

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.13 / December 2025

日本大学医学部総合医学研究所

Research Institute of Medical Science, Nihon University School of Medicine

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⁾

Technical innovation of supine breast MRI generated from prone breast MRI in patients with breast cancer

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

要旨

乳癌に対する乳房温存術では切除断端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で乳癌の広がり診断を行う。これにはMRIが最も優れるが、乳房MRIは腹臥位で撮影し乳房の形が手術台上の背臥位と異なり、腹臥位MRI上の癌の広がりを背臥位に再構築する客観的手法は未だない。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シミュレーションする技術開発を行っている。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を用いる。患者毎に乳房の大きさや柔らかさ、体位変換時の変形は様々だが、シミュレーションモデルに必要な患者固有の物性値に、マンモグラフィの乳房密度と乳房厚、並びにBMIの使用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9万人超が発症する。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、切除量を少なくする必要があり、断端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といった各種画像診断で広がり診断を行う。近年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が、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が最も優れる。乳房MRIは乳癌の術前検査として必須である。乳房MRIは腹臥位で行われる。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でき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1)。手術直前に背臥位でMRIを再検すれば乳腺切除線決定に有用なことは明らかだが、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

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

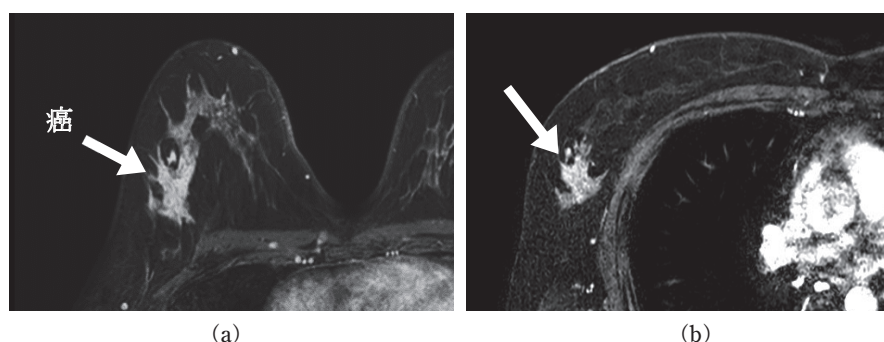


図1 (a) 腹臥位MRIと(b) 背臥位MRI間の乳房と癌の変形、並びに癌の移動

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上の乳癌の広がりや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違うために得られた情報を活かす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。

本研究の目的は、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である。

2. 対象及び方法

【1.画像提供】

本研究は、ヘルシンキ宣言に基づき、日本大学病院臨床研究審査委員会の承認を得て行った（承認番号：20220403）。インフォームドコンセントは日本大学病院のホームページに掲載することで研究対象者に拒否できる機会を保障する。日本大学病院で撮像された診療用腹臥位・背臥位造影乳房MRI画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シミュレーションモデルには、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。この物性値の候補に、年齢・BMI・マンモグラフィの乳房密度（%）/乳房厚（mm）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.精度検証】

本研究で生成される背臥位像の癌の位置を、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】

2016年から日本大学病院乳腺外科で診療用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、日本大学理工学部を提供した。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】

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、構造や流体の解析によく用いられる。本研究では、乳癌患者の体位の違いによる癌の位置変化を、有限要素解析ソフトウェア（ANSYS, Abaqus）を用いてシミュレ

ションした。癌の位置変化は乳房の変形に伴って生じる。まずは、癌罹患なしのボランティアの腹臥位MRIデータを用いてモデルを構築し、背臥位時相当の重力を負荷した際の変形形状を背臥位MRI像と比較し、変形形状が合致する乳房の物性値及び固定範囲を検討した。これによって良い一致を示した乳房の物性値及び固定範囲を用いて、上記モデルの各部位に癌を作成し、体位変化に伴う癌の局在と移動の関係を調べたところ、外側癌は乳房の変形と共に側胸部方向へ移動し、内側癌よりも移動距離が大きかったことがわかった(図2)。

② 軟体シミュレーション

「Obi Softbody」を利用した軟体シミュレーションにおいて、シミュレーションの解像度を向上させるために軟体の粒子を細かくする方法を試みた。これにより、これまでの結果では乳房の形状変化がうまくいかず、腹臥位の形状の影響が強く出ていた結果に対して、重力による形状の変化を再現できるようになった。また、粒子を小さくするとシミュレーション時の乳房の柔らかさが増すことがわかった。このため、粒子サイズに合わせて柔らかさを変化させるようにした(図3)。次に、シミュレーション時に剛体(胸壁)と結合させている軟体粒子の割合を変えることで、シミュレーションにどのような変化があるか検証を行った。これまで剛体との接続は軟体の底面全体を接続していたが、接続部で粒子が固

定され重力によって乳房が流れる様子を的確に表現できなかったためである。最後に剛体と軟体の形状を患者データから抽出したデータを用いてシミュレーションを行った。これまでは、MRI画像から上半身のポリゴンを作成し、肋骨部分などを目安に楕円形の剛体を設置していたが、MRI画像を部位ごとに分けることができたため、肋骨や筋肉などを動かない剛体として設定しシミュレーションを行った。剛体として設定した形状にエッジなどが発生し、意図しないシミュレーション結果となることがあったが、患者のデータを利用できることを確かめることはできた。

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CycleGANといったGAN(敵対的生成ネットワーク)に基づく画像間スタイル変換の手法を3D医用画像のモダリティ変換に用いる先行研究⁵⁾はあるが、我々の検討結果より、GANの手法は本研究に不向きであるとの結論に至った。そこで、新たな生成モデル(拡散モデル: Diffusion model)に着目して、造影・非造影の変換を行うAIを開発した。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、Vector-Quantized GAN(VQ-GAN)を用いた圧縮と復号を組み合わせるドメインの相互変換を直接学習するBBDM(Brownian Bridge Diffusion Models)を採用し、これを3D医用

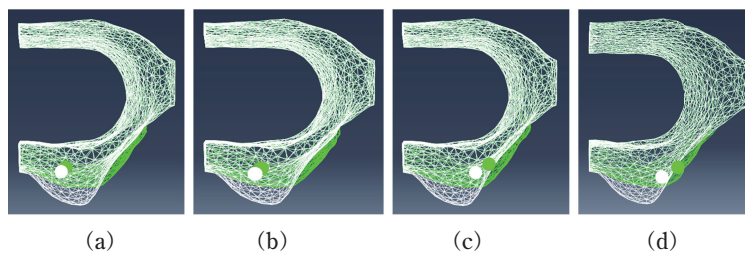


図2 腹臥位(白色)において、(a)内側上(b)内側下部(c)外側上部(d)外側下部に配置した球形癌の背臥位(緑色)における移動の様子

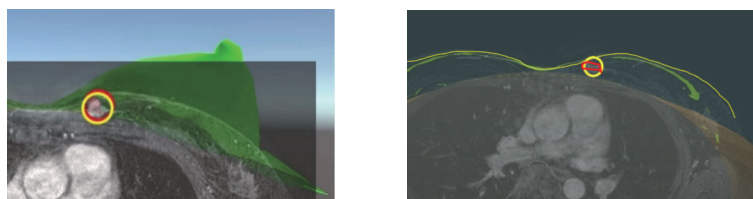


図3 粒子サイズと柔らかさの調整

画像に応用した。図4に、造影前の背臥位画像を入力として、造影後を意味する特徴を条件として付与し、スタイル変換を行う3D-conditional BBDM (3D-cBBDM) の概要を示す。

日本大学病院の腹臥位・造影／非造影像のペア330例で学習を行い、10例の腹臥位・背臥位ペアの症例群でテストを行った。図5に、学習に用いていないテストデータの中から、本物の造影・非造影像と、CycleGANおよび3D-cBBDMで生成した偽物の造影像の例を示す。

3D-cBBDMにより生成した偽物の造影像は、本物の造影像と遜色ない増強効果が得られていることが確認できる。今後は、緻密な性能検証を行うと同時に、背臥位MRIへの応用を検討する予定である。

【3.乳房の変形度合いに関わる物性値の探索】

対象は乳癌女性68名69乳房で、年齢は31-77歳、中央値51歳、BMIは16.8-35.0、中央値23.5であった。乳房密度はマンモグラフィ専用ビューワを用いて半自動的に定量化し、乳腺内に介在する脂肪は除外した（図6）。乳房密度は7.0-95.6％、平均51.4％、乳

房厚は18-78mm、平均43.9mmであった。乳房腹臥位・背臥位MRIの、造影前T1強調画像における乳頭から大胸筋までの最短距離の差（DNPp-DNPp-s）を深さ方向の乳房変形度、造影MRIにおける内胸動脈までの最短距離の差（DNIs-DNIp: DNIs-p）を横方向の乳房変形度と定義した（図7）。DNPp-sは12-82mm、中央値39mm、DNIs-pは6.5-62mm、平均28mmであった。マンモグラフィ乳房密度および乳房厚、BMIは、DNPp-s、DNIs-pと相関した。年齢はDNIs-pと相関した（図8）。以上より、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（2024/4、横浜）欧州放射線学会（2025/3、ウィーン）、Japanese Journal of Radiology⁶⁾ 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

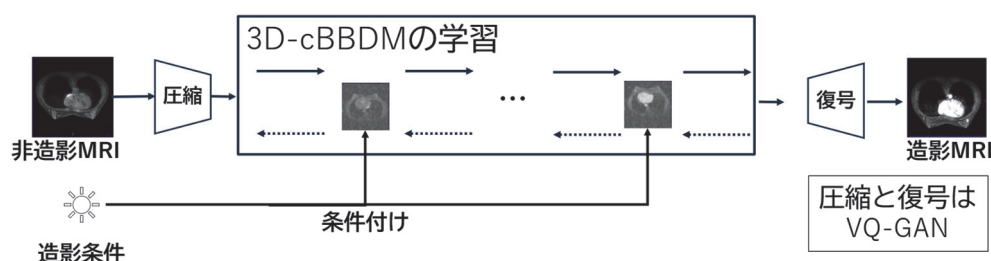


図4 3D-cBBDMの概要図

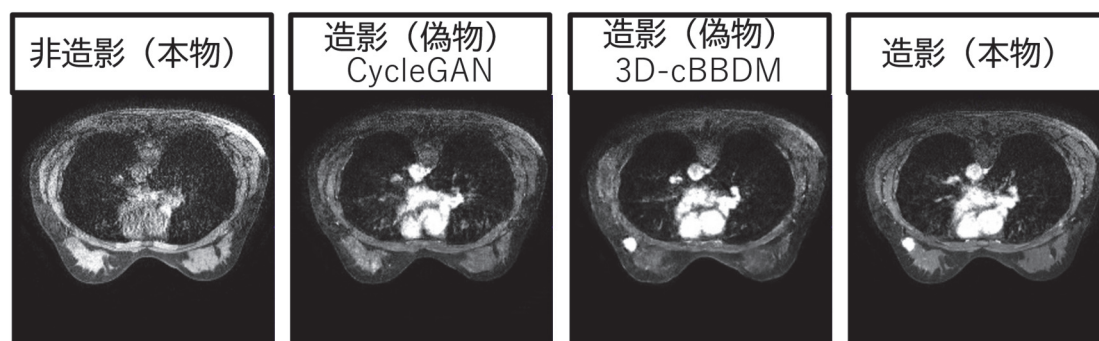


図5 非造影から造影への変換例

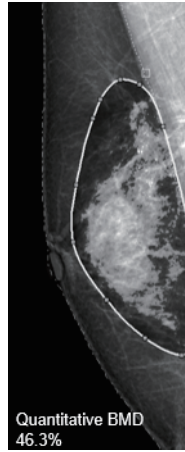


図6 乳房密度

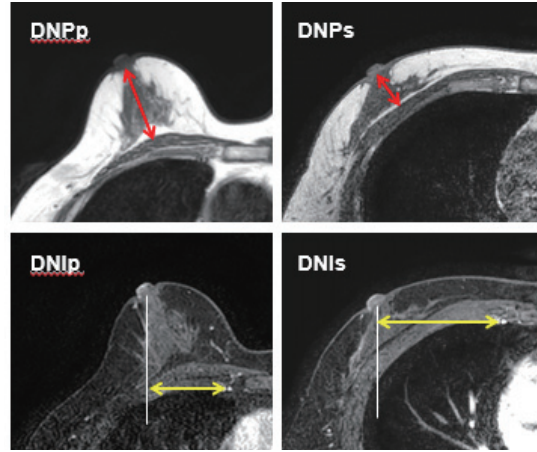


図7 深さ方向と横方向の乳房変形度

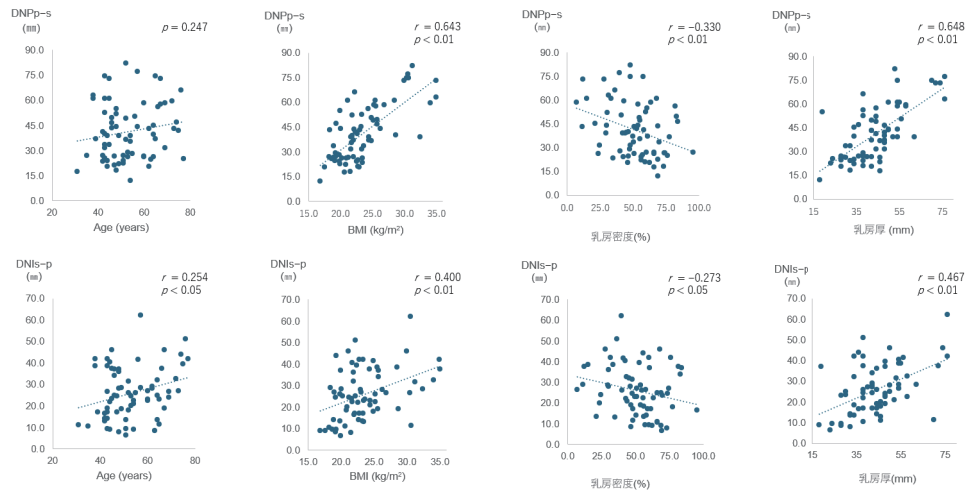


図8 患者固有の物性値の候補と乳房変形の相関 (図6-8は文献6より引用、一部改変)

された。乳房の主な構成要素は脂肪と乳腺組織で、その割合（乳房密度）は個人差が大きい。脂肪は乳腺組織より柔らかいため、乳房密度は乳房全体の柔らかさ・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た。今回の検討でこの仮定は証明された。マンモグラフィは、乳癌の術前検査として必須で、乳房密度は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・6年度学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕に採択され行った。

文献

- 1) Wang CB, Lee S, et al. Breast tumor movements analysis using MRI scans in prone and supine positions. *Sci Rep* 2020;10:4858.
- 2) Griesenauer RH, et al. Breast tissue stiffness estimation for surgical guidance using gravity-induced excitation. *Phys Med Biol* 2017;62:4756-4776.
- 3) Eiben B, et al. Symmetric Biomechanically Guided Prone-to-Supine Breast Image Registration. *Ann Biomed Eng* 2016;44:154-173.
- 4) Amano M, 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.
- 5) Hiasa Y, et al. Cross-modality image synthesis from unpaired data using cyclegan: Effects of gradient consistency loss and training data size. In *International workshop on simulation and synthesis in medical imaging*. Cham: Springer International Publishing 2018;31-41.
- 6) Amano M, Amano Y, Ishibashi N, Yamaguchi T, Watanabe M. Association between patient position-induced breast shape changes on prone and supine MRI and mammographic breast density or thickness. *Jpn J Radiol* 2025;43:641-648.

