

3 1. 川崎病患者児急性期血液中および咽頭粘膜上の細菌遺伝子の検出およびヒートショック蛋白の産生動態に関する検討

永田智¹、水落清¹、鏑木陽一郎¹、千葉幸英¹、辻浩和²

(¹小児科学、²株式会社 ヤクルト本社中央研究所 基礎研究二部 フローラ解析研究室)

〔目的〕 川崎病患者児より分離した細菌について分子系統学的な同定を試み、YIF-SCAN®の応用による川崎病関与菌に特異的な高感度定量システムを構築する。また、細菌 HSP60 を標的とした免疫学的検出法の開発を行う。

〔方法〕

I. 観察および検査項目

川崎病患者児においては、川崎病の診断を受けて入院し、治療経過中の患児で、治療開始前、ガンマ・グロブリン治療 (IVIG) などの治療終了時に、疾患対照患者では入院時に、それぞれ咽頭拭い液および定期検査のため採血した一部 (約2.0ml) を試験項目である病原菌候補の16SrRNAプライマーを用いた高感度定量と菌株特異的およびヒトHSP60の測定に供した。

II. 評価項目

(1) 主要評価項目

- ・治療開始時の咽頭拭い液および血液検体における病原菌候補菌の遺伝子の検出 と 血液検体におけるそれら菌株特異的およびヒト HSP60 の検出状況
- ・川崎病患者児においては、退院前の回復期検体における病原菌候補菌およびその菌株特異的およびヒト HSP60 の検出状況

(2) 副次的評価項目

- ・川崎病患者児においては、IVIG 不応例 (2 週間後) の冠動脈病変の発症率と病原菌候補の種類および菌株特異的および HSP60 の血中濃度の関連性

〔結果〕 A. 血液中の細菌遺伝子 (川崎病群 27 例、疾患対照群 22 例)の検出 : 図 1

川崎病群と疾患対照群間で、検出される細菌の種類に関しては明瞭な差異は認められなかった。

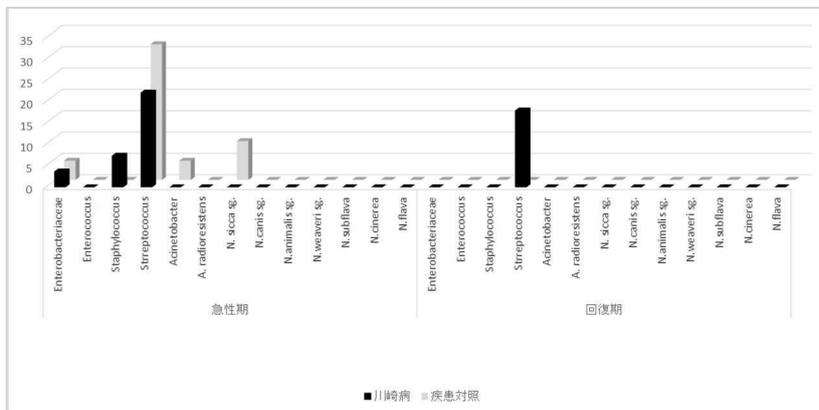


図 1. 血中の細菌遺伝子の検出率 (%)

B. 血清Heat-shock 蛋白 (HSP) 60 の検出 (川崎病群30例、疾患対照群16例)

川崎病急性期血清で認められるものと予想していたAcinetobacter 特異的 HSP60は、疾患対照群の血清中でも1例認められ、川崎病において特異的に血中に検出される蛋白と結論することはできなかつた。

AcinetobacterもしくはNesseria HSP60の患者血清中検出率は、川崎病群で10%、疾患対照群で6%程度であった。

C. 咽頭ぬぐい液の細菌遺伝子の検出 (川崎病群31例、疾患対照群23例) :

申請者らの過去の検討で川崎病の発症に関与すると推測していたNeisseria属の細菌は、新種のものであったが、細菌遺伝学的には*N.subflava*に最も近似するものであった。しかし、同菌は、川崎病群で疾患対照群より36.0%検出率は高まっていたが、Fisher's exact testでは統計的有意差は認められなかつた。一方、Enterobacteriaceaeの遺伝子は川崎病群でのみ検出され、疾患対照群では一切検出されなかつた。このEnterobacteriaceae陽性検体における増幅産物の塩基配列を解析したところ、11例中5例は、Enterobacteriaceae family、6例はPasteurellaceae familyに属していた。

〔考察〕 血液中の細菌遺伝子については、川崎病群と疾患対照群間で、検出される細菌の種類に関しては明瞭な差異は認められなかつた。川崎病急性期血清中 Acinetobacter 特異的 HSP60 は、疾患対照群の血清中でも認められた。咽頭ぬぐい液において、Enterobacteriaceae の遺伝子は川崎病群でのみ検出され、疾患対照群では一切検出されなかつたことは、川崎病の病態発症および冠動脈病変など特異的な合併症の発症にこれらの科に属する細菌が関与する可能性が高いと考えられた。今後は、これらの細菌について、属→種、さらに株レベルの同定を試みる予定である。

〔結論〕 咽頭ぬぐい液上の Enterobacteriaceae 科の細菌は川崎病発症に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

