

2 1 . マウス外傷性脳損傷後の髄膜リンパ管内皮細胞の網羅的遺伝子発現解析

島田亮、木林和彦
(法医学)

〔目的〕 髄膜リンパ管は脳脊髄液と脳の組織液を深部頸部リンパ節に輸送している。外傷性脳損傷では、頭部に作用した外力が髄膜を介して脳を損傷するので、髄膜リンパ管障害の脳機能への影響が予想される。本研究では、外傷性脳損傷での髄膜リンパ管障害を捉えるため、受傷後の髄膜リンパ管内皮細胞の遺伝子発現の変化を検討した。

〔方法〕 マウス(約 10 週齢)の頭部に硬膜の上から打撃を加えて大脳皮質に損傷を形成した。受傷後 3 日目の髄膜から Flow-cytometry のセルソータ機能を用いて髄膜リンパ管内皮細胞を採取した。Microarray 及び Realtime PCR を用い髄膜リンパ管内皮細胞の mRNA 発現解析を行った。

〔結果〕 髄膜リンパ管内皮細胞数は損傷群では Sham 群と比べて有意に減少した。Microarray による網羅的遺伝子発現では、リンパ管新生に関わる遺伝子の発現が有意に増加した。特に、FMS-like tyrosine kinase 4 (Flt4)と neuropilin 2 (Nrp2)の髄膜リンパ管内皮細胞の mRNA 発現量は損傷群では Sham 群と比べて有意に増加した。リンパ管に特異的に発現する Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (Lyve1)の髄膜リンパ管内皮細胞の mRNA 発現量は損傷群では Sham 群と比べて有意に減少した。

〔考察〕 外傷性脳損傷での髄膜リンパ管内皮細胞の障害と新生が確認され、髄膜リンパ管障害の病態への関与が示唆された。

〔結論〕 本研究は、外傷性脳損傷が髄膜リンパ管に障害を与えることを確認できた。今後、髄膜リンパ管障害が脳に及ぼす影響を解析する必要があると考える。

〔文献〕

- 1) Maloveska, M. (2018) *Neurol. Res.* 40: 372-380
- 2) Shimada R, Nakao K, Kibayashi K, et al. (2012) *J.Clin.Neurosci.* 19(3): 447-451
- 3) Da Mesquita, S. (2018) *Nature* 560: 185-191
- 4) Shimada R, Abe K, Kibayashi K, et al. (2014) *Neurol.Res.* 36(3): 239-246

〔発表論文〕

- 1) Shimada R, Tataru Y, Kibayashi K. (2022) Gene expression in meningeal lymphatic endothelial cells following traumatic brain injury in mice. *PLoS One.* 17(9): e0273892. doi: 10.1371/journal.pone.0273892

[学会発表]

- 1) 島田亮、木林和彦. 外傷性脳損傷モデルマウスにおける髄膜リンパ管内皮細胞の遺伝子発現変化.
第 90 回日本法医学会学術関東地方集会、横浜、2021/10
- 2) Shimada R. and Kibayashi K. Changes in gene expression in meningeal lymphatic vessels in mice with traumatic brain injury. 第 44 回日本分子生物学会年会、横浜、2021/12

2.2. 原発性線毛機能不全症の診断アルゴリズムにおける気道上皮培養細胞の有用性

近藤光子¹、黒川敦志¹、本多奈穂子¹、辻真世子¹、折茂真実¹、赤羽朋博¹、有村健¹、
八木理充¹、桂秀樹¹、竹内万彦²、多賀谷悦子¹

(¹呼吸器内科学、²三重大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科)

〔目的〕 原発性線毛機能不全症 (PCD) は遺伝性希少疾患であり、本邦における診断アルゴリズムが検討されている。当院では本疾患の高分化気道上皮培養細胞法を確立しており、これを用いた診断アルゴリズムの有用性を明らかにした。

〔方法〕 遺伝子検査を実施し気管支生検を施行した当院の PCD 12 例を、生検組織の解析とともに、Kurokawa らの conditional reprogramming 法¹⁾で培養し、透過型電子顕微鏡による線毛の微細構造、免疫染色²⁾、線毛運動の高速ビデオによる動画解析を行った。また患者の遺伝子解析、臨床像と対比した。

〔結果〕 診断時の年齢 17-51 歳(中央値 30 歳)、検出できた遺伝子異常 *DRC1* 2 例、*DNAH11* 3 例、*DNAH5* 2 例³⁾であった。気管支生検の線毛運動解析では不動～ほぼ不動 5 例、生検で不動ではないが培養線毛細胞で検出し得た運動異常 (hyperkinetic, stiff, circular) 5 例であった。免疫蛍光染色²⁾では *DNAH5* 欠損 3 例、*DNAH11* 欠損 3 例、*DRC3* 欠損 1 例、電顕では ODA 欠損 4 例、IDA 欠損+軸糸配列異常 1 例、その他の異常 3 例、ほぼ正常 5 例であった。%FEV₁ は 32.5-97.9%(中央値 55.3%)で、%FEV₁ と年齢は逆相関の傾向があった。画像は全例で気管支拡張症、一部に細気管支炎を認め、難治性 DPB として診断されていた。

〔考察〕 PCD の診断において、遺伝子変異や電顕異常を証明できたのは約半数であるが、培養細胞を用いた免疫染色や高速ビデオによる動画解析を追加することでさらに診断が可能になった。特に、電顕で構造異常を検出できない *DNAH11* 変異では、高速ビデオを用いた培養細胞でのみ、振幅は小さいが hyperkinetic な動きを検出できた¹⁾。高速ビデオの解析方法は、施設により標準化していない点が今後の課題である。PCD の診断アルゴリズムに従来の生検組織による電顕や遺伝子解析に加えて、培養細胞を用いた免疫染色、高速ビデオ解析を追加することで、より診断が可能になると考えられる。実際、欧州呼吸器学会のガイドライン⁴⁾の診断アルゴリズムには培養法が組み入れられている。また成人で診断がついた症例の多くは呼吸機能低下がみられており、早期診断の確立が重要であると推測された。

〔結論〕 複数の検査の組み合わせにより PCD の診断が可能になり、診断アルゴリズムに培養細胞を用いた解析も組み入れたことは有用であった。また診断時にはすでに呼吸機能が低下しているものも多く早期診断の必要性が示唆された。