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。将来的には、早期発症予測プログラムを健康診断や人間ドックなどに導入し、急性大動脈症候群に罹患しやすい患者のリスク層別化を行って、急性大動脈症候群の早期発見と医療の早期介入を可能にすることを最終的な目標とする。

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、高血圧歴との関連や、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-

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

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。

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（日本大学医学部動物実験委員会承認番号：AP23MED036-2）

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（日本大学医学部付属板橋病院臨床研究倫理審査委員会承認番号：RK-221011-2）

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

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。血管壁を構成している主要な細胞である血管平滑筋細胞は、血管壁の恒常性の維持に重要な役割を果たしており、腹部大動脈

瘤の血管壁では脱分化傾向を示すことがわかっている。そこで、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*) に着目し、*Apo E* と *Smtn B* の両遺伝子を欠損させたマウス (*Apo E* $-/-$ \times *Smtn B* $-/-$) にアンジオテンシン II を持続投与し、大動脈瘤の発症率について検討した。また、*Apo E* 単独欠損マウス (*Apo E* $-/-$) と比較して、病理組織学的評価を行った。

大動脈瘤発症率については、*Apo E* $-/-$ マウスで 62.5%、*Apo E* $-/-$ \times *Smtn B* $-/-$ マウスで 17% と *Apo E* $-/-$ \times *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症率が低かった (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、二次的变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 染色については、*Apo E* $-/-$ \times *Smtn B* $-/-$ マウスが *Apo E* $-/-$ マウスと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* $-/-$ \times *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、腹部大動脈瘤の発症低下につながる可能性が考えられる。*Apo E* $-/-$ \times *Smtn B* $-/-$ マウスでは *Apo E* $-/-$ マウスと比較して血管壁における炎症性サイトカインの mRNA 発現が減

弱していた。興味深いことに smoothelin はこれまで言われてきた平滑筋細胞の収縮への関与とともに、局所の炎症にも作用してる可能性が示唆された。本検討より大動脈瘤発症から伸展に至る機序の一部が解明されることが期待される。

②ラットを用いた大動脈解離モデル

大動脈解離 (Aortic dissection: AD) の発症には大動脈壁中膜の脆弱性の関与が指摘されているが、詳細な病態や発症機序は不明な点が多い。本研究ではラットを用いた AD モデル動物を作成し、AD 発症機序の解明を目的とする。SD ラットに β -aminopropionitrile (BAPN) を 3 週齢より飲料水に溶解して 7 週間投与した (BAPN 群)。また、同様のプロトコールで BAPN 投与後に 9 週齢から Angiotensin II (1mg/kg/day) を 1 週間持続投与した (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、病理組織切片を作製して評価した。

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。

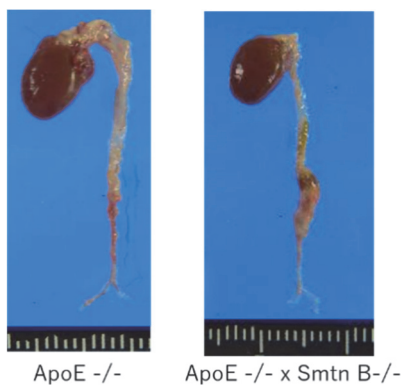


図 1 *ApoE* $-/-$ マウスと *ApoE* $-/-$ \times *Smtn B* $-/-$ マウスの大動脈 *ApoE* $-/-$ 群では腎動脈分岐部に動脈径の拡大がみられたが、*Smtn* $-/-$ \times *ApoE* $-/-$ 群では径の拡大が抑制される傾向にあった。

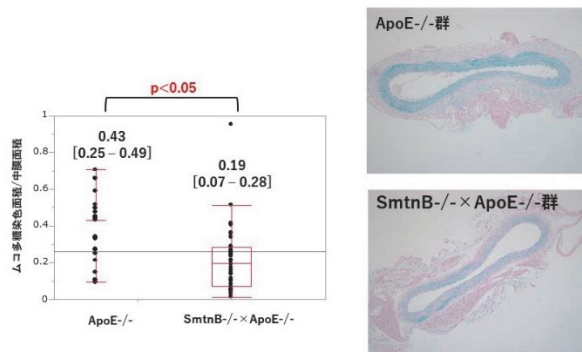


図 2 モデルマウスの Alcian-blue 染色での比較 *ApoE* $-/-$ 群と比較して、*SmtnB* $-/-$ \times *ApoE* $-/-$ 群では有意に Alcian-blue 陽性面積の減少がみられた。

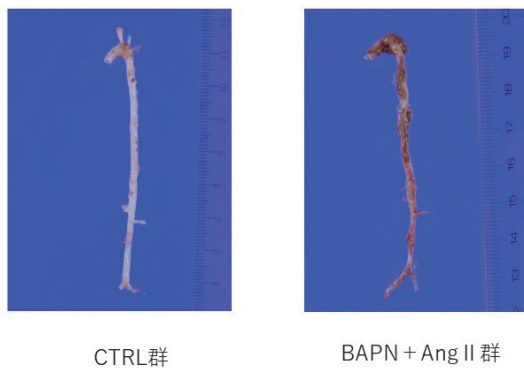


図3 モデルマウスのAlcian-blue染色での比較

BAPN + Ang II では大動脈弓周囲に大動脈径の拡張がみられた。

BAPNは細胞外基質の架橋に関与する酵素であるlysyl oxidaseを阻害する薬剤である。BAPNの投与により中膜の脆弱化を引き起こし、ヒトの大動脈解離に類似した病理組織所見を示した。さらに形態学的・分子病理学的検討を重ね、経時的な血液検査を行うことで、ヒトのAD発症機序の解明とバイオマーカーの開発に役立つと考える。

(2) ヒトの大動脈検体での検討

ADにおける大動脈壁の中膜平滑筋細胞の表現型と弾性線維の分布、アクチン架橋蛋白であるfilamin Aについて、ヒト検体を用いて検討した。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、平滑筋細胞の分化マーカー(smooth muscle myosin heavy chain: SM-MHC, smoothelin, S100A4)、elastin, filamin A, matrix metalloproteinase (MMP) 活性について、western blotting, zymography, RT-qPCRで検討した。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(図6)、western blottingで、AD群においてfilamin Aはfull-lengthの割合が低下して有意に断片化がしていることが示された。一方で、

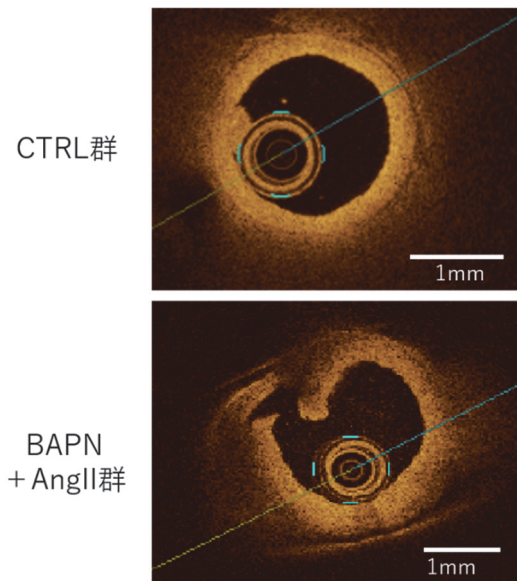


図4 コントロール群とBAPN+AngII群の大動脈壁に対するOCT画像

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。

full-length filamin AのmRNAの発現は、AD群で有意に増加していた。本研究において、ADにおける中膜変性では血管平滑筋細胞の表現型と弾性線維の分布が密接に関連していることが定量的、病理学的に示された。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。さらに我々は高血圧歴のある患者において解離発症群と非発症群とでfilamin A mRNAの発現を検討したところ、解離発症群においてはfilamin A mRNAの発現は非発症群と比較して有意に低下しており、断片化によるfilamin A mRNAの補填が解離群では作用していない可能性が示唆された。このメカニズムをさらに解明する事で

解離発症のメカニズムの解明につながると考えている。

(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

急性大動脈症候群の病理組織では、大動脈中膜に種々の変性をきたしている。心臓血管病理学会からの声明では中膜の変性の程度を3段階に分けて分類

しているが、血管病理に精通した医師の間でも意見が異なることもあり、血管病理の診断はたびたび困難である。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。

診断補助を実現するには、病理細胞画像から意味のある情報を取り出し数値化する過程（特徴量変

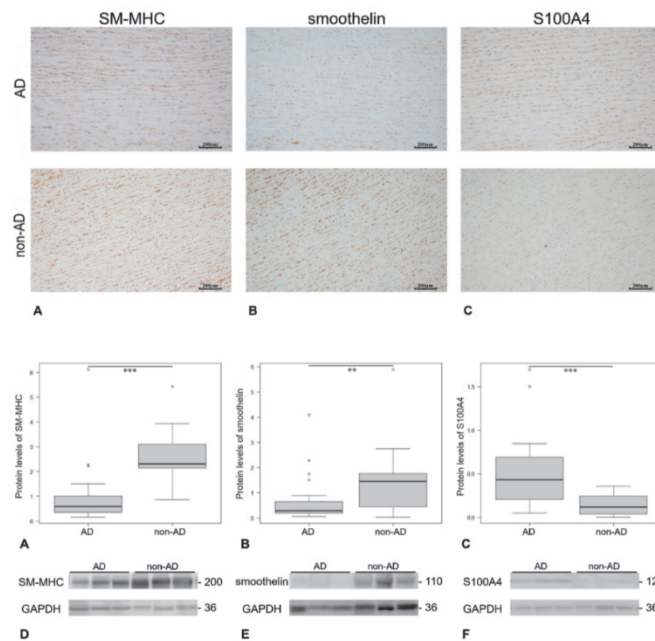


図5 ヒト大動脈における血管平滑筋細胞の表現型マーカーの免疫組織化学と蛋白分析

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

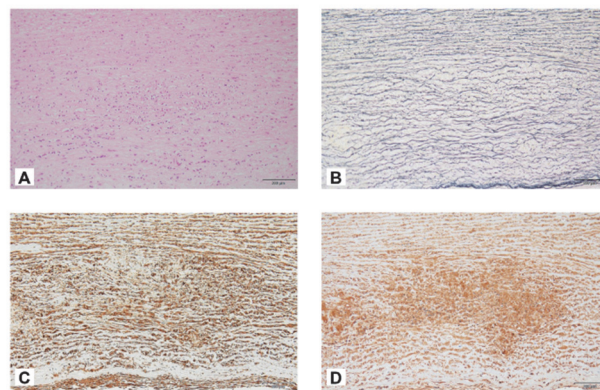


図6 AD群の中膜変性部位での代表的な連続切片のHEと免疫組織化学

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。HE：Hematoxylin-Eosin EVG：Elastica van Gieson α -SMA： α -smooth muscle actin

換)が必要となる。近年、深層学習によるモデルが脚光を浴びているが、1,000名以上の被験者数を前提とするため、大規模データセットを構築しにくい領域で直接適用することは難しい。そのため、小標本でも稼働するモデル構築が必要となる。このためには、深層学習以外の方法で画像特徴量を計算しなければならない。画像処理における一般的な特徴量には、SIFT・SURF・FOG・カラー特徴量などがあるものの、これらは一般画像に向けたものであるため、病理画像への適用は必ずしも適切とはいえない。このような中、過去に行われたいくつかの研究において、テクスチャ特徴量が病理細胞画像から意味のある情報を抽出できることが示されてきた。そのため、本研究を分担する生産工学部は、テクスチャ特徴量ベクトルで定義された数式をプログラミングコードとして実装することで、病理細胞画像の入力に対しテクスチャ特徴量ベクトルを返却するライブラリを開発した。本ライブラリは複数枚の画像の入力に対し一括して特徴量計算を行うことから、一括した画像解析に有効である。実際に、本ライブラリとSupport Vector Machineを用いて、病理細胞画像から心筋症を判定するソフトウェアのプロトタイプ開発に成功し、この結果がSpringer Proceedings in Mathematics & Statisticsに掲載された(ただし生検データではないこと、被験者数が少ないことから、Pilot studyであることを付記する)。このライブラリはあらゆる医用画像に適用することが可能であることから、急性大動脈症候群の判定に使用する画像に対しても適用することが可能である。したがって現在、画像収集を行っている途中である。収集完了後は、前述した心筋症判定と同一の手続きにより、急性大動脈症候群の判定補助を行うシステムを開発する予定である。

4. 考察

AASの発症を模したモデル動物の作製には、遺伝子改変やBAPN、Ang IIなどの化学物質の投与が行われている。既知の*ApoE*欠損マウスにAng IIを持続投与する大動脈瘤モデルにおいて*Smtn*の欠損を追加することで炎症性サイトカインの発現の抑制を伴って、大動脈瘤の発生が抑制された点は非常に興味深い。Smoothelinは平滑筋細胞の収縮に関連し、高分化な平滑筋細胞のマーカー蛋白として知られて

