2023 年度

基礎自主研修報告書

名古屋市立大学医学部

目　　次

<臨床病態病理学>

1. 胸腺MALTリンパ腫におけるCD274及びTNFRSF14の遺伝子異・・・・・・・・・・・1
髙橋　海人　本多　真子

2. 多形腺腫由来癌における HMGA2 周辺領域の染色体再構成の検索・・・・・・・・・2
篠田　透　　新美　雄啓

3. 要介護認定調査票特記事項を利用した機械学習モデル比較・・・・・・・・・・・・3
鈴木　真央

4. DEA によるコロナ禍前後における公立病院の経営効率性評価・・・・・・・・・・・4
竹岡　侑紀

<免疫学>

5. 皮膚への紫外線照射は骨格筋と腎臓の制御性 T 細胞を増加させる・・・・・・・・・・5
若杉　大路

6. Effect of UVB exposure of skin on immune cells in MALT・・・・・・・・・・・・・6
渡邉　友喜

<細菌学>

7. Clindamycin induces the production of exotoxin in Streptococcus pyogenes・・・・・・7
牛田　あかり　　大木　初音

8. Purification of sensor protein SPY1588 from Streptococcus pyogenes・・・・・・・8
佐久間　大翔

9. A 群レンサ球菌において酸化ストレス反応に関与する転写調整因子の同定・・・・・・9
高良　志織　　原田　将太朗

<実験病態病理学>

10. ラット前立腺発がんモデルに対するルチンの化学予防効果・・・・・・・・・・・・10
古幡　保之

11. CD81 is expressed in the tumor-inhibitory CAF expressing PDPN in the breast cancer microenvironment・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11
和田　裕太郎

12. マウス膵炎モデルにおける組織学的変化とプロテオーム解析を用いた膵炎発症膵癌における初期変化の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12
浅利　怜太　　吉永　拓未

13. 種々の腫瘍における CD70・CD27 の発現解析と大腸線維芽細胞における CD70 の機能解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13
栗本　真緒

14. 遺伝子疾患の患者のゲノムにCRISPR-Casを使った治療用DNAを挿入する治療法・・・14
河上　恭太郎

14.遺伝子疾患の患者のゲノムにCRISPER-Casを使った治療用DNAを挿入する方法・・・・15
小沼　文香

<薬理学>

15. 血圧レベルの静水圧による心筋細胞の収縮動態への作用・・・・・・・・・・・・・・・16
張　夏智　　村田　景星

16. Pannexin 3　とP2X 受容体を介した骨芽細胞分化制御機構の解明・・・・・・・・・・・17
丹羽　彩乃　堀場　大紀

<ウイルス学>

17. 細胞集団における EB ウイルス DNZ コピー数の分布を測定する・・・・・・・・・・・18
岩田　倫乃　岸　歩来　　関根　伸

<統合解剖学>

18. 中枢神経系に対するウロリチンのセノリシス効果についての検証・・・・・・・・・・・・19
鍛治　亮一郎　　清原　観

19. 試験管内における Hoxb8 発現ミクログリアの機能・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20
澤田　龍承

19. Functions of Hoxb8 in Microglia: Attenuating Pathological Activation in Vitro　Culture・・21
渡辺　明仁

<機能組織学>

20. ACIS3 のかゆみ行動への関与・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22
鈴木　智央里　藪　ひかり

21. 軌道の自然免疫反応における TRPV1 チャネルの関与・・・・・・・・・・・・・・・・・23
田中　小太郎　箕田　光史朗

<細胞生化学>

22. 近接標識法による一時繊毛の機能解明のための iPS 細胞の作成・・・・・・・・・・・・24
新本　莉子

23. 活性型 SMO 変異を持つ iPS 細胞を作成する試み・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25
谷嵜　優

24. ヒト iPS 細胞から心筋への分化の過程・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・28
伊藤　万祐

25. ツメガエル胚を用いた口腔顔面形態解析による口唇口蓋裂候補遺伝子の検証・・・・・・29
伊藤　奈緒

26. Involvement of Tidi1 in aging and neurodegeneration・・・・・・・・・・・・・・・・・30
小栗　真由子

27. How does obesity reduce Alzheimer's pathologies? ・・・・・・・・・・・・・・・・・31
花崎　潤弥

28. Biological implication in the increase of RDW as a marker for frailty・・・・・・・・・・32
山田　奈穂

<神経生化学>

29. Comparison of contractile properties of detrusor and bladder arterioles between normal and high-fat-dirt mice・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33
山田　晃也　　山本　なつ美

30. 便秘を引き起こす薬剤による大腸運動の変化・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34
矢野坂　直輝

<細胞生理学＞

31. ブタの尿道粘膜の収縮力調整における一酸化窒素と慎重の役割・・・・・・・・・・・・35
高橋　航太朗

32. Receptor subtype involved in α1-adranoceptor-mediated contraction of porcine ureter・36
山本　詩織

＜地域医療教育学>

33. 腰椎変性疾患に対する後方推体間固定術におけるCageのタイプ別による術後の影響についての検討・・37
秋澤　寿々丸　小林　流聖　坂本　雄基　田口　拓海　原田　悠希　宮田　誠也　矢田　風雅

＜公衆衛生学>

34. 運動を一人でするか複数人でするかの違いが疾患・全脂肪に及ぼす影響・・・・・・・38
岡本　拓

35. ディーゼルエンジンの排ガスと発がん性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39
鬼頭　佑誠

36. 外在化障害の評価尺度ADHD-Rating Scale-5とDisruptive Behavior Disorders Rating Scaleの日本語版開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32
颯田　慈英

37. ヴィーガン（ベジタリアン）の特性と健康への影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33
篠田　はるか

38. 家族形態が主観的幸福度に与える影響について：J-MICC岡崎研究・・・・・・・・・・・34
中島　一貴

＜医学・医療教育学>

39. Automatic Diagnostic Modeling of COVID-19 Images Using Pretrained Deep Learning Models and Transfer Learning Scheme・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35
水野　太陽

40. プロフェッショナリズムを形成する隠れたカリキュラムの特定・・・・・・・・・・・・36
水野　鷹法

41.「医療系学生はカリキュラム外活動で何を学ぶのか～Community of Practice の視点から～」・・37
堀田　真千子

<法医学>

42. Evaluation of the difference between two massive parallel sequencer for microhaplotypes typing・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・37
中島　暖菜

42. H_2S induces the assembly of stress granules in human bronchial epithelial cells ・・・・38
古橋　杏花

43. 法医解剖での死因特定における死後血検査の有用性についての検討・・・・・・・・・・39
三好　愛美

44. 機械学習を用いた恥骨結合面解析による年齢推定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・40
山本　峻也

<環境労働衛生学>

45. 有機リン系殺虫剤曝露とBMIまたは中性脂肪との関連性の検討・・・・・・・・・・・・40
上島　力登

46. シクロヘキサンの許容濃度の提案・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・41
小汐　真輝

47. アセトアルデヒド、ホルムアルデヒド、アニリン、ピリジンのＭＳ２ライブラリ作成とヒトでの曝露評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・42
中島　彩夢

48. 1―ブタノール、1―オクタノール、カテコール、フェノールの MS2 ライブラリの構築とヒトの曝露評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・43
宮永　大二郎

49. 機会学修を用いた 2020 年 3～11 月における国内 PM2.5 両の推定・・・・・・・・・・・・・44
野村　颯志

50. 抗酸化サプリメントと皮膚のアンチエイジングに関するシステマティックレビューおよびメタアナリシス・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・45
高田　初音

<神経発達・再生医学>

51. 生体マウスの加齢に伴う神経幹細胞能の低下・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46
北島　康太

52. 生後コモンマーモセットの脳室周囲に存在する細胞腫の解析・・・・・・・・・・・・・・47
半谷　和嗣

53. 放射状グリアから分化能を持つ成体神経幹細胞への変換メカニズムの解析・・・・・・・48
田原　愛香

54. 移動する新生ニューロンとその足場細胞間における分子相互作用・・・・・・・・・・・・49
川村　直矢

55. ニューロン移動およびグリオーマ浸潤を制御する共通分子ECMP-αの機能解析・・・・50
桝田　直晃

<神経発達症遺伝学>

56. 神経伝達症遺伝学　全　GABA作動性神経細胞または腹側の興奮性神経細胞におけるStxpb1の半減は攻撃性の亢進を示さない・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・51
姜　棋勲

57. 内側偏桃体背側後部、後部偏桃体、視床下部室傍核におけるStxbp1の欠損は攻撃性の亢進を示さない・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・52
北島　康太

58. *SCN1A*遺伝子の転写活性化によるドラベ症候群に対する遺伝子治療法の開発・・・・・52
菅原　匠

59. 肺線維症で見られる異常上皮細胞は前癌状態である・・・・・・・・・・・・・・・・・・53
宇佐美　諄

<神経毒性学>

60. 新規抗がん物質パルミトイルピペリジノピペリジンの血管新生抑制作用評価するためのアッセイ法検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・54
大栗　弘太郎

61. A possible promoting effect of protamine to neurite outgrowth of mouse cortical neurons・55
田中　健太

62. 新輝合成化合物のSTATファミリータンパクに対する因子凛々子ドッキング解析・・・・56
萩本　薫

63. シナプスにコンドロイチン硫酸は存在するのか？・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・56
森　玲衣奈

64. 若齢期に放射線被ばくしたB6C3F1マウスにおける短期講師紡織誘導肥満による肝がん形成に対する影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・57
山城　悠都

<認知症科学>

65. LPS誘発性脳微小出血に対するミクログリアおよびアミロイド病理の寄与・・・・・・・・58
大塚　孔介

66. 抗生物質投与による腸内細菌叢の乱れと脳内タウリン参加の関係性・・・・・・・・・・59
近藤　佐月

66. 抗生物質投与による腸内細菌叢の乱れと脳内タウリン参加の関係性・・・・・・・・・・60
佐野　由佳

67. ヒスタミン作動性神経と記憶想起の関係性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・61
井筒　蓮太郎

68. 慢性通モデルマウスに観られる脳の神経回路の変化・・・・・・・・・・・・・・・・・・62
寺西　悠人

<病態モデル医学>

68. Tcf23遺伝子は、マウスにおける脱落膜化と分娩に関与する・・・・・・・・・・・・・・63
薫　愛佳

68. Tcf23遺伝子は、マウスにおける脱落膜化と分娩に関与する・・・・・・・・・・・・・・63
舟橋　櫻子

68. Tcf23遺伝子は、マウスにおける脱落膜化と分娩に関与する・・・・・・・・・・・・・・63
島田　望羽

胸腺 MALT リンパ腫における *CD274* 及び *TNFRSF14* の遺伝子異常

臨床病態病理学　高橋海人（No.48）　本多真子（No.76）

1．背景・目的

Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue（以下、MALT リンパ腫）は低悪性度の節外性 B 細胞性リンパ腫で、腫瘍細胞は胚中心を経由した濾胞辺縁帯 B 細胞に由来している。B 細胞リンパ腫の 5～8%を占め、B 細胞リンパ腫の中ではびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫に次いで発生頻度が高く、罹患率は 10 万人当たり 0.5～2.6 人である。多くの症例は慢性炎症と深く関連し、あらゆる臓器に発生するが、胃（33%）、眼球付属器（24%）、肺（11%）、耳下腺（11%）が好発臓器である。MALT リンパ腫で一般に知られている遺伝子異常には t(11;18)(q21;q21)（20～40%）や t(14;18)(q32;q21)（～10%）が挙げられ、それぞれ *API2*::*MALT1* 融合遺伝子、*IGH*::*MALT1* 融合遺伝子を形成し、MALT リンパ腫の腫瘍発生に関連することが示唆されている。

胸腺における MALT リンパ腫は非常に稀で、自己免疫疾患であるシェーグレン症候群により発生する MALT リンパ腫のモデル疾患として重要であるが、特異的遺伝子異常は明らかにされていない。組織学的には、胸腺以外の MALT リンパ腫同様、多数の中心細胞様細胞や単球様 B 細胞、少数の免疫芽球様細胞で構成され、これらの腫瘍細胞の上皮系組織への浸潤像であるリンパ上皮性病変（lympho-epithelial lesion）が認められることがある。胸腺 MALT に特徴的な組織像として、腫瘍細胞がハッサル小体に浸潤する像が挙げられる[1, 2]（図 1）。

甲状腺 MALT リンパ腫は、胸腺 MALT リンパ腫と同様に自己免疫疾患と関連する疾患で、慢性甲状腺炎（橋本病）により発生する MALT リンパ腫のモデル疾患として重要である。過去の論文によると、甲状腺 MALT リンパ腫では *CD274* と *TNFRSF14* の遺伝子異常が高頻度にみられることが報告されている[3]。*CD274* 及び *TNFRSF14* はそれぞれ PD1 及び BTLA と結合するリガンドをコードする遺伝子であり、いずれも自己反応性 T 細胞の活性を抑えることで自己免疫を防ぐ役割を担っている[3]（図 2）。我々は、胸腺 MALT リンパ腫においても *CD274* 及び *TNFRSF14* の遺伝子異常が関連するかどうか検討した。

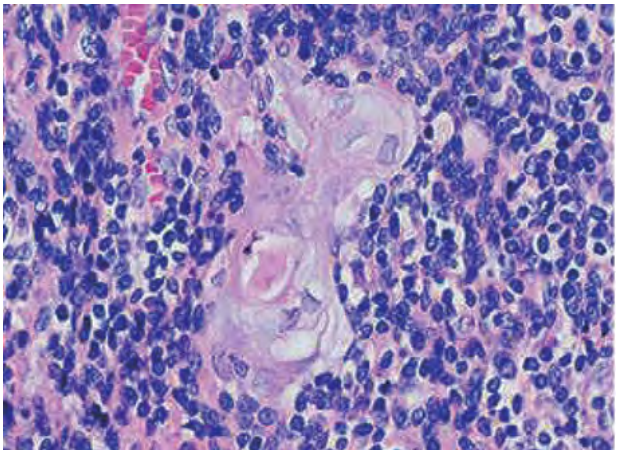


図 1　腫瘍細胞のハッサル小体への浸潤によるリンパ上皮性病変

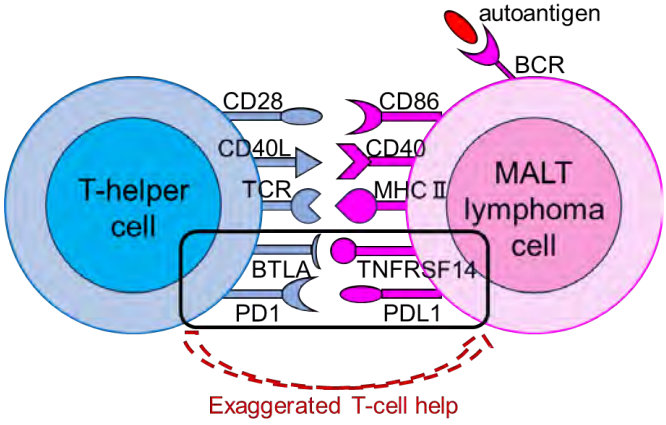


図 2　MALT リンパ腫細胞とヘルパー T 細胞の相互作用[3]

2．症例と方法

胸腺 MALT リンパ腫と診断された 21 症例のホルマリン固定パラフィン包埋組織を使用した（表 1）。これらの標本から DNA を抽出し、*CD274* 及び *TNFRSF14*（甲状腺 MALT リンパ腫において遺伝子変異が多くみられた領域）をサンガー法で解析した。臨床病理学的因子との関係を t 検定及び Fisher の正確検定を用いて解析した。

表 1 解析を行った症例の詳細

症例数（臨床情報が得られた症例数）		21（13）
年齢（歳）（n=13）	中央値（範囲）	52（23～75）
性別（n=13）	男：女	2：11
肉眼所見（n=12）	嚢胞性：充実性：嚢胞性と充実性	6：3：3
腫瘍Ig.表現型（n=10）	IgA：IgG	8：2
自己免疫疾患（n=12）	シェーグレン症候群：全身性エリテマトーデス	11：1
臨床病期（n=12）	Ⅰ / Ⅱ：Ⅲ / Ⅳ	11：1

3．結果

CD274 の遺伝子変異は 21 例中 6 例（29%）、*TNFRSF14* の遺伝子変異は 21 例中 5 例（24%）、*CD274/TNFRSF14*（*CD274* と *TNFRSF14* の少なくとも一方）に遺伝子変異のある症例は 21 例中 9 例（43%）であった（図 3）。

CD274 及び *TNFRSF14* の遺伝子異常の多くはミスセンス変異であり、遺伝子上に広く分布していた（図 4）。ミスセンス変異以外にはスプライシングサイトにおける塩基の置換などの変異がみられた。*CD274* と *TNFRSF14*、*CD274/TNFRSF14* の変異と臨床因子（年齢、性別、腫瘍 Ig.表現型、自己免疫疾患、臨床病期）との関係を t 検定と Fisher の正確検定により統計解析した結果、*CD274* と *TNFRSF14* の変異はいずれの臨床因子とも優位な関係がみられなかった。一方、*CD274/TNFRSF14* の変異と高齢との間には優位な関係がみられた（表 2）。

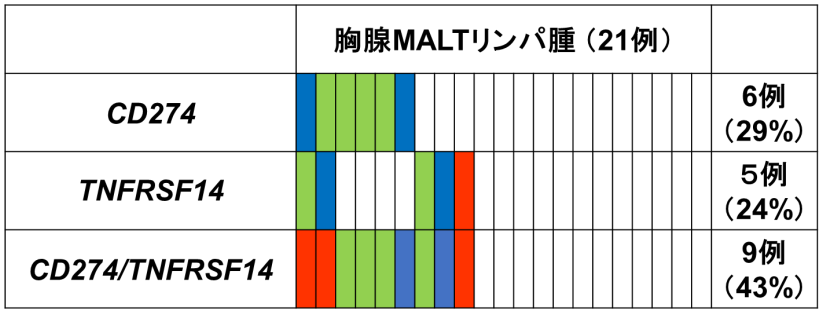


図 3 胸腺 MALT リンパ腫の遺伝子プロファイル

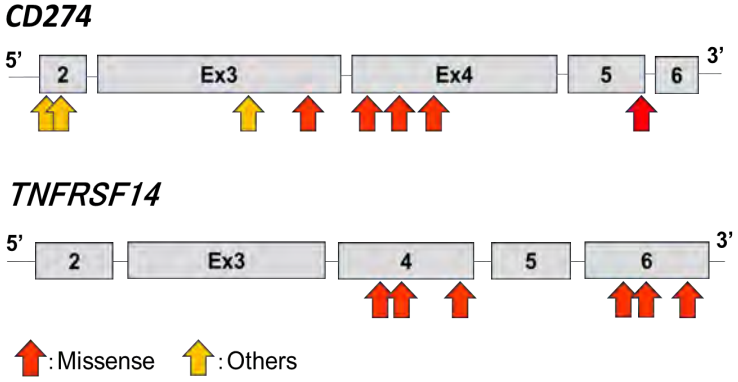


図 4 *CD274* と *TNFRSF14* の変異の分布

表 2 *CD274/TNFRSF14* の変異と臨床病理学的因子との関係

		CD274/TNFRSF14 (+)	CD274/TNFRSF14 (-)	*p* 値
年齢（歳）（n=13）	平均値 52.7（23～75）	60.3 (36~75)	43.8 (23~61)	0.0421
性別（n=13）	男	0	2	NS
	女	7	4	
腫瘍Ig.表現型（n=10）	IgA	5	3	NS
	IgG	0	2	
自己免疫疾患（n=12）	シェーグレン症候群	7	4	NS
	全身性エリテマトーデス	0	1	
臨床病期（n=12）	stage Ⅰ, Ⅱ	6	5	NS
	stage Ⅲ, Ⅳ	1	0	

NS: Not significant

4．考察

我々の結果(胸腺 MALT リンパ腫における *CD274* と *TNFRSF14* の遺伝子異常)は、甲状腺 MALT リンパ腫に関する過去の報告と比べて、それらの遺伝子変異頻度および変異の種類には軽度の差(変異頻度は低く、ミスセンス変異の割合は高い)が見られたが（表 3）、傾向は類似していた。また、甲状腺 MALT リンパ腫では *CD274* と *TNFRSF14* のミスセンス変異やフレームシフトも報告されていたが [3]、我々の胸腺 MALT 症例ではミスセンス変異やフレームシフトは検出されなかったことは、相違点として挙げられる。

遺伝子異常と臨床病理学的因子との関係について、*CD274/TNFRSF14* の異常は高齢に有意であったが、このことは甲状腺 MALT の論文と同様の結果であった。*CD274* と *TNFRSF14* の変異それぞれと臨床因子との間には優位な関係がみられなかったが、*CD274/TNFRSF14* の変異と高齢との間に優位な関係がみられたのは、解析症例数が増えたことが原因と考える。症例数を増やし、臨床情報をさらに集めることで、*CD274* と *TNFRSF14* それぞれと年齢などの臨床因子との間に優位な関係を示すことができる可能性がある。

表 3 胸腺及び甲状腺 MALT リンパ腫における *CD274* 及び *TNFRSF14* の変異と臨床因子との比較

	胸腺MALT リンパ腫	甲状腺MALT リンパ腫[1)]
*CD274*の変異の頻度	6/21 (29%)	40/76 (53%)
*CD274*のミスセンス変異の頻度	4/6 (67%)	18/40 (45%)
*TNFRSF14*の変異の頻度	5/21 (24%)	40/76 (53%)
*TNFRSF14*のミスセンス変異の頻度	5/5 (100%)	26/40 (65%)
*CD274/TNFRSF14*の変異の頻度	9/21 (43%)	53/76 (70%)
臨床因子との関連	高齢に有意	高齢に有意

今後の展望として、今回解析できなかった領域や他の遺伝子の解析、*CD274* や *TNFRSF14* の異常によって発がんに至るまでの経路の解析、シェーグレン症候群のモデルマウスを用いた in vivo での機能実験を行うことが考えられる。

参考文献

1. 松井琢哉, 水野幸太郎, 小田梨紗, 山田 健. 胸腺発生 MALT リンパ腫の 2 切除例. 日呼外会誌 2015; 29(2): 61-66.

2. 中村栄男. リンパ腫アトラス第 5 版. 文光堂 2018:114-119.

3. Fangtian Wu, Natsuko Watanabe, Ming-Qing Du, et al. Thyroid MALT lymphoma: self-harm to gain potential T-cell help. Leukemia 2021; 35(12): 3497-3508.

PLAG1,HMGA2 融合遺伝子陰性多形腺腫および

多形腺腫由来癌における *HMGA2* 周辺領域の染色体再構成の検索

臨床病態病理学　篠田透(No.39), 新美雄啓(No.62)

〈背景〉

多形腺腫（pleomorphic adenoma, PA)は，全唾液腺腫瘍および良性唾液腺腫瘍のなかで最も頻度の高い良性腫瘍である[1)]．組織学的には，導管上皮・軟骨様基質等が混在した多彩な像を示す(図 1.)．大部分の症例は外科的治療により良好な経過をたどるが，時に多形腺腫由来癌(carcinoma ex PA, CxPA)と呼ばれる悪性腫瘍化が生じることが知られている．

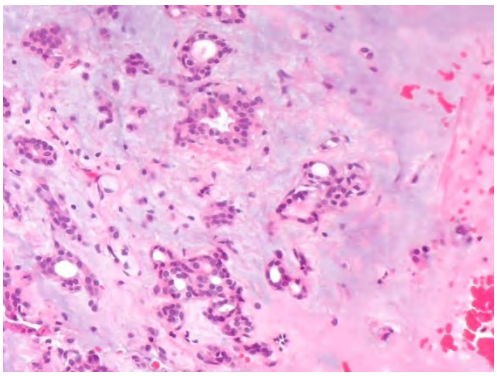


図 1．多形腺腫の組織像（HE 標本）
導管上皮と軟骨様基質が混在した像を示している。

PA では，転写活性因子に関連する遺伝子である *pleomorphic adenoma gene 1, PLAG1, High mobility group AT-hook 2, HMGA2* を含んだ融合遺伝子が，それぞれ 50%，10%の症例に検出される． PA において， *PLAG1, HMGA2* はそれぞれ 14，7 以上のパートナー遺伝子との間に融合遺伝子を形成することが知られている(図 2.)． パートナー遺伝子の中には，エンハンサー機能を有する遺伝子が含まれており，enhancer hijacking による腫瘍発生の可能性があると考えられている[2)]． また，enhancer hijacking 以外の腫瘍発生メカニズムとして，promoter swapping の可能性や，*HMGA2* 下流の miRNA 結合部位の欠失による *HMGA2* 転写の活性化といった可能性が挙げられている[3)]．

PLAG1, HMGA2 に関連した融合遺伝子の検出される PA については，様々な腫瘍発生メカニズムが議論されている一方で，40%の PA 症例の遺伝子学的背景は不明である． 本研究では，このような PA 症例が enhancer hijacking により腫瘍が発生するという仮説に基づき， *HMGA2* 周囲の染色体分離の検索を行った．

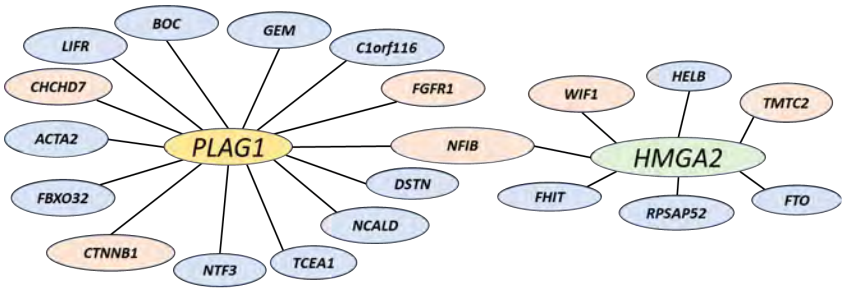


図 2．多形腺腫における，*PLAG1, HMGA2* のパートナー遺伝子一覧
PLAG1, HMGA2 ともに，複数のパートナー遺伝子との間に融合遺伝子を形成することが知られている．特に，図中の赤丸内の遺伝子はエンハンサーとしての機能が報告されており，enhancer hijacking による腫瘍発生メカニズムが議論されている．

〈目的〉

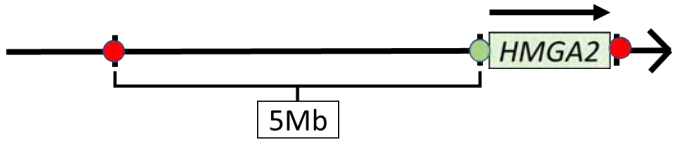
PLAG1, *HMGA2* 再構成陰性 PA 症例に対して *HMGA2* 上流 5Mb 領域の染色体分離を検索し，その腫瘍発生メカニズムを検討すること。

〈方法〉

PA 33 例， CxPA 8 例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて検討を行った． 分離 fluorescence in situ hybridization, FISH 法を用いて *PLAG1, HMGA2* の分離を検索した. *PLAG1, HMGA2* 再構成陰性例に対しては，染色体 5Mb 間にある切断点を検索する新規の分離 FISH 法 [4]を用いて， *HMGA2* 上流の 5Mb 領域の分離を検索した(図 3 上段.).

FISH法の判定では，最低 100 細胞を観察し，その 10%以上に分離シグナルが確認できた場合に分離陽性と判定した(図 3 下段.).

得られた結果に対しては，Fisher 検定を用いて統計学的解析を行った.



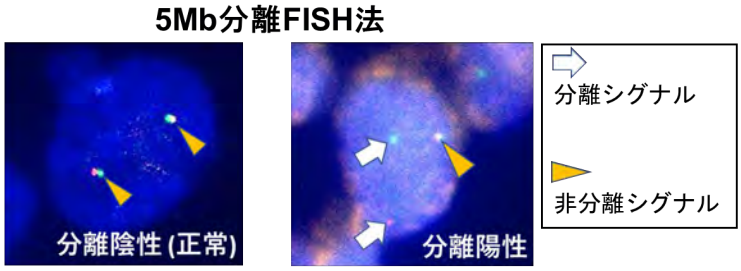


図 3. *HMGA2* 上流 5Mb 分離 FISH 法

図上段：*HMGA2* および *HMGA2* 上流 5Mb 間の FISH プローブの作製位置.
新規 FISH 法により，従来よりも広範囲の異常の検出が可能となった.

図下段：*HMGA2* 上流 5Mb の分離 FISH 法の FISH シグナル. 左図では，融合シグナル 2 組が確認され陰性と判断される. 右図では，一方のシグナルのペアが分離シグナルとして観察され，分離陽性と判定される.

〈結果〉

PA 33 例に対して分離 FISH 法を行ったところ，15 例に *PLAG1* 分離が，4 例に *HMGA2* 分離が，13 例に *HMGA2* 上流 5Mb 間の分離が認められた． 症例全体では，33 例中 32 例 (97%)の症例で *PLAG1*, *HMGA2*, *HMGA2* 上流 5Mb のいずれかの分離が認められた（表 1. 図 4.).

CxPA 8 例では，2 例に *PLAG1* 分離が，5 例に *HMGA2* 上流 5Mb 間の分離が認められた. *HMGA2* 分離陽性症例は認められなかった． 症例全体では，8 例中 7 例 (88%)の症例で *PLAG1*, *HMGA2*, *HMGA2* 上流 5Mb のいずれかの分離が認められた（表 1. 図 4.).

PLAG1, *HMGA2*, *HMGA2* 上流 5Mb の分離頻度に対して統計学的解析を行ったが，PA, CxPA 間で有意差は認められなかった（表 1.).

	PA (n=33)		CxPA (n=8)		
検索対象	n	%	n	%	p値
PLAG1 split (+)	15	45	2	25	NS
HMGA2 split (+)	4	12	0	0	NS
HMGA2 上流5Mb 領域のsplit (+)	13	39	5	63	NS
Total	**32/33**	**97**	**7/8**	**88**	NS

表 1. PA と CxPA における分離 FISH の結果

PA, CxPA ともに約 90%の症例で PLAG1, HMGA2, HMGA2 上流 5Mb 間のいずれかに染色体分離が認められた．各群間に統計学的な有意差は認められなかった．

NS: Not significant

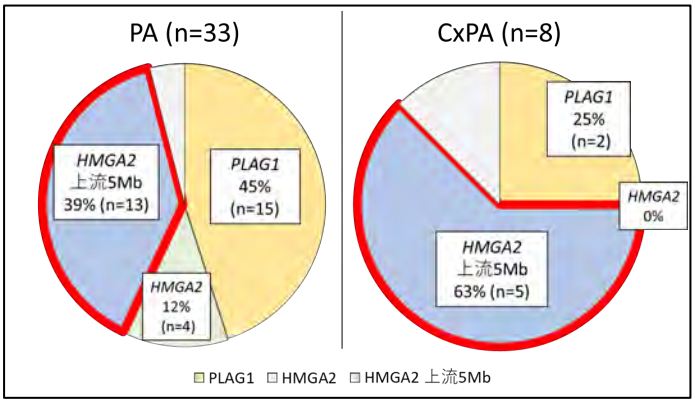


図 4. PA と CxPA における分離 FISH の結果のグラフ

黄色，緑色の症例が既知の遺伝子分離が検出された PA, CxPA 症例である．本研究では，青色で示す症例に新たな染色体構造異常が認められた．

〈考察〉

本研究で使用した PA 症例では，*PLAG1, HMGA2* 切断の割合は概ね既報と一致していた。また，*PLAG1, HMGA2* 再構成陰性 PA の約 90%において，*HMGA2* 上流 5Mb 領域に染色体切断が生じていることが分かった． これは，「遺伝子学的背景が不明な多形腺腫においても enhancer hijacking により腫瘍が発生するのではないか」という本研究の仮説に矛盾しない結果であると考えられた．

また， 本研究で新たに発見された *HMGA2* 上流 5Mb 領域の染色体切断は，PA が悪性転化した腫瘍である CxPA にも検出された． この結果から，本染色体構造異常が腫瘍発生に関与している異常である可能性が考えられた．

この考察をさらに進めるために今後の展望として以下の 3 点を考えている．

一点目は，*HMGA2* 上流 5Mb 分離陽性例において，既報告パートナー遺伝子の関与を検索することである．特にエンハンサー機能を有する既報告遺伝子において，遺伝子切断が証明された場合には，enhancer hijacking に関連して腫瘍が発生しているという仮説をより強固なものにできると考えている．また，既報告パートナー遺伝子の関連が証明できなかった場合には，次世代シーケンサによる網羅的遺伝子解析を行うことで，腫瘍発生に関連するゲノム上のイベントを検出することを考えている．

二点目として，*HMGA2* 上流 5Mb 領域の分離陽性症例で *HMGA2, PLAG1*，および他の関連する分子の発現が上昇しているかを検討することである．生体内において，*HMGA2* は *PLAG1* の上流因子として存在しており，ともにその下流に存在する増殖因子である *IGF2* を活性化させる働きがあると言われている[3)]．このようなシグナル経路が PA の腫瘍発生にどのように関与しているかは不明であるものの，*HMGA2, PLAG1* に加え，*IGF2* 発現の変化を検討することは，腫瘍発生メカニズムを考察するうえで重要な情報となると考えられる．

三点目として，他の組織型への症例の拡大をすることが挙げられる．本研究で使用した PA は，

CxPA のみならず，唾液腺導管癌に代表される唾液腺原発悪性腫瘍の発生母地となっている可能性が指摘されている．本研究の内容を PA に関連するとされている悪性腫瘍に拡大することで，形態学的観点により分類されている唾液腺腫瘍を遺伝子学的情報に基づいて再分類することを最終目標としている．

本研究で我々は，*PLAG1, HMGA2* 融合遺伝子陰性 PA において，新たに *HMGA2* 上流 5Mb 領域に染色体切断が生じていることを発見した．これは，PA の腫瘍発生に関与する異常の可能性があり，90%以上の PA が遺伝子学的に説明可能となる可能性がある．今後のさらなる検討が望まれる．

〈参考文献〉

1) Adel K. El-naggar. WHO Classification of Head and Neck Tumors. World Health Organization. 2017. 347p.
2) Göran Stenman, et al. Fusion Oncogenes in Salivary Gland Tumors: Molecular and Clinical Consequences. Head Neck Pathol. 2013;7(Suppl 1):12-19.
3) Göran Stenman, et al. Chromosome Translocations, Gene Fusions, and Their Molecular Consequences in Pleomorphic Salivary Gland Adenomas. biomedicines. 2022;10(8):1970.
4) Kaori Ueda, et al. The Landscape of MYB/MYBL1- and Peri-MYB/MYBL1-Associated Rearrangements in Adenoid Cystic Carcinoma. Modern Pathology. 2023;26(10).

要介護認定調査票特記事項を利用した機械学習モデル比較

臨床病態病理学　鈴木麻央(No.45)

1.はじめに

少子高齢化が着々と進んでいる現代では、介護保険の利用者も増えている。また人手不足や働き方改革が推進されていることを鑑み、要介護認定審査の自動化を考える研究もなされている[3]。本研究では、要介護認定調査特記事項テキストを利用した要介護認定二次判定機械学習モデルを提案する. 具体的には学習データから判定機を作成し、テストデータに対して結果予測を行い学習モデルの比較分析を行う。

2.要介護認定について

要介護認定調査は被保険者からの申請によって始まり、訪問調査員による訪問調査を経て、マークシートを用いた決定木分析による一次判定、介護認定審査会による二次判定の順で進められる。審査会による二次判定には時間がかかること、審査員の異動などによって判断がばらつくことから二次判定の自動化が求められている。よって今回は二次判定の自動化について研究を行った。

3.方法

分析 1

“排尿・排便後の後始末”の項目についての排泄の自立の程度(自立、見守り、一部介助、全介助)を数値化したものを目的変数とした予測モデルを作成する。文献[2]に掲載された 27 例を学習データとして利用。

(1)　テキストマイニング(使用ソフト:KHcorder)

説明変数として、特記事項に書かれたテキストを KHcorder で数値化したものを使う。具体的には、対応分析図を作成し、自立の程度に関係が強く高頻度で使用された語のダミー変数を用いる。

(2)　機械学習(使用ソフト:R)

上記の学習データ 27 例に対し、排泄の自立の程度について、決定木分析、ランダムフォレスト、SVM、重回帰分析を用いて機械学習を行い、各手法での予測モデルを作成する。文献[1]の二次判定事例 23 例のうち“排尿、排便後の後始末”の項目について言及のある 9 例を予測データとして入力し、各モデルの正答率を求める。

分析 2 要介護度の要因分析

要介護度を目的変数、事例集に記載された予後の見通し、痴呆の有無、排泄の自立の程度、複雑動作、問題行動を説明変数とした重回帰分析を行う。文献[3]の 23 例を利用した。

4.結果

分析 1

(1)　テキストマイニング

対応分析の結果は図1の通り。「声かけ」もしくは「見守り」、「介護者」もしくは「介助」、「廃棄」もしくは「オムツ」もしくは「失禁」、それぞれの語彙を含む場合を1、含まない場合を 0 とダミー変数化し、これを機械学習の説明変数とした。

(2)　Rによる機械学習

結果は図2の通り。今回使用したデータは 100%の学習が可能でランダムフォレストの OOB 値は 0%、SVM のトレーニングエラーは 0、重回帰分析は完全分離となった。正答率

は決定木分析で一番高くなり、正解に 2 がないのは事例不足であったと考える。

分析 2 要介護度の要因分析

結果は図 2 の通り。要介護度の要因として「複雑動作」が性の影響を持つことが統計的に認められた。

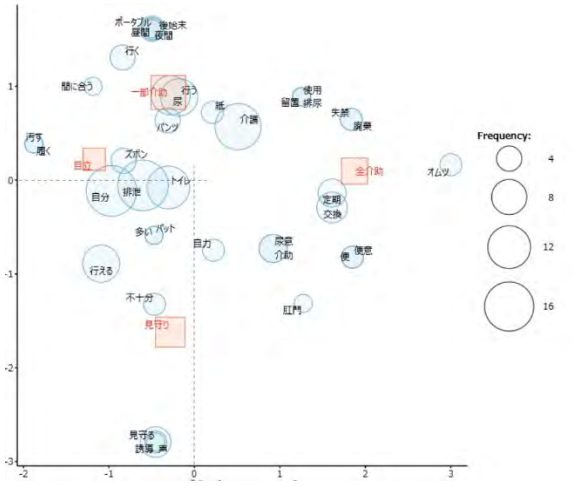


図 1:対応分析の結果

	rF	SVM	決定木	重回帰	正解
3	1	1	1	1	1
5	4	4	4	4	4
8	3	3	3	3	3
10	2	2	3	4	3
12	3	3	3	3	3
13	3	3	3	3	3
15	1	1	1	1	3
16	2	2	3	4	3
23	4	4	4	4	4
正答率	66.7%	66.7%	88.9%	66.7%	

図2:各手法によるモデルの比較結果

```
Residuals:
     Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.67846 -0.68142  0.05353  0.64987  1.63860

Coefficients:
                          Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)                0.74937    0.51825   1.446    0.166
予後.悪化C.                0.49960    0.49056   1.018    0.323
痴呆.アルツハイマー含む.   0.89079    0.69239   1.287    0.216
排便.排尿                 -0.27489    0.27557  -0.998    0.332
複雑動作                   0.79807    0.21897   3.645    0.002 **
問題行動                   0.04218    0.09519   0.443    0.663
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1
```

図3:R による重回帰分析の結果

5.考察

今回はデータ数が少なかったが、多くの実データを用いて分析を行うことができればより精度の高いモデルを作成することが期待できる。より精度の高いモデルが作成できれば二次判定の自動化に寄与できるだろう。

6.参考文献

[1]厚生労働省「要介護認定二次判定変更事例集」(2003 年 9 月)
[2]「要介護認定調査　特記事項　文例・記入例」
[3]神谷達夫、岡本悦司、「要介護認定業務効率化を目指した機械学習モデルの検討」(日本医療経営学会誌　Vol.14　No.1)

DEA によるコロナ禍前後における公立病院の経営効率性評価

臨床病態病理学 竹岡侑紀 (No.51)
指導教員:茨木智

1. はじめに

SARS-CoV-2 の世界的大流行の下で、全国の公立病院では経営状況に大きな変化が現れている。

そこで本研究では、効率性分析における代表的な手法であるデータ包絡分析法(Data Envelopment Analysis:以下 DEA)と呼ばれる手法を用いて、コロナ禍前後の全国の公立病院の経営効率性を計算し、その後ウィンドー分析を用いて各年度の効率値の比較を行い、またトービット分析や重回帰分析によって効率値やその増加率に影響を与える要素を調べることで、このような医療を取り巻く状況の変化の中で経営効率性を変化させる要因について考察した。

2. 方法

本研究の DEA[1]による計算では、規模に関して収穫可変を仮定する VRS モデルの中で入力指向型モデルを採用し、入出力変数を以降に述べるように設定することで、計算によって求められた効率値をその病院の経営効率性とした。まず、入力変数は一床あたり固定資産に病床数をかけたもの、職員給与費の中で基本給と手当と賃金(報酬)と法定福利費を足したもの、材料費と光熱水費と通信運搬費と修繕費と委託料を足したものの3変数とした。次に、出力変数は入院収益、外来収益の2変数とした。これらの各変数は[1]に基づいたもので、入力変数のそれぞれは順にその病院の資本量、人的資源投入量、医療サービスに必要な費用投入量を表すものとしている。また、後述する時系列分析においては新たに補助金(国庫補助金と都道府県補助金と他会計補助金と他会計負担金と他会計繰入金を足したもの)を出力変数に加え、3 入力 3 出力としたモデルでも計算を行った。

分析対象は全国の公立病院とし、データはすべて[2]から抽出し計算を行った。その際、必要なデータが掲載されていない病院を分析の対象外として除外することで、全国の 661 病院が分析の対象となった。2018 年度から 2021 年度の各年度について計算を行ったほか、ウィンドー分析[3]という時系列分析手法を用いて、各病院の効率値の年度ごとの変化についても評価した。時系列評価によって求められた全病院平均効率値の年度推移を、通常のモデルと、出力に補助金を追加したモデルとについて比較した。

トービット分析における被説明変数としては、単年度で行った DEA の計算結果である経営効率性を用いた。説明変数としては[1]を踏まえ、病床数、医師平均年齢、医師一人あたり一日平均患者数、一般病床比率、救急病院の告示の有無、病床利用率、補助金比率(補助金額を総収益で除したもの)、平均在院日数を用いた。

重回帰分析における被説明変数としては、時系列分析によって求めた各年度の効率値をその前年度の効率値で除したものを用い、それを経営効率性増加率とした。説明変数としては対象となる 2 年度における平均病床数、平均医師年齢、医師一人あたり平均患者数の増加率、平均一般病床比率、救急病院の告示の有無の平均、病床利用率の増加率、補助金比率の増加率、平均在院日数の増加率を用いた。

3. 結果

時系列分析によって得られた効率値を年度ごとに比較したところ、コロナ禍による影響が本格化した 2020 年度以降で効率値の平均値の低下が見られた。ところが、出力変数に補助金を追加したモデルでは, 2020 年度以降の効率値の平均値の低下が緩和されることが認められた(図 1)。

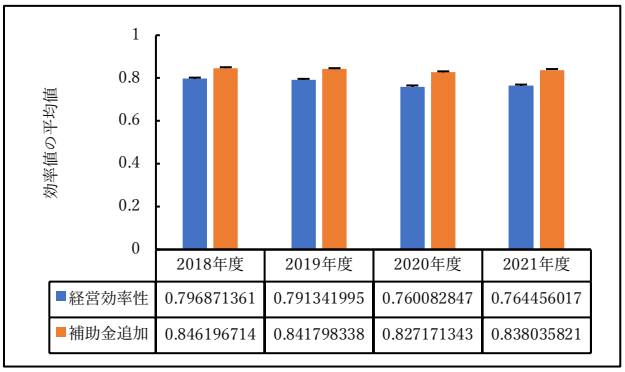


図 1 年度ごとの効率値の比較

トービット分析と重回帰分析の結果については表1、2に示すとおりであり、係数の符号が正であれば効率性やその増加率に対して正の影響を、符号が負であれば負の影響を及ぼしていると解釈できる。

表 1 トービット回帰分析の結果

説明変数	2018年度経営効率性		2019年度経営効率性		2020年度経営効率性		2021年度経営効率性	
	フルモデル	最適モデル	フルモデル	最適モデル	フルモデル	最適モデル	フルモデル	最適モデル
定数項1	8.32E-01 ***	8.17E-01 ***	7.84E-01 ***	8.26E-01 ***	8.57E-01 ***	8.70E-01 ***	8.67E-01 ***	9.08E-01 ***
定数項2	-2.29E+00 ***	-2.29E+00 ***	-2.25E+00 ***	-2.25E+00 ***	-2.36E+00 ***	-2.37E+00 ***	-2.39E+00 ***	-2.38E+00 ***
病床数	2.20E-04 ***	2.20E-04 ***	2.57E-04 ***	2.56E-04 ***	1.52E-04 ***	1.62E-04 ***	1.37E-04 ***	1.43E-04 ***
医師平均年齢	-1.50E-04		3.79E-04		-6.50E-04		-2.28E-04	
医師一人あたり一日平均患者数	9.85E-04	9.70E-04	5.15E-05	6.39E-05	8.17E-04 **	7.64E-04 **	3.32E-05	2.98E-05
一般病床比率	4.48E-02 .	4.58E-02 .	4.29E-02 .	3.93E-02 .	5.14E-02 *	4.73E-02 *	4.52E-02 *	3.85E-02 .
救急病院の告示の有無	-3.82E-02 *	-3.83E-02 *	-4.00E-02 *	-3.89E-02 *	-3.04E-02 .	-2.79E-02 .	-2.06E-02	-1.80E-02
病床利用率	-9.24E-05		2.87E-04		5.39E-04		6.15E-04 .	
補助金比率	-5.39E-01 ***	-5.33E-01 ***	-5.34E-01 ***	-5.50E-01 ***	-4.60E-01 ***	-5.04E-01 ***	-4.70E-01 ***	-5.18E-01 ***
平均在院日数	1.00E-03	9.53E-04	1.15E-03 .	1.28E-03	1.27E-03 *	1.37E-03 *	3.24E-04	4.24E-04

表 2 重回帰分析の結果

説明変数	2019年度経営効率性増加率		2020年度経営効率性増加率		2021年度経営効率性増加率	
	フルモデル	最適モデル	フルモデル	最適モデル	フルモデル	最適モデル
定数項1	1.05E+00 ***	1.05E+00 ***	8.53E-01 ***	8.31E-01 ***	9.07E-01 ***	9.20E+02 ***
平均病床数	2.54E-05 *	2.38E-05 .	-6.68E-05 ***	-6.97E-05 ***	2.06E-05	2.43E-05 .
平均医師年齢	-1.26E-03 ***	-1.24E-03 ***	-7.87E-04	-7.70E-04	-6.48E-04 .	-6.77E-04 *
医師一人あたり一日平均患者数の増加率	-6.43E-03	-6.35E-03	6.46E-03 **	6.54E-03 **	-2.14E-04	-2.40E-04
平均一般病床比率	-8.59E-03		-1.05E-02		1.08E-02	
平均の救急病院の告示の有無	1.39E-03		-2.26E-03	.	9.63E-03	
病床利用率の増加率	6.40E-02 ***	6.45E-02 ***	2.05E-01 ***	2.03E-01 ***	1.41E-01 ***	1.39E-01 ***
補助金比率の増加率	-5.86E-02 ***	-5.89E-02 ***	-3.35E-03 .	-3.50E-03 .	-2.38E-02 **	-2.28E-02 **
平均在院日数の増加率	1.03E-02		-1.24E-02		-7.31E-03	

4. 考察

時系列分析の結果からコロナ禍の前後における病院経営効率性の低下と補助金による効率性低下に対する緩和効果が確認できたと考えた。また、要因分析の結果から 2020 年度においては、医師 1 人当たりの患者数が少ない病院ほど、また一般病床比率が低い病院ほど経営効率性が低いことが分かり、2019 年度からの経営効率性増加率は病床利用率を高く維持した病院ほど、また病床数が少ない病院ほど高いことが分かった。こういった結果の背景には、重症患者対応病院では少ない重症患者に多数の医師が付いて治療にあたったことや、非一般病床においてコロナ感染予防対応などにより特別な人員配置や構造設備が必要となったことが関係すると考えられる。

5. 参考文献

[1] 獺口浩一(2012)『自治体病院の経営効率性分析』. 琉球大学学術リポジトリ

[2] 平成 30 年度～令和 3 年度地方公営企業年鑑 第3章 事業別 6. 病院事業

[3] 岸邦宏ら(2001)『ウィンドー分析法による地下鉄事業の経営および利用効率評価』. 土木計画学研究・論文集 Vol.18 no.1

皮膚への紫外線照射は骨格筋と腎臓の制御性 T 細胞を増加させる

免疫学分野　若杉大路　98

実験背景

Treg は制御性 T 細胞とも呼ばれ、CD4 陽性ヘルパーT 細胞の 1 つである。Treg は免疫抑制機能により過剰な免疫応答を抑え、自己免疫疾患の発症を抑える働きする。さらに、近年、組織に浸潤した Treg は傷ついた組織の修復など、生体の恒常性を保つために重要な役割を持っていることがわかってきた。

免疫学研究室では、マウスの皮膚に紫外線(UVB)を照射すると皮膚で Treg 増殖と活性化が誘導され創傷治癒を促進することを明らかにした。そこで、皮膚への UVB 照射が、他の組織でも Treg の増加と活性化を誘導するのではないかと考えた。
皮膚に近い骨格筋はこの影響を受けやすいのではないかと予想し、調べた。

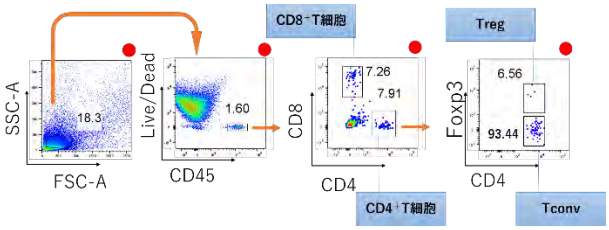
実験目的【骨格筋】

骨格筋の Treg は皮膚への UVB 照射により増加・活性化するのかを明らかにすること。

実験方法【骨格筋】

UVB を一週間前に照射したマウスと非照射マウスを PBS で灌流後、大腿筋・下腿筋を採取し、コラゲナーゼを作用させ、細胞懸濁液を調製した後、フローサイトメトリーで解析した。

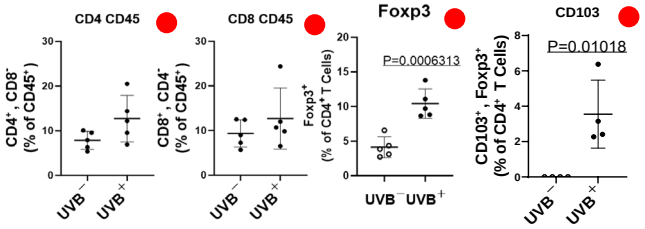
ゲーティングストラテジーは右図の通りである。CD45 陽性の免疫細胞のなかから、CD4 陽性と CD8 陽性細胞をそれぞれゲートし、CD4 陽性細胞はさらに Foxp3 陽性を Treg とし陰性を Tconv とした。



実験結果【骨格筋】

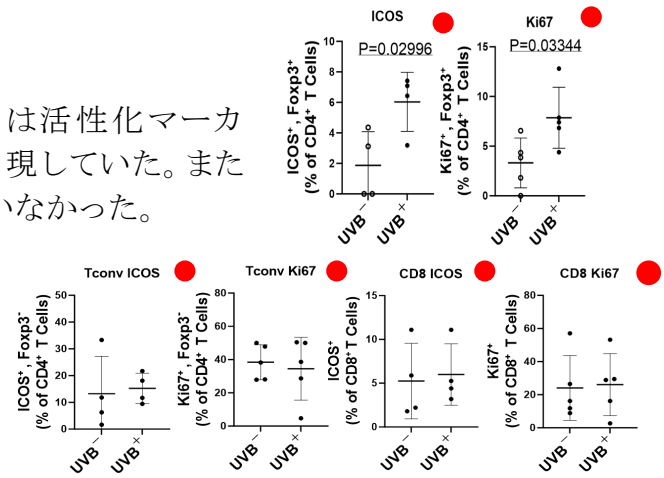
結果①

皮膚への UVB 照射により骨格筋の CD4+T 細胞は増加する傾向にあり、組織 Treg の割合が増加した。



結果②

UVB 照射後に骨格筋で増加した Treg は活性化マーカーの ICOS と増殖マーカーの Ki67 を高発現していた。また Tconv と CD8+T 細胞での発現は増えていなかった。



小括

以上の実験より、皮膚への UVB 照射は、骨格筋の T 細胞のうち、組織 Treg の活性化と増加を選択的に誘導することがわかった。

このような結果から、さらに皮膚から離れた非リンパ系臓器でも影響を受けるのではないかと考え、次に腎臓でも実験を行った。

実験目的【腎臓】

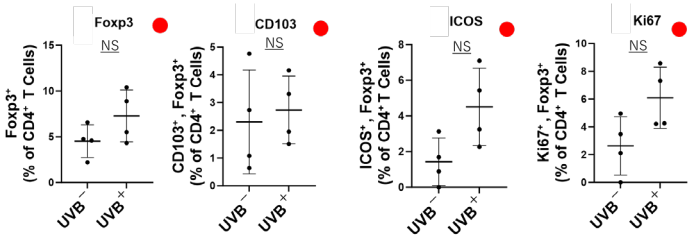
腎臓の Treg は皮膚への UVB 照射により増加・活性化するのかを明らかにすること。

実験方法【腎臓】

UVB を一週間前に照射したマウスと非照射マウスを PBS で灌流後、左右の腎臓を採取し、コラゲナーゼを作用させ、細胞懸濁液を調製した後、フローサイトメトリーで解析した。

実験結果【腎臓】

皮膚への UVB 照射により腎臓において、有意差はないものの活性化した Treg が増加する傾向が見られた。



結論・考察

皮膚への UVB 照射は、直接照射を受けていない骨格筋において活性化した組織常在型 Treg の増加を促進し、同様の傾向は腎臓でもみられた。Treg は組織の損傷治療の働きがあり、UVB 照射による増加は骨格筋や腎臓の損傷組織の修復促進に寄与する可能性がある。

これを確かめるためには、筋損傷もしくは腎損傷させたマウスを用い UVB 照射したものとそうでないもので、治癒レベルを比較する実験を行えばよいと考える。

体表への UVB 照射が、内部組織の治療促進につながれば、損傷に対して新しい治療方法を提案できるようになる可能性がある。

参考文献

1. Yamazaki S et al., J Immunol 2014
2. Shime H and Odanaka M et al., PNAS 2020
3. Hori S, Nomura T and Sakaguchi S. Science 299: 1057-1061, (2003)
4. Mackay, L. K. et al. Nat. Immunol. 14, 1294-1301 (2013)
5. Li, D.-Y. & Xiong, X.-Z. Front. Immunol. 11, 2104 (2020)
6. Soares, A. et al. J. Immunol. Methods 362, 43-50 (2010)

Effect of UVB exposure of skin on immune cells in MALT

免疫学分野　渡邉友喜　100 番

研究目的

皮膚への紫外線照射が粘膜関連リンパ組織の免疫細胞に与える影響についての研究を行った。皮膚が紫外線(UVB)に曝露されるとCD11b 陽性樹状細胞が活性化し、それに伴い制御性 T 細胞(Treg)が増加・活性化し、炎症や過剰な免疫応答を抑制することで全身の免疫系に影響を与える(文献 1-3)。 近年、新型コロナウイルスやインフルエンザなどの感染症や花粉症などのアレルギーに対して粘膜関連リンパ組織(MALT)での免疫応答の重要性が注目されているが、UVB 曝露が粘膜免疫応答に関連するリンパ組織の免疫細胞に影響を与えるかどうかは分かっていない。

粘膜関連リンパ組織 MALT 及び所属リンパ節は体の粘膜に付随し、粘膜免疫応答の誘導を担い、粘膜面での CD4, CD8T 細胞が関与する細胞性免疫や、B 細胞が関与する体液性免疫といった免疫応答の場として重要である。口腔粘膜の免疫応答を担い、ヒトの扁桃に相当する鼻咽頭関連リンパ組織(NALT),頸部リンパ節(CLN),腸管の免疫応答を担うパイエル板(PP),腸間膜リンパ節(MLN)に着目し、これらのリンパ組織の Treg, CD8 陽性 T 細胞,B 細胞の割合と活性化の変化について調べた。

研究方法

マウスの皮膚に紫外線を照射し、7 日後にそれぞれのリンパ節を単離し細胞懸濁液を作成した。それぞれの細胞数をカウントし、一定細胞数になるように懸濁液を調製し懸濁液を蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した。

解析手順として、CD45 陽性 Live_dead 陰性を生きた免疫細胞とし、そのうち CD3 陽性を T 細胞とした。T 細胞を CD8 陽性と CD4 陽性に分け、CD4 陽性 T 細胞のうち Foxp3 陽性を Treg,陰性を Tconv とした。また、CD45 陽性のうち CD19 陽性を B 細胞とした。

研究結果

UVB 照射による NALT での免疫細胞の割合の変化として、Treg の増加と CD19 陽性 B 細胞の増加が見られた。頸部リンパ節 CLN では、 NALT と同様に Treg の増加、B 細胞の増加, 活性そして、CD8 陽性 T 細胞の減少が見られた。腸間膜リンパ節 MLN では、 Treg,Tconv,CD8 陽性 T 細胞では大きな変化は見られなかったが、B 細胞の割合は増加した。パイエル板 PP では、Treg,Tconv,CD8 陽性 T,B 細胞で大きな変化は見られなかった。(図1)

以上の解析結果から UVB 照射によって全体として大きな変化ではないが MALT での免疫細胞の割合が変化し、特に NALT,CLN では Treg の増加が見られた。NALT と CLN で増加した Treg に関して、Treg の活性化や CD8 陽性 T 細胞と Treg の比の変化についてさらに調べた。Treg の活性化を示すマーカーである ICOS と KLRG1 では、NALT,CLN 共に割合の増加が見られ、UVB 照射により増加した NALT,CLN の Treg は活性化していると考えられる。(図 2)
細胞性免疫を促進する CD8 陽性 T 細胞と細胞性免疫に抑制的に働く Treg のバランスを比で表したところ、UVB＋マウスでの NALT,CLN はともに値が減少しており、UVB －マウスと比べて Treg が優位となっている可能性が考えられる。(図 3)

考察

以上の結果より、NALT, CLN といった口腔粘膜の免疫応答に関連するリンパ組織では Treg の増加や活性化、CD8＋T 細胞の減少が見られ、UVB への曝露により口腔での細胞性免疫が抑制される可能性が考えられる。一方で、NALT や CLN そして、腸管の免疫応答に関連するリンパ組織である腸間膜リンパ節では B 細胞の増加が見られ、B 細胞を介した体液性免疫は強化される可能性が考えられる。

今後は感染モデルやアレルギーモデルのマウスを用いて、UVB 照射による口腔での免疫応答の変化をさらに調べていきたい。

参考文献

1. Yamazaki, S. et al. J. Immunol. 193, 5488–5497 (2014)
2. Yamazaki, S. et al. J. Immunol. 200, 119–129 (2018)
3. Shime, H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 117, 20696–20705 (2020)

図1

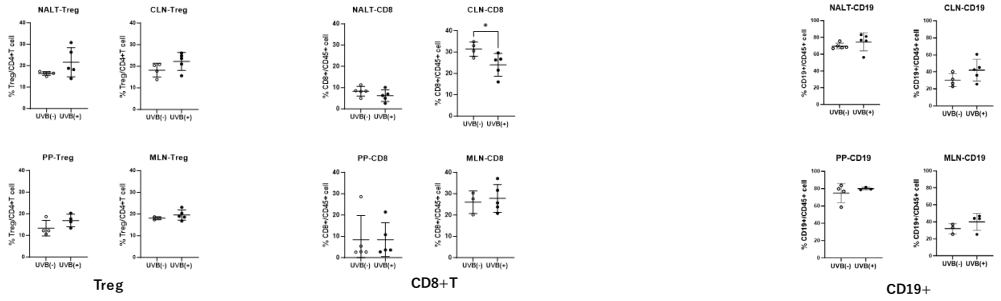


図2

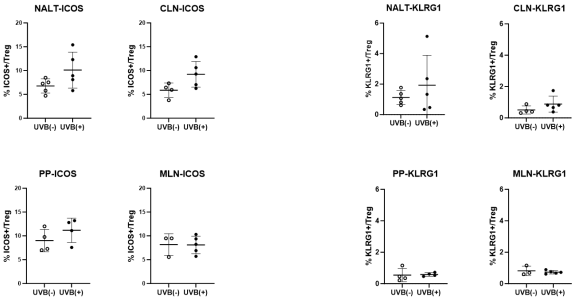
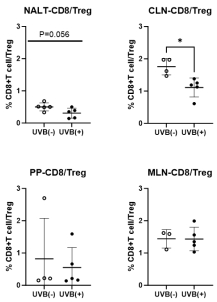


図3



Clindamycin induces the production of exotoxin in *Streptococcus pyogenes*

細菌学
211009 牛田あかり
211010 大木初音

1.目的

劇症型 A 群レンサ球菌感染症の治療の目的で用いられているクリンダマイシンを投与した際に、A 群レンサ球菌の毒素の分泌量が増加する現象について定量的に解明することを目的とした。

2.背景

A 群レンサ球菌はグラム陽性球菌で、連鎖上の配列を成し、β 溶血を示す細菌だ。この菌は小児における咽頭炎、猩紅熱、丹毒、とびひ、高い死亡率を呈する劇症型 A 群レンサ球菌感染症などの原因となる。また続発症に急性糸球体腎炎やリウマチ熱がある。その中でも劇症型 A 群レンサ球菌感染症は致死率が 30～40%に達する重篤な侵襲性感染症だ。現在、治療にはペニシリンとクリンダマイシン（CLI）の併用投与が推奨されている。

劇症型 A 群レンサ球菌の治療におけるクリンダマイシンについて先行研究で、投与について問題点があることが分かっている。

まず 1 つ目の問題点は、NADase 活性が A 群レンサ球菌において CLI に依存的に上昇する株が存在するということだ。NADase とは、劇症型感染症の起因の外毒素として近年注目されており、NAD の分解酵素である。つまり CLI が、NADase を増加させることで、かえって劇症型感染症を増悪させる可能性があることを示唆している。

2 つ目の問題点は、CLI は本菌において耐性菌が存在するという点だ。このような菌では CLI では菌の増殖を抑制できない。

そこで、私達は 1 つ目の問題点である、A 群レンサ球菌の NADase 活性が CLI 依存的に上昇することについて、その機構の解明のため、CLI を感知するセンサータンパク質、レスポンスレギュレータータンパク質を特定することにした。2 つ目の問題点である、CLI 耐性菌についても、感受性菌と同様に NADase 活性の上昇が起こるのかを明らかにすることにした。

先行研究では CLI 感受性菌 23 株中 19 株で NADase の産生量が増加したことが分かっている。また、19 株の感受性菌のうちの 1 つである 1529 株の CovS ノックアウト変異株では、NADase 活性が上昇しないことも明らかになっている。この結果より、CovS が NADase 活性の上昇に関与する可能性が示唆された。また、CLI 耐性菌では研究した 4 株全てで NADase 活性が上昇した。

3. 仮説

NADase 活性の上昇がおこる機構について仮説を立てた。まず、A 群レンサ球菌のセンサータンパク質は CLI を感知することで、レスポンスレギュレータータンパク質をリン酸化する。次に、リン酸化されたレスポンスレギュレータータンパク質は DNA に直接結合し、遺

伝子発現を調節する。これにより、抑制因子が制御され最終的には NADase 産生量が増加する。この機構は二成分制御系という。A 群レンサ球菌では 12 あるいは 13 種類のセンサータンパク質とレスポンスレギュレータータンパク質の組が存在することが知られている。

先行研究より、CovS と CovR の二成分制御系が NADase 活性の上昇に関係していると考えられる。そのため CovS と CovR について NADase 活性の測定を今回試みた。

また、2 成分制御系タンパク質ではないが、単独で存在するレスポンスレギュレータータンパク質に mga と rgg が存在する。これらは本菌の病原因子の発現に関与していると考えられる。

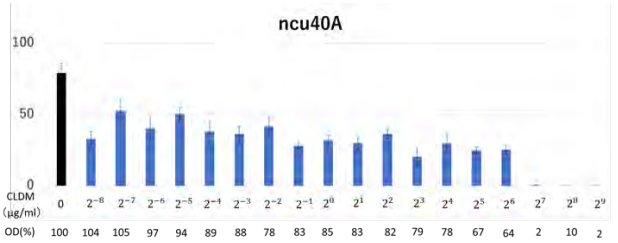
さらにすでに CovS がシステインプロテアーゼである speB 外タンパク質の発現に関与していることが判明している。実際、1529Δ*covS* では、分泌される speB のレベルが野生株である 1529 と比較して有意に低下していた。そこで speB のレベルの減少が、NADase を増加させる可能性についても考えた。

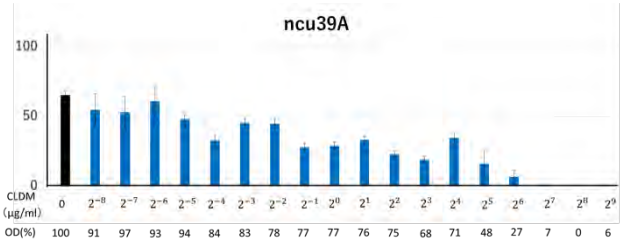
4. 方法

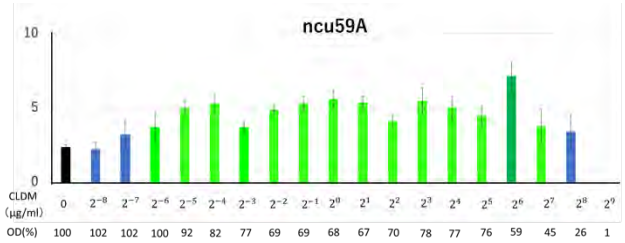
様々な濃度のクリンダマイシンを入れた培地に前もって培養した菌を入れ、37 度で一晩培養した。その後、濁度を計り、マイクロチューブに 1ml 取り出し遠心分離をかけ、上澄み液を取り出した。そこに NAD を加え、1 時間に分解された NAD の量から NADase 活性を算出した。

5. 結果

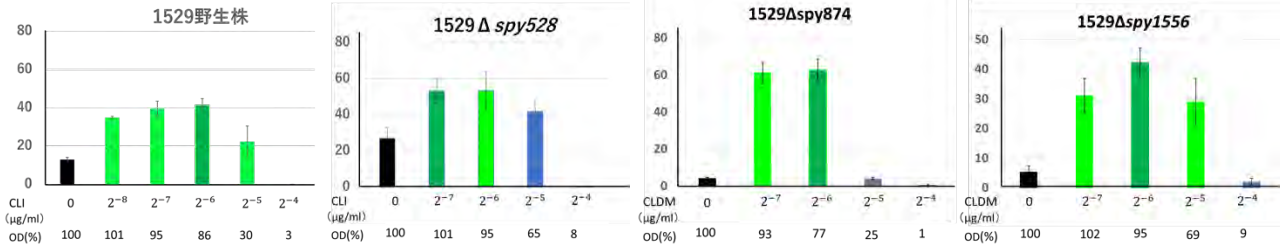
（図 1）

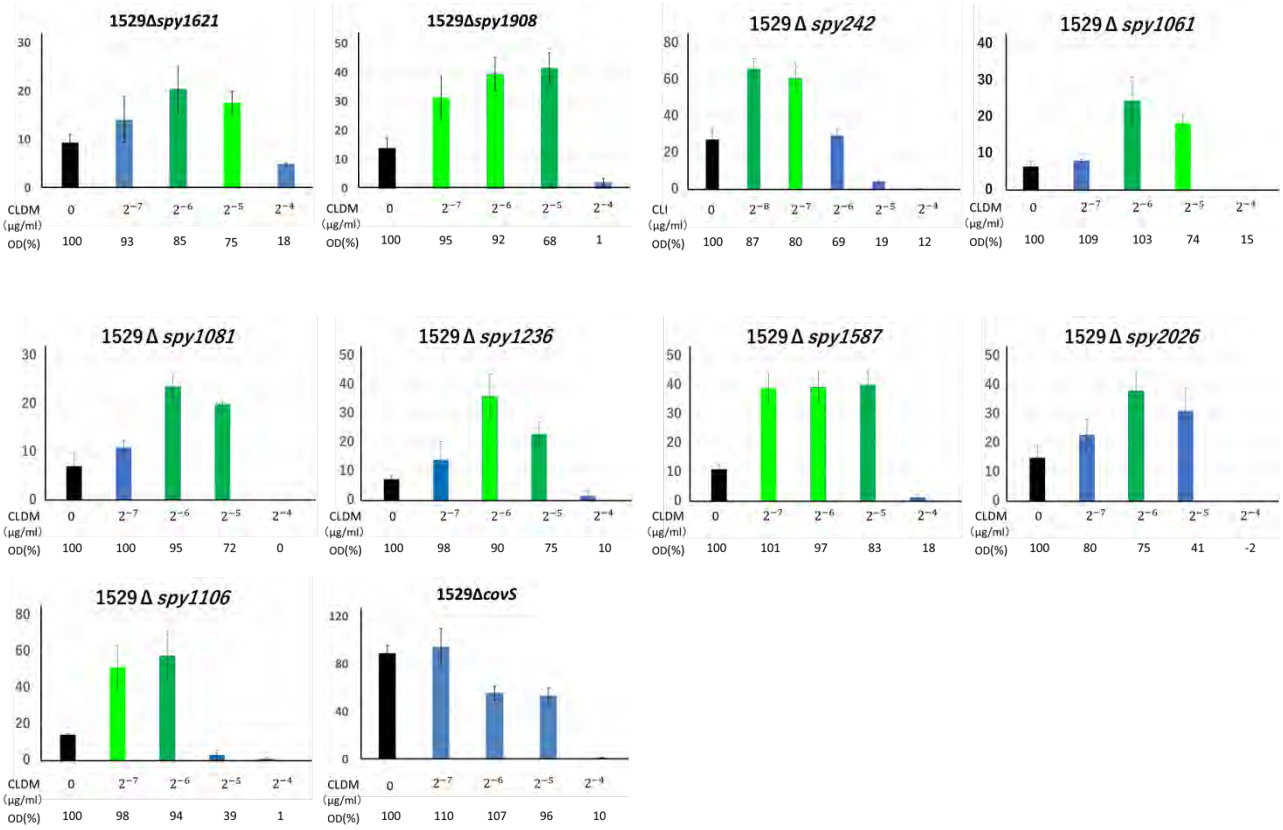




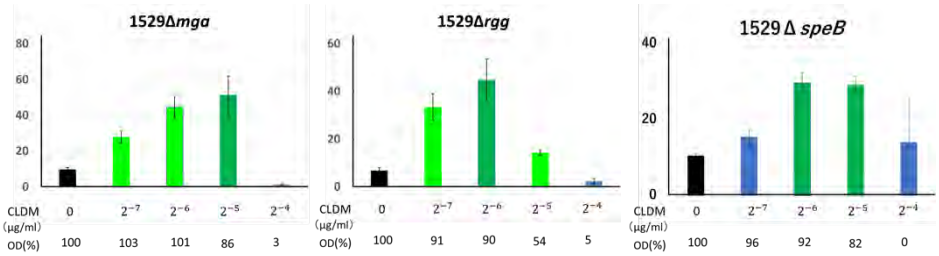


（図 2）

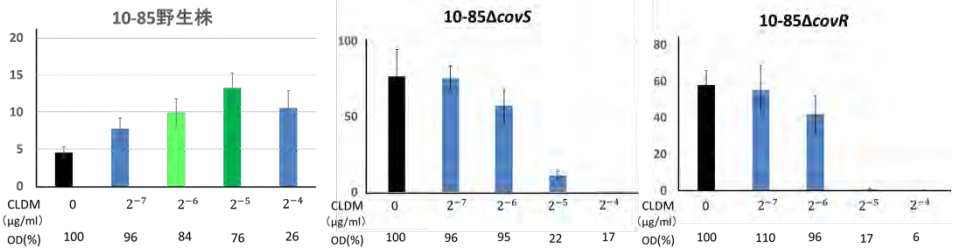




（図 3）



（図 4）



今回の研究では CLI 耐性菌を新たに 3 株追加解析した。（ncu40A、ncu39A、ncu59A）

ncu59A のグラフより、2 の-5 乗や 2 の-6 乗で菌の増殖が抑えられているにもかかわらず、CLI を入れていない黒のコントロールのときと比べ、NADase 産生量が上がっている。つまり、これは菌が CLI により NADase 産生が誘導されているということを示している。一方で、ncu39A、ncu40A では誘導は見られなかった。（図 1）

また先行研究の 19 株のうちのひとつである感受性菌である A 群レンサ球菌の 1529 株に存在する 13 種類のセンサータンパク質のうち 1 種が欠損した変異株をそれぞれ計 13 種類調べた。（Δ *spy242*、Δ *spy528*、Δ *spy874*、Δ *spy1061*、Δ *spy1081*、Δ *spy1236*、Δ *spy1106*、Δ *spy1556*、Δ *spy1587*、Δ *spy1621*、Δ *spy1908*、Δ *spy2026*、Δ *covS*）また 1529 Δ *mga*、1529 Δ *rgg*、1529 Δ *speB* についても調べた。

まず何も欠損などが与えられていない 1529 株では誘導が見られた。また、センサータンパク質を欠損させた変異株の一つである 1529Δ*spy528* も野生株と同様に誘導が見られた。他の Δ*covS* 以外の欠損株でも野生株と同様に誘導が見られた。しかしながら欠損を与えた 13 種類のうちΔ*covS* のみ誘導は見られなかった。以上より CovS のみ CLI 依存性の NADase 活性上昇に関わることが判明した。(図 2)

また 1529 株を野生株とするΔ*mga*、Δ*rgg* についても誘導が見られた。よって mga、rgg は CLI 依存性の NADase 活性上昇に関与しないことが分かった。Δ*speB* も野生株に近い誘導が見られたため、CLI 依存性の NADase 活性上昇に関与しないことが分かった。(図 3)

さらに 1529 株においては CovS が関与することが明らかになったため、感受性菌の違う株である 10-85 株について CovS と CovR の関与をより詳しく調べた。

10-85 株の野生株では CLI 依存性 NADase 活性の上昇が見られた。一方で 10-85 Δ*covS* では野生株と異なり誘導は見られなかった。また、10-85Δ*covR* も 10-85Δ*covS* と同様に CLI 依存性の誘導は見られなかった。(図 4)1529 株に加えて、10-85 株についても、同様の結果が得られたことで、CLI 依存的に NADase 活性が上昇することにおける CovS や CovR の関与がさらに強調された。

6. 考察

今回および過去の試験から、CLI 耐性菌では 7 株中 5 株で CLI 依存的に NADase 活性の上昇が誘導されることが分かった。よって、先行研究では CLI 耐性菌であっても 100%NADase の活性が上昇するという結果であったが、今回の研究で NADase の活性の上昇が起こるかは株によると考えられる。

また、1529 株のみでなく、10-85Δ*covS* と 10-85Δ*covR* も CLI 依存的に NADase は上昇しなかったため、CLI 依存的に NADase 活性が上昇することに関与していたのは CovS、CovR のみであると考えられる。さらに、他の単独で存在するレスポンスレギュレータータンパク質のΔ*mga*、Δ*rgg*、外タンパク質のΔ*speB* は誘導されたため、mga、rgg、speB 非依存性だと考えられる。

7. 今後の課題

どのようなメカニズムで CLI 投与によって毒素産生量の増加が誘導されるのかを解明することが必要だ。CovS、CovR が関与することが今回明らかになったため具体的にどのように関わっているのか明らかにしていくのが今後の目的である。また、現在、劇症型 A 群連鎖球菌症の第一選択薬としてペニシリンと CLI の併用投与が推奨されているが、原因菌が CLI 耐性菌の場合、増殖の抑制ができず、毒素産生量が増加するため、安易に使用することはかえって人体に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。そのため、劇症型感染症に対する新たな治療法の確立が必要だと考えた。

Purification of sensor protein SPY1588 from Streptococcus pyogenes

細菌学分野　佐久間大翔　35

目的・背景

A 群レンサ球菌は酸を感受して、M タンパクや線毛から構成されるバイオフィルムを形成し、抗菌物質や生体の防御機構から細菌自身を守る仕組みを持っている。

このような外からのストレスを感受する仕組みとして、細菌は Two-component regulatory system 略して TCS を持っており、バイオフィルム形成には、センサータンパク質が SPY1588、レスポンスレギュレータータンパク質が SPY1587 の TCS が関わっている。

しかし SPY1588 のどのアミノ酸部分が酸を感受するかはまだ解明されていない。過去の研究ではまずドメインごとの立体構造の解析を目指していましたが、なかなか成功せず、そのような論文もない。

そこで今回の目的は可溶化に成功しやすいと考えられるヒスチジンキナーゼドメインである SPY1588-406 と可溶化率が非常に高いタグである NasuA タグを持つpET43,1a による組換えタンパク質の精製を目指し、立体構造解析につなげることだ。