〔文献〕

- 1) Nagata S, Yamashiro Y, Ohtsuka Y, Shimizu T, Sakurai Y, Misawa S, et al. Heat shock proteins and superantigenic properties of bacteria from the gastrointestinal tract of patients with Kawasaki disease. *Immunology* (2009) 128:511–20. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03135.x
- 2) Nagata S, Yamashiro Y, Maeda M, Ohtsuka Y, Yabuta K. Immunohistochemical studies on small intestinal mucosa in Kawasaki disease. *Pediatr Res.* (1993) 33:557–63. doi: 10.1203/00006450-199306000-00004

〔発表論文〕

- 1) Nagata S. Cause of Kawasaki disease-From past to present. *Front. Pediatr.*, 05 February 2019 | <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00018>

3 2. 血管炎における病原微生物の同定

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。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¹⁾。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う。

〔方法〕 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う。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する。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う。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する。本研究は、本学倫理委員会の承認（承認番号：5700）を受けて施行している。

〔結果〕 2021年9月現在の時点で、血管炎患者由来皮膚17サンプル、血管炎患者由来血清22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12サンプルの採取を行った。現在、検体の処理を進めており、データの抽出・解析中である。

〔考察〕 信頼性のある研究結果を導き出すには、十分な検体数が必要であり、更なる検体収集の継続が必要である。十分なサンプル数が揃えば、血管炎の各病型による微生物叢の相違や予後との関連性などについても検討を進めたいと考えている。

〔結論〕 本研究のように、第三世代シーケンサーを用いた高感度なメタゲノム法を用いて、血管炎におけるウイルスを含めた病原微生物由来の核酸の解析を行った例は過去に無く、血管炎発症メカニズムの解明に繋がる事が期待される。引き続き検体の収集及び解析を進める予定である。

〔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

3.3. 骨髄増殖性腫瘍および類縁疾患における関連遺伝子の解析

吉永健太郎、志関雅幸
(血液内科学)

〔目的〕 真性多血症、本態性血小板血症、原発性骨髄線維症の原因遺伝子として、2005年 *JAK2V617F* 遺伝子変異が発見され、*CALR*、*MPL* 遺伝子などドライバー遺伝子変異の発見により、それまで骨髄増殖性疾患といわれていたものが、骨髄増殖性腫瘍に分類されるようになった。我々は以前、特発性赤血球増多症と診断されているものの中にも *JAK2V617F* 遺伝子変異が15%程度認められることを報告した¹⁾。その後、特発性赤血球増多症と診断された症例のなかに、*JAK2 Exon12* 変異陽性例も認められることが報告された^{2),3)}。現在はヘモグロビン値と *JAK2* 遺伝子変異の有無だけでも真性多血症と診断できるように基準が変更されているが、実臨床では *JAK2V617F* 遺伝子変異までしか検査が行えていないのが現状である。原因不明の赤血球増多は特発性赤血球増多症と診断されているが、クローナルな造血の証明が難しく、治療判断に苦勞する。クローン性の造血の有無の証明と原因遺伝子の探索が求められている。

〔方法〕 対象は2008年以降に *JAK2V617F* 遺伝子変異が陰性で、2次性赤血球増多の原因が特定できない赤血球増多症と診断された10例について、*JAK2 Exon12* について direct sequencing で変異の有無を調べた。

〔結果〕 と 〔考察〕 *JAK2 Exon12* 受容体遺伝子は10例全例で陰性であった。*JAK2* 遺伝子陰性の特発性赤血球増多症を特定し、現在 *TET2* を含む *EPOR*、*TET2*、*ASXL1*、*EZH2*、*IDH1/IDH2*、*DNMT3A* の変異について検討中である。

〔文献〕

- 1) Kentaro Yoshinaga A Naoki Mori A Yan-hua Wang A, Kaori Tomita A Masayuki Shiseki A Toshiko Motoji *JAK2 V617F* mutation is rare in idiopathic erythrocytosis:a difference from polycythemia vera. *Int J Hematol* 2008,88:82–87
- 2) Pardanani A, Lasho TL, Finke C, et al. , Prevalence and clinicopathologic correlates of *JAK2* exon 12 mutations in *JAK2V617F*-negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007,21, 1960–1963
- 3) Percy MJ, Scott LM, Erber WN et al., The frequency of *JAK2* exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Hematologica* 2007, 92:1607-1613
- 4) Delhommeau D. , Pharm.D., Dupont S. et al. Mutation in *TET2* in myeloid cancers. *New Engl L Med*. 2009;360:2289-301

3 4. 中大脳動脈永久閉塞ラットモデルにおける Pregabalin による脳虚血抑制効果

阿南英典、小林智範、川俣貴一
(脳神経外科学)

〔目的〕 Pregabalin は電位依存性カルシウムチャンネルの $\alpha 2\text{-}\delta$ subunit の阻害剤としての作用を持ち、Ca イオンの細胞内流入を抑制することでグルタミン酸などの興奮性アミノ酸の産生を抑制する。ラット中大脳動脈永久閉塞モデルを作成し、Pregabalin 投与による梗塞巣の変化とそのメカニズムについて検討した。