いる。今回の検討から生体内での*Smtn*の新たな役割が明らかになった。これらの研究成果から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、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および人工知能を用いて研究を推進することで、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) Nienaber CA, Eagle KA. Aortic dissection: new frontiers in diagnosis and management: Part I: from etiology to diagnostic strategies. *Circulation* 2003; 108(5):628-635.
- 2) Erbel R, et al. Diagnosis and management of aortic dissection. *Eur Heart J* 2001;22(18):1642-1681.
- 3) Hagan PG, et al. The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease. *JAMA* 2000;283(7): 897-903.
- 4) Larson EW, Edwards WD. Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases. *Am J Cardiol* 1984;53(6):849-855.
- 5) Zhou B, et al. Contractile Smooth Muscle and Active Stress Generation in Porcine Common Carotids. *J Biomech Eng* 2018;140(1):0145011-0145016.
- 6) Wang L, 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) Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ, Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 2007;15(3):100-108.
- 8) Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(9):1510-1520.
- 9) Brisset AC, 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) Chaabane C, 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、代謝機能障害関連脂肪性肝疾患 (metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD) や炎症を伴う代謝機能障害関連脂肪肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH) の罹患が増加している。その発症及び進展には肝実質細胞である肝細胞のみならず、肝臓に豊富に存在する免疫細胞の関与が重要であるが、その詳細な制御機構は不明な点が多い。本研究では、近年急速に普及したシングルセル解析を用いてマウス由来肝臓免疫細胞の動態を解析することに成功したため報告する。

1. はじめに

肝臓を占める細胞の約70%は肝細胞 (実質細胞) であるが、残りの約30%を占める非実質細胞には類洞内皮細胞や間葉系星細胞に加え、肝常在 Kupffer細胞や単球由来マクロファージ、ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞, NKT細胞, T細胞, B細胞などの免疫細胞が多く含まれているため、肝臓は代謝臓器であるとともに免疫臓器であるとも言える¹⁾。これらの免疫細胞は門脈から取り込まれる栄養成分や外来異物に反応して相互に、または肝細胞と複雑に連携しながら代謝、炎症、生体防御や抗腫瘍活性等の免疫作用を制御し、肝恒常性を維持している。近年の食事の西洋化等による脂質代謝異常は脂肪肝やMASLDを呈するが、その一部がMASH、肝線維化、肝硬変、そして肝細胞癌へと進展する。このうち、MASLDからMASHへの進展には慢性炎症を伴うため、免疫細胞の活性化が重要となる。したがって、これらの非ウイルス性肝障害の

予防及び治療戦略を見出す上で、肝細胞の代謝機能解析のみならず、免疫細胞の詳細な機能解析が必要である。しかし、先述のように肝臓には多種多様な免疫細胞が存在する上、環境や刺激に対して複雑な制御を受けることから肝臓の免疫臓器としての機能解析はまだ十分に行われていない。

核内受容体はリガンド依存性転写因子であり、ヒトでは48種類が同定されている。多くの核内受容体は体内の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。肝臓X受容体 (liver X receptor, LXR) はコレステロールの代謝産物であるオキシステロールをリガンドとする核内受容体であり、LXR α と LXR β の2種類のアイソフォームを有する。LXRは体内でコレステロールの代謝調節を担う他、マクロファージなどの免疫細胞に発現し、抗炎症作用を有するため、高コレステロール血症やアテローム性動脈硬化症などの治療標的として注目されている²⁾。我々は先行研究におい

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

て、LXR欠損マウスの肝臓免疫細胞の解析を行った。その結果、LXR α 欠損マウスは肝臓への顕著なコレステロール蓄積を伴い、活性型マクロファージを集積させることによって食餌誘導性MASHを増悪させること³⁾、LXR α / β 欠損マウスはKupffer細胞や単球由来マクロファージ、NKT細胞の細胞分布が野生型と顕著に異なることを見出した^{4,5)}。これらの知見は、LXRが免疫細胞を介した肝保護作用を担う重要な因子であることを示している。しかし、これまでの解析は、着目した個々の細胞群の機能解析を行ったものであり、他に存在する多様な免疫細胞の挙動については未だ不明である。そこで、MASLDからMASHの進展メカニズムにおけるLXRの機能を詳細かつ正確に解明するためにも、肝臓免疫細胞全体の挙動を詳細に追跡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。先述の通り、肝臓には多種多様な細胞が存在するため肝臓免疫細胞の解析には有用な解析手法である。そこで、本学内においてシングルセル解析を実施するため、昨年度はライブラリー作製装置である10x Genomics社のChromium iXを導入した他、既存のシングルセルデータを用いてシークエンスデータの解析系を構築した。また、実験においては全身性LXR α / β 欠損マウスに加え、細胞選択的LXR α / β 欠損マウスを作製し、肝臓免疫細胞の解析を行った。その結果、全身性LXR α / β 欠損マウスは野生型と比較して早期にMASLD及びMASHを誘導することを確認した。また、作製した細胞選択的LXR α / β 欠損マウスの中で、肝細胞選択的LXR α / β 欠損マウスにおいて、通常飼育下にも関わらず肝臓免疫細胞数や血中トランスアミナーゼ値が全身性LXR α / β 欠損マウスと同様に増加していることを見出した。そこで、今回は肝細胞選択的LXR α / β 欠損マウスにおける肝臓免疫細胞を用いてシングルセル解析を実施し、全身性LXR α / β 欠損マウスとの比較を行ったため、以下で結果を報告する。

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 欠損 (LXR $\alpha^{-/-}$) 及びLXR β 欠

損 (LXR $\beta^{-/-}$) 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た。LXR $\alpha^{flxed/flxed}$ (LXR $\alpha^{fl/fl}$) マウスは同じくMangelsdorf教授より、LXR $\beta^{flxed/flxed}$ (LXR $\beta^{fl/fl}$) マウスは仏GIE-CERBM (IGBMC) のPierre Chambon教授より供与を受けた。LXR $\alpha^{fl/fl}$ LXR $\beta^{fl/fl}$ マウスとThe Jackson Laboratoryより導入した*Albumin* (*Alb*) -Cre マウス (Stock No. 003574) を交配させることにより肝細胞選択的LXR α / β 欠損マウス (LXR $\alpha^{fl/fl}$ LXR $\beta^{fl/fl}$ *Alb*-Cre^{tg/+}) を作製した。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及び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) シングルセル解析のための肝臓免疫細胞単離

マウスより肝臓を摘出後、コラゲナーゼによる肝組織分散及びパーコール密度勾配法による肝細胞除去によって肝非実質細胞を得た。得られた細胞をfluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した抗CD45抗体及び死細胞を標識するpropidium iodide (PI) と混合後、FACSAriaを用いてPI陰性及びCD45陽性の免疫細胞を単離した。

3) シングルセルライブラリーの作製

単離した細胞は10x Genomics社が提供するChromium Fixed RNA Profiling Reagent Kits 及びChromium iXを用いてシングルセルライブラリーを作製した。各ライブラリーは混合後、NovaSeq 6000を用いたシークエンス解析を行った。シークエンスデータはRのプログラムパッケージである"Cell Ranger ARC (ver.8.0.1)"を用いてマウスのリファレンスゲノム配列 (mm10) へのマッピング (一次解析) を行った。マッピング後のシークエンスデータについては同じくRのプログラムパッケージであるSeurat (ver. v5) を用いて二次解析を行った。

4) MASHモデルマウスの解析

マウスに通常食 (CE-2, 日本クレア製) または0.2%コレステロール及び42%脂肪を含有する西洋食 (TD88137, Envigo 製) を自由摂取により摂餌させ、12週間後の肝臓を摘出した。肝障害の評価として、肝組織の観察及び血中トランスアミナーゼ値を評価した。また、血中、肝臓、脾臓における代表的

な免疫細胞の組成についてはFACSLyricを用いて解析した。

3. 結果

1) シングルセル解析のための細胞単離, ライブラリー作製及びシーケンス解析

シングルセル解析には野生型 (C57BL/6J), 全身性 LXR α / β 欠損 (LXR $\alpha^{-/-}$ LXR $\beta^{-/-}$), Floxed コントロール (LXR $\alpha^{fl/fl}$ LXR $\beta^{fl/fl}$), 肝細胞選択的 LXR α / β 欠損 (LXR $\alpha^{fl/fl}$ LXR $\beta^{fl/fl}$ Alb-Cre^{tg/+}) の各マウスを用いた。野生型は全身性 LXR α / β 欠損の, Floxed コントロールは肝細胞選択的 LXR α / β 欠損に対するコントロールとして用いた。各マウスより肝臓を摘出し, コラゲナーゼによる肝組織分散及びパーコール密度勾配法により肝非実質細胞を単離した。次に, 免疫細胞をセルソーターを用いて単離するため, 細胞を FITC 標識した抗 CD45 抗体及び生細胞を選別するため PI を処理後, セルソーターを用いて分析した。その結果, 野生型及び Floxed コントロールマウスは PI 陰性及び CD45 陽性の免疫細胞が肝臓非実質細胞のうち約 40% であったのに対し, 全身性 LXR α / β 欠損及び肝細胞選択的 LXR α / β 欠損マウスは約 80% であり, 免疫細胞の割合が高

いことが示された (図1, 上段)。この分画をソーティングした結果, 各マウス1頭あたり約 $1.5\text{--}2.0 \times 10^6$ 個の細胞を単離した。また, ソーティング後の細胞を再解析し, 全ての検体で精製度が 95% 以上であることが確認できた (図1, 下段)。シングルセルライブラリーの作製には 2.0×10^5 個から 2.0×10^7 個の細胞数が必要である。そこで, ライブラリー作製により多くの細胞を用いるため, 各マウスの条件において2頭分の細胞を等量ずつ混合し, 使用することとした。

ソーティングし, 等量ずつ混合した細胞はただちに固定後, 4℃にて保存した。その後, 10x Genomics 社が提供する Chromium Fixed RNA Profiling Reagent Kits のプロトコルに基づき, シングルセルライブラリーを作製した。作製した各ライブラリーはバイオアナライザーを用いて濃度及び品質を確認後, NovaSeq 6000 を用いたシーケンス解析を行った。

2) シングルセルシーケンスデータの解析

1) の作業から, 4 検体全てにおいて, 細胞単離, シングルセルライブラリーの作製及びシーケンス解析の一連の解析を行うことに成功した。シーケンスデータは Cell Ranger ARC を用いてマウスゲノム配列へのマッピング (一次解析) を行った。その

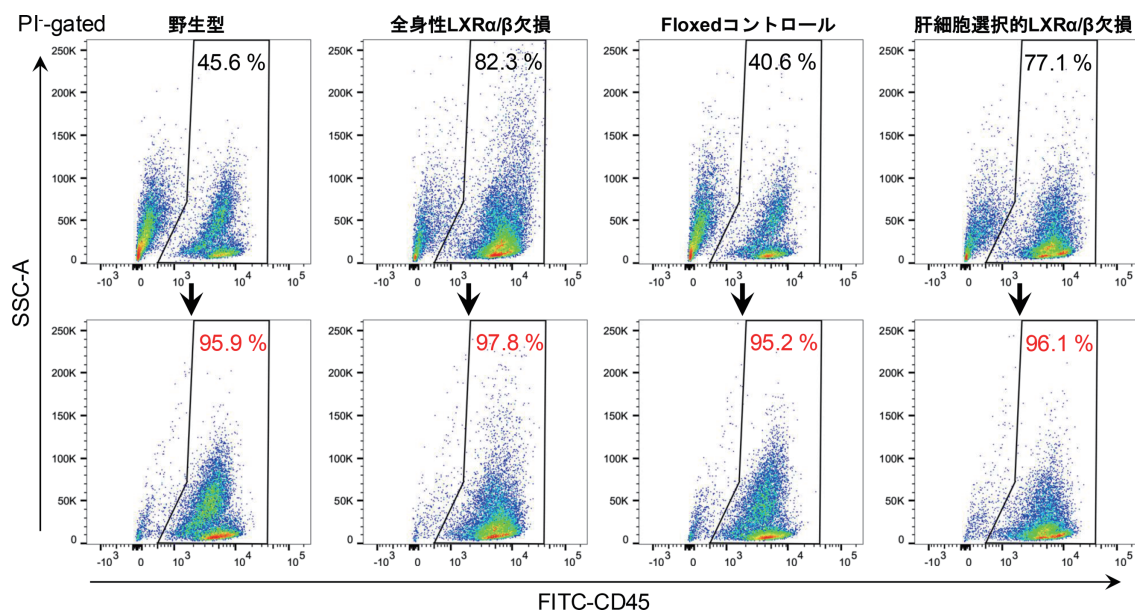


図1 セルソーターを用いた CD45 陽性免疫細胞のソーティング

野生型, 全身性 LXR α / β 欠損, Floxed コントロール, 肝細胞選択的 LXR α / β 欠損マウスより単離した肝臓非実質細胞を FITC 標識した抗 CD45 抗体を用いて免疫細胞を染色し, FACS Aria を用いて CD45 陽性免疫細胞をソーティングした。上段は各マウスの肝臓非実質細胞における PI 陰性 CD45 陽性細胞の割合を, 下段はソーティング後の細胞の一部を再解析した際の PI 陰性 CD45 陽性細胞の割合をドットプロットで示した。

結果、野生型からは8,754個、全身性LXR α / β 欠損からは9,140個、Floxedコントロールからは10,364個、肝細胞選択的LXR α / β 欠損からは11,327個の細胞の情報が得られた。次に、昨年度に既存のシーケンスデータを用いて構築した解析方法に基づき、Seuratを用いてシーケンスデータの二次解析を行った。まず、検出された遺伝子数やミトコンドリア遺伝子の割合等の情報から、死細胞や適切に単一細胞に分離されなかったアーティファクトを除去するフィルタリング操作を行った。その結果、野生型からは6,343個、全身性LXR α / β 欠損からは7,849個、Floxedコントロールからは8,048個、肝細胞選択的LXR α / β 欠損からは9,509個の細胞が選別された。次に、4検体のシーケンスデータを個別に次元削減、クラスタリング及びクラスター数を決定後、解析結果をuniform manifold approximation and projection (UMAP) を用いて可視化した。野生型の解析を行った結果、細胞群は16個のクラスターに分類された(図2)。各クラスターにおける細胞種を決定するため、上位に発現する変動遺伝子を抽出し、過去に報告されたシングルセルデータの情報^{6,7)}と比較した。その結果、まず、クラスター5及び14を除く全てのクラスターにおいてCD45をコードする*Ptprc*遺伝子の高い発現を認めたため、これらの細胞群は免疫細胞であることが示された(図3)。一方、*Ptprc*遺伝子の発現が非常に低い

