

4 1 . 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、同様に胃癌細胞株を用いて大腸癌と共通する耐性メカニズムの有無を検討する。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。また、胃癌細胞株である NCI-N87 を使用し、大腸癌細胞株と同様に Trifluridine 含有培地で継代、培養を開始している。それぞれの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ことを計画している。

〔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

4.2. 体外式膜型人工肺における新規抗凝固薬の確立—凝固第 XII 因子標的 siRNA の役割の解明

梅井菜央¹、中山正道²

(¹集中治療科、²先端生命医科学研究所)

〔目的〕 体外式膜型人工肺 (Extracorporeal membrane oxygenation: ECMO) 施行中は凝固第 XII 因子 (factor XII: FXII) の活性により血栓が形成されるため抗凝固薬が必須である。抗凝固薬として、現在は未分画ヘパリンが使用されているが、未分画ヘパリンは止血に必要な外因系凝固反応も阻害するため出血を引き起こす。一方、FXII のみを阻害すれば、出血を起こさず血栓形成を抑制できる可能性がある。FXII のみを阻害する方法として、FXII を標的とした siRNA (small interfering RNA) を脂質ナノ粒子 (Lipid nanoparticles: LNPs) に封入し投与方法が挙げられる。本研究は、FXII siRNA-LNPs の調整方法・投与方法・投与量・効果を検証した。

〔方法〕 1. FXII siRNA-LNPs の作成

脂質溶液は pH 応答性脂質 3060i10 (Broad Pharm), cholesterol (Millipore Sigma), 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Avanti Polar Lipids), 1, 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000] (C14PEG2000) (Avanti Polar Lipids) を 50: 38.5: 10: 1.5 (mol%) で混合し作成した。FXII siRNA 溶液は 19 の塩基からなる 2 本鎖 siRNA (5'-CCUACAUCGCGCAGCUGUA-3' and 5'-UACAGUGCAGCGAUGUAGG-3') を Sigma-Aldrich から購入し、3060i10: siRNA = 5 (or 6 or 10): 1 (w/w) になるように調製した。等量の脂質溶液と siRNA 溶液をボルテックスミキサーで急速に混合し LNPs を作製した。¹⁾

2. ラットの ECMO モデルの確立

ECMO 回路を、内径 1/16 inch のチューブ・蠕動ポンプ・模擬人工肺で作成した。模擬人工肺は、Form3 3D printer (Formlabs) で製造した。回路全長は 60 cm、模擬人工肺血液充填量は 0.3 mL、総血液充填量は 2.5 mL とした。雄の Sprague-Dawley ラットを使用し、鎮静鎮痛管理後、気管切開を行い人工呼吸器に装着した。左内頸動脈に 24-gauge の脱血管 (Insyte™)、右大腿静脈に 22-gauge の送血管 (Insyte™) を挿入した。血液流量は 2 ml/min を維持した。²⁾

3. FXII siRNA-LNPs の薬物動態の評価

1 mg/kg と 3 mg/kg の FXII siRNA-LNPs を尾静脈から投与し、投与 1.2.3.4.5 日後の activated partial thromboplastin time (aPTT) と FXII を評価した。aPTT と FXII の測定は、半自動血液凝固測定装置 CA-101 (Sysmex) を用いて測定した。

4. ECMO モデルでの FXII siRNA-LNPs の効果の検証

ラットをヘパリン群と siRNA 群に割り付け ECMO を開始し、両群間での人工肺圧較差・血栓量・出血時間を評価した。ヘパリン群ではヘパリンを 50 U/kg 静注後、50 IU/kg/h を 1 時間、25 IU/kg/h を 2 時間持続投与した。siRNA 群は 3 mg/kg siRNA と 3060i10 の比を 6:1 に調整した FXII siRNA-LNPs を投与 1 日後に ECMO を導入した。実験の終了は 3 時間とした。

測定値は平均値±標準誤差で表示した。統計解析は SPSS (version 27.0; SPSS Inc.) を使用し、Student's t 検定、線形混合モデルで行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

〔結果〕 ① FXII siRNA-LNPs の薬物動態の検証

aPTT 値は 1 mg/kg siRNA を投与 1 日後に 13.7 ± 1.3 秒から 21.5 ± 7.7 秒と最も延長し、5 日後には短縮していた。同様に、3 mg/kg siRNA を投与 1 日後に aPTT 値は 13.8 ± 1.8 秒から 36.6 ± 2.4 秒と最も延長し 5 日後には短縮していた。

FXII 値は、1 mg/kg siRNA を投与 2 日後に 24.2 ± 3.3 秒から 38.5 ± 1.8 秒と最も延長した。同様に、3 mg/kg siRNA を投与 2 日後に FXII 値は 25.8 ± 0.9 秒から 40.6 ± 0.3 秒と最も延長した。

また 1 mg/kg siRNA 投与 1 日後の aPTT 値は、lipidoid:siRNA 比が 5:1 で混合時 19 秒、6:1 で混合時 30.2 秒と、lipidoid:siRNA 比を 6:1 に増加させることで延長した。しかし、lipidoid:siRNA 比を 10:1 にしても延長は見られなかった。

② ECMO モデルでの FXII siRNA-LNPs の効果の検証

人工肺の圧較差はヘパリン群が 5.3 ± 1.9 mmHg で siRNA 群が 4.9 ± 1.8 mmHg と有意差はなく ($p=0.612$)、人工肺血栓量はヘパリン群が 0.08 ± 0.01 g siRNA 群が 0.10 ± 0.01 g と有意差はなかった ($p=0.061$)。出血時間はヘパリン群が 70 ± 17 秒、siRNA 群が 50 ± 8 秒と siRNA 群で出血時間の短縮がみられた ($p<0.05$)。