〔文献〕

1) Kurokawa K., Kondo M., Honda N. et al. (2022) *Respir Investig.* 60:407-17

2) Kurokawa A., Kondo M., Orimo M., et al. (2021) *Respir Investig.* 59: 550-4

3) Orimo M., Kondo M., Takeyama K., et al. (2019) Intern Med. 58: 2383-6

4) Lucas JS., Barbato A., Collins SA., et al. (2017) Eur Respir J;49

[発表論文]

1) Kurokawa K., Kondo M., Honda N. et al. Analysis of the diagnosis of Japanese patients with primary ciliary dyskinesia using conditional reprogramming culture. Respir Investig. 2022; 60:407-17

[学会発表]

1) Kurakawa A., Kondo M., Honda N. et al. Application of conditional reprogramming culture to analyze Japanese primary ciliary dyskinesia. The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Kyoto, Japan, 2021/11

2) 黒川敦志、近藤光子、本多奈穂子、阿部和大、辻真世子、赤羽朋博、有村健、八木理充、武山廉、桂秀樹、多賀谷悦子. DRC1 遺伝性変異を認め多面的解析を行った原発性線毛機能不全症の1例
第62回日本呼吸器学会学術講演会、京都、2022 / 4

2 3 . Up-regulation of aldosterone synthase induced by luteinizing hormone in human adrenocortical cells

Noriko Morishima, Satoshi Morimoto, Daisuke Watanabe and Atsuhiko Ichihara
(Department of Hypertension)

[Purpose] Plasma aldosterone concentration (PAC) is increased in stages of elevation of luteinizing hormone (LH) during the luteal phase of the ovarian cycle, menopause, or pregnancy ^{1,2}. PAC is elevated in patients with polycystic ovary syndrome who have elevated circulating concentration of LH. In addition, stimulation of aldosterone production by LH has been reported ³. In the present study, we investigated the mechanism by which LH increases aldosterone production in human adrenocortical cells.

[Methods] Immunohistochemical staining for CYP11B2, the aldosterone synthase, and LH receptor were performed using autopsy adrenal gland specimens. Changes in mRNA or protein expressions of CYP11B2 after treatment with LH, angiotensin (Ang) II or Ang II+LH were compared in human adrenocortical cells (HAC15 cells). Effects of an Ang receptor blocker (ARB), adenylyl cyclase inhibitor (KH7), cyclic AMP response element binding protein (CREB) inhibitor (666-15), protein kinase A (PKA) inhibitor (H-89), or β -catenin inhibitor (XAV939) on the increase in CYP11B2 mRNA expression induced by Ang II+LH were investigated in these cells.

[Results] Immunostaining for LH receptor was detected in cells positive for CYP11B2 in adrenal granulosa and fasciculata region in the human autopsy specimens. CYP11B2 mRNA was significantly increased after treatment with Ang II+LH than LH or Ang II alone in HAC15 cells (Figure1). Elevation of CYP11B2 mRNA expression induced by Ang II+LH was completely suppressed by the ARB, AC inhibitor, or CREB inhibitor and was significantly reduced by the PKA inhibitor or β -catenin inhibitor in these cells (Figure 2).

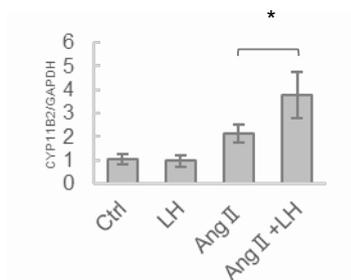


Fig.1 Expression CYP11B2 mRNA in HAC15 cells. *P<0.01

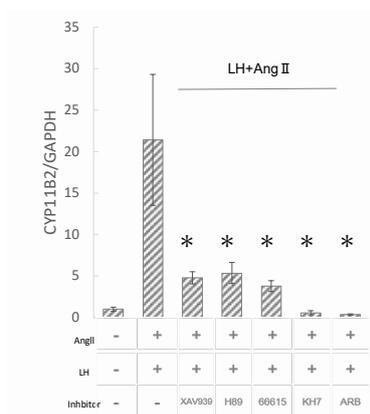


Fig.2. Effect of each inhibitor on CYP11B2 expression in HAC15 cells. *P<0.01

[Discussion] The present study showed that LH receptor is expressed in human adrenal cortical region and stimulation of this ectopic receptor may lead to CYP11B2 expression via AC-CREB pathway in the presence of Ang II. Stimulation of this pathway might be the cause of elevation of PAC during the luteal phase of the ovarian cycle, menopause, or pregnancy, although this presumption needs to be addressed by future studies.

[Conclusions] LH may augment CYP11B2 expression via AC-CREB pathway in the presence of Ang II in human adrenocortical cells.

[Reference]

- 1) A. H. Ahmed, R. D. Gordon, G. Ward, M. Wolley, C. Kogovsek, and M. Stowasser. *Clin Endocrinol (Oxf)*, vol. 83, no. 3, pp. 303-7, Sep 2015, doi: 10.1111/cen.12705
- 2) C. Sabbadin *et al.*, *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 10, p. 575, 2019, doi: 10.3389/fendo.2019.00575
- 3) K. Saner-Amigh *et al.*–*J Clin Endocrinol Metab*, vol. 91, no. 3, pp. 1136-42, Mar 2006, doi: 10.1210/jc.2005-1298

[Article]

- 1) in preparation

[Conference Presentation]

- 1) International Society of Hypertension 2022 Meeting in Kyoto

2 4. Cumulative dialytic glucose exposure is a risk factor for peritoneal fibrosis and angiogenesis in pediatric patients undergoing peritoneal dialysis using neutral-pH fluids

Yoko Shirai¹, Kenichiro Miura¹, Takeshi Ike², Kensuke Sasaki², Kiyonobu Ishizuka¹, Shigeru Horita³, Sekiko Taneda⁴, Daishi Hirano⁵, Kazuho Honda⁶, Yutaka Yamaguchi⁷, Takao Masaki² and Motoshi Hattori¹

(¹Department of Pediatric Nephrology, ²Department of Nephrology, Hiroshima University Hospital, ³Department of Pathology, Kidney Center, ⁴Department of Pathology, ⁵Department of Pediatrics, The Jikei University School of Medicine, ⁶Department of Anatomy, Showa University School of Medicine, ⁷Yamaguchi Pathology Laboratory)

[Purpose] Neutral-pH dialysate has been reported to be beneficial to prevent the peritoneal pathological changes in adult peritoneal dialysis (PD) patients, but its use is controversial in pediatric PD patients. Additionally, the impact of cumulative dialytic glucose exposure has not been examined. We aimed to compare the pathologic changes in the peritoneal membranes of pediatric patients undergoing PD using conventional fluids or neutral-pH fluids. We also aimed to identify the clinical factors, including cumulative dialytic glucose exposure, that are associated with the peritoneal pathology in pediatric patients who use neutral-pH fluids. Furthermore, we aimed to elucidate the mechanisms of the pathological changes in the peritoneal membrane in such patients using markers of hypoxia, and angiogenesis.

