

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.12 / December 2024

日本大学医学部総合医学研究所

Research Institute of Medical Science, Nihon University School of Medicine

膝蓋下脂肪体に由来する脱分化脂肪細胞 (DFAT) の 特性及び機能解析

松本太郎¹⁾, 谷本浩二²⁾, 遠藤則行²⁾, 中西一義²⁾, 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⁾, 櫻村勉⁴⁾,
李予昕¹⁾, 月村直樹¹²⁾, 秋田大輔¹²⁾, 風間智彦¹⁾, 長岡悠紀¹⁾

Characterization and functional analysis of dedifferentiated fat cells derived from infrapatellar fat pad

Taro MATSUMOTO¹⁾, Koji TANIMOTO²⁾, Noriyuki ENDO²⁾, Kazuyoshi NAKANISHI²⁾,
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⁾, Yuki NAGAOKA¹⁾

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) に類似した多能性細胞である。本研究では、変形性膝関節症患者の膝蓋下脂肪体から DFAT を調製し形質解析や機能解析を行い、皮下脂肪から調製した DFAT と比較検討を行った。その結果、膝蓋下脂肪体由来 DFAT は皮下脂肪由来 DFAT と同様の形質と多分化能を示し、さらに皮下脂肪由来 DFAT に比べて、細胞増殖能、軟骨分化能、軟骨変性抑制作用が高いことが明らかになった。変形性膝関節症に対する治療用細胞として膝蓋下脂肪体由来 DFAT は高い有効性を持つことが期待できる。

1. はじめに

関節軟骨は、無血管組織で自己修復能力に乏しいため、一度損傷すると再生させることは困難であると考えられている。近年、軟骨再生を期待した細胞治療が注目されている。実際に軟骨欠損や変形性膝関節症に対し、自己軟骨細胞や間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSC) を用いた細胞治療が行われ、その有効性が報告されている¹⁾。特に MSC は患者自身の骨髓や脂肪組織から培養調製が可能であり、軟骨分化能に加えて免疫制御作用や抗炎症作用を持つことから、軟骨変性疾患に対する高い治療

効果が期待されている。

膝関節に存在する脂肪組織である膝蓋下脂肪体 (Infrapatellar fat pad: IFP) (図1) は、関節鏡手術や膝の観血的手術においてしばしば切除され、医療廃棄物として扱われるため、細胞治療に利用しやすい組織と考えられている。膝蓋下脂肪体由来 MSC は、骨髓由来 MSC や皮下脂肪由来 MSC に比

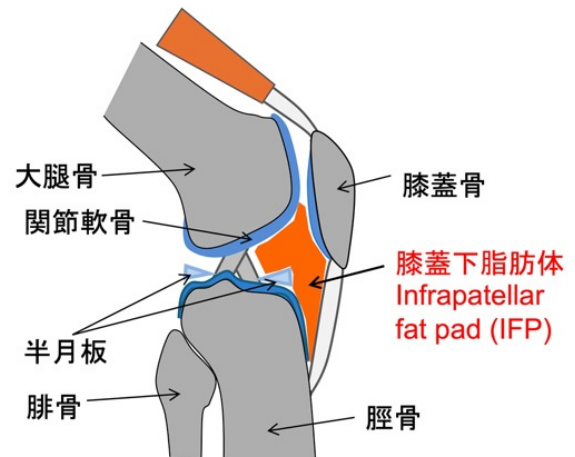


図1 膝蓋下脂肪体 (IFP) の局在部位

- 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) 日本大学医学部整形外科系整形外科学分野,
 - 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, I
 - 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外科学研究室,
 - 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
- 責任者連絡先: 松本太郎, matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

べ良好な軟骨分化能を示すことが明らかにされており、軟骨再生治療用細胞として注目されている²⁾。一方、MSCはヘテロな細胞集団であり、その品質は個体差が大きいことが知られている。とくに高齢者や糖尿病などの基礎疾患を持つ患者から調製したMSCは、増殖能や分化能の低下がしばしば認められる。

Matsumotoら³⁾は、成熟脂肪細胞を天井培養することで調製される脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell : DFAT) が高い増殖能とMSCと同等の多分化能を示すことを明らかにした。DFATの調製法の概略を図2に示す。DFATはドナーの年齢や基礎疾患に左右されず、少量の脂肪組織から均質なMSC様細胞を調製できるため、実用性の高いMSC代替細胞として期待されている。DFATは、皮下脂肪組織のみならず膝蓋下脂肪体からも調製可能であるが、その形質や分化指向性、治療活性については十分に解明されていない。そこで本研究では、変形性膝関節症患者の膝蓋下脂肪体からDFATを調製し、形質解析や機能解析を行い、同じ患者から採取した皮下脂肪由来DFATと比較検討を行った。そして変形性膝関節症に対する治療用細胞としての特性評価を行った。

2. 対象及び方法

日本大学医学部附属板橋病院整形外科において、人工膝関節置換術を施行する変形性膝関節症患者より同意を得た上で、手術時に余剰となり破棄予定の膝蓋下脂肪体および膝関節上前方の皮下脂肪組織の提供を受けた (n=7, 女性, 年齢64~87歳)。ヒト組織を用いたすべての実験は、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:RK160209-6)。摘出された膝蓋下脂肪体の一部は、パラフィン切片標本を作成し、Elastic van Gieson (EVG) 染色を行い、組織学的解析を実施した。皮下脂肪 (subcutaneous fat: SC) 由来のDFAT (SC-DFAT) と膝蓋下脂肪体由来のDFAT (IFP-DFAT) は既報³⁾に従い調製し、細胞表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。

SC-DFAT, IFP-DFATの細胞増殖能はWST-1アッセイにて評価した。SC-DFAT, IFP-DFATの脂肪分化能の評価は、脂肪分化誘導培地にて14日間培養後、Oil red O染色を行い、その染色強度を定量比較した。SC-DFAT, IFP-DFATの骨分化能の評価は、骨分化誘導培地にて14日間培養後、alizarin red S染色を行いその染色強度を定量比較した。SC-DFAT, IFP-DFATの軟骨分化能の評価には、Pellet培養法⁴⁾を用いて両細胞を軟骨分化誘導培地を含む15 mLポリプロピレンチューブ内で21日間培養し、軟骨様細胞塊を誘導した。そして誘導された軟骨様細胞塊の重量比較および組織学的解析を行った。組織学的解析は、軟骨様細胞塊のパラフィン切片標本を作成し、Toluidine Blue染色, Alcian Blue染色, Safranin O染色を行い評価した。また免疫組織化学的解析としてアグリカンに対する免疫染色を行い、両細胞の比較評価を行った。軟骨様細胞塊の硫酸化グリコサミノグリカン (sulphated glycosaminoglycans: sGAG) の定量法として、検体をprotease Kで56℃, 15時間処理後、dimethylmethlene blueを作用させ、吸光度計を用いてsGAG量を定量評価した。

軟骨分化に係る遺伝子発現解析として、SC-DFAT, IFP-DFATを軟骨分化誘導培地を用いて培養後、0, 7, 14日の時点で両細胞からRNAを抽出し、軟骨分化マーカーであるSOX-9, COL2A1の発現をリアルタイムRT-PCR法を用いて測定した。軟骨変性抑制, 免疫制御, 抗炎症作用に係る遺伝子発現解析として、SC-DFAT, IFP-DFATを100 mmディッシュに播種し、80%コンフルエントとなった時点で、TNF- α (10 ng/ml) を添加した。添加後12時間, 72時間後に両細胞からRNAを抽出し、免疫制御能に関与するProstaglandin E2 (PGE2, 遺伝子名PTGS2), 抗炎症作用に関与するTNF-stimulated gene 6 (TSG6, 遺伝子名TNFAIP6), 軟骨保護作用に関与するProteoglycan 4 (PRG4), Bone morphogenetic protein 2 (BMP2), Bone morphogenetic

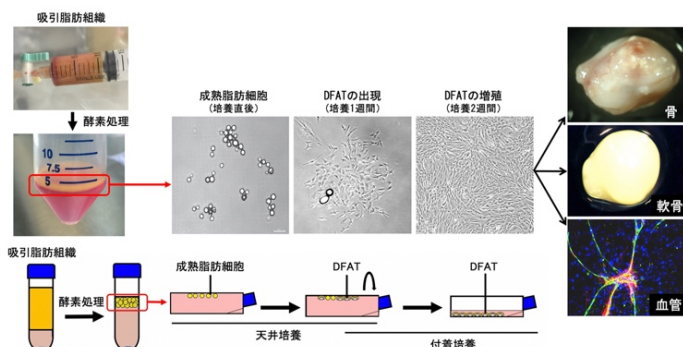


図2 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の調製法

protein 6 (*BMP6*) の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR法を用いて測定した。

滑膜線維芽細胞との共培養実験は、6 well プレートと0.4 mm孔を有するセルカルチャーインサーターを用いて実施した。6well プレートにはArticular Engineering社から購入したヒト滑膜線維芽細胞を播種し、セルカルチャーインサーターにSC-DFATまたはIFP-DFATを播種した。各細胞が80%コンフルエントに到達した時点で共培養を24時間行い、TNF- α (10 ng/ml) を添加し、12時間後に滑膜線維芽細胞からRNAを抽出した。そして軟骨基質分解酵素であるa disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (*Adamts4*) や炎症性サイトカインであるInterleukin 6 (*IL6*) の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR法を用いて測定した。内部標準として18s rRNAの発現を同時に測定し、18s rRNAに対する相対的定量解析 (Comparative CT法) を行った。2群間比較にはMann-Whitney U testを使用し、3群間の比較はOrdinary one-way ANOVAおよびTukey's multiple comparisons testにより有意差検定を行った。 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

3. 結果

ヒト膝蓋下脂肪体のEVG染色像を図3に示す。膝蓋下脂肪体は結合組織から構成される隔壁で分画された大小不動の小葉から構成され、隔壁の内部には

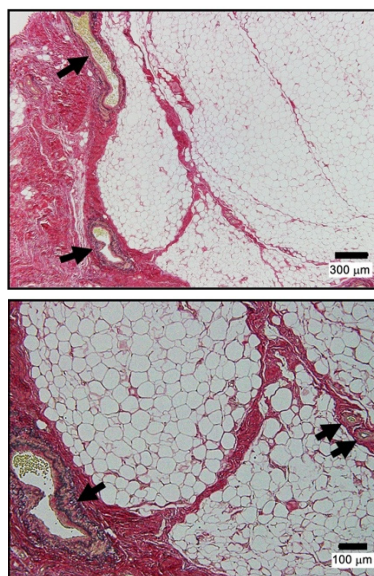


図3 膝蓋下脂肪体 (IFP) のEVG染色像 (矢印は血管を示す)

血管が豊富に発達している所見が観察された (図3 矢印)。

次に膝蓋下脂肪体から単離した脂肪細胞からDFATの調製を試みた。その結果、皮下脂肪と同じ調製方法で膝蓋下脂肪体からDFATの調製が可能であることが確認された。皮下脂肪からの調製と比べ、天井培養過程における細胞の形態変化や生成されたDFATコロニーの形態に顕著な違いは見られなかった。SC-DFATおよびIFP-DFATの細胞表面抗原解析の結果、両細胞ともにMSC陽性マーカーであるCD90, CD73, CD105がいずれも96%以上陽性を示し、一方、陰性マーカーである血管内皮細胞マーカーCD31, CD34, リンパ球マーカーCD45, 単球・マクロファージマーカーCD11b, CD14, ヒト白血球抗原マーカーHLA-DRはいずれも0.8%未満であった (図4)。これらの結果から、SC-DFATと同様に、IFP-DFATも国際細胞治療学会が定めたMSCの最小基準⁵⁾に合致する表面抗原発現プロファイルを示すことが確認された。

SC-DFATおよびIFP-DFATの細胞増殖能を比較した結果、培養4日目にはSC-DFAT群に比べIFP-DFAT群で細胞数が増加する傾向が認められ、培養7日目には、SC-DFAT群に比べIFP-DFAT群で有意 ($p < 0.05$) に細胞数が高いことが示された。SC-DFATおよびIFP-DFATの脂肪分化能を比較した結果、IFP-DFAT, SC-DFAT共に、同等のOil-red O染色強度を示し、両細胞間に明らかな違いは認められなかった。SC-DFATおよびIFP-DFATの骨分化能を比

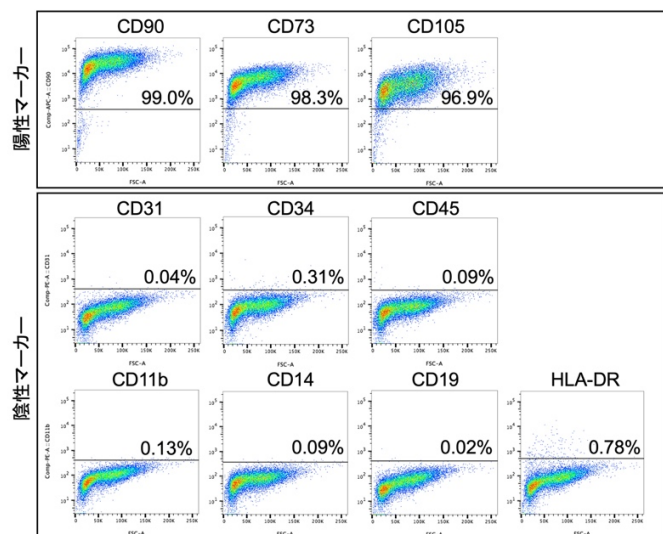


図4 IFP-DFATの細胞表面抗原解析

較した結果、両細胞ともに、同等の Alizarin red S 染色強度を示し、両細胞間に明らかな違いは認められなかった。軟骨分化能の比較では、IFP-DFAT および SC-DFAT とともに、直径 1.5-2.0 mm の軟骨様細胞塊の形成が認められた。検討した全てのドナーにおいて、IFP-DFAT から誘導された軟骨様細胞塊の重量は、SC-DFAT から誘導されたものよりも重かった (図 5)。

軟骨様細胞塊の組織学的解析結果を図 6 に示す。Toluidine Blue 染色では、IFP-DFAT は SC-DFAT に比べ、軟骨基質に特徴的な紫色の異染像が強く認められた。同様に Alcian Blue 染色では、軟骨成分である酸性ムコ多糖類を示す青藍色の染色像を強く認め、Safranin O 染色では、関節軟骨プロテオグリカ

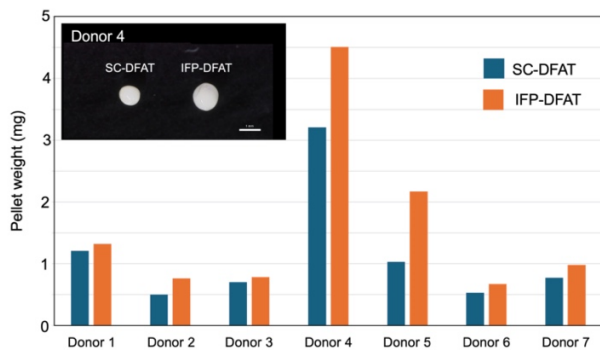


図 5 SC-DFAT, IFP-DFAT から誘導した軟骨様細胞塊の形態と重量比較

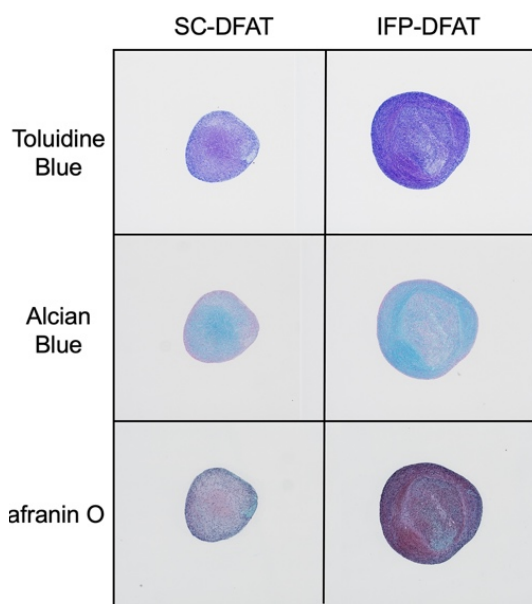


図 6 SC-DFAT, IFP-DFAT から誘導した軟骨様細胞塊の各種染色像

ンを示す赤色の染色像を強く認められた。軟骨特異的プロテオグリカンであるアグリカンに対する免疫組織染色像を図 7 に示す。IFP-DFAT は SC-DFAT に比べ、軟骨様細胞塊の周辺部位を中心にアグリカンの発現が強く認められる傾向があった。

軟骨細胞外基質の主要構成成分である硫酸化グリコサミノグリカン (sGAG) 量を定量した結果、IFP-DFAT は SC-DFAT に比べて有意 ($p < 0.05$) に高い値を示した。

軟骨分化マーカー遺伝子の発現解析を行った結果、軟骨分化の初期マーカーである *SOX9* は、軟骨分化誘導に伴い SC-DFAT, IFP-DFAT とともに同等の発現増加がみとめられた。これに対し、軟骨細胞の終末分化マーカーである II 型コラーゲン (*COL2A1*) の分化誘導後 14 日目における発現は、IFP-DFAT は SC-DFAT に比べ有意 ($p < 0.05$) に高値を示した。以上より、IFP-DFAT は SC-DFAT に比べ、軟骨分化指向性が高いことが示唆された。

軟骨変性抑制に係る遺伝子発現解析を行った結果、軟骨変性抑制、軟骨保護に係る *PRG4* や *BMP2* の発現は、IFP-DFAT が SC-DFAT に比べて顕著に高いことが明らかになった。一方、軟骨保護に作用する *BNP6* の発現は SC-DFAT で高いことが示された。滑膜線維芽細胞との共培養実験では、SC-DFAT, IFP-DFAT とともに滑膜線維芽細胞からの *ADAMTS4* や *IL6* の発現を同程度に抑制する作用が認められた。免疫制御・炎症抑制に係る遺伝子発現解析を行った結果、免疫制御能に関与する *PTGS2*、抗炎症作用に関与する *TNFAIP6* の発現は、両細胞共に TNF α 刺激下に発現が認められた。*PTGS2* の発現は SC-DFAT で高く、*TNFAIP6* の発現は IFP-DFAT で高い

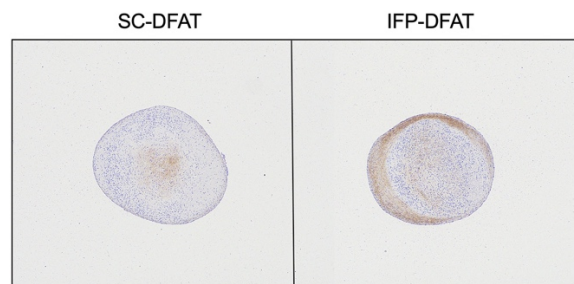


図 7 SC-DFAT, IFP-DFAT から誘導した軟骨様細胞塊のアグリカン免疫染色像

傾向が認められた。これらの解析結果のまとめを表1に示す。

4. 考察

IFP-DFATの形質解析を行った結果、国際細胞治療学会が定めたMSCの最小基準⁵⁾に合致する形質と多分化能を示すことが明らかになった。また同じ患者に由来するIFP-DFATとSC-DFATの比較検討を行った結果、IFP-DFATはSC-DFATに比べ、細胞増殖能、軟骨分化能、軟骨変性抑制作用に優れていることが示された。Ozekiら⁶⁾は、ラット変形性膝関節症モデルに対する滑膜由来MSCの軟骨変性抑制作用は、MSCから分泌されるTSG6, PRG4, BMP2, BMP6などの抗炎症作用や軟骨保護作用を有する液性因子のパラクライン効果によるものであることを報告している。また、MSCは変形性膝関節症患者の滑膜や軟骨から分泌される炎症性サイトカインや軟骨基質分解酵素の分泌を間接的に抑制することが明らかにされている⁷⁾。本研究の成果より、DFATを変形性膝関節症患者の関節内に投与した場合、MSCと同様の機序、すなわちパラクライン作用を介した直接的な抗炎症、軟骨保護効果や、軟骨変性に係わる滑膜細胞や軟骨細胞からの液性因子分泌を間接的に抑制することで、軟骨変性の進行を抑制する可能性が示された。実際、Endoら⁸⁾は、前十字靱帯切離と内側半月板切除によるラット変形性膝関節症モデルに対してラットSC-DFATを関節内投与し

た結果、軟骨変性を抑制できることを報告している。今後、同様の疾患モデルや臨床研究を用いてIFP-DFATがSC-DFATに比べて優れた治療効果を示すか検討することが望まれる。膝蓋下脂肪体は、皮下脂肪組織に比べて組織採取に伴う侵襲性は高いが、変形性膝関節症に対する人工関節置換術などを行う際に追加の侵襲なく採取できるといった利点がある。IFP-DFATの臨床応用例として、人工関節置換術を行った対側の膝関節に自家移植したり、拡大培養を行い他家移植用細胞として利用するといった応用が考えられる。Fujiiら⁹⁾は、最近、膝蓋下脂肪体由来するDFATは膝蓋下脂肪体由来するMSCに比べ、脂肪分化能や軟骨分化能が高いことを報告している。このような研究結果は、IFP-DFATによる細胞治療が既存の細胞治療に比べてより有効性が高く、将来的に変形性膝関節症に対する有効な治療法となる可能性を示唆している。

5. 結語

膝蓋下脂肪体から調製したDFAT (IFP-DFAT) は、皮下脂肪から調製したDFAT (SC-DFAT) と同様に、MSCに類似した形質を示し、軟骨、脂肪、骨への多分化能を示した。特に、IFP-DFATはSC-DFATに比べて、高い細胞増殖能と軟骨分化指向性を有することが明らかとなった。また、IFP-DFATおよびSC-DFATの双方で、軟骨変性抑制、免疫制御、抗炎症に関与する遺伝子発現が確認され、IFP-DFATは特

表1. SC-DFAT, IFP-DFATの機能解析結果のまとめ

評価項目		SC-DFAT	IFP-DFAT
細胞増殖能	WST-1 吸光度	+	++
脂肪分化能	Oil red O染色強度	+	+
骨分化能	Alizarin red S染色強度	+	+
軟骨分化能	ペレット重量	+	++
	ペレットsGAG量	+	++
	SOX9 発現	+	+
	Type II collagen (COL2A1) 発現	+	+++
軟骨変性抑制	PRG4 発現	+	+++
	BMP2 発現 (TNF α 刺激下)	+	+++
	BMP6 発現	++	+
	滑膜線維芽細胞からのADAMTS4 発現抑制 (TNF α 刺激下)	++	++
	滑膜線維芽細胞からのIL6 発現抑制 (TNF α 刺激下)	+	+
免疫制御・炎症抑制	PGE2 (PTGS2) 発現 (TNF α 刺激下)	++	+
	TSG-6 (TNFAIP6) 発現 (TNF α 刺激下)	+	++

に軟骨抑制に関連する遺伝子の発現が高い傾向が認められた。これらの結果は, IFP-DFAT が変形性膝関節症に対して高い治療活性を示す可能性を示唆している。

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) Burke J, Hunter M, Kolhe R, Isales C, Hamrick M, Fulzele S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis. Clin Transl Med 2016; 5 (1) :27.
- 2) Garcia J, Mennan C, McCarthy HS, Roberts S, Richardson JB, Wright KT. Chondrogenic potency analyses of donor-matched chondrocytes and mesenchymal stem cells derived from bone marrow, infrapatellar fat pad, and subcutaneous fat. Stem Cells Int 2016; 2016:6969726.
- 3) 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.
- 4) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284 (5411) :143-147.
- 5) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach 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.
- 6) Ozeki N, Muneta T, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, et al. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. Osteoarthritis Cartilage 2016; 24 (6) :1061-1070.
- 7) Lopa S, Colombini A, Moretti M, de Girolamo L. Injective mesenchymal stem cell-based treatments for knee osteoarthritis: from mechanisms of action to current clinical evidences. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2019; 8 (1) :16944.
- 8) Endo N, Matsumoto T, Kazama T, Kano K, Shimizu M, Ryu K, et al. Therapeutic potential of dedifferentiated fat cells in a rat model of osteoarthritis of the knee. Regen Ther 2024; 26:50-9.
- 9) Fujii S, Endo K, Matsuta S, Komori K, Sekiya I. Comparison of the yields and properties of dedifferentiated fat cells and mesenchymal stem cells derived from infrapatellar fat pads. Regen Ther 2022; 21:611-9.

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の成果報告

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⁴⁾, 山崎政彦⁴⁾,
豊谷純⁵⁾, 今林亘⁶⁾, 櫻井裕幸¹⁾, 岡村行泰¹⁾, 萩原謙¹⁾, 武藤伸洋⁶⁾, 内木場文男²⁾

Report on the results of fundamental research on the development of a next-generation surgical system based on interaction between surgeons and surgical assistants

Hiroharu YAMASHITA¹⁾, Masatoshi HATANO²⁾, Ken SAITO²⁾, Masahiko OSAWA³⁾,
Shota KATAGIRI⁴⁾, Minami KANEKO⁴⁾, Masahiko YAMAZAKI⁴⁾, Jun TOYOTANI⁵⁾,
Wataru IMAHAYASHI⁶⁾, Hiroyuki SAKURAI¹⁾, Yukiyasu OKAMURA¹⁾, Ken HAGIWARA¹⁾,
Shinyo MUTO⁶⁾, Fumio UCHIKOBA²⁾

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、外科医師数の漸減傾向は止まっていない。外科医療の安定供給は将来的に大きな課題となると推測される。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⁾。これと比例するように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1位は長らく悪性新

生物であり、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が普及し手術施行件数が増えている。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

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

責任者連絡先: 山下裕玄, yamashita.hiroharu@nihon-u.ac.jp

が中心となってきた。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。給与体系と労働時間のバランス不均衡のためであろうか、外科を志望する医師が増えないまま推移している。このままでは外科医数の絶対数減少だけでなく、外科指導医の高齢化に伴う後進育成体制にも大きな懸念を生じる。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3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3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。

1. 協働型鏡視下手術助手ロボットの開発:

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、高額の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。令和4年度は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したが、令和5年度で産業用モータを用いて改良型ロボットの製作を行い、AI（人工知能）による物体検出に基づいたビジュアルフィードバックによるカメラ追従制御、および執刀医の視線にあわせて対象物を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。最低限の結果として、模擬臓器に対して、執刀医の所望する部位を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. 腸管内手術助手マイクロロボットの開発:

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が可能だが、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は、漿膜側から粘膜面の情報が経口内視鏡情報なしでは全く得られないことが課題である。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実現を目的に開発する。令和4年度においては、直径2cmのマイクロロボットの筐体や脚部展開機構をコンピュータ支援設計（3D-CAD）により設計した。また、光造形の3Dプリンタでプロトタイプロボットを試作した結果、模型用の一般的な小型モータおよびギア

ボックスを用いて駆動に成功した。令和5年度においては、ステンレスを用いてプロトタイプロボットを試作する。また、腸管内を移動するための移動機構についても検討する。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。

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技術の開発:

腹腔鏡手術において、外科医はモニターに映し出された視覚情報から手術動作を決めている。そこで、外科医が手術中に注視している箇所を、実際の手術中にアイトラッカーを用いて視線データを収集、視線データから外科医の思考を可視化・定量化することで手術助手AIの実現に向けた知見の収集および技術開発を目指す。

定量化にあたっては、腹腔鏡手術において収集したデータのうち、視線データを用いて分析する視線ベースのアプローチと、腹腔鏡で取得した映像を用いて分析する画像ベースのアプローチの2つのアプローチを用いる。視線行動から読み取れる外科医の状態と、腹腔鏡から得られる施術状態や行動に関する情報を統合することで、外科医の思考をより正確にモデル化することができる。

また、手術助手AIの実現に向けた一歩として、手術助手の作業の1つであるカメラ操作を自動化するシステムの開発を目指す。前述の外科医の思考を可視化・定量化することによって得られた知見をシステムに流用することで、人間の助手が行っている、執刀する外科医の意図に則したカメラ操作を高い精度で自動化することが期待できる。

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5年度の研究成果および今後の展望を報告する。

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5年度の成果を以下に示す。

1. 協働型鏡視下手術助手ロボットの開発:

令和5年度は、まず、令和4年度に製作した2台の協働型手術ロボットに対して、機構的な問題点の

改良および産業用モータを用いて新たに改良型ロボットの製作を行った。図1に令和4年度に製作したロボット、図2に令和5年度に製作した改良型ロボットを示す。それぞれ中央部にあるのは実際の手術において使用されているオリンパス製の内視鏡カメラシステムであり、それぞれ左手にカメラ助手ロボット、右手に術野確保助手ロボットを示す。

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、また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機構と垂直リンク機構の組み合わせによる機構を提案した。令和4年度で試作したロボットの基礎動作実験においてコンセプト通りの動作結果が得られた。そのため、基



図1 令和4年度に試作したロボット

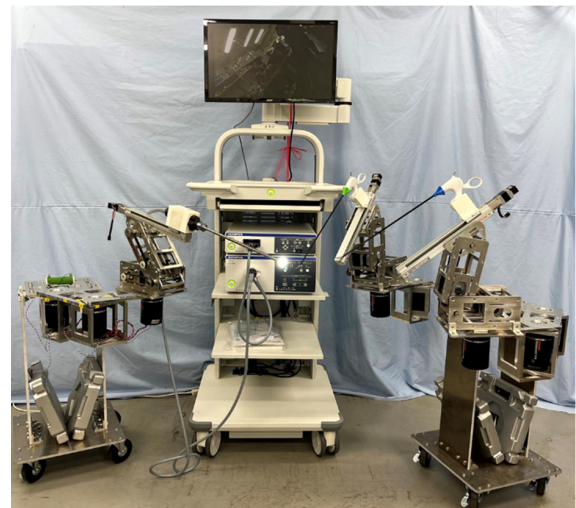


図2 令和5年度に製作した改良型ロボット

本的な構造である水平3関節・垂直3関節は変更なく、モータ等の駆動系のみ新型コロナウイルス感染症蔓延に伴う制限が解除され購入が可能となった産業用モータに変更した。このモータはモータ本体・ギア・センサー・制御回路が一体となったものであり、また本体が構造体として機能することによりシンプルかつ信頼性の高いタイプである。これにより全体として構造を簡素化できガタ・バックラッシュを減少させることができるとともに部品点数の減少や信頼性を向上させることができた。さらに部品点数を減少させることができたために軽量化につながり、令和4年度モデルで問題となっていたロボットの過重量を解決することができ、設計で期待していた通りの性能を得ることができ、スムーズな動作が可能であることを確認できた。

