2024 年度

基礎自主研修報告書

名古屋市立大学医学部

目　　次

<実験病態病理学>

1. CD63は乳がん腫瘍微小環境において遠隔移転を抑制する・・・・・・・・・・・・・・・・1
河村　賛太

2. 超音波内視鏡下で採取された微小膵組織に応用可能な膵浸潤がん診断法の確立・・・・・2
佐竹　良太

3. ラット前立腺発癌モデルに対するルチンの化学予防効果・・・・・・・・・・・・・・・・・3
松本　祥太朗　弓桁　千裕

4. 膵炎および膵癌における ACTN4 発現の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4
宮島　拓臣

5. 人工 CRISPR-Cas 複合体の DNA 切断活性を評価するシステムの構築・・・・・・・・・5
大山　世來　高橋　征吾

<免疫学>

6. Sdf4 is potentially involved in aging-related immune phenotype in regulatory T cells・・・・6
服部　蒼生

7. Cellular senescence of B cells and dendric cells in the liver of aged mouse・・・・・・・・・7
細田　桃花

8. 乳腺と肺における廊下細胞の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8
森本　理子

<細菌学>

9. タンパク質合成阻害剤による NADase 産生の増加・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9
伊藤　舞　伊藤　佑真

10. SpeB の糖鎖は好中球の浸潤を抑制する・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10
渡部　悠介

11. A 群レンサ球菌における酸化ストレス応答に関与する転写調整因子の ChIP アッセイによって同定された遺伝子の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11
今井　孝明　山本　茉莉

<薬理学>

12. Pannexin3 と P2X4 受容体を介した骨芽細胞文化制御機構の解明・・・・・・・・・・・・12
棚橋　祐太　野田　光史

13. 血圧レベルの静水圧による心筋細胞への作用メカニズムにおける TRPC3 の役割・・・・13
伊藤　倫佳　小杉　高秀

<ウイルス学>

14. 一過性に EBV が感染した胃がんの解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14
佐藤　一輝

14. 一過性に EBV が感染した胃がんの解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15
横山　琴弓

14. 一過性に EBV が感染した胃がんの解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16
深見　洸太

<公衆衛生学>

15. 幅広い心理特性に対する血清尿酸値のメンデルランダム化研究・・・・・・・・・・・・17
青山　琉眞

16. 幅広い心理特性に対する決戦尿酸値のメンデルランダム化研究・・・・・・・・・・・・18
荒木　丈二

17. イヤホン・ヘッドホンが張力に与える影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19
小日向　章吾

18. 若年時の「痩せ」と将来の骨折リスクに関するコホート研究・・・・・・・・・・・・・・20
花村　柚葉

19. 飲酒量の増加に伴う死亡率の上昇・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・21
山本　匠太

<医療統計・データサイエンス>

20. 骨肉腫における死亡に関する予後因子探索研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22
福井　翔太

21. 膵神経内分泌腫瘍患者における死亡に関する予後因子探索研究・・・・・・・・・・・・23
森田　大翔

<法医学>

22. Forensic STR marker genotype might be associated with phenotype・・・・・・・・・・・・24
髙宮　一真

23. 解剖前スクリーニング検査としての死後 CT の利点とその問題点についての検討・・・・25
尾畑　秀成

24. ヒト組織中マイクロプラスチックの顕微鏡による検出―予備実験―・・・・・・・・・・・26
椙村　むつみ

<地域医療学>

25. ICU 患者のせん妄発症率、発症の関連因子および ICU 外活動による影響の検討・・・・・27
梅原　杏　菊地　柾人　柴田　麻帆　長坂　凛太郎

26. COVID-19 による白内障手術患者の受診行動の変化の検討・・・・・・・・・・・・・・・28
魚住　晋太朗　北川　友哉　白幡　真彗　柳原　万葉　吉村　啓

<環境労働衛生学>

27. 甲状腺ホルモン(遊離型/タンパク結合型)測定法の開発過程とその結果・・・・・・・・・29
青山　葵

28. 除草剤尿中代謝物 MS2スペクトルライブラリの構築と一般集団への適応・・・・・・・30
川口　博史

29. 化学物質曝露と健康状態のバイオマーカーとしての内因尿中代謝物パネルの作成・・・31
坂井　玲音

30. 医学生の一日習慣塩分摂取量の推定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32
白木　颯太郎

31. n-デカンの職業曝露限界の提案：75ppm・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33
福岡　真大

<医学・医療教育学>

32. 医学生のストレスレベルの推定と、ストレスレベルとストレス要因の関連・・・・・・34
足立　梨沙

33. 名古屋市立大学　医学生における学習意欲の要因について・・・・・・・・・・・・・・・35
柴田　愛子

34. The differences of medical students' motivation for each year・・・・ ・・・・・・・・・36
鈴木　春緋

<細胞生理学>

35. ラット尾部精巣上体管の自発収縮の制御機構・・・・・・・・・・・・・。・・・・・・・・37
井土　健陽

36. Characterisation of the single-channel properties of the CPVT-linked mutation
RyR2-R169Q・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・38
澤田　宗良

37. 暴行痛み刺激によるラットの大都庁運動の変化における性差・・・・・・・・・・・・・39
榊　かりん

38. Enhanced current density and phosphatidylinositol 4.5-bisphosphoate（PIP_2）
sensitivity of TMEM16Achannels with a mutation associated with Moyamoya disease・・40
橘　遼太郎

39. Roles of stress hormones and mechanosensitive ion channel in bladder urothelial ATP
release ・・41
古田　優菜

40. Possible crosstalk between ER stress and peptidyl arginine deiminase(PAD2)・・・・・・42
関　菜月

＜脳神経生理学>

41. TRPV3とANO1の物理的相互作用に涵養するアミノ酸の同定・・・・・・・・・・・・・43
若山　栞太

42. うま味・甘味物質の投与による延髄孤束核中間部でのc-Fos発現の比較・・・・・・・・44
山脇　愛理

43. パーキンソン病モデルマウスにおける抗うつ薬ノルトリプチリンの効果・・・・・・・45
岩田　仁成

＜細胞生化学>

44. Sf3b1のノックダウンはXenopus胚の脳にアポトーシスを引き起こす・・・・・・・・・46
大川　ひなの 篠崎　遥奈

45. 活性型および制御型のGL13転写因子を発現するiPS細胞の作成・・・・・・・・・・・47
岸本　浩尚

46. ジュベール症候群関連遺伝子ノックアウトiPS細胞の樹立・・・・・・・・・・・・・・・・48
伊藤　成洋

47. 一次繊毛と細胞膜におけるGPR161の機能解明のためのiPS細胞の作製・・・・・・・・・49
藤井　祐宇

<統合解剖学>

48. 迷走神経刺激がうつ様賞状と腸管炎症を改善させる・・・・・・・・・・・・・・・・・・50
岡林　浩輝

49. 顕微授精マウスにおける社会行動異常の脳内メカニズム解析・・・・・・・・・・・・・51
小柴　拓実　齋藤　親良　冨田　翔

<機能組織学>

50. 軌道炎症喘息マウスの医療運動障害に対するタウロデオキシコール酸（TDCA）の効果・・52
岩永　秀　馬場　誠弥

51. The role of acid-sensing ion channel 3 in itch generation・・・・・・・・・・・・・・・・53
大島　清奈　小田　実那美

<神経発達・再生医学>

52. 新生ニューロンは障害組織が持つ誘引活性により傷害部へ移動する・・・・・・・・・・54
川瀬　薫

53. アルツハイマー病モデルマウスにおける成体海馬新生ニューロンのシナプス成熟・・・・55
花木　康太郎

54. 免疫細胞におけるインスリン受容体発現と慢性炎症の関連・・・・・・・・・・・・・・・56
横山　丈真

<認知症科学>

55. SH-SY5Y細胞におけるタウアイソフォームの発現パターンについて・・・・・・・・・・57
野倉　麻由

56. 低体温からの回復期におけるリン酸化タウの変化とグリンパティックシステムの関係・58
武田　拓朗

57. マウス脳内出血モデルにおけるCXCL10の病態生理学的機能の探索・・・・・・・・・・59
嘉戸 駿介

<神経毒性学>

58. 新規抗がん剤パルミトイルピペリジノピペリジンの鶏卵漿尿膜法を使った血管新生疎外を評価する至適タイミング・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・60
伊原　啓太

59. サイズと表面修飾に依存するシリカナノ粒子のミクログリア細胞に対する毒性・・・・61
小出　一貴

60. 放射線照射と短期間高脂肪餌のマウス肝への影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・・62
児玉　奈緒

61. 異なる3種類の改修法に基づくエクソソームの特性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・63
長谷田　光喜

<病態モデル医学>

62. 胚操作によるラット生殖技術の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・64
河合　莉湖

62. 胚操作によるラット生殖技術の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・65
西村　小町

62. 胚操作によるラット生殖技術の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・66
村上　海斗

<腫瘍・神経生物学>

63. ZFTA型上衣種の増殖関わるYAP1シグナルの解明・・・・・・・・・・・・・・・・・・・67
泉　響子

64. SHH型髄芽腫における*Fosl2*の機能と神経刺激による発現制御機構・・・・・・・・・・・68
岩田　浩希

<認知機能病態学>

65. ヒスタミン神経の自発的な活動における左右両側での同期・・・・・・・・・・・・・・69
松本　玲香

66. ヒスタミン神経の活性化による記憶想起促進のメカニズム・・・・・・・・・・・・・・70
大野　深智

67. *SCN2A*遺伝子変異による自閉スペクトラム症関連行動障害における側坐核と
背側終脳の役割の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・71
西田　和佳奈

<神経発達症遺伝学>

68. *STXBP1*遺伝子変異によるてんか発症における視床下核の役割の検討・・・・・・・・・・72
坪沼　葉音

69. CRISPR-ON/ｄCAS9を用いたtxbp1遺伝子活性により、大田原症候群モデルマウスの
てんかんと攻撃行動が改善した・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・73
齊藤　正成

66. 脱細胞化された精密切断肺スライスでは細胞外マトリックスが保たれる・・・・・・・・74
本田　泰良

CD63 は乳癌腫瘍微小環境において遠隔転移を抑制する

実験病態病理学、河村賛太、34

目的

CD63 はテトラスパニンファミリーに属する膜タンパク質で、細胞外小胞等に発現しており、細胞の移動、増殖などの機能を担うと考えられている。しかしながら、腫瘍微小環境（tumor microenvironment, TME）における CD63 の機能についてはほとんどわかっていない。我々は、腫瘍細胞に CD63 が高発現している乳癌患者は有意に予後が良好であることを独自に見出してきた。本研究の目的は、CD63 が良好な患者予後に寄与する機序を、特に腫瘍関連マクロファージ（tumor-associated macrophage, TAM）との関連に着目して分子生物学的に明らかにすることである。

方法

547 症例のヒト乳癌組織アレイを用いて免疫組織染色法による検討を行った。TAM は腫瘍抑制性マクロファージ（M1）と腫瘍促進性マクロファージ（M2）の2群のおおまかに分類される。本研究では、マクロファージ全体の標識として CD68、M2 の標識として CD163 を用いた。M1 については CD68―CD163 で算出した。蛍光二重染色法の解析は共焦点顕微鏡を用いて行った。統計解析は EZR を用いて行った。本文の図では腫瘍細胞に発現する CD63 を T63、TAM に発現する CD63 を M63 と表記した。

結果

腫瘍細胞における CD63 の発現強度に基づいて乳癌患者を2群に分けたところ、高発現群では遠隔転移が有意に抑制され（表1）、遠隔転移の有無で2群にわけたところ遠隔転移陰性群では有意に CD63 が高発現しており（図1）予後良好の主要な要因と考えた。転移が抑制される機序を明らかにするため TAM に着目した。CD63 高発現群の TME では M1、M2 いずれも増加していた（図2）が、遠隔転移の有無で 2 群にわけたところ M1、M2 ともに群間に有意な差はみられなかった（図3）。一方で TME に CD63 を発現するマクロファージ様の細胞が一定数みられ、CD63 高発現群で有意な増加がみられた（図4）。また CD63 陽性細胞は遠隔転移陰性群に多く（図5）、CD63 陽性細胞が多い群は有意に予後が良好であった（図6）。さらに CD63 陽性細胞がどのような細胞か調べるために蛍光二重染色を行った。その結果 CD63 陽性細胞は CD68 陽性、CD163 陰性を示したことから、M1 の一種であると考えられた。（図7）

結論

CD63 高発現群の TME では M1 の一種である CD63 陽性マクロファージが増加することで遠隔転移が抑制され、予後が良好となると推察された。

T63高発現/低発現群の遠隔転移の割合

	全患者	T63の発現量		p値
		Low	High	
患者数	430(100%)	259(60.2%)	171(39.8%)	
遠隔転移				
なし	333(77.4%)	187(72.2%)	146(85.4%)	0.0016
あり	48(11.2%)	39(15.1%)	9(5.3%)	
不明	49(11.4%)	33(12.7%)	16(9.4%)	

表1

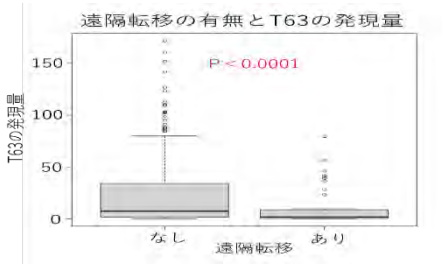
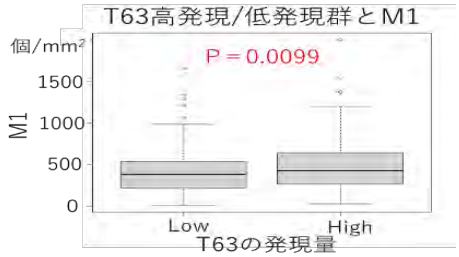


図1



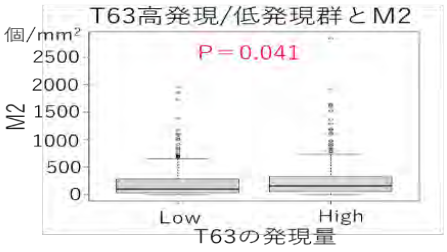
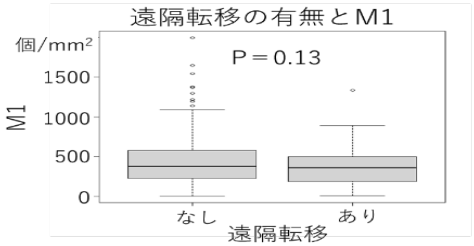


図2



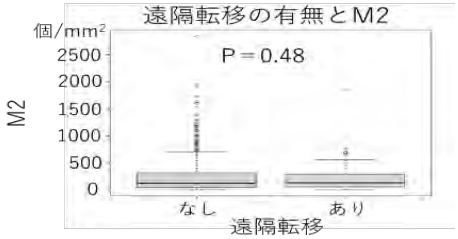
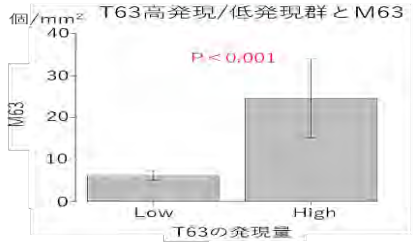


図3



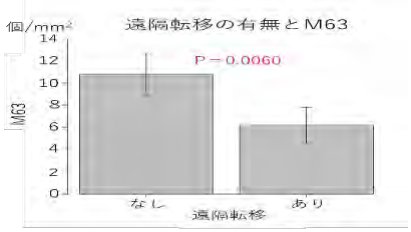


図4

図5

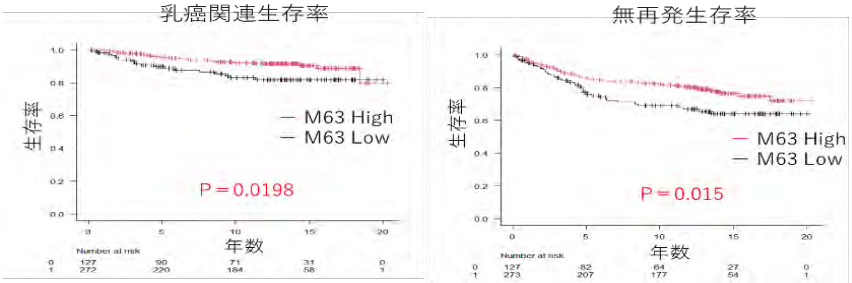


図6

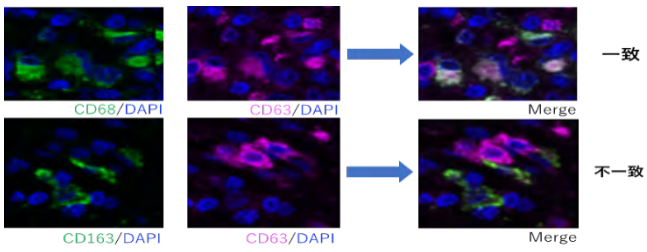


図7

超音波内視鏡下で採取された微小膵組織に応用可能な膵浸潤がん診断法の確立

実験病態病理学　佐竹良太(No.42)

現在、膵病変に対しての検査として、侵襲性の低い超音波内視鏡下穿刺吸引法(Endoscopic UltraSound-guided Fine-Needle Aspiration;EUS-FNA)が広まりつつある。EUS-FNA では内視鏡の先から超音波を発し、超音波によって病変を確認することができる。そして病変部に対して、針を刺すことで、病変部の組織を回収する。よって、こうして回収される組織は断片化されており小さい。FNA で得られた検体において線維性間質に膵管上皮の異型細胞が浸潤している像が観察されれば膵浸潤がん(Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma;PDAC)の診断は可能だが、断片化された膵管異型上皮のみが確認される像の場合、HE 染色で診断を行うのは困難である。そこで断片化された微小検体でも PDAC を診断できるような方法を確立するための研究を行うことにした。

PDAC は正常膵管から、PanIN-1、PanIN-2、PanIN-3 を経て発癌するという機構が知られており、その段階で p16 の欠失、p53 の欠失、SMAD4 の欠失などが起きるとされる。そこで p16、p53、SMAD4 の免疫染色を行い、発現の様子を調べることにした。また多くの腫瘍マーカーとして知られる GATA3 の免疫染色も行なった。さらに、p16 の近傍に存在し、p16 と共欠失しやすい MTAP について、通常診断業務では共欠失を調べるための FISH は困難なため、そのサロゲートマーカーとして MTAP の免疫染色も行なった。

臨床情報とともに遠隔転移のない PDAC のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)標本を 127 例集め、HE 染色に加え、GATA3、p16、MTAP、SMAD4、p53 の免疫染色を行い、組織アレイを作成した。そしてその組織アレイを光学顕微鏡下で評価した。

正常な膵管における発現パターンは GATA3 陰性、p16 陽性、MTAP 陽性、SMAD4 陽性、p53 野生型である。今回作成された標本では、GATA3 陽性のものが 32/127 例(25%)、p16 陽性のものが 97/127 例(76%)、MTAP 陽性のものが 38/127 例(30%)、SMAD4 陽性のものが 76/127 例(60%)、p53 変異型(過剰発現、完全欠失、細胞質性)のものが 53/127 例(42%)であった。一方で、GATA3 陰性、p16 陽性、MTAP 陽性、SMAD4 陽性、p53 野生型の PDAC の標本は 3/127 例(2%)であった。

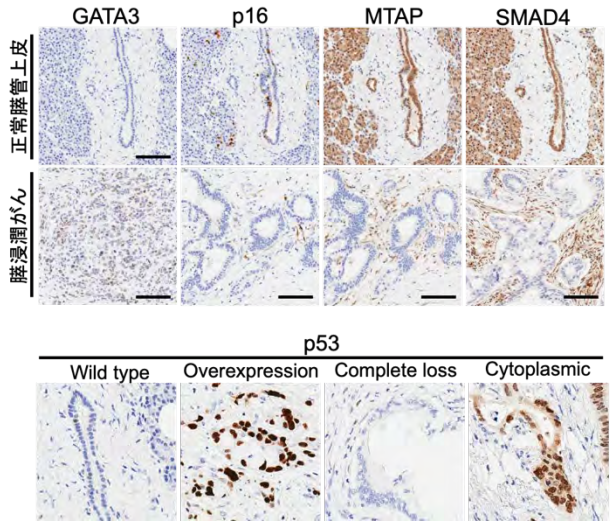


図 1　免疫染色の発現パターン

次に以上の発現パターンと臨床情報を EZR で統計解析した。単変量解析として、フィッシャーの正確検定、t 検定を行なったが、多くは有意差が出なかった。

遺伝子発現における全生存期間の有意差を調べるために Kaplan-Meier 曲線を描き、ログランク検定を行なったが、いずれの遺伝子発現においても有意差はみられなかった。そこで Cox 比例ハザードモデルによって生存期間における多変量解析を行なった。多変量のモデルには単変量解析で解析した性別、年齢、腫瘍サイズ、発生部位、病期、分化度、リンパ節転移、切除断端に加え、5 つのマーカーの発現パターンを組み込んだ。すると病期、分化度、GATA3 が残り、それらが独立して予後に影響を与えることがわかった。今回のモデルにおいては、GATA3 ではハザード比が陰性に比べて陽性で低いため、陰性に比べて陽性の場合に予後が良かった。(**表 1**)

表 1　Cox 比例ハザードモデルの結果

Model		HR (95% C.I.)	*P* -value
pT stage (reference pT1)			
	2	1.23 (0.66-2.31)	0.5105
	3	1.67 (0.83-3.34)	0.1506
	4	6.04 (1.68-21.77)	0.0060
GATA3 (reference negative)			
	Positive	0.57 (0.33-0.98)	0.0414
Differentiation (reference Well dif.)			
	Moderately dif.	2.11 (1.18-3.79)	0.0123
	Poorly dif.	2.95 (1.67-5.22)	0.0002

以上より、GATA3、MTAP、p16、SMAD4、p53 の免疫染色の組み合わせによって、98%の PDAC については診断可能であったが、2%の症例では診断が不可能であった。よって今後その診断不可能であった症例に対して有効なマーカーの検索が求められるとともに、膵炎による反応性病変や PanIN における発現パターンも確認する必要がある。

また Cox 比例ハザードモデルによって、GATA3 はリスク因子と考えられたが、その他の要因が関係している可能性も否定しきれない。そのため GATA3 の分子機構の解析も行い、予後との関連性についても検討していきたい。

ラット前立腺発がんモデルに対する化学予防効果

実験病態病理学　77 番　松本祥太朗
87 番　　弓桁千裕

1. 目的および背景

前立腺癌は欧米において発生頻度の高い癌であるが、近年は日本でも増加傾向で、日本人男性の癌患者の中で罹患者数は第 1 位である。リスク因子としては、年齢、人種、家族歴、食生活や肥満などが挙げられ、日本における罹患者数増加の原因として食生活の欧米化が考えられる。我々は以前、ドクダミ抽出物（HCT）にラット前立腺がん抑制効果があることを報告しており、HCT の主要な構成成分としてルチンを同定した〔1〕。ルチンは活性植物由来のフラボノイドであり、蕎麦や柑橘類など、天然の野菜や果物に多く含まれる。本研究では、ルチンの前立腺癌化学予防効果について検証した。

2. 方法

SV40T 抗原をプロバシンピロモーター制御下に導入して、生後 15 週にはオスの 100％がアンドロゲン依存性に前立腺癌を発がんするトランスジェニックラット（TRAP）を動物モデルとして用いた。6 週齢のオスの TRAP に通常の餌を 8 週間与えたコントロール群と、通常の餌に 0.04％ルチンと 0.2％ルチンを混合して 8 週間与えた 0.04％ルチン投与群と 0.2％ルチン投与群の 3 群に分けた。体重や臓器重量の測定を行い、解剖して摘出された前立腺の腹葉と側葉に HE（ヘマトキシリンエオジン）染色を行い、腫瘍病変における PIN と腺癌の割合と腺癌の発生頻度の評価を行った。また、免疫染色によりアポトーシス（TUNEL）、増殖活性（Ki67）、AR 発現量、SV40 発現量の定量解析を行った。また、前立腺側葉において、Western Blot 法を用いたタンパク質発現解析を行った。コントロール群 4 匹と 0.2％ルチン投与群 4 匹の TRAP の前立腺側葉サンプルを用いて、RNA シークエンスを用いた遺伝子解析を行った。

3. 結果（図・表）

コントロール群、0.04％ルチン投与群、0.2％ルチン投与群に分けた TRAP モデルの体重と臓器測定の結果を表 1 に示す。

表 1

	コントロール群	0.04％ルチン投与群	0.2％ルチン投与群
ラット個体数（匹）	12	13	13
体重（g）	600.3±46.3	607.2±53.0	612.9±47.2
臓器重量（g）			
肝臓	18.76±2.33	19.54±3.29	19.99±2.63
腎臓	2.90±0.24	3.02±0.34	3.09±0.32
前立腺	0.31±0.02	0.30±0.04	0.31±0.05

TRAP の体重と臓器重量に、群間の有意差は認められなかった。

次に、3 群の TRAP の前立腺腹葉と側葉における腺癌の発生頻度を表 2 に示す。

表 2

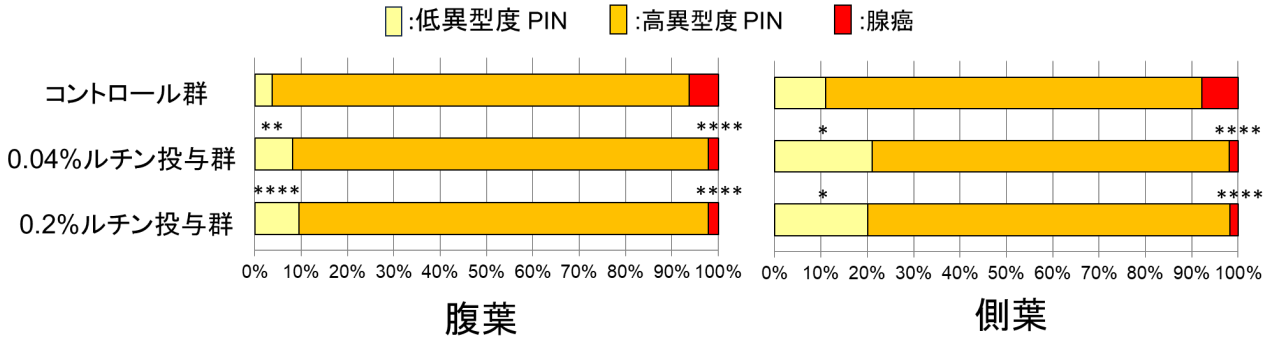
	個体数(匹)	腹葉	側葉
コントロール群	12	12(100%)	12(100%)
0.04%ルチン投与群	13	13(100%)	9(69%)
0.2%ルチン群	13	13(100%)	8(62%)*

*:p＜0.05(コントロール群と比較)

3 群全ての TRAP モデルで腺癌が発生した。前立腺側葉では 0.04%ルチン投与群と 0.2%ルチン投与群で腺癌の発生頻度が減少し、0.2%ルチン投与群では有意に減少した。

TRAP の前立腺腹葉と側葉において、腫瘍病変における低異型度 PIN・高異型度 PIN・腺癌の構成割合を、図 1 と図 2 に示す。

図 1　　図 2

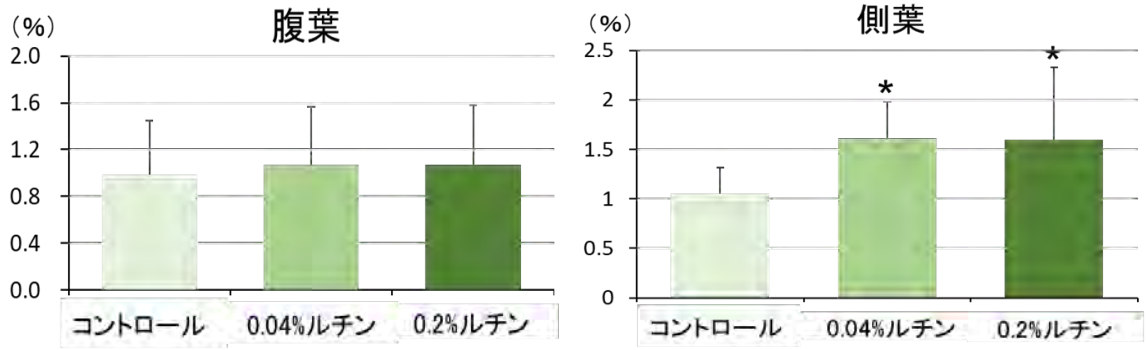


＊：p<0.05，**:p<0.01，****:p<0.0001(コントロール群と比較)

前立腺腹葉と側葉において、0.04%ルチン投与群と 0.2%ルチン投与群において、腫瘍病変における腺癌の割合は有意に減少し、低異型度 PIN の割合は有意に増加した。

TRAP の前立腺腹葉と側葉における TUNEL 陽性細胞の定量解析の結果を図 3 と図 4 に示す。

図 3　　図 4



*: p<0.05(コントロール群と比較)

前立腺腹葉において、3 群間で TUNEL 陽性細胞数に有意差は認められなかった。一方で、前立腺側葉において、0.04%ルチン投与群と 0.2%ルチン投与群で有意に TUNEL 陽性細胞数が増加し、アポトーシスの増加を示した。

TRAP の前立腺腹葉と側葉における Ki67 発現量の定量解析の結果を図 5 と図 6 に

示す。

図 5

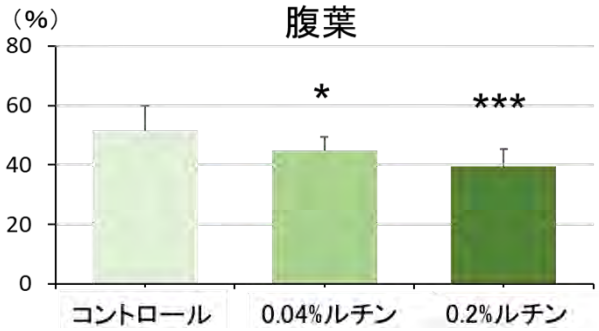
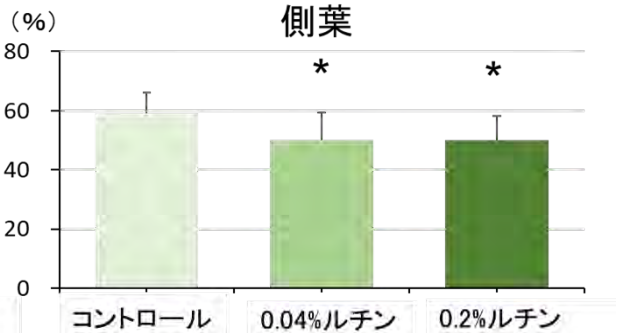


図 6



*: p<0.05, ***: p<0.001(コントロール群と比較)

前立腺腹葉と側葉において、0.04%ルチン投与群と 0.2%ルチン投与群では Ki67 の陽性率は有意に減少し、細胞増殖活性の減少を示した。

TRAP の前立腺腹葉と側葉における AR 発現量の定量解析の結果を図 7 と図 8 に示す。

図 7

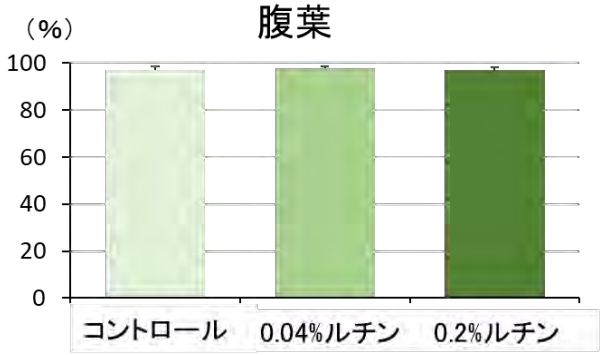
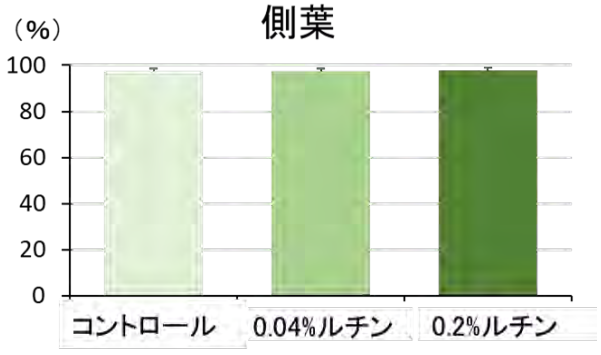


図 8



前立腺腹葉と側葉において、AR 陽性率に群間の有意差は見られず、AR 発現量に対する影響は認めなかった。

TRAP の前立腺腹葉と側葉における SV40 発現量の定量解析の結果を図 9 と図 10 に示す。

図 9

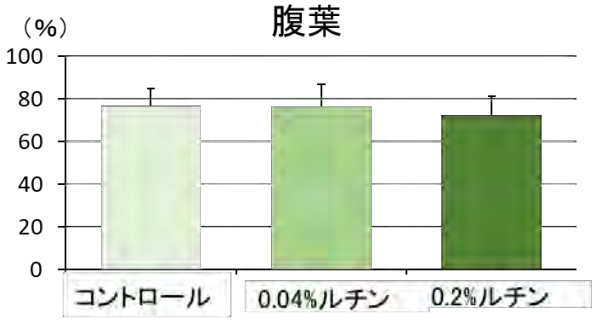
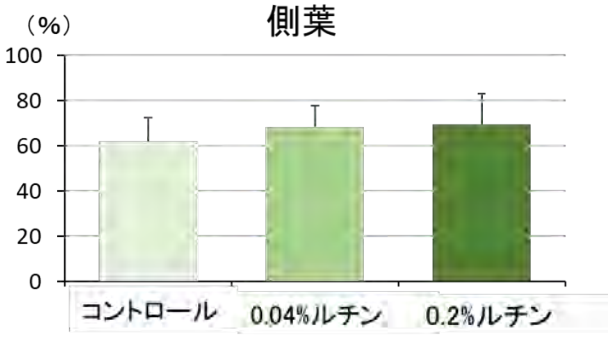


図 10



前立腺腹葉と側葉において、SV40 陽性率に群間の有意差は見られず、SV40 発現量に対する影響は認めなかった。

TRAP の前立腺側葉において、Western Blot 法を用いたタンパク質発現定量分析の

結果を図 11 と図 12 に示す。

図 11

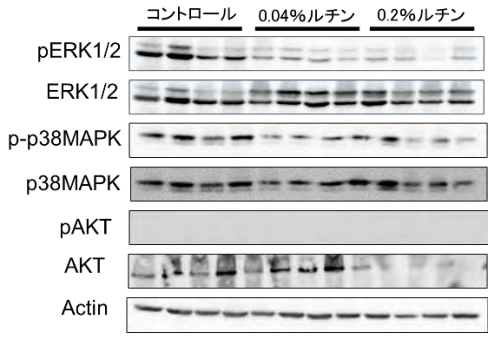
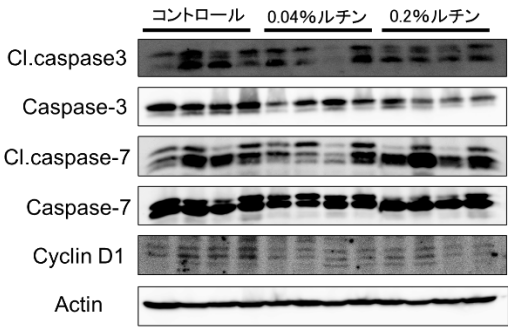


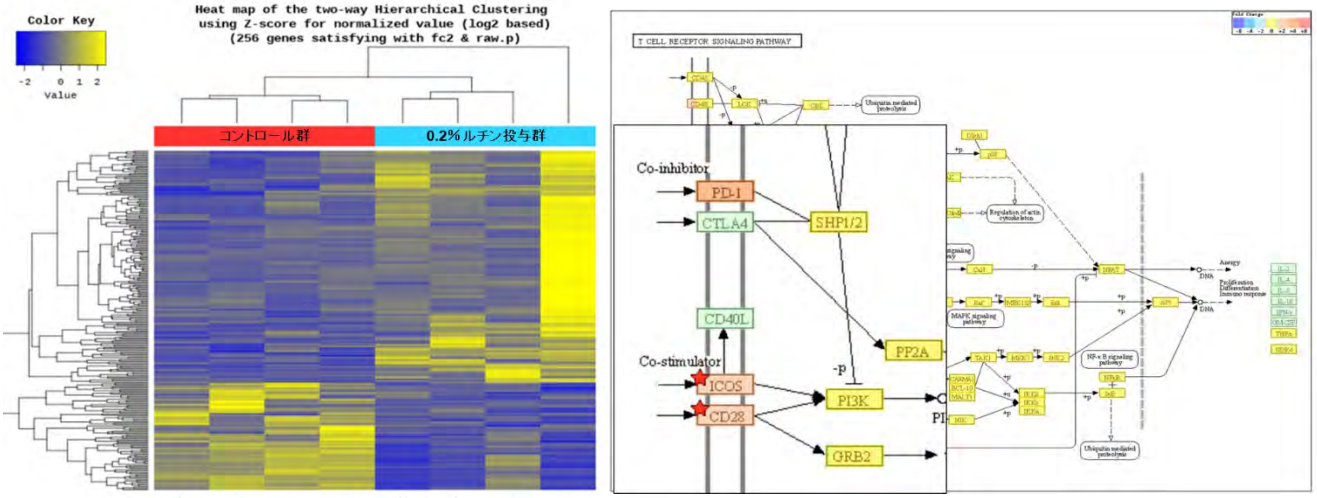
図 12



0.04%ルチン投与群と 0.2%ルチン投与群では、細胞増殖シグナル経路に関わるタンパク質である pERK、p-p38MAPK、CyclinD1 の発現低下が認められた。

前立腺側葉におけるコントロール群と 0.2%ルチン投与群の遺伝子発現変化を、RNA シーケンシングで解析した結果を図 13 に示す。

図 13



コントロール群に対して 0.2%ルチン投与群では、免疫チェックポイント分子である CTLA4 の発現量の減少と CD28 の発現量の増加が認められた。

4. 考察

ルチンは細胞増殖シグナル経路を抑制することで、前立腺発がん抑制効果を示した。また、ルチンが免疫チェックポイント分子に作用し、前立腺癌発がん抑制に関与している可能性がある。HCT の前立腺発がん抑制効果を調べた先行研究の結果と比べて、ルチン単独ではアポトーシスへの効果が少なく、また、AR 発現に対する効果は見られなかった。従って、HCT に含まれるルチン以外の成分がアポトーシス促進や AR 発現低下を促している可能性がある。

5. 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.

膵炎および膵癌におけるACTN4発現の検討

実験病態病理学　宮島拓臣(No.79)

背景

膵癌のリスクファクターとしては、喫煙・飲酒などの嗜好や糖尿病・肥満などの生活習慣病、家族歴などがあげられるが、その中でも慢性膵炎のリスクレベルは約15倍と他のリスクファクターよりもかなり高い。慢性膵炎を組織で観察すると、腺房細胞が管状構造に化生したADMや、高円柱上皮からなる前癌性病変であるPanINが見られ、最終的に膵癌が発生する。そのため、ADMやPanINといった初期の変化を捉える事は重要である(図 1)。そのため本実験では膵炎のモデルマウス(KC)とセルレイン(CL)を用いて、正常膵のWild-type(Wt)、ADMを発生するWt-CL群、広くPanINとADMをみるKC-CL群、線維化を伴う慢性膵炎を再現したKC-CL(day33)群を作成した。さらにそれぞれの膵組織からwholeやリン酸化タンパクを抽出しLC-MS/MSでプロテオーム解析を行った。その結果を基にクラスター解析、エンリッチメント解析をおこなったところ細胞骨格関連タンパクが慢性膵炎の進行と共に上昇していた。その中でも今回は、リン酸化、wholeいずれにおいても上昇をみるActin-binding群の一種であるACTN4に着目した。ACTN4の役割としてはアクチン線維を束状化し、アクチンリアレンジメント(再配置)をおこすことで細胞運動に関与している。そのためADMやPanINといった形態変化にも重要と考えられる。また細胞運動に関与するためがん転移・浸潤と関連していると言われており、実際に乳がんや大腸癌などとの関連性も報告されている。

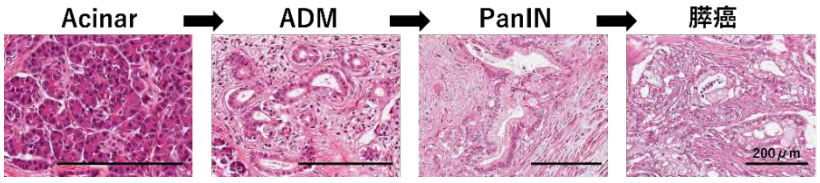


図 1.膵組織の組織学的変化

①ACTN4の発現が実際にマウスやヒト膵炎組織のADM,PanINで上昇しているのかを調べ、膵炎初期変化に関わっているか検討する。

②ヒト膵癌組織においてのACTN4の発現の違いを検討する。

結果(図・表)

①マウス膵炎組織

KC+CLマウスモデルの免疫組織化学染色において、ADMやPanINがAcinar細胞に比べて、ACTN4の細胞膜発現が有意に上昇していた(図 2)。先ほどの4種類のマウスでも免疫染色を行い、同様に発現面積を測定したところ、慢性膵炎の進行と共にACTN4の発現面積が上昇していることが分かった(図 3)。

また、ウェスタンブロッティングにおいても、ACTN4やその関連タンパクであるCollagen-1,Integlinα6,Rac1,βActinやリン酸化タンパクのp-ACTN4(S160)の発現が上昇していた。(図 4)

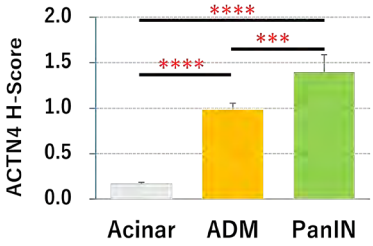


図 2. KC-CL(day3)のACTN4の発現

**** P<0.0001, *** P<0.001, *P<0.05
(Tukey's multiple comparisons test)

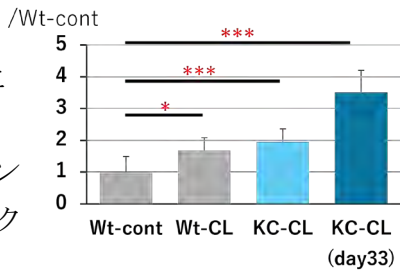


図 3. ACTN4の発現面積

*** P<0.001, * P<0.05
(Dunnett's multiple comparisons test)

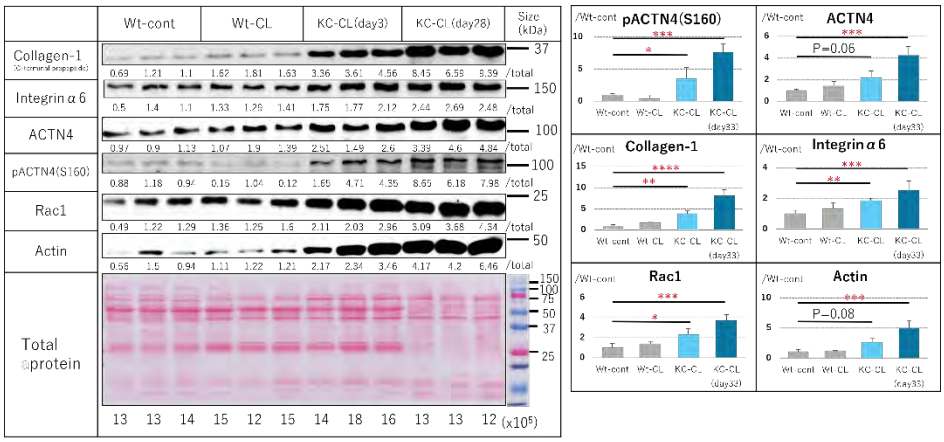


図 4. タンパク解析

**** P<0.0001, *** P<0.001, ** P<0.01, * P<0.05
(Dunnett's multiple comparisons test)

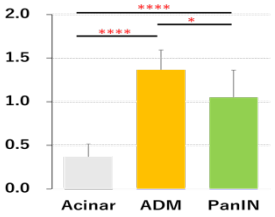


図 5. ヒト膵炎の ACTN4 発現

**** P<0.0001, * P<0.05
(Tukey's multiple comparisons test)

②ヒト膵炎組織

ヒト慢性膵炎の手術検体を用いた免疫組織化学的解析(n=11)においても、ADM や PanIN が Acinar 細胞に比べて、ACTN4 の発現が有意に上昇していた。(**図 5**)

③ヒト膵癌組織

ヒト膵癌の手術検体から組織アレイ 107 例に対して ACTN4 の免疫染色を行い、陰性～正常膵管の陽性程度を示す Score0.1 を ACTN4-low 群、それ以上の発現のある Score2.3 を ACTN4-high 群とした(**図 6**)。ACTN4-high,low での臨床病理学的な特徴を調べたところ、ACTN4 発現が高い膵癌患者は分化度が低いことが分かった。(**表 1**)

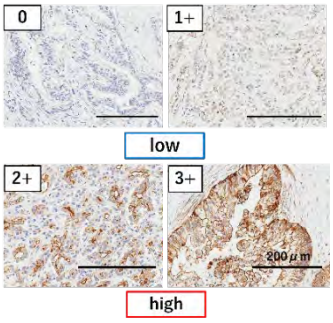


図 6. ACTN4 Score (0～3+)

	ACTN4 high	ACTN4 low	P value
n	63	44	
male/female	40/23	29/15	
Age(median)±SD	69±8.2	71±8.7	
Differentiation			<0.01
well	17	12	
mod	24	8	
por	21	22	
muc	0	2	
Ana	1	0	
TS(Size(mm))			
1(0-20)	12	13	
2(21-40)	41	20	
3(41-60)	9	11	
4(>61)	1	0	
Size±SD	30±14	28±13	
Location			
頭部	8	13	
体部	45	27	
尾部	9	4	
頭部+尾部	1	0	
N(+)	40	26	
M(+)	3	0	

表 1. ACTN4 と他因子の関連

また、ACTN4 と予後の関係性を調べた。すると、ACTN4 の発現が高い膵癌では disease-free-survival(DFS)、overall survival(OS)が共に予後不良であることが分かった。(**図 7,8**)

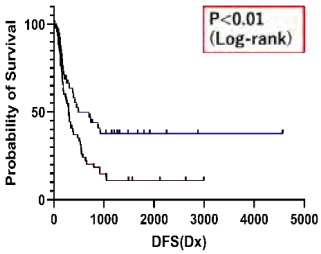


図 7. Disease-Free-Survival (DFS)

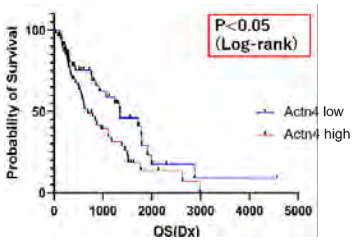


図 8. Overall Survival (OS)

考察

以上の結果から今回慢性膵炎の進行に伴い、マウス、ヒト検体の ADM や PanIN において ACTN4 やその関連タンパクが上昇していることが分かり、これらの発現変化が腺房細胞からの形態変化に関与している可能性があることが分かった。また、ACTN4 は膵癌において予後不良マーカーになり得る可能性があり、やはり浸潤などに関与している可能性がある。

人工 CRISPR-Cas 複合体の DNA 切断活性を評価するシステムの構築

実験病態病理学　大山世來（No.21）　高橋征吾（No.54）

背景

CRISPR-Cas9 は RNA ガイドヌクレアーゼであり、主に目的遺伝子を不活性化するためやノックアウトするために用いられる。CRISPR-Cas は標的細胞のゲノムに DNA を挿入するためにも使用できる。それは遺伝病を治すことに使えるが、過去に行われた標的に治療用 DNA を挿入する実験はすべて失敗している。これは CRISPR-Cas が標的 DNA を切断する際に治療用 DNA が物理的に存在しない場合、治療用 DNA は標的部位に挿入されないためであった。その後、標的 DNA の CRISPR/Cas 切断後の HDR 修復効率を高めるために、治療用 DNA の末端に転写因子認識 DNA 配列を付加したがこれも失敗した。治療用 DNA は DNA を切断する CRISPR-Cas9 複合体にほとんど結合しなかったからである。また、Cas9 に転写因子 DNA 結合ドメインを融合することで HDR 効率が向上することが分かっているが、治療用 DNA を用いた HDR 効率は依然として低い。

目的

そこで、DNA 挿入の効率を治療に使用できるレベルにまで高めるために、標的部位に挿入される DNA と結合したときにのみ標的 DNA を切断する CRISPR-Cas 複合体を工学的に作製することにした。今回は、その前段階として様々な CRISPR-Cas 複合体の DNA 切断活性を評価するシステムを構築した。

方法

標準的なプラスミド構築技術と PCR クローニングを用いて、sgRNA-CRISPR-Cas 複合体の切断活性を測定するシステムを構築した。

結果

ネオマイシン耐性遺伝子に、ATG 開始コドンを含む上流の sgRNA-CRISPR-Cas 標的部位を付加した。このプラスミドを pSTRKE-ATG-ATG-Neo と呼ぶ。pSTRKE-ATG-Neo でトランスフェクトに成功したヒト細胞は G418 に耐性を示したが、pSTRKE-ATG-ATG-Neo でトランスフェクトした細胞は G418 に耐性を示さなかった。次に、5’IRES 配列をもつピューロマイシン耐性遺伝子をクローニングベクターに挿入した。最後に、3 つの SV-40-ATG-ATG-Neo 配列を構築し、IRES-Puro の上流に挿入した。

考察

今回構築したシステムは、sgRNA-CRISPR-Cas 複合体の DNA 切断活性を試験するのに用いることができる。このシステムを用いた、標的ゲノムに挿入される DNA と結合しなければ不活性となる複合体の構築が期待される。

参考文献 : A Cas9-transcription factor fusion protein enhances homology directed repair efficiency (JBC 2021, 296, 100525)

Sdf4 is potentially involved in aging-related immune phenotype in regulatory T cells.

Department of immunology Aoki Hattori (No.66)

Background and Aim

Aging of the immune system increases the risk of serious infections, autoimmune and chronic diseases. $CD4^+$ $Foxp3^+$ regulatory T cells (Tregs) play a key role in maintaining immune tolerance and homeostasis with immune suppressive functions. These days, accumulating evidence suggests that aged Tregs are more proliferative and activated than young Tregs, suggesting that this phenomenon may contribute to the pathogenesis and progression of age-related diseases. However, the molecular mechanisms of such age-associated changes in Tregs remain unclear. In this study, we attempted to elucidate this unknown mechanism based on single-cell RNA sequence (scRNA-seq) analysis.

Methods

We used scRNA-seq datasets which focus on transcriptomic changes associated with aging in mice to identify differentially expressed genes between young and aged Tregs[1][2]. Identified genes were cloned from cDNA derived from mouse $CD4^+$ T cells, and these genes were inserted into adeno-associated virus (AAV) vector encoding the Thy-1.1 gene to distinguish non-transduced cells. To transduce these genes, $CD25^+$ Tregs were purified from mouse $CD4^+$ T cells and cultured in the presence of anti-CD3/CD28 antibodies and IL-2 for stimulation. Target genes were delivered to cultured Tregs using the AAV vectors. Transduced cells were analyzed the expression levels of CD62L, Ly6C, CD49b, and CD146 as young Treg markers[3] by flow cytometry.

Results

We identified Sdf4 as an up-regulated and Klf2 as a down-regulated gene with aging from scRNA-seq data analysis. Appropriate Treg-culture conditions for gene transduction were investigated and gene delivery capacity of produced AAV vectors were verified using EL4 mouse T-cell lymphoma cell lines. Subsequently, gene transfer to Tregs was successfully conducted. While Klf2 transduced Tregs did not change the phenotype, Sdf4 transduced Tregs exhibited reduced expression levels of age-dependent down-regulated molecules, such as CD62L and CD146 (**Fig. 1**).

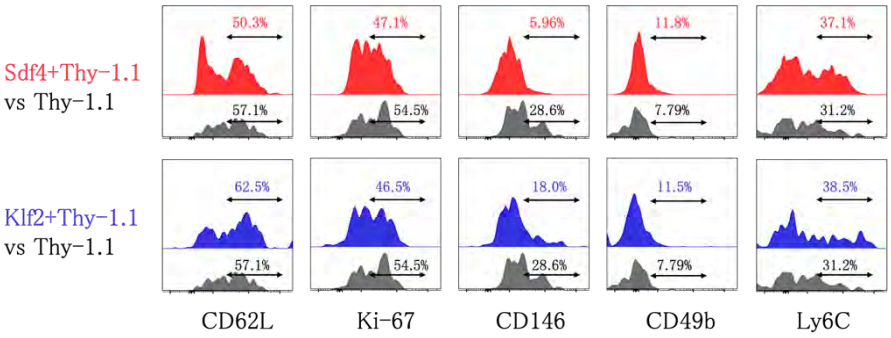


Fig. 1 Expression levels of CD62L, Ki-67, CD146, CD49b, and Ly6C in $Sdf4^{+}$ Tregs (top) and $Klf2^{+}$ Tregs (bottom) in comparison to $Thy\text{-}1.1^{+}$ (control) Tregs.

Discussion

These results indicate that up-regulation of Sdf4 has some effect on age-relate phenotype. From previous studies, SDF4 is a calcium binding protein and a positive regulator of calcium-calcineurin-NFAT signaling pathway which is important for T cell proliferation and activation[4]. This pathway could potentially explain the observed changes in the Sdf4-transduced Tregs such as reduced expression of CD62L and CD146. There are no previous studies on Sdf4 and the aging of the immune system. In summary, this study implies the age-associated up-regulation of Sdf4 is involved in the aged phenotype of Tregs and furthermore, in age-related dysfunction of the immune system. From now on, we would like to repeat similar experiments to confirm reproducibility and investigate more efficient methods of introducing genes into Tregs. Our future goal is to clarify the mechanism of Sdf4 regulation and its immunological roles in Tregs.

Reference

[1] The Tabula Muris Consortium. “A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse.” *Nature* **583**, 590-595 (2020).

[2] Elyahu Y, *et al.* “Aging promotes reorganization of the CD4 T cell landscape toward extreme regulatory and effector phenotypes.” *Sci Adv.* **5**, eaaw8330 (2019).

[3] de la Fuente *et al.* “Ageing impairs the regenerative capacity of regulatory T cells in mouse central nervous system remyelination.” *Nature communications* **15**, (2024).

[4] Chen L, *et al.* “Cab45-S promotes cell proliferation through SERCA2b inhibition and Ca2+ signaling.” *Oncogene* **35**, (2016).

Cellular senescence of B cells and dendric cells in the liver of aged mouse.

免疫学教室 細田桃花 出席番号:75

(back ground and aim)肝臓は加齢に伴い、老化細胞を蓄積している。老化細胞が蓄積されるにつれ、機能低下や線維化、細胞数の減少が生じると考えられてきている。しかしそのメカニズムは十分に解明されていない。本研究では、老齢マウスの肝臓においてどの細胞が老化しているのか調べた。さらに、老齢マウスから単離した免疫細胞を若齢マウスに移入し、どの細胞の老化が誘導されるか調べた。

(methods) $p16^{INK4a}$ は細胞分裂を停止させるタンパクであり、老化細胞マーカーとして用いられる。細胞単位で老化細胞を識別するため、p16 が発現すると、赤色蛍光タンパクである tdTomato が発現する p16-Cre^{ERT2}-tdTomato マウス(Ref.1)を使用した。このマウスで細胞が p16 を発現すると、tamoxifen で制御可能な Cre^{ERT2} リコンビナーゼが同時に合成され、tamoxifen を投与することでこれが核内に移行する。核内に移行後、tdTomato をコードする遺伝子の上流にあるストップコドンが除去され、tdTomato が恒常的に蛍光を発現するように成る。このマウスを使用した先行研究により、この tdTomato を発現する細胞の割合は若齢マウスより老齢マウスで増加することがわかっている(Ref.1)。

p16-Cre^{ERT2}-tdTomato マウスを用いて、肝臓でどのような細胞群が老化しているのかを明らかにするために、肝臓を3つに分画してフローサイトメトリー解析した。解析する際には、まず PBS で灌流し、組織から末梢血を取り除いた。肝臓を採取してコラゲナーゼを加えて、30 分間インキュベーション後、細胞懸濁液を 50 xg で遠心分離し、沈渣を①肝細胞とした。上清は、さらに解析上で免疫細胞マーカーの CD45 の有無で②非免疫細胞、③免疫細胞に分画した。非免疫細胞の分画には内皮細胞や肝星細胞などが含まれている。また、肝臓の免疫細胞の比較として、リンパ組織の一つである④鼡径リンパ節も解析した。

(Results)各画分における p16 陽性老化細胞の割合は①肝細胞:1.42%, ②非免疫細胞:0.59%, と、それぞれ p16 陽性老化細胞があることを確かに確認したが、そのなかでも③肝臓免疫細胞:2.95%と高い割合を確認した。また、④リンパ節免疫細胞:2.28%であることから、リンパ系全般に割合が高いことがわかった。

さらにこの肝臓内の p16 陽性老化細胞がどのような細胞であるかを調べたところ、p16 陽性老化細胞の大半は B 細胞であることがわかった。ただし、単に免疫細胞のなかで B 細胞が多く占め、母数が多い可能性が考えられたため、次にそれぞれの細胞の内で p16 陽性老化細胞の割合を調べた。その結果、B 細胞全体の中の、p16 陽性老化細胞の割合は 3.07%であり、他に調べた細胞の多くが 0.5%~1.5%であることと比較すると、単に母数の問題でなく、p16 陽性老化細胞の割合が高いことがわかった。また、樹状細胞における p16 陽性老化細胞の割合は 4.49%とわかり、樹状細胞は全体での割合は小さいものの、細胞集団における老化細胞の割合が非常に高いこ

とがわかった。(図 2)

100 週齢前後の老齢マウスから免疫細胞を単離し、20w 前後の若齢マウスに移入を行うと、その若齢マウスで肝臓の実質細胞の p16 の発現レベルが上昇することが報告されている(**Ref.2**)。これは免疫細胞の老化が個体の老化に関連していることを強く示唆している報告であり、この実験も行うことで、さらに免疫細胞の老化がどの細胞分画の老化を誘導するか調べた。老化免疫細胞の移入を行った結果、①肝細胞と②非免疫細胞において、p16 陽性老化細胞の割合が高くなる傾向が見られた。一方で、③肝臓免疫細胞と④リンパ節免疫細胞ではそのような傾向は見られなかった。(図 3)

(Conclusions and discussion)本研究の結果から、樹状細胞と B 細胞は他の免疫細胞よりも老化しやすい可能性があることが示唆された。これらは T 細胞との相互作用に重要な抗原提示機能を担う細胞であり、加齢に伴う免疫機能低下の原因の一つと考えられる。

また老化免疫細胞の移入により、肝臓の実質細胞で老化が誘導されたことから、老化細胞の異常なサイトカイン産生が周囲の細胞の老化を誘導する可能性がある。

また、老齢マウスの免疫細胞を移入することにより肝実質細胞の老化が誘導されたが、脾臓の免疫細胞を分画して移入することで、責任細胞を明らかにできる可能性がある。特に、B 細胞と樹状細胞に注目して解析することが重要であると考えられる。

(References)

1. Omori, S. *et al.* Generation of a p16 Reporter Mouse and Its Use to Characterize and Target p16high Cells In Vivo. ***Cell Metab.*** 32, 814-828.e6 (2020).
2. Yousefzadeh, M. J. *et al.* An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs. ***Nature*** 594, 100-105 (2021).

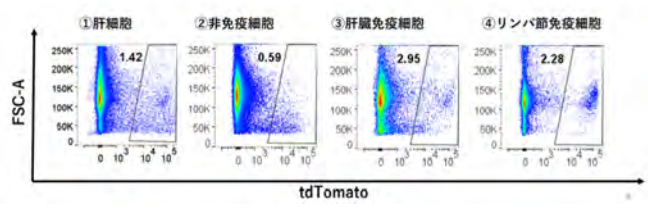


図 1 各分画における p16 陽性老化細胞の割合

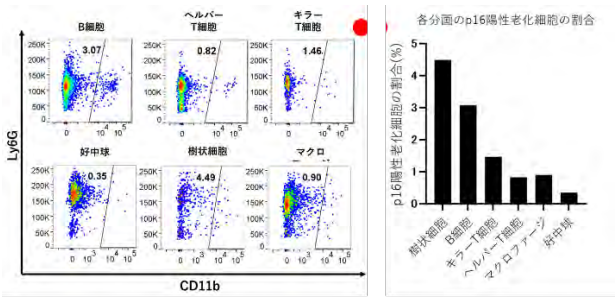


図 2 各細胞における p16 陽性老化細胞の割合

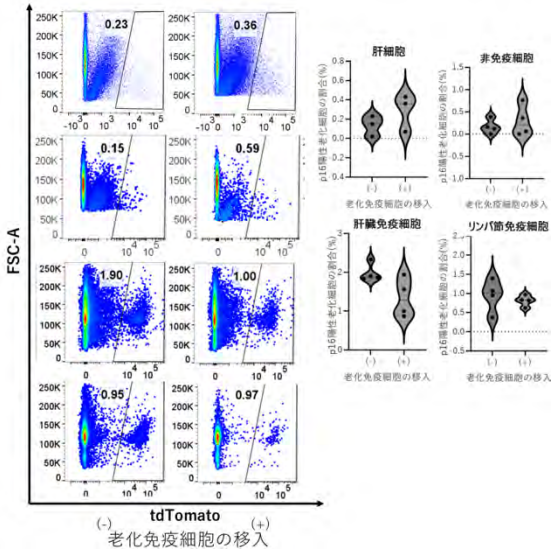


図 3 老化免疫細胞の移入結果

胸腺と肺における老化細胞の解析

免疫学分野　森本理子　82 番

背景及び目的

細胞は様々なストレスにより細胞老化が誘導されます。老化した細胞が加齢に伴って蓄積していくと各臓器や組織の機能低下や免疫機能の低下を引き起こします。そこで本研究では、加齢に伴って退縮することが知られる胸腺、と感染免疫応答の場として重要な肺において老化細胞の解析を行いました。また、老齢マウスの免疫細胞を若齢マウスに移入すると老化が誘発される、という実験系（文献1）を用いて胸腺と肺の老化細胞を解析し、免疫細胞の移入により胸腺と肺において老化が誘導されるかを調べました。

方法

老化細胞を可視化できる p16Cre^{ERT2}-dTomato マウス(以下 p16 マウス)を用いました。（文献2）老化した p16 マウスの胸腺と肺を採取し、蛍光抗体で染色した後にフローサイトメトリーで解析しました。また、老齢マウスから免疫細胞を単離し、若齢 p16 マウスに移入して同様に解析を行いました。

結果

① p16Cre^{ERT2}を発現する老齢マウスの胸腺においてのみ tdTomato の蛍光が観察され、老化細胞を検出できました。また、老齢マウスの胸腺については免疫細胞において p16^{+}老化細胞の割合が大きいということがわかりました。（図1）

② 分化段階の異なる T 細胞と B 細胞について分画して調べた結果、老齢マウスの胸腺では他の免疫細胞と比較してB細胞におけるp16^{+}老化細胞の割合が大きいということがわかりました。（図2）

③ 老齢マウスの肺については免疫細胞において p16^{+}老化細胞の割合が大きいということがわかりました。（図3）

④ T 細胞サブセット、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞、好中球について分画して調べた結果、老齢マウスの肺では他の免疫細胞と比較してB細胞におけるp16^{+}老化細胞の割合が大きいということがわかりました。（図4）。

⑤ 老齢マウス由来の免疫細胞を若齢マウスへ移入した結果、胸腺では p16^{+}老化細胞が増加する傾向がみられました。（図5）

⑥ 老齢マウス由来の免疫細胞を若齢マウスへ移入した結果、肺では p16^{+}老化細胞が増加する傾向がみられませんでした。（図6）

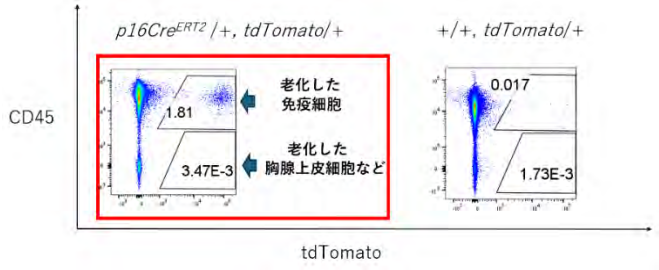


図1．老齢マウスの胸腺については免疫細胞において p16^{+}細胞の割合が大きい

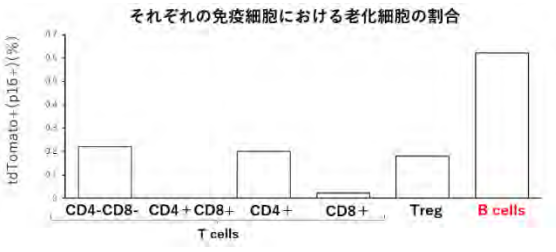


図2．老齢マウスの胸腺では他の免疫細胞と比較して B細胞におけるp16^{+}老化細胞の割合が大きい

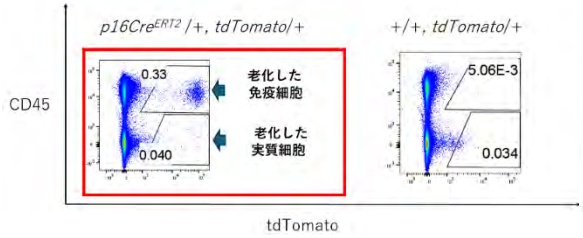


図３．老齢マウスの肺については免疫細胞において p16⁺細胞の割合が大きい

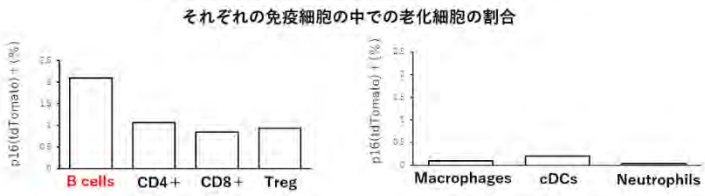


図４．老齢マウスの肺では他の免疫細胞と比較してB細胞におけるp16⁺老化細胞の割合が大きい

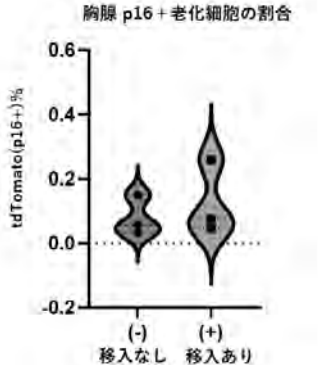


図５．老齢マウス由来の免疫細胞を若齢マウスへ移入した結果、胸腺では p16⁺老化細胞が増加する傾向がみられた

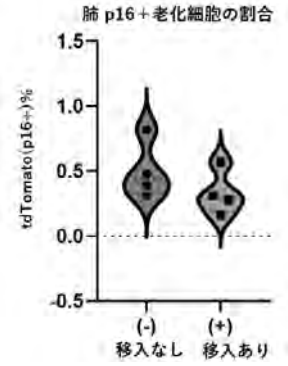


図６．老齢マウス由来の免疫細胞を若齢マウスへ移入した結果、肺では p16⁺老化細胞が増加する傾向がみられなかった

考察

胸腺における B 細胞は胸腺の形成に関与しているという報告があります。(文献3) このことから、胸腺で B 細胞における老化細胞の割合が大きいということが胸腺退縮の機構に関与している可能性があると考えます。また、胸腺では老齢マウスの免疫細胞を移入することによって老化が誘導される可能性があると考えます。一方、肺では B 細胞において老化細胞の割合が大きいことが分かりました。B 細胞は抗体産生に重要な働きをもつため(文献4)、B 細胞において老化細胞の割合が大きいことが加齢に伴って感染症罹患率が上がることと関連している可能性があると考えます。メモリーB 細胞などは感染免疫において重要であるなど、老化した B 細胞の分化状態をさらに詳しく解析する必要があると考えます。また老齢マウスの免疫細胞を若齢マウスに移入した結果、肺では老化細胞が増加しませんでした。p16⁺老化細胞が誘導されるタイミングを考慮して免疫細胞を移入してからタモキシフェンを投与するまでの期間を見直す必要があると考えます。

参考文献

1．Characterize and Target p16^{high} Cells *InVivo*”***Cell Metabolism*** **32**:814-828
Matthew J. Yousefzadeh1 et al.(2021)“An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs”***Nature*** Vol 594
2．Satotaka O et al.(2020)“Generation of a p16 Reporter Mouse and Its Use to and ageing of solid organs”***Nature*** Vol 594
3．Yasuhiro M et al.(2012) “Role of lymphotoxin for thymic organogenesis” ***Clinical immunology & allergology*** **58**:234-238
4．Kawamoto S et.al(2023)“Bacterial induction of B cell senescence promotes age-related changes in the gut microbiota”***Nat Cell Biol***:865-876

タンパク質合成阻害剤による NADase 産生の増加

細菌学　伊藤舞　8番　伊藤佑真　9番

＜背景＞

私たちは、劇症型 A 群レンサ球菌感染症をテーマに研究を行いました。劇症型感染症は、多臓器不全や軟部組織壊死などを引き起こす A 群レンサ球菌による疾患で、発病から急激に死に至ることも多い危険な疾患です。現在、治療はペニシリンとクリンダマイシン（CLDM）の併用投与が推奨されていて、ペニシリンは細胞壁合成阻害剤、CLDM はタンパク質合成阻害剤と異なる働きをしています。CLDM は、タンパク質である毒素の産生を防ぐことと、組織移行性が高いので挫滅した組織にも届くことが期待されていますが、先行研究で、投与について問題があることが明らかになっています。CLDM に依存的に、NADase という毒素の産生量が増加している株が確認されました。NADase とは、A 群レンサ球菌が菌体外に分泌する毒素のことで、エネルギー産生に必要な NAD を分解します。この毒素は劇症型感染症の原因の一つとしてほぼ間違いないと近年注目されています。すなわち、治療をするはずの CLDM が、かえって症状を悪化させているかもしれません。この抗生物質は治療にあまり適していないかもしれないと考えられます。

また、本菌には 13 種類の二成分制御系があり、環境の変化に応答して遺伝子の発現を調節しています。CovS/CovR はそのうちの一つで、主に病原因子の発現を抑制しています。センサータンパクの CovS はレギュレータータンパクの CovR をリン酸化します。リン酸化された CovR が DNA に結合して、遺伝子発現を負に制御します。このようにして、CovS/CovR は NADase をコードする遺伝子の発現を抑制しています。（図 1）

しかし、CLDM を加えた時 NADase 産生量が増加する現象には、センサータンパクの CovS が何らかの形で関わっているのではないかと過去の研究で報告されています。増加のメカニズムはまだ分かっていませんが、このことが解明のヒントになり得ると考えられます。

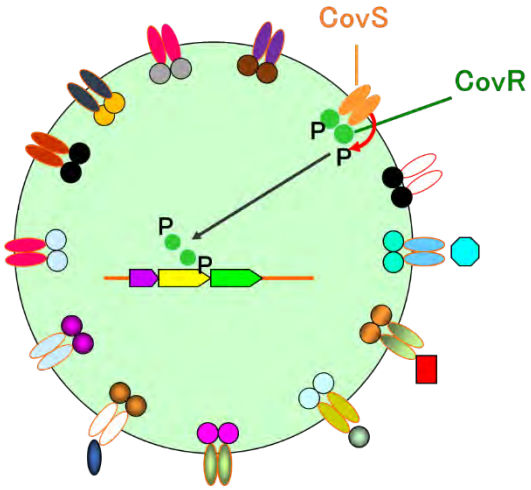


図 1:A 群連鎖球菌における二成分制御系および CovS/CovR の遺伝子発現抑制の流れ

＜目的＞

私たちは、二つの目的を掲げました。一つは、CLDM が NADase を増加させるメカニズムを明らかにすることです。もう一つは、CLDM には既に耐性菌が存在するので、NADase 産生を増加させず、なおかつ耐性菌にも効く有効な抗生物質を探すことです。具体的な

条件は、CLDM 耐性菌に効き、NADase 産生が増加せず、更にできるだけ少ない抗生物質量でも効果があることです。CLDM は感受性菌に対して 2^{-4}μg/ml で菌の増殖が抑えられます。今回は CLDM 耐性菌に対してこの濃度と同じくらいで抗菌効果を示し、NADase 産生を増加させない抗生物質を探します。

＜仮説＞

私たちは NADase を増加させるメカニズムについて仮説を立てました。最初に、CLDM が CovS に結合します。それによって、リン酸化が起こらなくなり、CovS/CovR による病原因子抑制の流れ（図1）が解除されます。そして、NADase 産生量が増加する、というものです。これを CovS 仮説と呼称します。この仮説に従うと CovS はクリンダマイシンに特異的に結合する可能性があるので、他の抗生物質ではどうか調べてみました。

＜方法＞

様々な濃度の抗生物質をいれた培地を用意して、菌を入れて、37度で一晩培養します。次の日に濁度計を用いて OD を測り、マイクロチューブに1ml 取り出し遠心分離をかけ、上清液を取り出した後、そこにβ-NAD を加え、1 時間置きます。その後分解されたβ-NAD の量から NADase 活性を算出しました。

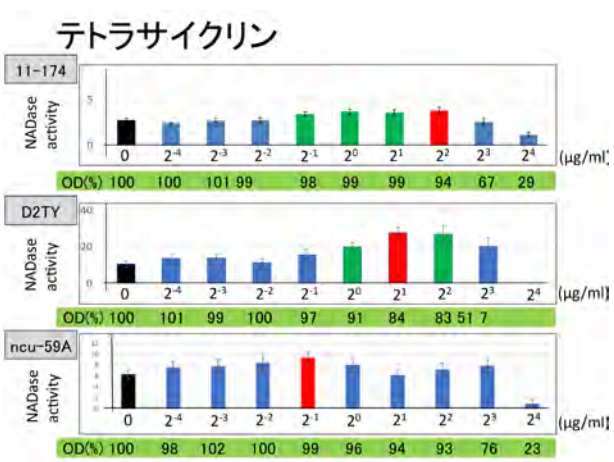
使用した抗生物質は、テトラサイクリン(Tc)、カナマイシン(Km)、クロラムフェニコール(Cp)、スペクチノマイシン(Sp)、ストレプトマイシン(Str)、ゲンタマイシン(Ge)の6種です。CLDM と同じ役割を持つタンパク質合成阻害剤に焦点を置いて実験して、ここからメカニズムを考察しました。

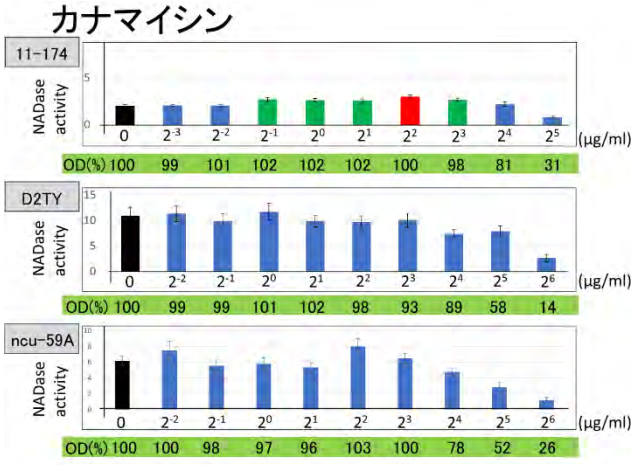
使用した菌株は、劇症型 A 群レンサ球菌感染症を引き起こす 11-174 株、D2TY 株、ncu-59A 株の3種です。いずれも CLDM 耐性菌です。Sp、Str、Ge は 11-174 株、ncu-59A 株の2種類で実験しました。

＜結果＞

使用した抗生物質ごとに各株のグラフを見て、抗生物質を何も入れていない時の NADase 活性と比べて、抗生物質を投与したものの中に、NADase 活性が有意に増加していると判断できる棒グラフがあるかないかを調べました。抗生物質を様々な濃度で加えていった時に、NADase の産生が有意に増加した場合を誘導ありとしました。

その結果、Cp、Sp は全ての株で NADase 産生を誘導し、Tc は2つ、Km は 1 つの株でのみ NADase 産生を誘導しました。Str と Ge は誘導しませんでした。（図2）





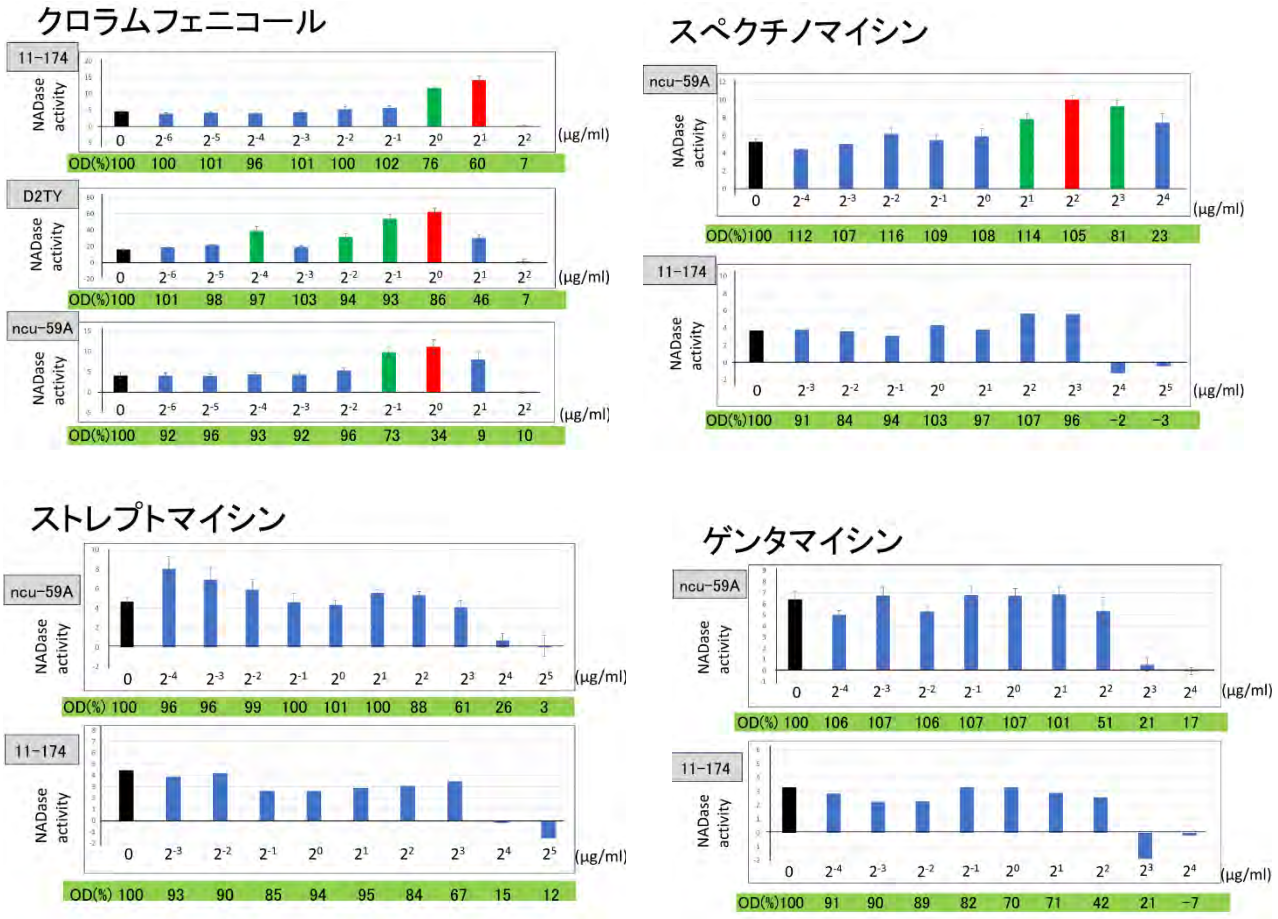


図2:3種類(Sp、Str、Ge は 11-174 株、ncu-59A 株の2種類)の菌株に各抗生物質を入れたときの NADase 活性を示したグラフ。グラフの縦軸は NADase 活性、横軸は抗生物質の濃度で、下段の緑色の帯に書かれているのは OD(抗生物質を入れていないときを 100%としたときの濁り具合)。抗生物質を入れていないとき(黒い棒グラフ)と比べて有意に増加しているグラフを緑色の棒グラフで示し、その中で最も大きいものを赤色で示した

しかし、CLDM を感受性菌に加えて抗菌効果を示した時の濃度は2^{-4}μg/ml ですが、その濃度と比べると、どれもそれより高かったです。(表 1)

	誘導	抗菌効果を示した最小濃度
クロラムフェニコール	3/3株誘導	2^0~2^2 μg/ml
スペクチノマイシン	2/2株誘導	2^4 μg/ml
テトラサイクリン	2/3株誘導	2^4 μg/ml
カナマイシン	1/3株誘導	2^5~2^6 μg/ml
ストレプトマイシン	0/2株誘導	2^4 μg/ml
ゲンタマイシン	0/2株誘導	2^2~2^3 μg/ml

$>2^{-4}$

表 1:各抗生物質における誘導の有無と抗菌効果を示した最小濃度。右の 2^{-4} はクリンダマイシンが抗菌効果を示す最小濃度。

＜考察＞

誘導の有無や抗菌効果を示した濃度から考えたところ、蛋白質合成阻害剤の中でCLDMに代われそうなものは見つかりませんでした。今回の研究の菌の株数を増やしたり、キノロン系などのタンパク質合成阻害剤以外の抗生物質を使ったりしてデータを集めることで、より適した抗生物質が見つかるのではないか考えています。

また、NADase産生が増加するのはCLDMに特有なものではないことも結果から読み取れるので、CovS は CLDM に特異的に結合しているわけではないと考えられます。これを踏まえて、産生増加のメカニズムの仮説を新たにたてました。この仮説は、リボソーム二抗生物質が作用することが関係していると考えています。

今回扱った抗生物質は蛋白質合成阻害剤であることから、タンパク質を合成するリボソームに作用します。リボソームの活性が阻害されることで、CovS の産生量が抑制されます。先述した通り、CovS-CovRは、NADaseをコードする遺伝子の発現を抑制しています。この抑制が阻害されることで NADase の産生が増加する、という仮説です。これをリボソーム仮説と呼称します。(図3)

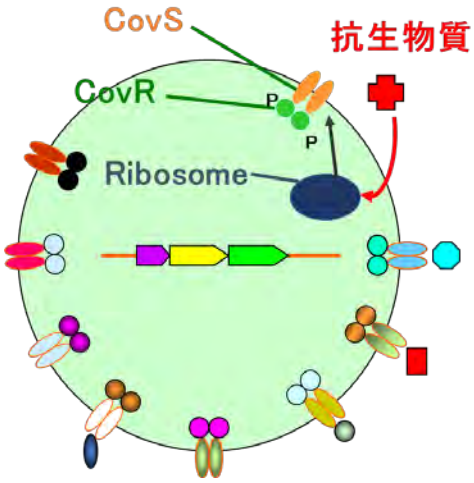


図3:リボソーム仮説の概要

これら二つの仮説が正しいのか検証するには、まず、抗生物質を加えた時の CovS の産生量の変化を調べる必要があると考えています。これにより各抗生物質で CovS の産生がどれくらい抑制されているかが分かります。例えば、CovS を多く抑制する抗生物質において、NADase の産生量が増加している場合、二つ目のリボソーム仮説を裏付けることの一つになり得ます。

＜参考文献＞

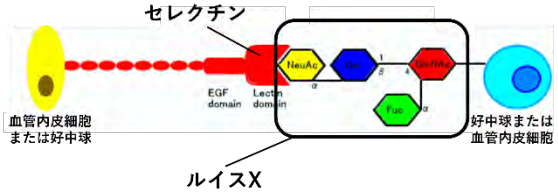
Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Apr 29;111(17):E1768-76.
Int J Microbiol. 2022 Oct 26:2022:4767765.
Jpn J Infect Dis. 2024 Sep 19;77(5):247-252.

