1．2021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

わが国における、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の変異について

雨宮 三千代

【要約】

SARS-CoV-2は、2019年12月に中国武漢市で確認されて以来、様々な変異を繰り返し、未だパンデミックの終焉には至らない。本研究では、わが国で感染拡大を引き起こしたアルファ株、デルタ株、オミクロン株の変異株のゲノムデータをNCBIデータベースから入手し、スパイクタンパクについて、BLASTを用いて、祖先である武漢株と比較した。それぞれの株は、特有の共通変異をもち、更に、わが国で新たな変異が追加された。

アルファ株（B.1.1.7）の共通変異は9か所（欠失2、非同義置換7、武漢株との変異数の差16塩基）、共通変異に新たな変異が加わった株（以下、新たな変異株）は14種類（同義置換8、非同義置換6、武漢株との変異数の差17, 18塩基）。

インドのデルタ株（B.1.617.2）の共通変異は9か所（欠失1、非同義置換8、武漢株との変異数の差14塩基）、新たな変異株は5種類（非同義置換5、武漢株との変異数の差14、15、17塩基）。

日本のデルタ株（AY.29, AY.29.1）の共通変異は9か所（欠失1、非同義置換8、武漢株との変異数の差13塩基）、新たな変異株は22種類（欠失1、同義置換6、非同義置換14, 1355TGなし1、武漢株との変異数の差13, 15, 16, 17塩基）。

オミクロン株（BA.1.1）の共通変異は32か所（欠失2、同義置換1、非同義置換28、挿入＋点変異1、武漢株との変異数の差55塩基）、新たな変異株は19種類（欠失1、同義置換4、非同義置換13、1336GAなし1、武漢株との変異数の差48, 54, 56, 57, 58塩基）。

オミクロン株（BA.2）の共通変異は23か所（欠失1、同義置換1、非同義置換21、武漢株との変異数の差31塩基）、新たな変異株は2種類（非同義置換2、武漢株との変異数の差32、38塩基）。

アルファ株、デルタ株、オミクロン株のわが国での変異を追うため、MEGAXで分子系統樹を作成した。興味深いことに、ステルスオミクロンと言われるオミクロン株（BA.2）は、2022年4月の時点では、オミクロン株（BA.1.1）に置き換わり、わが国の市中感染の主流となりつつあるが、2021年12月には、わが国で既に確認され、BA.1.1よりも先に武漢株から変異した株であることが計算上判明した。

アルファ株、デルタ株、オミクロン株の非同義置換のアミノ酸変異には、共通性がみられた。1841AG（614DG）は全ての株に共通。1501AT（501NY）は、アルファ株とオミクロン株（BA.1.1, BA.2）、2042CA（681PH）は、アルファ株とオミクロン株（BA.1.1, BA.2）、2042CG（681PR）は、デルタ株（B.1.617.2, AY.29, AY.29.1）が有していた。

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のスパイクタンパクは、従前流行したSARS-CoVと70％の相同性があり、特に宿主のACE2受容体との結合に影響するfurinプロテアーゼ開裂配列（681-PRRAR-685）が挿入されていることに特徴がある。このfurin配列は、他の2Bコロナウイルスにはなく、SARS-CoV-2に特有である。アルファ株、デルタ株、オミクロン株は、681番目

のプロリンに共通変異をもつため、この獲得が終わらぬパンデミックを引き起こしているのかもしれない。

【はじめに】

2019年12月、中国武漢市の海鮮市場に端を発すると言われているSARS-CoV-2は、瞬く間にパンデミックを引き起こし、未だ終息の目途がたたない。ウイルスは姑息にも変異を繰り返し、何波にも渡り、人類を襲い続けている。わが国も、現在、第6波であるオミクロン株が猛威を振るっている。

2021年夏のデルタ株は、医療逼迫や多くの死者を出し、わが国にとって未曾有の災禍であった。しかし、デルタ株のピークアウトは以外にも早く、10月から12月までの間は、感染者数が激減し、コロナウイルスから多少解放された時期でもあった。これまでの第1波から第5波をみると、その感染の波形は急峻なマウンテンシェイプであり、ピークから下降する期間が短いことに特徴がある。この原因は、ワクチンの普及、人々の行動変容、政府の施策の効果が考えられるが、ウイルス側の変異も原因の一つではないかと考える。

【目的】

本研究では、わが国で確認されたコロナウイルスの変異が、終息に向かわせるような弱毒化を引き起こすものであるかについて、NCBIのデータベースを用いて、アルファ株、デルタ株、オミクロン株のスパイクタンパク（Sタンパク）の変異を解析する。

【方法】

NCBI（National Center for Biotechnology Information）のSARS-CoV-2のデータベースから、わが国から報告されているSARS-CoV-2のゲノムデータを入手した（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/sars-cov-2）。

アルファ株、デルタ株、オミクロン株のスパイクタンパク（Sタンパク）の塩基と、武漢で報告された最初の株（NC_045512.2）のSタンパクの塩基とを、BLAST（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）を用いて比較・解析した。ゲノムは、各月の月末の週に登録されたデータを用いた。ウイルスの分子系統樹は、MEGAXを用い、最尤法で作成した。

【結果】

1. アルファ株（B.1.1.7）について

(1) アルファ株の流行

アルファ株は、B.1.1.7系統の株であり、イギリスから世界中に大流行を引き起こした。わが国では、2020年12月に、関東地方で報告されている。2021年3月からアルファ株のCollection Data数が増加し始め、8月にピークとなり、9月に2件報告されて以来、わが国でのアルファ株の報告はない（**図1-A**）。

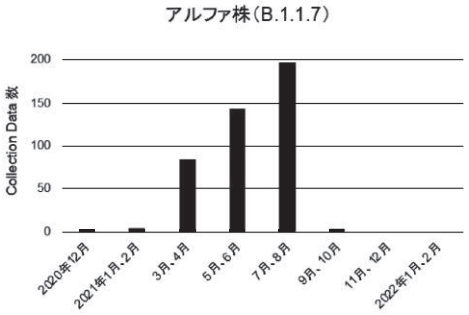
(2) アルファ株の変異

2019年に最初に報告された武漢株とアルファ株のDNA配列をBLASTで比較した。得られたアルファ株の配列には、9つの共通変異があった（**図1-B**）。6塩基欠失が1か所、3塩基欠失が1か所、1塩基変異が7か所あり、武漢株との差は16塩基であった。

203-208欠失では、ヒスチジンとバリンが欠失し、429-431欠失では、チロシンが欠失した。いずれの欠失もフレームシフトは起こらず、69番目はイソロイシン、143番目はバリンのままであった。1501 AT, 1709 CA, 1841 AG, 2042 CA, 2147 CT, 2944 TG, 3352 GCの点変異は、いずれも、アミノ酸の非同義置換であった。本研究で調べたアルファ株32例のうち、共通変異をもつ13例（40%）は2021年4月から8月までに、東京、静岡、神奈川で報告された（**図1-B**）。

一方、共通変異（変異数16）に、更に新たな変異が加わった株19例（60%）には、14種類の変異があり、8個は同義置換（58%）、6個は非同義置換（42%）、変異数は17または18の点変異であった（**図1-C**）。2021年3月と4月の新たな変異はいずれも同義置換で、共通変異株のSタンパクと立体構造上の差はない。注目すべきは、2097 TC変異で、これは同義置換（699LL）であるが、5月と8月に東京と広島で報告されており、この株は全国的に伝搬した可能性がある。2097 TCに、更に変異が加わった株5例はもっぱら2021年8月に報告されており、そのうち3個は同義置換（2619 CT, 2976 AG, 3060 TGC）、2個は非同義置換（58 AG, 464 CT）であった。

A



B アルファ株(B.1.1.7) の共通変異

塩基	203-208欠失	429-431欠失	1501AT	1709CA	1841AG	2042CA	2147CT	2944TG	3352GC
	ATA→A(del6)TC	GTT→GT(del3)T	AAT→TAT	GCT→GAT	GAT→GGT	CCT→CAT	ACA→ATA	TCA→GCA	GAC→CAC
アミノ酸	69(I→I) HVの欠失	143(V→V) Yの欠失	501(N→Y) 非同義置換	570(A→D) 非同義置換	614(D→G) 非同義置換	681(P→H) 非同義置換	716(T→I) 非同義置換	982(S→A) 非同義置換	1118(D→H) 非同義置換

	東京	静岡	神奈川	合計
2021年4月		2	1	
2021年5月	1			
2021年6月				
2021年7月	3	4		
2021年8月		2		
計	4	8	1	13

C アルファ株(B.1.1.7) 共通変異＋新たな変異

塩基		変異数	アミノ酸		同義置換、非同義置換		東京	静岡	広島	栃木	合計
1995CT	3534CT	18	665PP	1178NN	同	2021年3月	1				
	1061CT	17		354NN	同	2021年4月		1			
	3216AG	17		1072EE	同	2021年4月		1			
	2097TC	17		699LL	同	2021年5月 2021年8月	1		 1		
58AG	2097TC	18	20TA	699LL	非+同	2021年5月	1				
464CT	2097TC	18	155SI	699LL	非+同	2021年8月		1			
2619CT	2097TC	18	873YY	699LL	同・同	2021年8月		1			
2976AG	2097TC	18	992QQ	699LL	同・同	2021年8月		1			
3060TG	2097TC	18	1020AA	699LL	同・同	2021年8月			1		
	98CT	17		33TI	非	2021年6月 2021年8月		2 2			
	3803TC	17		1268VA	非	2021年6月				2	
	1044AG	17		348AA	同	2021年6月	1				
	224GT	17		75GV	非	2021年8月		1			
2507AG	3751GA	18	836QR	1251GR	非	2021年8月	1				
						計	5	10	2	2	19

図 1

A　NCBIデータベースに登録された、わが国におけるアルファ株（B.1.1.7）のCollection data数

B　アルファ株（B.1.1.7）の共通変異の塩基とアミノ酸およびCollection data数の内訳

C　アルファ株（B.1.1.7）の共通変異＋新たな変異の塩基とアミノ酸およびCollection data数の内訳。ハイライトは、同義変異を表す。

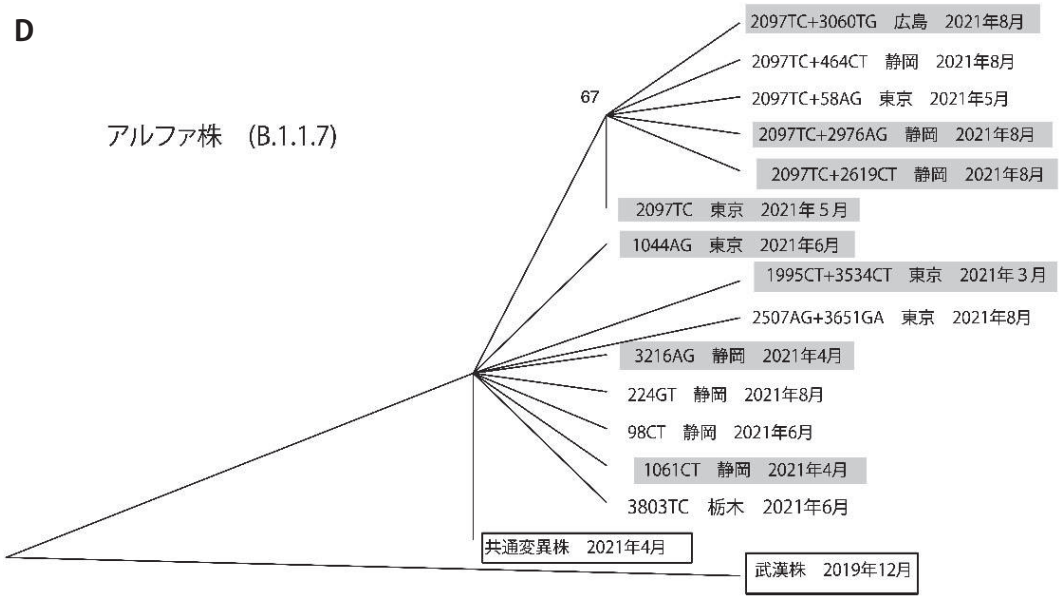


図 1

D　アルファ株（B.1.1.7）の分子系統樹。MEGAXの最尤法を用いた。数字はブートストラップ 値（信頼性）。ハイライトは、同義変異を表す。

(3) アルファ株の分子系統樹

わが国で変異したアルファ株の分子系統樹を示す（**図1-D**）。武漢株を祖先配列とし、最初に共通変異株が現れ、その後、二つのクラスターに別れた。一つは、共通変異株に更に1塩基点変異が加わったグループ、もう一つは2097TCを元に、更に1塩基点変異が加わったグループである。後者は、専ら2021年8月に報告されており、変異時期が遅いものと思われる。

2. デルタ株（B.1.617.2）について

(1) デルタ株（B.1.617.2）の流行

デルタ株は、B.1.617.2系統の株であり、インドで大流行を引き起こした。わが国では、NCBIのデータベースに14例が報告されている。2021年4月に東京で最初に報告され、東京では6月がピーク、静岡では9月がピークであった（**図2-A**）。

(2) デルタ株（B.1.617.2）の変異

武漢株とデルタ株（B.1.617.2）のDNA配列をBLASTで比較した。デルタ株（B.1.617.2）の共通変異は、次の8つである。6塩基欠失が1か所、1塩基変異が7か所あり、武漢株との差は13塩基であった。

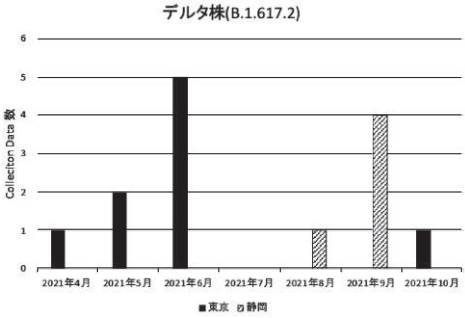
467-472欠失では、フェニルアラニンとアルギニンが欠失し、グルタミン酸がグリシンに置換された。56CG, 425GA, 1355TG, 1433CA, 1841AG, 2042CG, 2848GAの点変異は、いずれも、アミノ酸の非同義置換であった。

デルタ株（B.1.617.2）は、共通変異（変異数13）に、更に新たな変異が加わった株が13例報告された（**図2-B**）。これらには5種類の変異があり、武漢株との変異数の差は14, 15, 17の点変異である。これらの変異は、284CTを共通に持ち、わが国におけるデルタ株（B.1.617.2）の変異は、284CTから派生した可能性がある。東京では6月に、284CT+654GT+2604AG+3310GTの変異株が最も多く、静岡では9月に60CT+284CTの変異株が最も多かった。

(3) デルタ株（B.1.617.2）の分子系統樹

わが国で変異したデルタ株（B.1.617.2）の分子系統樹を示す(**図2-C**)。武漢株を祖先配列とし、最初に共通変異株が現れ、その後、284CT株が

A



B デルタ株(B.1.617.2) 共通変異

塩基	56CG	425GA	467-472欠失	1355TG	1433CA	1841AG	2042CG	2848GA
	ACA→AGA	GGT→GAT	GGA→G(del6)GA	CTG→CGG	ACA→AAA	GAT→GGT	CCT→CGT	GAT→AAT
アミノ酸	19(T→R)	142(G→D)	FRの欠失	452(L→R)	478(T→K)	614(D→G)	681(P→R)	950(D→N)
	非同義置換	非同義置換	156E→G	非同義置換	非同義置換	非同義置換	非同義置換	非同義置換

デルタ株(B.1.617.2) 共通変異+新たな変異

	塩基				変異数	アミノ酸				同義置換、非同義置換		東京	静岡
共通変異					13					非	2021年4月	1	
													合計
共通変異+新たな変異	284CT				14	95(T→I)				非	2021年5月	2	
	284CT	654GT	2604AG	3310GT	17	95(T→I)	218(Q→H)	868(E→E)	1104(V→L)	非+同	2021年6月	5	
	284CT	1480TC	2534CT	3141TC	17	95(T→I)	494(S→P)	845(A→V)	1047(Y→Y)	非+同	2021年8月		1
	60CT	284CT			15	20(T→T)	95(T→I)			非+同	2021年9月		4
	284CT	1640CT			15	95(T→I)	547(T→I)			非	2021年10月	1	
											合計	9	5 14

C デルタ株(B.1.617.2 インド)

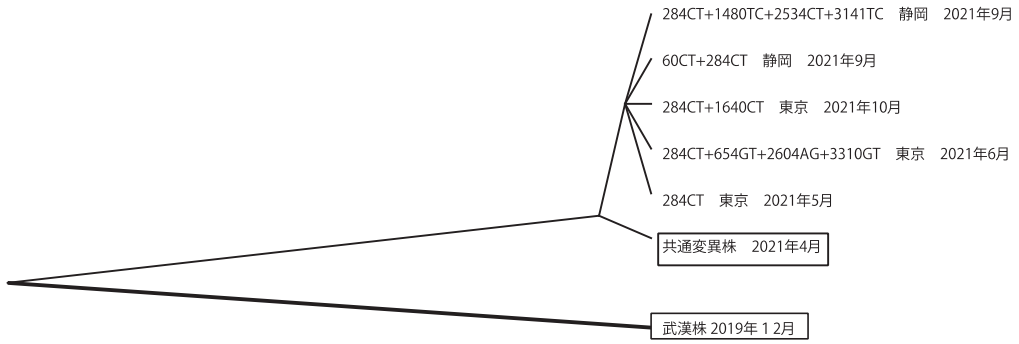


図 2

A NCBIデータベースに登録された、わが国におけるデルタ株（B.1.617.2）のCollection data数

B デルタ株（B.1.617.2）の共通変異および新たな変異の塩基とアミノ酸とCollection data数の内訳。ハイライトは、同義変異を表す。

C デルタ株（B.1.617.2）の分子系統樹。MEGAXの最尤法を用いた。数字はブートストラップ 値（信頼性）。

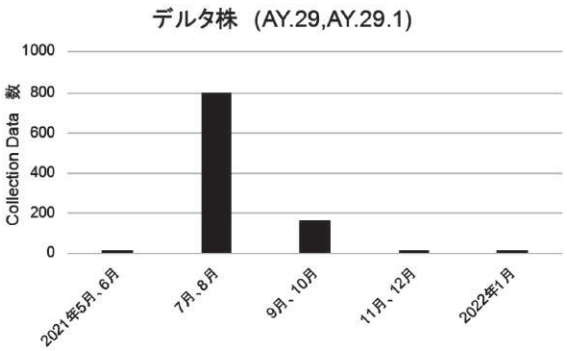
現れた。これを元に、更に1または3塩基の点変異が加わった株が、2021年9月、10月に遅れて現れた。

3. デルタ株（AY.29, AY.29.1）について

(1) デルタ株の流行

AY.29, AY.29.1はデルタ株の亜型で、わが国で流行した株である。NCBIに登録されたcollec-

A



B デルタ株(AY.29, AY.29.1) 共通変異

塩基	56CG	284CT	425GA	467-472欠失	1355TG	1433CA	1841AG	2042CG	2848GA
	ACA→AGA	ACT→ATT	GGT→GAT	GGA→G(del6)GA	CTG→CGG	ACA→AAA	GAT→GGT	CCT→CGT	GAT→AAT
アミノ酸	19(T→R)	95(T→I)	142(G→D)	FRの欠失	452(L→R)	478(T→K)	614(D→G)	681(P→R)	950(D→N)
	非同義置換	非同義置換	非同義置換	156E→G	非同義置換	非同義置換	非同義置換	非同義置換	非同義置換

	東京	静岡	広島	合計
2021年7月	4	3	1	
2021年8月	3	14	2	
2021年9月	1	0	0	
2021年10月	0	1	0	
合計	8	18	3	29

C デルタ株(AY.29, AY.29.1) 共通変異+新たな変異

	塩基		変異数	アミノ酸		同義置換、非同義置換	登録数		2021年7月	8月	9月	10月	11月	2022年1月	不明	合計
共通変異＋新たな変異	519GT		15	173QH		非	9	東京 静岡	2	2				1	4	
	1355TGなし		13				1	広島	1							
	13CT		15	5LF		非	2	静岡	2							
	234GA		15	78RR		同	1	静岡	1							
	520CT		15	174PS		非	1	静岡	1							
	3729TC		15	1243CC		同	2	静岡 東京	1		1					
	3296GA		15	1099GD		非	1	静岡	1							
	58AG	3741TC	16	20TA	1247CC	非+同	1	静岡		1		1				
	97AT		15	33TS		非	2	東京		2						
	114CT	519GT	16	38YY	173QH	非+同	2	静岡		2						
	1640ct		15	547TI		非	1	静岡		1						
	1791TC		15	597VV		同	1	静岡		1						
	1913CT	2501TC	16	640SF	834IT	非	1	静岡		1						
	2332AG		15	778TA		非	1	静岡		1						
	3153CT		15	1051SS		同	1	静岡		1						
	59CT	3729TC	16	20TI	1243CC	非+同	1	東京			1			1		
	627-629欠失		17	210I欠失			1	静岡			1					
	1365GT		15	455LF		非	1	静岡			1					
	1470TC		15	490FF		同	1	静岡				1				
	1481CT		15	494SL		非	4	東京				4				
	1431CT		15	477SS		同	2	静岡					2			
	1241AG		15	414QR		非	1	静岡						1		
								合計	9	12	4	6	2	3	4	40

図 3

A　NCBIデータベースに登録された、わが国におけるデルタ株（AY.29, AY.29.1）のCollection data数

B　デルタ株（AY.29, AY.29.1）の共通変異の塩基とアミノ酸およびCollection data数の内訳

C　デルタ株（AY.29, AY.29.1）の共通変異＋新たな変異の塩基とアミノ酸およびCollection data数の内訳。ハイライトは、同義変異を表す。

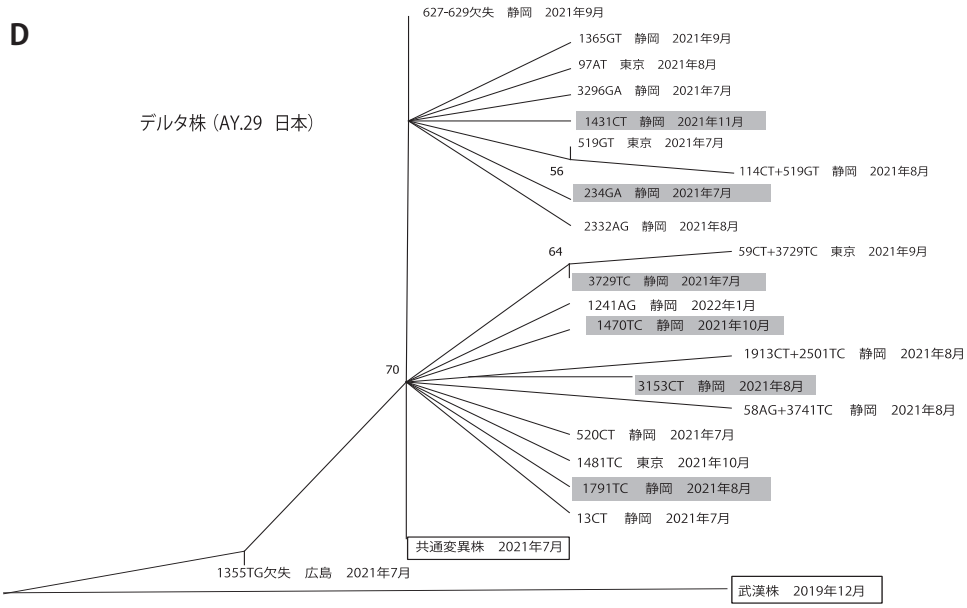


図３

D　デルタ株（AY.29, AY.29.1）の分子系統樹。MEGAXの最尤法を用いた。数字はブートストラップ値（信頼性）。ハイライトは、同義変異を表す。

tion dataは、2021年5月にから2022年1月まで、長期にわたり報告されており、2021年7月、8月がピークである（**図3-A**）。

(2) デルタ株（AY.29, AY.29.1）の変異

武漢株とデルタ株（AY.29, AY.29.1）のDNA配列をBLASTで比較した。AY.29, AY.29.1は9つの共通変異をもつ（**図3-B**）。6塩基欠失が1か所、1塩基変異が8か所あり、武漢株との差は14塩基である。インド株であるデルタ株(B.1.617.2)に284CTの点変異(95TI)が加わったものである。共通変異株69例中29例（42%）は、7月、8月がピーク、11月以降の報告はない。

一方、共通変異に新たな変異が加わった株は40例（58%）あり、22種類の変異があった（**図3-C**）。7月、8月に変異のバリデーションが多く、2022年1月まで新たな変異が確認された。519GT株は7月に東京で確認され、新たな変異株の22.5%（9/40）を占めた。更に変異した519GT+114CT株は、8月に静岡で確認された。

1481CT株は東京で10月に報告され、新たな変異株の10%（4/40）を占めた。

58AG+3741TC株は、8月と10月に静岡で、59CT+3729TC株は、東京で9月と2022年1月に報告され、長期間に渡り市中に存在していた。

デルタ株（AY.29, AY.29.1）の新たな変異の特徴は、非同義置換が14(63%)、同義置換が6(27%)、欠失が1（4.5%）、共通変異のうち1355TGのみが欠損している変異が1（4.5%）であった。武漢株との変異数の差は、13, 15, 16, 17であった。

(3) デルタ株（AY.29, AY.29.1）の分子系統樹

わが国で変異したデルタ株（AY.29, AY.29.1）の分子系統樹を示す（**図3-D**）。武漢株を祖先配列とし、最初に1355TG欠損株（共通変異配列のうち、1355の変異が無いもの）が現れ、その後、共通変異株が現れた。更に、2つのクラスターに別れた。4つの分子系統樹の枝が長いもの(58AG+3741TC, 1913TC+2501TC, 59CT+3729TC, 114CT+519GT）は、変異時期が遅いと思われる。

4. オミクロン株（BA.1.1）について

(1) オミクロン株（BA.1.1）の流行

オミクロン株は、BA.1.1系統の株であり、南

アフリカで最初に報告された。わが国では2021年12月28日にNCBIのデータベースに報告されている。2022年1月より、感染が急増したが、2022年4月にはオミクロン株（BA.2）に置き換わりつつある。

(2) オミクロン株（BA.1.1）の変異

武漢株とオミクロン株（BA.1.1）のDNA配列をBLASTで比較した。BA.1.1は、32個の共通

A オミクロン株（BA.1.1）共通変異

塩基	200,202,204-205,207-208 欠失6塩基	284CT ACT→ATT	425-433 欠失9塩基	632, 639-640, 642, 644, 646, 633TG, 635TG, 636AC, 642TA 挿入6塩基＋点変異4塩基	1016GA GGT→GAT	1037GA AGA→AAA	1111TC+1112CT TCC→CTC	1117TC TCA→CCA
アミノ酸	67 AIHV→67 VI アミノ酸2個欠失	96 TI 非同義置換	142GVYY→D アミノ酸3個欠失	211NLVR→IVREPE アミノ酸2個挿入	339G→D 非同義置換	346R→K 非同義置換	371S→L 非同義置換	373S→P 非同義置換
塩基	1124CT TCC→TTT	1251GT AAG→AAT	1320TG AAT→AAG	1336GA GGT→AGT	1430GA AGC→AAC	1433CA ACA→AAA	1451AC GAA→GCA	1478AG CAA→CGA
アミノ酸	375S→F 非同義置換	417K→N 非同義置換	440N→K 非同義置換	446G→S 非同義置換	477S→N 非同義置換	478T→K 非同義置換	484E→A 非同義置換	493Q→R 非同義置換
塩基	1486GA GGT→AGT	1493AG CAA→CGA	1501AT AAT→TAT	1513TG TAC→CAC	1640CA ACA→AAA	1841AG GAT→GGT	1963CT CAT→TAT	2037TG AAT→AAG
アミノ酸	496G→S 非同義置換	498Q→R 非同義置換	501N→Y 非同義置換	505Y→H 非同義置換	547T→K 非同義置換	614D→G 非同義置換	655H→Y 非同義置換	679N→K 非同義置換
塩基	2042CA CCT→CAT	2292CA AAC→AAA	2386GT GAT→TAT	2568CA AAC→AAA	2862AT CAA→CAT	2907TA AAT→AAA	2941CT CTT→TTT	3438CT GAC→GAT
アミノ酸	681P→H 非同義置換	764N→K 非同義置換	796D→Y 非同義置換	856N→K 非同義置換	954Q→H 非同義置換	969N→K 非同義置換	981L→F 非同義置換	1146D→D 同義置換

B オミクロン株（BA.1.1）共通変異＋新たな変異

変異数	欠失	挿入	点変異		同義・非同義置換
55	15	6	34	共通変異	
48	18	0	30	632-634 211NL→I (3塩基欠失)	非
54	15	6	33	1336GAの点変異なし	非
56	15	6	35	33CT GTC→GTT 11V→V	同
56	15	6	35	697AG ATT→GTT 233I→V	非
56	15	6	35	776CT ACA→ATA 259T→I	非
56	15	6	35	1144GT GTG→TTG 382V→L	非
56	15	6	35	1150CT CCT→CTT 384P→L	非
56	15	6	35	1296CT TGC→TGT 432C→C	同
56	15	6	35	1364TC TTG→TCG 455L→S	非

変異数	欠失	挿入	点変異				同義・非同義置換
56	15	6	35	1491CT TTC→TTT 497F→F			同
56	15	6	35	2031GT CAG→CAT 677Q→H			非
56	15	6	35	2046GT CGG→CGT 682R→R			同
56	15	6	35	2469CT TTC→TTA 823F→L			非
56	15	6	35	3604GC GAA→CAA 1202E→Q			非
56	15	6	35	3728GT TGT→TCT 1243C→S			非
57	15	6	36	2677GT GCA→TCA 893A→S	3728GT TGT→TCT 1243C→S		非
56	15	6	35	264TA GAT→GAA 88D→E			非
58	15	6	37	264TA GAT→GAA 88D→E	968CT ACA→ATA 323T→I	1099GT GTC→TTC 367V→F	非
58	15	6	37	264TA GAT→GAA 88D→E	968CT ACA→ATA 323T→I	1067AC AAG→ACG 356K→T	非

図 4

A　オミクロン株（BA.1.1）の共通変異の塩基とアミノ酸。ハイライトは、同義変異を表す。

B　オミクロン株（BA.1.1）の共通変異＋新たな変異の塩基とアミノ酸。ハイライトは、同義変異を表す。

A オミクロン株（BA.2）共通変異

塩基	56CT ACA→ATA	71-79 欠失9塩基	425GA GGT→GAT	638TG GTG→GGG	1224AC AGA→AGC	1251GT AAG→AAT
アミノ酸	19T→I 非同義置換	24LPPA→S アミノ酸3個欠失	142G→D 非同義置換	213V→G 非同義置換	408R→S 非同義置換	417K→N 非同義置換
塩基	1320TG AAT→AAG	1430GA AGC→AAC	1433CA ACA→AAA	1451AC GAA→GCA	1478AG CAA→CGA	1493AG CAA→CGA
アミノ酸	440N→K 非同義置換	477S→N 非同義置換	478T→K 非同義置換	484E→A 非同義置換	493Q→R 非同義置換	498Q→R 非同義置換
塩基	1501AT AAT→TAT	1513TC TAC→CAC	1841AG GAT→GGT	1963CT CAT→TAT	2037TG AAT→AAG	2042CA CCT→CAT
アミノ酸	501N→Y 非同義置換	505Y→H 非同義置換	614D→G 非同義置換	655H→Y 非同義置換	679N→K 非同義置換	681P→H 非同義置換
塩基	2292CA AAC→AAA	2386GT GAT→TAT	2862AT CAA→CAT	2907TA AAT→AAA	3438CT GAC→GAT	
アミノ酸	764N→K 非同義置換	796D→Y 非同義置換	954Q→H 非同義置換	969N→K 非同義置換	1146D→D 同義置換	

B オミクロン株（BA.2）共通変異＋新たな変異

変異数	欠失	挿入	点変異							
31	9	0	22	共通変異						
32	9	0	23	1213GA GAT→CAT 405D→H 非同義置換						
38	9	0	29	451AG AGT→GGT 151S→G 非同義置換	1016GA GGT→GAT 339G→D 非同義置換	1112CT TCC→TTC 371S→F 非同義置換	1117TC TCA→CCA 373S→P 非同義置換	1124CT TCC→TTC 375S→F 非同義置換	1126AG ACT→GCT 376T→R 非同義置換	1213GA GAT→CAT 405D→H 非同義置換

図５

A　オミクロン株（BA.2）の共通変異の塩基とアミノ酸。ハイライトは、同義変異を表す。
B　オミクロン株（BA.2）の共通変異＋新たな変異の塩基とアミノ酸。

変異を持つ（**図4-A**）。6塩基欠失が1か所、9塩基欠失が1か所、6塩基挿入＋点変異が1か所、点変異が29か所である。点変異のうち1個が同義置換であった。

共通変異に新たな変異が加わった株は19種類の変異があった。3塩基欠失が1、共通変異の1336GAの点変異なしが1、点変異が17である。そのうち、1塩基点変異が14、2塩基点変異が1、3塩基点変異が2であり、そのうち4個が同義置換であった（23.5%）（**図4-B**）。

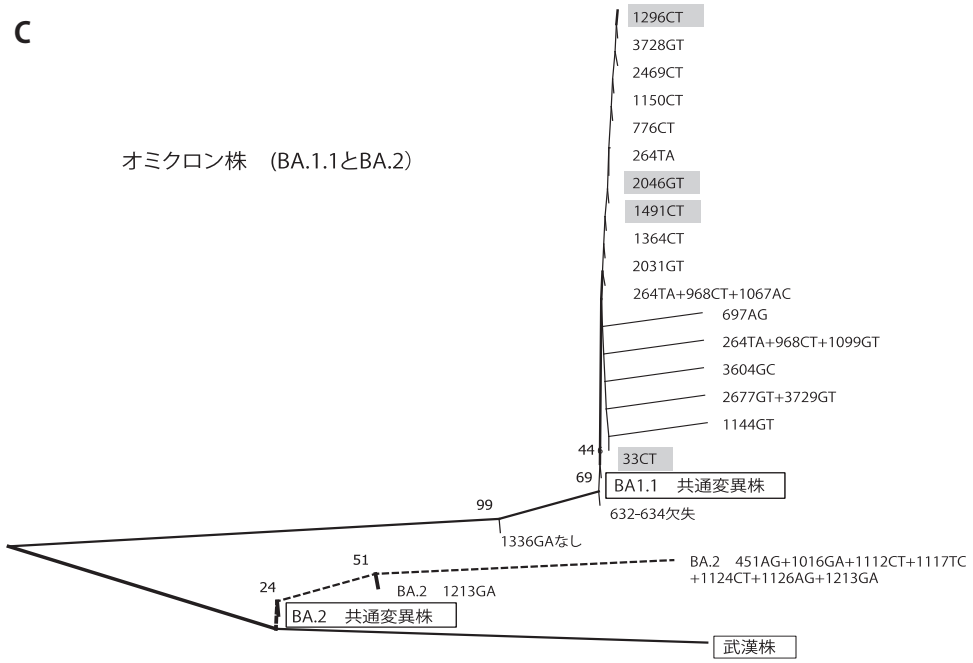


図５

C　オミクロン株（BA.１.１）とオミクロン株（BA.２）の分子系統樹。MEGAXの最尤法を用いた。
数字はブートストラップ 値（信頼性）。ハイライトは、同義変異を表す。

5. オミクロン株（BA.2）について

(1) オミクロン株（BA.2）の流行

オミクロン株は、BA.2系統の株であり、南アフリカで最初に報告された。わが国では2022年1月5日にNCBIのデータベースに報告されている。

(2) オミクロン株（BA.2）の変異

武漢株とオミクロン株（BA.2）のDNA配列をBLASTで比較した。BA.2は、23の共通変異を持つ（**図5-A**）。9塩基欠失が1か所、点変異が22か所である。点変異のうち1個が同義置換であった。

共通変異に新たな変異が加わった株は2種類あった。1塩基点変異が1, 7塩基点変異が1であり、全て非同義置換である。2022年3月中旬では、NCBIのBA.2のデータ登録数が3件のため、今後、変異が増加するものと思われる（**図5-B**）。

(3) オミクロン株(BA.1.1)とオミクロン株(BA.2)の分子系統樹

わが国で変異したオミクロン株（BA.1.1、BA.2）の分子系統樹を示す（**図5-C**）。武漢株を祖先配列とし、最初にBA.2の共通変異株が現れた。点線は、BA.2の変異株の系統を示す。一方、BA.1.1では、1336GAなしの株、632-634欠失株の後にBA.1.1の共通変異株が現れた。その後、個々に点変異をする系統と、枝が長く変異時期が遅い系統（697AG, 264TA+968CT, 3604GC, 2677GT+3729GT, 1144GT）に分かれた。

6. 変異株に共通する非同義アミノ酸変異について

アルファ株、デルタ株、オミクロン株の共通配列の非同義置換のアミノ酸変異は、共通性がみられた（**図6**）。1841AG（614DG）は全ての株が有していた。1501AT（501NY）はアルファ株とオミクロン株（BA.1.1, BA.2）が、2042CA（681PH）はアルファ株とオミクロン株（BA.1.1, BA.2）が、2042CG（681PR）はデルタ株（B.1.617.2, AY.29, AY.29.1）が有していた。425-433欠失は、アルファ株とオミクロン株(BA.1.1)が、1963CT(655HY)と2037YG（679NK）はオミクロン株（BA.1.1,

塩基 アミノ酸	425-433欠失	1501AT 501NY	1841AG 614DG	1963CT 655HY	2037TG 679NK	2042CA 681PH	2042CG 681PR
アルファ株（B.1.1.7）	○	○	○			○	
デルタ株（B.1.617.2）			○				○
デルタ株(AY.29, AY.29.1)			○				○
オミクロン株（BA.1.1）	○	○	○	○	○	○	
オミクロン株（BA.2）		○	○	○	○	○	

図6　アルファ株、デルタ株、オミクロン株に共通して保存されている変異

BA.2）のみの変異であった。

【考察】

SARS-CoV-2は、世界中で様々な変異を引き起こし、その変異の多様性は想像を遥かに超える。今回、NCBIのデータベースから、わが国で報告されたSARS-CoV-2を解析した結果、全てのウイルスで、共通したアミノ酸変異があることがわかった。1841AG（614DG）と2042CG（681PR）、2042CA（681PH）である（**図6**）。

681番目のプロリンの置換は重要と思われる。なぜなら、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のスパイクタンパクは、従前流行したSARS-CoVと70％の相同性があり、特に宿主のACE2受容体との結合に影響するfurinプロテアーゼ開裂配列（681-PRRAR-685）が挿入されていることに特徴がある。このfurin配列は、他の2Bコロナウイルスにはなく、SARS-CoV-2に特有である[1)]。

SARS-CoV-2はスパイクタンパクが宿主の細胞膜の受容体（ACE2受容体）に結合したあと、ヒトの細胞へ侵入を開始するが、スパイクタンパクはFurin（タンパク質分解酵素）によりS1とS2のフラグメントに切断される。S1の開裂部位は、680SPRRAR/SのRS間であり[2)]、その後S1フラグメントはACE2受容体に結合する。一方S2フラグメントはヒト細胞表面のセリンプロテアーゼであるTMPRSS2で切断され、膜融合が起り、ヒト細胞への感染が成立する。従って、681番目のプロリンの変異は、感染性に影響を及ぼすことが予想され、従前のコロナウイルスや、武漢株よりも強い感染性を獲得した可能性がある。

実際、本研究で得られた多くの変異が、ACE2受容体とどの程度の親和性を持つのかは、ゲノムのデータからでは判断ができず、見出された全ての変異について、タンパク質計算をして結論を出したいと考える。

【今後の展望】

今回のデータベースの調査で得られた非同義置換の変異スパイクタンパクについて、ACE2受容体との結合親和性をmyPrestoを用いて分子動力学計算をし、各々の変異が、感染性を増強・減弱させるものかを検討する。更に、感染の各波のピークアウト時に出現する変異株は、ACE受容体との結合親和性が低下したために感染力が減弱したのかを確認する。

【文献】

1. Malaiyan J, Arumugam S, et al.: An update on the origin of SARS-CoV-2: Despite closest identity, bat（RaTG13）and pangolin derived coronaviruses varied in the critical binding site and O-linked glycan residues. J Med Virol 93:1-7, 2020
2. Coutard B, Valle C, el al.: The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. Antiviral Res 176: 104742, 2020

糖尿病と認知機能－11
－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】

脳内産生型インスリンは、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知られている[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ことを基に、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、これまでに明らかにしてきた。これらを背景に、脳海馬内のインスリンの存在量と認知機能低下には、相互に関与している可能性があると考え、「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、これらラットの脳から海馬を単離し、Steinerの方法[4)]によっ

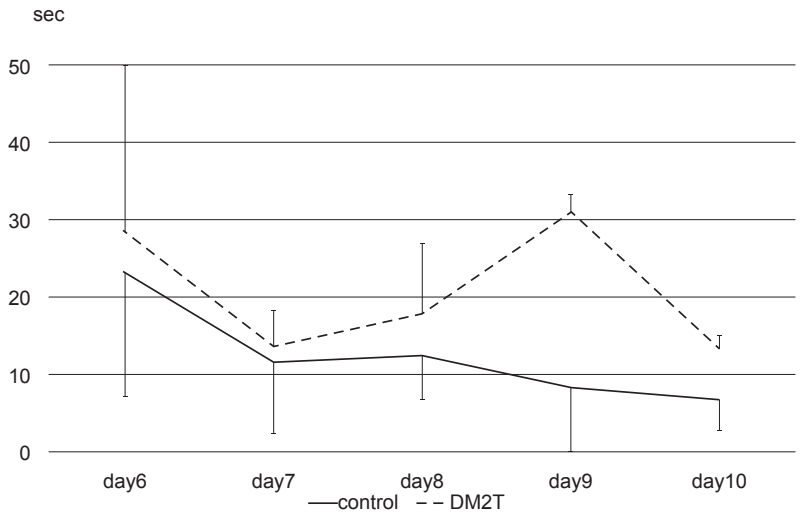


図 1a　ゴール到達時間（秒）

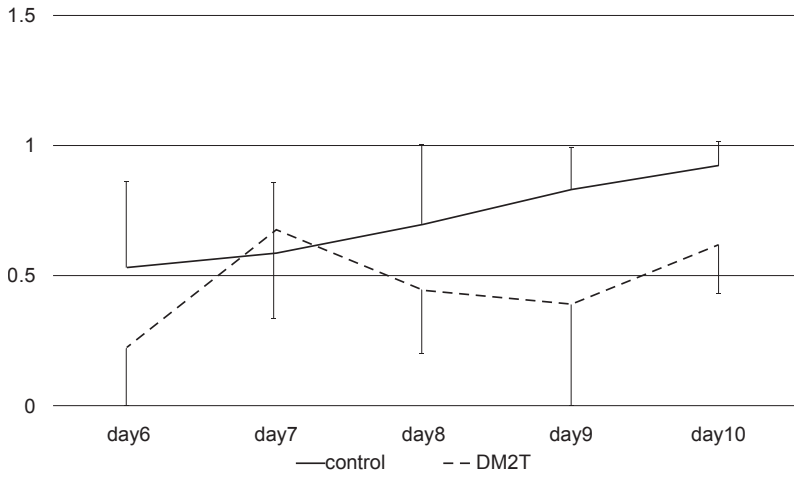


図 1b　行動効率

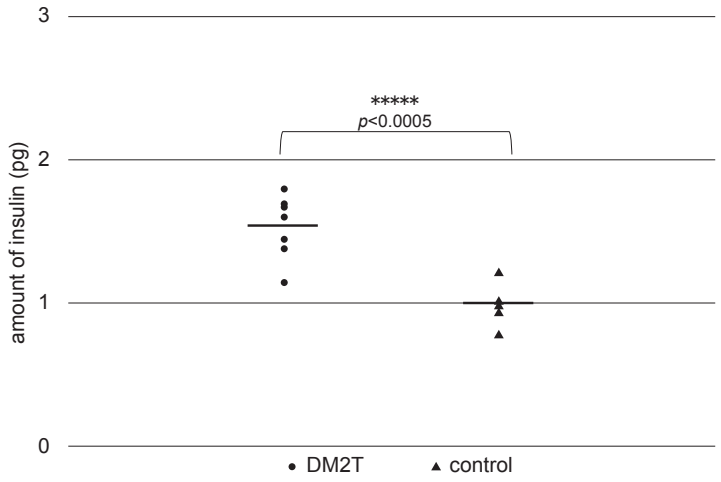


図 2a　1海馬当たりのインスリン量

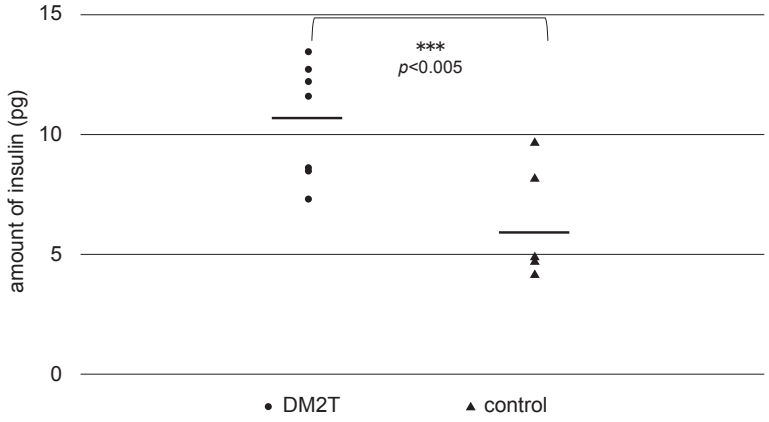


図 2b　海馬1mg当たりのインスリン量

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】

“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、すでに明らかにした。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られた。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]。

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型糖尿病の脳内では、末梢と同様に、脳内でもインスリン抵抗性が存在する可能性があり、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 signalling 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

同種臍帯血移植後のGVHD予防方法の臨床成績に与える影響についての前方視的検討

内田　直之、谷口　修一

【要約】

臍帯血移植（UCBT）後の至適なGVHD予防方法は確立していない。我々は、当院でのUCBT患者の治療成績に対するGVHD予防方法の影響を前向きに検討した。2021年10月から12月の間にUCBTを実施され、研究参加の文書同意をえた患者21名中、day 2に敗血症で死亡した1名を除く20名を対象とした。AML 12例、MDS 4例、ALL/MPAL 2例、ATLL 1例、AA 1例であった。年齢中央値60歳（32-71歳）、HCT-CI≧2点6例を含んだ。全例でTac+MMFによるGVHD予防が成された。MMF ≦20mg/kg群10例、＞20mg/kg群10例の2群間で、移植後100日の累積急性GVHD発症率が前者で100%、後者で63.3%と前者で有意に高かった。移植後100日の累積PIR・重症PIR発症率、累積非再発死亡率、累積再発率、無増悪生存率、全生存率はそれぞれ80% vs 80%、20% vs 20%、10% vs 12.9%、0% vs 10%、88.9% vs 79.5%、88.9% vs 88.9%で、両群間に有意差は認めなかった。以上より、UCBTにおいて、急性GVHDはGVHD予防時のMMFの量に依存することが示唆された。疾患リスクに応じたMMF用量の調節は、急性GVHD発症頻度を増加させるが、短期予後の悪化にはつながっていなかった。

【目的】

難治性造血器疾患に治癒をもたらす臍帯血移植（umbilical cord blood transplantation, UCBT）の成否は、移植後の同種免疫反応の制御にかかっているといっても過言ではない。同種免疫反応（生着前免疫反応、PIR；移植片対宿主病、GVHD）は、抗腫瘍効果の主要な役割を担う一方[1]、正常組織への過剰な同種免疫反応は治療関連死亡の要因となる[2]。UCBT後のGVHD予防として、シクロスポリン、タクロリムス等のカルシニューリン阻害剤（CI）とミコフェノール酸モフェチル（MMF）、メソトレキセート（MTX）などが組み合わせて使用されるが、至適方法は確立していない。当院ではタクロリムスとMMFの組み合わせを繁用しており[3]、タクロリムスは連日血中濃度を測定し、10-15ng/mlを目標濃度として点滴静注量を調整しているが、カプセル剤であるMMFは患者に応じて500-3000mg/日の範囲で投与している。本研究では、当院でのGVHD予防方法のMMF投与量に注目し、そのUCBT後アウトカムへの影響について、前向きに登録した患者コホートを用いて解析した。

【方法】

2021年10月～12月に初回同種移植としてUCBTを実施し、本研究参加に文書同意した患者を前向きに観察し、実体重当たりのMMF量に応じて2群間で移植成績を比較検討した。PIRの診断には、既報告で用いた基準を元に**表1**のように定めた[3]。統計解析は2群間の比較は名義変数ではFisherの正確検定、連続変数ではMann-Whitney U検定を用いた。全生存率、無増悪生存率はKaplan-Meier法を、非再発死亡、再発、PIR、急性GVHDの累積発症率はGray法を使用し、群間の比較はそれぞれLogrank検定、Gray検定を、多変量解析はそれぞれCox比例ハザード

表１　PIRの定義

38℃以上の発熱に以下の症状が２つ以上伴い、生着日より６日以上前に発症した場合をPIRと定義する。

・皮疹
・下痢（≧500ml/日か≧7回/日）
・黄疸（T.bil ＞2mg/dl）
・体重増加（ベースラインの＞5％）
・末梢性浮腫

以下の臓器障害のうち1つ以上該当する場合severe typeとする。

・肺（SpO_2 ＜92％か胸水・心嚢水貯留）
・腎臓（Cr ≧ベースライン×3）
・肝臓（T.bil ＞3mg/dl）
・骨髄（血球貪食症候群）
・中枢神経（痙攣）

回帰、Fine-Gray比例ハザード回帰を用いた。統計解析ソフトはEZRを使用した[4)]。

【結果】

1. 患者背景

登録した21例中、移植後2日に敗血症死亡した1名を除く20名を解析対象とした。年齢中央値60（32-70）歳、AML 12例、MDS 4例、ALL/MPAL 2例、ATLL 1例、AA 1例であった。骨髄破壊的移植前治療が16例、GVHD予防は全例でtacrolimus + MMFが使用された（**表2**）。

2. 全コホートの移植成績

生存者の観察期間中央値112.5（範囲, 73-163）日での100日全生存率は89.1％、無増悪生存率は84％、非再発死亡率は11％、再発率は5％（AAは二次性生着不全を再発と定義した）、好中球生着達成率は90％であった。免疫関連合併症の累積発症率は、全PIR 80％、重症PIR 31％、全急

表２　患者背景（AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; ALL, acute lymphoblastic leukemia; MPAL, mixed phenotype acute leukemia; ATLL, adult T-cell leukemia/lymphoma; AA, aplastic anemia; RIC, reduced-intensity conditioning; MAC, myeloablative conditioning; TAC, tacrolimus; MMF, mycophenolate mofetile; GvH, graft-versus-host; TNC, total nucleated cell count）

	Total	MMF-lo (≤20mg/kg)	MMF-hi (>20mg/kg)	*P*
Total（male / female）	60 (14/6)	10 (8/2)	10 (6/4)	0.63
Age, median（range）	60 years (32 - 71)	59 (32-71)	58.5 (41-70)	0.55
Disease, n.（%）				0.17
AML	12 (60%)	8	4	
MDS	4 (20%)	2	2	
ALL/MPAL	2 (10%)	0	2	
ATLL	1 (5%)	0	1	
AA	1 (5%)	0	1	
Disease status, n.（%）				0.65
non-remission status	13 (65%)	7 (70%)	5 (50%)	
Conditioning regimen, n.（%）				0.58
RIC / MAC	4 (20%)/16 (80%)	1 (10%)/9 (90%)	3 (30%)/7 (79%)	
GVHD prophylaxis, n.（%）				
TAC + MMF	20 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	
HLA disparity（GvH direction）				
Antigen　1/2/3	2/5/13	1/3/6	1/2/7	1.0
Allele　2/3/4	2/12/6	1/7/2	1/5/4	0.8
Number of TNC infused				
Median（range）×10^7/kg	2.07 (1.68-2.73)	2.00 (1.68-2.43)	2.21 (1.88-2.73)	0.043
Number of CD34$^+$ cells infused				
Median（range）×10^5/kg	0.85 (0.51-1.97)	0.79 (0.51-1.54)	0.89 (0.55-1.97)	0.32

性GVHD 81.7%、急性GVHD grade Ⅱ－Ⅳ 55%、grade Ⅲ－Ⅳ 41%であった。4例が死亡の転帰をとり、3例がNRM（間質性肺炎 1例、類洞閉塞症候群 1例、多臓器不全 1例）、1例が原病再発であった。