方法

spy1588406 のフラグメントをPCRで増幅し、制限酵素で処理し、*pET43,1a* にライゲーションさせたり、*pET43,1a* ベクターと *spy1588406* のプライマーを PCR で増幅し、In-fusion させたりした。このような方法で抽出したプラスミドベクターをシークエンスした後、大腸菌に導入した。大腸菌を IPTG の添加によりタンパク質発現の誘導を 20℃と 37℃で試みた後、リゾチーム処理し抽出した溶液の上清を取り出した。その後、様々なクロマトグラフィーで精製した。

結果

発現した目的タンパク質が上清で抽出できたかを確認するため SDS-PAGE を行ったところ、20℃で誘導した株で、推定分子量 90kDa の位置に黄枠のようにタンパク質が確認されたが、37℃で誘導した株では確認できなかった。(Fig.1)

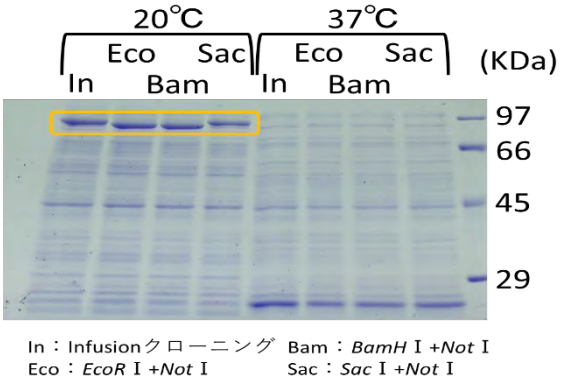


Fig. 1：Expression profile of recombinant SPY1588-406

His-Tag を持つ目的タンパク質の存在を確認するため、それぞれ2株ずつ His-Tag 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果、InFusion と Sac1＋Not1 で処理した株で黄枠のようにタンパク質が確認された。(Fig.2)

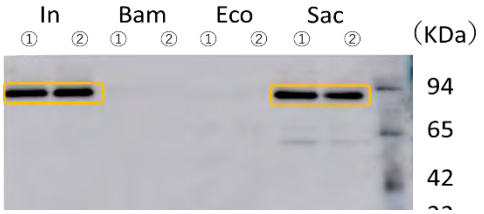


Fig. 2：Expression profile of recombinant SPY1588-406 Western blotting

次に、目的タンパク質精製のため、コバルトアフィニティークロマトグラフィーを行った。組換えタンパク

質は His-Tag をもつため、コバルトと結合し、カラムに吸着し、イミダゾールで溶出することで精製できると考えられる。SDS-PAGE で確認すると、イミダゾールを加えたところで、黄枠のように目的タンパク質を確認できた。(Fig.3)

NusA タグを取り除いた目的タンパク質を精製するため、エンテロキナーゼで NusATag の切断を試みた。組換えタンパク質はエンテロキナーゼサイトがあるため、そこで切断でき、NusA を切り離すことができると考えられる。SDS-PAGE で確認すると、NusATag の外れた目的タンパク質の推定分子量約 20kDa の位置にタンパク質を確認できた。

そして、目的タンパク質側を取り出すため S-Tag アフィニティークロマトグラフィーを行った。
切断した NusA 側は S-Tag をもつため、レジンと結合し、カラムに吸着することから目的タンパク質の精製ができると考えられる。SDS-PAGE で確認すると、flow through に黄枠のようにタンパク質を確認できた。(Fig.4)

目的タンパク質をさらに精製するため、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。結果を SDS-PAGE で確認すると、NaCl を加えたところで黄枠のようにタンパク質を確認できた。(Fig.4)

この精製できたタンパク質を CD スペクトルで二次構造を維持しているか確認した結果, α ヘリックスと β シート構造の特徴が見られ、二次構造が保持されていたといえる。(Fig.5)

また、アルファフォールドで SPY1588-406 の構造の予測を行った結果、α ヘリックス構造がここに β シート構造が見られた。(Fig.6)

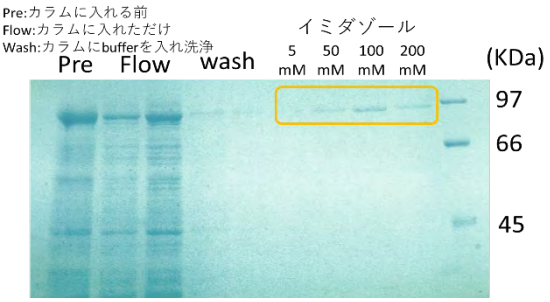


Fig. 3:Results of separation of *E.coli* supernatant after cobalt affinity chromatography

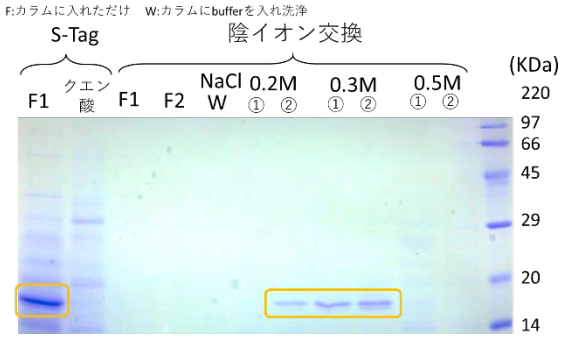


Fig. 4:Results of separation by S-tag and anion chromatography

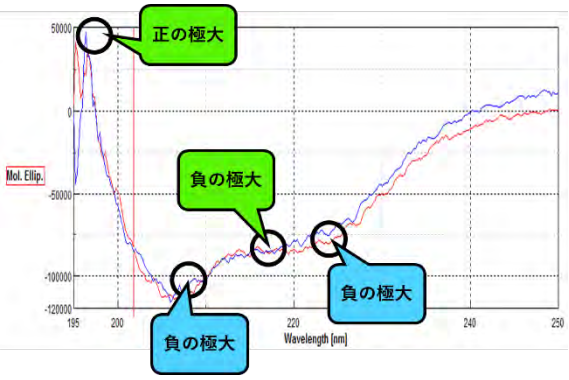


Fig. 5:CD spectrum of SPY1588-406

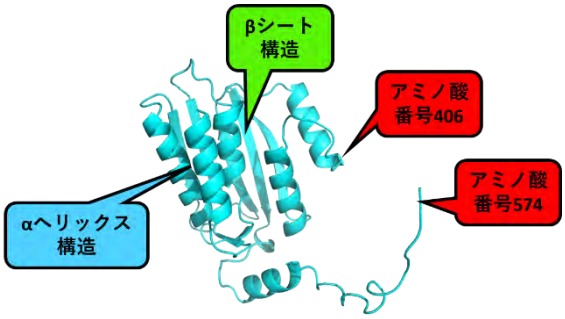


Fig. 6:Predictive structure of SPY1588-406

考察

今回、SPY1588-406 を可溶化かつ二次構造を維持して精製できた。このことから結晶化し立体構造解析を行うことに大きく近づいたといえる。

参考文献

TrxR, a New CovR-Repressed Response Regulator That Activates the Mga Virulence Regulon in Group A Streptococcus, Temekka et al., Infection and immunity, 2008

A 群レンサ球菌において酸化ストレス反応に関与する転写調節因子の同定

細菌学　高良志織（30 番）、原田将太朗（67 番）

＜目的＞

A 群レンサ球菌劇症株（10-85）には、発現制御遺伝子が、12 対存在する regulator/sensor を含め、総計 70～80 程存在することが知られている。しかし、これらの遺伝子の多くは、具体的にどのように遺伝子発現に影響を及ぼしているのか明らかになっていない。そこで、今回の研究では、酸化ストレスに関連する遺伝子を同定することを目的として、種々の実験を行った。

＜背景＞

細菌は、宿主の攻撃に対する抵抗性、例えば貪食への抵抗性メカニズムや毒素産生能を持つが、それには発現制御遺伝子の発現が必須となる。また、貪食時には、ファゴソーム内で起こる殺菌として過酸化水素などを介する oxidative メカニズムが知られているが、A 群レンサ球菌においては、酸化ストレスに関連する発現制御機構は、Δspy*1249*（以下 *spy* は省略），Δ*2115* などの一部のみしか解明されていない。そこで、酸化ストレス応答に関与する転写調節因子の同定を試みた。

＜方法＞

まず、実験に使用するノックアウト（KO）株および相補株を、劇症型感染症患者由来の 10-85 および 1529 株を用いて作成した。KO 株作成時には、pFW12 というプラスミドノックアウト用ベクターを用いて、電気ショックにより相同組換えを起こさせることで、樹立した。また、相補株作成時は、pLZ12-Km2 というベクターを用いて、元の遺伝子を導入することで樹立した。目的の遺伝子の方向が違う 2 種類の相補ベクターを導入した株をそれぞれ Comp1,comp2 と呼んだ。今回、私たちが作成した株は、10-85、1529 株のΔ*1249* およびΔ*2115* である。

次に、73 種類の転写関連遺伝子 KO10-85 株について、過酸化水素添加培地において、著しく発育が低下する株のスクリーニングを行った。使用するプレートは、BHI 溶液 20mL に過酸化水素を添加し、過酸化水素濃度 0%、0.0075%、0.00825%、0.009%、0.00975%、0.0105%のものを作成した。プレート上に菌液 8～10μL を滴下し、塗り広げ、24 時間ごとにプレートの写真を撮り、菌の発育を観察した。最終的な判定には、120 時間後の結果を用いた。

また、上記の方法で行ったスクリーニングにより、他の KO 株と比べ顕著に発育が低下したものについて、相補株、1529 株を用いて同様の実験を行った。相補株の実験において、遺伝子を戻した時に、10-85 野生株と同レベルまで発育が回復すれば、その遺伝子の酸化ストレスへの強い関与の可能性が示唆されることになる。また、相補株による実験が上手くいかなかった場合でも、1529 株について同じ遺伝子を KO し、10-85 株同様に発育が低下すれば、10-85 株に特異的な発育の低下ではないことが示され、その遺伝子の酸化ストレスへの関与の可能性がかなり高く示唆される。

さらに、液体培養により、種々のストレスが増殖に及ぼす影響を検討し、どの遺伝子が酸化ストレスにより強く関与しているかどうかを検証した。液体の BHI 溶液 4mL に、菌液

40μL を加え、24 時間後の濁度を計測し、KO 株ごとの発育の違いを測定した。通常条件を温度 37℃、pH7.0 で静置培養するものとし、過酸化水素濃度を 0.006%。0.0075%にした場合、温度を 40.5℃にした場合、振盪培養した場合、pH を 6.0 にした場合など、様々なストレス条件を加え、それぞれの条件下での濁度を記録した。

加えて、 DNase 産生、 SpeB(プロテイナーゼ)、Nga 活性の測定、E-test、マクロライド感受性試験も行った。これらの実験により、酸化ストレス抵抗性以外の機能への関与を検証した。 DNase 産生は塩酸法 、SpeB(プロテイナーゼ)は SDS-PAGE により行った。マクロライド感受性試験は E-test(エリスロマイシン)、ディスク法(エリスロマイシン、クラリスロマイシン)により行った。

＜結果(図・表)＞

スクリーニングの結果、10-85 および 1529 株由来の Δ*1634* 株、Δ*1259* 株、Δ*1878*、Δ*1834*、Δ*144*、Δ*1386*、Δ*1355* の 7 つの KO 株で、過酸化水素による増殖の著しい低下が観察された。

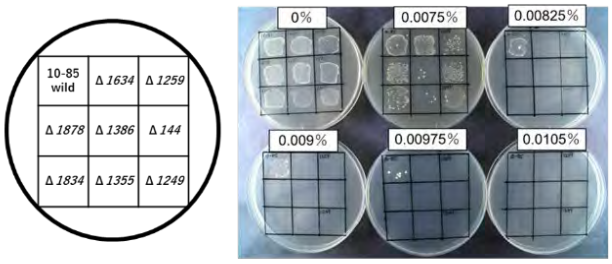


図1 過酸化水素抵抗性に強く関与していると考えられる7つのKO株の培養写真(10-85株)

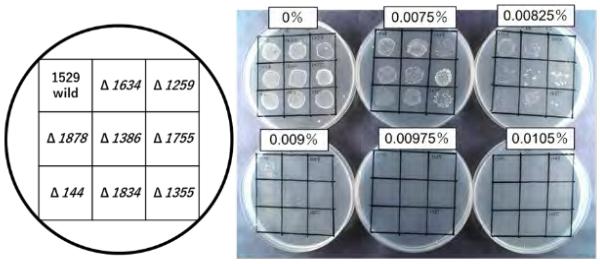


図2 過酸化水素抵抗性に強く関与していると考えられる8つのKO株の培養写真(1529株)

相補株による実験については、Δ1386 やΔ144 では、遺伝子を戻すことで 10-85 野生株と同程度にまで発育が回復することが確認された一方で、ΔΔなどでは、遺伝子を元に戻しても、片方の相補株のみしか機能の回復が起こらない、もしくはどちらの方向でも機能の回復が確認されないなどの結果となった。

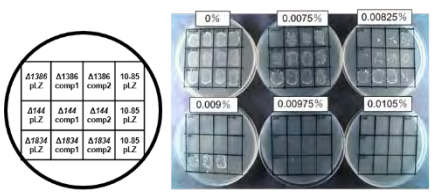


図3 酸化ストレス抵抗性に関与していると示唆される1386、144、1834の相補株の実験結果(10-85株)

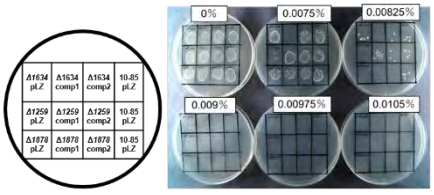


図4 酸化ストレス抵抗性に関与していると示唆される1634、1259、1878の相補株の実験結果(10-85株)

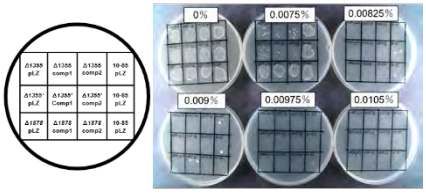


図5 酸化ストレス抵抗性に関与していると示唆される1355(lot1, 2)、1878の相補株の実験結果(10-85株)

続いて、液体培養による上記 7 つの遺伝子の KO 株の発育の変化について、過酸化水素濃度を変化させた場合は、どの KO 株においてもプレート培養時と同様発育が有意に低下した。温度条件を変化させた時は、Δ*1355* 株、振盪培養を行ったときはΔ*1878* 株、pH 条件を変化させたときはΔ*1259*、Δ*1878*、Δ*144* 株において 10-85 野生株と比較して発育の程度に有意差が見られた。以下にそれらの結果をまとめた表を掲載した。

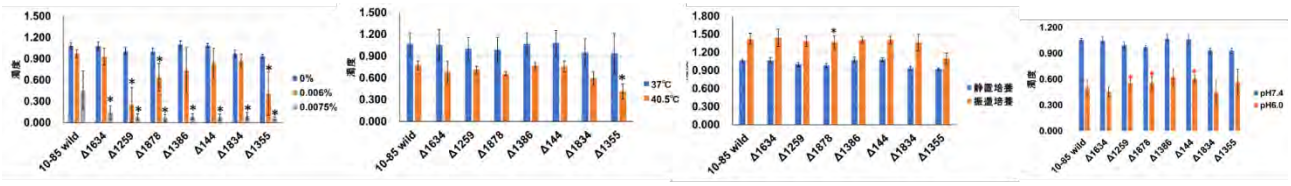


図6～9　液体培養において、過酸化水素濃度(図6)、温度(図7)、振盪(図8)、pH(図9)を変化させたときの濁度(10-85株)

	過酸化水素 0.006%添加	過酸化水素 0.0075%添加	温度40.5℃	振盪培養	pH6.0
Δ *1634*	→	↓↓	→	→	→
Δ *1259*	↓↓	↓↓	→	→	↑
Δ *1878*	↓	↓↓	→	↑	↑
Δ *1386*	→	↓↓	→	→	→
Δ *144*	→	↓↓	→	→	↑
Δ *1834*	→	↓↓	→	→	→
Δ *1355*	↓↓	↓↓	↓	→	→

表1　液体培養結果まとめ(10-85株)

次に、Δ *1355* と、酸化ストレスへの関与が既知のΔ *1249*、Δ *2115* について、過酸化水素添加培地での増殖の検討および液体培養実験を行った。過酸化水素添加培地での発育については、いずれの株も野生株と比較し発育が低下していた。

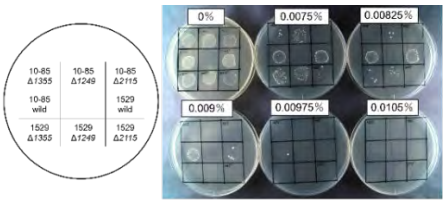


図10　1355, 1249, 2115各KO株の培養写真(10-85, 1529株)

続いて、液体培養の結果について、10-85 株においては、すべての KO 株で過酸化水素添加時に発現が有意に低下した。一方、1529 株については、Δ *1355* のみ発育の増加が見られた。さらに、特徴的な結果となったのが、振盪培養時のΔ *1249* 株であり、野生株とほかの KO 株の発育が増加しているのに対して、Δ *1249* のみ 10-85 株、1529 株の両方で発育が低下した。温度条件に関しては、Δ *1355* は他の 2 つの KO 株と比較して影響を受けにくいことが分かった。pH 条件に関しては、あまり差が見られなかった。これらの結果をまとめた表が、以下のものである。これらの結果より、Δ *1355* のストレス応答における機能の関連性は、Δ *1249* およびΔ *2115* とは異なっていた。

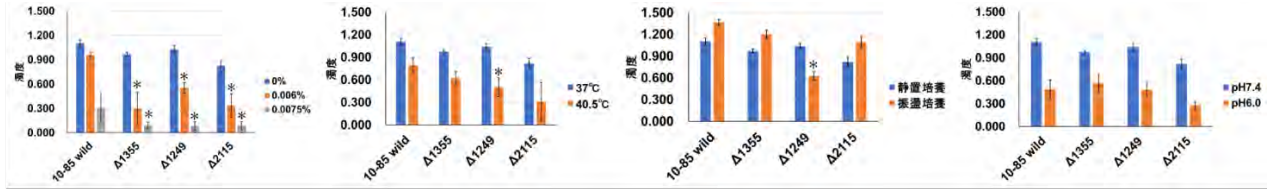


図11~14　液体培養において、過酸化水素濃度(図8)、温度(図9)、振盪(図10)、pH(図11)を変化させたときの濁度(10-85株)

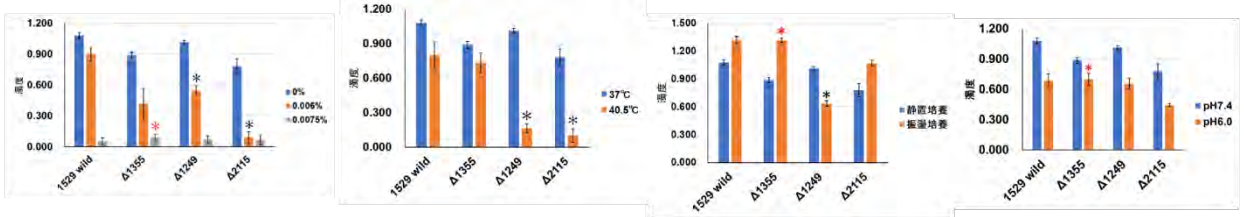


図15~18　液体培養において、過酸化水素濃度(図12)、温度(13)、振盪(図14)、pH(図15)を変化させたときの濁度(1529株)

	過酸化水素 0.006%添加	過酸化水素 0.0075%添加	温度40.5℃	振盪培養	pH6.0
10-85Δ *1355*	→	↓↓	→	→	→
10-85Δ *1249*	↓↓	↓↓	→	→	↑
10-85Δ *1878*	↓	↓↓	→	↑	↑

表2 液体培養結果まとめ(10-85株)

	過酸化水素 0.006%添加	過酸化水素 0.0075%添加	温度40.5℃	振盪培養	pH6.0
1529Δ *1355*	→	↓↓	→	→	→
1529Δ *1249*	↓↓	↓↓	→	→	↑
1529Δ *1878*	↓	↓↓	→	↑	↑

表3 液体培養結果まとめ(1529株)

加えて、DNase や SpeB、Nga 活性の測定、薬剤感受性試験を行った。DNase の実験では、Δ *1259*、Δ *1834*、Δ *1355*、Δ *1249* において、DNase の産生が低下しているという結果が得られた。ただし、DNase の産生に関係なく菌液中の菌量が少なかった可能性も否定できず、さらなる実験が必要である。SpeB の産生量については、KO 株ごとに大きな差は見られなかった。Nga 活性の結果については、10-85 株の Δ *1259* のみ wild 株と比較して Nga 活性が下がっており、Nga 産生への関与が大きいことが示唆された。また、それ以外の KO 株は 10-85、1529 株ともに wild 株と比較して活性が増加している点で非常に興味深い結果となった。薬剤耐性試験の結果については、株ごとに大きな差は見られなかった。

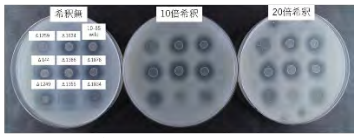


図19 DNase結果

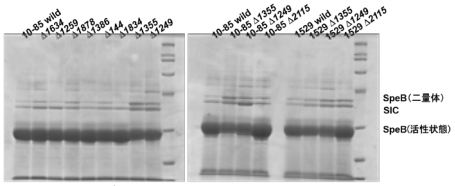
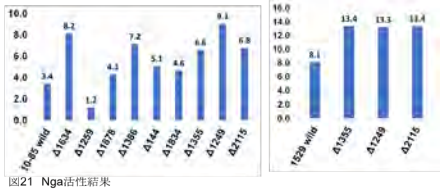


図20 SDS-PAGE結果


図21 Nga活性結果

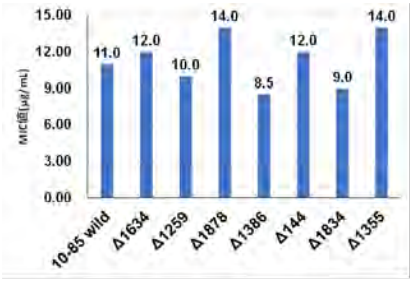


表22 エリスロマイシンによるE-test結果(10-85株)

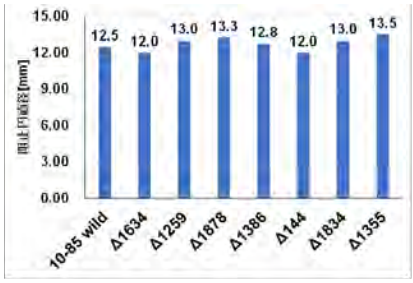


表23 ディスク法によるエリスロマイシン感受性の結果(10-85株)

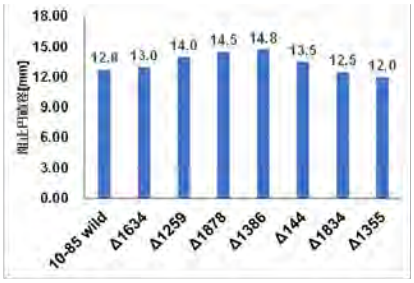


表24 ディスク法によるクラリスロマイシン感受性の結果(10-85株)

＜考察＞

10-85 および 1529 株由来のこれら7つの KO 株では、過酸化水素の影響によって増殖の著しい低下が観察された。温度条件では Δ *1355* で発育の低下が、振盪培養時は Δ *1878*、pH 条件では Δ *1259*、Δ *1878*、Δ *144* の発育の増加が見られた。また、Δ *1634*, Δ *1386*, Δ *1834* は、各ストレスを加えても野生株と比較して発育に大きな変化が見られなかったことから、過酸化水素抵抗性に、より特異的に関与していることが示唆された。

Δ *1249* や Δ *2115*、および毒素産生の探索の結果も踏まえ、酸化ストレスに反応する発現制御因子は、複数存在することが明らかになり、かつその機能には多様性があることが分かった。発現制御因子の酸化ストレス応答の意義を明らかにするためには、貪食細胞やマウスを用いたさらなる実験が必要である。

＜参考文献＞

神谷茂(2021), 標準微生物学第 14 版

ラット前立腺発がんモデルに対するルチンの化学予防効果

実験病態病理学　古幡 保之 出席番号 72

目的および背景

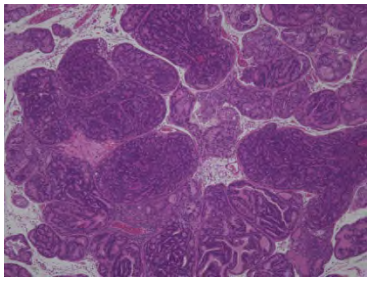
前立腺癌は米国において男性の罹患率第 1 位で、死亡率が第 2 位の癌である。危険因子としては人種、食生活、加齢、遺伝などがあげられる。我が国においても年々前立腺癌罹患者数が増加している癌であり、理由としては食生活の欧米化があげられる。先行研究において、ドクダミ抽出物(HCT)に前立腺癌抑制効果があることが分かり、HCT の主要な構成成分の中に Rutin(ルチン)が同定された [1]。今回の実験ではこの Rutin 投与が前立腺癌において、腺癌抑制効果を示すのかどうかを検証した。

方法

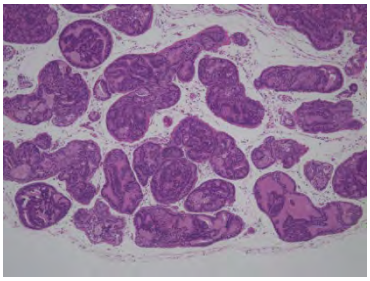
前立腺にアンドロゲン依存性で腺癌を発生させるトランスジェニックラット(TRAP)を用いた。6 週齢の雄 TRAP に通常の餌を与えた Control 群と通常の餌に Rutin が Rutin-Low(0.04%)あるいは Rutin-High(0.2%)が混ざっている群に分け、8 週間投与した。解剖後は摘出した前立腺の腹葉と側葉に HE(ヘマトキシリンエオジン)染色、Ki-67 免疫染色、TUNEL 免疫染色を行い、腺癌の発生率、腫瘍性病変における PIN と腺癌の割合、増殖活性(Ki-67)、アポトーシス(TUNEL)の定量解析を行った。

結果(図・表)

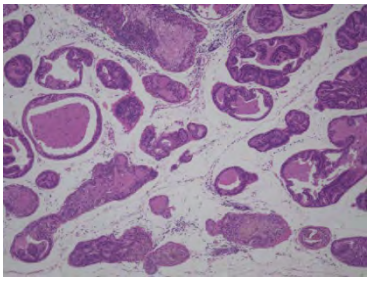
TRAP モデルを用いた Rutin 投与による組織像の変化と実験結果を以下に示す。



Control



Rutin-Low



Rutin-High

前立腺腹葉と側葉における腺癌の発生率を**表 1** に示す。

表 1　　* $p<0.05$

グループ	動物数	前立腺腹葉(%)	前立腺側葉(%)
Control	12	12 (100%)	12 (100%)
Rutin-Low	13	13 (100%)	8 (69.2%)
Rutin-High	13	13 (100%)	7 (61.5%) *

前立腺腹葉ではどの群においてもすべての個体で腺癌が発生した。一方で、前立腺側葉では Rutin-Low 群と Rutin-High 群で腺癌の発生率が減少を示し、Rutin-High 群では有意に減少を示した。

TRAP 前立腺腹葉と前立腺側葉における腫瘍性病変の割合を図 1 と図 2 に示す。

図 1

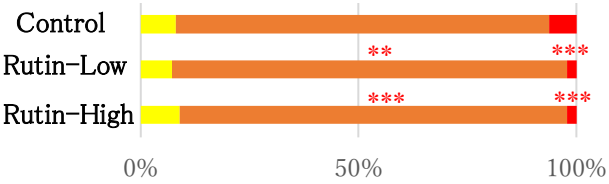
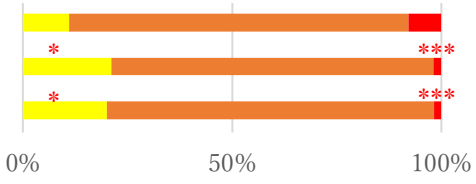


図 2





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

前立腺腹葉での腫瘍性病変における腺癌の割合と高異型度 PIN の割合は Rutin-Low 群と Rutin-High 群ともに有意に減少を示した。また前立腺側葉では Rutin-Low 群と Rutin-High 群ともに腫瘍性病変における腺癌の割合は有意に減少し、腫瘍性病変における低異型度 PIN の割合は有意に増加を示した。

次に前立腺腹葉での Ki-67 免疫染色と TUNEL 免疫染色での結果をそれぞれ図 3 と図 4 で示す。

図 3

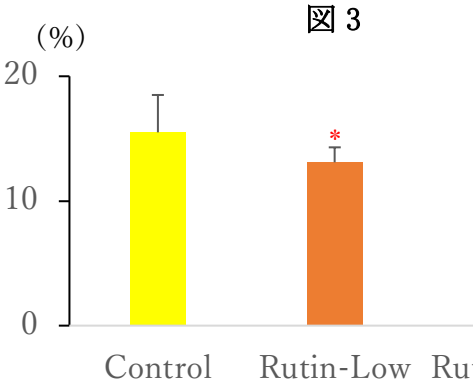
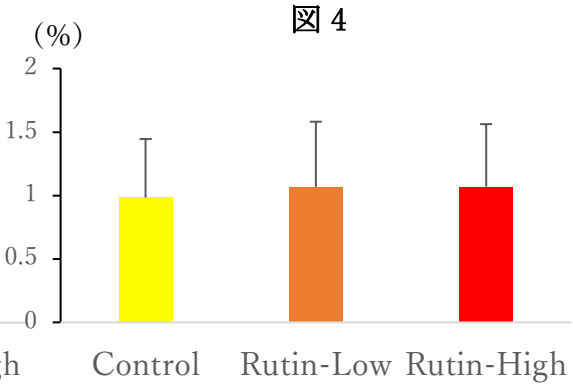


図 4



*** p<0.001, * p<0.05

前立腺腹葉では、Rutin-Low 群と Rutin-High 群ともに有意に細胞増殖活性が減少した。また、Rutin-Low 群と Rutin-High 群ともに Rutin 投与によるアポトーシスへの有意な影響は見られなかった。

考察

Rutin の投与により、前癌病変から腺癌への進展抑制が示された。今後の展望としては、Rutin 投与による細胞増殖活性を抑制する分子メカニズムを解析して考察したい。

参考文献

[1] Subhawat Subhawa, *et.al* "Suppressive Effect and Molecular Mechanism of *Houttuynia cordata* Thunb. Extract against Prostate Carcinogenesis and Castration-Resistant Prostate Cancer" *Cancer 2021*, 13, 3403.

CD81 is expressed in the tumor-inhibitory CAF expressing PDPN in the breast cancer microenvironment

実験病態病理学　和田裕太郎　No.99

目的・背景

癌微小環境は癌細胞だけでなく、脈管や免疫細胞、そして Cancer-Associated Fibroblast（CAF）で構成されている。CAF は癌細胞の増殖や浸潤を促進すると考えられてきたが、その機能などについて、いまだ未解明な部分が多い。テトラスパニンは細胞膜 4 回貫通型の膜タンパク質で、ヒトでは 33 種類が同定され、細胞増殖や接着、移動など細胞生物学的な重要性が指摘されている。癌微小環境におけるテトラスパニンの機能については不明な点が多い。当研究室では乳癌においてＣＡＦにテトラスパニンの 1 種である CD81 が高発現していると有意に予後良好であることを見出した。近年の研究において CAF は少なくとも腫瘍抑制性 CAF と腫瘍支持性 CAF の 2 種類にわけられ、それぞれにも複数の種類があると提唱されるようになってきた。本研究は、ヒト乳癌組織アレイを用いて、どのタイプの CAF に CD81 が高発現しているかを同定することを試みた。

方法

547 症例のヒト浸潤性乳癌組織アレイを用いて研究を行った。腫瘍支持性 CAF を α-smooth muscle actin（αSMA）を発現する CAF、腫瘍抑制性 CAF を Decorin

(DCN)発現型 CAF と Podoplanin (PDPN)発現型 CAF に 2 種類に細分化して定義した。組織アレイをそれぞれの抗体で染色し、染色強度を Image J を用いて定量的に計測した。ＥＺＲを用いてＲＯＣ曲線、生存曲線解析、階層的クラスター解析等の統計的解析を行なった。

結果

αSMA、DCN、PDPN それぞれについて、ROC 曲線によりカットオフ値を算出し 2 群に分けた。無再発生存期間の予後解析を行うと、高 PDPN 発現群は有意に予後良好であったが、αSMA、DCN には有意差がみられなかった。症例ごとのばらつきを抑えるため、症例ごとの PDPN/αSMA, DCN/αSMA, PDPN/DCN 比を計算し、それぞれ高値、低値の 2 群にわけて予後解析を行ったところ、PDPN/αSMA, DCN/αSMA がそれぞれ高値の群は有意に予後良好であった（図 1 ）。つぎに PDPN/αSMA, DCN/αSMA の値に基づく階層的クラスター解析を行ったところ、4 群に分類された (図 2)。それぞれ PDPN,DCN の発現との関係も調べた。（図 3 ）そのうち、PDPN/αSMA 高値を示す 2 群で予後良好の傾向がみられた（図 4)。また、PDPN/αSMA 高値を示す 2 群で CD81 が優位に高発現していた。また DCN/αSMA 高値を示す群においても CD81 の発現が強くなる傾向がみられた。（図 5 ）

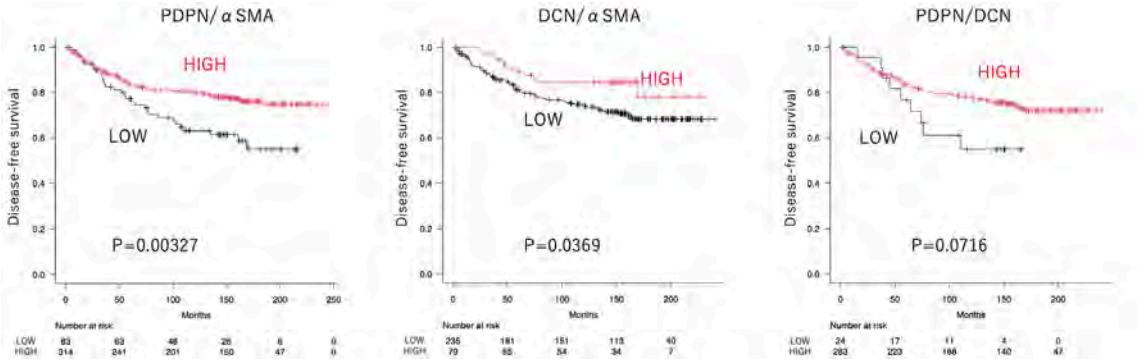


図 1

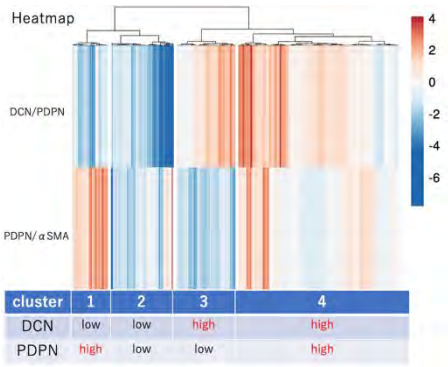


図 2

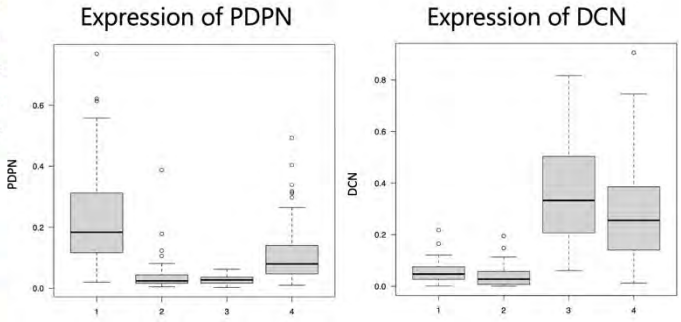


図 3

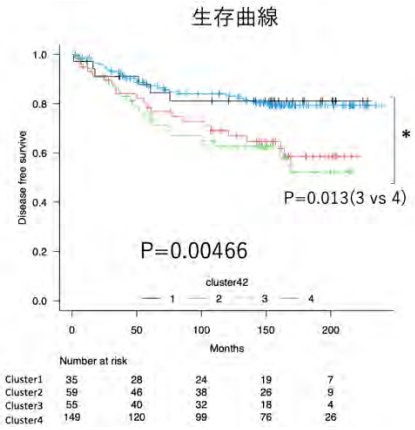


図 4

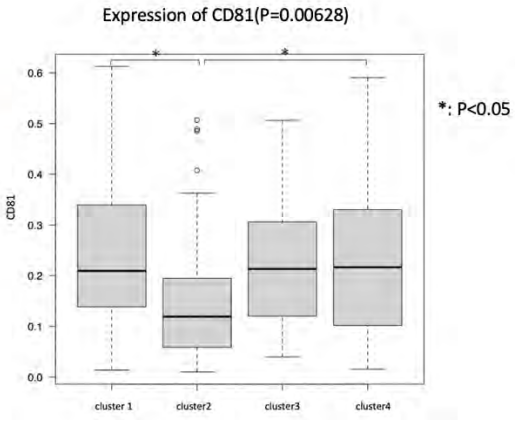


図 5

考察

乳癌微小環境において、ＰＤＰＮ発現型ＣＡＦの割合が多いと無再発生存期間が伸びることがわかり、CD81 はＰＤＰＮ発現型ＣＡＦに高発現している可能

性が示唆された。

参考文献

Cancer-Associated Fibroblast Subpopulations With Diverse and Dynamic Roles in the Tumor Microenvironment, Thomas Simon , Bodour Salhia, 2022 Feb;20

マウス膵炎モデルにおける組織学的変化とプロテオーム解析を用いた

膵炎発症膵癌における初期変化の検討

実験病態病理学　211003　浅利怜汰　211095　吉永拓未

背景

膵癌の 5 年生存率は男性で 8.9%、女性で 8.1%と他の癌と比べ、著名に予後が悪いことが知られています。膵癌のリスクファクターには喫煙や生活習慣病など様々なものがありますが、その中でも慢性膵炎のリスクレベルは 13.3～16.2 倍と非常に高いことが知られています(表1)。そのため、慢性膵炎に対し、膵癌発症前の段階からの介入が重要になります。慢性膵炎では腺房細胞から膵管への化生変化を示す ADM や前がん病変である PanIN が発現し、段階的に膵癌になっていくことが判明しています。膵癌へと至る遺伝子変化に関する研究は非常に多数報告されており、特に膵癌では Kras、P53、SMAD4、CDKN2A の遺伝子変化が良く知られており、Kras の変異は90%以上の膵癌で見られます。しかし、膵炎から膵癌への初期変化である ADM や PanIN へと至る変化についてはあまり知られていません。

	因子	リスクレベル
嗜好	喫煙	1.7~1.8倍
	飲酒	1.1~1.3倍
生活習慣病	糖尿病	1.7~1.9倍
	肥満	1.3~1.4倍
膵疾患	慢性膵炎	13.3~16.2倍
	膵管拡張	6.4倍
その他	胆石	1.7倍
	C型肝炎	1.5倍

膵癌診療ガイドラインより改変

表 1　膵癌のリスクファクター

目的

本研究では、膵炎発症膵癌の早期の ADM や Law-gradePanIN 病変に起こる分子病理学的変化をマウスモデルとプロテオーム解析を用いて検討し、早期の治療標的やマーカーを確立させることを目的としています。

方法

Pdx1-Cre;$Kras^{G12D/+}$(KC)マウスと Wtマウスそれぞれに生理食塩水を投与する control 群(Wt-cont, KC-cont)とセルレイン投与群(50 μg/kg/time)、(Wt-CL, KC-CL)を設定し、それぞれ 1 時間ごとに 8 回の腹腔内投与を 2 日間行い、投与の72時間後に膵臓を採取しました。

採取した膵組織は一部を凍結回収し、残りはホルマリン固定を行いました。ホルマリン固定を行った組織については組織学的解析を行いました。また、凍結回収した組織はタンパクを抽出し Whole プロテオーム解析を行う検体と、TiO_2 を使用したカラムにリン酸化タンパクを結合させて濃縮して回収したのち、リン酸化プロテオーム解析にを行う検体に分けて解析を行いました。

結果

① 膵組織の組織学的解析

肉眼的には Wt-cont 群と Wt-CL 群ではあまり大きな変化は見られませんでしたが、KC マウスでは軽度の腫大がみられ、さらに KC-CL 群では、高度な浮腫と種大が認められました。膵重量に

ついても、KC-CL 群は他群と比較し、有意に増大していることがわかりました(図1、2)。組織学的な検体においては、に関して、Caerulein 投与群では ADM の出現が確認され、Kras 変異群では PanIN を認めました。さらに、KC-CL 群では ADM と PanIN の両者を確認し、ADM の面積は他の群と比べ、有意な増大を認め、ADM と PanIN の両者を足し合わせた面積についても KC-CL 群で著名な面積の増大を確認しました(図1、3)。

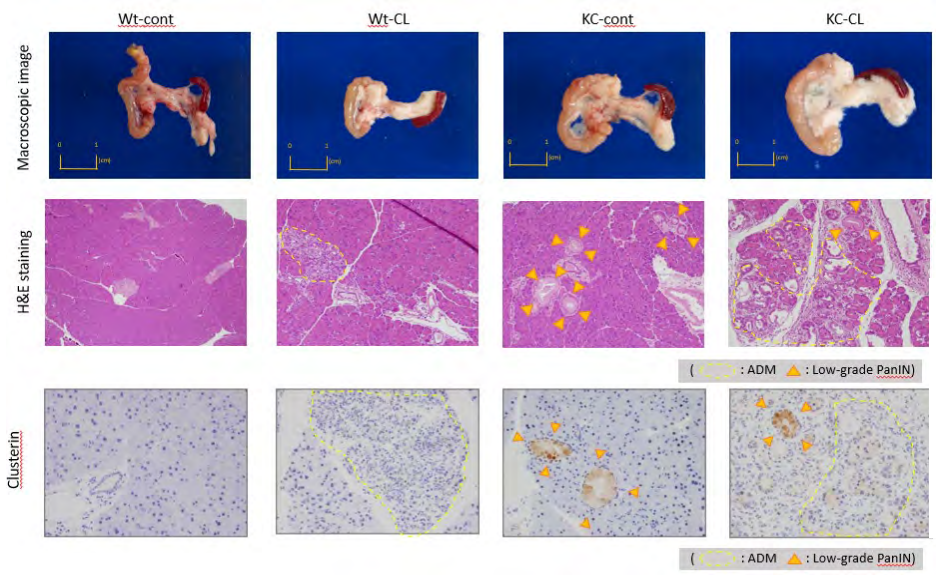


図 1 各群における膵像の肉眼像、組織像(HE 染色、免疫染色(クラスタリン))

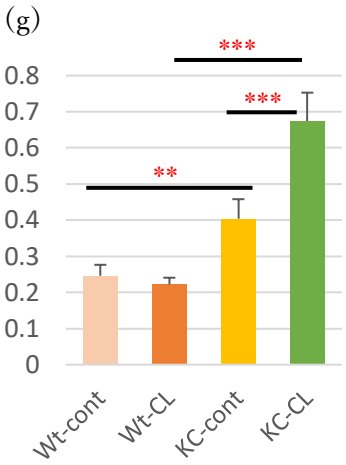


図 2 各群膵重量の平均

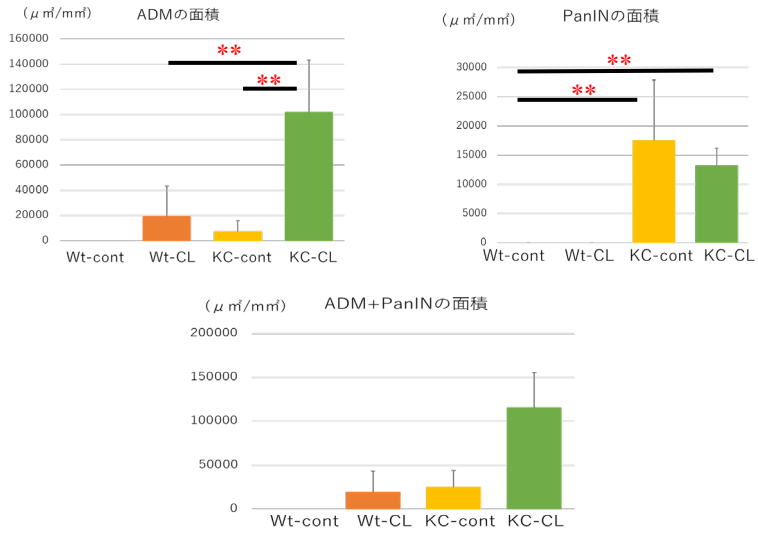


図 3 各群の ADM、PanIN、ADM+PanIN の面積

② Whole プロテオーム解析

各群 1 匹ずつプロテオーム解析を行った結果、Whole プロテオーム解析で 1482 個のタンパクが同定でき、CL 投与により Wt、KC 両方において 1.5 倍以上上昇したタンパクが 56 個、Kras 変異により cont 群、CL 群の両方で 1.5 倍以上上昇したタンパクが 188 個存在し、どちらの条件もみたしているタンパクが 29 個見つかりました。その中には、エンドサイトーシスに重要な役割を果た

し、慢性膵炎に関与するクラスタリン、膵腺房細胞に発現し、慢性膵炎などの炎症性変化に反応する Reg3b、Reg2、Reg3g などの RegFamily、膵管構造に発現する骨格タンパクである Krt19、8 などが含まれていました。(図4)

また、Whole プロテオーム解析で検出したタンパクの一つであるクラスタリンについて、免疫染色を行った結果、ADM や Low-gradePanIN 領域で発現が上昇していることがわかりました。その結果、クラスタリンが陽性の面積については、Kras の発現やセルレインの投与において有意に上昇していることがわかりました(図1、5)。

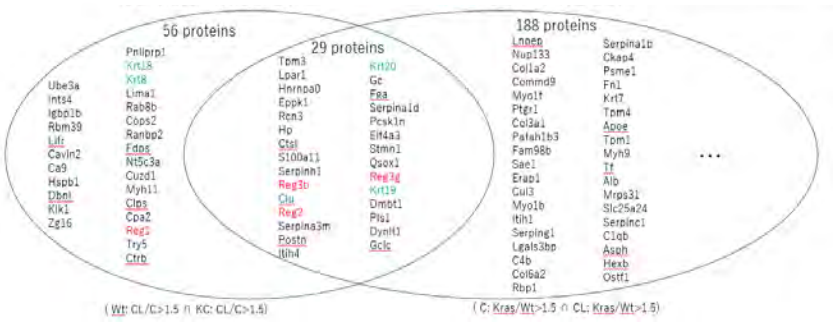


図 4 Whole プロテオーム解析の結果

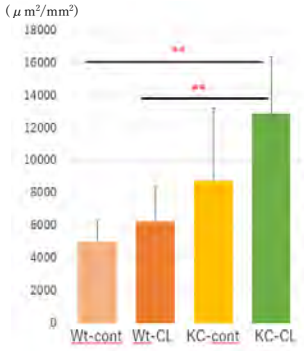


図 5 各群のクラスタリンの面積

③ リン酸化プロテオーム解析

各群 1 匹ずつ、リン酸化プロテオーム解析を行った結果798種類のタンパクが検出できました。KC-CLマウスとWt-cont マウスを比較した結果、上昇したリン酸化タンパクにはオステオポンチンや Krt8などが含まれていました。これらのデータをもとに特定したリン酸化部位と結合するキナーゼモチーフをスコア化し、リン酸化タンパクに結合しうるキナーゼタンパクを予測し、ボルケーノブロットを作成しました。その結果、KC-CL 群で上昇しているリン酸化タンパクは得られなかったものの、PLK2、PLK3 は有意に減少していることがわかりました。そのほかにも BMPR キナーゼや GRK キナーゼなどが低下していることがわかりました。(図6)

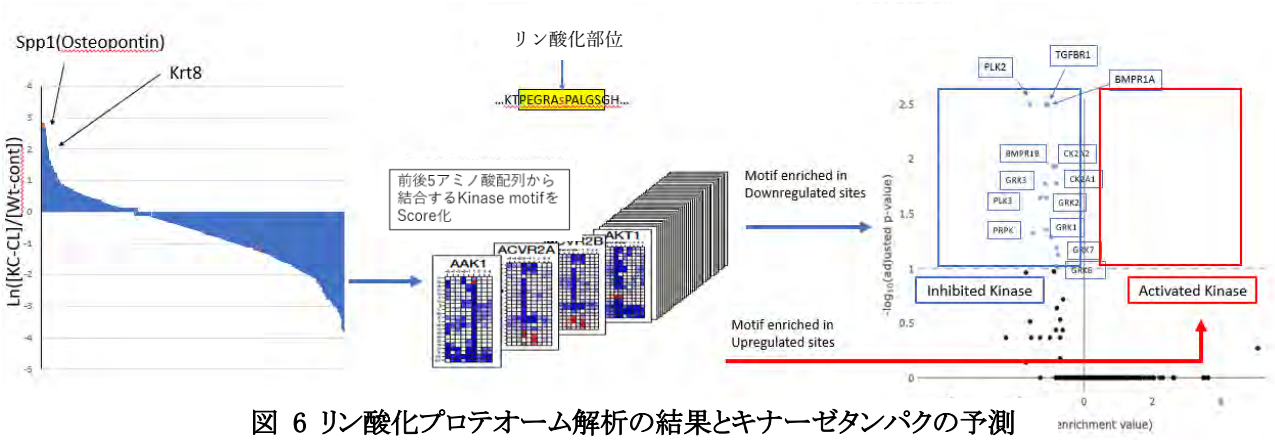


図 6 リン酸化プロテオーム解析の結果とキナーゼタンパクの予測

考察

今回用いたマウスモデルは膵炎で起きる初期変化の各段階を再現でき、そのタンパク変化はWholeプロテオーム解析でも検出可能であった。また、リン酸化プロテオーム解析でみられたPLK、BMPR、GRK 経路の有意な減少は慢性膵炎から膵癌への移行の初期段階に関係していると考えられる。今後、プロテオーム解析について解析数を増やし、リン酸化プロテオームの結果と併せて、更なる詳細なパスウェイ解析を行っていく予定である。

参考文献

・国立がん研究センターホームページ ： https://www.ncc.go.jp

・膵癌診療ガイドライン（2022 年版） 日本膵癌学会膵癌診療ガイドライン改訂委員会

・Brown JW, Cho CJ, Mills JC. Paligenosis: Cellular Remodeling During Tissue Repair. Annu Rev Physiol. 2022. 10;84:461-483.

・Marstrand-Daucé L, Lorenzo D, Chassac A, Nicole P, Couvelard A, Haumaitre A. Acinar-to-Ductal Metaplasia (ADM): On the Road to Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) and Pancreatic Cancer. Int J Mol Sci. 2023. 9;24(12):9946

・Johnson JL, Yaron TM, Huntsman EM, Kerelsky A, Song J, Regev A et al. An atlas of substrate specificities for the human serine/threonine kinome. Nature. 2023. 613(7945):759-766.

種々の腫瘍における CD70・CD27 の発現解析と大腸線維芽細胞における CD70 の機能解析

実験病態病理学　栗本真緒（No.29）

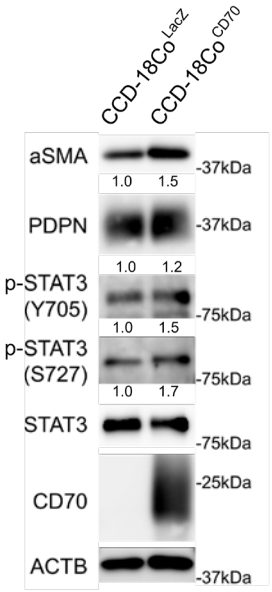
【目的】
CD70-CD27 経路を標的とした免疫療法の適応疾患拡充のため、CD70 陽性腫瘍性疾患の網羅的解析、同定を目指している。また、大腸癌 CAF における CD70 発現の意義を類推すべく、大腸線維芽細胞をモデルとして使用し、CD70 の機能解析を行った。

【背景】
CD70 は生理的状態では、活性化 T 細胞、B 細胞、成熟樹状細胞などに限定的に発現している[1,2]。また、CD27 は T 細胞、B 細胞、NK 細胞など、幅広いリンパ系細胞に発現している。通常体内では、CD70-CD27 シグナル伝達は NFκB 経路を介して T 細胞の増殖と分化を促進する際に共刺激的な役割を果たし、免疫機能を正に制御する働きがあるとされる[2,3,4]。しかし、腫瘍細胞上の異常な CD70 発現がいくつかの悪性腫瘍で報告されており[4,5,6]、いくつかのメカニズムを通じて腫瘍細胞の免疫逃避と増殖・浸潤等を亢進させることが示唆されている[7,8]。そこで、CD70を標的とした免疫療法への応用が期待されている[9,10]。

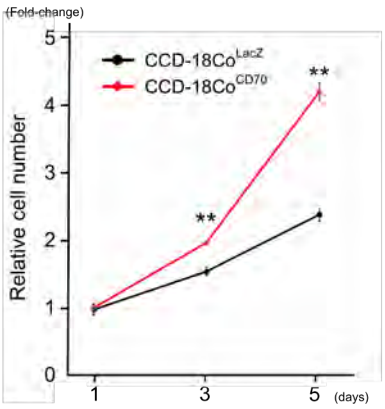
【方法】
原発性大腸癌 269 例を愛知医科大学病院から、膵臓癌 63 例を名古屋市立大学大学院研究科から、その他（上皮性、非上皮性、リンパ系）2066 例の腫瘍を米国国立がん研究所病理研究室から、腫瘍組織アレイ標本の状態で提供を受け、CD70、および CD27 の発現を免疫組織学的に評価した。培養細胞は、ヒト結腸線維芽細胞 CCD-18Co を ATCC から購入し、*CD70* とその対照として *LacZ* 遺伝子を遺伝子導入したものを使用した。

【結果】
分析した上皮腫瘍の中で、CD70は明細胞腎細胞癌（74%）が最も高い発現率を示した。胸膜中皮腫も比較的高い CD70 発現を呈した（50%）。間葉系腫瘍の中では、悪性末梢神経鞘腫瘍が最も多く（23%）、他の間葉系腫瘍でも、まれに CD70 発現が見られた。リンパ腫では、CD70は腫瘍性リンパ球で頻繁に発現があり、その中でもホジキンリンパ腫が最も多く、67％で発現が確認された。さらにリンパ腫でのみ、CD70-CD27 の共発現が、9～18%の症例で観察された。
大腸線維芽細胞を使った実験では、CD70によって 活性化線維芽細胞マーカーと考えられるαSMA、PDPNの発現が誘導され、リン酸化 STAT3 の発現亢進も確認された（図1）。また、CD70 は大腸線維芽細胞の増殖・浸潤・遊走能も有意亢進させた（図２．３）。

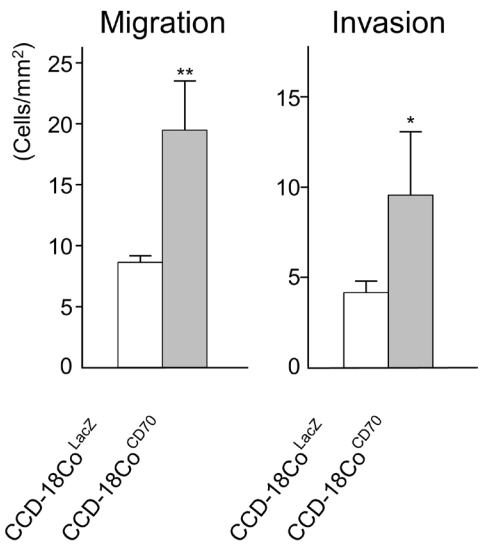
図



図



図



【考察】

腎淡明細胞癌、悪性胸膜中皮腫、悪性末梢神経鞘腫は高いCD70発現を呈し、これらの腫瘍を標的とするCD70免疫療法の可能性が期待される。また、CD70は大腸線維芽細胞の CAF 様遺伝子発現の誘導、細胞増殖能・浸潤遊走能の亢進を誘導したことから、大腸癌・膵癌 CAF を標的とした CD70 免疫療法の可能性も期待される。

【参考文献】

1) Nolte MA, et al., Immunol Rev 2009;229:216-231
2) Jacobs J, et al., Pharmacol Ther 2015;155:1-10
3) Duggleby RC, et al., Immunology 2007;121:129-139
4) Yang ZZ, et al., Blood 2007;110:2537-2544
5) Law CL, et al., Cancer Res 2006;66:2328-2337
6) Wischhusen J, et al., Cancer Res 2002;62:2592-2599
7) Nilsson A, et al., Exp Hematol 2005;33:1500-1507
8) Ranheim EA, et al., Blood 1995;85:3556-3565
9) Carsten Riether *et al.*, Nat Med. 2020; 26:1459-1467
10) David C. Smith *et al.*, Invest New Drugs. 2019; 37:297-306

遺伝子疾患の患者のゲノムに CRISPR-Cas を使った治療用 DNA を挿入する治療法

実験病態病理学　21 番　河上恭太朗

目的、背景

私たちの研究の最終的な目標は、CRISPR-Cas システムを用いて遺伝的欠損を修正するための治療用 DNA を患者に導入することである。昨年度の研究で、CRISPR-Cas が標的遺伝子の切断、治療用 DNA の導入を試みたが、失敗してしまった。その原因として、標的 DNA が CRIPER-Cas9 によって切断されるときに、治療用 DNA が切断部付近にある確率がとても低いことが挙げられる。Cas9 に DNA 結合ドメインを付加した場合でも、治療用 DNA に結合した Cas9 が標的部位を切断した Cas9 である確率が低すぎて、効果がなかった。

方法、結果

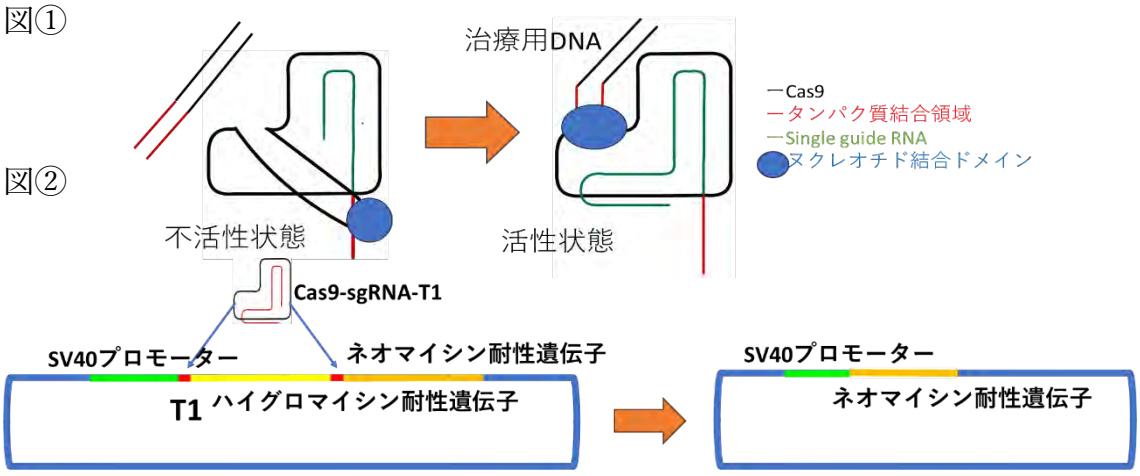
前述した昨年度の結果より、本年度は標的 DNA を切断する CRISPR-Cas 複合体に治療用 DNA が結合する確率を高める手段を試した。治療用 DNA を結合しない CRISPR-Cas 複合体をすべて不活性化し、治療用 DNA を結合している複合体を活性化させた。その原理は、sgRNA にタンパク質結合領域が、Cas9 にヌクレオチド結合ドメインが付加され、Cas9 のヌクレオチド結合ドメインが sgRNA のタンパク質結合領域と結合することで、CRISPR-Cas9 複合体は不活性化し、DNA を切断することができなくなるというものである。その後、治療用 DNA にタンパク質結合領域を追加し、治療用 DNA を結合している複合体を活性化させた（図①）。このタンパク質結合領域は、sgRNA のタンパク質結合領域よりも高い親和性で Cas9 ヌクレオチド結合ドメインと結合する。標的 DNA を切断する CRISPR-Cas 複合体に治療用 DNA が結合する確率を高める手段を試した後、Cas9 が正常な働きをしたかどうかを確かめるテストシステムの構築をした。　このシステムは 2 つの sgRNA-T1、sgRNA-T2 を含む CRISPR-Cas 複合体を生成する。図②のように、Cas9 による DNA の切断に成功すれば、Cas9-sgRNA-T1 は T1 標的部位を切断し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を除去して、ネオマイシンに耐性を持つ細胞が生成される。

考察

今後の研究では、このシステムが正常機能するかどうかを確認し、治療用 DNA を追加した CRISPR-Cas 複合体を作成する。機会があれば実施したいと考えている。

図①

図②



遺伝子疾患の患者のゲノムに

CRISPER-Cas を使った治療用 DNA を挿入する方法

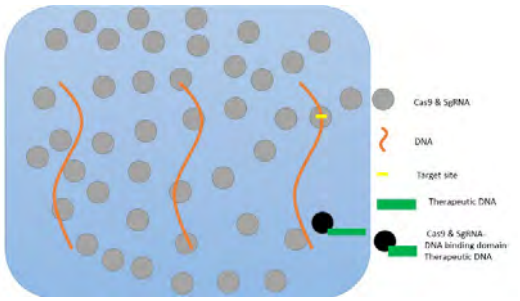
実験病態病理学　津田特任教授研究室
17 番　小沼文香

背景

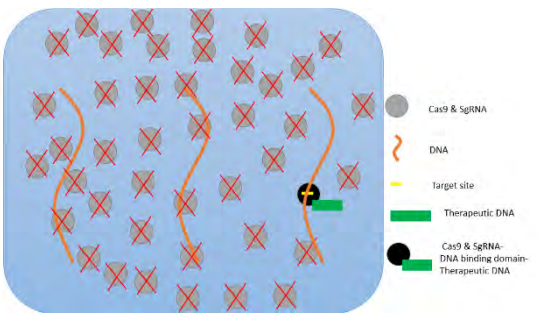
クローン病などの炎症性疾患であり、腸バリア機能障害を引き起こす患者の染色体の突然変異によって常駐微生物が腸上皮へ侵入することができるようになるために引き起こされると考えられているがこの治療の一つとして DNA 編集があげられる。DNA 編集を行うことができる酵素は CRISPR-Cas9 以外にも Meganuclease,Talen,Zinc Finger Nuclease 等が存在する。これらのうち後者 3 つは DNA に結合するタンパク質を用いる。したがって、異なる DNA 配列を標的とする必要がある場合は、タンパク質を再構築し、新しい標的を認識して結合する必要がある。対照的に、CRISPR-Cas システムは関連する RNA を使って DNA に結合するため、異なる DNA 配列を標的とする場合はタンパク質ではなく RNA のみを変更する必要があり、より容易であるために有用性が注目されている。

目的

CRISPER-CAS は遺伝子編集に用いられる RNA を誘導する酵素である。現在 CRISPER-Cas システムを治療に利用する臨床試験が数多く完了し、進行中である。しかし、これらの臨床試験は CRISPER-Cas を用いて標的遺伝子を不活化/ノックアウトするものである。昨年度までの学生実習で、CRISPER-Cas を用いて強化型蛍光タンパク(EGFP)を発現する DNA 配列を in vitro で標的細胞のゲノムに導入することを試みた。しかし、DNA を切断した際に Therapeutic DNA が物理的に存在する頻度が低かったため、この実験はすべて失敗に終わり(図1)、本年度は、これに対する解決策として Therapeutic DNA に結合していない CRISPER-Cas 複合体をすべて不活化する(図2)ということ考た。



(図1)これまでの研究
CRISPER-Cas 複合体と Therapeutic DNA の混合物が標的部位と結合する可能性は極めて低い。



(図2)本年度試みている解決策
DNA に結合していない CRISPR-Cas 複合体をすべて不活化すること

方法

CRISPR-Cas エンドヌクレアーゼ複合体の一部であるシングルガイド RNA(sgRNA)付加されたタンパク質結合領域が Cas9 の切断活性を抑える能力②Therapeutic DNA に付加されたタンパク質結合領域が Cas9 を再活性化させる能力を試験するために使用される 2 つの異なるプラスミドを構築した。

結果・今後の課題

構築したプラスミドのひとつは 2 つの異なる RNA と Cas タンパク質をコードし CRISPR-Cas9 複合体を生成する。構築したもう一つのプラスミドはすでに作られた CRISPR-Cas9 複合体の標的となる。我々は現在、後者のプラスミドを細胞ゲノムに挿入した細胞の単一クローンを育てることにより、遺伝子に限定されない CRISPR-Cas システムを構築しようとしている。

血圧レベルの静水圧による心筋細胞の収縮動態への作用

薬理学分野　57　張夏智
84　村田景星

1.　背景

心臓は常に収縮・弛緩を繰り返しており、細胞内 Ca^{2+}濃度の変化によって制御されている。これまでの研究から、心筋細胞のカルシウムハンドリングは伸展刺激などのメカニカルストレスによって修飾され、心筋細胞の収縮動態を変化させることが知られている。伸展刺激に加え、血管内や組織内にかかる静水圧もまた心筋細胞の重要な機能修飾因子であると考えられる。静水圧とは血液や間質液などから負荷される圧であり、毛細血管などで起こる間質と血管内での水のやり取りの駆動力として重要である。心臓において高圧状態が長期間持続すると、心肥大やそれに伴う収縮力の増大が生じ、末期には心不全などの病的変化に陥る。この病的変化は、心臓に発現する機械感受性陽イオンチャネルである Transient Receptor Potential Canonical 6 (TRPC6) の活性化による Ca^{2+}流入が原因だといわれている [1)]。このような圧力による病的な側面の研究は数多くなされているが、それらは圧負荷モデルマウスなどを使った生体レベルの実験が主であり、細胞レベルで静水圧が心筋細胞動態にどのように影響するかは、高静水圧負荷環境で心筋細胞の収縮動態をリアルタイムに測定する方法が確立されていなかったため、これまで明らかになっていない。

2.　目的

上記背景に基づいて、本研究では下記の 2 つを目的とする

1）新規開発した静水圧顕微鏡を用いて、血圧レベルの静水圧負荷が心筋細胞の収縮動態にどのように作用するのかを明らかにする。

2）静水圧による心筋細胞への作用機序に TRPC6 がどのように関与しているかを明らかにする。

3.　材料および方法

本研究では、静水圧を負荷しながら電気的に拍動させた細胞をリアルタイムに観測できる静水圧顕微鏡を用いて、静水圧負荷環境でのマウス心室筋細胞動態の変化を観測した。その詳細な方法を以下に記す。

- 使用したマウス、溶液および薬剤

マウス：129/Sv, 9～16 週齢, 雄の野生型 (WT) と $Trpc6^{-/-}$マウス

心筋細胞単離用溶液（Solution A）：128 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.18 mM $MgSO_4$, 1.18 mM KH_2PO_4, 10 mM HEPES, 20 mM taurine, 11 mM glucose

Normal Tyrode 溶液（NT 溶液）：140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1.8 mM $MgCl_2$, 5.0 mM HEPES, 11 mM glucose

薬剤：GsMTx-4 (2 μM), BI749327 (0.2 μM)

- 成体マウス心臓からの心筋細胞の単離

マウスにヘパリン 100 IU を腹腔注射した後、30 分間静置した。その後、マウスに吸入麻酔薬 (イソフルラン) を過剰吸入させ、呼吸及び心停止を確認し、開胸して心臓を素早く摘出した。その

大動脈から逆行性に18Gのカニューラを挿入し、ランゲンドルフ灌流装置にセットし、10 mM BDMを含む Solution A を用いて 37℃で 4 分間灌流した。そして、コラーゲナーゼとプロテアーゼが混合された Liberase を用いて、さらに 3〜6 分間灌流した。その後、酵素溶液内で心筋組織を 37℃で 10〜20 分間インキュベーションして心室筋細胞を単離した。その単離した細胞を、室温で 30 分間静置した後、実験に使用した。

- 静水圧顕微鏡を用いた心室筋細胞への静水圧負荷

129/Sv マウスの収縮期血圧である約 120〜130 mmHg[2]に対し、高血圧レベルに相当する 200mmHg の静水圧負荷をマウス心室筋細胞に加えた。マウス単離心室筋細胞を NT 溶液で満たされた静水圧チャンバーに封入し、静水圧顕微鏡にセットした。静水圧チャンバーには電気刺激用電極と加圧用テフロンチューブが取り付けられており、それぞれに細胞を拍動させる電気刺激装置 (MyoPacer) と静水圧チャンバー内の圧力を変動させるシリンジポンプ (FP-1300、MELQUEST)、静水圧チャンバー内の圧力を計測する圧力センサー (DPS2-AP-M8、SURPASS INDUSTRY CO., LTD) を接続した。そして、電気刺激 (1 Hz, 20 V) を与えることにより心室筋細胞を拍動させ、大気圧下で心室筋細胞の収縮能の指標であるサルコメア長の変化を測定した後、高静水圧下 (200 mmHg) で同様にサルコメア長の変化を記録した。 さらに、圧を解放して大気圧下で再度、サルコメア長の変化を測定した。その際のサルコメア長の変化の測定と解析には Fiji/ImageJ と各専用プラグインソフトを使用した。次に、機械感受性チャネル阻害剤 (GsMTx-4) と TRPC6 選択的阻害剤 (BI749327) を用いた薬理学的阻害実験を行った。WT マウスの心室筋細胞に静水圧負荷 (200 mmHg) を行った後、GsMTx-4 や BI749327 を含む NT 溶液に置換し、同一細胞に対して同様の静水圧負荷を行い、サルコメア長の変化を測定した。

4. 結果

今回の研究で行った実験の結果を以下に記す。

- WT マウス心室筋細胞への高静水圧負荷の作用

心室筋細胞に静水圧を加えたときの細胞長の変化について、心筋細胞の弛緩時のサルコメア長を比較した。大気圧下と高静水圧負荷 (200 mmHg) 下、圧解放後の大気圧下でそれぞれ、1.767 ± 0.010, 1.769 ± 0.010, 1.770 ± 0.012 μm と有意な変化は認められなかった。次に、心室筋細胞に高静水圧負荷した際に収縮力がどのように変化するのかを検討するため、大気圧及び高静水圧負荷、圧解放後における心筋細胞のサルコメア長の変化を比較した。大気圧下と比べて高静水圧負荷下では 4.3 ± 1.6 %の収縮力の有意な増大（圧誘発性収縮力反応）が見られ、高静水圧負荷を解放して大気圧に戻すと収縮力は初期状態に戻った。また、高静水圧負荷の心筋細胞の収縮波形への影響を詳細に検討するため、大気圧下と高静水圧負荷下で収縮波形のパラメータである Time to peak contraction (Tmax) と Relaxation time を比較した。大気圧と高静水圧で、それぞれ Tmax は 105.1 ± 4.3, 104.4 ± 4.1 ms、Relaxation time は 90.21 ± 6.60, 91.58 ± 7.50 ms であり、どちらも大気圧下と高静水圧負荷下で有意な変化は認められなかった。

- 機械感受性チャネル阻害剤と TRPC6 阻害剤の圧誘発性収縮力増大反応に対する作用

機械感受性チャネルが圧誘発性収縮力増大反応に関わっているかどうかを検討するため、機械感受性チャネル阻害剤（GsMTx-4）を投与した。その結果、GsMTx-4 により圧誘発性収縮力

増大反応は抑制された。次に、圧誘発性収縮力増大反応における TRPC6 の関与を明らかにするために、TRPC6 選択的阻害剤（BI749327）の作用を検討した[3]。その結果、BI749327 投与により、高静水圧負荷下での収縮力の増大はほぼ消失した。

- TRPC6 ノックアウトマウス心室筋細胞への高静水圧負荷の作用

薬理学的阻害実験の結果から、TRPC6 が圧誘発性収縮力増大反応に関与していると考えられた。そのため、Trpc6$^{-/-}$マウス心室筋細胞でも圧誘発性収縮力増大反応が抑制されるか検討した。WT マウス心室筋細胞では、高圧負荷により有意に上昇した収縮力が、Trpc6$^{-/-}$マウス心室筋細胞では完全に抑制されていた。

5. 考察

- WT マウス心室筋細胞への高静水圧負荷の作用

血管内皮細胞に対して静水圧を加えると、水チャネルを介した水の移動が生じて細胞内の水が排出され、細胞径が小さくなるという報告がある[4]。しかし、本研究の高静水圧条件では、弛緩状態のサルコメア長変化は生じず、細胞長は短縮しなかった。心筋細胞内は収縮タンパク質であるアクトミオシンが高密度に存在しており、静水圧負荷により水チャネルを介した水の移動が起きていたとしても、細胞の体積変化には繋がらなかったと考えられる。一方、200 mmHg の静水圧負荷により、心筋細胞の収縮力は増大した。その要因として、ミオシンの Ca^{2+}感受性の上昇[5]と細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇[6]の二つが考えられる。Yamaguchi らの先行研究では、高静水圧負荷下で Ca^{2+}トランジエントの増大が観測されているため、圧誘発性収縮力増大反応は細胞内 Ca^{2+}濃度上昇によって生じていると考えられる。また、心筋細胞の収縮波形のパラメータ解析から、静水圧負荷によって Tmax と Relaxation time は変化しなかった。Tmax は筋小胞体からのリアノジン受容体 (RyR) を介した Ca^{2+}放出を含む Ca^{2+}誘発性 Ca^{2+} 遊離などの速度、Relaxation time は Na^{+}/Ca^{2+} 交換輸送体 (NCX) を介した細胞外への Ca^{2+}流出や筋小胞体カルシウムポンプ (SERCA) を介した筋小胞体への Ca^{2+}の取り込みなどの速度に相当すると考えられる。そのため、静水圧負荷は RyR、NCX、SERCA などには影響していない可能性が高い。

- 機械感受性チャネル阻害剤と TRPC6 阻害剤の圧誘発性収縮力増大反応に対する作用

GsMTx-4 が圧誘発性収縮力増大反応を抑制したことから、静水圧により機械感受性チャネルが活性化し、その活性化が圧誘発性収縮力増大反応の発生に関与していると考えられる。GsMTx-4 は、TRPC チャネルなどの機械感受性チャネルを阻害することが知られている[7]。心臓では TRPC チャネルの 1 つである TRPC6 が高発現しており、TRPC6 は伸展刺激による心室筋の収縮力制御に関与している[1]。TRPC6 選択的阻害剤により、圧誘発性収縮力増大反応は有意に抑制された。このことから、TRPC6 が圧誘発性収縮力増大反応の制御メカニズムの重要な因子である可能性がある。

- Trpc6$^{-/-}$マウス心室筋細胞への高静水圧負荷の作用

TRPC チャネル阻害剤の多くは細胞毒性がため、圧誘発性収縮力増大反応が TRPC6 依存的な現象かどうかを薬理学的阻害実験から結論づけることは難しい。そこで、TRPC6 ノックアウトマウスの心室筋細胞を用いた実験を実施した。その結果、TRPC6 ノックアウトマウスの心室筋細胞で

は、TRPC チャネル阻害実験と同様に、圧誘発性収縮力増大反応が抑制された。Yamaguchi ら先行研究では、Trpc6$^{-/-}$マウス心室筋細胞では高静水圧負荷により細胞内 Ca^{2+}濃度が変化しないことを確認している。そのため、圧誘発性収縮力増大反応の発生機序に TRPC6 を介した直接的もしくは間接的な Ca^{2+}の流入による細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇が関与していると考えられる。

6. 結論

本研究では、静水圧顕微鏡を用いて 200 mmHg という高血圧レベルの静水圧が心室筋細胞の収縮力を増大させるということを初めて観察した。その発生メカニズムには、機械受容チャネルの一つである TRPC6 を介して直接的に細胞内へ Ca^{2+}を流入させる経路や TRPC6 を介した Na^{+}の流入が NCX による Ca^{2+}の細胞外への排出を抑制している経路などの関与が考えられる。

本研究で使用した静水圧顕微鏡は、心筋細胞の血圧受容メカニズムの完全解明に大きく寄与すると考えられる。また、TRPC6 選択的阻害剤を応用することで、高血圧等で生じる病的な心肥大や心不全等の圧誘発性心疾患に対する新規治療・予防法開発につながることが期待される。

7. 参考文献

1) Yohei Yamaguchi, et al. (2017). Role of TRPC3 and TRPC6 channels in the myocardial response to stretch: Linking physiology and pathophysiology. Proc Biophys Mol Biol, 130(Pt B), 264-272. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.06.010.
2) Christian F Deschepper, et al. (2004). Characterization of blood pressure and morphological traits in cardiovascular-related organs in 13 different inbred mouse strains. J Appl Physiol, 97(1):369-76. doi: 10.1152/japplphysiol.00073.2004
3) Brian Lee Lin, et al. (2019). In vivo selective inhibition of TRPC6 by antagonist BI 749327 ameliorates fibrosis and dysfunction in cardiac and renal disease. Proc Natl Acad Sci USA, 116 (20), 10156-10161. doi: 10.1073/pnas.1815354116.
4) Hongyuan Jiang, et al. (2013). Cellular pressure and volume regulation and implications for cell mechanics. Biophys J, 105(3), 609-19. doi: 10.1016/j.bpj.2013.06.021.
5) A M Gordon, et al. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. Physiol Rev, 80(2), 853-924. doi: 10.1152/physrev.2000.80.2.853.
6) David A Eisner, al et. (2017). Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. Circ Res, 121(2), 181-195. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310230.
7) Radhakrishnan Gnanasambandam, et al. (2017). GsMTx-4: Mechanism of Inhibiting Mechanosensitive Ion Channels. Biophys J, 112 (1), 31-45. doi: 10.1016/j.bpj.2016.11.013.