SpeB の糖鎖は好中球の浸潤を抑制する

細菌学　渡部悠介(No.93)

1. 背景・目的

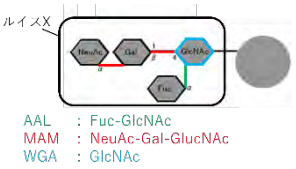
一般的に細菌が体内に侵入してくると、好中球は血管内から皮下組織へ浸潤し細菌を貪食する。好中球が血管内皮細胞へ浸潤するときに、セレクチンとルイス X という糖鎖の結合が関与している。*Streptococcus pyogenes* の劇症型株は血管からの好中球浸潤に抵抗性を持つと報告されている(1)。セレクチンとルイス X の結合に何らかの影響を及ぼしていると考え、何が関与しているのか調査をするために実験を行った。



2. 方法

使用株は SF370、1529、MDYK、GT01 である。SF370 株はゲノム株かつ非劇症型株で、1529、MDYK、GT01 は重症化して劇症型を引き起こす劇症型株である。細菌学講座の研究報告では、劇症型株の培養上清は好中球の浸潤を抑制するというデータを得ている。そこで今回は劇症型株の分泌タンパク質に着目した。

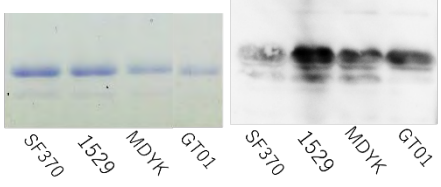
分泌タンパク質は培養上清から精製した。分泌タンパク質に糖鎖が結合しているかを確認するために過ヨウ素酸法を行った。そのタンパク質に結合する糖鎖の種類を確認するためにレクチンブロットを行った。結合する糖鎖にルイス X が存在するのではないかと考え、その検出に用いられるレクチンの AAL,MAM,WGA を使用した。



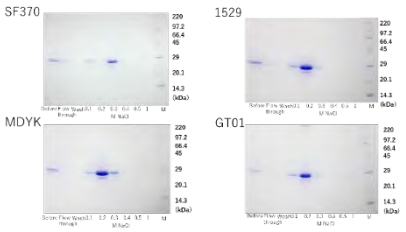
次に好中球を調製した。HL60 というヒト前骨髄球性白血病細胞由来細胞株を DMSO や ATRA で刺激し、好中球の能力を持つ細胞に分化させた。NBT 還元法で好中球の能力を持つ細胞になっているかを過酸化水素の発生有無により確認した(2)。NBT 陽性だと、黒色になり過酸化水素を発生する。

3. 結果

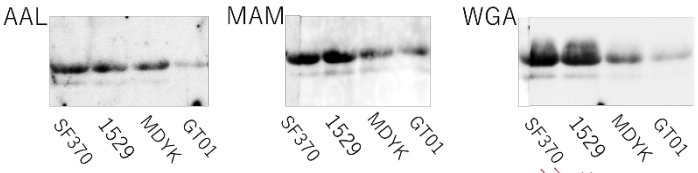
精製したタンパク質は質量分析の結果、SpeB だとわかった。過ヨウ素酸が分泌タンパク質と反応したため、分泌タンパク質中に糖鎖が存在することがわかった。また、SDS-PAGE の SpeB という分泌タンパク質のバンドと同じ位置に過ヨウ素酸が反応した。つまり、糖鎖が結合



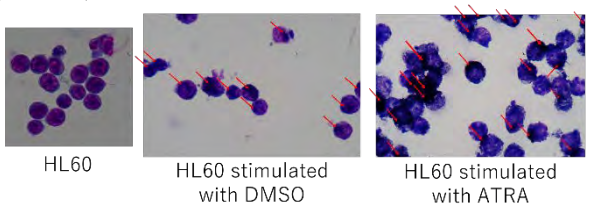
している糖タンパク質は SpeB であった。背景で上述したように劇症型株はセレクチンとルイス X の結合に何らかの影響を及ぼしていると考えた。SpeB に結合している糖がルイス X だと考え、次の実験を行った。



結合する糖鎖の種類を確認するためにレクチンブロットを行った。
AAL,MAM,WGA が反応したため、SpeB にはルイス X が存在していると確認できた。



好中球の調製について。好中球は HL60 を DMSO や ATRA で刺激をして分化させた。NBT 還元法で過酸化水素の発生有無により好中球の能力をもつ細胞になったことを確認した。



4. 考察

今回、*S.pyogenes* の培養上清から SpeB が精製できた。また好中球の調製ができた。今後の実験では SpeB と好中球のマイグレーションの実験を行っていく。

SpeB は糖タンパク質であり、ルイス X が存在することが分かった。だが、非劇症型株、劇症型株問わずルイス X が存在していたため、SpeB タンパク質や、ルイス X とタンパク質の間に何かほかの糖鎖が結合している可能性があり、それがセレクチンとの反応に影響を与えているのではないかと考えた。

5. 参考文献

1.Imai T.(2018) Lipoteichoic acid anchor triggers Mincle to drive protective immunity against invasive group A Streptococcus infection

2.臨床検査　43巻　4号（1999年4月発行）

A 群レンサ球菌における酸化ストレス応答に関与する転写調節因子の ChIP アッセイによって同定された遺伝子の解析

細菌学　今井孝明（12番）、山本茉莉（85番）

〈目的、背景〉

A 群レンサ球菌は劇症型感染症の原因菌として注目されている。感染者数は年々増加しており、2023 年には過去最多を更新した。2024 年はさらに増加し、11 月 3 日現在、感染者数は 1669 人となっている。

感染症においては、細菌側の病原性と宿主側の防御機構が重要である。感染防御機構として過酸化水素をはじめとする酸化ストレスが挙げられる。好中球やマクロファージが細菌を貪食すると、ファゴソーム内で過酸化水素を放出し、殺菌に働く。このように細菌は貪食・殺菌に際して酸化ストレスにさらされている。そのため貪食に抵抗するためのメカニズムが細菌の生存にとって重要であり、酸化ストレスの一つである過酸化水素に対する反応について、関連する因子やその発現メカニズムに関する研究が続けられてきた。

A 群レンサ球菌の酸化ストレス応答を研究することで、病原性や感染症についての理解が深まり、新たな治療法の開発や感染防御に寄与する可能性がある。

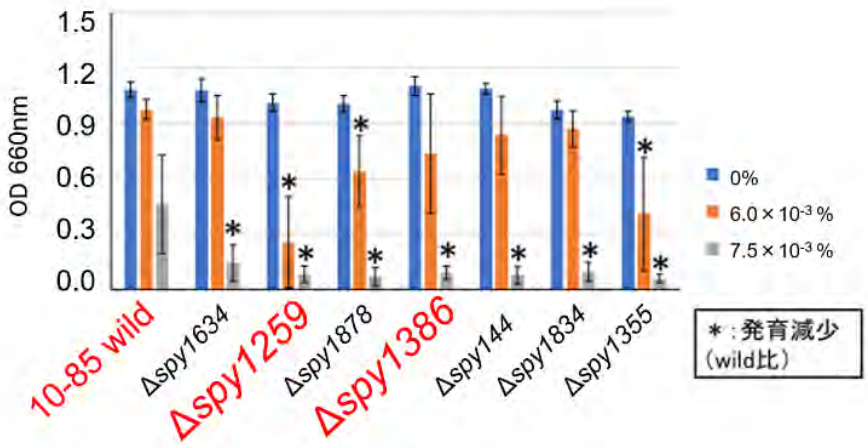


図１　H_2O_2添加液体培養における増殖の検討

図１はこれまでの実験結果である。A 群レンサ球菌ではゲノム解析によって遺伝子に番号が振られており、グラフの下部に書いてある数字はいずれも転写調節因子をコードする遺伝子である。wild 株と転写調節因子のノックアウト株それぞれについて様々な過酸化水素濃度における増殖を調べたところ、どの株でも過酸化水素濃度が高いほど増殖が抑制されることが分かった。また、同じ過酸化水素濃度では wild 株に比べて転写調節因子のノックアウト株の方が増殖の減少率が大きくなっていることがわかる。以上のことから、これらの転写調節因子が過酸化水素抵抗性に関与していることが示唆された。

特に過酸化水素抵抗性への関与が強いとみられる *spy1259* および *spy1386* をピックアップして ChIP アッセイを行った。ChIP アッセイによって転写調節因子が結合する遺伝子を同定することができた。今回の研究では、ChIP アッセイによって同定された遺伝子が実際に過酸化水素抵抗性に関与しているのかを調べることを目標に実験を行った。

	start	length	fold_enrichment	Gene
spy99	100384	194	5.85553	rpoC
spy183	168764	335	20.424	non-cording region
spy914	760461	195	6.19581	hylA
spy1156	868130	316	10.0862	non-cording region
spy1164	957587	742	6.85284	-
spy1250	1031558	193	5.33128	-
spy1281	1056134	194	6.48399	inlA
spy1684	1361920	279	12.473	non-cording region
spy1903	1584604	216	4.98032	-
spy1656	1376471	173	5.18719	non-cording region
spy1914	1597093	222	6.13326	-
spy1918	1602502	229	5.76472	-
spy1386~1384	1076578	1147	17.6408	non-cording region

図2　Spy1259 および Spy1386 に関する ChIP アッセイの結果

〈方法〉

ChIP アッセイによって同定された遺伝子のノックアウト株を A 群レンサ球菌の劇症型株である 10-85を用いて作成した。作成した株は *spy1386* に関係する *Δspy1385*、*Δspy1384*、*Δspy1385-1384* と *spy1259* に関係する *Δspy183*、*Δspy1156*、*Δspy1684* である。(図 2)

次に作成したノックアウト株を用いて、過酸化水素添加寒天培地上での増殖の検討を行った。この実験では、様々な過酸化水素濃度（0%、6.00×10^{-3} %、6.75×10^{-3} %、7.50×10^{-3} %、8.25×10^{-3} %、9.00×10^{-3} %、9.75×10^{-3} %）の BHI プレートを作成し、そこに一晩培養した菌液を 8～10 μL 滴下した。その後 24 時間ごとに観察し、120～168 時間後に最終判定した。

さらに過酸化水素添加の液体培地でも同様の実験を行った。この実験では、過酸化水素濃度が 0 %、6.00×10^{-3} %、6.375×10^{-3} %、6.75×10^{-3} %の BHI 溶液を作成し、BHI 溶液4mL に菌液 40 μL を加えて 24 時間後の OD を計測した。

最後に、10-85 とは別の劇症型株である 1529 株を用いてもノックアウト株を作成し、過酸化水素添加の寒天培地の実験を行った。

〈結果〉

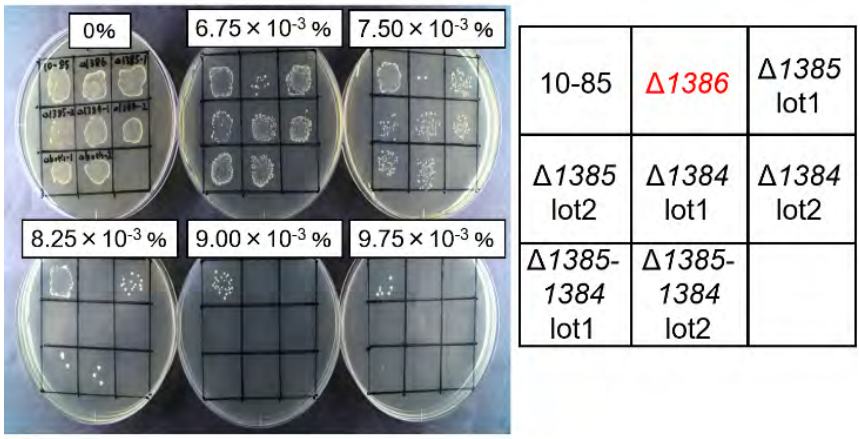


図3　H_2O_2添加培地における 10-85 由来 KO 株の増殖（1386 関係）

過酸化水素濃度が 0%の培地ではいずれの株も同程度増殖していた。一方で、過酸化水素濃度が高い培地では、左上の wild 株に比べてノックアウト株の発育は低下していた。(図3)

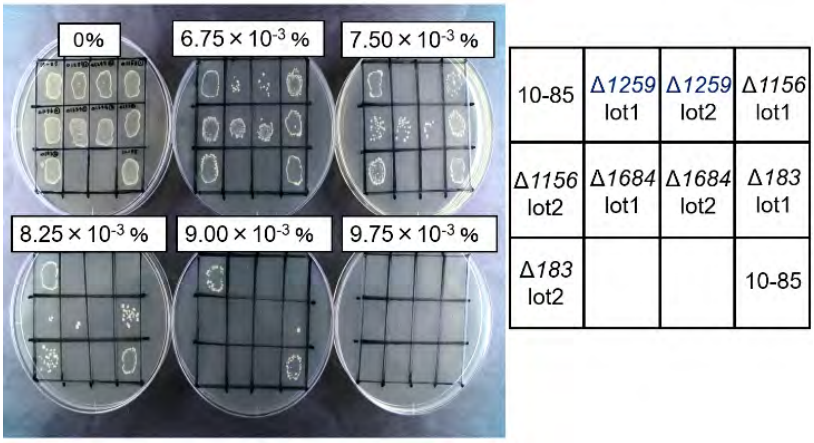


図４　H_2O_2添加培地における 10-85 由来 KO 株の増殖 （1259 関係）

1259 関係の株も過酸化水素濃度が 0%の培地ではいずれの株も同程度増殖していた。一方で、過酸化水素濃度が高い培地では、左上の wild 株に比べてノックアウト株の発育は低下していた。(図４)

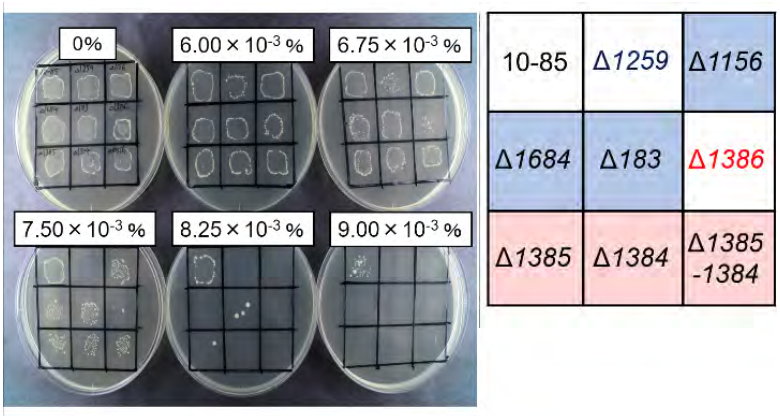


図５　H_2O_2添加培地における 10-85 由来 KO 株の増殖（まとめ）

再現性をとるために行った実験でも同様の結果を得ることができた。(図５)

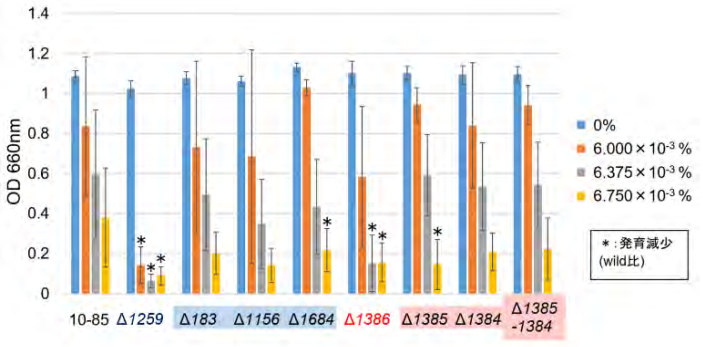


図６　10-85 由来KO株の液体培養の結果

H_2O_2濃度	6.000×10⁻³ %	6.375×10⁻³ %	6.750×10⁻³ %
10-85	32%	54%	74%
Δ1259	＊89%	＊96%	94%
Δ183	40%	62%	89%
Δ1156	42%	73%	93%
Δ1684	22%	75%	94%
Δ1386	57%	＊96%	96%
Δ1385	24%	56%	＊97%
Δ1384	33%	60%	90%
Δ1385-1384	24%	60%	89%

＊：発育減少(wild比)

$$減少率＝\frac{(H_2O_2濃度0\%でのOD)-(それぞれのH_2O_2濃度でのOD)}{(H_2O_2濃度0\%でのOD)}$$

図７　液体培養における減少率

液体培地を用いた実験において、いずれの株でも過酸化水素濃度が高くなるほど増殖が抑制されることがわかった(図６)。また、同じ過酸化水素濃度における濁度を比較すると、ノックアウト株では wild 株より濁度の減少率が大きく、有意差が認められるものも存在した(図７)。有意差はt検定を行い、５%以下となったものを有意差ありとした。

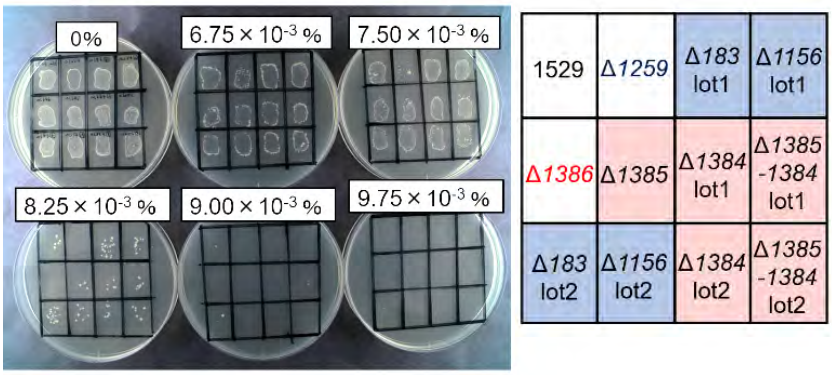


図８ H_2O_2添加培地における 1529 由来 KO 株の増殖

1529 株由来のノックアウト株を用いた実験では、Δ *spy1386* および Δ *spy1259* の増殖が wild 株と比べて低下することが確認できた。しかし、ほかの株に関しては、wild 株との明確な違いを観察することはできなかった。（図８）

〈結論、考察〉

図 3～図 7 の実験結果から、ChIP アッセイによって同定された遺伝子が過酸化水素抵抗性に関与していることが示唆された。一方、1529 由来の株を用いた実験は行った回数が少なく、ChIP アッセイによって同定された遺伝子のノックアウト株の発育が低下する事象が 10-85 株特有なのかどうか不明である。そのため、1529 由来株の実験を繰り返したり、ほかの劇症型株を用いた実験を行ったりする必要があると考える。また、今回調べた遺伝子がコードする遺伝子の機能やそれが過酸化水素抵抗性にどう関与しているのかを調べたり、Spy1259 や Spy1386 などの転写調節因子が本当に ChIP アッセイによって同定された遺伝子の発現を制御しているのかを調べたりする実験をする必要がある。

〈参考文献〉

神谷茂（2021）、標準微生物学第 14 版

Pannexin3 と P2X4 受容体を介した骨芽細胞分化制御機構の解明

薬理学
棚橋祐太　57
野田光史　64

1　背景

日本では近年、超高齢化に伴い骨粗鬆症の患者が増加している。骨形成、骨分化の機序を明らかにし、骨疾患の新規治療法を開発することは今後より重要になると考えられる。

骨形成とは、間葉系幹細胞由来の前骨芽細胞が遊走および増殖し、骨芽細胞に分化することで骨基質を形成することである。正常な骨形成には、前骨芽細胞におけるこれらの機能が重要であり、中でも今回は前骨芽細胞の分化に注目した。骨芽細胞分化は、ATP と関連していることが示唆されているため、これについて検討することとした。

前骨芽細胞が分化するにはまず、Pannexin [1)]や progressive ankylosis protein (ANK) [2)]、vesicular nucleotide transporter (VNUT) [3)]などの分子から放出された ATP が細胞膜上に存在する Ca^{2+}透過チャネルの 1 つである P2X 受容体に結合することが必要である。そして、P2X 受容体が活性化し、Ca^{2+}が細胞内に流入することで骨芽細胞分化が促進される。骨芽細胞分化に重要な経路として P2X7 や Wint/β-catenin シグナルを介した経路 [4)] などがこれまで報告されているが、骨芽細胞に強く発現する P2X4 の関わる経路の詳細は未だ十分には明らかになっていない。

2　目的

これまでの検討により、骨芽細胞が分化する際、細胞中の P2X4 受容体が細胞膜上に移動し機能発現することで、Ca^{2+}シグナル制御を介して骨芽細胞の分化を促進する可能性が示唆されている。また、ATP を細胞内から放出するヘミチャネルである Pannexin ファミリーのうち、Pannexin3 (Panx3) は骨芽細胞に特異的に発現し、骨芽細胞分化に重要であると示唆されている。本研究では、Panx3 から放出された ATP が、P2X4 刺激を介して骨芽細胞の分化に寄与するかどうかを明らかにする。

3　方法

3.1　細胞培養条件

マウス頭頂骨由来前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞は、MEM-α 培地に 10%ウシ胎児血清、100 U/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加した正常培地で培養し、37℃、5%CO_2で維持した。分化誘導では、MC3T3-E1 細胞を 50μg/mL のアスコルビン酸、10 mM の β-グリセロリン酸、および 10 nM のデキサメタゾンを含む骨芽細胞分化培地中で 3 日間または 7 日間培養した。

マウス骨髄由来骨芽細胞は、間葉系幹細胞を雄性マウス（C57BL/6J、5 週齢）の大腿骨や脛骨の骨髄から単離し、MC3T3-E1 細胞と同様に 7 日間分化培地中で培養した。

3.2　siRNA とプラスミド DNA のトランスフェクション

MC3T3-E1 細胞に、Lipofectamine RNAiMAX 試薬を用いて、Panx3 (siPanx3) と

P2X4 (siP2X4) の Silencer Select pre-designed siRNA を一過性にトランスフェクションした。コントロールとして Silencer Select ネガティブコントロール No.1 siRNA (siCont)を用いた。Panx3 強制発現には Panx3 の C 末端に mCherry を融合させた蛍光標識体を使用し、Lipofectamine3000 試薬を用いて一過性にトランスフェクションした。MC3T3-E1 細胞は、siRNA（各 30 nM）とプラスミド DNA（24 ウェルプレートで 200 ng/well）でトランスフェクションした 24 時間後に、分化培地で 7 日間培養した。

3.3 ATP 濃度の測定

3 日間分化させた MC3T3-E1 細胞において、培地中の ATP 濃度を Relative Luminescence Unit (RLU)として測定した。Panx3 の活性は、100 μM の CBX で処理または siPanx3 のトランスフェクションにより阻害した。

3.4 Real-time PCR

Quantstudio 12K Flex Real-Time PCR システムで PCR Master Mix を用いて定量的 real-time PCR を行った。骨芽細胞分化マーカー（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。

3.5 ALP 活性測定

7 日間分化させた MC3T3-E1 細胞及びマウス骨髄由来骨芽細胞の ALP 活性を Lab Assay ALP キットを用いて測定した。

3.6 薬物

Carbenoxolone（CBX）: Panx3 阻害剤

BzATP: P2X 活性化剤

PSB12062: 選択的 P2X4 阻害剤

4 結果・考察

ヘミチャネル Panx3 を介した細胞外への ATP 放出が細胞外 ATP 濃度変化に関わるかを検討するために、MC3T3-E1 細胞を 3 日間分化させた際の培地中の ATP 濃度を測定した。その結果、CBX 投与により ATP 濃度が減少したことから、骨芽細胞において Panx3 が ATP 放出に関与することが示唆された。次に、Panx3 を介した ATP 放出についてより詳細に検討するために、Panx3 強制発現系における ATP 放出能について検討を行った。Panx3 を過剰発現させると細胞外 ATP 濃度は上昇し、Panx3 を siRNA でノックダウンすると減少傾向が見られた。これらの実験結果から、Panx3 は細胞外 ATP 濃度の変化に深く関わっていることが示唆された。

次に、Panx3 を介した ATP 放出の骨芽細胞分化に対する影響を検討するために、real-time PCR を用いて骨芽細胞分化マーカーALP の発現量を定量した。CBX を投与すると ALP 発現が有意に低下したことから、Panx3 が骨芽細胞分化に関わっていることが示唆された。さらに、CBX と ATP アナログである BzATP の共投与が ALP 発現量を対照群と同程度まで回復させたことから、細胞外 ATP は骨芽細胞分化を促進する可能性が示された。これらの結果から、Panx3 から放出された ATP が骨芽細胞分化促進に関わっていることが示唆された。また、Panx3 発現抑制細胞における BzATP の作用を検討したところ、control siRNA 処置細胞で観察された BzATP 誘導性 ALP 発現上昇は Panx3 発現抑制により抑制された。

さらに、マウス大腿骨・脛骨から採取した骨髄由来間葉系幹細胞を用いて骨芽細胞分化に

おける Panx3 の役割を検討した。骨髄由来骨芽細胞に対する CBX 投与は、骨芽細胞分化に伴う ALP 活性の上昇を有意に抑制した。この結果は、MC3T3-E1 細胞を用いた結果と同様であることから、Panx3 は正常細胞における骨芽細胞分化にも深く関与していると考えられる。また、骨髄由来骨芽細胞において骨石灰化に伴うカルシウム沈着を赤色に染めるアリザリンレッド S 染色を行ったところ、Vehicle 群と比較して CBX 投与群において染色が有意に抑制された。以上の結果から株化細胞に加えて正常骨芽細胞においても、Panx3 が骨芽細胞分化に重要な役割を果たす可能性が示された。

Panx3 から遊離した ATP はアゴニストとして P2X4 に結合し、Ca^{2+}が細胞内に流入することで骨芽細胞分化を促進すると考えられる。MC3T3-E1 細胞に対して P2X4 阻害薬 PSB12062 の投与および siRNA による P2X4 発現抑制は ALP 発現を有意に抑制した。Panx3 及び P2X4 発現抑制細胞における ALP 活性について検討したところ、対照群と比較して Panx3 発現抑制細胞群において ALP 活性が有意に低下し、P2X4 発現抑制細胞では ALP 活性の減少傾向が見られた。これらの結果から、Panx3 と P2X4 は骨芽細胞分化の促進に重要な役割を果たす可能性が示された。

骨組織の軟骨内骨化に対する P2X4 の寄与を検討するために、胎生 15.5 日齢のマウスから単離した後肢中足骨を PSB12062 含有分化誘導培地で7日間培養し、石灰化した部分の長さと中足骨全長を測定した。PSB12062 による P2X4 阻害により中足骨全長はわずかに短縮する一方で、石灰化領域の骨全長に対する割合は大きく減少した。この結果から骨組織の軟骨内骨化においても、P2X4 を介した骨芽細胞分化制御が重要な役割を果たす可能性が示された。

本研究で得られた実験結果から、Pannexin3 から放出された ATP は P2X4 を活性化させ、骨芽細胞分化の促進に寄与していることが示唆された。ATP 刺激を介した P2X4の機能亢進による骨芽細胞分化制御が、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。

5 参考文献

1) Ishikawa M. *et al.* Pannexin 3 functions as an ER Ca^{2+} channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J Cell Biol.* 193, 1257-1274 (2011).

2) Minashima T. *et al.* The role of the progressive ankylosis protein (ANK) in adipogenic/osteogenic fate decision of precursor cells. *Bone.* 98, 38-46 (2017).

3) Inoue A. *et al.* VNUT/SLC17A9, a vesicular nucleotide transporter, regulates osteoblast differentiation. *FEBS Open Bio.* 10, 1612-1623 (2020).

4) Grol M.W. *et al.* P2X7 nucleotide receptor signaling potentiates the Wnt/β-catenin pathway in cells of the osteoblast lineage. *Purinergic Signal.* 12, 509-520 (2016).

血圧レベルの静水圧による心筋細胞への作用メカニズムにおける TRPC3 の役割

薬理学分野
10 伊藤倫佳 36 小杉高秀

背景

心筋細胞の収縮は、イオンチャネルを介した細胞内カルシウム（$[Ca^{2+}]_i$）の変化により引き起こされる。その収縮は、心室の拡張による伸展や血圧や組織圧に由来する静水圧等の機械刺激により調節されている。心臓に対する伸展の役割は、既存の実験装置が数多く存在するため、これまで詳細に研究されてきた [1]。その一方、静水圧に関しては、静水圧負荷環境で心筋細胞動態をリアルタイムに定量的に評価する方法が確立されていなかったため、血圧レベルの静水圧負荷が心筋細胞の収縮動態へどのように作用するのかは、ほとんど明らかでない。当研究室が開発した静水圧顕微鏡を用いた先行研究では、心室筋細胞への 200 mmHg の静水圧負荷が、顕著な収縮力増加を生じさせる（静水圧誘発性収縮力増加反応）ことを報告している。さらに、その収縮力増加の制御機構において、機械感受性非選択性陽イオンチャネルである TRPC (transient receptor potential canonical) 6 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。心臓には TRPC6 に加えて TRPC3 も発現しており [2]、これらはヘテロマー（TRPC3/6）を形成し、機能すると考えられている。そのため、TRPC3 も TRPC6 と同様に、静水圧誘発性収縮力増加反応に関与している可能性がある。

目的

上記背景に基づき、心筋細胞で観察される静水圧誘発性収縮力増加反応の制御機構に機械感受性チャネル TRPC3 関与しているかを明らかにする。

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心筋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と Ca^{2+}トランジェントの変化を観測した。その詳細な方法を以下に記す。

使用した実験動物、溶液および薬剤

マウス：129/Sv, 9～16 週齢, 野生型 (WT) と $Trpc3^{-/-}$（TRPC3 ノックアウト）オスマウス

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：Pyr3 (1 μM)

成体マウス心臓からの心筋細胞の単離

マウスにヘパリンを腹腔内注射した後、20 分間静置した。その後、その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。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で、10 mM BDM を含む Solution A を用いて 37℃で 4 分間灌流した。次に、コラーゲナーゼとプロテアーゼが混合された

Liberase 酵素を用いて、3～6 分間灌流した。その後、酵素溶液内で心筋組織を 37℃で 10～25 分間インキュベーションして心室筋細胞を単離し、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 120～130 mmHg[3]に対し、高血圧レベルに相当する 200 mmHg の静水圧負荷をマウス単離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、IonOptix）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）を与えて心室筋細胞を収縮させ、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）でも同様に記録した。 さらに、圧を解放して大気圧下でサルコメア長の変化を再度測定した。これら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。

心室筋細胞のカルシウムイメージング

カルシウムイメージングを行うための Ca^{2+}指示薬として Cal-520 acetoxymethyl ester (Cal-520 AM、AAT Bioquest) を用いた。単離心室筋細胞を 4.5 mM Cal-520 AM を含む NT 溶液中で 20 分間室温にてインキュベーションし、Ca^{2+}指示薬を負荷した後、NT 溶液で細胞を 30 分間洗浄した。細胞内 Ca^{2+}シグナルは、上述の静水圧顕微鏡で測定した。水銀ランプにより、Cal-520 を 470-495 nm の波長で励起した後、510-550 nm の波形で放出された光を sCMOS カメラで撮影した。画像は 250 frame s^{-1} で収集した後、Fiji/Image J ソフトウェアを用いてシグナル強度を算出した。

実験結果

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

マウス単離心室筋細胞に静水圧を加えたときの細胞長の変化を調べるため、心筋細胞の弛緩時のサルコメア長を比較した。大気圧と高静水圧負荷 (200 mmHg)、圧解放後の大気圧では、それぞれ、1.84 ± 0.03、1.84 ± 0.05、1.83 ± 0.02 μm と有意な変化は認められなかった。次に、高静水圧負荷時に心室筋細胞の収縮力がどのように変化するかを調べるため、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。大気圧と比べて高静水圧負荷環境では 13.1 ± 0.04 %の収縮力の有意な増大（静水圧誘発性収縮力増加反応）が見られ、高静水圧負荷を解放し大気圧に戻すと収縮力は初期状態へと戻った。また、心筋細胞の収縮は、$[Ca^{2+}]_i$ の変化により生じるため、心筋細胞の Ca^{2+}トランジェントを大気圧及び高静水圧負荷、圧解放後でそれぞれ測定した。大気圧に比べて高静水圧負荷時には統計的有意差は認めなかったが、Ca^{2+}トランジェントのピークは 4.9 ± 0.03 %増加しており、圧負荷開放後の大気圧では Ca^{2+}トランジエントの増加はほぼ初期状態に戻った。

TRPC3 阻害剤の圧誘発性収縮力増加反応に対する作用

TRPC3 が静水圧誘発性収縮力増加反応の発生にどのように関わっているかを調べるため、WT マウスの単離心室筋細胞に TRPC3 阻害薬（1 μM Pyr3）を使用した。Vehicle 群で認めた圧誘発性の収縮力増加は、Pyr3 投与群では抑制された。

Trpc3$^{-/-}$ マウス心室筋細胞への高静水圧負荷の作用

Pyr3 の細胞毒性の影響を排除するため、Trpc3$^{-/-}$マウス心室筋細胞を用いて静水圧誘発性収縮力増加反応がどのように変化するかを調べた。WT マウス心室筋細胞で認められた圧誘発性収縮力増加は、Trpc3$^{-/-}$マウス心室筋細胞では抑制されていた。WT マウス心室筋細胞で認めた高静水圧負荷に伴う Ca^{2+}トランジエントの増加も、Trpc3$^{-/-}$マウス心室筋細胞では抑制されていた。

考察

WT マウス心室筋細胞への高静水圧負荷の作用

血管内皮細胞に静水圧を印加す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の変化は生じず、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、高静水圧により水チャネルを介した水の移動が起きたとしても、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有意に増大した。その要因として、ミオシンの Ca^{2+}感受性の増大 [5]と細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇 [6]の二つが考えられるが、高静水圧負荷により Ca^{2+}トランジエントのピークの増大が観測されたため、静水圧誘発性収縮力増加反応は伸展刺激で観察される Frank-Starling 現象のようなミオシンの Ca^{2+}感受性の増強ではなく、$[Ca^{2+}]_i$の上昇により生じる現象であると考えられる。

TRPC3 ノックアウトの圧誘発性収縮力増加反応への影響

圧誘発性収縮力増加反応における TRPC3 の役割を検討したところ、Pyr3 の投与により圧誘発性収縮力増加は抑制された。しかし、TRPC チャネル阻害剤は一般的に細胞毒性が強いため、Pyr3 による効果が薬物特異的な反応なのか、細胞毒性による非特異的な反応なのかを結論づけることが難しい。そこで、Trpc3$^{-/-}$マウスの心室筋細胞を用いた実験を実施した。その結果、Pyr3 の実験と同様に圧誘発性収縮力増加反応は抑制されていた。また、Trpc3$^{-/-}$マウス心室筋細胞の Ca^{2+}トランジエントの測定では、高静水圧負荷による$[Ca^{2+}]_i$ の増加は生じていなかった。Trpc6$^{-/-}$マウスの心筋細胞でも同様の結果が得られているため、圧誘発性収縮力増加反応の発生機序としては、次の 2 つが考えられる。一つは、ヘテロマーを形成して機能する TRPC3/6 を介した直接的な Ca^{2+}の流入による$[Ca^{2+}]_i$の上昇である。もう一つは、TRPC3/6 を介した Na^+流入が Na^+/Ca^{2+}交換輸送体（NCX）を抑制的に制御し、その結果、NCX を介した間接的な Ca^{2+}流入が増加して$[Ca^{2+}]_i$ を上昇させるという機構である。しかし、これらの発生機構についての検討は未だに十分ではないため、TRPC3/6-NCX を介した圧誘発性収縮力増加反応の詳細な制御機構については、今後さらなる検討が必要である。

結論

本研究では、急性の静水圧負荷による Ca^{2+}ハンドリングの変化を介して生じる静水圧誘発性収

縮力増加反応の制御に機械感受性チャネルである TRPC3/6 が関与していることが示唆された。また、慢性高血圧による TRPC3/6 の活性化は、Ca^{2+}オーバーロード等の Ca^{2+}ハンドリングの異常を引き起こし、心不全発症に関与することが知られている [7]。したがって、今後は、静水圧誘発性収縮力増加反応における TRPC3/6 を介した Ca^{2+}ハンドリングの詳細な制御機構を明らかにすることで、高血圧状態の心臓において心肥大や心不全への移行を防ぐ新規心不全予防法の開発に繋げていきたいと考えている。

参考文献

1) Naruse K. (2018). Mechanomedicine. *Biophys Rev.* 10(5), 1257-1262.

2) Yamaguchi Y, et al. (2018). TRPC3 participates in angiotensin II type 1 receptor-dependent stress-induced slow increase in intracellular Ca^{2+} concentration in mouse cardiomyocytes. *J Physiol Sci. 68*(2), 15-164.

3) Deschepper CF, 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.

4) Jiang H, et al. (2013). Cellular pressure and volume regulation and implications for cell mechanics. *Biophys J.* 105(3), 609-19.

5) Gordon AM, et al. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev.* 80(2), 853-924.

6) Eisner DA, al et. (2017). Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res.* 121(2), 181-195.

7) Yamaguchi Y, 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.

一過性に EBV が感染した胃がんの解析

ウイルス学　佐藤一輝(43)

【背景】

Epstein-Barr virus(EBV)は、様々な病気と関連しており、DNA 高メチル化は EBV 感染の一つの特徴である。胃がんはピロリ菌などに加え EBV も発症に関与し、発生機序を反映する分子サブタイプとして、EBV、CIN、MSI、GS の 4 つに分類される。(*1)EBV 関連胃がんは EBV サブタイプに分類され、がん細胞内への EBV 感染で定義される。EBV 感染細胞において、異常な高メチル化パターンを示す DNA の CpG サイト(例:TP73 のプロモーター領域)が判明している。(*2)EBV 感染は生涯に渡り持続感染すると考えられているが、診断後に経過に伴って EBV が消失した症例が報告された。(*3)

【目的と仮説】

EBV 感染が時間経過により消失した症例があるため、「診断時には EBV 陰性であるものの、診断前に EBV に一過性に感染した胃がんが存在する」という仮説を立て、「EBV に一過性感染した胃がんの存在の検証と特徴の同定」を目的に本研究を行った。

【方法】

一般に公開されている胃がんの細胞株および臨床検体の遺伝子変異、遺伝子発現、DNA メチル化のデータを用いて階層的クラスタリング解析(類似しているサンプル同士を順にグルーピングしていく解析手法)を行った。(細胞株のデータは DepMap portal、臨床検体のデータは TCGA データベースから入手)

【結果】

細胞株において、メチル化レベルの分散の大きい上位 500 遺伝子でクラスタリングした。(図 1)SNU719(EBV 関連胃がん由来の細胞株)と類似したメチル化パターンを示し、前述した EBV 感染に特徴的な TP73 のメチル化レベルの高い細胞株を一過性感染が疑われる細胞株と仮定した。

臨床検体においてメチル化レベルでクラスタリングした結果、EBV 関連胃がん(赤のバンド)の臨床検体と距離が近く TP73 のメチル化レベルの高い黄色のバンドの部分を一過性感染の疑われる臨床検体と仮定した。(図 2)

一過性感染が疑われると仮定した群の妥当性を検討するため、細胞株において一過性感染が疑われる群でメチル化が亢進していた CpG サイト 400 か所を用いて臨床検体をクラスタリングした。(図 3)「主に EBV 関連胃がんと EBV 一過性感染の疑われる臨床検体で構成されるグループ A」と「主にそれ以外で構成されるグループ B」に分けることができた。

グループ A はグループ B よりも MSI を明らかに多く含むため、一過性感染が疑われる臨床検体の中で MSI に分類されているものに着目し、グループ A,B 間で MSI の成因に有意な差

があるか検証した。MSI はミスマッチ修復遺伝子の変異または発現低下によって、ミスマッチ修復機構の異常が生じて起こる。ミスマッチ修復遺伝子変異では 2 グループの症例数に有意差は見られなかった。一方、グループ A とグループ B の MSI において MLH1 のプロモーター領域で、グループ A ではグループ B に対して優位にメチル化が亢進していた。(図 4)
(*4 MLH1 プロモーター領域のメチル化が MLH1 の発現を低下させることは報告されている)

【考察】
EBV に一過性に感染した疑いのある MSI の臨床検体では、MLH1 プロモーター領域のメチル化レベルが EBV 一過性の感染を認めない MSI の臨床検体と比較して優位に高かった。EBV 感染によって MLH1 プロモーター領域のメチル化が亢進し、MLH1 の発現が低下し MSI となった後に EBV が消失し、MSI サブタイプの胃がんと診断される可能性が示唆される。

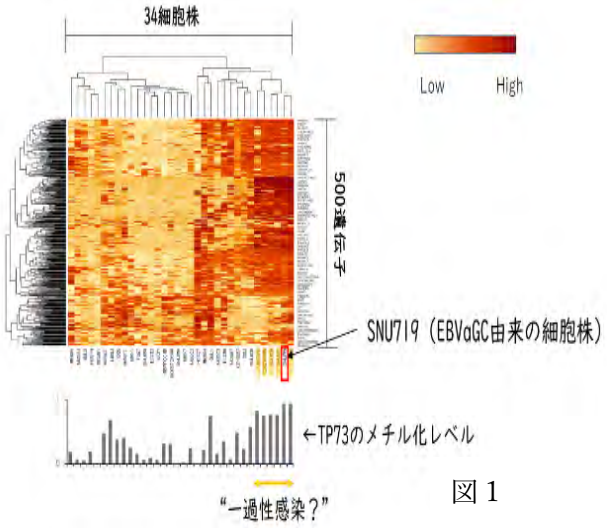


図 1

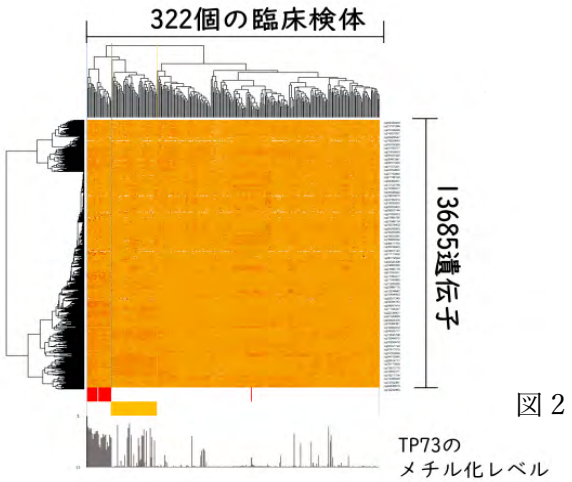


図 2

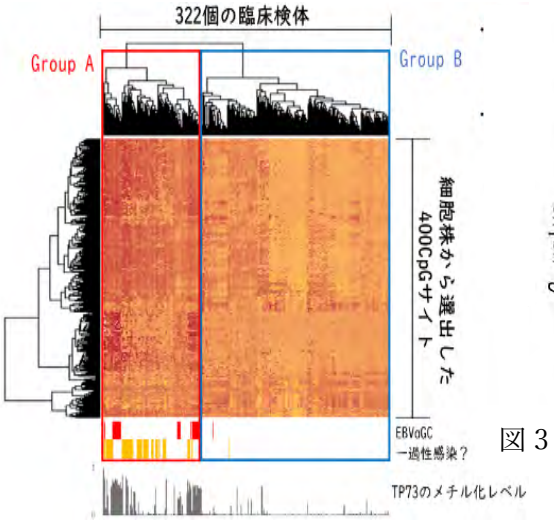


図 3

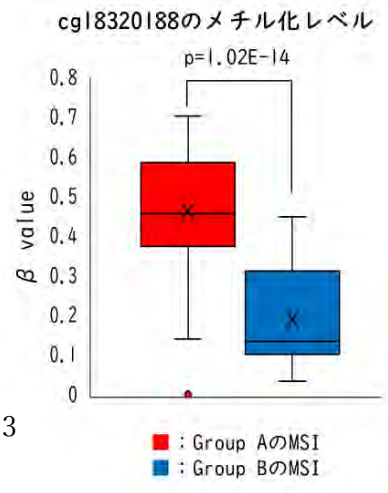


図 4

【参考文献】
*1:Nature 2014 Jul 23;513(7517):202-209 *2:J Pathol 2017;242(4):391-399
*3: J Pathol 2023;260(2):124-136. *4: Clin Epigenetics 2020 Jul 8;12:102

一過性に EBV が感染した胃がんの解析

ウイルス学　横山琴弓　88

1. 背景

EBV はヘルペス化の DNA ウイルスの一種で、世界人口の約 90%が感染し、生涯にわたって B 細胞に潜伏する。一部は血液腫瘍を引き起こす。また、一部の上皮細胞にも感染し、胃がんや上咽頭がんなどを引き起こすことでも知られている。胃がんは、胃の内壁に発生する悪性腫瘍であり、ピロリ菌などに加え EBV も発症に関与するとされており、発生機序を反映する分子サブタイプとして EBV、CIN、MSI、GS の 4 つに分類される。EBV（EBV 関連胃がん）はがん細胞内への EBV 感染で定義され、ほかのサブタイプと比較し予後は良好とされている。EBV 感染細胞においては、異常な高メチル化パターンを示す DNA の CpG サイトが判明しており、その一つに TP73 のプロモーター領域が挙げられる。EBV は一度感染すると生涯にわたり持続感染する、つまり「EBV 関連胃がんはいつまでも EBV 関連胃がんのまま」と考えられているが、経過に伴って EBV が消失した症例が報告された。これは「診断前には EBV 陽性であっても経過とともに消失し、診断時には EBV 陰性と診断されている症例が存在する可能性」を示唆している。

2. 目的

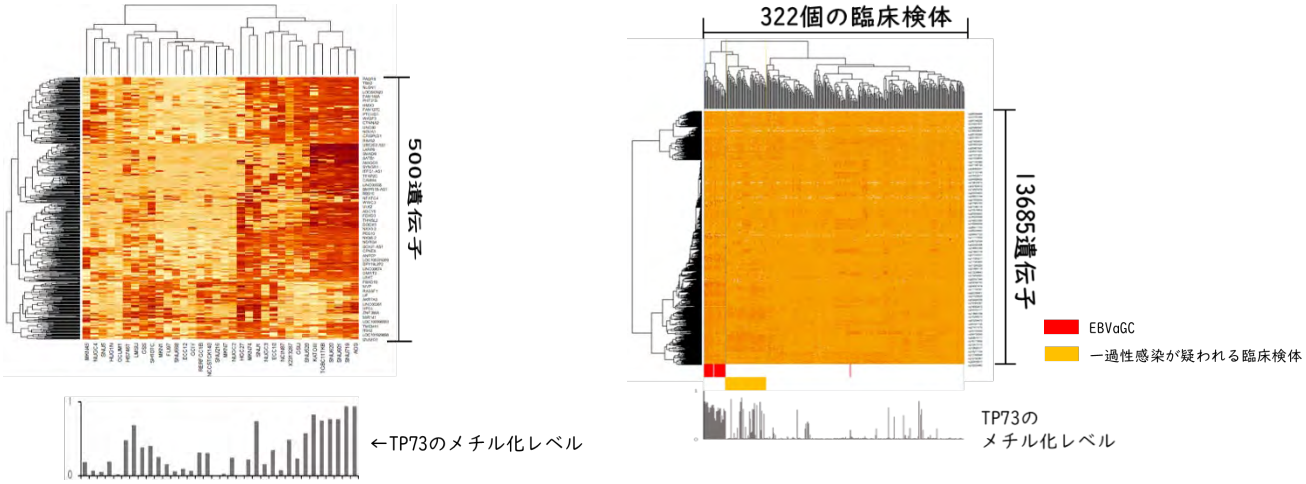
EBV に一過性感染した胃がんの存在の検証と特徴の同定

3. 方法

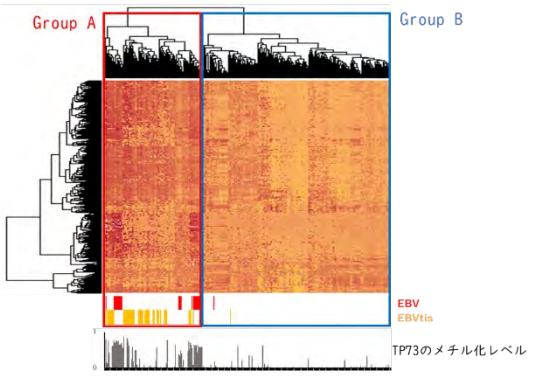
一般に公開されている胃がんの細胞株および臨床検体の遺伝子変異、遺伝子発現、DNA メチル化のデータ解析を行った。細胞株のデータは DepMap portal、臨床検体のデータは TCGA データベースよりそれぞれ入手した。細胞株と臨床検体のサンプルを、DNA メチル化や遺伝子発現などを基準に階層的クラスタリングを行った。階層的クラスタリングは、類似しているサンプル同士を順にグルーピングしていく解析手法である。

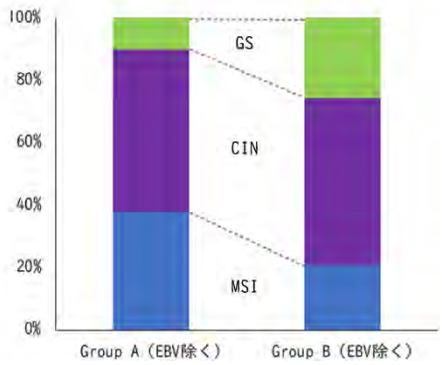
4. 結果

EBV 関連胃がんと共にクラスタリングされた細胞株および臨床サンプルを、クラスタリングに基づいて EBV 一過性感染が疑われる細胞株および臨床サンプルと仮定的に定義した。

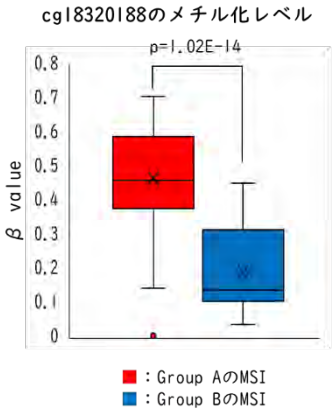


高い割合の EBV 一過性感染が疑われる臨床サンプルがマイクロサテライト不安定性（MSI）を示した。



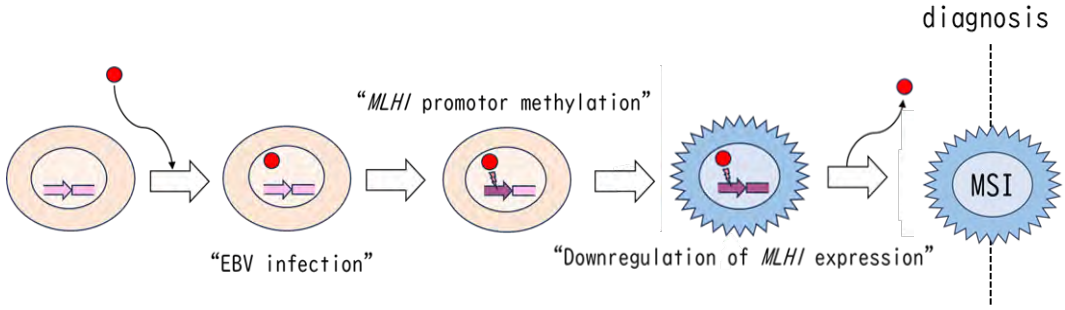


MMR 遺伝子の変異によって MSI になった可能性の検討を行ったところ、MMR 遺伝子変異を持つ臨床サンプルの数は、一過性感染が疑われる臨床サンプルと他の臨床サンプルの間で有意な差はなかったが、MLH1 プロモーターのメチル化が一過性感染の疑われる MSI 胃がんで有意に高く、これが遺伝子発現を抑制する可能性があることが示された。



5. 考察

EBV 一過性感染の疑いのある MSI の臨床検体では、MLH1 プロモーター領域のメチル化レベルが EBV 一過性感染を認めない MSI の臨床検体と比較して優位に高かったことから、EBV 感染によって MLH1 プロモーター領域のメチル化が亢進し、MLH1 の発現が低下。そして、MSI となった後に EBV が消失し、MSI サブタイプの胃がんと診断される可能性が示唆される。



（参考文献）
・Cell 2017;170(3):564-576.
・Nature 2014;513:202-209.

一過性に EBV が感染した胃がんの解析

ウイルス学　深見洸太　70

1. 背景

Epstein-Barr virus(EBV)はヘルペス科の DNA ウイルスの一種であり，世界人口の約 90 %が感染し，生涯にわたって B 細胞に潜伏することが知られており，一部は血液腫瘍を引き起こす．また，一部の上皮細胞にも感染し，胃がんや上咽頭がんなども引き起こす．胃がんはステージ分類や病理組織型分類等の臨床的分類の他に，分子サブタイプとして EBV，CIN，MSI，GS の 4 つに分けられる[1]．このうち EBV サブタイプに分類される EBV 関連胃がん(EBV-associated GC; EBVaGC)はがん細胞内への EBV 感染で定義され，感染細胞において異常な DNA 高メチル化パターンを示す[2][3]．近年，診断時には EBVaGC であっても経過に伴って EBV 感染細胞が消失した症例が報告された[4]．これは，診断前には EBV 陽性であっても経過とともに消失し，診断時には EBV 陰性になっている胃がんが存在するということを示唆している．本研究では，一過性に EBV が感染した胃がんの存在およびそれらは診断時に得られる情報で特定できるということを仮定し，存在の検証と特徴の同定を目的とした．

2. 方法

一般に公開されている胃がん由来の細胞株および臨床検体の遺伝子データ[5][6]を用いて階層的クラスタリング解析を行った．この結果に基づき，ミスマッチ修復(MMR)遺伝子の変異やプロモーター領域のメチル化レベルをクラスター間で比較した．

3. 結果

(1)細胞株において，メチル化レベルの分散上位 500 遺伝子を用いたクラスタリング結果．

全 34 細胞株のうち EBVaGC 由来の細胞株は SNU719 のみだったが，類似したメチル化パターンを示した細胞株が複数見つかった．これに加え，EBV 感染細胞に特徴的とされる TP73 のメチル化レベルも考慮し，5つの細胞株を一過性感染が疑われる細胞株と仮定した(Fig. 1)．

(2)臨床検体において，13,685 遺伝子のメチル化レベルを用いたクラスタリング結果．

(1)と同様に，このクラスタリング結果と TP73 のメチル化レベルを考慮し，一過性感染が疑われる臨床検体を仮定した(Fig. 2)．ここで，このクラスタリング結果に基づいて仮定した一過性感染が疑われる群は(1)のクラスタリング結果に基づいて仮定した一過性感染が疑われる細胞株に相当するものなのかを検討しようと考えた．そこで，細胞株において一過性感染が疑われる群でメチル化が亢進した CpG サイト 400 か所を選出し，これを用いて再度クラスタリング解析した．

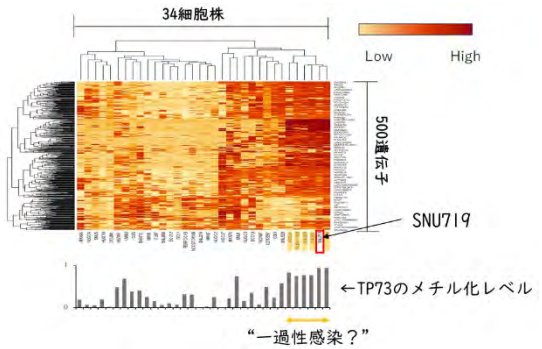


Figure 1. 細胞株において，メチル化レベルの分散上位 500 遺伝子を用いたクラスタリング結果．

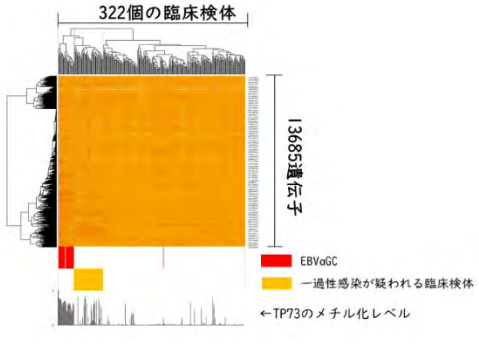


Figure 2. 臨床検体において，13,685 遺伝子のメチル化レベルを用いたクラスタリング結果．

(3)臨床検体において，細胞株から選出した 400 CpG サイトを用いたクラスタリング結果.

主に EBVaGC と一過性感染が疑われる臨床検体で構成される群(Group A)と，主にそれ以外で構成される群(Group B)に分けることができ(Fig. 3)，(2)で仮定した一過性感染が疑われる群は(1)の一過性感染が疑われる群に相当することが確かめられた．また，Group A に占める MSI サブタイプの割合は Group B に占める MSI サブタイプの割合より大きかった.

(4)MSI サブタイプの臨床検体において，Group A,B 間で7つの MMR 遺伝子(MLH1,MLH3, MSH2,MSH3,MSH6,PMS1,PMS2)[7]の変異およびプロモーター領域のメチル化レベルを比較した結果.

MMR 遺伝子変異を有する症例数に有意差は見られなかった．一方，MHH1 プロモーター領域の 4 か所のメチル化レベルは，Group A では Group B に対して優位に高かった(Fig. 4).

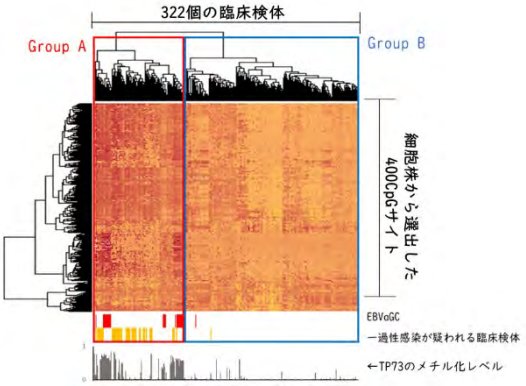


Figure 3. 臨床検体において，細胞株から選出した 400 CpG サイトを用いたクラスタリング結果.

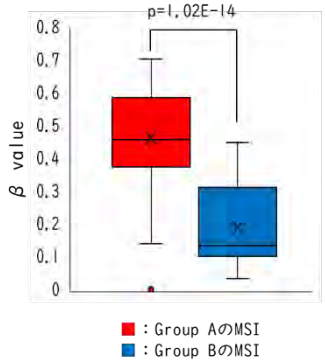


Figure 4. メチル化レベルに有意差が見られた MLH1 プロモーター領域の 4 か所のうちの一つである cg18320188 のメチル化レベル.

4. 考察

以上の結果に加え，細胞株に対する EBV 感染実験で MLH1 プロモーター領域のメチル化レベルが上昇したことが過去に報告されていること[8]を考慮すると，一部の胃がんは EBV 感染によって MLH1 プロモーター領域のメチル化が亢進し，MLH1 の発現が低下して MSI になった後，何らかの原因で EBV が消失して MSI サブタイプの胃がんと診断された可能性が示唆された．今後，EBV に一過性感染した胃癌を分類できるようになり，分子サブタイプに基づく分類が治療方針や予後予測に有効なものとして確立されれば，より良い治療法の開発・提供につながる可能性がある.

5. 参考文献

〔1〕Nature 2014;513(7517):202-209.
〔2〕Nature 2014;513:202-209.
〔3〕J Pathol 2017;242(4):391-399.
〔4〕J Pathol 2023;260(2):124-136.
〔5〕Cell 2017;170(3):564-576.
〔6〕Nature 2014;513:202-209.
〔7〕診療ガイドライン.がん診療ガイドライン.日本癌治療学会. http://www.jsco-cpg.jp/precision-medicine/guideline/
〔8〕J Pathol 2017;242(4):391- 399.

幅広い心理特性に対する血清尿酸値のメンデルランダム化研究

公衆衛生学　青山琉眞(No.2)

背景

プリン作動性情報伝達系は、特異的な受容体を通じて中枢神経系における情報伝達に携わり，精神疾患や睡眠，パーソナリティなどの心理特性に影響を与える [1]．プリン作動性情報伝達系の異常により，プリン体の最終代謝産物である尿酸が中枢神経系で増減することや，中枢神経系の尿酸値と血清の尿酸値が強く相関することから [2]，心理特性と血清尿酸値が関連する可能性が調べられてきた．例えば，健常者に比べ，うつ病患者の血清尿酸値は低く [3]，躁状態では高くなる[4]．また，高尿酸血症治療薬は躁状態を統計学的に有意に改善することがランダム化比較試験のメタアナリシスで実証されている [5]．また，不安症や特定のパーソナリティなどでも血清尿酸値が低下することが示されている [6,7]．しかし，血清尿酸値と心理特性の関連について一致した結論は得られていない [1]．その理由は，上述のメタアナリシスを除き，先行研究はすべて観察研究であり，交絡や因果の逆転などの各種バイアスが不可避であるためである．そこで，本研究では，観察研究においても因果関係を確かめることができるメンデルランダム化（Mendelian Randomization，MR）法を用いて，血清尿酸値が計 14 種の幅広い心理特性に及ぼす因果効果を包括的に調べる．

方法

サンプル： Genome Cohort on Psychosocial Traits (GCOP)研究で GWAS 遺伝子型データの存在する 4317 人を本研の究対象とした．GCOP 研究の測定値のうち，血清尿酸値（mg/dl）と，年齢，性別，BMI（kg/m^2），飲酒状況，婚姻状況と各心理特性を測定する質問紙の合計得点を用いた―自閉症特性：Subthreshold Autism Trait Questionnaire (SATQ)，ADHD 特性：Adult ADHD Self-Report Scale (ASRS)，抑うつ・不安：Kessler Psychological Distress Scale (K6)，不眠症特性：Insomnia Severity Index (ISI)，強迫性：Florida Obsessive-Compulsive Inventory (FOCI)，幻覚・妄想特性：Schizotypal Personality Questionnaire (SPQ)，ギャンブル依存性：Problem Gambling Severity Index(PGSI)，夜型特性：Morningness-Eveningness Questionnaire (MEQ)，主観的幸福度：1 項目主観的幸福度指標，パーソナリティ：Big Five Inventory (BFI)．また，先行研究の血清尿酸値に関する GWAS メタアナリシス [8] でゲノムワイドに有意な SNP のうち GCOP 研究で測定値のある 22 個の SNP（rs11264341，rs780094，rs9847710，rs7675964，rs1458038，rs2622621，rs670011，rs9349256，rs17145750，rs2941484，rs4734295，rs7091956，rs7903456，rs3925584，rs528211，rs3782889，rs11857366，rs8045611，rs1990292，rs3818247，rs2057291，rs2896019）の遺伝子型情報を用いた．

統計解析：1）線形回帰分析：各種心理特性得点を目的変数とし，血清尿酸値を説明変数とし，性別のみを共変量とした解析と，共変量として性別に加え，年齢，BMI，飲酒状況，婚姻状況を用いた解析を行った．2）2 サンプル法を用いた MR 解析：血清尿酸値を目的変数とする各 SNP の回帰係数とその標準誤差は先行研究の GWAS メタアナリシス [8] の公開データから得た．各心理特性を目的変数とする各 SNP の回帰係数とその標準誤差は GCOP 研究データを用いて推定した．こうして得られた回帰係数と標準誤差から，統計ソフト R の MendelianRandomization パッケージを用いて，血清尿酸値が各種心理特性に及ぼす因果効果に関する MR 分析を行った．その際，質問紙得点が正規分布から大きく乖離した 2 つの心理特性（FOCI と PGSI）については，得点を 2 値化し，ロジスティック回帰モデルを用い，それ以外の心理特性については線形回帰モデルを用

いた. MR 解析法としては, 操作変数となる SNP から血清尿酸値を迂回して心理特性に影響する経路がないことを前提とする Inverse-Variance Weighted (IVW) 法および, そのような迂回路の存在を許容する Weighted Median 法と MR-Egger 法を用いた.