[Methods] We performed a retrospective study of data obtained from medical records. Data relating to patients aged <15 years who commenced PD and underwent peritoneal membrane biopsy at our center between June 1992 and October 2020 were analyzed. In our center, neutral-pH fluids have been used since 2001. The data from 31 patients who used only conventional fluids (conventional group) and 33 patients who used only neutral-pH fluids (neutral-pH group) were analyzed. The peritoneal pathologic changes were compared between the two groups. In addition, the risk factors for peritoneal pathologic changes in the neutral-pH group were identified. We aimed to elucidate the mechanisms of the pathological changes in the peritoneal membrane in the patients using neutral-pH fluids by performing an immunohistochemical (IHC) study. Furthermore, human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) treated with high glucose were analyzed using markers of hypoxia, and angiogenesis.

[Results] The median (interquartile range) duration of dialysis was 3.2 (1.7–5.3) years in overall patients. After propensity score matching, the conventional group showed increased thickening of the submesothelial compact (SMC) zone and lower luminal/vessel diameter ratio than the neutral-pH group. In the neutral-pH group, the cumulative dialytic glucose exposure was an independent risk factor for greater thickness of the SMC zone (odds ratio [OR], 1.54; 95% confidence interval [CI], 1.16–2.05) and higher submesothelial microvessel density (OR, 1.29; 95%CI, 1.01-1.64).

IHC study showed that cumulative dialytic glucose exposure correlated with the proportion of the tissue expressing hypoxia inducible factor -1 α (HIF-1 α) ($r = 0.42$, $P = 0.02$) and vascular endothelial growth factor- α (VEGF- α) ($r = 0.55$, $P < 0.01$). High glucose significantly increased HIF-1 α and VEGF- α expressions in the HPMCs.

[Discussion] Previous study described that peritoneal membrane fibrosis and vasculopathy are significantly less marked in individuals using neutral-pH fluids than in those using conventional fluids [1]. Consistent with their findings, compared with neutral-pH fluids, we have shown for the first time that the use of conventional fluids was associated with greater thickness of the SMC zone, lower L/V ratio, and new membrane formation in pediatric PD patients. Schaefer et al. showed that pediatric patients who had undergone PD using neutral-pH fluids for a median of 13 months had peritoneal membranes with higher microvessel density and submesothelial thickness [2]. The present findings are consistent with those of Schaefer et al., in addition, we found that cumulative dialytic glucose exposure was an independent risk factor for greater thickness of the SMC zone and higher submesothelial microvessel density. We have shown that the cumulative dialytic glucose exposure significantly correlates with immunoreactivity for HIF-1 α and VEGF- α . A considerable number of cells in the SMC zone showed immunoreactivity for both HIF-1 α and VEGF- α . Furthermore, high glucose condition upregulated HIF-1 α and VEGF- α protein expression in HPMCs. These findings suggested that even in patients using neutral-pH fluids, dialytic glucose exposure causes pseudohypoxia, which induces VEGF- α production.

[Conclusions] we have shown that pediatric patients undergoing PD using neutral-pH fluids show less severe deterioration of their peritoneal membrane than those using conventional fluids. However, neutral-pH fluids also have a detrimental effect on peritoneal membrane when glucose is overloaded as an osmotic substance, and cumulative dialytic glucose exposure is an independent risk factor for peritoneal fibrosis and angiogenesis in patients undergoing PD using neutral-pH fluids.

[Reference]

- 1) Kawanishi K, et al. *Perit Dial Int.* 2013;33:242–251
- 2) Schaefer B, et al. *Kidney Int.* 2018;94:419–429

[Article]

- 1) Shirai Y, Miura K, Ike T, et al. Cumulative dialytic glucose exposure is a risk factor for peritoneal fibrosis and angiogenesis in pediatric patients undergoing peritoneal dialysis using neutral-pH fluids. *Kidney Int Rep.* 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2022.08.013>.

[Conference Presentation]

- 1) The 42th conference of Japanese Society for pediatric Renal Failure. 2021/12/9 on web

2.5. 急速進行性糖尿病性腎症の検討

唐澤一徳、秋山健一、秋久太良、宮部陽永、新田孝作、星野純一
(腎臓内科学)

〔目的〕 糖尿病性腎症症例の多くは慢性進行性の経過を辿る。しかしながら、糖尿病性腎症症例の一部には急速に腎機能が悪化し1年以内に腎死に陥る症例が存在する。我々は、以前に糖尿病性腎症第2期（早期腎症期）を合併している肺腺癌患者に第三世代の上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬（epidermal growth factor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI）を使用し、EGFR-TKI使用開始後わずか数ヶ月で腎死に至った症例を経験した。経過中、腎生検を行ったが明らかな薬剤起因性の尿細管間質性腎炎は認めず光学顕微鏡的所見レベルでは糖尿病性腎症Ⅱbの所見以外に明らかな所見は認めなかった。電子顕微鏡的所見の一部にTMA（thrombo micro angiopathy）様所見が同定されこの所見が急速進行性の腎機能悪化を誘導したと一応の結論には至ったが、正常で100万個あると言われている糸球体の極々一部でしか同定され得なかったこのTMA様所見が本当に急速進行性糖尿病性腎症の原因になったのかについて疑問の残る結論となった。そこで我々、糖尿病性腎症症例のうち急速進行性に腎機能障害が進行し1年以内に腎死に陥った症例を抽出し正常腎組織と慢性進行性の経過を辿った糖尿病性腎症症例、急速進行性糖尿病性腎症症例について比較検討することとした。