3. GVHD予防方法（MMF量）別の移植成績

実体重当たりMMF量 ≤20mg/kg（MMF-lo群, n = 10）と＞20mg/kg（MMF-hi群n = 10）の2群に分けて解析した。2群の患者背景を**表2**に示す。MMF-lo群で体重当たりの総有核細胞数が有意に低かった（P = 0.043）が、それ以外の因子は統計学的な有意差は認めなかった。移植後100日の全急性GVHDの累積発症率がMMF-lo群で100%、MMF-hi群で63.3%とMMF-lo群で有意に高かった（P = 0.0124）（**図1**）。Grade Ⅱ－Ⅳ（MMF-lo群 60%、MMF-hi群 50%）、Ⅲ－Ⅳ（同 41.7%、40%）のGVHDの累積発症率は有意差を認めなかった。全PIR（同 80%、80%）、重症PIR（同 20%、20%）の累積発症率は、両群間で有意差を認めなかった。100日全生存率（同 88.9%、88.9%）、無増悪生存率（同 88.9%、79.5%）、非再発死亡率（同 10%、12.9%）、再発率（同 0%、10%）、生着率（同 90%、90%）も両群間で有意差を認めなかった。

多変量解析では、実体重当たりのMMF量が＞20mg/kgであることが急性GVHD発症を低下させる有意な因子として抽出された（Hazard ratio, 0.28, P = 0.025）。Grade Ⅱ－Ⅳ、Ⅲ－Ⅳの急性GVHD発症には有意な因子は抽出されなかった。全PIR、重症PIR、発症、NRM、再発率、全生存率、無増悪生存率に統計学的に有意に影響する因子は抽出されなかった（データ供覧省略）。

【考察】

MMFはプリンのde novo合性経路のイノシン酸脱水素酵素を可逆的、非競合的に阻害し、DNA合成を阻害することで、同経路に依存するT細胞、B細胞の活性化を阻害する免疫抑制剤である。臓器移植領域で主に使用されていたが、シアトルのグループが造血細胞移植でも有用であると報告し、以降全世界で使用されている[5)]。UCBT後は好中球回復までの期間が骨髄・末梢血幹細胞移植よりも長いため、MTXと比べて骨髄抑制作用が軽いMMFは使用し易く、高齢患者などを中心に当院では繁用されている。一方で250mgのカプセル剤であり、至適投与量は十分確立していなかった。

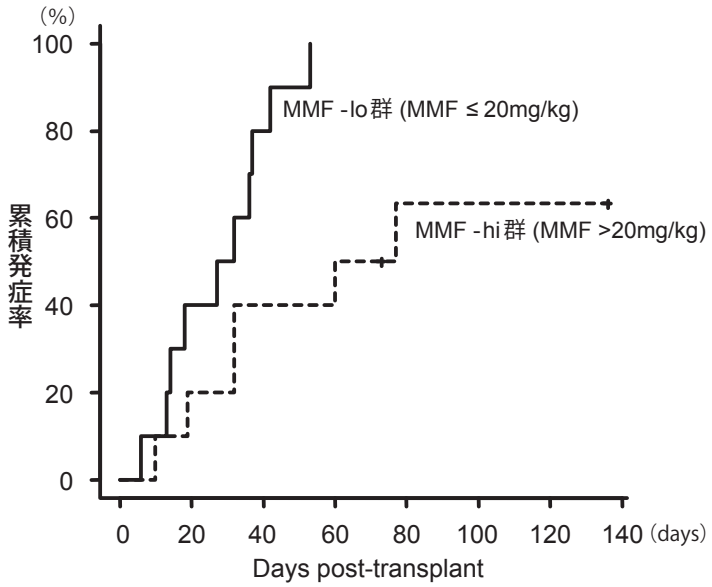


図 1　MMF使用量別の急性GVHD累積発症率
MMF-lo群でMMF-hi群と比べて有意に急性GVHD累積発症率が増加した（P = 0.0124）

この度の検討で、MMFの体重当たりの投与量での2群間比較で、MMF-lo群で急性GVHDの累積発症頻度が有意に高く、UCBT後の急性GVHDがMMF投与量依存性であることが示された。一方で、grade Ⅱ-Ⅳ、Ⅲ-Ⅳの重症GVHDの発症頻度は他ドナーからの移植と遜色なく、急性GVHDが直接死因となった例もなかったことから、MMF-lo群での投与量でも、UCBT後の急性GVHDの重症化抑制には十分である可能性が示唆された。本コホートでの急性GVHDの100日時点での累積発症率は81.7%と、既報告よりも高率であった。MMFは通常30-45mg/kg投与されることが多いが、当院のUCBT症例での投与量はこれらと比べて少量であり、高い全急性GVHD発症頻度に影響した可能性があり、このことも急性GVHD発症がMMFの投与量依存性であることを指示する。

以前我々はCI単独群とCI+MMF群のmatched pair analysisで、重症PIRを軽減し、早期のNRMを減少させ、生着達成率が改善することを報告した[3)]。今回の解析では、MMF-lo群とMMF-hi群とで全PIR・重症PIRの累積発症率に有意差が認められず、MMF-lo群での投与量でも、PIRのコントロールには十分であることを示している。両群共に好中球回復は90%と良好であったことも、これを支持する。PIRと急性GVHDの病態の異同については論議のあるところではあるが、この度のコホートでMMF投与量の影響がPIRと急性GVHDとでは異なっていた点は、両者が異なったメカニズムを有することを示唆する。一方で、今回解析に加えていない他の薬剤（コルチコステロイド等）がPIRの発症やその後のコントロールに影響した可能性も否定できない。

本研究コホートの各症例のMMF使用量は、担当医が個別に決定している。MMF-lo群とMMF-hi群とで移植後100日時点で非再発死亡率に有意差はなく、MMF使用量が少なくても短期的な予後の悪化は防げている。急性GVHD発症率は上昇することから、co-morbidityを有する治療関連死亡のリスクが高い例では、十分量のMMFを使用することが望ましいといえる。原疾患の再発リスクが高い場合、MMF使用量を減じることが再発率抑止に有効か否かは、いまのところ両群間の再発率に有意差はないことから明らかではない。

本研究の限界として、前向きコホート研究としては患者数が少なく、統計学的有意差が出にくかった可能性がある。また、今回検討対象としたMMF以外の使用薬剤の移植後アウトカムへの影響があった可能性が否定できない。さらに疾患リスクに応じて各担当医が設定したタクロリムスの目標値の違い（目標治療域内での高め・低めなど）や、介入タイミングの違いが移植成績に影響する可能性もある。観察期間も中央値が100日超と短く、長期予後への影響は検討できていないことも挙げられる。

本研究では、これまで主に後方視的解析結果ばかりであったUCBTのGVHD予防法を前向きに観察し、体重当たりのMMF使用量が急性GVHD累積発症率に影響することを示した。生存率や非再発死亡率への影響は認められず、MMF使用量が少ないことが、短期予後の悪化にはつながっていなかった。今後のさらなる症例集積と長期間のフォローアップで、適切なGVHD予防法の確立を目指すことが望まれる。

【文献】

1. Yamamoto H: Cord blood transplantation for advanced hematological malignancies; potential GVL effect of CB（SY1-3). The 41st Annual Meeting of the Japan Society for Hematopoietic Cell Translantation（Osaka), 2019
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
4. Kanda Y: Investigation of the freely avail-

able easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. Bone Marrow Transplant 48:452-458, 2013
5. Ueda Oshima M, Storer BE, Qiu H, et al.: Long-term outcomes with nonmyeloablative HLA-identical related hematopoietic cell transplantation using tacrolimus and mycophenolate mofetil for graft-versus-host disease prophylaxis. Transplant Cell Ther 163.e1-163.e7, 2021

同種造血幹細胞移植後の骨粗鬆症の発症率と予後に関する研究

森　有紀、渡部　音哉、山口　亨祐、梶　大介、景山　康生、田矢　祐規
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患者411例（男性247、女性164）における骨減少症・骨粗鬆症の発症率、リスク因子及び予後に関する解析を行った。年齢の中央値は52才で、285例で臍帯血移植を行った。移植後1～1.5年、2～2.5年及び3～4年の%YAMとTスコアは、91.4±17.2及び-0.73±1.39及び、89.2±16.0及び-0.90±1.30、87.1±15.3及び-1.06±1.25と経時的に低下傾向を示した。219例（53%）で骨減少症を認め、女性（HR 1.89）がリスク因子として同定された。このうち55例（13.4%）で骨粗鬆症を認め、リスク因子として、高齢（HR 1.04）と女性（HR 4.17）が同定された。136例でビスフォスフォネート療法、117例でビタミンD補充療法を行い、回復不十分と判断した14例でDenosumabを導入した。また若年女子38例でホルモン補充療法を行った。移植後骨減少症を認めかつ骨密度の経時的な評価が可能だった181例において、治療介入群の骨密度は、非介入群と比較して、移植後1～1.5年の時点では低いものの時間と共に改善し、非介入群に近づくことが明らかとなった。ビスフォスフォネート又はビタミンDの単剤投与よりも両者の併用投与において、より高い改善効果を認めた。以上より、同種移植患者で、特に高齢者や女性においては、骨密度の定期的なモニタリングが必要で、単剤治療で骨密度の改善が不十分な場合は併用治療を積極的に行うことで、骨減少症・骨粗鬆症の発症率や予後を改善できる可能性があることが示唆された。

【目的】

骨粗鬆症は、同種造血幹細胞移植後の重要な晩期合併症の1つであり、発症率は、骨粗鬆症で25%、骨減少症では50%に達する[1)]。リスク要因は、移植前処置の大量抗がん剤/全身放射線照射、移植片対宿主病（GVHD）とその予防/治療に用いられるカルシニューリン阻害剤の投与、長期にわたるステロイドの使用、性腺機能不全、消化管粘膜障害に起因するCaの吸収不良、腎不全など多岐に渡り、複数の因子が重なり合って骨形成と骨再吸収の不均衡を引き起こすと考えられる[2,3)]。骨粗鬆症は進行すると、脊椎の圧迫骨折や大腿骨頸部骨折などにより移植後の生活の質（QOL）を著しく損なうため早期に発見し対処することが大切だが、移植後骨減少症・骨粗鬆症に関する本邦のデータや指針は乏しいのが現状である[4-6)]。本研究では、本邦の同種移植後成人患者における骨減少症・骨粗鬆症の発症率、リスク因子、予防・治療介入による効果や予後を後方視的に解析し、移植後骨粗鬆症対策として有用な予防・治療戦略を確立することを目的とした。

【方法】

2010年4月～2018年12月に当院で同種造血幹細胞移植を施行後1年以上生存し、移植前に骨粗鬆症の既往がなく、かつ少なくとも移植後1回の骨密度評価を実施した患者を解析対象とした。骨密度は腰椎または大腿骨で測定した。骨減少症及び骨粗鬆症の診断は、骨密度のピークを示す同性の若年成人の骨密度の平均値（young adult mean, YAM）に対する比（%YAM）、及びYAMと標準偏差（SD）より算出されるTスコアを用いて行い、% YAMが70%以上80%未満或いはTスコア -1.0～-2.5（YAM-1.0SD～2.5SD）を骨減少症、% YAMが70%未満或いはTスコア -2.5以下（≦YAM -2.5SD）を骨粗鬆症と診断した。骨減少症及び骨粗鬆症の累積発症率を、非発症死亡を競合因子として、Gray's法を用いて評価した。リスク因子は、Fine-Gray比例ハザード回帰分析によるステップワ

イズ法を用いて同定した。予防・治療介入効果については、反復測定分散分析法により解析した。

【結果】

解析対象は411例で、男性247例及び女性164例、年齢の中央値は52（20-73）才で、384例（93.4%）が初回移植、臍帯血移植が69.4%（285例）を占め、91%（374例）で骨髄破壊的移植が行われた（**表1**）。フォローアップ期間の中央値は2146（365-4270）日だった。移植後1～1.5年の骨密度は、%YAMが91.4±17.2、T-スコアが-0.73±1.39、移植後2～2.5年では、%YAMが89.2±16.0、T-スコアが-0.90±1.30、移植後3～4年では%YAMは87.1±15.3、T-スコアが-1.06±1.25と、いずれも時間と共に低下傾向を示した。219例(53%)で骨塩の低下（骨減少症または骨粗鬆症）を認め、全累積発症率は53.6%、リスク因子として女性（HR 1.89（1.46-2.45), P<0.001）が同定された。このうち55例（13.4%）で骨粗鬆症の診断となり、全累積発症率は13.9%で、リスク因子として高齢（HR 1.04（1.01-1.06), P=0.002）と女性（HR 4.17（2.30-7.54), P<0.001）が同定された。136例（33.1%）でビスフォスフォネート療法を、117例（28.5%）でビタミンD補充療法を行い、両方の治療を要したのは72例（17.5%）だった。これらの治療で十分な改善が得られなかった14例（3.4%）でDenosumabを導入した。若年女子38例でホルモン補充療法を行った。移植後1～1.5年から経時的な骨密度評価が可能かつ移植後に骨減少症を認めた181例において、予防・治療介入群の骨密度は、移植後1～1.5年では低いものの時間と共に改善し、非介入群の値に近づくことが分かった（**図1**）。また、ビスフォスフォネートまたはビタミンDの単剤投与と併用投与を比較したところ、併用投与群では、単剤投与群と比較して、移植後1～1.5年の骨密度は低いものの、時間と共により良好な改善が認められた（**図2**）。

表 1　患者背景

項目		患者数
年齢	中央値	52 (20-73)才
性別	男性	247
	女性	164
原疾患	急性骨髄性白血病/MDS	265
	急性リンパ性白血病	45
	悪性リンパ腫	50
	その他	51
移植回数	初回	384
	2回目以降	27
移植源（ドナー）	臍帯血	285
	非血縁成人	82
	血縁成人	44
移植前処置	骨髄破壊的	374
	骨髄非破壊的	37
急性GVHD	あり	259
	なし	152
慢性GVHD	あり	253
	なし	158

【考察】

本研究における同種移植後骨減少症及び骨粗鬆症の発症率は既報告とほぼ同等だった。リスク因子については既に様々な要因が報告されているが、本研究では、骨減少症及び骨粗鬆症共に女性でのリスクが高いという結果が得られた。これは、移植前処置で使用される強力な抗がん剤や全身放射線照射などによる性腺機能不全により、閉経後骨粗鬆症と類似の病態が作り出されることが一因として挙げられる。従って、生殖年齢の同種移植後女性患者は骨密度の維持も考慮したホルモン補充療法の適応だと考えられる。一方、同種移植患者は、慢性GVHDやその治療としての高用量かつ長期のステロイドの投与など骨減少症や骨粗鬆症を進行させる要因が一般人口と比較して多い。しかしながらそのような条件下でも、ビスフォスフォネートやビタミンDを用いた早期の予防・治療介入により、骨塩量の低下を阻止し、改善につなげる可能性が十分にあることが明らかとなった。特にビタミンDについては、近年、同種移植後の骨疾患対策以外にも免疫回復や感染症対策としての効果も期待されている[7)]。以上より、同種移植後患者における定期的な骨密度のモニタリングの重要性と共に、特にリスクが高い高齢や女性患者では、骨減少症・骨粗鬆症の予防・早期発見を念頭においた対策が重要であることが示唆された。また本研究より、複数のリスク要因を有する

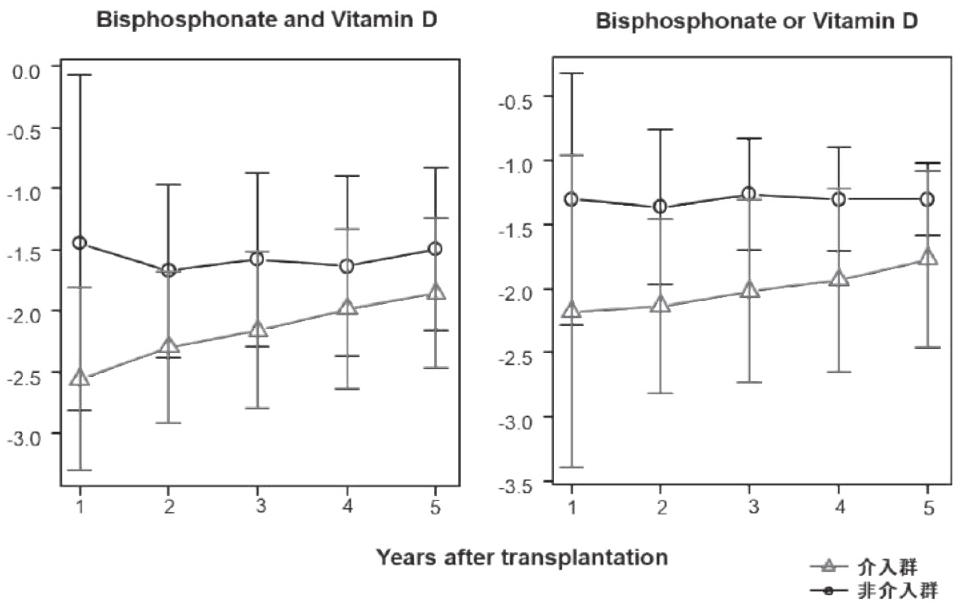


図１　移植後骨減少症患者における何らかの予防・治療介入の有無による骨密度の推移

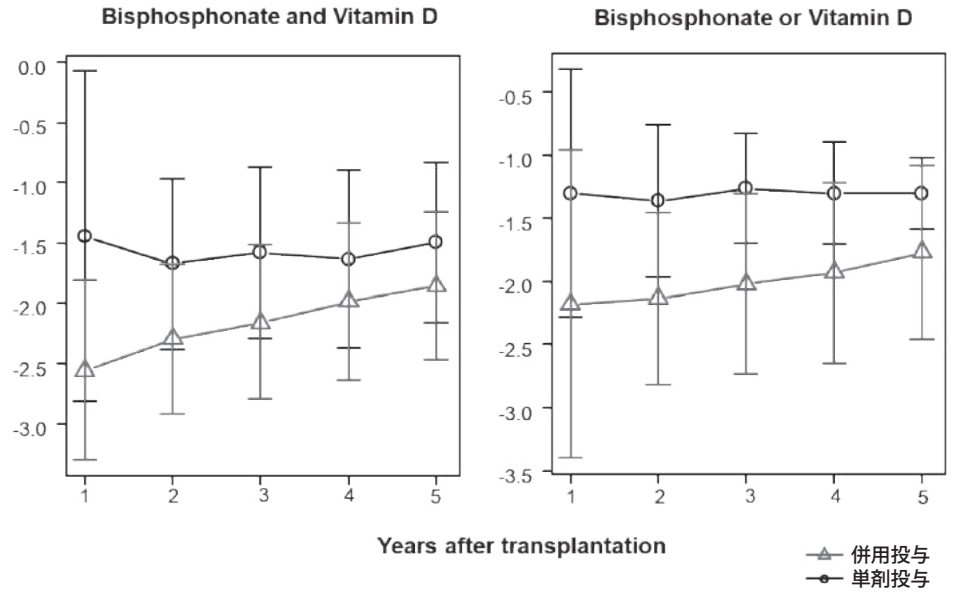


図２　移植後骨減少症患者におけるビスフォスフォネート又はビタミンＤの単剤投与と併用投与との比較

可能性が高い同種移植患者においても、適切なモニタリングと予防・治療介入により骨密度の改善が見込めることも示された。今後は、骨代謝性疾患とQOLとの関係についても解析を進めていきたい。

【文献】

1. McClune B, Majhail NS, Flowers ME: Bone loss and avascular necrosis of bone after hematopoietic cell transplantation. Semin Hematol 49:59-65, 2012
2. McClune BL, Majhail NS: Osteoporosis after stem cell transplantation. Curr Osteoporos Rep 11:305-310, 2013
3. Schulte CM, Beelen DW: Bone loss following hematopoietic stem cell transplantation: a long-term follow-up. Blood 103:3635-3643, 2004
4. McClune BL, Polgreen LE, Burmeister LA, et al.: Screening, prevention and management of osteoporosis and bone loss in adult and pediatric hematopoietic cell transplant recipients. Bone Marrow Transplant 46:1-9, 2011
5. Majhail NS, Rizzo JD, Lee SJ, et al.: Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 18:348-371, 2012
6. Nawata H, Soen S, Takayanagi R, et al.: Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis of the Japanese Society for Bone and Mineral Research (2004). J Bone Miner Metab 23:105-109, 2005
7. Hong S, Ferraro CS, Hamilton BK, et al.: To D or not to D: vitamin D in hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant 55:2060-2070, 2020

高齢者に対する臍帯血移植における従来と新規の移植前処置の比較

高木　伸介、谷口　修一

【要約】

高齢者や併存症を有する造血器疾患患者にとって臍帯血は重要な移植幹細胞源である。しかし、至適な移植前処置は確立されていない。我々はそのような患者集団に対して新規の移植前処置FBMTレジメンを用いているが、従来の移植前処置と比較して遜色ない結果が得られた。

【背景】

同種造血細胞移植（以下、同種移植）は難治性造血器疾患に対する根治療法である。日本国内では年間約4,000件の同種移植が行われているが、臍帯血移植はそのうちの約3分の1を占める。ドナーに負担をかけることなく迅速に提供できるため、日本国内で臍帯血は幅広く適用されており、高齢者や併存症を有する患者もその対象に含まれる。しかし現在でも高齢者や併存症を有する患者に対して臍帯血移植を行う際の移植前処置は未確立である。当科では長年、フルダラビン（Flu）150-180mg/m^2、メルファラン（Mel）80mg/m^2、全身放射線照射（TBI）4 Gyを用いた骨髄非破壊的前処置（FMT_4）を採用してきた。その後、2016年に非寛解期の骨髄系腫瘍に対するFlu 180 mg/m^2、ブスルファン（Bu）12.8mg/kg、Mel 80mg/m^2を用いた骨髄破壊的前処置（FB_4M）の有効性について報告した[1, 2]。しかし、高齢者や併存症を有する患者に骨髄破壊的前処置を用いる場合、非再発死亡率が高くなることが懸念だった。FMT_4での高率で速い好中球生着、FB_4Mの高い抗腫瘍効果、両者の特徴を生かした新規骨髄非破壊的前処置として、2018年7月からFlu 180mg/m^2、Bu 6.4mg/kg、Mel 80mg/m^2、TBI 4-8Gyを用いた新規骨髄非破壊的前処置（$FB_2MT_{4\text{-}8}$）を開始した。Buの投与量を半分に減量し、その減量分の前処置強度を補完するためにTBI 4Gyで代替した。本研究では高齢者及び併存症を有する患者に対する新規骨髄非破壊的前処置FB_2MT_4を用いた臍帯血移植の有効性と安全性について明らかにすることを目的とする。

【方法】

2018年7月から2021年3月の間に虎の門病院血液内科で行われた臍帯血移植のうちFB_2MT_4レジメンで移植前処置を行った症例を抽出した。後方視的観察研究のため除外基準は設けず、現在通院していない症例や死亡症例についても研究対象に含んだ。好中球生着の累積発症率についてFB_2MT_4を用いた患者群とその他の前処置を用いた患者群でGray法を用いて比較した。Kaplan Meier法を用いて算出した全生存率についてFB_2MT_4を用いた患者群とその他の前処置を用いた患者群でLog-rankテストを用いて比較した。統計解析にはEZRを使用した。

【結果】

2018年7月から2019年12月の間にFB_2MT_4を用いた臍帯血移植の27症例について解析した。年齢中央値は64歳（範囲: 33-72）、男性が16例（59%）、骨髄系腫瘍が23例（85%）、移植前病期が非寛解である症例が23例（75%）を占めていた。年齢は59歳以下が8例、60-64歳が6例、65-69歳が8例、70歳以上が5例だった。実体重の中央値は53.2kg（範囲: 40.3-102）、HCT-CI（造血細胞移植comorbidity index）スコアの中央値は2点（9-6）だった。全身放射線照射として7例がtomotherapyを採用していた。GVHD予防は1例を除いて全例でタクロリムス（Tac）とミコフェノール酸モフェチル（MMF）を用いていた。臍帯血に含まれる有核細胞数の中央値は凍結時が2.55×10^7/kg（範囲: 1.73-4.96）、解凍時が2.56×10^7/kg（範囲: 1.73-5.22）だった。臍帯血に含まれるCD34^+細胞数の中央値は凍結時が0.75×10^5/kg（範囲: 0.53-2.01）、解凍時が

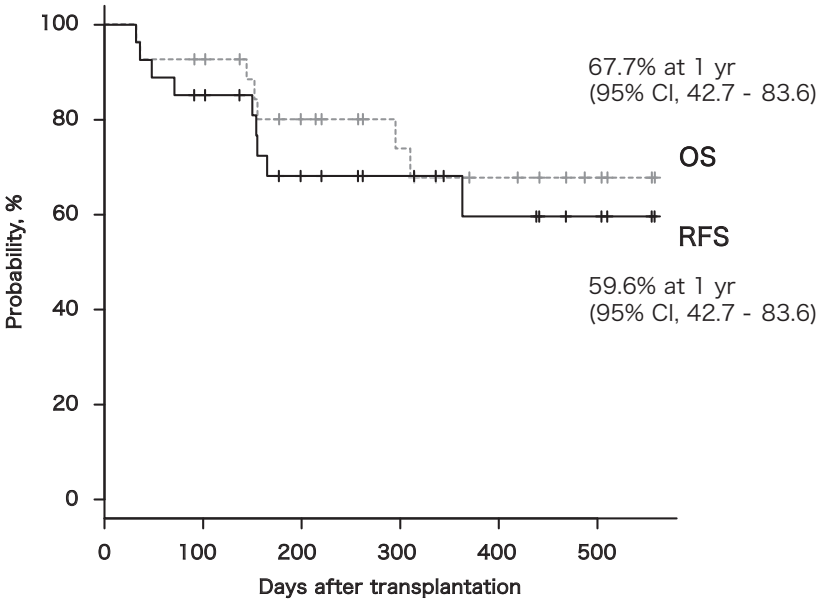


図 1

0.70×10^5/kg（範囲: 0.41-1.95）だった。レシピエント・ドナー間のHLA一致度（GVH方向）は、4/8が2例、5/8が4例、6/8が7例、7/8が10例、8/8が4例だった。移植後30日での好中球生着率は100%で、移植から好中球生着までの日数の中央値は17日（範囲: 13-30）だった。移植後7-11日目のドナーキメリズムは98.9%（範囲: 85.3-100）だった。移植後120日での血小板生着率（> 2万および> 5万/μL）は77.8%および74.1%で、移植から血小板生着までの日数の中央値は52日（範囲: 45-83）および53日（範囲: 45-92）だった。移植後1年での全生存率は67.7%（95%信頼区間: 42.7-83.6）、無再発生存率は59.6%（95%信頼区間: 42.7-83.6）だった（**図1**）。移植後1年での再発の累積発生率は27.8%（95%信頼区間: 9.9-49.1）、非再発死亡の累積発生率は11.7%（95%信頼区間: 2.8-27.5）だった。

これらの結果を受けて2018年7月から2021年3月の間にBuを用いた初回同種移植として臍帯血移植を行った262症例について予備解析を追加した。移植前処置開始前のPSが4の症例は除外した。移植前処置レジメンはFB_4M群 161症例、$FB_{2-3}M$群 42例、FB_2MT_{4-8}群 59症例だった。年齢中央値は58歳（範囲: 18-77）だった。移植後60日での好中球生着率は全体で94.3%（95%信頼区間: 90.5-96.6）だった。FBM群では92.6%（95%信頼区間: 87.9-95.5）だったのに対して、FBMT群では100%で良好な結果だった（P < 0.001）。移植後2年での全生存率は全体で45.0%（95%信頼区間: 37.7-52.0）だった。移植後1年での全生存率はFB_4M群では56.2%（95%信頼区間: 41.7-63.9）、$FB_{2-3}M$群では47.6%（95%信頼区間: 31.4-62.1）だったのに対して、FB_2MT_{4-8}群では63.7%（95%信頼区間: 47.7-72.7）で良好な結果だった（単変量解析, P < 0.05）。

【考察】

新規の移植前処置レジメンであるFBMTについて解析した結果、従前からの移植前処置と比較して、生着や全生存率などについて遜色のない結果だった。結果の後半部分の前処置レジメンの比較については今後、多変量解析を加えてさらに詳細な検討を行う予定である。また、FBMTレジメンにおける非再発死亡の原因となりうる移植後合併症について2022年度の研究で解析を行う予定である。

【文献】

1. Yamamoto H, Uchida N, Yuasa M, 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
2. Shimomura Y, Hara M, Yamamoto H, et al.: Adding melphalan to fludarabine and a myeloablative dose of busulfan improved survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a propensity score-matched cohort of hematological malignancies. Bone Marrow Transplant 56:1691-1699, 2021

【発表に関する事項】

1. 高木伸介, 三ツ木崇, 湯淺光博ら: 新たな強度減弱前処置FBMTを用いた臍帯血移植の成績. 第42回日本造血細胞移植学会総会（2020年, 東京）
2. 荒井奈々, 高木伸介, 山口享祐ら: 骨髄増殖性腫瘍に対するFBMTレジメを用いた臍帯血移植後の生着についての検討. 第43回日本造血細胞移植学会総会（2021年, 東京）
3. 川口有紀子, 高木伸介, 清水夕貴ら: 骨髄系腫瘍の高齢者に対するFBMT regimenを用いた臍帯血移植についての検討. 第83回日本血液学会学術集会（2021）
4. Takagi S, Ogura S, Araoka H, et al.: The impact of graft cell source on blood stream infection in the first 100 days after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant 56:1625-1634, 2021

異常間質細胞による濾胞性リンパ腫の支持機構の解明

坂田（柳元）麻実子
筑波大学医学医療系血液内科

【要約】
正常リンパ節および悪性リンパ腫においては、血管・リンパ管・間質細胞などのストローマ細胞が微小環境ネットワークを形成し、正常あるいはがん化したリンパ球の移動および活性化に関わると想定されていたが、詳細は明らかではなかった。本研究では、正常リンパ節および悪性リンパ腫のリンパ節病変について、これらのストローマ細胞の単一細胞解析を行い、アトラスを作製した。正常リンパ節、悪性リンパ腫の双方において、血管・リンパ管・間質細胞は10種類、8種類、12種類、合計30種類のサブタイプに分類され、一部はこれまでに同定されていない新規のサブタイプであった。また、悪性リンパ腫に特徴的に発現する遺伝子群、さらには悪性リンパ腫とこれらのストローマ細胞の相互作用に関する分子群を同定した。ストローマ細胞で特徴的に発現する遺伝子群の中には、悪性リンパ腫患者の予後の層別化に有用であった。本研究は悪性リンパ腫の病態解明および治療層別化に役立つと期待される。

【目的】
悪性リンパ腫は、リンパ節を含むさまざまなリンパ組織に主として発生する血液がんである。悪性リンパ腫は約80種類の疾患に分類され、多くの疾患は根治が困難であることから、新規の治療研究が進められている。なかでも、がん細胞を取り巻く微小環境細胞はがん細胞の生存や増殖を支持すると考えられてきたが、詳細は明らかではなかった。特に、リンパ節の内部はコンパートメント（各領域）に分離されており、血管・リンパ管・間質細胞などのストローマ細胞は、リンパ球あるいは悪性リンパ腫においてはがん化したリンパ球が各コンパートメント間を行き来し、特定のコンパートメントで活性化されるのに有用であると考えられてきたが、詳細は明らかではなかった。

さらに、近年では、単一細胞レベルで遺伝子発現を解析するシングルセルRNAシーケンス技術が開発され、多様性や新規の細胞種が同定されている。しかしながら、正常あるいは悪性リンパ腫のリンパ節病変におけるストローマ細胞については、単一細胞レベルの解析は十分行われてこなかった。そこで、ヒトのリンパ節と悪性リンパ腫の節性病変のストローマ細胞の多様性を包括的に明らかにするために研究を行った。

【方法】
本研究は、筑波大学附属病院および協力病院の各倫理委員会において承認を受けた上で行った。ヒト「正常」リンパ節を得ることは倫理的に困難であることから、代替として、固形腫瘍あるいはこれが強く疑われ、診療のためにリンパ節郭清術注を受けた患者検体の各リンパ節のごく一部について、腫瘍の転移がないことを確認したリンパ節を利用した。悪性リンパ腫については、濾胞性リンパ腫を主な解析対象とした（**図1**）。各リンパ節検体は細かく砕いた後、酵素処理を行った後、ストローマ細胞を含む非血液細胞分画をセルソーターで分取した。その後、Chromiumシステムを用いてライブラリ作製を行い、HiseqXによりシーケンスを行った。Seurat, Monocle3, CellphoneDBなどの各種パイプラインを用いてデータ解析を行った。

【結果】
ヒトリンパ節と濾胞性リンパ腫のストローマ細胞について、シングルセルRNAシーケンス解析による遺伝子発現データ情報を統合した。クラスタリング解析では、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、非内皮性間質細胞分画に分かれた。それぞれの細胞分画をin silicoに抽出後、再度クラスタ

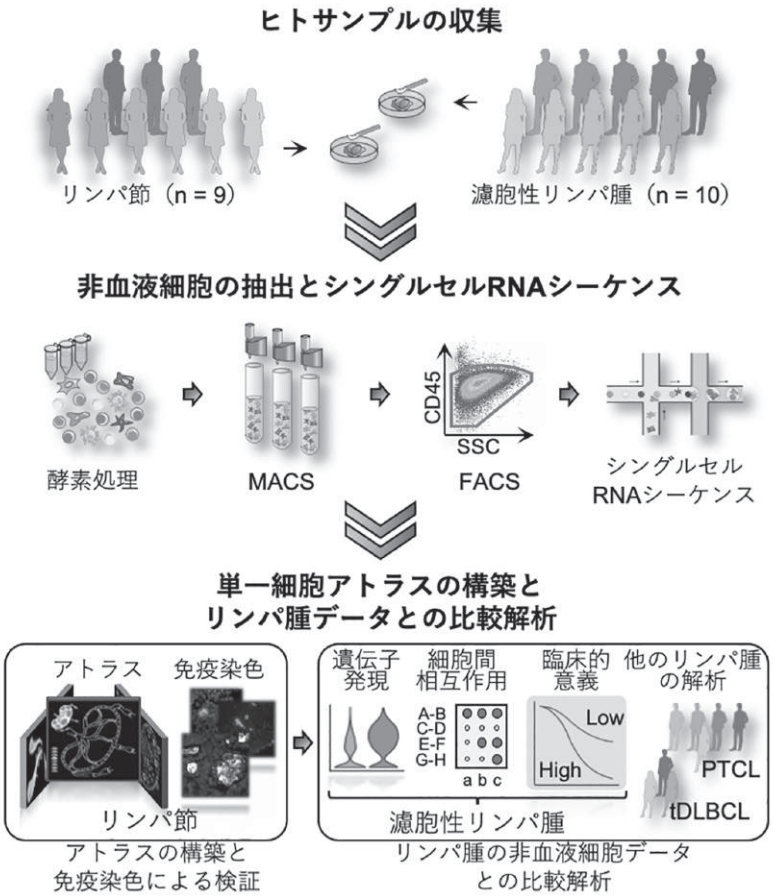


図 1　研究概要

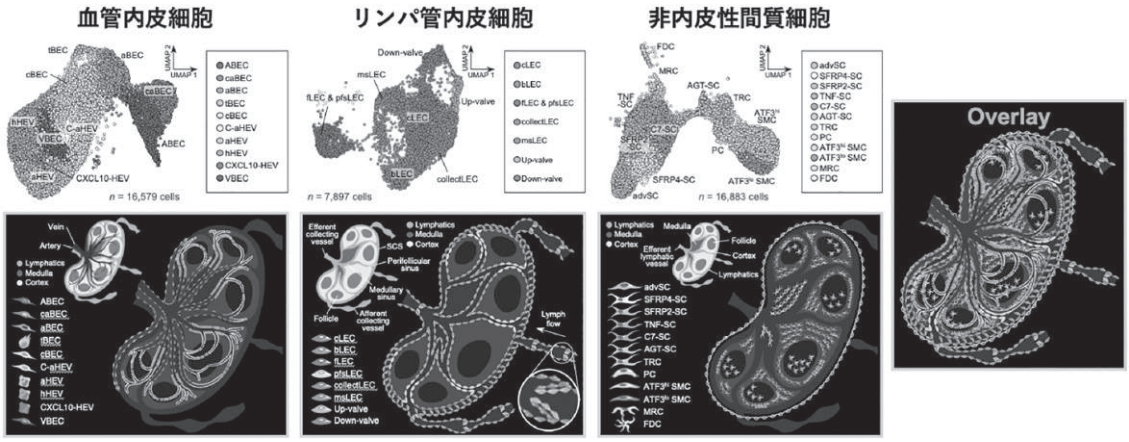


図 2　間質細胞により作製したシングルセルアトラス

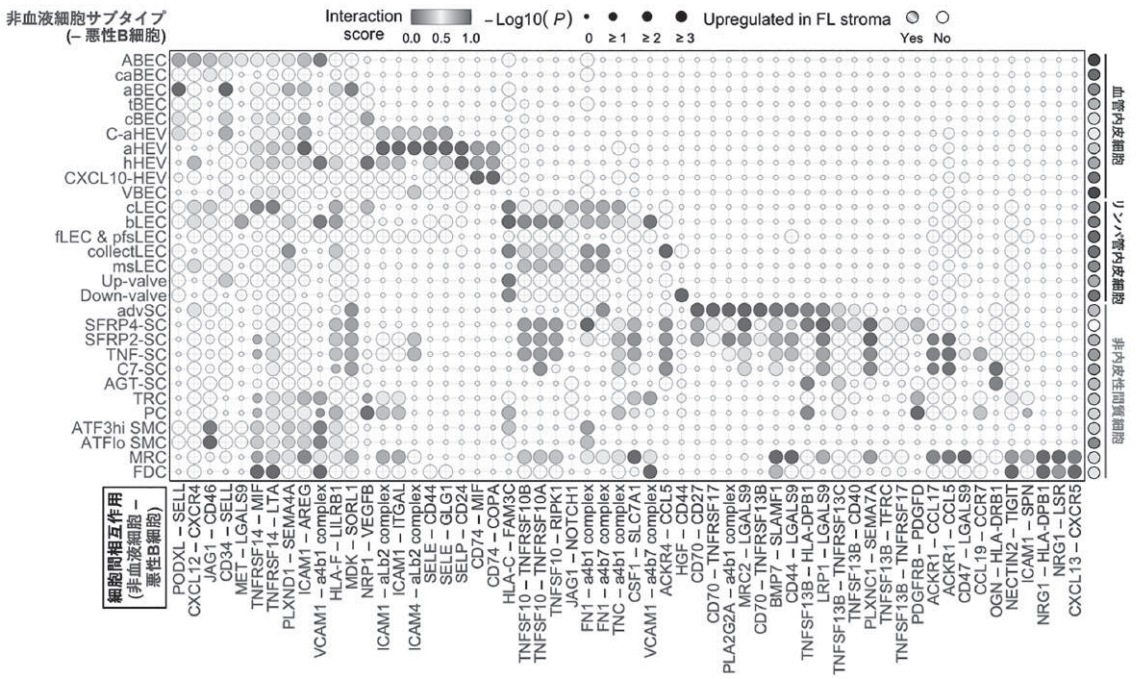


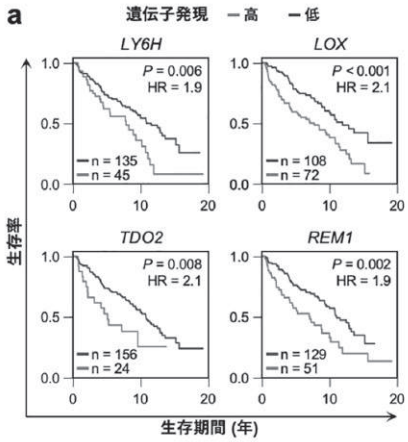
図３　腫瘍細胞と間質細胞の各サブクラスタ間の相互作用

リングを行ったところ、10種類、8種類、12種類、計30種類の異なったサブクラスターに細かく分類された（**図2**）。それぞれのサブクラスターについては、それぞれを特徴付ける遺伝子発現群を抽出し、機能の推定を行った。また、各サブクラスターのリンパ節の各コンパートメントにおける局在部位を免疫染色法により明らかにした。これによって、ヒトリンパ節について、単一細胞レベルのアトラス（シングルセルアトラス）を作製した。次に、濾胞性リンパ腫と「正常」リンパ節の間質細胞分画について、包括的な比較解析を行った。サブクラスター毎の比較では、遺伝子発現変化のパターンは大きく異なっていた。濾胞性リンパ腫の間質細胞における発現変化が知られていない発現変化も同定された。なかには、固形がんの間質細胞で高発現し、がんの進展を促す変化も含まれていた。さらには、濾胞性リンパ腫の腫瘍細胞と間質細胞の相互作用をin silicoに推定したところ、サブタイプ毎に特徴的な相互作用分子が同定された（**図3**）。さらに、間質細胞の各サブクラスタにおける遺伝子発現データと、過去に公開されている濾胞性リンパ腫の網羅的遺伝子発現解析データと臨床予後データを組み合わせて比較することで、予後不良に関わる間質細胞の遺伝子発現変化を同定した（**図4**）。

【考察】

本研究では、ヒトのリンパ節と悪性リンパ腫のリンパ節病変の間質細胞について、包括的にシングルセルRNAシーケンス解析と免疫染色を組み合わせることで、シングルセルアトラスを作製した。悪性リンパ腫の間質細胞について見いだされた特徴的な所見により、これらの間質細胞および間質細胞と腫瘍細胞間の相互作用分子を標的とする治療開発、また予後予測システムの開発に繋がることが期待される。さらには、今回作製したシングルセルアトラスを応用することで、ヒトリンパ節の間質細胞の分類に関する理解が進み、今後はがん免疫などの多様な研究へと応用されることが期待される。

※図はいずれも　Nature Cell Biology, in press から改変、引用した。



b

変数	単変量コックス回帰解析		多変量コックス回帰解析	
	ハザード比 (95% 信頼区間)	*P* 値	ハザード比 (95% 信頼区間)	*P* 値
IPIリスク, 中・高	3.12 (1.96–4.96)	<0.001	2.35 (1.46–3.80)	<0.001
自家移植, 施行なし	0.61 (0.26–1.41)	0.24	–	–
***LY6H* 発現, 高**	1.86 (1.18–2.93)	0.006	**1.98 (1.17–3.34)**	**0.010**
***LOX* 発現, 高**	2.07 (1.37–3.13)	<0.001	**2.07 (1.31–3.26)**	**0.001**
PTGIS 発現, 高	1.63 (1.07–2.46)	0.020	1.11 (0.65–1.91)	0.68
***TDO2* 発現, 高**	2.09 (1.19–3.76)	0.009	**1.95 (1.05–3.62)**	**0.033**
***REM1* 発現, 高**	1.92 (1.25–2.95)	0.002	**1.63 (1.01–2.64)**	**0.044**
PIEZO2 発現, 高	2.03 (1.12–3.68)	0.019	1.57 (0.79–3.10)	0.19
CHI3L1 発現, 高	2.23 (1.35–3.70)	0.001	1.57 (0.91–2.71)	0.10

図 4　非血液細胞由来の遺伝子（a: 遺伝子の発現値による全生存率の層別化。b: 多変量解析による予後因子の抽出）

【発表に関する事項】

1. Abe Y, Sakata-Yanagimoto M, et al.: A comprehensive single-cell atlas of nonhematopoietic cells in human lymph node and lymphoma reveals landscape of stromal remodeling. The European Hematology Association（EHA）2021 congress（2021年, web開催）
2. Abe Y, Sakata-Yanagimoto M, et al.: A comprehensive single-cell atlas of nonhematopoietic cells in lymphoma reveals landscape of stromal remodeling single-cell atlas of nonhematopoietic cells in human lymph node and lymphoma reveals landscape of stromal remodeling. 第80回日本癌学会学術総会（2021年, 横浜）
3. Abe Y, Sakata-Yanagimoto M, et al.: A Single-Cell Atlas of nonhematopoietic cells in human lymph node and lymphoma reveals landscape of stromal remodeling. American Society of Hematology（2021年, web開催）
4. Abe Y, Sakata-Yanagimoto M, Fujisawa M, Miyoshi M, et al.: A single-cell atlas of non-haematopoietic cells in human lymph nodes and lymphoma reveals a landscape of stromal remodeling. Nature Cell Biology, in press

悪性リンパ腫のサルベージ化学療法を対象としたフィルグラスチムのバイオ先行品と後続品の有効性・安全性の検討

伊藤　忠明、島野　玲菜、山本　久史、那須 いずみ、柏村 友一郎
山本　豪、内田　直之、谷口　修一、林　昌洋

【要約】

悪性リンパ腫に対する救援療法のひとつであるCHASE(±R)療法またはDeVIC(±R)療法施行時のフィルグラスチムのバイオ先行品と後続品の有効性と安全性を後方視的に検討した。対象患者はCHASE±R療法 29例（先行品群 17例)、DeVIC±R療法 49例（先行品群 19例)、フィルグラスチムの投与回数はCHASE±R療法で先行品群 8.0回、後続品群 11.0回、DeVIC±R療法で先行品群 10.0回、後続品群 10.0回であった。好中球が1000/μL以上に回復するまでの日数はCHASE±R療法で先行品群 8.0日、後続品群 10.0日、DeVIC±R療法で先行品群 10.0日、後続品群 9.0日であった。発熱性好中球減少症はCHASE±R療法で先行品群52.9%、後続品群41.7%、DeVIC±R療法で先行品群47.4%、後続品群 36.7%であった。腰痛はCHASE±R療法で先行品群5.9%、後続品群8.3%、DeVIC±R療法で先行品群10.5%、後続品群3.3%であった。CHASE±R療法およびDeVIC±R療法時のフィルグラスチムバイオ先行品と後続品において、有効性・安全性は統計学的有意差なく、臨床的に同程度であることが確認できた。本研究において、後続品の導入による医療費削減効果はCHASE±R療法1コースで19,126円であった。本研究により後続品使用を推進でき、医療費削減に寄与できると考える。

【目的】

バイオ後続品は、アミノ酸配列は先行品と同一であるが、糖鎖等の構造は完全に同一ではないため、バイオ先行品と後続品の有効成分の同一性を実証することは困難である[1)]。フィルグラスチムBS注「F」の治験は乳癌患者を対象としており[2)]、造血器腫瘍を対象とした治験データはない。悪性リンパ腫における報告はこれまで少数例に限られ、かつ救援療法時の有効性、安全性に関する報告はない。そのため、バイオ後続品を推奨する観点で悪性リンパ腫患者を対象としたフィルグラスチムBS注の臨床データの集積が必要となる。

本研究は、悪性リンパ腫のサルベージ療法のひとつであるCHASE±R療法、またはDeVIC±R療法施行時のフィルグラスチムの先行品と後続品の有効性と安全性を後方視的に検討する。

【方法】

2016年3月から2020年2月の期間に虎の門病院で悪性リンパ腫に対してサルベージ療法としてCHASE±R療法もしくはDeVIC±R療法を施行した患者のうち、フィルグラスチムを投与した症例を対象とした。CHASE±R療法、DeVIC±R療法を減量した症例、血液検査が週2回以下である症例は除外した。フィルグラスチムの先行品はグラン®、後続品はフィルグラスチムBS注「F」を投与した。全例において、1回75μgのフィルグラスチムを皮下投与した。

有効性の指標は、フィルグラスチムの投与回数、好中球が1000/μL以上に回復するまでの日数（duration of neutropenia: 以下DN）とした。以下にDNの定義を示す。

DN(日)＝(フィルグラスチム投与後に好中球数が1,000/μL以上に回復した日)－(フィルグラスチム投与開始日)＋1

安全性の指標は、FNと腰痛発症の有無とし、有害事象共通用語基準CTCAE ver.4.0よりGrade分類した。

患者背景は、年齢、身長、体重、BMI、BSA、フィルグラスチム投与開始までの日数、抗生剤使用の有無、骨髄浸潤の有無、原疾患、施行レジメン数、CHASE±RまたはDeVIC±Rのサイクル数、フィ

ルグラスチムの投与量、敗血症の有無とした。

フィルグラスチムの投与回数、DNの比較はMann-Whitney-U検定、FNと腰痛の有無の比較はχ^2検定、患者背景の比較はStudent-t検定、Mann-Whitney-U検定、χ^2検定を使用した。いずれも$p<0.05$の場合に有意差ありとした。統計解析ソフトは「SPSS ver.25.0」を使用した。

本研究は、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に従い、当院研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

表１　患者背景（CHASE）

	グランシリンジ（先行品）n=17	フィルグラスチムBS注（後続品）n=12	p値
年齢（歳）	54.0（39-69）	62.5（46-78）	0.510*
身長（cm）	163.9±7.9	164.4±9.6	0.948**
体重（kg）	54.9±7.5	57.1±10.4	0.471**
BMI（kg/㎡）	20.4±2.4	21.0±2.6	0.647**
BSA（㎡）	1.59±0.13	1.62±0.18	0.444**
フィルグラスチム投与開始までの日数	7.0（4.0-15.0）	5.5（4.0-8.0）	0.254*
抗生剤の使用の有無	13（76.5%）	6（50.0%）	0.245***
骨髄浸潤			
あり	3（17.7%）	1（8.3%）	0.321***
なし	10（58.8%）	5（41.7%）	
不明	4（23.5%）	6（50.0%）	
原疾患			
DLBCL	8（47.1%）	10（83.3%）	
FL	4（23.5%）	0	
PTCL	3（17.6%）	1（8.3%）	
CTCL	1（5.9%）	0	
MCL	1（5.9%）	0	
BL	0	1（8.3%）	
施行レジメン数			
1	10（58.8%）	4（33.3%）	0.227***
2	3（17.6%）	3（25.0%）	
3	2（11.8%）	1（8.3%）	
4	0	2（16.7%）	
5	1（5.9%）	2（16.7%）	
6	1（5.9%）	0	
CHASE±リツキシマブのサイクル数			
1	15（88.2%）	12（100.0%）	0.616***
2	0	0	
3	1（5.9%）	0	
4	1（5.9%）	0	

CHASE: Cyclophosphamide+Cytarabine+Dexamethasone+Etoposide
BMI: body mass index　BSA: body surface area　DLBCL: diffuse large B cell lymphoma
FL: follicular lymphoma　PTCL: peripheral T cell lymphoma　CTCL: cutaneous T cell lymphoma
MCL: mantle cell lymphoma　BL: burkitt lymphoma

平均値±標準偏差
年齢、フィルグラスチム投与開始日は中央値（範囲）
骨髄浸潤、疾患、施行レジメン数、CHASE±Rのサイクル数は実数（割合）
*Mann-Whitney U検定　** t検定　*** χ^2検定

表２　患者背景（DeVIC）

	グランシリンジ（先行品） n=19	フィルグラスチムBS注（後続品） n=30	p値
年齢（歳）	62.6（44-76）	68.1（34-82）	0.500*
身長（cm）	161.7±11.1	162.6±8.3	0.813**
体重（kg）	54.2±11.1	54.6±8.6	0.667**
BMI（kg/㎡）	20.6±2.6	20.7±3.0	0.743**
BSA（㎡）	1.56±0.19	1.57±0.14	0.758**
フィルグラスチム投与開始までの日数	6.0（4.0-13.0）	6.0（3.0-15.0）	0.936*
抗生剤の使用の有無	10（52.6%）	15（50.0%）	0.859***
骨髄浸潤			
あり	3（15.8%）	3（10.0%）	0.665***
なし	10（52.6%）	14（46.7%）	
不明	6（31.6%）	13（43.3%）	
原疾患			
DLBCL	11（57.9%）	15（50.0%）	
AITL	3（15.8%）	3（10.0%）	
ENKL	2（10.5%）	1（3.3%）	
PTCL	2（10.5%）	3（10.0%）	
FL	1（5.3%）	2（6.7%）	
HL	0	1（3.3%）	
ALCL	0	1（3.3%）	
BPDCN	0	1（3.3%）	
HSTL	0	1（3.3%）	
ATL	0	1（3.3%）	
BL	0	1（3.3%）	
施行レジメン数			
1	10（52.7%）	16（53.3%）	0.649***
2	7（36.8%）	7（23.3%）	
3	2（10.5%）	5（16.7%）	
4	0	2（6.7%）	
DeVIC±リツキシマブのサイクル数			
1	17（89.5%）	22（73.3%）	0.252***
2	2（10.5%）	6（20.0%）	
3	0	0	
4	0	1（3.3%）	
11	0	1（3.3%）	

DeVIC: Dexamethazone+Etoposide+Ifosfamide+Carboplatin
BMI: body mass index　BSA: body surface area　DLBCL: diffuse large B cell lymphoma
AITL: angioimmunoblastic T cell lymphoma　ENKL: extranoda NK/T cell lymphoma
PTCL: peripheral T cell lymphoma　FL: follicular lymphoma　HL: hodgkin lymphoma
ALCL: anaplastic large cell lymphoma　BPDCN: blast plasmacytoid dendritic cell neoplasm
HSTL: hepatosplenic T cell lymphoma　ATL: adult T cell leukemia lymphoma
BL: Burkitt lymphoma

