAC-3100（日本光電、東京）を被験者に24時間装着、自由行動下で記録した

表２　Clinical profile of study subjects

Clinical characteristics (at ABL)			
	PVI , N=49	Other ABL , N=43	P
Age, y	62.6 ± 11.1	60.1 ± 14.7	0.349
Male gender, n(%)	42 (85.7)	31 (72.1)	0.127
BMI, kg/m^2	23.9 ± 2.1	22.4 ± 3.1	**0.018**
Hypertension, n(%)	30 (61.2)	18 (41.9)	0.092
Depressor			
ACEI / ARB	11 (22.4)	7 (16.3)	0.600
CCB	17 (34.7)	9 (20.9)	0.169
β Blocker	25 (51.0)	9 (20.9)	**0.005**
Diuretics	2 (4.1)	2 (4.7)	1.000
Diabetes mellitus, n(%)	8 (16.3)	6 (14.0)	0.780
Hb A1c $_{NGSP}$, %	5.9 ± 0.8	5.8 ± 0.8	0.661
CKD on hemodialysis	1 (2.0)	1 (2.3)	1.000
Ischemic heart disease, n(%)	4 (8.2)	3 (7.0)	1.000
BNP, pg/ml	103 ± 108	86 ± 162	0.569
LAD, mm	37.2 ± 4.5	32.9 ± 5.7	**< 0.001**
LVEF, %	67.4 ± 9.7	68.4 ± 10.0	0.610

Method for PVI		Target for ABL	
RF , n(%)	29 (59.2)	AVRT・AVNRT combination	17 (39.5)
CTI in combination, n(%)	9 (18.4)	CTI	16 (37.2)
Cryo , n(%)	20 (40.8)	AVRT	6 (14.0)
CTI in combination, n(%)	15 (30.6)	AVNRT	3 (7.0)
		CTI・AVRT・AVNRT combination	1 (2.3)

【abbreviation】

ABL ; Ablation　ACEI ; Angiotensin converting enzyme inhibitor　ARB ; Angiotensin Ⅱ receptor blocker
AVNRT ; Atrioventricular nodal reentrant tachycardia　AVRT ; Atrioventricular reentrant tachycardia
BMI ; body mass index　BNP ; Brain natriuretic peptide　CCB ; calcium channel blocker
CKD ; Chronic kidney disease　Cryo ; Cryoballon ablation　CTI ; Cavo tricuspid isthmus
Hb A1c $_{NGSP}$; Hemoglobin A1c (National Glycohemoglobin Standardization Program)　LAD ; Left atrial diameter
LVEF ; Left ventricular ejection fraction　PVI ; Pulmonary vein isolation　RF ; Radiofrequency ablation

In Method for PVI, there are 29 cases (59.2%) of RF and 9 cases (18.4%) of the combination with CTI are included. There are 20 cases (40.8%) of Cryo, of which 15 cases (30.6%) include the combination with CTI.

In Other ABL group, the target of the ABL are comprised by 17 cases (39.5%) of combination of AVRT and AVNRT, 16 cases (37.2%) of CTI alone, 6 cases of AVRT alone (14.0%), 3 cases of AVNRT alone (7.0%) and 1 case of CTI-AVRT-AVNRT combination(2.3%).

後、解析装置DSC-3000（日本光電、東京）にて誤認識された拍ラベルを修正後、全心拍データをHRV解析ソフトMemCalc Chiram 3, ver.2.1（GMS Inc. Tokyo, Japan）に適用し時間領域と周波数領域（Power spectral density以下PSDと同義）指標を取得した（各指標は**表1**を参照）。

検証1: PVIおよびOther ABLが心臓自律神経に与える影響

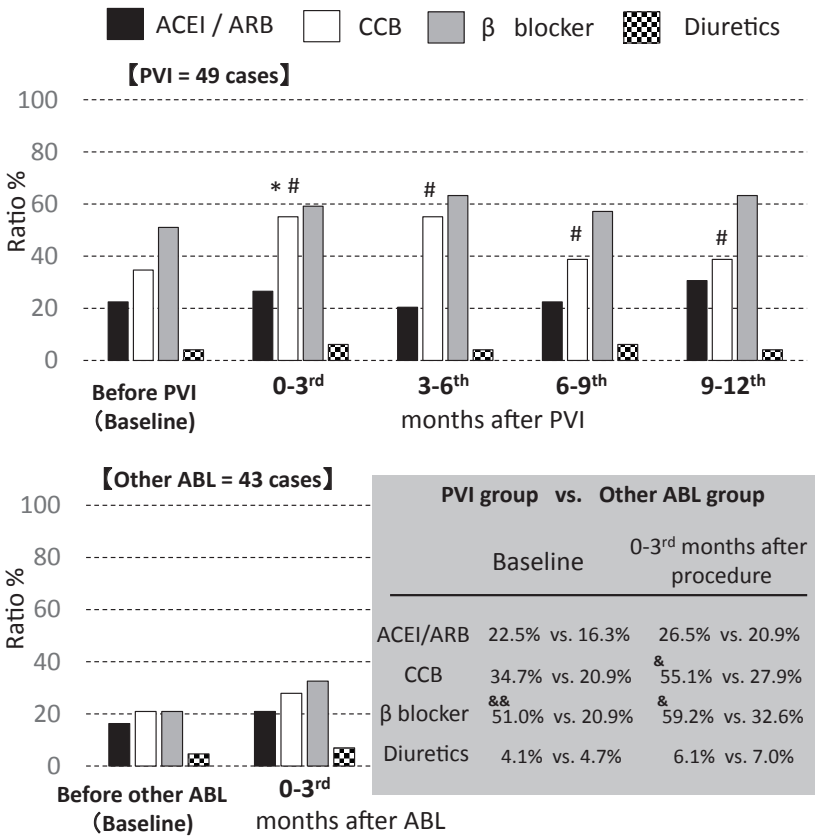
PVIが心臓自律神経に与える影響を明確にするためPVI群とOther ABL群の間でABL前（Baseline）とABL後0-90日（0-3rd）のHRVを各々比較した。

検証2: PVI後1年間における心臓自律神経機能の経時的変化

PVI前、PVI後0-90日、91-180日、181-270日、271-360日の5期（各々以下Baseline、0-3rd、3-6th、6-9th、9-12thとする）のHRVについて0-3rd、3-6th、6-9th、9-12thにおける経時的変化の有無、およびHRV各指標値をBaseline時100%とし、対する0-3rd、3-6th、6-9th、9-12thの比率を調査した。データの記載は平均値±標準偏差、中央値［四分位範囲］、症例数（%）で示した。検定法は検定が実施された図や表の余白に明記しP<0.05を統計学的有意とした。

【結果】

PVI群、Other ABL群のABL時の臨床的背景は**表2**に示す。PVI群のβ bloker処方はOther ABL群より有意に高頻度（**表2**、**図2**下段灰色領



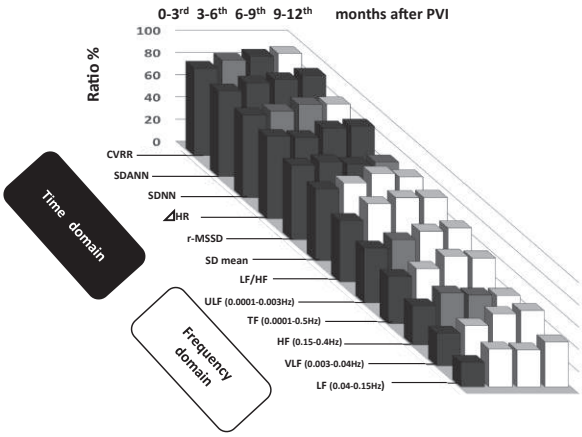
* P<0.05 ; Baseline vs. 0-3rd months after procedure (McNemar' Chi-squared test)
\# P<0.05 ; 0-3rd to 9-12th months after procedure (Cochran' Q test)
& P<0.05 && P<0.01 ; PVI =49 cases vs. Other ABL =43 cases (Fisher's exact test)

図２ Prescription status of depressors and autonomic drugs at the time of Holter ECG recording

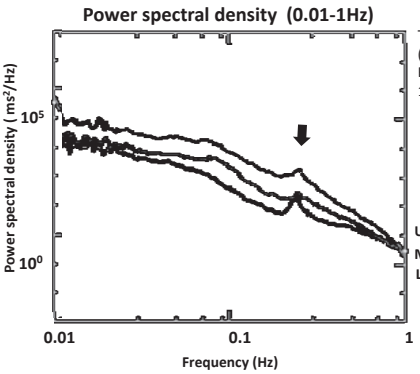
表 3　Time cause change of HRV observed through 1 year after PVI

HRV	Month after PVI				Friedman test
	0-3rd	3-6th	6-9th	9-12th	P
Time domain					
HR, bpm	73.8 [65.0-78.8]	71.3 [65.6-76.6]	69.8 [64.3-76.8]	70.2 [62.6-75.9]	0.007
ΔHR, bpm	11.7 [4.6-15.8]	12.4 [6.8-18.9]	13.8 [5.7-20.8]	15.6 [6.8-21.4]	0.007
SDNN, ms	93.9 [74.7-113.1]	95.6 [76.5-128.4]*	100.8 [79.7-126.8]*	102.8 [90.3-131.0]***	<0.001
SDANN, ms	84.1 [66.9-104.1]	85.5 [67.9-116.1]	92.7 [68.7-107.8]	89.2 [74.7-114.0]*	0.067
SD mean, ms	39.4 [30.2-48.7]	41.1 [33.7-54.9]***	47.6 [37.6-59.0]***	47.9 [37.9-60.3]*** ##	<0.001
CVRR, %	11.1 [9.4-13.1]	12.2 [9.2-14.8]	12.0 [9.9-13.9]	12.3 [10.5-14.6]**	<0.001
r-MSSD, ms	13.9 [10.8-18.9]	15.1 [11.3-21.9]	15.5 [12.4-20.1]	17.2 [14.2-20.0]*	0.006
Frequency domain					
TF, ms²	1906 [1258-3079]	2247 [1600-3930] ***	2762 [1876-4579] ***	3220 [2166-4692] *** ##	<0.001
ULF, ms²	1378 [1064-2311]	1850 [997-2516] *	2144 [1454-3303] ***	2143 [1609-3382] *** ##	<0.001
LF, ms²	59 [24-113]	86 [41-126] ***	98 [49-182] *** #	108 [51-199] *** #	<0.001
HF, ms²	28 [18-42]	32 [22-63] **	38 [22-61] **	41 [29-64] ***	<0.001
LF/HF	2.1 [1.4-4.7]	2.7 [1.7-4.9] *	3.0 [2.2-5.4] **	3.6 [2.1-5.1] **	<0.001

post hoc. Bonferroni
* : P<0.050　** : P<0.010　*** : P<0.001　0-3rd vs. 3-6th, 0-3rd vs. 6-9th, 0-3rd vs. 9-12th
# : P<0.050　## : P<0.010　3-6th vs. 6-9th, 3-6th vs. 9-12th



The box shows the ratio of HRV parameter(pre PVI as 100%) derived from this study subjects(shown by median value). White and gray box shows significant increment(p<0.05 and P<0.01, Friedman test) as compared with the period of 0-3 months on each HRV parameters.



The figure (Left) showes a typical case, changing in HRV (Frequency domain) caused by Cryoballon PVI (Upper line ; Before PVI. Middle line ; 12Th month after PVI, Lower line ; 1ST month after PVI) . The arrow shows peak of LF power.

	TF ms²	LF ms²	HF ms²
Upper ; Before PVI	8439	1299	229
Middle ; 12th months after PVI	3773	330	42
Lower ; 1st month after PVI	1906	105	17

図 3　Restoration of cardiac autonomic function observed after PVI

域)、カルシウム受容体拮抗薬は0-3rdに有意に増加した後、経過に伴い減少した(**図2**上段)。

1. 検証1: 0-3rdにPVI群のHRは有意に上昇し、他指標は有意に低下したがOther ABL群に有意な変化は見られなかった(**表2**)。
2. 検証2: 0-3rdのHRV諸指標はBaseline(100%)に対し22.1%;LF ~ 78.3%;CVRRを示した(以下dip)。その後、上昇傾向を全指標で認め3-6thの時点で周波数領域の指標の上昇はdipに対し全指標で有意点に達し、最終的に9-12thの時点でBaselineに対し40.5%;LF ~ 91.8%;CVRRを示した。PVI手技(RF、Cryo)間にdipの程度、その後のHRV上昇過程に対する有意な相互作用は認められなかった(**表3、図3上段**)。

【考察】

本研究ではPVI後のHRV低下を確認し、続けて約1年間の追跡でHRVの回復を認めた。Sandsら[4]は心移植患者のPSDのピークが消失し正常群の96%減となることを報告し、Thamesら[2]はイヌで心移植を行い術後にPSDのピークがほぼ消失するが、術後1年でLFを中心に小さなピークが観察されるようになることから再神経支配の存在を提唱している。本研究では**図3下段**症例のPSDが示すように、PVI後1ヶ月で明瞭なピーク(矢印: LF領域)がすでに見られ、またdipにおいても最も大きな低下がLFの78%減であったことは、PVIの除神経は心移植のように完全なものでないことを示唆する。一方で再神経支配の時期は、末梢神経では神経断裂後に数週~数年で再び神経支配する機構がWallerian degenerationとして知られている[5]。AFの自律神経リモデリングを研究した報告[6]では、左心耳の免疫組織学的検索から心房における末梢自律神経の支持基盤が線維芽細胞であることが示され、同様の機構が心房内自律神経線維にも適用できる可能性が示唆されており本研究でのHRV回復が数ヶ月~数年単位で進行していく様子からも上述の機構が心房に存在することを支持すると考える。

【参考文献】

1. Arora R, et al.: Neural substrate for atrial fibrillation: implications for targeted parasympathetic blockade in the posterior left atrium. Am J Physiol Heart Circ Physiol 294: 134-144, 2008
2. Thames MD, et al.: Sinus arrhythmia in dogs after cardiac transplantation. Am J Cardiol 24: 54-58, 1969
3. Pappone C, et al.: Pulmonary vein denervation enhances long-term benefit after circumferential ablation for paroxysmal atrial fibrillation. Circulation 109: 327-334, 2004
4. Sands KE, et al.: Power spectrum analysis of heart rate variability in human cardiac transplant recipients. Circulation 79: 76-82, 1989
5. Gaudet AD, et al.: Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. J Neuroinflammation 8: 110, 2011
6. 山下武士: 心房細動における自律神経リモデリング. 心電図 36: 334-343, 2016

拡張不全型心不全（HFpEF）に対する新しい薬物治療法の開発

杉山　篤、長澤（萩原）美帆子、神林　隆一、後藤　愛
千葉　浩輝、安東 賢太郎、内藤　篤彦、中瀬古（泉）寛子
東邦大学医学部薬理学講座

【要旨】

Caldaretは筋小胞体Ca^{2+}/ATPase（SERCA）の働きを促進するとともにRyR2受容体からの拡張期Ca^{2+} leakを抑制する化合物である。本研究では、ハロセン麻酔犬に対してcaldaret（0.5, 5, 50 μg/kg/10 min, i.v.）を累積的に投与し電気生理学的作用および心血行動態への作用を検討した（n=5）。低-中用量は左室等容性収縮速度を増加し、等容性弛緩速度も増加傾向を示したが、充満期拡張能には作用せず、拡張不全型心不全（HFpEF）よりも収縮不全型心不全（HFrEF）への有用性が期待される。一方、本研究では正常犬を用いて評価しており拡張能改善効果を過小評価している可能性もある。高用量は心拍数を増加し、総末梢血管抵抗を増大したので、虚血性心疾患やHFpEF患者ではかえって有害かもしれない。低-中用量は房室結節伝導を促進し、中-高用量は右室有効不応期を延長したので、細胞内Ca^{2+}動態の変化が心筋に存在する各イオンチャネルに与える作用に関しては細胞レベルでのさらなる機序の解明が必要である。

【目的】

拡張不全型心不全（HFpEF）および収縮不全型心不全（HFrEF）の臨床症状および予後は類似するが、全心不全患者に占める割合はHFpEFがHFrEFを上回ることが最近判明した[1, 2]。HFpEFの発症前要因は高血圧、左室肥大、加齢および女性であり、その非代償化の誘因として心房細動の合併や収縮期高血圧が報告されており、これはHFrEFの主な発症要因が虚血性心疾患であることと大きく異なる。HFrEFに関しては科学的根拠に基づいた治療ガイドラインが確立されているが、血圧がコントロールされているHFpEFに対して予後改善効果を有する有効な薬物療法は長らく同定されてこなかった[1, 2]。

最近のHFpEFに対する薬物療法に関する主な知見は以下の3点である[1, 2]。(1)HFpEFに対する薬物療法として、アンジオテンシン変換酵素阻害薬（PEP-CHF試験）、AT_1受容体拮抗薬（CHARM-Preserved試験, I-PRESERVE試験）およびβ遮断薬（J-DHF試験）の効果が検証されたが、予後の改善効果は確認されていない。(2)HFpEFに対するアルドステロン受容体拮抗薬スピロノラクトンの効果を検討した前向き大規模臨床試験（TOPCAT試験）では、HFpEF患者へのスピロノラクトンの投与により、症状増悪による入院は有意に減少したが心血管死や全死亡に有意な減少は認められなかった。(3)NO-cyclic GMP-PKG系の障害は、左室の求心性肥厚、titinのリン酸化障害による心筋スティフネス増加や間質へのコラーゲン沈着増加を介してHFpEFの発症に寄与するので、過去にphosphodiesterase-5阻害薬やneprilysin阻害薬がこの系の改善薬として研究が進められたが、予後の改善効果は確認されなかった。

HFpEFの患者数は今後、全世界で激増することが予想されるが、加齢や性別は修正できないので、左室の拡張機能障害を改善する薬物を早急に開発する必要がある。Caldaretは筋小胞体Ca^{2+}/ATPase（SERCA）機能の働きを促進するとともにRyR2受容体を介する拡張期Ca^{2+} leakの抑制などの細胞内Ca^{2+}動態の修飾作用を有する[3, 4]。本研究では、caldaretによる筋小胞体へのCa^{2+}取り込み促進効果が生体位心に、いかなる電気薬理学的作用を与えるかを評価した。

【方法】

雌性ビーグル犬をthiopental sodium（30 mg/kg）静注で麻酔導入後、気管内挿管し、人工呼吸器を用いて100％酸素を通気下でhalothane（1％）の吸入により麻酔を維持した（n=5）[5]。1回換気量を20 mL/kg、換気回数を15回/分とした。左右の大腿動静脈からカテーテルを挿入して左室圧、血圧および右室単相性活動電位を、また第Ⅱ誘導心電図を連続記録した。QT間隔はVan de Water式: QTc=QT−0.087×(RR−1000)，(RR: ms）を用いて補正した。データ解析にはWinVAS3 for Windows ver. 1.1R24(株式会社フィジオテック）を使用した。各測定点において心拍出量および右室有効不応期も評価した。薬物投与前値を測定後、低用量のcaldaret（0.5 μg/kg）を10分間で静脈内投与し、投与開始5, 10, 15, 20および30分後に各指標を測定した。次に中用量のcaldaret（5 μg/kg）を10分間で静脈内投与し各指標を同様に測定した。さらに高用量のcaldaret（50 μg/kg）を10分間で静脈内投与し、投与開始5, 10, 15, 20, 30, 45および60分後に各指標を測定した。

Caldaretは田辺三菱製薬株式会社より提供を受け、thiopental sodium（田辺三菱製薬株式会社）およびhalothane（武田薬品工業株式会社）は購入した。結果は平均値±標準誤差で表示し、統計は分散分析で解析後に対比法で特定の2点間の差を検定した。P <0.05を有意差ありと判定した。

【結果】

実験中に動物が死に至るような致死性心室不整脈の発生や血行動態の破綻は観察されなかった。

心血行動態指標に対する作用: 大動脈圧および左室圧波形の典型記録を**図1**に、血行動態の各指標の経時的変化を**図2A**に示す。低用量は20分の時点で心拍出量と左室圧最大立ち上がり速度を増加させ、中用量はそれらをそれぞれ15−20分および10−20分の時点で増加させた。また、最大降下速度の絶対値には増加傾向が観察された。高用量は低−中用量で観察された変化を減弱させ、心拍数を15分の時点で増加、60分の時点で減少させ、総末梢血管抵抗を5分および30−60分の時点で増加させた。他の指標には有意な変化を認めなかった。

電気生理学的指標に対する作用: 心電図の典型

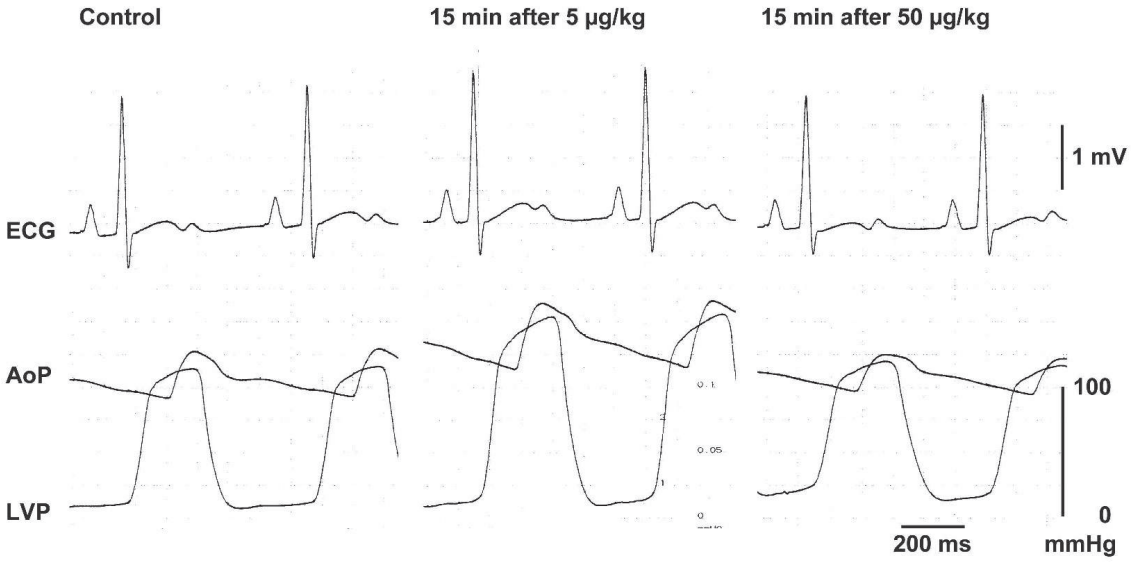


図1　洞調律時における第Ⅱ誘導心電図（ECG）、大動脈圧（AoP）および左室圧（LVP）波形の典型記録。Caldaret投与前（Control）、5 μg/kg投与開始15分後（15 min after 5 μg/kg）および50 μg/kg投与開始15分後（15 min after 50 μg/kg）。

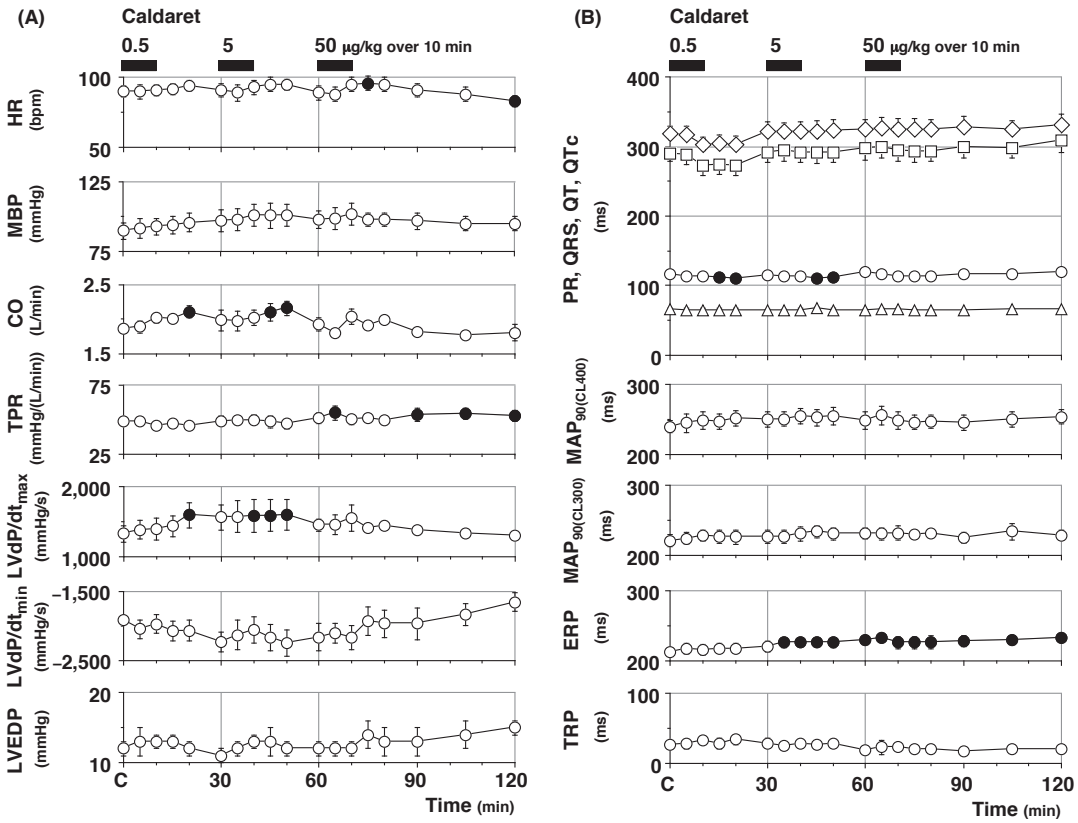


図２　Caldaretの心血管作用のまとめ。(A) 心拍数（HR)、平均血圧（MBP)、心拍出量（CO)、総末梢血管抵抗（TPR)、左室圧最大立ち上がり速度（$LVdP/dt_{max}$)、左室圧最大降下速度（$LVdP/dt_{min}$）および左室拡張末期圧（LVEDP）の変化の時間経過。(B) PR間隔（丸)、QRS幅（三角)、QT間隔（四角)、QTc（ダイヤモンド)、刺激周期400 ms時（$MAP_{90\ (CL400)}$）および300 ms時（$MAP_{90\ (CL300)}$）における右室単相性活動電位持続時間、右室有効不応期（ERP）および再分極終末相持続時間（TRP）の変化の時間経過。結果を平均値±標準誤差で示す（n=5)。黒塗りの記号は対応する薬物投与前（C）の値からの有意な変化$p < 0.05$を示す。

記録を**図1**に、電気生理学的指標の変化の時間経過を**図2B**に示す。低用量はPR間隔を15-20分の時点で短縮させた。中用量はPR間隔を15-20分の時点で短縮させたが、右室有効不応期を5-30分の時点で延長した。高用量は有効不応期を5-60分の時点で延長した。他の指標には有意な変化を認めなかった。

【考察】

本研究では、細胞内Ca^{2+}動態の修飾がいかに正常心の電気薬理学的指標に影響を与えるかを、caldaretを用いて分析した。過去の論文データに基づけば、今回のcaldaretの用量（0.5, 5および50 μg/kg）は細胞内Ca^{2+}動態の修飾作用を期待できる血中濃度を達成しうると考えられた[3-5]。

低-中用量は左室等容性収縮速度を増加し、さらに等容性弛緩速度も増加傾向を示したが、充満期拡張能には作用しなかった。今回は正常犬での評価なので拡張能の改善効果を過小評価している可能性がある。高用量では心拍数と総末梢血管抵抗の増加が観察されたが、これらはHFpEFの治療薬としては好ましくない作用かもしれない。

低-中用量は房室結節伝導を促進した。これは僧帽弁/三尖弁閉鎖不全を惹起して心房細動の誘因になる可能性がある。中-高用量は右室有効不

応期を延長した。心室内伝導速度や再分極過程には影響を与えなかったので、新規機序の心室不整脈予防薬としての可能性を期待できる。

以上のようにcaldaretによる細胞内Ca^{2+}動態の修飾は、変力/変弛緩作用のみならず種々の電気薬理学的作用を有することが明らかになった。

【文献】

1. Katzung BG: Drugs used in heart failure. In: Katzung BG, eds. Basic & clinical pharmacology 14th ed. McGraw-Hill Education: 212-227, 2018
2. Lam CSP, Voors AA, de Boer RA, Solomon SD, van Veldhuisen DJ: Heart failure with preserved ejection fraction: from mechanisms to therapies. Eur Heart J 39: 2780-2792, 2018
3. Satoh N, Sato T, Shimada M, Yamada K, Kitada Y: Lusitropic effect of MCC-135 is associated with improvement of sarcoplasmic reticulum function in ventricular muscles of rats with diabetic cardiomyopathy. J Pharmacol Exp Ther 298: 1161-1166, 2001
4. Satoh N, Kitada Y: Effects of MCC-135 on Ca^{2+} uptake by sarcoplasmic reticulum and myofilament sensitivity to Ca^{2+} in isolated ventricular muscles of rats with diabetic cardiomyopathy. Mol Cell Biochem 249: 45-51, 2003
5. Sugiyama A: Sensitive and reliable proarrhythmia in vivo animal models for predicting drug-induced torsades de pointes in patients with remodelled hearts. Br J Pharmacol 154: 1528-1537, 2008

【発表に関する事項】

1. Sugiyama A, Hagiwara-Nagasawa M, Kambayashi R, Goto A, Chiba K, Ando K, Naito AT, Izumi-Nakaseko H: Electropharmacological effects of intracellular Ca^{2+} handling modulator caldaret on the heart assessed in the halothane-anesthetized dogs. J Pharmacol Sci 139: 180-185, 2019

（8）消化器外科疾患

ICG血中消失率と3D volumetryに基づく新規肝切除安全基準の確立へ向けた基礎的検討

進藤　潤一、小林　祐太、木谷　嘉孝、橋本　雅司

【要約】

肝切除術の安全性を考慮した適応基準として本邦では、幕内基準（Semin Surg Oncol 1993）が広く用いられ、ICG15分値に基づいた至適術式の選択が行われているが、これは適応術式を大まかなカテゴリーとして分類する基準であり、具体的な安全切除限界を求めることができない。その欠点を補うべく我々は、ICG血漿消失率（ICG k値）と3D volumetryに基づく独自の切除適応基準（予測残肝k値［ICG-Krem］≥0.05）を用い、実臨床において良好な成績を収めてきた。本研究では当科の手術安全基準の妥当性を後ろ向きに検証し、新規肝切除安全基準の策定に向けた基礎的検討を行った。2013年～2017年に当院で切除を行った肝癌切除症例のうち、ICG-Krem ≥0.05を満たす323症例を対象とし、幕内基準内の症例、幕内基準逸脱症例の術後短期成績を比較した。幕内基準内の症例269例と幕内基準逸脱症例54例の成績の比較において、全合併症率には差を認めなかった。肝不全発生率は0.37% vs. 3.7%（P=0.074）と幕内基準逸脱例で多い傾向にはあったものの、いずれの群においても肝不全死は認めなかった。ICG-Krem ≥0.05を遵守することで幕内基準逸脱例でもmajor hepatectomyは安全に施行可能であり、当該24症例の成績は重症合併症 12.5%、肝不全率 3.3%、肝不全死亡 0%であり、幕内基準逸脱でminor hepatectomyを行った30例の成績（重症合併症 10.0%、肝不全率 4.2%、肝不全死亡 0%）と比較しても有意差を認めなかった。一方、幕内基準を満たしているかどうかにかかわらず、対象323例のうち誤嚥性肺炎や心筋梗塞といった偶発症による周術期死亡例が3例に認められた（周術期死亡率 0.9%）。これらはいずれも80歳以上の高齢者であった。以上の結果から、ICG消失率と3D volumetryに基づく肝切除適応決定法により、従来の基準をより客観的かつ安全に拡張することが可能と考えらえた。一方、高齢者の肝切除の安全基準に関してはさらなる検討が必要であることが示唆された。

【目的】

肝切除術は肝の悪性腫瘍に対する根治的治療の根幹であり、近年では原発性肝癌のみならず転移性肝癌に対しても積極的に施行されるようになっている。肝切除症例では慢性肝疾患や化学療法関連に伴う肝障害を伴うことが多いため、手術に際しては、腫瘍の根治性のみならず、個々の症例の肝予備能に合わせた手術計画が必要である。手術の安全性を考慮した適応基準として本邦では、幕内基準[1)]が広く用いられ、ICG15分値に基づく至適術式の選択が行われている。しかしこれは安全切除限界を具体的な数値で提示する基準ではないため、リスクの高い症例の切除適応決定に際しては切除リスクの予測が困難であるという問題点があった。そこで我々は過去の報告に基づきICG消失率（ICG k値）と3D volumetryに基づいた独自の切除適応基準を用い、実臨床において良好な成績を収めてきた。本研究では我々の手術安全基準の妥当性を後ろ向きに検証し、実臨床に即した新規肝切除安全基準の策定に向けた基礎的検討を行った。

【方法】

虎の門病院において2013年～2017年に肝細胞癌に対して切除を行った症例のうち、残肝予想ICG消失率（ICG-Krem）≥0.05を満たす323症例を対象とした。これを幕内基準内（In-M）、幕内基準外（Ex-M）の2群に分け術後短期成績の

比較を行うとともに、ICG-Krem ≥0.05の範囲における幕内基準の拡張の可能性について検討を行った。合併症の重症度はClavien-Dindo分類[2]を用いた。肝不全の定義はMullenらの定義[3]に従い、術後血清ビリルビン値最高値>7mg/dLとした。

【結果】

表1にIn-M群（n=269）、Ex-M群（n=54）の背景の比較を示す。血清ビリルビン値、AST、ALT、AFP、PIVKA-Ⅱの値はEx-M群で有意に高値であった。一方、アルブミン、血小板、PT-INR、コリンエステラーゼは両群で差は見られなかった。ICG15分値はEx-M群で有意に高く（18.4% vs. 13.0%、P<0.0001）、ICG-k値は有意に低かった（0.113 vs. 0.136、P<0.0001）。腫瘍の最大径はEx-M群で大きく、背景肝の性状に群間で差は認めなかった。

表2に手術因子と術後短期成績の比較を示す。Ex-M群では解剖学的切除が多く（92.5% vs. 28.6%、P<0.001）、手術時間、血流遮断時間、出血量はEx-M群で多かった。両群で術後合併症に差は認められなかったが、周術期死亡率は

表 1　背景因子

	Intra-Makuuchi group	Extra-Makuuchi group	*p*
Number of patients	269	54	
Age, y	68(37-87)	67(34-83)	0.239
Sex ratio (Male/Female)	189(70.3)/80(29.7)	46(85.2)/8(14.8)	0.029
BMI, kg/m^2	22.8(13.8-36.5)	24.1(17.6-32.9)	0.077
Child-Pugh grade			
A/ B/ C	247(91.8)/22(8.2)/0	49(90.7)/4(7.4)/1(1.9)	0.081
Albumin, g/dL	3.9(2.4-5.1)	3.9(2.4-4.7)	0.336
Total bilirubin, mg/dl	0.8(0.3-1.9)	1.1(0.5-2.3)	<0.001
Platelet, 104/μL	14.9(4.1-38.9)	15.2(6.4-28.7)	0.963
PT-INR	1.08(0.91-1.59)	1.11(0.9-1.63)	0.054
ICG R15, %	13.0(1.5-47.2)	18.4(5.9-47.2)	<0.001
ICGK	0.136(0.050-0.279)	0.113(0.050-0.189)	<0.001
AST(GOT), U/L	28(11-187)	37.5(11-103)	<0.001
ALT(GPT), U/L	23(7-173)	26.5(10-184)	0.040
Cholinesterase, U/L	260(21-800)	242(90-453)	0.202
AFP, ng/mL	7(1-30070)	32(1-670600)	<0.001
PIVKA-Ⅱ, mAU/mL	29(4-157050)	103(14-126110)	<0.001
Number of tumor	1(1-3)	1(1-3)	0.653
Maximum size of tumor, mm	20(2-180)	25(6-165)	0.015
Repeat hepatectomy	69(25.7)	11(20.4)	0.491
Back ground liver			0.859
Liver Cirrhosis	115(42.8)	25(46.3)	
Chronic hepatits	141(52.4)	27(50.0)	

Abbreviation: BMI, Body mass index; ICG-R15, Indocyanine green retention rate at 15 minutes; ICGK, serum clearance rate of ICG; AFP, alfa fetoprotein; PIVKA-Ⅱ, protein induced by vitamin K absence or antagonist.

