

1. 2024年度 研究成果

A 研究助成者による研究

(1) 血液疾患

非寛解期骨髓系腫瘍に対する強度減弱前処置FBMTを用いた臍帯血移植の解析

高木 伸介、内田 直之

【背景・目的】

高齢者や併存症を有する患者の造血器疾患に対して同種造血細胞移植を行う場合の至適な移植前処置は確立されていない。虎の門病院血液内科では強度減弱前処置FBMTを開発し主に臍帯血移植に用いており、その治療成績を明らかにする。また、移植前処置にFBMTを用いた臍帯血移植後に高頻度に類洞閉塞症候群（Sinusoidal obstructive syndrome, SOS）が経験されることが分かってきた。本研究では類洞閉塞症候群のバイオマーカーの開発も目指した。

【方法】

2018年7月から2022年12月に当院で臍帯血移植を行った症例のうち、Fludarabine 180 mg/m², Busulfan 3.2 or 6.4 mg/m², Melphalan 80mg/m², Total body irradiation 4Gyで構成された強度減弱前処置FBMTを非寛解期骨髓系腫瘍に対して用いた初回移植症例を抽出して解析した。前処置開始前のECOG PSが3以上の症例は除外した。

【結果】

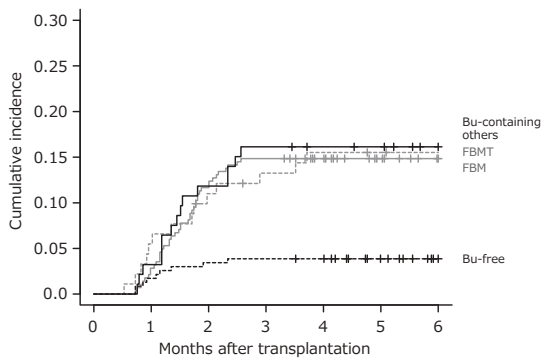
55症例が抽出された。年齢中央値は67歳（範囲、41-77）、男女比28:27、ECOG PS 1が35例、2が20例だった。造血器疾患は以下の通りだった。AML-MRC 24例、MDS 8例、AML-NOS 7例、治療関連骨髓腫瘍7例、Ph陰性骨髓

増殖性腫瘍7例、慢性骨髓性白血病1例、慢性骨髓単球性白血病1例。1例を除き全例でBusulfan 6.4 mg/m²を用いていた。11例でAraC持続静注を併用していた。全身放射線照射は臓器遮蔽を伴わない従来型の照射が11例、臓器遮蔽を伴わないTomoTherapyが39例、肝臓遮蔽したTomoTherapyが5例だった。移植後60日での好中球生着率は96.4%（95%信頼区間、86.2-99.1）、好中球生着中央日は18日目（範囲、11-56）だった。移植後1年での血小板生着率は69.4%（95%信頼区間、55.3-79.9）、血小板生着中央日は77日目（範囲、33-280）だった。移植後2年での全生存率は47.0%（95%信頼区間、27.1-56.7）、生存期間中央値は1.45年だった。移植後2年での無再発生存率は45.0%（95%信頼区間、31.6-57.6）、無再発生存期間中央値は0.88年だった。移植後2年での非再発死亡率は29.4%（95%信頼区間、18.0-41.7）だった。累積再発率は25.6%（95%信頼区間、15.0-37.6）だった。非再発死亡の内訳は以下の通りだった。感染症4例（腸球菌1例、アスペルギルス1例、アデノウイルス2例）、肺合併症2例（特発性肺炎症候群2例）、肝臓合併症5例（類洞閉塞症候群、sinusoidal obstructive syndrome, SOS 5例）、中枢神経合併症3例（脳出血1例、白質脳症1例、不明1例）、GVHD 2例（消化管1例、腎

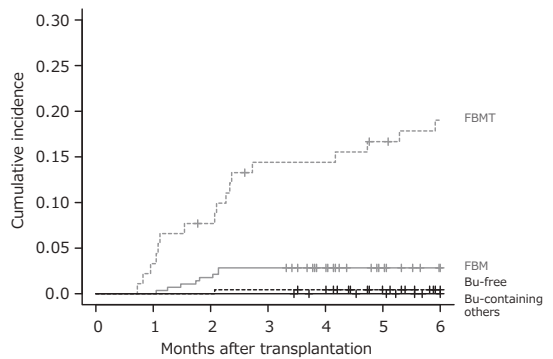
臓1例)。非再発死亡の中では肝臓合併症が最も多く、5例ともSOSだった。そこでSOSに着目して解析した。移植後1年でのSOSの累積発症率50.2% (95%信頼区間、38.2-65.2) だった。内訳はclassical SOS 7.7%, late onset SOS 92.3% (黄疸性34.6%、非黄疸性57.7%) だった。移植前処置FBMTを用いた臍帯血移植後に高頻度にSOS

が経験されることは、本研究の対象コホートを含む別の解析で証明し公表した (Figure 1)¹⁾。

SOSのバイオマーカー開発を目指しさらに解析を進めた。臍帯血移植を受けた118人の患者(中央値年齢61歳、範囲23~77歳)を後ろ向きに解析し、血清ヒアルロン酸 (HA) 値が様々なサブタイプにおけるSOSの予測因子としての有用性



The cumulative incidence of icteric late-onset SOS at 6 months was 15.5% (95% CI, 9.0-23.7) for the FBMT regimen, 14.8% (95% CI, 11.0-19.2) for the FBM regimen, 16.1% (95% CI, 9.5-24.3) for other Bu-containing regimens, and 3.9% (95% CI, 1.9-6.9) for the Bu-free regimens ($p < 0.001$).



The cumulative incidence of anicteric late-onset SOS at 6 months was 19.0% (95% CI, 11.7-27.7) for the FBMT regimen, 2.8% (95% CI, 1.3-5.3) for the FBM regimen, 0.0% (95% CI, 0.0-2.2) for the Bu-free regimens, and 0.4% (95% CI, 0.0-2.2) for the Bu-containing others ($p < 1 \times 10^{-15}$).

Figure 1 The cumulative incidence of late-onset SOS, by the pre-transplant conditioning regimen (Left panel, icteric late-onset SOS; Right panel, anicteric late-onset SOS)

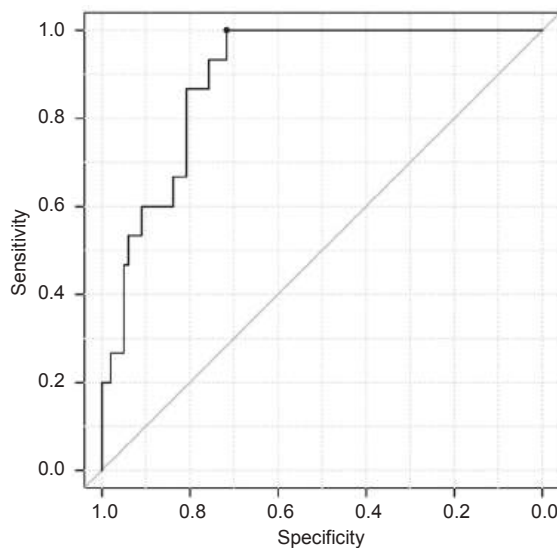


Figure 2 ROC curve for classical SOS

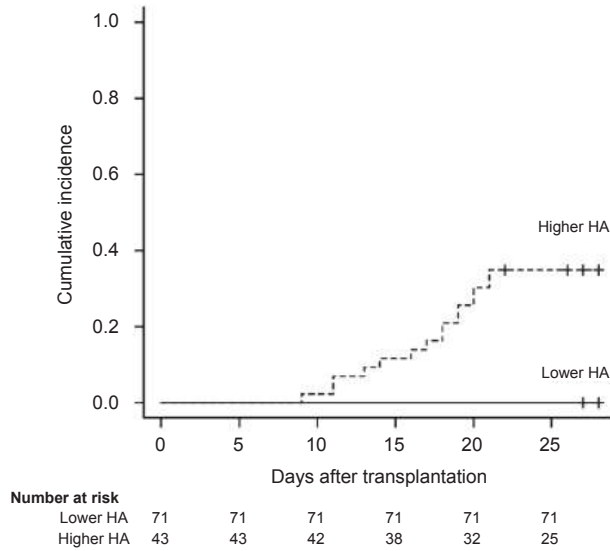


Figure 3 The cumulative incidence of classical SOS when divided by serum HA value threshold at day 9 post-transplant

を評価した。HAレベルは移植後に少なくとも2回測定された。SOSを発症した55人の患者のサブタイプには、古典的SOS (n = 16)、黄疸性遅発性SOS (n = 10)、および非黄疸性遅発性SOS (n = 29) が含まれていた。SOS群と非SOS群間でHAレベルに有意な差が認められ (p < 0.01)、また時間経過に伴ってHAレベルに有意な変化が見られ (p < 0.01)、その差は時間とともに増大した (p = 0.09)。古典的SOSについては、移植後9日目のHAレベルが受信者動作特性曲線 (AUC) で0.89 (95% CI, 0.83-0.96) となり、閾値は433ng/mL (特異度0.80、感度1.00) だった (Figure 2, 3)。その一方で、遅発性SOSについては、9日目および21日目のHAレベルは予測能力が低いことが示された (AUCはいずれも0.68、閾値はそれぞれ264ng/mLおよび305ng/mL)。

【考察】

非寛解期骨髄系腫瘍に対する新規強度減弱前処置FBMTを用いた臍帯血移植後の全生存率は従来の報告と遜色ない結果だった。今回の解析で

は全生存率に対する影響は認めなかったが、高いSOS発症率の克服が今後の課題であることが明らかになった。またSOSバイオマーカーについては、移植後SOS発症時期によりHA動態が異なり、9日目のHAレベルが古典的SOSの強力な予測因子となる一方で、遅発性での有用性は限定的だった。Busulfanの使用が遅発性SOSの強力なリスク因子になることが分かったため¹⁾、Busulfan使用の情報とHAレベルを組み合わせることで遅発性SOSの予測が可能になるか研究を継続する。

【文献】

1. Takagi S, Watanabe O, Yamaguchi K, et al.: Busulfan conditioning and prognostic impact of jaundice in late-onset sinusoidal obstruction syndrome following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 60: 418-421, 2025. doi: 10.1038/s41409-024-02501-1

臍帯血移植を受けた患者の移植後外来における多職種介入による身体機能回復への取り組み

成田 円 内田 直之

【目的】

造血幹細胞移植後患者の多くは、いざ退院してみると身体機能の低下を実感し、求めている退院後の日常生活を送れずに自尊心の低下や社会復帰の妨げによりQOLを低下させている現状がある。当院では移植前から多職種で介入し、移植を受ける患者へ入院中から退院後の生活までの内容が網羅されている「造血幹細胞移植（同種移植）をお考えの方へ」パンフレットを用い、リハビリの重要性やその方法、栄養摂取の工夫、日常生活の過ごし方などを支援している。また、退院後の患者の日常生活を移植前の生活水準にスムーズに戻すことができるよう「移植後看護外来」を設置し、食事や運動、睡眠などの視点から相対的なサポートを行っている。本研究は、臍帯血移植後の退院後早期に身体機能を改善しQOLを高め、患者が求める移植後の生活を送ることができるための、移植後外来における看護師と理学療法士、管理栄養士等の多職種の介入による退院後早期の身体機能回復の効果を検討することを目的とした。

【方法】

前向き介入調査研究。対象は、2023年6月から2024年6月までに当院で臍帯血移植を受け、継続して外来フォローしている患者（介入群）及び2022年9月から2023年5月までに当院で臍帯血移植を受け、継続して外来フォローしている患者（対象群）とした。介入群は、退院時に移植後6ヶ月及び1年時点での活動目標を設定し、理学療法士が作成した個別のメニューを用いてリハビリを自宅で継続する。患者は、作成されたりハビリメニューの実施状況についてアプリを用いて報告する。医療者は外来時と1週間ごとに、アプリにより報告された内容を確認し、家でのリハビリが継続できるようにプラスのフィードバックを意識し、必要回数を取り組むことができるように支援

する。また、患者は評価日より1週間前からの任意の3日間の食事摂取内容を写真に撮影し報告する。管理栄養士は、食事内容等により栄養評価を行い、個別の支援内容を書面にて提案する。それぞれの評価は、移植後6ヶ月、1年時に行い、結果を踏まえて目標の達成度について患者と振り返り、新たな目標やリハビリ・栄養プランを共有する。対象群は、多職種の介入はなく移植後6ヶ月もしくは1年時の外来にて、評価項目を調査する。リハビリ評価項目は、握力、5m歩行、5回起立試験、バランス試験（閉脚、セミタンデム、タンデム、片脚）、BI、J-CHS、SPPB、日本語版BFI、Lowton IADLとした。栄養評価項目は、血液検査（ヘモグロビン、総蛋白、アルブミン、中性脂肪、コレステロール、CRP）、InBody 720[®]（体重、BMI、体脂肪率、四肢骨格筋量）、食事内容（総摂取エネルギー、総タンパク質量）とした。QOL調査は、日本語版EQ-5D-5LとFACT-BMTで行った。

【結果・考察】

介入群の登録は15名であり、再発等による研究継続不可5名を除く10名を解析対象とした。男女各5名で、年齢中央値53.4歳、移植日から退院日までの入院期間中央値は80.5日であった。対象群の登録は移植後6ヶ月4名（男2女2）であり、年齢中央値は62歳、移植日から退院日までの入院期間中央値は90.7日であった。移植後1年の対象群は8名（男5女3）であり、年齢中央値は56歳、移植日から退院日までの入院期間中央値は92日であった。両群ともに疾患は非寛解期AML(MDS含)が多かった。現在介入継続中であり、データ解析に至っていない。介入研究の限界はあるが、本研究の成果が新たな多職種での協働につながり、移植患者さんが心身ともに早期に回復する可能性を秘めている。研究結果を迅速に共有し、医

療現場での活用を促進することができるよう、解析を進める。

(2) 内分泌・代謝疾患

クッシング病における USP8 依存性シグナル伝達ネットワーク機構異常の解明

竹下 章、小迫 英尊¹、山田 正三²、西岡 宏、竹内 靖博
徳島大学先端酵素学研究所¹
森山脳神経センター病院²

【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 の過剰分泌により高コルチゾール血症を来し、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。2015 年、エクソーム解析により ACTH 産生下垂体腫瘍の約 3 分の 1 で脱ユビキチン化酵素 USP8 の体細胞変異が報告された^{1,2)}。in vitro の解析で変異体が EGFR の脱ユビキチン化を促進することから活性型変異の機序が想定されたが、我々の免疫染色の解析では変異の有無と腫瘍の EGFR 発現に関連性は認められず³⁾、USP8 の標的蛋白は未だ明らかでない。

方法: USP8 変異陽性 (MUT) と野生型 (WT) 腫瘍 3 例ずつから RNA を抽出し 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と比較した。また MUT と WT 5 例ずつから蛋白を抽出しプロテオミクス解析による蛋白発現プロファイルを比較した。両者の結果から変異の有無で遺伝子発現に有意差はないが蛋白発現が MUT で高いものを USP8 の標的蛋白候補と想定し解析を行った。

結果: プロテオーム解析では 6,953 の蛋白発現について 2 群間の比較評価可能であった。MUT で有意 ($P < 0.05$) に 2 倍以上発現が多い蛋白は 64 個で、うち DNA マイクロアレイで 2 倍以上 mRNA 発現が高い蛋白を除くと 35 個が候補として残ったが、EGFR 含め USP8 の基質として報告されている既知の蛋白はなかった。

35 個のうち synaptotagmin など ACTH のメンブレントラフィックに関連する可能性のある膜輸送制御蛋白が 5 種認められた。そのほか corticotroph に比較的特異的に発現する CRH 受容体が MUT で 3.2 倍 ($p < 0.01$) 多く発現が認められた。CRH 受容体と USP8 変異体を培養細胞に強制発現させる系を用いて機能解析を行ったが CRH 受容体が USP8 の標的蛋白とする有意な結果は得られなかった。

今後の予定: 腫瘍細胞の初代培養を用いて siRNA により USP8 mRNA をノックダウンさせることができることが確認できたため今後は USP8 のノックダウンにより変異体で特異的に発現が低下する蛋白をプロテオミクス解析とトランスクリプトーム解析により検討する予定である。また synaptotagmin や CRH 受容体のノックダウンも行って培養液中の ACTH 産生能の変化や細胞の POMC 発現等を検討予定である。

【目的】

クッシング病は下垂体腫瘍からの 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 割はマイクロ腺腫とよばれる 1 cm 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。

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)}。 *in vitro* の解析で変異体がEGFRの脱ユビキチン化を促進することから活性型変異の機序が想定されたが、我々の免疫染色の解析では変異の有無と腫瘍のEGFR発現に関連性は認められず³⁾、USP8の標的蛋白は未だ明らかでない。本研究では網羅的なトランスクリプトームとプロテオーム解析に基づいてクッシング病におけるUSP8変異の標的蛋白を同定し、クッシング病の病態生理を明らかにすることを目的とする。

【方法】

①トランスクリプトーム解析

マイクロアレイ解析はクッシング病下垂体腫瘍組織のUSP8変異陽性腫瘍 (MUT) 3例と野生型腫瘍 (WT) 3例の計6例から腫瘍の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mRNA発現プロファイルを比較した。

②プロテオーム解析

クッシング病下垂体腫瘍組織MUT 5例とWT 5例の蛋白を抽出しTMT (Tandem Mass Tag)

法を用いて高感度質量分析によるプロテオーム解析を行い比較した。蛋白発現がMUTで有意に2倍以上 ($p < 0.05$) 高いものの中から、遺伝子発現が有意に2倍以上高いものを除き、さらに細胞外蛋白を除外しMUTの標的蛋白候補を抽出した。

【結果】

①トランスクリプトーム解析

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 (図1A)。

②プロテオーム解析

プロテオーム解析では6,953の蛋白発現について2群間の比較評価可能であった (図1B)。MUTで有意 ($p < 0.05$) に2倍以上発現が多い蛋白は64個で、うちDNAマイクロアレイで2倍以上mRNA発現が高い蛋白を除くと35個が候補として残ったが、EGFR含めUSP8の基質として報

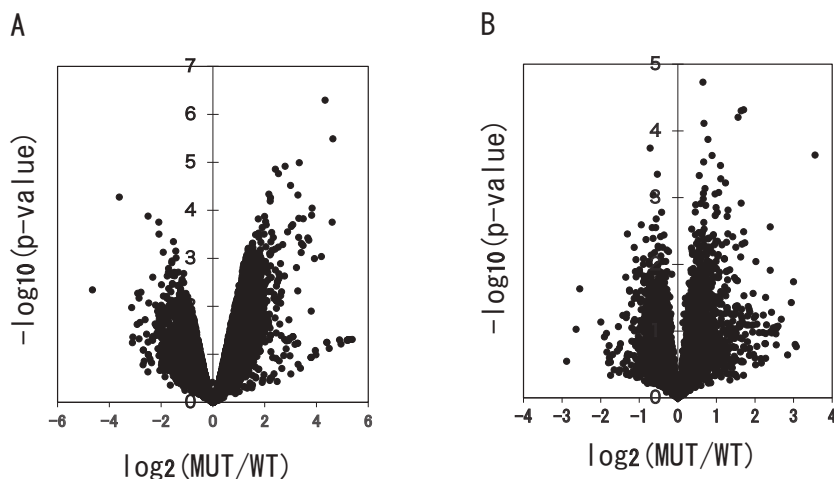


図1 ACTH産生腫瘍におけるトランスクリプトーム解析とプロテオーム解析

- A. USP8変異の有無によるマイクロアレイのvolcano plot
野生型 (WT)、変異体 (MUT) 3例ずつの解析
- B. USP8変異の有無による高感度質量分析 (TMT法) のvolcano plot
野生型 (WT)、変異体 (MUT) 5例ずつの解析

告されている既知の蛋白はなかった。35個の候補のうちsynaptotagminなどACTHのメンブレントラフィックに関連する可能性のある膜輸送制御蛋白が5個認められた(表1)。その他、下垂体ACTH産生細胞であるcorticotrophに比較的特異的に発現する蛋白としてCRH受容体(3.2倍)が認められた。CRH受容体、USP8変異体、CRE(cyclic AMP response element)配列を含むルシフェラーゼプラスミドを培養細胞に強制発現させる系を用いて機能解析を行った。しかしながら

表1 mRNA量に有意差はないが蛋白量が2倍以上の分子

ACTHのメンブレントラフィックに関連する膜輸送制御蛋白	MUT/WT
1. Synaptotagmin	3.3倍
2. Synaptic vesicle glycoprotein	2.9倍
3. Synaptotagmin-like protein	2.4倍
4. Exocyst complex component	2.0倍
5. AP-1 complex subunit sigma	2.0倍
corticotrophに特異的な蛋白	MUT/WT
1. CRH receptor 1	3.2倍

USP8変異体によるCRH受容体を介した転写活性の増強作用は認められず、CRH受容体がUSP8の標的蛋白と裏付ける結果は得られなかった(図2)。

【今後の予定】

腫瘍細胞の初代培養を用いてhorizon社のAccell™を用いたsiRNAによりUSP8 mRNAを3%にノックダウンさせることが確認できたため、今後はUSP8のノックダウンにより変異体で特異的に発現が低下する蛋白をプロテオミクス解析により検討する予定である。また上記のsynaptotagminやcorticotrophのノックダウンも行って培養液中のACTH産生能の変化や細胞のPOMC発現等を検討予定である。

【考察】

クッシング病におけるUSP8変異体の標的蛋白と考えられていたEGFR発現は今回のトランスクリプトームとプロテオーム解析にて蛋白発現に有意差は認められず標的蛋白とは考えにくかった。USP8変異陽性例でmRNA発現に差はないが、蛋白発現が2倍以上の蛋白が35種認められ、5種がACTHのメンブレントラフィックに関連する膜輸送制御蛋白であった。膜輸送制御複合

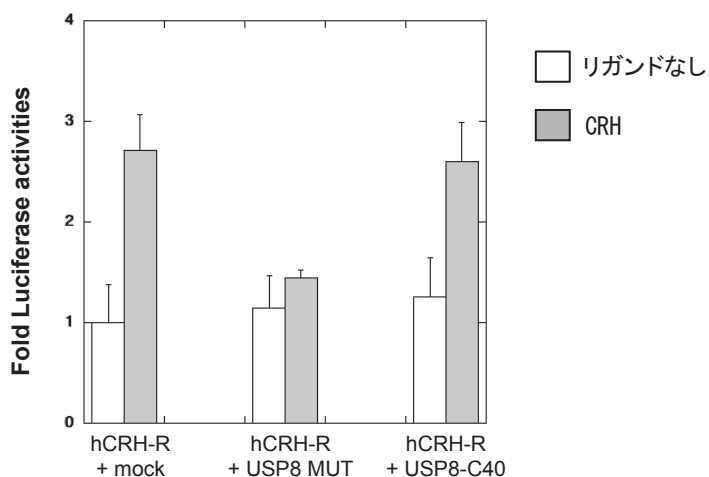


図2 cAMP response element (CRE) を用いたルシフェラーゼアッセイ

ラット膵腺房由来のAR42J細胞株にhCRH受容体、USP8変異体、CRE配列を含むルシフェラーゼプラスミドを一過性発現し、24時間後にCRHを添加、さらに24時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

体はACTH分泌小胞の膜融合とACTHの開口放出にカルシウムセンサーとして働くと考えられている。従って膜輸送制御複体を構成する蛋白がUSP8の標的蛋白の場合、USP8変異が分泌小胞のリサイクリングを促進しACTHの持続的な過剰分泌をきたす可能性が示唆された。そのほかCRH受容体が候補として考えられたが、レポーターアッセイで機能的な裏付けはできなかった。しかしながら臨床的にUSP8変異例は野生型に比しCRH負荷試験でACTHの過剰反応を認めることが多いことから、CRH受容体を介した持続的な活性化が腫瘍化とACTHの過剰分泌の成因に関わっている可能性があり、さらなる検討が必要と考えられる。

今後はUSP8変異陽性の患者初代培養細胞を用いてUSP8のノックダウンを行いトランスクリプ

トームとプロテオーム解析を行ってUSP8の標的蛋白の同定を目指す予定である。

【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

脂質異常症の原因についての研究－5

大久保 実

【要約】

低LDLコレステロール血症患者の*PCSK9*遺伝子の解析を行い、機能低下型variantを1例見出した。日本人の低脂血症の原因の一つに、*PCSK9*の機能低下があることを確認した。

【目的】

脂質異常症は動脈硬化性疾患の危険因子である。血中LDLコレステロール (LDL-C) 値が高いと虚血性心疾患が増加し、LDL-Cが低いと虚血性心疾患は減少する。LDL-Cに関与する遺伝素因として多くの脂質関連遺伝子のvariantsが知られるようになった¹⁾。

LDL-C値に関与する遺伝子の1つに*PCSK9*がある。*PCSK9* (proprotein convertase subtilisin/kexin 9) はLDL受容体機能の調整に関わる蛋白質で、機能が亢進すると高コレステロール血症になる²⁾。逆に、*PCSK9*機能が低下すると低脂血症になる³⁾。

本研究では、低脂血症患者の遺伝素因として*PCSK9* variantを検索した。甲状腺機能亢進症・肝疾患・悪性腫瘍などの基礎疾患が原因の低脂血症は除外した。

【方法】

基礎疾患を持たない低LDL-C血症患者(LDL-C

< 80 mg/dL) を対象とした。患者の末梢血からDNAを調製し、*PCSK9*の12個のエクソン領域をPCR増幅し、精製PCR産物の塩基配列を決定して*PCSK9* variantを同定した。

【結果】

1. 患者1の*PCSK9*遺伝子のエクソン8に点変異を同定した(図1)。*PCSK9* cDNAの1,284番目の塩基は正常ではguanine(G)であるが、adenine(A)に置換していた。患者はこのvariantのヘテロ接合体であった。
2. 蛋白レベルでは、428番目のアミノ酸は本来トリプトファンであるが、このvariantでは終止コドンに変わるため、N端の427個のアミノ酸しか持たない短縮蛋白が生成され、機能が低下することが考えられた。

【考察】

低LDLコレステロール血症患者に*PCSK9* variantを認め、日本人の低LDL-C血症の原因の一つに、*PCSK9*の機能低下型変異があることを確認した。このvariantは日本人の低脂血症で報告されていた⁴⁾。東北メディカル・ゲノムバンク ToMMoの最新のデータ60KJPNによれば、このvariantの日本人におけるアレル頻度は0.0005であった。米国Broad研究所のgnomADデータv4.0では

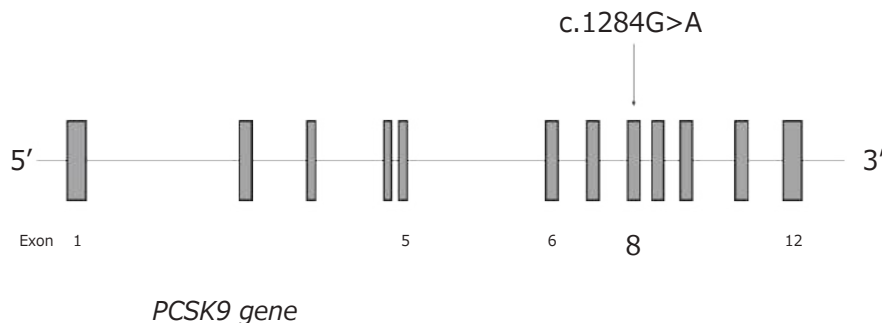


図1 *PCSK9*のc.1284G>A variant

東アジア人におけるアレル頻度は0.0002であった（ヨーロッパ人では0.0）。こうしたデータから、日本人を含む東アジア人に限って、*PCSK9* variantが低脂血症の稀な原因となっていると考えられた。

現在、*PCSK9*に対する抗体薬やsiRNA薬が高コレステロール血症の治療薬として臨床応用されている⁵⁾。壮年～老年期の高コレステロール血症患者に使われることが多い。しかし、*PCSK9* variantを持つ人は、幼少時から低LDLコレステロール血症である点が特徴で、動脈硬化予防的に働いていると考えられる。これには低脂血症の期間が極めて長いことが重要であると推測される。

【文献】

1. Zhou H, et al.: Rare diseases related with lipoprotein metabolism. In Lipid Transfer in Lipoprotein Metabolism and Cardiovascular Disease (eds Jiang XC) 171-188 (Springer Singapore, Singapore, 2020)
2. Abifadel M, et al.: Mutations in *PCSK9* cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature Genet* 34: 154-156, 2003
3. Cohen JC, et al.: Sequence variations in *PCSK9*, low LDL, and protection against coronary heart disease. *New Eng J Med* 354: 1264-1272, 2006
4. Miyake Y, et al.: Genetic variants in *PCSK9* in the Japanese population: rare genetic variants in *PCSK9* might collectively contribute to plasma LDL cholesterol levels in the general population. *Atherosclerosis* 196: 29-36, 2008
5. Ahmad M, et al.: Molecular Therapeutics in Development to Treat Hyperlipoproteinemia. *Mol Diagn Ther*, 2025, in press. doi: 10.1007/s40291-024-00768-0

機械学習を用いた解釈可能で高精度な、脂肪性肝疾患の発症・寛解予測モデル作成

岡田 啓

東京大学糖尿病・生活習慣病予防講座

【要約】

解釈可能な脂肪性肝疾患 (SLD) の予測モデルとして、Fatty Liver Index (FLI) が広く用いられてきたが、FLIの予測能力を超える解釈可能なモデルは、ブラックボックス型の機械学習モデル以外には報告されていない。本研究では、非ブラックボックス型で簡便かつ解釈可能な新しいSLDの診断予測指標を作成することを目的とした。対象は、2008年から2018年の間に東京都内の健診施設で実施された健診の参加者とした。対象者の80%をランダムに選びモデル開発用とし、残り20%をモデル検証用とした。機械学習であるLASSO回帰の1標準誤差ルールを応用したn標準誤差ルールを適用し、FLIと同程度の変数の数で解釈可能で簡便なモデルを模索した。そのモデルをSteatotic liver index (SLI) と名付け、FLIに対する優位性を検証用で横断的に確認した。また、尤度比を基にSLDを診断するためのカットオフ値を設定した。初回健診で腹部超音波データが得られた92,375名のうち、20,380名 (22.0%) がSLDを有していた。LASSO回帰のn標準誤差ルールにより構築されたSLIは、体格指数、腹囲、アラニンアミノトランスフェラーゼ、および中性脂肪の4変数で構成された。SLD診断のC統計量は、SLIがFLIよりも優れていた (0.909対0.887、p値<0.001)。SLIの診断カットオフ値を10および50と設定した場合、それぞれの陰性尤度比および陽性尤度比は0.09および10.7となり、SLDの除外および確定診断に適していた。SLDの診断において、SLIはFLIを上回る性能を持つ簡便かつ解釈可能な新しい指標であることが示された。今後、日本国外における診断性能の検証が必要である。

【目的】

近年、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD)

は脂肪性肝疾患 (SLD) へと名称が変更された¹⁾。SLDは世界人口の約4分の1が罹患しており、その有病率は増加している。肝硬変や肝癌といった肝合併症に加え、代謝疾患や心血管疾患との関連も指摘されており、臨床的に重要な疾患として、より効果的な介入の必要性が高まっている。診断のゴールドスタンダードは肝生検であるが、その侵襲性とSLDの高い有病率を考慮し、非侵襲のバイオマーカーを用いた多数の予測モデルが開発されてきた。従来のモデルとしては、Fatty Liver Index (FLI) がもっとも予測性能が良い指標とされ、採用されている²⁾。ブラックボックス手法を駆使しても、FLIより予測性能が良いものは限られており、新規のスコアを作成するためにはFLIの予測性能を超えることが必要だった。ブラックボックス手法を使ってもFLIの予測性能を超えることは出来ず、旧来の「Fatty」という名称を使わず予測モデルが作られることが望まれていた。

本研究では、LASSO回帰を活用し、解釈性と予測精度を両立させたSLD予測モデルを開発することを目的とした。LASSO回帰は一般化線形モデルを基盤とするため、モデル係数の解釈が容易であり、縮約過程による過学習の抑制と予測精度の向上を両立できるとされる。さらに、1SEを発展させたnSEルールを適用することで、最小限の変数で高精度な予測を可能にするモデルの開発を目指した。

本研究では、これらの手法を用いて、従来のFLIを超える予測精度を持ちながら臨床的に解釈可能なSLD予測モデルを構築することを目指した。

【方法】

本研究は、東京都の聖路加国際病院予防医療セ

ンターにおける健康診断プログラムのデータを用いた後ろ向き横断的コホート研究である。対象者は、2008年1月から2018年12月までに健康診断を受診した18歳以上の個人とした。選択基準は、(1)腹部超音波検査を受けた者、(2)検査データが利用可能な者とした。除外基準は、(1)がんや腹部手術歴を有しホルモン補充療法で治療中、(2)腎代替療法の治療中、(3)妊娠中の人とした。本研究は、聖路加国際病院および東京大学の倫理審査委員会の承認を受けている（承認番号20-R184, 2020264NI）。

本研究の主要アウトカムは、超音波検査によるSLDの診断である。予測モデルに使う変数は、本研究では、健診時の記録から、性別、年齢、BMI、血圧、腹囲、喫煙歴、既往歴、糖尿病や脂質異常症治療薬の使用状況、週当たりのアルコール摂取量（g）、および検査データを取得した。検査データには、血球数、HbA1c、アルブミン、クレアチニン、HDL-C/LDL-C、TG、AST、ALT、GGTP、CRPを用いた。予測モデルの開発は、対象者のデータを開発セット（80%）と検証セット（20%）に無作為に分割し、トレーニングセットで予測モデルを構築した。参照モデルにはFLIと同じ変数を用いたロジスティック回帰を、機械学習モデルにはLASSO正則化を適用したロジスティック回帰を使用した。LASSO回帰では、10分割交差検証により最適な正則化ハイパーパラメータλを決定し、さらにより厳密な正則化を行うnSEルール（n = 1, 2, …）を適用した。予測精度がFLIを上回るnSEルールのモデルから、最小限の変数で構成されるSLIを作成した。

モデル性能評価には、検証セットを用いた。評価方法としては、C統計量、キャリブレーション、意思決定曲線解析を行い、SLIとFLIの性能を比較した。DeLong検定を用いてC統計量を比較し、予測確率の精度と臨床的有用性を評価した。

SLIのカットオフ値の決定には、FLIの手法を参考に、SLIの感度・特異度などを算出し、陰性尤度比 < 0.10でSLDを除外し、陽性尤度比 > 10でSLDを確定する最適なカットオフ値を同定した。

【結果】

本研究では、健康診断を受診し腹部超音波検査を実施した42万112例のうち、6万793例を除外し、各人の最初の健診データである9万2,968例を解析対象とした。対象者のSLD有病率は21.9%であり、SLD群は年齢が高く、男性の割合が高かった。SLD群では、BMI、腹囲、肝酵素値、血圧、LDL-C、HbA1cが高く、HDL-Cが低かった。

LASSO回帰では、最適なλを決定し、腹囲、体格指数、自然対数変換したALTおよび中性脂肪を用いるモデル（10-27SEルール）を採用した。SLIは以下の式で定義された。

$$\frac{e^{0.074 * \text{腹囲} + 0.178 * \text{体格指数} + 1.626 * \ln(\text{ALT}) + 1.101 * \ln(\text{中性脂肪}) - 21.725}}{1 + e^{0.074 * \text{腹囲} + 0.178 * \text{体格指数} + 1.626 * \ln(\text{ALT}) + 1.101 * \ln(\text{中性脂肪}) - 21.725}} \times 100(\%)$$

SLIのC統計量（0.909）はFLI（0.892）より優れ（P<0.001）、校正および意思決定曲線解析でもFLIを上回る臨床的有用性を示した。SLIのカットオフ値は、10でSLDの除外診断に適し（陰性尤度比0.090）、50で確定診断に適していた（陽性尤度比10.7）。

【考察】

本研究では9万人超のデータを用いた横断解析を行い、新たな機械学習を用いたSLIが、従来のFLIよりも優れたSLD診断能力を有することを示した。特に、SLDの除外には、SLIのカットオフ値10、確定診断にはカットオフ値50が有用であった。また、SLIのC統計量は0.90を超え、FLIよりも高い診断精度を示した。本研究で開発したSLIは、解釈可能な指標でありながらFLIを超える診断・予測精度を有する点で画期的である。本研究では、LASSO回帰を応用した機械学習を用いて、簡潔かつ効率的で解釈可能なモデルを構築した。近年、ブラックボックス型機械学習の限界が指摘され、解釈可能な手法の重要性が再評価されている³⁾。というのも、医療AIの信頼性には透明性が重要であり、LASSO回帰は変数選択過程や係数を可視化できる点で優れている。今後、解釈可能な機械学習手法の応用が拡大することが期待される。本研究で作成されたSLIは、日本人におけるSLDをより正確に診断することが出来ることは証明されたが、今後、海外などでもその

妥当性が検証されることを願う。

【文献】

1. Lee B P, Dodge J L, Terrault N A: National prevalence estimates for steatotic liver disease and subclassifications using consensus nomenclature. *Hepatology* 79: 666–673, 2024
2. Bedogni G, et al.: The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 6: 33, 2006
3. Xie F, et al.: A universal AutoScore framework to develop interpretable scoring systems for predicting common types of clinical outcomes. *STAR Protoc* 4: 102302, 2023

【発表に関する事項】

1. Okada A, Oba K, Kimura T, Hagiwara Y, Ono S, Ikeda Kurakawa K, Michihata N, Yamauchi T, Nangaku M, Matsuyama Y, Kadowaki T, Yamaguchi S: The Steatotic Liver Index: a simpler and more interpretable predictor of steatotic liver disease using an enhanced shrinkage via a parsimonious machine-learning method. 米国内科学会日本支部年次総会・講演会2024 優秀賞, 臨床研究部門 (2024年6月)
2. Okada A, Oba K, Kimura T, Hagiwara Y, Ono S, Kurakawa KI, Michihata N, Yamauchi T, Nangaku M, Matsuyama Y, Kadowaki T, Yamaguchi S: Steatotic liver index: An interpretable predictor of steatotic liver disease using machine learning with an enhanced shrinkage method. *Hepatology Research*. 55: 527–546, 2025

健康寿命の延伸を目指した生体のリン感知機構の解明

高士 祐一

福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学講座

【要約】

生体に必須のミネラルであるリンは、線維芽細胞増殖因子23 (fibroblast growth factor 23: FGF23) により制御されている。これまで、FGF23の産生・分泌を担う骨がどのように血中リン濃度の変化を感知しているのかは不明であった。報告者らは、FGF受容体1 (FGF receptor 1: FGFR1) が、リン感知に必須の分子であることを報告している。本研究では、リンによるFGFR1の活性化を媒介する未知の分子の探索を試みた。結果、BioID (近接依存性ビオチン標識) 法を用いた実験において、TurboID付加FGFR1安定発現UMR106細胞の作出に成功し、ビオチン標識の条件検討まで確認することができた。今後、濃縮したビオチン化蛋白をLC-MS/MSによって直接同定することを計画している。リン感知機構の解明が、慢性腎臓病や血管石灰化、骨粗鬆症といった病態を克服するための新規創薬研究につながるものと期待される。

【目的】

線維芽細胞増殖因子23 (fibroblast growth factor 23: FGF23) は、血中リン濃度を低下させるように作用し、生体のリン代謝に中心的な役割を果たすホルモンである。一方、FGF23の産生・分泌を担う骨が、どのように血中リン濃度を感知しているのかについては不明であった。報告者らは、骨芽細胞様細胞株UMR106を用いた実験の中で、リンは、FGF受容体1 (FGF receptor 1: FGFR1) のリン酸化を惹起し、FGF23の産生・分泌を調節していることを突き止めた¹⁾。さらに、マウスを用いて骨特異的にFGFR1を欠失させたところ、本マウスは高リン血症を呈し、コントロールマウスに比して短命であることが判明した²⁾。ここから、FGFR1によるリン感知は、生命の維持に必須の機構であると考えに至った。しかし、現在まで、リンがどのような機構を介

してFGFR1をリン酸化するのかについては明らかではない。そこで本研究では、リンによるFGFR1のリン酸化機構の解明を目的とした。

【方法】

前述のUMR106細胞を用いた系で、リンとFGFR1のリン酸化の間の介在蛋白の探索を行うことを計画した。ここで、FGFR1に対する特異的な抗体があれば、免疫沈降反応を利用することで、細胞外リン濃度を上昇させた時にFGFR1への結合が変化する蛋白を探索することが可能である。しかし、FGFR1に対する特異的な抗体が世界的に見ても存在しないことが、障壁となった。そこで、FGFR1に標識を付加する下記の二つの手法を用いることで、この問題を克服することを目指した。

a) GFP-Trap法

本法を第一選択として計画した。なぜなら、本法は後述するb) BioID法に比して、同定できる蛋白の特異度が高いという特徴があるためである。FGFR1のC末端にGFPを付加し、GFPに対する特異的な抗体を利用する。GFP付加FGFR1の安定発現UMR106細胞を作製し、細胞外リン濃度を上昇させた時に、GFP付加FGFR1に結合する蛋白をLC-MS/MSで網羅的に解析する。TMT (tandem mass tag) 法を用いて定量解析し、fold changeとp値から、得られた候補蛋白の優先順位付けを行う。

b) BioID (近接依存性ビオチン標識) 法

上記a) の代替案として考えた手法である。本法は、前述のGFP-Trap法に比して、同定できる蛋白の特異度が下がるため、第二選択とした。一方、FGFR1に対する結合が弱い蛋白や結合が一時的である蛋白も標識できるため、より高感度のスクリーニングが可能であるという特徴を有する。FGFR1のC末端にビオチンリガーゼである