クラスター5及び14については、それぞれ*F8*遺伝子及び*Hnf4a*遺伝子の発現が高いことから、細胞単離の過程で混入した類洞内皮細胞及び肝細胞であることが示された。同様に、その他の各クラスターの遺伝子発現パターンを解析し、細胞種を決定づけるマーカー遺伝子を抽出した。その結果、野生型には2種類のKupffer細胞(クラスター0及び12、マーカー遺伝子:*Timd4*及び*Vsig4*)、2種類のT細胞(クラスター1及び10、マーカー遺伝子:*Cd3e*)、B細胞(クラスター2、マーカー遺伝子:*Cd19*)、4種類の単球マクロファージ(クラスター4, 9, 13, 15、マーカー遺伝子:*F13a1*, *Pf4*, *Il12*及び*Ms4a2*)、NK細胞(クラスター6、マーカー遺伝子:*Klre1*)、樹状細胞(クラスター8、マーカー遺伝子:*Siglech*)、好中球(クラスター8、マーカー遺伝子:*S100a8*)、プラズマ細胞(クラスター11、マーカー遺伝子:*Jchain*)及び細胞増殖マーカー遺伝子の発現が高い細胞群(クラスター7、マーカー遺伝子:*Top2a*)が含まれていることが明らかとなった。次に、各クラスターにおけるLXR α をコードする*Nr1h3*遺伝子及びLXR β をコードする*Nr1h2*遺伝子の発現を解析した。その結果、*Nr1h2*遺伝子はクラスター14(肝細胞)を除く全てのクラスターにおいて発現が認められた。一方、興味深いことに*Nr1h3*遺伝子はクラスター14(肝細胞)に加え、免疫細胞の中ではクラスター0, 12(Kupffer細胞)及びクラスター9(単球またはマクロファージ)において選択的に高発現することが示された。野生型と同様に他の3検体についてもクラスタリングを行った結果、各検体の細胞群は全身性LXR α / β 欠損では14個、Floxedコントロールでは14個、肝細胞選択的LXR α / β 欠損では11個のクラスターに分類され、クラスター数は検体ごとに異なることが示された。

次に、野生型、全身性LXR α / β 欠損、Floxedコントロール及び肝細胞選択的LXR α / β 欠損を比較するため、4検体の統合(インテグレーション)を行った。インテグレーション後のデータのクラスタリングを行った結果、合計15個のクラスターが検出された(図4、発表前データのため細胞種は未記載)。変動遺伝子の情報を用いて細胞のアノテーションを行った結果、Kupffer細胞、3種類のT細胞、B細胞、3種類の単球マクロファージ、NK細胞、樹状細胞、好中球、細胞増殖マーカー遺伝子の発現が

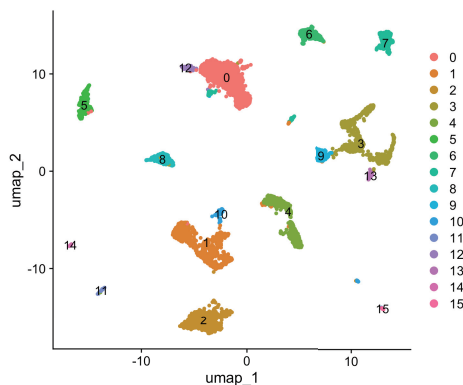


図2 野生型由来肝臓免疫細胞を用いたシングルセル解析

シングルセル解析によってクラスタリングされた細胞群をUMAPプロットで可視化した。各ドットは単一細胞を示し、色分けされた各クラスターは遺伝子発現パターンの異なる細胞集団を示す。野生型においてはクラスタリングの結果、16個のクラスターに分類された。

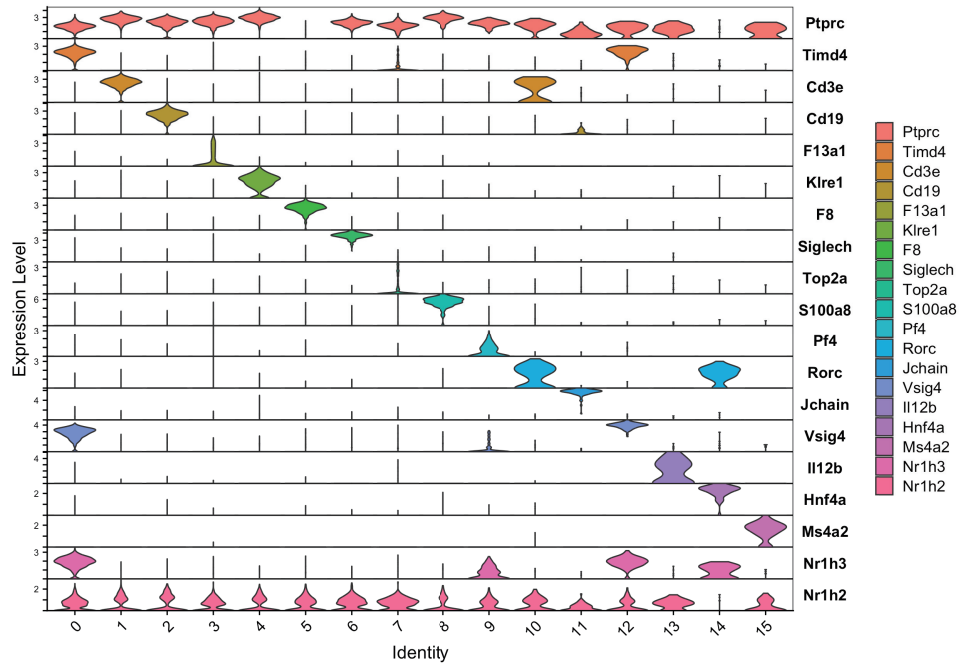


図3 野生型由来肝臓免疫細胞の各クラスターにおける遺伝子発現パターン

クラスター0から15の各クラスターにおいて選択的に発現する遺伝子 (*Timd4* から *Ms4a2*) 及び共通の免疫細胞マーカーである CD45 をコードする *Ptpcr* 遺伝子, LXR α をコードする *Nr1h3* 及び LXR β をコードする *Nr1h2* 遺伝子の発現パターンをヒートマップで示した。

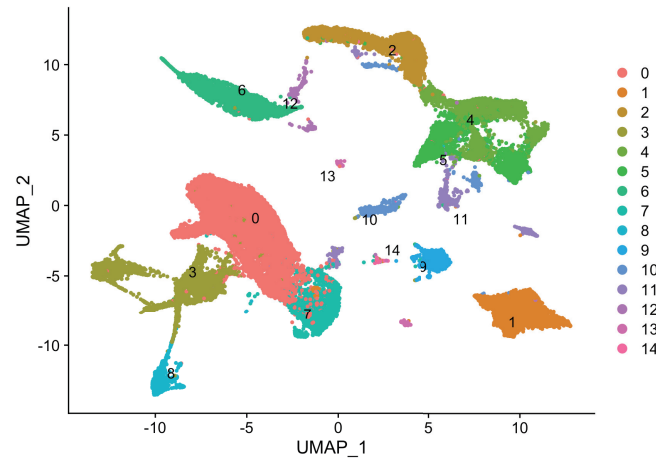


図4 4検体のインテグレーション後のUMAP

野生型, 全身性 LXR α / β 欠損, Floxed コントロール及び肝細胞選択的 LXR α / β 欠損の各シングルセル解析データをインテグレーションし, UMAP プロットを用いて可視化した。各ドットは単一細胞を示し, 色分けされた各クラスターは遺伝子発現パターンの異なる細胞集団を示す。インテグレーションの結果, 細胞群は15個のクラスターに分類された。

高い細胞群及び残存した類洞内皮細胞及び肝細胞が含まれていることが示された。インテグレーション後のクラスターには, 野生型において検出された細胞群 (図2) も含まれたが, 検出されなかった新規細胞群が存在したため, LXR α / β 欠損により細胞組成が変化することが示された。そこで, 野生型,

全身性 LXR α / β 欠損, Floxed コントロール及び肝細胞選択的 LXR α / β 欠損の4検体の細胞分布を比較した (図5)。その結果, まず, 野生型と Floxed コントロールにおける細胞分布パターンは類似することが確認できた。次に, 野生型と全身性 LXR α / β 欠損及び Floxed コントロールと肝細胞選択的

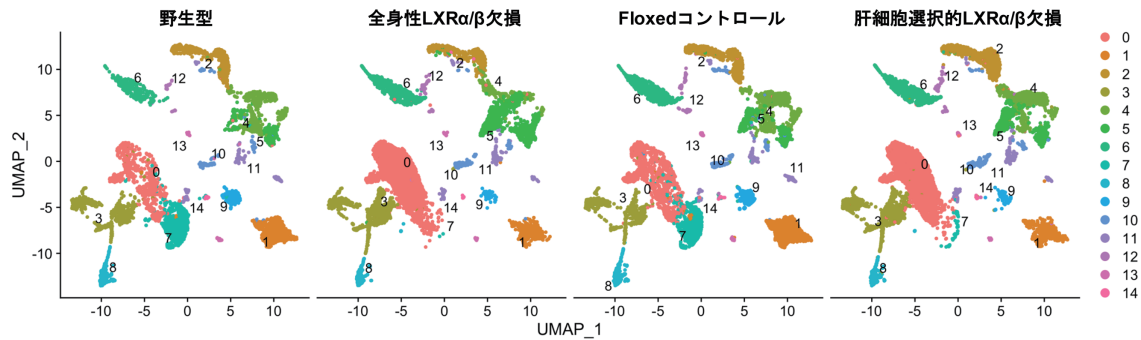


図5 肝臓免疫細胞を用いたシングルセル解析の4検体間の比較

左から野生型, 全身性 LXR α / β 欠損, Floxed コントロール, 肝細胞選択的 LXR α / β 欠損におけるインテグレーション後のシングルセル解析データを UMAP プロットを用いて検体ごとに可視化した。各ドットは単一細胞を示し、色分けされた各クラスターは遺伝子発現パターンの異なる細胞集団を示す。

LXR α / β 欠損をそれぞれ比較したところ、ある種のクラスターにおいて細胞分布パターンが異なることが示された。興味深いことに、全身性 LXR α / β 欠損と肝細胞選択的 LXR α / β 欠損のパターンは類似していた。

3) MASLD 及び MASH モデルマウスの解析

2) のシングルセル解析の結果より、LXR α / β 欠損により免疫細胞組成及び機能が変化するのは肝細胞の LXR α 及び LXR β に依存することが示されたが、これらの結果は通常食負荷の生理的条件下における効果であった。そこで、次に食餌誘導性 MASLD 及び MASH の病態モデルマウスにおける全身性及び肝細胞選択的 LXR α / β 欠損の影響を検討した。その結果、肝細胞選択的 LXR α / β 欠損マウスは全身性欠損と同様に肝臓及び脾臓の組織重量が有意に増加した。また、フローサイトメトリーを用いて肝臓免疫細胞組成を評価したところ、1) の結果を反映し、全身性欠損と肝細胞選択的欠損は類似の肝臓免疫細胞組成パターンを示した。

4. 考察

本年度の検討の結果、これまでの検討で見出した、生理的条件下において全身性 LXR α / β 欠損マウスで観察される肝臓免疫細胞の分布及び機能変化は肝細胞選択的 LXR 欠損マウスにおいても同様に観察されることがシングルセル解析を行うことによって明らかとなった。したがって、LXR α 及び LXR β は肝細胞において、脂質代謝制御を介して、または直接的に肝臓免疫細胞の分布及び機能制御に影響することが示された。近年、UK Biobank にお

けるヒトデータベースを用いた解析から、少なくとも 450 人に 1 人が LXR α の機能不全型変異体を保有していること、血中成分分析の情報から肝障害マーカーが有意に増加することが報告された⁸⁾。さらに、発見された機能不全型変異体の 1 つを肝細胞に発現させたマウスは MASH を早期に誘導することから^{8,9)}、我々が全身性及び肝細胞選択的欠損マウスを用いて見出した知見と一致し、LXR α 及び LXR β が肝免疫系恒常性維持及び肝障害抑制に必須な因子であることが示された。一方、先述の報告は、肝組織または単離した肝細胞に限定した解析であり、免疫細胞を用いた解析は報告されていない。したがって、本研究において我々が見出した知見は、MASH の病態制御における免疫作用を介した LXR α 及び LXR β のさらなる重要性を示す上で非常に重要な情報であると言える。今後は、今回確立したシングルセル解析や肝組織切片を用いてさらに詳細な解析を進めていく予定である。

5. 結語

令和 6 年度は、本研究の課題であった本学内でのシングルセル解析の実施及び解析について、実際に本検体を用いて達成することができた。その結果、これまでフローサイトメトリーを用いた個々の免疫細胞の検出や、肝臓非実質細胞を用いたバルクの RNA シークエンスなどの手法を用いた解析では見出すことのできなかった、希少細胞の情報や免疫細胞の全体像が把握できるようになった。なお、本解析手法は本研究で用いた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の細胞を用いて解析

が可能である。これまでは生細胞を用いて直ちにライブラリーを作製する必要があり、時間的な制限が問題であったが、最近は今回実施したように固定した細胞やパラフィン切片等を用いたライブラリー作製が可能となり、容易に検体が準備できるようになった上、短時間の反応系の実験にも利用可能になった。今後は、医学部内での技術提供及び普及に努めるとともに、本学全体の研究推進力の発展に貢献すべく他の医歯薬系学部である歯学部及び薬学部や、生物資源科学部及び文理学部等の生命科学系学部との連携を目指していきたい。

（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、本編で報告した内容は、日本大学本部発行の学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕実績報告書において重複して記載されていること、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, 22H04925 (PAGS) 及び25K10237）、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* 2019;20(20): E5045 (Review).
- 2) Endo-Umeda K, Makishima M. Exploring the roles of liver X receptors in lipid metabolism and immunity in atherosclerosis. *Biomolecules* 2025;15(4):579 (Review).
- 3) 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* 2018;159(3):1419-1432.
- 4) Endo-Umeda K, Nakashima H, Komine-Aizawa S, Umeda N, Seki S, Makishima M. Liver X receptors regulate hepatic F4/80 \cdot CD11b $^{+}$ Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice. *Sci Rep* 2018;8: 9281.
- 5) 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* 2021;11:22595.
- 6) Xiong X, Kuang H, Ansari S, Liu T, Gong J, Wang S et al., Landscape of Intercellular Crosstalk in Healthy and NASH Liver Revealed by Single-Cell Secretome Gene Analysis. *Mol Cell* 2019;75(3):644-660.
- 7) 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* 2020;53(3):641-657.
- 8) Lockhart SM, Muso M, Zvetkova I, Lam BYH, Ferrari A, Schoenmakers E et al., Damaging mutations in liver X receptor- α are hepatotoxic and implicate cholesterol sensing in liver health. *Nat Metab* 2024;6(10):1922-1938.
- 9) Clark AT, Russo-Savage L, Ashton LA, Haghshenas N, Amselle NA, Schulman IG. A mutation in LXR α uncovers a role for cholesterol sensing in limiting metabolic dysfunction-associated steatohepatitis. *Nat Commun* 2025;16(1):1102.