この新たに製作開発したロボットを用いて、動作制御系の設計・ソフトウェア作成を行った。その結果を以下に示す。本研究で目標とする半自律型の手術助手ロボットの実現のためには、ロボットの基本動作はロボット自身が判断することと、執刀医の意志をセンシングし制御動作に反映することの両方が必要である。そこで本研究では、前者のロボット自身の自律化のためには、AIを用いた対象物の識別および自然背景からの物体検出システムを構築した。

また後者の執刀医の意思のセンシングには、執刀医の視線情報を用いた。以下に詳細について述べる。AIを用いた物体検出には“インスタンスセグメンテーション”と呼ばれる手法を適用した。これは自然背景から対象物が存在するエリアを矩形で示すだけでなく、対象物の領域をドット単位で検出することができる。本研究では対象物として、現在内視鏡手術で最も件数の多い胆嚢摘出手術をターゲットとし、ロボットのリアルタイム制御系の開発のためにシリコン製の内視鏡手術練習材を用いた学習データ作成と、今後の研究用として実際の手術動画を用いた学習データ作成を行い用いた。これらの学習データを用いてAIのトレーニングを行った。その学習データを用いた物体検出結果より、カメラ映像内における対象物の位置を特定することができ、その対象物を常に映像の中心で捉え続けるためのロボット制御系（これをビジュアルサーボ系と呼ぶ）の開発を行った。図3にAIによる対象物体検出とロボット動作実験環境を示す。ロボットの先端にはカメラが設置され、被験者が持ったシリコン製のターゲットを動かし、ロボットはカメラ映像とAIによるインスタンスセグメンテーションにより検出した対象部位の位置座標情報を用いて、常に画面の中央で対象部位を捉え続けるようにロボットを動作させ

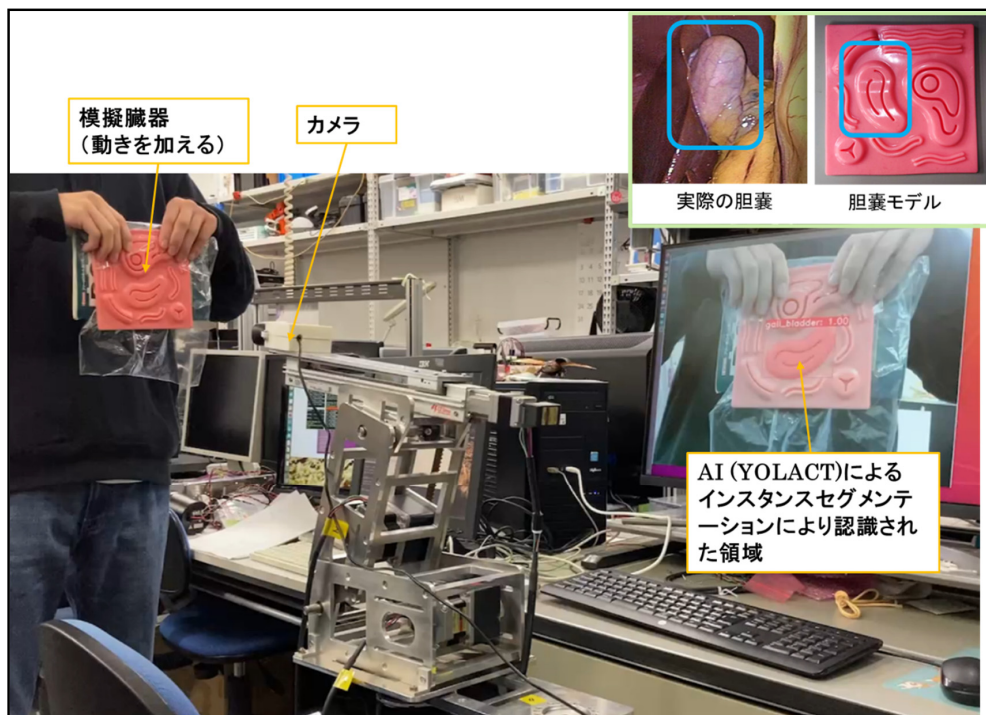


図3 AIによる対象物体検出とロボット動作実験環境

た。ここで、本来の内視鏡手術を模擬するためにはテーブル上に水平に置かれた模擬体内にターゲットを設置した状況で実験を行うべきであるが、カメラを挿入する体表に設置したトロッカー周りの回転運動等に変換するための座標変換計算等を実装する必要があり、今後の課題とする。

図3のモニター上には得られたターゲットの映像とともに、インスタンスセグメンテーションで検出された対象部位が100%の確率（毎サンプリングタイムにおける認識率は95%以上）として濃いピンク色で得られている。また被験者がターゲットを動かす、それをビジュアルサーボにより常に画面中央でとらえ続けることが確認できた。この研究成果について国際会議AROB2024にて発表を行った⁶⁾。

次に執刀医の視線入力によるロボット動作のリアルタイムオーバーライドを行うためのシステムについて構築を行った。図4に構築したシステムの有効性を確認するためのロボット動作実験環境を示す。視線入力にはtobii社製のアイトラッカーを用いた。アイトラッカーにはメガネタイプの装着型もあるが、本研究ではモニター下部にセンサーを設置する非接触型を採用した。これは実際の手術環境においても視線データ解析用に使用されているものと同型

機種である。図4において、実験者が図3と同じターゲットを手にとって動かし、それをロボットカメラで撮像することによりモニターに表示されたターゲットを被験者が目視し、その視線をセンサーで捉えてロボットにフィードバックし、ビジュアルサーボを行う。この視線情報を用いて執刀医が注視している点を常に映像の中心で捉え続けるためのビジュアルサーボ系の開発を行い、基礎実験の結果、被験者の視線の通りにロボットが動作することが確認できた。しかし、被験者の視線の動きとロボットの動作が共振し、被験者の酔いが発生することなどが新たな問題点として明らかになった。この点については今後の研究課題である。

以上、改良型ロボットの製作と、それをターゲットとしたAIと視線情報をハイブリッドで用いるビジュアルサーボシステムの研究開発を行い、本研究期間中における目標をほぼ達成することができた。また新たな問題点等も明らかとなったため、今後も研究開発を進める予定である。

2. 腸管内マイクロロボットの開発:

令和4年度に、3D-CADを用いて腸管内マイクロロボットの筐体および脚部機構の設計を実施した



図4 視線入力システムによるロボット動作実験環境

(図5)。ロボットの筐体は直径20mm、全長50mmで設計し、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。脚部機構の駆動には図5 (a) に示した送りネジ方式⁷⁾および図5 (b) に示したウォームギヤ方式⁸⁾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が開閉する。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が開閉する。

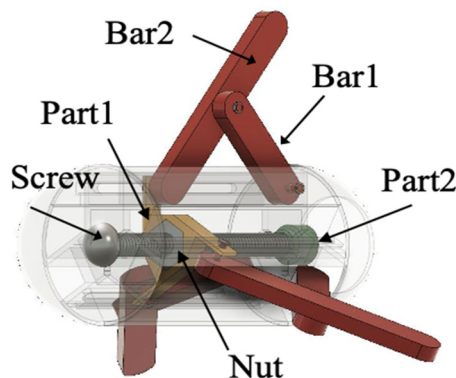
送りネジ方式およびウォームギヤ方式それぞれに長所と短所が存在するため、実際に試作して脚の展

開実験が必要である。

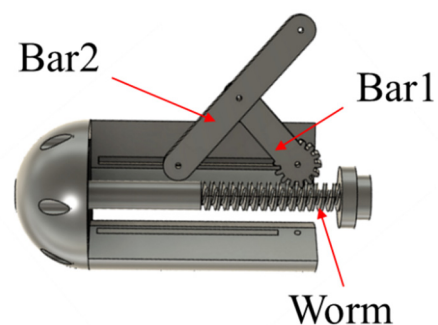
令和5年度には新たにウォームギヤによる脚部展開機構および送りネジによるロボットの移動機構を持つ腸管内マイクロロボットを設計した(図6)。脚部展開機構は送りネジと比較してより小型化が可能であるウォームギヤを採用した。移動メカニズムは図6 (b) に示した通り、ロボットの伸び縮みには送りネジを採用し、前部と後部に設けた脚部を交互に展開してミミズのように移動する機構とした。

図7にステンレスを放電加工して試作した、腸管内マイクロロボットを示す。図中左から順番に、脚部機構に送りネジ方式を採用したロボット、ウォームギヤ方式を採用したロボット、脚部展開機構および移動機構を持つロボットを示している。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8にウォームギヤ方式による脚部機構のモータ

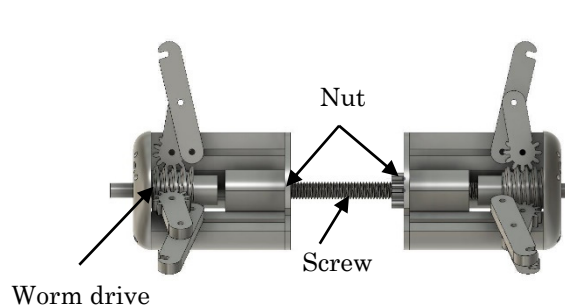


(a) 送りネジ方式による脚部機構

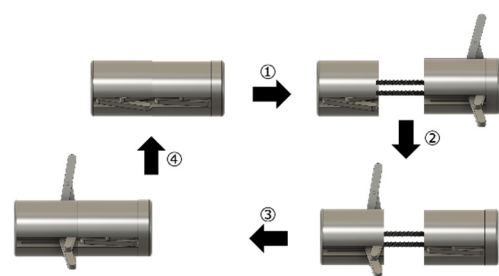


(b) ウォームギヤ方式による脚部機構

図5 設計した腸管内マイクロロボットの脚部機構



(a) 移動機構を持つ腸管内マイクロロボット



(b) 移動メカニズム

図6 設計した脚部展開機構および移動機構を持つ腸管内マイクロロボット

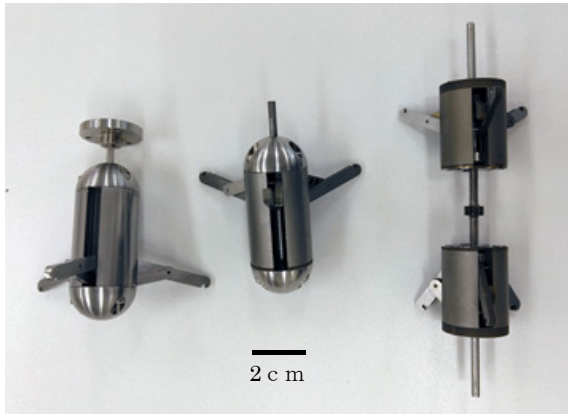


図7 試作した腸管内マイクロロボット

による駆動実験の一例を示す。試作した腸管内マイクロロボットは、直径3.2mm、長さ12mm、発生トルク $1.2 \times 10^{-2} \text{mN} \cdot \text{m}$ の超小型電磁モータでの駆動に成功した。現在、医療機器製造業の許可を取得している企業と小型電磁モータの供給について相談している状況である。

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 ラボ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。

令和5年度は、昨年度より引き続き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行い、執刀医と助手の視線データおよび腹腔鏡から得られる画像データを収集した。加えて、一部の手術においてはマイクを設置して術中の指示等のコミュニケーションの様子も収集した。

収集したデータに対して、視線データに対するアプローチではまずアイトラッカーから得られる注視箇所の遷移と視線状態について分析を行った。分析の結果、手術助手の方が術野全体を見ようとする視線移動が多いのに対して、執刀医は切除や剥離と

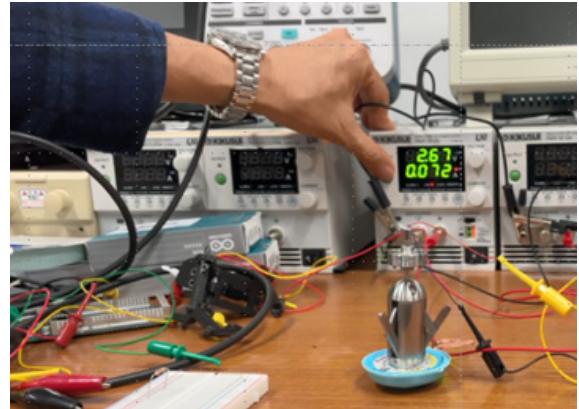


図8 ウォームギヤ方式による脚部機構のモータによる駆動実験

いった操作の際に患部に注目するため、特定箇所を注視する行動が多い傾向がみられた。また、瞳孔径について比較したところ、助手の方が平均的に大きく分散も大きい傾向がみられた（図9）。

交感神経が優位になると瞳孔径が大きくなることから、手術助手の方が手術中に緊張状態にある可能性が示された。また、外科医の執刀経験数の違いにより、担当手術助手が異なると図9に示す全体的な傾向とは逆に、執刀医よりも瞳孔径が小さく分布も同程度の場合もあった。一般的に、腹腔鏡下胆嚢摘出術は外科専修医が執刀する機会が多く、その指導的助手の精神的負荷が大きい。一方で、執刀医が既に多くの手術経験を有している場合には、手術助手の精神的負荷は軽度であるのが通常である。全体での解析結果は図9の通りであるが、瞳孔データから、精神状態に加えて外科医の経験量が読み取れる可能

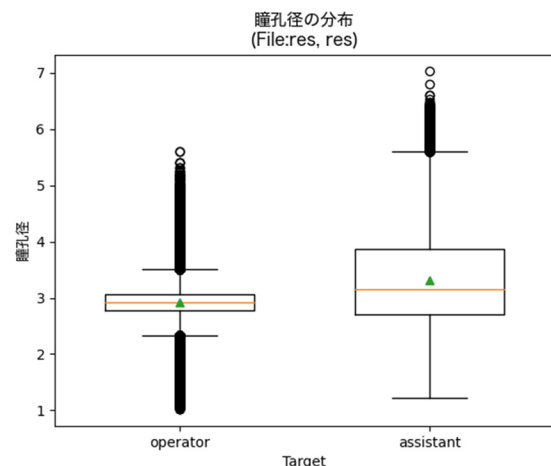


図9 執刀医と助手の瞳孔径の分布

性はあると推測する。

また、特定の箇所を注視しようとする際の視線行動である特定の探索と、視界全体を大まかに把握する際の視線行動である拡散的探索と呼ばれる2つの特徴的な視線行動パターン⁵⁾に着目して分析を行った(図10)。分析の結果、手術中に拡散的探索から特定の探索へと切り替わっている箇所がカメラ操作や鉗子の入れ替えといった動作と関連していることを明らかにした。また、特定の探索を行っている際に剥離や切除といった大きな変化を及ぼす動作を行っている傾向にあることが分かり、これらの視線行動から外科医の思考の一部を可視化できる可能性を明らかにした。

画像データを用いるアプローチでは、映像における前後の画像フレームの差分から腹腔鏡カメラの移動方向や移動量といったカメラ操作を推定するシステムの開発を行った。カメラ操作を推定する手法として、画像から特徴点を検出してフレーム前後の差分から推定する方法(図11)と前後の画像全体の幾何学的変換行列から推定する方法を比較し、幾何学的変換を利用することで安定した移動量を推定することが可能であることを示した(図12)。

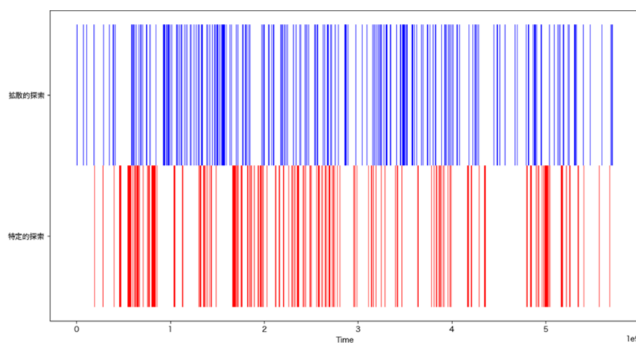


図10 手術中の特定の探索(赤線部)と拡散的探索(青線部)の可視化

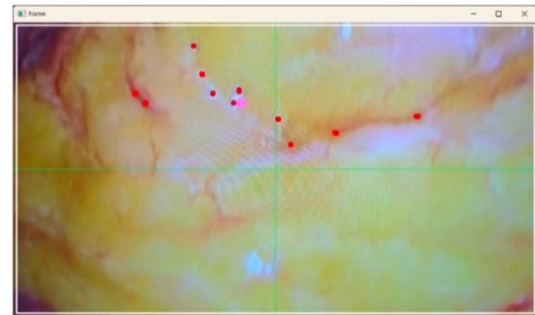


図11 画像から特徴点を検出した画像(赤い点が特徴点)

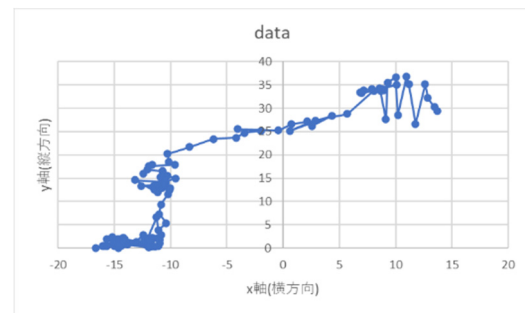


図12 動画から検出したカメラ動作

加えて手術助手AIの開発に向けた一歩として、手術助手の行動の中でも腹腔鏡カメラの操作に着目し、カメラ操作中のズーム操作を自動化することを目的としたプロトタイプシステムを開発した(図13)。

プロトタイプシステムでは、視線ベースのアプローチで扱った特定の探索や注視点のバラつきといった視線パターンに応じてズームイン・ズームアウトを決定することで、術者が注目したい箇所へズームし、注目が終わるとズームアウトする。実際の腹腔鏡手術の映像を用いて簡易なケーススタディを行い、バラつきを用いた判定では急激なズーム変化が起こることによる不快感を与える課題がある一方で、特定の探索に基づく判定ではユーザのズーム意

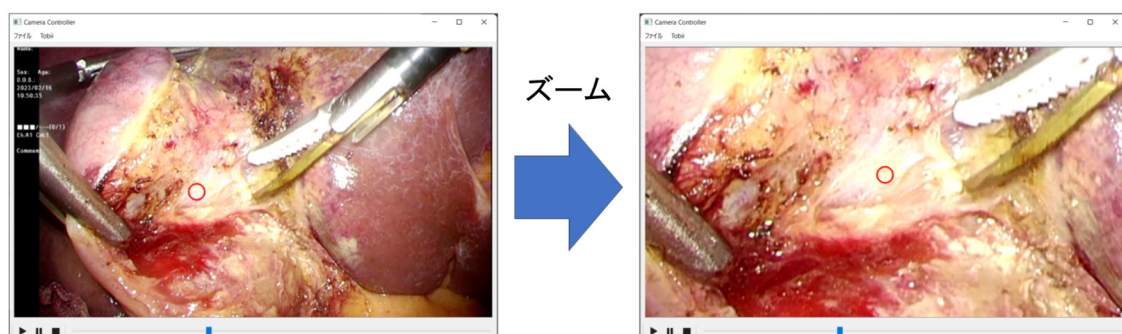


図13 視線行動に応じた自動ズームシステム

図が反映されにくいという課題が明らかになった。今後は画像ベースのアプローチによる施術状態の認識を統合した判定方法の開発に加えて、ズームの閾値や速度といったパラメータの決定方法の開発が求められる。

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、令和4年度で明らかになった問題点の解決と新型モータを用いた新しいロボットの製作をおこなった。また動作制御系の構築については、模擬臓器に対してAIのインスタンスセグメンテーションを用いた物体の領域検出を行い、ビジュアルサーボを実現することができた⁶⁾。さらに視線を捉えて注視点に対してもビジュアルサーボを実現することができた。これにより令和4年度および令和5年度の2年間で、協働型手術ロボットの基礎研究開発結果を達成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、令和4年度の研究で実施した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に基づき、プロトタイプロボットを作製した^{7), 8)}。ステンレスを放電加工して作製した、腸管内マイクロロボットのプロトタイプロボットは、超小型電磁モータでの駆動に成功した。現在、プロトタイプロボット内に実装可能な小型電磁モータの選定や、内視鏡メーカとの共同研究を模索している状況である。将来的にはロボットにカメラシステムを実装し、従来の内視鏡システムに代わる次世代型の内視鏡システムを確立する研究を実施する予定である。

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、視線ベースのアプローチについては特定の探索が特定の手術動作の開始時に現れること、切除や剥離といった操作に際して頻繁に現れることが明らかになり、線運動から外科医の思考の一部を可視化することが可能であることを明らかにした。加えて、外科医の経験によって視線状態に違いがあり経験の違いについても可視化できる可能性を明らかにし、今後の研究の発展の方向性を広げることができた。また、画像ベースのアプローチでは腹腔鏡の映像からカメラの移動方向および移動量を推定するシステムを開発することができた。加えて、手術助手のカメラ操

作、特にズーム操作を自動化するプロトタイプシステムを開発し、視線行動に基づくズーム判定方法やズーム速度に関して課題点を明らかにした。当初の計画通り、手術助手AIの開発に向けてシステム開発の一步を踏み出せたことに加え、より外科医の思考を正確に可視化・定量化するために2つのアプローチを考案することできたことから、当初の計画目標を概ね達成できたと考えている。

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、3つの方向性から研究推進した結果について、令和5年度の研究成果と今後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) 淳夫吉高, 謙太郎西田, 宗平嶋: 絵画鑑賞時の眼球停留の時間的な発生頻度に着目した注目状態の検出, 情報処理学会論文誌, 50, 5, pp. 1467-1476 (2009).
- 6) Motoki Akazawa, Kosuke Arai, Rina Karasawa, Yusuke Kobayashi and Masatoshi Hatano, Visual Feedback Systems for Camera Assistant Robots with AI, Proceedings of 29th International Symposium on Artificial Life and Robotics (AROB2024), 2024, pp.1197-1200

- 7) 高橋 知宏, 大工原 裕希, 熊倉 佑樹, LYU SHUXIN, 森下 克幸, 齊藤 健 (2023): “小型医療ロボット用の送りネジ機構で展開する脚部の開発”, 日本機械学会第14回マイクロ・ナノ工学シンポジウム予稿集
- 8) 陳恩, 高橋知宏, 大工原裕希, 熊倉佑樹, LYU SHUXIN, 森下克幸, 齊藤健 (2023): “ウォームギヤを用いて脚部機構を展開する医療用マイクロロボットの検討”, 令和5年度(第67回)日本大学理工学部学術講演会講演論文集, pp.589-590

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³⁾, 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

昨年度、病理標本の膜厚測定機器プロトタイプ1号機を開発した。動作確認、精度評価に基づき、改良型プロトタイプ2号機を開発し、1号機との測定精度の比較検討を行った。2号機は1号機よりも測定精度の格段の向上が認められたものの、目標とする社会実装可能に必要な測定精度に至らなかった。そこで、理工学的視点からの要素検討、測定原理そのものの見直しをはかった。「曲げ応力計測」の原理に基づく測定方法の有効性について予備的検討を行い、その有効性を検証した。

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) を用いて行われる。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である。

通常、FFPE切片は予め厚み (以下 膜厚) を設定してミクロトームを用いて薄切される。しかしながら、FFPEの膜厚は、薄切環境 (湿度や温度) や薄切技術により変化し、ミクロトームで設定した膜厚と実際に薄切されたFFPEの膜厚が必ずしも一致しない。われわれは先行研究において、FFPEの膜厚がHER2蛋白に対する免疫染色のスコア評価に影響を与えることを、染色強度の画像解析手法により証明した¹⁾。FFPEの膜厚は、その後の免疫組織学的検討の基礎となるにもかかわらず、現在まで十分な精度管理の対象となってきたおらず、膜厚コントロールシステムの確立が喫緊の課題であるとの認識に至った。膜厚コントロール方法について、特許出願 (:PCT/JP2018/017336) しているが、直接的に膜厚を測定する機器開発を目指して、本研究を行った。

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

責任者連絡先: 増田しのぶ, masuda.shinobu@nihon-u.ac.jp

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。本研究による開発機器のコンセプトは、工業用の非接触表面・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）に比較して、測定範囲、使用目的を限定し、手頃な価格を目指すこととした（表1）。

(2) 2号機の開発

当初の研究計画では、スライドガラス載置トレイを移動させ、10枚の連続測定を行う計画であった。しかしながら、昨年開発した1号機では期待した測

定精度を得ることができなかったため、表2に示すようなハード面、ソフト面の仕様変更を行い、2号機を開発した（表2、図1）。

(3) 測定精度の評価（1号機と2号機の比較）

薄切時にミクロトームの設定を4μmとし、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（1号機、2号機）により膜厚を測定した結果を比較検討した。検体間のばらつき、ならびに1枚の切片の4ヵ所の測定部位によるばらつきについても、比較検討した。

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	~ 80μm	4μm ± 10% 誤差を中心とする範囲
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

表2 膜厚測定器 1号機、2号機 仕様変更対比表

(株) 西川精機製作所

1. ハードの変更

No. 変更項目	第一期	第二期
1 ボールネジ使用部分変更	Z軸部のみボールネジを使用	XYZ（3軸）にボールネジを使用
2 ワークステージの変更	「樹脂製の固定具無し」の設定	アルミ製+固定クリップの設置
3 根幹となる、基本設計	10枚連続で測定する	測定数量を、1枚にして精度を上げる

2. ソフトの変更

No. 変更項目	第一期	第二期
1 日時の設定方法	特定コマンドより設定	ユーザーに分かり安いプログラム起動設定
2 PCと本機（マイコン）との通信方法	無線接続	有線接続
3 測定資料数量の変更	10枚連続で測定する	測定数量を、1枚にして精度を上げる



図1 1号機、2号機の仕様の変更

3. 結果

機器の動作確認 (2号機)

①測定部, ②標本識別部, ③PC制御, ④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) 1号機と2号機の測定結果の比較

- a. 概要 (図2) :1号機の測定結果 ($22.1 \pm 3.0 \mu\text{m}$) に比較して, 2号機では格段の測定精度の向上が認められた ($8.6 \pm 1.9 \mu\text{m}$)。
- b. 検体毎の測定値 (図3) :1号機に比較して, 2号機では測定精度の向上が認められたが, 依然, 測定値のばらつきも大きかった。

- c. 定部位による測定値 (図4) :スライド切片上の4ヵ所の測定部位によるばらつきが解消された。

2号機においては, 1号機よりも測定精度の格段の向上が認められたものの, 社会実装可能な機器に求められる測定精度に至らなかった。

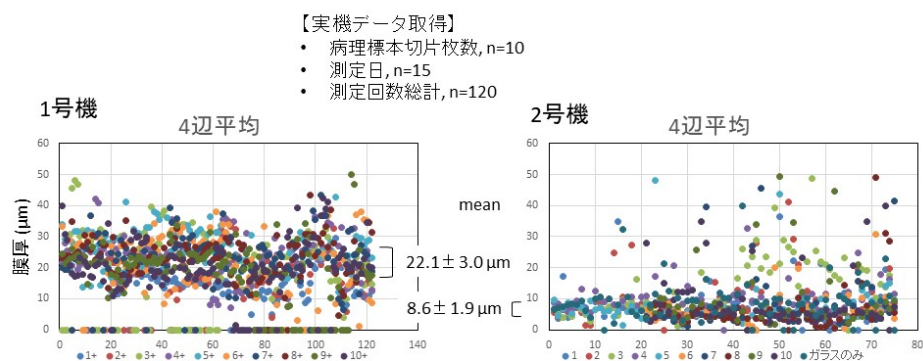


図2 1号機, 2号機の測定結果 (分布)

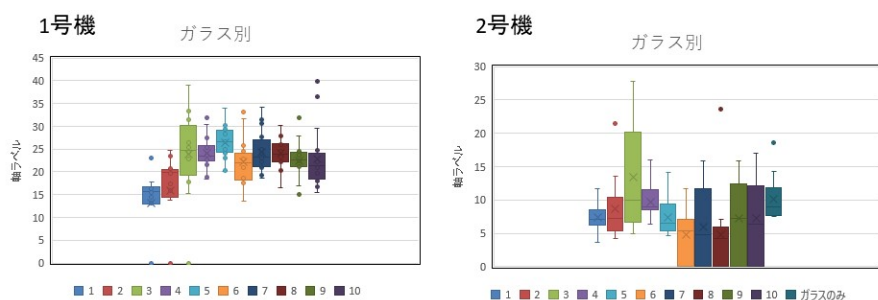


図3 1号機, 2号機の測定結果 (ガラス別)

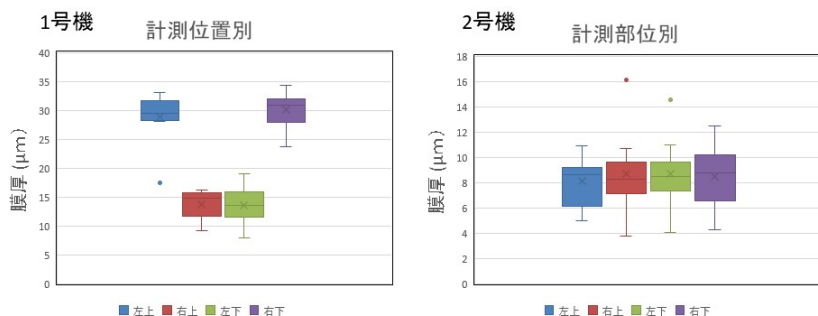


図4 1号機, 2号機の測定結果 (測定部位別)

4. 考察

2号機の測定結果 ($8.6 \pm 1.9\mu\text{m}$) は、目標とする測定精度 ($4.0 \pm 10\%\mu\text{m}$) に達しなかった。理工学部 青木義男教授、入江寿弘教授、大塚賢哉助手との共同で、理工学的視点からの要素検討を行い、以下の点が課題として指摘された。