TurboIDを付加したFGFR1の安定発現UMR106細胞を作製する。細胞外リン濃度を上昇させた時に、FGFR1に位置的・空間的に相互作用を示した蛋白をビオチン化により標識する。標識された蛋白を、ビオチン-アビジン結合を利用して精製し、LC-MS/MS解析を行う。

【結果】

a) GFP-Trap法

はじめに、FGFR1のC末端にGFPを付加したFGFR1の発現ベクターを作製し、本ベクターをリポフェクタミン法によりUMR106細胞に過剰発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。結果、GFPの蛍光は確認できたものの、FGFR1の本来の局在である細胞膜上ではなく、細胞質中にドット状に観察された。過剰発現の系では、GFP付加FGFR1蛋白の小胞体ないしゴルジ体から細胞膜への移送に問題が生じているものと考えられた。そこで、GFP付加FGFR1を細胞膜に発現させるために、安定発現細胞株を得ることとし、結果GFPの蛍光が細胞膜上に観察された。さらに、GFP蛋白の発現をウエスタンブロッティングにより確認した。しかし、膜蛋白であるGFP付加FGFR1を膜画分から効率良く、かつインタクトな形で溶解

するための条件検討に難渋した。細胞外リン濃度を上昇させた時に、GFP付加FGFR1に結合する蛋白を抗GFP抗体を用いたLC-MS/MSで網羅的に解析することを試みたが、FGFR1そのもののPSMs (peptide spectrum match) が8程度と低く、目的の蛋白を同定するには至らなかった。

b) BioID (近接依存性ビオチン標識) 法

次いで、第二候補としていたBioID (近接依存性ビオチン標識) 法に着手した。細胞外リン濃度を上昇させた時に、FGFR1に位置的・空間的に相互作用を示した蛋白をビオチン化により標識することで、網羅的なインタラクトーム解析を目指した。本研究期間中に、高活性型ビオチン化酵素であるTurboIDを付加したFGFR1安定発現UMR106細胞の作出に成功した。さらに、TurboID付加FGFR1の発現をウエスタンブロッティングで、細胞内局在を細胞染色によって確認した。加えて、ビオチン標識の条件を検討し、細胞中の蛋白のビオチン化が起こることをHRP標識および蛍光標識ストレプトアビジンを用いて確認した (図1)。今後、濃縮したビオチン化蛋白をLC-MS/MSによって直接同定することを計画している。

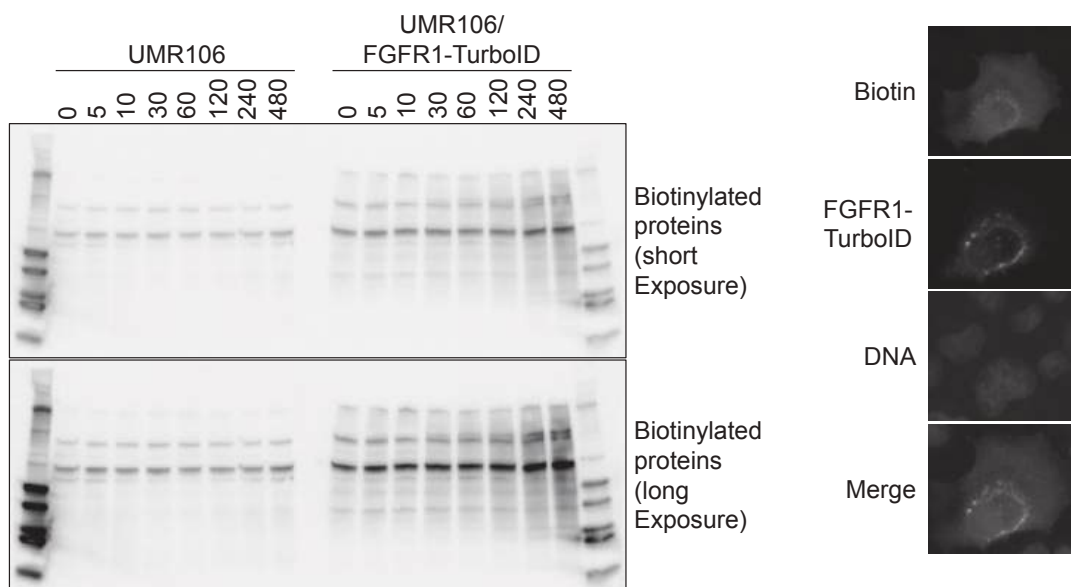


図1 BioID (近接依存性ビオチン標識) 法におけるビオチン標識の条件検討

【考察】

本研究では、リンによるFGFR1活性化に必要な未知のリン感知分子を明らかとし、生体のリン感知機構の全容解明を試みるために必要な実験のツールを確立できたものと考えている。リンは、慢性腎臓病や血管石灰化、骨粗鬆症の発症・進展に関与することが報告されている³⁾。本研究成果を元に、生体のリン感知機構の全容を解明することができれば、同定したリン感知機構の構成因子をターゲットとした創薬研究へと展開できる可能性がある。これにより、本邦に1,330万人もの罹患患者がいるとされる慢性腎臓病患者に向けて、血管石灰化および骨粗鬆症の発症・進展を抑制し、健康寿命の延伸を目指した新たな治療戦略の開発につながることを期待される。

【文献】

1. Takashi Y, Kosako H, Sawatsubashi S, Kinoshita Y, Ito N, Tsoumpra KM, Nangaku

M, Abe M, Matsuhisa M, Kato S, Matsumoto T, Fukumoto S: Activation of unliganded FGF receptor by extracellular phosphate potentiates proteolytic protection of FGF23 by its O-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 11418-11427, 2019

2. Takashi Y, Sawatsubashi S, Endo I, Ohnishi Y, Abe M, Matsuhisa M, Kawanami D, Matsumoto T, Fukumoto S: Skeletal FGFR1 signaling is necessary for regulation of serum phosphate level by FGF23 and normal life span. *Biochemistry and Biophysics Reports* 27: 101107, 2021

3. Takashi Y: Phosphate-sensing mechanisms and functions of phosphate as a first messenger. *Endocrine Journal* 71: 335-343, 2024

(3) 消化器疾患

非乳頭部十二指腸粘膜下層浸潤癌の臨床病理学的特徴

布袋屋 修、石井 侃、河合 優佑、落合 頼業
早坂 淳之介、鈴木 悠悟、光永 豊、小田切 啓之
松井 啓、河野 圭、高澤 豊

【要約】

非乳頭部十二指腸粘膜下層浸潤癌（SM癌）の臨床病理学的特徴を明らかにするために、自験の非乳頭部十二指腸癌79例（粘膜内癌：M癌73例、SM癌6例）を対象として検討を行った。SM癌では腫瘍径（23 vs 35mm, $p = 0.096$ ）では有意差はないものの大きい傾向にあり、周在性は1/2周以上（11% vs 50%, $p < 0.05$ ）が有意に多い傾向が見られた。拡大内視鏡やEUSによる診断精度は限られ、SM癌の深達度予測の難しさが確認された。形質発現は胃型がM癌で4.1%、SM癌で33.3%、腸型はM癌で11.0%、SM癌で33.3%、混合型はM癌で37.0%、SM癌では33.3%であり、2群で差はなかった。今回の検討ではSM癌の特徴を明らかにするには至らなかった。今後はさらなる症例数の蓄積と形質・組織型別解析が必要である。

【目的と背景】

非乳頭部十二指腸癌は発生頻度の低い腫瘍の一つである¹⁾。近年、内視鏡検査技術の進歩と上部消化管内視鏡検査の普及、内視鏡医の関心度の高まりなどから、無症状下での早期発見が増加している。このことは、粘膜癌の発見率の上昇をもたらしているが、一方で粘膜下浸潤癌（M癌）の発見率は依然として低いままである。粘膜下浸潤癌（SM癌）は、他臓器の癌と同様にリンパ節転移を来す可能性があると知られており²⁻⁴⁾、治療法の選択、とりわけ内視鏡切除（endoscopic resection; ER）適応の判断において極めて重要な因子であるため、その臨床病理学的特徴の解明と治療方針の確立が求められている。今回、SM癌の内視鏡学的・臨床病理学的特徴を明らかにする

ために、当院で内視鏡治療を行った非乳頭部十二指腸癌を対象にM癌とSM癌を比較し検討を行った。

【方法】

1. 本研究は2006年1月～2024年1月までに当院で内視鏡的粘膜下層剥離術（endoscopic submucosal dissection; ESD）を受け、病理検査にて非乳頭部十二指腸癌と診断された79症例79病変を対象とした。家族性大腸腺腫症や十二指腸乳頭部癌との鑑別が困難な主乳頭に接している病変は除外した。

2. 検討項目

患者及び病変の臨床的特徴として、年齢、性別、部位、主乳頭との位置関係、周在、病変径、肉眼型、色調、*H. pylori*の既往、胃粘膜萎縮度、白色不透明物質（white opaque substance; WOS）（D）の有無、超音波内視鏡（Endoscopic Ultrasonography; EUS）での深達度評価、EUS含めた内視鏡所見に伴う術前診断について評価を行った。

内視鏡的粘膜萎縮度は木村・竹本分類⁵⁾に準じて評価した。また*H. pylori*の感染診断は血清抗体法、尿素呼気試験、便中抗原法の1つ以上を施行し、内視鏡的萎縮度と除菌歴を組み合わせ、現感染、既感染、未感染として判定した。内視鏡診断においては、内視鏡所見とEUSを用いて診断した。NBI拡大内視鏡でSNADETの表面微細構造を観察し、菊池ら⁶⁾の報告に従い、大小不同の構造が残存しているものをpreserved、周囲より明らかに小型化しているものをmicrified、不明瞭となっているものをabsentの3パターンに分類した。そして、病変内が単独の粘膜模様のパターンで構成されるものをmono type とし、複数

表 1 SM浸潤癌6例の臨床病理学的特徴

年齢	性	Hp感染 状況	萎縮度	占拠 部位	腫瘍 長径 (mm)	形態	WOS	色調	M-NBI (S)	EUS	最終診断	SM浸潤 距離 (μ m)	組織型	粘液 形質	追加 治療	
1	73	女性	未感染	C-0	球部	70	I s	なし	発赤調	preserved, absent	M	M癌	200	tub 1	胃型	なし
2	71	男性	既感染	O-1	下行部 (乳頭肛 門側)	24	II a	なし	発赤調	preserved, micrified, absent	SM	SM癌	2275	tub 1 + mu c	胃型	手術
3	75	男性	既感染	C-1	水平部	42	II a+ II c	あり (周囲)	発赤調	preserved, absent	M	M癌	1100	tub 1 >> tub 2	腸型	手術
4	67	男性	既感染	O-2	SDA	55	I + II c	あり (一部)	発赤調	preserved, micrified	M	M癌	50	tub 1	腸型	なし
5	59	女性	未感染	C-0	SDA	20	II c	なし	発赤調	preserved, micrified, absent	未検査	M>SM癌	130	tub 2 >tub 1	混合型	なし
6	78	男性	未感染	C-0	SDA	28	II a+ II c	あり (周囲)	発赤調	preservesde, micrified, absent	M	M癌	90	tub 1	混合型	なし

の粘膜模様のパターンで構成されるものを mixed type とした。

病理学的事項としては一括切除率、深達度、粘液形質について評価を行った。粘液形質に関しては八尾ら⁷⁾の報告のように、胃型マーカー (MUC5AC, MUC6) と腸型マーカー (MUC2, CD10) を用い、免疫組織化学染色を施行し、胃型 (胃型マーカーのみ発現)、腸型 (腸型マーカーのみ発現)、胃腸混合型 (胃型と腸型ともに発現) に分類した。

【結果】

1. SM癌の臨床病理学的所見 (表1)

年齢は59～78 (中央値72) 歳、男性4症例、女性2症例であった。*H. pylori*の感染状態は未感染、既感染がそれぞれ3症例であった。内視鏡的粘膜萎縮度は、萎縮なしが3症例、C-1が1症例、O-1,2が2症例であった。占拠部位は球部から水平部までそれぞれ見られ、乳頭からみて口側が3病変、肛門側も3病変であり、病変の長径は24～70 (中央値35) mmであった。形態は0-I型が2病変、0-II型が4病変であった。WOSを認めたものは3病変あり、周囲にのみ付着していたものは2病変、全体に付着していたものは1病変であり、すべての病変は発赤調であった。拡大NBI検査では全ての表面構造にも preserved を認め、micrifiedは4病変、absentも4病変であった。EUSを行った病変は5病変であり、SM予測した

病変は1病変のみであり、内視鏡での最終診断でSMと診断したものも1病変であった。5病変は高分化型腺癌であったが、1病変は高分化型腺癌に加えて粘液癌を含んでいた。十二指腸形質は胃型形質が2病変、腸型形質が2病変、混合型が2病変であった。症例2と症例3はESD後に追加で手術を行い、症例2はリンパ節転移が見られた。全症例が無再発で経過している。

2. M癌とSM癌の臨床病理学的所見の比較 (表2-4)

M癌とSM癌の2群間に年齢、性別に特徴的な傾向は無かった。*H. pylori*の感染状態は未感染がM癌で41病変 (56.2%)、SM癌で3病変 (50.0%) と有意な差は無いものの、2群ともに約半数が未感染であった。内視鏡的胃粘膜萎縮度も同様にC0,1がM癌で45病変 (61.6%)、SM癌で4病変 (66.7%) 2群ともに多い傾向であった。腫瘍の所見では、腫瘍長径の中央値は (23 vs 35mm, $p = 0.096$) であり、統計学的有意差は無いもののSM癌が大きい傾向にあり、腫瘍の局在部は2群間で差は無かった。1/2周以上の周在がある病変はM癌で8病変 (11.0%)、SM癌で3病変 (50.0%) と有意にSM癌が多かった。肉眼型や色調も差はなかった (表2)。精査で行った内視鏡所見の比較を表3に示した。WOSが見られた病変はM癌で55病変 (75.3%)、SM癌で3病変 (50.0%) であり、差はなくともに周囲の付着が半数を占めてい

表 2 M癌とSM癌の患者及び病変の臨床的特徴の比較

	M癌 73病変	SM癌 6病変	P値
年齢 中央値 (範囲)	65 (43-89)	72 (59-78)	0.192
性別 男性 (%)	42 (57.5)	4 (66.7)	0.663
<i>H. pylori</i> 感染状態			
未感染	41 (56.2)	3 (50.0)	
現感染	20 (27.4)	2 (33.3)	
既感染	5 (6.8)	0 (0)	0.77
内視鏡的胃粘膜萎縮度			
C-0, 1	45 (61.6)	4 (66.7)	
C, 2-0-3	26 (35.6)	2 (33.3)	0.872
腫瘍長径 中央値 (mm)	23 (7-92)	35 (30-72)	0.096
局在部位 (%)			
球部	5 (6.8)	1 (16.7)	
上十二指腸角	22 (30.1)	2 (33.3)	
下行部	33 (45.2)	1 (16.7)	
下十二指腸角	11 (15.1)	1 (16.7)	
水平部	2 (2.7)	1 (16.7)	0.358
乳頭口側	30 (41.1)	3 (50.0)	
乳頭肛門側	43 (58.9)	3 (50.0)	0.671
周在1/2周以上 (%)	8 (11.0)	3 (50.0)	0.008
肉眼型 (%)			
0-I	7 (9.6)	1 (16.7)	
0-II a	39 (53.4)	3 (50.0)	
0-II c	14 (19.2)	1 (16.7)	
0-II a+IIc	13 (17.8)	1 (16.7)	0.959
色調 (%)			
発赤調	71 (97.3)	6 (100)	
白色調、同色調	2 (2.7)	0 (0)	0.681

た。NBI拡大内視鏡を十分に行えた症例は70例であり、preservedがM癌で51病変(69.9%)、SM癌で6病変(100%)、micrifiedがM癌で47病変(64.4%)、SM癌で5病変(83.3%)、absentがM癌で30病変(41.1%)、SM癌で4病変(66.7%)であり、SM癌では全例がmix typeであったが有意な差は2群間になかった。また、3つ全ての所見が病変に含まれた病変はM癌で12病変(16.4%)、SM癌で3病変(50.0%)であり有意差は無いもののSM癌で多い傾向であった。EUSはM癌では31病変、SM癌では5病変に対して実施され、SM癌の診断ができた病変は症例2の1病変のみであった。ESDでの一括切除率は2群で差は

なかった。形質発現については、SM癌では全例免疫染色を施行したが、M癌は38病変のみの検討となった。2群間の形質発現を比較すると、胃型はM癌で3病変(4.1%)、SM癌で2病変(33.3%)、腸型はM癌で8病変(11.0%)、SM癌で2病変(33.3%)、混合型はM癌で27病変(37.0%)、SM癌では2病変(33.3%)であり、2群で発現形質に差はなかった。

【考察】

本研究では、非乳頭部十二指腸癌79病変のうち、M癌が73病変(92.4%)、SM癌が6病変(7.6%)であり、このSM癌の発見率は、従来の報告と同様に極めて低いものであった^{1, 8)}。欧米諸国

表 3 M癌とSM癌の病変の内視鏡所見の比較

	M癌	73病変	SM癌	6病変	p値
WOS あり (%)	55	(75.3)	3	(50.0)	0.177
WOS 分布 (%)					
一部	9	(12.3)	0	(0)	
周囲	39	(53.4)	3	(50.0)	
全体	7	(9.6)	0	(0)	0.77
M-NBI (S) (%)					
preserved	51	(69.9)	6	(100)	0.221
micrified	47	(64.4)	4	(66.7)	0.696
absent	30	(41.1)	5	(83.3)	0.254
mono	12	(16.4)	0	(0)	
mix	52	(71.2)	6	(100)	0.244
全て	12	(16.4)	3	(50.0)	0.074
EUS 診断 (%)					
M	29	(39.7)	4	(66.7)	
SM	2	(2.7)	1	(16.7)	0.309
総合診断 (%)					
HGA	28	(38.4)	0	(0)	
M	43	(58.9)	5	(83.3)	
SM	2	(2.7)	1	(16.7)	0.165

表 4 M癌とSM癌の粘液形質発現の比較

	M癌	73病変	SM癌	6病変	p値
一括切除率 (%)	69	(94.5)	6	(100)	0.556
形質発現					
胃型	3	(4.1)	2	(33.3)	
腸型	8	(11.0)	2	(33.3)	
胃腸混合型	27	(37.0)	2	(33.3)	0.101

では早期で発見される症例は10-22%のところ、日本では50%以上で診断されていることから^{9,10)}、内視鏡技術の向上により早期段階での診断が進み、粘膜癌として発見される症例が増加していることが影響していると考えられる。一方で、明確な文献的証拠は乏しいが、十二指腸癌の進行が他の癌と比較して遅い、またはSM癌がM癌と比較して進展が速いなども可能性としては考慮される。

1. SM癌の臨床病理学的特徴について

腸型形質が主体と考えられていた非乳頭部十二指腸腫瘍に胃型形質を呈するものがあると認識さ

れ、胃型主体の腺癌の方が高い悪性度を有している可能性が示唆されている¹¹⁻¹³⁾。松枝ら⁸⁾の報告では少数例での検討ではあるが、SM癌の傾向として乳頭口側に位置し、胃型形質を示し、未分化型癌が多いことを指摘している。また、有意差は無いもののSM癌の11例中5例が<10mmの病変であり、M癌より多かったことも報告した。

今回の検討では、SM癌の周在は半周以上の病変が有意に多く、腫瘍長径がM癌よりも大きい傾向がみられた。この結果については本検討での病変は以前の報告⁸⁾と比較して組織型が未分化型ではなく分化型が多く占めていたことが影響し

ていることが推測される。分化型は未分化型と比較すると悪性度が低く、進行が緩徐に進展するため、M癌と比較して大きい病変であり、周在も半周以上の病変が今回多かったと予測される。

非乳頭部十二指腸腫瘍と*H. pylori*感染状況や胃粘膜萎縮度との関係は注目されており¹⁴⁻¹⁶⁾、萎縮の無い胃粘膜は、*H. pylori*の感染状況と関係なく独立したリスク因子であると報告もある¹⁴⁾。本検討でも、M癌とSM癌で比較を行ったが、2群間に有意差は無かった。しかし、両群ともに約半数が*H. pylori*未感染で、非萎縮粘膜であり、以前の報告の通り非乳頭部十二指腸腫瘍自体のリスクとなることは予測される結果であった。

2. 内視鏡所見と診断の困難さ

胃腫瘍の拡大観察診断においてはVS classification¹⁷⁾が広く普及しており、大腸腫瘍の深達度予測には、工藤・鶴田分類¹⁸⁾やJNET classification¹⁹⁾が主に用いられている。しかし、非乳頭部十二指腸腫瘍では、pitは通常視認できず、拡大内視鏡観察の主な対象は絨毛である。この絨毛そのものの拡大観察による質的診断の有用性が報告されている^{6, 20, 21)}。しかし、一定のコンセンサスはまだ得られていない。また、EUSによる十二指腸腫瘍の深達度評価の有用性については、限定的な可能性が報告されている²²⁾。

本症例では、M癌およびSM癌で色調やWOSの付着が確認される割合に差はなかった。NBI拡大内視鏡を用いた表面微細構造の観察では、M癌とSM癌のいずれにおいてもpreserved、micrified、absentが確認され、両者で有意差は認められなかった。ただし、SM癌では、これら3つの表面微細構造が混在する割合が高く、SM癌が異なる腫瘍特性を有している可能性が示唆された。しかし、診断の一助となる明確な指標を見出すには至っていない。さらに、EUSを用いた深達度診断では、SM癌と診断できたのは6病変中1病変のみであり、SM癌の深達度予測の困難さが改めて確認された。

【文献】

1. Alwmark A, Andersson A, Lasson A: Primary carcinoma of the duodenum. *Annals of surgery* 191: 13-18, 1980

2. Sakamoto T, Saiura A, Ono Y, et al.: Optimal Lymphadenectomy for Duodenal Adenocarcinoma: Does the Number Alone Matter? *Ann Surg Oncol* 24: 3368-3375, 2017
3. 吉水祥一, 河内洋, 山本頼正, 他: 非乳頭部十二指腸SM癌の12例. *胃と腸* 54: 1131-1140, 2019
4. Yoshimizu S, Kawachi H, Yamamoto Y, et al.: Clinicopathological features and risk factors for lymph node metastasis in early-stage non-ampullary duodenal adenocarcinoma. *J Gastroenterol* 55: 754-762, 2020
5. Kimura K, Takemoto T: An endoscopic recognition of the atrophic border and its significance in chronic gastritis. *Endoscopy* 3: 87-97, 1969
6. Kikuchi D, Hoteya S, Iizuka T, Kimura R, Kaise M: Diagnostic algorithm of magnifying endoscopy with narrow band imaging for superficial non-ampullary duodenal epithelial tumors. *Dig Endosc* 26 Suppl 2: 16-22, 2014
7. 八尾隆史, 椛島章, 上月俊夫, 他: 胃型分化型腺癌 - 新しい抗体を用いた免疫染色による癌の憩室判定. *胃と腸* 34: 477-485, 1999
8. Matsueda K, Kanzaki H, Takenaka R, et al.: Clinical and phenotypical characteristics of submucosal invasive carcinoma in non-ampullary duodenal cancer. *PLoS One* 16: e0256797, 2021
9. Qubaiah O, Devesa SS, Platz CE, et al.: Small intestinal cancer: a population-based study of incidence and survival patterns in the United States, 1992 to 2006. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 19: 1908-1918, 2010
10. Bojesen RD, Andersson M, Riis LB, et al.: Incidence of, phenotypes of and survival from small bowel cancer in Denmark, 1994-2010: a population-based study. *J Gastroenterol* 51: 891-899, 2016
11. Mitsuishi T, Hamatani S, Hirooka S, Fu-

- kasawa N, Aizawa D, Hara Y, Dobashi A, Goda K, Fukuda T, Saruta M, Urashima M, Ikegami M: Clinicopathological characteristics of duodenal epithelial neoplasms: Focus on tumors with a gastric mucin phenotype (pyloric gland-type tumors). *PLoS One* 12: e0174985, 2017
12. Toba T, Inoshita N, Kaise M, et al.: Clinicopathological features of superficial non-ampullary duodenal epithelial tumor; gastric phenotype of histology correlates to higher malignant potency. *J Gastroenterol* 53: 64-70, 2018
 13. Yoshida M, Shimoda T, Abe M, et al.: Clinicopathological characteristics of non-ampullary duodenal tumors and their phenotypic classification. *Pathol Int* 69: 398-406, 2019
 14. Kawasaki A, Tsuji K, Uedo N, et al.: Non-atrophic gastric mucosa is an independently associated factor for superficial non-ampullary duodenal epithelial tumors: a multicenter, matched, case-control study. *Clin Endosc* 56: 75-82, 2023
 15. Kawai T, Takeuchi M, Fukuzawa M: Gastric atrophy prevent from incidence of duodenal tumor?. *J Clin Biochem Nutr* 60: 219, 2017
 16. Kakushima N, Ono H, Yoshida M, et al.: Characteristics and risk factors for sporadic non-ampullary duodenal adenocarcinoma. *Scand J Gastroenterol* 52: 1253-1257, 2017
 17. Yao K, Anagnostopoulos GK, Ragnunath K: Magnifying endoscopy for diagnosing and delineating early gastric cancer. *Endoscopy* 41: 462-467, 2009
 18. Kudo S, Rubio CA, Teixeira CR et al.: Pit pattern in colorectal neoplasia: endoscopic magnifying view. *Endoscopy* 33: 363-373, 2001
 19. Sano Y, Tanaka S, S-e K, et al.: Narrow-band imaging (NBI) magnifying endoscopic classification of colorectal tumors proposed by the Japan NBI Expert Team. *Dig. Endosc* 28: 526-533, 2016
 20. Kakushima N, Kenemoto H, Sasaki K, et al.: Endoscopic and biopsy diagnoses of superficial, nonampullary, duodenal adenocarcinomas. *World J Gastroenterol* 21: 5560-5567, 2015
 21. 辻重継, 土山寿志, 辻国広, 他: 生検未施行の十二指腸上皮性腫瘍に対するNBI併用拡大内視鏡の有用性. *胃と腸* 51: 1554-1565, 2016
 22. Matsuda N, Hirose T, Kakushima N, et al.: Comparison of Endoscopic Ultrasonography and Conventional Endoscopy for Prediction of Tumor Depth in Superficial Nonampullary Duodenal Epithelial Tumors. *Digestion* 103: 319-328, 2022

高解像度食道内圧検査を用いた食道運動障害の探索

落合 頼業、菊池 大輔、布袋屋 修

【要約】

つかえ感・胸やけなどの症状を有するにも関わらず、内視鏡的に明らかな器質的異常がなく、診断・治療に難渋する症例を経験する。近年、高解像度食道内圧検査 (High-resolution manometry; HRM) が開発され、食道運動機能を評価できるようになった。本研究は上部消化管症状を有する患者におけるHRMを評価することで食道運動障害を明らかにし、その頻度と病態を解明することを目的とした。2013年7月から2022年5月までに当院で上部消化管症状を有し、HRMが施行された340例 (358検査) のうち、消化管術後症例などを除外した258例 (258検査) を後方視的に検討した。平均年齢は58 ± 15歳、男性が118例 (42.4%) であった。症状はつかえ感が101例 (39.1%) と最も多く、続いて胸焼け51例 (19.8%)、胸痛19例 (7.4%) であった。HRMの結果をChicago分類 version 3.0で解析すると、45.3% (117/258例) に何かしらの食道運動障害が認められた。食道運動障害の内訳は Disorders with EGJ outflow obstructionが69例 (26.7%)、Major disorders of peristalsisが12例 (4.7%)、Minor disorders of peristalsisが36例 (14%) であった。主症状と食道運動障害の関連性を解析すると、つかえ感を有する症例では66例 (65.3%) が何らかの食道運動障害を有しており、他の症状と比較して有意に頻度が多く ($p < 0.001$)、診断の内訳では食道アカラシアが30例 (45.5%) と最も多かった ($p < 0.001$)。本検討では内視鏡検査で症状の原因となり得る器質的異常がない有症状例において、45.3%に何かしらの食道運動障害が認められ、特につかえ感を有する症例では食道運動障害の頻度が有意に多く、疾患も多岐に渡っていた。

【目的】

つかえ感・胸やけなどの症状を有するにも関わらず、内視鏡的に明らかな器質的異常がなく、診

断・治療に難渋する症例を経験する。近年、高解像度食道内圧検査 (High-resolution manometry; HRM) が開発され、上部食道括約筋から下部食道括約筋まで連続的に食道運動機能を評価できるようになったことで食道運動障害の診断が可能となった。さらに国際的な食道運動障害の診断基準であるChicago分類が提唱され、難治性の消化器症状を有する患者においてHRMでなければ診断できない食道運動障害 (食道アカラシアやジャックハンマー食道など) が一定数みられることが明らかになってきている¹⁾。しかし、HRMを施行できる施設は限られており、単施設における多数の症例のデータはまだ少ない。本研究は上部消化管症状を有する患者における食道内圧検査を評価することで食道運動障害を明らかにし、その頻度と病態を解明することを目的とした。

【方法】

2013年7月から2022年5月までに当院で上部消化管症状を有し、Starlet[®] (スターメディカル社、東京) を用いてHRMが施行された340例 (358検査) を抽出した。食道運動障害の診断にはChicago分類 version 3.0²⁾ を用い、HRMから算出された検査値のカットオフは既報に準じた³⁾。全例でHRM施行前に原因精査目的の上部消化管内視鏡検査 (EGD) が施行されており、EGDのデータを全例で確認した上で上部消化管術後の35例、好酸球性食道炎の50例、食道腫瘍による食道狭窄を有していた1例、EGDデータがない2例、HRMを完遂できなかった5例を除外した。また、期間内で同一患者に複数回施行された18検査も除外した。計258例 (258検査) のHRM所見と臨床所見を後方視的に抽出し、食道運動障害を有する割合と、各症状と食道運動障害の関連性を後方視的に検討した (図1)。

【結果】

患者背景を表1に示す。平均年齢は58 ± 15歳、

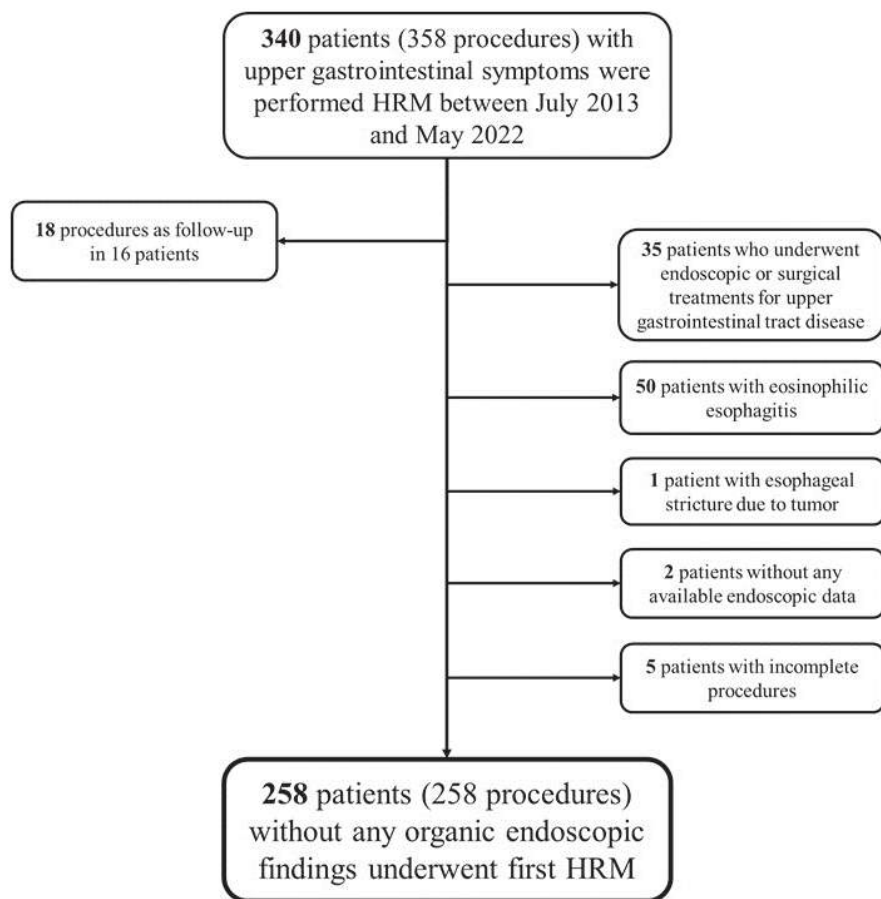


図 1 本研究のフローチャート

男性が118例（42.4%）であった。主症状はつかえ感が101例（39.1%）と最も多く、続いて胸焼け51例（19.8%）、胸痛19例（7.4%）であった。問診票から得られた症状スコアはFスケールが 16.6 ± 8.9 点、GERD Qが 7.3 ± 2.3 点、Reflux symptom indexが 13.4 ± 9 点、Eckardt scoreが 3 ± 3.1 点であった。HRMの結果をChicago分類 version 3.0に基づいて解析すると、Disorders with EGJ outflow obstructionが69例（26.7%）、Major disorders of peristalsisが12例（4.7%）、Minor disorders of peristalsisが36例（14%）であり、45.3%（117/258例）に何かしらの食道運動障害が認められた（表2）。食道運動障害の詳細はAchalasia Type I - III 33例（12.8%）、EGJ outflow obstruction 36例

（14%）、Distal esophageal spasm 2例（0.8%）、Jackhammer esophagus 4例（1.6%）、Absent contractility 6例（2.4%）、Ineffective esophageal motility 36例（14%）、Fragmented peristalsis 0例であった（表2）。主症状と食道運動障害の関連性を統計学的に解析すると、つかえ感を有する症例では66例（65.3%）が何らかの食道運動障害を有しており、他の症状と比較して有意に頻度が多かった（ $p < 0.001$ ）（表3）。更にChicago分類 version 3.0の各診断に分けて症状別に疾患を有する割合を検討すると、つかえ感を有する症例では食道アカラシアが30例（45.5%）と最も多く（ $p < 0.001$ ）、食道アカラシア以外にも多岐に渡る食道運動障害を有していた（表4）。一方で胸痛を

表 1 患者背景

Patients, n	258
Age (years), mean \pm SD	58 \pm 15
Sex (male), n (%)	118 (42.4)
Symptoms	
Dysphagia, n (%)	101 (39.1)
Heartburn, n (%)	51 (19.8)
Chest pain, n (%)	19 (7.4)
Globus sensation, n (%)	36 (14)
Dyspepsia-like, n (%)	29 (11.2)
Others, n (%)	22 (8.5)
Symptom scores	
FSSG, mean \pm SD	16.6 \pm 8.9
GERD Q, mean \pm SD	7.3 \pm 2.3
Reflux symptom index, mean \pm SD	13.4 \pm 9
Eckardt score, mean \pm SD	3 \pm 3.1
HRM	
IRP (mmHg), mean \pm SD	20.5 \pm 10
LES pressure (mmHg), mean \pm SD	37.6 \pm 35.3
Mean DCI (mmHg·s·cm), mean \pm SD	2,959 \pm 2,957
Max DCI (mmHg·s·cm), mean \pm SD	4,429 \pm 4,928
DL, mean \pm SD	7.4 \pm 1.5

Abbreviations: FSSG, Frequency Scale for GERD Symptoms; IRP, integrated relaxation pressure; LES, lower esophageal sphincter; DCI, distal contractile integral; DL, distal latency.

表 2 Chicago分類 version 3.0に基づいた食道運動障害を有する割合

Main categories	Patients, n (%)	Subcategories	Patients, n (%)
Disorders with EGJ outflow obstruction	69 (26.7)	Achalasia types I - III	33 (12.8)
		EGJ outflow obstruction	36 (14)
Major disorders of peristalsis	12 (4.7)	Distal esophageal spasm	2 (0.8)
		Jackhammer esophagus	4 (1.6)
		Absent contractility	6 (2.4)
Minor disorders of peristalsis	36 (14)	Ineffective esophageal motility	36 (14)
		Fragmented peristalsis	0
Abnormal 117/258 (45.3)			

Abbreviation: EGJ, esophagogastric junction.

有する症例においても47.4% (9/19例) が食道運動障害を有しており、また胸焼けを有する症例の1例には食道アカラシアが認められた。

【考察】

本研究では上部消化管症状を有する症例におけるChicago分類 version 3.0に基づく食道運動障害の割合を明らかにした。その結果、45.3%に何

表3 症状別にみた食道運動障害を有する割合

Symptoms	Disorders of esophageal motility	Normal	p-value
Dysphagia, n (%)	66 (65.3)	35 (34.7)	<0.001
Heartburn, n (%)	15 (29.4)	36 (70.6)	0.011
Chest pain, n (%)	9 (47.4)	10 (52.6)	0.854
Globus, n (%)	13 (36.1)	23 (63.9)	0.230
Dyspepsia, n (%)	9 (31)	20 (69)	0.100
Others, n (%)	5 (22.7)	17 (77.3)	0.026

表4 症状別にみた食道運動障害の詳細

Symptoms	Achalasia types I - III	EGJOO	DES	JE	AC	IEM	Total	p-value
Dysphagia, n (%)	30 (45.5)	17 (25.8)	2 (3)	4 (6)	2 (3)	11 (16.7)	66	<0.001
Heartburn, n (%)	1 (6.7)	4 (26.6)	0	0	1 (6.7)	9 (60)	15	0.123
Chest pain, n (%)	2 (22.2)	5 (55.6)	0	0	0	2 (22.2)	9	0.654
Globus, n (%)	0	6 (46.2)	0	0	1 (7.6)	6 (46.2)	13	0.198
Dyspepsia, n (%)	0	3 (33.3)	0	0	1 (11.1)	5 (55.6)	9	0.316
Others, n (%)	0	1 (20)	0	0	1 (20)	3 (60)	5	0.343

Abbreviations: EGJOO, esophagogastric junction outflow obstruction; DES, diffuse esophageal spasm; JE, jackhammer esophagus; AC, absent contractility; IEM, ineffective esophageal motility.sphincter; DCI, distal contractile integral; DL, distal latency.

