

3 1. 血管炎における皮膚と血清の微生物叢の変化

宮部千恵、宮田龍臣、大貫真依、石黒直子
(皮膚科学)

〔目的〕 血管炎の病因としては、感染症や他の自己免疫性疾患、薬剤性などが知られているが、50%が原因不明とされている。感染に対する生体の防御反応が、血管に対する免疫反応としての血管炎を起こす可能性が示唆されているが、そのメカニズムは十分解明されていない(1)。特に、ウイルスについては、従来の病原体同定法では全体の0.07%以下のウイルスしか検出できないとされており、未知のウイルスを含む病原体が血管炎発症に関与している可能性は否定できない。次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析技術の発達により、遺伝子特異的なプライマー等を必要とせず、サンプル中に存在している全ての核酸の塩基配列を網羅的に解読することが可能となった。サンプル中の核酸全てを断片化して解読するメタゲノムショットガン解析により、細菌、真菌以外にウイルスの検出も可能となる。本研究では、血管炎組織・血液中に含まれる微生物由来の核酸を網羅的に解析することで、ウイルスを含めた血管炎病原微生物の探索を行った。

〔方法〕 2020年から2022年にかけて、血管炎患者由来皮膚13サンプル、血管炎患者由来血清15サンプル、健常人コントロール由来皮膚組織11サンプル、健常人コントロール由来血清14サンプルの採取を行った。血管炎患者は、皮膚動脈炎4例、IgA血管炎12例、顕微鏡的多発血管炎1例、クリオグロブリン血症性血管炎1例と診断した。血管組織と血清から核酸を抽出し、ホスト細胞の除去処理後、抽出したDNAおよびRNAの両端にアダプター配列を付加したライブラリの調整を行った。大阪大学微生物病研究所との共同研究により、得られたDNA, RNAライブラリを、第3世代シーケンサーを用いて解析した。得られた配列の生物種アノテーションをマッピングおよび相同性検索により行った。さらに、血管炎患者由来検体と、健常人コントロール由来検体の間で微生物叢に変化があるか比較した。本研究は、本学倫理委員会の承認（承認番号：5700）を受け、ヘルシンキ宣言の原則に従い、文書によるインフォームド・コンセントを行った。

〔結果〕 Kraken2ソフトウェアを用いて血清と皮膚組織中のウイルス組成を解析した。通常、無菌とされる血清から、多種多様なウイルスが検出された。そのうち、SENウイルスは、血管炎患者由来の血清および血管炎患者由来の皮膚組織において、健常人よりも高頻度に検出された。また、各血清サンプルのSENウイルス陽性率を比較するために、定量PCRを実施したところ、血管炎患者17名中13名(76.5%)、健常人患者5名中2名(40%)でSENウイルスが検出された。次に、患者の臨床的特徴によってSENウイルスのリード数が異なるかどうかを検討した。皮膚動脈炎患者では、健常人と比較してSENウイルスのリード数の割合が有意に高いことが分かった。ユークリッド距離に基づく主成分分析を用いて血清サンプルのβ多様性を調べたところ、血管炎患者と健常人の間に差のある傾向が見られた(PERMANOVA: $R^2 = 0.06465$, $p = 0.0486$)。また、血管炎患者と健常人との間の差異を検出するために、線形判別分析効果量を用いて血清細菌分類群を分析した。血管炎患者の血清で顕著に増加した細菌は *Corynebacteriales* であった。

〔考察〕 本研究では、包括的なメタゲノム・ショットガンシーケンシングを利用して、血管炎患者では血清と皮膚組織中のウイルスと細菌の組成が変化することを証明した。特に、皮膚組織で検出される SEN ウイルスのリード数は、血管炎患者群で上昇していた。さらに、SEN ウイルスは IgA 血管炎患者よりも皮膚動脈炎患者の血清中に存在しやすい。SEN ウイルスは 1999 年に発見された血液媒介性の一本鎖環状 DNA ウイルスである。日本における SEN ウイルスの有病率は 10% と報告されており、一般人口に比べて肝疾患患者での発生率が高い(2)。HCV 関連混合型クリオグロブリン血症患者の約 5% が、小血管への免疫複合体 (IC) の沈着の結果として、クリオグロブリン血症性血管炎を発症する。本研究では、皮膚血管における SEN ウイルスの存在を組織学的に確認はできなかったが、他のウイルスと同様に、血管壁の直接傷害または血管壁への IC 沈着が血管炎を誘発する可能性がある。血清中に同定された細菌のうち、*Corynebacteriales* が血管炎患者の血清で有意に検出された。*Corynebacteriales* は通常、臨床的には重要でない汚染物質とみなされているが、上咽頭微生物叢および末梢血白血球における *Corynebacterium* の存在が川崎病と関連していることが示唆されている(2)。また、腸内の *Corynebacteriales* 1 が白斑患者の罹病期間や血清 IL-18 値と関連している報告もある(3)。

〔結論〕 我々は皮膚血管炎における微生物叢の変化を発見し、メタゲノムショットガン解析を用いて病原微生物の新たな候補を同定した。このような微生物組成の変化は、血管炎の環境的誘因あるいは潜在的な悪化因子として作用する可能性がある。血管炎の発症と進行におけるこれらの病原体の重要性を検証するためには、さらなる研究が必要である。

〔文献〕

- 1) Jennette, J. C. et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 65, 1-11, doi:10.1002/art.37715 (2013).
- 2) Shibata, M. et al. The presence of a newly identified infectious agent (SEN virus) in patients with liver diseases and in blood donors in Japan. *J Infect Dis* 184, 400-404, doi:10.1086/322050 (2001).
- 3) Ni, Q. et al. Gut Microbial Dysbiosis and Plasma Metabolic Profile in Individuals With Vitiligo. *Front Microbiol* 11, 592248, doi:10.3389/fmicb.2020.592248 (2020).