報告レポート

Pannexin3とP2X受容体を介した骨芽細胞分化制御機構の解明

薬理学分野
63 丹羽 彩乃
75 堀場 大紀

【意義・背景・目的】

骨組織の恒常性は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により維持されている。間葉系幹細胞から前骨芽細胞を経て骨芽細胞へと分化するため、骨芽細胞は、前骨芽細胞から骨芽細胞への正常な分化は骨組織の恒常性制御において重要な役割を果たしている。細胞内 Ca^{2+}シグナルは、非古典的 Wnt 経路や細胞外からの Ca^{2+}流入によって活性化し、CaMKⅡやCalcineurinといった細胞内 Ca^{2+}依存性酵素を介して、骨芽細胞の機能制御に関与することが報告されている [1)]。本研究室では、骨芽細胞分化における ATP 受容体 P2X を介した Ca^{2+}シグナルの役割を明らかにすることを目的に研究を行っている。

これまでの研究で、P2X4 が Pannexin などのヘミチャネルから放出される ATP によって刺激されることで Ca^{2+}流入を誘導し、骨芽細胞分化を促進することを明らかにしている。しかしながら、P2X4 阻害薬 5-BDBD 処置は、P2X 刺激薬 BzATP 誘導性 Ca^{2+}濃度上昇を完全には抑制しなかった。この結果は、骨芽細胞における P2X4 以外の P2X サブタイプの機能発現を示唆するものである。

P2X サブタイプの中で P2X7 は、T 細胞の分化を促進すること [2)]、P2X7 が骨の恒常性維持に寄与していること [3)]が報告されている。そこで本研究では、P2X7 を介した細胞内 Ca^{2+}シグナル制御と骨芽細胞分化との関係に着目し、骨芽細胞分化制御における P2X7 の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. 細胞培養

マウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 を 10 %牛胎児血清、100 U/mL ペニシリン及び 0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加した MEM-α 培地で培養した(37℃、5 % CO_2)。MC3T3-E1 細胞を 50 μg/mL アスコルビン酸、10 mM β グリセロリン酸及び 10 nM デキサメタゾンを含む骨芽細胞分化培地で 3 日及び 7 日間培養することにより骨芽細胞へと分化させた。

2. 初代培養骨芽細胞

5 週齢の雄性 C57BL/6J マウスの大腿骨、脛骨から骨髄細胞を単離して通常培地へ播種した。3 日間培養後、細胞をよく洗浄し、培養ディシュに接着している細胞を間葉系幹細胞として実験に用いた。間葉系幹細胞を再播種し、骨芽細胞分化培地中で 1 週間培養することで骨芽細胞へと分化させた。

3. siRNA のトランスフェクション

LipofectamineRNAiMAX を用いて、MC3T3-E1 細胞に 30 nM siRNA(control, P2X4, P2X7, Pannexin3)をトランスフェクションし、通常培地で培養した。また、トランスフェクション 24 時間後に分化誘導培地に置換して骨芽細胞分化を誘導した。

4. 細胞内 Ca^{2+}濃度測定(Ca^{2+}イメージング)

本実験では Ca^{2+}蛍光指示薬として、fura-2 acetoxymethyl(fura-2 AM)を使用した。

測定用チャンバーに細胞を付着させたガラス片を固定し、10 μM fura-2 AM を添加し、45 分～60 分間室温にて静置して細胞に負荷をした。その後、細胞外溶液で細胞に添加した過剰の fura-2 AM を 10 分間洗浄後、測定を開始した。

5. リアルタイム PCR 法

Quant studio 12K Flex Real-Time PCR システムを用いて、定量的リアルタイム PCR を行った。骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)の遺伝子特異的プライマーは、Primer Express ソフトウェアを用いて設計した。発現量は、GAPDH の発現量で規格化した。

6. ALP 活性測定

MC3T3-E1 細胞およびマウス初代培養骨髄由来骨芽細胞を 24 ウェルプレートにそれぞれ 1 ウェル当たり 5 万細胞、10 万細胞播種し、分化誘導培地で 1 週間培養した。ALP 活性の測定は LabAssay ALP キットを用いた。

7. 使用薬物

BzATP: P2X 受容体刺激薬
5-BDBD: P2X4 選択的阻害薬
A804598: P2X7 選択的阻害薬
Carbenoxolone (CBX): Pannexin 阻害薬

【実験結果】

7 日間分化誘導した MC3T3-E1 細胞を用いて、P2X 受容体刺激薬 BzATP(100 μM)誘導性 Ca^{2+}濃度上昇に対する P2X4 阻害薬 5-BDBD(10 μM)の作用を検討した。その結果、BzATP 誘導性 Ca^{2+}濃度上昇は 5-BDBD 前処置により有意に抑制されたが、完全には抑制されなかった。このことから、BzATP 誘導性 Ca^{2+}流入に 5-BDBD 非感受性成分が存在することが示された。5-BDBD 非感受性成分が P2X7 を介した Ca^{2+}流入であるかどうか検討するために、siRNA トランスフェクションにより P2X4 及び P2X7 の発現を抑制した。P2X4 及び P2X7 発現抑制細胞を 7 日間分化誘導したところ、P2X4 だけではなく P2X7 発現抑制細胞でも BzATP 誘導性 Ca^{2+}濃度上昇が有意に抑制された。この結果は、分化した MC3T3-E1 細胞において、P2X7 が BzATP 誘導性 Ca^{2+}流入を構成する要素として含まれる可能性を示している。

そこで、P2X7 受容体に加えて、ATP を放出する Pannexin3 の発現を抑制し、P2X7 受容体の骨芽細胞分化への寄与について検討した。分化過程を経時的に観察するために 3 日または 7 日間分化誘導した(Day3、Day7)後、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)の遺伝子発現をリアルタイム PCR により検討した。その結果、分化誘導により ALP の発現量が経時的に増加した。また、Control siRNA 導入細胞(対照群)と比較して、P2X7 及び Pannexin3 発現抑制細胞において ALP 発現量が有意に減少した。

ALP の遺伝子発現量だけでなく、ALP 酵素活性に対する P2X7 の寄与について検討した。P2X7 及び Pannexin3 の発現抑制細胞を 7 日間分化誘導したところ、未分化細胞と比較して ALP 活性が有意に増加した。一方、対照群と比較して P2X7 発現抑制細胞及び Pannexin3 発現抑制細胞では、ともに ALP 活性が抑制された。

次に、P2X7 siRNA 及び Pannexin3 siRNA をそれぞれトランスフェクションした後、分化誘導時に BzATP(100 μM)を同時処置した細胞の ALP 活性を測定した。対照群において、BzATP は分化誘導による ALP 活性上昇をさらに亢進した。一方で P2X7 発現抑制細胞における ALP 活性は、vehicle 及び BzATP 処置群いずれにおいても、対照群と比

べて減少した。またPannexin3遺伝子発現抑制細胞では、抑制されていた酵素活性が、BzATPの投与により一部回復した。

初代培養骨芽細胞でも同様の結果が得られるかを調べるために、マウス骨髄由来骨芽細胞を用いて P2X7 の骨芽細胞分化に対する影響を検討した。5 週齢の雄性 C57BL/6J マウスから大腿骨、脛骨を単離した後、骨髄細胞を回収した。骨髄細胞を再播種し、3 日間培養した後、その接着細胞を間葉系幹細胞として実験に用いた。これらの細胞に P2X7 阻害薬 A804598（10 μM）、Pannexin 阻害薬 CBX（100 μM）をそれぞれ投与し、7 日間骨芽細胞分化誘導した後に ALP 活性を測定した。その結果、P2X7 阻害薬及び Pannexin 阻害薬は、いずれも ALP 活性を有意に低下させた。

【考察】

P2X7 発現抑制により P2X 刺激薬誘導性 Ca^{2}濃度上昇が減弱したことから、P2X7 が P2X 刺激薬誘導性 Ca^{2}濃度上昇における 5-BDBD 非感受性成分を構成する可能性が示唆された。さらに、MC3T3-E1 細胞における ALP 遺伝子発現測定、ALP 酵素活性測定、初代培養骨芽細胞における ALP 酵素活性測定の結果から、P2X7 受容体は骨芽細胞分化に寄与していることが示唆された。また P2X 刺激は Pannexin3 発現抑制による ALP 酵素活性の低下を部分的に回復させたことから、Pannexin3 による ATP 放出が P2X を介した骨芽細胞分化制御に一部関与することが示唆された。

P2X4 を標的とした研究結果に加えて、P2X7 の結果を踏まえると、Pannexin3 から放出された ATP は P2X4 だけでなく P2X7 も活性化させると考えられる。ATP により活性化した P2X7 は、Ca^{2+}流入を介して骨芽細胞分化の促進に寄与する可能性が示された。これまでの検討から、P2X4 は骨芽細胞分化過程において細胞質から細胞膜上へ局在を変化させることにより、ATP を効率的に受容することで骨芽細胞分化を促進することが示唆されている。P2X7 の骨芽細胞分化過程における発現量及び細胞内分布については十分な検討が行えておらず、今後の課題である。

また、P2X7 は P2X4 と比較して ATP に対する感受性が数百倍低いことが報告されている。このことから P2X4 は生理条件下における骨芽細胞機能調整に寄与する一方で、P2X7 は炎症時や細胞障害時などの細胞外 ATP が顕著に上昇するタイミングで活性化され骨芽細胞の炎症応答等に関与するのではないかと考えられる。したがって、P2X による骨芽細胞分化制御は、生理条件下に加えて病態生理条件下においても骨組織の恒常性に重要な役割を果たす可能性が考えらえる。sP2X 活性化を介した骨芽細胞分化制御機構は骨量減少を伴う骨代謝性疾患における新たな創薬標的となる可能性がある。

【参考文献】

1. Kito and Ohya, Role of K^{+} and Ca^{2+}-permeable channels in osteoblast functions, *International Journal of Molecular Sciences* (2021)
2. Érika et al, P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against Plasmodium chabaudi malaria, *PLoS Pathogens* (2017)
3. Yutong et al, P2X7 receptor acts as an efficient drug target in regulating bone metabolism system, *Biomedicine and Pharmacotherapy* (2020)

細胞集団における EB ウイルス DNA コピー数の分布を測定する

ウイルス学

岩田倫乃(8)、岸歩来(24)、関根伸(46)

1.背景

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、ガンマヘルペスウイルスに分類される DNA ウイルスであり、約 170kb のゲノムに 80 を超える遺伝子をコードしている。EBV は唾液を介して生涯にわたり B 細胞に潜伏感染するウイルスであり、世界人口の 95%の人が感染している[1]。さらに、EBV はバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、鼻咽頭癌、胃がんなど、様々な悪性腫瘍に関連する。がんに関連するウイルスには他にも HBV、HCV、HPV などがあり、ワクチンなどを使用することで制圧の見込みがあるが、EBV には特異的な治療法はまだ存在しない。EBV 関連がんは患者数が年間 1 万人 (国内) と多いために、早急な治療法開発が望まれる。

2.目的

EBV の潜伏感染状態においては、数コピーから数十コピーのウイルスゲノムが宿主染色体に組み込まれることなく、約 170kbp の環状二本鎖 DNA の形で、宿主細胞の核内に維持される 。これをエピゾームという。私たちは、EBV-DNA を細胞内から 0 にする研究に取り組んでいたが、EBV-DNA を細胞内から取り除く治療法を開発する上で、細胞集団における EBV-DNA コピー数の分布と変化を測定し、薬剤の効き目を評価しなければならない。そこで、細胞集団における EBV の DNA コピー数の分布を測定する実験系として、EBV fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法が挙げられる。EBV-FISH 法とは、EBV-DNA とプローブの DNA を結びつけ、蛍光を観察する実験系であり、EBV-DNA を細胞から取り除く治療薬の開発の前段階として必要なこの EBV-FISH 法を確立することが今回の実験の目的である。

3.方法

EBV fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を採用した。

⑴DaudiE-EBVeGFP (DaudiE) というバーキットリンパ腫の細胞株 (EBV-DNA のコピー数を各細胞あたり 1～10 個ほど保有) または Namalwa 細胞 (EBV-DNA を必ず 2 個保有) を、サイトスピン (1700rpm、4 分) により、スライドガラスへ塗沫した。

⑵プロテアーゼ処理を行い、細胞膜と核膜の透過性を高めた。これによりプローブが核内へ達しやすくなる。

⑶全 EBV ゲノムに相補的な Texas Red 標識 FISH プローブを、標本に添加した。このプローブが EBV-DNA に結合することで顕微鏡で観察するときに赤い染色が見えるようになる。

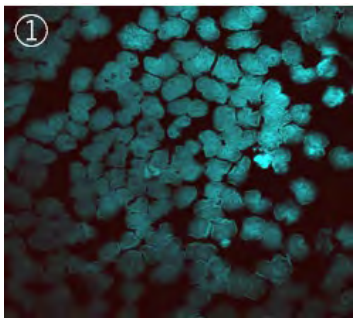
⑷標本を熱し (75℃、5 分) 、プローブと EBV-DNA を一本鎖にした。

⑸ハイブリダイゼーションを行い（37℃、16～72 時間）、プローブと EBV-DNA を結合させた。

⑹2×SSC/0.3%NP-40 に標本を浸し、EBV-DNA に結合していないプローブを洗い流した。これにより共焦点顕微鏡で観察しやすくなる。

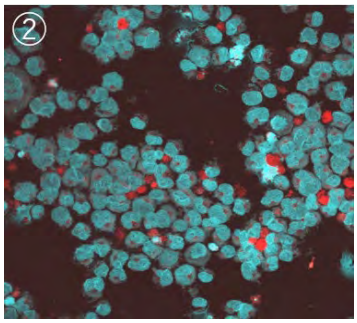
⑺DAPI（4‘6-ジアミジノ-2-フェニルインドール）を用いて細胞核を青く染色した。核全体を染色することで EBV-DNA が核内に対応しているかどうかを確認することができる。その後、共焦点顕微鏡（Olympus、FV3000）で観察した。

4.結果



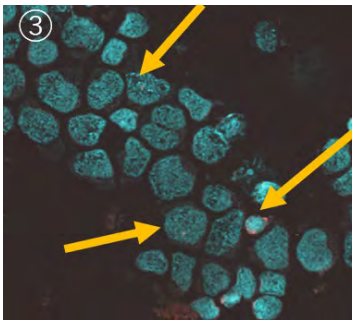
①今回の実験では DaudiE 細胞を使用した。本来であれば青い細胞核の中に赤い EBV-DNA シグナルが観察されるはずだが、初めの実験では EBV-DNA のシグナルを全く観察することができなかった（図 1）。この後、プロテアーゼ溶液（37℃）・変性時のホットプレート（75℃）・洗浄液（72℃）それぞれの温度が適当な値に達していなかったことが判明した。

図 1.初めの実験の結果（20 倍）



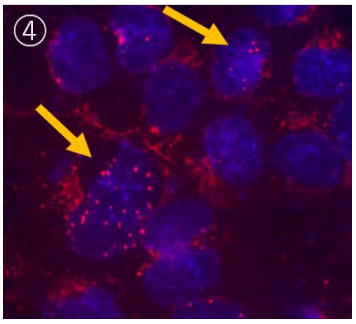
②前回に引き続き DaudiE 細胞を使用して、温度を適切に管理し、再度実験を行ったところ、赤いシグナルが見られた（図 2）。しかし、本来あるべき場所ではない細胞質等に散見されたため、このシグナルは EBV-DNA に結合しているものではない可能性が高いと判断した。

図 2.各処理の温度を適切に管理した場合の結果（20 倍）



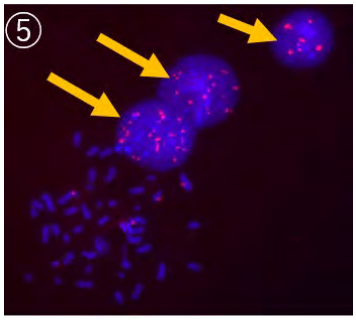
③赤いシグナルが細胞核内に観察できるかを確かめるため、細胞を変えて実験を行った。DaudiE 細胞では EBV-DNA コピー数にばらつきがあるのに対し、Namalwa 細胞は必ず 2 個で結果が明確であったので成功不成功が明確であった。しかし、結果は一部の細胞でのみ細胞核内に EBV-DNA に結合していると思われる赤いシグナルが見られた（図 3）。望ましい結果を得られない原因がプローブ、実験の手技、観察方法のいずれにあるかを突き止めるべく一部作業を外部委託することにした。

図 3.Namalwa 細胞を用いた場合の結果(40 倍)



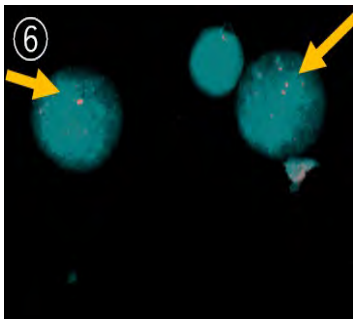
④DaudiE 細胞を用いて、プローブ添加以降の作業を外部委託した。その結果、一部の細胞で EBV-DNA シグナルを観察することができた。また、核外に赤い発光が見られた(図 4)。しかし、これまでの結果と比べ、④の EBV-DNA シグナルは格別に鮮明であったため、私たちのプローブ添加以降の作業に大きな問題があると考えられた。

図 4.プローブ添加以降の作業を外部委託した結果(100 倍)



⑤名市大のプローブを用いて、外部委託で全ての作業を行なってもらった。④では一部の細胞でのみ EBV-DNA のシグナルが見られたのに対し、⑤では全ての細胞で EBV-DNA のシグナルを観察することができた(図 5)。このため、プローブ添加前の作業にも問題があることが分かった。また、使用しているプローブ・観察方法には問題がないことが分かった。

図 5.外部委託で細胞の固定からの全ての作業を行ってもらった結果(100 倍)



⑥プローブ添加以降の作業を改善する目的で、委託先が固定した標本を用いて、私たちでプローブ添加以降の作業を行なった。この際、洗浄液の濃度を、2-×SSC から 0.4-×SSC に変更した。その結果、一部の細胞でしか EBV-DNA のシグナルを観察できなかった(図 6)。プローブ添加後の作業にはまだ改善点が残されていることが分かった。

図 6.外部委託先が固定した標本を用いて私たちでプローブ添加以降を行った結果(100 倍)

5.考察

これまでの実験結果を集積し、失敗の原因を検討した。

・塗沫標本の作成:回転数は適切か。→細胞の状態が良い最適な回転数(1700rpm)を予め測定してあるため問題はない。

・プロテアーゼ処理：プロテアーゼ処理が弱すぎると、プローブが細胞膜や核膜を通過できない。しかし強すぎても、細胞がスライドガラスが剥がれ落ちてしまう可能性がある。→検証の余地がある。

・プローブ添加：使用したプローブに異常はないか。→実験⑤において、名市大のプローブを用いて委託先が観察に成功しているためプローブに問題はない。

・プローブと標本の変性（75℃、5 分）：温度が低いためにプローブや標本が一本鎖になっていない可能性がある。→実験②以降、温度が 75℃になるように、実験機器は調節済みである。

・ハイブリダイゼーション（37℃、16～72 時間）：標本が湿った状態を維持できているか。→検証の余地がある。

・洗浄：洗浄液の濃度は適切か。→実験⑥はうまくいかなかったものの、改善が有効である可能性はある。

総評：初めの実験では全く EBV-DNA のシグナルを観察できなかったが、トラブルシュートによって一部の細胞で観察できるようになった。また、プローブ添加前の作業にもプローブ添加後の作業にも問題があることが判明した。今後もトラブルシューティングを継続し、問題を一つずつ改善していくことが望まれる。

6.参考文献

[1]村田貴之.EB ウイルスの感染様式とがん.ウイルス 第 64 巻 第 1 号.pp.95-104.2014

中枢神経系に対するウロリチンのセノリシス効果についての検証

統合解剖学 19 鍛治亮一郎　27 清原観

１・研究目的

セノリシスは老化細胞を選択的に取り除き、加齢関連疾患における老化形質を改善するプロセスである。ウロリチン A はザクロ果実などに多く含まれるエラグ酸の腸内代 謝産物であり、線虫やマウスの寿命を延ばす効果が報告されている（Nat Med. 2016,22(8):879-88)。また、肥満、糖尿病、加齢に伴う筋力低下や筋ジストロフィー、急性腎障害、膵臓がんなどにも効果があるとされている（ Trends Mol Med.2021,27(7):687-699)。ウロリチン A はミトコンドリアの古い機能不全をオートファジーにより除去する機能（マイトファジー）と関連している可能性がある。一方で、ウロリチ ン A は老化アストロサイトにおける KGA の転写を抑制し、老化アストロサイトの生存を 阻害することが我々の過去の研究で確認している。これにより、ウロリチン A がセノリシスの薬として有望である可能性が示唆される。今回の研究ではウロリチン A の存在下 で正常アストロサイトと老化アストロサイトの数をカウントし、この仮説を検証した。

２・方法

今回の研究では死細胞の数をカウントするために細胞をカウントする際は以下の点 に注意した。

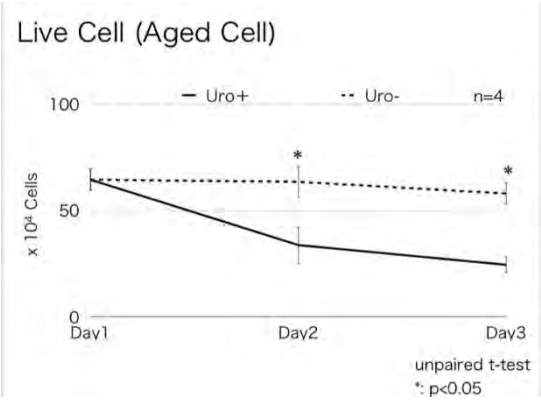
１：接着している細胞及び培養液中に浮遊している細胞全てを収取するために、培養液を収集し遠心分離し細胞を収集した。

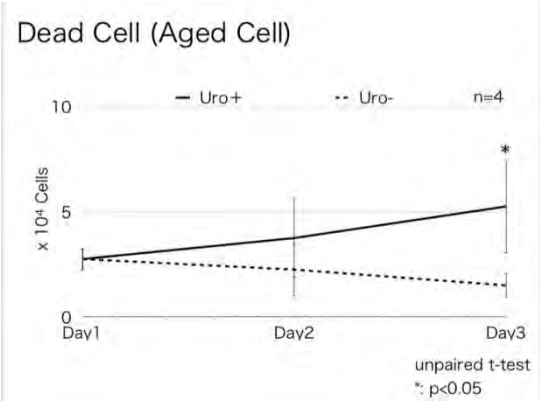
２：接着細胞はトリプシン/EDTA にて細胞をはがした後、遠心分離し細胞を収集した 。

３・結果

若い細胞に対しテモゾロミド添加した結果、若い細胞に対して老化を速める傾向が あったため、これを老化細胞としてさらに実験を行った。若い細胞では何も刺激をしない状態(図１）とウロリチンを添加した後で、生細胞、死 細胞ともに数の変化は認められなかった。一方、老化細胞では（図２）ウロリチン投与後は生細胞数は停滞し、死細胞数が増 加する傾向が見られた。

図１　　図２





４・考察. 反省点

ウロリチンは老化細胞数を選択的に減少させる傾向が見られ、これがセノリシス効果 を示していると推察される。現在、脳でセノリシスを起こす薬は開発されておらず、ウロ リチンがその研究を進める足掛かりになると考えられる。先行研究ではウロリチンの投 与で認知機能が上がるという報告があり、今回の結果と合わせて、ウロリチンがセノリシ スに効果を示すことが期待できると考える。反省点としては、サンプル数が１つと少な かったため、統計学的な検討が行えなかったことである。今後はさらにサンプル数を増 やし、さらに詳細な検討を行っていきたい。

試験管内における Hoxb8 発現ミクログリアの機能

38 澤田龍承

[導入・目的]

Hoxb8 遺伝子は強迫神経症（OCD）と関連していることが報告されている（Chen SK. Cell. 2010）。Hoxb 8 は脳内ではミクログリアのみに発現しており、OCD の関連のある脳部位である大脳皮質線条体回路の恒常性の維持を行っている（Nagarajan N. Mol Psychiatry. 2017）。しかし、現在 OCD における Hoxb8 の機能やメカニズムはほとんど明らかになっていない。今回は Hoxb8 発現ミクログリアの機能を調べることを目的とした。

[方法]

・細胞培養

・トランスフェクションと免疫染色

エレクトロポレーションを使用して、BV2 細胞に Hoxb8 をトランスフェクションした。そまた、Hoxb8 タンパクの発現の視覚化と局在化を確実にするために、抗体を使用して BV2 細胞における Hoxb8 発現を観察した。

・リアルタイム PCR

Hoxb8 の有無及び LPS 刺激の有無による遺伝子の発現変化を評価した。

・ウエスタンブロッティング

・細胞増殖の測定

IncuCyte システムを使用して 24 時間継続的に記録し、細胞が占める面積を測定した。

・ルシフェラーゼアッセイ

・NO 代謝物 NO 生成の測定

[結果]

・免疫染色やウエスタンブロッティングで Hoxb8 の発現が確認できた。

・リアルタイム PCR 法により図 1 のような結果が得られた。

Hoxb8 は IL10 の制御を強化するが、炎症性サイトカインの mRNA を抑制した。

・ルシフェラーゼアッセイにより図 2 のような結果が得られた。

Hoxb8 を発現する BV2 細胞は LPS 刺激に対する NFkB 活性を抑制した。

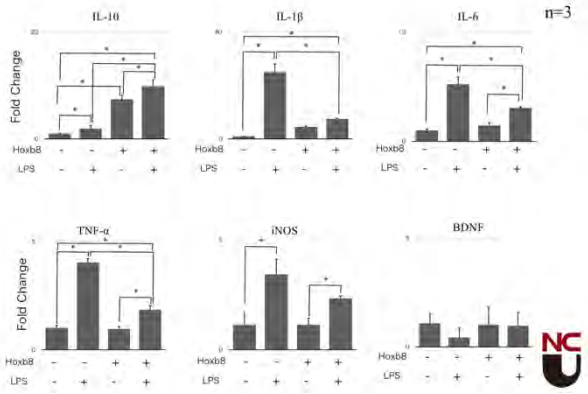


図 1

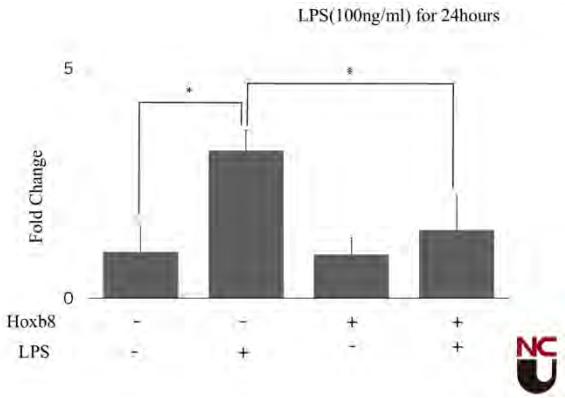


図 2

[考察]

・図 1

IL10mRNA が増えたことについて、Hoxb8 は IL10 プロモーター上の PBX1 という転写

因子と親和性が高く、結合しその刺激が IL10 の転写が進む 1 つの要因であることが分かっている。今回の結果もこの過程を経て IL10 の転写が促進されたのではと考えた。

炎症誘導性サイトカインの mRNA の増加が抑制されたことについて、これまでの研究で IL 10 はレセプターに結合すると JAK1/STAT3 を通して、炎症誘発性サイトカインの産生を抑制する、ということがわかっている。今回の実験ではこの経路で反応が起こったのかは確認できなかったが、IL10 がレセプターに結合し、JAK1/STAT3 を通して炎症誘発性サイトカインの産生を抑制しているのではと考えた。

・図 2

図 3 より、NFkB は IkB と複合体を形成しており、IKK という酵素が IkB をリン酸化するとこの複合体が分解され、NFkB が核に侵入し、転写因子として炎症誘発性サイトカインの発現を増加させることが分かっている。

さらに IL 10 は IKK の働きを抑制することもわかっている。

私たちの結果から、Hoxb8 を入れると IL 10 が働きかけることで IkB のリン酸化が抑制され、NFkB が核に侵入しにくくなるため NFkB の働きが抑制されるのではと考えた。

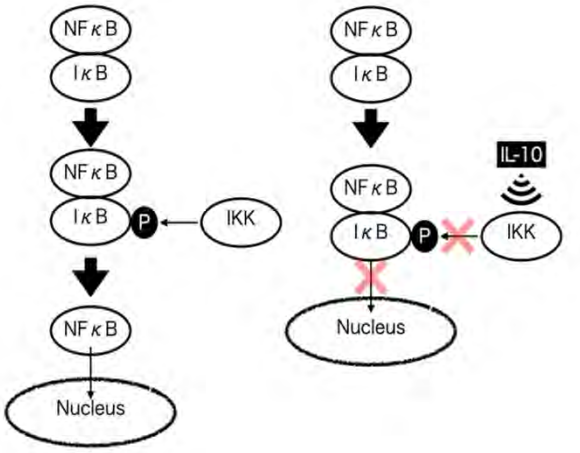


図 3

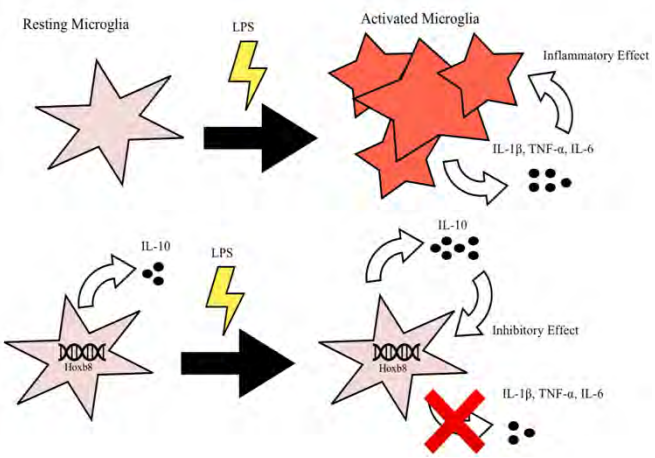


図 4

[結論]

これら全ての結果から、Hoxb8 を発現するミクログリア細胞は IL10 産生を促進する可能性があること、Hoxb8 が LPS 刺激に反応して炎症誘導性サイトカインの産生を抑制し、抗炎症に働いている可能性があることが分かった。

Functions of Hoxb8 in Microglia: Attenuating Pathological Activation in Vitro Culture

統合解剖学　渡辺明仁(No.99)

Introduction

Obsessive compulsive disorder (OCD) is a complex psychiatric disorder associated with neuroinflammation in the central nervous system(Attwells S. JAMA Psychiatry. 2017). Recent research has highlighted the involvement of microglia, particularly those expressing the Hoxb8 gene(Chen SK. Cell. 2010), in the context of OCD. However, the precise mechanisms and functions of Hoxb8- expressing microglia in OCD pathophysiology remain poorly understood. This study aims to investigate the functions of Hoxb8 expressing microglia.

Methods

-Cell Culture BV-2 cells, a microglia cell line, were grown in DMEM with 5% FBS and antibiotics.
-Transfection & Immunocytochemistry Murine Hoxb8 was cloned into the pCAGGS vector with a FLAG tag, and BV2 microglial cells were transfected using electroporation. The Immunostaining was used to observe Hoxb8 expression in BV2 cells using specific antibodies to ensure visualization and localization of Hoxb8 within the cellular context.
-Quantitative Real-Time PCR Total RNAs of BV-2 cells were extracted with Isogen. cDNAs were synthesized with reverse transcriptase. Quantitative real-time PCR was performed to evaluate the expression changes of selected genes using TB Green® Premix Ex Taq™ II and the Thermal Cycler Dice Real Time System. The values were applied to the ⊿⊿ Ct method for data analysis.
-Immunoblotting Cells cultured on a 35 mm dish, and collected with lysis buffer. The sample was prepared with Laemli sample buffer, separated by 10% SDS-PAGE, and subsequently electrotransferred to a PVDF membrane. The blot was then probed with an antibody against the indicated molecules.
-Measurement of Cell Proliferation Cell proliferation was evaluated using the IncuCyte System, which continuously recorded video footage during a 24-hour incubation period to determine the area occupied by the cells.
-Luciferase Reporter Assay Promega pGL4 luciferase reporter vectors containing an NF-κB response element(Promega 8491) and pRL-TK reporter vector as a control were transfected and incubated for 24 hours. Subsequently, cells were stimulated with LPS and incubated for another 24 hours before detection.
-Measurement of Nitric Oxide (NO) Metabolites NO production was determined, utilizing the fluorometric reagent 2,3-diaminonaphthalene with a microplate reader, and data analysis was performed using the SoftMax Pro software from Molecular Devices.

Results

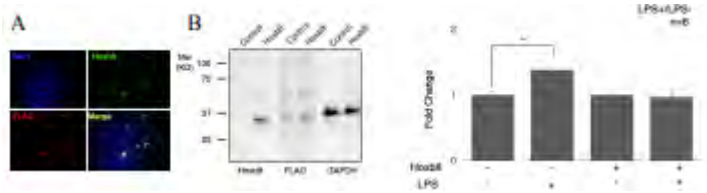


Fig.1 Transfection of Hoxb8 induces expressing Hoxb8 protein
(A) Immunocytochemistry, Hoxb8 and FLAG tag were co-expressed in transfected BV2 cells, while control was not. (B) Immunoblotting, Hoxb8 and FLAG tag were expressed in transfected BV2 cells, while these were not expressed in the control.
Fig.2 Hoxb8 suppresses the production of NO metabolites in response to LPS stimulation There was a difference in NO production between conditions with and without LPS in the control. However, this difference was not observed in microglia expressing Hoxb8.

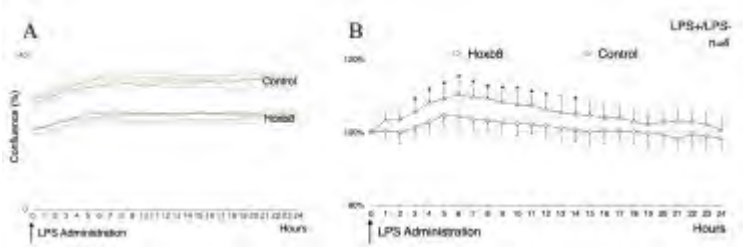


Fig.3 Hoxb8 expressing BV2 suppresses cell proliferation in response to LPS stimulation (A) The differences in % confluence between Hoxb8-expressing BV2 and control at 0 hour (24 hours after transfection) to 24 hours (48 hours after transfection) were shown. Hoxb8 could affect the cell proliferation within 24 hours after transfection. (B) Cell proliferation ratio with and without LPS stimulation. Cell proliferation ratio was suppressed in BV2 cells expressing Hoxb8 compared to the control. This effect was maintained for 12 hours starting 3 hours after LPS stimulation.

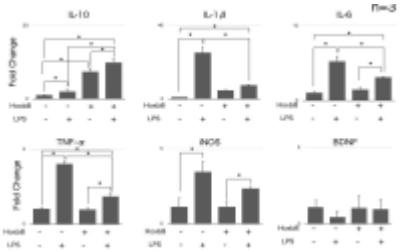


Fig.4 Hoxb8 enhances the regulation of IL-10, but it suppresses the mRNAs of proinflammatory cytokine or mediator In Hoxb8-expressing BV2, IL-10 mRNA expression was increased, and this upregulation was further enhanced by LPS stimulation. In contrast, in the control group, there was a minor upregulation of IL-10 mRNA expression. Moreover, Hoxb8 expression in BV2 cells led to the suppression of inflammatory cytokines and mediator such as IL-1 β , IL-6, TNF α , and iNOS. In the control, these were upregulated in response to LPS stimulation.

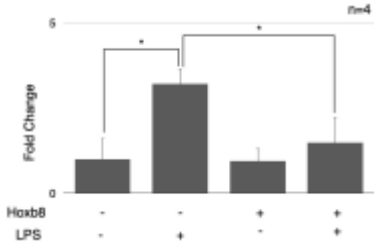
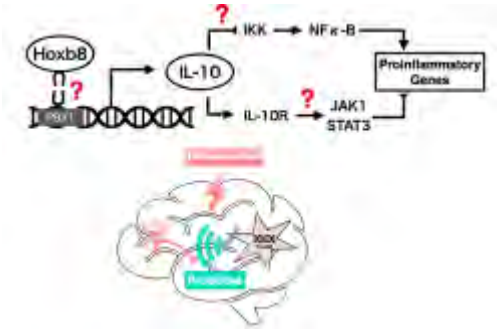


Fig.5 Hoxb8 expressing BV2 suppresses NF κ B activity in response to LPS stimulation In microglia expressing Hoxb8, NF- κ B luciferase activity decreased when exposed to LPS stimulation, as compared to the control

Discussion



· Hoxb8 binds to PBX1 on the IL-10 promoter, with PBX1 acting as a key regulator of IL-10 gene transcription(Chung EY. Immunity. 2007). · Upregulated IL-10 could suppress IL-1 β , TNF- α and IL-6 production in microglia in response to LPS stimulation through the JAK1/STAT3 pathway(Sun Y. J Neuroinflammation. 2019, Kremlev S. J Neuroimmunol. 2005, Sawada M. J Neurochem. 1999), and also inhibit IKK activity which phosphorylates I κ B(Wang P. J Biol Chem. 1995). · Our findings suggest that this investigation has the potential to provide an explanation for the underlying mechanisms in the previous report which showed that Hoxb8-expressing microglia could rescue OCD symptoms (Chen SK. Cell. 2010).

ASIC3 のかゆみ行動への関与

機能組織学　鈴木智央里(No.44)　簸ひかり(No.88)

〈目的〉

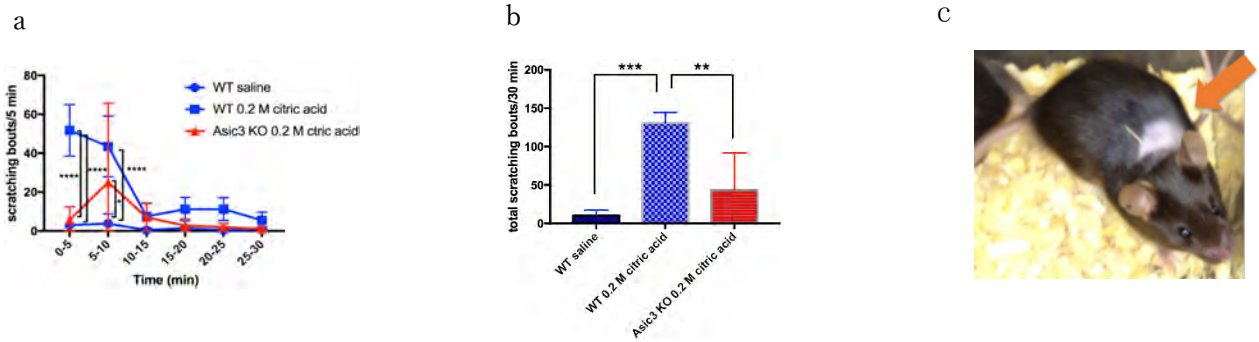
酸感受性イオンチャネル（ASIC: Acid-Sensing Ion Channel）ファミリーの1つである ASIC3が痒み感覚受容へ関与しているかについてノックアウトマウスを用いて明らかにする。

〈背景〉

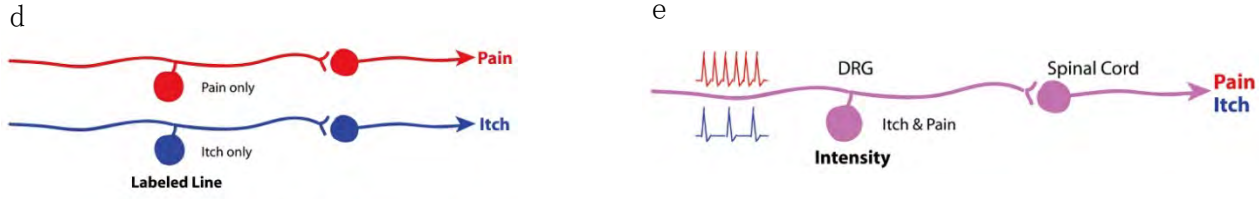
ASIC は低 pH 刺激により開口する2回膜貫通型の陽イオンチャネルである。その1つである ASIC3 は酸（虚血などのアシドーシス環境など）により発生する痛みや機械刺激受容に関与している。近年、低pH が起痒リガンドであることが知られるようになる[1]とともに、ASIC3がかゆみ応答を促進する[2]ことや agmatine が ASIC3 を介したかゆみ誘発に関与する[3]などの報告がある。しかし、いずれの報告も酸を皮下注射していることから疼痛を同時に伴う実験系によって評価されており、純粋にかゆみ刺激のみの評価は行われていない。このため、当教室では過去に刺激の少ないクエン酸塗布モデルを開発し、かゆみの評価を行った。後頚部に 0.2M クエン酸を塗布した野生型マウスでは掻爬行動が見られたが、同刺激を加えた ASIC3KO マウスでは掻爬行動はほとんど見られなかった（図 1a,b）。しかし、後頚部への刺激では、痛み刺激とかゆみ刺激の双方でスクラッチング行動をとるため、痛みとかゆみを判別できない。このため、かゆみ行動（スクラッチング）と痛み行動（ワイピング）を独立して測定することができる頬部[4]を標的としてクエン酸塗布実験を今回新たに行った。

また、かゆみの伝達経路にはかゆみは痛みの弱刺激であるとする Intensity Theory とかゆみに特異的な神経が存在するという Labelled Line Theory などの仮説がある(図 1d,e)。ASIC3 は痛覚受容体として知られているため、かゆみ受容体との共存を免疫組織化学染色にて明らかにすることで、上記仮説との整合性を検討した。

図 1



Applying citric acid to the skin induced itch-related behavior.
(a) Itch-related behavior in WT (blue) and ASIC3 KO (red) mice as determined by scratching bouts in 5-min bins during a 30-min period following applying saline or 0.2 M citric acid at the nape skin. (b) Regraphed data for the total number of scratching bouts in 30 minutes after application. n =5. Data are mean ± standard error of the mean. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.005$ comparisons between groups as indicated, by two-

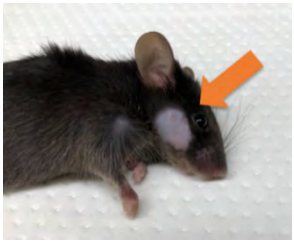


〈方法〉

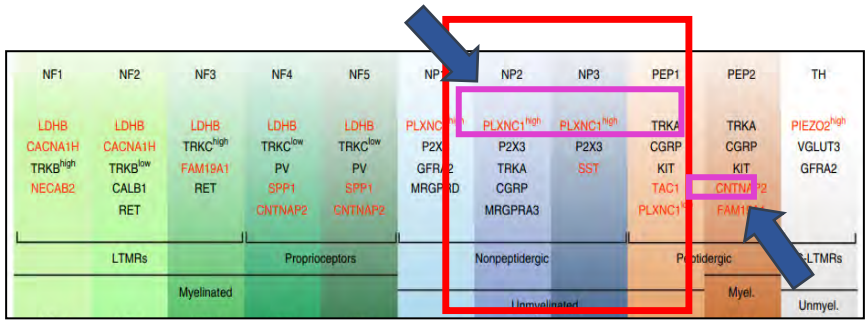
① かゆみ誘発試験：野生型および ASIC3 KO の頬部をシェーバーで剃毛(図 2a)。試験開始前 30 分間環境に慣れさせた。それぞれの頬部に 0.5M のクエン酸もしくは生理食塩水を塗布した。塗布直後から 30 分間のスクラッチ回数とワイピング回数をカウントした。

② 免疫組織化学染色：三叉神経節と後根神経節において ASIC3 とかゆみ神経との共存を免疫組織化学染色にて検討した。RNA sequence を用いた過去の報告[5]より、non-peptidergic クラスターがかゆみ神経と考えられる(図 2b)ため、PlexinC1 と P2X3 の2重陽性細胞をかゆみ神経と定義し、ASIC3 がこれらと共存しているかを観察した。ASIC3 は市販抗体にて検出困難なため、ASIC3-EGFP ノックインマウスを使用し、抗 GFP 抗体により ASIC3を検出した。

図2 a



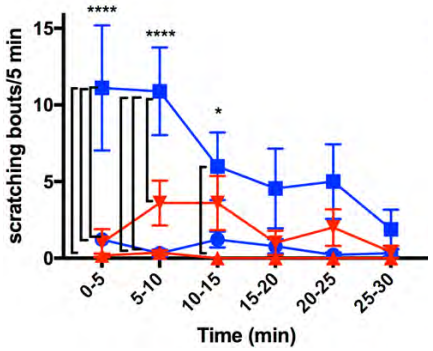
b



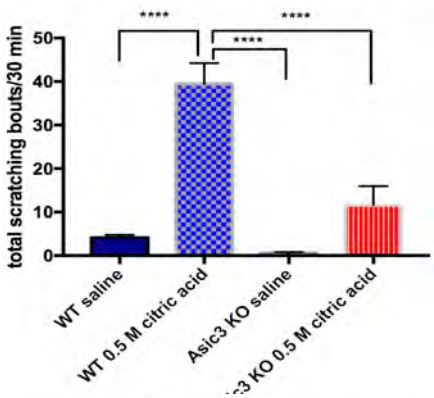
〈結果〉

① かゆみ誘発試験：クエン酸塗布後、野生型マウスでは有意にスクラッチ回数が多くみられた。一方では、ASIC3KO マウスで有意にスクラッチ回数が減った。生理食塩水では野生型・ASIC3KO マウスのどちらともほとんどが見られスクラッチングが見られなかった。30 分間の合計のスクラッチ回数においても野生型マウスと ASIC3KO マウスで有意差が見られた(図 3 a,b)。ワイピング行動はクエン酸と生理食塩水、野生型マウスと AISC3KO マウスに関わらずほとんど見られなかった(図 3c,d)。

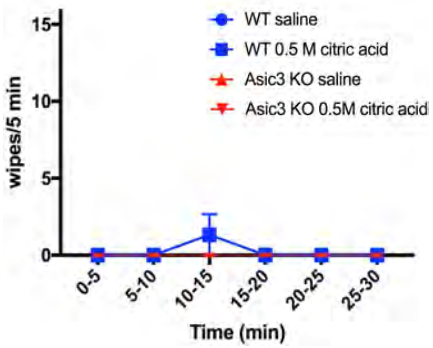
図3 a



b



c



d

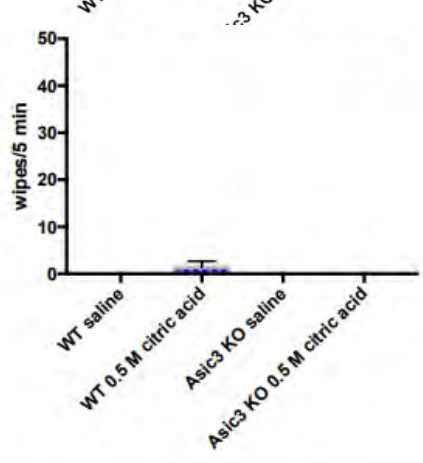


Fig. 3 Applying citric acid to the skin of the cheek induced only itch-related but not pain behavior.
(a) Itch-related behavior in WT (blue) and ASIC3 KO (red) mice as determined by scratching bouts in 5-min bins during a 30-min period following applying saline or 0.5 M citric acid at the right cheek. (b) Regraphed data for the total number of scratching bouts in 30 minutes after application. (c) Pain-related behavior as determined by wiping the cheek with a forepaw during observation of (a). (d) Regraphed data for the total number of wiping behavior in 30 minutes after application. n = 10-11. Data are mean ± standard error of the mean. *P < 0.05, **** P < 0.001 compared as indicated, by two-way repeated measures ANOVA(a and c) and one-way repeated measures ANOVA (b and d) followed by Tukey's multiple comparisons test. Asic3, acid-sensing ion channel 3; KO, knockout; WT, wild type.

②免疫組織化学染色：ASIC3、PlexinC1、P2X3 を染色したところ、ASIC3陽性細胞は全体の20%から30%であった。かゆみ神経を内包するとされる non-peptidergic クラスター（NP1-NP3）を意味する PlexinC1/P2X3 のダブルポジティブ細胞は、三叉神経節(TG)では 14%、後根神経節(DRG)では 34%ほどであった(図 4 a, b)。
また、かゆみ神経マーカーと ASIC3 の全てが陽性となるトリプルポジティブとなった細胞は本実験においては検出されなかった(図 4 c)。

図 4

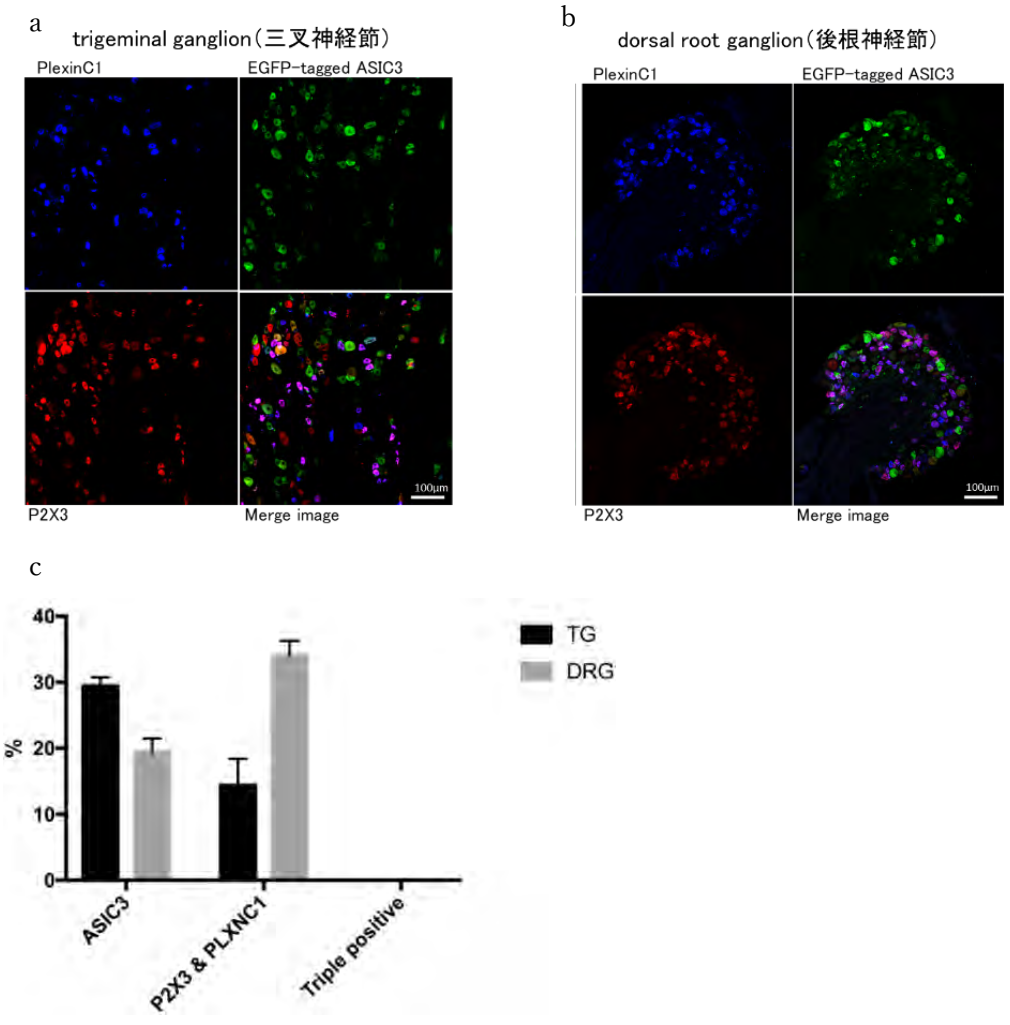


Fig.4 Diversity of ASIC3 positive neuron and itch-responsive neuronal subtypes.
Representative immunohistochemistry for PlexinC1, P2X3 and EGFP-tagged ASIC3 is shown in (a) trigeminal ganglion (TG) and (b) dorsal root ganglion (DRG) at the C2-C5 level. (c) Proportion of PlexinC1, P2X3 and EGFP-Tagged ASIC3 in TGs and DRGs. The proportion of triple-stained cells is not detected in all sections. Data in panel

〈考察〉

頬部へのクエン酸塗布によって野生型マウスにおいて掻爬行動が引き起こされた。このとき、疼痛の指標であるワイピング行動は伴わなかった。これらより、クエン酸塗布掻痒誘発モデルは純粋なかゆみを評価することが可能なモデルであると考えられた。また、野生型マウスへのクエン酸塗布によって観察された掻爬行動は、ASIC3KO マウスにおいて有意に減少した。この結果から、本実験系においてASIC3 は純粋にかゆみの受容に関与していることが示された。

また、免疫染色の結果よりASIC3 によるかゆみ刺激は既知のかゆみ神経と独立した経路であることが示唆された。もしも Labelled Line Theory がかゆみ感覚の全てを説明するのであれば、ASIC3 は一定程度の割合でかゆみ神経に観察されることが予想される。また、前述の通りASIC3 は疼痛受容体として広く知られているにもかかわらず、純粋なかゆみ行動を引き起こした。これらの結果は、ASIC3 のかゆみ受容機構が弱い痛み刺激をかゆみとして受容するいわゆる Intensity Theory によって説明が可能である。

今後、ASIC3 と既知の各種かゆみ受容体との共存や mechanical itch におけるASIC3 の役割を検討ことで、かゆみ感覚におけるASIC3 の役割への理解がさらに深まるものと考える。

〈参考文献〉

1) Lin S, Steinhoff M, Ikoma A, Chang Y, Cheng Y, Kopparaju R, Ishii S, Sun S, Chen C. Involvement of TRPV1 and TDAG8 in Pruriception Associated with Noxious Acidosis J Invest Dermatol 137(1):170-178. 2017.
2) Zhou G, Xu W, Lu Y, Zhou Y, Feng C, Zhang J, Sun S, Wang R, Liu T, Wu B. Acid-sensing ion channel 3 is required for agmatine-induced histamine-independent itch in mice. Front Mol Neurosci 16:1086285. 2023
3) Peng Z, Li W, Huang C, Jiang Y, Wang X, Zhu M, Cheng X, Xu T. ASIC3 Mediates Itch Sensation in Response to Coincident Stimulation by Acid and Nonproton Ligand. Cell Rep 13(2):387-98. 2015
4) Shimada S, LaMotte R. Behavioral differentiation between itch and pain in mouse. Pain 139(3):681-687. 2008
5) Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lönnerberg P, Lou D, Leffler J, Haeggström J, Kharchenko O, Kharchenko P, Linnarsson S, Ernfors P. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing.Nat Neurosci 18(1):145-53. 2015.

気道の自然免疫反応における TRPV1 チャネルの関与

機能組織学分野　53番田中小太郎　80番箕田光史朗

背景

喘息の主病態は Th2（T helper cell type 2）リンパ球と 2 型自然リンパ球（group 2 innate lymphoid cells:ILC2）が引き起こす 2 型炎症である（山口、日内会誌、2019)。前者は獲得免疫応答、後者は自然免疫応答に関わると考えられている。自然免疫応答では、アレルゲンの刺激によって気道上皮細胞から IL-33 や TSLP などが放出され、ILC2 を活性化することでこの炎症が始まるため、IL-33 と TSLP はこの応答の鍵分子である。

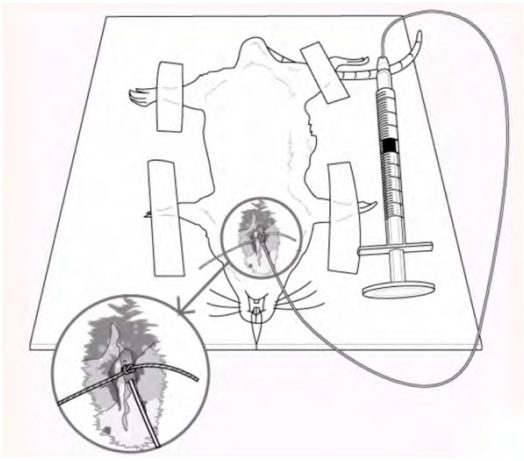
一方、TRPV1（Transient receptor potential vanilloid type 1）とよばれる陽イオンチャネルは、主に侵害受容器の神経終末に発現するが、気道では神経に加えて上皮にも発現していることが報告されている（Jia X et al, FEBS Lett, 2014; Schiffers C, et al. AJRCMB, 2020)。さらに、このチャネルは炎症状態でリガンドに対する応答が増大することから、炎症を主体とした喘息の病態にも深く関与している可能性がある。

目的

気道に発現する TRPV1 が、自然免疫における上皮の応答に関与するか調べることが本研究の目的である。本研究では、野生型（WT）マウスと TRPV1 ノックアウト（TRPV1-KO）マウスを用いて、急性期の炎症応答と、IL-33 の放出について比較検討した。

方法

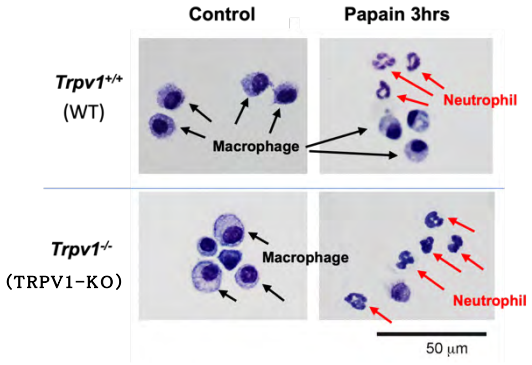
C57Bl/6J の 9～11 週齢　雄性の野生型（WT; *Trpv1*$^{+/+}$）マウスおよび同週齢　雄性の TRPV1 ノックアウト（TRPV1-KO; *Trpv1*$^{-/-}$）マウスを用いて、自然免疫応答を引き起こす Papain 点鼻刺激を行い、炎症を誘発させた。Papain とは、ダニ主要アレルゲンと構造が似ているプロテアーゼである。点鼻3時間後に麻酔下にて気管切開後に挿管して気管支肺胞洗浄液（Bronchoalveolar Lavage Fluid: BALF）を採取した（右図：sysmex アプリケーションレポート「気管支肺胞洗浄液(BALF)」より)。遠心後、沈渣を用いて計算盤にて総細胞数を、単層塗抹標本に May-Giemsa 染色を施し顕微鏡下にて細胞のサブタイプを調べた。BALF の上清では、IL-33 の濃度を ELISA 法（Enzyme-Linked Immune Sorbent assay）にて定量解析した。さらに肺組織を摘出し、型の如く固定、脱水、パラフィン包埋、薄切後に HE (Hematoxylin-eosin) 染色と PAS (Periodic acid-Schiff) 染色を行い、それぞれ肺内気管支周囲の細胞の遊走と気道粘液の増生の程度を顕微鏡下で観察評価した。

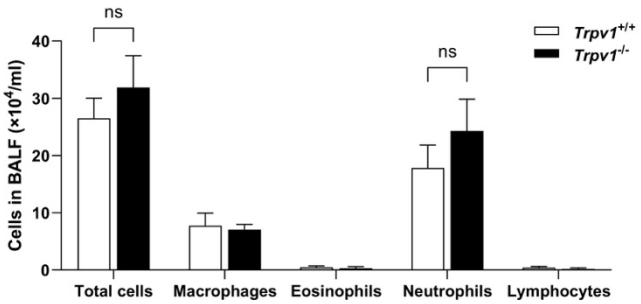


結果

1．BALF 解析

Papain 単刺激により WT、TRPV1-KO マウスともに BALF 中の総細胞数が有意に増加し、両群間に有意な差は認められなかった。BALF 中の細胞のサブタイプについて、下図左は、WT マウスと TRPV1-KO マウスの control と Papain 点鼻後 3 時間後の BALF 中の細胞サブタイプを示す顕微鏡像の一例である。下図右のグラフは、細胞のサブタイプ毎の細胞数を示す。このグラフから、WT マウスでも TRPV1-KO マウスでも同様に同程度の好中球の遊走が起きていることが分かった。

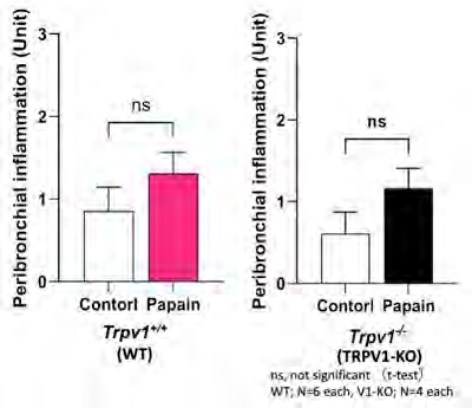




ns: not significant (Multiple t test)

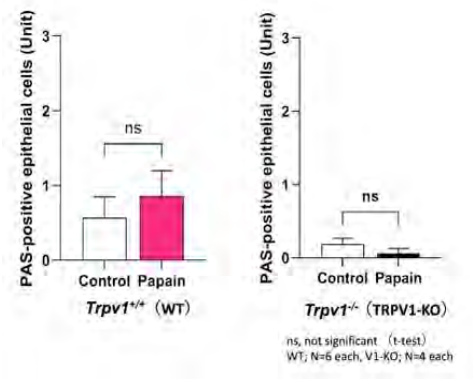
WT; N=6 each, V1-KO; N=4 each

2．組織学的解析1—HE 染色



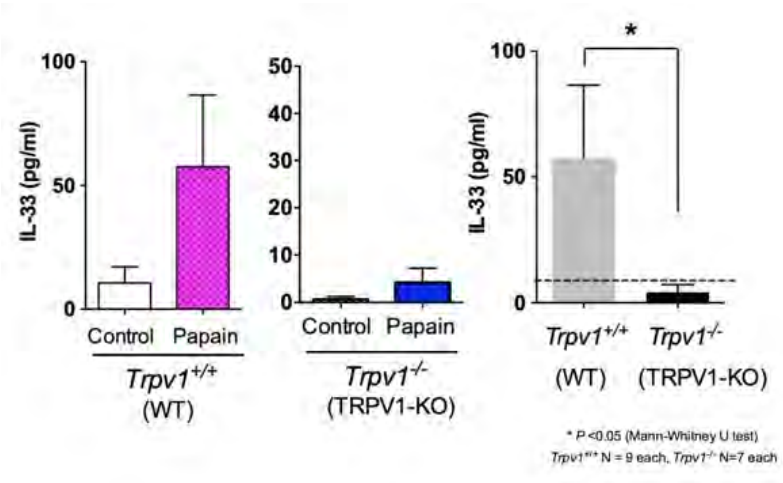
続いて、採取した肺組織を HE 染色し、WT マウスと TRPV1-KO マウスの気道周辺の炎症細胞の浸潤の程度を観察し、0～3 までの 4 段階で評価した（Ford JG et al., J Immunol, 2001；Myou S et al, J Immunol, 2003)。数字が大きくなるほど浸潤の程度が大きくなる。左図の左が WT、左図の右が TRPV1-KO マウスの結果を示しており、点鼻後 3 時間の肺では、ともに有意な炎症細胞の遊走は起きていなかった。

3．組織学的解析2—PAS 染色



採取した肺組織を PAS 染色し、WT マウスと TRPV1-KO マウスの気道上皮の粘液増生の程度を分類し、0～4 までの 5 段階で評価した（Ford JG et al., J Immunol, 2001；Myou S et al, J Immunol, 2003)。数字が大きくなるほど浸潤の程度が大きくなる。その結果を左図に示す。左が WT、右が TRPV1-KO を示している。結果としては、WT、TRPV1-KO マウスともに点鼻後 3 時間の肺では有意な粘液の増生は起きていなかった。

4. ELISA 法による BALF 中 IL-33 の定量解析



アレルゲンに応答して BALF 中に IL-33 が放出される（Matsuyama et al, Allergy, 2021)。上図は BALF 中の IL-33 濃度を ELISA 法により測定した結果を示す。上図一番左は WT マウスの結果であり、Papain 点鼻後 3 時間で BALF 中の IL-33 濃度が増加していることがわかる。真ん中のグラフは TRPV1-KO マウスの結果を示しており Papain 刺激後の IL-33 の濃度は control の時と比べてほとんど変化がなかった。上図一番右は Papain の刺激ありでこの両郡を比較したものであり、両郡間には有意な差が観察された。

考察

今回は吸入よりも応答が強いとされる点鼻による刺激を行った。Papain 点鼻後 3 時間における BALF 中の炎症細胞について、TRPV1-KO マウスでも WT マウスと同じように好中球の遊走が起きていた。アレルゲンの刺激早期では上皮から出される ATP などの因子が好中球を遊走させることがわかっており、TRPV1 はこの好中球遊走を引き起こす応答には関与していないと考えられる。また、肺内組織像の観察では WT でも炎症細胞の遊走や粘液の増生が起きておらず、これは、点鼻してから 3 時間という短い時間では、肺組織にまでその影響が及んでいなかった可能性があり、TRPV1-KO マウスとの比較を行うまでには至らなかった。一方、Papain 点鼻後 3 時間における BALF 中の IL-33 放出について、TRPV1-KO マウスでは WT マウスに比べて BALF 中の IL-33 濃度が有意に減少していた。このことから、TRPV1-KO マウスにおいて Papain の刺激があっても IL-33 があまり放出されないことが分かり、TRPV1 が Papain 刺激による IL-33 の放出に関与していることが示された。

参考文献

山口正雄　喘息病態の新理解(Th2, ILC2, 好中球性）日内会誌 108: 1114-1118, 2019.

Jia X, Zhang H, Cao X, Yin Y, Zhang B. Activation of TRPV1 mediates thymic stromal lymphopoietin release via the Ca2+/NFAT pathway in airway epithelial cells. FEBS Lett. 2014;588(17):3047-54. doi: 10.1016/j.febslet.2014.06.018.

Schiffers C, Hristova M, Habibovic A, Dustin CM, Danyal K, Reynaert NL, Wouters

EFM, van der Vliet A. The Transient Receptor Potential Channel Vanilloid 1 Is Critical in Innate Airway Epithelial Responses to Protease Allergens. Am J Respir Cell Mol Biol. 2020;63(2):198-208. doi: 10.1165/rcmb.2019-0170OC.

気管支肺胞洗浄液 Bronchoalveolar Lavage Fluid. Sysmex-labscience.jp. https://www.sysmex-labscience.jp/mypage/files/2012/01/data64.pdf

Ford JG, Rennick D, Donaldson DD, Venkayya R, McArthur C, Hansell E, Kurup VP, Warnock M, Grünig G. Il-13 and IFN-gamma: interactions in lung inflammation. J Immunol. 2001;167(3):1769-77. doi: 10.4049/jimmunol.167.3.1769.

Myou S, Zhu X, Myo S, Boetticher E, Meliton AY, Liu J, Munoz NM, Leff AR. Blockade of airway inflammation and hyperresponsiveness by HIV-TAT-dominant negative Ras. J Immunol. 2003;171(8):4379-84. doi: 10.4049/jimmunol.171.8.4379.

Matsuyama T, Machida K, Motomura Y, Takagi K, Doutake Y, Tanoue-Hamu A, Kondo K, Mizuno K, Moro K, Inoue H. Long-acting muscarinic antagonist regulates group 2 innate lymphoid cell-dependent airway eosinophilic inflammation. Allergy. 2021;76(9):2785-2796. doi: 10.1111/all.14836.