かしらの食道運動障害が認められた。HRMが広く行われるようになるにつれて食道運動障害は徐々に解明されてきているが、多数例における疾患頻度に関する報告は少ない。既報ではHRMを受けた上部消化管症状を有する症例の約50%に食道運動障害が認められたと報告されている⁴⁾。この報告では disorders with EGJ outflow obstruction, major disorders of peristalsis, minor disorders of peristalsis がそれぞれ患者の11.3%、14%、24.5%に認められたが、本研究ではそれぞれ26.7%、4.7%、14%に認められた。この差は患者背景の差によるものと考えられる。患者の主訴を比較すると、先行研究ではつかえ・嚥下障害が29%、GERDが55%、胸痛が5%、その他が11%であったのに対し、本研究ではそれぞれ39.1%、19.8%、7.4%、33.7%であった。したがって、本研究では disorders with EGJ outflow obstruction が先行研究よりも多く認められたと推測される。また201人の患者を対象とした別の研究では、Chicago分類 version 3.0に基づくと思

者の58.7%に食道運動障害が認められたことが示された⁵⁾。本研究の主な結果である食道運動障害を有する割合は既報と類似していた。

本研究における症状別の食道運動障害の分析では、つかえ感を有する患者に有意に多くのEMDがあることが示された。さらに、つかえ感を有する患者には、アカラシア、EGJ outflow obstruction, major disorders of peristalsis など、様々な種類の食道運動障害が認められた。また症例数は少ないものの、胸痛を有する患者の47.4%に食道運動障害が認められた。これらの結果は、つかえ・嚥下障害や胸痛などの症状が食道運動障害とより強い関係にある可能性があることを示唆している。

本研究にはいくつかのLimitationがある。まず単施設の後方視的検討であり、主症状はカルテから抽出されたものである。第二に、典型的な好酸球性食道炎の内視鏡所見を有さない症例においてランダム生検が全例に施行されていない。しかし、本研究はHRMを受けた258例を対象として

おり、単一施設としては多数例を検討である。食道運動障害はまだ十分に解明されているとは言えず、症状と食道運動障害との関連性を検討した本研究結果は日常診療に役立つものと考えられる。

結論として本研究では、Chicago分類 version 3.0に基づいて診断すると上部消化管症状を有する症例の45.3%に食道運動障害が認められた。特に、つかえ感を有する症例では食道アカラシアを始めとした食道運動障害を有する割合が有意に高かった。HRMはEGDで明らかな異常がないにも関わらず、難治性の上部消化管症状を有する症例の精査の一つとして活用されるべきである。

【文献】

1. Pandolfino JE, Kahrilas PJ: American Gastroenterological Association. AGA technical review on the clinical use of esophageal manometry. *Gastroenterology* 128: 209-224, 2005
2. Kahrilas PJ, Bredenoord AJ, Fox M, Gyawali CP, Roman S, Smout AJ, et al.: The Chicago Classification of esophageal motility disorders, v3.0. *Neurogastroenterol Motil* 27: 160-174, 2015
3. Kuribayashi S, Iwakiri K, Kawada A, Kawami N, Hoshino S, Takenouchi N, et al.: Variant parameter values-as defined by the Chicago Criteria-produced by ManoScan and a new system with Unisensor catheter. *Neurogastroenterol Motil* 27: 188-194, 2015
4. Monrroy H, Cisternas D, Bilder C, Ditaranto A, Remes-Troche J, Meixueiro A, et al.: The Chicago Classification 3.0 results in more normal findings and fewer hypotensive findings with no difference in other diagnoses. *Am J Gastroenterol* 112: 606-612, 2017
5. Jandee S, Jandee K.: Diagnostic yield of high-resolution esophageal manometry with Chicago Classification version 3.0 in Thai patients. *J Neurogastroenterol Motil* 27: 533-539, 2021

好酸球性食道炎及び無症候性食道好酸球症の病態に関する臨床病理学的研究

鈴木 悠悟、布袋屋 修

【要約】

背景: 好酸球性食道炎 (EoE) は食道への好酸球の浸潤により慢性炎症を来し、様々な臨床症状を来す疾患である。また、症状のない無症候性食道好酸球症 (aEE) は、EoEの潜在的な前駆症状であると考えられている。今回、aEEとEoEの臨床病理学的な違いを探索することで、EoEの症状に関与する因子を明らかにすることを目的とした。

方法: 内視鏡超音波検査および高解像度マンモトリーを受けた食道好酸球症の患者45名を対象とした。逆流性食道疾患の症状スケール (Frequency Scale for the Symptoms of Gastroesophageal Reflux Disease ; F-scale) に基づいて、aEE群 (n=16) とEoE群 (n=29) に分類し、臨床病理学的所見について比較検討を行った。

結果: F-scaleの中央値は、aEE群が3.0、EoE群が10.0で、患者背景、内視鏡所見、病理組織学的所見に有意差は認められなかった。食道壁は、胸部下部食道でEoE群の方が有意に厚く、cut off値は、食道全体の壁の厚さで3.13mm、表層から粘膜下層までの厚さで2.30mmであった。食道内圧検査では、aEE群で7人(43.8%)、EoE群で15人(51.7%)に異常所見がみられた。

結論: 胸部下部食道の壁肥厚がEoE患者における症状に関連する重要な臨床因子であることが示唆された。

【目的】

EoEは、Th2型の過剰な免疫応答により食道に好酸球優位の炎症を引き起こし、嚥下障害やつかえ感といった消化管症状を来す慢性の免疫性食道疾患である。本邦のガイドラインにおける好酸球性食道炎の診断基準では、食道機能障害に起因する臨床症状を有することが必須項目となってい

る^{1,2)}が、近年では消化器症状のないaEEが好酸球性食道炎と同様もしくは前駆病態であると報告されてきている。そこで食道好酸球症において消化器症状に関連する臨床病理学的な要因を明らかにすることを目的とした。

【方法】

2010年1月から2023年7月までに当院で上部消化管内視鏡検査を施行し、生検で15/HPF以上の好酸球浸潤を認めた食道好酸球症176例のうち、超音波内視鏡検査 (EUS) による評価を行った45症例を対象とし、Frequency Scale for the Symptoms of GERが6点以下をaEE群、7点以上をEoE群に分類して臨床病理学的な所見の比較検討を行った。

【結果】

男女比はaEE: 15/1、EoE: 23/6、平均年齢はaEE: 53.6 ± 13.3 歳、EoE: 48.7 ± 11.4 歳であった。BMI、Brinkman index、飲酒量、アレルギー性疾患の既往は両群に差は認められなかった。また、末梢血好酸球数中央値 (IQR) は274 (129-379)/ μL vs 252 (189-391)/ μL 、血清IgE中央値 (IQR) は93 (47-148) IU/mL vs 247 (70-757) IU/mLと両群で有意差は認められなかった。内視鏡所見はEosinophilic Esophagitis Endoscopic Reference Scoreで、縦走溝・輪状溝・白色渗出物、浮腫、狭窄のいずれの項目も有意差は認められなかったが、EoE群で狭窄症例が多い傾向にあった ($p=0.08$)。病理組織学的所見はEosinophilic Esophagitis Histologic Scoring Systemのlamina propria fibrosisがEoE群で高い傾向にあった ($p=0.064$)。EUSで食道壁を計測すると胸部下部食道全層と粘膜下層までの厚さがEoE群で有意に厚かった (図1, 2; 中央値 [IQR], 3.0 [2.6-3.2] vs 3.6 [3.2-4.4] mm; $p=0.001$ 、2.0 [1.7-2.4] vs 2.6 [2.4-3.3] mm; $p=0.001$)。Cut off値を食

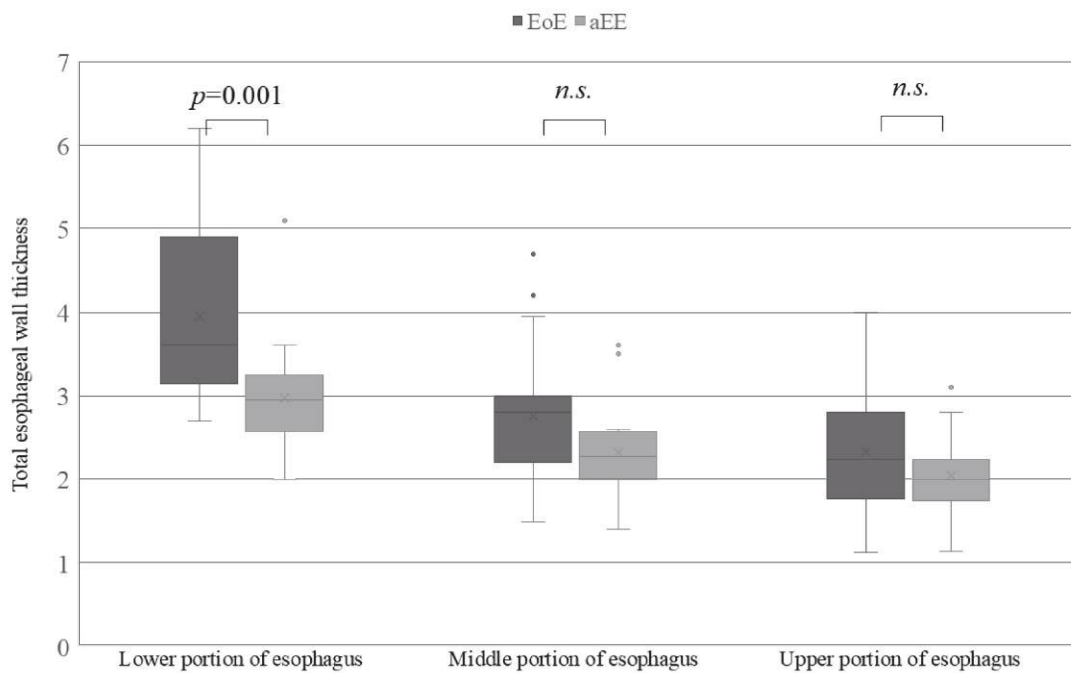


図 1 食道全層の厚さ

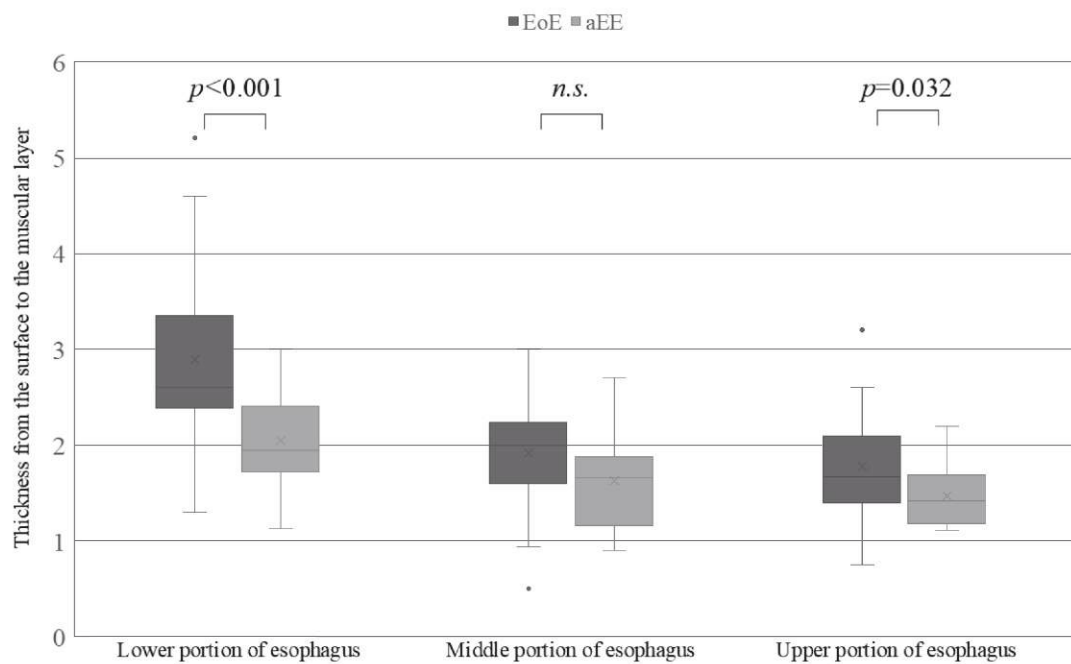


図 2 表層から粘膜下層までの厚さ

道全層で3.1mm、粘膜下層までで2.3mmとした場合、食道全層で84.0%の感度、75.0%の特異度；表層から粘膜下層までの厚さで84.0%の感度、68.7%の特異度であった。

【考察】

近年ではaEEはEoEと同一疾患のスペクトラム上に存在する病態と考えられている³⁻⁵⁾。aEEは臨床所見、内視鏡所見、免疫組織学的所見でEoEと差がないことが示唆されており、EoEに関連する症状に寄与する因子については報告が限られる。食道壁の肥厚は食道運動障害と関連していると一般的に考えられており下部食道括約筋における筋層の肥厚の程度が、アカラシア、遠位食道痙攣、および過剰収縮食道の重症度と関連していることが示されている⁶⁾。本研究では、aEE群とEoE群の間で食道壁の厚さに有意な差があり、特に食道下部において顕著であった。本研究から食道下部の壁の肥厚の程度は、EoEの症状の発症に関与する臨床的に評価することができる重要な要因であると想定された。また、食道筋層における密な好酸球浸潤が、EoE患者のみならず、jackhammer esophagus や nutcracker esophagus 患者においても食道の運動障害および病気の重症度と関連していることが報告されている⁷⁾。本研究でも、EoE群において筋層有意に厚かった。さらに、表層から粘膜下層までの厚さと食道全層の比率に有意な差はなかったが、EoE群ではその比率が高くなる傾向が見られた。このことからEoEにおいては好酸球浸潤に関連する慢性的な炎症が主に粘膜層および粘膜下層で進行し、線維化を来して症状の発症に関与することが示唆された。この点を支持するものとして、EoE群は病理学的所見の粘膜固有層の線維化スコア (LPF) が高い傾向が見られた。組織学的診断は生検によって食道の表層のみを評価できるが、LPFの評価は将来的なEoEの症状の発症予測にも役立つ可能性が考えられた。

この研究の結果から、EoE患者において、食道下部の壁肥厚が症状に関連する重要な臨床因子の一つであることが示唆された。現在、食道壁の厚さはEoEの評価項目には含まれていないが、EoEの病因解明において有用である可能性がある。

【文献】

1. Dellon ES, Muir AB, Katzka DA, Shah SC, Sauer BG, Aceves SS, et al.: ACG Clinical Guideline: Diagnosis and Management of Eosinophilic Esophagitis. *Am J Gastroenterol* 120: 31-59, 2025
2. Lucendo AJ, Molina-Infante J, Arias Á, von Arnim U, Bredenoord AJ, Bussmann C, et al.: Guidelines on eosinophilic esophagitis: evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults. *United European Gastroenterol J* 5: 335-358, 2017
3. Ishimura N, Sumi S, Okada M, Mikami H, Okimoto E, Nagano N, et al.: Is Asymptomatic Esophageal Eosinophilia the Same Disease Entity as Eosinophilic Esophagitis? *Clin Gastroenterol Hepatol* 17: 1405-1407, 2019
4. Kitamura H, Tanaka F, Nadatani Y, Otani K, Hosomi S, Kamata N, et al.: Eosinophilic esophagitis and asymptomatic esophageal eosinophilia display similar immunohistological profiles. *J Clin Biochem Nutr* 68: 246-252, 2021
5. Suzuki Y, Iizuka T, Hosoi A, Kikuchi D, Okamura T, Ochiai Y, et al.: Clinicopathological Differences between Eosinophilic Esophagitis and Asymptomatic Esophageal Eosinophilia. *Intern Med* 61: 1319-1327, 2022
6. Santander C, Perea E, Caldas M, Clave P: Catheter-based high-frequency intraluminal ultrasound imaging is a powerful tool to study esophageal dysmotility patients. *Ann N Y Acad Sci* 1395: 60-66, 2017
7. Nakajima N, Sato H, Takahashi K, Hasegawa G, Mizuno K, Hashimoto S, et al.: Muscle layer histopathology and manometry pattern of primary esophageal motility disorders including achalasia. *Neurogastroenterol Motil* 29, 2017

(4) 肝臓疾患

代謝異常関連脂肪性肝障害 (MASLD) 病態解析における リキッドバイオプシーの臨床的有用性

芥田 憲夫

【要約】

代謝異常関連脂肪性肝障害 (MASLD) の肝病態進行における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。連続肝生検に基づく縦断的な検討で、血清 miR122 動態は肝発癌率と生存率を含む予後予測に有用であった。血清 TERT C228T は高分化型肝癌を含む肝癌早期診断に有用であった。血清中の miR122 や TERT C228T を含む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将来期待される。

【目的】

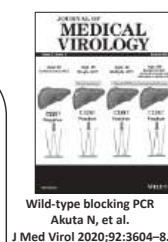
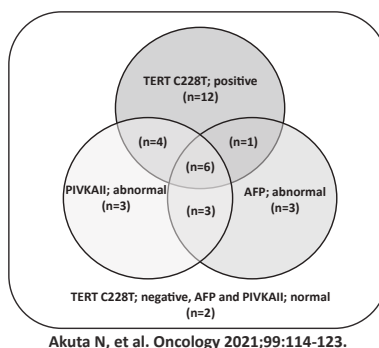
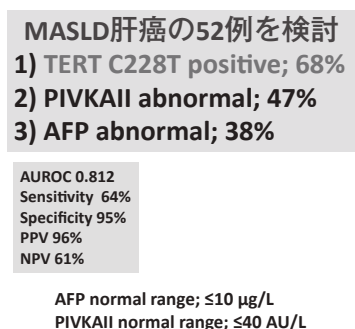
代謝異常関連脂肪性肝疾患 (MASLD) におけるプレジジョン・メディシンが期待されており、病態進行における宿主遺伝子要因の解析と非侵襲的診断の開発は喫緊の課題といえる。エピゲノム要因として血液中の microRNA (miRNA) 量が肝疾患の病態進行に影響することが報告されてい

る¹⁾ が MASLD 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血液中の cell-free DNA を用いた体細胞遺伝子変異、特に肝癌では TERT プロモーター変異 (TERT C228T) の有用性が報告されている²⁾。本研究では MASLD の病態解析における血液検体を用いた非侵襲的なリキッドバイオプシーの臨床的有用性を検討した。

【方法】

〔検討1〕 虎の門病院肝臓内科で連続肝生検を施行し線維化が改善しなかった肝病態悪化の危険性の高い MASLD の 64 例を対象とし、血清 miR122 動態から見た累積肝発癌率と累積生存率を検討した (Log-rank test)。血清 miR122 は Real time PCR で解析し、miR122 相対定量値は ddCT 法で評価した³⁾。

〔検討2〕 虎の門病院肝臓内科で肝癌と診断さ



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

図1 虎の門病院における背景肝がMASLD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

れた151例を対象とした。肝癌分化度と各種腫瘍マーカー（AFP/PIVKAI/ TERT C228T）との関係を解析し、TERT C228T単独陽性に影響する要因を検討した。血清TERT C228TはWild-type blocking PCRで測定し、全体の0.7%以上の微量な変異型まで検出可能な高感度測定系で判定した（図1）⁴⁾。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953, 1135, 1843）。

【結果】

〔検討1〕 連続肝生検の肝生検間隔は中央値3.0年であった。初回miR122値に対する2回目の比率をmiR122 ratioと定義すると、ratio <0.5倍の症例は≥0.5倍の症例よりも累積肝発癌率は高率で（Log-rank test; $P=0.027$ ）、累積生存率は低率であった（Log-rank test; $P=0.083$ ）（図2）。血清miR122動態は肝発癌率と生存率を含む予後予測に有用であり、miR122は肝病態進行に抑制的に作用することが確認された。

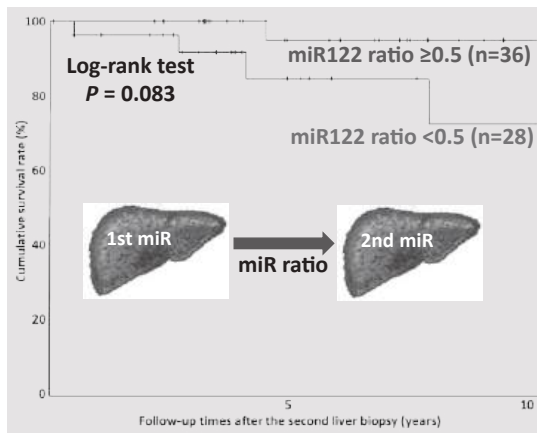
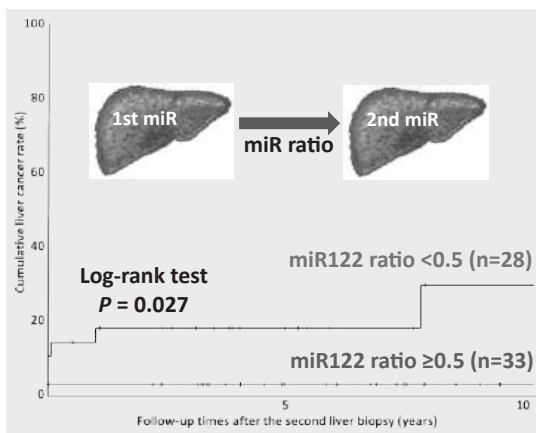
〔検討2〕 肝癌分化度から見た腫瘍マーカー陽性率: TERT C228T単独陽性率/AFP単独陽性率/PIVKAI単独陽性率は、高分化型を含む症例で21/8/15%、中分化型で14/9/24%、低分化型で

0/5/15%と、高分化型でTERT陽性率が高率であるのに対して中分化型ではPIVKAI陽性率が高率であった。血中TERT C228Tは高分化型肝癌を含む肝癌早期診断に有用であり、多段階発癌の早期への影響を示唆する所見が確認された。

【考察】

MASLD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MASLD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、肝臓内に多く存在するmiR122は肝癌を含む病態進行に抑制的に作用することが報告されている¹⁾。今回の連続肝生検に基づく血清miR122動態の検討では、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。この様に、血清miR122はMASLDの肝病態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。TERT変異は肝癌の多段階発癌における早期の段階に関与しているとされる。特に、肝硬変の段階で肝臓の組織中に9%、前癌状態のdysplastic noduleでは19%、早期肝癌では60%組織中にTERT変異が存在していると報告されている⁵⁾。但し、癌細胞から血中に染み出した微量なcfDNAをPCRで増幅して検出できれ

miR122 ratios (1回目miR122に対する2回目miR122の比率)



連続肝生検に基く縦断的な検討でも血清miR122動態は予後予測に有用であった

図2 虎の門病院における連続肝生検を施行したMASLD症例で線維化が改善しなかった64例における血清miR122動態から見た累積肝発癌率と生存率

ば、より非侵襲的なリキッドバイオプシーで肝癌早期診断に繋げることができる。今回の検討では、血清TERTは高分化型肝癌を含む肝癌早期診断に有用であることが確認された。MASLDの症例は本邦に約2,000万人以上は存在し、肝硬変や肝癌を含む肝病態進行例が増加傾向にある。このよう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⁶⁾。今回報告した血清中のmiR122やTERT C228Tを含む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将来期待される。

【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. *New Engl J Med* 380: 1450-1462, 2019
3. Akuta N, Kawamura Y, Suzuki F, Saitoh S, Arase Y, Kunitomo H, Sorin Y, Fujiyama S, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Suzuki Y, Kobayashi M, Ikeda K, Kumada H: Impact of circulating miR-122 for histological features and hepatocellular carcinoma of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. *Hepatol Int* 10: 647-656, 2016
4. Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Fujiyama S, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Suzuki Y, Kumada H: 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
5. Nault JC, Calderaro J, Di Tommaso L, Balabaud C, Zafrani ES, Bioulac-Sage P, Roncalli M, Zucman-Rossi J: Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology* 60: 1983-1992, 2014
6. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD): European Association for the Study of the Liver (EASL); European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO). *J Hepatol* 81: 492-542, 2024

C型肝炎ウイルス排除後の肝発癌リスクとしての 代謝要因の検討

瀬崎 ひとみ、鈴木 文孝

【要約】

C型慢性肝疾患に対する抗ウイルス療法によるSVR後長期にわたる経過観察の検討によりSVR後の肝発癌には肝線維化のみならず、糖尿病、飲酒に加え、高BMIもリスク要因となりえることが判明した。これらのリスク要因を踏まえたフォローアップ戦略の構築が重要となるものと思われる。

【目的】

C型慢性肝疾患はウイルス排除(SVR)後長期経過しても肝発癌を認める症例がある。肝線維化のみならず、それ以外のリスク因子を同定することにより肝癌の早期発見につなげることができ、SVR後のフォローアップをどのように行っていくかを議論することが可能となるものと思われる。そこで本研究ではIFN及びDAAs-SVR後長期にわたり経過を追っている症例で、SVR後肝発癌に関わる因子を同定し、特に代謝要因の影響について明らかにすることを目的とした。

【方法】

当院においてC型慢性肝疾患に対しIFN及びDAAs治療を行いSVRを達成した症例の内、治療開始前にHCCの既往なく、治療終了後24週以内にHCC発症なく、治療終了後24週以上経過観察可能な症例5,232例を対象とした。SVR24達成時点を起点とし、肝硬変の有無、飲酒(男性20g/日以上、女性14g/日以上)の有無、糖尿病の有無、BMIにより累積肝発癌率を検討し、SVR後肝発癌した症例の特徴を検討した。それらの因子を用いて肝発癌リスクのカテゴリー分類を行い、リスクカテゴリー別の累積肝発癌率を検証し、肝発癌リスクの層別化が可能かについて検討した。

【結果】

IFN-SVR群(n=2796)とDAAs-SVR群(n=2436)

はそれぞれ女性58.6%、40.0%、年齢中央値51歳と64歳、肝硬変割合が7.5%と22.3%と両群に有意差を認めた。また、IFN-SVR群で飲酒、喫煙歴、BMIが高いなど、両群の背景に差を認めた。経過観察期間は、IFN-SVR群で10.4年、DAAs-SVR群で5.6年であった。10年累積肝発癌率は、慢性肝炎で2.6%、肝硬変で19.3%と有意差を認め、1,000人年あたりの罹患率は肝硬変症例は慢性肝炎症例の8倍となっていた。Cox比例ハザードモデルで抽出されたSVR24以降の肝発癌に寄与する因子は、男性、肝硬変、SVR24時点の年齢55歳以上、GGT24U/L以上、FIB-4高値、AFP4.0 μg/L以上といった因子が抽出されたが、飲酒、糖尿病、BMIは有意な因子としては抽出されなかった。そこで、糖尿病の有無、飲酒の有無、BMIによりそれぞれ累積肝発癌率を検討すると、10年累積肝発癌率は、糖尿病なし4.4%/あり8.8% (P<0.001)、BMI23未満4.4%/23以上5.8% (P=0.005)、飲酒なし4.6%/あり6.4% (P=0.014)といずれも有意差を認めた。BMIに着目し、糖尿病の有無、飲酒の有無によりBMI23で層別化した10年累積肝発癌率は (BMI23未満/23以上)、糖尿病なしかつ飲酒なしで3.8%/5.1%と有意差を認めた (P=0.007)が、糖尿病ありまたは飲酒ありではBMIにより差を認めなかった。また、線維化の評価をSVR24時のFIB-4 2.67で分類すると、10年累積肝発癌率は (BMI23未満/23以上) FIB-4 1.30未満で0.7%/1.3% (P=0.037)、1.30-255で3.3%/4.7% (P=0.017)、2.67以上でも10.3%/16.1% (P=0.016)と有意差を認めた。そこで、高度線維化群 (SVR24時FIB-4 2.67以上n=1206)、代謝要因群 (SVR24時FIB-4 2.67未満かつ糖尿病または飲酒ありn=1106)、高BMI群 (SVR24時FIB-4 2.67未満かつ糖尿病なしかつ飲酒なしかつBMI23以上n=1077)、リスクなし群 (上記以外n=1659) とカ

テゴリー分類し、累積肝発癌率を検討したところ、Cox 比例ハザード回帰によりリスクなし群に比しそれぞれハザード比 8.09, 2.58, 1.93 と肝発癌リスクの層別化は良好であった。さらに、リスク要因なし群で FIB4 1.30 未満と 1.30-2.66 による発癌率を検討すると、飲酒なし、糖尿病なし、BMI23 未満、SVR24 時点の FIB-4 1.30 未満の症例からの肝発癌は認めなかった。

【考察】

IFN による発癌抑制効果については多くの報告があり、我々も IFN 治療後の 10 年累積発癌率は non-SVR 群が 15.0% であったのに対し、SVR 群は 1.5% と有意に肝発癌が抑制されたことを報告した¹⁾。さらに DAAs 治療による SVR 症例と IFN 治療による SVR 症例の発癌率は同等であること^{2, 3)} が既に報告されている。また、IFN 治療時代における SVR 症例の肝発癌リスク因子として、肝線維化のみならず、2 型糖尿病や飲酒については報告されていたが⁴⁾、一方で、SVR 後長期経過後発癌におけるリスク因子は明らかでなく、特に飲酒、糖尿病、BMI といった代謝要因が肝発癌にどのように影響するかについて解明する必要があるが、

本研究により、C 型慢性肝疾患は抗ウイルス治療によって SVR を達成後 10 年以上経過しても肝発癌を認める症例があることが明らかとなり、特に肝線維化の進行した症例では何年経過しても発癌のリスクが残存していることが判明した。一方、飲酒や糖尿病、高 BMI などの代謝要因を有する症例は、5 年以上経過してから発癌率が上昇してくる傾向があった。また、飲酒や糖尿病がなくても、BMI が 23 以上と高いと、BMI 単独で肝発癌のリスク因子になり得ることが判明した。以上のことから、抗ウイルス療法開始前より肝線維化の進行している症例は、SVR 後も肝発癌監視を継続していく必要があることは明白であるが、糖尿病、飲酒あるいは高 BMI の症例も長期に経過をみていくと肝発癌のリスクとなり得るため、注意すべき症例であると思われる。一方で、これら代謝要因なく、肝線維化の進行していない症例からも 25 例の肝発癌症例を認めたが、肝発癌症

例はいずれも SVR24 時点の FIB-4 値が 1.30 以上の症例であった。逆に言えば、リスク因子なく、FIB-4 1.30 未満の症例は肝発癌のリスクは極めて低く、こういった症例は SVR 後の経過観察を終了として良いかもしれない。ただし、このカテゴリーに分類される症例は若年例が多く、今回の検討症例全体の約 10% に過ぎないことも重要な点である。

SVR 後の肝発癌には肝線維化のみならず、糖尿病、飲酒に加え、高 BMI もリスク要因となりえることが判明した。今後さらに SVR 後の経過観察期間が長期となる症例が増加する中で、これらのリスク要因を踏まえたフォローアップストラテジーの構築が必要であると思われる。

【文献】

1. Ikeda K, Saitoh S, Arase Y, et al.: Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: A long-term observation study of 1,643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *Hepatology* 29: 1124-1130, 1999
2. Kobayashi M, Suzuki F, Fujiyama S, et al.: Sustained virological response by direct antiviral agents reduces the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with HCV infection. *J Med Virol* 89: 476-483, 2017
3. Ioannou GN, Green PK and Berry K: HCV eradication induced by direct-acting antiviral agents reduces the risk of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 68: 25-32, 2018
4. Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, et al.: Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology* 57: 964-973, 2013

【発表に関する事項】

SVR 後肝発癌リスクとしての代謝要因のインパクト

第 59 回日本肝臓学会 シンポジウム 4-6
2023 年 6 月 15 日

HBe抗原陰性B型慢性肝炎症例における、高感度HBcrAg測定の影響

保坂 哲也、鈴木 文孝

【要約】

B型慢性肝炎症例において血清HBコア関連抗原(HBcrAg)は肝内のcccDNA(完全2本鎖閉環状DNA)やHBVの転写活性を反映するマーカーとして実臨床で広く使用されているマーカーであり、昨今このHBcrAgの超高感度測定系(iTACT-HBcrAg)が使用可能となった。HBe抗原陰性抗ウイルス無治療のB型慢性肝炎非肝硬変症例において、iTACT-HBcrAgは肝癌リスク評価とHBsAg陰性化予測という、経過良好不良の両面において有用なマーカーであることが示された。

【目的】

HBe抗原陰性B型慢性肝炎症例は、活動性肝炎と非活動性キャリアが存在するheterogeneousな集団である。これらの症例に対する抗ウイルス療法導入の判断はALT値とHBVDNA量を用いて行うが、この2者のみでは、治療導入判断に苦慮する場合もしばしばある。また昨今HBVマーカーのうちHBコア関連抗原(HBcrAg)の高感度化が進められたが、その有用性についてはまだ不明な点が多い。そこで今回我々はHBe抗原陰性B型慢性肝炎症例における、高感度HBcrAg測定(iTACT-HBcrAg)の臨床アウトカムへの影響(HBs抗原陰性化、肝発癌等)に与える影響を評価することを目的とした。

【方法】

対象は当院にて抗ウイルス療法未治療のHBeAg陰性非肝硬変症例のうち1年以上経過観察し、ベースラインのHBcrAg量をiTACT-HBcrAg含む測定系で測定し得た1,738例である。iTACT-HBcrAgの定量下限は2.1 log U/mLであり、iTACT-HBcrAg量はベースラインの保存血清より測定を行った。ベースラインのHBcrAg量から見た肝炎病期の比較、肝発癌、HBsAg陰性化への関連性を検討した。

HBcrAg量により以下の4群に分類し種々の解析を行った。A群: <2.1 log U/mL、B群2.1-2.9、C群3.0-3.9、D群 \geq 4.0。肝炎病期はAASLD(アメリカ肝臓学会)ガイドラインを元に非活動期(IC)、活動期(IA)、グレーゾーン(GZ)の3つに分類した。検討項目は以下の通りである。

(1)肝細胞癌発症、(2)HBsAg陰性化(<0.05 IU/mL)、(3)ALT上昇(正常上限の2倍以上の上昇)。

【結果】

(1)肝炎病期別のベースラインのiTACT-HBcrAg量(中央値)は非活動期:2.3 log U/mL、グレーゾーン:3.1、活動期:4.4と肝炎病期の進行と共にHBcrAgが高値になる傾向を示した(P-trend < 0.001)。iTACT-HBcrAg量はHBVDNA量とは正の相関($R^2=0.344$)を示したが、HBsAg量とは相関関係を示さなかった($R^2=0.068$)。

また非活動期+グレーゾーン症例におけるその後のALT上昇(正常上限の2倍以上)の発生率は、D群>C群>B群=A群の順でALT上昇の発生率が高率(P<0.001)であり、HBVDNA量で調整した多変量解析でも同様の傾向を示した。

(2)肝癌罹患率はA群0.5、B群1.1、C群1.6、D群8.5千人/年であり、A群の肝癌発生が極めて低率であった(P<0.001)。肝炎病期や背景因子で調整した多変量解析において、D群と比較してC群の肝癌発症ハザード比(95%信頼区間)が0.28(0.13-0.58)、B群0.16(0.07-0.46)、A群0.05(0.01-0.18)とA群は肝癌発症リスクの極めて低い集団であることが示唆された。一方でHBVDNA量については、多変量解析で肝癌発症との関連性を認めなかった。

(3)非活動期とグレーゾーン期におけるiTACT-HBcrAgによる肝癌リスクの層別化を行ったとこ

ろ、非活動期でiTACT-HBcrAg ≥ 4.0 の症例の肝癌発症ハザード比95%信頼区間)が8.31 (1.02-67.9)、グレーゾーン症例においてもハザード比5.62 (1.30-24.2)と、iTACT-HBcrAgにより肝癌リスクを明確に層別化することができた。

(4)年率HBsAg陰性化率はA群20.0、B群13.4、C群12.6、D群13.1千人/年と他の群と比べてA群でのHBsAg陰性化率が高率であった($P < 0.001$)。HBsAg量や各種因子で調整した多変量解析において、D群と比較してC群のHBsAg陰性化ハザード比(95%信頼区間)が1.55 (1.01-2.36)、B群1.52 (0.98-2.36)、A群2.61 (1.67-4.06)とA群はHBsAg陰性化を達成しやすい集団であることが示唆された。またHBsAg量については、既報の通りHBsAg量低値がその後のHBsAg陰性化と関連することが多変量解析で示された。

【考察】

抗ウイルス療法未治療のHBeAg陰性非肝硬変症例においてiTACT-HBcrAg非検出症例は病期進行や肝癌発症の低リスク集団のみならずHBsAg陰性化を達成しやすい集団であることが示唆された。iTACT-HBcrAgは肝癌リスク評価とHBsAg陰性化予測という、経過良好不良の両面において有用なマーカーであることが示された。既存のHBVDNA量と比べてもiTACT-HBcrAgは肝癌リスク評価に有用なマーカーであることが示された。

【文献】

1. Suzuki F, Hosaka T, Imaizumi M, et al.: Potential of ultra-highly sensitive immunoassays for hepatitis B surface and core-related antigens in patients with or without development of hepatocellular carcinoma after hepatitis B surface antigen seroclearance. *Hepatology* 51: 426-435, 2021
2. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, et al.: Ultrasensitive Assay for Hepatitis B Core-Related Antigen Predicts Hepatocellular Carcinoma Incidences During Entecavir. *Hepatology* 66: 36-49, 2022
3. Suzuki F, Hosaka T, Suzuki Y, et al.: Clinical outcome after cessation of nucleos(t)ide analog treatment in chronic hepatitis B patients who achieved HBsAg seroclearance. *J Gastroenterol* 59: 34-44, 2024

【発表に関する事項】

第60回日本肝臓学会総会シンポジウムで学会発表(口演)(2024年6月)
第28回日本肝臓学会大会国際ワークショップで学会発表(口演)(2024年11月)
アメリカ肝臓学会(AASLD)で学会発表(口演)(2024年11月)

(5) 循環器疾患

中等度大動脈弁狭窄症の手術適応に関する運動生理学的な考察

伊東 秀崇、児玉 隆秀

【要約】

大動脈弁狭窄症に対する治療法は外科的手術およびカテーテル治療があるが、手術適応に難渋する症例も存在する。ガイドラインでは、運動負荷試験を実施し症状の有無や血圧の低下を確認することが推奨されているが、我が国では大動脈弁狭窄症に対する運動生理学的な考察はまだ少ないのが現状である。今回の研究では、大動脈弁狭窄症の治療適応を検討するために行った心肺運動負荷試験の結果と治療を行った対象者の運動生理学的なパラメータを比較することで、手術適応に関する運動生理学的な考察を行った。

【目的】

2013年以降、我が国において大動脈弁狭窄症に対して経カテーテル的大動脈弁置換術が開始され、現在適応が徐々に拡大している。手術適応に関しては、ハートチームカンファでその適応が話し合わせ、外科的手術またはカテーテル手術の適応が決定される。現在ガイドライン¹⁾では、有症候性の重症大動脈弁狭窄症や超重症の大動脈弁狭窄症などが手術適応となっている。しかし、手術適応を検討する際、無症候性の重症大動脈弁狭窄症や、有症候性の大動脈弁狭窄症の患者もおり、その手術適応に関しては議論の余地がある。ガイドラインでは、運動負荷を行い血圧低下や胸部症状を確認することを推奨しているが、大動脈弁狭窄症は過度な運動負荷による心不全増悪が引き起こされるリスクがあり、手術適応となる有症候性の大動脈弁狭窄症では運動禁忌²⁾であることから、多くの医療機関で運動負荷試験を大動脈弁狭窄症患者にかけることはためらわれるのが現状である。そのため、手術適応を検討するような症例に対しての運動生理学的な考察は非常に少ない³⁾。

今回の研究では、手術適応となる大動脈弁狭窄症の群と手術適応とならなかった群の運動生理学的な背景因子を比較することで、手術適応に参考となる運動生理学的なパラメータを検証することを目的とした。

【方法】

2022年4月から2024年12月までに中等度以上の大動脈弁狭窄症で心肺運動負荷試験を行った37例を対象とした。この37例を手術を行った治療実施群と、治療適応判断のためにCPXを行った群（手術は行わなかった）に分けて解析を行った。中等度以上の大動脈弁狭窄症に心肺運動負荷試験をかける群は、運動負荷時の症状の出現や血圧低下などの出現の有無及び運動耐容能（最高酸素摂取量: Peak O₂や嫌気性代謝閾値: AT）の低下の有無を確認することが目的に行われる。本来は、手術を実施した対象者も同様に手術前に心肺運動負荷試験を行うべきだが、治療適応患者は、運動負荷禁忌であり現実的にはそのような患者のデータを収集することが不可能である。治療実施群は手術後3か月以内に心肺運動負荷試験を行っており、運動耐容能の指標は、リハビリを行ったとしても、回復に数か月かかることから手術後の心肺運動負荷試験の結果でも、手術前の状態と仮定して解析することが可能である。

運動負荷試験には、ミナト医科学の呼気ガス分析器を使用した。運動負荷プロトコールは検査に立ち会う医師が決定した。運動負荷装置は、全例エルゴメータを用いている。

なお、今回解析に利用したパラメータは、循環器専門医が大動脈弁狭窄症の手術適応を判断するうえで運動生理的に妥当であると考えられるパラメータを使用した。特に、換気効率の指標となるVE V.S. VCO₂ slope⁴⁾ および、一回心拍出量

の指標である VO_2/HR ：酸素脈⁵⁾、心拍出の指標であるMinimum VE/ VCO_2 ⁶⁾、Fet CO_2 などを解析用パラメータとして解析した。逆に、手術後早期に回復してしまう運動時立ち上がり時定数(τ_{on})やプロトコール間での比較が困難である $\Delta VO_2/\Delta WR$ は今回の解析の対象から除外した。

【結果】

解析対象者のうち治療実施群は28名で76%、治療適応判断群は9名で25%であった。そのうち男性は、7名(78%)と18名(64%)であった。治療実施群の左室収縮能は $57.8 \pm 8.0\%$ 、治

療適応判断群は $60.9 + 7.4\%$ と両群に差は認めなかった。なお、治療適応判断群の大動脈弁の評価は、大動脈弁流速が $3.6 \pm 0.6\text{m/s}$ 、平均圧格差 $27.9 \pm 9.9\text{mmHg}$ 、AVA $1.06 \pm 0.4\text{cm}^2$ であった。重症度は、中等症が5例、中等症から重症が2例、重症が2例であった。なお手術実施群の大動脈弁の評価は術後でありすべて改善していた(表1)。運動生理学的パラメータで両群に統計学的な有意差あったのは、%Peak VO_2/HR (酸素脈 O_2 pulseの%割合)のみであった。なお、最高酸素摂取量は、治療実施群は治療適応判断群と

表 1 背景因子

	治療適応判断群	治療実施群	<i>P-value</i>
サンプル数	9 24%	28 76%	
年齢	73 ± 8.0	74.6 ± 11	0.346
性別 (男性)	7 78%	18 64%	0.566
EF %	57.8 ± 8.0	60.9 ± 7.4	0.555
大動脈弁流速 m/s	3.6 ± 0.6	2.3 ± 0.4	0.039
Mean PG mmHg	27.9 ± 9.9	10.5 ± 4.0	<0.001
AVA cm^2	1.06 ± 0.4	1.5 ± 0.4	0.448
重症度			
Moderate	5 55.6%	—	—
Moderate-severe	2 22.2%	—	—
Severe	2 22.2%	—	—

表 2 両群における運動生理学的パラメータ

	治療適応判断群	治療実施群	<i>P-value</i>
Peak VO_2	16.6 ± 4.3	15.8 ± 5.2	0.084
%Peak VO_2	75.6 ± 14.2	72.4 ± 19.5	0.159
AT	12.4 ± 2.9	11.6 ± 2.9	0.731
%AT	87.5 ± 17.1	82.8 ± 19.6	0.622
VE V.S. VCO_2 slope	37.6 ± 7.3	40.9 ± 10.5	0.289
%VE V.S. VCO_2 slope	133.9 ± 26.0	144.8 ± 34.8	0.348
Peak VO_2/HR	9.2 ± 3.6	7.4 ± 2.6	0.181
%peak VO_2/HR	77.1 ± 26.1	62.9 ± 16.1	0.004
Minimum VE/ CO_2	38.5 ± 8.4	42.6 ± 10.7	0.842
FET CO_2 (RCP)	5.4 ± 0.9	5.1 ± 0.8	0.444
R	1.08 ± 0.09	1.13 ± 0.1	0.905

表3 ロジスティック回帰分析

	Model 1 <i>p</i> -value	Model 2 <i>p</i> -value	Model 2 Odds Ratio
%Peak VO ₂	0.641	0.831	1.00 0.95-1.20
%AT	0.496	0.62	0.99 0.95-1.03
%VE V.S. VCO ₂ slope	0.385	0.491	1.01 0.98-1.04
%peak VO ₂ /HR	0.069	0.023	0.93 0.88-0.99
Minimum VE/CO ₂	0.292	0.266	1.07 0.95-1.21
F _{Et} CO ₂ (RCP)	0.385	0.385	0.58 0.17-1.98