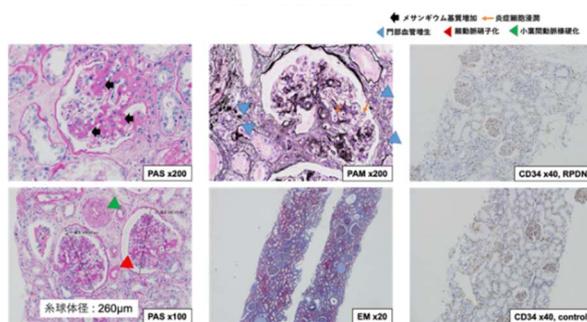


図1. 光学顕微鏡所見
※巻末にカラー図掲載

〔方法〕 糖尿病性腎症第3期（顕性腎症期）までであったが1年以内に急速進行性に腎機能障害が悪化し第5期（透析療法期）に至った症例をRPDN(rapid progressive diabetic nephropathy)群、生体腎移植 recipient 患者における0 hour biopsy 組織検体を normal control 群、第3期までの通常の慢性進行性の糖尿病性腎症の経過を辿った diabetic nephropathy control 群の3群に分けまずは血管内皮増殖因子(VEGF)の発現を免疫組織染色法を用いて比較検討した¹⁾。

〔結果〕 生体腎移植を受けたレシピエントの0 hour 腎組織検体の糸球体における免疫組織染色結果では糸球体上皮側に緑で示す VEGF 発現を認めた。赤で示す CD31 陽性の血管内皮細胞は、糸球体、PTC、その他の尿細管における血管に陽性であった。0 hour の尿細管間質では VEGF は殆ど発現しておらず、PTC の血管内皮が CD31 で赤に染色された。次に diabetic nephropathy control 群として糖尿病性腎症 class II b 患者で検討した。糸球体では、緑で示す VEGF が著明に高発現していた。尿細管の細胞質にも同様に著明に VEGF が高発現していたが、赤で示す CD31

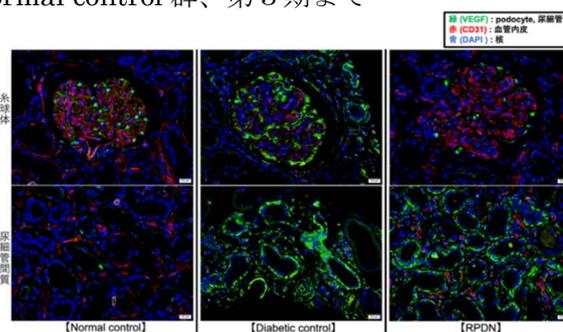


図2. 免疫組織染色
※巻末にカラー図掲載

陽性の PTC は著明に消失していました。RPDN 症例の糸球体では、0hour 腎組織検体の正常例と比較するとやや上皮側の VEGF が高発現している傾向にあり、diabetic nephropathy control 群と比較すると VEGF 発現は低減していた。また、尿細管の細胞質においては VEGF が発現し、CD31 陽性の血管内皮発現は 0 hour バイオプシー検体と比較するとやや減弱していますが、diabetic nephropathy control 群と比較して染色性は保たれていた。

〔考察〕 RRPDN 群と diabetic nephropathy control 群との間では特に糸球体での VEGF の発現に顕著な差が確認された。VEGF は内皮細胞の恒常性に寄与する物質であることが知られておりこの発現の低下は糸球体においては TMA 病変を誘導することが報告されている²⁾。急速進行性糖尿病性腎症の既報では本邦よりケースレポートがあり、進行した直腸癌を合併した、腎症のない 2 型糖尿病患者に抗がん剤の S-1 を投与し、TMA 様病態を発症し、約 3 ヶ月で末期腎不全に至った 1 例報告がある³⁾。症例対照研究としては、計 36 例の糖尿病患者において、フィブリンの存在、内皮細胞浮腫、泡沫細胞浸潤、基底膜の 2 重化で定義される TMA 病変がある群は、無い群と比較し 高齢者、網膜症有病率、貧血、血小板減少、蛋白尿、eGFR 低値、が有意に多かったと報告され、また糸球体の VEGF 発現低下と eGFR 低下は有意に相関し、TMA 群は有意に腎予後が悪かったとの報告がある⁴⁾。さらに、メサンギウム基質内の破碎赤血球の有無で Microangiopathy を定義し、微小血管障害がない群 50 例と微小血管障害がある群 14 例の 2 群間で比較し、微小血管障害がある群は、ない群と比較し、男性、蛋白尿、溶血を示唆する検査所見、全節性硬化病変、Kimmelstiel-Wilson nodule の層状化所見、が有意に多かったと報告等が散見されやはり TMA 病変の合併が RPDN の病態に強く影響していることが示唆された⁵⁾。

〔結論〕 RPDN の病態には TMA 病態の合併が影響していることが強く示唆された。糖尿病性腎症の方に TMA 病変を誘導することが報告されている分子標的薬の使用の際には注意を要する。

〔文献〕

- 1) Sison K, Eremina V, Baelde H, et al. Glomerular structure and function require paracrine, not autocrine, VEGF-VEGFR-2 signaling. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(10):1691-1701
- 2) Veron D, Reidy KJ, Bertuccio C, et al. Overexpression of VEGF-A in podocytes of adult mice causes glomerular disease. *Kidney Int*. 2010;77(11):989-999
- 3) Toriu N, Sawa N, Imafuku A, et al. Rapidly progressive glomerulonephritis caused by tegafur/gimeracil/oteracil resulted in diabetes nephropathy in a patient with minor risk of diabetes nephropathy: A case report. *CEN Case Rep*. 2020;9(4):347-353
- 4) Hernández-Arteaga K, Soto-Abraham V, Pérez-Navarro M, et al. Thrombotic microangiopathy in patients with diabetic nephropathy is associated with low VEGF expression and end-stage renal disease. *Clin Nephrol*. 2018;89(6):429-437
- 5) Paueksakon P, Revelo MP, Ma LJ, Marcantoni C, Fogo AB. Microangiopathic injury and augmented PAI-1 in human diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2002;61(6):2142-2148

〔発表論文〕 現在投稿中。

26. シュウ酸カルシウム腎障害モデルにおける Fibulin-7 の関与

杉浦秀和¹、土谷健^{1,2}、新田孝作¹

(¹腎臓内科学、²血液浄化療法科)

〔目的〕 Fibulins は分泌型糖タンパク質であり、fibulin-3、-4、-5 欠損マウスは弾性線維の異常を生じることが報告されている^{1),2)}。Fibulin-7 (Fbln-7) は歯の odontoblasts と preodontoblasts で発現する細胞外マトリックス (ECM) として同定され³⁾、また、心血管形成に影響を及ぼす可能性があることも報告されている⁴⁾。我々は、Fbln-7 は、尿細管細胞に発現し、高リン食マウス腎では、Fbln7KO マウスで障害が軽減し、Fbln7 は artificial calcium phosphate particles (aCPP) に親和性があることを報告した⁵⁾。シュウ酸カルシウム (CaOx) 投与でも急性腎障害が惹起されることが知られている。そこで、我々は aCPP と同様に CaOx は Fbln7 に親和性があり、細胞表面の Fbln7 に CaOx が結合して腎障害を惹起するという仮説を立てた。

