

5 1. 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 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 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*^{-/-}, *Uty*^{-/-}) 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*^{-/-}, *Uty*^{-/-}, *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。*Utx*^{+/+}および *Utx*^{-/-}マウス前立腺組織において、RNA sequencing (RNA seq) および Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)による網羅的遺伝子解析を行い、*Utx* 欠失が前立腺癌発症に及ぼす影響を評価した。

〔結果〕 初めに *Utx*^{-/-}, *Uty*^{-/-} 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*^{-/-}, *Uty*^{-/-}, *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*^{-/-}, *Uty*^{-/-}, *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)。さらに *Utx*^{+/+}および *Utx*^{-/-}マウス前立腺組織における RNA seq、GSEA の結果、UTX の欠損が DNA 損傷修復経路を不活性化することを見出した。DNA 修復マーカーである γ H2AX に対する抗体で照射前立腺組織を免疫蛍光染色したところ、*Utx*^{-/-}, *Uty*^{-/-}, *p53*^{+/-}マウスでは、*Utx*^{+/+}, *Uty*^{+/+}, *p53*^{+/+}マウスに比べて DNA 損傷の修復に要する時間が著しく延長していた。

〔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、*Utx*⁺および *Utx*⁻マウス前立腺組織における網羅的遺伝子解析の結果、UTX 欠失が DNA 損傷修復能の低下に寄与している可能性が示された。今後は今回得られた結果から、UTX 欠失前立腺癌において、オラパリブなどの DNA 損傷修復に関連のある薬剤の効果を検証していく。

〔結論〕 前立腺癌発症機構に UTX 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

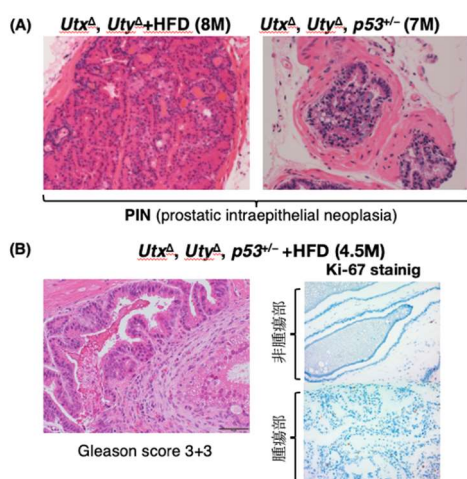


図 1. マウス前立腺 HE 染色 Ki-67 染色

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

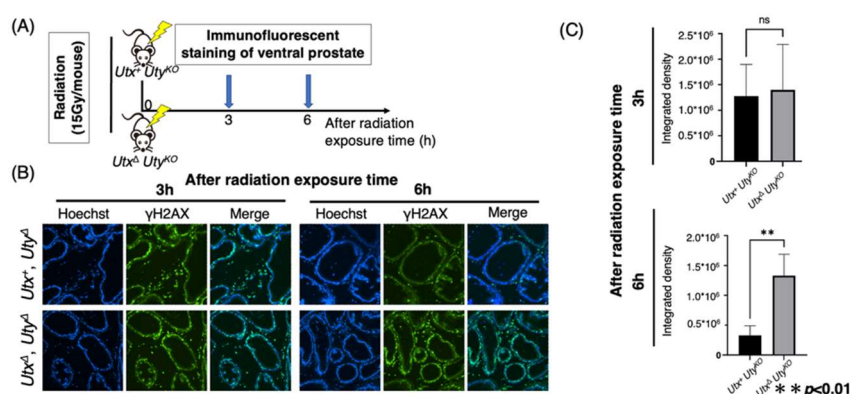
(B) *Utx*^A, *Uty*^A, *p53*^{+/-} +HFD (4.5M)では Gleason = 3+3 の前立腺癌の発症がみられる。Ki-67 染色では腫瘍部での陽性細胞の増加がみられる。

図 2. マウス前立腺組織における DNA 損傷修復機能

(A) シェーマ、マウスに放射線 (15Gy/マウス) を照射し、照射 3 時間後または 6 時間後に前立腺を摘除した。

(B) 抗 γ H2Ax 抗体による *Utx*⁺, *Uty*^A, *p53*^{+/-}マウスおよび *Utx*^A, *Uty*^A, *p53*^{+/-}マウス前立腺の免疫蛍光染色。