〔方法〕 脳梗塞モデルは雄 Sprague-Dawley ラット(250-300g)において、中大脳動脈を閉塞することにより作成した (Kobayashi et al Neurol Res 29: 884-887, 2007)。

Pregabalin (1 回投与量 10 mg/kg) は、脳梗塞作製前後で単回あるいは複数回投与した。脳梗塞作成から 24 時間後に神経所見 (forelimb placing test および hindlimb placing test) を確認した直後に sacrifice し、TTC 染色にて梗塞巣体積を測定した。

〔結果〕 Pregabalin の投与量を 10・20・30mg/kg で検討した。20・30mg/kg 投与群では呼吸状態が悪化したため、除外した。Pregabalin 10mg/kg 投与群で、脳梗塞作成後直後投与・30 分後投与で検討した。直後投与群では、caudoputamen 領域で梗塞巣の縮小を認めたが、cortex 領域では有意差を認めなかった。30 分後投与群では、caudoputamen・cortex 領域ともに梗塞巣の有意な縮小を認めた。

cPLA2 を用いた免疫染色を行うと、necrotic core では、コントロール群・Pregabalin 群とともに cPLA2 の発現が亢進していた。一方で、Penumbra に相当する peri-infarct area でコントロール群では cPLA2 の発現が亢進していたが、Pregabalin 投与群では cPLA2 の発現が有意に低下していた。

〔考察〕 Pregabalin は、電位依存性カルシウムチャンネルの $\alpha 2\text{-}\delta$ subunit の阻害剤であり、細胞内 Ca 濃度の上昇を抑制することで、cPLA2 を介した細胞障害を抑制していると示唆された。

〔結論〕 急性期脳梗塞において、Pregabalin は cPLA2 を介した抗炎症効果で Penumbra 領域での細胞障害を抑制させると考えられた。今後、Western-blotting や RT-PCR 解析を追加し、また、sPLA2 を介した microglia の penumbra 領域での活動についても合わせて検討を進める予定である。

〔文献〕

- 1) Sato S, Kawamata T, Kobayashi T, et al: Antidepressant fluvoxamine reduces cerebral infarct volume and ameliorates sensorimotor dysfunction in experimental stroke. Neuroreport 25: 731-736, 2014
- 2) Suzuki S, Kawamata T, Okada Y, et al: Filtrate of Phellinus linteus broth culture reduces infarct size significantly in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. eCAM, Article ID 326319, 7 pages, 2011. doi:10.1093/ecam/nen091
- 3) Kobayashi T, Kawamata T, Shibata N, et al: Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan

reduces cerebral infarct volume and periinfarct cytosolic phospholipase A₂ level in experimental stroke. *J Neurotraum* 26: 2355-2364, 2009

[学会発表]

- 1) 阿南英典、小林智範、川俣貴一. ラット中大脳動脈永久閉塞モデルに対するプレガバリン投与による治療効果の検討. 第37回脳卒中学会、福岡、2014/3

3 5 . Facial nerve regeneration with bioabsorbable collagen conduits filled with collagen filaments: An experimental study

Nami Hayakawa¹, Hajime Matsumine¹, Kaori Fujii¹, Hironobu Osaki², Yoshifumi Ueta²,
Wataru Kamei¹, Yosuke Niimi¹, Mariko Miyata² and Hiroyuki Sakurai¹

(¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery,²Department of Physiology, Division of
Neurophysiology)

[Purpose] A bioabsorbable collagen conduit (RenerateTM) filled with collagen filaments is currently approved as an artificial nerve conduit in Japan and is mainly used for connecting and repairing peripheral nerves after traumatic nerve injury. However, there are few reports on its applications for reconstructing and repairing the facial nerve. The present study evaluated the efficacy of the conduit on promoting nerve regeneration in a murine model with a nerve defect at the buccal branch of the facial nerve.

[Methods] Under inhalational anesthesia and microscopic guidance, the buccal branch of the left facial nerve in an 8-week-old Lewis rat was exposed, and a 7 mm gap was created in the nerve. The gap was then connected with either the nerve conduits (NC group) or an autologous nerve graft (the autograft group). At 13 weeks after the procedure, we compared the histological and physiological regenerations in the both groups.

[Results] We found compound muscle action potential amplitude is significantly larger in the autograft group (2.8 ± 1.4 mV) than in NC group (1.3 ± 0.5 mV) ($p < 0.05$). The number of myelinated fibers of the autograft group was higher (3634 ± 1645) than that of NC group (1112 ± 490) ($p < 0.01$). The fiber diameter of the autograft group (4.8 ± 1.9 μ m) was larger than that of NC group (3.8 ± 1.4 μ m) ($p < 0.05$). The myelin thickness of the autograft group was thicker than that of NC group (0.6 ± 0.3 μ m vs. 0.4 ± 0.1 μ m) ($p < 0.05$). G-ratio of the autograft group (0.74 ± 0.19) was lower than that of NC group (0.79 ± 0.10) ($p < 0.05$).

