

## 5 1 . ExpiSf Expression System を用いたリコンビナントタンパク質産生

増田信奈子

(先端生命医科学研究所)

〔目的〕 血管新生は生体の恒常性維持に不可欠であり、促進系と抑制系のバランスにより制御されているが、抑制系については不明な点が多く残されている。これまでに我々は心臓線維芽細胞が血管新生を抑制することを見出してその責任分子として LYPD1 を同定し、<sup>1)</sup>「LYPD1 は血管新生抑制活性を介して心臓における恒常的な構造およびその機能の維持に寄与する」と想定している。本研究では LYPD1 の相互作用分子の検索や機能部位の同定に向けて昆虫細胞を用いた LYPD1 タンパク質の大量発現系を構築することを目的とした。

〔方法〕 昆虫細胞 (ExpiSf9) を用いたタンパク質発現系は Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Gibco) を用いて構築した。ExpiSf9 はバイオシェイカーを用いて 27.5°C、110rpm で攪拌培養した。大腸菌 (DH5α) に導入して増幅し、抽出精製した GST 融合 LYPD1 プラスミドを大腸菌 (DH10Bac) に導入して組み換え Bacmid DNA を調整した。組み換え Bacmid DNA を ExpiSf9 に導入し、組み換えバキュロウイルスを調整した。組み換えバキュロウイルスを感染させた ExpiSf9 におけるタンパク質発現をウェスタンブロットで解析し、GST 融合 LYPD1 タンパク質の活性をマトリゲルアッセイで評価した。

〔結果〕 ExpiSf9 は播種密度を調整し 3 日または 4 日毎に継代することで passage 25 まで安定的に培養することができた。大腸菌 DH5α および DH10Bac への導入を経て GST 融合 LYPD1 配列を組み込んだ Bacmid DNA が得られ、これを passage 16 から 19 の ExpiSf9 に導入することで P0 の組み換えバキュロウイルスを調整した。ExpiSf9 への Bacmid DNA の導入は 3 回行ったが、得られた組み換えバキュロウイルス P0 を ExpiSf9 へ感染させた際に、いずれの P0 ストックを用いた場合でも GST 融合 LYPD1 タンパク質の発現をウェスタンブロットで検証できた。組み換えバキュロウイルスを感染させた ExpiSf9 から精製した GST 融合 LYPD1 タンパク質の機能を評価するために HUVEC のマトリゲルアッセイに添加したところ血管新生抑制活性は見られなかった。

〔考察〕 GST 融合 LYPD1 を組み込んだバキュロウイルスを ExpiSf9 に感染させリコンビナントタンパク質を得ることは出来たが血管新生抑制活性を保持していなかった。今回 GST が LYPD1 の C 末端に融合したリコンビナントタンパク質を設計したが、GST を融合する位置または融合タグ自体がタンパク質発現や活性に影響する可能性が考えられた。

〔結論〕 ExpiSf9 を用いたタンパク質発現系の構築は達成されたが、血管新生抑制活性を保持した GST 融合 LYPD1 タンパク質は得られなかった。今後は GST 等の融合タグの種類や位置を検討し、活性を保持した LYPD1 リコンビナントタンパク質の調整を試みる。

[文献]

- 1) Masuda S, Matsuura K, Shimizu T. (2018) Inhibition of LYPD1 is critical for endothelial network formation in bioengineered tissue with human cardiac fibroblasts. *Biomaterials*. 166: 109-121

## 5 2. 体位性頻脈症候群 (POTS) におけるアドレナリン受容体抗体の研究

佐藤恭子<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>足立医療センター・リハビリテーション科、<sup>2</sup>足立医療センター・内科)

〔目的〕 体位性頻脈症候群 (postural tachycardia syndrome, POTS) は、起立時に 30 拍/分以上の著明な心拍数の増加と立ちくらみやめまい、疲労感や睡眠障害等の多彩な症状を呈する病態である。有病率は 1/500 人で、若年の女性に好発する。発症機序として交感神経の過緊張、急性自律神経ニューロパチー、循環血漿量の低下の関与が指摘されているが、その病態生理と予後はいまだ明らかではない。近年、POTS 患者においてアドレナリン受容体自己抗体の関与が注目されているが、国内で実施できる自己抗体検査はなく、病因の特定や治療選択の点で大きな課題となっている。これまでの報告では POTS 患者における抗アドレナリン受容体抗体 ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ ) の関与<sup>1)</sup>のほか、自己免疫性自律神経節障害患者においてもアセチルコリン受容体抗体や抗ムスカリン性アセチルコリン受容体抗体陽性例が知られている<sup>2)-4)</sup>。今回の検討ではアドレナリン受容体に対する IgG 自己抗体に焦点を置き、自律神経機能、神経液性因子による循環動態と、臨床的フェノタイプとの関連を調査する。

〔方法〕 これまで東京女子医科大学附属足立医療センターで登録された約 60 名及び新しく発症した POTS 患者の中で、臨床研究参加の同意を頂いた者を対象とし、3 年間の研究期間内に 30 名の患者登録を目指す。具体的には、立位時の症状が 6 ヶ月以上続いており、原因となる他の疾患や服薬などが無いもので、起立試験にて立位 10 分以内に心拍が安静臥位より 30bpm 以上上昇する対象者を組み入れる。登録者には担当医による病歴聴取・診察の後、スクリーニング検査として一般生化学検査、12 誘導心電図、起立試験を行う。スクリーニング検査後の被験者に対し、循環自律神経機能検査 (AFT、図