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

5.2. B細胞におけるヒストン脱メチル化酵素 UTX の機能解析と自己免疫疾患病態への関与

世良康如¹、岩崎正幸¹、川上万留実²、小泉美穂¹、本田浩章¹

(¹実験動物研究所、²総合医科学研究所)

〔目的〕 遺伝子発現を抑制する役割をもつヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) の脱制御は、B細胞分化や恒常性の維持に関与することが推察される¹⁾。また、H3K27me3 を基質とするヒストン脱メチル化酵素 UTX は、歌舞伎役者様の顔貌を特徴とする、歌舞伎症候群の原因遺伝子としても知られ、その患者は、高頻度に種々の自己免疫疾患を発症する²⁾。そこで我々は UTX の B細胞における機能と自己免疫疾患発症への寄与を検討するため、UTX を B細胞特異的に欠失することが可能なコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製し、B細胞分化と自己免疫疾患発症に対する UTX 欠失の影響を検討した。

〔方法〕 コントロールと B細胞特異的 *Utx* cKO マウスから脾臓細胞を単離し、フローサイトメトリーによる膜表面マーカー解析を実施し、B細胞の各分化段階における UTX 欠失の影響を検証した。またミエリンタンパク質ペプチドとアジュバンドを免疫することで実験的自己免疫性脳脊髄炎を誘導し、臨床症状のスコアリング結果をコントロールと B細胞特異的 *Utx* cKO マウスで比較した。

〔結果〕 フローサイトメトリーによる膜表面マーカー解析の結果、UTX 欠失により、脾臓中の CD5 陽性の B-1 細胞が増加していることが明らかとなった。(図 1)。

また、実験的自己免疫性脳脊髄炎を誘導した UTX 欠失マウスはコントロールマウスに比較し、自己免疫疾患症状の緩和傾向が見られた。

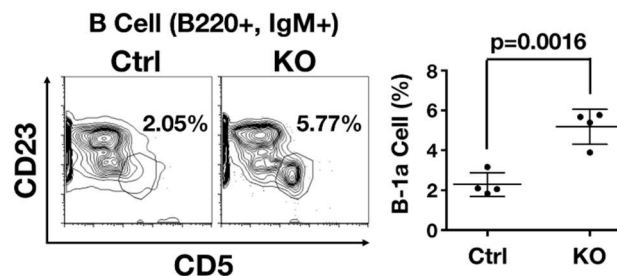


図 1. B細胞特異的 UTX cKO マウスは脾臓中の CD5 陽性 B-1 細胞が増加する

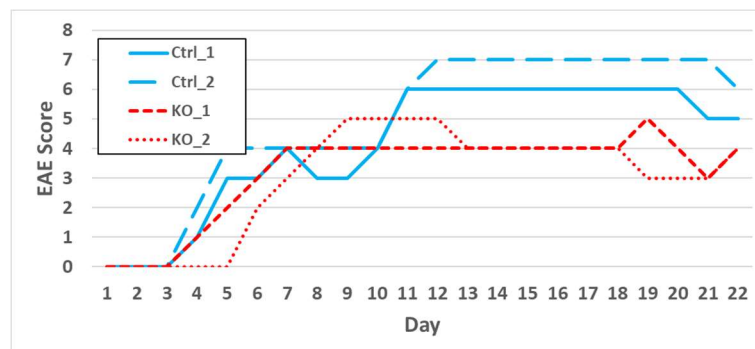


図 2. B細胞特異的 UTX cKO マウスは実験的自己免疫性脳脊髄炎が緩和傾向にある

〔考察〕 辺縁帯 B 細胞や B-1 細胞は T 細胞に依存的な免疫応答に重要な役割を果たすことが知られており、血中 IgM の主要な供給源であることが知られる³⁾。またこれらの細胞は自己免疫疾患に抑制的に関わる可能性が示唆されている³⁾。UTX 欠失によって増加した辺縁帯 B 細胞や CD5 陽性の B-1 細胞が自己免疫疾患症状の抑制に関与している可能性がある。

