

4 1. IgG4 関連副鼻腔炎の病態形成機序の解明

野島知人、瀬尾友佳子、中本実沙、ヤマカワ詩央、野中学
(耳鼻咽喉科学)

〔目的〕 近年、IgG4 関連疾患には慢性鼻副鼻腔炎(CRS)を高率に合併するという報告が複数あり¹⁾、ステロイドへの反応性が良いことなどからも、通常の CRS とは異なる IgG4 関連疾患として独立した CRS である可能性が考えられている。IgG4 関連疾患に伴う CRS では、鼻副鼻腔粘膜局所において IgG4 産生が亢進していると考えられ、他の CRS とは異なる IgG4 産生を促進する免疫機序が存在している可能性がある。

本研究では、IgG4 関連疾患に伴う CRS と他の CRS で、鼻副鼻腔粘膜における IgG4 産生に関連する因子の発現について比較検討した。抗体産生に関与する免疫担当細胞の浸潤や、産生された抗体の IgG4 へのクラススイッチに関与すると考えられる因子の発現について検討を行った。

〔方法〕 2009 年 3 月 16 日～2019 年 5 月 2 日の期間に当科で内視鏡下鼻副鼻腔手術(ESS)を施行した 32 例を対象とした。検体は、ESS を行った際に切除した鼻副鼻腔粘膜組織の残余を使用した。まず対象症例を下記の 4 群に分類した。①IgG4 関連疾患に伴う CRS (n=10)、②血清 IgG4 値、IgE 値が正常値の CRS (n=7)、③血清 IgG4 値正常、IgE 高値の CRS (n=7)、④血清 IgG4、IgE 共に高値で IgG4 関連疾患のない CRS (n=8)。

副鼻腔粘膜として篩骨洞粘膜を用いた。各群の副鼻腔粘膜を免疫グロブリンクラススイッチ関連分子である Activation-induced cytidine deaminase (AID) や IL-10、TGF- β 、また免疫担当細胞のマーカーに対する抗体を用いた免疫染色または染色法により同定した。そして、それぞれの鼻副鼻腔粘膜における陽性細胞数をカウントし、各群間の違いを比較検討した。AID については、real-time PCR でその mRNA 発現の差異も比較検討した。

本研究は本学倫理委員会の承認を受けて行った。(承認番号 5226)

〔結果〕 IgG4 関連疾患に伴う CRS の副鼻腔粘膜では、他の群と比べて、AID 陽性細胞、CD20 陽性細胞が有意に増加していることがわかった。一方で IL-10 や TGF- β 陽性細胞数については各群間で有意差は認められなかった。また、real-time PCR では IgG4 関連疾患に伴う CRS で AID mRNA のコピー数が有意に増加していた。

〔考察〕 Tsuboi らは、IgG4 関連疾患の口唇小唾液腺では、コントロールと比べて IL-10、TGF- β 、AID の発現が優位に増加していたという報告し、これらの因子が IgG4 関連疾患の病態形成に重要な役割を果たしている可能性を報告している²⁾。今回我々もこれらの因子に注目して検討を行った。

IgG4 関連疾患に伴う CRS の副鼻腔粘膜では、免疫グロブリンを産生する B 細胞と免疫グロブリンのクラススイッチの引き金となる AID 陽性細胞が増加していた。AID を発現する細胞は B 細胞や上皮細胞とされる³⁾。今回の検討では AID 陽性細胞、CD20 陽性細胞ともに間質に存在しており、AID を発現していた細胞は B 細胞と推測される。

これらのことから、IgG4 関連疾患に伴う CRS の副鼻腔粘膜局所では、B 細胞の増加や AID の発現亢進による、IgG4 産生を亢進させる特異な機序が生じている可能性が示唆された。今後はその他の IgG4 産生誘導因子等についても検討を行う必要があると考えられる。

〔結論〕 IgG4 関連疾患に伴う CRS の副鼻腔粘膜では、AID 陽性細胞と CD20 陽性細胞が有意に増加していた。これは IgG4 関連疾患に伴う CRS が他の CRS と異なる特異な機序で生じている可能性を支持していると考えられるが、今後さらなる検討が必要である。

〔文献〕

- 1) Moteki H, Yasuo M, Hamano H, et al. (2011) Acta Oto-Laryngologica. 131: 518-526
- 2) Tsuboi H, Matuo N, Iizuka M, et al. (2012) Arthritis Research & Therapy. 14: R171
- 3) Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, et al. (2000) Cell. Sep 1; 102(5): 553-63

〔発表論文〕

- 1) Nojima T, Nonaka M, Seo Y, et al. (2021) Increased expression of activation-induced cytidine deaminase in sinus mucosa from IgG4-related disease patients with comorbid chronic rhinosinusitis. ORL. 83(4): 286-294

〔学会発表〕

- 1) 野島知人、田宮亜希子、田邊愛弓、他. IgG4 関連疾患に伴う慢性鼻副鼻腔炎の IgG4 産生誘導因子に関する検討. 第 118 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会、広島、2017/5
- 2) 野島知人、野中学、瀬尾友佳子、他. IgG4 関連疾患に伴う慢性鼻副鼻腔炎の浸潤細胞の特徴についての検討. 第 117 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会、愛知、2016/5
- 3) Nojima T., Nonaka M., Seo Y., et al. Analysis of IgG4 class switch-related molecules in IgG4-related chronic rhinosinusitis. 16th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Tokyo, Japan, 2016/3

42. ビスホスホネートプロドラッグを抗原とした癌性腹水中の腫瘍浸潤 $\gamma\delta$ 型 T 細胞培養は可能である

阿部結貴¹、小林博人²、菅野俊幸¹、秋澤叔香¹、田畑務¹

(¹産婦人科学、²足立医療センター・輸血・細胞治療部)

〔目的〕 本邦の卵巣癌患者数は近年増加しており、腹膜播種による癌性腹膜炎、腹水貯留の進行した状態で診断されることが多く、未だ予後不良である。ヒト $\gamma\delta$ 型 T 細胞のうち末梢血中に多数存在する V γ 2/V δ 2T 細胞（以下 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は、V γ 2/V δ 2T 細胞を示す）は、マイコバクテリアなどの産生するピロリン酸モノエステルなどの非ペプチド抗原を認識し、細胞内寄生性細菌に対する感染防御を担っている。また、腫瘍細胞内には、メバロン酸代謝経路の中間代謝物であるピロリン酸モノエステルが高濃度に蓄積されており、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の標的となり傷害される。そのため $\gamma\delta$ 型 T 細胞は、癌免疫細胞療法のエフェクター細胞として、国内外で様々なアプローチで臨床試験が行われている¹⁾。田中、小林らは、化学合成したピロリン酸モノエステルの一種の 2 メチル, 3 ブテニル, 1 ピロリン酸 (2M3B-1PP) とインターロイキン 2 (IL-2) で活性化した自己 $\gamma\delta$ 型 T 細胞を用いた進行腎癌に対する養子免疫療法の臨床試験を実施し、有効性を報告した²⁾。In vitro においては、末梢血単核球に 2M3B-1PP やゾレドロン酸、増殖因子として IL-2 を加える事で大量培養が可能である。さらに IL-18 を添加する事で、CD56 陽性 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖を促し、細胞傷害活性が増強する事が報告されている³⁾。