〔考察〕 FXII siRNA-LNPs は、過去の報告で投与後 24 時間以内に効果が発現すると述べられている。³⁾ 事前研究では、¹⁾ FXII の半減期が 50–70 時間であることを考慮し、投与 3 日後に ECMO を導入したが、FXII siRNA-LNPs 投与後の ECMO 導入時期は投与 1 日後が最適と考える。FXII siRNA-LNPs の効果を高める方法として、siRNA のリン酸に対する pH 応答性脂質 3060i10 の窒素のモル比 (NP 比) を増量することが挙げられる。本研究では NP 比を 1.8 から 2.1 に増量することで aPTT は著明に延長した。過去の報告では、⁴⁾ NP 比を 2 から 2.6 に増量すると毒性が出現しており、安全域を考慮すると NP 比 2:1 は適切である。その他、効果を高める方法として、siRNA の投与量の増量があるが、3 mg/kg で血圧低下・体重減少・血小板減少の副作用がおきているため、これ以上増量することは難しい。今後さらに適切な投与量の検討を行い、血小板活性やサイトカインへの影響について検討する必要がある。

〔結論〕 3 mg/kg の FXII siRNA を siRNA と 3060i10 の重量比が 6:1 になるように調整した FXII siRNA-LNPs を投与 1 日後に ECMO を導入するとヘパリン同等の抗血栓作用が得られた。

〔文献〕

- 1) Umei N., Shin S., Lai A., et al. (2023) ASAIO J. 69: 527–532.
- 2) Umei N., Lai A., Miller J., et al. (2021) J Transl Med. 19: 179.
- 3) Stavrou EX., Fang C., Bane KL., et al. (2018) J Clin Invest. 128 (3) : 944–959.
- 4) Akinc A., Goldberg M., Qin J., et al. (2009) Mol Ther. 17 (5) : 872–879.

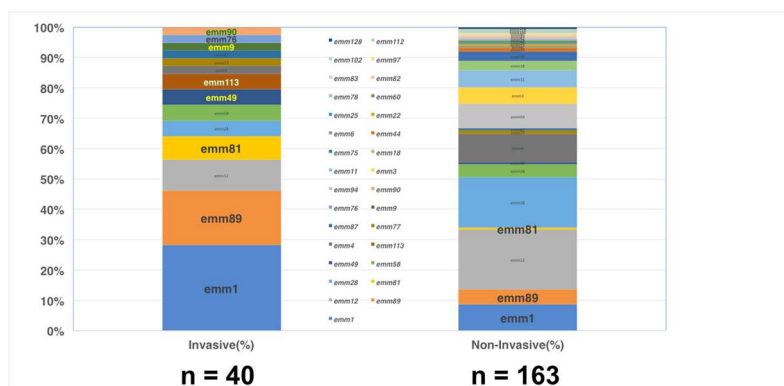
4.3. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症を起こす *Streptococcus pyogenes* の分子疫学

菊池賢、野澤睦美、坂間玲子、鶴澤豊、荒井祐子
(感染症科)

〔目的〕 *Streptococcus pyogenes*(GAS)はヒトから分離されるレンサ球菌で最も病原性が高い。GAS が起こす感染症では小児咽頭炎が最も多く、伝染性膿痂疹、せつ症、丹毒、猩紅熱などを起こす他、致死率 30%を越える最も激しい劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (Streptococcal toxic shock syndrome: STSS) が知られている。STSS は主に高齢者に発症し、発症 48 時間以内に死亡するケースが多い。STSS の起因菌としては 70%以上を GAS が占めている。with corona になってから、世界的に STSS は急増しており、日本では 2023 年の 941 例が 2024 年には 1888 例とこれまでで最多、2023 年の 2 倍以上の患者数を記録した。STSS の急増は with corona での感染対策の緩み、人との接触機会の増加、corona 対応下での人との接触制限による様々な感染症への免疫ブースター機会の減少による免疫低下などが指摘されているが、不明な点も多い。今回、近年急増する STSS 由来 *S. pyogenes* について、他の感染症由来株、保菌者由来株と比較し、菌株の面から STSS 発症の要因があるのか、解析を行った。

〔方法〕 1994 年 1 月から 2024 年 12 月までに東京女子医科大学病院で分離された GAS203 株を使用した。使用菌株は咽頭炎、皮膚軟部組織感染症、無症候性保菌などの全身感染以外の感染症由来を non-invasive 163 株、STSS および STSS の診断基準を満たさないが、血液培養から GAS が検出された全身感染症 40 株 (STSS 15 株、non-STSS 25 株) である。菌株は *emm* typing, 各種毒素遺伝子の保有状況を行った¹⁻⁴⁾。*emm1* については近年、急増している M1UK 株かどうかを allele-specific PCR にて調べ、direct-sequence で変異部位の確認を行った³⁾。

〔結果〕 図に Invasive 40 株、Non-invasive 163 株の *emm* 型別分布を示す。



Invasive 由来株では *emm1*, *emm89*, *emm81* の比率が高く、*emm9*, *emm49*, *emm76*, *emm90*, *emm113* は Invasive のみにみられた。一方、Non-invasive では *emm28*, *emm12*, *emm4*, *emm94* が多く、分離される *emm* 型は非常に多様であった。Invasive 40 株の STSS 15 株, non-STSS 25 株の *emm* 型では両者ともに *emm89*, *emm1*, *emm81* がみられるが、STSS では *emm89*, *emm81* が多く、*emm9*, *emm49* は STSS のみにみられた。Non-STSS では *emm28*, *emm12* のような Non-invasive に多い *emm* 型が混じっていたが、これは STSS にはみられなかった。Invasive 40 株の各種毒素遺伝子保有状況では STSS と Non-STSS では保有遺伝子に差は見られなかった。2022 年以前の 17 株では Invasive, Non-invasive ともに M1UK 株は全くみられなかったが、2023~2024 年に分離された 8 株は Invasive, Non-invasive