〔結論〕 UTX は B 細胞の分化制御に関与しており、その破綻により自己免疫疾患症状に影響を及ぼす。

〔文献〕

- 1) Guo M., Price MJ., Patterson DG., et al. (2018) EZH2 Represses the B Cell Transcriptional Program and Regulates Antibody-Secreting Cell Metabolism and Antibody Production. *J Immunol.* 200: 1039-1052.
- 2) Stagi S., Gulino AV., Lapi E., Rigante D., et al. (2016) Epigenetic control of the immune system: a lesson from Kabuki syndrome. *Immunol Res.* 64(2): 345-59.
- 3) Appelgren D., Eriksson P., Ernerudh J., et al. (2018) Marginal-Zone B-Cells Are Main Producers of IgM in Humans, and Are Reduced in Patients With Autoimmune Vasculitis. *Front Immunol.* 9: 2242.

5.3. ExpiSf Expression System を用いた GST 融合 LYPD1 タンパク質の産生

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、**「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〕 前年度までに ExpiSf9 細胞の継代培養、Bacmid DNA や組み換えバキュロウイルスの調整などの条件検討をすすめ、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ていたが、得られたリコンビナントタンパク質は血管新生抑制活性を保持していなかった。そこで本年度は GST 等の融合タグの位置を変更したリコンビナントタンパク質発現系を設計し、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た。これまでに GST 等のタグを LYPD1 の C 末端側に融合させたタンパク質で LYPD1 の活性が見られなかったため、今回は GST 等のタグを N 末端側に融合させたタンパク質を調整した。N 末端 GST 融合 LYPD1 配列を組み込んだ 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。得られた組み換えバキュロウイルスを感染させた ExpiSf9 における N 末端 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したところ、一部は可溶性画分に検出されたものの、多くが不溶性画分に検出された。組み換えバキュロウイルスを感染させた ExpiSf9 の可溶性画分から N 末端 GST 融合 LYPD1 タンパク質を精製し HUVEC のマトリゲルアッセイによる機能評価を試みたが、血管新生抑制活性は見られなかった。

〔考察〕 N 末端 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、得られたリコンビナントタンパク質は血管新生抑制活性を保持していなかった。これまでの検討で、GST 等のタグの融合位置に限らず得られた LYPD1 リコンビナントタンパク質の一部は可溶性であったものの、多くが不溶性画分に検出された。これらの結果や LYPD1 は分子内のシステイン残基 12 個により 6 つの

ジスルフィド結合を形成するタンパク質であることから、昆虫細胞発現系では GST 融合 LYPD1 タンパク質のフォールディングが不完全となり不溶化する可能性が示唆された。

〔結論〕 昆虫細胞発現系を用いて得られた GST 融合 LYPD1 リコンビナントタンパク質は血管新生抑制活性を保持していなかった。今後は哺乳類細胞発現系で LYPD1 リコンビナントタンパク質の大量発現系の構築を目指す。

〔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 4. 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¹、川内喜代隆²、マーシャル祥子¹、風間啓至¹、小川哲也¹

(¹足立医療センター・内科、²西尾久クリニック)

〔目的〕 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、NGS 解析（トランスクリプトーム/メチローム）、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（OGU1）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. 体位性頻脈症候群 (POTS) におけるアドレナリン受容体抗体と臨床像

佐藤恭子^{1,2}

(¹足立医療センター・リハビリテーション科、²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。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 患者における抗アドレナリン受容体抗体 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$)¹のほか、自己免疫性自律神経節障害患者にみられる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が発症に関係する可能性があるとしてされている²⁻⁴。

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。 α および β アドレナリン受容体の分子量はそれぞれ 45-49 kDa, 60-65 kDa である。 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ アドレナリン受容体は SK-N-MC (human neuroblastoma) 細胞、 $\beta 1$ アドレナリン受容体は A-375 (human melanoma, skin lymph node) および Hs294T (human melanoma, skin) 細胞膜上に多く発現することが知られている。