表２　手術因子と術後短期成績の比較

	Intra-Makuuchi (n=269)	Extra-Makuuchi (n=54)	*p*
Surgical procedure			
AR/ non-AR	77(28.6)/192(71.4)	50(92.6)/4(7.4)	<0.001
Trisectionectomy	0	1(1.9)	0.025
Hemihepatectomy	7(2.6)	16(29.6)	<0.001
Central bisectionectomy	2(0.74)	7(13.0)	<0.001
Sectionectomy	16(6.0)	7(13.0)	0.081
Left lateral sectionectomy	16(6.0)	4(7.4)	0.756
Segmentectomy	36(13.4)	15(27.8)	0.013
Limited resection	192(71.4)	4(7.4)	<0.001
Operation time, min	145(28-587)	220(68-529)	<0.001
Estimated blood loss, mL	225(0-3392)	670(5-11463)	<0.001
Inflow occlusion, min	11(0-80)	35(0-135)	<0.001
Transfusion	11(4.1)	7(11.1)	0.046
Maximum total bilirubin, mg/dL	1.4(0.5-19.0)	2.25(0.80-16.8)	<0.001
FLR/TLV, %	95.4(33.7-99.9)	80.7(31.5-99.3)	<0.001
Morbidity			
Bile leakage	4(1.5)	2(3.7)	0.265
Postoperative bleeding	0	1(1.9)	0.167
Refractory ascites*	19(7.1)	3(5.6)	>0.999
Hepatic insufficiency†	1(0.37)	2(3.7)	0.074
Surgical site infection	5(1.9)	0	0.594
Major morbidity‡	10(3.8)	6(11.1)	0.052
Liver-related mortality	0(0)	0(0)	1
In hospital mortality	1(0.37)§	2(3.7)¶	0.074
Postoperative stay, days	13(5-83)	17(6-68)	<0.001

Abbreviation: AR, Anatomic resection; non-AR, non-anatomic resection; FLR, future liver remnant; TLV, total liver volume.

*Refractory ascites was defined as more than 10ml /kg/day. †Postoperative hepatic insufficiency was defined as peak total bilirubin >7 mg/dL. ‡Clavien-Dindo grade Ⅲ or greater. §One patients died from intestinal perforation. ¶Two patients died from pneumonia with methicillin-resistant Staphylococcus aureus and myocardial infarction.

In-M群0.37%、Ex-M群3.7%でEx-M群で多い傾向が見られた（P=0.074）。In-M群の死亡例（n=1）は消化管穿孔、Ex-M群の死亡例（n=2）はMRSA肺炎、心筋梗塞が死因であり、肝不全死は認められなかった。これらはいずれも80歳代であった。

Ex-M群におけるmajor hepatectoyは安全に施行可能であり、当該24症例の成績は重症合併症12.5%、肝不全率3.3%、肝不全死亡率0%と良好で、Ex-M群でminor hepatectomyを行った30例の成績との比較においても有意差を認めなかった（**表3**）。

表 3　幕内基準逸脱症例におけるサブ解析

	Major hepatectomy* (N=24)	Minor hepatectomy† (N=30)	*p*
Albumin, g/dL	3.9 (2.8-4.7)	3.9 (2.4-4.5)	0.452
Total bilirubin, mg/dL	0.8 (0.5-2.1)	1.3 (0.5-2.3)	<0.001
Platelet, $10^4/\mu L$	15.4 (6.4-27.3)	14.4 (7.0-28.7)	0.321
PT-INR	1.1 (0.9-1.19)	1.1 (0.96-1.63)	0.422
ICG R15, %	16.0 (5.9-33.4)	21.5 (6.0-47.2)	0.004
ICGK	0.12 (0.073-0.189)	0.10 (0.050-0.188)	0.004
AST(GOT), U/L	40 (20-103)	37 (11-88)	0.223
ALT(GPT), U/L	35 (14-184)	25 (10-92)	0.347
Cholinesterase, U/L	259 (139-405)	232 (90-453)	0.384
AFP, ng/mL	73 (2.6-670600)	13 (1-1688)	0.024
PIVKA-Ⅱ, mAU/mL	183 (15-126110)	83 (14-3226)	0.126
Operation time, min	264 (177-489)	190 (68-529)	0.001
Estimated blood loss, mL	692 (230-5999)	532 (5-11463)	0.063
TLV, ml	1216 (807-1681)	1157 (634-1855)	0.5657
Resected parenchyma, g	357 (117-672)	113 (9-662)	<0.001
FLR/ TLV, %	71.3 (44.1-89.5)	90.1 (31.5-99.3)	<0.001
Morbidity			
Bile leakage	2 (8.3)	0	0.193
Postoperative bleeding	0	1 (3.3)	>0.999
Refractory ascites	1 (4.2)	2 (6.7)	>0.999
Hepatic insufficiency	1 (3.3)	1 (4.2)	>0.999
Surgical site infection	0	0	1
Major morbidity‡	3 (12.5)	3 (10.0)	1
Liver-related mortality	0 (0)	0 (0)	1
In hospital mortality	1 (4.2)	1 (3.3)	>0.999
Postoperative stay, days	20 (9-68)	14 (6-57)	0.006

Abbreviation: ICG-R15, Indocyanine green retention rate at 15 minutes; ICGK, serum clearance rate of ICG; AFP, alfa fetoprotein; PIVKA-Ⅱ, protein induced by vitamin K absence or antagonist Ⅱ; FLR, future liver remnant; TLV, total liver volume

*removal of 3 or more Couinaud's segment　†removal of less than 3 Couinaud's segment

‡Clavien-Dindo grade Ⅲ or greater.

【考察】

本研究では当科で採用している肝切除適応基準の安全性と妥当性を幕内基準内外における術後成績の比較から検討した。ICG-Krem ≥0.05をクリアしている限り、幕内基準内外に関わらず術後合併症に差は見られず、肝不全死亡も認められないことが確認された。

前述のように、幕内基準は適応術式の範囲を決定する大まかなカテゴリー分類であり、切除限界を客観的な数値で提示するものではない。肝の大きさや区域ごとの大きさのバランスは個体差が大きく、同じ術式でも侵襲の度合が患者により異な

ってくる可能性がある。特に肝癌においては担癌門脈枝の支配領域（3次分枝レベル）の系統的切除が予後の改善につながることが報告されており[4)]、肝容積計算と肝予備能に基づく安全かつ過不足ない切除術式の選択が腫瘍学的な面からも重要である。本検討では幕内基準逸脱症例の解剖学的切除選択率が93％と非常に高く、いずれの症例でも肝不全死が認められなかったことから、ICG-Krem ≥0.05は切除の安全を担保しつつ手術適応を広げ、より腫瘍学的に根治の期待しうる術式の選択を可能とする妥当な切除基準となり得る。

以上の結果より、ICG-Kremに基づく手術可能性の決定は妥当な手法であり、従来の幕内基準をより具体的かつ安全に拡張しうるものと考えられた。一方、今回検討対象とした323例中、周術期死亡を来した3例はいずれも80歳代の高齢者であり、高齢者の切除適応基準に関しては更なる検討が必要と考えられた。

【文献】

1. Makuuchi M, Kosuge T, Takayama T, et al.: Surgery for small liver cancers. Semin Surg Oncol 9: 298-304, 1993
2. Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, et al.: The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. Ann Surg 250: 187-196, 2009
3. Mullen JT, Ribero D, Reddy SK, et al.: Hepatic insufficiency and mortality in 1,059 noncirrhotic patients undergoing major hepatectomy. J Am Coll Surg 204: 854-862, 2007
4. Shindoh J, Makuuchi M, Matsuyama Y, et al.: Complete removal of the tumor-bearing portal territory decreases local tumor recurrence and improves disease-specific survival of patients with hepatocellular carcinoma. J Hepatol 54: 594-600, 2016

背景肝に発現するM-CSFの肝細胞癌発症おける関与の解明と、肝細胞癌の新規分子標的治療への応用

河野　寛
山梨大学第一外科

【要約】

目的: 肝細胞癌（HCC）発症進展における背景肝に発現するマクロファージの分化と成熟に関与するサイトカインmacrophage colony-stimulating factor（M-CSF）関与と、M-CSF受容体抑制剤のHCC増殖抑制効果を検討した。

方法:

検討Ⅰ: M-CSF欠損（op/op）とlittermateマウス（LT）に、ジエチルニトロサミン（DEN）を投与し、発癌率ならびに肝内M1/M2マクロファージ（Mφ）比と血管新生発現を検討した。

検討Ⅱ: 手術切除検体を用いて腫瘍周囲のM-CSFならびに新生血管発現、M2Mφ分布と、無再発生存期間（DFS）の予後を解析した。

検討Ⅲ: 分離肝Mφと単球をM-CSF存在下で共培養し、血管増殖因子産生、血管内皮細胞（VEC）増殖を検討した。

検討Ⅳ: マウスHCC株（MH134）の同系マウス皮下移植モデルと、ヒトHCC細胞株（Huh-7）のヌードマウス脾臓移植モデルにおいて、M-CSF受容体拮抗剤GW2580の腫瘍増殖抑制効果を検討した。

検討Ⅴ: DEN肝発癌モデルでGW2580の投与効果を検討した。

結果:

検討Ⅰ: op/opでは発癌率がLTと比較し有意に低下した。DEN投与後のop/opの背景肝において、腫瘍周囲のM1/M2 Mφ比と血管新生がLTと比較し有意に減少した。

検討Ⅱ: M-CSFならびに新生血管発現の高発現群においてDFSが有意に短縮していた。M-CSF発現は、単変量・多変量解析により独立した予後因子であった。

検検討Ⅲ: 肝Mφと単球は、M-CSF存在下でM-CSF濃度依存性にVEGFを産生したが、その産生量は肝Mφで有意に亢進していた。VECは、M-CSFと肝Mφの共培養条件下で増殖が最も亢進した。

検討Ⅳ: マウスHCC株ならびにヒトHCC細胞株において、GW2580投与により、腫瘍増殖が有意に抑制された。

検討Ⅴ: DEN投与による肝発癌はGW2580投与により抑制された。

考察: 背景肝に発現するM-CSFは、HCCの発症と進展に関与した。M-CSF受容体阻害剤投与によるHCC増殖抑制効果は、M-CSFを分子標的とするHCC新規治療開発への可能性を示唆する。

【背景】

肝臓のマクロファージであるKupffer細胞は肝類洞に存在し、貪食による異物除去能、活性酸素やサイトカインなどのメディエーター産生能、抗原提示能など種々の働きを有しており、自然免疫機構において非常に重要な役割を果たしている。C型肝炎ウイルス（HCV）感染肝におけるマクロファージは活性化しており、炎症性サイトカインInterleukin(IL)-18を産生している。さらに、肝臓でのIL-18発現は、肝内酸化ストレスと正相関があり、血漿IL-18値が高値症例ではより早期に、肝切除後再発する事実を報告した[1)]。当科で切除したHCV陽性肝細胞癌の標本を用いて、免疫組織染色法にて活性化肝マクロファージ分布と、8-OHdGをマーカーとして肝内酸化ストレスを検討した。結果、活性化肝マクロファージ数と肝内酸化ストレス増加していた。また、活性化肝マクロファージと肝内酸化ストレスの間には強い正相関を認めた結果より、活性化肝マクロファージは肝内酸化ストレスを増加させ、肝発癌を促進して

いる事実を報告している[2)]。

一方、macrophage-colony stimulating factor（M-CSF）はマクロファージの成熟・分化・増殖に関与し、組織での発現は肝臓で強い。最近の報告で、ヒト肝細胞癌において、M-CSFの非腫瘍部における発現と、発癌との関連が報告されている[3)]。しかし、その機序の詳細は未だ解明されていない。また、M-CSFによるマクロファージのVEGF産生増加と血管内皮細胞の増殖亢進の報告もある[4)]。

これらの結果は、背景肝に発現するM-CSFにより分化した肝マクロファージが産生する炎症性サイトカインならびにVEGFなどの血管新生因子が肝細胞癌の増殖を促進させている可能性を強く示唆していると考えられる。

これらの報告に基づいて考察すると、MCT投与によるマクロファージ由来の炎症性抑制、炎症性免疫作用増強、肝内のケトン体増加による肝発癌ならびに腫瘍増殖抑制効果が期待できると考える。

【目的】

肝細胞癌（HCC）発症進展における背景肝に発現するマクロファージの分化と成熟に関与するサイトカインmacrophage colony-stimulating factor（M-CSF）関与と、M-CSF受容体抑制剤のHCC増殖抑制効果を検討した。

【方法】

検討Ⅰ：M-CSF欠損（op/op）とlittermateマウス（LT）に、ジエチルニトロサミン（DEN）を投与し、発癌率ならびに肝内M1/M2マクロファージ（Mφ）比と血管新生発現を検討した。

検討Ⅱ：手術切除検体を用いて腫瘍周囲のM-CSFならびに新生血管発現、M2Mφ分布と、無再発生存期間（DFS）の予後を解析した。

検討Ⅲ：分離肝Mφと単球をM-CSF存在下で共培養し、血管増殖因子産生、血管内皮細胞（VEC）増殖を検討した。

検討Ⅳ：マウスHCC株（MH134）の同系マウス皮下移植モデルと、ヒトHCC細胞株（Huh-7）のヌードマウス脾臓移植モデルにおいて、

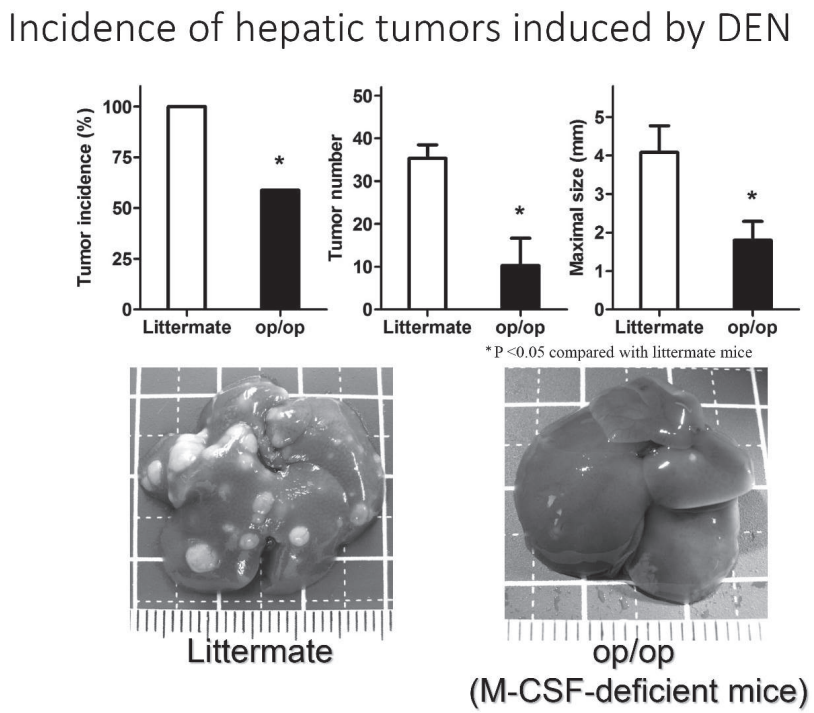


図 1

M-CSF受容体拮抗剤GW2580の腫瘍増殖抑制効果を検討した。

検討Ⅴ: DEN肝発癌モデルでGW2580の投与効果を検討した。

【結果】

検討Ⅰ: op/opマウスではLTマウスと比較し、DEN投与後の発癌率が有意に低下した。DEN投与後のop/opマウスの背景肝において、LTマウスと比較し腫瘍周囲のM1/M2 Mφ比と血管新生が有意に減少した（**図1**）。

検討Ⅱ: ヒト肝細胞癌の手術検体における検討においては、M-CSFならびに新生血管発現の高発現群において、低発現群と比較しDFSが有意に短縮していた。M-CSF発現は、単変量・多変量解析により独立した予後因子であった。

検討Ⅲ: 肝Mφと単球は、M-CSF存在下でM-CSF濃度依存性にVEGFを産生したが、その産生量は肝Mφで有意に亢進していた。分離VECは、M-CSFと肝Mφの共培養条件下で増殖が最も亢進した。

検討Ⅳ: マウスHCC（MH134）株の同系マウス皮下移植モデルならびにヒトHCC（Huh-7）細胞株のヌードマウス脾内移植モデルにおいて、M-CSF受容体拮抗剤GW2580投与により腫瘍増殖が有意に抑制された（**図2**）。

検討Ⅴ: DEN投与による肝発癌はGW2580の早期ならびに晩期投与のいずれにおいても肝発癌が抑制された。

【考察】

op/opマウスにおけるDEN誘発肝発癌モデルにおいて発癌が有意に抑制された結果より、M-CSFは化学物質誘発肝発癌に強く関与していることが明らかとなった。また、ウイルス性肝炎を背景の主とするヒトHCCにおける検討においても背景肝におけるM-CSFの発現が強いほど、より早期に再発する事実が明らかとなった。これらの結果より、M-CSF はHCCの発症と進展に関与すると考えられる。

今回のヒト検体の検討では、M-CSF発現と炎症を含む臨床学的因子との相関は認めなかった。

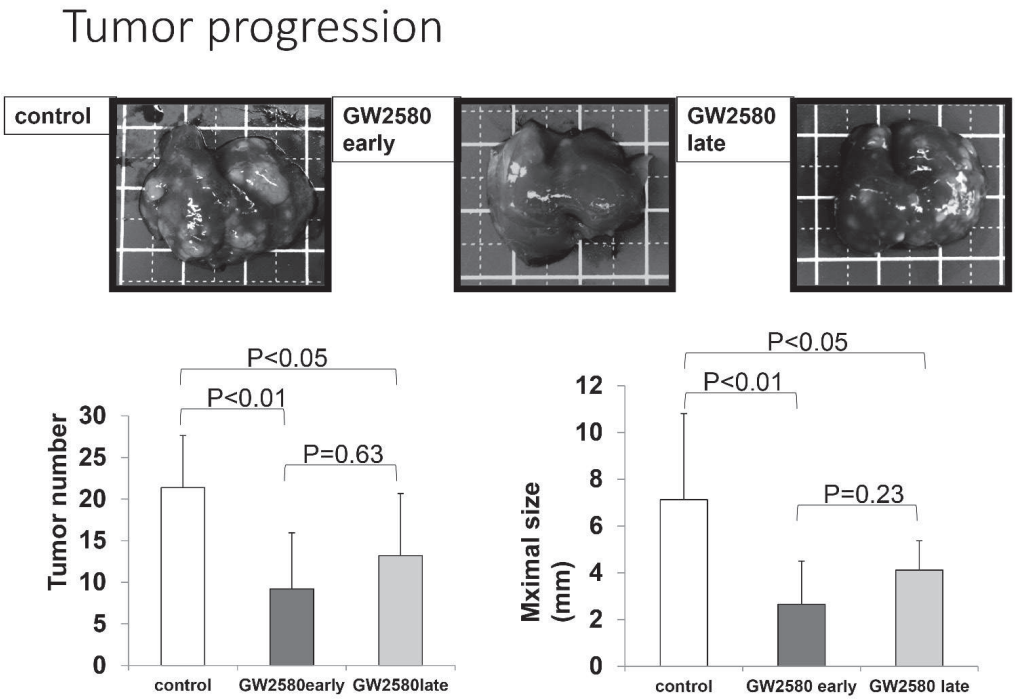


図２

この事実は、M-CSF発現が遺伝的な因子により制御されている可能性を示している。したがって、背景肝でのM-CSF発現の解析は個別化治療へと繋がる可能性を示唆する。臨床応用を目指した検討において、M-CSF受容体阻害剤（GW2580）投与により化学物質誘発肝発癌ならびにマウスとヒトの肝細胞癌細胞株移植モデルの癌の増殖は有意に抑制された。この結果は、背景肝に発現するM-CSFを分子標的とする肝発癌抑制を目的とした新規治療の開発への応用の可能性を示唆する。

【文献】

1. Asakawa M, Kono H, et al.: Int J Cancer 118: 564-570, 2006
2. Maki A, Kono H, et al.: Ann Surg Oncol 14: 1182-1190, 2007
3. Zhu XD, Zhang JB, et al.: J Clin Oncol 26: 2707-2716, 2008
4. Eubank TD, Galloway M, et al.: J Immunol 171: 2637-2643, 2003

直腸・肛門管周囲筋組織を含む直腸癌周囲剥離断端の病理学的検討

戸田　重夫、井下　尚子、富沢　賢治
花岡　裕、的場 周一郎、黒柳　洋弥

【要約】

直腸癌局所再発の重要なリスク因子は周囲剥離断端（CRM: Circumferential Resection Margin）陽性である。直腸癌手術の根治性と機能温存の両立は、構造の正確な理解および腫瘍進展様式の精緻な把握によって可能となる。そこで当院の下部直腸癌の切除症例中のCRM陽性部について解剖学的・組織学的に検討し、局所再発率の低減への手がかりを得ることを目的とした。

対象は下部直腸癌に対して2010年4月から2017年12月に直腸切除を行った463例中CRM陽性もしくは陽性疑いとされた18症例とした。周囲構造を把握するために、免疫染色（Desmin、Myoglobin、SMA、S-100、Neurofilament、CD34）を追加し、腫瘍露出部あるいは近接する部位を病理学的に判定した。

CRM陽性部の病理所見は4パターンに原因を分類でき、9例（50%）は線維化瘢痕形成が著明で腫瘍浸潤部との区別困難（3例局所再発）、5例は神経・血管・筋など腸管から放射状に伸びる線維状構造に沿った浸潤（2例局所再発）、3例は低分化癌のびまん性浸潤部（1例局所再発）、1例は術中に開放した膿瘍中に腫瘍細胞が存在していた（1例局所再発）。

CRM陽性率を低下させるためには、術前化学放射線治療後などで線維化瘢痕形成が強い場合あるいは腫瘍から周囲に伸び出す線維状構造を認めた場合は、可能な限り遠位で切除し、術中迅速診断を積極的に行うべきと考えた。

【目的】

本邦の大腸癌治療ガイドラインによれば、局所再発率は結腸癌で0.7%であるのに対して直腸S状部を含む直腸癌では4.1%（$p<0.0001$）と高い[1]。また一般的に直腸癌の中でも腫瘍が肛門に近いほど局所再発率が高いことが知られている[2]。直腸癌術後局所再発は治療困難でADLを著しく低下させるため、局所再発率の低減は直腸癌治療における最優先事項である。直腸癌局所再発の重要なリスク因子の一つは、外科剥離面と腫瘍の距離が1mm以下と定義されるCRM陽性であり、Norwegian Cancer Registryの686例のデータを用いたWibeらの報告ではCRM陰性例では局所再発率が5%、CRM陽性例では22%とされる[3]。

一方、直腸癌治療でのもう一つの大きな問題は機能温存である。括約筋温存手術で重要である括約筋は横紋筋・平滑筋の複雑な立体構造で成り立っており、特に前壁側では未だに十分な理解がない[4]。直腸癌手術の根治性と機能温存の両立は、構造の正確な理解および腫瘍進展様式の精緻な把握によってこそ可能となる。そこで当院の下部直腸癌手術例中のCRM陽性例について解剖学的・組織学的に検討することで、微細構造と腫瘍進展様式を把握し、CRM陽性率の改善ひいては局所再発率の低減への手がかりを得ることを目的とした。

【方法】

当院にて下部直腸癌に対して2010年4月から2017年12月に直腸切除を行った463例中、CRM陽性もしくは陽性疑いとされた症例を対象とした。緩和手術症例は除外した（**図1**）。

病理プレパラートを再検討し、切除断端から腫瘍までの距離が1mm以下であるものをCRM陽性とし、さらに病理学的にCRM陽性と判断された原因を判定した。周囲構造を把握するために、免疫染色（Desmin、Myoglobin、SMA、S-100、Neurofilament、CD34）を追加し、腫瘍露出部あるいは近接する部位を病理学的に判定した。またそれぞれの症例の局所再発の有無を検討した。

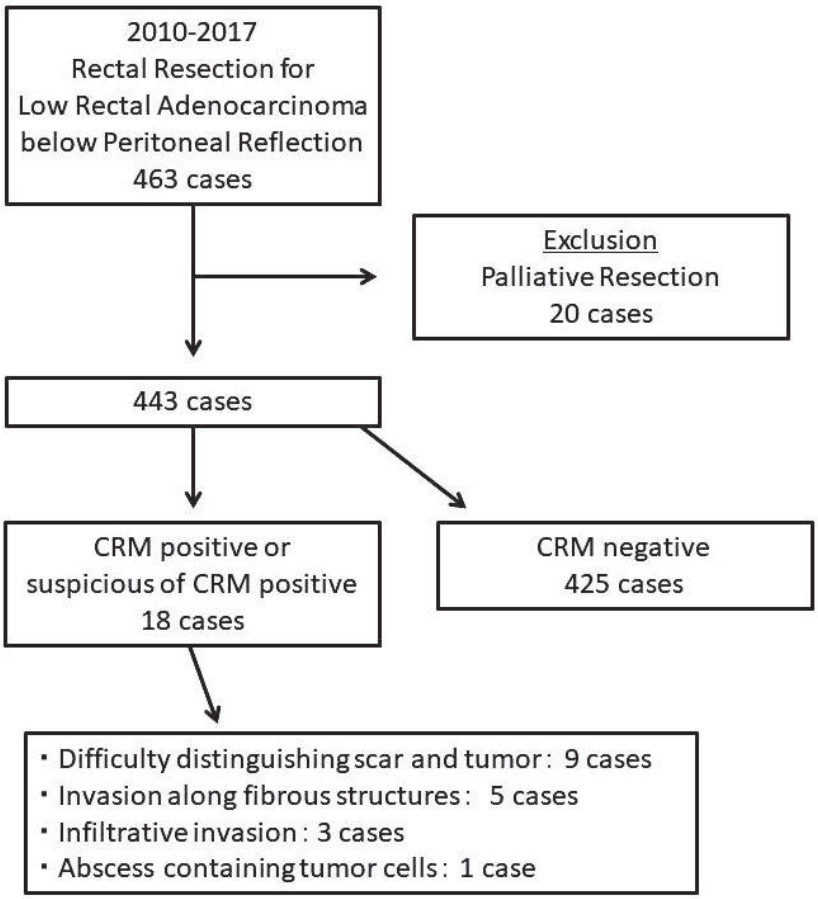


図１　症例フローチャート

【結果】

CRM陽性は18例認め、観察期間中央値30か月で局所再発を7例に認めた（**図2**）。CRM陽性の原因はそれぞれ、9例は瘢痕と腫瘍が区別困難である症例（3例局所再発）、5例は神経・血管・筋などの線維状構造に沿った浸潤部で陽性の症例（2例局所再発）、3例は低分化癌のびまん性浸潤部で陽性の症例（1例局所再発）、1例は術中に開放した膿瘍中に腫瘍細胞が存在した症例（1例局所再発）であった。

【考察】

直腸癌治療の重要な問題は局所再発制御と機能温存であり、両者に外科解剖と腫瘍進展様式が密接に関わっている。例えば括約筋間切開術と呼ばれる肛門括約筋温存手術では平滑筋である内肛門括約筋を一部あるいは全部切除して腫瘍からの剥離断端を十分確保しつつ、外肛門括約筋を温存し肛門温存を行うが、その際には括約筋の解剖理解が重要になる。また、悪性腫瘍は神経周囲浸潤に代表されるように線維状構造の外縁に沿って浸潤する傾向があるので、我々は下部直腸癌手術では筋線維に沿う腫瘍浸潤が重要な問題になりうると考えた。そこで今回我々はCRM陽性部の病理所見を免疫染色も追加して検討した。その結果、463例の下部直腸癌手術例中、CRM陽性症例を18例認め、原因を4パターンに分類できた。頻度の高い原因としては、腫瘍と瘢痕が区別困難で剥離面が腫瘍に近接した症例（9例）と、腫瘍から広がる線維状構造に沿った腫瘍進展（5例）があった。CRM陽性率を低下させるためには、腫瘍

