

日本大学医学部 総合医学研究所紀要

Bulletin of The Research Institute of Medical Science,
Nihon University School of Medicine

Vol.11 / December 2023

日本大学医学部総合医学研究所

Research Institute of Medical Science, Nihon University School of Medicine

免疫性腎炎に対するDFAT細胞療法の治療効果と作用機序の検討

阿部雅紀¹⁾, 丸山高史¹⁾, 逸見聖一郎¹⁾, 松本太郎²⁾, 加野浩一郎³⁾

Evaluation of effects and mechanism of the dedifferentiated fat cell therapies for the immune-induced nephritis

Masanori ABE¹⁾, Takashi MARUYAMA¹⁾, Seiichiro HEMMI¹⁾,
Taro MATSUMOTO²⁾, Koichiro KANO³⁾

要旨

今回我々は腎疾患の中でも特に生命予後の悪いANCA関連腎炎について、本学で開発された間葉系幹細胞の性質を有する脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) を用いた治療の効果と作用機序について検証した。その結果、生存率、採血・尿・組織所見の改善と安全性についても確認された。治療改善のメカニズムとして、免疫調整作用を有するTSG6の発現亢進がDFAT細胞移植後惹起され、ANCA関連腎炎の病因である自己免疫異常が改善されたためと考えられた。更にその後の検証から病態改善の機序として、DFAT由来のエクソソームによる病態改善の可能性が考えられ、今後臨床応用できる可能性が示唆された。現在までに得られた結果をまとめて以下に報告する。

1. はじめに

本学生物資源科学部の加野らは皮下成熟脂肪細胞を脱分化させDFATを得る技術を開発、特許化した(特願平10-378013)。DFATは再生医療の移植細胞原として骨、軟骨、筋、上皮および神経細胞などに分化転換させる技術の開発や間葉系幹細胞と同等の性質を有している事も解明してきた¹⁾。この間葉系幹細胞は他にも体内に障害が起きた際に障害部位に集積して障害部位を修復するのに寄与するという報告が散見されており、これを応用してこの間葉系幹細胞を体内に移植して様々な疾患を治療する試みが基礎実験のみならずヒトにおいても脳梗塞治療などに既に臨床応用され始めている。間葉系幹細胞は一般に骨髄細胞などから作製されるがその過程の侵襲も強くまた一度の処理で得られる間葉系幹細胞も限られたものである。これに対してDFATは間葉系幹細胞

と同等の性質を持ちながら局所麻酔下に1gの脂肪組織を採取出来れば細胞の性質上、その後大量調製が可能であるため、侵襲や組織破壊が非常に少なく、心不全や高齢患者からも採取・調製が可能である。さらにまた癌化などのリスクも他の移植細胞原と比べても格段に少なく、まとめると安価で安全でかつ低侵襲の手技によって大量調整が可能であり、間葉系幹細胞による疾患治療の移植細胞原として非常に期待の持てる治療ツールである。腎臓疾患は一度罹患すると根治治療が難しく病態が慢性化する場合も珍しくない。高血圧や糖尿病、糸球体腎炎など腎臓病の原因疾患には様々な疾患があるが、それらをまとめて慢性腎臓病 (CKD: Chronic Kidney Disease) と呼ぶ。この疾患は現在1330万人の患者が本邦に存在して、都合国民8人に1人か何らかの腎疾患に罹患している事になるが根治療法が十分でないのが現状である。根治療法が

1) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

2) 日本大学医学部機能形態細胞再生・細胞移植学分野

3) 日本大学生物資源科学部応用生物科学科

阿部雅紀: abe.masanori@nihon-u.ac.jp

十分でないため透析患者数の増加にもつながり医療費の高騰など社会問題化している。腎疾患の増加は高齢化や様々な医療技術、治療の進歩の裏返しとも言えるが、このような現状から腎臓病に対する治療法の更なる発展、開発が期待されている。また一部の腎疾患においては透析導入といった問題にとどまらず生命の危機に関係する、つまり生命予後の悪い腎疾患も存在する。

そのような背景の中、慢性腎疾患の中でも特に生命予後の悪いANCA関連腎炎について、本学で開発された間葉系幹細胞の性質を有するDFATを移植する細胞治療の効果と作用機序について検証した。

これまで我々は平成27年～29年度の科学研究費(15K09280)助成事業「進行性腎障害に対するDFATを用いた細胞移植治療の開発」にて自己免疫性腎炎がDFAT移植により改善し、その作用機序として免疫抑制作用にTSG-6の発現が関与している事を見出した²⁾。更に平成30～令和2年度の科研費(18K08255)助成事業によりANCA腎炎がDFAT移植で改善する事を見出した。病態改善の更なる詳細な機序として抗炎症物質TSG6の発現やマクロファージのM1からM2へ形質転換による抗炎症物質産生等、移植による免疫調整作用が機序として考えられた。しかしDFAT細胞移植において静脈投与されたDFATは殆ど肺にトラップされ、障害臓器の腎臓への集積は確認されず、DFATと障害臓器である腎臓と直接の細胞間インターアクションがない環境で上記のような現象がどのように見られているのか、細胞分子レベルでは依然不明のままであった。

一方、興味深いことに我々の研究室において、このDFATの培養上清中に細胞間コミュニケーションに関与するエクソソームが高純度に確認され、その内部にTリンパ球の増殖抑制や制御性T細胞分化抑制に関わるとされるmiRNAが確認され、DFATの分泌するエクソソームは種々の免疫調整作用を有するという結果を得た。その内容としてT細胞の増殖を制御する作用が報告されているmiRNA-20a-5p, miRNA-17-5p, ナイーブT細胞から制御性T細胞の分化誘導するmiRNA-26a-5p, miRNA-100-5p, Th17細胞への分化誘導を抑制するmiRNA-20b-5pの発現をエクソソーム内に確認している。

このin vitroの結果から考えて、in vivoにおいてもDFAT移植がエクソソームという液性因子を通じて

免疫調整を発揮する可能性は十分にある。本研究ではDFAT投与による病態改善の機序についてエクソソームを含め改めて検証するとともに、抽出されたエクソソームのみの投与で細胞投与と同等に病態が改善するかを検証して、将来の慢性腎臓病治療の開発の一助となることを目的とする。

2. 対象及び方法

ANCA関連腎炎のモデル動物であるSCG/ThpNkcマウスにDFATを経静脈的に細胞移植を行い、その改善効果を再検証した。さらにDFAT細胞移植による腎炎改善の機序を解明するため、移植後マウス血液中のエクソソームを抽出してmiRNAの発現を網羅的に行い、腎炎を改善させるmiRNAの検討を行った。またDFAT培養上清中のエクソソームをSCGマウスに投与して同様に効果が得られるかを検証した。以下その具体的方法を簡潔に記す。

1) DFATの作製

ddyマウスの皮下脂肪を採取してコラゲナーゼで処理し、低速遠心で得られた均一成熟脂肪細胞を20%ウシ胎仔血清含有DMEMで満たした天井側で培養する。DFATのコロニーが形成される培養7日頃にフラスコを反転し、通常の付着培養を行うことによりDFATは急速に増殖し、それを1週間後に凍結保存して後の実験用に保存する。

2) 実験に使用するSCG/ThpNkcマウスの繁殖

SCG/ThpNkcマウスは他のマウスと違い、生命力の弱いマウスである。発売元である、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所の疾患モデル小動物研究室は大阪にあり輸送が必要であった。そのため同マウスを輸送後は体力低下でそのまま死亡することもまれでなく、実験で使用する場合は輸送後、良好な環境におきその後繁殖した次世代マウスを使用することが必要になった。また繁殖後も本マウスは約8週齢より糸球体腎炎および血管炎を発症して雌親の授乳が困難であるため、健常マウスとしてddyマウスを同時期に同数交配し里親として使用した。5週齢のSCG/ThpNkcマウスを一週間の順化期間後、繁殖し、実験用マウスを作出した。繁殖では1回の繁殖で約5頭の出産が予想される事から、実験に使用する41頭を得るためにはメス9頭の交配が必要となった。

3) DFATの細胞移植

7週齢のSCG/ThpNkcマウスにddyマウス由来DFATをそれぞれ 1×10^6 個/頭、 1×10^5 個/頭、 1×10^4 個/頭の割合で各4頭ずつ静脈より細胞移植を行った。更に移植後の体内分布を検討する為、PKH26GLでラベルしたDFATを 10^5 個/頭の割合で移植した。

4) 移植後の評価項目

細胞移植後1カ月飼育した。その間1週間おきに体重測定、畜尿を施行した。1日尿蛋白量と定性試験にて潜血反応の経過を観察した。

5) 移植による治療効果、作用機序の検証

移植1カ月後、ddyマウス由来DFATを移植した群では生化学的検査として血液中のBUN, Cre, ANCA, ANA, WBC, CRP, IL-1, 6, 8, TNF- α , TSG-6濃度をELISA法で測定した。腎臓と肺についてReal-time PCR解析, Western blot法を用いて免疫制御分子としてTSG-6・IDOを, Th1-type cytokineとしてIFN- γ ・TNF- α を, M1マクロファージ関連サイトカインとしてMCP-1・IL-6・IL-12をM2マクロファージ関連サイトカインとしてCCL17・IL-4・IL-10・mannose receptorの発現の変化を観察した。これによりDFAT細胞移植が免疫系のどの部位に作用するかを考察した。

6) 移植による安全性の検証

移植後の代表的な副作用として、免疫毒性を機序とする移植片対宿主病 (GVHD) がある。この症状として代表的な皮膚病変 (手掌や足底、四肢や体幹の赤い斑点の有無、全身の皮膚の紅斑や水泡、脱落の有無)、消化器病変 (食欲低下、嘔吐、下痢等)、肝臓病変 (黄疸や意識障害) などが移植後の実験動物に診られないか注意深く観察した。以上の結果を踏まえて免疫性腎炎へのDFAT細胞移植療法について効果の有無や作用機序、免疫毒性を中心とした安全性について多角的に判断した。DFAT投与細胞数、DFAT投与期間などの細胞治療としてのデータを蓄積し、DFAT移植の最適治療条件を確立した。

7) 更なる作用機序、エクソソームについての検証

DFATから分泌されるエクソソームについて実験計画について以下の通りとした。

*in vitro*の系としてDFATを培養してその培養上清中においてサイズ排除クロマトグラフィー法を用いてエクソソームの回収を行った。DFATの培養上

清 (DMEM) 15mlを15ml tubeで4°C, 1500 g, 15 ~ 30分遠心, 15ml tubeの上清2mlを2ml tube (1Sample各9本)へ移し, 4°C, 10000 g, 10分遠心, Amicon限外濾過フィルター (Cut off100kDa)を用いて, MilliQ Water 15mlをいれて4000 g, 10分遠心し, フィルターの前処理を行い, 100kDa Amicon Ultra-15に加えた。更にqEVカラムに注入し抽出してDFAT培養上清中のエクソソーム濃縮液を作成した。以上より得られたDFAT培養上清濃縮液 0.5mlをqEVカラムの上から注入し抽出した。メイワフォーシス株式会社のナノ粒子マルチアナライザーを使用して培養上清, 血清中, 肺組織, 腎組織中のmiRNAについて測定を行った。

*in vivo*の系として以下のとおり施行した。移植1カ月後、メイワフォーシス株式会社製のqEVオートマチックフラクションコレクター (AFC) およびエクソソーム抽出キット (qEV) を用いて血液のエクソソームを抽出した。それがエクソソームであることを確認するために走査電子顕微鏡による観察と、ウェスタンブロット法によるエクソソーム特異的マーカーであるCD63のバンドについて確認した。エクソソームの存在を確認後、SeraMir™ Exosome RNA Amplification Kit (SBI, SeraMir) を用いてtotal RNAを抽出し、バイオアナライザ (Bioanalyzer RNA6000 Pico) でtotal RNAの解析、並びにAgilent Technology社製のオリゴDNAマイクロアレイを用いてmiRNAについて我々の予備実験の結果を始め更に網羅的解析を行った。得られたmiRNAをリアルタイムRT PCR法を用いてその発現を確認した。

3. 結果

移植後のDFATの体内分について、PKH26GLでラベルしたDFATは投与後1時間においてDFATの肺でのトラップが確認され、その他の臓器への分布は認めなかった。間葉系幹細胞が障害臓器に集積して障害臓器が修復される内容の既報があるため、腎臓の周囲または腎臓の内部にDFATの存在が見られることを予想していたが、静脈注射されたDFATはほぼすべてが肺にトラップされている結果であった (図1)。既報では同様の実験で障害の腎臓に間葉系幹細胞が集積していると報告しているものが散見されるが、肺の末梢血管径とDFATの細胞径は後者の方が大きく物理的に肺を通過することが理論的には

不可能であり、我々の結果はDFATが腎に集積する結果ではなかった。その後1週間、2週間と徐々に肺にトラップされDFAT数は減少していったが、この間その他の臓器への移行は認めなかった。

移植細胞数については 1×10^5 個/頭の割合で投与した群が最も生存率、治療成績が良く今回の結果ではこの方法が最適と考えられた。以下データはDFATを 1×10^5 個/頭の割合で投与した結果について述べる。生存率についてはDFATを移植した群が治療4か月後100%だったのに対して移植しなかった疾患群が66%と低下しており、移植したことによる生存率の改善を認めた(図2)。蛋白尿については腎炎群よりもDFAT投与群の方が蛋白尿の改善を認めた。腎臓組織の評価として、組織GIS(糸球体障害指数)は腎炎群と比較し、DFAT投与群で有意な低下を認めた($P=0.018$)(図3)。一方、尿管の障害度を表す指数であるTISでは腎炎群およびDFAT投与群において有意な差は認めなかった。腎機能の評価として、血清BUN値と血清Cr値について腎炎群とDFAT投与群で差を認めなかった。またANCA腎炎発症時に上昇する血清MPO-ANCA値は腎炎群と比較し、DFAT投与群で低下傾向であったが、有意な差は認めなかった。腎臓でのTSG-6のmRNA発現は腎炎群と比較し、DFAT投与群において有意な発現の亢進($P=0.041$)を認めた。TSG-6の発現を免疫組織学的に観察した。染色性は腎炎群とDFAT投与群で糸球体において同等であった。一方、

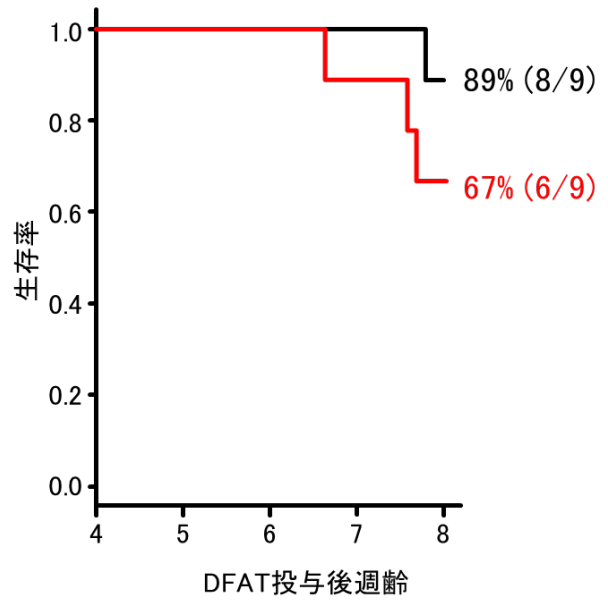


図2 DFAT移植後の生存率(赤;疾患群,黒;治療群)

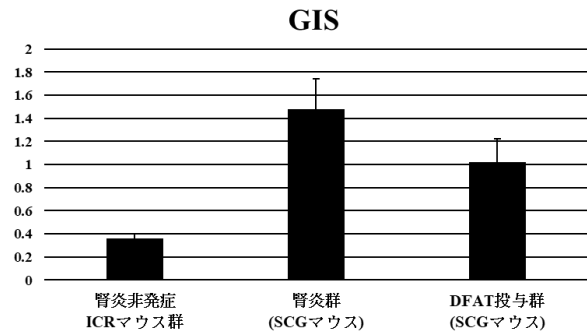


図3 治療後の糸球体障害指数(GIS)

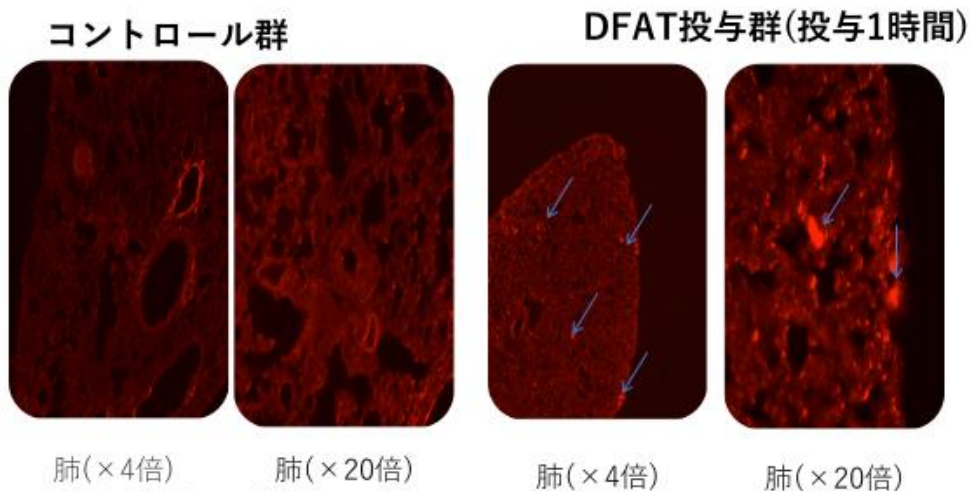


図1 移植されたDFATの体内分布

腎間質でのTSG-6の染色性は、腎炎群と比較し、DFAT投与群において、近位尿細管と遠位尿細管の両方において亢進を認めた。またCD44の発現は、DFAT投与群で低下傾向であった。免疫調整物質であるIL-10の発現はDFAT投与群で増加傾向であり、

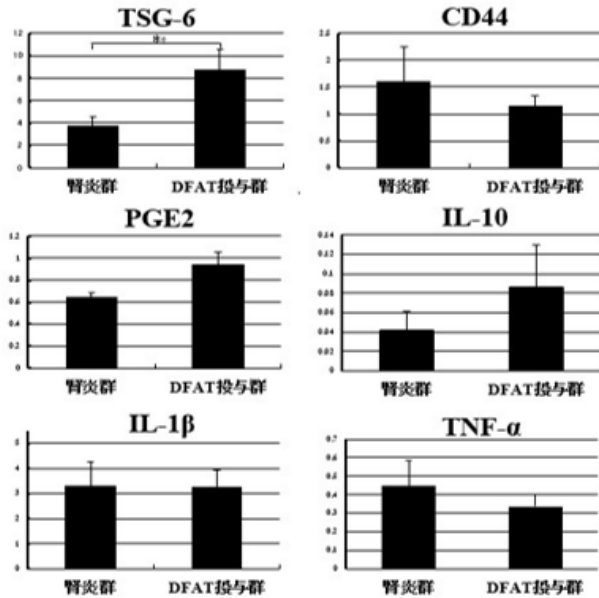


図4 移植後の各物質の発現

PGE2の発現は、腎炎群と比較し、DFAT投与群で増加傾向であった。IL-1βの発現は両群で差を認めず、TNF-αの発現は腎炎群と比較しDFAT投与群で低下傾向であった(図4)。またM1マクロファージのケモカインであるMCP-1の蛋白発現は、腎炎群と比較し、DFAT投与群において有意な発現低下(P = 0.04)を認めた(図5)。M2マクロファージに発現するケモサイトカインであるCCL-17の蛋白発現は、腎炎群と比較してDFAT投与群で有意な発現亢進(P = 0.04)を認めた(図6)。real-time PCR法でICAM, VCAMにおいては両群に優位な発現の差を認めず、脾臓細胞におけるActivated Tregの発現は両群に有意差を認めなかった。ここまでの結果をまとめると移植された間葉系幹細胞と類似するDFATが免疫性腎炎を改善する機序として、抗炎症作用をもつTSG-6の発現亢進と、M1マクロファージからM2マクロファージへの形質変換の誘導が病態の改善に関与していると考えられた。

またDFATについての催奇形性であるが、肺にはDFATがトラップされた後も肺への腫瘍形成などは認められず、現時点でのDFATによる催奇形性は認

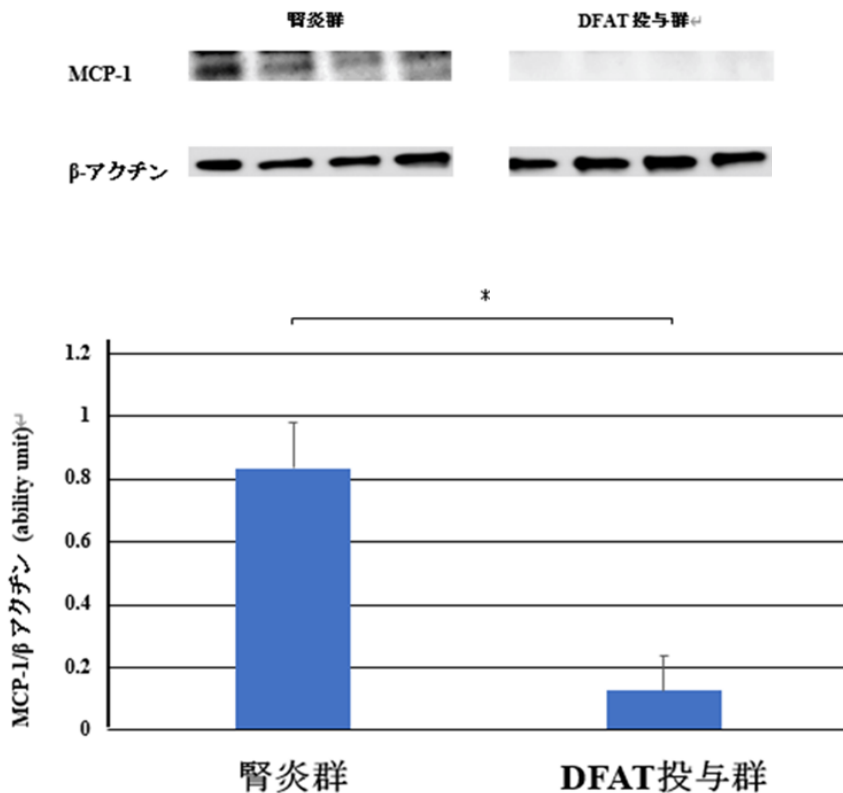


図5 移植後のMCP-1の発現

められなかった。

移植による免疫毒性の一種であるGVHDを考える手掌や足底，四肢や体幹の赤い斑点の有無，全身の皮膚の紅斑や水泡，脱落の有無といった皮膚病変や，食欲低下，嘔吐，下痢等の消化器病変，黄疸や意識障害といった消化器病変などが移植後観察されることは無かった。

これらより，DFATの細胞移植が難治性の自己免疫性腎炎に治療効果，副作用の両面から考えても臨床応用が可能であることが示唆されたと考えた。

エクソソームについての結果を以下に記す。DFATの培養上清中や治療マウスの血清内にエクソ

ソームについて検討した。前述の方法による細胞外小胞抽出キット（qEV）でDFAT培養上清中のエクソソームを回収した結果， 6.38×10^9 個/mlの豊富なエクソソームが確認された。TSG6に関係あるmiRNAとして既報では，miR214-5p，miR-1247-3p，miR-326-5p，miR204-3p，miR-23b-3pなどがある^{3,4)}。今回の我々の検証でもmiR-23b-3pはDFATおよび培養上清投与の両方において腎と肺，血清共に発現亢進を認めており既報どおりの結果である。つまり，同エクソソームがDFAT細胞移植によりまたはDFATの培養上清中に産生されそれが肺，腎臓に作用して，更にはTSG-6の産生亢進，組織修復に寄与

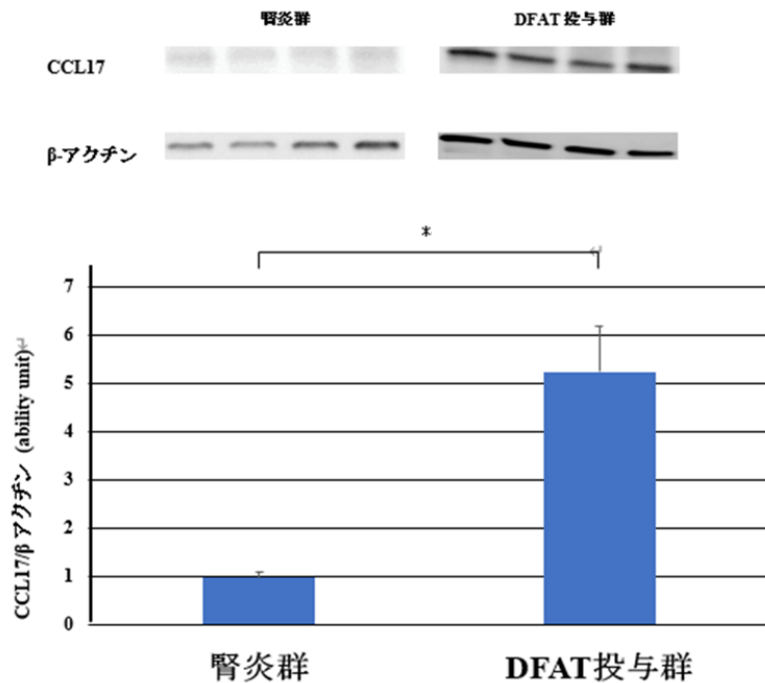


図 6 移植後のCCL-17の発現

	解析 No.	Test(分子)	Control(分母)	$\Delta\Delta Ct$ (Log2 [Test/Control])	Fold Change ([Test/Control])	Reguration	
mmu-miR-23a-3p	G1	No5 kidney	No4 kidney	-0.92	1.89	1.89	up
	G2	No5 lung	No4 lung	-0.18	1.13	1.13	up
	G3	No6 kidney	No4 kidney	-0.89	1.85	1.85	up
	G4	No6 lung	No4 lung	-0.05	1.04	1.04	up
mmu-miR-30a-5p	G1	No5 kidney	No4 kidney	-0.65	1.57	1.57	up
	G2	No5 lung	No4 lung	-1.10	2.14	2.14	up
	G3	No6 kidney	No4 kidney	-0.55	1.46	1.46	up
	G4	No6 lung	No4 lung	-0.98	1.97	1.97	up
mmu-miR-181a-5p	G1	No5 kidney	No4 kidney	0.14	0.91	1.10	down
	G2	No5 lung	No4 lung	0.38	0.77	1.30	down
	G3	No6 kidney	No4 kidney	-0.18	1.13	1.13	up
	G4	No6 lung	No4 lung	0.26	0.84	1.20	down

図 7 移植後のエクソソーム中のmiRNAの発現

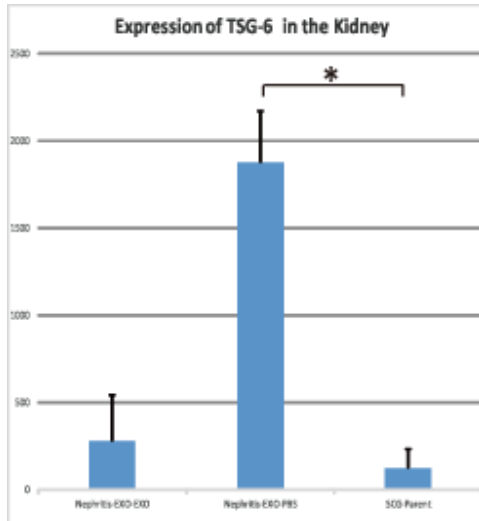


図8 エクソソーム注射後のTSG-6の発現

した可能性があり得る。miR214-5pは既報ではその発現が低下してそれによりTSG-6が亢進すると報告されている。我々の結果では、DFAT移植により血清や腎臓でその発現が低下していたのは既報どおりであったが、肺においては発現が亢進していた。miR-326-5pは既報ではその発現が亢進するとされている。我々の結果では腎臓ではその発現が亢進し、一方肺では低下していた。miR204-3pも既報では亢進すべきであるが、我々の結果では血清、腎臓、肺共に低下を認め、既報とは逆の結果であった。miR-1247-3pは既報では亢進すべきmiRNAであるが、我々の結果では血清では亢進し、腎臓、肺ではその発現は低下していた。既報と違う点は今後検討の余地があるがmiR-23b-3pは我々の結果は既報と同一であり、TSG6を更新させるメカニズムとしてこのmiRNAが最も寄与している可能性があり、DFATを直接細胞移植しなくても培養上清中にこのmiRNAの発現が確認できれば、培養上清の投与でも効果が得られる可能性がある。

さらに既報には無いTSG6に寄与するmiRNAとして、DFATの治療を行った個体に比して無治療の個体よりもmiR-23a-3p、miR-30a-5pが肺、腎臓共に発現が亢進しており、miR-181a-5pが低下している結果が得られた(図7)。TSG6発現亢進につながる、既報にはない新規のmiRNAの可能性のある注目すべき結果であり、今後頭数を増やして結果の蓄積を行っていく予定である。またDFATの培養上清中のエクソソームを疾患モデルに直接注射した後、腎臓

でのTSG-6が疾患群より有意に上昇している現象が確認出来た(図8)。エクソソームを2回投与した場合、無治療群と同程度にこれが低下していた。TSG-6の前駆物質であるTNF α も同様の結果が得られた。

4. 考察

我々の結果ではDFAT細胞移植によりTSG-6の発現が亢進して、それが免疫抑制作用を示すことが腎障害改善のメカニズムの概略である。このTSG-6がどのような形で発現が亢進して更に免疫抑制についてどのような役割を担っているかはいくつかの報告があるが、まだ完全には解明できていない^{5,6)}。

また近年、間葉系幹細胞由来のエクソソーム分泌により種々の効果が得られることが報告されている。

その一つにTSG-6の抗炎症作用の機序について、Songらによると炎症性腸疾患(IBD)モデルのデキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎マウスに脂肪組織由来MSCを腹腔内投与することで、MSCから分泌されたTSG-6がIBDを改善させ、炎症性サイトカイン(TNF α 、IL-6、IL-10など)の発現を調節した。またIBDの大腸切片とMSCをトランスウェル共培養することで、MSCから放出されたTSG-6がマクロファージM1からM2へ誘導を促進して抗炎症作用を起こしていると報告している⁷⁾。

この内容と今回の我々の結果を合わせて考えると、経静脈的に投与されたDFATが肺にトラップされDFATから分泌されたエクソソームが障害臓器まで移動することでエクソソーム内のマイクロRNAを介してTSG-6を増幅して、それがM1からM2へ誘導を促進して抗炎症作用、疾患改善をもたらした可能性が示唆された。間葉系幹細胞の一種であるDFATを全身投与した際のバラクライン効果の詳細の一端を証明できた可能性がある。

DFATの細胞治療において、当初は腎臓に直接投与して腎臓を改善することを想定していたため、腎動脈からDFATを直接投与することも行っていた。ある程度の効果はそれでも得られたが、ヒトにそれを行うことを考えると侵襲が大きくそこで静脈による全身投与を別に行った結果腎臓に直接投与するよりも治療成績が良好で、侵襲も腎臓に直接投与するよりもはるかに少なく、より臨床応用できる可能性

が高いと考えられた。しかし投与されたDFATがほとんど肺でトラップされ腎臓に到達しないにも関わらず腎症が改善する機序の詳細が不明であり、臨床応用するためにはその探索は必要と考えて、DFATを静脈から投与することを前提に研究を継続した。過去の我々の経験では、細胞を静脈に投与した場合にDFATではその数によっては肺に塞栓が起きたためか、注射後すぐに死亡する動物モデルが観られた。間葉系幹細胞をヒトに投与して疾患を投与する場合、ヒトでも同様のことが過去にも報告されておりその安全性を担保することが臨床応用では必要である。そこで今回DFATから産生されるDFATよりはるかに微小で塞栓の可能性はほぼ皆無であるため、安全性が遥かに高いエクソソームによる治療を考えて今回の結果を得た。特定のエクソソームを今後作成する技術は現在無いが今回の我々の研究で例えばDFATの培養上清中に既報のmiR-23b-3pや今回我々が見出したmiR-23a-3p, miR-30a-5pが確認され、その培養上清中のエクソソーム注射を行えば抗炎症、免疫作用が得られて、それがTSG6の発現を亢進させて、細胞の直接投与よりも安全に治療が行える可能性が今回の研究で示唆されたものであると考える。より安全な方法で治療法開発の可能性が示唆された点、今まで不明だった細胞移植後のパラクライン効果の一端を証明できた点が今回の収穫であり、臨床応用を目指して今後エクソソームについては更なる検証の蓄積が必要である。

5. 結 語

DFATの細胞移植により腎障害を改善させて、また安全性を確認することができた。腎障害について今回は免疫を機序とする腎炎について行った。糖尿病や高血圧に起因する腎障害についても、間葉系幹細胞の作用についての他の報告から障害を改善できる可能性がある。また細胞を直接投与しなくても細胞よりさらに微小な安全性の高いエクソソームを利用した治療に結び付けられる可能性があり、この治療法が腎障害に幅広く安全に行える可能性があることが示唆された。

(※この研究は、令和3年度日大学術研究助成金・総合研究の助成金交付により研究が遂行されたものです。尚、今回コロナ禍の影響もありマウスの供給が思った時期に届かないこともあり実験が予定より

も遅延したため、本来令和3年度で終了のところを令和4度にわたり研究期間延長をご許可頂き実験を継続致しました。マウスの個体数を増やして統計学的にも有意差がでるような結果であるかといった今までの得られた結果の再検証や、疾患改善に必要なエクソソームをより選択的に回収する試みとしてDFATを疾患群に注射後の血清中のエクソソームを回収、保存してそれを新たに疾患群に投与した場合、今までよりも劣らないもしくは良好な治療成績が得られるかを検討する予定でございました。しかし、前述の通り当マウスは疾患マウス故、寿命も短く、落下した衝撃でも死亡することもある、病弱であるため、非常に扱いが非常に難しいマウスでございます。繁殖も必ず成功するとは限りません。疾患マウスを直接搬入後その個体そのものを実験に使用すると搬入先である大阪からの長距離輸送のダメージで体調に影響が出来る可能性があり、搬入した個体を当施設で飼いならし、その後ペアリングのもとその代の仔マウスを里親の制度を用いて繁殖させて初めて実験に使用できるもので御座います。以前では5ペアから20～30頭以上の仔マウスを作成することに成功して、前述の通りの実験結果を得てまいりましたが、今回も同様の5ペアのマウスを購入し、導入の飼育を試みましたが結果5頭の仔マウスしか作成できず、販売元とも十分な連絡を取りましたが、十分な改善策は得られず、それ以降の実験の進行は困難な状態で研究資金が終了、1年を費やす結果となってしまいました。今後施行予定だった内容については新たに競争資金を得て実験の継続をしたいと思っております。また今回得られた研究結果の一部を文献8に掲載させて頂いたことをご報告申し上げます。今回研究の機会を与えて頂きました本学のすべての関係者の方々に心より感謝致申し上げます。)

文 献

- 1) Matsumoto T, Kano K, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008 ; 215(1) : 210-22.
- 2) Maruyama T, Fukuda N, Matsumoto T, et al. Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene 6. *Stem Cell Res*

- Ther 2015 ; 6 : 80. 1-16.
- 3) Hu Y, Li G, et al. Upregulated TSG-6 Expression in ADSCs Inhibits the BV2 Microglia-Mediated Inflammatory Response. *Biomed Res Int* 2018 ; 2018 ; 7239181.
 - 4) Miyaji T, Takami T, et al. Bone marrow-derived humoral factors suppress oxidative phosphorylation, upregulate TSG-6, and improve therapeutic effects on liver injury of mesenchymal stem cells. *J Clin Biochem Nutr* 2020 ; 66(3) : 213-223.
 - 5) Wang S, Lee C, et al. Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein ameliorates chronic liver damage by promoting autophagy formation in mice. *Exp Mol Med* 2017 ; 49(9) : e380.
 - 6) Kui L, Chan GC, et al. TSG-6 Downregulates IFN-Alpha and TNF-Alpha Expression by Suppressing IRF7 Phosphorylation in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Mediators Inflamm* 2017 ; 2017 ; 7462945.
 - 7) Song W, Qiang Li, et al. TSG-6 released from intraperitoneally injected canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate inflammatory bowel disease by inducing M2 macrophage switch in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2018 Apr 6;9(1):91.
 - 8) Utsunomiya K, Maruyama T, Shimizu S, Matsumoto T, Endo M, Kobayashi H, Kano K, Abe, Fukuda N. Implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated antineutrophil cytoplasmic antibody glomerulonephritis by immunosuppression and increases in tumor necrosis factor-stimulated gene-6. *Stem Cell Res Ther.* 2022 16;13(1):319.