[Discussion] In this study, the efficacy of the collagen nerve conduits was found to be inferior to that of the autologous nerve grafts, and as a possible reason, the implanted collagen nerve conduits might be degraded and absorbed before the conduit expressed its nerve-regeneration promoting ability. Another artificial nerve conduit (Nerbridge[®]) currently used in Japan is found to be degraded and absorbed for several months in vivo, because the artificial conduits are made of PGA. Since the conduit used in this study was made of collagen, the degradation and absorption rates are higher than those of PGA conduits. Collagen is degraded by proteases, gradually digested, and absorbed by the tissues surrounding the conduit, and the rate of absorption varies by the implantation site and temperature. In this study, the conduit was implanted under the facial skin where a high blood flow accelerates the tissue absorption of collagen of the conduit. The necessity for the immobilization of nerve regeneration site after artificial conduit implantation is proposed by Lohmeyer et al.,

suggesting that a 2-week-immobilization is essential. In this study, however, the body movements of rats caused by chewing and swallowing food immediately after implantation were unable to give a stable environment for nerve regeneration, probably resulting in the suppressed neuroregenerative effect of collagen conduits. Therefore, in humans, resting for a specific period of time after surgery could be effective for enhancing the nerve regeneration in the implanted collagen conduits. In addition, the amount of collagen filled in the lumen of the nerve conduit used in this study could be insufficient to induce Schwann cell proliferation.

Autologous nerves are an ideal nerve regeneration-inducing material for motor nerve reinnervation, because they have a strong connective tissue covered with the basement membrane, which makes the autologous nerve extremely strong, and they contain many Schwann cells enhancing nerve regeneration. Therefore, for finding ideal materials for artificial nerve conduits, specific cells as replacements for Schwann cells and growth factors are studied. Various studies report that the injections of stem cells and growth factors into the lumen of artificial nerve conduits improve their regeneration-inducing abilities. Maki et al. create an artificial nerve conduit of which lumen is filled with a cocktail of cytokines secreted by skeletal muscle-derived stem cells, implant the conduit into a sciatic nerve defect in mice, and find an enhanced nerve regeneration. In the authors' previous studies, for improving the neuroregenerative ability of the conduits, hybrid-type artificial nerve conduits of which lumen is filled with adipose-derived stem cells, stromal vascular fraction, and/or differentiated fat cells are prepared, transplanted into a defect of the buccal branch of the facial nerve in rats, and observed to enhance the nerve regeneration. Although the highly neuroregenerative ability of conduits containing adipose-derived stem cells is attractive for treating the nerve defects, the preparation process of the stem-cell conduits is quite complex and requires long time and high production cost, which could reduce a willingness to apply the conduits to clinical practice. On the other hand, collagen, which is one of the main materials for making the myelin sheath, plays an important role in the process of nerve regeneration, and collagen conduits filled with collagen filaments are found to give a suitable environment for nerve regeneration, and the production cost of the collagen conduits is expected to be reasonable as medical devices. Therefore, the collagen conduit used in this study is expected to be a handy medical device for reconstructing peripheral nerves. Since the neuroregeneration ability of the collagen conduit in this study was inferior to that of the autologous nerve graft, for enhancing the neuroregeneration ability, various low-cost stem cells and growth factors will be investigated for incorporating them in the lumen of the conduits.

[Conclusions] This study demonstrated the efficacy of collagen nerve conduit for facial nerve reconstruction following nerve injury. However, the effectiveness of the conduit on the promotion of nerve regeneration was inferior to that of the autograft.

36. 網膜傷害後の DNA 損傷応答の影響

西野玲子¹、蔣池かおり²、藤枝弘樹²

(¹眼科学、²解剖学 (神経分子形態学分野))

〔目的〕 網膜傷害後の魚類の Müller グリアや生後間もないラットの網膜前駆細胞では増殖時に DNA 損傷応答は起こらないのに対し、成ラットでは、網膜傷害後、Müller グリアは増殖時に DNA 損傷応答を呈し、細胞死を起こす¹⁾。そこで網膜の再生における DNA 損傷応答の影響を検討した。

〔方法〕 視細胞特異的にアポトーシスを誘導するアルキル化剤である N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を 6 週齢、オスの Wistar ラットに単回腹腔内投与し、投与 2 日後に眼球を摘出して網膜のみを器官培養を行い、培養開始から 0, 1, 2 日後に固定した。増殖した細胞をラベルするため、5-Ethynyl-2'-deoxy-uridine (EdU) を培地へ添加した。培地に ATM 阻害剤添加なし (コントロール) と ATM 阻害剤 (AZD1390) の濃度 5 つ (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM, 10000 nM) をそれぞれ添加して培養し、培養 1 日目 (Day in vitro ; DIV1) と培養 2 日目 (DIV2) にそれぞれ固定した。AZD1390 は ATM のリン酸化阻害剤であるため、ATM 阻害剤の効果をみるためにリン酸化 ATM (pATM) で免疫染色を行った。Müller グリアは核のマーカーである Sox9 を用いて免疫染色を行い評価した。

〔結果〕 ATM 阻害剤を添加していないコントロールの DIV1 と、DIV2 網膜では Müller グリアは pATM 抗体陽性だった。一方、ATM 阻害剤添加群は 100 nM 以上の濃度で DIV1 も DIV2 も pATM 抗体は陰性だった。ATM 阻害剤濃度の低い 1 nM, 10 nM はコントロールと同様 pATM 抗体陽性であった。つまり、器官培養網膜で ATM 阻害剤は濃度依存性に ATM のリン酸化阻害効果があることが分かった。