平均値±標準偏差
年齢、フィルグラスチム投与開始日は中央値（範囲）
骨髄浸潤、疾患、施行レジメン数、DeVIC±Rのサイクル数は実数（割合）
*Mann-Whitney U検定　** t検定　*** χ^2検定

【結果】

対象患者はCHASE ± R療法 29例（先行品群17例）、DeVIC ± R療法 49例（先行品群 19例）であった。患者背景は両群間において統計学的有意差は認めなかった。（**表1, 2**）。骨髄浸潤の有無は両群間において統計学的有意差は認めなかった。

1. 有効性

CHASE ± R療法

フィルグラスチム投与回数（中央値）は先行品群 8.0回、後続品群 11.0回であり統計学的有意差は認めなかった（p = 0.800）。DN（中央値）は先行品群 8.0日、後続品群 10.0日であり統計学的有意差は認めなかった（p = 0.590）（**図1a, b**）。

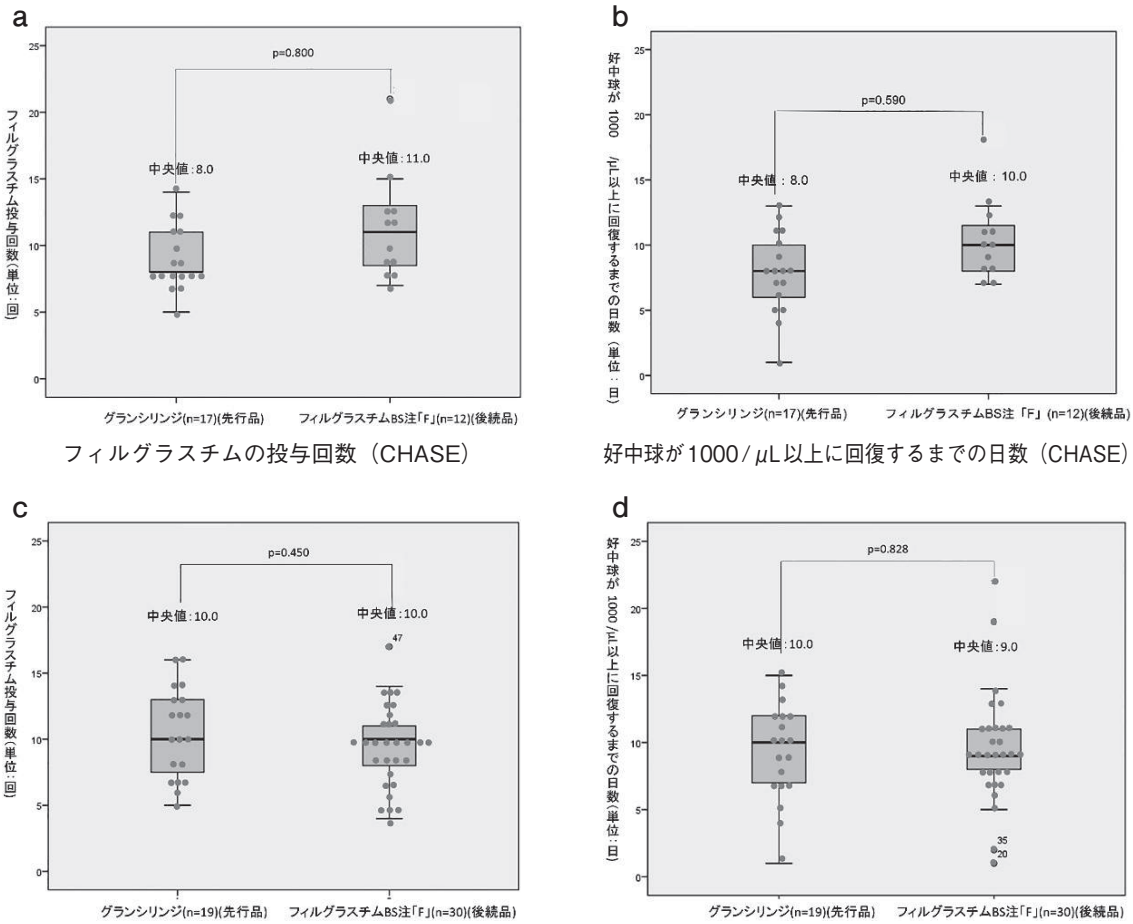
DeVIC ± R療法

フィルグラスチム投与回数（中央値）は先行品群、後続品群両群ともに10.0回であり統計学的有意差は認めなかった（p = 0.450）。DN（中央値）は先行品群 10.0日、後続品群 9.0日であり統計学的有意差は認めなかった（p = 0.828）（**図1c, d**）。

2. 安全性

CHASE ± R療法

FNの発症率は先行品群 9例（52.9%）、後続品



フィルグラスチムの投与回数（CHASE）　好中球が1000/μL以上に回復するまでの日数（CHASE）

フィルグラスチムの投与回数（DeVIC）　好中球が1000/μL以上に回復するまでの日数（DeVIC）

図 1　フィルグラスチムの投与回数とDN
中央値の比較にはMann-Whitney-U検定を用いた
CHASE: Cyclophosphamide+Cytarabine+Dexamethasone+Etoposide
DeVIC: Dexamethazone+Etoposide+Ifosfamide+Carboplatin

表３　有害事象（CHASE）

		グランシリンジ（先行品）n=17		フィルグラスチムBS注（後続品）n=12		P値
FN	Grade１	9	52.90％	5	41.7％	0.616
	Grade２以上	0	0.00％	0	0.0％	
腰痛	Grade１	1	5.90％	1	8.3％	0.913
	Grade２以上	0	0.00％	0	0.0％	

χ^2検定
CHASE: Cyclophosphamide+Cytarabine+Dexamethasone+Etoposide
FN: febrile neutropenia

表４　有害事象（DeVIC）

		グランシリンジ（先行品）n=19		フィルグラスチムBS注（後続品）n=30		P値
FN	Grade１	9	47.4％	11	36.7％	0.462
	Grade２以上	0	0.0％	0	0.0％	
腰痛	Grade１	2	10.5％	1	3.3％	0.311
	Grade２以上	0	0.0％	0	0.0％	

χ^2検定
DeVIC: Dexamethazone+Etoposide+Ifosfamide+ Carboplatin
FN: febrile neutropenia

群 5例（41.7％）であり統計学的有意差は認めなかった（p＝0.616）。腰痛（Grade1）は先行品群 1例（5.9％）、後続品群 1例（8.3％）であり統計学的有意差は認めなかった（p＝0.913）(**表3**)。血液培養の結果が陽性となった症例は先行品群 1例（5.9％）、後続品群 1例（8.3％）であり統計学的有意差は認めなかった（p＝0.913）。敗血症をきたした症例は両群ともに認めなかった。

DeVIC ± R療法

FNの発症率は先行品群 9例（47.4％）、後続品群 11例（36.7％）であり統計学的有意差は認めなかった。腰痛（Grade1）は先行品群2例（10.5％）、後続品群1例（3.3％）であり統計学的有意差は認めなかった（p＝0.311）(**表4**)。血液培養の結果が陽性となった症例は先行品群0例（0.0％）、後続品群 1例（3.3％）であった（p＝0.255）。敗血症をきたした症例は両群ともに認めなかった。

【考察】

バイオシミラーの積極的な使用は国策として推奨されている。しかし、当院のフィルグラスチム使用の大部分を占める血液疾患に対するデータは極めて少ない。フィルグラスチムBSの適応は、がん化学療法による好中球減少であり血液疾患に使用することは適切であるが実地臨床でのデータを検証、評価していく必要を有すると考え本研究を計画した。今回の研究により、悪性リンパ腫患者における救援療法（CHASE ± R /DeVIC ± R）においても先行品群と後続品群で同等の有効性と安全性が初めて示唆された。

フィルグラスチムの投与回数はCHASE ± R療法の先行品群で8.0回、後続品群で11.0回、DeVIC ± R療法の先行品群で10.0回、後続品群で10.0回であり、臨床的に同程度であることが確認できた。DNはCHASE ± R療法の先行品群で8.0日、後続品群で10.0日、DeVIC ± R療法の先行品群で10.0日、後続品群で9.0日であり、臨床的に同等であることが確認できた。FNの発現率はCHASE ± R療法の先行品群 52.9％、後続品群41.7％、DeVIC ± R療法の先行品群 47.4％、後続品群36.7％であり、臨床的に同等であるこ

とが確認できた。

腰痛（Grade 1）はCHASE ± R療法の先行品群1例、後続品群 1例、DeVIC ± R療法の先行品群2例、後続品群 1例であり臨床的に同等であることが確認できた。

本研究におけるCHASE ± R療法1コース施行時のフィルグラスチム投与回数の中央値は先行品群8回、後続品群11回であった。2021年12月時点でのグラン®シリンジ75の薬価は6,370円/本、フィルグラスチムBS注75μg「F」の薬価は2,894円/本である。本研究の対象患者は、後続品の導入により1コースで19,126円の経済効果を有することが明らかとなった。

本研究の対象患者は悪性リンパ腫でありレジメンはCHASE ± R療法とDeVIC ± R療法と限定しており、症例数も限られていることが課題である。今後さらなる検討が必要であると考える。

【文献】

1. 厚生労働省医薬食品局: バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針. 薬食審査発第0304007号, 2009年3月4日
2. Y Sagara, et al.: The efficacy and safety of FSK 0808, Filgrastim Biosimilar: a multi-center, non-randmized study in Japanese patients with breast cancer. Jpn J Clin Oncol 43: 865-873, 2013

（2）内分泌・代謝疾患

脂質異常症の原因についての研究－2

大久保　実

【要約】

家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体患者のLDL受容体遺伝子（*LDLR*）の解析を行い、今年度も多様な*LDLR*変異を見出した。6人の患者から5種類の変異を同定したが、スプライシング変異IVS12+2T>Cの頻度が高かった。

【目的】

血清脂質値は、食事・運動などの環境因子と遺伝素因に影響を受ける。血清LDLコレステロール値に影響を与える遺伝子座では、LDL受容体遺伝子（*LDLR*）が重要である。家族性高コレステロール血症（familial hypercholesterolemia: FH）は*LDLR*の遺伝的欠損症で、虚血性心疾患の原因になることが多い。しかもFHは一般人口の約200人に一人と高頻度である。

今年度も、臨床的にFHヘテロ接合体と診断した患者の*LDLR*の遺伝子解析を行った。

【方法】

日本動脈硬化学会の診断基準に拠って[1)]、FHと臨床診断した患者の末梢血からDNAを調製した。Hobbsらの方法に従い[2)]、*LDLR*の18個のエクソンとそれぞれのエクソン－イントロン接合部の塩基配列を決定して、*LDLR*変異を検索した。*LDLR*変異はCardiff大学のHuman gene mutation database（HGMD）・NIHのClinVar・British Heart FoundationのLDLR-LOVDデータベースを参照した。

【結果】

6人の日本人FH患者から、5種類の異なる*LDLR*変異を同定した（**表1**）。同定した変異は、

表 1　本研究で同定した*LDLR*変異

Patient number	変異の状態	変異の種類	変異が起こった領域	変異した塩基	変異の結果	日本人での初出報告
1	ヘテロ接合体	ミスセンス変異	Exon 5	c.797A>G	266番目のアスパラギン酸がグリシンにアミノ酸置換 (p.D266G)	Yu et al.
2	ヘテロ接合体	ミスセンス変異	Exon 7	c.1012T>A	338番目のシステインがセリンにアミノ酸置換 (p.C338S)	Maruyama et al.
3	ヘテロ接合体	ミスセンス変異	Exon 9	c. 1297G>C	433番目のアスパラギン酸がヒスチジンにアミノ酸置換 (p.D433H)	Miyake et al.
4	ヘテロ接合体	スプライシング変異	Intron 12	c.1845+2T>C (IVS12+2T>C)	スプライシング障害	Maruyama et al.
5	ヘテロ接合体					
6	ヘテロ接合体	ナンセンス変異	Exon 17	c.2431A>T	811番目のリジンが終止コドンに変異 (p.K811*)	Maruyama et al.

すべて日本人で既報の変異であった。

1. 患者1では、*LDLR*遺伝子のエクソン5に一塩基置換があった。*LDLR* cDNA上797番目の塩基が、正常ではAであるがGへと点変異していた（c.797 A>G）。このため、266番目のアミノ酸はアスパラギン酸からグリシンに置換される（p.D266G）。患者1はこのミスセンス変異のヘテロ接合体であった。
2. 患者2では、エクソン7に一塩基置換があった。*LDLR* cDNA上1012番目がTからAに点変異していた（c.1012T>A）。このため、338番目のシステインがセリンに置換される（p.C338S）。
3. 患者3には、エクソン9に一塩基置換があった。*LDLR* cDNA上1297番目がGからCに点変異していた（c.1297G>C）。このため、433番目のアスパラギン酸がヒスチジンに置換される（p.D433H）。
4. 患者4は、イントロン12のsplice donor siteの+2位の塩基に点変異（T→C）があった（IVS12+2T>C）。スプライシングに重要な領域に変異が起こっているため、正常なスプライシングが障害され、LDL受容体蛋白の合成が低下する。患者5は、患者4とは血縁関係はないが、同じスプライシング変異であった。
5. 患者6は、エクソン17に一塩基置換があった。*LDLR* cDNA上2431番目がAからTに点変異していた（c.2431 A>T）。このため、811番目のコドンが終止コドンになり、蛋白の合成が終了する（p.K811*）。N端から810番目までのアミノ酸だけからなる短いLDL受容体蛋白が予想された。

【考察】

FHはヒトの遺伝病として頻度の高いものの一つで、これまでに世界中から2,000種類以上の*LDLR*遺伝子変異がデータベースに登録されている。日本でも多施設から変異が報告されているが、その変異の頻度には地域差が見られる[3, 4]。今年度の私どもの研究では、ミスセンス変異3種（D266G, C338S, D433H）が各1家系ずつ、ナンセンス変異K811*が1家系、スプライシング変異IVS12+2T>Cが2家系に見つかった。これらはいずれも*LDLR*変異のデータベースに登録があり、日本人FH患者で既報の変異であった。

患者1の変異p.D266Gは金沢大の報告[5]が最初のものであり、2家系が報告されていた。266番目のアスパラギン酸が別のアミノ酸に置換された変異は、HGMDのデータベースによれば、p.D266E[2]やp.D266V[6]など他にも報告があるので、この部位でアスパラギン酸が保持されることが重要であると考えられる。

患者2の変異p.C338Sは、Maruyamaらの報告[7]が最初のものであり、患者の出身地によってFH Wakayamaと記載された。338番目のシステインが別のアミノ酸に置換された変異もやはり報告がある（p.D338G[8]など）ことからも、この部位でシステインが保持されることが重要であることが示唆された。

患者3の変異p.D433Hは、Miyakeらにより最初の患者の出身地によってFH Osakaと呼ばれた[9]。Miyakeらによれば、433番目のグルタミン酸がヒスチジンへ置換されると、LDL受容体蛋白が速やかに分解されるため、高コレステロール血症になるという。

その後、患者2および3の変異は、日本の他地域やスペイン人FH[10]でも報告されている。

患者4と5の変異IVS12+2T>CはHobbsらにより同定され、日本人FHでは最初の患者の出身地によってFH Niigataと呼ばれた[7]。私どもも昨年の報告書で2家系を見出しており、本年度の結果と合わせると頻度が高いと考えられる。なお、関西地区のFH患者の調査では、このIVS12+2T>C変異が最も多いことが報告されている[4]。また、インド人FH[11]からも報告されている。CinVarデータベースには、フランスのピティエ=サルペトリエール病院やサンパウロ大学からもIVS12+2T>Cの登録がある。

患者6の変異K811*は、最初の患者の出身地によってFH Tokyoとして報告された[7]。その後、金沢大のグループから、北陸地区のFH患者ではK811*の頻度が最も高く、FH患者の1/3以上を占めることが報告された[5]。また、CinVarデータベースには、サンパウロ大学からもK811*が登録されている。

本研究では、FH患者から多様な*LDLR*変異を見

出した。なかでもスプライシング変異IVS12+2T>Cの頻度が高いことが推測されたので、今後さらに症例を増やして検討を続けます。

【文献】

1. 日本動脈硬化学会. 動脈硬化性疾患予防ガイドライン（2017年版）. 2017
2. Hobbs HH, et al.: Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum Mutat 1: 445-466, 1992
3. Tada H, et al.: A catalog of the pathogenic mutations of LDL receptor gene in Japanese familial hypercholesterolemia. J Clin Lipidol 14: 346-351, 2020
4. Doi T, et al.: Patients with LDLR and PCSK9 gene variants experienced higher incidence of cardiovascular outcomes in heterozygous familial hypercholesterolemia. J Am Heart Assoc 10: e018263, 2021
5. Yu W, et al.: Molecular genetic analysis of familial hypercholesterolemia: spectrum and regional difference of LDL receptor gene mutations in Japanese population. Atherosclerosis 165: 335-342, 2002
6. Chmara M, et al.: Molecular characterization of Polish patients with familial hypercholesterolemia: novel and recurrent LDLR mutations. J Appl Genet 51: 95-106, 2010
7. Maruyama T, et al.: Common mutations in the low-density-lipoprotein-receptor gene causing familial hypercholesterolemia in the Japanese population. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15: 1713-1718, 1995
8. Lombardi MP, et al.: Molecular genetic testing for familial hypercholesterolemia: spectrum of LDL receptor gene mutations in the Netherlands. Clin Genet 57: 116-124, 2000
9. Miyake Y, et al.: A point mutation of low-density-lipoprotein receptor causing rapid degradation of the receptor. Eur J Biochem 210: 1-7, 1992
10. Mozas P, et al.: Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR. Hum Mutat 24: 187, 2004
11. ArulJothi KN, et al.: Molecular analysis of the LDLR gene in coronary artery disease patients from the Indian population. Clin Biochem 49: 669-674, 2016

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[2]
西岡　宏、山田　正三[3]、竹内　靖博
聖マリアンナ医科大学解剖学[1]
東京都健康長寿医療センター病理部[2]
森山脳神経センター病院[3]

【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酵素に関わるCYP3A4遺伝子発現が有意に高いことが判明した。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68例のACTH産生下垂体腫瘍で検討したところ、約60%が発現陰性、弱陽性が約20%、陽性が約20%でありCYP3A4 mRNAとCYP3A4免疫染色スコアに正の相関が認められた。またUSP8変異陽性のクッシング病下垂体腺腫でCYP3A4発現が有意に高値であった。腫瘍の初代培養を用いた解析で生理濃度のコルチゾール（≧30 nM）や低濃度のデキサメタゾン（≧3 nM）で用量依存性にCYP3A4 mRNAと蛋白発現、CYP3A4の酵素活性の上昇が認められたことからグルココルチコイド受容体GRを介した正の発現調節が考えられた。

考察: ACTH産生下垂体腫瘍の約40%にCYP3A4の発現が認められた。高コルチゾール血症によりGRを介してCYP3A4発現が誘導されることでCYP3A4による腫瘍細胞内コルチゾールの代謝が促進されること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が、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、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]。

これまでの研究で、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。

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、SXR抗体としてSanta Cruz Biotechnology社のマウスモノクローナル抗体（SC-4840）、発色はベクター社のImmPRESS Reagentを用いて行った。CYP3A4とSXRの発現量はエストロゲンレセプターに使われるAllred score（0～8点）を用い3点以上を陽性とし判定した[4]。

下垂体腫瘍の初代培養は96穴プレートで10%FCS添加DMEMを用いて行った。コルチゾールまたはデキサメタゾンを添加し48～72時間培養した。CYP3A4 mRNA発現は、トータルRNAを抽出しリアルタイムPCRを行い評価した。CYP3A4蛋白発現に関しては蛋白を抽出しWestern blotにて、またCYP3A4の酵素活性はP450-Glo™ CYP3A4 Assay and Screening System Luciferin-IPA（Prpmega社）を用いて測定した

【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MAP3K4）

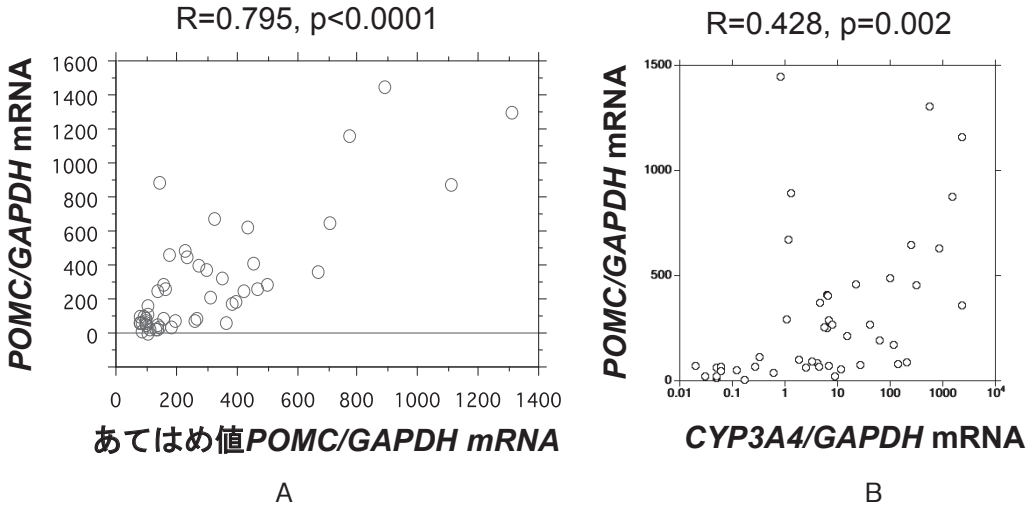


図１　CYP３A４とPOMC遺伝子発現の関連性

A　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MAP３K４遺伝子）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の発現量で補正した（n=51）。

B　腫瘍のCYP３A４ mRNAとPOMC mRNA発現量の相関
Spearmanの順位相関係数を用いて検定した。mRNAはGAPDHの発現量で補正した（n=51）。

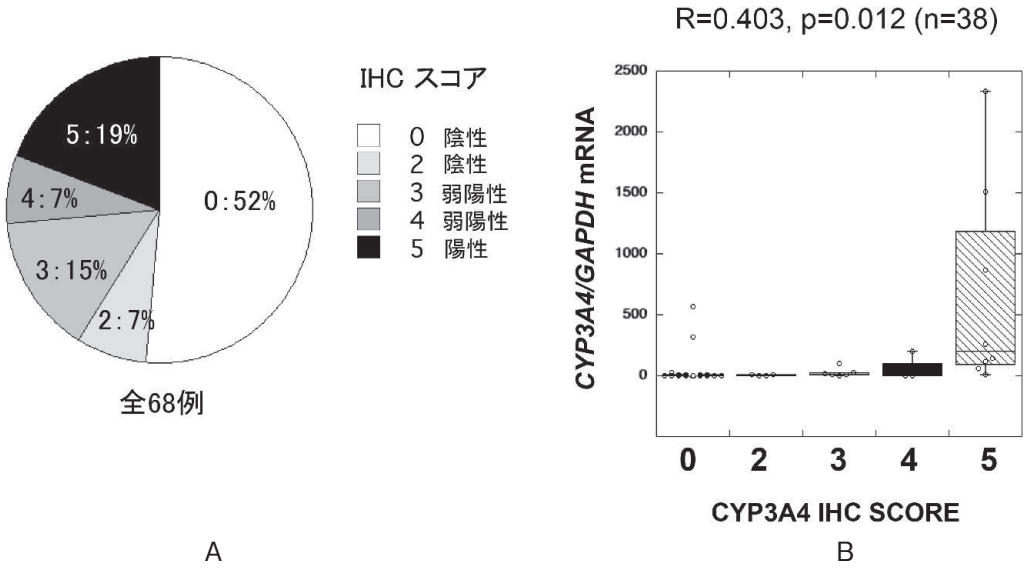


図２　CYP３A４蛋白の発現とCYP３A４遺伝子およびの関連性

A　免疫染色によるCYP３A４蛋白発現の評価
免疫染色によるCYP３A４蛋白の発現を乳癌でERの評価に用いられるAllred score（0，２～13点）を用いてスコア化した。３点と４点を弱陽性とし５点以上を陽性とした（n=68）。

B　免疫染色によるCYP３A４蛋白とリアルタイムPCRによるCYP３A４ mRNA発現量の相関
Spearmanの順位相関係数を用いて検定した。mRNAはGAPDHの発現量で補正した（n=38）。

の発現量が説明変数として選ばれた（R=0.795, p<0.0001）（**図1A**）。CYP3A4 mRNAとPOMC mRNA発現量に正の相関が認められた（R=0.428, p=0.002）（**図1B**）。

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68例のクッシング病下垂体腺腫の免疫染色を行ったところ59%が陰性、22%が弱陽性、19%が陽性であり約40%に発現が認められた（**図2A**）。腫瘍のCYP3A4の免疫染色（IHC）スコアとmRNA発現量には正の相関が認められた（R=0.403, p=0.012）（**図2B**）。CYP3A4発現はUSP8変異陽性例が陰性例よりもmRNAとIHCスコアの両者で有意に高値であった（データの詳細は割愛する）。

肝臓や腸管ではCYP3A4の発現は核内受容体であるステロイドゼノバイオティック受容体SXRを介して調節されておりSXRの発現について66例の免疫染色を行ったところ発現陰性は41%、弱陽性21%、陽性36%であった（**図3**）。CYP3A4とSXR発現に有意な相関は認められなかった。

USP8変異陽性の腫瘍の初代培養を用いた解析で、生理濃度のコルチゾール（≧30 nM）や低濃度のデキサメタゾン（≧3 nM）でCYP3A4のmRNA（**図4A**）と蛋白（**図4B**）発現量やCYP3A4の酵素活性（**図5**）が用量依存性に上昇する腫瘍が認められた。一方、SXRの強力なリガンドであるリファンピシン（10 μM）では

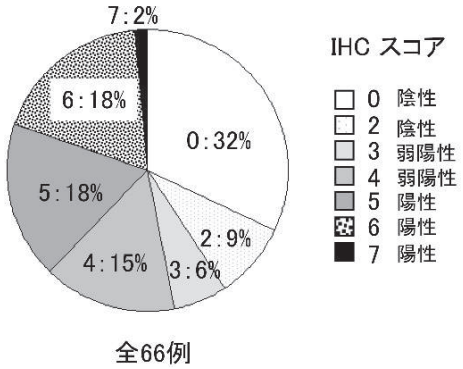
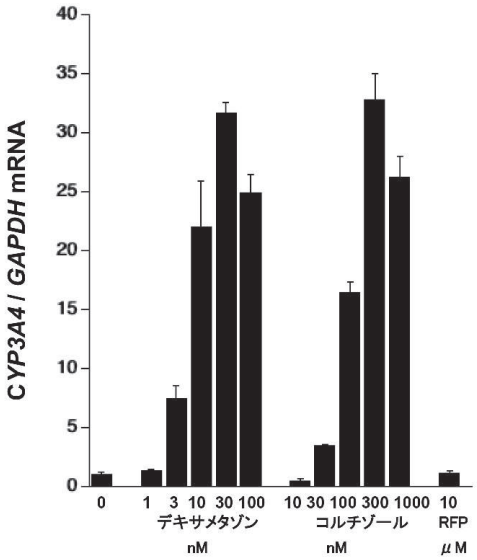


図３　免疫染色によるSXR蛋白の発現の評価
免疫染色によるSXR蛋白の発現を乳癌でERの評価に用いられるAllred score（0, 2 ～ 13点）を用いてスコア化した。3点と4点を弱陽性とし5点以上を陽性とした（n=66）。



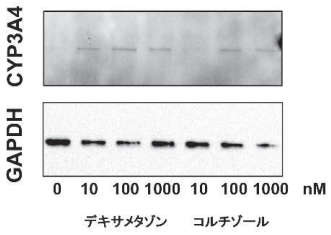


図４　クッシング病下垂体腺腫 初代培養を用いたグルココルチコイドによるCYP3A4発現調節
mRNAは48時間、蛋白は72時間培養後細胞を回収し測定した。
A　リアルタイムPCRによるCYP3A4 mRNA発現
GAPDHの発現量で補正した。
B　Western blotによるCYP3A4 蛋白発現
上段　CYP3A4、下段　GAPDH

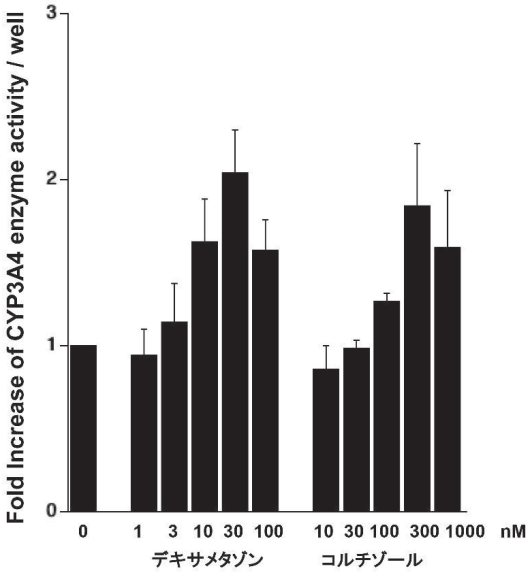


図５　クッシング病下垂体腺腫 初代培養を用いたCYP３A４の酵素活性
72時間培養後Promega社のLuciferin-IPAを用いて酵素活性を測定した。

CYP3A4 mRNA発現に変化を認めなかった。以上のことからSXRではなくグルココルチコイド受容体GRを介したCYP3A4の発現調節機構が考えられた。現在症例を増やして初代培養を用いた検討を行っている。

【考察】

本研究によりクッシング病の下垂体腺腫の約40％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で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[5)]。

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。

CYP3A4の発現を調節する因子として生理的濃度のコルチゾールが用量依存性にCYP3A4発現を正に調節する症例が存在することから、クッシング病では過剰なコルチゾールがGRを介してCYP3A4発現を誘導することで細胞内コルチゾールの低下をきたしネガティブフィードバック機構が破綻している可能性が考えられた。

今後は初代培養の症例を増やし、GRを介したCYP3A4の発現調節機構をUSP8変異の有無との関連性を含め検討する予定である。

【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. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, et al.: Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. Mod Pathol 11:155-168,1998
5. 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

レム睡眠中の睡眠時無呼吸が糖尿病網膜症に与える影響と治療効果の検討

西村　明洋、葛西　隆敏、鈴木　優矢、池田　更、松村　公男
菊野　庄太、長澤　薫、笠木　聡、森　保道

【要約】

レム睡眠中の睡眠時無呼吸が糖尿病網膜症（DR）に与える影響と治療効果を明らかにするため、当院に通院中の糖尿病症例でポリソムノグラフィ（PSG）を施行した症例を対象としたHistorical cohort研究を行った。ベースラインの患者背景（mean ± standard deviationまたはmedian（interquartile range））は年齢58.8 ± 11.8歳、男性86.8%，BMI26（24-29），HbA1c7.4%（6.8-8.7），無呼吸低呼吸指数（AHI）31.7（20.0-48.7）/h，レム睡眠中のAHI（REM-AHI）38.9（21.1-55.9）/h，ノンレム睡眠中のAHI（NREM-AHI）30.8（17.9-47.6），DR合併18.2%であった。追跡期間中のDR発症・進展なし85例、発症・進展あり3例、フォローなし146例であり、DR追跡率が低いためREM-AHI重症度がDRに与える影響を評価することは困難であった。今後DRの再評価などを行ったうえで再度解析を行う予定である。

【目的】

2型糖尿病（T2DM）症例の4-8割は睡眠時無呼吸症候群（Sleep Apnea Syndrome，SAS）を合併することが知られている[1]。SASはインスリン抵抗性増大による高血糖の悪化や治療抵抗性の高血圧、低酸素ストレスや慢性炎症などによって糖尿病血管合併症を悪化させる可能性があり、我々の報告でもSASは既知のリスク因子とは独立して糖尿病血管合併症と関連する可能性が示唆された[2,3]。

一方、以前からREM睡眠中はnon-REM睡眠中と比較して交感神経活性が亢進することが知られており[4]、それに伴ってREM睡眠中はAHIがより頻回となることが知られていたが近年REM-AHIが高血圧の新規発症やHbA1cと強く関連する一方でNREM-AHIはこれらと関連しないことが示され[5,6]、REM-AHIが各種イベントリスク増加の主要因ではないかと指摘されている。しかし、REM-AHIと糖尿病血管合併症との関連は現在明らかではない。

我々は先行横断研究でREM-AHIがDRやDKDと独立した関連を有することを明らかにした[7,8]。

本研究では特にREM-AHIとDRとの関連に焦点を絞り、REM-AHI評価後のDR発症・進展をエンドポイントとして縦断的な解析を行うこととした。

【方法】

研究デザイン: Historical cohort研究。対象患者の選定方針: 糖尿病のため当院通院歴のある症例のうち2004年5月1日～2019年12月31日の間にPSGを施行された症例。除外基準は（1）20歳未満の症例、（2）SAS以外の呼吸器疾患合併例、（3）心不全合併例、（4）透析中の症例、（5）PSG施行3ヶ月以内に脳卒中を発症した症例、（6）SAS既治療例、（7）2型以外の糖尿病症例、（8）PSG施行時および施行後のDR評価がなされていない症例とした。試験方法: ベースラインのDR重症度、DRリスク因子およびPSG結果とその後のDR発症・進展を調査する。DR重症度はDavis分類により評価する。REM/NREM-AHIは既報と同様4分位で4群に分類する。従属変数をDR発症、進展としたCOX比例ハザード解析を施行し、各種PSG指標がDR発症、進展に関連するか解析する。全ての統計解析にはIBM SPSS Statisticsメディカルモデルver22.0（日本IBM製）を用いる。

【結果】

患者背景は年齢58.8 ± 11.8歳、男性86.8%、BMI26（24-29）、平均血圧98.0 ± 14.0mmHg、糖尿病罹病期間6（2-14）年、現喫煙24.8%、心

血管イベント既往23.5%、網膜症18.2%、黄斑浮腫1.3%、HbA1c7.4%（6.8-8.7), eGFR 78.9±21.5mL/min/1.73m^2, non-HDLC142.0±32.3mg/dL, AHI31.7（20.0-48.7)/h, REM-AHI38.9(21.1-55.9)/h, NREM-AHI30.8(17.9-47.6)、網膜症発症・進展なし85例、発症・進展あり3例、フォローなし146例であり、イベント数が少ないためREM-AHI重症度がDRに与える影響を評価することは困難であった。

【考察】

今回の試験ではDRを継続的に評価していた症例が少なく、DR発症・増悪とREM-AHIとの関連を明らかにすることは困難であった。今後はまだ当院に継続通院している症例への眼底検査依頼や電話等による現状確認、前向き試験等による評価などが必要と考えられた。

【文献】

1. Foster GD, Sanders MH, et al.: Obstructive sleep apnea among obese patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 32:1017-1019, 2009
2. Nishimura A, Kasai T, et al.: Effect of sleep-disordered breathing on albuminuria in 273 patients with type 2 diabetes. J Clin Sleep Med 14:401-407, 2018
3. Nishimura A, Kasai T, et al.: Relationship between sleep disordered breathing and diabetic retinopathy: Analysis of 136 patients with diabetes. Diabetes Res Clin Pract 109:306-311, 2015
4. Somers VK, Dyken ME, et al.: Sympathetic-nerve activity during sleep in normal subjects. N Engl J Med 328:303-307, 1993
5. Mokhlesi B, Finn LA, et al.: Obstructive sleep apnea during REM sleep and hypertension. results of the Wisconsin Sleep Cohort. Am J Respir Cri Care Med 190:1158-1167, 2014
6. Grimaldi D, Beccuti G, et al.: Association of obstructive sleep apnea in rapid eye movement sleep with reduced glycemic control in type 2 diabetes: therapeutic implications. Diabetes Care 37:355-363, 2014
7. Nishimura A, Kasai T, et al.: Apnea hypopnea index during rapid eye movement sleep with diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 104:2075-2082, 2019
8. Nishimura A, Kasai T, et al.: Obstructive sleep apnea during rapid eye movement sleep in patients with diabetic kidney disease. J Clin Sleep Med 17:453-460, 2021

小脳顆粒細胞における甲状腺ホルモンの役割の解明

鯉淵　典之
群馬大学大学院医学系研究科応用生理学分野

【要約】
本研究では甲状腺ホルモン（TH）の発達期中枢神経系への作用を解析するため、マウス小脳顆粒細胞（GC）をモデルに、THと結合しない変異甲状腺ホルモン受容体（TR）を遺伝子導入し、甲状腺ホルモン阻害によるGC機能への影響を解析することとした。導入のために発現ベクターを作製し、種々の条件でelectroporationを行って顆粒細胞への導入を試みた。しかし、導入効率が悪く、動物モデル作製にまで至らなかったため、現在、Tet-on systemを用いた遺伝子改変動物作製を行っている。以上から、本研究で目指したモデル動物の作製はまだ途上であるが、電気生理学的解析による試験系は出来上がったため、遺伝子改変動物の作製後はスムースに研究が進むことが期待される。

【目的】
甲状腺ホルモン（thyroid hormone, TH）は神経発達・機能維持に不可欠である。周産期のTH不足はクレチン症（先天性甲状腺機能低下症）に知られるように、適切な時期に介入がなされなければ、重篤な発達障害を来す。THは核内受容体であるTH受容体（TH receptor, TR）に結合し、標的遺伝子の転写を調節する。TRは中枢神経系では特に小脳で顕著に発現しており[1)]、発達期のTH不足により小脳失調を引き起こすことが知られている[2)]。しかし、小脳機能におけるTHの作用メカニズムは未だ不明な点が多い。そこで本研究では小脳の中でも最も数の多い神経細胞であり、運動調節・学習において重要な役割を果たす小脳顆粒細胞（GC）に着目し、同細胞におけるTHの役割を明らかにすることを目的とする。この研究によりTHの神経細胞における役割を明らかにすることによって、未だ治療方法が不明である甲状腺ホルモン不応症やMCT8特異的甲状腺ホルモン細胞トランスポーター異常症などのTHと関連した先天性の神経発達異常症への治療法の解明の一助となることが期待される。

【方法】
本研究は群馬大学動物実験委員会の承認を受けて行われた。

1. Electroporationによる変異TRの遺伝子導入

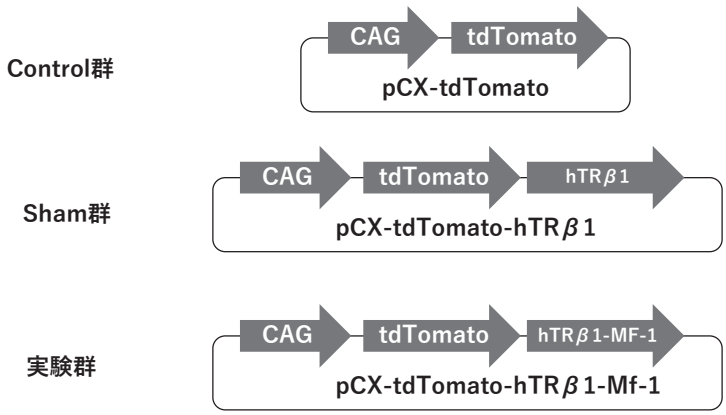


図１　作製した発現ベクター

図１に作製した発現ベクターを示す。ヒト由来変異TRβ1（hTRβ1-Mf-1、標的遺伝子のTH応答配列とは結合するが、THと結合しないため、発現させるとドミナントネガティブ作用により正常TRの作用をブロックする）ことは予め確認してある[3)]。hTRβ1-Mf-1は非特異的発現プロモータであるCAGと蛍光タンパク質tdTomatoの3'末端に組み込んだ。また、対照群として、正常ヒトTRβ1（hTRβ1）およびtdTomatoのみを組み込んだ発現ベクターも作製した。このベクターを作製後、種々の条件にて、*in vivo*遺伝子導入装置（NEPA21, ネッパジーン社）を用いてelectroporationにより新生仔マウスへの遺伝子導入を試みた（**図2**）。その後、マウスを屠殺し、凍結切片を作製し、共焦点顕微鏡下で検鏡し、導入タンパク質の発現を確認した。

2. 小脳顆粒細胞にhTRβ1-Mf-1を発現する遺伝子改変動物の作製

上記実験１において、十分なタンパク質の発現が得られなかったため、hTRβ1-Mf-1を顆粒細胞に発現する遺伝子改変マウスをYamamotoらの方法に則り作製した[4)]。作製方法については結果に示す。

【結果】

1. Electroporationによる変異TRの遺伝子導入

生後５～７日のマウスを用い、**図2**に示すような手法を用いて、発現ベクターを小脳表層（外顆粒層）に投与すると共に、electroporationによ

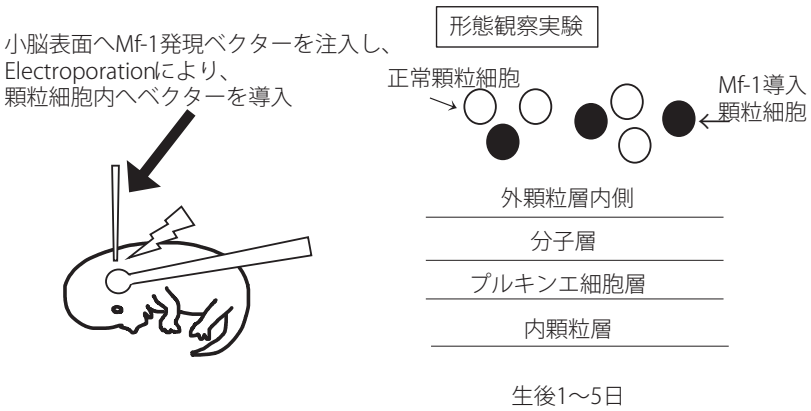


図２　Electroporationによる遺伝子導入法と解析
導入された細胞にはtdTomatoが発現するため、蛍光顕微鏡で同定が可能である。

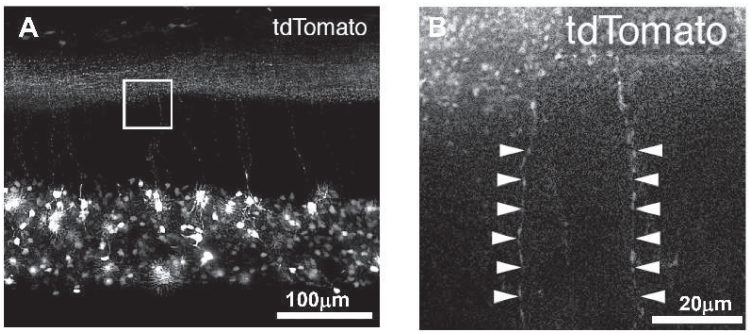


図3　CAG-tdTomatoベクターによる小脳顆粒細胞層でのtdTomatoタンパク質の発現
A　tdTomato陽性細胞は大部分が内顆粒層に局在している。
B　図Aの□部分の拡大像（分子層上層）。tdTomato陽性線維（矢印）が一部確認できる。

り細胞への遺伝子導入を試みた。投与1週間後の小脳皮質を**図3**に示す。tdTomato陽性細胞は主に内顆粒層に局在していた。また、分子層には内顆粒層の細胞から分子層へと延びたと考えられるtdTomato陽性線維も一部確認できたが、発現が弱く、細胞体まで辿ることはできなかった。また、この線維からさらに伸長してプルキンエ細胞へシナプスを形成する平行線維において、tdTomato陽性線維の終末を確認することはできなかった。そのため、どのプルキンエ細胞とシナプスを形成しているのか、同定できなかった。以上の結果から、プルキンエ細胞を用いてhTRβ1-Mf-1発現細胞によるシナプス可塑性変化を電気生理学的に解析することは断念し、以下の実験へと転換することとした。

2. 小脳顆粒細胞特異的にhTRβ1-Mf-1を発現する遺伝子改変動物の作製

上述したように、electroporationでは目的とするタンパク質の発現を顕微鏡下で十分捉えることができなかったため、現在、方針を変更し、遺伝子改変動物の作製に着手した。**図4**に遺伝子改変動物作製の概要を示す。

小脳顆粒細胞特異的に発現するGABA受容体α6サブユニットのプロモーターの下流に逆テトラサイクリン制御転写活性化因子（rtTA）を組み込んだ遺伝子を有する遺伝子改変動物は作製元から供与を受けた[4)]。rtTAはドキシサイクリン存在下のみでテトラサイクリン応答配列（TRE3G）に結合し、下流の遺伝子の転写を促進する転写因子である。さらに、TRE3Gプロモーター下流にhTRβ1-Mf-1を組み込んだ遺伝子を発現するマウスを作製した（Tet-on system）。この2種類のマウスを交配し、二つの外来性遺伝子を有する遺伝子改変動物を作製した。このマウスを用いれば、ドキシサイクリンの経口投与により、小脳顆粒細胞特異的に発現したrtTAがTRTE3Gプロモーター結合し、下流に組み込んだhTRβ1-Mf-1が発現してTR作用が抑制されるはずである。現在、ドキシサイクリンを飲水中に混合して投与を開始しており、母体から乳汁を介して、ドキシサイクリンがhTRβ1-Mf-1を発現させるか、解析を開始している。

【考察】

本研究では、小脳顆粒細胞をモデル系として、変異TRを導入することでTHの作用を抑制し、顆粒細胞の機能的発達にTHがどのように関与するのか、解析することを目的として開始した。当初、electroporationを用いて変異TR導入を試みたが、タンパク質の発現量が少なく、シナプス形成まで含めて、発現細胞を同定することはできなかった。そこで、方針を変更して、小脳顆粒細胞特異的にrtTAを発現し、かつ、TRE3Gプロモーター下流にhTRβ1-Mf-1を組み込んだ遺伝子を有するマウスを作製することとした。動物の作製は終了したが、hTRβ1-Mf-1の発現確認までには至っていないのが現状で、今後のさらなる解析が不可欠である。

遺伝子改変動物はまだ完全に確立してはいないが、シナプス可塑性の電気生理学的解析手法については確立することができた[5, 6)]。従って、遺伝

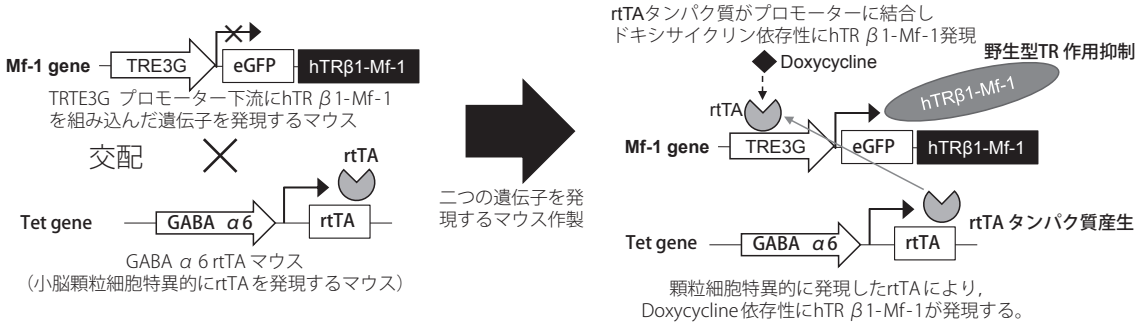


図 4　Tet-on systemにより特異的タンパク質を発現する遺伝子改変動物作製

子改変動物作製が確立され次第、電気生理学的実験を開始できる体制は整っている。なるべく早期に動物モデルを確立し、本格的に研究を開始できると確信している。

【謝辞】

本研究を支援してくださった冲中財団に深甚の感謝を申し上げます。また、実験を担当してくれた群馬大学大学院医学系研究科応用生理学分野のスタッフに、感謝いたします。

【文献】

1. Bradley DJ, Towle HC, Young WS 3rd: Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. J Neurosci 12: 2288-2302, 1992
2. Ishii S, Amano I, Koibuchi N: The role of thyroid hormone in the regulation of cerebellar development. Endocrinol Metab 36: 703-716, 2021
3. Yu L, Iwasaki T, Xu M, et al.: Aberrant cerebellar development of transgenic mice expressing dominant-negative thyroid hormone receptor in cerebellar Purkinje cells. Endocrinology 156:1565-1576, 2015
4. Yamamoto M, Wada N, Kitabatake Y, et al.: Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain. J Neurosci 23: 6759-6767, 2003
5. Suda M, Takatsuru Y, Amano I, et al.: Adult-onset hypothyroidism causes mechanical hypersensitivity due to peripheral nerve hyperexcitability based on voltage-gated potassium channel downregulation in male mice. J Neurosci Res 100: 506-521, 2022
6. Ninomiya A, Mshaty A, Haijima A, et al.: The neurotoxic effect of lactational PFOS exposure on cerebellar functional development in male mice. Food Chem Toxicol 159: 112751, 2022

（3）消化器疾患

ヒト消化管腫瘍および消化管正常粘膜に対する最適なオルガノイド培養法の確立

落合　頼業、泉谷　昌志[1]、菊池　大輔、三浦　裕司、陶山　浩一
的場 周一郎、上野　正紀、黒柳　洋弥、布袋屋　修
東京大学消化器内科[1]

【要約】

三次元培養であるオルガノイド培養の発展により、解剖的・機能的に生体内に存在する器官に近い特徴を示す培養細胞を用いて、繰り返し遺伝子変異検索や薬剤感受性の検討を行うことが可能となった。しかし、内視鏡生検検体由来のオルガノイド培養の報告はほぼなく、安定した培養条件が確立されたとは言えない状況である。本検討は消化管腫瘍の中で、最も成功率が高いと言われている大腸癌の検体から培養条件の検討を行うこととした。外科的切除後の手術検体から内視鏡用の生検鉗子を用い、計4ヵ所の腫瘍採取を行った。氷冷しつつ、可及的速やかにラボに移動した後に検体処理を行い、大腸癌細胞培養に使用可能とされるconditioned medium（1×LsY）を用いて初代培養を開始した。現時点で、計3例の大腸癌オルガノイド培養を行った。3例中2例では、細胞数は少ないながらも培養を継続中である。残る1例はコンタミネーションの影響で培養不成功となった。より確実な培養のため、検体採取から培養開始までの時間、細胞分離の際に用いる酵素の種類、酵素処置の時間、また細胞を細かくしすぎない、などの条件検討が今後の課題である。継続的に症例を蓄積していく予定である。

【目的】

三次元培養であるオルガノイド培養は解剖的・機能的に生体内に存在する器官に近い特徴を示し、繰り返し観察・操作・再現が可能な唯一無二のモデルと言える。2011年にヒト小腸・大腸のオルガノイド培養の成功が初めて報告された[1)]。このオルガノイド培養により、従来の二次元培養細胞株とは異なり、より生理的状態に近い環境を作り出すことが可能となった。今後はオルガノイド培養がより発展する中で、個別化医療（オーダーメイド医療）を目指した、個々の患者における遺伝子変異検索や薬剤感受性の検討が盛んに行われることが予想される。しかし、患者由来検体を用いたオルガノイド培養は近年報告されはじめた新規の手法であり、既報においても成功率が高いとは言えず、安定した培養条件が確立されたとは言えない状況である。特に内視鏡生検検体由来のオルガノイド培養に関する報告は少ない。臨床検体をより有効に用いるため、内視鏡的・あるいは外科的に採取されたヒトの消化管腫瘍および近傍の正常背景粘膜を、より確実に、安定してオルガノイド培養を行うための条件検討、また手法の確立を目的とした。

【方法】

消化管腫瘍の中で、最も成功率が高いと言われている大腸癌の検体から検討を行うこととした。外科的切除後の手術検体から内視鏡用の生検鉗子を用い、計4ヵ所の腫瘍採取と周囲の正常粘膜採取を行った。氷冷しつつ、可及的速やかにラボに移動して洗浄後に細胞解離酵素であるLiberaseとTrypLE Expressを用いて腫瘍細胞の分離を行った。遠心後に抽出した細胞を培地で懸濁し、マトリゲル上に播種した。培地に関しては既報で報告されている各種成長因子が入った完全培地を用いる予定であったが、成長因子や溶媒などの入手に時間を要しており、大腸癌細胞培養に使用可能