〔発表論文〕

- 1) Miyabe C, Miyabe Y, Miyata R, Ishiguro N. Pathogens in Vasculitis: Is It Really Idiopathic? *Jma j.* 2021;4(3):216-24.
- 2) Miyata R, Miyabe C, Oki H, Motooka D, Nakamura S, Miyabe Y, Takenaka Y, Fukuya Y, Yudo K, Ishiguro N. Alteration of microbial composition in the skin and blood in vasculitis. *Sci Rep.* 2023 Sep 15;13(1):15317.

3 2. 白血病細胞における ATR 阻害剤の有用性の検討

森元梓、王艶華、田中紀奈、篠原明仁、吉永健太郎、瀬尾幸子
(血液内科学)

〔目的〕 造血器腫瘍において、ATR 阻害剤を使用し合成致死を効率よく起こすためには、従来の p53 と異なる分子や独自の作用機序の解明が必要となる。本研究では、この造血器腫瘍の特徴に基づき、造血器腫瘍特異的な ATR 阻害剤の感受性を規定するマーカーを特定し、またすでに候補に挙げられている CDC25A がマーカーとして臨床的に使用できるか、また ATR 阻害剤を利用した新規の治療法の臨床応用を目的とする。

〔方法〕

①患者由来白血病細胞を用いた ATR 阻害剤感受性と CDC25A の関連

患者由来白血病細胞を初期培養し、安定した細胞株として培養できる段階になったところで、この細胞株について、RT-PCR、ウェスタンブロット法を行い CDC25A mRNA や CDC25A タンパクの発現について検証する。

・患者由来白血病細胞において CDC25A と ATR 阻害剤の感受性に相関が確認されない場合

エンリッチメント解析などの遺伝子発現量データベースを使用し、既知の ATR 阻害剤の白血病細胞株別の IC50 の値と相関する DNA 損傷応答遺伝子を検索する。

・候補遺伝子に対し、ウェスタンブロット法や RT-PCR で実際の発現量を検証

データベースで候補にあげられた、白血病細胞株における ATR 阻害剤の IC50 の値と相関する DNA 損傷応答遺伝子に対して、実際の細胞株ごとの発現量をウェスタンブロット法や RT-PCR を用いて検証し、関連の有無を検討し、治療効果を予想するためのマーカーとして利用できることを目指す。

②患者由来白血病細胞への ATR 阻害剤の作用

上述の患者由来白血病細胞株について、ATR 阻害剤を投与して細胞の生存阻害効果がみられるか検証する。また、これまでに固形がんでは報告されているように、抗癌剤との併用で抗癌剤単剤投与より高い細胞生存阻害効果みられるかを検討するため、抗癌剤単剤投与群と ATR 阻害剤と抗癌剤併用投与群に分けてそれぞれの群の細胞生存阻害率を比較する。

〔結果〕

これまでに白血病細胞における ATR 阻害剤の作用機序について明らかにした点は以下である。

- ① 10種類の白血病細胞株においては、すべての細胞株で ATR 阻害剤による細胞の生存阻害効果が確認された。また、細胞株により生存阻害効果を起こすために必要な ATR 阻害剤の濃度は異なる。
- ② 白血病細胞株において、抗癌剤単剤を投与した場合と比較して、ATR 阻害剤と抗癌剤併用投与した場合はより大きな細胞の生存阻害効果を認める。
- ③ 白血病細胞株では、従来の固形がんではいわれているように、ATR 阻害剤の感受性を規定する因子としてがん抑制遺伝子である p53 の発現の有無は関連がみられない。
- ④ ATR 阻害剤投与されたことによる白血病細胞に起きる変化を検証した結果、細胞がおこすアポトーシスの頻度と阻害剤の感受性は関連がみられなかった。

- ⑤ ④と同様にATR阻害剤の投与による細胞分裂頻度を検証した結果、10種類の白血病細胞で感受性良好な細胞では細胞の分裂頻度の低下を認め、感受性不良な細胞においては分裂頻度の変化がみられないか、亢進することが判明した。
- ⑥ 白血病細胞においては、ATR阻害剤の感受性と関連するDNA損傷応答遺伝子としてCDC25Aが上げられることを示した。検証した白血病細胞株の中で阻害剤の感受性不良な群ではCDC25AのmRNAの発現量が高く治療効果を予想するためのマーカーとして利用できる可能性があると考ええる。

白血病細胞において、ウエスタンブロット法にて放射線照射で DNA 二本鎖切断を起こさせた前後で ATR 阻害剤低感受性群の細胞株においては、CDC25A の発現が高くなる傾向がみられる

〔考察〕 白血病細胞株に対する ATR 阻害剤の細胞増殖阻害の効果は確認されており、またそこに CDC25A 阻害剤を組み合わせた場合にその効果が増強することも確認できている。これを実際の臨床検体由来の細胞で実証することができれば CDC25A をマーカーとして用いる新規治療の 1 つの提案ができると考えている。

3.3. Expansion of circulating HLA-DR⁺ T peripheral helper cells in ACPA-positive individuals at-risk for RA

Hideto Takada, Yuko Okamoto, Shohei Nakamura, Rina Moriyama, Ryo Motoyama, Hanae Kikuchi, Ayako Ino, Yasuhiro Katsumata, Masayoshi Harigai, Yuko Okamoto
(Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine)

[Purpose] Production of anti-citrullinated peptide/protein antibody (ACPA) following T and B cell interactions is a hallmark of ACPA+ RA. Recently identified peripheral helper T (Tph) cells have B cell-helper functions coupled with a migratory program targeting inflamed peripheral non-lymphoid tissues¹⁾. Tph cells are expanded in the inflamed joint and blood of ACPA+ RA patients. However, it is not known whether immune dysregulation with an expansion of Tph cells occurs in a pre-disease stage of RA (i.e., ACPA-positive at-risk individuals).