次に、DNA 損傷応答で ATM の下流に位置するヒストン H2AX のリン酸化 (γ H2AX) を呈しているか免疫組織化学的に検討した。

ATM 阻害剤を添加していないコントロールは DIV1 も DIV2 の網膜も Müller グリアは γ H2AX 陽性だった。また、ATM 阻害剤を添加したもの全てでもコントロールと同様に DIV1 と DIV2 の網膜で γ H2AX 陽性だった。

〔考察〕 ATM 阻害剤 (AZD1390) は Müller グリアの ATM のリン酸化を濃度依存性に阻害したが、ヒストン H2AX のリン酸化を呈していたことから、DNA 損傷応答は ATM 以外に別の経路が働いていることが示唆された。別の経路として DNA-PK が挙げられるので、今後は ATM だけではなく DNA-PK も同時に阻害する実験が必要である。

〔結論〕 ATM 阻害剤 (AZD-1390) は Explant 網膜では 100nM 以上の濃度で阻害効果が得られることが分かった。しかし、ATM 阻害剤だけでは DNA 損傷応答の阻害はされず、他の経路が働いていることが示唆された。

[文献]

- 1) Nomura-Komoike K., Saitoh F., Komoike Y., et al (2016) IOVS. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57: 1169-1182

3 7. RNA 干渉を介した補体 C5 発現制御によるラット腎移植抗体関連型拒絶反応の抑制

石郷岡秀俊¹、雑賀寛¹、時田大輔²、元井宗太郎³、鈴木裕太⁴、久保井良知³、松井千幸³、石山亮¹、池田敬至¹、石井瑠美¹、今井俊夫³、田邊一成¹

(¹泌尿器科学、²研究推進センター、³株式会社カン研究所、⁴エーザイ株式会社筑波研究所)

〔目的〕 抗体関連型拒絶反応 (AMR) は、制御が難しく治療法が確立されていないため、腎移植後の移植片喪失の主な原因となっている¹⁾。本研究は、AMR の主要因の一つとして報告されている補体依存性の内皮障害を効果的に抑制するために、その標的として補体末端経路の中心成分である C5 に注目し、C5 に対する低分子干渉 RNA 脂質ナノ粒子製剤 (C5 siRNA-LNP)²⁾ のラット腎移植モデルにおける AMR への有効性を評価するために行われた。

〔方法〕 レシピエントとして Lewis ラット (RT1^l) をドナーとして Brown Norway ラット (RT1ⁿ) を使用した。7~9 週齢のレシピエントにドナー皮膚を移植して感作し、感作後 4 週に腎移植を行った。C5 siRNA-LNP は、移植前 7 日および 4 日、移植当日、移植後は週 1 回 1.0 mg/kg を静脈内投与した。移植後 98 日まで観察した。C5 siRNA-LNP の補体活性抑制は Lewis ラットを用いた溶血試験で確認した。ルシフェラーゼ siRNA 製剤 (Control siRNA-LNP) を対照として使用した。

〔結果〕 C5 siRNA-LNP を 1.0 mg/kg 単回投与したところ、投与 7 日後にはラット溶血活性が補体活性の制御目標値である 20%以下に抑制されたが、14 日後には 20%以上となった。しかし、C5 siRNA-LNP を週 1 回 1.0 mg/kg 投与することで、7 日後も目標値以下を継続して維持し、週 2 回の投与でさらに溶血活性が低下した (表 1)。

表 1. C5 siRNA-LNP の投与量および投与方法による溶血活性の比較

| Treatment | Number of animals | Dose (mg/kg) | Dosing | Hemolysis (%) | | | | | |
|-------------------|-------------------|--------------|------------|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | | | days post-administration | | | | | |
| | | | | 1 | 3 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Control siRNA-LNP | 3 | 3.0 | | 100.9 ± 1.1 | 97.4 ± 4.0 | 96.8 ± 3.7 | 94.3 ± 4.5 | 93.3 ± 2.1 | 101 ± 4.7 |
| C5 siRNA-LNP | 3 | 1.0 | single | 70.4 ± 2.8 | 32.1 ± 5.4 | 16.4 ± 1.3 | 22.9 ± 3.0 | 45.6 ± 3.1 | 80.1 ± 3.1 |
| | 3 | 3.0 | | 66.0 ± 1.5 | 20.9 ± 0.1 | 11.4 ± 0.7 | 16.5 ± 1.2 | 29.7 ± 1.7 | 75.8 ± 0.9 |
| C5 siRNA-LNP | 3 | 1.0 | once/week | - | 35.4 ± 6.2 | 17.9 ± 0.6 | 8.9 ± 0.3 | 9.8 ± 1.0 | - |
| | 3 | 1.0 | twice/week | - | 42.9 ± 3.4 | 8.7 ± 0.8 | 6.5 ± 1.7 | 7.1 ± 1.2 | - |

Data (mean ± SD) were expressed as a percentage of hemolytic activity pre-administration of each rat.