ともにすべて M1UK であった。

〔考察・結論〕 Invasive 株では *emm1* 型と *emm89*, *emm81* の割合が多い一方、Non-Invasive 株では多様な *emm* 型がみられた。特に *emm1* 型は、Invasive 株で最も高い割合を占めていた。また、*emm87*, *emm58*, *emm9* 型は STSS のみにみられた。STSS を起こす株には特有の *emm* 型が集中していることは、これらの株にみられる重症化因子が、STSS 発症に寄与している可能性がある。これらの株が STSS の発症機序に大きく関与しているといえる。一方、Non-Invasive 株では *emm28* 型の割合が Invasive 株の約 3 倍であったことから、侵襲性が低い可能性がある。一方、Non-STSS 群には *emm28*, *emm4*, *emm77* などが含まれており、これらの株は Non-invasive にも多く含まれることから、重症化しにくい可能性があると考えられる。毒素遺伝子の保有状況からは STSS 発症に優位な差は認められなかった。このことは、STSS の発症機序が、特定の毒素遺伝子の有無のみでは説明できないということを示唆している。M1UK 株は 10 年程前から欧米を中心に世界中に広がっている強毒株で、以前の *emm1* (classical type) に 27 カ所の変異が入っており、SpeA などの毒素産生が高くなっていることが知られている³⁾。今回の検討では 2022 年以前には M1UK 株は認められなかった一方、2023 年以降の *emm1* は全て M1UK に置き換わっていた。これは Invasive のみならず Non-invasive 株でもみられていた。これまで、STSS は高齢者に圧倒的に多く、小児ではほとんどみられない理由として、小児咽頭炎などで流行している株と高齢者に広がっている株は別々であり、別々の集団で circulation していると考えられていた。しかし M1UK が両者から分離されているという事実は、今後、STSS が高齢者のみならず、より若年層にも広がることが強く懸念される。

〔文献〕

- 1) 池辺忠義、他. A 群溶血レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 検査マニュアル. 2024 年 1 月版. 国立感染症研究所 東京、日本 2024.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention Homepage. *Streptococcus pyogenes* database. <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepindex.htm>.
- 3) Zhi X, et al. Emerging invasive group A *Streptococcus* M1UK lineage detected by allele-specific PCR, England, 2020. *Emerg Infect Dis* 29 (5):1007, 2023.
- 4) Fraes A, et al. Superantigen gene complement of *Streptococcus pyogenes*-relationship with other typing methods and short-term stability. *Eur J Infect Dis* 32 (1):115, 2013

〔学会発表〕

- 1) 菊池 賢. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症. 日本病院薬剤師会 第 2 回感染制御専門薬剤師講習会 2024.10.26. 東京.
- 2) 菊池 賢. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症. 日本臨床検査薬協会講演 2024.10.29. 東京.
- 3) 菊池 賢. ウィズコロナ時代の感染症と感染対策. 第 88 回日本皮膚か学会東京支部学術週回教育講演 2024.11.17. 東京.
- 4) 菊池 賢. A 群溶連菌感染症の診断と治療. 第 36 回日本臨床微生物学会総会 Meet the expert. 2025.1.26. 名古屋.

4 4 . 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 (hDPSCs) が新たな再生医療の細胞源として注目されている。通常、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 (ON2 サプリメント) を用いた hDPSCs 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 hDPSCs の培養法の確立が可能となる。ON2 サプリメント単独では FBS 培地と比較すると有意に低い増殖能を確認できた。ON2 サプリメントの成分で増殖能に関連する因子は activin A、LIF、bFGF である。新たな増殖因子の添加検討を目的とした。

〔方法〕 ナカライテスク株式会社との共同研究契約を締結した。東京女子医科大学倫理委員会承認済である (承認番号: 2023-0043)。ECM Select Array Kit Ultra-36 (Advanced Biomatrix, #5170) を使用し、hDPSCs を 4×10^5 cells / plate 播種した。培地は α MEM+ON2+ 1 %PSA を使用した。24-120h までで細胞の接着能および増殖能を比較した。

〔結果〕 DPSCs 播種後 120h で細胞接着及び増殖を認めたのは、Fibronectin (125 μ g/ml) + Collagen IV (125 μ g/ml)、Collagen IV (250 μ g/ml)、Laminin (125 μ g/ml)、Collagen IV (125 μ g/ml)、Laminin (125 μ g/ml)、Collagen VI (125 μ g/ml)、Vitronectin (125 μ g/ml) + Collagen VI (125 μ g/ml)、Collagen IV + Collagen VI (125 μ g/ml) であった。

