

4 1. ネスチンは網膜損傷後のミュラーグリア増殖とミクログリア浸潤を制御する

本吉 絢¹、齋藤 文典²、藤枝 弘樹²、飯田 知弘¹

(¹眼科学、²解剖学 (神経分子形態学分野))

〔目的〕 傷害後の網膜ミュラーグリア (MG) の増殖能と神経再生能は、種によって大きく異なる。例えば魚類では網膜傷害後 MG は増殖後に神経に再分化する¹⁾が、哺乳類の再生能は乏しく、同じ哺乳類でもラットは網膜傷害後 MG の増殖能はあるが、マウスはない²⁾。また、ネスチンは、Class VI の中間径フィラメントタンパク質であり、中枢神経系では神経幹細胞マーカーとして知られている³⁾。網膜では網膜前駆細胞と MG に発現し、網膜傷害後に MG でネスチン発現が誘導されることが知られているが、その役割は不明である。MG の増殖・分化の制御因子を同定することで網膜変性患者の網膜修復治療の手がかりとなる可能性がある。本研究では、MG の増殖反応を制御する内因性メカニズムを同定するために、傷害後のマウスとラットの網膜におけるネスチンの発現と機能を比較解析した。

〔方法〕 実験動物は C57BL/6 マウスと Wistar ラットを使用した。網膜傷害モデルとしてメチルメタンサルホン酸 (MMS) の腹腔内投与を行い、視細胞変性を誘導した。網膜におけるネスチンの発現を免疫蛍光法、ウェスタンブロット法と定量 PCR で観察した。次に、ラットネスチンノックダウンとして、*in vivo* ラット網膜に shH10 をキャプシドとして作成したアデノ随伴ウイルス (AAV) を用い shRNA を硝子体内注射し、ミュラーグリア特異的にネスチンをノックダウンした。ネスチンをノックダウンした後、MMS 誘導傷害したラット網膜の MG 増殖、視細胞の貪食除去とミクログリア/マクロファージの浸潤を免疫蛍光法で解析した。さらに、マウスネスチンの過剰発現として MMS 誘導傷害後マウス網膜を摘出しネスチン遺伝子を *in vitro* electroporation で過剰発現させ、器官培養後の MG の増殖を免疫染色法で解析した。細胞周期マーカーとして Ki67、pRb、BrdU、EdU を、Müller グリアマーカーとして Sox9 を、ミクログリア/マクロファージのマーカーとして Iba1 を使用した。

〔結果〕 網膜傷害後、ラットの MG の増殖とネスチンの発現上昇を認めたが、マウスでは MG の増殖とネスチンの発現上昇は観察されなかった。また、ラットの網膜でネスチンを *in vivo* でノックダウンすると、免疫染色の解析で S 期のマーカーである BrdU と Sox9 の共染色の割合が 22% 有意に減少した。また細胞周期マーカーである ki67 と pRb も同様にネスチンノックダウンで Sox9 との共染色の割合の減少を認めた。すなわちラットネスチンノックダウンでは MG の増殖が抑制されていた。一方、ミクログリア/マクロファージの浸潤と死滅した視細胞の貪食除去がネスチンノックダウンで一過性に促進された。さらに、マウス網膜でのネスチンの過剰発現では、細胞増殖マーカーである EdU の取り込みを認める網膜細胞の数が増加し、EdU と Sox9 の共染色の割合が 5% 有意に増加した。

〔考察〕 本研究では、ラットの MG がマウスの MG よりも増殖能力が高いことが示された。また、ラットの RNAi を用いた *in vivo* ノックダウンとマウスの *in vitro* electroporation により、ネスチンがミュラー細胞増殖を制御していることが示唆された。今回の研究では、細胞周期のどの段階が制御されているかは不明であるが、過去の報告では、ネスチンは PI3K 経路の活性化を介して神経前駆細胞の G1/S 移行を促進することが報告されている^{4), 5)}。また、MG は傷害後のミクログリア/マクロファージ浸潤

を制御することが知られており⁶⁾、本研究で、ネスチンノックダウンにより MG の免疫応答が変化し、ミクログリア/マクロファージの浸潤が促進される可能性が示唆された。しかし、MG の増殖やネスチン発現が、哺乳類の神経再生能に寄与するかどうかはまだ明らかにされていない。今後、MG の応答を制御するメカニズムを理解するために、マウスとラットの比較解析が有用となる可能性がある。

〔結論〕 網膜傷害後のミュラーグリアの増殖と免疫応答の制御にネスチンが重要な役割を果たすことが示唆された。哺乳類網膜の傷害応答を制御する分子機構を同定するため、ラットとマウスで種を超えた解析が重要である。

〔文献〕

- 1) LenkowskiJR, RaymondPA. (2014) *Prog Retin Eye Res.* 40:94-123.
- 2) Nomura-KomoikeK, SaitohF, KomoikeY, et al. (2016) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 57(3):1169-82.
- 3) LendahlU, ZimmermanLB, McKayRD. (1990) *Cell.* 60(4):585-95.
- 4) LiuJ, JiX, LiZ, et al. (2015) *Brain Res.* 1610:1-11.
- 5) XueXJ, YuanXB. (2010) *Mol Cell Neurosci.* 45(1):26-36.
- 6) Nomura-KomoikeK, SaitohF, FujiedaH. (2020) *Sci Rep.* 10(1):1488.