	ベースライン(5分間臥位安静)
	0.1 Hz 呼吸統制 (3分間深呼吸):洞性不整脈
	・ 副交感神経(心臓迷走神経)の評価
	過呼吸(30秒間):
	・ 呼吸性アルカローシスによる脳血管収縮誘発→
	遠心性交感神経低下→血圧低下と末梢血管拡張
	Valsalva試験 (15秒間いきみ)
	・ 圧受容器反射弓の評価
	ハンドグリップ試験 (3分間)
	・ 筋肉、心臓への交感神経遠心路
	寒冷昇圧試験 (1分間)
	・ 交感神経遠心路

図 1. 自律神経機能検査(AFT)

1)、起立試験により心臓自律神経機能を評価する。

アドレナリン受容体はアドレナリン、ノルアドレナリンを始めとするカテコラミン類によって活性化される G 蛋白共役型の受容体である。主に心筋 ( $\beta 1$ ) や血管平滑筋 ( $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ) に存在し中枢神経系シナプス前 ( $\alpha 2$ ) にも存在する。患者血清中の抗アドレナリン受容体 IgG 抗体の有無を検証するための preliminary な実験として既にアドレナリン受容体発現が確認されている SK-N-MC (human neuroblastoma)等

の細胞ライセートを用いてウェスタンブロッティング法 (WB)を行っている<sup>5),6)</sup>。実際には細細胞ライセートの細胞膜画分を抽出し SDS-PAGE 電気泳動後メンブレンにトランスファーし患者血清とインキュベートする。メンブレンを洗浄後ペルオキシダーゼ標識二次抗体と ECL システム (GE ヘルスケア)を用いて血清中の細胞ライセートに対する抗体反応性を検討している。陽性コントロールとしては市販の抗ヒトアドレナリン受容体抗体を用いて WB を行った。

得られた全てのデータは連結可能匿名化された後、リレーショナルデータベースに入力され、R(version

4.1.1.)、JMP Pro (version 16) によって統計処理される。検査結果報告書、症例報告書等個人情報が記入された書類は東医療センター内科にある施錠可能な保管庫にて保存する。

〔結果と考察〕 これまでに血清の提供を受けて SK-N-MC の WB を行った POTS 患者 6 名のうち 4 名でアドレナリン受容体の分子量に相当する 50 kD 付近のバンドの検出が確認されている。

今後はアドレナリン受容体の cDNA を導入した細胞を用いた実験により、今回認められたバンドが抗アドレナリン受容体抗体であることを確認し、臨床データと合わせた解析を予定している。

〔文献〕

- 1) Li H, Yu X, Liles C, Khan M, Vanderlinde-Wood M, Galloway A, Zillner C, Benbrook A, Reim S, Collier D, Hill MA, Raj SR, Okamoto LE, Cunningham MW, Aston CE, Kem DC. Autoimmune basis for postural tachycardia syndrome. *J Am Heart Assoc.* 2014;3:e000755
- 2) Yu X, Stavrakis S, Hill MA, Huang S, Reim S, Li H, Khan M, Hamlett S, Cunningham MW, Kem DC. Autoantibody activation of beta-adrenergic and muscarinic receptors contributes to an “autoimmune” orthostatic hypotension. *J Am Soc Hypertens.* 2012;6:40–47
- 3) Gibbons CH, Freeman R. Antibody titers predict clinical features of autoimmune autonomic ganglionopathy. *Auton Neurosci.* 2009;146:8–12
- 4) Campos LA, Pereira VL Jr, Muralikrishna A, Albarwani S, Bras S, Gouveia S. Mathematical biomarkers for the autonomic regulation of cardiovascular system. *Front Physiol.* 2013;4:279
- 5) Kurose H, Arriza JL, Lefkowitz RJ. Characterization of alpha 2-adrenergic receptor subtype-specific antibodies. *Mol Pharmacol.* 1993;43:444–450
- 6) Moretti S, Massi D, Farini V, Baroni G, Parri M, Innocenti S, Cecchi R, Chiarugi P.  $\beta$ -adrenoceptors are upregulated in human melanoma and their activation releases pro-tumorigenic cytokines and metalloproteases in melanoma cell lines. *Lab Invest.* 2013;93:279

### 5 3 . High serum oxalate concentration associated with coronary artery calcification and lanthanum carbonate in hemodialysis patients

Tetsuya Ogawa, Yoko Nishizawa, Eriko Hirasawa, Mai Tosaka, Ai Horimoto,  
Kiyotsugu Omae and Nobuo Nagano

(Department of Medicine, Tokyo Women's Medical University Adachi Medical Center)

[Purpose] We aimed to demonstrate relationship between serum oxalate concentration and coronary calcification in ESRD patients undergoing hemodialysis

[Methods] Seventy-seven patients undergoing maintenance hemodialysis at single facility who underwent atherosclerosis checkup from 2011 to 2012 were enrolled and measured  $S_{Ox}$  retrospectively on 2021. Seventeen extremely outlying  $S_{Ox}$  patients were excluded and 60 patients including 42 males were analyzed. The median age 64 (35–85) years and median dialysis duration was 87.5 (17.1–410) months. Gender, Agastston's CAC score [2], major artery calcification volume, laboratory data and medications around atherosclerosis checkup date and new-onset cardiovascular disease (CVD) events and deaths during 10-years observation period were recorded. CVD event defined as admission due to non-fatal myocardial infarction, coronary artery disease or heart failure.  $S_{Ox}$  level was measured by commercial colorimetric oxalate assay kit and normal  $S_{Ox}$  level was 181  $\mu\text{mol/L}$ .