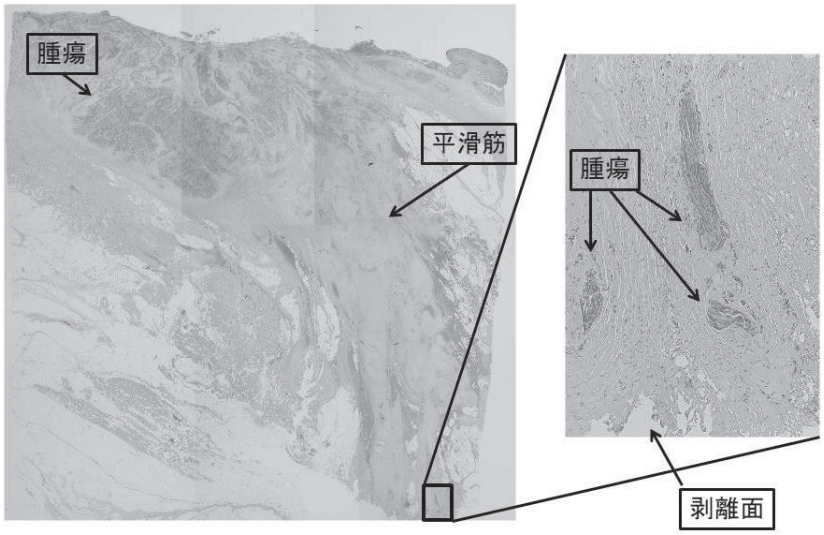


図２　平滑筋に沿う浸潤

近傍の瘢痕組織や線維状構造を切離する際は可及的に直腸から離れた位置で処理し、術中迅速診断を積極的に行って、陽性時には追加切除を行うべきと考えた。そのほかに低分化癌のびまん性浸潤症例や腫瘍周囲膿瘍内に腫瘍細胞が存在した症例などがCRM陽性となったが、それぞれ約1/3が局所再発をきたしており、CRM陽性の様式と局所再発率には明らかな相関は見られなかった。

【文献】

1. 大腸癌治療ガイドライン 2019年度. 金原出版, 2019
2. Parfitt JR, Driman DK: The total mesorectal excision specimen for rectal cancer: a review of its pathological assessment. Journal of clinical pathology 60: 849-855, 2007
3. Adam IJ, Mohamdee MO, Martin IG, Scott N, Finan PJ, Johnston D, et al.: Role of circumferential margin involvement in the local recurrence of rectal cancer. Lancet 344: 707-711, 1994
4. Tsukada Y, Ito M, Watanabe K, Yamaguchi K, Kojima M, Hayashi R, et al.: Topographic Anatomy of the Anal Sphincter Complex and Levator Ani Muscle as It Relates to Intersphincteric Resection for Very Low Rectal Disease. Dis Colon Rectum 59: 426-433, 2016

大腸憩室炎によるS状結腸膀胱瘻に対する腹腔鏡手術手技の開発および有用性に関する研究

富沢　賢治、黒柳　洋弥、的場 周一郎
戸田　重夫、花岡　裕

【要約】

S状結腸膀胱瘻とは大腸憩室炎により、膀胱とS状結腸の間に瘻孔が形成される病態であり、食生活の欧米化や高齢化などから増加傾向にある疾患である[1)]。瘻孔が自然閉鎖することはなく、手術が唯一の治療法であるが、その手術難易度は通常の大腸癌手術よりも炎症の影響により格段に高い。当科では2000年初頭より大腸癌に対する腹腔鏡手術を国内外にて先駆的に実施し、現在までに約5000例強の症例を蓄積した。同時に憩室炎の増加に着目し、S状結腸膀胱瘻に対しても早くから腹腔鏡手術を導入している[2, 3)]。過去の症例の成績を検証し、安全な腹腔鏡手術術式について検討した。

【目的】

大腸憩室炎によるS状結腸膀胱瘻に対する腹腔鏡手術の安全性および有効性を検証する。

【方法】

2005年4月から2018年12月まで当科で手術適応となったS状結腸憩室炎による結腸膀胱瘻は48例で、このうち腹腔鏡下手術を施行した46例について検討した。腹腔鏡手術以外の2症例は穿孔合併により糞便性腹膜炎を呈しており、開腹手術を選択した。

【手技の要点】

①左尿管損傷の予防のために左尿管ステントを挿入する。
②腸管の口側切離を先行し、瘻孔部の視野を多方面から確保する。
③瘻孔部では膀胱側よりも腸管側の剥離層を選択し、腸管が露出されそうになればすぐに戻れるように鋭的に層を描出していく。
④瘻孔部の切除は層を確実に識別するためにモノポーラ電気メスによる鋭的切離をする。
⑤癒着の強固な部分では腹腔鏡の拡大視効果を生かした多方面からの繊細で確実な操作を施行する。
⑥脾彎曲部授動をためらわず追加し吻合に余計な緊張をかけない。

【結果】

男性42例、女性が4例、年齢の中央値は60歳（32歳-84歳）であった。女性は4例中3例に子宮全摘出術の既往があった。25例（55%）にS状結腸の狭窄が同時に存在し大腸内視鏡は通過しなかった。術式は腹腔鏡下S状結腸切除術が38例、腹腔鏡補下ハルトマン手術が4例、腹腔鏡下低位前方切除術が4例であった。ハルトマン手術を選択した症例は全身状態高度不良例の3例と、複数回の腹部手術既往により高度な癒着を呈していた1例であった。また低位前方切除術を施行した4例は炎症が腹膜反転部まで強く波及していたために低位での吻合となった。手術時間の中央値は201分（最小値91分-最大値587分）で、出血量は15ml（少量-1200ml）で、全例術中合併症を認めず、また腹腔鏡からの開腹移行率は0%であった。また瘻孔剥離した膀胱に関しては1例のみ膿瘍腔を掻把したために腹腔鏡下に膀胱側腹膜を縫合閉鎖したが、残りの症例は膀胱側への手術操作は不要であった。手術関連死を認めず、術後合併症を9例に認めた。内訳としてSSI（Surgical site infection）が3例、吻合部出血が3例、イレウスが2例、尿管狭窄が1例であったが、いずれも保存的加療にて軽快した。術後尿道カテーテルの留置期間は5日（1日-9日）であり、膀胱造影の必要なく抜去し、特に問題となることはなかった。術後在院日数は11日（8日-22日）で、晩期合併症を認めず、結腸膀胱瘻の再発症例も認めなかった。また、切除検体は全例に病理学的検索を行い、悪性所見の

ないことを確認した。

【考察】

高齢化や食生活の欧米化に伴うS状結腸憩室炎の増加から、本疾患に対する手術は増加していくことが必然的に予想される。腹腔鏡手術は開腹手術に比しその拡大視効果による精緻な結腸膀胱瘻間の局所解剖の描出から、より正確な手術操作を可能とする。このため定型化された術式で施行すれば、本疾患で問題となる膀胱側の処置（膀胱部分切除、縫合閉鎖、大網充填等）や、人工肛門造設を不要とする。この結果、合併症の低減、長期尿道カテーテル留置がなくなり、在院日数の短縮化、早期社会復帰につながり、創部縮小による整容性のみならず人工肛門が不要で患者の満足度も高い手術を実現することができる。

【文献】

1. 日本消化管学会大腸憩室症ガイドライン 2017年
2. 富沢賢治, 他: 腹腔鏡下手術を施行したS状結腸憩室炎による結腸膀胱瘻の検討.日内視鏡外会誌 17: 753-759, 2012
3. Tomizawa K, et al.: Laparoscopic surgery for colovesical fistula associated with sigmoid colon diverticulitis: a review of 39 cases. J Anus Rectum Colon 3: 36-42, 2019

【発表に関する事項】

1. Tomizawa K, et al.: Laparoscopic Surgery for Colovesical Fistula due to Sigmoid Colon Diverticulitis. ACG 2018 Annual Meeting（Philadelphia）
2. 富沢賢治, 他: 大腸憩室炎によるS状結腸膀胱瘻に対する腹腔鏡手術を極める. 第31回内視鏡外科学会総会（福岡）

食道アカラシア患者の胸痛をゼロにする術式の開発

矢野　文章、小村　伸朗、坪井　一人
星野　真人、秋元　俊亮、矢永　勝彦
東京慈恵会医科大学外科学講座

【要約】

食道アカラシア患者の胸痛は食道の強収縮が原因とされており、Auerbach神経叢が食道筋層に運動刺激を与えることによって生じる。食道アカラシアに対する代表的な術式は腹腔鏡下Heller-Dor法と経口内視鏡的筋層切開術であり、縦方向に筋層切開を行って食道胃接合部の通過障害を解除している。Auerbach神経叢も同時に切離されているはずであるが、術後に胸痛が残存して悩んでいる患者も多い。今回、新たに食道筋層を横方向にも切開を加えることでAuerbach神経叢からの運動刺激を遮断し、胸痛を抑制できるか検討した。

【目的】

現在の食道アカラシアに対する腹腔鏡下Heller-Dor法（LHD）ならびに経口内視鏡的筋層切開術（POEM）は、つかえ感に対する症状の改善効果は優れているが、胸痛を伴う患者は術後も胸痛が残存することが多く、術後のQuality of life低下の一因となっている。今回、胸痛をゼロにする術式の開発を試みた。

【方法】

胸痛は食道の強収縮が原因とされており、Auerbach神経叢が筋層に運動刺激を与えている[1)]。食道ではAuerbach神経叢は輪状筋と縦走筋の間を蜘蛛の巣状に全周性に這っており、通常

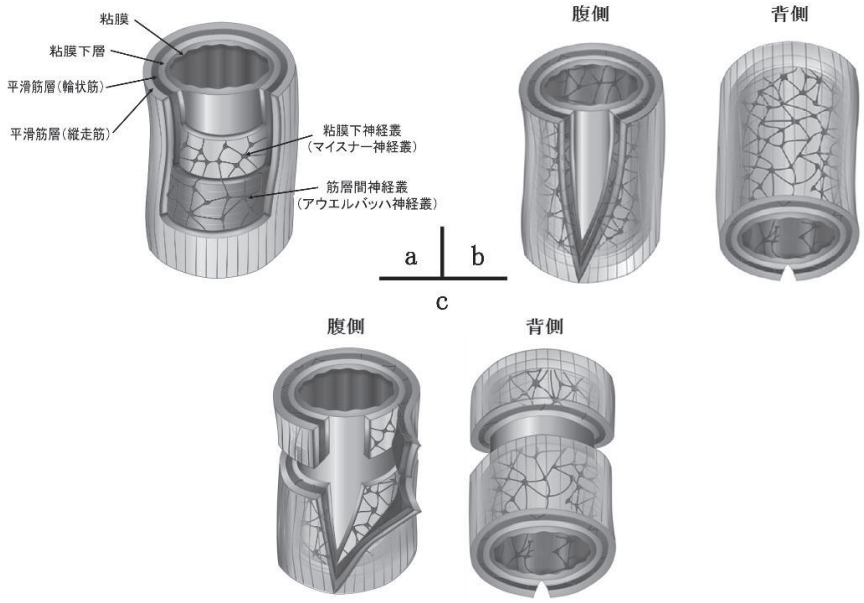
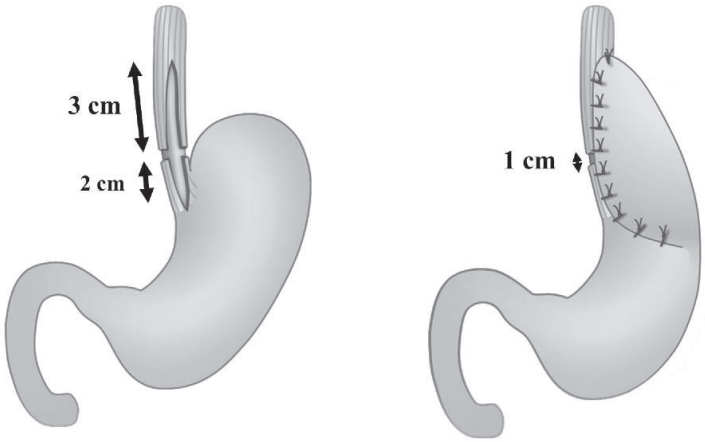


図 1

a　食道の解剖。Auerbach神経叢は輪状筋と縦走筋の間を蜘蛛の巣状に這っている。
b　縦方向の筋層切開のみでは背側からみると神経は切離されていない。
c　一部の筋層を横方向に全周切開を加えると、背側からみても神経は上下に分断されている。



CHM　　Dor法を付加

図２　術式詳細；食道側の筋層切開は６cmで、ECJから２cm上方の筋層を約１cmの幅で全周にわたって切開を加えた。筋層切開後はDor噴門形成術を逆流防止手術として付加した。

の筋層切開による縦一方向の筋層切開では蜘蛛の巣状に這っている神経を完全に分断することはできない。そこで、筋層の一部を全周性に切開（Circumference Heller myotomy；CHM）すれば確実に上下に神経叢の分断が可能となり、食道収縮波の伝搬を途絶できる可能性があると考えた（**図1**）。CHMでは、従来のHeller法に準じて通常の筋層切開を行った後に食道胃接合部（ECJ）から2cm上方の筋層を約1cmの幅で全周にわたって切開を加えた。筋層切開後はDor噴門形成術を逆流防止手術として付加した[2)]（**図2**）。

倫理委員会の承認（28-045(8288)）を得て、これまでに同意が得られた20人（女性12人、平均年齢45.7±11.2歳）の患者に対してCHMを施行し、その治療成績を検討した。なお、胸痛の評価は術前の痛みを10とした際の術後の値とし、評価時期は術前と術後3ヵ月が経過した時点とした。

【結果】

手術成績の詳細を**表1**に示した。平均手術時間は157.4±25.1分、出血量はいずれも少量で、2人（10%）に術中食道粘膜損傷を認めたが開腹移行例はなかった。術後在院日数の中央値は4日で従来の術式と同等であった。術後3ヵ月が経過した時点で、患者の主症状であるつかえ感は全例で改善した。胸痛も全例で改善し、70%（14/20）は完全に消失した。術後逆流性食道炎の発生率は25%（5/20）で、いずれもLos Angeles分類Grade A（Los A）の軽症であった。

【考察】

CHMの術中食道粘膜損傷の発生率は10%で、LHDの発生率が4.7-30%[3)]であることを考慮すると本術式の安全性は担保できているものと考えられる。

術後逆流性食道炎の発生率は25%で、LHDの発生率0.1-9.7%に比較して高いが、POEM術後の27.9-39%と比較すると若干低いようである[3)]。LHD同様に逆流を予防するためにDor法を付加しているが、LHDより発生率が高いのは一部全周性に筋層を切開することにより、筋層欠損を生じ逆流を防御する機構が低下している可能性がある。しかし、逆流防止処置を施さないPOEMよりは低率に抑えられており、食道炎の程度もすべてLos Aの軽症であった。

Omuraらの報告によるとLHDの胸痛の完全消失率、軽快率はそれぞれ57%、89%であるが[4)]、CHMでは70%、100%といずれも約10%増加しているものの術後胸痛をゼロにするまでは至っていない。しかし、術後15ヵ月を経過した後も胸痛が徐々に軽快している症例もいることから、今

表１　手術成績

症例	年齢（歳）	性別	手術時間（分）	出血量（g）	術中偶発症	術後在院日数（日）	胸痛（術後/術前）	術後逆流性食道炎
1	44	F	160	≒0	なし	4	0/10	Los A
2	31	M	154	≒0	なし	4	0/10	なし
3	53	F	129	≒0	なし	4	5/10	なし
4	39	M	124	≒0	なし	4	4/10	Los A
5	35	F	137	≒0	なし	4	0/10	なし
6	49	F	144	≒0	なし	4	0/10	なし
7	71	F	143	≒0	なし	7	0/10	なし
8	53	M	182	≒0	なし	4	0/10	なし
9	68	F	150	≒0	なし	4	3/10	なし
10	49	F	183	≒0	なし	6	0/10	なし
11	52	F	188	≒0	あり	4	0/10	なし
12	38	M	148	≒0	なし	4	0/10	なし
13	27	M	161	≒0	なし	4	0/10	なし
14	48	M	225	≒0	なし	4	1/10	Los A
15	37	M	149	≒0	なし	4	1/10	なし
16	45	F	141	≒0	なし	4	0/10	Los A
17	42	F	135	≒0	なし	4	0/10	なし
18	49	F	172	≒0	なし	4	0/10	Los A
19	33	M	186	≒0	あり	4	0/10	なし
20	51	F	137	≒0	なし	4	7/10	なし

後も経過観察の継続が必要であると考える。以上より、CHMは安全な術式であり、アカラシア患者の胸痛に対して有用である可能性が示唆された。

最後に、今回このような研究の機会をいただいた公益財団法人冲中記念成人研究所の関係者の皆さまに感謝致します。

【文献】

1. Bassotti G, et al.: Esophageal motor disorders in patients evaluated for dysphagia and/or noncardiac chest pain. Dysphagia 7: 3-7, 1992
2. Yano F, et al.: Learning curve for laparoscopic Heller myotomy and Dor fundoplication for achalasia. PLoS One 12: e0180515, 2017
3. Tsuboi K, et al.: Data analyses and perspectives on laparoscopic surgery for esophageal achalasia. World J Gastroenterol 21: 10830-10839, 2015
4. Omura N, et al.: Effect of laparoscopic esophagomyotomy on chest pain associated with achalasia and prediction of therapeutic outcomes. Surg Endosc 25: 1048-1053, 2011

【発表に関する項目】

1. 矢野文章，他：胸痛を伴うアカラシアに対する食道筋層全周切開の有用性．第118回日本外科学会定期学術集会（東京）
2. 矢野文章，他：胸痛をともなうアカラシアに対するCircumference Heller myotomy.第73回日本消化器外科学会総会（鹿児島）

（9）間脳下垂体疾患

先端巨大症患者における術後早期の生化学的治癒評価判定法の留意点

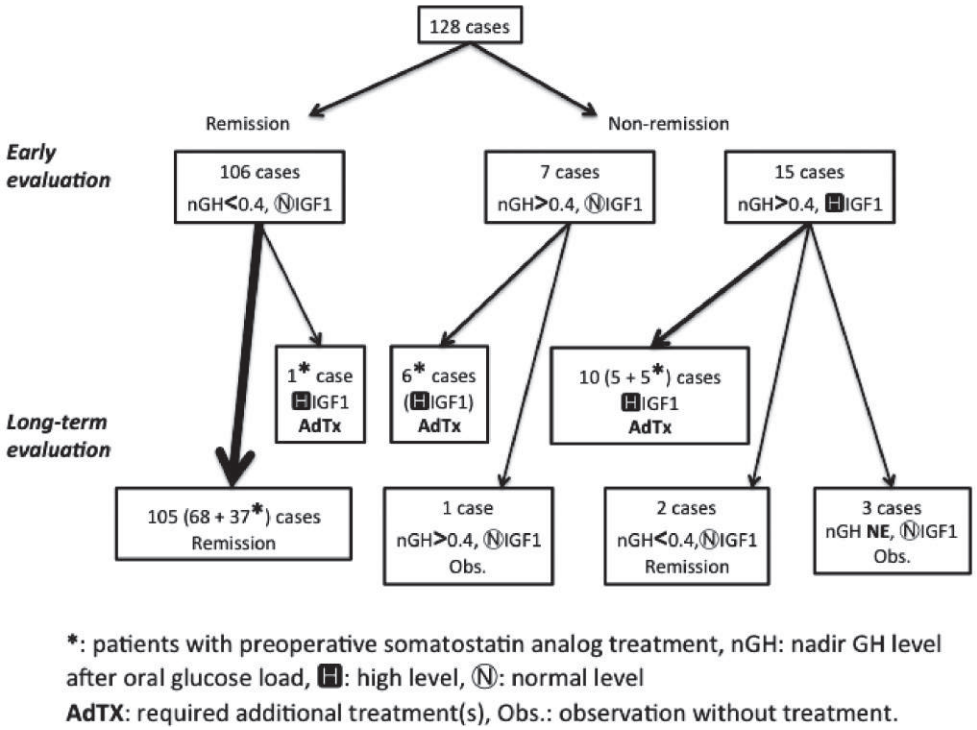
西岡　宏、山田　正三、井下　尚子

【要約】

成長ホルモン（GH）産生下垂体腺腫による先端巨大症に対する経鼻的腫瘍摘出術の術後治癒効果判定には糖負荷後GH抑制値（nadir GH）およびIGF-1値が用いられるが、術後早期の判定に行った場合には様々な問題点が指摘されている。今回自験例で術後早期（3ヶ月以内）の治療効果判定の意義を検証したところ、早期判定結果は大多数例で長期成績を反映していた。ただし特に術前ソマトスタチンアナログ治療を行っていた症例では遅発性のIGF-1値再上昇に注意する必要がある。一方、術中に腫瘍が全摘出と判断された症例の中には術後IGF-1値が遅発性に正常化をきたす症例もあり、術後追加治療の導入は慎重に判断する必要があると結論された。

【目的】

成長ホルモン（GH）産生下垂体腺腫による先端巨大症の術後治癒評価判定には糖負荷後GH抑制値（nadir GH）およびIGF-1値が用いられる。追加治療の必要性の判断のためにも術後早期の評



*: patients with preoperative somatostatin analog treatment, nGH: nadir GH level after oral glucose load, ⓗ: high level, ⓝ: normal level
AdTX: required additional treatment(s), Obs.: observation without treatment.

図１　128例の先端巨大症手術症例の早期と長期の治療効果判定結果

価判定は重要だが、判定時期や2つの基準の不一致など様々な問題点が指摘されている。それらのpitfall を明らかにする目的で、術後早期（3ヶ月以内）と長期（4年以上）の成績を比較検討した。

【対象と方法】

経鼻手術後4年以上（平均63ヶ月）フォローされている先端巨大症128例（全て初回手術例）。男性66例、女性62例、年齢は7-76歳。術前ソマトスタチンアナログ（SSA）治療を49例に行っていた。術後の寛解基準は糖負荷後nadir GH<0.4ng/mlかつ年齢性別基準値内IGF-1値とした（厚労省基準）。

【結果】

128例の長期成績は手術単独で寛解107例（83.6%）、追加治療によりコントロール良好17例、IGF-1値が正常なため追加治療なしで経過観察4例であった（**図1**）。長期寛解107例中105例は術後早期から寛解と判定されていた。術前SSA治療を行っていた5例に術後遅発性（12-36ヶ月後）にIGF-1値の再上昇を認め、内1例は術後早期に寛解と判定されていたが術後14ヶ月でIGF-1再上昇を認め追加治療を行っている。一方、逆に術前SSA治療を行っていない5例に術後IGF-1値の遅発性（術後13-26ヶ月）の正常化を認め、内2例は寛解を得ている（残りの3例には糖負荷試験未施行）。

【考察】

先端巨大症の治療の第一選択肢は外科治療（経鼻手術）であり、現在の治療効果判定基準により術後「治癒」が得られるのは約60-85%の症例である[1)]。手術により治癒が得られなかった場合はSSAを中心とした薬物治療や定位放射線治療などが行われるが、術後早期の効果判定はこれら追加治療の必要性を検討する上でも重要である。現在の判定基準は明瞭で簡潔ではあるが、判定時期や2つの判定結果の乖離など、これまでにも幾つかの問題点が指摘されてきた。特に術後3ヶ月以内の判定では2つの判定結果に最大30%までの乖離があるとの報告もある。IGF-1値の術後推移は症例により異なり、3ヶ月くらいかけて低下してくる症例も少なくなく、中には術後1年以上かけて正常値化した症例も報告されている。これら2つの判定結果の不一致の原因として、術前SSA治療の影響、術後のインスリン抵抗性低下の影響[2)]、IGF-1 binding protein半減期などが関与していると考察されている。またIGF-1値は肝機能障害、低栄養、悪性疾患などにより低下するため注意を要する。

今回の自験例の検討では経鼻手術後早期の効果判定は大多数例で長期成績を反映していた。しかし術前SSA治療を行っていて遅発性にIGF-1値再上昇を認めた症例が1例みられた。一方、術中所見と術後MRI所見で腫瘍が全摘出と判断されたが治癒基準を満たしていなかった症例の中には1年以上かけて遅発性にIGF-1値が正常値化した症例が5例（33.3%）あり、いずれも女性で術前SSA治療は行っていなかった。このような症例では、術後追加治療の導入は慎重に判断する必要があると結論された[3)]。

【文献】

1. Nishioka H, Fukuhara N, Horiguchi K, Yamada S: Aggressive transsphenoidal resection of tumors invading the cavernous sinus in patients with acromegaly: predictive factors, strategies, and outcomes. J Neurosurg 121: 505-510, 2014
2. Edo N, Morita K, Suzuki H, Takeshita A, Miyakawa M, Fukuhara N, Nishioka H, Yamada S, Takeuchi Y: Low insulin resistance after surgery predicts poor GH suppression one year after complete resection for acromegaly: a retrospective study. Endocr J 63: 469-477, 2016
3. Nishioka H, Fukuhara N, Yamaguchi-Okada M, Takeshita A, Takeuchi Y, Yamada S: Pitfalls in early biochemical evaluation after transsphenoidal surgery in patients with acromegaly. Endocrine J 64: 1073-1078, 2017

（10）病理診断

下垂体腺腫病理診断における多重免疫染色の検討

井下　尚子、山田　正三、西岡　宏

【はじめに】

下垂体腺腫は、稀な内分泌臓器腫瘍である。2017年度版WHO病理組織分類では、転写因子Tpit, Pit-1, SF-1に対する免疫染色を重視すると記載されたが、前葉ホルモンACTH, FSH, LH, GH, PRL, TSHに対する免疫染色が病理分類の主軸をなす[1, 2]。2004年度版WHO分類までは、電顕所見が分類に必要とされていたが、これが原則不要と記載された。しかし治療感受性予測のためにソマトスタチンレセプター（SSTR）発現を含めた臨床所見の差は、転写因子やホルモン染色だけに依存した細胞の分化系譜に基づく分類だけでは反映できないため、2017年版WHO分類においても、電顕所見に基づく組織亜型分類が依然として使用される。すなわち、今まで電顕を用いて診断、判断してきた事項を、HE染色や免疫染色所見で代用し、翻訳して判断することになる。このための診断の補助となる免疫染色は、細胞内小器官やフィラメント、骨格を描出するものである。

今までの病理分類で特に電顕所見に依存した分類基準は、GH-PRL-TSH産生細胞分化に関わる転写因子Pit-1系列のうち2種類以上を産生する腺腫、あるいはホルモン染色や転写因子染色陰性となるNull cell adenomaの診断で重視された[3]。特にPit-1系では、腫瘍組織型を産生するホルモン種の同定だけでなく組織所見から細分化することで、薬剤感受性を含む臨床所見に差が得られることがわかっている。単純にGH産生腺腫をdensely type(DG)とsparsely type(SG)に2分するにはサイトケラチン染色が有用で、SGでは中間型フィラメントの凝集体であるFibrous bodyがCAM5.2染色でドット状に染まる。GH-PRL-TSHの病理診断が難しい理由には、1つの腺腫細胞が複数のホルモンを産生するmonomorphous群、各ホルモンを産生する細胞が混ざって増殖するpolymorphous群（mixed adenoma）に分けること、3つのホルモン産生細胞が様々な組み合わせと割合で混在することなどがあげられる。これらを光学顕微鏡レベルの検索のみから判断するのは困難とされてきた。これらの区別では、電顕を使った場合、「1つ1つの細胞を、形態からどの分化段階の細胞か」を同定していくが、光顕では「どのような細胞内形態を示す細胞が、何ホルモンに陽性となる分泌顆粒を持っているか」などの判断には、細胞骨格の染色とホルモン染色が1対1対応できるように細胞所見を特定する能力は不十分である。特にpolymorphousな腫瘍の場合、分化の異なる細胞が混在しているため、レセプター発現などの判断を全体として行っても、腫瘍全体としての治療効果予測判定にはつながらない可能性がある。電顕の代用として腫瘍を構成する細胞腫ごとに性質を明らかにしていくためには多重免疫染色が有用と考えられるが、今のところほとんど報告はない。そこで今回、電顕に頼らない下垂体腺腫病理診断に向けて、前葉ホルモンやサイトケラチン、SSTRなどに対する2重免疫染色の技術の検討と診断有用性を検討した。

【方法】

冲中記念成人病研究所設置のLeica Bond Ⅲ自動免疫染色装置を用いて、2重染色を行った。赤色発色Bond Polymer Refine Red Detection（Novocastra）、茶色発色Bond Intense R Detection（Novocastra）を用い、各ホルモンの組み合わせの他、これにサイトケラチンやソマトスタチンレセプター染色を加えた検討も行った。下垂体検体は3μmの厚さに薄切し、染色に用いた（院内倫理委員会申請承認1450の一部の技術とし

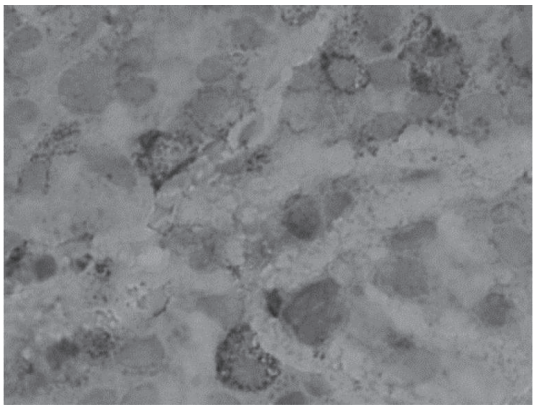


図１　GH/PRL染色　細胞質内にびまん性に顆粒状に染まっているのがGH。PRLは核横ゴルジ野に集簇するように染色されている。両者は同一細胞には染まっておらず、それぞれ別の細胞であることがわかる。Mixed adenomaと判断された。

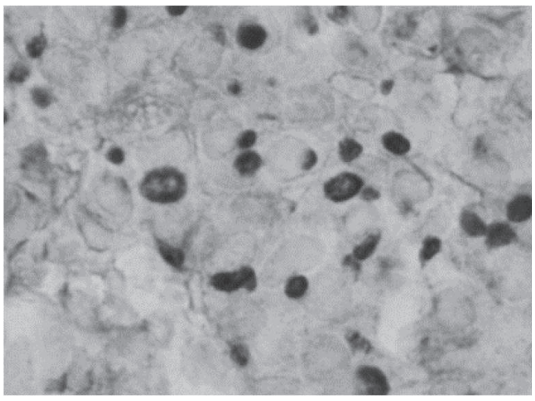


図2　CAM５.２サイトケラチン/ SSTR２A染色
ドット状に見えるのがCAM５.２染色により染め出されたFibrous bodyである。細胞膜が濃く見える細胞が、SSTR２A染色陽性である。Fibrous bodyがみられる細胞では、細胞膜のSSTR2A染色性は弱い。

て行った)。

【結果】

病理診断に有用と考えられた組み合わせの一部を報告する。GH-PRL産生腺腫におけるGH/PRL2重染色では、腫瘍細胞のほとんどが両者に陽性になるmonomorphous adenomaと、ほとんどがGHとPRLのどちらかにしか染まらないmixed adenomaの判断に有用となった（**図1**)。GH産生腺腫におけるCAM5.2サイトケラチン/SSTR２A２重染色では、特にfibrous bodyをもつSG型腫瘍細胞が50％程度の中間型GH産生腺腫において、SG型の細胞にはSSTR２A発現が弱く、DG型の細胞にSSTR２A発現が強いことが分かった（**図2**)。

【まとめ】

２重免疫染色は、電顕所見を光顕所見に翻訳する技術として有用である。中間型GH産生腺腫でSG型の細胞にはSSTR２A発現が弱く、DG型の細胞にSSTR２A発現が強いということは、ソマトスタチンアナログ治療中に効果が弱くなってきた場合には、SG型細胞有意の分布にpopulationが変化している可能性も示唆され、使用薬物の変更などを考慮できる。また2017年WHO分類で提示されているような多数の免疫染色項目を必要とする下垂体内分泌腫瘍の病理診断において、２種の抗体を同時に染める組み合わせを熟考することは、業務削減効果も期待されるだけでなく、選択する薬物の組み合わせなどを考えるためにも有用となる可能性が示唆された。

【文献】

1. Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J: WHO classification of tumours of endocrine organs 4th ed. IARC Press, 2017
2. Inoshita N, Nishioka H: The 2017 WHO classification of pituitary adenoma: overview and comments. Brain Tumor Pathol 35: 51-56, 2018
3. Nishioka H, Inoshita N, Mete O, et al.: The complementary role of transcription factors in the accurate diagnosis of clinically nonfunctioning pituitary adenomas. Endocr Pathol 26: 349-355, 2015