〔発表論文〕

- 1) Motoyoshi A, Saitoh F, Iida T, et al. (2023) Nestin Regulates Müller Glia Proliferation After Retinal Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 64(14)8.

〔学会発表〕

- 1) 本吉絢、齋藤文典、藤枝弘樹、他. ネスチンは網膜損傷後のミュラーグリア増殖とミクログリア浸潤を制御する. 第 62 回日本網膜硝子体学会総会、神奈川、2023 年 11 月

4.2. 網膜傷害後の Müller グリアの増殖と神経分化およびグリオシスの関連性

西野玲子^{1,2}、蔣池かおり¹、藤枝弘樹¹

(¹解剖学 (神経分子形態学分野)、²眼科学)

〔目的〕 Müller グリア (MG) は網膜に存在する主要なグリア細胞である。Zebrafish では網膜傷害後、MG が増殖し、網膜のあらゆる細胞に分化して完全に再生する。その際、グリオシスは抑制される。一方、哺乳類は網膜傷害後、網膜は再生せず、グリア性瘢痕を形成する¹⁾。哺乳類の網膜において、MG の増殖や神経への再分化を促す因子の報告はあるが²⁻⁴⁾、MG の細胞周期進入と神経分化やグリオシスの関連は明らかになっておらず、MG の増殖が哺乳類網膜の再生を促進するのか、それとも抑制するのかは明らかでない。本研究では網膜傷害後の MG の細胞周期をコントロールすることで、神経分化マーカーおよびグリオシスマーカーの発現への影響を検討することにより、MG の増殖が哺乳類網膜の再生に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

〔方法〕 視細胞を特異的に変性させる N-methyl-N-nitrosourea(MNU)を 5 週齢雄ラット (Wistar) に腹腔内投与し、MNU 投与後 2 日目に網膜を器官培養した。実験モデルは①コントロール群、②細胞周期停止群 (チミジンブロック法により細胞周期を停止)、③細胞周期再開群 (チミジンブロック後、チミジンを wash out して細胞周期を再開)、の 3 つの条件を用いた。細胞周期の評価には、cyclin D1, E1, E2, A2 の real-time PCR と、Cdc2 (S 期以降に発現) および pH3(M 期に発現)による免疫染色を行った。神経分化マーカーAscl1、NGN2、グリオシスマーカーGFAP の発現は、real-time PCR 法および免疫染色で検討した。

〔結果〕 視細胞傷害後、培養 1 日目に MG は S 期に入り、Ascl1、NGN2、GFAP はいずれも培養開始時に比べて有意に上昇した。細胞周期を停止すると、Ascl1、NGN2、GFAP はいずれもコントロールと比べて有意に減少した。細胞周期を再開すると、細胞周期を停止した網膜と比べて、Ascl1、NGN2、GFAP はいずれも有意に上昇した。また、MG の増殖によって MG の核が内顆粒層から外顆粒層へ遊走し、MG の細胞周期を停止すると遊走は抑えられていた。

〔考察〕 MG の増殖は Ascl1、NGN2 などの転写因子発現を誘導することで神経分化を促進し、同時に GFAP 発現を誘導してグリオシスも活性化することが示唆された。Zebrafish では網膜傷害後の MG の増殖はグリオシスを抑制するが、哺乳類では MG の増殖がグリオシスを活性化するために、網膜再生を抑制している可能性がある。

〔結論〕 ラット MG の S 期進入は神経再生を促すと同時にグリオシスも促した。

〔文献〕

- 1) Bringmann, A. et al. (2006) Prog. Retin Eye Res. 25, 397–424.
- 2) Pollak, J. et al. ASCL1 reprograms mouse Müller glia into neurogenic retinal progenitors. Development. 140, 2619-2631, doi:10.1242/dev.091355 (2013).

- 3) Ueki, Y. et al. Transgenic expression of the proneural transcription factor *Ascl1* in Müller glia stimulates retinal regeneration in young mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112, 13717-13722, doi:10.1073/pnas.1510595112 (2015).
- 4) Jorstad, N. L. et al. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature.* 548, 103-107, doi:10.1038/nature23283 (2017).

[発表論文]

- 1) Nishino, R., Nomura-Komoike, K., Iida, T. et al. (2023) *Sci Rep* 13, 22712

4.3. 情動記憶処理に対する抗精神病薬の急性効果と慢性効果

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（Oshibuchi, 2009）。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」という作業仮説が考えられた。昨年度までに、抗精神病薬である haloperidol の急性投与が情動記憶の想起を増強させること（紀要 41）、一方で、haloperidol の慢性投与が情動記憶の想起を抑制すること（紀要 42）を報告した。本年度は、haloperidol 慢性投与の情動記憶消去過程に対する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：条件刺激(conditioned stimulus; CS)として 30 秒間ブザー音と非条件刺激(unconditioned stimulus; US)として 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〕 第 1 回目に対する 2-10 回目のすくみ行動の減少率は、群間では SAL/HAL 群が有意に遅延し、群内比較による消去の開始は、HAL/SAL 群で第 2 回目、SAL/SAL 群が第 3 回目であった。

〔考察〕 HAL0.1 mg/kg 単回投与が、情動記憶消去を遅延させ、HAL 慢性投与消去過程の開始を促進した。

〔結論〕 Haloperidol は情動記憶処理に対し慢性投与により治療的效果を発揮する。慢性投与による、ドーパミン動態、ドーパミン D2 受容体レギュレーションなどの変容が関与していることが推測される。

[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.