新規BMP拮抗分子に着目した心筋細胞の線維化機構の解明

小林洋輝¹⁾, 常見明子¹⁾, 村田悠輔¹⁾, 松岡友実¹⁾, 中村吉宏¹⁾, 阿部雅紀¹⁾

Functional analysis of novel BMP antagonist as causal factor of myocardial fibrosis

Hiroki KOBAYASHI¹⁾, Akiko TSUNEMI¹⁾, Yusuke MURATA¹⁾, Tomomi MATSUOKA¹⁾,
Yoshihiro NAKAMURA¹⁾, Masanori ABE¹⁾

要旨

研究代表者は、これまでの研究によりBMP拮抗分子であるNeuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1) が末期腎不全の発症予測バイオマーカーであること、さらに腎線維化や近位尿管細胞のEMT誘導に関与する可能性を見出してきた。本研究ではこのNBL1の心筋における役割を明らかにすべく、細胞実験・動物モデル・臨床検体解析を通じて、NBL1の心筋線維化機構への関与を包括的に検討した。その結果、NBL1がEndMT様の応答を誘導すること、心筋ストレスモデルにおいて線維化・炎症を増強する可能性が示された。また、透析患者においてはNBL1自体のCVD予測能は確認されなかったが、多数の関連タンパク質が同定され、新たな多因子予測モデル構築の契機となった。

1. はじめに

研究代表者はこれまで、糖尿病性腎症患者の血漿中タンパク質を網羅的に解析し、BMP拮抗分子であるNeuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1) が末期腎不全 (ESRD) の発症を強力に予測するバイオマーカーであることを、世界で初めて報告した^{1,2)}。さらに、NBL1ノックアウトマウスにおいては腎線維化の進行が著明に抑制されることを確認している (未発表)。これらの所見は、NBL1が単なるバイオマーカーではなく、線維化の病態進展に関与する因子である可能性を示唆する。また、ヒト近位尿管細胞においてNBL1を添加して培養したところ、上皮間葉転換 (EMT) 様の変化が認められた。これまで、BMP7は腎線維化を抑制することが報告されており、その拮抗分子であるNBL1はBMP7の抗線維化作用を阻害すると考えられる。このことから、NBL1は腎臓のみならず、心筋におい

ても線維化の進展に関与している可能性があると考えた。

本研究では、①培養内皮細胞に対するNBL1の役割、②NBL1ノックアウトマウスを用いてNBL1が心臓の障害にどのような影響を及ぼすかについて検討した。また、③透析患者において、血中NBL1が心血管疾患の発症予測バイオマーカーになりうるかについて解析し、臨床的にもNBL1が新血管疾患の発症に関連するかについて検討した。

2. 対象及び方法

①培養細胞実験：HUVECを用いた内皮間葉転換 (EndMT) 解析

心筋線維化においては、線維芽細胞および筋線維芽細胞の活性化・増殖が中心的な役割を果たす。その線維芽細胞の一起源として、左心室や心室中隔に存在する心臓内膜細胞が、EndMTを経て線維芽細胞

1) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野
研究責任者: 小林洋輝, kobayashi.hiroki@nihon-u.ac.jp

胞へと分化することが報告されている。EndMTは、内皮由来細胞が間葉系形質（ α -SMAやfibronectinの発現）を獲得し、線維化に直接関与する過程である。本研究では、NBL1がEndMTを誘導しうるかを評価するため、実験モデルとしてヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を使用した。HUVECは心臓内膜細胞とは異なるが、内皮細胞としての表現型と応答性を有しており、EndMTに関する研究で広く活用されている細胞系である。そこで、HUVECをサブコンフルエントまで培養した後、リコンビナントNBL1が1000ng/mlになるように培地に添加して3～7日間培養した。遺伝子発現解析は、TRIzolで細胞を回収、total RNAを精製後に逆転写し、EndMTマーカーをリアルタイムPCRで解析した。またHUVECのマーカーであるVE-cadherinについては、固定後に蛍光免疫染色を行った。

②動物実験：NBL1ノックアウトマウスを用いた心筋障害モデルの作製と評価

次に、NBL1が心臓線維化に関与するかについて、非選択的 β アドレナリン受容体作動薬であるイソプロテレノールを用いた動物モデルで検討した（日本大学動物実験計画書 承認番号AP24MED031-1）。NBL1ノックアウト（KO）マウス（-/-）およびWTマウス（+/+）に対し、イソプロテレノールを浸透圧ポンプ（Model 1004 pump、リザーバー容量100 μ l、ALZET Tech）に注入し、投与量が20 mg/kg/dayで7日間皮下持続投与することで心筋障害を誘導した。これは心肥大・線維化を再現可能な確立されたモデルであり、心筋ストレスに対する各群の反応を比較することで、NBL1の病態関与を検証した。マウス心臓は、Sirius Red染色やMasson trichrome染色による線維化評価を行い、あわせて線維化関連遺

伝子（COL1A1、 α -SMA、fibronectinなど）および炎症・損傷関連マーカーの発現量を検討した。

③臨床研究：維持透析患者における血中蛋白と将来のCVD発症との関連の検討

日本大学医学部附属板橋病院の関連透析クリニック（6施設）に通院する維持血液透析患者を対象に保存血液検体を用いて血中NBL1を網羅的蛋白測定であるOlink explore HTを用いて測定し、将来の心血管イベント（致死性、非致死性の心筋梗塞、脳卒中、狭心症）の発症との関連をFold change analysisを用いて解析した。尚、本研究計画は日本大学医学部附属板橋病院の臨床研究倫理審査委員会に受理され（RK-220308-1）、全参加患者からの同意書を取得している。

3. 結果

①培養細胞実験：HUVECを用いた内皮間葉転換（EndMT）解析

HUVECをリコンビナントNBL1 1000ng/ml添加した培地で3日間培養した後のEndMTに関連する遺伝子をリアルタイムPCRで解析したところ、コントロール群と比較して、NBL1添加群でfibronectinの有意な上昇が認められた（Fig.1）。また、HUVECにリコンビナントNBL1 1000ng/ml添加した培地で7日間培養した後に固定し、血管内皮細胞に特異的に発現し、内皮細胞の形態を維持するVE-cadherinに対する蛍光免疫染色を行った（Fig.2）。コントロールのHUVECでは、細胞間にVE-cadherinが認められていたが、NBL1で刺激したHUVECにおいては、EndMTを起こすTGF β 1（ポジティブコントロール）と同様に、VE-cadherinの発現の減少が認められた。これらの結果よりNBL1が内皮細胞の形態およ

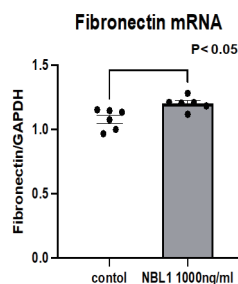


Fig 1. リアルタイムPCRによる発現解析（Day3）

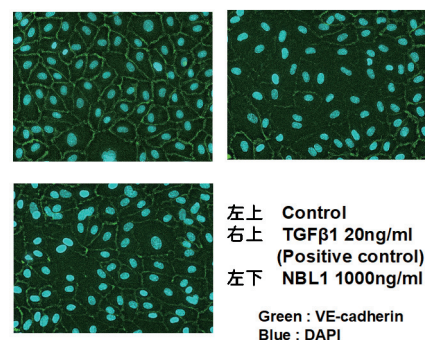


Fig 2. VE-cadherinの蛍光免疫染色（Day7）

び分子マーカーの変化を誘導し、EndMT様の細胞応答を促進する可能性があることを示している。今後は、NBL1がEndMTを誘導する際に関与する分子機構について、より詳細に検討する予定である。

②動物実験：NBL1ノックアウトマウスを用いた心筋障害モデルの作製と評価

NBL1ノックアウト (KO) マウス (-/-) および野生型 (WT) マウス (+/+) に対して、イソプロテレノールを20 mg/kg/dayで7日間、浸透圧ポンプを用いて皮下持続投与し、心筋障害モデルを作製した。投与前後の体重変化は、明確な減少傾向は認められなかった。一方、心臓重量比 (HW/BW) については、イソプロテレノール非投与のコントロール群と比較して、投与群では増加傾向が確認された。心臓組織からtotal RNAを抽出し、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を行った結果、イソプロテレノール投与群では、コントロール群に比べて線維化関連遺伝子 (fibronectin, α -SMA, TGF- β 1, CTGF等) の発現が上昇しており、加えて、炎症性ケモカインであるMCP-1の発現も増加していた。また、Sirius Red染色では、投与群において、コラーゲン線維の増加が認められた。これらの結果は、イソプロテレノール投与によって心筋組織において線維化および炎症応答が惹起されることを示唆している。なお、現時点では統計学的検定に必要な実験頭数には達していないため、引き続き動物実験を継続中である。今後は、NBL1 KOマウスとWTマウス間で線維化や炎症応答に差異が認められるかどうかについて、組織学的および分子生物学的評価を通じて検討を進めていく予定である。

③臨床研究：維持透析患者における血中蛋白と将来のCVD発症との関連の検討

注目していたNBL1については、血中濃度と2年以内のCVD発症との間に有意な関連は認められなかった。一方で、網羅的な探索により、多数の新規蛋白がCVDリスクと有意に関連することが明らかとなった。図に示すように (Fig.3 参照)、全5440蛋白のうち、152蛋白がCVD発症群で有意に上昇 ($\log_2 FC \geq 0.263$, FDR < 0.1)、15蛋白が有意に低下 ($\log_2 FC \leq -0.263$, FDR < 0.1) していた (図: Volcano plot)。これらの候補蛋白群には、NBL1が関与する重要な線維化 signaling である TGF- β pathway に含

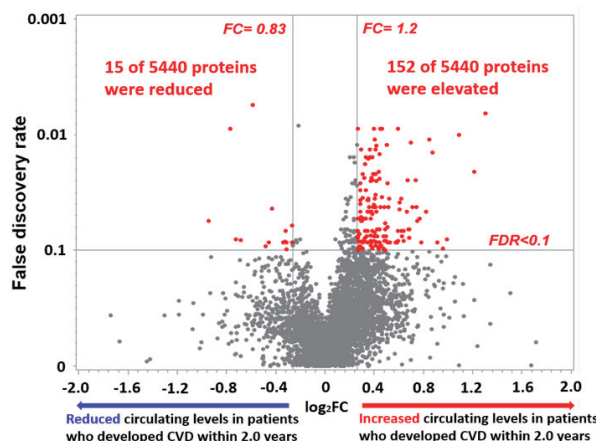


Fig 3. CVD発症群と非発症群における血中蛋白プロファイルの違い

まれる蛋白に加えて、以下のような生物学的特性が確認された：

- ・慢性炎症・免疫調節に関与するサイトカインやケモカイン様分子：慢性炎症状態が持続する透析患者では、軽微な免疫活性化がCVD進展の重要な引き金となる可能性があり、本研究で同定された複数の分子は、自然免疫系やT細胞活性と関連していた。
- ・血管構造や機能に関与する内皮細胞関連因子：血管内皮障害、血管リモデリング、マトリックス代謝に関与する因子が複数含まれており、透析患者に特有の動脈硬化の進行メカニズムを反映している可能性がある。
- ・代謝・ミトコンドリア機能に関与する酵素や構造蛋白：酸化ストレスやエネルギー代謝異常が心筋障害に波及する経路として注目されており、関連分子のいくつかはミトコンドリア局在や脂質代謝に関与していた。
- ・線維化や組織修復に関連する因子：特に心不全病態との関連が示唆される因子も複数含まれており、リモデリングに伴う組織硬化の進展が心血管イベントの背景にあることが示唆される。
- ・細胞ストレス応答やアポトーシスに関連する分子：カスパーゼ、ヒートショックタンパク、ユビキチン関連分子など、透析患者における細胞損傷と修復のバランス破綻を反映する可能性がある。

以上のように、本研究ではNBL1自体の有意性は確認されなかったものの、透析患者におけるCVD発症の新たな分子基盤が明らかとなった。今後は、

これらの蛋白を含む多因子予測モデルの構築、および外部コホートにおける再現性検証を通じて、個別化予防介入や治療標的の探索に発展させる必要がある。

4. 考察

本研究では、新規BMP拮抗分子であるNBL1が、心筋線維化の進展にどのように関与するかを、細胞実験、動物モデル、臨床検体の三段階で包括的に検討した。研究代表者がこれまでに糖尿病性腎症患者を対象とした研究で明らかにしてきたNBL1の腎線維化への関与に続き、本研究により、NBL1が腎臓に限らず心筋にも線維化促進因子として作用する可能性が示された。

まず、HUVECを用いた培養実験では、NBL1添加によってEndMT関連マーカーであるfibronectinの発現が有意に上昇し、内皮マーカーであるVE-cadherinの発現が減少したことが確認された。これらの結果は、NBL1が内皮細胞の形態的および分子的变化を誘導し、EndMT様の細胞応答を促進する可能性を示唆する。EndMTは心筋線維化における新たな線維芽細胞供給源として注目されており、心臓内皮細胞が間葉系細胞へと転換することで線維芽細胞を形成し、心筋組織のリモデリングに寄与する。この点で、NBL1がEndMT誘導因子として機能する可能性は、心筋線維化の分子機構を解明するうえで重要な意味を持つ。

次に、イソプロテレノール誘導心筋障害モデルを用いた動物実験では、NBL1 KO マウスではWTマウスに比べて線維化関連遺伝子 (fibronectin, α -SMA, TGF- β 1, CTGF) の発現上昇が抑制されており、加えてSirius Red染色でのコラーゲン沈着も軽度であった。これらの所見から、NBL1欠損はイソプロテレノールによる心筋線維化および炎症反応を抑制する保護的効果を有する可能性がある。また、炎症性ケモカインであるMCP-1の発現もWT群で有意に上昇し、NBL1が炎症応答の促進にも寄与することが示唆された。BMP7は本来、抗線維化・抗炎症作用を有することが知られており、NBL1はBMP7の作用を拮抗することで、TGF- β 経路を相対的に優位にし、線維化および炎症反応を促進すると考えられる。