Model 1 単変量解析

Model 2 多変量解析 (年齢、性別調整)

Odds Ratio は95%信頼区間を記載

比較して平均値は低下しているものの統計学的な有意差は認めず。嫌気性代謝閾値も治療実施群は治療適応判断群と比較して平均値は低下しているものの統計学的な有意差は認めなかった。嫌気性代謝閾値の%割合(平均値)は両群ともに正常の80%以上を超えていた(表2)。なお、手術の有無をアウトカムとして、ロジスティック回帰分析を実施したところ、単回帰分析では、統計学的な有意差が出たものはないが、年齢/性別で調整した場合、酸素脈の%割合は統計学的な有意差($p = 0.023$, odds ratio 0.88-0.99 95% CI)をもって有意差を認めた(表3)。

【考察】

今回の結果より、治療実施群と治療適応判断し結果手術を行わないと判断した群では、酸素脈の%割合(%peak VO₂/HR)が有意に差があることが示され、さらに治療適応の判断に大きく寄与することが示唆された。酸素脈は1回心拍出量の指標であり、大動脈弁狭窄症による心拍出の低下を示していると考えられる。手術後は後負荷が解除されるものの、左室肥大等の代償されるまでにある程度時間がかかることが予想され、手術後も酸素脈の回復に時間がかかると考えられる。

しかし、手術適応の判断をする上では、酸素脈の%割合のみで判断するのは十分とは言えない。ガイドラインに記載されているように、胸部症状の出現や血圧の低下も重要な所見である。さらに、最高酸素摂取量や嫌気性代謝閾値を含めた運動耐

容能の低下は、心不全の重症度の指標かつ、生命予後を鋭敏に反映する指標⁷⁾でもあることから、運動耐容能低下も手術適応を判断する今後のえでも、やはり重要な指標であると考えられる。今回の研究で、嫌気性代謝閾値の%割合の平均は両群ともに正常範囲内であった。これは、大動脈弁狭窄症のように慢性的に経過する場合、最大酸素摂取量は低下していくが比較的日常生活レベルの嫌気性代謝閾値レベルの運動強度は保たれることが多いため、嫌気性代謝閾値が保たれていることは、理にかなっている。つまり嫌気性代謝閾値まで低下してしまう例では、重症と判断しても差し支えないと考えられる。今回は有意差が出なかった心拍出の指標であるMinimum VE/VCO₂やF_{Et}CO₂に関しても、手術適応として重要なパラメータである可能性は高いが、今回の研究プロコール不適切であった可能性が高い。両パラメータは心拍出量の指標になるが、治療後比較的速やかに回復する可能性がある。そのため、治療後に行った心肺運動負荷試験では、すでに改善してしまった可能性がある。加えて、単施設の後向き観察研究であることから、さらなる研究が期待される。

【謝辞】

本研究は冲中研究所の研究助成により行われました。また、虎の門病院循環器センターの循環器内科先生方の協力を感謝いたします。

【文献】

1. 日本循環器学会, 日本胸部外科学会, 日本血

- 管外科学会: 日本心臓血管外科学会合同ガイドライン. 2020年改訂版 弁膜症治療のガイドライン
2. 日本循環器学会: 日本心臓リハビリテーション学会合同ガイドライン. 2021年改訂版 心血管疾患におけるリハビリテーションに関するガイドライン
 3. Le VDT: Cardiopulmonary exercise testing in aortic stenosis. *Dan Med J* 64: B5352, 2017. Accessed April 14, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28552098/>
 4. Nayor M, Xanthakis V, Tanguay M, et al: Clinical and hemodynamic associations and prognostic implications of ventilatory efficiency in patients with preserved left ventricular systolic function. *Circ Heart Fail* 13: e006729, 2020
 5. Taniguchi T, Morimoto T, Shiomi H, et al: High- versus low-gradient severe aortic stenosis: Demographics, clinical outcomes, and effects of the initial aortic valve replacement strategy on long-term prognosis. *Circ Cardiovasc Interv* 10, 2017. doi: 10.1161/circinterventions.116.004796
 6. Nakade T, Adachi H, Murata M, Oshima S: Characteristics of patients with a relatively greater minimum VE/VCO₂ against peak VO₂% and impaired exercise tolerance. *Eur J Appl Physiol* 118: 1547-1553, 2018
 7. Wasserman K, Whipp BJ, Koyl SN, Beaver WL: Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J Appl Physiol* 35: 236-243, 1973

『リバーズ Onco-Cardiology』の展開による癌転移制御法の開発

新藤 隆行、横山 茂之、桜井 敬之、神吉 昭子、田中 愛
信州大学医学部医学科循環病態学教室

【要約】

アドレノメデュリン (AM) は、血管の恒常性維持作用を有するペプチドであり、その機能は主として、AMの受容体活性調節タンパク、RAMP2あるいはRAMP3によって制御されている。本研究では、AM-RAMP2、3系と癌転移の関連を検討した。

血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2^{-/-}) では、転移予定先臓器の血管における炎症が、転移前土壌となること、さらに内皮間葉転換による血管構造の不安定化により、転移が促進する結果となった。一方、RAMP3ノックアウトマウス (RAMP3^{-/-}) では、癌関連線維芽細胞 (CAF) が間葉上皮転換を生じて良性化し、転移が抑制された。

AM-RAMP2系による血管の恒常性制御機構と、AM-RAMP3系によるCAFの制御機構に注目し、選択的にRAMP2を活性化し、RAMP3を抑制することが、癌転移の抑制につながると考えられた。

【目的】

分子標的薬や癌免疫療法などの新規治療法の登場により、癌治療は大きな進歩を遂げたが、未だ癌の転移を抑制する方法は存在しない。我々は、癌を生体から切り分けて考えるのではなく、癌の原発巣と転移巣を、血管を介した循環制御の観点から捉えることによって、癌転移を抑制する治療法につながる可能性を考え、検討を進めてきた。中でも血管の恒常性の破綻や異常増殖は、癌の病態にも密接に関与していることから、我々は、血管の恒常性制御の観点から、癌転移を抑制する新しいアプローチを考えた。

アドレノメデュリン (AM) は血管をはじめ、全身の様々な組織で広く産生され、血管拡張作用をはじめとした、多彩な生理活性を有するペ

チドである。AMの活性は、主として、AMの受容体に結合する受容体活性調節タンパクRAMP2およびRAMP3により制御されている。我々はこれまで、AMノックアウトマウス (AM^{-/-}) が血管の発生異常により胎生致死となること¹⁾、RAMPの中でもRAMP2のノックアウトマウス (RAMP2^{-/-}) のみがAM^{-/-}と同様の表現型を示して胎生致死となること²⁾ から、血管の発生および恒常性維持におけるAM-RAMP2系の重要性を明らかとしてきた。一方、RAMP3のノックアウトマウス (RAMP3^{-/-}) は血管の発生に異常は認められず、成体が得られる³⁾。AMおよび、RAMP2、RAMP3は様々な癌においても発現が認められる。本研究では、AM-RAMP2系、AM-RAMP3系と、癌転移の関連を、各種遺伝子改変マウスを用いて検討した。

【方法】

(1) AM-RAMP2系による血管恒常性維持と、癌転移抑制との関連

誘導型血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2^{-/-}) を用いて、原発巣から転移巣への自然転移モデルを作成した。C57BL/6マウス系統に移植することができるB16BL6メラノーマ細胞をマウスの足底部に移植し、肺転移させ、原発巣と転移巣の各々に生じる変化を解析した。

(2) AM-RAMP3系による癌関連線維芽細胞の悪性化と、癌転移促進との関連

RAMP3ノックアウトマウス (RAMP3^{-/-}) を用いて、C57BL/6マウス系統に移植することができるPan02腺癌細胞を脾臓に移植し、肝転移の検討を行った。特に、癌の悪性化に重要な働きをされると考えられている癌関連線維芽細胞 (CAF) に注目し、AM-RAMP3系によるCAFの制御機構を検討した。

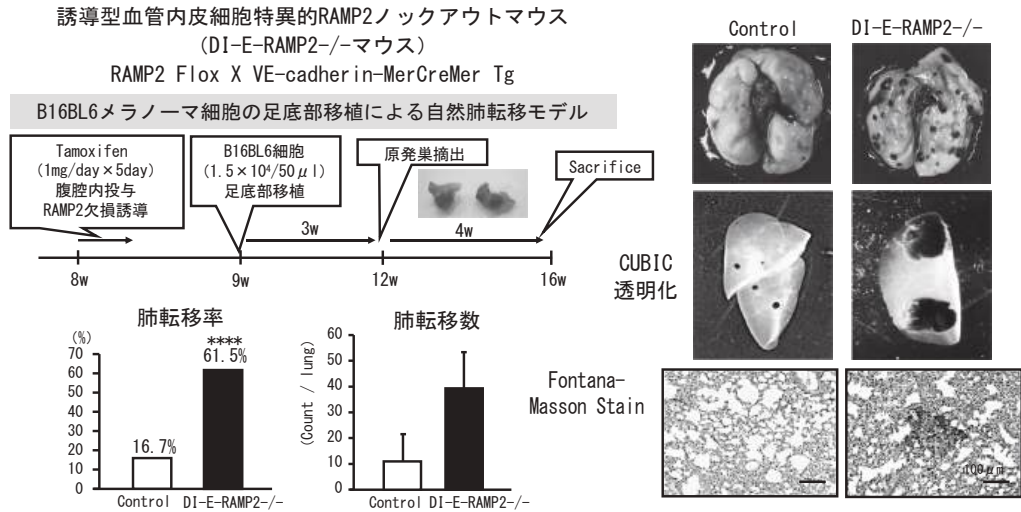


図1 DI-E-RAMP2^{-/-}マウスでは、メラノーマの肺への転移が亢進する

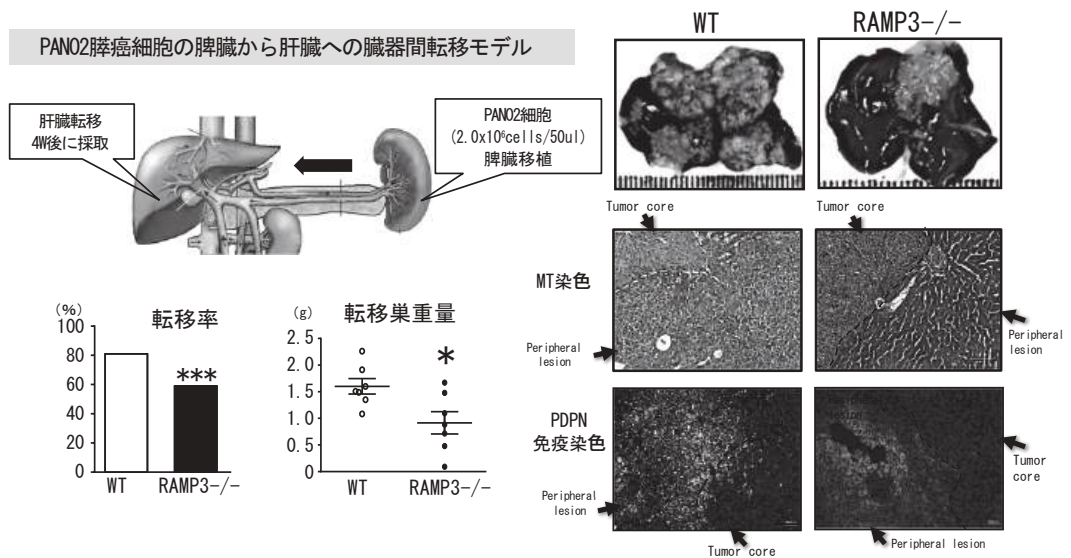


図2 RAMP3^{-/-}では、DI-E-RAMP2^{-/-}とは逆に、転移が低下する

【結果】

(1) AM-RAMP2系による血管恒常性維持と、癌転移抑制との関連

RAMP2^{-/-}は胎生致死のため、成体での解析が不可能である。そこで本研究では、RAMP2 floxマウスをVEカドヘリンMerCreMerマウスと交配することにより、誘導型の血管内皮細胞特異的

RAMP2ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2^{-/-}) ラインを樹立し、成体になってから血管のRAMP2遺伝子欠損を誘導することを試みた⁴⁾。DI-E-RAMP2^{-/-}では、タモキシフェン5日間の投与後、2週間後に、血管におけるRAMP2発現が20%以下に低下することが確認された。

DI-E-RAMP2^{-/-}を用いて、B16F10メラノ

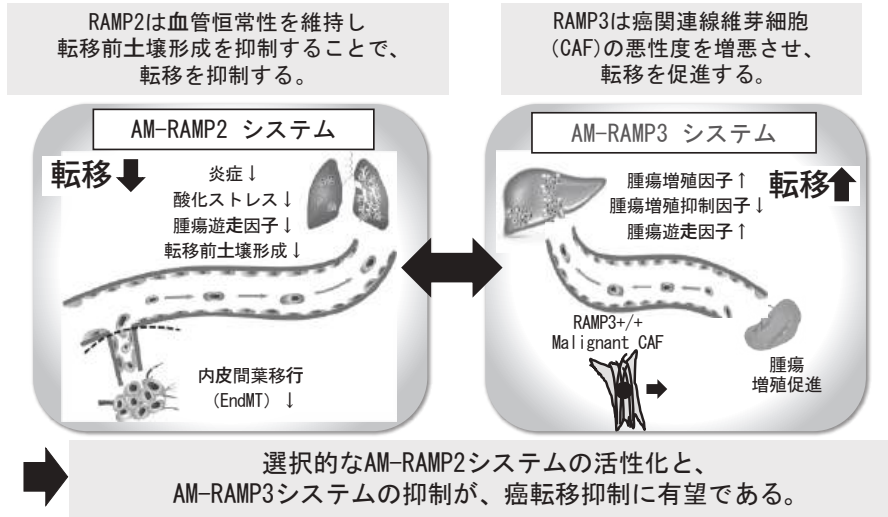


図3 癌転移において推測されるRAMP2、RAMP3の病態生理学的意義

ーマ細胞やS180肉腫細胞の皮下移植実験を行うと、コントロールマウスに比較して、腫瘍内血管新生は減弱し、腫瘍増殖は抑制された。一方、B16BL6メラノーマ細胞を用いて、原発巣から遠隔臓器への転移モデルの検討を行ったところ、DI-E-RAMP2^{-/-}では肺への転移率が亢進するという、一見すると相反する結果となった。DI-E-RAMP2^{-/-}において腫瘍転移が亢進するメカニズムを解明するため、RAMP2欠損誘導後に転移予定先臓器である肺に生じる変化を、時系列的に観察した。その結果、腫瘍の転移前の早期の段階で、血管壁におけるマクロファージの接着や浸潤、炎症性サイトカイン、ケモカインの発現亢進が認められた。RAMP2欠損誘導後も炎症は持続し、腫瘍の転移がはじまる直前の段階では、腫瘍細胞を転移巣へ誘導するとされるS100A8/A9とその下流因子であるSAA3の発現亢進が確認された。

次に、原発巣の腫瘍内血管について検討を進めた。DI-E-RAMP2^{-/-}では、腫瘍内血管のCD31(血管内皮細胞マーカー)陽性細胞が減少し、対照的にαSMA(間葉系細胞マーカー)陽性細胞が増加していた。このことから、DI-E-RAMP2^{-/-}の腫瘍内血管では、内皮間葉転換(EndMT)が生じていると考えられた。これを検証するため、

DI-E-RAMP2^{-/-}の肺血管内皮細胞の初代培養を行い、TGF-β刺激によるEndMT誘導実験を行った。その結果、DI-E-RAMP2^{-/-}の内皮細胞では、間葉系マーカーであるFSP-1陽性細胞が、野生型マウスと比較して有意に増加する一方、血管内皮細胞のマーカーであるVE-カドヘリンの発現が低下することが確認された。

逆にAM-RAMP2システムを活性化することで、これらの変化が抑制できるか検討した。RAMP2を過剰発現させた内皮細胞(RAMP2O/E)を樹立し、血管透過性アッセイを行うとRAMP2O/Eでは、血管透過性が抑制されていた。さらにB16F10メラノーマ細胞を用いて、重層培養法にて接着の評価を行うと、RAMP2O/Eでは腫瘍細胞の接着が抑制されていた。さらに、血管内皮細胞特異的にRAMP2を過剰発現させたトランスジェニックマウス(E-RAMP2 Tg)を樹立した。B16BL6メラノーマ細胞を移植し、自然肺転移を観察したところ、E-RAMP2 Tgでは、野生型マウスと比較して、腫瘍の転移が抑制され、生存率の改善を認めた。

(2) AM-RAMP3系による癌関連線維芽細胞の悪性化と、癌転移促進との関連

肺癌は予後不良であり、特に術後の肝転移の制御が重要な課題である。我々はDI-E-RAMP2^{-/-}

とRAMP3^{-/-}を用いて、膵癌細胞の臓器間転移におけるAM-RAMP系の意義を検討した⁵⁾。Pan02膵癌細胞を脾臓に移植し、肝転移の検討を行うと、DI-E-RAMP2^{-/-}では、メラノーマ細胞の肺転移実験の結果が再現され、転移率が上昇した。ポドプラニン (PDPN) は、リンパ管のマーカーとして知られる一方、癌関連線維芽細胞 (CAF) においても発現が認められ、PDPNの発現の高い癌は予後不良であることが報告されている。DI-E-RAMP2^{-/-}における転移巣の癌周辺領域では、RAMP3およびPDPNの発現が著明に亢進しており、PDPN陽性のCAFが増加していた。

一方で、RAMP3^{-/-}では、DI-E-RAMP2^{-/-}とは逆に、肝転移が有意に抑制され、転移巣の癌周辺領域のCAFが減少していた。さらにRAMP3^{-/-} CAFでは、PDPN発現が低下しており、ストレスファイバーの形成が抑制されている一方で、細胞膜直下のアクチンリングの形成が亢進しており、間葉上皮転換 (MET) を生じていると考えられた。そこで、PDPNがAM-RAMP3系のシグナル下流に存在することを検証するため、RAMP3ノックダウン線維芽細胞を樹立した。その結果、RAMP3発現低下に伴って、PDPN発現低下が確認された。さらにRAMP3^{-/-}の初代培養CAFでは、PDPN発現制御に関わるp-Src、Cas活性が低下していた。マイクロアレー解析では、RAMP3^{-/-} CAFでは、腫瘍増殖因子の発現低下と抑制因子の発現亢進が認められ、悪性度が低下していると考えられた。実際に、共培養系で、RAMP3^{-/-} CAFはPan02膵癌細胞の増殖、遊走を抑制すると共に、RAMP3^{-/-} CAFをPan02膵癌細胞と混合してマウスに移植すると、癌の増殖および転移は抑制された。このことから、RAMP3^{-/-} CAFは、癌増殖や転移を抑制する、いわば良性のCAFに表現型が変化していると考えられた。

次にRAMP3^{-/-}に対してAMを持続投与し、AM-RAMP2系を選択的に活性化したところ、癌転移はRAMP3^{-/-}よりもさらに抑制された。

【考察】

以上の結果から、DI-E-RAMP2^{-/-}では、転

移予定先臓器の血管における慢性炎症が、癌細胞にとっての転移前土壌となること、さらに原発巣の血管では、EndMTによる血管構造の不安定化、透過性亢進が生じ、癌細胞の血管内浸潤が亢進することで、転移が促進されたことが明らかとなった。一方、RAMP3^{-/-}では、PDPN発現が抑制され、CAFがMETを生じて良性化すると共に、代償的にAM-RAMP2系の亢進を生じた結果、癌の転移が抑制されたことが明らかとなった。

AM-RAMP2系による血管の恒常性制御機構と、AM-RAMP3系によるCAFの制御機構に注目し、選択的にRAMP2を活性化し、RAMP3を抑制することが、癌転移の抑制につながると考えられた。

【文献】

1. Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju K.H., Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H: Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene, *Circulation* 104: 1964-1971, 2001
2. Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Inuma N, Yoshizawa T, Koyama T, Fukuchi J, Iimuro S, Moriyama N, Kawakami H, Murata T, Kangawa K, Nagai R, Shindo T: The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity, *J Clin Invest* 118: 29-39, 2008
3. Yamauchi A, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Igarashi K, Toriyama Y, Tanaka M, Liu T, Xian X, Imai A, Zhai L, Owa S, Arai T, Shindo T: Functional differentiation of RAMP2 and RAMP3 in their regulation of the vascular system, *J Mol Cell Cardiol* 77: 73-85, 2014
4. Tanaka M, Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Liu T, Xian X, Imai A, Zhai L, Hirabayashi K, Owa

- S, Yamauchi A, Igarashi K, Taniguchi S, Shindo T: The endothelial adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular integrity and suppresses tumour metastasis, *Cardio-vasc Res* 111: 398–409, 2016
5. Dai K, Tanaka M, Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Wei Y, Tanaka M, Kakihara S, Matsui S, Shindo T: Deficiency of the adrenomedullin-RAMP3 system suppresses metastasis through the modification of cancer-associated fibroblasts, *Oncogene* 39: 1914–1930, 2020

心臓マクロファージに刻まれた免疫記憶に着目した心不全に対する新規治療戦略の確立

中田 雄一郎

千葉大学大学院医学研究院疾患システム医学

【要約】

心不全は急性増悪を繰り返しながら悪化するだけでなく、複数臓器の障害を誘導する多病の中心疾患であり、予後を規定する。そのため、心不全の再発や多臓器障害を誘導する分子機序の解明が強く求められている。我々は、横行大動脈結紮により誘導した心不全マウスの造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cell, HSC) をレシピエントマウスに骨髄移植する新たなモデル実験系を構築して解析することで、HSCから分化した心臓マクロファージが慢性炎症と組織リモデリングを誘導し、心不全の自然発症に至ることを見出した¹⁾。本病態が遺伝子変異を持たないマクロファージによって発症した経緯から、心不全発症の起源がHSCにクロマチンレベルで刻まれた自然免疫記憶に起因することが強く示唆されるが、その自然免疫記憶の実体や、心不全発症との関連性については全く分かっていない。そこで、本研究では、心不全によってHSCに刻まれた自然免疫記憶の細胞分化/組織間移行を超えた保存を可能にするエピゲノム制御機構を解明する目的で、心不全マウスから回収したHSCを用いて自然免疫記憶の中核と予想されるヒストン修飾の解析を行った。

【目的】

本研究は、心不全によってどのような自然免疫記憶 (エピゲノム制御) がHSCに刻まれ、細胞分化/組織間移行後も保存され、心臓マクロファージの機能変調を誘導するのか明らかにすることを目的とする。

【方法】

8週齢の野生型マウスを用いて横行大動脈結紮を施し、心不全モデルマウスの作製を行った。心不全マウスからセルソーターを用いてHSCを回収し、自然免疫記憶の中核と予想されるヒストン修飾をCut&Run シークエンシングによって検出した。本研究では、転写の活性化に寄与する active enhancerを規定するヒストン修飾である H3K27ac および H3K4me1 の検出を行った。

【結果】

コントロールと心不全マウスのHSCの active enhancer 領域 (H3K27ac および H3K4me1 が共存) の変化をCut&Run シークエンシングによって比較した。その結果、いくつかの領域で active enhancer のピークが心不全によって変化していた (図1)。また、コントロールと心不全のHSCの active enhancer のピークの数と比較し、心不全によって出現したピークまたは、消失したピ

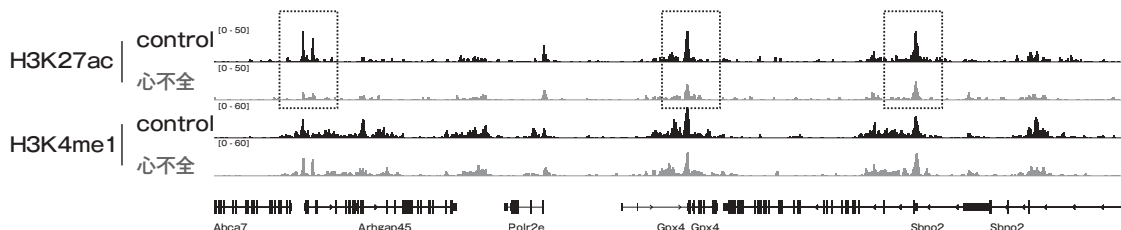
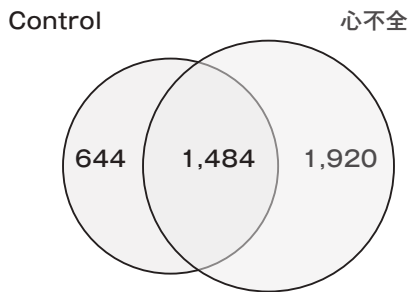


図1 造血幹細胞 (HSC) の active enhancer の変化

a) active enhancer のピーク数



b) 心不全によって消失したactive enhancer の特性

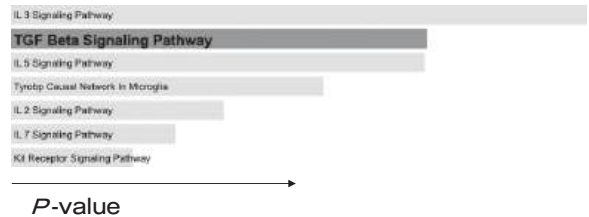


図2 造血幹細胞 (HSC) の active enhancer のピーク数とパスウェイ解析

ークを同定した。心不全によってHSCの active enhancer のピークのうち、644が消失し、1,920が出現した。消失したピークの近傍の遺伝子群でパスウェイ解析を行った結果、遺伝子発現解析同様、TGF- β シグナルが心不全ストレスによって抑制されており、遺伝子の発現変化とヒストン修飾の変化に連動性があることが明らかとなった(図2)。

【考察】

本研究では、骨髄のHSCに刻まれる自然免疫記憶の解読によって心不全発症の分子機序の解明に挑んでいる。その難解な疾患関連自然免疫記憶の解読は、生体防御のために確立された免疫記憶機構が、なぜ生体にとって不利に作用するのかという生物学的矛盾を解き明かす。さらに心臓マクロファージの機能変調させる自然免疫記憶のエピゲノム消去を実行しうる因子を探索・同定することで、心不全発症における責任ゲノム領域の特定、

およびそのエピゲノム制御因子と制御機構を解明する。また、本研究の将来的な目標として、同定された自然免疫記憶の制御因子を標的に、遺伝子操作や、薬学的応用によって刻まれた自然免疫記憶の消去や書き換えによる新規心不全の発症・再発予防療法の開発を目指す。

【文献】

1. Nakayama Y, Fujiu K, Oshima T, Matsuda J, Sugita J, Matsubara TJ, Liu Y, Goto K, Kani K, Uchida R, Takeda N, Morita H, Xiao Y, Hayashi M, Maru Y, Hasumi E, Kojima T, Ishiguro S, Kijima Y, Yachie N, Yamazaki S, Yamamoto R, Kudo F, Nakanishi M, Iwama A, Fujiki R, Kaneda A, Ohara O, Nagai R, Manabe I, Komuro I: Heart failure promotes multimorbidity through innate immune memory. *Sci Immunol* 9: eade3814, 2024

(6) 腎疾患

糖尿病性腎症における細動脈硝子化病変の血圧と腎障害進展との関係に及ぼす影響

山内 真之、澤 直樹、高澤 豊
木脇 圭一、辻本 敬之、河野 圭

【要約】

糖尿病性腎症において、細動脈硝子化病変が血圧と腎機能進行との関連に与える影響を検討した。腎生検で糖尿病性腎症と診断された2型糖尿病患者279例を対象とし、細動脈硝子化病変の割合により4群に分類して比較を行った。その結果、硝子化病変が進行するにつれ、eGFRの低下やアルブミン尿の増加が顕著となり、同じ血圧レベルでも腎障害の進行がより顕著であることが示された。また、硝子化病変の進行は腎複合アウトカムのリスク上昇とも関連していた。これらの結果から、細動脈硝子化病変は腎の自動調節機能を低下させ、血圧に対する感受性を高めることで、腎機能低下やESKDのリスクを増大させる可能性が示唆された。

【目的】

糖尿病性腎症は、糖尿病における代表的な最小血管合併症であり、高血圧を伴いつつアルブミン尿の増加や糸球体濾過量（GFR）の低下を呈し、最終的に末期腎不全へと進行する。これらの機能的変化は、糸球体基底膜の肥厚、メサンギウム拡大、細動脈硝子化病変などの構造的変化と並行して進行するとされている。

細動脈硝子化病変は、輸入細動脈および輸出細動脈の血管壁にヒアリン物質が沈着する病理変化であり、糸球体内の血行動態および自動調節機能に影響を及ぼす可能性がある。自動調節機能の破綻は、全身血圧の変動に対する糸球体内圧の感受性を高め、結果として糸球体高血圧、アルブミン尿の増加、GFRの低下を引き起こすと考えられ

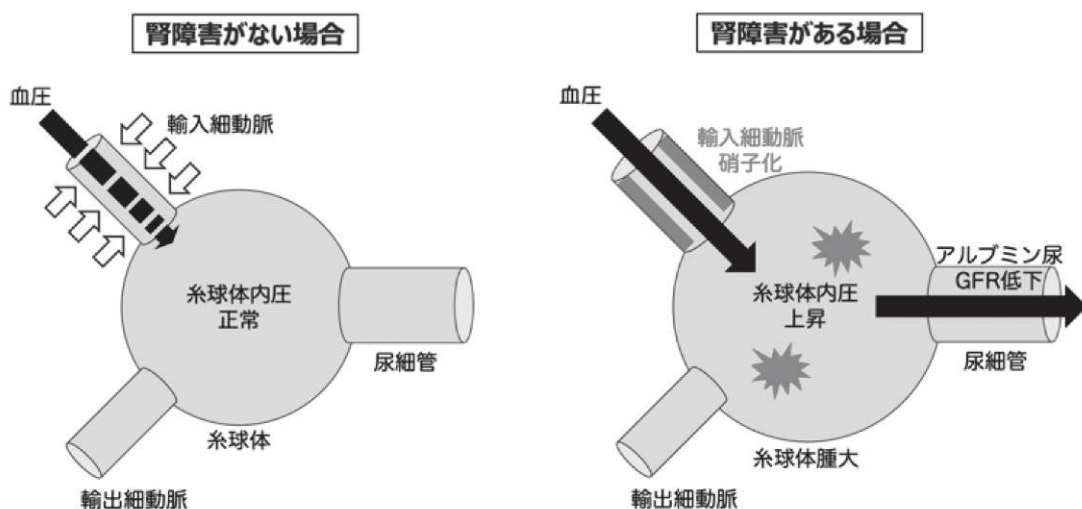


図1 糸球体内圧の自動調節能

ている(図1)^{1,2)}。これまでの形態学的研究では、細動脈硝子化病変が糸球体肥大や糸球体硬化、腎機能低下と関連していることが報告³⁾されているが、血圧と腎障害の関係性に対してこの病変がどのように影響を与えるかについては十分に検討されていない。

糖尿病性腎症における血圧管理は、腎機能の程度や併存疾患、個々の患者背景により最適な血圧目標が異なる可能性があり、画一的な管理が困難である。そこで本研究では、糖尿病性腎症において細動脈硝子化病変が血圧とアルブミン尿の増加、特にGFRの低下との関連性をどのように修飾するかを検討した。すなわち、細動脈硝子化が糸球体高血圧に対する感受性を高めることで、血圧と腎機能との関係性にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。

【方法】

本研究は後ろ向き観察研究である。対象は、1990年1月から2020年12月までに虎の門病院および虎の門病院分院で腎生検を受け、糖尿病性腎症と診断された2型糖尿病患者279例である。除外基準は、20歳未満の未成年、腎生検時に末期腎不全(推算糸球体濾過量[eGFR]が15mL/min/1.73m²未満)を認めた患者、ならびに腎移植既往のある患者とした。Study Flowは(図2)に示す。

研究対象は、観察された全細動脈に占める硝子化を認めた細動脈の割合に基づき、<10%、10-25%、25-50%、>50%の4群に分類した。ベースラインの特性は、連続変数については中央値および四分位範囲、カテゴリ変数については割合を用いて記述した。群間の比較は、連続変数には分散分析(ANOVA)、カテゴリ変数には χ^2 検定を用いて行い、順序付き群間の傾向の検定にはCuzickによる非パラメトリック検定を用いた。

血圧がアルブミン尿および腎機能の低下に与える影響を、細動脈硝子化病変の程度に応じて評価した。血圧は以下の通りに分類した：収縮期血圧(SBP, mmHg)は<110、110~<120、120~<130、130~<140、140~<150、150~<160、 \geq 160、拡張期血圧(DBP, mmHg)は<60、60~<70、70~<80、80~<90、90~<100、100~<110、 \geq 110。各群において、血圧と腎障害の進展(年間eGFR低下速度[mL/min/1.73m²/年]、尿中アルブミン/クレアチニン比[g/g])との関連を評価した。

さらに、Cox比例ハザード回帰モデルを用いて細動脈硝子化病変の程度に基づき層別化を行い、腎複合アウトカム(新たなESKDの発症[透析導入、腎移植、または腎疾患による死亡]またはeGFRの30%以上の低下)のハザード比(HR)および95%信頼区間(CI)を算出した。

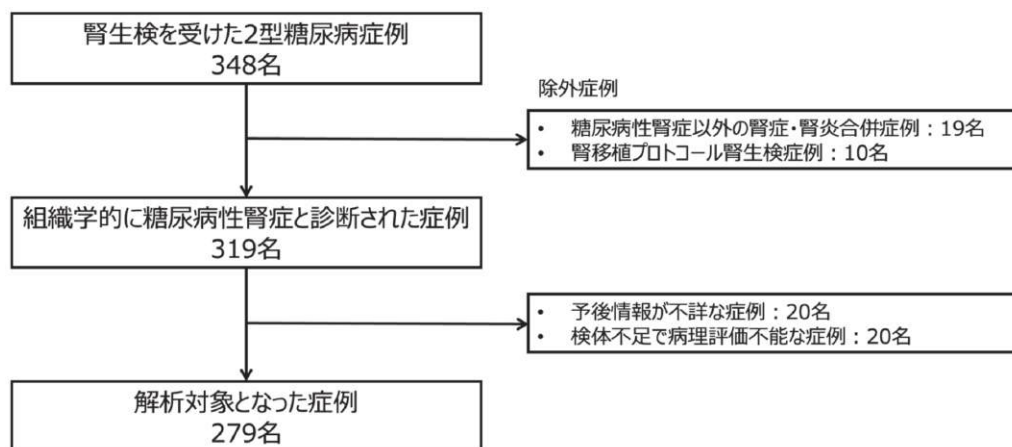


図2 Study Flow

すべての統計解析はStataバージョン18.5 (StataCorp, College Station, TX, USA) を用いて実施した。統計検定はすべて両側検定とし、P値<0.05を統計学的に有意と判断した。

【結果】

結果1：患者背景の比較

患者背景は表1に示す。細動脈硝子化病変が進行するにつれて、eGFRの低下およびアルブミン尿の増加との関連が認められた。特に、eGFRは病変の進行に伴い有意に低下しており (P for trend <0.01)、ACRも同様に有意に増加していた (P for trend <0.01)。また、収縮期血圧 (SBP)

は硝子化の進行とともに上昇する傾向が認められた (P = 0.03)。RAS阻害薬およびインスリンの使用率も病変の重症度に応じて増加していた (いずれも P < 0.01)。

結果2：血圧と腎機能・アルブミン尿の関係

細動脈硝子化病変の進行度により、同じ血圧レベルでも年間eGFR低下速度および尿中アルブミン量に差が認められた (図3)。特に、病変が高度な群では、収縮期血圧の上昇に伴うeGFRの低下やアルブミン尿の増加が顕著であり、血圧に対する腎の感受性が高まっている可能性が示唆された。

表 1 細動脈硝子化の程度別にみた患者背景

	<10% (n=17)	10-25% (n=39)	25-50% (n=169)	>50% (n=54)	P for trend
Age, years	51.1 ± 18.9	56.6 ± 14.9	60.3 ± 12.9	58.2 ± 11.0	0.20
Male, %	82.4	79.5	77.5	72.2	0.31
BMI, kg/m ²	23.4 ± 4.01	26.0 ± 4.76	24.4 ± 4.13	23.8 ± 4.12	0.40
Systolic BP, mmHg	130 ± 17.3	146 ± 21.1	142 ± 19.8	148 ± 23.1	0.03
Diastolic BP, mmHg	75.6 ± 13.7	82.7 ± 13.9	78.5 ± 13.4	80.7 ± 14.0	0.75
eGFR, mL/min/1.73m ²	59.3 ± 24.5	55.6 ± 23.8	42.3 ± 21.3	35.2 ± 17.0	<0.01
eGFR category, n (%)					
≥60 mL/min/1.73m ²	64.7	56.4	37.9	31.5	
30-60 mL/min/1.73m ²	23.5	33.3	29	18.5	
<30 mL/min/1.73m ²	11.8	10.3	33.1	50.0	
ACR, mg/gCr	1,125 ± 1,694	1,277 ± 1,659	2,591 ± 2,556	3,687 ± 3,339	<0.01
ACR category, n (%)					
<30 mg/gCr	35.3	7.69	2.96	1.85	
30-300 mg/gCr	17.7	18.0	9.47	3.7	
300-3,000 mg/gCr	17.7	25.6	10.1	9.26	
≥3,000 mg/gCr	29.4	48.7	77.5	85.2	
LDL cholesterol, mg/dL	139 ± 49.1	111 ± 33.0	126 ± 54.4	133 ± 47.4	0.49
Hb, g/dL	13.7 ± 2.10	13.2 ± 1.95	12.0 ± 2.07	11.1 ± 2.15	<0.01
Uric acid, mg/dL	5.99 ± 1.24	6.25 ± 1.34	6.70 ± 1.57	6.73 ± 1.33	0.02
Ever smoker, %	52.9	59.0	60.4	53.7	0.89
History of CVD, %	11.8	20.5	22.5	29.6	0.12
Hypotensive drug use, %	81.8	88.2	95.0	92.6	0.19
RAS inhibitor use, %	29.4	53.8	72.8	70.4	<0.01
Oral hypoglycemic drug use, %	17.6	41.0	52.1	32.1	0.53
Insulin use, %	37.5	35.9	54.4	66.7	<0.01
Statin use, %	6.25	25.6	37.3	37.0	0.02

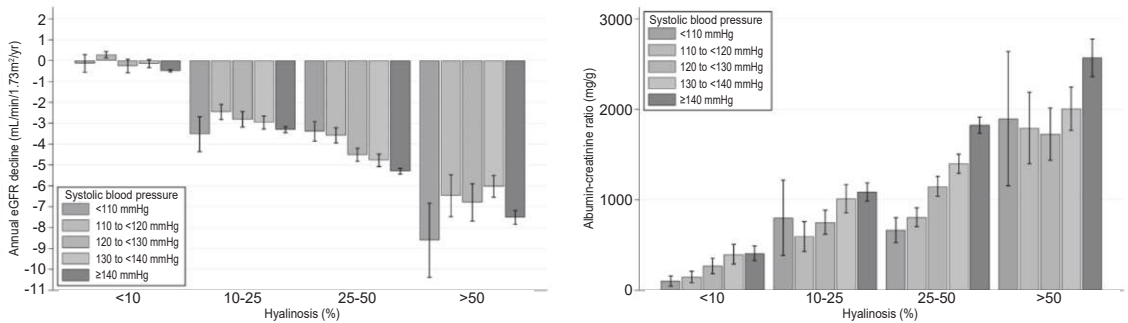


図3 細動脈硝子化病変の進行度による血圧と腎機能・アルブミン尿との関係

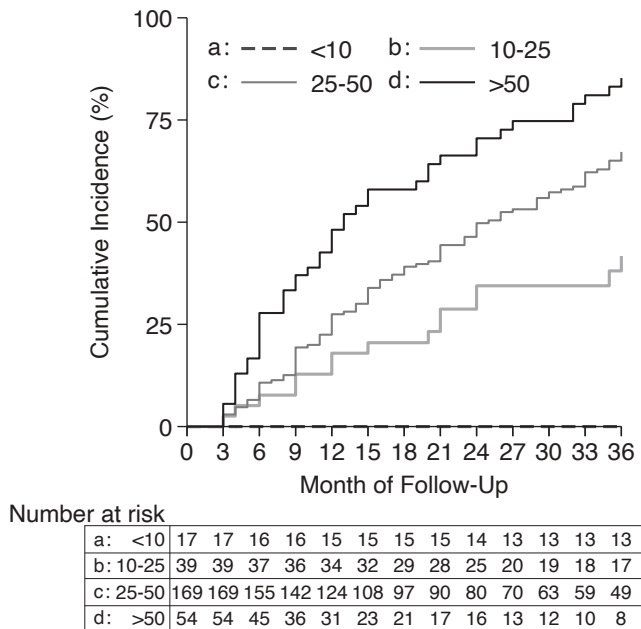


図4 細動脈硝子化病変の進行度別の腎複合アウトカム

結果3：腎複合アウトカムの発症率

細動脈硝子化病変の進行に伴い、その後の腎複合アウトカム（ESKDの発症またはeGFRの30%以上の低下）の発症率が有意に上昇していた。特に、病変の割合が50%以上の群では、アウトカム発症率が最も高かった（図4）。