[Results] The median  $S_{Ox}$  was 267 (221–563)  $\mu\text{mol/L}$  and new-onset CVD events, all-cause deaths occurred in 28 (47%) and 22 (37%) patients, respectively. In univariate analysis,  $S_{Ox}$  was associated with male ( $r = 0.27$ ,  $P = 0.03$ ), serum albumin ( $r = -0.25$ ,  $P = 0.05$ ), uric acid ( $r = 0.29$ ,  $P = 0.02$ ), phosphate ( $r = 0.26$ ,  $P = 0.04$ ), alkaline phosphatase ( $r = -0.28$ ,  $P = 0.03$ ), lanthanum carbonate ( $r = 0.32$ ,  $P = 0.01$ ), major artery calcification volume ( $r = 0.28$ ,  $P = 0.03$ ), and CAC score ( $r = 0.29$ ,  $P = 0.02$ ). In multivariate regression analysis,  $S_{Ox}$  was associated with lanthanum carbonate ( $F = 5.96$ ,  $P = 0.02$ ) and CAC score ( $F = 4.47$ ,  $P = 0.03$ , Table). Receiver operating characteristic curve showed  $S_{Ox} = 269.5$   $\mu\text{mol/L}$  was the best cut-off for predicting CVD events. We divided subjects into two groups by this cut-off  $S_{Ox}$  value and revealed  $S_{Ox}$  was associated with new-onset CVD events ( $N = 60$ ,  $P = 0.01$ ) even after adjusted by age under 75 years ( $N = 52$ ,  $P = 0.03$ ) or both age under 75 years and CAC score under 1000 ( $N = 28$ ,  $P = 0.04$ ) by Kaplan Meier method.

[Discussion] This study suggested that serum oxalate concentration was associated with coronary artery calcification score, lanthanum carbonate intake and cardiovascular events in dialysis patients. We previously reported that coronary artery calcifications were composed by calcium oxalate crystals by dual-energy computed tomography method. Also, recent study revealed new-onset cardiovascular events associated with serum oxalate concentration. These evidences support our study's findings. Though, lanthanum carbonate intake theoretically reduces serum

oxalate by forming lanthanum oxalate in the gastrointestinal tract and excreted as feces. However, lanthanum carbonate intake was positively correlated with serum oxalate concentration in our study. This result was contrary to our expectations, though one hypothesis is that long-term lanthanum carbonate intake might cause lanthanum deposition to gastrointestinal mucosa. And then lanthanum deposition might cause erosion or leaky gut and might result in oxalate translocation from gastrointestinal tract to vessels. As a limitation, this study done retrospectively that serum oxalate concentration might unstable.

[Conclusions]  $So_x$  was associated with CAC score, lanthanum carbonate and CVD events in ESRD patients undergoing hemodialysis.

[Reference]

- 1) Nishizawa Y, Higuchi C, Nakaoka T, et al. (2018) Compositional analysis of coronary artery calcification in dialysis patients in vivo by dual-energy computed tomography angiography. *Ther Apher Dial.*22: 365–370
- 2) Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, et al. (1990) Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol.* 15: 827–832

[Conference Presentation]

- 1) Yoko Nishizawa, Kiyotsugu Omae, Tetsuya Ogawa et al. High serum oxalate concentration associated with coronary artery calcification and lanthanum carbonate in hemodialysis patients. 59<sup>th</sup> The European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association, Paris, France, 2022/05

#### 5 4. 造血器腫瘍特に悪性リンパ腫の増殖機構の解明と標的分子の探索

小笠原壽恵、川内喜代隆、マーシャル祥子、風間啓至、佐倉宏  
(足立医療センター・内科)

〔目的〕 造血器腫瘍の中の悪性リンパ腫は種々のサブタイプを含む造血器腫瘍であり、それぞれに治療反応性や予後は異なっている。サブタイプごとの腫瘍増殖機構を明らかにすることは、リンパ腫の病態解明のみならず新たな治療法の開発に重要である。

〔方法〕 単離したリンパ腫細胞を、次世代シーケンサー（トランスクリプトーム解析、メチローム解析）、miRNA、細胞内シグナル伝達経路を組み合わせた網羅的解析を行いたいと考えている。

〔結果〕 我々はこれまで、造血器腫瘍のタイプごとに Ras/Raf/MEK/MAPK、PI3K/Akt/mTOR、JAK/STAT 経路の活性化に相違があること、腫瘍に高発現するテロメラーゼの活性化メカニズムにこれらのシグナル伝達分子が重要な働きをすることを見出した。さらに、病態が明らかにされていない PEL-like lymphoma の腫瘍細胞株を新規に樹立し VEGF が増殖に寄与していることを報告している。