今回の検討ではアドレナリン受容体に対する IgG 自己抗体と臨床的な重症度との関連を調査した。

〔方法〕 東京女子医科大学附属足立医療センターを受診した POTS 患者の中で、臨床研究参加の同意が得られた 10 名を対象とした。

抗アドレナリン受容体 IgG 抗体の検出には、ウエスタンブロッティング法 (WB) を用いた^{5,6}。具体的には既に WB でアドレナリン受容体発現が確認されている A-375、Hs294T、SK-N-MC 細胞の細胞ライセートの電気泳動を行い、WB 用のメンブレンにトランスファーしたのちに患者血清とインキュベートした。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、血清中の細胞ライセートに対する抗体反応性を検討した。また、市販されている抗ヒトアドレナリン受容体抗体を陽性コントロールとして使用した。

各症例の重症度は研究参加時の筋痛性脳脊髄炎 / 慢性疲労症候群 (ME/CFS) の PS (performance status)⁷ で評価した。

〔結果と考察〕 α および β アドレナリン受容体の分子量はそれぞれ 45-49 kDa, 60-65 kDa である。今回の検討では、50kD 付近に A375 で 2 名、Hs294T に 5 名、SK-N-MC に 4 名、バンドの検出が確認された。

被験者の研究参加時の PS の中央値は 6.5、頻出値は 7 であった。ME/CFS PS のスコアが高い症例は WB でのバンド検出も多い傾向がみられた。一方、WB で 50kD 付近にバンドの検出が確認された細胞系の数と ME/CFS PS が 5 以上の症例を比較した χ^2 検定では統計的な有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

これらのパイロットデータをもとにして、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、体位変換時の血行動態と筋交感神経活動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. β -adrenoceptors are upregulated in human melanoma and their activation releases pro-tumorigenic cytokines and metalloproteases in melanoma cell lines. *Lab Invest.* 2013;93:279.
- 7) 厚生労働省科研費補助金 障害者対策総合研究事業慢性疲労症候群診断基準（平成 25 年 3 月改定）。

5 6 . The effect of laxatives on reducing serum phosphate levels on three-combination probiotic in hemodialysis patients: A subanalysis of RCT

Tetsuya Ogawa¹, Eriko Hirasawa¹ and Nobuo Nagano^{1,2}

(¹Department of Medicine, Tokyo Women's Medical University Adachi Medical Center,

²Kidney Disease and Dialysis Center, Hidaka Hospital)

[Purpose] Dysbiosis of the intestinal microbiota in chronic kidney disease increases uremic toxin, which damage the epithelial tight junctions and increase the permeability of the intestinal wall via endotoxemia and systemic inflammation. Some articles reported that probiotics reduced the uremic toxin and decreased inflammation biomarkers in CKD patients. Meanwhile, we have already reported that oral administration of *Bifidobacterium longum* in a gastro-resistant seamless capsule decreases serum phosphate levels in patients receiving hemodialysis (Clin Kidney J, 5:373-374, 2012) . In addition, in this congress, we reported that three-combination probiotics decreased serum phosphate levels. Meanwhile, some articles reported the relationship hypophosphatemia and laxative abuse. The aim of this subanalysis study is to evaluate the efficacy on laxatives of reducing serum phosphate levels of three-combination probiotic in patients receiving hemodialysis.

[Methods] A 6-month prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study was conducted at three hemodialysis centers. As probiotic therapy, of three-combination probiotics (Bio-Three) tablets, each containing 2 mg of lactomin (*Streptococcus faecalis* T-110), 10 mg of *Clostridium butyricum* TO-A, and 10 mg of *Bacillus mesentericus* TO-A, were used. The patients receiving hemodialysis were randomly assigned to the Bio-Three group (n=37) and the placebo group (n=36). In both the Bio-Three group and the placebo group, patients orally received 6 tablets 3 times daily. We evaluated the effect of probiotic on serum serum phosphate level and gut microbioma before and 6 months after the start of treatment. The gut microbioma composition was analyzed by a 16s rRNA gene-based sequencing protocol. In addition, in patients with laxative (n=24), we evaluate the effect of probiotic on serum serum phosphate levels and gut microbioma.