癌性腹水から回収した腹水細胞中には、腫瘍浸潤 T 細胞(Ascites Infiltrating Lymphocytes: AILs) 以外に癌細胞を含んでいるが、ゾレドロン酸と IL-2 を用いて培養すると、AILs 中の $\gamma\delta$ 型 T 細胞が増殖すると共に、癌細胞が著明に減少することも見出されている⁴⁾。また、本来破棄される腹水濾過濃縮時に使用される濾過カラムの中空糸内からは大量の AILs が回収可能であり、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の培養も可能である⁵⁾。しかし、細胞増殖に関しては、同じ培養条件では末梢血 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の約 1/50 と培養効率が低く、4L の腹水を濾過したカラムより回収した AILs を全て培養しても、現状では臨床試験に供するに足る細胞数を得ることができない。そこで、AILs 中の $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖を阻害する要因を探索、分析することを目指している。今回は新たに $\gamma\delta$ 型 T 細胞を活性化させる抗原として合成されたビスホスホネートプロドラッグである tetrakis-pivaloyloxymethyl 2-(thiazole-2-ylamino)ethylidene-1,1-bisphosphonate(PTA)^{6),7)}を、AILs 中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞増殖のための抗原として用い、培養できるかを検討した。

〔方法〕 東京女子医科大学病院産婦人科に入院中で、癌性腹水貯留に対して腹水濾過濃縮再静注法を行った患者から同意を得て、腹水濾過膜に付着した単核球を採取した。抗原として 2M3B-1PP またはゾレドロン酸または PTA を用い、IL-2 と IL-18 を添加して 14 日間培養した。培養前後にフローサイトメトリーを用いて細胞表面抗原を解析した。この研究は「癌性腹水微小環境が及ぼす $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖抑制解除を目指した新規免疫細胞療法開発」(承認番号 5376)として本学倫理委員会で承認を受けて行っている。

〔結果〕 PTA を抗原とした、AILs 中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の培養は可能であった。さらに、PTA を用いて培養した方が、他の抗原を用いた時よりも培養後 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖率が高かった。

〔考察〕 癌細胞が混在する腹水の場合は、ピロリン酸モノエステルよりも、ゾレドロン酸の方が有用であると報告がある⁴⁾。PTA は新たな $\gamma\delta$ 型 T 細胞を活性化させる抗原として合成され、ゾレドロン酸などの第 3 世代ビスホスホン酸の親水性を減弱させた構造を有し、腫瘍細胞に取り込まれやすくなっている^{6),7)}。そのため、腹水中の細胞の様に癌細胞が混在する場合は、より効率的に $\gamma\delta$ 型 T 細胞を活性化できると考えられる。

〔結論〕 ビスホスホネートプロドラッグを、AILs 中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞増殖のための抗原として用い、培養することが可能であった。

〔文献〕

- 1) Kobayashi H., Tanaka Y. (2015) *Pharmaceuticals (Basel)*. 8(1): 40-61
- 2) Tanaka Y., Kobayashi H., Terasaki T., et al. (2007) *Medicinal Chemistry*. 3(1): 85-99
- 3) Abe Y., Kobayashi H., Akizawa Y., et al. (2018) *Annals of Cancer Research and Therapy*. 26(2): 71-6
- 4) Abe Y., Kobayashi H., Akizawa Y., et al. (2018) *Anticancer Res*. 38(7): 4327-31
- 5) Abe Y., Kobayashi H., Kanno T., et al. (2019) *Annals of Cancer Research and Therapy*. 27(2): 73-9
- 6) Matsumoto K., Hayashi K., Murata-Hirai K., et al. (2016) *Chemmedchem*. 11(24): 2656-63
- 7) Tanaka Y., Iwasaki M., Murata-Hirai K., et al. (2017) *Scientific Reports*. 7

4.3. ヒト原始卵胞に対する体外培養の試み – 続報

中林章

(産婦人科学)

〔目的〕 小児や若年性の悪性腫瘍に対する治療成績の向上に伴い、抗がん剤や放射線の生殖への毒性から妊孕能を温存する「fertility preservation」の概念が注目されている。男性では精子凍結が一般的な手技として普及しており、射出ができない場合に精巣組織凍結が考慮される。女性の場合、卵子を採取するためには、排卵誘発剤を使用し針で卵胞を穿刺する採卵が必要となり、得られる卵子も少ない。一方、卵巣組織凍結は大量の卵子を得られる利点があり、凍結保存技術も確立されており、2004年に、卵巣組織凍結保存後の自家移植による出産が報告された¹⁾。しかしながら、自家移植された卵巣組織片が生着する際に多くの卵子が障害を受けることや、自家移植の際の癌細胞の再移入の問題があり、2013年の報告では世界で約50例が成功しているにすぎない²⁾。2015年にXaioらが初めてヒト原始卵胞を体外培養し成熟卵子を得たことを報告し³⁾、新たな技術として期待されている。本技術が将来臨床応用されることが期待されており、研究開始当初は、原始卵胞から体外培養された卵子の評価を行うことを目的としていた。しかし、体外での原始卵胞発育が確認できず、まずは原始卵胞の発育を目的とした。

〔方法〕 本研究の対象は東京女子医科大学病院産婦人科に入院し卵巣を摘出する患者であり、今回、原始卵胞数が十分あると予想される若年女性を対象とした。清潔野で卵巣皮質を採取し、ピルビン酸ナトリウム、グルタミン、ヒト血清アルブミン、抗菌薬を添加したライボビッツ培地に入れ、培養室に運んだ。培養室に運んだ卵巣皮質を約1mm³の大きさに細切し、顕微鏡で観察し発育した卵胞を取り除いた。HEPES緩衝液、グルタミン、ヒト血清アルブミン、抗菌薬、トランスフェリン、セレンウム、ヒトインスリン、rFSH製剤、アスコルビン酸を添加したマッコイ5A培地で8日間培養した。その後、アクチビンAを加え、さらに8日間培養した。なお、本研究は東京女子医科大学倫理委員会での審査を経て実施した。