アトピー性皮膚炎・慢性特発性蕁麻疹における 細胞外小胞による病態制御機構の解明

岡山吉道¹⁾, 豊島翔太¹⁾, 坂本朋美¹⁾, 高橋恭子²⁾, 葉山惟大¹⁾,
木澤靖夫³⁾, 藤田英樹¹⁾, 李賢鎬¹⁾, 丸岡秀一郎¹⁾

Elucidation of pathophysiological control mechanism in atopic dermatitis and chronic spontaneous urticaria

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Shota TOYOSHIMA¹⁾, Tomomi SAKAMOTO¹⁾,
Kyoko TAKAHASHI²⁾, Koremasa HAYAMA¹⁾, Yasuo KIZAWA³⁾,
Hideki FUJITA¹⁾, Hyunho LEE¹⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾

要旨

ヒトマスト細胞からIgE依存性の刺激で特異的に分泌される細胞外小胞内のmiR103a-3pが2型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cell: ILC2) に取り込まれ, Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) の発現を下げることによってGATA3のアルギニン残基の脱メチル化を起し, IL-33存在下のILC2においてIL-5 mRNA発現を増強し, IL-5産生を増加させることを見出した。これによって好酸球性炎症を増悪されることが示唆された。

1. はじめに

生体の維持には細胞間のコミュニケーションが必須である。その方法としては, 細胞同士の接着により刺激を伝達する機構やホルモン, 細胞増殖因子, サイトカインや脂質メディエーターなどを細胞が分泌することに加え, 細胞が遊離する数十~数百ナノメートルのサイズの細胞外小胞がある。¹⁾²⁾ 細胞外小胞は, 遠隔の細胞間のコミュニケーションを媒介し, 免疫応答や血液凝固などさまざまなプロセスに関与している。³⁾ しかしながら, アレルギー・免疫疾患患者の血清中の細胞外小胞に含まれるタンパク質, 核酸 (mRNA, microRNA [miRNA], ノン・コーディング RNA) や脂質が疾患の病勢によってどのようなダイナミックな変化を起しているのかは, 全く知られていない。今回, 私達はヒトマスト細胞からIgE依存性の刺激で分泌される細胞外小胞内のmiR103a-3pが2型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cell: ILC2) に取り込まれ, IL-33刺激によるIL-5産生を特異的に増強し, 好酸球性炎症を増悪させること, アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis; AD) 患者では血清中の細胞外小胞内miR103a-3p発現が有意に増加していることを見出した。

生命倫理に関しては, 日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会に臨床研究審査申請書を提出し, 当委員会の承認を得ている (RK-150908-12 およびRK-160112-2)。

2. 対象及び方法

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては, 日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会に臨床研究審査申請書を提出し, 当委員会の承認を得ている (RK-150908-12 およびRK-160112-2)。

(2) ヒトマスト細胞の培養

ヒト滑膜マスト細胞は, 変形性関節症の滑膜組織から分離培養した。滑膜組織を採取後ただちに2% FBS, 100 IU/mLのstreptomycin/penicillinおよび

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

3) 日本大学薬学部

岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

1% fungizoneを含んだIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) に入れ細切した。1.5 mg/mLのcollagenase type Iと0.75 mg/mLのhyaluronidaseを用いて37°Cで1時間反応させた。比重遠心によってマスト細胞の前駆細胞を単離し100 ng/mLのrecombinant human stem cell factor (rhSCF) および50 ng/mLのrhIL-6を含んだ無血清培地 (Iscove's methylcellulose mediumとIMDM) で培養した。

(3) 細胞外小胞の単離

ヒト培養滑膜マスト細胞を刺激なし、100 ng/mLのIL-33, IgE感作のみ、およびIgE感作後、抗IgE抗体で24時間刺激し細胞上清を回収した。回収した細胞上清にExoQuick-TCを添加し、一晚反応させ、6,000 x g 30分遠心を行い、EVsを単離した。

(4) ヒトILC2の単離・培養

末梢血からLSMを用いて末梢血単核球から単離し、CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD16およびCD19 Microbeadsを用いてlineage陰性細胞を単離した。この細胞からLin⁺CD45⁺CRTh2⁺CD161⁺細胞(ILC2)をFACS Aria IIuで単離した。単離したILC2をマイトマイシン処理した末梢血単核球と100 IU/mLのIL-2存在下で培養した。

(5) サイトカイン測定

ILC2の培養上清中のIL-5およびIL-13はELISAで測定した。

(6) miR103a-3p mimicおよびmiRNA mimic controlのILC2への遺伝子導入

miR103a-3p mimicおよびmiRNA mimic controlは、10 nM, Sigma-Aldrich社製を用いた。ILC2への遺伝子導入は、MISSION siRNA Transfection Reagent Sigma-Aldrich社製を用いた。

(7) mRNAの発現解析

mRNAの発現解析にはquantitative RT-PCR法を用いた。

(8) タンパク質の発現解析

タンパク質の発現解析にはウエスタンブロッティング法を用いて解析をおこなった。

(9) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

PRMT5のwild typeとmiR103a-3p結合サイトを欠損させたPRMT5を作製しmiR103a-3p mimicあるいはnonsense miRNA mimicの影響をルシフェラーゼの活性を用いて定量化した。

(10) 統計解析

3群以上の統計解析はtwo-way analysis of variance (ANOVA) およびTukey's multiple comparison testもしくはone-way ANOVAおよびTukey's multiple comparison testで行った。臨床データの2群間比較は、Mann-Whitney U testで行った。p値が0.05未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 8 (MDF, Tokyo, Japan) を使用した。

3. 結果

(1) IL-33刺激したILC2に発現するPRMT4, PRMT5およびPRMT8に対するmiR103aの影響

ILC2のIL-5, IL-13の転写はGATA3によって制御されていることが知られている。また、Hosokawaら⁴⁾は、GATA3のアルギニン残基261の脱メチル化がIL-5の転写を促進するがIL-13の転写を促進しないと報告している。そこでmiR103a-3pがILC2においてGATA3のアルギニン残基のメチル化に影響を及ぼすという仮説を立てた。miR103a-3pはprotein arginine methyltransferase (PRMT) familyの4, 5および8の3'UTRに作用できることがin silicoの検索から判明したのでこれら酵素がIL-33刺激したILC2に発現しているかを検討した。図1の如くPRMT4の発現は低くmiR103a-3pの影響はなかった。PRMT5はIL-33によって発現が増強するがmiR103a-3pの添加によって有意に発現が抑制された。PRMT8はILC2において発現が見られなかった。

(2) IgE依存性刺激後にヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞のIL-33刺激したILC2に発現するGATA3のアルギニン残基のメチル化 (symmetric dimethyl-arginine : SDMA) とPRMT5の発現に対する影響

次にmiR103a-3pの影響がPRMT5への直接作用かどうか調べるためにルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったPRMT5のwild typeとmiR103a-3p結合

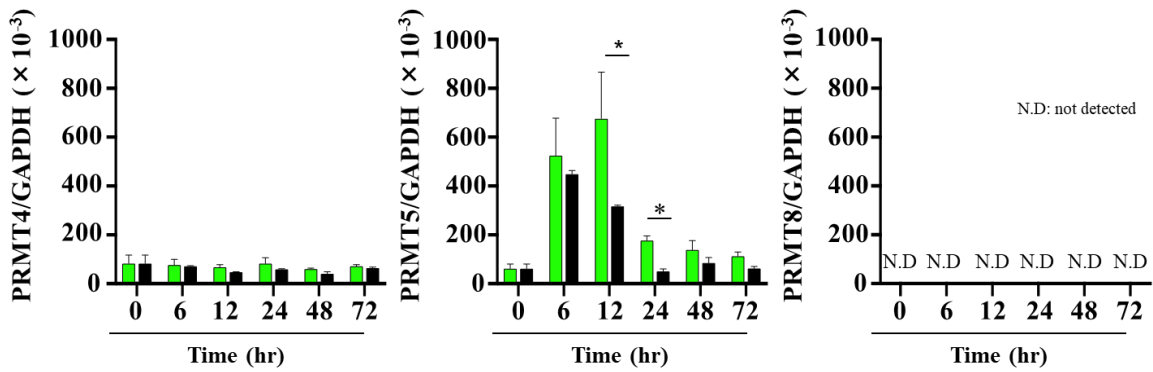


図1 IL-33刺激したILC2に発現するPRMT4, PRMT5およびPRMT8に対するmiR103aの影響。時間はIL-33刺激時間。緑のバーがmiR103a-3pの添加なし。黒が添加あり。

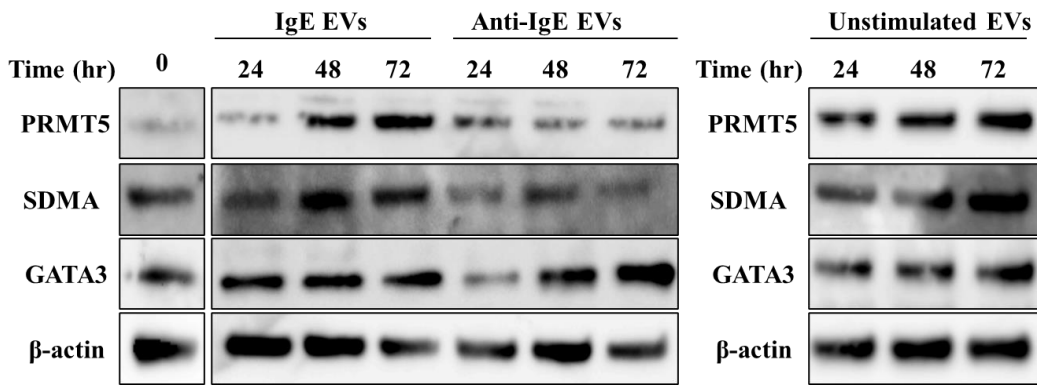


図2 IgE依存性刺激後にヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞のIL-33刺激したILC2に発現するGATA3のアルギニン残基のメチル化 (symmetric dimethyl-arginine : SDMA) とPRMT5の発現に対する影響

サイトを欠損させたPRMT5を作製しmiR103a-3p mimicあるいはnonsense miRNA mimicの影響を調べたところmiR103a-3p結合サイトを欠損させたPRMT5においてはmiR103a-3pによるルシフェラーゼ活性の低下が抑制されmiR103a-3pの影響がPRMT5への直接作用と確認された。

実際にIgE依存性刺激後にヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞がIL-33刺激したILC2に発現するGATA3のアルギニン残基のメチル化に影響を及ぼすかどうかウエスタンブロッティング法を用いて検討した。IgE依存性刺激後にヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞をIL-33刺激したILC2に添加24-72時間後にGATA3のアルギニン残基のメチル化(SDMA)は減弱しPRMT5の発現は低下した(図2)。

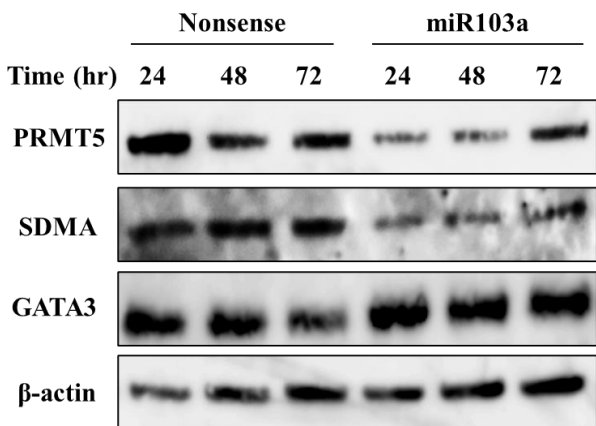


図3 miR103a-3pのIL-33刺激したILC2に発現するGATA3のアルギニン残基のメチル化への影響

GATA3タンパクの発現量には影響はなかった。

(3) miR103a-3pのIL-33刺激したILC2に発現するGATA3のアルギニン残基のメチル化への影響
次にmiR103a-3pが直接IL-33刺激したILC2に発現するGATA3のアルギニン残基のメチル化を減弱させるかを検討した。図3の如くmiR103a-3pが直接IL-33刺激したILC2に発現するGATA3のアルギニン残基のメチル化を減弱させ、PRMT5の発現を低下させた。

(4) IL-33刺激したILC2からのIL-5産生に対するPRMT5の発現低下の影響
最後にPRMT5の発現を減弱させるとIL-5の産生が増加するかについて検討を行った。IL-33刺激したILC2にshRNAの技術を用いてPRMT5の発現を低下させると図4のように確かにIL-5の産生は増加するがIL-13の産生には影響がないことが分かった。

4. 考 察

以上の結果からIgE依存性刺激にてヒトマスト細胞から遊離させる細胞外小胞内miRNAは、刺激なしや他の刺激とは異なるmiRNAを含有し、免疫細胞

機能を制御（この場合アレルギー炎症を増強）していることがわかった。実際にマスト細胞が活性化されているAD患者の血清中の細胞外小胞内miR103a-3pの発現が有意に増加していることを見出した。⁵⁾したがってAD患者では、患者の全身の皮膚において好酸球炎症を増強していると考えられた。

5. 結 語

ヒトマスト細胞からIgE依存性の刺激で特異的に分泌される細胞外小胞内のmiR103a-3pがILC2に取り込まれ、Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5)の発現を下げることによってGATA3のアルギニン残基の脱メチル化を起し、IL-33存在下のILC2においてIL-5 mRNA発現を増強し、IL-5産生を増加させることを見出した。これによって好酸球性炎症を増悪されることが示唆された。

謝 辞

本研究の成果は、令和3、4年度日本大学学術研究助成金〔総合研究〕の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116:281-97.
- 2) Makeyev EV, Maniatis T. Multilevel regulation of gene expression by microRNAs. *Science* 2008; 319:1789-90.
- 3) Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9:654-9.
- 4) Hosokawa H, Kato M, Tohyama H, Tamaki Y, Endo Y, Kimura MY, et al. Methylation of Gata3 protein at Arg-261 regulates transactivation of the Il5 gene in T helper 2 cells. *J Biol Chem* 2015; 290:13095-103.
- 5) Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Kurosawa Y, Hayama K, Matsuda A, Watanabe Y, Terui T, Gon Y, Matsumoto K, Okayama Y: miR103a-3p in extracellular vesicles from Fc ε RI-aggregated human mast cells enhances IL-5 production by group 2 innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol* 2021; 147: 1878-1891.

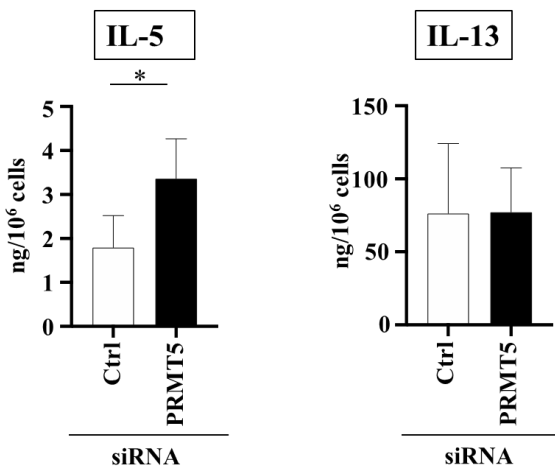


図4 IL-33刺激したILC2からのIL-5産生に対するPRMT5の発現低下の影響

重症アレルギー疾患患者に対する抗IgE抗体治療の コンパニオン診断薬の開発

岡山吉道¹⁾, 丹羽悠介¹⁾, 葉山惟大¹⁾, 丸岡秀一郎¹⁾, 木澤靖夫²⁾, 高橋恭子³⁾, 權寧博¹⁾

Development of companion diagnostic medicine for treatment of severe allergic patients with anti-IgE antibody

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Yusuke NIWA¹⁾, Koremasa HAYAMA¹⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾,
Yasuo KIZAWA²⁾, Kyoko TAKAHASHI³⁾, Yasuhiro GON¹⁾

要旨

慢性特発性蕁麻疹の治療薬であるヒト化抗IgE抗体（オマリズマブ）の投与前に治療効果を予測できるbiomarkerおよびオマリズマブの投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerの測定系としてfree IgEの酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）の測定系を最適化し、感度が1.17 ng/mLとなる臨床検体の測定系が確立できた。オマリズマブ投与前のfree IgEの測定はオマリズマブ投与開始8～12週間後の治療効果を判定できた。しかしながら、臨床血液検査で測定している血清IgE値（オマリズマブと結合したIgEとfree IgEの総和: total IgE）においてもオマリズマブ投与前のtotal IgEの測定はオマリズマブ投与開始8～12週間後の治療効果を判定できた。free IgEのカットオフ値は、133.3 ng/ml、感度は、57.1%、特異度は、85%であった。total IgEのカットオフ値は、327.6 ng/ml、感度は、71.4%、特異度は、72.5%であった。free IgE値が133.3 ng/ml以上でオマリズマブの治療効果が得られることが分かった。

1. はじめに

我が国の全喘息患者（300万人）のなかで高容量吸入ステロイド薬と長時間作用性β刺激薬等の長期管理薬の併用でも効果不十分な難治性喘息は、約34～35万人いる。この患者の治療費は、全喘息患者の治療費の七割を占めているため難治性喘息患者の医療費の削減が喫緊の課題である。難治性喘息患者の治療薬として使用されているヒト化抗IgE抗体（オマリズマブ）は、日本での売上額は50億円であり、患者の1カ月の医療費は30万円にもおよび、投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerは存在せず年余に渡り投与されている。従って副作用の頻度も上昇する。さらに、我が国で慢性特発性蕁麻疹と診断された患者の中で重症患者は5～6万人と推定されており、オマリズマブは重症患者に適応があり、

その患者の約7000人に年余に渡り投与されており、その減薬方法は確立されていない。我が国にてオマリズマブは、既存薬で効果が不十分な重症花粉症の適応となり、その患者数は国内に200～300万人いると推定されている。既に私達は、オマリズマブの投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerの測定系を実験室レベルで確立しており¹⁾、これはオマリズマブと結合していないIgE（free IgE）の測定系である。オマリズマブと結合したIgEは、マスト細胞や好塩基球を活性化できないが、free IgEはこれら細胞に結合し抗原に結合するとこれら細胞を活性化させる。臨床血液検査で測定している血清IgE値はオマリズマブと結合したIgEとfree IgEの総和である。今回さらに感度が高く安定したfree IgEの測定系（コンパニオン診断薬）を確立させ、free IgEが、

1) 日本大学医学部

2) 日本大学薬学部

3) 日本大学生物資源科学部

岡山吉道：okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

慢性特発性蕁麻疹の治療薬であるオマリズマブの投与前に治療効果を予測できるbiomarkerとなりうるかどうかを判定することを本研究課題の目的とする。

2. 対象及び方法

1. free IgE測定のための私達が実験室レベルで確立した酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) ¹⁾ の最適化

1-1. プレートに固定化するリコンビナント可溶性FcεRIα鎖濃度の最適化

(1) リコンビナント可溶性FcεRIα鎖をプレートに固定化する際、種々濃度のリコンビナント可溶性FcεRIα鎖 (0.03 ~ 0.50 µg/well) を含むコーティングバッファーを調製した。リコンビナント可溶性FcεRIα鎖は、CHO細胞にFcεRIα鎖を強制発現させて、その細胞上清をconcentratorにより濃縮後、抗FcεRIα鎖抗体 (clone CRA1) と affinity column を用いて精製した。ウエスタンブロッティング法 (WB) で精製を確認した。

(2) 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。

(3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

1-2. ブロッキングバッファーの最適化

(1) 種々のブロッキング溶液 (種々の濃度のFBS/PBS, BSA/PBS) を調製した。

(2) それぞれ等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。

(3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

1-3. サンプル濃度の最適化

(1) サンプルのマトリックスに極力近い標準希釈液を調製した。

(2) それぞれ等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。

(3) 標準曲線で適切なダイナミックレンジを確認し、サンプルの希釈直線を確認した。

(4) スパイク回復または希釈直線試験を行った。マトリックス効果を示す干渉物質の除去を行った。

1-4. 検出抗体濃度と酵素複合体の最適化

(1) 種々の濃度の検出抗体 (種々の clone や poly-

clonalのHRP標識抗IgE抗体) を含む標準希釈液を調製した。各基質に対する濃度範囲内の濃度に設定した。各種酵素複合体結合抗IgE抗体として clone 4F4, clone 1A2, clone 4C3, clone M94176, polyclonal抗体を用いた。

(2) 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。

(3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

1-5. シグナル検出の最適化

(1) サンプル中の抗原想定量や使用機器による抗原検出能力に基づいて、基質を選択した。

(2) 作業溶液をプレートへ添加してELISAを実行した。

(3) 抗原が全ダイナミックレンジにわたり確実に検出可能か検討した。

1-6. 希釈標準液の最適化

(1) 種々濃度の酵素複合体を含む標準希釈液を調製した。各基質に対する濃度範囲に対応した濃度に設定した。

(2) 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。

(3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

2. free IgE測定系のバリデーションの評価

日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会に小臨床試験の新規申請をし、承認を得た (RK-150908-12)

重症慢性特発性蕁麻疹患者の血清を用いて開発したELISAの分析法バリデーションを評価した。分析法バリデーション試験は以下の省令やガイダンスに従った。

・厚生省令第21号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」

(平成9年3月26日、一部改正 厚生労働省令第114号 平成20年6月13日) 準用・「トキシコキネティクス (毒性試験における全身曝露の評価) に関するガイダンスについて (平成8年7月2日薬審第443号)」準拠

以下の項目について評価した。

1) 検量線の作製

2) 定量下限の決定

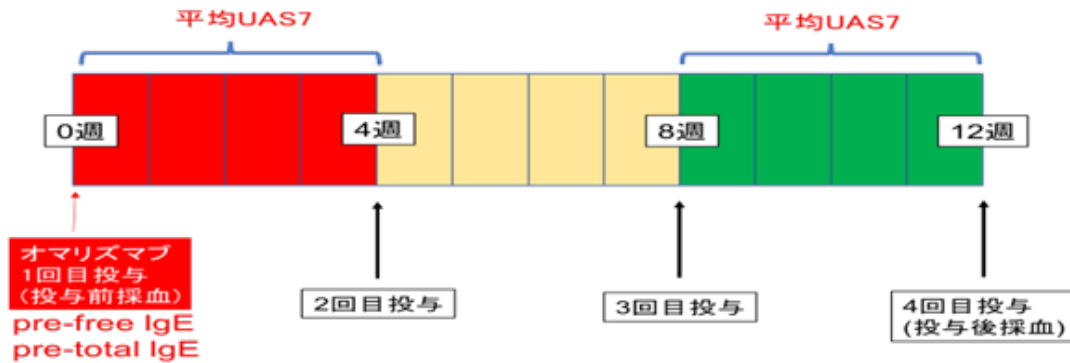


図1 臨床研究プロトコール

- 3) 日差再現性
- 4) 感度
- 5) 確認アッセイ
- 6) 抗体価算出

3. オマリズマブ投与前のfree IgE値 (pre-free IgE) とtotal IgE値 (pre-total IgE) とオマリズマブ治療効果の関連に関する解析

当該研究は、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会に臨床試験の申請をし、承認を得た (RK-150908-12) 図1のようにオマリズマブ1回目投与前に採血し、pre-free IgEとpre-total IgEを測定した。オマリズマブ2回目投与までの4週間のUAS7の平均値とオマリズマブ投与3回目から4回目までのUAS7の平均値を用いて治療効果を判定した。平均UAS7が6以下をresponder, 6より大きい場合をnon-responderとし、responderとnon-responderの2群間においてpre-free IgE値とpre-total IgE値に有意差があるかどうか評価した。

3. 結果

1. 私達が実験室レベルで確立したfree IgEの酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) ¹⁾ の最適化

1-1. プレートに固定化するリコンビナント可溶性FcεRIα鎖濃度の最適化

リコンビナント可溶性FcεRIα鎖の至適濃度は0.50 μg/well (PBSで希釈) であった。至適インキュベーション温度と時間は、4℃にて16時間であった。

1-2. ブロッキングバッファーの最適化

ブロッキングバッファーの最適条件は、PBS/0.5%

Casein, Wash Bufferは、PBS/0.05% Tween-20と決定した。至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて16時間であった。

1-3. サンプル濃度の最適化

血清をSample Diluent (PBS/0.05% Tween-20, 0.5% Casein) で希釈しオマリズマブ投与前は血清を40倍希釈。オマリズマブ投与後は血清を10倍希釈が至適条件であった。至適インキュベーション温度と時間は、4℃にて16時間であった。

1-4. 検出抗体濃度と酵素複合体の最適化

検出抗体は、HRP標識マウス抗ヒトIgE抗体clone M94176 (Fitzgerald Industries International, North Acton, MA, USA) と決定し、検出抗体をPBS/0.5% Caseinで1/1000に希釈が至適条件と決定した。至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて1時間であった。

1-5. および6. シグナル検出の最適化および希釈標準液の最適化

TBS (Sera Care, Milford, MA, USA) を用いて至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて30分であった。以上より高感度free IgE測定系 (コンパニオン診断薬) は、確立できた。

2. free IgE測定系のバリデーションの評価

1) 検量線の作製

検量線の作製にはimmunoCAP 総IgE (#10-9387-10 ファディア社) を用いた。300 ng/mLから150 ng/mL, 75 ng/mL, 37.5 ng/mL, 18.75 ng/mL,

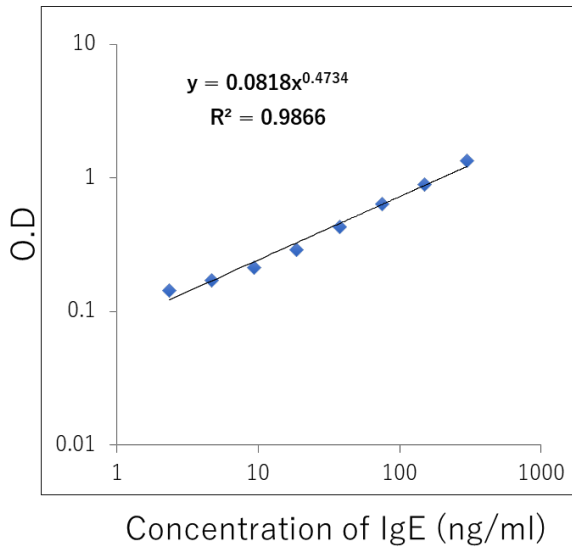


図2 free IgE ELISAの検量線

9.375 ng/mL, 4.688 ng/mL, 2.344 ng/mLと段階希釈して使用した(図2) Human myeloma IgE (Meck Millipore, Darmstadt, Germany) を検量線の作製に用いた場合に比較してimmunoCAP 総IgE (#10-9387-10 ファディア社)の方が感度がよかった。

2) 定量下限の決定

定量下限は、検量線から2.344 ng/mLと決定した。

3) 日差再現性

表1は、1週間の間隔をあけて2回同一のサンプルのfree IgE値 (IU/ml) を測定した結果である。Nはnormal healthy control (健常人) を指す。健常人4名において日差の再現性は確認できた。

4) 感度

Human myeloma IgE (Meck Millipore, Darmstadt, Germany) を検量線の作製に用いた場合に比較してimmunoCAP 総IgE (#10-9387-10 ファディア社)の方が感度がよかった。検量線スタンダードの最小値の1/2である1.17 ng/mLを感度とした。

5) 確認アッセイ

omalizumab投与前の慢性特発性蕁麻疹患者のfree IgE値 (pre free IgE) は、血清IgE値に相当するので受託臨床検査会社であるエスアールエル株式会社 (SRL) に外注しその測定値 (pre total IgE) と比較したところ、図3の如く相関係数は0.8198であった。

表1 free IgE 測定値の日差再現性

sample #	1回目free IgE測定値 (IU/ml)	2回目free IgE測定値 (IU/ml)
N96	102.89732	95.6919546
N99	207.93215	325.946815
N101	41.487436	47.3377897
N102	952.29925	1181.83206

P < 0.0001
r = 0.8198

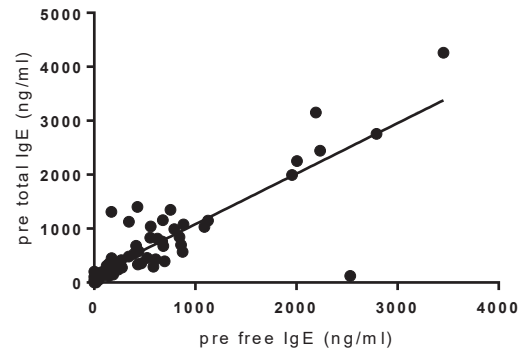


図3 pre free IgE 値とpre total IgE 値の相関

6) 抗体価算出

3.4 ng/mLは1 IU/mLに相当し抗体価はIU/mLで表した。

7) 凍結融解安定性

表2の如く、凍結サンプルと凍結融解を繰り返したサンプルでは測定値に大きな差が認められ、測定には-20℃以下で凍結保存したサンプルでなければならないことが明らかとなった。

表2 凍結融解安定性

サンプル番号	濃度(IU/ml) 凍結サンプル	濃度(IU/ml) 凍結融解サンプル
C197	367.422291	176.426263
C208	260.443437	120.592118
C216	571.457588	104.143648
C226	142.474057	69.7607231
C242	172.595234	74.6027514

3. オマリズマブ投与前のfree IgE値 (pre-free IgE) とtotal IgE値 (pre-total IgE) とオマリズマブ治療効果の関連に関する解析

その結果, 図4に示すように投与開始0~4週間後の平均UAS7で分類したresponderとnon-responderではpre-free IgE値, pre-total IgE値は有意差がなかった。

次に図5に示すようにオマリズマブ投与開始8~

12週間後の平均UAS7で分類したresponderとnon-responderの2群間でのpre-free IgE値, pre-total IgE値の有意差検定を行った。

オマリズマブ投与開始8~12週間後の平均UAS7で分類したresponderとnon-responderの2群間でのpre-free IgE値, pre-total IgE値は両者ともresponder群で有意に高かった。pre-free IgEのカットオフ値は, 133.3 ng/ml, 感度は, 57.1%, 特異度は, 85%

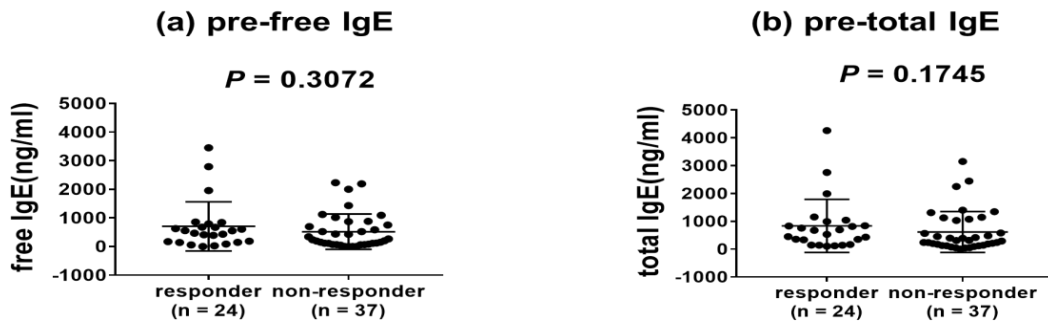


図4 オマリズマブ投与開始0~4週間後の平均UAS7で分類したresponderとnon-responderの2群間でのpre-free IgE値, pre-total IgE値の有意差検定

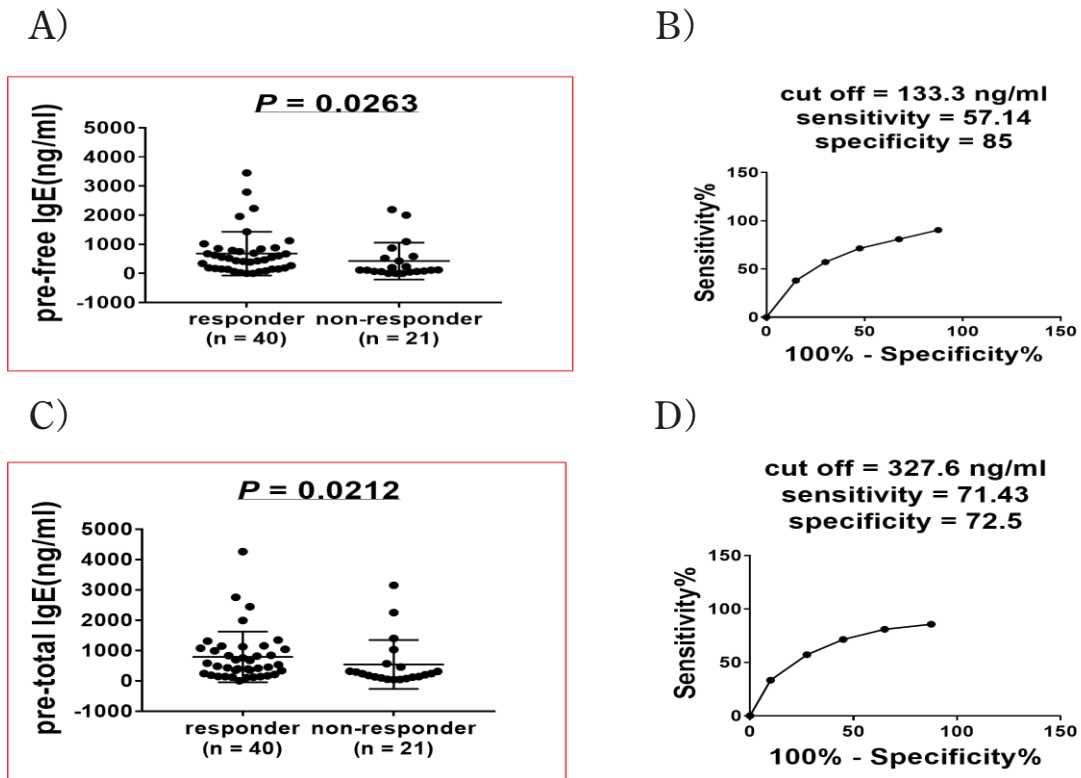


図5 オマリズマブ投与開始8~12週間後の平均UAS7で分類したresponderとnon-responderの2群間でのpre-free IgE値, pre-total IgE値の有意差検定(それぞれAとC)およびそれぞれのカットオフ値, 感度と特異度(それぞれBとD)

であった。pre-total IgEのカットオフ値は、327.6 ng/ml、感度は、71.4%、特異度は、72.5%であった。

4. 考 察

慢性特発性蕁麻疹の治療薬であるオマリズマブの投与前に治療効果を予測できるbiomarkerおよびオマリズマブの投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerの測定系としてfree IgEの酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) の測定系を最適化し、感度が1.17 ng/mLとなり、この感度は臨床検体の測定に十分使える系が確立できたとと言える。

free IgEが、慢性特発性蕁麻疹の治療薬であるオマリズマブの投与前に治療効果を予測できるbiomarkerとなりうるかどうかを判定するためにオマリズマブ投与前のfree IgEの測定し、オマリズマブ投与開始0～4週間および8～12週間後の平均UAS7で分類したresponderとnon-responderの2群間で有意差検定を行ったがオマリズマブ投与開始0～4週間後では有意差は認められなかったが、オマリズマブ投与開始8～12週間後の治療効果は予測できた。しかしながら臨床血液検査で測定している血清IgE値 (total IgE) においてもオマリズマブ投与前のtotal IgEの測定はオマリズマブ投与開始8～12週間後の治療効果を判定できた。この結果はChuangらの報告²⁾と合致していた。pre-free IgEのカットオフ値は、133.3 ng/ml、感度は、57.1%、特異度は、85%であった。すなわちpre-free IgE値が133.3 ng/ml以上でオマリズマブの治療効果が得られることが分かった。pre-total IgEのカットオフ値は、327.6 ng/ml、感度は、71.4%、特異度は、72.5%であった。従ってpre-free IgEのカットオフ値はpre-total IgEのカットオフ値より特異度は高かったが感度は低く、慢性特発性蕁麻疹に対してオマリズマブの治療効果を判定するbiomarkerとしてpre-free IgEがpre-total IgEに勝るものではなかった。現在オマリズマブ投与3回目の際に採血しpost-free IgEとpost-total IgEを測定しオマリズマブの投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerとなるかを検討中である。

5. 結 語

慢性特発性蕁麻疹の治療薬であるオマリズマブの投与前に治療効果を予測できるbiomarkerおよびオマリズマブの投与中の薬剤減量の目安となるbio-

markerの測定系としてfree IgEの酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) の測定系を最適化し、感度が1.17 ng/mLとなる臨床検体の測定系が確立できた。しかしながら、慢性特発性蕁麻疹に対してオマリズマブの治療効果を判定するbiomarkerとしてpre-free IgEがpre-total IgEに勝るものではなかった。

謝辞

本研究の成果は、令和4-5年度日本大学学術研究助成金 [社会実装研究] の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します

文 献

- 1) Ito R, Gon Y, Okayama Y, et. al. Development of assay for determining free IgE levels in serum from patients treated with omalizumab. *Allergol Int.* 2014;63 (Suppl 1) :37-47.
- 2) Chuang KW, Hsu CY, Huang SW, Chang HC. Association Between Serum Total IgE Levels and Clinical Response to Omalizumab for Chronic Spontaneous Urticaria: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2023;11 (8) :2382-2389.

病理標本の膜厚測定機器開発

— 膜厚標準化による標的分子評価と人工知能体系の適正化に関する研究 —

増田しのぶ¹⁾, 中西陽子¹⁾, 廣谷ゆかり¹⁾, 菊池加穂里¹⁾,
阿部仁²⁾, 向井規浩²⁾, 西川喜久³⁾

A study of development of a device to evaluate the tissue thickness of pathological sections: For adequate evaluation of biomarkers and basic platform for artificial intelligence systems by standardization of tissue thickness

Shinobu MASUDA¹⁾, Yoko NAKANISHI¹⁾, Yukari HIROTANI¹⁾, Kaori KIKUCHI¹⁾,
Hitoshi ABE²⁾, Norihiro MUKAI³⁾, Yoshihisa NISHIKAWA³⁾

要旨

病理標本の膜厚測定機器開発を行いプロトタイプ1号機についての動作確認、精度評価を行った。プロトタイプ1号機は、接触式センサーを用い、10枚連続測定可能な仕様とした。1枚のホルマリン固定パラフィン切片 (FFPE) について、スライドガラス表面を基点としてFFPEの膜厚を4点測定し、その平均値をFFPEの厚みとして測定結果を得た。求められる膜厚測定の精度には、大幅な改善の余地があることが明らかになった。今後、測定部の精度を向上させたプロトタイプ2号機を開発し、動作確認、精度評価を行う。

1. はじめに

病理診断は、身体から採取された組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片 (formalin fixed paraffin embedded sections, FFPE) を用いて行なわれる。組織内の状態を適切に観察するための第一段階として、適切な検体取扱いとともに、適切な標本作製が重要となる。

本研究開始の契機となった乳癌診療においては、バイオマーカーであるホルモン受容体 (エストロゲン受容体, ER; プロゲステロン受容体, PgR), HER2の発現状況と増殖活性マーカーである Ki67陽性率によって、薬物療法の治療選択が行われる。すなわち、ER陽性症例には抗ホルモン薬が、HER2蛋白高発現あるいはHER2遺伝子増幅を伴う症例には抗HER2抗体療法が、また、いずれも陰性の症例には、抗がん剤の適応となる。HER2蛋白に対する免疫染

色結果により抗HER2抗体療法の適応が決定されるため、その精度管理が重要となる¹⁾。

以上のように、病理診断、免疫組織化学的検討において、膜厚は重要な要素であるにもかかわらず、現在まで十分な精度管理の対象となっていない。通常、FFPE切片の薄切は、ミクロトームを用いて厚みを設定して行われる。しかしながら、実際の膜厚は、薄切環境 (湿度や温度) により影響を受けることが知られており、実際に薄切されたFFPEの膜厚は不明である。よって、われわれは、膜厚コントロールシステムの開発が喫緊の課題であるとの認識に至り、本研究を開始することとなった。

2. 対象及び方法

(1) 本研究による開発機器のコンセプト

現在、膜厚測定用の先行機器は存在しない。工業

1) 日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野

2) がん研有明病院臨床病理センター

3) (株)西川精機製作所

増田しのぶ: masuda.shinobu@nihon-u.ac.jp

表 1 工業用測定システムとの対比による本研究開発機器のコンセプト

	工業用測定システム	本研究開発機器
測定範囲	～ 80 μm	4 μm ± 10% 誤差を中心する範囲
機器の使用目的	工業製品に対して汎用的使用を想定	膜厚測定に限定
価格	高価	市中病院で購入可能な価格帯

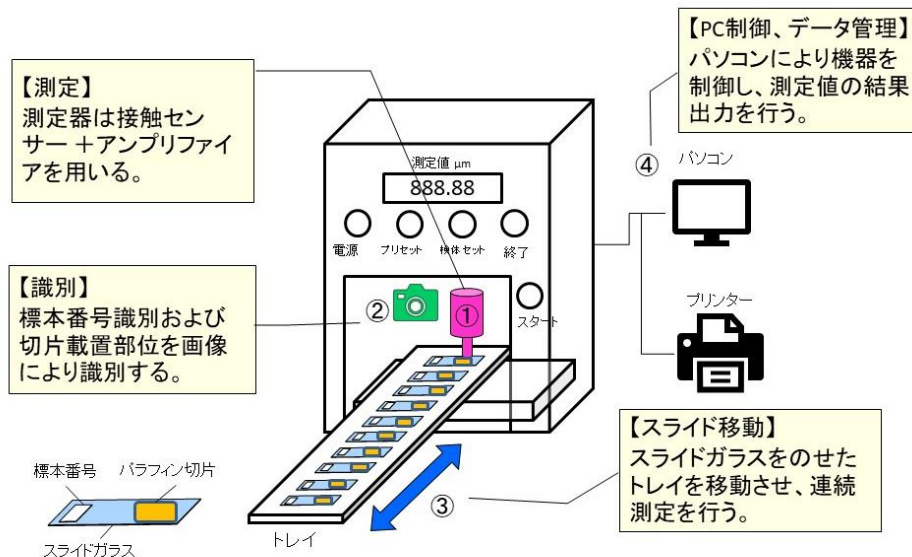


図 1 膜厚測定機器の開発計画

用の非接触表面・層断面形状計測システム（光干渉方式初高精度表面形状計測）との対比により、本研究による開発機器のコンセプトについて検討した（表1）。

(2) 本研究における機器開発の構想

本システムを、①測定部、②標本識別部、③スライド移動部、④PC制御、データ管理部から構成することとした（図1）。

(3) 工業用測定システムによる膜厚測定結果と比較検討することにより、精度評価を行った。

3. 結果

搬入されたプロトタイプ1号機（図2）について、以下の検討を行った。

(1) 機器の動作確認

①測定部、②標本識別部、③スライド移動部、④PC制御、データ管理部それぞれについて、動作確認を行い、設計通りに動作することが確認された。

(2) 測定精度の評価

薄切機器マイクロームで4μmに設定し、あらかじめ工業用測定システムにより膜厚を測定したFFPE標本10枚について、開発機器により膜厚を測定し、以下の結果を得た。FFPEの時間的経過による変化の有無をみるために、同一切片について、13回（8/23～9/28）測定した。

a. 測定結果の概要

現時点での膜厚測定結果は、大きく改善が必要なレベルであった（図3）。

b. 時間的経過によるFFPEの膜厚変化の有無

時間的経過による大きな変化は認められなかった（図4）。

c. 検体毎の測定値の差異

検体によって、測定値に多少の差異が指摘された（図5）。

d. 測定部位による測定値の差異

測定部位によって、膜厚には統計学的に有意差が指摘された（p<0.05）。スライドガラス切片の対角



図2 プロトタイプ1号機
((株)西川精密製作所納品報告書、取扱説明書より)

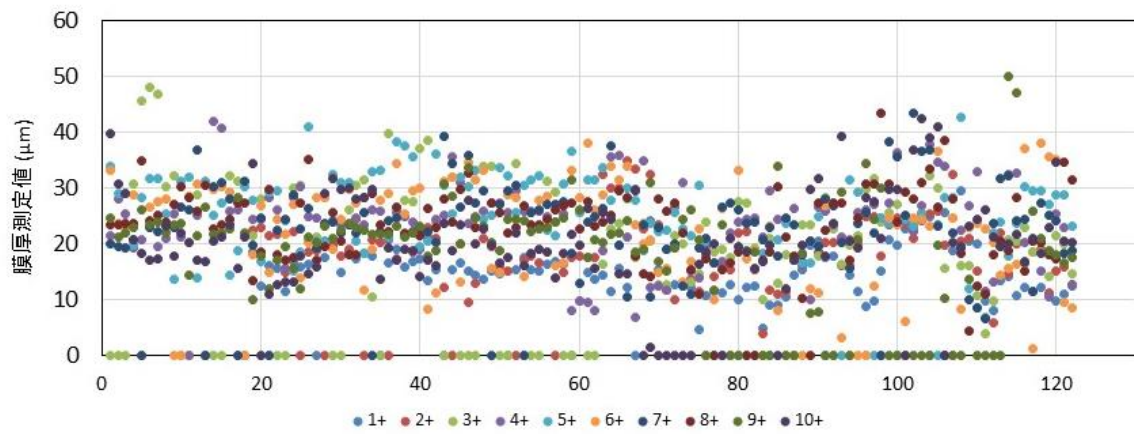


図3 プロトタイプ1号機の測定値分布

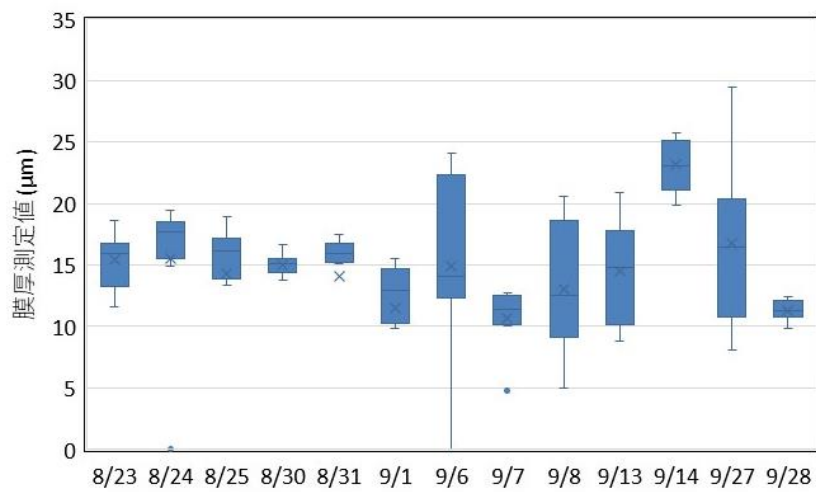


図4 時間的経過による膜厚の変化(サンプル1)(2022年)

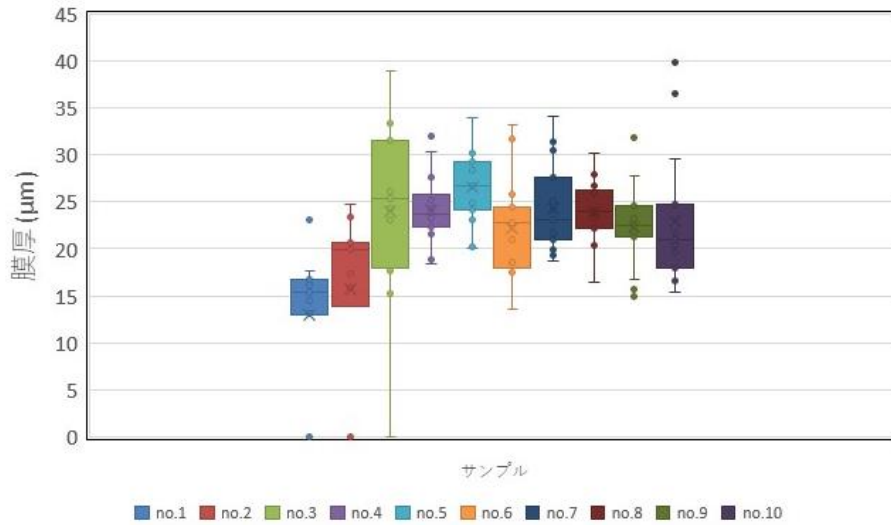


図5 サンプル毎の膜厚測定値

線上の測定値が近似していることから、測定時に何らかのゆがみが生じている可能性が示唆された（図6）。

e. 膜厚測定部位の確認

本開発機器においては、測定部位を確認すること

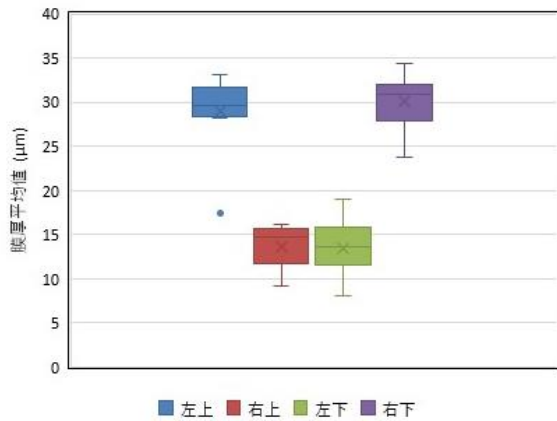


図6 部位別膜厚測定値

ができる仕様となっている。測定部位は仕様通りFFPEの4点となっていることが確認された（図7）。

4. 考 察

膜厚側の機器プロトタイプ1号機の精度は、大幅な改善の余地があるものであった。原因として考えられた点は、次の通りである。(1) 1度に10枚の連続測定を可能な仕様としたため、スライド移動部のカートリッジの剛性が測定誤差に影響を与えた可能性がある。(2) 容易にスライドガラスを着脱できるよう、スライドガラスを静置するカセットは浅く固定されていない仕様となっていたが、接触式センサーがスライドガラスに接触した際に、スライドガラスがZ軸方向に移動し、精度誤差に影響を与えた可能性がある。(3) ゼロ点の測定は、10枚測定の最初の1回となる仕様であったが、スライドガラス毎にゼロ点の測定が必要であった。

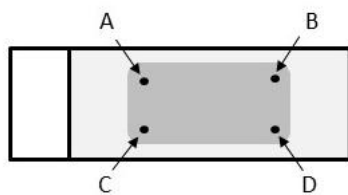


図7 測定部位の確認

以上の検討の結果、まずは、測定部の精度向上に開発の焦点を絞り、1枚のスライドガラス測定に限定したプロトタイプ2号機の開発を行うこととなった。

5. 結 語

病理標本の膜厚測定機器開発を行いプロトタイプ1号機についての動作確認、精度評価を行った。今後、測定部の改良を行ったプロトタイプ2号機の動作確認、精度評価を行う。

謝辞

本研究は、日本大学学術研究助成金（社会実装研究）の助成をうけて行った。

文 献

- 1) Masuda S, Suzuki R, Kitano Y, et al. Tissue Thickness Interferes With the Estimation of the Immunohistochemical Intensity: Introduction of a Control System for Managing Tissue Thickness. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2021; 29: 118-126.