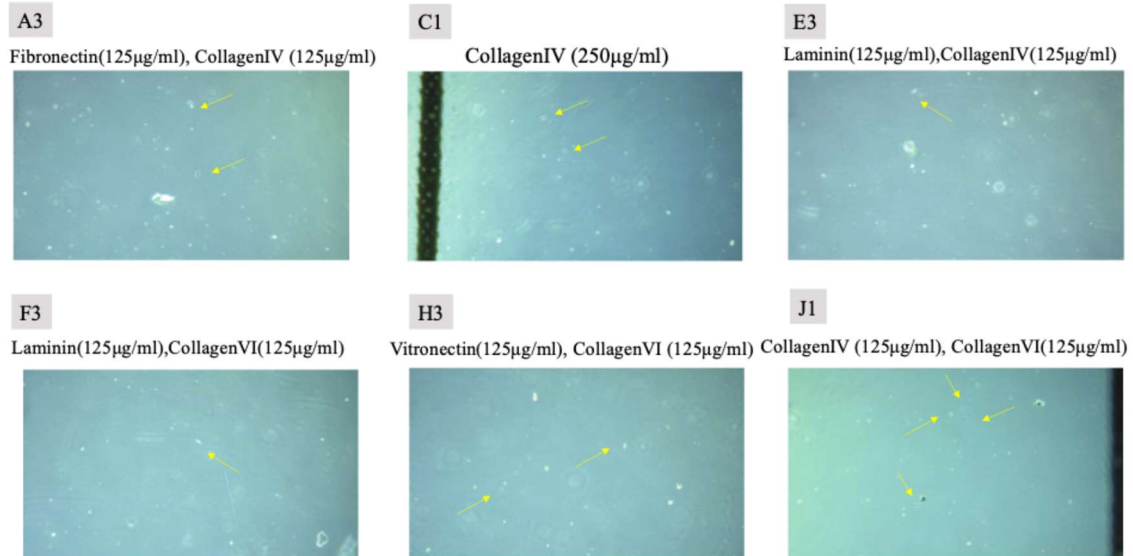
Fig.1 ECM Select® Array Kit Ultra - 36



36 ECM's and ECM combinations

	1	2	3
A	Collagen I (250µg/ml)	Collagen I (125µg/ml) Collagen IV (125µg/ml)	Fibronectin (125µg/ml) Collagen IV (125µg/ml)
B	Collagen III (250µg/ml)	Collagen III (125µg/ml) Collagen IV (125µg/ml)	Fibronectin (125µg/ml) Collagen IV (125µg/ml)
C	Collagen IV (250µg/ml)	Collagen IV (125µg/ml) Collagen VI (125µg/ml)	Fibronectin (125µg/ml) Laminin (125µg/ml)
D	Collagen V (250µg/ml)	Collagen V (125µg/ml) Collagen VI (125µg/ml)	Fibronectin (125µg/ml) Vitronectin (125µg/ml)
E	Collagen VI (250µg/ml)	Collagen VI (125µg/ml) Fibronectin (125µg/ml)	Laminin (125µg/ml) Collagen IV (125µg/ml)
F	Fibronectin (250µg/ml)	Collagen I (125µg/ml) Laminin (125µg/ml)	Laminin (125µg/ml) Collagen IV (125µg/ml)
G	Laminin (250µg/ml)	Collagen I (125µg/ml) Vitronectin (125µg/ml)	Vitronectin (125µg/ml) Collagen IV (125µg/ml)
H	Vitronectin (250µg/ml)	Collagen I (125µg/ml) Fibronectin (125µg/ml)	Vitronectin (125µg/ml) Collagen IV (125µg/ml)
I	Topolectin (250µg/ml)	Fibronectin (85.5µg/ml) Laminin (85.5µg/ml) Collagen IV (85.5µg/ml)	Vitronectin (125µg/ml) Laminin (125µg/ml)
J	Collagen IV (125µg/ml) Collagen VI (125µg/ml)	Fibronectin (85.5µg/ml) Laminin (85.5µg/ml) Collagen IV (85.5µg/ml)	Vitronectin (125µg/ml) Topolectin (125µg/ml)
K	Collagen III (125µg/ml) Collagen IV (125µg/ml) Collagen VI (125µg/ml)	Vitronectin (85.5µg/ml) Laminin (85.5µg/ml) Collagen IV (85.5µg/ml)	Topolectin (125µg/ml) Collagen IV (125µg/ml)
L	Negative Control (200µg/ml)	Fibronectin (85.5µg/ml) Laminin (85.5µg/ml) Collagen IV (85.5µg/ml)	Topolectin (125µg/ml) Collagen IV (125µg/ml)

Fig.2 **ECM Select Array Kit Ultra-36に播種後120時間のhDPSCs**



〔考察〕 以前には、CollagenIV、CollagenVIは間葉系幹細胞の培養で良好な増殖が得られた報告はまだない。また、新培地開発にはコストを極力抑える必要がある。良好な増殖能を持つ安価な無血清培地の開発には、CollagenIV、CollagenVIを入れることでコスト面で問題が生じてしまう。そのため、コスト面を考慮したさらなる検討が必要である。また、現在 ON2 サプリメントに含有する activin A や LIF が hDPSCs の増殖を阻害している可能性も示唆される。今後はそれらの含有濃度の検討も必要である。

〔結論〕 CollagenIVまたは CollagenVIのどちらかのコーティング条件下において α MEM + ON2 + 1%PSA 培地で hDPSCS は良好な細胞接着、増殖能が得られた。

〔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

45. 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、TGF- β や VEGF などの成長因子やサイトカイン産生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。PRF は複数のサイトカイン発現に関与し、中でも TGF- β 産生量が増加するという報告から、抽出から 1 時間後および 2 4 時間後の PRF に含まれる TGF- β 量を、ELISA 法により測定した。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 10~15%FBS、10~15% 中速 PRF または 10~15% 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 法を用いた ALP、Col1 α 1、Runx2、Osteocalcin の発現量測定により骨分化程度を定量化した。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、CD29、CD44、CD81、CD90 は陽性、CD14、CD34、CD105 は陰性であり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) ELISA 法を用いて測定した TGF- β 含有量は、中速 PRF よりも低速 PRF 中に多く、1 時間後と比較して 2 4 時間後に増加する傾