4 4 . Trifluridine の効果予測因子と耐性メカニズムの検討

中島豪、小高桂子、倉持英和
(化学療法・緩和ケア科)

〔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〕 大腸癌細胞株である HCT116、SW480、DLD-1 を使用し、Trifluridine 含有培地で継代、培養を継続している。異なる由来の大腸癌細胞株で同様の処理を行い、耐性獲得後に網羅的遺伝子発現解析を行い、耐性に寄与する遺伝子変化を探っていく予定である。

〔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

45. 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。臨床的な奏効が期待されるなか、未だ臨床的客観的評価法 (バイオマーカー) が確立されていない。我々は過去に報告したバイオマーカーである機能的 SMN 解析法の再検討を行い、臨床状態との関連を明らかにした。そのうえで、ヒト脊髄の定量解析で胎児期に最も高く SMN が発現するという報告を元に¹⁾、SMA 発症前新生児の出生時より出生後にかけて SMN の挙動を推定するために、新生児臍帯血、出生後末梢血、さらに母体末梢血の SMN 解析を行った。

〔方法〕 未治療の SMA 患者 37 例および発症前新生児の母親 5 例を含む SMA 患者の親 18 例より末梢血を採取した。既に I 型 SMA の先子を持つ 5 家族の次子妊娠時に、臨床遺伝学専門家による遺伝カウンセリングの後、出生前診断を行った。出生後、遺伝子検査による確定診断の後、各新生児の胎盤より臍帯血を、更に数か月毎に末梢血を継続的に採取した。採取した血液の機能的 SMN を比較するために、イメージングフローサイトメトリー (IFC) を用いて SMN スポット解析を行った。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〕 未治療 SMA 患者 37 例の SMN スポット陽性細胞率は病型 (I-III 型) あるいは (Ia-IIIb 型) 及び SMN2 遺伝子のコピー数に正の相関性を示した (相関係数 $r_s=0.376, 0.399, 0.425$)。新生児臍帯血の解析値は、0.1%-24.0%だった。これは同コピー数の SMA 患者の Z-スコアに換算すると 0.7SD-2.0SD となる。その後の新生児末梢血の解析は -0.8SD-0.8SD だった。各母親末梢血の解析はキャリア 18 例の統計値より換算して -0.2SD-2.4SD だった。臍帯血と母体末梢血の解析値間には正の相関性が認められた ($r_s=1.00$)。

〔考察〕 SMN スポット解析値は SMA の病型及び SMN2 コピー数に相関することから、SMA の重症度の指標となるバイオマーカーであることが示された。臍帯血の解析より、出生時に高値を示す場合があるが出生後は徐々に低下する傾向にあり、最終的に SMN が枯渇したところで SMA を発症する可能性が示された。これにより胎児期の脊髄前角細胞の motor neuron pool の状態が臍帯血によって推定できる可能性が示された。母子間の相関性より、母胎と胎児間での物質輸送、クロストークの存在が想定された。

〔結論〕 本研究により、出生後の SMN 枯渇が発症のタイミングを決定する可能性が示唆された。この報告は SMA の疾患修飾療法 (disease modifying therapy, DMT) の理論的根拠を提供した。

[文献]

- 1) Ramos, D. M., d'Ydewalle, C., Sumner, C. J., et. al.(2019) J. Clin Invest, 129, (11), 4817-4831

[発表論文]

- 1) 加藤 環, 横村守, 浦野真理, 佐藤裕子, 芦原有美, 伊藤万由里, 松尾真理, 米衛ちひろ, 児玉一男, 小俣卓, 大久保幸宗, 富樫紀子, 萩野谷和裕, 室月淳, 齋藤加代子, 脊髄性筋萎縮症 I 型の 2 例 : 疾患修飾治療実施における出生前診断と多施設多職種連携の意義, 脳と発達, 2023;55;35-39
- 2) 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
- 3) 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、大月典子、浦野真理、横村守、志真奈緒子、鈴木隼人、加島広太、塩谷萌華、若林秀隆、齋藤加代子 脊髄性筋萎縮症患者におけるリスジプラムの治療有効性バイオマーカーに関する検討 第 65 回小児神経学会学術集会 2023
- 2) 加藤環、大山有子、伊澤美佐子、加我真澄、江原裕子、宮村哲哉、相田匡史、齋藤加代子 SMA 未来会議～患者家族会、製薬会社、医療者が共に SMA の未来を考える患者・市民参画の医療～第 47 回遺伝カウンセリング学会学術集会 2023.
- 3) Tamaki Kato, Yumi Ikeda, Mamoru Yokomura, Mari Urano, Akiko Ueda, Kayoko Saito Transition from the patient registration system SMART Consortium to rare disease data registry of Japan in Spinal Muscular Atrophy. 第 68 回日本人類遺伝学会学術集会 2023
- 4) Mamoru Yokomura, Tamaki Kato, Mayuri Ito, Mari Urano, Kayoko Saito Investigation of the clinical course of the SMN2 gene 4-copy cases: In relation to the "4-copy problem" in newborn screening. 第 68 回日本人類遺伝学会学術集会 2023