[Methods] We analyzed peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to identify cell populations associated with serum ACPA positivity as well as eventual progression to RA. We employed mass cytometry in PBMCs from ACPA+ at-risk individuals (ARI), ACPA+ early RA patients, and healthy controls (n=17 in each group). Data were analyzed by computational analyses and biaxial gating. Study procedures were approved by the review board at Tokyo women's medical university (5237-R).

[Results] FlowSOM analysis of CD4⁺ T cells identified 10 metaclusters (i.e., cell populations). Of these, two metaclusters were significantly increased in ARI and RA compared to controls (Figure 1A). Metacluster 8 showed a high level of PD-1 expression and lack of CXCR5 expression, consistent with Tph cells (Figure 1B). t-SNE clustering visualized Tph cells composed of two distinct subpopulations based on HLA-DR expression (Figure 1C). Biaxial gating revealed that HLA-DR⁺ Tph cells were significantly increased in ARI (p = 0.002) and RA (p < 0.001) compared to controls, while HLA-DR⁻ Tph cells were increased only in RA (Figure 1D). In ARI, the frequency of HLA-DR⁺ Tph cells was higher in 'progressors' (i.e., ARI who developed RA within one year after PBMC collection) compared to non-progressors (p = 0.032, Figure 1E).

[Discussion] Our findings demonstrate an expansion of peripheral PD1^{hi}CXCR5⁻HLA-DR⁺ Tph cells in ACPA+ ARI, and importantly in a subset of ACPA+ individuals who later develop RA. Our study implicates HLA-DR⁺ Tph cells as critical cell subsets involved in the transition from ACPA+ at-risk state to classified RA.

[Conclusions] The expansion of HLA-DR⁺ Tph cells in ACPA+ individuals, including those who develop classified RA, and the association of the former sub-type with 'progressors' supports a key role of these cells in ACPA positivity as well as a transition from pre-RA to classified RA.

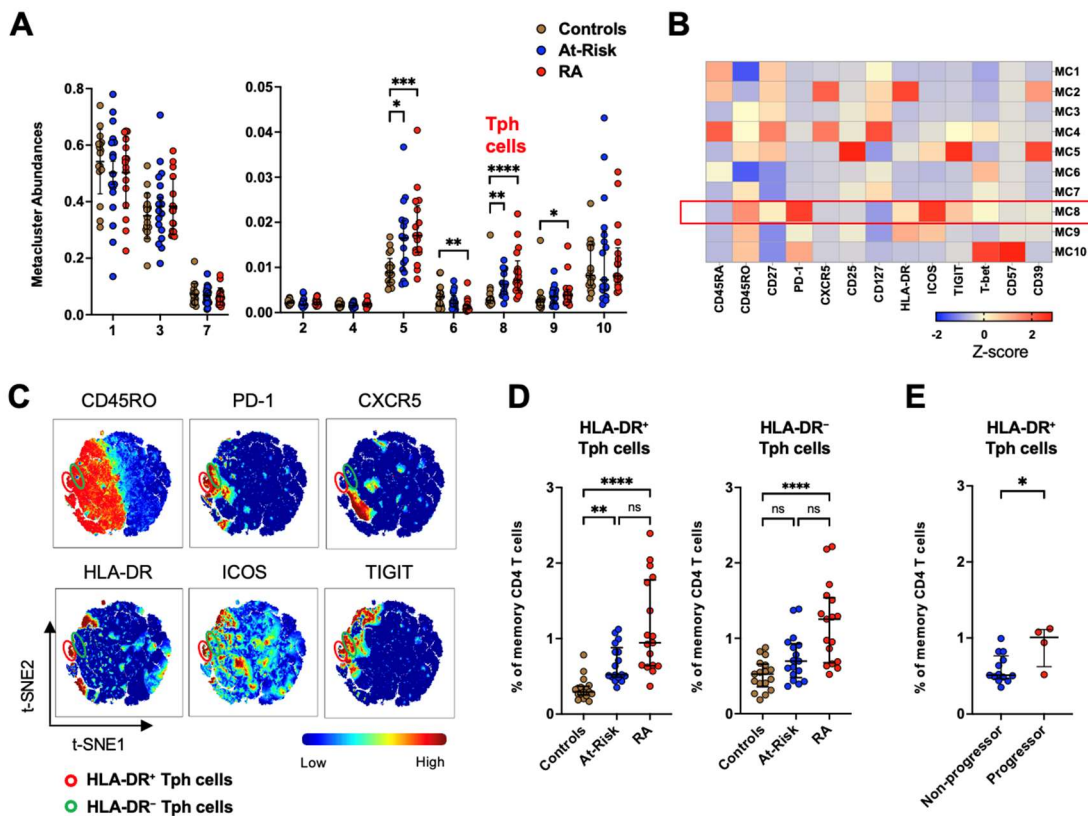


Figure 1. Identification of expanded HLA-DR⁺ Tph cells in blood of ACPA+ at-risk individuals and early RA patients. (A) Abundance of FlowSOM metaclusters of CD4⁺ T cells. (B) Heatmap of normalized expression of mass cytometry markers in each metacluster (MC). (C) Visualization of CD4⁺ T cells by t-SNE, showing HLA-DR⁺ Tph cells (red circle) and HLA-DR⁻ Tph cells (green circle). (D) Frequencies of HLA-DR⁺ Tph cells and HLA-DR⁻ Tph cells. (E) Frequency of HLA-DR⁺ Tph cells in ARI who developed RA within one year after PBMC collection (progressor, n=4) and those who did not develop RA within that period (non-progressor, n=13). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 by Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test in A and D, and by Mann-Whitney test in E. Error bars show median with interquartile range. ns, not significant; Tph, peripheral helper T.