〔考察〕 研究途中です。

〔結論〕 腫瘍細胞の増殖・生存に必須な分子群を同定することで、有効な新規治療法の開発に繋げることが期待される。

〔文献〕

- 1) P. Lundberg, A. Karow, R. Nienhold, R. et al. (2014) Blood, 123: 2220-2228
- 2) Kawauchi K, Ogasawara T, Aiba M, et al. (2016) Eur. J. Haematol. 96: 144-151

## 5.5. 乳糖不耐症患者の牛乳漸増負荷による腹部症状軽減に関する検討

長谷川茉莉

(足立医療センター・小児科)

〔目的〕 乳糖不耐症(LI)は、日本人に多いと言われているが、腹部の自覚症状だけでの調査が多く、種々の原因が混在している可能性があるため、乳糖摂取が原因の乳糖吸収不全(LM)の診断を要する。一方、LM の治療は、牛乳を継続摂取することで耐性が獲得され、腹部症状が改善されるという報告が海外では散見されるが、日本人での報告はないため、今回検討した。

〔方法〕 アンケート調査において牛乳・乳製品摂取で腹部自覚症状(LI 症状)を有するものの中から、心因性症状を鑑別するために、一般牛乳と乳糖減量乳飲料での 200ml 単盲検比較試験(SBCS)を行い、さらに、LM の確定診断には、呼気水素ガス濃度測定による 20g 乳糖負荷試験(20gLHBT)を実施した。牛乳漸増負荷治療は、LM 症例を対象に、牛乳 30ml から開始し、4-7 日で漸増し 200ml まで継続摂取させた。また、治療前後の、自覚症状の改善度、20gLHBT の診断値の変化、便中腸内細菌叢の変化(16S-rRNA による解析)について比較検討した。

〔結果〕 LI 症状を有する 46 例を対象にした。SBCS の結果は、陽性 22 例(47.8%)、陰性 4 例(8.7%)、評価困難群は 20 例(43.5%)であった。また、LM と診断されたのは 35 例(76.1%)であった。牛乳漸増負荷治療は、同意が得られた LM32 例を対象に行った結果、治療期間は平均 41 日で、最終的な症状改善は 29 例(90.6%)に認められた。治療後の LHBT の診断値の改善は約 1/3 に認めたが、半数は変化がなかった。治療前後の便中腸内細菌叢の解析では、32 例全体では、Clostridiales Lachnospiraceae [Ruminococcus] で有意な減少が認められた。また、最終症状が著明に改善した 7 例では、Blautia 属の有意な増加が認められた。

〔結論〕 LI 症状を有する 46 例中、20gLHBT で LM と診断されたのは、35 例(76.1%)であった。本研究の牛乳漸増負荷治療は、日常生活に支障をきたさずに実施できる LM の有効な治療法の一つである。

〔学会発表〕

- 1) 長谷川茉莉、他. 牛乳・乳製品摂取で腹部症状を有する人における乳糖不耐症の頻度. 乳糖不耐症における牛乳漸増負荷治療の有用性の検討. 第46回日本小児栄養消化器肝臓学会、奈良、2019/11

現在は英文雑誌に投稿予定



## 56. 人工心肺使用の心臓手術における APTT 凝固波形解析と凝固因子活性、トロンビン生成能による凝固機能評価

市川順子、小森万希子

(足立医療センター・麻酔科)

〔目的〕 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の凝固波形解析 (CWA) による凝固機能評価は血友病の重症度診断や血栓症、播種性血管内凝固症候群の補助的診断に用いられる。APTT-CWA が止血治療の効果において、どのくらい有用であるのか未だ不明である。そこで、人工心肺を用いた心臓手術における APTT-CWA の各パラメータの変化を凝固因子濃度やトロンビン生成能と比較検討した。

〔対象と方法〕 人工心肺を用いた心臓手術を予定した患者 24 人を対象として全身麻酔導入後 (基準) と体外循環離脱後かつプロタミン投与後に採血を行った。ヘパリンは 300U/kg を初回に投与し、その後 ACT が 400 秒以上を維持するように追加投与し、その中和に初回プロタミンは総ヘパリン投与量の 0.6 倍投与した。各検体における凝固第Ⅱ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ因子活性、フィブリノゲン濃度 (fig)、トロンビン生成能、および APTT-CWA を測定した。CWA は最大凝固速度 (min1)、最大凝固加速度 (min2)、delta を CS-2000 (Sysmex) で測定した。

〔結果〕 プロタミン投与後のヘパリン濃度はすべてにおいて 0.1U/ml 以下であった。人工心肺離脱後は基準と比較して第Ⅱ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ因子活性、Fig 濃度が有意に低下し、CWA 上も APTT が有意に延長し、min1、min2、delta が有意に低下した (表 1)。トロンビン生成能は人工心肺離脱後に lag time が有意に延長、総トロンビン生成量 (ETP)、Peak 値が有意に低下した (表 1)。CWA パラメータと第Ⅱ、Ⅷ、Ⅸ因子に相関があり、その中でも min1、min2 は第Ⅷ因子および peak 値と delta は fig 濃度と高い相関を示した (表 2)。