[Results] The serum phosphate levels in the Bio-Three group significantly decreased after 6-month treatment, while did not change in the placebo group. Furthermore, the serum phosphate level in patients with Bio-Three and laxative additionally decreased. In a 16s rRNA gene-based sequencing protocol analysis, serum phosphate levels were positively correlated with the occupancy ratio of *Erysipelotrichaceae*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, *Ruminococcaceae*, and *Sutterellaceae* and were negatively correlated with the occupancy ratio of *Leuconostocaceae* and *Lachnospiraceae* in patients with Bio-Three and laxatives.

[Conclusions] In this subanalysis study, the effect of reducing serum phosphate levels on three-combination probiotic might be augmented by laxatives and the specific bacteria in the gut microbioma might contribute to the decrease of serum phosphate levels.

5 7 . A non-epidermolytic keratinocytic epidermal nevus associated with a post-zygotic mutation in the gene encoding the epidermal growth factor receptor

Noriko Umegaki-Arao

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

[Purpose] Non-epidermolytic keratinocytic epidermal nevi (KEN) are benign congenital skin lesions characterized by linear distribution along the lines of Blaschko. Here, we describe a case of non-epidermolytic KEN exhibiting characteristic clusters of velvet-like whitish papules along the lines of Blaschko associated with a postzygotic mutation in *EGFR*.

[Methods] A 6-year-old boy without a family history presented with widespread whitish papules on his trunk from the age of 3 months. A biopsy showed acanthosis and basal melanosis without granular degeneration, combined with the hyperpigmented network by dermoscopy. These findings suggested that the irregular reflection of visible light at the surface of the hyperkeratotic stratum corneum may have produced the whitish appearance.

[Results] An exome sequencing using genomic DNA purified from the lesional epidermis detected a heterozygous *c.2582T>A* (p.L861Q) variant in *EGFR*, with no variants in any of the genes previously associated with KEN. Sanger sequencing followed by digital polymerase chain reaction analysis revealed the heterozygous *EGFR c.2582T>A* (p.L861Q) variant in the lesional epidermis, but not in the lesional dermis or white blood cells. Immunohistochemical staining revealed aberrant EGFR activation in the basal layer. We conclude that the *de novo* constitutive-active EGFR variant caused the non-epidermolytic KEN. The p.L861Q variant has been reported as an activating mutation of EGFR kinase in malignant tumors.

[Discussion and Conclusions] A lower incidence of EGFR mutations was also reported in seborrheic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma^{1,2}). However, to the best of our knowledge, this is the first report of a somatic *EGFR* mutation in non-epidermolytic KEN.

[Reference]

- 1) Hafner C, Toll A, Fernandez-Casado A *et al.* Multiple oncogenic mutations and clonal relationship in spatially distinct benign human epidermal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; **107**: 20780-5.
- 2) Georgieva IA, Mauerer A, Groesser L *et al.* Low incidence of oncogenic EGFR, HRAS, and KRAS mutations in seborrheic keratosis. *Am J Dermatopathol* 2014; **36**: 635-42.

[Article]

- 1) Umegaki-Arao N, Ono N, Tanaka R, Sasaki T, Fujita H, Shiohama A, Aoki S, Amagai M, Kubo A. A nonepidermolytic keratinocytic epidermal naevus associated with a postzygotic mutation in the gene encoding epidermal growth factor receptor. *Br J Dermatol.* 2019 Nov 20. doi: 10.1111/bjd.18729. (PMID : 31745974)

[Conference Presentation]

- 1) Umegaki-Arao N, Ono N, Tanaka R, Sasaki T, Fujita H, Shiohama A, Amagai M, Kubo A. A non-epidermolytic epidermal nevus associated with a postzygotic EGFR mutation. 1st. International Societies for Investigative Dermatology Meeting, Tokyo, Japan, 2023.05.10-13

58. クリオプレシピテートと比較した限外濾過による新鮮凍結血漿の濃縮効果

市川順子、小森万希子

(足立医療センター・麻酔科)

〔目的〕 クリオプレシピテート (Cryo) は新鮮凍結血漿 (FFP) よりも高濃度のフィブリノゲンを含み止血改善効果があるが、その作成に大型の冷却遠心機が必要になる。そこで、人工心肺中に FFP を投与し限外濾過により濃縮した場合を想定し、*in vitro* で透析膜を用いて FFP を限外濾過 (UF) 後に生成した濃縮物を凝固因子活性などにつき Cryo 製剤と比較検討した。