（11）感染症疾患

Helicobacter cinaedi（ヘリコバクター・シネディ）感染症の診断と治療法に関する研究

荒岡　秀樹、馬場　勝、米山　彰子

【要約】

先行研究において*Helicobacter cinaedi*菌血症はしばしば再発することが知られている。本研究では、菌血症の再発率、再発に寄与する危険因子、選択的腸管除菌の有用性について検討した。2009年3月から2016年12月までに、虎の門病院本院、虎の門病院分院で*H. cinaedi*菌血症を発症した症例を後方視的に解析した。研究期間中、168患者において*H. cinaedi*菌血症を発症した。うち、34患者で菌血症が再発した。100日累積再発率は18.7％であった。再発に寄与する危険因子を探索したところ、単変量解析では、直近の抗癌薬投与（HR 3.75；95％ CI 1.86-7.58；$P < 0.001$）、ステロイド投与（HR 3.79；95％ CI 1.70-8.45；$P = 0.0011$）、血液悪性疾患（HR 3.18；95％ CI 1.64-6.19；$P < 0.001$）が抽出された。多変量解析では、直近の抗癌薬投与（HR 2.47；95％ CI 1.19-5.12；$P = 0.015$）とステロイド投与（HR 2.40；95％ CI 1.03-5.61；$P = 0.044$）が独立した危険因子と特定された。168患者中47患者がカナマイシンによる選択的腸管除菌を受けていた。Gray検定では選択的腸管除菌を受けた群で再発率が低い傾向にあったが有意差は認めなかった（HR 0.46；95％ CI 0.18-1.18；$P = 0.11$）。一方、比例ハザードモデルでは選択的腸管除菌を受けた群で有意に再発率が低かった（HR 0.36；95％ CI 0.13-1.00；$P = 0.050$）。本研究では以下の3つの新知見を得た。1. *H. cinaedi*菌血症の100日累積再発率は18.7％であった。2. 直近の抗癌薬投与とステロイド投与が再発の独立した危険因子と特定された。3. 選択的腸管除菌は再発のリスクを低下させる可能性がある。以上の結果をまとめて、Clinical Infectious Diseases誌に掲載した。

【目的】

*Helicobacter cinaedi*は腸管在位*Helicobacter*属のひとつであり、ヒトに感染を起こす腸管在位*Helicobacter*属のなかで最も報告が多い菌種である。*H. 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。*H. cinaedi*による感染症の臨床症状は、蜂窩織炎、腸炎、髄膜炎、感染性動脈瘤、化膿性脊椎炎など多彩な報告があるが、その多くは血液培養から本菌が検出される（菌血症）ことで認知される。*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[1)]、感染症の原因菌として重要な細菌である。先行研究において*H. cinaedi*菌血症はしばしば再発することが知られている。本研究では、菌血症の再発率、再発に寄与する危険因子、再発のリスクを低下させるための選択的腸管除菌の有用性について検討した。

【方法】

2009年3月から2016年12月までに、虎の門病院本院、虎の門病院分院で*H. cinaedi*菌血症を発症した症例を抽出し、後ろ向きに検討を行った。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[2)]を用いて同定した。

【結果】

研究期間中、*H. cinaedi*菌血症を発症したのは168患者であった。168患者の臨床背景を**表1**に示す。

168患者中、34患者（20.2％）において菌血症の再発を認めた。*H. cinaedi*菌血症治療終了後の100日累積再発率は18.7％であった（**図1**）。

表 1　*H. cinaedi* 菌血症168患者の臨床背景

Characterstic	Number（n=168）
Age, median（range）, years	66（range, 26-88）
Sex	
Male/Female	88/80
Underlying disease	
Solid tumor	48
Hematological malignancy	40
Chronic renal failure	52
Hemodialysis	25
Diabetes mellitus	18
Chronic hepatic diseases	22
Post-orthopedic surgery	5
Respiratory diseases	13
Cardopvascular diseases	6
None	7
Human immunodeficiency virus positive/negative	0/127

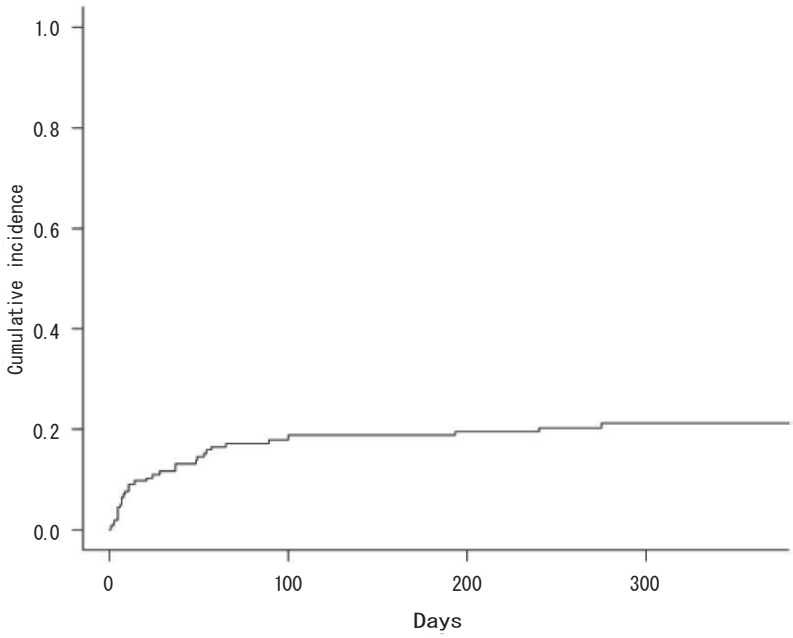


図 1　*H. cinaedi* 菌血症再発の100日累積曲線

菌血症再発群（n=34）と非再発群（n=134）を比較して再発のリスク因子を検討した。単変量解析では、直近の抗癌薬投与（HR 3.75；95% CI 1.86-7.58；$P < 0.001$）、ステロイド投与（HR 3.79；95% CI 1.70-8.45；$P = 0.0011$）、血液悪性疾患（HR 3.18；95% CI 1.64-6.19；

表２　*H. cinaedi* 菌血症再発のリスク因子の検討

Parameter	Number (%) for Group		Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	Recurrence Group (n = 34)	Nonrecurrence Group (n = 134)	HR (95% CI)	*P* Value	HR(95% CI)	*P* Value
Age >65 years	15 (44)	75 (56)	0.69 (0.35–1.36)	.28	…	…
Sex (Male)	18 (53)	70 (52)	0.96 (0.49–1.89)	.92	…	…
Underlying diseases						
Solid tumor	7 (21)	41 (31)	0.76 (0.33–1.76)	.52	…	…
Hematological malignancy	16 (47)	24 (18)	3.18 (1.64–6.19)	<.001	NR	…
Chronic renal failure	6 (18)	46 (34)	0.42 (0.17–1.02)	.056	NR	…
Hemodialysis	3 (9)	22 (16)	0.51 (0.15–1.73)	.28	…	…
Diabetes mellitus	2 (6)	16 (12)	0.49 (0.12–2.03)	.33	…	…
Chronic hepatic diseases	1 (3)	21 (16)	0.20 (0.027–1.52)	.12	NR	…
Chronic respiratory diseases	4 (12)	9 (7)	1.46 (0.50–4.24)	.48	…	…
Central venous catheter	1 (3)	12 (9)	0.39 (0.057–2.72)	.34	…	…
Peripheral venous catheter	14 (41)	44 (33)	1.61 (0.82–3.17)	.17	…	…
Cardiovascular device	1 (3)	14 (10)	0.29 (0.039–2.17)	.23	…	…
Anticancer chemotherapy within 3 months	22 (65)	41 (31)	3.75 (1.86–7.58)	<.001	2.47 (1.19–5.12)	.015
Within 1 week	15 (44)	31 (23)	2.50 (1.28–4.89)	.0075	…	…
Within 2 weeks	19 (56)	36 (27)	3.15 (1.61–6.17)	<.001	…	…
Within 4 weeks	19 (56)	38 (28)	3.03 (1.55–5.93)	.0012	…	…
Systemic steroids within 30 days	26 (76)	56 (42)	3.79 (1.70–8.45)	.0011	2.40 (1.03–5.61)	.044
Within 1 week	19 (56)	48 (36)	1.98 (1.01–3.87)	.047	…	…
Within 2 weeks	25 (74)	51 (38)	3.75 (1.74–8.10)	<.001	…	…
>700 mg of prednisone	20 (59)	50 (37)	2.10 (1.06–4.15)	.034	…	…
Pitt bacteremia score ≥1	10 (29)	38 (28)	1.24 (0.59–2.59)	.58	…	…
Charlson comorbidity index ≥5	5 (15)	41 (31)	0.53 (0.21–1.37)	.19	…	…
Neutropenia	4 (12)	11 (8)	1.85 (0.68–5.05)	.23	…	…
Diarrhea	2 (6)	16 (12)	0.60 (0.13–2.68)	.50	…	…
Cellulitis	13 (38)	41 (31)	1.27 (0.64–2.51)	.50	…	…
Antibiotic treatment <21 days	19 (56)	59 (44)	1.80 (0.92–3.50)	.08	NR	…
Antibiotic treatment <14 days	10 (29)	35 (26)	1.34 (0.64–2.77)	.44	…	…
SDD (already started SDD on completion of a course of systemic antimicrobial therapy)	6 (18)	36 (27)	0.46 (0.18–1.18)	.11	NR	…
Stool culture positive	15 (44)	43 (32)	0.86 (0.66–1.13)	.29	…	…
Penicillin-containing regimens	18 (53)	85 (63)	0.69 (0.36–1.35)	.28	…	…
Cephem-containing regimens	15 (44)	55 (41)	1.13 (0.58–2.20)	.73	…	…
Carbapenem-containing regimens	4 (12)	19 (14)	0.83 (0.31–2.24)	.72	…	…
Fluoroquinolone-containing regimens	5 (15)	11 (8)	1.57 (0.60–4.12)	.36	…	…

Abbreviations: CI, confidence interval; HR, hazard ratio; NR, not retained in the multivariate analysis model; SDD, selective digestive decontamination.

P <0.001）が抽出された（**表2**）。多変量解析では、直近の抗癌薬投与（HR 2.47；95% CI 1.19-5.12；P = 0.015）とステロイド投与（HR 2.40；95% CI 1.03-5.61；P = 0.044）が独立した危険因子と特定された（**表2**）。

H. cinaedi 菌血症168患者中47患者がカナマイシンによる選択的腸管除菌を受けていた。Gray検定では選択的腸管除菌を受けた群で再発率が低い傾向にあったが有意差は認めなかった（HR 0.46；95% CI 0.18-1.18；P = 0.11）。一方、比例ハザードモデルでは選択的腸管除菌を受けた群で有意に再発率が低かった（HR 0.36；95% CI 0.13-1.00；P = 0.050）。

【考察】

今回の研究において、以下の3つの新知見を得た。1. *H. cinaedi* 菌血症の100日累積再発率は18.7%であった。2. 直近の抗癌薬投与とステロイド投与が再発の独立した危険因子と特定された。3. 選択的腸管除菌は再発のリスクを低下させる可能性がある。

先行研究において、われわれは*H. cinaedi* 菌血症の1つの主要な感染経路が腸管からの血管内への侵入（bacterial translocation）であることを証明した[3)]。また、他のいくつかの先行研究で、選

択的腸管除菌が*Helicobacter*属やCampylobacter属菌血症の再発を抑制する可能性が示唆されている[4,5]。選択的腸管除菌の有用性については、今後さらに検討を継続する必要がある。

本研究にはいくつかのlimitationがある。第1に、本研究は後方視的研究である。臨床医が発熱等の症状があった際にのみ血液培養が採取されていることから、真の再発率はさらに高い可能性がある。第2に、菌血症が再発した際に、“reactivation”か“reinfection”かを判別することができていない。本来は菌の遺伝子学的な解析を追加することが理想である。しかしながら、治療終了後に菌血症が再発するまでの期間が短いことから、“reinfection”よりは“reactivation”の可能性が高いと考えられる。第3に、*H. cinaedi*菌株の薬剤感受性を測定していないことがあげられる。本研究においては抗菌薬の選択が再発に寄与する因子とはならなかったものの、*H. cinaedi*菌株の薬剤感受性を測定することにより、適切な抗菌薬選択や適切な治療期間の設定の議論を深めることが可能となる。今後、さらに研究をすすめていく必要がある。第4に、本研究では*H. cinaedi*再発の危険因子を特定することができたが、他に抽出しえなかった真の危険因子の存在が否定できない。*H. cinaedi*菌血症、そしてその再発は、患者の基礎疾患や免疫不全状態を示す1つの指標である可能性がある。

【結語】

*H. cinaedi*菌血症の100日累積再発率は18.7%であった。直近の抗癌薬投与とステロイド投与が再発の独立した危険因子と特定された。選択的腸管除菌は再発のリスクを低下させる可能性がある。以上の結果をまとめて、Clinical Infectious Diseases誌に掲載した[6]。

【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. 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
3. Araoka H, Baba M, Okada C, Kimura M, Sato T, Yatomi Y, Moriya K, Yoneyama A: First evidence of bacterial translocation from the intestinal tract as a route of *Helicobacter cinaedi* bacteremia. Helicobacter 23: e12458, 2018
4. Okada H, Kitazawa T, Harada S, Itoyama S, Hatakeyama S, Ota Y, Koike K: Combined treatment with oral kanamycin and parenteral antibiotics for a case of persistent bacteremia and intestinal carriage with *Campylobacter coli*. Intern Med 47: 1363-1366, 2008
5. Fujiya Y, Nagamatsu M, Tomida J, Kawamura Y, Yamamoto K, Mawatari M, Kutsuna S, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Mezaki K, Hashimoto M, Ishii S, Ohmagari N: Successful treatment of recurrent *Helicobacter fennelliae* bacteraemia by selective digestive decontamination with kanamycin in a lung cancer patient receiving chemotherapy. JMM Case Rep 3: e005069, 2016
6. Araoka H, Baba M, Okada C, Kimura M, Sato T, Yatomi Y, Moriya K, Yoneyama A: Risk Factors for Recurrent *Helicobacter cinaedi* Bacteremia and the Efficacy of Selective Digestive Decontamination With Kanamycin to Prevent Recurrence. Clin Infect Dis 67: 573-578, 2018

侵襲性カンジダ症原因菌の強酸（胃酸）耐性メカニズムの解明

高橋　梓
千葉大学・真菌医学研究センター

【要約】

病原性酵母*Candida glabrata*において、RIM101遺伝子が強酸耐性に関わり、腸管への定着を担う役割を持つことを示した。これまでにRIM101経路は、パン酵母においてアルカリ耐性を担うとされてきたが、今回初めてRIM101経路が酸耐性に関わることを明らかにした。RIM101の活性化に関わると予測された上流遺伝子のうち、一部は酸耐性には関与せず、新たに新規の活性化因子を見出した。さらに、活性化したRIM101の下流に位置し、強酸耐性を担う遺伝子12個を特定した。

【目的】

表皮や腸管粘膜の常在菌である病原性酵母*C. glabrata*は、免疫抑制を伴う治療により侵襲性カンジダ症を引き起こす。*C. glabrata*の特性として酸耐性機構があり、pH2の強酸条件化においても増殖可能であるが、その分子メカニズムは明らかになっていない。これまでに、当研究室の所有する*C. glabrata*遺伝子破壊株ライブラリーを用いて酸耐性遺伝子のスクリーニングを行い、RIM101遺伝子が酸耐性に関わることを明らかにした。RIM101経路は、パン酵母および*Candida albicans*において、アルカリ条件に応答して転写因子Rim101タンパクを限定分解し活性化する経路として知られていた[1-3]。そこで本研究では、*C. glabrata*においてRIM101経路上に位置し、強酸耐性を制御する遺伝子群について詳細な解析を試みた。

【方法】

強酸耐性: 各遺伝子欠損株を96穴プレート上のSC(synthetic complete)培地(pH2/pH5)で37度1晩培養し、OD600を計測した。

RNA-seq: wild typeおよび⊿Rim101株をそれぞれpH5/pH2のSC培地で培養し、RNeasy® Mini Kit（Qiagen）でRNAを抽出、TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2-Set A（Illumina）でライブラリーを作成し、Miseq sequencer（Illumina）でシークエンスを行った。得られたデータはCLC genomics workbenchを用いて解析した。

【結果】

はじめに、Rim101の上流で機能すると予測された遺伝子の欠損株の強酸耐性を調べ、*C. glabrata*においてRim101タンパクの活性を制御する上流遺伝子を推測した。次に、RIM101の遺伝子破壊株を用いてRNA-seqを行い、この遺伝子が発現を制御している下流の遺伝子群を特定した。

【考察】

RIM101の上流に位置すると予測された遺伝子のうち、3つはRIM101経路を介した強酸耐性に関与しておらず、新たに1つの遺伝子が関与する可能性が示された。今後はこれらの遺伝子が実際にRIM101を活性化していることを確認したのち、それぞれの因子の結合特性等を調べることにより、*C. glabrata*の強酸耐性におけるRIM101経路のカスケードを明らかにする予定である。

【文献】

1. Peñalva MA, Arst Jr HN: Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. Microbiol Mol Biol Rev 66: 426-446, 2002
2. Davis DA: How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. Curr Opin Microbiol 12: 365-370, 2009
3. Selvig K, Alspaugh JA: pH response pathways in fungi: adapting to host-derived and environmental signals. Mycobiology 39: 249-256, 2011

（12）高齢者総合診断部・認知症科疾患

アルツハイマー型認知症のエクソソーム解析による発症素因と臨床的バイオマーカーの検索

井桁　之総、植田　幸嗣[1]、湯山　耕平[2]、逸見　功[3]
公益財団法人がん研究会がんプレシジョン医療研究センター[1]
北海道大学大学院先端生命科学研究院・生体機能化学研究室[2]
日本赤十字看護大学[3]

【要約】

正常、MCI、ADと診断した患者を髄液Aβ42低下、リン酸化タウ上昇、総タウ上昇の有無からATN分類を行った。パイロットスタディーとして20検体からエクソソームを分離し1,756エクソソームを検出定量した。今後 AD発症にかかわる蛋白質を絞り込み、独立症例を用い検証実験を行う予定である。

【背景】

アルツハイマー型認知症（AD）ではアミロイドβ蛋白（Aβ）とリン酸化タウ蛋白（pTau）の神経毒性が発症に関与する。Aβ42はAD発症の約25年前から増加し、pTauは10年前から上昇する。2010年米国国立加齢研究所/米国アルツハイマー病協会（NIAAA）は診断基準を改変し、ADの全経過をPreclinical AD, MCI due to AD, AD dementiaの三段階に分類した[1)]。2018年には症状に関係なく大脳のA（Aβ）、T（pTau）、N（総Tau: 神経変性）で分類するATN分類が提唱された[2)]。AD脳ではAβとTauは伝播拡大し症状が進行するが機序は不明である。細胞外小胞エクソソームはAβやtauを含有/結合し、この伝播に関わると言われているが、ADにおけるエクソソーム含有分子の探索は、現在、Aβやタウなど特定の少数タンパク質やRNAを対象として行われているのみである[3, 4)]。本研究では血漿、髄液由来エクソソームから大規模プロファイル解析を行い、網羅的に発病素因分子、診断バイオマーカー候補を探索する。

【目的】

正常、MCI、ADと診断した患者の髄液・血液エクソソーム内蛋白質からAD発病素因分子/病態修飾分子を同定し、発症のバイオマーカーとして利用できるかを検討する。その後、同定された蛋白に連動する臨床診断マーカーを同定し、エクソソーム解析に頼らず臨床的バイオマーカーによるADの超早期診断を試みる。

【方法】

2017年7月から2018年6月に認知症外来受診した40歳以上80歳までの患者60人をNIA-AA診断基準を用い、AD、MCI、正常の3群に分類した。①WMSR, WAIS-III, MMSE, HDSRなど高次脳機能検査、嗅覚検査、In bodyによる骨格筋量の測定、HOMA-R/-βを測定した。髄液は0.5ccずつ分注し、血漿は分離後分注し、それぞれ-80℃で保存した。ELISAで髄液/血漿のAβ42, PTau, 総Tauを測定し、AD群と正常間でCut off値を決め、ATN分類を行った。髄液500μlからEV Second L70カラムでエクソソームを単離しトリプシン消化後、質量分析装置でLC/MS解析（液体クロマトグラフィーと質量分析器）した。その後、蛋白質同定定量解析し、プロファイル解析を行った。今後、蛋白質、（糖）脂質の分子バイオマーカー候補を同解析し、各ATN分類群間で比較し、疾患特異性を検討する。さらに認知機能評価の得点、インスリン抵抗性、嗅覚障害などの臨床指標との相関解析により疾患関連因子を抽出する。

【結果】

AD（n=23), MCI（n=14), 正常（n=23）にわけ、髄液Aβ42: 535以下、PTau: 81.0以上、総Tau: 790以上とCut off値を定めATN分類を行った。臨床AD；A+T+N+: 4検体、AD；A+T-N-: 4検体、MCI due to AD；A+T-N-: 3検体、正常（preclinical AD); A+T-N-: 1検体、正常；A-T-N-: 4検体、AD；A-T+N+: 4検体に分類した。パイロットスタディーとして20検体のエクソソームを分離し、1,756エクソソームを検出定量した。現在解析中で、1）ADで1.5倍以上に増加し有意差あり、2）ADで0.75倍以下に減少し有意差あり、3）すべてのADのみで検出、4）すべての健常のみで検出の4群は有力候補であり解析を急いでいる。

【考察】

AD発症過程で複数の蛋白質が関与することが予想された。今後ATN分類の検体を増加させ、独立症例を用い検証実験を行う予定である。さらに血漿のエクソソーム解析へとつなげてゆく。

【文献】

1. Sperling RA, et al.: Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement 7: 280-292, 2011
2. Jack CR Jr, et al.: NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. Alzheimers Dement 14: 535-562, 2018
3. Fiandaca MS, et al.: Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. Alzheimers Dement 11: 600-607, 2015
4. Van Giau V, et al.: Emergence of exosomal miRNAs as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. J Neurol Sci 15: 141-152, 2016

（13）神経内科疾患

筋萎縮性側索硬化症の遺伝子解析と臨床病型

角元　利行[1]、神崎　真実[2]、上坂　義和、石浦　浩之[3]
三井記念病院神経内科[1]
医療法人碧水会汐ヶ崎病院[2]
東京大学医学部附属病院神経内科[3]

【要約】

SOD1変異を有する家族性筋萎縮性側索硬化症の1家系について調査した。発端者は18歳1ヶ月で発症、母は63歳時に発症と、同一変異でも発症年齢に大きな違いが見られた。母においてはエダラボンの効果が一時的に見られたが、効果は限定的であり、今後の症例の蓄積が望まれる。

【目的】

家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）は頻度が低く自然史は十分に明らかになっていない。また、エダラボンはその作用機序からsuperoxide dismutase（SOD1）に変異を有するFALSに対して効果があると予想されるが、実臨床での効果は明らかでない。

【患者と方法】

SOD1に既知の病原性変異p.Ile113Thrを有する1家系母子の2名について調べた。症例は35歳男性、18歳1ヵ月時に右下肢の筋力低下・筋萎縮で発症し、19歳2ヵ月時にALSと診断された。19歳11ヵ月時にBiPAP導入し、20歳5ヵ月時に気管切開、20歳6ヵ月時に胃瘻造設術施行。23歳時には眼球運動のみとなり、28歳時には眼球運動も不可能となった。彼の65歳の母は、63歳10ヵ月時に構音障害で発症し、64歳8ヵ月時に診断されリルゾールの内服を開始した。64歳10ヵ月時よりエダラボンの点滴を開始した。65歳0ヵ月時に胃瘻造設術を施行。65歳6ヵ月までにエダラボンを9コース施行した。気管切開・人工呼吸器管理は希望せず、65歳6ヶ月時に呼吸不全により死亡した。両者とも書面でのインフォームドコンセントを得た後、末梢血白血球からゲノムDNAを抽出し、SOD1について直接塩基決定法で解析した。

【結果】

発端者と母の両方にSOD1の既知の病原性変異p.Ile113Thrをヘテロ接合性に認めた。母はエダラボン初回投与前に首下がりを認めていたが、エダラボン投与後に首下がりは改善した。次のコース時には元に戻っていたものの、エダラボン投与により再び首下がりが改善することを繰り返した。4コース目以降は首下がりは固定した。

【考察】

SOD1遺伝子に変異を有するFALS患者では、変異により発症年齢や進行速度といったphenotypeが異なることが知られている[1－3]。p.I113T変異では家族内のphenotype variabilitiyも高いことが知られている。一家系内の13名のFALS（SOD1 p.I113T）患者を調べた報告では発症年齢は37歳から67歳、発症から死亡までの期間は2～10年であった[4]。本研究の発端者は、既報のSOD1 p.I113T変異を有するFALS患者の中で最も若く、家族内でも突出して若い。

発端者の発症が早かった原因は、変異SOD1の発現量や、他の遺伝子変異の関与、ALS感受性遺伝子の関与などが想定される[3]が、現在検討中であり明らかではない。

発端者の母においては、エダラボン使用により一時的に首下がりが改善したものの、次のコース時には元に戻っていた。4コース目以降は首下がりは固定した。4コース開始の時期から%VC 60%と肺活量の低下が見られ、エダラボンは%VC 60%以上のALS患者に対し適応があること

から、4コース目以降は病状の進行によりエダラボンの効果が見られなくなった可能性がある。経過を総合すると、発端者の母においてエダラボン使用が胃瘻造設や呼吸不全の経過に与える影響は限定的だったと思われる。SOD1変異を有する家族性ALS患者におけるエダラボン使用についての報告はまとまったものがなく、さらなる症例の蓄積が望まれる。

【文献】

1. Orrell RW, et al.: Clinical and functional investigation of 10 missense mutations and a novel frameshift insertion mutation of the gene for copper-zinc superoxide dismutase in UK families with amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 48: 746-751, 1997
2. Juneja T, et al.: Prognosis in familial amyotrophic lateral sclerosis: progression and survival in patients with glu100gly and ala4val mutations in Cu, Zn superoxide dismutase. Neurology 48: 55-57, 1997
3. Yamashita S, Ando Y: Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. Transl Neurodegener 4: 13, 2015
4. Lopate G, et al.: Familial ALS with extreme phenotypic variability due to the I113T SOD1 mutation. Amyotroph Lateral Scler 11: 232-236, 2010

【発表に関する事項】

1. 角元利行、神﨑真実、上坂義和: SOD1に変異を有する家族性筋萎縮性側索硬化症の自然史とエダラボン使用の経験. 第59回日本神経学会学術大会（札幌）

（14）腫瘍性疾患

乳癌における晩期再発と腫瘍免疫に関する後方視的研究

尾崎 由記範、高野　利実

【要約】

乳癌に対しては、それぞれの病期に応じて、手術、術前術後化学療法、放射線療法などが行われる。治療の進歩により早期乳癌は多くの症例で根治が得られるが、術後5年以上経過してからの晩期再発が臨床的には大きな問題となっている。晩期再発のメカニズムについてはまだ明らかにはなっていない。切除可能早期乳癌の晩期再発に関連したバイオマーカーを探索することを目的とした研究を行っている。乳癌の臨床症例のデータでは124症例が本研究対象に該当し、そのうち再発症例は31例であった。転移再発部位は、骨転移が19例、肝転移が15例であった。腫瘍組織を用いた解析を今後予定している。

【目的】

切除可能早期乳癌の晩期再発に関連したバイオマーカーを、当院の手術検体を用いて探索する。

晩期再発は腫瘍微小環境における免疫状況や細胞休眠と深く関わっていると考えられ、腫瘍組織を用いた免疫バイオマーカーの解析や、予後不良因子と考えられているIL17RBとの関連を探索的に解析し、臨床データと共に予後への影響について解析する。

【方法】

臨床検体を用いた解析を行う。2011年4月～2015年3月までに虎の門病院にて乳癌と診断され、手術が行われた症例を対象とする。評価方法は、原発部位、臨床経過、治療内容、検査値、画像評価、無病生存期間、全生存期間、有害事象に関するデータをレトロスペクティブに収集する。また手術検体の病理学的特徴に関しては、HE染色や免疫組織染色を用いて評価を行う。調査項目は、年齢、性別、原発部位、臨床経過、検査値、化学療法投与歴、放射線治療歴、病理学的特徴、画像検査、無病生存期間、副作用、合併症、全生存期間、CT、PET-CT、MRI、消化管内視鏡、超音波検査、マンモグラフィなどである。病理学的評価については、日常診療で使用された標本の評価に加えて、組織型、壁深達度、間質量、脈管侵襲、簇出、神経侵襲、CD4、CD8、IL17RB、FOXP3などの免疫関連分子の発現性ならびにその発現レベル（免疫染色）を評価する。統計解析については、主要評価項目は、腫瘍組織内の免疫環境、IL17RBなどの免疫染色結果と無病生存期間や組織侵襲度などの臨床データとの関連を、Kaplan-Meier法・log-rank検定などを用いて統計学的に比較解析する。

【結果】

乳癌の臨床症例のデータを解析したところ、124症例が該当した。そのうちER陽性HER2陰性が97例、ER陽性HER2陽性が14例、ER陰性HER2陽性が5例、ER陰性HER2陰性が8例であった。全体124例のうち再発症例は31例であった。転移再発部位は、骨転移が19例、肝転移が15例であった。腫瘍組織を用いた解析は今後予定している。

【考察】

全体としては平均的な再発率を有するpopulationであり、またサブタイプの分布も一般的であり、評価を行うには適切な集団である。腫瘍を用いた解析を行い、IL17RBの発現と予後の関連を評価する。特に、ER陽性症例では晩期再発をきたすことが知られており、これらを対象とした解析を行うことで晩期再発に関連したバイオマーカーの探索を行っていく。

ニボルマブ治療例における治療効果に関する後方視的研究

近藤　千紘、尾崎 由記範、田辺　裕子
高野　利実、岸　晶子、林　伸和

【要約】

抗programmed cell death-1(PD-1) モノクローナル抗体のニボルマブは、PD-1とprogrammed cell death ligand-1(PD-L1)/PD-L2の結合を阻害し、T細胞への抑制性シグナルを減少させることで、腫瘍免疫反応を回復させ免疫チェックポイント阻害薬である[1,2]。根治切除不能な悪性黒色腫に対し2014年7月4日に日本で承認され、その後、転移性の腎細胞癌（2016年8月）などに適応が拡大され癌診療のキードラッグとなっている。免疫チェックポイント阻害薬は、3～10％で偽増悪や遅延効果を呈し病勢進行（PD）後の治療継続が有効な場合がある[3]。しかしながら、ニボルマブ単剤によりPDとなった後の治療継続の意義については、未だ不明な点が多い。当院臨床腫瘍科と皮膚科にてニボルマブ療法を行った症例を後方視的に調査した。ニボルマブ投与にて1st PD後に治療継続可能であった症例（12例）において、ニボルマブの病勢進行後の継続投与はその約6割の症例にクリニカルベネフィットが得られた。一方で真の病勢進行を呈する症例も存在しており症例選択には慎重な判断を要する。

【目的】

ニボルマブ療法の効果と副作用の臨床病理学的特徴、および治療の実態を明らかにする。2017年度は、とくに奏効症例および重篤な有害事象を生じた症例の特徴を明らかにする。

【方法】

2016年1月～2017年4月までに当院においてニボルマブ単剤療法を実施し、1回以上効果判定を行った腎癌と悪性黒色腫の症例を後方視的に抽出し、その治療経過と効果をResponse Evaluation Criteria In Solid Tumors（RECIST）v1.1に準じて評価した。