臨床グレード脱分化脂肪細胞 (DFAT) 製造用 ゼノフリー培地の開発

松本太郎¹⁾, 副島一孝²⁾, 檜村勉²⁾, 李予昕¹⁾, 風間智彦¹⁾,
萩倉一博¹⁾, 山元智衣¹⁾, 長岡悠紀¹⁾

Development of xeno-free media for the production of clinical grade dedifferentiated fat cells (DFAT)

Taro MATSUMOTO¹⁾, Kazutaka SOEJIMA²⁾, Tsutomu KASHIMURA²⁾, Yuxin LI¹⁾,
Tomohiko KAZAMA¹⁾, Kazuhiro HAGIKURA¹⁾, Chii YAMAMOTO¹⁾, Yuki NAGAOKA¹⁾

要旨

成熟脂肪細胞から「天井培養法」により誘導される脱分化脂肪細胞 (DFAT) は、間葉系幹細胞 (MSC) に類似した多能性細胞である。DFATは少量の脂肪組織から均質な治療用細胞を大量に作る事ができることから、実用性の高い再生医療の細胞源として期待できる。我々は、ウシ胎仔血清 (FBS) の代替としてヒト血小板溶解物 (hPL) を用いることにより、動物由来成分を含まずDFATの調製を可能とする「ゼノフリー培地」の開発に成功した。また臨床グレードDFATを効率良く製造できるhPLの至適濃度や基礎培地の検討を行った。さらに健常ボランティア脂肪組織を用いたDFATの試験製造を行い、再現性よく臨床グレードDFATが製造できることを確認した。このような調製培地の最適化により従来法に比べより安全で高効率にDFATを調製できることが明らかになった。

1. はじめに

再生医療によく用いられる間葉系幹細胞 Mesenchymal stem cells (MSC) は患者自身の骨髓液や脂肪組織などから培養調製でき、移植安全性が高いため、広く臨床応用が行われている。一方、MSCは患者の年齢や病状により細胞の品質にばらつきが生じやすく、均質性が低いといった問題点がある。MSCによる細胞治療を普及させるためには、簡便・安価に大量調製可能で、患者を選ばず均質で安定した性能を示すMSC製造技術の確立が望まれる。

Matsumotoら¹⁾は、成熟脂肪細胞を天井培養法という方法で培養することによって得られる脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cells: DFAT) が、MSCに類似した高い増殖能と多分化能を獲得することを明らかにした。DFATは、①患者の年齢や基礎疾患に影響されず安定的に調製できる、②少量の脂肪組

織サンプルから高効率に大量調製できる、③初代培養から均質な細胞が得られる、といった利点を有することから実用性の高い治療用細胞ソースとして有望であると考えられる。我々の研究グループでは、自施設内に設置された細胞加工施設 (CPF) においてアイソレータを用いた臨床グレードのDFAT製造法を確立し、2020年より重症下肢虚血患者を対象とした自家DFATを用いた血管再生細胞治療のFirst-in-Human臨床試験を実施中である。DFAT細胞治療を広く社会実装するためには、汎用性が高く、より安全、安価にDFATを調製する技術が求められる。

培養細胞を人体に移植する際には、安全性の観点から、その培地や調整試薬には動物由来の成分が含まれないいわゆる「ゼノフリー」が望ましいとされている。従来のDFAT調製法では、ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum: FBS) を含んだ培地の使用が必

1) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

2) 日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野

松本太郎: matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

須であった。このため最終製品の梱包時に十分な洗浄操作を行い、最終製品からウシ由来タンパク質を除去する必要があった。そしてこの洗浄操作により、最終製品の細胞数が大きく減少してしまうという問題点があった。また十分な洗浄を行っても最終製品中のウシ由来成分を完全に除去することはできないため、ウシ蛋白にアレルギーがある患者には投与できないなど、移植安全性に問題が残った。我々は、種々の培養条件を検討した結果、血清代替物として、ヒト血小板溶解物 (Human platelet lysate, hPL) を用いることにより、成熟脂肪細胞から DFAT を誘導し増殖させることができることを明らかにした。本研究では、臨床グレード DFAT 製造法の最適化を目指し、hPL の至適濃度や基礎培地の検討を行った。また健常ボランティア脂肪組織を用いた DFAT の試験製造を行い、安定的に臨床グレード DFAT が製造できるか検証した。

2. 対象及び方法

研究は、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て実施した (承認番号: RK-160209-6, RK-220111-1)。ヒト脂肪組織は被験者より同意取得後、脂肪吸引により採取された脂肪組織の提供を受け実験に使用した。実験プロトコルの概要を図1に示す。

脂肪組織 2mL をコラゲナーゼ (Liberase MNPS GMP grade, Roche) にて 37°C, 30 分間処理後、セルストレーナーを用いて未消化組織を濾過した。その後、低速度遠心分離 (135 × g, 1 分間) を行い、成熟脂肪細胞を浮遊層として単離した。天井培養には以下の組成の培地を用いた。血清代替物として、hPL は ① UltraGRO™-PURE (UltraGRO, AventaCell

BioMedical), ② Human Platelet Lysate (Stem Cell Technologies), ③ PLTGold™ Human Platelet Lysate (Sigma-Aldrich) を使用した。hPL 濃度は 5% を基準として、0.5 ~ 20% の範囲で検討した。また対照となる血清代替物として、ヒト MSC 用基礎培養液アニマルフリー添加剤 CiMS-sAF (sAF, 細胞科学研究所) を用いた。基礎培地としては、CSTI303-MSC (CSTI, 細胞科学研究所) または CiMS-BM (CiMS, 細胞科学研究所) を用いた。単離した成熟脂肪細胞分画 100 μL を上記の各培地 30mL に懸濁し、天井培養用フラスコ (サンプラテック) の仕切板下面に播種した後、仕切板上部に各培地 20mL を加えた。細胞はインキュベータ内 (37°C, 5% CO₂) で培養した。天井培養 7 日後に培地交換を行い、14 日後に PBS で 2 回洗浄後、細胞剥離液 TrypLE™ Select Enzyme (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞を剥離し、T-225 フラスコ 8 枚に 9×10^5 cells/flask で播種し 7 日間付着培養を行った。細胞形態の変化は経時的に位相差顕微鏡にて写真撮影を行った。細胞数の計測はトリパンブルーで死細胞を染色後、自動セルカウンター TC20 (Bio-Rad) を用いて測定した。

健常ボランティア脂肪組織を用いた試験製造では、5% UltraGRO 含有 CiMS 培地を用いて、上記製造法に従い 14 日間天井培養を行った後、継代し 7 日間付着培養を行った。細胞剥離液を用いて細胞剥離後、細胞数を計測するとともに、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原発現試験を行った。フローサイトメトリー用抗体は PE 標識抗ヒト CD73, CD90, CD105, CD31, CD45, HLA-DR 抗体 (BD Biosciences) を用いた。死細胞を検出するため 7-Aminoactinomycin D (7AAD, BD Biosciences) を

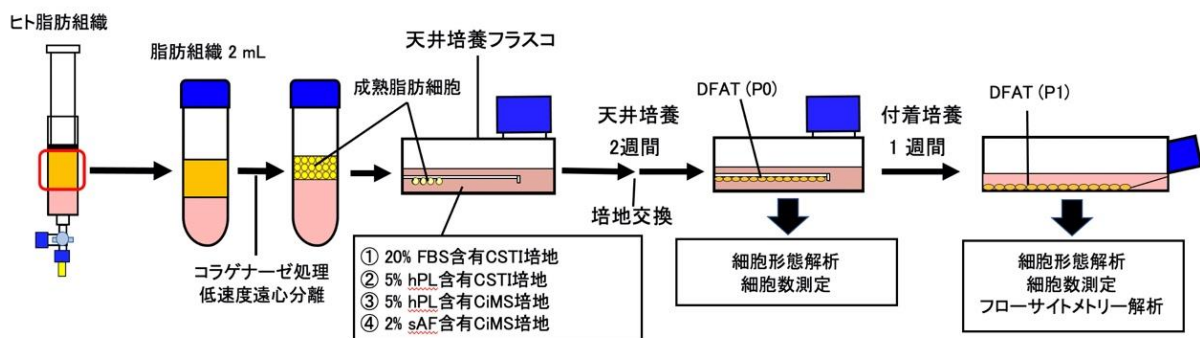


図 1 DFAT 調製法と実験プロトコルの概要

各サンプルに添加した。細胞表面抗原の測定は、CytoFLEXフローサイトメーター（Beckman Coulter）を使用し、フォワードスキャッター（FSC）およびサイドスキャッター（SSC）をゲーティング後、7AAD陰性分画をゲーティングし、生細胞のみを解析した。解析はCytExpertソフトウェア（Beckman Coulter）を用いて行った。アイソタイプコントロールの蛍光強度とサンプルの蛍光強度を比較し、標的抗原に対する陽性細胞率を測定した。

3. 結果

最初にFBSの代替品としてhPLを用いてヒト成熟脂肪細胞からDFATを誘導できるか検討した。各種培養条件下における細胞の形態変化を図2に示す。

その結果、従来培地（20% FBS含有CSTI）と同様に、5% hPL含有培地（5% UltraGRO含有CSTI, 5% UltraGRO含有CiMS）でも紡錘形の形態を示すDFATを誘導、増殖させることが可能であった。一方、MSC培養用無血清培地（2% sAF含有CiMS）では、少数のDFATが誘導されたが、これらを効率よく増殖させることはできなかった。またこれらの5% hPL含有培地を用いることにより、継代培養による細胞増殖も良好であることを確認した。以上の結果より、hPLを含有したゼノフリー条件下で、ヒ

ト成熟脂肪細胞からDFATを誘導、増殖させることに成功した。

次にhPL製品の種類に依存せずDFATが誘導可能か明らかにする目的で、各種市販品のhPLを用いてヒト成熟脂肪細胞からDFATを誘導できるか検討した。その検討結果を図3に示す。

3種類のhPL製剤（hPL-#1: AdventaCell BioMedical社製UltraGRO™-PURE, hPL-#2: StemCell Technologies社製Human Platelet Lysate, hPL-#3: Sigma Ardrich社製PLTGold Human Platelet Lysate）を5%含有した培地は、20% FBS含有培地を用いた場合と同様に、天井培養によるDFATの製造が可能であった。またいずれの5% hPL含有培地も20% FBS含有培地に比べ、増殖能に優れている傾向が確認された。これらの結果より、hPLは普遍的に脂肪細胞の脱分化を誘導しDFATを増殖できることが明らかになった。

次に、効率よく成熟脂肪細胞からDFATを誘導し増殖させるhPLの至適濃度の検討を行った。3名のドナーから採取した脂肪組織を用いて各種濃度のhPL（UltraGRO）含有CiMS培地で成熟脂肪細胞の天井培養を行い、14日後に誘導、増殖したDFATの細胞数を評価した。その結果、DFATを効率良く誘導、増殖させるhPLの至適濃度は5%～15%であった（図4）。またDFATを誘導できるhPLの最低濃度

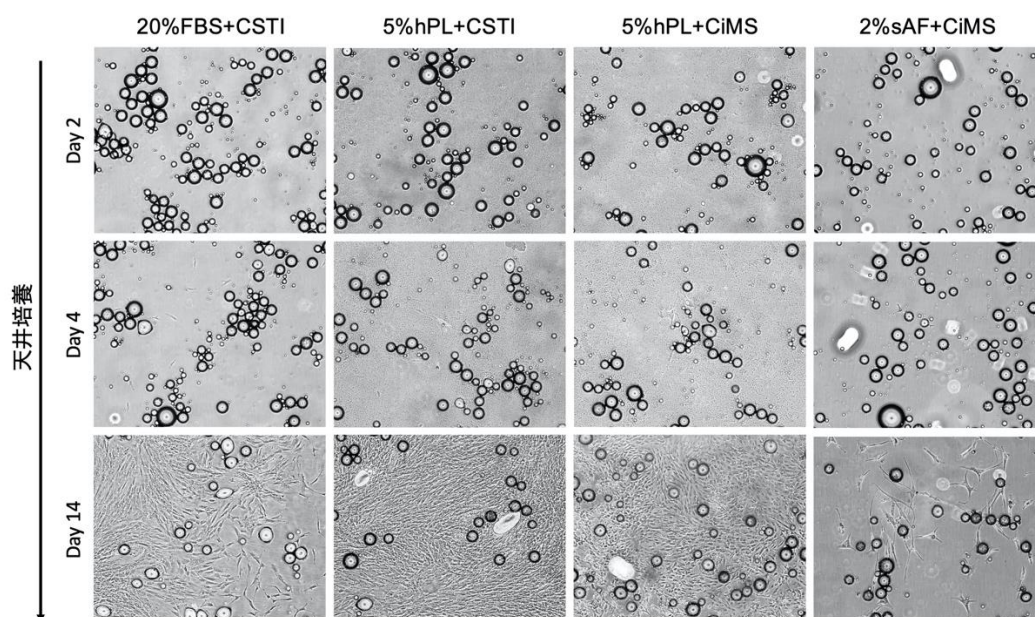


図2 各種培養条件による細胞形態変化

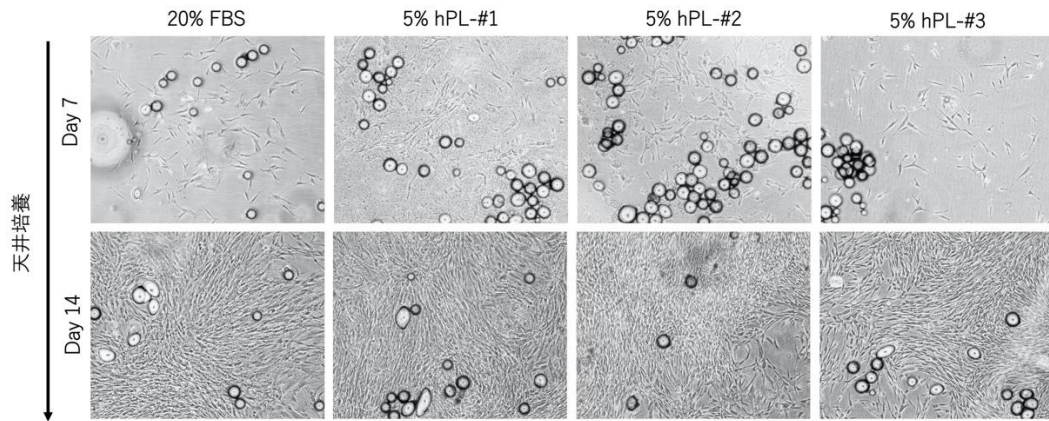


図3 各種hPL製品による細胞形態変化

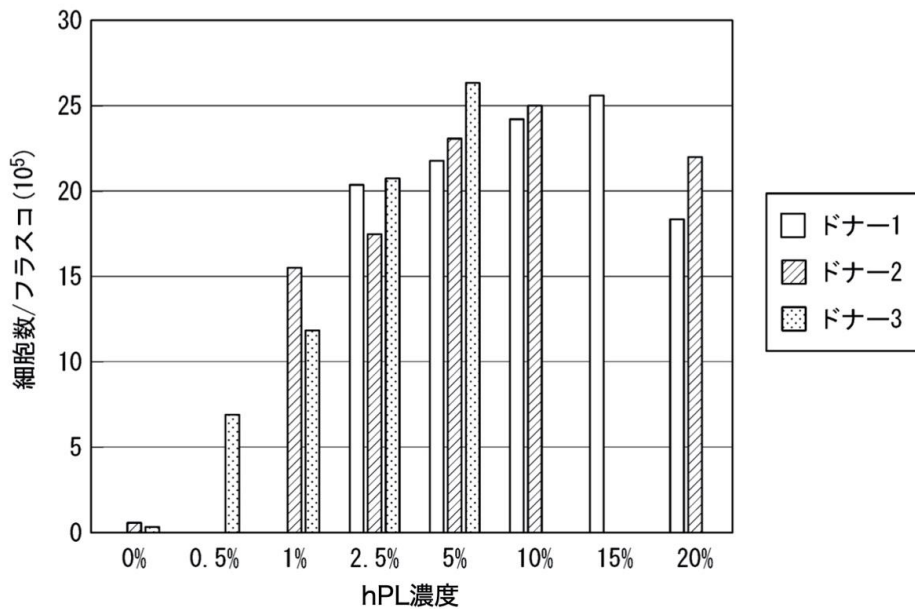


図4 各種hPL濃度によるDFAT細胞数

は0.5%であった。この検討結果より、臨床グレードDFATの調製用培地として、5% hPL (UltraGRO) 含有 CiMS を使用することとした。

次に実際に健常ボランティア脂肪組織から、5% hPL (UltraGRO) 含有 CiMS 培地を用いて、DFATの試験製造を行った。計5例の試験製造を行った結果、全ての症例で再現性良くDFATを誘導、増殖させることができた。天井培養2週間後には、1フラスコあたり 8×10^6 以上のDFATを安定的に調製できることが明らかになった(図5)。また継代培養を行った結果、培養21日目には、最終製品として 1.5×10^8 以上のDFATを調製できることを確認した。

次に培養21日目のDFATのフローサイトメトリーによる細胞表面抗原解析を行った。MSCマーカーおよびMSC陰性マーカーの発現プロファイルを図6に示す。MSCマーカーであるCD73, CD90, CD105はすべての症例で90%以上陽性であり、MSC陰性マーカーであるCD31, CD45, HLA-DRの陽性率は0.5%以下であった。以上の結果より、5% hPL (UltraGRO) 含有 CiMS 培地を用いた調製法でも、既存の方法と同等の均質性が高いMSCの形質を示すDFATが再現性良く調製できることが示された。

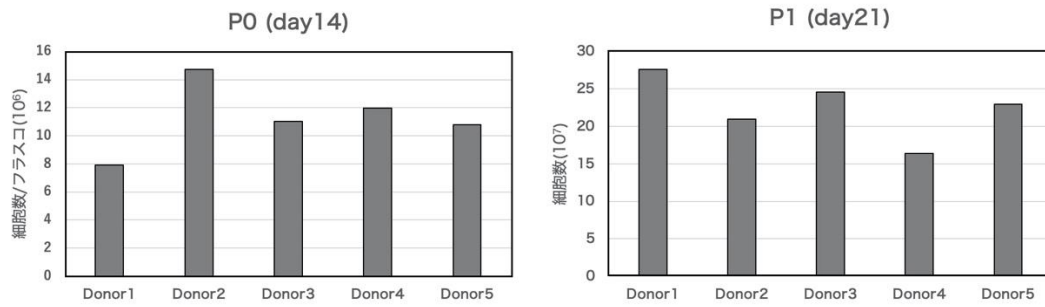


図5 試験製造により得られたDFATの細胞数

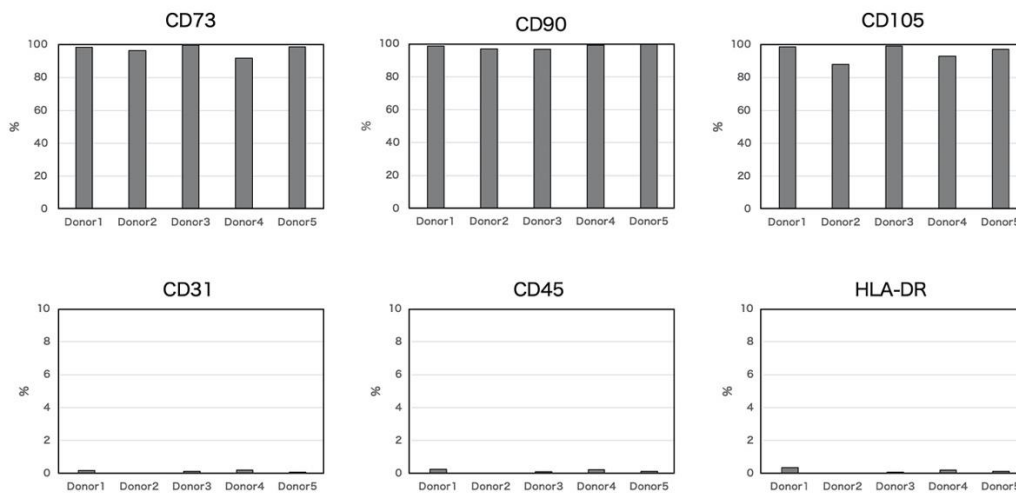


図6 試験製造により得られたDFATの細胞表面抗原試験

4. 考 察

これまでDFATを調製する方法として、20%という高濃度のFBSを含有した培地で天井培養を行うことが標準的な調製法であった。本研究ではFBSの代替としてhPLを用いても効率良くDFATを誘導、増殖できることを明らかにした。そしてhPLと適切な基礎培地との組み合わせにより、動物由来成分を含まない「ゼノフリー培地」を確立した。hPLの至適濃度の検討を行った結果、5%といった比較的低濃度で、現法である20% FBSと遜色なくDFATを誘導、増殖できることが明らかになった。hPLは近年MSCの増殖用培地として利用が広まっている添加物である²⁾。hPLには血小板由来成長因子(PDGF)、インスリン用成長因子(IGF-1)、形質転換成長因子ベータ(TGF-β)といった複数の成長因子が含まれ、これらの成長因子がDFATの増殖に寄与していると推測される。一方、これらの成長因子を個別に添加しても、脂肪細胞からDFATは誘導さ

れないことから、DFATの誘導(成熟脂肪細胞の脱分化)には、hPLに含まれる成長因子以外の生理活性物質が重要な役割を担っていることが示唆される。

5% hPL含有培地(5% UltraGRO含有CiMS培地)を用いて、健康ボランティア脂肪組織からDFATの試験製造を試みた結果、検討を行った5症例中全例で再現性良くDFATを調製することが可能であった。調製されたDFATの細胞表面抗原プロファイルは、国際細胞治療学会が定めたMSCの最小基準³⁾を満たしていた。調製効率として、脂肪組織5mLから3週間の培養期間(第1継代細胞)で 1.5×10^8 cellsのDFATが調製できることを確認した。今後より汎用性を高めるために、天井培養フラスコやゼノフリー培地に加え、最終製品梱包用の細胞凍結バッグや脂肪細胞単離用チューブなどを構成パーツとする「DFAT調製キット」を完成させる予定である。このキットの使用により一定の品質のDFATを多く

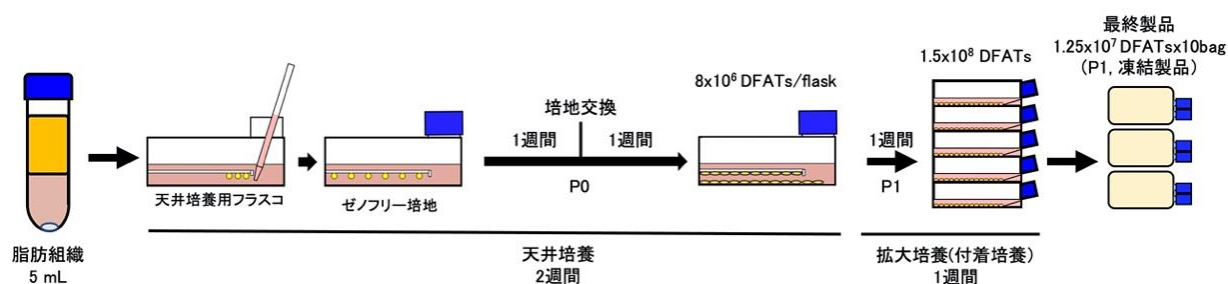


図7 治験用製品の製造工程

の細胞加工施設で製造することが可能となり、また最終製品を複数バッグからなる凍結製品とすることにより、長期間保存ができ複数回投与にも対応できるようになる予定である。現在開発を進めている治験用製品の製造工程を図7に示す。

5. 結 語

本研究では血清代替物としてhPLを用いることにより、動物由来成分を含まずDFATの調製を可能とする「ゼノフリー培地」の開発に成功した。また臨床グレードDFAT製造に用いるhPLの至適濃度や基礎培地を確定した。さらに健常ボランティア脂肪組織を用いたDFATの試験製造を行い、再現性よく臨床グレードDFATが製造できることを確認した。このDFAT調製用培地の最適化により、従来法に比べより安全で高効率に臨床グレードDFATを調製できるようになった。本研究成果はDFAT細胞治療を広く普及させることに寄与することが予想される。

謝辞

本研究は令和3年度日本大学学術研究助成金（社会実装研究）を受けて行われたものであり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; 215(1): 210-222.
- 2) Astori G, Amati E, Bambi F, Bernardi M, Chierigato K, Schafer R, et al. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7: 93.
- 3) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Corten-

bach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-317.

脱分化脂肪細胞移植による血管再生細胞治療

— ウサギ下肢虚血モデルを用いた自家細胞移植と他家細胞移植の比較 —

松本太郎¹⁾, 鈴木沙季²⁾³⁾, 田中正史³⁾, 副島一孝⁴⁾, 三木敏生⁵⁾, 大島猛史⁶⁾,
加野浩一郎⁷⁾, 坂井学⁸⁾, 中山智宏⁹⁾, 枝村一弥¹⁰⁾, 片岡則之¹¹⁾, 檜村勉⁴⁾,
李予昕¹⁾, 月村直樹¹²⁾, 秋田大輔¹²⁾, 風間智彦¹⁾Vascular regenerative cell therapy by dedifferentiated fat cells :
Comparison of autologous cell transplantation and allogenic cell
transplantation using a rabbit hind limb ischemia modelTaro MATSUMOTO¹⁾, Saki SUZUKI²⁾³⁾, Masashi TANAKA³⁾, Kazutaka SOEJIMA⁴⁾,
Toshio MIKI⁵⁾, Takeshi OSHIMA⁶⁾, Koichiro KANO⁷⁾, Manabu SAKAI⁸⁾, Tomohiro NAKAYAMA⁹⁾,
Kazuya EDAMURA¹⁰⁾, Noriyuki KATAOKA¹¹⁾, Tsutomu KASHIMURA⁴⁾, Yuxin LI¹⁾,
Naoki TSUKIMURA¹²⁾, Daisuke AKITA¹²⁾, Tomohiko KAZAMA¹⁾

要旨

脱分化脂肪細胞 (DFAT) は成熟脂肪細胞を天井培養することにより調製される間葉系幹細胞 (MSC) に類似した細胞である。DFATはMSCと同様にMHCクラスII分子を発現していないことから、自家移植のみならず、他家移植でもその治療効果が期待できる。本研究では、ウサギ下肢虚血モデルに自家DFATまたは他家DFATを虚血筋肉内に移植し、その生着性や血流改善効果を比較検討した。その結果、自家、他家DFATは共に移植後6週間まで虚血筋肉組織に検出された。自家DFATは他家DFATに比べ、側副血行路二次分枝の数や、平滑筋細胞を伴う成熟度の高い微小血管の数を有意に増加させた。以上より、側副血行路発達作用や、新生血管の成熟化作用は、他家DFATに比べ自家DFATで優れていることが示唆された。

1. はじめに

近年、生活習慣病の増加や高齢化に伴い末梢動脈疾患 (Peripheral artery disease: PAD) の患者数が増加している。PADは重篤化すると重症下肢虚血 (Critical limbs ischemia: CLI) に陥り、下肢切断に至る例も稀ではない。CLI治療の第一選択は血管内治療やバイパス手術などの外科的血管再建術である。しかし、全身状態不良のため手術に耐えられな

い症例や、末梢病変を主因とした治療適応のない症例が多数存在する。このような治療法のないCLI患者に対し、遺伝子治療や細胞治療による血管再生治療は下肢大切断を回避する最終手段と考えられている。Matsumotoら¹⁾は、脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を「天井培養」という方法で培養することにより得られる脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) が、高い増殖能と間葉系幹細胞

1) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野
2) 日本大学医学部社会医学系医学教育学分野
3) 日本大学医学部外科学系心臓血管外科学分野
4) 日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野
5) 日本大学医学部生体機能医学系生理学分野
6) 日本大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学系耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野
7) 日本大学生物資源科学部応用生物科学科
8) 日本大学生物資源科学部獣医内科学研究室
9) 日本大学生物資源科学部獣医放射線学研究室
10) 日本大学生物資源科学部獣医放射線学研究室
11) 日本大学工学部機械工学科
12) 日本大学歯学部歯学科歯科補綴学第II講座
松本太郎: matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

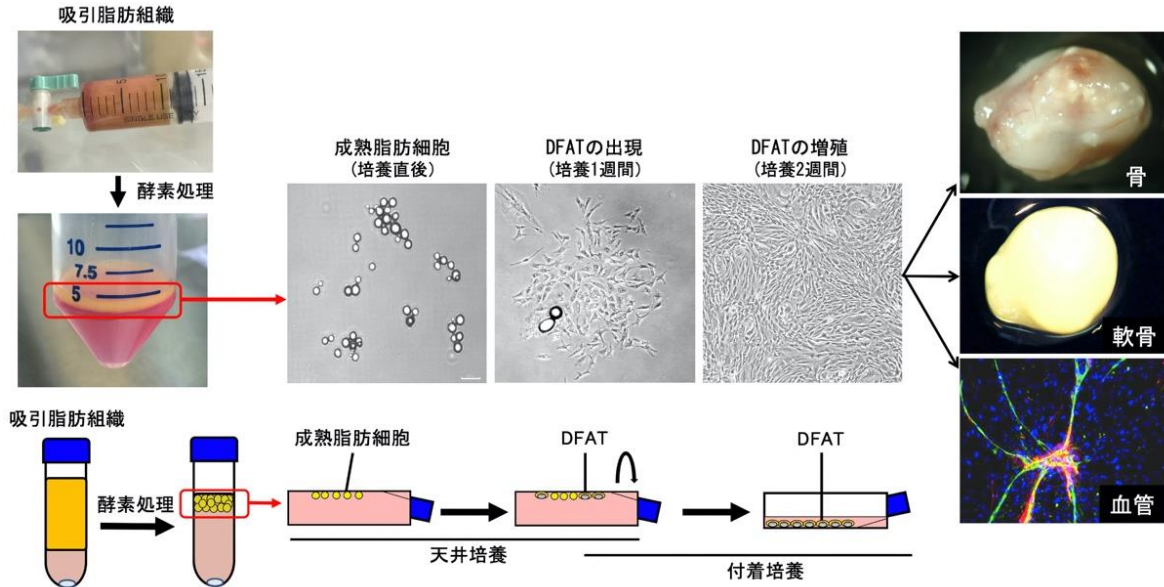


図1 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の調製法

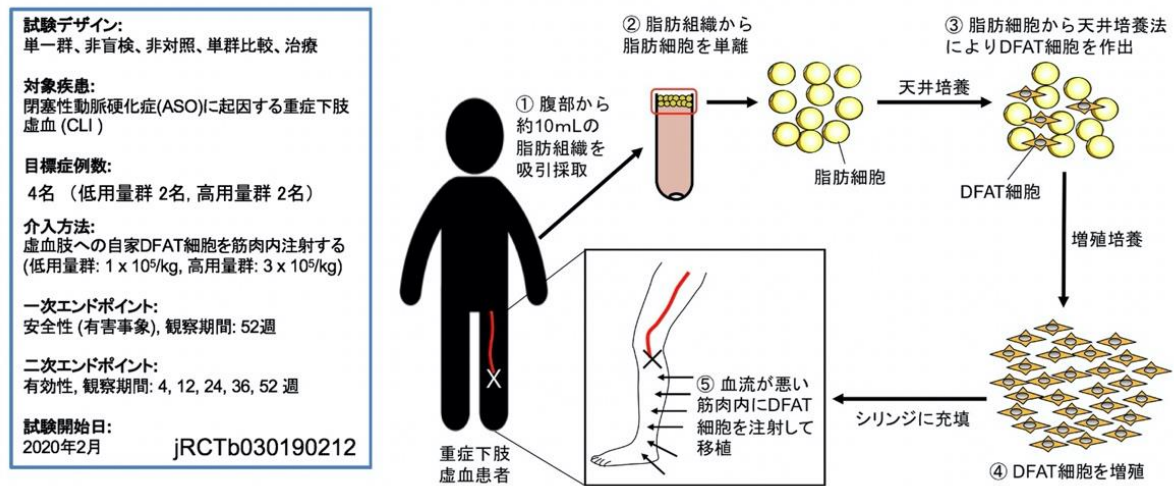


図2 重症下肢虚血 (CLI) に対する自家DFAT移植による血管再生治療

(Mesenchymal stem cell: MSC) に類似した多分化能を有することを明らかにした (図1)。

DFATは、ドナー年齢に影響されず少量の脂肪組織から大量に調製することが可能であり、新たな血管再生治療用細胞として期待されている。現在、日本大学医学部附属板橋病院にてCLIに対する自家DFAT移植による血管再生治療のFirst-in-Human試験を実施している (図2)。DFATはMSCと同様にMHCクラスII分子であるHLA-DRの発現を欠き、免疫原性が低いと考えられることから、自家移植用のみならず、他家移植用細胞としてもその治療効果

が期待できる。一方、虚血筋肉内投与における自家DFATと他家DFATの生着性や血流改善効果の差異はこれまでに明らかになっていない。

本研究では、ウサギ下肢虚血モデルに対して自家DFATと他家DFATを虚血筋肉内に移植し、その生着性や血管への分化能、血流改善効果を比較検討した。

2. 対象及び方法

実験動物は、日本白色家ウサギ（雄性, 2.5 kg）を用いた。実験は日本大学動物実験委員会および日本大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て実施した（承認番号: AP17M032, AP18MED042, 2016医8）。DFATの調製は、ウサギ皮下脂肪組織から既報¹⁾に従い調製した。下肢虚血モデルは、大腿深動脈分岐の約1cm中枢で総大腿動静脈を結紮切離し、末梢側は膝窩動脈、伏在動脈の分岐部より約1cm末梢で静脈も含めて結紮切離することで作製した。

DFATの局在・形質解析実験では、右大腿動静脈を結紮切離したウサギの下肢虚血モデルに対して、レンチウイルスベクターを用いてGFP標識した自

家または他家DFATを腓腹筋内に注射した。移植後2週, 4週, 6週目に腓腹筋を摘出し、抗GFP抗体および血管内皮細胞マーカー Isolectin B4 (IB4) を用いて免疫組織学的検討を行い、GFP陽性細胞の局在および形質解析を行った(図3)。

DFAT移植による血管再生効果の比較実験では、同様に右大腿動静脈を結紮切離したウサギの下肢虚血モデルに対して、虚血作製1週間後に自家DFAT (1×10^6 cells, 自家群, n=6) または他家DFAT (1×10^6 cells, 他家群, n=6) を下肢全体に筋肉内注射した。移植4週間後に患側と健側の経皮的酸素分圧 (TcPO₂) の測定を行い、両群の血流改善効果を比較検討した(図4)。