近接標識法による一次繊毛の機能解明のための iPS 細胞の作成

細胞生化学　新本莉子（No.42）

背景・目的

一次繊毛とはほぼすべての細胞の表面に存在する細胞小器官の1つで、シグナルの伝達や受容、セカンドメッセンジャーの貯蔵など、様々な機能を持つ。

近年、iPS 細胞が再生医療において注目されている。iPS 細胞は一次繊毛を有しているが、iPS 細胞の制御における一次繊毛の役割はまだ分かっていない。一次繊毛の機能の解明には一次繊毛に局在するタンパク質の解析が重要である。

一次繊毛タンパク質の同定方法の1つに近接標識法がある。近接標識法とは目的タンパク質の近位にあるタンパク質の標識を APEX（Ascorbate peroxidase）という酵素を用いて行うことができる技術である。APEX は H_2O_2 の存在下でビオチンフェノールをビオチンフェノールラジカルに変換することができ、ビオチンフェノールラジカルが周囲のたんぱく質と共有結合することで、目的タンパク質とその近位にあるタンパク質をビオチン標識することができる。

本研究では近接標識法によって一次繊毛に局在するタンパク質の解析を行うための iPS 細胞を作成することを目的とした。

方法

一次繊毛の基部にはトランジションゾーンというどのたんぱく質が繊毛に出入りできるかを制御する領域があり、NPHP というタンパク質が存在している。この NPHP 配列を利用することで目的タンパク質を一次繊毛に局在させることができる。本研究では一次繊毛のタンパク質を標識することができる pAAVS1-CAG-$NPHP_{1-203}$-EGFP-APEX（Cilia APEX）と、細胞質のタンパク質を標識することができる pAAVS1-CAG-EGFP-APEX（Cyto APEX）という2種類のプラスミドを作成した。PCR を用いてベクターとインサートを作成し、In-Fusion 法で両者を結合させることでプラスミドを作成した。（図 1）その後インサートが正しく挿入されているかを確かめるために制限酵素による確認実験を行った。制限酵素は Cilia-APEX では Xba Ⅰ を、Cyto-APEX では Not Ⅰ を使用した。

プラスミド作成後 Lipofectamine Stem Transfection Reagent を用いてプラスミドを iPS 細胞内に導入し培養した。その後 Biotin-streptavidin labeling と免疫染色を行った。（図 2）

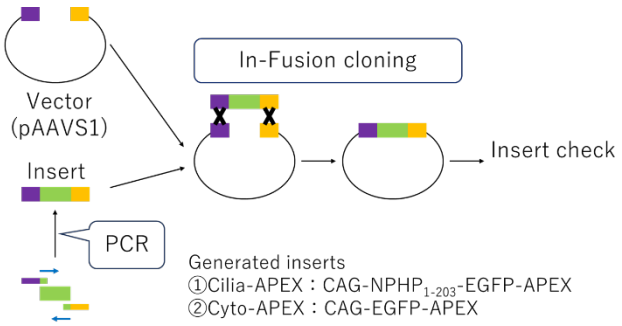


図 1　APEX をコードするプラスミドの作成

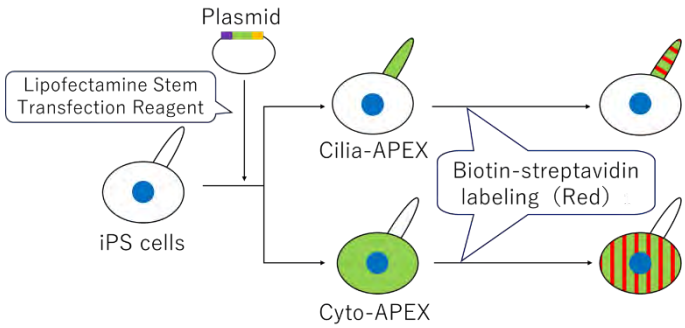
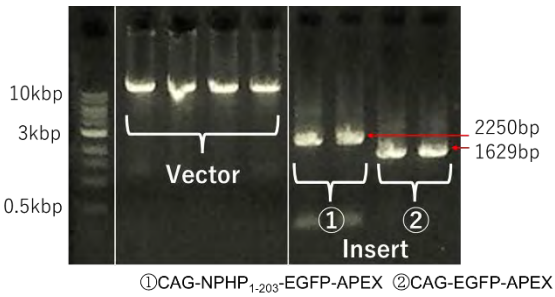


図 2　APEX を発現する iPS 細胞の作成

結果

APEX をコードするプラスミドの作成に成功した

Cilia-APEX と Cyto-APEX のプラスミドのベクターとインサートが得られ（図 3）、プラスミドが作成できた。確認実験の結果、予想されていた位置にバンドが現れたため目的のプラスミドを作成できたことが確認できた。（図 4）



①CAG-NPHP$_{1-203}$-EGFP-APEX ②CAG-EGFP-APEX

図 3

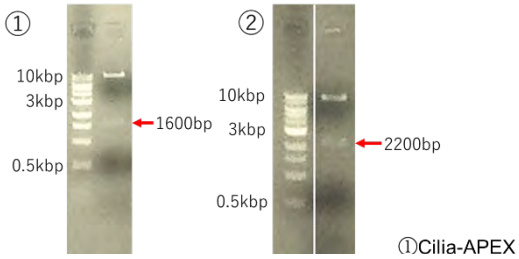
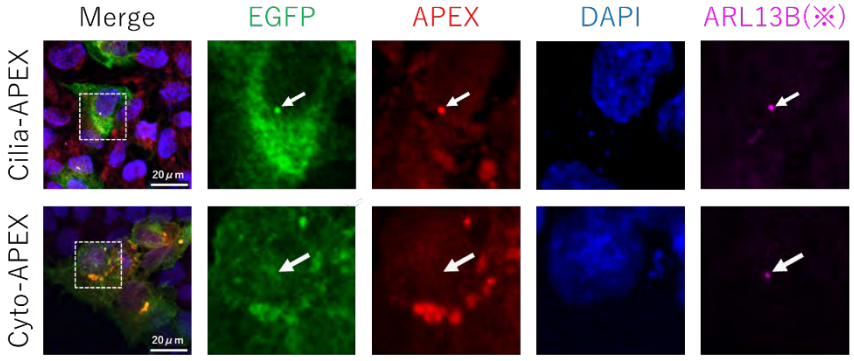


図 4

近

接標識法に使用可能な iPS 細胞の作成に成功した

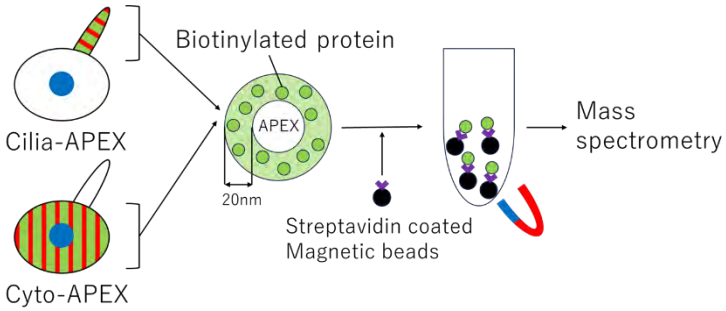
免疫染色の結果を図 5 に示す。Cilia-APEX では一次繊毛に EGFP と APEX が共局在していた。このことから Cilia-APEX iPS 細胞の一次繊毛で APEX によるビオチン標識が行われていることが確認できた。一方 Cyto-APEX では細胞質で EGFP と APEX の共局在がみられたが、一次繊毛での EGFP と APEX の共局在は見られなかった。このことから、Cyto-APEX iPS 細胞の細胞質で APEX によるビオチン標識が行われていることが確認できた。



※一次繊毛はARL13Bを用いて染色した。

図 5

今後の展望



APEX によってビオチン標識されたタンパク質にストレプトアビジンが結合した磁石ビーズを結合させることでタンパク質を集め、質量分析を行う。その後同定されたタンパク質について iPS 細胞の制御における役割を解析する。

活性型 *SMO* 変異を持つ iPS 細胞を作成する試み

細胞生化学、谷嵜優、54

目的

髄芽腫オルガノイド作成のための iPS 細胞の準備と目的遺伝子である *SMO(Smoothened)*を変異させた iPS 細胞のゲノム DNA を、サンガーシーケンス法で解析する。

背景

髄芽腫は小脳に好発する小児の悪性腫瘍で WNT 群、SHH-activated TP53-Wildtype、SHH-activated TP53-mutant、non-WNT/non-SHH 群の 4 グループが存在する。活性型 *SMO* である *SMOM2* は SHH 型髄芽腫によく見られる。*SMOM2* は *SMO* の 535 番目のトリプトファンがロイシンに変異したものである。SHH シグナルは人を含む動物の胚発生や組織の恒常性維持に関わる重要なシグナル伝達経路である。SHH シグナル伝達経路は、SHH タンパク質が PTCH と呼ばれる膜貫通型受容体に結合することで開始され、*Smoothened(SMO)*と呼ばれる下流のエフェクターの抑制を解除する。これにより、Gli と呼ばれる転写因子が核に移行し、細胞の増殖、 分化、生存に関わる様々な標的遺伝子の発現

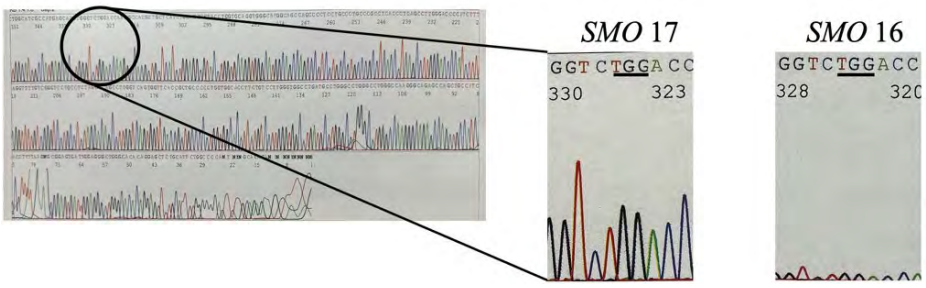
を制御する。*SMO* の活性化により SHH シグナル伝達経路に影響を与えてがんが引き起こされる。

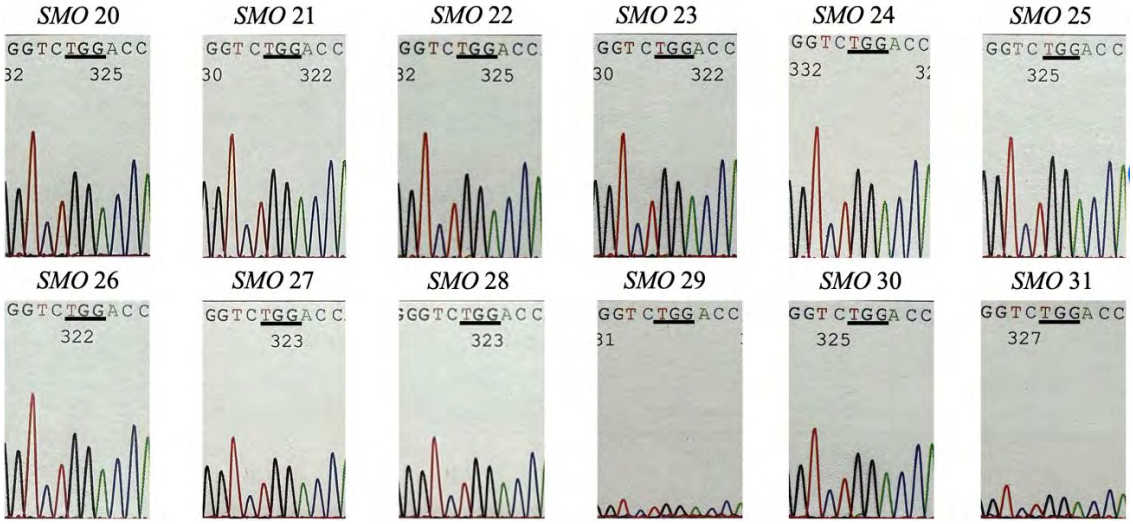
方法

　すでに教員が CRISPR/Cas9 を用いて編集した 201B7iPS 細胞からゲノム DNA を得て、それを PCR によって DNA を増幅させる。PCR product purification によって PCR 産物を精製する。その後、ラベリング反応をしてサンガーシーケンスで DNA の塩基配列を解析した。

結果

　シーケンスの結果は以下の通りである。





シーケンスの解析により *SMO* の 8～12,16,17,20～31 番は wild type であった。

SMO の 13～15,18,19,32～35 番はシーケンスで解析できなかったので、DNA を精製する精度が良くなかったと思われる

考察

今回は欲しい塩基配列(TTG)が得られなかったのでもう一度 CRISPR/Cas9 を行う必要がある。シーケンスによって欲しい塩基配列(TTG)が得られれば、シグナル伝達経路の活性を解析する。具体的には、RT-qPCR を用いて Gli の mRNA の量を測定する。

参考文献

Wanchen Wang *et al*. Front Cell Dev Biol. 2022

Arun Radharkrishnan *et al*. Nat Chem Biol. 2020

http://jpn-spn.umin.jp/sick/h7.htm

ヒト iPS 細胞から心筋への分化の過程

細胞生化学　伊藤万祐（No.7）

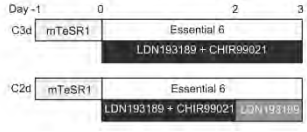
〈目的〉

我々の研究室ではシンプルで扱いやすいヒト心筋組織分化系の確立を目指している。ヒト iPS 細胞がまず中胚葉に分化しその後心筋前駆細胞、心筋へと分化していくことが知られている。本研究では我々の心筋分化系で細胞分化過程を見ることで、従来よりもシンプルな方法で心筋が作成できたことを確かめた。

〈背景〉

我々が心筋を誘導したプロトコルは従来のものより工程が少なく、加える試薬が安価であることが特徴だ。中胚葉形成の誘導と、それがさらに心臓中胚葉と心臓前駆細胞へと分化していく過程は、WNT、FGF、 TGFβスーパーファミリー等によって制御されている。1)我々のプロトコルでは、中胚葉化を進めるために Activin や BMP を使わず、代わりに CHIR99021 によって WNT シグナルを活性化させ、その後 LDN193189 を追加し BMP シグナルを阻害した。WNT シグナルの活性化が持続されると未分化 ES 細胞の中胚葉分化が誘導されることが分かっている。2)また、発生初期に心筋細胞の発生領域においてBPM アンタゴニストの Noggin が一過性に強く発現することが分かっており 3)本来加えるはずの BMP を LDN193189 の添加によって阻害したのはこれを再現したためと考えられる。またこれらの試薬は Activin や BMP と違ってタンパクでなくケミカルであるため、扱いやすく比較的安価である。

〈方法〉



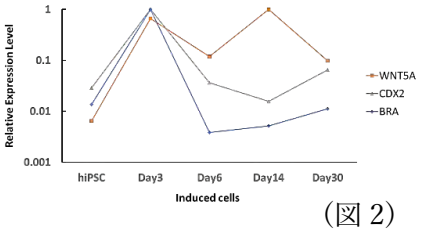
(図 1)

3 日目まで作成したプロトコル(図１)に沿って中胚葉誘導を行ったのち、30 日

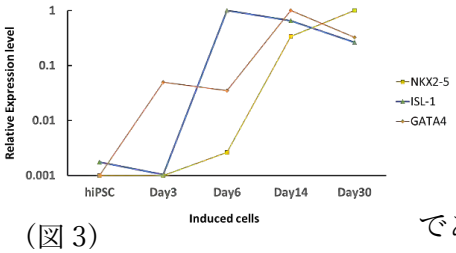
目まで D-MEM10%FBS で培養した。それぞれの段階におけるマーカーの発現は Quantitative PCR analysis で定量的に、Immnofluorescence で空間的に見た。

〈結果、考察〉

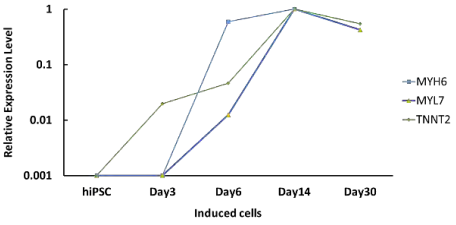
心臓誘導系における中胚葉マーカー(WNT5A、BRA、CDX2)は Day3 に発現してその後減少するものと発現が持続するものに分かれた。(図 2) CDX2 と BRA が一過性に働く転写因子であるのに対し、WNT5A は形態形成にもかかわっているため比較的長い間働いていたと予想される。心臓の前駆体マーカーは ISL-1、GATA4 の発現に続いて NKX2-5 が発現している。(図 3)マウスの生体においても ISL-1 と GATA4 がほぼ同時、その後 NKX2-5 という順に発現しており本研究において生体に近い形での分化が認められるといえる。心筋の機能的タンパクである MYH6、MYL7、TNNT2 の発現も確認でき、きちんと動く働きを持った心筋が誘導されたことが確認できた。(図 4)



(図 2)



(図 3)



(図 4)

以上の結果から、本プロトコルで心筋分化過程に沿った分化が見られ、きちんと機能する心筋ができたことが確認できた。

〈参考文献〉

1) Spater et al: Biologists, 141, p.4418-4431, 2014

2) Manjiri et al: JURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, volume 282, issue 43, p.31703-31712, 2007

3)湯浅慎介: 生物物理化学, 53 巻, 4 号, p.99-101, 2009

ツメガエル胚を用いた口腔顔面形態解析による

口唇口蓋裂候補遺伝子の検証

細胞生化学 伊藤奈緒（No.6）

【背景】

口唇口蓋裂とは、口唇や口蓋が正常に癒合しないまま出生する、先天性で多因子遺伝の疾患である。ヒトの顔面奇形では最も頻度が高く、約 700 人に 1 人と言われている。本研究に先立ち、マダガスカル人の口唇口蓋裂患者 26 人に対して全エクソームシーケンシングを行った所、以下の 7 つの候補遺伝子が発見された(Table 1)。この著者らとの共同研究で、これらの候補遺伝子が実際に口唇口蓋裂に寄与しているか、アフリカツメガエル胚を用いて検証した。

候補遺伝子	*WNT5B*	*GPC4*	*SEPTIN9*	*SKI*	*WDR11*	*MSX1*	*PHGDH*
変異	p.Arg88Leu	p.Ala322Gly	p.Glu370Lys	p.Arg152His	p.Met1057Val	p.Glu84Val	p.Ser311Phe

Table 1: 口唇口蓋裂の候補遺伝子

【方法】

アフリカツメガエル胚を 2 cell stage 時に各候補遺伝子の knockdown を行い、stage42 または 45 で固定して全長と顔面を観察した。撮影した顔写真を用いてランドマーク法、プロクラステス解析、主成分分析(PCA)を行い、口腔顔面の定量解析を行った。

【結果】

① RAR inhibitor treatment では口唇裂が認められる

アフリカツメガエル胚において、レチノイン酸は口腔顔面の形成に関与しており、これを阻害することで口唇口蓋裂が観察されることが知られている。そこでまずはレチノイン酸受容体阻害薬（RAR inhibitor）treatment を行い、実際に口唇裂が認められるか確認したところ、口唇裂に似た表現型が観察され（Figure 1）PCA においてもクラスター分離が認められた（Figure 2）。

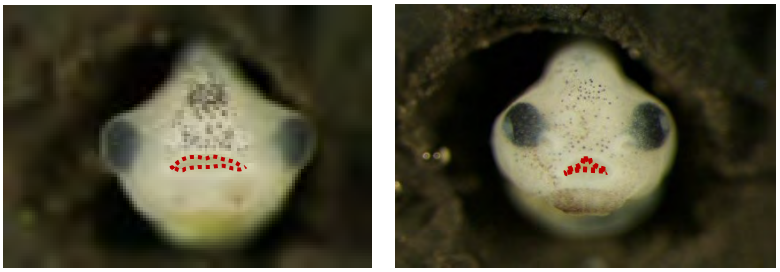


Figure 1: 左は control（DMSO）、
右は RAR inhibitor treatment を実施

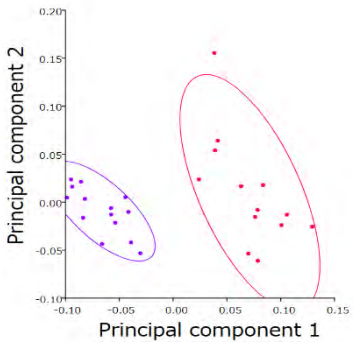


Figure 2: 口腔顔面ランドマークの PCA plot。
紫は control、赤は RAR inhibitor

② 単一遺伝子 knockdown による口腔顔面の定量解析

各候補遺伝子の single knockdown を行った所、*msx1* の single knockdown のみ PCA において軽度なクラスター分離が見られたが、明らかな口唇裂は観察されなかった。また、その他の候補遺伝子についても明らかな口唇裂は観察されず、PCA のクラスター分離は

認められなかった。

③ 患者から報告された double mutation 遺伝子の knockdown による口腔顔面の定量解析

7 つの候補遺伝子のうち、*WNT5B* と *GPC4*, *SKI* と *WDR11*, *MSX1* と *SEPTIN9* はそれぞれ同一患者から変異が発見されている（Table 2）。そこで各遺伝子ペアの double knockdown を行った。

	遺伝子変異
Child #1	***WNT5B, GPC4***
Child #2	***SKI, WDR11***
Child #3	***MSX1, SEPTIN9***

Table 2: 同一患者から発見された変異

wnt5b と *gpc4* の double knockdown では PCA において軽度なクラスター分離が見られたが、明らかな口唇裂は観察されなかった。*ski* と *wdr11* の double knockdown では明らかな口唇裂は観察されず、PCA においてもクラスター分離は認められなかった。*msx1* と *septin9* の double knockdown では口唇裂に似た表現型が観察され（Figure 3）、PCA においても明らかなクラスター分離が認められた（Figure 4）。

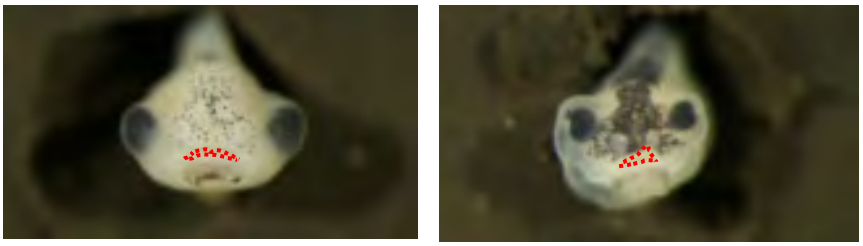


Figure 3: 左は control、右は *msx1* と *septin9* の double knockdown

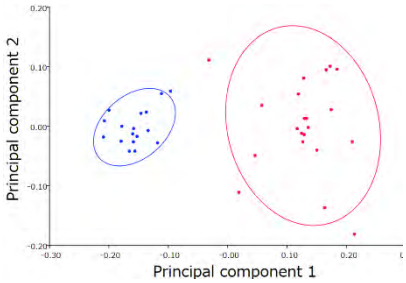


Figure 4: 青は control、赤は *msx1* と *septin9* の double knockdown

【結論】

各候補遺伝子の single knockdown, *wnt5b* と *gpc4*, *ski* と *wdr11* の double knockdown では明らかな口唇裂は観察されなかった。一方で、*msx1* と *septin9* の double knockdown では口唇裂に似た表現型が観察され、PCA においても明らかなクラスター分離が認められた。

【今後の方針】

結論を踏まえ、今後の方針として以下の 2 つが考えられる。

(1) *MSX1* と *SEPTIN9* のmRNA を injection することによる double knockdown 胚のレスキュー実験を行う

(2) 候補遺伝子のmRNA を injection して、過剰発現させて表現系を観察する（Gain of function の観察）

【参考文献】

・Kennedy AE, and Dickinson AJ. Median facial clefts in Xenopus laevis: roles of retinoic acid signaling and homeobox genes. Developmental Biology, 2012, May 1;365(1):229-40.

・Manojlovic Z et al. Genome analysis using whole-exome sequencing of non-syndromic cleft lip and/or palate from Malagasy trios identifies variants associated with cilium-related pathways and Asian genetic ancestry. Genes (Basel), 2023, Mar 7;14(3):665.

Involvement of Tid1 in aging and neurodegeneration

神経生化学 ・ Ilsong Institute of Life Science, Hallym University
Mayuko Oguri (No.16)

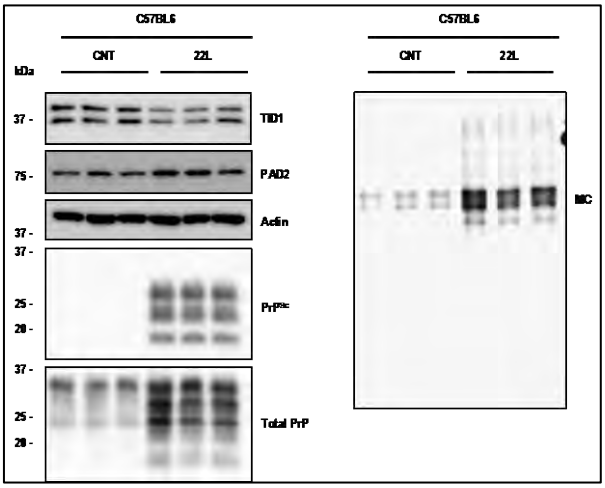
[Background and purpose]

Prion disease is caused by the accumulation of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) in the brain and is resistant to digestion by proteinase K. This abnormal form leads to neuronal damage and eventually neurodegeneration. Mitochondria are vital intracellular components involved in cell maintenance and can adapt to various stress conditions through mitochondrial homeostasis. Prion disease-mediated neurotoxicity leads to mitochondrial damage; however, mitochondrial dynamic mechanisms function to remove damaged parts and maintain mitochondrial membrane potential. Interestingly, prion infection induces mtROS and loss of mitochondrial membrane potential, decreased mtOXPHOS expression, and abnormal mitochondrial fission and mitophagy[1]. Mitochondrial homeostasis involves various proteins, among which Tid1 is mainly localized in the mitochondrial compartment. Previous studies have shown that loss of Tid1 has a detrimental effect on mitochondrial membrane potential and is important for maintaining mitochondrial homeostasis[2]. Various neurodegenerative diseases have also elucidated the involvement of Tid1; however, studies related to its involvement in prion diseases are yet to be performed. Therefore, we conducted experiments to evaluate the role of TID1 in Prion infection and mitochondrial damage.

[Methods]

Mice were infected with 1% 22L scrapie-infected brain homogenates intracerebrally, and brain tissues were collected at 130dpi. Neuronal cell cultures were used to induce mitochondrial damage using CCCP. SAM mouse brain samples (SAMR1 and SAMP8) aged 3M and 12M were also analyzed.

[Results]



We examined the effect of prion infection (22L, one of the prion disease strains) on the expression of various proteins in in vivo mouse models (Fig.1). We found that Tid1 expression level decreased during prion infection. Moreover, the expression level of PAD2, which induces abnormal citrullination of proteins, was increased. We also observed an increase in the expression level using the MC method, which detects the amount of abnormally folded proteins.

Figure 1. Changes in protein expression levels in the *in vivo* model.

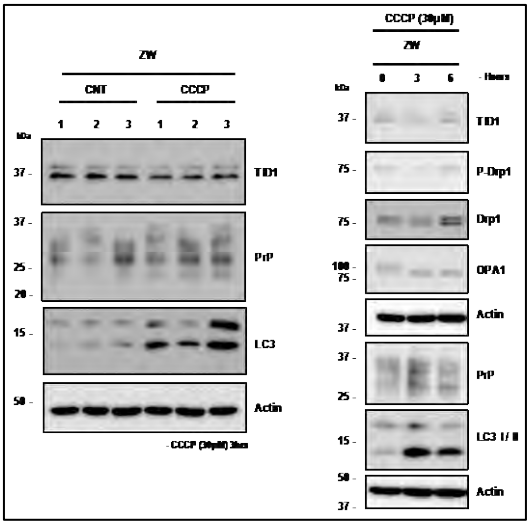


Figure 2. Changes of protein expression in in-vitro model.

Next, we conducted the experiment using in *in vitro* model (Fig.2). We observed a reduction in Tid1 expression in CCCP-treated cells. Moreover, we observed an increase in LC3-2, a marker of autophagy, in CCCP-treated cells. We also confirmed the changes over time. Drp1 activation, which indicates mitochondrial fission, did not change. However, the long isoform of OPA1 disappeared after 3 hours. Mitochondria are inactivated upon loss of membrane potential, which controls fusion activity by producing S-Opa1 through cleavage of L-Opa1. Therefore, I think it means mitochondrial fusion is prevented by CCCP treatment.

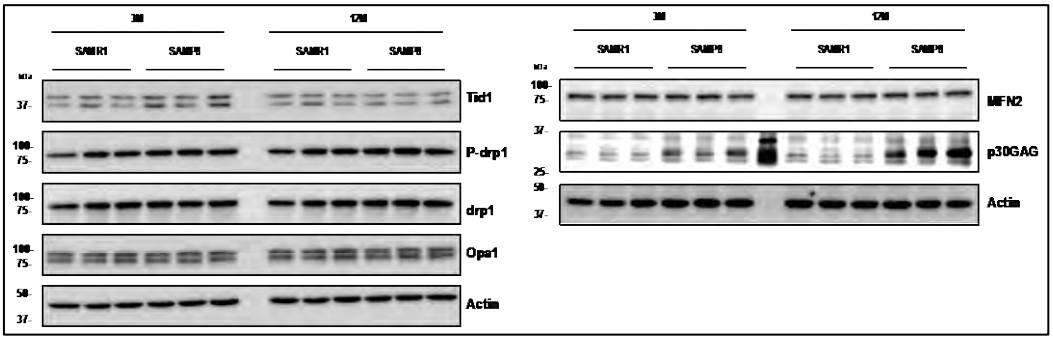


Figure 3. Changes in Tid1 and mitochondrial dynamics in an aging model.

To further study, we also performed experiments to understand the effect of aging on Tid1 expression (Fig.3). We observed that the expression level of Tid1 decreased even in aging accelerated mice. Drp1 activation remained almost unchanged. The expression levels of OPA1 and MFN2 remained unchanged. Therefore, we examined other proteins involved in mitochondrial homeostasis.

[Conclusion]

Based on these findings, we concluded that Tid1 expression levels decreased in prion infection, induced mitochondrial damage, and accelerated aging. However, the role of Tid1 in mitochondrial homeostasis is still unclear, and whether the presence of Tid1 can play a vital role in protection against mitochondrial damage requires further study.

[References]

1) Mo-Jong Kim, Hee-Jun Kim, Byungki Jang, Hyun-Ji Kim, Mohd Najib Mostafa, Seok-Joo Park, Yong-Sun Kim, Eun-Kyoung Choi(2022). Impairment of Neuronal Mitochondrial Quality Control in Prion-Induced Neurodegeneration.*Cells,* 11(17)

2) Andy Cheuk-Him, Stephen D. Baird, Robert A. Screaton (2014). Essential Role of Tid1 in Maintaining Mitochondrial Membrane Potential Homogeneity and Mitochondrial DNA Integrity. *Molecular and Cellular Biology,* 34(8)

How does obesity reduce Alzheimer's pathologies?

Neurochemistry, Hiroya Hanazaki, No.66

Objective

According to the previous report, obesity is associated with fewer Alzheimer's pathologies in subjects with dementia[1], which is consistent with our observation in ob/ob mouse, a model of obesity. The purpose of this study is to reveal the differences between normal and obese mice and discuss how obesity can reduce Alzheimer's pathologies.

Methods

・RNA-seq Data Analysis

The data from next generation-sequencer were statistically tested to identify differentially expressed genes (DEG) in the brains of these mice. And then, we examined which cells were most affected by each DEG and counted the number of such cells.

・Immunofluorescent staining

Coronal paraffin sections were incubated overnight at 4°C with Anti-IBA1 antibody (rabbit, 1:100, Fujifilim Wako). Then, sections were stained with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 546 (1:200) for an hour. After staining, we processed photomicrographs by using ImageJ and counted the number of IBA-1 positive microglia.

・Sudan Black staining

Coronal paraffin sections were left in Sudan Black B which stains lipids for 5 minutes. Then, we measured the thickness at equal intervals from the edge of the cingulum and calculate the average.

・Klüver-Barrera staining

Coronal paraffin sections were left in Luxol Fast Blue Solution in 55°C overnight. Then, we rinsed off excess stain and counterstained in Cresyl Violet Acetate for 10 minutes in 37°C.

Results

Microglia- and oligodendrocyte-related genes were found to be downregulated in ob/ob mice (Figure 1). Fluorescent staining, however, didn't show this feature, as there was no significant differences in the number of microglia (Figure *2*). Sudan Black staining showed thinning of the corpus callosum in ob/ob mice (Figure 3).

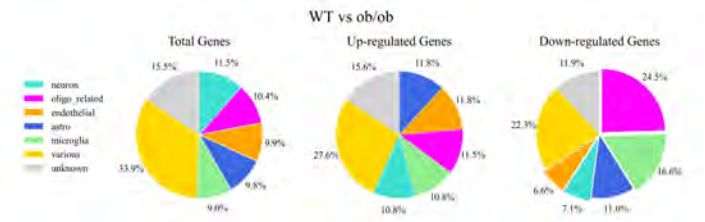


Figure 1 : Oligodendrocyte- and microglia-related genes were significantly decreased in ob/ob. Asterisks indicate significantly changed cells. (FDR < 0.05)

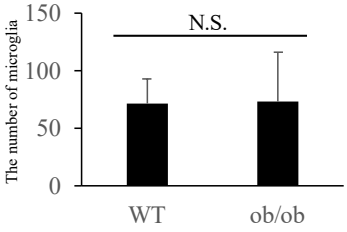


Figure 2 : No significant difference in the number of IBA-1 positive microglia.

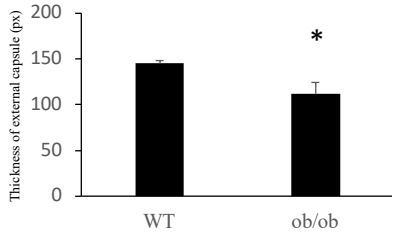


Figure 3 : Thinning of the external capsule in ob/ob. *p<0.05

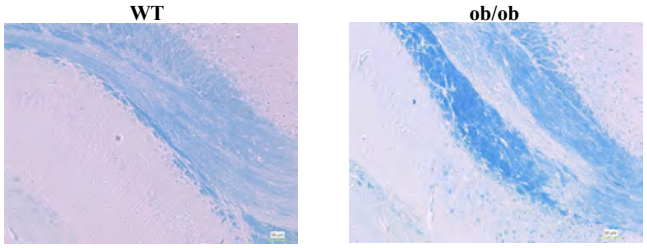


Figure 4 : Images of Klüver-Barrera staining. Scale bar, 50μm.

Conclusion

Although we couldn't see the difference of microglia in immunofluorescent staining, it is likely to say that microglia- and oligodendrocyte-related gene expression is decreased in ob/ob mice, which is consistent with the other data obtained from single-cell analysis, real-time PCR and ELISA. Also, thinner corpus callosum histologically indicates the reduction of oligodendrocyte-related genes. Although sufficient data could not be obtained due to the period of research, the images of Klüver-Barrera staining might show the axonal damage by decreasing oligodendrocytes (Figure 4).

These results suggest that these cellular changes in obesity mouse model might be involved in reduction of Aβ accumulation. It's interesting to see how microglia and oligodendrocyte changes in obesity relate to each other.

Discussion

I examined various documents in order to consider how the reductions in microglia, oligodendrocytes and Aβ accumulation relate to each other. Microglia have been reported to contribute to Aβ propagation[2]. It has also been reported that microglia are important for the growth and maintaining health of oligodendrocytes and loss of microglia results in abnormal myelination[3]. Furthermore, the TGFβ1–TGFβR1 axis in microglia-oligodendrocyte communication is important for the regulation of myelin health[3]. These reports indicate that when microglia are reduced in the obesity mouse model, Aβ propagation and accumulation are suppressed and oligodendrocytes are reduced as our study found.

Since we couldn't see the difference of the number of microglia in immunofluorescent staining, it is important to focus on the functions of microglia. For future studies, we would like to observe morphological changes in microglia at higher magnification and investigate whether stimulating TGFβR1 can rescue myelin health.

References

1. Shinohara M, Gheni G, Hitomi J, et al APOE genotypes modify the obesity paradox in dementia Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 2023;94:670-680.
2. d'Errico, P., Ziegler-Waldkirch, S., Aires, V. et al. Microglia contribute to the propagation of Aβ into unaffected brain tissue. Nat Neurosci 25, 20–25 (2022). https://doi.org/10.1038/s41593-021-00951-0
3. McNamara, N.B., Munro, D.A.D., Bestard-Cuche, N. et al. Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity. Nature 613, 120–129 (2023). https://doi.org/10.1038/s41586-022-05534-y

Biological implication in the increase of RDW as a marker for frailty.

Neurobiochemistry Naho Yamada 91

1. Purpose

Frailty is a medical condition of reduced function and health in the elderly. Detection and early intervention are needed to prevent long-term care of old patients. Although red cell distribution width (RDW) has been proposed as a potential prognostic marker in some cases, as well as frailty and cardiovascular diseases, the mechanism and/or biological implication remains to be elucidated. During my training, mouse models were used to address this issue. ① As MCV and RDW are known to be elevated in the mid-late life of women, I hypothesized that menopause might affect these parameters and used an ovariectomy model of estrogen deficiency. ② In humans, increased RDW is known to reduce life expectancy. Therefore, we examined how RDW and erythrocyte-expressed genes are altered by the presence of frail in aging mice.

2. Methods and results

In this study, we performed a surgical OVX to remove ovaries from 8-week-old female mice in order to deplete them of estrogen. Blood samples were then taken every week along with sham-operated mice to measure blood counts such as RDW and MCV. At the 4 weeks of post-surgery, no significant difference was observed in RDW or MCV, suggesting that estrogen may not play a direct role in maintaining erythroid cell size in mice.

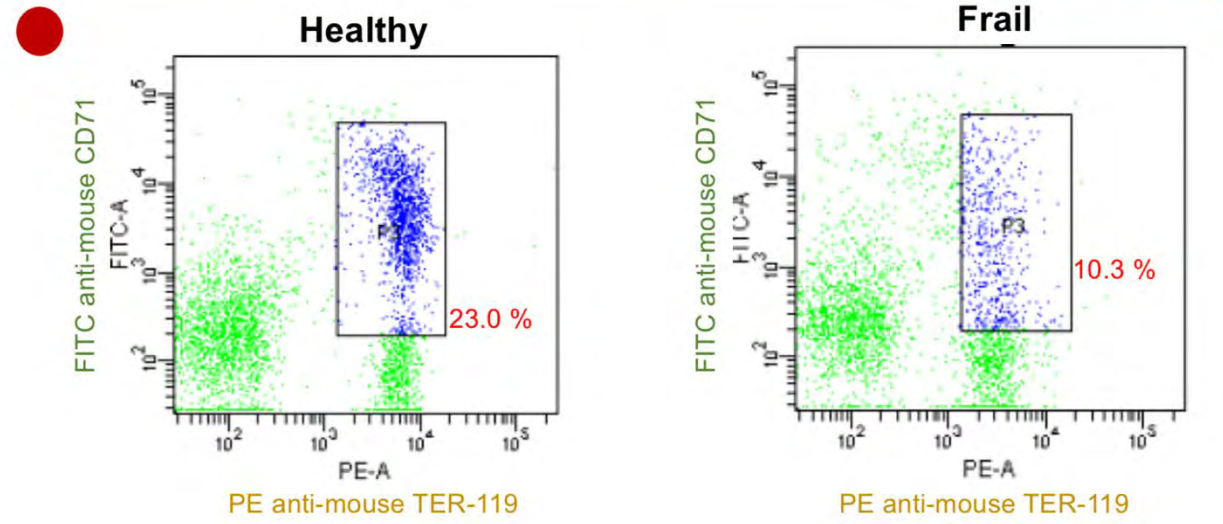


The results of blood samples for 4wks

Text mining was performed on human GWAS results and data from the mouse phenotype consortium to obtain information about molecules involved in RDW. As Ppp1r15a is a gene extracted from ~~both~~ human and mice data, I focused on this gene. Erythroid cells in the bone marrow of the aged mice, depending on the presence or absence of flail, were selected by FACS using antibodies to Ter119 and CD71. Q-PCR analyzed gene expression. Although the experiment is still too preliminary, the expression of Ppp1r15a was significantly increased in the mouse with elevated RDW, as were the associated stress-related genes as

well, conceivable that the gene may be involved in the regulation of RDW and may be a possible stress indicator in erythroid cells.

	Age (month)	sex	BW (g)	RDW (%)
Healthy	33	male	36.0	13.9
Frail	33	male	33.4	22.6





3. Consideration

In mice, there was no direct relationship between RDW and MCV values due to estrogen deficiency from ovariectomy. Therefore, there may be another reason for the significant increase in MCV in human middle-aged and older. On the other hand, RDW values differed depending on the physical condition of the aged mice, indicating that PPP1R15A gene expression acts as a stress sensor and is reflected in RDW values. Therefore, the present study indicated that the PPP1R15A gene expression in RDW and erythrocytes may be useful as a biomarker for frailty.

References: RDW and the risk of death in middle-aged and older adults Kushang V. Pate et al. Arch Intern Med. (2009)/Human GWAS Pilling et al. PLOS Genet (2017)/ International Mouse Phenotyping Consortium

Comparison of contractile properties of detrusor and bladder arterioles between normal and high-fat-diet mice

細胞生理　山田晃也 90，山本なつ美 95

＜目的＞

メタボリックシンドロームは過活動膀胱（OAB）の主要なリスクファクターであり（文献 1）、肥満そのものと OAB にも相関が示唆されている（文献 2）。本研究では、肥満モデルマウスである HFD マウスを作製し、以下の仮説１～3を検証することを目的とした。

（仮説1）排尿に関与しない排尿筋の自発収縮（non-voiding contraction、NVC）は、求心性神経を機械的に刺激して尿意を発生させることから（文献 3）、過剰な NVC は OAB における尿意切迫感や頻尿を来す。『HFD マウスでは、排尿周期の短縮や NVC の亢進が見られる』、との仮説を立て、膀胱内腔圧測定を行った。

（仮説2）膀胱排尿筋を収縮させる副交感神経性の伝達物質は、マウスなどの動物ではアセチルコリン（ACh）と ATP、健常なヒトでは ACh のみであるが、OAB 患者では ATP による排尿筋の収縮が出現する（文献 4）。『HFD マウスでは、排尿筋の神経性収縮に関与する ATP の比率が大きくなる』、との仮説を立て、排尿筋張力測定を行った。

（仮説3）虚血は OAB の主要な原因である。従来、膀胱栄養動脈が粥状硬化による動脈硬化で物理的に狭窄し、膀胱が虚血になり OAB を来すという説明がなされてきた（文献 5）。しかし肥満などにより交感神経活動が過剰になり、膀胱壁内の細動脈が過剰に収縮することにより機能的に虚血性 OAB を呈するとの説が提唱されている（文献 6）。『HFD マウスでは、膀胱粘膜の細動脈の交感神経性収縮性が亢進する』、との仮説を立て、細動脈径計測を行った。

＜方法＞

（HFD マウスの作製）HFD マウスは、約 10 週齢のマウスに、10 週間にわたり高脂肪食を摂食させることで作製した。週齢を対応させた Control マウスは標準食での飼育を継続した。脂肪食と標準食の構成成分(kcal%)を(図 1)に示す。10 週間の摂食期間前後での体重比（増加率）を算出し、Control マウスで最も増加率が大きかった個体（増加率＝1.35）よりも増加率が大きい個体のみを HFD マウスとして実験に用いた。

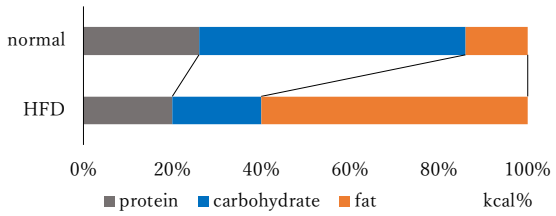


図 1 与えた飼料の構成成分

（膀胱内圧測定）

ウレタン麻酔したマウスの膀胱にカニューレを挿入し、一定速度（0.6mL/h）で生理食塩水を注入した。膀胱内腔とカニューレ内腔の圧は等しいため、カニューレ内腔圧力を測定することで膀胱内腔圧とした。

（筋張力測定）

粘膜剥離した膀胱排尿筋標本に電気刺激（EFS、pulse duration 100μs, 10 or 20Hz for 3s, every 3min,）を与えて誘発した収縮を、張力トランスデューサーを用いて等尺性

に測定した。EFS 誘発収縮の振幅、area under curve（AUC）、half-width について、受容体拮抗薬によるコントロール値からの減少率を、%amplitude，%AUC，%half-width として表した。

（血管径計測）

摘出した膀胱を切り開いてから、筋層を剥離除去し、細動脈を含む粘膜標本を作製した。電気刺激(EFS, pluse duration 100 μ sec, 20Hz for 5sec, every 2 min)による血管径の経時変化を観察した。測定パラメータとして、basal diameter（μ m），amplitude（μ m），area (m・s)，half width (s)を用いた。

＜結果＞

（膀胱内圧変化）

Control マウスでは 5 例中 5 例が周期的な排尿サイクルを示した（図 2A）。HFD マウスでは 5 例中 4 例が同様の排尿サイクルを示したが、1 例において NVC 発生回数の増加と平均振幅の増高を認め OAB を呈した(図２A)。Control マウスと HFD マウスとの比較では、NVC 発生回数や平均振幅に有意差はなかった（図 2B，C）。最大排尿圧、排尿閾値圧（排尿パラメータ）および、排尿周期・コンプライアンス（蓄尿パラメータ）にも有意差はなかった(data not shown)。

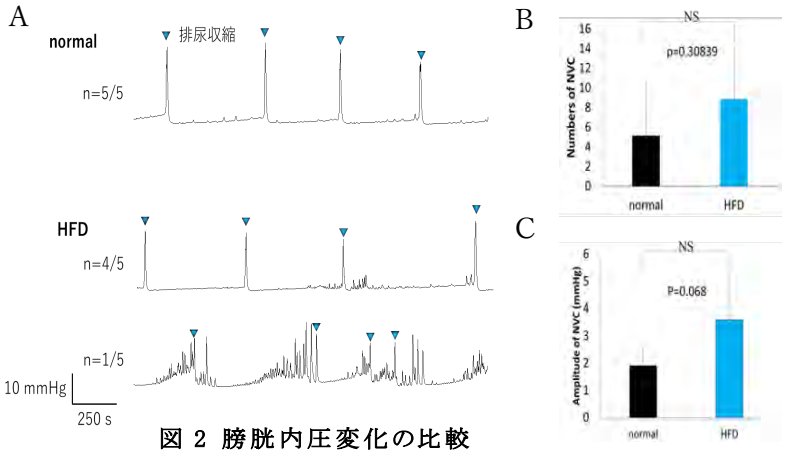


図 2 膀胱内圧変化の比較

（排尿筋の神経性収縮）

Atropine（ムスカリン性 ACh 受容体阻害薬）による減少率（ACh 成分、data not shown)）および α,β-methylene ATP によるプリン受容体脱感作による減少率（ATP 成分、図３）について、EFS10 、20Hz ともに、% amplitude、%AUC、%half-width において有意差はなかった

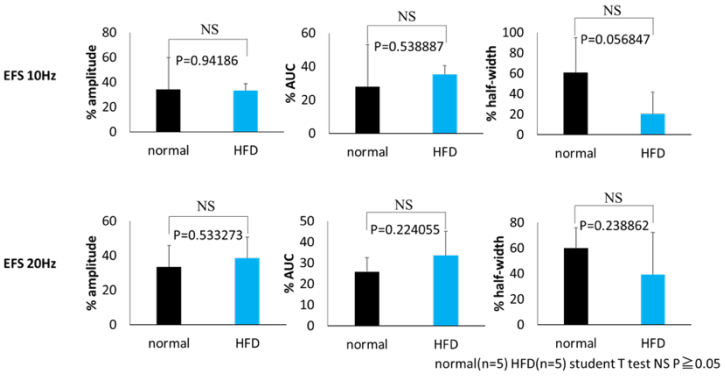


図 3 α,β-methylene ATP による減少率（ATP 成分）の比較

（細動脈の神経性収縮）

神経刺激による細動脈収縮において Control マウスと HFD マウスの間に有意差は見られなかった(図 4)。

非選択的 NO 合成酵素（NOS）阻害剤の L-NA により、Control マウス、HFD マウスともに神経性収縮が増加し、両群間に違いはなかった。神経性 NO 合成酵素（nNOS）阻害剤では、Control マウスで僅かに

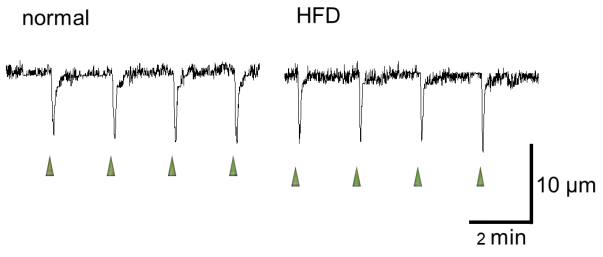


図 4 膀胱細動脈における神経性収縮の比較

減少、HFD マウスでは僅かに増加した。この結果から、NOS による NO の合成は、定常状態に比べて神経刺激時に増加すると考えられた(図 5)。

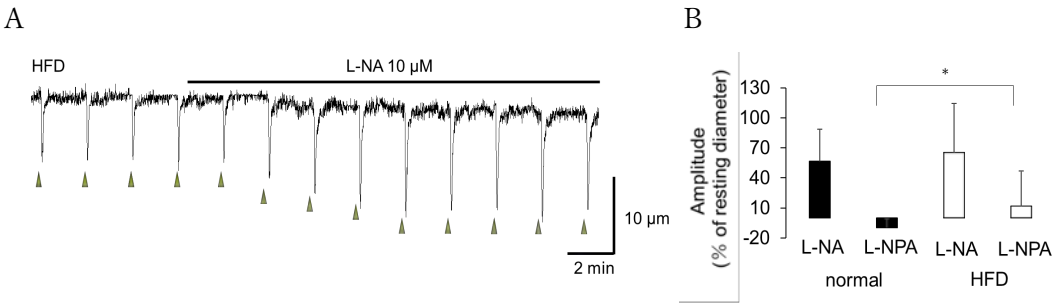


図 5 神経性収縮に対する NOS 阻害剤の影響

α受容体阻害薬であるフェントラミンにより、両群ともほとんどの標本で神経性収縮が消失したことから(図 6A)、神経性収縮は主に交感神経から放出されるノルアドレナリン(NAd)によって引き起こされていることが分かった(図 6B)。

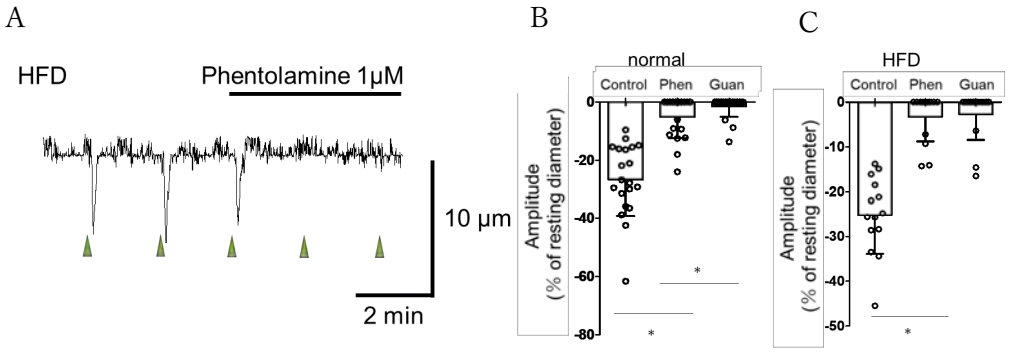


図 6 神経性収縮に対するα受容体アンタゴニストの影響

両群ともα受容体作動薬であるフェニレフリンによりわずかな収縮しか生じなかったが、L-NA 存在下では顕著な収縮を生じたことから(図 7A)、フェニレフリン刺激により内皮のα受容体が活性化されて NO が放出されることが示唆された(図 7B)。

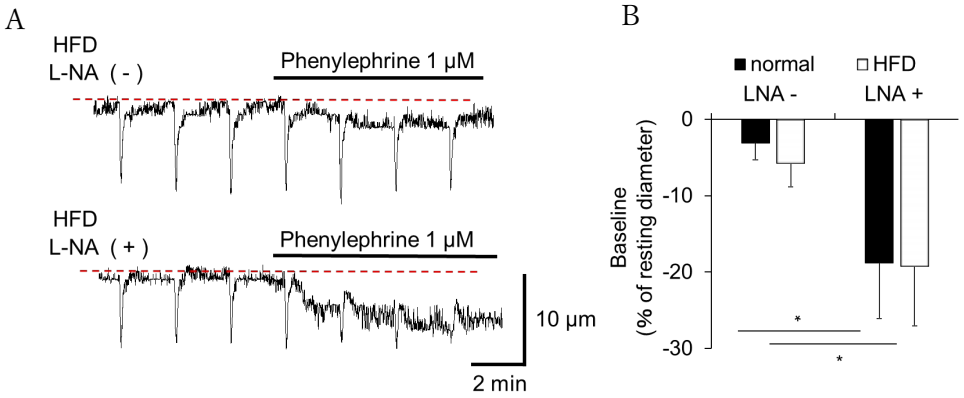


図 7 フェニレフリン収縮に対する NOS 阻害剤の影響

(細動脈の神経性拡張)

神経性血管拡張の観察は、L-NA 存在でのフェニレフリン収縮において観察した。知

覚神経伝達物質であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の受容体阻害薬である BIBN は両グループの神経性血管拡張を有意に減少させたため(図 8A-C)、主な神経性血管拡張の伝達物質は CGRP であることが分かった。

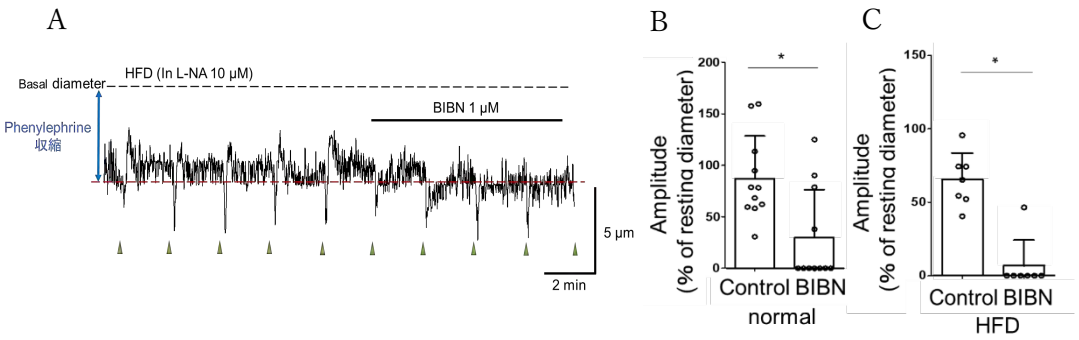


図 8 神経性血管拡張に対する CGRP 受容体アンタゴニストの影響

＜考察＞

Control マウスと HFD マウスの比較では、NVC の発生回数と平均 amplitude、排尿・蓄尿に関するパラメータに有意差は認めず、神経性排尿筋収縮における ATP 成分の比率に有意差も見られなかった。また膀胱粘膜下の細動脈平滑筋の神経性収縮における NAd と ATP の関与比率にも有意差は見られなかった。このことから、HFD マウスは必ずしも OAB を呈するとは限らないという結果であったが、肥満の人がすべて OAB になる訳ではないことから驚きではない。肥満そのものよりも、インスリン抵抗性や交感神経過活動、酸化ストレスの上昇など多様な併発因子がメタボリックシンドロームによる OAB には強く関与すると理解される。HFD マウスの中でこのような変化を示す個体を選別することで、HFD マウスと OAB の関係がより明らかになると考えられる。

膀胱粘膜下の細動脈平滑筋に作用する伝達物質などを図 9 にまとめた。フェニレフリン刺激により NO を放出するα受容体が内皮に存在する可能性が示された。また、神経性弛緩について今回の結果では CGRP が主要な伝達物質であると考えられた。しかし先行研究では NO 作動性神経および内皮からの神経誘発性 NO が関わっているとされており(文献 6)、更なる検討が必要である。

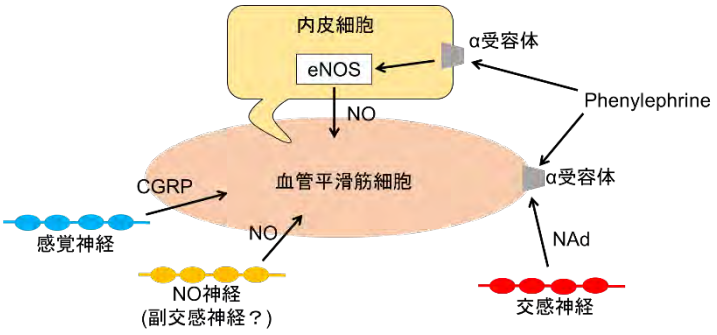


図 9 膀胱粘膜下の細動脈平滑筋に作用する神経伝達物質

＜参考文献＞

1) Novakovic et al. (2017). Scand J Urol51(6):470-473
2) Elbaset et al. (2020). Urology 143: 91—96
3) Heppner et al. (2016). J Gen Physiol.147:323-335
4) Chakrabarty et al. (2022). Exp Physiol. 107:350-358
5) Andersson et al. (2014). Ther Adv Urol. 6: 105-114
6) Tanaka et al. (2021) Br J Pharmacol 178:1073-1010

便秘を引き起こす薬剤による大腸運動の変化

岐阜大・獣医生理・名市大・ 細胞生理学　矢野坂　直輝

＜背景・目的＞

私たちが生活する中で、大腸運動に異常が起きると、便秘などの症状が現れる。また、便秘を誘発する薬もあり、薬剤誘発性の便秘として知られている。

便秘を引き起こす薬剤の代表例として、抗精神病薬や鎮痛薬であるモルヒネがある。便秘を引き起こす機序は、抗精神病薬がムスカリン受容体遮断による抗コリン作用、モルヒネは腸内神経叢におけるアセチルコリンの遊離抑制とされており、作用機序は異なるがいずれも末梢性の作用に起因すると考えられている。

大腸運動の制御には、内在神経系と中枢神経系が関わっており、上記の薬が中枢神経系に作用して便秘を引き起こしている可能性もある。中枢神経系を介して大腸運動を亢進させる物質の一つにカプサイシンがあり、腸管に作用したカプサイシンは感覚神経の TRPV1 チャネルを活性化して、シグナルが脊髄→脳へと伝えられ、その後下降性疼痛抑制系を賦活化することで、神経伝達物質としてドパミンとセロトニンが腸管に作用することによって大腸運動を亢進させる(文献１)。同様にグレリンアゴニストも中枢神経系の脊髄排便中枢を介して大腸運動を亢進させることが知られている(文献２)。

本研究では、便秘を引き起こす薬剤を静脈内に投与した時、中枢神経系を介した大腸運動の亢進に対してどのような影響を及ぼすのかを検討することを目的とした。

＜方法＞

8 週例の雄の SD ラットを α-クロラロースとケタミンで麻酔し、マリオットボトルと大腸・肛門のカニューレを繋ぎ、中を生理食塩水で満たし、大腸内腔圧と排出液量を記録した(図 1)。薬剤は静脈内または脊髄に投与した。侵害刺激としてカプサイシンを大腸内腔に投与した。

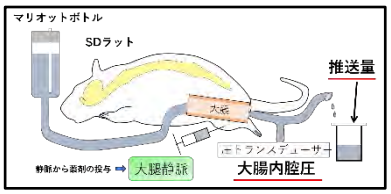


図 1　実験系

＜結果＞

カプサイシンによる大腸運動の亢進

麻酔下ラットにおいて、自発的な一過性大腸内圧上昇（以下大腸運動）が観察された。カプサイシン(100nmol)の大腸内腔投与により大腸運動が亢進した、これに伴う排出液量が増加した(図 2)。

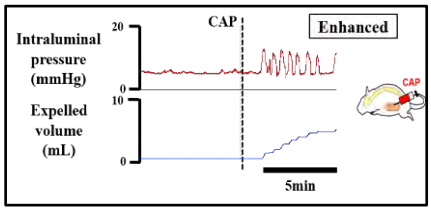


図 2 カプサイシンによる大腸運動の亢進

カプサイシンに対する抗精神病薬の影響

カプサイシン応答性が確認できた個体に、脱感作の影響を考慮し、2 時間後に抗精神病薬であるハロペリドール(5mg/kg)を静脈内投与し、その 5 分後カプサイシン(100nmol)を再度投与すると 1 度目の投与と同様に大腸運動は亢進した(図 3A)。一方、脊髄内にハロペリドール(100nmol)を投与した場合、カプサイシンによる大腸運動の亢進は抑制された(図 4)。

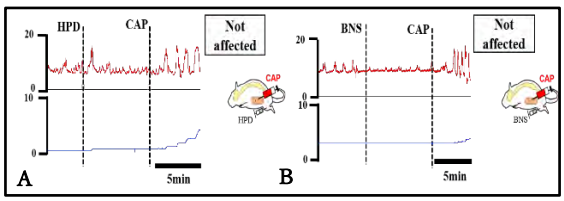


図 3 抗精神病薬の経静脈投与の影響

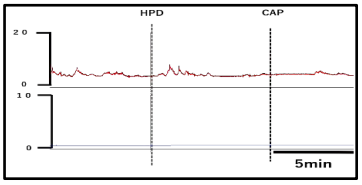


図 4　ハロペリドールの脊髄内投与の影響

同じく抗精神病薬であるブロナンセリン(2mg/kg)

の静脈内投与についても同様に大腸運動は亢進した(図 3B)。

抗精神病薬の自発運動に対する影響

対照実験(生理食塩水、図 5 A)に比べ、ハロペリドール(5mg/kg、図 5 B)とブロナンセリン(2mg/kg、図 5C)の静脈内投与により、自発運動は抑制された。

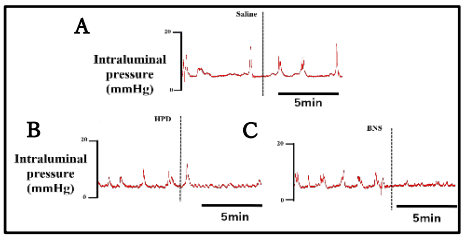


図 5　精神病薬の自発運動に対する影響

カプサイシンに対するモルヒネの影響

モルヒネ(4mg/kg)の静脈内投与により、カプサイシンによる大腸運動の亢進は抑制された(図 6)。

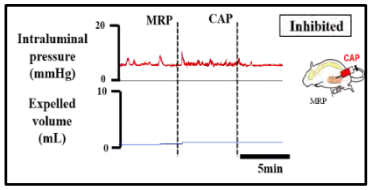


図 6　カプサイシンの作用に対するモルヒネの影響

グレリンアゴニストに対するモルヒネの影響

脊髄排便中枢で作用して大腸運動を亢進させるグレリンアゴニスト(20mg/kg)の静脈内投与で大腸運動が亢進することが確認できた個体に(図 7 A)、2 時間後にモルヒネ(4mg/kg)を静脈内に投与し、5 分後グレリンアゴニストを再投与すると大腸運動の亢進は抑制された(図 7B)。

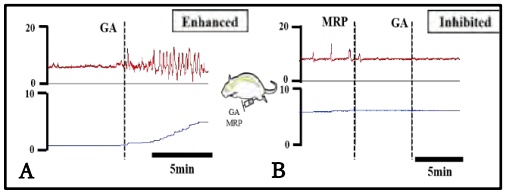


図 7 グレリンアゴニストの作用に対するモルヒネの影響

＜考察＞

今回の実験結果から、ハロペリドールとブロナンセリンの静脈内投与は、中枢よりもむしろ末梢で大腸に作用して大腸運動を抑制する可能性が示唆された。しかし、脊髄内にハロペリドールを投与した場合に抑制され、ハロペリドールが血液脳関門を通過すること、中枢での D2 受容体遮断薬(経口投与時)であることから、血中投与で中枢を介して大腸運動を抑制する可能性は否定できない。いずれの薬剤も自発運動は抑制しており、ハロペリドールの中枢性抑制はあるものの、カプサイシン刺激による強力な腸管運動刺激それを上回った可能性もある。投与量を変えるまたは別のカプサイシンより弱い中枢の D2 受容体アゴニストを用いることで、中枢での抑制作用についてさらに検討が出来ると考えられるが、今回行った実験結果では、抗精神病薬の中枢での抑制作用は確認できなかった。

モルヒネについて、モルヒネはカプサイシンとグレリンアゴニスト両方の中枢神経系を介する大腸運動の亢進を抑制することができた。しかし、モルヒネはオピオイド受容体作動薬であり、カプサイシンやグレリンアゴニストと作用点は異なるため、末梢で作用して大腸運動を抑制したのか、中枢で作用して大腸運動を抑制したのかは、今回の結果だけでは区別できない。グレリンアゴニストで大腸運動を亢進させ、モルヒネで抑制したところに、オピオイド受容体拮抗薬であるナロキソンを脊髄または脳室に投与することで大腸運動が再び亢進すれば、中枢で抑制していたと判断することが出来ると考えられ、今後機会があれば検討していきたい。本研究の遂行にあたり岐阜大学獣医生理学教室　志水泰武教授、椎名貴彦教授に多大なるご協力を賜りましたことを、この場をお借りして心より感謝申し上げます。

(文献 1)内藤清惟(2016)、岐阜大学獣医生理学卒業論文

(文献 2) Shimizu Y et al(2006). Evidence that stimulation of ghrelin receptors in the spinal cord initiates propulsive activity in the colon of the rat: J Physiol 576:329-38

ブタの尿道粘膜の収縮力調節における一酸化窒素と伸張の役割

細胞生理学　高橋航太朗(No.49)

＜背景＞

ブタの膀胱では、膀胱平滑筋（排尿筋）だけでなく、粘膜（粘膜筋板）も自発的一過性収縮(SPC)を起こす。蓄尿時後半に SPC が増加、増大することは、感覚神経に機械的刺激を与え尿意を発生させる役割がある。膀胱粘膜の SPC は、一酸化窒素（NO）供与体であるニトロプルシドナトリウム（SNP）により抑制され、伸展刺激により増加することが報告されており、また内在性 NO は神経細胞および尿路上皮から放出されることが示唆されている（文献 1）。近年、尿道粘膜においても SPC が発生することが明らかになった（文献 2）。本研究では、尿道粘膜の SPC が、膀胱粘膜の SPC 同様に NO によって調節されるのか、あるいは伸張感受性を持つのかを明らかにすることを目的とした。

＜方法＞

食肉処理施設から 6 ヶ月齢の雌ブタの膀胱尿道を取得し、各尿道から 2 つの筋切片標本を作製し、95%O2 + 5%CO2 で通気した 37℃クレブス液を含む organ bath 内に吊るし、初期張力 2.0g をかけ 30 分安定化させた。SPC が安定して発生することを確認したのち、SNP および NO 合成阻害剤である SNP および N-ω-ニトロ-L-アルギニン（L-NNA）がブタ尿道粘膜ストリップの SPC に及ぼす影響を調べた。NO がアドレナリン作動性受容体またはムスカリン作動性受容体の刺激によって放出されるかどうかについて、ノルアドレナリン（α および β 受容体刺激薬）、イソプレナリン（β 受容体刺激薬）、カルバコール（ムスカリン受容体刺激薬）を用いて検討した。また SPC の伸展応答性も調べた。

＜結果＞

SNP の尿道粘膜の基線張力と SPC に対する効果

SNP は 1μM 以上で、濃度依存性に基線張力を有意に低下させたが、SPC の頻度には有意な影響を及ぼさなかった（図1A）。図 1B に SPC の基線張力に対する効果をまとめた（N = 10）。

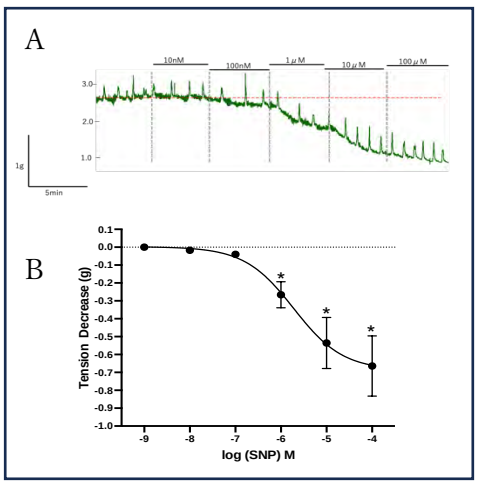


図 1　SNP の基線張力と SPC に対する作用

L-NNA の尿道粘膜の基線張力と SPC に対する効果

L-NNA（100μM）は基線張力と SPCs 共に有意な影響及ぼさなかった。

ノルアドレナリンの基線張力と SPC に対する効果

ノルアドレナリンは 1μM 以上で、濃度依存性に基線張力および SPCs の頻度を低下させた。L-NNA の存在下では、ノルアドレナリンの弛緩作用は抑制される傾向があったが有意差はなかった（N = 9、p=0.058、図 2）。

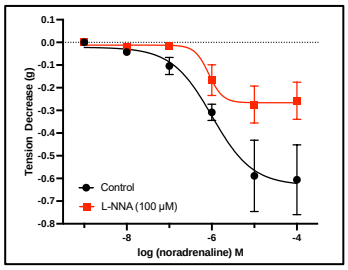


図 2 ノルアドレナリンの基線張力に対する作用

イソプレナリンの尿道粘膜の基線張力と SPC に対する効果

イソプレナリンは、1μM 以上で、濃度依存性に基線張力および SPCs の頻度を低下させた。L-NNA の存在下では、イソプレナリンによる弛緩作用は有意に抑制された（N=6、図 3）（p=0.0016）

カルバコールの尿道粘膜の基線張力と SPC に対する効果

カルバコールは、1μM 以上で、濃度依存性に基線張力および SPCs の頻度を増加させた。L-NNA はカルバコールによる収縮作用を増強しなかった。(N = 9、図 4)。

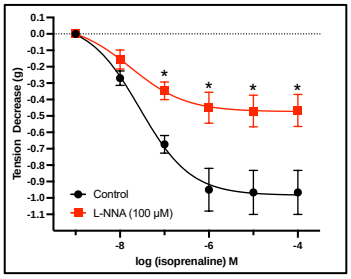


図 3 イソプレナリンの基線張力に対する作用

尿道粘膜の伸展応答

SPCs を発生する標本にかける基線張力を増加ないし減少させた際に、SPCs の振幅や頻度は変化せず、伸展応答は見られなかった(N = 6、図 5)。

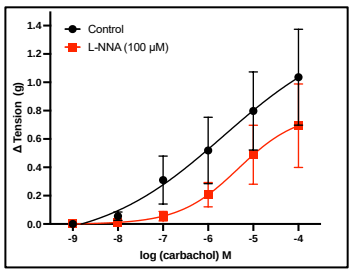


図 4 カルバコールの基線張力に対する作用

＜考察＞

L-NNA が基線張力および SPCs に有意な影響及ぼさなかったことから内因性の NO は持続的放出されていないことが示唆された。一方でイソプレナリンの弛緩作用が L-NNA により抑制されたことから、β アドレナリン受容体刺激は NO 放出を誘引すると推察された。尿道粘膜における SPCs、NO により SPCs が抑制されることは、NO が SPCsによる感覚神経への機械的刺激を抑制し、尿道を起点とした反射機構を抑制する可能性がある。

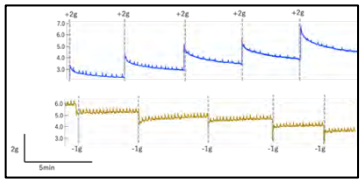


図 5 尿道粘膜の伸展応答

先行研究より、NO 合成酵素含有神経は尿道粘膜に投射していないため(文献 2, 図 6)、NO は神経系以外の上皮や血管内皮細胞などから放出される可能性がある。今後 β 受容体の分布を蛍光免疫染色により検証可能である。生体内では尿路上皮下にある交感神経から放出されるノルアドレナリンが上皮由来などの NO 放出の引き金となる可能性がある。

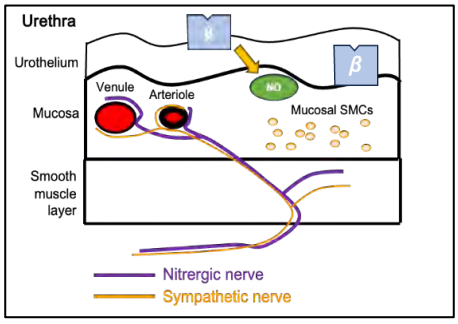


図 6 尿道粘膜における NO 含有神経分布

尿道粘膜の SPCs は伸張の影響を受けなかったが、これは尿道が膀胱に比べて容積変化に伴う形態変化が少ないことと合致している。

＜参考文献＞

1. Moro C et al. (2011), 'Urothelial/lamina propria spontaneous activity and the role of M3 muscarinic receptors in mediating rate responses to stretch and carbachol'. Basic and Translational Science, p1442.e9-1442.e15
2. Moro C & Chess-Williams R (2012), 'Non-adrenergic, non-cholinergic, non- purinergic contractions of the urothelium/ lamina propria of the pig bladder'. Autonomic and Autocoid Pharmacology, 32, 53-59
3. Mitsui R et al. (2021). 'Functional nitrergic innervation of smooth muscle structures in the mucosa of pig lower urinary tract' Cell and Tissue Research, 386,513-531

＜謝辞＞

本研究を進めるにあたりボンド大学の Assistant Professor Iris Lim, Associate Professor Donna Sellers, Professor Russell Chess-Williams, Students in Centre of Urology Research に大変お世話になりました。心から感謝申し上げます。

Receptor subtype involved in α1-adrenoceptor-mediated contraction of porcine ureter

Bond university (Center for Urology Research), 細胞生理学　山本　詩織　(93)

〈目的〉食生活の西洋化や高齢化により尿路結石の患者数は上昇しており、今後も患者は増加すると考えられている(文献 1)。尿管に結石が詰まると、腎盂内の圧が急上昇し疼痛発作や、血尿などの症状が出る。ノルアドレナリンによりα1-アドレナリン受容体(AR)が刺激されることで腎盂の自発一過性内圧上昇の頻度と振幅(収縮力)を増加させ、かつ腎盂から尿管への伝導を促進させることが分かっている(文献 2)。また、尿管のみでもノルアドレナリンにより収縮の頻度や振幅が増加することが分かっている(文献 3)。これらのことから、生体内では、交感神経作動時に同様の現象が起こることが想定される。PCR 法と免疫染色により尿管には 3 つのα1-AR サブタイプが存在し、α1D-AR、α1A-AR、α1B-AR の順で多く、それぞれの作用は明らかになっていない(文献 4)。そこでα1-AR のサブタイプに注目し、遮断薬のブタの尿管収縮における影響を検討した。

〈方法〉食肉処理施設から 6 ヶ月齢の雌ブタの尿管を取得し、各尿管から 3 つの筋切片標本を作製し、95%O_2 + 5%CO_2 で通気した 37℃クレブス液を含む organ bath 内に吊るし、初期張力 2.0g をかけ 30 分安定化させた。その後全ての標本にα1-AR 刺激薬 Phenylephrine の累積添加によりバースト状収縮を惹起した。2 つの標本にサブタイプ選択性が異なるα1-AR 遮断薬 (1nM,10nM)を前投与し、対照標本との比較により拮抗作用を評価した(図 1)。

〈結果〉**Tamsulosin (α1A/D-AR 遮断薬)による Phenylephrine 誘発性収縮の抑制**

Phenylephrine 投与により Control 標本(図 1 上段)ではバースト状収縮を生じたが、Tamsulosin (1nM or 10nM、図 1 中段および下段)は phenylephrine による誘発性収縮を抑制した(図 1)。Tamsulosin(1nM or 10nM) は、Phenylephrine 誘発性収縮の頻度 (図 2A)、AUC(図 2B)、最大振幅(図 2C)を有意に抑制した。

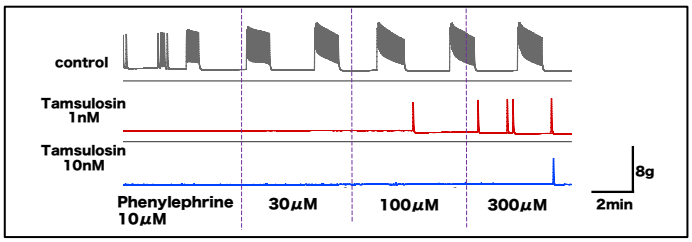


図　1　Phenylephrine による収縮

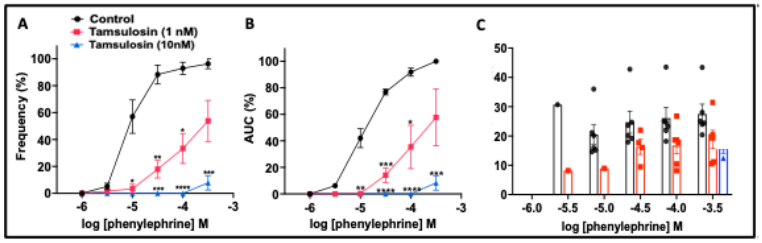


図　2 Tamsulosin による Phenylephrine 誘発性収縮の抑制

RS-100329 (α1A-AR 遮断薬)による Phenylephrine 誘発性収縮の抑制

RS-100329 (1nM or 10 nM)は Phenylephrine 誘発性収縮の頻度(図 3A)、AUC(図 3B)、最大振幅(図 3C) を有意に抑制した。

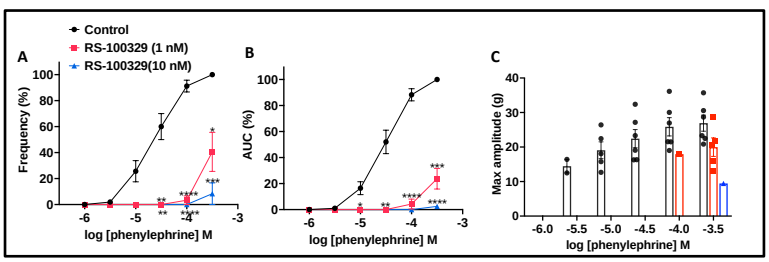


図　3 RS-100329 による phenylephrine 誘発性収縮の抑制

Silodosin（α1A-AR 遮断薬）による Phenylephrine 誘発性収縮の抑制

Silodosin(1nM or 10nM) は、Phenylephrine 誘発性収縮の頻度頻度(図 4A)、AUC(図 4B)、最大振幅(図 4C)を有意に抑制した。

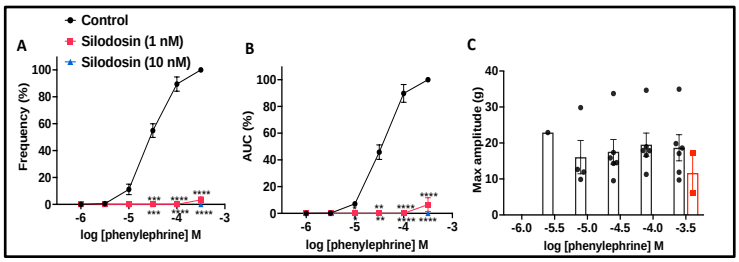


図 4 Silodosin による phenylephrine 誘発性収縮の抑制

RS-17053（α1A-AR 遮断薬）による Phenylephrine 誘発性収縮への影響

低濃度(1 nM)の RS-17053 は、Phenylephrine 誘発性収縮の頻度(図 5A)、AUC(図 5B)、最大振幅(図 5C)を抑制しなかった。高濃度(10 nM)の RS-17053 は頻度(図 5A)を有意に抑制したが、AUC(図 5B)と最大振幅(図 5C)については高濃度(100-300 μM)の Phenylephrine による収縮は抑制しなかった。

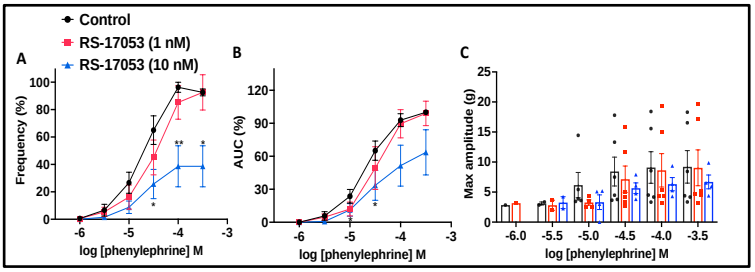


図 5 RS-17053 の phenylephrine 誘発性収縮における影響

Naftopidil（α1D-AR 遮断薬）による Phenylephrine 誘発性収縮への影響

低濃度(1 nM)の Naftopidil は Phenylephrine 誘発性収縮の頻度(図 6A)、AUC(図 6B)、最大振幅(図 6C)を抑制しなかった。高濃度(10 nM)の Naftopidil は頻度(図 6A)を有意に抑制したが、AUC(図 6B)と最大振幅(図 6C)は抑制しなかった。

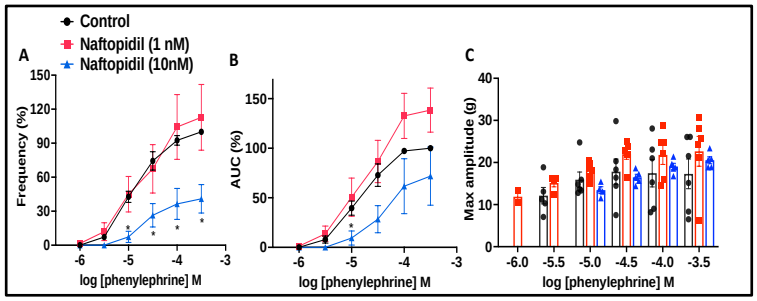


図 6 Naftopidil の phenylephrine 誘発性収縮における影響

〈考察〉ブタの尿管では、α1A-AR 遮断薬はα1D-AR 遮断薬よりも強力に Phenylephrine 誘発性収縮を抑制したことから、α1A サブタイプが収縮に大きく影響していると考えられる。α1D-AR の方がα1A-AR よりも多いにも関わらず、収縮への影響はα1A-AR が大きかったのは、α1A-AR を介した収縮経路の方が感受性が高いからであると考えられる。α1A-AR 遮断薬のうち、Silodosin と RS-100329 が低濃度でも尿管収縮を有意に抑制したが、これはこの二つの薬剤がα1A-AR への高い親和性と選択制を持つためであると考えられる。今回は尿管のみで観察したが、生体内（腎盂ー尿管）でも交感神経の働きを抑制して、結石疼痛を生じる腎盂尿管蠕動の頻度と振幅を下げる可能性があると考えられる。

(文献 1) Lim I *et al.*(2021) Current and emerging pharmacological targets for medical expulsive therapy, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 130, pp. 16-22

(文献 2) Morita T *et al.* (1983) Effects of Noradrenaline and Acetylcholine on Ureteral Peristalsis, *Tohoku J. exp. Med.*141, pp. 489-490

(文献 3) Hannappel J. and Golenhofen K. (1974) The Effect of Catecholamines on Ureteral Peristalsis in Different Species (Dog, Guinea-Pig and Rat), *Pflugers Arch.* 350, pp. 55-68

(文献 4) Itoh Y *et al.* (2007) Examination of alpha 1 adrenoceptor subtypes in the human ureter, *International journal of urology* 14, pp. 749-753

腰椎変性疾患に対する後方椎体間固定術におけるCageのタイプ別による術後の影響に　ついての検討

地域医療学分野
秋澤寿々丸（2)、小林流聖（32)、坂本雄基（34)、田口拓海（50)、原田悠希（68)、
宮田誠也(81)、矢田風雅(86)

1. 背景

腰椎変性疾患は、加齢減少に伴い、椎間板、椎間関節、黄色靭帯などに退行性変化(膨隆・肥厚)が生じ、椎間高の低下と椎間板の圧排に伴って厚膜嚢、馬尾神経、腰部神経根が圧迫され、腰痛や末梢神経障害などが主な症状として現れる疾患である。病状が進行した場合には手術による治療が必要となるが、主要な手術として、後方椎体間固定術などが挙げられる。これは、脊椎の固定および神経圧迫の除圧のための後方外科的アプローチであり、一部の椎間板を切除した後、その代わりとなるCageを後方から挿入し、スクリューなどで椎体を固定する。これにより、椎間板高を回復し、結果的に椎間孔の拡大と、脊柱の前弯の回復を図るものである。しかし、挿入したCageは、術後に椎体内に沈み込む症例が散見されるが、この沈み込みにより、手術で得られた前弯が失われ後弯化してしまうと、病状が再燃し、腰痛が再燃する可能性がある[1) 2)]。

Cageには複数の種類が開発されているが、代表的なCageはExpandable type、Static type、Rotated typeの3タイプである。Expandable type（RISE®, Catalyft®)はCageを椎間に挿入し、Cageが開くことで椎間板高を広げるもので、中でもRise®はCageが全体的に拡張し、Catalyft®は Cage の前方が拡張することで椎間板高を広げるものである[3)]。Static type（Tritanium®, Resitag®)はCageそのものの高さで支え、椎間板高を維持する。Rotated type（Capstone®)は、挿入後に回転させて支持するCageのことであり、本研究においてはRotated typeと総称することにした。

Lin GXらは、10件の比較研究により、1440名の腰椎変性疾患患者に対して腰椎椎体間固定術が行われた結果、Static typeとExpandable typeの2つのケージを比較した際、椎体間固定術において、沈み込みの程度に有意差は見られなかったと報告している[4)]。また、Chang CCらは、178名の腰椎変性疾患患者に対して腰椎椎体間固定術を行った結果、Static typeがExpandable typeに比べて沈み込みにくいということを発見したと報告している[5)]。研究者によって、Cageタイプによる沈み込みの影響などに関しては、異なる結論が出ており、また Rotated type に関する先行研究は不足していた。そこで我々は、Rotated typeを含めた3タイプのCageにおける術後の影響について研究を行うことにした。

2. 目的

後方椎体間固定術後における Cage の沈み込みのリスク因子の検討をタイプ別に比較検討することを目的とした。

3. 方法

3.1 スタディーデザイン

後ろ向き観察研究をデザインした。

3.2 スタディーサイト

名古屋市立大学医学部附属西部医療センターおよび名古屋市立大学大学院地域医療学にて実施した。

3.3 対象

2019 年 8 月 19 日から 2023 年 2 月 1 日までに名古屋市立大学医学部附属西部医療センター整形外科にて後方椎体間固定術を受けた症例で、過去に固定術歴がなく、またケージを挿入した場所が脊椎（L3~S1）の男女 192 名を対象とした。

3.4 データの収集方法

整形外科医師の助言によってケースレポートフォーム（CRF）を作成し、電子カルテから必要な情報を収集した。画像データについては X-P 画像や CT 画像から測定した結果を CRF に記入した。データは Excel ファイルにまとめた後、統計解析ソフトで解析・評価した。

3.5 調査項目

以下の項目の数値について調査し、情報収集を行った。

手術時の年齢、性別、身長、体重、BMI、基礎疾患、Cage の種類、Cage を挿入した位置と椎間数、挿入 Cage の高さ、Cage 角、Cage の腰椎前方からの距離、Cage による沈み込みの有無について。