ラット AMR モデルにおける移植片の生着期間への効果について評価した結果、C5 siRNA-LNP 単独 (生着期間中央値 (MST) : 7 日) と Untreated 群 (MST : 8.5 日) の間に有意な差はなかった。次に、シクロスポリン (CsA) とデオキシスパーガリン (DSG) 併用時の C5 siRNA-LNP の有効性について評価した。Untreated 群と CsA 単独 (MST : 9 日) もしくは DSG 単独 (MST : 14 日) の間で有意な差はなかったが、C5 siRNA-LNP+CsA 併用 (MST : 12 日) または C5 siRNA-LNP+DSG 併用 (MST : 17 日) は、Untreated 群に比べて生着期間が延長した。さらに、C5 siRNA-LNP+CsA+DSG の 3 剤併用 (C5 siRNA-triple therapy, MST : 56 日) ではより顕著な延長効果が認められ、これら 2 剤併用とともに、CsA+DSG 併用 (MST : 15.5 日、 $P = 0.0010$ 、ログランク検定) および Control siRNA-LNP+CsA+DSG 併用 (Control therapy, MST : 21.0 日、 $P = 0.0012$ 、ログランク検定) と比べ長期の

移植片生着が観察された (図 1)。

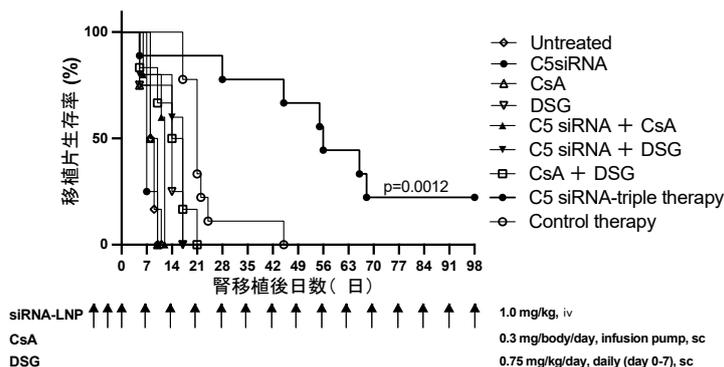


図1. C5 siRNA-LNP の移植片生着への効果と投与スケジュール

〔考察〕 C5 siRNA-LNP は、補体活性を反映する溶血活性を目標値以下に維持し、ラット AMR において既存免疫抑制剤の CsA と DSG を併用することで移植片生着期間を顕著に改善した。DSG は B 細胞の分化や抗体産生を抑制すること³⁾、また CsA は T 細胞の活性化を阻害するとともに IL-4 産生を抑制することで抗体産生に影響を与えることが報告されている⁴⁾。本研究の結果は、これらの免疫抑制剤併用下で C5 発現を抑制することで AMR による移植腎喪失を回避できる可能性を示し、腎移植後の AMR に C5 RNA 干渉が有効であることを示した初めての報告である。

〔結論〕 C5 siRNA-LNP は、前感作したラット腎移植モデルにおいて T 細胞や B 細胞などの免疫機能を抑制する状況下で AMR を抑制できることを示し、AMR の複合的な治療法における補体制御の選択肢として有用である可能性を示した。

〔謝辞〕 本研究は、AMED の課題番号 17pc0101019h0001 の支援を受けた。

〔文献〕

- 1) Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant.* 2012; 12: 388
- 2) Suzuki Y, Hyodo K, Tanaka Y, et al. siRNA-lipid nanoparticles with long-term storage stability facilitate potent gene-silencing in vivo. *J Control Release.* 2015; 220: 44
- 3) Fujii H, Takada T, Nemoto K, et al. Deoxyspergualin directly suppresses antibody formation in vivo and in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 1990; 43: 213
- 4) Ho S, Clipstone N, Timmermann L, et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80: S40

〔学会発表〕

- 1) H. Ishigooka, S. Motoi, T. Yamakawa, et al. Successful prophylaxis of antibody-mediated rejection by downregulation of C5 expression via RNA interference in a rat kidney transplant model. American Transplant Congress 2021 virtual connect, June 4-9, 2021

38. 木村病におけるペリオスチンの発現亢進について

崎谷恵理、野中学
(耳鼻咽喉科学)

〔目的〕 ペリオスチンはファシクリンファミリーに属する分泌型の細胞接着タンパク質であり、その発現は骨膜、心臓弁、胎盤、表皮真皮境界部などに見られ、種々の炎症性疾患や癌組織での発現亢進が知られている。心臓弁前駆細胞への分化や心筋細胞の増殖、また種々の腫瘍細胞でも細胞増殖、組織侵襲や転移を誘導して腫瘍の進展を促進する。さらに喘息やアトピー性皮膚炎、好酸球性副鼻腔炎、アレルギー性結膜炎、全身性強皮症などの慢性炎症の病変部での発現も亢進している報告されている。ペリオスチンの発現を誘導する因子としては、TGF- β やBMP-2が知られているが、Th2型サイトカインのIL-4、IL-13がTGF- β 非依存的にペリオスチン発現を誘導させ、アレルギー性炎症の増悪化に重要な役割を果たしていると考えられている¹⁾。これらの特徴から近年喘息患者に対する分子標的薬の治療効果予測因子として注目されている。木村病もTh2型炎症でありIL-4、IL-13の関与があると報告されている²⁾。Th2型炎症である木村病の病態形成にペリオスチンが関与しているかどうか、下記の方法で検討した。