4 6. *stx2f*保有腸管出血性大腸菌 (EHEC)の分子疫学解析

菊池賢¹、阿部蘭¹、坂間玲子¹、鎌田啓祐¹、鶴澤豊¹、荒井祐子¹、宇野浩一²、野口秋雄²、金子寛²、佐藤寿夫²

(¹感染症科、²日本微生物研究所)

〔目的〕 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は感染症法 3 類感染症に指定され、無症候性保菌者でも届出対象と決められている。わが国では食品製造、食品加工、給食等の大量調理に従事する人には毎月、EHEC、赤痢菌、*Salmonella* 検便検査が義務づけられており、EHEC が検出されると、陰性が確認されるまで、業務に就くことができない¹⁾。EHEC を規定する志賀毒素 (Stx)には Stx1, Stx2 があり、それぞれ、Stx1a, Stx1c, Stx1d, Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2r, Stx2f などのサブタイプが知られている¹⁾。Stx2f は近年、比較的新しく発見された Stx で、ヒトに溶血性尿毒症性症候群 (HUS) を発症させるなど、病原性が強いことが知られている¹⁾。しかし、Stx2f は他の Stx2 subtype とはタンパクの 1 次構造がかなり異なっており、検査キットとして販売されるイムノクロマトグラフ法、ELISIA 法、RPLA 法や real-time PCR では検出できない¹⁾。このため、Stx2f 保有 EHEC の実態や分子疫学解析はほとんど行われていない。今回、2021 年に日本微生物研究所で健常保菌者から検出された *stx2f* 保有 EHEC 42 株について、分子疫学的調査を行った。

〔方法〕 2021 年 1 月から 2021 年 12 月までに食品関連従事者の検便検査で分離された *stx2f* 保有 EHEC 42 株 (観察期間内の重複削除、1 例 1 株とした) について、各種毒素遺伝子の保有状況、血清型、MLST によるタイピングなどを行った¹⁾。

〔結果〕 日本微生物研究所で 2021 年に提出された 1494662 検体より、検出された EHEC は 529 株で、そのうち 42 株 (8%) が *stx2f* を保有していた。この 42 株のうち、4 株は大腸菌ではなく、類縁の *Escherichia albertii* であった。これらの保有する毒素遺伝子、血清型、MLST 結果を表に示す。EHEC では MLST 13581, 血清型 O-105 が 15 株 (39%) と最も多かったが、様々な遺伝子背景を持つ、多様な株がみられた。EHEC 感染症発症に重要な役割を果たす intimin 遺伝子 *eae* は 27 株 (71%) が保有しており、*stx2f* 保有 EHEC の高い病原性が伺えた。この *eae* subtype は θ が 73% と最多で、 α 2, β 1, β 2 が残りを占めた。また、近年、注目される新しいタイプの DNA 損傷毒素である cytolethal distending toxin 遺伝子 *cdt* も 12 株 (32%, *cdt-I* 11 株, *cdt-II* 1 株) が保有していた。一方、*E. albertii* は MLST では 2693 ないし、新型、血清型 Non type がほとんどを占め、*eae*, *cdt-II* を全て保有していた。*eae* subtype は N1.1, γ 5, ϵ 3 と、いずれも *E. albertii* で過去に報告されている type であった。

Table 1. Distribution of virulent factors in *stx2f* (+) EHEC strains

Species	MLST	Serotype	Virulent factors											No. of isolates	
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i> other than <i>stx2f</i>	<i>eae</i>	<i>hly</i>	<i>astA</i>	<i>aggR</i>	<i>cdt I</i>	<i>cdt II</i>	<i>cdt III</i>	<i>cdt IV</i>	<i>cdt V</i>		
<i>E. coli</i> (38)	13581	105	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
	13581	105	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	583	63	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
	583	63	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	583	63	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
	11102	148	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
	11102	148	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1
	3558	148	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
	40	109	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	3
	20	109	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1
	20	52	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1
	297	169	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
	297	169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	New	25	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1
	28	81	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1
	95	1	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1
	201	115	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
	675	115	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1
	3672	NT	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
	Total number	4748	78	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
			2	2	27	3	18	0	11	1	0	0	0	38	
<i>E. albertii</i> (4)	2683	NT	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	1
	New	NT	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
	New	NT	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
	New	25	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	1
Total number			0	0	4	0	2	0	1	4	0	0	0	4	

〔考察・結論〕 今回調べた *stx2f* 保有 EHEC 42 株のうち、本来の大腸菌は 38 株で、近縁の *E. albertii* が 4 株含まれていた。*eae* は EHEC38 株のうち、71%、*E. albertii* では 100% 保有しており、*stx2f* 保有株の病原性の高さが危惧された。*stx2f* はコマーシャルベースキットでの検出ができず、健常者保菌のみならず、臨床現場での EHEC 感染症疑い患者でも過小評価されている可能性が高いと思われる。今回の研究でも様々な遺伝的背景を持った多様な株が分離されており、今後の動向、疫学調査継続が必要であると思われた。

〔文献〕

- 1) 原田哲也、井口純、勢戸和子、伊豫田淳. 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル. 2022 年 10 月改訂版.
- 2) Hinenoya A, Nigita A, Ninomiya K, Asakura M, et al. Prevalence and characteristics of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* from children with diarrhea in Japan. *Microbiol Immunol* 53: 206-215, 2009.