〔方法〕 Fbln7-CaOx binding assay を施行した。Fbln7 に V5 で標識した Fbln7 を過剰発現させた CHO-K1 cells (Fbln7OE) の condition medium 1.0 ml に CaOx を 0.5、1、2 mg/ml を加え、1 時間振盪 incubate し、1000x g for 1 min 遠心し、上澄み液 (Supernatant) と沈殿物 (Precipitate) を回収し、V5 antibody を用いて Western blot analysis を施行した。

〔結果〕 上澄み液中の Fbln7-V5 は、CaOx 用量依存性に低下し、沈殿物の Fbln7-V5 は、CaOx 用量依存性に増加した。BSA は CaOx の影響を受けなかった (図 1)。

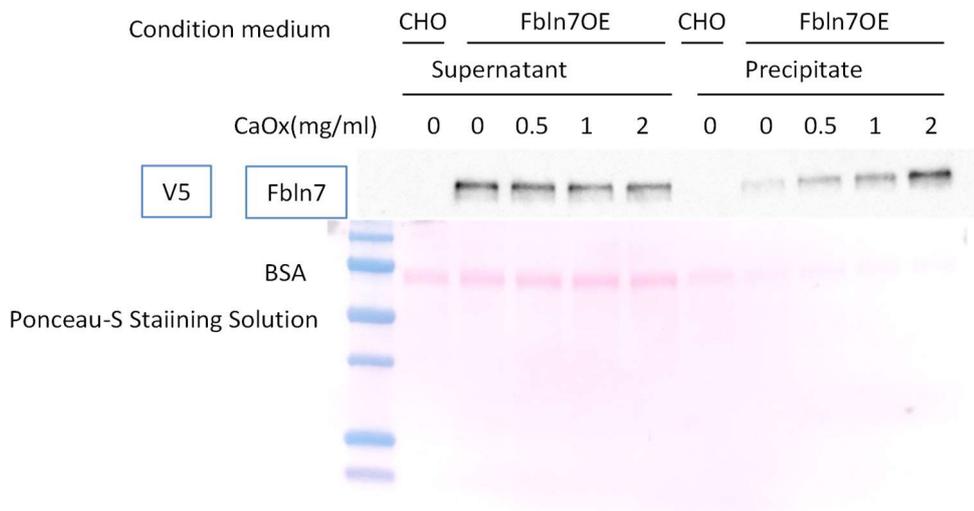


図 1. CaOx の濃度変化条件下による Fbln-7 と CaOx との結合変化

〔考察〕 CaOx は mediumun に不溶性であるため、沈殿物は CaOx である。この結果は、CaOx は Fbln7 と親和性をもち、細胞表面の Fbln7 と CaOx が結合することで、CaOx 原生腎尿細管障害が生じている可能性を示していると考えられた。

〔結論〕 CaOx と Fbln7 は、親和性があることが示唆された。

〔謝辞〕 本研究は、常住淳（九州保健福祉大学 薬学部 薬学科）、柳沢裕美（筑波大学生命領域学際研究センター）との共同研究である。

〔文献〕

- 1) Yanagisawa H, Schluterman MK, Brekken RA. (2009) J. Cell Commun. Signal. 3(3-4): 337-347
- 2) Huang J, Davis EC, Chapman SL, et al. (2010) Circ. Res. 106(3): 583-592
- 3) de Vega S, Iwamoto T, Nakamura T, et al. (2007) J. Biol. Chem. 282(42): 30878-30888
- 4) Russell MW, Raeker MO, Geisler SB, et al. (2014) Hum. Mol. Genet. 23(16): 4272-4284
- 5) Tsunozumi J, Sugiura H, Oinam L, Ali A, Thang BQ, Sada A, Yamashiro Y, Kuro-O M, Yanagisawa H. Matrix Biol. 2018 Dec; 74:5-20

〔発表論文〕

- 1) Fibulin-7, a heparin binding matricellular protein, promotes renal tubular calcification in mice. Tsunozumi J, Sugiura H, Oinam L, Ali A, Thang BQ, Sada A, Yamashiro Y, Kuro-O M, Yanagisawa H. Matrix Biol. 2018 Dec; 74:5-20

〔学会発表〕

- 1) 杉浦秀和、常住淳、土谷健、他。新規細胞外マトリックス fibulin-7 は慢性腎臓病に関与するのか？
58回日本腎臓学会学術総会、名古屋、2015/6
- 2) 杉浦秀和、常住淳、土谷健、他。細胞外マトリックス fibulin-7 の腎臓病モデルにおける関与。
59回日本腎臓学会学術総会、神奈川、2016/6
- 3) 杉浦秀和、常住淳、土谷健、他。腎線維化モデルにおける fibulin-7 の発現変化
60回日本腎臓学会学術総会、仙台、2017/6
- 4) 杉浦秀和、常住淳、土谷健、他。腎障害モデルにおける fibulin-7 の発現変化
61回日本腎臓学会学術総会、新潟、2018/6
- 5) 杉浦秀和、常住淳、土谷健、他。fibulin-7 の腎線維化モデルにおける役割
62回日本腎臓学会学術総会、名古屋、2019/6
- 6) 杉浦秀和、常住淳、土谷健、他。シスプラチン負荷モデルにおける fibulin-7 の関与
63回日本腎臓学会学術総会、横浜、2020/6
- 7) 杉浦秀和、常住淳、土谷健、他。シュウ酸カルシウム負荷モデルにおける fibulin-7 の関与
65回日本腎臓学会学術総会、神戸、2022/6

27. マウス中大脳動脈永久閉塞モデル遠隔虚血コンディショニングにおける eNOS、Akt リン酸化の関与

齋藤萌子、石塚健太郎、星野岳郎、北川一夫
(脳神経内科学)

〔目的〕 我々は中大脳動脈永久閉塞に対して遠隔虚血コンディショニング(RIC : remote ischemic conditioning)を1日1回行うことで72時間後まで脳保護効果が観察される事と、一酸化窒素合成酵素阻害薬投与で脳保護効果が消失する事を昨年までの本誌で報告している。本研究では、脳血管内皮機能を制御する内皮型一酸化窒素合成酵素 eNOS とその調節因子の一つである Akt のリン酸化の発現および脳虚血早期から分解がみられる細胞骨格タンパク質 Fodrin の分解程度に対する遠隔虚血コンディショニングの影響を明らかにする。