【考察】

本研究では、糖尿病性腎症において細動脈硝子化病変が血圧と腎機能の進行に与える影響を検討

した。その結果、硝子化病変が進行するにつれ、血圧とアルブミン尿およびGFR低下との関連が強まる傾向が認められた。すなわち、細動脈硝子化病変の重症度が高いほど、同じ血圧レベルでも腎障害がより進行しやすいことが示された。

細動脈硝子化病変は、腎内の自動調節機能を障害し、糸球体内圧の変動に対する緩衝能を低下させる可能性がある^{1,2)}。これにより、全身血圧の変動がそのまま糸球体に伝わり、糸球体高血圧を

引き起こす結果、アルブミン尿の増加および糸球体構造の損傷を通じてGFRの低下を促進すると考えられる⁴⁾。本研究では、硝子化が進行した群において、収縮期血圧の上昇とeGFRの低下およびアルブミン尿増加との関連が特に顕著であったことから、細動脈病変が腎血行動態に与える影響の大きさが示唆される。

また、硝子化病変の進行度が高い群では、腎複合アウトカムの発症率が有意に高かった。これは、細動脈レベルでの構造的変化が、腎機能予後にも独立して影響を及ぼす可能性を示すものであり、病理所見としての硝子化病変の重要性を支持する。

以上より、糖尿病性腎症における細動脈硝子化病変は、単なる構造的変化にとどまらず、血圧の腎への影響を増幅し、腎機能低下やESKDのリスクを高める要因である可能性がある。したがって、糖尿病性腎症の病態評価においては、細動脈病変の有無およびその重症度を考慮することが、将来的な腎予後を見通す上で重要であると考えられる。

【文献】

1. Hill GS, Heudes D, Bariéty J: Morphometric study of arterioles and glomeruli in the aging kidney suggests focal loss of autoregulation. *Kidney Int* 63: 1027-1036, 2003
2. Hill GS, Heudes D, Jacquot C, Gauthier E, Bariéty J: Morphometric evidence for impairment of renal autoregulation in advanced essential hypertension. *Kidney Int* 69: 823-831, 2006
3. Moriya T, Omura K, Matsubara M, Yoshida Y, Hayama K, Ouchi M: Arteriolar hyalinosis predicts increase in albuminuria and GFR decline in normo- and microalbuminuric Japanese patients with Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 40: 1373-1378, 2017
4. Kohagura K, Zamami R, Oshiro N, Shinzato Y, Uesugi N: Heterogeneous afferent arteriopathy: a key concept for understanding blood pressure-dependent renal damage. *Hypertens Res* 47: 3383-3396, 2024

(7) 消化器外科疾患

進行肝細胞癌の oncological resectability の定義に向けた基礎的検討

進藤 潤一、大久保 悟志、松村 優

【要約】

近年の薬物治療の進歩により、従来外科的切除の効果が期待できなかった進行肝細胞癌に対するコンバージョン手術の意義が議論されるようになり、望ましい治療戦略の議論を目的として2023年肝細胞癌の腫瘍学的切除可能性に関するExpert Consensus Statementが日本肝癌研究会、日本肝胆膵外科学会から発表された。しかし同基準は専門家の意見を基にした暫定基準であり具体的な臨床データによる裏付けがない。本研究では当院の実臨床データに基づきExpert Consensusの臨床的有用性を探るとともに、実臨床に即した腫瘍学的切除可能性の分類法の提言に向けた基礎的検討を行った。虎の門病院において肝細胞癌に対して根治的切除を行った1,822例 (population 1)、進行肝癌に対してレンパチニブ治療を行った107例 (population 2) を基に解析を行った。外科的切除集団であるPopulation 1において、腫瘍学的切除可能性分類は全生存率、無再発生存率ともに良好な予後層別化能を示し、内科的治療集団であるPopulation 2においても全生存率との相関が確認され、同基準の臨床的妥当性が示された。Population 2においてレンパチニブ治療後の追加インターベンション成功率、R0切除率はBR1、BR2症例で有意に異なっており、同基準はいわゆる切除へのコンバージョンを企図する上でターゲットとなる集団の選び出しに有用な可能性が示唆された。同基準の定義は腫瘍のサイズ/数、腫瘍栓の程度、肝外病変の程度により行われるが、Population 2はBR2基準に相当する因子の数によってさらに予後の層別化が可能であり、サブグループの定義の是非も含め今後多施設データによる検討の必要性が示唆された。

【目的】

過去数年の薬物治療の急速な進歩により、従来外科的切除の効果が期待できなかった進行肝細胞癌に対するコンバージョン手術の意義が議論されるようになっている。しかし肝細胞癌は、根治を目指した治療を行っても真の意味での治癒を得ることが困難な癌腫であり、仮に薬物治療が奏効して切除にたどり着くことができたとしても、それが本当に予後の改善につながるかどうかについては確固たるエビデンスがない。そこで日本肝胆膵外科学会・日本肝癌研究会の合同プロジェクトとして「いわゆるborderline resectable HCCに関するWG」が2020年に立ち上げられ、3年間の議論の後、腫瘍学的切除可能性に関するExpert Consensus Statementが2023年末に発表された¹⁾。しかし、これは専門医に対するアンケート調査とエキスパートの意見をもとにした暫定的な基準であり、臨床データによる裏付けが存在していない。そこで本研究では、実臨床データに基づきExpert Consensusの臨床的有用性を探るとともに、実臨床に即した腫瘍学的切除可能性の分類法の提言に向けた基礎的検討を行った。

【方法】

虎の門病院において1995年1月から2023年8月に肝細胞癌に対して根治的治療を行った1,822例 (Population 1)、ならびに2010年10月から2020年9月に切除不能進行肝細胞癌に対してレンパチニブ治療を導入された107例 (Population 2) のデータをもとに解析を行った。腫瘍学的側面からみた切除可能性分類についてはExpert Consensus Statement 2023の定義¹⁾を用い、技術的側面から見た切除可能性分類については当院からの既報の定義²⁾を用いて解析を行った。

【結果】

まず表1にPopulation 1の背景因子をまとめた。同集団の臨床データをもとに、年齢、性別、肝細胞癌治療歴、B型肝炎、C型肝炎、Child-Pugh score、技術的切除可能性分類、腫瘍学的切除可能性分類、術前薬物治療の有無、術前AFP値、術前DCP値、治療年の12因子を交絡因子としてCoxハザードモデルにより調整を行うと、腫瘍学的切除可能性分類は全生存率 (BR1: hazard ratio[HR], 1.88; 95%CI, 1.38-2.55; BR2: HR, 4.12; 95% CI, 3.01-5.65)、無再発生存率 (BR1: HR, 1.86; 95%CI, 1.44-2.41; BR2: HR, 3.62; 95% CI, 2.71-4.82) とともに有意な相関を示し、

調整後の生存曲線において良好な予後層別化能を示した (図1)。

同様にPopulation 2の背景因子を表2にまとめた。Population 2では腫瘍学的切除可能性分類の分布がR 1例 (0.9%)、BR1 35例 (32.7%)、BR2 71例 (66.4%) であったことからR症例を除いた106例にて予後因子の解析を行ったところ、腫瘍学的切除可能性分類は全生存率と有意な相関を示した (BR2: HR, 1.96; 95%CI, 1.13-3.38 vs. BR1)。図2aのごとく、BR2症例はBR1症例と比較して有意に生存率が悪い結果であり、腫瘍学的切除可能性分類はレンパチニブ導入後の追加インターベンション成功率 (BR1 23/35 (65.7%)

表 1 Baseline characteristics of the population 1 (n=1,822)

Age*	67 (28-90)
Male	1,374 (75.4%)
Body mass index	22.9 (20.8-25.0)
HBsAg positive	504 (27.7%)
HCV-Ab positive	940 (51.6%)
Prior history of curative treatment for HCC	364 (20.0%)
Preoperative systemic therapy	15 (0.8%)
Albumin (g/mL)	3.8 (3.5-4.1)
Bilirubin (mg/mL)	0.9 (0.7-1.1)
Prothrombin (%)	90.1 (81.6-98.2)
Platelet (10 ⁴ /mm ³)	14.3 (10.4-18.8)
Child-Pugh A/B	1,687 (92.6) / 135 (7.4%)
Presence of intrahepatic lesion	1,801 (98.8%)
Maximum size (mm) ^a	22 (2-250)
Number ^a	1 (1-16)
Portal invasion (vp0/vp1/vp2/vp3/vp4) ^b	1,309 (71.8%) / 462 (25.4%) / 33 (1.8%) / 12 (0.7%) / 6 (0.3%)
Venous invasion (vv0/vv1/vv2/vv3) ^b	1,716 (94.2%) / 97 (5.3%) / 4 (0.2%) / 5 (0.3%)
Biliary invasion (b0/b1/b2/b3/b4) ^b	1,780 (97.7%) / 34 (1.9%) / 3 (0.2%) / 3 (0.2%) / 2 (0.1%)
Presence of extrahepatic lesion	35 (1.9%)
BCLC stage(stage 0/stage A/stage B/stage C)	593 (32.6%) / 1,077 (59.1%) / 82 (4.5%) / 70 (3.8%)
Technical resectability (R/MR/UR) ^c	1,355 (74.4%) / 467 (25.6%) / 0 (0%)
Oncological resectability (R/BR1/BR2) ^d	1,674 (91.9%) / 83 (4.6%) / 65 (3.6%)
AFP (ng/mL)	10.0 (4.0-54.9)
DCP (mAu/mL)	31.0 (17.0-120.0)
Cirrhosis	896 (49.2%)
Differentiation (well/moderate/poor/unknown)	191 (10.5%) / 1,204 (66.1%) / 385 (21.1%) / 42 (2.3%)
Margin status (R0/R1/unknown)	1587 (87.1%) / 209 (11.5%) / 26 (1.4%)
Year(1995-2008/2009-2017/2018-2023)	663 (36.4%) / 673 (36.9%) / 486 (26.7%)

Figures represent median (interquartile range) or number (percentage) unless indicated.

^a Median (range), ^b Histopathological diagnosis, ^c Based on the criteria reported by Shindoh et al [1],

^d Based on the JLCA and JSHBPS Expert Consensus Statement 2023 [14]

Abbreviations. HBsAg., Hepatitis B antigen; HCV-Ab, anti-hepatitis C antibody; AFP, alpha fetoprotein; DCP, des-gamma-carboxy prothrombin.

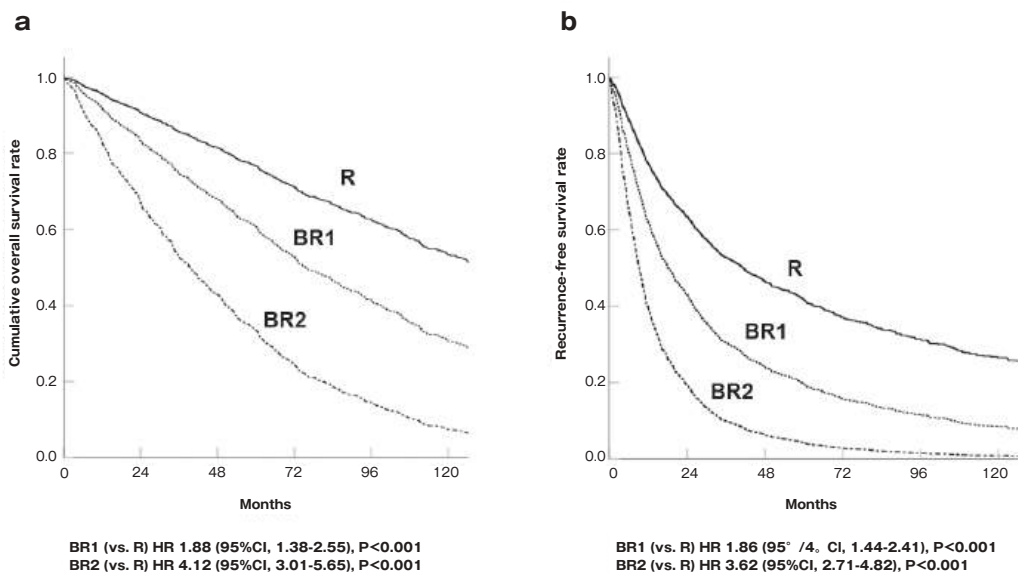


図 1 腫瘍学的切除可能性分類に基づく population 1 の予後層別化能 (a: 全生存率、b: 無再発生存率)

表 2 Baseline characteristics of the population 2 (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 vascular 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.

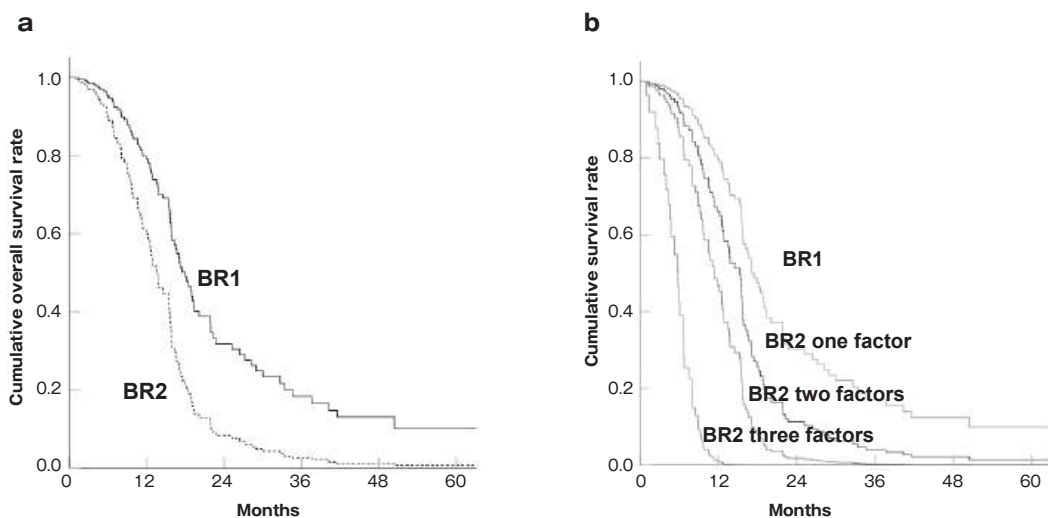


図2 腫瘍学的切除可能性分類に基づく population 2 の予後層別化能

vs. BR2 30/71 (42.3%)、 $P=0.023$)、R0切除率 (BR1 6/35 (17.1%) vs. BR2 3/71 (4.2%)、 $P=0.056$) との相関が認められた。Expert Consensus 2023における腫瘍学的切除可能性分類は、最大腫瘍径/腫瘍数、腫瘍栓の程度、肝外病変の程度の3因子をもとに定義されるが、これら3因子のBR2基準にかかる因子の数でBR2をさらに分類してみると図2bのようにさらなる生存曲線の層別化の可能性が示された。

【考察】

本研究ではExpert Consensus Statement 2023¹⁾で出された肝細胞癌の腫瘍学的切除可能性分類の臨床的妥当性ならびに今後の改定に向けた基礎的検討を行った。本研究では外科的切除症例、内科的治療症例双方における解析を通じ、同基準の臨床的妥当性が単施設データから示された。同様に、本分類が進行肝臓におけるレンパチニブ治療後の追加インターベンション施行率、R0切除へのコンバージョン率と相関を認めたことから、集学的治療の意義のある患者集団の選り出しに一定の役割を果たしうることが示唆された。

一方、Population 2におけるサブ解析において、腫瘍学的切除可能性を定義する3因子の陽性数に

基づき、さらなる予後の層別化が可能であったことから、因子の陽性数やそれぞれの予後因子としてのインパクトを含めた今後の基準の改定が必要となる可能性も示唆された。本研究のlimitationとして単施設における後ろ向きデータに基づく調査である点が挙げられるが、同基準の臨床的有用性が強く示唆される結果が示されたことから、今後多施設データを用いたvalidationならびに、同基準の改定に向けた検討を進める必要性が示されたといえる。

以上、本研究では肝細胞癌の腫瘍学的切除可能性に関する暫定基準の臨床的妥当性と今後の検討課題を明らかにした。学会主導のAll Japanの多施設研究により、より臨床に即した基準の作成を進めるとともに、同基準を基に内科・外科の間で肝細胞癌患者に対する望ましい治療アプローチの検討が進むことが期待される。

【文献】

1. Akahoshi K, Shindoh J, Tanabe M, et al.: Oncological resectability criteria for hepatocellular carcinoma in the era of novel systemic therapies: the Japan Liver Cancer Association and Japanese Society of

Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery Expert
Consensus Statement 2023. *Liver Cancer*
13: 579-589, 2024

2. Shindoh J, Kawamura Y, Kobayashi T, et

al: Prognostic impact of surgical interven-
tion after lenvatinib treatment for advanced
hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*
28: 7663-7672, 2021

(8) 病理

肺 hepatoid adenocarcinoma の臨床病理学的検討

宇留賀 公紀、藤井 丈士、高澤 豊

【要約】

目的: 肺癌は、日本人の癌死亡数の第一位であり、2019年の統計で年間約7.5万人が死亡されている。肺腺癌は肺癌の中でもっと多い組織型であり、およそ50-60%を占める。肺 hepatoid adenocarcinoma (hepatoid adenocarcinoma of lung; HAL) は腺癌の特殊型の1つであるが、その中でさらに稀な腫瘍である。形態学的には異型の強い腫大核と肝細胞類似の好酸性の細胞質を有し、豊富な核分裂像を伴う。本研究において、HAL症例について臨床病理学的な review を行った。

方法: 虎の門病院にて2019年から2023年の間に4例がHALと診断されて、対象とした。それぞれの症例について、WHO 2021 classification に基づく組織型、免疫組織学的所見、分子病理学的特徴、病期、臨床的背景と経過について検討を行った。

結果: 症例の背景については、男性が3例、女性が1名、年齢中央値が75歳であった。検体は、外科切除例が2例、骨転移からの生検と経気管支的肺生検がそれぞれ1例を含んだ。組織学的にはいずれも、肝細胞癌に類似する好酸性の豊かな細胞質を有していた。免疫組織学的に腫瘍細胞の陽性率は、TTF-1 100% (4/4, 細胞質パターン)、HNF4 α 100% (4/4)、Hep Par 1 100% (4/4)、arginase-1 50% (2/4)、alpha-fetoprotein 25% (1/4) であった。免疫微小環境については、PD-L1 (clone 22C3) は75% (3/4) で陽性を示した。Oncomine Dx Target Test Multi-CDx による分子病理学的背景は、1例で *KRAS G12C* が検出された。この症例は術後再発され、*KRAS G12C* 阻害剤である Sotorasib による治療が行われ、部分奏効が得られた。

結論: HAL の診断には、HE染色での肝細胞癌類似の特徴的所見とともに、免疫組織学的に TTF-1 (細胞質パターン) と HNF4 α 、Hep Par 1 が陽性になることが重要であった。1例では *KRAS G12C* が検出され、それに対する阻害剤が奏功し、分子病理学的解析が臨床的に重要であった。HAL は遺伝子変異の頻度が多いことが報告されており、分子病理学的な検索を行い、その結果に応じた適切な治療を行うことで予後を改善する可能性がある。

【目的】

肺癌は、日本人の癌死亡数の第一位であり、2022年の統計で年間約5.4万人が死亡されている¹⁾。肺腺癌は肺癌の中でもっと多い組織型であり、およそ50-60%を占める。肺 hepatoid adenocarcinoma (hepatoid adenocarcinoma of lung; HAL) は特殊型の中でさらに稀な腫瘍で、形態学的には異型の強い腫大核と肝細胞類似の好酸性の細胞質を有し、豊富な核分裂像を伴う²⁾。本研究において、HAL症例について臨床病理学的な review を行った。

【方法】

本研究について虎の門病院研究倫理審査委員会で承認を得た。虎の門病院にて2019年から2023年の間に4例がHALと診断されており、対象とした。それぞれの症例について、通常型の肺腺癌の成分を有する場合には、WHO 2021 classification³⁾ に基づく組織型を5%単位で評価した。また、リンパ管・静脈侵襲、胸膜浸潤、リンパ節転移、腫瘍径、浸潤径などについて病理報告書からデータを収集した。*EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*RET*などの遺伝子変異や融合遺伝子の有無、免疫チェックポイント療法の予測因子となるPD-L1発現についても、調査をした。上記

の症例について、Hep-Par1, AFP, Glypican 3, TTF-1などによる免疫組織学的な解析を行った。また、臨床的な背景、予後、画像所見、治療への反応などの臨床的解析をした。以上から、HALの症例の症例における臨床病理学的特徴を明らかにした。

【結果】

症例背景については、表1に示す。男性が3例、女性が1名、年齢中央値が75歳であった。検体は、外科切除例が2例、骨転移からの生検と経気管支的肺生検がそれぞれ1例を含んだ。臨床経過については、1例は手術のみで根治したが、残り3例は化学療法を受けており、いずれの症例も免疫チェックポイント阻害を行った。病理組織学的にはいずれも、肝細胞癌に類似する好酸性の豊か

な細胞質を有していた(図1)。免疫組織学的な腫瘍細胞での陽性率は、TTF-1 100% (4/4, 細胞質パターン)、HNF4 α 100% (4/4)、Hep Par 1 100% (4/4)、arginase-1 50% (2/4)、alpha-fetoprotein 25% (1/4)であった。免疫微小環境については、PD-L1 (clone 22C3) は75% (3/4)に症例でtumor proportion score (TPS) 1%以上の陽性を示した。Oncomine Dx Target Test Multi-CDxによる分子病理学的背景は、1例でKRAS G12Cが検出された。この症例の病理病期はStage IA2であったが、4か月後に肺門部節転移をされた。カルボプラチンによる化学放射線療法を行うも再発され、KRAS G12C阻害剤であるSotorasibによる治療が行われ、部分奏効が得られた。しかし、Sotorasib開始の42日後に病勢の

表 1 臨床背景

症例	年齢	性別	喫煙歴 (Pack-years)	病期	臨床経過
1	77	男性	75	I A2	手術→化学放射線療法→デュルバルマブ→ソトラシブ
2	77	男性	46	I A2	手術
3	73	男性	13.3	IV	カルボプラチン+ペメトレキセド+ペムプロリズマブ
4	64	女性	100	III B	化学放射線療法→デュルバルマブ

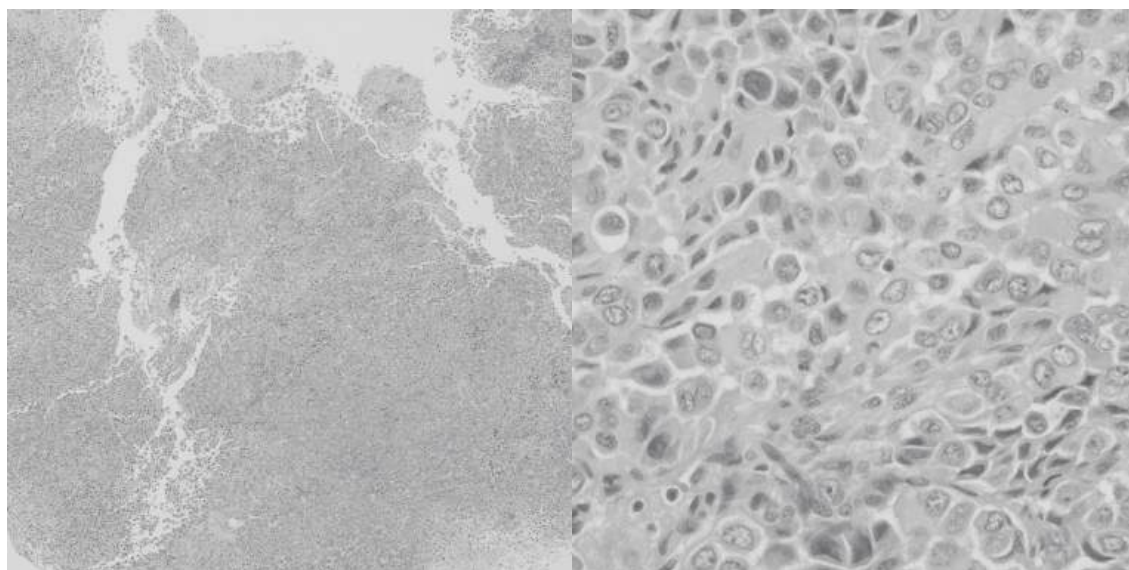


図 1 病理組織学的所見

進行が確認され、術後再発した3か月後に死亡された。

【考察】

肝細胞癌の形態に類似する腺癌 (Hepatoid adenocarcinoma)は多くの臓器で報告されているが、最も多いのは胃である。肺については、IshikuraらがAFP産生するHALを報告したのが最初である⁴⁾。HALの診断において、形態的に豊かな細胞質を有することを特徴とするHE所見が最も重要である^{2, 5)}。免疫組織学的には、HepPar1、AFP、CK8、CK18がしばしば陽性になるとともに、TTF-1がcytoplasmic patternで陽性になる。AFP産生を伴うことは必ずしも必要ではなく、これはすべての肝細胞癌がAFPを発現していないことによる。

今回の検討を行った4例の内、1例は*KRAS G12C*の変異を有していた。Panらは1,139例の肺癌手術症例を対象に*ALK*と*ROS1*、*RET*変異の検索を行い、肝細胞形質を有する症例は、ない症例より有意に変異が多かったと報告している⁶⁾。Zhaoらは516例の肺癌手術症例を対象に*ROS1*変異の検索を行い、肝細胞形質を有する症例では*ROS1*変異が多かったとしている⁷⁾。HALにおける*KRAS*変異については、*KRAS G12V*の症例が1例、報告されている⁸⁾。

Sotorasibは、*KRAS G12C* 阻害剤である。CodeBreak 100試験では、126例の*KRAS G12C*を有する非小細胞癌症例を対象にSotorasibの投与が行われ奏効率37.1%、無再発性生存期間11.1か月を示した⁹⁾。今回の検討でSotorasibが投与されたのは1例のみであるが無再発生存期間は42日と、臨床試験より短かった。HAL症例の全生存期間の報告についても、0.4-108か月までと幅広く、今後の症例の集積と検討が必要である。

HALの診断には、HE染色での肝細胞癌類似の特徴的所見とともに、免疫組織学的にTTF-1(細胞質パターン)とHNF4 α 、Hep Par 1が陽性になることが重要であった。1例では*KRAS G12C*が検出され、それに対する阻害剤が奏功し、分子病理学的解析が臨床的に重要であった。HALは遺伝子変異の頻度が多いことが報告されており、分子病理学的な検索を行い、その結果に応じた適

切な治療を行うことで予後を改善する可能性がある。

【文献】

1. がん情報サービス: https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/cancer/12_lung.html
2. Suster D, Mino-Kenudson M, Suster S: Diagnostic pathology: thoracic. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier; 2022
3. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic Tumours (World Health Organization Classification of Tumours) 5th edition
4. Ishikura H, Kanda M, Ito M, Nosaka K, Mizuno K: Hepatoid adenocarcinoma: a distinctive histological subtype of alpha-fetoprotein-producing lung carcinoma. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 417: 73-80, 1990
5. Miyama Y, Fujii T, Murase K, Takaya H, Kondo F: Hepatoid adenocarcinoma of the lung mimicking metastatic hepatocellular carcinoma. Autopsy Case Rep 10: e2020162, 2020
6. Pan Y, Zhang Y, Li Y, Hu H, Wang L, Li H, et al: ALK, ROS1 and RET fusions in 1139 lung adenocarcinomas: a comprehensive study of common and fusion pattern-specific clinicopathologic, histologic and cytologic features. Lung Cancer 84: 121-126, 2014
7. Zhao J, Zheng J, Kong M, Zhou J, Ding W, Zhou J: Advanced lung adenocarcinomas with ROS1-rearrangement frequently show hepatoid cell. Oncotarget 7: 74162-74170, 2016
8. Chen HF, Wang WX, Li XL, Xu CW, Du KQ, Zhu YC, et al: Hepatoid Adenocarcinoma of the Lung with EGFR Mutation and the Response to Tyrosine Kinase Inhibitors. J Thorac Oncol 14: e217-e219, 2019
9. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, Price TJ, Falchook GS, Wolf J, et al: Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. N

Engl J Med 384: 2371-2381, 2021

【本研究に関する報告】

Uruga H, Miyamoto A, Fujii T, Okuma T, Mitsumura T, Tamaoka M, Takazawa Y: A case of hepatoid adenocarcinoma of the lung harboring *KRAS G12C* responded favorably to sotorasib. Pathol Int 74: 546-

551, 2024

2024年7月5日に, Mari Mino-Kenudson先生 (Vice Chair for Anatomic Pathology Director, Pulmonary Pathology, Massachusetts General Hospital・Professor of Pathology, Harvard Medical School) に御講演を頂いた。

乳癌におけるHER2低発現に関する研究

木脇 圭一, 藤田 優貴, 高澤 豊, 川端 英孝

【要約】

目的: 乳癌における Human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) 低発現の診断は腫瘍内不均一性や観察者間一致率の低下などにより混乱が生じている。本研究では免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry, IHC) による判定と定量的な Copy Number Variation (CNV) 解析との相関を検討した。

方法: 虎の門病院で手術を施行された乳癌症例 11例 (HER2 IHC Score 3+ 2例, IHC Score 2+ ISH陽性2例, IHC Score 2+ ISH陰性1例, IHC Score 1+ 3例, IHC Score 0 3例) を対象とした。FFPE標本を用いてHER2 IHCを再実施し、digital PCR法によるCNV解析を行った。結果: HER2陽性/陰性の判定とCNV解析の結果は一致した。一方で、IHC Score 0と判定された症例群と Score 1+と判定された症例群の間でCNV解析の結果に一部乖離が認められた。

結論: IHC Score 0と1+の境界領域において従来のIHC法による判定とCNV解析による定量的評価との間に乖離が生じる可能性が示唆された。この乖離は腫瘍内不均一性やIHC染色の主観性に起因する可能性が高い。より多数の症例を用いた検討が望まれる。

【目的】

Trastuzumab Deruxtecan (T-DXd) は Human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) を標的とした抗体薬物複合体であり、抗HER2ヒト化 monoclonal 抗体と linker を介して結合された Topoisomerase I 阻害作用を有する Camptothecin 誘導体から構成される¹⁾。本邦では2020年3月に「化学療法歴のあるHER2陽性手術不能又は再発乳癌 (標準的な治療が困難な場合に限る)」を適応として承認され、進行・再発HER2陽性乳癌に対する三次治療薬として日常臨床で使用されている。さらに2023年3月27日には「化学療法歴のあ

るHER2低発現の手術不能又は再発乳癌」へと適応が拡大された。ここで「HER2低発現 (HER2-low)」とはHER2免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry, IHC) Scoreが1+またはIHC Scoreが2+でかつin situ hybridization (ISH) 法が陰性の場合と定義される (Figure 1)²⁾。

HER2 IHC Scoreが0, 1+, 2+の乳癌症例においては腫瘍内におけるHER2タンパク質の発現が不均一であることが多く診断に不確実性が伴う^{3, 4)}。実際、T-DXdの有効性を評価する多施設共同第Ⅲ相臨床試験 (DESTINY-Breast06試験) では登録施設と中央病理検査室の間でHER2低発現の診断結果が約25%の症例で異なっていたと報告されている。また、米国の18名の病理専門医 (board-certified pathologists) が参加した試験においてもIHC Score 0と1+の間での診断一致率は26%に留まったと報告されている⁵⁾。臨床現場においてはIHC Score 2+と3+の症例ではISH法による追加検査が可能であるため診断の不一致が大きな問題となることは少ない。しかしIHC Score 0と1+の症例ではISH法による追加検査が適応とならず、かつIHC Scoreの判定が治療方針に直接影響するため、その判定の不一致は臨床上重要な問題となり得る。

臨床現場におけるHER2検査はIHC法によるタンパク質発現の評価とISH法によるHER2遺伝子増幅 (Copy Number Variation, CNV) の評価が用いられる。両検査の結果はIHC陰性 (0, 1+)、判定保留 (2+)、陽性 (3+) の各群間で相関することが知られており、特にIHC判定保留 (2+) の症例に対してISH法が追加検査として実施される²⁾。しかしISH法はIHC Score 0と1+の症例の鑑別には適用できず、また、視覚的な評価に基づくため、結果の解釈に主観性が介入する可能性がある⁴⁾。Digital PCR等を用いたCNV解析はIHC法およびISH法による評価と相関することが示さ

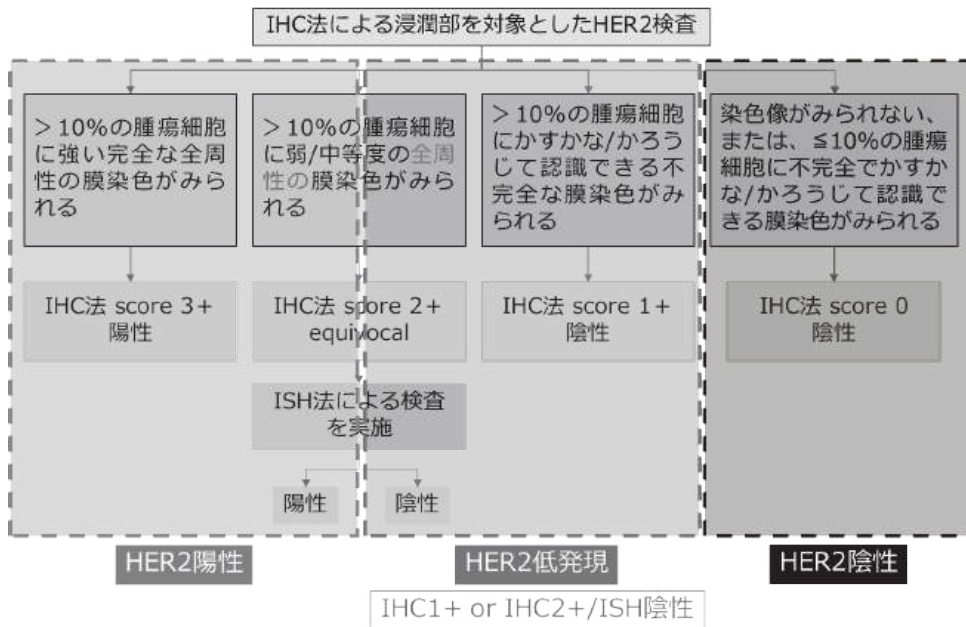


Figure 1 HER2-lowの定義

れているが⁶⁾、IHC Score 0と1+の症例における詳細な検討はなされていない。本研究では病理医が判定するIHC Score 0および1+の乳癌症例を対象に定量的な評価が可能なdigital PCR法を用いてCNV解析を行い、CNVと免疫組織化学染色によるタンパク質発現との相関について検討することを目的とする。

【方法】

本研究は虎の門病院病理部において実施し、同院の研究倫理審査委員会の承認を得て行った。対象は2006年から2022年までに当院乳癌外科で手術を施行された乳癌症例のうちHER2 IHC Score 3+の症例2例、IHC Score 2+かつISH陽性の症例2例、IHC Score 2+かつISH陰性の症例1例、IHC Score 1+の症例3例、IHC Score 0の症例3例の計11例とした。HER2 IHCおよびISHの結果はいずれも病理診断報告書の記載を用いた。除外基準は1) 術前薬物療法による治療効果がGrade 2b以上の症例、2) 20歳未満の症例とした。診療録より臨床情報、放射線画像診断結果、治療法、臨床検査データなどを収集した。

ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) ブロックから薄切片を作製し、コンパニオン診断薬と同様のプロトコルを用いてHER2免疫組織化学染色 (Ventana Benchmark GX, Ventana ultraView PATHWAY HER2 (4B5)) を実施した。染色された標本に対してコンパニオン診断薬の判定基準に準拠した評価を行った。

FFPE切片からTaKaRa DEXPATを用いてDNAを抽出した。抽出手順はキット付属のプロトコルに従った。CNV解析にはThermoFisher QuantStudio 3D Digital PCRシステムを用いた。測定は製造元のプロトコルに従って行った。

【結果】

再染色したHER2 IHCの評価の結果は病理診断報告書の結果と一致した。各症例のSubtypeとCNV解析の結果をTable 1およびFigure 2にまとめた。Copy number順にSample番号を割り当てた。ISHの結果とエストロゲン受容体 (Estrogen Receptor; ER) の染色結果は病理診断報告書の結果を採用した。

Table 1 症例のSubtypeと結果

Sample	HER2 IHC	HER2 ISH	Subtype	Copy Number
1	0		TNBC	0.6
2	0		Lum	0.7
3	1+		Lum	1.1
4	0		TNBC	1.2
5	1+		TNBC	1.6
6	1+		Lum	2.5
7	2+	negative	Lum	3.6
8	2+	positive	HER2	6.8
9	2+	positive	Lum-HER2	9.4
10	3+		Lum-HER2	11.5
11	3+		Lum-HER2	14.7

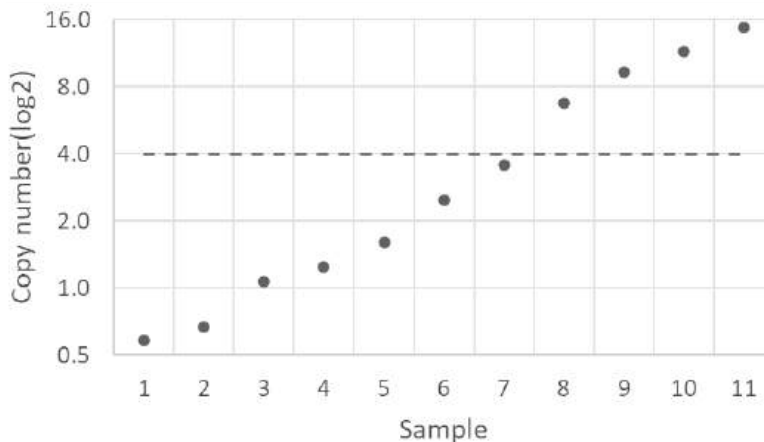


Figure 2 CNV解析結果

HER2 IHCおよびISHの結果からはSample 8-11がHER2陽性と判定される。ASCO/CAP HER2ガイドラインではHER2/CEP17 ratioのカットオフ値は2.0に設定されており²⁾、CNV解析ではCopy number 4.0に相当する (Figure 2の点線)。CNV解析の結果からも同様にSample 8-11が陽性と判定され、実臨床で行われるHER2 IHCおよびISHの結果と一致した。一方で、IHC Score 0と判定されたSample 1, 2, 4のうちSample 4はCNV解析でCopy

numberが2.0を超えており、IHC Score 1+と判定されたSample 3, 5, 6のうちSample 3はCopy numberが2.0未満であった。

【考察】

UzunparmakらはHER2発現 (HER2 IHC Score 1-3+)が49.8%の癌で認められ、HER2低発現 (IHC Score 1+または2+) は多くの腫瘍型で認められると報告している⁷⁾。現在、HER2-lowは主に乳癌で検討されているが今後様々な癌腫への適応拡大が

予想される。

本研究では乳癌におけるHER2低発現の生物学的特性をより詳細に検討するためIHC Score 0および1+の症例を対象にdigital PCR法を用いたCNV解析を行い、CNVとIHCによるタンパク質発現との相関について検討した。その結果、IHC Score 0と判定された症例群 (Sample 1, 2, 4) と Score 1+と判定された症例群 (Sample 3, 5, 6) の間でCNV解析の結果に一部差異が認められた。この結果はIHC Score 0と1+の境界領域において従来のIHC法による判定とCNV解析による定量的評価との間に乖離が生じる可能性を示唆するものである。また、IHC Score 0と1+の鑑別における主観性や判定の揺らぎを示唆する先行研究とも一致する^{3, 4)}。

IHC法とCNV解析の結果に乖離が生じた原因として以下の3点が考えられる。

- 1) 腫瘍内不均一性: Marchiòらが報告しているように乳癌組織内におけるHER2発現の不均一性がIHCにおけるサンプリングエラーを引き起こしCNV解析との乖離を生じさせた可能性がある³⁾。特に、腫瘍の一部にHER2高発現領域が存在する場合、IHC染色ではその部分が強調されて評価される一方、CNV解析では腫瘍全体の平均的なコピー数が反映されるため結果に差異が生じやすくなると考えられる。
- 2) IHC染色の主観性: Fernandezらの研究が示すようにIHCの判定は病理医の主観に依存する部分があり、特にScore 0と1+の境界領域では判定が揺らぎやすい⁵⁾。一方、CNV解析は定量的な評価が可能であるが実験手法による誤差が生じ得る。
- 3) 測定対象の違い: IHCとCNV解析ではそれぞれ異なる原理に基づいてHER2の状態を評価している。IHCは細胞膜におけるHER2タンパク質の発現量を反映するのに対し、CNV解析はHER2遺伝子の増幅数を反映する。Otsujiらの研究が示すように両者の間には一定の相関関係があるものの完全に一致するわけではない⁶⁾。