〔結果〕 卵巣を摘出する卵巣癌の20歳女性に対して実施した。卵巣皮質の採取に際しては、卵巣表層上皮、卵巣白膜の内側に位置している帯状構造を意識して行った。また、培養後の観察を容易にするため、なるべく組織が薄くなるように細切した。24ウェルプレートで計96切片を16日間培養した。培養後、顕微鏡下に切片を観察したが、明確な卵胞を確認することはできなかった。

〔考察〕 今回も、Telferらの報告⁴⁾に従い培養を実施した。今回で4回目の試みとなり、不慣れな操作はなかった。多くの原始卵胞が存在する若年であれば、体外での原始卵胞発育が期待できると予想していたが、実際には発育を確認することはできなかった。Telferらは、帝王切開術時に正常な卵巣を一部摘出しており、この点が卵巣腫瘍のある卵巣を摘出した今回との相違であり、原始卵胞発育が認められなかった要因として考えられる。一方、ヒト原始卵胞の体外培養における報告はTelferら以降なく、本研究が時期尚早であると判断した。

〔結論〕 原始卵胞を体外で培養し成熟卵子を得ることが可能となれば、「がんサバイバー」が将来妊娠する可能性を高めることができ、また、挙児希望で治療反復不成功の夫婦に対しても新たな治療法となり得る。さらに、体外での培養は、成熟卵子への発育のメカニズム解明の糸口となる。生殖医療の発展のため、引き続き研究を進めていきたい。

〔文献〕

- 1) Donnez J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Lancet 2004, 364: 1405-10
- 2) Stoop D, et al. Fertility preservation for age-related fertility decline. Lancet 2014, 384: 1311-9
- 3) Xiao S, et al. In vitro follicle growth supports human oocyte meiotic maturation. Sci Rep 2015, 27;5:17323. doi: 10.1038/srep17323
- 4) M.McLaughlin, et al. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multistep culture system. Mol. Hum. Reprod. 2018, 24(3): 135-142

〔発表論文〕

- 1) 中林章. (2020) ヒト原始卵胞の体外培養により得られる卵子の質的評価. 赤枝医学研究財団年俵あゆみ. 第5号: 52-53.

体内：原始卵胞→前胞状卵胞→胞状卵胞→成熟卵胞→排卵→成熟卵子 体外：卵巣摘出→原始卵胞の体外培養→未熟卵子の体外培養→成熟卵子

図1. 成熟卵子になるまでの過程

4.4. 情動記憶処理に対する抗精神病薬の効果

押淵英弘、不破達、榎本幸輔、柴田和郎、西村勝治
(精神医学)

〔目的〕 精神疾患に共通する病態としてストレスへの脆弱性が想定されてきたが、近年、ストレスに対する回復力（レジリエンス）が注目されている。しかし、レジリエンス機構は生物学的に解明されていない。著者らはこれまで、ストレス脆弱性に、情動記憶想起時の扁桃体ドーパミン過剰放出が関連すること、ドーパミン受容体遮断薬である抗精神病薬がこの扁桃体ドーパミンの過剰放出を安定化することを見出してきた¹⁾。一方で、抗精神病薬が扁桃体ドーパミン放出を安定化することは、情動記憶想起時の恐怖の行動上の表出（すくみ行動）には影響しない。この結果から、「抗精神病薬が扁桃体ドーパミン放出を安定化することは、その後の情動記憶の意味づけに作用している」という作業仮設が考えられた。昨年度には、抗精神病薬である haloperidol の急性投与が情動記憶の消去を遅延させることを見出した（紀要 41）。本年度は、抗精神病薬の慢性投与の情動記憶消去過程への効果を検証することを目的とした。

〔方法〕 7 週令雄性 SD 系ラットを用いた。

1) 恐怖条件付け：30 秒間ブザー音と 0.8mA フットショックを同時に提示した。2) haloperidol(HAL) 慢性投与：HAL 1.0 mg/kg または同量の溶媒を 14 日間連続で投与した。3) すくみテスト：ブザー音を提示しすくみ行動を測定した。1 日おきに計 10 回行った。第 1 回目のみ、ブザー音提示前に HAL 0.1 mg/kg または同量の溶媒(SAL)を腹腔内に投与した。対象を 2) で HAL 慢性投与の有無の 2 群 (HAL or SAL) に分け、それぞれを 3) で HAL 急性投与の有無の 2 群 (hal or sal) に分けた。計 4 群(HAL/hal, HAL/sal, SAL/sal, SAL/sal)により情動記憶の消去過程に対する HAL の効果を検証した。

本研究は東京女子医科大学動物実験委員会の承認を得、各指針を遵守して行った。

〔結果〕

1) 第 1 回目のすくみ時間は、HAL/SAL 群が SAL/SAL 群より統計学的に有意に短縮した。
2) 第 1 回目に対する 2-10 回目のすくみ行動の減少率は、いずれの群も回数に依存して減少したが、群間では SAL/HAL 群が有意に遅延した。

〔考察〕 結果は、HAL0.1 mg/kg 単回投与が、情動記憶想起時のすくみ行動に対して急性効果を示さず、その後の消去過程を遅延させることを再現した。HAL 慢性投与は、1) この単回投与の効果を減弱させ、また、2) 情動記憶が想起される以前に消去過程を促進した。

〔結論〕 抗精神病薬の情動記憶処理に対する作用は、投与直後の非特異的鎮静作用ではなく、投与後の情動記憶の意味づけに、文脈的に作用していることが示唆される。

[文献]

- 1) Oshibuchi H, Inada K, Sugawara H, Ishigooka J. Aripiprazole and haloperidol suppress excessive dopamine release in the amygdala in response to conditioned fear stress, but show contrasting effects on basal dopamine release in methamphetamine-sensitized rats. *Eur J Pharmacol.* 2009 Aug 1;615(1-3):83-90. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.05.006. Epub 2009 May 27. PMID: 19477171

[学会発表]

- 1) 榎本幸輔. 情動記憶処理に対するハロペリドール慢性投与の効果について. 2022 年度日本神経精神薬理学会、福岡、2022/6
- 2) 榎本幸輔. ストレス体験における情動記憶処理過程についての検討. 2022 年度日本精神神経学会、東京、2022/11

4 5. Trifluridine の効果予測因子と耐性メカニズムの検討

中島豪¹、出雲渉^{1,2}、倉持英和¹

(¹化学療法・緩和ケア科、²消化器・一般外科)