〔対象と方法〕 37°Cで融解した FFP を 500ml の生理食塩水で洗浄後の透析膜内に流入させ、ポンプによって流量 300ml/min で送液を行いながら廃液を 50ml, 50ml, 100ml, 50ml と排出させ、検体量を含めて 360ml を廃液し濃縮させた。Cryo は日本輸血細胞治療学会のクリオプレシピテート作成プロトコルに準じて作成した。FFP と UF 後の濃縮物及び Cryo の各種蛋白、フィブリノゲン (Fib) 濃度、凝固因子活性、浸透圧、比重、血液粘弾性検査である ROTEM (EXTEM と NATEM) などを測定し、各因子を比較検討した。

〔結果〕 UF 濃縮液は Cryo と比較して、Fib 濃度、FVIII 活性、フォン・ヴィレブランド因子 (VWF) 活性、浸透圧は有意に低いものの、FV、FIX 活性、アンチトロンビン (AT) III 活性、総蛋白、アルブミン、比重が有意に高かった (表 1)。限外濾過後の各種凝固因子、抗凝固因子、蛋白、比重、浸透圧は廃液量に応じて FFP と比較して有意に上昇した。FFP と比較すると分子量が比較的大きい Fib 濃度、第 IX 因子、VWF 活性の平均変化率それぞれ 171%、182%、148% であり、分子量が比較的小さい第 V 因子、アルブミン濃度の平均変化率は 178%、144% であった。限外濾過に応じて NATEM の CT, CFT は有意に短縮し、 α 角は有意に高くなり、EXTEM と NATEM の最大血餅硬度は有意に上昇した。

〔考察〕 UF 濃縮液の ROTEM 上の変化は、限外濾過により上昇した凝固因子活性が凝固カスケードにおける増幅、進展相を強化し、最終的にフィブリン重合反応が強まったことを示唆した。ROTEM では Cryo の最大血餅硬度が UF 濃縮液と比較して有意に高く、フィブリノゲン濃度の上昇を反映していると考えた。本研究における透析膜の分画分子量 10kDa 程度であり、理論上、分子量 10~50kDa 程度以上の成分を濃縮回収できる。しかし、UF におけるフィブリノゲンの回収率は 34.8% と低く、分子量が大きい凝固因子の活性やタンパク濃度の変化率は分子量が比較的小さい凝固因子活性やアルブミン濃度の変化率と同程度であった。これは全濾過による目詰まりや濃度分極が進行した結果、膜の分離性能の低下が原因と考えた。一方、蛋白やアルブミン濃度は高く膠質浸透圧維持に有効であり、アンチトロンビン活性も高いゆえ抗血栓性にも優れていると考えた。

〔結語〕 透析膜を用いて FFP を限外濾過することにより、FFP 中の凝固因子、抗凝固因子を濃縮することができた。限外濾過後の濃縮液は Cryo と比較して Fib 濃度は低いものの総蛋白や AT III 活性が高いことが特徴的であった。

[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) 岡崎亮太、市川順子、福田友樹、向山瑤子、小森万希子. クリオプレシピテートと比較した限外濾過による新鮮凍結血漿の濃縮効果. 第70回日本麻酔科学会学術集会、神戸、2023/6