さらに、維持透析患者における臨床的な解析で

は、NBL1の血中濃度と将来の心血管イベント発症との明確な相関は認められなかったものの、Olink explore HTによる網羅的評価により、CVD発症群で有意に変動する複数の候補タンパク質が同定された。これらの多くは、TGF- β /BMP経路、慢性炎症、血管内皮障害、代謝異常、ミトコンドリア機能、細胞ストレス応答などに関連しており、NBL1が直接・間接的に関与する可能性のある生物学的ネットワークの広がりを示している。特に、透析患者のような慢性炎症状態においては、軽度な分子変動が複合的に蓄積し、CVD発症リスクを高めることが想定され、NBL1を超えて今回同定した多様な血中タンパク質が複合的に病態に関与する可能性が示唆された。

NBL1はもともと神経芽細胞腫における腫瘍抑制因子として発見されたが、近年では線維化や炎症など多様な病態への関与が注目されている。今回の研究により、NBL1がBMPシグナルを介して腎・心いずれの臓器でも線維化を促進することが示され、心腎連関病態における中心的役割を担う可能性が明らかとなった。今後、NBL1の発現調節因子や作用機序をより詳細に解明すること、さらにはNBL1を標的とした治療介入の有効性をin vivoおよび臨床試験で検討することが期待される。さらに、維持透析患者を対象とした血中蛋白質の網羅的解析により同定した新規蛋白についてはNBL1とは別に、別コホートでのValidationや機能解析を進める予定である。

一方で、本研究にはいくつかの限界も存在する。まず、動物実験における検体数が限られており、統計学的有意差を明確に示すには更なる頭数の追加が必要である。また、EndMTの誘導においても、VE-cadherinやfibronectinに加えて、SnailやSlugといったトランスクリプションファクターの発現や細胞運動性の評価を通じた包括的解析が求められる。さらに、臨床検体解析においてNBL1の有意な予測能を認めなかったことから、その他の多因子予測モデルやパネルマーカーとしての応用を検討する必要がある。

以上より、NBL1はBMPシグナルを介して心筋線維化および炎症を促進する新たな分子であり、腎疾患のみならず心疾患の進展にも関与する可能性が示唆された。特に心腎連関病態における分子ターゲットとしての価値は高く、今後のトランスレーショナ

ルリサーチや創薬研究への応用が強く期待される。

5. 結語

本研究により、NBL1がBMPシグナルを抑制することを通じて心筋線維化および炎症に関与する可能性が示された。細胞・動物・臨床の各実験系で一貫した所見が得られ、NBL1が心腎連関に関与する共通の線維化促進因子であることが示唆された。今後、NBL1を標的とした診断法および治療法の開発が期待される。

謝辞

本研究は、令和6年度本部助成金(若手研究者助成金)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) Kobayashi H, Looker HC, Satake E, et al. Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 is a circulating protein associated with progression to end-stage kidney disease in diabetes. *Sci Transl Med* 2022;14(657):eabj2109.
- 2) Kobayashi H, Satake E, Murata Y, et al. Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 is associated with the severity of interstitial fibrosis and kidney function decline in IgA nephropathy. *J Nephrol* 2023;36(8):2245-2256.

免疫細胞可視化マウスを用いた妊娠免疫応答の解明

高田和秀¹⁾, 竹田善紀¹⁾, トリンズイクアン¹⁾, 相澤(小峯)志保子¹⁾Evaluation of the immune system during pregnancy
by immune response visualization mouseKazuhide TAKADA¹⁾, Yoshinori TAKEDA¹⁾, Quang Duy TRINH¹⁾,
Shihoko KOMINE-AIZAWA¹⁾

要旨

妊娠子宮にはNK細胞、制御性T細胞 (Treg)、マクロファージ、樹状細胞など多種多様な免疫担当細胞が集積し、胎盤形成や免疫寛容に関与する。しかし、妊娠に伴って子宮内に増加するこれらの細胞は、元来子宮内に存在していた細胞が増殖・分化したのか、他臓器から移動してきたのか、不明である。本研究では紫外線照射により蛍光発色に変化するKikGRマウスを用い、各リンパ組織における免疫細胞を標識し、子宮の免疫細胞の由来を明らかにすることを目的とした。フローサイトメトリの結果より、腋窩リンパ節から子宮へCD3+T細胞の遊走が認められ、その大半はCD8+細胞傷害性T細胞ということが判明した。また腸と女性生殖器官における相互作用に関する文献検索も併せて行った。本研究により半非自己である胎児に対する免疫応答の理解が進めば、少子化時代における不妊・不育の治療や予防戦略の確立に寄与することが期待できる。

1. はじめに

メスの体内で胎盤と胎児を育てる真胎生の生殖様式をとる脊椎動物では、獲得免疫系による異物認識から、半非自己である胎児・胎盤が逃れるメカニズムが必要である¹⁾。妊娠子宮にはNK細胞、制御性T細胞 (Treg)、マクロファージ、樹状細胞など多種多様な免疫担当細胞が集積し、胎盤形成や免疫寛容に関与する²⁾。しかし、妊娠に伴って子宮内に増加するこれらの細胞は、元来子宮内に存在していた細胞が増殖・分化したのか、他臓器から移動してきたのか、不明である。近年、妊娠後のマウス子宮における未成熟樹状細胞の増加は子宮外からの流入であることが報告されたが³⁾、それ以外の免疫細胞の由来は明らかになっていない。そこで本研究では紫外線照射により蛍光発色に変化するKikGRマウス⁴⁾を用い、各リンパ組織における免疫細胞を標識し、子

宮の免疫細胞の由来を明らかにすることを目的とした。本研究により半非自己である胎児に対する免疫応答の理解が進めば、少子化時代における不妊・不育の治療や予防戦略の確立に寄与し、SDGs目標「3.すべての人に健康と福祉を」の達成の一助となる。

2. 対象及び方法

本研究は遺伝子組換え実験及び動物実験であるため、医学部各委員会の承認を得て実施した。(承認番号GU24MED002-2、AP24MED025-2、AP24MED026-2)。実験の概要を図1に示す。

マウス

KikGRマウス (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<tm1.1(CAG-kikGR)Kgwa>) は、特定の波長の光 (紫外線等) により緑色から赤色に蛍光が変化する光変換蛍光タン

1) 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: 高田和秀, takada.kazuhide@nihon-u.ac.jp

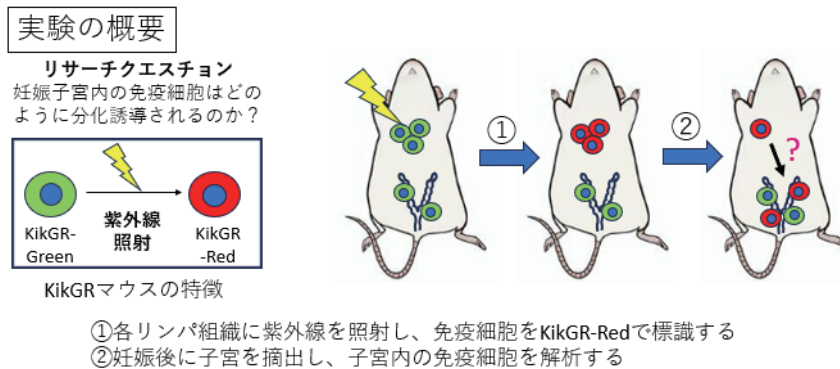


図1 実験の概要

パク質であるキクメイシ (*Favia fava*) 由来 KikGR 遺伝子をノックインしたマウスであり、理研バイオリソースセンターから購入後、維持継代を行った。

リンパ節への紫外線照射

イソフルランによる吸入麻酔下において8~12週齢のメスマウスの腋窩を剃毛後に上皮切開し、腋窩リンパ節を露出した状態において、紫外線照射を2分間行った。紫外線照射にはペンキュアー2000（株式会社モリタ製作所）を用いた。最後に創部を縫合した。

フローサイトメトリーによる子宮免疫細胞の評価

紫外線照射から一週間後、イソフルラン吸入麻酔下に、熟練者によって頸椎脱臼し安楽死させた後に、子宮を摘出した。組織をセルストレーナー上でハサミを用いてホモジェナイズしたあとPBSを加えながらシリンジの底部で濾し、50mlチューブに回収した。2000rpmで5分遠心した後上清を捨て、ACK Lysis Buffer (Thermo Fisher) を1ml加えて3分間静置し、赤血球を溶血させた。PBSを10ml加え2000rpmで3分間遠心した後上清を捨て、PBS1mlでペレットを溶解し1.5mlエッペンチューブに移し替えた。

再度10000rpmで3分遠心した後上清を捨て、Live/Dead (Thermo Fisher; 1:1000 in PBS) を100μl加えて室温で10分間遮光しながらインキュベートした。10分後にPBSを900μl加え10000rpmで3分遠心した後、上清を捨てPBS100μlに希釈した細胞表面抗体液を加えて室温で遮光しながら20分インキュベートした。用いた細胞表面抗体はanti-CD45

(1:100; BD)、anti-CD3 (1:100; BD)、anti-CD4 (1:100; BD)、anti-CD8 (1:100; BD)、anti-CD19 (1:100; BD)、anti-NK1.1 (1:100; BD) である。その後PBSを900μl加え10000rpmで3分間遠心して洗浄した。洗浄は計2回行った。

次にCytofix/Cytoperm (BD) を100μl加え40分間氷上で静置した。その後Perm wash (BD) を500μl加えて12000rpmで3分間遠心した。上清を捨てたのち、Perm washで希釈したanti-Foxp3 抗体(1:100; BD) を100μl加え、室温で遮光しながら30分間インキュベートした。その後Perm washを500μl加え12000rpmで3分間洗浄した。洗浄は計2回行った後、PBSに希釈した0.8%PFA液を300μl加え、解析まで4℃で保管した。フローサイトメトリーにおける解析はCytoFLEX (Beckman Coulter) を用いた。KikGRマウスは全身にFITCチャンネルで検出可能な蛍光色素KikGR-Greenを発現しており、紫外線照射によりPEチャンネルで検出可能な蛍光色素KikGR-Redに変化する。そのため子宮から離れた遠隔組織で紫外線標識した細胞が子宮で検出された場合には、その遠隔組織から免疫細胞が遊走したということになる。

3. 結果

フローサイトメトリーの結果を図2に示す。図中の枠内がKikGR-Red陽性細胞、つまり腋窩リンパ節から子宮へ遊走してきた細胞と考えられる。フローサイトメトリーの結果より、腋窩リンパ節から子宮へCD3+T細胞の遊走が認められ、その大半はCD8+細胞傷害性T細胞ということが判明した。一方でCD4+ヘルパーT細胞の遊走はCD8+細胞傷害

性T細胞と比べると少なく、Foxp3+制御性T細胞は検出されなかった。またB細胞やNK細胞の遊走も認めたが、B細胞の遊走数は他の細胞と比べると相対的に少なかった。

4. 考察

今回のフローサイトメトリーの結果をまとめると、腋窩リンパ節から子宮へ遊走する免疫細胞は主にCD8+細胞傷害性T細胞とNK細胞であると考えられた。通常の動物実験では、動物愛護の観点から必要数のマウスをその都度購入することが原則であるが、KikGRマウスは提供元の理研バイオリソースセンターの規定により、繁殖用ペアでの提供となったため、自施設で繁殖を行う必要があった。それゆえマウスの繁殖継代を自施設で行った。今回の研究期間ではマウスの不妊や、出産した仔マウスを母親マウスが食殺してしまう事例が生じる等、当初の繁殖計画通りにマウスの供給を行うことが出来なかった。そのため現在繁殖計画を見直し、安定したマウスの供給体制の構築中である。マウスの安定供給体制が確立次第、腸骨下リンパ節やパイエル板など他のリンパ節標識も行い、妊娠時の免疫細胞の遊走も評価していく予定である。

次に腸と女性生殖器間における相互作用の関係について考察する。妊娠可能年齢における女性の腔内細菌叢は多様性の低い*Lactobacillus*主体であることが多い⁵⁾。しかしながら、多様性が多い方が健康的

とされる腸内細菌叢とは真逆であり、なぜ1~2種類の*Lactobacillus*のみが優位種として選択されるのかについては、まだ分かっていない。我々は以前腔内優位種が他の*Lactobacillus*の増殖を抑制するとの仮説を立て、それぞれの種の培養上清をお互いに添加することでその影響を検討したが、予想に反し*Lactobacillus*同士の明らかな増殖要請は見られなかった⁶⁾。この結果から女性の腔内における*Lactobacillus*の優位性には、宿主側の選択因子が強く影響している可能性が想定される。興味深いことに、マウスの腔内細菌叢は*Lactobacillus*主体ではないが、ヒトの腸内細菌叢を再現したマウスでは、腔内の*Lactobacillus*の割合が増加しており⁷⁾、腸-腔相関の存在が考えられる。

腸内細菌叢の制御にIgAが関与していることは近年分かってきたが⁸⁾、最近では腔内細菌もIgAコーティングを受けているとの報告が散見される⁹⁻¹¹⁾。機序はまだ不明であるものの、腔内細菌叢の構成によって、IgAコーティングの程度は変化しており、IgAによる細菌叢制御の可能性が示唆される。さらに子宮摘出後には腔内の抗体濃度が低下したという報告があり¹²⁾、子宮への抗体産生細胞を含む免疫細胞の遊走の実態解明が重要であると思われる。

子宮頸がんの原因となるヒトパピローマウイルス(HPV)の予防のために、HPVの構造の一部を表面に発現させた*Lactobacillus*を用いた経口ワクチンが研究されている。経口ワクチン投与後に、ワクチン

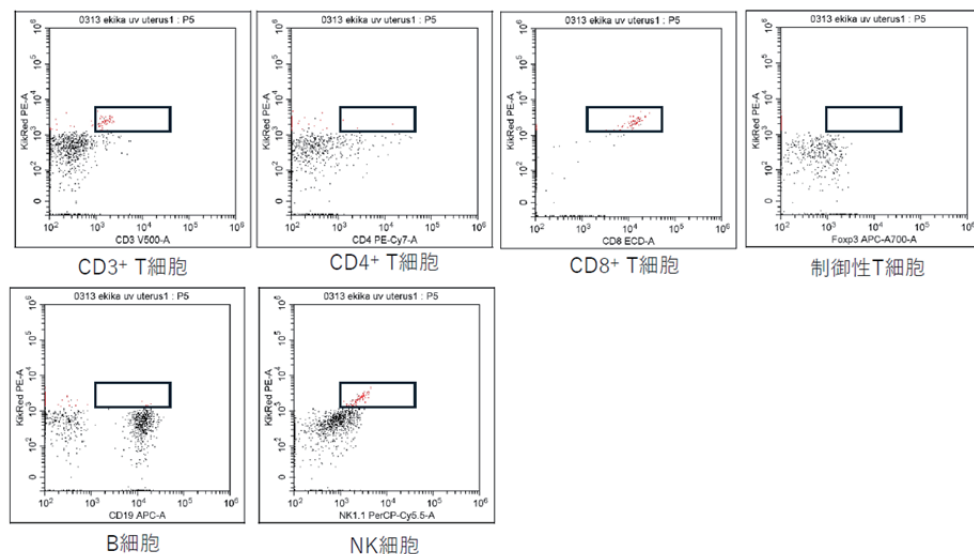


図2 フローサイトメトリーの結果

の標的構造を認識するIgA抗体が腔内で検出されていることから、消化管で*Lactobacillus*の一部を認識した免疫細胞が腔まで遊走し、局所で抗体を産生している可能性が考えられる^{7,13,14}。ヒトの回腸では*Lactobacillus*が局所的に多く¹⁵、そこで*Lactobacillus*反応性の免疫細胞が誘導され、その一部が腔へと遊走して、抗体産生を行うことで腔内細菌叢を制御しているという可能性が示唆された(図3)¹⁶。