〔学会発表〕

- 1) 菊池賢、坂間玲子、鵜澤豊. 無症候性保菌者由来 *stx2f* 保有大腸菌、*E. albertii* の分子疫学解析. 第 72 回日本感染症学会東日本地方学術集会 2023.10.26. 東京.

47. ヒト歯髄幹細胞を用いた無血清培地の開発

松井友里^{1,2}、吉用賢治³、古賀陽子²

(¹東京医科大学口腔外科学分野、²歯科口腔外科学(口腔顎顔面分野)、³ナカライテスク株式会社)

〔目的〕 2000年に Gronthos らがヒト歯髄に分化能の高い間葉系幹細胞が存在することを報告し、ヒト歯髄幹細胞が新たな再生医療の細胞源として注目されている。通常、歯髄幹細胞(DPSCs)の培養にはウシ胎児血清(FBS)が必要である。しかし、FBSの使用に関しては、未知の成分があり移植安全性の問題や倫理的問題を有し、現状では、Good Manufacturing Practice グレードであれば臨床応用が可能であるが500ml当たり約20万円/本と高額であり、実際の臨床応用への展開には高ランニングコストは否めない。そこで、われわれは、FBSを用いた従来の培養条件と同等の無血清/xeno-free 試薬を用いた歯髄幹細胞培地の開発を目的として本研究を立案した。本研究が実現可能となれば、血清に依存しない新たなヒト歯髄幹細胞の培養法の確立が可能となる。

〔方法〕 DMEM/Ham'sF12+ON2+1%PSAの培地でDPSCsの細胞播種密度の検討を行った。基礎培地の決定のためDMEM/Ham'sF12、 α MEM、eRDF、低血清用DMEM/Ham'sF12の4条件を設定し、①細胞形態の観察、②CCK8キットを用いてP1-P3までの増殖能、③Flow cytometryによりDPSCs細胞特性の変化、④自己複製能についてコントロール培地の α MEM+FBS+1%PSAと比較した。

〔結果〕 DMEM/Ham'sF12+ON2培地において、DPSCsは 1×10^4 cells/cm²の播種濃度で培養可能であることが確認された。基礎培地の種類に依存無く細胞形態に変化を認めなかった。24h-72hまでの増殖能は4条件では大きな差は認めなかったが、FBS含有培地で培養した場合と比較すると有意に低いことが確認できた。FACS解析にて、CD29(+), CD44(+), CD81(+), CD90(+), CD105(+), CD14(-), CD34(-)を示し、細胞特性に変化は認めなかった。自己複製能に、FBS含有培地では20-30倍、4条件では1-7倍の増殖能を認めた。

〔考察〕 ON2サプリメント含有無血清培地では、FBS含有培地と比較して増殖能が有意に低いため、ON2サプリメントに増殖因子や接着タンパクの添加が必要であることが示唆され、今後さらなる検討が必要であり現在検討中である。

〔結論〕 ON2サプリメント含有培地では、ヒト歯髄幹細胞が培養可能であることがわかった。基礎培地を変えても4条件の増殖能、細胞特性、自己複製能は差がなく、FBS含有培地には有意に劣ることがわかった。

[文献]

- 1) Ying Hua, Kenji Yoshimochi, Junjun Li, et al. (2022) Development and evaluation of a novel xeno-free culture medium for human-induced pluripotent stem cells. *Stem Cell The.*13:223
- 2) Yoko Kawase-Koga, Yasuyuki Fujii, Daiki Yamakawa, et al. (2020) *Jun*; 14: 128-135

48. ヒト歯髄幹細胞における遠心速度の違いによる多血小板フィブリンの有用性検討

中野愛二香¹、松井友里^{1,2}、壇辻百合香¹、菅野勇樹¹、古賀陽子¹

(¹ 歯科口腔外科学、² 東京医科大学)

〔目的〕 ヒト歯髄幹細胞は間葉系幹細胞の一つであり、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、神経細胞など様々な種類の細胞への分化能を有している¹⁾。そのため、再生医療分野において近年注目されている。その培養には、従来ウシ胎児血清 (FBS) などの異種動物の血清を用いることが多い。しかし、培養した細胞を臨床において使用するにあたり、動物由来成分の抗原性を考慮する必要がある。多血小板フィブリン (PRF) はヒトの血液より簡便に採取でき、成長因子やサイトカインにより組織再生を促すことが報告されている²⁾。また、代替成分としての有効性も示されている³⁾。我々は、遠心速度の異なる PRF を用いて細胞増殖および分化誘導における有効性検討を目的に研究を行っている。