- ・測定対象の試料はパラフィンであり、物理的な接触による膜厚測定では接触力で変形する。
- ・高さ測定用プローブが複数ある場合、プローブ間の高さ方向の誤差および測定対象のガラスブ

レートの傾斜により、測定部位により誤差が大きくなる。

測定原理そのものを見直すこととなり、「曲げ応力計測」の原理に基づく、ひずみゲージを用いた機器開発の可能性について、検討することとなった(図5)。

「曲げ応力計測」(2ゲージ法)の原理を図6に示す。ひずみは構造敏感な物理量で、触針から固定部までの距離(X)をとることで測定感度を向上することが可能である。

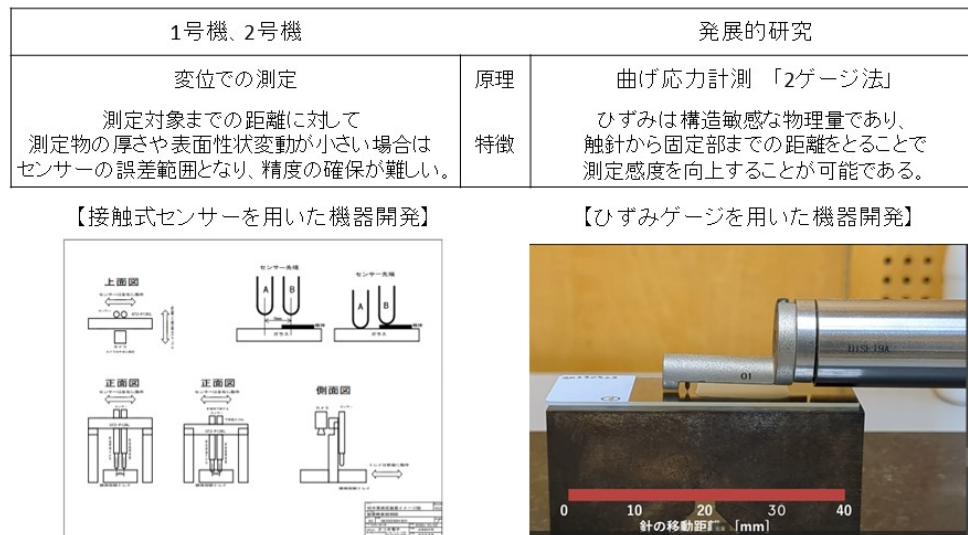
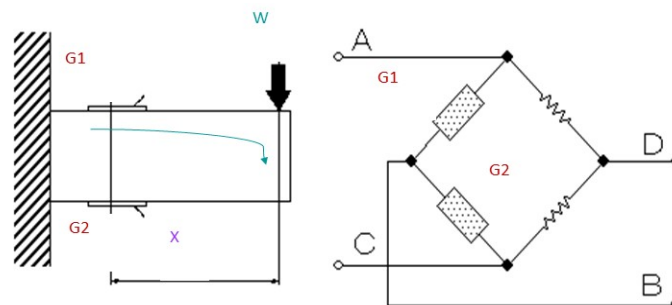


図5 理工学部との共同研究により方法論・原理の見直し



- ・取り扱いが簡便で安価な膜厚測定手法として、検出器に「ひずみゲージ」を用いる。
- ・曲げ応力計測として用いられる、2ゲージ法(G1, G2)を応用し、ガラスと病理組織切片との差を測定し、膜の厚さを測定する。
- ・ひずみは構造敏感な物理量であり、触針から固定部までの距離(X)をとることで測定感度を向上することが可能である。

図6 曲げ応力計測2ゲージ法の原理

市販の表面粗さ測定機を用いた予備的検討によりガラス面と切片表面の高さの差異について、 $4.5\mu\text{m}$ 程度の測定結果を得ることができた(図7)。

以上の結果から、実用化のためには、「曲げ応力計測」原理に基づく、より多角的で深度のあるプロジェクトが必要となった。

5. 結語

病理標本の膜厚測定機器としてプロトタイプ1号機、2号機を開発した。目標とする社会実装に必要な測定精度には至らなかったものの、医学と理工学の複合的視点から有意義な議論と検証がなされ、今後の方向性が示された。

謝辞

本研究は、日本大学学術研究助成金(社会実装研究)の助成をうけて行いました。理工学的視点から、貴重な意見をいただき、探索検証を行っていただきました理工学部 青木義男教授、入江寿弘教授、大塚賢哉助手に深謝いたします。

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

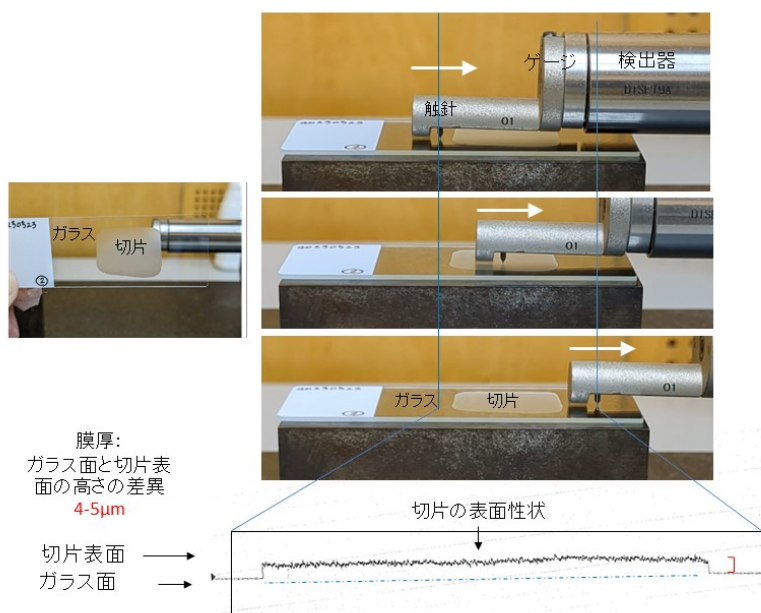


図7 市販の表面粗さ測定器を用いた予備的検討

脱分化脂肪細胞 (DFAT) 調製キットを用いて製造した 治験用細胞製品の特性解析

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⁾, 菓子本美和¹⁾

Characterization of cell products for clinical trials produced using the dedifferentiated fat cell (DFAT) preparation kit

Taro MATSUMOTO¹⁾, Kazutaka SOEJIMA²⁾, Tsutomu KASHIMURA²⁾, Yuxin LI¹⁾, Tomohiko
KAZAMA¹⁾, Kazuhiro HAGIKURA¹⁾, Chii YAMAMOTO¹⁾, Yuki NAGAOKA¹⁾, Miwa
KASHIMOTO¹⁾

要旨

脱分化脂肪細胞 (DFAT) は、成熟脂肪細胞を「天井培養」という方法で培養して得られる、間葉系幹細胞 (MSC) に類似した多能性細胞である。我々は、細胞治療に用いる臨床グレード DFAT を簡便かつ効率良く製造できる「DFAT調製キット」を開発し、このキットを用いた治験用製品の製造方法を確立した。この方法により製造した最終製品について、規格試験および特性解析を行った結果、凍結融解後もすべての検体で、品質や治療活性が保持されていることが確認された。また最終製品の長期保存試験においても、液体窒素下で12ヶ月間保存後に品質や特性が維持されていることを確認した。今後、この最終製品を用いた細胞治療の医師主導治験を実施する予定である。

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 cell (MSC) は患者自身の体から調製できるが、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、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。脱分化脂肪細胞 Dedifferentiated fat cell (DFAT) は、成熟脂肪細胞を「天井培養」という方法で培養して作られる MSC に類似した多能性細胞である¹⁾。DFAT はドナーの影響を受けず、少量の脂肪組織から均質な治療用細胞を大量に作ることができるといった特長を有することから、実用性の高い再生医療用の細胞として期待できる。

我々は、これまでに臨床グレードの DFAT 製造法を確立し、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臨床研究を実施し、安全性と高い有効性を確認している。また、医師主導治験に向けた準備として、臨床グレード DFAT 製造法の改良と最終製品の形状変更を行った。具体的には、既存の細胞培養フラスコより簡便かつ効率的に DFAT 調製を可能とする「天井培養フラスコ」を独自に開発した。また DFAT 調製用培地に関して、ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum: FBS) の代替としてヒト血小板溶解物 (Human platelet lysate: hPL) を用いることにより、動物由来成分を含まない「ゼノフリー化」を達成した。また最終製品の形状を新鮮細胞懸濁液から長期保存可能な凍結細胞懸濁液に変更した。そして、この天井培養フラスコを主要構成パーツとし、高効率で安価に DFAT を製造できる「DFAT調製キット」を開発した。さらにこのキットを用いた治験用製品の製造法及び品質

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
責任者連絡先: 松本太郎, matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

管理法を確立した。

本研究は、この治験用製品の製造法に従い、健康ボランティア脂肪組織から臨床グレードDFAT（凍結製品）の試験製造を行った。そして製造された治験用最終製品を融解し、規格試験や特性解析試験を行い、品質や性能が担保されたDFATが再現性よく製造できるか検証した。またDFAT最終製品の長期保存試験を行い、長期保存後もその品質や特性が保持されているか検討を行った。

2. 対象及び方法

本研究は、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-220111-1）。DFATの原料となるヒト脂肪組織は、健康ボランティアから同意取得した後、局所麻酔下に5～10 mLの脂肪吸引を行い研究に使用した。脂肪組織の採取は脂肪吸引術に熟練した形成外科の医師が担当した。DFAT調製キットを用いた治験用製品の製造は、日本大学医学部リサーチセンター細胞加工施設（CPF）に設置されたセルプロセッシングアイソレータ内で実施した。DFAT調製キットの内容と本キットを用いた治験用製品の製造工程をそれぞれ、図1、図2に示す。脂肪細胞単離工程は、脂

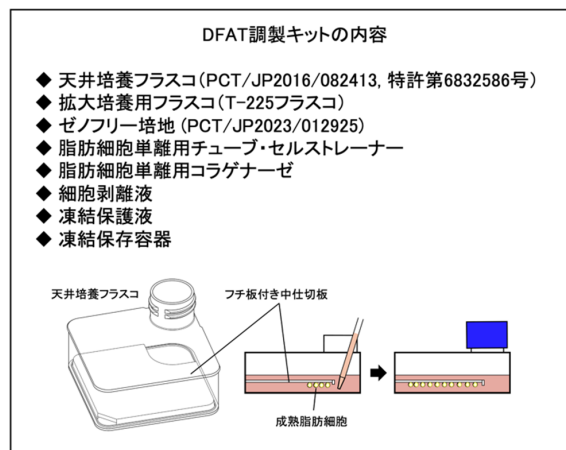


図1 DFAT調製キットの内容

肪組織をコラゲナーゼ（Liberase MNP-S GMP grade）にて37℃、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、低速度遠心分離を行い、成熟脂肪細胞を浮遊層として単離した。単離した成熟脂肪細胞分画を調製用ゼノフリー培地に懸濁し、天井培養フラスコの仕切板下面に播種した。細胞培養はインキュベータ内で37℃、5%CO₂条件下で行った。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）を用いて細胞を剥離し、T-225 フラスコ8枚に9 × 10⁵ cells/flaskで播種し、7日間拡大培養を行った。培養終了後、細胞剥離液を用いて細胞を剥離し、凍結保護液（CP-1™ High Grade）に懸濁した。細胞懸濁液を5 × 10⁶ cells/mLの細胞濃度で3 mLずつ凍結保存バックに梱包し、ディープフリーザー（-80℃）で24時間保存後、液体窒素（-196℃）液相下に凍結保存した。こうして製造された凍結保存バッグ入り凍結細胞懸濁液を治験用最終製品として扱った。

治験用最終製品の融解方法は、液体窒素タンクから取り出した最終製品を事前に37℃に加温したウォーターバスに入れ、急速融解した。融解した細胞は、最終製品の規格試験として、生細胞数、生細胞率、表面抗原確認試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験を実施した。生細胞数、生細胞率の評価は、生細胞と死細胞を蛍光試薬（AO/PI法）で染色し、自動蛍光セルカウンター（LUNA-FX7™）により測定した。表面抗原確認試験は、フローサイトメトリー（Cytoflex）によるCD105、CD90、CD73、CD31、CD45、HLA-DR陽性細胞率を測定した。エンドトキシン試験は、定量・比濁法（日本薬局方準拠）、マイコプラズマ否定試験は、NAT法（7株、3回測定）、無菌試験は、直接法（日本薬局方準拠）で行った。エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験は、信頼性

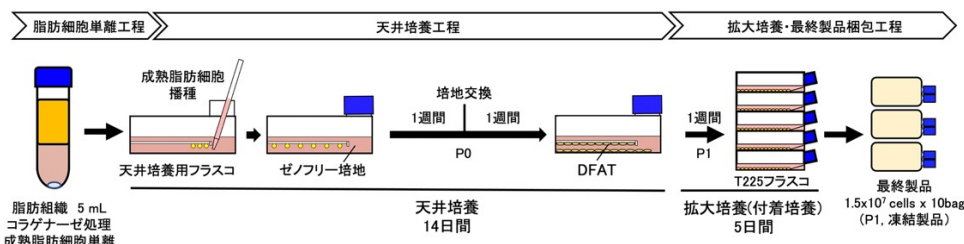


図2 治験用製品の製造工程

基準を満たした条件下で測定するため、外部試験施設に委託し、それぞれ事前に反応干渉因子試験、分析バリデーション、適合性試験を行った上で実施した。

最終製品の特性解析として、融解した最終製品を用いて、プラスチック面への付着能、細胞増殖能、コロニー形成能、多分化能を評価した。また最終製品調整時の培養上清を用いて、血管新生能、生理活性物質の分泌能、目的外生理活性物質の分泌能を評価した。プラスチック面への付着能は、最終製品を再播種し、1, 3, 7日後に培養ディッシュへの接着の有無を位相差顕微鏡で観察し評価した。細胞増殖能は、最終製品を再播種し、1, 3, 7日後にWST-1アッセイにて吸光度を測定することにより評価した。コロニー形成能は、最終製品を再播種し増殖させた後、CFU-Fアッセイを行い、コロニー形成率を算出した。多分化能は、最終製品を再播種し増殖させた後、各種分化誘導培地で一定期間培養し、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞への分化を評価した。血管新生能は、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の管腔形成アッセイを用いて、最終製品調整時の培養上清の管腔形成能を評価した。生理活性物質の分泌能は、培養上清中のHepatocyte growth factor (HGF), Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) のタンパク濃度をELISA法で定量評価した。目的外生理活性物質の分泌能は、培養上清中のInterferon- γ (IFN- γ), Tumor necrosis factor- α

(TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) のタンパク濃度をELISA法で定量評価した。

また最終製品の長期保存試験として、液体窒素下に12ヶ月間、凍結保存した検体 (n=3) を融解し、生細胞数、生細胞率、細胞表面抗原試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験、再播種1日後の付着能、再播種3日後の増殖能、再播種後の多分化能 (脂肪、骨、軟骨、平滑筋) を評価した。

3. 結果

最終製品の規格試験の結果を表1に示す。検討を行った5検体 (Lot. a～Lot. e) の融解後の生細胞数は $4.9 \sim 6.9 \times 10^6$ cells/mL、生細胞率は88.1～95.7%であり、いずれも管理基準 (生細胞数 1×10^6 cells/mL以上、生細胞率70%以上) を満たしていた。表面抗原確認試験では、陽性マーカーであるCD105, CD90, CD73の陽性率が、それぞれ96.7～98.6%, 98.8～99.5%, 92.0～99.0%, 陰性マーカーであるCD31, CD45, HLA-DRの陽性率が、それぞれ0.15～0.51%, 0.07～1.12%, 0.13～0.62%であり、すべて管理基準 (陽性マーカー80%以上、陰性マーカー5%未満) を満たしていた。エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験は、5検体ともすべての項目で陰性であることを確認した。以上より、検討を行った5検体において、規格試験の管理基準値から逸脱することなく、最終製品を製造できることを確認した。

表 1. 治験用最終製品の規格試験結果

工程	試験項目	試験結果					管理値
		Lot. a	Lot. b	Lot. c	Lot. d	Lot. e	
規格試験 最終製品 (凍結細胞懸濁液)	生細胞数	6.1×10^6	5.4×10^6	6.9×10^6	6.0×10^6	4.9×10^6	1×10^6 /mL以上
	生細胞率	92.8	95.7	88.1	93.9	91.7	70%以上
	表面抗原確認試験	CD105	98.1	98.1	96.7	98.6	80%以上
		CD90	99.1	99.5	99.3	98.8	
		CD73	98.1	99.0	92.5	97.4	
		CD31	0.18	0.15	0.36	0.16	5%未満
		CD45	0.17	0.07	0.55	0.61	
		HLA-DR	0.23	0.13	0.41	0.24	
	エンドトキシン試験	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	マイコプラズマ否定試験	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	無菌試験	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

最終製品の特性解析の結果を表2、図3、図4に示す。検討を行った3検体 (Lot. c, Lot. d, Lot. e) はいずれも融解後のプラスチック面への付着能を有し、付着後の細胞増殖は良好であった。CFU-Fアッセイによるコロニー形成能試験では、3検体ともにコロニー形成が認められ、その形成率はLot. c 23.3%, Lot. d 18.7%, Lot. e 10.3%であった。多分化能の評価では、3検体ともに脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞への分化能を有することが確認

された。HUVEC管腔形成アッセイを用いた血管新生能試験では、3検体ともにHUVECの管腔形成が誘導される所見が認められ、*in vitro*での血管新生能を有することが確認された。生理活性物質の分泌能試験では、検討を行った4検体 (Lot. a, Lot. b, Lot. c, Lot. d) の培養上清中のHGF濃度が7,649~16,234 pg/mL、VEGF濃度が1,304~1,645 pg/mL、SDF-1濃度が2,789~8,683 pg/mL、MCP-1濃度が1,417~1,956 pg/mLであり、生体内で治療活性を示す十分

表 2. 治験用最終製品の特性解析結果のまとめ

試験項目	試験結果				
	Lot.a	Lot.b	Lot.c	Lot.d	Lot.e
プラスチック面への付着能	-	-	付着能あり	付着能あり	付着能あり
細胞増殖能	-	-	増殖能あり	増殖能あり	増殖能あり
CFU-Fコロニー形成能	-	-	形成能あり (23.3%)	形成能あり (18.7%)	形成能あり (10.3%)
多分化能 (脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞)	-	-	多分化能あり	多分化能あり	多分化能あり
血管新生能 (血管内皮細胞管腔形成能)			管腔形成能あり	管腔形成能あり	管腔形成能あり
培養上清HGF濃度	8720 pg./mL	16234 pg./mL	7649 pg./mL	13842 pg./mL	-
培養上清VEGF濃度	1645 pg./mL	1350 pg./mL	1304 pg./mL	1622 pg./mL	-
培養上清SDF-1濃度	8683 pg./mL	4095 pg./mL	5035 pg./mL	2789 pg./mL	-
培養上清MCP-1濃度	1417 pg./mL	1439 pg./mL	1956 pg./mL	1647 pg./mL	-

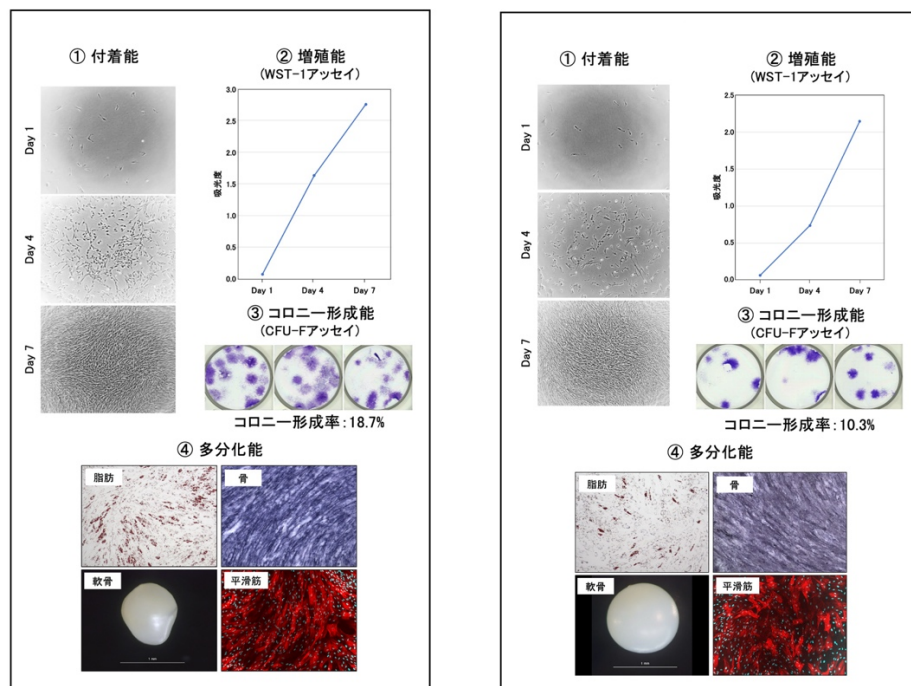


図 3 治験用最終製品の特性解析結果 (Lot. dおよびLot. eの結果)

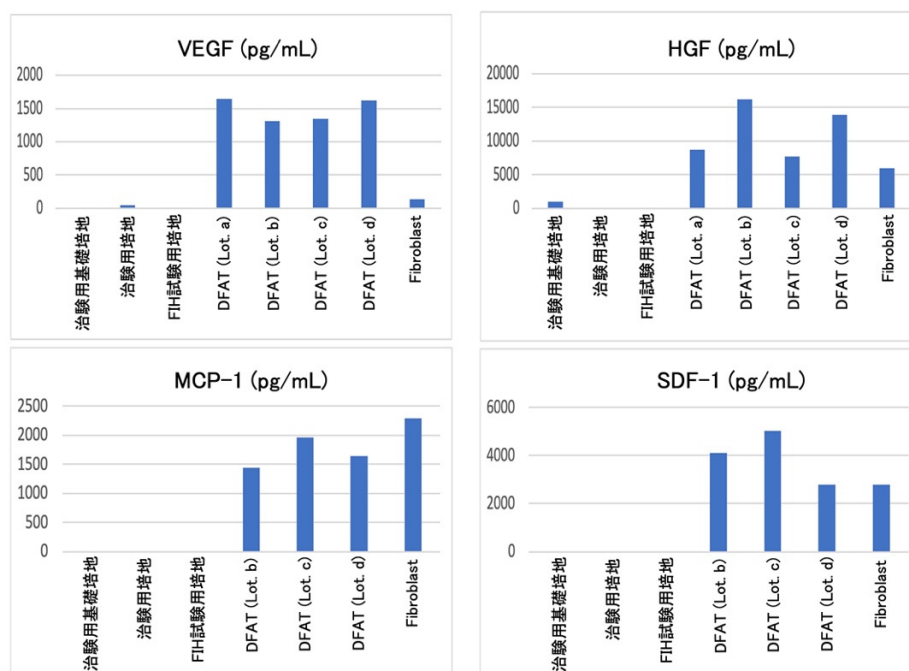


図 4 治験用最終製品の培養上清中の生理活性物質濃度

な濃度の液性因子が分泌されていることが確認された。これらの液性因子は、DFAT調製に用いる培地中にはほとんど検出されなかったことから (図4)、DFATから分泌されていることが示された。またこれらの液性因子は、皮膚線維芽細胞 (Fibroblast) の培養上清でも検出されたが、DFAT培養上清に比べてその濃度が低い傾向があり、特にVEGFやHGFの分泌濃度はDFATに比べて明らかに低いことが示された。一方、目的外生理活性物質の分泌評価として測定した培養上清中のIFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β のタ

ンパク濃度は、ELISA法にてほとんど検出感度以下であった。以上より、検討を行った最終製品は融解後も細胞増殖能、多分化能、血管新生能、生理活性物質分泌能を維持していることが明らかになった。

最終製品の長期保存試験の結果を表3に示す。液体窒素下に長期保存された最終製品の品質試験及び特性解析を行った結果、検討を行った3検体 (Lot. a, Lot. b, Lot. c) における凍結保存期間12ヶ月まで生細胞数、生細胞率、細胞表面抗原発現プロファイルは、いずれも管理基準 (生細胞数 1×10^6 cells/mL

表 3. 治験用最終製品の長期保存試験の結果

試験項目		12ヶ月保存試験・試験結果			
		Lot.a	Lot.b	Lot.c	規格値
生細胞数		4.83×10^6 /mL	4.76×10^6 /mL	6.24×10^6 /mL	1×10^6 /mL以上
生細胞率		94.6%	96.7%	93.3%	70%以上
細胞表面 抗原試験	CD73	97.04%	99.23%	88.15%	80%以上
	CD90	95.35%	99.57%	96.56%	
	CD105	96.15%	97.53%	87.54%	
	CD31	0.10%	0.07%	0.02%	5%未満
	CD45	0.21%	0.14%	0.15%	
	HLA-DR	0.16%	0.06%	0.07%	
エンドキシン試験		陰性	陰性	陰性	陰性
マイコプラズマ否定試験		陰性	陰性	陰性	陰性
無菌試験		陰性	陰性	陰性	陰性
プラスチック面への付着能		付着能あり	付着能あり	付着能あり	付着能あり
細胞増殖能 (Doubling Time: DT)		増殖能あり (DT19.8h)	増殖能あり (DT18.8h)	増殖能あり (DT15.8h)	増殖能あり
多分化能 (脂肪、骨、軟骨、平滑筋)		多分化能あり	多分化能あり	多分化能あり	多分化能あり

以上、生細胞率70%以上)を満たしていた。また再播種後のプラスチック付着能、細胞増殖能、多分化能もすべての検体で保持されていた。細胞倍加時間(DT)は、Lot. a: 19.8時間、Lot. b: 18.8時間、Lot. c: 15.8時間であり、いずれも高い増殖能が保持されていることが明らかになった。またいずれの検体もエンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験は陰性であった。以上より、DFAT調製キットにより製造された治験用最終製品は、少なくとも液体窒素下の凍結保存にて12ヶ月は安定的にその品質と細胞特性が保持されていることが示された。

4. 考察

今回、DFAT調製キットを用いた治験用製品の製造プロトコルに従い、製造した治験用最終製品の規格試験及び特性解析を行った結果、融解後もMSCの最小基準²⁾に合致する表面抗原発現プロファイルを示し、細胞増殖能、多分化能、血管新生能、生理活性物質(HGF、VEGF、SDF-1、MCP-1)の分泌能が維持されていることが確認された。この製造プロトコルに従い製造した治験用最終製品(凍結細胞懸濁液)は、臨床研究で用いた新鮮細胞懸濁液と同様に、移植による高い血流改善効果が期待できると思われる。

HGFとVEGFは血管内皮細胞に作用し、血管新生を誘導する主要増殖因子である。またHGFは血管内皮細胞のみならず、ペリサイトにも作用し、血管の成熟化に関与する³⁾。SDF-1やMCP-1には、末

梢血より単球・マクロファージを動員する作用があり、これらの血液細胞の動員が、虚血組織における血管新生や側副血管のリモデリングを促進することが報告されている⁴⁾。DFATは移植部位でこのような種々の血管新生促進因子を分泌することにより、血流改善効果を発揮すると考えられる。

治験用最終製品の安全性に関しては、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験を実施し、これらの汚染がないことが確認された。また目的外生理活性物質として測定した炎症性サイトカイン(IFN- γ 、TNF- α 、IL-18)濃度もすべて検出限度以下であった。これらの結果より、治験用最終製品が一定の安全性を示すことが確認された。今後、治験用最終製品の核型解析、軟寒天コロニー形成試験、免疫不全マウスを用いた反復投与毒性試験などを実施し、移植安全性を検証する予定である。そして、治験用最終製品の品質、安全性、治験プロトコルに関するPMDA RS戦略相談を実施し、機構の合意を取得したのちに、この治験用最終製品を用いた細胞治療の医師主導治験を開始する予定である。

脂肪由来治療用細胞として現在広く臨床応用されている脂肪由来幹細胞(Adipose-derived stem cells: ASC)、間質血管分画(Stromal vascular fraction: SVF)細胞と、今回確立した治験用DFATとの差異を表4に示す。DFATは患者の負担、調製効率、細胞品質、治療コストといった面で、高い優位性を示すと考えられる。

表 4. DFATと他の脂肪由来治療用細胞との比較

項目	DFAT	ASC	SVF細胞
患者の負担 脂肪採取量 (麻酔法)	低い <10mL (局所麻酔)	比較的低い 30~50mL (静脈麻酔)	高い 200~300mL (全身麻酔)
培養期間	約3週間	約6週間	培養不必要
最小継代数	第1継代	第3継代	-
得られる細胞数	5億個	1千万~1億個	100万~1億個
1回の組織採取で可能な 治療回数	3回以上	1回	1回
幹細胞の純度	高い >99.9%	比較的高い >99%	非常に低い 0.2~1%
品質のばらつき	少ない	大きい	非常に大きい
治療コスト	低	中	高

5. 結語

DFAT調製キットを用いた製造プロトコールに従って試験製造を行った治験用最終製品は、液体窒素下に12ヶ月間保存後もDFATとしての品質及び特性を保持し、高い治療活性が期待できることが明らかになった。今後、この治験用最終製品を用いた細胞治療の医師主導治験を実施する予定である。

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) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach 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.
- 3) Kaga T, Kawano H, Sakaguchi M, Nakazawa T, Yanai Y, Morishita R. Hepatocyte growth factor stimulated angiogenesis without inflammation: differential actions between hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Vascular Pharmacology* 2012; 57 (1) : 3-9.
- 4) van Royen N, Hoefer I, Bottinger M, Hua J, Grundmann S, Voskuil M, et al. Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circulation Research* 2003; 92: 218-225.