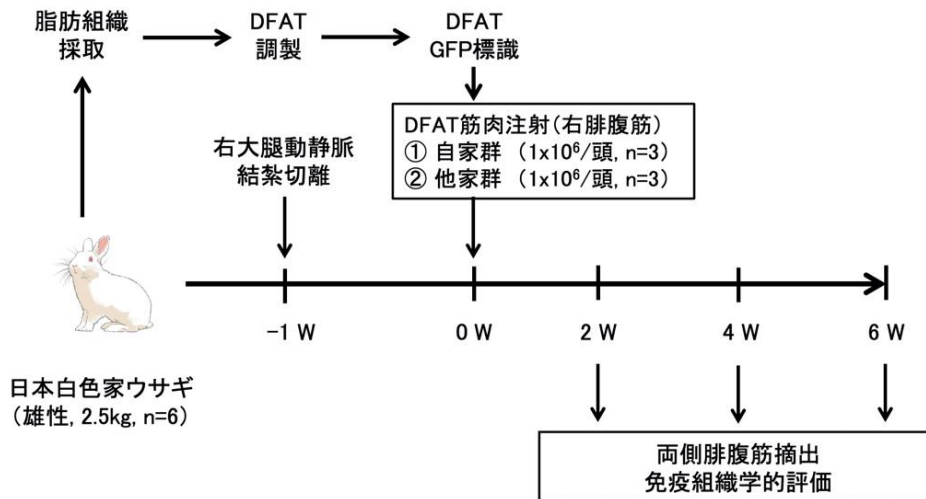


図3 虚血筋組織へ移植したDFATの局在・形質に関する比較実験

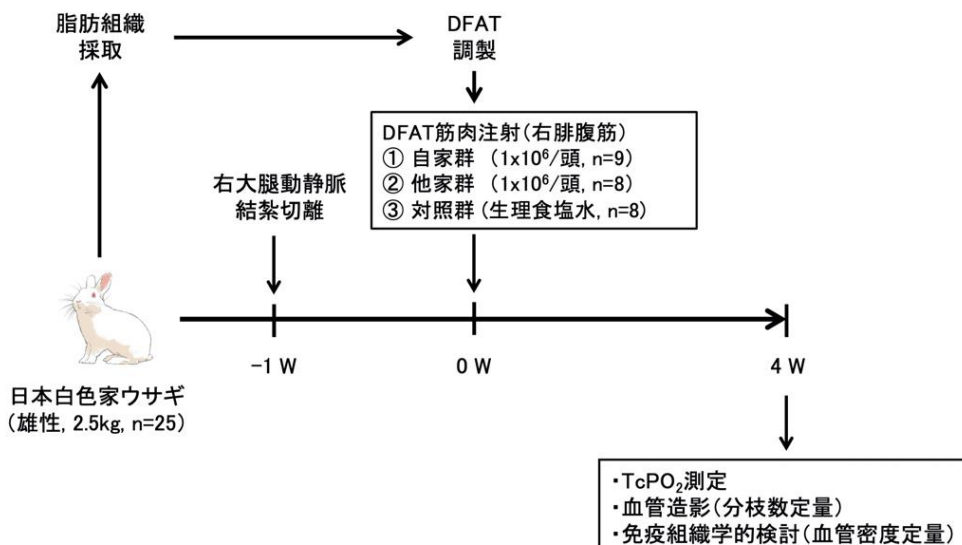


図4 DFAT移植による血管再生効果の比較実験

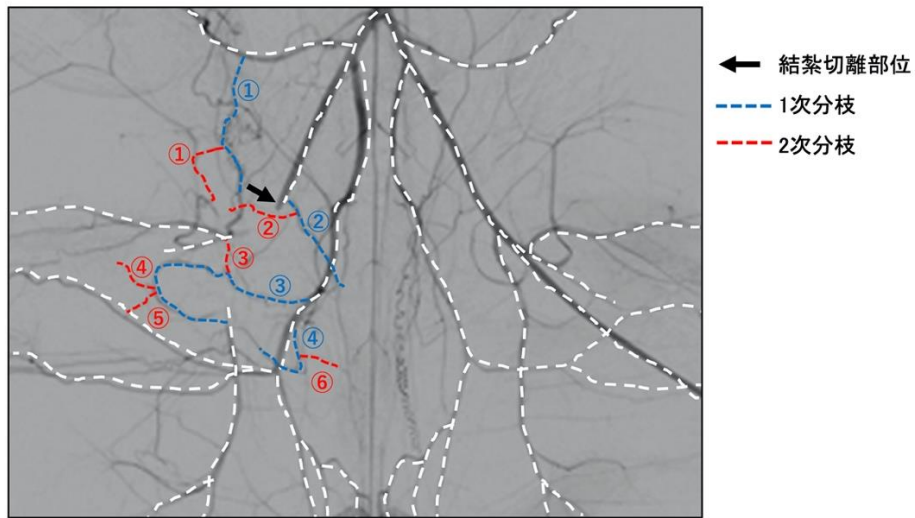


図5 血管造影による側副血行路1次分枝, 2次分枝の定量方法

また下肢血管造影を行い、両群の側副血行路の発達程度を一次分枝数、二次分枝数に分けて定量評価した(図5)。さらに腓腹筋を摘出し組織切片を作成後、血管平滑筋マーカーである抗平滑筋 α アクチン(ASMA)抗体とIB4を用いて免疫組織学的検討を行い、両群のIB4陽性血管数とIB4、ASMA二重陽性血管数を定量評価した。定量結果はmean \pm SDで示した。TcPO₂、側副血行路数、血管密度の2群間比較は、Mann-Whitney's U testを用いて統計学的処理を行い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

3. 結果

GFP標識した自家または他家DFATを腓腹筋内に投与し、2週間ごとに腓腹筋の凍結組織切片を作成し、抗GFP抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、DFATの局在・形質解析を行った。その結果、GFP陽性細胞は筋繊維の間質に分布し、特に虚血が強く筋繊維の萎縮が強い部位に集積する傾向が認められた(図6)。

自家群、他家群ともに移植後4週目までGFP陽性細胞の生着が認められた(図7)。移植後6週目でも微量ながらGFP陽性細胞が検出され、その数は自家群で多い傾向にあった。

GFP陽性細胞の集積が認められた部位では、GFP陽性で血管内皮マーカーIB4陽性を示す細胞の存在が認められた(図8)。

以上の結果より、虚血筋肉組織へのDFAT移植に

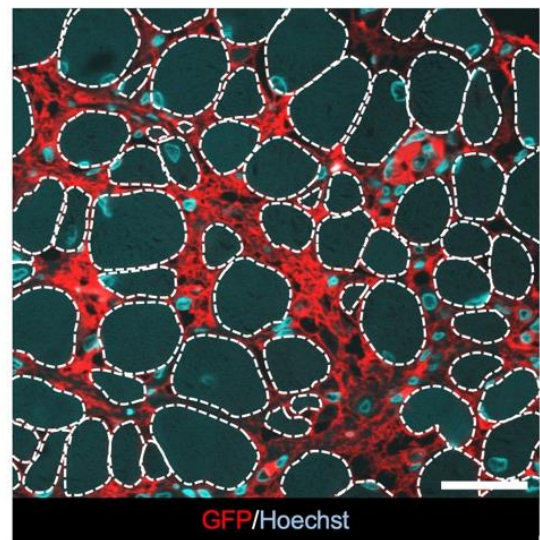


図6 GFP陽性DFATの虚血筋肉組織内の局在(破線は虚血により萎縮した筋繊維を示す, Scale bar: 100 μ m)

より自家、他家移植を問わず4週間以上にわたり細胞の生着が認められ、その一部は血管内皮細胞の形質を獲得していることが示された。

次にウサギ下肢虚血モデルを作製し、自家DFATまたは他家DFAT移植による血管新生効果を比較検討した。移植4週間後のTcPO₂の実測値は、自家群69.5 \pm 23.5 mmHg, 他家群48.5 \pm 15.2 mmHg, 健側との比では、自家群79.4 \pm 26.2%, 他家群76.8 \pm 22.2%といずれも自家群のTcPO₂値の方が高い傾向にあったが、両群間に有意差は認めなかった。血管

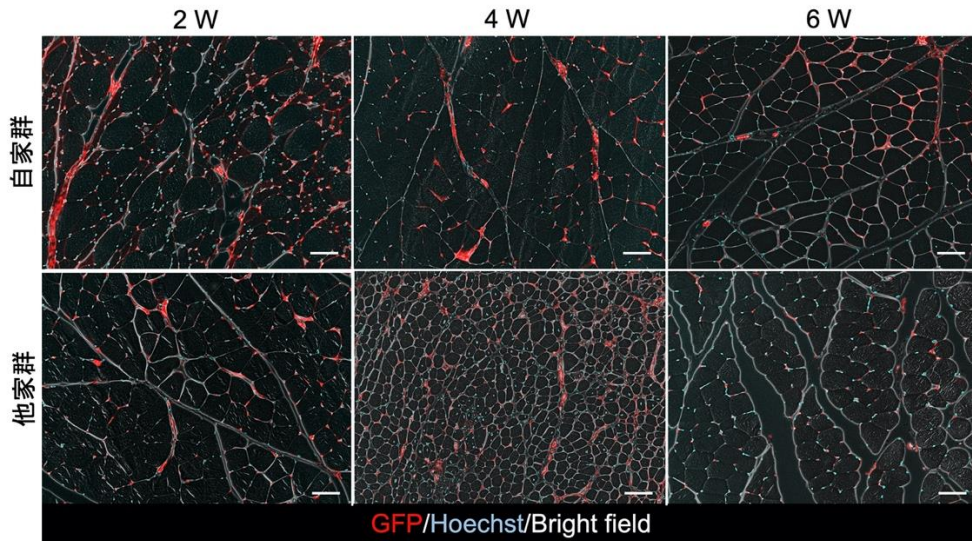


図7 移植したGFP標識DFATの局在変化
(Scale bar: 100 μ m)

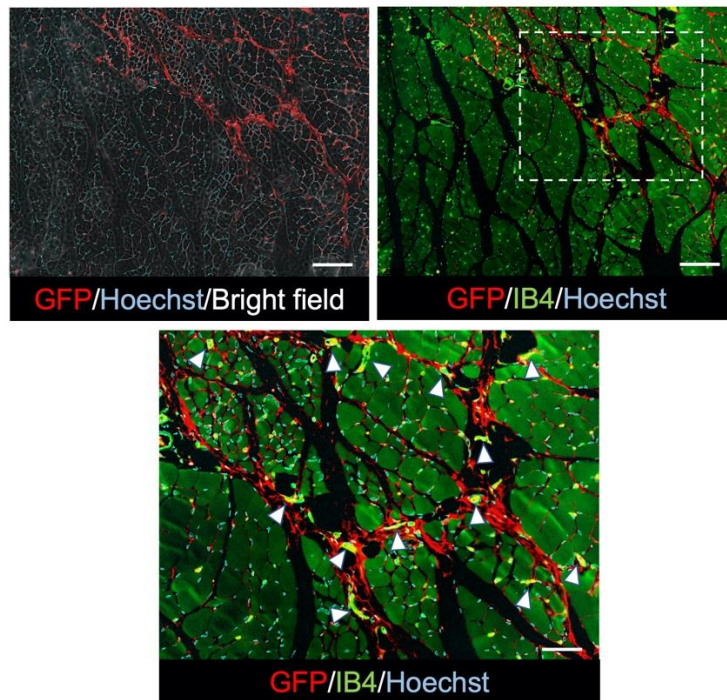


図8 移植したGFP標識DFATの形質変化
(矢頭: GFP⁺IB4⁺細胞, Scale bar: 上段200 μ m, 下段100 μ m)

造影検査による側副血行路発達の評価を行った結果、一次分枝数は自家群で 16.0 ± 2.0 本、他家群で 14.5 ± 1.1 本と両群間に有意差を認めなかったが、二次分枝数は自家群で 17 ± 1.2 本、他家群で 14 ± 0.9 本と自家群の方が有意 ($p < 0.05$) に分枝数の増加を認めた。次に腓腹筋を摘出して切片標本を作成し、両群の血管密度の比較を行った。血管内皮細胞

マーカーIB4陽性血管数を定量した結果、自家群で 212.0 ± 58.6 個、他家群で 197.5 ± 98.5 個であり、両群間に有意差は認められなかった。一方、IB4とASMA二重陽性の血管数を定量した結果、自家群で 33.0 ± 7.5 個、他家群で 22.0 ± 3.0 個であり、自家群で有意 ($p < 0.05$) に血管密度が増加していた。以上の結果より、DFAT自家移植は、他家移植に比べ

側副血行路二次分枝の発達や虚血筋肉組織における平滑筋細胞を伴う微小血管増生に関してより高い効果を示すことが明らかになった。

4. 考 察

DFAT局在・形質解析実験において、移植したDFATは自家細胞、他家細胞ともに6週間までは検出可能であり、その一部は血管内皮細胞の形質を獲得することが示された。MSCは高い免疫寛容能を有し、その機序としてMHCクラスII分子複合体やCD40, CD80, CD86といった副刺激因子を発現していないことが明らかにされている²⁾。我々はヒトDFATもMHCクラスII分子複合体であるHLA-DRを発現していないことを報告している¹⁾。今回の研究にて、他家DFATが長期間生着性を維持できた理由として、ウサギDFATもMHCクラスII分子複合体を発現していないことにより、高い免疫寛容能を有していることが一因と考える。一方、他家移植が自家移植と同等の生着性を示すか否かについては、検討数を増やした群間比較を行い、評価する必要がある。

移植したDFATの血管内皮細胞への分化については、以前の報告にて、DFATはmethylcellulose mediumといった特定の培養条件下で培養することにより血管内皮細胞に分化することが示されている³⁾。またin vitroにおけるDFATの内皮細胞への分化はBone morphogenetic protein (BMP) 4とBMP9の同時刺激により促進することが報告されている⁴⁾。In vivoにおけるDFATの血管内皮細胞への分化メカニズムは今後さらなる検討が望まれる。

DFAT移植による血管再生効果の比較実験では、DFAT移植により側副血行路の発達が促進することが明らかになった。側副血行路発達に関わる分子機構は、動脈新生と呼ばれている⁵⁾。まず刺激を受けた血管内皮細胞からMonocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) やGranulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) が分泌され、単球・マクロファージを側副血行路周辺に動員する。これらの動員された免疫細胞は、血管新生因子であるVascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)などを分泌するとともに、細胞外基質のリモデリング因子であるMatrix metalloproteinase (MMP), Tissue inhibitor of metallopro-

teinase (TIMP) を分泌することにより、動脈新生が誘導される。我々は以前の研究にて、これらのサイトカインのうち、VEGF-A, MCP-1, TIMP-1, TIMP-2がDFATで高発現していることを報告している^{6,7)}。したがって、移植したDFATによる側副血行路の発達促進機序は、DFATから分泌されるこれらのサイトカインのパラクライン作用によると推測される。そして本研究において自家DFATが他家DFATより側副血行路の発達が良好であった理由として、自家DFATの方が宿主免疫細胞の影響を受けずに、細胞間相互作用がより円滑に行われることが一因と考えられる。

5. 結 語

自家DFAT、他家DFATは共に移植後6週目までは虚血筋肉組織に検出され、その一部は血管内皮細胞の形質を獲得していることが明らかとなった。また自家DFATは他家DFATに比べ、側副血行路二次分枝の形成および平滑筋細胞を伴う成熟度の高い微小血管の新生を有意に促進することが明らかとなった。これらの結果より、DFAT自家移植は側副血行路発達促進などを介した高い治療効果が期待できると考えられる。

謝 辞

本研究は第4期日本大学理事長・学長特別研究の助成を受けて行われたものであり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; 215(1): 210-222.
- 2) Contreras-Kallens P, Terraza C, Oyarce K, Gajardo T, Campos-Mora M, Barroilhet MT, et al. Mesenchymal stem cells and their immunosuppressive role in transplantation tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 2018; 1417(1): 35-56.
- 3) Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109(5):656-663.
- 4) Jumabay M, Abdmaulen R, Urs S, Heydarkhan-Hagvall S, Chazenbalk GD, Jordan MC, et al. Endothelial differentiation in multipotent cells derived from mouse and human white mature adipocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 53(6):790-800.

- 5) Fung E, Helisch A. Macrophages in collateral arterio-genesis. *Front Physiol* 2012; 3:353.
- 6) Watanabe H, Goto S, Kato R, Komiyama S, Nagaoka Y, Kazama T, et al. The neovascularization effect of dedifferentiated fat cells. *Sci Rep* 2020; 10(1):921.
- 7) Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, Kazama M, Kano K, Ryu J, et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Eng Part A*. 2013; 19(15-16):1792-1802.

執刀医と手術助手のインターアクションに基づいた 次世代型手術システムの開発基盤研究

山下裕玄¹⁾, 羽多野正俊²⁾, 齊藤健²⁾, 大澤正彦³⁾, 片桐祥太⁴⁾,
金子美泉²⁾, 山崎政彦²⁾, 豊谷純⁵⁾, 今林亘⁶⁾, 櫻井裕幸¹⁾,
岡村行泰¹⁾, 萩原謙¹⁾, 岩男彩¹⁾, 武藤伸洋⁶⁾, 内木場文男²⁾, 後藤田卓志¹⁾

Development of human machine interface offering minimally invasive surgery based on current interaction system between surgeons

Hiroharu YAMASHITA¹⁾, Masatoshi HATANO²⁾, Ken SAITO²⁾, Masahiko OSAWA³⁾,
Shota KATAGIRI⁴⁾, Minami KANEKO²⁾, Masahiko YAMAZAKI²⁾, Jun TOYOTANI⁵⁾,
Wataru IMAHAYASHI⁶⁾, Hiroyuki SAKURAI¹⁾, Yukiyasu OKAMURA¹⁾, Ken HAGIWARA¹⁾,
Aya IWAO¹⁾, Shinyo MUTO⁶⁾, Fumio UCHIKOBA²⁾, Takuji GOTODA¹⁾

要旨

わが国においては、医師全体の人数が漸増しているにも関わらず、外科医師数は漸減傾向が止まらず、外科医療の安定した供給は大きな課題である。手術支援ロボットに見られるように、ロボット分野は高度化および多機能化が進み医療分野への躍進がめざましい。また、AIの医療への活用も広く検討されているところである。外科手術は、より侵襲性の低い鏡視下手術が普及しており、年々鏡視下手術件数が増加している。これらを鑑み、外科医の不足に関わらず精度の高い低侵襲外科治療を国民へ継続提供できる、次世代型手術システムの基盤開発を目的とした研究を行っている。「協働型鏡視下手術助手ロボット開発」、「腸管内手術助手マイクロロボット開発」、「外科医の思考を可視化・定量化しロボットで再現するためのデータ解析・AI技術開発」の三つで構成される。

1. はじめに

わが国において国民の高齢化率は増加の一途であり、急速に高齢化社会から超高齢社会へと進んでいる¹⁾。国内の医療費は年々確実に膨れ上がっており、医療費削減は喫緊の課題である。また、わが国の医療機器貿易は2019年、2020年と連続で1兆円を大きく超える輸入超過で²⁾、現状のまま医療費の国外流出が続くと国内経済の逼迫、現状の医療制度へ影響、結果として国民が適切な医療を受けられなくなるリスクが潜在すると言える。医療は国民の安定した生活を下支えするサービスで、その安定した供給体制の構築は間違いなく必要不可欠と言える。

わが国における死亡原因の第一位は悪性新生物で、全死亡数に占める割合は令和2年人口動態統計を参照すると27.6%である³⁾。特に胃癌、大腸癌といった消化管癌患者は罹患数が多く、癌死亡の2位、3位と上位を占める。治療法の中心にあるのは外科医による外科的切除である。消化器外科領域は従来開腹での手術が中心であったが、わが国ではじめて腹腔鏡下胆嚢摘出術が行われた1990年以降⁴⁾、急速に腹腔鏡下手術件数が増えている。創が小さく従来の開腹手術と比較し創痛は軽減、患者の早期回復も得られている。特に労働世代においては、経済的な面でも早期社会復帰はメリットが大きい。低侵襲手

1) 日本大学医学部

2) 日本大学理工学部

3) 日本大学文理学部

4) 日本大学芸術学部

5) 日本大学生産工学部

6) 日本大学工学部

山下裕玄 : yamashita.hiroharu@nihon-u.ac.jp

術のニーズは年々高まっており、癌死亡の1位である肺癌や、食道癌といった胸腔操作が必要な手術においても鏡視下手術が中心となってきている。しかしながら、鏡視下手術の担い手である「外科医」は、医師全体の人数が漸増しているのにも関わらず年々漸減傾向にある。外科専攻医の募集定員は4割弱しか充足されていない現状で、このまま推移していくと外科指導医の高齢化が進み、外科医数の絶対数減少だけでなく後進育成にも大きな影響を与える。また、医師の地域格差に付随した問題も久しく未解決な課題として存在しており、居住地域によっては国民が外科治療を安定的に享受できなくなるリスクがあると言える。

外科治療は手術支援ロボットに見られるように高度化および多機能化が進み、ロボット分野の医療分野への躍進がめざましい昨今である。また、AIに見られるようにビッグデータの医療への活用が爆発的に広がっている。これらの背景を鑑み、外科医の不足に関わらず精度の高い低侵襲外科治療を国民へ継続提供できるシステム基盤開発を、下記の三つの方向性から推進することを検討した。

2. 対象及び方法

本研究は「協働型鏡視下手術助手ロボット開発」、 「腸管内手術助手マイクロロボット開発」、 「外科医の思考を可視化・定量化しロボットで再現するためのデータ解析・AI技術開発」の三つにより成り立っている。以下に各開発テーマの詳細について述べる。

2-1. 協働型鏡視下手術助手ロボット開発

低侵襲外科手術は、一般的には執刀医1名に加えて助手として少なくとも2名の外科医が加わる。そこで、現状より少ない人数で同じ精度の手術を施行できる条件を考えると、高精度のロボットに置換することが選択肢として挙がる。実際に、現在実臨床に導入されている手術支援ロボットは、執刀医自身が執刀医・助手の全ての作業を、ロボットを介して行う人間拡張テクノロジーで、手術助手として1名の削減に成功している。しかしながら、高額な初期投資とランニングコストのために病院経営の視点から導入困難な施設が多く、その普及には限界がある。多くの施設への導入の可能性を考えると低コスト化が必須である。手術助手は術野を展開し安定さ

せる作業が中心であることから、執刀医のコントロール下に助手作業のみをロボットに置換するコンセプトを考えた。この方策によりロボット担当の作業が少なくなり、その分ロボットの小型化・低コスト化も期待できる

外科医が手術中に行っている作業を分解すると、1. 見る 2. 把持 3. 術野の展開 4. 判断 5. 切離（剥離）・縫合で基本的に構成される。この基本動作の中で、判断、切離（剥離）・縫合は執刀医自身が行うが、手術助手は把持、術野の展開が中心である。また、鏡視下手術の画像を術者・助手に提示するカメラ助手は、手術の進行にあわせてカメラ画像の中心位置を調節する。これらの手術助手が行う作業を具現化する協働型手術ロボットを設計する。研究当初はfull manual型、同時に研究予定の人工知能データを元にして将来的に半自律型、さらに自律型に発展させることを目指す。入手しやすい部品を用いた2台のプロトタイプロボットを製作、その後改良型ロボット、ビジュアルフィードバックによる鉗子追従制御機構、執刀医の操作にあわせてトラッキングし続けて映像を提供する「カメラ助手ロボット」の実現を目指す。

2-2. 腸管内手術助手マイクロロボット開発

現在人体内で医療補助を実現したロボットはカプセル内視鏡のみである。腸管蠕動に従って排出されるまでカメラで撮影記録するのみで、外部からの操作が全く出来ず、治療介入操作は不可能である。消化管外科手術において、特に微小病変の切除において漿膜側から粘膜面の情報が全く得られないことが障壁となっている。そこで、消化管内に入ることが出来るカプセル内視鏡以下のサイズで、かつ病変の位置認識と治療操作を同時に実現できる腸管内マイクロロボットの開発を行う。直径2cm程度の脚部や医療器具が折りたたまれたマイクロロボットの試作・制御システムの開発を行う。筐体や脚部の折りたたみ機構、鉗子の収納機構をコンピュータ支援設計(3D-CAD)により設計する。光造形の3Dプリンタでプロトタイプを作製し、各機構の動作の確認を実施する。カメラを内蔵させ、収納した脚部を展開し、消化管内腔からの情報の送受信を目指す。実現可能性を鑑みながら、ロボットに実装するデバイスを取捨選択する。将来的にはカメラを内蔵させ消化

管内腔からの情報の送受信を同時に行えるロボット開発を目指す。将来的にはマクロの消化管腔から、よりミクロの血管内での処置にも繋がる学術的独自性と創造性を兼ね備える研究と考えている。

2-3. 外科医の思考を可視化・定量化しロボットで再現するためのデータ解析・AI技術開発

同じ手術であっても経験値によって執刀医、助手のそれぞれの視点・動作が異なる。外科医はモニターに描出された術野からの視覚情報から全ての行動を決めている。外科医が手術中に行っている作業の中で、経験によって決定的に差が出る領域は「見る」、「術野の展開」、「判断」である。優れた外科医が手術中にどこを注視しているのか？を実際の鏡視下外科手術においてアイトラッキングデータを収集し、外科医の思考を可視化・定量化しモデル化を目指す。協働的に手術を進める「手術助手」のアイトラッキングデータを同時に収集し、協働型ロボットの動作に反映させるAI化の基礎データを構築する。アイトラッカーを用いた執刀医と助手の注視点、腹腔鏡画像、胸腔鏡画像、医師同士の会話をマルチモーダルなビッグデータとして収集する。次に、データから「若手医師と指導医の注目点の違い」「共同注視したタイミング」といった分析や、「ベテラン医師が注目する点」「把持される点」「切除される点」を予測するAIの開発を行う。

このようなコンセプトの研究として日本大学特別研究(期間:令和4年度~令和5年度)に採択された。本稿では、本研究について述べると共に、令和4年度の研究成果および令和5年度にむけての展望を報告する。

3. 結果

前章で述べた三つの開発研究を行った結果について、令和4年度の成果を以下に示す。

3-1. 協働型鏡視下手術助手ロボット開発

令和4年度は、主に2台の協働型手術ロボットのプロトタイプを製作し、機械的構造の問題抽出することを目標に研究開発を行った。図1に申請時の3D-CADによる基礎設計図(ver.0)を示す。図1に示したロボットは、上腕部の機構をできるだけ少なくすることにより重心を下げ、その代わりに車輪によって床を移動することにより、アーム先端の位置姿勢の自由度を確保するコンセプトであった。研究開始後、この点について研究組織メンバーで実際の内視鏡手術時の執刀医や助手医師の動き等について検証・検討した結果、手術中は、特に助手医師2名はほとんど下半身を動かさず、上半身の動きだけで作業を行っていることが分かった。本ロボットシステムの主要コンセプトは、既存の手術チームや手術室にできる限り変更を与えず、2名の助手作業のロボットによる代替であるため、現在の助手作業と同様に主に上半身を用いて作業を行うために、多関節の水平リンクと垂直リンク機構の組み合わせによる機構を発案し、図2に示すような改良版ロボットについて再設計を行った(ver.1)。それぞれ向かって左側がカメラ助手ロボット、右側が術野確保助手ロボットである。図2の改良版ロボットに見える車輪は運搬用であり使用時は固定され、上半身のアーム部のみ動作する。また図1に対し図2のロボットは特にアーム先端部の垂直リンク部分が大型化されている。これは世界情勢の問題により当初予定していた回転モータの入手が困難になり、直動シリンダー方式に変更しているためである。

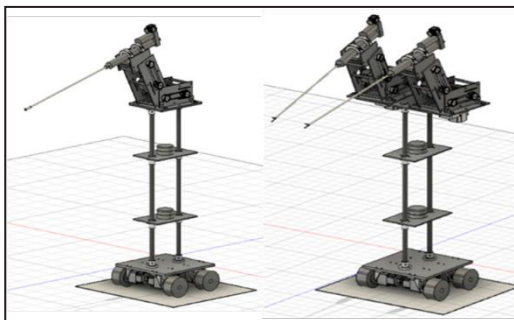


図1 3D-CADによる設計図(ver.0)

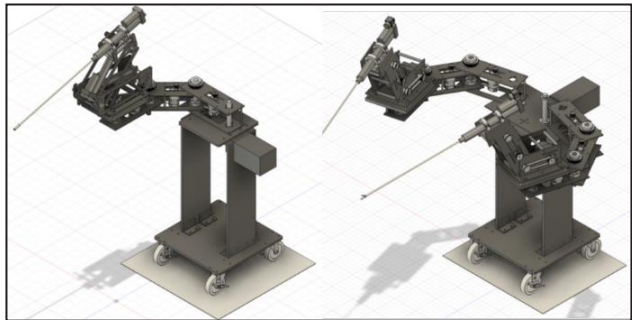


図2 3D-CADによる設計図(ver.1)



図3 試作したカメラ助手ロボット (ver.1)



図4 試作した改良版カメラ助手・術野確保ロボット (ver.2)

この改良したロボットを具現化し、有効性・問題点を明らかにするために、実際にロボットの製作を行った。図3に実際に製作したカメラ助手ロボットを示す。機構的な問題点などの確認を行った。図3を見ると図2で設計した通りのロボットが具現化されていることが分かる。このロボットを用いて各リンク機構の動作について、動作のスムーズさや部品同士の干渉などの機構的構造の問題抽出について検討を行った。その結果、先に述べたアーム先端部の垂直リンク部分の大型化に伴い水平リンクの各軸に過大な負荷がかかり、アーム先端部分が設計通りの姿勢を保てないことが明らかとなった。そのため、各金属部材寸法や回転軸の支持方法などの再検討・再設計を行い、さらなる改良版ロボットの試作を行った。試作した改良版助手ロボット (ver.2) を図4に示す。図4では、実際に研究代表者が手術にて使用している物と同型番の内視鏡カメラを本研究費で購入し、それをカメラ助手ロボットと組み合わせ、カメラ助手ロボットシステムとして用いる状態を示している。

以上、複数回の再設計・検討・試作を繰り返し、令和4年度の目標通りの協働型手術ロボットのプロトタイプ製作を達成することが出来た。なお、助手作業を行うための動作制御系の設計・作成は令和5年度で研究開発予定である。そのためのビジュアルフィードバック制御系の基礎研究開発も行った結果も示す。

前述の手術助手ロボット2台を半自律的に動作させるためには、体内環境や対象部位（臓器や血管など）を自動で認識し、その結果を用いてロボットの動作指示を算出する必要がある。ここで、実際の手術動画を用いて研究開発を行うためには倫理委員会等の承認が必要であるが、これは今後の研究目標である。また、その委員会承認のためには、どのような現状システムがあり、どのような手術動画情報が必要かを、審議資料として示す必要がある。よってまず、基礎研究として、研究分担者の理工学部研究室にある対象物を用いて基礎研究を行った。患者の体内環境は千差万別であり、手術中の対象部位・位置姿勢特定にはAI（人工知能）を用いた方法が適していると考え研究を行った。ここで、対象物の画像的な認識と、実際の大きさや位置・姿勢の幾何学的な認識は、別々の手法が必要となり、前者はカメラ、後者はレーザーセンサを用いることが工業的利用には一般的であるが、これを手術に応用する場合、現在入手できるレーザーセンサで体内に入れられるサイズの物は無い。よって、内視鏡カメラ映像を利用して、物体検出のみならず、その位置姿勢を認識する手法について研究を行った。その際、先に述べたように、手術映像の入手は困難であったため、工作物である木片および自然物である農作物を対象に基礎AIシステムの研究開発を行った。その結果の一例を図5～7に示す。図5は直方体の木片の位置姿勢をAIを用いて認識した結果の一例であ

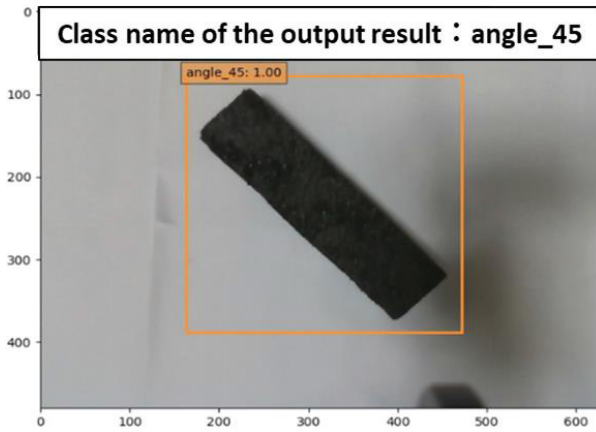


図5 対象物の位置姿勢認識結果の一例

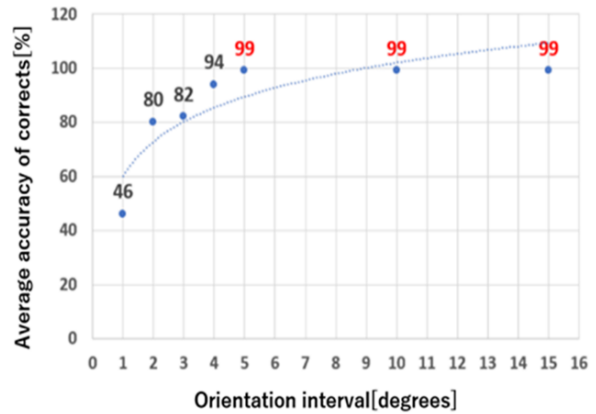


図6 姿勢の認識精度の一例

り、この場合は45°の姿勢の木片であることが正しく認識出来ていることを示している。またAIにより画像情報のみで、どの程度の姿勢差まで認識出来るかについて研究を行った結果の一例を図6に示す。図6より、5°以上の姿勢差は99%の精度、2~4°の姿勢差は80%、1°の姿勢差は46%の精度で認識出来ていることが分かる。これにより、術野確保助手ロボットの鉗子先端で対象部位を把持したい場合、画像情報とAIを用いてほぼ人間と同程度の精度で認識出来る可能性があることが明らかとなった。なお、この結果については、国際会議AROB 28th 2023にて「Recognition for Orientation of Target Objects Using Object Detection Algorithm」という題目で研究発表を行った⁵⁾。

また図5では、対象物の位置を矩形領域内として認識しているが、手術に用いる場合には、更に正確な対象物の形状や位置姿勢を認識する必要がある。そこで、インスタンスセグメンテーションと呼ばれる更に高度なAI物体検出システムについて研究開発を行った。その認識結果の一例を図7に示す。これは木片よりもさらに自然物に近い農作物を対象物とした結果であり、図より対象物の領域を正確に塗りつぶしており認識出来ていることが分かる。以上により、ビジュアルフィードバック制御系のための認識システムについて、AIを用いた認識システムの構築が可能と評価した。なお、AIによる認識精度は学習画像枚数に依存し、数万枚の画像が必要となる。そのため手術動画の使用と教師画像の作成は今後開発予定である。



図7 AIを用いた領域抽出の一例

3-2. 腸管内マイクロロボット開発

令和4年度は、3D-CADを用いて腸管内マイクロロボットの筐体デザインおよび機構設計を実施した。図8に設計した腸管内マイクロロボットを示す。ロボットは図8aに示すように、直径20mm、全長50mmで設計した。図8bに示す通り3本の脚部を120°毎に配置し、成人の大腸の直径である6cm程度まで展開する設計とした。脚部の展開機構にはスコットラッセルの厳正直線運動機構を採用し、直線運動を示す機構のなかで最も単純な機構によって、

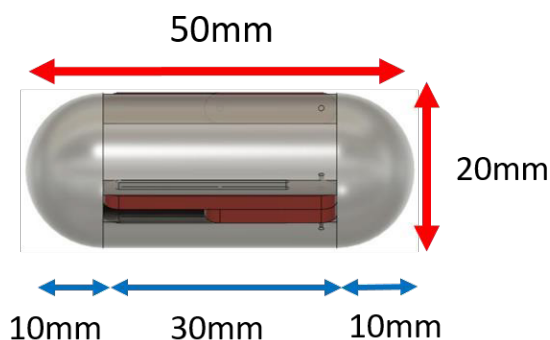
省スペース化を実現した。

図9に設計した腸管内マイクロロボットの脚部機構を示す。脚部機構の駆動には送りネジ方式(図9a)およびウォームギヤ方式(図9b)を別々に設計した。送りネジ方式による脚部機構において、中心にM3の3角ネジを送りネジとして用い、送りネジを回転することでM3のナットが移動する。ナットの移動に伴い、脚を固定したパーツが展開することで脚部の開閉を行う(図9a)。ウォームギヤ方式による脚部機構は、中心にウォームギヤを配置し、ウォームギヤが回転することでBar1に施したネジが移動する事で脚部の開閉を行う(図9b)。

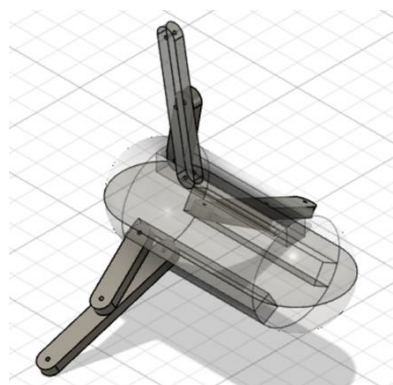
送りネジ方式およびウォームギヤ方式それぞれに長所と短所が存在するため、実際に試作して脚の展開実験を行った。

図10に試作した腸管内マイクロロボットを示す。図10aは脚部機構に送りネジ方式を採用し、図10bはウォームギヤ方式を採用した。筐体や部品はそれぞれの要求精度に基づいて熱溶解積層型3Dプリンタや光造形3Dプリンタで試作した。試作した腸管内マイクロロボットはモックアップではなく、実際に可動部を備えているため、モータを接続することで脚部が展開可能である。

図11にウォームギヤ方式による脚部機構のモータによる駆動実験の一例を示す。図11aは脚部展開前を示し、図11bは展開後を示している。図中左側はDCモータであり、DCモータの回転動作を脚部機構が脚部の展開動作に変換していることを示している。現在ロボット内に搭載可能なDCモータによる駆動を目指している状況である。

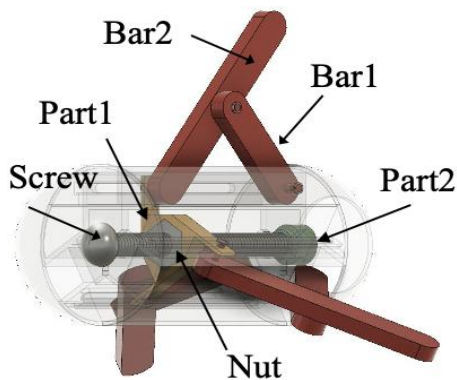


(a) 腸管内マイクロロボットの外径およびその寸法

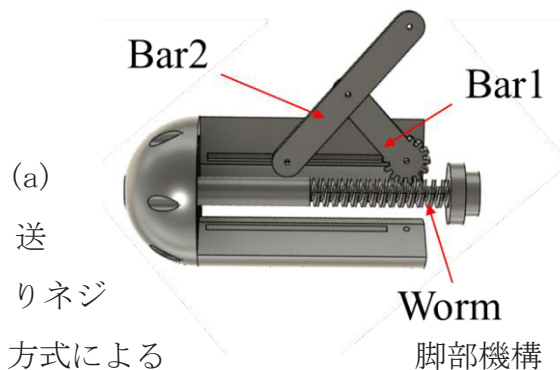


(b) 脚部を展開したイメージ図

図8 設計した腸管内マイクロロボット



(a) 送りネジ方式による脚部機構

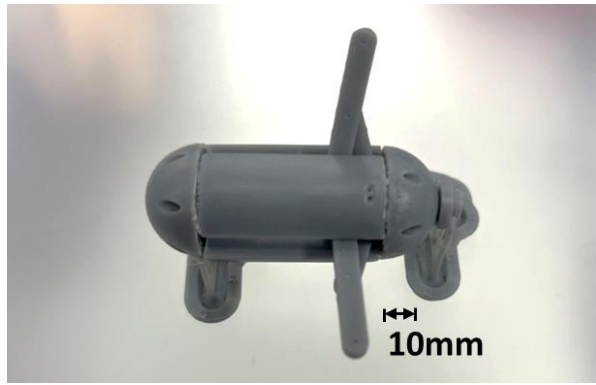


(b) ウォームギヤ方式による脚部機構

図9 設計した腸管内マイクロロボットの脚部機構



(a) 送りネジ方式による脚部機構の試作



(b) ウォームギヤ方式による脚部機構の試作

図10 試作した腸管内マイクロロボット



(a) 脚部展開前



(b) 脚部展開後

図11 ウォームギヤ方式による脚部機構のモータによる駆動実験

また、医療応用に向けたマイクロロボットの開発と題して、生物試料分析学会が発行する論文誌（生物試料分析）の特集に本研究の計画を紹介した⁶⁾。

3-3. 外科医の思考を可視化・定量化しロボットで再現するためのデータ解析・AI技術開発：

外科手術での医師のアイトラッキングデータを用いた観察研究（日本大学医学部研究倫理審査承認番号20221202）の承認を令和4年12月12日に受け、日本大学病院消化器外科での鏡視下手術を対象にアイトラッキングデータの収集を開始した。鏡視下手術モニターにTobii ProアイトラッカーおよびTobii Proラバスクリーンエディションを搭載したコンピュータと接続し、執刀医と助手の注視点、腹腔鏡画像を収集した。まず記録の妥当性・正確性を

検証する目的に、3例の低難度手術を選択し、執刀医のアイトラッキングデータのみを収集した。

図12,13に具体例を提示する。執刀医の注視点の軌跡が赤丸で表示されているが、注視が停留した場所は濃い赤で描出されている。図12では腹腔鏡下鼠径ヘルニア手術中の縫合閉鎖手技中の視線データであるが、画面上方から針の刺入点に向かって注視点が移動し、刺入点に的確に一定時間注視し続けていることが分かる。図13では切離する予定の胆嚢管に剥離鉗子が挿入されているが、鉗子挿入位置に一致して注視していることが分かる。執刀医の視線履歴の記録は問題なく行えることが確認された。