〔方法〕 成熟 C57BL/6 雄マウスを用いてイソフルレン吸入麻酔下で左中大脳動脈 (MCA) を露出させ嗅索より近位部を永久閉塞した。MCA 閉塞から 70 時間の脳皮質血流をモニターした。RIC 群は MCA 閉塞 30 分後から両側下肢鼠径部でカフを用いて 200mmHg の負荷をかけ 5 分間駆血 5 分間解放を 4 回反復した。対照群は遠隔虚血負荷なしで同じ時間麻酔をかけ偽処置を行った群とした (Sham 群)。MCA 閉塞 30 分後から偽処置または遠隔虚血負荷を行った直後に大脳皮質を摘出した。灌流中心部をサンプルとし、eNOS 蛋白、Akt 蛋白と各リン酸化の発現、Fodrin 蛋白分解物の発現をウエスタンブロット法により確認した。

〔結果〕 最初に RIC、MCA 閉塞おのおのにおける eNOS、Akt リン酸化と Fodrin 分解への影響について検討した。非虚血動物で RIC 単独では eNOS、Akt のリン酸化レベルに影響をあたえずフォドリンの分解も促進しなかった。一方 MCA 閉塞では eNOS のリン酸化は低下傾向にあり、Akt リン酸は有意に低下していた。またフォドリン分解が観察された。次に MCA 閉塞に際して RIC を負荷した際の eNOS、Akt リン酸化とフォドリン蛋白分解への影響について Sham 処置群と比較検討した。e-NOS および Akt のリン酸化は Sham 群に比べて RIC 群で亢進しており、フォドリン蛋白の分解は Sham 群に比べて RIC 群で抑制されていた。

〔考察〕 遠隔虚血コンディショニングの脳保護作用には、eNOS リン酸化を介した血管内皮機能が関与することが示唆された。

〔結論〕 マウス中大脳動脈永久閉塞に対する遠隔虚血コンディショニングの保護効果には eNOS、Akt リン酸化が関与していることが示唆された。

〔学会発表〕

- 1) 齋藤萌子、石塚健太郎、星野岳郎、他. マウス中大脳動脈永久閉塞モデル遠隔虚血コンディショニングにおける eNOS、Akt リン酸化の関与. 第 64 回日本脳循環代謝学会学術集会、岐阜 (Web 開催)、2021/11

- 2) 齋藤萌子、石塚健太郎、星野岳郎、他. マウス中大脳動脈永久閉塞モデルにおける遠隔虚血コンディショニングの効果. 第47回日本脳卒中学会学術集会、大阪 (Web 開催)、2022/3

28. 抗 MOG 抗体関連疾患 3 症例における脳病理学的検討

池口亮太郎¹、神田菜月¹、小原三千代¹、増井憲太²、柴田亮行²、清水優子¹、北川一夫¹
(¹脳神経内科学、²病理学 (人体病理学・病態神経科学分野))

〔目的〕 抗 myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 抗体関連疾患 (MOGAD) は、視神経脊髄炎、急性散在性脳脊髄炎、視神経炎などを呈することが中枢神経の自己免疫性炎症性疾患である¹⁾。ここ数年、大脳病変を呈するサブグループも認知されてきているが、脳病理を検討した研究は少なく、病態についても明らかでないことが多い。本研究は腫瘍様脳病変を呈し抗 MOG 抗体が陽性であった 3 例において脳病理学的検討を行い、MOGAD の病態を明らかにすることを目的とする。

〔方法〕 2015 年 1 月から 2022 年 5 月の間に、当院に入院し腫瘍様脳病変を呈した患者のうち、抗 MOG 抗体陽性かつ脳生検を行った患者について臨床的・病理学的特徴について検討した。CD3、CD4、CD8、CD20、CD68、CD79a、CD138、C9neo、GFAP、SM131、MOG などの免疫染色を行った。本研究は本学倫理委員会の承認を得ている。

〔結果〕 2015 年 1 月から 2020 年 5 月の間に、腫瘍様脳病変を呈した患者は 24 例であり、そのうち 6 例で抗 MOG 抗体が陽性だった。うち 3 例で脳生検を施行した。3 例の発症年齢中央値は 18 歳 (15～22 歳)、男性が 2 例であった。いずれも脊髄炎や視神経炎など頭蓋外病変はなかった。髄液検査では 3 例とも単核球優位の細胞数上昇が認められた。オリゴクローナルバンドは 1 例で陽性だった。頭部 MRI では 3 例とも基底核から側頭葉にかけて、長径 4cm 以上のガドリニウム増強効果を伴う病変が認められた。いずれもステロイド治療を行い治療反応性は良好であったが、再発が 2 例でみられた。脳病理では、3 例とも血管周囲にリンパ球の集簇があり、2 例で B 細胞優位、1 例では T 細胞が優位であった。3 例とも炎症性脱髄の所見が認められ、軸索は 2 例では保たれていたが、1 例では脱落していた。明らかな補体の沈着はみられず、3 例とも MOG の脱落が認められた。

〔考察〕 今回の検討では、既報告同様に全ての患者で炎症性脱髄の所見が認められた。代表的な炎症性脱髄性疾患である多発性硬化症 (MS) では、病理学的に炎症性脱髄の所見を示す (一次的脱髄)。一方、MS の類縁疾患である視神経脊髄炎では、脱髄所見は呈するもののアストロサイトが primary に障害されるため二次的脱髄と認識されている。我々の今回の検討では、MOG の脱落も認められ、一次的な脱髄であることが示唆された。また自験例では急性期中枢神経病変に B 細胞優位のリンパ球集簇が 2 例でみられた (1 例は T 細胞優位)。既報告では、ほぼ全例が T 細胞優位のリンパ球集簇を示しており、本例における特徴的な所見であった^{2,3)}。また本例では補体の沈着が明らかでなかった (既報告では約半数弱で沈着あり)。以上より、MOGAD は炎症性脱髄性疾患であるが臨床像は様々であり、既報告および今回の病理学的検討から heterogeneous な疾患であることが示唆された。