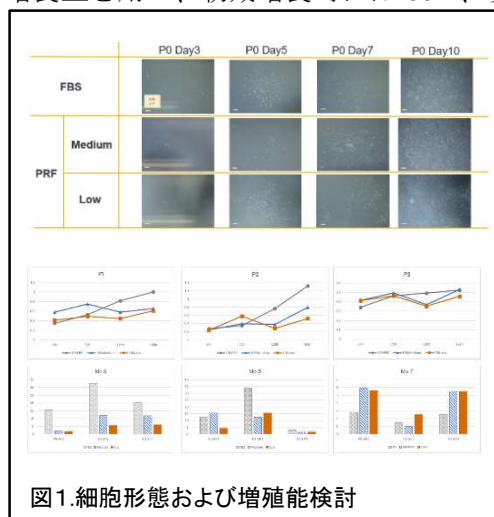


図1.細胞形態および増殖能検討

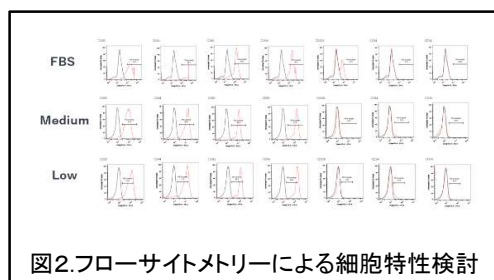


図2.フローサイトメトリーによる細胞特性検討

向にある(図3)ことが分かった。また、骨分化誘導能に関しては、3サンプルのうち2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。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。個体間による差はあるが、FBS培養時と比べPRF培養群において各遺伝子発現量の増加を認めた。(図4)

〔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。サイトカイン含有量は中速と比べ低速に多く、これは遠心速度による沈殿量の差ではないかと考えられる。

骨分化誘導能についてはFBS群よりPRF群の方が高く、PRF間での誘導能の差には個体中のサイトカイン含有量の差が関係していると考えられる。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 Brahimi, 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 (Basel). 10(10): 1196

〔TGF- β 〕

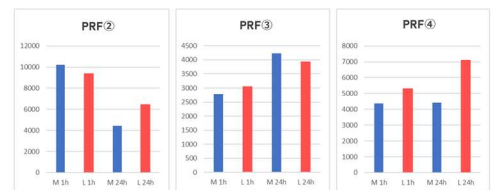
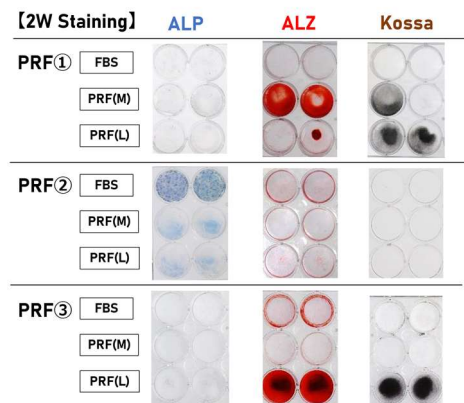


図3.ELISA 法による解析



〔2W Realtime PCR〕

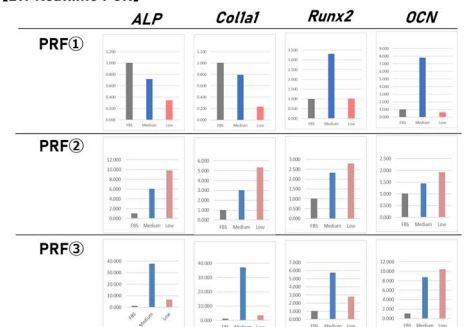


図4.骨染色およびリアルタイムPCR法による解析

46. 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す共に、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*^Δおよび *Uty*^Δ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 PARP 阻害薬 (poly ADP-ribose polymerase) の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

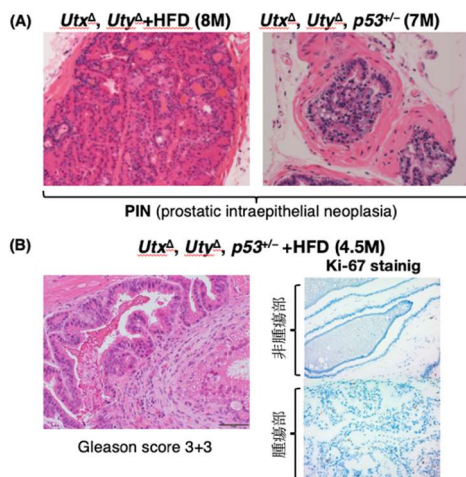


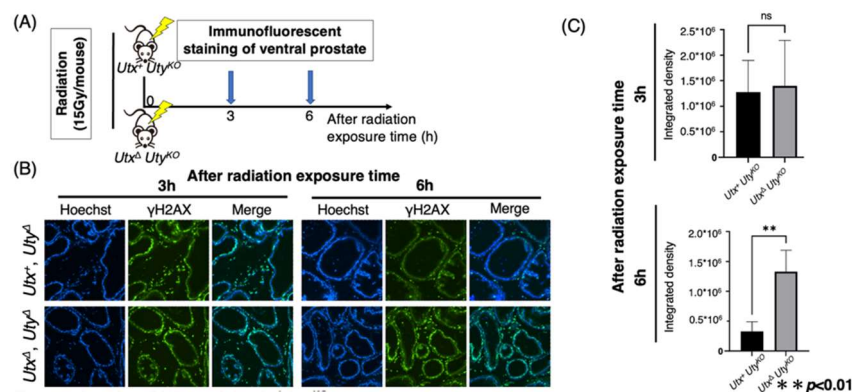
図 1. マウス前立腺 HE 染色 Ki-67 染色

- (A) *Utx*^Δ, *Uty*^Δ+HFD (8M)、*Utx*^Δ, *Uty*^Δ, *p53*^{+/-} (7M)マウスでは前立腺上皮内腫瘍がみられる。
- (B) *Utx*^Δ, *Uty*^Δ, *p53*^{+/-} +HFD (4.5M)では Gleason = 3+3 の前立腺癌の発症がみられる。Ki-67 染色では腫瘍部での陽性細胞の増加がみられる。