〔方法〕 まず、ヒト全血から遠心分離により多血小板フィブリン (PRF) を抽出した。遠心速度は中速 (177g、1200rpm、8分間)、低速 (44g、600rpm、8分間) とした。抽出後、PRF を 6 ウェルプレートに播種し、37°C で 1 時間静置した。その後、2ml の α -MEM を加え、2 日毎に 2ml の上清回収を 2 週間行った。回収した上清を FBS に代わり、培養時の血清成分として使用した。また、ヒト抜去歯より歯髄幹細胞を採取し、培養を行なった。細胞培養液は 10%FBS、10%中速 PRF または 10%低速 PRF、および 1%PSA を添加した α MEM を使用した。細胞培養には培養皿を用い、初期培養時には 6cm、以降継代時には 10cm の培養皿を使用した。細胞密度は 1×10^5 とした。初期培養時より細胞形態と増殖能を比較し、2 代継代後に骨分化誘導を 2~3 週間行った。誘導後は ALP 染色、アリザリンレッド染色、フォンコッサ染色およびリアルタイム PCR により骨分化程度を視覚化した。また、3 代継代後にフローサイトメトリーを行った。

〔結果〕 細胞形態は全条件において DPSC と同様の形態であった。増殖能については、FBS 培養時と比較し、PRF 培養群の増殖能が低いということが分かった (図 1)。全条件下での培養細胞の特徴の検討のために行ったフローサイトメトリーでは、いずれの培養条件においても、間葉系幹細胞と類似した特徴を持つことが示された (図 2)。また、骨分化誘導能に関しては、2 サンプルのうち 1 サンプルは 3 週目において FBS 培養時と比べ明らかな差を示したが、1 サンプルでは明確な差は認めなかった (図 3)。リアルタイム PCR 法による解析では、ALP、*Col1 α 1*、*Runx2*、*Osteocalcin* の発現量を調べた。2 サンプルとも、ALP の発現量は低速 PRF が高かったが、その他の遺伝子については発現傾向が異なった (図 4)。

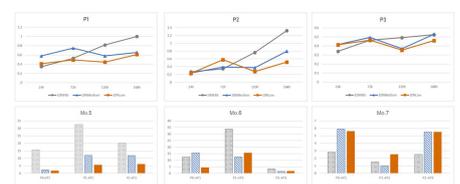
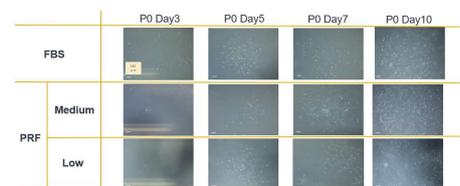


図1.細胞形態および増殖能検討

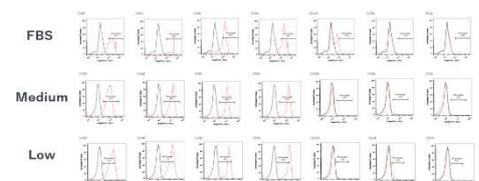


図2.フローサイトメトリーによる細胞特性検討

〔考察〕 増殖能においては培養条件中に差を認め、FBS 群、中速 PRF、低速 PRF の順に高かった。

また、細胞特性については 3 群ともに明らかな差異を認めなかった。

骨分化は FBS 群より PRF 群の方が高いと考えられる。リアルタイム PCR 法による解析での初期マーカーである ALP と Col1 の結果から、低速 PRF の方が中速 PRF よりも骨分化が早いという仮説を立てた。

手技による差あるいは細胞や血清における個体差が生じている可能性が考えられるため、今後サンプル数を増やし、同様の検証を継続していく。また、PRF 生成時の遠心速度については、高速（710g、2400rpm、8 分間）と低速との比較も行う予定である。

〔文献〕

- 1) S Gronthos, M Mankani, J Brahim, et al. (2000). Proc Natl Acad Sci USA. 97(25): 13625-13630
- 2) J. Choukroun, S. Ghanaati (2018). Eur J Trauma Emerg Surg. 44: 87-95
- 3) Ayano Hatori, Daiki Yamakawa, Sarah Al-Maawi, et al. (2023). Bioengineering(Basal). 10(10) :1196