結果

血清尿酸値が各心理特性に及ぼす影響について, 共変量として性別のみ (OLS: sex adjusted) および性別と年齢, BMI, 飲酒状況, 婚姻状況 (OLS: multi-adjusted) を用いた線形回帰分析を行ったところ, パーソナリティの勤勉性では前者のモデルのみ有意になり, ギャンブル依存性では両方のモデルで有意になった. 次に, 22 個の SNP を操作変数とし, 血清尿酸値が各心理特性に及ぼす因果効果を3つの MR 解析法にて調べたところ, 統計学的に有意となる因果効果は認められなかった (Table) (MR-Egger 法の結果は省略).

考察

これまで一致した所見の得られなかった, ギャンブル依存性および勤勉性の逆概念である衝動性に血清尿酸値は因果効果を及ぼさないことを本研究により示すことができた. 本研究で用いた MR 解析法のうち, MR-Egger 法では, SNP が血清尿酸値を経ずに心理特性に影響する迂回路の存在を統計学的に検定することができるが, いずれの心理特性についても迂回路の存在は認められなかった. しかし, 同法は検出力が低く, 本研究で用いた4千人強のサンプルサイズでは検出力が不足していた可能性が高いため, 迂回路の存在を完全に否定することはできない. しかし, 用いた SNP の半分に迂回路が存在したとしても妥当な結論を導く Weighted Median 法でも IVW 法や MR-Egger 法と同じ結論が得られているため, 本研究で得られた結果は頑健である.

Table. 血清尿酸値が各心理特性に及ぼす因果効果:線形回帰分析と MR 法の解析結果

質問紙		OLS: sex-adjusted		OLS: multi-adjusted		IVW		Weighted Median	
		beta	P-value	beta	P-value	beta	P-value	beta	P-value
SATQ(自閉症特性)		-0.19	0.076	-0.14	0.208	0.51	0.486	0.19	0.850
ASRS (ADHD特性)		0.01	0.794	-0.01	0.857	0.07	0.850	-0.17	0.707
K6 (抑うつ・不安)		0.01	0.758	0.03	0.505	0.06	0.887	-0.13	0.789
ISI (不眠症特性)		0.04	0.566	0.01	0.939	0.09	0.883	-0.70	0.262
MEQ (夜型特性)		-0.01	0.822	-0.01	0.752	-0.15	0.712	-0.05	0.909
SPQ (幻覚妄想特性)		-0.02	0.675	-0.05	0.352	-0.44	0.203	-0.30	0.535
Happiness		0.00	0.851	-0.01	0.674	-0.02	0.821	0.05	0.688
BFI (パーソナリティ)	協調性	<0.01	0.939	-0.01	0.801	-0.02	0.959	0.60	0.180
	勤勉性	**-0.12**	**0.039**	-0.09	0.113	-0.75	0.147	-0.78	0.131
	神経症傾向	-0.03	0.566	0.02	0.681	0.62	0.095	0.37	0.469
	経験への開放性	-0.01	0.822	-0.01	0.823	0.10	0.823	0.21	0.705
	外向性	0.06	0.305	-0.01	0.878	-0.51	0.110	1.48	0.669
		OR	P-value	OR	P-value	OR	P-value	OR	P-value
PSGI (ギャンブル依存性)>0		**1.10**	**0.005**	**1.09**	**0.016**	0.74	0.249	0.58	0.065
FOCI (強迫性)>0		1.05	0.160	1.03	0.292	0.90	0.617	0.80	0.456

参考文献

1) Mol Psychiatry. 2018;23:94-106. 2) J Alzheimers Dis. 2010;19:1331-1336. 3) J Affect Disord 2018:225:684-690. 4) J Psychiatr Res. 2016;81:133-139. 5) Br J Psychiatry. 2017;210:10-15. 6) Biol Psychiatry. 2014;75:31-37. 7) J Affect Disord. 2018;225:684-690. 8)Commun Biol 2019; 2:115.

余暇時間の運動と全死亡との関連について

～J-MICC 岡崎研究のデータを用いた縦断的解析～

公衆衛生学 荒木丈二(No.4)

1.背景・目的

日本人の運動不足は社会問題となっている。また世界保健機関（WHO）のデータによると2022年には世界中の成人の31.3%、約18億人が、推奨とされる身体活動レベルに達していないことが分かっている[1]。先行研究によると、運動不足は高血圧・肥満などの生活習慣病の発症リスクを増大させ、また死亡リスクも増大させることがわかっている[2]。しかし運動と死亡の関連に関する研究は多数あるが、余暇時間だけの運動と死亡に関する研究は少ない。そこで余暇時の運動量に焦点を当て、運動と全死亡との関連について検討した。

2.方法

研究デザインは縦断研究を用いた。対象者は、日本多施設共同コホート研究(J-MICC)岡崎研究のベースライン調査参加者、男性4,163人、女性3,398人(調査票に不備があった対象者は研究から除外した)。研究リクルート期間は2007年から2011年で、その後2023年12月まで追跡した。調査方法は①自記式調査票②住民票調査の2つを用いた。①自記式調査票では年齢・性別・身長・体重・学歴・喫煙・飲酒・運動のデータを収集し、②住民票調査では死亡の有無・日付のデータを収集した。調査票のデータをもとに各人の余暇時間の運動量を1週間あたりのMETs・時を算出した。また算出した運動量をA群:0 METs・時/week、B群:0＜METs・時/week＜23、C群:23≦METs・時/weekの3群に分けた。ここの23METs・時/weekは健康維持のために厚生労働省が推奨している基準となる運動量である[3]。統計解析には生存期間に対する多変量解析、Cox 比例ハザード回帰モデルを用いた。目的変数は生存期間、対象のイベントは全死亡、説明変数は3群に群分けした運動量(A 群、B 群、C 群)とした。調整変数は年齢・飲酒習慣・喫煙歴・最終学歴・BMIとした。年齢は連続変数として扱い、飲酒習慣では、やめた・(ほとんど)飲まない、月 1～3 日飲む、週 1～4 日飲む、週 5～7 日飲む（4 群）、喫煙歴では、吸わない、やめた、吸う(3 群)、最終学歴では、小・中学校、旧制中学・高校、専門学校・短大・高専、大学・大学院、その他（5 群）、BMI[kg/m^2]は18未満、18以上22未満、22以上25未満、25以上(4群)にそれぞれ群分けした。

3.結果

A群(運動量 0)をReferenceとすると、B群(0＜METs・時/week＜23)、C群(23≦METs・時/week)のハザード比(95%CI)は、男性ではそれぞれ、0.72(0.56-0.94)、0.69(0.52-0.91)、女性ではそれぞれ、1.13(0.70-1.82)、0.71(0.41-1.23)となり、男性でのみ運動している群で統計学的有意に死亡におけるハザード比の低下が見られた。

4.結論・考察

男性では、余暇時間に運動していない群に対して運動している群の方が死亡リスクが低いことが示され、女性では運動している群と運動していない群とで有意な関連は見られないことが示された。余暇時間に運動することで仕事や日常生活のストレスが和らぎ、全体的な健康が向上し死亡リスクが下がると考えられる。また女性で有意な関連が見られなかった理由として、参加者に対する死亡者数の割合が少なかったことが考えられる(男性は参加者 4,163 名に対して死亡者数 544 人、一方、女性は参加者 3,398 人に対して死亡者数 157 人)。今後、追跡期間を延長し更なる解析が必要であると考えた。

Table.1 対象者の特性

(男性)	運動量			(女性)	運動量		
	A 群	B 群	C 群		A 群	B 群	C 群
全体	689	2,371	1,103	全体	660	2,023	715
平均年齢(SD)	54.00(10.43)	58.38(10.75)	64.71(8.45)	平均年齢(SD)	51.89(10.04)	56.20(10.24)	61.62(8.95)
喫煙歴(%)				喫煙歴(%)			
吸わない	167(24.2)	628(26.5)	342(31.0)	吸わない	545(82.6)	1,765(87.3)	655(91.6)
やめた	257(37.3)	1,112(46.9)	586(53.1)	やめた	42(6.4)	134(6.6)	35(4.9)
吸う	265(38.5)	631(26.6)	175(15.9)	吸う	73(11.1)	124(6.1)	25(3.5)
最終学歴(%)				最終学歴(%)			
小・中学校	105(15.2)	314(13.2)	211(19.1)	小・中学校	65(9.9)	254(12.6)	121(16.9)
旧制中学・高校	311(45.1)	982(41.4)	508(46.1)	旧制中学・高校	281(42.6)	880(43.5)	341(47.7)
専門学校・短大・高専	69(10.0)	211(8.9)	54(4.9)	専門学校・短大・高専	240(36.4)	643(31.8)	193(27.0)
大学・大学院	198(28.7)	855(36.0)	325(29.5)	大学・大学院	71(10.8)	242(12.0)	58(8.1)
その他	6(0.9)	9(0.4)	5(0.5)	その他	3(0.5)	4(0.2)	2(0.3)
飲酒習慣(%)				飲酒習慣(%)			
なし	219(31.8)	634(26.7)	304(27.6)	なし	431(65.3)	1,333(65.9)	498(69.7)
月1～3日飲む	62(9.0)	234(9.9)	100(9.1)	月1～3日飲む	66(10.0)	221(10.9)	58(8.1)
週1～4日飲む	109(15.8)	449(18.9)	197(17.9)	週1～4日飲む	79(12.0)	266(13.2)	94(13.2)
週5～7日飲む	299(43.4)	1,054(44.5)	502(45.5)	週5～7日飲む	84(12.7)	203(10.0)	65(9.1)
BMI[kg/m²](%)				BMI [kg/m²] (%)			
<18	27(3.9)	46(1.9)	35(3.2)	<18	54(8.2)	138(6.8)	37(5.2)
18~22	173(25.1)	613(25.9)	283(25.7)	18~22	264(40.0)	884(43.7)	323(45.2)
22~25	249(36.1)	1,052(44.4)	515(46.7)	22~25	217(32.9)	645(31.9)	245(34.3)
25≦	240(43.4)	660(27.8)	270(24.4)	25≦	125(18.9)	356(17.6)	110(15.4)
死亡者数	75	277	192	死亡者数	21	105	36

Table.2 ハザード比

	A 群 (参照群)	B 群 HR (95%CI)	C 群 HR (95%CI)
死亡(男性)	1	**0.72**(0.56-0.94)	**0.69**(0.52-0.91)
死亡(女性)	1	1.13(0.70-1.82)	0.71(0.41-1.23)

[参考文献]

1. Strain T, Flaxman S, Guthold R, Semenova E, Cowan M, Riley LM, Bull FC, Stevens GA; Country Data Author Group. National, regional, and global trends in insufficient physical activity among adults from 2000 to 2022: a pooled analysis of 507 population-based surveys with 5·7 million participants. Lancet Glob Health. 2024 Aug; 12(8): e1232-e1243. doi: 10.1016/S2214-109X (24)00150-5. Epub 2024 Jun25. PMID: 38942042; PMCID: PMC 11254784, (参照 2024-09-11).
2. Inoue M, Iso H, Yamamoto S, Kurahashi N, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S; Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group. Daily total physical activity level and premature death in men and women: results from a large-scale population-based cohort study in Japan (JPHC study). Ann Epidemiol. 2008 Jul;18(7):522-30. doi: 10.1016/j.annepidem.2008.03.008. Epub 2008 May 27. PMID: 18504139, (参照 2024-09-11).
3. 健康づくりのための身体活動・運動ガイド 2023-厚生労働省, (参照 2024-09-18).

イヤホン・ヘッドホンが聴力に与える影響

公衆衛生学　小日向章吾　25 番

○背景

厚生労働省の健康づくりネット [1] によると、ヘッドホンやイヤホンの利用者は若年成人が多く、若年成人はヘッドホンを用いて大音量で音楽を聴取する傾向にあることが挙げられている。また、中高所得国の 12 歳～35 歳の約半数が MP3 プレイヤーやスマートフォンなどのパーソナルオーディオシステムで、WHO 基準（1 週間に最大 40 時間、80dB 以下）以上の危険なレベルの音を聞いている。

○目的

イヤホンやヘッドホンなどのリスニングデバイスの使用が聴力に影響を与えるかどうかを調べる。

○方法

研究デザインとしてメタアナリシスを採用した。論文検索は PubMed を用いた。検索式は（Hearing loss [MeSH Terms]) AND ((earphone) OR (headphone) OR (personal audio device) OR (MP3 player) OR (personal music players)) とした。論文の採用条件としては、フルテキストが読めること、イヤホンやヘッドホンなどのリスニングデバイスの使用と難聴の関係を調べた研究であること、デバイスの使用者と非使用者を比較したオッズ比が書かれていることとした。その後、それぞれの論文から得たオッズ比を変量効果モデルで統合した。統計解析ソフトは EZR（ver.1.68）を用いた。

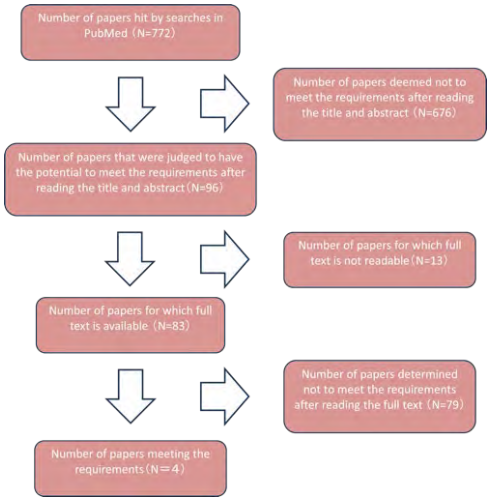


図 1　フローチャート

○結果

PubMed で検索したところ、ヒットした論文は 772 件あった。そのうち 4 件の論文 [2-5] が採用条件を満たした（図1）。採用した 4 件の研究から得た各オッズ比を統合すると図2のようになった。統合されたオッズ比は 1.79 (95%CI: 1.00-3.18) だった。

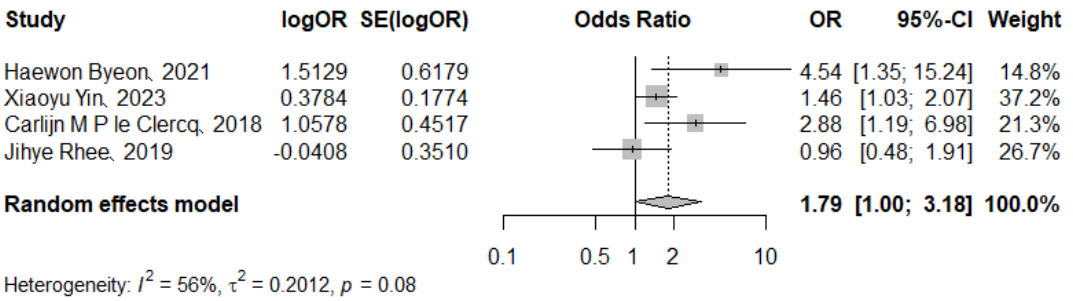


図 2　イヤホンやヘッドホンなどのリスニングデバイスの使用が難聴に与える影響

○考察

1 つ目の論文[2]では、曝露の定義が騒がしい環境でのイヤホン使用であったため、他の研究と比べてオッズ比が高いのではないかと考察した。2 つ目の論文[3]では、騒音性難聴の 307 人と、その対照群 307 人を対象としているので、人数が少ないが、統合する際の重みが大きいのではないかと考察した。3 つ目の論文[4]は、曝露の定義がポータブルミュージックプレイヤーであったが、これはイヤホンやヘッドホンなどのリスニングデバイスと組み合わせて使用されるので、今回の研究の採用条件を満たすと判断した。4 つ目の論文[5]は、曝露の定義がパーソナルステレオであったが、これもイヤホンやヘッドホンなどのリスニングデバイスと組み合わせて使用されるので、今回の研究の採用条件を満たすと判断した。

また、イヤホンと難聴に関するオッズ比が記載されていたが、解析方法が異なっていたので統合しなかった論文[6]を紹介する。この論文[6]は、1 日のイヤホン使用時間が 1 時間増加すると難聴のなりやすさが何倍になるかを調べた研究であり、このオッズ比は 1.19 (95%CI: 1.01-1.41) だった。したがって、この論文では、イヤホンの使用が長いほど、難聴を引き起こす可能性が高いことを示していた。

○まとめ

イヤホンやヘッドホンなどのリスニングデバイスの使用は聴力低下を引き起こす可能性がある。しかし、本研究は対象者の属性、曝露群、対照群、帰結の定義が若干異なる研究のオッズ比を統合しており、研究間の異質性が見られる。また本研究では 4 つの研究のデータしか含まれていない。したがって、オッズ比の解釈には注意が必要である。

○参考文献

1. ヘッドホン（イヤホン）難聴 - e-健康づくりネット（厚生労働省）. https://e-kennet.mhlw.go.jp/tools_headphone/ (2024 年 11 月 25 日閲覧)
2. Haewon Byeon. Associations between adolescents' earphone usage in noisy environments, hearing loss, and self-reported hearing problems in a nationally representative sample of South Korean middle and high school students. Medicine (Baltimore) 100 (3): e24056, 2021.
3. Xiaoyu Yin et al. Effects of Genes, Lifestyles, and Noise Kurtosis on Noise-Induced Hearing Loss. Noise Health 25 (118): 143-157, 2023.
4. Carlijn M P le Clercq et al. Association Between Portable Music Player Use and Hearing Loss Among Children of School Age in the Netherlands. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg 144 (8): 668-675, 2018.
5. Jihye Rhee et al. Hearing loss in Korean adolescents: The prevalence thereof and its association with leisure noise exposure. PLoS One 14 (1): e0209254, 2019.
6. Da-An Huh et al. The Effects of Earphone Use and Environmental Lead Exposure on Hearing Loss in the Korean Population: Data Analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES), 2010-2013. PLoS One 11 (12): e0168718, 2016.

若年時の「痩せ」と将来の骨折リスクに関するコホート研究

公衆衛生学分野　花村柚葉（No.68）

1. 背景・目的

令和 4 年度厚生労働省による国民健康・栄養調査によると、20 歳代の女性の約 5 人に 1 人が BMI＜18.5 の「痩せ」にあたることが分かっている(1)。また、ある論文によると、近年の SNS などのメディアの発達により、痩せ願望や体型不満をもつ若い女性が多く、小学六年生から大学生を対象に調査を行ったところ、全ての学校段階で、理想体重が実際の体重をかなり下回っていたという(2)。そのような現状をふまえて、女性の若い頃の「痩せ」が将来の健康リスクにどのような影響を与えるのかを明らかにすることを本研究の目的とした。低い BMI がある種の骨折のリスクファクターになりうることは既に知られている(3)ため、本研究では中学生時の体型が将来の骨折リスクにどのような影響を与えるかに焦点を当てた。

2. 方法

本研究は、日本多施設共同コホート研究（J-MICC study）岡崎研究の二次調査に参加した 2,343 人の女性を対象とした。この研究の exposure を自己記入式の中学生時の体型とし、対象者を太っていた、普通、痩せていた、の 3 つのカテゴリーに分けた。次に outcome を骨折の有無とした。今回の研究では若年時の痩せによる骨量低下が原因となるような骨折について調べたかったので明らかに体型以外が原因となるような頭・顔・肘・指の骨折、また逆に肥満がリスクファクターとなるような膝・足首の骨折は除いた。そして年齢、出生時体重区分　（大きかった、普通、小さかった、不明）、中高生時の運動量(全然していない、あまりしていない、ほどほど、よくやっていた、やりすぎだった)、出産人数を共変数として解析に含めた。データ解析は全て EZR を用いて行い、ロジスティック回帰分析により中学生時の体型ごとの骨折リスクを評価した。

3. 結果

対象者 2343 人のうち、本研究の定義する骨折が見られたのは 54 人であった。交絡を調整する前の結果では、中学生時に痩せていた人は普通の体型だった人に比べて、将来の骨折リスクのオッズ比が 1.69(95％信頼区間：0.93－3.05)となった(Table1 参照)。次に全ての交絡因子を含めた多変量解析の結果、中学生時に痩せていた人は普通の体型であった人を基準としたときの骨折リスクのオッズ比が 1.78(95％信頼区間：0.93－3.39)となった。（Table2 参照）調整前に比べて共変数を調整した後のオッズ比が高くなったことから、交絡の影響があったと言える。そして、1.78 というオッズ比は中学生時に痩せていた人の方がそうでない人に比べて、わずかに骨折しやすい傾向があることを示している（p値が 0.08＜10％なので、有意ではないが傾向ありと考えた）。

4. 考察

今回の研究の限界として、骨折の発生が 54 名と少なかったことが挙げられる。サンプル数を増やせば、中学生時の体型と将来の骨折の関係が有意に出た可能性があるといえるだろう。しかし、本研究から、若年時の痩せ型は将来の骨折リスクをわずかに高める可能性があることが示唆された。女性はそのようなリスクを理解した上で若い頃にどのような体型を目指すのかを自身で判断すべきだと考える。

5. 参考文献

(1) 厚生労働省　令和4年度国民健康・栄養調査結果の概要
(2) 向井隆代、女子におけるダイエット行動とメディアの影響　小中高大学生を対象とした横断研究より、青年心理学研究、2018/8/31
(3) C.De Leat, Body mass index as a predictor of fracture risk: A meta-analysis, Osteoporosis International, 01 June 2005

飲酒量の増加に伴う死亡率の上昇

公衆衛生学分野　山本匠汰　84

(1) 目的

飲酒量の増加に伴って死亡率は上昇するのではないかという仮説を立て、それを検証。また、結果に基づく改善方法の模索。

(2) 背景

過度な飲酒が死亡率を高めることは知られており、日本において多飲酒者はアルコールを1日当たり 60g以上摂取している人と厚生労働省によって定義されている。また、アルコールを 1 日当たり 40g以上摂取する場合生活習慣病リスクが大きくなることも厚生労働省の見解として示されている。

国民健康・栄養調査によると 2022 年時点でアルコールを1日当たり 40g以上摂取する男性は 13.5%いる。

(3) 方法

研究デザインはコホート(追跡型)研究。

対象者は日本多施設共同コホート研究(J-MICC study)岡崎研究の男性参加者4,153 人(平均年齢:59.3 歳、平均追跡期間:13.6 年、1 日当たりアルコール摂取量が 200g をこえる参加者は除いた)

調査方法は自記式調査票。

アルコール摂取量は10種類の酒について1週間のアルコール摂取量をアンケートに基づいて集計し、集計値を式(1)に代入。

式(1):頻度(回数/週)×1 回あたりの量×係数 1×係数 2×23

係数 1:各種のアルコール含有量と飲酒単位量から日本酒量へ変換

係数 2:各種の飲酒単位量への変換

死亡は住民票調査によって集計。

以上の値を用いて目的全数を全死亡、説明変数を1日当たりの飲酒量、調整変数を年齢(連続変数)、以下群変数として BMI、喫煙、学歴、運動習慣の有無とした。Cox 比例ハザード回帰で死亡率を求める。

(4) 結果

Table1. Alcohol Consumption and Change in HR (corrected)

Group (Alcohol g/day)	Cases	Death (%)	HR	95%CI	P-value
Non-drinker	1,114	140(13)	1.00	reference	-
0-20	1,499	184(12)	1.13	0.90-1.41	0.295
20-40	666	82(12)	1.04	0.79-1.37	0.770
40-60	419	61(15)	1.43	1.05-1.94	0.022
60-80	179	28(16)	1.80	1.19-2.71	0.005
80-200	134	15(11)	1.14	0.66-1.99	0.640
Quit-drinker	142	34(24)	1.64	1.12-2.39	0.011

(5) 考察

アルコール摂取量と死亡率の上昇には一定の関係性がみられた。

アルコール摂取量 80-200g/日の群において HR で有意性がなかったのは、健康体でなければ過度な飲酒ができないためだと考える。

Quit-drinker において HR が有意に高いのは、何らかの健康上の問題を抱えたことによって飲酒習慣をやめたためだと考える。

(6) 結論

アルコール摂取量の増加によって死亡率は上がる傾向にあることが言える。

健康維持の観点から飲酒習慣及びアルコール摂取量の削減に努めるべきである。

骨肉腫における死亡に関する予後因子探索研究

医療統計学・データサイエンス分野、福井大翔、71

背景:

骨肉腫は小児及び若年者に好発する、原発性悪性骨腫瘍である。骨肉腫は全悪性骨腫瘍の約 20%を占める。本邦では毎年 200～300 例の症例がある。治療の進歩により生存率は向上したが、5 年生存率は 60～70%にとどまり、予後不良例も多い。6つの既知の予後因子として性別、年齢、臨床病期、分化度、腫瘍径、原発部位が知られている。(1)

目的:

研究では、骨肉腫患者における、全死亡についての既存の予後因子を確認し、新たな予後因子を同定する。

方法:

本研究は後ろ向きコホート研究として実施した。対象データとして、米国の公的がん登録データベースである SEER Research Data (Surveillance, Epidemiology, and End Results) の 17 Registries, Nov 2023 Sub[2020-2021]を使用した。このデータの症例集積期間は 2000 年から 2021 年であった。

集団の抽出においては以下の除外基準を用いた。まずステージ等の検討変数の基準が不確定であるため、2000 年から 2003 年に登録された症例を除外した。また、重症例が早期に登録されやすい可能性があり、かつ追跡期間が不十分であるため、2018 年から 2021 年に登録された症例も除外した。さらに、エンドポイントや予後因子が不明または欠測がある症例を除外した。

エンドポイントは全生存期間とした。既知の予後因子として、性別、年齢、臨床病期、分化度、腫瘍径、原発部位を検討し、新規の予後因子候補を組織学型、人種とした。

多変量解析には Cox 比例ハザードモデルを用い、予後因子を探索した。ここで新規の予後因子候補にて統計的有意差($p<0.05$)が得られた場合、詳細を検討するため、Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成し、ログランク検定で群間の差を評価した。

結果:

SEER データベースに登録されている約 975 万例のうち、骨肉腫と診断された例を抽出した。このうち、上記の基準を満たさない症例を順次除外し、最終的に 2,278 例を解析対象とした(図 1)。



図 1 フローチャート

多変量 Cox 回帰分析の結果(図2)、既知の予後因子のうち、性別は予後因子ではなかった ($p=0.142$)が、その他の 5 つの既知の予後因子は、予後因子として再確認された。また、新規の予後因子候補である、組織学型は新規の予後因子として同定された($p=0.011$)が、人種は予後因子として同定できなかった($p=0.825$)。

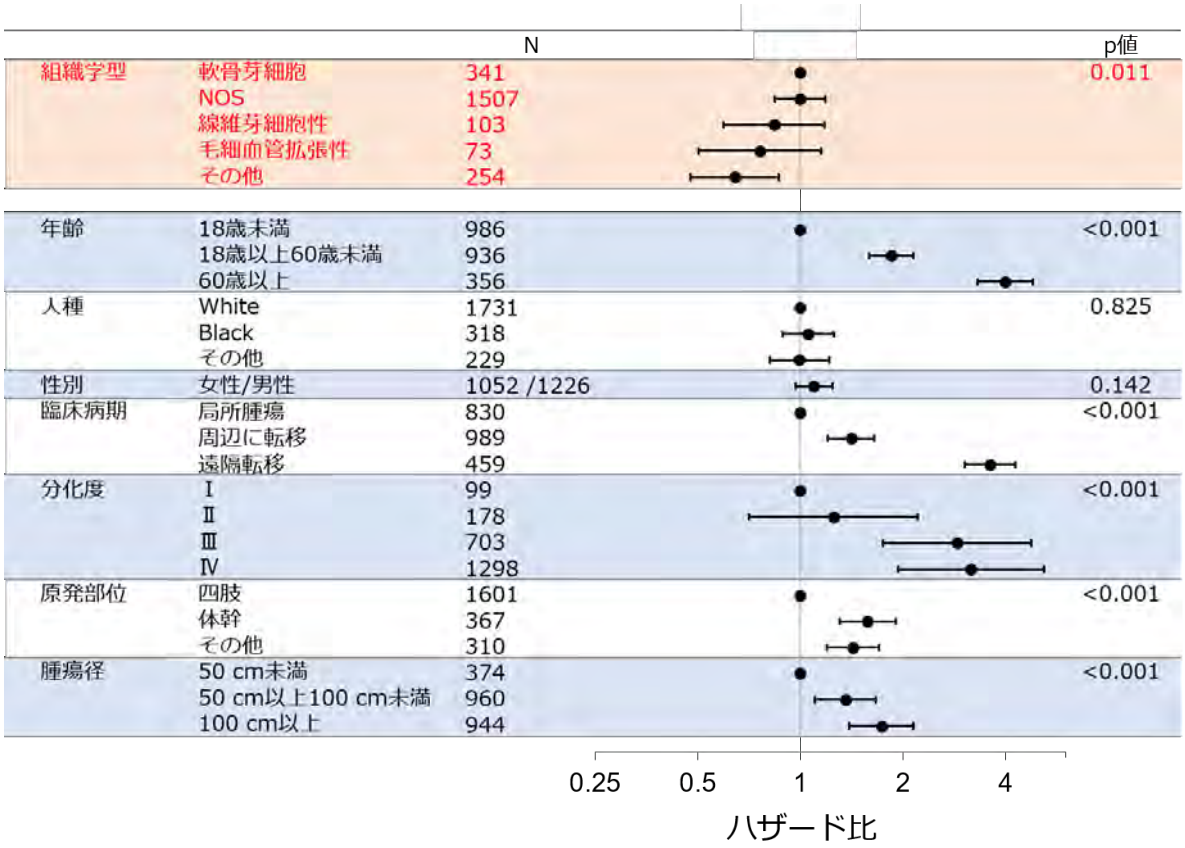


図 2 多変量 Cox 回帰分析の結果

新たに予後因子として同定された、組織学型についての生存率を図 3 に示した。各群間で差が認められた(p<0.001)。

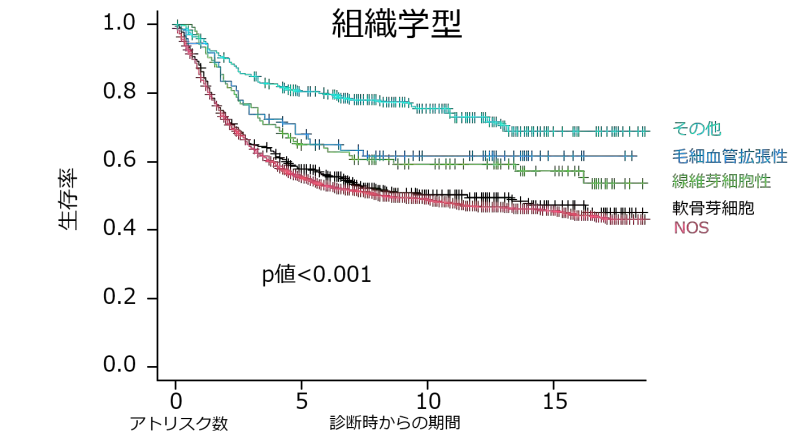


図 3 組織学型に基づく KM 曲

考察:

骨肉腫患者にて、既知の予後因子のうち、年齢、臨床病期、分化度、腫瘍径、原発部位の 5 つを予後因子として再確認できた。組織学型が新規の予後因子として同定された。

組織学型が予後因子として同定された理由は、先行研究に比べ、本研究で用いたデータの症例数が多いことに基づくと考えられた。

本研究の限界として、SEER Research Data では治療の詳細情報が得られず、治療に関する情報を解析に用いることができなかった。

参考文献

1. Xin S, Wei G. Prognostic factors in osteosarcoma: A study level meta-analysis and systematic review of current practice. J Bone Oncol. 2020;21:100281.

膵神経内分泌腫瘍患者における死亡に関する予後因子探索研究

医療統計学・データサイエンス分野　森田大翔　81

背景:

膵神経内分泌腫瘍（pancreatic neuroendocrine tumors, pNETs）は、膵臓の内分泌細胞に由来する希少な悪性疾患であり、その発生頻度は他の膵腫瘍に比べて低い。日本における年間罹患率は 10 万人あたり 3．37 人と推定され、罹患数は少ないものの診断数は近年増加傾向にある。pNETs の予後は多様な要因に影響を受けることが知られている。これまでの研究により、年齢、性別、人種、婚姻状況、腫瘍径、腫瘍の部位、腫瘍分化度、臨床病期の 8 つが主要な予後因子として報告されている。(1,2) しかしながら、これらの既存の予後因子が現在の臨床にてどの程度の妥当性を持つか、また新たな予後因子が存在するかについては十分に検討されていない。

目的:

本研究では、膵神経内分泌腫瘍患者における、全死亡についての既存の予後因子を確認し、新たな予後因子を同定する。

方法:

本研究は後ろ向きコホート研究として実施した。対象データとして、米国の公的がん登録データベースである SEER Research Data (Surveillance, Epidemiology, and End Results) の 17 Registries, Nov 2023 Sub[2020-2021]を使用した。このデータの症例集積期間は 2000 年から 2021 年であった。

集団の抽出においては以下の除外基準を用いた。まずステージ等の検討変数の基準が不確定であるため、2000-2003 年に登録された症例を除外した。また、重症例が早期に登録されやすい可能性があり、かつ追跡期間が不十分であるため、2018-2021 年に登録された症例も除外した。さらに、エンドポイントや予後因子が不明または欠測がある症例を除外した。

エンドポイントは全生存期間とした。既知の予後因子を年齢、性別、人種、婚姻状況、腫瘍径、腫瘍の部位、分化度、臨床病期の 8 個、新規の予後因子候補を腫瘍数（単発・多発）、腫瘍の機能性（ホルモン産生の有無）とした。

多変量解析には Cox 比例ハザードモデルを用いた。ここで新規の予後因子等で統計的な有意差（本研究では p 値 0.05 以下とする）が得られた場合、詳細を検討するため、Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成し、ログランク検定で群間差を評価した。

結果:

SEER Research Data に登録されていた約 975 万例のうち、膵神経内分泌腫瘍と診断された 14,820 例を抽出した。このうち、上記の除外基準を満たさない症例を除外し、5,777 例を解析対象とした（図 1）。

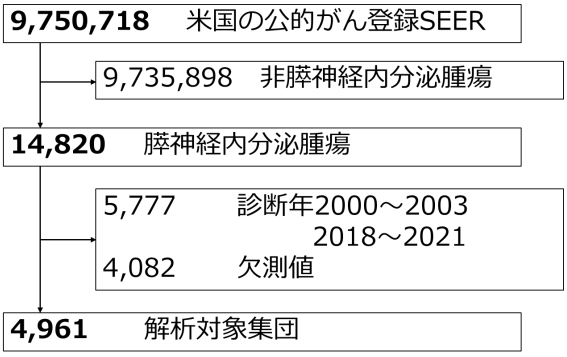


図 1:症例フローチャート

多変量 Cox 回帰分析の結果（図 2）、既知の 8 つの予後因子のうち、人種は予後因子ではなかった（p=0.233）が、その他 7 つの既報の予後因子は予後因子であることが再確認された。また、新規因子候補とした腫瘍数は新規の予後因子として同定された（p<0.001）が、機能性は予後因子として同定できなかった（p=0.960）。

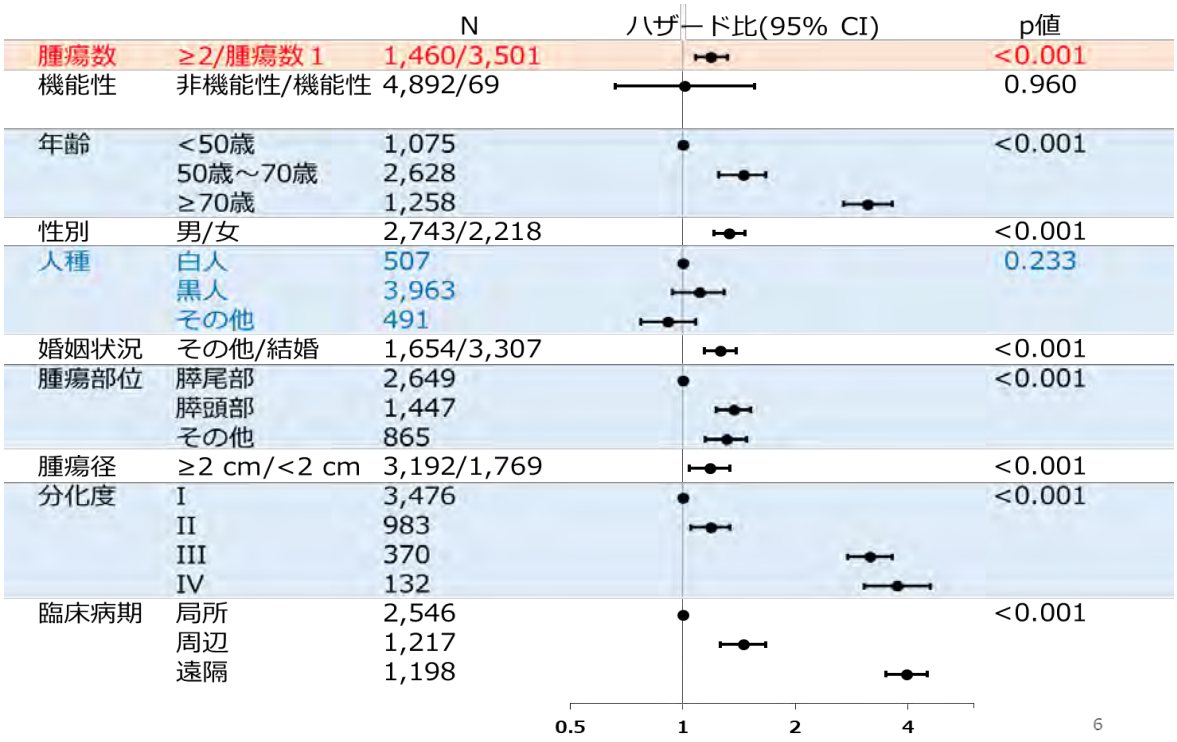


図 2：患者背景および多変量 Cox 回帰分析の結果

新たに同定された予後因子である、腫瘍数の生存曲線を描述した（図 3）。腫瘍が単発および多発である群の 5 年生存率は、それぞれ 60％および 52％であり差があった（p<0.001）。

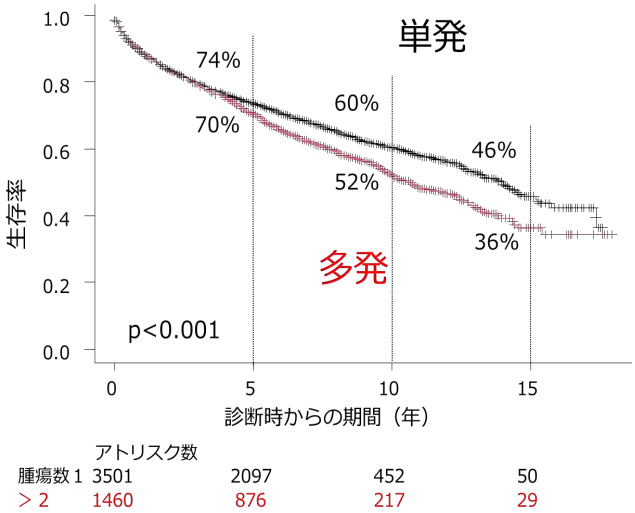


図 3：腫瘍数に基づく生存率

考察：

本研究では、膵神経内分泌腫瘍患者において既存の予後因子 8 項目中 7 項目を再確認し、腫瘍数を新たな予後因子として同定した。

腫瘍数が予後因子となる理由として、長期の追跡データを活用した点が挙げられる。この結果は、腫瘍数が短期的な予後よりも長期的な予後に影響を及ぼす可能性を示唆している。

本研究の限界として、SEER Research Data には治療の詳細情報が含まれておらず、治療選択や治療反応が予後に与える影響を検討することができなかった。

参考文献：

(1) Zhou H, et al. Cancer medicine. 2017;6(11):2745-56.
(2) Yang Z, et al. Frontiers in Endocrinology. 2023;14:1025485.

Forensic STR marker genotype might be associated with phenotype

法医学　髙宮一真　No.53

【Objective】

現在、法医学では個人識別の DNA マーカーとして、The Combined DNA Index System(CODIS)に含まれる 20 個の short tandem repeat (STR)が使用されている。しかし、CODIS 座位の中には遺伝子の近くに存在するものもあり、これらの座位が表現型に与える影響については十分に解明されていない。これまでにヨーロッパを中心とした集団では STR と遺伝子発現に関する研究が行われ、いくつかの座位で弱い関連が指摘されている。直接的な関連として、STR 長の変異がメチル化やヒストン修飾に影響を及ぼし、遺伝子発現レベルの変化を引き起こし、疾患や形質変化の原因となりうると考えられている。また間接的な関連として、CODIS STR が遺伝子発現に影響または強く連鎖するバリアントと連鎖不平衡状態にあることから、STR の遺伝型から発現量が推定できる場合がありうると指摘されている。本研究では、日本人集団データを用いて、 STR マーカーと、その近傍に存在する Genome-Wide Association Study(GWAS)関連バリアントおよび遺伝子発現との関連を調査し、CODIS 座位の遺伝型が表現型に与える影響を検討した。

【Methods】

本研究において、データは全て 1000 Genomes プロジェクトに含まれる日本人 104 人の試料に基づいている。STR の遺伝型は既報 [1]より入手した(D21S11 は欠損)。

まず jMorp に掲載されている日本人を対象とした 12 個の GWAS において検出された各 CODIS STR の前後 100kb 以内に位置するバリアントを抽出した。これらのバリアントと STR 間の連鎖不平衡の指標値(r^2)を、ハプロタイプデータに基づき計算し、関連の程度を調べた。

次に、各 CODIS STR に対応する STR アリル量(β)を算出し、CODIS STR と 100kb 以内にある遺伝子の発現量との相関を検討した。遺伝子発現量は前述の 104 人のうち、82 人のリンパ芽球様細胞株を用いたマイクロアレイの公開データを使用した [2]。β はrをアリルの反復数，pをアリル頻度とすると下のように表される。アリル頻度は日本人 1501 人のポピュレーションデータを用いた。

$$\beta = \sum_{i=1}^{2} r_i p_i$$

【Results】

CODIS 座位の前後 100kb 以内に存在する遺伝子、GWAS 関連バリアントの数、および関連する表現型(trait)の数を示す(Table 1)。GWAS でヒットしたバリアントは合計 134 個、表現型は 178 個であった。

前述したr^2と、バリアントと traits 間のp値の関係を示す(Figure 1)。データが入手できた 106 個のバリアントのうち、1個(rs4244808)が、TH01 と弱い関連があった(r^2=0.092)。このバリアントは *IGF2* のイントロンに存在し、身長に弱い関連

Table 1. Genes and numbers of GWAS hit variants and traits within 100 kb before and after the CODIS STR.

STR	Gene	Variants	Traits
D1S1656	*AGT, C1orf198, CAPN9, COG2*	5	5
D2S1338	*RUFY4, TNS1*	10	13
D2S441	*C1D*	2	2
TPOX	*TPO*	8	13
D3S1358	*LARS2, LIMD1*	6	11
FGA	*DCHS2, FGA, FGB, FGG, PLRG1*	2	3
CSF1PO	*CDX1, CSF1R, PDGFRB, SLC26A2, TIGD6, HMGXB3*	13	13
D5S818		7	7
D7S820	*SEMA3A*	0	0
D8S1179	*ZNF572*	5	14
D10S1248		5	5
TH01	*ASCL2, INS, TH, IGF2*	13	20
D12S391	*BORCS5, LRP6, MANSC1*	5	5
vWA	*ANO2, VWF*	1	2
D13S317		2	2
D16S539		13	13
D18S51	*BCL2, KDSR*	5	6
D19S433	*URI1*	14	24
D21S11		14	16
D22S1045	*C1QTNF6, IL2RB, KCTD17, RAC2, SSTR3, TMPRSS6*	4	4

Expression data were not available for those in blue

を示していた(効果量:0.05)。
CODIS STR とその近傍遺伝子の発現との関係について、相関係数が±0.1 以上であった STR-遺伝子ペアは 12 個であった。この 12 個について単回帰分析により関連性を検討したところ、*ASCL2* と TH01 との間に弱い関連が示された(p 値=0.0038、q 値=0.046)(Figure 2)。

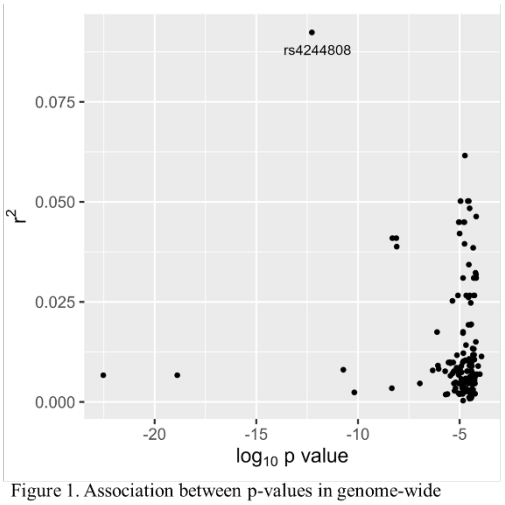


Figure 1. Association between p-values in genome-wide association study (GWAS) and linkage disequilibrium coefficient (r^2) with CODIS STRs.

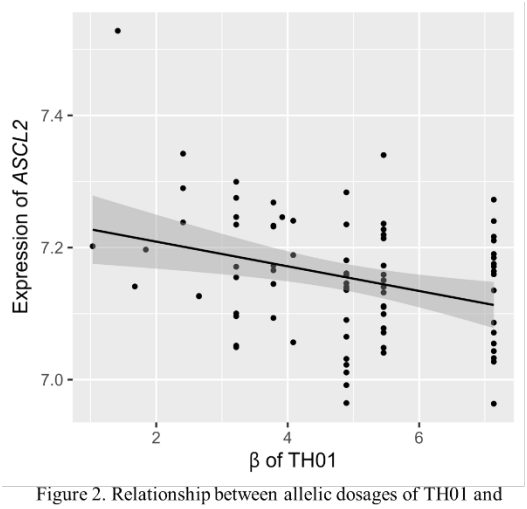


Figure 2. Relationship between allelic dosages of TH01 and expression level of ASCL2 in lymphoblastoid cells.

【Discussion】
今回の結果、統計学的に弱い関連が認められた TH01 は、これまでにもヨーロッパの集団で形質との関連が指摘されている座位である。TH01 をイントロンに含む *TH* の周辺には多数のインプリンティング遺伝子が存在している(Figure 3)。マウスにおいて *Th* を含む領域を欠失させるとインプリンティングに異常が生じるとの報告がある。ヒトにおける *TH* 周辺の遺伝子制御機構については、現時点では明確ではないが、今後明らかになれば、TH01 の遺伝型が個人識別に不要な情報を含む可能性が考えられる。ただし今回の検討を含め、これまで TH01 の遺伝型が直接表現型に影響を与えることが証明されたわけではない。現時点では CODIS STR は法医学的マーカーとして問題なく利用可能と考えられるが、継続的に表現型との関連について注視する必要がある。

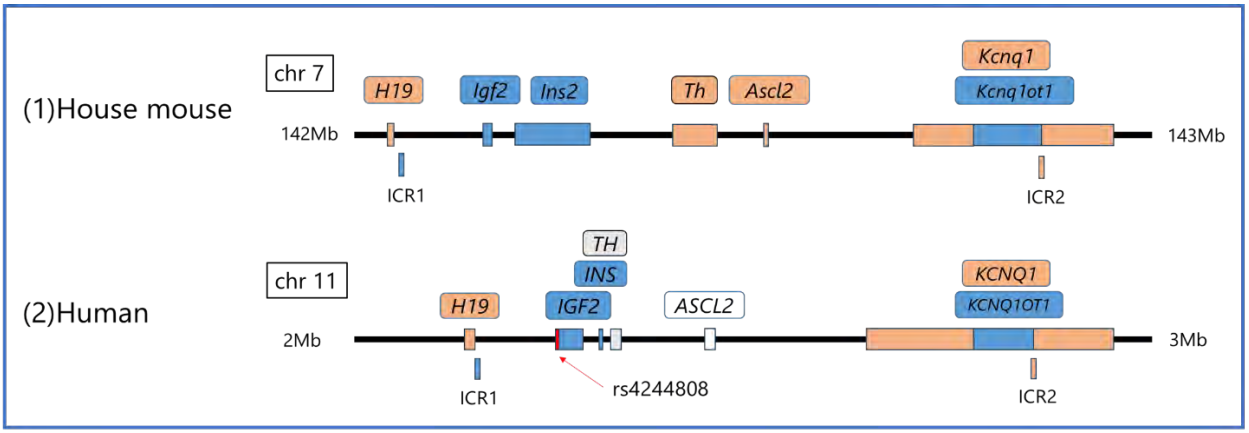


Figure 3. Gene map around TH01 in human and corresponding one in mouse. The label color of the gene name indicates the origin of the expressed gene: blue for the father, orange for the mother, white for both, gray for unknown. ICR: imprinted control region.

【参考文献】1) doi:10.3390/genes13122205, 2) doi:10.1371/journal.pgen.1002639

解剖前スクリーニング検査としての死後 CT の利点と

その問題点についての検討

法医学　尾畑秀成　24 番

1.目的・背景

近年，CT 検査が死因診断に積極的に用いられるようになっている。今回我々は死後 CT 検査画像とそれによる解剖前の死因診断を解剖後の死因診断と比較検討して，死因診断における死後 CT を用いる際の有用性とその注意点について検討した。

2.方法

2016 年 6 月から 2024 年 7 月までに事前に死後 CT を実施し，名古屋市立大学法医学教室で法医解剖を実施された 67 例を対象にした。解剖前に実施した CT 検査画像と医師による読影所見および死因診断を解剖所見と比較検討した。また，解剖および検査結果から溺死と診断された事例においては，溺死と診断するための所見を確立すべく，溺死例と他の死因による CT 所見とを比較検討した。

3.結果

解剖前の死後 CT と解剖所見とを比較した結果，損傷が両者で認められたものが 17 個，死後 CT で指摘がなかった損傷が解剖で認められたものが 138 個，死後 CT で指摘があるが解剖では指摘がない所見が 18 個あった（Table）。

Table．死後ＣＴと解剖所見との比較

一致したもの

損傷	個数
骨折	14
血気胸	3

解剖所見で明らかになったもの

損傷	個数
皮下出血	45
表皮剥脱	41
骨折	13
肝挫傷	6
硬膜下血腫	5
熱傷	5
くも膜下出血	4
肺挫傷	2
索溝	2
その他	15

解剖所見では指摘がないもの

所見	個数
副鼻腔内液体貯留	11
骨折	4
気胸・血胸	3
その他	18

溺死では肺野全体に間質の肥厚を伴うすりガラス様陰影がみられた（Fig.a）。また，小葉中心性の淡い斑状影が気道散布様に分布しているものもみられた。他の所見としては胸腔内液体貯留，気胸，肺水腫を認めた。非溺死の肺をみると溺死の肺所見と類似し

ているものがあった(Fig.b)。また，頭部 CT をみると溺死例，非溺死例ともに副鼻腔内に液体貯留を認めた(Fig.c,d)。

a



b



c



d



Figure. a)溺死の肺所見 b)非溺死(くも膜下出血)の肺所見 c)溺死の頭部所見 d)非溺死(肺水腫)の頭部所見

4.考察

皮下出血や臓器損傷など死後 CT では検出が困難な損傷があり，死後 CT の読影の際には注意が必要である。
非溺死の肺をみると溺死の肺所見と類似しているものがあり，肺の所見のみで溺死を診断することは極めて困難であるといえる。
解剖前スクリーニング検査としての死後 CT は，解剖時に損傷の検出が容易になる点や，副鼻腔など解剖時に検索しにくい部位の検索ができるなど，有用な点も多いと考えられた。

5.参考文献
死亡時画像診断(Autopsy imaging)におけるチェックシートの活用 | 新潟市医師会 (niigatashi-ishikai.or.jp)

ヒト組織中マイクロプラスチックの顕微鏡による検出―予備実験―

法医学　椙村むつみ(No.50)

1．目的・背景

マイクロプラスチック(MP)とはプラスチック製品から発生する粒径5mm 以下のプラスチック粒子である。使用済みプラスチックの一部は環境中に放出される。しかし放出されたMP は分解されないため、MP のヒトへの暴露による健康影響の懸念が高まっているが、その実態はほとんど明らかになっていない。最新の研究ではヒトの健康にも影響があり、MPの体内の動脈硬化部位への蓄積量に依存して、虚血性心疾患や脳卒中などの死亡を含む病気の発症のリスクが高くなることが報告されている。しかし、MP の蓄積と法医解剖例でみられる致死的疾患との関連はよく分かっていない。そこで MP の蓄積について知るために本研究では、体内に蓄積した MP の顕微鏡による検出方法の確立を目指した。

2．方法

MP は脳や心臓など体の様々な部位に蓄積していることが報告されている。そこで今回は特に蓄積量が多いとされている肝臓と腸管を用いて、それらを蛍光試薬で染色し、顕微鏡を用いた MP の検出・形状に関する検討をして予備実験を行った。顕微鏡は蛍光顕微鏡、電子顕微鏡、ライトシート顕微鏡を使い、プラスチック粒子の染色には蛍光試薬である Nile red を用いた。Nile red はマイクロプラスチックを調べた論文でも広く使用されており、オレンジ色の光で発光するが、脂質との親和性が高く、脂肪滴に取り込まれて蛍光を発することもある。そこで、今回は論文でもよく見られた紫外線照射(UV)を併用した実験を行った。今回は大きく分けて2つの実験を行った。なお今回の実験は全てガラス器具を用いた。

1つ目は作製したプラスチック粒子の観察である。プラスチック製品をやすりで削ってプラスチック粒子を作製し、Nile red 染色後、蛍光顕微鏡で観察した。

2つ目はヒト組織中の MP の検出である。まず肝臓と腸管から一部を切り取り、観察用の試料を作製した。蛍光顕微鏡と電子顕微鏡は一週間ほどかけて臓器を KOH で溶解させ、その後超遠心を行い、その残渣を観察した。今回蛍光顕微鏡では溶液の一部をスライドガラスに塗抹したものと溶液をメンブレンフィルターに通して吸引ろ過し、フィルター上に残った2種類の試料を観察した。ライトシート顕微鏡用試料は、臓器を脱脂し、Nile red 染色した後に透明化したものを観察した。

3，結果・考察

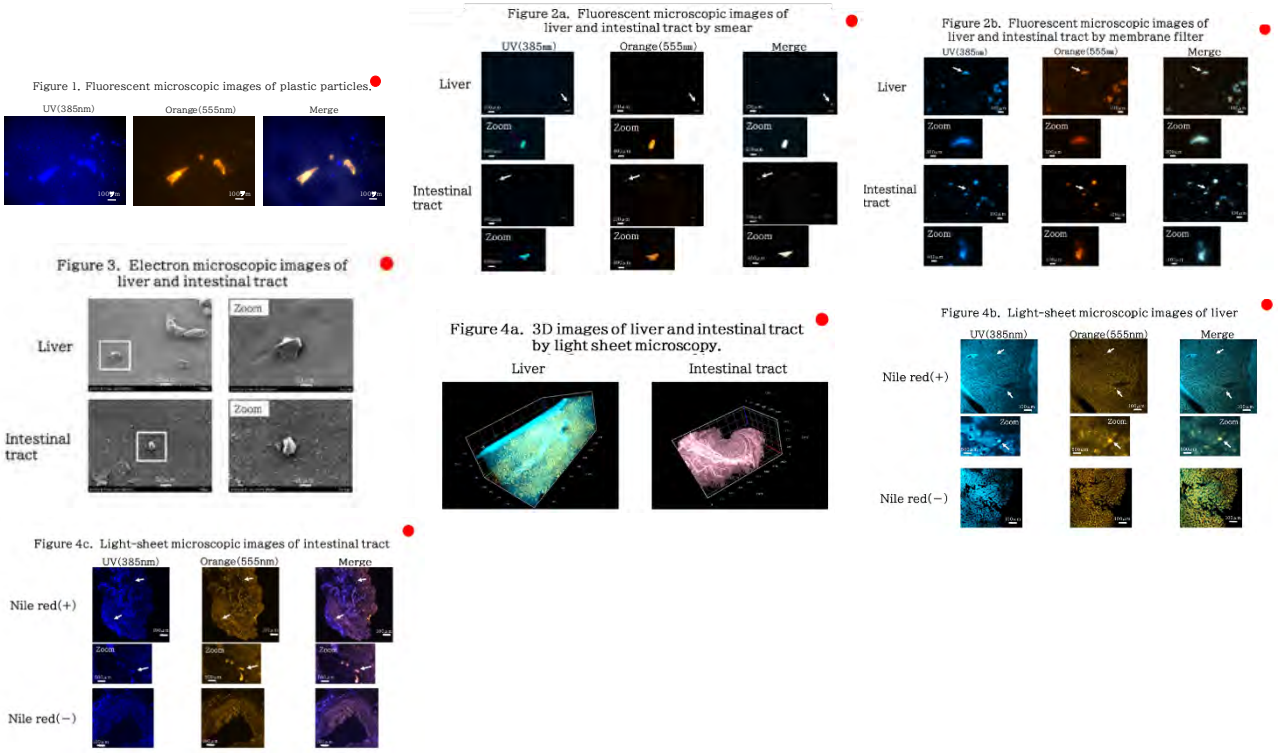
まず作製したプラスチック粒子の蛍光顕微鏡による観察を行ったところ、UV の光のみではプラスチックを含む多くのものが発光した。そこで Nile red 染色によるオレンジの光との重なりを見た結果、UV の光でもオレンジの光でも発光しているものがプラスチックであると言える。(Figure 1)。

次にヒト組織中 MP を観察した結果について説明する。まず溶液の一部をスライドガラスに塗抹したものと溶液をメンブレンフィルターに通して吸引ろ過し、フィルター上に残ったものの2つを蛍光顕微鏡で観察したところ、肝臓と腸管共にUVとオレンジ、それぞれの光で発光しているところが一部重なっていることが分かり、形や大きさから MP である可能性が考えられた(Figure 2a,2b)。そしてより詳細に形状を調べるために走査型電子顕微鏡で観察したところ、肝臓・腸管ともに生体内由来ではないと思われる形が不自然な10μm～25μmほどの粒子が観察でき、その形や大きさから MP である可能性が考えられた。(Figure 3)。

最後に3次元的に観察するためにライトシート顕微鏡を用いて実験を行った。ライトシ

ート顕微鏡とは立体試料を透明化し、3D のイメージングを可能にする顕微鏡である。組織の切片を観察する電子顕微鏡や蛍光顕微鏡に比べ、ライトシート顕微鏡は組織全体を3D で観察できるため検出しやすいという特徴がある。今回ライトシート顕微鏡では肝臓と腸管の3次元の画像を撮影し(Figure 4a)、その際に撮られた 1000 枚ほどの写真の中からプラスチック粒子の存在を確認した。その結果肝臓・腸管ともに UV とオレンジ、それぞれの光で発光しているところが、一部重なっていることが分かり、Nile red 染色をしていない方ではオレンジの光が UV と重なる粒子状のものは検出されなかった。その結果より、UV による発光と NR による蛍光が重なるところが MP の可能性があると考えられた(Figure 4b,4c)。

すべての過程で臓器なしをコントロールとして行った結果、UV とオレンジの光が重なっている部分は無かったため、外部からのプラスチックの混入は無かったと言える。



4. 結論

今回ヒト組織中で MP と思われるものを顕微鏡により検出することが可能であった。しかし、今の段階では MP の可能性があるということしか言えないので、今後フーリエ変換型赤外分光法(FTIR)や熱分解ガスクロマトグラフ質量分析(Py-GC/MS)などを用いて素材や素材別の定量を行って、明らかにしていく必要がある。

5. 参考文献

・Microplastics: Detection in human samples, cell line studies, and health impacts, Environmental Toxicology and Pharmacology 101 (2023) 104204

・Microplastics and Nanoplastics in Atheromas and Cardiovascular Events, N Engl J Med 2024;390:900-10

・Quantitation and identification of microplastics accumulation in human placental specimens using pyrolysis gas chromatography mass spectrometry, Toxicological Sciences, 2024, 199(1), 81-88

ICU 患者のせん妄発症率、発症の関連要因および ICU 外活動による影響の検討

地域医療学分野　梅崎杏(17)、菊池柾人(30)、柴田麻帆(47)、長坂凜太郎(60)

1. 背景・目的

せん妄とは注意や理解、記憶などの機能が急性に低下する病態であり、その症状が変動することを特徴とする。ICU ではせん妄発症率が高く[1]、ICU でのせん妄発症は死亡率の上昇や入院期間の延長と関連する[2]ということが先行研究で報告されている。また、リハビリテーションはせん妄発症期間を短くすること[3]、若者よりも高齢者の方がせん妄になりやすいこと[4]、オピオイドの使用が用量依存的にせん妄のリスクを高めること[5]も先行研究で明らかになっている。

名古屋市立大学医学部附属西部医療センターの ICU では、通常のベッドサイドリハビリテーションに加え、屋外庭園散策や入浴などのリハビリテーションも行っている。今回の研究では、屋外庭園散策と入浴を ICU 外活動、ベッドサイドリハビリテーションと病棟内歩行を ICU 内活動と定義した。ICU 外活動は患者の幸福と人間性を重視したケアであるということが先行研究で示されている[6]。

本研究では、せん妄発症率とせん妄発症のリスク要因を明らかにするとともに、ICU 外活動のせん妄発症への影響を検討することを目的とした。

2. 方法

2.1 スタディーデザイン

後ろ向き観察研究を行った。

2.2 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にて実施した。

2.3 対象

2023 年 1 月から 2024 年 7 月の間に名古屋市立大学医学部附属西部医療センターの ICU に入室した患者のうち、以下のすべての基準を満たす患者を対象とした。

①観察期間に ICU に入室した患者
②ICU 在室日数が 3〜30 日間の患者
③Intensive Care Delirium Screening Checklist(ICDSC)によるせん妄評価が行われた患者

2.4 データ収集方法

麻酔科医師から助言を頂きながら、CRF（ケースレポートフォーム）を作成し、電子カルテから必要な情報を収集した。収集したデータは Excel に打ち込み、複数回チェックを繰り返した。その後、統計解析ソフトにて解析・評価した。

2.5 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。

・患者の基本属性【年齢、性別、身長、体重、BMI、現病歴、既往歴、入院形態】
・ICU 在室中の検査値【白血球、好中球、ヘモグロビン、血小板(PLT)、Na、K、pH、クレアチニン、塩基過剰、尿素窒素(BUN)、乳酸】
・リハビリテーション項目【開始日、方法】
・患者状態【重症度評価(SOFA スコア)、昏睡の有無、人工呼吸の有無、身体拘束の有無、酸素投与の有無、鎮静薬剤投与】

2.6 評価・評価項目

評価内容は、せん妄発症率、せん妄群と非せん妄群の二群間比較・多変量解析によるせん妄発症のリスク要因とせん妄発症を遅らせる要因の推定である。

主要評価項目は、せん妄発症に対する ICU 外活動の影響とした。副次評価項目は、せん妄発症の関連要因と、せん妄発症までの時間および関連要因とした。

2.7 統計解析方法

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、連続変数は平均値(mean)、標準偏差(SD)、中央値(median)、四分位範囲(IQR)で要約した。群間比較についてカテゴリー変数は χ^2 検定、独立した連続変数は Shapiro-Wilk の正規性検定で正規性の検討を行った後、t 検定、Mann-Whitney U 検定を用いた。

リハビリテーション方法の違いによる ICU 入室からせん妄発症までの日数の変化を Kaplan-Meier 法で評価した。各要因はログランク検定を使って比較した。

せん妄発症のリスク要因はステップワイズ法で共変量を選択し、ロジスティック回帰分析にて推定した。共変量は以下の通りである。

〈性別、年齢、BMI、オピオイド投与、人工呼吸、酸素投与、術後、消化器外科手術、呼吸器外科手術、整形外科手術、乳腺内分泌科手術、口腔外科手術、SOFA、PLT (day 3)、BUN (day 3)、Creatinine (day 3)〉

せん妄発症を遅らせる要因はステップワイズ法で共変量を選択し、Cox 比例ハザードモデルにて解析を行った。共変量は以下の通りである。

〈性別、年齢、BMI、オピオイド投与、人工呼吸、酸素投与、術後、消火器外科手術、呼吸器外科手術、整形外科手術、乳腺内分泌科手術、口腔外科手術、SOFA、PLT (day 3)、BUN (day 3)、Creatinine (day 3)、ICU 外活動、ICU 内活動、リハビリテーション無し〉

データ解析には SPSS version 29.0.0.0 を用いた。

すべての検定において、有意水準は両側で $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

3. 結果

3.1 患者の基本属性

Table1-1 は患者の基本属性のうち、性別、年齢、BMI をせん妄の有無で比較した結果を示したものである。

今回の研究では、男性 178 名(56.9%)、女性 135 名(43.1%)、計 313 名の患者が対象となった。ICU 患者全体のせん妄発症率は 21.4%(313 人中 67 人)であった。対象者の年齢の中央値は

せん妄を発症した患者では 78 歳、せん妄を発症しなかった患者では 72 歳であった。より高齢の患者が有意にせん妄を発症しやすいという結果が得られた。対象者の BMI の中央値はせん妄を発症した患者では 22.3、せん妄を発症しなかった患者では 23.0 であった。性別および BMI についてはせん妄発症の有無に対して有意差は見られなかった。

Table 1-1. General characteristic of patients

	With Delirium n = 67	Without Delirium n = 246	*p* value
Sex - male, n (%)	42 (62.7)	136 (55.3)	0.278
Age - median (IQR)	78 (70- 82)	72 (62- 78.25)	**<0.001**
10 - 39	1 (1.5)	14 (5.7)	<0.001
40 - 64	9 (13.4)	61 (24.8)	
65 - 74	12 (17.9)	81 (32.9)	
75 - 84	33 (49.3)	73 (29.7)	
≥ 85	12 (17.9)	17 (6.9)	
BMI - median (IQR)	22.3 (19.6- 24.4)	23.0 (20.2 -25.3)	0.507
<18.5	12 (17.9)	29 (11.8)	0.297
≥18.5 - <25	41 (61.2)	149 (60.6)	
≥25	14 (20.9)	68 (27.6)	

Abbreviation: IQR, interquartile range; BMI, body mass index

Table1−2 は患者の基本属性のうち、ICU 入室理由と、それが術後ならば何科の手術を受けていたかをせん妄の有無で比較した結果を示したものである。

術後に ICU に入室した患者のうち、せん妄を発症した患者は 53 名、せん妄を発症しなかった患者は 228 名で、せん妄発症は有意に少なかった。また、特に、呼吸器外科手術を受けた患者群で有意に少なかった。

Table 1-2. General characteristic of patients

	With Delirium n = 67	Without Delirium n = 246	*p* value
Reason for entering ICU, n (%)			
Postoperative (n = 281)	53 (79.1)	228 (92.7)	**0.001**
Septicemia (n = 4)	4 (6.0)	0 (0.0)	<0.001
After resuscitation (n = 2)	0 (0.0)	2 (0.8)	0.459
Respiratory failure (n = 17)	9 (13.4)	8 (3.3)	0.001
Hemorrhagic shock (n = 2)	1 (1.5)	1 (0.4)	0.323
Anaphylaxis (n = 1)	0 (0.0)	1 (0.4)	0.601
Others (n = 6)	0 (0.0)	6 (2.4)	0.197
Which department surgery, n (%)			
Digestive surgery (n = 117)	31 (46.3)	86 (35.0)	0.090
Respiratory surgery (n = 52)	3 (4.5)	49 (19.9)	**0.003**
Orthopedic surgery (n = 58)	15 (22.4)	43 (17.5)	0.359
Endocrine surgery (n = 25)	1 (1.5)	24 (9.8)	0.027
Oral surgery (n = 9)	0 (0.0)	9 (3.7)	0.112
Others (n = 20)	3 (4.5)	17 (6.9)	0.470

Abbreviation: ICU, Intensive Care Unit

3.2 ICU 患者の検査値

Table2 は ICU 全患者について、入室から 3 日目、7 日目、14 日目、21 日目の臨床検査データをせん妄の有無で比較した結果を示している。

せん妄発症患者では、3 日目の PLT は有意に低く、BUN とクレアチニン値は有意に高くなっていた。

Table 2. Laboratory tests on Day3,7,14 and 21 from ICU admission

	Day3 (n = 303)			Day7 (n = 51)			Day14 (n = 15)			Day21 (n = 5)		
mean (SD)	With delirium n = 57	Without delirium n = 246	*p* value	With delirium n = 15	Without delirium n = 36	*p* value	With delirium n = 4	Without delirium n = 11	*p* value	With delirium n = 2	Without delirium n = 3	*p* value
WBC, $\times 10^3$/L	12.19 (5.25)	11.20 (5.77)	0.207	10.52 (4.99)	11.14 (9.38)	0.762	9.12 (3.41)	8.35 (3.57)	0.712	9.90 (2.52)	9.55 (0.50)	0.835
Neutrophil, $\times 10^9$/L	83.45 (7.27)	82.10 (7.79)	0.358	81.26 (8.59)	80.94 (7.22)	0.914	71.95 (8.34)	74.00 (10.79)	0.787	75.70 (2.26)	72.15 (12.09)	-
Hemoglobin, g	10.28 (1.97)	11.58 (6.80)	0.124	10.86 (2.02)	10.70 (1.28)	0.733	10.72 (2.48)	10.90 (1.36)	0.895	10.53 (0.97)	12.25 (2.19)	0.456
PLT, $\times 10^9$/L	174.81 (79.01)	199.04 (72.74)	**0.019**	173.31 (88.95)	186.91 (85.57)	0.585	283.90 (146.42)	341.00 (112.95)	0.459	292.67 (188.32)	370.50 (163.34)	0.669
Na, mmol	139.85 (4.81)	139.05 (3.14)	0.203	141.10 (5.74)	138.18 (6.359)	0.092	138.18 (6.34)	139.75 (2.63)	0.645	137.33 (2.89)	140.00 (0.00)	0.251
K, mmol	4.20 (0.68)	4.27 (0.45)	0.423	3.90 (0.54)	3.84 (0.49)	0.688	4.16 (0.42)	4.55 (0.13)	0.097	4.50 (0.20)	4.35 (0.21)	0.480
pH	7.42 (0.05)	7.42 (0.04)	0.397	7.43 (0.09)	7.45 (0.06)	0.651	7.42 (0.09)	7.41 (0.11)	0.909	7.32 (0.10)	7.34 (-)	-
BUN, mg/dl	29.29 (23.08)	16.85 (12.03)	**<0.001**	31.43 (26.49)	22.82 (23.07)	0.234	16.80 (6.34)	16.50 (10.28)	0.947	34.33 (34.39)	21.00 (0.00)	0.571
Creatinine, mg/dl	1.27 (1.20)	0.94 (1.06)	**0.047**	1.27 (1.67)	1.21 (1.46)	0.885	0.57 (0.20)	0.51 (0.17)	0.579	1.16 (1.56)	0.47(0.33)	0.526
Base excess, mmol/L	4.25 (22.15)	0.58 (3.01)	0.286	2.97 (5.23)	4.63 (6.98)	0.550	3.78 (3.51)	6.05 (5.73)	0.510	1.87 (6.70)	15.80 (-)	-
Lactate, mg/dl	15.45 (9.27)	14.62 (7.62)	0.565	11.50 (4.89)	11.13 (2.70)	0.828	9.50 (3.73)	8.00 (1.41)	0.446	7.67 (4.62)	7.00 (-)	-

Abbreviation: WBC, white blood cells; PLT, platelet; Na, Sodium; K, Potassium; pH, potential hydrogen; BUN, blood urea nitrogen; SD, standard deviation

3.3 リハビリテーション場所、人工呼吸、身体拘束、酸素投与、オピオイド投与の有無、SOFA スコア、せん妄発症回数

Table3 は ICU 患者のリハビリテーション方法、人工呼吸、身体拘束、酸素投与、オピオイド投与の有無、SOFA スコアを用いた重症度判定をせん妄の有無で比較した結果を示した表である。また、せん妄患者のせん妄発症回数も示した。

SOFA スコアが高い方が有意にせん妄を発症しやすいという結果になった。

Table 3. Place of rehabilitation, condition of artificial respiration, physical restraint, oxygen and opioid, SOFA, and number of delirium onset during ICU stay

	With Delirium n = 67	Without Delirium n = 246	*p* value
Place of rehabilitation, n (%)			
Out-of-the-ICU	6 (9.0)	3 (1.2)	<0.001
In-the-ICU	51 (76.1)	117 (72.0)	0.496
No rehabilitation	10 (14.9)	66 (26.8)	0.044
Condition of patients, n (%)			
With artificial respiration, n (%)	19 (28.4)	26 (10.6)	<0.001
With physical restraint, n (%)	23 (34.3)	10 (4.1)	<0.001
With oxygen, n (%)	60 (89.6)	221 (89.8)	0.946
With opioid, n (%)	23 (34.3)	60 (24.4)	0.102
SOFA, n (%)			**<0.001**
0 - 6	43 (65.2)	211 (89.4)	
≥7	23 (34.8)	25 (10.6)	
Number of delirium onset, n (%)			
Total	195	-	
Morning	70 (35.9)	-	
Afternoon	68 (34.9)	-	
Evening	57 (29.2)	-	