これを踏まえ、手術の助手作業に特化したロボット実現にむけたAI開発の第一歩としても、執刀医・手術助手の視線情報から「外科医の判断・行動パ

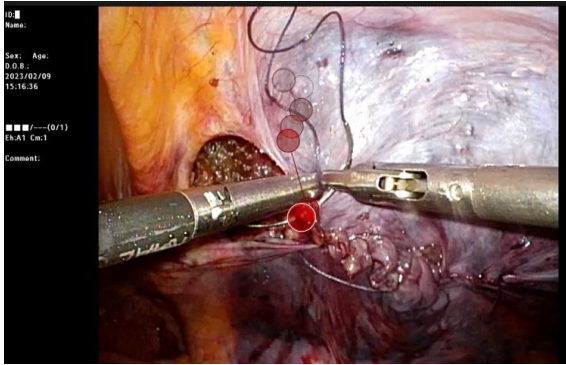


図12 腹腔鏡下鼠径ヘルニア修復術の執刀医のアイトラッキングデータイメージ

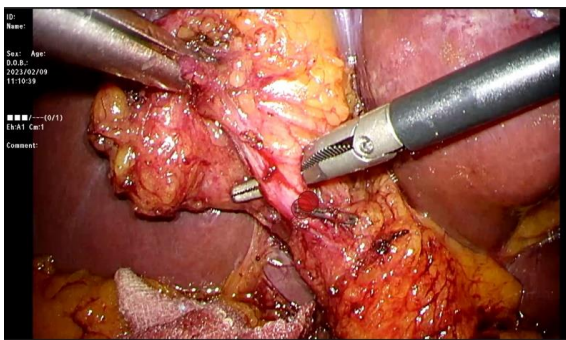


図13 腹腔鏡下胆嚢摘出術の執刀医のアイトラッキングデータイメージ

ターン」に関する知見の発見を目指している。初期検討として、執刀医と助手の視線データの特徴について比較を行い、執刀医と助手でどのように視線情報に差が見られるかの検討を考えている。手技が比較的シンプルな低難度手技である鏡視下手術のデータ解析を用いて、経験手術数の違いによる視線データの違いを今後検証していく予定である。指導医の視線データも取得することで、模範手技を可視化し、教師データとしてのモデル化を行うこともあわせて検討している。執刀医と助手のアイトラッキングデータを同時に収集しており、視線履歴の差異からの検討で、2名の外科医のインタラクションの可視化が出来るかどうか検証を進めていきたい。

4. 考察

協働型手術ロボットのプロトタイプ製作については、複数回の再設計・検討・試作を繰り返し、令和4年度の目標通りの成果を達成することが出来た。ビジュアルフィードバック制御系については、臓器画像ではないが、AIを用いた物体の位置姿勢認識を

行うことが出来た。それに加え、さらに新しいインスタンスセグメンテーションによる詳細な形状抽出を行うシステム構築を達成することができた。次年度以降に向けた基礎システム製作が実現できたと考えている。

腸管内マイクロロボットの開発では、まずは研究計画に従って、プロトタイプロボットの筐体デザインおよび特に重要である脚の展開機構設計を実施した。脚の展開機構は2種類設計し、3Dプリンタを用いて腸管内マイクロロボットのプロトタイプを試作し、モータで試作したロボットの駆動に成功した。令和5年度の計画においては腸管内マイクロロボットのプロトタイプ試作、ROS2を用いた制御システム開発を予定していた。従って腸管内マイクロロボットの開発における当初の研究目的に対する達成度は当初の計画以上に進展している。

外科医の思考を可視化・定量化しロボットで再現するためのデータ解析・AI技術開発については、アイトラッキングデータを収集するコンピュータ、デバイスの納入が遅れ2022年11月下旬となった。鏡視下手術が施行される日本大学病院手術室で、コンピュータとモニターの接続試験を翌12月に行い、データ収集に不足したコード類が判明した。2023年1月に再度接続設定を行った後、データ収集開始が2023年1月下旬まで遅れた。しかしながら、初回3例の手術において執刀医の注視点軌跡が正確にデータ収集できることの確認ができた。また、少ないデータ数だけでの検討であり検証が必要ではあるものの、確信を持って手術操作を行う際には執刀医の凝視時間が長い傾向があった。執刀医が注視する持続時間に応じたカメラ助手ロボットとの連携ができれば、カメラのフォーカス点を自動調整する機能付加により執刀医がストレスなく手術を進められる可能性があることを新規に考案した。低難度手術を中心に、徐々に中難度手術へと対象を拡大し、アイトラッキングデータの解析による視線データのモデル化を目指していきたい。執刀医と助手の視線データのヒートマップの差異、軌跡の違いを検証することで、手術中のインタラクションを明らかにしていく。

5. 結 語

外科医の不足した条件で精度の高い低侵襲外科治療を国民へ継続提供できるシステム基盤開発について、三つの方向性から研究推進した結果について、令和4年度の研究成果と令和5年度の展望について述べた。2024年に適用となる「医師の働き方改革」に表されているように、医師の長時間労働や医療機関全体としての効率化は早急な解決を求められている。協働型の手術ロボットは、遅滞ない高速通信技術下に遠隔操作可能となれば、医療崩壊地域への人的支援となるポテンシャルを有すると考えており、多くの課題を解決しうる創造性を有する。次世代型手術システム基盤開発を達成するために必要な技術研究を今後も進めて行けたらと考えている。

謝辞

本研究は令和4年度日本大学特別研究の助成を受けたものである。記して感謝する。

文 献

- 1) 総務省 統計トピックスNo.126 統計からみた我が国の高齢者-「敬老の日」にちなんで- <https://www.stat.go.jp/data/topics/pdf/topics126.pdf>
- 2) 厚生労働省 薬事工業生産動態統計年報 <https://www.mhlw.go.jp/topics/yakuji/2021/nenpo/>
- 3) 厚生労働省 令和2年(2020)人口動態統計 <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei20/index.html>
- 4) 石川泰郎, 酒井滋, 山川達郎, 阿部宏之, 賀古真, 永井孝三: 腹腔鏡下胆嚢摘出術 - 本邦第1例を含む5例の経験. 日臨外医学会誌(1991) 52, 859-864.
- 5) Motoki Akazawa, Tomoya Tanaka, Masatoshi Hatano, Recognition for Orientation of Target Objects Using Object Detection Algorithm, Proceedings of 28th International Symposium on Artificial Life and Robotics (AROB2023), 2023, pp.1183-1186
- 6) 齊藤健, 金子美泉, 内木場文男, 佐伯勝敏, 武藤伸洋, 見坐地一人, 山下裕玄, 後藤田卓志. 医療応用に向けたマイクロロボットの開発. 生物試料分析. 2022; 45(4):169-173.

新規免疫抑制解除法の併用による 固形がんにも有効なCAR-T細胞療法の開発

加藤侑希¹⁾, 池田俊勝¹⁾, 加藤果野子²⁾, 杉俊洸²⁾, 川名敬²⁾, 平井宗一¹⁾

Development of chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy for solid tumors by modulating immunosuppressive tumor microenvironment.

Yuki KATOH¹⁾, Toshikatsu IKEDA¹⁾, Kanoko KATOH²⁾,
Toshihiro SUGI²⁾, Kei KAWANA²⁾, Shuichi HIRAI¹⁾

要旨

固形がんに対するCAR-T療法の大きな課題は、腫瘍微小環境中の免疫抑制の克服と、腫瘍特異的な標的抗原の同定である。本研究では、著者らがこれまでの研究で新たに同定した、免疫抑制誘導分子：stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)、および、標的抗原分子：Glypican-1 (GPC1)を標的とした、新規CAR-T細胞療法の可能性を検討した。その結果、SCD1は、コレステロール代謝との相互作用によりT細胞のエフェクター機能を負に制御していること、更に、SCD1阻害剤は、抗GPC1-CAR-T細胞の治療効果を著明に増強することを明らかとした。以上より、SCD1およびGPC1は、固形がんにも有効なCAR-T細胞療法を開発するうえで、魅力的なターゲットである可能性が示唆された。

1. はじめに

我々はこれまでに、新規の腫瘍抗原GPC1を標的としたヒトCAR-T細胞療法の前臨床研究を行い、GPC1が、固形腫瘍に対するCAR-T細胞療法の極めて有望な標的である可能性を報告した¹⁾。また、並行して進めていた、多種のがん患者の臨床検体を用いた網羅的遺伝子発現解析から、がん微小環境およびT細胞において、SCD1が、免疫抑制を誘導する鍵分子であることを見出し、SCD1阻害剤は、CD8陽性T細胞の抗腫瘍活性を直接増強することを明らかにしている²⁾。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは未だ明らかになっていない。

そこで本研究では、SCD1阻害剤がT細胞のエフェクター機能を増強するメカニズムを明らかにし、最終的には、担癌マウスモデルを用いて、SCD1阻害剤が、抗GPC1-CAR-T細胞療法の治療効果を増強しうるかを検証し、固形がんにも有効な新たなCAR-T

細胞療法の開発を行うこととした。

2. 対象及び方法

まず、*in vitro*において、SCD1がT細胞のエフェクター機能を負に制御している分子メカニズムの解析を行った。具体的には、ヒト末梢血からCD8⁺T細胞をMACS beadsを用いて単離・活性化し、SCD1阻害剤 (A939572またはCAY10566) を作用させた。SCD1存在下、或いは、非存在下で、数日間培養した後、サイトカイン産生能、細胞内脂肪酸代謝状態およびコレステロール代謝状態を、ELISA、qPCR、WB、ガスクロマトグラフィー-質量分析および、コレステロール測定キットで評価した。

次にGPC1 CAR-T細胞に対する、SCD1阻害剤の作用を検証した。GPC1 CAR-T細胞は、マウス脾細胞を、IL-7 および concanavalin A で活性化し、翌日、抗GPC1-CAR遺伝子を導入することで作製した。

1) 日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野

2) 日本大学医学部産婦人科学系産婦人科学分野

加藤侑希 : kato.yuki@nihon-u.ac.jp

上記、T細胞での評価項目に加え、ターゲットのがん細胞と共培養したときの、IFN- γ 生産能および細胞傷害活性に対する効果を、それぞれ、ELISAおよびカルセイン放出アッセイにより評価した。

最後に、担癌マウスモデルを用いて、SCD1阻害剤と抗GPC1-CAR-T細胞の併用治療効果を評価した。具体的には、8週齢のC57BL/6マウスの脇腹にGPC1を恒常的に発現させたマウス肉腫細胞(MCA205-mGPC1細胞)を皮下接種し、移植4日後に、培養したGPC1-mCAR-T細胞、または、マウスコントロールT(mCont-T)細胞を静脈内投与した。その後、IL-2を1日2回、合計6回腹腔内注射した。また、併用療法群のマウスには、腫瘍移植後4日目から16日間、1日2回、10mg/kgのA939572を経口投与した。

3. 結果

3-1. SCD1阻害剤は、acetyl-CoA acetyltransferase 1 (ACAT1) 依存的なコレステロールエステル化反応の抑制を介して、T細胞のエフェクター機能を増強する

我々はこれまでに、SCD1がCD8⁺T細胞に対して直接的な免疫抑制活性を持つことを明らかにしてきたが、その分子メカニズムは明らかにされていない。そこで、SCD1阻害剤がCD8⁺T細胞に直接作用し、その抗腫瘍活性を増強するかを評価した。抗CD3および抗CD28抗体で活性化したヒトCD8⁺T細胞をSCD1阻害剤で処理すると、SCD1が生成する脂肪酸であるオレイン酸およびパルミトレイン酸の細胞内レベルが低下し、CD8⁺T細胞によるIFN- γ 生産が著しく増強した。興味深いことに、このSCD1阻害剤によるT細胞機能増強効果は、パルミトレイン酸ではなくオレイン酸の添加によってキャンセルされた。従って、SCD1によって細胞内のオレイン酸の増加を介してT細胞活性が抑制されていることが示唆された。

これまでに、オレイン酸は、コレステロールエステラーゼであるACAT1の最良の基質で、また、ACAT1遺伝子ノックアウトがCD8⁺T細胞による細胞傷害性サイトカイン産生を増強することが報告されている³⁾。そこで我々は次に、CD8⁺T細胞のエフェクター機能におけるSCD1とACAT1の関係を明らかにしようと試みた。CD8⁺T細胞において

ACAT1によって制御されるコレステロールのエステル化に対するSCD1阻害剤の効果を評価したところ、SCD1阻害剤はエステル化コレステロール(ACAT1代謝産物)とコレステロール(ACAT1代謝前駆体)の比率(代謝産物/基質比)を低下させることがわかった。詳細な解析の結果、SCD1阻害剤は細胞内の総コレステロール量にはほとんど影響を与えず、エステル化コレステロールを有意に減少させることが判明した。更に、エステル化コレステロールであるオレイン酸コレステリルの添加により、CD8⁺T細胞による、SCD1阻害剤誘導性IFN- γ 産生の増強がキャンセルされることが判明した。これらの結果から、SCD1阻害剤は、細胞内オレイン酸レベルを低下させることにより、ACAT1依存的に産生されるエステル化コレステロールを減少させ、T細胞のエフェクター機能を増強している可能性が示唆された。

3-2. SCD1阻害剤は、GPC1特異的マウスCAR-T細胞の抗腫瘍機能を高める

SCD1阻害剤が、CD8⁺T細胞に直接作用し、その抗腫瘍機能を高める可能性が示唆されたため、SCD1阻害剤がCAR-T細胞の抗腫瘍機能も高めるかどうか検討した。我々はこれまでに、GPC1高発現の固形がんに対して強力な抗腫瘍活性を発揮するGPC1特異的マウスCAR-T(GPC1-mCAR-T)細胞を開発している²⁾。この、GPC1-mCAR-T細胞をSCD1阻害剤で処理すると、T細胞と同様に、細胞内のオレイン酸およびエステル化コレステロールレベルの著明な低下が確認された。続いて、SCD1阻害剤処理または非処理のGPC1-mCAR-T細胞とmGPC1を安定発現するMCA205腫瘍細胞(MCA205-mGPC1)を*in vitro*で共培養し、サイトカイン分泌能および細胞傷害性を評価した。その結果、SCD1阻害剤処理により、GPC1-mCAR-T細胞のIFN- γ 産生および細胞傷害活性が有意に向上することが示された。

SCD1阻害剤が、*in vitro*でCAR-T細胞のエフェクター機能を高めることから、MCA205-mGPC1移植担癌マウスモデルを用いてGPC1-mCAR-T細胞とSCD1阻害剤の併用効果を評価した。その結果、SCD1阻害剤とGPC1-mCAR-T細胞の併用療法はGPC1-mCAR-T細胞単独、SCD1阻害剤単独よりも強い抗腫瘍活性を示した。これらの結果から、SCD1-

ACAT1軸は、抗PD-1抗体やCAR-T細胞療法を併用したがん免疫療法の治療効果を向上させるための重要なターゲットであることが強く示唆された。

4. 考 察

免疫チェックポイント阻害剤やCAR-T細胞療法などのがん免疫療法の効果を高めるためには、non-T cell-inflamedによる炎症性免疫抵抗性に関わるメカニズムを理解することが重要である。近年、抗腫瘍免疫応答を高めるためのターゲットとして、腫瘍微小環境における脂質代謝を含む免疫代謝が注目されている⁴⁾。我々は以前、脂肪酸不飽和化酵素SCD1が、がん細胞やT細胞において免疫抑制活性を持つことを明らかにし、その活性を阻害すると、がん細胞やT細胞によるCCL4などのDC-recurringケモカインの産生を増加させることにより、抗PD-1抗体の抗腫瘍活性を高めることをマウス腫瘍モデルで示した²⁾。本研究では、SCD1-オレイン酸-ACAT1-エステル化コレステロール経路を阻害することで、ヒトおよびマウスの抗腫瘍CD8⁺T細胞のエフェクター機能を直接高めるSCD1阻害の新規メカニズムを示し、SCD1-ACAT1 axisへの介入が、CAR-T細胞療法との併用がん免疫療法の開発に有用であることを明らかとした(図1)。

本研究では、SCD1-ACAT1 axisによって制御される細胞内のオレイン酸とエステル化コレステロールが、抗腫瘍CD8⁺T細胞のエフェクター機能に重要であることを明らかにしたが、エステル化コレステロールによる免疫抑制のメカニズムについては更なる検討が必要である。最近の研究では、様々な脂肪

酸がT細胞機能の重要な制御因子であることが示されている。Ma *et al.*は、多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸が、脂質過酸化とフェロトーシスの増加を介してCD8⁺T細胞によるIFN- γ 産生を低下させることを示した⁵⁾。Nava Lauson *et al.*は、リノール酸がミトコンドリア機能を向上させ、疲弊を防ぐことを通じて、CD8⁺T細胞のエフェクター機能の主要なポジティブレギュレーターであることを報告した⁶⁾。また最近では、細胞内コレステロールもまた、脂肪酸同様にT細胞の抗腫瘍活性の制御に大きな役割を果たしていることが示されている。Yang *et al.*は、CD8⁺T細胞の細胞膜におけるコレステロールレベルの上昇が、T細胞受容体のクラスタリングとシグナル伝達を促進し、その結果、サイトカインとcytotoxic granulesの産生が著しく促進されると報告した³⁾。Ma *et al.*は、CD8⁺T細胞におけるコレステロールの蓄積は、ERストレスを増大させることで、PD-1, 2B4, TIM-3, LAG-3などの免疫チェックポイント分子の発現を促進し、CD8⁺T細胞を疲弊に導くことを報告した⁷⁾。しかし、腫瘍免疫微小環境における脂質代謝の全貌は、脂肪酸代謝とコレステロール代謝のクロストークを含めて、まだ解明されていない。我々は、SCD1-ACAT1 axis, 即ち、fatty acid metabolism - cholesterol metabolism axisが、抗腫瘍CD8⁺T細胞のエフェクター機能の重要な制御因子の一つであることを証明した。脂肪酸とコレステロール、およびそれらの代謝物の適切なレベルは、抗腫瘍T細胞の機能にとって重要であると考えられ、今後さらなる研究が必要である。

5. 結 語

SCD1は、ACAT1が生成する免疫抑制性のエステル化コレステロールの増加を通じて、抗腫瘍CD8⁺T細胞のエフェクター機能を抑制していることが明らかとなった。従って、SCD1-ACAT1 axisは、CAR-T細胞療法の治療効果を増強する魅力的なターゲットである。

謝 辞

本研究遂行にあたり、多大なるご助言とご協力を賜りました。原弘之准教授、金川太郎氏および富田直子氏に深謝いたします。本研究は、令和3年度若手研究者環境整備支援助成金の支援を受けたものであります。

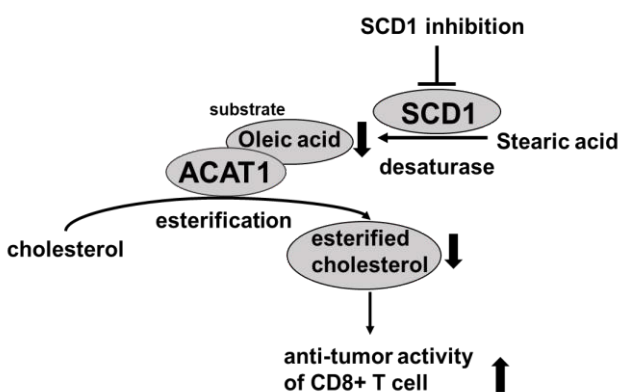


図1 SCD1阻害により、T細胞の細胞傷害活性が増強されるメカニズムの概略図。

文 献

- 1) Kato D, Yaguchi T, Iwata T, *et al.* GPC1 specific CAR-T cells eradicate established solid tumor without adverse effects and synergize with anti-PD-1 Ab. *Elife* 2020; 9: e49392.
- 2) Katoh Y, Yaguchi T, Kubo A, *et al.* Inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) enhances the antitumor T cell response through regulating β -catenin signaling in cancer cells and ER stress in T cells and synergizes with anti-PD-1 antibody. *J Immunother Cancer* 2022; 10(7): e004616.
- 3) Yang W, Bai Y, Xiong Y, *et al.* Potentiating the antitumor response of CD8(+) T cells by modulating cholesterol metabolism. *Nature* 2016; 531: 651-655.
- 4) Bader JE, Voss K, Rathmell JC. Targeting Metabolism to Improve the Tumor Microenvironment for Cancer Immunotherapy. *Mol Cell* 2020; 78: 1019-1033.
- 5) Ma X, Xiao L, Liu L, *et al.* CD36-mediated ferroptosis dampens intratumoral CD8(+) T cell effector function and impairs their antitumor ability. *Cell Metab.* 2021; 33: 1001-1012.e1005.
- 6) Nava Lauson CB, Tiberti S, Corsetto PA, *et al.* Linoleic acid potentiates CD8(+) T cell metabolic fitness and antitumor immunity. *Cell Metab* 2023; 35: 633-650.e639.
- 7) Ma X, Bi E, Lu Y, *et al.* Cholesterol Induces CD8(+) T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab* 2019; 30: 143-156.e145.

低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルにおける 成長ホルモンによる治療効果

長野 伸彦¹⁾

Therapeutic effects of growth hormone in a low birth weight-non-obese diabetes mouse model

Nobuhiko NAGANO¹⁾

要旨

日本人の小児2型糖尿病では顕著な肥満を生じない非肥満型2型糖尿病の症例が比較的多く、我々も実臨床でこの低出生体重-非肥満型2型糖尿病を発症する患者が存在することを報告した。近年、未熟性の強い早産児が成人期に至るまでインスリン抵抗性を示すとの報告が散見され、その原因の一つとして早産・極低出生体重で出生した児が、正期産児に比べて除脂肪量（主に筋肉量）が成人期に至るまで少ないことが挙げられている。我が国では、超早産児の救命率が向上し、将来的に早産・極低出生体重で出生した糖尿病の患者数は増加することが予想され、その予防法や治療法の開発が喫緊の課題である。本研究では、我々の開発した低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルに体組成改善効果（筋肉量を増やし、脂肪量を減らす）を持つ成長ホルモンを投与し、その予防・治療効果を検討した。そして幼仔期からの成長ホルモン投与は、酸化ストレスの減少によりミトコンドリア機能異常を改善し、インスリン抵抗性を改善する作用を有する可能性があることを見出した。今後、ヒトの非肥満型糖尿病発症にミトコンドリア機能異常が関連しているのか、成長ホルモンによる発症予防・治療効果があるのかを検証していく必要がある。

1. はじめに

日本は先進国の中で、平均出生体重が減少し、低出生体重児の出生頻度が増加している唯一の国である（2005年以降、約10%の割合で低出生体重児が出生している）。子宮内で低栄養に曝露された胎児は体重が減少するのみならず、その環境に適合するための体質変化が生じる。そして、出生後に児の栄養環境が改善すると相対的な過栄養状態となるために成人期に2型糖尿病などの生活習慣病を発症するリスクが高くなることが提唱された^{1) 2)}。日本人の小児2型糖尿病では顕著な肥満を生じない非肥満型2型糖尿病の症例が比較的多く³⁾、我々も、実臨床でこの低出生体重-非肥満型2型糖尿病を発症する患者が存在すること⁴⁾、小児の2型糖尿病患者の中の

一定数が低出生体重児であることを報告してきた⁵⁾。それゆえ、その予防法の開発が喫緊の課題である。我々は、低出生体重児-非肥満型糖尿病の病態メカニズムを明らかにするため、子宮内虚血操作により低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルの開発（特願2020-116354）に成功し、その高血糖発症機序が除脂肪重量の低下による筋原性インスリン抵抗性の増加とミトコンドリア機能異常であることを明らかにした⁶⁾。成長ホルモン（Growth Hormone: GH）には、身長促進効果以外にも筋肉量を増やし脂肪量を減らす体組成改善効果があることが報告されている⁷⁾。低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルを用いて、幼仔期からの成長ホルモン投与が非肥満型糖尿病の治療効果があるかを明らかにす

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野
長野伸彦：nagano.nobuhiko@nihon-u.ac.jp

ることができれば、低出生体重児の健康増進に大きく貢献できる可能性がある。

本研究の目的は、子宮内虚血を用いた低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルに成長ホルモンを幼仔期から投与することで高血糖の発症を予防できるかを明らかにすることである。

2. 対象及び方法

1) 低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルの作製

妊娠しているICR系統のマウスを用いて、妊娠16.5日にイソフルラン吸入麻酔下（導入5%，維持2%）に下腹部を切開した。子宮動脈を露出し、胎仔マウスを傷つけないようにクリップで子宮動脈の血流を15分間遮断した。その後、子宮動脈のクリップを外して胎仔を母親マウスの腹腔内に還納し、下腹部を縫合した。母親マウスはホットプレートで37.5°Cに温めた。非虚血群として、同様の麻酔と下腹部切開を加えた妊娠16.5日のマウスをコントロール群とした。

2) 高血糖発症機序の解明

その後、妊娠19日に出生した新生仔マウスの雌を虚血群、非虚血（コントロール）群の2群に分類し、連日体重計測を行った。8週齢の体重測定後、イソフルランで吸入麻酔（導入5%，維持2%）を行ない、腹囲、身長、体組成の測定を行い、心臓より全採血を行い、その後臓器を摘出した。マウスの体組成は、実験動物用体組成計を用いて、除脂肪量、脂肪量を測定した。肝臓を用いてメタボローム解析を行い、血液サンプルを用いて、糖代謝（空腹時血糖値、インスリン濃度、HOMA-R）、脂質代謝に関する生化学的検査を行った。脂質代謝に関しては、High Performance Liquid Chromatography法を用いたりポ蛋白質粒子サイズ解析による血中脂質プロファイルを行った。HPLC法を用いたりポ蛋白質粒子サイズ解析については、ゲルろ過HPLC法で、主格分画（カイロミクロン、VLDL、LDL、HDL）とトリポ蛋白サブクラスのコレステロールとトリグリセライド（TG）が測定可能である⁸⁾。

3) 成長ホルモンの効果に関する検討

妊娠19日に出生した新生仔マウスの雌を虚血群、非虚血（コントロール）群の2群に分類し、連日体重計測を行った。生後4週から成長ホルモンをマウ

スの頸背部皮下に週6回注射した（0.5mg/kg/weekを4週間使用）。実験動物用体組成計を用いて、除脂肪量、脂肪量を8週齢に測定した。その後、採血を行い、肝臓を摘出した。血液を用いて、糖代謝（空腹時血糖値、インスリン濃度、HOMA-R）、脂質代謝に関する生化学的検査、肝臓を用いてメタボローム解析を行った。

3. 結果

1) 低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルの作製

出生体重の中央値は虚血群1.5g、非虚血（コントロール）群1.9gと虚血群で有意に低かった（ $p < 0.05$ ）。成獣期（雌）の体重、空腹時血糖値、インスリン濃度、HOMA-Rはそれぞれ中央値で虚血群36.9g、196.9mg/dL、 $3.9 \mu\text{IU/mL}$ 、1.9、非虚血群41.2g、75.0mg/dL、 $1.4 \mu\text{IU/mL}$ 、0.3であった。成獣期になっても虚血群は非虚血群に比べて低体重（特に除脂肪重量が低下）であるにも関わらず、血糖、インスリン濃度、HOMA-R、総TGが有意に高かった（表1, $p < 0.05$ ）。

2) 高血糖発症機序の解明

肝臓のメタボローム解析（ n はそれぞれ3）では、ATP、乳酸の中央値はそれぞれ虚血群16.0nmol/g、14.9nmol/g、非虚血群37.0nmol/g、5.7nmol/gと虚血群では、ATPが低く、乳酸が高値であり（ $p < 0.05$ ）、ミトコンドリア機能異常の存在が確認された（図1）。高血糖発症の機序は、ミトコンドリア機能異常による筋肉量減少に伴うインスリン抵抗性の増加が考えられた。

3) 成長ホルモンの効果に関する検討

虚血群のGH投与群と非投与群（ n はそれぞれ6）の比較では、8週齢の空腹時血糖値に有意な差を認めなかった（虚血GH投与群平均：166.3mg/dL、虚血GH非投与群：171mg/dL）。一方で、脂肪重量と除脂肪重量についてはそれぞれ平均値で、虚血GH投与群が10.9 g、21.3 gで虚血GH非投与群が18.7 g、16.6 gと虚血GH投与群で有意に脂肪重量の減少と除脂肪重量の増加を認めた（ $p < 0.01$ ）。肝臓のメタボローム解析（ n はそれぞれ3）の結果（階層的クラスター解析）では、明らかにGH投与群は非投与群では代謝産物が異なっていた（図2）。

特に着目すべき点として、GH投与により、虚血

表 1 低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデル

	Control (n=7)	Ischemia (n=7)	p-Value
Blood glucose (mg/dL)	75.0	196.9	<0.01
IRI (μIU/mL)	1.4	3.9	0.03
HOMA-R	0.3	1.9	<0.01
Fat mass (g)	17.7	16.6	0.95
Free fat mass (g)	22.6	19.1	0.01
Total-triglyceride (mg/dL)	37.3	82.1	0.02

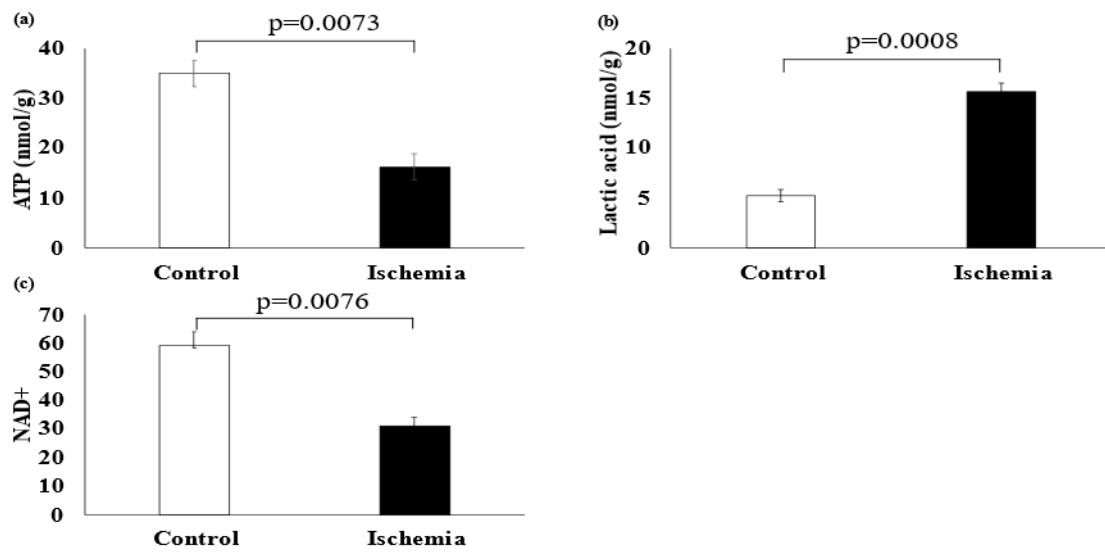


図 1 肝臓のメタボローム解析 (ミトコンドリア機能関連)

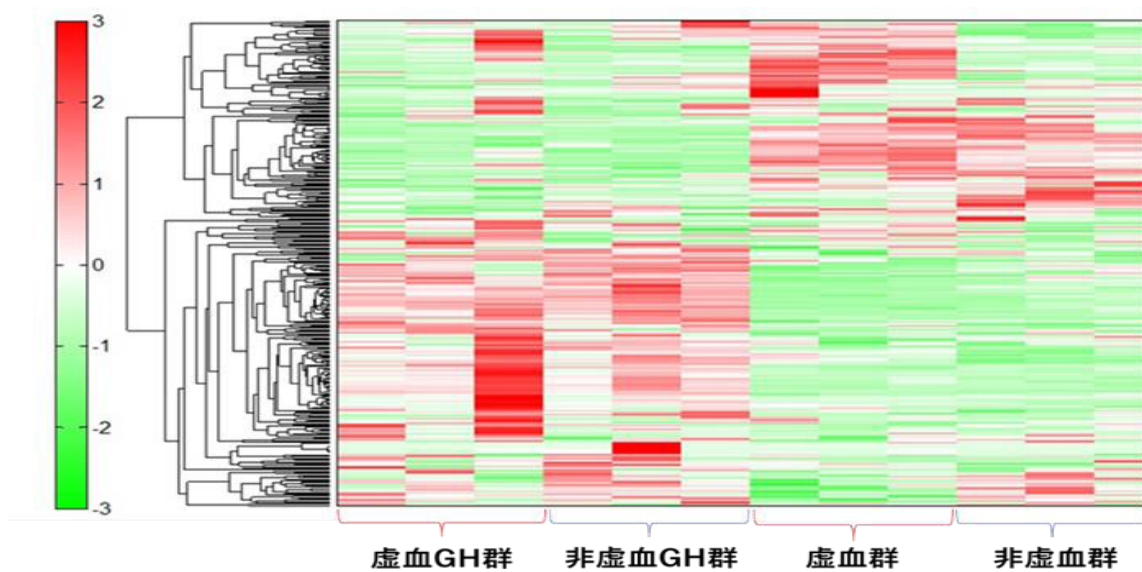


図 2 成長ホルモン投与の有無による肝臓のメタボローム解析の違い (階層的クラスター解析)

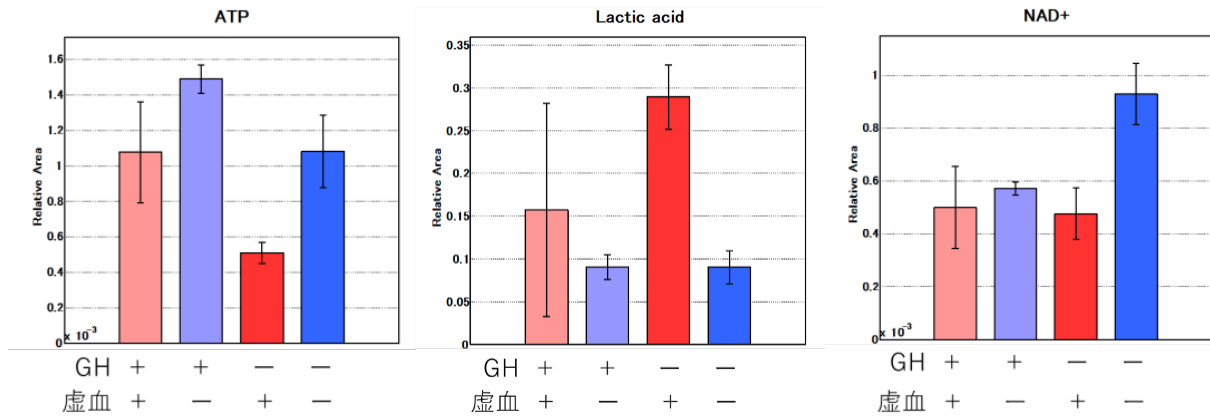


図3 成長ホルモン投与の有無による肝臓のメタボローム解析 (ミトコンドリア機能関連)

Major Category	Compound name	Comparative Analysis							
		Ischemia vs Control		IschemiaGH+ vs Control		IschemiaGH+ vs Ischemia		Control GH+ vs Control	
		Ratio [†]	p-value [‡]	Ratio [†]	p-value [‡]	Ratio [†]	p-value [‡]	Ratio [†]	p-value [‡]
Anti-oxidant	Ascorbic acid	1.1	0.184	1.1	0.566	1.0	0.802	1.3	0.073
	Carnosine	0.9	0.684	1.1	0.740	1.3	0.451	0.8	0.605
	Ergothioneine	0.5	0.008	0.9	0.814	2.0	0.108	0.9	0.563
	Glutathione (GSH)	1.9	0.030	1.6	<0.001	0.8	0.164	1.6	0.035
	Hypotaurine	1.3	0.359	1.8	0.041	1.5	0.076	1.9	0.100
Oxidative stress	3-Indoxylsulfuric acid	1.6	0.024	1.2	0.296	0.8	0.175	1.1	0.632
	Cysteine	2.3	0.032	6.8	0.188	3.0	0.265	4.7	0.034
	Methionine sulfoxide	1.2	0.444	1.4	0.564	1.2	0.723	1.8	0.131
	N,N-Dimethylglycine	0.9	0.677	0.5	<0.001	0.6	0.109	0.6	0.059
	S-Adenosylmethionine	1.6	0.005	0.6	0.055	0.4	0.004	0.4	0.005

各群 n=3 (自施設データ)

図4 成長ホルモン投与の有無による肝臓のメタボローム解析 (酸化ストレス関連)

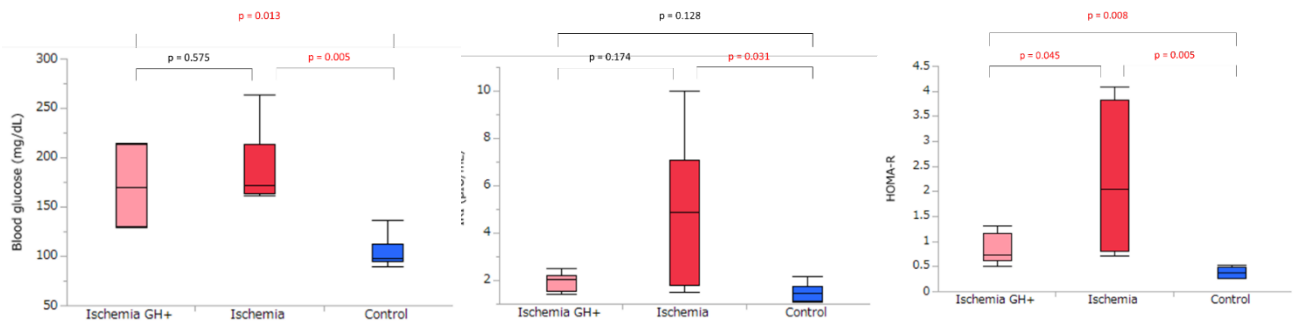


図5 成長ホルモン投与の有無による血糖, インスリン濃度, HOMA-Rの比較

群と非虚血群間で認められていたATPや乳酸の産生の差が認められなくなっていた(図3)。また、成長ホルモン投与は、非投与群と比較して肝臓において抗酸化物質が増加し、酸化ストレスマーカーが減少した(図4)。

またインスリン濃度とHOMA-Rの検討では、GH投与により虚血群と非虚血群間に認められていたインスリン濃度の差がなくなり、HOMA-Rの低下を認めた(図5)。

4. 考 察

1) 早産児のインスリン抵抗性

超低出生体重で出生した平均32歳の成人100例を対象とした報告によると、正常産出生の成人と比べて4倍の耐糖能異常リスクがある⁹⁾。163例の早産出生の成人を対象とした報告によると、正常産出生の成人と比べて空腹時血清インスリン値やインスリン抵抗性指数(HOMA-R)が有意に高い。近年未熟性の強い早産児が、成人期に至るまでインスリン抵抗性を示すとの研究が散見される¹⁰⁾。

2) 早産・低出生体重児のインスリン抵抗性の要因

要因としては、以下の2つが考えられている。

①筋肉量減少に伴う筋原性インスリン抵抗性

我々のモデルマウスでは、除脂肪重量が少なかった。早産・極低出生体重で出生した児は、5歳時点で正常産児に比べて除脂肪量(主に筋肉量)が少ないという報告¹¹⁾があり、低出生体重で出生した児が成人期において、筋容積減少や筋細胞機能異常を呈するとも報告されている^{12) 13)}。また、出生時に発育不全を伴っていたマウスが成獣期に筋容量低下や筋組成の変性を認め、インスリン抵抗性と関連していたとする報告もある¹⁴⁾。成長ホルモンは、筋肉量増加効果を持ち、実臨床でも我々は低出生体重児が成長ホルモン投与開始2年後にインスリン抵抗性の改善を認めることを見出している¹⁵⁾。

②ミトコンドリア機能異常

我々のモデルでは虚血群がコントロール群と比して、ATPが低く、乳酸が高値であり、ミトコンドリア機能異常の存在が示唆された。虚血、血流の再灌流によってreactive oxygen species (ROS)などの酸化ストレスが産生されミトコンドリア機能の低下をもたらすと報告されている¹⁶⁻¹⁹⁾。我々のモデルで、虚血群はコントロール群と比較して酸化ストレス

マーカーが高かった。また実際の2型糖尿病患者でも健常者と比較して、ミトコンドリア呼吸鎖複合体あるいはミトコンドリア代謝関連遺伝子の発現低下を認めるという報告^{20) 21)}や末梢血細胞中のミトコンドリアDNA量の低下が、インスリン抵抗性と相関するという報告²²⁾もある。一方、成長ホルモンは、肝臓脂肪合成の抑制作用²³⁾を持ち、成長ホルモンの代謝産物であるinsulin-like growth factor-1 (IGF-1)は肝細胞における酸化ストレスを軽減すると報告されている²⁴⁾。成長ホルモン投与による酸化ストレス軽減作用が、ミトコンドリア機能の改善と関連している可能性がある。

5. 結 語

虚血による酸化ストレスの増加は、ミトコンドリア機能障害を引き起こす。ミトコンドリア機能障害は筋萎縮を引き起こし、非肥満型糖尿病の原因となる筋肉量減少によるインスリン抵抗性の増加と関連している可能性がある。成長ホルモンの投与は、酸化ストレスの減少によりミトコンドリア機能異常を改善し、インスリン抵抗性を低下させる作用を有する可能性がある。今後、ヒトの非肥満型糖尿病発症にミトコンドリア機能異常が関連しているのか、成長ホルモンによる発症予防・治療効果があるのかを検証していく必要がある。

謝 辞

本研究は、日本大学学術研究助成〔若手研究者環境整備支援助成金〕を受けたものです。

文 献

- 1) De Boo HA, Harding JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006, 46: 4-14.
- 2) Barker DJP, et al. Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. *N Engl J Med* 2005, 353: 1802-9.
- 3) Urakami T, Kuwabara R, Habu M, et al. Clinical characteristics of non-obese children with type 2 diabetes mellitus without involvement of β -cell autoimmunity. *Diabetes Res Clin Pract* 2013, 99: 105-11.
- 4) Nagano N, Kaneko C, Ohashi S, et al. Non-obese type 2 diabetes with a history of being an extremely preterm small-for-gestational-age infant without early adiposity rebound. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, 19: 8560.
- 5) Abe Y, Urakami T, Hara M, et al. The Characteristics of abdominal fat distribution in Japanese adolescents

- with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019, 12: 2281-2288.
- 6) Katayama D, Nagano N, Shimizu S, et al. A Non-Obese Hyperglycemic Mouse Model that Develops after Birth with Low Birthweight. *Biomedicines* 2022, 10(7): 1642.
 - 7) Bengtsson BA, Brummer RJ, Bosaeus I. Growth hormone and body composition. *Horm Res* 1990, 33 Suppl 4: 19-24.
 - 8) Nagano N, Okada T, Yonezawa R, et al. Early postnatal changes of lipoprotein subclass profile in late preterm infants. *Clinica Chimica Acta* 2012, 18: 109-12.
 - 9) Morrison KM, Ramsingh L, Gunn E, et al. Cardiometabolic health in adults born premature with extremely low birth weight. *Pediatrics* 2016, 138.
 - 10) Hovi P, Andersson S, Eriksson JG, et al. Glucose regulation in young adults with very low birth weight. *N Engl J Med* 2007, 356: 2053-2063.
 - 11) Gianni ML, Roggero P, Piemontese P, et al. Boys who are born preterm show a relative lack of fat-free mass at 5 years of age compared to their peers. *Acta Paediatr* 2015, 104: e119-e123.
 - 12) Jensen CB, Martin-Gronert MS, Storgaard H, et al. Altered PI3-kinase/Akt signalling in skeletal muscle of young men with low birth weight. *PLoS One* 2008, 3: e3738.
 - 13) Jensen CB, Storgaard H, Madsbad S, et al. Altered skeletal muscle fiber composition and size precede whole-body insulin resistance in young men with low birth weight. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92: 1530-1534.
 - 14) Beauchamp B, Ghosh S, Dysart MW, et al. Low birth weight is associated with adiposity, impaired skeletal muscle energetics and weight loss resistance in mice. *Int J Obes (Lond)* 2015, 39: 702-711.
 - 15) Suzuki J, Urakami T, Morioka I. Greater insulin resistance in short children born small-for-gestational age than in children with growth hormone deficiency at the early period of growth hormone therapy. *Pediatr Int* 2021; 63: 1180-1184.
 - 16) Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol* 2015, 6, 524-551.
 - 17) Crabtree MJ, Hale AB, Channon KM. Dihydrofolate reductase protects endothelial nitric oxide synthase from uncoupling in tetrahydrobiopterin deficiency. *Free Radic. Biol. Med.* 2011, 50: 1639-1646.
 - 18) Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 2007, 12: 815-833.
 - 19) Yu N, Wang S, Wang P, Li Y, Li S, Chen H, Wang T. The calcium uniporter regulates the permeability transition pore in isolated cortical mitochondria. *Neural Regen. Res* 2012, 7: 109-113.
 - 20) Kelley DE, He J, Menshikova EV, et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002, 51: 2944-2950.
 - 21) Petersen KF, Dufour S, Befroy D, et al. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004, 350: 664-671.
 - 22) Song J, Oh JY, Sung YA, et al. Peripheral blood mitochondrial DNA content is related to insulin sensitivity in offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2001, 24: 865-869.
 - 23) Cordoba-Chacon J, Majumdar N, List EO, et al. Growth Hormone Inhibits Hepatic De Novo Lipogenesis in Adult Mice. *Diabetes* 2015, 64: 3093-103.
 - 24) Higashi Y, Sukhanov S, Anwar A, et al. IGF-1, oxidative stress and atheroprotection. *Trends Endocrinol Metab.* 2010, 21: 245-54.