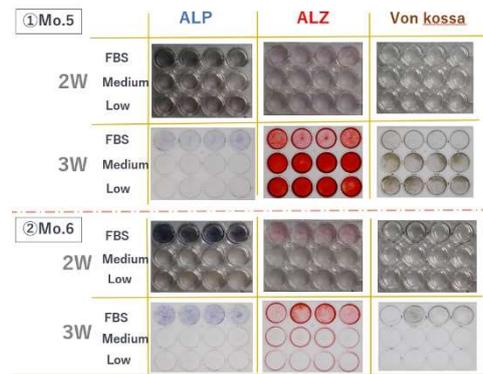


図3.骨染色

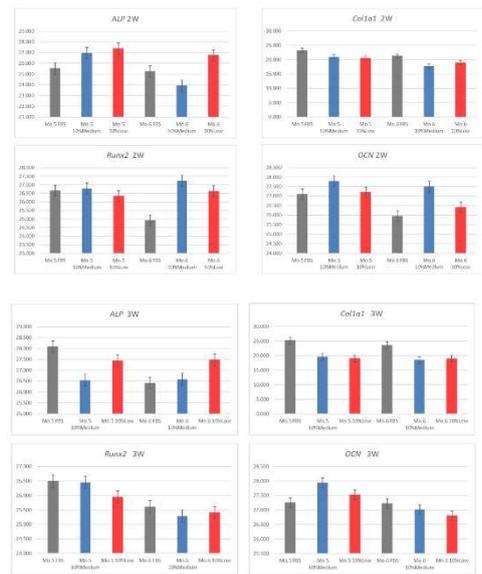


図4.リアルタイム PCR 法による解析

49. 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 ノックアウト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〕 自己免疫疾患における UTX の役割を解明する目的で、マウス自己免疫疾患誘導モデルとして免疫不全マウス(Rag2^{-/-}Il2rb^{-/-})に、ナイーブ T 細胞(CD4⁺CD45RB^{high}CD25⁻)を移入することにより大腸炎を発症させるマウス炎症性大腸炎誘発実験モデルを用いた。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脾細胞を調整し、セルソーターを用いてナイーブ T 細胞を採取し、免疫不全マウス腹腔内へ移入し、疾患誘発の差異を調べた。

〔結果〕 コントロールマウスでは炎症性大腸炎の特徴的な症状である体重減少や下痢が認められ、著明な腸管肥厚をともなう腸炎の形態が確認されたのに対し、UTX ノックアウトマウスではこれらの症状が著明に改善されることが明らかとなった (図 1)。

〔考察〕 炎症性大腸炎の発症には腸管における T helper(Th)反応が関与している。Th 反応は Th1, Th2, Th17 からなり、正常の腸管では免疫反応を制御する regulatory T cell (Treg) との間でバランスが保たれているが、炎症性大腸炎腸管ではその調節機構が破綻しており、Th17 反応の亢進がみられる。我々は UTX ノックアウトマウス由来ナイーブ T 細胞はコントロールマウス由来ナイーブ T 細胞に比べ、Treg への分化が亢進すると共に、Th17 への分化は減弱するという *in vitro* の予備実験結果を得ており、今回の結果は大腸炎誘発に関与する Th17/Treg のバランスの違いによるものと考えられた。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 の関与が指摘されており¹⁾²⁾、今回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 ノックアウトマウスは MDS と自己免疫疾患発症を説明する初めてのモデルマウスであり、今後、さらに UTX ノックアウト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。

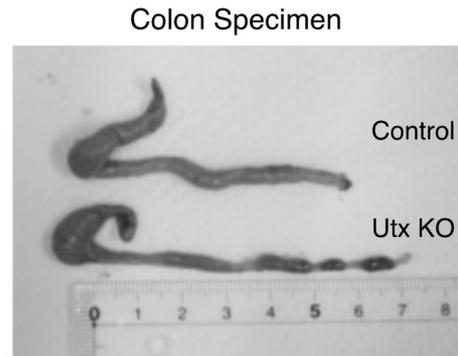
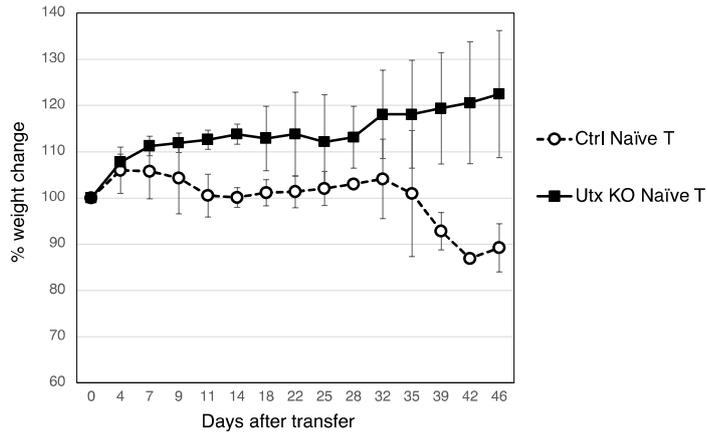


図 1. Utx KO マウスとコントロールマウス由来ナイーブ T 細胞移入による炎症性大腸炎の差異

[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.