[Reference]

- 1) Deepak A Rao, et al. (2017) Nature. 542 (7639) : 110-114

[Article]

- 1) Takada H, Holers VM, Okamoto Y, et al. (2024) Expansion of HLA-DR Positive Peripheral Helper T and Naive B Cells in Anticitrullinated Protein Antibody-Positive Individuals At Risk for Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheumatol. 76(7): 1023-1035.

[Conference Presentation]

- 1) Takada H., et al. Expansion of circulating HLA-DR⁺ peripheral helper T cells and CXCR5⁺ CD38⁺ mature naïve B cells in ACPA-positive individuals at-risk for and with classified RA. American College of Rheumatology convergence 2023, San Diego, USA. 2023/11

3 4. 全身性強皮症における細胞老化と線維化をリンクする因子の探索的研究

市村裕輝、樋口智昭、川口鎮司
(膠原病リウマチ内科学)

〔目的〕 全身性強皮症は原因不明の臓器の線維化をきたす疾患であり、現状も有効な治療選択肢が限られている。近年の研究において、全身性強皮症由来線維芽細胞において、老化関連遺伝子の発現が更新していることが見いだされており、また老化遺伝子を抑制することにより線維化の改善を認めることが報告されている¹⁾。しかしながら、全身性強皮症患者由来の線維芽細胞と、通常の老化線維芽細胞の差異について検討は行われていない。この差異が直接的な疾患因子となることが想定されることより、これを同定するべく、本研究を立案した。

〔方法〕 全身性強皮症患者由来線維芽細胞と継代培養を重ね細胞老化をきたした線維芽細胞の RNA を抽出し、RNA-seq を行う。健常線維芽細胞と比較し発現変動遺伝子を抽出し、両群の発現変動遺伝子の比較を行う。老化細胞の指標としては、senescence-associated β -galactosidase 活性を基準に用い、全身性強皮症患者由来線維芽細胞の活性と同程度の senescence-associated β -galactosidase 活性となるまで培養を行った健常線維芽細胞を比較群として設定する。

〔結果/考察〕 過去論文の再現のため、全身性強皮症患者由来線維芽細胞と健常線維芽細胞の senescence-associated β -galactosidase 活性を確認したところ、全身性強皮症患者由来線維芽細胞で有意に活性が高かった。今後、RNA を回収し、比較を進めていく。

〔文献〕

1) Tsuo PS, *et al*, Curr Opin Rheumatol. 2022 ; 34 : 343-350

3 5. 特発性炎症性筋疾患のトランスクリプトーム解析によるフェノタイプの差異に関する検討

市村裕輝

(膠原病リウマチ内科学)

〔目的〕 皮膚筋炎/多発筋炎を含む特発性炎症性筋疾患は原因不明の炎症性筋症をきたす疾患であるが、その病態は不明な点が依然として多く、治療法も限られている。その要因の一つとして、臨床所見・経過が多彩であることが一因として挙げられ、そのサブグループ分けが必要と考えられている。近年、複数の自己抗体が特発性炎症性筋疾患の患者血清より同定されており、自己抗体毎に合併症や予後が異なることが明確になっている¹⁾。また、一部では筋病理にも差異を認めることが報告されている²⁾。そこで我々は、自己抗体毎での特発性炎症性筋疾患の病変筋部分での分子学的差異があるかにつき、検討を行うことを目的として、本研究を立案した。

〔方法〕 当科に 2010 年 4 月～2024 年 3 月の間に入院加療を行った特発性炎症性筋疾患患者のうち、筋生検を実施した症例の生検検体より、RNA を抽出し、mRNA-seq を施行する。診療録より自己抗体の結果を含む血液検査結果、臨床症状・合併症、治療経過に関して情報収集を行う自己抗体毎での発現変動遺伝子を、RNAseqChef(img.ku.shinyapps.io/RNAseqChef/)を用いて抽出し、特異的な発現変動遺伝子の抽出を行う。また、RNAseq データをクラスター解析を行い、いくつかのクラスターに分類し、各クラスターに特徴的な臨床像を抽出する。

〔結果/考察〕 (現在 RNA-seq を施行し、データを収集中である。) 現行までで収集した RNA-seq のデータでは、炎症性のフェノタイプを呈する群と筋再生のフェノタイプを呈する 2 つの群が認められることを確認している。全データを収集の上、解析を進めるが、この 2 つのフェノタイプでの臨床経過の差異につき検討をさらに進める予定である。

〔文献〕

1) Fujimoto M, *et al*, Curr Opin Rheumatol. 016 ; 28 : 636-644

2) Tanboon J, *et al*, Neurology. 2022 ; 98 : e739-e749

3 6 . 全身性強皮症における IL-19 の関与に関する検討

廣瀬光、市村裕輝、樋口智昭、川口鎮司
(膠原病リウマチ内科学)