〔方法〕 木村病の耳下腺部に病変がある6症例と耳下腺多形腺腫の摘出時に摘出した正常耳下腺6例を対象として以下の方法で検討した。

- ① 遺伝子解析に対して東京女子医科大学倫理委員会にて承認を受け（承認番号：2144）、次世代シーケンサーを用いてmRNAを網羅的に解析した。
- ② Mouse anti-periostin monoclonal antibody(SANTA CRUZE BIOTECHNOLOGY[®])を用いてPAP法で免疫染色をしてペリオスチンの発現程度を比較検討した。
- ③ シノテスト社のペリオスチンELISA KITを用いて、ペリオスチン濃度をELISAで検討した。さらに、血清のペリオスチン濃度と白血球数、好酸球数、IgEとの相関の有無を検討した。

〔結果〕 ペリオスチンのmRNAコードであるPOSTINは、次世代シーケンサーで木村病耳下腺部において2番目に高い発現を認めた。免疫染色では濾胞外に線維芽細胞様の陽性細胞が木村病耳下腺部で正常耳下腺部より有意差をもって多くみられた。また血清ペリオスチン濃度はコントロールと比較して有意差をもって高値であった。さらに、血清ペリオスチン濃度は血清IgE値と相関がみられた。

〔考察〕 木村病では、以前TSLPの主な産生細胞はマクロファージと線維芽細胞であったことを報告した³⁾。またマウスではマクロファージがペリオスチンを分泌し、分泌されたペリオスチンは組織へのマクロファージの遊走を促進して炎症を増幅している可能性があることが報告されている⁴⁾。今回の研究より、線維芽細胞が直接産生するTSLPだけでなく、線維芽細胞が産生したペリオスチンを介したマクロファージのTSLPの産生亢進のサイクルがある可能性があると考えた。

〔結論〕 木村病の耳下腺部病変において、ペリオスチンの産生亢進が見られ、血清中のペリオスチン濃度も有意差をもって上昇していた。ペリオスチンは木村病におけるアレルギー性炎症の遷延化や病態形成に関与している可能性がある。

〔文献〕

- 1) 出原賢治. (2017) アレルギー 66(6): 792-797
- 2) Yamazaki K., Kawashima H., Agematsu K., et al. (2013) Hum Immunol.74(9): 1097-1102
- 3) Sakitani E. Nonaka M. Shibata N., et al (2015) ORL. 77(1): 44-54
- 4) Nakazeki F. Nishiga M. Ono K., et al. (2018) Sci Rep 4:8(1):8553

〔学会発表〕

- 1) 崎谷恵理. 山村幸江. 野中学. 木村病におけるペリオスチンの発現について 第 1 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会、金沢、2021/7

39. ヒト原始卵胞に対する体外培養の試み

中林章

(産婦人科学)

〔目的〕 小児や若年性の悪性腫瘍に対する治療成績の向上に伴い、抗がん剤や放射線の生殖への毒性から妊孕能を温存する「fertility preservation」の概念が注目されている。男性では精子凍結が一般的な手技として普及しており、射出ができない場合に精巣組織凍結が考慮される。女性の場合、卵子を採取するためには、排卵誘発剤を使用し針で卵胞を穿刺する採卵が必要となり、得られる卵子も少ない。一方、卵巣組織凍結は大量の卵子を得られる利点があり、凍結保存技術も確立されており、2004年に、卵巣組織凍結保存後の自家移植による出産が報告された¹⁾。しかしながら、自家移植された卵巣組織片が生着する際に多くの卵子が障害を受けることや、自家移植の際の癌細胞の再移入の問題があり、2013年の報告では世界で約50例が成功しているにすぎない²⁾。2015年にXaioらが初めてヒト原始卵胞を体外培養し成熟卵子を得たことを報告し³⁾、新たな技術として期待されている。本技術が将来臨床応用されることが期待されており、今回、原始卵胞から体外培養された卵子の評価を行うことを目的とした。

〔方法〕 東京女子医科大学病院産婦人科に入院し卵巣を摘出する患者を対象とした。清潔野で卵巣皮質を採取し、ピルビン酸ナトリウム、グルタミン、ヒト血清アルブミン、抗菌薬を添加したライボビッツ培地に入れ、培養室に運んだ。培養室に運んだ卵巣皮質を約1mm³の大きさに細切り、顕微鏡で観察し発育した卵胞を取り除いた。HEPES緩衝液、グルタミン、ヒト血清アルブミン、抗菌薬、トランスフェリン、セレンウム、ヒトインスリン、rFSH製剤、アスコルビン酸を添加したマッコイ5A培地で8日間培養した。その後、アクチビンAを加え、さらに8日間培養した。なお、本研究は東京女子医科大学倫理委員会での審査を経て実施した。