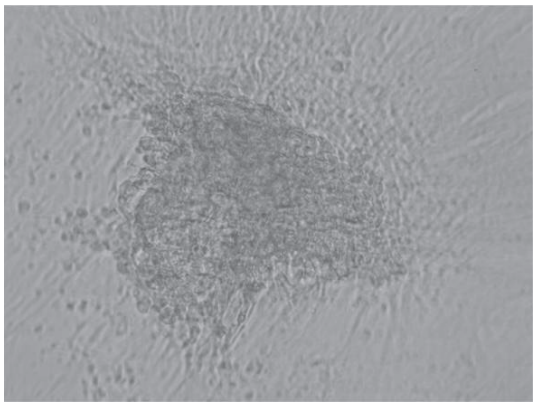


図１　症例１の培養細胞

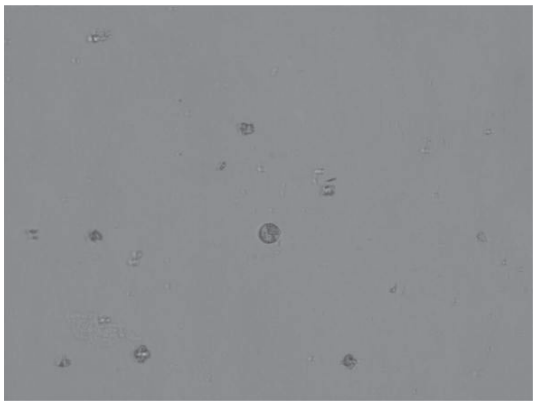


図２　症例２の培養細胞

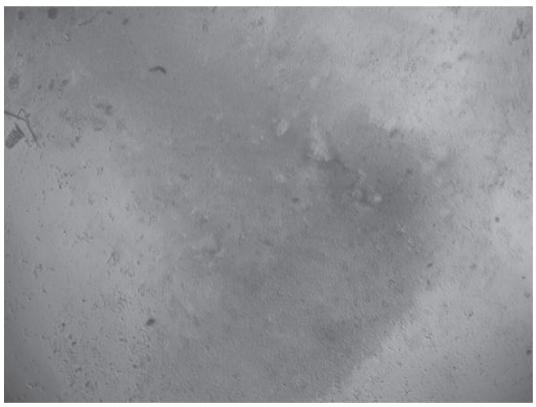


図３　症例３の培養細胞

とされるconditioned medium（1×LsY）を用いて初代培養を開始した。細胞播種翌日には、マトリゲルを被せてサンドイッチ状にした。その後は培養細胞の状況を観察し、適応なタイミングで培地交換を行っている。尚、同時に採取した正常粘膜は液体窒素にて凍結保存して、後日まとめて培養を行う予定としている。

【結果】

現時点では計3例の大腸癌細胞の初代培養を行っている。症例1: 54歳男性、進行S状結腸癌の切除検体より採取した腫瘍細胞4検体（手術検体摘出から培養検体摘出まで55分）を培養し、経過観察中である。現在約12週経過しているが4検体中の1検体で増生した線維芽細胞と共生するように細胞塊がみられており、今後継代の予定である（**図1**）。症例2: 77歳女性、進行上行結腸癌の切除検体より採取した4検体（手術検体摘出から培養検体摘出まで38分）を培養中である。現在6週経過しているが、4検体中の2検体でそれぞれ少量の細胞がマトリゲル上で観察されている（**図2**）。症例3: 57歳男性、進行下行結腸癌の切除検体より採取した4検体（手術検体摘出から培養検体摘出まで5分）を培養したが、培養開始後1日で恐らくコンタミネーションの影響か、培地に混濁した浮遊物が認められた（**図3**）。1週ほど経過を見たが、浮遊物が増加傾向であり、培養を中止した。

【考察】

内視鏡生検由来のオルガノイド培養に関する報告は少ないが、大腸癌肝転移巣からの生検検体由来の培養成功率は71％であったと報告されている[2)]。本検討では大腸癌のオルガノイド初期培養を現時点で3例行い、2例とも培養継続中である。残る1例については検体採取前の手術検体の汚物除去、また細胞処理時の十分な洗浄が不足していた。これまでの反省を生かし、検体の洗浄の徹底、検体摘出から採取までの時間をより短くする、細胞分離の際に酵素処置の時間を短くし、細胞を細かくしすぎない、あるいはサンドイッチ法からドーム法に変更する、などの条件検討が今後の課題である。特に本検討は今後の内視鏡生検検体による培養を見据えて、外科検体からの採取の際にも

内視鏡生検鉗子を使用している。採取できる細胞量が少ない中でより効率的に培養していく条件検討が求められる。今後も継続して症例を蓄積することで内視鏡生検検体由来のオルガノイド培養を確立していきたい。

【文献】

1. Sato T, Stange DE, Ferrante M, et al.: Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. Gastroenterology 141:1762-1772, 2011
2. Weeber F, van de Wetering M, Hoogstraat M, et al.: Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases. Proc Natl Acad Sci U S A 112:13308-13311, 2015

膵癌微小環境におけるcircular RNAを介した non-cell autonomousな癌促進機構の解明

清宮　崇博
東京大学医学部附属病院

【要約】

膵癌および正常膵組織で発現する環状RNAを網羅的に解析することにより膵癌で高発現する環状RNAとしてcircXを同定した。circXを発現する膵癌では上皮間葉転換や低酸素応答といった膵癌の病態との関連が知られる遺伝子群が高発現しており、circXは膵癌の病態に関与している可能性が示唆された。また、circXは膵癌細胞株よりも膵星細胞で顕著に高発現しており、膵癌微小環境においてnon-cell autonomousに膵癌促進に寄与している可能性が示唆された。

【目的】

環状RNAは、通常のRNA分子に存在する5'末端と3'末端が結合した環状構造を有する1本鎖RNAであり、膵癌をはじめとする様々な癌で異常発現していることが近年明らかになってきた[1, 2]。本研究では、膵癌および正常膵組織で発現する環状RNAを網羅的に解析することにより膵癌で高発現する環状RNAを同定し、その発現様式、膵癌の病態への関与、バイオマーカーとしての応用可能性について検討することを目的とする。

【方法】

CPTAC3データベース[3]にある膵癌140例、正常21例のRNAシークエンスデータを利用して、環状RNAの発現を網羅的に解析した。Limmaパッケージ[4]を用いて経験ベイズ法によって膵癌と正常の間で有意に発現変動する環状RNAを探索した。5'末端と3'末端の結合により環状化していることを確認するためにRT-PCRとサンガーシークエンスを行った。膵癌細胞株AsPC-1、BxPC-3、CFPAC-1、Capan-1、

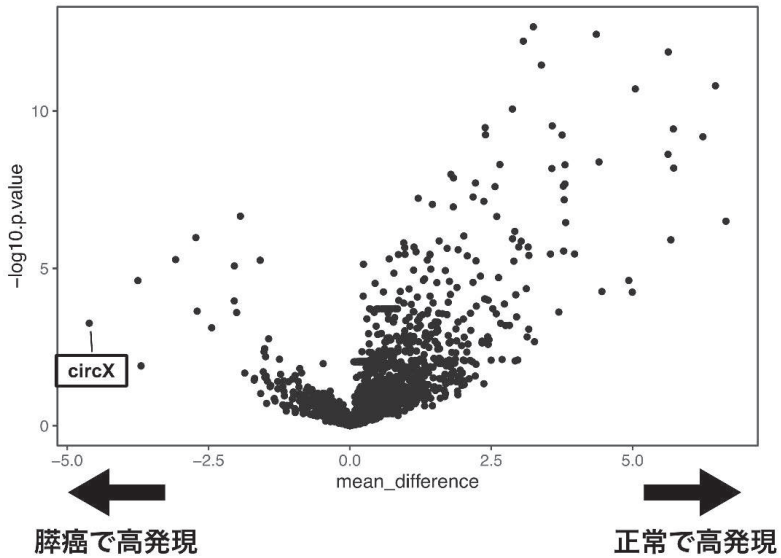


図１　膵癌と正常における環状RNAの発現

HPAF2、KLM1、NORP1、Panc-1、SW1990および膵星細胞における環状RNAの発現をRT-qPCRで測定した。膵癌患者4例、非癌患者4例の血清中における環状RNAの発現をドロップレットデジタルPCRで測定した。

【結果】

CPTAC3データベースを用いて膵癌140例と正常21例における環状RNAの発現を比較し、184個の有意に発現変動する環状RNAを同定した（$q<0.05$）。膵癌で有意に高発現する環状RNAのうち、正常との発現量の差が最も大きい環状RNA（circX）に着目した（**図1**）。

この環状RNAはX遺伝子のエクソン25の5'末端とエクソン38の3'末端が結合して環状化していることをサンガーシークエンスによって確認した（**図2**）。

このX遺伝子由来環状RNAは、膵癌においては38％（53/140例）で発現していたのに対して、正常においては21例全てに発現を認めなかった。膵癌のcellularityとcircXの発現の関係を明らかにするために、膵癌140例をcellularityの高い群（n=105）と低い群（n=35）に分類しcircXの発現を比較した。CircXはcellularityが高い群においては40％（42/105例）で発現していたのに対して、cellularityが低い群においては31％（11/35例）で発現しており、cellularityとcircXの発現の有無には有意な相関を認めなかった（**図3**）。

次に、circXを発現する膵癌の特徴を明らかに

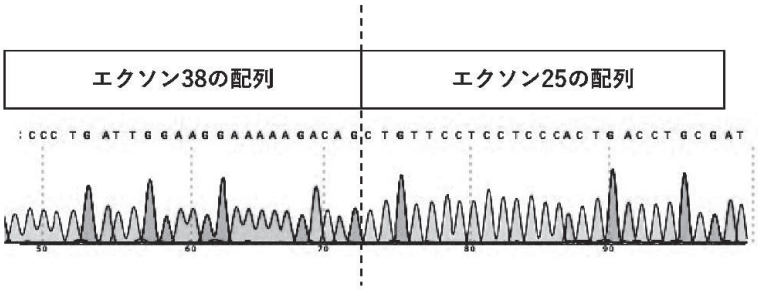


図２　サンガーシークエンスの結果

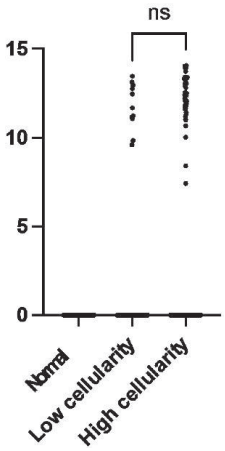


図３　CellularityとcircX発現量の関係

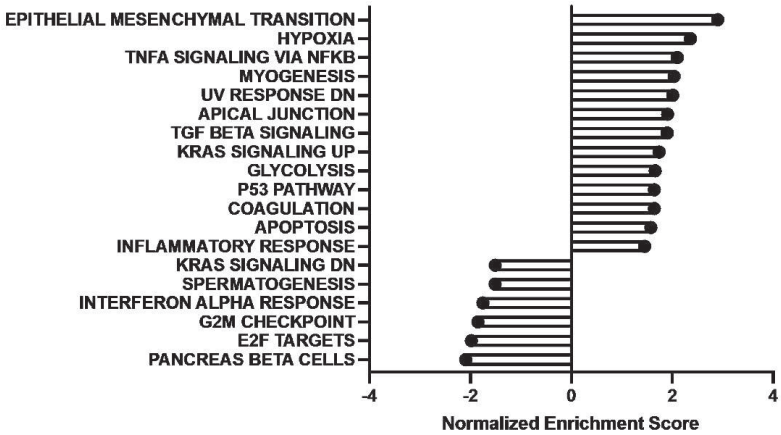


図４　Gene set enrichment analysisの結果

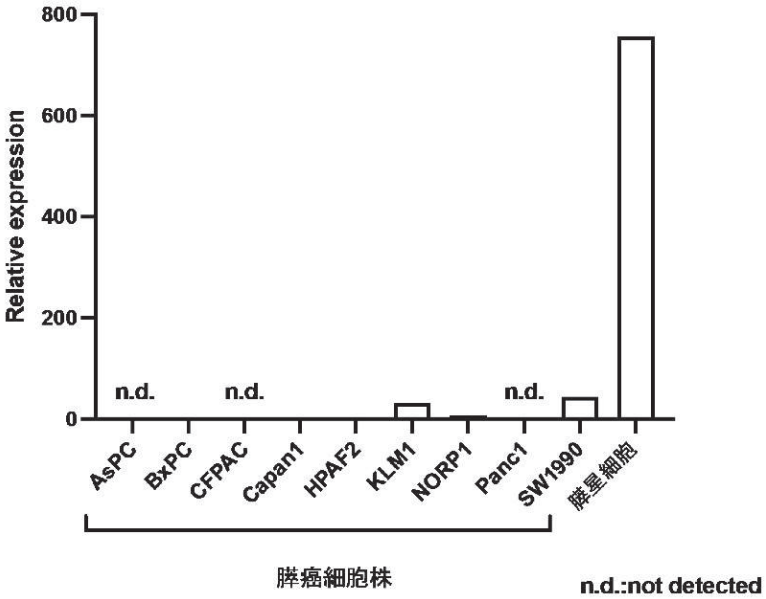


図５　細胞株におけるcircXの発現量

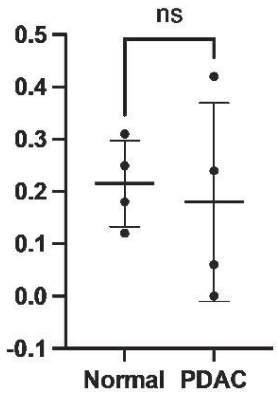


図６　血清中におけるcircXの発現量

するために、膵癌140例をcircX発現群（n=53）と非発現群（n=87）に分類し、生存期間や病期などの臨床病理学的背景を比較したが、有意な差は認めなかった。続いて、circX発現膵癌の分子生物学的な特徴を明らかにするために、circX発現群と非発現群の遺伝子発現を比較した。Gene set enrichment analysisでは、上皮間葉転換や低酸素応答など、膵癌の病態に重要な役割を果たすことが知られている遺伝子セットがcircX発現群で有意に発現上昇していた（**図4**）。

次に、circXの発現様式を明らかにするために、膵癌細胞株および膵星細胞におけるcircXの発現をRT-qPCRで測定した。その結果、circXは膵癌細胞株よりも膵星細胞で顕著に高発現していた（**図5**）。

最後に、circXのバイオマーカーとしての応用可能性を検討するために、膵癌患者と健常者の血清中のcircXの発現量をデジタルPCRで測定した。血清中のcircXの発現量は極めて少なく、膵癌患者と健常者の間で有意な差は認めなかった（**図6**）。

【考察】

本研究ではCPTAC3データベースのRNAシークエンスデータを用いて膵癌および正常膵における環状RNAの発現を網羅的に解析することにより、膵癌で高発現する環状RNAとしてcircXを同定した。

circX発現膵癌と非発現膵癌では遺伝子発現プロファイルが大きく異なっており、circX発現膵癌では上皮間葉転換や低酸素応答といった膵癌の病態との関連が知られる遺伝子セットが高発現していた。このことは、circXの発現が膵癌の進行に寄与している可能性を示唆している。細胞株を用いたcircXの発現の検討では、circXは膵癌細胞株よりも膵星細胞で顕著に高発現していた。膵星細胞は膵癌微小環境においてnon-cell autonomousに膵癌促進に重要な役割を果たすことが知られているため[5, 6]、circXは膵癌微小環境において膵癌の進行に寄与している可能性がある。細胞株での検討ではcircXは膵星細胞で高発現していた一方で、膵癌組織においてはcellularityとcircXの発現には有意な相関を認

めなかった。これらの結果は、膵星細胞の中にcircXを発現するサブタイプとそうではないサブタイプが存在する可能性や、膵癌の間質において膵星細胞の分布が不均一である可能性を示唆している。これを明らかにするために、組織における膵星細胞の分布とcircXの発現の関係について詳細な検討が必要である。

本研究ではcircXが膵癌の進行に寄与する可能性が示唆された一方で、circXの発現と臨床病理学的背景との関連は認められなかった。CPTAC3に登録された症例の大多数はstage Ⅰ-Ⅲで、比較的予後良好な症例が選択されていたために、臨床病理学的背景に差が認められなかった可能性が考えられる。膵癌におけるcircX発現の影響を明らかにするために、より幅広い病期を含むコホートでcircXと臨床病理学的背景との関連を調査することが必要である。さらに、circXの機能解明に向けて今後も研究を継続し、その結果に基づいて新たな膵癌治療法の開発を目指したい。

【文献】

1. Chen LL: The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs. Nat Rev Mol Cell Biol 21:475-490, 2020
2. Seimiya T, Otsuka M, Iwata T, et al.: Aberrant expression of a novel circular RNA in pancreatic cancer. J Hum Genet 66:181-191, 2021
3. Cao L, Huang C, Cui Zhou D, et al.: Proteogenomic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma. Cell 184:5031-5052. e26, 2021
4. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al.: limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Res 43:e47, 2015
5. Sousa CM, Biancur DE, Wang X, et al.: Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. Nature 536:479-483, 2016
6. Shi Y, Gao W, Lytle NK, et al.: Targeting LIF-mediated paracrine interaction for pancreatic cancer therapy and monitoring. Nature 569:131-135, 2019

（4）肝臓疾患

非アルコール性脂肪肝炎の病態・治療における宿主遺伝子要因のインパクト

芥田　憲夫、鈴木　文孝

【要約】

非アルコール性脂肪肝炎の肝発癌を含む病態予測や治療介入下における宿主遺伝子要因のインパクトとリキッドバイオプシーの臨床的有用性について検討した。血清microRNA-122高値例は良好な生存率を示し、SGLT2阻害剤導入早期のmicroRNA-122動態から長期的な治療反応性を予測出来る可能性が示唆された。肝癌診断においてはAFP/PIVKAIIと比較して血清TERT C228T陽性率が高率であり、経時的にもTERT C228TがAFP/PIVKAIIに先行して陽転化する症例が確認された。宿主遺伝子要因を用いたリキッドバイオプシーに基づくハイリスク症例の絞り込みが今後期待される。

【目的】

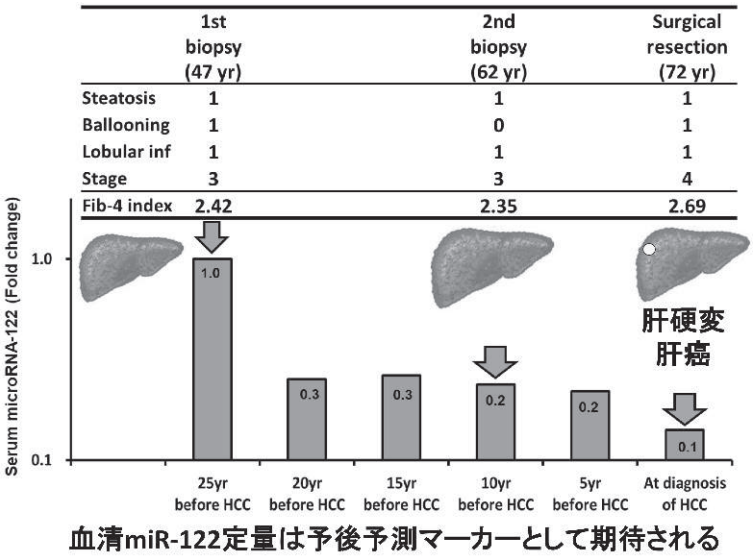
非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の病態進行と治療反応性における宿主遺伝子要因のインパクトは不明な点が多い。血液中のmicroRNA（miR）量が肝疾患の病態進行に影響することが報告されている[1]がNASHの病態進行へのインパクトは十分検討されていない。更に、様々な臓器の悪性腫瘍を含む病態進行を予測するバイオマーカーとして組織中のみならず血液中のcell-free DNA（cfDNA）を用いた癌遺伝子TERTプロモーター変異（ホットスポットであるTERT C228T変異）のインパクトがNASH肝発癌でも報告されている[2]。これら血液検体を用いて診断、治療法選択、治療効果予測などを行うリキッドバイオプシーは組織生検に比べて低侵襲的で繰り返し行うことができる点が利点である。今回はNASHの肝発癌を含む病態予測や治療介入下における宿主遺伝子要因のインパクトとリキッドバイオプシーの臨床的有用性について検討した。

【方法】

虎の門病院肝臓内科で肝生検からNASHと確定診断された477例を対象とした。〔検討1〕初診時の血清miR-122相対定量値から累積生存率を検討した（Log-rank test）。更に、糖尿病合併NASHにSGLT2阻害剤を開始して5年が経過した1例の肝組織の経時的推移と血清miR-122相対定量値の推移との関連を検討した。血清miR-122相対定量値はReal time PCRで解析し、ddCT法で評価した。〔検討2〕背景肝がNASHで肝癌と診断された34例において肝癌に特異的な血清バイオマーカー（TERT C228T, AFP, PIVKAII）陽性率の比較を行った。特に、血清TERT C228T変異においてはNASHで肝癌の無い21例との比較からSensitivity, Specificity, PPV, NPV, AUROCを検討した。更に、経過観察中に肝癌が指摘され、同時にTERT C228Tが陽転化した5例において、AFP/PIVKAIIの経時的な推移を評価した。血清TERT C228T変異は当院で開発したWild type blocking PCRを用いる高感度測定法で検出した。本検出系は0.7％の変異型DNAまで検出可能な測定系である[3]。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1135, 1843）。

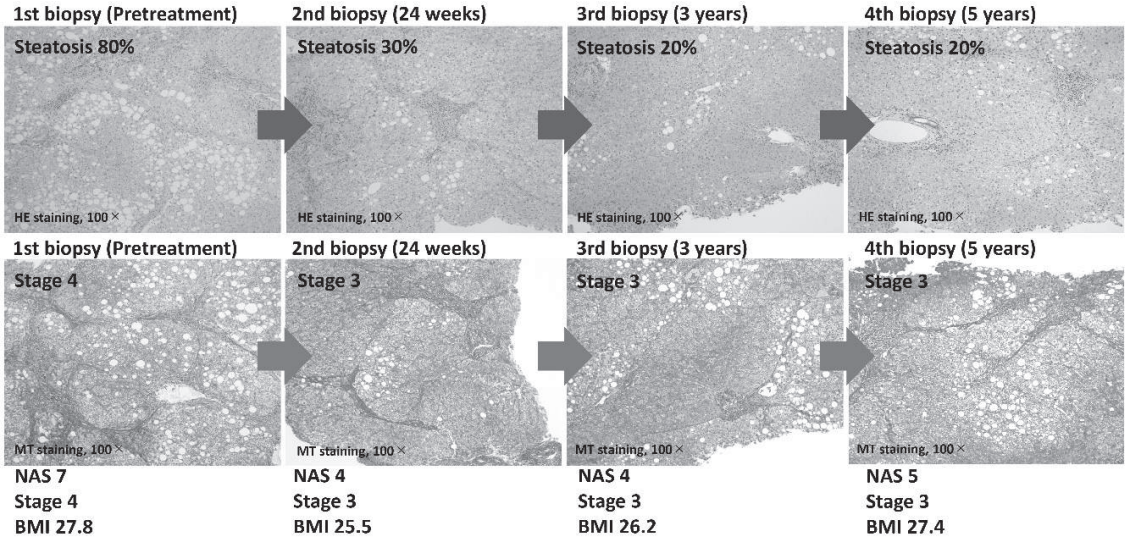
【結果】

〔検討1〕miR-122相対定量値1.00倍以上（n=208), 0.50-1.00倍（n=102), 0.50倍未満（n=113）の3群で比較すると、miR-122が高値の症例では良好な生存率を示した（Log-rank test; P=0.003)。肝癌出現まで25年間経過フォロー出来た1例では肝硬変、肝癌に進行する前に既にmiR-122の低下傾向が確認された（**図1**)。SGLT2阻害剤投与症例の検討では、治療開始前/24週間後/3年後



血清miR-122定量は予後予測マーカーとして期待される

図１　虎の門病院肝臓内科のNASH肝癌発生例における血清miR-122相対定量値の経時的推移（NASH肝癌出現例における25年間に渡る縦断的解析）



SGLT2阻害剤の長期投与により肝組織改善を維持した症例

図２　虎の門病院肝臓内科で糖尿病合併NASHにSGLT２阻害剤５年投与して肝組織が改善した１例

/5年後の4点で肝生検を施行された。Steatosisは80%/30%/20%/20%と減少傾向を維持し、Stageは4/3/3/3と低下傾向を維持していた（**図2**）。本症例のmiR-122はSGLT2阻害剤導入後1週間の時点で急峻な低下を示し、治療導入早期のmiR-122動態から長期的な治療反応性を予測出来る可能性が示唆された。〔検討2〕TERT C228T陽性率68%、AFP陽性率38%(基準値 ≤10 μg/L)、PIVKAII陽性率47%（基準値 ≤40 AU/L）であり、NASH肝癌ではAFP/PIVKAIIと比較してTERT

NAFLD肝癌の34例を検討

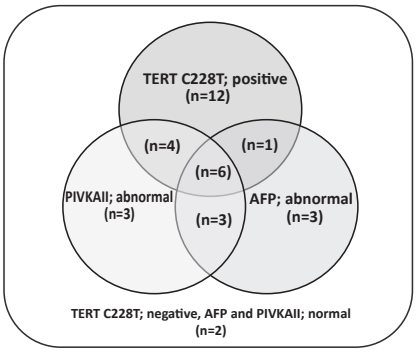
1)TERT C228Tpositive;68%

2) PIVKAII abnormal;47%

3) AFP abnormal;38%

AUROC 0.812
Sensitivity 64%
Specificity 95%
PPV 96%
NPV 61%

AFP normal range; ≤10 μg/L
PIVKAII normal range; ≤40 AU/L



NASH肝癌ではAFP/PIVKAIIと比較して血清TERT C228T陽性が高率であった

図３　虎の門病院肝臓内科における背景肝がNASHで肝癌を指摘された症例における各種腫瘍マーカー陽性率の比較

症例1, 男性				
年齢 / 診断	48 years / No-HCC	64 years / No-HCC	71 years / No-HCC	72 years / HCC
TERT C228T	Negative	Negative	Negative	Positive
AFP	Normal	Normal	Normal	Normal
PIVKAII	Not done	Normal	Normal	Normal
症例 2, 男性				
年齢 / 診断	56 years / No-HCC	57 years / No-HCC	58 years / No-HCC	59 years / HCC
TERT C228T	Negative	Negative	Negative	Positive
AFP	Normal	Normal	Normal	Normal
PIVKAII	Normal	Normal	Normal	Normal
症例 3, 女性				
年齢 / 診断	73 years / No-HCC	74 years / No-HCC	75 years / HCC	
TERT C228T	Negative	Negative	Positive	
AFP	Normal	Normal	Normal	
PIVKAII	Normal	Normal	Normal	
症例 4, 男性				
年齢 / 診断	58 years / No-HCC	67 years / No-HCC	77 years / No-HCC	80 years / HCC
TERT C228T	Negative	Negative	Negative	Positive
AFP	Normal	Normal	Normal	Normal
PIVKAII	Not done	Not done	Normal	Abnormal
症例 5, 女性				
年齢 / 診断	64 years / No-HCC	67 years / HCC		
TERT C228T	Negative	Positive		
AFP	Normal	Abnormal		
PIVKAII	Normal	Abnormal		

AFP normal range; ≤10 μg/L
PIVKAII normal range; ≤40 AU/L

血清TERT C228Tは経時的にもAFP/PIVKAIIに先行して陽転化する症例が確認された

図４　虎の門病院肝臓内科で血清TERT陽性のNASH肝癌５例におけるAFP/PIVKAIIとの比較

C228T陽性率が高率であった。TERT C228Tの肝癌検出力は、Sensitivity 64%、Specificity 95%、PPV 96%、NPV 61%、AUROC 0.812であり、高いSpecificity、PPV、AUROCを示した（**図3**）。肝癌指摘時にTERT C228Tが陽転化した5例中3例でAFP/PIVKAIIは陰性を持続しており、経時的にもTERT C228TがAFP/PIVKAIIに先行して陽転化する症例が確認された（**図4**）。

【考察】

NASH診療におけるリキッドバイオプシーの臨床応用が期待されている。miRはNASHの病態進行を促進するタイプと抑制するタイプに分け

られる。特に、肝臓内に多く含まれるmiR-122はNASHの肝癌を含む病態進行に保護的に作用することが報告されている[1)]。今回の成績から、初診時のmiR-122高値の症例の予後が良好であり、経時的にも肝癌に進行する前からmiR-122が低下していることが確認された。今回の検討では、miR-122が肝病態進行に抑制的に作用していることを実臨床で確認することが出来た。更に、SGLT2阻害剤の治療においても早期のmiR-122動態が治療反応性を反映している可能性が示唆された。この様に、血清miR-122相対定量値はNASHの肝病態と治療反応性を予測する血清バイオマーカーとして有用であることが確認された。

肝癌の多段階発癌では肝組織中の*TERT* promoter, *TP53*, *CTNNB1*等の体細胞癌遺伝子変異が関与する[2)]。今回の成績から、NASH肝癌ではAFP/PIVKAIIと比較してTERT C228T陽性率が高率であり、経時的にもTERT C228TがAFP/PIVKAIIに先行して陽転化する症例が確認された。この様に、血清TERT C228TはNASH肝癌を診断する血清バイオマーカーとして有用であることが確認された。今後は、更にSensitivityとNPVの高いTERT C228T変異の検出系を開発していく必要が有る。

NASHの患者は本邦に約400万人は存在し、肝硬変や肝癌といった肝病態進行例が増加傾向にある。この様なハイリスク症例を効率良く非侵襲的に拾い上げることが喫緊の課題である[4, 5)]。今回報告した血清中のmiRとcfDNAの様な宿主遺伝子要因を用いたリキッドバイオプシーに基づくハイリスク症例の絞り込みが今後期待される。

【文献】

1. Wang X, He Y, Mackowiak B, Gao B: MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. Gut 70:784-795, 2021
2. Villanueva A: Hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 380:1450-1462, 2019
3. Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, et al.: Detection of TERT promoter mutation in serum cell-free DNA using wild-type blocking PCR combined with Sanger sequencing in hepatocellular carcinoma. J Med Virol 92:3604-3608, 2020
4. Tokushige K, Ikejima K, Ono M, et al.: Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020. Hepatol Res 51:1013-1025, 2021
5. Tokushige K, Ikejima K, Ono M, et al.: Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020. J Gastroenterol 56:951-963, 2021

B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療でHBs抗原陰性化例における核酸アナログ中止後の予後に関する検討

鈴木　文孝

【要約】

B型慢性肝疾患に対する治療として核酸アナログ製剤（NA）が2000年より広く使用されている。現在は、エンテカビル、テノホビル製剤を中心に使用され、多くの症例でウイルスの陰性化が得られている。NA投与によりB型肝炎の臨床的治癒を意味するHBs抗原の陰性化が得られる症例は非常に少ないが、HBs抗原の陰性化が得られた症例では、NA治療中止可能であると言われている。本研究は、NA治療にてHBs抗原が陰性化した後にNAを中止した症例での長期的な予後を明らかにすることが目的である。NA治療中にHBs抗原が陰性化し、その後NA治療を中止し長期的なfollow upが行われた73例を対象とした。男性: 女性63:10、年齢57才（23-83）、慢性肝炎: 肝硬変 60:13。NA中止後の①HBV DNA再出現例、②HBs抗原再出現例、③再治療例について検討した。

①HBV DNA再出現例18例（25%）であった。HBV DNA再燃に関係する因子を検討すると、再燃例でNA終了時HBs抗体陰性例が有意に多く（P=0.037）、NA終了時でのHBs抗原陰性期間が短い傾向にあった。HBV DNA量は17例において自然経過で陰性化を認めた。②HBs抗原再出現例は6例（8%）であった。HBs抗原再陽性化例の6例中5例は、自然経過で陰性化した。③再治療例は2例（2.7%）であった。NA治療後HBs抗原の陰性化を認めNAを中止した症例では、HBV DNA量の上昇による肝炎再燃率は、1.3%（1/73）と低率であった。HBV DNA量の再出現は、終了時HBs抗体陰性例で多いため、このような症例では慎重な経過観察が必要である。

【目的】

B型慢性肝疾患に対する治療として核酸アナログ製剤（NA）が2000年より広く使用されている。現在は、エンテカビル、テノホビル製剤（テノホビルディポキシルフマレイト; TDF、テノホビルアラフェナミド; TAF）[1-4]を中心に使用され、多くの症例でウイルスの陰性化が得られている。しかし、B型肝炎の臨床的治癒を意味するHBs抗原の陰性化が得られる症例は非常に少ない[1]。さらにNA投与によりHBs抗原の陰性化が得られた症例では、NA治療中止可能であると言われている[5]が、日本でのデータは報告されていない。NA治療にてHBs抗原が陰性化した後にNAを中止した症例での長期的な予後を明らかにすることが目的である。

【対象と方法】

当院にてNA治療中にHBs抗原がArchitect HBsAg QT（CLIA法）にて陰性化（<0.05 IU/mL）し、その後NA治療を中止し長期的なfollow upが行われた73例を対象とした。男性: 女性63:10、年齢57（23-83）、慢性肝炎: 肝硬変 60:13。NA中止後の①HBV DNA再出現例、②HBs抗原再出現例（≥0.05 IU/mL; CLIA法）、③肝炎再燃例の特徴、を解析した。

【結果】

①HBV DNA再出現例18例（25%）（NA中止時HBV DNA量陽性例1例を除く）であった。HBV DNA再燃に関係する因子を検討すると、再燃例でNA終了時HBs抗体陰性例が有意に多く（P=0.037）、NA終了時でのHBs抗原陰性期間が短い傾向にあった。その後の経過観察でHBV DNA量は17例において自然経過で陰性化を認めた。

②HBs抗原再出現例は6例（8%）であった。HBs抗原再陽性化例の6例中5例は、その後の経過観察で自然経過で陰性化した。

③再治療例は2例（2.7%）であった。HBV DNA量が上昇後肝炎とHBs抗原の再出現を認めた1例と、HBV DNA量が2.2まで上昇した1例

でNAの再投与を行った。肝炎を認めた症例では、NAの再投与により再度HBV DNA量、HBs抗原の陰性化を認めた。

【考察】

NA治療後HBs抗原の陰性化を認めNAを中止した症例では、HBV DNA量の上昇による肝炎再燃率は、1.3%（1/73）と低率であった。HBV DNA量の再出現は、終了時HBs抗体陰性例で多いため、このような症例では慎重な経過観察が必要である。一方NA中止後HBV DNA量の再出現やHBs抗原の再出現を認めた症例でも、自然経過で陰性化する症例が多く、早急なNA再治療は必要ではない。

【文献】

1. Suzuki F, Hosaka T, Suzuki Y, et al.: Long-term outcome of entecavir treatment of nucleos(t)ide analogue-naïve chronic hepatitis B patients in Japan. J Gastroenterol 54: 182-193, 2019
2. Ono A, Suzuki F, Kawamura Y, et al.: Long-term continuous entecavir therapy in nucleos(t)ide-naïve chronic hepatitis B patients. J Hepatol 57: 508-514, 2012
3. Hara T, Suzuki F, Kawamura Y, et al.: Long-term entecavir therapy results in falls in serum hepatitis B surface antigen levels and seroclearance in uncleos(t)ide-naïve chronic hepatitis B patients. J Viral Hepat 21: 802-808, 2014
4. Suzuki F, Suzuki Y, Hosaka T, et al.: Efficacy of long-term tenofovir-based rescue therapy in patients with chronic hepatitis B refractory to nucleoside/nucleotide analogs. J Gastroenterol 52:641-651, 2017
5. 日本肝臓学会編「B型肝炎治療ガイドライン（第3.4版）」https://www.jsh.or.jp/lib/files/medical/guidelines/jsh_guidlines/B_v3.4.pdf

【発表に関する事項】

Suzuki F, Sezaki H, Hosaka T, et al.: Virologic analysis of tenofovir resistance in a patient with chronic hepatitis B experiencing viral breakthrough during combination treatment with tenofovir disoproxil fumarate and entecavir. Hepatol Res 51:503-508, 2021

（5）循環器疾患

多層オミクス解析による心血管疾患の高精度予測マーカー開発とプレシジョン医療応用－急性心不全患者における臨床転帰とトリメチルアミンN-オキシドとの関連の民族的差異－

相澤　健一
自治医科大学医学部

【要約】

心血管疾患は長年にわたる炎症や変性の過程を経て多様な病態を示すため、プロテオーム、メタボロームに着目した多層オミクス解析が期待される領域である。近年、腸内細菌叢由来の酸化代謝物トリメチルアミンN-オキシド（TMAO）が心疾患と関連することが欧米から相次いで報告され、注目されている。しかし、他の民族、特に日本人における意義は明らかではなかった。本研究は民族性がTMAOレベルと心不全（HF）の関連に影響を与えるかどうかを明らかにすることを目的とする。英国レスター大学のコホートは主に白人（n = 842, 77%）と南アジア人（n = 129, 12%）の患者で構成されたが、自治医科大学のコホート（n = 116, 11%）の患者はすべて日本人だった。主要評価項目は、入院後1年以内の全死亡および/またはHF再入院の測定とした。TMAOレベルは、日本人患者（中央値［四分位範囲］: 9.9μM［5.2-22.8］）の方が白人（5.9μM［3.6-10.8］）および南アジア人（4.5μM［3.1-8.4］）患者よりも有意に高かった（p <0.001）。また、TMAOレベルは、交絡因子調整後の死亡および再入院との関連を示した（p = 0.002）。TMAOレベルに基づく死亡率および再入院の関連に民族間の違いが観察された。したがって、TMAOレベルの解釈には民族性を念頭に置くことが重要である。

【目的】

本研究では、オミクス解析を駆使し、心血管疾患の病態関連蛋白質の新規発見ないし病態メカニズムの解明を目標としており、プレシジョン医療実践のためのバイオマーカーとして臨床応用（診断・治療）の糸口とする。最終的には、心血管疾患の病態関連蛋白質の新規発見ないし病態メカニズムの解明ならびに臨床応用を目的とする。

具体的には酸化された腸の微生物叢由来の代謝物であるトリメチルアミンN-オキシド（TMAO）は、心不全患者の転帰と関連しており、血中TMAOレベルの上昇と転帰不良（死亡率/再入院）との関連性が示されている[1-8]。ただし、これまでの研究では主に白人患者が登録されており、TMAOと転帰との関連に対する民族的影響は十分に調査されてなかった。本研究は、民族の違いがTMAOレベルと心不全アウトカムの関連に影響を与えるかを調査することを目的とする。

【方法】

1. 調査対象母集団

TMAOレベルは、日英2つの施設（自治医科大学附属病院およびイギリスのレスター大学病院とグレンフィールド病院）において急性心不全患者で測定された。サンプル収集、TMAO測定、およびデータ管理のプロトコルは同一のものを使用した。 英国レスターコホートは、白人（n = 842, 87%）と南アジア人（n = 129, 13%）の2つの主要な民族グループで構成された。自治医科大学附属病院のコホートの患者はすべて日本人だった。本臨床研究は、各参加施設の倫理委員会によって承認され、ヘルシンキ宣言に準拠した。

2. 統計分析

主要評価項目は、入院後1年以内の心不全による全死亡および/心不全または再入院（死亡率/心不全）の複合エンドポイントを用いた。臨床データは、連続変数のマンホイットニーU検定と

カテゴリー変数のカイ2乗検定を使用して、民族性と比較した。クラスカル・ウォリス検定を使用して、民族グループとTMAOレベルとのグループ差を比較した。Cox比例ハザード回帰モデルを使用して、年齢、性別、心不全の既往歴、虚血性心疾患、高血圧、糖尿病、NYHA（ニューヨーク心臓協会）クラス、収縮期血圧の調整後ZlogTMAOレベル、血圧、血中ナトリウムレベル、推定糸球体濾過率（eGFR）による腎機能、ヘモグロビン、およびナトリウム利尿ペプチド（NT-proBNPまたはBNP）と各民族グループの結果を関連付けて分析した。カプラン・マイヤー生存曲線を生成し、Mantel-Coxログランク検定を使用して、人口中央値および民族中央値で層別化された場合のTMAOレベルの生存率との違いを比較した。

【結果】

1. TMAOに関連する患者の人口統計と臨床パラメーター

急性心不全患者計1,087人のTMAOレベルを測定した。このうち842（77%）は白人、129（12%）は南アジア人、116（11%）は日本人だった（**表1**）。TMAOレベルは、白人の患者や南アジア人の患者と比較して日本人の患者で有意に高かった（中央値［四分位範囲］: 9.9 μM［5.2-22.8］、5.9 μM［3.6-10.8］、および4.5 μM［3.1-8.4］、それぞれ、日本人、白人、南アジア人の患者の場合、p <0.001）（**図1**）。

2. 1年後の死亡率/心不全の予測因子としてのTMAOレベル

白人患者の1年死亡率は民族グループの中で最も高く（p <0.001）、1年死亡率/心不全率の場合、

表 1　民族性に応じたベースラインの患者特性

	Total (n = 1087)	Caucasian (n = 842)	South Asian (n = 129)	Japanese (n = 116)	P value
TMAO (μmol/L)	5.9 (3.5–11.4)	5.9 (3.6–10.8)	4.5 (3.1–8.4)[b]	9.9 (5.2–22.8)[a]	<0.001
Demographics					
Age	77 (69–83)	79 (71–85)	71 (62–78)[b]	74 (67–81)[b]	<0.001
Male	594 (61%)	508 (60%)	86 (67%)	87 (67%)	0.207
Prior HF	364 (35%)	282 (34%)	44 (34%)	38 (35%)[a]	0.962
Ischaemic heart disease	322 (30%)	225 (27%)	58 (45%)[a]	39 (34%)	<0.001
Hypertension	641 (59%)	480 (57%)	86 (67%)[a]	75 (65%)	0.039
Diabetes mellitus	328 (34%)	261 (31%)	67 (52%)[a]	42 (36%)	<0.001
Dyslipidaemia	274 (25%)	202 (24%)	35 (27%)	37 (32%)	0.156
Atrial fibrillation	491 (45%)	418 (50%)	23 (18%)[b]	50 (43%)	<0.001
NYHA class IV	534 (54%)	451 (54%)	73 (59%)	35 (30%)[b]	<0.001
LV ejection fraction (%)	35 (25–48)	35 (26–48)	34 (23–48)	34 (26–49)	0.782
Clinical signs					
Systolic blood pressure (mmHg)	132 (115–150)	133 (115–150)	135 (116–155)	126 (105–150)	0.240
Diastolic blood pressure (mmHg)	75 (65–85)	74 (65–85)	74 (65–85)	81 (66–94)[a]	0.023
Heart rate (beat/min)	90 (74–106)	88 (74–106)	90 (73–102)	92 (76–112)	0.310
Medication					
Aspirin	458 (42%)	363 (43%)	64 (50%)	31 (28%)[b]	0.001
Beta-blocker	445 (41%)	345 (41%)	57 (45%)	43 (38%)	0.617
ACE inhibitor or ARB	587 (54%)	457 (54%)	70 (54%)	60 (54%)	0.990
Diuretics	647 (60%)	505 (60%)	81 (63%)	61 (55%)	0.371
Laboratory					
Urea (mmol/L)	8.9 (6.5–12.6)	9.0 (6.6–12.7)	8.1 (6.2–12.5)	8.9 (6.4–11.6)	0.383
eGFR (mL/min/1.73 m^2)[c]	49 (36–66)	48 (35–64)	51 (37–68)	56 (36–82)[a]	0.026
Sodium (mmol/L)	138 (135–141)	138 (135–141)	137 (135–140)	140 (137–142)[a]	0.001
Haemoglobin (g/dL)	12.3 (10.8–13.7)	12.4 (10.9–13.8)	11.9 (10.5–13.0)[b]	11.9 (10.7–13.4)	0.012
NT proBNP (pg/mL)	–	2123 (996–3946)	2103 (833–3454)	–	–
BNP (pg/mL)	–	–	–	654 (355–1095)	–
z-transformed log natriuretic peptide	0.17 (−0.43–0.62)	0.18 (−0.40–0.66)	0.18 (−0.53–0.56)	0.05 (−0.59–0.59)	0.460
Outcomes					
Mortality at 1 year	281 (26%)	243 (29%)	25 (19%)[b]	13 (11%)[b]	<0.001
Mortality/HF at 1 year	418 (39%)	332 (39%)	52 (41%)	34 (29%)	0.096

ACE, angiotensin-converting enzyme; ARB, angiotensin receptor blocker; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HF, heart failure; LV, left ventricular; NT-proBNP, N-terminal pro B-type natriuretic peptide; NYHA, New York Heart Association; TMAO, trimethylamine-N-oxide. Data are expressed as median (interquartile range) for continuous variables or n (%) for categorical values. Categorical variables were analyzed with χ^2 tests. Continuous variables were analysed with Mann–Whitney U tests.
[a]Significantly higher compared with Caucasian.
[b]Significantly lower compared with Caucasian pairwise analyses.
[c]Estimated by Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration formula.

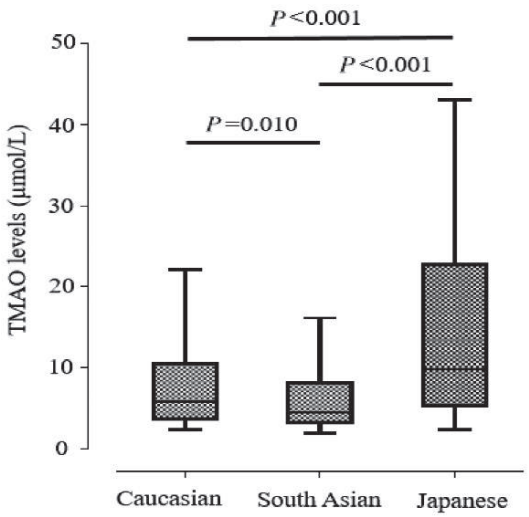


図１　民族別の急性心不全患者のTMAOレベル。箱ひげ図は、年齢、性別、および民族グループにわたる推定糸球体濾過量を調整したTMAOレベルの分布を示す。箱は中央値と四分位範囲を示し、ひげは10パーセンタイルと90パーセンタイルを示す。すべてのP値は、ボンフェローニ補正との多重比較のために調整された。TMAO、トリメチルアミン-N-オキシド。

民族グループ間に有意差はなかった（p = 0.096）（**表1**）。

TMAOレベルは、一変量［ハザード比（HR）95％信頼区間（CI): 1.28（1.17-1.40）、p <0.001］の死亡率/心不全と有意に関連した（未調整のp <0.001、調整済p = 0.002）（**表2**）。白人と南アジア人の患者（p = 0.823）の間に死亡率/心不全との関連について観察された差異はなかったが、日本人の患者（p = 0.042）と、死亡率/心不全のリスクが低かった（**表2**）。カプラン・マイヤー生存分析でも、南アジア人と日本人の患者間（p = 0.068）、および白人と南アジア人の患者間（p = 0.822）に有意差はなかった。しかし、白人と日本人の患者の間で有意差が観察された(p = 0.041)（**図2**）。

民族グループとTMAOレベル間の相互作用を調査したところ、調整後の全人口（民族グループ）とTMAOレベルの間に有意な相互作用は認められなかった（未調整p = 0.408、調整済p = 0.125）。各民族グループを考慮した場合、死亡率/心不全を伴うTMAOのハザード比は3つの民族グループ間で類似していた（HR未調整1.15-1.38、調整済み0.88-1.23）（**表2**）。

生存分析では、全人口のTMAOレベルの中央値を考慮すると、白人の患者はTMAOの上昇（p <0.001）を伴う心不全による全死亡および/または再入院の発生率の増加を示したが、日本人および南アジア人患者は、TMAOと生存との関連を示さなかった（p≥0.444）。さらに、TMAOが各民族グループの中央値で層別化された場合、白人の患者は循環レベルの上昇を伴うイベントの発生率の増加を示したが（p <0.001）、日本人および

表２　心不全による全死因および/または入院のCox回帰モデル

	Unadjusted		Adjusted[a]	
	HR (95% CI)	*P* value	HR (95% CI)	*P* value
Univariate model				
logTMAO	1.28 (1.17–1.40)	<0.001		
Ethnic group				
Caucasian	Reference			
South Asian	1.03 (0.77–1.39)	0.823		
Japanese	0.69 (0.49–0.99)	0.042		
Multivariate model				
logTMAO		<0.001		0.002
Ethnicity group		0.057		0.311
Ethnic group*logTMAO		0.408		0.125
Caucasian*logTMAO	1.38 (1.24–1.53)		1.23 (1.08–1.40)	
South Asian*logTMAO	1.15 (0.86–1.55)		0.88 (0.61–1.25)	
Japanese*logTMAO	1.21 (0.93–1.57)		1.02 (0.77–1.35)	

CI, confidence interval; HR, hazard ratio; TMAO, trimethylamine-N-oxide.
[a]Adjusted for age, sex, previous history of heart failure, ischaemic heart disease, hypertension, diabetes, systolic blood pressure, New York Heart Association class, sodium, haemoglobin, estimated glomerular filtration rate, and standardized natriuretic peptide.