〔考察〕 CWA は光の透過度の経時的な変化を波形で表示し、血餅形成の全過程を反映する。この波形を特徴づける 4 つのパラメータとして光の透過度が減少始める時間に相当する APTT、波形の加速度や減速度を表す min1、min2、透過度の変化を表す delta などがある。今回の研究で、波形の加速度や減速度を表すパラメータは凝固因子活性やトロンビンバーストを反映するピーク値と透過光強度は fig 濃度と強い相関を示した。APTT は細胞基盤型の凝固反応モデルの開始時期 (initiation) を表すとされるが、CWA の各パラメータはその後の増幅期、進展期まで反映することが考えられた。APTT 値はフィブリン形成を最初に認めた時点であり、全トロンビンの 5% が生成したに過ぎず、フィブリンポリマー形成はそれ以降とされる<sup>1)</sup>。凝固因子の補充の指標として、PT-INR が 2.0 以上、APTT が基準の上限の 2 倍以上とされるが、これらは出血量を反映する指標としては相関が小さく<sup>2)</sup>、加速度や減速度の指標も含めた APTT-CWA パラメータは血液製剤投与の指標としてより有用な可能性がある。

〔結語〕 人工心肺使用の心臓手術において、APTT-CWA のパラメータは凝固因子濃度のみならずトロンビン生成能、フィブリノゲン濃度との相関も高く、止血治療における効果的なモニタリングになりうる可能性を示唆した。

[文献]

- 1) Claude Negrier, Midori Shima, Maureane Hoffman. (2019) Blood Rev. PMID: 31164248
- 2) Wolberg AS.(2010) Haemophilia. 16 Suppl 3:7-12

[学会発表]

- 1) 久保拓之、市川順子、岡崎亮汰、甲田昌紀、大串雅子、小森万希子. 人工心肺使用の心臓手術における APTT 凝固波形解析と凝固因子活性, トロンビン生成能による凝固機能評価. 第 69 回日本麻酔科学会学術集会、神戸、2022/6

表 1. 人工心肺使用の心臓手術における凝固機能検査、トロンビン生成能および APTT-CWA パラメータの変化

CWAパラメータ	CT(s)	Min1(%s)	Min2(%/S2)	Max2(%/S3)	Delta (%)
導入後	31.6±3.7	6.20±1.89	0.94±0.27	0.78±0.24	64.8±20.1
人工心肺離脱後	41.4±9.2*	3.54±2.14*	0.50±0.32*	0.38±0.24*	43.2±24.7*
凝固因子濃度	F II (%)	FVIII(%)	FIX(%)	FX (%)	
導入後	84.4±18.5	125.3±25.7	95.8±23.9	75.0±16.7	
人工心肺離脱後	41.6±11.4*	64.6±32.2*	58.7±20.5*	37.1±9.6*	
トロンビン生成	lag time(s)	ETP(nM/min)	Peak TG(nM)		
導入後	2.23±0.22	2102.8±305.5	440.7±62.9		
人工心肺離脱後	2.67±0.58*	2049.2±149.2*	324.7±44.4*		

平均値±標準偏差 \*P<0.05 vs 基準値

表 2. APTT-CWA パラメータと活性化凝固因子濃度、トロンビン生成能との相関

凝固因子濃度	F II (%)	FVIII(%)	FIX(%)	FX (%)	フィブリノゲン濃度
CT(s)	-0.433**	-0.653**	-0.488**	-0.284*	
Min1(%s)	0.407**	0.674**	0.328*	0.125	
Min2(%/S2)	0.407**	0.681**	0.369**	0.132	
Delta (%)					0.981**
トロンビン生成	lag time(s)	Peak TG(nM)	ETP(nM/min)	ttPeak (min)	
CT(s)	0.105	0	0.1	-0.063	
Min1(%s)	-2	0.68**	0.267	-0.057	
Min2(%/S2)	-0.015	0.71**	0.27	-0.066	
Delta (%)	0.016	-0.576**	-0.231	0.073	

\*P<0.05, \*\*P<0.001

5 7 . Comparison of survival and perioperative outcome of the colonic stent and the transanal decompression tube placement and emergency surgery for left-sided obstructive colorectal cancer: A retrospective multi-center observational study “The CODOMO study”

Hiroyuki Kato, Rieko Shimojima and Koichiro Sato

(Department of Clinical Laboratory and Endoscopy, Adachi Medical Center)

[Purpose] Advances in endoscopic technology have led to the reevaluation of self-expandable metallic stent (SEMS) placement as a bridge-to-surgery (BTS) in patients with obstructive colorectal cancer<sup>1)</sup>. In Japan, after inclusion of SEMS placement as a BTS in the medical insurance coverage in 2012, this procedure has been increasingly performed. However, a transanal decompression tube (TADT) placement has been used as a BTS. We aimed to retrospectively evaluate the optimal strategy for obstructive leftsided colorectal cancer (OLCRC) by comparing SEMS and TADT placement with emergency surgery.