術前乳癌患者の腹臥位乳房MRIを用いた 背臥位MRI像生成の探索的研究

天野真紀¹⁾, 関弘翔²⁾, 山口健²⁾, 渡邊満洋³⁾, 栗飯原萌³⁾, 石橋直也¹⁾,
天野康雄¹⁾, 金子美泉³⁾, 内木場文男³⁾

Study on technical innovation of supine breast MRI generated from prone breast MRI in patients with breast cancer

Maki AMANO¹⁾, Hiroto SEKI²⁾, Ken YAMAGUCHI²⁾, Mitsuhiro WATANABE³⁾, Moe AIBARA³⁾,
Naoya ISHIBASHI¹⁾, Yasuo AMANO¹⁾, Minami KANEKO³⁾, Fumio UCHIKOBA³⁾

要旨

乳癌は日本女性が罹患する癌の第1位で、比較的若い年齢の女性が罹患し社会の関心も高い。乳癌治療の主軸は手術で、乳房温存術(乳房部分切除術)が半数を超える。乳房温存術では乳腺断端の癌細胞陽性回避と乳房整容性の両者を満たす過不足ない乳腺切除が求められ、術前に各種画像診断を用いて乳癌の広がり診断を行う。この広がり診断にはMRIが最も優れるが、乳房MRIは腹臥位で撮影される。そのため、乳房の形が手術台上の背臥位と異なる。このため、乳腺外科医は乳腺切除線決定時、腹臥位MRIで描出された癌の広がりを脳内で背臥位に再構築する。これには客観性や標準化に問題がある。そこで我々は腹臥位造影乳房MRIを理工学的に背臥位像に変換する技術の研究を開始している。理工学的技術には、有限要素法、軟体シミュレーション、ディープラーニングの手法を用いシミュレーションモデルを作成中である。個々の患者毎に乳房の大きさや柔らかさは異なり、体位変換時の乳房の変形も様々である。作成中のシミュレーションモデルでは、患者に依存する物性値を用いる必要があり、術前検査として必須のマンモグラフィにおける乳房密度と乳房厚、並びにBMIは乳房形状の変化と関連し、背臥位像生成モデルの物性値に使用できる可能性が示唆された。

1. はじめに

【背景】乳癌は日本女性が罹患する癌の第1位で、年間9万人超が発症している。比較的若い年齢の女性が罹患し、ピンクリボン運動など社会の関心も高い。乳癌治療の主軸は手術で、乳腺全摘術と乳房温存術(癌とその周囲の乳腺組織のみを切除)がある。乳房温存術は手術全体の半数を超える。

乳房温存術では、断端陽性(=摘出標本の断端に病理学的に癌が見られること)が術後の局所再発や予後と関連しており、断端陽性を防ぐ必要がある。一方で、術後の残存乳房の整容性を保つためには、切除量をできるだけ少なくする必要がある、断端陽性回避と乳房整容性の両者を満たすには過不足ない

乳腺組織切除が求められる。

このため、乳癌の治療前には、マンモグラフィ・超音波・MRIといった各種では検診の普及により浸潤部のない非浸潤癌が増加している。この非浸潤癌の広がり診断は触診では難しく、画像診断の中ではMRIが最も優れており(図1)、乳房MRIは乳癌の術前検査として必須である。

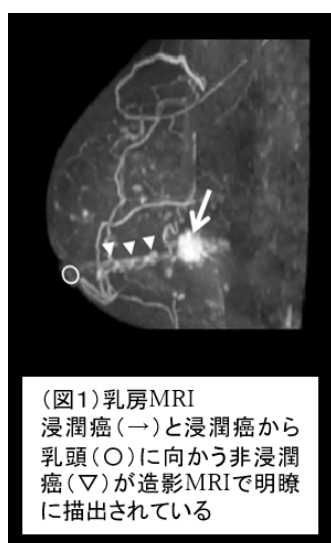
しかし、乳房MRIの問題点として撮影を腹臥位で行うことが挙げられる(図2)。乳房を腹臥位で下垂させて撮像するとスキャン中の呼吸による画像のブレを回避できる。また、乳房を立体的に表示するため癌の広がり診断に有用だが、乳房の形は手術台上の背臥位と大きく異なる(図3)。手術直前に背

1) 日本大学病院放射線科

2) 日本大学理工学部 応用情報工学科

3) 日本大学理工学部 精密機械工学科

責任者連絡先: 天野真紀, amano.maki@nihon-u.ac.jp



臥位でMRIを再検すれば乳腺切除線決定に有用であることは明らかなが、MRIでの乳癌の描出には造影剤投与が必要で、コスト上の問題や造影剤副作用の懸念があり、標準検査ではない。以上より、乳房温存術での乳腺切除線決定は、外科医が腹臥位MRIで描出された癌の広がりを含めて頭の中で背臥位に再構築して行っているのが現状である。

この問題を解決すべく、体位変換と乳房の形状変化は活発に研究されており、体位変換による乳房内での癌の移動の傾向を観察したもの¹⁾、乳房の柔らかさと形状変化の傾向を観察したもの²⁾、非剛体変換を用いて腹臥位MRIと背臥位画像(CTやMRI)の位置合わせを試行したもの³⁾などがある。また、研究代表者の天野真紀は背臥位造影MRI画像をプロジェクターを用いて乳房皮膚に直接プロジェクションマッピングする装置を開発した⁴⁾。しかし、腹臥位MRIで描出された乳癌の広がりを含めて背臥位での乳房内に描出する実用可能な手法はいまだ確立されていない。

以上のように、画像診断は病気の形態を術前に詳しく観察でき手術支援に必須のツールだが、検査時と手術時の環境が異なっているために得られた情報を活かし切るに至っていない現状がある。一方で患者負担の観点から検査は取捨選択する必要がある。

【目的】腹臥位造影乳房MRIを背臥位像に変換し、背臥位での乳癌の位置と広がりを表示できる技術を開発すること。

【独創性】腹臥位乳房MRIを用いて背臥位像を作成する試みは行われているものの、画像の信号強度に基づいた変換技術のみでは精度が低い。本研究では、理工学的多角的なアプローチで精度の高い背臥位像生成技術の構築を目指す。

【創造性】この背臥位生成モデルが完成すれば、乳房温存術の切除範囲決定を客観的に行え、断端陽性率低下が期待できる。乳房全摘から乳房温存への適応症例増加も見込める。

2. 対象及び方法

【1. 画像提供】

本研究では、これまでに日本大学病院乳腺外科で診療のために施行された腹臥位造影乳房MRI画像並びに、背臥位造影乳房MRIを後方視的に収集し日本大学理工学部を提供する。

【2.背臥位像生成法の確立】

理工学的技術に、①乳房内をセグメンテーションして要素に分け重力方向の変化による変形を計算する有限要素法、②変形過程を動的に解析する軟体シミュレーションを用い、さらに、③ディープラーニングの手法による仮想画像の生成を加えて、多角的にアプローチする。

【3.乳房の変形度合いに関わる物性値の探索】

患者毎に乳房の変形度合いは異なる。本研究で作成する背臥位像生成モデルには、症例毎に乳房の変形度合いに関連する物性値を当てはめ、精度の高いモデルを作成する。この物性値の候補として、年齢・BMI・マンモグラフィ上の乳房密度/乳房厚・腹臥位MRIにおける乳房内の乳腺/脂肪比を挙げ、乳房の変形度合いと比較し、有効な物性値を決定する。

【4.乳房セグメンテーションモデルの作成】

本研究で作成する背臥位像生成モデルを実行するにあたっては、あらかじめ乳房構成を乳腺組織・脂肪・癌などにセグメンテーションする必要がある。ディープラーニングを用い、有効なセグメンテーションモデルの作成を目指す。

【5.精度検証】

日本大学病院では、乳房温存術予定症例に対し背臥位造影MRI像を乳房皮膚にプロジェクションマッピングして切除線決定を行っている。この症例を対象として、本方法で生成される背臥位像の癌の位置を、プロジェクションマッピング用に実際に撮像された造影背臥位MRI像の癌の位置と比較する臨床試験を施行する。

3. 結果

【1.画像提供】

本研究では、これまでに日本大学病院乳腺外科で診療のために施行された腹臥位造影乳房MRI画像(343例)並びに、背臥位造影乳房MRI(39例)を後方視的に収集し、日本大学理工学部に提供した。さらに、ディープラーニングでは多くの画像を要するため、米国NIHの画像データベースCancer Imaging Archiveより、腹臥位造影MRI(Duke大学、900例)をダウンロードし、この中から本研究に使用可能な乳房MRI画像を抽出した。

【2.背臥位像生成法の確立】

理工学的多角的にアプローチする。

1.有限要素法

有限要素法とは、複雑な形状や特性を有する物体や構造の挙動を微小要素に分割し、連続体として全体の挙動を扱う数値解析法の一つであり、構造や流体の解析によく用いられている。本研究では、乳癌患者の体位の違いによる乳癌位置の変化を有限要素解析ソフトウェア(ANSYS,Abaqus)を用いてシミュレーションを行っている。解析モデルは、当初、乳房を皮膚、脂肪、乳腺、癌を構成要素とし、各要素の変位に着目して解析を進めていたが、計算時間が長いなど実用性を見込むことが難しいため、現在では、乳房を一つの構造体と捉え、乳房全体の形状変化が妥当かどうかを、文献値を用いてパラメーターを変えつつ検証・調整中である(図4)。癌の大きさによる変形度合いへの影響も考えられ、癌の大きさを変えての検討も行っている。今後は、乳房を癌と非癌部にセグメンテーションしたモデルを用いて、個々の物性値を当てはめて、腹臥位MRIによって位置を特定された乳癌が手術のための背臥位ではどこに位置するかを明確にする。

2.軟体シミュレーション

背臥位の位置推定として、物理シミュレーションの1つであるソフトボディや流体などを用いる。このうち、本研究では、「Obi Softbody」のライブラリを用いて、乳房の腹臥位から背臥位への変換をシミュレーションしている。複数のパターンでシミュ

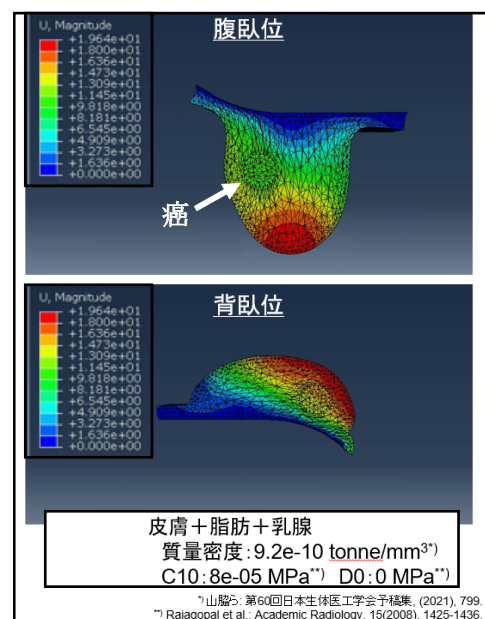


図4 有限要素法による腹臥位から背臥位への乳房内への移動量

レーションを行い、より現実に近い組み合わせや粘性、粒子のサイズを検討中である(図5)。今後は症例を増やし、Soft Bodyの細かさをさらに調整して精度の向上を目指す。また、使いやすさを念頭にUser InterfaceのWindowsなど汎用性の高いシステムへの移動を検討する。

3. ディープラーニング

画像に写るウマとシマウマの相互変換を実現するCycle GAN(敵対的生成ネットワーク)といった画像間スタイル変換の手法を基に、非造影乳房MRIと造影乳房MRIの信号強度の違いをスタイルと捉えつつ、解剖学的な一貫性を考慮した変換を実現するディープラーニングモデルを作成中である。

実際には、再現性が高い心臓の増強効果が強く学習されたために、これをトリミングして除いた画像で再度シミュレーションを行った。また、計算時間短縮のために解析不要な胸壁をトリミングして除いた画像も作成し、シミュレーションを繰り返し、精度を調整した。しかし、Cycle GANの手法は、症例毎に癌の位置が異なる、乳房の変形に個人差があるなどの多様性のあるモデルには不向きであるとの結論に至った。そこで、あらたなディープラーニングである生成モデル(拡散モデル:Diffusion model)に着目して、解析モデル作成を開始した。開発に先立ち、日大病院の腹臥位・造影/非造影例で試行したところ、コントラストの再現性(増強効果)がCycle

GANより、拡散モデルで高く、増強効果の再現性は高いことが期待できると考えられた(図6)。

一方で、実際に撮影したMRI(本物)と比べると空間分解能が少し低い印象であった。拡散モデルは、ノイズを除去することで生成するため学習が安定するが、生成速度が遅いという欠点があり、本研究の当初は試さなかったが、精度の向上が認められた論文が出ていることから高い品質が求められる本研究には適している可能性が高いと判断した。また、拡散モデルでは医用画像など膨大な次元をもつデータの扱いが難しいことから、BBDMと呼ばれるドメインの相互変換を直接学習する方法の採用を検討中である。

今後は解析を促進させ、最終的には、拡散モデルを用いたMRIのドメイン変換を採用し、Cycle GANを用いた解析モデルとの比較を行う予定である。

【3. 乳房の変形度合いに関わる物性値の探索】

患者毎に乳房の変形度合いは異なる。本研究で作成する背臥位像生成モデルには、症例毎に乳房の変形度合いに関連する物性値を当てはめ、精度の高いモデルを作成する。この物性値の候補として、年齢・BMI (Body Mass Index)・マンモグラフィ上の乳房密度/乳房厚・腹臥位MRIにおける乳房内の乳腺/脂肪比を挙げ、乳房の変形度合いと比較した。

対象は乳癌女性42人で、年齢は35-76歳、平均53.2歳であった。BMIは16.8-34.9、平均22.4であった。乳房MRIのT1強調画像で乳頭から大胸筋までの最小距離の差(mm)を腹臥位、背臥位で計測し、その両者の差(dDNPp-s)を乳房形状の変化と定義した。マンモグラフィ乳房密度は、まず、従来の4レベルの視覚評価を行い、次に研究助成金を用いて導入したマンモグラフィ専用ビューワ(mammodite, NetCam)を用いて自動および手動で定量化した。手動による定量では、乳腺内に介在する脂肪は除外した。さらに、マンモグラフィ撮影時の乳房厚

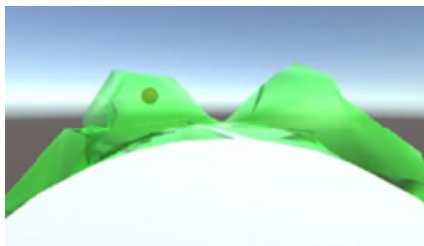


図5 軟体シミュレーションによる腹臥位から背臥位の乳房の動的変化



図6 ディープラーニング: Cycle GAN と拡散モデルの比較

も記録した。乳房形状の変化 (dDNPp-s) と、年齢、BMI、マンモグラフィ乳房密度または乳房厚の相関性を統計学的に評価した。結果は、従来の4レベルでは、5例が極めて高濃度、11例が不均一高濃度、26例が乳腺散在性を示し、脂肪性を示した患者はいなかった。自動および手動で定量された乳房密度 (13.0-68.4%および68.4%および5.9-88.8%) は、4レベル間で差があった (両者とも $p < 0.001$, $r = 0.675$ および 0.762)。手動によるマンモグラフィ乳房密度および乳房厚 (16-76mm) は、dDNPp-s (16-76mm) と相関した ($p < 0.05$, $r = -0.368$, $p < 0.01$, $r = 0.504$) (図7)。年齢はdDNPp-sと相関無し、BMIは相関あり ($p < 0.05$) であった。

以上より、手動によるマンモグラフィ乳房密度と乳房厚、BMIは、背臥位像生成モデルの物性値に使用できる可能性が示唆された。

本検討は、第83回日本医学放射線学会総会 (2024年4月12日、横浜) で発表した。

4. 考察

乳房の変形度合いに関わる物性値の探索では、マンモグラフィによる乳房密度と乳房厚、BMIが背臥位像生成モデルの物性値に使用できる可能性が示唆された。乳房の主な構成要素は、脂肪と乳腺組織である。その割合は、乳房密度と呼ばれ、個人差が大きい。脂肪は乳腺組織より柔らかいことが分かっており、乳房密度は、乳房全体の柔らかさと相関し、腹臥位から背臥位への体位変換による乳房の形状変化と関連していると仮定し、この仮定は今回の検討

で証明された。マンモグラフィは、乳癌の術前検査として必ず行われ、乳房密度は撮影後に後方視的にも計測可能である。簡便な乳房の柔らかさ、体位変換による乳房の変形度合いを示す物性値として、利用可能であることが分かった。一方で、乳房厚は一般に乳房の大きさとみなされ、乳房の変形は乳房の大きさ、すなわち、重量と関連していると考えられた。

今後は、有限要素法・軟体シミュレーション・ディープラーニングによる乳房変形のシミュレーションモデルを完成させ、これに、乳房密度・乳房厚・BMIの個々の症例毎の物性値を当てはめて、精度の高いシミュレーションを目指す。

5. 結語

術前乳癌患者の腹臥位乳房MRIを用いた背臥位MRI像生成のシミュレーションモデルを本学理工学部と共同で作成中である。マンモグラフィ乳房密度と乳房厚、BMIは、背臥位像生成モデルの物性値に使用できる可能性が示唆された。

謝辞

本研究は、令和5年度学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕に採用いただき研究したものである。

文 献

- 1) CB Wang, S Lee, T kim, et al. Breast tumor movements analysis using MRI scans in prone and supine positions. Sci Rep 2020;10 (1) :4858.

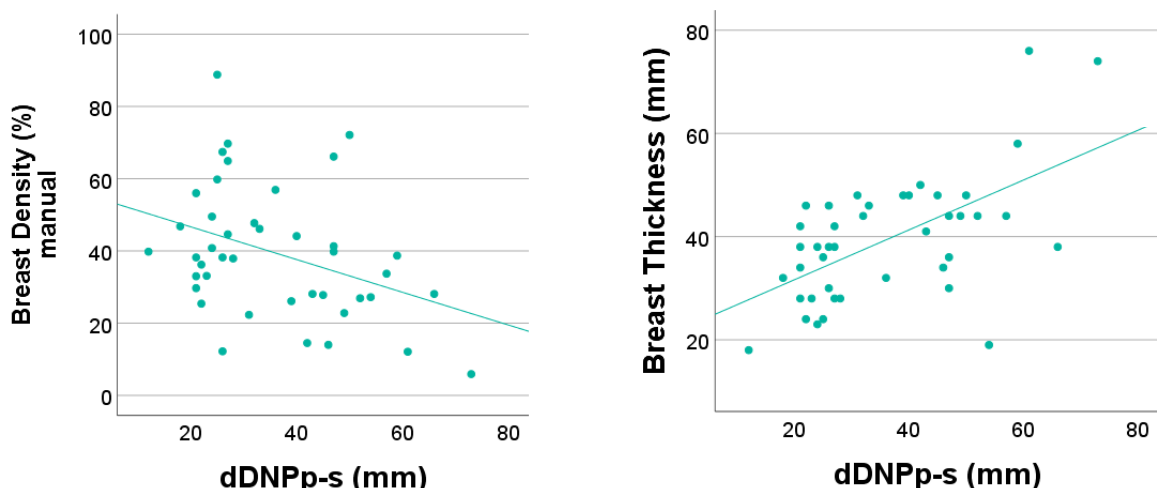


図7 手動によるマンモグラフィ乳房密度・乳房厚と乳房形状の変化 (dDNPp-s) の相関

- 2) RH Griesenauer, AW Jared, LR Arlinghaus, et al. Breast tissue stiffness estimation for surgical guidance using gravity-induced excitation. *Phys Med Biol* 2017;6 (12) :4756-4776.
- 3) B Eiben, V Vavourakis, JH Hipwell, et al. Symmetric Biomechanically Guided Prone-to-Supine Breast Image Registration. *Ann Biomed Eng* 2016;44 (1) :154-173.
- 4) M Amano, T Kitabatake, O Nakata, et al. Development of MRI Projection Mapping System for Breast-Conserving Surgery in the Operating Room: Preliminary Clinical Results in Invasive Breast Cancer. *Biomed Res Int* 2020;2020:5314120.

急性大動脈症候群の病態解明と人工知能による 新規診断技術・バイオマーカーの開発

羽尾裕之¹⁾, 福田安希代¹⁾, 傳田侑也¹⁾, 山田清香¹⁾, 鈴木真由美¹⁾, 宇都健太¹⁾, 森雅也²⁾,
原一之²⁾, 大前佑斗²⁾, 豊谷純²⁾

Study on molecular pathology of acute aortic syndrome and New diagnostic techniques with artificial intelligence

Hiroyuki HAO¹⁾, Akiyo FUKUDA¹⁾, Yuya DENDA¹⁾, Sayaka YAMADA¹⁾, Mayumi SUZUKI¹⁾,
Kenta UTO¹⁾, Masaya MORI²⁾, Kazuyuki HARA²⁾, Yuto OMAE²⁾, Jun TOYOTANI²⁾

要旨

大動脈瘤破裂、大動脈解離などの急性大動脈症候群は致死の経過を辿る重篤な疾患であるが、病態は不明な点が多い。現状では発症後早期の診断・治療に重点が置かれ、発症の予測は困難と考えられている。本研究では、急性大動脈症候群の動物モデルおよび患者血液、手術・病理解剖で得られた大動脈組織検体を用いて、本症候群の病態の更なる解明を目指す。さらに患者の画像や検査データなどの臨床情報とともに、患者検体を用いて、急性大動脈症候群の発症が予測可能な人工知能による早期発症予測プログラムの開発と新規バイオマーカーを特定することを目的とする。さらに、新規バイオマーカーを活用した動脈硬化性疾患罹患者、結合組織病罹患者などのハイリスク患者の予後を前向きに解析し、バイオマーカーの予測能および診断能を解析することを副次的な目的とする。

1. はじめに

急性大動脈症候群 (Acute aortic syndrome: AAS) は大動脈瘤破裂や大動脈解離 (Aortic dissection: AD) を含む、致死的な経過を辿る重篤な疾患である^{1,2)}。上行大動脈に解離が及ぶStanford A型のADはきわめて予後不良の疾患で、発症後に致死率が1時間あたり1-2%上昇すると報告されており³⁾、外科手術などの侵襲的治療を行わなければ48時間以内の致死率が約50%とされる。AASの機序はMarfan症候群などの一部の遺伝性結合組織病を除いて不明であるが、高血圧との関連や、中膜の血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells: VSMCs) と、細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) などの周辺蛋白との相互作用による中膜変性が関与していると考えられている⁴⁾。VSMCsは成熟した血管壁においては高分化/収縮型の表現

型をとるが、血管損傷や動脈硬化などといった修飾が加わると、脱分化/合成型へ表現型が変化し、遊走能や増殖能が上昇する⁵⁾。AAS患者の大動脈中膜においては、脱分化/合成型への変化が促進されており、これは血管のリモデリングを加速する因子と考えられ、発症の一因とする報告もある⁶⁾。すなわち、血管壁は加えられた負荷に応じて組織学的な変化がおこるが、ECMの分解や合成といった受動的反応に対して、VSMCsでは能動的反応によって、細胞の表現型を変化させて収縮機構を調整する⁵⁾。2つの表現型は光学顕微鏡レベルでは形態学的に見分けることは困難であるが、高分化型VSMCsではsmooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC) とsmoothelinが高発現していることが指摘されている⁷⁾。一方で、脱分化型VSMCsのマーカー蛋白に関しては確認が困難なことも多いが⁸⁾、アテローム動脈性

1) 日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野

2) 日本大学生産工学部

責任者連絡先: 羽尾裕之, hao.hiroyuki@nihon-u.ac.jp

動脈硬化症などの変化をきたした血管壁のVSMCsではS100A4の発現が上昇しており⁹⁾, S100A4を脱分化型マーカー蛋白として用いた論文が報告されている¹⁰⁾。VSMCsの表現型の変化のほかに、最近のプロテオーム解析で、Niemann-Pick disease type C2 protein (NPC2) と insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7) の2つのタンパク質が、大動脈瘤のVSMCや泡沫細胞で産生が亢進し、血液中でも同様の変動がみられることが報告され¹¹⁾, 急性大動脈症候群の新規バイオマーカーとして活用できる可能性が示された。この2つのタンパク質も、現状では臨床診断に導入されてはいないが、このような新規マーカー候補の知見の蓄積が進めば、将来的には診断ツールとして用いられる分子が確立される可能性が期待される。本研究の目的は、手術で採取されたヒトのAD患者の大動脈壁とモデル動物を用いて、AASの発症機序を明らかにすることである。また、近年の人工知能の医学領域への応用に関する研究は、実験レベルの研究から、社会実装可能なレベルの研究まで、日進月歩で進んでいる。本研究では患者の画像や検査データなどの臨床情報に加え、患者血液検体や手術・病理解剖で得られた大動脈壁を用いた病態解明の過程で得られた様々な生化学的データから、生産工学部・理工学部と共同で人工知能を用いたAASの診断システムを開発する。現時点で我々が調べた限り、全世界において急性大動脈症候群の早期診断を目的とした人工知能を用いた診断システムの開発に関する研究成果は報告されていない。

2. 対象及び方法

(1) 動物モデルを用いた急性大動脈症候群の病態解明

①ApoE・smoothelin遺伝子欠損マウスを用いた大動脈瘤モデル動物の作成

腹部大動脈瘤のモデルマウスとしてApo E遺伝子欠損マウスにAngiotensin II (Ang II) を持続投与する手法が確立されている。このモデルマウスに高分化な血管平滑筋細胞に発現する遺伝子であるSmoothelin B (Smtn B) を欠損させ (SmtnB -/- × Apo E -/-), Apo E単独欠損マウス (Apo E -/-) との免疫組織化学的所見と遺伝子発現量の比較を行った。

②ラットを用いた大動脈解離モデルの作成

Sprague-Dawley (SD) ラットに対して、ECMの合成を阻害する薬剤である β -aminopropionitrile (BAPN) を3週齢より飲料水に0.08%の濃度で溶解して7週間投与した (BAPN群)。また、同様のプロトコールでBAPN投与中に9週齢からAngiotensin II (Ang II) を1mg/kg/dayの速度で1週間皮下に持続投与した (BAPN+Ang II群)。コントロール群 (CTRL群) では薬剤投与は行わなかった。それぞれ10週齢で安楽死処置を行い、大動脈を採材した。大動脈はex-vivoで光干渉断層撮影装置 (optical coherence tomography: OCT) を用いて観察を行った後、免疫組織化学的所見と遺伝子発現量の比較を行った。

(2) ヒトの大動脈検体での検討

ADで手術をした24例 (AD群) と、大動脈疾患のない剖検例17例 (control群) の大動脈壁の中膜を用いて、免疫組織化学的所見と遺伝子発現量の比較を行った。

(3) 人工知能を用いた急性大動脈症候群の診断技術の開発

現在、AI学習を用いた病理診断について生産工学部と会議を重ねており、必要な画像を収集している。今後、血管病理の診断補助としての利用を目指している。

3. 結果

(1) 動物モデルとヒト検体を用いた急性大動脈症候群の病態解明

①ApoE・smoothelin遺伝子欠損マウスを用いた大動脈瘤モデル動物の作成

大動脈瘤発生率について、Apo E^{-/-}マウスで62.5%, Apo E^{-/-} × Smtn B^{-/-}マウスで17%とApo E^{-/-} × Smtn B^{-/-}マウスにおいてApo E^{-/-}マウスと比較し有意に腹部大動脈瘤発生率が低かった (図1, $p < 0.05$)。

病理組織学的評価について、Alcian-blue, Mac2, Smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) を染色し、それぞれの染色面積についてImage J35を用いて2群間で比較した。大動脈瘤形成部で炎症性変化による組織構造破壊していることを考慮し、二次的変化を除外するために大動脈瘤部以外の切片で染色を行った。結果としてAlcian-blue染色につい

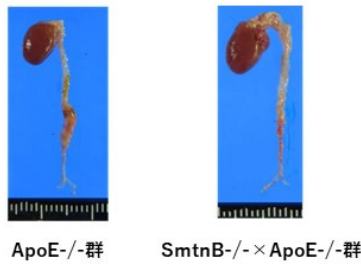


図1 ApoE^{-/-}マウスとSmtnB^{-/-}×ApoE^{-/-}マウスの大動脈のマクロ像

ApoE^{-/-}群では腎動脈分岐部に動脈径の拡大がみられたが、SmtnB^{-/-}×ApoE^{-/-}では径の拡大が抑制される傾向にあった。

では、Apo E^{-/-}×Smtn B^{-/-}マウスがApo E^{-/-}マウスに比較して有意に染色率（Alcian blue 陽性面積/中膜面積）が低かった（図2, $p<0.05$ ）。Mac2, SM-MHC においては2群間における有意差は認めなかった。Alcian blue 染色では酸性ムコ多糖沈着をみており、Alcian blue 染色陽性面積が、Apo E^{-/-}×Smtn B^{-/-}マウスにおいて低かったことから、Smtn B欠損により酸性ムコ多糖の合成が抑制され、腹部大動脈瘤の発生低下につながる可能性が考えられる。

遺伝子発現について、S100A4 ($p=0.000069$), TGF β ($p=0.037$), F4/80 ($p=0.00071$), Col1a1 ($p=0.010$) の遺伝子発現は、いずれもApo E^{-/-}マウス群に対してApo E^{-/-}×Smtn B^{-/-}マウス群で有意に発現量が低下していた。

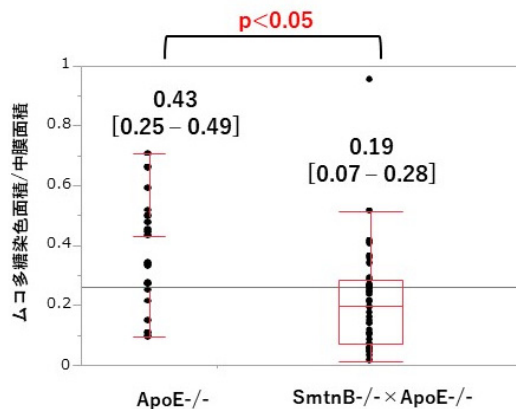


図2 モデルマウスのAlcian-blue染色での比較
ApoE^{-/-}群と比較して、SmtnB^{-/-}×ApoE^{-/-}群では有意にAlcian-blue 陽性面積の減少がみられた。