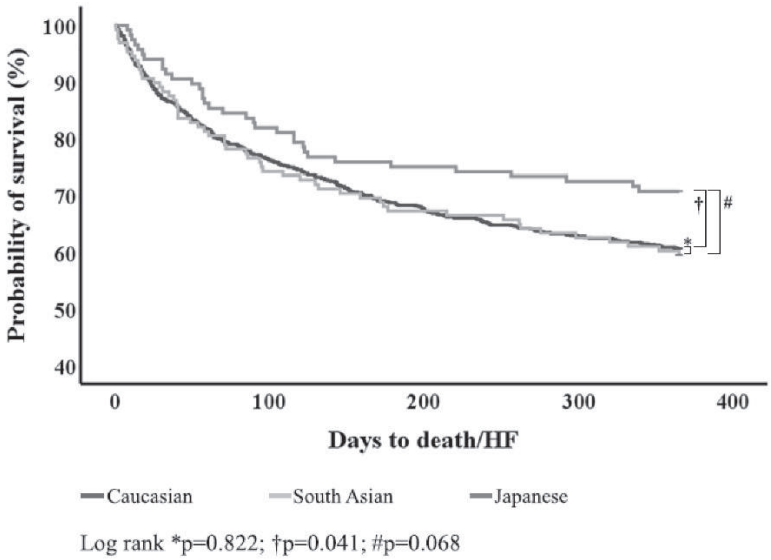


図２　心不全発症後１年間の民族性とすべての死因および/または再入院の関係を示すカプランマイヤー曲線。*ログランク
P = 0.822; † P = 0.041; #P = 0.068。HF、心不全。

南アジア人の患者はTMAOと死亡率/心不全イベントとの関連を示さなかった（p≥0.410）。死亡率および心不全による再入院についても、同様の結果が観察された。

【考察】

急性心不全患者のTMAOレベルは民族によって異なった。白人および非白人患者は、死亡率/心不全の生存確率に有意差がなかった。ただし、TMAOの中央値で二分した場合、白人の患者のみが、TMAOレベルの上昇に基づいて層別化する能力を示したが、日本人および南アジア人の患者ではそうではなかった。以前の調査結果と併せて、TMAOは白人患者に選択的なリスクを調整した民族選択性の寄与を示し、少なくとも調査対象のコホートにおけるTMAOの測定値は、白人の有害事象とのリスク関連に適用可能であるが、非白人患者には適用できないことを示している。

TMAOレベルは食事/生活習慣の影響を受けることが知られており、コリン/カルニチンが豊富な食品（魚や赤身の肉など）の摂取は、TMAOレベルが高く、菜食主義者はそのレベルが低いことと関連している。本調査結果は、食事の貢献における文化的および民族的な違いを反映している可能性がある。

民族の違いは、急性心不全患者のTMAOレベルとその有害な結果を伴うリスク層別化に影響を与える。本研究はTMAOの生成メカニズムや心不全の病態解明および、新たな心不全治療薬の開発につながると期待される。

【文献】

1. Suzuki T, et al.: Heart 102:841-848, 2016
2. Tang WH, et al.: J Am Coll Cardiol 64:1908-1914, 2014
3. Troseid M, et al.: Journal of Internal Medicine 277:717-726, 2015
4. Schuett K, et al.: J Am Coll Cardiol 70:3202-3204, 2017
5. Salzano A, et al.: Eur J Prev Cardiol 19:2159-2162, 2020
6. Yazaki Y, et al.: Eur J Heart Fail 10, 1291-1294, 2019
7. Suzuki T, et al.: European journal of heart failure 21:877-886, 2019
8. Salzano A, et al.: Heart Fail Clin 16:23-31,

2020
9. Cho CE, et al.: Mol Nutr Food Res 61, 2017
10. Cassambai S, et al.: Eur J Prev Cardiol 17: 1899-1902, 2019
11. Wu WK, et al.: Gut 68:1439-1449, 2018
12. Jaacks LM, et al.: Nutrition 32:975-984, 2016
13. Zaman MJ, et al.: Heart 99:729-736, 2013
14. Shafi T, et al.: J Am Soc Nephrol 28:321-331, 2017

薬剤誘発性心不全の予後予測と個別化治療に関する研究

赤澤　宏
東京大学大学院医学系研究科循環器内科学

【要約】

がんの寛解率や治癒率は格段に向上しているが、それにともなって、がんあるいはがん治療による副作用に関連する心血管合併症の管理が生命予後やQOLを左右する大きな要因となりつつある。とくに、アントラサイクリン系抗がん剤のように心毒性が古くから知られた薬剤に加えて、様々な分子標的薬による心毒性が問題となっている。HER2阻害剤や血管新生阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、さらにプロテアソーム阻害剤や免疫チェックポイント阻害剤など既存の薬剤に加えて、今後も心毒性に対する対応を要する抗がん剤はさらに増加することが予想される。アントラサイクリン系抗がん剤による心毒性が遺伝的要因により影響されることは知られていたが、いくつかの感受性遺伝子領域がゲノムワイド関連解析により同定されている。複数の遺伝子バリアントを使って遺伝的リスクスコアを作成し、従来の臨床的危険因子を組み合わせることで発症リスクの層別化が可能となりつつある。

そこで私たちは、腫瘍循環器領域のエビデンスの創出と標準的治療法の確立、さらに基礎研究の発展を目的として、多施設共同研究グループである日本腫瘍循環器学術ネットワーク（J-OCEAN: Japan Onco-Cardiology Educational and Academic Network）を立ち上げた。がん登録患者数が全国でもトップレベルにある大阪国際がんセンター、国立がんセンター中央病院、がん研有明病院、都立駒込病院、新潟県立がんセンターと東京大学医学部附属病院が連携して活動を始めているが、将来的には参加施設を追加してオールジャパンのネットワークへと発展させる構想である。臨床情報と遺伝情報を数多くの症例から精密に収集し、質の高いデータベースを構築するこ

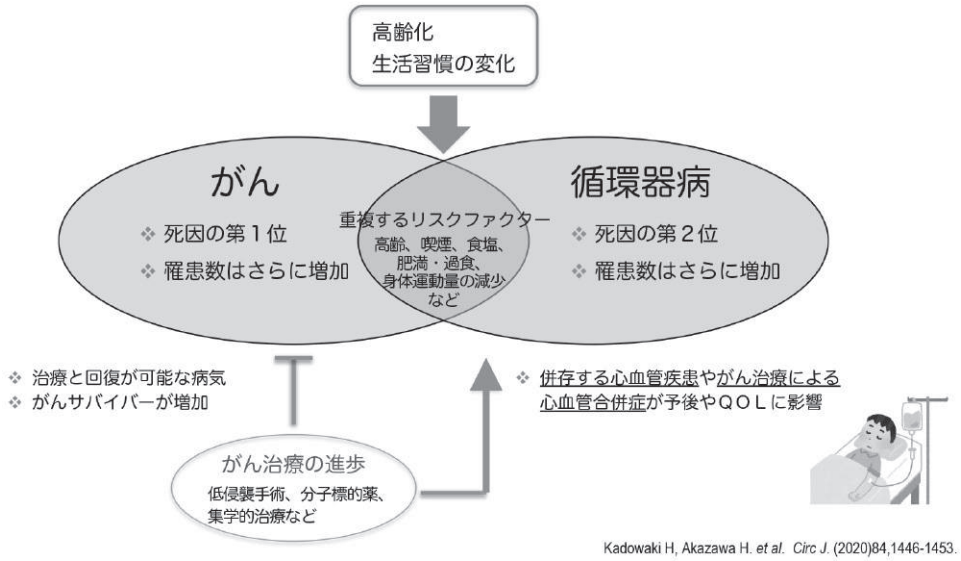


図１　がんと循環器病

とで、我が国におけるがん治療関連心機能障害の臨床像を明らかにするとともに、疾患発症や病型決定に有用な遺伝子マーカーを同定し、統合的なリスク層別化と予後予測手法を提案することを目標としている。公益財団法人冲中記念成人病研究所より令和3年度研究助成をいただき、抗がん剤による心不全発症の包括的ゲノム解析を開始した。

【はじめに】

近年、がんの治療成績は目覚ましく向上しているが、がんの罹患率は年々増加を続けており、その結果がんサバイバーが急増している。一方で、循環器疾患も生活習慣の欧米化と高齢化によって増加している。また、一部のがんと循環器疾患との間には、高齢や喫煙、肥満、過食、身体運動量の減少といった共通するリスク要因が存在しており、がんと循環器疾患を合併する患者、あるいは循環器疾患を発症するがんサバイバーが必然的に増加傾向にある[1)]（**図1**）。

また、がん治療薬による副作用が生命予後やQOLを左右する大きな要因となりつつある。とくに、アントラサイクリン系抗がん剤のように心毒性が古くから知られた薬剤に加えて、様々な分子標的薬による心毒性が問題となっている（がん治療関連心機能障害CTRCD: cancer therapeutics-related cardiac dysfunction）[2)]。HER2阻害剤や血管新生阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、さらにプロテアソーム阻害剤や免疫チェックポイント阻害剤など既存の薬剤に加えて、今後も心毒性に対する対応を要する抗がん剤はさらに増加することが予想される[3)]（**図2**）。

アントラサイクリンによる細胞毒性が遺伝的要因により影響されることは知られていたが[4)]、心毒性についてもいくつかの感受性遺伝子領域がゲノムワイド関連解析（GWAS: Genome-Wide Association Study）により同定されている。例えば小児がん患者では、*SLC28A3*遺伝子のバリアントがアントラサイクリンによる心毒性の発症リスクと相関し、他の遺伝子バリアントとともに遺伝的リスクスコアを作成し、従来の臨床的危険因子を組み合わせることで発症リスクの層別化が可能であったと報告されている[5)]。ただし、このバリアント（rs7853758）はアミノ酸変異をともなわないsynonymousバリアント（Leu461Leu）であり、その機能的意義については不明である。また、ヨーロッパ系の小児がん患者280例のGWASにより、*RARG*遺伝子のnonsynonymousバリアント（rs2229774, p.Ser427Leu）がアントラサイクリンによる心毒性と高度に関連することが示され、別のヨーロッパ系患者96例および非

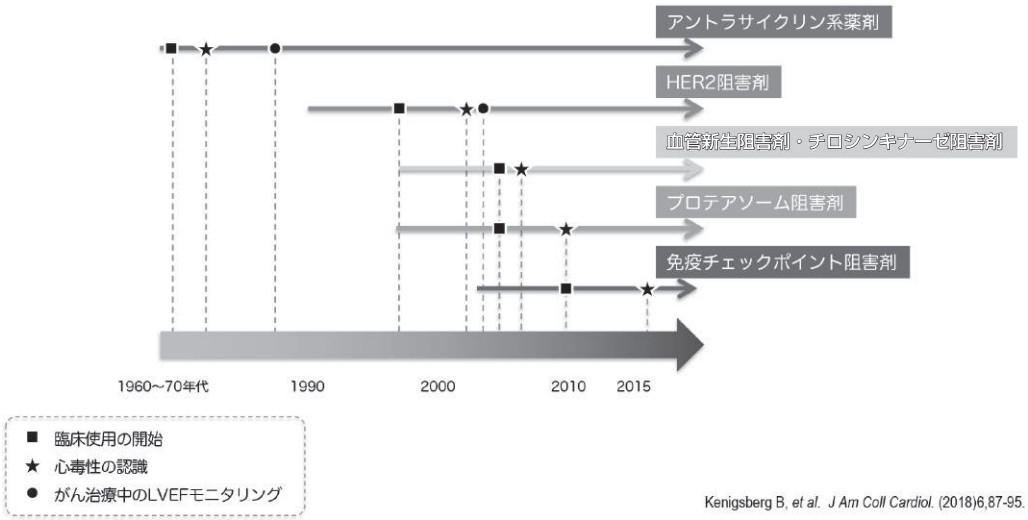


図２　がん薬物療法による心毒性

ヨーロッパ系患者80例のコホートを対象でも関連が確認された[6]。*RARG*は核内受容体retinotic acid receptor γ（RARG）をコードする遺伝子であるが、ラット心臓由来H9c2細胞株を用いた解析により、RARGはTop2βをコードする*Top2b*遺伝子のプロモーター領域に結合してその発現を抑制するが、RARGバリアントでは*Top2b*遺伝子の発現抑制が弱いことが明らかとなった[6]。つまり、RARGバリアントでは心筋細胞におけるTop2βの発現レベルが高いために、アントラサイクリンによる心毒性が高まるという機能的な関連性が示唆された。したがって、遺伝学的背景はCTRCD発症の底上げ因子として重要であり、複数の遺伝子バリアントを使って遺伝的リスクスコ

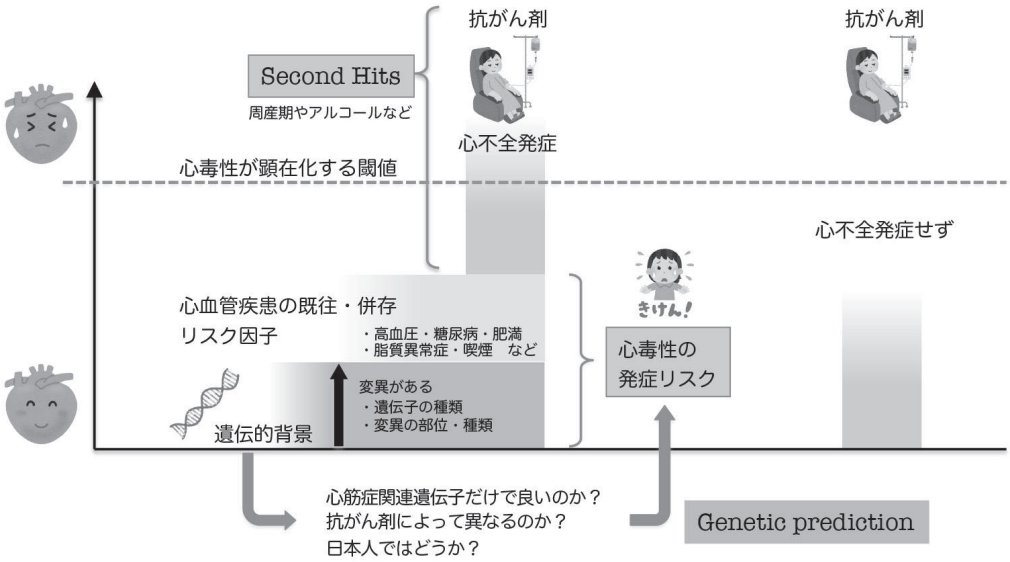
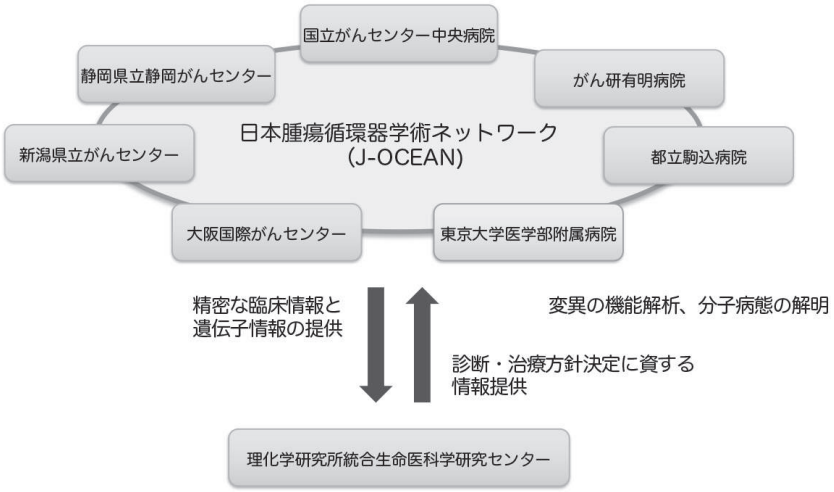


図３　遺伝学的背景：疾患発症の底上げ因子としての重要性



データベースの構築・公開、ゲノム解析、リスク階層化・予後予測、治療法最適化の確立

図４　オールジャパン体制の臨床情報と遺伝子情報の収集

アを作成し、従来の臨床的危険因子を組み合わせることで発症リスクの層別化が可能と考えられる（**図3**）。

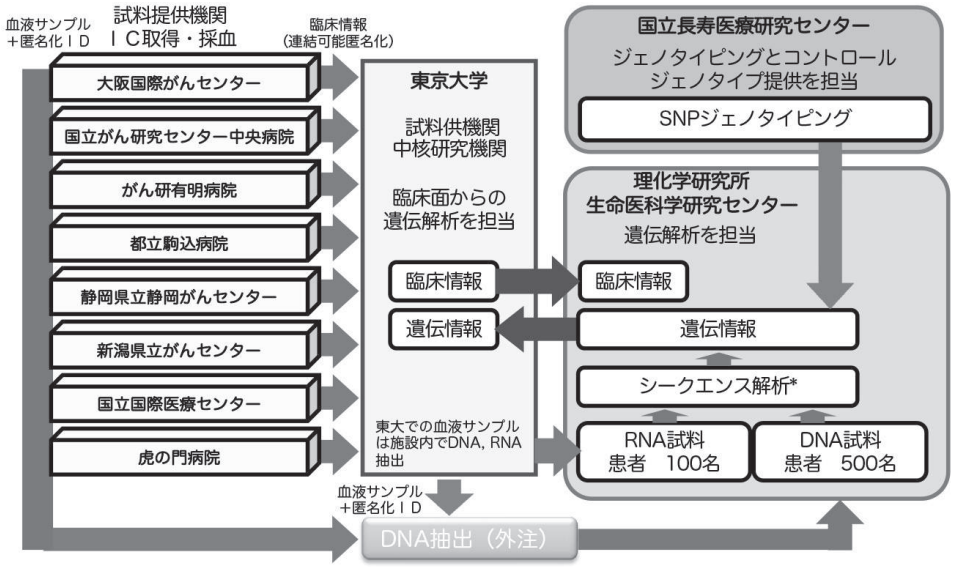
そこで私たちは、腫瘍循環器領域のエビデンスの創出と標準的治療法の確立、さらに基礎研究の発展を目的として、多施設共同研究グループである日本腫瘍循環器学術ネットワーク（J-OCEAN: Japan Onco-Cardiology Educational and Academic Network）を立ち上げた（**図4**）。がん登録患者数が全国でもトップレベルにある大阪国際がんセンター、国立がんセンター中央病院、がん研有明病院、都立駒込病院、新潟県立がんセンターと東京大学医学部附属病院が連携して活動を始めているが、将来的には参加施設を追加してオールジャパンのネットワークへと発展させる構想である。臨床情報と遺伝情報を数多くの症例から精密に収集し、質の高いデータベースを構築することで、我が国におけるがん治療関連心機能障害の臨床像を明らかにするとともに、疾患発症や病型決定に有用な遺伝子マーカーを同定し、統合的なリスク層別化と予後予測手法を提案することを目標としている。

公益財団法人冲中記念成人病研究所より令和3年度研究助成をいただき、抗がん剤による心不全発症の包括的ゲノム解析を始めることができた。プロジェクトの概要と進捗状況、今後の展開について報告させていただきたい。

【方法】

1. 抗がん剤による心不全発症の包括的ゲノム解析

本研究はCTRCDの遺伝的背景を解析し、どのような遺伝子変異・多型がその発症や重症化に寄与するかを検討することにより、疾患メカニズム解明と患者の層別化、そして治療法の開発を目指すものである。 遺伝子解析は一塩基多型ジェノタイピングアレイによる解析や、次世代シークエンサーを用いた候補遺伝子または全エクソンまたは全ゲノムにわたる遺伝子解析を実施する。また遺伝子多型のメカニズムを理解するためにメッセンジャーRNAを採取し解析を行う。その他に診断に有効なバイオマーカー検索のため末梢血マイクロRNAの解析なども行う。このような解析を通じて、早期診断バイオマーカー、早期診断薬、新規治療標的を探索する（**図5**）。



* 一塩基多型アレイを用いたゲノムワイドな原因遺伝子検索
候補遺伝子に対するターゲットシークエンス
候補遺伝子の同定が難しい場合、全エクソン領域または全ゲノム領域にわたる原因遺伝子変異の探索

図５　抗がん剤による心不全発症の包括的ゲノム解析

1）研究対象者

- 研究対象者数: 全体の予定人数（本学を含む）500例、自施設での予定人数100例
- 選択基準組みいれ基準: 抗がん剤使用にて循環器内科にコンサルトがあり、心機能低下をきたした患者。年齢は18歳以上とする。20歳未満の場合は本人と親の両方の同意を必要とする。
- 除外基準: 認知症があり、代諾者の同意が必要

（医）

審査番号	2019069G

西暦　2020年06月23日

審　査　結　果　通　知　書
実　施　許　可　通　知　書

倫理委員会の設置者
東京大学大学院医学系研究科・医学部長　殿
実施医療機関の長
東京大学医学部附属病院長　殿

倫理委員会委員長
東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会
ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会
藤井　知行

審査依頼のあった件についての審査結果を下記のとおり通知いたします。

記

研究課題名	抗がん剤による心不全発症の包括的ゲノム解析
審査結果	■承認する　□条件付きで承認する　□変更を勧告する　□承認しない □該当しない　□既承認申請の取り消し
審査事項（審査資料）	＜新規案件＞ ■研究の新規実施 ＜継続案件＞ □研究に関する変更 □その他（　　）
審査区分	■委員会審査（審査日：西暦2020年05月18日） □迅速審査（審査日：西暦　年　月　日）
指摘事項および理由・条件等	・「各施設で付与した「匿名化ID」から、研究全体の「共通匿名化ID」への付け替えの必要性」について確認、検討すること。
備考	一括審査対象の共同研究施設数：4施設 施設名：東京大学医学部附属病院、国立国際医療研究センター、新潟県立がんセンター新潟病院、国立研究開発法人国立がん研究センター ※ 委員会審査時における上記施設事項については、その後、適切に修正されたことが、2020年6月22日付で確認されている

研究責任者　小室　一成　殿

西暦　2020年06月22日

依頼のあった研究に関する審査事項について上記のとおり決定しましたので通知いたします。
倫理委員会の設置者
東京大学大学院医学系研究科・医学部長
齊藤　延人（公印省略）

西暦　2020年06月23日

倫理委員会での審査結果が承認となりましたので、研究の実施を許可いたします。
実施医療機関の長
東京大学医学部附属病院長
瀬戸　泰之（公印省略）

採血管と採血

PAXgene® DNA採血管

採血、輸送、そしてDNA精製のための採血管

DNA/パンキングに適した採血管です。PAXgene® DNA採血管は、細胞固定とDNA精製を簡便に行うための独自に開発された添加剤が充填されています。
血液サンプルは簡単さを用いて真空採血によりPAXgene® DNA採血管に直接採取することができます。
採血後の保管温度は以下の通りです。

採血管の種類	温度/期間
16mm PAXgene® DNA採血管 （カタログ番号：761115）	15～25℃：14日間 2～8℃：28日間 30℃：7日間 -20℃：10週間 -80℃：24か月※

8.5mlとやや大きいです

BD バキュテイナ® セーフティロック™ ブラッドコレクションセット（ホルダー付）

安全機構付き鞘付針とホルダーが一体となり、より安全で効率的な採血を可能にしました。

- 鞘付針とホルダーがあらかじめ一体化されており、鞘付針をホルダーに挿入する動作がないため、安全性と効率性が高まります。
- セーフティシールドはボタンで簡単に作動できます。
- 作動後のセーフティシールドは安全にロックされるため、採血後だけでなく、廃棄容器内の針刺し損傷も防止できます。

販売名	BD バキュテイナブラッドコレクションセット
医療機器認証番号	226AMBZX00064000

通常のアダプターでは奥まで真空採血管を挿入できないため上記を用います

一施設、最初は30組ほどお送りしております。ご希望により何本でもお送りします。
必要情報　①希望本数　　②送付先住所、電話、氏名　　③受け取り可能日時
E-mail: kaoru.ito@riken.jpまで

採血後手順と保存

PAX管使用法

- 採血前に室温にしておく（4℃～室温で保存可）
- 採血後直ちにゆっくりと**8～10回転倒混和**する
- 血液が入った採血管を冷凍保存するときには、必ず**ワイヤーラックに立てる**こと
- －70～－80℃で冷凍保存するときには、一旦－20℃で24 時間凍結させてから、－70～－80℃に移すこと

検体の保存

一定数ためておく場合は、鍵付きミニ冷凍庫（-30℃）を購入しますので、言ってください。

検体の送付

ヤマト運輸　クール宅急便　着払い

宛先：
〒230-0045　神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号
理化学研究所生命医科学研究センター　東研究棟E520
伊藤　薫
045-503-9347

図６　倫理審査承認後にサンプルの収集を開始

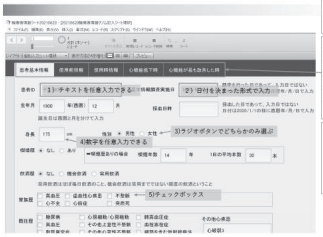
臨床データ記入ソフトウェアの立ち上げ

ファイルメーカー準拠のプログラムです。
→**ＰＣ起動と同時に自動起動**されます
（右上の電源ボタンを少し長押ししてＰＣが起動します）

画面上のアイコンをクリック
→または

または タスクバー上のアイコンをクリック

患者情報の入力



①アプリケーションを立ち上げると左のような画面が出ます。最初は、1人目にテスト入力患者の情報が表示されます。

②1人の患者につき、「基本情報」、（抗がん剤）「使用前情報」、「使用時情報」、（使用後）「心機能低下時」、（使用後）「心機能が最も改善した時」のタブがありますので、タブをクリックして切り替えを行います。

③入力形式には左図にあるように
1）テキスト(文字列)、2）日付
3）ラジオボタンで１つのみ選択
4）数字
5）チェックボックス
を入力できる箇所があります

＊ラジオボタンはdeleteキーで入力をキャンセルできます

患者IDについて

- 各施設ごとの匿名化**IDにて臨床情報入力シートを記入**する
（患者ID-匿名化IDは各施設で保持し、外部に出すことはない）
- 各施設から集められた臨床情報は、中央施設である東京大学で共通化IDを付け直される（2重匿名化）
- 共通化IDに基づき全体のゲノム研究は行なわれる

図７　倫理審査承認後にサンプルの収集を開始

な場合。

2）研究方法

東京大学循環器内科で得られた患者血液については患者IDの予備匿名化ののち、DNA、RNAを同科にて抽出する。検体数が20程度集まった時点で東京大学生物統計情報学寄付講座に対応表のある匿名化を依頼する。匿名化ののちDNA、RNA試料は理化学研究所に送付される。共同研究施設では採血後、各々の施設で対応表のある匿名化ののち、血液検体が理化学研究所に送られDNAが抽出される。DNAの一部は、一塩基多型アレイによるタイピング目的のため、理化学研究所から国立長寿医療研究センターに送付される。RNAは分解が早いため、抽出体制が整った東京大学でのみ収集される。

匿名化された臨床データは東京大学に集められクリーニング、解析を行う。遺伝子解析は1）一塩基多型アレイを用いたゲノムワイドな原因遺伝子検索、2）TTNなどの候補遺伝子に対するターゲットシークエンス、3）候補遺伝子の同定が難しい場合の次世代シークエンサーを用いた全エクソン領域または全ゲノム領域にわたる原因遺伝子変異の探索、4）末梢血リンパ球よりRNAを採取し、RNAシークエンスを行いDNA情報と統合解析、5）血清よりマイクロRNAを採取し同様にDNA情報と統合解析、を行う。

一塩基多型アレイによるタイピングは国立長寿医療研究センターで行われ、ゲノムデータは理化学研究所に送付される。シークエンスは民間外部委託（マクロジェン）にて行われる。DNA解析の対象群は研究分担者　尾崎浩一の協力のもと国立長寿医療研究センターバイオバンクに登録された6,000人のアルツハイマー病患者と4,000人の健常人の一塩基多型アレイデータを用いる。これら対象群のゲノムデータは、国立長寿医療研究センターから理化学研究所に送付される。全ての遺

合計18症例

送付元施設（病院名）	症例数
東京大学医学部附属病院	10
大阪国際がんセンター	0
国立がん研究センター中央病院	0
がん研究所有明病院	0
がん・感染症センター都立駒込病院	0
静岡県立静岡がんセンター	0
新潟県立がんセンター新潟病院	4
国立国際医療センター	4
虎の門病院	0
順天堂大学医学部付属順天堂医院	0
聖マリアンナ医科大学	0

→　参加施設の追加
登録に対するインセンティブ

図８　施設毎症例登録状況

年齢	性別	がん種	がん治療薬	ADR換算積算量 (mg/m2)	LVEF (最も低下)	LVEF (直近)	BNP (検体採取時)
41	F	急性骨髄性白血病	シクロフォスファミド等(詳細不明)	-	20	46	60.6
37	F	小児卵巣がん	詳細不明	-	32	41	197
32	M	慢性骨髄性白血病	イダルビシン、ダサチニブ	120	42	64	91.1
36	F	慢性骨髄性白血病	詳細不明	300	47	57	122.2
70	F	乳癌	ドキソルビシン+トラスツズマブ＋ペルツズマブ	240	46	52	51
39	F	乳癌	ドキソルビシン+トラスツズマブ＋ペルツズマブ	240	15	58	26.3
59	F	乳癌	ドキソルビシン+トラスツズマブ	240	-	60	25.7
58	F	卵巣癌	ドキシル＋カルボプラチン	-	40	52	15
27	F	ランゲルハンス組織球症	ドキソルビシン＋メソトレキセート	490	31	-	55.2
67	F	急性リンパ性白血病	ドキソルビシン	452	18	25	367

図９　東大病院の症例

伝情報は理化学研究所より東京大学に提出され、詳細な臨床情報に結びつけられた解析が行われる。また東京大学より遺伝解析に必要な臨床情報が（対応表は添付せずに）理化学研究所に提出され、症例対象研究が行われる。最終的に得られた遺伝解析結果は学術学会や学術雑誌などで報告する。

【結果】

1. 倫理審査承認（2020年6月23日）、サンプルと臨床情報の収集を開始（**図6**，**図7**）
2. 施設毎症例登録状況

2022年3月の時点での施設毎症例登録状況を**図8**に、自施設での登録症例の詳細を**図9**に示す。

合計18症例とまだ解析には十分な症例が登録

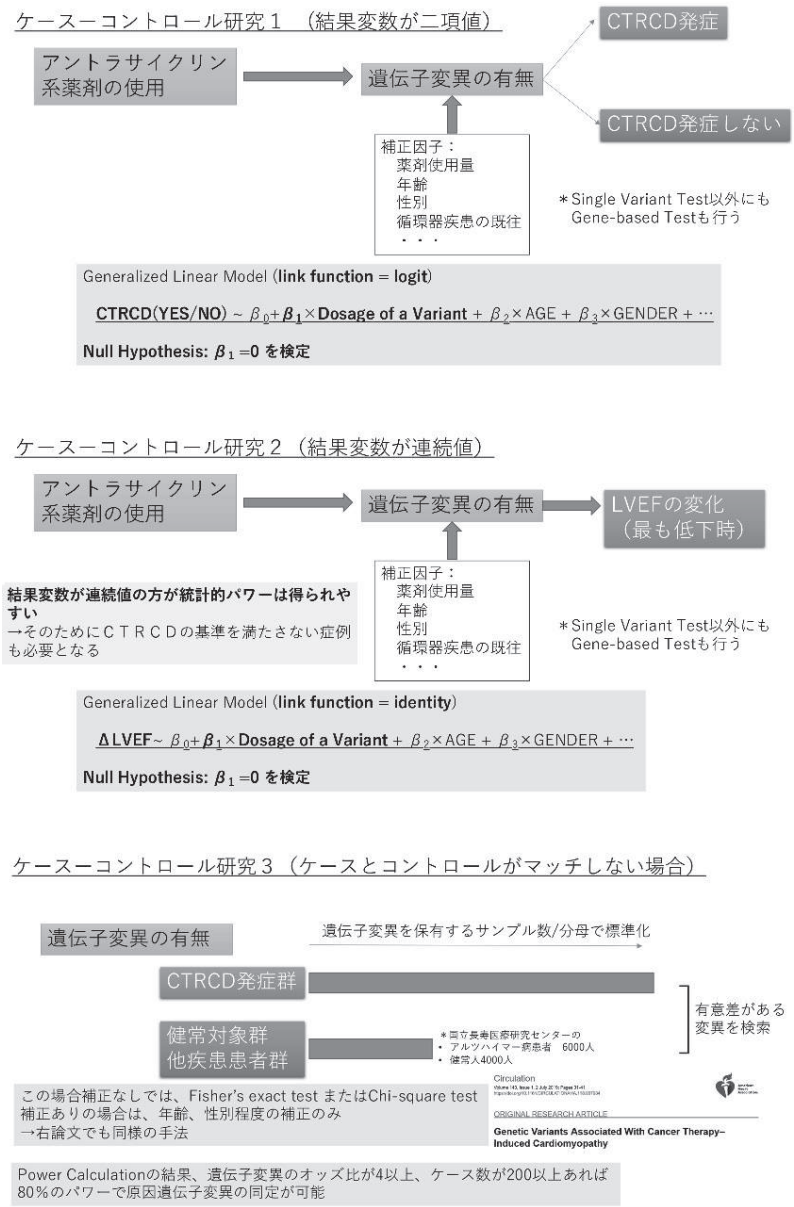


図 10　今後の解析方法

されていない。今後は参加施設を追加拡充し、登録に対するインセンティブを設けることを検討している。

3. 今後の解析方法（**図10**）

サンプルと臨床情報を収集した後に、以下の解析を行う予定にしている。

1）ケース・コントロール研究1（結果変数が二項値）
CTRCD発症の有無の2群で遺伝子変異を検索

2）ケース・コントロール研究2（結果変数が連続値）
左室駆出率（LVEF）の変化量に与える遺伝子変異の影響を検証

3）ケース・コントロール研究3（ケースとコントロールがマッチしない場合）
CTRCD発症群と健常対象群/他疾患患者群で遺伝子変異を検索

【謝意】

本研究を進めるにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人冲中記念成人病研究所に深甚なる謝意を表します。

【文献】

1. Kadowaki H, Akazawa H, Ishida J, et al.: Cancer therapeutics-related cardiac dysfunction- insights from bench and bedside of onco-cardiology. Circ J 84: 1446-1453, 2020
2. Ewer MS, Lippman SM: Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. J Clin Oncol 23: 2900-2902, 2005
3. Kenigsberg B, Wellstein A, Barac A: Left ventricular dysfunction in cancer treatment: is it relevant? JACC Heart Fail 6: 87-95, 2018
4. Duan S, Bleibel WK, Huang RS, et al.: Mapping genes that contribute to daunorubicin-induced cytotoxicity. Cancer Res 67: 5425-5433, 2007
5. Visscher H, Ross CJ, Rassekh SR, et al.: Pharmacogenomic prediction of anthracycline-induced cardiotoxicity in children. J Clin Oncol 30: 1422-1428, 2012
6. Aminkeng F, Bhavsar AP, Visscher H, et al.: A coding variant in RARG confers susceptibility to anthracycline-induced cardiotoxicity in childhood cancer. Nat Genet 47: 1079-1084, 2015

スペックルトラッキング心エコー法を用いた糖代謝異常例における早期心機能障害の検出－心不全パンデミック時代における新たな予防戦略の構築－

中西　弘毅
東京大学循環器内科

【要約】

糖尿病は心不全の重要なリスク因子であるが、近年、糖尿病発症前のインスリン抵抗性と心不全発症の関連に注目が集まっている。スペックルトラッキング心エコー法で求められる左室長軸方向ストレイン（LVGLS）は、左室駆出率低下前の潜在性左室収縮障害を鋭敏に検出でき、心不全発症の予測因子であることが明らかになってきた。本研究の目的は、心疾患のない一般住民において、インスリン抵抗性と潜在性左室収縮障害の関係を検証することである。器質的心疾患を有さない539例を対象にhomeostatic model assessment of insulin resistance（HOMA-IR）とtriglyceride-glucose index（TyG index）を評価し、心エコー指標との関係を検証した。HOMA-IRで分類したインスリン抵抗性群は、正常糖代謝群と比較して潜在性左室機能障害の割合が多く、糖尿病群と同程度であった（正常糖代謝群14.0%、インスリン抵抗性群42.4%、糖尿病群48.9%；$p<0.001$）。また、TyG indexはLVGLSと正の相関を示した（$r=0.35$, $p<0.001$）。多変量解析において、インスリン抵抗性の存在は糖尿病と同様に、既知の心血管リスク因子や心エコー指標と独立してLVGLS低下と関係した。今後は、インスリン抵抗性への早期介入により潜在性左室機能障害が改善し、心不全発症予防に繋がるかどうかの検証を要する。

【目的】

2型糖尿病は世界的に増加傾向であり、疫学的に極めて重要な疾患である[1]。糖尿病は冠動脈疾患を惹起し、心機能を低下させるだけではなく、糖尿病それ自体が「糖尿病性心筋症」と呼ばれる心機能障害をきたし、心不全発症リスクを増加させることが知られている[2]。スペックルトラッキング心エコー法で求められる左室長軸方向ストレイン（left ventricular global longitudinal strain; LVGLS）は、左室駆出率低下前の早期左室収縮障害の検出に有用な指標であることが報告されており、糖尿病の症例でも低下していることが示されている[3]。近年、大規模疫学研究において、インスリン抵抗性の存在が、他の心血管病リスクと独立した心不全発症リスクであることが示され[4]、このような症例における早期の心機能障害検出の重要性が増している。また、triglyceride-glucose index（TyG index）は簡易に計測できるインスリン抵抗性の指標として最近注目を浴びている[5]。しかし、インスリン抵抗性と潜在性左室機能障害の関係性は十分にわかっていない。本研究の目的は、心疾患のない一般住民において、インスリン抵抗性と潜在性左室収縮障害の関係を検証することである。

【方法】

対象は、血液検査、心エコー図検査を含む心血管ドックを受診した症例572例である。このうち、心房細動/粗動例（7名）、冠動脈疾患例（17例）、左室駆出率低下あるいは有意な弁膜症を有する例（6例）、およびエコー画像不鮮明例（3例）を除外し、最終的に539例について解析を行った。全例で心血管リスク因子の有無を評価し、Body mass index（BMI）は身長・体重から算出した（kg/m^2）。血液検査は空腹時に施行し、血糖値、血中インスリン濃度、総コレステロール値、中性脂肪値、クレアチニン値、CRP値を評価した。homeostatic model assessment of insulin resistance（HOMA-IR）は、空腹時インスリン濃度（μU/ml）×空腹時血糖値（mg/dl）/405によ

り算出した[6]。TyG indexはln（空腹時中性脂肪値［mg/dl］×空腹時血糖値［mg/dl］/2）により算出した[5]。推定GFR（eGFR）値はMDRDの式より算出した[7]。

経胸壁二次元心エコー図検査は、Toshiba Aplioを用い、計測はアメリカ心エコー図学会（ASE）のガイドラインに基づいて行った[8]。左室心筋重量をDevereuxの式[9]から、左房容積を心尖部四腔像・二腔像からシンプソン法[8]で評価し、いずれも体表面積で補正した。また、ASEのガイドラインに基づき左室拡張能を評価した[10]。左室流入血流速度波形から拡張早期波（E波）、心房収縮波（A波）を測定した。組織ドプラ法により評価した中隔・側壁の拡張早期僧帽弁輪速度の平均値をe'として、E/e'比を算出した。スペックルトラッキング解析は、Tomtec社の2D Cardiac Performance Analysesで行った。LVGLSは心尖部4腔像、2腔像、長軸像のストレイン値の平均から算出した[11]。

研究参加者を糖尿病群、インスリン抵抗性群（HOMA-IR≧1.5）、正常糖代謝群（HOMA-IR<1.5）の3群に分けて心エコー指標の比較を行っ

表１　糖代謝異常と臨床背景、心エコー指標の関係

	正常糖代謝群 (n=428)	インスリン抵抗性群 (n=66)	糖尿病群 (n=45)	P値
年齢，歳	56±10	57±10	62±9*†	0.002
男性，n（%）	269（62.9）	60（90.9）	41（91.1）	<0.001
高血圧，n（%）	101（23.6）	29（43.9）	25（55.6）	<0.001
脂質異常症，n（%）	131（30.6）	30（45.5）	33（73.3）	<0.001
Body mass index, kg/m²	23.0±2.8	26.4±2.9*	24.9±3.7*†	<0.001
血液検査				
血糖，mg/dl	92±8	101±9*	118±20*†	<0.001
インスリン，μU/ml	3.02±1.45	8.73±2.83*	7.84±16.42*	<0.001
HOMA-IR	0.70±0.35	2.17±0.69*	2.16±3.55*	<0.001
TyG index	8.3±0.5	8.9±0.7*	8.9±0.6*	<0.001
総コレステロール，mg/dl	205±34	207±40	184±37*†	<0.001
eGFR, ml/min/1.73m²	77±14	75±16	75±18	0.255
CRP, mg/dl	0.04（0.02-0.08）	0.07（0.05-0.11）*	0.07（0.03-0.14）*	<0.001
心エコー指標				
左室拡張末期径，mm	44.1±4.1	45.8±4.7*	45.7±3.9*	0.001
左室収縮末期径，mm	28.1±3.2	29.3±3.8*	29.3±3.2	0.004
左室駆出率，%	63.0±5.5	60.4±5.3*	60.3±5.3*	<0.001
左室心筋重量係数，g/m²	64.5±15.2	66.4±15.1	72.8±17.6*	0.002
E波，cm/sec	66.1±13.6	61.9±9.9*	58.3±11.4*	<0.001
A波，cm/sec	57.7±14.7	59.3±14.2	62.1±14.5	0.13
E/A比	1.21±0.39	1.10±0.30*	0.97±0.25*	<0.001
e'，cm/sec	8.2±2.0	7.4±1.6*	6.5±1.4*†	<0.001
E/e'比	8.4±2.1	8.7±2.0	9.3±2.1*	0.017
左房容積係数，ml/m²	22.0±5.7	23.0±6.1	21.9±5.0	0.359
LVGLS, %	-19.7±3.1	-17.6±2.6*	-16.8±2.4*	<0.001

*p<0.05 vs 正常糖代謝群、†p<0.05 vs インスリン抵抗性群

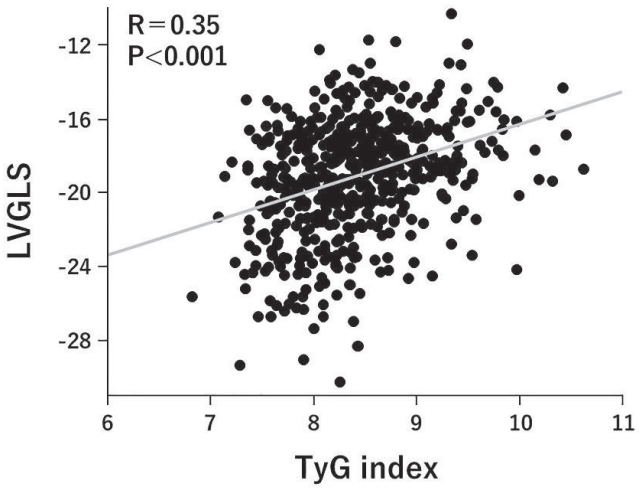


図 1　TyG indexとLVGLSの関係

た。また、TyG indexとLVGLSの関係を評価した。さらに潜在性左室機能障害(LVGLS>-16.65%)を従属因子として、糖代謝異常との関係性につき、単変量および多変量解析を行った。

【結果】

平均年齢は57±10歳、370例（68.6%）が男性であった。平均左室駆出率は62.5±5.6%、平均LVGLSは-19.2±3.1%であった。45名（8.3%）が糖尿病群、66名（12.2%）がインスリン抵抗性群であった。インスリン抵抗性群は、正常糖代謝群と比較して左室心筋重量係数やE/e'比は同等であったが、LVGLSの有意な低下を認めた（-17.6±2.6% vs -19.7±3.1%, p<0.05:**表1**）。潜在性左室機能障害の頻度は、インスリン抵抗性群（42.4%）と糖尿病群（48.9%）でほぼ同等であり、正常糖代謝群（14.0%）に比して高率であった（p<0.001）。次にTyG indexとLVGLSの関係を検討したところ**図1**に示すように有意な正の相関を示した（r=0.35, p<0.001）。多変量解析において、インスリン抵抗性は糖尿病と同様に、既知の心血管リスク因子、他の心エコー指標と独立してLVGLS低下と関係した（インスリン抵抗性群: 補正オッズ比2.38, p=0.007, 糖尿病群: 補正オッズ比3.02, p=0.003）。

【考察】

今回の研究で示されたインスリン抵抗性と潜在性左室収縮障害の関係は、インスリン抵抗性と心不全発症の関係性を裏付けるものと考えられた。またTyG indexとLVGLSは有意な相関を示したことから、TyG indexの評価はインスリン抵抗性の評価のみならず、心不全ハイリスク症例の検出にも有用で簡便なマーカーであることが示唆された。慢性炎症[12]やレニンアンジオテンシン系の活性化[13]、冠微小循環障害[14]などがインスリン抵抗性と潜在性左室機能低下の関連をつなぐ機序として考えられるが、今後のさらなる検討が必要である。本研究にはいくつかの限界が存在する。第一に、LVGLSは心不全の強力な予測因子であるが、横断研究のため実際の心不全発症をみていないことである。第二に本研究では肥満患者が少なくまた心血管疾患のない症例を対象としており、本研究結果を他の人種や心血管疾患を有する症例に適応できるか不明である。今後、生活習慣の介入に伴うインスリン抵抗性の改善がLVGLSで評価した潜在性左室機能障害の改善につながるか否か検討が必要であり、これによって得られる結果は心不全発症予防に有用な情報を提供する可能性があると考えている。

【文献】

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al.: Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the American Heart

Association. Circulation 139: 56-528, 2019
2. Marwick TH, Ritchie R, Shaw JE, et al.: Implications of underlying mechanisms for the recognition and management of diabetic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 71: 339-351, 2018
3. Wang Y, Yang H, Huynh Q, et al.: Diagnosis of nonischemic stage B heart failure in type 2 diabetes mellitus: optimal parameters for prediction of heart failure. JACC Cardiovasc Imaging 11: 1390-1400, 2018
4. Vardeny O, Gupta DK, Claggett B, et al.: Insulin resistance and incident heart failure the ARIC study (Atherosclerosis Risk in Communities). JACC Heart Fail 1: 531-536, 2013
5. Guerrero-Romero F, Simental-Mendia LE, Gonzalez-Ortiz M, et al.: The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. J Clin Endcrinol Metab 95: 3347-3351, 2010
6. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al.: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28: 412-419, 1985
7. Matsuo S, Imai E, Horio M, et al.: Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. Am J Kidney Dis 53: 982-992, 2009
8. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, et al.: Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. J Am Soc Echocardiogr 28: 1-39, 2015
9. Devereux RB, Reichek N: Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. Circulation 55: 613-618, 1977
10. Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, et al.: Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. J Am Soc Echocardiogr 29: 277-314, 2016
11. Voigt JU, Pedrizzetti G, Lysyansky P, et al.: Definitions for a common standard for 2D speckle tracking echocardiography: consensus document of the EACVI/ASE/Industry Task Force to standardize deformation imaging. J Am Soc Echocardiogr 28: 183-193, 2015
12. Kosmala W, Jedrzejuk D, Derzhko R, et al.: Left ventricular function impairment in patients with normal-weight obesity: contribution of abdominal fat deposition, profibrotic state, reduced insulin sensitivity, and proinflammatory activation. Circ Cardiovasc Imaging 5: 349-356, 2012
13. Joseph JJ, Echouffo Tcheugui JB, et al.: Renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and incident type 2 diabetes mellitus: MESA. J Am Heart Assoc 7: e009890, 2018
14. Schindler TH, Cardenas J, Prior JO, et al.: Relationship between increasing body weight, insulin resistance, inflammation, adipocytokine leptin, and coronary circulatory function. J Am Coll Cardiol 47: 1188-1195, 2006

（6）腎疾患

多発性嚢胞肝患者の臨床および遺伝的特徴の検討

星野　純一

【要約】

目的: 巨大多発性嚢胞肝（PLD）症例の生命予後が不良であることが明らかになっている。一方、巨大PLDの早期発見およびハイリスク群の同定・治療介入は重要な臨床課題である。今までPLDの原因遺伝子として、PKD1,2遺伝子のほか、PRKCSH, SEC63遺伝子異常が報告されているが、過半数は原因不明である。今回、孤発PLD患者の遺伝子異常の解析とその臨床的特徴の検討を目的とした。

方法: 当院通院中のPLD患者のうち、身長補正総肝体積（htTLV）が1800 m^3以上かつ腎嚢胞が10個未満の患者を対象とした。研究参加の同意を得た患者の血液からDNAを抽出し、DNA解析（whole exome sequence）を行った。得られた結果を元に、PLD関連遺伝子異常別の臨床的特徴を検討した。総肝体積と総腎体積の測定はCT画像体積測定システムVINCENTを用いた。

結果: 観察期間内に52例の遺伝子解析を行った。全体の患者背景は、平均年齢56.1（35.8-76.3）歳、女性77%、BMI 21.8（16.6-28）、身長補正総肝体積（htTLV）中央値 4036.0（650.6-9147.6）cm^3、身長補正総腎体積（htTKV）373（57.0-2842.1）cm^3であった。

DNA解析の結果、PKD1 19名（36.5%）、PKD2 16名（30.8%）、GANAB 2例（3.8%）、PRKCSH 5例（9.6%）、SEC63 1例（1.9%）のPLD関連遺伝子異常が検出された。なお9例（17.3%）は既知のPLD関連遺伝子異常は検出されなかった。

患者背景を比較すると、各群の年齢中央値はPKD1, PKD2, GANAB, PRKCSH, SEC63でそれぞれ58.6, 52.1, 56.5, 55.2, 56.5歳と類似していたが、総肝体積/総腎体積比（LKratio）はそれぞれ7.0, 8.6, 14.7, 15.9, 20.4であった。PKD1, PKD2 variantsに比べ、GANAB, PRKCSH, SEC63遺伝子異常群では、腎嚢胞は小さく、正常に近い腎形態を保っていた。また、PKD1群ではPKD2群に比べてhtTKVが有意に大きかった（691（190-2842）vs 324（194-1194）mL, $p<0.05$）。

結語: わが国の巨大PLD患者における遺伝子異常は、PKD1, PKD2, PRKCSHの順に多く、GANABやSEC63遺伝子異常も稀ながら存在する。肝臓・腎臓体積とその比を用いることで、原因遺伝子異常を推察することが出来る可能性がある。

【目的】

多発性嚢胞腎は、進行性に腎臓・肝臓の多発性嚢胞が増大し、多臓器不全・るいそうなどにより致死的な経過を辿る[1)]。我々は院内倫理委員会の承認のもと、多数の巨大多発性嚢胞肝（PLD）患者に対して肝動脈塞栓術を施行し、嚢胞の縮小効果を報告してきた[2)]。しかし同治療にて患者QOLは改善を認めているものの、嚢胞増大機序は未だ明らかでない。

巨大PLD症例の生命予後が不良であることが明らかになっている。一方、巨大PLDの早期発見およびハイリスク群の同定・治療介入は重要な臨床課題である。今までPLDの原因遺伝子として、PKD1,2遺伝子のほか、GANAB, PRKCSH, SEC63遺伝子異常が報告されているが、PLDは原因不明が過半数を占めている[3, 4)]。さらに患者予後やPLD増大に関する臨床的解析は行われていない。今回、PKD2などの新規遺伝子異常を発見した実績のあるYale大学Somlo研究室と共同で、PLD患者の遺伝子異常の解析とその臨床的特徴の検討を目的とした。

【方法】

当院通院中のPLD患者のうち、身長補正総肝体積（htTLV）が1800 m^3以上かつ腎嚢胞が10個未満の患者を対象とした。

エントリー基準は以下の通りである。

- 虎の門病院および虎の門病院分院に通院する20歳以上の成人
- 巨大嚢胞肝を有する: 身長補正総肝体積（htTLV）が1800 cm^3以上
- 腎嚢胞がない、または10個未満

研究参加の同意を得た患者の全血は、検体検査室にて-80℃に凍結され、SRLに送付してDNA抽出を行った。DNA検体は、院外に送付する前に各検体に新たな識別番号を付与し、FedexにてYale大学Somlo lab（管理責任者: Stefan Somlo）に送付し、DNA解析（whole exome sequence）を行った。

また、患者情報およびCT画像を収集し、総肝体積と総腎体積の測定はCT画像体積測定システムVINCENTを用いた。

得られた結果を元に、PLD関連遺伝子異常別の臨床的特徴を検討した。

【結果】

観察期間内に52例の遺伝子解析を行った。

全体の患者背景は、平均年齢56.1（35.8-76.3）歳、女性77%、BMI 21.8（16.6-28）、身長補正総肝体積（htTLV）中央値 4036.0（650.6-9147.6）cm^3、身長補正総腎体積（htTKV）373（57.0-2842.1）cm^3であった。

DNA解析の結果、PKD1 19名（36.5%）、PKD2 16名（30.8%）、GANAB 2例（3.8%）、PRKCSH 5例（9.6%）、SEC63 1例（1.9%）のPLD関連遺伝子異常が検出された。なお9例（17.3%）は既知のPLD関連遺伝子異常は検出されなかった（**表1**、**図1**）。

患者背景を比較すると、各群の年齢中央値はPKD1, PKD2, GANAB, PRKCSH, SEC63でそれぞれ58.6, 52.1, 56.5, 55.2, 56.5歳と類似していたが、総肝体積/総腎体積比（LKratio）はそれぞれ7.0, 8.6, 14.7, 15.9, 20.4であった。PKD1, PKD2 variantsに比べ、GANAB, PRKCSH, SEC63遺伝子異常群では、腎嚢胞は小さく、正常に近い腎形態を保っていた。また、PKD1群ではPKD2群に比べてhtTKVが有意に大きかった（691（190-2842）vs 324（194-1194）mL, $p<0.05$）（**表1**）。

【考察】

PKDは最も患者数の多い遺伝性疾患であるものの、発症機序や治療に関しては未解明の点が多く、未だにわが国における透析導入原因疾患の第4位を占める疾患である。PKDには一定の割合で巨大化PLDを合併し、その割合は女性に多

表 1　遺伝子異常別の患者背景と肝臓・腎臓体積の比較

		All patients (n=52)	PKD1 variants (n=19)	PKD2 variants (n=16)		GANAB (Case36)	GANAB (Case37)	PRKCSH (n=5)		SEC63 (Case43)	Not detected (n=9)	
Age	(years old)	56.1 (35.8-76.3)	58.5 (35.8-76.3)	52.1 (37.8-66.5)		56.5	61.4	55.2 (42.3-72.0)		55.5	51.3 (37.6-75.1)	
Female	n(%)	40 (76.9)	15 (78.9)	13 (81.3)		female	female	3.0 (60.0)		female	6 (66.6)	
BMI	(kg/m^2)	21.8 (16.6-28)	21.9 (18.5-28)	21.9 (18.7-27)		26.0	21.3	21.2 (19.5-25.4)		20.5	21.3 (16.6-26.2)	
htTLV	(mL/m)	4036.0 (650.6-9147.6)	4824.5 (1911.6-9147.6)	3938.2 (1434.6-6050.7)		3437.0	6318.2	2394.3 (650.6-8211.2)		3385.6	5762.9 (1046.5-7454.3)	
htTKV	(mL/m)	373.1 (57.0-2842.1)	691.1 (189.7-2842.1)	323.8 (193.9-1194.1)	*	234.3	161.9	179.4 (138.2-207.8)	**	165.4	242.0 (57-994.8)	**
ratioLK		8.5 (2.0-57.1)	7.0 (2.0-19.6)	8.6 (3.8-19.2)	**	14.7	39.0	15.9 (4.2-39.5)	*	20.4	14.3 (5.1-57.1)	*
Alb	(g/dL)	3.8 (2.8-4.7)	3.7 (3.3-4.2)	3.8 (2.8-4.5)		4.0	4.0	3.9 (3.6-4.7)		4.2	3.8 (2.8-4.5)	
ALT	(IU/L)	16 (6-117)	13 (6-68)	18 (10-75)	*	12	32	26 (16-44)	**	23	17 (10-117)	*
ALP	(IU/L)	307 (61-1864)	255 (61-1864)	306 (154-861)		263	783	370 (224-455)		343	349 (281-733)	*
Cre	(mg/dL)	0.8 (0.5-13.8)	1.1 (0.6-13.8)	0.7 (0.5-1.8)	**	0.6	0.5	0.9 (0.5-0.9)		0.7	0.8 (0.6-2.7)	
eGFR	(mL/min/1.73m^2)	59.3 (14.5-97.8)	56.1 (14.5-90.2)	71.9 (30.6-97.8)		76.2	80.0	71.9 (57.5-92.8)		71.1	63.6 (18.7-91.3)	
Bil	(mg/dL)	0.8 (0.2-4.2)	0.8 (0.4-1.3)	0.6 (0.2-4.2)	*	0.7	0.8	0.9 (0.4-1.1)		0.9	0.7 (0.5-3.8)	
Plt	(10^4/μL)	186 (83-424)	178 (83-298)	191 (134-424)		185	145	170 (147-239)		103	200 (150-290)	
PT%	(%)	83.1 (53.6-137.2)	81.6 (53.6-137.2)	85.5 (54.6-118.6)		87.8	78.0	81.3 (77.9-102.9)		75.9	88.2 (58.7-95.1)	
RRT	n(%)	5 (9.6)	5 (26.3)	0 (0.0)	*	No	No	0 (0.0)	*	No	0 (0.0)	*

* p-value <0.05 (reference PKD1)

** p-value<0.01 (reference PKD1)

wilcoxon rank sum test and chi-squared test.