[Methods] We included 301 patients with stage II and III OLCRC from 27 institutions. The study patients were divided into Surgery group (emergency surgery, n=103), SEMS group (BTS by SEMS, n=113), and TADT group (BTS by TADT, n=85). We compared the survival and perioperative outcomes of patients in the Surgery group as a standard treatment with those in the SEMS and TADT groups

[Results] The 3-year relapse-free survival rate in patients in the Surgery group was 74.8 %, while that in patients in the SEMS group and TADT group were 69.0% (p=0.39) and 55.3% (p=0.006), respectively(Fig.1). The technical success rate was not statistically different, but the clinical success rate was significantly higher in the SEMS group than in the TADT group (p=0.0040)(Table 1). With regard to postoperative complications after curative surgery, the SEMS group had significantly lower of complications ( $\geq$ Grade 2) than the Surgery group (p=0.022).

[Discussion] This study is a multicenter and retrospective study. We clarified that short-term and long-term outcomes of patients with SEMS placement for OLCRC were acceptable when compared with those of patients who underwent emergency surgical procedure.

[Conclusions] This study suggests that SEMS placement followed by surgery, has no adverse influence in terms of the patient relapse-free survival, compared with emergency surgery. Additionally, total number of complications after curative surgery were significantly lower in the SEMS group than the Surgery group. SEMS placement performed by experienced endoscopist, can be a treatment option for OLCRC as well as emergency surgery.

[Reference]

- Tomita M, Saito S, Makimoto S, et al: Self-expandable Metallic Stenting as a Bridge to Surgery for Malignant Colorectal Obstruction: Pooled Analysis of 426 Patients From Two Prospective Multicenter Series. *Surg Endosc* 33(2): 499-509. (2019)

[Article]

- S Endo, K Kumamoto, H Kato, et al. (2021) Comparison of survival and perioperative outcome of the colonic stent and the transanal decompression tube placement and emergency surgery for left-sided obstructive colorectal cancer: A retrospective multi-center observational study “The CODOMO study”. *International Journal of Colorectal Disease* 36: 987–998

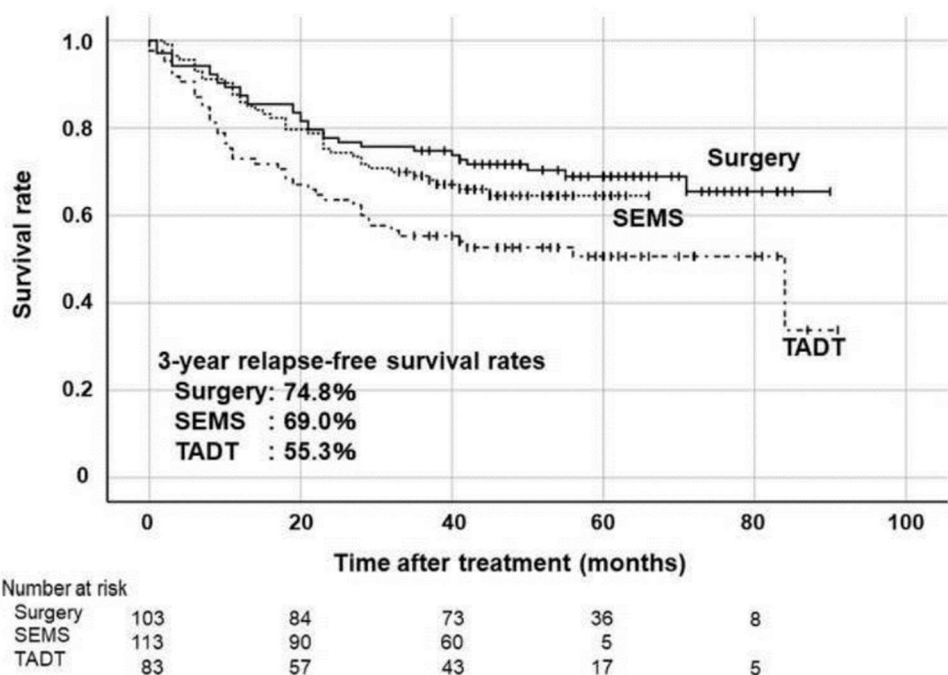


Fig 1. Kaplan-Meier curves of relapse-free survival rates on an intention-to-treat basis in all cases. Surgery vs SEMS:  $p=0.39$ , Surgery vs TADT:  $p=0.006$  by log-rank test

Table 1. Technical and clinical success rates and complications during decompression

	SEMS group (113 patients) Number of patients (%)	TADT group (85 patients) Number of patients (%)	P value
Technical success rate	112 (99.1)	80 (94.1)	N.S
Clinical success rate	110 (97.3)	73 (85.9)	0.004
Complications during decompression			N.S
Perforation	2 (1.8)	2 (2.4)	
Migration	0	5 (5.9)	
Re-obstruction	1 (0.9)	0	
Emergency operation during decompression	3 (2.7)	11 (12.9)	0.009

## 58. 食道癌におけるテロメラーゼ活性の発現と臨床病理学的因子との関連について

島川武

(足立医療センター・外科)

〔目的〕 従来のテロメラーゼ活性測定法は、煩雑で解析に必要な組織量が多いなどの欠点があった。これに対し、リアルタイム PCR を用いる測定法は、コンタミネーションが低く、簡便で迅速に定量的な測定が可能である。今回われわれは、食道癌症例の内視鏡下の生検組織と切除標本から得られた腫瘍組織と正常組織のテロメラーゼ活性値を測定し、臨床病理学的因子との関連を検討した。