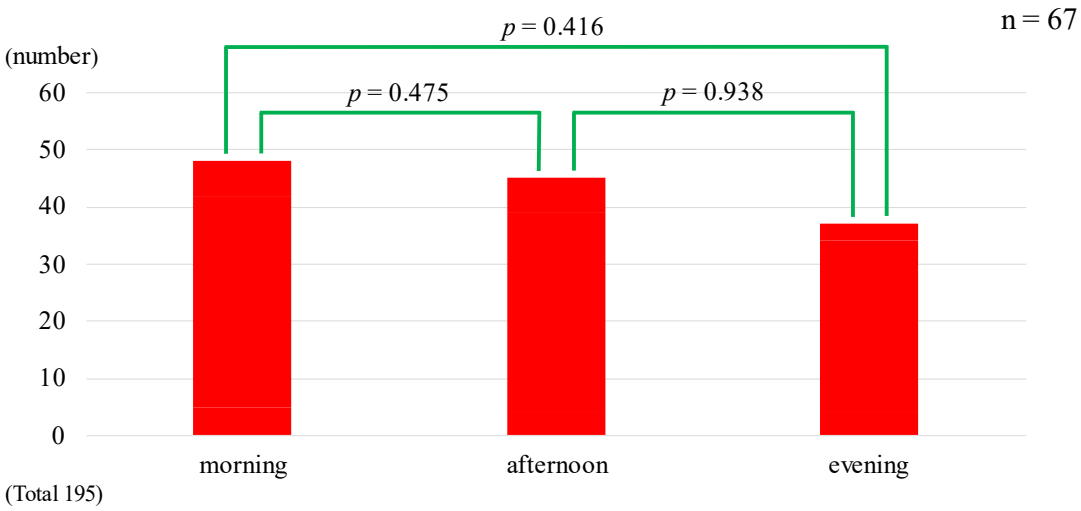
Abbreviation: SOFA, sequential organ failure assessment; ICU, Intensive Care Unit

3.4 時間別のせん妄発症回数

Figure1 はせん妄を発症した ICU 患者について、朝、昼、夜別の発症回数を記載したグラフである。

結果として有意な差は見られなかった。

Figure 1. Numbers of delirium onset cases in the morning, afternoon, and evening **among patients with delirium**



3.5 せん妄発症患者の検査値

Table4 はせん妄を発症した患者のみを選び、ICU 入室から 3 日目、7 日目の臨床検査データをリハビリテーションの有無で比較した結果を示している。

7 日目のナトリウム濃度にのみ有意差を認めたが、データ数が少ないため、せん妄発症との関連が明らかとは言えなかった。

Table 4. Laboratory findings on Day3 and Day 7 from delirium onset **among patients with delirium**

	Day3 (n = 46)			Day7 (n = 18)		
mean (SD)	With rehabilitation n = 27	Without rehabilitation n = 19	*p* value	With rehabilitation n = 12	Without rehabilitation n = 6	*p* value
WBC, $\times 10^3$/L	12.37 (5.19)	11.11 (5.77)	0.487	10.68 (5.25)	9.10 (0.87)	0.612
Neutrophil, $\times 10^9$/L	83.93 (7.17)	81.53 (7.94)	0.444	81.52 (8.72)	79.55 (10.68)	0.775
Hemoglobin, g	10.30 (2.05)	10.18 (1.49)	0.862	10.72 (2.08)	12.00 (11.1)	0.309
PLT, $\times 10^9$/L	175.72 (82.44)	169.60 (58.78)	0.823	176.77 (91.42)	143.33 (69.15)	0.547
Na, mmol	140.00 (4.91)	139.00 (4.32)	0.548	141.42 (5.98)	138.33 (1.16)	0.034
K, mmol	4.21 (0.67)	4.13 (0.78)	0.734	3.93 (0.56)	3.63 (0.20)	0.375
pH	7.42 (0.053)	7.42 (0.045)	0.734	7.43 (0.091)	-	-
BUN, mg/dl	28.75 (22.64)	32.30 (26.50)	0.658	32.44 (27.31)	23.00 (20.08)	0.570
Creatinine, mg/dl	1.21 (1.10)	1.60 (1.66)	0.488	1.33 (1.76)	0.72 (0.19)	0.556
Base excess, mmol/L	4.85 (23.82)	0.55 (4.28)	0.665	2.97 (5.23)	-	-
Lactate, mg/dl	15.30 (7.60)	16.33 (17.44)	0.892	11.50 (4.89)	-	

Abbreviation: WBC, white blood cells; PLT, platelet; Na, Sodium; K, Potassium; pH, potential hydrogen; BUN, blood urea nitrogen; SD, standard deviation

3.6 せん妄発症のリスク要因

Table5 はせん妄発症のリスク要因をロジスティクス回帰で推定した結果を示したものである。

オピオイド投与、高年齢、BUN の高値、SOFA スコアの高値がリスク要因だった。呼吸器外科手術に関してはせん妄発症リスクが有意に低かった。

Table 5. Factors relating to onset of delirium using Logistic regression analysis

n = 287

	Co-efficient	SE	*p* value	OR	95% CI
Opioid use	0.798	0.365	0.029	2.222	1.086 - 4.543
Age group	0.620	0.172	<0.001	1.858	1.327 - 2.601
Respiratory surgery	-1.655	0.652	0.011	0.191	0.053 - 0.686
BUN on day 3	0.280	0.010	0.004	1.029	1.009 - 1.049
SOFA score	0.749	0.221	<0.001	2.115	1.370 - 3.264

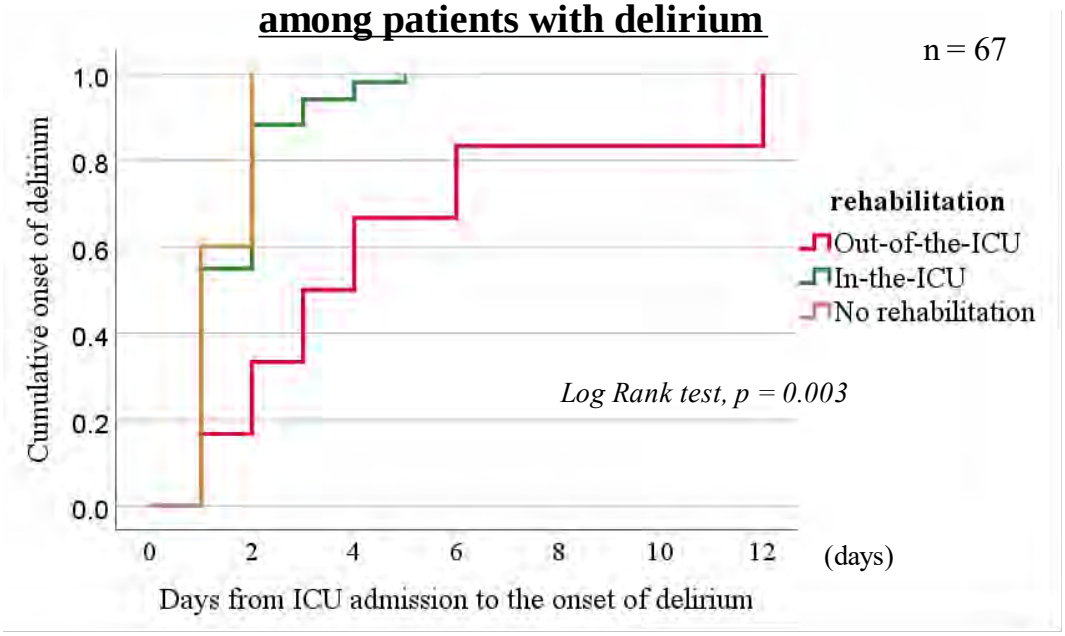
Abbreviation: SOFA, sequential organ failure assessment; BUN, blood urea nitrogen; SE, standard error; OR, odds ratio; CI, confidence interval

3.7 リハビリテーション方法の違いによる ICU 入室からせん妄発症までの時間の変化

Figure2 はリハビリテーション方法の違いよる ICU 入室からせん妄発症までの時間の変化を Kaplan-Meier 曲線で示したものである。

ICU 外活動を行った患者については、行わない患者に比べて、せん妄発症の開始が有意に遅れるという結果が得られた。

Figure 2. Kaplan-Meier curve of days from ICU admission to the onset of delirium according to the method of rehabilitation among patients with delirium



3.8 せん妄発症を遅らせる要因

Table6 はせん妄発症を遅らせる要因をコックス比例ハザードモデルで推定した結果を示している。

ICU 外活動がせん妄発症を遅らせる要因であった。

Table 6. Factor relating to the delay to the onset of delirium using Cox proportional hazard model

n = 65

	Co-efficient	SE	*p* value	HR	95% CI
Out-of-the-ICU rehabilitation	-1.161	0.538	0.031	0.313	0.109 - 0.898

Abbreviation: SE, standard error; CI, confidence interval; HR, hazard ratio

4.まとめと考察

4.1 まとめ

観察対象者のせん妄発症率は 21.4%であった。せん妄発症のリスク要因は、オピオイド投与、高年齢、BUN の高値、SOFA スコアの高値であった。ICU 外活動はせん妄発症を遅らせる要因であった。

4.2 考察

高年齢、オピオイド投与、BUN の高値がせん妄発症のリスク要因であるという結果は先行研究と一致していた[4) 5) 7)]。重症度を示す SOFA スコアの高値がせん妄発症のリスク要因になる結果も先行研究と一致していた[8)]。

ICU 外活動（屋外庭園・入浴）は患者のせん妄発症を遅らせる効果があると考えられた。緑や日光、流水音が患者のストレス軽減に効果があると先行研究で報告されており、本研究でも、ICU 外活動が患者のストレス軽減に影響を与えることで、せん妄発症をより遅らせたのではないかと推察できる[9)]。

5.研究の限界

今回は、データ収集のために西部医療センターに通える期間が限られており、31 日以上 ICU に在室した患者についてのデータは収集できなかった。

また、後ろ向き観察研究であるため、カルテに記載のある情報のみの検討になった。

6.結語

本研究により、ICU 入室患者のせん妄発症のリスク要因が明らかになった。さらに、ICU 外活動がせん妄発症の遅延に有効であることが示唆された。

今回の研究では時間の制約により、集められるデータ数に限界があった。今後の研究ではより多くのデータを集め、検証を続ければ、ICU 外活動がより有効であることが明らかになるものと期待する。

7.謝辞

本研究に際し、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、名古屋市立大学医学部地域医療学・兼松孝好先生、後藤道子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附属西部医療センター病院長・大原弘隆先生、麻酔科教授・笹野信子先生、麻酔科助教・坂本みな実先生をはじめとする麻酔科の方々、病院職員の方々、名古屋市立大学医学部総合診療医学・総合内科学・宮﨑景先生、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) Mart MF, et al. Semin Respir Crit Care Med. 2021; 42(1):112-126.
2) Ely EW, et al. JAMA. 2004; 291(14):1753-62.
3) Schweickert WD, et al. Lancet. 2009; 373(9678):1874-82.
4) Iglseder B, et al. Wien Med Wochenschr. 2022; 172(5-6):114-121.
5) Duprey MS, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2021; 204(5):566-572.
6) Sasano N, et al. Crit Care Explor. 2022; 4(1):e0604.
7) Pang H, et al. Crit Care. 2022; 26(1):258.
8) Salluh JI, et al. BMJ. 2015; 350:h2538.
9) Transfer of Critically ill Patients to the Outdoors, Intensive Care Society, 2021

COVID-19 による白内障手術患者の受診行動の変化の検討

地域医療教育学

16 魚住晋太朗、32 北川友哉、49 白幡真彗、83 柳原万葉、90 吉村啓

1. 背景

白内障とは、目の水晶体が白く濁ってしまう疾患である。一般的には加齢に伴い症状が進行すると言われており、視界が霞む、ぼやけるといった症状を患者は訴えることが多い。

白内障の治療を行うにあたっては、白色に濁った水晶体を取り除き、代わりに人工のレンズ(眼内レンズ)を挿入する。これをすることによってレンズの濁りを無くし、レンズの濁りによって生じていた視力障害を無くしていく。この手術は一般的には、侵襲が小さい手術であり患者の身体への負担が小さいと言われている。

COVID-19 蔓延下において、日本眼科学会は、白内障手術を優先度の低い手術であると位置づけた。院内の混雑による感染拡大を防止するために、白内障手術は延期を検討してもよいとしたのである[1)]。実際、他国での例を挙げると、カナダでは COVID-19 蔓延下において、白内障手術患者の手術待機時間が通常時に比べて延長し[2)]、COVID-19 蔓延が落ち着いた 2023 年には白内障の手術待機時間が通常時に戻った[3)]ことを示す先行研究が存在する。日本においては、COVID-19 蔓延によって、白内障手術患者の受診行動がどのように変化していたのかを示す先行研究が存在しなかった。よって、今回の基礎自主研修を通じて、白内障手術患者の受診行動がどのように変化していたのかを研究した。

2. 目的

COVID-19 の流行が、白内障手術患者の受診行動にどのような影響を及ぼしたのかを検討することとした。

3. 方法

3.1 スタディーデザイン

後ろ向き観察研究をおこなった。

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にて実施した。

3.3 対象

2019 年から 2022 年の 4 年間に、名古屋市立大学医学部附属西部医療センターの眼科を受診して白内障手術を行った 45 歳以上の男女 1928 人のうち、無作為に抽出した 686 人（約 35％）を対象とした。

3.4 データ収集方法

担当教員及び眼科医師のアドバイスをいただきながら、CRF（ケースレポートフォーム）を作成し、電子カルテから全患者の必要な情報を収集した。集めたデータはエクセルに入力し、複数回チェックを行った後、統計解析ソフト（ＳＰＳＳ）を用いて解析・評価を行った。

3.5 調査項目

以下の項目について調査を行った。

・基本属性【年齢、性別、身長、体重、BMI，基礎疾患、眼科疾患、症状、飲酒・喫煙・アレルギーの有無、同居家族の有無】

・検査値および眼科所見【視力、眼圧、結膜・角膜・前房・水晶体の状態、ケラト値（角膜の曲率半径）、レフ値（角膜の屈折力）】

3.6 主要・副次評価項目

主要評価項目は、COVID-19 による白内障患者への影響要因の推定である。副次評価項目は年次ごとの各項目の割合や値の変化である。

3.7 統計解析方法

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、連続変数は平均値（mean）、標準偏差（SD）、中央値（median）、四分位範囲（IQR）で要約した。また、群間比較について、カテゴリー変数はカイ二乗検定を行った。そして、独立した連続変数については、Shapiro-Wilk の正規性検定で正規性の検討、合わせて t 検定、Mann-Whitney U 検定を行った。その他にもロジスティック回帰分析を用いて、目が見えにくいと訴えて来院した患者のリスク要因を分析した。この分析における共変量は年齢、性別、同居家族の有無、飲酒の有無、基礎疾患、アレルギーの有無とした。

4.結果

本研究では、我々が主体的に、新たに後ろ向きにデータを収集して解析を行ったものである。すべての結果は本研究によるものであり、過去に発表された結果は含まれていない。

4.1 患者の基本属性

Table1(a)は患者の基本属性を示したものである。患者背景に関して、年次ごとに見ると、どの年も 75-84 歳の割合が一番高く、COVID-19 が流行した 2020 年と 2021 年には 75 歳以上の高齢者の割合が減少していた。また独居の患者に関しては、患者割合が COVID-19 流行直後に増加し、感染拡大が進んでいくにつれて減少、その後 COVID-19 感染拡大が収束に向かうと再び増加した。

4.2 患者の加入していた医療保険

Table 1(b)は患者が加入していた医療保険および医療費の自己負担割合を示したものである。いずれの集団にも年次ごとの変化は見られなかった。

4.3 患者の基礎疾患

白内障の背景にある基礎疾患別の患者割合を調べたところ、糖尿病を患っている患者割合は COVID-19 流行直後に減少し、終息後に増加傾向がみられた。一方で、高血圧の患者は流行直後の減少傾向はみられたが、終息後に大きな変化は確認されなかった。

4.4 患者の併発する眼科疾患

Table 1(d)は白内障患者の併存する眼科疾患の年次変化を示している。白内障手術患者に併発していた眼科疾患の有無に関して調べると、緑内障を併発している患者には有意な増加が確認された。

4.5 受診時の訴え

Table 2 は患者の訴えそれぞれについて患者割合の年次変化を示す。「見えにくさ」を訴えた患者が多いことが分かる。「見えにくさ」を訴えた患者には、年ごとの有意な増加がみられた。

4.6 手術時の目の状態

Table 3(a)は白内障手術患者の、手術直前の左目の検査所見を示す。
水晶体の混濁の程度を示す Grade2 の患者割合は COVID-19 流行直後に増加が確認できた一方で、Grade3 の患者割合は流行直後には減少が確認された。
Table 3(b)では右目でも検証したが、左目と同様の傾向を確認できた。以後の解析についても、全て両眼それぞれについて解析しているが、より所見が強いと考えられた左眼を中心に提示する。

先ほどの Table3(a)でも示したが、水晶体混濁度 Grade2 と Grade3 の患者割合の年次変化を示す。Figure 1 から、COVID-19 流行時に Grade2 患者の緩やかな減少傾向を確認でき、Grade 3 患者の割合は増加傾向にあることが確認できた。

次に、Grade2 と Grade3 それぞれについて、年齢別に分けて調べた年ごとの患者割合の推移である。左は Grade2 の患者を、右は Grade3 の患者を示す。年齢を 4 群に分けて表示しているが、Grade 3 では COVID-19 が流行した直後の 2020 年に、75～84 歳の割合が大きく減少していたことが Figure 2 で分かった。

Figure 3 では軽症の Grade1-2 と重症の Grade3-4 で、「見えにくさ」を訴えた患者割合を年ごとに比較した。Grade1-2 の患者の方がむしろ「見えにくい」と訴えた人の割合が高くなったが、有意差はなかった。

Table 4 では白内障手術を入院で行った患者割合と、手術を行ったのが両眼なのか片眼なのかを示す。調査した 4 年間のどの年でも入院患者は 7 割を超えていた。

Table 5(a)では手術患者が受けた手術直前の眼球屈曲率などの検査結果の年次推移を示す。ケラト値の計測値からは読み取れる傾向はなかった。

同様に Table 5(b)ではレフ値の検査結果を示す。これからも特に目立った傾向は確認できなかった。

Table 6 では対象患者の中で、「見えにくさ」を訴える患者について、ロジスティック回帰分析を用いて、その関連因子を年次ごとに分析した。
すると、2020 年から 2022 年のいずれの年も独居である患者のオッズ比が高いことからリスク要因であることが確認でき、2022 年では年齢もリスク要因であることが確認できた。

4. 結果

西部医療センターで白内障手術を受けた患者数は COVID-19 の流行時には減少を認めた。一方、「目の見えにくさ」を訴える患者の割合は流行時に増加傾向にあった。
COVID-19 流行時には水晶体の Grade2 の患者割合は減少傾向にあり、Grade3 の患者割合は増加傾向にあった。ただし、流行直後には、Grade3 に多い 75 歳以上 85 歳

未満の患者割合が一時的に大きく減少していた。また「目の見えにくさ」を訴える患者のリスク要因として同居家族の有無と年齢が挙げられた。

5. 考察

COVID-19 の感染を恐れた外出自粛により、75 歳以上の高齢者が来院を控え、それに伴って白内障の症状が進行した患者の受診が COVID-19 終息後の 2022 年に増加したのではないかと考えた。

また、独居の患者は、見守りの中で視力の低下を指摘してくれる同居家族がいないことなどにより、「目の見えにくさ」に早期に気づかず、症状が重くなるまで受診しないため、「目の見えにくさ」を訴えるリスクが高くなったのではないかと考えた。

6. 研究の限界

本研究は西部医療センターの臨床データのみであり、また時間の制約で全例調査まではできず、十分なデータ量を得ることができなかった。加えて後ろ向き研究であるため、カルテに記載されている情報のみの解析となった。さらに、COVID-19 流行時の受診行動は、病院側による手術制限なども影響している可能性も考えられたので、患者の自発的な受診行動のみを評価できていない可能性もあると考察した。

7. 結語

COVID-19 の流行は白内障手術患者の一部に受診を控えるような行動変容を及ぼした可能性があり、手術時点での「目の見えにくさ」を訴えた患者は増加した。また、白内障手術患者において「目の見えにくさ」に影響を与えた要因は独居と年齢が考えられた。受診行動の変化についての検証については、さらに多くのデータで検討するとともに、病院側の要因なども加えていく必要が考えられた。

8. 謝辞

本研究に際し、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、名古屋市立大学医学部地域医療学・兼松孝好先生、後藤道子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附属西部医療センター病院長・大原弘隆先生、眼科の医師、看護師の先生方、病院職員の方々、名古屋市立大学医学部総合診療医学・総合内科学・宮﨑景先生、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。

10.参考文献

1)日本眼科学会.“新型コロナウイルス感染症流行時の眼科手術に対する考え方（第6 報：手術時期の目安について）”. 2022 Feb;9

2)Reason B, et al. Healthc Q. 2022 Jan;24(4):11-15

3)Kildyushov A, et al. Healthc Q. 2024 Jul;27(2):12-15.

甲状腺ホルモン(遊離型/タンパク結合型)測定法の開発過程とその結果

配属先:環境労働衛生学分野　実習先:国立環境研究所　青山葵(1)

1. 背景と目的

甲状腺ホルモンは主にT3、T4からなり、それぞれ遊離型(フリー)とタンパク結合型(フリーと併せてトータル)のいずれかの形で血中を循環し、恒常性や代謝、発達に重要な役割を果たしている。近年環境中の様々な化学物質が甲状腺ホルモンの動態に影響を与えていることがわかってきた。特にT3はニューロンにも作用するため化学物質によって引き起こされたT3の低下は脳の発達に影響を及ぼすかもしれない。現在臨床で広く用いられている電気化学発光免疫測定法(ECLIA)は、血清中の目的物質と蛍光抗体との間で抗原抗体反応を起こし、測定するもので、迅速で安価、操作が簡単というメリットがある。その一方で、一部の患者において抗体が干渉を起こし誤差が生じやすく精度が低いことに加え、一度の測定で一種類の物質しか測定できないというデメリットがある。

今回用いたLC-MS/MSという機器はLC(液体クロマトグラフィー)により物質を疎水性の違いで分離後、MS(質量分析装置)で検出し定量分析するという仕組みで、一度に何種類もの物質を高精度に測定できるというメリットがある。今回の研究の目的はLC-MS/MSを用いた甲状腺ホルモン測定法を確立し、ECLIAのデメリットを克服することである。

2. 方法

フリー体を分離し測定するため、プレートシェイカーに妊婦血清54本(二重測定を4本で行った)とバッファーを添加し、37℃、250rpmで18時間平衡透析を行った。バッファー側を取りだし、内部標準試料などを加えサンプル試料を作成した。作成したサンプル試料 54 本と検量線試料 10 本、精度管理試料 3 本を固相抽出法により精製した。精製試料を LC-MS/MS で測定した。算出された値とECLIA による測定値を比較し、ブランド・アルトマン図を作成した。分析データの品質管理のため、検出下限値(MDL)、最小報告値(LCMRL)、検量線の直線性、定量範囲、回収率(添加回収率と内部標準回収率)、併行精度、再現性の 7 点の精度管理データを取得した(表1)。

表 1　精度管理データ（一部）

		fT3	fT4
検量線の直線性		0.9979	0.9976
検出限界値(pg/mL)		0.751	0.488
最小報告値(pg/mL)		1.27	1.01
添加回収率(%)	低濃度	102.3	98.0
	中濃度	102.6	100.8
	高濃度	100.0	96.5
併行精度(%)		4.2	4.6

2. 結果と考察

フリー体の T3(fT3)では、ばらつきに正負の偏りがなく、数値も ECLIA による値と大きく異ならなかった。精度管理結果から見ても、LC-MS/MS で、真度、精度の高い測定ができたと考えられる。フリー体の T4(fT4)では、すべての試料においてLC-MS/MS測定値がECLIA 測定値より大きかった(表1)。精度管理結果からは、LC-MS/MS で、真度、精度の高い測定ができていたと推定された(表1)。T3 のブランド・アルトマン図を見ると縦のばらつきに正負の偏りはなく、両者の差も小さい(図1)。精度管理結果から見ても LC-MS/MS による測定は真度も精度も高かったと考えられる。fT4 のブランド・アルトマン図を見ると、すべての点が 0 を大きく超えていることがわかる(図2)。つまりすべての試料において LC-MS/MS 測定値が ECLIA 測定値を上回っていた。精度管理結果からは LC-

MS/MS による測定は真度・精度ともに高かったと考えられる。

表 2　測定結果

方法	項目	数	平均値	標準偏差	P25	中央値	P75	P95	最大値
ECLIA	fT3	50	3.31	0.69	3.00	3.20	3.48	4.06	7.3
	fT4	50	12.7	2.67	11.5	12.4	13.4	14.9	27.7
LC-MS/MS	fT3	50	3.25	0.73	2.84	3.16	3.49	4.25	7.09
	fT4	50	17.7	4.63	15.0	16.5	18.7	24.9	39.4

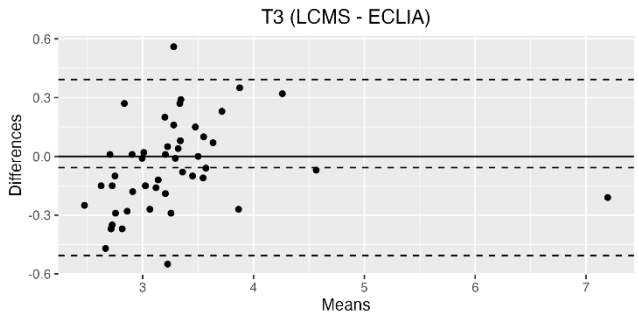


図 1　ブランド・アルトマン図(fT3)

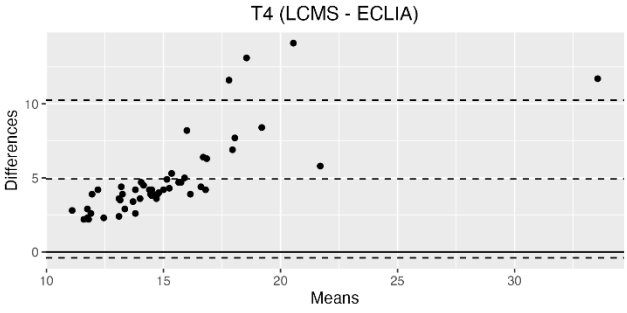


図 2　ブランド・アルトマン図(fT4)

縦軸が LC-MS/MS 測定値から ECLIA 測定値を引いた値、横軸が両者の平均値を表しており、ブランド・アルトマン図から二種類の測定方法の一致具合を確認できる。実線は 0、上の点線は+1.96SD、真ん中の点線は平均、下の点線は-1.96SD を表す。

4. 結論

現時点では、LC-MS/MS と ECLIA のどちらが真値に近いかは判断できない。濃度の分かっている試料を ECLIA で測定したり、LC-MS/MS の設定を変え、妨害物質等の影響を取り除いたりなどの実験により原因を明らかにする必要がある(引き続き実施中)。今回の研修を通し、目的であった環境物質が与える健康影響・疫学調査におけるデータの取得過程について学ぶこと、LC-MS/MS を用いた甲状腺ホルモンの測定法を確立すること、の二点を達成することができた。また、ECLIA による測定と LC-MS/MS による測定の違い、真度と精度の違い、日頃臨床で使われている機器がどのように精度管理されているかなどについても学ぶことができた。

参考文献

[1]磯部友彦,小林弥生,岩井美幸,中山祥嗣.化学物質バイオモニタリングにおける分析精度管理.計測と制御,第 60 巻(8),2021

除草剤尿中代謝物 MS2 スペクトルライブラリの構築と一般集団への適応

環境労働衛生学 川口博史 28

【目的】 世界での農薬の使用量は増加し続けており、年に約 400 トンの農薬が使用されている。除草剤はそのうちの 53%を占めている。そのため、我々は日々、食品などを介して除草剤を摂取していると考えられる。しかし、除草剤のヒトへの複合曝露影響はほとんど評価されていない。除草剤のヒトへの複合曝露影響を評価するには、体内に取り込んだ化学物質を一度に網羅的に測定できるノンターゲット分析が有効である。本研究では除草剤でのノンターゲット分析を可能にする除草剤尿中代謝物のライブラリを構築し、一般集団のメタボローム中に検出されるか明らかにすることを目的とした。

【方法】 令和元年の生産量が 300 トン越える除草剤のうち、有効成分量が 3.3 トン以上かつ投与溶媒への溶解度を考慮し、21 種類を測定対象とした(表1)。測定対象とした除草剤を表 1 に示した。11-12 週齢の雄の ICR マウス に 1 日目に溶媒(水又はコーン油)のみを、2 日目に半数致死量の 1/16－1/4 の除草剤を、4 日目にその倍の用量を強制経口投与し、投与後 24 時間の尿を採取した。採取した尿の比重を正規化し、アセトニトリルでタンパク質沈殿を行いその上清を分注した。分注したサンプルを高速液体クロマトグラフ-高分解能質量分析計で測定し、保持時間・精密質量・MS2 スペクトルを得た。MZmine3 を使用し、得られた MS1 ピークが以下の条件を満たすものを選択した。まず、1/4LD50 を投与したマウスのピークエリアが溶媒のみを投与したマウスのピークエリアの 6 倍の面積を持つもの、そして 1/2LD50 を投与したマウスのピークエリアが溶媒のみを投与したマウスのピークエリアの 12 倍の面積を持つもの、1/4LD50 を投与したマウスと 1/2LD50 を投与したマウスのピークエリアがブランクのピークエリアの 100 倍の面積を持つものを選択した。これにより用量依存的に増えている MS1 ピークのうちものを選択し、MS2 スペクトルのライブラリを構築した。

その後、尿中化学物質の測定に同意をした女子大学生 73 名(平均年齢 21.2 歳)の早朝尿のメタボロームデータに構築した MS2 スペクトルライブラリを適用した。MSDIAL を使用し、保持時間の差が 1 分以下で m/z の差が 1mDa 以下のものを選択した。

【結果】 条件を満たす用量依存的に増えている 21 種類の除草剤由来の尿中代謝物と考えられる 911(ポジティブイオン) と 703(ネガティブイオン)の MS2 スペクトルからなるライブラリを構築した。1 つの除草剤に対して少なくとも2つのスペクトルが選択された(表2)。

また、構築した MS2 ライブラリを一般集団に適用した結果を表3に示した。11 種類の除草剤由来の計 23 のスペクトルが条件を満たしていた。さらに表4は検出された MS2 スペクトルが大学生 73 名の内何名から検出されたかというのを示している。リニュロンを除く 10 種類の除草剤で 50 名以上から検出されており、日常生活でこれらの除草剤に曝露されている可能性がある。

【考察】 本研究で構築した MS2 ライブラリで除草剤の複合曝露を把握することができる。今後、この手法をさらに発展させ、除草剤複合曝露によるヒト健康影響評価に用いることが期待される。また、除草剤散布のない一般集団において、今回使用した 21 種類の除草剤

のうち 10 の除草剤に曝露されている可能性が示唆された。検出された除草剤は必ずしも生産量の多さと一致していなかった。

【参考論文】

・Nomasa K et al. Development of a strategic approach for comprehensive detection of organophosphate pesticide metabolites in urine: Extrapolation of cadusafos and prothiofos metabolomics data of mice to humans. Journal of Occupational Health. 2021. 63 (1), e12218

・Chaleckis R et al. Fungicide Metabolite MS2 Spectral Libraries for Comprehensive Human Biomonitoring. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2024. 72 (3), p.18247-18256

表 1. 対象除草剤

除草剤	スペクトル数 POS	NEG	除草剤	スペクトル数 POS	NEG	除草剤	スペクトル数 POS	NEG
グリホサート	1	2	パラコート	2	0	リニュロン	25	35
ペンタゾン	15	52	ブロマシル	37	60	ジメタメトリン	96	29
グリホシネート	1	1	DCMU	19	52	フルフェナセット	56	57
DBN	31	84	トリフルラリン	62	50	テブチウロン	41	15
アシュラム	11	14	ペンチオカーブ	66	47	ピラクロニル	52	37
MCPA	0	5	ペンディメタリン	125	59	ブタクロール	115	47
ジクワット	1	2	ヘキサジノン	43	16	プレチラクロール	112	42

表 2. 構築したライブラリ数

除草剤	スペクトル数 POS	NEG	除草剤	スペクトル数 POS	NEG	除草剤	スペクトル数 POS	NEG
グリホサート	1	2	パラコート	2	0	リニュロン	25	35
ペンタゾン	15	52	ブロマシル	37	60	ジメタメトリン	96	29
グリホシネート	1	1	DCMU	19	52	フルフェナセット	56	57
DBN	31	84	トリフルラリン	62	50	テブチウロン	41	15
アシュラム	11	14	ペンチオカーブ	66	47	ピラクロニル	52	37
MCPA	0	5	ペンディメタリン	125	59	ブタクロール	115	47
ジクワット	1	2	ヘキサジノン	43	16	プレチラクロール	112	42

表 3. ヒトメタボロームの MS2 スペクトルライブラリ照合結果

除草剤	検出されたスペクトル数 POS	NEG
フルフェナセット	4	3
プレチラクロール	1	1
ブタクロール	3	1
アシュラム	1	0
ジメタメトリン	2	0
ヘキサジノン	1	0
ペンディメタリン	1	0
トリフルラリン	1	0
リニュロン	0	1
DBN	0	2
グリホサート	0	1
計	14	9

表 4. 除草剤曝露が疑われるピークが検出された人数

親物質	人数	親物質	人数
フルフェナセット a	73	アシュラム	73
フルフェナセット b	71	ジメタメトリン a	73
フルフェナセット c	50	ジメタメトリン b	3
フルフェナセット d	38	ヘキサジノン	73
フルフェナセット e	19	ペンディメタリン	68
フルフェナセット f	73	トリフルラリン	73
フルフェナセット g	73	リニュロン	3
プレチラクロール a	73	DBN a	71
プレチラクロール b	73	DBN b	73
ブタクロール a	73	グリホサート	50
ブタクロール b	73		
ブタクロール c	70		
ブタクロール d	73		

化学物質曝露と健康状態のバイオマーカーとしての内因性尿中代謝物パネルの作成

環境労働衛生学　坂井玲音（No.40）

（1）目的・背景

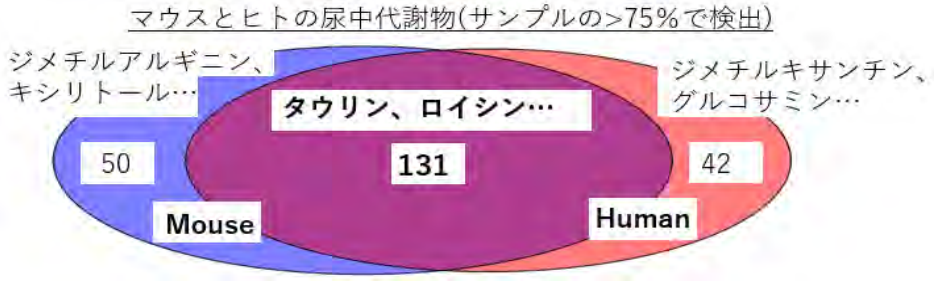
我々は日々の生活の中で様々な化学物質に曝露されており、それらによるヒト健康へのリスクを適切に評価・管理する必要がある。その一方で、環境中の化学物質の数は増加しており、全ての化学物質とその代謝物を評価することは難しい。そこで、化学物質に曝露させたマウス尿中の内因性の主要代謝産物を測定、その変動と曝露レベルとの関連を解析し化学物質の曝露評価を行うことを本研究の目的とした。

（2）方法

①ICR 雄マウスに 1 日目は 溶媒(control)、2 日目、4 日目は化学物質を¼LD_{50} (Low dose), ½LD_{50} (High dose) それぞれ投与し、24 時間尿を回収した。
②女子大学生 73 名の早朝尿を回収した。
③得られた尿から液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS 法）を用いて測定し、保持時間、*m/z*、イオンクロマトグラム、MS2 スペクトルを得た。
④得られた測定値をもとに代謝物パネルを作成し、化学物質を投与したことによる変化が見られないものは排除した。
これらをもとに化学物質を曝露したことによる代謝物の存在量の変動を評価した。

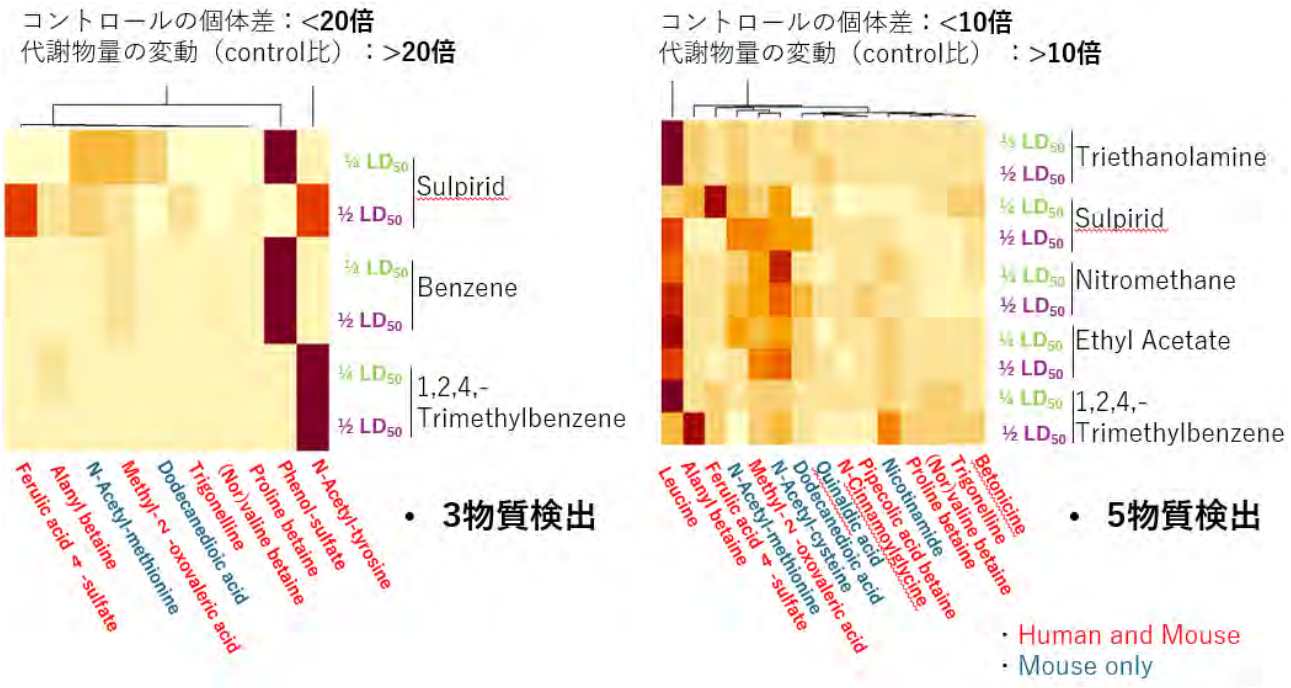
（3）結果

（ｉ）ヒトとマウスに共通した代謝物は以下の 131 物質見つかった（下図）。



1 (Iso)Butyryl-carnitine	27 Acetyl-carnitine	53 Glutaryl-carnitine	79 N2-Acetyl-asparagine	105 Oleic Acid
2 (Iso)Valeryl-carnitine	28 Aconitic acid	54 Glutaryl-glycine	80 N2-Acetyl-glutamine	106 Oxoglutaric acid
3 (Nor)valine betaine	29 Adenine	55 Glycyl-aspartic acid	81 N2-Acetyl-histidine	107 Pantothenic acid
4 2-Aminoadipic acid	30 Adenosine	56 Glycyl-proline	82 N2-Acetyl-lysine	108 Phenol-sulfate
5 2-Hydroxyadipic acid	31 Adipoyl-carnitine	57 Guanine	83 N2N2-Dimethylguanosine	109 Phenylacetylglutamine
6 2-Hydroxyglutaric acid	32 AICA-riboside	58 Hexaethylene glycol	84 N-3-Phenylpropionyl-glycine	110 Phenylalanine
7 2-Methylbutyrylglycine	33 Alanyl betaine	59 Hexitol (Sorbitol Mannitol Galactitol)	85 N6-Methyl-lysine	111 Pipecolic acid betaine
8 2-Methylcitric acid	34 Allantoin	60 Hippuric acid	86 N6-Succinyladenosine	112 Proline betaine
9 2-Oxoadipic acid	35 Azelaic acid	61 Homarine	87 Na-Acetyl-citrulline	113 Prolylhydroxyproline
10 3-Cresotinic acid	36 Betonicine	62 Homocitrulline	88 N-Acetyl-5-aminosalicylic acid	114 Propionyl-carnitine
11 3-Hydroxyisovaleryl-carnitine	37 Butyrobetaine	63 Hypoxanthine	89 N-Acetyl-arginine	115 Pseudouridine
12 3-Indoleacetic acid	38 Carnitine	64 Indole-3-lactic acid	90 N-Acetyl-aspartic acid	116 Pyridoxal
13 3-Methyladipic acid	39 cis-Urocanic acid	65 Indoxyl-glucuronide	91 N-Acetyl-cysteine	117 Pyroglutamic acid
14 3-Methylglutaconic acid	40 Citric acid	66 Indoxyl-sulfate	92 N-Acetyl-D-hexosamine	118 Quinic Acid
15 3-Ureidoisobutyric acid	41 Citrulline	67 Inosine	93 N-Acetyl-histamine	119 Riboflavin
16 4-Acetamidobutanoic acid	42 Creatine	68 Kynurenic acid	94 N-Acetylneuraminic acid	120 Suberylglycine
17 4-Aminovaleric acid betaine	43 Cysteine-S-sulfate	69 Leucine	95 N-Acetyl-threonine	121 Taurine
18 4-Guanidinobutanoic acid	44 Daidzein	70 Lysine	96 N-Acetyl-tryptophan	122 Threonic acid
19 4-Hydroxybenzoic acid	45 Ectoine	71 Malic acid	97 N-Acetyl-tyrosine	123 Tricarballylic acid
20 4-Hydroxyhippuric acid	46 Ethylmalonic Acid	72 Methyl-2-oxovaleric acid	98 N-Cinnamoylglycine	124 Trigonelline
21 4-Hydroxyphenylacetic acid	47 Ferulic acid 4-sulfate	73 Methylimidazoleacetic acid	99 NeNe-Dimethyl-lysine	125 Tryptophan
22 4-Hydroxyphenyllactic acid	48 Gentisic acid	74 Methylsuccinic acid	100 N-Hexanoylglycine	126 Tyrosine
23 4-Pyridoxic acid	49 Glucose (Hexose)	75 Methyluric acid	101 N-Methyl-4-pyridone-3-carboxamide	127 Ureidopropionic acid
24 5-S-Methylthioadenosine	50 Glucuronic acid	76 N-(Iso)butyrylglycine	102 N-Phenylglycine	128 Uric acid
25 5-Sulfosalicylic acid	51 Glutamic acid	77 N1-Methyladenosine	103 N-Propionylglycine	129 Xanthine
26 7-Methylguanine	52 Glutamine	78 N1-Methylguanosine	104 N-Tigloylglycine	130 Xanthosine
				131 Xanthurenic acid

（ⅱ）化学物質曝露後に大きな変化を示した内因性代謝物の検出（下図）



※条件付けをそれぞれ 20 倍と 10 倍で行った。赤字で示した内因性代謝物は、ヒトとマウスの両方で検出された物質。青字で示した物質はマウスのみで検出された。

20 倍で条件付けした方では、Sulpirid・Benzene・1,2,4-Trimethylbenzene の 3 物質が検出され、10 倍で条件付けした方では、Triethanolamine・Sulpirid・Nitromethane・Ethyl Acetate・1,2,4-Trimethylbenzene の 5 物質が検出された。

(4) 考察

ヒトおよびマウスの尿サンプルから 131 の主要代謝産物が検出された。この 131 の代謝物は一般的な代謝物であった。

用いた 115 化学物質のうち 6 物質で投与量依存的な内因性代謝物の増加が見られ、一部はヒトの尿中で検出された。このことから、ヒト尿中の主要代謝産物の測定で、6 物質の曝露を評価できる可能性があることが分かった。

研究の限界としては、今回の研究では一つの化学物質に対して一匹のネズミの 3 用量の尿データしかなかったことや、ノンターゲット LC-MS 法を用いており、濃度には言及できていないことなどが挙げられる。

フェニルケトン尿症など、化学物質の濃度変化が少なくても発症する疾患がある。そのため、健康への影響を調べるためにはもう少し小さい変化のものを調べる必要がある。しかし、技術的に現在は難しいため、今後技術が発展するとできるようになることが期待される。

(5) 参考文献

1) Tsugawa H. et.al. (2020) Nature Biotechnology, 38, 1159-116
2) Nomasa K. et.al. (2021) J Occup Health, 63(1), e12218
3) Kikuchi K. et.al. (2017) Nature Communications, 10, 1835

医学生の一日習慣塩分摂取量の推定

環境労働衛生学　白木颯太郎　48

目的・背景

日本人の一日平均塩分摂取量は他国と比べると高く、令和4年(2022)「国民健康・栄養調査」の結果[(1)]によると、9.7g (男性 10.5g、女性 9.0g)とされている。これは、世界保健機関(WHO)が健康のために掲げる目標量である 5g の 2 倍弱に相当する[(2)]。健康と学歴の関係は報告されている[(3)]が私の知る限りでは塩分摂取量と学歴の関係についての報告はみられなかった。そこで、健康について学ぶ者の一日習慣塩分摂取量を調べ、日本人の平均塩分摂取量と比較し、検討した。

方法

名古屋市立大学医学部医学科に在籍する学生 13 人に、2024 年 9 月 25 日(水)から 2024 年 10 月 1 日(火)の 1 週間、早朝尿の採集を依頼し、計 91 本のサンプルの比重や導電率、尿ナトリウムカリウム比を測定した。また、13 人の身長や体重、筋肉量、体脂肪率、脂肪量、BMI を測定した。尿から得られたデータを計算式に代入し、一日塩分摂取量を導出した。得られた推定値を使用し、過去の報告[(4)]をもとに 1 日習慣塩分摂取量を算出し、最良べき乗法および反復測定分散分析を用いて解析した。解析には、習慣摂取量の分布推定[(5)] version1.2 および、R version4.3.1 のソフトウェアを使用した。

結果

Table1. participants‘ characteristics and the average of their actual values.

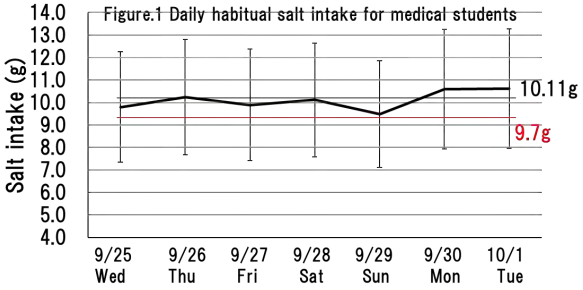
Variables		ALL n = 13
Sex	male	12 (92.3%)
	female	1 (7.7%)
age(year)		20.5 ± 0.93
body height(cm)		171.7 ± 4.1
body weight(kg)		62.4 ± 8.6
muscle mass(kg)		49.7 ± 5.7
body fat percentage(%)		15.5 ± 7.0
fat amount(kg)		9.95 ± 5.5
BMI(kg/m²)		21.2 ± 2.7

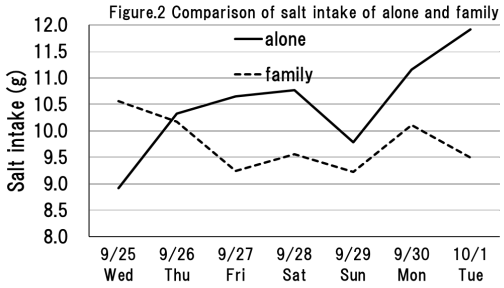
Table 2. participants' urine and the average of their actual values.

Variables	ALL n = 91
specific gravity	1.022 ± 0.0075
conductivity(mS/m)	18.8 ± 5.9
sodium-potassium ratio	4.9 ± 2.5

Table.3 The subject's daily salt intake calculated by the formula, the daily habitual salt intake estimated by the best power law, and their statistics. Difference between daily salt intake and habitual salt intake based on lifestyle.

	ALL		ALONE (n = 6)		FAMILY (n = 7)	
Statistic	daily intake (g)	habitual intake (g)	daily intake (g)	habitual intake (g)	daily intake (g)	habitual intake (g)
minimum point	5.723	7.356	6.391	8.534	5.723	7.279
maximum point	15.92	12.1	15.92	12.14	14.2	11.11
average	10.11	10.11	10.5	10.51	9.77	9.77
standard deviation	2.2	1.23	2.27	1.23	2.11	1.27
less than 5.0 %	0	0	0	0	0	0
7.5g or higher %	89.01	92.31	95.24	100	83.67	85.71
9.7g or higher %	57.14	69.23	61.9	83.33	53.06	57.14
inter-day variability	0.0334		0.000546		0.293	
inter-individual variability	0.0162		0.00022		0.167	
inter-day/inter-individual variability	2.06		2.48		1.76	





医学生 13 名（男性 12 名、女性 1 名）の平均年齢は 20.5±0.93 歳、1 日の食塩摂取量は 10.1±2.2g、習慣的食塩摂取量は 10.1±1.2g であった。個人内／個人間分散比は 2.06 であった。一人暮らし 6 名の習慣的食塩摂取量は 10.5±1.2g、実家暮らし 7 名の習慣的食塩摂取量は 9.77±1.3g であった。

考察

医学生の平均 1 日習慣塩分摂取量は、国民平均より高かった。また、個人間変動よりも個人内変動が大きく、日間変動が大きかった。さらに、下宿生と自宅生の塩分摂取量において有意差はみられなかったが、下宿生の方が、塩分摂取量が多かった。国民健康・栄養調査によると 20 代の食塩摂取量は平均 9.4 ± 3.9gで塩分摂取量があり、中央値は 8.8gである[(1)]。今回の我々の結果は、この値と比較したところ高値であり、医学生の塩分摂取量が多いことが分かる。われわれの食生活が塩分過多になる理由として、家庭を持たず、自炊をしているものが少なく、経済的に安定しているものが比較的多いことから、外食の機会が多いことが挙げられる。味覚形成は幼少期に完成してしまうため、味覚による塩分摂取量の調整は困難であると考えられる。したがって、塩分摂取量の改善のためには、客観指標を用いた塩分摂取量を把握する機会を設けたり、塩分摂取量と疾患のリスクについて学んだりする必要がある。研究の限界点としては、対象者数が 13 人であり、サンプル数が小さいこと、男女比に偏りがあることが挙げられる。さらに塩分摂取量は食事量と相関関係があることが判明しているが、今回の調査では食事調査をしていないため、エネルギー摂取量が不明であり、エネルギーを調節した解析ができないことが挙げられる。

参考文献

(1) 厚生労働省　国民健康・栄養調査 2022
(2) Sodium reduction - World Health Organization (WHO) accessed on 2024/8/27
(3) Tanaka et al., Educational inequalities in all-cause and cause-specific mortality in Japan: national census-linked mortality data for 2010-15, Int J Epidemiol. 2024 Feb 14;53(2):dyae031. doi: 10.1093/ije/dyae031.
(4) Sumikama et al., Development of a Method for Estimating Dietary Salt Intake Using the Overnight Urinary Sodium/Potassium Ratio, J Clin Med Res. 2021;13(9):479-486
(5) 横山　徹爾　データ評価のための統計的方法―分散分析の利用　田中秀幸　習慣的な食事摂取量の分布を推定するための理論と実際　―集団への食事摂取基準の適用の観点から―　国立保健医療科学院生涯健康研究部

n-デカンの職業曝露限界の提案 ：75 ppm

環境労働衛生学 福岡真大（72 番）

1．背景

製造現場では種々の化合物が使われている。n-デカンは工場で使われている有機溶剤の一種で、溶剤や工業用原料、反応溶媒として使用されている。香料原料としての世界の年間使用料は0.1~1.0トンである[1] n-デカンの許容濃度（OEL）は未設定であり、労働者の健康に有害影響を与えるリスクが否定できない。

2．目的

現在、n-デカンには許容濃度が定まっていない。そこで、n-デカンのヒトや動物に対する影響についての論文をレビューして、n-デカンの許容濃度の提案値を考案することを目的とした。

3．方法

まず、米国環境保護庁（EPA）から発表されているレビュー論文及びその原著論文を参照した。その後、PubMed、Scopus、Cochrane Library を用いて文献を検索した。検索結果が 100 件よりも多い場合は、「exposure」「inhalation」などの語句を追加して絞り込んだ。次に、抄録及び本文の内容から関連性が薄いものを除外し、残った文献をレビューした。必要に応じてレビューした文献の引用論文も参照した。最後に、得られた情報から許容濃度提案値の考案及び許容濃度提案理由書を作成した。許容濃度提案値は、得られた No Observed Adverse Effect Level (NOAEL)に種差の不確実係数を除し、8 時間加重平均に換算した、NOAEL(/8h)を基に考案した。種差の不確実係数は、ヒトが実験動物よりも感受性が高いと仮定することで安全を確保するもので、社会的に広く使われている 10 を使用した。

4．結果

データベースで文献を検索し関連性が薄いものを除外した結果次のようになった。PubMed で「n-decane」と検索して 3 件→1 件、「n-alkane」で 15 件→2 件、「decane」7 件→1 件、Scopus で「decane, carcinogenesis, alkane」で 26 件→1 件、「decane, human exposure, inhalation, kinetic」で 6 件→3 件、Cochrane Library で「n-decane」で 4 件→1 件であった。引用文献を合わせて 34 本の文献をレビューした。

ヒト曝露研究では、Kjærgaard (1987)[2] において、0、10、35、100 ppm の 4 段階で n-デカンを 6 時間/日で 1 日曝露させたところ、曝露前後で涙液分泌物の細胞含有量に変化がみられた。多形核白血球は、0、10 ppm で有意に減少し、35、100 ppm で有意ではないが増加した。立方上皮は、35 ppm でのみ有意に増加した。これらの変化は急性結膜炎を示すものではなく、NOAEL の最大値を 100 ppm（/6h）とした（Table1）。

ラット曝露では、Lammers (2011)[3]において、0、93.9、281、939 ppm の 4 段階で n-デカンを 8 時間/日で曝露させたところ、939 ppm 曝露の 1 日目と 3 日目の計測で、視覚刺激に対する反応までの潜時が 6 秒以上になる頻度が有意に増加した。この変化は可逆的で、曝露終了から 1 日経過した 4 日目の計測では正常に戻っており、NOAEL を 939 ppm（/8h）とした（Table2）。また、Rim (2004)[4] において、0、50、200、800 ppm の 4 段階で n-デカンを6時間/日で 28 日間曝露させたところ、オスの 200、800 ppm 曝露で

平均赤血球ヘモグロビン濃度が有意に減少した。この変化は有意ではあるが僅かで、赤血球数やヘモグロビンは変化していないため、NOAEL を 800 ppm(/6h)とした(Table3)。

Table 1. Cell count changes in conjunctival secretions before and after n-decane exposure

Cell type	0 ppm	10 ppm	35 ppm	100 ppm
Polymorphonuclear leucocytes**	-186*	-62*	3	27
Cuboidal epithelium***	-3	0	5*	-12

* indicates significant difference at $p < 0.05$. ** indicates significant difference in log-linear analysis of linear trend. *** indicates significant difference in Kruskal Wallis one-way analysis of variance.

Table 2. Visual discrimination performance test of rats exposed to n-decaane

	Latency > 6 seconds			
	One day preexposure	First 8hour exosure	Third 8hour exposure	One day postexposure
Control	4.50±1.04	5.00±1.27	4.00±0.71	3.50±0.50
93.9 ppm	3.88±1.25	6.00±1.39	4.25±0.70	3.13±0.90
281 ppm	3.38±1.40	5.75±2.87	4.13±0.90	4.00±0.76
939 ppm	5.00±1.84	12.00±2.39*	9.13±2.02*	4.38±1.03

* indicates significant difference at $p < 0.05$.

Table 3. Hematology data of rats exposed to n-decane

	male				female			
	Control	50 ppm	200 ppm	800 ppm	Control	50 ppm	200 ppm	800 ppm
RBC	7.3±0.4	7.6±0.6	7.7±0.5	7.4±0.5	7.6±0.3	7.4±0.3	7.4±0.4	7.4±0.6
HGB	14.2±0.6	14.6±0.6	14.7±0.9	14.6±0.7	14.9±0.6	14.5±0.6	14.8±0.5	14.6±1.1
HCT	43.3±2.3	45.0±2.5	45.7±2.8	45.6±2.8	43.8±1.8	43.2±3.6	43.3±2.4	43.7±3.2
MCHC	33.0±0.8	32.4±0.8	32.3±0.5*	32.0±0.8*	34.0±0.7	33.8±1.8	34.2±1.6	33.4±1.4

* indicates significant difference at $p < 0.05$. RBC, red blood counts ($10^6/mm^3$). HGB, hemoglobin (g/dL). HCT, hematocrit (%). MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration (%).

その他の毒性について、ヒトでの中毒症例、疫学調査の報告や、ヒト及び動物で長期の吸入・経口毒性についての報告は見当たらなかった。発がん性について、Van Duuren (1976)[5]において、n-デカン単体の皮膚塗布では皮膚腫瘍は発生しなかったが、発がん性物質であるベンゾ[a]ピレンと共塗布すると、ベンゾ[a]ピレンの発がん作用を促進した。遺伝毒性・生殖毒性について、それぞれ 900、1000 ppm で毒性はなかった[6]。感作性についての報告は見当たらなかった。

以上の NOAEL を種差の不確実係数 10 で除し NOAEL(/8h)を算出すると Kjærgaard (1987)が 75 ppm、Rim (2004)が 60 ppm、Lammers (2011)が 93.9 ppm となった。

5. 考察

結果から、ヒトの NOAEL(/8h)の最大値は 75 ppm であり、この値はラットの NOAEL(/8h)の 60 ppm、及び 93.9 ppm と比較しても大きな差はない。よって、n-デカンの許容濃度として 75 ppm を提案する。これにより急性・亜急性毒性による有害影響を抑えるとともに、長期毒性による有害影響を予防することができると思われる。次にアルカンの炭素鎖の長さと許容濃度の関係について考える。アルカンの許容濃度は、ブタン 500 ppm、ペンタン 300 ppm、ヘキサン 40 ppm、ヘプタン 200 ppm、オクタン 300 ppm、ノナン 200 ppm である[7]。Swann(1974)[8]によると、末梢神経毒性が強いヘキサンを除き、炭素鎖が長くなるにつれてアルカンの刺激性は強くなる。ブタンよりもオクタンやノナンの方が許容濃度は小さくなっているおり、n-デカンの許容濃度提案値 75 ppm もこの傾向に従っている。

n-デカンのヒトに対する健康影響、特に長期毒性に関する研究は多くはない。そのため、より高い安全性を担保するためにはさらなる研究が必要になると考える。

引用文献

1) A.M. Api et al. Food Chem. Toxicol. 2020. 146:111804.
2) S Kjaergaard et al. Environ. Int. 1989. 15(1-6):473-482.
3) J.H.C.M.Lammers et al. Int. J. Toxicol. 2011. 30(1):47-58.
4) Kyung Taek Rim et al. J. Environ. Toxicol. 2004. 19(4):345-352.
5) Van Duuren et al. J. Natl. Cancer I. 1976. 56(6):1237-1242.
6) OECD. SIDS Initial Assessment Profile. 2011.
7) 日本産業衛生学会 産業衛生学雑誌 2023;65(5):268-300.
8) H.E.Swann et al. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 1974. 35(9). 511-518.

医学生のストレスレベルの測定と、ストレスレベルとストレス要因の関連

医学・医療教育学分野　足立梨紗（No.3）

医学生は、授業、試験、実習、社会的な関係など多くの要因から影響を受け、ストレスを感じやすい環境に置かれている。これらのストレスが積み重なることで、精神的健康に悪影響を及ぼし、医学生は他の学生に比べて抑うつや不安を感じやすく、バーンアウト（燃え尽き症候群）に陥るリスクが高いことが先行研究から知られているが、どの要因が最もストレスに関連しているのかについては十分に解明されていないため、この研究を行うことを決めた。また、本研究は医学生が経験するストレス要因を特定し、それとストレスレベルとの関連を明らかにすることを目的としている。[1)]

今回の研究では、名古屋市立大学医学部 1～4 年生を対象とし、学年 LINE にマイクロソフトチームズを用いたアンケートフォームを送信した。実施期間は 2024 年 10 月 4 日の 15 時から 2024 年 10 月 11 日の 15 時までの 7 日間で、アンケートフォームの内容は、基本情報、ストレスレベルを測定するもの、最後にストレス要因を測定するもので構成した。ストレスレベルの測定は、コーエンという心理学教授が作った「知覚されたストレス尺度（PSS）」を使用した。[2)]これには 10 項目の質問があり、各項目につき 0～4 のスコアをつけ、合計する。総合スコアが高いほどストレスを多く感じていることを示す。0～13 点は低ストレス群、14～26 点は中ストレス群で、27～40 点は高ストレス群と、3 つに分類することが出来る。ストレス要因の測定は、授業理解、試験不安、教材の量、友人関係、家族の期待、時間管理、学業とプライベートのバランス、金銭面の 8 つのストレス要因について 1～10 の 10 段階で評価して貰った。データ分析には EZR を使用した。まず、one-way ANOVA を行い、独立変数は 8 つのストレス要因で、従属変数はストレスレベルとした。次に、重回帰分析を行い、独立変数は 8 つのストレス要因と性別、年齢で、従属変数はストレススコアとした。

アンケートは計78名から回答をいただいた。（表 1）内訳は、男性が37名、女性が39名だった。学年別では、1年生が13名、2年生が20名、3年生が34名、4年生が11名で、ストレスレベル別では、高ストレス群が18名、中ストレス群が39名、低ストレス群が21名だった。One-way ANOVA の結果は、グラフ 1 のようになった。授業内容を理解していると感じることや、試験不安が少ないこと、教材量の負担が少ないことが、低いストレスと関連することが分かった。家族からの過度な期待や金銭的不安が強いと、高いストレスと関連している傾向が見られた。良好な友人関係や学業とプライベートのバランスが取れていると、低いストレスに関連していることが示唆されていた。また、男女別のグラフ 2 を見ると、男性は「授業理解」、「教材の量」、「金銭面」が女性より強く、「バランス」は高ストレス群と低ストレス群で差が大きかった。女性は家族からの期待が強いとストレスが高く、「授業理解」や「金銭面」では差が見られなかった。重回帰分析の結果は、関係が強そうなのは、係数が大きい、バランス、家族からの期待、金銭面だった。（表 2）しかし、ボンフェロー二の補正をかけると、どの要因も有意ではなかったため、それほど関連が強いとは言えない可能性がある。

本研究の結果を考察すると、まず、医学部の難解な授業内容と多量の教材により、高ストレス群は学業の進捗や理解に不安を感じやすいと考えられる。また、試験は学業の進捗を測る重要な指標であるが、試験への不安は高いストレスと関連する可能性がある。さらに、学業に多くの時間を割く必要があり、効率的な時間管理ができないと

学業とプライベートのバランスが取れず、ストレスがさらに増加する可能性がある。また、家族からの期待や金銭的な不安も精神的負担となり、学業への集中を妨げていると考えられる。

最後に本研究の長所と短所について述べる。長所は、まず、コーエンのストレス尺度を用いており、客観的なデータに基づいて分析を行っているため、結果が信頼性をもつといえる。また、アンケートを LINE で告知する手軽な方法により、学生がアクセスしやすく回答率があがりやすい。短所は、調査対象が名市大医学部1～4年生のみであるため、一般化が難しいことである。また、横断的調査であり、因果関係が特定できないことや、ストレス要因が学業や社会的要因に偏っており、他の要因を考量できていないことが挙げられる。

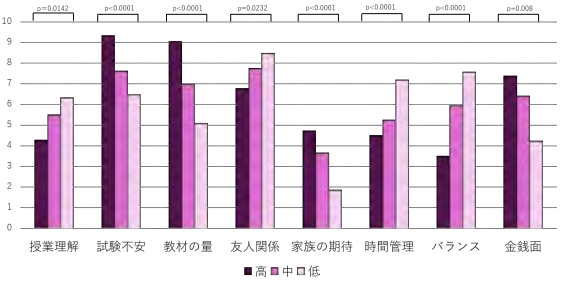
参考文献

1） Ishak, W., Nikravesh, R., Lederer, S., Perry, R., Ogunyemi, D., & Bernstein, C. A. (2013). Burnout in medical students: A systematic review. Journal of Medical Education, 45(5), 201-207.

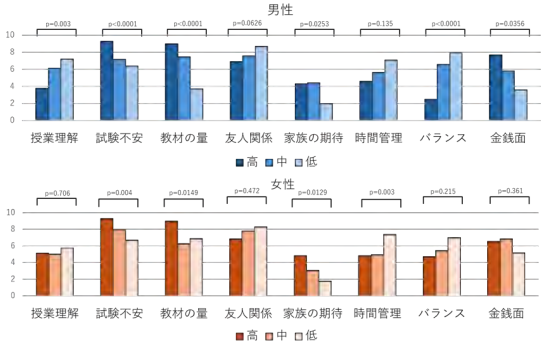
2) Cohen, S., Kamarck, T., & Mermelstein, R. (1983). A global measure of perceived stress. Journal of Health and Social Behavior, 24, 385-396.