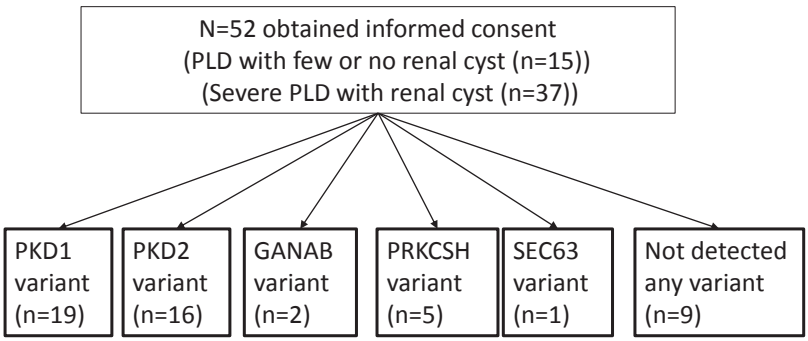


図 1　Flow chart

く、巨大化した場合には生命予後も不良であることが明らかになっているものの、未だに過半数のPLD患者の遺伝子異常が明らかにされておらず、発症機序は不明で有力な治療法も存在していない。

巨大PKDに伴う巨大PLDの場合は、PKD関連遺伝子異常が寄与する可能性が考えられたことから、今回は腎臓増大を伴わない巨大PLD患者に限定し、その遺伝子異常の解析を行った。

その結果、腎臓増大を伴わない場合であっても、PKD1, PKD2, PRKCSH遺伝子異常の順にPLD関連遺伝子異常が検出され、その臨床的特徴としてPKD1遺伝子異常群ではその他の遺伝子異常群に比べて腎体積が有意に大きく、PKD1, PKD2遺伝子異常群では総肝体積/総腎体積比（LKratio）が10未満であることが明らかとなった。一方のPRKCSH, GANAB, SEC63遺伝子異常群ではいずれもLKratioが10以上であり、腎形態は殆ど正常であった。

日本人を含むアジア人において巨大PLD患者における遺伝子異常と臨床的特徴は未だ明らかでない。2021年に女子医大グループが128名のPKD患者のなかでPKD1 nonsense mutationが肝嚢胞の直径と相関することを報告しているが、TLVは明らかでなく、PKD1とPKD2遺伝子異常に焦点を絞った検討となっている。今回、二施設かつ症例数が限定されてはいるものの、アジアではじめて巨大PLD患者におけるGANAB, PRKCSH, SEC63も含めたPLD関連遺伝子異常の疾患分布が明らかとなった。更に総肝体積・総腎体積に関する情報からPLD遺伝子異常がある程度類推できる可能性が示唆された。今後は、各遺伝子異常群における総肝体積増大速度や生命予後などに関する更なる検討を行っていきたい。

【謝辞】

本研究の遂行に際して、虎の門病院腎センター内科 関根章成先生、水野裕基先生、高石由里奈さん、中原知穂さん、Yale大学Stefan Somlo教授、Whitney Besse氏に多大なご協力を頂いた。改めて感謝申し上げたい。

【文献】

1. Hoshino J, Suwabe T, Hayami N, et al.: Survival after arterial embolization therapy in patients with polycystic kidney and liver disease. J Nephrol 28: 369-377, 2015
2. Hoshino J, Ubara Y, Suwabe T, et al.: Intravascular embolization therapy in patients with enlarged polycystic liver. Am J Kidney Dis 63: 937-944, 2014
3. Porath B, Gainullin VG, Cornec-Le Gall E, et al.: Mutations in GANAB, encoding the glucosidase iialpha subunit, cause autosomal-dominant polycystic kidney and liver disease. American journal of human genetics 98: 1193-1207, 2016
4. Besse W, Dong K, Choi J, et al.: Isolated polycystic liver disease genes define effectors of polycystin-1 function. J Clin Invest 127: 1772-1785, 2017

早期糖尿病性腎臓病における血清ヘモグロビン濃度と腎予後との関係: 全国腎生検コホート解析

山内　真之、星野　純一、澤　直樹、乳原　善文、和田　隆志[1]
金沢大学腎臓内科学[1]

【要約】

糖尿病性腎臓病（DKD）患者の腎予後予測、特に早期腎症の段階における腎予後予測は困難であるとされている。一方、早期腎症の段階から貧血が起こることが知られている。そこで我々は、血清ヘモグロビン（Hb）濃度が、初期の尿細管間質障害を反映し、DKD進行の予後予測マーカーとして使用できるのではないかと仮定した。公的研究班で収集された腎生検にて糖尿病性腎臓病と診断されたコホートを用いて、腎生検時の推定糸球体濾過量（eGFR）が60 mL/min/1.73 m^2以上の患者246名を同定した: 年齢56（45 ～ 63）歳、男性62.6%、Hb 13.3（12.0-14.5）g/dL、eGFR 76.2（66.6-88.6）mL/min/1.73 m^2、尿中アルブミン/クレアチニン比 534（100-1480）mg/g Crea。血清Hb濃度は、≦12, 12.1 ～ 13.3, 13.4 ～ 14.5, ≧14.6 g/dLの4分位に分類した。血清Hb濃度と腎病理所見の重症度との関連性を検討した。多変量Cox回帰モデルを用いて、DKD進展（末期腎不全の新規発症、eGFRの50%以上の低下、血清クレアチニン値の倍化）のハザードリスクを評価した。既知のDKD進展の危険因子に血清Hb濃度を加えることによるDKD進行の予後の付加価値も評価した。血清Hb値は、すべての腎臓病理学的特徴、特に間質線維化の重症度と負の相関を示した（ρ = -0.52; P < 0.001）。中央値4.1年の追跡期間中に、95人にDKD進展のイベントが見られた。DKD進展の既知の危険因子で調整すると、第1、第2、第3四分位群（第4四分位群は基準）のハザード比はそれぞれ2.74［95%信頼区間（CI）1.26-5.97］、2.33（95% CI 1.07-5.75）および1.46（95% CI 0.71-3.64）であった。DKD進展の既知の危険因子に血清Hb濃度を加えることで、DKD進行の予後予測能が向上した（グローバルカイ統計量が55.1から60.8に増加；P < 0.001）。血清Hb濃度は、初期の腎線維化を反映し、腎臓病の初期段階におけるDKD進展の予測に有用であると考えられる。

【目的】

糖尿病性腎臓病において蛋白尿（あるいはアルブミン尿）は腎予後（透析導入）の独立した危険因子であることが知られているが[1-4]、早期腎症（推定糸球体濾過量eGFR 60 mL/min/1.73 m^2以上）の段階では蛋白尿を認めることが稀であり腎予後予測を困難にしている。また、昨今、蛋白尿を呈さずに腎機能が低下する一群（糖尿病性腎臓病の40%）の存在が報告され[5]、蛋白尿以外の腎予後予測マーカーの必要性が出てきた。我々は腎病理解析から、この蛋白尿陰性糖尿病性腎臓病の腎障害進展因子は尿細管間質障害であることを報告した[6]。間質障害マーカーは多数あるが、日常臨床で簡単に計測できるものがあれば腎予後予測に有用と考えられる。腎間質細胞は造血ホルモンであるエリスロポエチンを産生し、血清ヘモグロビン（Hb）濃度の調整をしているが、間質障害により血清ヘモグロビン濃度が低下することが知られている。今回、我々は腎生検にて糖尿病性腎臓病と確認された厚労省研究班ならびに日本医療研究開発機構研究班の全国腎生検コホートを用いて、蛋白尿陰性糖尿病性腎臓病の血清Hb濃度、尿細管間質障害、腎予後との関連を調べることにより、腎障害進展メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】

デザイン: 後ろ向きコホート研究

対象: 公的研究班で収集された腎生検にて糖尿病性腎臓病と診断された895例のうち、腎生検時に早期腎症すなわちeGFR 60 mL/min/1.73 m^2

表 1　全体および血清ヘモグロビン濃度の四分位値で層別した患者のベースラインの臨床的および病理学的特徴

	All	血清ヘモグロビン濃度				*P* for trend
		四分位 1 <12.0	四分位 2 12.0–13.3	四分位 3 13.4–14.5	四分位 4 ≥14.5	
ベースラインの臨床特性						
血清ヘモグロビン濃度（g/dL）	13.3 (12.0, 14.5)	11.1 (9.8, 11.7)	12.8 (12.3, 13.1)	13.8 (13.6, 14.2)	15.4 (15.1, 16.1)	<0.001
患者数	246	64	61	61	60	
年齢（歳）	56 (45, 63)	57 (49, 66)	58 (49, 64)	57 (46, 63)	51 (41, 58)	<0.001
男性（%）	62.6	42.2	52.5	63.9	93.3	<0.001
糖尿病罹病期間（年）	10 (5, 17)	13 (8, 18)	10 (5, 20)	11 (6, 17)	7 (3, 14)	0.027
BMI（kg/m^2）	22.9 (20.9, 25.6)	21.8 (20.3, 24.0)	22.8 (20.3, 25.4)	22.8 (20.8, 25.4)	25.0 (22.1, 27.7)	<0.001
HbA1c（%）	7.9 (6.6, 9.6)	7.4 (6.2, 8.3)	8.8 (7.2, 10.2)	8.5 (6.9, 10.2)	7.7 (6.5, 8.9)	0.718
eGFR（mL/min/1.73 m^2）	76.2 (66.6, 88.6)	70.3 (65.8, 79.4)	76.3 (65.9, 86.9)	77.4 (67.6, 86.6)	81.9 (68.4, 95.7)	0.002
尿アルブミン/クレアチニン（mg/g creatinine）	534 (100, 1480)	1510 (241, 2700)	693 (153, 1545)	360 (50, 1121)	252 (120, 650)	<0.001
収縮期血圧（mmHg）	136 (124, 150)	133 (125, 153)	138 (126, 156)	140 (127, 152)	130 (117, 140)	0.046
拡張期血圧（mmHg）	78 (70, 87)	76 (68, 84)	77 (70, 86)	80 (70, 89)	78 (70, 88)	0.391
総コレステロール（mg/dL）	210 (177, 238)	212 (185, 252)	209 (170, 243)	202 (175, 232)	212 (181, 235)	0.236
LDLコレステロール（mg/dL）	131 (106, 158)	121 (105, 172)	129 (92, 161)	129 (109, 150)	136 (109, 158)	0.743
HDLコレステロール（mg/dL）	45 (37, 56)	50 (34, 63)	52 (40, 70)	42 (34, 51)	45 (37, 49)	0.239
中性脂肪（mg/dL）	141 (97, 200)	134 (85, 189)	107 (90, 158)	155 (103, 192)	168 (112, 253)	0.024
薬剤使用率（%）						
RAS系阻害薬	50.7	56.4	50	56.7	38.7	0.110
血糖効果薬	52.2	46.2	61.1	66.7	35.5	0.577
スタチン製剤	16.8	20.7	17.2	26.1	0	0.166
喫煙（%）	53.8	33.3	47.4	59.1	66.7	0.033
心血管病既往（%）	16.1	7.9	17.1	21.4	17.1	0.232
ベースラインの腎病理学的特性						
米国病理学会糖尿病性腎症分類						
糸球体分類						<0.001
Class（%）						
Ⅰ	36.7	20	31	46	43.2	
Ⅱa	20.3	4	10.3	24.3	20.3	
Ⅱb	18	16	34.5	13.5	10.8	
Ⅲ	23.4	60	20.7	16.2	8.1	
Ⅳ	1.6	0	3.5	0	2.7	
間質病変						
間質線維化・尿細管萎縮（%）						<0.001
0	23.2	12.5	14.8	27.9	38.3	
1	41.9	32.8	47.5	42.6	26.2	
2	24.8	26.7	31.2	27.9	10	
3	10.1	25	6.6	1.6	6.7	
間質炎症（%）						<0.001
0	31.7	15.6	27.9	36.1	48.3	
1	53.7	60.9	59	50.8	43.3	
2	14.6	23.5	13.1	13.1	8.4	
血管病変						
細動脈硝子化（%）						0.019
0	15.9	9.4	11.7	14.8	28.3	
1	56.7	65.6	55	55.7	50	
2	27.4	25	33.3	29.5	21.7	
細動脈硬化（%）						0.059
0	27.7	28.1	16.7	31	35	
1	47.5	42.2	56.7	40	51.7	
2	26.8	26.7	26.6	29	13.3	

データは中央値（25%、75%）、または百分率で表した。

以上であった246例

臨床評価項目: 年齢、性別、BMI、糖尿病罹病期間、喫煙有無、降圧薬内服有無、血圧、HbA1c、中性脂肪、LDLコレステロール、尿酸値、eGFR（推定糸球体濾過率）、UACR（尿中アルブミン量）、RAS系降圧薬、血糖降下薬、スタチン、心血管病の既往など

アウトカム: 末期腎不全（血液透析、腹膜透析、腎移植、腎不全関連死）

除外基準: 観察期間内に死亡イベントを起こした症例あるいは他の腎症の合併症例、移植腎生検症例

統計解析: 腎生検時の血清ヘモグロビン濃度を4分位（≦12, 12.1 ～ 13.3, 13.4 ～ 14.5, ≧14.6 g/dL）に分け、Spearman相関係数を用いて、血清Hb濃度、尿細管間質障害度との関係を評価した。次に、Kaplan-Meier法、単変量および多変量Cox回帰モデルを用いて、血清ヘモグロビン濃度と腎予後との関係を評価した。最後に、Global Chi-square, Akaike Information Criterion（AIC）, Bayesian Information Criterion（BIC）を用いて、臨床所見に対する血清ヘモグロビン濃度の腎予後予測能の付加価値を評価する。統計解析には統計ソフトStata 15を使用した。

【結果】

全コホート895名のうち、腎生検時にeGFR 60 mL/min/1.73m^{2}以上であった246名を本解析の対象とした。**表1**は、全体および血清Hb濃度の四分位値で層別した患者のベースライン特性を示している。全体では、年齢（中央値（四分位範囲））: 56歳（45-63歳）、男性: 62.6％、糖尿病罹病期間: 10年（5-17年）、BMI: 22.9（20.9-25.6）、収縮期血圧: 136（124-150）mmHg、拡張期血圧: 78（70-87）mmHg, HbA1c: 7.9％（6.6-9.6）、総コレステロール: 210（177-238）mg/dL, eGFR: 76.2（66.6-86.6）mL/min/1.73m^{2}および尿アルブミン/クレアチニン比 534（100-1480）mg/g Creaであった。腎生検前および腎生検時に赤血球造血刺激因子製剤や鉄剤の投与を受けていた患者はいなかった。男性の割合、BMI、eGFRは血清Hb濃度の四分位が増加するにつれて増加したが、年齢と尿アルブミン/クレアチニン比は血清Hb濃度の四分位が増加するにつれて減少した。

表2は、血清Hb濃度の四分位値と臨床的・病理的特性の行列相関の結果である。血清Hb濃度の四分位は、eGFR、尿アルブミン/クレア

表２　血清ヘモグロビン濃度とベースラインの臨床的および病理学的特徴との相関性

	臨床的特性				病理学的特性				
					糸球体病変	間質病変		血管病変	
	eGFR	尿アルブミン/クレアチニン比	収縮期血圧	HbA1c	糸球体分類	間質線維化・尿細管萎縮	間質炎症	細動脈硝子化	細動脈硬化
血清ヘモグロビン濃度	0.54***	-0.30***	-0.24***	0.31***	-0.47***	-0.52***	-0.26***	-0.26***	-0.21**
eGFR		-0.40***	-0.29***	0.31***	-0.49***	-0.60***	-0.27***	-0.20***	-0.39**
尿アルブミン/クレアチニン比			0.39***	-0.17***	0.39***	0.43***	0.13***	0.18***	0.20**
収縮期血圧				-0.09*	0.33***	0.30***	0.13***	0.18**	0.16*
HbA1c					-0.14*	-0.20***	-0.02*	0.03	-0.05*
糸球体分類						0.50***	0.20***	0.35***	0.31***
間質線維化・尿細管萎縮							0.50***	0.39***	0.39***
間質炎症								0.43***	0.11***
細動脈硝子化									0.13***

血清ヘモグロビン濃度と臨床的・病理的特性との相関係数をSpearmanの相関順位検定を用いて求めた。

*p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001

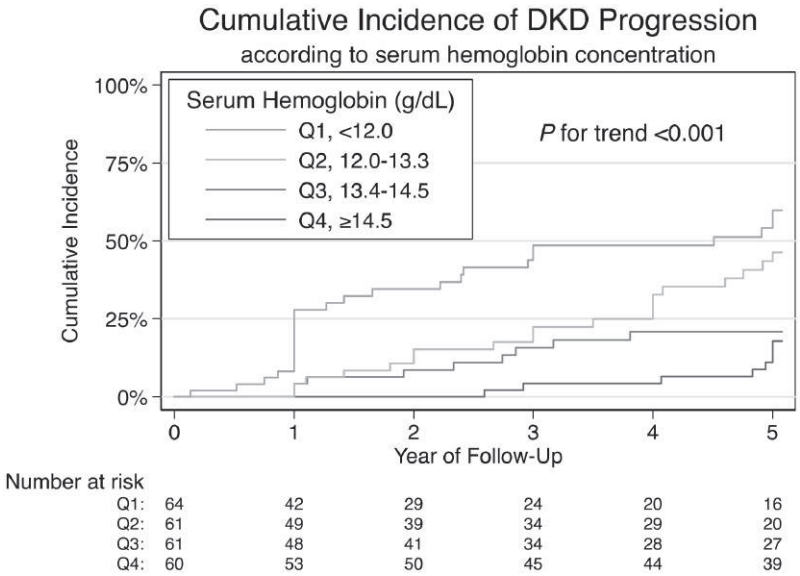


図１　血清ヘモグロビン濃度の四分位値によるDKD進行の累積発生率
DKDの進展は、腎イベント（透析、腎移植、腎臓が原因の死亡）の新規発症、血清クレアチニンの倍化、eGFRの50%以上の低下の複合と定義された。

表３　血清ヘモグロビン濃度の四分位数によるDKD進展のリスク

HR（95% CI）	血清ヘモグロビン濃度				*P* for trend
	四分位１ ＜12.0	四分位２ 12.0-13.3	四分位３ 13.4-14.5	四分位４ ≥14.5	
モデル1	3.81（2.14-6.80）	2.34（1.29-4.24）	1.48（0.78-2.80）	Ref.	＜0.001
モデル2	4.37（2.28-8.37）	2.64（1.38-5.04）	1.61（0.81-3.18）	Ref.	＜0.001
モデル3	2.74（1.26-5.97）	2.33（1.07-5.75）	1.46（0.71-3.64）	Ref.	＜0.001

単変量および多変量Cox比例モデルにより、HR（95% CI）とP値を決定した。
モデル1: 単変量。
モデル2: 年齢と性別を調整。
モデル3: DKD進展の既知の危険因子（年齢、性別、BMI、糖尿病期間、収縮期血圧、Hb A1c、eGFR、尿中アルブミン/クレアチニン比、RAS系阻害薬使用）で調整。

チニン比、間質性病変を含むすべての腎病変のスコア、特に間質性線維化および尿細管萎縮（IFTA）のスコアと有意に相関した（ρ = 0.52、P<0.001）。

腎生検後4.1年（中央値）の追跡期間中に95人（38.6%）がDKDの進展を認めた。血清Hb濃度の四分位値によるDKD進展の累積発生率を**図1**に示す。DKD進展の累積発生率は、血清Hb濃度の低下とともに有意に増加した（P for trend <0.01）。

表3は、血清Hb濃度の四分位とDKDの進展との関連についてのハザード比（HR）および95%信頼区間（95% CI）を示す。第4四分位と比較して、DKD進展の未調整HR（95% CI）は、第3四分位が1.48（0.78-2.80）、第2四分位が2.34（1.29-4.24）、第1四分位が3.81（2.14-6.80）であった。ベースライン時のDKD進展の既知の危険因子を調整しても、DKD進展のHRは変わらなかった［第3

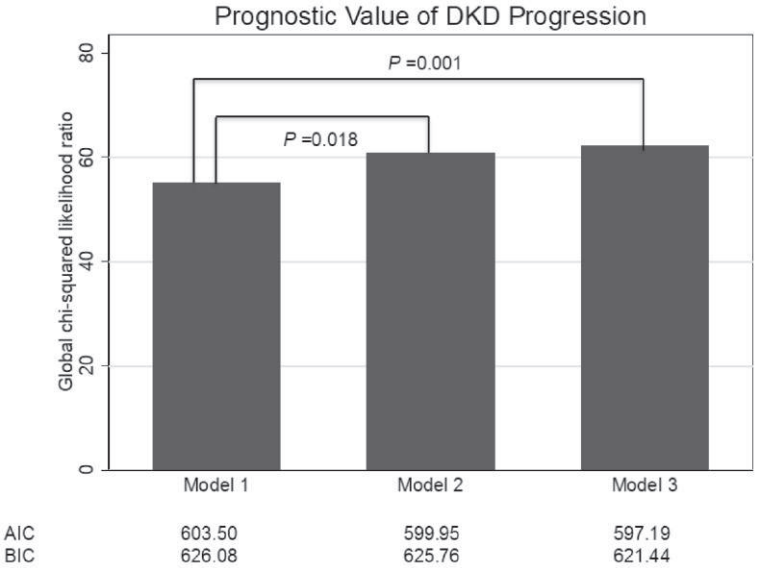


図２　DKDの予後予測能の付加価値
血清ヘモグロビン濃度および間質性線維・尿細管萎縮（IFTA）の、DKD進行の確立された危険因子の標準的な臨床評価に対する増加価値を、グローバルカイ二乗尤度比、AIC、BICで示した。
モデル1: DKD進展の既知の危険因子（年齢、性別、BMI、糖尿病罹病期間、収縮期血圧、ヘモグロビンA1c、eGFR、尿中アルブミン/クレアチニン比、RAS系阻害薬使用）の標準的な臨床的評価。
モデル2: モデル1＋血清ヘモグロビン濃度。
モデル3: モデル1＋IFTA。

四分位、第2四分位、第1四分位のHRはそれぞれ1.46（0.71-3.64）、2.33（1.07-5.75）、2.74（1.26-5.97）であった]。

図2は、DKD進展の標準的な臨床的危険因子に対する血清Hb濃度の予後予測能の付加価値を示す統計である。血清Hb濃度を臨床モデルに加えることにより、グローバルカイ二乗尤度比は55.1から60.8（P<0.001）に増加し、これはIFTAスコアを臨床モデルに加えるのと同等の値を示した（グローバルカイ二乗尤度比55.1から62.4；P<0.001）。同様に、臨床モデルのみに血清Hb濃度を加えることで、AICとBICの値が改善され、これも臨床モデルのみと同等の改善となった。

【考察】

DKD進展を予測するバイオマーカーは、現在、もっぱらeGFRと蛋白尿（あるいはアルブミン尿）に依存している[7)]。しかし、eGFRがまだ低下しておらず、蛋白尿が増加していない早期腎症の段階では、これらのマーカーをDKD進展の予測に使用することは困難である。さらに、これまでの実験的腎病理学的研究や剖検症例腎病理の研究により、腎機能が保たれている糖尿患者でも、既に糸球体や尿細管間質の障害が起きていることが明らかになっており[8-10)]、早期腎症の段階における病理学的変化と腎予後との両方に関連するバイオマーカーの必要性が明らかにされている。本研究では、血清Hb濃度が尿細管間質障害と腎予後とに関連するマーカー候補であることがわかった。エリスロポエチン産生を妨げる腎線維化が貧血の主な原因であることを示唆する証拠が蓄積されている[11, 12)]。しかし、DKD患者、特に早期腎症の段階では腎生検が必ずしも適用ではないため、ヒトにおける尿細管間質障害と貧血の関連を

検討する研究は希少である。我々のデータから、血清Hb濃度は、初期の腎線維化を反映し、腎臓病の初期段階におけるDKD進展の予測に有用であると考えられる。

【文献】

1. Nelson RG, Bennett PH, Beck GJ, et al.: Development and progression of renal disease in Pima Indians with non-insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 335:1636-1642, 1996
2. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, et al.: UKPDS GROUP. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). Kidney Int 63:225-232, 2003
3. Packham DK, Alves TP, Dwyer JP, et al.: Relative incidence of ESRD versus cardiovascular mortality in proteinuric type 2 diabetes and nephropathy: results from the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) database. Am J Kidney Dis 59:75-83, 2012
4. Ninomiya T, Perkovic V, de Galan BE, et al.: Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes. J Am Soc Nephrol 20:1813-1821, 2009
5. Porrini E, Ruggenenti P, Mogensen CE, et al.: Non-proteinuric pathways in loss of renal function in patients with type 2 diabetes. Lancet Diabetes Endocrinol 3:382-391, 2015
6. Yamanouchi M, Furuichi K, Hoshino J, et al.: Nonproteinuric versus proteinuric phenotypes in diabetic kidney disease: a propensity score-matched analysis of a nationwide, biopsy-based cohort study. Diabetes Care 42:891-902, 2019
7. Berhane AM, Weil EJ, Knowler WC, et al.: Albuminuria and estimated glomerular filtration rate as predictors of diabetic end-stage renal disease and death. Clin J Am Soc Nephrol 6:2444-2451, 2011
8. Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, et al.: Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. J Clin Invest 74:1143-1155, 1984
9. Caramori ML, Parks A, Mauer M: Renal lesions predict progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. J Am Soc Nephrol 24:1175-1181, 2013
10. Klessens CQ, Woutman TD, Veraar KA, et al.: An autopsy study suggests that diabetic nephropathy is underdiagnosed. Kidney Int 90:149-156, 2016
11. El-Achkar TM, Ohmit SE, McCullough PA, et al.: Kidney Early Evaluation Program. Higher prevalence of anemia with diabetes mellitus in moderate kidney insufficiency: The Kidney Early Evaluation Program. Kidney Int 67:1483-1488, 2005
12. Zeisberg M, Kalluri R: Physiology of the renal interstitium. Clin J Am Soc Nephrol 10:1831-1840, 2015

ヒトiPS細胞由来3D血管を用いた血管疾患の病態解明

豊原　敬文、渡邉　駿、菊地　晃一、鈴木　健弘、阿部　高明
東北大学大学院医工学研究科
東北大学病院腎高血圧内分泌科

【要約】

動脈硬化の罹患しやすさには個人差があることが知られているが、その原因は明らかではなかった。申請者は動脈硬化に罹患しにくい患者由来iPS細胞を樹立し、血管細胞に分化して解析することで動脈硬化に罹患しにくい患者の血管平滑筋ではArylacetamide Deacetylase（AADAC）という小胞体リパーゼの発現が上昇していることを発見した。さらに、AADACは細胞内脂質代謝を変化させることで動脈硬化防御的に働いていることを解明した。一方で、動脈硬化は同じ患者において、動脈分岐部や狭窄部位などの特定部位に生じやすいことが知られているが、その原因についてはこれまで十分に明らかにされていない。そこで本研究では我々の知見をさらに発展させてiPS細胞由来3D血管を作製することで、血流によるメカニカルストレスの影響も解析できる方法の開発を行った。

【目的】

虚血性心疾患や脳血管障害などの動脈硬化に起因する血管障害は糖尿病患者において依然として死因の上位にあり、新たな治療法の開発が期待されている。しかし、動脈硬化を引き起こす原因については未だ十分に解明されていない。また、日々の臨床の中で同程度の糖尿病や高血圧、脂質異常症に罹患していても、一部の糖尿病患者は動脈硬化に罹患しやすく、一部の患者は罹患しにくいことが知られている。これまでこのような個人差が生じる機序についても遺伝子、環境要因、代謝的因子などの研究が進められてきたが未だ十分に明らかにされていなかった。

そこで申請者はこの疑問に対して患者由来iPS細胞を用いて解析することを着想した。Massachusetts General Hospital（MGH）の患者データベースの中で数十年以上の糖尿病罹患歴があるにもかかわらず心臓カテーテル検査で心血管病変が“全く認められない患者”と比較的短期の糖尿病罹患歴にもかかわらず“心血管治療が必要になった患者”からそれぞれiPS細胞を樹立して、血管細胞（内皮細胞、血管平滑筋細胞）に分化誘導した。上記で得られた両群のiPS細胞から誘導した内皮細胞及び血管平滑筋の遺伝子発現を比較したところ、動脈硬化になりにくい患者由来の血管平滑筋ではArylacetamide Deacetylase（AADAC）という小胞体に存在するリパーゼの発現が上昇して血管防御的に働いていることが明らかになった[1)]。

一方で、動脈硬化は同じ患者において、動脈分岐部や狭窄部位などの特定部位に生じやすいことが知られている。しかし、その原因についてはこれまで十分に明らかにされていない。そこで本研究では我々の知見をさらに発展させて動脈硬化を特定部位に生じさせるリスク因子を同定することを目的とした。

【方法】

我々の研究から動脈硬化になりにくいといった特殊なphenotypeを呈する患者由来iPS細胞を用いて病態を*in vitro*で再現・解析することで新たな生体内防御因子を明らかにすることが可能であるという知見が得られている。一方で、特定部位に動脈硬化が生じやすい機序として血流の物理的刺激による影響が考えられるが従来の平面培養を主体とした研究ではその解析が難しい。そこで、患者iPS細胞由来血管細胞から生体内動脈を模倣した3D血管を作製し、流体力学的刺激を与えて解析することを計画した。具体的にはiPS細胞由来血管平滑筋細胞をコラーゲンに包埋し管構造モールド内で固定させることで3D血管を構築し、

還流することで炎症反応などの遺伝子や代謝物の変化を解析する。

【結果】

iPS細胞由来の3D血管を作製し培地を灌流させることに成功した。さらに播種細胞やコラーゲン比の最適化を行い、生体内血管に類似した血管平滑筋細胞密度を有する3D血管を作製することが可能となった。

同時に動脈硬化になりやすい患者及びなりにくい患者由来iPS細胞より血管平滑筋と内皮細胞を分化誘導して同様に3D血管を作製する準備も整っている。

【考察】

血流刺激の解析には今後正確な血流の力学的な評価が必要である。作製した3D動脈モデルを用いて血流の物理的刺激を再現できるように粘性を調節した培地（乱流や流速などの測定をする場合は培地に小ビーズも追加）を還流し、血管で生じる乱流や剪断応力、円周方向壁応力の評価を行い、どの様な機械的刺激が動脈硬化の原因となっているか解析することも今後可能になると思われる。

さらに、動脈硬化に“なりやすい”患者と動脈硬化に“なりにくい”患者由来3D血管の比較を行い、動脈硬化好発部位に生じる遺伝子変化、代謝物変化を検討することで血流による血管細胞への物理的影響を明らかにし、動脈硬化の病態解明や治療標的の発見も期待される。

【文献】

1. Toyohara T, Roudnicky F, Florido M H C, et al.: Patient hiPSCs identify vascular smooth muscle arylacetamide deacetylase as protective against atherosclerosis. Cell Stem Cell 27: 147–157, 2020

血管内皮障害によるサイトカインストーム発生機構の解明

服部　浩一[1,2]、島津　浩[3]、Heissig Beate[1]、安達　英輔[3]、高橋　聡[3]
順天堂大学大学院医学研究科[1]、東京大学医科学研究所[2]
国立国際医療研究センター[3]

【要約】

研究者らは、これまでの実験結果から、TNF-αをはじめとする炎症性サイトカインの細胞外ドメイン分泌が、一部のマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）群をはじめとするメタロプロテアーゼによって制御されていること、またMMPの相互活性化機構を通じ、血液線維素溶解系（線溶系）因子プラスミンが多くのMMPを上方制御していることを見出した。そこで敗血症や、移植片対宿主病（GVHD）、マクロファージ活性化症候群（血球貪食症候群, MAS）等のサイトカインストーム症候群の疾患モデルをMMP-9、あるいはプラスミノーゲン遺伝子欠損マウスとその野生型で作製したところ、興味深いことに、これらの遺伝子欠損マウスの生存率は、野生型と比較して有意に高いことが判明した。このため、研究者らは、神戸学院大学薬学部との共同研究で、従来、止血剤として開発されているプラスミンの活性中心に作用する新しいプラスミン阻害剤、抗線溶剤YO-2をドラッグリポジショニングの形で転用し、これらの疾患モデルとその対照群に投与したところ、疾患モデル群の生存率を有意に改善することに成功した。新型コロナウィルス（SARS-CoV2）感染症（COVID-19）の病態､特に重症化した病態は、サイトカインストーム症候群と理解されている。研究者らは、海外の研究協力者らと共に精査した結果、欧米や中東、そして日本のCOVID-19患者から採取した血液中で、炎症性サイトカイン系の濃度増加が認められた。また、欧米や中東では、有意に線溶系の賦活化因子でもある組織型プラスミノーゲンアクチベータ（tPA）、そしてプラスミン生成を示すプラスミンα2アンチプラスミン複合体（PAP）濃度の増加が認められたことから、血管内皮障害・機能異常の際に血管内皮に発現が増加するアンジオクライン因子の活性、産生がCOVID-19の重症化を制御しているとの研究者らの仮説を裏付ける結果が得られた。さらに、SARS-CoV2の細胞内侵入時にスパイク分解など、感染上重要な役割を担うtransmembrane protease, serine 2（TMPRSS2）が、多くの線溶系因子と同様、セリンプロテアーゼ群に属することから、前述の抗線溶剤の活性への影響を*in vitro*で確認したところ、有意に阻害されることを確認した。このため、研究者らは、現在、米国ワシントン大学セントルイス校との共同研究により、SARS-CoV2の感染モデル、COVID-19の疾患モデルを使用し、抗線溶剤の有効性を確認中である。

【目的】

申請者らは、これまでの文科省・学振科研費での研究を通じて、血液凝固・線溶系因子を含む血管内皮由来の生理活性物質－アンジオクライン因子分泌に伴う炎症性細胞動員と虚血性壊死組織の再生修復機構を解明した。また申請者らは、厚労科研での活動を通じ、アンジオクライン因子による生体恒常性維持機構－アンジオクラインシステムの存在を示唆し、血管内皮障害に伴うそのシステム破綻の観点から、MASやGVHD、血栓性微小血管障害（TMA）、敗血症性ショック等のサイトカインストーム症候群の病態を解明してきた[1,2)]。

最近、COVID-19の重症化に伴ってサイトカインストームや凝固・線溶系亢進・血栓傾向の発生と共に、川崎病、MAS類似の病態が多発することが注目されている[3,4)]。本研究で、申請者らは、感染性、非感染性の要因で形成される炎症性疾患の病態中で、炎症の波及、ないしは放射線、低酸素等の生理学的ストレスによって併発する血

管内皮障害が、凝固・線溶系因子を含むアンジオクライン因子の供給を促進し、線溶系、MMPsの相互活性化を通じて、炎症性サイトカインの異常分泌とさらなる凝固・線溶系の亢進を惹起し、血栓傾向を含めた炎症性疾患の重症化を誘導するとの仮説に基づき、血管内皮障害を端緒としたサイトカインストームの発生機序を解明し、そして血中や内皮細胞上に発現するアンジオクライン因子群の検出によるその関連疾患群の重症化や血栓傾向等の合併症の発症を予見する診断技術、またこうした知見を基礎とした予防、治療法開発の基盤形成までを目的の範疇とする。

【方法】

本研究計画では、不測の事態に備え、2020年末より可及的速やかに、米国の共同研究者Michael S Diamondらと BSL3で使用するCOVID-19感染モデルに加え、申請者らがこれまでの研究で確立したGVHDやMAS、多臓器系統性炎症症候群等のサイトカインストーム症候群の動物モデルを使用し、経時的に末梢血を含む各種臓器・組織を採取する。翌年3月頃から、凍結血漿・血清中の炎症性サイトカイン、アンジオクライン因子濃度、活性を測定し、臓器については病理切片を作製、アンジオクライン因子による免疫特殊染色、in situ hybridizationによる血管内皮を中心とした微小環境の細胞・組織構成を精査する。またソーティングによって採取した血管内皮細胞の包括的遺伝子発現を含む性状解析等を施行し、COVID-19の血管内皮障害とサイトカインストームの発生や病勢との関係を明らかにする。また動物実験と並行して、2020年末より、申請者と国内の共同研究者らを通じて、COVID-19やGVHDの病勢や重症度、治療歴、そして血中の凝固・線溶系因子等を含む内皮由来のアンジオクライン因子の検査、病理組織等を利用した内皮性状データを集積し、疾患モデルのデータとの照合、また国外の共同研究者の意見も参考にしながら、COVID-19の重症化、サイトカインストームの早期診断に有用な因子を絞り込むと同時に、疾患モデルにおいて、これまでの研究で使用した新薬によるアンジオクライン因子活性制御の、サイトカインストームの抑制に対する有用性、有効性を探る。

申請者は、全ての研究計画の立案と総括、計画前半の疾患モデルの解析の主な部分を担う。共同研究者は、疾患モデル及び臨床検体の分子生物学的解析と国際共同研究基盤を構築し、論文作製面でのサポートの他、臨床情報の集積と管理にあたる。また国外の共同研究者は、COVID-19をはじめとする炎症性疾患におけるサイトカインストームの発生要因等、国際的な視点からの疾患モデルでの実験結果、そして本邦の患者データに対する考察とこれらに関する適切な助言を行っていくこととする。

【結果】

研究者らは、まず、敗血症性ショック、急性GVHDに加え、MAS等の各種炎症性疾患モデルを、MMP-9、あるいはプラスミノーゲン遺伝子欠損マウスとその野生型で作製したところ、興味深いことに、これらの遺伝子欠損マウスの生存率は、野生型と比較して有意に高いことが判明した。このため、責任者らは、神戸学院大学薬学部との共同研究で、プラスミンの活性中心に作用する新しいプラスミン阻害剤YO-2をドラッグリポジショニングの形で転用し、これらの疾患モデルとその対照群に投与したところ、疾患モデル群において、血中あるいは組織中のアンジオクライン因子である組織型プラスミノーゲンアクチベータ（tPA）、プラスミン生成、そしてMMP-2、MMP-9の活性、発現と血中TNF-α及びIL-6、Fas ligand、IL-1β濃度を有意に抑制し（**図1**）、さらに生存率を改善することに成功した（**図2**）。

研究者らは、サイトカインストームを伴う敗血症性ショック、そして急性GVHDの疾患モデルの解析を通じて、MMPの活性阻害剤が、TNF-αやFas ligandを含む炎症性サイトカインの血中濃度を抑制し、生存率と標的臓器の病理所見とを有意に改善することを報告した。またMMPの相互活性化システムにおいては、セリンプロテアーゼに属する主要な線溶系因子、プラスミンが、MMP-13やMMP-9の活性化を上方から制御していることが知られている。プラスミンは、主に肝臓で産生される、その前駆酵素であるプラスミノーゲンが、やはりアンジオクライン因子である組織型プラスミノーゲンアクチベータ（tPA）に

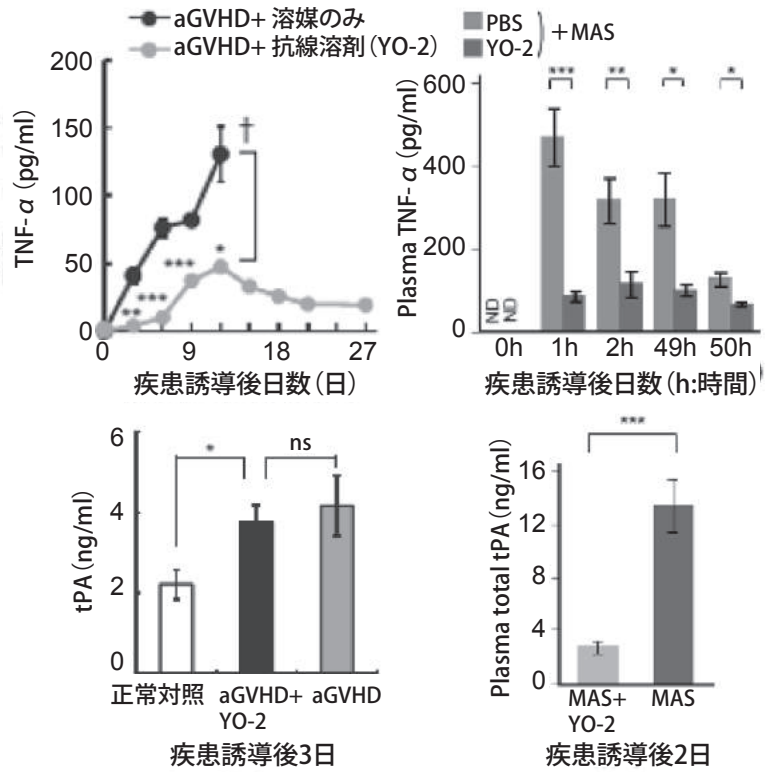


図１　サイトカインストーム症候群（急性GVHD, MAS）の疾患モデル（マウス）に対する線溶阻害剤YO-２投与による炎症性サイトカイン（TNF α）とアンジオクライン因子（tPA）の抑制作用。YO-２投与群は、どちらの血中濃度も対照群と比較して有意に抑制されている。

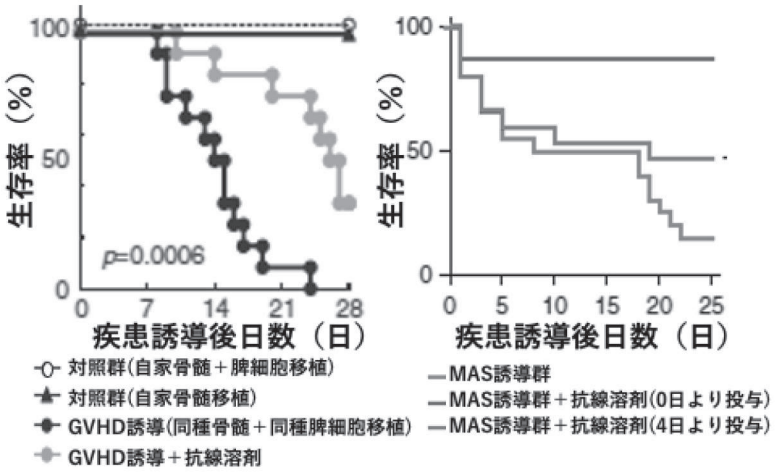


図２　サイトカインストーム症候群の疾患モデルに対するYO-２による生存率の改善。YO-２投与群は、対照群と比較して有意に生存率を改善している。

より活性化されて生成する。筆者らは、デンマークのコペンハーゲン大学との共同研究で、主に血管内皮より産生供給される組織型PA（tPA）のマウス生体への投与が、MMP-9の活性化と内皮由来の造血因子、炎症性サイトカイン分泌を通じ、造血幹細胞の炎症性細胞群への分化、そして動員また、これら炎症性疾患モデルで、サイトカインストームが惹起されることを確認した。また、この時、tPAが、炎症性細胞の低密度リポ蛋白-1（LRP-1）と結合し、炎症性サイトカインやMMPの産生に寄与していることを明らかにした（**図3**）。また重症急性GVHD患者の炎症性サイトカインとアンジオクライン因子の血中濃度を測定したところ、両者に有意な相互作用が存在することも判明した（**図4**）。次に来院時、有症状の中東・アジア、イスラエル・パレスチナに属するアンナジャフ大学でCOVID-19患者20人から採取した血液を採取し、精査したところ、マウス炎症性疾患モデルでも認められた血中の炎症性サイトカイン系の濃度増加に伴って、線溶系の賦活化因子でもあるtPA、そしてプラスミン生成を示すプラスミンα2アンチプラスミン複合体（PAP）濃度の増加が認められており、アンジオクライン因子系の活性増加が示唆されたことから炎症性疾患動物モデルで成立する仮説を裏付ける結果が得られた。

そこで研究者らは、各種疾患モデルで一定の有効性を認めたYO-2により、COVID-19の重症化に伴って発生するサイトカインストームを惹起する炎症性サイトカインの産生・分泌を制御することを試みた。国内施設では、SARS-CoV2の感染実験はBSL3の施設数が少ないこともあって短期間で予備実験を十分進めることが出来ないとの判断から、この分野で、近年目覚ましい研究成果を挙げている、ワシントン大学セントルイス校のDiamond S Michael教授に、これまでの基礎研究データをご提示し、共同研究を申し出たところ、快諾して頂いた。そこで、前述の抗線溶剤をSARS-CoV2の感染モデルに使用したところ、初回データとしては、対照群と比較して有意な予後の改善は認められなかった。しかしながら、これまでの実験経験から投与開始時期と投与量を少し

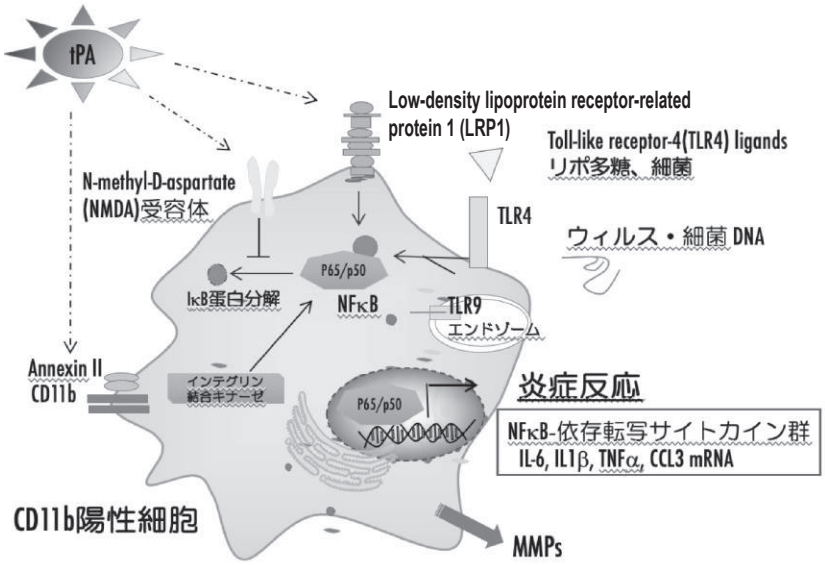


図３　tPAとその受容体との結合による炎症性細胞内シグナル伝達とその作用。血管内皮よりアンジオクライン因子として分泌されたtPAは、プラスミンを介してMMPsを活性化するばかりでなく、これらの受容体を介して炎症性細胞等の他系統細胞にも作用している。

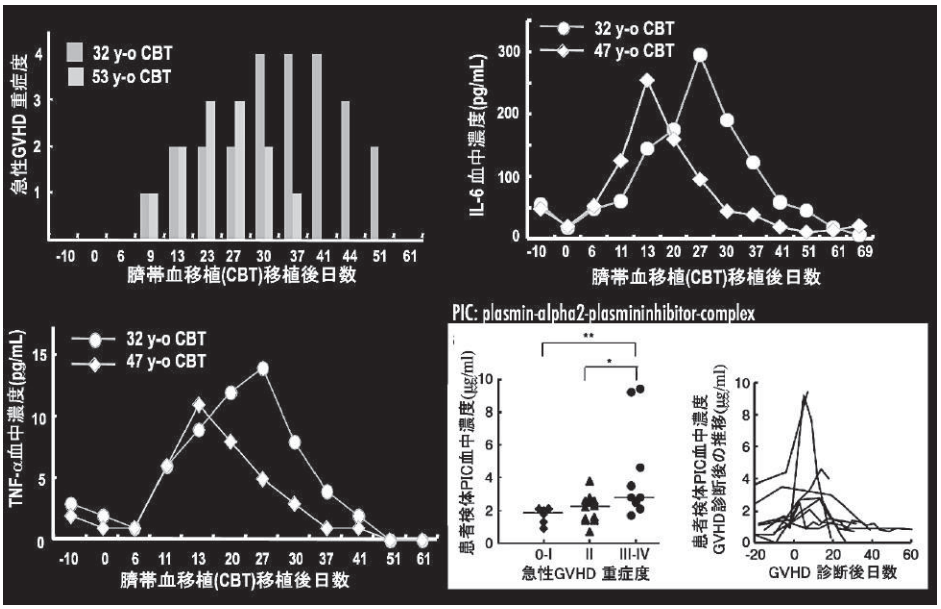


図４　サイトカインストーム症候群である急性GVHD重症例の重症度の推移と炎症性サイトカイン（TNFα, IL-6）の動態、さらにプラスミンのレベル（プラスミンα２プラスミン抑制因子複合体: PICとして検出）と急性GVHD重症度との相関性を示した。重症GVHD（グレード３～４）ではサイトカインストームが発生しており、線溶系亢進の指標であるプラスミンがGVHDの重症度と有意に相関して推移していることが判明した。

増加させたところ、有意な改善を認めつつあるので、このあたりのデータ確認を急いでいる状況である。

【考察】

こうした実験結果の考察として、ワシントン大学の研究者とも話し合ったところ、臨床病態でも指摘されている通り、COVID-19は、凝固系亢進、血栓形成の傾向が著しく、抗線溶剤による線溶系の阻害はむしろ凝固系亢進の傾向を助長する可能性があるため、このため、予後の改善が認められなかった可能性があることが推測された。実際、責任者らの所属施設を含めた国内のCOVID-19の治療においても、現在、ヘパリン、低分子ヘパリンなどの抗凝固剤の併用が、臨床的に普及し始めている。ただ、SARS-CoV２の細胞内侵入時にスパイク分解など、感染上重要な役割を担うTransmembrane protease, serine 2（TMPRSS2）が、線溶系因子群と同様のセリンプロテアーゼ群に属していることから、抗線溶剤YO-2が感染初期段階より機能していればウィルスの侵入を阻害するなどの効果も期待されるため、SARS-CoV２の感染暴露よりも早いタイミングで投与する群を作製したところ予後の改善が認められたとの一報のあり、当方でもin vitroの状況でYO-2のTMPRSS2に対する活性制御状況を確認しているところである。

疾患モデルと臨床検体の両面からCOVID-19の重症化を予見する因子として、血管内皮障害を示唆する一部のアンジオクライン因子tPA、PAI-1、MMPなどの血液中でのプロテアーゼ活性の増加、濃度増加が、サイトカインストームや血栓傾向等のCOVID-19の重症化病態の発生の前段階で認められることから、重症化の早期診断法開発において極めて有望であることが示唆された。臨床検体については、さらに現在進行中の本邦での集積を進め、早期診断上の有用性を確認し、確固たる基盤形成へと進めていきたい。

【謝辞】
末筆となりましたが、この度の助成に対し、衷心より深謝致しますと共に、貴財団の今後の益々のご発展を祈念し、本稿の締め括りとさせて頂きます。

【文献】

1. Shimazu H, Munakata S, Tashiro Y, et al.: Pharmacological targeting of plasmin prevents lethality and tissue damage in a murine model of macrophage activation syndrome. Blood 130: 59-72, 2017
2. Sato A, Nishida C, Sato-Kusubata K, et al.: Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. Leukemia 29: 145-156, 2015
3. Jose RJ, Manuel A: COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. Lancet Respir Med 6:E46-47, 2020
4. MacGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C: The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. Autoimmune Rev 19:102537, 2020

【発表に関する事項】

1. Salama Y, Shiou-Yuh Lin, Dhahri D, Hattori K, Heissig B: Aloysia citrodora essential oil inhibits melanoma cell growth and migration by targeting HB-EGF-EGFR signaling. Int J Mol Sci in press, 2021
2. Heissig B, Salama Y, Takahashi S, Okumura K, Hattori K: The multifaceted role of EGFL7 in cancer and drug resistance Cancers 13:1014, 2021
3. Heissig B, Salama Y, Takahashi S, et al.: The multifaceted role of plasminogen in cancer Int J Mol Sci 22:2304, 2021
4. Heissig B, Salama Y, Shimazu H, et al.: The multifaceted role of plasminogen in cancer and inflammation Cell Signal 75:109761, 2020
5. Sato-Okabayashi Y, Isoda K, Heissig B, et al.: Low-dose oral cyclophosphamide therapy reduces atherosclerosis progression decreasing inflammatory cells in a murine model of atherosclerosis by decreasing inflammatory cells in a murine model of atherosclerosis. Int J Cardiol Heart Vasc 20:100529, 2020
6. Salama Y, Andries H, Yokoyama K, et al.: The EGFL7-ITGB3-KLF2 axis enhances survival of multiple myeloma in preclinical models. Blood Adv 24: 1021-1037, 2020
7. Salama Y, Shiou-Yuh Lin, Dhahri D, Hattori K, Heissig B: The fibrinolytic factor tPA drives LRP1-mediated melanoma growth and metastasis. FASEB J 33: 3465-3480, 2019

（7）消化器外科疾患

肝硬変合併肝細胞癌切除患者におけるサルコペニア、内臓脂肪量の評価と簡易測定法の確立

大久保 悟志、小林　祐太、進藤　潤一、橋本　雅司

【要約】

体組成データは種々の癌における予後との関連が報告されている。しかしながら、肝硬変合併肝細胞癌患者における内臓脂肪/内臓脂肪分布の予後に与える影響については明らかではない。当院において肝硬変合併肝細胞癌に対して手術施行した181例を対象に後方視的に診療録データを収集した。また、内臓脂肪/皮下脂肪比（VSR）をCT画像から算出し、短期および長期予後との関連を比較した。VSRは男性、女性でそれぞれ1.33, 0.93をカットオフ値とし、highおよびlow VSR群に分けた。検討の結果、181例のうち、60例（33%）がhigh VSR群、121例（67%）がlow VSR群であった。High VSR群はlow VSR群と比してHbA1cやCRPが高値であった一方、BMIは両群に差を認めなかった。VSRは術後合併症発生率との有意な関連を認めなかったが、多変量解析による予後解析では、high VSR群はAJCC stage等と独立した予後不良因子（hazard ratio,2.65; P=0.001）であった。再発形式に着目すると、high VSR群は初回再発時に切除不能な再発を来す割合がlow VSR群に比べ高率（39% vs. 18%, P=0.025）であった。これらの結果からVSRが高値であることは肝硬変合併肝細胞癌切除患者において、腫瘍増悪と予後に関連する因子であると考えられた。

【目的】

体組成データは近年様々な癌種で予後との関連が報告されており、その中でもBody mass index（BMI）は代表的な体組成データの一つである。肝がんにおいてBMI高値と予後との関連は多数報告されているが、一方で、BMI低値が非B非C型肝細胞癌（HCC）に関連しているとの報告もある。BMI高値、低値がそれぞれ予後に関連しているとの報告は他癌種や心疾患においても報告されており、このような現象は「BMIパラドックス」と呼ばれている[1,2]。そのため、近年ではBMIによらない体組成データが着目されており、その中でも内臓脂肪/皮下脂肪比（VSR）は、サルコペニア等とならびその有用性が着目されている。一方で肝細胞癌患者においてはその検討は未だ十分ではない。本研究では肝硬変合併肝細胞癌切除患者において、先に述べたVSRをはじめとした種々の栄養指標が合併症や予後、再発形式にどのように寄与しているか検討した。

【方法】

本研究は2011年から2017年までの肝切除患者のうち、背景肝が肝線維化スコアのF3またはF4であった患者227人を抽出した。そのうち、再肝切除症例31例、データ不十分な15例を除いた181例を解析対象とした。術前の採血データなどから、栄養指標であるmodified Glasgow Prognostic Score（mGPS），neutrophil-lymphocyte ratio（NLR），Controlling Nutrition Status（CONUT）gradeを算出した。また、CTの第三腰椎レベルのCT横断像のデータを、画像解析ソフトを用いて皮下脂肪、内臓脂肪領域の面積比をVSRとして算出した。VSRは男性1.33, 女性は0.93をカットオフ値としてそれより低い場合をlow VSRと設定した[3]。

【結果】

まず**表1**に対象症例の背景をまとめた。VSRの中央値は男性が1.21（0.29-4.53）、女性0.55（0.21-2.73）であった。181人のうち、60人（33%）はhigh VSR群で121人（67%）はlow VSR群であった。High VSR群は男性、B型肝炎、HbA1c、

表 1　Baseline characteristics and short term outcomes of the patients

	Total n = 181	High VSR n = 60	Low VSR n = 121	P
Baseline characteristics				
Age	67(34-87)	68(53-82)	66(34-87)	0.534
Male gender	123(68%)	50(83%)	73(60%)	0.001
BMI	23.1(13.8-40.4)	23.2(17.8-34.2)	22.9(13.8-40.4)	0.573
ASA Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ	15(8%)/142(78%)/24(13%)	4(7%)/44(73%)/12(20%)	11(9%)/98(81%)/12(10%)	0.061
Hepatitis B	43(24%)	9(15%)	34(3%)	0.036
Hepatitis C	96(53%)	27(45%)	69(57%)	0.086
Albumin (mg/dl)*	3.8(2.4-4.9)	3.9(2.4-4.8)	3.7(2.4-4.9)	0.069
Total cholesterol	163(98-268)	166(123-237)	159(98-268)	0.148
Bilirubin (mg/dl)*	0.9(0.4-2.2)	0.9(0.4-2.0)	0.9(0.4-2.2)	0.417
Platelet count (10^4/mm^3)*	12.7(3.1-36.8)	13.7(5.0-33.6))	12.4(3.1-36.8)	0.064
Prothrombin (%)*	81.7(36.5-120.0)	86.1(36.5-120.0)	80.4(38.3-101.5)	0.006
HbA1c*	5.7(4.4-9.3)	6.1(4.7-9.0)	5.5(4.4-9.3)	0.005
White blood cell count	4.6(1.5-12.2)	4.8(2.4-10.8)	4.4(1.5-10.6)	0.023
Neutrophil count	2.7(0.6-8.4)	3.0(0.9-7.6)	2.4(0.6-8.2)	0.004
Lymphocyte count	1.4(0.5-3.3)	1.4(0.5-3.3)	1.4(0.5-3.1)	0.492
C-reactive protein (mg/dl)	0.0(0.0-5.0)	0.1(0.0-5.0)	0.0(0.0-2.0)	0.003
mGPS 0/Ⅰ/Ⅱ	131(72%)/42(23%)/8(4%)	48(80%)/10(17%)/2(3%)	83(69%)/32(26%)/6(5%)	0.087
NLR	1.9(0.3-8.8)	2.1(0.6-8.8)	1.7(0.3-7.4)	0.100
CONUT grade, normal (0-1) / light (2-4) / moderate (5-8) / severe (9-12)	58(32%)/95(52%)/26(14%)/2(1%)	22(37%)/31(52%)/6(10%)/1(2%)	36(30%)/64(53%)/20(17%)/1(1%)	0.561
SATI	40.4(2.0-165.0)	33.5(2.0-109.0)	44.4(2.9-165.0)	0.001
VATI	40.4(2.3-134.4)	63.4(2.3-134.4)	35.5(1.2-97.3)	< 0.001
Sarcopenia (low SMI)	118(65%)	40(67%)	78(64%)	0.452
Procedures				
Pure laparoscopic hepatectomy	33(18%)	10(17%)	23(19%)	0.435
Major hepatectomy	11(6%)	5(8%)	6(5%)	0.371
Surgical outcomes				
Operation time*	145(42-529)	158(67-459)	136(42-529)	0.128
Estimated blood loss	225(0-11463)	375(0-2080)	200(0-11463)	0.004
Any morbidity	34(19%)	16(27%)	18(15%)	0.046
Major abdominal morbidity	8(4%)	5(7%)	3(2%)	0.071
AJCC stage ⅠA/ⅠB/Ⅱ/ⅢA/ⅢB/Ⅳ	74(41%)/47(26%)/51(28%)/2(1%)/5(3%)/2(1%)	15(25%)/19(32%)/22(37%)/0(0%)/2(3%)/2(3%)	59(49%)/28(23%)/29(24%)/2(2%)/3(2%)/0(0%)	0.015

Figure represent median (range) unless indicated. *Median (interquartile range)

Abbreviations. VSR, visceral to subcutaneous adipose tissue area ratio; BMI, body mass index; ASA, American Society of Anesthesiologist; HBV, Hepatitis B Virus; HCV, Hepatitis C Virus; mGPS, modified Glasgow Prognostic Score; NLR, Neutrophil-Lymphocyte ratio; CONUT, Controlling Nutrition Status; SATI, subcutaneous adipose tissue index, VATI, visceral adipose tissue index; SMI, skeletal muscle index.