低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病の病態解明

— 新規モデルマウスによる腎機能解析 —

清水翔一¹⁾, 長野伸彦¹⁾, 片山大地¹⁾, 松田健剛¹⁾,
徳永航¹⁾, 中崎公隆¹⁾, 森岡一朗¹⁾

Analysis of renal function in a low birth weight-type 2 diabetes mouse model

Shoichi SHIMIZU¹⁾, Nobuhiko NAGANO¹⁾, Daichi KATAYAMA¹⁾,
Kengo MATSUDA¹⁾, Wataru TOKUNAGA¹⁾,
Kimitaka NAKAZAKI¹⁾, Ichiro MORIOKA¹⁾

要旨

低出生体重児は将来、慢性腎臓病や糖尿病を発症しやすいが、その発症機序は未だ明確ではない。そのため本研究では低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病モデルマウスを用いてメカニズムを検討した。ICR系統の妊娠マウスを妊娠16.5日に両側子宮動脈の血流をクリップで遮断し、胎児の低酸素と低栄養を引き起こした群を虚血群 (I) として、コントロール群 (C) と比較した。8週齢の時点では2群間に腎病理組織学的な変化を認めなかった。しかしI群では微量アルブミン尿といった、慢性腎臓病・糖尿病性腎症の早期発見のマーカーをすでに認めていた。さらに腎臓のメタボローム解析でも2群間に明確な差を認めた。特に腎障害と関連の深い、コハク酸、S-アデノシルメチオニン、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamideに2群間に有意な差異を認めていた。低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病モデルマウスは慢性腎臓病や糖尿病を引き起こす可能性があり、その病態にはコハク酸、S-アデノシルメチオニン、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamideが関わっている可能性が示唆された。

1. はじめに

本邦では少子化が進む一方、低出生体重児の割合は減少していない。低出生体重児は将来、慢性腎臓病や糖尿病を発症しやすいが¹⁾、そのメカニズムの解明と予防法の開発が喫緊の課題である。我々は、子宮内虚血操作により低出生体重-非肥満2型糖尿病マウスモデルの作成に世界で初めて成功した (特願2020-116354)²⁾。本研究の目的は、我々の開発したマウスモデルの腎組織形態、尿検査を用いた腎機能評価で慢性腎臓病の存在を明らかにすること、さらに腎臓組織のメタボローム解析を用いて、腎障害の発症機序を解明することである。その結果、低出生体重児の成人期の慢性腎臓病や糖尿病性腎症に関与する新しいメカニズムを明らかにする。

既報では、慢性腎臓病の病態メカニズムの仮説と

して、酸化還元反応の破綻を介したミトコンドリア内膜での代謝異常によってミトコンドリア障害や、腎臓のAMP/ATP比の上昇が、AMP活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の細胞内エネルギー不良を起こすことが推測されている³⁾。しかし、低出生体重児に発症する慢性腎臓病においてもそれらの病態メカニズムが関連しているかは不明である。そのために、子宮内虚血による低出生体重-非肥満2型糖尿病マウスモデルを使用し、慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症モデルを作成した。そのモデルを用いて、腎臓組織のメタボローム解析、腎病理学的解析にて低出生体重の慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症の病態メカニズム解析を行うことを目的とした。

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野
清水翔一: shimizu.shoichi@nihon-u.ac.jp

2. 対象及び方法

妊娠12日目のICR系統マウス（三共ラボサービス株式会社 東京，日本）を入手した。すべてのマウスに通常食を与え，水を自由に摂取させた。妊娠マウスを，妊娠16.5日にイソフルラン麻酔下で下腹部を切開した。両側子宮動脈の血流をクリップで遮断し，胎児の低酸素と低栄養を引き起こした群を虚血群（I）とした。15分後クリップを外し，胎子を腹腔内に還納，腹部を縫合した。同様の麻酔下で下腹部の切開のみを行った群をコントロール群（C）とした。出生したI群とC群の雌の新生仔を4週齢で離乳し，8週齢まで普通食で飼育した（各群：n=10）。体重測定は出生時と8週齢まで週2回行った。7～8週齢に蓄尿を行い，尿検査にて尿中 β 2マイクログロブリンおよびアルブミンの測定を行った。尿中クレアチニン，尿中 β 2マイクログロブリンおよびアルブミンは，マウスを実験動物用代謝ケージで飼育した状態で採取した24時間尿検体から，従来のクレアチニンデアミナーゼを用いた酵素法で測定した。その後腎臓摘出を行い，腎臓切片を作成し，hematoxylin and eosin 染色および，Periodic acid-Schiff 染色を行い，まず病理組織学的な検討を行った。具体的には糸球体径，メサンギウムの拡大の有無，硬化病変の割合について比較した。

さらに腎機能や糖代謝に関する腎臓メタボローム解析を行った。各群マウスの凍結腎臓組織切片を処理し，キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析

計を用いて行った。

統計解析はJMP ver. 14（SAS Institute Cary NC, USA）を用いて行った。p値<0.05を有意差とした。なお，全てのプロトコールと手順は，日本大学医学部動物実験委員会の承認を受け実施した（承認番号AP21MED002-2）。

3. 結果

論文公表前のデータであるため現時点での詳細な公表は避ける。出生体重，体重推移については先行研究²⁾と同様に，C群と比較してI群で有意に低体重であった（図1）。つまり子宮内虚血によって低出生体重仔が産まれた。その後もI群は低体重で推移し，8週齢でもI群は低体重のまま推移した。続いて，両群の8週齢における腎臓病理組織所見を比較した。各群の腎臓病理標本を用いて，糸球体径，メサンギウムの拡大の有無，硬化病変の割合において，両群間に有意差は認めなかった。

一方，7週齢での蓄尿尿中 β 2マイクログロブリンおよびアルブミンの結果を図2に示した（n=7）。両群の7週齢の尿中 β 2マイクログロブリンおよびアルブミンの平均値は，C群（26 μ g/L，2.7 mg/dL）と比較して，I群（116 μ g/L，6.5 mg/dL）で有意に高かった。つまり，腎臓病理組織学的な影響はまだ認めていない若い週齢ではあるが，微量アルブミン尿といった，慢性腎臓病・糖尿病性腎症の早期発見のマーカーをすでに認めていた。続いて腎臓のメタボ

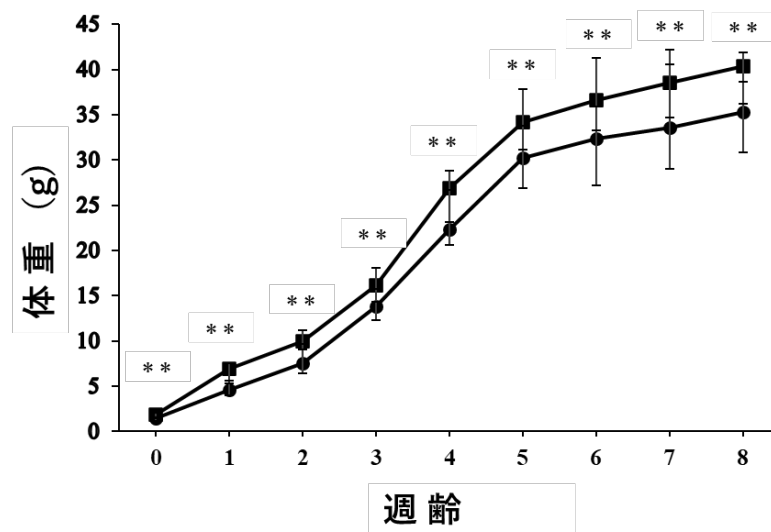


図1 8週齢までの各週齢における2群間の体重の推移（●：I群，■：C群，各群n=10，** p<0.01）

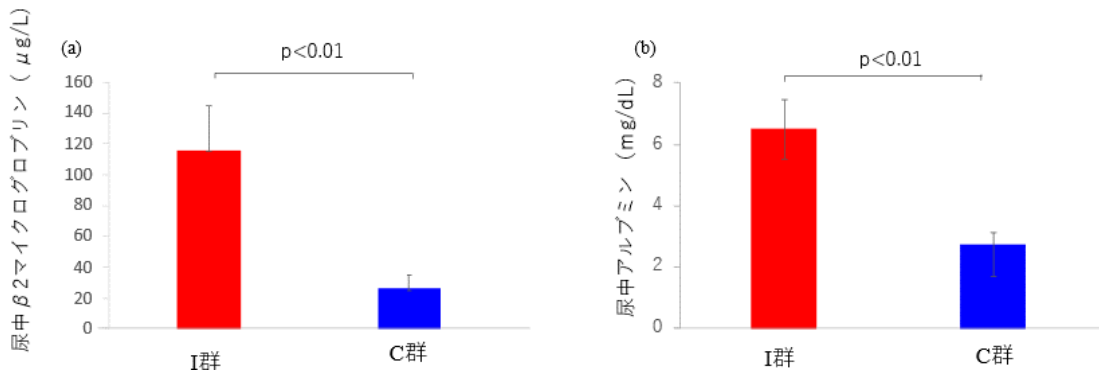


図2 7週齢での蓄尿検査結果 (各群n=7)

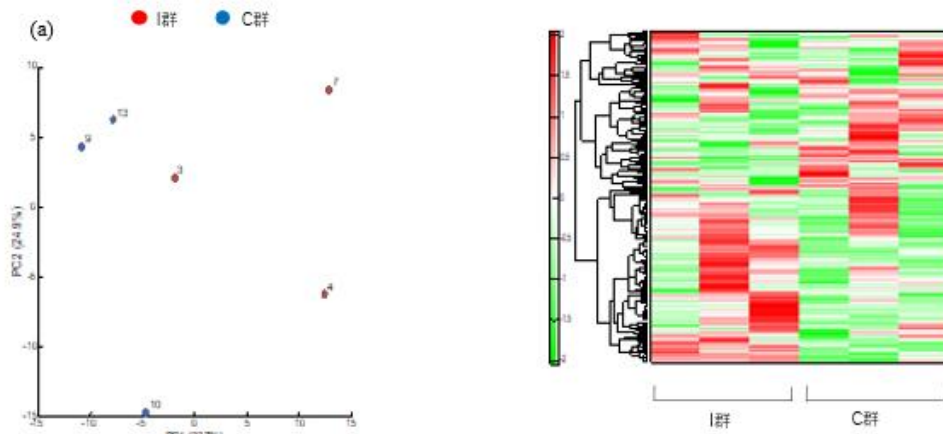


図3 メタボローム解析 (a) 主成分 (PC) 分析 (b) 階層型クラスター分析のヒートマップ表示 (各群n=3)。

ローム解析を行った。主成分分析および階層型クラスター分析のヒートマップ表示において、I群とC群との間に明確な差が見られた (図3)。コハク酸、スベルミジンはC群よりもI群で有意に高く (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$)、S-アデノシルメチオニン、5'-シチジル酸は、C群よりもI群において有意に低かった (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$)。Human Metabolome Databaseを用いた物性分類では、腎機能障害の指標となる、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamideがC群よりもI群で有意に高かった ($p < 0.05$)。

4. 考察

低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病マウスモデルにおいて、8週齢という比較的若い時期では、腎臓病理組織学的な変化は来しておらず、慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症を発症するという結論には至

らなかった。しかしすでに微量アルブミン尿を認め、慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症の予兆を来していた。腎臓のメタボローム解析においては、C群よりもI群でコハク酸の有意な高値を認めていた。高血糖によりミトコンドリアのコハク酸が多量に産生され、コハク酸受容体が存在する遠位尿細管に伴って存在するプロレニンを活性化し、レニンが産生されるというのでは腎障害に関連するという既報もあり⁴⁾、コハク酸の低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病マウスモデルの慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症に関与している可能性が示唆された。またC群よりもI群で有意な低値を示した、S-アデノシルメチオニンはメチオニンから生成され直接のメチル基供与体である⁵⁾。そのためS-アデノシルメチオニンの不足が組織によるメチル化の割合が低下を招き、腎臓組織の組織修復能の低下に繋がった可能性も示唆される。

Human Metabolome Databaseを用いた物性分類では、腎機能障害の指標となる、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamideがC群よりもI群で有意に高く、これらが同モデルの慢性腎臓病、糖尿病性腎症発症に関連する可能性があると思われた。今後さらに週齢を重ねて実験をすすめていく予定である。

5. 結 語

低出生体重-肥満・非肥満2型糖尿病モデルマウスは慢性腎臓病や糖尿病を引き起こす可能性を認められた。またその病態にはコハク酸、S-アデノシルメチオニン、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamideなどが関わっている可能性が示唆された。

謝辞

本研究は日本大学学術研究助成金〔若手研究者助成〕を受けて行われたものであり、謝意を表します。

文 献

- 1) White SL, Perkovic V, Cass A, et al. Is low birth weight an antecedent of CKD in later life? A systematic review of observational studies. *Am J Kidney Dis* 2009; 54: 248-261
- 2) Katayama D, Nagano N, Shimizu S, et al. A Non-Obese Hyperglycemic Mouse Model that Develops after Birth with Low Birthweight. *Biomedicine* 2022; 10(7):1642
- 3) Kikuchi H, Sasaki E, Nomura N, et al. Failure to sense energy depletion may be a novel therapeutic target in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2019; 95: 123-137
- 4) Toma I, Kang JJ, Sipos A, et al. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *J Clin Invest* 2008; 118: 2526-2534
- 5) Obata F, Kuranaga E, Tomioka K, et al. Necrosis-driven systemic immune response alters SAM metabolism through the FOXO-GNMT axis. *Cell Rep* 2014; 7: 821-833

ホエイプロテインの体脂肪減少効果 — カゼインプロテインとの比較 —

青木亮二¹⁾, 中崎公隆¹⁾, 長野伸彦¹⁾, 森岡一朗¹⁾

Body fat reducing effects of a whey protein diet

Ryoji AOKI¹⁾, Kimitaka NAKAZAKI¹⁾, Nobuhiko NAGANO¹⁾, Ichiro MORIOKA¹⁾

要旨

本研究では、乳清タンパク質食による体脂肪減少のメカニズムについて検討した。妊娠したマウスにホエイまたはカゼインを与え、その子マウスには母マウスに与えた餌を与えた。4週齢で離乳した後、雄の子マウスには実母に投与した飼料を与えた（各群n=6）。12週齢で、体重、脂肪量、空腹時血糖値、インスリン、homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)、コレステロール、トリグリセリド、肝臓組織における脂質代謝関連遺伝子の発現レベル、脂肪組織のメタボロームデータを測定し、2群間で比較した。生まれた新生仔マウスの出生体重は、両群で同程度であった。カゼイン群の仔に比べ、12週齢の時点で、ホエイ群の仔は体重が少なく、脂肪量、HOMA-IR、トリグリセリド値が有意に低く（それぞれ $p < 0.01$, $p = 0.02$, $p = 0.01$ ）、脂肪組織の抗酸化物質グルタチオンと抗炎症物質1-メチルニコチンアミド値が有意に高かった（それぞれ $p < 0.01$, $p = 0.04$ ）。空腹時血糖値、インスリン、コレステロール値（それぞれ $p = 0.75$, $p = 0.07$, $p = 0.63$ ）、脂質代謝関連遺伝子の発現レベルには差が見られなかった。ホエイプロテインはカゼインプロテインよりも抗酸化作用や抗炎症作用が強く、それが体脂肪を減らすメカニズムと関連していると考えられた。

1. はじめに

日本は、平均出生体重が減少し、低出生体重児の出生率が減少していない先進国の一つである¹⁾。低出生体重児は、成人後に肥満や2型糖尿病などの疾患を発症するリスクが高くなる。胎児は、子宮内で栄養不足になると、体重増加が遅れる環境に適応するために生理的な変化を起こし、出生後に栄養環境が改善されると相対的に栄養過多となる。Developmental origins of health and disease (DOHaD) 理論²⁾は、病気のリスクを十分に理解することで、生涯にわたってその発症を回避する必要があることを示している。小児科医にとって、DOHaD理論は、そもそも病気の発症を防ぐためには、幼児期や思春期前の栄養管理が必要であるという考えを支持して

いる³⁾。本研究では、低出生体重児が将来罹患しやすいメタボリックシンドロームの発症を予防する可能性がある栄養素である乳清タンパク質に注目した。

ホエイプロテインは、ヨーグルトやチーズなどの乳製品に多く含まれる栄養豊富な乳タンパク質で、多くの健康効果があるとされている。ホエイプロテインは機能性食品とされ、近年では栄養補助食品としての需要も高まっている⁴⁾。また、ホエイプロテインは母乳や人工乳にも含まれている。母乳中のタンパク質組成は、授乳期間中に変化する。初乳は90%のホエイプロテインと10%のカゼインタンパク質で構成されているが、成熟した母乳ではその比率がホエイ60%、カゼイン40%に移行する。一方、

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野
青木亮二: aoki.ryoji@nihon-u.ac.jp

人工乳は通常、20%のホエイプロテインと80%のカゼインタンパク質で構成されている⁴⁾。ホエイプロテインの主な成分としては、ラクtofエリン、ベータラクtoグロブリン、アルファラクtoアルブミン、グリコマクロペプチド、免疫グロブリンなどがある⁵⁾。ホエイプロテインの健康増進効果を生化学的なレベルで証明する証拠が増えつつある。

詳細は以下の通りである：

1. **糖代謝効果**：ホエイプロテインは、末梢組織におけるセロトニンおよび肝臓組織における線維芽細胞増殖因子21の分泌を抑制することにより、インスリン抵抗性を改善する⁶⁾。
2. **筋肉タンパク質合成効果**：ホエイプロテインは、筋肉の合成に必要な代謝経路であるmTOR (mammalian target of rapamycin) を活性化することにより、筋肉の合成を促進する⁷⁾。
3. **抗炎症作用**：マウス肝炎モデルにおいて、ホエイプロテインが炎症性サイトカインの産生を抑制し、肝細胞の壊死やアポトーシスを抑制する⁸⁾。同様の結果が臨床でも認められ、COPD患者の炎症反応を抑制した⁹⁾。
4. **抗酸化作用**：ホエイプロテインは、in vitroで抗酸化作用の発現を示す¹⁰⁾。
5. **脂質代謝効果**：ホエイプロテインは、脂質代謝に関わる転写因子に影響を与えることにより、マウスにおいてトリグリセリドの分解を促進し、脂肪酸の合成を阻害する¹¹⁾。

最近、実臨床で低出生体重児が若年で非肥満型の2型糖尿病を発症するとの報告が散見される。桑原らは、出生後十分な栄養で育った低出生体重児が成人後に2型糖尿病を発症することが多く、発症時には皮下脂肪に比べ内臓脂肪の蓄積が著しいと報告した¹²⁾。長野らは、超早産のSmall-for-gestational age児は、若年で非肥満型2型糖尿病を発症する可能性があり、その原因検索のために体組成の検討を行った。その結果、体脂肪は正常範囲にあるが筋肉量は不足していることを発見し、非肥満型2型糖尿病の発症に筋肉量が関与している可能性を示唆している¹³⁾。早産・低出生体重児が2型糖尿病を発症しやすい原因として、早産児は満期産児に比べて酸化ストレスマーカーの値が高いことが報告されている¹⁴⁾。さらに、男性は女性よりも酸化ストレスマーカーのレベルが高いことが報告されており、その結果、男性は

2型糖尿病や心血管イベントを起こしやすいとされている^{15, 16)}。ホエイプロテインの筋肉合成の促進、グルコースおよび脂質代謝の改善効果、ならびに抗炎症および抗酸化作用により、乳幼児期、幼児期、思春期前にホエイプロテインを多く含む食事を与えることは、その後の糖尿病の発症を予防することにつながると考えられる。しかし、ホエイプロテインがこれらの効果を発揮するメカニズムについては、まだ完全に解明されていない¹⁷⁾。

そこで本研究では、胚発生から成体までホエイプロテインを曝露した雄マウスを、同時期にカゼインタンパク質食に曝露して飼育したマウスと比較して、身体的および生化学的变化を測定することにより、ホエイプロテインがグルコースおよび脂質代謝に及ぼす影響を調べ、体脂肪減少に関与する潜在的メカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. 対象及び方法

2.1. 実験動物について

すべての実験プロトコルおよび手順は、日本大学板橋病院動物実験委員会の承認を得た（承認ID：AP20MED018-1, 承認日：2020年6月5日）。妊娠2日目のInstitute of Cancer Research (ICR) 妊娠マウスは、三共ラボサービス株式会社（東京都千代田区）から購入した。

2.2. 飼育条件

ICR妊娠マウスは到着後、カゼイン食群およびホエイ食群の2群に分けた。出生後、雄の仔マウスを選択し、母親と同じ飼料で飼育した。温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12/12時間の明暗サイクルのもとで飼育された。カゼイン群では、マウス実験において妊娠期および成長期に投与される標準的なげっ歯類飼料であるAIN-93G（カゼイン20%、L-シスチン0.3%、コーンスターチ39.7486%、 α -コーンスターチ13.2%、スクロース10.0%、大豆油7.0%、セルロースパウダー5.0%、ミネラル3.5%、ビタミン1.0%、コリンビタレート0.25%、ターシャリーブチルヒドロキノン0.0014%：エネルギー359kcal）（オリエンタル酵母工業株式会社, Ltd. 東京, 日本）¹⁸⁾。ホエイ群では、カゼイン成分をホエイに置き換えたAIN-93Gの改良ブレンドでマウスを飼育した。仔マウスは12週齢まで飼育された。12週齢まで飼育し、

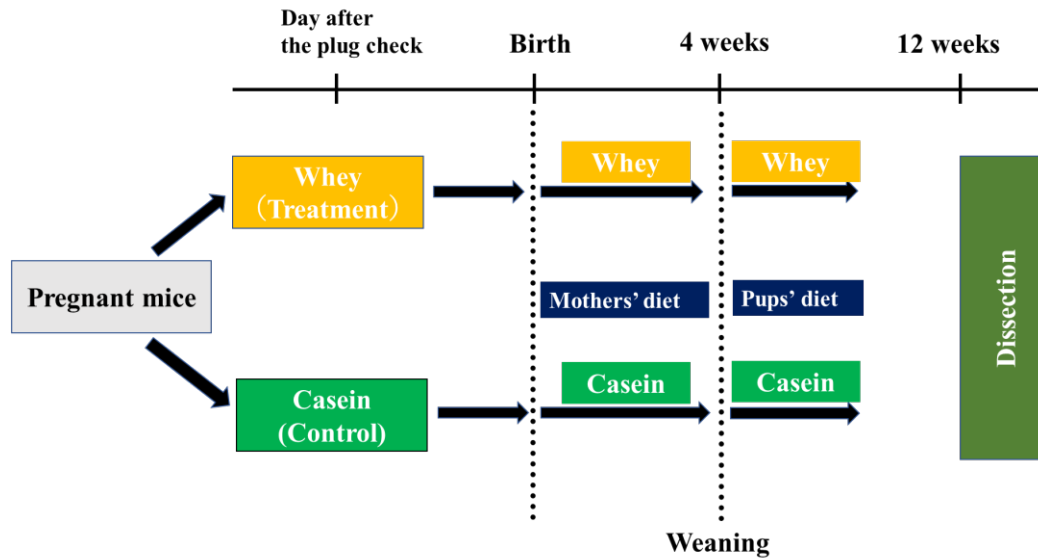


図1 実験手順 研究の流れ

身体的および生化学的測定を行った(図1)。

2.3. 体重測定

仔マウスの体重は、生後から12週齢まで週1回計測した。

2.4. 血糖値, 血清インスリン, インスリン抵抗性(HOMA-IR)

12週齢の雄成体マウスを12時間絶食させ、イソフルラン吸入麻酔(導入5%, 維持2%)下で解剖を行った。血液は正中切開による心臓穿刺で心臓から採取した。血糖値はStat Strip XP2(Nipro, Osaka, Japan)を用いて測定した。次に、3000rpmで5分間の遠心分離により全血から血清を分離し、 -20°C で保存した。血清中のインスリンは、マウス/ラット総インスリン(高感度)アッセイキット(株式会社免疫生物研究所, 群馬県藤岡市)を用いて、免疫反応性インスリン量(IRI)を評価した。また、血清は、インスリン抵抗性について、homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)¹⁹⁾を用いた。

2.5. 体組成と脂肪重量

体組成は、実験動物用生体電気インピーダンス分光法(BIS)装置(ImpediVET™: 株式会社バイオリサーチセンター, 名古屋市, 日本)を用いて測定した²⁰⁾。脂肪量(FM)と無脂肪量(FFM)を推定す

るため、脂肪組織は単位体積あたりの水分が少ないため筋肉などの組織よりも導電性が低いため、生体組織の電気伝導度のBIS差を測定した。脂肪重量を評価し、観察可能な脂肪組織はすべて解剖した。

2.6. 血清リポ蛋白の分画

血清リポ蛋白質は、ゲル浸透高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、既出の方法(LipoSEARCH®; Skylight Biotech, Akita, Japan)に従って、コレステロールとトリグリセリド含有量に基づく異なる画分に分離した²¹⁻²³⁾。コレステロールとトリグリセリドの値は、HPLCの溶出プロファイルのピークに基づいて、全体と主要なリポタンパク質クラス(超低密度リポタンパク質(VLDL), 低密度リポタンパク質(LDL), 高密度リポタンパク質(HDL))のそれぞれについて推定したリポ蛋白の粒子径の違いに対応するHPLCの溶出プロファイルのピークに基づく²²⁾。

2.7. 肝組織の遺伝子発現解析

肝臓の脂質代謝に関連する遺伝子(PPAR α , PPAR γ , SREBP1c, HSL, LPL)のRNA発現量は、リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)を用いて測定した。RNAは、ReliaPrep RNA Miniprep Systems(Promega Corporation, Madison, WI, USA)が提供するプロトコルを用いて、雄マウス(1群あたりn=5)の凍結肝臓組織から単離した。

RNAは、ABI Geneamp 9700 PCR Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Tokyo, Japan) 上でReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて補欠DNAに逆転写した。RT-qPCRは、KOD-Plus-Ver.2ポリメラーゼミックス(東洋紡株式会社)を用いて、ABI Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.) で実施した。

本研究では、過去の報告と同じプライマーを参考として使用した。これらのプライマーは、タカラバイオ株式会社(日本、草津市)製である¹¹⁾。

2.8. 脂肪組織のメタボローム解析

雄マウスの凍結脂肪組織のサンプル(約50mg, 各群n=5)をジルコニアビーズ(5mmφおよび3mmφ)を含んだホモジナイズチューブに入れ、そこに内部標準(H3304-1002, Human Metabolome Technologies, Inc. 山形, 日本)を含む50%アセトニトリル/ミリQ水1500μLを添加した。ビーズシェーカー(Shake Master NEO, BioMedical Science, Tokyo, Japan)を用いて、4℃で1500 rpm, 120秒のホモジナイズを2サイクル行った。次に、2300×g, 5分間, 4℃で遠心分離を行い、高分子成分を除去した。次に、400μLの上清を採取し、9100×g, 4℃で120分間遠心分離し、ミリポアの5kDaカットオフフィルター(Human Metabolome Technologies社(HMT), 山形県鶴岡市)を用いて濾過した。最後に、濾液を真空蒸発させて乾燥させ、50μLのMilli-Q水に溶解させた。この溶液を、Agilent CE システム(Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)を用いたキャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析法^{24, 25)}によるメタボローム解析を行った。統合ソフトウェア(慶應義塾大学, 日本, 静岡)を用いて自動的に検出されたピークについて、マススペクトルのピーク面積, m/z, および移動時間のデータ(範囲: 50~1000 m/z)を算出した²⁶⁾。各ピークのm/z値と移動時間から、HMT代謝物データベースを参照して、各ピークに関連する化学種を同定した。各代謝物の相対量は、ピーク面積を内部標準物質とサンプル量で正規化することにより算出した。主成分分析および階層型クラスター分析は、既出の方法²⁷⁾に従って実施した。

2.9. 血清クレアチニンおよび尿クレアチニン

血清は2.4節に記載した方法で採取し、血清クレアチニンは酵素法を用いて測定した。尿クレアチニンは、マウスを実験動物用代謝ケージで飼育した状態で採取した24時間尿サンプルを用いて、従来のクレアチニンデアミナーゼを用いた酵素法により測定した。

2.10. 統計解析

データは、平均値±平均値の標準誤差で報告されている。各結果は、JMP統計ソフト(ver.14.0: SAS Institute, Cary, NC, USA)を用い、マン・ホイットニーU検定を用いて実験群(ホエイ)と対照群(カゼイン)の間で比較した。p<0.05の場合は統計的に有意な差、0.05<p<0.10の場合はわずかに有意な差とした。

3. 結果

3.1. 体重の履歴

出生時の体重は、両群間に有意差はなかった。しかし、その後1週間ごとに、体重はカゼイン群よりホエイ群で低くなった。12週目では、体重はカゼイン群よりホエイ群で有意に低かった(48.3g vs 61.0g, p<0.01)(図2a, b)

3.2. 血糖値, IRI, HOMA-IRについて

空腹時血糖値は、両群間で有意差はなかった(177.5 mg/dL vs. 184.7 mg/dL, p=0.75)。IRIは、カゼイン群よりもホエイ群でわずかに低かった(22.0μIU/mL vs. 47.0μIU/mL, p=0.07)。HOMA-IRは、カゼイン群よりもホエイ群で有意に低かった(7.9 vs. 19.2, p=0.02)(図2c-e)。

3.3. 脂肪重量と体組成 脂肪重量

脂肪重量と体組成 脂肪重量は、カゼイン群よりもホエイ群で有意に低かった(2.4g vs. 3.8g, p<0.01)。しかし、体組成は、FFM(67.9% vs. 64.7%, p=0.63)およびFM(32.0% vs. 35.3%, p=0.63)において両群で同様だった(図2f-h)。

3.4. 血清および尿中クレアチニン

クレアチニン値は、ホエイ群ではカゼイン群より血清でわずかに高く(0.11 mg/dL vs. 0.14 mg/dL, p

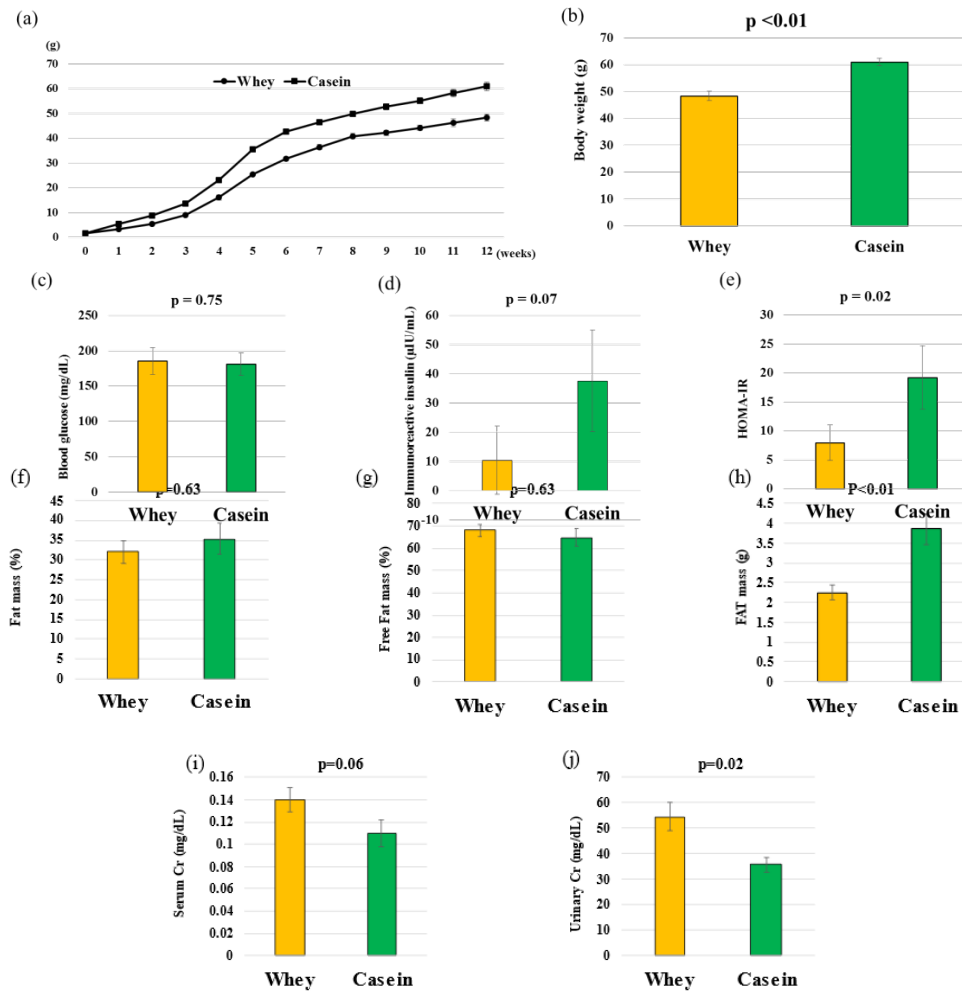


図2 体重とグルコース代謝マーカー

(a) 出生から12週齢までの体重増加の変化 (●:ホエイ, ■:カゼイン)。 (b) 体重は最終日に測定した。 (c) 空腹時血糖値。 (d) 血清免疫反応性インスリン値。 (e) インスリン抵抗性レベルのホメオスタシスモデル評価。 (f) 脂肪量 (%)。 (g) 遊離脂肪量。 (h) 脂肪量 (g)。 (i) 血清Cr (j) 尿中Cr。 データは平均値 ± 平均値の標準誤差で示す (各群 n = 6)。 * p < 0.05, ** p < 0.01。

= 0.06), 尿で有意に高かった (35.8 mg/dL vs. 54.6 mg/dL, p = 0.02) (図 2i, j)。

3.5. 血清リポ蛋白質分画

コレステロール値については, 総量および個体値に両群間で有意差は認められなかった (総量: 173.51 mg/dL vs. 153.46 mg/dL, p = 0.63; VLDL: 10.85 mg/dL vs. 10.94 mg/dL, p = 0.94; LDL: 25.16 mg/dL vs. 23.38 mg/dL, p = 0.52; HDL: 136.44 mg/dL vs. 116.16 mg/dL, p = 0.26) (図 3a~d)。 一方, トリグリセリド値は, 測定されたすべての結果において, カゼイン群よりもホエイ群で有意に低かった (総量: 51.47mg/dL, p = 0.52)。 測定された (合計: 51.47 mg/dL vs. 119.2 mg/dL, p = 0.01) (図 3e)。

3.6. 肝臓の遺伝子発現

RT-qPCR解析の結果, PPAR α の肝発現は, カゼイン群よりもホエイ群でわずかに高かった (p = 0.08); しかし, 評価した他の脂質代謝関連遺伝子のいずれにおいても, それ以外の差は認められなかった (PPAR γ , p = 0.27; SREBP1c, p = 0.73; HSL, p = 0.58; LPL; p = 0.25) (図 4a-e)。

3.7. 脂肪の代謝

グルタチオン, 1-メチルニコチンアミド, ミオイノシトールリン酸 (1-リン酸+3-リン酸) のレベルは, カゼイン群よりもホエイ群で有意に高かった (p < 0.01, p = 0.04, p = 0.01) (図 5 a~c)。

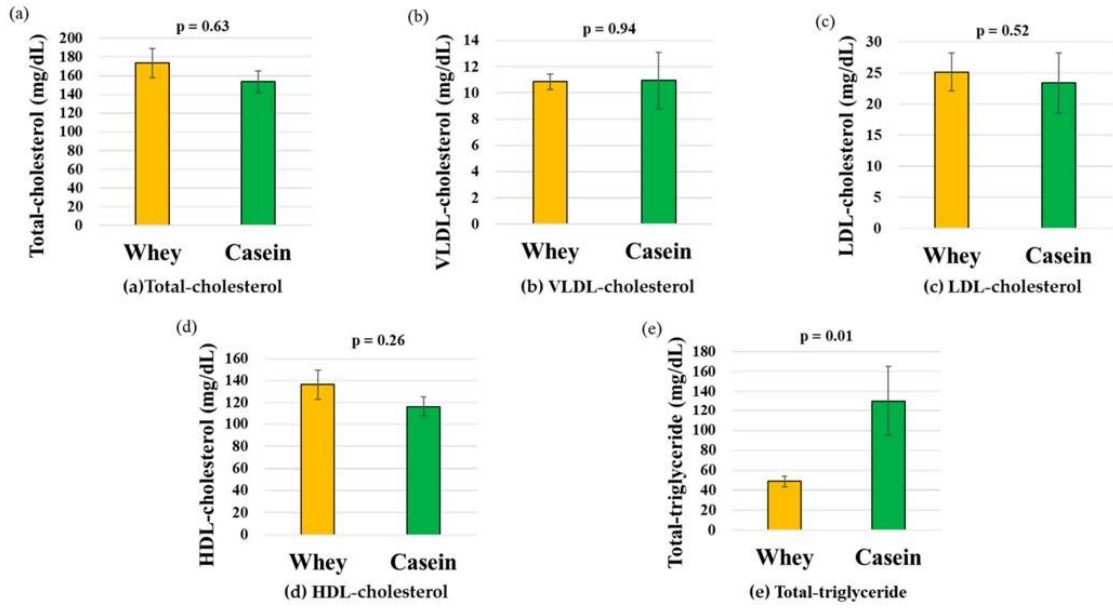


図3 体組成と血清リポ蛋白値

(a) 総コレステロール。(b) VLDL, (c) LDL, (d) HDLコレステロール, (e) 総トリグリセリド。データは平均値±平均値の標準誤差で示す(各群n=6)。HDL, 高比重リポ蛋白, LDL, 低比重リポ蛋白, VLDL, 超低比重リポ蛋白。