	全体	男性	女性
対象者数（%）	78	37 (47.4)	39 (50.0)
平均年齢	20.5	20.2	20.8
学年カテゴリ（%）			
1年	13 (16.7)	6 (7.7)	7 (9.0)
2年	20 (25.6)	11 (14.1)	8 (10.3)
3年	34 (43.6)	15 (19.2)	18 (23.1)
4年	11 (14.1)	5 (6.4)	6 (7.7)
ストレスレベルカテゴリ(%)			
高	18 (23.1)	10 (12.8)	7 (9.0)
中	39 (50.0)	17 (21.8)	22 (28.2)
低	21 (26.9)	10 (12.8)	10 (12.8)

表 1：サンプルの基本特性



グラフ 1：one-way ANOVA の結果（全体）



グラフ 2：one-way ANOVA の結果(男女別)

ストレス要因	係数	P 値
授業理解	0.2523	0.5317
試験不安	0.6567	0.1117
教材の量	0.4546	0.1322
友人関係	-0.4945	0.1668
家族からの期待	0.6717	0.0391
時間管理	-0.1534	0.6371
バランス	-0.7494	0.0398
金銭面	0.5486	0.0361
性別	-0.3138	0.8101
年齢	0.0563	0.7518

表 2：重回帰分析の結果

名古屋市立大学 医学生における学習意欲の要因について

～ARCS モデルによる検討～

医学・医療教育学 柴田愛子 46 番

目的

学習意欲を上げ学生が効果的に学習できるように、名市大の医学部生の学習意欲向上の要因を調査することにした。

背景

論文を読み、ARCS モデルを利用した医療従事者向けのプログラムは学習効果が高いことが分かったため、ARCS モデルに従って学習意欲の要因を分析することとした。

研究方法

マイクロソフトフォームズを利用したアンケート調査を行った。アンケートは各学年のグループ LINE にリンクを送ったり、直接お願いしたりした。期間は 2024 年 10 月 7 日から 10 月 21 日で、対象は名市大の医学部2～6年生とした。アンケート内容はベスト講義を聞き、その理由を ARCS モデルに従った選択肢:①面白そうだった(A:注意)、②やりがいや意義を感じた(R:関連性)、③やれば習得や理解ができそうだと感じた(C:自信)、④やってよかったと感じた(S:満足感)から選んでもらい、さらにその理由について ARCS の各項目の下位分類を参考に選択肢を作成し、回答してもらった。

結果

全体回答者	56人				A		R		C		S	
全体回答数	70回答			選択人数(人)	(人)	(%)	(人)	(%)	(人)	(%)	(人)	(%)
教養科目	6回答				6	100.0	5	83.3	3	50.0	6	100.0
医学	69回答											
	基礎医学	60人	医学入門	1	1	100.0	1	100.0	1	100.0	1	100.0
			医薬看連携地域参加型学習	2	1	50.0	2	100	1	50.0	2	100
			肉眼解剖学	11	9	81.8	8	72.7	6	54.5	7	63.6
			生理学	14	6	42.9	11	78.6	8	57.1	11	78.6
			生化学２	1	1	100	1	100	1	100	1	100.0
			医学情報学	1	1	100	1	100	1	100	1	100.0
			水平統合基礎	2	2	100	2	100	0	0.0	2	100.0
			細菌学	8	8	100	8	100	7	87.5	7	87.5
			法医学	4	4	100	3	75.0	1	25	3	75.0
			ウイルス学	2	1	50.0	1	50.0	2	100	1	50.0
			免疫学	3	2	33.3	3	100	2	66.7	3	100.0
			(実験・臨床) 病理学	1	1	100	0	0.0	0	0.0	1	100.0
			医療倫理	2	2	100	2	100	1	50	2	100.0
			医療安全の視点から	2	2	100	2	100	1	50	2	100.0
			水平統合病態	2	2	100	1	50.0	0	0.0	0	0.0
			基礎自主研究	3	2	100	2	100	2	100	2	100.0
			神経科学	1	1	100	1	100	0	0.0	0	0.0
	臨床自習	9人			5	55.6	6	66.7	6	66.7	5	66.7
なし		1人										
合計					57	76.0	60	80	43.0	57.3	57	76.0

回答者数56名、総回答数70回答となった。ベスト講義として選ばれたのは、肉眼解剖学 11 人、生理学 14 人、細菌学 8 人、臨床実習 9 人が多かった。また、ARCS の各項目の割合は A 注意 76%、R 80%、C 57.3%、S 76%となりました。ARCS 各項目の下位分類の内訳について、全体の傾向をまとめると、以下のようになった。

・問題について考えることと話題にユーモアや珍しさを感じることで学生の注意をひくことができる。（A：注意）

・将来の目標に必要だと感じることでやりがいを感じる学生が多い。（R:関連性）

適切な目標が明示されていたり、チャレンジ精神が刺激されると自信を感じる学生が多い。（C：自信）

・教え合いによって、学習効果を実感し、満足感を感じる学生が多かった。（S:満足感）

・満足感を感じる理由はその他を選んだ学生が最も多かった。（S：満足感）考察

学生の意欲が上がった科目が A（注意）・R（関連性）・C（自信）・S（満足感）の要素をバランスよく満たしている場合と、A・R・C・S のうちどれかを特に満たしている場合があった。また、科目によって学習意欲が向上した細かい要因は異なるので、科目の特徴を生かして学習意欲を向上させることが重要である。

全体の傾向より、学生の学習意欲を上げるのに効果的だと考えられるのは以下。

①問題について考えさせる(A:注意）

②将来の目標のために必要だと感じさせる(R:関連性）

③適切な目標が明示されている(C 自信）

④教えあい学習効果を実感させること(S）

また、学習に関して、自信(C)を感じている学生は比較的少なかったため、学生が自信を持てるようなカリキュラムにすることが重要である。

本研究の長所は、名市大の医学生の実際の声をきくことができたことと、整理されたモデルに従って、意欲を上げた要因について調査したため、より具体的な改善案が分かり、今後の授業やカリキュラム作成に活用できる可能性があることである。一方、短所は自己選択バイアスを考慮する必要があることと、回答人数が少ないので、名市大医学生全体の傾向がつかめたとは言えないことであるので、さらに詳細な研究が必要である。

参考文献

Daisuke Son 1, Kazumi Kawamura , Miho Utsumi , Mitsuko Nakashima , Kanako Suzuki , Naho Watanabe The Development and Evaluation of the Interprofessional Education Facilitation Program for Health Professionals Using the Attention, Relevance, Confidence, and Satisfaction (ARCS) Model of Instructional Design 2023 Apr

J.M.ケラー著 鈴木克明 監訳 学習意欲をデザインする ARCS モデルによるインストラクショナルデザイン 稲垣忠 鈴木克明 編著 教師のためのインストラクショナルデザイン授業設計マニュアル

The differences of medical students’ motivation for each years

医学・医療教育学　鈴木春緋　（NO.55）

１．背景

モチベーションが上がるとはどのようなことか。どうしたらモチベーションを上げることが出来るのか。この答えは既に研究されており、動機づけと呼ばれる。動機づけには、内的動機づけと外的動機づけに分けることができる。内的動機づけとは自己決定の程度であり、興味があったり楽しいと感じたりといった内的要因によって行動することであり、外的動機づけは自身の目標や他者からの評価といった外的要因によって行動することである。このように、勉強に対するモチベーションを上げるためには、自分で決めること、将来に役立つと感じること、他者からの評価があることなどが重要である。(Anne-Sophie Sarkis ほか, 2020) モチベーションを上げる方法はわかっているものの、現在の医学部の学生の中にはモチベーションが低い学生がいることは事実であり、また、入学当初と比べてモチベーションの低下がある学生がいることも考えられる。

２．目的

学年ごとにモチベーションの程度や種類に違いがあり、各学年でモチベーションを上げる効率的な方法に違いがあるのではないかということに注目した。本研究では、各学年における動機づけの違いについて調査し、さらに、学年ごとの期待する、やる気の出る授業とはどのようなものかについて知ることを目的とする。

３．方法

名古屋市立大学医学部の学生 13 人対して、一対一で研究の背景を説明した後に以下の質問項目に従って、一人 30 分～40 分程度の半構造化インタビューを行った。その後、インタビュー内容を文字化して NVivo を用いてテキストをコード化し、得られたコードをカテゴリー化して質的に分析した。

＜質問項目＞

・現在の医学部の勉強をする一番の動機は何ですか。
・勉強への意欲をかきたてられるのはどのような授業ですか。
・こんな授業だったら、もっとやる気が出るのにといった希望はありますか。
・大学生活において、達成感、責任感、成長実感を感じた経験はどのようなものでしたか。（一年生には高校生活においての経験も聞いた。）

４．結果

勉強への動機について3つのテーマに分けることができた。
また、やる気の出る授業については10のテーマに分けることができた。

各項目の学年別の回答者数を比較した。(表1、表 2、表 3)

	一年生(5人)	三年生(4人)	六年生(4人)	合計 (13)
試験や進級のため	4	2	4	10
将来の目標のため	4	2	2	8
興味関心	2	2	2	6

表1:勉強への動機

	一年生(5人)	三年生(4人)	六年生(4人)	合計 (13)
学校のテストのため	3	2	1	6
国家試験に合格するため	0	0	4	4
再試験を受けたくないから	1	2	0	3
進級のため	2	0	0	2
理想の医師になるため	2	2	1	5
医学部の勉強は未来に直結しているから	2	1	0	3
医師になる現実を感じたから	2	0	0	2
来年働かなければならないから	0	0	2	2
興味ある	2	1	1	4
学んでいくのが今すごい楽しい	2	1	1	4
自分に合った勉強の仕方を探るため	0	1	0	1

表2:勉強への動機(詳細)

	一年生(5人)	三年生(4人)	六年生(4人)	合計 (13)
分かりやすい、理解できる授業	4	4	3	11
メリハリのある授業	3	2	2	7
実習、見学等	3	3	1	7
熱心で親しみのある先生	3	2	2	7
テストのためだけではない授業内容	3	2	1	6
仲間と共に学ぶ	2	1	3	6
できると感じられる	1	2	0	3
自分で選択できる	2	0	1	3
授業環境を改善する	0	1	1	2
報酬がある	0	1	1	2

表 3:やる気の出る授業

5. 考察

どの学年も、試験のため、将来の目標のため、興味関心が動機となって勉強している。各学年の違いについては、六年生は国試のためはもちろんであるが、来年実際に働くことを想像して、それがモチベーションになっている。三年生は部活やバイトなど勉強以外での活動が増え、大学生活において、達成感や責任感を感じた経験が三年生の前後の時期にあることが多いことから、両立のために再試験を避けようと、勉強をすることがあると考えられる。一年生は医学部の授業は直結していて価値があるため学ぼうと思っているなどといった意見から、医学部の勉強が将来に直結することを期待して、医学部の授業を楽しみにしている。

やる気の出る授業は、どの学年も、分かりやすい理解できる授業が挙がっていた。これは、一年生と三年生はテスト、六年生は国試のためという外的動機づけによって分かりやすい授業が求められているのではないかと考えられる。各学年の違いについては、六年生は、参加型の授業や、共に教えあって勉強することがやる気に繋がると回答した。三年生は実習や病院見学を挙げていたが、基礎医学を学ぶ上で、臨床現場での繋がりをしったり、実験してみて目で見てわかったりすることを望んでいるのではないかと考えられる。一年生はテストのためだけでない内容について知りたいという意見があったが、大学受験の勉強で、高校範囲を超えた内容を使って試験問題が解けた経験から、深く学ぶことを望んでいるのではないかと考えられる。

6. 参考文献

・Lebanese students' motivation in medical school: does it change throughout the years? A cross-sectional study (Anne-Sophie Sarkis ほか,2020)

・動機づける力　モチベーション理論と実践(DIAMOND ハーバード・ビジネス・プレビュー編集部, 2009)

ラット尾部精巣上体管の自発収縮の制御機構

221006 井土健陽

背景

精巣上体は自発収縮を発生し、精子の貯蔵や輸送を介して精子の成熟に寄与することから、精巣上体が機能不全をおこすと男性不妊の原因となりうる。ラットの近位尾部精巣上体管は長軸方向に自発収縮を発生し、この収縮はL型電位依存性 Ca^{2+}チャネル(LVDCCs)阻害薬により抑制される(1)。平滑筋層の最内層にはPDGFRα^{+}陽性細胞が存在している(1)。PDGFRα^{+}細胞はTMEM16A(ANO1) Ca^{2+}活性化塩素イオンチャネル(CaCCs)を特異的に発現しており、単離PDGFRα^{+}陽性細胞はTMEM16A阻害薬に感受性のある自発的内向き電流を発生する(2)。すなわち、PDGFRα^{+}陽性細胞が発生するTMEM16A CaCCs開口によるペースメーカー電位が平滑筋に伝播し、LVDCCsを活性化して収縮を起こしていることが示唆される。本研究では、ラットの近位尾側精巣上体管の電気活動を記録し、自発収縮を引き起こす電気活動の発生メカニズムを調べることで、不妊治療の一助になりうることを目的とした。

方法

ラットの近位尾部精巣上体から精巣上体管(長さ3 mm)を切り出し、管腔内に2本のステンレスワイヤーを通して短軸方向に伸展し、さらにタングステンピンで筋収縮による標本の動きを抑制した。標本を36 ℃のKrebs溶液で灌流し、ガラス微小電極法を用いて平滑筋細胞の膜電位を記録した。薬物は灌流液中に溶解して投与した。データは平均±標準偏差で表した。また、t検定を用いてコントロール条件下と薬剤投与間の各種パラメータの平均値の差を検証した。有意水準は0.05とした。

結果

精巣上体管平滑筋の静止膜電位は-51.8 ± 6.0 mVであり、自発スローウェーブ(SWs)を発生した。SWsの振幅、半値幅、頻度は、それぞれ35.5 ± 5.6 mV, 2.0 ± 0.6 sec, 6.3 ± 1.0 min^{-1}であった。LVDCCs阻害薬であるnifedipine (3 μM)によりSWsが消失し、振幅7.8 ± 2.3 mVの一過性脱分極が残った(Fig. 1)。

T型電位依存性カルシウムチャネル(TVDCCs)阻害剤である$NiCl_2$ (10 μM)は、SWsの頻度を15.3%減少させたが(control:5.7 ± 0.8 min^{-1}、$NiCl_2$:4.8 ± 0.6 min^{-1}、 Fig. 2、5)、振幅は変化させなかった。

高カリウム濃度溶液($[K^+]_o$=20.2 mM)は、膜を脱分極させてSWsの頻度を38.6%増加させた(control: 5.8 ± 0.3 min^{-1}、高カリウム溶液:9.5 ± 1.5 min^{-1}、 Fig. 3、5)。一方、ATP感受性カリウムチャネル(K_{ATP})活性剤levcromakalim(1 μM)は膜を過分極させてSWsの頻度を16.3%減少させた

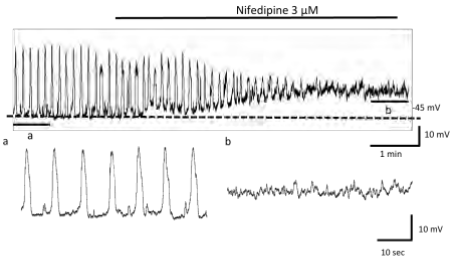


Figure 1 nifedipine投与によるスローウェーブへの影響.下図a,bは上図a,bの拡大図

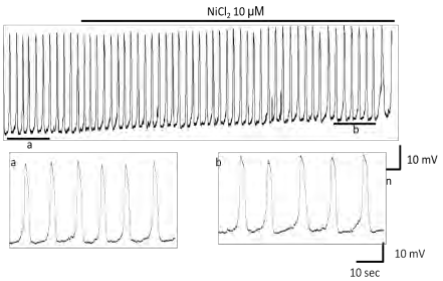


Figure 2 $NiCl_2$投与のSWsへの影響。下図a,bは上図a,bの拡大図

(control: 6.3 ± 1.5 min^{-1}、levcromakalin：5.2 ± 1.3 min^{-1}、Fig. 5)。K_{ATP} 阻害剤 glibenclamide (3 μ M)は膜を脱分極させて SWs の頻度を 15.4%増加させた(control: 6.5 ± 1.5 min^{-1}、glibenclamide：5.2 ± 1.3 min^{-1}、Fig.5)。

TMEM16A の選択的阻害薬である Ani9 (10 μ M)は、SW の頻度を 13.4%減少させたが(control: 6.7 ± 0.6 min^{-1}、Ani9：5.8 ± 0.8 min^{-1}、Fig. 4、5)振幅は変化させなかった。 CaCCs を非特異的に阻害する niflumic acid (100 μ M)は、SWs の頻度を 31.2%減少させた (control: 6.8 ± 1.3 min^{-1}、niflumic acid：4.7 ± 2.0 min^{-1}、Fig. 5)。

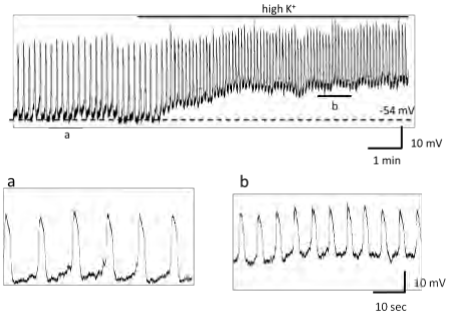


Figure 3 高カリウム濃度 Krebs 溶液灌流の SWs への影響。下図 a,b は上図 a,b の拡大図

考察

ラット近位尾部精巣上体では、平滑筋細胞は SWs を発生させており、これは TMEM16A による自発脱分極が LVDCCs を活性化させることで形成されていることが示された。一方、TVDCCs も SWs の頻度の規定に関与しており、SWs の頻度は電位依存性であることから、TVDCCs による脱分極は TMEM16A による自発脱分極が LVDCCs の閾値に達することを容易にしていると考えられる。TMEM16A を特異的に阻害すると SWs の頻度は減少したが振幅は変化しなかった。非特異的に CaCCs を阻害すると SWs の頻度はさらに減少したことから TMEM16A 以外のクロライドチャネルも SWs の発生に関与していることが考えられる。小胞体(SR)からの周期的な自発カルシウムの放出と取り込みは小胞体 Ca^{2+}-ATPase 抑制剤に感受性があり、自発収縮が抑制されることが示されている(1)。今回観察された SWs もこの SR を介したメカニズムによって活性化された CaCCs を介して形成されており、これが最終的に活性化させる LVDCCs が自発収縮のもとになっていると考えられる。

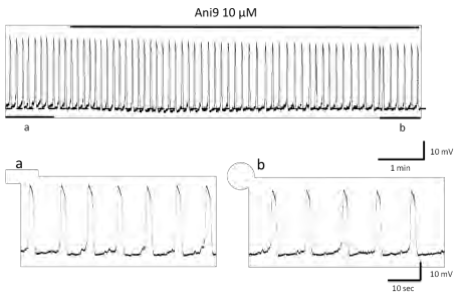


Figure 4 Ani9 投与による SWs への影響。下図 a,b は上図 a,b の拡大図

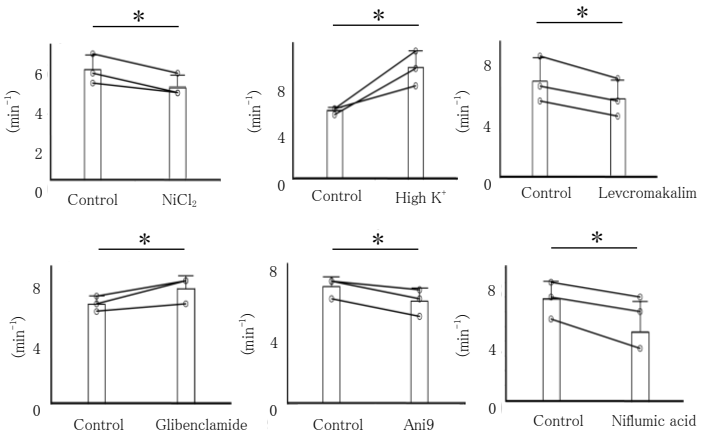


Figure 5 各薬剤による SWs の頻度への影響

参考文献

1. Mitsui, R., Hashitani, H., Lang, R. J., & van Helden, D. F. (2021). Mechanisms underlying spontaneous phasic contractions and sympathetic control of smooth muscle in the rat caudal epididymis. *Pflügers Arch, 473*(12), 1925-1938.
2. Kudo, W., Mitsui, R., & Hashitani, H. (2024). Involvement of ANO1 currents in pacemaking of PDGFR α -positive specialised smooth muscle cells in rat caudal epididymis. *Cell and Tissue Res*, 397 (1) 1-12.

Characterisation of the single-channel properties of the CPVT-linked mutation RyR2-R169Q$^{+/-}$

細胞生理学分野 Sora Sawada (No. 44)

Introduction

Ryanodine receptor 2 (RyR2), the sarcoplasmic reticulum (SR)-Ca^{2+} release channel, plays a crucial role during cardiac excitation-contraction (E-C) coupling. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia type 1 (CPVT1) that causes life-threatening arrythmias and sudden cardiac death in children and young adults has been shown to be linked to mutations in RyR2.[1)] A newly discovered mutation in RyR2, R169Q, is also associated with arrythmias, and some studies indicated that CPVT patients with RyR-R169Q$^{+/-}$ may present Left-Ventricular Non-Compaction (LVNC). To further elucidate the mechanism that underlies the emergence of cardiac arrhythmia and cardiomyopathy in patients with the RyR2-R169 Q$^{+/-}$, we investigated how this mutation leads to aberrant SR Ca^{2+}-release.

Methods

Using single-channel recordings in planar lipid bilayers, we compared the gating and conductance properties of RyR2 channels taken from mouse hearts bearing the RyR2-R169Q$^{+/-}$ mutation with those of wild type RyR2.[2)] Briefly, SR vesicles containing RyR2 were homogenised, isolated and then incorporated into the lipid bilayer where RyR2-mediated SR Ca^{2+}-release was measured as RYR2 Ca^{2+} currents across the bilayer. The luminal Ca^{2+} concentration was fixed at 50 mM.

Results

Firstly, We investigated the RyR2 open probability (Po)–$[Ca^{2+}]_{cyt}$ relationship (Fig 1). Po of RyR2-WT increased at the cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) ranging from 1 μM to 500 μM, then decreased at $[Ca^{2+}]_{cyt}$ from 500 μM to 2mM, resulting in the typical bell-shaped Po–$[Ca^{2+}]_{cyt}$ curve (Fig1, bule bars). The RyR2-R169Q$^{+/-}$ Po was larger at the entire range of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ between 1 μM to 2 mM compared to that of RyR2-WT (Fig1, orange bars). The Po–$[Ca^{2+}]_{cyt}$ relationship of RyR2-WT and RyR2-R169Q$^{+/-}$ was summarised in Fig1. For I-V relationship, on the other hand, there was no significant difference in the channel conductance between the two genotypes (Fig 2).

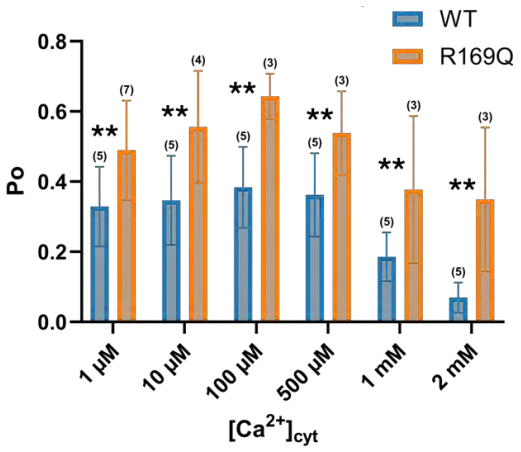


Figure 1. The Po – $[Ca^{2+}]_{cyt}$ relationship
Po-$[Ca^{2+}]_{cyt}$ relationship for RyR2-WT and RyR-R169Q+/- . Plot is shown in mean ± SEM, numbers of experiments (n) were labelled above the bars. Main effect of genotype p = 0.0091, main effect of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ p = 0.2503 and interaction genotype X $[Ca^{2+}]_{cyt}$ p = 0.9971, two-way ANOVA). ** indicates p < 0.01 for genotype.

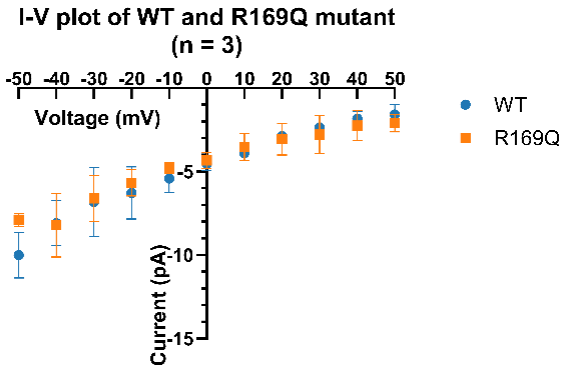


Figure 2. Current – Voltage relationship
Current-voltage relationship of RyR2-WT and RyR-R169Q$^{+/-}$ at voltages ranging from -50 to 50 mV ($[Ca^{2+}]_{cyt}$ = 10 μM). (mean ± SEM, n=3 on both genotypes); p = 0.707 (unpaired t-test)

RyR2-R169Q$^{+/-}$ exhibited sub-conductance state gating at all $[Ca^{2+}]_{cyt}$ tested displaying a weak $[Ca^{"+}]_{cyt}$ dependency (Fig3A) that significantly contributes to the overall Po of the mutant channels. Full-conductance state gating of RyR2-R169Q$^{+/-}$ showed bell-shaped $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dependency as did WT RyR2.

Discussion

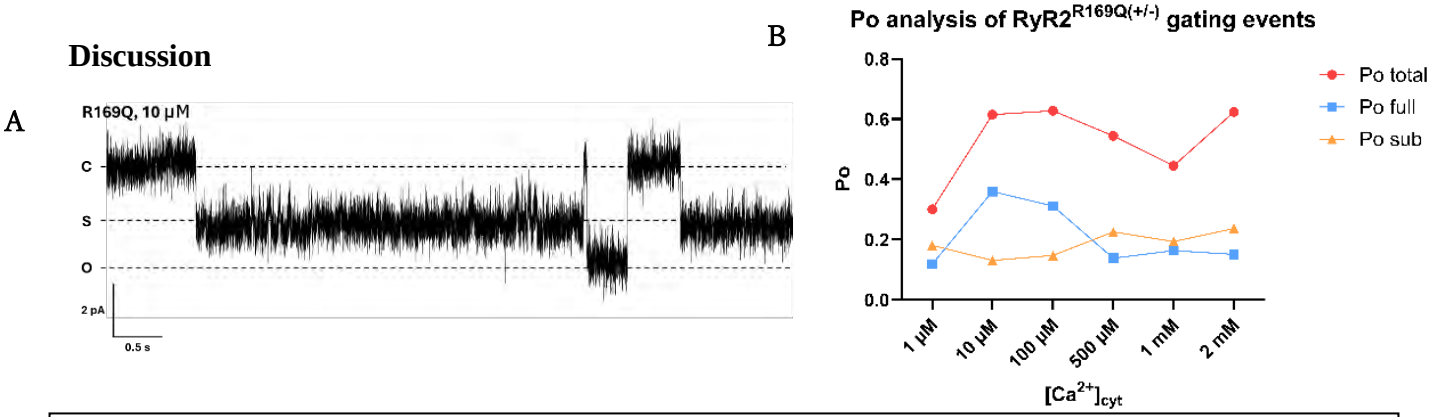


Figure 3. Dependence of sub- and full-conductance gating on cytosolic $[Ca^{2+}]$ for RyR2-R169Q$^{+/-}$. (A) A trace in which RyR2-R169Q$^{+/-}$ exhibits sub-conductance state gating. Closed, open (full conductance state gating) and sub-conductance state gating levels are indicated by C, O and S. **(B)** Po full (light blue) is average Po of full conductance events of three channels. Po sub (yellow) is average Po of sub-conductance state gating of three channels. Po total (red) is the sum of open full conductance Po and sub-conductance Po.

Our results demonstrated that RyR2-R169Q$^{+/-}$ significantly enhances channel gating across a wide range of $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Additionally, we revealed that the mutation induces sub-conductance state gating in a $[Ca^{2+}]_{cyt}$ -dependent manner that further increases channel activity above normal. These results are in line with another RyR2 N-terminal mutation (R420Q) exhibiting sub-conductance states that also depend on $[Ca^{2+}]_{cyt}$.[3] Taken together our results indicated that the increased activity of channels from RyR2-R169Q$^{+/-}$ hearts could underlie aberrant SR-Ca^{2+} release in cardiomyocytes, disrupting rhythmic contractions and predisposing individuals to arrhythmic events. Further investigation of gating behavior of RyR2-R169$^{+/-}$ at $[Ca^{2+}]_{cyt}$ of 100 nM or lower is required to evaluate the contribution of RyR2-R169$^{+/-}$ to diastolic Ca^{2+} leak in CPVT patients. Our discovery that RyR2-R169Q$^{+/-}$ has sub-conductance state gating might provide new therapeutic target for CPVT patients.

References

1. Wilson et al. (2021). J Physiol **599**, 5179–5201.
2. Sitsapesan et al. (1991). J Physiol **434**, 469–488.
3. Liheng et al. (2021). Circ Res **129**, e35-e52.

膀胱痛み刺激によるラットの大腸運動の変化における性差

岐阜大学　獣医生理学・名古屋市立大学　細胞生理学　榊かりん No.41

1.　目的・背景

慢性機能性消化器障害である過敏性腸症候群の患者は、膀胱の不快感、頻尿、下腹部痛など下部尿路症状を呈する膀胱痛症候群を併発することが多い(文献 1)。大腸と膀胱は独立した器官であるものの、どちらも副交感骨盤神経による機能調節を受けており、脊髄の副交感神経核が大腸と膀胱の機能異常の連動に関与するのではないかと考えられている。本研究では、これまでの中枢神経系による大腸運動の制御機構の研究結果をもとに(文献 2)、膀胱への痛み刺激が大腸運動に与える影響を解明するとともに、その機序を性差も考慮して明らかにすることを目的とした。

2.　方法

8週齢、雌雄の SD ラットをウレタン(1.0 g/kg,I.P.)で麻酔し、大腸および肛門にカニューレを繋いだ。マリオットボトルからの生理食塩水で大腸内腔を満たし、大腸内腔圧および肛門からの排液量を測定した。尿道を結紮した状態で膀胱の頂端にカニューレを挿入し、膀胱内腔圧を測定した。膀胱痛み刺激は、膀胱への生理食塩水注入による過伸展刺激およびカプサイシン投与刺激により惹起し、大腸運動にどのような変化をもたらすのか調べた(図 1)。

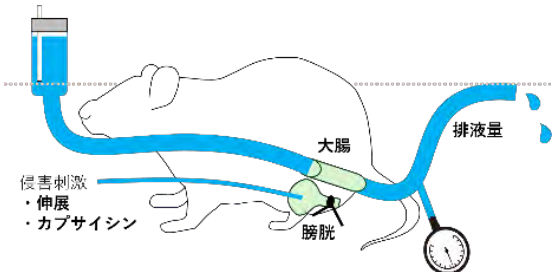


図1　in vivo 実験系

3.　結果

伸展刺激による大腸運動の変化

膀胱内に生理食塩水を注入し膀胱内腔圧を60 mmHg まで上昇させて5分間維持したところ、雌雄ともに大腸内腔圧の激しい変動と、それに伴う排液量の増加がみられた(図2)。

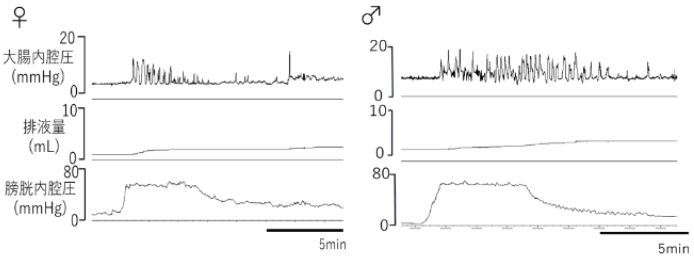


図2　膀胱伸展刺激における大腸運動の変化

膀胱内カプサイシン投与による大腸運動の変化

膀胱内に TRPV1 受容体を活性化して感覚神経を過剰興奮させるカプサイシン(100 nmol)を注入したところ、雌雄ともに大腸運動が亢進した。

脊髄のモノアミン受容体阻害が膀胱伸展に対する大腸運動応答に及ぼす変化

陰性対照として、生理食塩水を脊髄腔内投与後に膀胱内腔圧を60 mmHgにし、大腸運動が亢進することを確認した。D_2様ドパミン受容体拮抗薬であるハロペリドール(100 nmol)を脊髄内腔投与し、膀胱伸展刺激を加えたところ、雌では大腸運動の亢進は阻害され、雄では大腸内腔圧の変動はみられたが、排液量の増加には至らなかった(図3)。5-HT_2受容体および5-HT_3受容体の拮抗薬であるケタンセリン、ドラセトロン(それぞれ100 n

mol)を脊髄腔内に両方投与し、膀胱を伸展させたところ、雌では大腸運動亢進作用は阻害されず、雄では部分的に抑制された(図4)。また、雄ラットにおいて、ハロペリドールとケタンセリン、ドラセトロン(それぞれ 100 nmol)を同時に脊髄腔内投与すると、膀胱伸展刺激による大腸運動亢進作用は完全に阻害された。

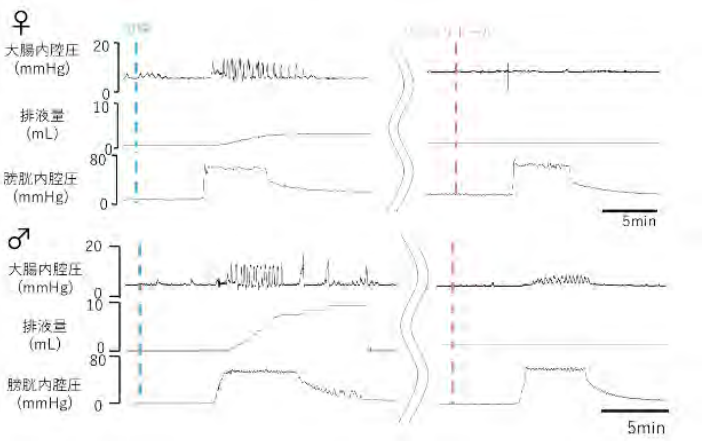


図3　D_2様受容体拮抗薬投与時の膀胱刺激に対する大腸運動の変化

4. 考察

雌雄ともに、膀胱過伸展またはカプサイシン注入による侵害刺激を与えると、大腸運動が亢進した。膀胱刺激による大腸運動亢進作用は、雌ではドパミン作動性神経、雄ではドパミンおよびセロトニン作動性神経の活性化によるものであることが明らかとなった。これらのモノアミン神経は脳から腰仙髄に投射している下行性神経であることが知られていることから、膀胱と大腸における機能の連動に中枢神経が関与していること、その神経回路には性差があることが示唆された。大腸刺激による大腸運動の亢進は、雌では GABA 作動性神経、雄ではドパミンおよびセロトニン神経の活性化による(文献2)。すなわち雄ラットでは、膀胱刺激時の大腸運動亢進作用に関わる神経伝達物質が大腸刺激における運動亢進機序と同じ神経伝達物質であるのに対し、雌では異なる神経伝達物質が関与していた。膀胱と大腸は同じ骨盤臓器で隣接しているものの、雌では間に子宮が存在し、妊娠時に膀胱と大腸の位置が離れるため、別の神経回路になっているのではないかと考えた。また、雌雄における神経伝達物質の違いの原因として、性ホルモンの影響が考えられるため、子宮摘出をしたラットにおいてどのような結果が得られるのか、今後さらなる検討が必要である。

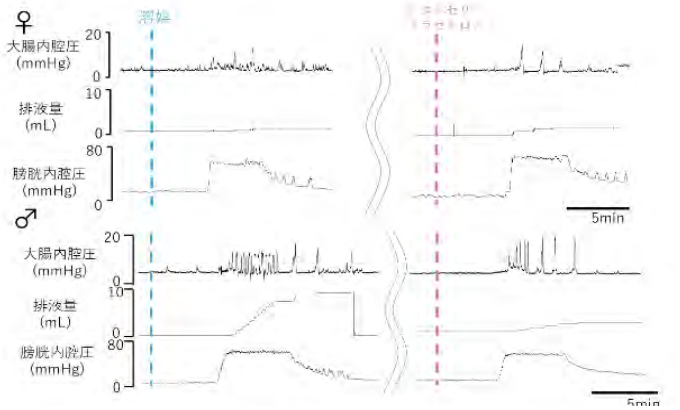


図 4　5 -HT_2受容体および 5 -HT_3受容体拮抗薬投与時の膀胱刺激に対する大腸運動の変化

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、岐阜大学獣医生理学研究室の志水泰武教授、椎名貴彦教授、堀井有希助教、学生の皆様に多大なるご協力を賜りましたこと、心より感謝申し上げます。また、本研究のために尊い命をささげてくれた、たくさんのラットたちに深く感謝し、心からご冥福をお祈りいたします。

6. 参考文献

1. Gisela C et al. (2012), Co-morbidities of interstitial cystitis. *Font Neurosci* **6**: 114.
2. Horii K et al. (2021), Sexually dimorphic response of colorectal motility to noxious stimuli in the colorectum in rats. *J Physiol* **559**: 1421-1437.

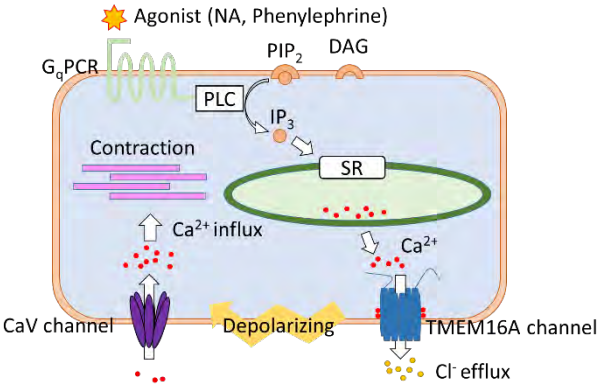
Enhanced current density and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) sensitivity of TMEM16A channels with a mutation associated with Moyamoya disease.

名古屋市立大学細胞生理学
Tammaro Lab, Department of Pharmacology, University of Oxford.
橘遼太郎（No. 56）

Introduction

Moyamoya disease (MMD) is one of the cerebrovascular disorders caused by the narrowing of carotid arteries. Patients with MMD present symptoms including seizure, ischemic stroke, or even bleeding in the brain, are mostly found in Asian countries. Currently, no specific cure is available for MMD that is genetically driven, although several causal genes have been found. TMEM16A gene, encoding Ca^{2+} activated Cl^- channel that plays fundamental role in vasoconstrictions (**Fig1**), is a newly identified responsible gene.

Fig 1 Diagram of TMEM16A channel



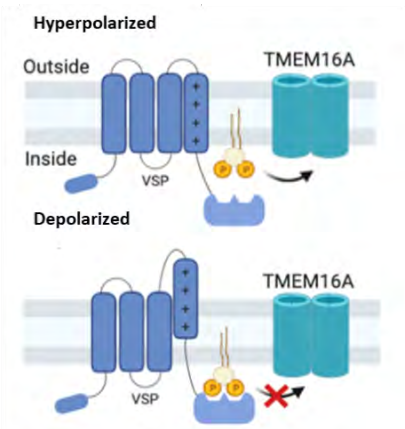
In this study, I focused on single point TMEM16A mutation, namely substitution of glutamic acid 459 into a Lysin. (TMEM16A-E459K)[1]. Since This residue resides close to the binding site of phosphatidylinositol, 4,5-bisphosphate (PIP_2), an endogenous channel activator, I hypothesized that this mutation alters the channel affinity to PIP_2 and thereby modulates channel gating properties.

Methods

Whole-cell patch clamp recordings were made from transfected human embryo kidney cell expressing TMEM16A and voltage sensing phosphatase (VSP) where necessary. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was set to 56 nM with EGTA.

VSP dephosphorylates PIP_2 upon depolarisation to deplete membrane PIP_2 [2], allowing a comparison of PIP_2 binding affinity between TMEM16A-E459K and WT (**Fig2**). Contractility of isolated rodent arteries was examined using wire myography.

Fig 2. Diagram of VSP

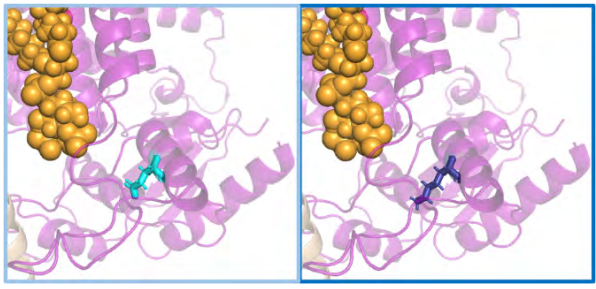


Results

- Structure analysis of E459K mutation

E459K residue locates very close to PIP_2 binding site of TMEM16A.

Fig 3. E459 (left in cyan) and E459K (right in dark blue) relationships with PIP2 (orange)



- Effects of the TMEM16A inhibitor on α-adrenergic constrictions

In both mouse aorta and rat carotid artery, phenylephrine (PE)-evoked vasocontractions were attenuated by Ani9, the TMEM16A selective inhibitor, by about 80% and 50%, respectively. Nifedipine, the L-type voltage-dependent Ca^{2+} channel blocker, further

diminished the vasoconstrictions.

- Comparison of channel properties between TMEM16A-E459K and WT

TMEM16A-E459K showed 5-folds increased current comparing with WT. Noise Analysis, the technique that enables us to investigate single channel properties, such as single channel conductance, and channel open probability, or the number of channels expressing on plasma membrane, revealed that TMEM16A-E459K showed about 5 times larger open probability than WT(**Fig 4).**

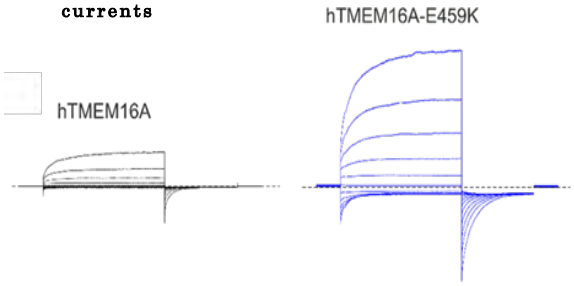


Fig 4. Mutation associated increased currents

- Effects of VSP-induced PIP_2 depletion on TMEM16A-E459K and WT currents

VSP-induced PIP_2 depletion largely reduced depolarisation-evoked sustained WT TMEM16A currents (red) compared with control (without VSP, black). The corresponding current reduction was smaller in TMEM16A-E459K (blue) (**Fig4).**

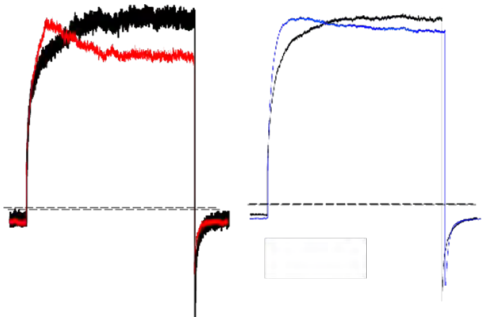


Fig4. VSP effects on TMEM16A (red) and TMEMA-E16459K (blue) with control without VSP (black)

- Channel sensitivity to Ani9

In both WT and TMEM16A-E459K, 50 nM Ani9 almost completely suppressed whole-cell TMEM16A currents.

Discussions

There are several possibilities regarding the less sensitivity of mutant TMEM16A currents to VSP-induced PIP_2 depletion than WT. PIP_2 depletion may diminish inositol trisphosphate (IP_3) production (see Fig1), reducing intracellular Ca^{2+} release that triggers TMEM16A activation. However, experiments were carried out at a fixed $[Ca^{2+}]_i$ of 56 nM. Continuous supply of PIP_2 may be required to retain TMEM16A currents. However, this possibility is unlikely as a previous study revealed that VSP almost completely delete membrane PIP_2 [3]. Thus, it is likely that TMEM16A is capable of holding PIP_2 on its binding site to retain channel activation. TMEM16A-E459K appears to have a higher PIP_2 affinity than WT, and therefore displays smaller current reduction upon PIP_2 depletion than WT.

Conclusions

Moyamoya disease associated mutation E459K alters TMEM16A channel properties to enlarge current density compared with WT. This change appears to be attributable to the increased channel open probability presumably arising from a higher PIP_2 binding affinity of TMEM16A-E459 than WT. Since the abnormal mutant currents can be suppressed by Ani9, Ani9 may have a therapeutic potential for the treatment of MMD.

References

[**1**] Amélie Pinard et al. (2023), Brain, 146(9):3616-3623. [**2**] Yasushi Okamura et al. (2009),J Physiol, 587(3):513-520. [**3**]Björn H Falkenburger et al. (2010), J Gen Physiol, Feb;135(2):99-114.

Roles of stress hormones and mechanosensitive ion channels in bladder urothelial ATP release

Centre for Urology Research, Bond University・細胞生理学　古田優菜 (No.74)

《Introduction》

Stress can significantly impact on the bladder function, leading to various symptoms such as urinary urgency or increased voiding frequency, and therefore play an important role in the pathophysiology of overactive bladder (OAB) and interstitial cystitis (IC)/bladder pain syndrome. Stretch stimulation induces Ca^{2+} influx into urothelial cells through mechanosensitive channels, leading to ATP release. ATP activates P2X receptors on afferent nerves, causing physiological the sense of urination. However, an excessive ATP release can overstimulate this sensory pathway, leading to urinary urgency.

This experiment aimed to reveal the roles of stress hormones and mechanosensitive ion channels in modulating ATP release from bladder urothelial cells, contributing to the development of treatments for stress-induced bladder diseases.

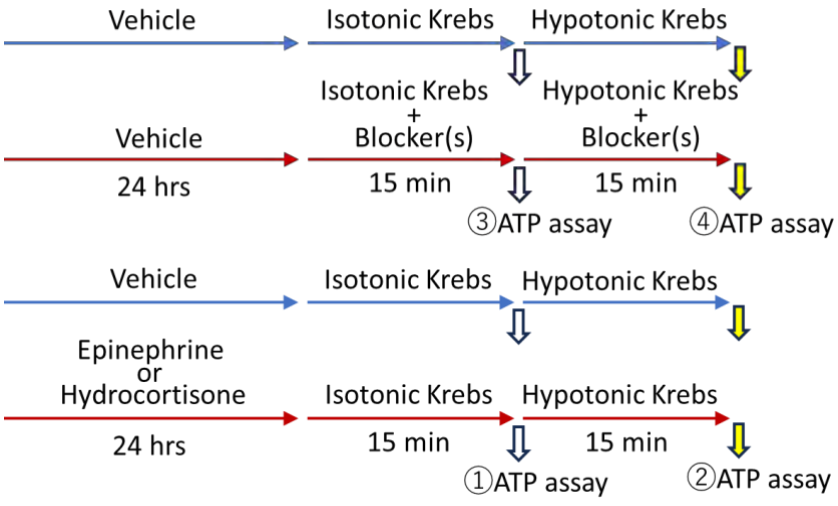
《Methods》

RT4 cells, a human bladder papilloma cell line commonly used to study urothelial biology and drug effects, were utilized.

Cell viability assay: Effects of stress hormones on the cell viability were assessed using a resazurin cell viability kit (Viable cells reduce resazurin to resorufin by generating mitochondrial metabolites).

ATP luminescence assay: ATP luminescence assays were conducted. Luciferin and luciferase were added to the cell supernatant, and luminescence released upon the ATP-induced conversion of luciferin to oxyluciferin to quantify ATP release. Experimental protocols were shown in Figure 1. Stress hormones and mechanosensitive channel blockers were listed in Table 1.

【Figure 1】



【Table 1】

Stress hormones
Vehicle (culture media)
Epinephrine(10μM)
Vehicle (Ethanol)
Hydrocortisone(100nM)

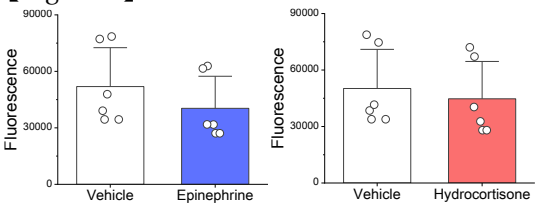
Mechanosensitive ion channel blockers
Vehicle (DMSO)
Dooku1 (PIEZO antagonist, 10μM)
Tranilast (TRPV2 antagonist, 10μM)
Combined (10μM Dooku1 + 10μM Tranilast)

※ Epinephrine reflects short-term stress, while hydrocortisone reflects long-term stress.

《Results》

Effects of stress hormones on the cell viability: Epinephrine and hydrocortisone showed no significant effects on cell viability (Figure 2).

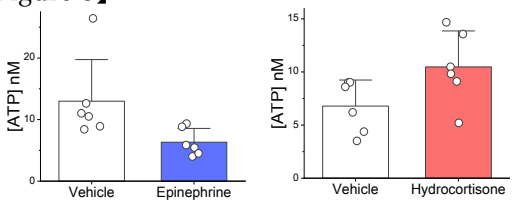
【Figure 2】



Effects of stress hormones on the urothelial ATP release:

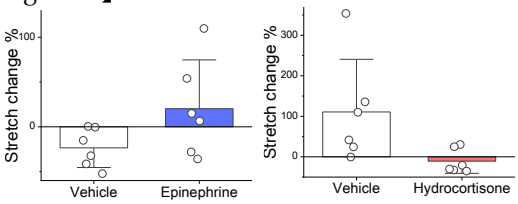
① Basal ATP release: Epinephrine significantly decreased basal ATP release. Hydrocortisone tended to increase basal ATP but its action was not statistically significant (Figure 3).

【Figure 3】



② Stretch-induced ATP release: Hydrocortisone but not epinephrine significantly decreased stretch-induced ATP release (Figure 4).

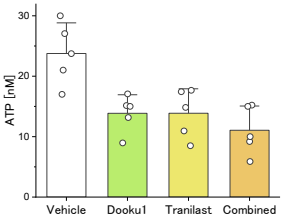
【Figure 4】



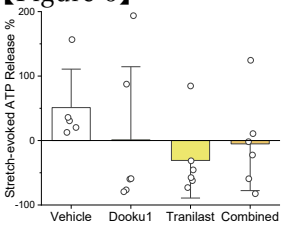
Effects of mechanosensitive ion channel blockers on the urothelial ATP release

① Basal ATP release: Dooku1, tranilast, and their combination significantly decreased basal ATP release (Figure 5).

【Figure 5】



【Figure 6】



② Stretch-induced ATP release: Dooku1, tranilast, and their combination tended to decrease stretch-induced ATP release but their actions were not statistically significant(Figure 6).

《Discussion》

Epinephrine (short-term stress) and hydrocortisone (long-term stress) differently affect urothelial ATP release. However, these results are not consistent with my initial hypothesis that both epinephrine and hydrocortisone increase ATP release. Unexpectedly, mechanosensitive ion channel blockers failed to reduce stretch-induced ATP release, although these blockers attenuated basal ATP release.

Several possible reasons for these unexpected results were considered:

1. The cells may not express mechanosensitive receptors as anticipated, although previous findings suggest otherwise.
2. Local and direct effects of stress hormones may be more complex than expected. For example, ATP breakdown/turnover might occur.

《References》

1. Mechanotransduction in the urothelium: ATP signalling and mechanoreceptors. Li X, Hu J, Yin P, Liu L, Chen Y. Heliyon. 2023 Aug 23;9(9):e19427
2. Activation of Piezo1 or TRPV2 channels inhibits human ureteral contractions via NO release from the mucosa. Liu J, et al. Front Pharmacol. 2024. PMID: 38989142

Possible crosstalk between ER stress and peptidyl arginine deiminase (PAD2)

Institute of Life science, Hallym University 脳神経生理学 Natsuki Seki (No.52)

Background: Peptidyl arginine deiminase (PAD) is activated by Ca^{2+} and citrullinates various proteins. It has been reported that the expression and activity of PAD2, a member of the PAD family, are increased in prion disease. Additionally, ER stress has been reported to increase, and the PERK pathway is activated in prion disease, leading to an increase in cytoplasmic Ca^{2+} concentration. We hypothesized that the increase in Ca^{2+} concentration caused by ER stress might enhance PAD2 expression and activity.

Methods: Astrocytes and neurons stable expressing the human PAD2 vector (hPAD) and the Mock vector (Mock) were used. Protein levels were determined using Western blotting. To identify the proteins that may be affected by PAD2, we performed two-dimensional electrophoresis.

Results

First, we determined whether ER stress can affect PAD2 expression in astrocytes. Treatment with thapsigargin (TG), which induces ER stress, increased PAD2 expression in astrocytes expressing PAD2 (hPAD2) compared to controls (mock) (Figure 1). Next, we investigated whether PAD2 could affect ER stress markers, such as ATF4, CHOP, and GADD34, following TG treatment. We found that TG treatment increased ATF4, CHOP, and GADD34 levels compared to controls in both Mock and hPAD2 astrocytes. However, the increase in these proteins in hPAD2 astrocytes was higher than in Mock astrocytes (Figure 2), indicating that PAD2 may mediate ER stress.

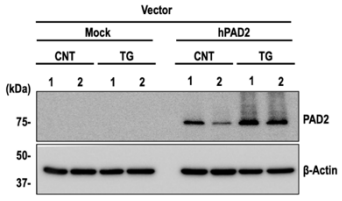


Figure 1. Comparison of PAD2 expression in astrocytes with and without thapsigargin (TG, 300 nM) treatment. We used thapsigargin (TG) to induce ER stress. β-Actin is used as a loading control.

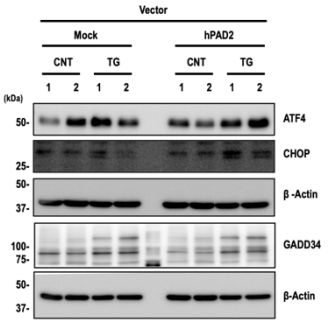


Figure 2. Expression levels of ATF4, CHIP, and GADD34 in astrocytes expressing either mock or hPAD2 with and without thapsigargin (TG, 300 nM) treatment. ATF4 and CHOP are ER stress markers, while GADD34 is an inhibitor of the PERK pathway, which is part of the cellular response to protein misfolding.

Next, we examined the time course of expression of these proteins following TG treatment. We found that TG treatment increased ATF4 and CHOP levels until 6 h, after which these levels decreased at 24 h in both Mock and hPAD2 cells. However, the extent of the decrease at 24 h was smaller in hPAD2 astrocytes than that in mock astrocytes (Figure 3A). In addition, increased PAD2 levels are accompanied by citrullinated proteins. Citrullinated proteins also increased depending on the expression level of PAD2 (Figure 3B). Next, we investigated the effect of PAD2 on apoptosis as detected by cleaved caspase 3. Cleaved caspase 3 levels in hPAD2 cells were

lower than those in mock cells at 24 h after TG treatment (Figure 3C).

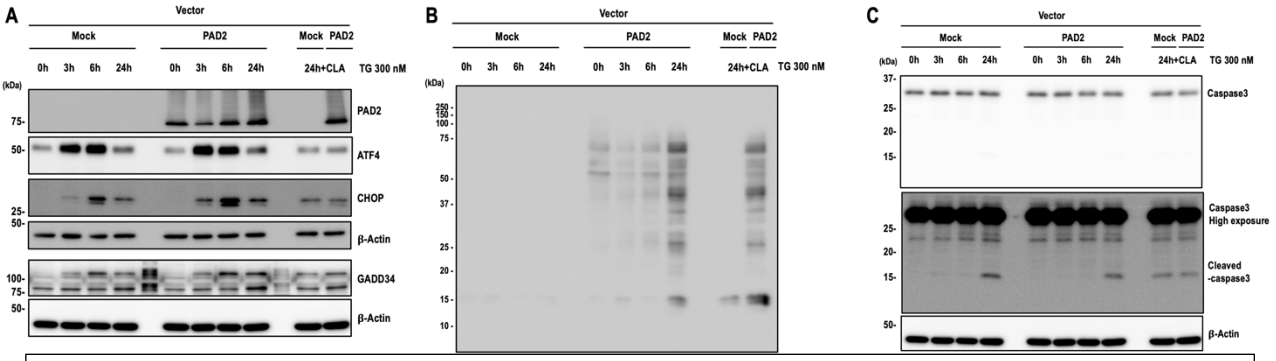


Figure 3. Increased ER stress activation markers in PAD2-expressing astrocytes. **A.** Expression levels of PAD2 and ER stress markers (ATF4, CHOP, and GADD34). **B.** Detection of citrullinated proteins by α-anti-modified citrullinated. **C.** Detection of apoptotic marker caspase 3 and its cleaved form in astrocytes at 0, 3, 6 and 24 hrs following treatment with thapsigargin (TG, 300 nM). Cells expressing PAD2 showed increased expression of ER stress markers and citrullinated proteins; however, lower levels of cleaved caspase-3 were observed.

Furthermore, when we performed the same experiment using neuronal cells, TG treatment increased PAD2 levels in hPAD2 cells compared to the control (Figure 4A). Additionally, the levels of ATF4, CHOP, and citrullinated proteins were elevated in these cells after TG treatment (Figure 4B). Finally, we conducted two-dimensional electrophoresis to identify the proteins citrullinated by PAD2 due to ER stress. Compared with the control group, the TG-treated group displayed four distinct spots. These spots were extracted from the gel, and their amino acid sequences are currently being analyzed (Figure 4C).

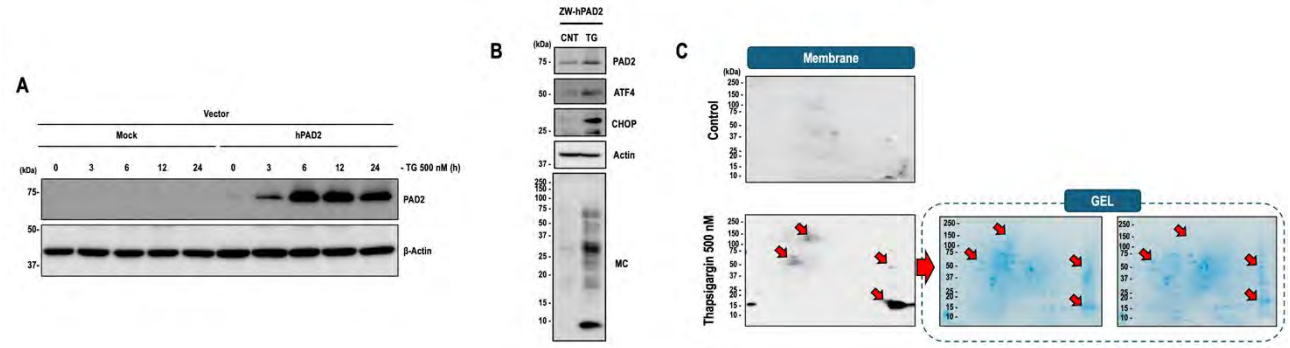


Figure 4. Identification of novel citrullinated protein candidates under ER stress conditions. **A.** Changes in PAD2 expression in PAD2-expressing neuronal cells (ZW cells) in 500 nM TG treatment (0h, 3h, 6h, and 24h). **B.** Expression of PAD2, ATF4, CHOP, and modified citrullinated (MC) proteins in PAD2-expressing cells with or without TG treatment (500 nM; 24h). **C.** 2-D electrophoresis analysis showing modified citrullinated proteins in control and TG-treated neuronal cells, with the corresponding gel stained with Coomassie Blue (R-250). Four protein spots were collected for further analysis.

Conclusions: ER stress increased both the expression and activity of PAD2, which in turn elevated the expression levels of ER stress-related proteins. However, apoptosis was suppressed. These results suggest that PAD2 expression may confer resistance to ER stress-induced apoptosis.

TRPV3 と ANO1 の物理的相互作用に関与するアミノ酸の同定

温度生物学　若山栞大　91

目的

TRPV3 と ANO1 の物理的相互作用に関与するアミノ酸の同定。

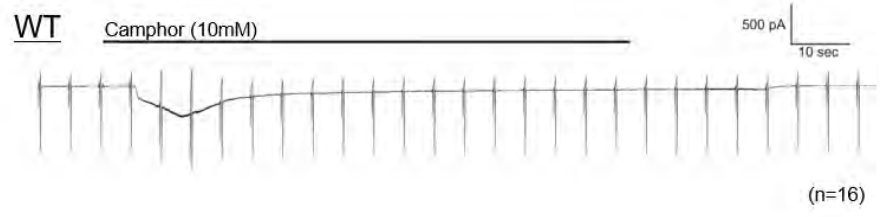
背景

TRP チャネルは細胞の様々な感覚刺激に反応する非選択性陽イオンチャネルである。ヒトの 11 種類の温度感受性 TRP チャネルのうちカルシウム透過性の高い TRPV1、TRPV3、TRPV4 は活性化によって膜電位変化や様々な細胞応答をひき起こす。この細胞応答は特定の結合タンパクが活性化することによるもので、その中にカルシウム活性化クロライドチャネルであるアノクタミン 1(TMEM16A)の活性化が挙げられる。TRP チャネルの開口によりカルシウムイオンが細胞内に流入、物理的に近接した ANO1 が活性化してクロライドイオンが電気化学的勾配に従って細胞内に流入または細胞外に流出する。過去、富永教授は脳脈絡叢上皮細胞における脳脊髄液分泌(TRPV4)、後根神経節ニューロンにおける痛み増強(TRPV1)、皮膚表皮細胞の増殖・移動(TRPV3)にこの機能連関が関与していることを報告してきた。なお機能連関が物理的相互作用に依存することは物理的解析によって示されている。そこで、ANO1 と機能連関を示す TRP チャネルに共通するアミノ酸残基が ANO1 との物理的結合に関わると仮定して、アミノ末端にある TRPV1 の N331、TRPV3 の N338、TRPV4 の N367 のアスパラギンをそのアミノ酸候補として挙げた。物理的相互作用に関与するアミノ酸の同定は TRP チャネルと ANO1 との物理的相互作用を阻害することで生理的応答に影響し得る薬剤開発に繋がる。

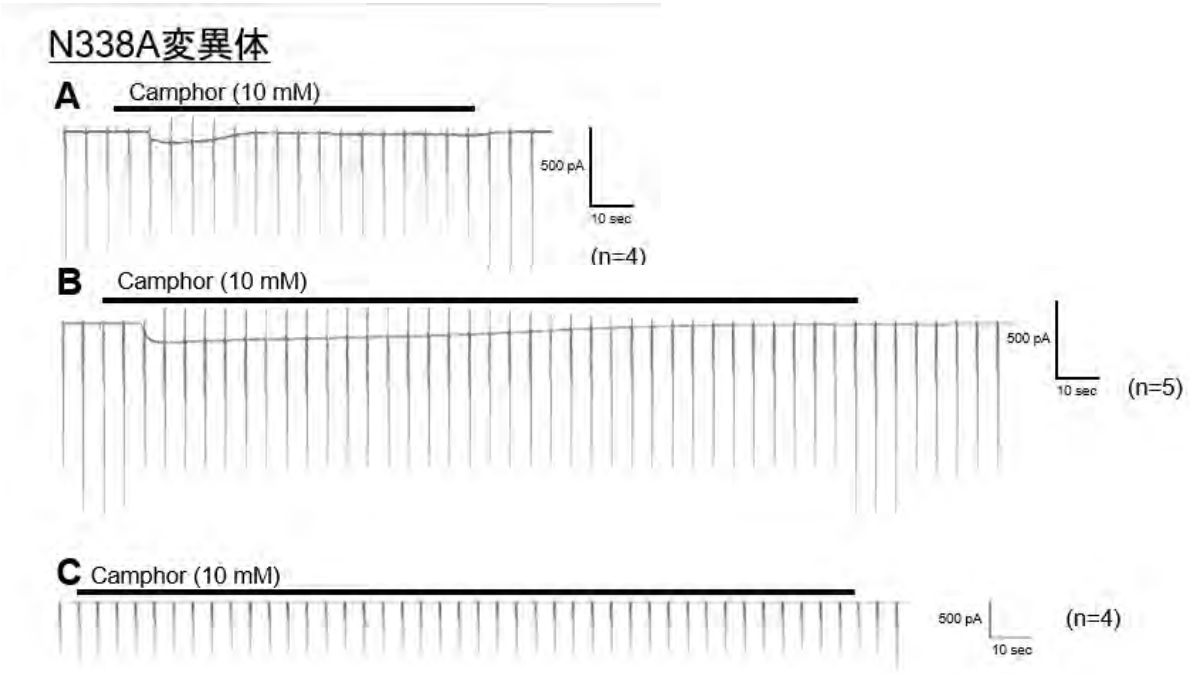
方法

本研究では HEK293T 細胞にマウス TRPV3 と ANO1 遺伝子を共発現させ、ホールセルパッチクランプ法を用いて電流記録を行った。マウス TRPV3 には野生型(WT)と N338A ミュータントを使用した。細胞内液および細胞外液に NMDG クロライドを用いることによって、TRP チャネルを介したカルシウム流入で活性化した ANO1 のクロライド電流のみを観察した。保持電位はマイナス 60mV で、5 秒に一回 300m 秒の−100mV から+100mV に膜電位を変化させたランプパルスを加えた。

結果



10mM の Camphor 投与で観察された ANO1 媒介クロライド電流



10mM の Camphor 投与で観察された ANO1 媒介クロライド電流

結果として 、WT では TRPV3 のアゴニストである Camphor10mM の投与により、早い活性化と不活性化を示す ANO1 媒介クロライド電流が観察された。一方で、N338A ミュータントでは先ほどの野生型と同じようにカンファー投与から早い活性化、不活性化を示す群と、ワイルドタイプと比べて電流の不活性化が遅延した群、電流が観察されなかった群の 3 種類の電流が観察された。

結論・考察

TRPV3 アゴニストである Camphor 投与によって観察される ANO1 媒介性 Cl 電流は TRPV3 の N338A 変異によって WT とは異なる電流が観察された。アスパラギン残基はマウス TRPV1 (N331)でも保存されており、同様の実験をマウス TRPV1 の WT、N331A 変異体で行うことで、このアスパラギン残基が TRPV1 と ANO1 の物理的相互作用に関与することを確認することができる。そして、この物理的相互作用に関与するアスパラギンは薬剤標的になり得る。

参考文献

Y.Takayama et.al Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin1, The FASEB Journal (2014)
Y.Takayama et.al Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin1 in sensory neurons, PAINS (2015)
Y.Takayama et.al Interaction between TRP channels and anoctamins, Cell Calcium (2024)

うま味・甘味物質の投与による延髄孤束核中間部での c-Fos 発現の比較

脳神経生理学　山脇愛理　No.86

＜背景＞

うま味物質のグルタミン酸ナトリウム（MSG）の経口投与により、SHR/Izm ラットの攻撃性が低下すること、腹部迷走神経から延髄孤束核中間部（iNTS）への神経活動入力（神経性腸脳相関）が重要であることが明らかになっている。またうま味受容体は T1R1 と T1R3 の複合体からなる G タンパク質共役型受容体で、甘味受容体（T1R2 と T1R3）と一部共通している。さらに甘味物質による刺激は、脊髄を介して伝達されることが知られている。[1)]

＜目的＞

うま味と甘味の受容体は構造が類似し T1R3 が共通しているので、両基本味は相加・相乗作用を示すのか否かについて、ガダムプロットを作成することから調べる。さらに両基本味の相加・相乗作用が神経性腸脳連関以外の脊髄路を介するか否かを調べるため、消化管から脊髄への投射部位について調べる。

＜方法＞

1, 3 週齢の雄Wistar/STラットを 1 日前より絶食さらに 2 時間前より絶飲させた。

2, 蒸留水(DW)、うま味物質の MSG 水溶液（180 mM）、甘味物質のグルコース（Glu）水溶液（180 mM）、MSG 水溶液（90 mM）と Glu 水溶液（90 mM）の混合液を用意し、各溶液 0.75 mlをゾンデにより胃内投与した。

3, Glu の適正投与濃度を検討する実験では、様々な濃度の Glu（180, 360, 720, 1440 mM）を胃内投与した。

4, 胃内投与 90 分後、深麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドで灌流し、脳を取り出し、後固定したのちスクロース溶液に置換、クライオスタットで厚さ 40 μm の脳切片を作成した。

5, 脳切片を抗 c-Fos 抗体（1:1000, Encor 社）を用い、浮遊法による酵素抗体法で免疫染色し、DAB により発色させた。

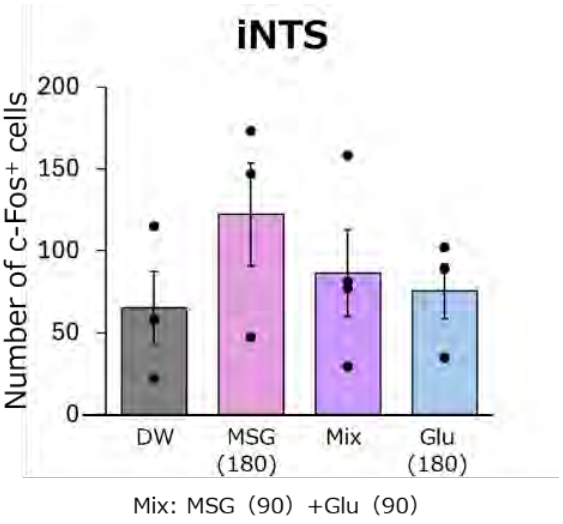


図１　MSG 及び Glu の胃内投与による c-Fos 陽性細胞数

6, 消化管から脊髄への投射を検討する実験では、胃、十二指腸、小腸へ逆行性トレーサーの Fluoro-Gold（FG、２%）を 0.5 ml/min で 10 分間投与した。2週間後に固定し、厚さ 40 μm 脊髄切片を 0.5 mm 毎に作成し、観察した。

＜結果＞

1, MSG（180 mM）によって iNTS における c-Fos 陽性細胞の増加が確認された。一方、Glu（180 mM）投与では c-Fos 発現の増加は認められなかった。（図1）

2, 様々な濃度のGlu水溶液を投与したところ、1440 mM の Glu 水溶液投与によってc-Fos 現量が有意に増加した。（図2左）

3, ガダムプロット作成するため Glu（720mM）と MSG（90mM）の混合液の投与したところ、予想外に c-Fos 陽性細胞数の増加は確認できなかった。（図2右）

4，FG の胃・十二指腸・小腸への投与により、脊髄後角で FG 陽性の神経細胞体が見られた。（図3）
5，胃への投与では、腰膨大部から 4 mm 頭側の脊髄で FG 陽性細胞が認められ、十二指腸への投与では、頸膨大部から 6 mm 尾側部から腰膨大部までの部位に認められた。
7，小腸への投与では、頸膨大部から腰膨大部の付け根までの広い範囲で FG 陽性神経細胞が見られた。（図3）

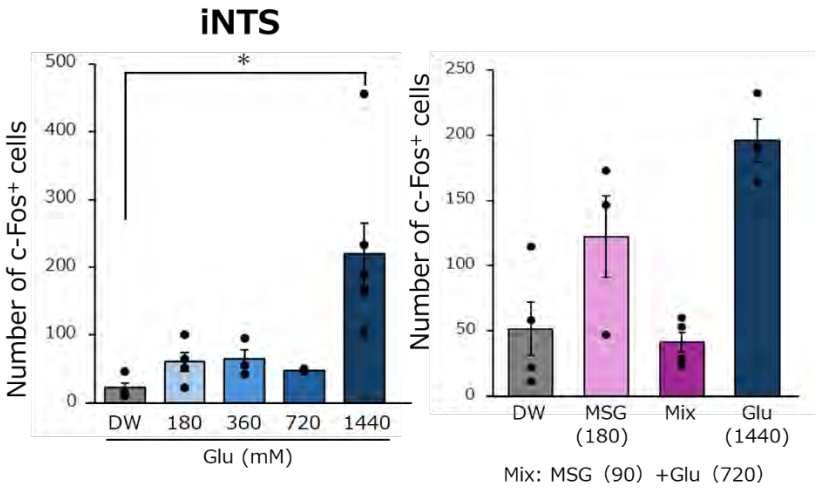


図2
Glu の適正投与濃度の検討
MSG 及び Glu の胃内投与による
c-Fos 陽性細胞数

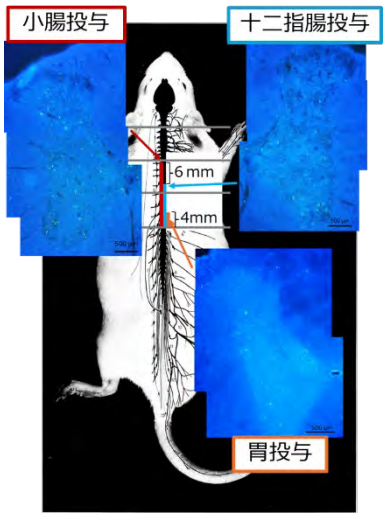


図3　消化管への FG 投与による脊髄投射位置

＜考察＞

1440mM の Glu 投与により、c-Fos 発現が ON/OFF 的に増加することが分かった。また今回の実験から、MSG と Glu の2基本味に関して相加・相乗作用のガダムプロット解析は不可能であることが分かった。その理由として、1）腸上皮に存在する SGLT・GLUT やインスリンなどの影響により、Glu の伝達機構が複雑であること、2）甘味の腸脳連関の神経路には迷走神経路意外にも脊髄経路の存在があり伝達経路が複雑であることが考えられる。

また、今回の実験では FG 投与により消化管からの脊髄投射部位を確認でき、その投射部位が予想に反し脊髄でのトレース位置が消化管の配置順番とは逆になっていた。しかし、細胞体のみを観察していたので遠心路のみ観察したことが考えられる。今後は、双極性細胞であることを念頭に入れて、求心路を示す神経終末を観察することが必要であると考えられる。

参考文献

1)Hypothalamic detection of macronutrients via multiple gut-brain pathways
Goldstein N, *et al.*, Cell Metab.;33:676-687, 2021.