今後の課題として、より多数の症例を用いた検討を行い、統計学的な有意差を検証する必要がある。

さらにIHC Score 0と1+の症例における予後や治療効果との関連を明らかにすることが臨床的意義の解明に繋がると考えられる。

【文献】

1. Modi S, Park H, Murthy RK, Iwata H, Tamura K, Tsurutani J, Moreno-Aspitia A, Doi T, Sagara Y, Redfern C, Krop IE, Lee C, Fujisaki Y, Sugihara M, Zhang L, Shahidi J, Takahashi S: Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-Low-Expressing Advanced Breast Cancer: Results From a Phase Ib Study. *J Clin Oncol* 38: 1887-1896, 2020
2. Schnitt SJ, Tarantino P, Collins LC: The American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists Guideline Update for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 147: 991-992, 2023
3. Marchiò C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E, Sapino A: Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Semin Cancer Biol* 72: 123-135, 2021
4. Grassini D, Cascardi E, Sarotto I, Annaratone L, Sapino A, Berrino E, Marchiò C: Unusual Patterns of HER2 Expression in Breast Cancer: Insights and Perspectives. *Pathobiology* 89: 278-296, 2022
5. Fernandez AI, Liu M, Bellizzi A, Brock J, Fadare O, Hanley K, Harigopal M, Jorns JM, Kuba MG, Ly A, Podoll M, Rabe K, Sanders MA, Singh K, Snir OL, Soong TR, Wei S, Wen H, Wong S, Yoon E, Pusztai L, Reisenbichler E, Rimm DL: Examination of Low ERBB2 Protein Expression in Breast Cancer Tissue. *JAMA Oncol* 8: 1-4, 2022
6. Otsuji K, Sasaki T, Tanaka A, Kunita A, Ikemura M, Matsusaka K, Tada K, Fukayama M, Seto Y: Use of droplet digital PCR for quantitative and automatic analysis of

- the HER2 status in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 162: 11–18, 2017
7. Uzunparmak B, Haymaker C, Raso G, Masciari S, Wang L, Lin H, Gorur A, Kirby B, Cimo AM, Kennon A, Ding Q, Urschel G, Yuan Y, Feng G, Rizvi Y, Hussain A, Zhu C, Kim P, Abbadessa G, Subbiah V, Yap TA, Rodon J, Piha-Paul SA, Meric-Bernstam F, Dumbrava EE: HER2-low expression in patients with advanced or metastatic solid tumors. *Ann Oncol* 34: 1035–1046, 2023

膵神経内分泌癌、内分泌・非内分泌混合腫瘍の進展機構の解明

木脇 祐子

東京科学大学(旧・東京医科歯科大学) 包括病理学分野

【要約】

膵神経内分泌癌 (pancreatic neuroendocrine carcinoma; NEC) および膵内分泌・非内分泌混合腫瘍 (mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasm; MiNEN) はまれな膵悪性腫瘍であり、包括的な遺伝子解析の報告は乏しい。本研究では、NEC、MiNEN計12例を収集し、臨床病理学的検討を行うと共に、10例についてnCounter® PanCancer Pathways Panelを用いたがん関連パスウェイに関する遺伝子の網羅的発現解析を行い、正常膵上皮および膵管腺癌と比較した。また、NECおよびMiNEN症例を*KRAS*変異の有無で層別化し、両群間での遺伝子発現プロファイリングデータの差異を検討した。正常膵上皮と比較すると、13種類のがん関連パスウェイのすべてが膵管腺癌、MiNEN、NECの順に発現上昇していた。膵管腺癌のデータと比較すると、NEC、MiNENともにDNA損傷修復経路の遺伝子が最も発現上昇していた。*KRAS*変異群と*KRAS*野生群とを比較すると、*KRAS*変異群で*MMP7*が有意に発現上昇し、*NKDI*が有意に発現低下していた。13種類のがん関連パスウェイの発現変動の程度からは、膵管腺癌、MiNEN、NECの順に悪性度が高い事が予想された。*KRAS*変異の有無に基づいたMiNENとNECの発現遺伝子の比較からは、*KRAS*変異を有するMiNENおよびNECではWntシグナル伝達経路の調節異常が認められた。

【目的】

本研究では、稀少腫瘍である膵NECおよび膵MiNENの臨床病理学的特徴を検討する。その上で、がん関連パスウェイに関する遺伝子発現の観点から膵NEC、MiNENの遺伝子発現プロファイリングを解明する。また、近年で膵NECでは*KRAS*変異に代表される遺伝子変異の有無によ

り細分類される可能性が示唆されている事から、*KRAS*変異に着目した膵NEC、MiNENの臨床病理学的特徴、遺伝子発現プロファイリングを検討する。

【方法】

- (1) 対象症例: 2001年1月～2020年8月の間に外科的切除ないし病理解剖で得られた膵NEC、MiNENの計12例を対象とした。
- (2) 病理組織学的解析: 各症例の代表剖面1枚を選定し、WHO2017/2019分類¹⁾に基づき、Ki67陽性率、核分裂像からグレードを再評価した。免疫組織化学的に各腫瘍の神経内分泌マーカー (Chromogranin A, Synaptophysin, CD56, INSM1), Rb1, p53蛋白発現を解析した。
- (3) *KRAS* 遺伝子変異解析: 各症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE) から腫瘍組織のゲノムDNAを抽出し、*KRAS* 遺伝子変異の有無を解析する。
- (4) nCounterを用いた網羅的遺伝子発現解析: 各症例のFFPEからmRNAを抽出し、nCounter® PanCancer Pathways Panel (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) により13種類のがん関連経路に代表的な770遺伝子の発現解析を行った。NECおよびMiNENとの対比のために、正常膵上皮および膵管腺癌を用いた。解析にはnSolver Analysis Software 4.0を用いた。ここで得られた解析結果に基づき、免疫組織化学的手法を用いて更に蛋白発現解析を追加した (図1)。

【結果】

- (1) 12例のNECおよびMiNENの臨床病理学的所見: MiNENおよびNEC患者12人の平均年齢は69.5歳、男性8人、女性4人、腫瘍平均径は3.6 cm (2.0～9.0 cm) であった。術後

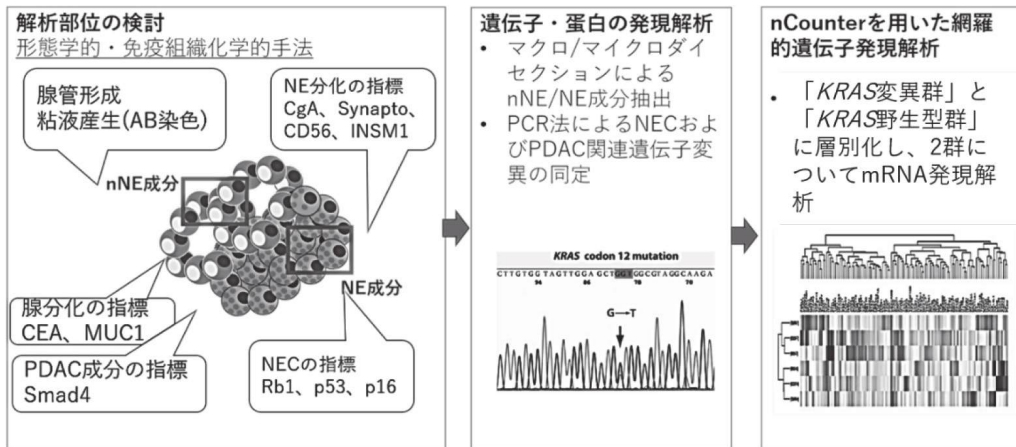


図 1 研究の概要

表 1 本研究における膵 NEC、MiNEN 症例の臨床病理学的特徴

Case (Patient No.)	Age	Sex	Pre-treatment information	WHO classification	Subclassification of NEC	nCounter (RNA sequence)	Primary tumor size (cm)	Lymph node metastasis	Distant metastasis	Stage	Immunohistochemistry					KRAS	Overall survival (mo)	Status
											Synaptophysin	Chromogranin A	INSM1	Ki-67 index	Rb			
1	67	M	No	MINEN		○	3.2	Yes	liver, bone	IV	p+	p+	p+	40	loss	mutant	20	DOD
2	63	M	No	MINEN		○	9.0	Yes	No	III	+	+	+	80	loss	mutant	1	DOD
3	63	F	No	MINEN		○	2.0	Yes	liver, lung	IV	+	+	p+	50	loss	mutant	14	AWD
4	74	F	No	MINEN		○	2.4	No	liver	IV	+	p+	p+	30	loss	mutant	6	AWD
5	68	M	No	NEC	Large	○	3.5	No	liver	IV	p+	+	+	40	loss	mutant	23	DOD
6	80	M	No	NEC	Small	○	3.0	Yes	liver	IV	+	+	+	40	loss	mutant	123	AWD
7	52	F	No	NEC	Large	○	2.8	Yes	liver	III	+	+	+	50	loss	mutant	6	AWD
	median 67 mean 66.7	M4 F3															median 14.0 mean 28.0	
8	73	M	CDDP+CPT-11, CSDCA+CPT-11	NEC	Small	○	3.0	Yes	liver	IV	p+	p+	p+	60	intact	wild	15	DOD
9	80	F	No	NEC	Small	○	3.6	Yes	No	III	-	p+	p+	50	intact	wild	24	NED
10	71	M	sunitinib, everolimus+TAE	MINEN		○	4.7	Yes	liver, bone	IV	p+	p+	p+	80	intact	wild	15	DOD
11	22	M	No	NEC	Small	○	3.5	No	liver, lung, peritoneal dissemination	IV	p+	+	p+	80	intact	wild	8	DOD
12	75	M	CRT	MINEN			2.2	No	liver	IV	p+	p+	p+	40	intact	wild	24	AWD
	median 73 mean 64.2	M4 F1															median 15.0 mean 17.0	

Abbreviations: NED, no evidence of disease, DOD, died of disease, AWD, alive with disease.
N/A, not available.
p+, partly positive.

放射線化学療法は12例中3例に施行されていた。全生存期間の中央値は15.0ヵ月（平均23.0ヵ月）で、12例中6例が観察期間中に死亡し、5例に再発が認められ、10例に遠隔転移が認められた。転移臓器は肝臓（10/12例）、リンパ節（8/12例）、骨（2/12例）、肺（2/12例）、後腹膜（1/12例）であった（表1）。病理組織学的にNECは6例中4例が小細胞型、2例が大細胞型であった。MiNEN 6症例は全てWHO

分類²⁾のmixed ductal adenocarcinoma-NECに相当し、形態学的および免疫組織化学的に認識可能な腺癌成分とNEC成分の2成分から構成されていた。

(2) 膵NECおよびMiNENにおけるKRAS変異: 12症例のNECおよびMiNENのうち、KRAS変異は7例（58.3%）で同定され、NECが3例、MiNENが4例含まれていた。KRAS変異陽性7例のうち5例はp.G12Rで、このうち3

例がMiNEN、2例がNEC（大細胞型1例と小細胞型1例）であった。また、MiNENのうち1症例ではp.G12Sとp.G12Vの2種類の*KRAS*変異が検出された。形態学的所見と*KRAS*変異との間に特異的な関連性は認められなかった。症例数が少なく統計学的な解析は困難であったが、*KRAS*変異の有無で層別化した場合、平均年齢に明確な差は認められなかったが（*KRAS*変異群：平均66.7歳、*KRAS*野生型群：平均64.2歳）、*KRAS*野生型群の患者の中には22歳の症例も含まれていた。*KRAS*変

異群の全患者は免疫組織化学的にRb発現消失を認めたが、*KRAS*野生型群ではRB発現消失は認められなかった。

- (3) 正常腭上皮、膵管腺癌と比較した、MiNEN、NECのがん関連パスウェイ調節異常: nSolver Analysis Software 4.0によって測定されたグローバル有意性スコア (significance score; SS) を算出し、正常腭上皮と各腫瘍組織型の遺伝子発現の程度を比較した。正常腭上皮と比較した場合、膵管腺癌、MiNEN、NECのいずれの組織型においても、各がん関連

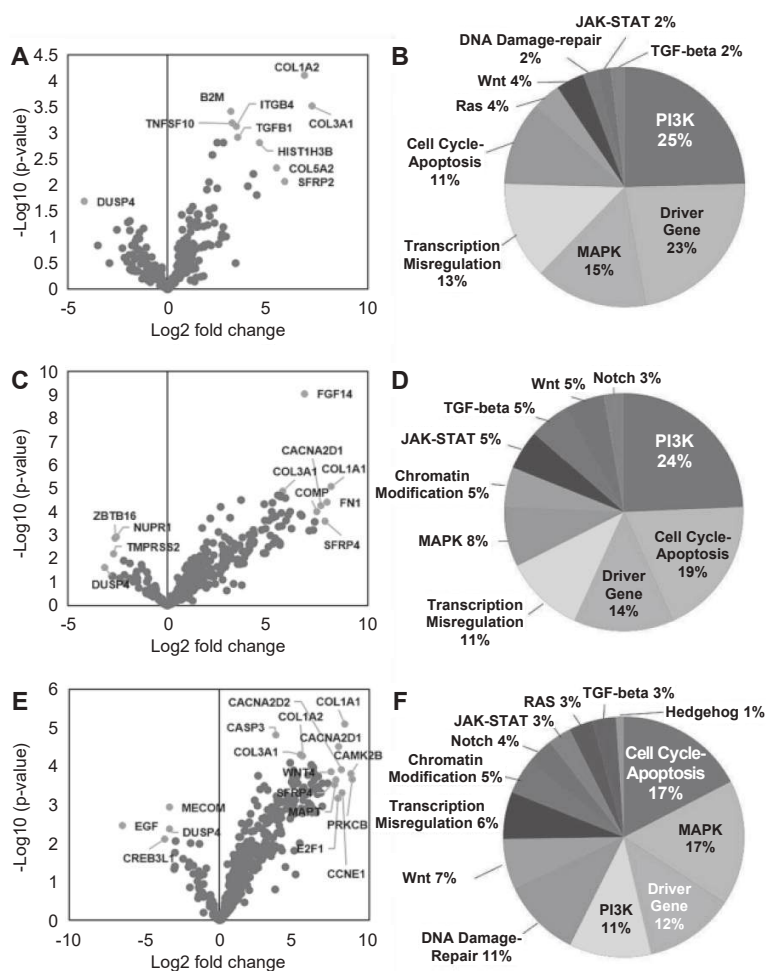


図2 正常腭上皮と比較した際の、各組織型における発現変動遺伝子を示した volcano plot (図2A: 膵管腺癌、2C: MiNEN、2E: NEC) および、発現変動を示したがん関連パスウェイを表す円グラフ (図2B: 膵管腺癌、2D: MiNEN、2F: NEC)

パスウェイの遺伝子発現は上昇していた。膵管腺癌では、ヘッジホッグおよびPI3K経路を含むいくつかの経路が発現上昇していた。MiNENではDNA損傷修復経路の発現上昇が認められた。NECではDNA損傷修復経路の発現上昇の度合いが最も大きかった。発現異常の程度の大きさをSSの数値の大きさとして比較すると、 $SS \geq 3$ を示すパスウェイの数は、膵管腺癌とMiNENがそれぞれ2パスウェイであったのに比べ、NECでは12パスウェイと顕著に多かった。各パスウェイのSSの平均値を腫瘍のサブタイプ間で計算すると、SSの平均値は膵管腺癌 (SS: 2.359)、MiNEN (SS: 2.724)、NEC (SS: 3.323) の順であり、この順にがん関連パスウェイの調節異常が漸増することが示された。各腫瘍組織型を正常膵上皮と比較すると、有意な発現調節異常 (上昇ないし低下) を示す遺伝子数は、膵管腺癌 30個、MiNEN 154個、NEC 239個であった。NECについては小細胞型で188個、大細胞型で60個の有意な発現調節異常を示す遺伝子が認められた (図2)。

- (4) 膵管腺癌、MiNEN、NEC間で比較した際のがん関連パスウェイの発現遺伝子解析: 正常膵上皮と各腫瘍型との比較とは異なり、どの腫瘍組織間で比較した際にも、SS 3以上の大きな遺伝子発現差は観察されなかった。膵管腺癌とMiNENを比較すると、MiNENではDNA損傷修復経路 (SS; 1.3)、クロマチン修飾経路 (SS; 1.3)、Wnt経路 (SS; 1.1)、MAPK経路 (SS; 1.1) の軽度な発現上昇が認められた。膵管腺癌とNECを比較すると、NECではDNA損傷修復経路 (SS; 1.9)、クロマチン修飾経路 (SS; 1.7)、Wnt経路 (SS; 1.7)、MAPK経路 (SS; 1.5) の発現の軽度の増加が観察された。MiNENとNECを比較すると、NECはWnt (SS; 1.2)、DNA損傷修復 (SS; 1.0)、Driver Gene (SS; 1.0) 経路において軽度の発現増加を示した。
- (5) *KRAS*変異の有無で層別化したNECとMiNENの発現遺伝子解析: NECおよびMiNENを*KRAS*変異の有無で層別化すると、*KRAS*変異

群と野生型群の間で有意な発現差を示す遺伝子は合計43個認められ、*KRAS*野生型群と比較して*KRAS*変異群では34遺伝子が発現上昇、9遺伝子が発現低下していた。このうち、*KRAS*変異群では*MMP7* (Wnt/ β -カテニンの標的遺伝子)の発現増加が4.57倍と最も大きかった。対照的に、*RASGRF1* (MAPKおよびRas経路に関与) は-5.29倍、*NKDI* (Wnt経路に関与) は-6.31倍の発現低下を示した。*KRAS*変異群で顕著な発現増加が認められた*MMP7*について免疫組織化学的に検討すると、検討し得た*KRAS*遺伝子変異症例5例全てで*MMP7*陽性または部分陽性が確認された。一方、*KRAS*野生型群では4例中1例で*MMP7*に部分陽性像が確認された。

【考察】

本研究における遺伝子発現解析では、膵MiNENでのPI3K経路および細胞周期-アポトーシス経路の活性化、膵NECでのMAPK経路および細胞周期-アポトーシス経路の活性化が明らかになった他、*KRAS*変異の有無で層別化すると*KRAS*変異群で*MMP7*のアップレギュレーション、*NKDI*のダウンレギュレーションが認められ、更に免疫組織化学的に*MMP7*の発現が認められた。近年、Yachidaら³⁾は膵NECが*KRAS*変異を有するductal-typeと、*KRAS*変異のないacinar-typeとに分けられる事を報告し、*KRAS*変異を有さないacinar-type NECでWnt経路の発現調節異常が見られたと報告した。今回の我々の解析結果とYachidaらの結果とは異なるが、少なくとも*KRAS*変異の有無が膵MiNENおよびNECにおけるWntシグナル伝達の調節異常に関与している可能性を示唆する。また、免疫組織化学的に*KRAS*変異症例では全例でRb蛋白発現消失が確認されたが、これは膵NEC、MiNENにおいてRbが*KRAS*変異の有無を予測する代用マーカーになる可能性を示唆する。

本研究では症例数が少なく統計学的解析は困難であったが、まれな腫瘍である膵MiNENおよびNECの臨床病理学的特徴を*KRAS*変異の有無の観点から検討し、がん関連シグナル伝達経路に関連する遺伝子発現所見を同定し得た。症例の更な

る詳細な検討と集積により、膵臓のみならず他の原発臓器における NEC および MiNEN の発生・進展機序に関する新たな知見が得られる可能性がある。

※図表の一部は Gene. Volume 893, 30 January 2024, 147916 から引用した。

【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。

【文献】

1. Board, W.C.o.T.E.: Digestive System Tumours, fifth ed. ed. World Health Organization. Lyon 2019

2. Klimstra, DS. et al.: Mixed ductal adenocarcinoma-neuroendocrine neoplasms. 2022. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Endocrine and neuroendocrine tumours. Lyon (France) : International Agency for Research on Cancer. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 10). <https://publications.iarc.fr>. <https://tumourclassification.iarc.who.int/chaptercontent/53/88>
3. Yachida, S., et al.: Comprehensive genomic profiling of neuroendocrine carcinomas of the gastrointestinal system. *Can. Discov* 12: 692-711, 2022

日本病理剖検輯報における日本人の公開剖検がん疫学情報を用いた探索的な2次解析による癌自然史の検討

岡 優、原 智彦¹、伊藤 慎治、山口 雄
林田 迪剛、阪口 和滋、浦上 慎司
医薬品医療機器総合機構ワクチン等審査部¹

【要約】

本研究は、日本人病理解剖登録データを用いて、稀な悪性腫瘍を含む原発巣の転移パターンを臓器別に明らかにし、転移パターンに基づいた分類を試みた。332,195件の剖検症例と810,206件の臓器転移データから、76種類の原発悪性腫瘍の転移頻度と48臓器への転移割合を算出した。階層型・非階層型クラスター分析の結果、脳、肺、肝臓、骨、腹膜、血液リンパ系臓器が主要転移部位として特定され、原発悪性腫瘍は7つのカテゴリーに分類された。この分類は、稀な悪性腫瘍を含む転移パターンの包括的な理解に寄与し、臨床における診断・治療戦略の最適化に資する可能性がある。

【目的】

悪性腫瘍の転移は癌関連死の主要な原因であり、そのメカニズムとパターンの理解は臨床的に極めて重要である。本研究は、日本病理剖検輯報を用いて、稀な悪性腫瘍を含む多様な原発悪性腫

瘍の臓器特異的な転移パターンを網羅的に解析し、転移パターンに基づいた原発悪性腫瘍の分類システムを構築することを目的とする。

【方法】

1993年から2021年に登録された日本病理剖検輯報年報から、原発悪性腫瘍とその転移臓器に関するデータ（計332,195件の剖検症例と810,206件の臓器転移）を抽出した。国際疾病分類第10版（ICD-10）に基づき、76種類の原発悪性腫瘍を同定し、48の臓器転移部位における転移頻度（剖検あたりの転移数）および転移割合（原発悪性腫瘍における全臓器中の転移臓器の割合）を算出した。転移割合を標準化したデータを用いて、階層型クラスター分析および非階層型クラスター分析を実施し、原発悪性腫瘍を転移パターンに基づき分類した。2つの分類法の一致度は、 κ 係数を用いて評価した。

【結果】

解析の結果、全悪性腫瘍の平均転移頻度は2.44

表 1 転移パターンに基づく原発悪性腫瘍の分類

グループ	特徴	原発悪性腫瘍
A	肺転移	歯肉、心臓および心膜、下咽頭、喉頭、口唇、肝臓および肝内胆管、縦隔、食道、中咽頭、副甲状腺、陰茎、胸膜、胸腺、甲状腺、舌、気管
B	肺および肝臓転移	肛門および肛門管、膀胱、子宮頸部、胎盤、尿管、尿道および尿道周囲腺、膈
C	骨および内臓転移	大動脈小体および傍神経節腫、骨および関節軟骨、乳房、眼および付属器、上顎洞、鼻腔および中耳、鼻咽頭、耳下腺、末梢神経系および自律神経系、梨状洞、前立腺、脾臓、外陰
D	腹膜および内臓転移	Vater膨大部、虫垂、上行結腸、盲腸、下行結腸、肝外胆管、胆嚢、卵巣、胆道重複病変、結腸重複病変、膵臓、腹膜、後腹膜、S状結腸、小腸、胃、横行結腸
E	造血器・リンパ系転移	造血器悪性腫瘍、リンパ系悪性腫瘍、扁桃
F	脳転移	脳幹、小脳、大脳、脳神経系、頭蓋咽頭管、松果体、下垂体
G	脳および内臓転移	耳および外耳道、脊髄髄膜

であった。多臓器転移傾向を示した原発悪性腫瘍は胎盤 (5.09)、眼および付属器 (4.24)、卵巣 (3.94) であり、一方、転移頻度が1未満の原発悪性腫瘍は主に中枢神経系腫瘍であった。階層型・非階層型クラスター分析の両方において、脳、肺、肝臓、骨、腹膜、および血液リンパ系臓器が主要な転移部位として特定され、この結果に基づき、原発悪性腫瘍は7つのカテゴリーに分類された (表1)。2つの分類法間の一致度は高く、重み付けされていない κ 係数は0.84 (95%信頼区間: 0.75-0.93)、重み付け κ 係数は0.77 (95%信頼区間: 0.60-0.93) であった。転移臓器の割合は、原発悪性腫瘍の解剖学的位置および臓器特異性と関連していた。例えば、副甲状腺悪性腫瘍は肺転移の割合が41.9%と高く、前立腺悪性腫瘍は骨転移の割合が22.3%と高かった。

【考察】

本研究により、原発悪性腫瘍の転移パターンは、解剖学的な近接性や臓器特異性によって規定されることが示唆された。肺や肝臓への転移は胸部・腹部臓器の悪性腫瘍で多く¹⁾、骨転移は前立腺癌や乳癌で高頻度に認められた²⁾。また、卵巣癌は腹膜転移を特徴とし、消化器系悪性腫瘍と類似したパターンを示した³⁾。これらの知見は、転移メカニズムの理解^{4, 5)}、転移リスクの高い臓器の予測、および個別化医療の推進に貢献する可能性がある。本研究は、大規模な日本人剖検データを用いた包括的な解析であり、稀な悪性腫瘍を含む多様な原発悪性腫瘍の転移パターンを網羅的に明らかにした点で新規性が高い。しかし、剖検データを用いた後方視的な研究であるため、選択バイアスの影響は否定できない。また、剖検率の低下も結果の解釈に影響を与える可能性がある。

【文献】

1. Budczies J, von Winterfeld M, Klauschen F, Bockmayr M, Lennerz JK, Denkert C, et al: The landscape of metastatic progression patterns across major human cancers. *Oncotarget* 6: 570-583, 2015
2. Nguyen B, Fong C, Luthra A, Smith SA, DiNatale RG, Nandakumar S, et al: Genomic characterization of metastatic patterns from prospective clinical sequencing of 25,000 patients. *Cell* 185: 563-575.e11, 2022
3. Castaneda M, den Hollander P, Kuburich NA, Rosen JM, Mani SA: Mechanisms of cancer metastasis. *Semin Cancer Biol* 87: 17-31, 2022
4. Chaffer CL, Weinberg RA: A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331: 1559-1564, 2011
5. Klein CA: Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature* 501: 365-372, 2013

【発表に関する事項】

1. Hara T, Oka S, Ito S, Yamaguchi T, Hayashida M, Sakaguchi K, Urakami S: Metastatic Patterns: Insights from Japanese Pathological Autopsy Registry Analysis. *Oncology*. 2024; DOI: 10.1159/000542684. Published online: November 21, 2024
2. Oka S, Hara T, Ito S, Waki M, Usui A, Noda T, Tanaka M, Hayashida M, Sakaguchi K, Urakami S: 致死的前立腺癌、腎癌および膀胱癌における転移臓器の経時的変化: 日本剖検登録の解析. 第111回日本泌尿器科学会総会 111: ROMBUNNO.PDA-15-06 (WEB ONLY), 2024

(9) 腫瘍疾患

細胞極性から紐解く腎がんの進展メカニズムと新規治療薬への展開

佐々木 和教

順天堂大学大学院医学研究科老人性疾患病態・治療研究センター

【要約】

細胞極性は上皮組織を正常に保つ働きをし、その崩壊ががんの進展に密接に関係する。細胞極性の消失を防ぐことが、がん治療の重要なステップの一つに挙げられ、細胞極性の分子メカニズムの理解が不可欠となる。そこで本研究では、細胞極性の分子メカニズムからがんの進展メカニズムを解明することを目的として、生化学・細胞生物学的なウェット解析と臨床情報の統計的なデータ解析を行い、細胞極性を対象とした新たな治療標的を見出すことを試みた。その結果、Rap1の活性化に参与するGDP/GTP交換因子GEFが細胞極性を調節する一方、がん微小環境によるGEFの発現低下が腎がんの進展に参与する可能性を得た。今後、腎がんにおけるGEFの発現およびGEF活性を調節する分子メカニズム解析を進め、細胞極性の回復によるがん治療という新しい創薬を目指す。

【目的】

タンパク質などの生体成分は、上皮細胞の中で空間的に偏って局在する。これは細胞極性と呼ばれる普遍的な現象で、細胞間接着や上皮組織を正常に保つ働きをする。がんの進展には、細胞極性の崩壊が密接に関係し、がん微小環境などによる細胞極性の乱れは細胞間接着の消失と周辺組織への浸潤・転移を引き起こす。そのため、がん治療の重要なステップの一つに、細胞極性の消失を防ぐことが挙げられ、治療標的の策定には細胞極性を調節する分子メカニズムの理解が不可欠である。そこで本研究では、細胞極性の中核を担うタンパク質atypical protein kinase C (aPKC)に着目し、aPKCに結合するタンパク質の同定と機能解析を行い、細胞極性の分子メカニズムからがん

の進展メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

①aPKC結合タンパク質の網羅的同定

2つの精製タグをタンデムに付加したaPKC発現ベクターをHeLa-S3細胞に導入し、aPKCを安定的に発現する細胞株を樹立した。この細胞株の細胞抽出液を調整し、2つのタグを用いてaPKCを2段階で精製し、aPKCと共に精製されるaPKC結合タンパク質を質量分析で同定した。

②上皮細胞の培養と免疫染色

siRNAをトランスフェクションしてノックダウンした腎上皮MDCK細胞をコラーゲン内に埋め込み、3次元シストを形成させた。培養6日後にパラホルムアルデヒドで固定し、マーカーに対する抗体を用いて免疫染色した。

発現ベクターを導入して過剰発現するMDCK細胞を樹立した。単層に播種した過剰発現細胞を低カルシウム濃度の培地で培養して細胞を脱極性化し、パラホルムアルデヒドで固定、マーカーに対する抗体を用いて免疫染色した。

③がん患者ゲノミクスデータの統計的な解析

公共がんゲノミクスデータベースから腎がん患者のデータセットをダウンロードし、細胞極性関連因子が患者の予後にどのように関連するか、生存時間解析を行った。統計的な有意差検定はログランク検定を行った。また、細胞極性関連因子の発現量とがんのステージ、またはがん微小環境の指標との散布図を作成し、統計的な相関分析を行った。

【結果】

これまでに我々は、aPKCをコアとする細胞極性複合体が細胞極性を調節する分子メカニズムを見出してきた¹⁻⁴⁾。上皮細胞が極性化する際に

は、aPKC細胞極性複合体が、できたばかりの細胞間接着部位にいち早く集結し、自らを目印とする極性形成の場を作る¹⁾。そして、足場タンパク質Shank2との相互作用を介して、目印情報を活性化Rap1の局在へと置き換える⁴⁾。しかし、極性形成の場においてRap1が活性化する分子メカニズムやその仕組みの異常がどのようながんの病態に関連するか不明であった。

そこで本研究では、Rap1の活性化メカニズムを明らかにするためにaPKCの周辺分子イベントに着目し、生化学的手法を用いてaPKC結合タンパク質を網羅的に探索した。その結果、同定した結合タンパク質の中から、Rap1の活性化に関与するGDP/GTP交換因子GEFを見出した。細胞極性におけるGEFの役割を明らかにするため、腎上皮MDCK細胞にてGEFをノックダウンし、コラーゲンゲル内にて包埋培養したところ、コントロール細胞は内腔が一つのシストを形成したのに対して、ノックダウン細胞は複数の内腔を有するシストを形成した。このGEFが上皮細胞のアピカル膜形成に関与することを示唆する。そこで、ノックダウンとは逆に、GEFの過剰発現がアピカル膜の維持に働くかどうかを検証した。そのために、MDCK細胞を低カルシウム濃度の培地で培養すると、細胞間接着を失ってアピカル膜を消失し、脱極性化する実験系を用いた。その結果、コントロール細胞は脱極性化に伴い、細胞間接着とアピカル膜を消失したのに対して、GEFの過剰発現細胞はアピカル膜および細胞間接着を維持した。これらの結果はGEFが上皮細胞のアピカルベール極性に関与することを示唆している。

次に、本シグナル系のどのような異常が、どのがんに関連するかを明らかにするため、がん患者ゲノミクスデータを統計的に解析し、がん種の特性を試みた。GEFの発現と患者生存率のカプランマイヤー解析から、腎がんにおいて、このGEFの発現が低い患者は発現が高い患者と比べて予後が悪いことを見出した。そしてGEFの発現とがん微小環境の指標との相関分析から、GEFの発現はがん微小環境の指標と逆相関し、がん微小環境の指標が高いほど、GEFの発現が低いこ

とを見出した。さらには、がんのステージとの相関分析から、がんのステージが進行するに伴い、GEFの発現が低いことも分かった。これらの結果は、GEFの発現が腎がんの進展に関連することを示唆している。

【考察】

本研究により、GEFが上皮細胞の極性を調節することで上皮組織を正常に保つ一方、がん微小環境によるGEFの発現低下が細胞極性を消失させ、腎がんの進展に関与する可能性が得られた。このGEF機能を賦活化することががんに対する新たな治療標的となり得る。今後、細胞極性の回復によるがん治療という新しい創薬を目指し、腎がんにおけるGEFの発現およびGEF活性を調節する分子メカニズムの解明に取り組む。

【謝辞】

本研究を進めるにあたり、研究助成してくださいました公益財団法人沖中記念成人病研究所のご関係の皆様へ、この場を借りて厚くお礼申し上げます。

【文献】

1. Horikoshi Y, Suzuki A, Yamanaka T, Sasaki K, Mizuno K, Sawada H, Yonemura S, Ohno S: Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *J Cell Sci* 122: 1595-1606, 2009
2. Yoshihama Y, Sasaki K, Horikoshi Y, Suzuki A, Ohtsuka T, Hakuno F, Takahashi S, Ohno S, Chida K: KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of aPKC kinase activity in epithelial cells. *Curr Biol* 21: 705-711, 2011
3. Sasaki K, Kakuwa T, Akimoto K, Koga H, Ohno S: Regulation of epithelial cell polarity by PAR-3 depends on Girdin transcription and Girdin-G α i3 signaling. *J Cell Sci* 128: 2244-2258, 2015
4. Sasaki K, Kojitani N, Hirose H, Yoshihama Y, Suzuki H, Shimada M, Takayanagi A, Yamashita A, Nakaya MA, Hirano H, Takahashi H, Ohno S: Shank2 Binds to aPKC

and Controls Tight Junction Formation with Rap1 Signaling during Establishment of Epithelial Cell Polarity. Cell Rep 31: 107407, 2020

【発表に関する事項】

Sasaki K: Regulation of epithelial cell polar-

ity by the PAR-aPKC complex and G protein signaling. The 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists Symposia 「Diverse roles of cell polarity in development」 2024年6月22日 (招待講演)

ニューラルネットワークを組み込んだ肺癌単一細胞遺伝子発現データのメタ解析と機能解析

生島 弘彬

東京大学医学部附属病院呼吸器内科

【要約】

目的: Single cell RNA-seq (scRNA-seq) の普及により、腫瘍細胞内のheterogeneityの存在についての知見が多数報告されるようになった。しかし、1検体あたりのデータ量が大きくなること、腫瘍に含有される腫瘍細胞割合が限られること、などから、既存の研究で解析対象となる患者数や細胞数は限定的であった。加えて、腫瘍組織ではbatch effectなどの問題により解析間でscRNA-seqデータを比較することが難しく、解析間での一般性を検討することが難しいという問題があった。本研究では、neural networkを応用した新規のscRNA-seqデータ統合方法を肺癌組織に応用することで、既存の知見よりもより一般性がある肺癌細胞内でのheterogeneityの知見を明らかにし、さらにそこで認められた特定のsubpopulationもしくはその特徴付けに関与する特定の遺伝子を特定し、肺癌の進展機構の解明と新規治療戦略の構築を目指す。

方法: Variational interference (variational Bayesian; 変分推論) をdeep neural networkに応用したvariational autoencoder (single-cell ANnotation using Variational Inference: scANVI) を用いて、非小細胞肺癌を対象とした21研究、212検体(腺癌: 156、扁平上皮癌: 41、NOS: 15)、898,422癌細胞のscRNA-seq raw dataの統合を行った。統合後の再クラスタリングにはLeiden algorithmを用いた。

結果: scANVIによるscRNA-seqデータ統合後、再クラスタリングを行ったところ、17種類の細胞集団への再クラスタリングが行われた。そのうちのCluster 0は、EGFR変異陽性肺癌細胞の特異的な集積がみられた。Cluster 0の

発現解析の結果、この細胞集団ではCD63やTMSB4Xなどの遺伝子発現が亢進していた。さらに、UMAPによる次元削減で、これらの遺伝子の高発現細胞はEGFR変異陽性肺癌細胞の分布に一致していた。

考察: ニューラルネットワークを用いた非小細胞肺癌212症例のscRNA-seqデータのメタ解析により、EGFR変異陽性肺腺癌に特徴的な細胞集団を同定することができた。これらの遺伝子がEGFR変異陽性肺癌細胞の多発脳転移やびまん性肺内転移と関係している可能性が示唆される。

【目的】

肺癌は年間死亡者数が約7.5万人と悪性腫瘍で最多の死亡原因となっているが、遺伝子異常の解明と分子標的治療薬の開発によりその治療成績はここ10年で大きく改善しており、特に我が国で肺腺癌の約半数を占めるepidermal growth factor receptor (EGFR) 変異陽性肺癌は分子標的治療薬の大きな恩恵を受けている。一方で、EGFR変異陽性肺癌はEGFR野生型肺癌に比べて多発脳転移やびまん性肺内転移などの劇的な進行での発症を来す症例の頻度が多いことも知られており、その予後とquality of life (QOL) に大きな負の影響を与えているが、その機序は不明である^{1,2)}。

Single cell RNA-seq (scRNA-seq) の普及により、遺伝子発現レベルを単一細胞単位で計測可能となり、その結果、腫瘍細胞内のheterogeneityの存在についての知見が多数報告されるようになった³⁾。しかし、1検体あたりのデータ量が大きくなること、腫瘍に含有される腫瘍細胞割合が限られること、などから、既存の研究で解析対象となる患者数や細胞数は限定的であった。加えて、

腫瘍組織ではbatch effectなどの問題により解析間でscRNA-seqデータを比較することが難しく、解析間での一般性を検討することが難しいという問題があった。本申請者はこれまでに正常肺組織のscRNA-seqのメタ解析を基にして、正常肺におけるheterogeneityについて解析を進めてきた。そこで本研究では、この手法を肺癌組織に応用することで、既存の知見よりもより一般性がある肺癌細胞内でのheterogeneityの知見を明らかにし、さらにそこで認められた特定のsubpopulationもしくはその特徴付けに関与する特定の遺伝子の機能解析を行い、肺癌の進展機構の解明と新規治療戦略の構築を目指す。

【方法】

2023年までに非小細胞肺癌検体に対するscRNA-seqを行い、raw dataがdepositされている研究として、21研究のデータを解析対象とした。

Variational interference (variational Bayesian; 変分推論) を deep neural network に応用した variational autoencoder (single-cell ANnotation using Variational Inference: scANVI) を用いて、212検体 (腺癌: 156、扁平上皮癌: 41、NOS: 15)、898,422 癌細胞の scRNA-seq raw data の統合を行った。解析は Python の Scanpy を用い、統合後の再クラスタリングには leiden algorithm を用いた。

【結果】

まず、212検体の腫瘍細胞データについて、補正等を行わずに統合処理を行ったうえで、UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) により次元削減を行ったところ、batch毎の細胞集簇がみられ、生物学的意味付けではなく、batch effectによる集簇が行われていることが示唆された (図1)。そこで、scANVIのアルゴリズムを適用した上でデータ統合を行った