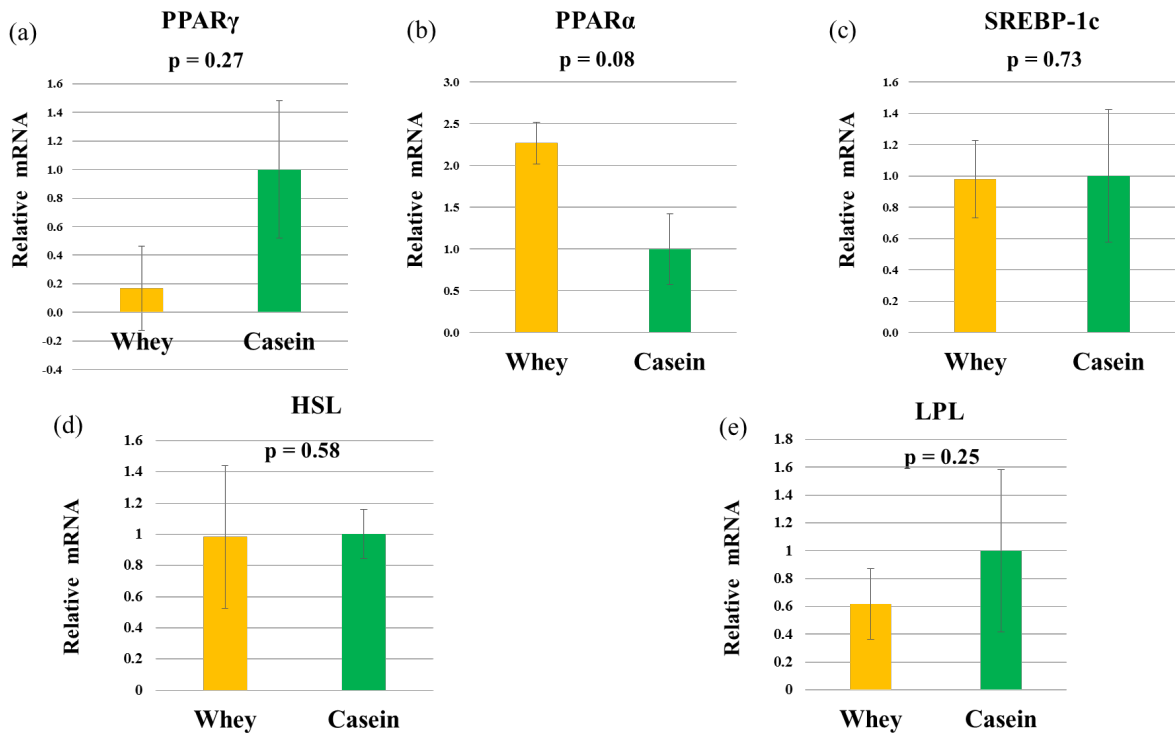


図4 相対的mRNAレベル

(a) PPAR γ , (b) PPAR α , (c) SREBP-1c, (d) (HLS), (e) LPL。(各群n=5)。PPAR γ , ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ ; PPAR α , ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α ; SREBP-1c, ステロール調節因子結合タンパク質-1c; HSL, ホルモン感受性リパーゼ; LPL, リポタンパク質リパーゼ。

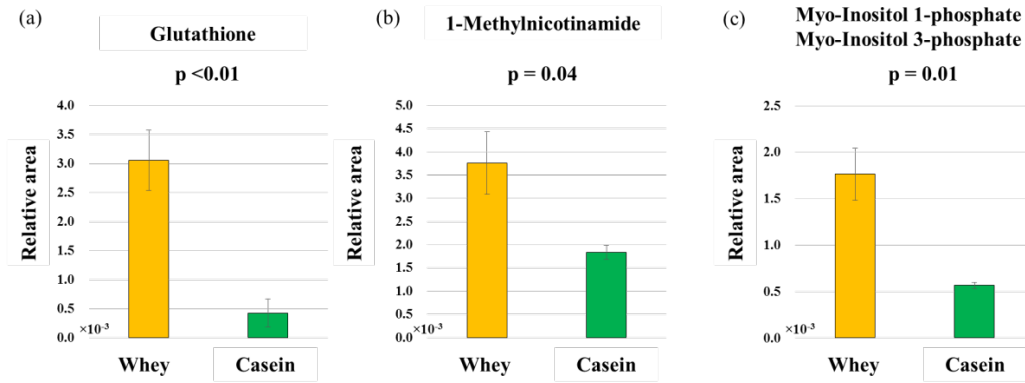


図5 ホエイ群とカゼイン群の包括的比較分析

(a) グルタチオン。(b) 1-メチルニコチンアミド。(c) ミオ-イノシトール1-リン酸とミオ-イノシトール3-リン酸。(各群n = 5)。

4. 考察

本研究では、マウスモデルにおいて、ホエイプロテインの摂取が脂質代謝を活性化し、脂肪量を減少させ、インスリン抵抗性を低下させることを明らかにした。これらの結果は、ホエイプロテインの摂取によりβ酸化が促進され、抗炎症作用や抗酸化作用が認められたためと推論している(図6a, b)。

4.1. 脂質の代謝

ホエイプロテイン飼料で飼育したマウスは、カゼインタンパク質飼料で飼育したマウスに比べ、血清総トリグリセリド値が有意に低いことを見いだした。また、ホエイ群のマウスは、カゼイン群に比べPPARα RNAの発現量が有意に高いことが確認された。以前の報告では、ホエイプロテインがPPARαの発現を増加させ、PPARαが細胞内のミトコンドリアβ酸化を増加させることにより、脂質代謝を活性化することが示されている^{11, 28)}。したがって、ホエイプロテインの摂取は、PPARαの発現を増加させることでトリグリセリドの利用を促進すると推測される。さらに、これらのマウスの脂肪組織のうち、ホエイ群では、ニコチンアミドの代謝物である1-メチルニコチンアミドがカゼイン群に比べ有意に多く含まれていた。1-メチルニコチンアミドは抗炎症作用とβ酸化制限作用を有することから、乳清タンパク質の摂取はβ酸化を調節することで脂質代謝を改善すると考えられる²⁹⁾(図6a)。

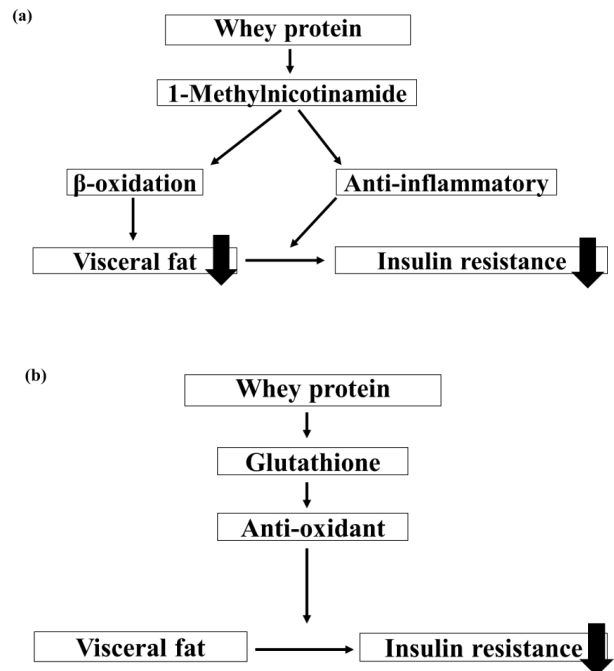


図6 ホエイプロテインが脂質とグルコースの代謝を改善するメカニズムの理論

(a) 1-メチルニコチンアミドと (b) グルタチオン。

4.2. グルコース代謝

脂肪細胞では、アディポサイトカイン産生を制御する機構を破壊すると、炎症性サイトカインが過剰に産生され、インスリン抵抗性につながる³⁰⁾。また、重度の酸化ストレスは、脂肪細胞のインスリン受容体を減少・不活性化させ、この細胞の遺伝子発現やインスリン分泌を低下させる^{31), 32)}。メタボローム解析の結果、1-メチルニコチンアミドとグルタチオン脂肪組織のレベルは、カゼイングループよりもホ

エイグループで有意に高いことが示された。ホエイプロテイン摂取による1-メチルニコチンアミドの増加が、脂肪細胞における慢性炎症を抑制し、インスリン抵抗性を改善したと推測される(図6a)。また、ホエイプロテインはグルタチオン量を増加させることで抗酸化作用を発揮するため、このことも観察されたインスリン抵抗性改善のメカニズムである^{33), 34)}(図6b)。

4.3. 筋原性インスリン抵抗性の改善

大豆タンパク質と比較した、ホエイプロテインはインターロイキン-6と腫瘍壊死因子- α の循環レベルを低下させ、筋肉代謝に影響を与えることが報告されている³⁵⁾。我々の研究では、ホエイプロテインはカゼインタンパク質と比較して、脂肪組織における抗炎症マーカーである1-メチルニコチンアミドのレベルを増加させることが判明している。血清クレアチンの上昇により筋肉量が増加すると、筋原性インスリン抵抗性が低下する可能性がある³⁶⁾。本研究では、筋肉量を測定しておらず、分析した2つのグループは統計的に類似した身体組成を有していた。これらの結果から、ホエイプロテインは、皮下脂肪よりも内臓脂肪を減らす可能性がある。FFMに差が見られなかった理由として、ホエイプロテインとカゼインプロテインの介入期間が比較的短かったことが考えられる。しかし、血清クレアチンはホエイ群でカゼイン群より有意に高かったと判断した。ホエイプロテインは、クレアチンを増加させるとともに筋肉量を増加させるための栄養補助食品として一般的に使用されている³⁷⁾。したがって、ホエイプロテインはこの研究におけるクレアチニンに影響を与えた可能性がある。ホエイプロテイン摂取による血清クレアチンの上昇は、インスリン抵抗性を改善する可能性がある。

4.4. ミオ-イノシトールリン酸塩

本研究では、メタボローム解析により、脂肪組織中のミオ-イノシトール1リン酸およびミオ-イノシトール3リン酸レベルが、カゼイン群よりも乳清群で有意に高いことが示された。ミオイノシトールは膜リン脂質の成分で、シグナル伝達の役割を担っている。ミオイノシトールの発現が低下したラットは、肝臓のトリグリセリド含量が高くなる³⁸⁾。ミオ-イ

ノシトール1-リン酸とミオ-イノシトール3-リン酸はともにミオ-イノシトール代謝経路に属する。ミオ-イノシトールはインスリン抵抗性を改善する³⁹⁾。ミオ-イノシトール1-リン酸やミオ-イノシトール3-リン酸によって直接的にグルコースや脂質の代謝が改善されたという報告はないが、今回の知見はその関連性を示唆している。

4.5. 乳幼児と酸化ストレス

Matsubasaらは、日本の超低出生体重児50名から生後数日間の尿を採取し、酸化ストレスマーカーである8-ヒドロキシデオキシグアノシンを測定した。その結果、超低出生体重児の尿中の8-ヒドロキシデオキシグアノシンは満期産児よりも高く、酸化ストレスマーカー値は出生後の体重が増加するにつれて減少することが示された⁴⁰⁾。また、Piyushらは、栄養不良の母親から生まれた小さな妊娠年齢の乳児は、健康な母親から生まれた適切な妊娠年齢の乳児に比べて、酸化ストレスマーカーであるマロンジアルデヒドのレベルが高く、スーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンパーオキシダーゼなどの抗酸化システムの酵素のレベルが低いことを報告している⁴¹⁾。これらの結果は、低出生体重児で出生前ストレスが高い乳児は、酸化ストレスが高く、抗酸化能が低いことを示唆している。今回の研究では、新生児期からホエイプロテインを用いた栄養補給を行うことで、抗酸化力および抗炎症力が向上することが明らかとなった。したがって、これらの子どもたちにホエイプロテインを摂取させることで、酸化ストレスを軽減し、抗酸化力を向上させることが可能であると考えられる。

4.6. 母乳と粉ミルクの抗酸化作用と抗炎症作用の比較

母乳は、多くの点で乳児にとって最良の栄養源と考えられている。母乳には、炭水化物、タンパク質、脂肪、ビタミン、ミネラル、消化酵素、ホルモンが含まれている。母乳のタンパク質組成は、時間の経過とともに変化する子供の成長に適応し、ホエイタンパクとカゼインタンパク質の割合が変化する⁴²⁾。また、母乳は抗酸化作用や抗炎症作用の面でも人工乳より優れているとされている。Aycicekらは、母乳または牛乳を改良した粉ミルクを与えた健康な有

期乳児54名を調査し、酸化ストレスマーカーが母乳群で低いことを明らかにした⁴³⁾。また、Allanらはヒト腸管モデルを用いた研究で、母乳が腸管上皮の炎症マーカーであるインターロイキン8を減少させ、toll-like receptor 4の発現をダウンレギュレートし、炎症反応を抑制することを明らかにした⁴⁴⁾。これらの報告から、粉ミルクと比較して母乳の優れた抗酸化作用や抗炎症作用は、母乳に含まれるホエイタンパク質の割合が高いことに起因していると考えられる。したがって、タンパク質の比率を変え、カゼインタンパク質よりもホエイプロテインの比率を高めることで、抗酸化作用や抗炎症作用が強まると考えられる。酸化ストレスは、細胞の損傷やいくつかの慢性疾患の悪化の一因となる。食事から摂取する抗酸化物質は、フリーラジカルとの戦いを助け、それによって酸化ストレスを予防または軽減する。Corrochanoらは、酸化ストレスが細胞傷害の原因となり、いくつかの慢性疾患を悪化させることを報告し、異なる乳源の乳清を比較し、ホエイプロテインを既知の食品抗酸化物質の幅広いスペクトルの中に位置づけた⁴⁵⁾。しかし、ホエイプロテインが標的臓器の抗酸化レベルを高めるのに有効であるためには、その抗酸化活性が加工だけでなく、上部消化管通過や血流への到達にも耐えなければならない。本研究では、ホエイサンプルに直接細胞が触れることで、グルタチオンなどの細胞内抗酸化物質が増加することが示された。これらの*in vitro*アッセイの生理学的妥当性には疑問があり、ラットやヒトを含む食事介入試験から、乳清製品が細胞の抗酸化バイオマーカーを高めるという矛盾したエビデンスがある。

5. 結 語

胎児期に開始したホエイプロテイン介入は、抗炎症および抗酸化作用を有するいくつかの代謝物のレベルを増加させ、脂肪体重の減少、インスリン抵抗性の改善につながることを示唆される。体重の減少、インスリン抵抗性の改善に寄与すると考えられる。

謝辞

本研究は日本大学学術研究助成金 若手研究者助成) を受け実施された。

文 献

- 1) Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan Vital Statistics in Japan in 2017. Available online: <https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/81-1.html> (accessed on 7 June 2022). (In Japanese).
- 2) Gluckman, P.D, Hanson, M.A. Living with the past: Evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004; 305: 1733–1736.
- 3) Uauy, R, Kain, J, Corvalan, C. How can the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis contribute to improving health in developing countries? *Am. J. Clin. Nutr* 2011; 94: 1759–1764.
- 4) Kunz, C, Lonnerdal, B.O. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Paediatr* 1992; 81: 107–112.
- 5) Marshall, K. Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev* 2004; 9: 136–156.
- 6) Nonogaki, K, Kaji, T. Whey protein isolate inhibits hepatic FGF21 production, which precedes weight gain, hyperinsulinemia and hyperglycemia in mice fed a high-fat diet. *Sci. Rep* 2020; 10: 15784.
- 7) Bodine, S.C, Stitt, T.N, Gonzalez, M, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol* 2001; 3: 1014–1019.
- 8) Kume, H, Okazaki, H, Sasaki, H. Hepatoprotective Effects of Whey Protein on D-Galactosamine-Induced Hepatitis and Liver Fibrosis in Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2006; 70: 1281–1285.
- 9) Sugawara, K, Takahashi, H, Sugawara, T, et al. Effect of Anti-Inflammatory Supplementation with Whey Peptide and Exercise Therapy in Patients with COPD. *Respir. Med* 2012; 106: 1526–1534.
- 10) Bayram, T, Pekmez, M, Arda, N, et al. Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. *Talanta* 2008; 75: 705–709.
- 11) Sasaki, H. Whey Protein Intake Modulates Lipid Metabolism by Transcriptionally Affecting PPARs and SREBP1c and Their Downstream Enzymes in Mice. *Food Nutr. Sci* 2019; 10: 1045–1055.
- 12) Kuwabara, R, Urakami, T, Yoshida, K, et al. Case of type 2 diabetes possibly caused by excessive accumulation of visceral fat in a child born small-for-gestational age. *J. Diabetes Investig* 2020; 11: 1366–1369.
- 13) Nagano, N, Kaneko, C, Ohashi, S, et al. Non-obese type 2 diabetes with a history of being an extremely preterm small-for-gestational-age infant without early adiposity rebound. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022; 19: 8560.
- 14) Moore, T.A, Ahmad, I.M, Zimmerman, M.C. Oxidative Stress and Preterm Birth: An Integrative Review. *Biol. Res. Nurs* 2018; 20: 497–512.
- 15) Kander, M.C, Cui, Y, Liu, Z. Gender difference in oxidative stress: A new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *J. Cell Mol. Med* 2017; 21: 1024–1032.
- 16) Huebschmann, A.G, Huxley, R.R, Kohrt, W.M, et al. Sex differences in the burden of type 2 diabetes and cardiovascular risk across the life course. *Diabetolo-*

- gia 2019, 62, 1761–1772.
- 17) Hashemilar, M, Khalili, M, Rezaeimanesh, N, et al. Effect of Whey Protein Supplementation on Inflammatory and Antioxidant Markers, and Clinical Prognosis in Acute Ischemic Stroke (TNS Trial): A Randomized, Double Blind, Controlled, Clinical Trial. *Adv. Pharm. Bull* 2020; 10: 135–140.
 - 18) Lien, E.L. Comparison of AIN-76A and AIN-93G diets: A 13-week study in rats. *Food Chem. Toxicol* 2001; 39: 385–392.
 - 19) Matthews, D.R, Hosker, J.P, Rudenski, A.S, et al. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412–419.
 - 20) Lukaski, H.C, Johnson, P.E, Bolonchuk, W.W, et al. Assessment of fat free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body. *Am. J. Clin. Nutr* 1985; 41: 810–817.
 - 21) Okazaki, M, Yamashita, S. Recent advances in analytical methods on lipoprotein subclasses: Calculation of particle numbers from lipid levels by gel permeation HPLC using “Spherical Particle Model”. *J. Oleo Sci* 2016; 65: 265–282.
 - 22) Usui, S, Hara, Y, Hosaki, S, et al. A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC. *J. Lipid Res* 2002; 43: 805–814.
 - 23) Okazaki, M, Usui, S, Ishigami, M, et al. Identification of unique lipoprotein subclasses for visceral obesity by component analysis of cholesterol profile in high-performance liquid chromatography. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2005; 25: 578–584.
 - 24) Ohashi, Y, Hirayama, A, Ishikawa, T, et al. Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS. *Mol. Biosyst* 2008; 4: 135–147.
 - 25) Ooga, T, Sato, H, Nagashima, A, et al. Metabolomic anatomy of an animal model revealing homeostatic imbalances in dyslipidaemia. *Mol. Biosyst* 2011; 7: 1217–1223.
 - 26) Sugimoto, M, Wong, D.T, Hirayama, A, et al. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 2010; 6: 78–95.
 - 27) Yamamoto, H, Fujimori, T, Sato, H, et al. Statistical hypothesis testing of factor loading in principal component analysis and its application to metabolite set enrichment analysis. *BMC Bioinform* 2014; 15: 51.
 - 28) Berger, J, Leibowitz, M.D, Doebber, T.W, et al. Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) γ and PPAR δ Ligands Produce Distinct Biological Effects. *J. Biol. Chem* 1999; 274: 6718–6725.
 - 29) Takeuchi, K, Yokouchi, C, Goto, H, et al. Alleviation of fatty liver in a rat model by enhancing N1-methylnicotinamide bioavailability through aldehyde oxidase inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2018; 507: 203–210.
 - 30) Suganami, T, Ogawa, Y. Adipose tissue macrophages: Their role in adipose tissue remodeling. *J. Leukoc. Biol* 2010; 88: 33–39.
 - 31) Furukawa, S, Fujita, T, Shimabukuro, M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Investig* 2004; 114: 1752–1761.
 - 32) Nomiyama, T, Igarashi, Y, Taka, H, et al. Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2004; 320: 639–647.
 - 33) Bounous, G, Gold, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: Role of glutathione. *Clin. Investig. Med* 1991; 14: 296–309.
 - 34) Franco, R, Cidlowski, J.A. Apoptosis and glutathione: Beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 2009; 16: 1303–1314.
 - 35) Prokopidis, K, Mazidi, M, Sankaranarayanan, R, et al. Effects of whey and soy protein supplementation on inflammatory cytokines in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Br. J. Nutr* 2023; 129: 759–770.
 - 36) Beauchamp, H, Ghosh, S, Dysart, M.W, et al. Low birth weight is associated with adiposity, impaired skeletal muscle energetics and weight loss resistance in mice. *Int. J. Obes* 2015; 39: 702–711.
 - 37) Juha, J.H, Christopher, M.L, Jeffrey, R.S. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutr. Metab* 2010; 7: 51.
 - 38) Andersen, D.B, Holub, B.J. The Relative Response of Hepatic Lipids in the Rat to Graded Levels of Dietary Myo-Inositol and Other Lipotropes. *J. Nutr* 1980; 110: 496–504.
 - 39) Croze, L.M, Vella, E.R, Pillon, N.J, et al. Chronic treatment with myo-inositol reduces white adipose tissue accretion and improves insulin sensitivity in female mice. *J. Nutr. Biochem* 2013; 24: 457–466.
 - 40) Matsubasa, T, Uchino, T, Karashima, S, et al. Oxidative stress in very low birth weight infants as measured by urinary 8-OHdG. *Free Radic. Res* 2002; 36: 189–193.
 - 41) Gupta, P, Narang, M, Banerjee, B.D, et al. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: A case control study. *BMC Pediatr* 2004; 4: 14.
 - 42) Sánchez, C, Franco, L, Regal, P, et al. Breast Milk: A source of functional compounds with potential application in nutrition and therapy. *Nutrients* 2021; 13: 1026.
 - 43) Aycicek, A, Erel, O, Kocyigit, A, et al. Breast milk provides better antioxidant power than does formula. *Nutrition* 2006; 22: 616–619.
 - 44) Walker, A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J. Pediatr* 2010; 156 (Suppl. S2):, S3–S7.
 - 45) Corrochano, A.R, Buckin, V, Kelly, P.M, et al. Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. *J. Dairy Sci* 2018; 101: 4747–4761.

羊膜上皮細胞から様々な細胞種への分化誘導に関する研究

太向勇¹⁾, 野本正幸²⁾, 九鬼直人³⁾, 加賀三鈴¹⁾, 高野智圭⁴⁾, 三木敏生¹⁾

Induction of various cell types from amniotic epithelial cells

Isamu TAIKO¹⁾, Masayuki NOMOTO²⁾, Naoto KUKI³⁾,
Millei KAGA¹⁾, Chika TAKANO⁴⁾, Toshio MIKI¹⁾

要旨

In vitro differentiation of human pluripotent stem cells (hPSCs) into desired cell types is a promising tool for regenerative medicine to treat damaged organ or tissue cells. However, because of the difficulty to obtain the hPSCs and the differentiation methods, it has been still under development. Here, we report a method to utilize human amniotic epithelial cells (hAECs) a type of placental stem cell that possess pluripotent stem cell-like differentiation potential, immunomodulatory, and anti-inflammatory properties and are therefore considered to have prospects for cell-based therapy. We differentiated hAECs into tree cell types including alveolar type II (ATII) cells, hepatocytes and pancreatic β -cells through direct cell reprogramming strategy. We successfully induced each cell type marker gene. Moreover, global gene expression analysis by using RNA-sequencing revealed that differentiated ATII like cells expressed many of Respiratory gaseous exchange by respiratory system associated genes. Our results indicated the potential of hAECs in regenerative medicine.

1. はじめに

人体における組織レベルでの細胞の損傷は治療が困難であり、究極的には細胞移植以外に方法はない。しかしながら、組織のドナーは偶発的に発生した脳死患者等のごく限られた状況下でしか得られず、レシピエントに比べて圧倒的に不足している。このような中で近年再生医学の発展に伴い、iPS細胞など多能性幹細胞から様々な細胞種ひいては組織を作出することが試みられている。しかしながら、iPS細胞を始めとして各種の多能性幹細胞の作出には多大な労力を要したり、倫理的な問題が伴ったりするために十分な細胞数を確保することが難しい。また、特定の細胞種に分化誘導を行う方法として、

各組織の系統発生の段階を様々な成長因子や小分子化合物によって再現することで行われている。この種のアプローチは一定の成功をおさめてはいるものの、長期間にわたる複雑な細胞培養プロセスを必要とするなど、依然として課題は多い。これらのことから、現在広く使われている多能性幹細胞を用いて特定の細胞種を治療に応用できるほどに量産するのは難しく、簡便かつ大量に入手することが可能な多能性細胞と、その細胞からのより簡便な分化誘導法の開発が求められている。

今後の活用が有望視されている多能性細胞として、胎盤から簡便かつ大量に採取することが可能な胎盤由来の幹細胞である羊膜上皮細胞が近年注目さ

1) 日本大学医学部生体機能医学系生理学分野
2) 日本大学医学部内科学系呼吸器内科学分野
3) 日本大学医学部外科学系小児外科学分野
4) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野
太向勇: taiko.isamu@nihon-u.ac.jp

れている(図1)^{1), 2)}。羊膜上皮細胞は比較的未分化な細胞であり、様々な細胞へと分化する能力を持っている。ヒトの羊膜上皮細胞(hAECs)は本来廃棄される胎盤を1時間程度トリプシンで処理するという極めて簡便な方法で一度に大量に採取することが可能であり、他の多能性細胞のように複雑なプログラミング手順を必要とせず特殊な培養も必要としない。また、ES細胞のように受精卵を破壊することが無いため倫理的な問題は少なく、非侵襲的な方法で得ることができる。また、胎児由来であることから、ゲノムDNAへのダメージの蓄積はほとんどない。さらには腫瘍形成能がないことに加えて免疫回避能力も有している。これらの性質から、今後細胞再生治療への応用が期待される。しかしながら、これらの性質が明らかにされてから間もないために研究は進んでいない。

本研究では羊膜上皮細胞から①肺胞上皮細胞②肝細胞③膵β細胞への分化誘導を目指して研究を行った。①肺胞上皮細胞は感染症やCOPD、特発性肺線維症等により欠損し、軽度の損傷であれば自律的に回復する。損傷が重度である場合は移植する以外の根本的な治療法はないが、移植するに足る細胞数を確保するのが難しく、実現に至っていない。②肝臓は肝硬変や劇性肝炎、肝細胞癌等様々な肝臓の疾患で生体肝移植が適用されているが、ドナーの負担は

相当に重く、代替的な手段が求められている。中でも細胞移植治療として多能性幹細胞からの肝細胞の分化誘導は有望な選択肢の一つとして盛んに研究が行われている。③β細胞は血糖値を下げる唯一のホルモンであるインスリンを分泌し、血糖値の調節に必須の細胞である。インスリンの分泌不全は糖尿病の原因となる。機能を回復させるために移植治療も行われているが、やはり圧倒的にドナーは足りない³⁾。これらの細胞種への分化誘導をより簡便な方法で行うために、転写因子の導入によるダイレクトリプログラミング法を用いた⁴⁾。この方法であれば、抗腫瘍原性や、免疫回避能等のhAECsとしての移植治療に有用な性質を残したまま目的の細胞の性質を保持させることが期待できる。本研究では、hAECsから上記の細胞種への分化誘導に最適な転写因子の探索を行い、更には分化誘導を行った細胞の遺伝子発現を調べることで実際に目的とする細胞種に特有の遺伝子発現が見られるかを解析した。

2. 対象及び方法

2.1. 羊膜上皮細胞の単離

hAECsは胎盤から剥離した羊膜上皮細胞をPBSにより洗浄し、30分間のトリプシン処理を2回することで単離した。単離したhAECsはクライオバイアルに分注後液体窒素中で保存し、各種分化誘導実験に使用した。

2.2. プラスミド作製

NKX2-1cDNA及びSFTPCプロモーター配列はAddgeneより入手した(49989, 126689)。HNF3G(FOXA3)及びMAFAは人工遺伝子合成により入手した。その他の転写因子のcDNAはダナフォームより購入した。いずれもpLenti6ベクター(Invitrogen)にクローニングすることで本実験に使用した。

レンチウイルスの作製

レンチウイルスはHEK293T細胞に目的遺伝子を保持したレンチウイルスベクターとpsPAX2及びpMD.2G(Addgene12260及び12259)をそれぞれ2:2:1の割合でポリエチレンイミン(Polysciences)を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後16時間で培地を交換し、交換後48時間で培地を回収してウイルス液とした。回収したウイルス液はqPCR Lentivirus Titer Kit (Applied Biologi-

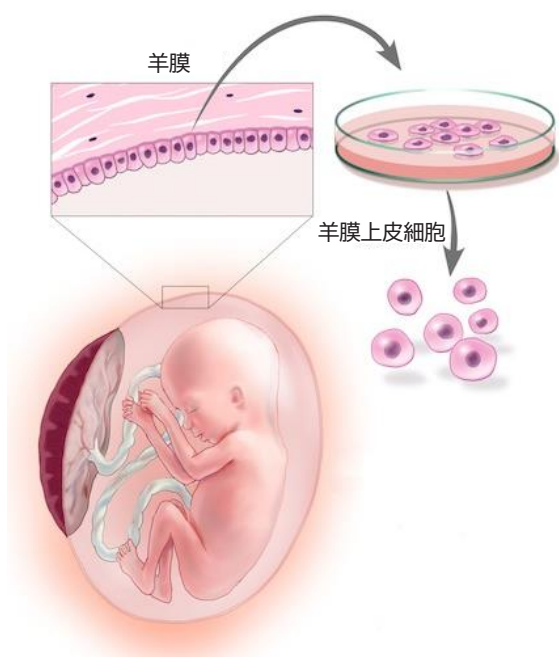


図1 羊膜上皮細胞の採取

表1 qPCRに用いたprimer配列

遺伝子名	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	ACGGGAAGCTTGTCAAT	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
SFTPC	CCGCAGTGCCTACGTCTAAG	AGATGTAGTAGAGCGGCACCT
NKX2-1-UTR	GCTGGGGAGAGGAAAGAGTC	GGGCACTTCCTTTGTGTGTCAG
SERPINA1(A1AT)	TGGGCATCACTAAGGTCTTCAG	CAGCTTCAGTCCCTTTCTCGT
INS	ACGAGGCTTCTTCTACACACCC	TCCACAATGCCACGCTTCTGCA

cal Materials) で力価を計測し, hAECsにはMOI15-30となるように感染させた⁵⁾。

2.3. 細胞培養

ヒト羊膜上皮細胞はDMEM (Gibco) に10% FBS (ニチレイ), 200 μ M L-Glutamine, 1 \times 非必須アミノ酸, 1 \times Antibiotic-Antimycotic, 55 μ M 2-mercaptoetanol (いずれも Gibco), 5ng/ml EGF (peprotech) を加えた培地で培養した。HEK293T細胞はコラーゲンコートした培養皿状でDMEM (和光純薬) に10% FBS, 2 mM L-Glutamine, ペニシリンストレプトマイシンを加えた培地中で培養した。いずれの細胞も37°C, 5% CO₂で培養した。

2.4. 分化誘導

1) 肺胞上皮細胞

単離直後に凍結保存されたhAECsを融解後14日間培養した後でSFTPC-GFPを細胞に導入し, さらに2日間培養後10cm dishに再播種した。SB-431542 (10 μ M) を加えた培地で2日培養した後, NKX2-2を導入した。その後IMDMにFBS, L-Glutamine, KGF, FGF10 (いずれも10 ng/ml, peprotech), CHIR99021 (10 μ M, ナカライテスク) を加えた培地で14日間培養後, 各種実験に用いた。

2) 肝細胞及び膵 β 細胞

凍結融解後14日間培養したhAECsにそれぞれの転写因子を導入し, さらに10日間培養した後細胞を回収し, 各種実験に用いた。いずれも培養はhAECsの培地で行った。培地に添加した試薬はそれぞれ, 以下の濃度で使用した。SB-431542 (10 μ M), ALK5 Inhibitor II (10 μ M), LDN-193189 (1 μ M), T3 (3 μ M) (いずれもシグマアルドリッチ)

3) RT-qPCR

細胞は回収後NucleoSpin RNA (タカラバイオ) で

RNAを回収し, ReverTra Ace (東洋紡) で逆転写反応を行った後PerfeCTa SYBR Green FastMix (Quantabio) により, でLightCycler 480 (Roche) でqPCRを行った。内在性コントロールにはGAPDHを用いた。用いたPrimer配列は表1にまとめた。

4) Transcriptome解析

Transcriptome解析はSTARソフトウェアを用いてマッピングし, Rソフトウェアの Feature Counts ツールでリードカウントを計測した。Differentially expressed geneはDeseqソフトウェアを用いて算出した。主成分分析, Volcano plotの作図はRを用いた。ヒートマップはHeatmapperを用いて作成した。

3. 結果

3.1. II型肺胞上皮細胞への分化誘導

肺胞上皮細胞にはI型とII型が存在し, II型肺胞上皮細胞が前駆細胞としての機能を持つことが知られており, II型細胞を再生させることでI型細胞の再生も期待できる。II型肺胞上皮細胞の性質及び個性を決定する転写因子として肺及び甲状腺に特異的に発現しているNKX2-1がマスターレギュレータとして知られている⁶⁾。本研究ではNKX2-1をレンチウイルスによって羊膜上皮細胞に導入することでII型肺胞上皮細胞の分化誘導を試みた。先行研究によりiPS細胞から胚体内胚葉細胞への分化を経てII型肺胞上皮細胞へと分化誘導を行う方法がいくつか報告されている⁷⁾。これらの報告では, TGF β シグナリングの抑制及び, KGF, FGF11のシグナルがII型肺胞上皮細胞への分化誘導効率を高めることが報告されている。これらのことから, NKX2-1の導入による分化誘導効率を高めることを目的としてTGF β 受容体 (ALK5) の阻害薬であるSB-431542に加え, FGF10, KGFを併用した。また, 肺胞上皮細胞への分化の簡便な検出のために, II型肺胞上皮に特異的

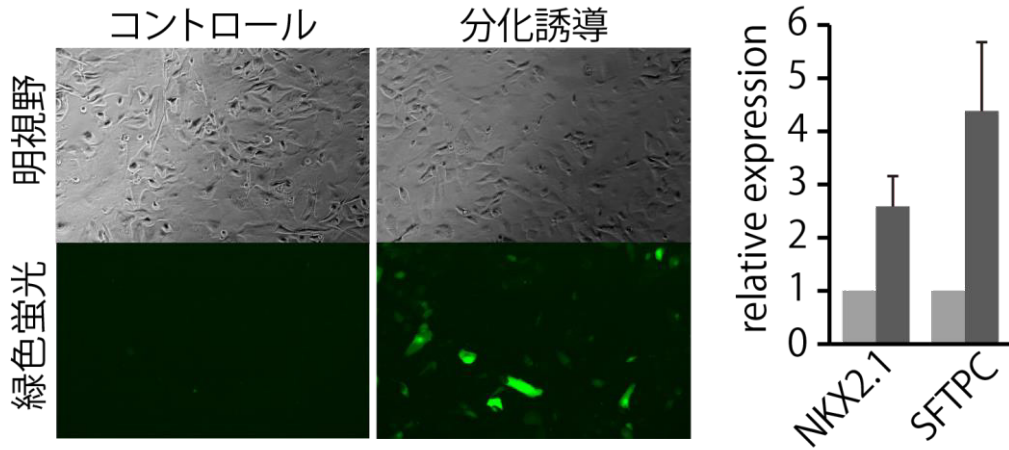


図2 SFTPCの発現の確認

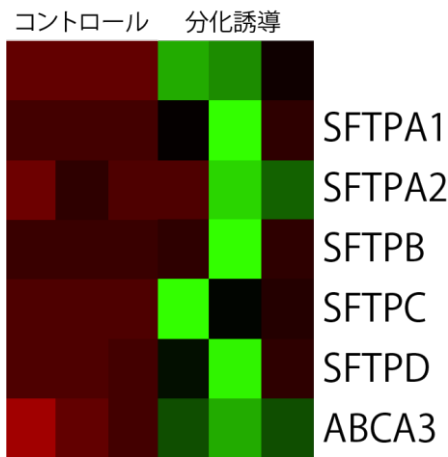


図3 分化誘導による遺伝子発現の変化

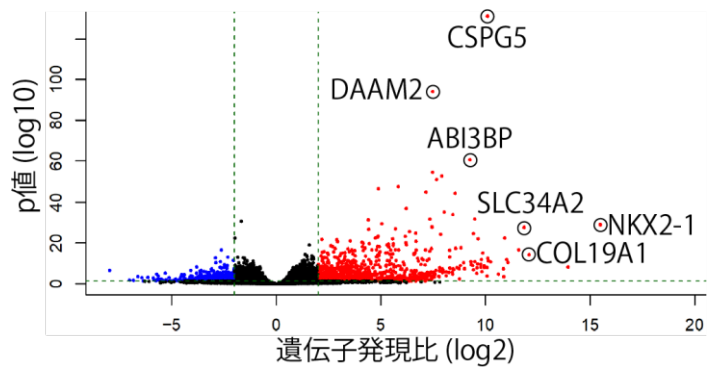


図4 分化誘導群における遺伝子発現の変化

なマーカーであるSFTPC (肺サーファクタントプロテインC) 遺伝子のプロモーター依存的にGFPを発現するレポーターを用いた。これによって細胞からRNAを抽出することなく、GFPの蛍光を指標としてII型肺胞上皮細胞への分化を経時的に検出することが可能となる。hAECsを10日間培養し、十分な細胞数まで増殖させた後、SB-431542によりTGFβシグナリングを抑制した状態でNKX2-1を導入した。導入後5日目でGFPの蛍光が検出されはじめ、2週間後で蛍光はプラトーに達した (図2)。実際にII型肺胞上皮マーカーのSFTPC遺伝子が発現しているかどうかを確認するために、NKX2-1を導入してから2週間培養した細胞を回収し、RT-qPCRによりmRNA量を確認したところNKX2-1を導入しなかった細胞に比べて約4.4倍上昇していた。(図2) さら

には、強制発現させたNKX2-1 (ORF, タンパク質コード領域) には含まれない3'UTR (非コード領域) の配列を標的としたプライマーセットを用いて内在性のNKX2-1の発現を確認したところ、予期せぬことに、コントロールと比べて2.6倍の発現上昇が見られた (図2)。

本法を用いた分化誘導によるより広範な遺伝子の発現の変化を確認するために、グローバルな遺伝子発現プロファイルの変化をRNA-sequencingによるトランスクリプトーム解析によって確認した。遺伝子発現プロファイルの比較では期待通り、SFTPC以外の肺サーファクタントプロテインに加え、その分泌を担うトランスポータータンパク質であるABCA3の発現も上昇していた (図3)。Gene ontology解析では分化誘導を行った細胞では、肺胞での