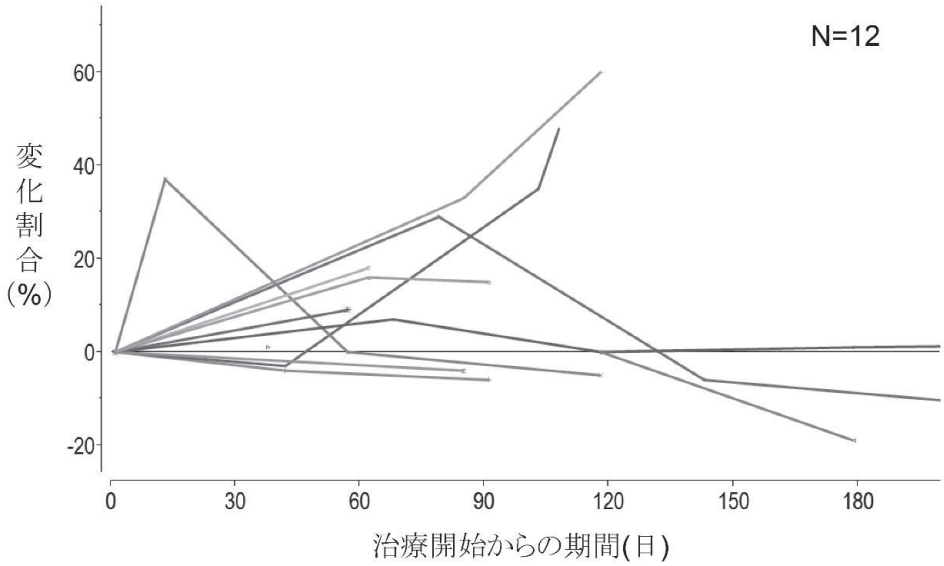


図１　ベースラインサイズを０とした場合の各症例の標的病変変化割合

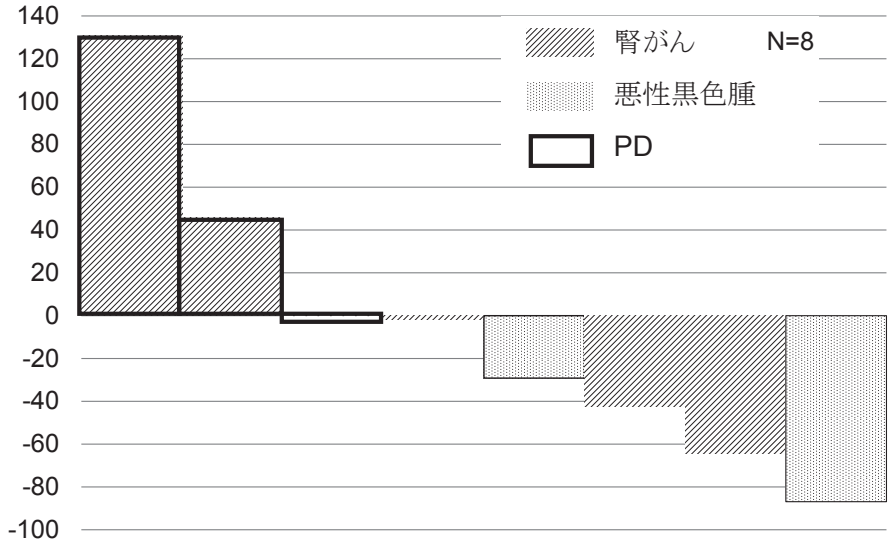


図２　初回PD（RECIST v1.1）時をベースラインとした場合の標的病変の最大縮小割合

【結果】

対象は12例、腎癌/悪性黒色腫 7/5例。年齢中央値62.5歳（範囲: 31-84歳）、男/女 7/5例、Performance Status 0/1 6/6例、転移臓器は、肺/肝/骨/リンパ節 8/5/4/3例であった。観察期間中央値 5.1か月において、ニボルマブ投与回数中央値7回（範囲: 1-29）、治療継続期間は中央値 7.2か月（95%信頼区間[CI] 0.5-19.5）であった。ニボルマブ治療を中止した8例の中止理由は、1st PD/2nd PD/有害事象 5/2/1例であった。1st PDまでの時間は中央値1.8か月（95%CI 0.2-2.3)、1st PDとなった10例中8例（80%）が治療を継続した（**図1**)。1st PD時を基準とした場合、その後の効果判定は、部分奏効/病勢安定/PD 4/1/3例であり、5例（63%）で臨床効果が得られた（**図2**)。

【考察】

ニボルマブ投与にて1st PD後に治療継続可能であった症例において、その約6割の症例にクリニカルベネフィットが得られた。化学療法既治療の非小細胞がん症例を対象としてPD-L1抗体（N=425）と化学療法の比較を行った前向き第III相試験の後ろ向き解析が報告された。PD-L1抗体で治療を行いPDとなった78%の症例うち、51%が治療を継続し、その後の治療効果は部分奏効7%、病勢安定49%であった。臨床効果は56%であり、本研究と同様の結果であった[4)]。病勢増悪後に同じ治療を継続する治療戦略は新規のものであり、一定の割合で有効性が確認されたが慎重な症例選択と経過観察が必要と考えられた。

【文献】

1. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, et al.: Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. Cancer Res 66: 3381-3385, 2006
2. Hino R, Kabashima K, Kato Y, et al.: Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. Cancer 116: 1757-1766, 2010
3. Victoria L, et al.: Pseudoprogression and Immune-Related Response in Solid Tumors. J Clin Oncol 33: 3541-3543, 2015
4. Gandara DR, von Pawel J, Mazieres J, et al.: Atezolizumab Treatment Beyond Progression in Advanced NSCLC. Results From the Randomized Phase Ⅲ OAK Study 13: 1906-1918, 2018

乳がん、または、卵巣がんの日本人患者におけるタキサン系抗がん剤誘発感覚性末梢神経障害と*SCN9A*の遺伝子多型との相関

田辺　裕子、尾崎 由記範、田村　宜子
高野　利美、川端　英孝

【要約】

近年、抗がん剤の有害事象である感覚性末梢神経障害に関連する遺伝子多型が報告されている[1-3]。脊髄後根神経節に位置するナトリウムチャンネルのうち、特に、*SCN9A*と*SCN10A*によってコードされるNav1.7とNav1.8は、痛覚のゲートキーパー分子として役割を果たす[4,5]。そこで、乳がんまたは卵巣がん患者においてタキサン系抗がん剤の有害事象として生じた感覚性末梢神経障害とナトリウムチャンネルの遺伝子多型[6]の関連について検討したところ、感覚性末梢神経障害の強度と*SCN9A*-rs13017637が有意に相関した。

【目的】

タキサン系抗がん剤による感覚性末梢神経障害と*SCN9A*と*SCN10A*の遺伝子多型の関連について検討することを目的とする。

【方法】

乳がん、または、卵巣がんの日本人患者（186名）において、3つの*SCN9A*と2つの*SCN10A*の遺伝子多型を測定した。患者をNCI-CTCAEスケールを用いた末梢神経障害がグレード0-1（コントロール群, N=108）とグレード2-3（しびれが強い群, N=78）の2群に分けた。統計学的手法としてロジスティック回帰分析を使用した。

【結果】

評価した5つの遺伝子多型のうち、*SCN9A*-rs13017637は、グレード2以上のタキサン系抗がん剤誘発感覚性末梢神経障害と有意に相関した（odds ratio（OR）= 3.463, P = 0.0050）。また、乳がん患者だけに絞って解析を行った場合も同様の結果であった（OR 5.053, P = 0.0029）。さらに、rs13017637は、治療後1年時（=タキサン系抗がん剤による感覚性末梢神経障害の持続期間を反映する）におけるグレード2以上の末梢神経障害と相関した（OR 3.906, P = 0.037）。

【考察】

SCN9A rs13017637は、タキサン系抗がん剤による感覚性末梢神経障害の強度と持続期間と関連した。これらの結果は、末梢神経障害のリスクの高い患者を同定するのに役立つ可能性がある。

【文献】

1. Gréen H, Söderkvist P, Rosenberg P, Mirghani RA, Rymark P, Lundqvist EA, et al.: Pharmacogenetic studies of Paclitaxel in the treatment of ovarian cancer. Basic Clin Pharmacol Toxicol 104: 130-137, 2009
2. Tanabe Y, Shimizu C, Hamada A, Hashimoto K, Ikeda K, Nishizawa D, et al.: Paclitaxel-induced sensory peripheral neuropathy is associated with an ABCB1 single nucleotide polymorphism and older age in Japanese. Cancer Chemother Pharmacol 79: 1179-1186, 2017
3. Baldwin RM, Owzar K, Zembutsu H, Chhibber A, Kubo M, Jiang C, et al.: A genome-wide association study identifies novel loci for paclitaxel-induced sensory peripheral neuropathy in CALGB 40101. Clin Cancer Res 18: 5099-5109, 2012
4. Peters CM, Jimenez-Andrade JM, Kuskowski MA, Ghilardi JR, Mantyh PW: An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat. Brain Res 1168: 46-59, 2007
5. Li Y, North RY, Rhines LD, Esteves Tatsui

C, Rao G, Edwards DD, et al.: DRG voltage-gated sodium channel 1.7 is up-regulated in paclitaxel-induced neuropathy in rats and in humans with neuropathic pain. J Neurosci 38: 1124-1136, 2018

6. Xia Z, Xiao Y, Wu Y, Zhao B: Sodium channel Nav1.7 expression is upregulated in the dorsal root ganglia in a rat model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy. Springerplus 5: 1738, 2016

ヒト尿サンプル由来前立腺がんオルガノイドを用いたがん転移誘導機構の解明

臼井　達哉
東京農工大学獣医薬理学研究室

【要約】

前立腺がんは泌尿器がんの中でも非常に罹患率が高く、米国においては男性がんの罹患率1位、死亡率2位になっており、国内においても近い将来に罹患率1位となることが予想されている。特に、転移性前立腺がんは、難治性であり確立した治療法がほとんどないことから新規治療法の開発が求められている。我々はこれまでの研究において、前立腺がん罹患犬の尿サンプルを用いて前立腺がんオルガノイドを作製する方法を樹立し[1)]、このオルガノイドが、生体内のがん微小環境を高いレベルで再現できること、免疫不全マウスの体内で腫瘍を再形成すること、抗がん剤および放射線に対する感受性試験を行えることを明らかにした。

そこで本研究ではヒト前立腺がん患者の非侵襲的なオルガノイド培養法を確立し、前立腺がんの転移を誘導する新規制御機構の解明につなげることを目的とした。

山口大学医学部泌尿器科学講座で前立腺がんと診断された患者3検体の前立腺液を採取し、非侵襲的にオルガノイド培養を行った。培養後、わずかにオルガノイド形成が認められたが、増殖能が弱く継代後に増殖が停止した。そこで、膀胱がん患者からも手術前の膀胱洗浄によって細胞を回収し、オルガノイド培養を行った。10検体中の4検体でオルガノイド形成が認められた。2系統のオルガノイドは、継代後も増殖能を維持することが観察された。

今回の検討では、前立腺がん患者ではサンプル数が十分集まらなかったこともあり、非侵襲的な前立腺がんオルガノイドの培養法確立には至らなかった。一方、膀胱がん患者では膀胱洗浄液中の細胞からオルガノイド形成が認められた。今後の展望としては、がん幹細胞の活性が高い患者を優先的に選択して検体数を増やし、培養条件の更なる改善を行い、非侵襲的な前立腺がんおよび膀胱がんオルガノド培養法の確立を目指す。

表１　本研究課題で用いた患者情報。PCは前立腺がん、BCは膀胱がん患者を示す。

	Organoid making day	性別	年齢	ステージ
hPC17001	5月29日	男性	78	cT3aN1M1c, GS4+5
hBC17001	6月16日	男性	81	cT1N0M0, high grade
hBC17002	6月30日	男性	89	pT2N0M0, high grade
hBC17003	7月21日	男性	83	pTaN0M0, low grade
hPC17002	8月17日	男性	80	cT4N1M1c, GS4+4
hBC18001	2月2日	女性	55	pTaN0M0, high grade
hBC18002	3月15日	男性	84	pT1N0M0, HG, CIS+
hBC18003	3月16日	男性	81	cT3疑い、ADL不良
hBC18004	3月23日	男性	76	pT1N0M0, HG, CIS-
hBC18005	3月24日	男性	63	cT3以上, low grade
hBC18006	5月25日	男性	63	cT3以上, low grade
hPC18001	6月1日	男性		
hBC18007	8月15日	男性	65	cT1N0M0疑い

【目的】

本研究ではヒト前立腺がん患者の非侵襲的なオルガノイド培養法を確立し、前立腺がんの転移を誘導する新規制御機構の解明につなげることを目的として研究をおこなった。

【方法と結果】

山口大学医学部泌尿器科学講座で前立腺がんと診断された患者3検体の前立腺液を採取し、非侵襲的にオルガノイド培養を行った。培養後、わずかにオルガノイド形成が認められたが、増殖能が弱く継代後に増殖が停止した。そこで、膀胱がん患者からも手術前の膀胱洗浄によって細胞を回収し、オルガノイド培養を行った。10検体中の4検体でオルガノイド形成が認められた。2系統のオルガノイドは、継代後も増殖能を維持することが観察された（**表1, 図1, 図2**）。

【考察】

今回の検討では、前立腺がん患者ではサンプル数が十分集まらなかったこともあり、非侵襲的な前立腺がんオルガノイドの培養法確立には至らな

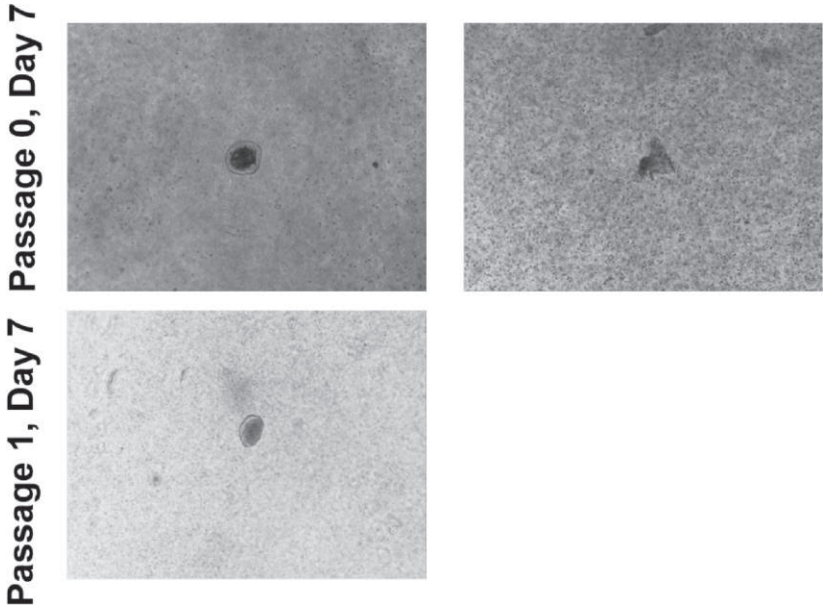


図１　前立腺がん患者の尿サンプル由来オルガノイドの観察像。

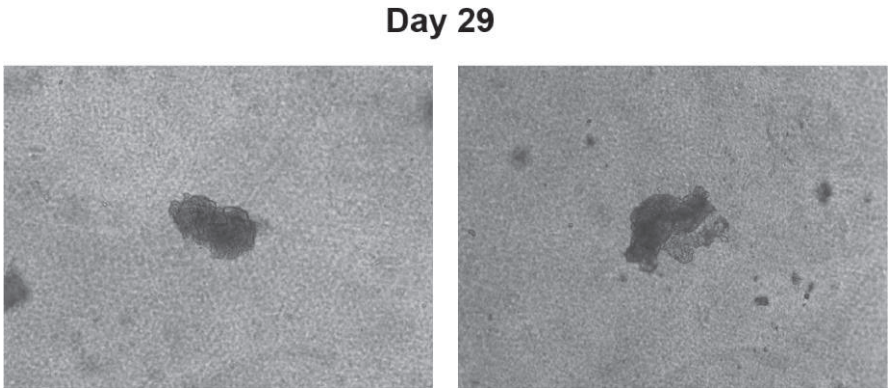


図２　膀胱がん患者の尿サンプル由来オルガノイドの成長過程。

かった。一方、膀胱がん患者では膀胱洗浄液中の細胞からオルガノイド形成が認められた。今後の展望としては、がん幹細胞の活性が高い患者を優先的に選択して検体数を増やし、培養条件の更なる改善を行い、非侵襲的な前立腺がんおよび膀胱がんオルガノド培養法の確立を目指す。

【文献】

1. Usui T, et al.: Establishment of a dog primary prostate cancer organoid using the urine cancer stem cells. Cancer Sci 108: 2383-2392, 2017

微小環境の改変による難治性がんに対する治療基盤の構築

中嶋　幸生
国立がん研究センター研究所分子病理分野

【要約】
難治性がんとして知られる膵がんは高い浸潤能と転移能を有しており、免疫治療を含めた全身治療の改良が求められている。免疫応答には、免疫細胞ががん組織内へと透過することが必須であり、がん微小環境中の血管内皮細胞が制御している。本研究の目的は、がんの血管内皮細胞の性質を変化させることにより、抗腫瘍免疫細胞をがん組織内に円滑に輸送する技術を開発することである。研究計画は次の5段階とする: ①手術検体から、がんの血管内皮細胞を分離・培養する。②網羅的発現解析を行い、特徴的な発現分子・パスウェイを明らかにする。③該当した分子の臨床病理学的意義を検討する。④薬剤スクリーニングによって、免疫細胞の血管内皮細胞への接着・透過を促進させる化合物を同定する。⑤膵がんのモデルマウスに候補化合物を投与し、効果を評価する。このように、難治性がんの治療成績の向上を目指して、がんへの免疫応答を最大化する基盤的技術を構築する。

【背景】
膵がんは、罹患率と死亡率がほぼ等しく、極めて難治性のがんとして知られている。膵がんに特徴的な性質として、早期より脈管侵襲や神経浸潤を伴うなど、周囲組織への極めて高い浸潤能力を有していることが挙げられる。また、早期発見手段を欠いており、唯一の根治療法である切除手術が適応となる場合は全体の1～2割に過ぎず、切除後の再発も高い頻度で生じる。そして、腫瘤が小さくても遠隔転移を起こしやすいという特徴も兼ね備えているため、今後さらなる全身治療の開発が求められている。現在、全身治療の一つである免疫治療としては、免疫チェックポイント阻害剤による免疫賦活療法、がんワクチン療法やエフェクターT細胞療法などが種々の癌腫の臨床例において施行されている。しかしながら、これまで膵がんにおいては、免疫治療が奏効したという報告はほぼない。免疫治療を円滑に奏効させるための課題として、①治療の際に導入される免疫細胞のがん特異的な反応性の増強、②がんの免疫逃避機構の分子メカニズムの更なる解明が要請されている。このような現状に対して、がん微小環境において免疫治療が奏効しないメカニズムを明らかにした[1)]。特に、がん微小環境中の血管内皮細胞においては、免疫細胞をがん組織内へと輸送を制御することができず、機能不全に陥っている[2)]。

【目的】
本研究の目的は、がん微小環境を構成する血管内皮細胞の機能不全を回復させることにより、がん組織内へ抗腫瘍免疫細胞の移行を円滑化する技術を開発することである。

【方法】
1. 手術検体を用いた細胞培養には、膵がんの手術検体を酵素処理し、細胞選択用ビーズ・遠心分離を用いた手法にて、膵がん由来の血管内皮細胞を分離培養した。
2. 腫瘍血管内皮細胞の網羅的解析として、上記1. によって得られた膵がん由来の血管内皮細胞のRNAを抽出してアレイ解析を行い、特徴的な分子プロファイルを検討した。また、バイオインフォマティクスを用いたアプローチであるIngenuity Pathway Analysis（IPA）によって、がんの血管内皮細胞において活性化/減弱化している分子パスウェイを検討した。
3. 膵がん臨床検体における発現解析としては、上記2. の結果に基づき、注目したパスウェイ中の候補分子の発現について、臨床病理学的に解析を行った。解析には、国立がん研究センター・バイオバンクに登録・保管されている外科切除膵がんの検体を用いた。

4. 腫瘍血管の機能不全を回復する化合物の同定のため、上記によって候補となったパスウェイを標的とする化合物を種々の製造会社から取り寄せ、オリジナルの薬剤ライブラリーを作成した。次に、候補化合物による腫瘍血管の正常化に対する効果について、標的分子の発現量、リンパ球の接着性と遊走性に基づいて評価した。

【結果】

1. 膵がんの手術検体を酵素処理し、細胞選択用ビーズ・遠心分離を用いた手法によって、膵がん由来の血管内皮細胞の培養を試みた。培養された細胞の確認には、膵がんの血管内皮マーカーであるCD31とERG1を用いて蛍光染色を行い、両者の陽性細胞を確認した。さらに、培養された細胞が血管形成能を有することをTube formation assayにて確認した。
2. 得られた腫瘍血管内皮細胞の網羅的な分子解析として、RNAを抽出しアレイ解析を行ったところ、正常の膵臓血管内皮細胞に比べて2748種類の分子発現と47のパスウェイに相違が認められた。その中でもリンパ球浸潤に関与するTNFRシグナリングに着目し、以降の実験にて詳細に検討を行った。
3. 膵がん臨床検体における発現解析として、TNFR1シグナリングの下流を構成し、リンパ球の接着を制御している責任分子であるE-selectin、VCAM1、ICAM1に焦点を置いて臨床病理学的に発現の解析を行った。その結果、がん組織内の総血管数に対してE-selectin、及びVCAM1陽性率が低下していることが示唆された。
4. 上記によって候補となったTNFR1シグナリングを標的とする43種の化合物ライブラリーを用いて、腫瘍血管の機能不全を回復する化合物の同定を試みた。まず、第一層目のスクリーニングとして細胞障害試験を行い、7種類の細胞毒性の高い化合物を除外した。次に、第二層目のスクリーニングとして、qPCRを用いて、E-selectinとVCAM1の発現を誘導する薬剤の同定を試みたところ、4種のIAP阻害剤が該当した。さらに、第三層目のスクリーニングとして、リンパ球の接着と透過性を亢進させる薬剤の同定を試みた。結果として、XIAP阻害剤の一部にリンパ球の接着を促す効果が認められた。

【考察】

膵がんの手術献体から分離培養した血管内皮細胞を用いて、リンパ球の接着を促す可能性のある薬剤を同定した。今後、マウスの膵がん細胞移植モデルを用いて、薬剤の効果を検証する必要性がある。

【文献】

1. Nakajima K, Nangia-Makker P, Hogan V, Raz A: Cancer Self-Defense: An Immune Stealth. Cancer Res 77: 5441-5444, 2017
2. Hamzah J, Jugold M, Kiessling F: Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. Nature 453: 410-414, 2008

【発表に関する事項】

1. Nakajima K, Ino Y, Hiraoka N: Characterization of pancreatic cancer endothelial cells: Approaching to enhance immune cell infiltration for immunotherapy. Forth CRI-CIMT-EATI-AACR international cancer immunotherapy conference（New York）

神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子PHLDA3の遺伝子診断による予後・治療薬選択の診断法開発

大木 理恵子
国立がん研究センター研究所基礎腫瘍学ユニット

【要約】

本研究の目的は、希少がんであるヒトの神経内分泌腫瘍（neuroendocrine tumor；以下NET）の症例解析とモデルマウスの作製・解析を通じてNETの本態を解明することである。

NETは、神経内分泌細胞に由来する腫瘍であり、膵臓、下垂体、甲状腺、消化管、肺など全身の様々な臓器に生じる。希少がん故にサンプルの収集が難しいことやマウスモデルの開発が遅れていることにより、未だ腫瘍発生機序は十分に解明されていない。

我々は、機能未知であったPHLDA3遺伝子が、新規p53標的遺伝子であり、がん遺伝子Aktの抑制因子である事を見いだし、肺と膵臓のNETにおいて、がん抑制遺伝子として機能している事を明らかにした[1, 2]。膵NETの詳細な解析により、PHLDA3遺伝子は約70％と非常に高頻度にヘテロ接合性の喪失（loss of heterozygosity；以下LOH）を呈すること、さらにはメチル化とLOHの2 hitにより機能が失われていることが示された。加えて、肺のNETにおいてもPHLDA3遺伝子の高頻度のゲノム異常が示された。また、PHLDA3欠損マウスでは、膵島過形成や下垂体NET発症など、いくつかの組織の神経内分泌細胞の異常増殖・腫瘍が高頻度で発生する事を明らかにした。これらの事から、我々は、PHLDA3が様々な組織に由来するNET共通のがん抑制遺伝子であり、PHLDA3によるAkt抑制がNET抑制において中心的な役割を持つと考えている。

そこで本研究課題では、NET抑制におけるPHLDA3遺伝子の機能を解明することを目的に、臨床医との緊密な連携のもと集めた詳細な臨床情報の付帯したヒトNET臨床サンプルを用いたPHLDA3の遺伝子異常を中心としたゲノム解析と、ヒトNETのゲノム異常を模倣するPHLDA3遺伝子を欠損したNETマウスモデルの解析を行う。本研究は、組織を超えたNET共通のがん抑制メカニズムの解明につながる。さらには、共通のNET抑制経路を明らかにすることで、各種の希少NETを統合して扱うことが可能になれば、NET研究とそれに続く創薬や治療法の開発が加速すると予想される。

【目的】

NETは希少がんであり、研究が十分に進んでいない。2011年には膵NETの全ゲノム配列が解析されたが、未だに未解明な事が多い。患者の生命を救うためにも、さらなるNETの研究は必須である。PHLDA3遺伝子はNETの抑制において重要な役割を果たすため、本研究を遂行する事で、NETの発症メカニズム解明に加え、NETの予後診断・治療と結びつく結果が得られると考えられ、NET患者の個別化医療に貢献できる。さらに、肺や下垂体など、膵以外の様々なNETにおいてもPHLDA3遺伝子はがん抑制的に機能すると考えられるため、本研究は、組織を超えたNET共通のがん抑制メカニズムの解明につながる。

【方法】

詳細な臨床情報の付帯したヒトNET臨床サンプルを用いたゲノム解析と、NETマウスモデルを用いた解析を進める。

1. ヒトNET臨床サンプルを用いたゲノム解析

これまでに、ヒト膵（150）・下垂体（203）・大腸（69）・甲状腺（30）・副甲状腺（10）のNET（症例数）を収集しており、大規模な臨床検体を用いた解析を進めた。これまでに、様々なNETにおいてPHLDA3遺伝子の異常が認められており、PHLDA3がNET共通のがん抑制遺伝子として機能すると考えられる。

今後は、収集したサンプルのPHLDA3遺伝子のゲノム解析（点突然変異、LOH、メチル化の解析）を進めた。また、次世代シークエンサーを用いた網羅的なゲノム解析も行い、PHLDA3遺伝子異常の有無と、他の遺伝子異常との関連の解析を進めた。さらには同定されたゲノム異常と患者予後との関連の解析を進めた。また膵 NETの治療にはAkt経路阻害剤であるエベロリムスやアポトーシス誘導剤であるストレプトゾトシンが用いられているが、これらの薬剤の有効性とゲノム異常との関連の解析を進める。

2. 動物モデルを用いた解析

これまでに構築したPHLDA3遺伝子を欠損した膵NET・下垂体NETのモデルマウスの解析を行った。ヒトNETにおいて、PHLDA3以外で、高頻度に変異やLOHが見られる遺伝子としてMEN1遺伝子が知られているが、我々は膵NETの発症にPHLDA3とMEN1の両経路の不活性化が必要である事を示した[2)]。マウスにおいては、MEN1欠損マウスとPHLDA3欠損マウスは膵NETの発生部位である膵島の過形成を起こすが、我々は、両マウスを掛け合わせ、早期に悪性度の高い膵NETを発症する、初のヒト膵NETのゲノム異常を模倣した膵NETモデルマウスを作製した。今後は、この膵NETマウスモデルを用い、特にPHLDA3遺伝子欠損とNETの悪性度との関連を重点的に解析する。また膵NETの治療に用いられる薬剤をマウスに投与し、薬剤の有効性とPHLDA3遺伝子欠損との関連を解析する。

【結果】

詳細な臨床情報の付帯したヒトNET臨床サンプルを用いたゲノム解析と、NETマウスモデルを用いた解析を進めた。具体的には、膵NET（150症例）、下垂体NET（203症例）、大腸NET（69症例）と甲状腺NET（30症例）・副甲状腺NET（10症例）の検体を用いて、これらのNETにおけるPHLDA3遺伝子の異常の有無を中心としたゲノム解析を行った。予備実験の段階ではあるが、調べたすべてのNETにおいて、PHLDA3遺伝子の異常があると考えられる結果を得ている。今後は、網羅的全エクソン配列解析、RNA-seqも行い、PHLDA3変異と一緒に変異する遺伝子群を見いだし、どのような細胞内経路が傷害されてNETが発症するかを明らかにする。

【考察】

詳細な臨床情報の付帯したヒトNET臨床サンプルを用いたゲノム解析と、NETマウスモデルを用いた解析を進めた。今後さらに研究を進め、希少がんである神経内分泌腫瘍の本態解明と、新しい予後・治療法選択のための診断法開発を目指す。

【文献】

1. Kawase T, et al.: PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. Cell 136: 535-550, 2009
2. Ohki R, et al.: PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors. Proc Natl Acad Sci USA 111: E2404-E2413, 2014

（15）脳神経外科疾患

当センターにおける特発性正常圧水頭症（iNPH）に対する腰部くも膜下腔－腹腔短絡術（LP shunt）の治療成績

鮫島　直之
東京共済病院脳神経外科

【はじめに】

特発性正常圧水頭症（idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus: iNPH）は、診療ガイドラインの2004年発刊[1]、2011年改定[2]と、我が国の高齢化社会に突入したことも相まって徐々に関心が高まっている。治療の主体はシャント手術であり、その方法には、脳室-腹腔短絡術（Ventriculo-peritoneal shunt ; VPシャント）、腰部くも膜下腔－腹腔短絡術（Lumbo-peritoneal shunt ; LPシャント）、脳室-心房短絡術（Ventriculo-atrial shunt ; VAシャント）がある。全国のシャント術件数も、ここ数年着実に増加してきている。世界的にも臨床研究や基礎研究は拡大してきており、日本ではSINPHONI（Study of idiopathic normal-pressure hydrocephalus on neurological improvement）という多施設共同前向き臨床試験の成果として、iNPHに対するVPシャントの有効性が証明された。続いて行われたSINPHONI-2(同じく多施設共同前向き臨床試験)では、LPシャントのVPシャントと比較しての非劣性が証明された[3]。近年は脳に穿刺を行わず、腰椎くも膜下腔から腹腔へ髄液を導くLPシャント手術は特に注目されてきている。今回、当院単一施設でのiNPHに対するLPシャントの手術手技と治療成績を示す。

【方法】

対象は2009年4月から2016年3月まで当センターでprobable iNPH と診断し、LPシャントを施行した患者374例（男性244例、女性130例　平均78.2 ± 6.5歳)。これら患者を術後1年間追跡し、主要評価項目としてmRSの改善を評価した。副次的評価項目として、歩行障害、認知障害、排尿障害の改善を評価した。また手術合併症につき検討した。これらの結果を2つのSINPHONIの結果と比較した。

歩行障害、認知症、排尿障害の3症状改善の有無の評価は、特発性正常圧水頭症診療ガイドラインに基づき行った[1,2]。客観的に症状の改善が示されたもの、すなわちTimed Up and Go Test（TUG）スコア10％以上の改善、Mini-Mental State Examination（MMSE）3点以上の改善、排尿障害においてはiNPH Grading Scale（iNPHGS）1点以上の改善を認めたものを、シャントによる症状の改善の評価とした。

【結果】

当センターでLPシャントを施行し1年間の追跡が行えた連続339例で検討した。339例中221例（65％）（95％CI: 60-71）でfavorable outcome（mRSスコア1以上の改善）であった（**表1**）。これはSINPHONI（全例VPシャント）の100例中69例（69％）（95％CI: 59-78, p=0.627)、SINPHONI-2（全例LPシャント）の83例中52例（63％）（95％ CI: 51-73, p=0.607）と比較して同等であった。術後3か月後、1年後の歩行障害の改善（TUG10％以上の改善）はそれぞれ87.9％、71.0％、認知症の改善（MMSE3点以上改善)は56.5％､44.0％､排尿障害の改善(iNPHGS1以上の改善）は70.0％、61.8％であった。術後1年間以内に手術を要した手術関連合併症は339例中29例（8.6％)。内訳は慢性硬膜下血腫12（3.5％)、チューブ閉塞5 、下肢神経痛4、チューブ逸脱2, チューブ断裂2 、バルブ破損1, 皮下血腫1。CSDHを防ぐ工夫として、20cmH_2O以上かつ1cmH_2O毎の高圧設定を導入。従来多いと