50. CBL 変異を有する慢性骨髄単球性白血病における UTX 機能欠失による急性転化機構の解析に関する研究

黒川美有、世良康如、岩崎正幸、本田浩章
(実験動物研究所)

〔目的〕 *Cbl* 遺伝子はユビキチン E3 リガーゼをコードし、その変異は慢性骨髄単球性白血病 (chronic myelomonocytic leukemia, CMML) の約 10% で認められる。我々は以前、CMML 患者で認められた CBL 蛋白質の 367 番目のアミノ酸であるグルタミンがプロリンに置換した変異体 (CBL^{Q367P}) を後天性に誘導可能に発現するコンディショナルノックイン (*CblcKI*) マウスを作製し、CMML の発症を認めた¹⁾。CMML は付加的遺伝子異常を伴い急性骨髄性白血病に移行することが知られており (急性転化)、その 1 つとしてヒストン修飾因子をコードする UTX 遺伝子欠損が報告されている²⁻³⁾。今回我々は、CBL 変異を伴う CMML の急性転化における UTX 機能欠失の関与を検討する目的で、我々は *CblcKI* マウスに後天的に誘導可能に UTX を欠失するコンディショナルノックアウト (*Utx cKO*) マウスを掛け合わせ、解析を行った。

〔方法〕 コントロール (*Ctrl*)、*CblcKI*、*CblcKI/UtxcKO* の 3 群のマウスについて、発現誘導の 4 週間後から、末梢血数の推移、骨髄における造血幹前駆細胞数、脾臓の重量比較を行った。また、*CblcKI*、*CblcKI/UtxcKO* の 2 群のマウスの骨髄から *Lin*⁻, *Sca1*⁺, *cKit*⁺ (LSK) の造血幹前駆細胞を単離して、網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行い、得られた結果について gene set enrichment analysis (GSEA) によるパスウェイ解析を行なった。その他、*CblcKI*、*CblcKI/UtxcKO* の 2 群の骨髄から LSK の造血幹前駆細胞を単離して、Mitostress テストを行なった。

〔結果〕 CBL 発現誘導と UTX 発現欠失誘導後 (以下誘導後) の生存率は、*Ctrl* 群および *CblcKI* 群に比較して *CblcKI/UtxcKO* 群で著明な低下を認め (図 1)、誘導後 4 週の造血組織の解析結果では、*Ctrl* 群および *CblcKI* 群に比較して *CblcKI/UtxcKO* 群で末梢血の白血球増多、血小板減少、および脾臓の腫大を認めた。誘導後 4 週の *CblcKI* マウスと *CblcKI/UtxcKO* マウスの LSK 細胞を用いた RNA-seq 結果を KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) を用いてパスウェイ解析を行なったところ、*CblcKI* LSK 細胞に比較して *CblcKI/UtxcKO* LSK 細胞で RIBOSOME と OXIDATIVE PHOSPHORYLATION の活性化を認め、細胞内代謝が亢進していることが示唆された (図 2)。最後に Mitostress テストで *CblcKI/UtxcKO* LSK 細胞が *CblcKI* 群と比較してミトコンドリア呼吸能 (OCR)、解糖系 (ECAR) で高い傾向にあった。

〔考察〕 RNA-seq 結果から細胞内代謝が亢進していることが示唆された。今後はミトコンドリア機能を含めた細胞内代謝解析を行うと共に、競合的骨髄移植による造血幹細胞活性の差についても検討する予定である。

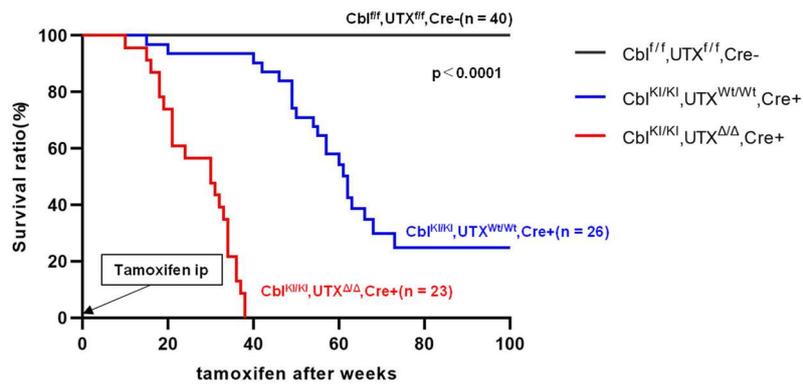


図 1. Tamoxifen 投与後の生存曲線

※巻末にカラー図掲載

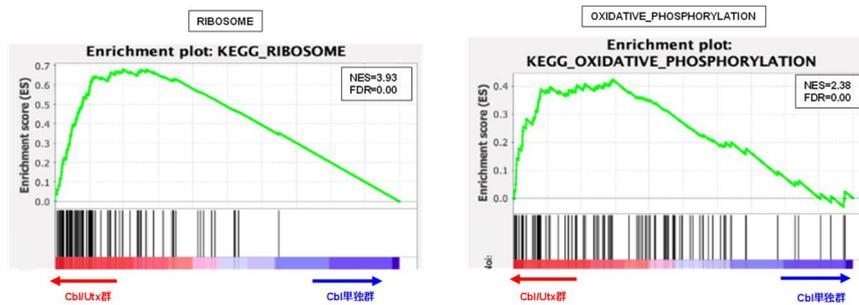


図 2. Tamoxifen 投与 4 週間後のパスウェイ解析

※巻末にカラー図掲載

〔文献〕

- 1) Nakata Y., Ueda T., Honda H., et al. (2017) Blood. 129(15) :2148-2160
- 2) Jankowska M. A., Makishima H., Maciejewski P. J., et al. (2011) Blood. 118(14) :3932-3941
- 3) Kar Abu S., Jankowska A., Maciejewski P. J., et al. (2013) Haematologica. 98(1) :107-113