〔目的〕 全身性強皮症は様々な臓器の線維化を特徴とする全身性疾患であり、その病態メカニズムは現時点で判然としていない。IL-19 は IL-10 ファミリーに属するサイトカインであり、近年、特発性肺線維症患者血清にて高値であることが報告され、線維化に関与することが示唆された¹⁾。そこで、我々は全身性強皮症患者血清にて IL-19 値の測定を行い、その関与について検討を行った。

〔方法〕 2010 年 6 月 1 日～2023 年 2 月 28 日までに当科に入院した全身性強皮症患者のうち、血清提供に同意をいただいた 72 例の血清 IL-19 値の測定を ELISA にて行った。比較群として健常ボランティア 18 例の血清より同様に行った。電子カルテより臨床情報を収集し、臨床パラメーターとの関連について検討を行った。

〔結果〕 全身性強皮症患者血清にて有意に IL-19 値が高かった（中央値 [四分範囲]、全身性強皮症群 28.4 [11.5-75.7] ng/mL; 健常例 8.0 [8.0-12.0] ng/mL, $P < 0.05$ (Mann-Whitney's U test))。皮膚硬化の程度や、間質性肺疾患の有無との関連性は認めなかったが、間質性肺疾患を有する例では、線維化範囲が広範囲にわたる例で高値の傾向を認めた。

〔考察〕 全身性強皮症において、IL-19 が高値を認める例が多いことが判明した。既報にて線維化病変との関連は報告されており、本結果もそれと矛盾しない結果ではあるが、IL-19 がどのように全身性強皮症と関連しているかはここまでの検討では不明確である。今後、線維芽細胞に IL-19 を添加することにより線維化関連遺伝子の発現亢進を認めるか否か検討を進め、病態との関連性について明確にしていく。

〔結論〕 全身性強皮症患者では血清中 IL-19 値が高値であり、病態との関連が示唆された。

〔文献〕

1) Wang Y, *et al*, Mediators Inflamm. 2022 ; 6755407

37. cT1 限局性腎細胞癌における腎部分切除術後の pT3a アップステージの予測因子・腫瘍学転帰

石山亮¹、大前憲史²、近藤恒徳³、飯塚淳平¹、吉田一彦¹、福田洋典¹、橘秀和¹、石原弘喜¹、小林博人³、高木敏男¹

(¹泌尿器科学、²福島県立医科大学病院臨床研究教育推進部、³足立医療センター・泌尿器科)

〔目的〕 臨床病期 T1N0M0 (cT1) の腎細胞癌 (RCC) の標準治療は腎部分切除術もしくは腎摘除術である¹⁾²⁾。2016 年に本邦でロボット支援下腎部分切除術が保険収載され、昨今は腎機能温存のため腎部分切除術が拡大している。一方で、術後に病理学的病期 T3a 症例が少数ながら認められている (pT3a upstaging)。当院での cT1 RCC に対して、腎部分腎切除を施行した患者の pT3a upstaging の予測因子・腫瘍学的転帰を調査した。

〔方法〕 2011 年 1 月から 2020 年 12 月までに当院で cT1 RCC に対して腎部分切除術 (開腹、腹腔鏡、ロボット支援を含む) を施行した 1617 症例 (再発例、Von-Hippel-Lindau 病など再発高リスク症例を除外) を後方視的に解析した。

〔結果〕 1617 人の cT1 RCC 症例のうち、28 人 (1.73%) に pT3a upstaging を認めた。pT3a upstaging 相関因子に関する多変量のロジスティック回帰モデルでは、「男性」と「cT1b (腫瘍径>40mm)」に有意差を認めた (男性 : OR = 5.07、95%CI : 1.18–21.8、cT1b : OR = 8.36、95%CI : 3.56–19.6) (表 1)。Recurrence-free survival (RFS) に関する Kaplan–Meier 法による解析では、pT3a upstaging 症例は pT1 症例 (non-upstaging) と比較して有意に短縮していた ($p < 0.0001$)。しかし、他の病理学的因子を調整した多変量の Cox 比例ハザード回帰モデルでは、pT3a upstaging と RFS との相関を認めなかった (HR = 1.59、95%CI : 0.58–4.36) (表 2)。pT3a の成分 (周囲脂肪浸潤、腎洞浸潤、腎静脈浸潤) を個別に分析した感度解析でも、いずれも RFS との相関を認めなかった。

表 1. pT3a upstaging の予測因子 (Logistic 回帰分析)

	Univariable		Multivariable	
	OR (95 % CI)	p-value	OR (95 % CI)	p-value
Male sex	4.84 (1.14 – 20.5)	0.0322	5.07 (1.18 – 21.8)	0.0292
Age ≥60 years	1.91 (0.88 – 4.16)	0.1037	1.93 (0.87 – 4.28)	0.1033
Body mass index ≥24	1.41 (0.66 – 3.00)	0.3678	1.06 (0.49 – 2.30)	0.8909
Clinical symptoms	1.64 (0.66 – 4.10)	0.2857	1.49 (0.58 – 3.79)	0.4075
Clinical T1b	6.89 (3.01 – 15.7)	< 0.0001	8.36 (3.56 – 19.6)	< 0.0001
High R.E.N.A.L. nephrometry score (10–12)	0.98 (0.34 – 2.85)	0.97	0.44 (0.15 – 1.33)	0.1468

OR: Odds ratio, CI: Confidence Interval.