表1　東京共済病院NPHセンター（単一施設）とSINPHONI（多施設共同研究）におけるiNPHに対するシャント術後のmodified Rankin Scale（mRS）の改善率

	LP shunt our hospital	LP shunt SINPHONI2*		VP shunt SINPHONI*	
	No.（%）95%CI	No.（%）95%CI	p Value	No.（%）95%CI	p Value
No. of patients	339	83		100	
mRS (favorable outcome)	221（65）60-71	52（63）51-73	0.607	69（69）59-78	0.627

される腹腔側シャントチューブの挿入法に筋膜ギャップ法にZ縫合を加える工夫を行い逸脱を防止した。

【結論】

LPシャントは高齢者が対象となり合併症の回避が重要。些細なことが、シャントの効果に影響するために多くの工夫やポイントがある。当院単一施設でのiNPHに対するLPシャントの安全かつ有効な手術成績を示した。

【文献】

1. 日本正常圧水頭症研究会 特発性正常圧水頭症診療ガイドライン作成委員会. 特発性正常圧水頭症診療ガイドライン（第1版）. メディカルビュー社, 2004
2. 日本正常圧水頭症学会 特発性正常圧水頭症診療ガイドライン作成委員会. 特発性正常圧水頭症診療ガイドライン（第2版）. メディカルビュー社, 2011
3. Kazui H, Miyajima M, Mori E, Ishikawa M et al.: Lumboperitoneal shunt surgery for idiopathic normal pressure hydrocephalus (SINPHONI-2): open-label randomized trial. Lancet Neurology 14: 585-594, 2015

High-resolution cone-beam CTによる脳出血術中活動性出血の予測

吉野　正紀、原　貴行

【要約】

脳出血における手術の有用性は不明確であるため、手術を要する症例を適切に選択する必要がある。CT angiography（CTA）におけるspot signは術中の活動性出血の予測因子であることが報告されているが、spot signは感度が低いことが問題であった。そこで本研究ではCTAより空間分解能が高い脳血管撮影を用いて管電圧80kVのHigh-resolution cone-beam CT（hr-CBCT）を撮影した特発性脳出血患者で、術前にhr-CBCTを施行した26例（男16、女8、平均年齢60.3）を対象として、hr-CBCTの術中の活動性出血における新たな予測因子としての有用性を検討した。その結果、Hr-CBCTでは1）出血血管末梢部分への造影剤の限局性貯留（pooling）を13例に、2）出血血管から血腫腔内への造影剤の漏出（extravasation）を2例に、3）pooling + extravasationを2例に認め、合計17名（65.3%）にhr-CBCTで陽性所見が得られた。術中活動性出血を認めた症例は18例（69.2%）でhr-CBCTが陽性の症例で活動性出血が有意に多かった（16/17 VS. 2/9；P = 0.02）。またhr-CBCTサインの有無、抗血小板薬・抗凝固薬内服の有無、血腫量を説明変数としてロジスティック回帰分析を行なったところhr-CBCT陽性所見が唯一の術中活動性出血の予測因子であった（オッズ比 56.0；95%信頼区間 4.33-724.0；P = 0.02）。本研究よりhr-CBCTは術中の活動出血の予測因子となり得ることが示された。Hr-CBCTは、手術が必要な脳出血症例の適切な選択に寄与するものと期待される。

【背景・目的】

脳内出血急性期の早期手術の有用性を検討した初めての大規模、国際他施設randomized controlled trial（RCT）では早期手術治療と初期保存治療では、その結果に差が認められなかった[1)]。その後もいくつかのRCTが行われたが、外科治療の効果に有意差を認めたとするものもあれば、最初の報告と同様に早期手術治療と初期保存治療の間に差を認めなかったとの報告もあり、現時点で脳出血患者に対する手術療法の有用性は不明確であるとされている。しかしこれらの結果は脳内出血において外科的治療の果たす役割はあるが、どの患者グループに有効であるかという点が不明確であるともいえる。このため脳内出血患者の予後改善に寄与するためには、手術療法が有用な患者を適切に選択する必要がある。これらの患者を適切に選択するための一助としてCT angiography（CTA）におけるspot signの検討が行われてきた。CTAにおけるspot signはCTAを撮像した際に認める血腫腔内の造影される焦点のことを指し、spot signの有無は急性期における血腫増大の予測因子であるとされる[2)]。さらにspot signは術中の活動性出血の予測因子でもあることが報告されており[3)]、手術治療を要する患者選択の一助として有用性が期待されている。しかし脳内出血患者におけるspot signは感度が低いことが問題であった。そこで本研究ではCTAより空間分解能が高い脳血管撮影を用いて管電圧80kVのHigh-resolution cone-beam CT（hr-CBCT）を撮影し、血腫腔内における異常所見を同定する。同定した所見の、術中の活動性出血における新たな予測因子としての有用性を検討した。

【対象・方法】

2015年1月1日から2017年12月31日までに手術適応となる特発性脳出血患者で術前にhr-CBCTを施行した26例（男16、女8、平均年齢60.3）を対象とした。まずhr-CBCTによって得られた所見と術中の活動性出血の関係を検討した。この際、

術中の活動性出血の有無に関しては手術記載より判断した。またhr-CBCTによって得られた所見に加え、その他の画像的･臨床的項目（年齢、性別、来院時Glasgow Coma Scale、来院時血圧、高血圧既往、糖尿病既往、脳梗塞既往、脳出血既往、抗血小板薬・抗凝固薬内服有無、血腫量等）についても術中活動性出血を認めた群と術中活動性出血を認めなかった群とで統計学的に比較・検討し、術中の活動性出血の予測に真に有用な因子の検討を後方視的に検討した。この検討にはロジスティック回帰分析を用いた。

【結果】

Hr-CBCTでは以下の3所見を認めた。(1)出血血管末梢部分への造影剤の限局性貯留（pooling）（**図1**）。(2)出血血管から血腫腔内への造影剤の漏出（extravasation）（**図2**）。(3)pooling + extravasation（**図3**）。また(1)のpoolingは26例中13例に、(2)のextravasationは26例中2例に、(3)のpooling + extravasationは26例中2例に認め、合計17名（65.3%）にhr-CBCTで陽性所見が得られた。術中活動性出血を認めた症例は18例（69.2%）であった。これらをhr-CBCTが陽性の群と陰性の郡でわけて検討すると、hr-CBCTが陽性の17症例中で術中活動性出血を認めたのは16例であり、hr-CBCTが陰性の9症例では2例のみに術中の活動性出血を認め、hr-CBCTが陽性の郡において術中の活動性出血が有意に多かった（P=0.02）。また術中の活動性出血の有無を予測するために、まずhr-CBCT所見の有無を含め、年齢、性別、来院時Glasgow Coma Scale、来院時血圧、高血圧既往、糖尿病既往、脳梗塞既往、脳出血既往、抗血小板薬・抗凝固薬内服の有無、血腫量を説明変数として単変量解析を行ったところ、hr-CBCT所見の有無、抗血小板薬・抗凝固薬内服の有無、血腫量のp値が0.1以下であった。そのため、これらを説明変数としてロジスティック回帰分析を行なったところhr-CBCT陽性所見が唯一の術中活動性出血の予測因子であった（オッズ比 56.0；95%信頼区間 4.33-724.0；P=0.02）。

【考察】

CTAにおけるspot signは、脳内出血急性期における血腫増大の予測因子として知られている[2)]。またspot signは術中の活動性出血を予測因子であるとの報告もあり[3)]、spot signは手術療法が有用な患者を適切に選択する有用な予測因子としての役割が期待されている。一方でspot signの脳内出血に患者における陽性率は18.9-37%と低値であり、手術療法が有用な患者を適切に選択するには感度が低かった。そこで本研究では、CTAよりも空間分解能が高い脳血管撮影を用いてhr-CBCTを撮影したところ、CTAと同様に血腫腔内に異常な造影剤の貯留所見を認め、その陽性率は65.3%と既存の報告より高値であった。本結果から、hr-CBCTは既存のモダリティより高率に術中の活動性出血を予測する因子とし

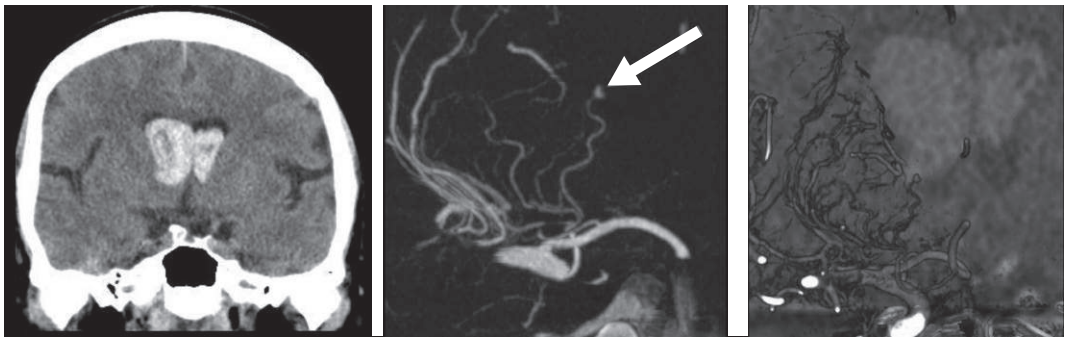


図 1　出血血管末梢部分への造影剤の限局性貯留（pooling）
白矢印: poolingしている部分

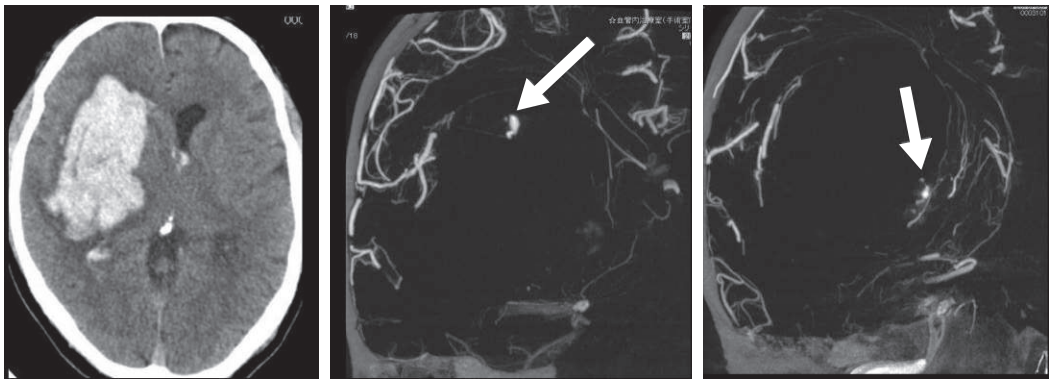


図２　出血血管から血腫腔内への造影剤の漏出（extravasation）
白矢印：extravasation している部分

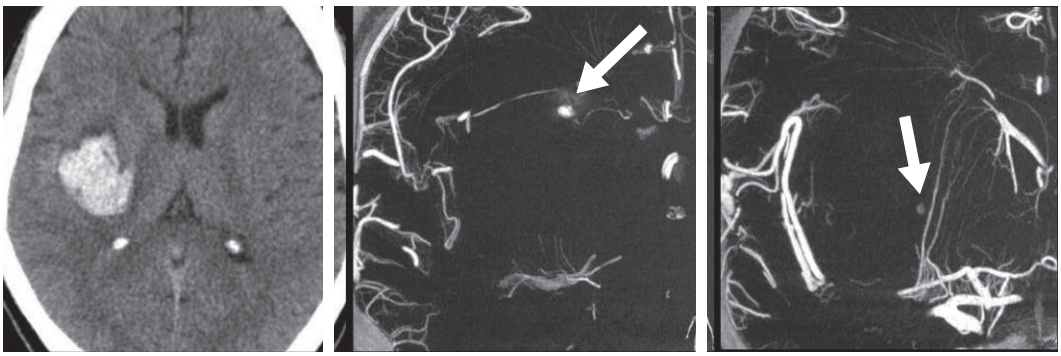


図３　pooling + extravasation

て期待される。一方で、本研究ではhr-CBCTによる所見が、急性期の血腫増大や患者の予後に関与するかは検討できておらず、この点は今後の課題と思われる。

【結論】

本研究よりhr-CBCTは術中の活動出血の予測因子となり得ることが示された。Hr-CBCTは、手術が必要な脳出血症例の適切な選択に寄与するものと期待される。

【文献】

1. Mendelow AD, Gregson BA, Fernandes HM, et al.: Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial intracerebral haematomas in the International Surgical Trial in Intracerebral Haemorrhage（STICH）: a randomised trial. Lancet 365: 387-397, 2005
2. Wada R, Aviv RI, Fox AJ, et al.: CT angiography "spot sign" predicts hematoma expansion in acute intracerebral hemorrhage. Stroke 38: 1257-1262, 2007
3. Brouwers HB, Raffeld MR, van Nieuwenhuizen KM, et al.: CT angiography spot sign in intracerebral hemorrhage predicts active bleeding during surgery. Neurology 83: 883-889, 2014

（16）腎センター外科疾患

腎移植拒絶反応診断としての血漿中核酸解析

中村　有紀

【要約】

腎不全の根治的治療法としての腎移植はひろく臨床で行われるようになってきたが、長期成績改善には急性拒絶反応および慢性移植片障害を早期に検出し、拒絶反応を管理することが課題である。しかし、移植腎に機能障害を認めた場合、拒絶反応性腎機能障害と薬剤性腎障害の鑑別診断は難しく、侵襲の大きい腎生検が唯一の確定診断であった。microRNA（miRNA）は21-25塩基（nt）長の1本鎖RNA分子であり真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与する。ヒトゲノムには1000以上のmiRNAがコードされていると考えられる。miRNAは、細胞の発生、分化、増殖および細胞死などの基本的な生命現象の調節に関わっている。特に哺乳類の場合、2,500種類以上のmiRNAが遺伝子発現の30-90％を制御していることが知られている。これらの知見から、miRNAと生命現象の間には非常に密接な関係が成り立っているといえる。本研究では簡便かつ鋭敏に腎拒絶反応の検出を可能とする新規バイオマーカー探索を目的として、腎移植患者の生着群と拒絶群の血漿に含まれるmRNAおよびmiRNAの網羅的解析を行い、腎拒絶反応の診断の可能性、腎機能の推移について検討する。

【研究計画・方法】

本研究は腎移植患者の腎移植術前に採取した血漿中のmRNAおよびmiRNAの発現プロファイルの網羅的解析により簡便かつ感度の高い腎拒絶反応診断法を確立すること、腎機能を予測することを目的とするものである。

方法；腎移植のレシピエントとドナーから採取した血液検体から血漿を分離し、そのmRNAおよびmiRNAを抽出する。得られたmRNAとmiRNAはDNA microarrayおよびmiRNA arrayを用いて発現プロファイルを解析し、bioinformatics により腎拒絶反応群で有意に上昇または低下している遺伝子群を同定する。また、同時に採取した腎組織の病型と比較することにより、疾患特異性および感度について検討する。

測定方法；東レ株式会社にてNEDO 体液中マイクロRNA測定技術基盤開発事業、3-Gene解析を行った。使用DNAチップはヒトmiRNAチップ（Human miRNA Oligo Chip）を用いた。

対象；2018年3月から2018年9月に施行された生体腎移植14例。レシピエントの移植前、移植後1時間とドナーの移植前の採血検体の血漿を分離してmiRNAの測定を施行した。

解析方法；生体腎移植14例のうち2018年12月までの観察期間においては拒絶反応をきたしたのは1例のみであった。抽出されるmiRNAは2565あった。拒絶反応が1例のみの場合では統計学的に抽出されるmiRNAは同定されるものの拒絶反応を分離する利用価値があるmiRNAであることを示す可能性は乏しい。よって今回の解析では腎機能の推移を移植後1週間の血清クレアチニンと24時間クレアチニンクリアランスに焦点を当て分類することとした。

レシピエントの移植前検体（R-0）レシピエントの移植後1時間後検体（R-1）ドナー術前検体（D）と設定した。

【結果】

1. **図1**

今回の検体の中で

解析A：Rx-0移植前のRecipient miRNAのみで解析

解析B：Rx-1移植1時間後のRecipient miRNAのみで解析

解析C：Donner miRNAのみで解析

A: Rx-0 移植前のRecipient miRNAのみで解析

B: Rx-1 移植１時間後の Recipient miRNAのみで解析

C: Donner miRNAのみで解析

D: (Rx-1)-(Rx-0)の差のみで解析

E: (Rx-0)-(D)の差にみで解析

miRNA=2565
10: A~Eの各グループ内で欠損値があるmiRNAは除去
20: A~Eの各グループ内で欠損値およびmiRNA6000以降を除去
30: Rx-0, Rx-1, D　すべてのデータで欠損値　およびmiRNA6000以降を除去

2: Cr<1.2　　Yes=1 No=0
3: Ccr>70　　Yes=1 No=0
4: Cr<1.2 Ccr>70 を　　Group3
Cr>=1.2 Ccr<70 を　　Group1
それ以外を　　Group2

Ex. A13の解析は　Rx-1で　A~Eの各クループ内の欠損値を除去し、: Ccr>70 Yes=1 No=0
として解析した。

図 1

解析D:（Rx-1）-（Rx-0）の差のみで解析
解析E:（Rx-0）-（D）の差にみで解析
miRNA=2565
AからEのグループにそれぞれについて
10: 十の位が1；A ～ Eの各グループ内で欠損値があるmiRNAは除去
20: 十の位が2；A ～ Eの各グループ内で欠損値およびmiRNA6000以降を除去
30: 十の位が3；Rx-0, Rx-1, D　すべてのデータで欠損値　およびmiRNA6000以降を除去
2: 一の位が2；Cr<1.2　Yes=1 No=0
3: 一の位が3；Ccr>70　Yes=1 No=0
4: 一の位が4；Cr>=1.2 Ccr<70 をGroup1
Cr<1.2 Ccr>70 をGroup3
それ以外をGroup2として解析した。
Ex. A13の解析はRx-1でA ～ Eの各クループ内の欠損値を除去し、: Ccr>70 Yes=1 No=0として解析した。
（統計方法）
統計ソフトR version3.2.1。Stepwise discriminant analysisとCanonical discriminant analysisにて解析を行った。

2. **図2**

A1: Rx_0の解析において
A12解析: 血清クレアチニン
レシピエントの移植前血漿検体のうち腎機能血清クレアチニンを良化させるmiRNAはhas-miR-1470, has-miR-193a-5p, has-miR-4313, has-miR-519c-5p, has-miR-1193が湧出された。腎機能血清クレアチニンを悪化させるのはhas-miR6757-5p, has-miR4444, has-miR638, has-miR423-5pが抽出された。
A13解析: 24時間クレアチニンクリアランス
レシピエントの移植前血漿検体のうちクレアチニンクリアランスを良化させるのはhas-miR-5189-5p, has-miR-637, has-miR-4710, has-miR-7975であった。
レシピエントの移植前血漿検体のうちクレアチニンクリアランスを悪化させるのは、has-miR-4286、has-miR-4278、has-miR-6806-5p, has-miR-6777-5p, has-miR-4728-3pが抽出された。

A1: Rx_0の解析　　Rx_0での欠損値除去

Cr

A12　100%

Truth	Prediction 0	Prediction 1	total
0	4	0	4
1	0	7	7
total	4	7	11

Ccr

A13　100%

Truth	Prediction 0	Prediction 1	total
0	5	0	5
1	0	6	6
total	5	6	11

Cr + Ccr

A14　100%

Truth	Prediction 1	Prediction 2	Prediction 3	total
1	3	0	0	3
2	0	3	0	3
3	0	0	5	5
total	3	3	5	11

A12		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-1470	MIMAT0007348	5.68E+12	2.86E+12
hsa-miR-6757-5p	MIMAT0027414	-6.81E+12	-3.33E+12
hsa-miR-193a-5p	MIMAT0004614	4.32E+12	1.69E+12
hsa-miR-4313	MIMAT0016865	1.98E+12	6.06E+11
hsa-miR-519c-5p, hs	MIMAT0002831,	1.19E+12	7.88E+11
hsa-miR-4444	MIMAT0018962	-1.65E+12	-8.31E+11
hsa-miR-1193	MIMAT0015049	1.28E+12	5.83E+11
hsa-miR-638	MIMAT0003308	-9.68E+10	-8.65E+10
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	-1.42E+09	-1.04E+09
	定数項	-1.90E+13	

A13		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-5189-5p	MIMAT0021120	8.26E+14	5.34E+14
hsa-miR-4286	MIMAT0016916	-9.74E+14	-5.06E+14
hsa-miR-637	MIMAT0003307	5.94E+14	4.78E+14
hsa-miR-4710	MIMAT0019815	3.61E+14	2.31E+14
hsa-miR-4278	MIMAT0016910	-1.74E+14	-1.23E+14
hsa-miR-6806-5p	MIMAT0027512	-5.29E+13	-4.11E+13
hsa-miR-6777-5p	MIMAT0027454	-1.81E+13	-1.07E+13
hsa-miR-7975	MIMAT0031178	2.20E+12	2.28E+12
hsa-miR-4728-3p	MIMAT0019850	-7.26E+10	-6.07E+10
	定数項	-2.35E+15	

A14		LD1	LD2
hsa-miR-4688	MIMAT0019777	-2.62E+03	-1.88E+00
hsa-miR-4747-5p	MIMAT0019882	-8.55E+01	-7.84E-01
hsa-miR-4769-5p	MIMAT0019922	-1.74E+01	-1.74E-01
hsa-miR-6750-5p	MIMAT0027400	-2.97E+02	1.23E+01
hsa-miR-6753-5p	MIMAT0027406	3.12E+03	-2.62E+01
hsa-miR-6793-5p	MIMAT0027486	-4.69E+02	5.58E+00
hsa-miR-6806-5p	MIMAT0027512	-4.72E+02	1.51E+01

Case	LD1	LD2
1	601.5025	6.449583
2	603.0709	7.534125
4	194.4897	-14.122644
5	-1199.7694	2.634317
6	601.7376	7.488191
8	604.3817	6.622725
9	602.4324	4.223126
10	195.406	-13.869716
12	-1198.1303	3.022949
13	194.9691	-13.774665
14	-1200.0903	3.79201

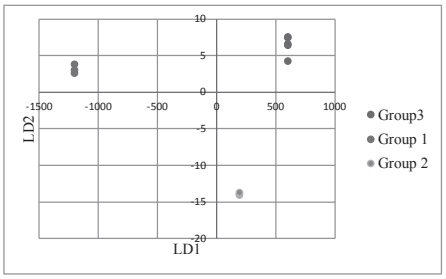


図 2

A2: Rx_0の解析　　Rx_0での欠損値+miRNA6000以降除去

Cr

A22　100%

Truth	Prediction 0	Prediction 1	total
0	4	0	4
1	0	7	7
total	4	7	11

Ccr

A23　100%

Truth	Prediction 0	Prediction 1	total
0	5	0	5
1	0	6	6
total	5	6	11

Cr + Ccr

A24　100%

Truth	Prediction 1	Prediction 2	Prediction 3	total
1	3	0	0	3
2	0	3	0	3
3	0	0	5	5
total	3	3	5	11

A22		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-1470	MIMAT0007348	5.68E+12	2.86E+12
hsa-miR-6757-5p	MIMAT0027414	-6.81E+12	-3.33E+12
hsa-miR-193a-5p	MIMAT0004614	4.32E+12	1.69E+12
hsa-miR-4313	MIMAT0016865	1.98E+12	6.06E+11
hsa-miR-519c-5p, hs	MIMAT0002831,	1.19E+12	7.88E+11
hsa-miR-4444	MIMAT0018962	-1.65E+12	-8.31E+11
hsa-miR-1193	MIMAT0015049	1.28E+12	5.83E+11
hsa-miR-638	MIMAT0003308	-9.68E+10	-8.65E+10
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	-1.42E+09	-1.04E+09
	定数項	-1.90E+13	

A23		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-5189-5p	MIMAT0021120	8.26E+14	5.34E+14
hsa-miR-4286	MIMAT0016916	-9.74E+14	-5.06E+14
hsa-miR-637	MIMAT0003307	5.94E+14	4.78E+14
hsa-miR-4710	MIMAT0019815	3.61E+14	2.31E+14
hsa-miR-4278	MIMAT0016910	-1.74E+14	-1.23E+14
hsa-miR-6806-5p	MIMAT0027512	-5.29E+13	-4.11E+13
hsa-miR-6777-5p	MIMAT0027454	-1.81E+13	-1.07E+13
hsa-miR-7975	MIMAT0031178	2.20E+12	2.28E+12
hsa-miR-4728-3p	MIMAT0019850	-7.26E+10	-6.07E+10
	定数項	-2.35E+15	

A24		LD1	LD2
hsa-miR-4688	MIMAT0019777	-2.62E+03	-1.88E+00
hsa-miR-4747-5p	MIMAT0019882	-8.55E+01	-7.84E-01
hsa-miR-4769-5p	MIMAT0019922	-1.74E+01	-1.74E-01
hsa-miR-6750-5p	MIMAT0027400	-2.97E+02	1.23E+01
hsa-miR-6753-5p	MIMAT0027406	3.12E+03	-2.62E+01
hsa-miR-6793-5p	MIMAT0027486	-4.69E+02	5.58E+00
hsa-miR-6806-5p	MIMAT0027512	-4.72E+02	1.51E+01

Case	LD1	LD2
1	601.5025	6.449583
2	603.0709	7.534125
4	194.4897	-14.122644
5	-1199.7694	2.634317
6	601.7376	7.488191
8	604.3817	6.622725
9	602.4324	4.223126
10	195.406	-13.869716
12	-1198.1303	3.022949
13	194.9691	-13.774665
14	-1200.0903	3.79201

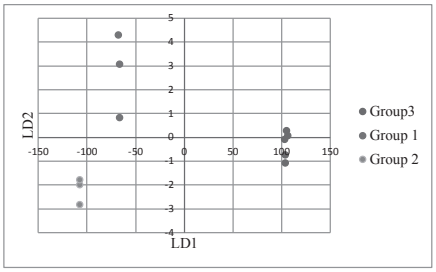


図 3

A14解析: クレアチニンとクレアチニンクリアランス

症例1、2、6、8、9は腎機能クレアチニンとクレアチニンクリアランスが良好なgroup1に相当する。腎機能を良化する因子はhas-miR-6753-5pが抽出された。

症例5、12、14は腎機能が悪化、has-miR-4688,4747-5p, has-miR-4769-5p, has-miR-6750-5p, has-miR-6793-5p, has-miR-6806-5pは悪化因子となる。

3. **図3**

A2: Rx_0の解析（Rx_0での欠損値除去+miRNA6000以降除去）

A22: 血清クレアチニンに及ぼす影響因子

has-miR-1470、has-miR-193a-5P、has-miR-4313、has-miR-519c-5P、has-miR-1193が正の影響であった。一方、has-miR-6757-5p, has-miR-4444, has-miR-638, has-miR-423-5pは負の影響であった。

A23: クレアチニンクリアランスへの影響

has-miR-5189-5p, has-miR-637, has-miR-4710, has-miR-7975は正の影響であった。一方、has-miR-4286、has-miR-4278、has-miR-6806-5P、has-miR-6777-5P、has-miR-4728-3pは負の影響であった。

A24: クレアチニンとクレアチニンクリアランス

Group1とGroup3との比較においてLD1が正の因子が腎機能の良化へLD2の正の因子が腎機能の悪化に影響する結果となった。

has-miR-6753-5pは腎機能を良化する。has-miR-6750-5pは悪化因子となった。

4. **図4**

A3: Rx_0の解析（全ての欠損値の除去+miRNA6000以降の除去）

A32解析: 血清クレアチニン

レシピエントの移植前血漿検体のうち腎機能血清クレアチニンを良化させるmiRNAはhas-miR-532-3p, has-miR-4539, has-

A3: Rx_0の解析　　すべての欠損値+miRNA6000以降除去

Cr

A32		Prediction 0	Prediction 1	total
Truth	0	4	0	4
	1	0	7	7
	total	4	7	11

100%

Ccr

A33		Prediction 0	Prediction 1	total
Truth	0	5	0	5
	1	0	6	6
	total	5	6	11

100%

Cr + Ccr

A34		Prediction 1	Prediction 2	Prediction 3	total
Truth	1	3	0	0	3
	2	0	3	0	3
	3	0	0	5	5
	total	3	3	5	11

100%

A32		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	1.13E+11	8.99E+10
hsa-miR-4478	MIMAT0019006	-6.86E+10	-5.59E+10
hsa-miR-4539	MIMAT0019082	1.36E+11	9.53E+10
hsa-miR-874-5p	MIMAT0026718	-5.80E+10	-4.29E+10
hsa-miR-4486	MIMAT0019020	-6.40E+10	-3.68E+10
hsa-miR-1224-5p	MIMAT0005458	-1.74E+10	-1.13E+10
hsa-miR-1207-5p	MIMAT0005871	3.48E+09	2.44E+09
hsa-miR-1306-5p	MIMAT0022726	-1.01E+09	-1.08E+09
hsa-miR-3194-5p	MIMAT0015078	3.46E+08	2.66E+08
	定数項	-1.63E+11	

A33		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-5189-5p	MIMAT0021120	5.62E+14	4.15E+14
hsa-miR-4286	MIMAT0016916	-4.03E+14	-2.36E+14
hsa-miR-92b-5p	MIMAT0004792	1.16E+14	1.02E+14
hsa-miR-4701-5p	MIMAT0019798	7.04E+13	7.03E+13
hsa-miR-625-3p	MIMAT0004808	-2.47E+13	-2.71E+13
hsa-miR-4736	MIMAT0019862	2.70E+13	2.45E+13
hsa-miR-4722-5p	MIMAT0019836	-1.47E+13	-8.98E+12
hsa-miR-3150b-5p	MIMAT0019226	-1.49E+12	-1.24E+12
hsa-miR-328-5p	MIMAT0026486	3.34E+10	3.02E+10
	定数項	-1.69E+15	

A34		LD1	LD2
hsa-miR-3153	MIMAT0015026	1851.3668	6.675027
hsa-miR-3177-5p	MIMAT0019215	1911.6598	14.012799
hsa-miR-3925-5p	MIMAT0018200	3928.9491	-2.830316
hsa-miR-4463	MIMAT0018987	100.9647	-4.22391
hsa-miR-4498	MIMAT0019033	4772.1863	3.849609
hsa-miR-4665-5p	MIMAT0019739	-318.9979	3.00208
hsa-miR-4688	MIMAT0019777	-13327.66	-9.561765

Case	LD1	LD2
1	5251.553	-0.8237398
2	5250.739	0.4386491
4	-4164.062	-6.8846232
5	-4586.985	5.7670815
6	5250.136	-1.5607208
8	5249.282	1.5914399
9	5251.436	1.1928148
10	-4165.243	-6.357012
12	-4584.737	6.8931433
13	-4164.948	-6.3237219
14	-4587.171	6.0666891

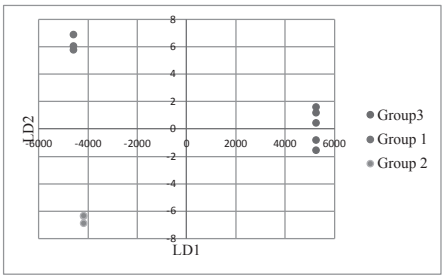


図 4

miR-1207, has-miR-3194が抽出された。腎機能血清クレアチニンを悪化させるのはhas-miR-4478,has-miR-874-5p, has-miR-4486, has-miR-1306-5pが抽出された。

A33解析: 24時間クレアチニンクリアランス

レシピエントの移植前血漿検体のうちクレアチニンクリアランスを良化させるのはhas-miR-5189-5p, has-miR-92b-5p, has-miR-4701-5p, has-miR-4736, has-miR-328-5pであった。レシピエントの移植前血漿検体のうちクレアチニンクリアランスを悪化させるのは、has-miR-4286、has-miR-625-3p、has-miR-4722-5p, has-miR-3150b-5p, has-miR-4728-3pが抽出された。