〔結論〕 MOGAD は、MS や NMOSD など既知の炎症性脱髄性疾患と異なる臨床像を呈する独立した炎症性脱髄性疾患である。これまでの臨床研究および病理学的検討から、MOGAD は heterogeneous な疾患であることが示唆された。腫瘍様脳病変を呈する若年者においては、MOGAD を鑑別に挙げる必要がある。

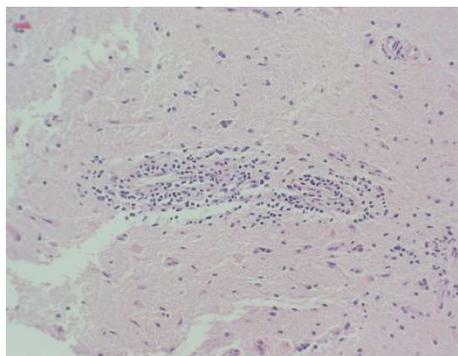


図 1. 抗 MOG 抗体関連疾患の急性期における脳病理学的所見(HE 染色)
MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein

※巻末にカラー図掲載

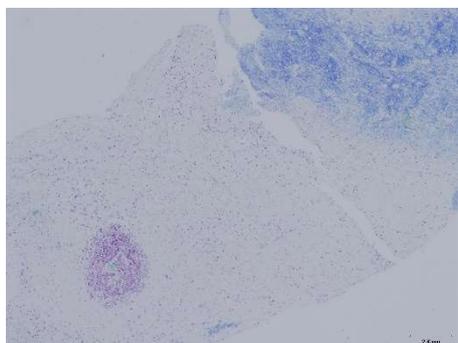


図 2. 抗 MOG 抗体関連疾患の急性期における脳病理学的所見(KB 染色)
MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein

※巻末にカラー図掲載



図 3. 抗 MOG 抗体関連疾患の急性期における脳病理学的所見(CD20 染色)MOG: myelin oligodendrocyte glycoprotein

※巻末にカラー図掲載

〔文献〕

- 1) Jurynczyk M., Messina S., Woodhall M.R., et al. (2017) Clinical presentation and prognosis in MOG-antibody disease: a UK study. *Brain*. 140(12): 3128-3138
- 2) Takai Y., Misu T., Kaneko K., et al. (2020) Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease: an immunopathological study. *Brain*. 143(5): 1431-1446
- 3) Höftberger R., Guo Y., Flanagan E.P., et al. (2020) The pathology of central nervous system inflammatory demyelinating disease accompanying myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody. *Acta Neuropathol*. 139(5): 875-892

29. 多発性硬化症合併妊産婦の血中 Neurofilament-Light 鎖、オステオポンチン、調節性 T 細胞の検討

清水優子、池口亮太郎、小嶋暖加、根東明広、宗勇人、北川一夫
(脳神経内科学)

〔目的〕 多発性硬化症 (MS) の妊娠・出産にともなう再発予防の新たな治療戦略として、疾患活動性を反映するバイオマーカーを検索し、有用なバイオマーカーを同定できれば、妊娠・出産に伴う再発予防に活用し、MS 合併妊娠の転機を良好にすることができる、と考えた。MS の再発、身体機能障害との関連性について我々が報告したオステオポンチン (osteopontin: OPN)¹⁾ や、近年 MS の疾患活動性の指標となる新規バイオマーカー候補である Neurofilament-Light 鎖 (NfL) に注目した。本研究の目的は、MS・NMOSD の疾患活動性を反映するバイオマーカーを検索し、妊娠出産に伴う再発予防に応用することである。

〔方法〕 対象は 2018 年 1 月から 2022 年 3 月まで当科通院加療中の成人 MS 合併妊産婦 13 例で。

- ①主要評価項目：妊娠前・妊娠中・出産後の血中調節性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg), OPN, NfL を測定し、妊娠前、妊娠期、出産後、妊娠出産に伴う再発 (relapse) における変化を検討する。
- ②Visit スケジュール：妊娠前 1 年、妊娠第 1 三半期 (During Pregnancy Trimester 1: DP1)、妊娠第 2 三半期 (DP2)、妊娠第 3 三半期 (DP3)、出産後 0~90 日 (postpartum 1: PP1)、出産後 91 日~180 日 (PP2)、出産後 181 日~360 日 (PP3+4) および再発時 (relapse) である。
- ③各 Visit 評価項目：利用する研究対象者の診療情報は、妊娠年齢、疾患修飾薬の治療の有無、妊娠出産と新生児の転機である。バイオマーカー検査としてフローサイトメータ法を用いた末梢血単核球の Treg (CD4+CD25+CD127[±])、血漿中 NfL (SIMOA 法) と OPN (ELISA 法) を測定。なお本研究は、当大学に設置された臨床研究に関する倫理委員会の承諾を得て行った。

〔結果〕 MS 合併妊産婦 13 例の平均年齢 32 歳±3.5 歳、妊娠 16 例。うち 3 例で出産後早期の再発を認めた。全例、妊娠前に疾患修飾薬による治療を行っており、グラチラマー酢酸塩以外は妊娠判明時に治療を中止。母子ともに妊娠・出産に伴う有害事象と新生児先天異常なし。妊娠前、妊娠中、出産後、再発時の血中 Treg, OPN, NfL の結果は、OPN と NfL は妊娠前と比較し、出産後早期の PP1 は有意に高値を示し ($p<0.05$)、出産後早期の再発リスクに関連している可能性が示唆された (図 1)。しかし、Treg は妊娠前、妊娠中と比較し、出産後と再発時に平均値は低値であったが統計的有意差はなかった (図 2)。

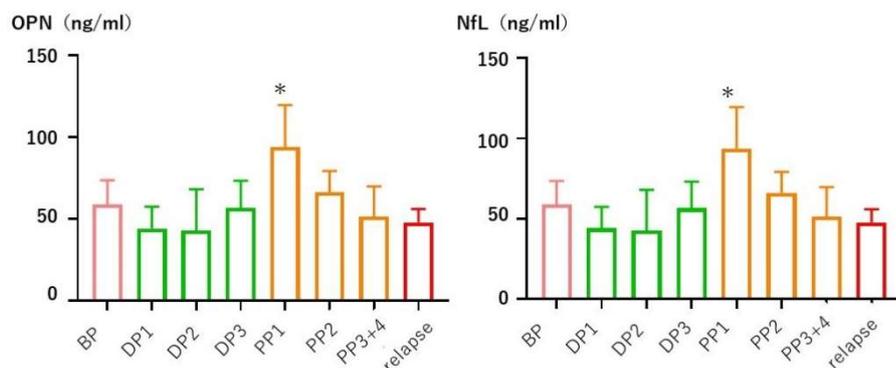
〔考察〕 近年、血中 NfL は、「MS の臨床上有用なバイオマーカー」として注目されている²⁾。NfL は神経軸索変性を反映するたんぱく質で、再発時 MS 患者の血清および血漿中で有意に高値を示し、疾患活動性、身体機能障害の進行と正の相関関係をきたす。血漿中 OPN は、単球、マクロファージ、活性化 T 細胞、アストロサイト、樹状細胞に発現し、サイトカイン、ケモカインなどを産生、細胞遊走を誘導する炎症性蛋白である。MS では、OPN は活性化された CD4+T 細胞に発現し、Th1、Th17 亢進作用を有し、疾患重症度との関連性が報告されている³⁾。Treg は、自己免疫疾患に対して、自己に対する