表 2. 無再発生存率への影響 (Cox hazard 回帰分析)

	Crude		Model 1 ^a		Model 2 ^b	
	HR (95 % CI)	p-value	HR (95 % CI)	p-value	HR (95 % CI)	p-value
Pathological T3a upstaging	8.17 (3.48 – 19.2)	< 0.0001	3.50 (1.47 – 8.33)	0.0047	1.59 (0.58 – 4.36)	0.3712
Male sex			2.27 (1.19 – 4.35)	0.0131	2.01 (1.03 – 3.91)	0.0395
Age ≥60 years			2.80 (1.72 – 4.56)	< 0.0001	2.69 (1.64 – 4.40)	< 0.0001
Body mass index >24			1.17 (0.74 – 1.84)	0.4902	1.14 (0.72 – 1.80)	0.574
Clinical symptoms			0.93 (0.50 – 1.72)	0.8185	0.94 (0.51 – 2.27)	0.8578
Clinical T1b			2.14 (1.31 – 3.50)	0.0025	1.35 (0.80 – 2.27)	0.2543
High R.E.N.A.L. nephrometry score (10–12)			1.49 (0.85 – 2.61)	0.1593	1.45 (0.83 – 2.54)	0.1932
Surgical approach (Robot-assisted partial nephrectomy)			1.31 (0.79 – 2.16)	0.2924	1.08 (0.64 – 1.82)	0.7648
Positive surgical margin					1.56 (0.51 – 4.81)	0.4389
Non-clear cell type					1.04 (0.55 – 1.96)	0.9065
Fuhrman grade ≥3					1.68 (1.02 – 2.78)	0.0434
Sarcomatoid components					1.65 (0.18 – 14.9)	0.6548
Lymphovascular invasion					3.48 (2.10 – 5.74)	< 0.0001

HR: Hazard ratio, CI: Confidence Interval.

^a Model 1 adjusted for preoperative factors.

^b Model 2 adjusted for pathological factors in addition to Model 1.

〔考察〕 cT1 RCC の腎部分切除術後の pT3a upstaging に関連して「男性」と「cT1b」が独立因子であった。多くの先行研究で腫瘍径と pT3a upstaging との関連が示唆されている。性差に関する先行研究は少ないが、中高年男性に一般的に認める粘着性腎周囲脂肪が臨床 T stage を downstaging させている可能性を考えた。pT3a upstaging 症例は、pT1 症例よりも RFS が短縮していた。しかし、他の因子の調整した後の多変量解析では pT3a upstaging と RFS の間の関連性は消失した。先行研究での pT3a upstaging の腫瘍学的転帰への影響は controversial であり、結論が出ていない。今回の解析結果では pT3a upstaging が RFS に与える影響は限定的であった。

〔結論〕 「男性」と「cT1b」が cT1 RCC の腎部分切除後の pT3a upstaging の重要な予測因子であった。pT3a upstaging 症例は、pT1 (non-upstaging) と比較して RFS の短縮を認めたが、多変量解析では pT3a upstaging は RFS の独立した予測因子ではないことが示された。

〔文献〕

- 1) Campbell S, Uzzo RG, Allaf ME, et al. (2017) Renal mass and localized renal cancer: AUA guideline [AUA guideline]. J Urol; 198: 520–9.
- 2) Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, et al. (2015) EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. Eur Urol ; 67: 913–24.

〔発表論文〕

- 1) Ishiyama R, Omae K, Kondo T, et al. (2024) Predictive factors and oncological outcomes of pathological T3a upstaging in patients with clinical T1 renal cell carcinoma undergoing partial nephrectomy. Jpn J Clin Oncol. 7; 54(2): 160-166.

〔学会発表〕

- 1) 石山亮. cT1 限局性腎細胞癌における pT3a アップグレードの検討. 第 109 回日本泌尿器科学会総会、横浜、2021/12

3 8 . IgG4 関連副鼻腔炎の病態形成機序の解明

野島知人¹、中西遥¹、八木詩央¹、中本実沙¹、瀬尾友佳子¹、上芝秀博²、飯塚譲²、
柳澤直子²、野中学¹

(¹耳鼻咽喉科・頭頸部外科学、²微生物学免疫学)

〔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⁾、IgG4 関連疾患に伴う CRS（CRS with IgG4-RD）は IgG4 関連疾患の一つである可能性が考えられている。しかし現状では、まだ CRS with IgG4-RD は IgG4 関連疾患として認められていない。

CRS with IgG4-RD 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る。この IgG4 産生機序が、その他の CRS とは異なり、現在知られている IgG4 関連疾患と同じ機序で起きているのであれば、CRS with IgG4-RD は IgG4 関連疾患であると言えるのではないかと考えた。

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。IgG4 関連疾患で増加することが知られている、抗体産生に参与する免疫担当細胞などの因子や、産生された抗体の IgG4 へのクラススイッチに関与する因子の発現について検討を行った。

〔方法〕 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篩骨洞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。①CRS with IgG4-RD (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)。

着目した因子は、B 細胞や制御性 T 細胞などの免疫担当細胞に加え、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、免疫グロブリンのクラススイッチが起こる場であるリンパ濾胞、リンパ濾胞内に胚中心の形成を誘導するケモカインである CXCL13 などの因子に着目した。

それぞれの因子に対する免疫染色または染色法を用いて各群の篩骨洞粘膜を染色し、それぞれの陽性細胞数をカウントして、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〕 CRS with IgG4-RD の副鼻腔粘膜では、他の群と比べて、B 細胞と制御性 T 細胞、AID 陽性細胞、CXCL13 陽性細胞、リンパ濾胞数が有意に増加していることがわかった。また、real-time PCR においても CRS with IgG4-RD で AID mRNA のコピー数が有意に増加していた。

〔考察〕 Tsuboi らは、IgG4 関連疾患患者の小唾液腺では、IgG4 誘導因子である AID や、制御性 T 細胞の産生するサイトカインである IL-10 と TGF- β が有意に上昇しており、これらが 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⁾。抗体を産生する B 細胞に AID が発現することで、免疫グロブリンのクラススイッチを促進する。そこに制御性 T 細胞の IL-10 などのサイト