パーキンソン病モデルマウスにおける抗うつ薬ノルトリプチリンの効果

脳神経生理学　岩田仁成　14 番

目的、背景：パーキンソン病（PD）は、運動症状である無動･寡動、安静時振戦、筋強剛、姿勢反射障害に加え、抑うつや不眠などの非運動症状を特徴とする進行性の神経変性疾患である。PD の治療においては、非運動症状のために抗うつ薬が用いられることがある。PD に対する三環系抗うつ薬であるノルトリプチリンの効果を明らかにするため、ノルトリプチリンを PD モデルマウスに投与し、電気生理学的および生化学的手法を用いて実験を行った。

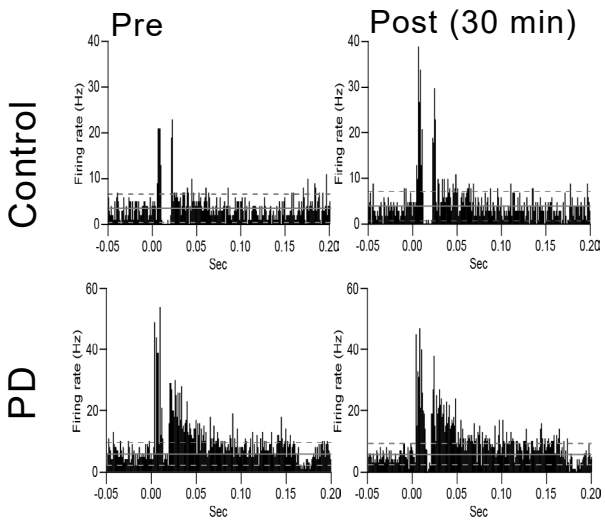
方法：コントロールまたは PD モデルマウスを作成するため、生理食塩水または 6-ヒドロキシドーパミン（6-OHDA）をそれぞれマウスの脳に注入した。行動変化を観察し、PD の運動症状を評価した。電気生理学的解析のため、覚醒状態で淡蒼球外節（GPe）および黒質網様部（SNr）においてノルトリプチリン投与前後の神経活動を記録した。生化学的解析では、生理食塩水またはノルトリプチリンの投与後に線条体を採取し、ウェスタンブロットを実施した。

結果：大脳皮質を電気刺激したときの応答を GPe で記録すると「興奮－抑制－興奮」からなる一過性の三相性の応答が認められる（図 1 A, 左上）。コントロールマウスにおいて、ノルトリプチリン投与後に「遅い興奮」が増加した（図 1 A, 右上）。この「遅い興奮」は皮質-線条体-GPe-視床下部-GPe 経路を介していると考えられており、ノルトリプチリン投与後にこの経路における神経伝達が増強したことが示唆される。SNr では、コントロールマウスにおいて大脳皮質を電気刺激したときの応答を記録すると「早い興奮－抑制－遅い興奮」からなる三相性の応

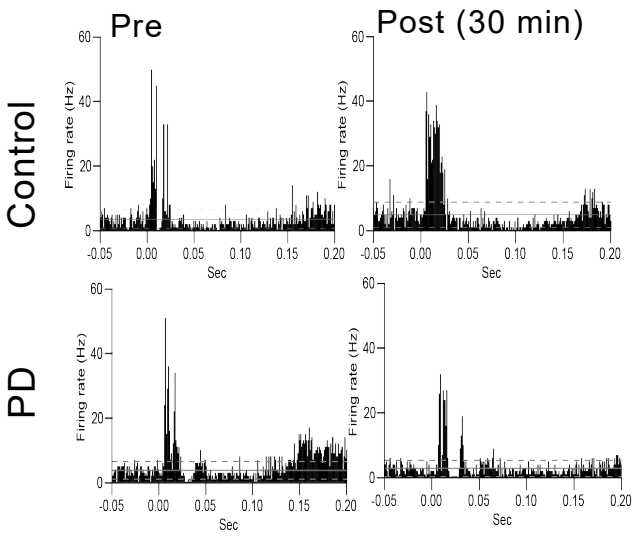
答が観察されるが（図１B, 左上)、PD モデルマウスでは「抑制」が失われ、「早い興奮ー遅い興奮」からなる二相性の応答が認められる（図１B, 左下)。しかし、ノルトリプチリンの投与により「抑制」が回復し、三相性の応答に回復した（図１B, 右下)。さらに、ウェスタンブロットの結果、ノルトリプチリン投与は PD モデルマウスの Rasgrp2 のリン酸化を促進した(図 2)。

考察：D1 受容体は線条体-黒質路（直接路）に発現し、大脳皮質の刺激に対する SNr での「抑制」は直接路を介すると考えられている。また、D1 受容体刺激により Rasgrp2 のリン酸化が促進されることが知られている。今回の我々の結果は、三環系抗うつ薬であるノルトリプチリンの投与が D1 受容体を介したシグナル伝達を活性化し、PD モデルマウスにおいて直経路の機能を回復させることを示唆している。

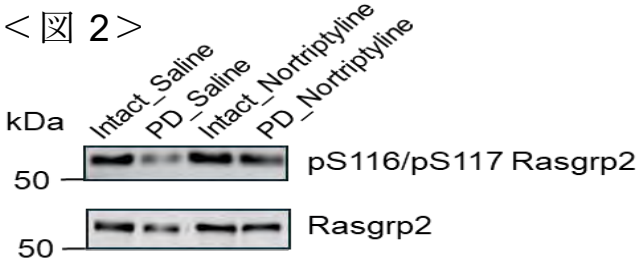
＜図 1＞(A)

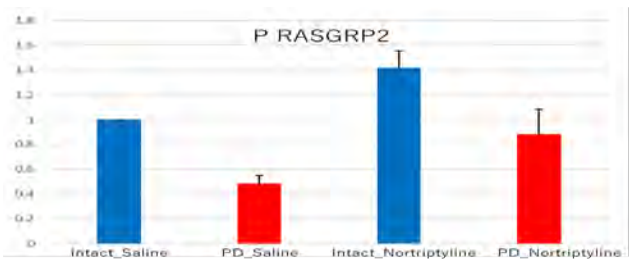


(B) SNr



＜図 2＞





sf3b1 のノックダウンは Xenopus 胚の脳にアポトーシスを引き起こす

細胞生化学　大川ひなの(18)　篠﨑遥奈(45)

【目的・背景】

小頭症とは、同じ年齢や性別の新生児と比べ、頭囲が年齢平均値より標準偏差の 2 倍を超えて小さい状態であることと定義される新生児の奇形である。小頭症の新生児は数千人に一人の割合で生まれ、原因は様々だが、神経幹細胞の分裂異常に伴う先天性中枢神経系の形成不全が原因の一つとして挙げられる。

小頭症の発症メカニズムには、神経幹細胞の分化効率が上昇し、幹細胞が枯渇することや、神経幹細胞の細胞死が亢進することなどの神経幹細胞の異常が考えられる。

本学の新生児・小児医学研究室で小頭症患者のゲノム解析をしたところ、sf3b1 という遺伝子にスニップ(SNP)が見つかった。小頭症を示した症例ではこれまでに報告されたことのない遺伝子であったことから、SF3B1 の機能を調べることにした。

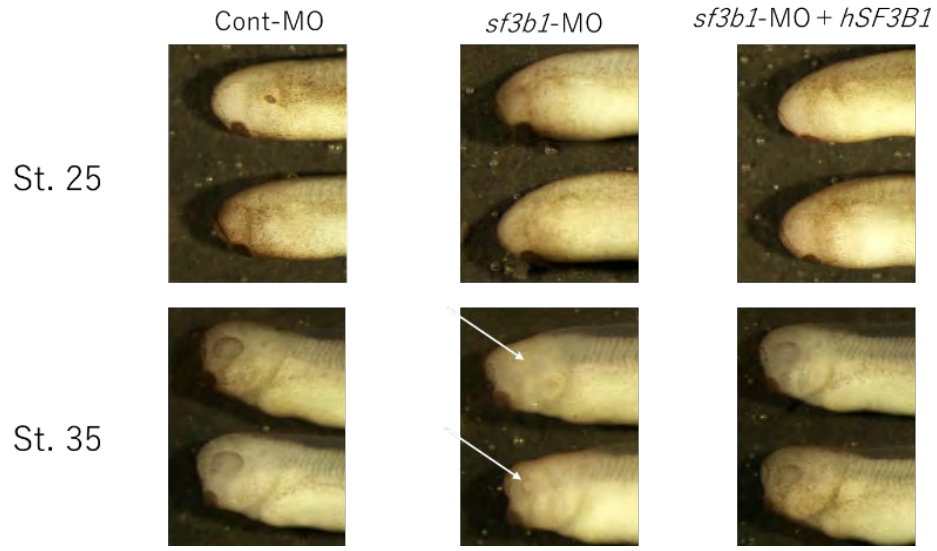
本実験では、小児科の病気である小頭症をきっかけに sf3b1 遺伝子に注目したため、胚発生の系を用いてこの遺伝子についての解析を試みた。免疫蛍光染色を行い、マーカーの発現の増減などに注目して表現型について分析した。アフリカツメガエルの胚を用いた理由としては、発生が早い、実験の費用が抑えられる、脊椎動物である、一度にたくさんの卵を産む、初期段階での発生が見やすい、サイズが大きい、などの利点が挙げられる。

【方法】

2細胞期の胚において、それぞれの細胞にモルフォリノをインジェクションした。

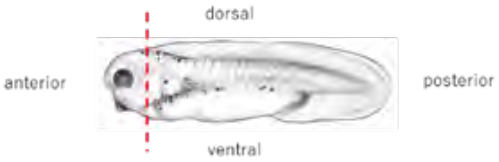
コントロール群にはコントロールモルフォリノ(cont-MO)と呼ばれる関連遺伝子には影響を及ぼさないモルフォリノを、sf3b1 ノックダウン群、レスキュー群には sf3b1 モルフォリノ(sf3b1-MO)をインジェクションしました。また、レスキュー群には、4 細胞期にヒトの SF3B1 メッセンジャーRNA をそれぞれの細胞にインジェクションした。それらをステージ 25(st.25)、もしくはステージ 35(st.35)になるまでインキュベートし、ホルマリン固定して免疫蛍光染色を行なった。

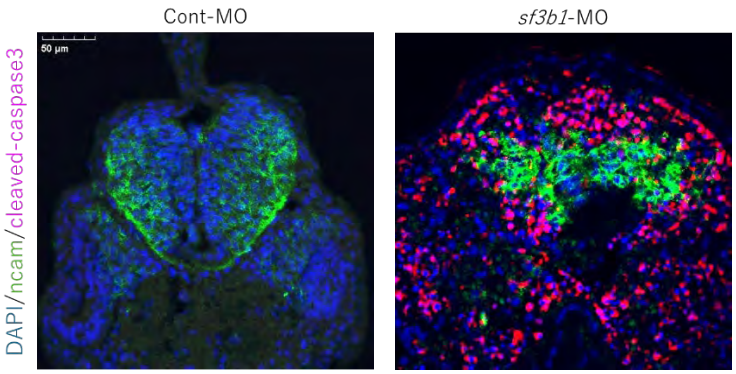
【結果】



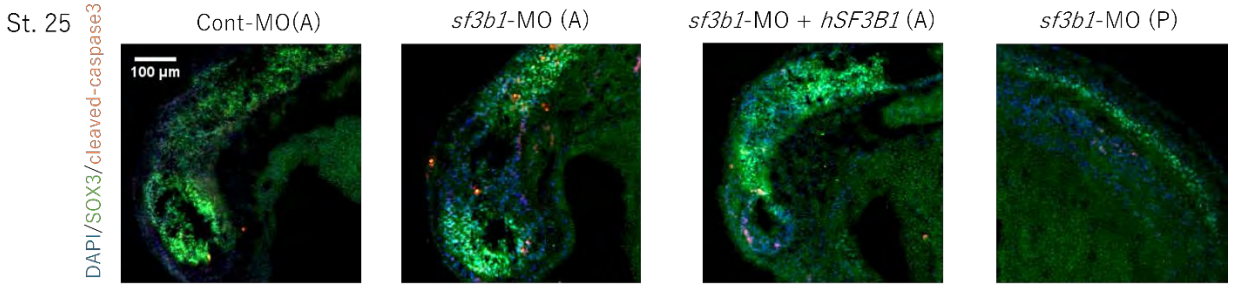
上記の画像は、st.25,st.35 のコントロール群、sf3b1 ノックダウン群、レスキュー群のアフリカツメガエル胚を撮影したものである。sf3b1-MO をインジェクションした胚では、コントロール群と比較して後期尾芽胚で頭部が小さいという結果が得られた。また、レスキューをした胚では、形態異常の改善が見られた。このことから、sf3b1 ノックダウン群では脳に異常がある可能性が高いと考え、脳に焦点を当てて実験を進めることにした。脳のサイズに影響を与える要因として、アポトーシスと有糸分裂が挙げられることから、この 2 点の要因について調べることにした。

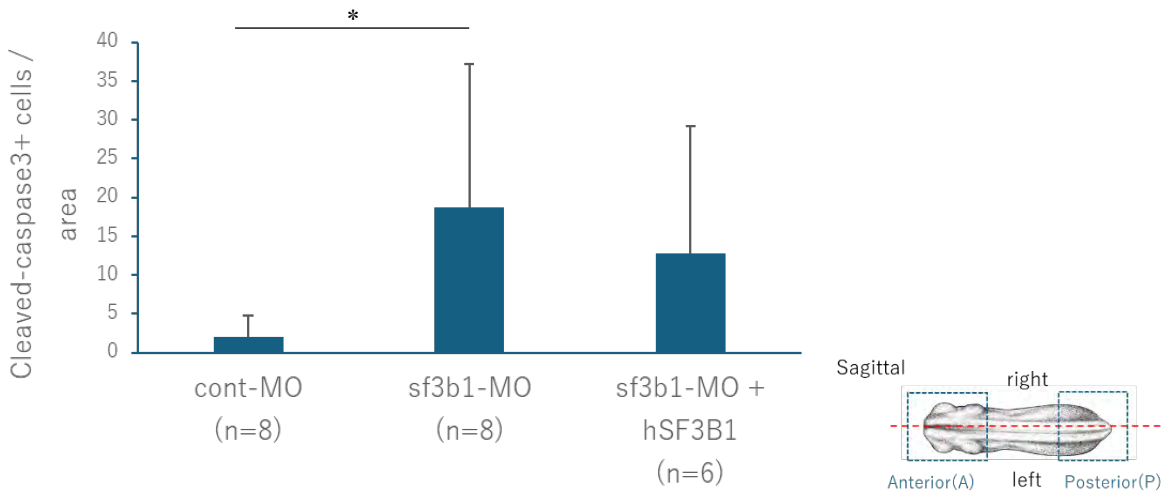
まず、アポトーシスについて調べた。始めに、肉眼的にも明らかに形態異常が見られた st.35 について、上段の図のようにトランスバースで切片を作成した後、免疫蛍光染色を行ない、観察した。





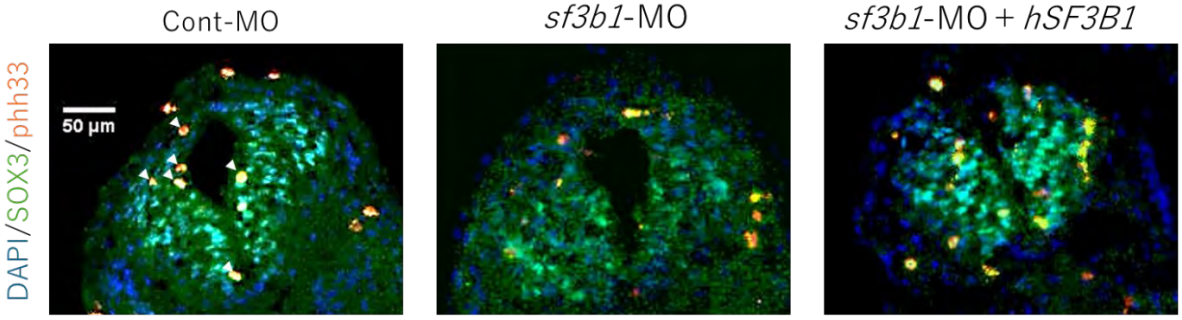
下段の画像では、青色が DAPI、緑色が ncam、赤紫色が cleaved-caspase3 を表す。DAPI は核のマーカー、ncam は神経細胞のマーカー、cleaved-caspase3 はアポトーシスのマーカーである。左側のコントロール群では形態が正常であり、アポトーシスも見られないのに対し、右側の sf3b1 ノックダウン群では明らかに形態が崩れており、アポトーシスも多く観察できることがわかる。
Sf3b1 のサンプルは明らかに形態が崩れており、定量的に解析をするには困難だと判断したため、より手前のステージである st.25 において画像解析を進めることにした。





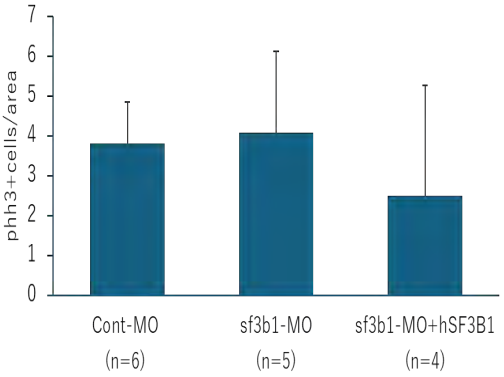
St.25 の胚を下段右図のようにサジタルに切って切片を作成し、画像解析を行ったところ、上段の画像が得られた。この画像では、青色が DAPI、緑色が SOX3、赤色が cleaved-caspase3 を表す。SOX3 は神経細胞のマーカーである。この画像において、脳域でアポトーシスが起きている細胞の数を数えた結果、sf3b1 ノックダウン群ではコントロール群よりもアポトーシスが多く見られた。上段左 3 枚の画像において、コントロール群とレスキュー群ではアポトーシスが起こっている細胞がほとんど観察出来ないのに対し、sf3b1 ノックダウン群では多くのアポトーシスが見られた。ここで、脳の面積当たりのアポトーシスが起こっている数をグラフ化したところ、コントロール群と sf3b1 ノックダウン群の間に優位差が見られた。(*p<0.05)
また、上段右の尾部の画像において、SOX3 が発現している範囲ではアポトーシスが見られないことがわかる。尾部に関しては、3群の間で優位差は見られなかった。

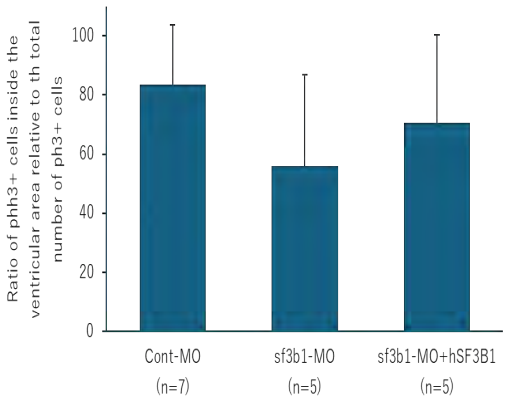
次に、神経幹細胞の有糸分裂について調べた。神経幹細胞には脳の内側(脳室側)―外側(脳膜側)極性があり、細胞周期に応じて細胞核を移動させ、核が脳の内側に位置する時に細胞分裂を行う。このように、機能的な神経系の構築には、神経幹細胞が、特定の位置で秩序をもって増殖することが重要である。以上を踏まえ、sf3b1 をノックダウンしたアフリカツメガエル胚の脳において、分裂期の細胞数が変化するか、正常な位置での分裂が行われているかの 2 点を調べることにした。



St. 25
Transverse







St.25の胚において、上段右の図のようにトランスバースに切った切片を作成し、免疫蛍光染色を行なったところ、上段左の画像が得られた。この画像では、青色が DAPI、緑色が SOX3、赤色が PHH3 を表す。PHH3 は細胞分裂期にある細胞のマーカーであり、脳領域で発現している PHH3 を矢頭で表示している。画像解析の結果、細胞分裂期にある細胞の数、脳室帯の内外で分裂している細胞の割合に有意差は見られなかった。左下のグラフは、脳領域で PHH3 が発現している細胞を数え、面積当たりの数を計算し、解析した結果である。このデータでは有意差は見られなかった。右下のグラフは、脳室帯で分裂している細胞の数の、脳領域で分裂している細胞の数に対する割合を算出した結果である。このデータにおいても有意差は見られなかった。

【考察】

sf3b1-MO を injection した胚では、cont-MO をインジェクションした胚に比べて多くの神経幹細胞のアポトーシスが見られた。また、コントロール群, sf3b1 ノックダウン群, レスキュー群の間では、 細胞分裂期にある神経幹細胞の数、脳室の周囲で分裂している神経幹細胞の割合ともに有意差は見られなかった。

以上の結果から、sf3b1 のノックダウンにより、脳の神経幹細胞が減少したことがわかった。これにより、SF3B1 は小頭症の原因遺伝子のうちの 1 つである可能性が示されたと言える。

【参考文献】

Zhou Z, Gong Q, Wang Y, Li M, Wang L, Ding H, Li P. The biological function and clinical significance of SF3B1 mutations in cancer. Biomark Res. 2020 Sep 3;8:38. doi: 10.1186/s40364-020-00220-5. PMID: 32905346; PMCID: PMC7469106.

Moreno N, González A. Pattern of Neurogenesis and Identification of Neuronal Progenitor Subtypes during Pallial Development in *Xenopus laevis*. Front Neuroanat. 2017 Mar 27;11:24. doi: 10.3389/fnana.2017.00024. PMID: 28396626; PMCID: PMC5366753.

Xenopus illustrations © Natalya Zahn (2022)

活性型および抑制型の GLI3 転写因子を発現する iPS 細胞の作成

細胞生化学 岸本浩尚(No.31)

【背景と目的】

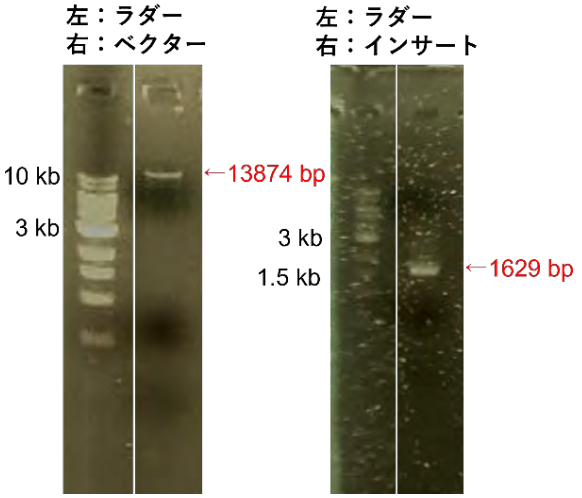
細胞表面に存在する細胞小器官の一つである一次繊毛には、ソニックヘッジホッグシグナル伝達経路というものが存在する。この経路の下流では GLI3 という GLI ファミリー転写因子の1つが重要な役割を果たしており、活性型として働くときは全長(full length)のままで存在し、抑制型として働くときは切断され N 末端側のみの形で存在する。GLI3は転写因子として機能する際、様々なタンパク質と結合するがそのタンパク質は組織ごとに異なる。そして、脳の神経幹細胞において GLI3 と結合するタンパク質の正体は、いまだ一部しか解明されていない。よって、このタンパク質を特定すること、そして脳の神経幹細胞における活性型と抑制型それぞれの GLI3 が結合するタンパク質が異なるのかを調べることを目的とした。

【方法】

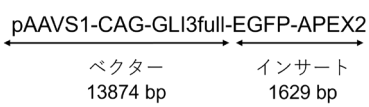
① 目的のプラスミド(活性型の GLI3 full length をコードするものと抑制型の GLI3N 末端側をコードするもの)のベクターとインサートを PCR によって増幅し、ベクターにインサートを挿入して目的のプラスミドを作成。
② トランスフェクション試薬を用いて iPS 細胞にプラスミドを導入。
③ iPS 細胞から脳の神経幹細胞を作成し、近接標識法により GLI3 結合タンパク質を単離し、質量分析を行う。

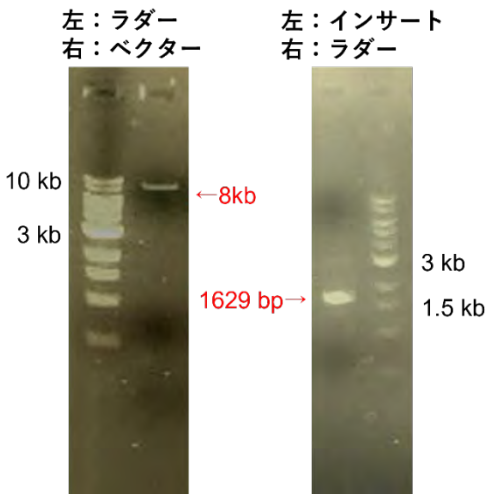
【結果】

まず、GLI3 full length をコードするプラスミドのベクターとインサートを PCR で増幅することに成功した。(写真1) 同様に GLI3N 末端側をコードするプラスミドのベクターとインサートを PCR で増幅させたが、ベクターは失敗しインサートのみ成功した。(写真2) その後、GLI3 full length をコードするプラスミドを作成し、制限酵素を用いて狙ったプラスミドができていることを確認した。(写真3) そして、完成した GLI3 full length をコードするプラスミドを iPS 細胞に導入することに成功した。(写真4)

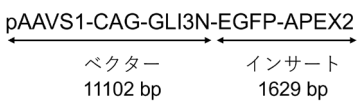


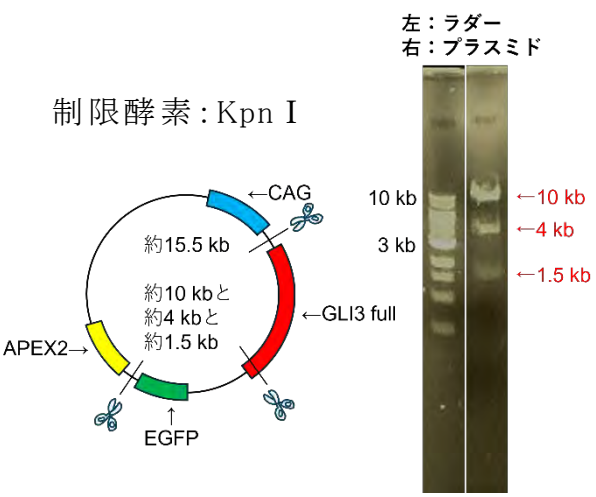
【写真1】



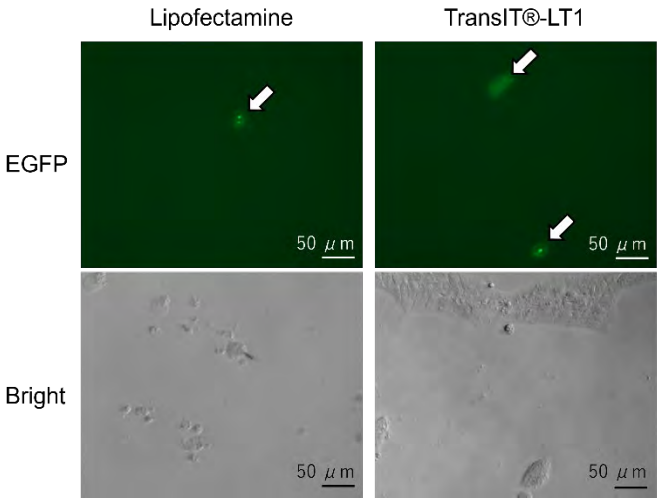


【写真2】





【写真３】



【写真 4】

導入時に Lipofectamine と TransIT®-LT1 という試薬を用いた。蛍光（白矢印）を確認することができ、導入に成功した。

【結論と今後の展望】

今回の実験では、GLI3 full length をコードするプラスミドを作成し、iPS 細胞に導入するところまで成功した。今後の展望としては、今回実験に失敗してしまった GLI3N 末端側をコードするプラスミドのベクターを作成し直し、GLI3N 末端側をコードするプラスミドを作成後、iPS 細胞に導入する。その後、それぞれの iPS 細胞から脳の神経幹細胞を作成し GLI3 結合タンパク質を単離して質量分析をする。また、GLI3N 末端側をコードするプラスミドのベクターの増幅に失敗した理由としては、プライマーが予定された位置にきちんと結合しなかったことが考えられる。

ジュベール症候群関連遺伝子ノックアウト iPS 細胞の樹立

細胞生化学、伊藤成洋、221007

目的

ジュベール症候群原因遺伝子（RPGRIP1L、TMEM67）をノックアウトした細胞から腎オルガノイドを作成し、表現型を確認すること。

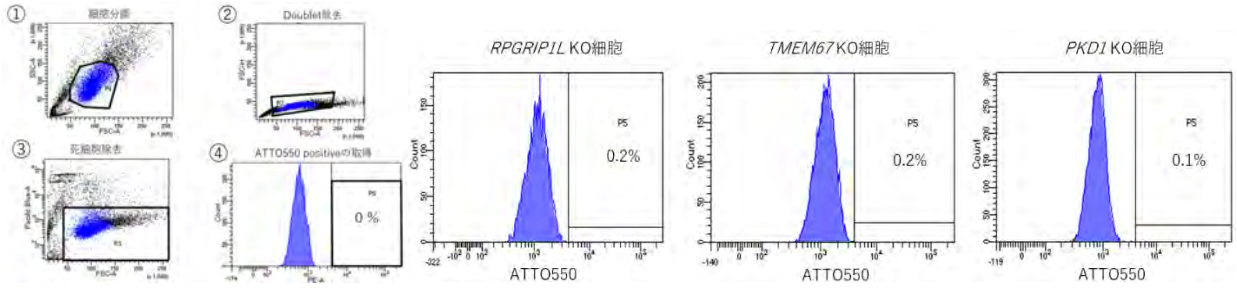
背景

細胞生化学のラボは、繊毛に関わる研究を行っている。繊毛の機能不全によってジュベール症候群が誘導される。ジュベール症候群の原因遺伝子は48種類以上あることがしられており、一部の患者では腎疾患も発症し、腎嚢胞がみられる。RPGRIP1L と TMEM67 は繊毛の transition zone に発現をする遺伝子で、ジュベール症候群の原因遺伝子である。また、腎嚢胞を伴う腎機能不全も発症することが知られている。

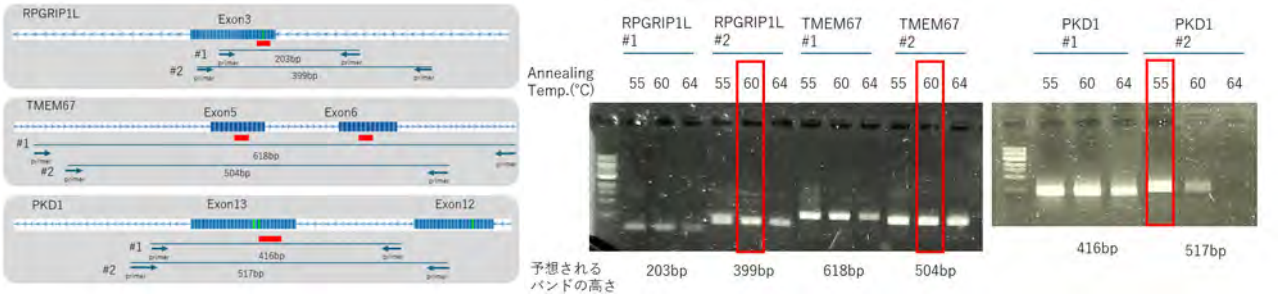
方法

CRISPR/Cas9 system を用いて、3種類のノックアウト iPS 細胞を作成した。ノックアウトした遺伝子は RPGRIP1L、TMEM67、PKD1（ポジティブコントロールとして用いた）である。ATTO550 によって蛍光標識された Cas9 RNP complex は electroporation により細胞内に導入した。Cas9 RNP complex が導入された iPS 細胞は FACS によって分離した。その後培養し、シングルセルごとにストックをした。ノックアウトが出来ているかの確認は Sanger-sequence により塩基配列を読み取って行った。

結果



左：Negative control でゲート設定をしたときの図。右：Cas9 RNP complex が導入できた細胞の分画を行ったときの量。



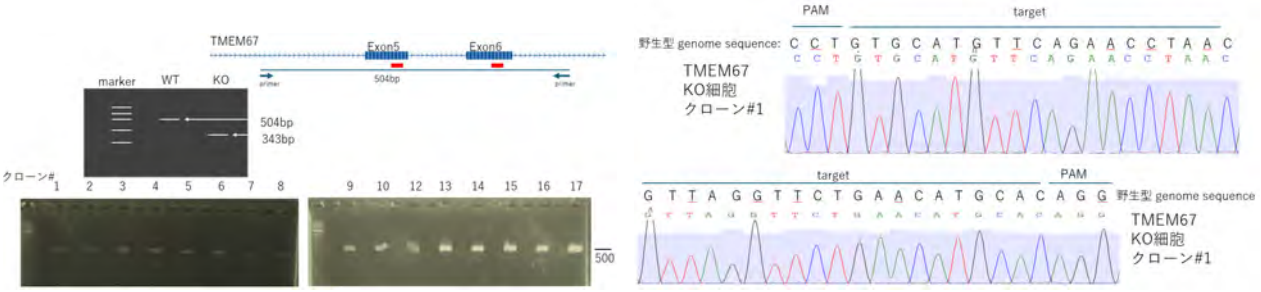
左：各遺伝子に対して、2 ペアのプライマーを設計した図。赤色部分が各遺伝子に対する CRISPR/Cas9 の標的を示している。標的部分を挟むように 200～600bp 程の大きさで設計をした。

右：PCR と電気泳動をし、プライマーが機能するかの実験を行った時の図。この際、アニー

リング温度を 55℃,60℃,64℃で 3 種類試して行った。バンドの濃さ等を考慮して赤色で囲まれたプライマーのペアとアニーリング温度で行うことにした。



左：RPGRIP1L を CRISPR/Cas9 の標的としたシングルセルの配列をサンガー法によって読み取った。野生型 genome sequence との差異はみられなかった。右：PKD1 を CRISPR/Cas9 の標的としたシングルセルの配列をサンガー法によって読み取った。野生型 genome sequence との差異はみられなかった。



左：TMEM67 は CRISPR/Cas9 の標的を 2 つ設定した。2 部位でノックアウトした場合、DNA 修復が 2 地点で行われ、バンドが低い位置でみられると予想したという図。バンドは 16 サンプルすべてで WT の位置にみられた。右：TMEM67 を CRISPR/Cas9 の標的としたシングルセルの配列をサンガー法によって読み取った。野生型 genome sequence との差異はみられなかった。

考察

Sanger-sequence で配列を読み取れたため、細胞をストックした後の実験手順に誤りはなかったと考えられる。また、FACS によるゲート設計をしたことから Cas9 RNP complex が導入できていない可能性も低いと感じた。以上の理由より、Cas9 RNP complex が機能していなかった可能性が高いと考えた。

展望

Cas9 RNP complex の tracrRNA や Cas9 を新しくして KO 細胞を再度作成してみる。また、並行して現在作成したサンプルの解析を進め、KO が確認できたら腎臓のオルガノイドを作成していき、表現型を確認する。

参考文献

Fleming et al., Clin J Am Soc Nephrol., 2017
Delous et al., nature genetics, 2007
Baala et al., Am J Hum Genet., 2007

一次繊毛と細胞膜における GPR161 の機能解明のための iPS 細胞の作製

細胞生化学　藤井祐宇（No.73）

【背景】

GPR161 は G 蛋白質共役受容体(GPCR)であり、GPR161 は、一次繊毛における発生過程のソニックヘッジホッグ経路というシグナル伝達を適切に制御する上で重要な役割を果たす。ヒトにおける GPR161 変異は、二分脊椎などの発達障害を引き起こす。そこで、脳における GPR161 の機能解明が必要である。ここで、GPR161 は、一次繊毛に存在する場合と細胞膜に存在する場合とで、機能が異なる可能性がある。

【目的】

一次繊毛、細胞膜それぞれに局在する GPR161 に結合するタンパク質を調べる。

【方法】

一次繊毛を有さない細胞（*IFT88* KO）を培養し、成長スピードや一次繊毛の有無について解析を行った。また、これらの細胞から脳オルガノイドを作製した。次に、GPR161 の機能解明のために、iPS 細胞に GPR161、APEX2（近接標識タンパク質）、EGFP の融合タンパク質をコードするプラスミドを導入した。

【結果】

IFT88 KO iPS 細胞は Control iPS 細胞と同程度の早さで成長した（Figure1）。また、*IFT88* KO iPS 細胞の ARL13B 陽性および IFT88 陽性の一次繊毛の数は、Control iPS 細胞と比較して有意に減少した（Figure2,3）。*IFT88* KO 脳オルガノイドの培養に成功した（Figure4）。GPR161 結合タンパク質を検出するプラスミドの作製に成功し（Figure5）、iPS 細胞に導入することに成功した（Figure6）。

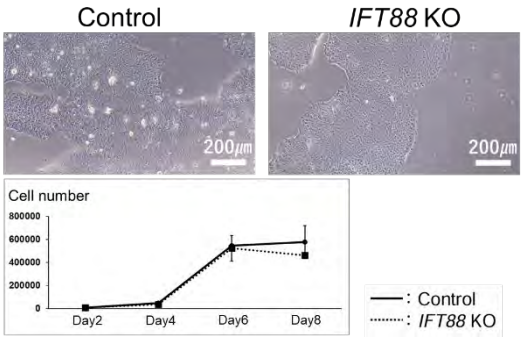


Figure1：上段左は Control、上段右は *IFT88* KO の iPS 細胞のコロニーの画像。下段のグラフは Control および *IFT88* KO iPS 細胞の成長曲線。

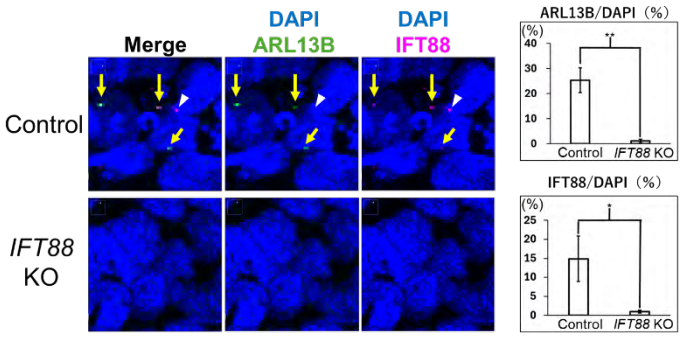


Figure2：左は Control および *IFT88* KO iPS 細胞の免疫染色の画像。黄矢印は IFT88 陽性一次繊毛、白矢頭は Background を示す。右は ARL13B 陽性および IFT88 陽性一次繊毛を有する細胞の割合を示したグラフ。

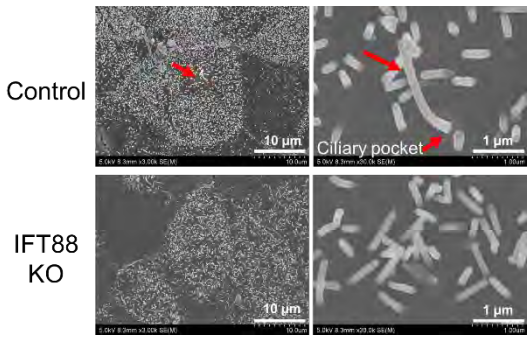


Figure3：走査型電子顕微鏡で観察した画像。上段左と上段右の上の赤矢印は一次繊毛、上段右の下の赤矢印は Cilialy pocket を示す。

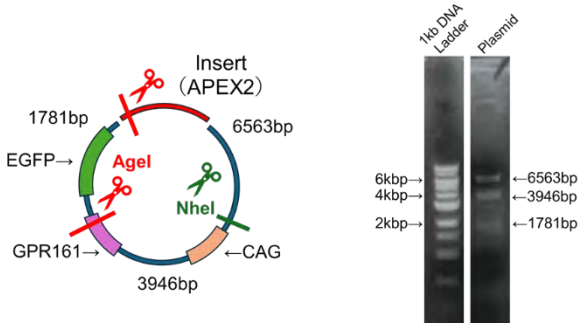


Figure5：作製したプラスミドを制限酵素で切断し、電気泳動によって目的のバンドを得た。

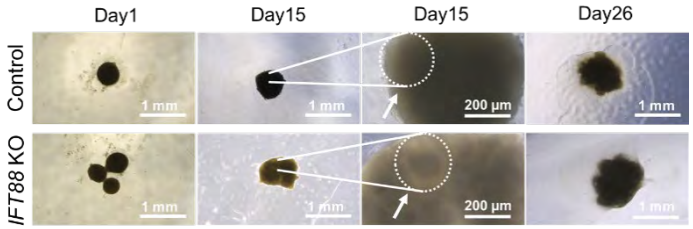


Figure4：Control および *IFT88* KO iPS 細胞から作製、培養した脳オルガノイドの画像。白矢印は脳室を示す。



Figure6：プラスミドを導入した Control iPS 細胞。プラスミドの EGFP による緑色蛍光を認める。

【結論】

IFT88 KO iPS 細胞は Control iPS 細胞と同様に増殖した。IFT88 陽性および ARL13B 陽性の一次繊毛の数は、Control iPS 細胞と比較して減少した。一次繊毛内外の GPR161 の機能を調べるための Control iPS 細胞の作製に成功した。

【今後の展望】

IFT88 KO 細胞でも同様の遺伝子編集を行い、Control および *IFT88* KO iPS 細胞を用いて脳オルガノイドを作製し、GPR161 結合タンパク質を解析する予定である。

【参考文献】

・Keren I. Hilgendorf. (2019). Omega-3 Fatty Acids Activate Ciliary FFAR4 to Control Adipogenesis. *Cell*, Volume 179, Issue 6p 1289-1305.e21

・Shu-Hsien Sheu. (2022). A serotonergic axon-cilium synapse drives nuclear signaling to alter chromatin accessibility. *Cell*, Volume 185, Issue 18p3390-3407.e18

・Sun-Hee Hwang. (2021). Ciliary and extraciliary Gpr161 pools repress hedgehog signaling in a tissue-specific manner. *eLife*.67121

迷走神経刺激がうつ様症状と腸管炎症を改善させる

統合解剖学分野　岡林浩輝（No.22）

【背景と目的】

慢性ストレスは脳と消化管の機能に影響を与え、うつ用症状や腸管の炎症を引き起こすことが知られている。一方、迷走神経刺激（VNS）は、ストレスによって誘発されるうつ様症状や消化管の炎症反応を抑制する効果が報告されており、腸脳連関を調整する新しい治療法として注目されている。しかし、腸脳連関において重要な役割を果たしていると考えられる腸の炎症が、どのように脳に影響を与えるのかについては、今だとして不明な点が多く残されている。

本研究の目的は、慢性ストレスが引き起こす腸の炎症とうつ様症状に対する迷走神経刺激（VNS）の効果を評価することである。これにより、ストレス関連疾患における腸脳相関の調節メカニズムを解明し、将来的な治療戦略の基盤を築くことを目指す。

【方法】

本研究では、マウスを対象とし、社会的敗北ストレスを用いて慢性ストレスモデルを構築した。ストレス誘発は5日間にわたり実施し、各ストレスの終了後に1時間の休息を設けた。その後、迷走神経耳介枝を20分間刺激した（ストレス電気刺激群:SS 群）。また、対照群として、耳介先端部を同様の刺激をした群（ストレス非刺激群：SC）およびストレスを与えなかった群（非ストレス非刺激群：NS 群）を設けた。腸の炎症および形態学的変化を評価するため、以下の手法を用いた。

・リアルタイム PCR 法

炎症性サイトカイン（TNF-α、IL-1β、IL-6）の mRNA 発現量を測定した。

・免疫染色法

腸内の免疫細胞（CD3 陽性細胞）および腸管グリア細胞（GFAP 陽性細胞）の局在と発現を評価した。

・HE 染色法

腸粘膜の形態学的変化を観察した。

うつ様行動の評価には、オープンフィールドテストおよび社会的相互作用テストを使用した。これにより、行動変化と分子・細胞レベルでの変化との関連性を詳細に解析した。

【結果】

SC 群における腸内の炎症性サイトカイン（TNF-α、IL-1β、IL-6）の mRNA 発現レベルは、NS 群に比べて有意に上昇した。一方で、SS 群では、これらの炎症性サイトカインの発現が有意に低下した（図 1）。また、SC 群において腸内の CD3 陽性細胞の数が増加していたが、SS 群では減少が認められた（図 2）。さらに、腸絨毛におけるグリア細胞マーカーである GFAP の発現は、NS 群および SC 群と比較して SS 群で有意に増加した（図 3）。しかし、HE 染色による形態学的観察では、いずれの群においても腸粘膜の明らかな構造変化は観察されなかった

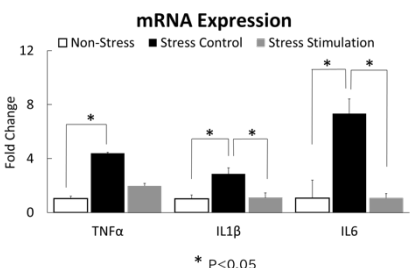


図 1

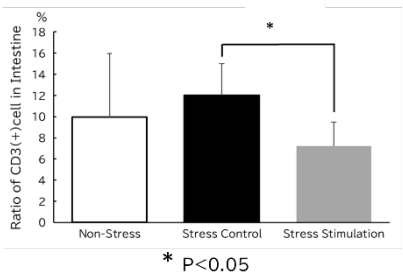


図 2

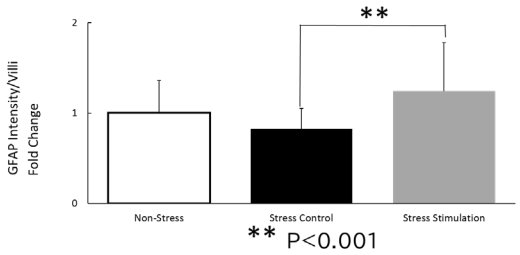


図 3

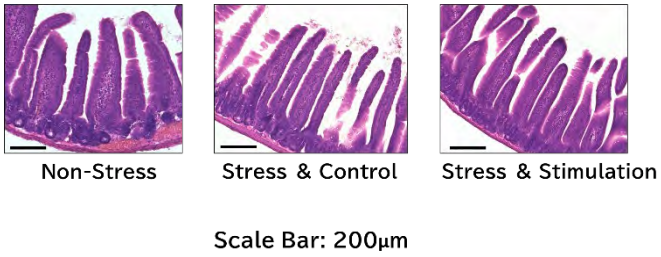


図 4

（図 4）。行動解析では、SC 群でうつ様行動が観察されたが、SS 群ではオープンフィールド試験および社会的相互作用試験においてこれらの行動が改善された（図 5）。

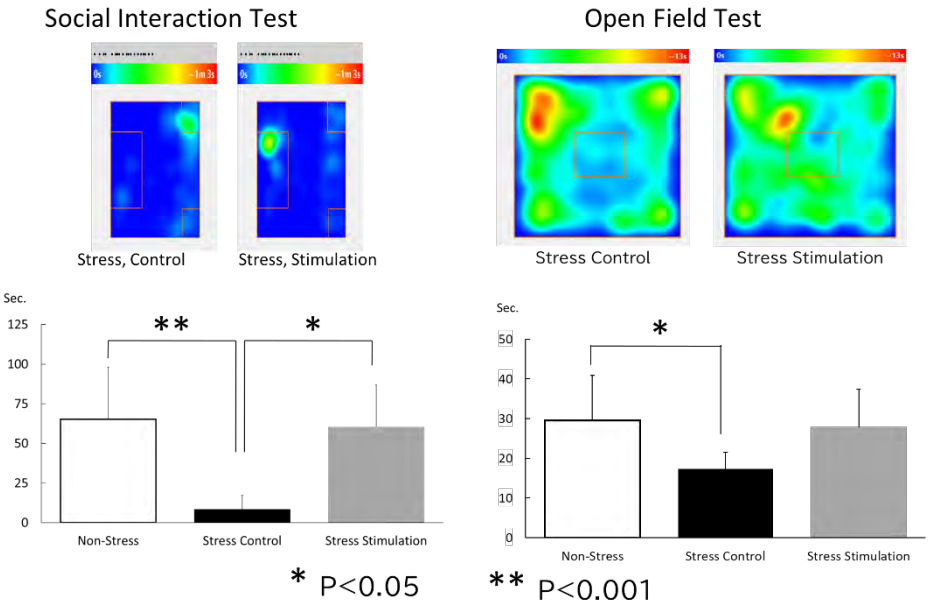


図 5

【まとめと考察】

以上の結果から、迷走神経刺激は慢性ストレスに伴う腸の炎症およびうつ様症状を軽減する可能性が示唆された。この作用には、炎症性サイトカインの抑制、免疫細胞の局在の変化、および腸管グリア細胞の調節が関与していると考えられる。これらの知見は、VNS が腸脳連関を介した治療戦略として有望であることを支持しており、ストレス関連疾患や、腸と脳の双方向性の関係の異常を伴う疾患の新たな治療法の可能性を示すものである。今回の実験系では、腸の異常が脳に与える影響について解明することは出来なかったが、今回の結果を参考に、腸バリア機能障害によって漏出したサイトカインが引き起こす脳内炎症を起因としたうつ様症状への改善のメカニズムのさらなる検証を行いたいと思う（図6）。

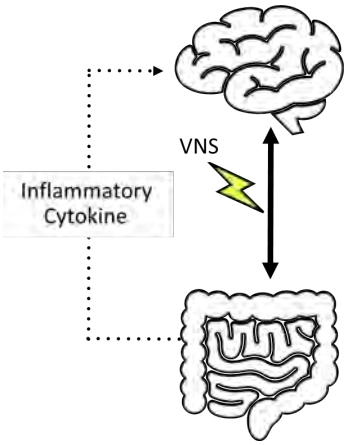


図 6

【参考文献】

1. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008;455(7215):894-902.
2. Li H, Kawatake-Kuno A, Inaba H, et al. Discrete prefrontal neuronal circuits determine repeated stress-induced behavioral phenotypes in male mice. *Neuron*. 2024;112(5):786-804.e8.
3. Zhang B, Wang HE, Bai YM, et al. Bidirectional association between inflammatory bowel disease and depression among patients and their unaffected siblings. *J Gastroenterol Hepatol*. 2022;37(7):1307-1315.

顕微授精マウスにおける社会行動異常の脳内メカニズム解析

統合解剖学分野
小柴拓実（No.35），齋藤親良（No.38），冨田翔（No.59）

背景

近年、日本における不妊治療、生殖補助医療（ART）の利用は増加しており、2021年は11．6人に1人（8．6%）が ART により生まれている。ART は、卵子に精子を振りかける体外受精(IVF)と精子を直接卵子の中にマイクロインジェクションする顕微授精(ICSI)に大別されている。この、ICSI はごく少量の精子を用いて受精できるという簡便性と授精率の高さから、ART による出産の約7割を占めている。ところが、ICSI はウサギ2匹とウシ2匹が無事に生まれただけでヒトに応用されたため、ICSI が個体の機能に及ぼす影響は不明である。先行研究では ART によって出生体重の低下や神経発達の異常、代謝機能の異常が生じるリスクが報告されているが、これらを否定する論文もあり、未だ結論には至っていない。特に ICSI が世代を超えて及ぼす影響については不明であった。

最近、京都大学のグループが ICSI による次世代への影響を、マウスを用いて解析した研究が報告された。研究グループは、B6系統のマウスの精子を用いて ICSI によって F1 マウスを作製した。この F1 マウスは、外見上の異常を認めなかった。次に、この F1 マウスの精子を用いて IVF によって ICSI-F2 マウスを作製したところ、死産や水頭症のマウスの確率が有意に多くなった。さらにこの F2マウスから IVF によって ICSI-F3 マウスを作製したところ、状況はさらに悪化し、死産、頭部や四肢の欠損症、水頭症のマウスが多く生まれた。この F2 マウスから IVF ではなく自然交配して F3 マウスを作製しても眼球の無い無眼症や水頭症のマウスが生まれた。このように、ICSI によって流産や頭部や四肢の欠損症、水頭症が、F1 世代では問題ないものの、世代を超えて生じることがマウスレベルでは示唆された。さらに、統合解剖学分野研究室では、外見上は異常の無い ICSI-F2 マウスの行動を評価したところ、不安行動を評価する Open field test において、中心部を避けて壁際を好む、つまり不安行動の亢進を示すことが示唆された。また、マウスの社交性を評価する Social interaction test においては、相手マウスのいる target zone を避けて corner zone を好むことが示唆された。このように、ICSI-F2 マウスでは、不安行動の増加と社会性の低下といった行動異常を示すことが示唆された。

方法・目的

本研究では、ICSI で生まれた F1 マウスから、さらに IVF によって F2 マウスを作製し、外見上異常のないものの社会性の低下した ICSI-F2 マウスを用いて、脳のどの部位に異常があるのか、広域脳神経活動マッピングを行った。具体的には、神経活動マーカーとして広く利用されている c-Fos の発現を定量解析することで、社会性異常の責任脳部位の探索・抽出を行うことを目的とした。

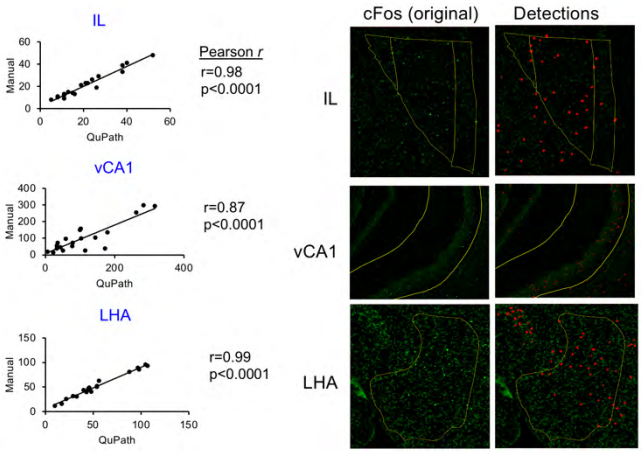
実験方法として、まず、ICSI-F2 マウスあるいは対照群として自然交配マウスを初めて接触するマウスと 3 分間接触させ、90 分後に灌流固定して脳を摘出した。ICSI-F2 マウスは、京都大学大学院医学研究科・篠原隆司教授より分与していただいたマウスを使用した。自然交配マウスと ICSI-F2 マウスについて、定常状態のマウスと social cue を負荷したマウスの合計4グループ、各6匹ず

つを用いた。クライオスタットを用いて厚さ 20um の切片を作製し、神経活動マーカーの c-Fos に対する抗体を用いた免疫染色法により、脳内 198 部位の c-Fos 発現量を定量解析した。免疫染色は研究室の定法に則って行った。

今回、c-Fos 発現はセミオートでの定量方法を用いて最終的に脳内 198 カ所を定量した。最初のステップとして、5カ所の脳領域の切片について、マウス1匹あたり3－4枚、平均で15枚の染色画像を ABBA ソフトウェアに展開した。ABBA ソフトウェアでは AI によって染色に用いた切片が標準マウス脳のどこに位置するかを自動認識する。しかし、実際の切片では、左右差や切断面の角度によって、標準脳アトラスとはかなり異なる。この違いを補正するために ABBA ソフト上では、冠状断での前後の位置をアトラスと合わせ、縦横の位置や歪みを補正することができる。これによって、微小脳部位のアノテーションを半自動で行うことができた。また、関心領域として認識させる際には、切片どうしが重なっている箇所や不純物などは認識しないように設定した。その後 QuPath ソフトウェアを用いて、すべての切片に対して同じ閾値を設定した蛍光強度を示した c-Fos 陽性細胞の個数と領域面積を定量し、これを198 部位に対して行った。これら一連の定量解析は統合解剖学分野研究室にてセットアップされているパイプラインを使用したが、免疫染色とこの補正作業についてはマウス24匹分、約360枚の切片について3人で行った。

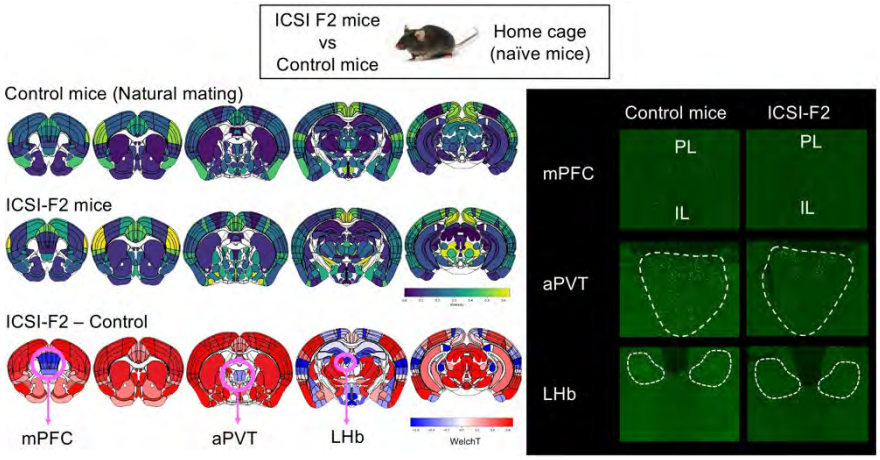
結果

まず、今回の解析に用いた ABBA と QuPath を用いたセルカウントの精度を検証するために、目視で定量した値との比較を行い、妥当性を確認した*(図 1)*。Infralimbic are (IL)、ventral CA1(vCA1)、視床下部外側野(LHA)の3部位について、私たちが目視でカウントした値と ABBA と QuPath ソフトウェアを用いてカウントした値の相関をみた。その結果、いずれの部位においてもスペアマンの相関係数は非常に高く、有意差を認めた。これらの結果から、今回用いた定量方法について他の部位について解析を進めた。



(図 1)

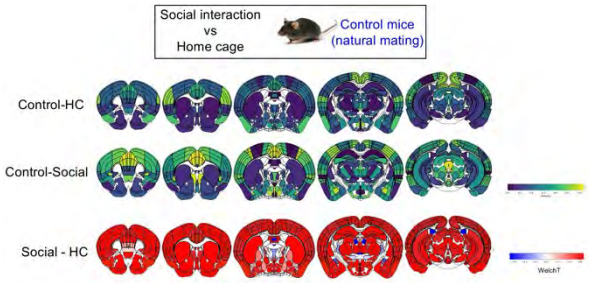
次に、ICSI-F2 マウスとコントロールマウスにおいて、定常状態の c-Fos の発現量を定量した*(図 2)*。ICSI-F2 マウスの mPFC(内側前頭前皮質)、aPVT(前室傍核)、LHb(外側手綱核)において、自然交配マウスに比べて c-Fos 発現の低下が見られた。



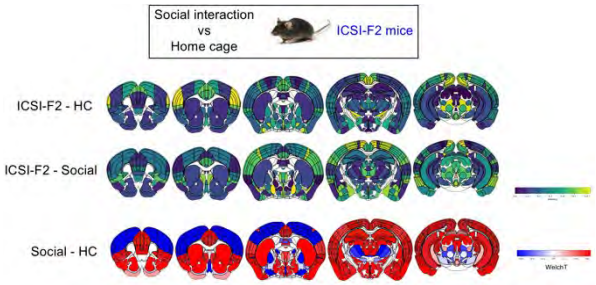
(図 2)

続いて社会的接触後に神経活動が変化した脳領域を調べた*(図 3) (図 4)*。自然交配マウスでは社会的接触後に多くの脳領域でc-Fos 発現の増加を認めた。ICSI-F2 マウスでも社会的接触後に多くの脳領域でc-Fos 発現の増加を認めたが自然交配マウスとの違いも認められた。

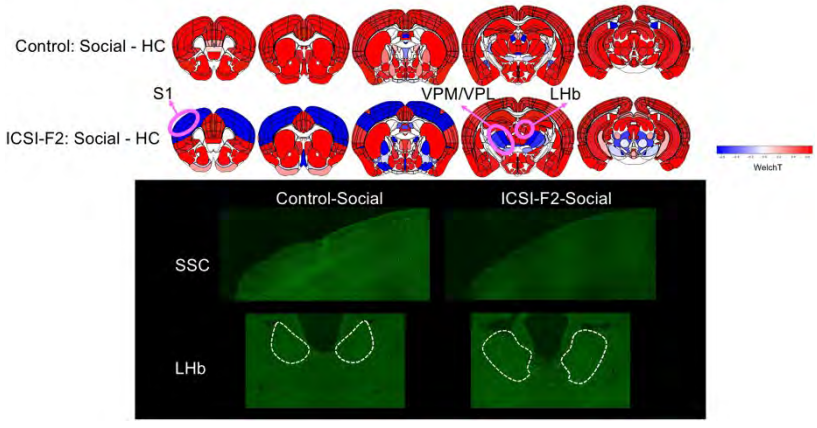
そして、自然交配マウスとICSI-F2 マウスについて Social interaction による c-Fos 発現変動を解析した*(図 5)*。ICSI-F2 マウスに特徴的な脳部位として、Social interaction test によって SSC（体性感覚野）、VPM/VPL（視床）、LHb（外側手綱核）が抽出できた。SSC と VPM/VPL では、自然交配マウスでは social interaction によって活性化されるのに対して、ICSI-F2 マウスではこの活性化を認めず、逆に手綱核(LHb)では、ICSI-F2 マウスで活性化されていた。



(図 3)

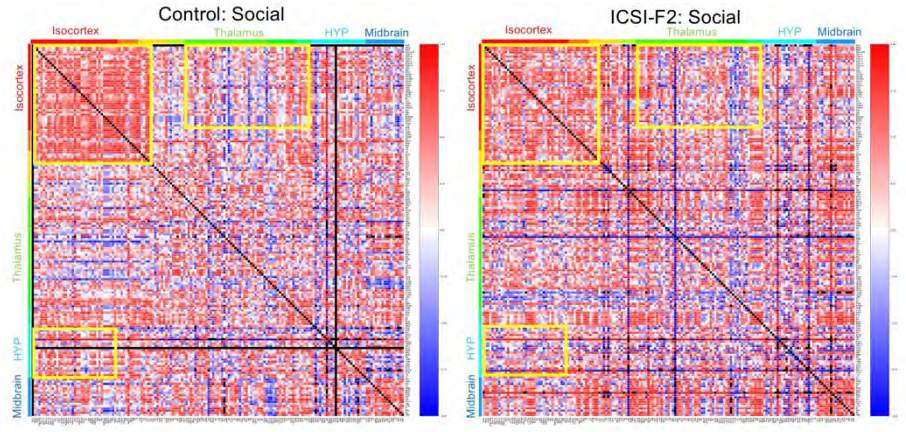


(図 4)



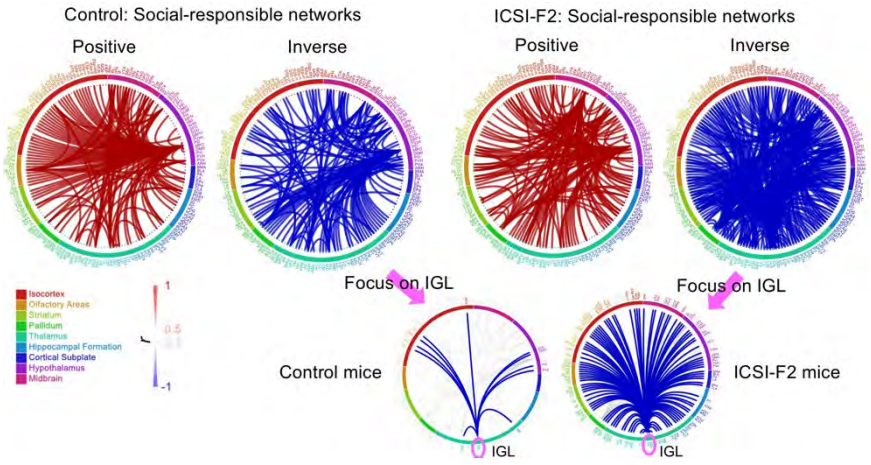
(図 5)

さらに、c-Fos 発現を指標として、2領野間の相関、すなわち、ネットワークコネクティビティーを検討した*(図 6)*。自然交配マウスで Social interaction test を行った群と、ICSI-F2 マウスで Social interaction test を行った群のそれぞれに関して、ネットワークを形成している可能性のある部位を調べた。その結果、ICSI-F2 マウスでは、自然交配マウスに比べて、social interaction 後に isocortex 内のコネクティビティーが低くなっていた。また、ICSI-F2 マウスでは、自然交配マウスに比べて、視床下部(HYP)と isocortex 間のネットワークが低くなっていること、逆に視床(thalamus)と isocortex 間のネットワークが高くなっていることが示唆された。



(図 6)

ここまで検証したのは広域脳神経活動マップであったが、次に局所神経ネットワークを検証した*(図 7)*。social interaction 後のコネクティビティーのうち相関係数の正負両方に強かった二部位の組み合わせの中からうち、上位 1%の組み合わせのみをピックアップして円環図を作成した。ICSI-F2 マウスに特徴的だった部位として、IGL(間膝状体葉)が挙げられる。自然交配マウスと ICSI-F2 マウスとでは、IGL との強い関連性を示した領域の数が、ICSI-F2 マウスでは大きく増加した。



(図 7)

考察

私たちが行った実験により、ICSI-F2 マウスでは自然交配で出生したマウスより mPFC（内側前頭前皮質）、aPVT（前室傍核）、LHb（外側手綱核）で c-Fos の発現が低いことがわかった。また、ICSI-F2 マウスでは他のマウスとの社会的接触により、体性感覚野と視床で c-Fos の発現が下がり、LHb（外側手綱核）での発現が上がることがわかった。さらに、脳領域間のネットワーク解析により、ICSI-F2 マウスでは IGL（間膝状体葉）を介した機能的な関連がみられることが示唆された。
本研究により、顕微授精によって生まれたマウスの次世代にわたる行動異常のメカニズムとして、脳内ネットワークの異常が示唆された。特に、視床領域の異常な神経活動が ICSI-F2 マウスにおける異常な社会活動に関係している可能性が示唆された。また、IGL（間膝状体葉）は視覚情報処理に関わっている視床の一部位であり、ICSI-F2 マウスにおいて見られる社会性の低下、不安行動の増強の責任部位である可能性がある。今回の結果はあくまでマウスでの解析になる。しかしマウスの研究であっても顕微授精といった操作、ある意味生殖細胞の環境変容が世代を超えて形態や脳機能を変化させるといった事実から、ヒトでの影響・安全性を議論する必要はあるかもしれない。ヒトでは生殖サイクルの長さから、ICSI によって出生した人で生殖適齢期にある人はまだ多くないが、F2 世代が生まれたという報告例は日本・ベルギーではまだないようだ。不安をあおる過度な発信は危険だが、モデル動物を用いたさらなる検証とヒトでの追跡調査が待たれる。

参考文献

- Mito Kanatsu-Shinohara, 2023, Intracytoplasmic sperm injection induces transgenerational abnormalities in mice
- Nicolas Chiaruttini, 2024, ABBA, a novel tool for whole-brain mapping, reveals brain-wide differences in immediate early genes induction following learning

気道炎症喘息マウスの胃腸運動障害に対するタウロデオキシコール酸（TDCA）の効果

機能組織学　岩永秀（NO.15）　馬場誠弥（NO.69）

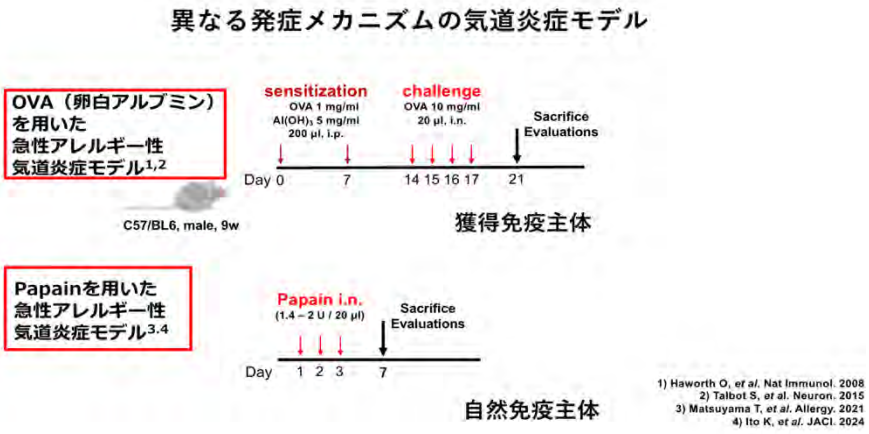
背景

喘息は気道に起こる炎症により気道が狭くなり、咳、痰、息苦しさなどの症状が現れる呼吸器系の疾患です。糖尿病、肥満、精神疾患など様々なリスク因子があり、逆流性食道炎(GERD)や鼻炎やアトピーなどの併存疾患が多いことも知られています。その併存疾患の1つに機能性ディスペプシア（Functional dyspepsia; FD）があります。機能性ディスペプシアとは消化不良や胃痛、胃もたれ、吐き気など、慢性的に腹部周辺に不調がありながら、内視鏡や検査で異常が認められない原因が不明な疾患です。機能性ディスペプシア合併喘息の患者は、機能性ディスペプシア非合併喘息の患者とくらべ、喘息コントロールが悪いなどの特徴がみられます。機能性ディスペプシアの原因としては、ヒト固有の精神的な影響などが指摘されながらも明確なコンセンサスが得られていませんでした。

目的・方法

我々の研究グループは、機能性ディスペプシア患者の十二指腸液の胆汁酸を解析すると、タウロデオキシコール酸（TDCA）やグリコデオキシコール酸（GDCA）といった二次胆汁酸が減少しており、その減少が胃の排出能低下と相関があるという報告に注目し、機能性ディスペプシア患者に二次胆汁酸を補えば症状が改善するのではないかと考えました。

まずこのプロジェクトの最初に C57BL/6J 雄性マウスを用いた基礎研究を行うことを考えました。急性アレルギー性気道炎症のモデルには大きく 2 種があり、1つが卵白アルブミン（Ovalbumin; OVA）の腹腔内感作と気道刺激からなる獲得免疫主体のモデルであり、他方が Papain の点鼻による自然免疫主体のモデルです。このうち既報にて胃腸運動障害のある後者モデルを再現し、まずこの個体に機能性ディスペプシアの症状の一つである胃の排出能の遅延が起きているかを調べました。

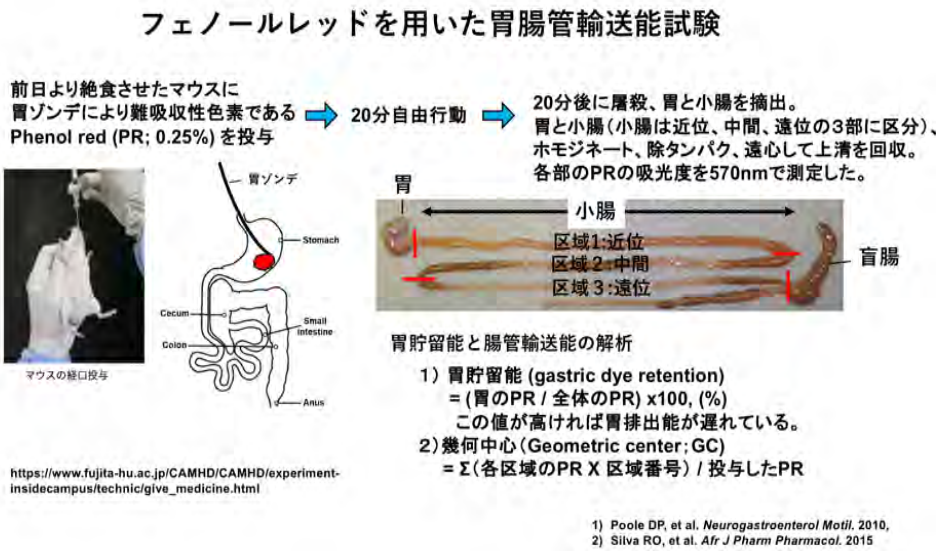


1) Papain による急性アレルギー性気道炎症モデルマウスの作製

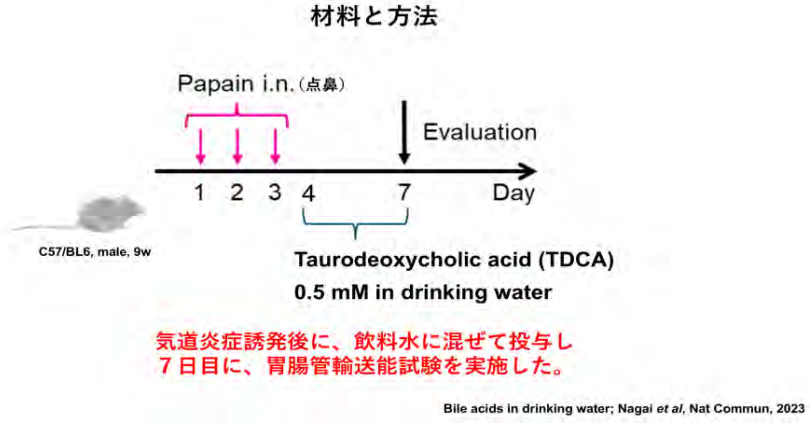
C57BL/6J 雄性マウスを用い、イソフルランで麻酔後 Papain (2-2.5 U / 20 μL / mice)の点鼻を 3 日間繰り返すことで気道炎症マウスを作製しました。その後 7 日目に屠殺して胃腸管運動能の評価を行いました。

2) 胃腸運動能の評価

胃排出能の測定方法としては、前日から絶食した個体の胃内に難吸収性色素であるフェノールレッド(Phenol red; PR)を投与、20 分後に胃と小腸を取り出し、小腸は3分割したのち胃を含めた合計4区域をホモジネート、除タンパクして各部の PR の吸光度を測定しました。
そして、1)胃貯留能(gastric dye retention)と 2)小腸の PR 中央値の幾何中心を算出しました。1 については、この値が高いほど胃排出能が遅延していることになり、2 については、以下の図の式にあるように、例えば小腸の区域 1 に投与した PR 全量がある場合は 1、区域 3 に投与した PR 全量がある場合は 3、となるような算出方法で、この値が小さいほど胃腸管輸送能が遅延していることを示しています。



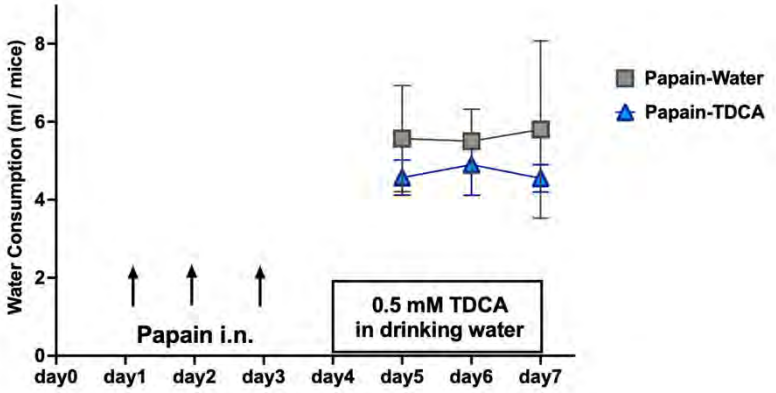
3) タウロデオキシコール酸(TDCA)を用いた実験



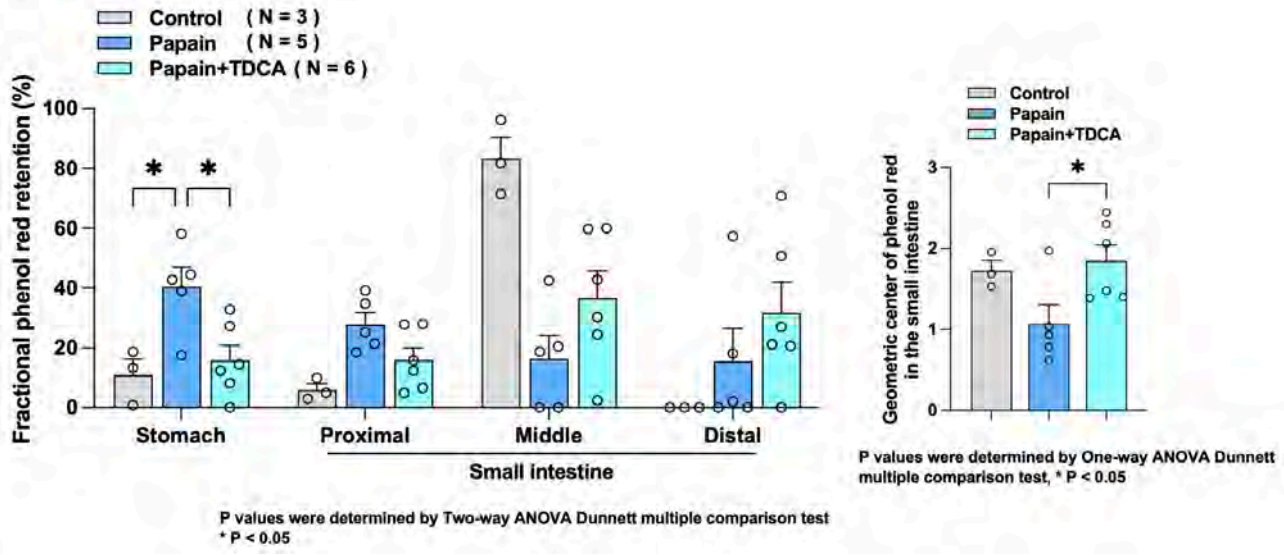
Papain 点鼻モデルマウスにおいて胃の輸送能が低下していたため、まず Papain で 3 日点鼻して気道炎症を誘発させたマウスに、4 日目より飲料水に TDCA (0.5 mM)を混ぜて投与し、胃排出能がどのように変化するか調べました。

結果

飲料水に TDCA を混ぜても飲水量に変化はありませんでした。マウスでは、TDCA が含まれていても、嫌がることなく、あるいはすごく好んで摂取することなく、水と同程度飲水しているようでした。



そして、PR による液性の胃排出能と小腸輸送能の実験結果です。この実験では3回実施して、全ての実験で同様の結果を得ています。その結果、Control では、全体の 10%程度の胃内 PR 量、すなわち 90%の PR が排出されているのに対し、Papain の点鼻マウスでは、約 40%の胃内 PR 量で 60%しか胃から排出されていないことが確認できました。そして、この胃排出能の遅延は気道炎症が起きた後の TDCA の飲水により有意に改善していました。そして、幾何中心値から分かる通り TDCA 投与群で胃腸管輸送能の遅延も改善されていました。(下図)



考察

Papain のみを点鼻投与されたマウス群は胃排出能・小腸輸送能が遅延していたのに対し、Papain による気道炎症誘発後に TDCA を投与されたマウス群は胃排出能・小腸輸送能の遅延が有意に改善しました。これらの結果から、Papain 誘発気道炎症モデルに見られる胃腸管運動不全の原因の一つに胆汁酸代謝の異常が考えられます。2次胆汁酸は腸内細菌により1次胆汁酸から生成されるので、腸内細菌叢の乱れがその背景にあるのかもしれません。

また、ヒトの喘息患者でもこの 2 次胆汁酸の減少が機能性ディスペプシア発症と関連していることが確認できれば、TDCA を経口投与することでこの喘息患者の胃腸管運動障害が改善する可能性があります。今後の課題として、さらに N 数を増やすことでより結果の確度をあげること、他の胆汁酸でも効果があるのかどうかを調べる必要があります。

参考文献

Ito K, Kanemitsu Y, Ueda T et al. J Allergy Clin Immunol. 2024 Jun 21:S0091-6749(24)00632-8. doi: 10.1016/j.jaci.2024.06.008.

Oshima T. Digestion. 2024;105(1):26-33. doi: 10.1159/000532082.

Wauters L, Ceulemans M, Lambaerts M et al. Gut. 2021 Nov;70(11):2208-2210. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323598.

Poole DP, Godfrey C, Cattaruzza F et al, .Neurogastroenterol Motil. 2010 Jul;22(7):814-25, e227-8. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01487.x.