〔結果〕 卵巣を摘出する卵巣癌の34歳女性および子宮体癌の37歳女性に対して実施した。卵巣皮質の採取にあたり、厚さが1-2mmであることを意識して行った。その後、培養後の観察を容易にするため、なるべく組織が薄くなるように細切した。24ウェルプレートで計96切片を16日間培養した。培養後、顕微鏡下に切片を観察したが、明確な卵胞を確認することができなかった。

〔考察〕 今回、Telferらの報告⁴⁾に従い培養を実施した。明確な卵胞を確認することができていれば、卵丘細胞卵子複合体を単離し培養を継続したが、その操作は行わずに中止することとなった。培養成功のためには、培養条件の調整よりもまず原始卵胞が多く含まれている部分の採取が重要であると考えた。卵巣皮質は1-2mmの厚さで外側から順に卵巣表層上皮、卵巣白膜、帯状構造となっており、原始卵胞は髄質に近い帯状構造に位置する。肉眼での識別は困難であり、柔らかい髄質を指標としてその外側を採取することが求められる。

〔結論〕 原始卵胞を体外で培養し成熟卵子を得ることが可能となれば、「がんサバイバー」が将来妊娠する可能性を高めることができ、また、挙児希望で治療反復不成功の夫婦に対しても新たな治療法とな

り得る。さらに、体外での培養は、成熟卵子への発育のメカニズム解明の糸口となる。生殖医療の発展のため、引き続き研究を進めていきたい。

[文献]

- 1) Donnez J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Lancet 2004, 364: 1405-10
- 2) Stoop D, et al. Fertility preservation for age-related fertility decline. Lancet 2014, 384: 1311-9
- 3) Xiao S, et al. In vitro follicle growth supports human oocyte meiotic maturation. Sci Rep 2015, 27;5:17323. doi: 10.1038/srep17323
- 4) M.McLaughlin, et al. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multistep culture system. Mol. Hum. Reprod. 2018, 24(3): 135-142

[発表論文]

- 1) 中林 章. (2020) ヒト原始卵胞の体外培養により得られる卵子の質的評価. 赤枝医学研究財団年俵あゆみ. 第5号: 52-53.

| |
|---|
| 体内：原始卵胞→前胞状卵胞→胞状卵胞→成熟卵胞→排卵→成熟卵子 体外：卵巣摘出→原始卵胞の体外培養→未熟卵子の体外培養→成熟卵子 |
|---|

図1. 成熟卵子になるまでの過程

40. 精神疾患に対するレジリエンスと抗精神病薬の効果

押淵英弘、村岡寛之、榎本幸輔、柴田和郎、稲田健、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神経の過活動が関連すること、抗精神病薬がこれを安定化する作用があることを見出してきた¹⁾。最近、一定閾値以下の扁桃体ドーパミン放出は恐怖記憶の消去を促進することが示唆された²⁾。以上より、扁桃体ドーパミン放出が安定化することは、情動記憶の消去を通して精神疾患に対するレジリエンスに関与することが示唆される。本研究では、「情動記憶の消去過程に対するドーパミン受容体遮断薬である抗精神病薬の効果を検証することを目的とした。

〔方法〕

対象： 8週令雄性 S.D.ラットを使用し以下の4群に分配する。Haloperidol 0.05 mg/kg s.c.群 (HAL0.05)、Haloperidol 0.10 mg/kg s.c.群 (HAL0.1)、Haloperidol 1.00 mg/kg s.c.群 (HAL1.0)、生理食塩水 1 ml/kg s.c.群 (SAL)。

行動学的評価： 恐怖条件づけ後、1日おきに条件刺激 (CS) を10回提示する。毎回のすくみ行動の時間を測定し、初回からの減少の変化を観察し、初回 CS 時のすくみ時間を基礎値とした変化率で検証する。

〔結果〕 恐怖条件付け後に CS を提示するとすくみ行動が生じ、CS10 回目まで一貫して減少した。すくみ時間の減少は、SAL 群に比して、HAL0.05 群と HAL0.1 群では遅延し、HAL1.0 群では早期に生じた。とくに CS3 時点でのすくみ時間の減少は、SAL 群に比して、HAL0.1 群でのみ遅延していた。

〔考察〕 扁桃体ドーパミンは、少ない放出だと情動記憶処理の消去を促進し・多い放出だと抑制する dual action 仮説がある²⁾。HAL は扁桃体ドーパミンの放出を促進する¹⁾。以上より、ドーパミン受容体遮断薬である抗精神病薬は、扁桃体ドーパミンの 1)放出を促進する作用と 2)伝達を遮断する作用により、情動記憶消去を制御している可能性がある。

〔結論〕 精神疾患に対する脆弱性とレジリエンスの理解のために、情動記憶処理における消去を尺度として、行動と扁桃体ドーパミン神経系を評価することは有用である。

〔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) Kwon OB, Lee JH, Kim HJ, et al. Dopamine Regulation of Amygdala Inhibitory Circuits for Expression of Learned Fear. *Neuron*. 2015;88(2):378-389. doi:10.1016/j.neuron.2015.09.001

[学会発表]

1) 2021 年度躁うつ病懇話会 (Web) 榎本幸輔