②ラットを用いた大動脈解離モデル

BAPN+Ang II 群では7頭全てで急性大動脈解離を発症し（図3）、OCTでの観察により、解離は中膜の深層の外膜に近い部位で起きていることがわかった（図4）。うち4頭は10週齢前に死亡した。BAPN 群は8頭中1頭のみADを発症したものの、OCTで大動脈全長に渡る中膜の肥厚が観察され、CTRL群と比較して有意差を示した（ 0.35 ± 0.06 vs 0.23 ± 0.03 mm, $p<0.01$ ）。BAPN投与を行った2群では弾性線維の離開と断裂がみられ、膠原線維が増加し、ムコイド物質のプール状の沈着がみられた。解離部位では弾性線維の菲薄化が目立った。表1に示したように、解離の存在部位が上行まで達しているもの

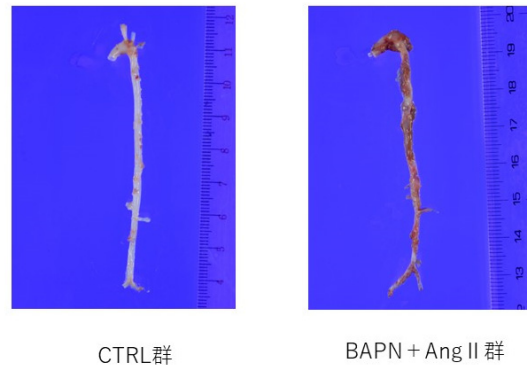
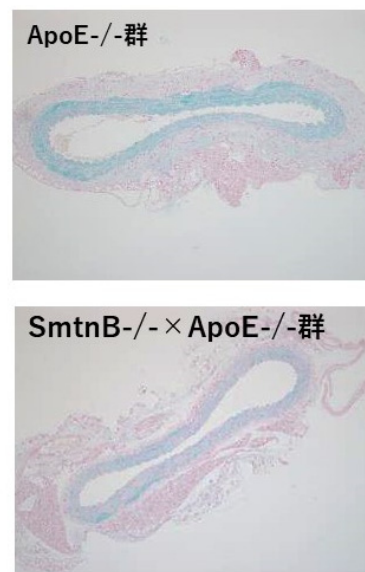


図3 大動脈モデルラットのマクロ像

BAPN + Ang II では大動脈弓部周囲に大動脈径の拡張がみられた。



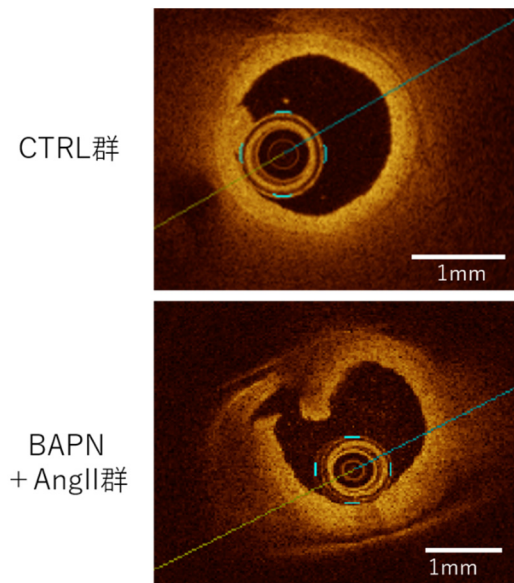


図 4 モデルラットの大動脈壁に対する OCT 画像

大動脈解離発症例の OCT では、CTRL 群と比較して中膜の肥厚がみられ、中膜が二層に剥離した像が観察された。

表 1 ラット大動脈解離モデルの発症様式と合併症

	CTRL (n=4)	BAPN (n=11)	BAPN+Ang II (n=7)
Aortic dissection	0	1	7
Type of dissection			
Stanford type A		1	6
Stanford type B			1
length of false lumen			
<10mm		0	2
10mm ≤		1	5
skip lesion	0	0	3
Aortic rupture	0	1	4
Localization of rupture			
Aortic arch		1	2
Descending aorta			1
Abdominal aorta			1
Other vessel events	0	0	1
rupture of renal artery			1
death without vessel events	0	2	0
bowel obstruction		1	
rupture of intestine		1	

BAPN 群では 1 頭が大動脈解離を発症し、2 頭が血管イベント以外で死亡した。BAPN + Ang II 群では 7 頭全頭が大動脈解離を発症した。CTRL：コントロール群 BAPN： β -aminopropionitrile 内服群 BAPN + Ang II：BAPN と Angiotensin II 併用群

をヒトの大動脈解離の分類に基づいて Stanford type A, 達していないものを Stanford type B として分けると, BAPN+Ang II 群の7頭中6頭が Stanford type Aであった。解離腔の長さは10mmをこえるものが5頭で, 3頭は離れた2カ所にADを発症していた。BAPN群も含めて解離による偽腔の破裂をきたしたものは5頭であり, 破裂部位は様々であった。BAPN+Ang II 群では血管イベント以外で死亡した症例はなかったが, BAPN群では6週0日に腸閉塞で, 8週0日に腸穿孔で死亡した2頭が含まれた。

(2) ヒトの大動脈検体

AD群において, 高分化平滑筋細胞マーカーであるSM-MHC, smoothelinの発現が低下していた。一方で脱分化平滑筋細胞マーカーであるS100A4は発現が増加していた(図5)。AD群において, 中膜の弾性線維の主要成分であるelastinはその分布が低下しており, MMP-2の活性は増強していた。また, 高分化平滑筋細胞マーカーとelastinの分布に正の相関関係があることが示された。また, 中膜変性が強い部位においてfilamin Aが濃染された像がみられた(図6)。

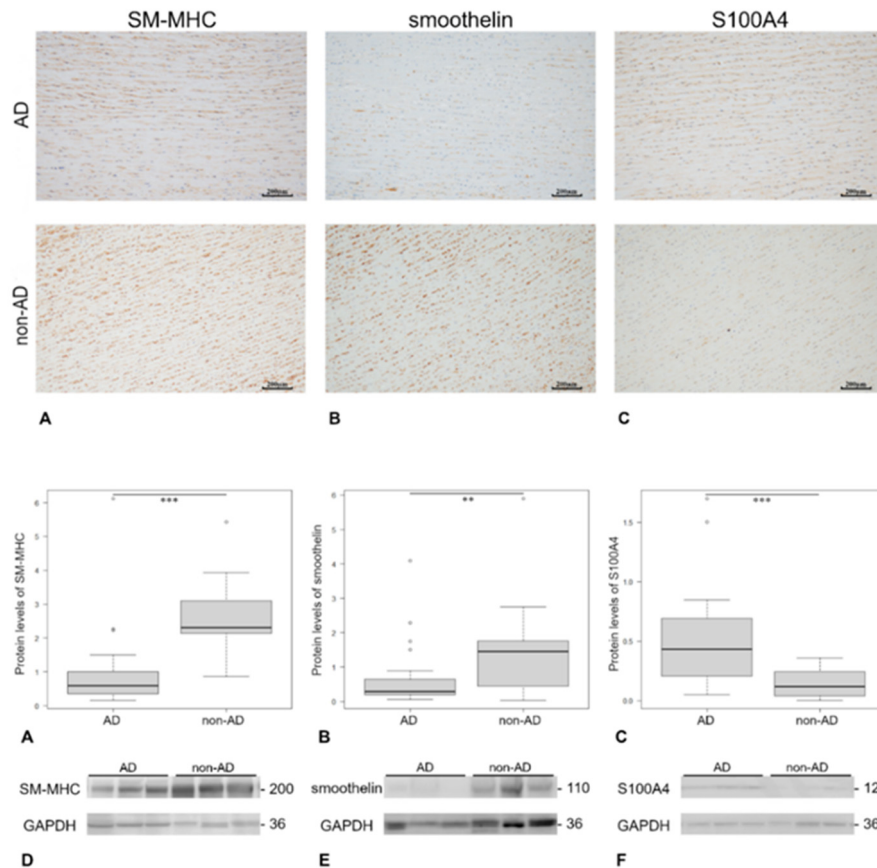


図5 ヒト大動脈における血管平滑筋細胞の表現型マーカーの免疫組織化学と蛋白分析

AD群において (A) Smooth muscle - myosin heavy chain (SM-MHC) と (B) smoothelin の陽性面積の減少, (C) S100A4 の陽性染色の増加があった。発現量の結果も同様であった ($p<0.001$, $p=0.0062$, $p<0.001$; D-F)。AD群: 大動脈解離群 non-AD群: 非大動脈解離群 Scale bar = 200 μ m

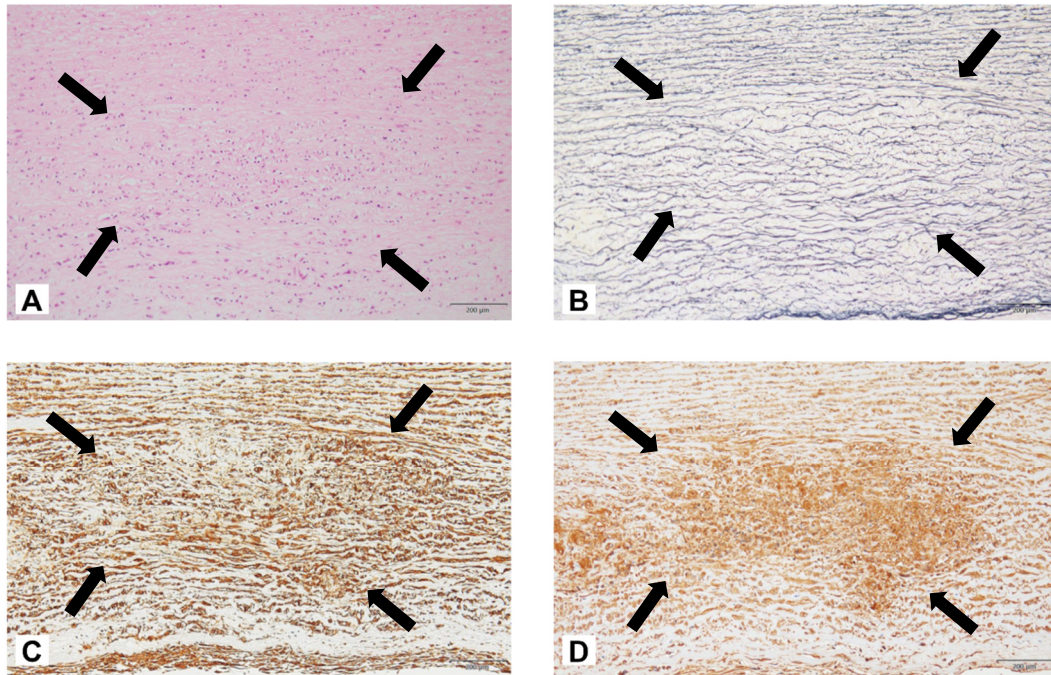


図6 AD群の中膜変性部位での代表的な連続切片のHEと免疫組織化学

HE染色(A)において血管平滑筋細胞の配列の乱れと、EVG染色(B)で弾性線維の離開、断裂を伴う α -SMA染色(C)陽性の部位において、filamin AのC末端抗体による染色(D)で嚢状に濃染される像がみられた(黒矢印)。
HE: Hematoxylin-Eosin EVG: Elastica van Gieson α -SMA: α -smooth muscle actin

4. 考察

ヒトのAASの発症を模したモデル動物の作製は広く行われており、遺伝子変異の導入やBAPN、Ang IIなどの化学物質の投与が行われている。既知の大動脈瘤モデルマウスに対してSmtn遺伝子を欠損させることで大動脈瘤の発生を抑制できた理由について、炎症の抑制が関与している可能性がある。関連する遺伝子や抑制される炎症カスケードの追求をすることで、大動脈瘤の発生機序の解明や新規治療に役立つと考える。大動脈解離モデルラットについて、BAPNはLOXを阻害することで弾性線維を破壊することが知られているが、マウスへの投与によりMMP-2/9の発現と活性が上昇したという報告があり[6,7]、これらによるECMの分解によって中膜変性が進行することがAD発症の要因となっていることが考えられる。ラットにおいてBAPNとAng IIを併用した報告は少なく、AD発症のためのBAPNの至適濃度についても検討されているが、本研究におけるモデルでは100%の確率でADを発症しており、AD以外の合併症の頻度も多くないことからモデル動物として有用であると考えられる。

ヒトのADをきたした中膜について、高分化平滑

筋細胞マーカーは発現が減少しており、また、中膜変性が強い部位においてfilamin Aが濃染された像がみられた。AD発症に関して、その背景にある中膜変性には複数の要素の変化が指摘されており、エラスチンを含む細胞外基質の分解が血管平滑筋細胞の脱分化を誘導している可能性がある。つまり、これまでの研究で広く知られているように高血圧や血管障害などの直接的な因子で血管平滑筋細胞が脱分化型に形質転換することに加え、MMPなどの酵素の活性化により誘導されたエラスチンの分解が血管平滑筋細胞の脱分化を促進することで、中膜変性が進行する可能性がある。filamin Aの断片化について、Marfan症候群患者の拡張した大動脈の中膜において指摘されていたが、今回の結果から、遺伝性結合組織病の背景のないAD患者の大動脈壁中膜においても、filamin Aの断片化が中膜変性へ関与している可能性がある。今後さらに大動脈中膜における平滑筋細胞の表現型や周辺蛋白と細胞外基質との関連を検討することがADの病態解明につながると考えられる。

5. 結語

急性大動脈症候群の発症機序について、動物モデルとヒトの検体を用いて追及することで、新規の診断技術や新規治療につながる可能性がある。

謝辞

本研究は日本大学学術研究助成 [独創的・先駆的研究] を受けて行われたものであり、謝意を表します。

文 献

- 1) CA Nienaber, KA Eagle. Aortic dissection: new frontiers in diagnosis and management: Part I: from etiology to diagnostic strategies. *Circulation* 2003;108 (5) :628-635.
- 2) R Erbel, et al. Diagnosis and management of aortic dissection. *Eur Heart J* 2001;22 (18) :1642-1681.
- 3) P.G Hagan, et al. The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD) : new insights into an old disease. *JAMA* 2000;283 (7) :897-903.
- 4) EW Larson, WD Edwards, Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases. *Am J Cardiol* 1984;53 (6) :849-855.
- 5) B Zhou, et al. Contractile Smooth Muscle and Active Stress Generation in Porcine Common Carotids. *J Biomech Eng* 2018;140 (1) :0145011-0145016.
- 6) L Wang, et al. Association of smooth muscle cell phenotypes with extracellular matrix disorders in thoracic aortic dissection. *J Vasc Surg* 2012;56 (6) :1698-1709,1709 e1.
- 7) S.S Rensen, PA Doevendans, GJ van Eys. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 2007;15 (3) :100-108.
- 8) H Hao, G Gabbiani, ML Bochaton-Piallat. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23 (9) :1510-1520.
- 9) AC Brisset, et al. Intimal smooth muscle cells of porcine and human coronary artery express S100A4, a marker of the rhomboid phenotype in vitro. *Circ Res* 2007;100 (7) :1055-1062.
- 10) C Chaabane, et al. Biological responses in stented arteries. *Cardiovasc Res* 2013;99 (2) :353-363.
- 11) Yagi H, et al. Discovery of novel biomarkers for atherosclerotic aortic aneurysm through proteomics-based assessment of disease progression. *Sci Rep* 2020;10 (1) :6429.

シングルセル解析から読み解く
非アルコール性脂肪肝炎の病態制御梅田香織¹⁾, 山口涼香²⁾, 山岸賢司²⁾, 和田平³⁾, 槇島誠¹⁾

Single-cell analysis in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis

Kaori ENDO-UMEDA¹⁾, Suzuka YAMAGUCHI²⁾, Kenji YAMAGISHI²⁾,
Taira WADA³⁾, Makoto MAKISHIMA¹⁾

要旨

近年の食事の欧米化や運動不足などの生活習慣の変化により、脂肪肝の罹患者が増加している。この内一部が炎症を伴う非アルコール性脂肪肝炎を発症することやその進展には免疫細胞による炎症反応が重要であることは知られているが、その制御は複雑であり、不明な点が多い。シングルセル解析は単一細胞あたりの網羅的遺伝子発現解析を可能にしたゲノミクス解析手法である。我々はこの手法を非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスの実験系に適用することにより、その進展メカニズムの一端を解明できると考えた。今回は、MASHモデルマウスの作製と解析及びシングルセル解析の解析手法の構築と既存データへの展開について経過を報告する。

1. はじめに

肝臓を構成する細胞の70%は肝細胞(実質細胞)であり栄養成分や薬物の代謝を担当するが、残りの30%は非実質細胞には類洞内皮細胞や間葉系星細胞に加え、肝固有マクロファージであるKupffer細胞や骨髄由来の誘導マクロファージ、ナチュラルキラー(natural killer, NK)細胞, NKT細胞, T細胞, B細胞などの多様な免疫細胞が互いに、または肝細胞と協調しながら代謝, 炎症, 生体防御, 抗腫瘍活性など多岐にわたる機能を発揮する(図1)¹⁾。肝臓において脂質代謝異常等により脂肪肝(旧表記: 非アルコール性脂肪性肝疾患 nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD, 現在は metabolic dysfunction associated fatty liver disease, MASLD へと名称変更)を呈すると、やがて一部が非アルコール性脂肪肝炎(旧表記: nonalcoholic steatohepatitis, NASH, 現在

は metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH へと名称変更), 肝線維化, 肝硬変, そして肝細胞がんへと進展するが, MASLD から炎症反応を誘導する MASH への進展には免疫細胞群の活性化が特に重要である。しかし, 先述の通り肝臓には多種多様な免疫細胞が存在するため, その制御機構は複雑であり, 未だ不明な点が多い。

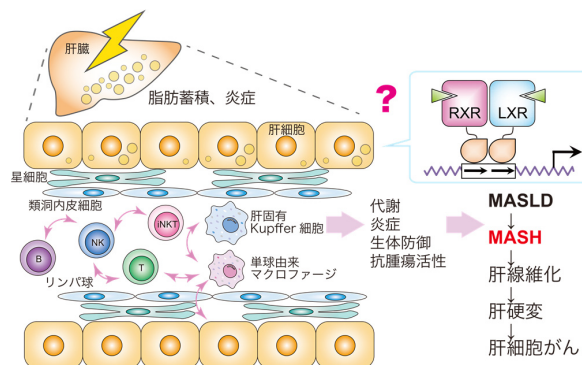


図1 肝臓に存在する多様な免疫細胞とその機能、肝障害への関与

1) 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野

2) 日本大学工学部

3) 日本大学薬学部

責任者連絡先: 梅田香織, umeda.kaori@nihon-u.ac.jp

核内受容体はリガンド依存性転写因子であり、体内の様々な脂溶性代謝産物をリガンドとして認識し、標的遺伝子の発現を制御する。コレステロールの代謝産物であるオキシステロールの受容体として作用する肝臓X受容体 (liver X receptor, LXR) α 及びLXR β は、体内でコレステロール代謝調節を担うセンサーとして働くが、マクロファージなどの免疫細胞において抗炎症作用を有することも知られている。我々は先行研究において、全身性LXR α 欠損マウスが肝細胞への顕著なコレステロール蓄積を伴い、通常は存在しない活性化マクロファージが集積し早期にMASHを誘導すること²⁾、全身性LXR α / β 欠損マウスは通常飼育下で骨髓由来の誘導マクロファージが肝臓に集積し、急性肝障害に過敏となること³⁾、胸腺での分化成熟化異常により肝臓においてNKT細胞が消失し、抗腫瘍活性が減弱する等⁴⁾、LXR α / β による免疫細胞を介した肝保護作用を複数報告した。しかし、先行研究では先述の細胞群における個々の機能解析を行ったが、MASHの進展制御メカニズムを詳細にかつ正確に解明するためには、肝臓免疫系全体を把握する必要があると考えた。

シングルセル解析は単一細胞あたりの網羅的遺伝子発現解析を可能にしたゲノミクス解析である。従来の複数の細胞が混在したバルクの検体を用いるRNAシーケンス解析では見出すことのできなかった、希少な細胞群の情報が得られることから、多種多様な免疫細胞が存在する肝臓の解析には非常に有用である。そこで、シングルセル解析の解析手法をまずは本学内で確立すること、そしてLXR α / β 欠損マウスを用いたMASHモデルマウスの検体に適用することにより、MASH進展時の免疫細胞におけるLXR α / β の細胞選択的標的遺伝子または新規機能を明らかにすること、さらにLXR α / β のMASHの予防または治療標的としての可能性を見出すことを目指し、本研究を開始した。

2. 対象及び方法

1) 実験に用いた遺伝子改変マウス

野生型マウス (C57BL/6J) は日本クレアより購入した。全身性LXR α 及びLXR β 欠損マウスはテキサス大学サウスウェスタンメディカルセンターのDavid Mangelsdorf教授より供与を受け、C57BL/6J

マウスと10回以上バッククロスをかけた個体を用いた。LXR α ^{flxed/flxed} 及びLXR β ^{flxed/flxed} マウスは同じくMangelsdorf教授及び仏GIE-CERBM (IG-BMC) のPierre Chambon教授より供与を受け、The Jackson Laboratoryより購入した各種Creレポータートランスジェニックマウスと交配させることにより細胞選択的LXR α 及びLXR β 欠損マウスを作製した。各実験には7~8週齢のオスマウスを使用した。なお、本研究において実施した全ての動物実験はカルタヘナ法、日本大学遺伝子組換え実験実施規定及び文部科学省が定めた「研究機関等における実験動物等の実施に関する基本指針」に従い、日本大学医学部に実験計画を申請し、承認を得た上で実施した。

2) MASHモデルマウスの作製

マウスに通常食 (CE-2, 日本クレア) 及び0.2% コレステロール及び42%脂肪 (ココアバター) を含む西洋食 (日本クレア) を自由摂取により摂餌させた。先行研究において、全身性LXR α 欠損マウスは1.25%コレステロール及び15%脂肪 (ココアバター) 含有食により早期にMASHを誘導することを報告したが²⁾、本研究ではヒトMASHの病態を考慮し、動脈硬化誘導食として用いられ、コレステロールの毒性が軽度である0.2%のコレステロール含有量を採用した。8または12週間摂餌後、マウスを安楽死させ解析を行った。

3) MASHモデルマウスの解析

① 肝障害の評価

食餌依存性肝障害の評価のため、体重、肝重量、脾臓重量などの臓器重量の比較、肝組織の観察 (ヘマトキシリン-エオシン (hematoxylin and eosin, HE) 染色) 及び血中トランスアミナーゼ値により肝障害の程度を評価、比較した。また、血中総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸等の成分分析をテストワコー等の比色定量法を用いて行った。

② 肝臓免疫細胞の解析

マウスより全採血後、肝臓を摘出し、細切後、コラゲナーゼ反応により肝組織を分散させた。肝細胞と免疫細胞を含む非実質細胞を確実に分離するため、33%パーコール溶液を用いた密度勾配遠心分離法により肝細胞を除去し、非実質細胞分画を得た。赤血球を除去後、細胞数を計測し、リアルタイムPCR法を用いたバルクの遺伝子発現解析やマルチ

カラーフローサイトメトリーを用いた免疫細胞分布解析等の評価を行った。

③ 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差を用いて示し、統計解析はPrism 10を用いて一元配置分散分析を行った後にTukey's testを用いて各群間の比較を行った。

4) シングルセル解析の解析手法の構築及び展開

① シングルセル解析の解析手法の構築

シングルセルシーケンスデータの解析は工学部に設置された高性能ワークステーション (HPC システムズ社製, Xeon CPU: 500 core 以上, メモリ: 1,024 GB, HDD: 600 TB) を用いて実施した。解析には、動脈硬化モデルマウスを用いて過去に実施した手法に基づき⁵⁾、統計処理に特化したプログラミング言語である R (version 4.2.1) を用いた。

② 構築した解析手法の既存データへの展開

上記①で確立した解析手法を令和4年度の文部科学省学術変革領域研究第2期先進ゲノム支援によって実施した野生型及びLXR α/β 欠損マウスの通常食及び西洋食負荷マウスより単離した、好中球を除くCD45陽性肝臓免疫細胞の4群に展開した。肝臓免疫細胞の検体は、東京大学において10xGenomics社のシングルセルマルチオーム解析 (遺伝子発現解析と遺伝子上のオープンクロマチン領域を網羅的に検出するエピゲノム解析 Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC) -seqの同時解析) システムを用いてシーケンスライブラリーを作製し、イルミナ社のシーケンサーNovaSeq 6000を用いてシーケンシングを行った。得られたシーケンスデータ (FASTQ ファイル) について、同じく10xGenomics社より供給されたRのプログラムパッケージ“Cell Ranger ARC”を用いて一次解析 (マウスゲノム配列へのマッピング) まで完了し、最終的に得られたデータセットを以降の解析に用いた。

3. 結果

1) MASHモデルマウスの解析

① 全身性LXR α 及びLXR β 欠損の影響

野生型及び全身性LXR α/β 欠損マウスに西洋食を負荷したところ、両群共に西洋食負荷により体重増加を認めたが、野生型及び全身性LXR α/β 欠損間における体重及び肝重量の変化は認められなかつ

た。野生型において、西洋食負荷12週間経過後に血中総コレステロール値の増加が観察された。一方、LXR α/β 欠損マウスは通常食群においても野生型と比較して低値を示し、西洋食負荷の効果は認められなかったことから、コレステロール逆転送系が障害されていることが確認できた。野生型において、肝障害マーカーである血中トランスアミナーゼ値の西洋食負荷による増加は認められなかった。しかし、LXR α/β 欠損においては、通常食群においてすでに野生型と比較し有意な増加を認め、西洋食負荷によってさらなる増加傾向を示した。

次に、HE染色により肝組織の観察を行った。その結果、我々の過去の報告と一致してLXR α/β 欠損マウスの通常食負荷群において免疫細胞浸潤が認められた³⁾。野生型においては西洋食負荷群において肝臓への脂肪蓄積や肝細胞のバルーニングが観察されたが、LXR α/β 欠損においては肝細胞のバルーニングは検出されたものの脂肪蓄積は軽微であった。しかし、顕著な免疫細胞浸潤を認め、MASHを誘導することが示された。

② 細胞選択的LXR α 及びLXR β 欠損

肝臓に存在する免疫細胞等を標的としたCreトランスジェニックレポーターマウスを用いて数種類の細胞選択的LXR α 及びLXR β 欠損マウスを作製した。これらのマウスについてはこれまで肝臓免疫細胞に関する報告がないため、まずは通常食負荷の状態の肝組織の観察及びフローサイトメトリーを用いた肝臓免疫細胞の分布評価を行った。その結果、Kupffer細胞、骨髄由来の誘導マクロファージ、T細胞等の代表的な免疫細胞の細胞分布を解析したところ、ある種の細胞選択的欠損においてコントロールマウスと比較して明らかに免疫細胞分布が異なることを見出した。また、その分布は全身性欠損とも異なる分布であった。肝組織のHE染色の結果、類洞構造の異常、肝細胞の増殖及び免疫細胞浸潤が観察された。さらに、西洋食負荷によりその免疫細胞分布変化はさらに顕著な差を認めた。

2) シングルセル解析の解析手法の構築及び展開

① シングルセル解析の解析手法の構築

今回展開するシングルセルマルチオーム解析は遺伝子発現解析とATAC-seq解析の同時解析であるため、Cell Ranger Arcを用いた一次解析によって得られたデータセットには単一細胞中にそれぞれのシー

ケンスデータが含まれている。そこで、各データ解析に特化したRのプログラミングパッケージである“Seurat v4”⁶⁾及び“Signac”⁷⁾を用いて解析した。複数検体のデータ統合（インテグレーション）には遺伝子発現解析データより得られる変動遺伝子及びATAC-seq解析データより得られるオープンクロマチン領域の位置情報を用いて行い、次元圧縮、クラスタリング及び可視化を行うための手法を設計した。各細胞種の同定は既報の複数の論文の情報より得られた細胞選択的に発現する遺伝子情報を元に行った⁸⁾。Gene Ontology解析には“ClusterProfiler”⁹⁾を、転写因子のモチーフ解析には“HOMER”¹⁰⁾をそれぞれ用いた。以上、複数のRのプログラミングパッケージを組み合わせることによって一連のシングルセル解析手法を構築した。

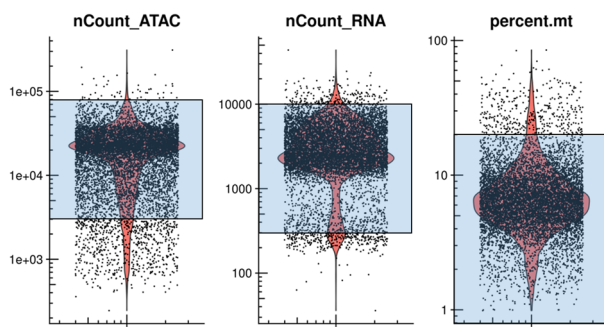


図2 シングルセルデータのフィルタリングの一例
各ドットは単一細胞を示す。オープンクロマチン領域のピーク数（左）、RNAの発現量（中）、ミトコンドリア遺伝子の割合（右）を示したバイオリンプロット。枠内の細胞のみを選別し、以後の解析に用いた。

② 構築した解析手法の既存のシングルセルデータへの展開

まず初めに、野生型及びLXR α / β 欠損マウスの通常食または西洋食負荷4検体について、データのフィルタリングを個々に行った。ATAC-seqデータについては単一細胞中のオープンクロマチン領域のピーク数、遺伝子発現解析については全RNAの発現量を検出することにより単一細胞あたりに相当する数値より逸脱した細胞を除去した。また、ミトコンドリア遺伝子の発現量を比較することにより、死細胞を除去し、単一の生細胞のみを選別した（図2）。

次に、4検体のデータのインテグレーションを遺伝子発現解析及びATAC-seqそれぞれについて行った。遺伝子発現解析については各細胞に選択的に発現する変動遺伝子を抽出し、4群間でアンカリングを行い、ATAC-seqについてはオープンクロマチン領域のピークデータを元に4群間で共通するピークセットを作成し、データを統合した。インテグレーションした各データは次元圧縮及びクラスタリングを行い、t分布型確率的近傍埋め込み法（t-distributed Stochastic Neighbor Embedding, tSNE）を用いて可視化した。その結果、遺伝子発現解析では16個の免疫細胞群へ、ATAC-seq解析では15個の免疫細胞群のクラスターへの分類に成功した（図3）。