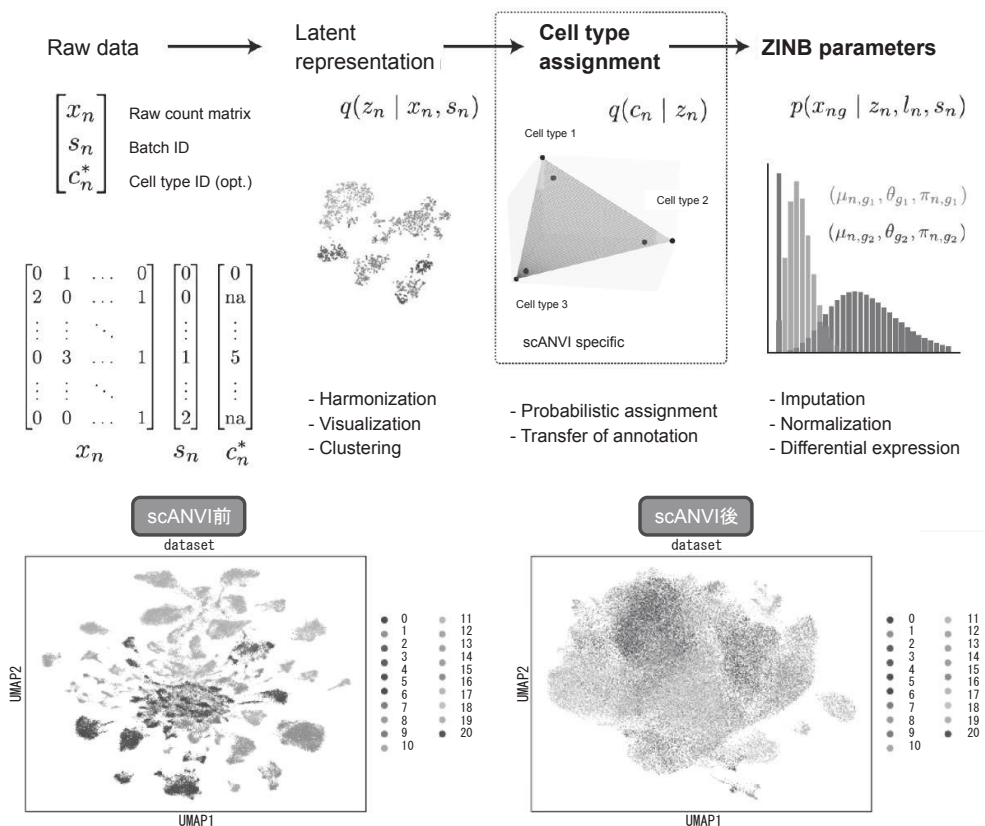


図1 scANVIのscheme (上)。scANVI前後での遺伝子発現データのUMAP (下)。

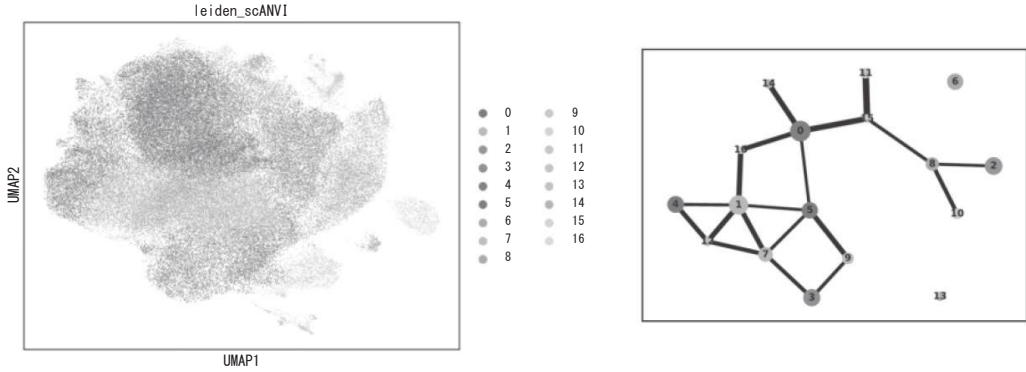


図 2 scANVIのアルゴリズムにより統合したscRNA-seqデータに対するclustering

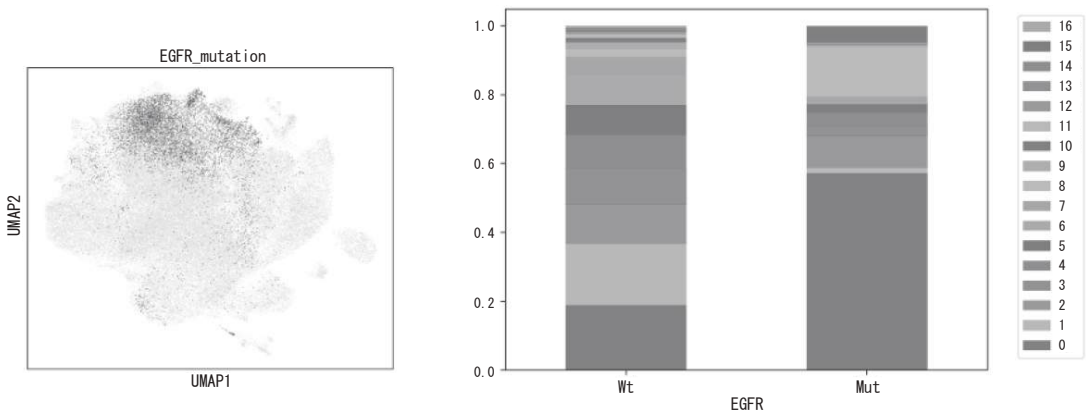


図 3 EGFR変異陽性非小細胞肺癌のcluster間の分布

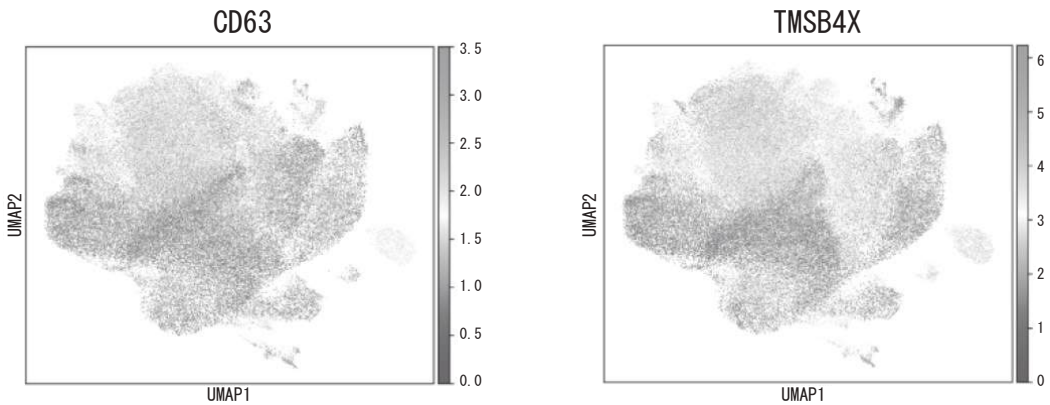


図 4 CD64, TMSB4Xの単一細胞遺伝子発現

ところ、batch毎の影響が減弱して観察された(図1)。そこで、このscANVIのアルゴリズムにより統合したscRNA-seqデータに対して、クラスタ

リングを行ったところ、17種類の細胞集団へと分類されることが明らかとなった(図2)。

次に、EGFR変異陽性肺腺癌に特徴的な細胞集

団、遺伝子発現プロファイルを特定するために、17種類の細胞集団上にEGFR変異陽性肺腺癌由来細胞をマッピングしたところ、17個のクラスターのうち、「Cluster 0」に特徴的な集積を認めた(図3)。そのため、次に、Cluster 0に特異的に発現する遺伝子を網羅的に解析した。その結果、Cluster 0に特徴的に発現する遺伝子として、CD63やTMSB4Xを同定した(図4)。

【考察】

ニューラルネットワークを用いた非小細胞肺癌212症例のscRNA-seqデータのメタ解析により、EGFR変異陽性肺腺癌に特徴的な細胞集団を同定することができた。その細胞集団では、CD63、TMSB4Xなどの多発脳転移やびまん性肺内転移に寄与している可能性のある遺伝子発現が亢進していた。今後、それらのfunctional validationや治療標的としての意義について解析を進める。

【謝辞】

本研究実施にあたり助成を頂きました冲中記念成人病研究所に御礼申し上げます。

【文献】

1. Suh JH, Kotecha R, Chao ST, Ahluwalia MS,

Sahgal A, Chang EL: Current approaches to the management of brain metastases. *Nat Rev Clin Oncol* 17: 279-299, 2020

2. Tompkins W, Grady CB, Hwang WT, Chandrasekhara K, McCoach C, Sun F, Liu G, Patel D, Nieva J, Herrmann A, Marrone K, Lam VK, Velcheti V, Liu SV, Montenegro GLB, Patil T, Weiss J, Miller KL, Schwartzman W, Dowell JE, Shaverdashvili K, Villaruz L, Cass A, Iams W, Aisner D, Aggarwal C, Camidge DR, Marmarelis ME, Sun L: Characteristics of Long-Term Survivors With EGFR-Mutant Metastatic NSCLC. *JTO Clin Res Rep* 5: 100669, 2024
3. Kim N, Kim HK, Lee K, Hong Y, Cho JH, Choi JW, Lee JI, Suh YL, Ku BM, Eum HH, Choi S, Choi YL, Joung JG, Park WY, Jung HA, Sun JM, Lee SH, Ahn JS, Park K, Ahn MJ, Lee HO: Single-cell RNA sequencing demonstrates the molecular and cellular reprogramming of metastatic lung adenocarcinoma. *Nat Commun* 11: 2285, 2020

(10) 感染症

免疫不全患者における侵襲性真菌感染症の診断精度の向上に関する研究

荒岡 秀樹、馬場 勝、内田 直之、宮崎 義継¹
国立感染症研究所真菌部¹

【要約】

高度免疫不全患者における侵襲性真菌感染症は、診断が難しく、予後不良である。侵襲性真菌感染症における、早期診断法をはじめとした適切な治療戦略の確立が求められている。2013年から2024年までの間に、国立感染症研究所真菌部へ侵襲性真菌感染を疑って、検体（生検の検体、パラフィン切片）を提出した36症例を後ろ向きに解析した。虎の門病院で菌株が得られ、その同定と感受性検査を依頼した症例は除外した。検体種ごとの培養とPCR検査の陽性検体数/依頼検体数を以下に示した。肺: 培養 2/16、PCR 7/16。脳: 培養 0/1、PCR 1/1。副鼻腔: 培養 3/5、PCR 4/5。経気管支肺生検: 培養 0/2、PCR 1/2。肺胞洗浄液: 培養 1/1、PCR 1/1。パラフィン切片: PCR 4/9。培養陰性であっても、PCR検査で菌種が判明する症例が一定数あった。また、病理パラフィン切片の陽性率も44%であった。臨床医が真菌感染症を強く疑った症例では、専門機関との連携による遺伝子検査が有用であることが示唆された。

【背景と目的】

高度免疫不全患者における侵襲性真菌感染症は、早期診断が難しく、予後不良である¹⁾。検査の基本は、真菌培養、同定、薬剤感受性検査であるが、真菌培養の感度は高くない²⁾。カンジダ症、アスペルギルス症、ムーコル症をはじめとした侵襲性真菌感染症における、早期診断法をはじめとした適切な治療戦略の確立が求められている。侵襲性真菌症のなかでも、アスペルギルス症、ムーコル症、フサリウム症、スケドスポリウム症といった糸状菌感染症の診断においては、全ての検査

を自らの検査室で行うことができる施設は限られている。また、近年は培養検査に加えて、遺伝子検査の有用性が示唆されている。虎の門病院においては、自施設の検査室で培養検査を実施することはできるが、遺伝子検査を行うことはできない。

上記の背景から、虎の門病院では長年にわたり真菌感染が疑われる症例において、その臨床検体や臨床分離菌株を国立感染症研究所真菌部と共同で解析を行ってきた。一連の解析を通じて、検体種と検査法の陽性率を解析し、適切な早期診断法の提唱を目指す。また、詳細な真菌検査が可能な施設とのネットワーク確立の重要性を明らかにする。

【方法】

2013年から2024年までの間に、国立感染症研究所真菌部へ侵襲性真菌感染を疑って、検体（生検の検体、病理パラフィン切片）を提出した症例を後ろ向きに解析した。生検の検体は、臨床医が糸状真菌感染症を強く疑った際に、病院内の検査と並行する形で生検体の培養と遺伝子検査の実施を依頼した。病理パラフィン切片は、病院内の培養検査で陰性であったものの、病理所見で糸状真菌を認めた症例に限り、追加で国立感染症研究所に病理パラフィン切片からの遺伝子検査の実施を依頼した。なお、虎の門病院で菌株が得られ、その同定と感受性検査を依頼した症例は除外した。

国立感染症研究所で得られた検査結果について、検体種ごとに真菌培養と遺伝子検査の陽性率と真菌種を調査した。

本研究は、施設内の倫理委員会の承認を得て行っている。

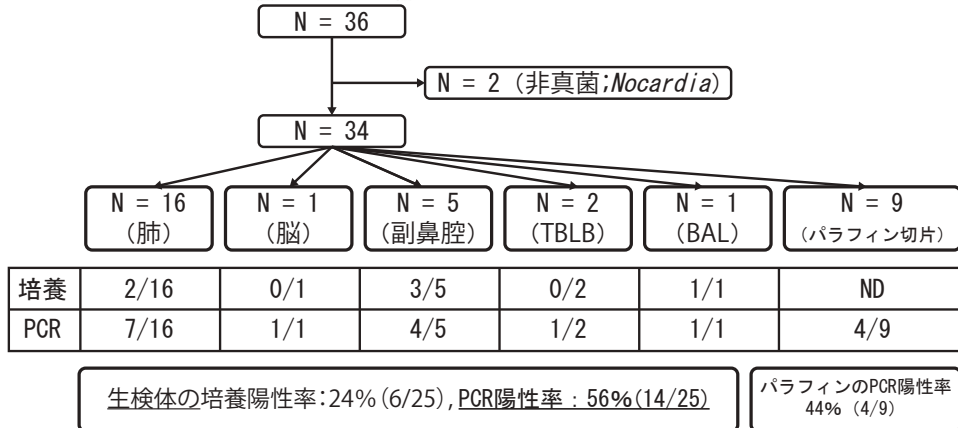


図 1 各検体種における、真菌培養と遺伝子検査 (PCR) の陽性検体数/依頼検体数、陽性率

【結果】

研究期間中の該当症例は36例であった。うち2例は細菌感染が特定されたため、解析対象から除外し、最終的に34例を解析した。

各検体種における、真菌培養と遺伝子検査 (PCR) の陽性検体数/依頼検体数を図1に示した。肺: 培養 2/16、PCR 7/16。脳: 培養 0/1、PCR 1/1。副鼻腔: 培養 3/5、PCR 4/5。経気管支肺生検: 培養 0/2、PCR 1/2。肺胞洗浄液: 培養 1/1、PCR 1/1。パラフィン切片: PCR 4/9。全体では、生検体の培養陽性率は24% (6/25)、PCR陽性率は56% (14/25) であった。また、パラフィン切片のPCR陽性率は44% (4/9) であった。

表1に検体種ごとに、培養あるいはPCRで陽性となった菌種を示した。全体では、Aspergillusが7例、Mucorが7例と最多を占めていた。

【まとめと考察】

生検体でのPCR陽性率は56% (培養陽性率は24%)、パラフィン切片でのPCR検査は44%であることが明らかになった。培養陰性であっても、PCR検査で菌種が判明する症例が一定数あり、生検体のPCR検査の有用性が示唆された。また、パラフィン切片からの遺伝子検査の有用性を示す論文はいくつかあるが³⁾、実臨床における陽性率まで論じた研究は寡少であり、本研究のデータは貴重なものと考ええる。

本研究のlimitationとして、①臨床医が真菌感

表 1 検体種ごとに培養あるいは遺伝子検査 (PCR) が陽性となった菌種

肺	Cunninghamella 3, Rhizopus 2, Scedosporium 1, Malassezia 1
脳	Aspergillus 1
副鼻腔	Aspergillus 3, Phaeoacremonium 1
TBLB	Caprinellus 1
BAL	Rhizopus 1
パラフィン切片	Aspergillus 3, Mucorale 1

染を強く疑った症例に絞った検査前確率のバイアス②真の原因真菌かどうか、汚染菌の可能性はないかの断定はできない③症例数が少なく今後のさらなる蓄積が必要、などがあげられる。

【結論】

侵襲性真菌感染症を疑った際に、生検検体やパラフィン切片の遺伝子検査は有用であることが示唆された。

【文献】

1. Baddley JW, Andes DR, Marr KA, Kontoyiannis DP, Alexander BD, Kauffman CA, Oster RA, Anaissie EJ, Walsh TJ, Schuster MG, Wingard JR, Patterson TF, Ito JI, Williams OD, Chiller T, Pappas PG: Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. Clin Infect

Dis 50: 1559–1567, 2010

2. Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Ráčil Z, Richardson M, Rogers TR: Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother.* 66: i15–24, 2011
3. Ganesan A, Wells J, Shaikh F, Peterson P, Bradley W, Carson ML, Petfield JL,

Klassen-Fischer M, Akers KS, Downing K, Bialek R, Tribble DR, Wickes BL: Molecular Detection of Filamentous Fungi in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Specimens in Invasive Fungal Wound Infections Is Feasible with High Specificity. *J Clin Microbiol* 58: e01259–19, 2019

(11) 神経疾患・高齢者・認知症疾患

アルツハイマー病病理に関連する細胞外小胞蛋白質 カタプシンBの発見

井桁 之総、植田 幸嗣¹、湯山 耕平²
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²

【背景】

アルツハイマー病 (AD) は、アミロイドβ (Aβ) の細胞外凝集 (老人斑) とリン酸化タウ蛋白質 (pTau) の細胞内蓄積 (神経原線維変化: NFT) を病理学的特徴とする。脳脊髄液 (CSF) 中の Aβ 42 は AD 発症の約 25 年前から低下し始め、pTau は約 10 年前から上昇する¹⁾。アミロイドカスケード仮説では、Aβ 蓄積が神経毒性 (pTau 依存性) や神経炎症 (ミクログリア活性化) を誘導し、病態の進行を促進すると考えられている²⁾。この病理学的進行は Braak ステージとして分類され、CSF の Aβ 42 および pTau は病理状態を反映する³⁾。細胞外小胞 (EV) は病原蛋白質の神経細胞間の伝播に関与し、AD 病態進行に寄与する⁴⁾。EV にはエクソソーム (50-150nm)、マイクロベシクル (150-1000nm)、アポトーシスベシクル (1000-5000nm) が含まれ、その積荷 (タンパク質、脂質、核酸) は放出細胞の種類や病態によって異なる⁵⁾。中枢神経 (CNS) 由来 EV には、AD 病態に関与する Aβ やその分解酵素、タウ蛋白質が含まれ⁶⁾、タウの細胞間伝播にも関与し⁷⁾、疾患進行のバイオマーカーとして期待される。2018 年、NIA-AA は AD 診断のため Aβ (A) タウ (T) 神経変性 (N) を用いた ATN 分類を提案し、臨床診断から生化学的診断へと移行しつつある⁸⁾。本研究では EV 内蛋白質を網羅的に調べ、AD 病態に関与する新たな蛋白質を同定する。

【方法】

対象は 136 名 (男性 71 名、平均 71.3 歳、AD 患者 50 名、MCI 26 名、健常者 60 名) 採取した CSF

の Aβ 42、p-Tau、t-Tau を ELISA 法で測定し ROC 解析で ATN のカットオフ値を決定した。うち 60 例 (健常者 23 名、MCI 14 名、AD 患者 23 名) を ATN 分類し、非アルツハイマー病理群を除いた 16 例 (各群 A-T-N-, A+T-N-, A+T+N-, A+T+N+ から 4 例ずつ) を選出し、サイズ排除クロマトグラフィーで EV を抽出し質量分析 (LC-MS/MS) を行った。有意に変動した特定の EV 蛋白質について、136 例の CSF と血漿の EV を用い ATN 分類による大規模バリデーションを実施した (Fig. 1)。

【結果】

CSF バイオマーカーのカットオフ値は Aβ 42: 677.9pg/ml, pTau: 73.0pg/ml, tTau: 597.7pg/ml であり、これを基に ATN 分類を行った。正常バイオマーカー群と AD 連続体に絞り込み (Table 1) その CSF から採取された EV の平均粒径は約 120nm であった。そこから 1,756 種の EV 蛋白質を同定した。この中で 87 種は EV データベース (Vesiclepedia) の Top100 に該当し、Gene Ontology 解析で EV が適切に抽出されたことを確認した。ATN 分類の正常/A 群間、A/TN 群間比較で統計学的に変動する蛋白質を解析しアミロイド病期 (A) への進行に伴い Cathepsin B (CatB) を含む 3 種の蛋白質が有意に増加し、Contactin 6 を含む 3 種が有意に低下した。また、タウ病期 (T) では Pericentrin など 2 種が増加 (Fig. 2 B, C; Table 2)、Neurexophilin-1 など 3 種が低下した。そのうち CatB は Aβ 出現とともに増加し (Fig. 2 D)、老人斑形成に関与すると言われ、136 名 (Table

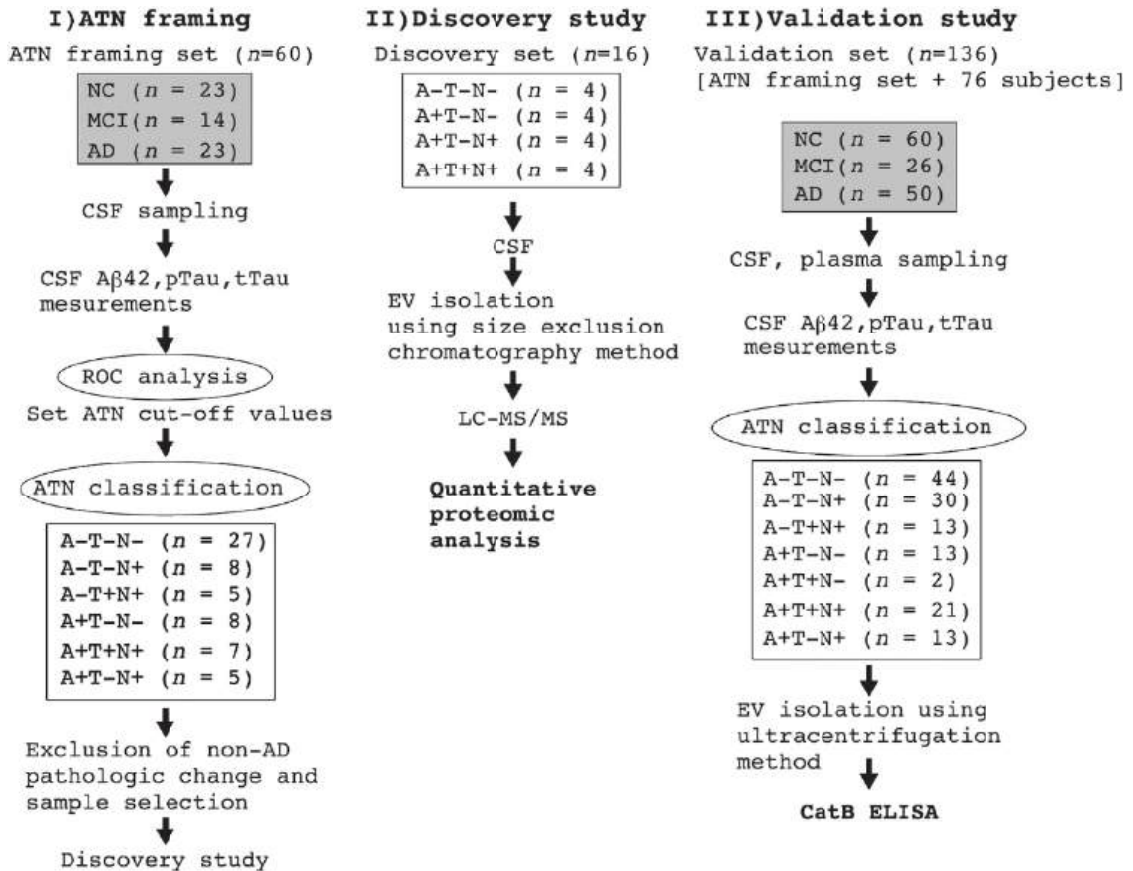


Figure 1 Workflow of the analysis of extracellular vesicle (EV) proteins in CSF and plasma according to ATN classification.

CSF and plasma samples were collected from normal control (NC), mild cognitive impairment (MCI), and Alzheimer's disease (AD) participants and classified into ATN groups based on the levels of Aβ₄₂, pTau and tTau in the CSF. In the liquid chromatography-mass spectrometry-based biomarker discovery phase, after the exclusion of non-AD pathologic changes, EVs were isolated from the 16 selected CSF samples using size exclusion chromatography and analysed by mass spectrometry. In an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based validation study for CatB, EVs were collected from 136 CSF and plasma samples by ultracentrifugation prior to the ELISA. LC-MS/MS= liquid chromatography-tandem mass spectrometry; ROC = receiver operating characteristic.

3) のバリデーション研究の対象とした。このCSFおよび血漿のEVCatB濃度を測定し、CSF-EV中のCatBはアミロイド陽性群で有意に増加し (A-: 35.9 ± 24.7 pg/ml, A+: 95.4 ± 23.9 pg/ml, P<0.0001) CSF中Aβ₄₂濃度と強い負の相関 (r=-0.65) を示した (Fig.3 A-E)。血漿では遊離CatBでは差を認めなかったが、血漿EVCatB

濃度はA-T-N-群よりA+T-N-群が有意に高値 (P=0.042) を示し、CSFのAβ₄₂濃度と中程度の負の相関があった (Fig.4 A-F)。これにより、EV CatBがADのアミロイド病態を反映する有望なバイオマーカーであることが明らかになった。

【考察】

アミロイド前駆体蛋白質からAβを切断するβ

Table 1 Patient information: discovery set (for proteomic analysis)

Classification	A-T-N-	A+T-N- / A+T-N+	A+T+N+
<i>n</i>	4	8 (4/4)	4
Age, mean ± SD	75.5 ± 4.4	73.4 ± 5.7	65.3 ± 11.0
Sex	4 F	2 M, 6 F	2 M, 2 F
Diagnosis	4 NL	1 NL, 3 MCI, 4 AD	4 AD
MMSE	28.75 ± 1.5	26.8 ± 2.9	23.3 ± 4.3
Aβ ₁₋₄₂ (pg/ml)	1326.8 ± 316.0	434.7 ± 70.8	324.8 ± 109.3
pTau (pg/ml)	42.0 ± 6.5	60.0 ± 16.8	129.3 ± 35.9
tTau (pg/ml)	341.7 ± 81.9	579.6 ± 187.8	1355.0 ± 445.0

A = Aβ deposition; Aβ = amyloid beta; AD = Alzheimer's disease; F = female; M = male; MCI = mild cognitive impairment; MMSE = Mini Mental State Examination; N = neurodegeneration; NL = normal; T = pathological tau.

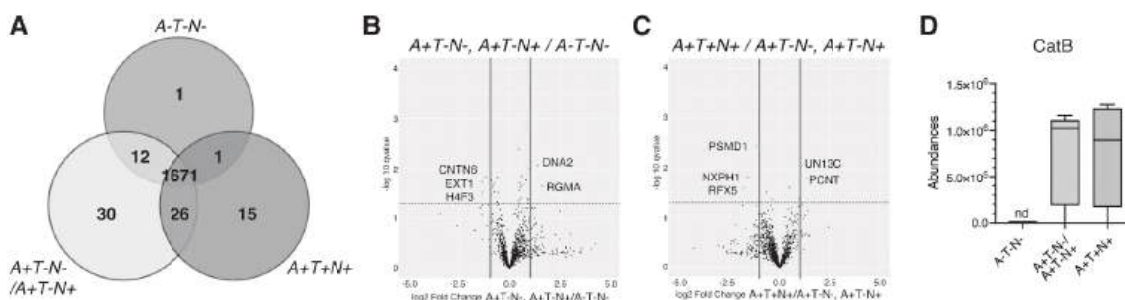


Figure 2 Proteomic analysis of CSF extracellular vesicle (EV) proteins in the discovery set under ATN classification.

(A) Venn diagram of CSF EV proteins quantified in three ATN groups. (B and C) Volcano plots showing statistically significant EV proteins in A+T-N-/A+T-N+ versus A-T-N- (B) and in A+T+N+ versus A+T-N-/A+T-N+ (C). (D) The abundances of CatB protein quantified by mass spectrometry are shown. A = Aβ deposition; N = neurodegeneration; nd = not detected; T = pathological tau.

セクレターゼは beta-secretase 1 (BACE1) であるとされるが、CatB もその一種であるとする説がある。CatB 阻害剤は AD モデルで Aβ 産生抑制効果が報告され⁹⁾、疫学調査でも同阻害薬 Sildenafil 服用者で AD 発症率が約 18% 低下しているとの報告がある¹⁰⁾。今後 EV CatB を超早期 AD 診断バイオマーカーとして確立し、Sildenafil の AD 発症予防薬への応用を検討する必要がある。

【結論】

EV CatB はアルツハイマー病の診断バイオマ

ーカーおよび治療ターゲットとして非常に有望な蛋白質である¹¹⁾。

【文献】

1. Sperling R A et al: Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 280-292, 2011, doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.003

Table 2 Up- and down-regulated EV proteins during ATN stage transition

Protein ID	Protein name	log2FC	q-value
A+T-N-, A+T-N+/A-T-N-			
Q96B86	Repulsive guidance molecule A (RGMA)	1.64	2.3×10^{-2}
P51530	DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2 (DNA2)	1.35	8.6×10^{-3}
Q9UQ52	Contactin 6 (CNTN6)	-1.21	1.5×10^{-2}
P62805	Histone H4 (H4F3)	-1.36	3.1×10^{-2}
Q16394	Exostosin-1 (EXT1)	-1.37	1.9×10^{-2}
P07858	Cathepsin B (CatB)	Detected only in A+ group	
A+T+N+/A+T-N-, A+T-N+			
O95613	Pericentrin (PCNT)	1.32	1.6×10^{-2}
Q8NB66	Protein unc-13 homolog C (UN13C)	1.08	8.7×10^{-3}
Q99460	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 (PSMD1)	-1.19	3.6×10^{-3}
P58417	Neurexophilin-1 (NXPH1)	-1.59	1.5×10^{-2}
P48382	DNA-binding protein RFX5 (RFX5)	-1.75	2.6×10^{-2}

Table 3 Patient information: validation set for CatB enzyme-linked immunosorbent assay

Classification	Normal AD biomarkers	Non-AD pathologic change			AD continuum		
	A-T-N-	A-T-N+	A-T+N+	A+T-N-	A+T+N-	A+T+N+	A+T-N+
<i>n</i>	44	30	13	13	2	21	13
Age, mean ± SD	70.2 ± 8.4	72.5 ± 6.1	74.8 ± 4.1	69.1 ± 7.6	74.0 ± 4.2	69.8 ± 8.0	73.2 ± 7.5
Sex	28 M, 16 F	14 M, 16 F	8 M, 5 F	5 M, 8 F	2 F	10 M, 11 F	6 M, 7 F
Diagnosis	31 NL, 10 MCI, 3 AD	20 NL, 6 MCI, 4 AD	4 NL, 1 MCI, 8 AD	1 NL, 1 MCI, 11 AD	2 MCI	1 NL, 2 MCI, 18 AD	3 NL, 4 MCI, 6 AD
MMSE	28.6 ± 1.5	27.9 ± 2.7	23.2 ± 6.4	22.9 ± 3.1	26.5 ± 2.1	24.3 ± 3.7	25.0 ± 4.3
Aβ ₁₋₄₂ (pg/ml)	1184.0 ± 291.6	1316.8 ± 417.9	1063.1 ± 361.8	453.1 ± 108.1	392.2 ± 33.5	465.5 ± 128.4	464.5 ± 107.8
pTau (pg/ml)	47.5 ± 10.0	55.1 ± 11.0	109.8 ± 36.2	52.3 ± 13.7	122.0 ± 66.5	107.1 ± 26.5	54.2 ± 16.7
tTau (pg/ml)	379.3 ± 149.0	755.8 ± 105.5	1271.0 ± 315.1	418.6 ± 161.3	566.0 ± 24.5	1116.5 ± 417.1	939.4 ± 237.8

A = Aβ deposition; Aβ = amyloid beta; AD = Alzheimer's disease; F = female; M = male; MCI = mild cognitive impairment; MMSE = Mini Mental State Examination; N = neurodegeneration; NL = normal; T = pathological tau.

- Hardy J, Selkoe D J: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356, 2002, doi: 10.1126/science.1072994
- Braak H, Braak E: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239-259, 1991, doi: 10.1007/BF00308809
- Jiang L et al.: Exosomes in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Alzheimer's Disease. *Med Sci Monit* 25: 3329-3335, 2019, doi: 10.12659/MSM.914027
- Yanez-Mo M et al.: Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4: 27066, 2015, doi: 10.3402/jev.v4.27066
- Yuyama K, Igarashi Y: Physiological and

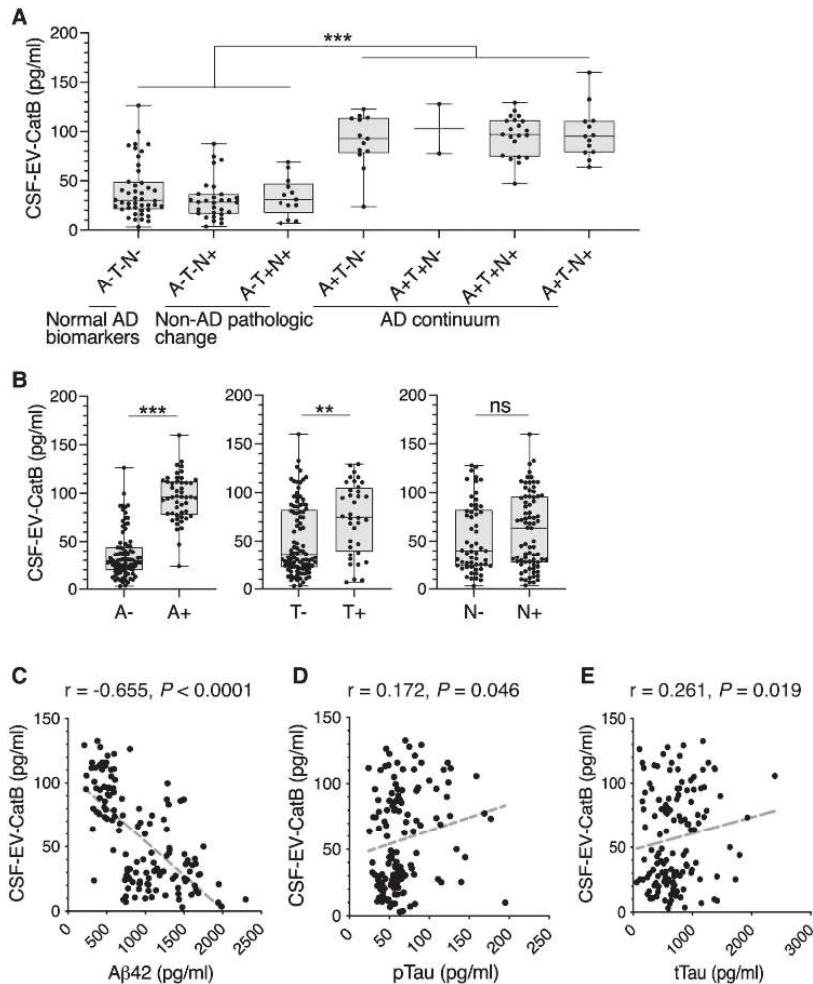


Figure 3 ELISA-based validation of CatB in CSF extracellular vesicles (EVs).

(A) Box plots of CatB abundances in CSF EVs in each ATN group, which were quantified by ELISA (validation set, $n = 136$). (B) Box plots of CatB in CSF EVs in A+/A-, T+/T- and N+/N- classifications. One-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparisons test. ns = non-significant, $**P < 0.01$, $***P < 0.005$. (C-E) Scatter plots showing correlations between CatB in CSF EVs and (C) $A\beta_{42}$, (D) pTau and (E) total Tau levels in CSF. AD = Alzheimer's disease; $A\beta$ = amyloid beta; A = $A\beta$ deposition; N = neurodegeneration; T = pathological tau.

pathological roles of exosomes in the nervous system. *Biomol Concepts* 7: 53–68, 2016, doi: 10.1515/bmc-2015-0033

7. Asai H et al.: Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 18: 1584–1593, 2015, doi: 10.1038/nn.4132
8. Jack C R, Jr. et al.: NIA-AA Research

Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 14: 535–562, 2018, doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.018

9. Hook G et al.: Cathepsin B Gene Knockout Improves Behavioral Deficits and Reduces Pathology in Models of Neurologic Disorders. *Pharmacol Rev* 74: 600–629, 2022, doi:

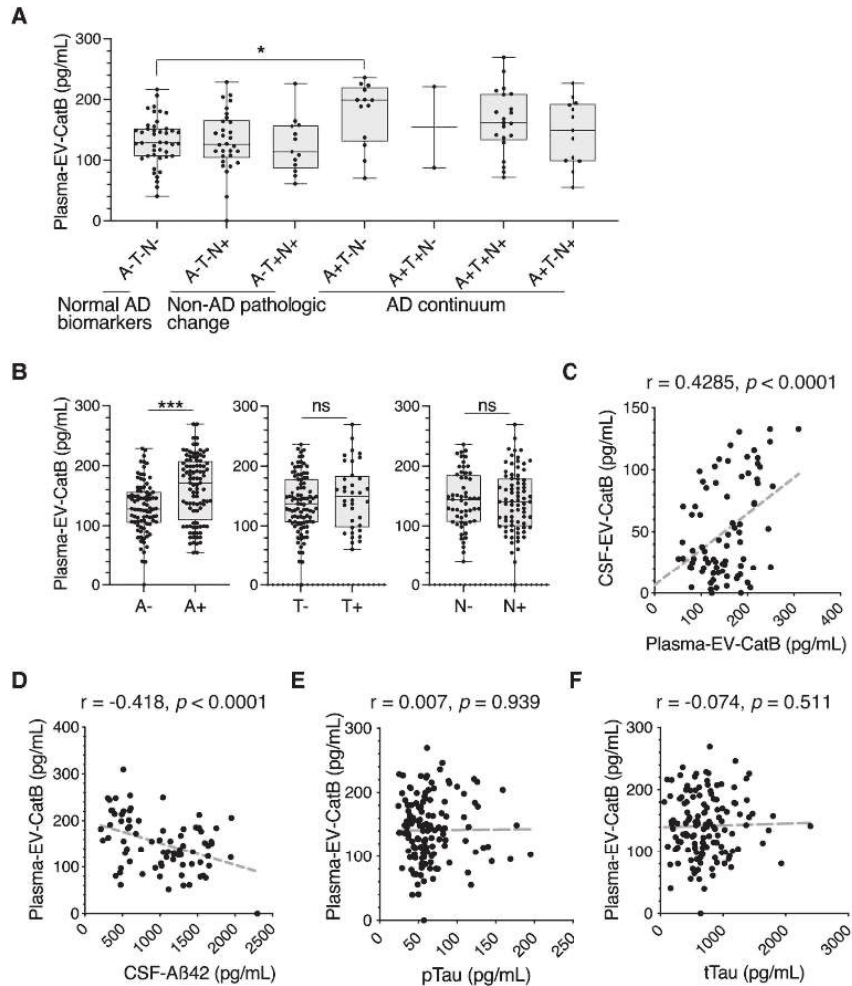


Figure 4 ELISA validation of CatB in plasma extracellular vesicles (EVs) as a putative blood biomarker using ATN classification.

(A) Box plots of CatB abundances in plasma EVs in each ATN group, which were quantified by ELISA (validation set, $n = 136$). (B) Box plots of plasma-EV-CatB in A+/A-, T+/T- and N+/N- classifications. One-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparisons test. ns = non-significant, $*P < 0.05$ and $***P < 0.005$. (C) Correlations between CatB levels in EVs derived from CSF and plasma. (D-F) Scatter plots showing correlations between plasma-EV-CatB and (D) $A\beta_{42}$, (E) pTau and (F) total Tau levels in CSF. A = $A\beta$ deposition; AD = Alzheimer's disease; N = neurodegeneration; T = pathological tau.