〔方法〕 測定した組織は、生検：13例、切除標本：2例、生検および切除標本：10例。測定法は、(1)凍結保管した組織を Quantitative Telomerase Detection キット(QTD)中の Lysis Buffer で溶解、(2)BCA 法にてタンパク質量を測定、(3)組織上清と QTD Pre-mix を反応させ、Ct 値を測定し、QTD キット中の標準物質から換算しテロメラーゼ活性値を求めた。

〔結果〕 正常粘膜組織のテロメラーゼ活性値は  $0.001 \pm 0.001$  amol/ $\mu$ l、腫瘍組織では  $0.165 \pm 0.218$  amol/ $\mu$ l であり、正常粘膜組織では極めて低値で、腫瘍組織では非常に高値であった。cStage 別では、I: 0.465、II: 0.024、III: 0.163、IVa: 0.197、IVb: 0.070 と差はみられなかった。正常粘膜組織にはテロメラーゼ活性はほとんどなく、腫瘍組織では有意に高値であった。死亡例では活性値は有意に高値であった。生検組織と切除標本の活性値はほぼ一致した。予後との関連でみると死亡例： $0.194 \pm 0.239$ 、生存例： $0.033 \pm 0.056$  と死亡例で有意に高値であった。

〔結論〕 本法によれば生検組織でも、正確にテロメラーゼ活性値を測定できる。さらに症例を蓄積することにより、予後因子としての応用も可能と考える。

〔学会発表〕

1) 第 116 回日本外科学会定期学術集会(2016)にて発表。

現在も凍結標本を蓄積中です。但しいまだ一部試薬が入手困難なため、直ぐには再測定ができない状況です。

## 59. 急性胆管炎における菌血症予測因子としての血清乳酸値の診断能

大浦弘嵩<sup>1</sup>、西野隆義<sup>2</sup>、嶋由紀子<sup>1</sup>、村上大輔<sup>1</sup>、白戸美穂<sup>1</sup>、杉山晴俊<sup>2</sup>、新井誠人<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>八千代医療センター・消化器内科、<sup>2</sup>八千代医療センター・内視鏡科)

〔目的〕 急性胆管炎は、敗血症を合併した際には致死的になりうる胆道細菌感染症である。高乳酸血症は敗血症の診断指標に含まれるものの、急性胆管炎における意義は明らかではない。今回は血清乳酸値の急性胆管炎における菌血症に関する診断能について検討することを目的とした。

〔方法〕 2014年以降、当院で治療を受けた連続118症例(M:F=79:39、平均75歳)の急性胆管炎を対象に後方視的におこなった。診断および治療はTokyo Guidelines 2013/2018 (TG13/18)にも続いて行った。細菌培養のため、血液検体および血液試料は入院時に採取(2セット)され、血液培養陽性群(n=50)および陰性群(n=68)に分類した。血清乳酸値の血液培養陽性に対する診断能はROC解析にておこなった。

〔結果〕 1.TG13/18による急性胆管炎重症度は、118人中、重症、中等症および軽症で各々25人、43人および50人であった。2.重症度別の血液培養陽性率は重症、中等症および軽症で各々88%、44%および18%であった。3.ROC解析の結果、血清乳酸値の曲線下面積(AUC)は0.75であり、CRP 0.62に比べて有意に高値(p=0.04)であった。4.指摘カットオフ値は乳酸値18mg/dL(感度65.3%、特異度58.8%)であった。5.血清乳酸値18mg/dLおよび血清プロカルシトニン値3ng/mL以上を組み合わせると、非重症(軽症および中等症)における血液培養陽性に対するAUCは0.68であり、感度64.3%および特異度72.3%であった。

〔考察〕 入院時に血清乳酸値18mg/dL以上の急性胆管炎患者は、重症度によらず菌血症の高リスクであると考えられた。

〔結論〕 入院時の血清乳酸値に注目することにより早期の胆道ドレナージを要する高リスク患者を拾い上げ、TG18に基づくマネージメントをより有用にする可能性が考えられた。

〔学会発表〕

1) 大浦弘嵩、西野隆義、嶋由紀子、村上大輔、白戸美穂、杉山晴俊、新井誠人、第58回日本胆道学会学術講演会、横浜、2022/10

## 60. 先天性溶血性貧血における転写因子 GATA1 の標的化機構の解明

槍澤大樹<sup>1</sup>小倉浩美<sup>1</sup>、山本俊至<sup>2</sup>、菅野仁<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>輸血・細胞プロセッシング科、<sup>2</sup>ゲノム診療科)

〔目的〕 赤血球アデノシンデアミナーゼ (ADA) 過剰産生症 (OMIM 102730) は先天性溶血性貧血 (CHA) の極めて稀な一型であり、過去に4家系のみが報告されていたが<sup>1)</sup>、我々は原因不明の先天性溶血性貧血と診断された日本人男性を ADA 過剰産生症の新たな症例と診断した。遺伝子解析の結果、ADA 遺伝子の構造的変異はなく、*GATA1*、c.920G>A、p.R307H の新規ミスセンス変異が同定された<sup>2)</sup>。造血系転写因子 (TF) である GATA1 は赤血球分化の制御に重要な役割を担っているが、特定のシス制御因子と相互作用して転写を制御する正確なメカニズムは、まだ十分に解明されていない<sup>3)</sup>。本論文では、国際共同研究による解析を行い、*GATA1* の R307C/H ミスセンス変異によって引き起こされる、ADA 過剰産生を伴う CHA の一病型について、その発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。