〔目的〕 Trifluridine は結腸・直腸癌および胃癌に臨床応用されている抗がん剤である。第 III 相臨床試験の結果、プラセボと比較して結腸・直腸癌については全生存期間 7.1 カ月（プラセボ 5.3 カ月、 $P<0.0001$, HR0.68）、胃癌については全生存期間 5.7 カ月（プラセボ 3.6 カ月、 $P=0.0003$, HR0.69）と統計学的有意差をもって生命予後を延長することが知られている^{1),2)}。いずれのがん種についても、現在の診療ガイドラインでは後方ラインでの使用が推奨されているため、がんが進行している症例への使用となることが多く、投与による有害事象から体力低下、QoL 低下を来す症例も多い。現在、Trifluridine の奏功性を予測するための手段は確立していないが、効果予測が可能となれば、奏功性の低い症例への Trifluridine 投与回避、他剤検討が出来るようになり QoL の維持や緩和ケアの早期介入が可能となる。また奏功性の低い抗がん剤投与を回避することで医療経済上のメリットも期待できる。今回、Trifluridine への耐性細胞株を作製し、耐性に関わる因子を遺伝子学的背景から検討する。また、臨床症例で Trifluridine を投与された症例の奏功性とその患者のがん組織から得られた遺伝子学的背景とを検討し、Trifluridine 耐性株での遺伝子学的背景との相同性をみる。

〔方法〕 大腸癌培養がん細胞株を用いて Trifluridine 含有培地で継代し耐性株を作成する。元の細胞と耐性株との網羅的遺伝子発現比較解析を行い、耐性に関わる遺伝子候補を抽出する。また、耐性に関わる遺伝子候補の発現差異と実臨床の Trifluridine 奏功性について、臨床がん組織検体を用いて解析検討する。

〔結果〕 大腸癌細胞株 HCT116 を使用し、Trifluridine 含有培地で継代し、培養継続中である。現在 40 継代を経過し Trifluridine への濃度耐性を獲得してきている。近く網羅的発現比較解析を行う予定である。

〔文献〕

1) Mayer, R.J. et al. (2015) N. Engl. J. Med. 372(20): 1909-1919

2) K Shitara et al. (2018) Lancet Oncol Nov;19(11): 1437-1448

46. 脊髄性筋萎縮症における治療有効性モニタリングのためのバイオマーカーの開発

大月典子、加藤環、横村守、松尾真理、齋藤加代子
(ゲノム診療科)

〔目的〕 脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy, SMA) は Survival Motor Neuron 蛋白質 (以下 SMN) 欠乏に起因する進行性神経筋疾患である。近年、神経細胞の SMN 発現誘導を目的とした核酸医薬 (2017 年)、遺伝子導入薬 (2020 年)、低分子医薬 (2021 年) が承認された。発症機序の解明に伴い早期の治療開始が望まれているが、信頼性の高い臨床的客観的評価法 (バイオマーカー) が未だ確立されていない。我々は過去に報告したバイオマーカーである機能的 SMN 解析法の再検討に加え、中枢神経系-循環器系 SMN 輸送の可能性¹⁾についての検証を考えた。そこで生体成分特異的な SMN 定量法を構築し、細胞内外の SMN 定量、機能的 SMN 解析と臨床情報を併せて解析する。本研究では、治療法に応じた SMA バイオマーカーの確立、更にその社会実装化を目的としている。

〔方法〕 A あるいは B の 2 種類の薬剤を投与した SMA 群を 1) 薬剤 A の治療開始群と 2) 薬剤 A の治療継続群、さらに 3) 薬剤 B の治療開始群の 3 群に分別した。更に未治療群を加えて 4 群とし、インフォームドコンセントの下に治療過程の末梢血検体を継続的に採取した。以下の 3 点について検討した。

1. イメージングフローサイトメーター (IFC) による CD33 強陽性細胞 (単球画分) の SMN 解析および機能分子群との共局在解析 2. ELISA 法とウエスタンブロット法による細胞外 SMN 定量 (末梢血・脳脊髄液) 3. ELISA 法による単位末梢血単核球当たりの SMN 定量

最終的に、検討結果と臨床情報 (生理学的・生化学的検査および運動機能評価) との相関解析を行う。なお本研究は東京女子医科大学倫理審査委員会より以下の承認を受けて行った。

- ・脊髄性筋萎縮症患者由来細胞を用いた病態解明およびバイオマーカーの確立 (承認番号: No. 4786)
- ・脊髄性筋萎縮症における治療有効性モニタリングのためのバイオマーカーの開発 (承認番号: No. 5639)

〔結果〕 合計 140 症例の結果を得た。IFC による SMN 解析は、解析値の推移が薬剤により異なる傾向を示した。

1) 薬剤 A の治療開始群は 12 例だった。投与後、解析値は上昇するがその後増減を繰り返す。SMN2 遺伝子 (以下 SMN) コピー数が 3 コピー以下では変動幅は 10%以内だが、4 コピーでは 50%に近い。

2) 薬剤 A の治療継続群は 51 例だった。投与前データが存在しないため経時的な変動幅を観察した。A 群と同様に SMN 4 コピー症例は 3 コピー以下の症例より変動幅が大きい。3 コピー以下では年齢に応じて変動幅が減少する傾向にあったが、4 コピーでは年齢の影響が認められなかった。

投与後の解析値を症例毎に平均し、未治療群 37 症例との比較を行った。

SMN コピー数間 (3 群) と SMA 病型間 (3 群)、あるいはコピー数と病型の組み合わせ (6 群) に分類し、解析値との相関を比較した。未治療群では SMN コピー数間でのみ相関が認められ、病型間では認められなかった。一方、継続投与群では、コピー数間、病型間ともに解析値との相関性が認められた。またそれらを組み合わせた 6 群間での一部にも相関性が認められた。

3) 薬剤 B の治療開始群は 40 例だった。うち投与開始より 5 か月以上経過した 20 例は SMN コピー数、病型分類にかかわらず投与前より投与後の SMN 解析値は 1 か月後と 5 か月後で有意に上昇した。

また、運動機能評価は5か月後に有意に上昇し、神経電動検査は一部上昇傾向を示した。

SMN 定量解析は定量法の再現性について検討中である。一斉に比較定量するため、検体分離時に別行程を経て冷凍保存している。

〔考察〕 薬効機序の違いを踏まえ、2種の薬剤とバイオマーカーとしてのSMN解析について考察した。

薬剤Aは局所投与であり、限定的なSMN発現誘導を目的とする。局所で誘導されたSMNが全身に波及するイメージである²⁾。末梢血での影響を言及するには複数回のデータが必要だった。治療開始後SMN解析値は上昇する傾向にあるが、その後増減により変動する。血中濃度の影響を回避するために、薬剤投与と採血のタイミングを一定にした。解析値に経時的な上昇が認められない症例については投薬反応の安定期に入るのか、何らかの抑制機構によるものか明らかではない。しかし、51例の継続投与群と37例の未治療群の比較により、特定のコピー数、病型の群で解析値が投与により高値を示す傾向が認められた。このことによりIFCによるSMN解析は薬剤AにおいてSMA治療感受性の指標となりうる可能性が示された。今後は、解析値と臨床情報の相関性について検討する。