CRPおよびNLR値がlow VSR群に比して高い傾向にあった。一方、体組成データであるBMIやサルコペニアの有無、皮下脂肪面積や内臓脂肪面積は両郡に差を認めなかった。AJCCによるステージ分類も差を認めなかった。

次に**図1**および**表2**に長期予後とVSRの解析結果をまとめた。Log-rank testによる解析ではHigh VSR群は術後全生存期間の中央値がlow VSR群に比して有意に悪かった。Cox regression解析ではVSRはAJCC stageと独立した予後因子であった。

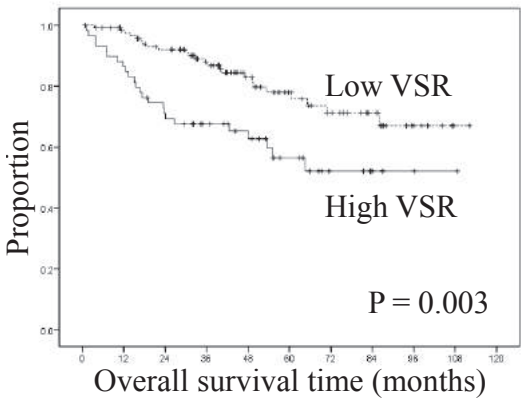


図 1

対象症例181例のうち、high VSR群の33症例（49%）、low VSR群の56症例（46%）に再発を認めており、両郡に差を認めなった（P=0.175）。再発形式別の検討では単発の肝内再発、多発肝内再発、肝外再発の再発はhigh VSR群で17例（52%）、9例（27%）、そして7例（21%）であったのに対してlow VSR群では40例（71%）、14例（25%）、そして2例（4%）であり、high VSR群のほうが肝外再発が多い傾向にあった。切除不能な再発をきたした割合はhigh VSR群の13例（39%）に比してlow VSR群は10例（18%）と、high VSR群のほうが有意に高かった。

【考察】

本研究は肝硬変合併肝細胞癌切除患者において、VSR値がAJCC stageなどと独立した切除後の予後因子であることを明らかにした。

アディポサイトは脂肪組織の主要な構成要素の

表 2　Predictive factors for overall survival, relapse-free survival and time-to- interventional failure after hepatectomy

	*P**	Coefficient†	SE	Wald χ^2	HR	95% CI
Overall survival						
AJCC stage	**<0.001**	**0.754**	**0.22**	**11.8**	**2.13**	**1.38-3.27**
CONUT grade	**0.001**	**0.759**	**0.226**	**11.3**	**2.14**	**1.37-3.33**
High VSR	**0.002**	**0.973**	**0.318**	**9.4**	**2.65**	**1.42-4.94**
ASA score +1	0.058	0.606	0.32	3.6	1.83	0.98-3.44
Major hepatectomy	0.075	0.902	0.507	3.2	2.47	0.91-6.66

* Based on likelihood test adjusted for the other factors in the final model.
† Estimated coefficient for the variable and the associated standard error.
Abbreviations: SE, standard error; HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval; BMI, body mass index; ASA, American Society of Anesthesiologist; CONUT, Controlling Nutrition Status; VSR, visceral to subcutaneous adipose tissue area ratio.

Note. Multivariate cox regression with stepwise backward selection for variables with P <0.1 in univariate analysis among the following 21 potential confounders: high VSR, age, male gender, BMI >25 kg/m^2, ASA score, hepatitis B infection, hepatitis C infection, bilirubin >1.0 mg/dl, platelet count >10x10^4/mm^3, Prothrombin >80%, modified Glasgow prognostic score +1, neutrophil-lymphocyte ratio, CONUT grade, sarcopenia, pure laparoscopic hepatectomy, major hepatectomy, operation time > 145 minutes, estimated blood loss > 225ml, any morbidity, and AJCC stage.

一つであり、エンドクラインやパラクラインによる様々な機能を持つ。しかしながら、内臓脂肪と皮下脂肪において、それぞれのアディポサイトの機能が異なることが近年報告されている。内臓脂肪のアディポサイトはインスリン抵抗性や中性脂肪上昇に関与しているとされ[4)]、実際に本検討においてもHbA1c値はhigh VSR群のほうが有意に高かった。また、内臓脂肪のアディポサイトはIL-6といった炎症誘発性サイトカインにも関与しており、high VSR群において、CRPやNLRが高値であったことに矛盾しない。また、アディポサイトはレプチンと呼ばれる、vascular endothelial growth factor（VEGF）分泌増加を促すことによって細胞増殖や転移、抗アポトーシス作用に関連するホルモンを分泌することが知られており、過去の研究でも内臓脂肪の増加と血中のVEGFの増加が関連していることが報告されている[5)]。VEGFは肝細胞癌において予後不良因子であることが広く知られており、今後は血中のVEGF濃度を測定することでVSRとHCCの予後との関連がより明らかになることが予想された。

以上、本研究において、肝硬変合併肝細胞癌切除患者において、VSR高値は腫瘍増悪や予後に関わる独立した因子であることが示された。本研究を基に内臓脂肪と肝細胞癌の関係についてさらなる研究を行うことで肝細胞癌患者のさらなる予後改善につながることが期待される。

【文献】

1. Strulov Shachar S, Williams GR: The obesity paradox in cancer-moving beyond BMI. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 26:13-16, 2017
2. Antonopoulos AS, Oikonomou EK, Antoniades C, et al.: From the BMI paradox to the obesity paradox: the obesity-mortality association in coronary heart disease. Obesity Reviews 17:989-1000, 2016
3. Fujiwara N, Nakagawa H, Kudo Y, et al.: Sarcopenia, intramuscular fat deposition, and visceral adiposity independently predict the outcomes of hepatocellular carcinoma. Journal of Hepatology 63:131-140, 2015
4. Tilg H, Moschen AR: Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nature Reviews Immunol 6:772-783, 2006
5. Miyazawa-Hoshimoto S, Takahashi K, Bujo H, Hashimoto N, Saito Y: Elevated serum vascular endothelial growth factor is associated with visceral fat accumulation in human obese subjects. Diabetologia 46:1483-1488, 2003

進行肝癌における術前化学療法とconversion surgeryの意義に関する検討

進藤　潤一、川村　祐介、橋本　雅司

【要約】

肝細胞癌に対する近年の分子標的薬の進歩は、従来治療が困難とされてきた進行肝癌症例に対する追加インターベンションの可能性を拡大しつつあるが、いわゆる「根治」を目的としたコンバージョン手術の意義についてはいまだ明らかではない。当院において2010年から2020年にレンバチニブによる治療を行った切除不能進行肝細胞癌107例のデータを用い、治療経過中に①R0切除を達成したケース、②R2切除に終わったケース、③切除以外のインターベンションを行ったケース、④全身治療以外の追加インターベンションを行わなかったケース（コントロール群）の4群について、時間依存性共変量を用いたCox回帰を用い、追加インターベンションの意義について検討を行った。不死時間バイアスの影響を減らすため治療介入を起点として疾患特異的生存率を比較検討すると、コントロール群と比較してR0切除、切除以外のインターベンションが行われた群では予後が良好な傾向が認められ、Cox回帰でもR0切除（Hazard ratio［HR］, 0.11, 95% CI, 0.02-0.50）、切除以外のインターベンション（HR, 0.32, 95% CI, 0.14-0.69）は有意な予後因子として抽出された。一方、R2切除（HR, 0.64; 95% CI, 0.25-1.62）の予後改善効果は示されなかった。以上から進行肝癌に対するレンバチニブ治療後の手術介入は、根治切除が達成できれば予後改善に寄与する可能性が示された。

【目的】

肝細胞癌は予後不良な癌腫の1つであり、患者の長期生存を期待するために様々な治療アプローチが開発されてきた。近年、肝癌に対しては様々な分子標的薬が使用できるようになり、従来不可能であった外科的治療介入が可能となるケースが少なからず見られるようになっている。化学療法を用いた外科治療へのconversionは大腸癌肝転移の領域ではその有効性が報告され、現在積極的な治療が行われているものの、肝癌においても同様の治療戦略が有効であるかどうかについては未だ一定の見解が得られていない。本検討では進行肝癌を対象に術前化学療法ならびにconversion surgeryの予後へ与える影響を検討し、外科的切除を念頭においた積極的治療介入の意義を明らかにすることを企図した。

【方法】

本検討では肝細胞癌に対する分子標的薬による術前治療とconversion surgeryの純粋な意義を明らかにするため、虎の門病院において2010年～2017年に切除不能進行肝細胞癌に対してレンバチニブによる治療を行った107例を対象に解析を行った。治療経過中に①R0切除に至ったケース、②R2切除に終わったケース、③切除以外のインターベンションを行ったケース、④全身治療以外の追加インターベンションを行わなかったケース（コントロール群）の4群に関して、時間依存性共変量を用いたCox回帰にて治療介入の意義を検討した。

【結果】

まず**表1**に対象症例の背景をまとめた。年齢の中央値は73歳と比較的高齢で、BCLC stage Cが60例（56.1%）。Child-Pugh Aが99例（92.5%）と肝機能良好例が多く、TACE不応が76例（71.0%）、肉眼的門脈腫瘍栓を有する症例が20例（18.7%）であった。レンバチニブ投与期間の中央値は5.6か月（0.1-34.9か月）、副作用中止が29例（27.1%）、Relative dose intensityは4週 98.2%、8週 80.4%、12週73.0%と比較的高く維持され、最良効果はRECIST 1.1による評価でCR 0例（0%）、PR 39例（36.4%）、SD 48例（44.9%）、PD 14例（13.1%）、評価不能 6例（5.6%）、

表 1　対象集団の背景

N	107
Age	73(35-93)
Male gender	82(76.6%)
Etiology（HB/HC/HB+HC/nBnC）	16(15.0%)/ 54(50.5%)/ 1(0.9%)/ 36(33.6%)
BCLC stage（A/B/C）	7(6.5%)/ 40(37.4%)/ 60(56.1%)
Performance status（0/1/2）	94(87.9%)/ 12(11.2%)/ 1(0.9%)
Child-Pugh class（A/B）	99(92.5%)/ 8(7.5%)
ALBI grade（1/2/3）	34(31.8%)/ 72(67.2%)/ 1(0.9%)
CONUT undernutrition grade [a] (normal/mild/moderate/severe)	21(19.6%)/ 64(59.8%)/ 19(17.8%)/ 3(2.8%)
History of MTA administration	16(15.0%)
Refractoriness to TACE [b]	76(71.0%)
Intrahepatic disease	94(87.9%)
Extrahepatic disease	44(41.1%)
Maximum size（mm）	31(11-175)
Number of tumor	4(1-200)
Macroscopic portal invasion [c] (Vp0/Vp1/Vp2/Vp3/Vp4)	87(81.3%)/ 3(2.8%)/ 9(8.4%)/ 2(1.9%)/ 6(5.6%)
Macroscopic venous invasion [c] (Vv0/Vv1/Vv2/Vv3)	99(92.5%)/ 1(0.9%)/ 1(0.9%)/ 6(5.6%)
Type 4 enhancement pattern [d]	23(21.5%)
AFP level（ng/mL）	88(1-61041)
DCP level（mAu/mL）	215(8-96035)
Duration of treatment with lenvatinib（months）	5.6(0.1-34.9)
Discontinuation of lenvatinib due to adverse event during the treatment course	29(27.1%)

Figures represent median（range）unless indicated.
[a] Undernutrition grade defined based on the CONUT score
[b] Defined based on the consensus statement
[c] Macroscopic vascula invasion defined by Liver Cancer Study Group of Japan
[d] Heterogeneous arterial enhancement pattern suggestive of poor differentiation
Abbreviations. HB, hepatitis B; HC, hepatitis C; BCLC; Barcelona Clinic Liver Cancer; CONUT, controlling nutritional status; MTA, molecular targeted agent; TACE, transarterial chemoembolization; AFP, alpha-fetoprotein; DCP, des-gamma-carboxyprothrombin

mRECISTによる評価でCR 8例（7.5%）、PR 60例(56.1%)、SD 19例(17.8%)、PD 14例(13.1%)、評価不能6例（5.6%）であった。107例中54例(50.5%）で経過中に薬物治療以外の治療介入が行われ、手術以外のインターベンションが38例(35.5%)。内訳はTACE 28例、RT 7例、BAI 1例、TACE+RT 1例、TACE+BAI 1例であった。手術介入は16例で行われ、そのうち12例が根治的切除を企図した切除であり、最終的に9例(8.4%）でR0切除を達成した。不死時間バイアスの影響を排除するため治療介入を起点とした疾患特異的生存率の解析（**図1**）では、コントロールと比較してR0切除、切除以外のインターベンションが行われた群では予後が良好な傾向が認め

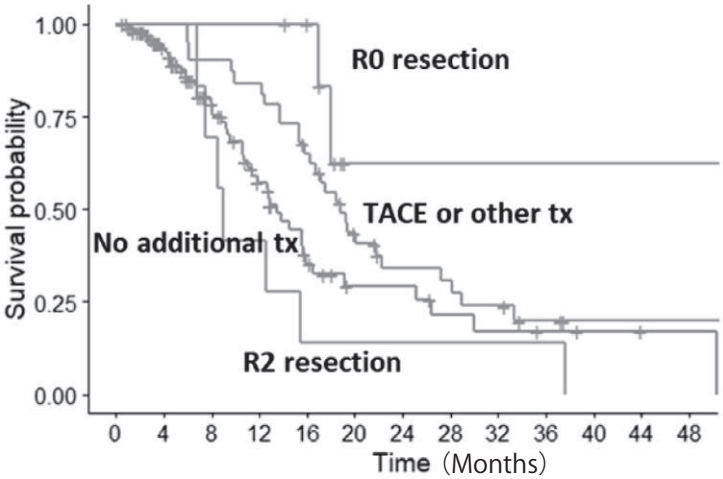


図１　不死時間を考慮したレンバチニブ投与後の治療介入別の疾患特異的生存率

表２　時間依存性共変量を用いた疾患特異的生存率に関するCox回帰

	P*	HR	95% CI
Additional intervention（vs. control）			
R2 resection	0.380	0.64	0.25-1.62
TACE or other additional treatment	0.003	0.32	0.14-0.69
R0 resection	0.002	0.11	0.02-0.50
Best response（vs. mRECIST PD or NE）			
mRECIST SD	<0.001	0.26	0.12-0.59
mRECIST PR	<0.001	0.22	0.12-0.44
mRECIST CR	0.002	0.19	0.06-0.61
CONUT undernutrition grade（vs. normal）			
mild	0.654	1.27	0.54-3.02
moderate	0.043	3.40	1.22-9.44
severe	0.039	4.95	1.31-18.70
AFP +100 ng/mL	0.051	1.002	0.999-1.006
DCP +100 mAu/mL	0.026	1.001	1.000-1.002
Type 4 enhancement pattern	0.004	2.70	1.43-5.09
BCLC C（vs. BCLC A or B）	0.033	1.84	1.04-3.24

Abbreviations. HAFP, alpha-fetoprotein; DCP, des-gamma-carboxyprothrombin; HR, hazard ratio.

られ、Cox回帰（**表2**）においてもR0切除（Hazard ratio［HR］, 0.11, 95% CI, 0.02-0.50）、切除以外のインターベンション（HR, 0.32, 95% CI, 0.14-0.69）は有意な予後因子として抽出された。一方、R2切除（HR, 0.64; 95% CI, 0.25-1.62）の予後改善効果は示されなかった。

【考察】

本研究では切除不能進行肝癌に対するレンバチニブ治療後の追加インターベンション、特に手術介入の意義について検討を行った。レンバチニブ治療後に何らかのインターベンションによる介入が行われたケースでは疾患特異的生存率が長い傾

向にあり（**図1**）、特にR0切除、ならびにTACEを中心とした手術以外の治療介入によって予後延長がもたらされる可能性が示唆された。一方、R2切除の予後は不良であり、切除不能な状態から全身治療を経て切除へのコンバージョンを行うとしても、根治的な治療介入が成功するか否かがいわゆる「コンバージョン手術」の意義の根幹にかかわる部分であることが示唆された。

肝細胞癌は一般的に化学療法に耐性であり、近年まで臨床的に十分な効果を示す薬物が存在しない癌腫であったが、分子標的薬の開発が進み、現在では一次治療としてソラフェニブ、レンバチニブ、アテゾリズマブ+ベバシズマブの3剤が、二次治療としてレゴラフェニブ、ラムシルマブ、カボザンチニブの3剤が使用可能となっている。このうちレンバチニブは、長らく唯一エビデンスのある薬剤であったソラフェニブに対する非劣勢がREFLECT試験[1]にて証明され、その抗腫瘍効果の高さから現在注目されている分子標的薬の一つである。本検討のノイエスと言える点は、レンバチニブ投与症例における切除へのコンバージョン率を、先行するpreliminary study[2]のアップデートデータを用いて示すとともに、いわゆる「コンバージョン切除」の予後上乗せ効果を明らかにした点にある。上記の通り、近年の肝細胞癌をとりまく全身治療の環境は劇的に変化しており、どのような状態のどのような患者にどの薬剤をどのように使用することが追加インターベンションの意義につながるのかについては今後検討していかねばならない点である。しかし本研究で示されるように、これまで根治的治療をあきらめざるを得なかったような進行肝癌症例の中にも、長期生存ないし治癒を目指せるケースが少なからず存在すること、そうした臨床アプローチが可能となってきたということは肝細胞癌診療における光明であると言える。

以上、本研究において切除困難進行肝癌に対するレンバチニブ治療後の根治的切除介入は予後改善に寄与する可能性が示された。他の薬剤の同様の検討や今後の多施設データでの検討とともに、進行肝癌に対する時代に即した治療アルゴリズムの早期確立が望まれる。

【文献】

1. Kudo M, Finn RS, Qin S, et al.: Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. Lancet 391: 1163-1173, 2018
2. Shindoh J, Kawamura K, Kobayashi Y, et al.: Prognostic impact of surgical intervention after lenvatinib treatment for advanced hepatocellular carcinoma. Ann Surg Oncol 28: 7663-7672, 2021

（8）脳・下垂体疾患

易怒性を呈する特発性正常圧水頭症に関する研究
－髄液シャント手術は易怒性を改善させられるか－

渡辺　玲、桑名　信匡、久保田　真由美、鮫島　直之
国家公務員共済組合連合会　東京共済病院

【要約】

特発性正常圧水頭症（idiopathic normal pressure hydrocephalus: 以下iNPH）における易怒性の出現率を調査し、髄液シャント手術の効果を検証した。また易怒性を呈するiNPH患者は、正常者と比較して脳梁が伸展されていることが確認され、脳室拡大に伴う脳梁の進展が易怒性発生に関与している可能性が示唆された。

【目的】

超高齢化社会が急速に進行している本邦においては、高齢者の医療や介護が重要な社会的課題である。iNPHは歩行障害、認知症、排尿障害を3徴候とする疾患であり、脳室拡大を認めるが髄液圧は正常であり、髄液シャント術により症状が改善する疾患としてHakimとAdamsが1965年に初めて報告した[1, 2]。本邦ではiNPHガイドライン[3]が作成されるなど、この領域では世界を牽引している。iNPHの3徴である歩行障害、認知症、尿失禁に関する検討は多くの報告がある[4－6]。認知症は中核症状である記銘力障害の他に周辺症状があり、易怒性は周辺症状の一つとしてアルツハイマー病などではよく検討されている。一方でiNPH患者において精神症状全般に関する報告は散見されるが[7, 8]、易怒性に焦点を当てた検討は、筆者らが渉猟し得た限りでは認めなかった。そこで今回はiNPH患者に於ける易怒性の発現頻度、シャント手術後の改善度に関して検討を加えた。

【方法】

当施設に於けるiNPH患者の内、易怒性を呈する症例を抽出し、タップテスト（髄液排除試験）前後、および髄液シャント手術症例に関しては術前後の易怒性の変化を評価した。易怒性の評価はNPI-Q（Neuropsychiatry Inventory Questionnaire）を用いて実施した。また水頭症により脳梁が物理的に伸展されていることが易怒性の発生に関与している可能性があるため、脳梁長 / 脳梁高＝脳梁伸展率と定義し、この伸展率の術前後での変化を計測した。

【結果】

2020年1月～2021年10月までに当院でタップテストを実施したprobable iNPHの症例372例中、易怒性を呈した症例は16例（4.3%）であり、髄液シャント手術を実施した症例は11例であった（**図1**）。この11例中でNPI-Qでの評価で術後に易怒性の改善が得られた症例は10例であった。易怒性が改善した症例の脳梁伸展率は、術前後で平均23.7%低下したのに対して、改善しなかった症例は0.39%のみの低下であった（**表1**）。

【考察】

Limbic Systemと前頭前野との間では相互に抑制する作用が働いており、入ってきた感覚情報が自身にとって有益か有害かを瞬時に判断し、有害と判断すると不安や苛立ちを感じるとされている。易怒性の発現機序は不明な点が多いが、このLimbic Systemに障害を生じると、情動のコントロールが困難となり、全ての対象に苛立つ様になり易怒性が発現すると言われている。

服部らは、iNPHとアルツハイマー病（以下AD）の脳弓の体積・長さ・平均断面積を計測した結果を報告している[9]。これによると、iNPH患者では脳弓の体積、平均断面積は健常者やAD患者よりも有意に小さく、逆に脳弓の長さは長かった。AD患者では脳弓の長さは変わらないが、体積と平均断面積が健常人よりも低下していた。

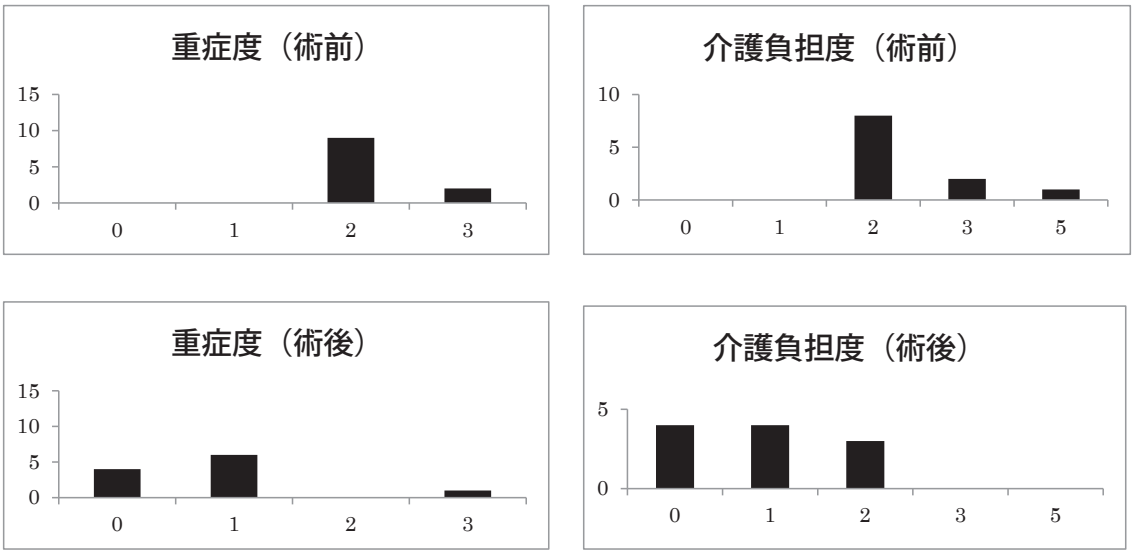


図１　NPI-Qによる易怒性重症度および介護負担度評価

表１　脳梁伸展率　術前後の変化

No.	易怒性	伸展率	伸展率		平均値
	改善有無	術前	術後	減少率	
1	有	19.09	15.22	20.27	23.7
2	有	30.18	22.56	25.45	
3	有	34.48	22.64	34.34	
4	有	33.02	26.79	18.87	
5	有	29.51	25.74	12.78	
6	有	24.29	18.1	25.48	
7	有	21.81	14.82	32.05	
8	有	38.22	29.62	22.5	
9	有	29.23	21.72	25.69	
10	有	20.01	16.17	19.19	
11	無	20.31	20.22	0.39	0.39

このことからiNPHでは脳弓が機械的に伸展された結果、脳弓の微小構造が変化したと結論づけている。一方ADでは海馬の委縮に伴い、海馬からの投射線維を多く含む脳弓の神経線維にも変性が生じて委縮を来すと結論づけている。

SzczepekらはiNPH患者の脳梁に有意な変化が生じていることを指摘している[10)]。

彼らの説を元に考えると、iNPH患者では脳室拡大によって脳梁および脳弓が機械的伸展を受けることが主体であるため、シャント手術により脳室拡大が改善されると脳梁や脳弓の伸展も改善されて易怒性を含む認知機能が改善すると考えられる。

今回の研究では、iNPH患者に対する髄液シャント手術は易怒性の改善に有効であることが確認できた。また易怒性が改善した症例では脳梁伸展

率が術後に有意に低下しており、髄液シャント手術により脳梁の物理的伸展が解除されることが、易怒性の改善に関与していることが示唆された。

【文献】

1. Hakim S, Adams RD: The special clinical problem of symptomatic hydrocephalus with normal cerebrospinal fluid pressure; observations on cerebrospinal fluid hydrodynamics. J Neurol Sci 2: 307-327, 1965
2. Adams RD, Fisher CM, Hakim S, et al.: Symptomatic occult hydrocephalus with "normal" cerebrospinal-fluid pressure; a treatable syndrome. N Engl J Med 273: 117-126,1965
3. 日本正常圧水頭症学会　特発性正常圧水頭症の診療ガイドライン作成に関する研究班: 特発性正常圧水頭症診療ガイドライン第3版: メディカルレビュー社, 大阪, 2020
4. Marmarou A, Young HF, Aygok GA, et al.: Diagnosis and management of idiopathic normal-pressure hydrocephalus: A prospective study in 151 patients. J Neurosurg. 102: 987-997, 2005
5. Hellstrom P, Edsbagge M, Blomsterwall E, et al.: Neuropsychological effects of shunt treatment in idiopathic normal pressure hydrocephalus. Neurosurgery 63: 527-535, 2008
6. Aruga S, Kuwana N, Shiroki Y, et al.: Effect of cerebrospinal fluid shunt surgery on lower urinary tract dysfunntion in idiopathic normal hydrocephalus. Neurourol Urodyn 37: 1053-1059, 2017
7. Kito Y, Kazui H, Kubo Y, et al.: Neuropsychiatric symptoms in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. Behav Neurol 37: 165-174, 2009
8. Larsson A, Wikkelso C, Bilting M, et al.: Clinical-parameters in 74 consecutive patients shunt operated for normal pressure hydrocephalus. Acta Neurol Scand 84: 475-482, 1991
9. Hattori T, Sato R, Aoki S, et al.: Different patterns of fornix damage in idiopathic normal pressure hydrocephalus and Alzheimer Disease. AJNR 33: 274-279, 2012
10. Szczepek E, Czerwosz L, Szary C, et al.: Diffusion tensor imaging (DTI) in the differential diagnosis of normal pressure hydrocephalus and brain atrophy. : Article in Polish. Pol Merkur Lekarski 37: 221-226, 2014

成長ホルモン産生下垂体腺腫の組織型とソマトスタチン受容体発現の関連

西岡　宏、井下　尚子[1]
東京都健康長寿医療センター病理診断科[1]

【要約】

GH産生下垂体腺腫を組織型別: Densely granulated type（DG）85例とSparsely granulated type（SG）30例にソマトスタチン受容体（SSTR）の発現を免疫組織化学的に検索した。SSTR 2Aの発現はSGがDGよりも低く、従来の所見: SGには第一世代ソマトスタチンアナログ（SSA）薬物治療抵抗例が多い、ことと一致した。これに対して、SSTR5の発現はSGがDGよりも僅かに高く、SGはDGよりも第二世代SSA治療有効例が多い可能性が示唆された。

【目的】

成長ホルモン（GH）産生下垂体腺腫に対する治療の第一選択肢は外科手術であるが、術後非治癒例や手術困難例などに対しては薬物治療が行われ、その第一選択肢となるのがソマトスタチンアナログ（SSA）である。GH産生腺腫の多くが発現しているソマトスタチン受容体（SSTR）2に親和性の強い第一世代SSA（オクトレオチド、ランレオチド）がもっとも多く使用されているが、近年これに加えてSSTR5にも親和性を持つ第二世代SSA（パシレオチド）が登場した。薬物治療の選択は従来try and errorで行われてきたが、近年薬物治療の選択基準がいくつか提唱されている[1)]。今回、組織型とSSTR発現の相関を検討した。

【対象と方法】

対象は先端巨大症で発症したGH産生下垂体腺腫115例。HE所見、サイトケラチン（CAM5.2）とGHの免疫組織化学所見から、典型的なDensely-granulated type（DG: 主に好酸性腺腫、CAM5.2が細胞質内cap状陽性、GHびまん性強陽性）とSparsely-granulated type（SG: 主に嫌色素性腺腫、CAM5.2が細胞質内dot状陽性、GH散在性に弱陽性）の二型に分け、これらの中間型は除外し検討した。125例に対してSSTR2AとSSTR5の免疫組織化学を行い、細胞膜が強陽性（3+）から陰性（-）までの4段階で評価した。

【結果】

DG 85例とSG 30例のSSTR2AとSSTR5の免疫組織化学所見一覧を呈示する（**表1**）。4段階評価の平均値はDGのSSTR2A は2.48、SSTR5は1.91であり、SGのSSTR2Aは2.20、SSTR5は2.03であった。DG, SGともにSSTR2AはSSTR5よりも強く発現していたが、SSTR2A発現はDGがSGより強く、一方でSSTR5の発現はDGよりもSGにやや強く認められた（有意差なし）。

【考察】

GH産生腺腫は単一ではなく複数の組織型よりなるが、プロラクチン産生との混合型腺腫などを除くと、細胞質内の分泌顆粒の数により大きく二型に分類される: DGとSG。両者は臨床像だけでなく、内分泌所見（GH産生能）、画像所見、薬物治療反応性などが異なる。DGとSGの組織診断は本来、電子顕微鏡所見に基づいて行うべきであるが、SGに特徴的な細胞質内構造物: 線維性球状構造物（Fibrous body）が免疫組織化学的にサイトケラチン陽性なことを利用して診断されることが多い。今回はサイトケラチン（CAM5.2）の免疫組織化学だけでなく、細胞質のHE染色性とGH免疫組織化学所見を交えて典型例に分けて検討した。

臨床的にDGはSGに比して頻度が多く、通常はGH産性能が高い、薬物治療（第一世代SSAや

表 1

	DG（n＝85）	SG（n＝30）
SSTR2A	58/13/11/3 (2.48)	17/5/5/3 (2.20)
SSTR5	23/40/13/9 (1.91)	12/9/7/2 (2.03)

ドパミンアゴニスト）効果が高い。一方、SGは若年者・女性にやや多い、大型や浸潤性腫瘍であることが多い、GH産性能はやや低いが腫瘍増殖能はやや高い、薬物治療抵抗例が多いなどの特徴があり、このためWHO組織型分類（2017年）でもSGは臨床的にaggressiveな一組織型とされている。先端巨大症の中で若年者、SG、大型腫瘍、GH・IGF-1高値例、増殖能亢進腺腫は高リスク症例と報告されている[2)]。

先端巨大症は高血圧、糖尿病による心脳血管障害や悪性腫瘍などの全身合併症によりQOL低下と生命予後短縮をきたす疾患である。従来は先端巨大症患者の標準化死亡比（SMR）は正常者の2-3倍と報告されてきたが、近年は薬物治療、主に第一世代SSAの普及による内分泌治療成績（GHおよびIGF-1値の正常値化）の向上によりSMRも著明に改善している。第一世代SSA抵抗因子は若年者、SG、SSTR2低発現、*AIP*変異例などであり[3)]、上記の高リスク症例と重なる。最近では薬剤選択にあたり、組織型だけでなくSSTRの発現を免疫組織化学的に直接検索することが推奨されている[1)]。SSTR発現と薬剤効果が正相関する訳ではないが発現陰性例では効果は期待できない。当院でもこれまでSSTR2Aの免疫組織化学を行い、術後の薬物治療の選択に用いてきた。

SGには難治例や薬剤抵抗例が多いと報告されてきたが、第二世代SSA有効例が多いとの報告が散見される。しかしこれまで組織型別にSSTR発現を検索した報告はみられなかった。今回の検討ではSSTR2AのDGがSGよりも高く、従来の所見と一致した。これに対して、SSTR5の発現はSGがDGよりも僅かに高かったが、両組織型ともSSTR2AはSSTR5よりも高く発現していた。これらの結果からは、一部のSGに第二世代SSAは有効であり、その有効率はDGよりもやや高い可能性が示唆された。

【結語】

GH産生腺腫に対する薬物治療の選択は、各症例のSSTR発現などに基づいた個別化治療（テーラーメード治療）が今後推奨される[1,3)]。薬剤抵抗性の多いSGに対してもSSTR2AやSSTR5の発現を検索し適切な薬物治療の可能性を検討していく必要がある。

【文献】

1. Kasuki L, et al.: Management of endocrine disease: Personalized medicine in the treatment of acromegaly. Eur J Endocrinol 178: R89-R100, 2018
2. Fernandez-Ridriguez E, et al.: Update on prognostic factors in acromegaly: Is a risk score possible? Pituitary 18: 431-440, 2015
3. Fleseriu M, et al.: A Pituitary Society update to acromegaly management guidelines. Pituitary 24: 1-13, 2021

（9）病理

世界肺癌学会より提唱された肺腺癌における新たな病理学的評価法の検証

宇留賀 公紀、藤井　丈士、髙澤　豊

【要約】

目的: 2020年6月に世界肺癌学会より肺腺癌における病理学的新grading systemが提言され、WHO胸部腫瘍組織分類第5版に導入された。同提言では、grade 1はlepidic優位でhigh-grade patterns（micropapillary, solid, complex glandular patterns)が20%未満の症例、grade 2はacinarとpapillary優位でhigh-grade patternsが20%未満の症例、grade 3ではhigh-grade patternsが20%以上の症例と定義した。今回、当院の症例を用いて肺腺癌の病理学的新grading systemの検証を行った。

方法: 虎の門病院にて2011年に病理病期I期の肺浸潤性非粘液腺癌に対して、根治的外科手術が行われた56例を対象とした。上記の新grading systemに加えて、リンパ管・静脈侵襲、胸膜浸潤、腫瘍径、浸潤径、tumor spread through air spaces（STAS）の有無の評価を行った。無再発生存期間、全生存期間の解析は、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。多変量解析はCox回帰分析を用いて、いずれも$p = 0.05$以下を有意とした。

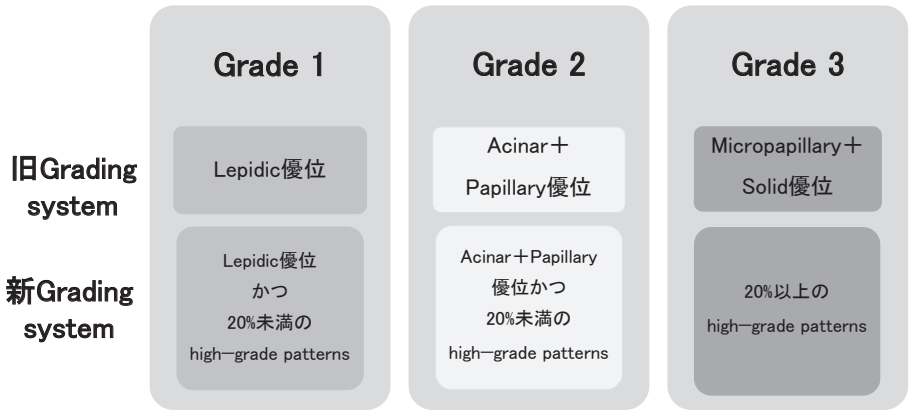
結果: 新grading systemでgrade 1と診断した症例は16例（28.6%)、grade 2は35例（62.5%)、grade 3は5例（8.9%）であった。単変量解析では、gradeが上昇するほど統計学的に有意に無再発生存期間、全生存期間が短縮した（それぞれ$p = 0.03$, $p = 0.04$)。多変量解析では、無再発生存期間、全生存期間は有意差はなく（それぞれ$p = 0.38$, $p = 0.74$)、核異型のみが有意な予後因子であった。

結論: I期の肺腺癌で8.9%の症例が世界肺癌学会より提唱された新grading systemでgrade 3に該当した。新grading systemは旧grading systemと比較して、無再発生存期間、全生存期間、いずれも単変量解析では有意差を伴って予後予測に有用であったが、多変量解析では有意差を示せなかった。

【目的】

2011年にInternational Association for the Study of Lung Cancer（世界肺癌学会）/American Thoracic Society/European Respiratory Societyがmultidisciplinary lung adenocarcinoma classification[1]を発表して以降、肺腺癌の病理学的形態が予後と関連することが判明してきた。つまり、lepidic優位である症例が最も予後が良好であり、acinarとpapillary優位が次に良好で、micropapillaryとsolid優位が最も予後不良である[3, 4]。さらに、優位な組織型でなく、5%以上のmicropapillaryとsolidが存在することのみで、リンパ節転移や術後再発が多いことが示された[5]。以上の様に肺腺癌の病理学的形態の重要性の知見が集積される中、2020年6月に世界肺癌学会より肺腺癌における病理学的grading systemが提唱された[6]。同提言では、grade 1はlepidic優位でhigh-grade patterns（micropapillary, solid, complex glandular patterns）が20%未満の症例、grade 2はacinarとpapillary優位でhigh-grade patternsが20%未満の症例、grade 3ではhigh-grade patternsが20%以上の症例と定義した。無再発生存期間の検討で、grade 1, 2, 3の順で有意差を持って良好であった。この新たな病理学的grading systemは2021年に出版されたWHO胸部腫瘍組織分類第5版[7]に導入され、標準的な評価方法となった。そこで、今回当院の症

表１　新旧Grading systemの比較



例を用いて肺腺癌のgrading systemの検証を行いたい。

【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。虎の門病院で2011年にⅠ期浸潤性非粘液腺癌に対して、肺葉切除を行った56例を対象とした。浸潤性粘液腺癌、fetal、colloid adenocarcinomaなど稀な組織型については除外した。腫瘍の最大径、浸潤径、WHO第4版に基づく肺腺癌の亜型（lepidic, acinar, papillary, micropapillary, solid）ならびにhigh-grade patterns（micropapillaryとsolid、complex glandular patterns）の5%ごとの評価し、新旧の評価方法（**表1**）に基づくgradingを行った。併せて、リンパ管・血管侵襲、胸膜浸潤、壊死、tumor spread through air spaces（STAS）などの病理背景、および臨床背景について検討した。統計解析は、SPSS statistical software（version 18.0, SPSS Inc, Chicago, IL）を用いた。無増悪生存期間、全生存期間については生存曲線をKaplan-Meier法より算出し、比較はLog Rank検定、Cox回帰分析にて行った。

【結果】

56例の症例背景を**表2**に示した。男性 35例（62.5%）、女性 21例（37.5%）、年齢が65歳以上は36例（64.3%）、病理病期IA期 41例（73.2%）、IB期 15例（26.8%）であった。胸膜浸潤は8例（14.3%）、リンパ管侵襲は25例（44.6%）、静脈侵襲は21例（37.5%）に認め、STASは29例（51.8%）に見られた。旧grading systemに基づく評価では、grade 1は16例（28.6%）、grade 2は35例（62.5%）、grade 3は5例（8.9%）であった。一方で新grading systemに基づく評価では、grade 1は16例（28.6%）、grade 2は27例（48.2%）、grade 3は13例（23.2%）であった。無再発生存期間の単変量解析では、旧grading systemではgradeと無再発生存期間は有意差は認めなかったが（$p = 0.09$）、新grading systemではgradeが上がるほど有意に無再発生存期間が短縮していた（$p = 0.03$）（**図1**）。多変量解析では、新・旧ともにgrading systemは有意差がなく、核異型のみが有意な因子であった（**表3**）。全生存期間でも、

表２　症例背景（n=56）

背景因子	
性別（男性/女性）	35/21
年齢（65歳以上/未満）	36/20
病理病期（IA/IB）	41/15
核grade（1/2/3）	14/39/3
壊死あり	8
胸膜浸潤あり	11
リンパ管侵襲あり	25
静脈侵襲あり	21
STAS*あり	29

*STAS: Tumor Spread through Air Spaces

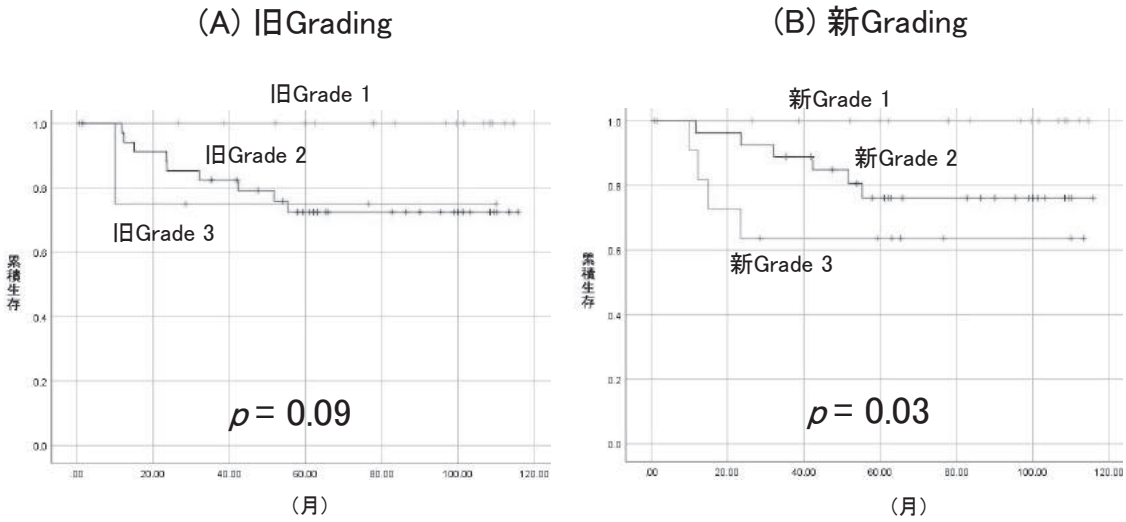


図 1　無再発生存期間の解析

表 3　無再発生存期間と背景因子の検討

背景因子	単変量解析（p値）	多変量解析（p値）
性別（男性/女性）	0.21	
年齢（65歳以上/未満）	0.51	
病理病期（IA/IB）	0.14	0.45
核異型（1/2/3）	0.00	0.02
壊死	0.04	0.61
胸膜浸潤	0.00	0.19
リンパ管侵襲	0.04	0.67
静脈侵襲	0.01	0.83
STAS	0.22	
新Grading system	0.03	0.38

旧grading systemは有意差は認めなかったが（$p = 0.38$）、新grading systemではgradeが上がるほど有意に短縮していた（$p = 0.04$）（**図2**）。多変量解析では、新・旧ともにgrading systemは有意差がなく、核異型のみが有意な因子であった（**表4**）。

【考察】

今回、当院における浸潤性非粘液性腺癌の症例を対象に、2020年6月に世界肺癌学会より発表された病理学的新grading system[6]について検討した。新grading systemは旧grading systemと比較して、無再発生存期間、全生存期間、いずれも単変量解析では有意差を伴って予後予測に有用であったが、多変量解析では有意差を示せなかった。

世界肺癌学会より新grading systemを発表した論文[6]内においては、New York University Langone Healthの284例のI期をtraining cohort、Massachusetts General Hospitalの212例のⅠ期をvalidation cohortとして、新grading分類を

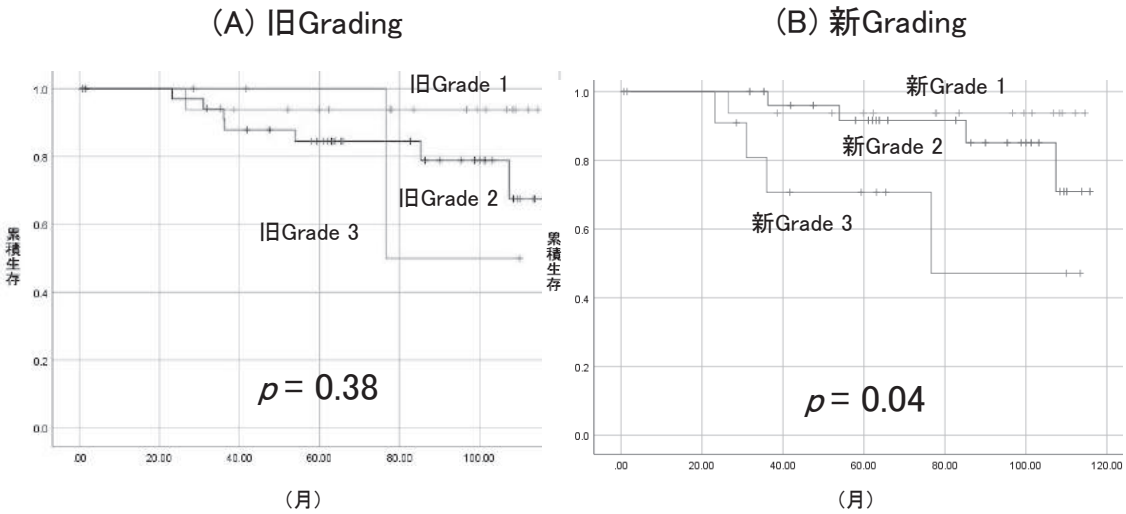


図２　全生存生存期間の解析

表４　無再発生存期間と背景因子の検討

背景因子	単変量解析（p値）	多変量解析（p値）
性別（男性/女性）	0.07	0.79
年齢（65歳以上/未満）	0.04	0.28
病理病期（IA/IB）	0.73	
核異型（1/2/3）	0.01	0.00
壊死	0.00	0.62
胸膜浸潤	0.78	
リンパ管侵襲	0.00	0.90
静脈侵襲	0.00	0.66
STAS	0.91	
新Grading system	0.04	0.74