また、以下の数値の術前、術後、3 か月後、6 か月後の値

Lumbar lordosis（LL）、Segmental angle（SA）、Disc height（DH）、Place of subsidence

以上の項目を調査項目とした上で、Cage の沈み込み状況とリスク因子を主評価項目と設

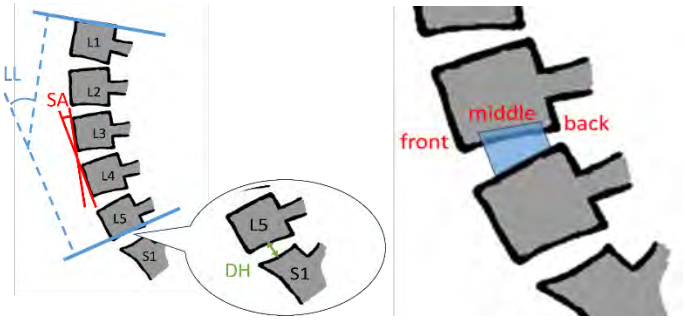
定した。

3.6 比較

・Expandable、Static、Rotated の 3 群間比較
・Expandable (RISE®, Catalyft®)、Static、Rotated (Capstone®)の 4 群間比較
・術前-術直後の比較
・術直後と術後 3 か月、術後 6 か月の経時的変化
・沈み込みの有無による 2 群間比較
以上の比較を行った。

3.7 定義

本研究を行うにあたり、Lumber lordosis(LL)と Segmental Angle(SA)、 Disc height(DH)については以下の左図の様に定義した。沈み込みの有無については、以下の右図の様な場合には、前方、中央、後方の三か所が上下ともに沈んでいるものと定義した。



3.8 解析方法

データの要約について、カテゴリー変数は度数とパーセンテージで、連続変数はシャピローウィルクの正規性検定で正規性の検討をしたのち、正規分布しているものは平均値と標準偏差で、非正規分布のものは中央値と四分位範囲で要約した。群間比較について、カテゴリー変数はカイ二乗検定で、対応のある連続変数はウィルコクソン検定もしくはフリードマン検定で、独立した連続変数はマンウィットニーユー検定もしくはクラスカルウォリス検定を用いた。術前と、術前から術直後の変化については、相関グラフを用いて可視的に評価するとともに、スピアマンの相関係数を求めた。Cage の沈み込みへのリスク因子は、患者の基本属性に加え、挿入したケージの種類を共変量とし、変数の選択にはステップワイズ選択法を用いて変数を選択し、ロジスティック回帰分析にて解析を行った。データは SPSS version29 を用いて解析し、すべての検定において、有意水準は両側で P 値が 0.05 より小さいものを統計的に有意とした。

4．結果

4.1 患者の基本属性

今回の研究は、男性 108 名(56.25%)、女性 84 名(43.75%)、計 192 名の患者を対象に行った。対象者の手術時の年齢の中央値は Expandable type では 69 歳、Static type では 65 歳、Rotated type では 72 歳で、全患者の年齢の中央値は 68.5 歳であった。手術時の年齢について、3 タイプ間では Rotated type で有意に高い値であった。対象者の性別による有意差は見られなかった。対象者の手術時の BMI の中央値は Expandable type では 24.91、Static type では 23.76、Rotated type では 23.29 であった。手術時の BMI について、3 タイプ間では Expandable type が有意に高い値であった(Table1)。

Table 1. Patient demographic

	Expandable n=63	Static n=62	Rotated n=67	P value
	RISE® Catalyft®	Trilamium® Restrag®	Capstone®	
Age-median (IQR)	69. 00 (52.00-74.00)	65.0 (48.5-72.0)	72.0 (60.0-78.0)	**0.005**
50 and less (%)	15 (25.8)	16 (25.8)	5 (7.5)	**0.005**
51-70 (%)	22 (34.9)	29 (46.8)	27 (40.3)	
71-80 (%)	24 (38.1)	12 (19.4)	27 (40.3)	
>80 (%)	2 (3.2)	5 (8.1)	8 (11.9)	
Sex				0.202
Male (%)	39 (61.9)	35 (56.5)	34 (50.7)	
Female (%)	24 (38.1)	27 (43.5)	33 (49.3)	
BMI-median (IQR)	24.91 (23.00-28.41)	23.76 (22.26-26.46)	23.29 (20.4-25.44)	**0.001**
<25 (%)	33 (52.4)	39 (62.9)	50 (74.6)	0.031
>=25 (%)	30 (47.6)	23 (37.1)	17 (25.4)	
Diabetes mellitus (%)	6 (9.5)	6 (9.7)	9 (13.4)	0.721

IQR: Inter Quartile Range

4.2 Cage を挿入した椎間の位置と椎間数

患者の椎間の中で Cage を挿入した椎間の位置は全てのタイプで L4/L5 間が有意に高い値を取り、Expandable type では 53 椎間、Static type では 35 椎間、Rotated type では 65 椎間であった(Table2)。

患者に挿入した cage の数は Expandable type では 2 椎間、Static type では 1 椎間、Rotated type では 2 椎間が最も多い結果となった(Table2)。

Table 2. Description of surgical location

	Expandable n=63	Static n=62	Rotated n=67	P value
	RISE® Catalyft®	Tritanium® Reoneg®	Capstone®	
Place- n (%)				
L2/L3	0 (0.0)	7 (11.3)	3 (4.5)	**0.017**
L3/L4	22 (34.9)	6 (9.7)	36 (53.7)	**<0.001**
L4/L5	53 (84.1)	35 (56.5)	65 (97.0)	**<0.001**
L5/S1	45 (71.4)	21 (33.9)	48 (71.6)	**<0.001**
Number of Cages inserted - n (%)				**<0.001**
1	21 (33.3)	55 (88.7)	0 (0.0)	
2	26 (41.3)	7 (11.3)	49 (73.1)	
3	16 (25.4)	0 (0.0)	18 (26.9)	

L : lumbar vertebra S : sacral vertebra

4.3 タイプ別の沈み込み

患者の Cage を挿入した椎間での沈み込みは Expandable type で 93.7%、Static type で 79.0%、Rotated type で 94.0%となり、Static type では有意に沈み込みにくい結果となった(Table3)。

Table 3. Subsidence by type

	Expandable n=63	Static n=62	Rotated n=67	P value
	Rise® Catalyft®	Tritanium® Reoneg®	Capstone®	
subsidence (%)	59 (93.7)	49 (79.0)	63 (94.0)	**0.024**

L : lumber vertebra S: sacral vertebra

4.4 タイプ別の沈み込む部分の違い

患者の椎間の沈み込みを Front、Middle、Back に分けると、Expandable type のうち、RISE®については Back が、Static type では Middle が有意に沈み込みにくい結果となった(Table4)。

Table 4. Place of subsidence by type

	Expandable		Static	Rotated	P value
	RISE®	Catalyft®	Trunnion® Resting®	Capstone®	
Front - n (%)	20 (80.0)	32 (84.2)	44 (71.0)	60 (89.6)	0.056
Middle - n (%)	22 (88.0)	34 (89.5)	35 (56.5)	56 (83.6)	**<0.001**
Back - n (%)	15 (60.0)	32 (84.2)	41 (66.1)	58 (86.6)	**0.006**

4.5 術前から術後 6 ヶ月までの種類別の推移

LL の比較においては、左のグラフにて、術前で有意に近い値で RISE®が大きく、Capstone®が小さかったのが、術直後には有意差は無くなっている。右のグラフにおいて、RISE®は術前から術直後で有意に減少しており、一方、Capstone®は術前から術直後で有意に増加し、術後 6 ヶ月間では有意に減少している。(Figure 1)

SA の比較において、A の左のグラフにて、術後 3 ヶ月時点で有意に RISE®が小さく、Static type が大きかった。A の右のグラフにおいて、術後 6 ヶ月間で Capstone®は有意に減少をしている。B のグラフから、種類間・経時的変化ともに有意差は見られなかった。(Figure2)

DH の比較において、A の右のグラフより、全種類で術前から術直後で有意な増加が見られる。術後 6 ヶ月間では Catalyft®を除いて有意に減少している。B のグラフから、全種類で術前から術直後にかけて増加に有意傾向が見られる。RISE®と Static type では、術後 6 ヶ月間で減少に有意傾向が見られる。(Figure 3)

Figure 1. 術前から6か月後までのLumbar lordosisの推移

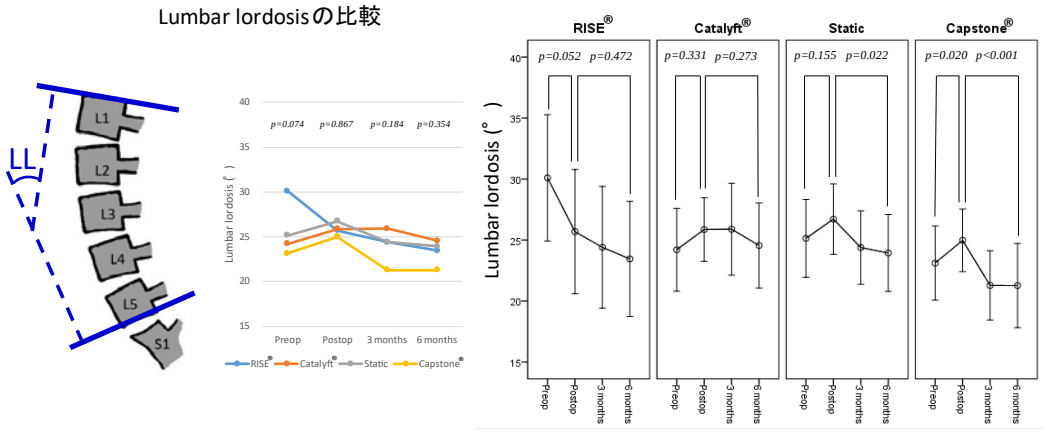
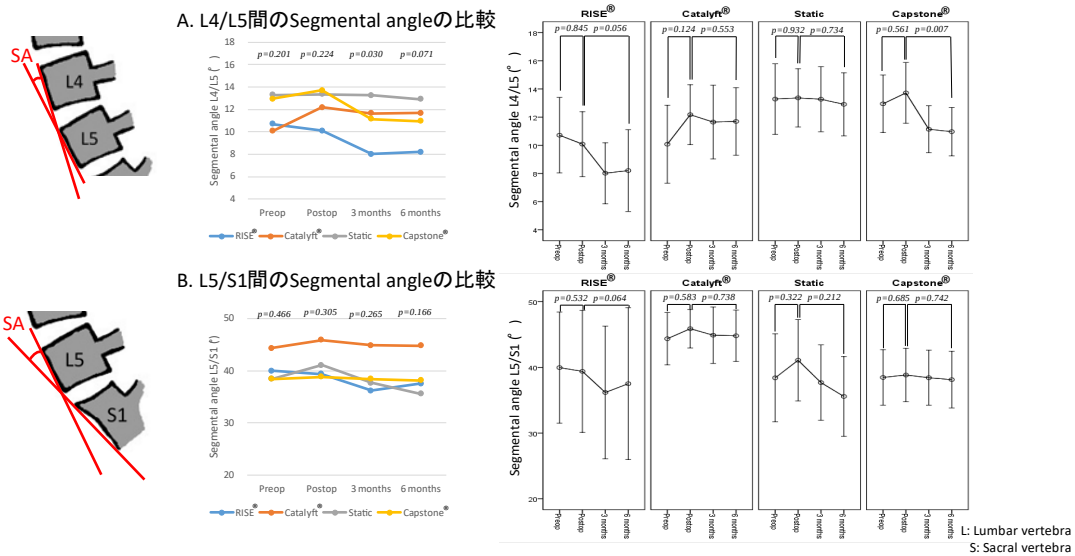
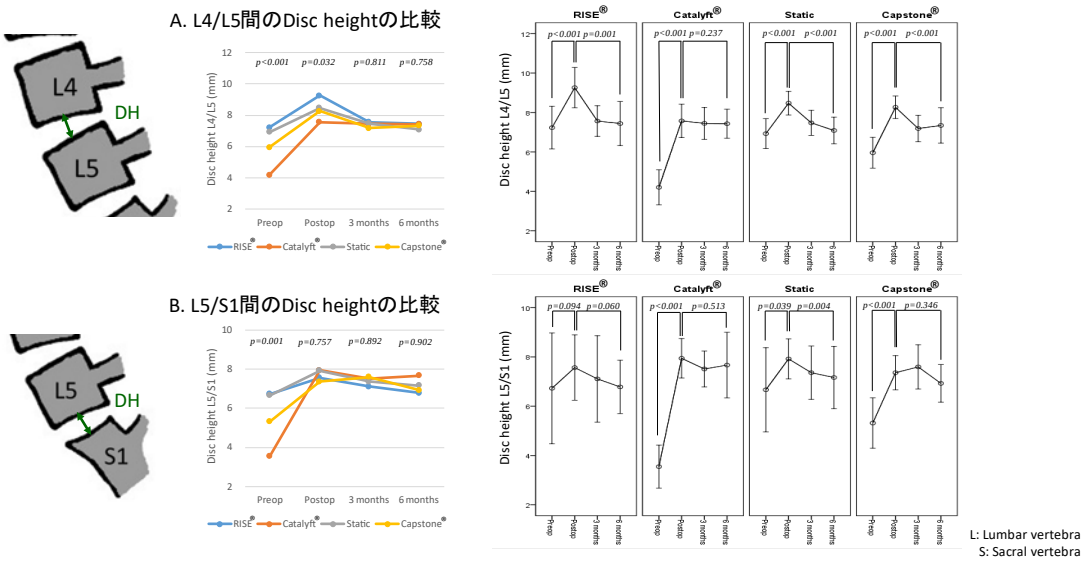


Figure 2. 術前から6か月後までのSegmental angleの推移



L: Lumbar vertebra
S: Sacral vertebra

Figure 3. 術前から6か月後までのDisc heightの推移



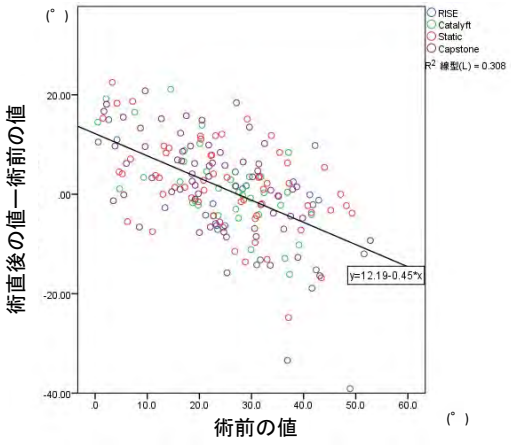
4.6 術前、術直後の改善の関連についての散布図

術前及び術直後における治療効果の改善を検討してみたところ、やや負の相関が見られたことから、術前の数値が小さかったものは、術後にかけて大きな改善がみられ、術前の数値がもともと大きかったものは、術直後にかけての改善が小さかったということが分かった。(Figure 4)

相関係数は大きくはないものの、いずれも有意差を認め、負の相関がみられたと判断した。L3/L4 間、Ł5/S1 間に関しては、ややばらつきが多いように見えた。相関係数から、L4/L5 間が最も改善しやすいことが分かった。(Figure 5)

L5/S1 間において相関係数が−0. 784 であり、強い相関が見られた。また、ほかの二つに関しても、有意に負の相関が見られた。(Figure 6)

Figure 4. Lumbar lordosisの術前、術直後の改善の関連について

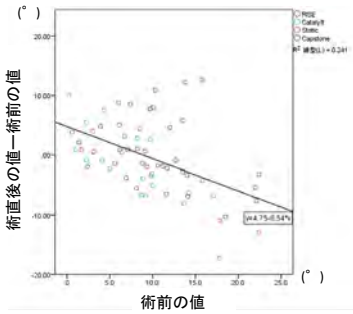


r=-0.529

p<0.001

Figure 5. Segmental angle の術前、術直後の改善の関連について

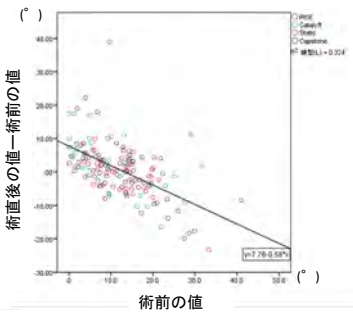
L3/L4



r=-0.504

p<0.001

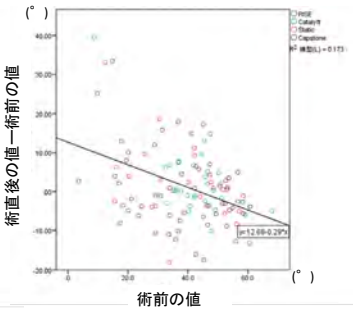
L4/L5



r=-0.571

p<0.001

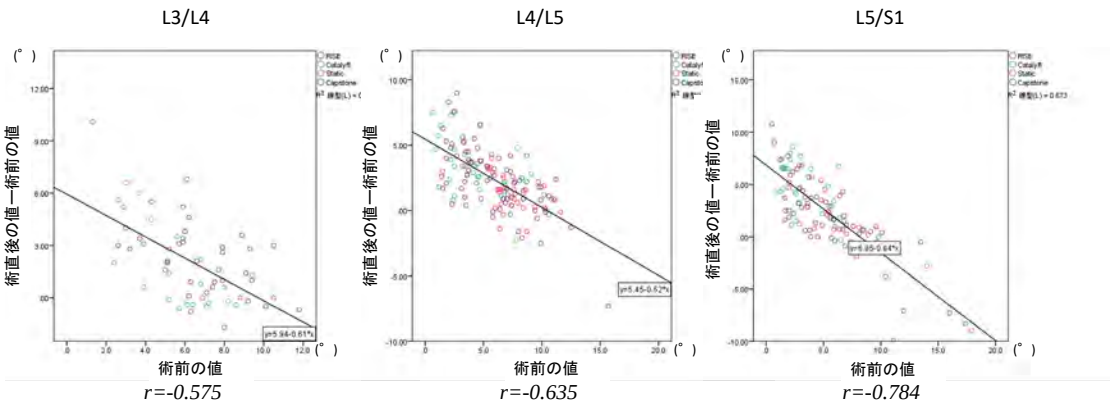
L5/S1



r=-0.328

p<0.001

Figure 6. Disc heightの術前、術直後の改善の関連について



r=-0.575
p<0.001

r=-0.635
p<0.001

r=-0.784
p<0.001

4.7 基本属性の沈みこみの有無への影響

患者の基本属性を沈み込みの有無で二群比較したところ、いずれの項目で有意差は見られなかった。(Table 5)

Table 5. Comparison of attributes with and without subsidence

	With cage subsidence	Without cage subsidence	P value
Age-median (IQR)	64.0 (55.0-69.5)	69.0 (56.0-76.0)	0.101
50 and less (%) (N=36)	32 (18.7)	4 (19.0)	0.146
51-70 (%)	65 (38.0)	13 (61.9)	
71-80 (%)	60 (35.1)	3 (14.3)	
>80 (%)	14 (8.2)	1 (4.8)	
Sex			0.931
Male (%)	96 (56.1)	12 (57.1)	
Female (%)	75 (43.9)	9 (42.9)	
BMI-median (IQR)	23.9 (22.0-26.6)	24.5 (20.8-26.4)	0.935
<25 (%)	108 (63.2)	14 (66.7)	0.753
>=25 (%)	63 (36.8)	7 (33.3)	
Diabetes mellitus (%)	20 (11.7)	1 (4.8)	0.337

IQR : Inter- Quartile range

4.8 Cage の種類の沈み込みの有無への影響

Cage の種類を沈み込みの有無で二郡比較したところ、他の Cage に比べ、Static type は沈み込みが少なかった。(Table 6)

Table 6. Comparison of cage types with and without subsidence

		With cage subsidence	Without cage subsidence	P value
Type				**0.021**
Expandable	RISE® (%)	24 (14.0)	1 (4.8)	
	Catalyft® (%)	35 (20.5)	3 (14.3)	
Static	Tritanium® Resitag® (%)	49 (28.7)	13 (61.9)	
Rotated	Capstone® (%)	63 (36.8)	4 (19.0)	

4.9 沈み込みのリスク因子

沈み込みのリスク因子を明らかにするために、患者の基本属性と Cage の種類を共変量として、ロジスティック回帰分析を行った。全椎間における解析の結果、沈み込みのオッズ比は 0.247、つまり Static type が沈み込みにくいことがわかった。また各椎間における解析の結果、Static type のほか、L3/L4 間で年齢が沈み込みの因子であるとわかった。ただし、L3/L4 間では RISE®のデータが一つしか得られなかったため、共変量から抜いて解析をおこなった。(Table 7)

Table 7. Risk assessment of subsidence using multivariate analysis

	Coefficient	Standard Error	P value	Odds ratio	95% confidence interval
L3-S1					
Static	-1.398	0.484	**0.004**	0.247	0.096-0.633
L3/L4 ※					
Age	-0.548	0.209	**0.009**	0.578	0.384 - 0.872
Static	-1.843	0.506	**<0.001**	0.158	0.059 - 0.427
L4/L5					
Static	-1.664	0.334	**<0.001**	0.189	0.099 - 0.364
L5/S1					
Static	-1.429	0.334	**<0.001**	0.239	0.125 - 0.461

Co-variants：Age, Sex, BMI, Diabetes Mellitus, RISE®, Catalyft®, Static, Rotated
※Since RISE® was used in one casa, it was removed from the Co-variants for analysis
L: lumbar vertebra, S: sacral vertebra

5.考察

後方椎体間固定術における沈み込みに関して、Cage のタイプにより沈み込みの有無に差があった。Static type は他の Cage に比べ沈み込みが少なかったが、これは椎間内での操作が少ないためであると考えられる。また、全椎間で見たとき、患者の基本属性による沈み込みへの影響は観察されなかったが、各椎間で個別にみると、L3/L4 間においてのみ、年齢が若いほど沈み込みが少ないことが観察された。

Cage はどのタイプでも沈み込みがみられたが、これは負荷によるもので避けがたく、これが Disc Height の低下につながったと考えられる。

患者の腰椎の前弯や Segmental Angle 関して、腰椎の前弯は、Cage のタイプ間で数値を比べた際、Rotated type による改善が大きかった。これは術前の腰椎の前弯が大きかった患者に対して Rotated type が選択される傾向があったためであると考えられる。Segmental Angle では Cage のタイプによらず、術前と術直後で統計的に有意な差は認められなかった。

本術式では Disc Height の改善は有意であるが、腰椎の前弯や Segmental Angle の改善が少ないという結果は、先行研究と一致しているが、その数は十分ではなかった。

本研究は名古屋市立大学医学部付属西部医療センターのみの 1 施設における研究であったことや、後ろ向きコホート研究であったため、収集できる情報に限りがあった。また、解剖学的理由により挿入する Cage を選択したことが結果に影響を与えた可能性があることや、LL, SA, DH, Place of Subsidence を測定する際、測定者の技術により数値にばらつきがあった可能性があることが研究の限界としてあげられる。

6.結語

本研究により、後方椎体間固定術における沈み込みに関して、Cage のタイプにより沈み込みの程度に差があるということが分かった。特に Static type は他の Cage と比べて沈み込みのリスクが低いことが分かった。

また、全椎間で見たときは年齢、性別、BMI などによる沈み込みへの影響はないことが分かったが、各椎間でみると、L3/L4 間において、年齢が若いほうが沈み込みのリスクが低かった。これらのことから、使用する Cage を選択する際に年齢を考慮する必要性が

示唆された。

今回得られた知見から、Static の Cage を基本概念に持つ新たなケージの開発・使用が Cage の沈み込みの発生を防ぐことにつながり、治療効果の改善に役に立つと思われる。また、今後、VAS や ODI などの痛みに関するスコアや、骨密度などの臨床データを含んだランダム化比較試験等の前向き研究が必要であると考えた。

7.謝辞

本研究に際し、終始適切なアドバイスとご指導を賜りました名古屋市立大学データサイエンス学部・間辺利江先生、名古屋市立大学大学院医学研究科地域医療学・兼松孝好先生に深く感謝申し上げます。また、調査や分析の際にご協力いただきました名古屋市立大学医学部付属西部医療センター病院長・大原弘隆先生や、同整形外科の稲田充部長をはじめとする整形外科の先生方、職員の方々、名古屋市立大学大学院医学研究科総合診療医学・総合内科学の宮崎景先生、赤津裕康先生、川出義浩先生をはじめとするスタッフの方々に厚く御礼申し上げます。

8.参考文献

1) 総合東京病院.“腰椎変性疾患”.総合東京病院.2023.https://www.tokyo-hospital.com/center/spine-spinal-cord-cnt/lumbar-d/,（参照 2023-12-06）.
2）梅林　猛.“後方椎体間固定術（TLIF/PLIF）とは(術式、適応疾患、手術の流れ、予後等)”.医療法人メディカルフロンティア.2019.http://mdf.or.jp/plif/,(参照 2023-12-06).
3) Globus Medical.“RISE® Spacer”.Globus Medical. 2023 .
https://www.globusmedical.com/japan/products/rise/,（参照 2023-12-06）.
4）“Does the application of expandable cages in TLIF provide improved clinical and radiological results compared to static cages? A meta-analysis”, Lin GX, et al. frontiers, 2022;9
5）“Long-term radiographic outcomes of expandable versus static cages in transforaminal lumbar interbody fusion”, Chang CC, et al. journal of neurosurgery, 2020; 34(3):471-480

運動を一人でするか複数人でするかの違いが疾患・全死亡に及ぼす影響

公衆衛生学分野　岡本拓　15

＜背景・目的＞

運動が筋力やバランス能力の維持、生活習慣病の予防につながることは一般的に知られている。また、日本の高齢者を対象とした研究で、運動を一人ではなく複数で行うほうがより健康に良い可能性があり、転倒の減少 (Hayashi et al., 2018) や主観的健康感の向上 (Kanamori et al., 2016) につながると報告されている。しかし、疾患の罹患や死亡のリスクを低減するかどうかについてはまだ十分に研究されていない。そこで、一人ではなく複数人で運動することが、疾患の予防や死亡リスクの低下につながるかどうかを調べた。

＜方法＞

研究デザインはコホート (追跡型) 研究で行った。対象者は 2013 年に実施された日本多施設共同コホート研究 (J-MICC study) 岡崎研究の第二次調査参加者 4734 人であった。調査方法は自記式調査票であり、年齢、性別、BMI、K6 尺度、代謝当量、学歴、世帯構成、喫煙、飲酒、就業形態、病歴についてのデータを扱った。また、住民票調査 (2022 年度まで) により死亡の有無、死亡日について調べた。

運動形態との関連を調べるために、多変量ロジスティック回帰または Cox 比例ハザード回帰を行った。目的変数は主観的健康状態、転倒 (過去 1 か月間で転びそうになった) 、糖尿病、高脂血症、高血圧、狭心症、心筋梗塞、脳卒中、尿路結石、がんであり、自記式調査票で調査時点での有無を調べたため、多変量ロジスティック回帰を用いて横断的な検討を行った。全死亡については追跡調査を行っているため Cox 比例ハザード回帰を用いて解析した。説明変数は誰と運動したのか (一人、家族、友達) であった。調整変数は年齢、性別、BMI、学歴、K6、世帯構成、喫煙、飲酒、就業形態、代謝当量とした。

＜結果＞

対象者のうち 2965 人は一人で運動する、598 人は家族と運動する、1171 人は友人と運動すると回答していた。運動の形態によって、BMI、代謝当量、抑うつには差異がみられた (図1)。

表1にロジスティック回帰分析の結果を示す。主観的健康感については統計的有意差があり、家族や友人と運動したほうが健康感が良くなることがわかった。転倒については有意差はなかったものの、オッズ比が1よりは小さかった。疾患の罹患については、糖尿病は統計的な有意差があり、一人ではなく友人と運動したほうが糖尿病になる人が少ないことがわかった。他の疾患については統計的に有意な結果は見られなかった。全死亡についても有意差はなかった (表 2)。

＜考察＞

他の人と運動することが主観的健康感と転倒に与える影響については従来研究と同様の結果になった。理由としては、社会的関係を築けること、他の人と運動する人は調査時点で運動を継続している可能性が高いということが考えられる。

疾患の罹患については糖尿病について関連がみられた。理由としては、糖尿病には有酸素運動が適しており、一人よりも複数人で行う運動が有酸素運動を行いやすいからと考えられる。

全死亡については関連がみられなかった。理由としては、死亡している人数が少ないこと、死亡に与える効果がそれほど大きくないことが考えられる。

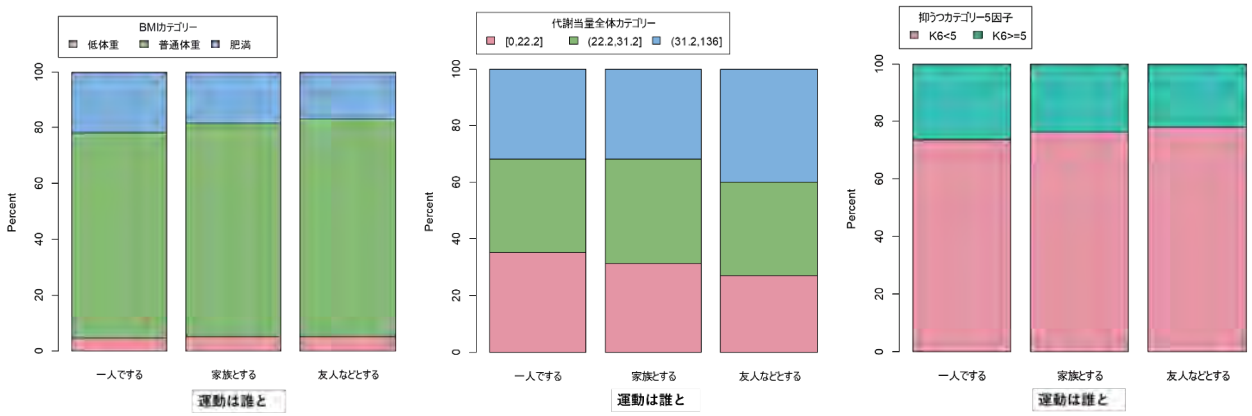


図1 対象者の特徴 (BMI、代謝当量、抑うつ)

表 1 主観的健康感、転倒、疾患の罹患との関連 (OR:オッズ比、CI:信頼区間)

	一人 (参照群)	家族 OR (95%CI)	友人 OR (95%CI)
健康感が悪い	1	**0.75 (0.58~0.98)**	**0.72 (0.58~0.89)**
転倒	1	0.96 (0.77~1.20)	0.86 (0.72~1.03)
糖尿病	1	0.83 (0.60~1.16)	**0.76 (0.59~0.99)**
高脂血症	1	0.99 (0.79~1.24)	0.93 (0.78~1.11)
高血圧	1	0.98 (0.78~1.23)	0.92 (0.77~1.11)
狭心症	1	1.26 (0.79~2.01)	0.78 (0.52~1.19)
心筋梗塞	1	0.80 (0.35~1.81)	0.84 (0.43~1.63)
脳卒中	1	0.63 (0.34~1.17)	0.77 (0.49~1.21)
尿路結石	1	0.83 (0.61~1.13)	0.85 (0.67~1.09)
がん	1	1.03 (0.75~1.41)	0.85 (0.65~1.11)

表 2 全死亡との関連 (HR:ハザード比、CI:信頼区間)

	一人 (参照群)	家族 HR (95%CI)	友人 HR (95%CI)
死亡	1	1.24 (0.81~1.91)	1.09 (0.77~1.55)

＜まとめ＞

他の人と一緒に運動することで、身体活動による生理的効果だけでなく、心理的・社会的な効果により、さらなる健康の増進につながる可能性があることがわかった。しかし、本研究は疾患の罹患については横断研究のため因果関係について確証的なことは言えない。全死亡については、関連は見られなかったが、現在も追跡調査を継続しており、将来的には因果関係を検討できると考えられる。

＜参考文献＞

Hayashi et al. International Journal of Environmental Research and Public Health 15, 1413 (2018)

Kanamori et al. Scientific Reports 6, 39151 (2016)

ディーゼルエンジンの排ガスと人への発がん性

B3 公衆衛生学 鬼頭佑誠

【背景・目的】

自分の車がディーゼル車であり、ディーゼルエンジンが好きであることから、どのように環境に悪いのか、どのような規制があるのかについて非常に興味を抱いていた。また、近年、地球温暖化や光化学スモッグといった大気汚染や、それが原因と考えられる肺がんやアレルギー疾患を罹患する患者の増加が世界中で問題視されている。そのため、原因とされているディーゼルエンジンの仕組みや排気ガスの人や環境の影響について調べた。

【方法】

ディーゼルエンジンの仕組みや環境、健康への影響についてガソリンエンジンと比較しながら書籍やインターネットを用いて調べた。また、以下の既存研究による解析を行った。

・The Diesel Exhaust in Miners Study : A Nested Case-Control Study of Lung Cancer and Diesel Exhaust （IARC によるディーゼル排気についての研究論文）

・国立環境研究所による発がん性のリスクについての論文

【結果・対策】

・仕組みについて

エンジンは根本的には空気を吸入、圧縮、燃焼、排気の順序で行われている。ガソリンエンジンは空気の吸入過程で燃料を噴射し圧縮過程で空気を圧縮し、その後点火プラグからの火花により燃焼を開始する。対して、ディーゼルエンジンは空気を吸入してその空気を高圧縮することで 500～800℃にして、その後ディーゼル燃料(軽油)を噴射し、自然発火させる。そして、両者とも排気ガスとして CO、NOx、HC などの有害物質を発生させている。ディーゼルエンジンが有害と言われている理由は以下の 2 つがあげられる。

1)ガソリンエンジンには三元触媒が備わっていて、排気ガス浄化が行われている。具体的にこの装置は白金、パラジウム、ロジウムを用いて CO や HC を酸化して CO2 や水に、NOx を還元して窒素に変えている。

2)ディーゼルエンジンの高圧縮という過程により、燃料と空気がしっかり混ざる前に着火してしまいシリンダー内が酸欠状態になり不完全燃焼が起きてしまう。そのため、光化学スモッグの原因の NOx や発がん性のある PM が発生する。NOx はオゾン層を破壊したり、温室効果が高かったりする一方、PMは発がん、呼吸器系の沈着による呼吸器障害を引き起こす。

・人への発がん性について

〈The Diesel Exhaust in Miners Study : A Nested Case-Control Study of Lung Cancer and Diesel Exhaust（Journal of the National Cancer Institute）の解析結果〉

本研究は、8つの非金属地下採掘施設に勤務していた労働者の肺がん死亡者 198 人と対照被験者 562 人を対象としたコホート研究とこのコホートにネストした肺がん症例対照研究である。交絡因子は喫煙（状況/強度）と勤務場所（地上/坑内）を考慮している。本研究意義としては、これまでは十分なサンプルサイズ、過去のディーゼル曝露に関する定量的データを有する研究がなかったため、IARC（国立がん研究機関）は一度 1998 年にディーゼル排気をグループ2A としたが、本研究により十分な証拠を得られ、IARC は 2012 年にディーゼル排気をグループ1に分類を変更したのである。

本研究で得られた結果は以下 2 つの表に示す。左表は坑内作業の経験がある被験者を対象とした平均 REC 強度とオッズ比を、右表は肺がんによる死亡日直前 15 年間のディーゼル曝露を除外した累積 REC とオッズ比を示している。これらの表からディーゼル被曝量の増加に伴うリスクの傾向はすべての指標において、統計的に有意であり、特に肺がんによる死亡日直前 15 年間を除外した累積 REC においてリスク勾配が最も強かったことがわかった。この結果を根拠に、 IARC は 2012 年にディーゼル排気をグループ1に分類を変更したのである。

平均REC強度(μg/㎥),四分位数	オッズ比(95%区間)	肺がん死亡者/対照被験者
0～39未満	1.0(reference)	29/89
39～71未満	1.91(0.91~4.01)	29/57
71～147未満	2.38(1.04~5.44)	29/66
147以上	3.69(1.40~9.70)	29/52

累計REC(μg/㎥)四分位数15年間のラグ※	オッズ比(95%区間)	肺がん死亡者/対照被験者
0～81未満	1.0(参考値)	29/92
81～325未満	2.46(1.01~6.01)	29/52
325～878未満	2.41(1.00~5.82)	29/69
878以上	5.10(1.88~13.87)	29/51

上記の平均 REC、累積 REC は 1998－2001 年の REC 測定値の中央値で置き換え相対的な時間傾向を使用することで代替 REC 曝露測定値のセットを作成し、この測定値から地下調査対象者の累積被曝量を算出している。また、平均 REC はDEMS調査で測定された仕事の部分集合に関する REC 測定値の算術平均値である。

また、上記に示した IARC のグループ 1 やグループ2A などの発がん性分類は、人に対する発がん性に関する様々な要因を評価し、4 段階に分けており、人に対する発がん性があるかどうかの証拠の強さを示している。具体的には、グループ 1 は実験動物かつ人において発がん性の十分な証拠があり、曝露を受けた人において作用因子が発がん性物質の重要な特性を示す有力な証拠がある場合分類される。それに対し、グループ2A は人において発がん性の限定的な証拠がある、実験動物において十分な証拠がある、作用因子が発がん性の主要な特性を示す有力な証拠がある、以上の3つのうち発がん性評価のワーキンググループが下した評価が少なくとも 2 つを含む場合に分類される。

【具体的に行われている車への対策】

対策として実際に車に搭載されている仕組みとして以下の 3 つが挙げられる。

1）電子制御でポンプに高圧力を燃料にかけて緻密な燃料噴射をすることで完全燃焼に近づけてススの発生を抑えるコモンレールシステム

2）アドブルー(高品位尿素水)を高温の触媒内に噴射し、発生したアンモニアガスにより NOx を分解し、無害な N2 と水にする尿素 SCR システム

3）軽油の燃えカス(PM)から出た微粒子の物質をフィルターで捕集して、排ガスを抑制する DPF(ディーゼル微粒子捕集フィルター)

【本研究を通して感じたこと】

力強く燃費の良いディーゼルエンジンは尿素 SCR システムや DPF などにより環境や健康への影響を考慮に入れ大切に守っていかなければならないエンジンだと改めて考えた。

【参考文献】

https://www.bing.com/ck/a?!&&p=4534d68ad829ee75JmltdHM9MTcwMTgyMDgwMCZpZ3VpZD0yYzk5MzVlNC0zMGU0LTYyYjctMWJiMy0zYWJjMzE3NTYzZDEmaW5zaWQ9NTE5Nw&ptn=3&ver=2&hsh=3&fclid=2c9935e4-30e4-62b7-1bb3-3abc317563d1&psq=The+Diesel+Exhaust+in+Miners+Study+%3a+A+Nested+Case-Control+Study+of+Lung+Cancer+and+Diesel+Exhaust&u=a1aHR0cHM6Ly9wdWJtZWQubmNiaS5ubG0ubmloLmdvdi8yMjM5MzIwOS8&ntb=1

外在化障害の評価尺度 ADHD-Rating Scale-5 と Disruptive Behavior Disorders Rating Scale の日本語版開発

公衆衛生学、颯田慈英（No. 36）

背景

注意欠如・多動症（Attention-deficit/hyperactivity disorder, ADHD）は子どもの約 5%が罹患し，その約半分は反抗挑発症（Oppositional defiant disorder , ODD）もしくは素行症（Conduct disorder, CD）を併発する[1]．これらの疾患の診断には，複数の情報源から情報を得る必要があり，通常，子どもの親（養育者）と教師から ADHD と ODD，CD についての評価尺度を用いて診断に必要な情報を得ることがガイドラインで推奨される[2]．これらの疾患の評価尺度として最もよく使われる ADHD-Rating Scale（ADHD-RS）は，精神科診断基準が DSM-5 に改定されたのに合わせ， ADHD-RS-5 へと改訂された[3]．ADHD と ODD，CD を評価対象とする Disruptive Behavior Disorders Rating Scale (DBDRS)も広く使われるが[4]，ADHD-RS-5 も DBDRS も日本語版が存在しない．そこで，本研究では，両尺度の日本語訳を作り，その信頼性と妥当性を検証することを目指した．

方法

逆翻訳を用いる標準的な手法により両尺度の日本語訳を作成した．2021 年 6 月 29 日～10 月 28 日に福井大学病院子どものこころ診療部を受診した外来患者のうち，年齢が 6～18 歳で，養育者が日本語コミュニケーションに困難がなく，代諾者による本研究への参加に同意が得られた計 135 人を研究対象とした．ADHD-RS-5 と DBDRS の内的一貫性信頼性は Cronbach’s α を調べた．59 人については平均 3.37 日の間隔を置いて再び両尺度を施行し，級内相関係数で再検査信頼性を調べた．両尺度の各サブスケールの基準妥当性は Kiddie Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia-Present Lifetime (KSADS)による診断をゴールドスタンダード診断として、Area Under the ROC Curve (AUC)を調べた．両尺度の各サブスケールの構成概念妥当性は Child Behavior Check List (CBCL)のサブスケールとの Spearman 相関係数を調べた．

結果

本研究参加者の特性についての年齢は中央値 14.8 歳であり，中学生と高校生が約 4 分の 3 を占め，男女比はほぼ等しかった（男性：51.1%）．両尺度のすべてのサブスケールで Cronbach’s $\alpha > 0.80$ であり内的一貫性信頼性は十分に高く，級内相関係数 > 0.60 であり再検査信頼性も十分に高かった．DBDRS の ADHD サブスケール以外の両尺度のサブスケールは AUC > 0.90 であり，基準妥当性は十分高かった（Table 1）．両尺度の ADHD サブスケールは CBCL の注意の問題サブスケールと，両尺度の ODD サブスケールは CBCL の攻撃的行動サブスケールと，両尺度の CD サブスケールは CBCL の規則違反的行動との相関が高かった．一方，それ以外の両尺度と CBCL のサブスケール間の相関は低いことから，両尺度の構成概念妥当性を示すことができた（Table 2）．

考察

本研究により，ADHD-RS-5 および DBDRS の日本語訳を作成し，その信頼性と妥当性を

示すことができた．両尺度とも内的一貫性信頼性と再検査信頼性，構成概念妥当性は高かったが，これは両尺度の原版および他言語版の所見に一致する[3,4]．一方，ゴールドスタンダード診断に対する両尺度の基準妥当性はこれまで調べられたことはなく，前版の ADHD-RS について 2 つの研究が調べたにとどまるが，その所見は本研究結果と概ね一致する[5,6]．ADHD のゴールドスタンダード診断に対する基準妥当性は，ADHD-RS-5 の方が DBDRS よりかなり高かった．これは前者が「どれくらいの多いか」に関する頻度に基づく回答形式を用いるのに対し，後者は「どれくらい当てはまるか」に関する程度に基づく回答形式を用いることに起因するのかもしれない．以上，両尺度ともに良好な心理測定学的性質を有しており，日本の臨床現場における ADHD や ODD，CD の診断・スクリーニングおよび重症度評価に役立つと期待される．

Table 1. ADHD-RS-5 と DBDRS の内的一貫性信頼性と再検査信頼性，基準妥当性

		内的一貫性信頼性	再検査信頼性	基準妥当性
		Cronbach' α (95% CI)	級内相関係数 (95% CI)	AUC (95% CI)
ADHD-RS-5	不注意	0.88 (0.86-0.91)	0.86 (0.77-0.91)	0.90 (0.85-1.00)
	多動・衝動	0.90 (0.88-0.93)	0.85 (0.76-0.91)	
DBDRS	不注意	0.91 (0.88-0.93)	0.82 (0.72-0.89)	0.83 (0.75-0.91)
	多動・衝動	0.89 (0.86-0.92)	0.89 (0.83-0.93)	
	反抗挑発症	0.93 (0.91-0.95)	0.82 (0.70-0.89)	0.92 (0.87-0.93)
	素行症	0.83 (0.80-0.87)	0.66 (0.49-0.78)	0.96 (0.92-1.00)

Table 2. ADHD-RS-5 と DBDRS の構成概念妥当性

	CBCL	不安・抑うつ	引きこもり・抑うつ	身体愁訴	社会性の問題	思考の問題	注意の問題	規則違反的行動	攻撃的行動
ADHD-RS-5	不注意	0.10	0.12	0.03	0.49**	0.45**	**0.75****	0.56**	0.58
	多動・衝動	0.11	0.03	0.05	0.61**	0.38**	**0.72****	0.55	0.61**
DBDRS	不注意	0.25**	0.22**	0.11	0.62	0.50	**0.87**	0.57	0.65**
	多動・衝動	0.18*	0.09	0.07	0.64**	0.44**	**0.79****	0.62**	0.69**
	反抗挑発症	0.30**	0.29**	0.10	0.58**	0.44**	0.61**	0.58**	**0.85****
	素行症	0.12	0.16	0.01	0.55	0.39**	0.58**	**0.77****	0.58**

参考文献

1. J Child Psychol Psychiatry. 2001;42:487–92.
2. Attention deficit hyperactivity disorder: diagnosis and management. London: National Institute for Health and Care Excellence(NICE);2019.
3. ADHD Rating Scale-5 for Children and Adolescents: Checklists, Norms, and Clinical Interpretation. Guilford Publications; 2016.
4. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 1992;31:210–8.
5. Res Dev Disabil. 2016;55:268–78.
6. Neurologia (Engl Ed). 2019;34:563–72.

ヴィーガン(ベジタリアン)の特性と健康への影響

公衆衛生学分野　篠田はるか　出席番号 40 番

1．背景・目的

ヴィーガンの健康への影響はイメージで語られることが多いため、社会疫学的な見方により論理的に考え調査することとした。第一の目的は、ヴィーガンの定義、特徴、健康影響を調査することである。しかし、健康影響についてはヴィーガンとベジタリアンの区別をつけた研究は少なかった。よって第二の目的として、健康影響についてはベジタリアン全体に着目し、非ベジタリアンとヴィーガンを含めたベジタリアンを比較して、死亡率、うつ病の有病率に違いはあるのかを調査することとした。

2．方法

PubMed, Google Scholar を用いて論文を検索し、その結果をまとめた。目的②に使用する論文に関しては、フルテキストにアクセス可能かつ結果をオッズ比(OR)もしくはハザード比(HR)で提示してあるものに限定した。

3．結果

①ヴィーガンについて

「ベジタリアン」は「一部または全部の動物性食品を避ける人」のことを指す。「ヴィーガン」はベジタリアンの中でも、肉・魚・卵・乳製品と一番厳格に動物性食品を制限している人のことである。ヴィーガンとその他ベジタリアンの精神的な特徴を比較すると、ヴィーガンは、向社会的な動機の構成において有意に高いスコアを示している、自分の食事パターンに対してより肯定的な感情を持っている、自分の食事パターンが自分のアイデンティティとより絡み合っていると考えている、自分の食事パターンに従う動機が強い、といった特徴があった。

②非ベジタリアンと比較した場合のヴィーガン含むベジタリアンの健康影響について

2-1:死亡率

PubMed にてメタアナリシスと系統的レビューに絞り「vegetarian mortality」と検索してヒットした２２件中４件を参照し、その結果をまとめた。(図1参照)

	1	2	3	4
発行年	1999	2014	2021	2023
人数	76,172	153,332	131,869	2,230,443
研究数	5	3	8	76
全死亡	0.95 (0.82, 1.11)	**0.88 (0.80, 0.97)**	0.84 (0.65, 1.07)	**0.84 (0.78, 0.92)**
虚血性心疾患	**0.76 (0.62, 0.94)**	0.81 (0.64, 1.02)	**0.70 (0.61, 0.80)**	
心血管疾患		0.87 (0.75, 1.01)		**0.90 (0.85, 0.94)**
Ⅱ型糖尿病		**0.54 (0.49, 0.60)**		**0.82 (0.77, 0.86)**
脳血管疾患	0.93 (0.74, 1.17)		0.93 (0.74, 1.18)	
胃癌	1.02 (0.64, 1.62)			1.73 (0.90, 3.31)
膵臓癌				**0.68 (0.55, 0.84)**
肺癌	0.84 (0.59, 1.18)	0.86 (0.42, 1.79)		0.88 (0.56, 1.38)
乳癌	0.95 (0.55, 1.63)	0.80 (0.56, 1.15)		**0.92 (0.87, 0.97)**
前立腺癌	0.91 (0.60, 1.39)	**0.65 (0.44, 0.95)**		0.94 (0.81, 1.08)

表１　ベジタリアンの死亡率についてのメタアナリシス

ベジタリアンの各疾患における死亡率は、全死亡、虚血性心疾患、心血管疾患、Ⅱ型糖尿病、膵臓癌において有意に低かった。特に、虚血性心疾患についてはメタアナリシス以外の論文でも多く言及され、ベジタリアンは死亡率が低いという結果で一致していたことから、確実であると判断した。

2-2:うつ病

PubMed にてメタアナリシスと系統的レビューに絞り「vegetarian depression」と検索してヒットした9件中２件を参照した。どちらも非ベジタリアンと比較してベジタリアンのうつ病のリスクが高いと結論付けていた。しかし、研究の質、調査の追加、対象研究数、不均一性の高さを考慮すると、この２つの論文からうつ病リスクが高いとは一概には判断できなか

った。また、観察研究も参照し、PubMed にて「vegetarian depression」と検索してヒットした 126 件のうち 13 件の結果を表にまとめた。(表 2 参照) また、この表をフォレストプロットとして出力した。(図 1 参照) 結果はうつ病リスクが高い、低い、有意差なしの中で非常に揺れていた。また、以前の研究ではうつ病リスクが高い、低い、いずれかの結論が出ていたが、今年に入ってから有意差無しという結果が多く出ていることが見受けられた。

	発行年	調査実施の年	ORまたはHR	人数	地域
1	2023	2018	0.61 (0.54, 0.70)	11,623	中国
2	2023	2018-2019	1.03 (0.71, 1.51)	2,033	イラン
3	2023		1.06 (0.98, 1.14)	180,532	イギリス
4	2023	2007-2010	0.66 (0.34,1.26)	9,584	アメリカ
5	2021	2005-	0.70 (0.52, 0.93)	10,577	台湾
6	2020		0.41 (0.23, 0.71)	435	イラン
7	2019	2010-2013	0.57 (0.35, 0.92)	892	アメリカ
8	2019	2016	1.62 (1.07, 2.46)	1,051	中国
9	2018		1.67 (1.14, 2.44)	9,668	イギリス
10	2018	2012-2018	1.44 (1.08, 1.92)	90,380	フランス
11	2016		0.80 (0.61, 1.05)	3,846	イラン
12	2015	1999-2014	0.74 (0.61, 0.89)	15,093	スペイン
13	2012	1998-1999	1.48 (0.98, 2.26)	4,358	ドイツ

表 2　ベジタリアンにおけるうつ病についての論文

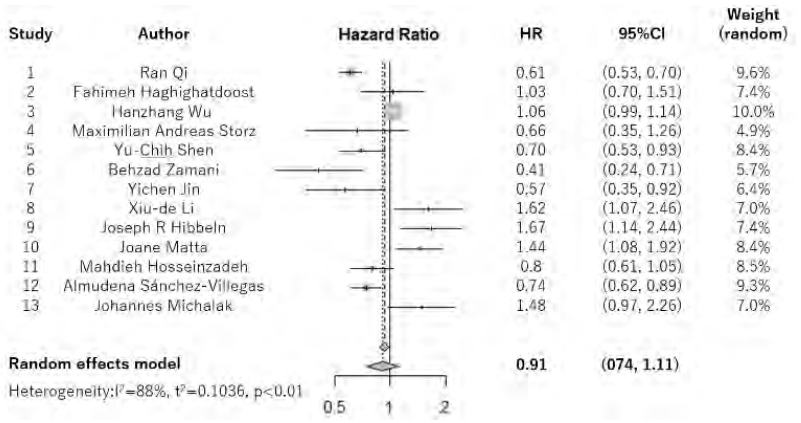


図 1　ベジタリアンにおけるうつ病についての Forest Plot

4. 結論・考察

ヴィーガンの特徴として性格の面では、社会的活動に対する動機付けが強く自己の食事パターンを肯定的に捉えている、という特徴があることがわかった。このことから、ヴィーガンがその食生活を選ぶ動機はその他ベジタリアンと比べて社会全体に貢献したいという欲求が強く、かつ野菜食を良いものと判断してその食生活を遵守していると考えられる。死亡率については、虚血性心疾患、心血管疾患、Ⅱ型糖尿病、膵臓癌では有意に死亡率が低かった。脳疾患やその他の癌など有意差が出ていない疾患もあるが、調査していた限りで死亡率が高いという疾患はみられなかったため、統括的に見て寿命が長いという点で健康にいいと判断できる。うつ病は結果にばらつきがあり、いまだ議論の余地がある。ベジタリアンやヴィーガンが着目されてきたのは最近のことであり、健康影響についての論文は5年程前から徐々に多くなってきたばかりである。よって今後の研究の広がりによって研究数が増えていくこと、また、地域差、定義、うつ病の測定方法など統一的な見方を設けることで結果が確定してくるのではないかと考えられる。今年発行された研究では有意差なしと結論付けているものが多いことを踏まえると、今までの結果のゆれは研究数や人数の少なさに由来しており、今後は「有意差なし」という結果がでるのではないかと推察した。

5. 参考文献(主著者と出版年のみ示す)

1) Alnasser A. (2023). 2) Daniel L R. (2019). 3) Wang Y. (2023). 4) Jabri A. (2021). 5) Le LT. (2014). 6) Timothy J Key. (1999). 7) Qi R. (2023). 8) Haghighatdoost F. (2023). 9) Hanzhang Wu. (2023). 10) Storz MA. (2023). 11) Yu-Chih Shen. (2021). 12) Zamani B. (2020). 13) Jin Y. (2021). 14) Li XD. (2019). 15) Hibbeln JR. (2018). 16) Matta J. (2018). 17) Hosseinzadeh M. (2016). 18) Sánchez-Villegas A. (2015). 19) Michalak J. (2012). 20) Fazelian S. (2022). 21) Iguacel I. (2021).

家族形態が主観的幸福度に与える影響について:J－MICC 岡崎研究

公衆衛生学分野、中嶋一貴（No. 61）

【背景・目的】

幸福度と関連する要因は、睡眠時間、趣味、学歴、家族形態、仕事形態、年齢等様々考えられる。この中の家族形態の項目に関して、幸福度との関連性について着目した先行研究は数多く存在するが(1)(2)、自己記入式の調査による主観的な幸福度の点数を用いた研究や、男女別で検討した研究は少ない。そこで、自己記入式による主観的な幸福度の点数を幸福度の指標として捉え、更に男女別で分けた家族形態と幸福度の関連について検討を行った。

【方法】

本研究の参加者は、2007 年から 2011 年にかけて日本多施設共同コホート(J-MICC)研究の岡崎研究に参加した 35～79 歳の男女 7,565 名である。(男性:4164 名、女性:3401 名)参加者全員は、岡崎市在住かつ、はるさき健診センターの受診者であり、健康と生活習慣に関する調査票の第一次調査票に回答している。家族形態は、一人暮らし(未婚)、一人暮らし(既婚)、夫婦二人、親と二世代、子と二世代、三世代以上の 6 つに分類されている。解析方法としては、多変量線形回帰分析を行い、同時に層別解析も行った。この際、年齢、平均睡眠時間、飲酒年間頻度(月 1～3 日、週 1～2 日、週 3～6 日、毎日)、喫煙歴(吸う、やめた、吸わない)、健康状態(最高に良い、とても良い、良い、あまり良くない、良くない、全然良くない)、ストレス感(全く感じなかった、あまり感じなかった、多少感じた、大いに感じた)、最終学歴(小、中学、旧制中学、高校、専門、短大、高専、大学、大学院、その他)、仕事形態(自営、社長、正社員、公務員、契約、派遣社員、パート、アルバイト、主婦、学生、退職者、その他)の 8 因子を交絡因子とした上で、家族形態(説明変数)と主観的幸福度の点数(目的変数)との関連を評価した。また、この 8 因子を考慮した上で、主観的幸福度点数の調整済み平均値である、最小二乗平均値についても算出した。なお、すべての統計解析は EZR ソフトウェアを用いて行った。

【結果】

本研究の参加者は、男女共に、一人暮らし、夫婦二人といった居住形態をとっている人は少なく、(前者から順にそれぞれ、男性 211 人、18 人、女性 246 人、5 人)親と二世代、子と二世代三世代以上といった居住形態をとっている人が多かった。(前者から順にそれぞれ男性 1326 人、1900 人、709 人、女性 900 人、1596 人、654 人)(Table.1、Table.2)多変量線形回帰分析結果から、一人暮らしの人と比較して、主観的幸福度の点数は男性では、親と二世代、子と二世代、三世代以上で有意に正の関連が見られた。(β=13.20,95%CI:7.71-18.69(親と二世代)、β=11.44,95%CI:6.00-16.89(子と二世代)、β=13.46,95%CI7.94-18.97(三世代以上))また最小二乗平均値についても、一人暮らし(未婚)の値である 63.2 を reference とした際に、親と二世代(76.4)、子と二世代(74.7)、三世代以上(76.7)の値は統計学的に有意に高い値であった。その一方で、女性では同尺度で評価した際に、一人暮らし(未婚)の値(75.5)を reference とすると、親と二世代(79.0)、子と二世代(76.9)、三世代以上(76.9)であり、有意な差は観察されなかった。(Table.3、Table4)

【考察】

交絡因子調整済みの男性、女性の一人暮らし(未婚)の主観的幸福度の点数を比較すると、女性の方が約 12.3 点高かった。また、上記の最小二乗平均値の比較について、男性の場合は一人暮らしである reference 値と比較して、多世代同居では 10 点以上離れた値が存在していた。これらを踏まえると、「女性は一人暮らしであっても、男性と比較して幸福度の点数が高く、主観的幸福感を決定づける要因として家族形態変化の影響は受けにくいこと」、そして、「男性は一人暮らしの幸福度点数が低く、多世代同居という家族形態では幸福度が高いことから、家族形態と幸福度に強い結びつきが存在すること」の 2 点が考えられる。尚、男性が多世代同居により幸福度が上昇する理由としては、精神面で支えが出来ることや、仕事に対するモチベーションの上昇等が考えられる。

Table1.対象者の特性(男性)

	居住形態						
	①一人暮らし未婚	②一人暮らし既婚	③夫婦二人	④親と二世代	⑤子と二世代	⑥三世代以上	P-value
全体.n	42	169	18	1326	1900	709	
年齢(SD)	51.74(12.00)	58.94(11.31)	58.78(7.42)	64.24(8.77)	56.60(10.76)	58.12(10.75)	<0.001
平均睡眠時間(SD)	6.69(0.98)	6.56(1.75)	6.39(0.78)	6.97(1.08)	6.75(1.08)	6.75(1.10)	<0.001
最終学歴.n(%)							
小・中学校、旧制中学	7(16.7)	42(24.9)	1(5.6)	249(18.7)	258(13.5)	122(17.2)	0.003
高校	14(33.3)	71(47.0)	5(30.0)	559(42.7)	799(47.1)	301(42.5)	
専門学校、短大、高専	8(19.1)	12(7.1)	1(5.6)	92(7.0)	167(8.8)	55(7.7)	
大学、大学院	12(28.6)	43(25.5)	6(33.4)	422(31.9)	666(35.0)	228(32.1)	
その他	1(2.4)	1(0.6)	1(5.6)	4(0.3)	10(0.5)	3(0.4)	
飲酒頻度.n(%)							
月1～3日	4(17.4)	26(19.4)	1(6.2)	96(9.6)	206(14.3)	86(16.2)	0.044
週1～2日	4(17.4)	13(9.7)	4(25.0)	133(13.2)	184(12.8)	59(11.1)	
週3～6日	7(30.4)	34(25.3)	6(37.5)	324(32.2)	422(29.4)	159(30.0)	
毎日	8(34.8)	61(45.5)	5(31.2)	451(44.9)	626(43.5)	226(42.6)	
喫煙歴.n(%)							
吸う	14(33.3)	56(33.1)	5(27.8)	283(21.3)	525(27.6)	188(26.5)	<0.001
やめた	13(31.0)	65(38.5)	7(38.9)	686(51.7)	867(45.4)	323(45.6)	
吸わない	15(35.7)	48(28.4)	6(33.3)	357(26.9)	513(27.0)	198(27.9)	
健康状態.n(%)							
最高に良い	0(0.0)	3(1.8)	0(0.0)	11(0.8)	5(0.3)	8(1.1)	0.119
とても良い	5(11.9)	20(11.8)	4(22.2)	168(12.7)	218(11.5)	69(9.7)	
良い	24(57.1)	113(66.9)	12(66.7)	895(67.5)	1298(68.2)	463(65.3)	
あまり良くない	12(28.6)	28(16.6)	1(5.6)	229(17.0)	368(19.4)	142(20.0)	
良くない	1(2.4)	5(3.0)	1(5.6)	23(1.7)	47(2.2)	21(3.0)	
全然良くない	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(0.3)	9(0.5)	6(0.8)	
ストレス感.n(%)							
全く感じなかった	3(7.1)	15(8.9)	2(11.1)	129(9.7)	101(5.3)	43(6.1)	<0.001
あまり感じなかった	14(33.3)	53(31.4)	2(11.1)	543(41.0)	510(26.9)	202(28.5)	
多少感じた	14(33.3)	68(40.2)	11(61.1)	508(38.3)	849(44.7)	320(45.1)	
大いに感じた	11(26.2)	33(19.5)	3(16.7)	145(10.9)	438(23.1)	144(20.3)	
仕事形態.n(%)							
自営、社長	8(19.0)	26(15.4)	4(22.2)	218(16.5)	447(23.5)	165(23.3)	<0.001
正社員、公務員、契約、派遣社員	18(42.8)	65(38.4)	17(66.7)	256(19.3)	803(42.3)	276(38.9)	
パート、アルバイト、主婦、学生	4(9.5)	15(8.9)	1(5.6)	156(11.8)	141(7.4)	58(8.2)	
退職者	10(23.8)	57(33.7)	1(5.6)	677(47.3)	417(22.0)	185(26.1)	
その他	2(4.8)	6(3.6)	0(0.0)	68(5.1)	91(4.8)	25(3.5)	

Table2.対象者の特性(女性)

	居住形態						
	①一人暮らし未婚	②一人暮らし既婚	③夫婦二人	④親と二世代	⑤子と二世代	⑥三世代以上	P-value
全体.n	37	709	5	900	1596	654	
年齢(SD)	57.14(11.83)	62.47(10.70)	53.00(10.70)	61.39(8.38)	53.63(10.19)	54.81(10.10)	<0.001
平均睡眠時間(SD)	6.22(1.06)	6.57(1.09)	6.20(0.84)	6.65(1.07)	6.35(0.99)	6.30(1.04)	<0.001
最終学歴.n(%)							
小・中学校、旧制中学	4(10.8)	47(27.5)	0(0.0)	156(17.4)	184(11.5)	87(13.3)	<0.001
高校	13(35.1)	79(37.8)	2(40.0)	421(46.8)	665(41.7)	285(43.6)	
専門学校、短大、高専	10(27.0)	53(30.1)	1(20.0)	236(26.2)	561(35.2)	214(32.8)	
大学、大学院	10(27.0)	29(13.9)	2(40.0)	86(9.5)	179(11.3)	65(9.9)	
その他	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.1)	5(0.3)	2(0.3)	
飲酒頻度.n(%)							
月1～3日	4(25.0)	24(34.8)	1(100.0)	78(26.0)	193(31.8)	65(31.7)	0.283
週1～2日	4(25.0)	15(21.7)	0(0.0)	60(20.0)	150(24.7)	40(19.5)	
週3～6日	4(25.0)	17(24.6)	0(0.0)	92(30.6)	145(23.9)	71(34.6)	
毎日	4(25.0)	13(18.8)	0(0.0)	70(73.3)	119(19.6)	29(14.1)	
喫煙歴.n(%)							
吸う	5(13.5)	14(6.7)	0(0.0)	38(4.2)	118(7.4)	47(7.2)	<0.001
やめた	2(5.4)	21(10.0)	0(0.0)	41(4.6)	117(7.3)	29(4.4)	
吸わない	30(81.1)	174(83.3)	5(100.0)	821(91.2)	1361(85.3)	578(88.4)	
健康状態.n(%)							
最高に良い	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	3(0.3)	15(0.9)	2(0.3)	0.014
とても良い	2(5.4)	22(10.6)	0(0.0)	101(11.2)	123(7.7)	52(8.0)	
良い	22(59.5)	130(62.5)	5(100.0)	584(64.9)	1021(64.0)	420(64.3)	
あまり良くない	12(32.4)	42(20.2)	0(0.0)	193(21.4)	396(24.8)	163(25.0)	
良くない	1(2.7)	13(6.2)	0(0.0)	14(1.6)	34(2.1)	12(1.8)	
全然良くない	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(0.6)	7(0.4)	4(0.6)	
ストレス感.n(%)							
全く感じなかった	2(5.4)	13(6.2)	0(0.0)	31(3.5)	33(2.1)	12(1.8)	<0.001
あまり感じなかった	7(18.9)	43(20.6)	0(0.0)	195(21.7)	229(14.3)	99(15.2)	
多少感じた	14(37.8)	99(47.4)	4(80.0)	467(52.0)	810(50.8)	327(50.1)	
大いに感じた	14(37.8)	54(25.8)	1(20.0)	205(22.8)	524(32.8)	215(32.9)	
仕事形態.n(%)							
自営、社長	6(16.2)	28(13.4)	0(0.0)	80(8.9)	164(10.3)	70(10.7)	<0.001
正社員、公務員、契約、派遣社員	9(24.3)	40(19.1)	3(60.0)	114(12.7)	418(26.2)	188(28.8)	
パート、アルバイト、主婦、学生	8(21.6)	107(51.2)	2(40.0)	645(71.7)	926(58.1)	349(53.5)	
退職者	13(35.1)	21(10.0)	0(0.0)	35(3.9)	34(2.1)	18(2.8)	
その他	1(2.7)	13(6.2)	0(0.0)	26(2.9)	57(3.3)	28(4.3)	

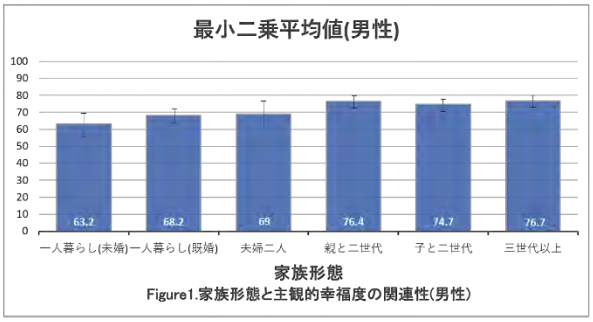


Figure1.家族形態と主観的幸福度の関連性(男性)

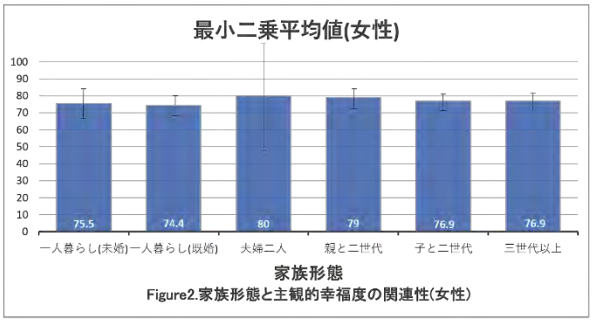


Figure2.家族形態と主観的幸福度の関連性(女性)

Table3. 家族形態と主観的幸福度における多変量線形回帰分析(男性)

	最小二乗平均値	95%信頼区間下限	95%信頼区間上限
一人暮らし(未婚)	63.2	57.0	69.4
一人暮らし(既婚)	68.2	64.4	72.0
夫婦二人	69.0	61.9	76.2
親と二世代	76.4	73.2	79.6
子と二世代	74.7	71.5	77.8
三世代以上	76.7	73.4	80.0

Table4. 家族形態と主観的幸福度における多変量線形回帰分析(女性)

	最小二乗平均値	95%信頼区間下限	95%信頼区間上限
一人暮らし(未婚)	75.5	67.5	83.5
一人暮らし(既婚)	74.4	69.1	79.7
夫婦二人	80.0	48.4	111.6
親と二世代	79.0	74.2	83.8
子と二世代	76.9	72.4	81.4
三世代以上	76.9	72.1	81.8

【参考文献】

(1)Saelens W et al. A comprehensive evaluation of module detection methods for gene expression data. Nat commun. 2018 Mar 15;9(1):1090.

(2)Sztányi-Szekér B et al. [Connection between satisfaction with relationship-, life, well-being and the development of the family structure]. Psychiatr Hung. 2022;37(2):124-132.

Automatic Diagnostic Modeling of COVID-19 CT Images Using Pretrained Deep Learning Models and Transfer Learning Scheme

医学・医療教育学　水野太陽（No.78）

【目的】

- CT 画像から COVID-19 の自動鑑別 AI モデルを開発すること。
- 医療 AI 開発のプロセスを学ぶこと。

【背景】

医療資源が不足している COVID-19 の感染拡大初期では、AI を駆使した CT 画像による事前スクリーニングが有益であったが、プライバシーの問題から、COVID-19 の CT 画像は入手が困難であり、CT 画像を用いた自動診断 AI の開発が妨げられてきた。そこで Xingyi Yang らは、多くの論文のプレプリントから、216 人の患者から得られた、812 枚の CT 画像（陽性：349 枚，陰性：463 枚）を集め、オープンソース化した。このデータセットを用いて、COVID-19 罹患が疑わしい CT 画像を識別するための AI を開発した。

【方法】

開発言語としては Python を用い、フレームワークは PyTorch を使用した。

利用可能な CT 画像の数が限られているため、畳み込みニューラルネットワークに基づく事前学習済みモデルから転移学習を行った。

1. TorchXRayVision ライブラリの DenseNet、TorchVision ライブラリの DenseNet169、ResNet18、ResNet50、VGG16、転移学習を用いないモデルの 7 つのモデルを作成し、エポック数=10 で比較し、最も優れたモデルを選択した。

2. 1. で最も精度の高かったモデルの前処理を調整し、より精度を高めた。
3. 開発したモデルが CT 画像上のどの部分に注目しているかを可視化し解釈するために、GradCAM 技術を利用し、このモデルの医学的な妥当性を評価した。

【結果】

1. 7 つのモデルの精度、F1 スコア、AUC 値はそれぞれ下図のようになり、すべての数値で DenseNet121 が最も優れた成績を出した。
2. DenseNet121 の前処理を調整した結果、エポック数=10、バッチサイズ=20、学習率=0.00005、最適化手法：Adam、スケジューラ：StepLR において、精度=0.80、F1 スコア=0.82、AUC 値=0.88 で最大となった。
3. GradCAM によるヒートマップは、モデルが肺野に注目していることを示唆した。

【結論】

- 本研究により、0.80 の精度を持つ AI を開発することができた。
- モデルの着目領域が医学的にある程度妥当であることを確認できた。
- 医療 AI 開発をほぼすべて独力で行い、プロセスの概要を理解出来た。

【参考文献】

- COVID-CT-Dataset: A CT Scan Dataset about COVID-19
  (Xingyi Yang, Xuehai He, Jinyu Zhao, Yichen Zhang, Shanghang Zhang, Pengtao Xie)
  https://arxiv.org/abs/2003.13865

プロフェッショナリズムを形成する隠れたカリキュラムの特定

医学医療教育学　水野鷹法　No.79

導入

現在、名古屋市立大学医学部のカリキュラムではプロフェッショナリズムの形成や職業的アイデンティティの成熟につながることを意図した講義、実習は少ないが医療従事者の証言などから名古屋市立大学医学部の卒業生はプロフェッショナリズムを身に着けて卒業していると考えられる。

大学 6 年間で職業的アイデンティティの形成に影響を与える隠れたカリキュラムが存在しているという仮説をもとに何によって職業的アイデンティティの形成、プロフェッショナリズムの形成を促しているかを学生、卒業生のインタビューをもとに調査する。

方法

在校生および卒業生に対して研究の背景と目的を説明した後 1 対 1 の半構造化インタビューを行った。半構造化インタビューの質問項目は以下の通りである。

・医学部、医師になると実感した授業、実習とその理由
・その授業とその他の授業との違い
・1～4 年生の時に医師、医学生としてのアイデンティティ形成に影響した、または医師になる自覚が芽生えた授業があるかとそれを受けて世界観、価値観がどのように変わったか
・5,6 年生から病院実習がはじまったことによる心境の変化

インタビューを文字に起こしインタビュー内容からテーマ、キーワードを抽出した。

結果

プロフェッショナリズムの形成を促している講義、実習、要素を図1にまとめた。

	リアリティ	将来像	認知	緊張感	責任	医療事故	死	第三者	患者
AMEC			○						
医学入門		○							
解剖実習	○			○	○			○	
生理学実習				○					
法医学	○						○		○
基礎自主研修		○							
医療倫理					○	○			
医療安全					○	○			
セメスター	○	○				○	○		
OSCE	○								○
病院実習	○	○	○	○	○	○	○	○	○

図1　プロフェッショナリズムを形成する講義と要素

・第三者、患者

患者や親族などの学外の第三者の存在を認識することが医者になる自覚や責任感につながるという意見が挙げられた。

「(解剖実習は)どなたかのご遺体とそのご家族がいると認識すると自分たちだけでは済まないとなり急にハードルが上がる」(卒業 1 年目研修医)

・リアリティ、将来像、認知

医師に対する解像度が上がり将来像を意識すること、自分自身や周りからの認知によって自身が医者になる自覚につながると考えられる。以下のような意見が挙げられた。

「(AMEC で)白衣を着た時に目に見えて変化があるので少し意識が変わった。」(医学部5年生)
「(セメスター)実際医者になって働く将来のイメージがつかめる」(医学部5年生)

・緊張感、責任、事故

医療事故の事例から感じる恐怖や緊張感から医学生、医師としての責任感が生じると考えられる。以下のような意見が挙げられた。

「(解剖実習)生きていた方を解剖させていただく点で他の実習とは異なる緊張感がある」(医学部6年生)
「(生理学実習)人生で初めて採血をやったから緊張した」(医学部5年生)

・死

死を身近に感じることが医者として自身がどうなるべきかを考えるきっかけになる。

「(法医学)唯一死に直面する科目であり死について考えるようになる」(卒業1年目研修医)

「(セメスター)しっかりやらないと人が死ぬかもしれないという恐怖を感じた。」(医学部5年生)

議論

名古屋市立大学においてプロフェッショナリズムは段階的に形成されていると考えられその段階は医学生、医師としての自覚の芽生え、責任感、死の実感、患者(第三者)への意識に大別されると考えられる。

・医学生、医師としての自覚の芽生え

もともと本人が持っている医師に対するイメージとつながる時に自覚が芽生えると考えられる。学年ごとに段階的なものになっており 1 年生の時に白衣を着ることなどから形から感覚的なものから学年が上がり実際の症例を知り、手技を学ぶなどより具体的なものから自身の医師に対するイメージに結びつけ、新たなイメージを構築される。

・責任感

最初は解剖実習などを通じて医学生としての責任を体感し、学年が上がり授業を通じて実際の症例や医療事故などを聞いてより具体的なものに昇華される。

・患者(第三者)への意識

最初は解剖実習で御検体には直面するが親族などの生きている大学外の第三者を直接は見えないところで認識する。OSCE で模擬患者と対面し病院実習で実際の患者さんと初めて対面するように段階を踏んでいる。

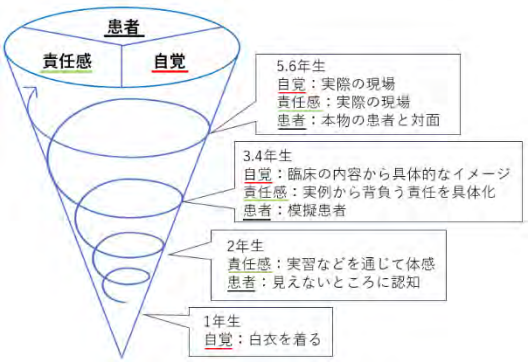


図 2 プロフェッショナリズムを形成するらせん型カリキュラム

このように段階を踏みながら自覚、責任感の順に身に着けていき最終的に病院実習にて患者さんと対面し全ての要素を含んだ病院実習が行われる。プロフェッショナリズムの形成はらせん型カリキュラムに沿って教育されていると考えられる。(図2)プロフェッショナリズムの形成を目的とする講義は少ないがさまざまなことを通じてプロフェッショナリズムは形成されていると考えられる。

今回の研究ではインタビュー数が十分に確保できなかったことから他の要素がある可能性、今回挙げた要素が個人特有のものである可能性を否定できない。また性別による差異もあると考えられたがこのことを示すにはインタビューを増やさなければ断定は厳しいだろう。

参考文献

Cruess, Richard L. Cruess, Sylvia R. Boudreau, J. Donald Snell, Linda, Steinert, Yvonne A Schematic Representation of the Professional Identity Formation and Socialization of Medical Students and Residents A Guide for Medical Educators: *Academic Medicine 90(6):p 718-725, June 2015.*

John Dent. Ronald Harden. Dan hunt. A PRACTICAL GUIDE FOR MEDICAL TEACHERS sixth edition

医学教育モデルコアカリキュラム令和 4 年度改訂版

「医療系学生はカリキュラム外活動で何を学ぶのか ～Community of Practice の視点から～」

医学・医療教育学 74 堀田真千子

1. 背景

医療系学部は、多くの学生が運動系のサークルだけでなく、救急救命や山岳診療を目的とした医療系の学生団体にも参加している。これらの正規カリキュラム以外の場で行われる学習活動は一般的に正課外活動[1)]と呼ばれる。また、明確な実践を目的として協力するコミュニティは、Community of Practice（CoP）[2)]と呼ばれる。多くの医療系学生が学生時代に正課外の CoP を経験するが、これらの活動を通しての学生の学びを医学教育の視点から論じた報告は存在しない。

名古屋市立大学では、2021 年より、夏期休業中に教育プログラムを開講し、学生と教員が主体的かつ協働的に学ぶ教育プログラムが行われている。これらの教育プログラムの企画・運営は、名古屋市立大学医療系学部と人文社会学部の有志学生が所属する学生団体 medicalHUB によって行われている。

2. 目的

学生団体 medicalHUB に参加した医療系の学生が活動を通して得た学びを、医学教育的な枠組みから記述する。

3. 方法

medicaHUB 運営に参加した学生 13 名に一人あたり 30 分から 1 時間かけて半構造化インタビューを行った。質問項目は、表 1 に示した通りである。発言を文字起こししたのちに、主題分析の手法で解析した。

4. 結果と考察

MedicalHUB は、医療系学生に向けた学習プログラムの開発という明確な目標（実践）に取り組む団体として機能しており CoP と捉えられた。それぞれの CoP の特徴を捉えるためには、「領域」「実践」「コミュニティ」の 3 方向から分析する CoP の構造モデル[3)]が有効であるとされており、今回はその枠組みから結果を考察した。

それぞれの発言とその分類は表 2 に示した。今回は便宜的に最も関連が深い要素に分類したが，実際は最初に述べた通りに構造モデルの 3 要素は図 1 のように密接に関わっており、分けて論じることはできない。構造モデルの 3 方向からの解釈が可能であった。

また、運営に複数年参加した学生の発言を経時的に追うと、参加当初は構造モデルの要素の一部に興味を抱いていたのに対して、現在は他の要素にも着目していることがわかる。学習者のこの視点の変化は、Wenger によっても報告されており[3)]、運営に複数年参加することによって参加者にとって着実に正統的周辺参加が起きていたことが考えられた。

CoP の教育実践の限界としては、先行研究で、コミュニティへの参加の機会が不公平であることが挙げられている[4)]。今回の報告をもとに、日本の医学部でより多くの有効な CoP が立ち上がることを期待する。

5. 結論

本報告では，学生団体 medicalHUB の活動を CoP と捉えることで，参加を通して学生が得た学びについて言語化することができた。

木村ら[5)]は，実践を医学教育学の概念的枠組みを使って言語化する医学教育者の役割を重要視してい

る。今回の基礎自主研修を通して、学生の立場から医学教育の視点を用いて自分たちの活動を分析することができた。今後の medicalHUB の活動に還元していくとともに、より一般化して、全国の団体に役立てられるように理論構築を目指したい。

6. 参考文献

1) 溝口侑, and 溝上慎一. ″大学生のキャリア発達とロールモデルタイプの関係――ロールモデル尺度(RMS) の開発の試み――.″ *青年心理学研究* 32.1 (2020): 17-36.