5. 結語

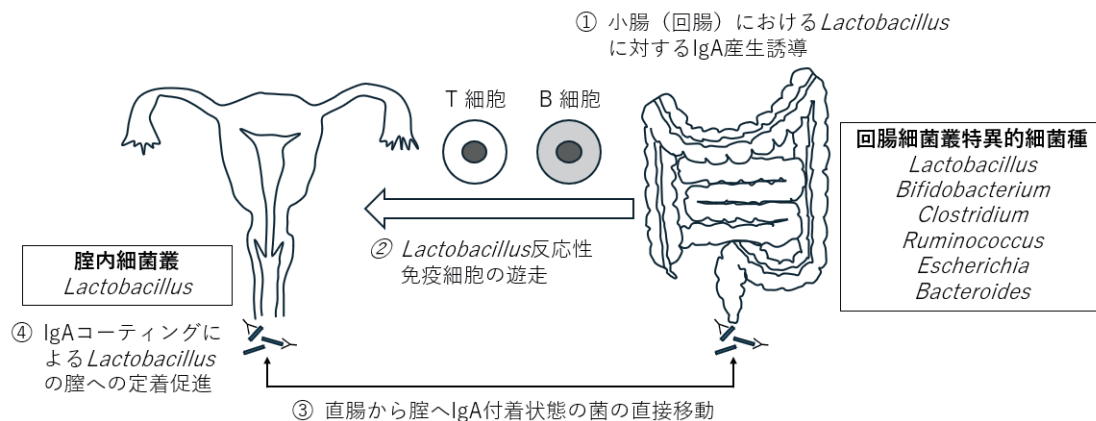
腸－子宮相関や、腸－腔相関の機序が明らかになり、半非自己である胎児に対する免疫応答の理解が進めば、少子化時代における不妊・不育の治療や予防戦略の確立に寄与することが期待できる。

謝辞

本研究は 令和6年度 日本大学若手研究者助成金の支援のもと行われた。

文 献

- 1) Rackaityte E, Halkias J. Mechanisms of Fetal T Cell Tolerance and Immune Regulation. *Frontiers in immunology* 2020;11:588.
- 2) Ding J, Maxwell A, Adzibolosu N, Hu A, You Y, Liao A, et al. Mechanisms of immune regulation by the placenta: Role of type I interferon and interferon-stimulated genes signaling during pregnancy. *Immunological reviews* 2022;308:9-24.
- 3) Yasuda I, Shima T, Moriya T, Ikebuchi R, Kusumoto Y, Ushijima A, et al. Dynamic Changes in the Phenotype of Dendritic Cells in the Uterus and Uterine Draining Lymph Nodes After Coitus. *Frontiers in immunology* 2020;11:557720.
- 4) Tomura M, Hata A, Matsuoka S, Shand FH, Nakaniishi Y, Ikebuchi R, et al. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Scientific reports*. 2014;4:6030.
- 5) Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:4680-4687.
- 6) Hayashida S, Takada K, Melnikov VG, Komine-Aizawa S, Tsuji NM, Hayakawa S. How were *Lactobacillus* species selected as single dominant species in the human vaginal microbiota? Coevolution of humans and *Lactobacillus*. *Medical Hypotheses* 2022;163:110858.
- 7) Mejia ME, Mercado-Evans V, Zulk JJ, Ottinger S, Ruiz K, Ballard MB, et al. Vaginal microbial dynamics and pathogen colonization in a humanized microbiota mouse model. *NPJ biofilms and microbiomes* 2023;9:87.
- 8) Huus KE, Bauer KC, Brown EM, Bozorgmehr T, Woodward SE, Serapio-Palacios A, et al. Commensal Bacteria Modulate Immunoglobulin A Binding in Response to Host Nutrition. *Cell host & microbe* 2020;27:909-921.e5.
- 9) Breedveld AC, Schuster HJ, van Houdt R, Painter



Takada K, *Front. Immunol.* 2025より改変

図3 腸－腔相関の予想図

- RC, Mebius RE, van der Veer C, et al. Enhanced IgA coating of bacteria in women with *Lactobacillus crispatus*-dominated vaginal microbiota. *Microbiome* 2022;10:15.
- 10) Schuster HJ, Breedveld AC, Matamoros SPF, van Eekelen R, Painter RC, Kok M, et al. The interrelation between microbial immunoglobulin coating, vaginal microbiota, ethnicity, and preterm birth. *Microbiome* 2024;12:99.
- 11) Murphy K, Gromisch M, Srinivasan S, Wang T, Wood L, Proll S, et al. IgA coating of vaginal bacteria is reduced in the setting of bacterial vaginosis (BV) and preferentially targets BV-associated species. *Infection and immunity* 2024;92:e0037323.
- 12) Mestecky J, Russell MW. Induction of mucosal immune responses in the human genital tract. *FEMS immunology and medical microbiology* 2000;27:351-355.
- 13) Mohseni AH, Taghinezhad SS, Keyvani H. The First Clinical Use of a Recombinant *Lactococcus lactis* Expressing Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncogene Oral Vaccine: A Phase I Safety and Immunogenicity Trial in Healthy Women Volunteers. *Molecular cancer therapeutics* 2020;19:717-727.
- 14) Yoon SW, Lee TY, Kim SJ, Lee IH, Sung MH, Park JS, et al. Oral administration of HPV-16 L2 displayed on *Lactobacillus casei* induces systematic and mucosal cross-neutralizing effects in Balb/c mice. *Vaccine* 2012;30:3286-3294.
- 15) Yersin S, Vonaesch P. Small intestinal microbiota: from taxonomic composition to metabolism. *Trends in microbiology* 2024;32:970-983.
- 16) Takada K. IgA and the gut-vagina axis. *Frontiers in immunology* 2025;16:1547303.

地域健康広告プロジェクト： ローカルメディア連携による持続可能な健康的な地域社会の実現

権 寧博¹⁾，丸岡秀一郎¹⁾，北野尚孝¹⁾，茅原良平²⁾

Regional Health Advertising Project: Achieving a Sustainable Healthy Community through Local Media Collaboration

Yasuhiro GON¹⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾, Hisataka KITANO¹⁾, Ryohei KAYAHARA²⁾

Abstract

To address the need for sustainable health promotion in aging societies, this project promotes regional health literacy and preventive behavior through collaboration among Nihon University Itabashi Hospital, Itabashi Keizai Shimbun, Nihon University College of Art, and a community radio station. Since September 2024, health articles have been published in the local newspaper, and a podcast titled *anatato*, produced by students and faculty, has been distributed via YouTube and social media.

This initiative uses cross-promotional strategies to link written and audio content, making health information more accessible and engaging. Feedback from residents helps adapt the content to local needs. Supported by the Nihon University Alumni Association, the project aims to foster public awareness, increase screening and vaccination uptake, and contribute to the SDGs by ensuring inclusive access to health information.

1. はじめに

本研究は、高齢化社会において地域社会への健康情報の発信を通じて、地域全体の健康水準を向上させることを目的とした社会実装型の研究であり、これによりSDGsの達成に寄与することを目指している。高齢者の増加に伴い、慢性疾患や生活習慣病が広がる中で、医療資源の圧迫と医療費の増大が深刻化している現状において、地域社会での健康増進と予防医療の推進が不可欠である。これにより、SDGsの目標である「すべての人に健康と福祉を」の達成に向けた具体的なアクションを展開することを目指している。

本プロジェクトでは、日本大学医学部とローカルネットニュースメディア、日本大学芸術学部、イン

ターネットラジオ局（コミュニティFM）が連携し、健康情報の効果的な発信と住民の行動変容を促進する取り組みを行う。健康広告の作成やポッドキャストでの音声配信コンテンツ（ラジオ番組）の制作、書籍の出版を通じて、地域住民に実践的かつ親しみやすい形で健康情報を提供し、予防医療を推進する。また、これらの活動を通じて得られた成果を広く社会全体に還元する。

地域の特性やニーズに応じた健康情報普及のモデルを確立することを目指している。この研究は、地域社会の健康水準を高め、医療費の抑制や健康格差の縮小を図ることで、SDGsの達成に寄与し、持続可能な社会の実現に貢献することを目的としている。

1) 日本大学医学部

2) 日本大学芸術学部

責任者連絡先: 権 寧博, gon.yasuhiro@nihon-u.ac.jp

2. 対象及び方法

2-1 ローカルネットニュースメディアとの連携

日本大学医学部附属板橋病院は、ローカルネットニュースメディア「板橋経済新聞」と提携し、地域の健康情報発信を通じて地域全体の健康向上を目指す取り組みを2024年9月より開始している。具体的には、板橋経済新聞に健康に関する記事広告を掲載し、「早期発見につながる情報」や「健康的な生活を送るための実践法」などを発信する。また、健康診断の重要性、ワクチンの必要性、日常生活での疾患予防策、新しい診断法や治療法の紹介も行う予定である。大学病院の医療専門家が地域に役立つ健康情報を提供し、地域内で行われる健康イベントやキャンペーン、最新の医療技術の導入事例などを住民がタイムリーに得られるようにする。さらに、地域の病院やクリニックで実施されている特別な健康プログラムや新しい治療法、地域住民向けの健康講座や無料検診の情報も積極的に発信し、住民が利用できる医療サービスに対する認識を深め、健康管理意識を高めることを目指している。また、このプロジェクトの一環として、板橋経済新聞との提携により、閲覧情報や読者のフィードバックを収集し、地域のニーズを把握し、それに基づいた健康情報の発信を行う予定である。これによって、読者が関心を寄せる健康問題や地域特有の課題を反映させた記事を作成し、地域住民にとって実用的で役立つ情報を提供する。板橋医の検診受診状況や、疾病発生状況などを参考に、地域に必要な情報を提供し、積極的な健康診断や医療機関の活用を促す。また、地域医療機関の意見を参考に、地域住民に必要な情報やサービスを提供する体制を強化していく。

3. 結果

日本大学医学部附属板橋病院は、「板橋経済新聞」と提携し、地域の健康情報を発信

ローカルネットニュースメディアである「板橋経済新聞」に、健康に関する記事広告を定期的に掲載し、これまでに合計16本の記事を配信した。記事の内容は、「早期発見につながる情報」や「健康的な生活を送るための実践的なアドバイス」などを発信しており、健康診断の重要性、ワクチン接種の必要性、日常生活における疾患予防策、新しい診断法や治療法の紹介も行っている。



「病院を聴くラジオ anatato」の制作と配信

日本大学では、芸術学部と医学部が連携し、医療現場の理解を深めるための新たなメディア実践として、ポッドキャスト番組「病院を聴くラジオ anatato」を制作・配信している。番組では、芸術学部放送学科の学生が主体となり、構成・収録・編集までを担当。医療従事者との対話を通じて、病院という空間に潜在する“物語”や“音”を探り出し、それらを「聴く」コンテンツとして再構成することを目指している。医療者の視点と生活者の視点を横断しながら、医療に関する情報をわかりやすく、かつ情緒豊かに届ける新たな試みとなっている。2024年度より、YouTubeチャンネル「日藝チャンネル」にて定期的な配信を開始し、若者を中心に一般市民を含む幅広い層への発信を行っている。

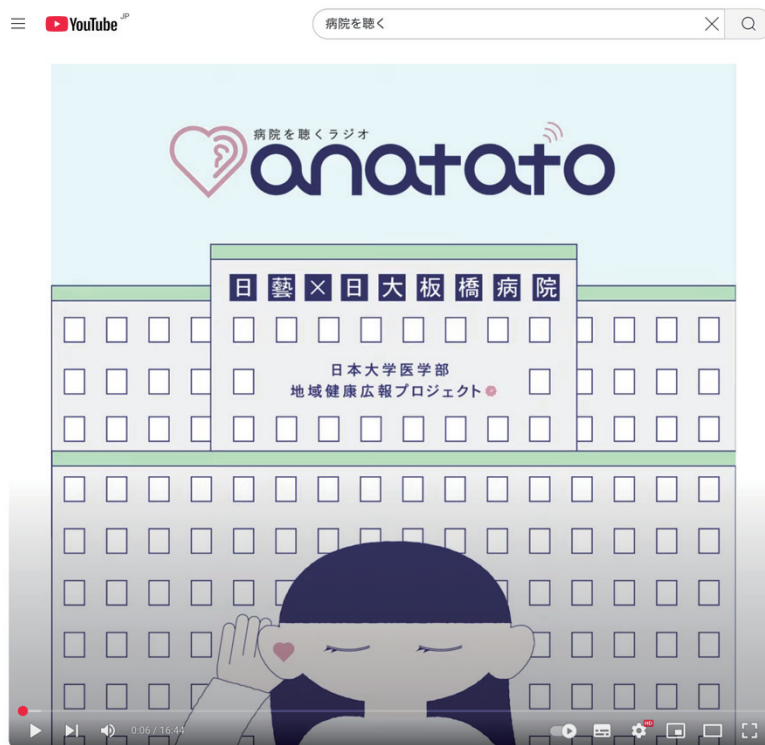
健康広報プロジェクト SAKURA（SNSを活用した健康情報発信）

本プロジェクトの一環として、Facebook上に「健康広報プロジェクト SAKURA」という公式ページを立ち上げ、SNSを活用した地域向け健康情報の発信を行っている。2024年12月に開設されたこのページでは、地域密着型の情報発信を意識し、板橋経済新聞に掲載された健康関連記事の共有に加え、独自に企画した健康コラムや啓発コンテンツも定期的に投稿している。運用にあたっては、閲覧数・エンゲージメント（いいね・シェア・コメント）などの指標をモニタリングし、投稿内容の改善や最適化に活用している。開設90日後にはフォロワー数789名、投