図 2. 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 γH2Ax 抗体による *Utx*⁺, *Uty*^Δ, *p53*^{+/-}マウスおよび *Utx*^Δ, *Uty*^Δ, *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

47. 炎症性腸疾患におけるヒストン脱メチル化酵素 UTX の役割

岩崎正幸、村元啓仁、世良康如、本田浩章
(実験動物研究所)

〔目的〕 潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease, IBD)は若年者に多い難治性疾患であり、自己免疫疾患による機序が想定されている。近年、CD4⁺T 細胞分化の制御においてエピジェネティック因子の関与が明らかとなり、自己免疫疾患との関連性が多く報告されているものの、その分子機構は不明な点が多い¹⁾。本研究はヒストン脱メチル化酵素 UTX(ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome)の自己免疫疾患における役割を明らかにし、新規治療法開発の探索を目的とする。我々はこれまでにマウス自己免疫疾患誘導モデルを用いて、UTX は炎症性大腸炎の発症に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。今回、自己免疫疾患における UTX の Treg 機能への影響について調べた。

〔方法〕 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、naive 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と、この炎症性大腸炎誘発実験モデルに Treg 細胞を naive T 細胞と同時に移入すると疾患発症が抑制されるシステムを用いて Treg の機能を評価した。T 細胞特異的に UTX を欠損した *Utx* (cKO) 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 naive T 細胞と Treg 細胞を採取し、野生型 naive T 細胞と野生型または cKO 由来 Treg 細胞を同時に移入して炎症発症の抑制機能を比較した。

〔結果〕 野生型 naive T 細胞と野生型または cKO 由来 Treg 細胞を免疫不全マウス(Rag2^{-/-}Il2rb^{-/-})に同時に移入して炎症発症の抑制機能を比較したところ、どちらも炎症性大腸炎の抑制が同等に認められることから、Treg 細胞の機能には差異がない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。今回、野生型と cKO 由来 Treg 細胞には機能の差異は無いことが明らかとなり、また、*Utx* cKO 由来の naive T 細胞はコントロールマウス由来 naive 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* の実験結果を得ていることから、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。

〔結論〕 *Utx* cKO 由来の naive T 細胞は大腸炎発症を抑制する Treg 細胞への分化誘導が亢進しているため、症状が著明に軽減されたと考えられ、UTX は Treg 細胞への分化誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。naive T 細胞を用いた RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行い、UTX の欠失によって変動する遺伝子の同定や、GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)を用いて、活性化・不活化した pathway およびその制御に関与する因子の探索を行いたい。

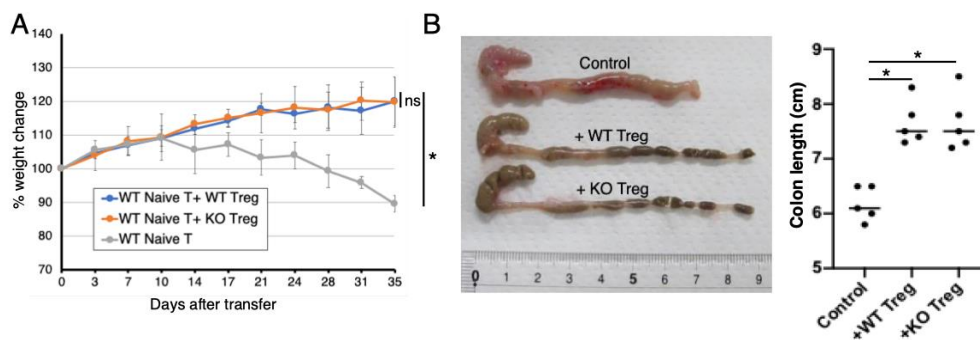


Figure 1. ***Utx*-deficient as well as WT Treg cells similarly prevent colitis**

WT naive T ($CD4^+CD45RB^{high}$) cells and Treg ($CD4^+CD25^+$) cells from WT and *Utx* KO mice were i.p. injected into *Rag2^{-/-}Il-2rb^{-/-}* mice (3×10^5 naive T + 3×10^5 Treg cells per mouse). (A) Body weight changes after injection of naive T and Treg cells, (B) Colon length. Quantitative data are shown as the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.001$.