2) Wenger, Etienne. Communities of practice: Learning, meaning, and identity. Cambridge university press, 1999.

3) Wenger, Etienne, Richard McDermott, and William M. Snyder. コミュニティ・オブ・プラクティス ナレッジ社会の新たな知識形態の実践. 翔泳社, 2013.

4) Cruess, Richard L., Sylvia R. Cruess, and Yvonne Steinert. ″Medicine as a community of practice: implications for medical education.″ Academic Medicine 93.2 (2018): 185-191.

5) 木村武司, et al. ″臨床研修指導医講習会における医学教育ケースカンファレンスの試み.″ *医学教育* 51.5 (2020): 591-595.

0 PICo projectとmedicalHUBで経験したことについて振り返ってください
1 medicalHUBは、どんなメンバーから構成されていて、何をしていますか
2 medicalHUBの活動に参加して、あなた自身の学びは何でしたか
（活動が2年目の学生について）昨年度から変化した点はありましたか
3 将来の夢は何ですか
4 medicalHUBの運営を通しての学びは、あなたの将来の夢にどのような影響を与えると思いますか
5 なぜ、来年もmedicalHUBの運営に参加しようと思ったり、後輩に勧めたいと思ったのですか
6 社会の中で、medicalHUBとはどのような役割を果たしていると考えますか

表 1 インタビュープロトコル

	項目	インタビューデータ	医学教育理論	所属
実践	スキルや知識が向上した	「パソコンとデザインと公式LINEとか，そういうICT(を使ったシステム構築)がちゃんと学べた。」	コンピテンシー	医学部A
	自己の得意・不得意に関してメタ認知を獲得した	「やっぱそういう(マネジメントや単純作業をこなす)能力とかも必要だし，自分には足りてないし…でも，(自分が中心となって取り組んできた)デザインとかさ…才能だなと思い始めてきたんだよね」	自己調整学習力	医学生B
	奉仕の精神	「どこかの役に立ちたいって思う節があって、（だからこそ、試験勉強など）自分のことは自分で頑張らなきゃみたいな。」	内発的動機付け	医学生C
	カリキュラム内では探求できないことまで探求できた	「（実習の際に、指導者の人が）どういう経歴でどういうことをしているのかとかいうのはあんまりお聞きする機会がないので（そういう点では、medicalHUBはいいですよね）」		看護学生D
領域	後輩教育をキャリアに活かす視点を手に入れた	「自分が現場に行っ（て、PICo projectのような教育プログラムに関わる機会があっ）たら、将来、この（プログラムに参加する）子たちを絶対この病棟に入りたいと思わせたいって、思わせられる人でありたいなと思うんですけど。	正統的周辺参加	看護学生E
	仕事に対する責任感を感じられた	「責任の面をかなり負えたっていうのかな。ある意味社会の一部みたいなのを経験できたっていうのは非常に大きかったかな。運営を通して自分より上の立場の人にわざわざ時間を取ってもらう（経験を通してそう感じた）かな。」	共同エージェンシー	医学生F
コミュニティ	多職種連携の重要性の気づき	「医学部と看護学部で。全然…見てるところが違って、同じもの見てても、なんかすごい視点が全然違うから、面白いなって思いました。学部によって学ぶことが違うじゃないですか。その授業の影響力っていうのもすごい大きいんだろうなと。だからこそなんかあの、多職種連携。それが大切なのかな。」	正統的周辺参加	看護学生G
	キャリアに対する具体的なイメージを持った	「私は，…結構，人の意見に左右されやすいっていうか，…でも，なんか，medicalHUB入ってたら，（顧問の先生や看護師さんと話す機会があるから）自分の道を見つけやすくなる手段(になったり)…誇りを…持てるようになったりするのかなとか考えました」	ロールモデル	看護学生H

表 2 インタビュー結果

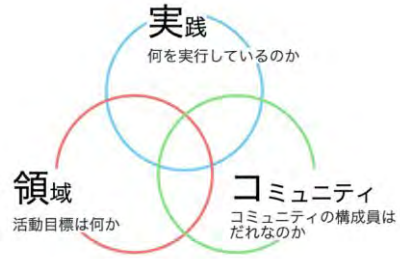


図 1 CoP の構造モデル

Evaluation of the difference between two massive parallel sequencers for microhaplotypes typing

法医学 中島暖菜(59)

Background

近年, Massive parallel sequencer (MPS)の普及によりマイクロハプロタイプ (MH) という新しいマーカー形態が注目されている。200bp 以内に存在する 3～5 個の SNP を組み合わせたハプロタイプをアリルとし、多型性が比較的高く、変異率が低いという点で有用性が高いと考えられている。2020 年の基礎自主研修で行われた実験で、新たに構築した X 染色体上の 10 座位の MHs の型判定を MPS の一種である IonS5 (ThermoFisher, MA, USA) を用いて実施した際にアリルインバランスが見られた。アリルインバランスとは、型判定の際にアリルが想定と異なる割合で検出されることであり, MPS においてはリードの比率が不均衡であることを表す。

アリルインバランスの原因としてはある座位の遺伝子のコピー数に多型があり、その座位が欠失または重複していることであるコピーナンバーバリアント, DNA コンタミネーション、MPS を用いたライブラリ調整や DNA シーケンシングにおけるエラー、データ解析上のエラーなどが挙げられる。その時の IonS5 を用いた男性サンプルの解析結果では、最多ハプロタイプのリードが全リードに占める割合は 10 座位で 85～96%となった。男性の X 染色体であるためこの割合は本来 100%に近いほど望ましい結果だが、80%台の座位もあるなどばらつきが大きかった。IonS5 ではこれまで複数回ランを実施しており, 同じクオリティ基準であるのにも関わらず特定のランでアリルインバランスが顕著であることがあったことからコピーナンバーバリアントである可能性は低いと考えられ, 座位ごとにばらつきの程度に差があることから, コンタミネーションの可能性も低いと考えられた。本研究ではこれを踏まえ、このアリルインバランスが MPS を用いたライブラリ調整や DNA シーケンシングにおけるエラー、データ解析上のエラーに由来するのかを検証するため, 同じサンプルを別の MPS である MiSeq (Illumina, Tokyo, Japan) を用いて解析し, その違いを検討した。

Method

同意を得て採取した男性由来の DNA88 サンプルを用い, 対象の 10 座位を PCR 増幅した(Figure 1)。増幅産物の塩基配列決定を MiSeq によって行い、MHs のマッピング, バリアントコール, および型判定はフリーソフトウェアの MicroHaplator を用いた。ただし、IonS5 では各座位において平均深度が 500 未満のサンプルは解析から除外したのに対し、今回の MiSeq では全般に得られたリード数が少なかったためリード数が 50 未満の場合は当該座位の解析から除外した。

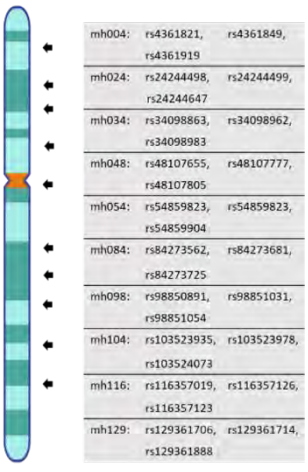


Figure1. Locations of 10 microhaplotypes on the X chromosome.

ここで IonS5 と MiSeq の塩基配列決定法の違いについて説明する。IonS5 は, 半導体チップ内に dNTP を 1 種類ずつ順に送り, 塩基の伸長反応時に放出される H^+による pH 変化を検出し配列を特定する。カスタムプラグインを注文することができ, まだ一般的でないマイクロハプロタイプの解析など, 容易に自由度の高い解析をすることが可能である。

一方, MiSeq は蛍光標識した保護基付き dNTPs を DNA ポリメラーゼとともに添加し, 取り込まれた際の蛍光色素を観測した後, 保護基などを除去して次の伸長反応へ進む。IonS5 に比べて長時間を要するが、DNA を両側から読み取るペアエンドシーケンシングを行うため正確性は高くなる。ただし既存の解析プログラムがない場合は自身で解析を行う必要があり, データ解析に関する

技術を要する場合がある。

両者にはライブラリ調製の過程にも違いがある。インデックスを付けたサンプルはそれぞれ識別されるため，一度に解析する全サンプルのアンプリコンを混合する。IonS5 ではそれぞれのアンプリコンの増幅にエマルジョン PCR を行い，MiSeq ではブリッジ PCR を行う。どちらのシーケンサーにおいても，この工程は全サンプルに影響する工程といえる。

Results and conclusions

IonS5 と MiSeq のそれぞれを用いた場合の、各座位における最多ハプロタイプのリードが全リードに占める割合を Figure 2 に示す。IonS5 の結果が 85～96%であったのに対して、MiSeq の結果は 96～99%となり、全ての座位でアリルインバランスは改善された。

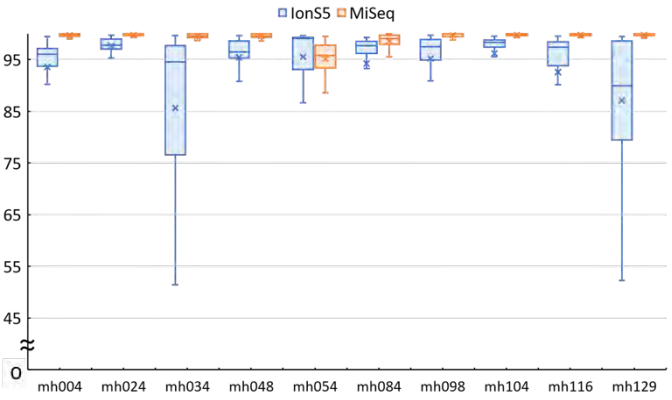


Figure2. Boxplots showing the percentage of the reads most observed at 10 microhaplotype loci analyzed by the IonS5 and Miseq sequencers.

MPS において一般にシーケンシングのエラーが起こりやすいのは、リーディング領域に連続塩基が多い場合や GC 含量の多い場合などである。そこで 10 座位のリーディング領域における SNP 前後の連続塩基の有無及び GC 含量を確認したところ、どちらも結果との関係は不明瞭であった。したがって単純なシーケンシングエラーが原因ではないと考えられ、エマルジョン PCR のような全てのサンプルに関わる実験工程が原因である可能性が指摘できる。(Figure 3, 4)

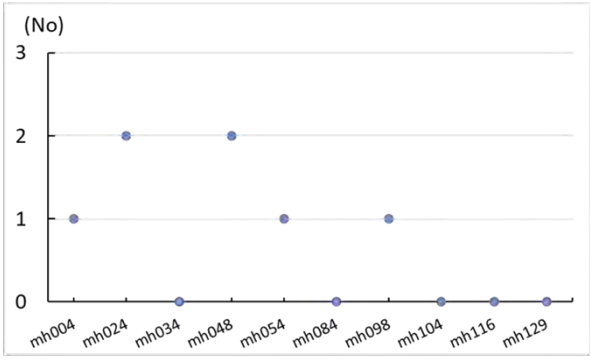


Figure3. Numbers of three or more consecutive identical bases adjacent to the SNPs within each microhaplotype.

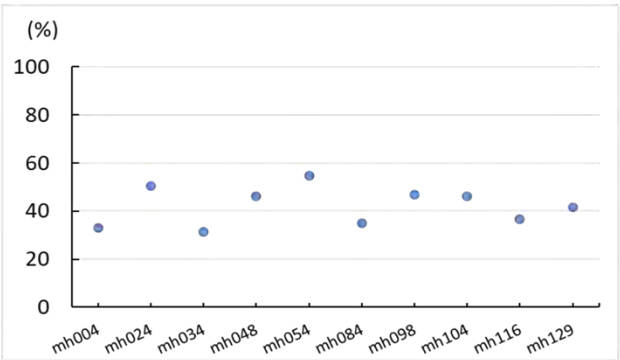


Figure4. The percentages of GC content per microhaplotype loci.

このことは，IonS5 では同じクオリティ基準であるのにも関わらず特定のランでアリルインバランスが顕著であることがあったことからも妥当であると考えられる。

一般的に用いられる深度等の指標値の他に，何らかの別の指標値を示すことができればアリルインバランスを回避できる可能性がある。

MH の実務応用を検討する上で，機器による特性を理解し，その対策を検討することが重要であることが分かった。今回の実験のシーケンシングにおいて十分なリード数が得られなかったサンプルがあったことから，サンプルの濃度等を調整し，さらに検討する必要があると考えられた。

H_2S induces the assembly of stress granules in human bronchial epithelial cells.

法医学　古橋　杏花（No.71）

〈目的・背景〉

近年、体内にある生理的な濃度の硫化水素には、神経伝達物質や平滑筋弛緩因子、血管新生などの生理的機能があることがわかっている。一方、高濃度の硫化水素に曝露されると呼吸機能が損なわれ、最終的には数分以内に死に至る。その毒性には硫化水素へのストレス応答が関与していると報告されているが、呼吸器系の細胞におけるストレス機構はまだ完全には解明されていない。本研究では、高濃度硫化水素を吸引したことによるヒトへの影響を、ヒト気管支上皮細胞を用いて細胞ストレス応答の一つであるストレス顆粒形成の観点から調べた。

ストレス顆粒とは低酸素や熱、ヒ素などのストレス刺激に応答して、一過性に形成される細胞内小器官である。ストレスから細胞を防御するために SGs を形成し、RNA の翻訳を一時停止させる。

〈方法〉

SGs の構成成分 GFP-G3BP1 を遺伝子導入した GFP-tagged G3BP1-transfected CHO cell と、ヒト気管支上皮細胞である Beas-2B cell を実験に使用した。培養した細胞に硫化水素の発生源として NaHS を曝露した。曝露溶液から H_2S が気体となって逃げることを避けるため、すぐにフィルムで密閉し、37℃1 時間インキュベートした。

CHO cell では NaHS 曝露後 IN Cell Analyzer を用いて経時的に撮影を行い、SGs 形成の観察と統合的ストレス応答(ISR)の阻害剤(ISRIB)効果の確認をした。

Beas cell では、まず固定し、G3BP1 で免疫染色した後、蛍光顕微鏡で観察することで、SGs 形成の観察と ISRIB の効果の確認をした。また、ウエスタンブロッティングを行い、SGs 形成の指標タンパク質であるリン酸化 eIF2α の検出、および新規タンパク質生合成量の puromycin 抗体を用いた検出を行った。

〈結果〉

G3BP1-CHO cell において、5mM NaHS の曝露により、SGs の形成が認められた。ISRIB を添加すると、その SGs の形成が阻害された（Figure 1)。

Beas cell において、5, 10mM NaHS の曝露により、SGs の形成が認められた（Figure 2)。 ISRIB 存在化および非存在下で、SGs 形成に顕著な差は認められなかった(Figure 3)。SGs 形成に必須である eIF2α のリン酸化が NaHS の濃度依存的に増加した（Figure 4)。NaHS 曝露により、新規タンパク質生合成の阻害が認められた（Figure 5)。

〈考察〉

高濃度の H_2S の曝露時には、呼吸器系の細胞内で SGs が形成されることが明らかとなった。H_2S 曝露時には、高濃度の H_2S から細胞を防御する機構が働くと考えられる。G3BP1-CHO cell の結果より、SGs形成には ISR の関与が推定された。

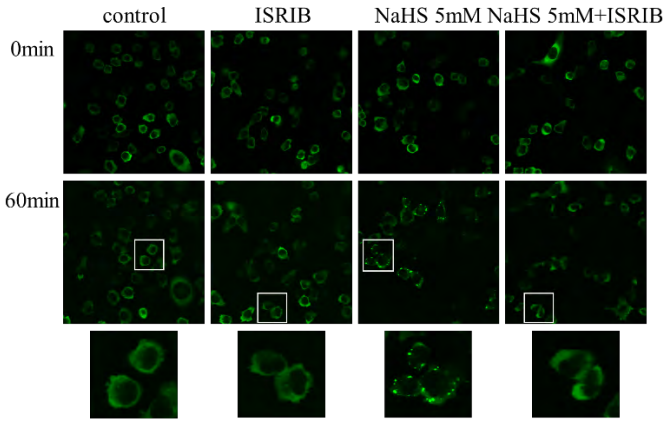


Figure 1. Effect of ISRIB on stress granules formation in G3BP1-CHO cells by IN Cell Analyzer.
ISRIB : Inhibitor of integrated stress response (ISR).

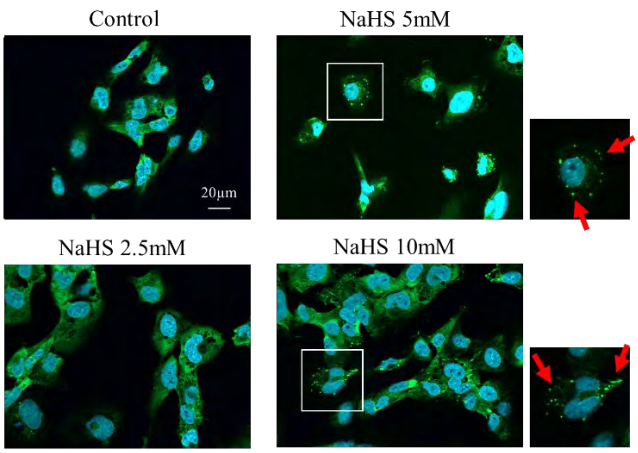


Figure 2. Fluorescence microscopic imaging in NaHS-exposed Beas cells. ➔ : stress granules

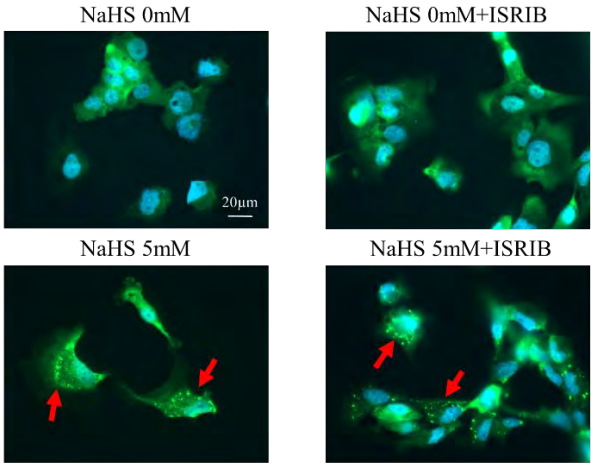


Figure 3. Effect of ISRIB on stress granules formation in Beas cells by fluorescence microscope. ➔ : stress granules

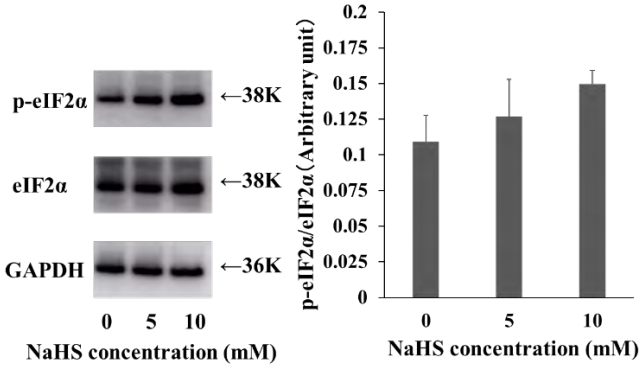


Figure 4. Western blot analysis for the detection of phospho-eIF2α and eIF2α in NaHS-exposed Beas cells.
*p＜0.05 , significantly different from control value.

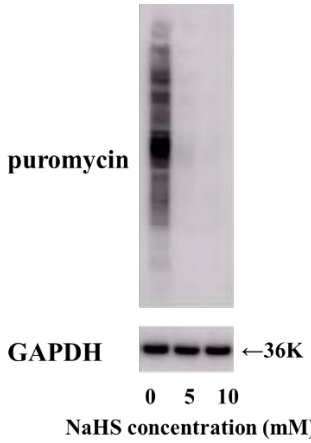


Figure 5. Measurement of protein synthesis in Beas cells by puromycin labelling method.

〈参考文献〉

・木村英雄．硫化水素(H_2S)の生理的機能と医療応用．生化学 第 85 巻 第 2 号，pp 63-75，2023

法医解剖での死因特定における死後血検査の有用性についての検討

法医学　83 番　三好愛美

1. 研究背景

法医解剖においては，生前の経過や病歴が不明であることが多く、解剖により死因を特定が難渋することも多い。生前の遺体の状況を推定する一助として、解剖時に採取される死後血を用いた生化学検査についての有用性について検討が行われてきたが，いまだ確立されたものはない。死体血は，死後変化の影響を受けるため、生前血の基準値を当てはめることができないことや、採血部位あるいは採取時の死後経過時間によっても数値が大きく変動することが問題となる。

本研究の目的は、死体血の採取部位および死後経過時間による値の変動を考慮して、死後血の生化学的解析が死因判定における有用性について検討した。

2. 方法

2008 年から 2023 年の間に名古屋市立大学法医学教室で法医解剖を実施し、死後血の採取が可能であった 201 例について、各検査値の相関関係、死因との関連、採取部位による差異、検査値の経時的変動を検討した。血液生化学検査の項目としては、Tg、TP、CRP、Glu、BUN、Cre、Na、Cl、K、P、Mg、CPK、CPKMB、LDH、EAcAc、3HB、TKB の 17 項目であった。

3. 結果

上大静脈における成分同士の相関関係おいては、153 組中 101 組において有意差が確認された。特に電解質同士の組み合わせで有意差ありが多くみられた。

（Table1）

	Tg	TnT	TP	CRP	Glu	BUN	Cre	Na	Cl	K	P	Mg	CPK	CPKMB	LDH	EAcAc	3HB
Tg																	
TnT	0.933																
TP	0.223	0.749															
CRP	0.396	0.172	0.191														
Glu	0.362	0.029	0.018	0.148													
BUN	0.373	0.957	0.765	<0.01	0.577												
Cre	0.898	0.757	0.02	0.012	0.223	<0.01											
Na	0.749	<0.01	<0.01	0.066	<0.01	0.667	0.384										
Cl	0.956	<0.01	<0.01	0.095	<0.01	0.138	0.73	<0.01									
K	0.958	<0.01	<0.01	0.1	<0.01	0.608	0.555	<0.01	<0.01								
P	0.549	<0.01	<0.01	0.965	<0.01	0.055	0.181	<0.01	<0.01	<0.01							
Mg	0.82	0.022	0.058	0.361	<0.01	0.885	<0.01	<0.01	0.453	<0.01	<0.01						
CPK	0.095	<0.01	0.368	0.063	0.347	0.417	0.532	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.016					
CPKMB	0.607	<0.01	0.691	0.229	<0.01	0.468	0.896	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.015	<0.01				
LDH	0.874	<0.01	0.051	<0.01	0.036	0.042	0.075	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.7	0.02			
EAcAc	0.035	<0.01	0.024	<0.01	<0.01	0.043	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01		
3HB	0.065	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	
TKB	0.066	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

Table1.　Correlation between biochemical tests in the superior vena cava

死因別比較においては、TP は急性 CO 中毒・焼死で、CRP・BUN は感染症で高値となった。Mg は海水での溺死で高値となったが、有意差は確認できなかった。（Fig1）

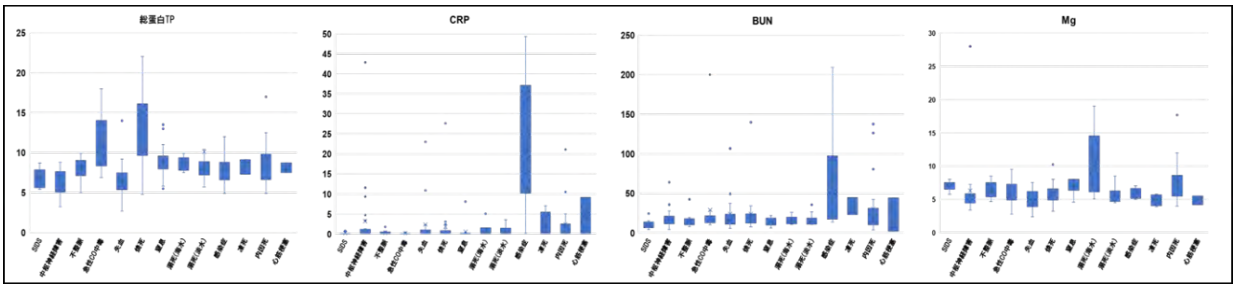


Fig1. Comparison of cadaver blood biochemistry values by cause of death

血液採取部位比較では、上大静脈、左心血、外腸骨静脈の 3 部位間で検査値に差がないもの（TP, CRP, BUN, Na, Cl, Mg）、特定の臓器から産生されることによりその周辺での数値が高くなるもの（Tg）、筋肉量に影響を受けるもの（Cre, CPK, CPKMB）があった。(Table2)

p 値	Tg	TnT	TP	CRP	Glu	BUN	Cre	Na	Cl	K	P	Mg	CPK	CPKMB
上大静脈/左心血	0.024	0.233	0.814	0.522	<0.01	0.474	0.051	0.567	0.24	0.144	0.056	0.675	<0.01	<0.01
左心血/外腸骨静脈	0.167	0.109	0.575	0.839	0.368	0.146	0.037	0.508	0.225	0.028	0.03	0.538	<0.01	0.586
外腸骨静脈/上大静脈	0.065	0.019	0.284	0.8	0.409	0.187	0.684	0.94	0.897	0.345	0.729	0.82	0.585	0.404

Table2.　Comparison of cadaver blood biochemistry values by site of collection

死亡直後と解剖時の検査値比較では、TP は緩徐に増加し、血液中の血漿成分が血管外に漏出しておこる血液の濃縮によるもの考えられた。CPK は急激にかつ持続して上昇していることから骨格筋の崩壊によるものと考えられた。K, Na, Cl は2点での検討ではその変化がわずかであったが，それらの検査値は死後急激に値が変化しその後の変化は緩徐であることを示しているものと考えられた.

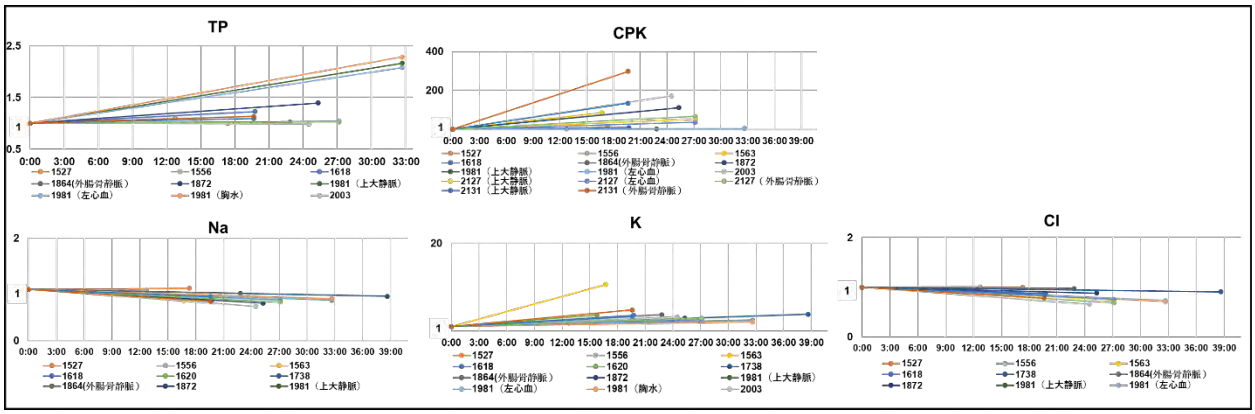


Fig2. Comparison of variation in cadaver biochemical test values with time since death

4. 結論

死後血における生化学検査値は死後変化の影響を大きく受け、その変化は溶血や筋細胞の崩壊に関係し、検査項目により多様である。BUN や CRP のように死後変化の影響を受けにくく、死因と比較的相関が高い検査項目は死因診断に有用である。死後血検査は、死後血に関して十分な知識を持つこと、また死体の周囲状況や法医解剖による所見と併せて利用することで、死因診断に有用である。死後血検査を死因診断により有用なものとするため、今後事例を増やし検討を加えることが必要である。

5. 参考文献

①中井利昭（編集代表），検査値のみかた，中外医学社，2006

②中原一彦，検査値辞典，総合医学社，2011

③野崎義行，（1997），最新の海水の元素組成表（1996 年版）とその解説，日本海水学会誌第 51 巻，5

④法医学ブログ，死後血液検査の意義，< https://houigaku.blog/article/402.html>，(参照日 2023 年 11 月 16 日)

機械学習を用いた恥骨結合面解析による年齢推定

法医学　山本峻也　出席番号 94

・背景

恥骨には年齢に応じた特徴をもつ部位があり、法人類学的に重視されている。恥骨による年齢推定には非計測的方法と計測的方法があるが, 非計測学的方法では鑑定者の習熟度等に左右されることがあり、定量的で客観的な計測的識別法の確立が求められている。

・目的

本研究では恥骨標本を 3D スキャナで読み取り、再構成した 3 次元像を用いて機械学習による年齢推定を試み、その有用性について検討した。

・方法

剖検時採取した男性恥骨標本 270 例(16-99 歳、右 161 例、左 109 例)を 3D スキャナを用いて読み取り、HBM-Rugle ソフトウェア（メディック・エンジニアリング社）を使用して恥骨の相同モデルを作成した。相同モデルは各 3 次元像を同一位相・同一点数からなるポリゴンで構成したモデル群であり, 大きさ、姿勢、構成する点数を調整でき、これによりサンプルを同一条件で扱うことが可能となる。

機械学習は 2 次元投影像および 3 次元像を対象とし、回帰法を採用して行った。前者は Brain-Rugle ソフトウェア（メディック・エンジニアリング）を利用するもの（以下 2 次元 CNN）で、調整済みの恥骨結合面正面像に加えて y 軸（上下軸）周りに-60、-45、45 度回転させたものの画像を一つに連結し提示画像を準備した。後者では調整済みの 3 次元像を基に学習を行う Python ライブラリの Pytorch を用いて作成した学習モデル（以下 3 次元 CNN）を採用した。これらの提示画像および 3 次元像をサンプル群 1（25-69 歳の 224 例）と、サンプル群 2(16-99 歳の 270 例)に分けそれぞれ 150 個を機械学習用データとした。またこれとは別に、サンプル群 1、サンプル群 2 ともに 60 個をランダムに選択し、 同様にして提示画像と 3 次元像を作成し検証用データとし、年齢推定の精度を計測した。なお、学習オプションは 2 次元 CNN では学習アルゴリズム SGDM、バッチサイズ 10、エポック数 1000、学習率 0.0001、3 次元 CNN では学習ネットワーク PointNet、学習アルゴリズム Adam、バッチサイズ 32、エポック数 500、学習率 0.0001、学習に使用する頂点数 5364 にそれぞれ固定し、同一の条件で学習モデルを 5 個作成し、5 回のテスト結果の平均で評価した。

さらに、3 次元 CNN については 15792 頂点からなる別の相同モデルを用意し、学習用データ 148 個、検証用データ 37 個として、学習に使う頂点数を 1024, 4096, 8192, 15792 と変化させ、情報量と精度の関係について検討した。

・結果と考察

サンプル群 1 における 2 次元および 3 次元 CNN による年齢推定の結果を Fig.1、2 に示す。2 次元 CNN では平均誤差は 8.25 歳、誤差 5 歳以下が

33.7%、10 歳以下 65.0%、15 歳以下 85.7%、20 歳以下は 96.7%。3 次元 CNN では平均誤差 7.58 歳、 誤差 5 歳以下が 42.0%、 10 歳以下 68.7%、15 歳以下 88.7%、20 歳以下は 95.3%であった。いずれにおいても 50-54 歳のサンプルで平均誤差が最小であった。また一般に、若年層では実年齢よりも高く、高年層では実年齢よりも低く推定することが多かった。

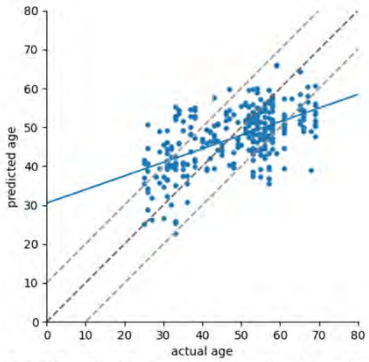


Fig. 1. Results of age regression estimation using pubic bone images in 2DCNN.

サンプル群 2 を用いて 2 次元および 3 次元 CNN による年齢推定した結果とサンプル群 1 のそれとの比較を Table 1 に示す。2 次元 CNN、3 次元 CNN ともにサンプル群 2 はサンプル群 1 に比べて平均誤差が有意に大きくなった。このことから、サンプルは年齢の幅が小さい方が精度がよいといえる。

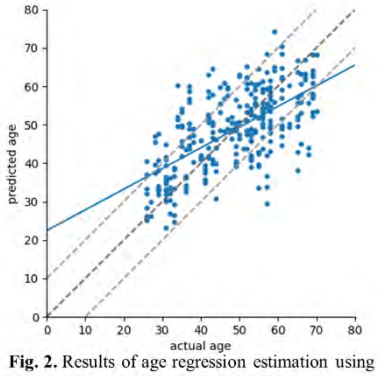


Fig. 2. Results of age regression estimation using 3D images of the pubic bone in 3DCNN.

また、頂点数 15792 の相同モデルを用い、参照する頂点数を削減して検証を行なった結果を Fig.3 に示す。頂点数が 1024 と 15792 の学習モデルとを比較すると、後者の方が有意に平均誤差が小さかった。一般に学習に使用する頂点数が増えれば精度が上昇することが見て取れた。また、今回は検討していないが、同じ頂点数でも相同モデルの頂点の分布次第で精度に影響する可能性も考えられた。

Table 1. Comparison of age regression estimation using pubic bone images between two groups of 2DCNN and 3DCNN .

	Mean Error (years)		
	samples1	samples2	p value
2DCNN	8.25	10.65	0.026
3DCNN	7.58	11.05	6.63E-05

*: t-test

今回の検討により、 2 次元画像、3 次元像を利用した機械学習による年齢推定はある程度有用ではあることが分かった。しかし、今回は 2 次元 CNN では 1 通りの 4 視点画像での学習しか行えていないため、より様々な視点、より多くの画像の組み合わせでの学習が行えれば改善の余地があるだろう。3 次元 CNN では 3 次元像を点群として認識して頂点情報のみで学習を行ったが、法線情報を加えての学習や面積情報を加えて点群ではなく物体として認識しての学習などの実装をできれば改善の余地があるだろう。加えて高負荷な処理であるため 1 回あたりの学習に時間を要することも課題と言える。また、一般に恥骨結合面を利用した年齢推定では、若年層における精度が高い反面、中高年層では年齢推定幅が広くなるが、今回の機械学習手法による推定においては、それとは異なる傾向が見られた。これは従来の推定法を補完する意味では有用な結果と言えるが、さらなる精度向上に向けての課題でもある。

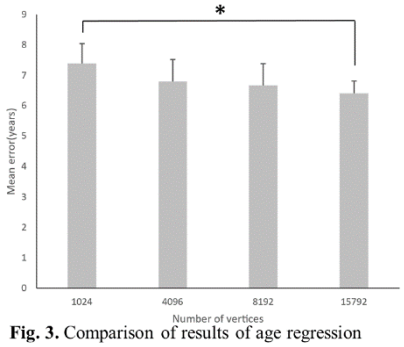


Fig. 3. Comparison of results of age regression estimation by 3DCNN using 4 groups of 3D images of the pubic bone with different numbers of vertices
*:Dunnett-test

有機リン系殺虫剤曝露とBMIまたは中性脂肪との関連性の検討

環境労働衛生学　上島力登(20)

1. 背景・目的

2019年の肥満者の割合は男性33.0%、女性22.3%で、男性で2013年から有意に増加している[1)]。有機リン系殺虫剤(OPP)は、アセチルコリンエステラーゼを阻害することで有機リン中毒を引き起こす[2)]。ピロリン酸テトラエチルやパラチオンといった強い毒性が認められたOPPの販売や使用が農薬取締法に基づき禁止されてきた。また、OPPはマウスの高トリグリセリド血症を誘導することが報告されている[3)]。2021年の名古屋市において、OPPは屋外で0.14482 t･kl、屋内で0.42987 t･kl使用されている[4)]。OPPは体内で代謝され、ジアルキルリン酸(DAP)として尿中に排泄される。本研究の目的は、害虫駆除業者(PCO)における尿中DAP濃度とbody mass index(BMI)または中性脂肪との関連を調べることである。

2. 方法

研究参加者は、2014年3月と2014年8月の健診を受けた男性PCO19名である。ジメチルリン酸(DMP)、ジメチルチオリン酸(DMTP)、ジエチルリン酸(DEP)、ジエチルチオリン酸(DETP)の4種類のDAPを測定した。検出限界(LOD)をそれぞれ0.10μg/L、0.05μg/L、0.11μg/L、0.02μg/Lとし、LOD未満はLODを√2で割った値を代入し[5)]、自然対数変換した。参加者をBMIに基づいてNormal群(＜25kg/m^2)とOverweight群(≧25kg/m^2)の2群に分けた。また、参加者を中性脂肪に基づいてNormal群(≦110mg/dl)とHigh群(＞110mg/dl)の2群に分けた。DMP, DMTP, DEP, DETPの尿中濃度とBMIもしくは中性脂肪との関連を、年齢を調節した二項ロジスティック回帰分析を用いて検討した。

3. 結果

Normal群とOverweight群間においてt検定を行ったところ、体重と中性脂肪ではそれぞれ有意差が認められ(p=0.000039, 0.031)、年齢と身長ではそれぞれ有意差が認められなかった(p=0.13, 0.29)。殺虫剤の使用頻度は、Normal群のうち6人が週3回未満、3人が週3回以上、1人が不明で、Overweight群のうち4人が週3回未満、5人が週3回以上であった(表1)。

Normal群とOverweight群間においてU検定を行ったところ、全てのDAP濃度(DMP、DMTP、DEP、DETP)で有意差は認められなかった(p=0.28, 0.74, 0.81, 0.97、表2)。

2項ロジスティック回帰分析において、尿中DAPとBMI間には、年齢調整前、調整後いずれにおいても有意な関係は見られなかった(表 3)。尿中 DAPと中性脂肪において年齢調整前、調整後いずれにおいても有意な関係は見られなかった(表4)。

4. 考察

本研究参加者の尿中DMP, DMTP, DETP濃度の中央値は、日本の一般人の尿中濃度の中央値(それぞれ1.9μg/L、0.7μg/L、0.11 μg/L)と比べて高かった[6)]。これは、職業曝露の影響であると考えられる。次に、研究参加者の肥満率は、2014 年の日本人男性の肥満率(28.7%)と比べて高かった[1)]。職業は学歴と関連し、学歴は肥満と関連することが示されており[7)]、学歴は肥満の原因となりうる。また、OPP 曝露と BMI／中性脂肪の間に関連は見られなかった。日本の 2014 年の農薬出荷量は 236534 t･kl であり、これは1994年の475614 t･kl と比べ半分以下となっている[8)]。薬剤の適切な利用法が確立したため、本研究の参加者にOPP曝露の影響が認められなかった可能性が考えられる。

本研究にはいくつかの限界が存在する。第一に、研究対象者が少ない。第二に、BMIと尿中濃度に影響を与える食事について調整できていない。第三に、尿中代謝物の半減期が 1 日から 2 日であり、また冬季と夏季で曝露量が異なるため、持続的な曝露を反映していない。複数回の尿による曝露評価が必要であると考えられる。

表 1:研究参加者の特徴

	Normal	Overweight
	(n=10)	(n=9)
Age (y)	32.3±9.0	38.6±6.7
Height (cm)	171.7±5.3	168.7±6.1
Weight (kg)	61.4±7.2	79.7±6.3
Triglyceride (mg/dl)	89.6±37.9	134.1±40.2
Occupational pesticide use (n)		
Less than 3 times a week	6	4
3 or more times a week	3	5
Missing	1	0

表 2:尿中 DAP 濃度

	Normal	Overweight
	(n=10)	(n=9)
DMP (μg/L)	3.3 (1.8 - 6.4)	0.7 (0.07 - 4.9)
DMTP (μg/L)	2.5 (1.7 - 4.0)	2.3 (0.8 - 4.0)
DEP (μg/L)	1.6 (1.1 - 2.1)	1.9 (0.4 - 3.1)
DETP (μg/L)	0.1 (0.1 - 0.3)	0.2 (0.01 - 0.4)

表 3:尿中 DAP と BMI の 2 項ロジスティック回帰分析の結果

	Crude OR	95% CI	Adjusted OR	95% CI
DMP	0.36	0.11 - 1.2	0.18	0.03 - 1.1
DMTP	0.52	0.10 - 2.8	0.30	0.04 - 2.2
DEP	0.46	0.08 - 2.8	0.52	0.08 - 3.4
DETP	0.70	0.17 - 2.8	0.76	0.17 - 3.4

表 4:尿中 DAP と中性脂肪の 2 項ロジスティック回帰分析の結果

	Crude OR	95% CI	Adjusted OR	95% CI
DMP	0.51	0.17 - 1.5	0.48	0.15 - 1.5
DMTP	0.34	0.05 - 2.3	0.30	0.04 - 2.1
DEP	0.25	0.03 - 2.1	0.26	0.03 - 2.2
DETP	0.36	0.08 - 1.7	0.37	0.08 - 1.7

参考文献

1. 厚生労働省　令和元年国民健康・栄養調査報告 https://www.mhlw.go.jp/content/001066903.pdf
2. Sultatos LG. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides., J Toxicol Environ Health., 1994 Nov
3. Suzuki Het.al, Organophosphate agents induce plasma hypertriglyceridemia in mouse via single or dual inhibition of the endocannabinoid hydrolyzing enzyme(s)., Toxicol Lett. 2014 Feb 10
4. 令和 3 年度名古屋市の施設等における農薬・殺虫剤等薬剤の使用状況調査結果
5. Oya N et.al, Exposure levels of organophosphate pesticides in Japanese diapered children: Contributions of exposure-related behaviors and mothers' considerations of food selection and preparation. Environ Int. 2020 Jan
6. Li AJ, et.al, Profiles of urinary neonicotinoids and dialkylphosphates in populations in nine countries. Environ Int. 2020 Dec
7. Novak M et.al, A life-course approach in explaining social inequity in obesity among young adult men and women. Int J Obes (Lond). 2006 Jan
8. 厚生労働省　農薬の生産・出荷量の推移（平成元～令和 4 農薬年度） https://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_info/attach/pdf/index-14.pdf

シクロヘキサンの許容濃度の提案

環境労働衛生学　小汐真輝　No. 31

1.　研究の目的・背景

この研究の目的はシクロヘキサン(CHX)の許容濃度の提案である。CHX は無色で刺激臭を持つ有機溶剤である。現在の許容濃度 150 ppm は、300 ppm が臭気閾値であり、目や粘膜に対する刺激が報告されていることを理由に設定されている。しかし、この許容濃度は 1970 年に設定されたものであり、検討の余地があると考えた。

2.　研究方法

PubMed で文献調査を行った。検索ワードとして、“cyclohexane occupational exposure”などを用いた。なお、2002 年に米国産業衛生専門家会議（ACGIH）が曝露限界値（TLV）の提案理由書を公表していることから、2002 年以降に発表された原著論文に絞って検索した。実験方法が今回の研究目的に沿っていないと判断した論文や、Abstract に CHX の記載がない論文に関しては参照しなかった。また、参照した文献の引用論文も参照した。各論文の最大無影響量 NOEL（No Observed Effect Level）、最大無毒性量 NOAEL（No Observed Adverse Effect Level）を検討し、最小となる NOAEL を求めた。

3.　結果

① ヒトに対する影響

職業的曝露による重大な健康影響は 2002 年時点では観察されていない[1)]。ボランティア 12 人に対し CHX を 24.94 ppm、または 249.4ppm 4 時間曝露した実験において、24.94 ppm では 1 人、249.4 ppm では 7 人が頭痛を訴え[2)]、曝露濃度間で有意差が見られた（$P<0.05$）（Fisher の正確確率検定）。

② 動物に対する影響

(ア) 慢性毒性

マウスに対し CHX を 0, 500, 2000, 7000 ppm、6 時間、週 5 日 14 週間曝露した。7000 ppm で有意な肝重量増加が見られたが、曝露終了後一か月後、対照群との有意差は見られなかった。2000, 7000 ppm で警告刺激に対する反応の減少、一部のマウスで、歩行異常や反応性亢進を含む行動毒性が見られた。ここでは、可逆的な行動の変化に対する NOEL は 500 ppm と評価されている[1)]。

(イ) 生殖毒性・発生毒性

ラットに対し CHX を 0, 500, 2000, 7000 ppm 妊娠 6 日目から 15 日目にかけて曝露した。7000 ppm の濃度で曝露したラットで、母体の体重の増加量の減少が見られた。また、二世代間での発生毒性を調べるために、親・子に該当するラットに CHX を 10 週間にわたり 0, 500, 2000, 7000 ppm 曝露した。7000 ppm 曝露したラットでは、親子、そして孫で体重の減少が見られた[3)]。よって、ここでは発生・生殖毒性に対する NOEL を 500 ppm とした。

(ウ) 神経毒性

マウスに対し CHX を 0, 30000 ppm、30 分間 1 日に 2 回 30 日間曝露した。30000 ppm では海馬において神経細胞の活動レベルの指標である c-fos発現の減少が見られることから、興奮毒性

に対する神経細胞の脆弱性の増加を示唆していると考えられた。また、脳組織の損傷があった場合に活性化する Neuropeptide Y の発現が増加した。興奮毒性に関与する受容体である NMDAR1 も有意に発現が増加しているため、今回の結果から、CHX 曝露は海馬興奮毒性を与える可能性があると考えられた。この実験では、長期にわたって海馬の恒常性の変化を引き起こし、この変化と同時に有意な運動障害や、報酬追及行動の促進が見られた[4]。

(エ) 反復投与毒性

マウスに対し CHX を 0, 9000 ppm、1 日に 30 分 30 日間曝露した。学習能力、空間記憶能力を除く機能の欠陥がみられた。また、脳の進行性障害を示唆する症状（APE1 過剰発現、反応性グリオーシス、海馬 CA1、CA3 領域におけるミクログリアの反応性の増加）が見られた[5]。

4. 考察

ヒトについて、先に述べたボランティアに対する 4 時間の実験的気中曝露の曝露濃度 249.4 ppm を許容濃度設定の前提である 8 時間時間加重平均濃度に換算すると約 125 ppm となる。

一方、動物実験では、短時間曝露について、マウスに CHX を 9000 ppm、 1 日に 30 分 30 日間曝露した際、学習能力、空間記憶能力を除く機能の欠陥が見られた。また、脳の進行性の障害を示唆する症状として、APE1 過剰発現、反応性グリオーシス、海馬 CA1、CA3 領域におけるミクログリアの反応性の増加が見られた。この曝露濃度を 8 時間時間加重平均濃度に換算すると 562.5 ppm であり、種差の不確実係数 10 を適用すると、56.25 ppm となる。長時間曝露について、マウスに 6 時間、週 5 日 14 週間曝露した実験では 2000 ppm 以上で警告刺激に対する反応の減少、一部のマウスで、歩行異常や反応性亢進を含む行動毒性が見られた。ここでは、可逆的な行動の変化に対する NOEL は 500 ppm と評価されているが、行動毒性に対する評価であるため、これを NOAEL とする。この曝露濃度を 8 時間時間加重平均濃度に換算すると 375 ppm であり、種差の不確実係数 10 を適用すると、37.5 ppm となる。毒性影響について、ヒトでは 12.5 ppm から 125 ppm の間で頭痛が増加している。また、ACGIH は TLV-TWA を 100 ppm に、ドイツ研究振興会は MAK(Maximum workplace concentration) を 200 ppm に設定している。

以上より CHX の許容濃度として、50 ppm を提案する。しかし、データが不十分であり、今後さらなる研究が必要である。

5. 参考文献

1) ACGIH.: Cyclohexane: TLVs and BEIs with 7th Edition Documentation. (2002)

2) Lammers JH et al.: Neurobehavioral effects of cyclohexane in rat and human. Int J Toxicol. 28:488-497(2009)

3) Kreckmann KH et al.: Inhalation developmental toxicity and reproduction studies with cyclohexane. Drug Chem Toxicol. 23:555-573(2000)

4) Campos-Ordonez T et al.: Cyclohexane inhalation produces long-lasting alterations in the hippocampal integrity and reward-seeking behavior in the adult mouse: Cell Mol Neurobiol. 39:435-449(2019)

5) Campos-Ordonez T et al.: Cyclohexane produces behavioral deficits associated with astrogliosis and microglial reactivity in the adult hippocampus mouse brain: Cell Mol Neurobiol. 35:503-512(2015)

アセトアルデヒド、ホルムアルデヒド、アニリン、ピリジンの MS2 ライブラリ作成とヒトでの曝露評価

環境労働衛生学　中島彩夢(No.60)

背景・目的

本研究では、ヒトの健康に対する詳細なリスク評価が必要な化学物質のうち、使用頻度と環境中の存在量の観点から、労働現場で使用される 4 つの化学物質(アセトアルデヒド、ホルムアルデヒド、アニリン、ピリジン)を選定した。包括的な曝露評価を可能にするために、マウス尿を用いて 4 つの環境化学物質の MS2 ライブラリを作成し、作成した MS2 ライブラリをヒトの尿と照合した。

方法

上記の物質を各 11-12 週齢の ICR 雄マウスに初日は溶媒のみ(対照)、2 日目に半数致死量の 4 分の 1、4 日目に 2 分の 1 を強制経口投与し、24 時間尿を回収した[1]。尿サンプルを高分解能液体クロマトグラフ-質量分析計を使用して測定した。網羅的に測定するために、水に溶けやすい物質の分離に適している Hydrophilic interaction chromatography (HILIC)と水に溶けにくい物質の分離に適している逆相クロマトグラフィー(RP)、正イオン化モード(POS)と負イオン化モード(NEG)の 4 種類の方法で測定した。濃度のピーク面積比である半数致死量の 2 分の 1 /対照が 10 以上を基準として物質の MS2 スペクトルを、MS-DIAL[2] により代謝物候補とノイズに振り分けた。代謝物候補の MS2 スペクトルから MS2 ライブラリを作成し、MS-FINDER[3] で構造推定を行い代謝経路を推測した。

マウス尿と同じ方法で測定した 73 人の女子大学生の尿サンプルのデータとマウス MS2 ライブラリを MS-DIAL を用いて照合し、同定された代謝物候補について曝露評価を行った。

結果

表1　MS2 ライブラリに含まれる代謝物候補の MS2 スペクトル数(少なくとも分子式が推定できる MS2 スペクトル数)

	HILIC POS	HILIC NEG	RP POS	RP NEG
acetaldehyde	0	0	0	0
formaldehyde	9(4)	10(1)	0	8(7)
aniline	23(4)	25(8)	7(2)	14(8)
pyridine	10(2)	0	7(1)	2(0)

MS2 スペクトル数はアセトアルデヒド 0、ホルムアルデヒド 27、アニリン 69、ピリジン 19 の、合計 115 スペクトルの MS2 ライブラリを作成することができた(表1)。

マウスライブラリとの照合によりヒト尿中で見つかった化合物について、ホルムアルデヒドはヒト尿中から 1 つ、dihydroxyacetophenone-sulfate(RP NEG)が見つかったが、ホルムアルデヒドからの代謝経路を推測することができなかった(図 1B)。アニリンはヒト尿中から 2 つ、acetaminophen-sulfate と acetaminophen-glucuronide(RP NEG, POS・HILIC NEG,POS)が見つかり、両代謝物候補のアニリンからの代謝経路の報告があった[4](図 1E)。ピリジンはヒト尿中に代謝物候補は見つからなかった。

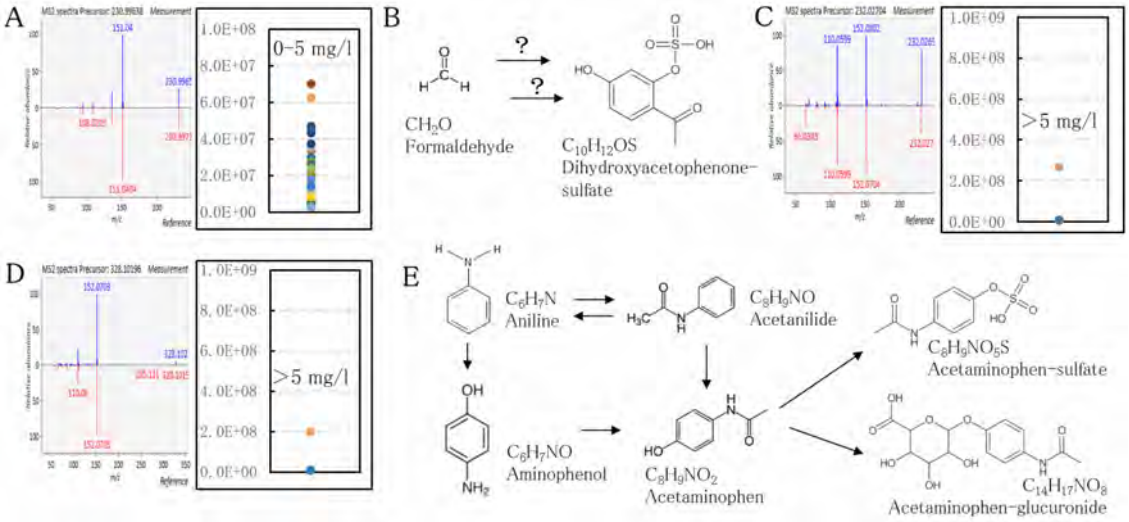


図1　ヒト尿で見つかった代謝物のMS2スペクトルの照合とサンプルごとの濃度分布と代謝経路。A dihydroxyacetophenone-sulfate, B はホルムアルデヒドからの dihydroxyacetophenone-sulfate の代謝経路不明、C acetaminophen-sulfate, D acetaminophen-glucuronide、Eはアニリンから acetaminophen-sulfate と acetaminophen-glucuronide の代謝経路の報告あり[4]。

考察

アセトアルデヒドで代謝物が得られなかったのは、アセトアルデヒドは代謝により最終的に水と二酸化炭素になり、アセトアルデヒドの代謝物を特異的に検出できないと推測した。ホルムアルデヒドについて、ヒト尿中で見られた dihydroxyacetophenone-sulfate に複数のヒト尿サンプルで代謝物濃度のピークがあること(図 1A)、ホルムアルデヒドからの代謝経路が不明であること(図 1B)、他のホルムアルデヒド代謝物は検出されていないことから、dihydroxyacetophenone-sulfate がホルムアルデヒドの代謝物であるか不明であった。さらに調査したところ dihydroxyacetophenone-sulfate は漢方薬に含まれているペオノール(植物化合物)の代謝物として報告があり[5]、ペオノールの曝露の可能性がある。アニリンは、同一のヒト尿サンプルからアセトアミノフェンの代謝物でもある acetaminophen-sulfate, acetaminophen-glucuronide のみ見られ(図1C,D,E)、アセトアミノフェンは薬として広く利用されていることから、アニリンの曝露ではなくアセトアミノフェンの曝露と推測した。また、両代謝物候補の尿中推定濃度が 5mg/l 以上であることからもアセトアミノフェンの摂取由来であると推測された[4]。今回ピリジン代謝物が検出されなかったのは、主に合成原料として用いられ女子大学生集団での曝露が少ないためであると考えられる。

ヒトメタボロームデータの推定に有用なライブラリが構築でき、一度に曝露スクリーニングを行うことが可能であった。異なる化学物質から共通の代謝物が尿中に排泄される場合、曝露した化学物質を同定することが困難である点が本方法の限界点である。

参考文献

[1] Nomasa K et al.(2021)J Occup Health, Vol 63, pages e12218
[2] Tsugawa H et al.(2015) Nat Methods, Vol 12, pages 523-526
[3] Tsugawa H et al.(2016) Anal Chem, Vol 88, pages 7946-7958
[4] Modick H et al. (2014) Reproduction, Vol 147, pages R105-R117
[5] Yasuda T et al. (1999) J Nat Prod, Vol 62, pages 1142-1144

1-ブタノール、1-オクタノール、カテコール、フェノールの MS2 ライブラリの構築とヒトの曝露評価

環境労働衛生学　宮永大二郎（No.82）

（1）目的・背景

1-ブタノール、 1-オクタノール、カテコール、フェノールは、塗料材や香料として用いられており、一般環境下での普遍的な曝露が想定される。これらの物質は曝露量によってヒトの健康に悪影響を及ぼす可能性があり、健康リスク評価が必要である。しかし、現状ではこれらの環境化学物質の代謝物のライブラリがなく、曝露評価が難しい[1)]。そこで、上記の 4 物質の MS2 ライブラリの構築、ライブラリとヒト尿のメタボロームデータとの照合による曝露評価を本研究の目的とした。

（2）方法

11-12 週齢の ICR 雄マウスに1 日目は溶媒のみ(対照)、2 日目、4 日目は上記の化学物質の半数致死量の 4 分の 1(低用量)， 2 分の 1(高用量)をそれぞれ投与し、回収した 24 時間尿を液体クロマトグラフィー質量分析法にて測定した。網羅的に調べるために Hydrophilic interaction chromatography（HILIC，親水性化合物の保持が可能）と逆相クロマトグラフィー（RP，疎水性化合物の保持が可能）をそれぞれ正イオン(POS)と負イオン(NEG)モードで検出した。その後、高用量/対照が 10 以上を基準として MS-DIAL[2)]を用い代謝物候補 MS2 スペクトルを選択し、MS-FINDER[3)]にて代謝物候補の分子式、構造の推定を行った。それらを推定代謝物の MS2 スペクトルライブラリに収載し、MS-DIAL を用いて 73 人の女子大生の尿サンプルと照合した。

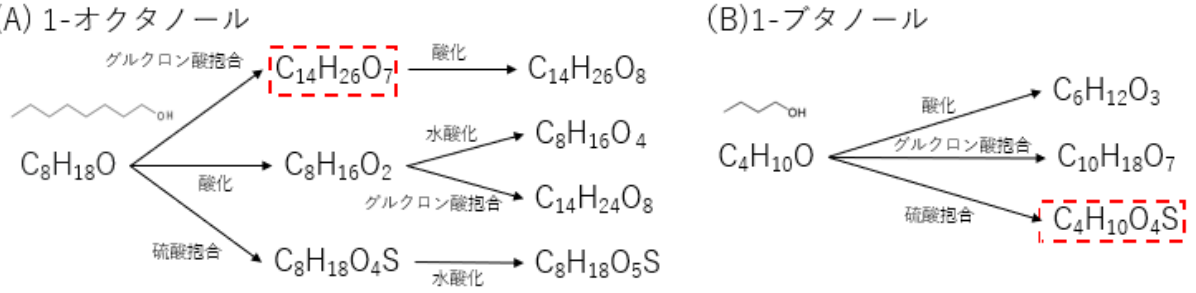
（3）結果・考察

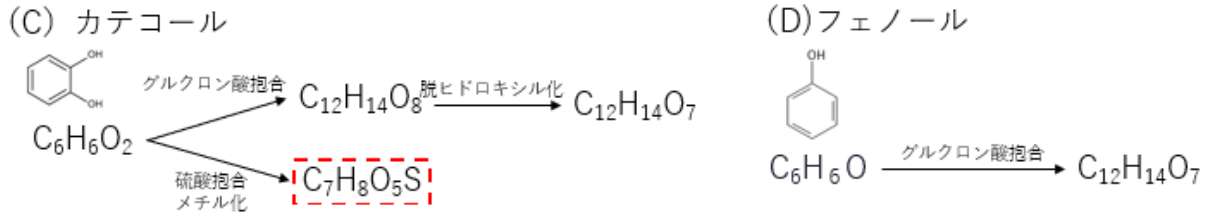
（ⅰ）LC-MS を用いてマウスから得られた代謝物候補の MS2 スペクトルの数(内、分子式を推定できたもの)

	HILIC NEG	HILIC POS	RP NEG	RP POS
1-butanol	8(1)	3(1)	4(2)	1(1)
1-octanol	14(5)	8(3)	19(6)	12(2)
catechol	14(2)	6(0)	8(3)	2(0)
phenol	2(1)	2(0)	2(1)	4(2)

得られた MS2 スペクトルの総和は 109 個であり、そのうち 30 スペクトルは構造が推定された。さらにその中の 15 代謝物候補は代謝経路に組み込まれた。

（ⅱ）得られた化学式より考えられる代謝経路

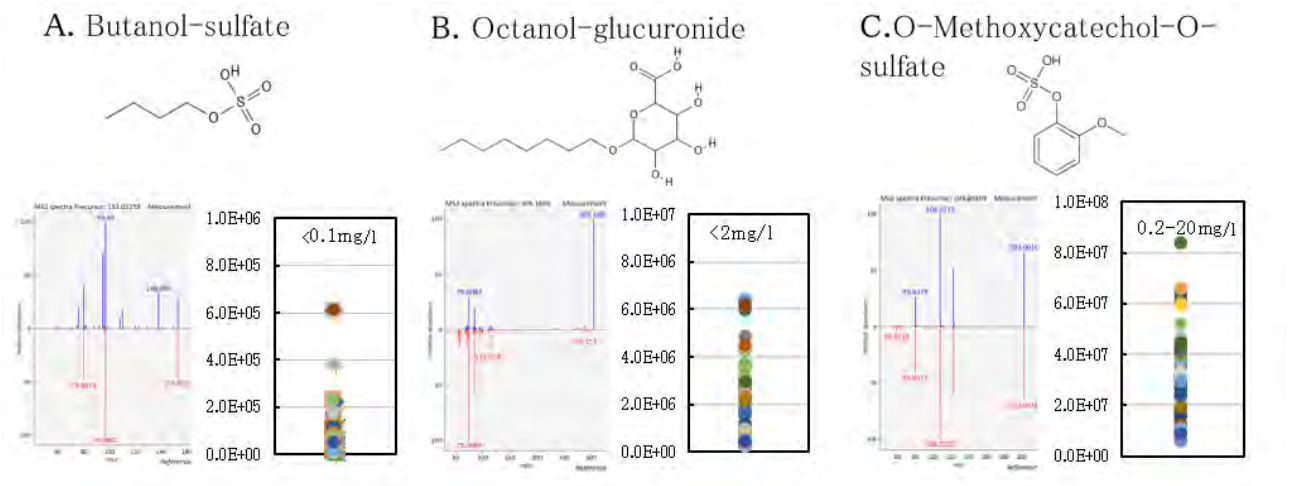




*点線で囲まれているものはヒトの尿と照合できたもの

ヒト尿代謝物と一致したのは、(A)が Butanol-sulfate、(B)が Octanol-glucuronide 、(C)が O-Methoxycatechol-O-sulfate、(D)は存在しなかった。

(iii)推定代謝物の尿中濃度



*左が MS2 スペクトル、右が代謝物の尿中濃度である。

(i)、(ii)より4物質の投与マウス尿測定の結果、30 スペクトルからなる第 I 相反応代謝物 7 つと 8 つの抱合体が推定された。また、(iii)A より、1-ブタノールが<0.1mg/l であるのは、マイナーな代謝経路[4]の産物のみ検出され、主代謝物であるブチル酸は検出されなかったことが一因と考えられた。さらに(iii)B より、1-オクタノール代謝物がヒト尿中に多く含まれるのは、1-オクタノールが化粧品[5]に含まれており女子大生の曝露が多かったためだと考えられた。(iii)C では、カテコール代謝物がヒト尿中に多く含まれ、(ii)より、カテコールはカテコール自体の曝露よりもカテキンがカテコールとなり[6]代謝されたと考えられた。フェノールの代謝物がヒトの尿中で見つからなかった理由として、尿中濃度が低く本実験の測定の感度では計測できなかった、もしくは曝露がなかったためと考えられた。

(4)参考文献

1) Nomasa K. et.al. (2021) Journal of Occupational Health, Vol 63(1), pages e12218
2) Tsugawa H. et.al. (2020) Nature Biotechnology, Vol 38, pages 1159-1163
3) Lai Z. et.al. (2017) Nature Methods, Vol 15, pages 53-56
4) Bale A. et.al. (2014) Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), pages 470-472
5) Falbe J. et.al (2013) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, pages 1-26
6) Knezevic S. et.al. (2021) PharmaNutrition, Vol 17, pages 100273

機械学習を用いた 2020 年 3～11 月における国内 PM2.5 量の推定

配属先:環境労働衛生学分野　実習先:国立環境研究所　埜村颯志(64)

1. 背景と目的

日本では、海塩やバイオマス燃料、土埃、焼却炉等のばい煙、鉱物の堆積場等の粉塵を発生する施設で PM2.5 が生じている。また、それらへの曝露、吸引によって、アレルギー性肺疾患や喘息、心血管疾患、高次機能障害が誘引されることが分かっている。しかし、地上における PM2.5 観測所が一部地域で不足している。そこで、地上観測所の不足によるデータの不足を補うために、広範囲に扱える衛星データに加え、更に 2020 年 3～11 月(春～秋)の諸データを用いて PM2.5 濃度推定モデルを作成し、季節毎と 3 季節間の平均 PM2.5 濃度の推定と比較を行うことを目的とした。また、先行研究で推計された 2011～2016 年のデータと比較し、2020 年に発生した新型コロナウイルスによって、平均 PM2.5 濃度がどのような影響を受けたかを調べることも目的とした。

2. 方法

まず、最終的に全国 PM2.5 濃度を表したメッシュマップを作成するために、日本地図(小笠原諸島を含まない)を 379,643 グリッドに分割した。次に、NASA や気象庁のホームページから特徴量データをダウンロードした(表 1)。収集したデータのうち、欠損しているデータ(表 1 の下段)については逆距離加重法、エアロゾル光学的厚さ(AOD)については機械学習(ランダムフォレストモデル)を用いたデータの補間を行った。逆距離加重法は、測定地点の実測値と未測定地点までの距離の逆数による加重平均を行い未測定地点の値を予測する方法である。AOD は、エアロゾルを含む大気層がどれ程の透明性を持つかを示す指標である。AOD とエアロゾル濃度は比例関係にあり、不足した AOD データについては、雲量、気温、標高、緯度経度、相対湿度データを用いた機械学習による補間を行うことで、逆距離加重法よりも精度の高い推定値を得ることを目的とした。全てのデータが揃った段階で、PM2.5 測定局データを除く全てのデータを用いた機械学習(ランダムフォレストモデル)により PM2.5 濃度の推定を行った。なお、先行研究より、AOD のみを用いた PM2.5 推定モデルも有用とされているが、表 1 に示す特徴量を用いた方が更に精度が高くなることから、本研究においては表 1 に示すデータを収集した。また、その精度については PM2.5 測定局データを用いた 10 分割交差検証により行った。

AOD	PM2.5 測定局データ	土地利用情報	標高	植生指数	工業用地	道路網	人口
気温	気圧	降水量	相対湿度	大気境界層の高さ	西風、南風の風力、風向	雲量	

表 1　収集した特徴量データ

3. 結果と考察

図 1 は、機械学習によって得られた PM2.5 推定値を、PM2.5 測定局データを用いた 10 分割交差検証により評価したものである。赤色の点線は、推定 PM2.5 濃度値が PM2.5 測定局データと等しいことを示しており、傾きが 0.79 と 1 に近い値を取ったことから、推定値は測定値とほぼ等しくなることが示された。また、決定係数R^2が 0.83 であり、0.8～1 の範囲内においてモデルは優れているとされることから、本機械学習モデルの有用性が示された。

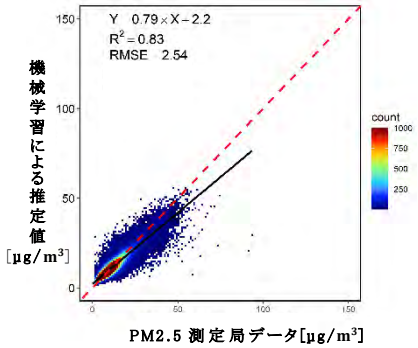


図 1　10 分割交差検証

図 2 は、3 季節間の平均 PM2.5 濃度を示している。九州地方において最も高濃度であったが、これは東アジア地域から黄砂やエアロゾルが西風によって運ばれてきた可能性を示唆している。また、東京周辺も高濃度であったが、こ

れは周辺地域よりも自動車交通量や産業活動量が多かったためと考えられる。図 3 は、3 季節毎の濃度の違いを示している。各季節における平均 PM2.5 濃度は、春が 9.86±1.40 $\mu g/m^3$、夏が 9.86±2.03 $\mu g/m^3$、秋が 7.84±1.11 $\mu g/m^3$となったことから、春と夏が同等に高濃度であり、標準偏差は夏の方が大きいことが分かった。春は特に九州地方が高いというように、春になって東アジア地域の雪や凍土が解けたことで、黄砂やエアロゾルが偏西風で日本へと運ばれてきたことが考えられる。また、夏が高濃度である原因としては、空気中に存在する PM2.5 の前駆体が、日照時間の増加に伴って光化学反応を起こしやすくなったことが考えられる。東京について、夏と秋は周辺地域よりも高いにも関わらず、春のみ平均と近くなったが、これはコロナ発生による外出規制によって、自動車交通量や産業活動量が減少したためと考えられる。

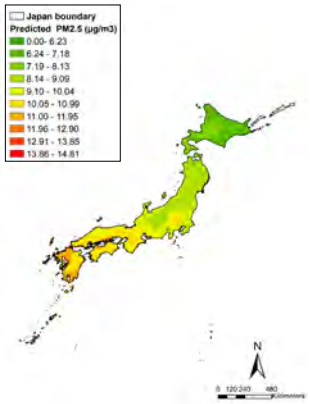


図 2　3 季節間の平均 PM2.5 濃度

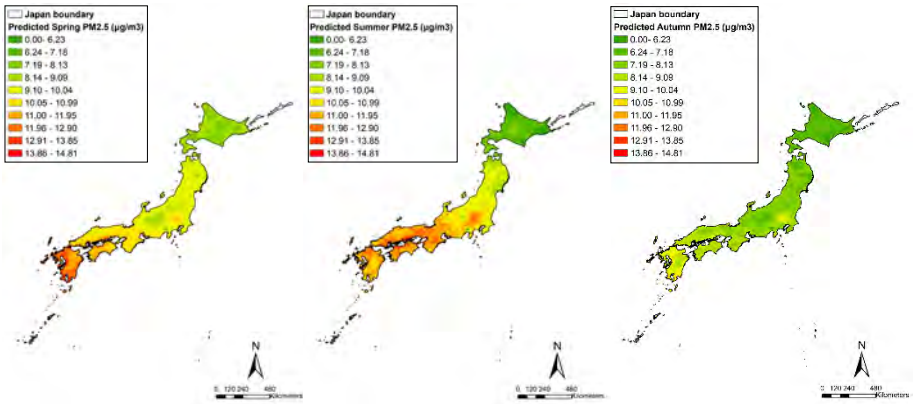


図 3　3 季節毎の平均 PM2.5 濃度（左：春、中央：夏、右：秋）

表 2 は、7 大都市圏におけるコロナ発生前(2011～2016 年)とコロナ発生時(2020 年 3～11 月)間の平均 PM2.5 濃度を比較したものである。なお、コロナ前の期間のデータ(※)に関しては、先行研究[1]より引用した。その結果、全ての都道府県において濃度が低下していることが分かった。これは、コロナによる外出規制措置が取られたために、自動車交通量や産業活動が低下したことで PM2.5 の排出源が減少したためと考えられる。

中央値[μg/m3]	北海道	宮城	東京	愛知	大阪	広島	福岡
コロナ前 (2011~2016)※	10.4	10.8	12.8	14.3	14.2	15.1	16.9
コロナ禍 (2020/3~11)	7.12	8.62	9.47	10.1	10.3	10.4	11.4

表 2　7 大都市圏におけるコロナ発生前(2011～2016)とコロナ発生時(2020/3～11)間の平均 PM2.5 濃度の変化

4. 結論

2020 年は春と夏の PM2.5 濃度が同等に高く、春は西風によって東アジア地域から PM2.5 が運ばれてきた可能性がある。また、夏は日照時間の増加によって、PM2.5 前駆体が光化学反応を起こしやすくなった可能性がある。コロナ禍では、外出規制措置が取られて PM2.5 排出源が減少したために、発生前よりも濃度が減少した可能性があるが、12 月以降の濃度推定を行い、外出規制緩和に伴う濃度の増減を比較する必要がある。

参考文献

[1]Jung, C.-R.; Chen, W.-T.; Nakayama, S.F. A National-Scale 1-km Resolution $PM_{2.5}$ Estimation Model over Japan Using MAIAC AOD and a Two-Stage Random Forest Model. *Remote Sens.* 2021, *13*, 3657.

[2] Nakata, M.; Sano, I.; Mukai, S. Air pollutants in Osaka (Japan). *Front. Environ. Sci.* 2015, *3*, 18.

[3] Wang, J.; Ogawa, S. Effects of Meteorological Conditions on PM2.5 Concentrations in Nagasaki, Japan. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2015, *12*, 9089-9101.