一方経口投与の薬剤Bは薬剤Aと異なり、消化吸収を経て全身的にSMN発現を誘導する。そのため投与によるSMN解析値の速やかな上昇が末梢血に反映されることが期待された。その結果、解析値上昇と共に、運動機能をはじめとした客観的評価項目の有意な改善が認められた。このことによりIFCによるSMN解析は薬剤Bにおいて治療効果の指標となりうる可能性が示された。

〔結論〕 SMN解析値の推移が2種類の薬剤により異なる傾向を示した。本解析法はSMAのバイオマーカーとして、治療法選択あるいは治療評価の指標となりうる可能性が示唆された。今後、凍結保存中の検体によるSMN定量解析の結果を鑑みた後、SMN体内動態についての考察を行う必要がある。

〔文献〕

- 1) Nash LA, McFall ER, Parks RJ, et al. (2017) *Sci. Rep* 7 (1): 13859
- 2) Hornung S, Dutta S and Bitan G, (2020) *Front Mol Neurosci*. 13: 38

〔発表論文〕

- 1) Kato T, Matsuo M, Saito K, et al. (2021 *in press*) An overview of the clinical characteristics of Japanese patients with spinal muscular atrophy: data from SMART consortium. *TWMUJ*. 5
- 2) Otsuki N, Saito K, et al. (2018) A new biomarker candidate for spinal muscular atrophy: Identification of a peripheral blood cell population capable of monitoring the level of survival motor neuron protein. *PloS One*, 13(8) e0201764

〔学会発表〕

- 1) 加藤環、齋藤加代子、他. SMN遺伝子領域のゲノム解析によるSMA患者の遺伝子型と表現型の研究. 日本人類遺伝学会第66回大会 横浜、2021/10

47. *pvl* 保有メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の分子疫学解析

菊池賢、坂間玲子、鎌田啓祐、鶴澤豊、荒井祐子
(感染症科)

〔目的〕 近年、日本におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は従来、New York/Japan clone と呼ばれた病院感染型 (HA)-MRSA: SCC*mec* type II, MLST ST5, *spa*-type t002 から、入院、外来由来株とともに市中感染型(CA)-MRSA: SCC*mec* type IV にほとんどが置き換わりつつある。我々は関東 13 施設で 2018—2019 年に分離された MRSA のゲノム解析を行い、この CA-MRSA の主流が、SCC*mec* type IV, MLST ST1-CC1, *spa*-type t1784 の新たなクローンで占められていることを報告した¹⁾。その一方で、よう、せつなどの皮膚軟部組織感染や壊死性肺炎を起こす白血球溶解毒素 Pantone-Valentine Leukocidin (PVL) を産生する MRSA が急増していることも見いだした¹⁾。しかし、近年、分離される MRSA のうち PVL をコードする遺伝子 *pvl* を保有する MRSA がどのようなクローンとして広がっているのか、皮膚軟部組織感染以外にも広がりを見せているのかは明らかにされておらず、今回、調査を行った。

〔方法〕 2019 年 1 月から 2022 年 10 月までに当院で分離された MRSA 643 株 (観察期間内の重複削除、1 例 1 株とした入院患者由来 377 株、外来患者由来 266 株) について、PCR にて *pvl* を検出し、得られた *pvl* 保有 MRSA 68 株について、MIC 測定、SCC*mec* type, 各種毒素遺伝子、*spa*-type, MLST を行った¹⁾。

〔結果〕 図 1 に得られた MRSA の入院、外来由来別を示す。入院患者由来株では 7%、外来患者由来株では 16% が *pvl* を保有していた。図 2 に外来患者由来 *pvl* 保有株の分離株数の年次推移を示す。2019-2021 年までは 17-19% と高い分離率を示していたが、2022 年は 2% と低くなっていた。図 3 には入院患者由来 *pvl* 保有株の分離株数の年次推移を示す。2022 年に 12.5% と急増している。図 4 には各種抗菌薬への耐性率を示す。LVFX, EM の耐性は 80% を越えている。しばしば CA-MRSA 治療薬として用いられている CLDM への耐性も 30% 近くに及んでいた。このうち 5 株に誘導型マクロライド耐性を示しており、誘導試験を確認しないと、CLDM 感受性と誤って判定されるものであった。一方、FOM, MUP, VCM, TEIC, RFP, ST に対する耐性は認められなかった。図 5 に *pvl* 保有 MRSA 68 株の *spa*-type 結果を示す。57% を占めたのが t008 でこれは SCC*mec* type IV, MLST-ST8 の世界を席卷している USA300 と呼ばれるクローンである。一方、USA300 以外では、複数の t005, t852, t1784, t024, t437 型の株が認められ、トータルでは 18 種類の多岐に渡る型が見られた。図 6 に遺伝子型のまとめを示す。遺伝子型では少なくとも 20 種類のクローンが存在していた。この中には急速に国内で市中感染のみならず、病院感染にも蔓延しつつある t1784 や t005 が含まれていた。t1784 では通常、*sea*, *seh* 保有株が多いのだが、3 株 *pvl* 保有株が見つかった。t005 は *sec*, *tst*, *seg*, *sei* を保有する New York/Japan に代わる HA-MRSA として注目される株である。このように、USA300 以外の非常に多様な MRSA に *pvl* が広がっている事が今回の調査で初めて、明らかとなった。

〔考察・結論〕 これまで、日本を含む世界各国で *pvl* 保有 MRSA の急増は報告されているが、その多くは t008, ST8, SCC*mec* type IV の USA300 およびその類縁クローンであった。今回の調査で、初めて、非常に多様な MRSA クローンに *pvl* が拡散していることが明らかになった。2019 年 12 月に始まった COVID-19 の世界での蔓延は、Covid-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) などそれに伴う様々な感染症の多様化を引き起こしている。*pvl* 保有 MRSA が COVID-19 蔓延により、その勢力拡大や病原性の変化などに寄与している可能性もある。今後、これらの株の病原性や疫学について、注意深く観察すべきと考えた。

〔文献〕

1) Ogura K, Kaji D, Sasaki M, Otsuka Y, Takemoto N, Miyoshi-Akiyama T, Kikuchi K. Predominance of ST8 and CC1/spa-t1784 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Japan and their genomic characteristics. J Glob Antimicrob Resist. 2022 Mar;28:195-202. doi: 10.1016/j.jgar.2022.01.011. Epub 2022 Jan 29. PMID: 35092827

〔発表論文〕

1) Ogura K, Kaji D, Sasaki M, Otsuka Y, Takemoto N, Miyoshi-Akiyama T, Kikuchi K. Predominance of ST8 and CC1/spa-t1784 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Japan and their genomic characteristics. J Glob Antimicrob Resist. 2022 Mar;28:195-202. doi: 10.1016/j.jgar.2022.01.011. Epub 2022 Jan 29. PMID: 35092827

〔学会発表〕

1) 菊池賢 PVL 産生 MRSA-市中感染型 MRSA の変遷. 第 86 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 シンポジウム. 2022.11.20. 東京.