免疫応答の抑制（免疫寛容）を司っており、MS の妊娠期間は免疫寛容の機能として増加するが、出産後低下する。しかしいずれも MS 合併妊産婦での検討は行われていない。

今回の研究結果では、MS の疾患活動性に関与すると考えられる血漿中 NfL と OPN が妊娠前と比較し、出産後早期（出産後 3 ヶ月間）に有意に高値を示していたことから、MS 合併妊娠の疾患活動性を反映するバイオマーカーとしての可能性が示唆された。一方、末梢血リンパ球 Treg は、妊娠期間と比較し出産後に平均値は低値であったが有意差は認められず、疾患活動性のマーカーとしての可能性は低いと考えられた。本研究の Limitation は、症例数は 13 例と少ないこと、妊娠・出産期間中の試料採取タイミングが困難であったことである。今後症例を蓄積し、疾患修飾薬、妊娠出産に関連する再発とこれらバイオマーカーとの関連性について研究を遂行する。

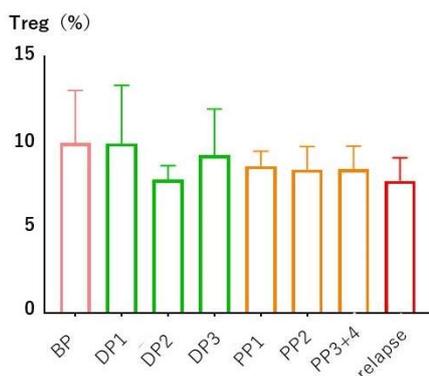
〔結論〕 今回の結果から、血中 NfL と OPN が、MS 合併妊娠の疾患活動性を反映する可能性のあるバイオマーカーである可能性が示唆された。血中 NfL と OPN 用い、MS 合併妊娠に伴う再発予防が可能ならば患者の長期予後が良好になり、QOL の向上と医療資源の適正な分配に貢献できると考えられる。

* : BPと比較し $p < 0.05$



BP:妊娠前,DP1:妊娠第1三半期,DP2:妊娠第2三半期,DP3:妊娠第3三半期,PP1:出産後~90日,PP2:出産後91~180日,PP3+4:出産後181~1年後,OPN:osteopontin,NfL: Neurofilament light chain, Treg: regulatory T cell

図 1. MS 妊娠出産期における血中 OPN と NfL の変化



BP:妊娠前、DP1:妊娠第1三半期、DP2:妊娠第2三半期、DP3:妊娠第3三半期、PP1:出産後~90日、PP2:出産後91~180日、PP3+4:出産後181~1年後、Treg: regulatory T cell

図 2. MS 妊娠出産期における末梢血リンパ球 Treg の変化

〔文献〕

- 1) Shimizu Y, et al. J Neuroimmunol.263(1-2):148-51,2013
- 2) Varhaug KN, et al. Front Neurol. Apr 5;10:338.doi: 10.3389. 2019
- 3) Murugaiyan G, et al. J Immunol. 181(11):7480-8 2008

30. POEMS 症候群と血管炎性脳梗塞

鈴木美紀、西村絢子、小林正樹、北川一夫
(脳神経内科学)

〔背景〕 POEMS 症候群 (polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, skin changes) は形質細胞増殖に関連する稀な全身疾患である¹⁾。冠動脈や下肢静脈の虚血性疾患はしばしば報告されているが、脳梗塞の報告は稀である。

〔方法〕 POEMS 症候群の経過中に脳梗塞を合併した症例を報告し、文献的考察を加える。

〔結果〕 51 歳男性。2 型糖尿病でインスリン療法中であった。まず足底のビリビリ感が出現し、徐々に拡大。3 か月ほどの経過で杖歩行となり当院紹介受診。別途の経過として、しびれが出現した頃に、脳梗塞となりアスピリンが開始されていた (他院にて加療で詳細不明)。診察で皮膚は暗褐色に色調変化を認め、腹部 CT で肝脾腫がみられ、臨床的・電気生理学的に多発神経炎をみとめ、血中 IgA- λ が陽性で、POEMS 症候群と診断した。初回血中 VEGF は 14900 pg/ml であった。生検 (神経・リンパ節) 目的にアスピリンを中止したところ、意識障害、失語、右片麻痺が出現した。MRI で左大脳半球の多発性梗塞、MRA で左 M1 起始部の閉塞を認め、過去の画像と比較し経時的に進行した狭窄が確認された。POEMS 症候群に関連した血管炎性脳梗塞と診断、後療法は抗血小板薬 2 剤併用療法とした。その後化学療法後に自家末梢血幹細胞移植を行い、経過は良好である。

〔考察〕 VEGF 値は、POEMS 症候群の病態に密接に関連していると共に、疾患活動性や治療効果判定にも関連する²⁾。過去に報告されている症例では VEGF は高くても 2000~3000 pg/ml 程度であるが、本例は脳梗塞発症時 VEGF 16900 pg/ml であり、疾患活動性が極めて高いと考えられた。

〔結論〕 VEGF 高値の POEMS 症候群の症例では、脳梗塞を発症するリスクが高い。

〔文献〕

- 1) Dispenzieri A. (2014) Am J Hematol 89 : 214-223
- 2) Misawa S, Sato Y, Katayama K, et al. (2015) BMJ Open 5: e009157

〔学会発表〕

- 1) 西村絢子ら. MCA 領域に血管炎性脳梗塞を合併した POEMS 症候群の 1 例. 第 47 回日本脳卒中学会学術集会、大阪、2022/3
- 2) 本例は学部 3 年生の研究プロジェクトの症例報告でも使用した。