The role of acid-sensing ion channel 3 in itch generation

機能組織学　大島清奈(No.19) 小田実那美(No.23)

1. 目的

侵害受容器である Asid-Sensing Ion Channel 3 (ASIC3)が、痒みの受容においてどのような役割を担っているのか明らかにすることで、酸によって惹起される痒みの知覚経路を考察する。

2. 背景

酸感受性イオンチャネル(ASIC)とは 2 回膜貫通型のイオンチャネルで、水素イオン、すなわち低pH(酸)をリガンドとして開口する陽イオンチャネルである。ヒトでは、少なくとも4つの遺伝子と 6 つのサブタイプが存在している。中枢・抹消問わず神経細胞に発現しており、抹消では侵害受容器に存在してアシドーシスによる痛みの惹起に関与しているとされている。一方、酸が起痒物質であることがわかるような事例も存在する[1)]ことから、ASIC3 が痒みの惹起にどのように関与しているのかを検討することで、酸によって誘発される痒みがどのような経路で知覚されるのか考察した。

3. 方法

① クエン酸塗布マウス痒み誘発試験

齧歯類において、特に頬部に刺激を与えると、痛みを知覚した場合には前足で刺激部位を拭う行動(ワイピング行動)を示すのに対して、痒みを知覚した場合には後ろ足でひっかく行動(スクラッチング行動)をとる[2)]。これによって痛みと痒みの区別することが可能である。野生型および ASIC3 KO の頬部をシェーバーで剃毛し、30 分環境に慣れさせた後に生理食塩水または 0.5M のクエン酸を筆で塗布した(Fig. 1 a)。その後 30 分間観察して、スクラッチング行動とワイピング行動をそれぞれカウントし統計処理を行った。

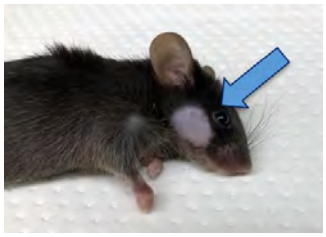
② 免疫組織化学染色

ASIC3 を直接染色するのに適した抗体が無かったため、ASIC3-EGFP KI マウスを利用し、抗 EGFP 抗体を用いて免疫組織化学染色をおこなった(Fig. 1b)。
ASIC3-EGFP KI マウスの三叉神経節(TG)と、頸部(C2～C4)の後根神経節(DRG)を摘出し、それぞれ組織切片を作製した。シングルセル RNA シークエンスを用いた DRG クラスタ分類[3)]では、non-peptidergic つまり NP1-NP3 のクラスタが痒みに特異的な感覚神経であるとされている(Fig. 1c)。ここで PlexinC1 が NP1-NP3 をラベルしているが、PlexinC1 は一部 peptidergic のクラスタつまり PEP1 にも発現が見られる。そこで Substance P (SP)を PEP1 のマーカーとして用いることで、PlexinC1 ポジティブかつ SP ネガティブであるような細胞を痒み神経とすることで痛み神経との区

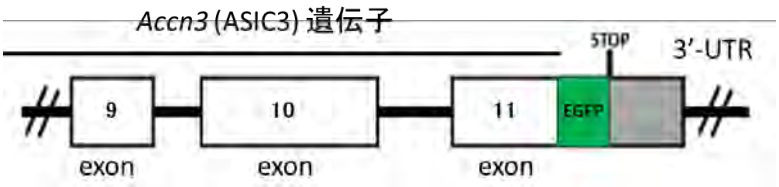
別化を図った。

Fig.1

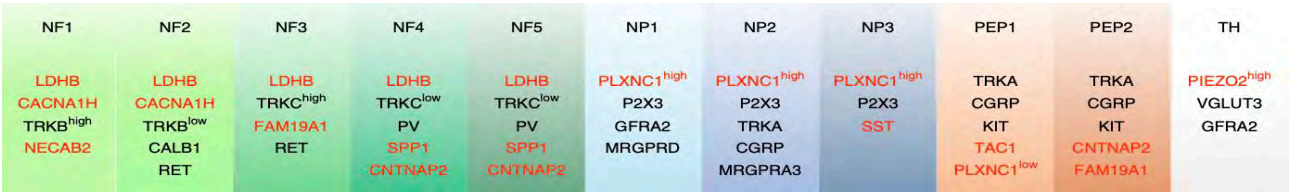
a



b



c



3)Usoskin *et al*, Nat Neurosci, 2015 より引用

4. 結果

① クエン酸塗布マウス痒み誘発試験

クエン酸を塗布した場合、ASIC3 KO では野生型と比較して有意にスクラッチング行動の回数が減少した(Fig. 2a,b)。同時に 30 分間のワイピイング行動もカウントして痛みの評価も行ったが、野生型および ASIC3 KO のいずれの場合もワイピング行動はほとんど示さなかった(Fig. 2c,d)。

Fig.2

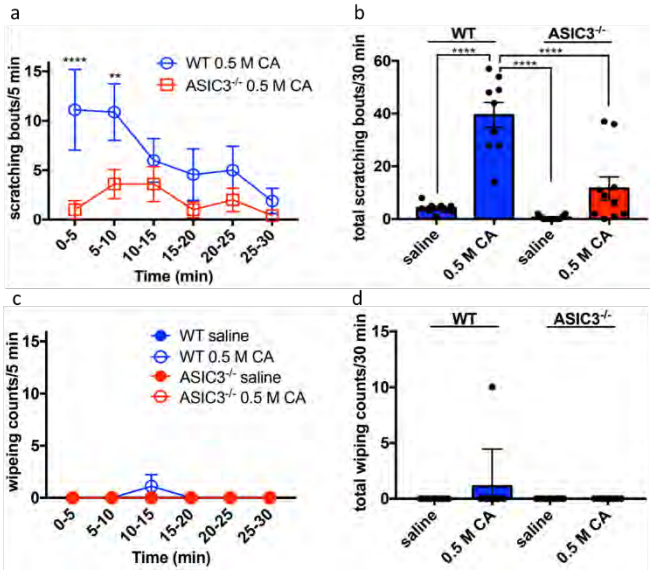


Fig. 2 Applying citric acid to the skin of the cheek induced only itch-related but not pain behavior.
(a) Itch-related behavior in WT (blue) and ASIC3 KO (red) mice as determined by scratching bouts in 5-min bins during a 30-min period following applying saline or 0.5 M citric acid at the right cheek. (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 = 9-11. Data are mean ± standard error of the mean. *$P < 0.05$, **** $P < 0.001$ compared as indicated, by two-way repeated measures 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

各マーカーともコントラスト良く染め分けすることができ、それぞれの発現率は先行研究[4)5)6)]と矛盾しない結果となった(Fig.3a,b,e)。三叉神経節では 3 匹のマウスについて 1 匹あたり左右それぞれ 3 切片の合計 24051 細胞を、後根神経節では C2-C4 について同様に 16532 細胞をカウントした。PlexinC1 ポジティブかつ PEP1 ネガティブであるような細胞における ASIC3 の発現率は三叉神経節で 0.08％、後根神経節で 0.02％となった(Fig. 3c,d)。 つまり、痒み神経が属するクラスタ(NP1-NP3)において ASIC3 の発現はほぼ見られなかった(Fig. 3f)。

Fig.3

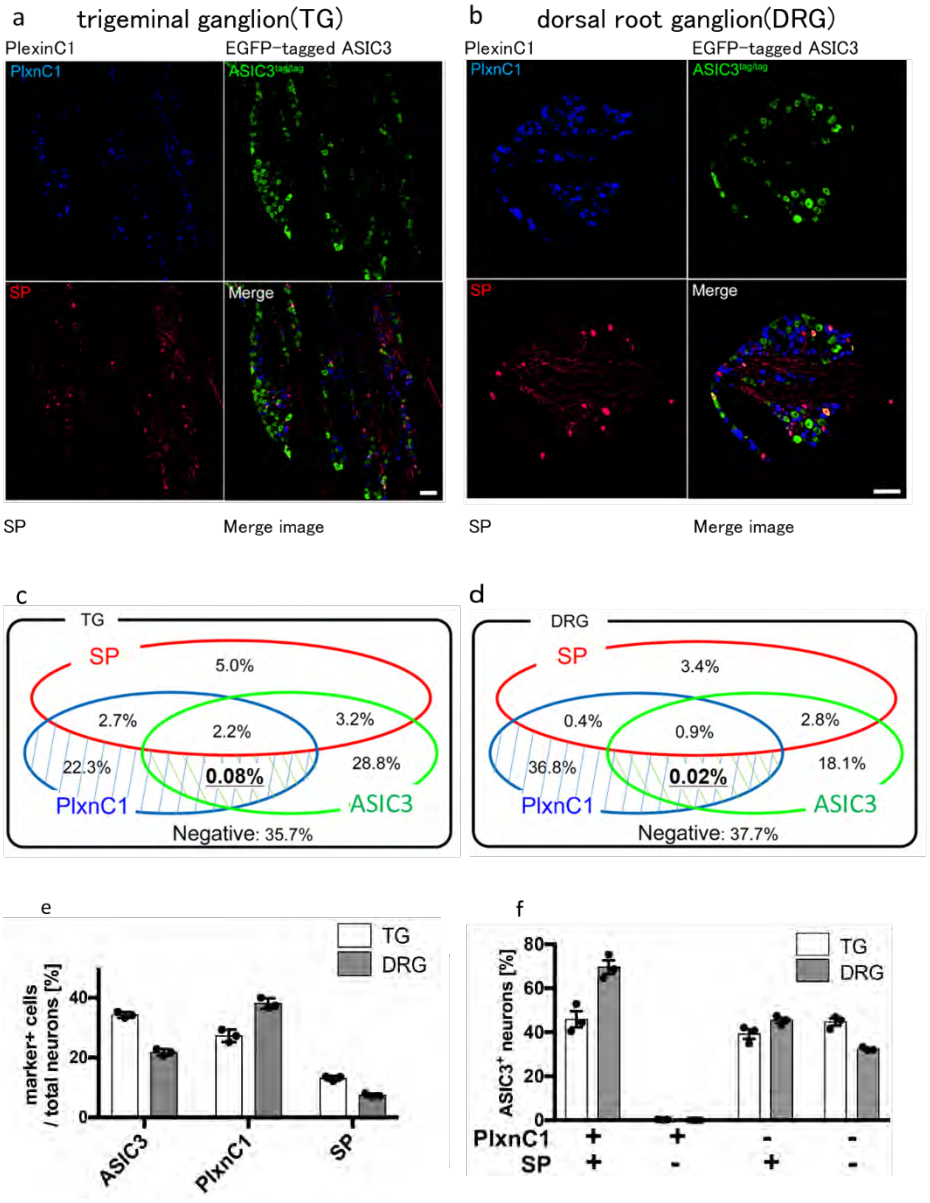
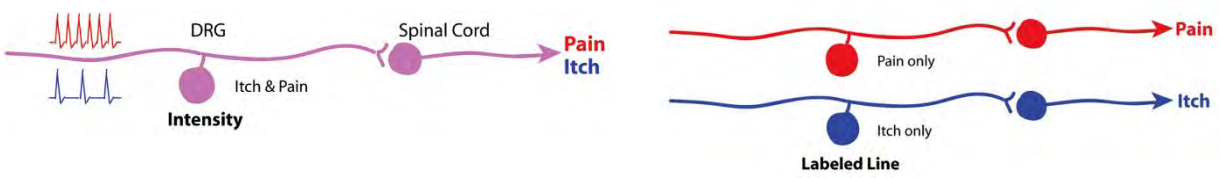


Fig.3 Distribution of ASIC3 positive neuron and itch-responsive neuronal subtypes.
Representative immunohistochemistry for PlexinC1, Substance P and EGFP-tagged ASIC3 is shown in (a) trigeminal ganglion (TG) and (b) dorsal root ganglion (DRG) at the C2-C4 level. The Venn diagrams indicate the positive rate for each marker in (c) TG and (d) DRG at the C2-C4 level. (e) shows the proportion of PlexinC1, Substance P and EGFP-Tagged ASIC3 in TGs and DRGs. (f) shows the proportion of EGFP-Tagged ASIC3 in each subgroup with PlxnC1±/SP± in TGs and DRGs. Data in panels (e) and (f) is shown as mean ± standard error of the mean. All data are from three mice/group, three sections/mice. Cell count is 24,051 cells in TGs and 16,532 cells in DRGs. Scale bars: 100μm.

5. 考察

行動解析において、クエン酸塗布によって誘発される掻爬行動は ASIC3 KO マウスで有意に減少することが示された。また、免疫染色において ASIC3 は既存の痒みに応答する神経クラスタ(NP1-NP3)とは独立していることが示された。痒みの神経伝達に関する仮説として、Intensity theory（痛みの弱刺激がかゆみであるとする説）と Labeled Line Theory(痛み神経とは別のかゆみに特異的な感覚神経の経路が存在するという説)がある(Fig. 4)。近年は Mrgprなど特定の起痒物質で発火する受容体の発見などにより Labeled Line Theory が主流になりつつある。一方で本結果は、痛みのジェネレーターである ASIC3 が痒みを惹起したものの、痒みを受容するとされる神経クラスタ(NP1-NP3)とはほぼ共存しなかった。このことから、Intensity theory つまり ASIC3 が侵害受容器を介して弱い痛み刺激を痒みとして受容しているという仮説の存在、または共存が示唆された。

Fig.4



6. 参考文献

1) Lin S *etal.*, Involvement of TRPV1 and TDAG8 in Pruriception Associated with Noxious Acidosis. J Invest Dermatol 137(1):170-178. 2017.
2) Shimada S *etal.*, Behavioral differentiation between itch and pain in mouse. Pain 139(3):681-687. 2008.
3) Usoskin D *etal.*, Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. Nat Neurosci 18(1):145-53. 2015.
4) Lin SH *etal.*, Evidence for the involvement of ASIC3 in sensory mechanotransduction in proprioceptors. Nat Commun. 2016.
5) Albisetti GW *etal.*, Identification of Two Classes of Somatosensory Neurons That Display Resistance to Retrograde Infection by Rabies Virus. J Neurosci. 2017.
6) Battaglia G *etal.*, Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. J Comp Neurol. 1988.

新生ニューロンは傷害組織が持つ誘引活性により傷害部へ移動する

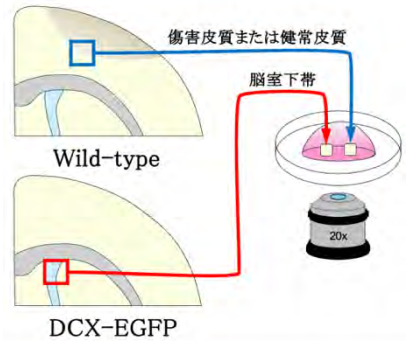
神経発達・再生医学　川瀬薫（No.29）

〈背景・目的〉

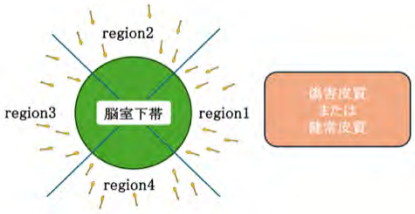
長らくの間、生後の脳では新生ニューロンは産生されないと考えられてきたが、近年の研究により、脳室下帯などの一部の領域では生後も新生ニューロンが産生され続けることがわかってきた[1]。脳室下帯で産生された新生ニューロンは吻側移動流を通り高速に嗅球に向かって移動する。一方で、脳が傷害を受けると、脳室下帯で産生された新生ニューロンの一部は傷害部位に向かって移動する。しかし、新生ニューロンがどのようなメカニズムで傷害部に移動するかについては完全には解明されていない。そこで私たちは、新生ニューロンは傷害組織が持つ誘引活性により傷害部へ移動するという仮説をたて、培養組織において新生ニューロンが傷害組織に誘引されるかを検証した。

〈方法〉

実験 1 では、脳室下帯と傷害皮質または健常皮質との共培養を行なった。生後 0 または 1 日の DCX-EGFP マウスから採取した脳室下帯と、凍結傷害 3 日後の wild-type のマウスから採取した傷害皮質または健常皮質をマトリゲルの中で共培養し、培養 24 時間後に免疫染色を行った（Fig.1）。DCX-EGFP マウスを脳室下帯の組織として使用することで、DCX/GFP 二重陽性細胞は脳室下帯の組織を移動する新生ニューロンであると特定することができる。脳室下帯の周囲を 4 つの領域に分けて、皮質に一番近い領域を region1 とし、そこから反時計回りに region2,3,4 と定義した。各領域の DCX/GFP 二重陽性細胞の数をカウントし、全領域の二重陽性細胞に占める各領域の二重陽性細胞の割合を比較した（Fig.2）。

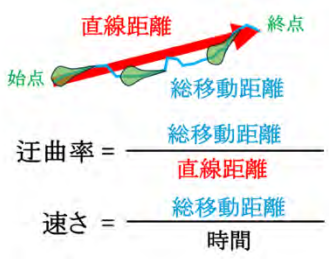


（Fig. 1）



（Fig. 2）

実験 2 では、移動する新生ニューロンの動態を評価するために、共培養中にタイムラプスイメージングを行ない、GFP 陽性によって定義した移動する新生ニューロンを追跡した。動態は、region1 とそれ以外の領域を移動する新生ニューロンの迂曲率と速さを使用して比較した（Fig.3）。迂曲率は、新生ニューロンが実際に移動した総移動距離を始点から終点の直線距離で割った値として定義され、迂曲率が小さいほどより直線に近く移動したことを示している。また、速さは総移動距離を観察時間から算出した。



（Fig. 3）

〈結果〉

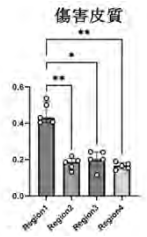
実験 1 では、脳室下帯と傷害皮質の共培養を行うと、region1 における二重陽性細胞がその他の領域と比較してより多く観察された（Fig.4）。一方で、脳室下帯と健常皮質との共培養では、二重陽性細胞の分布は領域間で差を認めなかった（Fig.5）。さらに、脳室下帯と傷害皮質の共培養において、二重陽性細胞の割合は region1 で有意に高値を示した（Fig.6）。これに対して、脳室下帯と健常皮質との共培養では、各領域の二重陽性細胞の割合に有意差は認められなかった（Fig.7）。



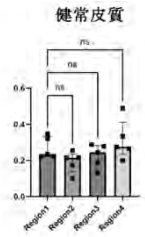
(Fig.4)



(Fig.5)

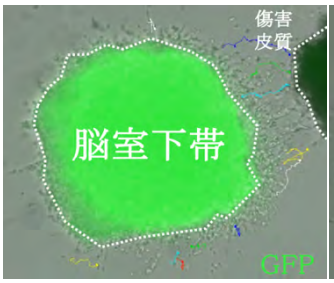


(Fig.6)

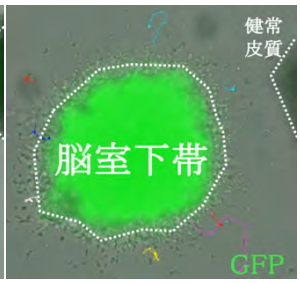


(Fig.7)

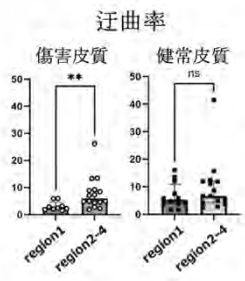
実験 2 では、脳室下帯と皮質の共培養中にタイムラプスイメージングを行った。
Figure8,9 は観察期間中に移動するニューロンの軌跡を示している。傷害皮質との共培養では、region1 を移動する新生ニューロンはより直線に近く、速く移動したのに対し、その他の領域ではより蛇行し、ゆっくりと移動した（Fig.8)。一方で、健常皮質との共培養においては、各領域を移動する新生ニューロンの動態に差は認められなかった（Fig.9)。移動するニューロンの軌跡を定量化し、Region1 とその他の領域を比較すると、傷害皮質との共培養では、Region1 の迂曲率は有意に小さく、より速く移動していた (Fig.10,11)。それに対して、健常皮質との共培養では、各領域の迂曲率と速さに有意差は認められなかった（Fig.10,11)。これらの結果は、脳室下帯と傷害皮質の共培養を行うと、皮質に近い領域を移動するニューロンはより直線的に、速く移動していることを示している。



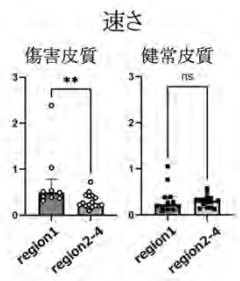
(Fig.8)



(Fig.9)



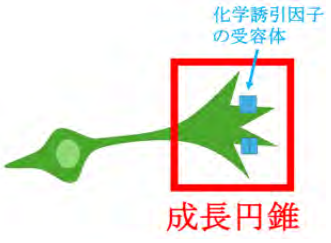
(Fig.10)



(Fig.11)

〈まとめ・考察〉
以上の結果から、脳室下帯と傷害皮質との共培養を行うと、傷害皮質に近い領域にはその他の領域に比べて移動する新生ニューロンが有意に多く存在し、傷害皮質に近い領域を移動する新生ニューロンはより直線に近く速く移動していることが示された。これにより、脳室下帯の組織から移動する新生ニューロンは傷害皮質に誘引されていることが示唆された。

〈今後の展望〉
当研究室では、移動する新生ニューロンの先端にも、軸索と同じようにガイダンス因子を受け取り、軸索伸長の方向を決定している成長円錐が存在することを報告した[2] (Fig.12)。移動する新生ニューロンもまた、傷害皮質皮質が分泌する誘引因子を成長円錐の受容体で受け取り、その方向性を決定しているという仮説のもと、傷害部がどのような誘引因子を分泌しているのか、また、新生ニューロンの成長円錐には誘引に関わるどのような受容体が存在するのかついて解明していきたい。



(Fig.12)

〈参考文献〉
1. Doetsch et al., **Cell**, 1999 Jun 11;97(6):703-16
2. Nakajima et al., **Nat. Commun.**, 2024 Mar 9;15(1):1877

アルツハイマー病モデルマウスにおける

成体海馬新生ニューロンのシナプス成熟

神経発達・再生医学　花木康太郎　67

【背景・目的】

脳内のほとんどの領域では、生後間もなく、新しいニューロンがつくられなくなると言われているが、脳室下帯と海馬歯状回では生後もニューロンがつくられている。海馬歯状回では、神経幹細胞から新生ニューロンが産生され、シナプスを形成して神経回路に統合されることで、記憶や学習に貢献している。最近、私たちの研究室は、正常脳において、脳内の貪食細胞であるミクログリアが新生ニューロンのシナプスを貪食することを報告した。このメカニズムとして、死細胞が貪食される過程で細胞の外膜に露出するホスファチジルセリン（PS）が、一部のシナプスにも露出し、それをミクログリアが認識して貪食することを明らかにした（Kurematsu et al.,2022）。

アルツハイマー病は、アミロイドβの蓄積により、神経細胞が脱落し、脳が委縮する神経疾患である。これまでに、アルツハイマー病モデルマウスでは、大脳皮質や海馬 CA1 領域のニューロンでシナプスの密度が減少することが報告されている（Crowe et al.,2014; Hong et al.,2016）。同様に、海馬歯状回の新生ニューロンでも、シナプスの密度が減少している可能性がある。最近の研究で、シナプス密度の減少にはミクログリアによる貪食の関与が示唆されている。しかし、アルツハイマー病モデルマウスでミクログリアがどのようなメカニズムでシナプスを貪食しているかは不明だった。本研究では、海馬新生ニューロンに着目し、ミクログリアによる海馬新生ニューロンのシナプス貪食のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】

アルツハイマー病モデルマウスとして、マウスのアミロイドβ配列をヒト化したノックインマウスを用いた（App-KI マウス；Saito et al.,2014）。PS依存的なミクログリアによる新生ニューロンのシナプス貪食を阻害するために、私たちの研究室で開発された *Dcx-CreER; Rosa26-tdTomato; Rosa26-MFG- E8^{D89E}* マウス（D89E マウス）を用いた。*MFG-E8* は細胞外膜の PS とミクログリアをつなぐ分泌タンパク質だが、*D89E* 変異体は PS には結合するものの、ミクログリアに結合できず、貪食を阻害できることが分かっている（Kurematsu et al.,2022）。このマウスにタモキシフェンを投与すると、新生ニューロンから *MFG-E8^{D89E}* が発現し、PS を露出したシナプスに結合して、ミクログリアによる貪食が阻害される。App-KI マウスと、D89E マウスを交配し、*APP-KI;D89E* マウスを得た。

【結果】

マウスの脳を固定し、切片を作製したのち、蛍光タンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その後、組織切片をスライドガラス上に封入し、超解像顕微鏡でシナプスを撮像した（**Fig.1**）。シナプスは、ヘッドが 0.5 μm 以上あり、かつ首を持つ成熟型の Mushroom 型シナプス（**Fig.1**、黄色矢頭）や、ヘッドが 0.5 μm 以下の thin 型シナプスなどが観察された。成熟型の Mushroom 型シナプスに着目し、密度を解析した。その結果、アルツハイマー病モデルマウスの海馬新生ニューロンでは Mushroom 型シナプスの密度が WT マウスに比べて有意に減少してい

た。また、*MFG-E8*^{D89E} で PS 依存的な貪食を阻害したマウスでは、アルツハイマー病モデルマウスで観察されていた Mushroom 型シナプスの密度の減少が回復した（**Fig.2**）。この結果から、アルツハイマー病モデルマウスの海馬新生ニューロンにおける成熟シナプス密度の減少は PS 依存的に制御されていることが示唆された。

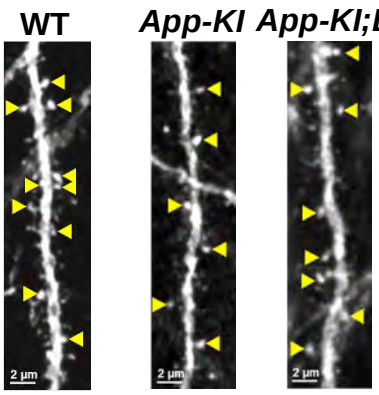


Fig.1

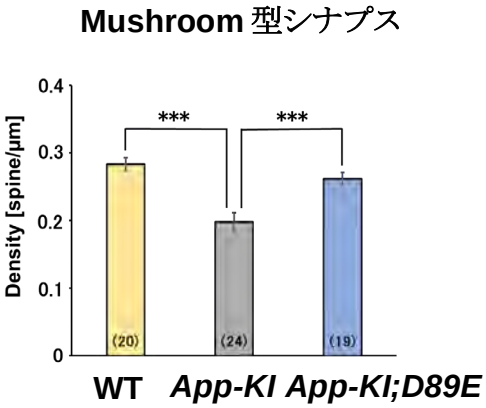


Fig.2

【考察】

今回の研究で海馬歯状回での新生ニューロンのシナプスの成熟過程には、PS が関与していることが明らかになり、PS 依存的なミクログリアによる貪食の関与が示唆された。現在、ミクログリアとシナプスのコンタクトと貪食について解析している。（**Fig.3**）の白い矢印で示すように、アルツハイマー病モデルマウスでは、ミクログリアが3つのシナプスを同時に包み込んでいる様子が観察された。正常時ではこのような頻繁なコンタクトは見られなかったため、貪食が促進している可能性が考えられる。

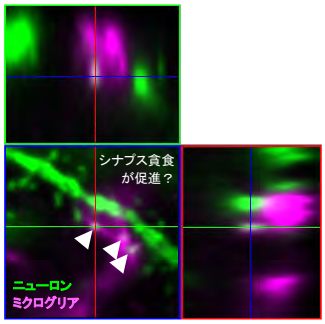


Fig.3

現在アルツハイマー病の最新治療法として、レカネマブと呼ばれる抗アミロイド β 抗体の投与が行われている。アルツハイマー病では、アミロイド β の蓄積だけでなく早期からミクログリアが持続的に活性化し、活発にシナプスを貪食し続けてしまう可能性がある。そこで、アミロイド β を除去する方法に加えて、本研究のように PS 依存的なミクログリアによるシナプスの貪食を阻害してシナプスを守ることができたら、アルツハイマー病でも成熟シナプスを維持していくことができるようになるかもしれない。

【参考文献】

Kurematsu et al., ***J Exp Med*** 219(4):e20202304 (2022)
Saito et al., ***Nat Neurosci*** 17(5):661-663 (2014)
Crow et al., ***Brain Struct Funct*** 219(2):571-580 (2014)
Hong et al., ***Science*** 352 (6286):712-716 (2016)

免疫細胞におけるインスリン受容体発現と慢性炎症の関連

神経発達・再生医学 89番 横山丈真

目的

単球マクロファージにおけるインスリン受容体の発現パターンと糖尿病誘導スクロース負荷との関連についてフローサイトメトリーを用いて評価し，慢性炎症のバイオマーカーとしての可能性を探る。

背景

2型糖尿病は慢性炎症によってサイトカイン伝達抑制因子がインスリンシグナルを負に抑制することで始まる。

慢性炎症を引き起こす中心的存在として単球/マクロファージが挙げられる。
これらが酸化ストレスを受けるとJNK経路から核内転写因子Foxo1が過度に増加し、炎症関連遺伝子の転写が増加する。一方でFoxo1を負に制御する経路の上流にはインスリン受容体が存在しているため、インスリンシグナルの低下はFoxo1を介して炎症を誘導する。
よって、インスリン受容体は慢性炎症のバイオマーカーとなりうるのではないかと考えた。

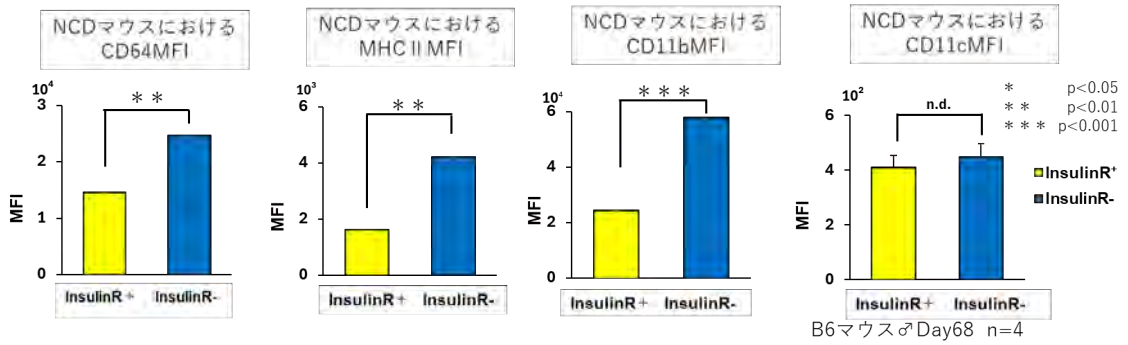
方法

通常食(NCD)マウスと30％High Sucrose負荷(Suc)マウスについて

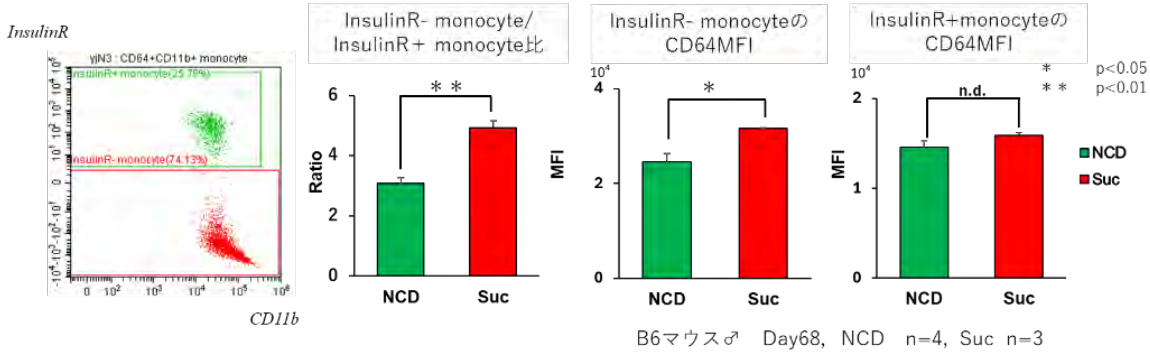
1. 150μL PBS-1mMEDTAに、マウス尾をcut tailして3～4滴の血液を採取する
2. FACS buffer 350μL加えて遠心
3. 上清を取り除き、Ack lysis buffer 500μLで8分lysisして再度遠心
4. 上清を取り除き、FACS buffer 1000μL加えて遠心
5. 上清を取り除き、抗体mixを加え4℃暗所に20分静置後，FACS buffer 1000μLでwashし遠心
6. 上清を取り除き、FACS buffer 150μL加えてフローサイトメトリー

抗体	抗体:FACS buffer	clone番号	company	Lot番号	color
CD16/CD32	1:200	93	eBioscience	14-0161-81	no color
CD103	1:200	M290	BD	562772	APC
CD11b	1:200	M1/70	TONBO	25-0112	APC-Cy7
CD64	1:75	S18017D	Bioregend	161003	PE
CD11c	1:100	N418	eBioscience	25-0114-81	PE-Cy7
MHC class2	1:100	M5/114.15.2	TONBO	80-5321	Redflour 710
B220 / CD45R	1:100	RA-3-6B2	invitrogen	46-0452-82	eFluor710
Insulin R	1:67	Polyclonal	RDsystems	FAB1544G	Alex 488

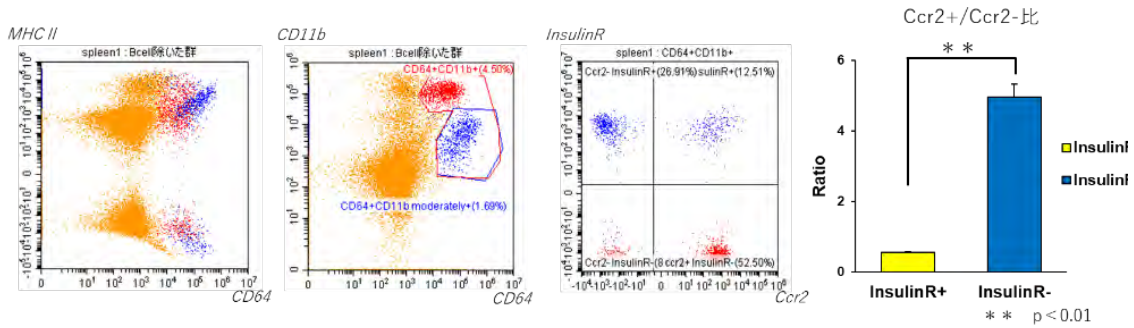
結果



NCD 群において、InsulinR−monocyte は InsulinR+monocyte に比べ CD64、MHCⅡ、CD11bの発現に有意な増加を認めた、一方で CD11c は有意差を認めなかった



monocyte における InsulinR− / InsulinR+ 比は有意に増加した。
InsulinR− monocyte における CD64(炎症マーカー)発現は有意に増加した、一方で Insulin R＋ monocyte における CD64 発現は有意差を認めなかった



脾臓の単球/マクロファージにおいて、インスリン受容体と Ccr2 には逆相関を認めた。
Ccr2+/Ccr2−比は InsulinR+/−によって有意差を認めた。

単球における InsulinR の発現によって単球の活性化パターンが異なり、Sucrose 負荷による変化も見られた。糖尿病のバイオマーカーたりうる可能性が示唆された。

考察

InsulinR+ monocyte において、Insulin シグナルは核内転写因子Foxo1 を負に制御しCcr2 発現を低下させる。InsulinR−monocyte ではシグナルが入らなくなることで Foxo1 が核内に留まり Ccr2 発現が増加すると考えらえる。単球・マクロファージにインスリンシグナ

ルを十分に効かせることが慢性炎症のTONEを抑えることにつながる可能性があり、将来的に治療標的になる可能性が示唆される。

参考文献

Kawano.Y, et al. (2012).” Loss of Pdk1-Foxo1 signaling in myeloid cells predisposes to adipose tissue inflammation and insulin resistance”. Diabetes. https://search.app/F7p95NUMtYXcUzNu6.

SH-SY5Y 細胞におけるタウアイソフォームの発現パターンについて

認知症科学分野　野倉麻由(No.63)

【背景】

タウは、*MAPT* 遺伝子にコードされる微小管結合タンパク質で、神経活動において重要な役割を果たしており、過剰にリン酸化を受けると微小管から離れて凝集・蓄積し、タウオパチーを引き起こす。蓄積するタウのアイソフォームによって異なるタウオパチーが生じることから、タウアイソフォームの発現パターン制御がタウオパチーの病態形成において重要だと考えられている。しかし、in vitro モデルの不足により、この発現パターンを制御するメカニズムを解析することは難しくなっている。

【目的】

ヒト神経芽細胞種由来の SH-SY5Y 細胞においてタウアイソフォームの発現とそのパターンを変化させる要因を調べ、この細胞がこの制御システムの in vitro 解析ツールとなる可能性を検討する。

【方法】

タウアイソフォーム発現パターンを変化させうる要因として、ウシ胎児血清(FBS)の濃度と分化を誘導するレチノイン酸(RA)の有無という 2 つの条件を用いた。4 つの 10cm dish に SH-SY5Y 細胞を播種し、DMEM(high glucose)+10% FBS の培地で一日増殖させた。その後 1% FBS RA(−)、 1% FBS RA(+)、 10% FBS RA(−)、 10% FBS RA(+)の4つの培養条件下におき、この日を day0 とした。RA は 10μM の all-trans RA を用い、RA を加えないものはコントロールとして同濃度の DMSO を加えた。day0 と day7 で形態を観察した。また、day2 と day7 で lysate を回収し、ウエスタンブロットで解析した。

【結果】

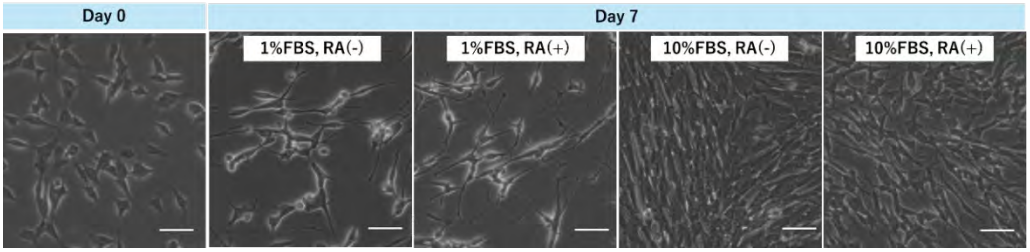


Figure 1. Morphological images of SH-SY5Y cells.
Morphological alteration of the cells could be detected depending on the culture conditions. The phase contrast images were obtained using inverted microscope(Axio Observer.Z1(Carl Zeiss). Scale bars represent 50μm.

FBS の濃度と RA の添加が細胞形態に与える影響を調べるため、形態観察を行った。その結果、day7 の 1% FBS 培地で RA を加えたものにおいて、神経突起の伸張が見られ、神経細胞様の形態へと変化していることが分かった（Figure 1)。

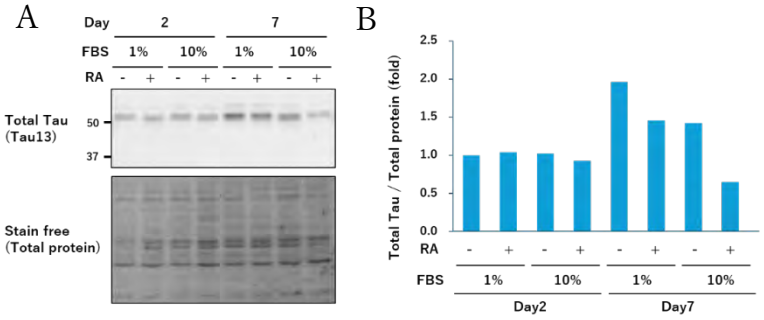


Figure 2. Total tau levels in SH-SY5Y cells.
A) Total tau were immunoblotted with the anti-human tau antibodies, Tau13. B) Band intensity of tau was determined with a ChemiDoc Touch MP Imaging System.

次に、培養条件の変化がタウ発現に与える影響を、タウ特異的抗体を用いたウエスタンブロットを行って確認した。その結果、day7 で 1% FBS RA(−)と 10% FBS RA(−)を比較すると、1% FBS でタウの発現は増加していた。RA(−) と (+)で比較すると、どちらの培地でも RA(+)でタウの発現は抑制された (Figure 2)。

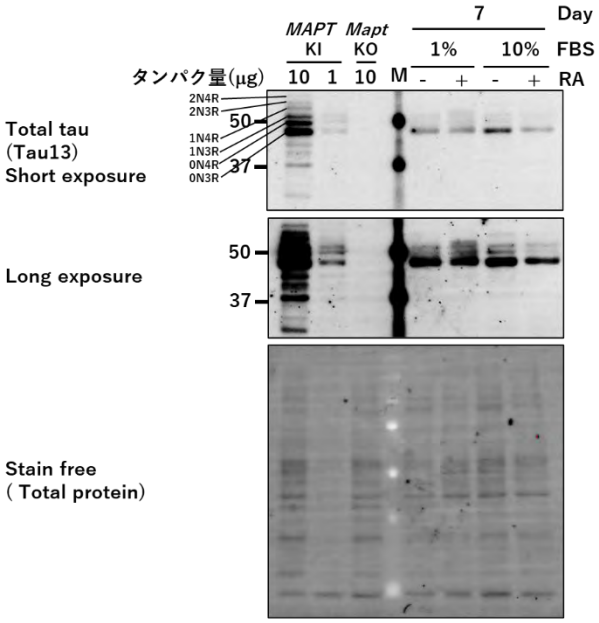


Figure 3. Tau isoforms in SH-SY5Y cells and animal models. Dephosphorylated biochemical extracts of SH-SY5Y cells and brains derived from animal models were subjected to western blot analysis. *MAPT* KI mouse and *Mapt* KO mouse were used as a positive or negative controls.

最後に、タウアイソフォームの発現を解析するため、脱リン酸化処理を行ったサンプルを用いてウエスタンブロットを行った。タウは通常リン酸化されており、SDS-PAGE においてそれが移動度に影響を与えるため、タウアイソフォーム解析のためには脱リン酸化処理が必要である。その結果、10% FBS RA(−)で 4 つのアイソフォーム(0N3R、 0N4R、 1N3R タウと 1N4R か 2N3R のどちらかに相当するもの)が見られた。また、1% FBS RA(−)では 0N3R タウ主体で発現していたが、1% FBS で RA(+)では 0N4R、 1N3R タウといったさらに分子量の大きなアイソフォームが発現していた (Figure 3)。

【考察】

SH-SY5Y 細胞は未分化で合計 4 種のタウが発現していた。また、1% FBS 培地で RA を加えることにより、神経細胞様の形態変化と、タウアイソフォームの発現パターンが変化していた。これらのことから培養・分化条件を変えることによって、この細胞がタウアイソフォーム発現パターン制御機構を解析するツールとして有用であることが示唆された。

【参考文献】

・Smith *et al*. Tau isoform expression and phosphorylation state during differentiation of cultured neuronal cells, *FEBS Letters* 375(3), 243-248 (1995).

・Agholm *et al*. An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons, *Journal of Alzheimer's Disease* 20(4), 1069-1082 (2010).

・Langerscheidt *et al*. Differentiating SH-SY5Y Cells into Polarized Human Neurons for Studying Endogenous and Exogenous Tau Trafficking: Four Protocols to Obtain Neurons with Noradrenergic, Dopaminergic, and Cholinergic Properties, *Methods in Molecule Biology* 2754, 521-532 (2024).

・Jämsä *et al*. The retinoic acid and Brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation, *Biochemical and biophysical research communications* 319(3), 993-1000 (2004).

・Targett *et al*. Differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells using retinoic acid and BDNF: a model for neuronal and synaptic differentiation in neurodegeneration, *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Animal* 60(9), 1058-1067 (2024).

低体温からの回復期におけるリン酸化タウの変化と

グリンパティックシステムの関係

認知症科学分野、武田拓朗(No.55)

【目的】グリンパティックシステムが低体温からの回復におけるリン酸化タウの正常化に関わっているかを調査する。

【背景】麻酔誘発性の低体温によって微小管結合タンパク質タウは過剰なリン酸化を受けるが[1]、体温上昇に伴いそれは正常化する。どのようにタウのリン酸化が急速に正常化するかの機序は未だ不明である。本実験では、低体温とその回復期におけるリン酸化タウの変動を調査する。次に、この回復期におけるリン酸化タウの変動が脳内の老廃物除去に重要な役割を担うグリンパティックシステム[2]によるものであるかを検証する。血管周囲腔を覆っているアストロサイトの足突起に発現しているアクアポリン 4(AQP4)という水チャネルがグリンパティックシステムに深く関与しており[2,3]、この AQP4 を阻害することでその役割を検討する。

【方法】4 ヶ月齢の C57BL/6J マウスに三種混合麻酔(0.3 mg/kg メデトミジン 4 mg/kg ミダゾラム, 5 mg/kg ブトルファノール)を腹腔内投与することで低体温を引き起こした。コントロール群では低体温を引き起こさせないように、麻酔投与後すぐに温熱板にのせ体温を維持させた。低体温から回復させる群では、低体温を引き起こした 4 時間後から温熱板に 0.5 時間から 1 時間のせ、体温の回復を促した。グリンパティックシステムが関与しているかを調べるために、AQP4 阻害薬の TGN-020 を麻酔投与 15 分前に腹腔内投与した。大脳皮質中のセリン残基 199 番目にてリン酸化されたタウ(p-tau199)と総タウ(t-tau)の量を ELISA により解析した。統計解析では、GraphPad Prism を用いた。

【結果】麻酔により体温減少が引き起こされ、温熱板で温めたマウスでは体温が一部回復した(Fig. 1)。低体温により p-tau199 量はコントロール群と比べて有意に増加し、1 時間温めたマウスでは p-tau199 量が低体温群と比べて有意に減少した(Fig. 2A)。一方、低体温により t-tau 量はコントロール群と比べて減少する傾向がみられた(Fig. 2B)。直腸温と p-tau199 量は負の相関がみられ、直腸温と t-tau 量は正の相関がみられた(Fig. 2C, D)。次に、TGN-020 注入群は、非注入群と比べて麻酔投与後の体温低下や温熱版に置いた際の体温の上昇に効果は見られなかった(Fig. 3A)。そこで p-tau199 量を測定すると、体温を 1 時間温めた群では低体温群と比べて有意な減少が見られていた一方、TGN-020 注入群で同

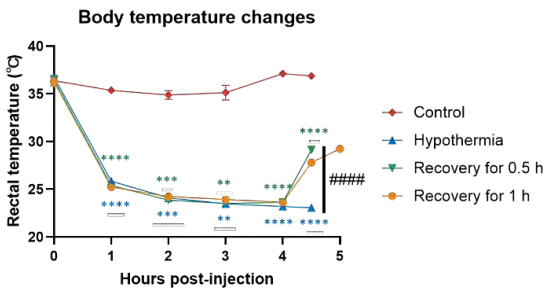


Figure 1. Anaesthesia injection caused hypothermia in mice without temperature control. Heating the hypothermic mice led to a significant recovery of the body temperature. Data were mean±SEM(n=4 mice/group). Mixed-effects analysis with Tukey's multiple comparisons test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ####p<0.0001.

変化は見られなかった(Fig. 3B)。

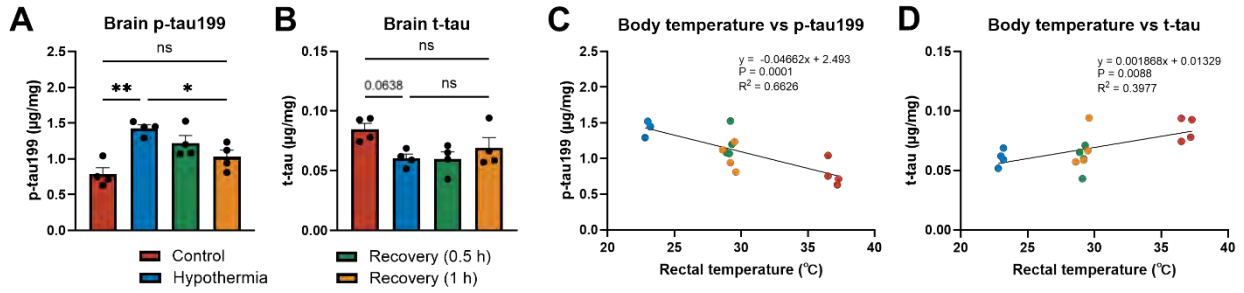


Figure 3. (A) Hypothermic mice demonstrated a significant increase in p-tau199 levels in the brain compared with the control mice. Subsequent heating for an hour normalised p-tau199 levels in a time-dependent manner. (B) Hypothermia induced a reducing trend of t-tau levels in the brain. (C, D) Brain p-tau199 levels were correlated with the rectal temperature negatively. Meanwhile, a positive correlation was observed between t-tau levels and body temperature. Data were mean±SEM (n=4 mice/group). One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$.

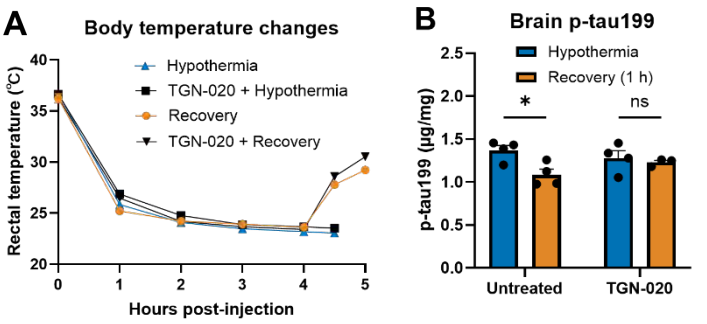


Figure 2. (A) TGN-020 pretreatment had no effect on body temperature changes during hypothermia and its recovery. (B) TGN-020 injection prevented the reduction of p-tau199 levels after heating for an hour. Data were mean±SEM (n = 3-4 mice/group). One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. $^{*}p<0.05$.

【考察と今後の展望】低体温状態から体温を上昇させることにより、低体温によって上昇した p-tau199 量は減少を示した。AQP4 の阻害で体温変化に影響は及さなかったものの、体温を温めた個体の p-tau199 量は低体温時と比べて変化しなかった。このことから、AQP4 が低体温からの回復期における p-tau199 のクリアランスに影響を与えていることが示唆された。当該結果をさらに検証するため、脳脊髄液中のタウの解析や長期的に体温を回復させたマウスの解析、p-tau199 以外のリン酸化タウの解析も検討する。さらに、AQP4 に依存しない異なる機序を検討するため、キナーゼやホスファターゼの活性状態の調査も考慮する。

【参考文献】

1. Planel, E. *et al.* Anesthesia Leads to Tau Hyperphosphorylation through Inhibition of Phosphatase Activity by Hypothermia. *J. Neurosci.* **27**, 3090-3097 (2007).
2. Iliff, J. J. *et al.* A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β. *Sci. Transl. Med.* **4**, (2012).
3. Iliff, J. J. & Nedergaard, M. Is There a Cerebral Lymphatic System? *Stroke* **44**, (2013).

マウス脳内出血モデルにおけるCXCL10の病態生理学的機能の探索

認知症科学、 嘉戸俊介（No.26）

【目的】

脳内出血モデルマウスにおいて、免疫細胞の脳組織への浸潤を抑制する新しい治療標的を探索する。

【背景】

脳内出血は、脳血管の破綻により脳実質内に血液が流出し、重篤な運動機能障害を引き起こす疾患である。特に酸化ストレスや免疫反応などによる二次性の脳障害に対しては有用な治療薬が存在しない。近年、二次性の脳障害にT細胞の浸潤が関与することが報告されている。

【方法】

C57BL/6J マウスの線条体にⅦ型コラゲナーゼを注入して脳内出血を惹起した後、0，1，3，5，7 日目に real-time RT-PCR でケモカインについて mRNA の発現量を測定した。また、脳内出血惹起後 3 日目に enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)で c-x-c motif chemokine 10 (CXCL10)を定量した。さらに、*Cxcl10* ノックアウト (KO)マウスに脳内出血を惹起し、3 日目まで行動解析を行い運動機能障害を測定した後、蛍光 Nissl 染色により傷害領域の体積と周囲長の最大値を測定した。

【結果】

脳内出血後の脳組織では主に炎症性ケモカインの mRNA 発現量が増加した (**Fig. 1 A**)。脳内出血後の二次性の脳障害において酸化ストレスや神経細胞傷害の点で重要とされる、3 日後における mRNA の発現量変化を Volcano plot で可視化し、いくつかの遺伝子を抽出した (**Fig. 1 B**)。その中でも、T 細胞の浸潤に着目していたという背景から、T 細胞の浸潤を促進するケモカインである *Cxcl10* に注目した。*Cxcl10* は、脳内出血後に高い発現量を維持していた (**Fig. 2 A**)。また、脳内出血を惹起した 3 日後の脳組織では、脳内出血を惹起しなかった群と比較して CXCL10 の量が優位に高かった (**Fig. 2 B**)。さらに、*Cxcl10* KO マウスでは、野生型マウスと比べて脳内出血後の運動機能障害が一部軽減された (**Fig. 3**)。また、傷害領域の体積と周囲長の最大値において *Cxcl10* KO マウスと野生型マウスの間に差はなかった (**Fig. 4**)。

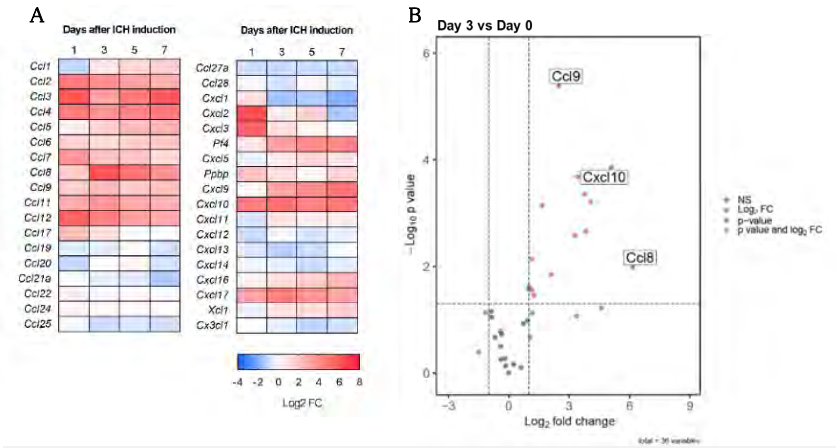


Figure 1. (A) Changes in mRNA expression (Log2 fold change) of chemokines after Intracerebral hemorrhage (ICH) induction. n=3. **(B)** Differentially expressed genes (DEGs) at 3 days after ICH induction compared to Day 0. DEGs were extracted with a p-value ≤ 0.05 and Log_2 FC ≥ |1 |.

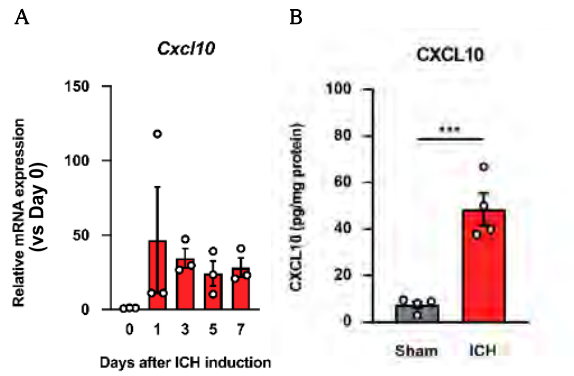


Figure 2. (A) Changes in *Cxcl10* mRNA expression. Mean ± S.E.M., n = 3. (B) CXCL10 protein levels at three days after ICH induction. Mean ± S.E.M., n = 4. *** $p < 0.001$. Unpaired t-test.

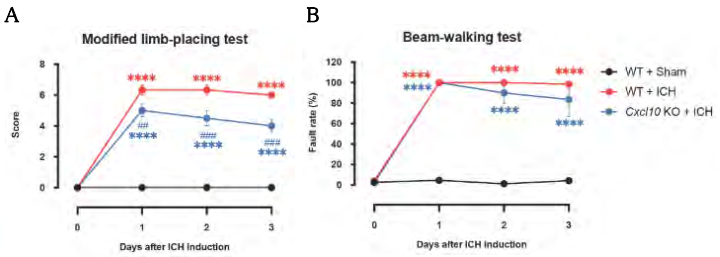


Figure 3. (A, B) Motor dysfunction in *Cxcl10* KO mice and wild-type (WT) mice after ICH evaluated by modified limb placing test (A) and beam walking test (B). Mean ± S.E.M., n = 3 (WT + Sham), 3 (WT + ICH), 4 (*Cxcl10* KO + ICH), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared with WT + Sham, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared with WT + ICH. Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

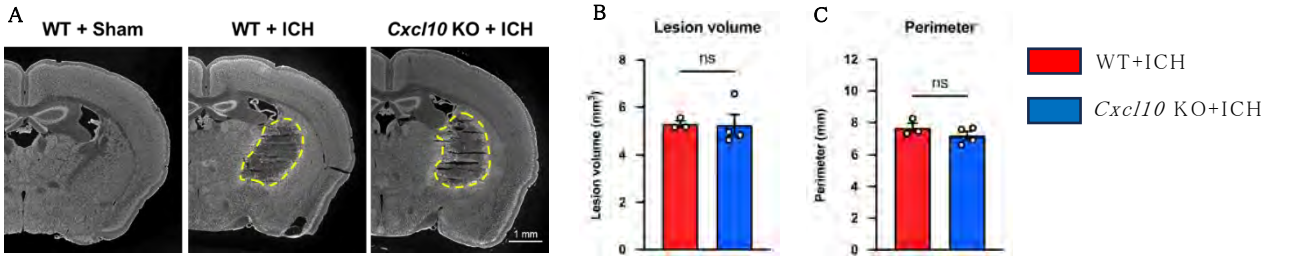


Figure 4. (A) Representative images of brain coronal sections stained with NeuroTrace Red, a fluorescence Nissl staining at three days after ICH induction. Lesion areas were indicated by Nissl-negative regions. Dashed line: Border of hematoma. (B) Lesion volume in *Cxcl10* KO mice and WT mice after ICH. (C) Perimeter in *Cxcl10* KO mice and WT mice after ICH. Mean ± SEM, n = 3-4, ns: not significant. Mann-Whitney U test (B), unpaired t-test (C).

【考察と今後の展望】

脳内出血惹起後の脳組織において、mRNA レベルでもタンパク質レベルでも CXCL10 の発現量は上昇した。また、*Cxcl10* KO マウスでは血腫の大きさに影響することなく、脳内出血後の運動機能障害が一部軽減された。これらから、脳内出血後の脳内では CXCL10 が上昇し、運動機能障害の悪化に寄与していると考えられる。今後、T 細胞の浸潤を免疫染色によって評価することや、脳内でどのような細胞が CXCL10 を産生しているかを *in situ* hybridization を用いて確認することが求められる。

【参考文献】

1. Zhang, X. *et al.* T lymphocytes infiltration promotes blood-brain barrier injury after experimental intracerebral hemorrhage. *Brain Research.* **1670**, 96-105 (2017).
2. Shi, S. X. *et al.* $CD4^+$ T cells aggravate hemorrhagic brain injury. *Science Advances.* **9**, eabq0712 (2023).

新規抗がん剤パルミトイルピペリジノピペリジンの鶏卵漿尿膜法を使った血管新生阻害を評価する至適タイミング

神経毒性学分野　No. 11 伊原啓太

1. 背景と目的

私たちは、天然中鎖脂肪酸のデセン酸（10-HDA）の誘導体である新規化合物パルミトイルピペリジノピペリジン（PPI）がヒトの大腸がん細胞に対して抗がん作用を示すことを明らかにした[1]。インシリコ解析により PPI は転写因子 STAT3 の SH2 ドメインに結合できることが検出され、PPI と SH2 ドメインとの結合は STAT3 の二量体形成を阻害することが示唆された。PPI はリン酸化 STAT3 の発現レベルを低下させ、STAT3 の転写活性を抑制し、STAT3 の標的遺伝子である VEGF(血管内皮増殖因子)の発現レベルを低下させた。PPI は鶏卵漿尿膜の血管新生を抑制することが示されている[2]。

本研究では鶏卵漿尿膜法を用いて PPI 投与時の血管新生阻害作用の至適タイミングを調べた。去年の研究では PPI 投与までのインキュベーション時間の違いがどのように血管新生抑制に影響するかを調べたが、孵卵器でインキュベーションしている時間は同じものの PPI 投与後からインキュベーション終了までの時間が異なっていたため、違いを明確に比較することは難しいという問題点があった。今年度は PPI 投与からカウントまでの時間を 48 時間に統一して実験を行なった。

2. 方法

〈CAM assay〉

鶏の褐色有精卵（後藤孵卵場、岐阜県各務原市）を用いた鶏卵漿尿膜法 chorioallantoic membrane (CAM) assay により血管新生阻害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、午前 9 時に孵卵器に入れ 5 日後の午後 2 時に薬剤を投与する群(125 時間、Group A)、または午後 4 時に孵卵器に入れ 5 日後の午前 9 時に薬剤を投与する群(113 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。

〈CAM の成長曲線〉

鶏の褐色有精卵(後藤孵卵場)を木曜日の午前 9 時(96, 99, 102, 105, 108, 120, 125 時間測定用)または午後 4 時(91,113 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、顕微鏡の接眼レンズにあるメモリにより長半径と短半径を決定し、(面積)＝(長半径)×(短半径)×3.14 とした。面積をシリコンリングの面積で換算して CAM 面積を算出した。

3. 結果

平均血管数は孵卵器に入れて 113 時間のインキュベート後に PPI を投与した Group B の 0 μM PPI では 15.8±3.1 本、10 μM PPI では 9.7±1.7 本 ($p<0.05$)と 39％の

有意な抑制効果が見られた(図 1)。125 時間のインキュベート後に PPI を投与した Group A の 0μM PPI では 18.6±1.7 本、10μM PPI では 14.5±2.4 本 (p<0.0001)と22%の有意な抑制効果が見られた(図 1)。Group A と Group B のどちらのグループにおいても有意差が見られたが、その抑制効果は Group B の方が大きかった。

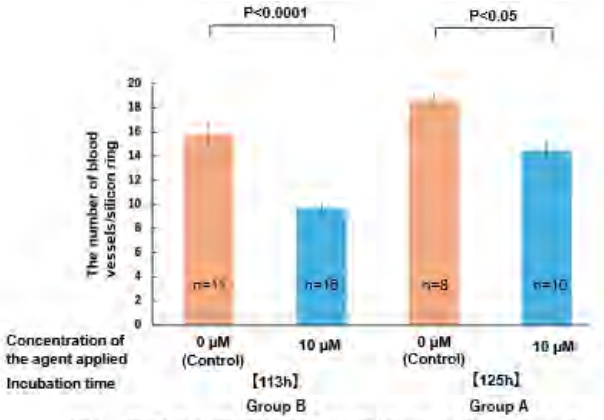


図1 PPIの血管新生抑制作用(Group A, Group B)

CAM はインキュベート開始後 91 時間では観察されず、96 時間から 125 時間まで時間経過とともに CAM の面積は大きくなった(図 2)。また、午前 9 時に孵卵器に入れ 5 日後の午後 6 時に薬剤を投与する群(105 時間、Group C)は CAM の成長曲線から薬剤投与の至適タイミングと考えられたため、上記の CAM assay を行い血管新生阻害作用について調べた。105 時間のインキュベート後に PPI を投与した Group C の 0μM PPI では 16.6±1.4 本、10μM PPI では 11.1±1.3 本 (p<0.05)であり、血管数が 33%有意に減少した(図 3)。

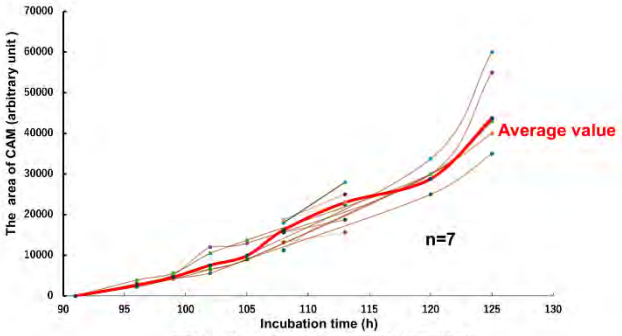


図2 CAM面積の成長曲線(面積)

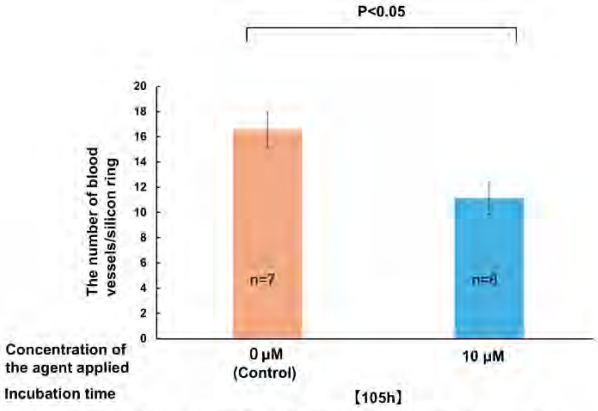


図3 PPIの血管新生抑制作用(Group C)

4. 考察

CAM assay の結果より、薬剤を投与するまでの培養時間が CAM の成長と PPI の血管新生阻害作用に影響することが示された。CAM 面積については顕微鏡の接眼レンズに付随したメモリで短径と長径を測定しシリコンリングとの比較により換算して CAM 面積を算出したため実際の CAM の大きさと乖離がある。CAM 面積の測定・算出方法については検討が必要である。CAM の成長曲線は 105 時間以降で顕著な増加を示しており至適タイミングと考えられる。CAMの面積が小さい時期に PPI を投与した方がより高い効果を示すことが推測されたためインキュベート開始後 105 時間で PPI を投与したが、その抑制効果は 113 時間と同程度だった。今後の課題はインキュベーション時間の詳細な条件検討をすることでより最適なインキュベーション時間を探索することである。

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.

サイズと表面修飾に依存するシリカナノ粒子のミクログリア細胞に対する毒性

神経毒性学分野
33 番 小出一貴

【背景と目的】シリカナノ粒子は二酸化ケイ素から成る粒子で薬物送達としての活用が期待されている。シリカナノ粒子は粒子径が小さいと血液脳関門を通過し中枢神経系を障害する。ミクログリアは中枢神経系グリア細胞の一種であり、異物に応答して炎症性のサイトカインやケモカインを放出する。先行研究においてマクロファージにサイズや表面官能基の異なるシリカナノ粒子を添加すると異なる活性を示した[1]。本研究ではシリカナノ粒子のサイズと表面官能基を変えてミクログリア細胞に対する毒性を評価した。

【方法】ミクログリア細胞株 6-3 を 3 種類の緑色蛍光シリカ（3 μm-Plain, 50 nm-Plain, 50 nm-NH_2）の存在下または非存在下で培養した。これらのシリカの最終濃度を 100 μg/ml とした。シリカに 24 時間曝露させたときの生細胞数、死細胞数を WST/LDH assays で、細胞内で何が起こっているのかを知るために RT-PCR で 6 時間曝露時における炎症性因子（iNOS, MIP2, IL-1β）の mRNA 発現レベルを測定した。また、ミクログリアは貪食能を有するので 3 μm-Plain を食作用で、50 nm-Plain, 50 nm-NH_2 を飲作用で取り込んでいる可能性を考えた。EIPA（マクロピノサイトーシス阻害剤）を用いて 3 時間曝露時における 50 nm-Plain, 50 nm-NH_2 の取り込み量をフローサイトメーターで調べた。またこの時の iNOS, MIP2, IL-1βの mRNA 発現レベルを調べた。

【結果】WST/LDH assays により 50 nm-Plain の毒性が最も大きいことが分かった（図 1）。iNOS, MIP2, IL-1β の mRNA 発現レベルの解析では、3 分子すべてにおいて 50 nm-Plain における mRNA 発現レベルが最も高かった（図 2）。ナノサイズシリカに対するマクロピノサイトーシスによる取り込みの関与を検討してみたところ、EIPA 存在下で 50 nm-Plain, 50 nm-NH_2 に対するシリカの取り込み蛍光強度が低下した（図 3）。また、EIPA 自体の毒性により細胞が死滅して細胞内に取り込まれたシリカが細胞外に漏れることで蛍光強度が下がっているのではなく、細胞が生存している状態でシリカの取り込み量が EIPA によって抑制された。50 nm-Plain における MIP2, IL-1βの mRNA 発現レベルが EIPA により大きく抑制された。Control における MIP2, IL-1βの mRNA 発現レベルが EIPA により顕著に増加した（図 4）。

【結論】シリカはマイクロサイズよりもナノサイズのほうが毒性は大きかったが、NH_2 で表面修飾することで毒性を弱めることができた。炎症性因子の発現量の増大はシリカ曝露による細胞毒性と相関が見られたことから炎症性因子の産生により細胞死が起きた可能性が示唆された。ミクログリア細胞においてナノサイズのシリカの取り込みが一部マクロピノサイトーシスを介していることが示唆された。EIPA をマクロファージにおける適正濃度で用いたところ EIPA 自体の毒性により多くの細胞死が起きた。ミクログリア細胞での適正濃度や異なる阻害剤で検討する必要がある。

【参考文献】

[1] Inoue M et al. Size and surface modification of silica nanoparticles affect the severity of lung toxicity by modulating endosomal ROS generation in macrophages. *Part Fibre Toxicol* 18(1):21 (2021).