A34解析: クレアチニンとクレアチニンクリアランス

症例1、2、6、8、9は腎機能クレアチニンとクレアチニンクリアランスが良好なgroup1に相当する。腎機能を良化する因子はhas-miR-3153, has-miR-3177-5p, has-miR-3925-5p, has-miR-4463, has-miR-4498が抽出された。has-miR-3925-5p, has-miR-4498は3000以上の係数となる。

症例5、12、14は腎機能が悪化、has-miR-4655-5p, has-miR-4688は悪化因子となる。has-miR-4688は-13327.66の係数であり優位に腎機能悪化を悪影響する。

5. **図5**

B1: Rx_1の解析　Rx_1での欠損値除去

B12解析: 血清クレアチニン

レシピエントの移植前血漿検体のうち腎機能血清クレアチニンを良化させるmiRNAはhas-miR-124-3p, has-miR-3682-3p, has-miR-4730が抽出された。腎機能血清クレアチニンを悪化させるのはhas-miR-1246,has-miR-1236-3p, has-miR-451a, has-miR-4496, has-miR-3621, has-miR4278が抽出された。

B1: Rx_1の解析　　Rx_1での欠損値除去

Cr

100%

B12		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	4	0	4
	1	0	7	7
	total	4	7	11

Ccr

100%

B13		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	5	0	5
	1	0	6	6
	total	5	6	11

Cr + Ccr

100%

B14		Prediction			
		1	2	3	total
Truth	1	3	0	0	3
	2	0	3	0	3
	3	0	0	5	5
	total	3	3	5	11

B12		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-124-3p	MIMAT0000422	2.90E+12	1.11E+12
hsa-miR-1246	MIMAT0005898	-7.99E+11	-9.31E+11
hsa-miR-3682-3p	MIMAT0018110	6.43E+11	5.20E+11
hsa-miR-1236-3p	MIMAT0005591	-1.75E+11	-1.33E+11
hsa-miR-451a	MIMAT0001631	-6.61E+10	-9.81E+10
hsa-miR-4496	MIMAT0019031	-2.02E+11	-1.07E+11
hsa-miR-3621	MIMAT0018002	-3.30E+10	-3.13E+10
hsa-miR-4730	MIMAT0019852	9.38E+09	1.14E+10
hsa-miR-4278	MIMAT0016910	-9.82E+08	-4.88E+08
	定数項	-1.08E+13	

B13		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-4700-5p	MIMAT0019796	3.75E+13	3.32E+13
hsa-miR-3132	MIMAT0014997	-4.76E+13	-3.46E+13
hsa-miR-1910-3p	MIMAT0026917	3.79E+13	2.92E+13
hsa-miR-6859-5p	MIMAT0027618	-2.21E+13	-1.94E+13
hsa-miR-3682-3p	MIMAT0018110	9.95E+12	8.05E+12
hsa-miR-6846-3p	MIMAT0027593	3.91E+12	3.50E+12
hsa-miR-1237-3p	MIMAT0005592	-2.27E+12	-1.53E+12
hsa-miR-6793-5p	MIMAT0027486	1.69E+11	9.19E+10
hsa-miR-1203	MIMAT0005866	-2.56E+09	-2.64E+09
	定数項	-5.67E+13	

B14		LD1	LD2
hsa-miR-3138	MIMAT0015006	-379.59493	2.379954
hsa-miR-3160-5p	MIMAT0019212	362.77997	4.613234
hsa-miR-3202	MIMAT0015089	2720.33692	-20.26647
hsa-miR-4419a	MIMAT0018931	-3455.3431	3.770984
hsa-miR-4428	MIMAT0018943	-72.56107	-3.073188
hsa-miR-4800-5p	MIMAT0019978	310.55769	-3.220377
hsa-miR-6878-5p	MIMAT0027656	-382.23369	7.605805

Case	LD1	LD2
1	48.70118	6.36606
2	48.99597	5.067599
4	1533.19995	-3.480637
5	-1612.7051	-3.460069
6	48.68241	4.541044
8	47.6614	5.304804
9	50.52964	3.627114
10	1530.81092	-5.151151
12	-1613.8857	-5.191975
13	1531.65563	-4.531637
14	-1613.6465	-3.091151

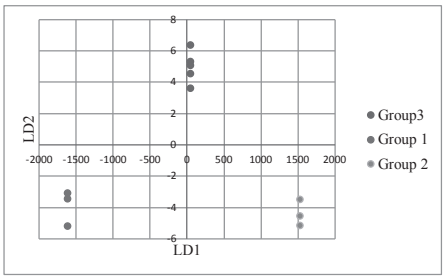


図 5

B13解析: 24時間クレアチニンクリアランス

レシピエントの移植前血漿検体のうちクレアチニンクリアランスを良化させるのはhas-miR-4700-5p, has-miR-1910-3p, has-miR-3682-3p, has-miR-4730であった。

レシピエントの移植前血漿検体のうちクレアチニンクリアランスを悪化させるのは、has-miR-3132、has-miR-6859-5p、has-miR-1237-3p, has-miR-1203が抽出された。

B14解析: クレアチニンとクレアチニンクリアランス

症例1、2、6、8、9は腎機能クレアチニンとクレアチニンクリアランスが良好なgroup1に相当する。LD2が腎機能の良悪の因子になるとすると、LD2を正に影響する因子はhas-miR-3138, has-miR-3160-5p, has-miR-4419a, has-miR-6878-5pが抽出された。Group2症例4、10、13、Group3症例5、12、14、は腎機能が悪化、has-miR-3202, has-miR-4428, has-miR-4800-5pは悪化因子となる。

6. **図6**

B2: Rx_0の解析: Rx_1での欠損値除去+miRNA6000以降除去

B22解析: B12の解析結果と同様に、血清クレアチニン

レシピエントの移植前血漿検体のうち腎機能血清クレアチニンを良化させるmiRNAはhas-miR-124-3p, has-miR-3682-3p, has-miR-4730が抽出された。腎機能血清クレアチニンを悪化させるのはhas-miR-1246,has-miR-1236-3p, has-miR-451a, has-miR-4496, has-miR-3621, has-miR4278が抽出された。

B23解析: 24時間クレアチニンクリアランス

レシピエントの移植前血漿検体のうちクレアチニンクリアランスを良化させるのはhas-miR-4700-5p, has-miR-1910-3p, has-miR-

B2: Rx_0の解析　　Rx_1での欠損値+miRNA6000以降除去

Cr

B22		Prediction 0	Prediction 1	total
Truth	0	4	0	4
	1	0	7	7
	total	4	7	11

100%

Ccr

B23		Prediction 0	Prediction 1	total
Truth	0	5	0	5
	1	0	6	6
	total	5	6	11

100%

Cr + Ccr

B24		Prediction 1	Prediction 2	Prediction 3	total
Truth	1	3	0	0	3
	2	0	3	0	3
	3	0	0	5	5
	total	3	3	5	11

100%

B22		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-124-3p	MIMAT0000422	2.90E+12	1.11E+12
hsa-miR-1246	MIMAT0005898	-7.99E+11	-9.31E+11
hsa-miR-3682-3p	MIMAT0018110	6.43E+11	5.20E+11
hsa-miR-1236-3p	MIMAT0005591	-1.75E+11	-1.33E+11
hsa-miR-451a	MIMAT0001631	-6.61E+10	-9.81E+10
hsa-miR-4496	MIMAT0019031	-2.02E+11	-1.07E+11
hsa-miR-3621	MIMAT0018002	-3.30E+10	-3.13E+10
hsa-miR-4730	MIMAT0019852	9.38E+09	1.14E+10
hsa-miR-4278	MIMAT0016910	-9.82E+08	-4.88E+08
		定数項	-1.08E+13

B23		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-4700-5p	MIMAT0019796	3.35E+11	2.96E+11
hsa-miR-3132	MIMAT0014997	-3.84E+11	-2.78E+11
hsa-miR-1910-3p	MIMAT0026917	3.96E+11	3.05E+11
hsa-miR-5708	MIMAT0022502	-2.13E+11	-1.72E+11
hsa-miR-4655-3p	MIMAT0019722	4.08E+10	3.65E+10
hsa-miR-29b-3p	MIMAT0000100	-2.53E+10	-2.28E+10
hsa-miR-184	MIMAT0000454	6.04E+10	2.51E+10
hsa-miR-5787	MIMAT0023252	2.68E+09	2.62E+09
hsa-miR-874-5p	MIMAT0026718	9.38E+08	5.37E+08
		定数項	-9.97E+11

B24		LD1	LD2
hsa-miR-211-3p	MIMAT0022694	2.0595873	-2.8776396
hsa-miR-3138	MIMAT0015006	-6.347392	1.3283483
hsa-miR-3160-5p	MIMAT0019212	10.9296199	2.162262
hsa-miR-3202	MIMAT0015089	37.7109263	-7.4313286
hsa-miR-4419a	MIMAT0018931	-66.759059	2.2363757
hsa-miR-4726-5p	MIMAT0019845	-1.1025065	1.7428048
hsa-miR-4740-5p	MIMAT0019869	-0.8228204	0.7473117

Case	LD1	LD2
1	5.602326	2.5514514
2	4.159094	2.3758555
4	28.6816	-3.7086009
5	-34.28529	-1.5289677
6	3.845321	1.0684976
8	4.537571	3.289007
9	3.59465	2.4597617
10	26.016606	-1.3696009
12	-35.791882	-2.5670652
13	27.572565	-2.3017374
14	-33.932562	-0.2686009

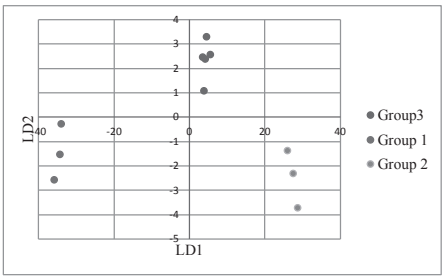


図 6

B3: Rx_1の解析　　すべての欠損値+miRNA6000以降除去

Cr

100%

B32		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	4	0	4
	1	0	7	7
	total	4	7	11

Ccr

100%

B33		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	5	0	5
	1	0	6	6
	total	5	6	11

Cr + Ccr

100%

B34		Prediction			
		1	2	3	total
Truth	1	3	0	0	3
	2	0	3	0	3
	3	0	0	5	5
	total	3	3	5	11

B32		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-124-3p	MIMAT0000422	78.104	29.883
hsa-miR-4732-5p	MIMAT0019855	-55.995	-39.456
hsa-miR-4284	MIMAT0016915	24.834	28.896
	定数項	-233.225	

B33		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-4736	MIMAT0019862	28.318	18.518
hsa-miR-4655-5p	MIMAT0019721	-19.982	-13.818
	定数項	16.789	

B34		LD1	LD2
hsa-miR-3160-5p	MIMAT0019212	5.034077	1.0192958
hsa-miR-4419a	MIMAT0018931	-16.366249	0.3035336
hsa-miR-518c-5p	MIMAT0002847	4.372639	-1.9132759

Case	LD1	LD2
1	3.093506	-1.2473793
2	3.029355	1.5931688
4	7.263415	-0.8411538
5	-10.289986	0.9242525
6	1.982347	0.3275398
8	2.058793	1.3847806
9	3.124673	-0.3919513
10	6.276526	-0.182923
12	-12.172603	-1.0890898
13	5.005791	-0.29243
14	-9.371817	-0.1848146

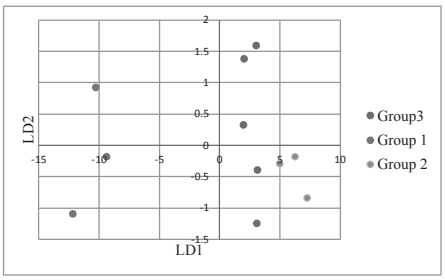


図 7

C1: Dの解析　　Dでの欠損値除去

Cr

100%

C12		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	4	0	4
	1	0	7	7
	total	4	7	11

Ccr

100%

C13		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	5	0	5
	1	0	6	6
	total	5	6	11

Cr + Ccr

91%

C14		Prediction			
		1	2	3	total
Truth	1	3	0	0	3
	2	1	2	0	3
	3	0	0	5	5
	total	4	2	5	11

C12		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-1227-3p	MIMAT0005580	-57352800	-30180098
hsa-miR-6856-5p	MIMAT0027612	58741616	43533892
hsa-miR-1306-5p	MIMAT0022726	-53547428	-42985552
hsa-miR-6727-3p	MIMAT0027356	32156140	19950990
hsa-miR-4260	MIMAT0016881	-10562001	-6907172
hsa-miR-320a	MIMAT0000510	5305928	3682941
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	1592946	1062037
hsa-miR-7847-3p	MIMAT0030422	-852657	-343503
	定数項	34761698	

C13		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-4313	MIMAT0016865	-4.38E+13	-1.44E+13
hsa-miR-370-3p	MIMAT0000722	3.31E+13	1.30E+13
hsa-miR-2116-3p	MIMAT0011161	-1.32E+13	-6.67E+12
hsa-miR-671-5p	MIMAT0003880	5.92E+12	3.10E+12
hsa-miR-1228-3p	MIMAT0005583	-2.75E+12	-1.57E+12
hsa-miR-6846-5p	MIMAT0027592	-9.25E+11	-4.46E+11
hsa-miR-1227-3p	MIMAT0005580	1.61E+11	8.50E+10
hsa-miR-1908-5p	MIMAT0007881	-8.74E+10	-6.67E+10
hsa-miR-7108-5p	MIMAT0028113	6.88E+09	4.27E+09
	定数項	3.45E+13	

C14		LD1	LD2
hsa-miR-3907	MIMAT0018179	-1.106301	-0.2766373
hsa-miR-4455	MIMAT0018977	-2.876475	-0.9345263
hsa-miR-4750-3p	MIMAT0022979	12.396655	-0.5187908

Case	LD1	LD2
1	5.270399	0.22632848
2	4.966244	-0.4578554
4	-1.96499	0.07232117
5	-5.966786	0.2481382
6	5.539674	1.82274485
8	3.769939	-1.487048
9	4.232929	0.17970692
10	-4.121117	0.29902121
12	-4.336012	-0.4247814
13	-1.42825	-1.2511962
14	-5.96222	0.80859015

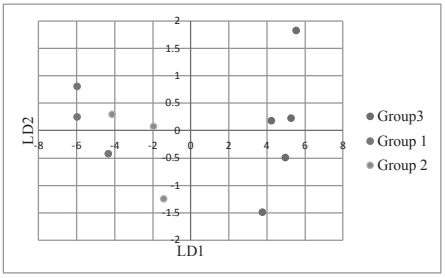


図 8

4655-3p, has-miR-184, has-miR-5787p, has-miR-874-5pであった。

レシピエントの移植前血漿検体のうちクレアチニンクリアランスを悪化させるのは、has-miR-3132, has-miR-6859-5p, has-miR-1237-3p, has-miR-1203が抽出された。

B24解析: クレアチニンとクレアチニンクリアランス

症例1、2、6、8、9は腎機能クレアチニンとクレアチニンクリアランスが良好なgroup1に相当する。LD2が腎機能の良悪の因子になるとすると、LD2を正に影響する因子はhas-miR-3138, has-miR-3160-5p, has-miR-4419a, has-miR-6878-5pが抽出された。Group2症例4、10、13、Group3症例5、12、14、は腎機能が悪化、has-miR-211-3p, has-miR-3202, has-miR-4740-5pは悪化因子となる。

7. **図7**

B3: Rx_1の解析: すべての欠損値除去+miRNA6000以降除去

B32解析: 血清クレアチニン

レシピエントの移植前血漿検体のうち腎機能血清クレアチニンを良化させるmiRNAはhas-miR-124-3p, has-miR-4284が抽出された。腎機能血清クレアチニンを悪化させるのはhas-miR-4732-5pが抽出された。

B33解析: 24時間クレアチニンクリアランス

レシピエントの移植前血漿検体のうちクレアチニンクリアランスを良化させるのはhas-miR-4736であった。

レシピエントの移植前血漿検体のうちクレアチニンクリアランスを悪化させるのは、has-miR-4655-5pが抽出された。

B34解析: クレアチニンとクレアチニンクリアランス

症例1、2、6、8、9は腎機能クレアチニンとクレアチニンクリアランスが良好なgroup1に相当する。LD1が腎機能の良悪の因子になるとすると、LD1を正に影響する因子はhas-miR-3160-5p, has-miR-518c-5pが抽出された。has-miR-518c-5pは悪化因子となる。

8. **図8**

C1: Dの解析: Dでの欠損値除去

C12解析:

ドナー因子が血清クレアチニン値に影響をおよぼすのは、has-miR-6856-5p, has-miR-6727-3p, has-miR-320a, has-miR-671-3pであった。負の因子はhas-miR-1277-3p, has-miR-1306-5p, has-miR-4260, has-miR-7847-3pであった。

C13解析:

ドナーの因子がクレアチニンクリアランスに影響を及ぼすのは正の影響はhas-miR-370-3p, has-miR-671-5p, has-miR-1227-3p, has-miR-7108-5pであった。

負の影響はhas-miR-4313, has-miR-2116, has-miR-1228-3p, has-miR-6846-5p, has-miR-1908-5pであった。

C14解析: クレアチニンとクレアチニンクリアランス

Group1は腎機能良好群でありLD1の因子の中でhas-miR-4750-3pは正の影響、has-miR-3907, has-miR-4455は負の影響を及ぼしていた。

9. **図9**

C2: Dの解析: Dでの欠損値+miRNA6000以降除去

C22解析:

ドナー因子が血清クレアチニン値に影響をおよぼすのは、has-miR-505-5p, has-miR-654-3p, has-miR-339a-5p, has-miR-4496であった。負の因子はhas-miR-1277-3p、has-miR-451a、has-miR-663b、has-miR-4455, has-miR-3156-5pであった。

C23解析:

ドナー因子がクレアチニンに及ぼす影響は、正の影響has-miR-370-3p, has-miR-671-5p, has-miR-4327, has-miR-339-5pあった。負の影響はhas-miR-4313, has-miR-2116-3p, has-miR-1228-3p, has-miR-4751, has-miR-3622a-5pであった。

C24解析: クレアチニンとクレアチニンクリア

C2: Dの解析　　Dでの欠損値+miRNA6000以降除去

Cr

100%

C22		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	4	0	4
	1	0	7	7
	total	4	7	11

Ccr

100%

C23		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	5	0	5
	1	0	6	6
	total	5	6	11

Cr + Ccr

91%

C24		Prediction			
		1	2	3	total
Truth	1	3	0	0	3
	2	1	2	0	3
	3	0	0	5	5
	total	4	2	5	11

C22		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-1227-3p	MIMAT0005580	-5.85E+12	-3.08E+12
hsa-miR-505-5p	MIMAT0004776	2.25E+12	1.90E+12
hsa-miR-451a	MIMAT0001631	-6.66E+11	-1.46E+12
hsa-miR-654-5p	MIMAT0003330	2.46E+12	1.26E+12
hsa-miR-663b	MIMAT0005867	-8.42E+11	-7.75E+11
hsa-miR-339-5p	MIMAT0000764	3.25E+11	1.57E+11
hsa-miR-4455	MIMAT0018977	-4.37E+10	-3.43E+10
hsa-miR-4496	MIMAT0019031	6.93E+10	3.16E+10
hsa-miR-3156-5p	MIMAT0015030	-3.28E+09	-1.69E+09
	定数項	1.04E+13	

C23		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-4313	MIMAT0016865	-3.97E+14	-1.30E+14
hsa-miR-370-3p	MIMAT0000722	3.00E+14	1.18E+14
hsa-miR-2116-3p	MIMAT0011161	-1.23E+14	-6.24E+13
hsa-miR-671-5p	MIMAT0003880	5.72E+13	2.99E+13
hsa-miR-1228-3p	MIMAT0005583	-2.69E+13	-1.53E+13
hsa-miR-4751	MIMAT0019888	-6.76E+12	-3.18E+12
hsa-miR-3622a-5p	MIMAT0018003	-1.97E+12	-9.33E+11
hsa-miR-4327	MIMAT0016889	8.29E+11	5.30E+11
hsa-miR-339-5p	MIMAT0000764	4.82E+10	2.33E+10
	定数項	3.07E+14	

C24		LD1	LD2
hsa-miR-3907	MIMAT0018179	-1.105301	-0.2796373
hsa-miR-4455	MIMAT0018977	-2.875475	-0.9346263
hsa-miR-4750-3p	MIMAT0022979	12.396665	-0.5187968

Case	LD1	LD2
1	5.270399	0.22632648
2	4.956244	-0.4878554
4	-1.96499	0.07232117
5	-5.996786	0.2481382
6	5.539874	1.82274485
8	3.769939	-1.487048
9	4.232929	0.17970692
10	-4.121117	0.29302121
12	-4.336012	-0.4247614
13	-1.42826	-1.2511662
14	-5.96222	0.60659015

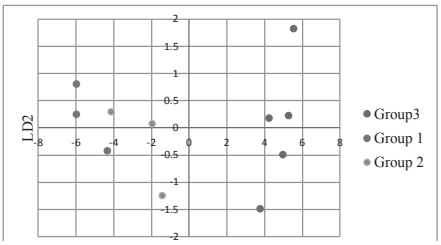


図 9

C3: D1の解析　　すべての欠損値+miRNA6000以降除去

Cr

100%

C32		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	4	0	4
	1	0	7	7
	total	4	7	11

Ccr

100%

C33		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	5	0	5
	1	0	6	6
	total	5	6	11

Cr + Ccr

100%

C34		Prediction			
		1	2	3	total
Truth	1	3	0	0	3
	2	0	3	0	3
	3	0	0	5	5
	total	3	3	5	11

C32		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-1227-3p	MIMAT0005580	-4.79E+14	-2.52E+14
hsa-miR-505-5p	MIMAT0004776	1.62E+14	1.37E+14
hsa-miR-4685-5p	MIMAT0019771	-3.18E+14	-1.98E+14
hsa-miR-4489	MIMAT0019023	2.24E+14	1.16E+14
hsa-miR-4758-3p	MIMAT0019904	2.25E+14	1.28E+14
hsa-miR-1254	MIMAT0005905	-1.69E+14	-6.64E+13
hsa-miR-1913	MIMAT0007888	-9.42E+12	-5.27E+12
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	-2.36E+12	-1.56E+12
hsa-miR-625-3p	MIMAT0004808	-5.23E+10	-2.09E+10
	定数項	1.32E+15	

C33		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-4313	MIMAT0016865	-1061.129	-348.175
hsa-miR-370-3p	MIMAT0000722	924.131	363.143
hsa-miR-2116-3p	MIMAT0011161	-260.616	-131.755
hsa-miR-4327	MIMAT0016889	-95.637	-61.191
	定数項	1137.037	

C34		LD1	LD2
hsa-miR-1224-3p	MIMAT0005459	-453.55943	-5.5120496
hsa-miR-1260b	MIMAT0015041	-689.59061	2.5059003
hsa-miR-4687-5p	MIMAT0019774	-3378.0512	3.7536018
hsa-miR-4750-3p	MIMAT0022979	-586.95365	-4.9012243
hsa-miR-525-5p	MIMAT0002838	2596.63112	3.2323674
hsa-miR-593-5p	MIMAT0003261	53.24165	-0.5546707
hsa-miR-940	MIMAT0004983	2148.76975	-1.5572049

Case	LD1	LD2
1	902.44275	-1.7023034
2	900.82838	-0.3931036
4	-1423.8815	-2.8143032
5	-82.03947	3.9296077
6	903.47724	0.1446043
8	902.61501	-2.6477661
9	903.46639	-1.9749802
10	-1423.047	-0.541453
12	-80.29322	3.635796
13	-1422.0361	-1.4645583
14	-81.53253	3.8284598

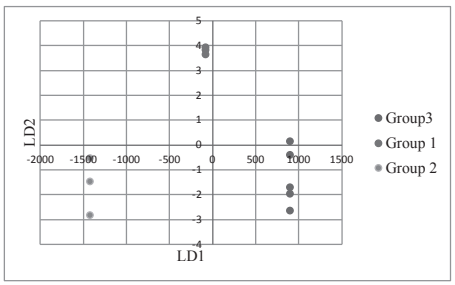


図 10

ランス

Group1は腎機能良好群でありLD1の因子の中でhas-miR-4750-3pは正の影響、has-miR-3907,has-miR-4455は負の影響を及ぼしていた。

10. **図10**

C3: Dの解析: すべての欠損値+miRNA6000以降除去

C32解析:

ドナー因子が血清クレアチニン値に影響をおよぼすのは、has-miR-505-5p, has-miR-505-5p, has-miR-4489, has-miR-4758-3pであった。負の因子はhas-miR-1277-3p,has-miR-4685-5p,has-miR-1254,has-miR-1913, has-miR-423-5p, has-miR-625-3pであった。

C33解析:

ドナー因子がクレアチニンに及ぼす影響は、正の影響has-miR-370-3p, has-miR-4327, 負の影響はhas-miR-4313、has-miR-2116-3pであった。

C34 解析: クレアチニンとクレアチニンクリアランス

抽出されたLD1のhas-miR-525-5p, has-miR-593-5p, has-miR-940は腎機能改善する正の影響を及ぼす可能性がある。

11. **図11**

D1: (Rx_1-Rx_0) の解析: (Rx_1-Rx_0) での欠損値除去

D12解析: レシピエントの1時間－0時間採血の差がクレアチニンに及ぼす因子

hsa-miR-6769b-5p, hsa-miR-873-3p, hsa-miR-668-5p, hsa-miR-7107-5p, hsa-miR-4708-3pが正の影響であった。一方、hsa-miR-3162-3p, hsa-miR- 3619-3p, hsa-miR-4523, hsa-miR-188-5pは負の影響であった。

D13解析: レシピエントの1時間－0時間採血

D1: (Rx_1 – Rx_0)の解析　　(Rx_1 – Rx_0)での欠損値除去

Cr

D12		Prediction 0	Prediction 1	total
Truth	0	4	0	4
	1	0	7	7
	total	4	7	11

100%

Ccr

D13		Prediction 0	Prediction 1	total
Truth	0	5	0	5
	1	0	6	6
	total	5	6	11

100%

Cr + Ccr

D14		Prediction 1	Prediction 2	Prediction 3	total
Truth	1	3	0	0	3
	2	0	3	0	3
	3	0	0	5	5
	total	3	3	5	11

100%

D12		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-3162-3p	MIMAT0019213	-1.34E+15	-7.70E+14
hsa-miR-6769b-5p	MIMAT0027620	1.73E+15	8.35E+14
hsa-miR-3619-3p	MIMAT0019219	-1.02E+15	-4.10E+14
hsa-miR-873-3p	MIMAT0022717	1.13E+14	1.92E+14
hsa-miR-4523	MIMAT0019061	-7.91E+13	-1.10E+14
hsa-miR-668-5p	MIMAT0026636	5.61E+13	2.63E+13
hsa-miR-7107-5p	MIMAT0028111	1.58E+13	8.58E+12
hsa-miR-4708-3p	MIMAT0019810	1.10E+12	7.93E+11
hsa-miR-188-5p	MIMAT0000457	-9.81E+10	-6.41E+10
	定数項	3.01E+14	

D13		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-6786-3p	MIMAT0027473	-386920300	-538307276
hsa-miR-1296-5p	MIMAT0005794	327227095	466089593
hsa-miR-3944-3p	MIMAT0018360	-203499960	-251242892
hsa-miR-25-5p	MIMAT0004498	-205181837	-88837530
hsa-miR-3689d	MIMAT0019008	-120274749	-89037023
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	163797160	95442452
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	-22388352	-14532560
hsa-miR-1268b	MIMAT0018925	-2922959	-1303563
	定数項	553125552	

D14		LD1	LD2
hsa-miR-23b-3p	MIMAT0000418	-1.123427	0.4683748
hsa-miR-4640-3p	MIMAT0019700	-189.61118	-0.1637549
hsa-miR-663b	MIMAT0005867	305.337829	0.4552141
hsa-miR-6766-3p	MIMAT0027433	190.259063	2.0958417
hsa-miR-6796-3p	MIMAT0027493	-113.33373	-0.3809384
hsa-miR-7108-3p	MIMAT0028114	-29.413289	-2.1826824

Case	LD1	LD2
1	4.263306	0.9894395
2	4.012096	0.420615
4	230.050388	-0.858649
5	-236.03424	-2.4257488
6	3.550483	2.4651657
8	3.57008	0.1615134
9	3.926496	0.7523205
10	228.936075	-1.3565498
12	-236.84347	0.221188
13	228.14379	-0.2523701
14	-233.575	-0.1169243

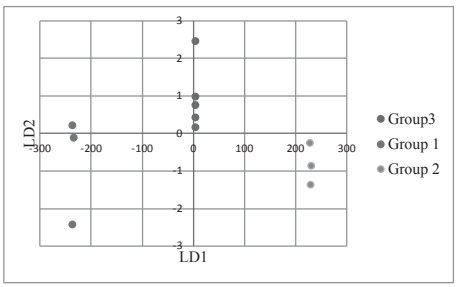


図 11

の差がクレアチニンクリアランスに及ぼす因子

hsa-miR-1296-5p,hsa-miR-532-3pは正の影響であった。

hsa-miR-6786-3p,hsa-miR-3944-3p,hsa-miR-25-5p,hsa-miR-3689-d,hsa-miR-532-3p,hsa-miR-1268b負の影響であった。

D14解析: レシピエントの1時間－0時間採血の差がクレアチニンとクレアチニンクリアランスに及ぼす因子

Group1とGroup3での因子の比較ではLD1、LD2ともに有意なmiRNAは認めない。

12. **図12**

D2:（Rx_1-Rx_0）の解析（Rx_1-Rx_0）での欠損値+miRNA6000以降除去

D22解析: レシピエントの1時間－0時間採血の差がクレアチニンに及ぼす因子

hsa-miR-3150a-3p, hsa-miR-3187-3p, hsa-miR-4286, hsa-miR-4519, hsa-miR-211-3pが正の影響であった。一方、hsa-miR-3162-3p, hsa-miR-195-3p, hsa-miR-2110, hsa-miR-221-3pは負の影響であった。

D23解析: レシピエントの1時間－0時間採血の差がクレアチニンクリアランスに及ぼす因子

hsa-miR-1539, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-1181, hsa-miR-1202, hsa-miR-671-3pは正の影響であった。

hsa-miR-4717-3p,hsa-miR-3622b-3p,hsa-miR-1185-1-3p,hsa-miR-3689-d,hsa-miR-519c-5pは負の影響であった。

D24解析: レシピエントの1時間－0時間採血の差がクレアチニンとクレアチニンクリアランスに及ぼす因子

Group1は正の影響をLD1から受けることになった。

正の影響はhsa-miR-211-3p, hsa-miR-326, hsa-miR-4253 hsa-miR-4640-3pが抽出された。負の影響でGroup1と2とで解読が困

D2: (Rx_1 – Rx_0)の解析　　(Rx_1 – Rx_0での欠損値)+miRNA6000以降除去

Cr

100%

D22		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	4	0	4
	1	0	7	7
	total	4	7	11

Ccr

100%

D23		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	5	0	5
	1	0	6	6
	total	5	6	11

Cr + Ccr

100%

D24		Prediction			
		1	2	3	total
Truth	1	3	0	0	3
	2	0	3	0	3
	3	0	0	5	5
	total	3	3	5	11

D22		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-3162-3p	MIMAT0019213	-2.08E+14	-1.19E+14
hsa-miR-3150a-3p	MIMAT0015023	1.42E+14	6.40E+13
hsa-miR-3187-3p	MIMAT0015069	1.27E+14	7.19E+13
hsa-miR-195-3p	MIMAT0004615	-4.87E+13	-3.32E+13
hsa-miR-2110	MIMAT0010133	-6.46E+13	-3.22E+13
hsa-miR-4286	MIMAT0016916	2.28E+13	1.07E+13
hsa-miR-4519	MIMAT0019056	1.82E+12	3.44E+12
hsa-miR-211-3p	MIMAT0022694	1.64E+12	1.29E+12
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	-5.11E+10	-1.13E+11
	定数項	-2.19E+13	

D23		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-4717-3p	MIMAT0019830	-6.39E+16	-3.33E+16
hsa-miR-3622b-3p	MIMAT0018006	-2.47E+16	-2.04E+16
hsa-miR-1185-1-3p	MIMAT0022838	-2.90E+16	-2.13E+16
hsa-miR-1539	MIMAT0007401	1.56E+16	1.21E+16
hsa-miR-519c-5p, hs	MIMAT0002831, M	-3.22E+15	-3.98E+15
hsa-miR-642a-5p	MIMAT0003312	1.50E+15	2.60E+15
hsa-miR-1181	MIMAT0005826	9.30E+14	7.08E+14
hsa-miR-1202	MIMAT0005965	1.36E+13	1.06E+13
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	2.84E+11	4.39E+11
	定数項	5.19E+16	