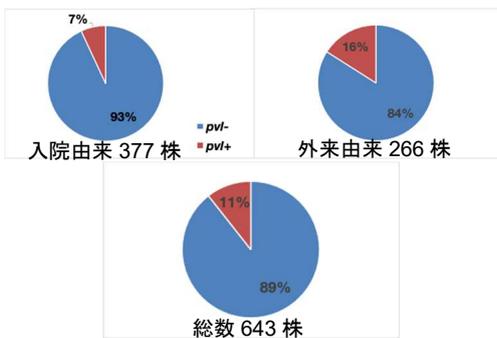


図 1. 2019-2022 *pvl* 保有 MRSA

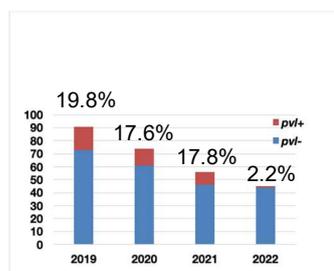


図 2. 外来患者由来 *pvl* 保有 MRSA の分離株数

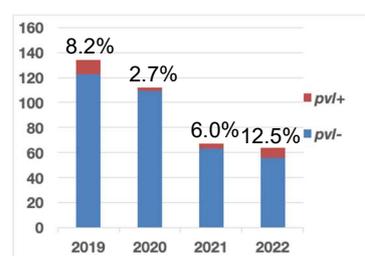


図 3. 入院患者由来 *pvl* 保有 MRSA の分離株数

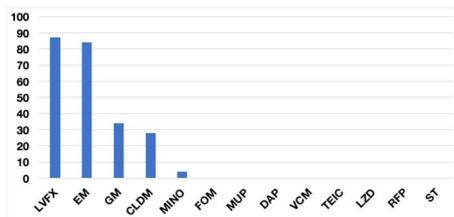


図 4. 2019-2022 *pvl* 保有 MRSA 68 株の薬剤耐性率(%)



図 5. 2019-2022 *pvl* 保有 MRSA の *spa*-typing

spa	SCC <i>mec</i>	Other toxin genes	n	%
t008	IV	none	39	57.35
t005	IV	tst, sec, seg, sei	5	7.353
t008	IV	tst, seg, sei	1	1.471
t852	IV	seg, sei	4	5.892
t1784	IV	seg, seh	2	2.941
t11784	IV	seh	1	1.471
t024	IV	none	2	2.941
t437	IV	seb	1	1.471
t019	V	seb	1	1.471
t034	IV	seg, sei	1	1.471
t034	V	none	1	1.471
t068	IV	none	1	1.471
t309	IV	seg, sei	1	1.471
t596	IV	seg, sei	1	1.471
t597	IV	seg, sei	1	1.471
t622	IV	none	1	1.471
t597	IV	none	1	1.471
t1255	V	none	1	1.471
t3081	IV	none	1	1.471
t5989	IV	none	1	1.471
t6653	IV	seg, sei	1	1.471
total			68	100

図 6. 2019-2022 *pvl* 保有 MRSA 遺伝子型

48. ヒストン修飾因子に注目した骨髄異形成症候群と自己免疫疾患の共通分子基盤の解明

岩崎正幸、世良康如、本田浩章
(実験動物研究所)

〔目的〕 エピジェネティクス制御の破綻が造血器腫瘍や自己免疫疾患の発症・維持に重要な役割を果たしている。骨髄異形成症候群(MDS)には自己免疫疾患が高頻度に合併することが知られているが、その理由は不明である。我々はヒストン脱メチル化酵素 UTX ノックアウトマウスを作製したところ、MDS 様の病態に加えて自己免疫疾患の病像を呈することを見出した。本研究は MDS と自己免疫疾患の合併疾患モデルである UTX 欠失マウスの解析を通じて、両疾患に存在する共通の分子メカニズムを明らかにし、新規治療法開発の探索を目的とする。

〔方法〕 tamoxifen 腹腔内投与後、UTX を全身で後天性に欠失を誘導することが可能なコンディショナルノックアウトマウスとコントロールマウスからリンパ節細胞を調整し、flow cytometry を用いてリンパ系細胞の頻度を調べた。さらにノックアウトおよびコントロールマウスとの造血細胞を用いた RNA-seq を行い、網羅的遺伝子発現解析を行った。

〔結果〕 UTX 欠失マウスのリンパ節における CD4⁺T 細胞の頻度を調べたところ、Wt マウスに比べ顕著に減少していることが明らかとなった (図 1)。造血細胞における遺伝子発現解析では、UTX 欠損細胞では制御性 T 細胞(Treg)関連の免疫抑制性サイトカイン・アダプター分子の発現が強く抑制されている一方で、複数のインターフェロン関連分子の発現が高度に増強していた (表 1)。

〔考察〕 今回の結果は、UTX 欠失はヒストン H3K27 メチル化脱制御を介して遺伝子発現を攪乱することにより、MDS を誘発する一方で、免疫機構の障害が生じ、自己免疫疾患発症にも寄与していることを強く示唆した。また、MDS における造血不全の一因として免疫機構の異常が示唆され、Treg の関与も指摘されているが^{1),2)}、我々の遺伝子発現解析の結果はそれを裏付けるものであった。

〔結論〕 我々が作製した UTX 欠失マウスは MDS と自己免疫疾患発症を説明しうる初めてのモデルマウスであり、今後、さらに UTX 欠失マウスの病理および免疫異常の解析を進めていくことで、UTX 欠失が MDS および自己免疫疾患発症に関与する共通の分子機構を明らかにしていきたい。

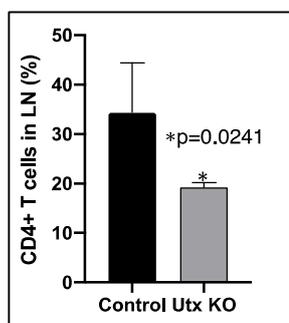


図 1. リンパ節における CD4⁺T 細胞の頻度

表 1. 造血細胞における遺伝子発現解析

発現低下遺伝子		発現上昇遺伝子	
遺伝子名	KO/Ctrl	遺伝子名	KO/Ctrl
Ctla4	0.19	Ifng	18.0
Lag3	0.32	Ifi204	11.3
Ebi3	0.06	Ifi205	42.0
IL-10	0.48	Cxcl9	18.4
Nlrc3	0.23	Cxcl10	16.9
Lax1	0.15	Irf1	1.9