策定した。最終的には、Brigham and Women's Hospital/St.Vincent's HospitalのⅠ～Ⅲ期の300例の浸潤性肺腺癌をtest cohortとしてvalidation試験が行われており、新grading systemは旧grading systemより無再発生存期間を正確に予測することが可能であったが（p <0.0001 vs p = 0.00013)、全生存期間では差が見られなかった（p = 0.00011 vs p <0.001）と報告されている。また、Kagimotoら[8]は、外科切除を行った1,059例の自施設の肺腺癌症例を検討し、新grading systemでgrade1 382例（36.1%)、490例（46.3%)、187例（17.7%）であり、旧grade 2の95例（16.2%）が新grade 3と評価された。また、新grading systemは無再発生存期間、全生存期間と有意に相関しており（ともにp <0.001)、新grade 3の再発生存期間は、新・旧いずれのgrade 2より有意に短かったとしている。

一方で新grading systemの問題点もいくつか指摘されている。最も重要な点は、high-grade

patternsの中でcomplex glandular patternsの定義があいまいな事がある。また、病理学的なgradingを腫瘍面積で行うか、細胞数で行うかも決められていない。最後に、世界肺癌学会より新grading systemを発表した研究の予後因子にリンパ管侵襲が含まれていない、浸潤性粘液腺癌（invasive mucinous adenocarcinoma）でvalidationされていないことがある。

今回の検討で、浸潤性非粘液腺癌に対する世界肺癌学会より発表された新grading systemの有用性が示されたが、診断上の問題点も見られた。今後、より多くの症例で検討していくことが重要であると考えられる。

【発表に関連する事項】

宇留賀公紀、藤井丈士、髙谷久史、髙井大哉、藤森賢、髙澤豊: IASCL Pathology Committeeによる浸潤性肺腺癌の新グレーディングシステムの当院での検討。第110回日本病理学会総会 2021年（東京）

【文献】

1. 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
2. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, et al.: Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. Mod Pathol 24:653-664, 2011
3. Warth A, Muley T, Meister M, et al.: The novel histologic international association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. J Clin Oncol 30:1438-1446, 2012
4. Zhao Y, Wang R, Shen X, et al.: Minor components of micropapillary and solid subtypes in lung adenocarcinoma are predictors of lymph node metastasis and poor prognosis. Ann Surg Oncol 23:2099-2105, 2016
5. Ma M, She Y, Ren Y, et al.: Micropapillary or solid pattern predicts recurrence free survival benefit from adjuvant chemotherapy in patients with stage IB lung adenocarcinoma. J Thorac Dis 10:5384-5393, 2018
6. Moreira AL, Ocampo PSS, Xia Y, et al.: A grading system for invasive pulmonary adenocarcinoma: a proposal from the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. J Thorac Oncol 15:1599-1610, 2020
7. WHO Classification of Tumours Editorial Board. WHO Classification of Tumours, 5th ed. WORLD HEALTH ORGANIZATION 2021
8. Kagimoto A, Tsutani Y, Kambara T, et al.: Utility of newly proposed grading system from international association for the Study of Lung Cancer for Invasive Lung Adenocarcinoma. JTO Clin Res Rep 2:100126, 2020

ER陽性乳癌におけるRetinoic acid-inducible gene Iの免疫組織化学的な解析

佐藤 順一朗、木脇　圭一、高澤　豊、川端　英孝
東　浩太郎[1]、井上　聡[2]
東京大学医学部付属病院老年病科[1]
東京都健康長寿医療センター研究所老化制御研究チーム
システム加齢医学研究[2]

【要約】

今回、ER陽性乳癌患者の手術検体について、免疫組織化学的解析を行った。retinoic acid-inducible gene I（RIG-I）陽性のとき、無病生存率は有意に低下した。また、RIG-Iの反応性とestrogen-respive finger protein（Efp）/TRIM25の反応性との間に正の相関関係が見られた。RIG-IとEfpが共に陽性の時、無病生存率は有意に低下した。両者の反応性の評価を組み合わせることによってより正確に患者の予後を予測できる可能性がある。

【目的】

我々はこれまでに、エストロゲン誘導性遺伝子としてEfpを同定し、Efpの免疫反応性が陽性のとき、乳癌患者の予後不良因子となることを明らかにした[1)]。また、EfpはRIG-Iを活性化することにより、自然免疫にも関与することを明らかにした[2-4)]。RIG-Iはcytosolic pattern recognition receptorの一種で[5)]、乳癌では細胞株を用いた解析をもとに腫瘍促進因子であるという報告および腫瘍抑制因子であるという報告があるものの[6-9)]、臨床データや患者サンプルを用いた解析はまだ報告されていない。今回、ER陽性乳癌患者サンプルを免疫組織化学的に評価し、RIG-Iの反応性と予後の関係について評価するとともにEfpの反応性との関係を検討することにした。

【方法】

2006年から2017年に当院で先行して手術を受けた乳癌患者145名からER陽性の症例を臨床データと共に抽出した。臨床転帰を無病生存率で評価した。無病生存率は、手術日から最初の遠隔再発または最終フォローアップまでの期間と定義した。平均追跡期間は86.6カ月（7-154カ月）であった。免疫染色には自作した抗体を用い、用手的に染色した。RIG-IとEfpの発現は、腫瘍細胞の細胞質の染色性を0～3（0: 陰性、1: 弱陽性、2: 中等度陽性、3: 強陽性）と点数化して評価し、3以上の場合を「陽性」と定義した。統計解析は、EZR（自治医科大学さいたま医療センター、日本、version 1.35）を用いて実施した。カイ2乗検定

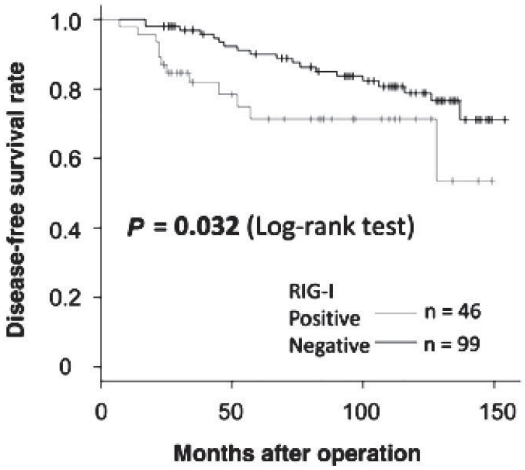


図１　ER陽性乳癌患者の無病生存率をRIG-I免疫反応別に分けたKaplan-Meier曲線。薄い線はRIG-I免疫反応陽性例（n＝46）、濃い線はRIG-I免疫反応陰性例（n＝99）を表す。2つの曲線の差は、log-rank検定により統計的に有意であった（P＝0.032）。

を用いて、標的タンパク質の反応性と臨床病理学的パラメータとの関係を評価した。無病生存曲線はKaplan-Meier法により作成し、log-rank検定により統計的有意差を算出した。単変量および多変量解析はCox比例ハザードモデルで行った。単変量解析で統計的に有意なパラメータは、多変量解析でさらに評価した。

【結果】

RIG-Iの反応性と臨床病理学的パラメータとの間に有意な関係は見られなかった。RIG-Iが陽性

表 1　Univariate and multivariate analyses of disease-free survival with clinicopathological parameters in ER-positive breast cancer patients

Variables	Univariate			Multivariate
	P-value	Hazard ratio	95% CI	P-value
Age（≧ 50 vs < 50 years old）	0.539			
Tumor size（≧ 20 vs < 20 mm）	**0.008**	2.354	1.154-4.803	**0.019**
Lymph node status（+/-）	**0.019**	2.155	1.027-4.523	**0.042**
PgR Status（+/-）	0.377			
HER2 Status（+/-）	0.816			
RIG-I Status（+/-）	**0.037**	2.139	1.025-4.460	**0.043**
Nuclear grade（3 / 2,1）	0.574			

Abbreviations: CI = confidence interval; PgR = progesterone receptor; HER2 = human epidermal growth factor receptor 2; RIG-I = retinoic acid-inducible gene I

表 2　Relationship between the Efp status and clinicopathological parameters in ER-positive breast cancer patients

		Efp status		P-value
		Negative（n = 90）	Positive（n = 55）	
Age	≧ 50 years old	75	44	0.612
	< 50 years old	15	11	
Tumor size	≧ 20 mm	65	32	0.081
	< 20 mm	25	23	
Lymph node status	Negative	54	28	0.284
	Positive	36	27	
PgR status	Negative	29	16	0.693
	Positive	61	39	
HER2 status	Negative	79	48	0.929
	Positive	11	7	
RIG-I Status	Negative	71	28	**0.0004**
	Positive	19	27	
Nuclear Grade	1, 2	76	42	0.225
	3	14	13	

Abbreviations: Efp = estrogen-responsive finger protein; PgR = progesterone receptor; HER2 = human epidermal growth factor receptor 2; RIG-I = retinoic acid-inducible gene I

のとき、無病生存率は有意に低下した（P=0.032）（**図1**）。Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量および多変量解析により、RIG-I陽性は、腫瘍径やリンパ節転移などの既知の予後因子とともに、無病生存率の独立した予後不良因子であることが示された（P=0.043）（**表1**）。Efpの反応性と臨床病理学的パラメータとの間には有意な関連性は認められなかったが、RIG-Iの反応性との間には強い正の相関が認められた（P=0.0004）（**表2**）。Cox比例ハザードモデルを用いた無病生存率の単変量解析では、腫瘍の大きさやリンパ節転移などの既知の予後因子に加えて、Efp陽性も無病生存率の有意な予後不良因子であることが示された（P=0.044）。Kaplan-Meier解析により、RIG-IとEfpが共に陽性の群と他の3群との比較を行った。いずれも陽性である患者は、無病生存率が有意に悪化した（P=0.005）（**図2**）。Cox比例ハザードモデルで評価すると、RIG-IとEfpが共に陽性の時、腫瘍径とともに無病生存率の独立した予後因子（P=0.038）であった。

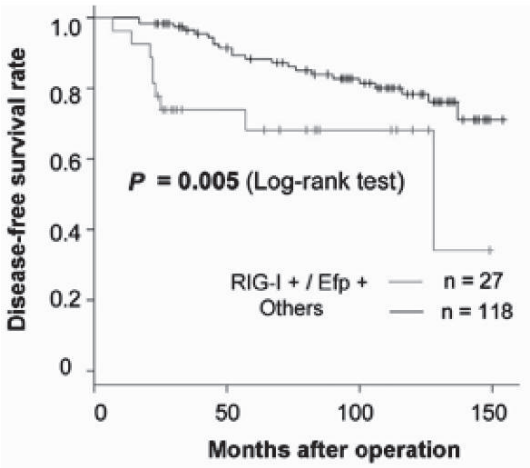


図２　ER陽性乳がん患者の無病生存率をEfpとRIG-Iの免疫活性で分けたKaplan-Meier曲線。薄い線はEfpとRIG-Iの両免疫活性が陽性であった症例（n＝27）、濃い線はその他の症例（n＝118）である。２つの曲線の差はlog-rank検定により統計的に有意であった（P＝0.005）。

【考察】

今回、ER陽性乳癌患者の臨床サンプルを分析することにより、RIG-Iが予後不良を予測するバイオマーカーとなりうることを示した。RIG-IとEfpの2つのタンパク質の反応性には正の相関があり、RIG-IとEfpの免疫活性を組み合わせて評価することで患者の予後を予測でき、ER陽性乳癌患者の個別化治療に有用である可能性が示唆された。

【文献】

1. Inoue S, Orimo A, Hosoi T, et al.: Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein. Proc Natl Acad Sci USA 90:11117-11121, 1993
2. Urano T, Saito T, Tsukui T, et al.: Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. Nature 417:871-875, 2002
3. Suzuki T, Urano T, Tsukui T, et al.: Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. Clin Cancer Res 11:6148-6154, 2005
4. Gack MU, Shin YC, Joo CH, et al.: TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. Nature 446:916-920, 2007
5. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, et al.: The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat Immunol 5:730-737, 2004
6. Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, et al.: Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. Cell 159:499-513, 2014
7. Nabet BY, Qiu Y, Shabason JE, et al.: Exosome RNA unshielding couples stromal activation to pattern recognition receptor signaling in cancer. Cell 170:352-366, 2017
8. Elion DL, Jacobson ME, Hicks DJ, et al.: Therapeutically active RIG-I agonist induc-

es immunogenic tumor cell killing in breast cancers. Cancer Res 78:6183-6195, 2018
9. Wu Y, Zhao W, Liu Y, et al.: Function of HNRNPC in breast cancer cells by controlling the dsRNA-induced interferon response. EMBO J 37: e99017, 2018

新規自己反応性T細胞に着目した自己免疫疾患発症機構の解明

河部　剛史
東北大学大学院医学系研究科 病理病態学講座 免疫学分野

【要約】

CD4$^+$ T細胞は外来抗原に対する獲得免疫応答における司令塔としての役割を果たすリンパ球であるが、申請者はこの細胞中に、自己抗原認識依存的に産生され病原体感染時には自然免疫機能を発揮しうる新規「Memory-phenotype（MP）細胞」を同定した。本研究ではこれに基き、MP細胞の質的特異性や感染防御機能、さらには自己免疫疾患惹起能を解明することを目的とした。研究の結果、MP細胞は抗原特異的メモリーT細胞とは表現型が異なり、前者細胞は定常状態下においてTh1様の遺伝子発現プロファイルを有する「MP1」分画を多く含むことが分かった。このMP1分画はIL-12によって恒常的に分化誘導され、上述のMP細胞の自然免疫機能の主軸を担うことも明らかになった。さらに、MP1細胞は自己免疫・炎症性疾患を惹起する潜在性を有することも確認された。今後、MP細胞の産生・維持・分化・活性化機構や免疫学的機能の全容を解明することにより、新興・再興感染症や自己免疫・炎症性疾患の病態理解、根治的治療法の確立にもつながるものと期待される。

【背景・目的】

CD4$^+$ T細胞は、外来抗原特異的獲得免疫応答に必須のリンパ球である。これに対し申請者は、同細胞中に、自己抗原特異的に産生され恒常的に準活性化状態を呈する新規細胞集団「Memory-phenotype（MP）細胞」を同定した[1)]。本細胞は、獲得免疫の中枢を担うはずのT細胞にあって自然免疫機能を有するという極めて特異な性質を保持し、現在注目を集めている[2-4)]。

MP細胞は、抗原認識非依存性かつサイトカイン反応性にエフェクターサイトカインを産生しうることから、本来は自然リンパ球（ILC）と類似の機序で自然免疫的感染防御に寄与するものと考えられる。一方、同細胞はILCとは異なり自己抗原特異性を有することから、病原体感染時などの炎症性サイトカイン亢進環境下においては本細胞が自己組織に過剰反応し、自己免疫・炎症性疾患を惹起する可能性が類推される[5)]。

そこで本研究では、MP細胞の質的特異性や分化・活性化機構を解明し、さらには同細胞による感染防御機能や自己免疫・炎症性疾患発症機構を究明することを目的とした。

【方法】

MP細胞の質的特異性や分化機構を解明するために、野生型（WT）や各種遺伝子欠損（KO）マウスを用いたSingle cell RNAseq（scRNAseq）ならびにフローサイトメトリー解析を行った。また、同細胞の感染防御機能を明らかにする目的で、マウスを*Toxoplasma gondii*感染に供し生存解析等を施行した。さらに、MP細胞による自己免疫・炎症性疾患発症機構を究明するために、MP細胞を*Rag2* KOマウスに移入したうえで各種フローサイトメトリー解析や組織学的解析（HEや免疫組織化学染色など）を施行した。

【結果】

1. MP細胞の特異的マーカー

上述の様に、MP細胞は自己抗原認識依存的に産生され、病原体感染時には自然免疫機能を発揮する。このことから同細胞は、外来抗原特異的に活性化し獲得免疫を担う抗原特異的メモリーT細胞とは本質的に異なる存在であるものと考えられる[2-4)]。しかし、両者を鑑別するマーカーはこれまで同定されていなかった。

そこで我々はまず、scRNAseq解析により、MP細胞とリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）特異的メモリーT細胞の遺伝子発現プロファイルを比較したところ、両プロファイルが本質的に異なることが判明した（**図1**）。さらに、

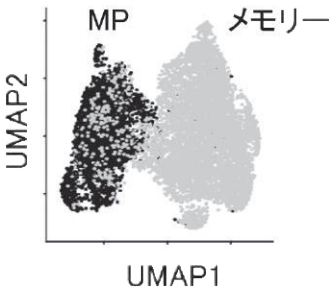


図１　MP細胞と抗原特異的メモリー細胞の遺伝子発現プロファイル
MP細胞とLCMV特異的メモリーCD4^{+} T細胞をscRNAseq、UMAP解析にて比較した。

両者を区別するマーカーの候補として、細胞表面蛋白質X、Y、細胞内蛋白質Zをコードする遺伝子が同定された。そこで、両細胞におけるこれらの蛋白発現を比較したところ、ほぼ全ての抗原特異的メモリーT細胞がX^{+} Y^{+} Z^{hi}の表現型を有するのに対し、MP細胞はX^{-} Y^{+}、X^{+} Y^{+}、X^{+} Y^{-}、X^{-} Y^{-}（全てZ^{lo}）の4細胞集団に分類されることが分かった。すなわち、MP細胞の鑑別マーカーとしてX, Y, Zが同定された。

現在は、上記の知見をもとに、MP細胞に含まれる4分画の意義の解明、TCR repertoireの解析、ヒトMP細胞の同定等を施行中である。

2. MP細胞サブセットの分化・活性化機構

我々は、MP細胞の不均質性（Heterogeneity）を解析する目的で、T-bet/RORγt/Foxp3レポーターマウス由来のMP細胞のscRNAseqならびにフローサイトメトリー解析を行ったところ、定常状態下においてMP細胞がT-bet^{+} MP1, RORγt^{+} MP17, T-bet^{-} RORγt^{-} MP0等の多彩なサブセットから構成されることが明らかになった（**図2a, b**）。特にMP1細胞はT-bet^{hi} CXCR3^{+}の極めて高度な分化状態を呈しており、そうした分画がMP細胞のうち約半数を占めることが分かった（**図3a**）。

そこで我々は、MP1分画の恒常的分化機構を解析した。その結果、定常状態下においてMP1分化は1型樹状細胞（DC1）由来のIL-12に依存して起こることが示された（**図3a**）。この恒常的IL-12はDC1においてMyD88およびCD40シグナル依存的に産生され、さらに、一切の外来抗原・アゴニストを欠損するAntigen-freeマウスにおいても等しく生成されることが証明された（**図3b, c, d**）。これらの事実より、IL-12の恒常的産生ひいてはMP1分化は自己認識により惹起・増幅されるものと考えられた。

さらに、MP1細胞のエフェクター機能を詳細に解析したところ、トキソプラズマ感染時、同細胞はTCRシグナル非存在下においてもIL-12/18に反応してIFN-γを産生することが明らかになった。さらに、免疫不全マウスにMP1細胞を移入したうえで同マウスを*T. gondii*感染に供し、さらに抗原認識を抗体投与によりブロックしたうえで生存解析を施行したところ、同細胞移入は生

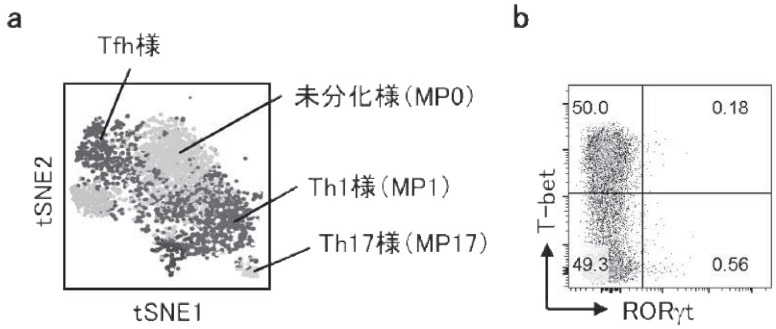


図２　MP細胞のHeterogeneity
(a) MP細胞をscRNAseq, tSNE解析に供した。
(b) T-bet/RORγt/Foxp3レポーターマウス由来のMP細胞におけるT-bet, RORγtの発現。

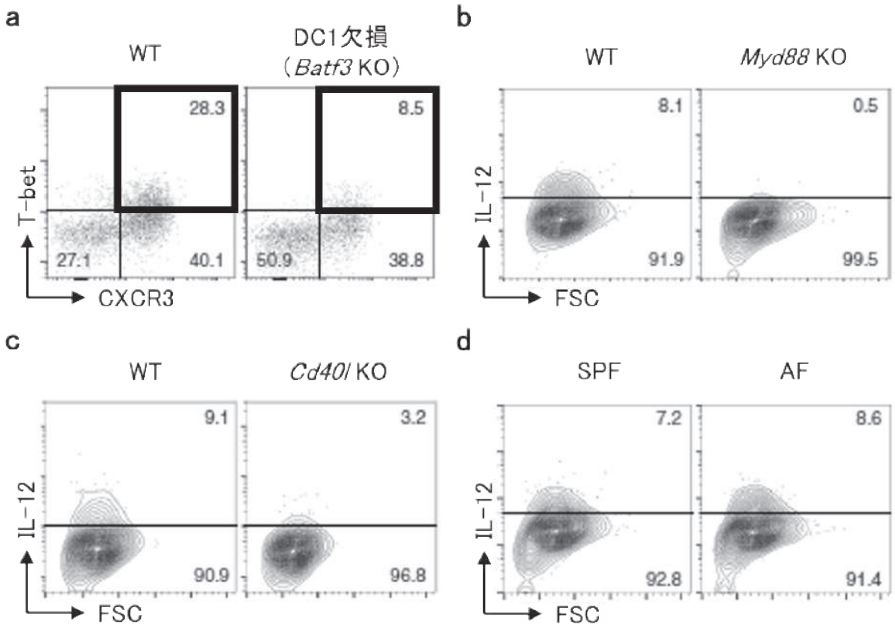


図３　MP１サブセットの定常的分化機構
(a)WTおよび*Batf3* KOマウスのMP細胞におけるT-bet, CXCR3の発現。太枠はMP１分画を示す。
(b,c,d)WT, *Myd88* KO, *Cd40l* KO, Antigen-free（AF）マウスのDC１細胞におけるIL-12の恒常的発現。

存期間を有意に延長することが分かった。以上より、MP1サブセットは自然免疫的感染防御機能を有することが証明された。

現在、MP細胞に含まれる他のサブセットであるMP0やMP17に関しても同様に、その分化・活性化機構を解析中である。

3. 自己免疫・炎症性疾患におけるMP細胞の機能

Rag2 KOマウスにナイーブ$CD4^+$ T細胞を移入すると、激烈な腸炎を発症する[3)]。そこで我々は、MP1細胞を*Rag2* KOマウスに移入したところ、腸炎は軽快した一方、数週間の経過を経て全身性の炎症（大腸炎、間質性肺炎、胆管炎、胃炎、腎炎、卵巣炎など）が惹起されることが明らかになった。同炎症はTh1優位であり、また制御性T細胞の共移入によって抑制されることも分かった。現在、MP細胞依存的炎症における詳細な分子メカニズムを解析中である。

【考察】

上記の一連の研究により、定常状態におけるMP1細胞の分化機構や自然免疫的感染防御機能が証明されつつある。このことから、MP2/17に関しても同様にそれぞれ固有の分化機構や感染防御機能の存在が示唆され、現在、MP細胞の分化機構・エフェクター機能を包括的に解明するプロジェクトが鋭意進行中である。今後、MP細胞の分化機構の全容が明らかになれば、同細胞を人為的に活性化することにより、病原体の特異性によらず幅広い感染症に対応する新規「免疫賦活化治療」の創出にも資するものと期待される。

一方で我々は、MP細胞が全身性炎症を惹起する潜在性を有することを示唆する所見を得た。この知見は、MP細胞が自己免疫疾患の本質的病因であるとの我々の従来からの仮説[4,5)]を強く支持している。今後、MP細胞による全身性炎症惹起メカニズムを分子レベルで明らかにし、さらに制

御性T細胞による抑制機構を解析することにより、T細胞の恒常性維持機構の全容解明につながることが期待される。

【謝辞】

貴研究所からの研究助成により本研究をここまで展開することができました。心より御礼申し上げます。

【発表に関する事項】

1. Kawabe T, Yi J, Kawajiri A, Hilligan K, et al.: IL-12 derived from type 1 dendritic cells tonically promotes the differentiation of innate T-bet^{high} memory-phenotype CD4^{+} T lymphocytes in steady state. The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. (Nara)
2. Kawajiri A, Ishii M, Li J, et al.: Inflammatory potential of self-driven memory-phenotype CD4^{+} T cells. The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. (Nara)

【文献】

1. Kawabe T, Jankovic D, Kawabe S, et al.: Memory-phenotype CD4^{+} T cells spontaneously generated under steady-state conditions exert innate TH1-like effector function. Sci Immunol 2: eaam9304, 2017
2. Kawabe T, Zhu J, Sher A: Foreign antigen-independent memory-phenotype CD4^{+} T cells: a new player in innate immunity? Nat Rev Immunol 18:1, 2018
3. Kawabe T, Yi J, Sprent J: Homeostasis of naïve and memory T lymphocytes. Cold Spring Harb Perspect Biol 13:a037879, 2021
4. Kawabe T, Sher A: Memory-phenotype CD4^{+} T cells: a naturally arising T lymphocyte population possessing innate immune function. Int Immunol, *In press*
5. Yi J, Kawabe T, Sprent J: New insights on T-cell self-tolerance. Curr Opin Immunol 63:14-20, 2020

（10）感染症

Helicobacter cinaedi（ヘリコバクター・シネディ）感染症に関する疫学研究

荒岡　秀樹、馬場　勝、遠藤　勇祐

【要約】

*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。菌血症を契機に虎の門病院で診断された55患者から得られた85株についてMIC値を測定し、あわせて投与された抗菌薬の臨床効果について検討した。

主要抗菌薬のMIC50とMIC90は以下の通りであった。アンピシリン（MIC50: 16 μg/mL, MIC90: 32 μg/mL）、アモキシシリン（4 μg/mL, 8 μg/mL）、ピペラシリン（8 μg/mL, 8 μg/mL）、セフトリアキソン（4 μg/mL, 8 μg/mL）、セフェピム（8 μg/mL, 16 μg/mL）、メロペネム（0.12 μg/mL, 0.12 μg/mL）、カナマイシン（1 μg/mL, 2 μg/mL）、テトラサイクリン（0.12 μg/mL, 0.5 μg/mL）、レボフロキサシン（8 μg/mL, >64 μg/mL）。

55患者中、全身抗菌薬投与のみで治療された43患者について治療効果を検討した。12患者で菌血症が再発していた。キノロン系薬が投与されていた症例において菌血症再発が多い傾向が見られた。

今後、データベースを蓄積している168患者から得られた菌株について解析を進め、最適な抗菌薬治療の確立を目指す。

【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MSM（Men who have sex with men）における直腸炎の原因菌として初めて報告された。*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[1)]。*H. cinaedi*は注目されはじめた新興感染症の1つとして位置づけられる細菌である。しかしながら、薬剤感受性測定と実際の臨床効果について検討した研究は未だなく、治療法の確立が急務である。

本研究の目的は、血液培養から検出した*H. cinaedi*ヒト臨床分離株の薬剤感受性を測定し、実際に投与された抗菌薬とその臨床効果との相関を明らかにすることである。これによって、*H. cinaedi*菌血症・感染症の治療法の確立を目指す。

【方法】

2009年3月から2018年12月までに、虎の門病院本院、虎の門病院分院で血液培養から*H. cinaedi* を検出した症例を対象とした。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。同定のgold standardはgyrB-targeted PCR [2, 3)]（195 bp; forward primer: 5'-AGGGATTCCACAAAGTGAGC-3'; reverse primer: 5'-TCTTGTCCTGTGCGTTCATC-3'）とした。

研究期間中診断された168患者から得られた253菌株（菌血症の再燃があるため、同一患者から複数菌株が得られることがある）を解析対象として、検討を順次開始した。本研究は、施設内の倫理委員会の承認を得て、愛知学院大学薬学部微生物学講座との共同研究として行っている。

1. 薬剤感受性の測定

薬剤感受性を測定する薬剤として、ペニシリン系（アンピシリン、アモキシシリン、カルベニシ

リン、ピペラシリン、ピペラシリン・タゾバクタム)、セフェム系（セフトリアキソン、セフェピム)、カルバペネム系（イミペネム、メロペネム)、アミノグリコシド系（ゲンタマイシン、カナマイシン)、テトラサイクリン系（テトラサイクリン)、マクロライド系（エリスロマイシン)、キノロン系（シプロフロキサシン、レボフロキサシン、モキシフロキサシン)、メトロニダゾール、クロラムフェニコールを選択した。

これらの薬剤について、最小発育阻止濃度(MIC値）を測定した。MIC値の測定は、改良レビンタール培地を用いた微量液体希釈法にて、3日間微好気環境で培養後に判定した。

2. 治療効果の検証

対象患者について、過去のカルテデータから投与された抗菌薬と臨床効果を解析し、その相関を検討した。本菌による菌血症の再発を治療失敗と定義し、再発あり群と再発なし群にわけて、その治療効果を比較検討した。

【結果】

現時点で、55患者、85株についてMIC値を測定し、臨床効果について検討した。各抗菌薬のMIC50とMIC90は以下の通りであった。アンピシリン（MIC50: 16μg/mL, MIC90: 32μg/mL)、アモキシシリン(4μg/mL, 8μg/mL)、ピペラシリン(8μg/mL, 8μg/mL)、セフトリアキソン（4μg/mL, 8μg/mL)、セフェピム（8μg/mL, 16μg/mL)、イミペネム（0.06μg/mL, 0.06μg/mL)、メロペネム(0.12μg/mL, 0.12μg/mL)、ゲンタマイシン（0.25μg/mL, 0.5μg/mL)、カナマイシン（1μg/mL, 2μg/mL)、テトラサイクリン（0.12μg/mL, 0.5μg/mL)、エリスロマイシン（32μg/mL, 32μg/mL)、シプロフロキサシン（32μg/mL, >64μg/mL)、レボフロキサシン（8μg/mL, >64μg/mL)。

55患者中、全身抗菌薬投与のみで治療された43患者について治療効果を検討した。12患者(28%)で菌血症が再発し、治療失敗と判断された。

キノロン系薬（レボフロキサシン）のみで治療されていた3例中2例（67%）は治療失敗となり、そのMIC値は8μg/mL、64μg/mL、64μg/mLと高値であった。また、キノロン系薬と他のβラクタム薬で治療（同時期に併用ではなく、スイッチして投与)した5例中においても2例(40%)が治療失敗していた。

ペニシリン系薬のみで治療されていた9例においては2例（22%）が治療失敗しており、そのMIC値にはばらつきが見られた。

【考察】

今回の研究は、自施設の薬剤感受性データを明らかにし、治療効果との相関を研究する世界初の試みである。解析途中であり、対象の症例数が少ないため、最終結論には至らなかったが、以下の中間解析結果を得た。

1. 薬剤感受性

既報[4]と同様に、キノロン系薬やマクロライド系薬には耐性傾向が強い菌株が多かった。また、カルバペネム系薬やアミノグリコシド系薬、テトラサイクリン系薬は低いMIC値を示し、ペニシリン系薬やセフェム系薬は中間のMIC値を示した。

2. 治療効果の検証

キノロン系薬での治療は、治療失敗につながる可能性が示唆された。βラクタム薬間での比較は困難であった。

次年度、本研究をさらに推進し、計168患者のMIC値測定と治療効果の検証を行う予定である。最適な抗菌薬選択の確立を目指す。併せて、菌株の相同性の検証を多方面から行い、また当院での患者の動きと照合し、市中感染や院内感染の評価を行う。

【文献】

1. Araoka H, Baba M, Kimura M, et al.: 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. Araoka H, Baba M, Okada C, et al.: 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
3. Minauchi K, Takahashi S, Sakai T, et al.: The nosocomial transmission of *Helico-*

bacter cinaedi infections in immunocompromised patients. Intern Med 49: 1733-1739, 2010
4. Kawamura Y, Tomida J, Morita Y, et al.: Clinical and bacteriological characteristics of Helicobacter cinaedi infection. J Infect Chemother 20: 517-526, 2014

2光子生体イメージングで解明するCOVID-19の病態メカニズム

植木　紘史
東京大学医科学研究所ウイルス感染部門
国立国際医療研究センター呼吸器系ウイルス感染症研究部

【要約】

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染症（COVID-19）は時として致死性の肺組織障害を引き起こす急性呼吸器感染症である。COVID-19重症例の肺では大量の免疫細胞の浸潤が認められ、病態の増悪に関与することが示唆されているが詳細は不明である。SARS-CoV-2の感染部位における炎症進展ならびに組織障害のメカニズムを解明するためには、感染から重症化に至るまでの感染個体の体内で起きている様々な生理学的事象を可視化して解析する必要がある。我々はこれまでに、2光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングシステムを開発したことで感染動物の肺を高解像度で観察し定量化解析が可能な実験系を確立してきた。本研究では生体イメージングシステムを用いて、SARS-CoV-2感受性動物であるヒトアンジオテンシン変換酵素2発現トランスジェニックマウスの肺を細胞レベルで可視化して解析することによりSARS-CoV-2の病原性発現メカニズムの一端を明らかとした。

【目的】

2019年末に発生した新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染症（COVID-19）の世界的流行が続いている。COVID-19症例の多くは、発熱、咳、鼻汁、咽頭熱などの軽い呼吸器症状でおさまるが、高齢者や基礎疾患を有する者などは重度のウイルス性肺炎を併発して重症化し、死に至ることも少なくない。重篤なウイルス性肺炎を呈した患者には呼吸器症状や全身症状に応じた対処療法が行われるが、有効な治療法は確立していない。COVID-19重症例の肺では大量の免疫細胞の浸潤が認められ[1)]、病態の増悪に寄与することが示唆されているが詳細は不明であり、COVID-19の病態解明は喫緊の課題である。SARS-CoV-2の感染部位における炎症進展ならびに組織障害のメカニズムは、感染から重症化に至るまでの感染個体の体内で起きている様々な生理学的事象を可視化して解析することにより解明に繋がると考えられる。我々はこれまでに、2光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングシステムを開発したことで感染動物の肺を高解像度で観察し定量化解析が可能な実験系を確立してきた[2, 3)]。本研究では、SARS-CoV-2感染肺における免疫細胞の役割について、生体肺イメージングシステムを用いて解析し、COVID-19肺炎の病態を解明することを目指した。

【方法】

本研究ではSARS-CoV-2に高い感受性を示す実験動物用ハムスター（Syrian hamster）あるいはヒトアンジオテンシン変換酵素2（hACE2）発現トランスジェニック（Tg）マウスに蛍光レポーターSARS-CoV-2を感染させ生体イメージング解析に供した。蛍光レポーターSARS-CoV-2は感染細胞において蛍光タンパク質Venusを発現するため感染細胞を蛍光標識することが可能である。蛍光Dextran、蛍光標識抗Ly-6G抗体ならびに抗CD41抗体を経静脈的に投与して肺の血流と免疫細胞の一種である好中球ならびに血小板を可視化した。感染ハムスターならびにhACE2 Tgマウスは麻酔下で管理し人工呼吸器で補助しながら開胸し、露出させた肺を肺吸引保定器で保持した。感染肺の病態生理学的な変化を蛍光顕微鏡を用いてタイムラプス像として撮影し、画像解析ソフトを用いて定量化解析を行った。

【結果】

蛍光レポーターSARS-CoV-2に感染したhACE2 Tgマウスの肺を観察すると、Venus陽性のⅠ型肺胞上皮細胞とⅡ型肺胞上皮細胞が観察

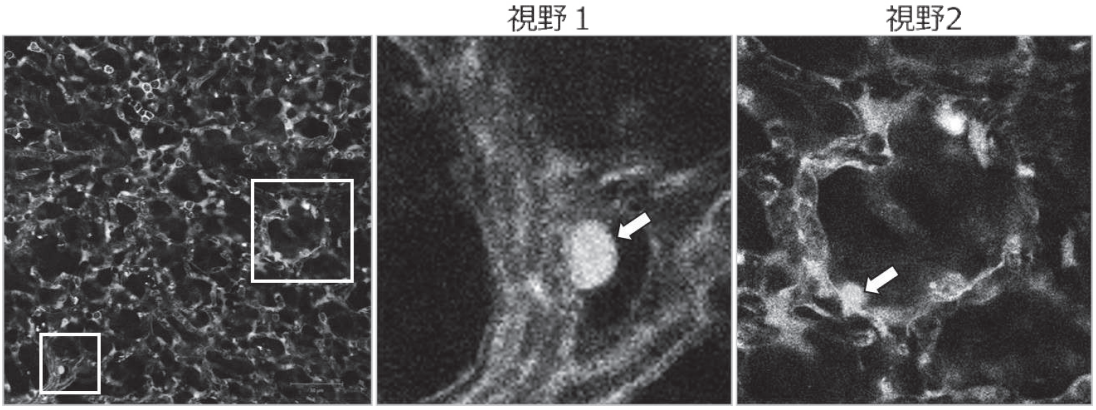


図 1　SARS-CoV-2感染肺の生体イメージング

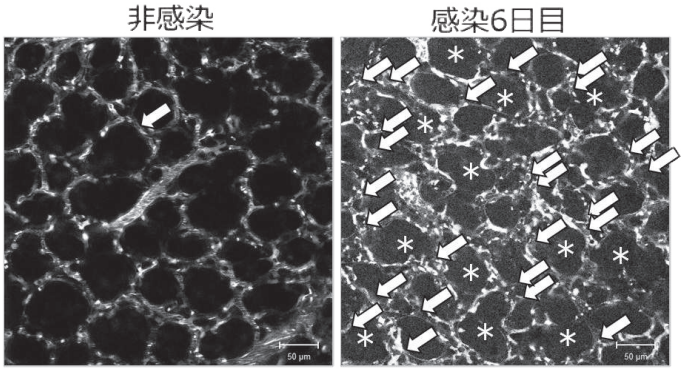


図 2　SARS-CoV-2感染肺における血管透過性ならびに好中球の挙動

され、これらの肺胞上皮細胞種がSARS-CoV-2に感染することが示された（**図1**矢印）。一方で、蛍光レポーターSARS-CoV-2に感染したハムスターの肺では顕微鏡観察視野においては感染細胞ならびに特徴的な病変は観察されなかった。ハムスターではhACE2 Tgマウスと比べて病態の進行が緩やかであるため、顕微鏡での観察が可能な肺胞領域までSARS-CoV-2感染が広がらなかったためと考えられる。以降の病態学的な解析はhACE2 Tgマウスを用いて実施した。蛍光標識DextranをhACE2 Tgマウスの血管内に投与すると血流が可視化され、Dextranの分子量を選択することで血管の透過性を評価することが可能である[3)]。血中アルブミン（66k Da）とほぼ同程度の分子量の蛍光標識Dextran（70k Da）を投与すると、蛍光レポーターSARS-CoV-2に感染したhACE2 Tgマウスの肺ではDextranの肺胞腔への漏出が認められた（**図2＊**印）。一方、非感染マウスでは肺毛細血管からの蛍光標識Dextranの漏出は認められなかった。また、SARS-CoV-2に感染したhACE2 Tgマウスの肺では、肺毛細血管中の好中球の数が感染経過に従って増加し、その移動速度が低下することが示された（**図1**矢印）。さらに、SARS-CoV-2感染肺において好中球は血小板との複合体からなる微小血栓様の凝集塊を形成することが明らかとなった（**図3**血小板:矢頭、好中球:矢印）。

【考察】

本研究では生体イメージング法を用いてSARS-CoV-2感染肺における血流や遊走する好中球の挙動を捉えることに成功した。SARS-CoV-2感染肺では肺胞腔への血液の漏出が起き

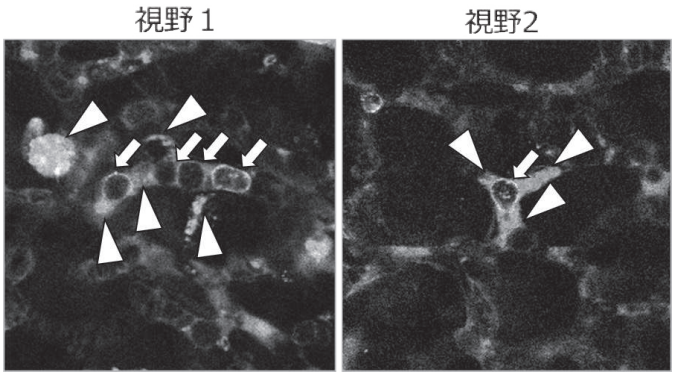


図３　SARS-CoV-２感染肺における好中球と血小板の複合体

ていることが明らかとなり、SARS-CoV-2の感染により血管内皮細胞の損傷や細胞間接着の減弱が生じることで肺毛細血管の透過性が大きく亢進していることが示唆された。さらに、タイムラプス像で撮影したSARS-CoV-2感染肺では肺毛細血管中の好中球の数が増加し、その移動速度が低下することが明らかとなった。SARS-CoV-2感染肺における好中球の運動性の変化は、細胞膜表面に発現するインテグリンやセレクチンといった接着因子の発現変化に起因すると考えられる[4-6]。COVID-19肺炎における肺毛細血管中の好中球の増加や、血小板との複合体形成による微小血栓が肺塞栓の原因となり病態の増悪に寄与している可能性が明らかとなった。生体イメージング法を用いて感染微小環境を高解像度で観察することで従来の組織学的な解析では見出すことのできなかったSARS-CoV-2感染における免疫細胞応答の一端が明らかとなった。

【文献】

1. Liao M, et al.: Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. Nat Med 26:842-844, 2020
2. Ueki H, et al.: In vivo imaging of the pathophysiological changes and neutrophil dynamics in influenza virus-infected mouse lungs. Proc Natl Acad Sci USA 115:E6622-E6629, 2018
3. Ueki H, Wang IH, Zhao D, Gunzer M, Kawaoka Y: Multicolor two-photon imaging of in vivo cellular pathophysiology upon influenza virus infection using the two-photon IMPRESS. Nature protocols 15:1044-1065, 2020
4. Yipp BG, et al.: The lung is a host defense niche for immediate neutrophil-mediated vascular protection. Science Immunology 2:eaam 8929, 2017
5. Phillipson M, et al.: Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. J exp Med 203:2569-2575, 2006
6. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S: Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat Rev. Immunol 7:678-689, 2007

（11）高齢者・認知症疾患

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２

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】

アルツハイマー型認知症（AD）の髄液のエクソソーム蛋白質の網羅的解析を行いExoCが診断バイオマーカーとして有用であった。

【背景】

ADはアミロイドβ蛋白質（Aβ）とリン酸化タウ蛋白質（pTau）の神経毒性で発症する。2010年、米国国立加齢研究所／米国AD協会は全経過をPreclinical AD, MCI due to AD, AD dementiaに分類し2018年には症状に関係なくA（Aβ）T（pTau）N（総Tau）によるATN分類を提唱した。AD脳ではAβ, pTauが伝播し機序不明とされ、細胞外小胞エクソソーム（Exo）はAβ, tauを含み伝播に関わるがAD Exo診断マーカーは樹立されてない。

【目的】

正常、MCI, ADと診断した患者の髄液／血液ExoからAD病態修飾分子を同定しバイオマーカーを決定する。同時に発症時に変化する臨床的診断マーカー（骨格筋量、インスリン抵抗性、嗅覚能）を同定する。

【方法】

2017/7月から2018/6月に外来受診し同意を得た患者60人をNIAAA診断基準でAD, MCI, 正常の3群に分け①WMSR, MMSEなど高次脳機能検査、嗅覚検査、骨格筋量、HOMA-Rを測定した。髄液／血漿を採取しELISAで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。髄液からEV Second L70カラムでExoを単離しトリプシン消化後、LC/MS解析し蛋白質同定／定量解析しプロファイル解析で候補蛋白を挙げた。別検体で検証実験としAD30例、MCI13例、正常37例、計80例の髄液と血漿のExoを超遠心法で検出し候補Exo蛋白のELISAで実存を確認し、AD疾患特異性を検討した。一方、上記外来患者60人（平均年齢71.8±7.3）の高次脳機能検査と嗅覚能を評価しAβ42, pTau, tTauとの相関を調べた。

【結果】

髄液Aβ42 535pg/ml, pTau 81.0pg/ml、総Tau 790pg/mlをCut off値と定めATN分類を行いA+T+N+が4、A+T-N-が4、A+T-N-が3、A+T-N-が1、A-T-N-が4、A-T+N+の4検体に分類した。Pilot studyで20検体の髄液Exoを分離しLC/MS解析を行い1,756種のExo蛋白質を同定した。1）ADで1.5倍以上増加した蛋白、2）ADで0.75倍以下に減少した蛋白、3）ADのみの検出蛋白、4）健常のみ検出蛋白の4群を候補としA+T+N+とA-T-N-で有意差がある50種、A+T+N+のみで検出された21種、A-T-N-のみの4種の計75種を候補蛋白質とした。統計学的、既報告からB, R, C, Pに絞り込み、検証実験として別検体を含むA+T+N+11例、A+T-N+7例、A+T-N- 12例、A-T+N+10例、A-T-N-30例、A-T-N+10例の髄液と血漿のExoからもB, R, C, Pが各蛋白質のELISAキットで検出された。Exo Cのみが髄液と血漿で髄液Aβ42と相関した。臨床的バイオマーカー嗅覚能の解析は既報の通りで

ある。

【考察】

ExoCがAD診断バイオマーカーとして有用と考えられた。

【発表に関する事項】

1. 井桁之総、逸見功、今井昌康、他: 高次脳機能検査と髄液マーカーの相関からみたアルツハイマー型認知症嗅覚診断マーカー. Dementia Japan 33: 145, 2019
2. 井桁之総、逸見功、今井昌康、他: アルツハイマー型認知症の診断において嗅覚能は髄液Aβ42低下の代用になり得る. Dementia Japan 34: 136, 2020
3. 井桁之総:アルツハイマー病. 味と匂いのニューロサイエンス. CLINICAL NEUROSCIENCE 39:228-231, 2021

（12）神経内科疾患

神経変性における細胞間相互作用制御によるalpha-synuclein蓄積の抑制

矢澤　生
常葉大学保健医療学部

【要約】

神経変性疾患では、alpha-synucleinが様々な蓄積様式を示すことにより神経変性が起こる。パーキンソン症候群を示す多系統萎縮症（MSA）では、中枢神経系のオリゴデンドロサイトと神経細胞にalpha-synucleinが蓄積する。MSAでは孤発性に発病することが多く、神経変性に対する根本的な治療方法の開発が遅れている。本研究では、MSAのモデル動物を活用して、MSAの病態機序を明らかにして治療法開発を目指す。病理解剖組織所見から明らかになった神経変性の特徴から、オリゴデンドロサイトの病的な役割に着目し、モデルマウスの脳初代培養系によりalpha-synuclein蓄積の抑制を検討した。

【背景】

alpha-synucleinの蓄積が原因となり発病する神経変性疾患には、中脳黒質の神経細胞などに蓄積するパーキンソン病、そして中枢神経系オリゴデンドロサイトなどに蓄積する多系統萎縮症（MSA）などの疾患がある。同じタンパク質の蓄積が原因となり発病するが、病理解剖の所見では明らかに神経変性の所見が異なり、異なる神経変性の様式が推定される。実際に、MSAの組織所見ではパーキンソン病の黒質神経細胞に出現するレビー小体は出現せずに、alpha-synucleinが蓄積したオリゴデンドロサイトの周辺の神経細胞の変性がおこる。また、臨床的にもMSAではパーキンソン病に類似する神経症候（パーキンソン症候群）を呈するが、抗パーキンソン病薬は無効である。本研究では、異なる神経変性の機序の検討を行い、神経変性のモデル動物により新たな治療法開発を検討した。過去の研究では、MSAの病理解剖所見では、特徴であるグリア細胞封入体（GCI）はalpha-synucleinの蓄積が関わることから、マウス脳においてヒト野生型alpha-synucleinを特定のグリア細胞（オリゴデンドロサイト）に発現することにより、二次性に神経細胞が脱落する神経変性動物モデルを開発した[1)]。さらに、動物モデルとその脳組織細胞による初代培養細胞により、モデルマウス中枢神経において神経細胞に内因性マウスalpha-synucleinの蓄積を認めた。したがって、オリゴデンドロサイトで強制発現されたヒトalpha-synuclein蓄積が、二次的に神経細胞内の内因性マウスalpha-synucleinの蓄積が誘導される神経変性モデルであることを示した[2)]。さらに、①神経細胞内では内因性alpha-synucleinの蓄積が起こり微小管関連タンパク質と結合する[2)]、②二次性の神経細胞の内因性alpha-synuclein発現上昇の誘導には、神経外のオリゴデンドロサイトから発する分子シグナルか関与する[3)]、③alpha-synuclein蓄積誘導分子シグナルはオリゴデンドロサイトが成熟の過程で分泌される、等の知見が得られた。これらをヒト病理組織で検証し、初代培養細胞やマウス個体を用いてalpha-synuclein抑制の方法について検討した。alpha-synuclein抑制を誘導する化合物については民間企業との共同研究を実施してリード化合物の探索を進めている。

【方法】

MSAの病理解剖所見ではalpha-synucleinはオリゴデンドロサイトおよび神経細胞に蓄積して神経変性を起こすが、alpha-synucleinがオリゴデンドロサイトに蓄積すると、近くの神経細胞にalpha-synucleinの蓄積が軸索突起に誘導されて神経細胞の脱落が起こることが観察された。故に、中枢神経のオリゴデンドロサイトに特異的にヒ

ト野生型alpha-synucleinを発現する遺伝子改変マウスを作製して、MSAのモデルとして「CNP-Synマウス」を報告した[1)]。CNPはオリゴデンドロサイト単独に存在するたんぱく質であり、本研究ではヒト野生型alpha-synuclein遺伝子の前に接続して、発現するプロモーターとして使用した[1)]。オリゴデンドロサイトに発現したalpha-synucleinは、CNP-Synマウスの中枢神経において脳萎縮、さらにマウスの運動機能の低下を起こす表現型をとる。さらに、組織学的に神経細胞脱落がマウス中枢神経の大脳皮質、大脳基底核、脊髄中間外側核などに起こり、この神経変性所見と分布は多系統萎縮症の患者に認める所見に類似した。

【結果】

MSAモデルマウスの初代培養によって、オリゴデンドロサイトのalpha-synuclein蓄積の抑制に関する検討を行った。初代培養細胞モデルでは、オリゴデンドロサイトの分化が神経細胞のalpha-synuclein蓄積に関与し、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増加によりalpha-synuclein蓄積抑制の効果があることを示した。さらに、オリゴデンドロサイトの分化に影響する化合物および細胞移植法を用いて、細胞モデルや動物個体モデルの治療を試みる。

【考察】

MSAでは有効な治療法が確立していないが、今後、動物・細胞モデルによって新しい治療のアプローチが開発される可能性がある。このためにはMSAのヒト中枢神経系に起こる神経変性の病態を正確に把握して、動物モデルに反映させて動物実験を行う必要がある。また、ヒトの神経変性には10年単位の長期の変性過程が想定されるために、実験動物ではその寿命を考慮し、トリガー、発症、神経変性の進行などの各過程ごとの解析が求められる。

【文献】

1. Yazawa I, et al.: Mouse model of multiple system atrophy: alpha-synuclein expression in oligodendrocytes causes glial and neuronal degeneration. Neuron 45: 847-859, 2005
2. Nakayama K, Suzuki Y, Yazawa I: Microtubule depolymerization suppresses alpha-synuclein accumulation in a mouse model of multiple system atrophy. Am J Path 174: 1471-1480, 2009
3. Suzuki Y, Jin C, Yazawa I: Cystatin C triggers neuronal degeneration in a model of multiple system atrophy. Am J Path 184: 790-799, 2014