表 1. クリオプレシピテートと限外濾過後の濃縮物の凝固因子活性、浸透圧、比重、ROTEM 凝固機能などパラメータの比較

	クリオプレシピテート群	限外濾過群	p values
VWF-Rco(IU/dl)	615.2±176.6	183.6±94.4	<0.01
VWF:Ag(IU/unit)	865.5±284.3	258.0±104.2	<0.01
第V因子活性(%)	65.4±11.6	160.7±24.3	<0.01
第IX因子活性(%)	129.3±26.3	183.7±41.8	<0.01
第VIII因子活性(%)	486.9±182.7	165.0±28.0	<0.01
第XIII因子活性(%)	179.2±56.1	165.0±28.0	0.228
フィブリノゲン濃度(mg/dl)	>900	584.7±122.8	<0.01
フィブリノゲン量(mg)	>450.4	448.5±140.5	
PT-INR	1.15 ±0.06	0.97 ±0.06	<0.01
プロトロンビン時間(s)	13.7±0.66	11.6±0.8	<0.01
活性化部分トロンボプラスチン時間 (s)	26.9±2.3	35.8±6.9	0.174
アンチトロンビン活性 (%)	89.5±10.5	≧150	<0.01
総蛋白 (g/dl)	7.3±0.6	14.2±2.6	<0.01
アルブミン (g/dl)	3.6±0.3	7.9±1.7	<0.01
浸透圧 (mOsm/kg/H2O)	304.0±19.1	271.5±9.3	<0.01
比重	1.03±0.002	1.05±0.005	<0.01
容量 (ml)	51.0±3.5	57.8±14.8	0.146
EXTEM			
CT(s)	54.3 ±6.5	89.9±17.8	<0.01
CFT (s)	23.1±3.7	88.5±37.4	<0.01
Alpha angle	85.7±0.7	74.9±5.3	<0.01
MCF (mm)	63.5±10.1	31.3±4.3	<0.01
NATEM			
CT (s)	708.3±156.9	735.0±219.6	0.767
CFT (s)	167.2±85.3	172.4±77.8	0.892
Alpha angle	65.0±8.8	61.1±9.0	0.355
MCF (mm)	65.6±10.5	31.5±5.7	<0.001

平均値±標準偏差

59. 当院における大腸内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) の長期治療成績と多発病変の特徴

下嶋理恵子、加藤博之
(足立医療センター・検査科)

〔目的〕 当院では、大腸腫瘍に対する内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) を 2006 年より導入し技術の向上に努めてきた。今回、当院における大腸 ESD 症例に関して長期治療成績を含め検討した。さらに内視鏡治療後の経過観察中に問題となる多発病変の特徴を明らかにする。

〔方法〕 対象は、2017 年 4 月までに施行された大腸 ESD 症例 514 例 (577 病変)、男性 331 例、女性 183 例、平均年齢 67.7 歳 (36-90 歳) である。ESD 治療経過、臨床病理学的検討および長期予後、また多発病変の検討を行った。

〔結果〕 ESD 施行部位は、横行結腸 133 例、S 状結腸 119 例、上行結腸 111 例、直腸 96 例の順に多く、肉眼形態は LST を含む IIa 型が 345 例。平均腫瘍径は 26mm で最大 120mm。高度浸潤や線維化のため切除不能例を認めたが、完遂率は 99%、一括切除率 96.1%、平均所要時間 51 分。偶発症は、内視鏡的止血術を要した後出血 9 例 (1.6%)、後腹膜気腫 5 例 (0.9%)、微小穿孔 (クリップ閉鎖) 3 例 (0.5%) などを認めたが全例保存的に軽快。病理は腺腫 385 例・腺腫内癌 85 例・M 癌 52 例・SM 軽度浸潤癌 12 例・SM 高度浸潤癌 29 例・NET 8 例。追加腸切除術は 22 例に施行。切除標本での癌局所遺残は 4 例、リンパ節転移は 1 例認めた。臨床経過は、M 癌と腺腫の各 1 例で局所再発を 1 年以内にきたしたが、内視鏡的に切除し得た。ESD 単独での一回治癒率は 99.6%、内視鏡治癒率は 100%であった。追加腸切除例 (SM 高度) の 1 例は 31 か月後肺転移再発を認め 56 か月後に原病死された。また 6mm の NET で 17 か月後肝転移再発をした稀な症例を経験した。次に、ESD 施行後に大腸内視鏡検査 (CS) の施行を確認し得た 273 例を検討した。観察期間中央値は 36 カ月で、high grade 以上の腺腫および癌を 60 例、85 病変認めた。これらを 1 年前後で検討すると、1 年未満群は 39 病変。平均腫瘍径 16.5mm、腺腫 33・M 癌 4・SM 癌 2 病変。IIa が 21 病変 (53.9%) と多かった。1 年以上群は 46 病変。平均腫瘍径 15.2mm、腺腫 35・M 癌 6・SM 癌 5 病変。IIa が 32 病変 (69.9%) と多かった。