カインが作用することでクラススイッチを IgG4 へ誘導し、局所での IgG4 産生が増加していると考えられる²⁾。

一方、リンパ濾胞は B 細胞を中心としたリンパ球の集塊で、その内部に形成される胚中心で免疫グロブリンのクラススイッチが起こるとされている。CXCL13 は濾胞樹状細胞から産生されるケモカインで B 細胞の遊走させることで、胚中心の形成に関与すると考えられている³⁾。

今回の我々の研究結果から、CRS with IgG4-RD の副鼻腔粘膜局所では、免疫グロブリンのクラススイッチが生じる場であるリンパ濾胞が増加しており、増加した B 細胞、制御性 T 細胞、AID により 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。

〔結論〕 CRS with IgG4-RD の副鼻腔粘膜局所では、IgG4 関連疾患と同じ IgG4 産生機序が存在しており、そのことから、CRS with IgG4-RD は IgG4 関連疾患であると推察される。しかしまだそれを確定するには至らず、今後さらに他の IgG4 産生誘導因子等についても検討を行っていく必要があると考えられる。

〔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) 中山田真吾、田中良哉. (2015) Jpn. J. Clin. Immunol. 39(1): 1-7

〔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. IgG4 関連鼻副鼻腔炎の病態について. 第 63 回日本鼻科学会総会・学術講演会、東京、2024/9
- 2) Nojima T., Nakanishi H., Mukai M., et al. IgG4-related CRS may be a new CRS phenotype. 42nd Congress of the International Society of Inflammation and Allergy of the Nose, and 24th Congress of the International Rhinologic Society, Tokyo, Japan, 2024/4
- 3) 野島知人、中西遥、野中学、他. IgG4 関連疾患と慢性鼻副鼻腔炎. 第 72 回日本アレルギー学会学術大会、東京、2023/10

39. ニボルマブによる癌性腹水中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞培養中の PD-1 発現率への影響

阿部結貴¹、小林博人²、尾上佳子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〕 $\gamma\delta$ 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),2)}。我々も難治性腹水を伴う卵巣癌患者に対して、自己末梢血単核球から活性化培養した $\gamma\delta$ 型 T 細胞を、腹腔内投与することで癌性腹水の症状緩和を目指した臨床試験を行い、安全性を確認している³⁾。

In vitro では、末梢血単核球に活性化剤としてゾレドロン酸 (Zol)、増殖因子として IL (Interleukin) -2 を加える事で大量培養が可能である。さらに IL-18 を添加すると CD56 陽性 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖が促され、細胞傷害活性が増強する事も報告している⁴⁾。また、腹水濾過濃縮の際に使用される濾過カラムから回収した腹水浸潤リンパ球 (Ascites Infiltrating Lymphocytes: AILs) からも、Zol と IL-2 を用いて $\gamma\delta$ 型 T 細胞を培養できることを確認している⁵⁾。課題として末梢血 $\gamma\delta$ 型 T 細胞に比べて培養効率が約 1/50 と低いため⁶⁾、臨床応用には効率的な増殖方法の開発が必要である。

新たに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)^{7),8)} を Zol の代わりに使用しても、AILs 中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞を培養できる⁹⁾。培養時に抗 PD-1 (Programmed cell death 1) 抗体としてニボルマブを添加することで、有意差はなかったが AILs 中の $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖率は高い傾向であった¹⁰⁾。

今回の研究では、AILs 培養時にニボルマブ添加有無による PD-1 発現率の違いを検討した。

〔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、濾過カラムより AILs を採取した。活性化剤として PTA または Zol を用い、IL-2 と IL-18 を添加し 14 日間培養した。培養時にニボルマブを添加する群としない群に分けた。培養前、培養 3 日目と 14 日目にフローサイトメトリーで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承認を受けて行っている。

〔結果〕 患者 6 例の AILs を用いて培養を行った。 $\gamma\delta$ 型 T 細胞中 PD-1 陽性細胞の割合は、培養前の中央値 (最小値 - 最大値) で 0.53% (0 - 1.22) であった。

ニボルマブ非添加群では、培養 3 日目の PD-1 の発現率は、培養前より有意に高く (PTA 群 $p=0.02$ 、Zol 群 $p=0.0051$)、培養 14 日目は、培養 3 日目より有意に低下した (PTA 群 $p=0.045$ 、Zol 群 $p=0.005$)。Zol 群において、培養 3 日目の PD-1 発現率はニボルマブを添加した群より非添加群が有意に高かった ($p=0.045$) (図 1)。

〔考察〕 ニボルマブ添加群で $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖率が高い傾向 (有意差なし) を示した¹⁰⁾ 理由として、早期に PD-1 シグナルを遮断することで $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖が増強される可能性が示唆された。