[文献]

- 1) Voulgarelis M., Giannouli S., Ritis K., et al. (1997) *Eur J Clin Invest.* 34(10): 690-700
- 2) Kordasti SY., Ingram W., Hayden J., et al. (2007) *Blood.* 110: 847-850

4 9 . Compass-like 複合体構成因子 PTIP のハプロ不全型造血器腫瘍発症機構の解析

世良康如、岩崎正幸、本田浩章
(実験動物研究所)

〔目的〕 骨髄系腫瘍の病態には染色体異常やエピジェネティクスの破綻が重要な役割を持つ。7番染色体モノソミーや長腕の部分欠失 (-7/del(7q)) は骨髄系腫瘍で広く認められ、エピジェネティック因子 MLL3 など 7q に位置する複数のがん抑制遺伝子のハプロ不全の蓄積により骨髄系腫瘍の病態に寄与すると考えられているが、未知の 7q 上のハプロ不全型のがん抑制遺伝子の寄与も推察される¹⁾。PTIP は MLL3 とともに Compass-like 複合体を形成して、エンハンサー領域を規定するエピジェネティック因子である。興味深いことに PTIP は 7q に位置しており、骨髄系腫瘍において発現低下を認めた。本研究は、骨髄系腫瘍における PTIP のがん抑制遺伝子としての可能性を検討する。

〔方法〕 *Ptip* コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製し、脾臓のマクロ所見や末梢血中の骨髄細胞数、骨髄中の造血前駆細胞数などを測定した。また、マウス白血病ウイルスを感染させた際の白血病発症の有無とその期間を継時観察した。

〔結果〕 作製した *Ptip* cKO マウスはコントロールマウスと比較して、造血幹前駆細胞数と骨髄球数の増加、レトロウイルス感染による白血病発症感受性の亢進などが認められた (図 1)。

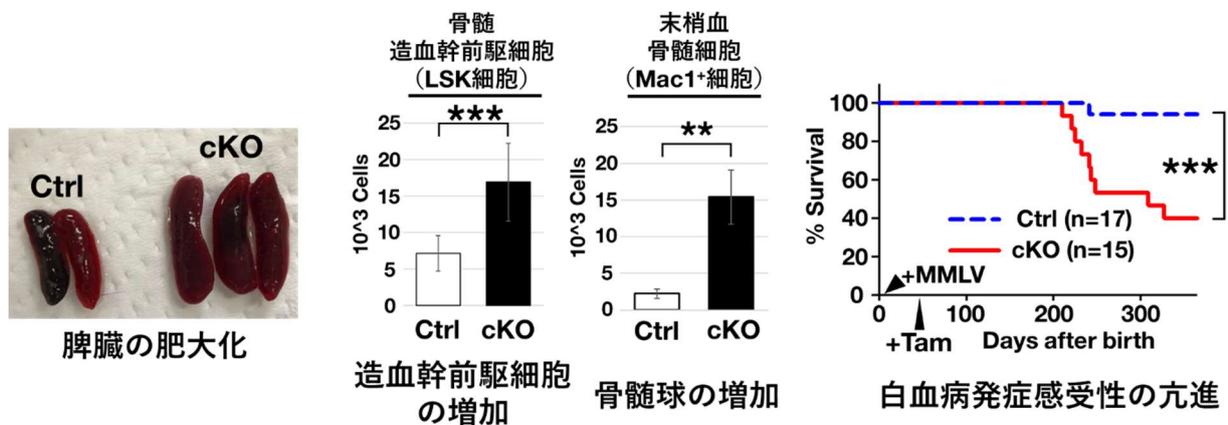


図 1. PTIP ホモ cKO マウスの造血所見

〔考察〕 -7/del(7q)などにともなう PTIP の発現低下は、骨髄系腫瘍の病態に重要な役割をになうことが推察された。

〔結論〕 PTIP のホモ欠失マウスは、造血系は骨髄球分化への偏りや骨髄幹前駆細胞の増加、二次的な遺伝的挿入変異に対する白血病発症感受性の亢進などの表現型を呈したことから、造血器腫瘍の病態に PTIP 欠失が寄与することが強く示唆された。今後はヘテロ欠失マウスの解析や、その他の 7q がん

抑制遺伝子の欠失マウスとの掛け合わせを行い、PTIP のがん抑制遺伝子としての機能を検討していきたい。

[文献]

- 1) Honda H, Nagamachi A, Inaba T., (2015) -7/7q- syndrome in myeloid-lineage hematopoietic malignancies: attempts to understand this complex disease entity. *Oncogene*. 34(19): 2413-25

50. マウスモデルを用いたエピジェネティクス変異による前立腺癌発症機構の解明

村元啓仁^{1,2}、岩崎正幸¹、世良康如¹、本田浩章¹

(¹実験動物研究所、²順天堂大学泌尿器科)

〔目的〕 DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティクス制御は組織恒常性に重要であり、その変異は発癌に深く関与する。前立腺癌では、ヒストン修飾因子である UTX(Ubiquitously Transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome)の変異が高率に認められる¹⁾。UTXはX染色体由来であり、Y染色体にはその相補体である UTY(Ubiquitously Transcribed tetratricopeptide repeat, Y chromosome)が存在するが、前立腺癌においては UTX 変異に加えて UTY 欠失が報告されており、UTX/UTY の機能欠失が協調して発癌に関与している可能性が高い。本研究は我々が独自に作製したモデルマウスおよび前立腺癌細胞株を用いて、前立腺癌発症機構における UTX および UTY 機能欠失の関与を解明することを目的とする。得られた結果は、前立腺癌を含めたヒト悪性腫瘍におけるエピジェネティクス変異による発癌機構に新たな知見ともたらず共に、エピジェネティクス変異やその下流の遺伝子発現変化を対象とした新規治療法の開発に役立つことが期待される。

〔方法〕 前立腺癌の病態における UTX と UTY の機能喪失の関与を明らかにするために、前立腺組織において *Utx* と *Uty* の両方を欠損させた遺伝子改変マウス (*Utx*^A, *Uty*^A) を作製した。また、前立腺癌では *p53* の変異が頻繁に起こるため、腫瘍抑制遺伝子である *p53* をヘテロ接合で欠損させたマウス (*p53*^{+/-}) と交配し、*Utx*^A, *Uty*^A, *p53*^{+/-} マウスを作製した。さらに、前立腺に炎症を起こすことで前立腺癌の発生を促進させるとされている高脂肪食を 8-9 週齢から投与した。また、マウス前立腺癌細胞株 RM-1 とヒト前立腺癌細胞株 C4-2 において、UTX と UTY の両方を siRNA でノックダウンし、コントロール細胞株との生物学的表現型を比較した。