〔考察〕 本邦における大腸 ESD の多施設研究では、大腸癌研究会「内視鏡摘除手技の標準化」プロジェクト研究で、大腸 ESD 816 例を検討し、一括切除率 94.5%、穿孔率 1.6%、後出血 2.2%との報告がある¹⁾。当院の治療成績は、一括切除率 96.1%、穿孔率 0.5%、後出血 1.6%と、有用性と安全性は同等もしくはそれを上回る良好な成績であったと短期治療成績について報告してきた²⁾。

臨床経過では、2 例に局所再発を認めたのみで局所遺残再発率 0.4%であり、前述のプロジェクト研究¹⁾ 1.4%に劣らない成績となった。また、ESD 後の長期治療成績について多施設共同研究の結果が 2022 年に示され、局所再発率は 0.5%と、当院と同等の優秀な成績であった³⁾。SM 軽度浸潤癌までの ESD 初回治癒率は 99.6%で良好な局所治療といえた。

M 癌で粘膜内再発を認めた 1 例は、横行結腸脾彎曲部の屈曲が強く治療に難渋した 70mm 大の症例であった。一括切除はなされたが、水平断端の癌浸潤の有無が不明 (HMX) となっていた。そのため 4 か月後に下部内視鏡検査を施行したところ、瘢痕近傍に 4mm 大の病変を指摘され、再内視鏡治療で切除し得

た。また、回盲部の 35mm Isp 型の腺腫で白色線維化が高度のため浮上せず分割切除となった 1 例が 7 か月後に腺腫再発をきたした。先の多施設共同研究の結果においても、分割切除および断端陽性が有意に局所再発のリスク因子であった³⁾。このように、断端の評価が困難な症例また分割切除例では、術後短期間に下部内視鏡を施行し、局所再発の有無を早期に発見し治療することが重要と思われた。

長期予後では、上行結腸の IIa+IIc 14mm の病変で SM1500 μ ・脈管侵襲陽性のため追加腸切除が施行され、癌遺残はなく、リンパ節転移陰性であったが、31 か月後肺転移再発を認めた症例を認めた。局所再発だけではなく、遠隔転移再発に留意し大腸癌治療ガイドラインに基づき CT などの画像診断や血清腫瘍マーカーなどを含めたサーベイランスが術後 5 年程度必要となる⁴⁾。

〔結論〕 大腸 ESD は、適切な方法を行う限りにおいて安全に施行され、長期でも良好な治療成績であった。ESD 後の CS は、局所再発率より多発病変の発生率の方が高く、また表面型病変が多いとの特徴を踏まえて行うべきと考える。

〔文献〕

- 1) Nakajima T, Saito Y, Tanaka S, et al. (2013) Surg Endosco. 27(9): 3262-3270.
- 2) Shimojima R, Otsuka H, Kihara K, et al. (2019) Jpn J Cancer Chemother. 46(2): 321-323.
- 3) Ohata K, Kobayashi N, Sakai E, et al. (2022) Gastroenterology. 163: 1423-1434
- 4) Hashiguchi Y, Muro K, Saito Y, et al. (2020) Int J Clin Oncol. 25(1): 1-42

〔学会発表〕

- 1) 第 78 回日本大腸肛門病学会， 東京， 2023/11

60. 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、TRAP アッセイや ELISA 法が主流で様々な欠点があった。今回使用したリアルタイム PCR を用いる測定法は、コンタミネーションリスクが低く、簡便・迅速且つ高感度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、生検および切除標本を使用した。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 Spectrometer で測定、(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 別では差はみられなかった。生検組織と切除標本のテロメラーゼ活性値はほぼ一致した。予後の関連でみると死亡例で有意に高値であった。

〔結論〕 生検組織でも、正確にテロメラーゼ活性値を測定可能である。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。

〔文献〕

- 1) Piatyszek, M.A. et al. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Methods in Cell Science*. 1995; 17: 1
- 2) Shay, J.W. and Wright W.E. Telomerase activity in human cancer. *Current Opinion in Oncology*. 1996; 8: 66-71

〔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。

※一部試薬が入手困難なため現在は凍結標本を蓄積中。