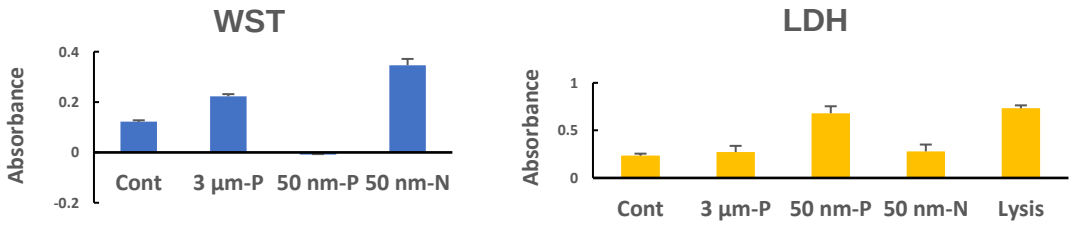


図 1 ：24 時間曝露時の WST/LDH assays

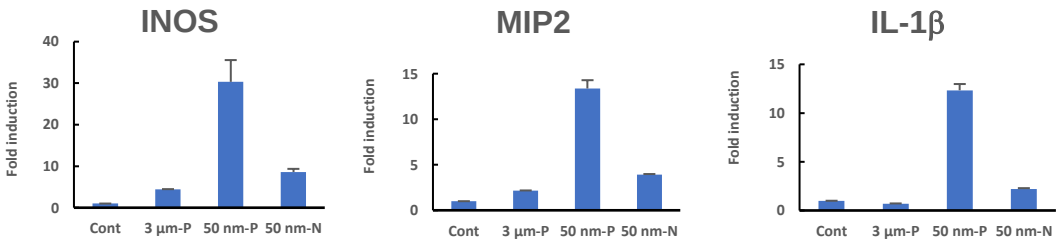


図 2 ：6 時間曝露時における iNOS, MIP2, IL-1β の mRNA 発現レベル

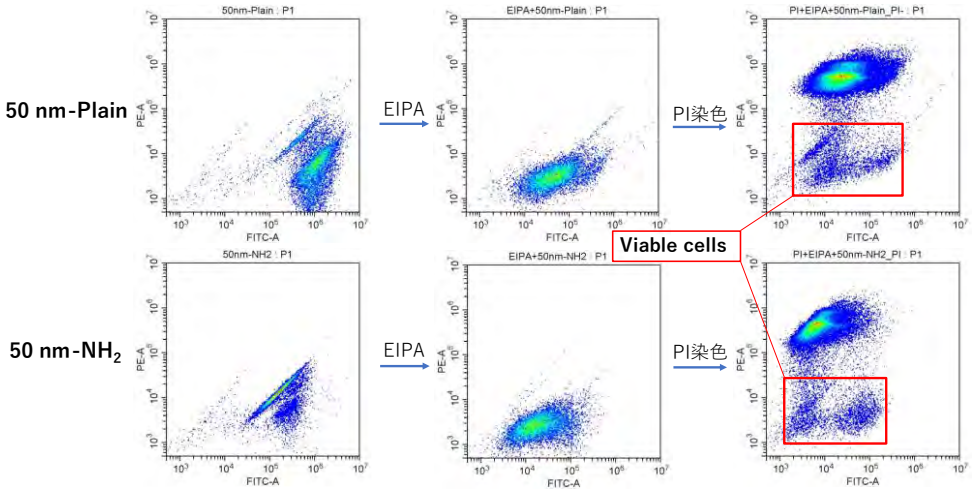


図 3 ：3 時間曝露時のナノサイズシリカの取り込み

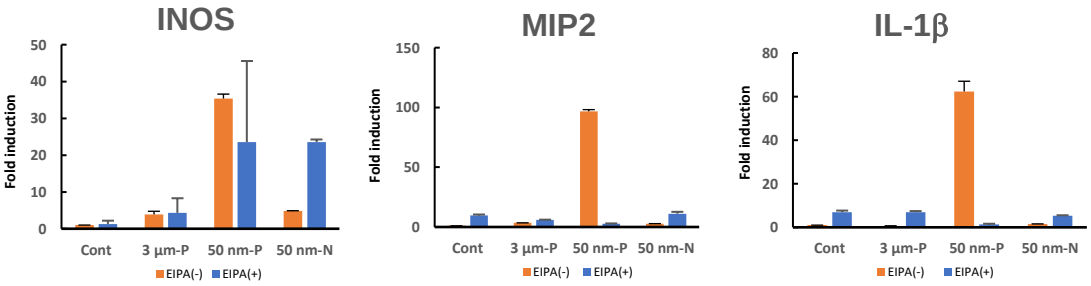


図 4 ：3 時間曝露時における iNOS, MIP2, IL-1β の mRNA 発現レベル

放射線照射と短期高脂肪餌のマウス肝への影響

放射線医学研究所　放射線影響予防研究部
神経毒性学分野
No.37　児玉奈緒

【背景】
放射線医学研究所での先行研究により、幼若期のマウスへの放射線照射は肝がんのリスクを増加させることが明らかとなった。また、放射線照射後は、肝臓組織に脂肪の蓄積がみられた(1)。しかしながら放射線照射後に高脂肪餌を与えると肝にどのような影響を及ぼすかがまだわかっていない。短期高脂肪餌のマウス肝に対する影響を解析するために以下の実験を行った。

【方法】
8 日齢の B6C3F1 雄マウス(528 匹)を 4 群に分け 0 Gy または 4 Gy のγ線を照射し、その後 29 日齢から 56 日齢の間、高脂肪餌または通常餌を与えた。また、28 日齢から 84 日齢まで 7 日毎に、100 日齢から 500 日齢まで 100 日毎に解剖し、肝臓組織を採取した。今回の解析においては、各タイムポイントで 1 匹ずつ、計 56 匹のマウスを用いた。切り出したマウス肝臓組織をパラフィンに包埋し、ミクロトームで薄切切片を作製した。その後、細胞増殖マーカーの Ki-67、細胞老化マーカーの p21、p16、繊維化マーカーのαSMA、炎症性サイトカインマーカーの TNFα、IL-8、IL-6 を用いて免疫組織化学染色を行った。染色した切片をデジタル画像化し、5 か所無作為に選び、Ki-67、p16、p21、IL-6 は陽性細胞数をカウント、TNFα、αSMA、IL-8 に関しては発現の局在を確認することで解析した。

【結果】
Ki-67、IL-6、TNFαは放射線照射の有無、高脂肪餌の有無にかかわらず、陽性細胞はほとんどみられなかった。αSMA は放射線照射の有無、高脂肪餌の有無にかかわらず、陽性細胞はみられたが群間での違いは見られなかった(図 1)。これは、活性化型肝星細胞(2)が染色された可能性がある。線維化の確認は、コラーゲン染色をする必要があると考えられる。p21 陽性細胞がいずれの群でもみられ、陽性細胞数を照射群と非照射群で比べたところ、照射群が少し多い傾向にあった(図 2)。p16 陽性細胞はいずれの群でもみられるが、各群で差があるとは言えなかった(図 3)。IL-8 は高脂肪餌を与えている期間に、肝全体に発現が多くみられた。また、高脂肪餌の終了後一週間後までは発現がみられたが、その後 70 日、77 日と徐々に減少していく傾向にあった(図 4)。高脂肪餌による IL-8 の発現を検討する必要がある。

【まとめ】
今回の結果は免疫組織化学解析の最適な染色条件を決定するための有用な情報を提供することができた。

【謝辞】
本研究をサポートして頂きました量子科学技術研究開発機構　放射線医学研究所放射線影響予防研究部の皆様に深く感謝致します。

【参考文献】

(1) Ionizing radiation promotes, whereas calorie restriction suppresses, NASH and hepatocellular carcinoma in mice Shang, Morioka, Kakinuma et al. Int J Cancer 153:1529-1542, (2023)

(2) アルコール性脂肪肝炎の治療標的としての 肝星細胞の活性化機序 土田 琢磨 日薬理誌(Folia Pharmacol. Jpn.) 154:203-209,(2019)

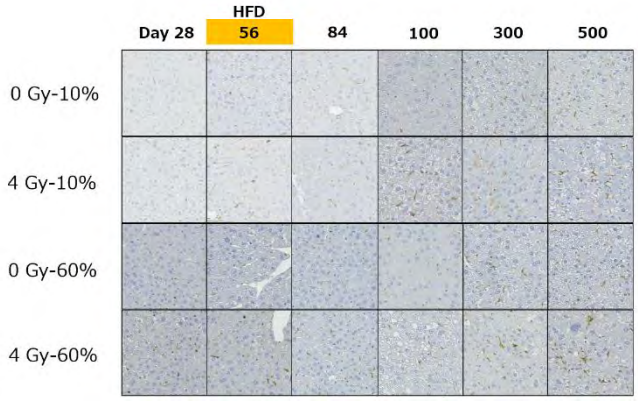
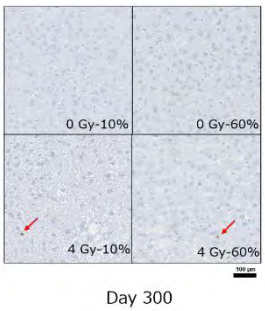


図 1. αSMA の免疫組織染色



Day 300

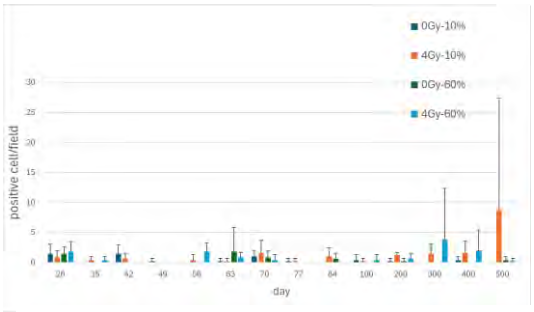
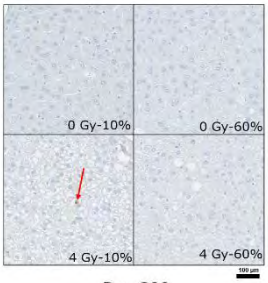


図 2. 各日齢における p21 陽性細胞数



Day 300

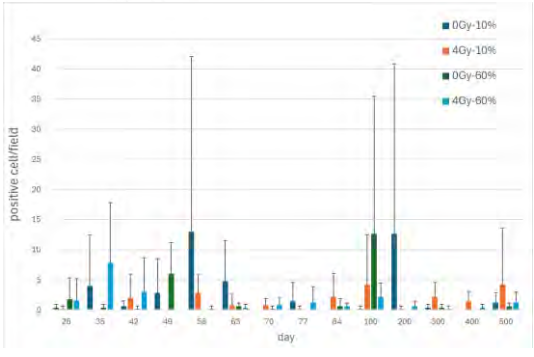


図 3. 各日齢における p16 陽性細胞数

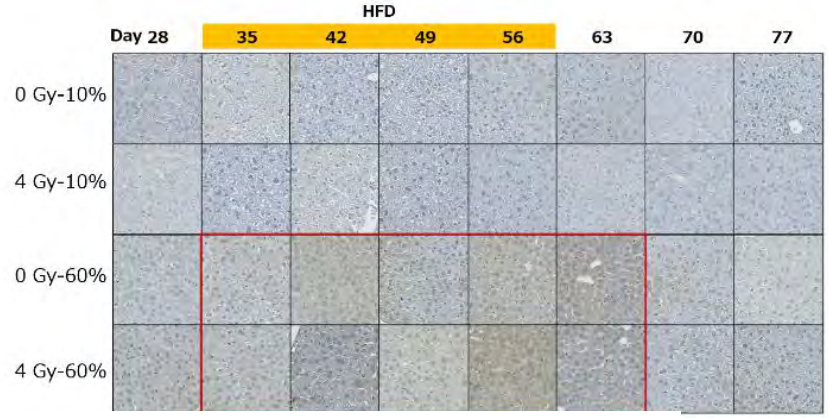


図 4. IL-8 の免疫組織染色

異なる 3 種類の回収法に基づくエクソソームの特性

神経毒性学分野　長谷田光喜　65

【背景・目的】
エクソソーム(SEV)とは後期エンドソーム膜の出芽により形成され、さらに多胞性エンドソームが細胞膜と融合することで完全な粒子を形成しエキソサイトーシスにより細胞外へ分泌される細胞外小胞のことである。SEV は体内の細胞間コミュニケーションや組織間のクロストークにおいて重要な役割を果たす。現在 SEV を回収する様々な方法が開発されている一方で SEV の特性が回収法によって異なる可能性があるため、今回は異なる 3 種類の方法(超遠心法(UC)、限外濾過法(UF)、PS アフィニティー法(PS))で回収した SEV の特性を評価した。

【方法】
コントロール群(N)、lipopolysaccharide(LPS)、カルモジュリン阻害剤(W13)、またはその両方(LPS+W13)を加えた 4 種の RAW-Blue 細胞由来の培養液を用意した。この RAW-Blue 細胞とはマクロファージ細胞株の RAW264.7 細胞をベースとした細胞である。遠心分離によって細胞や大きな小胞を除去し、その後に限外濾過法を介して濃縮したサンプルから UC、UF そして PS の 3 種類の回収法で SEV を集めた。それぞれの回収法で集めた SEV の粒子数と粒子径を Nanotracking analysis(NTA)法で、タンパク量を BCA 法で、CD63,CD9,CD81 といったエクソソーム関連タンパク質の含有量を Western blotting で調べた。
UC; SEV を 110000×g で沈降させて 2 回 PBS で洗浄した。
UF;膜の種類と孔径の異なる多孔質膜を用いて、特定のサイズの粒子を補足する方法。表面に無数の小さい穴が開いているメッシュが充填されたカラム(qEV 35nm、IZON)を用いた。SEV より大きい粒子はメッシュで遮られるため通過が遅く、SEV より小さい粒子はメッシュの表面の穴に入るため通過が遅くなる。この原理を利用しちょうど SEV が落ちてくるタイミングで回収した。
PS;細胞外小胞の膜に多く含まれているホスファチジルセリンに結合するタンパク質と磁気ビーズを利用する方法。まず Streptavidin Magnetic Beads と Biotin-labeled Exosome Capture を固定化し SEV を捕まえる。次に Washing Buffer を用いてこの SEV 結合ビーズを洗浄して最後に Exosome Elution buffer を用いて SEV を溶出した。

【結果】
NTA 法によって N、LPS、W13、LPS+W13 それぞれの場合の SEV の粒子数を調べると、UF で回収した SEV の粒子数が他の方法と比べて多かった(図 1)。また、平均粒子数を調べると、UC で回収した SEV の平均粒子径が大きい傾向にあった(図 2)。BCA 法によって SEV のタンパク量について調べると、UC で回収した SEV のタンパク量が多い傾向にあった(図 3)。Western blotting で SEV 中のエクソソーム関連タンパクについて調べると、CD63 のタンパク含有量は PS、UF、UC の順で多く、CD9 のタンパク含有量は LPS を加えるとその順と異なり UF、PS、UC の順で多くなった(図 4)。CD81 についてはバンドが検出されなかった。

【考察】

本研究では、SEV の分離方法の違いにより回収される SEV の性質が異なることが明らかとなった。 医療や研究などで SEV を使用するのに際し特定の性質を有する SEV を収集する必要があるため、本研究成果は目的に応じて回収方法を選択するための有益な情報になると考えられた。

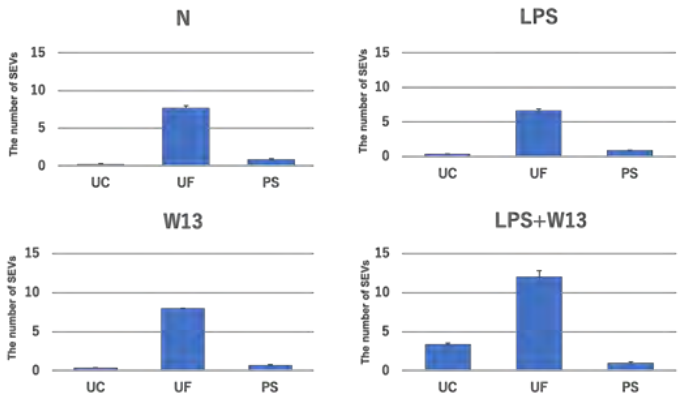


図１　SEV の平均粒子数

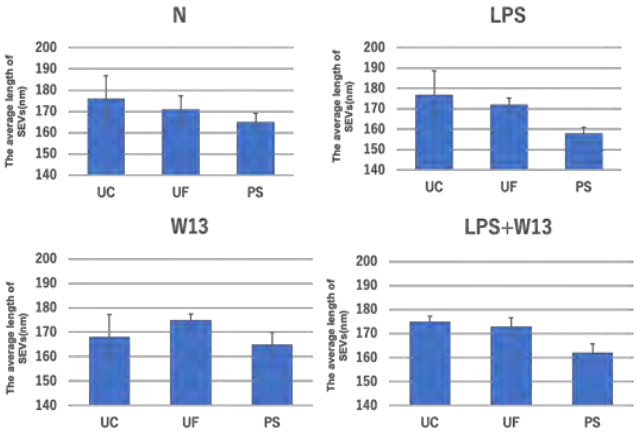


図２　SEV の平均粒子径

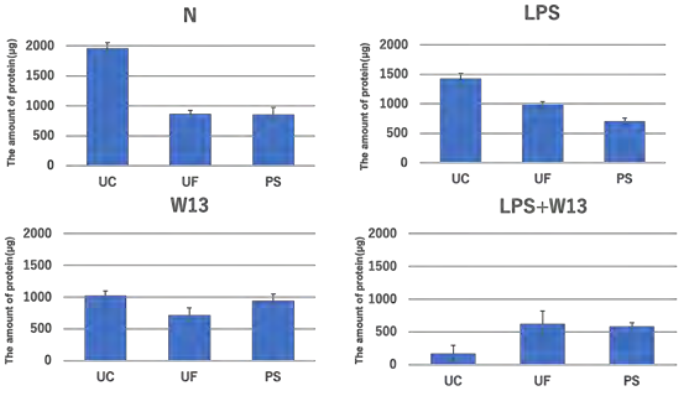


図３　SEV10^{10} 個あたりのタンパク量

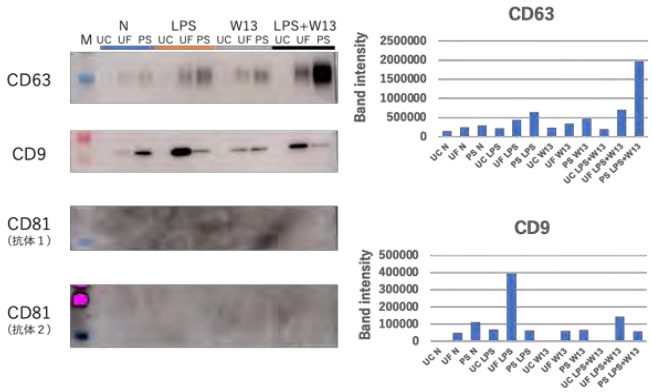


図４　エクソソーム関連タンパクの含有量

胚操作によるラット生殖技術の確立

病態モデル医学分野　河合莉瑚(No.27)

【目的】

ラットを用いて受精卵の移植を行うこと、その技術を用いて遺伝子欠損ラットを作成すること

【背景】

ラットは長い間実験動物として多用されてきたものの、マウスと比較して胚操作技術が安定せず遺伝子改変ラットの作成や維持が困難だった。一方でラットの体外受精や配偶子の凍結保存等の報告が散見されるようになり、その生殖工学技術は少しずつ進歩してきている。そのため各動物施設で、ラットの生殖技術を安全で確実にすることが今求められている。

【方法】

ドナーとなるメスの Long-Evans6 匹を用意して、PMSG と hcg を腹腔内注射しホルモン処理を行い、同日の夜にオスの Long-Evans と交配させ、採卵した。一方でメスの Wister-Imamichi 5 匹を用意し仮親を作成した。胚移植後に黄体を維持し胚が子宮に着床するためには、オスとの交尾刺激が必要だが、本研究では精管結紮オスラットによる交尾刺激のかわりに EGET を用いて膣にバイブレーション刺激を与えることで偽妊娠状態を作成した。偽妊娠状態の Wister-Imamichi 3 匹にドナーである Long-Evans から採卵した受精卵を移植した。

本研究では遺伝子欠損ラットの作成に向けた第一歩として、ラットからの採卵とその採卵した受精卵を仮親ラットへ移植した。移植後、仮親ラットの子宮内に胎仔を確認できたため、次に本研究の本来の目的である遺伝子欠損ラットの作成に取り組んだ。雌の Long-Evans から採卵した受精卵に CRISPR/Cas9 複合体を電気的に導入し、その受精卵から取り出した前核期胚を偽妊娠状態の雌の Wistar-Imamichi に移植した。本実験では、電気パルスを発生させるエレクトロポレーターを用い、一回目の強い電気パルスで細胞膜の穿孔を行ったのちに二回目の弱い電気パルスで穿孔箇所から核酸を効率的に胚内に導入するという二段階の電気パルス条件で胚への核酸導入を試みる TAKE 法を使った。この結果、核酸導入後の胚はほぼすべてで生存しており CRISPR/Cas9 複合体を電気的に導入することに成功した。

【結果】

	ID	Number of egg	abnormal	unfertilized	Fertilized
Donor	A	19	0		
	B	20	1		
	C	17	0		
	D	11	6		
	E	13	0		
	F	13	2		
	total	93	9	15	69

Table.1 retrieve fertilized eggs

	No.	The number of TF(left/right)	The number of embryos
TF Rats	1	10/10	0
	2	15/15	5
	3	10/10	2
	total		7

Table2. implant fertilized eggs into rats

【考察】

① 採卵について

採卵結果の表(Table1)より全体の採卵数に対して得られた受精卵数の割合は正常だった。雌ラットに行った排卵誘発のためのホルモン注射や、雄ラットとの交配については問題なく行われたと考えられる。一般的に一匹の雌ラットから得られる受精卵数は 20-50 個ほどといわれているのに比べて本研究で得られた受精卵数が少なくなっている。これは全体の採卵数が少ないところに起因すると考えられる。採卵を行う際に、卵管還流が不十分ですべての卵を流しきれなかったことや、卵管還流は十分だったものの卵管還流後に卵管にへばりついていた卵を見逃してしまったことなどが全体の採卵数を少なくした原因だと考察した。

② 偽妊娠について

卵管膨大部を刺激する EGET を用いて実験を行ったところ、5 匹中 4 匹の卵管膨大部を腫脹させ偽妊娠状態にすることに成功した。参考にした論文と比較して同等の割合であったため、期待通りの結果が得られたといえる。卵管膨大部が腫脹しなかった一匹に関しては、器具の挿入具合が不十分で卵管膨大部に十分な刺激を与えられなかったことが原因だと考えられる。精管結紮雄マウスを使用せずとも、短時間で偽妊娠状態のラットを作成することができた。

③ 移植について

卵管膨大部に移植した胚に対して 50%ほどの数の胎仔が生まれるのが一般的だが、移植した胚の数に対して胎仔数が少ない結果になった。マウスに比べてラットでは卵管膨大部周囲の脂肪組織が多いため卵管膨大部に移植する際のアクセスがうまくいかなかったこと、移植作業に時間を要したため、採取した受精卵から取り出した胚を外部環境にさらしている時間が長くなってしまい胚に大きなダメージを与えてしまったことなどが原因と考えられる。

【参考文献】

・Kaneko T, Endo M, Tsunoda S, Nakagawa Y, Abe H. Simple induction of pseudopregnancy by artificial stimulation using a sonic vibration in rats.

・Endo M, Tsunoda S, Tawara H, Abe H, Kaneko T. Successful pseudopregnancy of rats by short period artificial stimulation using sonic vibration.

胚操作によるラットの生殖技術の確立

病態モデル学分野　西村小町 出席番号 62

【背景】

ラットは長い間実験動物として研究に多用されてきたものの、マウスと比較して胚操作技術が安定せず、遺伝子改変ラットの作製や維持は困難だった。そのため各動物施設でラットの生殖技術を安全で確実にすることが今求められている。

【目的】

本研究では、ラットを用いて受精卵の移植を行うこと、また最終的にはその移植技術を用いて KO ラットを作製することを目的とした。

【方法】

(1)メスの Long-Evans 6 匹をホルモン処理して採卵

(2-1)メスの Wister-Imamichi5 匹をインピーダンスチェックにて前発情期であると確認

(2-2)E-GET で Wister-Imamichi5 匹の卵管膨大部を腫脹させ偽妊娠状態を作製

(2-3)Long-Evans から採取した卵を Wister-Imamichi に移植

【結果】

〈実験 1〉排卵誘発および交配・採卵

	ID	Number of egg	abnormal	unfertilized	Fertilized
Donor	A	19	0	15	69
	B	20	1		
	C	17	0		
	D	11	6		
	E	13	0		
	F	13	2		
	total	93	9		

〈実験 2〉仮親作製

EGET を用いて刺激を与えたメスの Wister-Imamichi5 匹のうち、4 匹において卵管膨大部の腫脹が見られた。

〈実験 3〉胚移植

	No.	The number of TF(left/right)	The number of embryos
TF Rats	1	10/10	0
	2	15/15	5
	3	10/10	2
	total		7

【考察】

〈実験 1〉排卵誘発および交配・採卵

受精卵の割合は正常であることからオスや排卵誘発については問題はなかったといえる。一方で、受精卵数は少なかったことから、卵管環流が不十分であったことや環流後の卵管の付着物の除去不足が考えられる。

〈実験 2〉仮親作製

8 割のラットにおいて偽妊娠に成功し、他の論文と同様の成功率が得られた。精管結紮マウスを使わない偽妊娠に成功したといえる。

〈実験 3〉胚移植

移植した受精卵数に対して胎仔数が少なくなった。これはラットがマウスと比較して卵管膨大部周囲の脂肪組織が多く、卵管膨大部へのアクセスが悪かったためだと考えられる。また、移植に時間を要してしまい、胚が外部に晒されることでのダメージが大きかったことも原因として考えられる。

【参考文献】

KN-595 偽妊娠ラット作製器具 EGET 取扱説明書

株式会社夏目製作所 https//www.nazme.co.jp

胚操作によるラットの生殖技術の確立

病態モデル医学分野　村上海斗

目的

ラットを用いて受精卵を作製すること。
最終的にはKOラットを作製すること。

背景

ラットはマウスと比較してよりヒトに近いと考えられており、ヒトのモデル生物として応用されてきたが、胚操作技術が安定せず遺伝子改変ラットの作製が困難だった。
そのため、各動物施設ではラットの胚操作技術を安定させることが求められている。

方法

①ラットをドナーとレシピエントに分けて実験を行う。

・ドナー

Long-Evansと呼ばれる系統の雌ラット6匹に対してPMSGを投与し、卵胞の成熟を促し、約44時間後にHCGを投与し、排卵を促す。
その後、雄のラットとmateさせ、翌日に採卵を行った。

・レシピエント

Wistar-Imamichiと呼ばれる系統の雌ラットの中からインピーダンスチェックによって前発情期の個体を5匹ピックアップした。
その後、5匹のラットに対してEGETによって膣に刺激を与え、卵管膨大部を腫脹させ偽妊娠ラットを作製した。

②ドナーから採卵した受精卵をレシピエント3匹の左右の卵管に10～15個ずつ移植し、妊娠後期にラットの腹部を開き胎仔が存在するか確認する。

③この技術を用いて、エレクトロポレーターによって二段階パルスを加え、ある遺伝子に対するKOラットを作製する。

結果

	ID	Number of egg	abnormal	unfertilized	Fertilized
Donor	A	19	0	15	69
	B	20	1		
	C	17	0		
	D	11	6		
	E	13	0		
	F	13	2		
	total	93	9		

Table1 採卵の結果

	No.	The number of TF(left/right)	The number of embryos
TF Rats	1	10/10	0
	2	15/15	5
	3	10/10	2
	total		7

Table2 移植の結果

採卵の結果、各個体からの採卵数が通常20～50個のところ、10～20個と少なく、このうち受精卵の割合は正常であった。(Table1)
また、EGETによるバイブレーションで5匹中4匹の卵管膨大部の腫脹に成功した。これは先行研究と比較して同程度の割合であった。

さらに、移植の結果 3 匹中 2 匹に計 7 匹の胎仔が確認できたが、通常移植数に対して 50％ほどの胎仔が確認できるのが望ましいところ、10％ほどしか確認できなかった。(Table2)

KO ラットに関して、操作は問題なく行われ、近日誕生が期待される。

考察

・採卵について

受精卵の割合は正常だったことから、雄ラットや排卵誘発の操作については問題がなかったと言える。しかし、母数となる卵の数が少なかった。

原因として考えられるのはバッファーでの卵管還流が不十分であったことや、還流後に卵管に付着した卵を除去し切れなかった事が挙げられる。

・偽妊娠について

こちらは偽妊娠ラットの作製率は先行研究と比較して同程度であったため、成功と言えるが、卵管膨大部が腫脹しなかった 1 匹について言えるのは EGET の差し込みが不十分であり、十分な刺激を与えることができなかったということである。

・移植について

移植した受精卵数に対して胎仔数が少なかった理由として考えられるのは、ラットはマウスと比較して卵管膨大部周辺の脂肪組織が多いため、卵管膨大部へのアクセスが悪くなってしまっていた点と、移植操作に慣れず時間を要してしまったため、胚を外部にさらしていた時間が長く、ダメージを与えてしまった可能性が考えられる。

謝辞

本研究にあたりご協力くださった大石先生をはじめ、実験動物研究教育センターの職員の方々にお礼申し上げます。

ZFTA 型上衣腫の増殖に関わる YAP1シグナルの解明

腫瘍・神経生物学　泉響子　No.5

目的・背景

個別化治療のためにはがんの分子的な分類とがんシグナルの同定が重要である。上衣腫は以前、その発生部位や組織学的特徴に基づいて病理学的に分類されてきたが、最近では DNA メチル化プロファイルに基づく分子分類が主流である。 DNA メチル化は遺伝子発現の調節に関与しており、実際にこの分類ごとに遺伝子発現や、変異の種類、予後が異なることが明らかになりつつある。本研究では、この中でも我々は特に予後が悪いとされる、ZFTA 型上衣腫に注目する。

2014 年、ヒト全ゲノムシーケンスにより、テント上上衣腫 20 検体中 16 検体で、特徴的な ZFTA–RELA 融合遺伝子を発現していることが報告され、当ラボの研究成果をもとに、2021年に ZFTA 型上衣腫として新たに分類されるようになった。

我々はその中で、「融合遺伝子は単独でがんを誘導し、腫瘍の増殖や悪性化に関与している」ことを示したが、ZFTA 型上衣腫は高悪性度で再発リスクが高いことが特徴であるため、この融合遺伝子の発がんシグナルを解明し、治療標的を明らかにすることが求められている。

ZFTA型上衣腫細胞株 EP1NSを用いてFDA認可薬によるハイスループットスクリーニング（HTS）を行った結果、がん細胞を有意に減少させたとして、YAP 阻害剤である Verteporfin が同定された。そこで、shRNA によって YAP1 をノックダウンすると YAP1 下流の遺伝子発現が抑制されることがわかった。

さらに我々の先行研究で、HTS から Dioscin と Ponatinib という薬剤も同定され、がん細胞を有意に減少させていた。

そのため、ZFTA 型上衣腫においてこれらの薬剤のメカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。

方法

上衣腫細胞株に Dioscin/Ponatinib を投与し、YAP1 の下流遺伝子である CYR61、CTGF の qPCR を行った。また、YAP1 抗体による免疫蛍光染色を行った。

結果

ZFTA 型上衣腫において YAP1 の核移行を抑制することで YAP1 の下流遺伝子の発現（図1）、核移行(図2)が抑制されることがわかった。

考察

当研究室の研究により、ZFTA 型上衣腫で shRNA を用いて L1CAM をノックダウンすると、がん細胞の増殖が低下し、細胞死が増加することが明らかになった。また文献により、Dioscin/Ponatinib が、SRC の阻害剤として共通の働きを持っていることがわかった。このため、ZFTA 型上衣腫におけるがんのメカニズムとして、「L1CAM が SRC を活性化させ、SRC が YAP1 の分解を抑制性に制御し、核移行する YAP1 の発現が上昇し、発がんシグナルが増強される」という仮説を考えている。

今後は、近年報告された特異的な SRC の阻害剤 eCF506 を、国際共同研究として用いることでこの仮説を検証していく予定である。

参照

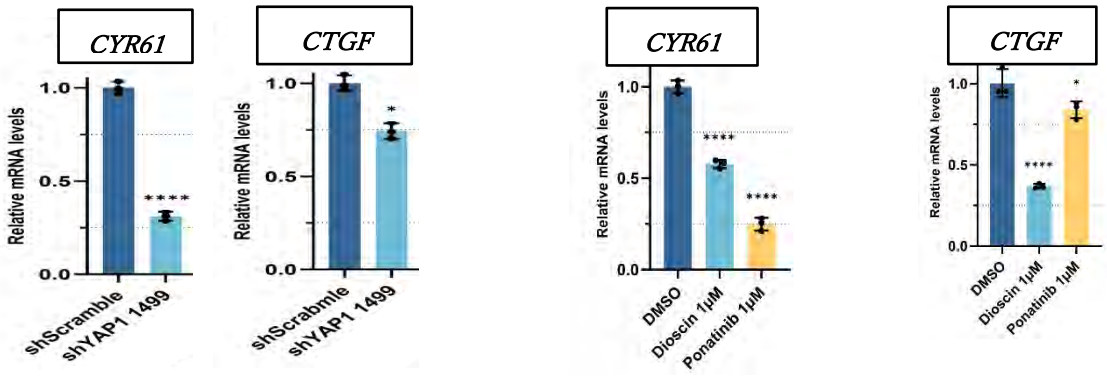


図1　Dioscin/Ponatinib によって YAP1 の下流遺伝子の発現が抑制される

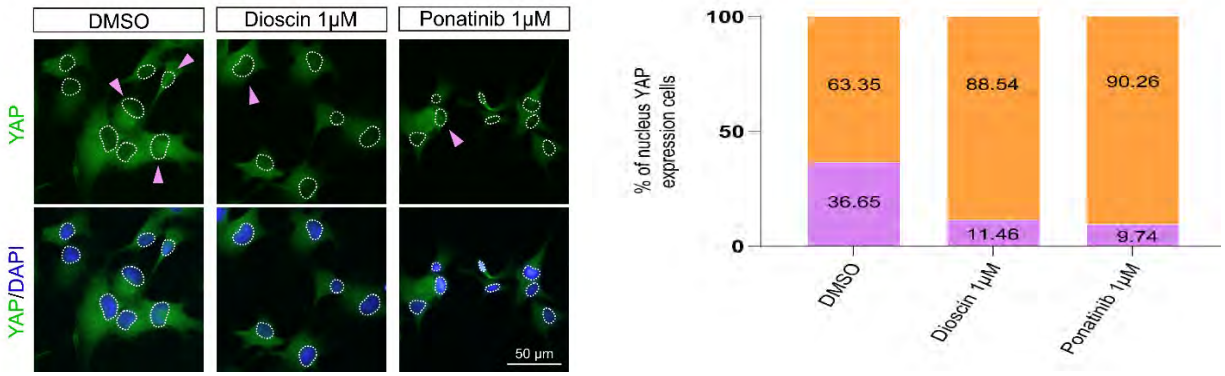


図2　Dioscin/Ponatinib によって YAP1 の核移行が抑制される

・Parker et al., Nature 2014
・Zheng et al. Cancer Discovery. 2021
・Louis et al. Neuro Oncol. 2021.
・Hanxia Li, et al., OncoTargets Ther. 2018.
・William R. N. Davidson, et al., Blood. 2012
・Carolin Temps et al.,　Cancer. Res. 2021

SHH 型髄芽腫における *Fosl2* の機能と神経刺激による発現制御機構

腫瘍・神経生物学分野　岩田浩希(13 番)

〈背景〉

脳腫瘍はニューロンやグリア細胞に囲まれた独特な環境で発生する。最近、ニューロンと腫瘍細胞の相互作用が、腫瘍の成長に関わるメカニズムとして注目されている[1,2]。しかし、神経活動やそれに関連する分子が細胞増殖や腫瘍形成の初期段階にどのように寄与するかは、まだ詳しく解明されていない。そこで我々は、腫瘍形成過程が既知であるソニックヘッジホッグ(SHH)型髄芽腫(MBSHH)の Ptch1 欠損モデルを用いて実験を行った[3]。

最初期遺伝子(IEGs)は、神経活動によって迅速に誘導される遺伝子群である。我々は、IEGs が MBSHH の腫瘍形成に重要な役割を果たす可能性がある、という仮説を立てた。以前のマイクロアレイ解析では、IEGs のひとつである Fosl2 の発現が、起源細胞(小脳顆粒細胞前駆体、GNPs)と比べて腫瘍細胞で有意に上昇していることがわかった。また、Fosl2 のノックアウトにより腫瘍形成が抑制されることも明らかにした[4]。そこで本研究では、神経活動が GNPs での Fosl2 発現を促進するかどうかを調べた。

〈目的〉

髄芽腫の起源細胞に神経伝達物質を添加することで電気的活動を誘導し、*Fosl2* の発現が上昇するかを観察した。今回は人為的な電気的活動をほどこすためにグルタミン酸刺激を行った。

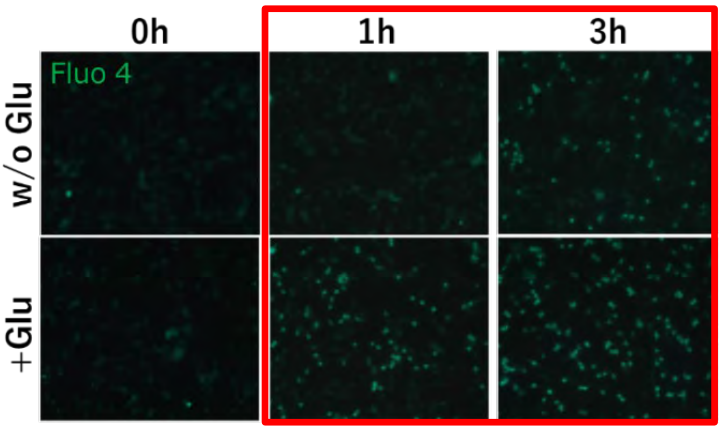
〈方法〉

最初に生後 7 日齢の野生型 ICR マウスから小脳を摘出し、密度勾配遠心法を使うことで目的の GNPs を単離した。2 日間培養した後、Fluo 4(カルシウムインディケーター)を添加し、次いでグルタミン酸刺激を行い、蛍光顕微鏡を用いて細胞内カルシウムイオン(Ca^{2+})イメージングを行った。Fluo4 は Ca^{2+}が結合すると緑色に光るため、神経活動に伴う細胞内 Ca^{2+}の上昇を視覚的にとらえることが出来る。また、同条件で培養およびグルタミン酸刺激した GNPs を用いた qPCR を行うことで、刺激前後の *Fosl2* の発現を比較した。さらに、グルタミン酸刺激による *Fosl2* の発現上昇が、刺激後の細胞内 Ca^{2+}の上昇に依存しているかを調べるため、Ca^{2+}キレート剤 BAPTA を添加してからグルタミン酸刺激を行った GNPs を用いた qPCR を行った。

〈結果(図・表)・考察〉

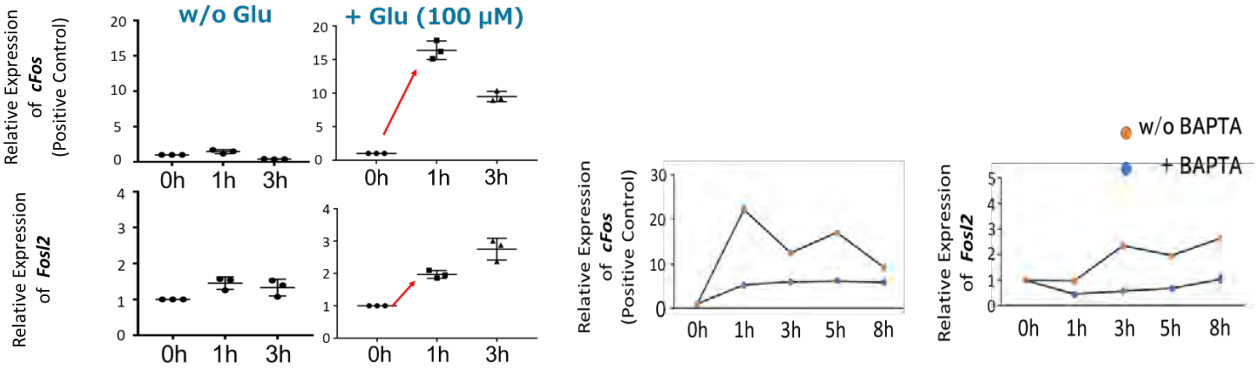
細胞内 Ca^{2+}イメージング

刺激前(0h)は蛍光の強さに差がなかったが、1, 3 時間後にはグルタミン酸刺激を行った群が強く光っていた。この結果より、グルタミン酸刺激の1, 3 時間後に、細胞内 Ca^{2+}が上昇することを確認した。



qPCR

ポジティブコントロールの *cFos* は、グルタミン酸刺激なしの場合は時間に関わらず変化がなく、グルタミン酸刺激を行うと1時間後に発現が約 15 倍に上昇した。よって神経活動が起きていることを確認できた。同条件で、*Fosl2* はグルタミン酸刺激の 3 時間後に発現が約3倍上昇した。さらに、Ca^{2+}のキレート剤である BAPTA を処理した GNPs でグルタミン酸刺激を行うと BAPTA なしで見られていた *Fosl2* の発現上昇が見られなくなった。



〈結論・今後について〉

本研究により、GNP にグルタミン酸刺激をすることによって細胞内カルシウムイオンが増加し、Fosl2 の発現が上昇することがわかった。今後は、動物モデルおよび DREADD システムを用いて生体内で細胞内 Ca2+ を増加させた際に、Fosl2 の上昇と腫瘍形成の促進が見られるかを確認する。

〈参考文献〉

1) Venkataramani, V., Tanev, D.I., Strahle, C. et al. Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. Nature. 2019

2) Winkler F, Venkatesh HS et al. Cancer neuroscience: State of the field, emerging directions. Cell. 2023

3) Oliver et al. Loss of patched and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma. Development. 2005

4) Jingu et al., in preparation

ヒスタミン神経の自発的な活動における左右両側での同期

認知機能病態学　松本玲香　78

＜目的＞

ヒスタミン神経の活動は揺れ動いており、活動が高まったときに手がかりを与えると想起しやすく、活動が低いときに手がかりを与えても想起しにくい、ということが最近の研究で明らかになった。しかし、ヒスタミン神経の自発的な活動特性については明らかになっていない。そこで、本研究では、外部刺激がない状態におけるマウスのヒスタミン神経の活動周波数と、左右のヒスタミン神経活動の同期について調べた。

＜背景＞

記憶の想起と忘却の変動は、日常生活でよく生じる一方、そのメカニズムは未だ完全には解明されていない。特に、認知症などの神経変性疾患においては、記憶障害が顕著であり、その克服には記憶プロセスの基盤となる神経活動の解明が重要である。このような研究は、認知症治療の改善や予防法の開発などに繋がるのではないかと考えた。

＜方法＞

本研究におけるヒスタミン神経の活動の測定には、ファイバーフォトメトリー法を用いた。神経細胞は発火によってカルシウムイオン濃度が上昇する。このカルシウムイオン濃度の上昇を蛍光カルシウムセンサーGCaMP によって計測した。本実験では、GCaMP を TMN に導入して光ファイバーを TMN の上部に埋め込み、顕微鏡を用いて光ファイバーに励起光を照射し、蛍光を検出した。TMN にはヒスタミン神経以外の神経系も存在するが、この方法により、ヒスタミン神経の活動を特異的に測定することが可能である。

＜結果（図・表）＞

外部からの刺激がない状態でのヒスタミン神経の活動を測定したところ、ヒスタミン神経の活動には自発的な変動が見られることがわかった。（図１）

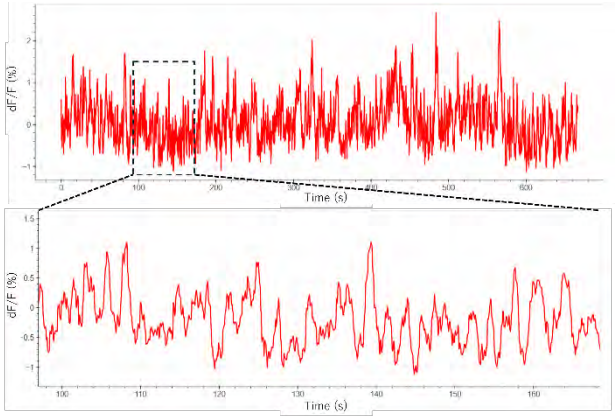
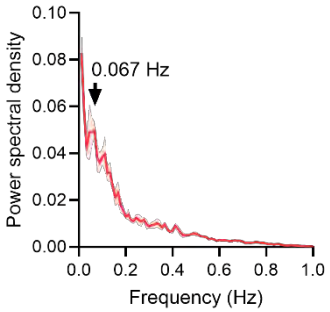


図　1　ヒスタミン神経の自発的な活動

次に、その変動の周波数について調べたところ、周波数のピークは約 0.067Hz で、ヒスタミン神経は約 15 秒に 1 回の頻度で揺らいでいることがわかった。（図２,３）



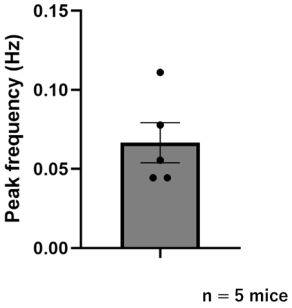


図 2 周波数成分の強度分布の平均　　図 3 周波数のピークの平均

さらに、蛍光の退色やマウスの動きの影響を排除するために、カルシウム依存的な 470nm の励起光とカルシウム非依存的な 405nm の励起光を交互に照射し、その差分を神経細胞の活動を示す指標とした。左右のファイバーを同時に撮影し、ヒスタミン神経の自発的な活動を記録したところ、左右で活動が同期しているように見えた。（図 4）

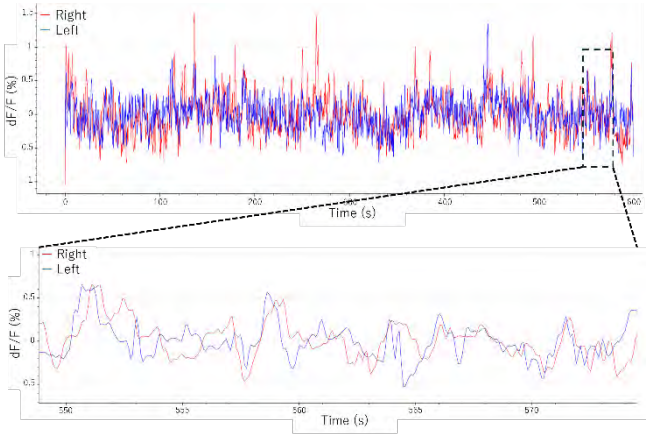
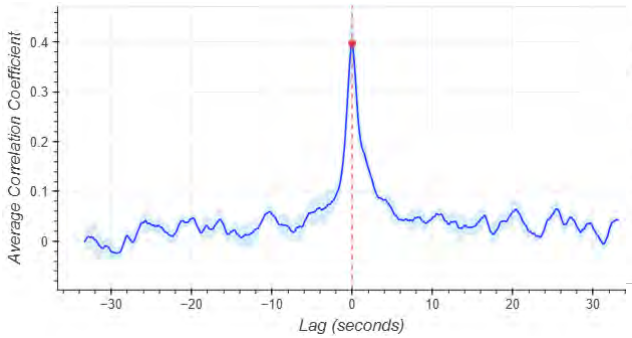


図 4 ヒスタミン神経の活動の左右での比較

そこで、左右のヒスタミン神経活動の相互相関を調べたところ、ラグタイムが 0 秒付近で相関係数が最も高いことがわかった。このことから、左右のヒスタミン神経の活動が時間的な遅れなしで同期しているのではないかと考えられる。（図 5,6,7）



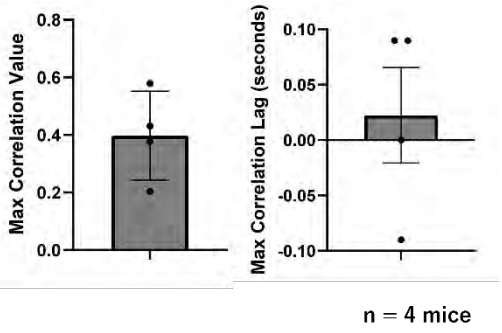


図 5 左右の相互相関関数のグラフ　　図 6 ピークの相関係数の平均　図 7 ピーク時のラグタイムの平均

＜考察＞

ヒスタミン神経の自発的な活動は約 15 秒に 1 回の頻度で揺らいでいた。また、この自発的な活動は右脳と左脳の間で同期していた。これは、学習や記憶に関わる準備的なプロセスと関連しているのではないかと考えられる。記憶学習のプロセスにおけるヒスタミン神経活動の具体的な役割を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

＜参考文献＞

スタンフォード神経生物学

ヒスタミン神経の活性化による記憶想起促進のメカニズム

認知機能病態学　大野深智（No.20）

＜目的と背景＞

認知症に代表される神経変性疾患は、記憶の想起障害を引き起こす。記憶障害の治療法を確立するためには記憶想起のメカニズムを解明する必要がある。ヒスタミン神経は結節乳腺核（TMN）に起始し、ヒスタミンやその他の神経伝達物質を放出する。われわれは以前、ヒスタミン神経を光遺伝学的に活性化することで、連合報酬学習における報酬予測行動であるリッキングが促進されることを証明し、ヒスタミン神経活性化が記憶想起を促進する役割を果たす可能性を示唆した。しかし、この効果は直接的な記憶制御というよりも、覚醒やモチベーションの変化に由来する可能性もあり、その基礎となるメカニズムは依然として不明である。本研究では、ヒスタミン神経の活性化が覚醒やモチベーションに影響を及ぼすかどうか、また想起促進におけるヒスタミンの関与やヒスタミン神経下流の領域などを含む具体的なメカニズムについて検討した。

＜方法＞

Cre 依存的に ChR2-eYFP を発現する AAV を HDC-Cre マウスの TMN に注入し、ヒスタミン神経を選択的に活性化して以下の 4 つの実験、観察を行った。

① ヒスタミン神経活性化による覚醒への影響の検証
　覚醒の指標として瞳孔の面積を用いた。4 秒間の光刺激によってヒスタミン神経を活性化した。光照射前（OFF）4 秒と光照射中（ON）4 秒の瞳孔面積の平均を求めて標準化し、OFF と ON で比較した。
② ヒスタミン神経活性化によるリッキングに対するモチベーションへの影響の検証
　光刺激中に報酬を示したトライアル（ON trial）と光刺激をせずに報酬を示したトライアル（OFF trial）での報酬提示前後のリッキング頻度を比較した。
③ ヒスタミン神経活性化時の記憶想起促進におけるヒスタミンの関与についての検証
　HDC inhibitor の脳室内投与によって脳内ヒスタミン枯渇マウスを作成した。マウスに報酬ありと報酬なしの 2 種類の音を用いた報酬条件付けを行い、条件付け 2 回目の際のリッキング頻度を測定して auROC 解析を行った。auROC 解析では、光刺激をしたトライアル（ON trial）における報酬ありと報酬なしの間の auROC、光刺激をしていないトライアル（OFF trial）における報酬ありと報酬なしの間の auROC をそれぞれ算出し、コントロール群と HDC inhibitor 群でまとめた。
④ 共焦点顕微鏡で脳スライスを撮影し、eYFP の発現を観察した。

＜結果＞

① 図 1 に示すように、OFF と ON で有意な差は見られなかった。

② 図 2 に示すように、OFF trial と ON trial で報酬提示前後のリッキング頻度に有意な差は見られなかった。
③ 図 3 のグラフのような結果になった。個体数が少なかったため統計解析ができなかった。
④ 図 4 に示すように、BLA（扁桃体外側基底核）を含む脳の様々な領域で軸索が観察できた。

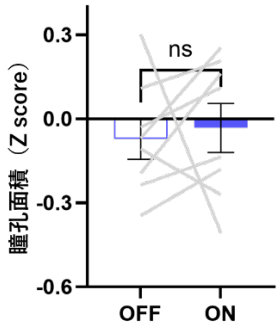


図 1　OFF と ON の瞳孔面積の比較

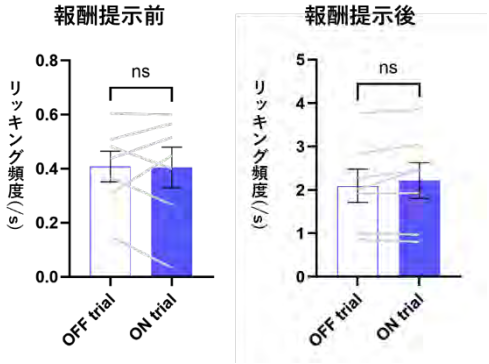


図 2　報酬提示前後のリッキング頻度

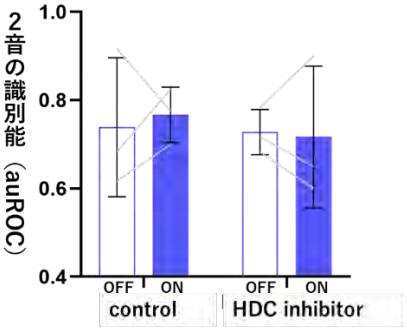


図 3　2 音の識別能

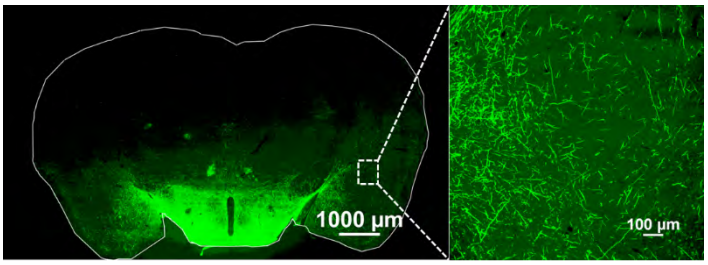


図 4　脳全体と BLA を含む部分の拡大図

＜考察＞

① 結果から、ヒスタミン神経活性化はマウスの覚醒度に影響を与えないと考えられる。
② 結果から、ヒスタミン神経活性化はマウスのリッキングに対するモチベーションに影響を与えないと考えられる。
③ 今回は統計解析ができなかったが、今後の課題として個体数を増やすことやプロトールの改良などを考えている。
④ ヒスタミン神経は TMN から BLA を含む脳の様々な領域に投射していると考えられる。

SCN2A 遺伝子変異による自閉スペクトラム症関連行動障害における側坐核と背側終脳の役割の検討

神経発達症遺伝学　西田和佳奈　No.61

背景

SCN2A 遺伝子は電位依存性ナトリウムチャネルαサブユニットの一つである Nav1.2 をコードしている。これまでに山川ラボではてんかんや自閉症患者の Scn2a 変異に関する世界初の報告がされており[1,2,3]、その後大規模解析から自閉スペクトラム症でもっとも高頻度に変異を示すことやその変異があるとほぼ100%自閉症になることがわかっている[4,5]。また、統合失調症でも複数の変異が報告されている。これまでに mPFC や VTA 特異的に Scn2a 遺伝子を欠損させたマウスが作成されていて、山川ラボでの PPI 試験の結果から全身性の Scn2a ヘテロノックアウトマウスは、PPI の異常を示さないが、mPFC における Scn2a の欠損は PPI を低下させ、VTA における欠損では逆に上昇させることが分かった[6,7]。この結果と辺縁系ループ、山川ラボで以前報告しているてんかん発症神経路に関する知見[8]、過去の統合失調症動物モデルで報告された知見を組み合わせ、mPFC または VTA で Scn2a を欠損したマウスで想定される PPI 神経回路モデルが提案されている[7]。mPFC から側坐核(NAc)にある高頻度発火抑制性神経細胞(FSI)への興奮性神経伝達の低下が FSI の発火低下を引き起こし、それが中型有棘細胞(MSN)の脱抑制(活性化)を介して、その結果 PPI の低下につながっていると想定していて、この回路は最近になり提唱されてきている統合失調症の神経回路仮説、すなわち「大脳皮質興奮性神経伝達の低下が VTA の活性化、ドーパミン放出の亢進を二次的に引き起こす」という仮説[9]をうまく説明している。

目的

現在作成されている PPI 神経回路モデルはまだ未解明、未確認の部分が多いため、その解明を目指した。

方法

(1) PV-Cre のマウスの NAc に AAV-DIO-DREADD hM4Di(hM4 を遺伝子編集できる Cre 組み換え酵素を搭載したアデノ随伴ウイルスベクター)を注入し、FSI 特異的に発現させ、CNO(hM4D に結合する人工リガンド)を投与したもの、CNO を投与していないものを用意し、3チャンバーテストとオープンフィールドテストを行った。

(2) *Scn2a*(f/+)(*Scn2a* のエクソンが loxP サイトに挟まれており、Cre 組み換え酵素によって除去される)マウスのうち、AAV-Emx1-Cre(floxed 遺伝子を除去できる Cre 組み換え酵素を搭載したアデノ随伴ウイルスベクター)を注入し大脳皮質特異的に *Scn2a* を完全に除去したもの(Cre(+))、Cre を含まない AAV を注入したもの(Cre(-))を用意し 3 チャンバーテストを行った。

結果

側坐核(NAc)の高頻度発火抑制性神経細胞(FSI)の活動を低下させたマウスは馴染みのないマウスへのアプローチ時間の統計的有意な増加を示さないことが分かった(図1)。また、中央滞在時間の減少傾向を示すが、移動距離には大きな影響を与えないことが

分かった(図２)。

大脳皮質,海馬,嗅球,扁桃体（背側終脳）の興奮性神経細胞において Scn2a を半減させたマウスは馴染みのないマウスへのアプローチ時間の有意な減少を示した。また、変異マウスは空のケージに対するアプローチ時間の有意な減少も示した(図３)。

図１

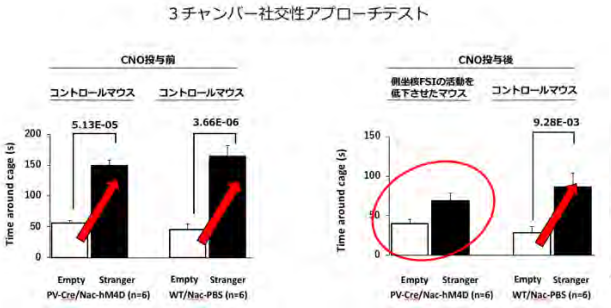


図２

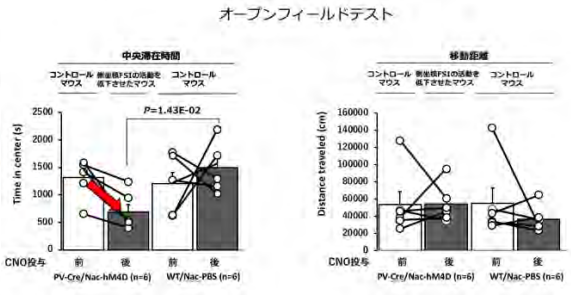
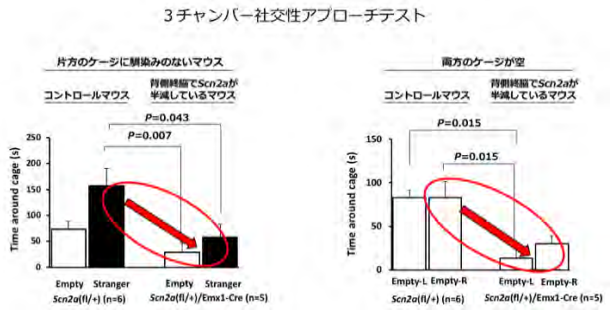


図３



考察

山川ラボでは mPFC における *Scn2a* 欠損マウスでも不安様行動の亢進が報告されており、以前の知見と今回の結果を合わせると mPFC から側坐核 FSI への興奮性神経伝達の低下が FSI の活動低下を引き起こし、その結果行動異常を引き起こしている可能性が想定される。今後、さらなる検証が必要である。

参考文献

1. Sugawara et al., *PNAS* 98: 6384-6389, 2001
2. Kamiya et al., *J Neurosci* 24:2690-2698, 2004
3. Ogiwara et al., *Neurology*, 73: 1046-1053, 2009
4. Fu et al., Nat Genet 54:1320-1331, 2022
5. Rolland et al., *Nature Medicine,* Volume 29, 1671-1680, 2023
6.Tatsukawa *et al.*, *Mol Autism* 10:15, 2019
7. Suzuki *et al.*, *Mol Neurobiol* 61:622-634, 2024
8. Miyamoto *et al.*, *Nat Commun* 10:1917, 2019
9.Howes OD, Onwordi EC. The synaptic hypothesis of schizophrenia version III: a master mechanism. Mol Psychiatry, 2023

STXBP1 遺伝子変異によるてんかん発症における視床下核の役割の検討

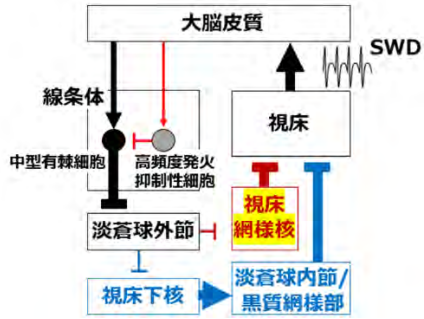
神経発達症遺伝学　坪沼葉音

背景

STXBP1 遺伝子は、神経伝達物質の放出に必須のシナプスタンパク質 Munk18-1 をコードしており、その病原性変異がてんかん患者でみられる。*Stxbp1*(+/-)マウスでは、皮質-線条体興奮性伝達の減少がてんかん発作を引き起こすことが報告され、*Stxbp1*(+/-)マウスにおけるてんかん発症回路が提案されている。(Miyamoto et al, *Nat Commun* 10:1917, 2019)。しかし、神経回路の下流側については、まだ解明されていない。

目的

今回の研究では、視床下核(STN)が本当に回路に関与しているのか、それとも網様体視床核(RTN)が新しい回路として関与しているのかを明らかにすることを目的とした。また、線条体高頻度発火抑制性神経細胞(s-FSI)の活動低下がマウスのてんかん発作を確実に引き起こすかどうかも評価した。



Stxbp1(+/–)マウスにおけるてんかん発症回路

方法

CNO の腹腔内投与により

①　Stxbp1(+/-);STN-AAV5-Ef1a-DIO-hM4Di & AAV-PHP.eB-Vglut2-Cre マウス

(視床下核の活動を選択的に低下させることができるマウス)

Stxbp1(+/-)マウスの視床下核(STN) に hM4Di を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を微小注入し、さらに Vglut2 プロモーター下で Cre を発現する AAV-PHP.eB を後眼窩投与して作製

②　PV-Cre;RTN-AAV5-Ef1a-DIO-hM3Dq マウス

(視床網様核の投射細胞の活動を選択的に亢進させることができるマウス)

パルブアルブミン(PV)-Cre ドライバーマウスの視床網様核(RTN)に hM3Dq を発現する AAV を微小注入して作製

③　PV-Cre;CPu-AAV5-Ef1a-DIO-hM4Di マウス

(線条体のパルブアルブミン陽性 FSI 細胞の活動を選択的に低下させることができるマウス)

PV-Cre ドライバーマウスの背側線条体(CPu)の高頻度発火抑制性神経細胞(FSIs)に hM4Di を発現する AAV を微小注入して作製

これらのマウスに CNO を腹腔内投与(1mg/kg)することで神経活動の操作を行った。皮質脳波(ECoG)記録を CNO 投与前後に 3 時間ずつ実施し、SWD をカウントした。また、てんかん発作を検出するための行動試験を行った。

結果

Stxbp1(+/-)マウスで視床下核の活動を低下させても SWD は誘発されなかった(n=5)(図 1)。視床

網様核の投射細胞の活性化(n = 2)および線条体 FSI 細胞の不活性化(n = 1)は SWD を誘発しなかった(図 2,図 3)。一方、側坐核の高頻度発火抑制性神経細胞の活動を低下させたマウスの行動試験では、6 匹中 3 匹に激しいてんかん発作がみられた。

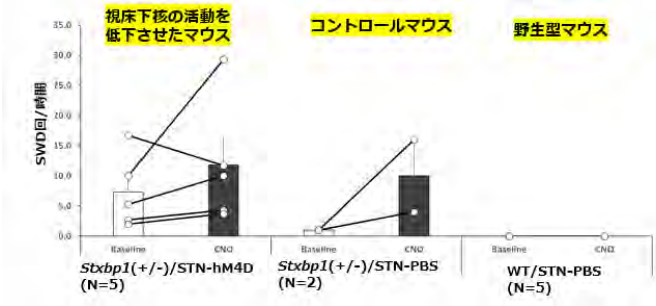


図 1

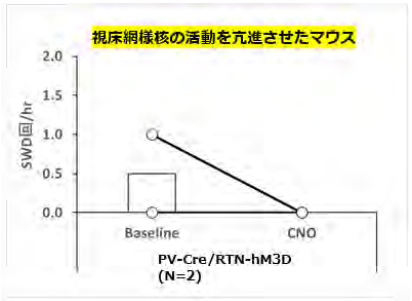


図 2

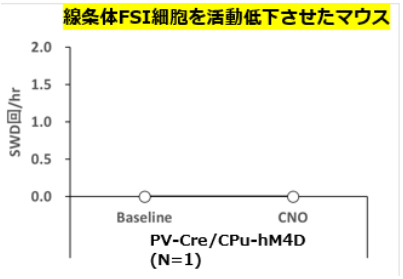


図3

考察

視床下核の活動低下はてんかん発症に影響を与えない可能性、視床網様核で異常脳波が見られたが、野生型マウスで視床網様核を活動亢進させてもてんかんは発症しない可能性、背側線条体もしくは側坐核がてんかん発症に関与する可能性が生じた。今後、動物数を増やすなどして検証を行っていく必要がある。

参考文献

1.Dulubova *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A,* 2007.

2.Saitsu *et al.*, *Nat Genet* 40:762-8, 2008

3.Ogiwara et al., *Neurology,* 73: 1046-1053, 2009

4.Touma *et al.*, *Epilepsia* 54:e81-5, 2013

5.Nakamura *et al.*, *Neurology* 81:992-8, 2013

6.Miyamoto *et al.*, *Nat Commun* 10:1917, 2019

CRISPR-ON／ｄＣＡＳ９を用いたStxbp1遺伝子活性により、大田原症候群モデルマウスのてんかんと攻撃行動が改善した。

神経発達症遺伝学　齊藤正成　No.39

背景

シナプス小胞の膜融合に関わるシナプス伝達に必須なタンパク質である Munc18-１をコードする *STXBP1* 遺伝子のヘテロ接合性機能喪失変異が、大田原症候群　（重症てんかん）、自閉症スペクトラム症、知的障害などの神経疾患患者で報告されている。*STXBP1* 変異を有する自閉スペクトラム症患者の青年期までの観察研究において、32 人中 8 人ではっきりした攻撃性が見られると報告されており、また、山川ラボでは全身性の *Stxbp1* ヘテロ(+/−)ノックアウトマウスが激しい攻撃性の亢進を示すことを見出していた。これらのことから、*Stxbp1* ヘテロ(+/−)ノックアウトマウスを用いることで、難治な大田原症候群の有効な治療法を開発することができると考えた。

目的

今回の実験では、大田原症候群の疾患モデルマウスである *Stxbp1* ヘテロ(+/−)ノックアウトマウスにおいて、人工の転写活性化因子である CRISPR-ON を作用させ、*Stxbp1* 遺伝子の発現量を上昇させることで、てんかんや攻撃性が改善されるのかを調べた。

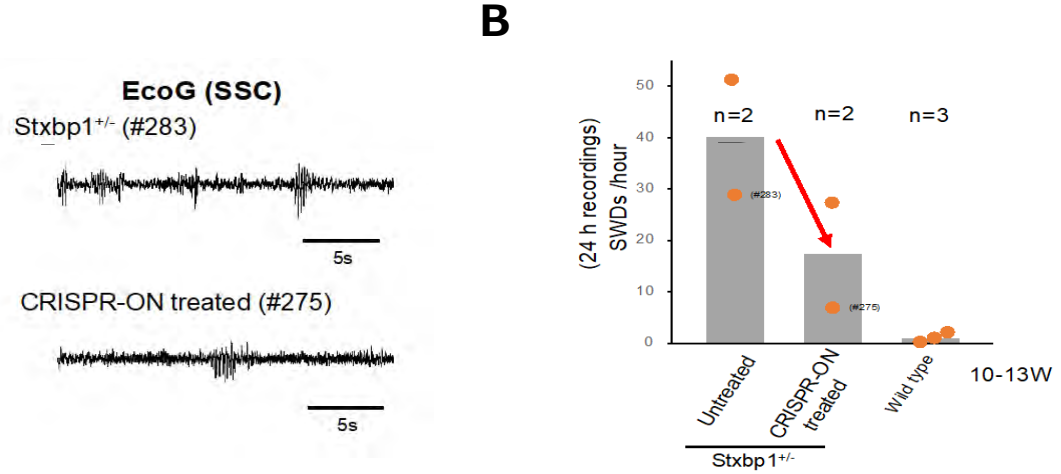
方法

マウスは、*Stxbp1* ヘテロ(+/−)ノックアウトマウスと Cre 依存的に dCas9-VPR を発現するマウスを交配して使用した 。生後 1 日の新生児マウスに、アデノ随伴ウイルス(AAV) を脳室内投与して Cre と *Stxbp1* 遺伝子プロモーターを標的とする gRNA 遺伝子を導入した。CRISPR-ON によって *Stxbp1* mRNA 量と Munc18-1 タンパク量が増加することを確認した後、10-13 週齢で皮質脳波　(EcoG) 測定による spike-and-discharge (SWD) の発生を調べた。また、10 週齢で open-field test による活動量、16 週齢で resident-intruder test による攻撃性を評価した。

結果

10 週齢の *Stxbp1* ヘテロ(+/−)ノックアウトマウスの皮質脳波には高い頻度で棘徐波複合の波形 (SWD)が検出された。治療群のマウスでもＳＷＤは検出され、完全には消失していなかった (Fig.1A)。２４時間記録した脳波からＳＷＤの発生頻度を計測した。治療群では、未治療群に比べてＳＷＤの発生頻度が 2 分の 1 に減少した(Fig. 1B)。

Fig.1



Resident Intruder test において治療群は、未治療群に比べると攻撃回数（Fig. 2A）と継続時間（Fig. 2B）に明らかな低下傾向が見られた。一方、非攻撃性の行動では、治療群と未治療群に差は見られなかった(Fig. 3）。■

Fig.2

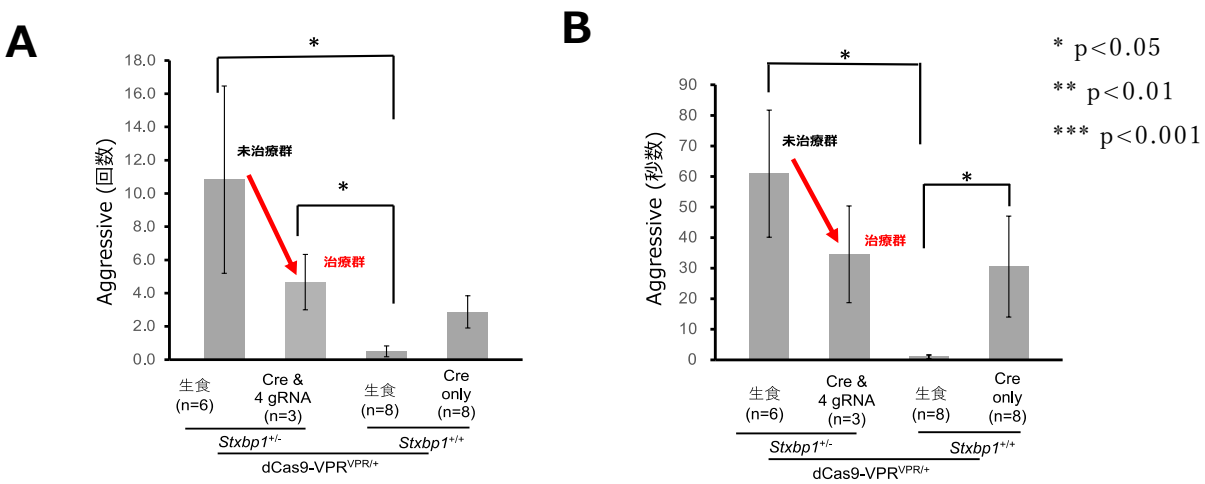
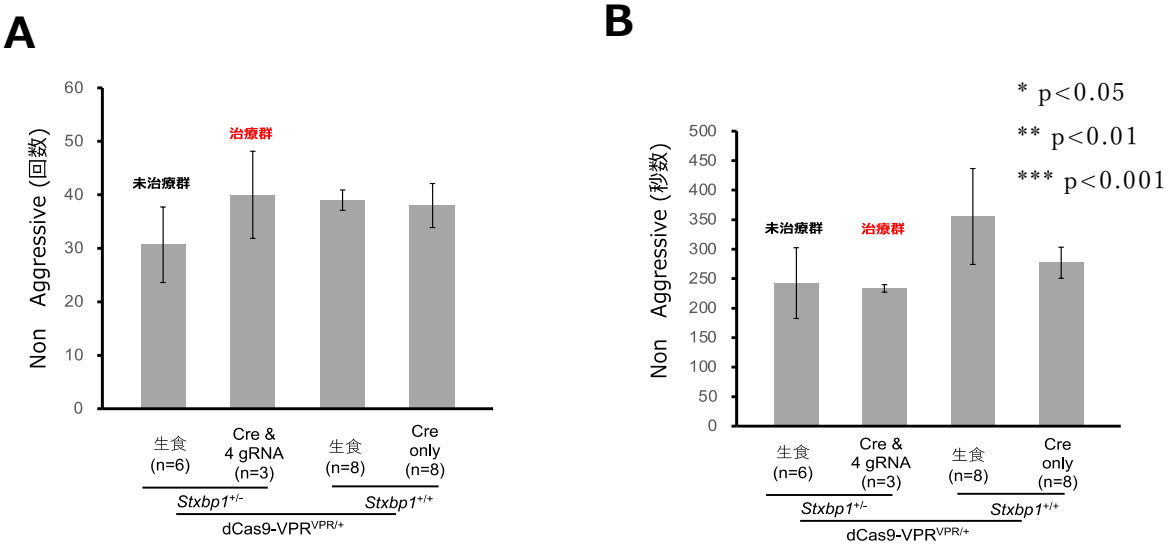


Fig.3



考察

今回 CRISPR-ON が作用した領域が、 *Stxbp1* の発現と完全には一致していないことがてんかんの回復、攻撃性の減少が不完全であった一因の可能性がある。後方領域である視床下部、中脳や延髄で CRISPR-ON をよりよく作用させることが今後の研究の１つの課題である

参考文献

1. Dulubova *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007.
2. Hoischen *et al.*, *Nat Neurosci*, 2014.
3. Stamberger *et al.*, *Neurology*, 2022.
4. Miyamoto *et al.*, *Hum Mol Genet*, 2017.
5. Maeder *et al.*, *Nat Methods*, 2013
6. Yamagata *et al.*, *Neurobiol Dis*, 2020.

脱細胞化された精密切断肺スライスでは細胞外マトリックスが保たれる

神経発達症遺伝学　本田泰良（76）

1.背景

脱細胞化とは組織から細胞を除去し、細胞外マトリックスを保つ技術である。近年、脱細胞化の研究が進められ、動物由来の組織を脱細胞化して移植用のバイオマテリアルとして治療に応用されている。

近年精密切断肺スライス（Precision-cut lung slices、以下 PCLS）を利用した肺に関する研究が進んでいる。PCLS は肺を一定の厚さでスライスした薄切肺で、ex vivo 培養が可能であるなどの利点をもつ。

2.目的

本研究では、脱細胞化を肺に適用できるのではないかと考え以下の２点を検討した。1）PCLS を脱細胞化できるか検討する。2）線維化肺の PCLS を脱細胞化した後に、細胞外マトリックスの質的な変化を検出できるか調べる。質的な変化とは変性コラーゲンを指す。線維化肺は肺癌に移行するするリスクが高いが、線維化肺の間質では変性コラーゲンが蓄積していることが知られており、これが癌化に関与していると考えられている。

3.方法

脱細胞化するために、細胞膜を溶解するために2種類の界面活性剤に PCLS を浸してインキュベートし、核を破壊するために DNase 内でインキュベートした。最後に、細胞外マトリックスを保ちながらウォッシュをするために高濃度の NaCl 溶液内でインキュベートした。脱細胞化した PCLS は、Hoechst による核染色、FITC による構造タンパク質の染色、CHP による変性コラーゲンの染色を行った。

4.結果

1）脱細胞化 PCLS では核が除去され、細胞外マトリックスの構造は保たれた。さらに、臓器に比べて脱細胞化に必要な時間は大幅に短縮された。

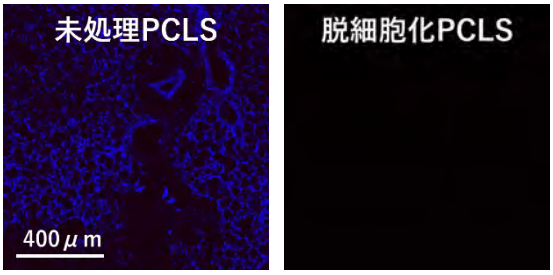


図1：脱細胞化 PCLS では核（青）が除去された。

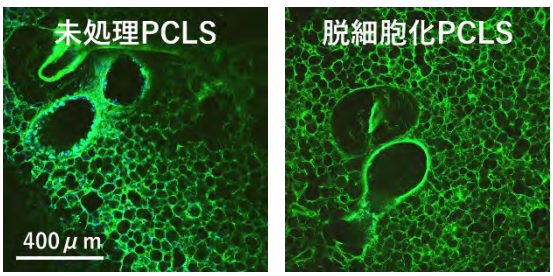


図2：細胞外マトリックスの構造タンパク質（緑）は脱細胞化の前後で変化が見られなかった。

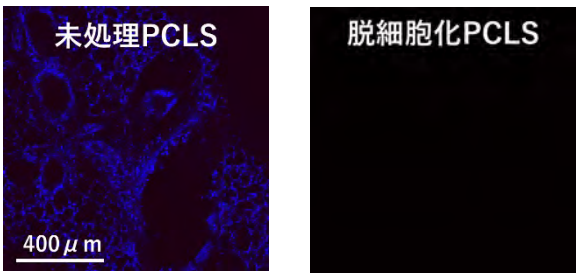


図3：脱細胞化によって変性コラーゲン（赤）は生じなかった。

表1：各プロトコルのインキュベーションタイムの比較

	Incubation time	
Decellularizing agent	Long term	Short term
Triton-X100	Over night	1h
Sodium deoxycholate	Over night	1h
DNase	1h	1h
NaCl	1h	30min

実験当初に用いていた臓器に対するプロトコル（Long term）と PCLS に対して考案したプロトコル（Short term）において、それぞれの脱細胞化溶液でインキュベーションに必要な時間を記した。臓器に対するプロトコルでは、脱細胞化をするためにウォッシュなどの工程を含めて約3日間かかっていたが、PCLS に対する Short term のプロトコルでは、約4時間で脱細胞化できることが分かった。

2）脱細胞化された線維化肺（病態誘導から 14w 後の UIP 病態モデルマウスの慢性期の肺）でも細胞外マトリックスの質的な変化は検出された。

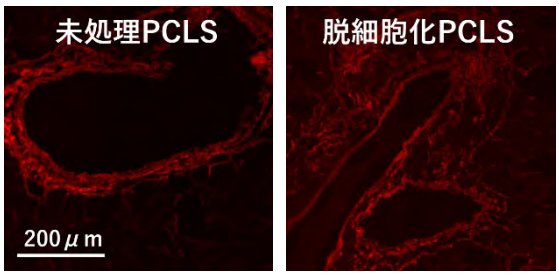


図4：脱細胞化した線維化肺の PCLS でも変性コラーゲン（赤）は検出された。変性コラーゲンが脱細胞化によってダメージを受けることで、CHP が結合できなくなり、蛍光が見られなくなる可能性は低い。

5.考察

1）PCLS は臓器に比べて短い時間で脱細胞化することが可能で、実験を効率化することが分かった。

2）脱細胞化された線維化肺でも、細胞外マトリックスの質的な変化は保持されていた。

これらのことから、脱細胞化した PCLS は細胞の足場として機能することが期待される。脱細胞化した線維化肺の PCLS 上に癌細胞を播種し、その動態を観察することで、肺の線維化から癌に移行するメカニズムを説き明かす手がかりになると考えられる。

6.参考文献

1.F.Tomiyama, et al. (2024). Orthotopic transplantation of the bioengineered lung using a mouse-scale perfusion-based bioreactor and human primary endothelial cells

2.Y.Miura, et al. (2022). Pathophysiological conditions induced by SARS-CoV-2 infection reduce ACE2 expression in the lung

3.K. L Leiby, et al. (2022). Engineered Lung Tissues Prepared from Decellularized Lung Slices