D24		LD1	LD2
hsa-miR-185-5p	MIMAT0000455	-0.7415102	1.489389
hsa-miR-211-3p	MIMAT0022694	1.5954912	-2.804755
hsa-miR-326	MIMAT0000756	2.0759227	3.394819
hsa-miR-4253	MIMAT0016882	2.5362453	-2.346181
hsa-miR-4433a-5p	MIMAT0020956	-2.0106676	-18.127599
hsa-miR-4640-3p	MIMAT0019700	0.7472275	5.784952
hsa-miR-5010-5p	MIMAT0021043	-4.0294723	6.706774

Case	LD1	LD2
1	3.33E+00	-1.0794151
2	2.11E+00	0.3499484
4	-1.46E+00	-1.0243821
5	-2.41E+00	0.9294107
6	3.26E+00	0.965855
8	1.98E+00	-0.2322565
9	-7.62E-05	0.2621544
10	-1.41E+00	-1.5477023
12	-1.50E+00	2.9094956
13	-2.05E+00	-1.1417615
14	-1.88E+00	-0.3913446

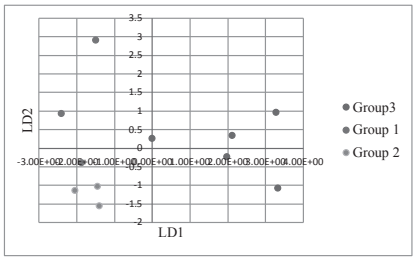


図 12

難であった。

13. **図13**

D3:（Rx_1-Rx_0）の解析: すべての欠損値+miRNA6000以降除去

D32解析: レシピエントの1時間－0時間採血の差がクレアチニンに及ぼす因子

hsa-miR-296-3p, hsa-miR-4313, hsa-miR-4433a-5p,が正の影響であった。一方、hsa-miR-665, hsa-miR-211-3p, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-3907, hsa-miR-181d-3p, hsa-miR-1193は負の影響であった。

D33解析: レシピエントの1時間－0時間採血の差がクレアチニンクリアランスに及ぼす因子

hsa-miR-4294, hsa-miR-4443, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-572, hsa-miR-320-c, hsa-miR-4707-5pは正の影響であった。

hsa-miR-4749-3p, hsa-miR-564は負の影響であった。

D34解析: レシピエントの1時間-0時間採血の差がクレアチニンとクレアチニンクリアランスに及ぼす因子

LD1によりGroup1は正の影響を受けることになった。

正の影響はhsa-miR-320-c, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-4294 hsa-miR-4443が抽出された。

14. **図14**

E1:（Rx_0-D）の解析:（Rx_0 - D）での欠損値除去

E12解析: レシピエントの0時間－ドナーの0時間採血の差がクレアチニンに及ぼす因子

hsa-miR-6511a-5p, hsa-miR-614, hsa-miR-2467-3p, hsa-miR-1273g-3p, hsa-miR-3186-3pが正の影響であった。一方、hsa-miR-4300, hsa-miR-519e-5p, hsa-miR-8073は負の影響であった。

D3: (Rx_1 – Rx_0)の解析　　すべての欠損値+miRNA6000以降除去

Cr

100%

D32		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	4	0	4
	1	0	7	7
	total	4	7	11

Ccr

100%

D33		Prediction		
		0	1	total
Truth	0	5	0	5
	1	0	6	6
	total	5	6	11

Cr + Ccr

100%

D34		Prediction			
		1	2	3	total
Truth	1	3	0	0	3
	2	0	3	0	3
	3	0	0	5	5
	total	3	3	5	11

D32		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-665	MIMAT0004952	-1.70E+11	-1.32E+11
hsa-miR-296-3p	MIMAT0004679	3.96E+11	1.89E+11
hsa-miR-211-3p	MIMAT0022694	-1.05E+11	-8.25E+10
hsa-miR-4313	MIMAT0016865	1.76E+11	1.01E+11
hsa-miR-370-3p	MIMAT0000722	-3.04E+11	-1.11E+11
hsa-miR-4433a-5p	MIMAT0020956	6.89E+10	4.17E+10
hsa-miR-3907	MIMAT0018179	-1.52E+10	-1.41E+10
hsa-miR-181d-3p	MIMAT0026608	-8.45E+09	-3.90E+09
hsa-miR-1193	MIMAT0015049	-3.47E+08	-1.40E+08
	定数項	9.32E+10	

D33		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-4749-3p	MIMAT0019886	-75864989	-32876179
hsa-miR-4294	MIMAT0016849	28834887	24892991
hsa-miR-564	MIMAT0003228	-25438476	-16567691
hsa-miR-4443	MIMAT0018961	8122800	5718509
hsa-miR-328-3p	MIMAT0000752	5641637	3958659
hsa-miR-572	MIMAT0003237	2361650	1020422
hsa-miR-320c	MIMAT0005793	649938	662394
hsa-miR-4707-5p	MIMAT0019807	414474	291932
	定数項	31493907	

D34		LD1	LD2
hsa-miR-320c	MIMAT0005793	9.33489	-3.0789542
hsa-miR-328-3p	MIMAT0000752	-10.747574	-1.9747532
hsa-miR-4294	MIMAT0016849	-19.278925	3.2700347
hsa-miR-4443	MIMAT0018961	-7.296004	0.3410853
hsa-miR-4707-5p	MIMAT0019807	2.357937	-7.0542134
hsa-miR-4749-3p	MIMAT0019886	37.22668	2.5027133
hsa-miR-564	MIMAT0003228	12.341395	5.2711113
hsa-miR-572	MIMAT0003237	2.5096	0.4455558

Case	LD1	LD2
1	9.492915	1.2804729
2	8.699382	0.188888
4	-6.892712	-2.6774783
5	-6.957841	1.8098621
6	10.517232	-1.3061399
8	8.283325	0.6112651
9	6.88999	-0.768692
10	-7.253836	-0.579938
12	-7.330618	2.6113793
13	-7.771748	-2.792367
14	-7.67609	1.6227478

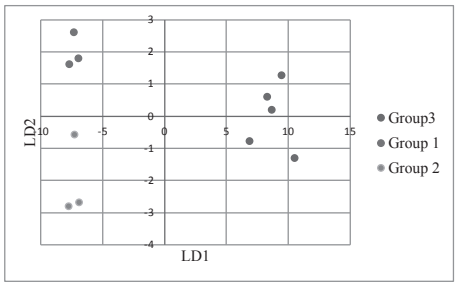


図 13

E1: (Rx_0 – D)の解析　　(Rx_0 – D)での欠損値除去

Cr

E12　100%

Truth	Prediction 0	1	total
0	4	0	4
1	0	7	7
total	4	7	11

Ccr

E13　100%

Truth	Prediction 0	1	total
0	5	0	5
1	0	6	6
total	5	6	11

Cr + Ccr

E14　100%

Truth	Prediction 1	2	3	total
1	3	0	0	3
2	0	3	0	3
3	0	0	5	5
total	3	3	5	11

E12		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-6511a-5p	MIMAT0025478	515846399	210774810
hsa-miR-4300	MIMAT0016853	-160764468	-125727860
hsa-miR-614	MIMAT0003282	100619420	56027975
hsa-miR-519e-5p	MIMAT0002828	-40853952	-37984085
hsa-miR-2467-3p	MIMAT0019953	46728741	40038230
hsa-miR-8073	MIMAT0031000	-22868995	-20527812
hsa-miR-1273g-3p	MIMAT0022742	4148070	4606341
hsa-miR-3186-3p	MIMAT0015068	-562638	-507503
	定数項	-145558665	

E13		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-3616-3p	MIMAT0017996	2786730848	2515382152
hsa-miR-4665-5p	MIMAT0019739	-1687021614	-1304444893
hsa-miR-3689d	MIMAT0019008	-477769561	-506061964
hsa-miR-181d-3p	MIMAT0026608	235802479	199495924
hsa-miR-7109-5p	MIMAT0028115	-473010467	-368501774
hsa-miR-4505	MIMAT0019041	133656482	130049875
hsa-miR-3621	MIMAT0018002	-28709392	-32000437
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	-1288574	-1962289
	定数項	293183533	

E14		LD1	LD2
hsa-miR-125a-3p	MIMAT0004602	30.601114	-1.7493017
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	1.737573	-0.0070141
hsa-miR-326	MIMAT0000756	-4.354313	-0.9273677
hsa-miR-3616-3p	MIMAT0017996	-48.740933	1.54904107
hsa-miR-4454	MIMAT0018976	-3.616928	0.74626283
hsa-miR-6515-5p	MIMAT0025486	-37.283014	-1.1805728
hsa-miR-6823-3p	MIMAT0027547	7.146796	0.58493641

Case	LD1	LD2
1	37.905432	1.21929688
2	35.49158	1.74311113
4	5.302162	-2.872525
5	-65.860001	0.19382857
6	36.785459	1.71160216
8	36.617807	1.0502851
9	37.040496	-0.7714029
10	5.926008	-1.6640114
12	-66.065844	-0.0838639
13	2.937989	-2.6604851
14	-65.961096	2.13416447

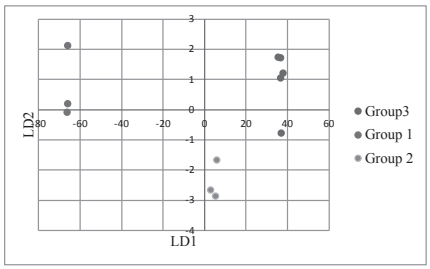


図 14

E2: (Rx_0 - D)の解析　　(Rx_0 - D)+miRNA6000以降除去

Cr

E22　100%

Truth	Prediction 0	1	total
0	4	0	4
1	0	7	7
total	4	7	11

Ccr

E23　100%

Truth	Prediction 0	1	total
0	5	0	5
1	0	6	6
total	5	6	11

Cr + Ccr

E24　100%

Truth	Prediction 1	2	3	total
1	3	0	0	3
2	0	3	0	3
3	0	0	5	5
total	3	3	5	11

E22		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-1227-3p	MIMAT0005580	31946879	25045046
hsa-miR-181d-3p	MIMAT0026608	-21985979	-18600793
hsa-miR-4299	MIMAT0016851	12286365	10473010
hsa-miR-4635	MIMAT0019692	8451117	6690976
hsa-miR-451a	MIMAT0001631	-1255871	-4163641
hsa-miR-3175	MIMAT0015052	2986650	2422218
hsa-miR-92b-3p	MIMAT0003218	-324915	-661399
hsa-miR-5571-5p	MIMAT0022257	28917	50243
	定数項	-25808674	

E23		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-3616-3p	MIMAT0017996	1.29E+14	1.17E+14
hsa-miR-4665-5p	MIMAT0019739	-8.47E+13	-6.55E+13
hsa-miR-3689d	MIMAT0019008	-2.24E+13	-2.38E+13
hsa-miR-181d-3p	MIMAT0026608	1.65E+13	1.40E+13
hsa-miR-4748	MIMAT0019884	-1.27E+13	-1.13E+13
hsa-miR-3138	MIMAT0015006	1.71E+12	2.95E+12
hsa-miR-1539	MIMAT0007401	-6.53E+11	-8.27E+11
hsa-miR-128-1-5p	MIMAT0026477	-9.90E+10	-1.29E+11
hsa-miR-4417	MIMAT0018929	-1.85E+10	-1.82E+10
	定数項	9.31E+12	

E24		LD1	LD2
hsa-miR-125a-3p	MIMAT0004602	31.1506818	3.4580597
hsa-miR-296	MIMAT0004901	-0.7178153	0.0650966
hsa-miR-3191-3p	MIMAT0015075	11.1289488	-4.8664943
hsa-miR-3194-3p	MIMAT0019218	-12.402722	1.6876233
hsa-miR-3616-3p	MIMAT0017996	-67.790768	-0.4957605
hsa-miR-4747-5p	MIMAT0019882	-2.4929451	-1.4924574
hsa-miR-4792	MIMAT0019964	0.290118	0.3826211

Case	LD1	LD2
1	26.43655	2.9091326
2	27.46202	2.798639
4	35.74224	-6.5485533
5	-81.86099	0.5523323
6	28.69526	4.5956153
8	26.72741	4.4989141
9	26.27042	4.6241318
10	35.86237	-4.6581674
12	-79.24497	-0.744094
13	35.28578	-6.7916702
14	-81.37511	-1.2274601

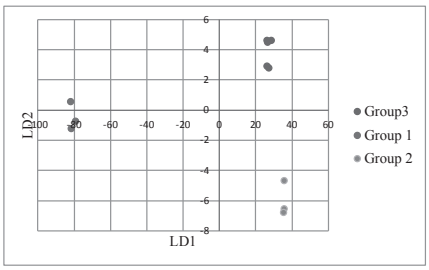


図 15

E13解析: レシピエントの0時間－ドナーの0時間採血の差がクレアチニンクリアランスに及ぼす因子

hsa-miR-3616-3p,hsa-miR-181d-3p, hsa-miR-7109-5p, hsa-miR-4505,は正の影響であった。

hsa-miR-4665-5p, hsa-miR-3689d, hsa-miR-7109-5p, hsa-miR-3621, hsa-miR-671-3pは負の影響であった。

E14解析: レシピエントの1時間-0時間採血の差がクレアチニンとクレアチニンクリアランスに及ぼす因子

LD1によりGroup1とGroup3は明確に振り分けが可能になった。

正の影響はhsa-miR-125a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-6823-3pが抽出された。負の影響はhsa-miR-326, hsa-miR-3616-3p, hsa-miR-4454であった。

15. **図15**

E2: (Rx_0-D) の解析: (Rx_0-D) +miRNA 6000以降除去

E22解析: レシピエントの0時間－ドナーの0時間採血の差がクレアチニンに及ぼす因子

hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-4299, hsa-miR-4635, hsa-miR-3175, hsa-miR-5571-5pが正の影響であった。一方、hsa-miR-181d-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-92b-3pは負の影響であった。

E23解析: レシピエントの0時間－ドナーの0時間採血の差がクレアチニンクリアランスに及ぼす因子

hsa-miR-3616-3p,hsa-miR-181d-3p, hsa-miR-3138,は正の影響であった。

hsa-miR-4665-5p, hsa-miR-3689d, hsa-miR-4748, hsa-miR-1539, hsa-miR-128-1-5p, hsa-miR-4417は負の影響であった。

E3: (Rx_0 - D)の解析　　すべての欠損値+miRNA6000以降除去

Cr

E32		Prediction 0	Prediction 1	total
Truth	0	4	0	4
	1	0	7	7
	total	4	7	11

100%

Ccr

E33		Prediction 0	Prediction 1	total
Truth	0	5	0	5
	1	0	6	6
	total	5	6	11

100%

Cr + Ccr

E34		Prediction 1	Prediction 2	Prediction 3	total
Truth	1	3	0	0	3
	2	0	3	0	3
	3	0	0	5	5
	total	3	3	5	11

100%

E32		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-1227-3p	MIMAT0005580	1.14E+12	8.97E+11
hsa-miR-181d-3p	MIMAT0026608	-6.56E+11	-5.55E+11
hsa-miR-4299	MIMAT0016851	4.63E+11	3.95E+11
hsa-miR-4635	MIMAT0019692	2.45E+11	1.94E+11
hsa-miR-615-5p	MIMAT0004804	-1.85E+11	-1.44E+11
hsa-miR-25-5p	MIMAT0004498	-6.04E+10	-4.76E+10
hsa-miR-525-5p	MIMAT0002838	-2.73E+10	-2.95E+10
hsa-miR-3151-5p	MIMAT0015024	1.06E+10	8.94E+09
hsa-miR-1233-5p	MIMAT0022943	9.12E+08	1.15E+09
	定数項	-8.20E+11	

E33		判別係数	標準化判別係数
hsa-miR-3616-3p	MIMAT0017996	1.48E+14	1.33E+14
hsa-miR-4665-5p	MIMAT0019739	-1.24E+14	-9.56E+13
hsa-miR-4736	MIMAT0019862	6.57E+13	6.78E+13
hsa-miR-550a-5p	MIMAT0004800	-2.37E+13	-2.80E+13
hsa-miR-3911	MIMAT0018185	-1.26E+13	-1.70E+13
hsa-miR-4726-5p	MIMAT0019845	6.99E+12	5.43E+12
hsa-miR-5001-5p	MIMAT0021021	-2.54E+12	-1.51E+12
hsa-miR-185-3p	MIMAT0004611	-1.36E+11	-1.48E+11
hsa-miR-920	MIMAT0004970	-3.78E+10	-4.25E+10
	定数項	3.42E+13	

E34		LD1	LD2
hsa-miR-125a-3p	MIMAT0004602	1445.57687	-7.498507
hsa-miR-181d-3p	MIMAT0026608	26.06043	3.51863
hsa-miR-3616-3p	MIMAT0017996	-2788.8435	5.291193
hsa-miR-4313	MIMAT0016865	-255.66469	3.728254
hsa-miR-4538	MIMAT0019081	-706.44958	9.142418
hsa-miR-4588	MIMAT0019777	-80.81419	-11.150180
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	297.36954	2.80703

Case	LD1	LD2
1	1857.0085	4.106611
2	1856.6464	4.023961
4	317.4618	-10.299912
5	-3412.8755	2.0942
6	1856.2049	6.088977
8	1857.4284	3.726239
9	1858.4832	4.340775
10	318.3471	-9.490468
12	-3411.3689	3.002308
13	316.1302	-11.68798
14	-3413.6569	4.104289

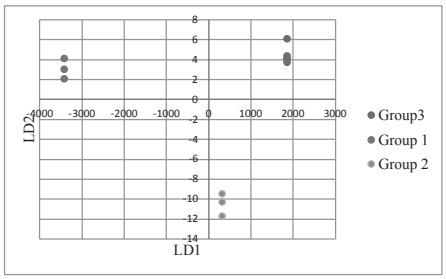


図 16

E24解析: レシピエントの1時間－0時間採血の差がクレアチニンとクレアチニンクリアランスに及ぼす因子

LD1によりGroup1とGroup3は明確に振り分けが可能になった。

正の影響はhsa-miR-125a-3p, hsa-miR-3191-3p, hsa-miR-4792pが抽出された。負の影響はhsa-miR-298, hsa-miR-3194-3p, hsa-miR-3616-3p, hsa-miR-4747-5pであった。

16. **図16**

E3:（Rx_0-D）の解析: すべての欠損値+miRNA6000以降除去

E32解析: レシピエントの0時間－ドナーの0時間採血の差がクレアチニンに及ぼす因子

hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-4299, hsa-miR-4635, hsa-miR-3151-5p, hsa-miR-1233-5pが正の影響であった。一方、hsa-miR-181d-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-25-5p, hsa-miR-525-5pは負の影響であった。

E33解析: レシピエントの0時間－ドナーの0時間採血の差がクレアチニンクリアランスに及ぼす因子

hsa-miR-3616-3p,hsa-miR-4736, hsa-miR-4726-5pは正の影響であった。

hsa-miR-4665-5p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-3911, hsa-miR-5001-5p, hsa-miR-185-3p, hsa-miR-920は負の影響であった。

E34解析: レシピエントの1時間－0時間採血の差がクレアチニンとクレアチニンクリアランスに及ぼす因子

LD1によりGroup1とGroup3は明確に振り分けが可能になった。

正の影響はhsa-miR-125a-3p, hsa-miR-3191-3p, hsa-miR-468-5pが抽出された。負の影響はhsa-miR-4313, hsa-miR-4538, hsa-miR-3616-3p, hsa-miR-4688であった。

以上をまとめると、レシピエント0時間の解析ではhsa-miR-1470, hsa-miR-193-5pはクレアチニン下降（改善）、hsa-miR-6753-5pはクレアチニン下降+クレアチニンクリアランス上昇の腎機能改善に寄与する。hsa-miR-4688, hsa-miR-6750はクレアチニン上昇+クレアチニンクリアランス下降の腎機能悪化に影響する。

【結果のまとめ】

1. レシピエントの移植後1時間の解析ではhsa-miR-3682-3p, hsa-miR-4730, hsa-miR-124-39, 4700-5pはクレアチニンの下降（改善）、クレアチニンクリアランス上昇（改善）に寄与した。hsa-miR-3160-5pはクレアチニン下降（改善）とクレアチニンクリアランスの上昇（改善）に寄与する可能性が示唆された。
2. ドナーの術前の解析については腎機能を良化する因子は多数抽出された。hsa-miR-671-5p, hsa-miR-4750-3p, hsa-miR-505-5p, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-4327が改善させる因子であった。腎機能悪化する因子についてはhsa-miR-1277-3p, hsa-miR-4455, hsa-miR-4313, hsa-miR-1228, hsa-miR-2116-3pが抽出された。
3. レシピエントの1時間-レシピエントの0時間での解析ではhsa-miR-3162-3pはCrを下降（改善）させ、hsa-miR-4443はクレアチニンクリアランスを上昇させる、また、クレアチニンの下降とクレアチニンクリアランスの上昇をさせ、腎機能を改善させる因子であった。
4. レシピエントの移植前とドナーの移植前においてhsa-miR-1227-3P, hsa-miR-4299, hsa-miR-4635はクレアチニンを下降させる。hsa-miR-3616-3p, hsa-miR-181d-3pはクレアチニンクリアランスを上昇させる。hsa-miR-1259-3pはクレアチニンとクレアチニンクリアランスを改善させる。hsa-miR-4655-5p, hsa-miR-3616はクレアチン、クレアチニンクリアランス共に悪化させる可能性がある。hsa-miR-181c-3pは腎機能を悪化もさせ良化もさせる因子であった。

【考察】

近年、より低侵襲な診断技術として血液等の体液から疾患の診断を行うliquid biopsy の技術を用いた 拒絶反応 および慢性移植片傷害の検出が試みられている[1-3]。我々も特に血清中の

microRNA（miRNA）を標的としてliquid biopsy研究を進めてきたが[4]、これらが血清に含有される量は極めて微量であり、検出の困難性および再現性に問題があった。そこで我々は新規のliquid biopsy技術として血小板に含まれるmiRNAおよびmRNAに着目した。血小板は末梢血に大量に含まれる止血に必須の細胞である。血小板は無核の細胞であるにもかかわらず、以前より大量のmRNAおよびmiRNA等の核酸を含むことが報告されており、血小板機能の観点から解析がなされてきたが、全身性および局所性の疾患の病勢により、血小板中のtranscriptomeに変化が起こることが知られるようになり、実際慢性腎不全患者の血小板では複数の遺伝子およびmiRNAの発現量が変化していることが報告されていた[5]。当初は血小板からのmiRNAの発現量を測定し拒絶反応におけるバイオマーカーとしてのmiRNAを抽出することを試みた。血小板からの抽出において、検出の困難性が生じ、解析が不可能となったために血漿を成分としたmiRNAの検出を行なった。血漿中のmiRNAを検出することとしたために、実際はリンパ球からのものか、他の血球からのものかの特定が困難であり、実際miRNAの検出特異性は担保されていない点は改善の余地がある。また、当初は拒絶反応症例と非拒絶反応症例との同程度数の症例蓄積を見込んでいたが、拒絶反応の症例数は観察期間内では少数なことより、腎機能に設定を変更して、解析を行うことにした。

現状において血漿中で腎臓病、腎移植後の腎障害においてバイオマーカーとしてのmiRNAはmiR-21郡が腎臓の繊維化に影響し、miR-223群とmiR-10aは急性拒絶反応のマーカーとして報告がある[5-7]。miR-182-5pはAcute kidney injury、miR-142-5p,miR-155, miR-223はT cell mediated acute rejection, miR-320, miR-324-3pはAcute rejection, miR-142-3p, miR-204, miR-211はInterstitial fibrosis/Tubular atrophyに関与していると報告されている[8,9]。

自験例では過去の報告と合致するようなmiRNAを認めることがなかった。

A, B, C, D, Eのそれぞれの解析中、解析Aで腎機能の改善に3因子、悪化に2因子、解析Bでは腎機能改善に5因子のmiRNAの重複を認めた。解析Cにおいては腎機能改善に5因子のmiRNAの重複を認めた。腎機能悪化に4因子のmiRNAの重複を認めた。解析Dにおいては優位な重複を認めなかった。解析Eにおいては腎機能の改善に6個の因子のmiRNAの重複を認め、腎機能の悪化に3因子のmiRNAの重複を認めた。しかし、解析を横断的に重複するmiRNAは存在しなかった。今後は現在収集している症例数を増加して解析を行い、拒絶反応の有無によるバイオマーカーとしてのmiRNA抽出を行う必要がある。

【参考文献】

1. Mas VR, et al.: MicroRNAs as Biomarkers in Solid Organ Transplantation. Am J Transplant 13: 11-19,2013
2. Scian MJ, et al.: Identification of biomarkers to assess organ quality and predict post-transplantation outcomes. Transplantation 94: 851-858, 2012
3. Maluf DG, et al.: The urine microRNA profile may help monitor post-transplant renal graft function. Kidney Int 85: 439-449, 2014
4. Murakami Y, et al.: The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis. BMC Cancer 13: 99, 2013
5. Plé H, et al.: Alteration of the platelet transcriptome in chronic kidney disease. Thromb Haemost 108: 605-615, 2012
6. Wilflingseder J, et al.: microRNAs in Kidney Transplantation. Nephrol Dial Transplant 30: 910-917, 2015
7. Ledeganck KJ, et al.: MicroRNAs in Acute Kidney Injury and Kidney Transplantation. Clin J Am Soc Nephrol 14: 454-468, 2019
8. van den Akker EK, et al.: MicroRNAs in Kidney Transplantation: Living up to Their Expectations? J Transplant 354826, 2015
9. van de Vrie M, et al.: Urinary MicroRNA as Biomarker in Renal Transplantation. Am J Transplant 17: 1160-1166, 2017

腎移植における慢性拒絶反応の解明と新たな予後予測バイオマーカーの探索

松波　昌寿、中村　有紀、石井　保夫

【目的】

臨床の腎移植では免疫抑制剤、臓器保存、手術手技などの進歩により、移植初期には良好な成績を得られるようになった。長期生着が得られるようになった現在、最大の問題は慢性拒絶反応の予防であり、この慢性拒絶反応を予測できる有効なバイオマーカーの発見が不可欠である。

研究代表者の米国での研究成果である動物実験（サル）モデルを参考に、虎の門病院で施行されたヒトの腎生検のフォルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）からmRNAを抽出し、NanoString遺伝子解析装置を用いてmRNAの網羅的解析を行い、慢性拒絶反応を患った症例の検体におけるバイオマーカーの経時的変化を観察する[1-3]。

移植後早期の時点で、慢性拒絶反応を正確に予測し診断することが可能となれば、患者の予後は劇的に改善されると想定し、その予後予測バイオマーカーの確立が重要な課題と考えられる。

本研究では、過去30年間にわたり虎の門病院において保管されていた移植腎FFPEサンプルからretrospectiveにmRNAを抽出し、NanoString遺伝子解析装置を用いて、正確な遺伝子解析を行う。慢性拒絶患者の移植後早期の時点（術後約3ヶ月～1年）で発現しているmRNA発現を解析することにより、簡便かつ感度の高い予後予測バイオマーカーを探索しようとする点が特徴的である。

また最終的には、prospectiveに術後3か月、6ヶ月の移植後早期のタイミングでprotocol biopsyを行い、同定された予後予測バイオマーカーを用いて、患者の免疫抑制剤漸減に反映させていきたいと考えている。subclinical rejectionと呼ばれる顕在化しない（自覚できる症状がなく、Crや蛋白尿にも異常がみられない）拒絶反応を早期に診断し、腎移植後成績の向上を目指したい。

【方法】

本研究では、慢性拒絶反応を患った症例における、移植後早期の時点での腎生検サンプル（FFPE）のmRNA発現についてNanoString遺伝子解析装置を用いて検証する[4]。

本研究は、研究代表者が米国のマサチューセッツ総合病院において2015年から2017年にかけて同様の実験モデルをサルの検体を用いて行っており、これらの手法はすでに確立されていて、一定の成果の研究実績がある[1-4]。

1. 対象症例の選定

虎の門病院にて行われた過去565例のヒト腎移植後の腎生検サンプルを（FFPE）から、対象症例となりえるサンプルを30例ほど集めて、経時的に各症例の病理所見、特に慢性拒絶反応の推移を検証する。

2. mRNAの抽出およびNanoString遺伝子解析

米国のNanoString社が製造するNanoString遺伝子解析装置は、調べたい遺伝子の種類や発現量などをPCRによる増幅なしにダイレクトに最大800種類の遺伝子を正確に検出、カウントすることができる。そのためiPS細胞、幹細胞などの再生医療分野、がん研究、免疫研究、新薬創出などの研究に有効と期待されている。近年、米国では研究結果を踏まえ実臨床においてすでに導入されている。

3. データ解析

得られたデータは専用ソフトウェアのnSolverを使用してデータ解析を行う。

【結果】

現在、虎の門病院にて行われた過去565例のヒト腎移植後の腎生検サンプルを（FFPE）から、対象症例の選定を行っている段階にあるため、まだ具体的な結果は得られていない。

最終的には、対象症例となりえるサンプルを

30例ほど集めて、経時的に各症例の病理所見、特に慢性拒絶反応の推移を検証し、研究代表者が以前に発表した研究成果と同様の所見が得られるのか検討していきたい。

【考察】

研究代表者は、米国での研究成果において、急性拒絶反応を患ったサルは移植後早期（1～4ヶ月）の、まだ組織学的に拒絶反応と診断されていない段階からGZMB, IFNG, GNLY, CXCL11, FCGR3A等の炎症反応関連mRNAがすでに高く、その一方で慢性拒絶反応を患ったサルでは移植後早期の時点で、TEK、PECAM1等の血管内皮細胞因子（endothelium-associated transcripts）が高く発現していることを明らかにした[5,6]。

さらに、移植腎における各種mRNAは経時的変化が顕著で、バイオマーカーの解釈には時間的要素を考慮することが重要であるという知見を得ている[5,6]。

また、2017年にAdamらは慢性拒絶反応のサルFFPEサンプルからNanoString遺伝子解析装置を用いて34個の慢性拒絶反応に関するmRNAを検証し、3つの血管内皮細胞因子（VWF, DARC, CAV1）がROC解析を用いて慢性拒絶群と非慢性拒絶群を区別する診断に有用であることを報告した[3]。これらの結果を踏まえ、米国では実臨床において同様の取り組みがすでに開始されている。

【文献】

1. Smith RN, Matsunami M, Adam BA, Rosales IA, Oura T, Cosimi AB, et al.: RNA expression profiling of nonhuman primate renal allograft rejection identifies tolerance. Am J Transplant 18: 1328-1339, 2018
2. Smith RN, Adam BA, Rosales IA, Matsunami M, Oura T, Cosimi AB, et al.: RNA expression profiling of renal allografts in a nonhuman primate identifies variation in NK and endothelial gene expression. Am J Transplant 18: 1340-1350, 2018
3. Adam BA, Smith RN, Rosales IA, Matsunami M, Afzali B, Oura T, et al.: Chronic Antibody-Mediated Rejection in Nonhuman Primate Renal Allografts: Validation of Human Histological and Molecular Phenotypes. Am J Transplant 17: 2841-2850, 2017
4. Adam B, Afzali B, Dominy KM, Chapman E, Gill R, Hidalgo LG, et al.: Multiplexed color-coded probe-based gene expression assessment for clinical molecular diagnostics in formalin-fixed paraffin-embedded human renal allograft tissue. Clin Transplant 30: 295-305, 2016
5. Matsunami M, Oura T, Adam BA, Mengel M, Rosales IA, Smith R-N, et al.: Transcriptional Factor FOXP3 in Renal Allograft Biopsies Predicts Tolerance in Non-Human Primates. Transplantation 102: S269-S270, 2018
6. Matsunami M, Oura T, Rosales I, Smith RN, Adam B, Mengel M, et al.: mRNA Biomarkers in Renal Allograft Protocol Biopsies Detected by the Nanostring Platform Predict Tolerance in Non-Human Primates. Am J Transplant 17: suppl 3, 2017