〔方法〕 ADA 過剰産生を伴う CHA 症例に対してエクソームおよび target-captured sequencing (TCS) 解析を行なった。患者骨髄単核球を採取し、*in vitro* で赤血球系への分化能を解析した。GATA1 欠損細胞株 G1E および G1E-ER4 を用いて、変異型 GATA1 の機能解析を行なった。野生型 (WT) または変異型 GATA1 タンパク質を発現するヒト赤芽球初代細胞および細胞株について RNA sequencing (RNA-seq), assay for transposase-accessible chromatin sequencing (ATAC-seq), chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq), CUT&RUN, and single-cell RNA-seq/ATAC-seq を用いて GATA1 クロマチン占拠プロファイルの解析を行なった。

〔結果〕 解析した3家系の CHA のうち1例で p.R307C/chrX:48652248 C>T が、我々の症例を含む2例で p.R307H/chrX:48652249 G>A の変異が同定された。R307C 変異体を持つ患者の骨髄前駆細胞は赤血球系への分化が抑制され、増殖の低下や形態の変化が認められたことから赤血球遺伝子制御プログラムの障害が示唆された。

患者および健康ドナーの初代細胞に R307C/H または WT GATA1 のいずれかを外因性に発現させると WT でよく赤血球系への分化能を改善した。遺伝子導入した R307C 変異患者細胞の転写プロファイルを検討した結果、GATA1 WT に対する R307C および R307H 変異体の遺伝子発現変化は良く一致していた。R307C/H 導入細胞では WT 導入細胞と比較して ADA 遺伝子発現量が上昇し、一方で赤血球最終分化に重要な赤血球膜タンパク質、グロビン遺伝子、ヘム生合成系酵素遺伝子の発現が抑制されていた。

R307C/H 変異が存在する領域は TF 結合特異性を調節する調節天然変性領域 (intrinsically disordered region : IDR) 内に位置しているが、共免疫沈降と質量分析による解析の結果、表原型に関連すると考えられる異常は検出されなかった。また、R307C/H 変異は予測される核局在シグナルを部分的に破壊しているが、実際に核内での GATA1 発現は 40%減少し、細胞質では増加していた。

単一細胞 ATAC-seq 解析により、R307C/H は、GATA1 のクロマチン占拠率の低下や変化を引き起こし、それに伴って主要な赤血球特異的遺伝子発現の障害を引き起こす可能性が示唆された。ChIP-seq の

結果、WT と比較して R307C/H のクロマチン占拠率はさまざまに変化しており、遺伝子発現の変化パターンとほぼ一致していた。

〔考察〕 CHA の表現型を示す *GATA1* R307C/H 変異体の機能解析により、*GATA1* の IDR が、適切な核内局在と忠実なクロマチン占拠を可能にする上で、重要かつこれまで知られていなかった役割を担っていることを明らかにすることができた。これらの変異体が結合する部位や発現に影響を与える標的遺伝子を区別する、特定の DNA 配列モチーフや他の物理的特徴は確認されなかったが、クロマチン占拠部位の変異により赤血球膜タンパク質、グロビン遺伝子、ヘム生合成系酵素、その他赤血球最終分化段階の転写調節因子などの遺伝子群の発現低下が起こり、赤血球の成熟障害および溶血が引き起こされると考えられた。この結果は厳密な TF 結合特異性に寄与する IDR の役割の重要性を示唆していると考えられた。

〔結論〕 *GATA1* R307C/H 変異による赤血球分化障害および溶血は核局在の変化、クロマチン占拠率の変化、局所的に変化したタンパク質相互作用など多因子性であり、造血分化の異なる段階における適切な遺伝子発現が、C 末端 IDR の主要残基を介して *GATA1* が正確かつ効果的にクロマチンを占拠していることに依存することが示唆された。

〔文献〕

- 1) Kanno H., Tani K., Fujii H., et al. (1988) Adenosine deaminase (ADA) overproduction associated with congenital hemolytic anemia: case report and molecular analysis. *Jpn. J. Exp. Med.* 58(1): 1-8
- 2) Ogura H., Yamamoto T., Utsugisawa T., et al. (2016) The novel missense mutation of *GATA1* caused red cell adenosine deaminase overproduction associated with congenital hemolytic anemia [abstract]. *Blood.* 128(22). Abstract 400
- 3) Katsumura K. and Bresnick E. (1997) GATA Factor Mechanisms Group. The GATA factor revolution in hematology. *Blood.* 129(15): 2092-2102

〔発表論文〕

- 1) Ludwig L., Lareau C., Bao E., et al. (2022) Congenital anemia reveals distinct targeting mechanisms for master transcription factor *GATA1*. *Blood.* 139(16): 2534-2546

〔学会発表〕

- 1) Utsugisawa T., Ogura H., Yamamoto T., et al. The novel missense mutation of *GATA1* caused red cell adenosine deaminase overproduction associated with congenital hemolytic anemia. 58th ASH Annual Meeting and Exposition. San Diego, CA USA. 2016/12