また、既存の細胞のアノテーション方法に基づき、各クラスターに特異的にかつ高発現する遺伝子のパターンから、Kupffer細胞、骨髄由来の誘導マクロファージ、T細胞、NK細胞、B細胞、樹状細胞

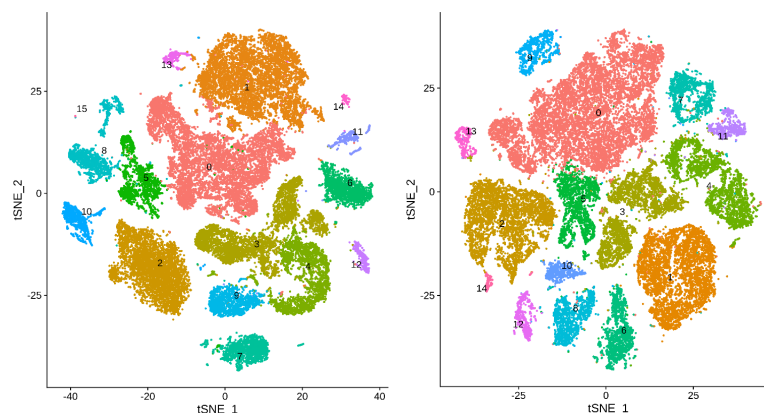


図3 MASHモデルマウスの肝臓より単離したCD45陽性免疫細胞を用いたシングルセル解析。

4検体を統合したシングルセル遺伝子発現解析（左）及びATAC-seq解析（右）のクラスタリング結果をtSNEプロットで可視化した。各ドットは単一の細胞を示し、色分けされた各クラスターは異なる細胞集団を示す。

などを同定した(図4)。次に、各クラスターに含まれる細胞数について、野生型及びLXR α / β 欠損マウスの通常食または西洋食負荷の4群間で比較を行った。その結果、LXR α / β 欠損群で骨髄由来の誘導マクロファージが増加するなど、これまで我々が報告した知見³⁾を反映する結果が確認できた。その一方で、既存のフローサイトメトリーや非実質細胞を用いたバルクの遺伝子発現解析では着目していなかったある種の細胞集団における遺伝子発現パターンが西洋食負荷やLXR α / β 欠損によりダイナミックに変化することが、本解析により初めて示された。

4. 考察

初年度である令和5年度の研究結果より、全身性LXR α / β 欠損マウスがコレステロールの毒性の低い西洋食によってもMASHを早期に誘導することが示された。肝組織の観察によって脂肪蓄積が野生型と比較して減少したが、オイルレッドO染色を用いた脂肪染色や肝組織中のコレステロール、中性脂肪、脂肪酸等の定量分析等の詳細な解析を行う必要がある。本研究に先立ち実施した全身性欠損由来肝臓免疫細胞のシングルセルデータを用いて構築した解析手法を展開させた結果、西洋食及びLXR α / β 欠損によって細胞組成がダイナミックに変化するこ

とを見出した。今後はさらに詳細な解析を進め、LXRの標的細胞及び遺伝子、新規機能を特定する。細胞選択的LXR α / β 欠損を用いた検討についてはある種の細胞選択的欠損において、全身性欠損で認められた変化に加えた新たな知見を見出すことができた。現在、当該マウスを用いた詳細な解析を行っているところであり、令和6年度中にはシングルセル解析を実施し、全身性欠損の結果との比較を行う予定である。

また、我々はこれまでLXRに加えて同じく核内受容体であるビタミンD受容体(vitamin D receptor, VDR)の肝臓免疫系に対する影響についても解析を進めている。先行研究において、全身性VDR欠損マウスの自己免疫性肝障害モデルを解析した結果、Kupffer細胞の機能異常により肝炎が軽減することを報告した¹¹⁾。現在、MASHモデルマウスの肝臓免疫細胞におけるVDR影響についても全身性VDR欠損マウス及び細胞選択的VDR欠損マウスを用いた解析を検討しており、シングルセル解析へと発展させる予定である。さらに、脂質代謝異常を誘導することが知られている概日リズムなどの環境要因の影響についても検討し、肝臓免疫系を介したMASHの進展要因をさらに追求する。

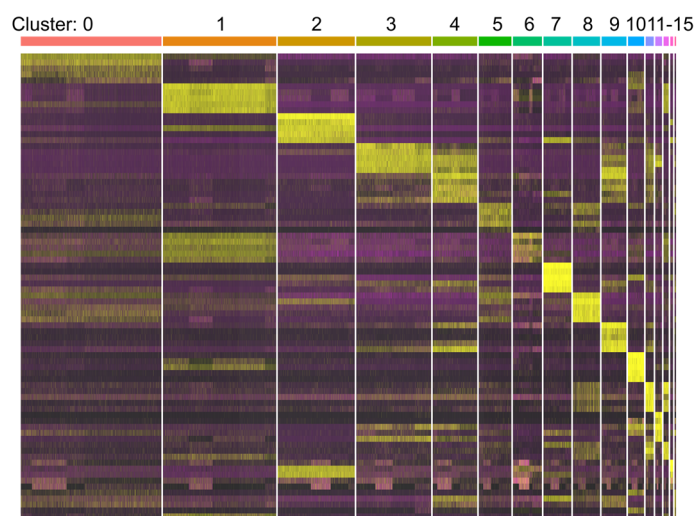


図4 各クラスターに選択的に発現する遺伝子を示したヒートマップ。シングルセルマルチオーム解析のうち、遺伝子発現解析のクラスタリング解析において検出された上位5つの遺伝子をヒートマップにて示した。

5. 結語

令和5年度は当学内でのシングルセル解析の確立を目指し、工学部内の高性能ワークステーションを用いることにより、シーケンスデータを用いたバイオインフォマティクス解析手法の構築及び既存データへ展開に成功した。令和6年度は医学部生化学分野内に設置した10xGenomics社のシングルセルライブラリー作製装置であるChromium Xiを用いて、実際にMASHモデルマウスより単離した免疫細胞を用いたライブラリーの作製からシーケンシングまで実施することにより、検体準備からデータ解析までの一連の解析手法の確立を目指す。本解析は肝臓免疫細胞のみならず、ヒト及びマウスのほとんどの組織を用いた解析に応用できる。また、生細胞に加え、パラフィン切片等固定化した検体からもライブラリー作製が可能となったため、容易に検体が準備できるようになった。今後は本解析手法を医学部他、生命科学系学部の研究に提供することにより、研究成果や人材育成、そして本学全体の研究推進力の発展に貢献していきたい。

(本研究は令和5年度日本大学学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕を受けて行われたものであり、ここに謝意を表します。また、本研究において用いた実験材料や実施した内容については、本学術研究助成金の他、科研費(21K06862及び22H04925(PAGS))、日本大学若手研究者環境整備支援助成金(令和3年度)、武田科学振興財団(令和3年度)、アステラス病態代謝研究会(令和4年度)からの各助成によるものも一部含まれることを記載します。)

文 献

- 1) **Endo-Umeda K**, Makishima M. Liver X Receptors Regulate Cholesterol Metabolism and Immunity in Hepatic Nonparenchymal Cells. *Int J Mol Sci*. 20 (20) : E5045, 2019 (review)
- 2) **Endo-Umeda K**, Nakashima H, Umeda N, Seki S, Makishima M. Dysregulation of Kupffer Cells/ Macrophages and Natural Killer T Cells in Steatohepatitis in LXR α Knockout Male Mice. *Endocrinology*, 159 (3) : 1419-1432, 2018
- 3) **Endo-Umeda K**, Nakashima H, Komine-Aizawa S, Umeda N, Seki S, Makishima M. Liver X receptors regulate hepatic F4/80+CD11b+ Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice. *Sci Rep*, 8: 9281, 2018
- 4) **Endo-Umeda K**, Nakashima H, Uno S, Toyoshima S, Umeda N, Komine-Aizawa S et al., Liver X receptors regulate natural killer T cell population and antitumor activity in the liver of mice. *Sci Rep*, 11:22595, 2021
- 5) **Endo-Umeda K**, Kim E, Thomas DG, Liu W, Dou H, Yalcinkaya M et al., Myeloid LXR deficiency induces inflammatory gene expression in foamy macrophages and accelerates atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 42 (6) :719-731, 2022
- 6) Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM 3rd, Zheng S, Butler A et al., Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*, 184 (13) , 3573-3587, 2021
- 7) Stuart T, Srivastava A, Madad S, Lareau CA, Satija R. Single-cell chromatin state analysis with Signac. *Nat Methods*, 18 (11) :1333-1341, 2021
- 8) Remmerie A, Martens L, Thoné T, Castoldi A, Seurinck R, Pavie B et al., Osteopontin Expression Identifies a Subset of Recruited Macrophages Distinct from Kupffer Cells in the Fatty Liver, *Immunity*, 53 (3) , 641-657, 2020
- 9) Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*, 16 (5) :284-287, 2012
- 10) Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P et al., Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell*, 28;38 (4) :576-589, 2010
- 11) Umeda N, **Endo-Umeda K**, Nakashima H, Kato S, Seki S, Makishima M. Concanavalin A-induced acute hepatitis is attenuated in vitamin D receptor knockout mice with decreased immune cell function. *J Leukoc Biol*, 106 (4) : 791-801, 2019

低出生体重-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-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はわずかであった。しかしI群では尿細管障害マーカーや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の上昇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-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⁾。また今までも「胎児期低栄養による腎障害および高血圧発症メカニズムの解明」研究をテーマに活動していた。胎児期低栄養ラットの腎臓内の幹細胞がエピジェネティクスの異常を示すことで、児の成体期の腎障害および高血圧発症につながる可能性を証明した³⁾。しかしながら胎児期低栄養モデルは、極端な低蛋白食により、妊娠中の母

体の代謝状態や体環境に変化を起こしうる可能性があり、必ずしもヒトにおける低出生体重児に応用できるのか疑問が残った。そこで低出生体重-非肥満2型糖尿病マウスモデルに応用しようと考えた。低出生体重児は、腎臓由来間葉系幹細胞のエピジェネティクスの異常により、慢性腎臓病や糖尿病性腎症が発症する。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

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

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⁴⁾。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。

2. 対象及び方法

1) 低出生体重-非肥満2型糖尿病マウスモデルの作製

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。産仔が得られた後も離乳するまでメスマウスにはそのままの飼料、飲水を与えた。妊娠したメスマウスについて、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。両側子宮動脈を露出し、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遮断し（図1）、胎児の低酸素と低栄養を引き起こした群の出生仔を虚血群（I群）とした。12分後にクリップを外し、胎仔を腹腔内に還納、



図1 マウスの子宮動脈の血流遮断

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の出生仔をコントロール群（C群）とした。

2) 腎組織障害の表現型の確認

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）。体重測定は出生時および8週齢まで毎週行った。7～8週齢に、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。測定に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8週齢に腎臓摘出を行い、腎臓切片を作成し、hematoxylin and eosin 染色および、Periodic acid-Schiff 染色を行い、腎臓病理（糸球体数、糸球体長径、硬化糸球体割合）の検討を行った。さらに腎機能や糖代謝に関しての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。

なお統計解析はJMP ver. 14を用いた。Wilcoxon/Kruskal-Wallisの検定およびWelchのt検定を用いて、 p 値<0.05を有意差とした。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。

(1) 出生体重、体重推移

出生体重の平均値はI群1.5g、C群1.8gと子宮内虚血によって低出生体重仔が産まれた（ $p<0.01$ ）（図2a）。その後もI群はC群と比較し有意に低体重で推移した（ $p<0.01$ ）（図2b）。

(2) 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

両群の7週齢の尿中 β 2マイクログロブリン（図3a）およびアルブミン（図3b）の平均値は、C群と比較して、I群で有意に高かった（いずれも $p<0.01$ ）。

(3) 8週齢での腎臓病理検査

両群の8週齢における腎臓病理所見を比較した。糸球体数、硬化割合において両群間に有意差は認めなかった。長径においてはI群でC群より有意に長かった（ $p<0.05$ ）（図4）。

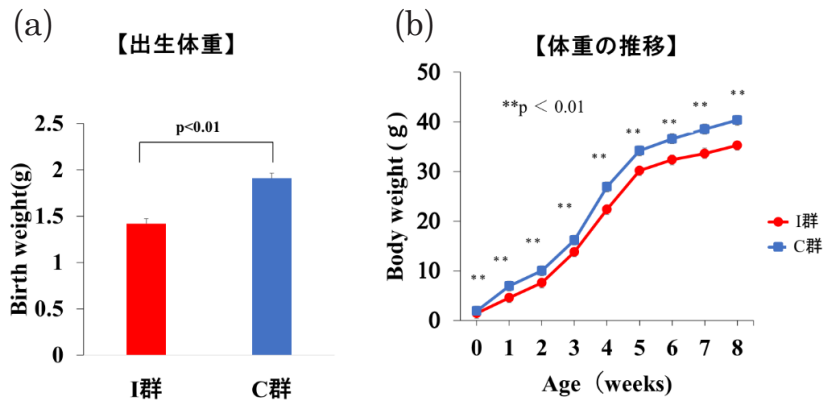
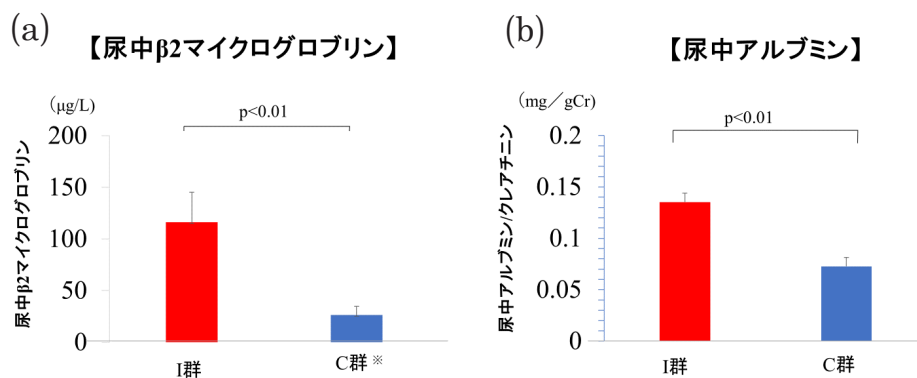


図2 (a) 出生体重 (b) 出生から8週齢までの体重推移 (平均 ± 標準誤差 (各群 n=10))



※C群で感度の10 μg/L以下が複数あり。10 μg/Lとして計上

図3 (a) 尿中β2ミクログロブリン (b) 尿中アルブミンの7週齢での蓄尿検査結果 (平均 ± 標準誤差 (各群 n=6))

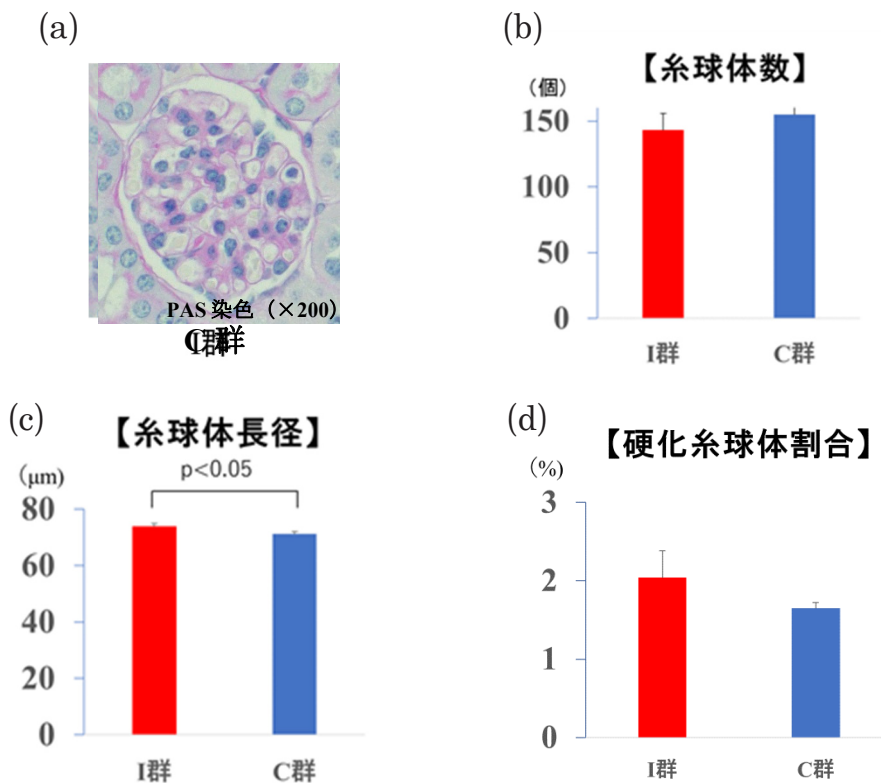


図4 8週齢での (a) 病理像 (b) 糸球体数 (c) 糸球体長径 (d) 糸球体硬化割合の結果 (平均 ± 標準誤差 (各群 n=6))

(4) メタボローム解析

腎臓のメタボ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5)。

また、以下の化合物において、2群間に有意な差を認めた(表1)。赤字で示した、N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide, S-Adenosylmethionine, Succinic acidはなかでも腎臓病との関連が知られている。

さらに、Human Metabolome Databaseに基づく検討をおこなったところ、Renal disease, Uremic toxinに分類されるものとして、表2の化合物が挙げられた。うちN1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamideにおいて、2群間に有意な差を認めていた。

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、腎病理組織学的な変化はわずかであり、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。しかしすでに尿細管マーカーや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で伴に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では腎障害に関連するという既報もあり⁵⁾、コハク酸の低出生体重・肥満・非肥満2

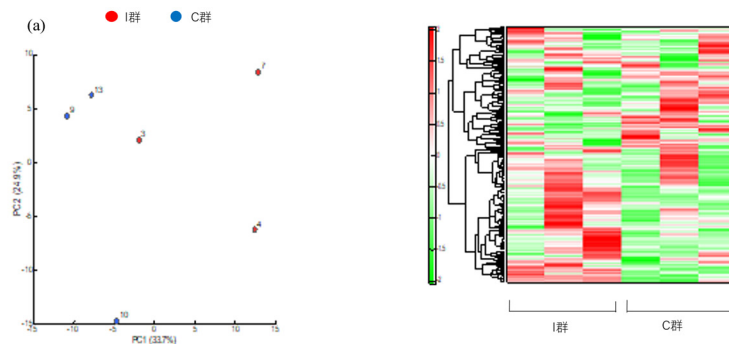


図5 メタボローム解析 (a) 主成分(PC)分析 (b) 階層型クラスター分析のヒートマップ表示(各群n=3)。

表1 メタボローム解析において2群間に有意差を認めた化合物

Compound name	Comparative Analysis		
	Ischemia vs Control		
	Ratio [†]	<i>p</i> -value [‡]	
Argininosuccinic acid	1.5	0.021	*
Ascorbic acid	0.5	0.004	**
CMP	0.7	0.032	*
FAD_divalent	0.8	0.046	*
Hypotaurine	1.3	0.024	*
Inosine	0.8	0.034	*
Isovalerylcarnitine	2.4	0.012	*
myo-Inositol 1-phosphate myo-Inositol 3-phosphate	1.4	0.039	*
N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide	2.6	0.049	*
N ⁵ -Ethylglutamine	2.1	0.011	*
Ribulose 5-phosphate	0.7	0.008	**
S-Adenosylmethionine	0.5	0.002	**
S-Carboxymethylcysteine	1.6	0.029	*
Spermidine	1.5	0.024	*
Stachydrine	2.0	0.043	*
Succinic acid	1.8	0.005	**
Taurocholic acid	0.6	0.027	*

表 2. Human Metabolome Database に基づく検討

Major Category	Minor Category	Compound name	Comparative Analysis		
			Ischemia vs Control		
			Ratio [†]	p-value [‡]	
Renal disease, Uremic toxin	Renal failure, Kidney disease, Uremic toxin	3-Indoxylsulfuric acid	2.3	0.231	
	Renal failure	ADMA	1.2	0.391	
	Renal failure, Kidney stone	Citric acid	1.4	0.476	
	Kidney disease, Renal function	Creatinine	1.7	0.127	
	Renal failure, Aciduria, Kidney stone	Glyceric acid	2.3	0.085	
	Kidney disease, Uremic toxin	Guanidinosuccinic acid	1.4	0.255	
	Chronic renal failure	His	1.0	0.913	
	Kidney disease	Lys	1.2	0.344	
	Renal failure	N-Acetylneuraminic acid	1.0	0.760	
	Renal failure	N ¹ -Methyl-4-pyridone-5-carboxamide	2.6	0.049	*
	Renal disease	SDMA	1.3	0.295	
	Kidney failure	Taurine	0.9	0.504	
	Chronic renal failure, Hemodialysis	Taurocyamine	1.1	0.579	
	Kidney failure	Trimethylamine N-oxide	2.5	0.142	

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⁶⁾。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考えられた。

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. *Biomedicines* 2022; 10 (7) :1642
- 3) Shimizu S, Fukuda N, Chen L, et al. Abnormal epigenetic memory of mesenchymal stem and progenitor cells caused by fetal malnutrition induces hypertension and renal injury in adulthood. *Hypertens Res.* 2024;47 (9) :2405-2415
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

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、その仔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、雄の仔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、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tofelin、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⁾。

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

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思われる。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、日本大学医学部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、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、身体的および生化学的測定を行った。

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（ImpediVETTM: 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. 血清リポタンパクの分画

血清リポタンパク質は、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（Lipo-SEARCH®; 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。リポタンパク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 Mini-prep 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（5mm ϕ および 3mm ϕ ）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1500 μL 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°C で1500 rpm、120秒のホモジナイズを2サイクル行った。次に、2300 $\times\text{g}$ 、5分間、 4°C で遠心分離を行い、高分子成分を除去した。次に、400 μL の上清を採取し、9100 $\times\text{g}$ 、 4°C 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、50 μL 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, $p < 0.01$)。

3.2. 血糖値, IRI, HOMA-IRについて

空腹時血糖値は、両群間に有意差はなかった (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 (22.0 μ IU/mL vs. 47.0 μ IU/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, $p = 0.02$)。

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。

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, $p = 0.06$)、尿で有意に高かった (35.8 mg/dL vs. 54.6 mg/dL, $p = 0.02$)。

3.5. 血清リポタンパク質分画

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, $p = 0.26$)。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, $p = 0.01$)。

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, $p = 0.25$)。

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 ($p < 0.01$, $p = 0.04$, $p = 0.01$)。

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。

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PPAR α 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PPAR α の発現を増加させ、PPAR α 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、PPAR α 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⁾。

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。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)}。

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) PD Gluckman, MA Hanson. Living with the past: Evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004;305 (5691):1733–1736.
- 3) R Uauy, J Kain, C Corvalan. How can the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis contribute to improving health in developing countries? *Am J Clin Nutr* 2011;94 (6 Suppl):1759–1764.
- 4) C Kunz, B Lönnerdal. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Paediatr* 1992;81 (2):107–112.
- 5) K Marshall. Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev* 2004;9 (2):136–156.
- 6) K Nonogaki, T Kaji. 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 (1):15784.
- 7) SC Bodine, TN Stitt, M Gonzalez, 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 (11):1014–1019.
- 8) H Kume, K Okazaki, H Sasaki. Hepatoprotective Effects of Whey Protein on D-Galactosamine-Induced Hepatitis and Liver Fibrosis in Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70 (5):1281–1285.
- 9) K Sugawara, H Takahashi, T Sugawara, et al. Effect of Anti-Inflammatory Supplementation with Whey Peptide and Exercise Therapy in Patients with COPD. *Respir Med* 2012;106 (11):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 (3):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 (9):1045–1055.
- 12) R Kuwabara, T Urakami, K Yoshida, 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 (5):1366–1369.
- 13) N Nagano, C Kaneko, S Ohashi, 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 (14) :8560.
- 14) TA Moore, IM Ahmad, MC Zimmerman. Oxidative Stress and Preterm Birth: An Integrative Review. *Biol Res Nurs* 2018;20 (5) :497–512.
 - 15) MC Kander, Y Cui, Z Liu. Gender difference in oxidative stress: A new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *J Cell Mol Med* 2017;21 (5) :1024–1032.
 - 16) AG Huebschmann, RR Huxley, WM Kohrt, et al. Sex differences in the burden of type 2 diabetes and cardiovascular risk across the life course. *Diabetologia* 2019;62 (10) :1761–1772.
 - 17) M Hashemilar, M Khalili, N Rezaeimanesh, 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 (1) :135–140.
 - 18) EL Lien, FG Boyle, JM Wrenn, RW Perry, CA Thompson, JF Borzelleca. Comparison of AIN-76A and AIN-93G diets: A 13-week study in rats. *Food Chem Toxicol* 2001;39 (4) :385–392.
 - 19) DR Matthews, JP Hosker, AS Rudenski, et al. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28 (7) :412–419.
 - 20) HC Lukaski, PE Johnson, WW Bolonchuk, et al. Assessment of fat free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body. *Am J Clin Nutr* 1985;41 (4) :810–817.
 - 21) M Okazaki, S Yamashita. 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 (4) :265–282.
 - 22) S Usui, Y Hara, S Hosaki, 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 (5) :805–814.
 - 23) M Okazaki, S Usui, M Ishigami, 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 (3) :578–584.
 - 24) Y Ohashi, A Hirayama, T Ishikawa, et al. Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS. *Mol Biosyst* 2008;4 (2) :135–147.
 - 25) T Ooga, H Sato, A Nagashima, et al. Metabolomic anatomy of an animal model revealing homeostatic imbalances in dyslipidaemia. *Mol Biosyst* 2011;7 (4) :1217–1223.
 - 26) M Sugimoto, DT Wong, A Hirayama, et al. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 2010;6 (1) :78–95.
 - 27) H Yamamoto, T Fujimori, H Sato, 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) J Berger, MD Leibowitz, TW Doebber, et al. Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) γ and PPAR δ Ligands Produce Distinct Biological Effects. *J Biol Chem* 1999;274 (10) :6718–6725.
 - 29) K Takeuchi, C Yokouchi, H Goto, 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 (1-4) :203–210.
 - 30) T Suganami, Y Ogawa. Adipose tissue macrophages: Their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol* 2010;88 (1) :33–39.
 - 31) S Furukawa, T Fujita, M Shimabukuro, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Investig* 2004;114 (12) :1752–1761.
 - 32) T Nomiya, Y Igarashi, H Taka, 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 (3) :639–647.
 - 33) G Bounous, P Gold. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: Role of glutathione. *Clin Investig Med* 1991; 14 (4) : 296–309.
 - 34) R Franco, JA Cidlowski. Apoptosis and glutathione: Beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 2009;16 (10) :1303–1314.
 - 35) K Prokopidis, M Mazidi, R Sankaranarayanan, 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 (5) :759–770.
 - 36) B Beauchamp, S Ghosh, MW Dysart, et al. Low birth weight is associated with adiposity, impaired skeletal muscle energetics and weight loss resistance in mice. *Int J Obes* 2015;39 (4) :702–711.
 - 37) JJ Hulmi, CM Lockwood, JR Stout. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutr Metab* 2010;7:51.
 - 38) DB Andersen, BJ Holub. The Relative Response of Hepatic Lipids in the Rat to Graded Levels of Dietary Myo-Inositol and Other Lipotropes. *J Nutr* 1980;110 (3) :496–504.
 - 39) LM Croze, ER Vella, NJ Pillon, et al. Chronic treatment with myo-inositol reduces white adipose tissue accretion and improves insulin sensitivity in female mice. *J Nutr Biochem* 2013;24 (2) :457–466.
 - 40) T Matsubasa, T Uchino, S Karashima, et al. Oxidative stress in very low birth weight infants as measured by urinary 8-OHdG. *Free Radic Res* 2002;36 (2) :189–193.
 - 41) P Gupta, M Narang, BD Banerjee, 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) C Sánchez, L Franco, P Regal, et al. Breast Milk: A source of functional compounds with potential application in nutrition and therapy. *Nutrients* 2021;13 (3) :1026.

- 43) A Aycicek, O Erel, A Kocyigit, et al. Breast milk provides better antioxidant power than does formula. *Nutrition* 2006;22 (6) :616–619.
- 44) A Walker. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr* 2010;156 (2 Suppl) :S3–S7.
- 45) AR Corrochano, V Buckin, PM Kelly, et al. Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. *J Dairy Sci* 2018;101 (6) :4747–4761.