[文献]

- 1) Ray G. and Longworth MS. (2019) Inflamm Bowel Dis. 25(2): 235-247

48. 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 マウスから骨髓細胞と脾臓細胞を単離し、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 細胞と辺縁帯 B 細胞が増加しており血清中の IgM 抗体量が増加していることが明らかとなった。(図 1)。骨髓中では Large preB 細胞の割合が増加していることが明らかとなった。(図 2) 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 3)

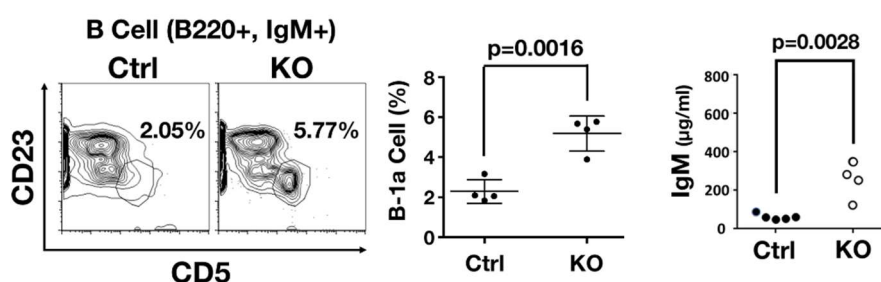


図 1. B 細胞特異的 UTX cKO マウスは脾臓中の CD5 陽性 B-1 細胞と血清中の IgM 抗体量が増加する

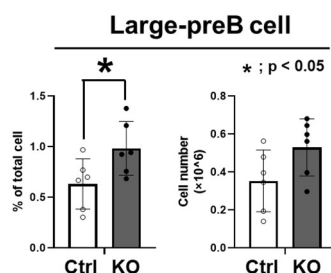


図 2. B 細胞特異的 UTX cKO マウスは骨髓中の Large-preB 細胞の割合が増加する

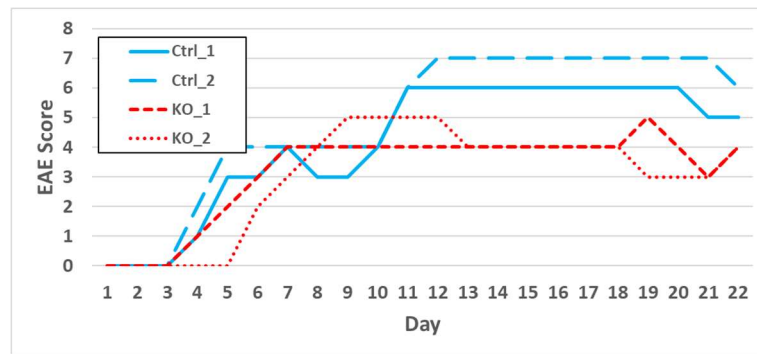


図 3. B 細胞特異的 UTX cKO マウスは実験的自身免疫性脳脊髄炎が緩和傾向にある

〔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⁾。骨髄中で増加していた Large preB 細胞は、BCR signaling が次の成熟ステップに進行するのに必要である⁴⁾。以上の結果から UTX 欠失によって BCR signaling が減衰し、その結果増加した辺縁帯 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示された。

〔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.
- 4) Mårtensson IL, Almqvist N, Grimsholm O, et al. (2010) The pre-B cell receptor checkpoint. FEBS Lett. 584(12):2572-9.

4 9 . The effect of high-intensity focused ultrasound irradiation on tumor volume reduction in a pancreatic cancer mouse model

Toshihiro Yamaguchi, Shuji Kitahara and Ken Masamune

(Faculty of Advanced Techno-Surgery, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science)

[Purpose] The purpose of this study is to evaluate the effects of high-intensity focused ultrasound (HIFU) irradiation on tumor volume suppression in a pancreatic cancer mouse model. Specifically, we compare the efficacy of two HIFU methods—Continuous Wave (CW) and trigger Pulse Wave (PW)—in achieving tumor volume reduction, and investigate the occurrence of an abscopal effect, whereby localized HIFU treatment induces systemic antitumor effects.

[Methods] A mouse model was established using KPC cells derived from pancreatic ductal adenocarcinoma. These KPC cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with nutrients and injected subcutaneously into the thighs of 5-week-old male C57BL/6JJc1 mice. HIFU treatment was performed using a SONIRE device, employing two irradiation methods: PW and CW. HIFU was applied only to one side, with three 10-second irradiation sessions. Tumor volume was measured using digital calipers over a 14-day period after cell transplantation. Changes in tumor volume were recorded on days 0, 3, 7, and 10 post-HIFU irradiation. Mice were divided into three groups—control, CW, and PW—with tumor volumes compared across these groups to determine both immediate and prolonged effects of HIFU on tumor suppression. Statistical analysis was conducted using JMP PRO 17 software, with significance defined as $P < 0.05$.

[Results] Tumor Suppression on Irradiated Side: Significant suppression of tumor volume was observed on the irradiated (right) side in both CW and PW groups compared to the control on day 3. PW showed a stronger suppressive effect on tumor volume than CW.

Abscopal Effect on Non-Irradiated Side: Tumor volume reduction was also noted on the non-irradiated (left) side in both HIFU groups, indicating a possible abscopal effect. However, the suppression effect was more prominent on the irradiated side.

Tumor Volume Changes Over Time: By day 7 post-irradiation, the tumor volumes in both CW and PW groups started to increase, reaching levels comparable to the control group by day 10. This suggests that the tumor suppression effect of HIFU was temporary.

[Discussion] This study demonstrated that HIFU not only induces local tumor suppression but also stimulates a systemic immune response that can affect distant, non-irradiated tumor sites. The PW irradiation method showed a stronger tumor-suppressive effect than the CW method, indicating its potential for enhancing systemic antitumor immunity. Combining HIFU with immune checkpoint inhibitors may offer an effective treatment strategy for pancreatic cancer. Future research should

focus on elucidating the mechanisms of the immune response induced by HIFU and exploring ways to translate these findings into clinical applications.