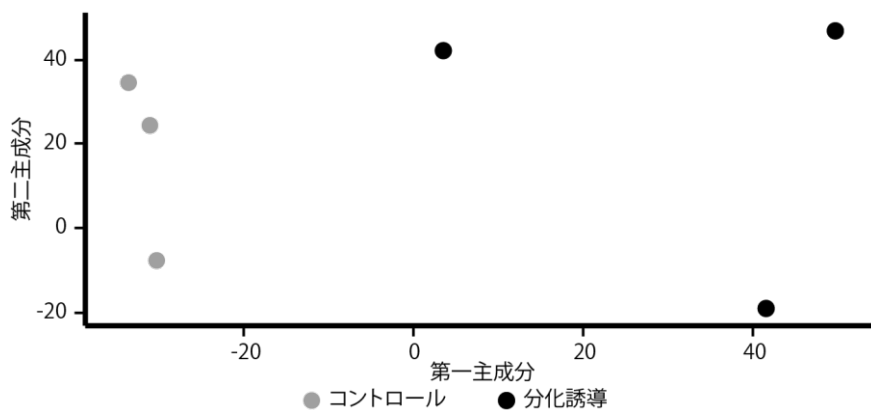


図5 遺伝子発現変化の主成分分析

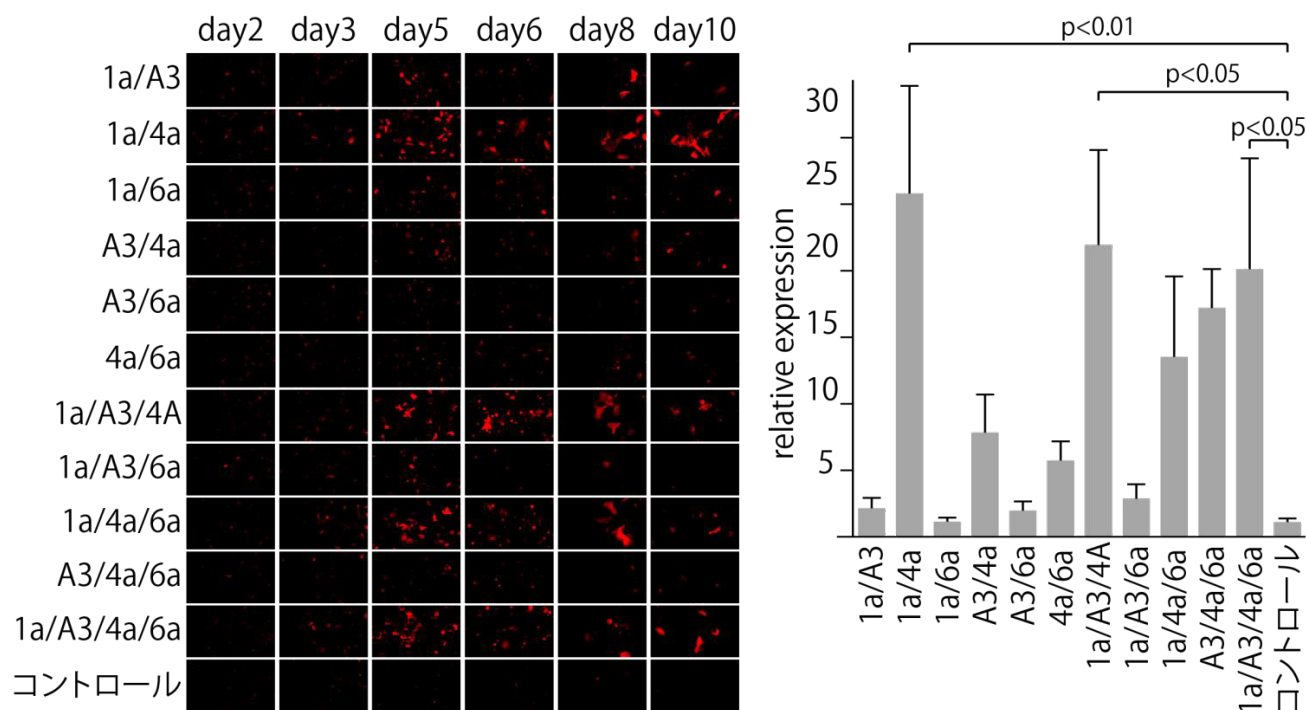


図6 レポーター遺伝子発現の経時変化とAAT1の発現

ガス交換に関連する遺伝子群の発現が亢進しており、逆に広範な免疫反応関連の遺伝子群の発現は低下していた(表2)。ヒト肺胞上皮細胞との遺伝子発現プロファイルを比較したところ、肺胞でのガス交換に関連する遺伝子群の上昇という点では類似していたが、hAECsでも発現が見られる上皮系細胞としての性質を示す遺伝子群が亢進している一方で免疫応答関連遺伝子の発現は抑制されていた(表3)。これら以外に、CSPG5、DAAM2、ABI3BP、SLC34A2、COL19A1など細胞外マトリクスや肺疾患に関連す

る遺伝子で顕著な発現の上昇が確認された。(図4)主成分分析を行ったところ、元のhAECsとは明確に異なったクラスターを形成していた(図5)。以上の結果から、hAECsにNKX2-1を強制発現させることで2週間という短期間で広範な肺胞上皮細胞に関連する遺伝子の誘導が可能であることが示された。また、一部hAECsとしての性質が保持されていることも示唆された。

表2 Gene Set Enrichment Analysis: 分化誘導 vs コントロール

	NES [†]	遺伝子数	補正p値	
低下していた遺伝子群	Negative regulation of viral genome replication	-1.93	49	9.30E-03
	Interferon-alpha production	-1.92	23	2.60E-02
	Regulation of interferon-alpha production	-1.92	23	2.60E-02
	Positive regulation of interleukin-4 production	-1.91	19	2.70E-02
	Regulation of natural killer cell proliferation	-1.9	7	5.40E-03
	Negative regulation of viral process	-1.9	82	2.50E-03
	Positive regulation of amine transport	-1.89	24	3.20E-02
	Maintenance of gastrointestinal epithelium	-1.88	13	3.30E-02
	上昇していた遺伝子群	Cotranslational protein targeting to membrane	2.138	102
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane		2.128	96	1.10E-03
Protein targeting to ER		2.094	111	1.10E-03
Establishment of protein localization to endoplasmic reticulum		2.055	114	1.10E-03
Oligodendrocyte development		1.991	38	2.10E-03
Oligodendrocyte differentiation		1.962	84	1.10E-03
Central nervous system myelination		1.959	18	5.10E-03
Axon ensheathment in central nervous system		1.959	18	5.10E-03
Cyclic nucleotide biosynthetic process		1.939	16	7.50E-03
Cyclic purine nucleotide metabolic process		1.939	16	7.50E-03
Adenylate cyclase-activating G protein-coupled receptor signaling pathway		1.938	92	1.10E-03
Adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway		1.934	142	1.10E-03
Cyclic nucleotide metabolic process		1.925	34	6.00E-03
Activation of adenylate cyclase activity		1.92	24	8.30E-03
CGMP metabolic process		1.917	14	9.30E-03
Protein targeting to membrane		1.911	197	1.00E-03
Negative regulation of multicellular organism growth		1.908	11	5.30E-03
Respiratory gaseous exchange by respiratory system		1.903	58	5.10E-03
Ammonium ion metabolic process		1.898	18	1.60E-02
Vascular process in circulatory system		1.888	201	1.00E-03
Response to axon injury		1.881	69	5.10E-03
Regulation of tube size		1.876	97	1.90E-03

†補正エンリッチメントスコア

3.2. 肝細胞への分化誘導法の開発

肝細胞への分化と性質の維持にはHNF (Hepatocyte nuclear factors) と呼ばれる遺伝子群の相互作用が重要とされている。肝臓の発生初期ではHNF1B, 3B, 3G (FOXA3) の発現が優位であり、その後HNF4A, 6Aの発現が亢進し、成体肝ではHNF1A, 4Aが肝臓の性質と機能の維持を担っていると考えられている^{8), 9)}。本研究では、発生段階で必要なHNF3G, 6A及び肝機能の維持に必要であると考えられているHNF1A, 4AをhAECsに導入することでダイレクトプログラミングを試みた。肺胞上皮細胞と同様に、肝細胞への分化の簡易的な指標として、 α 1-アンチトリプシン (A1AT) プロモーター依

存的にmCherryを発現するレポーターを用いた。HNF遺伝子群の相互作用の影響を調べるために本研究では、各因子の2種、3種及び4種全ての組み合わせで遺伝子を導入し、遺伝子発現を比較した。hAECsを10日間培養し十分な細胞数を得た後、A1AT-mCherryを導入後各組み合わせのHNF遺伝子群を導入した。遺伝子の導入後2日でmCherryの蛍光が観察され始め、10日間上昇し続けた (図6)。実際にA1ATの発現を見るために、細胞を回収し、RT-qPCRによりmRNA量を確認したところHNF1A, 4Aの組み合わせで遺伝子の導入をしたもので最も発現が亢進しており、4種全て及び1A, 3G, 4Aの組み合わせでも有意な発現上昇が見られた。他方で、

表3 Gene Set Enrichment Analysis: 分化誘導 vs コントロール

	NES [†]	遺伝子数	補正p値
Cornification	-2.43	73	5.90E-03
Keratinization	-2.42	86	6.10E-03
Keratinocyte differentiation	-2.22	157	8.40E-03
Eyelid development in camera-type eye	-2.17	11	3.70E-03
Skin development	-2.15	265	1.20E-02
Peptidyl-arginine modification	-2.11	18	1.10E-02
Epidermis development	-2.09	304	1.40E-02
Embryonic eye morphogenesis	-2.05	32	1.10E-02
Hemidesmosome assembly	-2.04	12	8.40E-03
Epidermal cell differentiation	-2.03	208	1.00E-02
Regulation of cardiac muscle cell action potential	-2.03	23	1.80E-02
Positive regulation of axonogenesis	-1.98	78	6.10E-03
Embryonic camera-type eye formation	-1.97	10	1.60E-02
Positive regulation of axon extension	-1.96	38	2.00E-02
DNA methylation involved in gamete generation	-1.96	14	2.90E-02
Gonadotropin secretion	-1.93	12	3.20E-02
Luteinizing hormone secretion	-1.92	7	1.10E-02
Humoral immune response	2.18	162	2.40E-03
Neutrophil chemotaxis	2.17	71	2.40E-03
Complement activation	2.15	45	2.40E-03
Granulocyte chemotaxis	2.15	91	2.40E-03
Regulation of complement activation	2.13	35	2.40E-03
Neutrophil migration	2.11	87	2.40E-03
Granulocyte migration	2.10	107	2.40E-03
Regulation of humoral immune response	2.09	50	2.40E-03
Humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	2.07	35	2.40E-03
Complement activation, classical pathway	2.02	25	2.50E-03
Antimicrobial humoral response	1.98	79	2.40E-03
Myeloid leukocyte migration	1.92	156	2.40E-03
Positive regulation of macrophage derived foam cell differentiation	1.92	17	6.90E-03

†補正エンリッチメントスコア

低下していた遺伝子群

上昇していた遺伝子群

他の組み合わせでは有意な発現の上昇は見られなかった (図6)。またA1AT以外に肝細胞に発現が特異的なアルブミン遺伝子及びAFP遺伝子の発現の上昇も観察された。以上の結果より、hAECsにHN-F1A, 3G, 4A及び6Aを導入することで肝細胞マーカー遺伝子の発現を誘導できることが示された。

3.3. 膵β細胞への分化誘導法の開発

先行研究により、膵β細胞への分化及び膵β細胞としての性質を維持するために必須であると考えられている転写因子の中から、ヒト羊膜上皮細胞で発現していない5種類の転写因子 (MAFA・NKX2-1・NKX6-1・PAX6・PDX1) に着目した^{10), 11)}。最初に

各々の転写因子の効果を確認するために、それぞれの転写因子を導入し、インスリン遺伝子発現に変化があるか調べた。遺伝子導入後2週間で確認したところ、インスリン遺伝子の発現に有意な変化は見られなかった。次に2種類の遺伝子の組み合わせでインスリン遺伝子の発現を誘導できないかを調べるために上記5因子の中でそれぞれ2種類の組み合わせで遺伝子を導入したが、インスリン遺伝子の有意な発現上昇は認められなかった。培養期間をさらに4週間に延長してもインスリン遺伝子の発現に大きな変化はなかった。少数の転写因子ではインスリン遺伝子の発現を誘導できないと考え、5因子全てを同時に導入することを試みた。同様に1週間培養し、

mRNA量を確認したところ、5種類の転写因子を導入した細胞で2~4倍のインスリン遺伝子の発現上昇が見られた。培養期間を4週間に延長したが、インスリン遺伝子の発現はこれ以上上昇することはないかった。

次に上記5因子の導入に加えて、更なるインスリン遺伝子の発現を上昇させることが可能な小分子化合物の探索を行った。先行研究により、①Wnt/ β -カテニンシグナリングの活性化②TGF β シグナリングの抑制③BMPシグナリングの抑制④甲状腺ホルモンによる刺激が β 細胞への誘導効率を上昇させることが知られている。これらの中で、①hAECsではWnt/ β -カテニンシグナリングは内在的に活性化されているため除外し、他の②~④について検証した。TGF β シグナリングの抑制についてはSB-431542及びALK5 Inhibitor IIにより、BMPシグナリングの抑制はLDN-193189、甲状腺ホルモンはトリヨードチロニン (T3) を培養液に添加することで行った。それぞれの小分子を培養液に添加後レンチウイルスにより上記5因子を導入し、同様の条件で2または4週間培養したところ、TGF β シグナリングを抑制した条件でコントロールと比べて10~15倍のインスリン遺伝子の発現の上昇が確認された。一方で、BMPシグナリングの抑制は大きな効果はなく、甲状腺ホルモンの添加はむしろインスリン遺伝子の発現を抑制した。以上より本研究で羊膜上皮細胞に5種類の転写因子 (MAFA・NKX2-2・NKX6-1・PAX6・PDX1) をレンチウイルスにより導入し、ALK5 Inhibitor IIを加えて培養することで、顕著なインスリン遺伝子の発現誘導を行うことが可能であることを示した。また、驚くべきことにiPS細胞における研究では β 細胞への誘導効率を上昇させることが示されている甲状腺ホルモンの添加は、上記5因子の導入に加え、TGF β シグナリングの抑制によるインスリン遺伝子の発現上昇の効果を完全に抑え込み、インスリン遺伝子の発現に対し強い抑制効果を持つことが示された。

4. 考 察

本研究ではNKX2-1を強制発現させることで2週間という極めて短期間でhAECsにおいてII型肺胞上皮細胞に特異的な遺伝子群を発現する細胞の誘導に成功した。Gene ontology解析の結果では今回の

方法で誘導した細胞は元となったhAECsの性質を残していることが示唆された。他方では、肺胞上皮細胞としての機能に重要であると考えられている遺伝子群の発現はいずれも上昇しており、この結果になった理由として、hAECsに特徴的な遺伝子の発現が抑制されなかったためであると考えられる。今回の方法は転写因子の導入によって肺胞上皮細胞の性質を持たせるというものであり、hAECsの特徴を抑制するものではないが、これはむしろ有用である。hAECsには腫瘍原性の低さや免疫回避能など、移植治療に重要な性質を備えているため、hAECsの特徴を保持したまま、肺胞上皮細胞の性質を獲得させることができたことは将来的な応用に高い可能性を持たせたといえる。今後今回誘導した細胞が肺サーファクタントプロテインを分泌するか、I型肺胞上皮細胞に分化可能かどうか等を検討し、どの程度II型肺胞上皮細胞としての機能を保持しているか調べるとともに、併せて移植治療に有用なhAECsとしての機能も保持していくかを調べることで今回の方法がII型肺胞上皮細胞の再生に有用であることが示されることが期待される。

肺胞上皮細胞はNKX2-1という唯一かつマスターレギュレータと呼べるほどに影響力の高い転写因子が存在したため、単一の遺伝子の導入で分化を誘導することができたと考えられる。一方で膵 β 細胞や肝細胞にはマスターレギュレータと呼べるほど単一で影響力の高い転写因子の存在は報告されておらず、複数の転写因子が互いに相互作用しながら絶妙なバランスの元で保持されていると考えられている。それ故に本研究では、肺胞上皮細胞へ広範な遺伝子の発現変化を惹起することができなかった可能性がある。遺伝子の相互作用を考慮して、各遺伝子の発現量を変化させるか、遺伝子を強制発現させるタイミングを遺伝子ごとに変化させるなどの更なる工夫が求められると考えられる。また、今回はhAECsが比較的未分化であり、ゲノムの多くの領域で開かれていると考えられているため、DNAやヒストンの修飾酵素の機能に干渉する小分子化合物を用いなかった。このため、膵 β 細胞や肝細胞の分化誘導に必要な領域が一部不活性であった可能性も排除できない。今後はこれらの可能性を検証していくことで、更なる分化誘導効率の上昇が期待される。

本研究では、hAECsにII型肺胞上皮細胞、肝細胞、膵β細胞に特異的な転写因子を導入することで、それぞれの細胞に特異的な遺伝子の発現を誘導することに成功した。本研究で用いたhAECsには移植治療に有用な特性を持っている。第一にhAECsは胎児由来の細胞であるため、加齢や環境によるダメージに晒されていないため、腫瘍原性等様々な疾患の原因となり得るゲノムDNAへのダメージの蓄積が無く、ゲノムDNAはほぼ無傷な状態で保たれている。第二に、hAECsは簡便な手法で大量の細胞を倫理的な問題なく採取することが可能である。hAECsは本来廃棄される胎盤から採取可能であるため、非侵襲的な方法で採取が可能であり、また、特別な培養方法も必要なく、トリプシン処理という組織からの細胞採取方法として広く用いられた確立された方法で採取が可能である。第三に、hAECsはレシピエントに安全に移植が可能である。hAECsのゲノムDNAは安定であるため、腫瘍原性を有しておらず、移植しても腫瘍を形成しない^{12), 13)}。加えて、hAECsは免疫回避能を持っており、他家移植における拒絶反応や炎症反応を制御するのに有益であると考えられる¹⁴⁾。以上のことから、hAECsは細胞移植治療に理想的な細胞であり、hAECsに目的の細胞の性質を付与することに成功した本研究の意義は大きい。本研究を元に今後hAECsの更なる移植治療への応用法の開発が進むことが期待される。

5. 結語

本研究では、本来廃棄される胎盤から簡便かつ大量に採取することが可能な、胎児由来の多能性幹細胞であるhAECsに細胞種特異的な転写因子を導入することで、それぞれの細胞に特異的な遺伝子の発現を誘導できることを示した。今後さらに培養条件等を工夫することで更に目的の細胞へ近づけることが期待される。

謝辞

本研究は日本大学若手研究者助成金及び科学研究費補助金の助成の元に行われたものである。

文献

1) Miki, T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res. Ther.* 2011;2:25.

2) Takano, C. *et al.* Clinical perspective on the use of human amniotic epithelial cells to treat congenital metabolic diseases with a focus on maple syrup urine disease. *Stem Cells Transl. Med.* 2021;10:829–835.

3) Rezaia, A. *et al.* Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2014;32:1121–1133.

4) Wang, H., Yang, Y., Liu, J. & Qian, L. Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms and progress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2021;22:410–424.

5) Taiko, I. *et al.* Selection of red fluorescent protein for genetic labeling of mitochondria and intercellular transfer of viable mitochondria. *Sci. Rep.* 2022;12:19841.

6) Longmire, T. A. *et al.* Efficient Derivation of Purified Lung and Thyroid Progenitors from Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2012;10:398–411.

7) Yamamoto, Y. *et al.* Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nat. Methods.* 2017;14:1097–1106.

8) Si-Tayeb, K. *et al.* Highly Efficient Generation of Human Hepatocyte-like Cells from Induced Pluripotent Stem Cells. *Hepatology. Baltim. Md.* 2010;51:297–305.

9) DeLaForest, A. *et al.* HNF4A is essential for specification of hepatic progenitors from human pluripotent stem cells. *Dev. Camb. Engl.* 2011;138:4143–4153.

10) Theis, F. J. & Lickert, H. A map of β-cell differentiation pathways supports cell therapies for diabetes. *Nature* 2019;569:342–343.

11) Aigha, I. I. & Abdelalim, E. M. NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic β cell development, identity, and proliferation. *Stem Cell Res. Ther.* 2020;11:459.

12) Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D. B. & Strom, S. C. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells.* 2005;23:1549–1559.

13) Ilancheran, S. *et al.* Stem Cells Derived from Human Fetal Membranes Display Multilineage Differentiation Potential. *Biol. Reprod.* 2007;77:577–588.

14) Miki, T. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2018;80:e13003.

マウス白色脂肪組織におけるビタミンD受容体の役割

石澤通康¹⁾, 風間智彦²⁾, 梅田香織¹⁾

Role of vitamin D receptor in mouse white adipose tissue

Michiyasu ISHIZAWA¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Kaori ENDO-UMEDA¹⁾

要旨

ビタミンD受容体(Vitamin D receptor; VDR)は体内のカルシウム恒常性維持に重要だが、糖代謝や免疫系への関与も近年報告されている。特に白色脂肪組織における役割は疫学研究と遺伝子改変動物の結果に矛盾があり、明確ではない。白色脂肪組織を加齢による自然蓄積或いは高脂肪食による人工的蓄積によって増量させた際、VDR欠損マウスではいずれも体重増加、肥満の指標であるレプチン発現レベルの増加が軽減された。熱産生系の関与が示唆されたが、既報の結果と一部異なることから、今後より詳細な解析が必要である。

1. 背景

ビタミンD受容体(Vitamin D receptor; VDR)は体内のカルシウム恒常性に重要な役割を担う他、自然免疫増強、炎症抑制、免疫細胞の調節作用が報告されている。ビタミンDは細胞レベルでグルコース取込みやインスリン感受性を増強し、血中ビタミンD濃度は2型糖尿病と負に相関するが、VDR欠損マウスは高脂肪食摂取による体重増加が抑制されることから、VDRの脂肪組織における役割は明確ではない。

2. 方法

8週齢及び16週齢のC57BL/6Jマウスを遺伝子背景とする雄Vdr (+/-)マウス及びVdr (-/-)マウスを使用した。肥満モデルとの比較では、8週齢から12週齢の雄Vdr (+/+)マウス及びVdr (-/-)マウスCE-2或いは高脂肪食HFD32(いずれも日本クレア)を4週間自由摂取させた。統計解析は一元配置分散分析の後Tukey's testにて各群間を比較した(Prism8)。

3. 結果

3-1. 加齢に伴う体重増加におけるVDRの関与

Vdr (+/-)マウスは8週齢から16週齢への加齢に伴い有意な体重増加を認めたが、Vdr (-/-)マウスは増加しなかった(図1A)。加齢に伴い、Vdr (+/-)マウスの精巣上体脂肪組織(epididymal white adipose tissue; eWAT)では重量が増加したが、Vdr (-/-)マウスでは増加しなかった(図1B)。eWATにおいて、加齢に伴い肥満の指標であるLeptin発現はいずれのマウスでも増加した(図1C)。白色脂肪の熱産生系亢進(ベージュ化)遺伝子群の中で、cell death-inducing DNA fragmentation factor α -like effector A(Cidea)は野生型マウスでは変化がなく、Vdr (-/-)マウスでは有意な発現増加を認めた(図1E)。その他の熱産生系遺伝子群の発現変化は認められなかった(図1D, F)。

3-2. 肥満モデルの体重増加におけるVDRの関与

野生型(Vdr (+/+))マウスとVdr (-/-)マウスに

1) 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野

2) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

石澤通康: ishizawa.michiyasu@nihon-u.ac.jp

マウス白色脂肪組織におけるビタミンD受容体の役割

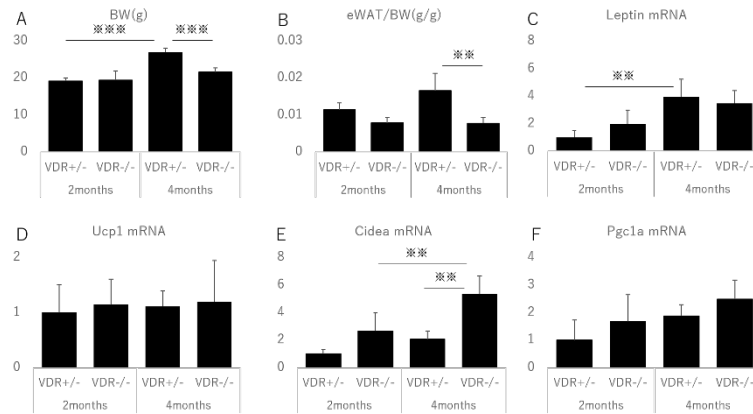


図1 2ヶ月齢及び4ヶ月齢マウスにおける(A)体重、(B)精巣上体白色脂肪組織重量及び、(C-F)精巣上体白色脂肪組織における遺伝子発現(18S rRNAレベルにて標準化)、One way ANOVA post hoc Tukey's test ※※ p<0.01, ※※※ p<0.001

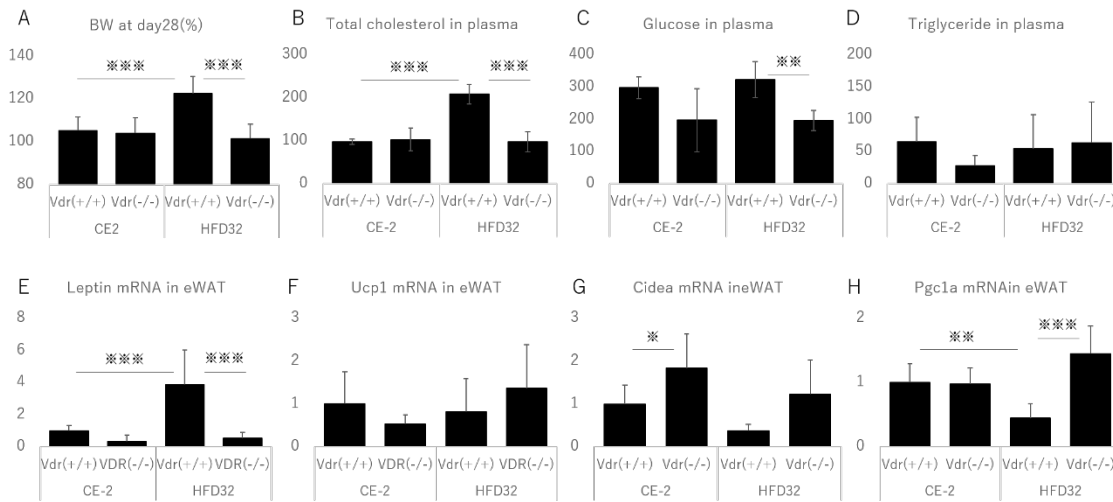


図2 4週間の高脂肪食摂取マウスにおける(A)体重、(B-D)血漿生化学成分、(E-H)精巣上体白色脂肪組織における遺伝子発現(18S rRNAレベルにて標準化)、One way ANOVA post hoc Tukey's test ※ p<0.05, ※※ p<0.01, ※※※ p<0.001

4週間HFD32を自由摂取させた結果、野生型マウスでは有意に体重が増加し、血中グルコース及び総コレステロールの増加を認めたが、HFD32摂取は血中中性脂肪は増加させなかった(図2A-D)。eWATにおいて、HFD32摂取は野生型マウスのLeptinを有意に発現増加したが、Vdr(-/-)マウスでは増加しなかった(図2E)。HFD32摂取は野生型マウスのCidea及びperoxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha(Pgc1a)発現を減少させたが、Vdr(-/-)マウスでは増加或いは維持された(図2G, H)。Uncoupling protein 1(Ucp1)発現は変化しなかった(図2F)。

4. 考察

VDRの欠損は加齢及び高脂肪食を摂取させた際、いずれにおいても体重の増加と精巣上体白色脂肪組織の重量増加を抑制した。この結果はNarvaez, Wangらが報告している結果と一致する^{1,2)}。そのメカニズムはVDR欠損に伴うUCP1の過剰発現と熱産生系の亢進(ベージュ化)と説明されたが、本研究ではUcp1発現は加齢、高脂肪食摂取いずれにおいても変化しなかった。VDRによるUCP1遺伝子の発現抑制メカニズムはUCP1遺伝子上のVDR応答領域へのVDRの動員と説明されたがマウスにおいて検証はされていない³⁾。一方、褐色脂肪細胞の分化誘導実験においてビタミンDは生理的濃度でUCP1発現を誘導し、薬理的濃度で発現を抑制する⁴⁾

ため、VDRによるUCP1遺伝子の直接的または間接的制御メカニズムが存在すると考えられる。一方、本研究で明らかにしたVDR欠損マウス脂肪組織におけるCIDEAとPGC1A遺伝子の発現制御はこれまで報告されていない。CIDEAの熱産生系における機能は明らかではないが、過剰に存在した際、UCP1を抑制するため、熱産生系遺伝子群とVDRとの相互理解が必要である⁵⁾。本研究成果は、VDRの熱産生系制御において、UCP1分子の抑制以外のメカニズムの存在を示唆している。また、VDRは3週齢マウスでは体重増加に関与せず、11ヶ月齢では体重増加に関与する⁶⁾。加齢に伴い脂肪組織のVDRは発現増加するが、時期選択的な脂肪組織におけるVDRの機能についても検証の余地がある。VDRの糖尿病への関与については全身性VDR欠損マウスでインスリン感受性に大きな差がないことが報告されている⁷⁾。疫学研究の結果を説明するためには、今後VDR発現組織（消化管、膵臓、脂肪組織、免疫細胞）においてVDRの役割を詳細に知る必要がある。

5. 結 語

マウスVDRは加齢及び肥満病態モデルにおける体重及び白色脂肪組織の増加、維持に必要である。脂肪蓄積におけるVDRの役割を詳細に知ることは、疫学的に知られているビタミンDと肥満・糖尿病の関係性を明確にし、適切な補充療法や予防的栄養介入の情報となることが期待できる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、助成を賜りました日本大学医学部創立50周年記念研究奨励金の関係者の皆様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Narvaez CJ, et al. Lean Phenotype and Resistance to Diet-Induced Obesity in Vitamin D Receptor Knock-out Mice Correlates with Induction of Uncoupling Protein-1 in White Adipose Tissue. *Endocrinology*. 2009; 150(2):651-61.
- 2) Wong KE, et al. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 296(4): E820-8.
- 3) Malloy PJ et al. Cell-Autonomous Regulation of Brown Fat Identity Gene UCP1 by Unliganded Vitamin D Receptor. *Mol Endocrinol*. 2013;27(10):1632-42.
- 4) Mukai T, Kusudo T. Bidirectional effect of vitamin D on brown adipogenesis of C3H10T1/2 fibroblast-like cells. *PeerJ*. 2023;11:e14785.
- 5) Fischer AW et al. UCP1 inhibition in Cidea-overexpressing mice is physiologically counteracted by brown adipose tissue hyperrecruitment. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2017;312(1):E72-E87.
- 6) Schutkowski A et al. Vitamin D Does Not Play a Functional Role in Adipose Tissue Development in Rodent Models. *Mol Nutr Food Res*. 2018;62(4).
- 7) Lau SL et al. Metabolic changes in vitamin D receptor knockout mice. *PLoS One*. 2022;17(6):e0267573.

担がんマウスの心理社会的ストレスと 嗅覚障害に対する鎮痛薬の効果

梶原一絵¹⁾, 北島 治¹⁾, 佐野 誠¹⁾

The effect of anesthetics on social isolation stress and dysosmia in cancer-bearing mice

Ichie KAJIWARA¹⁾, Osamu KITAJIMA¹⁾, Makoto SANNO¹⁾

要旨

これまでに我々は担がんマウスにおける嗅球僧帽細胞変性がデュロキセチン投与により抑制されることを報告してきたが、嗅球僧帽細胞変性と嗅覚異常との関連性が不明であった。今回、腭癌マウス(デュロキセチン投与群, 非投与群)と健常マウスに埋没ペレットテスト(Buried Pellet Test: BPT)を施行し、さらに嗅球腹側の変性僧帽細胞数との相関を解析した。BPT時間は健常マウスと比較して担がんマウス(非投与群)で有意に短縮し、一方デュロキセチン投与により延長した。嗅球僧帽細胞の変性細胞数はBPT時間と逆相関した。これらの結果により、終末期において癌により嗅覚過敏が誘発され、デュロキセチンにより嗅覚過敏が緩和されたことが考えられる。さらに、嗅球腹側僧帽細胞の変性の程度とBPT時間が逆相関したことから、僧帽細胞変性が嗅覚過敏を誘発した可能性が考えられた。

1. はじめに

近年、がんに対する治療方針の多様化から、患者に適したサポータブケアが求められている。これまでに適応外の抗うつ薬(デュロキセチン)が腭癌の自然発症モデルに対して抗腫瘍効果のみならず、疼痛緩和や悪液質の軽減、食欲低下・体重減少の遅延、生存期間の延長や嗅球僧帽細胞変性の緩和に寄与することを報告してきた(Kajiwara I, Pain, 2020)。しかしながら、がん患者における嗅覚障害の病態解明や治療法の開発は進んでいない。そこで、今回、床に埋めた餌を掘り出すまでの時間を測定する埋没ペレットテスト(Buried Pellet Test: BPT)を用いて嗅覚障害と僧帽細胞変性との関連性を検討した。

2. 対象及び方法

腭癌マウスをデュロキセチン投与群(PD群, n=7)

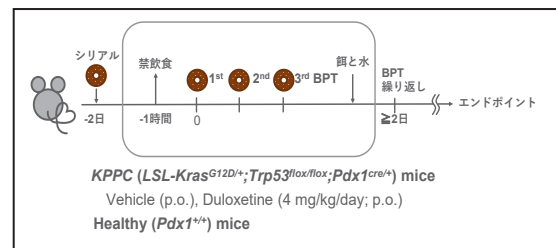


図1 埋没ペレットテスト(BPT)の手順

と非投与群(PV群, n=6)の2群に分け、デュロキセチン(4 mg/kg/日)は6週齢から人道的エンドポイントまで連日投与した(図1)。この2群と健常マウス(C群, n=6)に対してBPTを施行した。BPTは、実験2日前に甘いシリアルを与え、実験1時間前に絶水・絶食とし、BPT時間を最長5分・3回測定し合計時間を求めた。エンドポイント時に嗅球を採取し、HE染色標本を作製し、嗅球の変性僧帽細胞と

1) 日本大学医学部麻酔科学系麻酔科学分野
梶原一絵: kajiwara.ichie@nihon-u.ac.jp

非変性細胞数をカウントした。BPT時間はSteel-Dwass検定にて統計解析し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3. 結果

C群のBPT時間は計測期間中に明らかな変化が認められなかったが、PV群、PD群はともに終末期に向かい短縮した(図2左)。死亡前3日のPV群のBPT時間(3回の合計平均)39秒で、リッターメイトの健常マウスの797秒と比較して有意に短縮した(図2右)。一方、PD群では256秒とPV群と比べて有意に延長した。嗅球腹側の変性僧帽細胞に関しては、C群と比べてPV群で有意に増加し、その増加はデュロキセチン投与で有意に減少した(PV: 449.9 cells/mm², PD: 37.9 cells/mm², C: 0 cells/mm²) (図

3)。興味深いことに、嗅球腹側僧帽細胞の変性細胞数とBPT時間は逆相関し、変性細胞数が多い方がBPT時間が短いことが明らかとなった(図4)。

4. 考察

BPT時間がC群に対してPV群で短縮したことは、終末期において嗅覚過敏が誘発されたことが示唆された。一方、PV群に比べてPD群でBPT時間が延長したことは、デュロキセチンにより嗅覚過敏が緩和された可能性が考えられる。さらに、嗅球腹側僧帽細胞の変性の程度とBPT時間が逆相関したことから、僧帽細胞変性が嗅覚過敏を誘発し、デュロキセチンが僧帽細胞変性、嗅覚過敏を抑制したことが推察された。現在、その詳細なメカニズムを解明するために、嗅球のアミン濃度を解析中である。

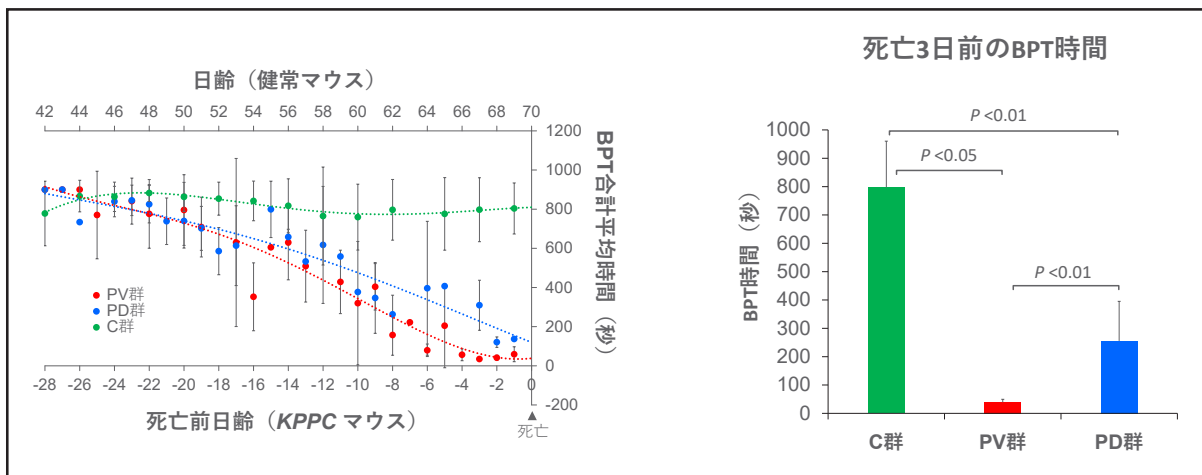


図2 BPT時間の推移と比較

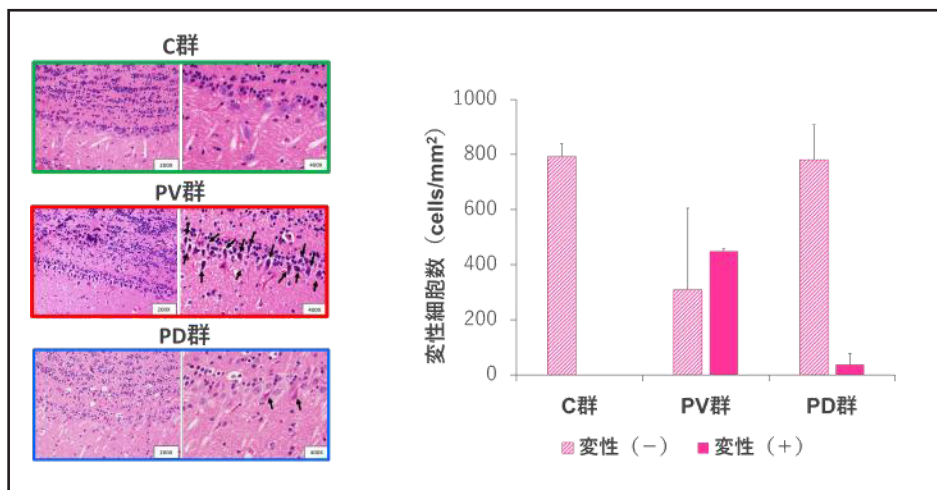


図3 嗅球腹側のHE染色(左)、嗅球腹側僧帽細胞変性数(右)

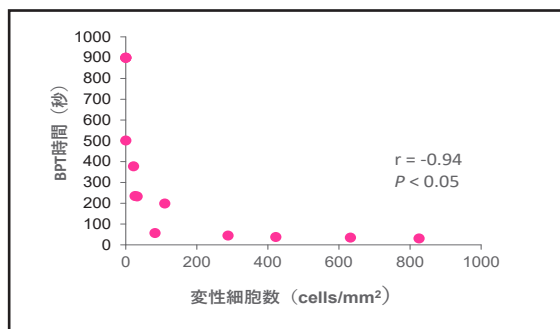


図 4 嗅球腹側の変性細胞数とBPT時間の関係

5. 結 語

膵癌マウスで生ずる嗅球腹側の僧帽細胞変性が、嗅覚過敏の原因であることが示唆された。デュロキセチンは僧帽細胞変性を抑制し、嗅覚過敏を緩和させた。

謝辞

本研究は令和4年度医学部50周年記念研究の助成金交付により遂行されました。貴重な研究の機会を与えてくださり、終始多くのご指導、ご助言を頂きました日本大学医学部麻酔科学系麻酔科学分野主任教授 鈴木孝浩先生に心から感謝いたします。

そして、本研究のために尊い命を亡くしたすべてのマウスに追悼の意を捧げるとともに、心より感謝いたします。

文 献

- 1) Kajiwara I, Sano M, Ichimaru Y, Oshima Y, Kitajima O, Hao H, Masamune A, Kim J, Ishii Y, Ijichi H, Suzuki T. Duloxetine improves cancer-associated pain in a mouse model of pancreatic cancer *via* stimulation of noradrenaline pathway and its antitumor effects. PAIN, 2020;161(12) :2909-2919.

日本大学医学部総合医学研究所紀要
Bulletin of the Research Institute of Medical Science,
Nihon University School of Medicine

編集委員会

委員長 槇島 誠
委員 西山博孝, 羽尾裕之, 原 弘之,
深谷 親, 森岡一朗
幹事 井上広一, 葛西玲広, 正田雅之, 藤田順一

(50音順)

※2023年10月1日時点

Editorial Board

Editor-in-Chief Makoto MAKISHIMA
Associate Editors Hirotaka NISHIYAMA, Hiroyuki HAO,
Hiroyuki HARA, Chikashi FUKAYA, Ichiro MORIOKA
Managing Editors Koichi INOUE, Reo KASAI, Masayuki SHODA, Jun-ichi FUJITA

発行者 日本大学医学部総合医学研究所長 槇島 誠
発行所 日本大学医学部
〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1 TEL.03-3972-8111
Publisher Makoto MAKISHIMA
Director, Research Institute of Medical Science,
Nihon University School of Medicine
30-1, Ohyaguchi-kamicho, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610 JAPAN
Phone +81-3-3972-8111