ミトコンドリア標識に最適な赤色蛍光タンパク質の比較検討

太向勇¹⁾, 高野智圭²⁾, 三木敏生¹⁾

Comparative examination of red fluorescent proteins for labeling mitochondria

Isamu TAIKO¹⁾, Chika TAKANO²⁾, Toshio MIKI¹⁾

要旨

近年, ミトコンドリアトランスファーと呼ばれるミトコンドリアの機能が低下した細胞へ正常なミトコンドリアが輸送される細胞間の相互作用についての研究が, ミトコンドリアの機能不全の治療法への応用として期待されている。ミトコンドリアトランスファーの研究では, ドナーとレシピエントのミトコンドリアをそれぞれ異なった色で標識する必要がある。本研究で我々は4種類の赤色蛍光タンパク質についてミトコンドリアの標識に最も適切なものはどれか比較検討した。その結果, 一部の赤色蛍光タンパク質は凝集体を形成することを発見した。また, 比較した中で最も適切であると判断したTurboRFPを用いて実際にミトコンドリアトランスファーを検出することに成功した。

1. はじめに

ミトコンドリアは細胞内のATP産生をはじめとして, アポトーシスやカルシウムイオンの貯蔵など細胞の生存を左右する様々な細胞の機能に密接に関与しており, ミトコンドリアの機能不全は様々な疾患の原因になることが知られている。しかしながら, 一度低下したミトコンドリアの機能を回復させる現実的な方法は現在のところ確立されておらず, ミトコンドリアの機能不全を根本的に治療することは不可能である。ミトコンドリアの機能を回復させる方法として, ミトコンドリアトランスファーと呼ばれる細胞間におけるミトコンドリアの輸送プロセスの応用が有望視されている¹⁾。ミトコンドリアトランスファーはミトコンドリアゲノムの損傷などによりミトコンドリアの機能が低下した細胞に対して, 健康なミトコンドリアを保持する細胞がミトコ

ンドリアを能動的に輸送する細胞間相互作用である。細胞間でのミトコンドリア輸送の可能性は2005年にKoyanagiらによって血管内皮細胞と心筋細胞との間で最初に報告された²⁾。より決定的な報告として翌年Speesらによって, ミトコンドリアDNAを欠損した(ρ 0) A549ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株に骨髄間葉系間質細胞が健康なミトコンドリアを輸送することが報告された³⁾。またこれにより, ミトコンドリア機能の欠損により失われたはずの, 好気呼吸による酸化的リン酸化を経たATP合成が回復することも報告された。これ以降ミトコンドリアトランスファーに関する研究は, ミトコンドリアの機能不全を回復させる試みを含め, 盛んに行われている。最近では, 2021年にBrestoffらによってマウス生体内で脂肪細胞からマクロファージへとミトコンドリアが輸送されることが示され, ミトコンド

1) 日本大学医学部生体機能医学系生理学分野
2) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野
責任者連絡先: 太向勇, taiko.isamu@nihon-u.ac.jp

リアトランスファーの治療への応用の期待が益々高まっている⁴⁾。

ミトコンドリアトランスファーの研究は間葉系間質細胞を中心に行われているがそれ以外にも様々な細胞がミトコンドリア輸送能を持っていることが示されている。中でもヒト羊膜上皮細胞はミトコンドリアトランスファーのドナー細胞として高い潜在性を有していると考えられる。羊膜上皮細胞は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。羊膜上皮細胞は比較的未分化な細胞であり、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、ミトコンドリアトランスファーのドナーとしても高い有用性があると考えられる^{5,6)}。

細胞間でミトコンドリアが輸送されるプロセスとして、細胞間の直接的な接触による輸送、細胞融合、細胞外小胞輸送等の仮説が考案されている^{7,8)}。中でも、membrane nanotubesあるいはtunneling nanotubes (TNTs) と呼称される細胞間を繋ぐ管状の構造を介した輸送方法は、ドナー細胞からレシピエント細胞への直接的な輸送方法として注目されている⁹⁾。TNTsを介したミトコンドリア輸送では他のメカニズムに比べて、より輸送先の細胞の指定が容易であり、狙った細胞に特異的にミトコンドリアを輸送する方法として最適であると考えられる。しかしながら、TNTsを介したミトコンドリアトランスファーにおいて、ドナー細胞がどのように標的のレシピエント細胞を認識しているのか等の治療への応用に必要な詳しいメカニズムは全く解明されておらず、今後の研究が必要となっている。

ミトコンドリアトランスファーの研究において必須とされるのが、ミトコンドリアの標識方法である。最も一般的に使われるミトコンドリアの標識方法はテトラメチルローダミンメチルエステル (TMRM) やMitoTrackerといった蛍光小分子化合物を用いた方法である。しかしながら、これら蛍光小分子化合物では長期間の標識は不可能であり、通常数日間の培養期間を要するミトコンドリアトランスファーの研究には不向きである。また、これら蛍

光小分子化合物は全くの無毒ということではなく、ミトコンドリアの機能にわずかながら影響を与えることが知られており、ドナー細胞のミトコンドリアの機能を阻害してしまう恐れがある^{10,11)}。これらのことから、ミトコンドリアトランスファーの研究においては、蛍光小分子化合物以外の方法でミトコンドリアを標識する必要がある。その方法として使用されているのが、ミトコンドリアターゲティングシグナルを付加した蛍光タンパク質による標識方法である¹²⁾。特にEGFPは古くから様々な医学生物学研究に用いられており、その有用性は広く知られており、ミトコンドリアの標識にも頻繁に用いられている。EGFPの他にミトコンドリアトランスファーを研究する際にはドナー細胞とレシピエント細胞の両方の細胞を異なった色で標識することが求められる。緑色の次に最もよく使われるのは光学系でも広く普及している赤色であり、特にDsRedはミトコンドリアトランスファーの研究を含めしばしばミトコンドリアの標識に用いられる。しかしながら、DsRedは多量体を形成するタンパク質であり、凝集体を形成することが知られ、ミトコンドリアターゲティングシグナルを付与した場合にも正常にミトコンドリアに局在しない可能性がある¹³⁾。以上のことから、本研究ではミトコンドリアトランスファーの研究に最適なミトコンドリアを標識するための赤色蛍光タンパク質の比較検討を行った。でも

2. 対象及び方法

細胞培養

不死化ヒト羊膜上皮細胞はDMEM (Gibco) に10% FBS (ニチレイ)、200 uM L-Glutamine、1× 必須アミノ酸、1× Antibiotic-Antimycotic、55 uM 2-mercaptoethanol (いずれもGibco)、10 ng/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℃、5% CO₂で培養した。

レンチウイルスの作製及び感染

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p MD.2G (Addgene12260及び12259) をそれぞれ2:2:1の割合でポリエチレニミン (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 Biological Materials) で力価を計測し、hAECsにはMOI15-30となるように感染させた。

画像取得

ミトコンドリア及びライソソームの染色は100 nMのMitoTracker Green, Orange, CMTMRosもしくはLysoTracker Deep Red (Life Technologies) を37°C 30分のインキュベートにより行った。その後、培地で2回洗浄し37°Cで撮影した。

ミトコンドリアトランスファー実験ではEGFPを導入した細胞をコラーゲン及びポリLリジンでコートしたガラスボトムディッシュに播種し、300uMの過酸化水素を含む培地で60分処理した後、ミトコンドリア局在シグナルを付与したTurboRFPを導入した不死化AE細胞と20時間共培養した。その後MitoTracker Deep Redで上記同様に染色し、画像を取得した。

全ての画像は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP8, ライカ) で取得した。

細胞増殖試験

不死化AE細胞を50,000 cells/wellの密度で24wellプレートに播種後レンチウイルスにより各種遺伝子を導入した。その後96 wellプレートに50,000 cells/wellの密度で播種し、Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用い、488 nmの吸光度をInfinite 200 PROプレートリーダー (Tecan) を測定することで細胞増殖を測定した。

フローサイトメトリー

細胞は488nm (EGFP) と561nm (DsRed, mCherry, TurboRFP and mKO κ) のレーザーを備えた

FACS Aria (BD) で、フィルターの設定はそれぞれ530/30 nm (EGFP) もしくは582/15 nm (for DsRed, mCherry, TurboRFP and mKO κ) で行った。細胞は1週間ごとに継代し、レンチウイルスによる遺伝子の導入後6, 14, 21, 28 及び42日後に測定した。

3. 結果

ミトコンドリア局在タンパク質の設計

蛍光タンパク質はこれまでに様々な生物から様々な性質を持ったものがクローニングされ、度々なる改良により医学生物学研究に応用されている。その中から我々は1.赤色蛍光タンパク質の中でも比較的使用されている頻度の高いDsRedと2.そのモノマー型改良体であるmCherry、3.タンパク質の成熟が早い性質を保持したTurboRFP、4.比較的最近クローニングされたmKO κ の4種類の赤色蛍光タンパク質にEGFPを加えた5種類について、それぞれミトコンドリアターゲティングシグナルを付与することでミトコンドリアに局在させ、その性質を比較した。ミトコンドリアへの過度な外来タンパク質の集積を防ぐために、発現プロモーターは中程度の強さを持つhPGKプロモーターを採用した。また、ミトコンドリアへの局在を確実なものにする為に、ヒトCOX8A遺伝子のミトコンドリア標的シグナルを直列に重複させた。これらをそれぞれレンチウイルスベクターにクローニングし、本研究に用いた (図1)。本研究で使用した赤色蛍光タンパク質の特性を表1に示す。

今回作製したそれぞれのミトコンドリア局在蛍光タンパク質はMitoTrackerと共局在し、検出できるレベルでの細胞質への漏れ込みはなかった。TurboRFPおよびmKO κ に関しては正常なミトコンドリアの形態を保持しており、凝集体等の異常な構造

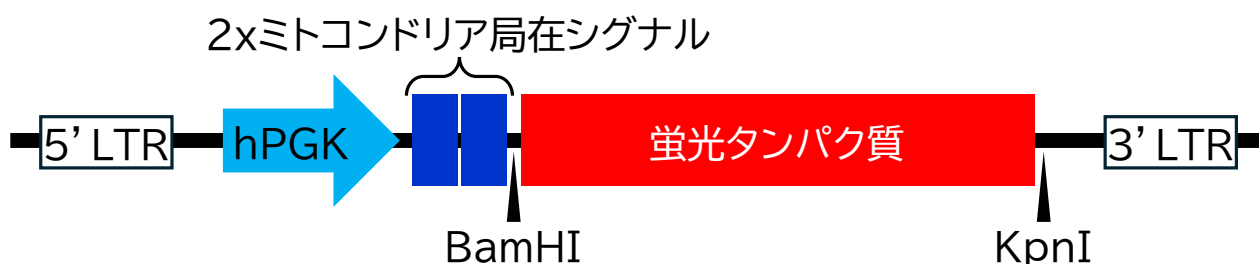


図1 本研究で用いたミトコンドリア局在蛍光タンパク質をコードしたレンチウイルスベクターのマップを示す。蛍光タンパク質はヒトPGKプロモーターにより発現する。それぞれの蛍光タンパク質は制限酵素BamHIとKpnIで交換可能である。

表1. ミトコンドリア局在赤色蛍光タンパク質の特性の比較

蛍光タンパク質の特性

タンパク質名	多量体形成	起源となった生物種	最大励起波長 (nm)	最大蛍光波長 (nm)	モル吸光係数	量子収率	pKa	成熟時間 (分)
EGFP	弱い2量体	Aequorea victoria	488	507	55900	0.6	6	25
DsRed	4量体	Discosoma sp	558	583	72,500	0.68	4.6	1600
mCherry	単量体	Discosoma sp	587	610	72,000	0.22	4.5	15
TurboRFP	2量体	Entacmaea quadricolor	553	574	92,000	0.67	4.4	90
mKO κ	単量体	Verrillifungia concinna	551	563	105,000	0.61	4.2	未報告

は観察されなかった (図2)。一方でDsRed及びmCherryに関してはそれぞれ $37 \pm 4.5\%$ 、 $54 \pm 5.5\%$ の細胞においてMitoTrackerと共染色されない、通常の細胞では観察されることのない球状の凝集体が主に核の周囲に観察された (図3)。凝集体が観察された細胞の多くは正常なミトコンドリアも保持していたが、中には凝集体が支配的な細胞も存在していた。これらの凝集体は正常なミトコンドリアに比べて明るく、蛍光タンパク質が凝集していることが示唆された。またこれらの凝集体は細胞に感染させるレンチウイルス量を極限まで減らしても出現し、ウイルス量に依存しないことから、過度な外来遺伝子

の導入によって起こったものではないことが示唆された。先行研究により、DsRed系列の蛍光タンパク質はしばしばライソソームに局在することが報告されている¹⁴⁾。ミトコンドリアに局在シグナルを付加したmCherryを発現させた不死化AE細胞をライソソーム染色試薬LysoTrackerで染色したところ、典型的なミトコンドリアの形状をしたmCherryは染色されなかった一方で、凝集体は共染色された (図4)。この結果から、ミトコンドリア局在シグナルをDsRed及びmCherryに付加してもライソソームに局在し得ることが示された。

次に我々は5種類の蛍光タンパク質をミトコンド

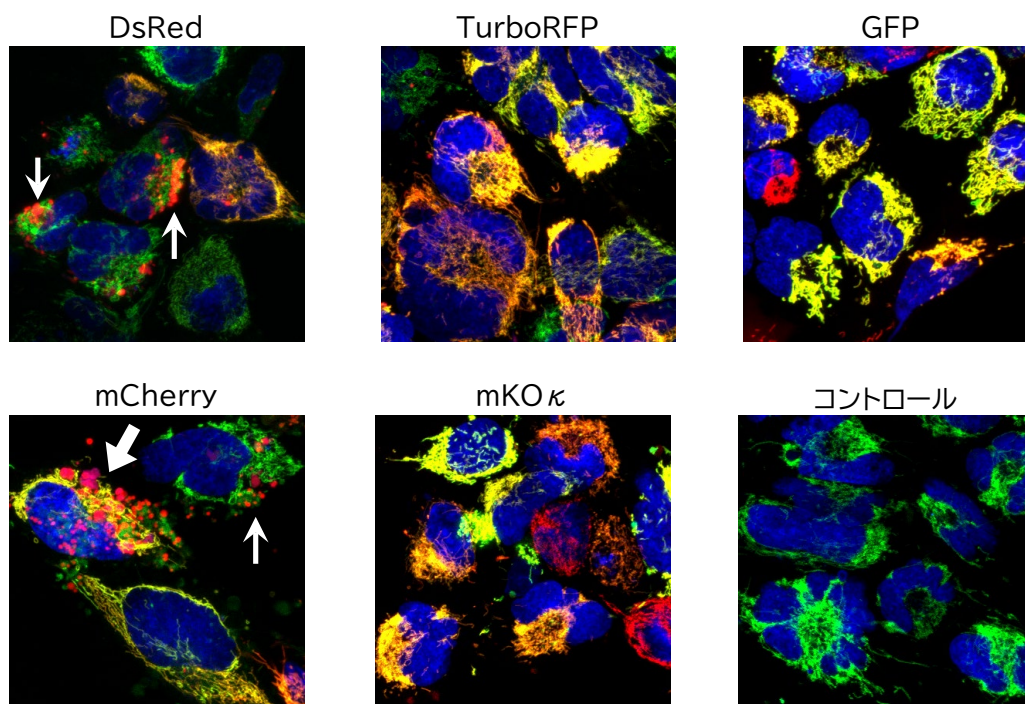


図2 ミトコンドリアに蛍光タンパク質を局在させた不死化AE細胞の蛍光画像。

青:ヘキスト33342。DsRed、mCherry、turboRFP、mKO及びコントロールは、緑:MitoTracker Green、赤:それぞれの蛍光タンパク質。EGFPは、緑:EGFP、赤:MitoTracker Orangeをそれぞれ示す。白い矢印はMitoTrackerと共染色されない凝集体を示す。

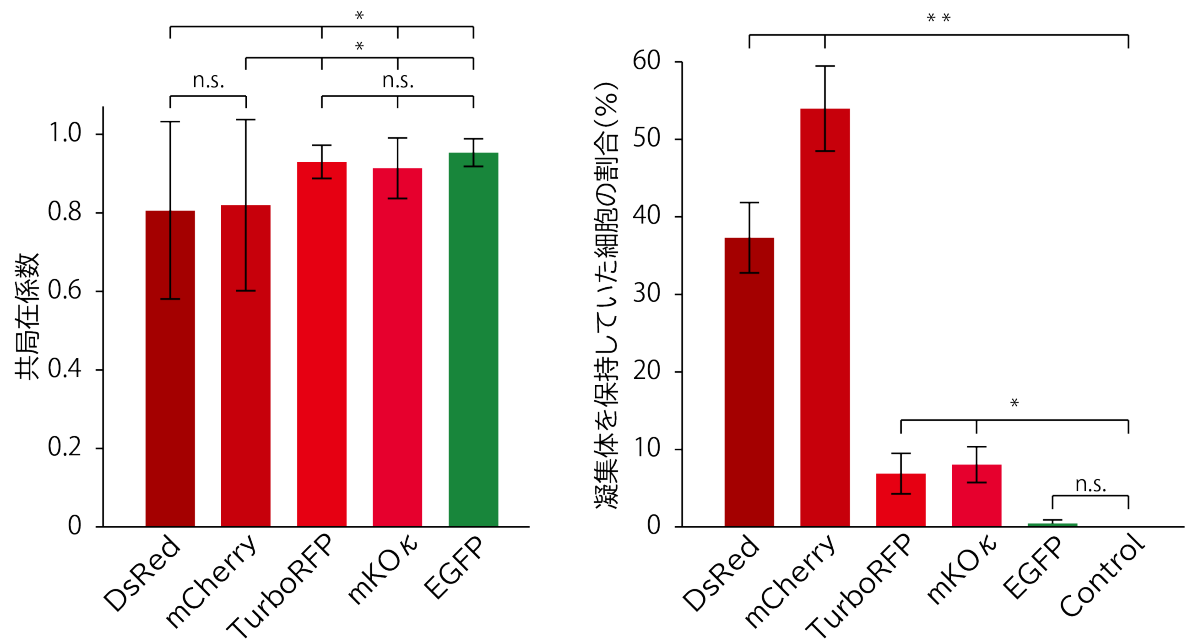


図3 (A) ミトコンドリア局在蛍光タンパク質とMitoTrackerの共局在係数を示す。それぞれ80細胞の平均 $\pm$ 標準偏差を示す。*: $p < 10^{-6}$ n.s.: not significant ($p > 0.05$); Tukey's HSD test。 (B) 凝集体を保持していた細胞の割合を示す。3回の試行の平均 $\pm$ 標準偏差を示す。それぞれの試行は7視野から最低でも80細胞の解析データを含む。**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ n.s.: not significant ($p > 0.05$); Tukey's HSD test

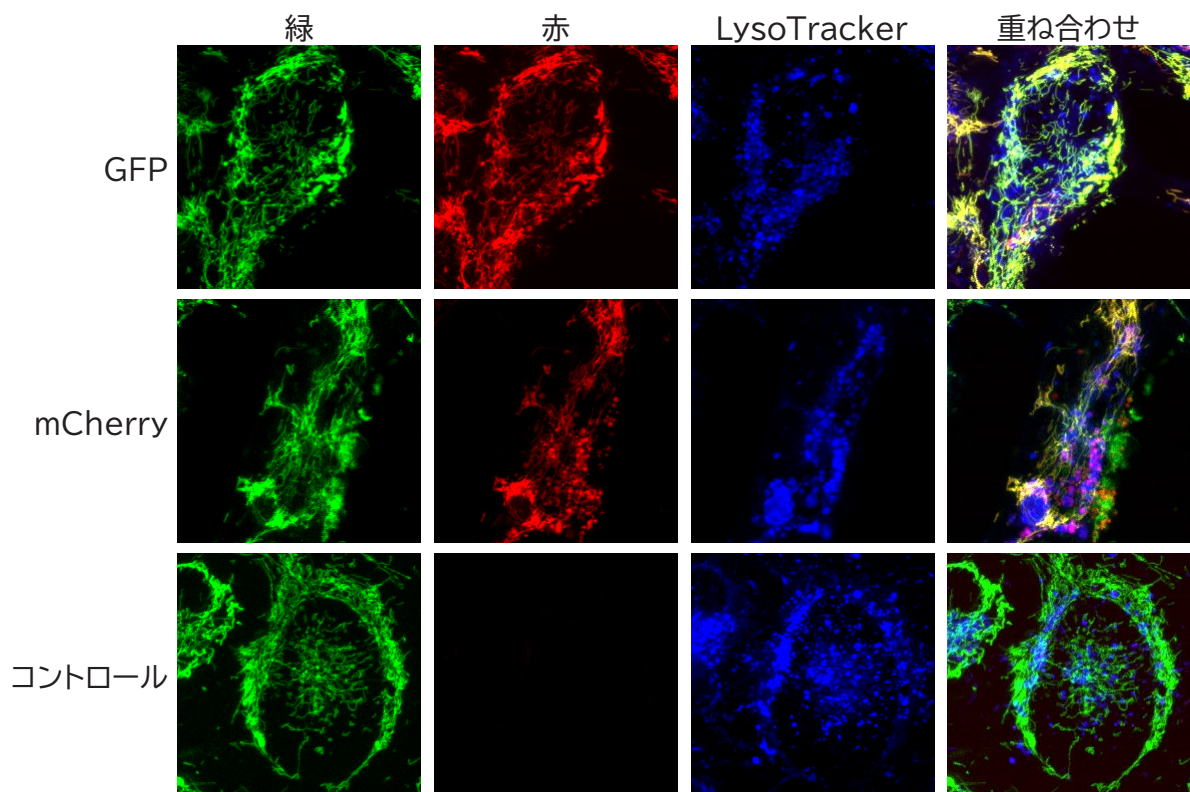


図4 ミトコンドリア局在蛍光タンパク質を発現させた不死化AE細胞をLysoTrackerで染色した蛍光画像を示す。青: LysoTracker blue、mCherry及びコントロール細胞では赤: mCherry、緑: MitoTracker Green、EGFPでは、緑: EGFP、赤: MitoTracker Orangeを示す。

リアに局在させたことによる細胞への影響について調べた。細胞の増殖を比較したところ、意外なことにいずれの蛍光タンパク質をミトコンドリアに局在させても細胞の増殖率に大きな変化はなかった (図5A)。また、いずれの蛍光タンパク質も1か月以上培養しても僅かな蛍光強度の変化は見られたものの、ミトコンドリア局在蛍光タンパク質を保持している細胞の割合に変化はなかった (図5B)。特筆すべきことに、EGFPはミトコンドリアに局在させても1か月以上蛍光強度に変化は見られなかった。

ミトコンドリアトランスファーの研究においては長期間の観察が必要となることから、用いる蛍光タ

ンパク質は十分な明るさのみならず、度重なる励起光の照射による蛍光退色耐性を保持している必要がある。そこで本研究で用いた4種類の赤色蛍光タンパク質について、共通の撮影条件下での蛍光強度と励起光による蛍光退色に対する安定性を比較した。一般的な赤色蛍光の撮影条件下ではTurboRFPが最も高い蛍光強度を示した。また蛍光退色に対する光安定性に関してはいずれも同程度であった (図6)。GFPのようにpH感受性の高い蛍光タンパク質はしばしば、パラホルムアルデヒド等による細胞固定により著しく蛍光強度が低下することが知られている。そこで我々は細胞固定によるそれぞれの蛍光強

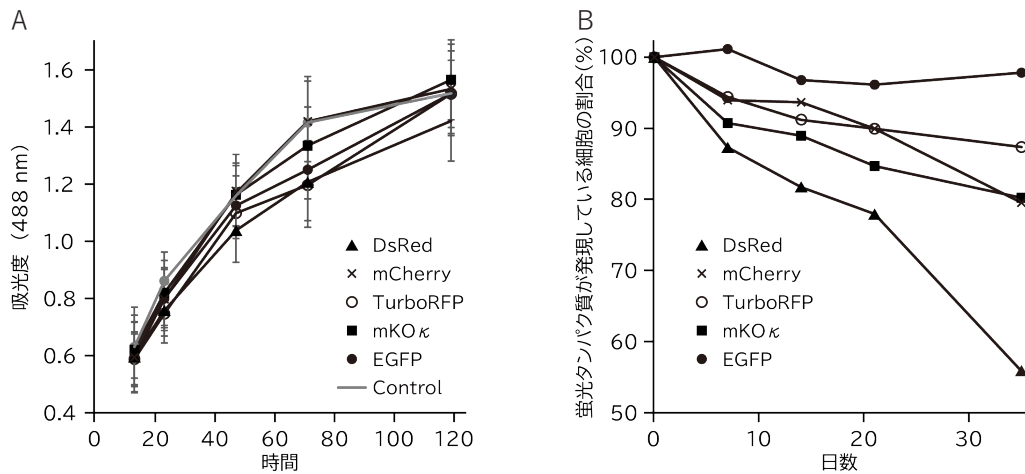


図5 (A) ミトコンドリア局在蛍光タンパク質を発現させた不死化AE細胞の増殖曲線を示す。それぞれ3回の試行の平均±標準偏差を示す。(B) 蛍光タンパク質陽性細胞の割合の時間変化を示す

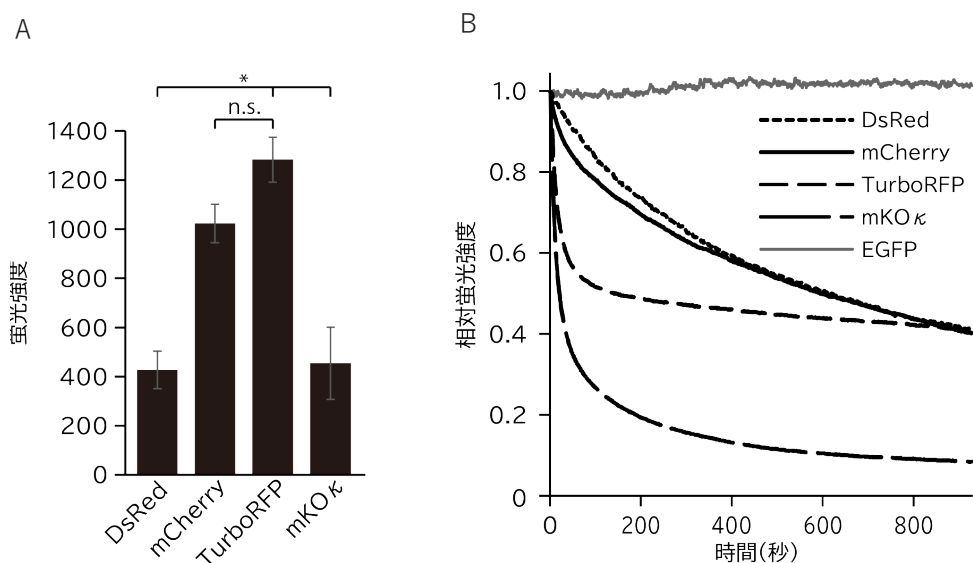


図6 (A) 不死化AE細胞に発現させたミトコンドリア局在蛍光タンパク質の明るさを示す。3回の試行の平均±標準偏差を示す。それぞれの試行は7視野から最低でも80細胞のデータを含む。n.s.: not significant ($p > 0.05$); Tukey's HSD test. (B) 蛍光退色の時間変化を示す。EGFPは488nmレーザーで励起したデータ、他は555nmのレーザーで励起したデータ。

度蛍光強度の変化を調べた。その結果EGFPは著しい蛍光強度の低下が観察されたが、赤色蛍光タンパク質は総じて変化はなかった。以上の結果から我々はTurboRFPがミトコンドリアトランスファーの研究において最適な赤色蛍光タンパク質と判断した。

TurboRFPを用いたミトコンドリアトランスファーの検出

実際にTurboRFPを用いてミトコンドリアトランスファーが検出できるかを検証した。先に述べたように、AE細胞はミトコンドリアトランスファーのドナーとして高い適正を持っている。そこで我々は不死化したAE細胞にミトコンドリア局在シグナルを付与したTurboRFPをレンチウイルスにより導入し、ドナー細胞とした。レシピエント細胞は低濃度の過酸化水素で処理したHEK293T細胞を用いた。ミトコンドリアゲノムは核ゲノムに比べてDNAダメージに感受性が高く、適切な濃度の過酸化水素で処理することで、ミトコンドリアゲノムにのみ損傷を与えることでミトコンドリアトランスファーのレシピエント細胞のモデルを簡易的に作製することができる¹⁵⁾。細胞の識別のためにEGFPで標識したレシピエントHEK293T細胞を100 uMの過酸化水素に60分間曝露した後ミトコンドリアにTurboRFPを発現させた不死化AE細胞と20時間共培養した。その後、膜電位依存的にミトコンドリアを染色でき、かつTurboRFPとEGFP励起・蛍光波長が重複しないMitoTracker Deep Redで染色し、プリズム分光を備えた共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、TurboRFPで標識されかつ、MitoTracker Deep Redでも染色されたミトコンドリアを保持するレシピエントのHEK293T細胞が多数存在することを確

認した。3D再構成画像による確認により、これらのミトコンドリアは単に293T細胞に重なっているのではなく、確かに細胞質内に存在することが確認された。

4. 考察

本研究で我々はミトコンドリア移行シグナルを付与したDsRed及びその単量体化誘導体であるmCherryを細胞に発現させると、ライソソームに局在する明るい凝集体を形成することを示した。これらの凝集体が細胞の機能に深刻な影響を与える証拠は見出せなかった。しかしながら、本来ミトコンドリアに局在することを意図した蛍光タンパク質がライソソームへ誤って局在することは、ミトコンドリアトランスファーの研究においては人為的な偽陽性を生じる得る致命的な問題となる。ライソソームは細胞内の不要物を分解する機能を持っており、その内容物はしばしば細胞外へと放出される。放出された内容物を他の細胞が貪食した場合、それがミトコンドリアトランスファーによって能動的に輸送されたものとの区別は困難である。これまでに、数多くのミトコンドリアトランスファーの研究においてDsRed及びmCherryがミトコンドリアの標識に使われているが^{16,17)}、それらの研究結果には注意を払う必要がある。

本研究ではミトコンドリア局在シグナルを付与したDsRed及びmCherryが何故ライソソームに局在するか明らかにできていない。本研究で用いたミトコンドリア局在シグナルやリンカー配列が影響を及ぼした可能性が考えられるが、他の蛍光タンパク質

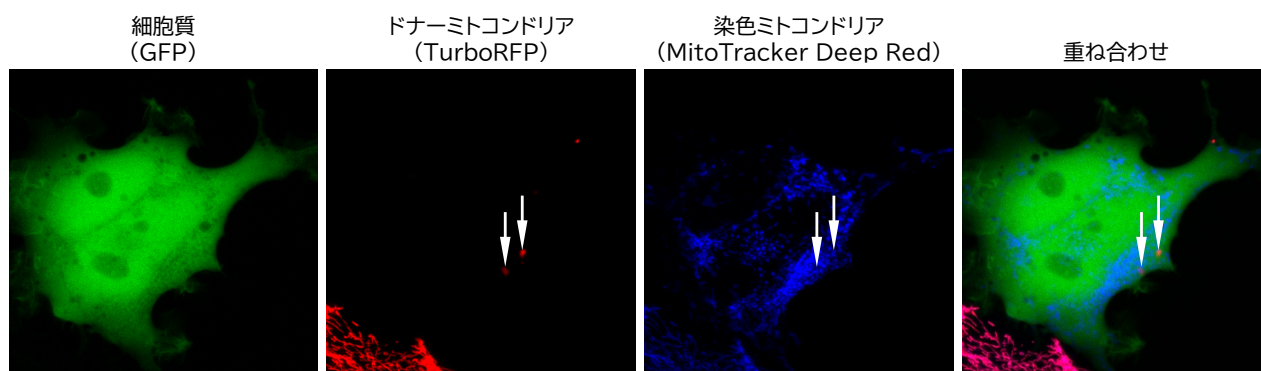


図7 ミトコンドリア局在TurboRFPを発現した不死化AE細胞から過酸化水素で処理した293T細胞にミトコンドリアが輸送された様子。白い矢印は転移したミトコンドリアを示す。

でも全くミトコンドリア局在シグナルとリンカー同じ配列を用いているが、凝集体は確認されていない。また、過度な外来遺伝子の発現はしばしばライソソームへの凝集を引き起こす可能性が考えられる。しかしながら、感染させるウイルスの力価を下げてライソソームへの凝集は観察されることに加え、本研究では比較的弱いヒトPGKプロモーターにより発現させているためライソソームへの凝集を引き起こすほど多量のタンパク質が発現していることは考えられず、否定される。Katayama等による報告ではゴルジ複合体へのmCherryの局在も同様にライソソームへの凝集を引き起こすことから¹⁴⁾、DsRed及びその誘導体の内在的な性質によるものと推察される。

本研究では、hAECsが過酸化水素で障害を与えた細胞にミトコンドリアを輸送する能力を持つことを示した。本研究で用いたhAECsはミトコンドリアトランスファーのドナー細胞として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ミトコンドリアゲノムへのダメージの蓄積が無く、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^{18,19)}。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²⁰⁾。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をミトコンドリアのドナー細胞としてミトコンドリアの損傷による疾患の治療への応用に向けた研究がさらに進むことが期待される。

5. 結語

本研究で我々は4種類の赤色蛍光タンパク質についてミトコンドリアに局在させた際の性質について比較検証した。その中でDsRed及びmCherryは少ない確率で細胞のライソソームにも局在することを示した。さらに我々はTurboRFPでミトコンドリアを標識したヒト羊膜上皮細胞がミトコンドリアを損傷した細胞へミトコンドリアを輸送する能力があることを示した。

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) Mohammadaliipour A, Dumbali SP, Wenzel PL. Mitochondrial Transfer and Regulators of Mesenchymal Stromal Cell Function and Therapeutic Efficacy. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:1519.
- 2) Koyanagi M, RP Brandes, J Haendeler, AM Zeiher, S Dimmeler. Cell-to-Cell Connection of Endothelial Progenitor Cells With Cardiac Myocytes by Nanotubes. *Circ Res*. 96 2005;96 (10) :1039–1041.
- 3) JL Spees, SD Olson, MJ Whitney, DJ Prockop, Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103 (5) :1283–1288.
- 4) JR Brestoff, et al. Intercellular Mitochondria Transfer to Macrophages Regulates White Adipose Tissue Homeostasis and Is Impaired in Obesity. *Cell Metab* 2021;33 (2) :270-282.e8.
- 5) Miki T, Yasuda S, Kahn M. Wnt/ β -catenin Signaling in Embryonic Stem Cell Self-renewal and Somatic Cell Reprogramming. *Stem Cell Rev Rep* 2011;7 (4) :836–846.
- 6) 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 (6) :829–835.
- 7) A Acquistapace A. et al. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. *Stem Cells* 2011;29 (5) :812–824.
- 8) Islam, M. N. et al. Mitochondrial transfer from bone marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat. Med.* 18, 759–765 (2012) .
- 9) J Pasquier. et al. Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *J Transl Med* 2013;11:94.
- 10) Zielonka J. et al. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem Rev* 2017;117 (15) :10043–10120.