[Conclusions] HIFU treatment, especially PW irradiation, is effective in reducing tumor volume, albeit temporarily. The potential systemic antitumor response, as indicated by the observed abscopal effect, suggests that HIFU could be integrated into broader therapeutic strategies for pancreatic cancer. Further research is necessary to explore combination therapies that could sustain the tumor suppression effect, making HIFU a viable treatment option for advanced pancreatic cancer. In future research, it is important to elucidate the mechanism of the immune response by HIFU treatment and explore the path to its clinical application. In addition, this study has several limitations. First, since the mouse model used was limited, it is expected that the effects of HIFU treatment will be examined in other animal models and humans, aiming for a wider range of applications. The results of this study show the potential of HIFU treatment and strengthen its position as part of future cancer treatment.

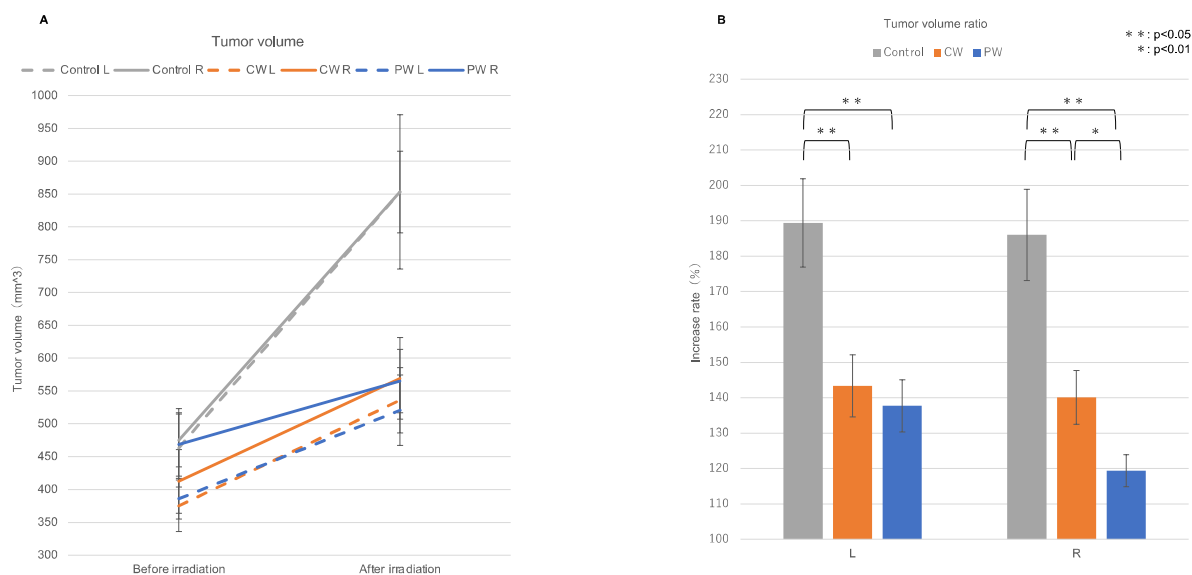


Fig.1 Tumor volume and tumor volume ratio in each group. (A): Tumor volume up to 10 days after HIFU irradiation. (B): Ratio of tumor volume before and after HIFU irradiation (days 0 and 3).

5 0 . Psychological Stress in Pregnant Japanese Women who opted for a Labor Analgesia

Yukie Iizuka

(School of Nursing, Tokyo Women's Medical University)

〔Purpose〕 Women in labor experience intense pain. In Japan, some pregnant women choose labor analgesia to relieve this pain. This study aimed to assess the psychological stress levels in pregnant Japanese women who opted for labor analgesia.

〔Methods〕 The participants included Japanese women with singleton and term pregnancies. Exclusion criteria were as follows: unmarried status, age under 20 years of age, history of cesarean section or instrumental delivery, previous stillbirth, or previous delivery of a child with disability.

Psychological stress levels were assessed by measuring concentrations of chromogranin A (CgA) in saliva. Saliva samples for CgA analysis were collected using a Salivette® at two time points: before labor onset and within 48 h after delivery. The saliva samples were stored at -80 °C and salivary CgA concentrations were analyzed using the Yanaihara Institute Inc., Shizuoka, Japan, within eight months after collection. The salivary CgA concentration was expressed as picomoles per milligram of total protein (pmol/mg). Descriptive statistics was performed using Microsoft Excel 2019.

This study was approved by the Ethics Committees of the Tokyo Women's Medical University (No. 2023-0044). A detailed explanation of this study was given to all participants, and written informed consent was received. Clinical practice was prioritized over study, consistently.

〔Results〕 Saliva samples were collected from four participants receiving labor analgesia, including two primiparas and two multiparas. All the participants underwent labor, either induced or augmented with oxytocin. The mode of delivery for two participants was vacuum-assisted vaginal delivery.

The salivary CgA concentrations (pmol/mg) before labor onset and within 48 h after delivery were shown in Table 1.

〔Discussion〕 The salivary CgA concentrations before labor onset were higher than those within 48 h after delivery, suggesting women may experience high psychological stress levels before the onset of labor, even if they choose to undergo labor anesthesia. However, the small sample size and use of convenient sampling are limitations of this study.

〔Conclusions〕 Salivary CgA concentrations indicated that women receiving labor analgesia also may experience psychological stress before the onset of labor. Hence, it is essential that midwifery care reduces pre-labor psychological stress among pregnant Japanese women who choose to undergo labor analgesia in Japan.

[Acknowledgement] The authors thank the medical physicians and midwives at Tokyo Women's Medical University Yachiyo Medical Center in Japan for their assistance with participant recruitment. This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number JP19K19654.

Table1. Concentrations of CgA in the saliva of pregnant Japanese women who opted for labor analgesia (pmol/mg) (*n* = 4)

Participants ID	Before labor onset	Within 48 h after delivery
A	4.0	2.1
B	9.8	4.7
C	9.5	5.0
D	8.5	3.3