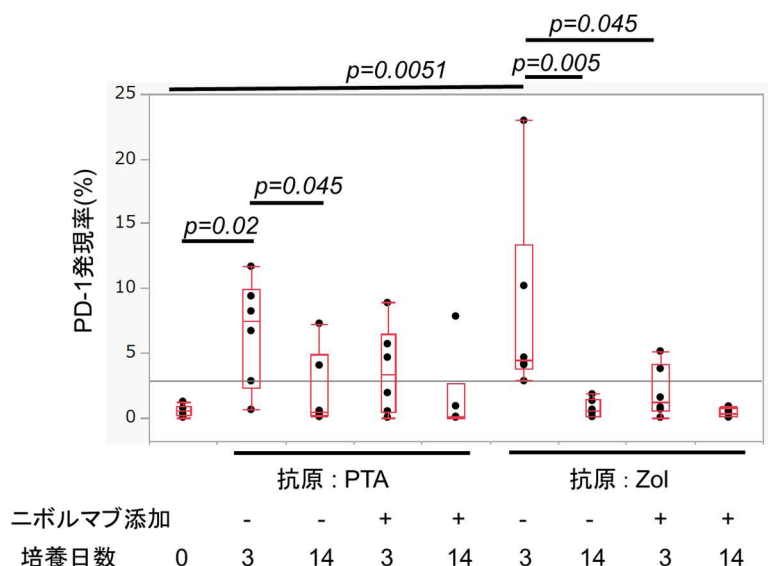


図 1. 癌性腹水中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞培養中の PD-1 発現率

〔結論〕 ニボルマブ非添加群では、培養 3 日目の PD-1 の発現率が培養前より有意に高く、培養 14 日目は培養 3 日目に比べて有意に低下した。培養の早期段階で PD-1 シグナルを遮断することで、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖が促進される可能性が示唆された。

〔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., Toshiyuki K., et al. (2024) Annals of Cancer Research and Therapy. 32(2): 31-38.
- 4) Abe Y., Kobayashi H., Akizawa Y., et al. (2018) Annals of Cancer Research and Therapy. 26(2): 71-6.
- 5) Abe Y., Kobayashi H., Akizawa Y., et al. (2018) Anticancer Res. 38(7): 4327-31.
- 6) Abe Y., Kobayashi H., Kanno T., et al. (2019) Annals of Cancer Research and Therapy. 27(2): 73-9.
- 7) Matsumoto K., Hayashi K., Murata-Hirai K., et al. (2016) Chemmedchem. 11(24): 2656-63.
- 8) Tanaka Y., Iwasaki M., Murata-Hirai K., et al. (2017) Scientific Reports. 7.
- 9) 阿部結貴、小林博人、菅野俊幸、他. (2022) 東京女子医科大学総合医科学研究所紀要 42: 80-81
- 10) 阿部結貴、小林博人、田畑務. (2023) 東京女子医科大学総合医科学研究所紀要 43: 72-73

40. 情動記憶処理時扁桃体ドーパミン動態に対するグアンファシンの急性効果

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情動記憶処理障害が想定されている。著者らはこれまで、情動記憶を想起することと扁桃体ドーパミンが関連すること、各種向精神薬が情動記憶想起時の扁桃体ドーパミンの応答性放出を安定化することを見出してきた (Oshibuchi, 2009; Miyagi, 2014; Muraoka, 2018; Kawano, 2018)。グアンファシンは注意欠如多動症の治療薬であるがグルタミン酸神経終末におけるノルアドレナリン $\alpha 2A$ 受容体アゴニスト作用によりグルタミン酸神経伝達を活性化することが作用機序であると考えられている。一方で、グアンファシンには情動安定作用があるが、扁桃体ドーパミンへの作用はこれまで観察されていない。そのため本研究では情動記憶想起時の扁桃体ドーパミンの応答性放出に対するグアンファシンの急性効果を検証した。

〔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) 生化学的評価として、生体微小透析と高速液体クロマトグラフィー法により扁桃体 (probe位置: posterior 2.4 mm, lateral 5.2 mm to the bregma, depth - 7.2 mm from bone surface)の細胞外ドーパミンレベルを測定した。3) Guanfacine (GU) 1.0 mg/kg または同量の溶媒を急性投与し、80分後にCSを暴露しその後のドーパミンの経時変化を観察した。

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〕 GU 1.0 mg/kg の投与により扁桃体ドーパミンの基礎放出量は変化しなかった。

溶媒投与群ではCS暴露後に扁桃体ドーパミンの応答性放出がみられた。

GU 1.0 mg/kg 投与群ではCS暴露後に扁桃体ドーパミンの応答性放出がみられなかった。

〔考察〕 GUはドーパミン神経の基礎放出に影響せずに応答性放出を抑制するために、情動記憶処理ネットワークの抑制により間接的に扁桃体ドーパミン神経系を抑制している可能性がある。

〔結論〕 GUの情動安定化作用に扁桃体ドーパミンの応答性放出を抑制する作用が関与している可能性がある。

〔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.

- 2) Miyagi J, Oshibuchi H, Kasai A, Inada K, Ishigooka J. Valproic acid inhibits excess dopamine release in response to a fear-conditioned stimulus in the basolateral complex of the amygdala of methamphetamine-sensitized rats. *Eur J Pharmacol.* 2014 May 5;730:20-5. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.01.020. Epub 2014 Feb 26. PMID: 24583338.
- 3) Kawano T, Oshibuchi H, Kawano M, Muraoka H, Tsutsumi T, Yamada M, Ishigooka J, Nishimura K, Inada K. Diazepam suppresses the stress-induced dopaminergic release in the amygdala of methamphetamine-sensitized rat. *Eur J Pharmacol.* 2018 Aug 15;833:247-254. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.05.048. Epub 2018 Jun 6. PMID: 29885289.
- 4) Muraoka H, Oshibuchi H, Kawano M, Kawano T, Tsutsumi T, Yamada M, Ishigooka J, Nishimura K, Inada K. Escitalopram attenuates fear stress-induced increase in amygdalar dopamine following methamphetamine-induced sensitisation: Implications of fine-tuning action of selective serotonin reuptake inhibitors on emotional processing. *Eur J Pharmacol.* 2018 Sep 5;834:1-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.06.033. Epub 2018 Jul 5. PMID: 29981749.