- 11) C Sargiacomo, S Stonehouse, Z Moftakhar, F Sotgia, MP Lisanti. MitoTracker Deep Red (MTDR) Is a Metabolic Inhibitor for Targeting Mitochondria and Eradicating Cancer Stem Cells (CSCs) , With Anti-Tumor and Anti-Metastatic Activity In Vivo. *Front Oncol* 2021;11:678343.
- 12) R Rizzuto, M Brini, P Pizzo, M Murgia, T Pozzan. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr Biol* 1995;5 (6) :635–642.
- 13) RE Campbell. et al. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99 (12) :7877–7882.
- 14) H Katayama, A Yamamoto, N Mizushima, T Yoshimori, A Miyawaki. GFP-like Proteins Stably Accumulate in Lysosomes. *Cell Struct Funct* 2008;33 (1) :1-12.
- 15) SW Ballinger. et al. Hydrogen Peroxide- and Peroxynitrite-Induced Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 2000;86 (9) :960–966.
- 16) L Gao, Z Zhang, J Lu, Pei G. Mitochondria Are Dynamically Transferring Between Human Neural Cells and Alexander Disease-Associated GFAP Mutations Impair the Astrocytic Transfer. *Front Cell Neurosci* 2019;13:316.
- 17) L-F Dong, et al. Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells. *eLife* 2017;6:e22187.
- 18) T Miki, T Lehmann, H Cai, DB Stolz, SC Strom. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells* 2005;23 (10) :1549–1559.
- 19) S Ilancheran, et al. Stem Cells Derived from Human Fetal Membranes Display Multilineage Differentiation Potential. *Biol Reprod* 2007;77 (3) :577–588.
- 20) T Miki. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. *Am J Reprod Immunol* 2018;80 (4) :e13003.

ヒト羊膜上皮細胞における運命決定機構の解明 ～非古典型 Wnt シグナル経路の探索～

高野智圭¹⁾, 加賀三鈴²⁾, 太向勇²⁾, 相澤(小峯)志保子¹⁾, 三木敏生²⁾

Elucidation of fate determination mechanisms in human amniotic epithelial cells ～ Exploring the non-canonical Wnt signaling pathway～

Chika TAKANO¹⁾, Millei KAGA²⁾, Isamu TAIKO²⁾, Shihoko KOMINE-AIZAWA¹⁾, Toshio MIKI²⁾

要旨

ヒト羊膜上皮細胞 (hAEC) は胎盤を覆う羊膜から分離できる多能性幹細胞である。我々はこれまでに hAEC の多能性および分化の制御機構について検討し、hAEC の自発的分化には TGF- β 経路に依存する上皮間葉転換が関与することを示した。さらに一連のプロセスには Wnt/ β -catenin 経路の介在がある可能性を見出し、hAEC における古典型 Wnt 経路のスイッチング機構について解析を進めてきた。しかし他の多能性幹細胞では古典型 Wnt 経路のみならず非古典型 Wnt 経路もこのスイッチング機構に影響を及ぼすことが示唆されており、我々も先行研究で非古典型 Wnt 経路の重要なリガンドである WNT5A の mRNA 発現上昇を捉えていたことから、本研究では β -catenin に依存しない非古典型 Wnt 経路について解析することを目的とした。相対定量プロテオーム解析を用いて hAEC における網羅的蛋白発現を解析し、非古典型 Wnt 経路および関連蛋白の翻訳後修飾を抽出することが出来た。hAEC の分化には Wnt/PCP 経路をはじめとする複数のシグナル伝達経路が関与することが示唆され、今後さらなる解析を重ねて hAEC の運命決定機構に関する新たな知見に繋げたい。

1. はじめに

ヒト羊膜上皮細胞 (human amnion epithelial cells: hAEC) は胎盤の羊膜を覆う一層の上皮細胞である。胎生初期の幹細胞と同じ表面マーカーを発現し、三胚葉に分化する能力を持つことから、「胎盤由来幹細胞」のひとつと考えられている¹⁾。遺伝子的に比較的安定で腫瘍原性がないこと、免疫原性が低いことから、臨床応用つまり細胞移植治療に適した細胞と考えられている^{2,3)}。また細胞自体は通常分娩後に破棄される胎盤から容易に、かつ大量に分離できるため、ドナーへの侵襲はなく、実用可能性も高い。成熟肝細胞への分化能を有することから、これまでに先天性代謝異常症、特にアミノ酸代謝異常症やライソゾーム病の疾患モデルマウスを用いて、その治療

効果が明らかにされてきた^{4,5)}。その作用機序は移植された hAEC が肝臓内で機能的肝細胞に分化し、先天的に欠失していた酵素を作り出すことによる病態改善と考えられる。これらの知見より hAEC は先天性肝代謝異常症に対する細胞移植の有力な細胞源になり得る。

hAEC を細胞移植のソースとして用いることを考える場合、「多能性の制御」は生着効率や治療効果に影響する最も重要な因子である。我々は hAEC が持つ多能性の維持や、分化の制御に関わる分子機序について研究を行ってきた。胎盤から分離した hAEC は *in vitro* で培養を始めると直ちに TGF- β 依存性の上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) を起こす。TGF- β の Type I レセプター

1) 日本大学医学部 病態病理学系微生物学分野,
2) 日本大学医学部 生体機能医学系生理学分野
責任者連絡先: 高野智圭, takano.chika@nihon-u.ac.jp

(ALK5) 選択的阻害剤であるSB-431542を用いてEMTを抑制すると、hAEC特有の上皮様形態を維持したまま細胞を培養することができる。我々は過去にRNA-seqを用いた網羅的トランスクリプトーム解析により、TGF- β 依存性EMTを起こしたhAECは三胚葉への分化を示唆する遺伝子が優位に発現する一方、TGF- β 依存性EMTを抑制したhAECは多能性を示唆する遺伝子発現が優位であることを見出した。さらに細胞免疫染色や細胞表面糖鎖の解析等から「TGF- β 依存性EMTを抑制することによりhAECの多能性が保持される」ことを2022年に報告した⁶。哺乳類における他の多能性幹細胞においても、EMTが起こるにつれて細胞の多能性が失われるという報告があり、上記はそれに一致する結果であった。しかしながら、TGF- β 経路がhAECの多能性/分化に与える影響は直接的作用か、間接的作用かについて、さらなる解析が必要と考えられた。我々はRNA-seq解析の結果から、Wnt/ β -catenin経路の標的遺伝子も二群間で大きく変化することを見出していた。Wnt経路は胚発生における機能が知られており、体軸パターンの決定や細胞運命の決定などに関与するため、hAECにおける運命決定のプロセスにも介在している可能性が示唆された。

多能性幹細胞におけるWnt/ β -catenin経路には単なるON/OFFだけではなく、特有のスイッチング機構があることが知られている。核内に移行した β -cateninがp300もしくはCBPどちらのコアクターと複合体を形成するかにより、分化もしくは自己複製の細胞運命が決まるとされている(図1)。さらにここで重要な鍵を握るDNA結合蛋白としてT cell factor (TCF) familyが知られている

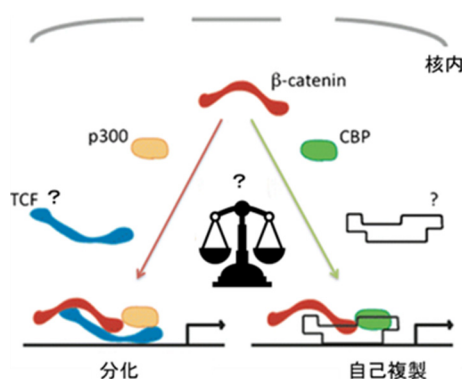


図1 Wnt/ β -catenin経路のスイッチング機構

が、自己複製に関わるCBPと複合体を形成するDNA結合蛋白は未だ不明であり⁷、特にhAECについてこの機序を検討した報告はない。前述のように我々は先行研究にて、TGF- β 依存性EMTを起こしたhAECと抑制したhAECでは、Wnt/ β -catenin経路の標的遺伝子発現が大きく異なることを見出した。DNA結合蛋白に関わる過去の報告を交えて遺伝子発現パターンを考察し、hAECにおいては「TCF7L2が β -catenin/p300と複合体を形成すると分化の運命決定がされ、TCF7L1が β -catenin/CBPと複合体を形成すると自己複製、つまり多能性維持の運命決定がされる」と仮説を立てた。本仮説については科学研究費助成事業の助成を受けて現在検証中である。

RNA-seq解析の結果では、培養したhAECにおいてWnt関連遺伝子であるWNT5AのmRNA発現上昇が見られていたことから、「古典型」Wnt経路のみならず β -cateninに依存しない「非古典型」Wnt経路も関与する可能性が示唆された。そこで本研究では、定量的プロテオーム解析を用いて、TGF- β 阻害剤を用いて培養した細胞と対照群における蛋白発現を比較し、hAECにおけるTGF- β 経路の部分的な不活化が非古典型Wnt経路に及ぼす影響を解析することを目的とした。さらには二群間における蛋白の翻訳後修飾を検出しPathway解析を行うことで、これまで着目してこなかった新たな制御機構を見出し、今後の研究の発展に繋がる知見を得ることを目的とした。

2. 対象及び方法

2-1. hAECの分離

日本大学医学部附属板橋病院 産婦人科で、研究対象者に研究内容を説明し、書面で同意書を取得した。患者選択基準は下記である。

- ① 本研究への参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、研究対象者本人または代諾者の自由意思による文書同意が得られた者
- ② 健常な妊産婦
- ③ 帝王切開術を予定されている者
- ④ HIVや肝炎ウイルスなどの感染症に罹患していない者（術前検査で確認）
- ⑤ 胎盤の病理検査を提出しない者

帝王切開手術の際に摘出された胎盤を収集した。

無菌操作にて羊膜を剥離し、十分な洗浄後、トリプシンによる酵素処理によりhAECを分離した。(倫理委員会承認番号：RK-220412-6)

2-2. hAECの培養

初代hAECは基本培地として、ダルベッコ改変イーグル高グルコース培地 (DMEM high glucose) に10%ウシ胎児血清, 1%非必須アミノ酸, 2mM L-グルタミン, 55 μ M 2-メルカプトエタノール, 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを加えた培地を用いて7日間培養した (Control群)。TGF- β 依存性EMTを阻害する目的で先行研究より使用しているTGF- β type Iレセプター (ALK5) の選択的阻害剤であるSB-431542を基本培地に10 μ M添加し, 同じく7日間培養した (SB-treated群)。いずれも37°C, 5% CO₂ 下で培養した。

2-3. 検討に用いるhAECの選出

異なる6名の妊婦から分離したhAECを培養し, 細胞接着率, 細胞生存数を記録し, 状態の良い3検体を検討に用いた。SB-431542を添加するとSMAD2/3のリン酸化が阻害され, そのフィードバックによりSMAD7のmRNA発現が上昇することが知られているため, 培養細胞からRNAを抽出し, Control群とSB-treated群におけるSMAD7発現解析を行い, 細胞の選出の指標とした。

2-4. プロテオーム解析

3検体のhAECを前述の2種類の培地で7日間培養し, それぞれControl群とSB-treated群の計6サンプルから, リン酸化阻害剤を含むタンパク質抽出試薬を用いて蛋白抽出を行った。その後の相対定量プロテオーム解析は, アプロサイエンスグループに委託した。ペプチドペアの同時同定と相対的定量化を行うため, 6サンプルはアイソバリック標識タンデム質量タグ (TMT pro TM 18plex Label Reagent Set) を用いて標識し, イオンクロマトグラフィーにはICAT[®] Cation Exchange Buffer Packを用いて, LC-MS/MS分析に供された。一部のサンプルはTitansphere[®] Phos-TiO Kitを用いてリン酸化ペプチドの精製・濃縮を行った後に, LC-MS/MS分析に供された。納品されたデータをもとに, Proteome Discoverer 3.0を用いて定量解析や二群間比較解析を実施した。

3. 結果

3-1. 蛋白定量解析

Control群とSB-treated群の計6サンプルの定量的プロテオーム解析により, 2332個のマスター蛋白が同定された。正規化された蛋白質量はサンプルによる個体差を認めなかった。PCA plotでSB-treated群にはやや個体間のばらつきが認められた。発現蛋白全体でエンリッチメント解析を行うと, 生物学的プロセスではCell organization and biogenesisおよびOther metabolic/ biological processesに関わる発現が高いことが示され, 一方でCell deathに関わる蛋白はほとんど検出されなかった。細胞の構成要素ではCytosol由来蛋白と同程度にNucleus由来蛋白も含有されていた。

個々の蛋白発現に着目するとControl群およびSB-treated群ともにWnt5aの発現が検出された。Wnt/ β -catenin経路に関わる蛋白を広くスクリーニングしたところ, 56の候補蛋白を抽出することが出来た。古典型Wnt経路であるTCF dependent signaling in response to WNTに関する蛋白発現のみならず, 非古典型Wnt経路である β -catenin independent WNT signalingのうち, PCP/CE pathway, Ca²⁺ pathway, WNT5A-dependent internalization of FZD4およびWNT5A-dependent internalization of FZD2, FZD5 and ROR2に関する蛋白が発現していた。

3-2. 発現変動蛋白の抽出

発現変動蛋白の統計解析処理により, 差次的発現する (P-value<0.05, Log2fold>0.5) 蛋白をControl群で42個, SB-treated群で55個抽出することが出来た。上位蛋白はcell organization and biogenesis, cell adhesion, protein metabolism, signal transductionに関わる蛋白であり, 予想通り上皮の増殖や接着に関わる蛋白発現が多かった。興味深いことに, Pathway解析では非古典型Wnt経路のWnt/PCP経路で重要な役割を果たすRho GTPaseファミリーに関する複数の蛋白が検出された。その他, 脱ユビキチン化酵素など翻訳後修飾に関わる蛋白も複数抽出することが出来た。

3-3. 蛋白質の翻訳後修飾

全マスター蛋白2332個のうち, 408個の蛋白のリン酸化が検出された。発現変動解析を行うとSB-

treated群の方が発現蛋白の翻訳後修飾が多いことがわかり、hAECにおけるTGF- β 経路のSMAD2/3のリン酸化阻害による他経路の活性化をスクリーニングすることが出来た。さらにSB-treated群で有意に発現する(P-value<0.05, Log2fold>0.5)蛋白を18個抽出することが出来た。上位蛋白はprotein metabolismに関わる蛋白であり、上記と同様に脱ユビキチン化酵素が含まれた。Pathway解析ではRho GTPaseファミリーや、同じくWnt/PCP経路で重要な役割を果たすRac1 GTPaseのリン酸化修飾が検出された。さらに β -catenin自体の翻訳後修飾を網羅的に解析することができ、Control群およびSB-treated群ともに特異的なセリンのリン酸化が検出された。

(図表や蛋白質名の詳細は別途学術誌に投稿予定のため掲載を控えた。)

4. 考察

本研究ではリン酸化蛋白質の相対定量プロテオーム解析により、培養した初代hAECの網羅的な蛋白発現を明らかにすることが出来た。さらに、EMTにより多能性と分化に影響を及ぼすTGF- β 経路の遮断による発現変動蛋白と翻訳後修飾が明らかとなった。hAECは胚盤胞を起源とする胎児由来の細胞であるが、胚発生に関わるWnt経路がhAECの分化にも関わることを示された。

前述のように我々が先行研究で行ったRNA-seq解析では、培養したhAECにWNT5AのmRNA発現の上昇を認めていたが、今回の解析でもControl群およびSB-treated群ともにWnt5a蛋白の発現が検出された。Wnt5aは非古典型Wnt経路を活性化する代表的なリガンドである。非古典的Wnt経路は β -cateninに依存しない経路であり、主に平面内細胞極性(Wnt/PCP: Planar Cell Polarity)経路とWnt/ Ca^{2+} 経路に二つが知られている⁸。前者のWnt/PCP経路では、WntリガンドがFrizzled (Fz) 受容体および共受容体に結合し、Disheveled (Dvl) タンパク質が活性化される。その後、RhoやRacなどのGTPaseが活性化され、これが細胞骨格の再構築や細胞の運動に関与する。最終的に、JNK (c-Jun N-terminal kinase) 経路が活性化される。後者のWnt/ Ca^{2+} 経路ではWntリガンドがFz受容体およびGタンパク

質共受容体に結合し、Gタンパク質を介してホスホリパーゼC (PLC) を活性化する。PLCは、 PIP_2 をイノシトール三リン酸(IP_3)とジアシルグリセロールに分解し、 IP_3 は Ca^{2+} 放出を刺激して細胞質 Ca^{2+} 濃度を上昇させる。カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ、カルシニューリン、およびその他のカルシウム依存性経路を活性化し、下流の遺伝子転写を引き起こす。本研究において発現変動蛋白を解析したところ、培養したhAECではWnt/PCP経路の活性化を示唆する蛋白が増加していた。翻訳後修飾の解析においてもRhoやRacなどのGTPaseのリン酸化修飾が検出されており、上記を裏付ける結果であった。我々はこれまで、SB-treated群における特徴的な細胞形態の変化や、多能性の維持について報告しており、この機構にWnt/PCP経路が関与している可能性が示唆されたが、個々の蛋白特異的な抗体を用いた発現解析や、関連するPathwayの活性化/遮断によるhAECの機能解析を含めたさらなる検討が必要である。さらに本研究では β -catenin自体のリン酸化部位も見出すことが出来たが、このリン酸化は細胞質および核の β -cateninレベルと転写調整を増加される機能が報告されており、今後の研究対象となる知見を得た。

多能性幹細胞のひとつであるヒトES細胞においても、その運命決定における古典型Wnt経路、非古典型Wnt経路の役割については複数の相対する議論がある⁹。つまり、Wnt経路の活性化は多能性の喪失につながるという報告もある一方で、Wnt経路が自己複製能の維持に不可欠とする報告もある。Wnt伝達が脊椎動物の初期発生中に体軸形成や、器官形成を制御するために重要であることは明らかであるが、多能性幹細胞の特徴の維持における役割は解明されていない。さらに非古典型Wnt経路においては、前述のWnt/ β -catenin経路のスイッチング機構を制御するとの報告もあるため、我々が科学研究費助成事業の助成を受けて検証中である古典型Wnt経路の解析に、本研究で得られた解析結果もあわせ、より広い視野で全体像を検討する必要がある。

本研究では非古典型Wnt経路に焦点を当てて解析を進めたが、hAECの網羅的な蛋白発現と定量解析は情報量が多く、Wnt経路の他にも分化や細胞遊

走に関わる様々な経路の関与や、翻訳後修飾が見出された。ここで得られた結果は運命決定に関わる研究のみならず、多岐に渡るシーズの抽出に使用することが出来る。我々は本研究の先に、hAECを用いた新規治療開発、再生医療としての臨床応用を目指している。hAEC製剤が実用化すれば、希少難治性疾患である多くの先天性代謝異常症の治療領域における画期的な第一歩となる可能性を秘めている。具体的にはアミノ酸代謝異常症、尿素サイクル異常症、ライソゾーム病、有機酸代謝異常症や脂肪酸代謝異常症など、単一遺伝子欠損による酵素活性の低下を主たる病因とする代謝疾患が広く適応となる。さらにはhAECの免疫寛容作用を生かし、代謝異常症以外の肝疾患、例えば肝線維症や劇症肝炎にも応用できる可能性がある。我々は本研究のような基礎研究を重ねるとともに、実装化に向けてhAEC製剤の作出にも取り組んでいる。

5. 結語

胎盤由来幹細胞であるhAECの網羅的蛋白解析を行い、主に非古典型Wnt経路における発現解析を行った。hAECの分化にはWnt/PCP経路をはじめとする複数のシグナル伝達経路が関わることが示唆された。さらなる検討を重ね、hAECの運命決定機構の解明に繋げたい。

謝辞

本研究についてお力添えを頂きました日本大学学術研究助成に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D.B. & Strom, S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* **23**, 1549-1559 (2005) .
- 2) Miki, T. A Rational Strategy for the Use of Amniotic Epithelial Stem Cell Therapy for Liver Diseases. *Stem Cells Transl Med* **5**, 405-409 (2016) .
- 3) 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* **10**, 829-835 (2021) .
- 4) Skvorak, K.J. *et al.* Placental stem cell correction of murine intermediate maple syrup urine disease. *Hepatology* **57**, 1017-1023 (2013) .
- 5) Rodriguez, N.S. *et al.* Liver-Directed Human Amniotic Epithelial Cell Transplantation Improves Systemic Disease Phenotype in Hurler Syndrome Mouse Model. *Stem Cells Transl Med* **6**, 1583-1594 (2017) .
- 6) Takano, C. *et al.* Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition Maintains Stemness in Human Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cell Rev Rep* **18**, 3083-3091 (2022) .
- 7) Miki, T., Yasuda, S.Y. & Kahn, M. Wnt/beta-catenin signaling in embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Stem Cell Rev* **7**, 836-846 (2011) .
- 8) Qin, K. *et al.* Canonical and noncanonical Wnt signaling: Multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk. *Genes Dis* **11**, 103-134 (2024) .
- 9) Van Camp, J.K., Beckers, S., Zegers, D. & Van Hul, W. Wnt signaling and the control of human stem cell fate. *Stem Cell Rev Rep* **10**, 207-229 (2014) .

大動脈瘤および大動脈中膜石灰化病変における 細胞外基質代謝の役割

宇都健太¹⁾, 傳田侑也¹⁾, 福田安希代¹⁾, 村田伸弘²⁾

A role of extracellular matrix metabolism in the pathogenesis of aneurysm and arterial medial calcification

Kenta UTO¹⁾, Yuya DENDA¹⁾, Akiyo FUKUDA¹⁾, Nobuhiro MURATA²⁾

要旨

本研究は、動物モデルを用いて、動脈中膜変性病変である大動脈瘤・大動脈解離および中膜石灰化でのI型collagen代謝を解析する。病変発症の新規動物モデルの作製、さらに大動脈病変の定量評価の改変を行い、ヒトに応用可能な血管病変評価法の確立を目指す。現在、動物モデル作製条件の設定を進めている段階である。

1. はじめに

本研究は、動脈中膜変性病変（大動脈瘤・中膜石灰化）における、細胞外基質（ECM）代謝、特にI型collagen代謝の解明を目的とする。大動脈瘤や中膜石灰化では中膜の断裂や変性がみられ、病変形成機序として血管平滑筋（VSMC）およびECM代謝が大きな役割を持つ。一方、血管の主要ECMはI型collagenであるため、病変の解明にはcollagen代謝の解析が必要不可欠である。本研究の解析過程では、動物での新規大動脈瘤・大動脈解離モデルの作製、さらに大動脈瘤形態や血管石灰化の定量評価の改変を行い、ヒトに応用できる血管病変の解析方法を確立することを副次的な目的とする。

2. 対象及び方法

対象の動物は以下の通りである。動脈瘤群:離乳後のApoE KOマウスに、①β-aminopropionitrile monofumarate (BAPN) (0.3%-0.4%飲水中) 24週投与。②高血糖餌 + angiotensin II投与。血管石灰化群:8週齢のSprague-Dawleyラットに対し、③War-

farin群 (warfarin 3mg/g食餌・vitamin K1 1.5mg/g食餌:2~4週間投与), ④Vitamin C群 (warfarin 3mg/g食餌・vitamin K1 1.5mg/g食餌:2~4週間投与 + vitamin C腹腔内投与)。上記の群に対し, alizarin red染色や組織透明化試薬を用いて、石灰化領域を明瞭に可視化, 定量評価を行う。また剖出血管のμCT撮像, 走査電顕および透過電顕を用いて, 血管のcollagen構造の変化, 血管内でのVSMC, リンパ球, macrophageなどの分布や形状を観察する。生化学的評価としては, 血清生化学的指標, NTX, CTX, PINP, CINP, intact PTH, osteocalcin, sIL-2R, CRPなどのECM代謝, Ca代謝, 炎症反応に関する指標を測定する。採取した大動脈からタンパクおよびmRNAを抽出し, LOX, cbfa-1, ALP, MMP1, MMP2, MMP9, MMP13, RANKL, IL-2, IL-6, TNFαなどのECM代謝関連のRNA array解析を施行する。また, 培養ラットA7r5細胞 (ラット大動脈平滑筋由来細胞:RVSMC) を用いて, 種々生理活性物質の作用について石灰化培地 (3%リン負荷培地など) を使用して解析を行う。また, siRNAあるいはsiRNA

1) 日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野

2) 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野

責任者連絡先:宇都健太, uto.kenta@nihon-u.ac.jp

発現 plasmid DNA の導入により, *MMP2*, *MMP9*, *TGF β 1*, *TGFBR2*, *AT1R*, *AT2R*, *FBN1*, *COL3A1*, *LOX* など, 血管病変に関与する遺伝子発現を調節し, RVSMC の形質転換を惹起して, ECM 関連タンパクや転写因子動態を解析する。光顕, 蛍光顕微鏡および透過電顕を用いて観察する。

3. 結果

現状では③の Warfarin 投与ラットによる石灰化条件¹は確立し, ④の Vitamin C 投与ラットは作製途中である。また, ①②の ApoEKO マウスでの大動脈瘤形成の病変形成条件を設定中である。これらの条件調整が困難で, 想定モデル作製に至らず, 実験の第一段階に時間を要している。

4. 考察

研究代表者は, Marfan 症候群の大動脈病変に関し, VSMC の形質転換・アポトーシス, 動脈瘤病変のレニン・アンジオテンシン系や脂肪酸代謝を解析し, 中膜石灰化に関して, エイコサペンタエン酸の石灰化抑制作用, 架橋酵素の lysyl oxidase (LOX) の骨での作用や, LOX と石灰化との関連について解析してきた。病変形成機序における ECM 代謝変動が重要な役割をもつが, 大動脈瘤, 大動脈解離, 中膜石灰化など, ヒトでの中膜変性病変の形成機序は不明な点が多い。適切な動物モデルが確立されていないことが, ヒトの病変機序の解明を困難にしているため, 本研究ではこれらの血管疾患モデル作製に重点を置く。

謝辞

本研究は日本大学医学部助成金 創立50周年記念研究奨励金の支援を受けて遂行中です。ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Uto K, Yoshizawa S et al. Inhibition of extracellular matrix integrity attenuates the early phase of aortic medial calcification in a rodent model. *Atherosclerosis* 319:10-20, 2021.

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	岡田真広, 奥田貴久, 西山博孝, 松本太郎, 増田しのぶ
幹事	井上広一, 葛西玲広, 藤田順一

(50音順)

※2024年4月1日時点

Editorial Board

Editor-in-Chief	Makoto MAKISHIMA
Associate Editors	Masahiro OKADA, Takahisa OKUDA, Hirotaka NISHIYAMA, Taro MATSUMOTO, Shinobu MASUDA
Managing Editors	Koichi INOUE, Reo KASAI, 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