抗酸化サプリメントと皮膚のアンチエイジングに関する システマティックレビューおよびメタアナリシス

環境労働衛生分野　高田初音　47

1. 研究の背景および目的

酸化ストレスは皮膚老化の主な原因の一つである。近年は性別や年齢に関係なく多くの人が美容のためにサプリメントを飲む。しかし、その有効性に関するいくつかの研究（1）があるものの確立した知見はない。本研究の目的はシステマティックレビューと臨床試験のメタアナリシスを通じて、ヒトの皮膚老化に対する抗酸化サプリメントの効果に関するエビデンスをまとめることである。本研究は PRISMA（2）をもとに行った。また、システマティックレビューやメタアナリシスの有効性や手法を理解する。

2.方法

2000/1/1～2023/8/31に PubMed データベースに掲載された論文を対象に，検索式を用いて検索し、ランダム化比較試験を本研究に組み入れた。メタアナリシスは、十分な比較可能なエビデンスが得られた場合に、皮膚の老化（皮膚の水分補給、皮膚の弾力性、経表皮水分喪失など）に対する抗酸化サプリメントの効果を探るために行った。メタアナリシスには皮膚の水分補給をアウトカムにあげている論文を用いた。検索式は以下のとおりである。

検索式:((((″dietary supplements″OR ″antioxidants″ OR ″ascorbic acid″ OR ″carotenoids″ OR ″retinoids″ OR ″vitamin a″ OR″vitamin e″OR ″tocopherols″ OR ″vitamins″OR (″vitaminc″OR ″supplement″OR ″diet*″OR″oral″OR ″intake″OR ″ingestion″)) AND (″skinaging″ OR ″Epidermis″OR ″skin care″OR″Elasticity″OR ″skin pigmentation″ OR (″skin hydration″OR ″skin condition″OR ″skin moisturizing″OR ″skinroughness″ OR ″dry skin″OR ″wrinkl*″OR ″skinbarrier″OR ″skin health″OR ″Facial wrinkling″OR ″Skinelasticity″OR ″skin water loss″OR ″age spots″NOT(″Meta-Analysis″OR ″systematic review″ OR″Review″AND ″humans″) NOT (″mice″ OR″rats″)) AND (2000/1/1:2023/8/31)

表. PICO/PECO の設定

P: Patients(患者)	健康な成人（18 歳以上）、男女、人種は問わない
I: Intervention/Exposure(介入条件)	ランダム化対照試験
C: Control(対照群)	プラセボまたは同サプリメントの少ない量の服用
O: Outcome(結果)	Skin hydration, elasticity, transepidermal water loss, などの肌の状態

3.研究結果

文献検索により2665件の記録が同定され、15件（アスタキサンチン4件、カロテン4件、フェノール7件）の研究が適格条件を満たした。8件のランダム化試験（合計255人が参加）をメタ解析に含め、カロテノイド（4件）とフェノール（4件）の効果を評価した。カロテノイドとフェノールは、それぞれ0.63（任意単位）（95%信頼区間または CI:−0.31～1.56）と0.17（任意単位）（95%CI:−0.65～

0.99)の平均差で、皮膚の保湿に対する全体的な有意な効果を示さなかった。

図1. 論文抽出の流れ

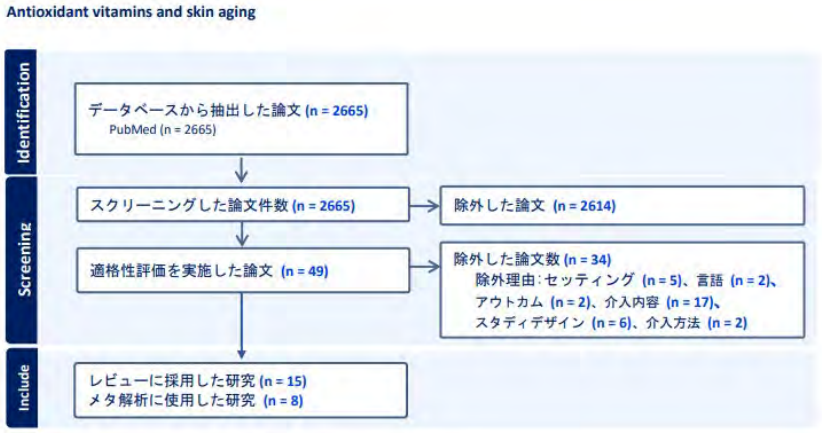


図2. カロテノイドの皮膚の水分含量に及ぼす効果のメタアナリシスの結果

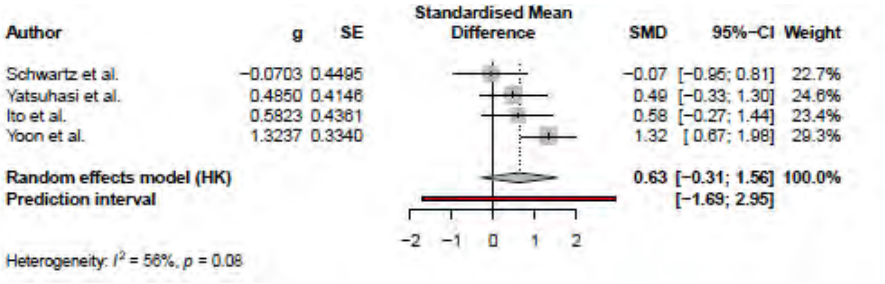
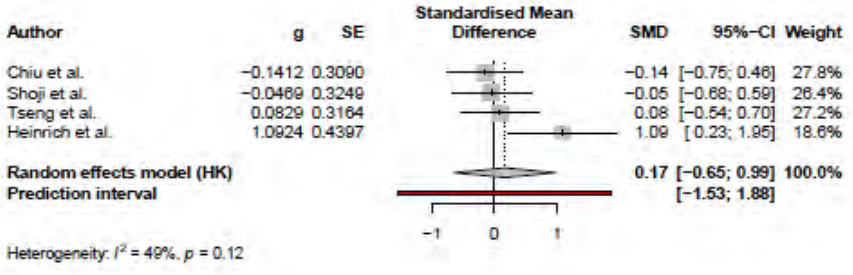


図3. フェノールの皮膚の水分含量に及ぼす効果のメタアナリシスの結果



4.考察

ポリフェノール、カロテンともに有効である証拠は見つからなかった。メタアナリシスに含められる研究が少ないため、さらなる介入研究が必要である。また、今回の研究では PubMed のみを使用したため、複数のデータベースを使用する必要がある。

5. 参考文献

(1) Sun Q. Effectiveness of dietary supplement for skin moisturizing in healthy adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Front Nutr. 2022 9:895192.

(2) Moher D. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analysis: the PRISMA statement. PLoS Med 2009; 6: e1000097.

成体マウスの加齢に伴う神経幹細胞能の低下

神経発達・再生医学分野　北島康太　25

目的・背景

近年の研究により、胎生期のみならず成体脳内においても、限られた領域において神経幹細胞が存在し、持続的に新しいニューロンを産生することが明らかとなった(**参考文献1**)。神経幹細胞から新生ニューロンが産生されることをニューロン新生と呼ぶ。新生ニューロンは産生された場所から目的地まで移動し、成熟することで脳機能の維持に関与している。このニューロン新生は、胎生期にピークとなった後、急激に減少し、その後増加することはない。神経幹細胞には、分裂を行わない休眠期と、増殖を行い幹細胞としての能力を持つ活性期がある。これまでの研究では、加齢によって神経幹細胞が減少すること(**参考文献2**)は明らかとなっていたが、休眠期および活性期神経幹細胞がどのように加齢によって減少するのかは明らかにされていなかった。そこで本研究では、休眠期および活性期の神経幹細胞の減少を週齢別に調べることで、成体脳における神経幹細胞の能力が加齢によってどのように変化するのかを調べた。

方法

神経幹細胞がいつ減少するのかを調べるために、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月のマウスを使用した。脳切片をビブラトームにより作製し、免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色では、神経幹細胞のマーカーとして、脳室下帯では、BLBP, GFAPを、海馬歯状回では BLBP, Nestin を、また、増殖マーカーとして Ki67 を使用した。神経幹細胞マーカーと増殖マーカーが両方染まった細胞を活性期、神経幹細胞マーカーだけが染まった細胞を休止期とした。2種類の幹細胞を区別し、脳室下帯と海馬歯状回でのそれぞれの神経幹細胞数をカウントした。

結果

脳室下帯では、神経幹細胞の総数、休眠期神経幹細胞数、活性期神経幹細胞数はいずれも9ヶ月から12ヶ月の間に減少した。また、神経幹細胞の能力を示す活性期神経幹細胞の割合も9ヶ月から12ヶ月の間で減少しており、幹細胞としての能力が9ヶ月から12ヶ月の間に低下していることが明らかとなった(**図1**)。

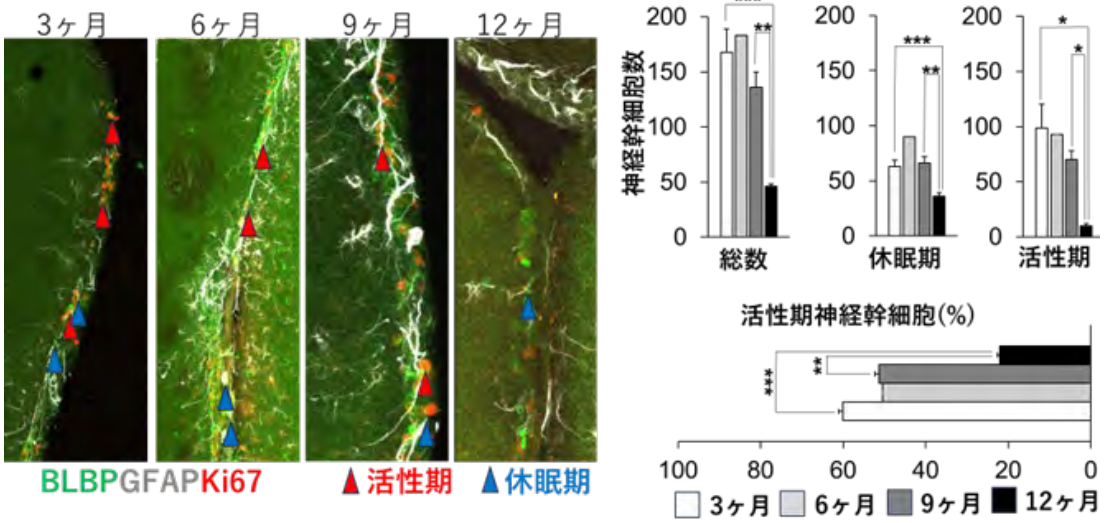


図1：脳室下帯の免疫染色像と神経幹細胞数および活性期神経幹細胞の割合

海馬歯状回では、神経幹細胞の総数と休眠期神経幹細胞数の減少は脳室下帯と同様に9ヶ月から12ヶ月の間で認められたが、活性期神経幹細胞数の減少は、脳室下帯と異なり3ヶ月から9ヶ月と9ヶ月から12ヶ月の間に認められた。また、活性期神経幹細胞の割合については、3ヶ月から12ヶ月の間で減少することが明らかとなった(**図2**)。

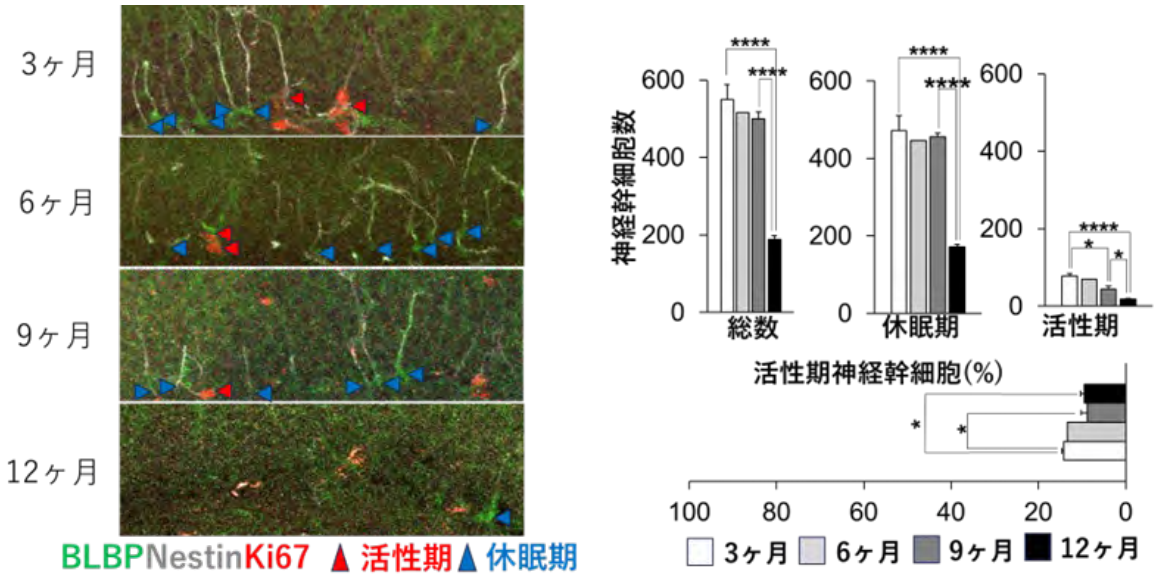


図2:海馬歯状回の免疫染色像と神経幹細胞数および活性期神経幹細胞の割合

考察

本研究により、成体脳における神経幹細胞の減少および幹細胞の能力低下は、特定の時期で生じていることが示唆された。今回の研究で明らかとなった神経幹細胞が減少する時期よりも前に、幹細胞を温存させるようなアプローチが確立されれば、神経幹細胞の減少前の状態を維持することができるかもしれない。例えば、筑波大学の研究によると、本来冬眠しないマウスを人工的に冬眠させる技術が開発されている(**参考文献3**)。人工冬眠に伴う低代謝状態により、神経幹細胞を維持することができるかもしれない。こうしたアプローチと今回得られた結果を組み合わせることで、幹細胞を温存し、将来的には老化の抑制や寿命の延長が可能になるかもしれない。

参考文献

1: 澤田 雅人, 澤本 和延, 生後脳におけるニューロン移動の調節機構, *Journal of Japanese Biochemical Society*, 91(2): 178-190, 2019.

2:Allison M. Bond, Guo-li Ming, Hongjun Song, What Is the Relationship Between Hippocampal Neurogenesis Across Different Stages of the Lifespan?, *Frontiers Neuroscience*, 16: 891713, 2022.

3:Tohru M. Takahashi, Genshiro A. Sunagawa, Shingo Soya, Manabu Abe, Katsuyasu Sakurai, Kiyomi Ishikawa, Masashi Yanagisawa, Hiroshi Hama, Emi Hasegawa, Atsushi Miyawaki, Kenji Sakimura, Masayo Takahashi, Takeshi Sakurai, A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents, *Nature*, 583(7814):109-114, 2020.

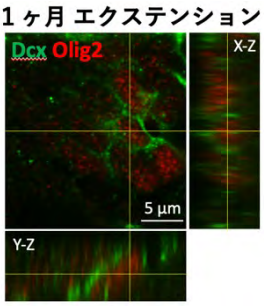
生後コモンマーモセットの脳室周囲に存在する細胞種の解析

神経発達・再生医学分野　半谷　和嗣　69

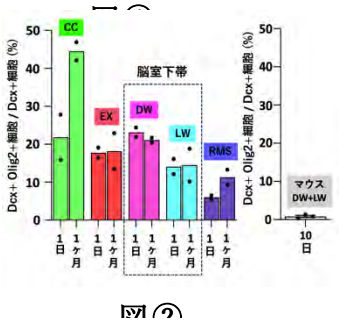
背景　神経科学分野では、マウスなどの齧歯類モデル動物を多く使い、研究されている。しかし、マウスから得られた知見を直接ヒトに臨床応用することは難しいため、霊長類モデル動物を用いて研究する必要がある。霊長類の中でもコモンマーモセットは実験に用いやすく、寿命も適度に長いため、ヒトのモデル動物として使える。

目的１　マウスとマーモセットの脳は、共通して側脳室の周りに脳室下帯があり、生後に神経が新生している。また、脳室下帯を構成する細胞も共通している。しかし、マーモセットの詳しい遺伝子発現については知られていない。そこで我々はマーモセットの脳室下帯周囲のシングルセル RNA シークエンス解析を行った。マウスと同様に、神経幹細胞、神経前駆細胞、新生ニューロン、オリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）などの細胞群は同定されたが、一部同定が難しい細胞群が存在した。この細胞群は、OPC マーカーである OLIG2 や SOX10 を発現し、新生ニューロンマーカーである DCX も発現していた。これまで見られなかった新生ニューロンと OPC の両方のタンパク質を発現する細胞がマーモセット脳に存在している可能性が示された。そこで、私は Dcx と Olig2 の二重陽性細胞が存在するか調べた。

実験方法　灌流固定した脳（マーモセット：生後１日齢２個体、1ヶ月齢２個体、６年齢１個体　マウス：生後１０日齢３個体）から冠状切片を作成した。切片は、新生ニューロンマーカーの DCX 抗体と OPC マーカーの OLIG2 抗体で免疫染色した。撮影した画像を用いて、定量解析をした。定量解析は、脳室下帯周囲を５つの領域に分けて行った。領域：生後神経新生が生じる脳室下帯の側脳室 Dorsolateral wall(DW)と Lateral wall(LW)、DW の延長線上にある、新生ニューロンが多くあるエクステンション（EX）、脳梁(CC)、嗅球に向かう新生ニューロンが多くある吻側移動流(RMS)。細胞の選定基準として、Dcx は核の周囲を取り囲んでいる形態であれば陽性と判定し、Olig2 は非特異的なシグナルを選択しないように、輝度が平均値±標準偏差２倍の範囲である細胞を陽性とした。



結果１　シングルセル RNA シークエンスの結果から予測した通り、マーモセットの脳室周囲の領域には、Dcx と Olig2 が共在した二重陽性細胞が存在した。（図①）
Dcx-Olig2 二重陽性細胞が全 Dcx 細胞に占める割合を定量解析した。脳梁では、Dcx 細胞の数は生後一日齢と１ヶ月齢で変わらなかったが、二重陽性細胞が占める割合が高くなった。脳室下帯では二重陽性細胞が産生され、一定の割合を保った。マウスでは二重陽性細胞はほぼ見られなかった。（図②）

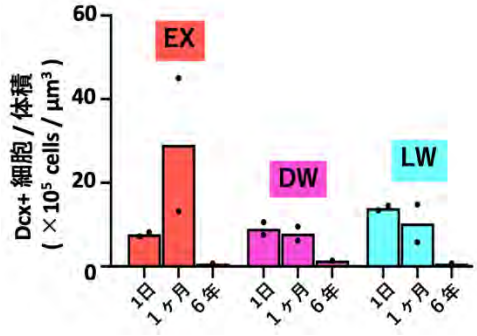


図②

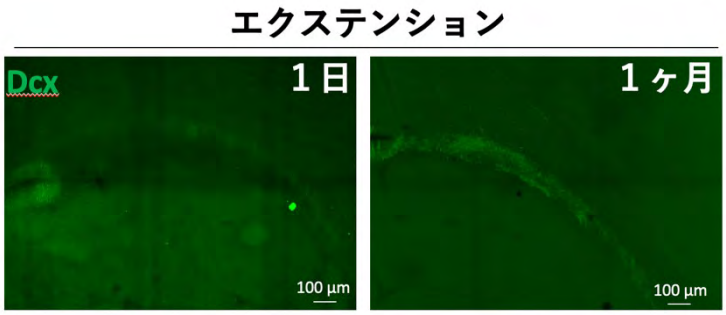
目的２　新生ニューロンは脳室下帯で産生され、エクステンションを通り脳梁と大脳新皮質に向かって移動することが分かっている。今回の結果から二重陽性細胞は脳室下帯周囲に広く分布しており、二重陽性細胞も新生ニューロンと同様であることが考えられる。生後１ヶ月の脳梁で、二重陽性の割合が増加したことから、神経新生に

おいて何か変化があるのではと考え、脳室下帯とエクステンションにおける Dcx＋細胞密度を解析した。

結果２ エクステンションにおいて、生後 1 日齢と比較して 1 ヶ月齢では Dcx+細胞密度が増加した。免疫染色図からも見て取れる。脳室下帯では密度変化があまりなかった。（図③-1、2）



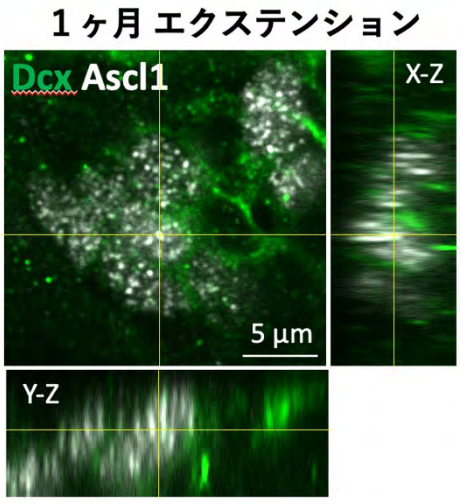
図③ 1



図③ 2

目的３ 1ヶ月齢において Dcx+細胞密度が増加するエクステンション（結果２）では、多くの細胞が Ascl1 を発現するとの報告が以前ある。Ascl1 は活性期神経幹細胞や神経前駆細胞のマーカーである。そこで、エクステンションにおいて Dcx 細胞が産生しているか、免疫染色で確認した。

結果３ 1ヶ月齢において Ascl1と Dcx は同じ細胞で発現していた。エクステンションでも神経幹細胞または神経前駆細胞が Dcx+細胞に分化していると考えられる。（図④）



図④

まとめ・考察 Dcx+細胞がエクステンションで産生され、密度が1ヶ月齢で増加することがわかった。そして、マーモセットの脳室周囲では、マウスでほぼ見られなかった Dcx-Olig2 の共発現細胞が存在していた。1ヶ月齢の脳梁では、その数が増加した。以上から、生後1ヶ月はマーモセットの脳梁および大脳新皮質形成に重要な期間であることが予想できる。

展望 これまで齧歯類モデル動物から得た知見は、ヒトへの臨床応用において、欠かせないものであった。今後は、霊長類における知見をさらに得ることで、よりヒトへの translational medicine が発展するものと考えられる。今回、マーモセットで見出した Dcx+Olig2+共発現細胞は、状況に応じて、ニューロンやオリゴデンドロサイトのどちらかに分化する性質を持つと考えられることから、広く再生医療へ応用できる可能性がある。

参考文献

Akter *et al.*, Dynamic Changes in the Neurogenic Potential in the Ventricular–

Subventricular Zone of Common Marmoset during Postnatal Brain Development, Cereb Cortex, 2020, 30 (7), 4092-4109

放射状グリアから分化能を持つ成体神経幹細胞への変換メカニズムの解析

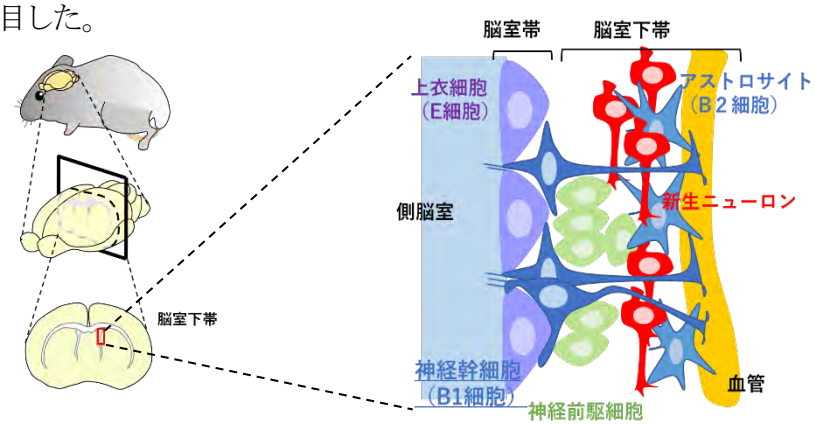
神経発達・再生医学分野　56　田原愛香

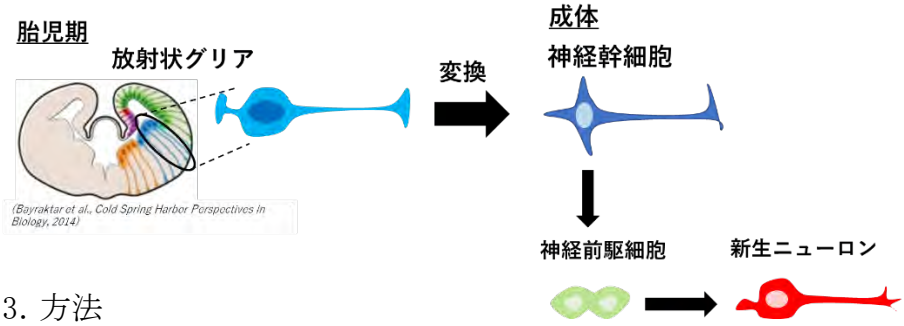
1. 目的

分化能を有する成体 NSCs の形成には、放射状グリア由来分子 1（RGDM1）が重要であるという仮説を検証すること。

2. 背景

脳室-脳室下帯（V-SVZ）は、成体マウスの脳における神経幹細胞（NSC）のニッチである。NSCs には、自己複製能と、ニューロンやオリゴデンドロサイトに分化する可能性という 2 つの性質がある。分化の過程で、NSCs は神経前駆細胞に分化し、新しいニューロンを生成して嗅球に移動する。しかし、成体 NSCs の分化能を制御する分子機構はまだ不明である。本研究では、成体 NSCs の形成過程に注目した。成体 NSCs は、胎児の放射状グリア細胞に由来する。放射状グリアから成体神経幹細胞へ変換するのに重要な因子は何か、という疑問がわいた。澤本先生の研究室ではいくつか候補があったが、その中でも今回は radial glia-derived molecule 1(RGDM1)に着目した。





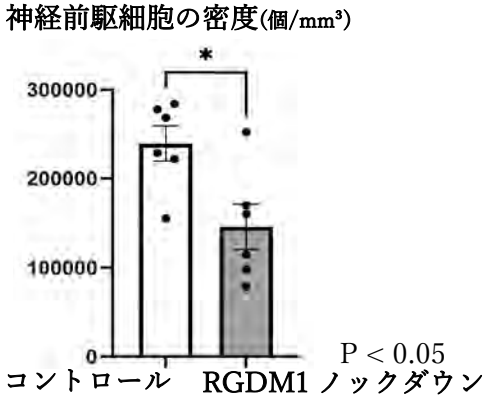
3. 方法

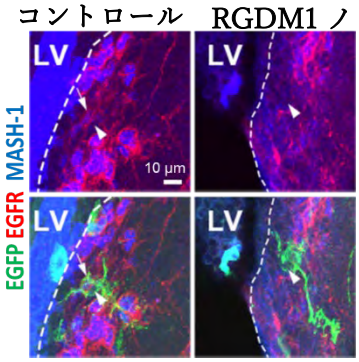
LacZ（コントロール）または RGDM1 を標的とする miRNA を発現するレンチウイルスを胎生 16 日目のマウスの側脳室に注入した。生後 28 日目にマウスを固定し、免疫組織化学的解析を行った。

4. 結果

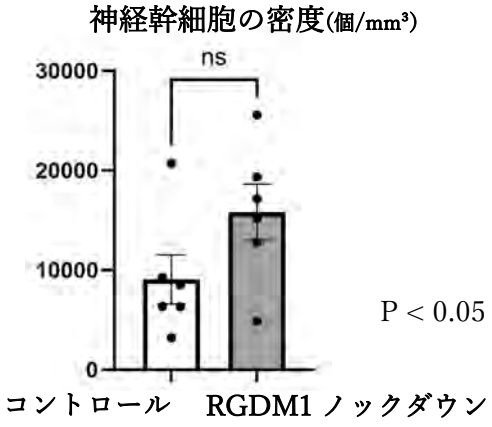
P28 において、RGDM1 ノックダウン群の V-SVZ における神経前駆細胞の密度は、対照群のそれよりも有意に減少していた。また、RGDM1 ノックダウン群の V-SVZ では、神経前駆細胞へ分化する NSCs の割合が、P28 において対照群よりも有意に減少していた。レンチウイルスに感染した

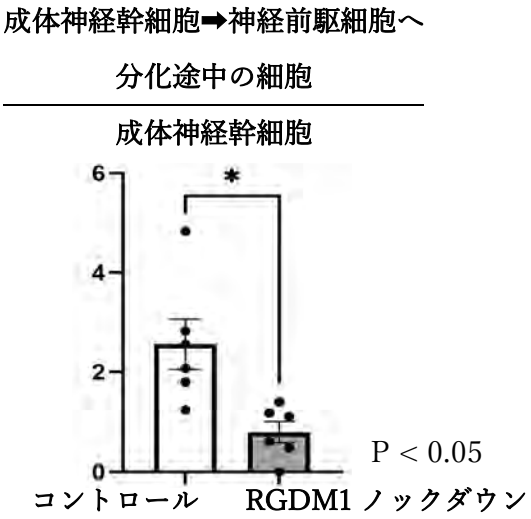
神経幹細胞の密度には有意差はなかった。





矢印：神経幹細胞から神経前駆細胞に分化途中の細胞
矢頭：神経幹細胞





5. 考察

これらの結果から、RGDM1 は分化能をもつ成体神経幹細胞の変換にとって重要であることが示唆された。今後の展望としては、まず、Ki67 陽性(分裂中)の EGFP 陽性神経幹細胞の密度を比較するべきだと思った。なぜなら、分化と自己複製のバランスが崩れている可能性があると考えられるからだ。もっと若い時にさかんに分化して、幹細胞が枯渇したのか、またさらに加齢によって幹細胞が枯渇するのかなど、P28 前後のマウスの分化能の検証ができると良いなと感じた。

加えて、成体神経幹細胞が分化能を示すメカニズムを深く知りたいと思った。最近の研究で、ヒトでも生後に神経幹細胞、新生ニューロンが発見された。(Paredes et al., Science, 2016) したがって、人間にとっても、成体神経幹細胞がどのように作られるのか、その分化能をどのように維持するのかなどを調べることは重要で、詳しいメカニズム解明できれば、正常発達の仕組みがわかっておもしろそうだと感じた。

6. 参考文献

- 脳室下帯、脳科学辞典
https://bsd.neuroinf.jp/wiki/%E8%84%B3%E5%AE%A4%E4%B8%8B%E5%B8%AF
- 神経幹細胞、脳科学辞典
https://bsd.neuroinf.jp/wiki/%E7%A5%9E%E7%B5%8C%E5%B9%B9%E7%B4%B0%E8%83%9E
- Paredes MF, James D, Gil-Perotin S, Kim H, Cotter JA, Ng C, et al. Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. Science. (2016) 354(6308):aaf7073.
- Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A, Rowitch DH. Astrocyte development and heterogeneity. Cold Spring Harb Perspect Biol. (2014) 7(1):a020362.

移動する新生ニューロンとその足場細胞間における分子相互作用

神経発達・再生医学分野 川村直矢（No.22）

1. 背景と目的

脳室下帯（V-SVZ）由来の新生ニューロンは、他の細胞を足場として移動するが、その細胞接着の制御機構は完全には解明されていない。私たちの研究室では、シングルセル RNA シーケンス（scRNA-seq）のデータセットを用いて包括的な細胞間相互作用（インタラクトーム）解析を行い、細胞接着分子-1（CAM1）に注目した。CAM1 は様々なアイソフォームを持ち、PDZ 結合ドメイン（PBD）を持つ。さらに、scRNA-seq は、PDZ ドメインの裏打ちタンパク質であり、N-カドヘリンを介した接着を制御することが報告されている Adherence Junction Factor-3（AJF3）の新生ニューロンにおける高発現を示した。新生ニューロンと足場細胞間の分子相互作用を理解することで脳傷害部位へのニューロン移動を促進する新規治療法開発につなげる。

2. 実験方法と結果

成体 *Cam1*-floxed マウスを用いて脳室下帯由来の新生ニューロンの移動を観察した結果、距離を計測した。Cam1-KO 細胞は嗅球に到達できた細胞割合が減少し、逆に移動流の後方で溜まっている割合が増加したことから、CAM1 が移動を促進していることが明らかになった。

CAM1 のアイソフォームをリアルタイム PCR で解析した結果、脳室下帯において最も主要な CAM1 アイソフォームは CAM1γ long form であることが明ら

かになった。CAM1ゃ long form と高い親和性を示す CAM2 を miRNA でノックダウンすると、新生ニューロンの鎖状移動が損なわれた一方で、個別移動への影響は認められなかった。

さらに、免疫共沈降実験より、CAM1 は PDZ 結合ドメインを介して AJF3 と結合することが示された。N カドヘリンを介した細胞間接着は AJF3 によって調節されるため、CAM1-AJF3 によって細胞移動が制御されている可能性が考えられた（図を参照)。そこで、NCad-Fc をコートした培養ディッシュに CAM2 コートを追加するとニューロン移動が促進された。

3. 考察

CAM1 と CAM2 がニューロン移動に関与していること、また N-カドヘリン接着を制御している AJF3 と CAM1 が PDZ ドメインを介して結合していることが分かったことから、CAM1 と CAM2 の結合が、AJF3 を介して N-カドヘリン接着を調節している可能性が示唆された。

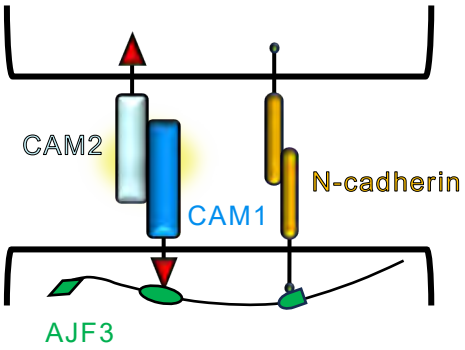


図:CAM1,CAM2 新生ニューロン移動調節機構の仮説

また、CAM2 と既に開発されている NCad スポンジや NCad-mRADA を用いた新生ニューロン移動を促す人工足場を組み合わせることで新たな人工足場の開発につながると考えている。

ニューロン移動およびグリオーマ浸潤を制御する

共通分子 ECMP-α の機能解析

神経発達・再生医学分野 211076 桝田直晃

背景および目的

神経発達・再生医学分野では新生ニューロンの移動について研究を進めてきた。成体脳で産生された新生ニューロンは未熟な形態で鎖状の細胞塊を形成して、お互いを足場として利用しながら目的地へ移動する（澤田、澤本、2019）。一方、グリオーマは、脳の中に浸潤する難治性の脳腫瘍で外科的な切除や、薬物療法による治療が行われているが完治には至らず、浸潤を標的とした根本的な治療法の開発が望まれている。当研究室の研究で、グリオーマは新生ニューロンと同様に未熟な形態で鎖状の細胞塊を形成し、脳内を浸潤することが分かった。また、ニューロンで発現する細胞膜分子 ECMP-α が足場細胞に沿ったニューロンの鎖状移動を促進することを見いだした。さらに、鎖状で移動するグリオーマにも ECMP-α が発現していることを明らかにした。しかしグリオーマの移動において ECMP-α がどのような役割を果たすかは不明である。そこで本研究では、グリオーマ浸潤における ECMP-α の役割を明らかにすることを目的とした。

方法

マウスグリオーマモデルでは、Cre で組み換わった細胞に tdTomato を発現するマウスで、生後 1 日齢で電気穿孔法により脳室下帯の細胞に Trp53, Pten, Nf1 のガイド RNA、Cas9 および Cre をコードするプラスミドを導入し、CRISPR-Cas9システムを用いてこれらの遺伝子をノックアウトしてグリオーマを形成させた（Zuckermann et al., 2015）。このプラスミドに、ECMP-α のガイド RNA を加えてノックアウトすることで、ECMP-α の機能を調べた。ヒトグリオーマ細胞株の実験では、グリオーマの単一細胞溶液を非接着性フラスコに播種し、球状に増殖させ、1 週間後にマトリゲルに包埋しライブイメージングによって鎖状移動を観察した。

結果

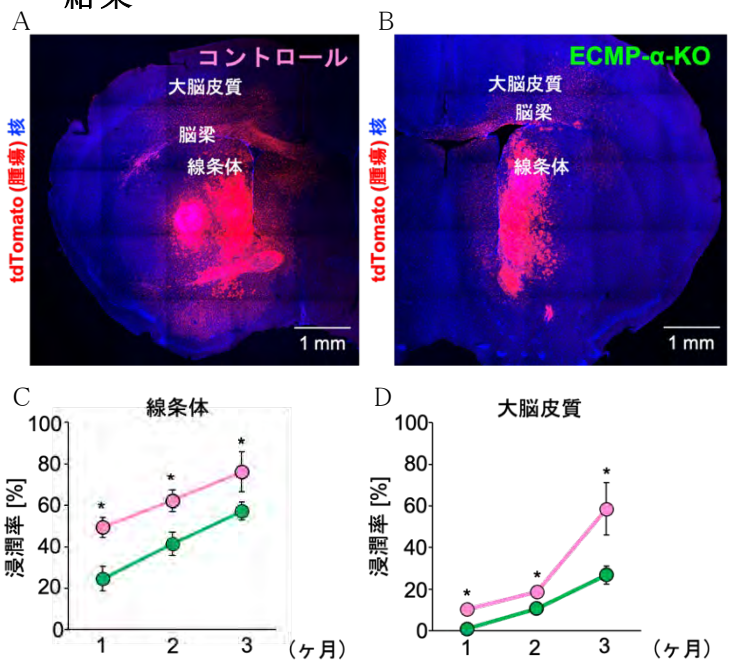


図 1A.図 1B

2 ヶ月後のコントロールと ECMP-α ノックアウトマウスにおける tdTomato 陽性細胞の分布図

図 1C.図 1D

大脳皮質と線条体におけるコントロールと ECMP-α-ノックアウトマウスにおける 4 ヶ月,8 ヶ月,12 ヶ月の腫瘍浸潤率推移

*p<0.05

マウスグリオーマの実験でグリオーマの浸潤における ECMP-α の役割を調べるために、腫瘍形成後 1,2,3 ヶ月の tdTomato 陽性細胞の分布を解析した。コントロールでは、脳室下帯に近い線条体に腫瘍の塊が形成されるとともに、脳梁や大脳皮質にグリオーマが観察されたことから、腫瘍がこれらの領域に浸潤していくことが示唆された(図 1A)。一方で、ECMP-a-KO モデルでは、鎖を形成するグリオーマはほとんど観察されなかった(図 1B)。大脳皮質および線条体でどれだけ腫瘍が広がったかを浸潤率として解析した結果、ECMP-a-KO ではコントロールよりも腫瘍浸潤が抑制され、特に、3 ヶ月における大脳皮質への浸潤は強く抑制された(図 1C, D)。以上の結果から ECMP-α がグリオーマの浸潤に関与することが示唆された。

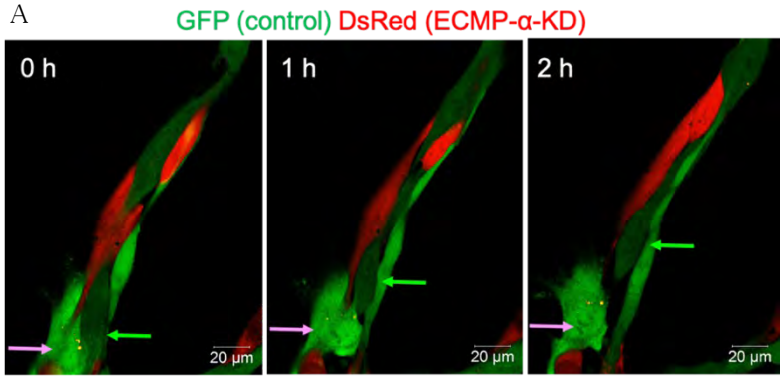
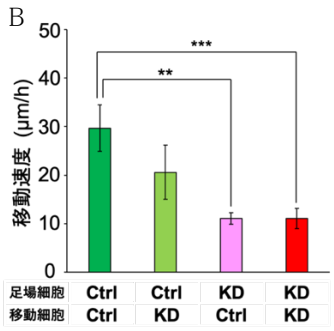


図 2A

コントロールと ECMP-α-ノックダウン細胞による鎖状移動のタイムラプス

図 2B

移動速度**p<0.01 ***p<0.005



次に、U251 のコントロール細胞を緑色に、ECMP-α ノックダウン細胞を赤色に蛍光標識し、マトリゲルに包埋して移動における ECMP-α の役割を調べたところ、ニューロンと同様に、グリオーマでも鎖状で移動することが明らかになった(図 2A)。また、コントロール細胞に沿って移動する細胞(図 2A、緑矢印)はスムーズに移動しているのに対し、ECMP-α ノックダウン細胞に沿う細胞(図 2A、ピンク矢印)はうまく移動できず、離脱する様子も観察できた。細胞の移動速度を定量した結果、足場細胞の ECMP-α をノックダウンすると移動細胞の速度に有意に低下したことから、足場細胞の ECMP-α がグリオーマの鎖状移動を促進していることが示唆された。(図 2B)

考察

ECMP-αはグリオーマの鎖状移動を促進することで浸潤に関与することが明らかになった。ECMP-α がグリオーマの増殖にも関与する可能性は残るが、今回立ち上げたイメージングの系で増殖についても評価できる。今後、マウス脳で ECMP-α阻害によるヒトグリオーマ浸潤の抑制効果を検証することで、成体脳におけるニューロン移動とグリオーマ浸潤の共通性の理解が深まるだけでなく、ECMP-αを標的とした全く新しいグリオーマ浸潤の治療法の開発につながる可能性がある。

参考文献

Zuckermann *et al.*, Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling,Nature communication,2015, 6, Article number:7391

澤田、澤本，生後脳におけるニューロン移動の調節機構，生化学,2019, 91(2), 178-190

神経伝達症遺伝学　全 GABA 作動性神経細胞または腹側の興奮性神経細胞における Stxbp1 の半減は攻撃性の亢進を示さない

神経発達症遺伝学　姜棋勲

背景

STXBP1 遺伝子は神経伝達に重要なタンパク Munc18-1 をコードする遺伝子であり、自閉症、知的障害、統合失調症といった神経発達症や、てんかん性脳症の患者で高頻度に変異を示すことが知られている[①]。また、Stxbp1 遺伝子の変異を有する神経発達症患者のうち一定数が攻撃性を示すことが報告されている[②]。山川ラボの以前の報告で、全身で Stxbp1 遺伝子を欠損させたヘテロフロックスマウス(f/+)の攻撃性が上昇したという報告があった[③]。さらに、攻撃性上昇のメカニズムを明らかにするために、脳の特定の神経細胞のみで Stxbp1 遺伝子を欠損させた幼児期のマウスを作成し、同様の実験を行ったところ、背側終脳(大脳皮質、海馬、嗅球、扁桃体の一部)の興奮性神経細胞である Emx1、脳全体の GABA 作動性神経細胞である Vgat で Stxbp1 を半減させたマウスの攻撃性は共に上昇しないことも報告されている[③]。以上から、腹側の興奮性神経細胞である Vglut2 で Stxbp1 遺伝子を半減させた場合の攻撃性がどうなるのかについて検討した。また、海外のあるチームの研究で、成体期の Vgat-Cre-Stxbp1 欠損マウスの攻撃性の亢進に関する報告があった[④]ことから、成体期の Vgat-Cre-Stxbp1 欠損マウスの攻撃性についても検討した。

目的

脳の特定の細胞のみで Stxbp1 を半減させることで、攻撃性亢進のメカニズムを解明する。

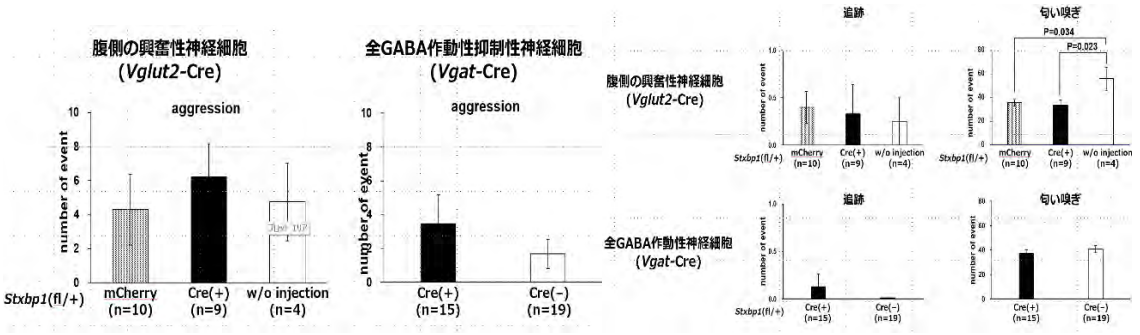
方法

Cre マウスについて、Stxbp1 遺伝子のエクソンを loxP 配列で挟み、Cre-ドライバーマウスと掛け合わせることで、標的となる遺伝子を半減させる Stxbp1-Cre ドライバーマウスを作成した。また、攻撃性亢進の検討について、Resident-intruder test という、約一週間床替えを行わずに縄張り意識を形成したレジデントマウスのケージにイントルーダーマウスを入れ、攻撃性行動、追跡行動、匂い嗅ぎ行動を検討した。

結果

攻撃性行動について、Vglut2-Cre で Stxbp1 を半減させたマウスでも、Vgat-Cre で Stxbp1 を半減させたマウスでも攻撃性亢進は見られなかった。また、追跡行動につい

ても両者ともに変化は見られず、匂い嗅ぎ行動については Vgat-Cre-Stxbp1 欠損マウスについては変化は見られず、Vglut2-Cre-Stxbp1 欠損マウスについては有意な差が見られたものの、攻撃性亢進について直接的な関与は見られなかった。



結論

成体期においても全 GABA 作動性神経細胞での *Stxbp1* の半減は攻撃性に関与せず、腹側の興奮性神経細胞での *Stxbp1* の半減も攻撃性に関与しないことが分かった。

考察

脳の興奮性神経細胞、抑制性神経細胞で Stxbp1 を半減させても攻撃性の亢進が見られなかったことから、他の神経細胞(セロトニン作動性神経細胞やドーパミン作動性神経細胞など)が攻撃性亢進に関係するのではないかと考えるため、今実験とは異なる脳神経細胞で検討していく必要がある。

参考文献

① Hoischen *et al.*, *Nat Neurosci*, 2014
② Stamberger *et al.*, *Neurology*, 2022
③ Miyamoto *et al.*, *Hum Mol Genet*, 2017
④ Kim *et al.*, *bioRxiv* preprint, 2021

内側扁桃体背側後部、後部扁桃体、視床下部室傍核における Stxbp1 の欠損は攻撃性の亢進を示さない

神経発達症遺伝学　211072　古山拓人

背景

Stxbp1 遺伝子は、神経伝達物質放出に必須なシナプス蛋白質 Munc18-1 をコードしており、てんかん、自閉症スペクトラム障害、知的障害などの神経発達症患者において、この遺伝子の病原性変異体が同定されている。STXBP1 変異体を持つ患者や Stxbp1 欠損マウスでは攻撃性の亢進が報告されている。ところで、脳のさまざまな異なる領域が神経発達症の個々の異なる症状に責任を有しており、特に視床下部腹内側核の腹外側 VMHvl の細胞活動上昇が攻撃性亢進に必須でありかつ十分であると知られている。しかし、VMHvl での Stxbp1 半減は細胞活動の低下につながり、攻撃性の低下をもたらすと考えられる。一方で VMHvl の活動を制御する上流の神経回路がいくつか知られており、特に重要な神経核として、内側扁桃体背側後部(MeApd)、後部扁桃体(PA)および視床下部室傍核(PVH)などが知られており、今回の研究ではこれら3領域に注目した。

目的

MeApd、PA、PVH で Stxbp1 を欠損させ、これらの神経核が STXBP1 変異を持つヒトや全身性 Stxbp1 ヘテロノックアウトマウスで見られる攻撃性の上昇に関与しているか検討した。

方法

Cre リコンビナーゼ存在下で Stxbp1 を欠失するようにしたマウスの脳部位のなかで攻撃性に深く関与すると考えられている神経核に Cre リコンビナーゼを発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を定位的にマイクロインジェクションし、Stxbp1 の発現を局所的に欠損させたホモ欠損させた以下のマウスを作製し、その行動を Resident Intruder Test により評価した。

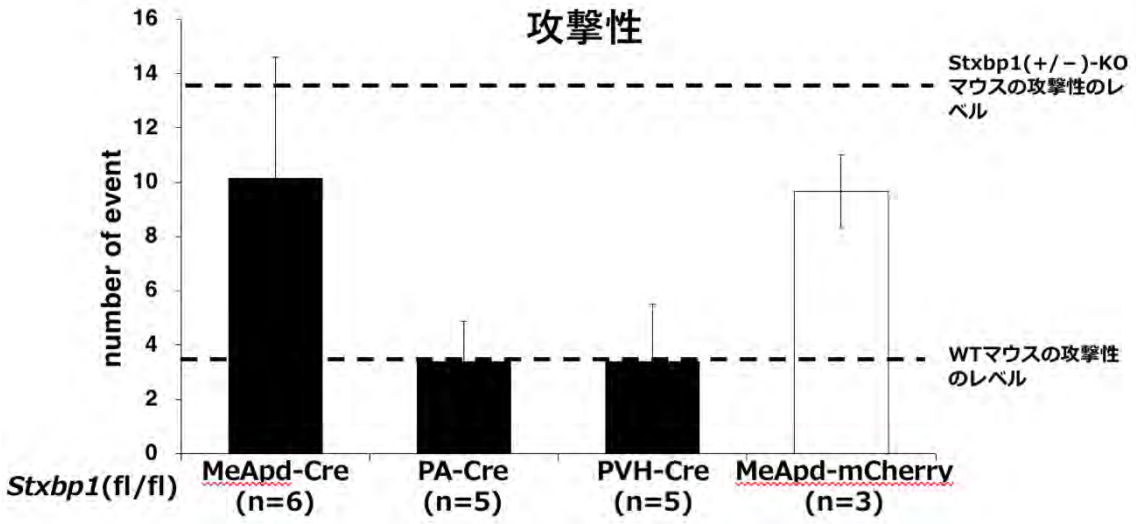
(1)Stxbp1(fl/fl);MeApd-AAV-Cre マウス：Stxbp1 ホモ欠損(fl/fl)マウスの内側扁桃体後背部(MeApd)に AAV を注入したマウス。

(2) Stxbp1(fl/fl);PA-AAV-Cre マウス：Stxbp1(fl/fl)マウスの後部扁桃体(PA)に AAV を注入したマウス。

(3) Stxbp1(fl/fl);PVH-AAV-Cre マウス：Stxbp1(fl/fl)マウスの視床下部傍核(PVH)に AAV を注入したマウス。

結果

これらのマウスで Intruder Test を行った。PA や PVH に微小注入したマウスの攻撃性は野生型と同程度であり、攻撃性の亢進は再現されなかった。一方 MeApd に注入したマウスでは攻撃性の亢進傾向がみられなかったが、コントロールとして MeApd に mCherry を注入したマウスも同程度の攻撃性を示していることから、これらの上昇は Stxbp1 の遺伝子発現量に依存しておらず、機械的な侵襲の影響である可能性も考えられる。また、これら3種の Stxbp1 欠損マウスは、いずれも匂い嗅ぎ・追跡行動に異常を示さなかった。



考察

以上の結果から、これら3領域における Stxbp1 の欠損は、STXBP1 変異をもつ患者や全身性のヘテロノックアウトマウスで見られる攻撃性行動に強く影響しないと考えられるが、さらに慎重な検討が必要である。

また、他の脳領域、特に縫線核や内側前頭前皮質(mPFC)などが攻撃性の亢進に関与する有力な候補だと考えられる。

今後これらの脳領域で Stxbp1 を欠損させ、どのような効果が見られるか検討し、攻撃性に責任を有する神経回路を明らかにしていく。

SCN1A 遺伝子の転写活性化によるドラベ症候群に対する遺伝子治療法の開発

神経発達症遺伝学　菅原匠　No.43

背景

SCN1A 遺伝子は電位依存性ナトリウムチャネル α 1 サブユニット(Nav1.1)をコードする遺伝子で、乳児期の難治性のてんかん、知的障害、自閉症、突然死などを特徴とするドラベ症候群の患者でヘテロ機能喪失変異が見つかっている。CRISPR-ON 法は CRISPR/Cas9 技術を基とする転写活性化システムであり、切断活性を失わせた deficient-Cas9(dCas9)に転写因子(VPR など)を結合させ、gRNA によって標的遺伝子のプロモーター領域に誘導させることで遺伝子の転写を促進させる。我々は以前に、CRISPR-ON 法が Scn1a(+/−)ドラベ症候群モデルマウスに対して治療効果があることを示したが、AAV の収容能力に限界があるため必要な因子の一部はトランスジェニックマウスによって導入されている。

目的

本研究では、将来の臨床応用に向け、CRISPR-ON の因子を小型化することで全ての要素を組み込んだ AAV ベクターを作製し、これをドラベ症候群モデルマウスに導入してその治療効果を調べ、さらに AAV ベクターの改良を行った。

方法

従来の CRISPR-ON で使用した SpdCas9 より小型の Nme2dCas9 と小型化 VPR ドメインを組み合わせた AAV ベクターを作製した。また、*Scn1a* 遺伝子の上流プロモーターを標的とし、マウス由来の Neuro2a 細胞で転写効率が高い4種の gRNA を結合した AAV ベクターを別で作製した(Fig.1)。この2種の独立した AAV ベクターを生後 1 日齢のドラベ症候群マウスに同時に投与し、CRISPR-ON を作用させた。さらに、*Scn1a* mRNA 量、生存率、熱性けいれん感受性を調べることで治療効果を評価した。

結果

結果 1: CRSPR-ON を導入したマウス脳から、RNA を抽出して逆転写反応後に定量 PCR を用いて *Scn1a* mRNA 量を測定した。CRSPR-ON を作用させた野生型とヘテロ変異マウスともに Scn1a mRNA 量の上昇を示さなかった(Fig.2) 。この結果は、2 種の AAV ベクターで投与した Nme2dCas9-VPR と4つの gRNA による転写の活性化が、マウス脳内で十分に高くないことを示している。

結果 2: CRSPR-ON を導入したドラベ症候群モデルマウスの生後 50 日間の生存率は、対照群とほぼ同じであった (Fig.3)。

結果 3: 熱誘発性のけいれん発作では治療群に高い閾値温度を示した個体が複数観察されたが、平均温度に統計的な有意差はなかった (Fig.4)。

以上の結果が示すように十分な治療効果が得られなかったため、CRISPR-ON の改良を行った。

結果 4: Nme2dCas9 に2箇所のアミノ酸置換を導入することによって、転写活性を約2倍上昇することに成功した(Fig.5)。また、転写活性化ドメインをさらに小型の NFZ に変更することで、dCas9-NFZ と gRNA を 1 つのベクターに納めた All-in-one 型の AAV ベクターの作製が可能になった(Fig.6)。さらに短縮型 U6 プロモーターを使用することで付加できる gRNA が 2 種に拡張できると想定される。

結果 5:短縮型 U6 プロモーターを検討したが、完全長の U6 プロモーターに比べ転写活性が不浄に低く、CRISPR-ON での使用には適さないことが明らかになった(Fig.7)。

結果 6:1 種の gRNA と完全長 U6 プロモーターを組み込んだ All-in-one 型の AAV ベクターを作製して活性を測定したが、Scn1a mRNA の増加は 1.2 倍だった(Fig.8)。

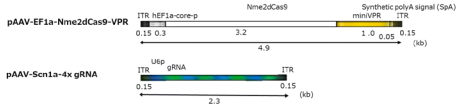


Fig.1

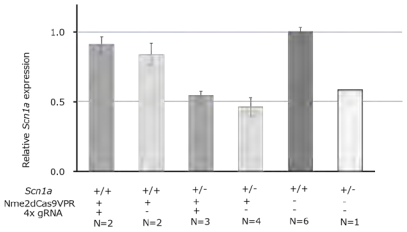


Fig.2

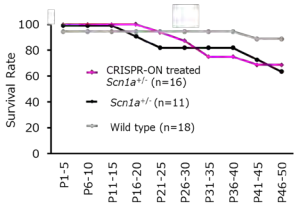


Fig.3

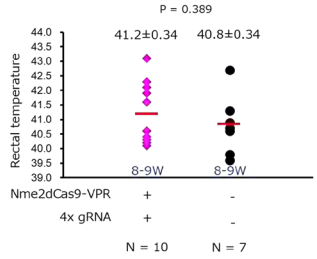


Fig.4

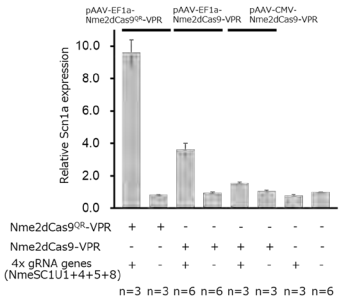


Fig.5

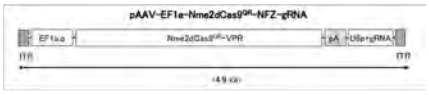


Fig.6

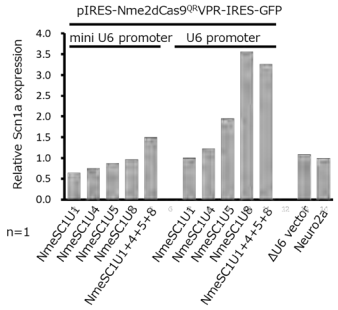


Fig.7

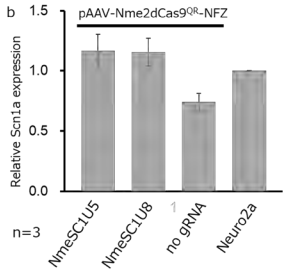


Fig.8

結論・ディスカッション

ドラベ症候群モデルマウスにおいて 2 種の AAV ベクターで導入した CRISPR-ON による Scn1a 遺伝子の転写量の上昇は不十分であることが明らかになったが、本研究では、Nme2dCas9 の改変による活性の向上と all-in-one 型のベクターが作製可能であることが示された。今後、より高活性の gRNA を選別すること等により、転写活性化効率が上昇すれば、生体内において CRISPR-ON を AAV ベクターだけで作用させることが可能になることが予想される。したがって、CRISPR-ON は、将来的にはドラベ症候群の治療への応用が期待される有望な技術である。

《参考文献》

1) Ogiwara et al., J *Neurosci*: 5903-5914, 2007.
2) Mali P *et al.*, Science, 339, 823-826 (2013).
3) Yamagata et al., *Neurobiol* Dis 141:104954, 2020.
4) Edraki et al., *Mol* Cell 2019.
5) Vola et al., *bioRxiv* 2018.

肺線維症で見られる異常上皮細胞は前癌状態である

神経発達症遺伝学　宇佐美諄　No.10

1. 背景

特発性肺線維症/idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)は慢性進行性であり、難治性である為予後が不良な疾患である。IPF 患者の肺では、間質の線維化が見られるだけでなく合併肺癌 [1]を発症する場合もある。IPF 患者では急性期(早期)病理像として non specific interstitial pneumonia (NSIP)、慢性期(進行期)病理像として不可逆的な肺胞構造の破綻が特徴的な usual interstitial pneumonia (UIP)が見られる。さらに、細気管支では NSIP、UIP いずれの病理像でも異常な肥厚を示す上皮細胞(異常上皮細胞)が見られ、この異常上皮細胞が合併肺癌へ進展する前癌状態である可能性が高い[2]。異常上皮細胞は肺胞辺縁で見られるクラブ細胞と同様に *Scgb1a1*$^{+}$であることが判明している。

2. 目的

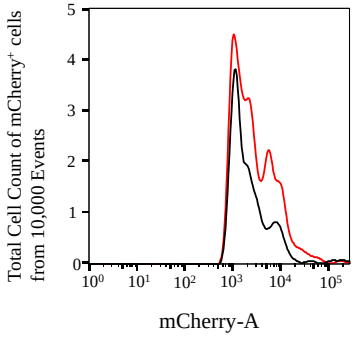
異常上皮細胞の性質を明らかにし、異常上皮細胞が前癌状態であるか検討する。

3. 方法

ブレオマイシンの気道投与により IPF 患者と同じ病態・病理像が誘導される UIP 病態モデルマウスを用いた。さらに、UIP 病態モデルマウスの *Scgb1a1* プロモーター下に mCherry(蛍光タンパク質)の cDNA を遺伝子導入した。病態が誘導されていないマウスの肺を通常肺、病態が誘導されたマウスの肺を NSIP 肺(病態誘導から 2w 後の急性期)或いは UIP 肺(病態誘導から 14w 後の慢性期)として比較した。比較した肺において *Scgb1a1* を発現する細胞(クラブ細胞或いは異常上皮細胞)を mCherry の発現の有無で判別し、mCherry^{+}細胞について 1)FACS による mCherry^{+}細胞の数の変化、2) FACS による mCherry^{+}細胞の細胞周期の変化、3)*in situ hybridization* による分化能の変化を検討した。

4. 結果

1) FACS 解析の結果、通常肺に比べ UIP 肺で mCherry^{+}細胞数が約 1.7 倍増加していた。



	Sample	mCherry^{+} cells (%)
	Normal lung	1.03
	UIP lung	1.72

図 1; UIP 肺では異常上皮細胞が増加した
10,000 細胞中の mCherry^{+}細胞数をヒストグラムで示す。ヒストグラムは縦軸が細胞数、横軸が mCherry の蛍光強度を表している。通常肺(黒)、UIP 肺(赤)で示している。

2) mCherry^{+}細胞において、S 期では UIP 肺で通常肺に比 4%の増加が見られたが G_2 期の割合に差は見られなかった。n 数が不足し統計学的計算ができないが、異常上皮細胞はある程度の分裂能を獲得している可能性がある。各細胞周期の割合は表 1 に示す。

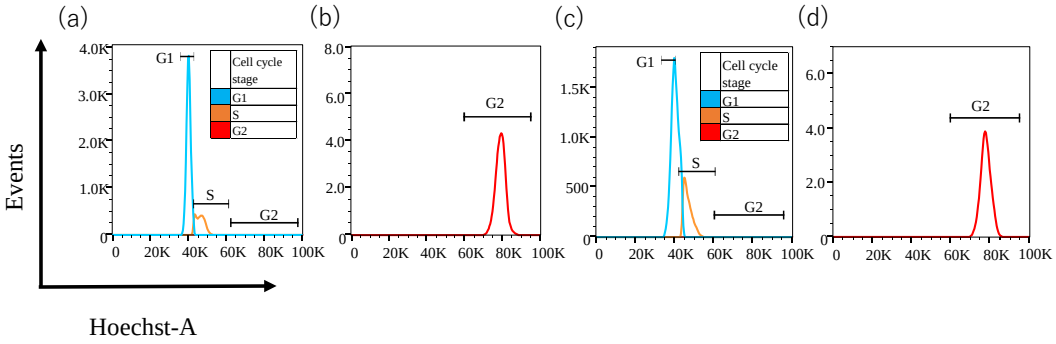


図 2； 通常肺および UIP 肺における mCherry^{+}細胞の、各細胞周期の分布
FlowJo により cell cycle 解析を行った。(a) 通常肺および (c) UIP 肺で G_1 期(青)、S 期(橙)、G_2 期(赤)各細胞周期の範囲が示されている。(b, d) G_2 期の細胞数が少ないのでそれぞれの右に G_2 期のピークを拡大して示した。

Cell cycle stage (%)	Normal lung	UIP lung
G1	66.9	60.2
S	30.7	34.7
G2	0.19	0.17

表 1； 異常上皮細胞は通常細胞より分裂が亢進している

3) 急性期病変である NSIP では、Ⅱ型肺胞上皮細胞への分化過渡期であることを示す *Scgb1a1*$^{+}$/*Sftpc*$^{+}$のクラブ細胞や異常上皮細胞が認められるが、慢性期病変である UIP では、分化過渡期の細胞は認められなかった。

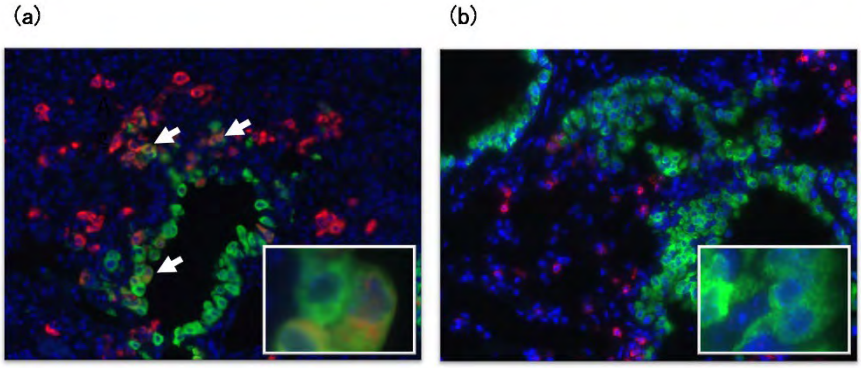


図 3； UIP では、分化過渡期の細胞(橙)が認められない
クラブ細胞や異常樹皮細胞が発現する *Scgb1a1*(緑)、クラブ細胞や異常上皮細胞の分化先であるⅡ型肺胞上皮細胞が発現する *Sftpc* (赤)、核をヘキスト(青)で染色した。(a) 急性期病変である NSIP 肺 (b)慢性期病変である UIP 肺を示す。 矢印は分化過渡期の異常上皮細胞、白枠内は異常上皮細胞を拡大したものをそれぞれ示す。

5. 考察

異常上皮細胞は分化能を失っており、非腫瘍性の増殖能を示していることから前癌状態である可能性がある。

6. 参考文献

1) Natsuizaka M, et al., (2014) Am J Respir Crit Care Med
2) Miura Y, et al., (2022) Life Sci Alliance

新規抗がん物質パルミトイルピペリジノピペリジンの血管新生抑制作用を評価するためのアッセイ法検討

神経毒性学分野　No. 13　大栗弘太郎

1. 背景と目的

パルミトイルピペリジノピペリジン（PPI）は、我々が抗がん候補物質として創製した新規化合物である[1]。PPI による STAT3 の転写阻害が、アポトーシス、血管新生、細胞周期進行に関連する分子の発現に影響を与え、最終的にがん細胞の増殖抑制に寄与するメカニズムの一つである可能性が示されている[2]。また、我々は、PPI が鶏卵漿尿膜（chick chorioallantoic membrane、CAM）およびヒト大腸がん細胞移植マウスにおける血管新生を抑制し、ヒト大腸がん細胞において血管内皮増殖因子（VEGF）の発現レベルを著しく低下させることを見出した[2]。しかし、PPI が血管の成長を抑制しているのか、成長した血管を減らしているのかは不明である。そこで、PPI の投与時期が血管新生抑制作用に影響を与えるか検討する必要がある。本研究では、そのための CAM アッセイ法の条件を検討した。

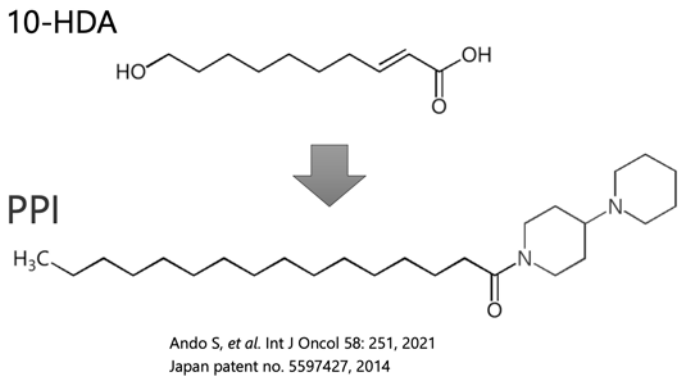


図１　10-HDAとPPIの化学構造式

2. 方法

＜CAM 面積の測定＞

鶏の褐色有精卵（後藤孵卵場、各務原市）を金曜日の午前 11 時（96, 120, 125、144 時間測定用）または午後 4 時（96, 113, 120, 144 時間測定用）に孵卵器に入れ、翌月曜日から経時的に CAM の大きさを測定した。CAM の大きさは面積によって評価した。CAM を楕円と見なし、目視により長半径と短半径を決定し、（CAM 面積）=（長半径）×（短半径）× 3.14 とした。

＜CAM アッセイ＞

CAM アッセイにより血管新生抑制作用について調べた。短時間（113 時間）あるいは長時間（125 時間）のインキュベート後の PPI 投与が血管新生抑制作用にどのような影響を及ぼすかを見るため、午後 4 時に孵卵機に入れ 5 日後の午前 9 時に薬剤を投与する群（113 時間、Group A）、または午前 11 時に孵卵機に入れ 5 日後の午後 4 時に薬剤を投与する群（125 時間、Group B）に分けた。薬剤を投与する際には、各 CAM 上に置いたシリコンリングの中心に 0、10 μM PPI を滴下した。薬剤投与後、2 日間のインキュベート後、血管を見やすくするためイントラリポス（大塚製薬）を注入し、シリコンリング内の血管を実体顕微鏡下にて撮影し、その本数を数えた。

＜統計＞

血管新生抑制作用について、ボンフェローニの多重比較検定を用いて有意差を検定した。

3．結果

＜CAM 面積＞

CAM の面積は孵卵機でのインキュベート開始後 96 時間で 1.54±0.96 mm^2 (n=31)、113 時間で 12.3±5.27 mm^2 (n=13)、120 時間で 31.2±11.4 mm^2 (n=30)、125 時間の時点で 92.0±22.9 mm^2 (n=17)、144 時間で 363±81.3 mm^2 (n=29)であった(図２)。113 時間と 125 時間での CAM の面積は約 7.48 倍(P<0.001)と有意に差があった。

＜CAM assay＞

平均血管数は孵卵機に入れて 113 時間のインキュベート後に PPI を投与した Group A の 10 μM PPI (n=31)で 13.5±3.49 本、0 μM (n=21)で 19.1±4.91 本、125 時間のインキュベート後に PPI を投与した Group B の 10 μM PPI (n=27)で 16.1±4.79 本、0 μM (Vehicle、n=28)で 17.9±4.20 本であった。Group A において PPI 投与で有意に血管数が減少した(P<0.0001)。Group B においても PPI 投与で血管数が少ない傾向にあったが、有意差はなかった(図３)。

4．考察

インキュベートの時間が CAM の成長に影響を及ぼすことが明らかになった。今回行なった条件では、CAM の面積が小さい時期に PPI を投与した方が血管数減少効果は高かった。しかし、本研究では、Group A と Group B で、PPI 投与までのインキュベート時間を 12 時間ずらしているが、その後のインキュベート時間も含めた合計のインキュベート時間は等しい。すなわち、PPI 投与後のインキュベート時間が異なっているため、血管新生の程度を両グループ間で比較するには適切なアッセイ法ではない。よって今後の研究として、PPI 投与後、両グループで同じ時間インキュベートをした上で血管新生抑制作用の程度を比較し、PPI の投与時期と血管新生の過程の関連性についてさらに調べる必要がある。

5．参考文献

[1] Suzui M and Iinuma M: Anticancer agent, Japan Patent No. 5597427, 2014.

[2] Ando S, *et al.* Int J Oncol 58: 251-265, 2021

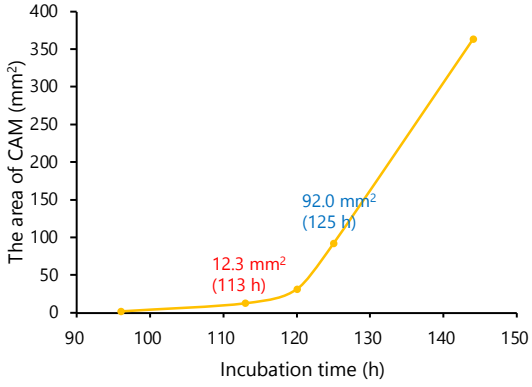


図２　CAM 面積の成長曲線

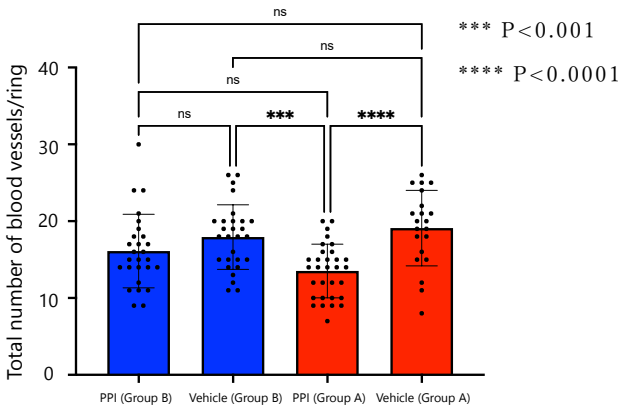


図３　PPI の血管新生抑制作用

A possible promoting effect of protamine to neurite outgrowth of mouse cortical neurons

神経毒性学分野　田中健太　出席番号 52 番

＜目的＞

マウスの大脳皮質ニューロンにおけるプロタミンの神経突起伸長への作用を検証する。

＜背景＞

脊髄は脳とつながり中枢神経系を構成する組織である。脳からの指令を末梢に伝え、逆に末梢からの情報を脳に伝える役割を担っている。この働きによって生物は外部から刺激を受けたときに、その状況に適した行動が取れる。脊髄が損傷を受けると、神経軸索が切断されて回路が断絶されることで、感覚・運動機能の障害、自律神経麻痺が起きる。現在、脊髄損傷に対する有効な治療法がないため、日本では 10 万人を超える脊髄損傷患者が後遺症に苦しんでいる。脊髄損傷部では、グリア性瘢痕が形成され、そこにコンドロイチン硫酸（Chondroitin sulfate: CS）と呼ばれる糖鎖が蓄積し、軸索の再伸長を強力に阻害している[1) 2)]。CS は軸索末端の細胞膜上にあるチロシン脱リン酸化酵素 PTPRσ に結合して、軸索末端を dystrophic endball と呼ばれる異常構造に変化させる[3) 4)]。驚くべきことに、dystrophic endball 自体は 100 年ほど前に Cajal によって発見されていた[5)]。この異常構造の形成を阻止できる物質の探究がされているが、未だ臨床応用には至っていない。このような現状において、ヘパリンの拮抗薬であるプロタミンの脊髄損傷に対する治療薬となる可能性が見出された。

所属研究室は、プロタミンが CS の軸索伸長阻害効果を打ち消すことを見出し、脊髄損傷マウスの運動障害の亜急性期での治療に成功した（未発表データ）。Kulesskaya らも、低分子プロタミンを急性期の脊髄損傷マウスに投与することで、軸索伸長が促進され、運動障害が改善されることを報告している[6)]。アルギニンに富むプロタミンは正電荷を帯びており、静電気的相互作用と水素結合を介して CS と結合する[7)]。その結果、CS が軸索末端の PTPRσ に結合することを阻害し、軸索再伸長に対する阻害効果が打ち消されたと考えられる。しかし、プロタミンの神経細胞への作用は不明な点が多い。そこで本研究では、マウスの大脳皮質神経細胞を初代培養し、プロタミンの神経細胞の神経突起伸長への作用を検証した。

＜方法＞

生後 1 日までの仔マウス(C57BL/6J, 3 匹)から大脳皮質を摘出し、パパインで分散することで神経細胞を得た。神経細胞を 10mm 四方のガラスプレートに播種し、プロタミン(1 μg/mL)または生理食塩水(コントロール)を含む培養液中で 24 時間培養した。その後、神経細胞特異的に発現しているチューブリン（Tuj1）の抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。プロタミン処理とコントロールのサンプルでそれぞれ 43 枚、合計 86 枚の画像が得られた。画像解析では、第一に ImageJ を用いてそれぞれ 15 枚の画像に対して、神経突起と細胞体の蛍光シグナルの面積を測定した。第二に OlyVIA を用いて 86 枚全ての画像に対して、蛍光画像を元に神経突起を手動でトレースすることで長さを測定した。各画像について全ての神経突起の長さを合計し、細胞

数で割ることで標準化し定量化を行った。そして、これら二つの解析方法の適合性について検討し、得られた結果を統計学的に評価した。

＜結果と考察＞

ImageJ を用いた場合、一部の細胞体において、細胞膜の蛍光シグナルを除去することが難しく、神経突起の面積のみを正確に計測することができなかった。一方、OlyVIA による計測では問題点が見られなかったため、OlyVIA を使い解析することとした。コントロールのサンプルにおける一細胞あたりの神経突起の長さは平均 78.1 μm/cell であった。一方プロタミン処理のサンプルでは平均 87.9 μm/cell であり、コントロールに比べて、神経突起が 1.13 倍伸びることが分かった($p<0.01$)。

プロタミンの神経突起への伸長効果はわずかであったが、これは処理時間が 24 時間であり、その効果の大きさは妥当であると考えられる。以上の結果からプロタミンが大脳皮質に対して作用する可能性が示唆された。今回の研究は、プロタミンの神経突起伸長を検討するための新たな技術的情報を提供するかもしれない。また、中枢神経系におけるプロタミンの有効性をよりよく理解するためには、さらなる研究が必要である。具体的には、本研究では一種類のプロタミン濃度での測定であったが、今後の研究では複数のプロタミン濃度を設定し、同様の解析を行うことで、濃度依存的変化を検証しエビデンスレベルを高める必要がある。また、プロタミンの神経細胞への作用メカニズムを解明する必要もある。さらなる検証が重ねられた末に、プロタミンを用いた脊髄損傷の効果的な治療法が確立されることを期待したい。

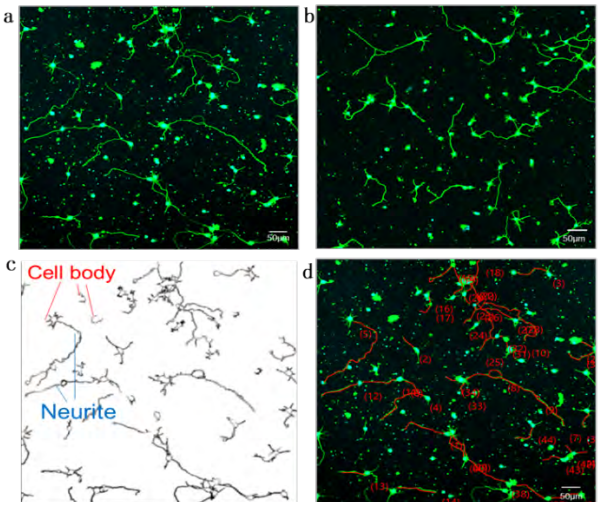


図1．プロタミン処理(a)、コントロール(b)の代表的な顕微鏡写真とImageJ(c)、OlyVIA(d)の代表的な解析画像

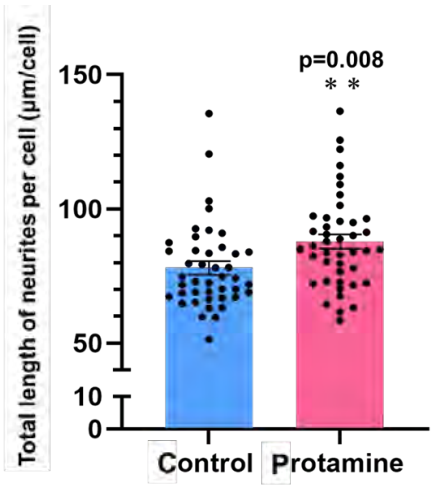


図2．一細胞当たりの全神経突起長

＜参考文献＞

1) Davies S. J. A. et al., (1999) *J. Neurosci.* 19, 5810-5822.
2) Jerry Silver J. and Miller J. H. (2004) *Nature Reviews Neuroscience* 5, 146-156.
3) Shen Y. et al., (2009) *Science*,326, 592-596.
4) Sakamoto K. et al., (2019) Nat. Chem. Biol., 15, 699-709.
5) Ramón y Cajal, S.(1928) Oxford Uni. Press.
6) Kulesskaya N. et. al., (2022) *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 865275.
7) Futaki S. (2017) 生化学 89, 8-14.