〔結果〕 初めに *Utx*^A, *Uty*^A マウスを用いて前立腺癌が発症するか観察したが、このマウスは前立腺癌を発生しなかった。次に、このマウスに 8-9 週齢から高脂肪食を 6 ヶ月間投与したところ、前立腺上皮内腫瘍が観察された。また *Utx*^A, *Uty*^A, *p53*^{+/-} マウスを観察したところ、7 ヶ月齢で同様に前立腺上皮内腫瘍が観察された。そこで *Utx*^A, *Uty*^A, *p53*^{+/-} マウスに 8-9 週齢から高脂肪食を投与したところ、Gleason score = 3+3 の前立腺癌の発症が観察された(図 1)。*In vitro* においては、UTX と UTY の両方を siRNA でノックダウンした RM-1 と C4-2 細胞は、コントロール細胞と比較して増殖能、遊走能、浸潤能が増加した(図 2)。

〔考察〕 過去に報告された前立腺癌モデルマウスで *p53* 変異を導入して作成されたマウスは、*p53* 変異とともに *PTEN* や *Rb* などの癌抑制遺伝子を変異させて作成していた²⁾。申請者は、前立腺組織特異的 *Utx* 欠失および *Uty* 欠失、*p53* ヘテロのマウスに高脂肪食を投与して前立腺癌モデルマウスの作成に成功しており、前立腺癌におけるエピジェネティクス変異モデルとしては世界で初めてのマウスモデルである。このマウスを使用することによりヒト前立腺癌に近い結果を得ることが期待できる。また、*In vitro* の結果から、前立腺癌発症機構に UTX 欠失と UTY 欠失が寄与していると考えられる。本研究によって UTX および UTY の機能が明らかになれば、UTX 欠失や UTY 欠失がみられる泌尿器

癌以外での癌腫でも、発症機構の解明につながる可能性がある。今後 UTX、UTY 欠失による分子機構解明のため、マウス前立腺組織で RNA seq およびパスウェイ解析として gene set enrichment analysis (GSEA)を行い、網羅的に遺伝子発現変動を比較する。また、H3K27me3 および H3K4me1 に対する抗体で免疫染色を行い、表現型が UTX による H3K27 脱メチル化によるものか、または Compass-like complex を介したもののかについて検討する。

〔結論〕 前立腺癌発症機構に UTX 欠失と UTY 欠失が寄与していると考えられる。本研究によって UTX および UTY の機能が明らかになれば、UTX 欠失や UTY 欠失がみられる泌尿器癌以外での癌腫でも、発症機構の解明につながる可能性がある。

図 1

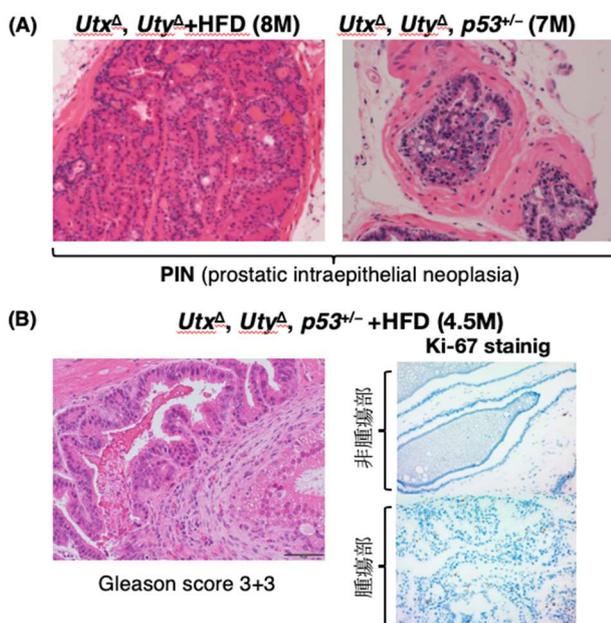


図 1. マウス前立腺 HE 染色 Ki-67 染色

(A) *Utx*^Δ, *Uty*^Δ+HFD (8M)、*Utx*^Δ, *Uty*^Δ, *p53*^{+/-} (7M)マウスでは前立腺上皮内腫瘍がみられる。

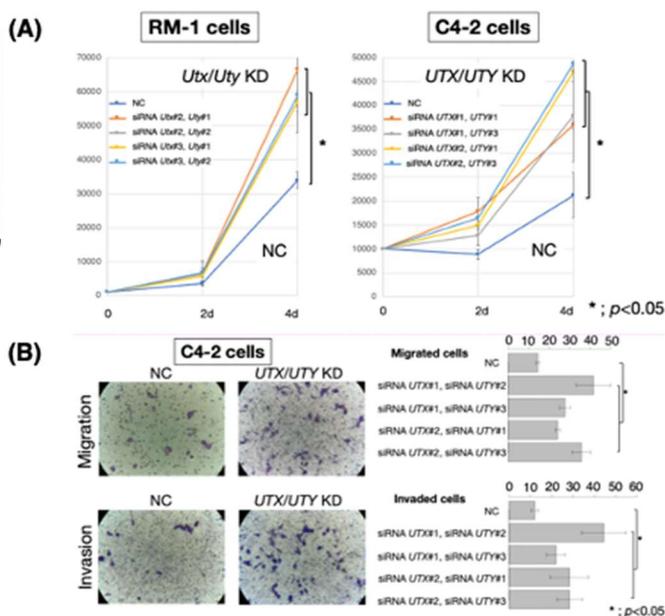
(B) *Utx*^Δ, *Uty*^Δ, *p53*^{+/-} +HFD (4.5M)では Gleason = 3+3 の前立腺癌の発症がみられる。Ki-67 染色では腫瘍部での陽性細胞の増加がみられる。

図 2. RM-1、C4-2 による細胞増殖曲線、遊走能、浸潤能アッセイ

(A) 細胞増殖曲線;コントロール細胞と比べて UTX/UTY ノックダウン細胞で増殖能上昇がみられる

(B) 遊走能、浸潤能アッセイ;コントロール細胞と比べて UTX/UTY ノックダウン細胞で遊走能、浸潤能上昇がみられる

図 2



〔文献〕

- 1) Van der Meulen J., Speleman F., Van Vlierberghe P. (2014) The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. *Epigenetics* 9(5): 658-668
- 2) Wu X., Gong S., Roy-Burman P., et al. (2013) Current mouse and cell models in prostate cancer research. *Endocrine related cancer* 20(4): 155-170