10.1124/pharmrev.121.000527

10. Adesuyan M et al: Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors in Men With Erectile Dysfunction and the Risk of Alzheimer Disease: A Cohort Study. *Neurology* 102: e209131,

2024, doi: 10.1212/WNL.0000000000209131

11. Yuyama K et al: Extracellular vesicle proteome unveils cathepsin B connection to Alzheimer's disease pathogenesis. *Brain* 147: 627–636, 2024, doi: 10.1093/brain/awad361

「アポリポタンパクEアイソフォームの変換」を原理としたアルツハイマー病制圧戦略の探索

山崎 雄、石川 若芸
広島大学大学院医系科学研究科脳神経内科学

【要約】

APOE4からAPOE2への時間的・細胞特異的なアイソフォーム切り替えを可能にするAPOE「スイッチ」(APOE4to2S)マウスモデルを作成するためAPOE「スイッチ」技術が生体内で機能するかどうかの確認を行った。その結果APOE「スイッチ」技術が肝臓で機能することを確認した。

【目的】

アポリポ蛋白E (APOE) 遺伝子多型 (APOE2、APOE3、APOE4) はアルツハイマー病の強力な発症リスク規定因子である^{1,2)}。具体的にはAPOE4キャリアのアルツハイマー病発症リスクは一般的なAPOE3キャリアと比較して15倍以上高い一方APOE2キャリアはほとんどこの病気を発症しない。

本研究の目的はAPOE2蛋白が持つ神経保護作用と抗認知症作用に注目しこれを利用してAPOE4の病原性を低減させる可能性を明らかにすることである。具体的にはAPOE4からAPOE2への時間的・細胞特異的なアイソフォーム切り替えを可能にするAPOE「スイッチ」(APOE4to2S)マウスモデルを用いAPOE4を保護的なAPOE2に変換することでAPOE4の病原性が低減するかどうかを検証する。APOEの独自の生物学的特性をより深く理解しAPOEアイソフォームの操作がヒトへの介入法として発展する可能性を探る。

【方法】

相同組換えベクターを次の通りデザインした。すなわち、ApoE遺伝のコーディング領域をヒト化 (APOE4配列) さらにFlag tagおよびEGFPをレポーターとして融合しCre発現によりヒト

APOE3配列、HA tagおよびmCherryに置換される構造である。

その後既報通り³⁾ 相同組換えES細胞クローンの樹立、アグリゲーション法によるキメラマウス作製、生殖系列キメラマウスの同定 (F1ヘテロマウスの取得)、薬剤耐性遺伝子の除去を行い解析用マウスコホートを構築した。

【結果】

APOE「スイッチ」技術が生体内で期待通りに機能するかどうかを確認するためにAPOE4to2Sと同様の原理を採用したAPOE4to3Sマウスを用い以下の解析を行った。

① APOE「スイッチ」マウスモデルコホートの構築

まずAPOE「スイッチ」マウスコホートの安定的な維持を行うためマウスApoE遺伝子座にノックインされたAPOE4to3Sコンストラクトを簡単に検出する方法を確立した。特異的なプライマーを使用したジェノタイピング法によりAPOE「スイッチ」マウス個体が確実に検出できることを確認した (図1)。

② APOE「スイッチ」技術が生体内で機能するかどうかの確認

次にAPOE「スイッチ」マウスをCMV-Creマウスと交配することで全身臓器におけるAPOE「スイッチ」を誘導した。その後APOEを高発現する肝臓においてAPOEの発現がAPOE4からAPOE3に変換されているかをウエスタンブロットティングにより確認した。APOE4とAPOE3の差異は一アミノ酸であり既存抗体での区別が困難なため変換の確認はノックインされたコンストラクト内に配置されたレポーター遺伝子 (mCherry) の発現を定量することで行った。「スイッチ」あ

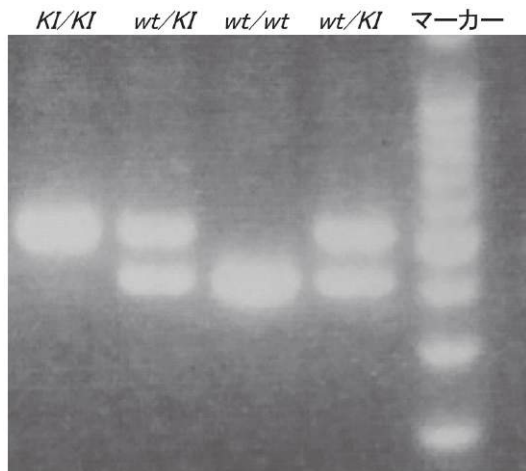


図1 APOE「スイッチ」マウスのジェノタイプピング
以下のプライマーを使用しジェノタイプピングを行った。

F 16525: AGGACTTGTTCGGAAGGAG

R 16916: TCAGCCATGAGGAGCCACAGTTTG

なお、PCR productはwild type alleleが392bp、targeted alleleが486bpに相当する。

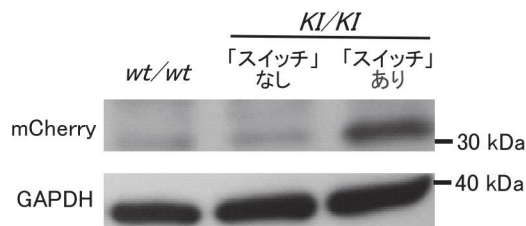


図2 APOE「スイッチ」誘導後肝臓のウエスタン
ブロッティング

肝臓からRIPAバッファーを用いて全タンパク質を抽出。SDS-PAGEゲル上でタンパク質を分離後、PVDF膜に転写した。5%スキムミルク (TBS-T) で室温1時間ブロッキングを行った。

mCherryは抗mCherry抗体 (1: 1000希釈) を使用して検出し、内源性コントロールとしてGAPDHは抗GAPDH抗体を用いて検出した。HRP結合二次抗体 (1: 5000希釈) で1時間インキュベーション後、ECL発光試薬を用いてタンパク質バンドを検出した。

GAPDHはmCherryの発現を正規化するためのローディングコントロールとして使用した。

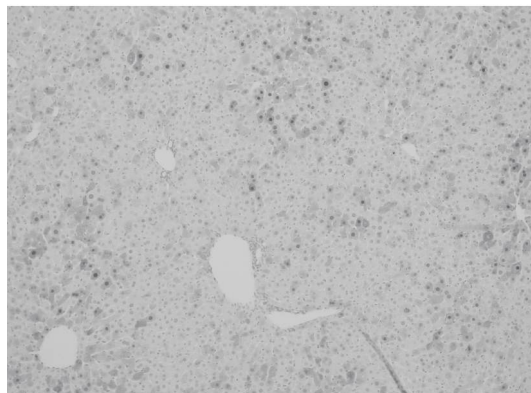


図3 APOE「スイッチ」誘導後肝臓の免疫組織染色

4%パラホルムアルデヒドで固定後、肝臓はパラフィン包埋された。5 μ mの連続切片を作成し、抗mCherry抗体 (1: 500希釈) を用いて一晩4 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。次に、HRP結合二次抗体で1時間室温でインキュベートし、DAB発色剤でシグナルを視覚化した。組織はヘマトキシリンで核を染色し、光学顕微鏡で観察した。mCherryの陽性シグナルは茶色で示されている。

り群にのみ肝臓におけるmCherry発現が確認されAPOE「スイッチ」技術が生体内で機能していることが生化学的に確認された (図2)。

さらにAPOEの発現がAPOE4からAPOE3に変換されているかを肝臓の免疫組織染色により確認した。「スイッチ」あり群にのみ肝臓におけるmCherry発現が確認され、APOE「スイッチ」技術が生体内で機能していることが免疫組織科学的にも確認された (図3)。

【考察】

本研究ではAPOE「スイッチ」技術が生体内で期待通りに機能するかを検証するためにAPOE4to3Sマウスを用いた解析を行った。得られた結果はAPOE「スイッチ」が肝臓において確実に行われることを示しこの技術が生体内で機能することを確認した。このことはAPOEアイソフォームを操作するための有用な実験プラットフォームが確立された可能性を示す。

APOE4からAPOE2への変換がアルツハイマー病において実際にどのような有益な効果をもた

らすかについては現時点では明らかになっていない。今後の研究ではこの変換がアルツハイマー病の治療法として有望かどうかを検証する必要がある。

本研究で確立されたプラットフォームを用いることでAPOEアイソフォームの操作がどのようにアルツハイマー病の病態に影響を与えるかを体系的に評価することが可能となる。具体的にはAPOE4からAPOE2への変換が神経保護作用をもたらすのか、またはアルツハイマー病の進行を抑制するのといった点を今後の研究で明らかにしていく予定である。これによりAPOE4からAPOE2への変換が実際に治療効果を持つかどうかの判断材料が得られることが期待される。

【まとめ】

APOE「スイッチ」が肝臓において行われたことが確認されこの技術が生体内で機能することが示された。すなわち「アルツハイマー病ハイリスクAPOE4からAPOE2への「切り替え」による脳恒常性再構築」を実験病理学的に明らかにするための研究基盤構築が進んだ。

【謝辞】

ご支援いただきました公益財団法人沖中記念成

人病研究所の皆様にご心より感謝申し上げます。成果獲得に向けて今後も精一杯取り組んでまいります。誠にありがとうございました。

【文献】

1. Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC, Bu G: Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol* 15: 501-518, 2019
2. Takebayashi Y, Yamazaki Y, Yamada H, Yazawa K et al.: Apolipoprotein E genotype-dependent accumulation of amyloid β in APP-knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 683:149106, 2023
3. Li Z, Kanazashi H, Tokashiki Y, Fujikawa R et al.: *Biochem Biophys Res Commun* 599: 69-74, 2022

【発表に関する事項】

1. 石川若芸, 山崎 雄, 丸山博文: APOE4からAPOE3への変換を生体内で実現するヒト化APOEマウスモデルの作成と解析. 第43回日本認知症学会学術集会, 福島, 2024年11月

尿毒素フェニル硫酸の糖尿病性腎症におけるインスリン分泌促進機序、老化との関連検討

頓宮 慶泰^{1,2}、阿部 高明²

東北大学医学部医学科（当時）¹

東北大学大学院医学系研究科病態液性制御学分野²

【要約】

末期腎疾患患者は、血中インスリン濃度が有意に高いにもかかわらず、空腹時血糖値とHbA1c値が低い傾向がある。従来、この高インスリン状態は腎機能低下による代謝クリアランスの減少が原因と考えられてきた¹⁾。本研究では、腎不全時に蓄積する腸内細菌由来の尿毒素であるフェニル硫酸(PS)が、膵臓からのインスリン分泌を促進し、糖代謝を変化させることを報告する。さらに、PSが腎機能低下時にインスリン抵抗性を増加させることを示し、これが慢性腎臓病(CKD)および糖尿病性腎臓病(DKD)患者における糖代謝異常に関与している可能性を明らかにした²⁾。

【目的】

腎機能低下患者における低血糖とインスリン分泌増加のメカニズムを解明し、PSのインスリン分泌および抵抗性への影響を検討すること。

【方法】

1. 動物実験

C57BL/6マウスおよび高脂肪食負荷KKAYマウス(DKDモデル)にPS(50mg/kg/day)を5週間投与し、空腹時血糖値、インスリン値、ブドウ糖負荷試験(GTT)、インスリン負荷試験(ITT)を評価した²⁾。

2. 細胞実験

ラット膵β細胞株(INS-1e)および単離膵島を用いて、PSのグルコース刺激インスリン分泌(GSIS)への影響を検討した³⁾。RNA-seqを用いて遺伝子発現変化を解析した。

3. 臨床コホート研究

U-CAREコホート⁴⁾のDKD患者362名と非糖尿病患者100名を対象に、血中PS濃度とHbA1c、

尿中C-ペプチド/クレアチニン比(UCPCR)との関連を解析した。

【結果】

1. PS投与によるインスリン分泌促進と糖代謝改善(図1)

高脂肪食負荷KKAYマウスにPSを投与すると、空腹時血糖値が低下し(図1左上、 $p < 0.05$)、空腹時インスリン値が上昇した($p = 0.05$)。PSによりβ細胞面積が有意に増大した(図1左下)。DKD患者コホート解析では血中PS濃度とHbA1c値に負の相関が認められた($r = -0.1631$ 、 $p = 0.0035$ 、図1右)。

2. PSによるインスリン分泌メカニズム

PSはINS-1e細胞および単離膵島からのグルコース刺激インスリン分泌を有意に増加させた。RNA-seq解析により、PSはDdah2(ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ2)の発現を上昇させ、Prkag1(AMPKサブユニット)の発現を低下させることが判明した。Ddah2ノックダウンでPS誘導性インスリン分泌増加が抑制された。

3. PSによるインスリン抵抗性誘導

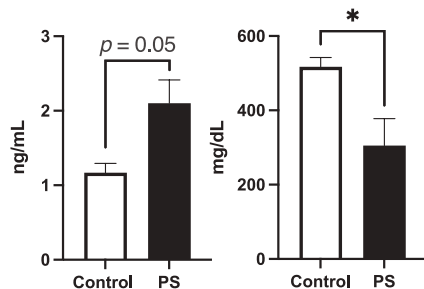
DKDモデルマウスでは、PSによりインスリン抵抗性が誘導された。3T3-L1由来脂肪細胞のRNA-seq解析により、PSはlncRNA(Neat1, Malat1など)の発現を変化させ、Erkリン酸化を促進することが判明した。

4. 臨床コホート研究結果

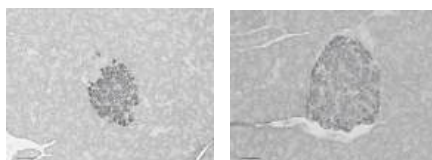
血中PS濃度とHbA1c値に弱い負の相関が認められた。腎機能低下例($eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$)のDKD患者では、血中PS濃度とUCPCRに正の相関が認められ、インスリン抵抗

高脂肪食負荷KKAYマウス (DKDモデル)
にPS (50 mg/kg/day)を 5週間を投与

空腹時インスリン 空腹時血糖



PS投与によりβ細胞増大



DKD患者コホート(U-CARE study)解析

血中PS (μM) と HbA1cの関係

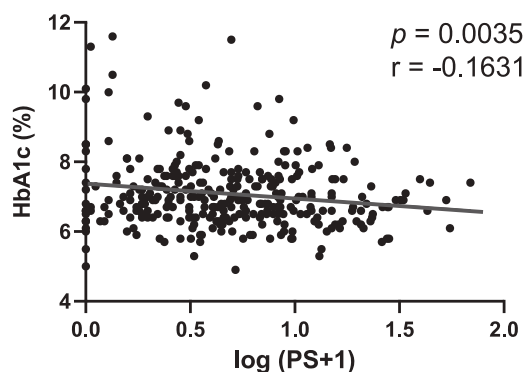


図1 PSはインスリン分泌を増加し糖代謝を改善

性との関連が示唆された。

【考察】

本研究では、PSが膵β細胞に作用してインスリン分泌を促進するとともに、腎機能低下例においてインスリン抵抗性を誘導することを明らかにした。Ddah2およびPrkag1を介したインスリン分泌促進メカニズムと、lncRNAの発現変化およびErkリン酸化を介したインスリン抵抗性誘導メカニズムが示唆された。

臨床的には、HbA1cを慢性高血糖の、UCPCRを慢性高インスリン血症の指標と考えると、PSはCKDの有無にかかわらず高血糖と負の関連を示し、DKD患者においては高インスリン血症と正の関連を示すことが明らかとなった²⁾。

これらの知見は、腎機能低下患者における糖代謝異常の新たなメカニズムを提示するとともに、PSが糖尿病治療の新たな標的となる可能性を示唆している。我々の以前の研究でも示したように¹⁾、PSのような腸内細菌由来物質の制御は、DKD患者の治療戦略として有望である。老化との関連についてはさらなる研究を要し、今後のさ

らなる課題として検討を進める。

【文献】

1. Kikuchi K, et al.: Gut microbiome-derived phenyl sulfate contributes to albuminuria in diabetic kidney disease. *Nat Commun* 10: 1835, 2019
2. Tongu Y, et al.: Hypoglycemia and hyperinsulinemia induced by phenolic uremic toxins in CKD and DKD patients. *Scientific Reports* 15: 5762, 2025
3. Hasegawa K, et al.: The hydrolase DDAH2 enhances pancreatic insulin secretion by transcriptional regulation of secretagogin through a Sirt1-dependent mechanism in mice. *FASEB J* 27: 2301–2315, 2013
4. Mise K, et al.: Identification of novel urinary biomarkers for Predicting Renal prognosis in patients with type 2 diabetes by glycan profiling in a Multicenter prospective cohort Study: U-CARE Study 1. *Diabetes Care* 41: 1765–1775, 2018

【発表に関する事項】

1. Tongu Y, et al.: Hypoglycemia and hyperinsulinemia induced by phenolic uremic toxins in CKD and DKD patients. *Scientific Reports* 15: 5762, 2025
2. 頓宮慶泰, 菊池晃一, 鈴木健新, 三瀬広記, 和田淳, 秋山泰利, 那谷耕司, 鯨井涼太, 松本洋太郎, 富岡佳久, 渡邊駿, 豊原敬文, 鈴木健弘, 田中哲洋, 阿部高明: 尿毒素フェニル硫酸は糖尿病性腎症におけるインスリン分泌促進とインスリン抵抗性に関与する, 第44回日本高血圧学会総会, 2022 (第44回日本高血圧学会総会最優秀演題賞を受賞)
3. Tongu Y, Kasahara T, Akiyama Y, Ho H J, Matsumoto Y, Kujirai R, Kikuchi K, Nata K, Kanzaki M, Suzuki K, Watanabe S, Toyohara T, Suzuki T, Kawabe C, Suzuki C, Tanaka T, Wada J, Tomioka Y, Abe T: Gut microbiome-derived phenyl sulfate promotes insulin secretion and insulin resistance in DKD patients, 12th CKD Frontier Meeting, Nagoya, 2023 (CKD Frontier Awardを受賞)
4. 頓宮慶泰, 笠原朋子, 川邊千陽, 鈴木健新, 菊池晃一, 三瀬広記, 鯨井涼太, 松本洋太郎, 秋山泰利, 渡邊駿, 豊原敬文, 鈴木健弘, 和田淳, 富岡佳久, 田中哲洋, 阿部高明, 糖尿病性腎症におけるインスリン分泌促進とインスリン抵抗性亢進の原因に尿毒素フェニル硫酸が存在する, 第66回日本糖尿病学会総会, 2023
5. 頓宮慶泰, 笠原朋子, 川邊千陽, 鈴木健新, 菊池晃一, 三瀬広記, 鯨井涼太, 松本洋太郎, 秋山泰利, 渡邊駿, 豊原敬文, 鈴木健弘, 和田淳, 富岡佳久, 田中哲洋, 阿部高明, 尿毒素フェニル硫酸はインスリン分泌を刺激し糖尿病性腎症におけるインスリン抵抗性を惹起する, 第66回日本腎臓学会総会, 2023

全身代謝を制御するアストロサイト神経連関の解明

松田 烈士

関西医科大学附属生命医学研究所 侵襲反応制御部門

【要約】

グリア細胞の一種であるアストロサイトは中枢神経系に存在する神経細胞や他のグリア細胞、さらには末梢神経系や末梢組織とつながる血管とも相互に情報のやりとりを行っている。このような特徴から、アストロサイトは脳-身体連関におけるインターフェイスとして重要な役割を担っていると想定されている。最近、我々はマウスの特定脳領域に存在するアストロサイトの化学遺伝学的活性化 (Gq-DREADD) が体温低下や酸素消費量の低下を誘導することを発見した。本研究では本現象のメカニズム解明に挑んだ。アストロサイトのGi-DREADD刺激では体温や酸素消費量に影響がなかったことから、本現象の誘導にはGqシグナルが重要な細胞内シグナルである可能性が示唆された。昨年、受容体Xの薬理的阻害が体温・酸素消費量低下を抑制することを既に報告したが、*in vivo*ゲノム編集により神経細胞特異的に受容体Xを操作することでも、アストロサイト誘導性低体温は抑制された。これらの一連の結果から、アストロサイトを軸とした体温・代謝変動の仕組みの一端が明らかになった。

【目的】

代表者はこれまで、アストロサイトが生体機能へと及ぼす影響に関する研究を行ってきた¹⁾。アストロサイトに着目した研究を行う中で、特定の脳領域に存在するアストロサイトがマウスの全身代謝を低下させる可能性を見出した。そこで本研究では、アストロサイトが代謝状態を制御する仕組みを明らかにすることを目指した。

【方法】

HEK293T細胞に3種のplasmidを用いたトリプルトランスフェクションを行うことで組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) を作製し、塩化セシウム密度勾配遠心により精製した。精製した

AAVをC57BL/6マウスの特定脳領域へ微量注入することで目的細胞に任意の機能性たんぱく質を発現させたマウスを作製した。DREADDシステムを利用した実験では、クロザピン-N-オキシド (CNO) を1mg/kg腹腔内投与し、各種生理応答変化の測定を行った。

【結果】

CNO投与によりアストロサイトにGi-DREADD刺激を与え、表面体温および酸素消費量を測定した。蛍光たんぱく質を発現させたコントロール群と比較し、それらの測定値に有意な差はみとめられなかった。この結果は、GiやGβγを介したアストロサイト内シグナル伝達経路は、体温や酸素消費量の変動に関与しないことを示唆する。

つづいて、代謝・体温変動に関わるグリア-神経インタラクションに重要な受容体を特定することを試みた。これまで我々は、薬理的なスクリーニングにより候補受容体Xを同定している。実際にアストロサイト近傍の神経細胞上の受容体Xを発現低下させたときに、体温や酸素消費量の低下が抑制されるか否かについて検討を行った。hSynプロモーター制御下でCas9および受容体Xを標的としたsgRNAを発現するように設計したAAVを利用することで、*in vivo*ゲノム編集を行った。作製したマウスのアストロサイトをGq-DREADD刺激した際の体温および酸素消費量の変化を計測した。その結果、神経細胞特異的に受容体Xを発現低下させた動物では、アストロサイト誘導性低体温が抑制され、酸素消費量の低下については抑制傾向がみられた。

【考察】

本研究ではアストロサイトを介した中枢性の代謝制御機構の仕組みの解明を行った。Gi-DREADDを用いた解析により、アストロサイト誘導性代謝制御の細胞内シグナル伝達機構とし

て、Gi pathwayが関与しないことを明らかにした。また、in vivoゲノム編集を用いた解析により、代謝制御に関わるグリア-神経インタラクションの仕組みを特定した。アストロサイトを介した新たな中枢性の代謝制御機構の解明は、同細胞を標的とした代謝異常疾患の戦略構築の一助になり得ると期待している。

【文献】

1. Kohro Y, Matsuda T, Yoshihara K, Kohno K, Koga K, Katsuragi R, Oka T, Tashima R, Muneta S, Yamane T, Okada S, Momokino

K, Furusho A, Hamase K, Oti T, Sakamoto H, Hayashida K, Kobayashi R, Horii T, Hata-da I, Tozaki-Saitoh H, Mikoshiba K, Taylor V, Inoue K & Tsuda M: Spinal astrocytes in superficial laminae gate brainstem descending control of mechanosensory hypersensitivity. *Nat. Neurosci* 23: 1376-1387, 2020

【発表に関する事項】

1. 松田烈士, 小早川令子, 小早川高: 自律神経機能におけるアストロサイトの役割. *Neuro*2024, 福岡, 2024年7月

筋萎縮性側索硬化症の病態解明とその治療法開発

藤田 幸
島根大学医学部

【要約】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）では、運動神経が障害され、次第に体の自由がきかなくなる進行性の神経変性障害である。日本のALS患者数は約1万人と推定されており、高齢者に発症が多く見られることから、少子高齢化の傾向のある我が国では、今後も患者の増大が予想される。ALSに対するケアとして、呼吸管理や栄養・理学療法により症状を和らげる方法や、残存した一部の筋肉や眼球の動きで意思を伝達する装置などが開発されている。対症療法を適切に行うことで進行を遅らせることができるようになりつつあるが、ALSの発症原因は未だ不明な点が多く残されており、直接の原因に対する治療法は確立されていない。このような現状から、ALSを克服するための治療法開発は社会から強く求められており、喫緊の課題である。

本研究では、ALSモデルマウスを用いて、標的因子の発現誘導が神経細胞死の抑制および運動機能の改善に与える影響を解析した。組織免疫染色により、標的因子の発現誘導により細胞死が減少することが示され、またRotarod試験において運動機能の改善傾向が確認された。これらの結果は、標的因子がALSの病態進行を抑制し、運動機能の維持に寄与する可能性を示唆する。

【目的】

ALSの治療のためには、破綻した神経ネットワークを再建することが必要であるが、中枢神経細胞自身の再生能力は弱く、元通りに回復するのは困難である。申請者はこれまでにALS、パーキンソン病、アルツハイマー病などの様々な神経変性疾患モデルを用いて、神経回路の修復を妨げるメカニズムの解明に取り組んできた^{1,2)}。ALSでは全身の筋萎縮や呼吸障害を生じるが、これらの障害は運動神経が変性し運動機能を司る神経ネ

ットワークが破綻するためである。根本的な治療のためには、破綻した神経ネットワークを再建することが必要であるが、一度切断された中枢神経細胞の軸索が、自然に再生することはほとんど無い。これは、中枢神経細胞自身の再生能力が極めて弱いためである。そこで申請者は、運動神経細胞の周囲に存在する細胞の力をかりて、障害された神経回路を再構築することはできないかと考えた。本研究では、神経細胞の周囲に存在する免疫担当細胞が、病態に与える影響について検証した。

【方法】

①組織免疫染色

マウスに3種混合麻酔を腹腔内投与して麻酔をかけ、4% PFA/PBSで、マウスを経心的に灌流固定した。組織を取り出し、4% PFA/PBS、4℃で一晩後固定を行った。続いて30% スクロース/PBS中に浸け、4℃でサンプルが沈むまで浸漬した。その後、組織をOCT compoundで包埋し、凍結標本を作製した。クライオスタットを使用し、冠状方向に厚さ20μm、の凍結薄層切片を作製し、その後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体を4℃で一晩静置した。切片をPBSで洗浄をした後、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体を室温遮光下で1時間反応させた。PBSで洗浄後、Fluorescent mounting mediumを用いて封入した。封入後のサンプルを観察、撮影した。

②Rotarod試験

神経疾患モデルマウスの運動機能障害を評価するため、Rotarod testを実施した。Rotarod testでは、マウスを回転するロッドの上に置き、マウスがロッドから落下するまでの時間、もしくはロッド上を2度回転するまでの時間を測定した。このとき、ロッドの回転は5分間で25r.p.mまで徐々に加速させた。損傷後、各時点での試行は3回行い、それぞれの平均値を算出した。また、すべて

のマウスは本試験の前の3日間に上記の試行を3回ずつ行いRotarodへ順化させ、3日目の試行の平均値を採用した。

【結果】

標的因子の発現誘導により、細胞死が減少するか、抗Cleaved Caspase3抗体を用いた組織免疫染色により解析した。その結果、コントロールと比較して、死細胞数が減少することがわかった。

SOD1G93Aマウスにおける運動機能障害が緩和されるか、Rotarod testを実施し、解析した。標的因子の発現誘導、およびコントロール群について、Rotarodへ馴化後、マウスを回転するロッドの上に置き、マウスがロッドから落下するまでの時間、もしくはロッド上を2度回転するまでの時間を測定した。標的因子の発現を誘導した群では、溶媒コントロール群と比較して滞在時間の延長傾向が見られた。

【考察】

本研究の結果は、標的因子がALSにおける神経変性を抑制し、運動機能の保持に寄与する可能性を示唆している。ALSは運動神経の変性による進行性の神経疾患であり、その根本的な治療法は確立されていない。本研究では、中枢神経の再生能力が低いという課題に対し、運動神経細胞の周囲に存在する細胞の機能を利用することで、神経回路の再構築を試みた。これまでの研究では、神経炎症がALSの進行に大きく関与していることが示唆されており、特に免疫細胞の働きが神経変性の抑制に寄与する可能性が指摘されている。本研究においても、標的因子の発現が神経細胞死を抑制することから、免疫細胞を介した神経保護メカニズムの関与が考えられる。

また、Rotarod試験の結果から、標的因子の発現誘導によって運動機能が改善する傾向が見られたことは、ALSにおける神経回路の再構築に寄与している可能性を示唆する。特に、運動神経の

変性が進行するALSにおいて、運動機能の改善は患者のQOL向上に直結する重要な要素である。今回の結果は、標的因子の発現が運動機能を維持する新たな治療戦略の可能性を示すものであり、今後の研究においてその分子メカニズムをさらに明らかにすることを目指す。

本研究で解析を進めた標的因子の発現がどの細胞種に作用し、どのようなシグナル伝達経路を介して神経細胞死を抑制するのか、詳細なメカニズムは未解明である。免疫細胞を介した間接的な効果だけでなく、神経細胞自身の応答も関与している可能性があるため、さらなる分子レベルでの解析が必要である。また、今回の実験はALSモデルマウスを用いたものであり、ヒトALS患者において同様の効果が得られるかどうかは今後、ヒト細胞や剖検組織を用いた検討が必要である。依然として多くの課題が残されているが、本研究の成果は新たな治療への展開に向けた重要な一歩となると考えられる。

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、公益財団法人冲中記念成人病研究所より多大なるご支援を賜りましたこと、厚くお礼申し上げます。

【文献】

- 1 Oda W, Fujita Y, Baba K, Mochizuki H, Niwa H, Yamashita T: Inhibition of repulsive guidance molecule-a protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. Cell death & disease 12: 181, 2021
- 2 Sada N, Fujita Y, Mizuta N, Ueno M, Furukawa T, Yamashita T: Inhibition of HDAC increases BDNF expression and promotes neuronal rewiring and functional recovery after brain injury. Cell death & disease 11: 655, 2020

魚油を用いて脊椎動物の成り立ちの一端を解明する

升田 紫

東京大学医学部附属病院予防医学センター

【要約】

我々は、脂質代謝を制御する要の転写因子 SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) と、魚油に多く含まれる多価不飽和脂肪酸 (PUFA: Poly Unsaturated Fatty Acid) の関連に着目し、研究を続けている。脊椎動物の SREBP には -1 と -2 のアイソフォームが存在し、両者はアミノ酸配列がよく似ているにも関わらず、機能は大きく異なり、前者は中性脂肪/脂肪酸代謝、後者はコレステロール代謝を制御する。本研究は、似て非なる機能を持つ2種の SREBP の差異を決定づけるドメインを探索し、脂質代謝が関与する病態解明に取り組む。

【目的】

我々は先行研究¹⁾で、PUFA が SREBP-1 特異的な作用を介して肝臓での中性脂肪合成を抑制する一方、SREBP-2 に対しては抑制しない事を発見した。そこで、SREBP-1 のみに PUFA を感受する特異的なドメインが存在するという仮説のもと、以下2つの目的を掲げ、本研究を展開した。

(目的1) 肝臓の SREBP-1 特異的な PUFA 感受ドメインの絞り込みと同定

(目的2) SREBP-1 上の PUFA 感受ドメインで相互作用する分子の探索

【方法】

(目的1) 肝臓の SREBP-1 特異的な PUFA 感受ドメインの絞り込みと同定

我々は先行研究¹⁾で、生きたままのマウス肝臓での SREBP の転写活性を可視化・定量化し、in vivo imaging system (IVIS) で評価する独自のニュートリゲノミクス手法を構築した。本手法を応用し、本研究では、SREBP 配列を改変した遺伝子を自作し、上述の IVIS を用いて、PUFA による SREBP の転写活性の変動を評価した。結果、SREBP-1 上の PUFA 感受ドメインを絞り込

むことが出来た。

(目的2) SREBP-1 上の PUFA 感受ドメインで相互作用する分子の探索

絞り込んだ SREBP-1 配列の近傍には、既存の分子として SCAP (SREBP cleavage-activating protein) の存在がよく知られる。SREBP-1 特異的な PUFA 感受ドメインの手がかりを探すため、我々は、既知の SCAP との関連に着目して検討を行った。

【結果】

本研究により、SREBP-1 上の PUFA 感受ドメインを絞り込んだ。

【考察】

脂質は生命誕生や維持に必須の成分であるため、SREBP は、いわば生命の源をつかさどる主役である。我々は、本研究を通じて SREBP の進化過程を明らかにする事で、脂質代謝が関与する様々な病態解明に繋がりたいと希求する。なお我々は、PUFA と SREBP の関連性以外にも、摂食に伴う生命現象に幅広く興味を持って長年研究を続け、摂食に伴い変動する中性脂肪合成の「スイッチのオン・オフ」を決定する分子機構の解明を初めて果たす事が出来た²⁾。他、高蛋白食による肝臓の転写調節機構の解明を通して転写因子 KLF15 の新規標的遺伝子を初めて同定し³⁾、インスリンが3大栄養素間 (蛋白質・糖質・脂質) のバランスを制御する分子メカニズムの解明も果たした⁴⁾。直近では、摂食に伴って変動する SREBP-1 の発現調節に、KLF15 や糖質コルチコイド受容体が重要な役割を担う事も初めて報告した⁵⁾。我々は引き続き、ニュートリゲノミクス研究の発展に貢献したいと考えており、この度の助成に深謝申し上げる。

【文献】

1. Takeuchi Y, et al.: Polyunsaturated fatty

- acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. *J Biol Chem* 285: 11681–11691, 2010
2. Takeuchi Y, et al.: KLF15 Enables Rapid Switching between Lipogenesis and Gluconeogenesis during Fasting. *Cell Rep* 16: 2373–2386, 2016
 3. Mehrzad Saber Z, et al.: High protein diet-induced metabolic changes are transcriptionally regulated via KLF15-dependent and independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 582: 35–42, 2021
 4. Takeuchi Y, et al.: FoxO-KLF15 pathway switches the flow of macronutrients under the control of insulin. *iScience* 24: 103446, 2021
 5. Takeuchi Y, et al.: GR-KLF15 pathway controls hepatic lipogenesis during fasting. *FEBS J* 291: 259–271, 2024

B 冲中記念成人病研究所専任研究員による基礎的研究

糖尿病性認知障害に対する nACh receptor subunits の関与

新郷 明子、鬼頭 昭三¹
湘南藤沢徳洲会病院¹

【要約】

目的: 糖尿病に伴う認知障害に関連して、STZ 脳内投与ラットにおける脳内インスリン・シグナリングの障害に対する donepezil およびインスリンの効果を検討することを目的とした。

方法: STZ を脳室内単回投与して作製した脳内糖尿病モデルラットの認知機能を、Morris Water Maze を使用して測定した。また、このモデルラットにインスリン、または donepezil を投与し、認知機能に対する影響を、行動科学的検討、および、免疫組織化学的検討によって解析した。

結果: 脳内糖尿病モデルラットの低下した認知機能は、インスリン、donepezil の投与によって、改善の傾向を示した。

結論: 脳室内 STZ 投与によるインスリン・シグナリングの障害が、インスリン、donepezil の投与によって改善をみたことは、糖尿病患者におけるインスリン・シグナリングの障害による海馬機能の低下は、インスリン投与による改善のみならず、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤である donepezil によっても、改善する可能性が示された。

【目的】

糖尿病とアルツハイマー病 (AD) の関係について、糖尿病患者は非糖尿病患者に比して高い頻度で AD に罹患するという統計的報告が数多く出されている。先に、我々は 2 型糖尿病患者で外来通院中の ADL が自立している年齢 50 ~ 85 歳の患者について、頭部 MRI 矢状断面像をもとにした VSRAD (Voxel-based Specific Regional analysis system for Alzheimer's Disease) による解析

を海馬傍回に焦点を当てて行った結果、59% で海馬傍回の萎縮が存在することを示した¹⁾。これらの点を受けて、糖尿病患者における海馬機能の低下が脳内インスリン・シグナリングとの関連で問題視されている。糖尿病患者における認知機能の障害は、糖尿病患者が認知障害に陥ると、自己管理が困難となり、糖尿病の治療自体を不可能にするという意味で重要な問題である。本研究では、糖尿病に伴う認知障害に関連して、認知能との関係が注目されている、脳内 $\alpha 7$ 受容体の持つ意味について結論を出すために行動科学的小および生化学的立場から検討することを最終目的とし、本年度は、donepezil およびインスリンが、STZ 脳内投与における脳内インスリン・シグナリングの障害に対する効果を検討することを目的とした。

【方法】

Wistar strain 雄性ラット 4 週齢に、STZ を第 3 脳室内投与し、脳内糖尿病モデル (STZ-icv)²⁾ を作成し (n=7~8)、対照ラットには STZ の溶液 PBS を投与した (n=10)。

これらのラットについて、Morris Water Maze (MWM) を用い、ゴール到達までに要した遊泳距離、時間、平均速度などを ANY-MAZE (Stoelting Co., USA) を使用して測定し、行動効率 path efficiency を算出した。また、STZ-icv には、STZ 投与 2 週間後に、持効型インスリン 0.5U を脳室内単回投与 (n=7~8)、または donepezil 3mg/kg を行動科学的測定 1 時間前に経口投与 (n=14) し、それぞれの投与の効果を同様に行動科学的に測定した。

行動測定後、ラットの脳についてリン酸化 IGF1 受容体 (pIGF1R)、Ki67、DCX、Akt、Amyloid

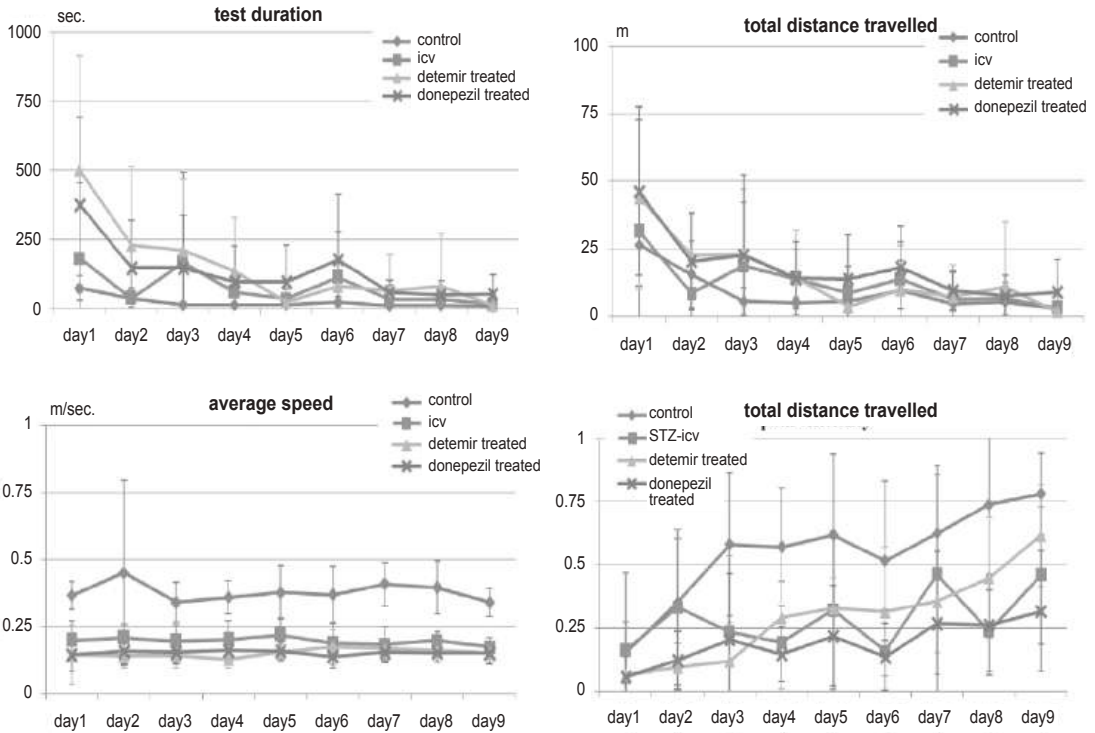


図 1

betaタンパク (Ab) について、免疫組織化学的染色を行い、特に海馬断面について比較検討した。

実験動物に対する動物愛護上の配慮は、NIH Guide for the Care Use of Laboratory Animals に基づき、実験動物に対し不必要な苦痛を与えないようにした。

【結果】

①行動科学的検討

MWMを用いて、連続9日間の測定を行った。対照群 (control) に比して、STZ-icv群の遊泳距離、遊泳時間、行動効率path efficiencyは低下を示し、脳室内単回インスリン投与、または、donepezilの経口投与によって改善の傾向をみた (図1)。

②免疫組織学的検討

海馬のCA領域および歯状回 (DG) において、共にpIGF1R、Ki67、DCX、AKTの発現は、対照群に比して著明に低下していた。一方、Abのみ、対照群に比して1.5倍を超える発現の増強が

表 1

control	$F_{(8,80)} = 6.60, p < 0.0001$
STZ-icv	$F_{(8,53)} = 1.18, p = 0.3281$
STZ-icv (insulin treated)	$F_{(8,62)} = 6.76, p < 0.0001$
STZ-icv (donepezil treated)	$F_{(8,117)} = 2.59, p < 0.05$

見られた (表1、図2)。

【考察】

糖尿病患者において、ADに対する高いリスクが存在することは、先に我々がまとめたVSRADによる解析でも確認されている¹⁾。経過を追って繰り返しVSRAD解析を行った結果では、43%において血糖コントロールが良好であっても海馬傍回の萎縮は進行の傾向を示し、この海馬傍回萎縮の進行は高齢糖尿病患者においてより著明であった。

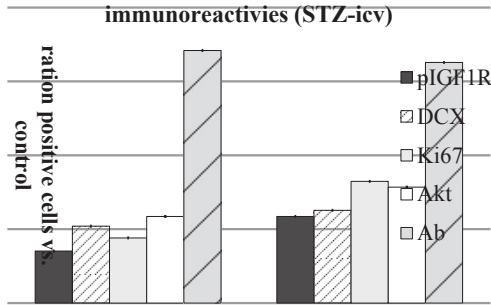


図 2

今日ではインスリンは、脳内でも生合成されているとされ³⁾、インスリン受容体は嗅球、視床下部、大脳皮質、海馬、を中心として、脳内に広く存在することが明らかになっている。本年度の我々の実験結果より、STZ-icvラットの脳内にインスリンを直接単回投与、または donepezil の経口投与によって、STZ脳室内投与による認知機能の低下は改善の傾向を示し、path efficiency（認知行動の効率性）の上昇は、とくにインスリン投与において著明に有意であった。このことは、STZ脳室内投与によって障害された脳内インスリン・シグナリングがインスリン投与によって、改善の方向を示したと考えられる。

昨年度、脳室内STZ投与によってnAChR $\alpha 7$ およびインスリン分解酵素（IDE）の歯状回（DG）における発現が上昇を示すことを報告したが、さらなる検討の結果、DG、CA領域ともにSTZ-icvにおけるIDE発現の低下が一層著明であることが明らかとなった。また、IDEの低下は、hippocampal fissureを境に海馬側で特に著明な発現低下を示しており、ここを通る貫通線維を介する情報伝達に影響を与えることが示された⁴⁾。一方、Abの発現は、DG、CA領域ともに過剰な発現を示し、特に、DGの堤部において著明であることから（図3）、この場所におけるAbとIDEの発現変化は、海馬における長期増強の発現に影響を与えていることは明らかである。

また、脳内インスリン・シグナリングが障害されることによる認知機能の障害は、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬である donepezil の経口投

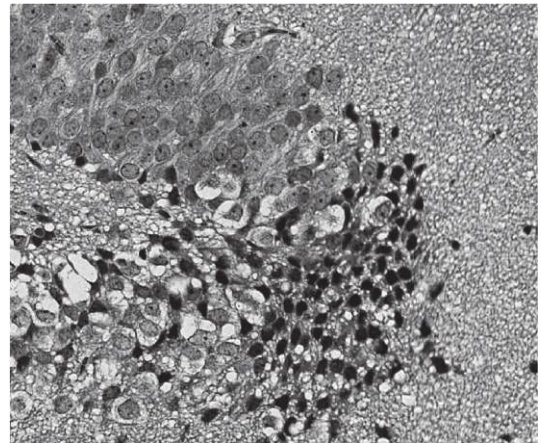


図 3 海馬堤部のAb発現（STZ-icv）

与によっても改善されたことは、インスリン・シグナリングが障害されて認知機能障害をおこした糖尿病脳は、昨年度の報告で論じたように、グルコース代謝の異常を介し、コリン系神経伝達機構の異常を招き、結果として、AD脳で見られるように、アセチルコリン濃度の低下が生じていると考えられる。また、donepezilはインスリン・シグナリングの中心ともいべき因子であるAktを活性化させることが明らかになっており⁵⁾、donepezilが記憶学習に深くかかわるCREBを活性化する経路を促進すると考えられる。

【文献】

1. 新郷明子, 鬼頭昭三: 糖尿病と認知機能低下. 月刊糖尿病 1: 152-157, 2009
2. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, et al.: Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. J Neurochem 101: 757-770, 2007
3. Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, et al.: Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. J Biol Chem 269: 8448-8454, 1994
4. Shingo AS, Kanabayashi T, Murase T, Kito S: Cognitive decline in STZ-3V rats is largely due to dysfunctional insulin sig-

nalling through the dentate gyrus. Behav Brain Res 229: 378-383, 2012

5. Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C: Insulin receptor signaling in rat hippocampus: A study in STZ (ICV) induced memory deficit model. Eur Neuropsychopharmacol 21: 261-273, 2011

【発表に関する事項】

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