新規合成化合物のSTATファミリータンパクに対するインシリコドッキング解析

神経毒性学分野　萩本薫（No.65）

1．背景と目的

私たちの研究室では、中鎖天然脂肪酸であるデセン酸（10-HDA）をもとに、10-HDAと比較し1,000倍以上のヒトの大腸がん細胞増殖抑制効果を持つ新規合成化合物パルミトイルピペリジノピペリジン（PPI）を創製した（図1）[1]。PPIは、インシリコ解析により転写因子であるSTAT3のSH2ドメインに結合することが見出され、実際にSTAT3の転写活性を抑制した[2]。

SH2ドメインをもつSTATファミリーには、タンパク構造が既知のものとして、STAT1, 2, 3, 5a, 5b, 6の6種類が存在する。本研究では、私たちが創製した化合物とこれらのタンパクに対する結合親和性を解析することで、特異的にはたらくタンパクと化合物の抗がん効果の関係を調べた。

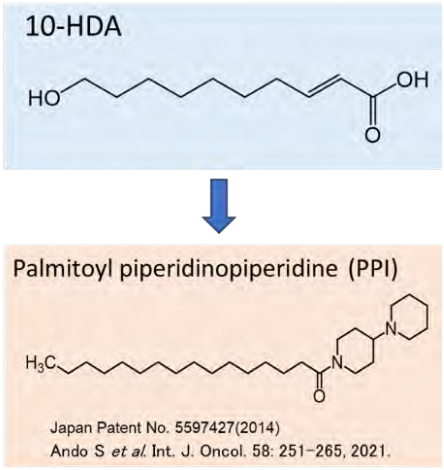


図1　PPIの化学構造式

2．方法

Discovery Studio2020（Dassault Systems BIOVIA、本学薬学部の共用機器センター）を用いて結合親和性を調べた。リガンドは、PPIに加え、PPIを初期リードとして設計された42種類の新規合成化合物を用いた[3]。化合物の構造はChemDrawで作成し、Discovery Studioで3次元化した。レセプターであるSTATタンパクの立体構造は、STAT1（PDB code 1yvl）、STAT2（6ux2）、STAT3（3cwg）、STAT5a（1y1u）、STAT5b（6mbw）、STAT6（4y5w）を用いた。解析に使用する結合部位は、示された候補からSH2ドメインを含むSphereを選んだ。リガンドとレセプタータンパクのドッキングの計算には、CDOCKERアルゴリズムを用いた。化合物のSH2ドメインに対する結合親和性は、リガンドと標的タンパクとの結合のしやすさを示した値である-CDOCKER_ENERGY（kcal/mol）により評価した。STAT1、2、5bでは、初めに示されたSphereの大きさがリガンドに対して小さかったため、リガンドが結合できる大きさに拡大して計測した。

3．結果

本研究では、PPIや42種類の新規合成化合物とSTATファミリータンパクとの結合親和性を解析した。また、以前の研究で、これらのうち29の化合物の、がん細胞株における50%細胞生存率（IC_{50}）の値が得られている[4]。そこで、そのIC_{50}と、STATそれぞれに対する結合親和性の大きさの間に相関があるかどうかも調べた。

まず、STATタンパクそれぞれに対する-CDOCKER_ENERGYの最小値・最大値を見ると、STAT3は、他のSTATと比べて最大値・最小値がともに大きくなった。また、STAT3の中では、コード1222の化合物で最もスコアが大きくなった（65.8kcal/mol）（図2）。

また、最大値・最小値を示した化合物は複数のSTATで共通しており、あるSTATに対する結合親和性が大きい化合物は、他のSTATに対しても大きい結合親和性を示すという傾向が見られた。化合物全体を見ても同様に、結合親和性の大きさはSTATファミリーの間で似た傾向を示すことが分かった。化合物の構造について見てみると、それぞれのSTATで最も-CDOCKER_ENERGYが大きくなった化合物は、類似した構造を持って

いることが分かった（図 3）。

		STAT3	STAT1	STAT2	STAT5a	STAT5b	STAT6
Max	-CDOCKER_ENERGY (kcal/mol)	65.8 (1222)	43.2 (1222)	31.4 (1223)	43.4 (1217)	43.5 (1217)	33.3 (1223)
	IC_{50} (μM)	0.66	0.66	1.27	0.41	0.41	1.27
Min	-CDOCKER_ENERGY (kcal/mol)	8.9 (1208)	-20.1 (1210)	-28.1 (1210)	-8.79 (1221)	-165.1 (1210)	-18.7 (1208)
	IC_{50} (μM)	1.77	—	—	1.24	—	1.77

図 2　-CDOCKER_ENERGY の最大値・最小値（括弧内の数字、化合物のコード名）と、その化合物の IC_{50}（-、活性が弱く計測不能）

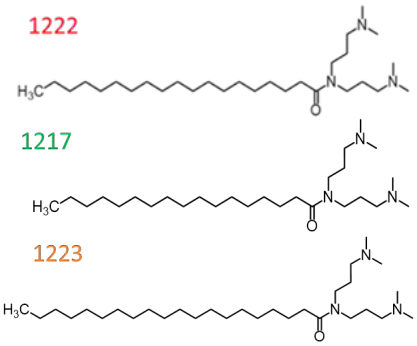


図 3　図 2 で最大値を示した化合物の構造式

次に、IC_{50} と STAT への結合親和性の相関について、得られている IC_{50} の値をすべて含めて調べたところ相関が弱かったため、IC_{50} が 20 μM 以下の、より薬としての効果が高いものに注目して相関を調べた（n=58）。結果は、結合親和性が大きいものほど IC_{50} が小さい、つまり結合しやすいものほど腫瘍増殖抑制効果が強い傾向があるという相関が、STAT1（R=−0.260, P<0.05）、STAT3（R=−0.405, P<0.01）、STAT5a（R=−0.307, P<0.05）において見られた。STAT3 と比較すると、他の STAT では Sphere の大きさの条件を緩めて解析したもの（STAT1, 2, 5b）もあるが相関は弱く、全体の結合親和性も小さかった（図 4, 5）。

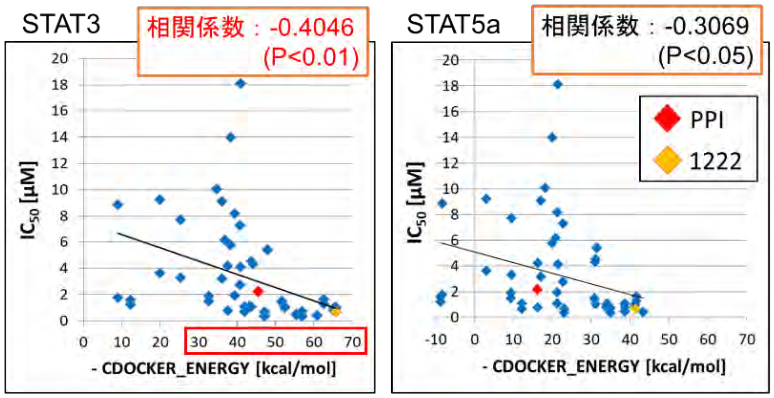


図 4　-CDOCKER_ENERGY と IC_{50} との相関の代表的な散布図　（STAT3 と STAT5a）

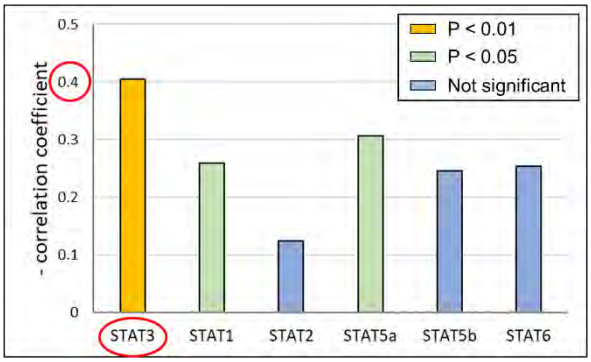


図 5　各 STAT における-CDOCKER_ENERGY と IC_{50} との相関係数

4. 考察

新規合成化合物のうち、他の化合物と比べ、1222 で STAT3 の SH2 ドメインへの結合親和性が最も大きいことが分かった。また、STAT3 と比較して、他の STAT に対する化合物の結合親和性は小さく、IC_{50} との相関も弱かったことから、PPI や新規合成化合物は、主に STAT3 を標的として作用することで腫瘍増殖抑制効果を示していると考えられた。

5. 参考文献

[1] Suzui M and Iinuma M: Anticancer agent, Japan Patent No. 5597427, 2014
[2] Ando S, *et al.* Int J Oncol 58: 251-265, 2021
[3] Suzui M and Iinuma M: Anticancer agent, Japan Patent No. 6532730, 2019
[4] 2021 年度基礎配属レポート

シナプスにコンドロイチン硫酸は存在するか？

神経毒性学分野　森 玲衣奈　出席番号 85 番

1．背景

コンドロイチン硫酸（CS）はプロテオグリカンを構成する糖鎖の 1 つであり、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）として軟骨、間質等の様々な組織に分布する。これまでの研究により、シナプス形成時に、シナプス前細胞の軸索末端に発現するチロシン脱リン酸化酵素 RPTPσ がシナプスオーガナイザーとして働くことが知られている。この RPTPσ は CS の受容体としての働きも持つ。また、軸索がシナプスを作る時、その末端を丸くすることが観察される。一方で、軸索損傷時には、軸索の末端の周りに CSPG が豊富に存在するようになり、CS は RPTPσ に結合する。すると、軸索伸長は阻害され、軸索先端では丸くなる形態変化が引き起こされる。シナプス形成に CS が関わるという情報はないものの、RPTPσ の機能や類似した形態変化から、CS がシナプス形成に関わることが予想できる。

2．目的

本研究の目的は、CS がシナプスに存在するか確認することである。CS は糖鎖であり、染色による検出は難しい。そこで、azide と alkyne との結合反応であるクリックケミストリーを使って、CS の構成員である *N*-acetylgalactosamine(GalNAc)の検出を試みた。従来のクリックケミストリーでは、銅が azide と alkyne との反応を触媒する。しかし、銅が生体や生細胞に対し毒性を示すため、生細胞における GalNAc の検出には使用できなかった。しかし、近年 alkyne 供与体として cyclooctyne を用いることにより銅触媒を必要としないクリックケミストリーが発明されており、生体や生細胞への応用が注目されている。azide 供与体として、azide が付加された GalNAc を培養神経細胞に取り込ませ、それを蛍光標識することで、CS のシナプスにおける分布を検証した。

3．方法

GalNAc は具体的には次のように標識した。まず、生後 0-1 日齢のマウスの大脳皮質から神経細胞を採取し、2 週間培養した（n=3）。次に神経細胞に azide 付加 GalNAc を 10μM 加え、azide 付加 GalNAc を CS 生合成経路に取り込ませた。azide 付加 GalNAc を加えてから 4 日後に alkyne 供与体として、蛍光色素の結合した dibenzylcyclooctyne（DBCO）を約 0.1％含む PBS を神経細胞に加えて 10-20 分インキュベートした。また、DBCO 蛍光シグナルが神経細胞のどこに存在しているのかを確かめるためにシナプスマーカーとして、前シナプスのマーカーとしてシナプトフィジン、後シナプスのマーカーとして PSD95、そしてシナプス形成の場である樹状突起のマーカーである MAP2 に対して蛍光免疫染色を行った。蛍光観察は、共焦点レーザー顕微鏡と 100 倍の油浸対物レンズを用いて行った。観察される DBCO 蛍光シグナルは、DBCO が azide 付加 GalNAc に結合したことによるものであることを確かめるために azide を付加させていない GalNAc を負荷した神経細胞を DBCO で染色したものをコントロール染色として行った。この条件のサンプルについても同様にシナプスの染色を行った。

4. 結果

azide 付加 GalNAc を加えた神経細胞、GalNAc を加えた神経細胞を観察したところ、GalNAc を加えた神経細胞においても DBCO 蛍光が確認された。非特異的反応を除去するため、GalNAc を加えた神経細胞において DBCO 蛍光が見られない観察条件を決め、同じ観察条件で azide 付加 GalNAc を負荷したサンプルの DBCO 蛍光シグナルを観察した。すると、粒状の蛍光シグナルが検出された（図 1）。次に、クリックケミストリーとシナプスに対する染色を組み合わせて染色し、同様に観察した。その結果、azide 付加 GalNAc を負荷した神経細胞の樹状突起上に DBCO の蛍光シグナルが検出された（図 2）。さらに、シナプスマーカーとの共局在を検証したところ、DBCO の蛍光シグナルは、シナプトフィジンおよび PSD95 の蛍光シグナルと重なるものや近傍に局在するものが観察された（図 3）。この結果は、他のマウス 2 匹から独立して培養した神経細胞を使って繰り返し実験をすると、同様の観察結果が得られ、再現性が確認できた。

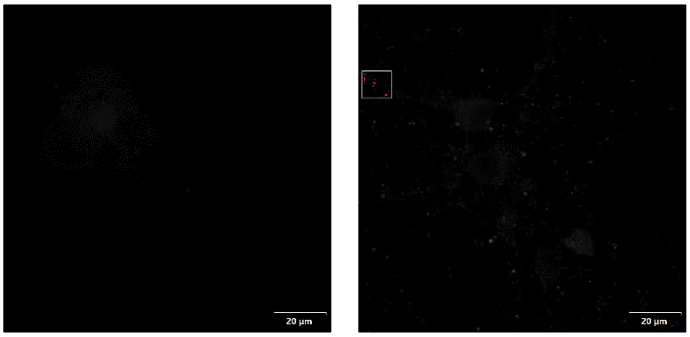


図 1 DBCO による azide 付加 GalNAc の検出。GalNAc を負荷した神経細胞（左）と azide 付加 GalNAc を負荷した神経細胞（右）。

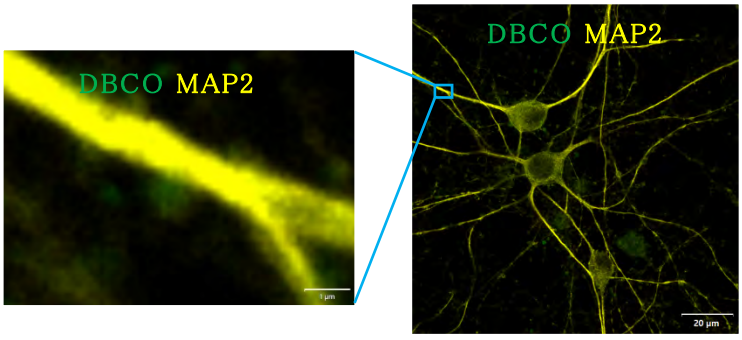


図 2 樹状突起上に観察された DBCO の蛍光シグナル。緑色が DBCO、黄色が MAP2 を示す。

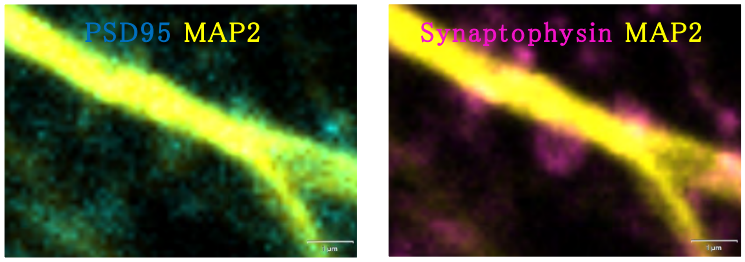


図 3 DBCO のシグナルは PSD95（左）およびシナプトフィジン（右）の蛍光シグナルの近傍に局在する。

5. 考察

本実験では、CS がシナプスにおいて存在する可能性を示すことに成功したと考えている。しかし、今回、観察された DBCO のシグナルが CS を構成する GalNAc に由来するものであるかは断定できない。そこで今後は、CS に対する特異抗体を用いた染色と組み合わせて検証を行う必要がある。また、クリックケミストリーを用いた標識方法には標識する仕組みや検出性の改良が必要であると分かった。今後の展望として，アルキンを1つ含んだ DBCO に比べ、アルキンを 2 つ含んだ DBCO の方が、活性化エネルギーが高く，反応を起こしにくいため、アルキンを 2 つ含んだ DBCO を使用することでノイズを減らすことができると考えている。

6. 参考文献

喜井 勲、吉田 優、細谷 孝充 ダブルクリック反応：生体分子の新しい化学修飾法 日本生化学会 テクニカルノート 2012 第 84 巻 第 4 号 p.306-311

若齢期に放射線被ばくしたB6C3F1マウスにおける短期高脂肪食誘導肥満による肝がん形成に対する影響

神経毒性学分野
出席番号89　山城悠都

【背景】小児は、放射線に感受性が高いことから放射線被ばく後の発癌が危惧されている。造影検査や、小児癌の放射線治療などは必要な医療被ばくではあるが、リスクが未だ明らかになっていない。そのような放射線被ばく後の腫瘍形成過程における生活習慣の影響も懸念されている。食事誘発性肥満（DIO）は、発癌を促進することが報告されている。肝臓において、DIOに起因する 非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）と非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は、C 型肝炎ウイルスなどのウイルス性肝疾患やアルコール性肝疾患と並び、肝癌の主要な危険因子であり、NASH から肝硬変、肝癌のような発癌メカニズムが知られている。これまでの先行研究より、放射線被ばくによるNASH発症メカニズムとして、若齢期マウスに放射線を被ばくさせると肝細胞内に脂肪蓄積が誘導され、NASH が発症することで早期に肝癌が発症することが判明している [1]。しかしながら、放射線被ばく後に短期高脂肪食による DIO がその後の肝癌のリスクに与える影響は分かっていない。

【目的】本研究では、若年期マウスを用いて放射線被ばく後の短期高脂肪食によるDIOが寿命及び肝癌リスクに対する影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】B6C3F1雄マウスに1週齢で0Gyまたは4Gyのガンマ線を照射した。その後、マウスを高脂肪食（HFD）投与群と通常脂肪食（NFD）投与群に分け、20週齢から24週齢までの4週間投与した。Kaplan-Meier法およびLog-rank検定により、寿命短縮および肝細胞癌（HCC）発生確率を解析した。ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、ki-67、α-SMA、p21 抗体による免疫組織化学染色も行い、組織学的変化、細胞増殖、線維化及び細胞老化について解析した。

【結果】短期HFDは寿命および肝発癌に影響を与えなかった（図1、2）。ki-67陽性細胞数は短期HFD投与による影響を受けなかった（図3）。一方、短期HFD群では、NFD群と比較して p21 陽性細胞数が一過性に増加した（図 4）。肝臓への一過性の脂肪蓄積は短期HFD群でのみ観察された（図5）。α-SMA発現量は短期HFDの影響を受けなかった（図6）。

【考察】放射線照射後の短期HFDは、肝臓の細胞増殖、細胞老化、線維化に持続的な影響を及ぼさないことが分かった。短期 DIO により蓄積した脂肪は、通常食に戻すことで肝細胞内の脂肪蓄積は改善され NASH、肝硬変、肝癌への進展には至らなかったと考えられた。以上より、短期 DIO は肝発癌を有意に促進しなかったと考えられた。今後、放射線被ばく後の長期 DIO が寿命や肝癌のリスクにどのような影響を及ぼすかを調べることが重要である。

【参考文献】

1) *Ionizing radiation promotes, whereas calorie restriction suppresses, NASH and hepatocellular carcinoma in mice*
Y. Shang, T. Morioka, S. Kakinuma et al. IJC, 2023, p1539

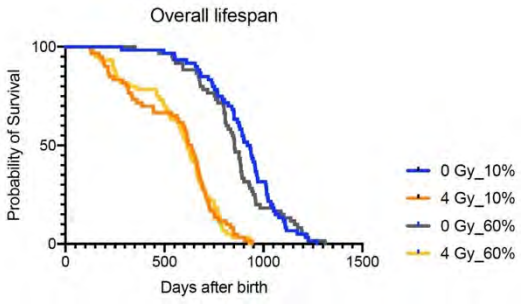


図 1. 照射及び DIO が寿命に対する影響
Shang, Morioka and Kakinuma, Manuscript in preparation

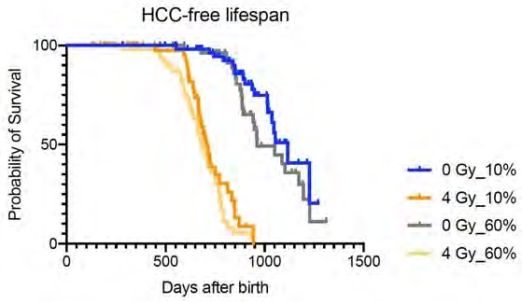


図 2. 照射及び DIO が肝細胞癌発症に対する影響
Shang, Morioka and Kakinuma, Manuscript in preparation

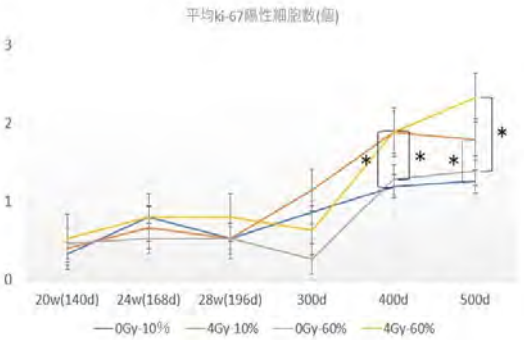


図 3. Ki67 陽性細胞数の経時的変化
$*p < 0.05$

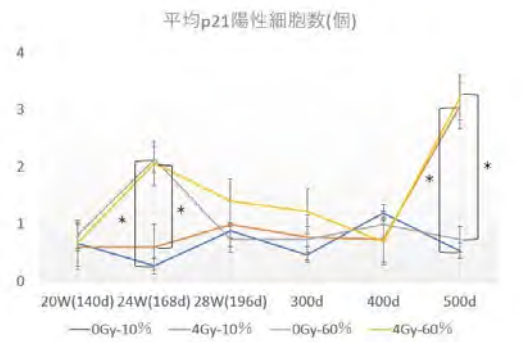


図 4. p21 陽性細胞数の経時的変化
$*p < 0.05$

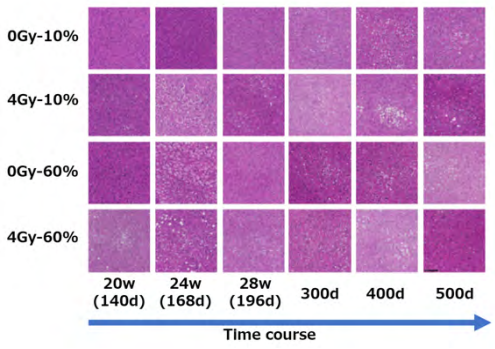


図 5. 短期 DIO の脂肪蓄積にもたらす影響

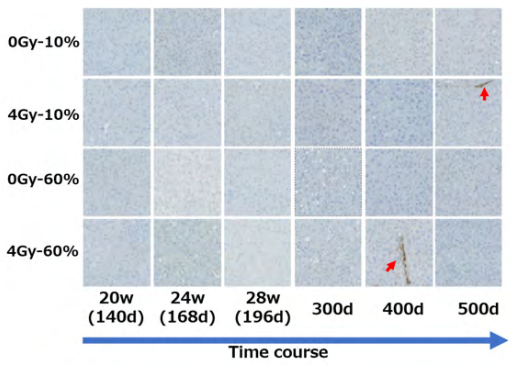


図 6. 短期 DIO の α-SMA 発現量にもたらす影響

LPS 誘発性脳微小出血に対するミクログリアおよびアミロイド病理の寄与

認知症科学、大塚孔介 (No.14)

【目的】マウスにリポ多糖(LPS)を投与し、アミロイド病理とミクログリアが脳微小出血(CMBs)の形成に関与するかを検証する。

【背景】アルツハイマー病(AD)の血管病理の 1 つに CMBs があり、AD 患者の約 24%で見られる [1]。また、LPS を投与したマウスにおける CMBs の形成、脳血管に遊走したミクログリアによる血液脳関門(BBB)の透過性の上昇が既に報告されている [2,3]。

【方法】3 ヶ月齢の C57BL/6J(B6)マウスに vehicle(生理食塩水)、3 mg/kg LPS、10 mg/kg LPS のいずれかを腹腔内投与した。また、AD モデルマウスである *App*$^{NL-G-F}$/*MAPT* ダブルノックイン(*App*: amyloid precursor protein, *MAPT*: microtubule associated protein tau; *App* dKI)マウスの 5 ヶ月齢と 13 ヶ月齢の個体に vehicle、3 mg/kg LPS を投与した。初回投与から 6 時間、24 時間後にそれぞれ 2 回目、3 回目の投与を行い、3 日後に脳の摘出を行った。後日 CMBs の解析とミクログリアの免疫組織化学的な解析を行った。画像解析では Fiji を、統計解析では GraphPad Prism をそれぞれ用いた。

【結果】B6 マウスの体重変化を経時的に計測したところ、LPS による体重減少の効果がみられたが、濃度依存性は見られなかった (**Fig.1A**)。*App* dKI マウスでもコントロール群に比べ LPS を投与したマウスで有意に減少したが、5 ヶ月齢と 13 ヶ月齢のマウスで減少量は同程度だった (**Fig. 1B, C**)。各マウスの CMBs の個数を数えたところ、B6 マウスでは 10

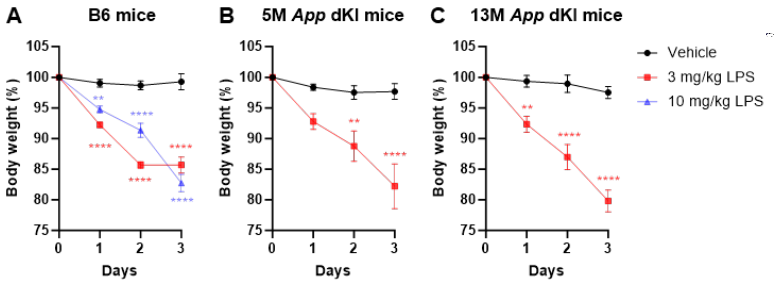


Figure 1. (A) Body weights of B6 mice injected with 3 mg/kg and 10 mg/kg LPS similarly decreased after injections. Mixed-effects model with a Tukey post-hoc test. n=7-9 mice. **(B, C)** LPS reduced the body weight of *App* dKI mice in an age-independent manner. Mixed-effects model with a Šídák post-hoc test. n=3-4 mice. Data were mean±SEM. **p<0.01, ****p<0.0001.

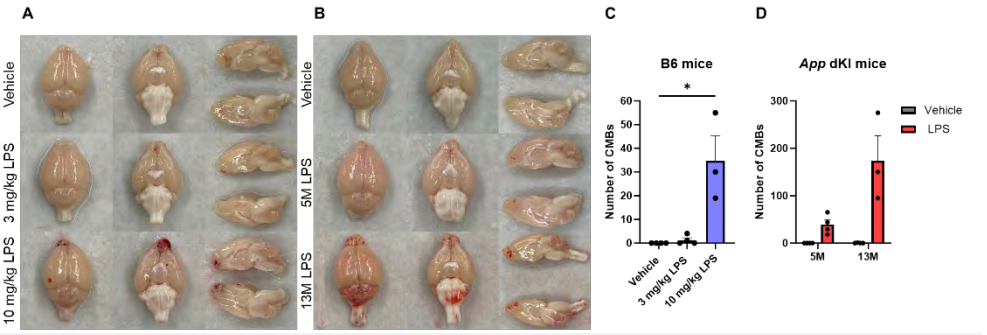


Figure 2. (A, C) B6 mice injected with 10 mg/kg LPS increased the CMB counts. Few CMBs were found in 3 mg/kg LPS-treated mice. Kruskal-Wallis test with a Dunn post-hoc test. n=3-4 mice. **(B, D)** *App* dKI mice injected with 3 mg/kg LPS increased the CMB counts in an age-dependent manner. Multiple Mann-Whitney tests. n=3-4 mice. Data were mean±SEM. *p<0.05.

mg/kg LPSを投与したマウスでコントロール群よりCMBsの個数が有意に多かった。3 mg/kg LPSを投与したマウスでもまばらなCMBsが観察された（Fig. 2A, C）。一方、若齢の *App* dKIマウスでは3 mg/kg LPSを投与したマウスにおけるコントロール群に対するCMBsの増加量はB6マウスに比べ大きく、高齢の *App* dKIマウスではその増加がより顕著であった（Fig. 2B,D）。B6マウスの血管をポドカリキシン抗体、ミクログリアをIba1抗体でそれぞれ染色し、細胞体と血管が接触した血管関連ミクログリアの密度、ミクログリアの細胞体の面積を定量した（Fig. 3A）。10 mg/kg LPSを投与したマウスでは血管関連ミクログリアの割合がコントロール群に比べ有意に高く、細胞体面積も他の2群に比べ大きく増加した（Fig. 3B, C）。

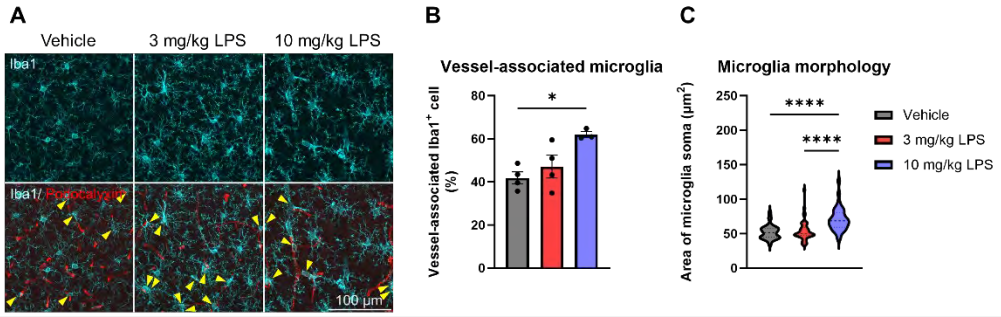


Figure 3. (A) Confocal micrographs of Iba1-positive microglia (cyan) and podocalyxin-positive blood vessels (red) were presented. Yellow arrowheads represent the vessel-associated microglia. (B) The percentage of vessel-associated microglia increased in B6 mice injected with 10 mg/kg LPS. One-way ANOVA with a Holm-Šídák post-hoc test. n=3-4 mice (C) The microglial soma area increased in 10 mg/kg LPS-treated mice. Kruskal-Wallis test with a Dunn post-hoc test. n=36-48 cells. Data were mean±SEM. *p<0.05, ****p<0.0001.

【考察と今後の展望】

B6マウスではLPSの濃度に伴いCMBs形成が増悪し、BBB透過性を上げる血管関連ミクログリアが1つの原因に考えられる。また、3 mg/kg LPSを投与したB6マウスではわずかなCMBsが見られた一方で、若齢の *App* dKIマウスではCMBs形成が増悪し、高齢の同マウスではより顕著な増悪が見られた。この結果はアミロイド病理と加齢がCMBs形成を増悪させたことを示唆する。同月齢のB6マウス、*MAPT* KIマウスで同実験を行い、アミロイド病理とCMBs密度の相関性を解析する必要がある。将来的には脳微小出血の機序を解明し、認知機能の低下を抑制する方法を新たに確立することを目指す。

【参考文献】

1. Gungor, I. *et al.* Frequency and topography of cerebral microbleeds in dementia with Lewy bodies compared to Alzheimer's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **21**, 1101-1104 (2015).
2. Sumbria, R. K. *et al.* A murine model of inflammation-induced cerebral microbleeds. *J. Neuroinflammation* **13**, 218 (2016).
3. Haruwaka, K. *et al.* Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nat. Commun.* **10**, 5816 (2019).

抗生物質投与による腸内細菌叢の乱れと脳内タウリン酸化の関係性

認知症科学分野　近藤佐月（No.33）

【背景】
脳と腸は脳腸相関を介して双方向に作用していること、また腸内細菌叢の乱れである dysbiosis が神経変性疾患に関与していることが多くの研究で示されているが、そのメカニズムの詳細は明らかになっていない。これらのメカニズムの解明は、タウに関連する神経変性疾患の新たな治療標的を明らかにする可能性がある。

【目的】
当研究室ではこれまでに、Germ free（GF）マウスを用いて、dysbiosis が脳腸相関を介してタウのリン酸化を亢進させることを明らかにしてきた。しかし神経変性疾患の病態の進行に関与する dysbiosis は老化または成長に伴って起こる後天的なものであると考えられる。そこで、後天的な dysbiosis によってタウリン酸化が亢進するかどうかを調べるため、抗生物質投与によって dysbiosis を引き起こし、その影響を評価した。

【方法】
Antibiotic-treated マウス（Abx マウス）には抗生物質を含む水を 4 週間与え、Recolonized Abx マウス（AbxR マウス）にはその後普通の水を 4 週間与えた。Control マウス、Abx マウス、AbxR マウスのそれぞれについて、糞便からは DNA を抽出してリアルタイム PCR 法で腸内細菌量を測定し、臓器は形態の観察と重量の測定を行い、大脳皮質におけるタウのリン酸化レベルは Western blotting で評価した。

【結果】
リアルタイム PCR 法により、抗生物質投与により腸内細菌の量が減少することが示された。抗生物質投与後、盲腸の肥大を含む胃腸の異常が観察され、Abx マウスで dysbiosis が生じたことが示唆された。これらの変化は抗生物質投与の中止によって回復した。抗生物質投与によるタウのリン酸化の変化は観察されなかった。

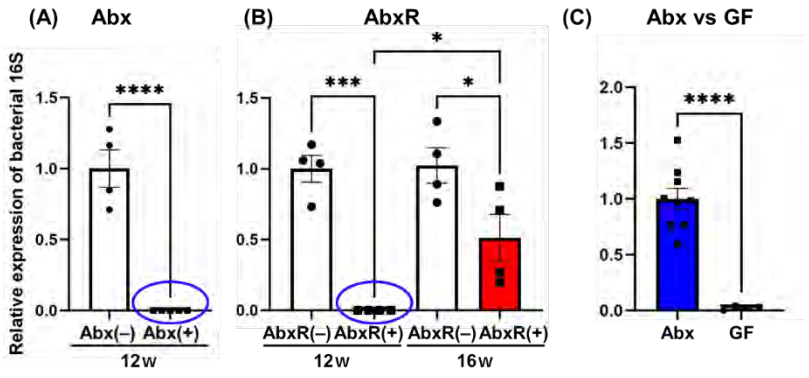


Figure 1. The bacterial load in the feces of Abx, AbxR and control mice

Quantitative PCR was performed using DNA extracted form mice feces and specific primers for amplifying the bacterial 16S rRNA gene. (A), (C) Unpaired t test, Abx(-): n=4, Abx(+): n=5, Abx: n=9, GF: n=4, (B) Mxed-effects model with a Tukey post-hoc test, n=4-5, *p < 0.05, ***p < 0.001, ****p <0.0001

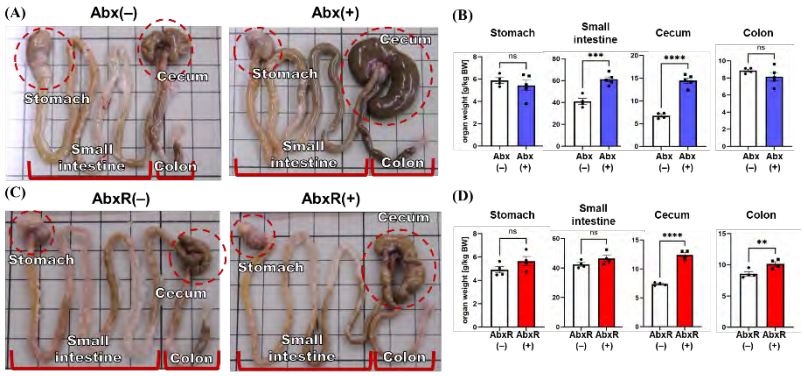


Figure 2. Effects of antibiotic treatment on the morphology of gastrointestinal tract

(A) Representative images of gastrointestinal tract. (B) Weight of organs of control mice and Abx mice. (C) Representative images of gastrointestinal tract. (D) Weight of organs of control mice and AbxR mice. Unpaired t test, Abx(-), AbxR(-), AbxR(+): n=4, Abx(+): n=5, $^{**}p < 0.01$, ***p<0.001, ****p<0.0001

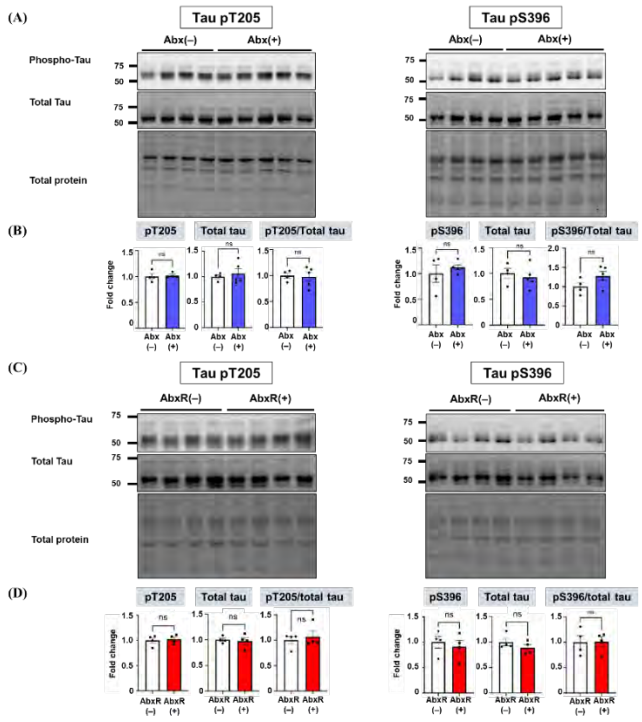


Figure 3. Effects of antibiotic treatment on tau phosphorylation level in the cortex

(A) Representative images of Western blot showing phospho-tau S396 and T205. (B) Quantitative analysis of phospho-tau, total tau and phospho-tau/total tau in control mice and Abx mice. (C) Representative images of Western blot showing phospho-tau S396 and T205. (D) Quantitative analysis of phospho-tau, total tau and phospho-tau/total tau in control mice and AbxR mice.
Unpaired t-test, Abx(-), AbxR(-), AbxR(+):n=4, Abx(+): n=5

【考察】

Abx 投与による dysbiosis は、タウのリン酸化状態には影響を及ぼさなかった。この結果は GF マウスと一致せず、このことから、我々は以下の 2 つのことを考えた。1 つ目は、抗生物質投与によって死滅しなかった腸内細菌がタウリン酸化に関係している可能性である。これについては今後菌叢解析を行い、抗生物質投与によっても残っていた細菌の種類を同定し、その細菌とタウリン酸化の関係について調べてみたいと考えている。2 つ目は、幼少期の dysbiosis がタウリン酸化に関係している可能性である。GF マウスは出生からずっと無菌状態であるのに対し、今回の抗生物質投与は 8 週齢から行ったので、もっと週齢の低い幼少期の腸内細菌の有無がその後のタウリン酸化に関係しているかもしれないと考えた。これについては抗生物質をもっと早い段階から投与する実験を行ってみたいと考えている。

※本基礎自主研究課題は、B35 認知症科学分野 佐野由佳との共同研究テーマである。

抗生物質投与による腸内細菌叢の乱れと脳内タウリン酸化の関係性

認知症科学分野　佐野由佳(No.37)

1．背景

近年、脳と腸が密接に相互に関係しているという脳腸相関が注目されている。その要素の一つである、腸内細菌叢のバランスの乱れ、dysbiosis が様々な生命現象、疾患形成に関与しているという先行研究が多くある。例えば、腸内細菌叢が年齢依存的に変化することから、加齢により生じた dysbiosis が何らかの形で老化に関与すること示唆されている。さらに dysbiosis は神経変性疾患をはじめとした様々な疾患に関係しており、例えばアルツハイマー病患者の腸内細菌組成は健常者と異なり、dysbiosis が起こっていることが報告されている。しかしながら、そのメカニズムの詳細は未だ明らかにされていない。

今回の研究は微小管を安定化させるタンパク質であるタウに着目した。タウは数多くの神経変性疾患に関係しており、リン酸化タウの蓄積によって起こる疾患のことを総称してタウオパチーという。タウオパチーにはアルツハイマー病や大脳皮質変性症などが挙げられますが、どれも未だ治療法のない疾患であり、タウに着目した研究はこれらの治療法確立に大きな役割を果たすだろうと考えられる。

我々の研究室では以前タウのリン酸化に腸内細菌が関連しているかを Germ free (GF) マウスを用いて検討した。GF マウスではタウのリン酸化が亢進することが明らかとなり、タウリン酸化が脳腸連関によって制御されていることが示唆された。

2．目的

Dysbiosis は神経変性疾患の病態の進行に関与するということが分かっている。GF マウスは生まれた時から常に無菌状態であるのに対し、このような dysbiosis は、成長もしくは老化に伴って起こる後天的なものと考えられる。そこで私たちは、後天的に生じる dysbiosis によりタウリン酸化が亢進するのか、抗生物質を用いて dysbiosis を引き起こすことで調べることにした。

3．方法

Control 群は Sample collection まで普通の水で飼育した。Antibiotic-treated mouse、通称 Abx 群には抗生物質を混ぜた水を4週飲ませることで後天的に dysbiosis を生じさせ、Recolonized Abx mouse、通称 AbxR 群においては Abx 群と同様の処置を施したのち、抗生物質を中止して Control 群と同様に 4 週間普通の水を飲ませることで腸内細菌叢を回復させ、その後 Sample collection を行った。糞については、16s primer を用いて細菌 DNA 量の解析、臓器は形態の観察と重量の測定、脳は摘出して大脳皮質のタウのリン酸化を Western blot で解析した。

4．結果

腸内細菌量については、抗生物質投与により Abx マウスで減少し、抗生物質投与中止により AbxR マウスで回復した。消化管の形態については、Abx マウスで異常が見られ、AbxRマウスでその異常が改善した。このことから、腸内細菌叢の変化が消化管の形態変化に関与しているといえる。タウのリン酸化については、Abx マウス・AbxR マウスのいずれにおいても Control 群と差が見られ無かった。このことから、抗生物質投与による

dysbiosis は脳内のタウリン酸化に影響を与えないといえる。

5．考察

今回腸内細菌が減少し、消化管の形態異常が見られたのにも関わらず、タウのリン酸化に変化がなかった原因について考察を行うため、GF マウスとの比較を行った。

	Abx マウス	GF マウス
腸内細菌量	一部残っている	ゼロ
消化管の形態変化	あり	あり
タウリン酸化	変化なし	亢進

GF マウスは腸内細菌が完全にいないのに対し、今回 Abx マウスでは一部の細菌が残っていた。そして、消化管の形態異常についてはどちらでも見られたが、タウのリン酸化については GF マウスでは亢進が見られたのに対し、Abx マウスでは変化が見られなかった。

このことから、我々は以下の 2 つのことを考えました。1 つ目は、抗生物質投与によって死滅しなかった腸内細菌がタウリン酸化に関係している可能性である。これについては今後菌叢解析を行い、抗生物質投与によっても残っていた細菌の種類を同定し、その細菌とタウリン酸化の関係について調べてみたいと考えている。2 つ目は、幼少期の dysbiosis がタウリン酸化に関係している可能性である。GF マウスは出生からずっと無菌状態であるのに対し、今回の抗生物質投与は 8 週齢から行ったので、もっと週齢の低い幼少期の腸内細菌の有無がその後のタウリン酸化に関係しているかもしれないと考えた。これについては抗生物質をもっと早い段階から投与する実験を行ってみたいと考えている。

6．発表について

質疑応答で 3 つ質問を頂いた。

1 つ目はタウのリン酸化に関する脳腸連関のメカニズムは分かっているのか？だった。これについては既報において野生型マウスでは腸内細菌がタウのリン酸化を抑制する物質を出しているという結果が出ている。しかしながらその細菌については特定されていないので、今後菌叢解析等を行う事でこの問題を解決したい。

2 つ目は、GF マウスにおいて SPF マウスから糞便移植を行った場合、タウのリン酸化はどのようになるか？だった。これについては 2021 年基礎自主研修において、床敷交換による馴化、すなわち腸内細菌叢の回復を行っており、その結果タウのリン酸化の亢進が抑制されたという結果が出ている。そのため糞便移植による腸内細菌叢の回復によっても同様の結果が得られると予想される。

3 つ目は、生後すぐからずっと抗生物質を投与する実験は出来ないのか？だった。今回のような自由飲水の方法だと、離乳前のマウスに投与することは難しいが、ゾンデなどで経口投与を行えば可能かもしれない。しかし、生存率の点ではずっと抗生物質を投与し腸内細菌が無い状態では、マウスが死んでしまう可能性も考えられる。

※本基礎自主研修課題は、B35 認知症科学分野　近藤佐月との共同研究テーマである。

ヒスタミン作動性神経と記憶想起の関係性

認知機能病態学　井筒蓮太郎（No.5）

1．背景と目的

わが国では高齢化に伴い、認知症高齢者の割合が増加している。また現在行われている治療は対症療法に過ぎず、根本的な治療法の開発が急がれる。認知症では記憶想起が重度に障害されるため、記憶想起のメカニズムを理解することが認知症の治療法開発につながると考える。過去の研究で、脳内ヒスタミンが記憶想起を促進する因子であることが分かっている。脳内ヒスタミンはヒスタミン作動性神経から放出されるが、ヒスタミン作動性神経活動と記憶想起の関係はまだ詳しく解明されていない。現在本研究室で行われている実験から、条件付けされたマウスで記憶想起がみられるときは、記憶想起の手掛かりとなる音提示の直前にヒスタミン作動性神経活動が上昇することが示唆されている。そこで本研究では、条件付けで音提示の直前にヒスタミン作動性神経を光遺伝学的に抑制し、その記憶想起への影響を検証した。またヒスタミン作動性神経はヒスタミン以外の神経伝達物質も放出することが知られており、ヒスタミン作動性神経の記憶想起の調節にヒスタミンが関与するか検証する実験を行うために、脳内ヒスタミンを減少させたマウスの作成を試みた。

2．方法

ヒスタミン作動性神経選択的に Cre リコンビナーゼを発現する HDC-Cre マウスを用いた。マウスは摂食制限により体重の 80～85％になるように調整しながら実験を行った。音報酬条件付けでは音提示(2 秒間、75dB)の 1 秒後に 10％スクロース水を提示し、記憶想起の指標となるリッキング行動を計測した(Fig1．A)。光遺伝学的手法を用いた実験では、両側の結節乳頭核（TMN)に AAV5-Ef1α-DIO-NpHR3.0-EYFP または AAV5-Ef1α-DIO-EYFP を投与し、投与部位の上方に光ファイバーを埋め込んだ(Fig1．B)。脳内ヒスタミン減少マウスの作成では、α-フルオロメチルヒスチジン（α-FMH，5 μg/5 μℓ)を脳室内投与した。脳室内投与では脳室にカニューレを埋め込んだ(Fig2．A)。脳内ヒスタミンの定量は LC/MS で行い、ピーク面積を測定した(Fig2．B)。

3．結果

音報酬条件付けで音提示の 1 秒前に光照射をしてヒスタミン作動性神経活動を抑制すると、実験を行った 3 匹中 2 匹で音提示によって誘発されるリッキング頻度が減少する傾向がみられた(Fig1．C 右)。コントロールの 2 匹ではほとんど変化が見られないか、リッキング頻度が上昇した(Fig1．C 左)。α-FMH を脳室内投与したマウスでは、溶媒のみを投与したマウスに比べて脳内ヒスタミン量が有意に減少した(Fig2．C)。

4．考察

音報酬条件付けで音提示の直前にヒスタミン作動性神経活動を抑制すると、記憶想起の指標であるリッキング頻度が減少する傾向がみられた。ここからヒスタミン作動性神経と記憶想起の関係性が示唆されるが、今回の実験ではまだ例数が少ないため、今後これを証明するために実験を継続する必要があると考える。またヒスタミン合成阻害薬の投与により脳内ヒスタミン量が減少したことから、阻害薬の効果を確認することが出来た。今後

この脳内ヒスタミン減少マウスを用いて、ヒスタミン作動性神経の記憶想起の調節にヒスタミンが関与するか検証する実験を行う。

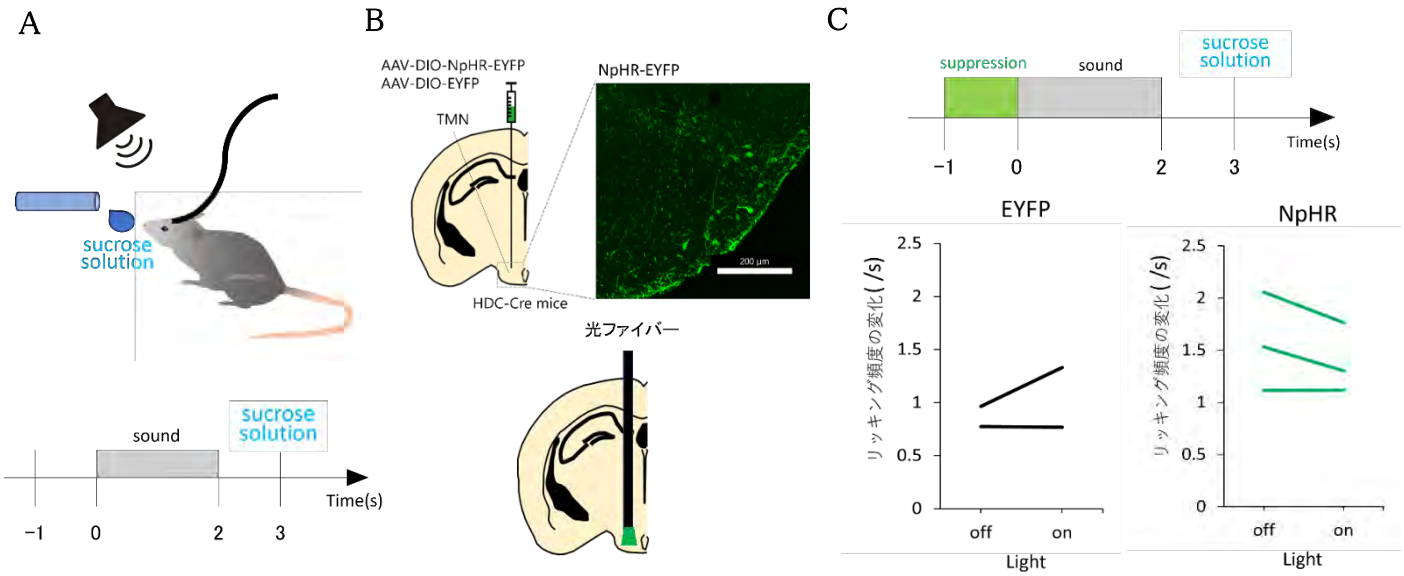


Fig1. (A)音報酬条件付けの実験スキーム (B)Cre リコンビナーゼ依存的に NpHR あるいは EYFP を発現させるアデノ随伴ウイルスベクターを HDC-Cre マウスの TMN に投与する概略図(左) NpHR-EYFP の発現を確認する画像(右) AAV 投与部位の上方に光ファイバーを埋め込む概略図(下) (C)ヒスタミン作動性神経活動を抑制した場合の音提示によって誘発されるリッキング頻度

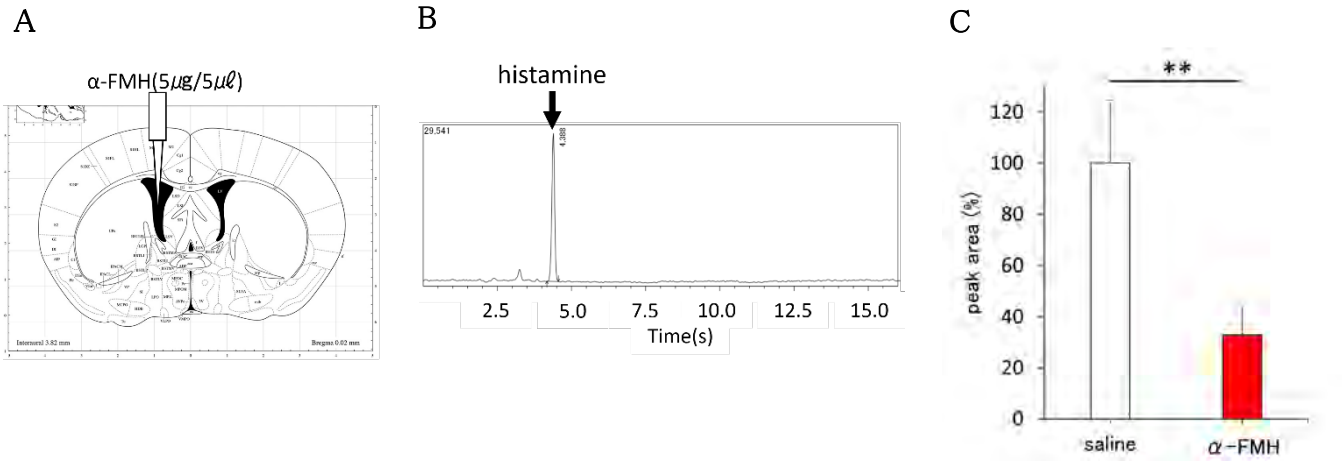


Fig2. (A)ヒスタミン合成阻害薬を脳室内投与する概略図 (B)LC/MS によって得られた脳内ヒスタミンのピークの一例 (C)溶媒あるいはα-FMH を投与した時の、LC/MS によるヒスタミンピーク面積の、溶媒投与群の平均値に対する割合。(** p<0.01, スチューデントの t 検定, n=5, 6)

5. 参考文献

(1) Kamei C et al. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 1993, 16, 128-132
(2) Nonaka A et al. Brain Research. 2013, 1493, 19-26
(3) Xiao Yu et al. Neuron. 2015, 87, 164-178

慢性痛モデルマウスに観られる脳の神経回路の変化

認知機能病態学　寺西悠人　No.58

背景

世界中の 30% 以上の人が慢性痛に苦しんでいる。 慢性痛は持続するだけでなく、認知機能や情動機能にも影響を与えるため、慢性痛が脳の神経回路に変化を引き起こす可能性がある。

目的

本研究では慢性痛モデルマウスの大脳皮質広域の活動を明らかにすることを目的とした。

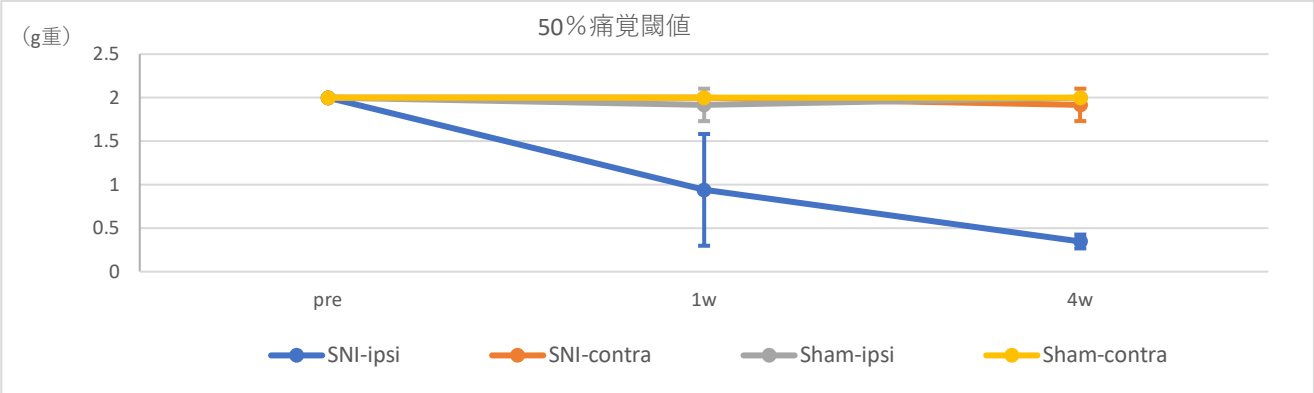
方法

慢性痛モデルマウスを作成するためにマウスの左足に Spared nerve injury（SNI、総腓骨神経と脛骨神経を結紮する）手術を行った。痛覚閾値の低下を確認するために手術前、術後１週間、術後４週間に Von Frey 試験を行った。皮質広域のカルシウムイメージングを行うためにマウスの眼窩静脈叢に AAVPHP.eB-hsyn-soma-jGCaMP8m を導入し、大脳皮質広域で soma-jGCaMP8m の発現誘導した。還流固定し脳を摘出しスクロース置換した後薄くスライスし顕微鏡で GCaMP の発現を確認した。頭部固定するめにチャンバーフレーム取り付け手術と頭蓋骨コーティング手術を行った。頭部固定しスクロース報酬刺激、エアパフ嫌悪刺激を与えた時の活動、自発活動の jGCaMP 蛍光強度の上昇を頭蓋骨越しに測定した。SNI 群と Sham 群の自発活動から皮質領域間の FC を算出した。クロース水報酬刺激、エアパフ嫌悪刺激による各領域の応答を確認した。470nm と 405nm の画像に分離し、補正と dF/F 算出を行い、脳領域ごとのシグナルを算出した。

結果

Von Frey 試験

図１



フィラメントの最大値を2g重とし小さいフィラメントから順に大きくしていき初めて反応した前後二回の試験から 50％痛覚閾値を算出した。SNI 群 6 匹と Sham 群 6 匹の平均を出した。SNI 群の手術した足側の痛覚閾値が低下した。

刺激を与えた時のカルシウム蛍光強度を解析し、DF/F をトライアルごとに分けコントラストの最大を 0.15 に設定し図 2. 図 3. を得た。

図２.



Sham　　SNI

スクロース報酬刺激

図３.



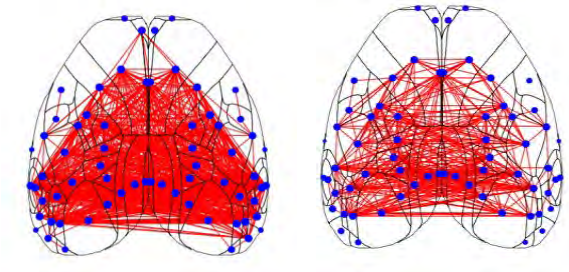
Sham　　SNI

エアパフ嫌悪刺激

SNI 群と Sham 群に刺激を与えた時の大脳皮質の応答の差はなかった。

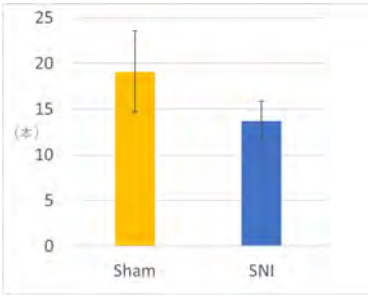
自発活動時の各 ROI の蛍光変化から相関係数を計算し、ROI を各領域の重心に置き、相関係数が 0.8 を超える ROI を結び図４. をだした。Sham 群 4 匹 SNI 群 4 匹の各 ROI から出ている線の合計の平均を図 5 で示した。

図４.



Sham　　SNI

図５.



SNI 群の各 ROI から出ている線の合計は低下する傾向が見られた。

考察

慢性痛モデルマウスに報酬・嫌悪刺激を与えたときに大脳皮質領域の応答に変化が見られなかった。

慢性痛モデルマウスでは自発活動時脳領域の相関が減少傾向であった。

慢性痛が情動機能に影響を与える可能性があることより、情動に関与する領域の神経回路の変化を見ていく。

参考文献　Naoki Yamaguchi et al.10.1126/sciadv.abj5586.

Cichon,J et al.10.21769/BioProtoc2777.

Tcf23 遺伝子は、マウスにおける脱落膜化と分娩に関与する

病態モデル医学分野　薫愛佳(18)

1.目的
Tcf23 遺伝子の in vivo における機能を明らかにする

2.背景
Tcf23 とは bHLH ドメインを有する転写調節因子である。Tcf23 は他の bHLH ドメインをもつタンパクと結合することで、機能的に不活性なヘテロダイマーを形成しその結合蛋白の機能を阻害する。過去の研究により、Tcf23 はヒト子宮間質細胞の脱落膜化を促進するということが明らかになっている。しかし、Tcf23 遺伝子の *in vivo* における機能については未だ解明されていない。

3.方法、結果
まず、Tcf23 が発現する場所を調べるためにマウスの子宮において免疫染色を行った結果、平滑筋や子宮間質細胞に Tcf23 が発現していることが分かった。
次に、第1～3エクソンを欠失させることで Tcf23 遺伝子欠損マウス作製した。DNA、RNA、タンパクそれぞれのレベルで、作製した Tcf23 遺伝子欠損マウスが問題ないことを確認した。
更に、妊娠に関与するホルモンであるエストロゲンとプロゲステロン処理することで、子宮間質細胞の脱落膜化を観察した。妊娠の着床期に、ホルモンの影響を受けた子宮内膜の間質細胞は脱落膜細胞へと分化する。胚着床のために必要なこの分化を脱落膜化といい、妊娠成立において重要な役割を担っている。Tcf23 遺伝子を持つマウスでは、間質細胞の核が拡大し、細胞が敷石状の形態に変化する正常な脱落膜化が観察された。一方で、Tcf23 遺伝子欠損マウスの間質細胞ではそのような変化は見られず、細胞は線維芽細胞の形態のままだった。このことは、Tcf23 遺伝子欠損マウスでは子宮間質細胞の脱落膜化が抑制されることを示唆している。脱落膜化マーカーの IGBFP1（インスリン様成長因子結合タンパク）と RRL（プロラクチン）を用いても同様の結果が得られた。
Tcf23 遺伝子欠損マウスでは脱落膜化が正常に起きないため、妊娠中期には胎児の死亡と吸収をもたらすことも確認できた。遺伝子欠損マウスの子宮では所々に黒く細くなっている部分が観察された。これは胎児が死亡し吸収された箇所であり、そのほかの箇所にも血液が付着しているなどの異常が見られた。野生型マウスでは全体の 10％の胎児が死亡、吸収されたのに対して、遺伝子欠損マウスでは 30％以上の胎児が死亡、吸収されていた。
Tcf23 欠損マウスは分娩開始が遅れることもわかった。一般的に、マウスは交配後 19 日目で分娩が開始する。野生型マウスは 15 匹中 14 匹が 19 日までに分娩を開始した一方で、遺伝子欠損マウスは 15 匹中 2 匹のみ 19 日までに分娩が開始され、残りの 13 匹では分娩開始または自然分娩が見られなかった。
妊娠 13.5 日目と 19 日目のマウスの子宮平滑筋を HE 染色、マッソントリクローム染色し、観察した。（図1）HE 染色を見ると野生タイプのマウスは全体的に厚みがあり平滑筋がしっかりしていて子宮筋層が発達しているのに対し、TCF23 遺伝子欠損マウスは平滑筋が全体的に薄くなっていた。マッソントリクローム染色では、筋層が赤く、コラーゲン繊維が青く染まる。野生タイプのマウスは厚みがあり、しっかり発達しているのに対し、TCF23 遺伝子欠損マウスでは筋層の乱れが見られ全体的に薄っぺらくなっていた。同様に妊娠 13.5 日目と 19 日目のマウスの子宮平滑筋を検出し染色する、スムースマッスルアクチン、ダピ染色を行ない観察した。(図2)野生タイプのマウスで

は平滑筋がしっかり繋がっているのに対し、Tcf23 遺伝子欠損マウスでは平滑筋は所々途切れており、薄くなっていることが確認できた。
最後に、子宮の発達に必要な遺伝子群の発現を調べた。コネキシン 43、プロコラーゲン 4A1、マトリックスメタロプロテアーゼ 2 を調べたところ、野生タイプに比べて Tcf23 遺伝子欠損マウスは全て発現が低下していた。これらのことから TCF23 遺伝子欠損マウスでは、子宮平滑筋層の発達が不全であることが分かった。

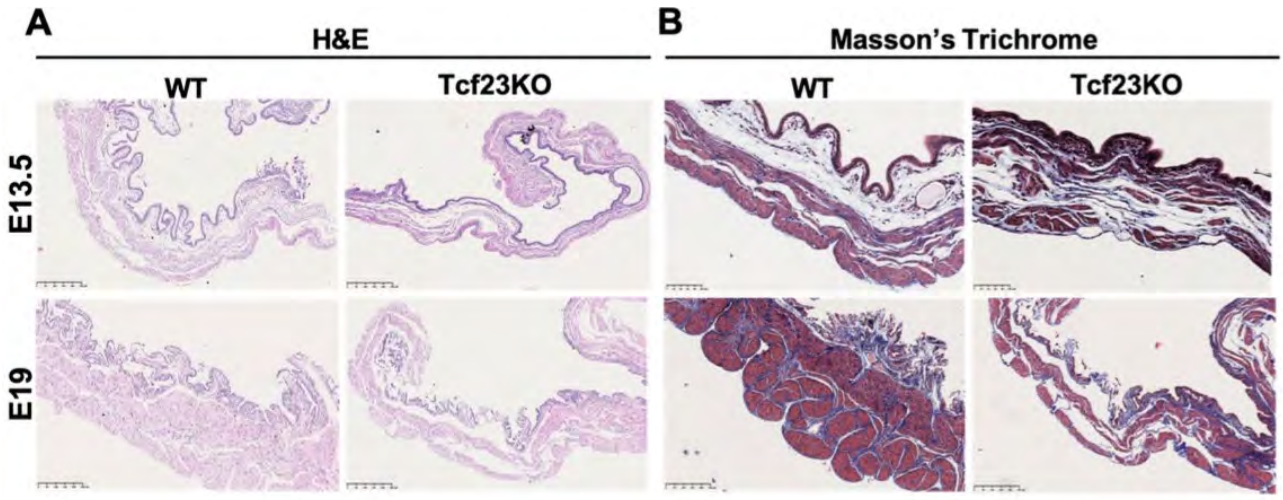


図1

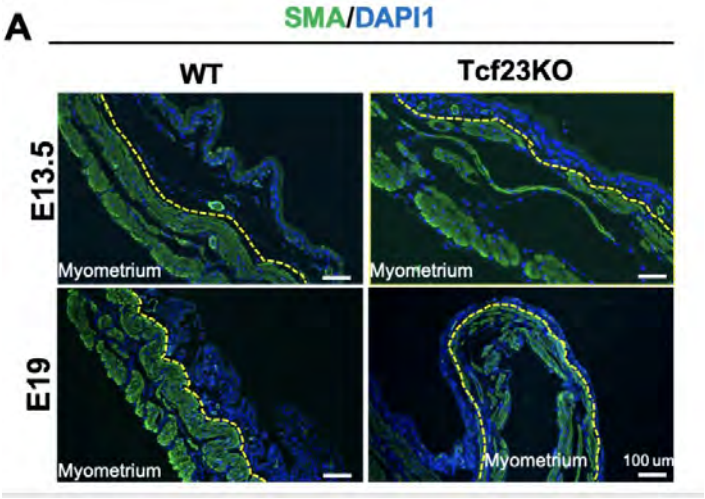


図2

4.まとめ、考察
今回の研究で、TCF23 遺伝子はマウスの子宮において、間質細胞と平滑筋に発現し、間質細胞から脱落膜への変化である脱落膜化と平滑筋の発達に重要な役割を果たし、分娩の開始に関与していることが分かった。今後の課題として、Tcf23 が結合してその役割を抑制する転写因子や、分娩開始に関わるホルモン異常の有無の解明などが挙げられる。

Tcf23 遺伝子は、マウスにおける脱落膜化と分娩に関与する

病態モデル医学分野　舟橋櫻子　 70 番

1. 目的

Tcf23 遺伝子の *in vivo* における機能を明らかにする。

2. 背景

過去の研究で、*in vitro*では Tcf23 遺伝子がヒト子宮間質細胞の脱落膜化を促進することが分かっている。ヒト子宮間質細胞を脱落膜化処理すると、 Control においては、敷石上の形態、核の拡大、 IGFBP1 やプロラクチンといった脱落膜化マーカーの上昇がみられ、正常な脱落膜化が見られるものの、 Tcf23 をノックダウンすると、間質細胞の形態は変化せず、脱落膜化マーカーの上昇もみられなかったことから、 Tcf23 が減少すると脱落膜化が抑制されることが分かった。

3. 方法

① まず、第１～３エクソンを欠損させることで Tcf23 遺伝子欠損マウスを作成した。 WB により、 DNA 、RNA、タンパクそれぞれのレベルで欠損マウスに問題がないか確認した。

② エストロゲン、プロゲステロン処理を行い、子宮間質細胞の脱落膜化を観察した。また、 IGBFP1 やプロラクチンといった脱落膜化マーカーの変化等も調べた。

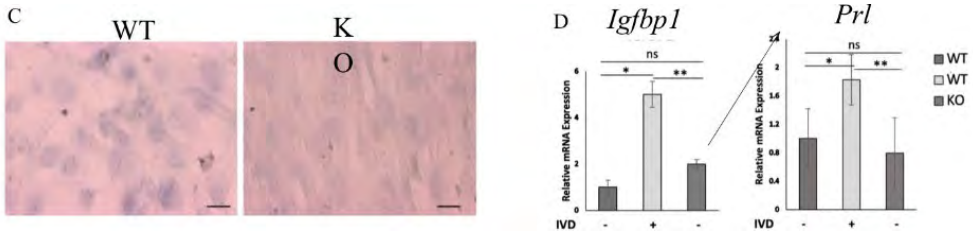
③ 妊娠13.5日目と19日目のマウス子宮平滑筋において、 HE 染色、マッソントリクローム染色、スムースマッスルアクチン、ダピ染色をし、観察した。

④ 子宮平滑筋の機能に重要な遺伝子群の発現を観察した。

4. 結果

① Tcf23 欠損マウスを作製したところ、RNA、タンパクレベルともに、 Tcf23 の発現は見られず、期待通りのマウスが作製できた。

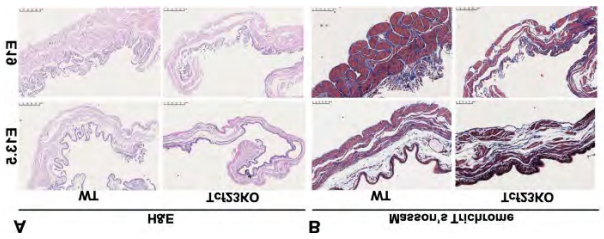
② 子宮間質細胞を単離しホルモン処理したところ、野生型マウスでは、核が拡大し、細胞形態が敷石状に変化した。一方で、 Tcf23 欠損マウスでは線維芽細胞の形態のままであり、変化は認められなかった。脱落膜化マーカーにおいても同様で、野生型マウスでは IGFBP1 、プロラクチンが上昇したが、 Tcf23 欠損マウスではそれらの上昇は見られなかった。



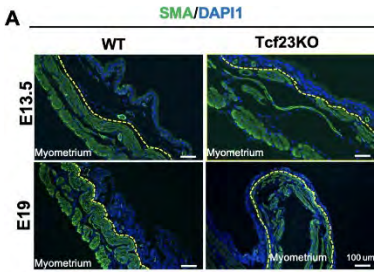
さらに、 Tcf23 欠損マウスでは正常な脱落膜化が起こらないため、妊娠中期には胎児の死亡・吸収が見られた。具体的には、野生型では全体の 10% 、欠損マウスでは 30% 以上の胎児が死亡・吸収された。

また、 Tcf23 欠損マウスは分娩開始が遅れることも明らかになった。マウスは交配後平均19日で分娩が始まるが、19日までに分娩を開始したのは、野生型では15匹中14匹、遺伝子欠損マウスでは、15匹中 2 匹という結果になった。また、その 2 匹を除く遺伝子欠損マウスはそもそも分娩開始や自然分娩がみられなかった。

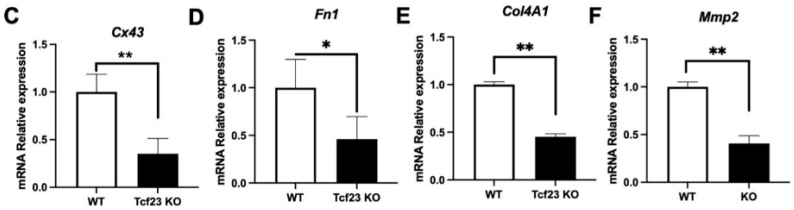
③　子宮内膜の HE 染色では、野生型の平滑筋は全体的に厚みがあり筋層の発達がみられる一方で、遺伝子欠損マウスでは全体的に薄い平滑筋が観察された。そして、マッソントリクローム染色では、野生型では厚みのある、欠損マウスでは構造が乱れた薄い筋層（赤色部）がみられた。



スムースマッスルアクチン、ダピ染色では、野生型と比較して、所々断片化した薄い筋層が遺伝子欠損マウスでみられた。



④　子宮内膜の遺伝子発現解析では、コネキシン43、フィブリノネクチン 1 、プロコラーゲン 4A1 、マトリックスメタロプロテアーゼ 2 全てにおいて、野生型に比べて Tcf23 遺伝子欠損マウスでは発現が低下していた。



5.　考察

Tcf23 遺伝子は脱落膜化や平滑筋層の発達、分娩に関与する。今後の課題としては、 Tcf23 はどの転写因子と結合するのか、分娩においてホルモン異常はみられるのか、またヒトの婦人科系の疾患等との関連の有無などがあげられる。

TCF23 遺伝子は、マウスにおける脱落膜化と分娩に関与する。

病態モデル医学分野　島田望羽　41

「Tcf23 遺伝子は、マウスにおける脱落膜化と分娩に関与する」というテーマについて研究した。

Tcf23 とは bHLH ドメインを有する転写調節因子である。bHLH ドメインを有するタンパク同士が二量体を形成すると、DNA と結合することでその機能が活性化する。しかし、Tcf23 はほかの bHLH ドメインをもつタンパクと結合すると、機能的に不活性なヘテロダイマーを形成し、その結合蛋白の機能を阻害する。

過去の研究では、Tcf23 はヒト子宮間質細胞の脱落膜化を促進するということが明らかになっており、Tcf23 をノックアウトすると、間質細胞の脱子葉反応が抑制され、IGFBP1、プロラクチンといった脱子葉マーカーの発現が低下した。

そこで、本研究では、Tcf23 遺伝子の *in vivo* における機能を明らかにすることを目的とした。

マウスの子宮において免疫染色を行うと、平滑筋や子宮間質細胞に Tcf23 が発現していた。子宮内で分離した細胞別に見てもこれは明らかであった。

次に第１～３エクソンを欠失させて Tcf23 遺伝子欠損マウス作製した。DNA、RNA、タンパクそれぞれのレベルで作製した Tcf23 遺伝子欠損マウスに問題がないことを確認した。

また、妊娠に関与するホルモンであるエストロゲンとプロゲステロン処理することで、子宮間質細胞の脱落膜化を観察した。妊娠の着床期に、ホルモンの影響を受けた子宮内膜の間質細胞は脱落膜細胞へと分化する。胚着床のために必要なこの分化を脱落膜化といい、妊娠成立において重要な役割を担っている。Tcf23 遺伝子を持つマウスでは、間質細胞の核が拡大し、細胞が敷石状の形態に変化して、正常な脱落膜化が観察された。一方で、Tcf23 遺伝子欠損マウスの間質細胞ではそのような変化は見られず、細胞は線維芽細胞の形態のままだった。このことは、Tcf23 遺伝子欠損マウスでは子宮間質細胞の脱落膜化が抑制されることを示唆している。

Tcf23 遺伝子欠損マウスでは脱落膜化が正常に起きないため、妊娠中期には胎児の死亡と吸収をもたらすことも確認できた。

さらに、Tcf23 欠損マウスは分娩開始が遅れることもわかった。妊娠 13.5 日目と 19 日目のマウスの子宮平滑筋を HE 染色、マッソントリクローム染色、さらに、子宮平滑筋を検出し、染色するスムースマッスルアクチン、ダピ染色を行ない、観察した。どの染色においても、野生タイプのマウスでは平滑筋に厚みがあり、しっかりと繋がっているのに対して、Tcf23 遺伝子欠損マウスでは平滑筋はところどころ切れ、薄くなっていることが確認できた。これらから、Tcf23 遺伝子欠損マウスでは、子宮平滑筋層の発達が不全であることが分かった。

また、子宮の発達に必要な遺伝子群である、細胞接着因子のコネキシン 43 およびフィ

ブリノネクチン 1、4 型コラーゲンをコードするプロコラーゲン 4A1、組織修復などの働きを持つマトリックスメタロプロテアーゼ 2 を調べたところ、野生タイプに比べて Tcf23 遺伝子欠損マウスは全て発現が低下した。これらから、子宮平滑筋層の機能に重要な遺伝子の発現が Tcf23 遺伝子欠損マウスでは下がっていることが分かった。

今回の研究では、Tcf23 遺伝子はマウスの子宮において、間質細胞と平滑筋に発現し、間質細胞から脱落膜への変化である脱落膜化と平滑筋の発達に重要な役割を果たし、分娩の開始に関与していることが分かった。

Tcf23 はどの転写因子と結合してその役割を抑制するのか、ということと、分娩開始に関わるホルモン異常の有無についてが今後の課題である。