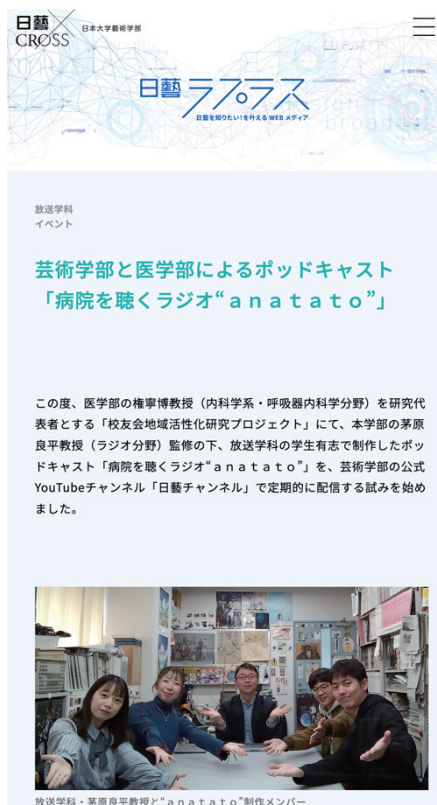
稿平均エンゲージメント数500件を記録している。地域住民との双方向の関係性を築きながら、地域医療の可視化と健康行動の促進を目指しているこの取り組みは、SNSを活用した健康情報発信の新たなモデルとしての展開が期待される。

4. 考察

本研究を通じて明らかになったことは、地域に根ざした多媒体連携による健康情報発信が、住民の健康意識向上と医療機関の利用促進に有効な可能性がある点である。特に、ローカルネットニュースメ



病院を聴くラジオ「anatato」（2025年6月22日配信）日本大学医学部 齋藤圭准教授（内科学系消化器肝臓内科学分野 内視鏡センター長）



放送学科・茅原良平教授と「anatato」制作メンバー



ディアと音声メディア（インターネットラジオ）のクロスプロモーションにより、各メディアの特性を活かしながら、幅広い層に対する情報到達が可能となった。また、芸術学部の学生が主体となったラジオ番組の制作は、医療情報の表現力を高めるとともに、若年層へのアプローチにも寄与している。住民の声やフィードバックを反映することで、双方向性のある健康情報流通モデルが構築されつつある。今後は、視聴・閲覧データ、受診率、予防接種率などの定量的指標をもとに、さらなる評価を行い、より効果的な情報提供方法の確立を目指す必要がある。

5. 結語

本プロジェクト研究は、大学附属病院と地域メディア、芸術学部、インターネットラジオ局との連携により、地域住民の健康増進と行動変容を目指す

実践的な取り組みである。今後も、地域の特性やニーズに応じた健康情報の発信と、それに基づく新たな教育・研究連携の展開が期待される。本プロジェクトは、医療とメディア、そして教育が交差する新たな健康情報発信モデルとして、地域社会に持続的なインパクトを与えるものであり、今後の他地域への応用や政策的な活用の可能性も含めた発展が望まれる。

謝辞

本研究の実施にあたり、日本大学校友会からの地域活性化研究支援を賜り、深く感謝申し上げます。校友会のご支援により、医学部および芸術学部の連携による地域健康情報発信の取り組みを具体化し、実社会への還元を図ることができました。ここに厚く御礼申し上げます。

Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1に着目した 血液透析患者における心血管イベント予測法の開発

小林洋輝¹⁾, 常見明子¹⁾, 村田悠輔¹⁾, 松岡友実¹⁾, 中村吉宏¹⁾, 阿部雅紀¹⁾

Elucidating the Role of Neuroblastoma Suppressor of Tumorigenicity 1 in Predicting Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients

Hiroki KOBAYASHI¹⁾, Akiko TSUNEMI¹⁾, Yusuke MURATA¹⁾, Tomomi MATSUOKA¹⁾,
Yoshihiro NAKAMURA¹⁾, Masanori ABE¹⁾

要旨

本研究は、心血管イベントの高リスク群である維持透析患者において、血中Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1) が心血管疾患の予測バイオマーカーとなり得るかを明らかにすることを目的とした。関連6施設の透析患者を対象に保存血液検体を用い、Olink explore HTによる網羅的血中蛋白解析を実施した。その結果、注目していたNBL1は心血管イベントとの有意な関連を示さなかったが、炎症、血管障害、代謝異常、線維化、細胞ストレス応答などに関与する多数の新規蛋白が心血管イベント発症群で有意に変動していた。今後、これらの候補分子を組み合わせた多因子予測モデルの構築や、再現性検証を通じた新規治療標的の探索が期待される。

1. はじめに

慢性腎臓病の末期像である維持血液透析患者では、心血管死のリスクが一般人口と比較して極めて高いことが知られている。特に透析導入後早期の心血管イベント発症は予後を大きく左右する要因であり、その発症予測と早期介入は、医療経済的観点からも喫緊の課題である。透析患者における冠動脈疾患の高率な合併の背景には、高齢、糖尿病、高血圧、脂質異常など古典的リスク因子の蓄積に加え、慢性炎症や酸化ストレス、カルシウム・リン代謝異常といった腎不全に特有の病態が関与していると考えられている。

しかしながら、こうした既知の危険因子のみではすべての心血管イベントを十分に説明できず、腎不全という特殊な病態環境下において心筋障害や血管障害を促進する内因性分子メカニズムの解明が求

められている。

研究代表者はこれまでに、糖尿病性腎症患者における血漿中プロテオームを網羅的に解析し、新規BMP拮抗分子であるNeuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1) が末期腎不全 (End-Stage Renal Disease: ESRD) の進展を強力に予測するバイオマーカーであることを世界で初めて報告した^{1,2)}。さらに、NBL1ノックアウトマウスを用いた腎線維化モデルにおいては、腎組織の線維化進展が有意に抑制されることが示され、NBL1が単なるマーカーにとどまらず、病態進展に関与する因子である可能性が示唆された。加えて、ヒト近位尿細管細胞を用いたin vitro解析では、NBL1添加により上皮間葉転換 (EMT) 様の形態変化や線維化関連マーカーの発現上昇が認められ、BMP7の抗線維化作用に対してNBL1が拮抗的に作用する可能性も見出されている。

1) 日本大学医学部 内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野
責任者連絡先: 小林洋輝, kobayashi.hiroki@nihon-u.ac.jp

これら一連の成果から、NBL1は腎臓に限らず、同様に線維化病態が進行する心臓組織においても病態修飾因子として機能する可能性があるとして着想した。特に、腎不全患者においては、心腎連関により心筋線維化が進行しやすく、NBL1がこの連関における共通の線維化促進因子として関与している可能性がある。

以上の背景を踏まえ、本研究では、NBL1が維持透析患者における心血管イベントの予測バイオマーカーとなりうるかを明らかにすることを目的とした。血中NBL1の定量を起点としつつ、Olink explore HTを用いた網羅的血中蛋白解析により、新たなバイオマーカーの探索を行うことで、より精度の高いリスク層別化や個別化予防介入への応用を目指した。

2. 対象及び方法

本研究は、維持血液透析患者における心血管イベントの予測因子としての血中NBL1の有用性を検討することを目的とした前向き観察研究である。対象は、日本大学医学部附属板橋病院の関連透析クリニック6施設に通院する維持血液透析患者とし、同意を得た上で保存血液検体および臨床情報を収集した。

測定には、保存血液検体（ -80°C 保管）を用い、Olink社の高感度網羅的蛋白質解析プラットフォーム「Olink Explore HT (High Throughput)」を用いて、5,440種類の血中タンパク質を定量した。測定値は相対発現量としてNPX (Normalized Protein expression) スケールで算出された。

アウトカムは、登録後2年間に発症した心血管イベント（致死性、非致死性の心筋梗塞、脳卒中、狭心症）とし、診療録の定期的なレビューにより確認した。イベントの定義と判定は事前に定めた基準に基づき、2名以上の医師により評価された。

統計解析は、NBL1および全血中蛋白について、将来の心血管イベント発症の有無による群間比較を行い、 \log_2 fold changeを算出した。さらにFalse Discovery Rate (FDR) 補正を行った上で、多重検定の影響を制御し、有意な変動タンパク質の同定を行った。

本研究は、日本大学医学部附属板橋病院の臨床研究倫理審査委員会にて審査・承認を受けた（承認番

号：RK-220308-1）。すべての参加者から文書によるインフォームド・コンセントを取得し、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮のもとに実施した。

3. 結果

維持透析患者における血中蛋白と将来のCVD発症との関連の検討において、注目していたNBL1については、血中濃度と2年以内のCVD発症との間に有意な関連は認められなかった。一方で、網羅的な探索により、多数の新規蛋白がCVDリスクと有意に関連することが明らかとなった。図に示すように (Fig.1参照)、全5440蛋白のうち、152蛋白がCVD発症群で有意に上昇 ($\log_2\text{FC} \geq 0.263$, $\text{FDR} < 0.1$)、15蛋白が有意に低下 ($\log_2\text{FC} \leq -0.263$, $\text{FDR} < 0.1$) していた (図：Volcano plot)。これらの候補蛋白群には、NBL1が関連する重要な線維化 signaling であるTGF- β pathwayに含まれる蛋白に加えて、以下のような生物学的特性が確認された：

- ・慢性炎症・免疫調節に関与するサイトカインやケモカイン様分子：慢性炎症状態が持続する透析患者では、軽微な免疫活性化がCVD進展の重要な引き金となる可能性があり、本研究で同定された複数の分子は、自然免疫系やT細胞活性と関連していた。
- ・血管構造や機能に関与する内皮細胞関連因子：血管内皮障害、血管リモデリング、マトリックス代謝に関与する因子が複数含まれており、透析患者に特有の動脈硬化の進行メカニズムを反映している可能性がある。

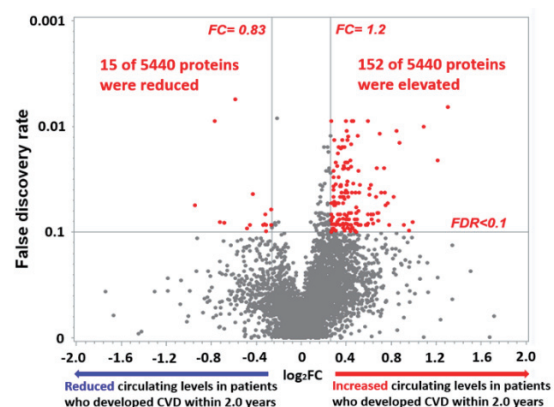


Fig 1. CVD 発症群と非発症群における血中蛋白プロファイルの違い

- ・代謝・ミトコンドリア機能に関与する酵素や構造蛋白：酸化ストレスやエネルギー代謝異常が心筋障害に波及する経路として注目されており、関連分子のいくつかはミトコンドリア局在や脂質代謝に関与していた。
- ・線維化や組織修復に関連する因子：特に心不全病態との関連が示唆される因子も複数含まれており、リモデリングに伴う組織硬化の進展が心血管イベントの背景にあることが示唆される。
- ・細胞ストレス応答やアポトーシスに関連する分子：カスパーゼ、ヒートショックタンパク、ユビキチン関連分子など、透析患者における細胞損傷と修復のバランス破綻を反映する可能性がある。

以上のように、本研究ではNBL1自体の有意性は確認されなかったものの、透析患者におけるCVD発症の新たな分子基盤が明らかとなった。今後は、これらの蛋白を含む多因子予測モデルの構築、および外部コホートにおける再現性検証を通じて、個別化予防介入や治療標的の探索に発展させる必要がある。

4. 考察

本研究では、維持透析患者において、血中NBL1が心血管イベントの予測バイオマーカーとなり得るかを検討したが、予測能に関する有意な関連は確認されなかった。この結果は、NBL1が腎線維化においては重要な役割を果たす一方で、心血管病態、特にイベント発症予測においては単独の指標としての有用性が限定的である可能性を示唆している。

一方で、Olink Explore HTを用いた網羅的蛋白解析により、心血管イベント発症群では152種類の蛋白が有意に上昇し、15種類が有意に低下しており、透析患者におけるCVDリスクに関与する多彩な分子群が新たに明らかとなった。特に、これらの蛋白の多くは、慢性炎症、免疫調節、血管内皮機能障害、代謝異常、ミトコンドリア機能低下、組織線維化、アポトーシスなどの多様な生物学的経路と関係しており、透析患者の病態の複雑性を反映する結果であった。

慢性炎症および免疫活性化は、透析患者において低レベルながら持続しやすく、動脈硬化の進展や左室肥大といった心血管病変の基盤となる。今回同定されたサイトカインやケモカイン様分子の多くは、

自然免疫系やT細胞関連経路に関与しており、無症候性で進行する炎症環境がCVDリスクを高めることを支持している。

また、内皮細胞由来の分子やマトリックスリモデリング関連因子の増加は、血管リモデリングや動脈硬化、石灰化病変の進行と関連し、透析患者における独特な血管病態の一端を示している。さらに、代謝およびミトコンドリア機能に関与する分子の変動も複数観察され、エネルギー代謝異常や酸化ストレスが心筋細胞の脆弱性を高め、心不全の進展に寄与している可能性が示唆された。

線維化や組織修復関連分子の上昇もまた注目すべき知見である。NBL1が関与するTGF- β /BMPシグナル経路の他にも、組織硬化や心室リモデリングを誘導する経路に属する因子が多数同定され、透析患者においては、腎臓同様に心筋においても線維化が進行しやすい背景があると考えられる。

さらに、ユビキチンプロテアソーム系やヒートショック蛋白など、細胞ストレス応答およびアポトーシス関連分子の異常は、細胞損傷と修復の恒常性が破綻していることを示唆しており、慢性腎疾患に特徴的なミクロな組織障害が心血管病態に波及していることがうかがえる。

以上の結果から、本研究では当初想定していたNBL1単独の予測的有用性は確認できなかったものの、透析患者における心血管イベント発症に関わる新たな分子群を多数同定することができた点は重要である。これらの知見は、従来のリスク因子だけでは捉えきれなかった病態の分子基盤を明らかにするものであり、今後、これらの分子を統合した多因子予測モデルの構築や、独立した外部コホートにおける再現性検証を経て、より精緻なリスク層別化や個別化予防戦略の開発につながることを期待される。

5. 結語

本研究により、NBL1単独の予測能は確認されなかったものの、多数の新規蛋白が透析患者のCVD発症と関連することが明らかとなり、今後の予測モデルや治療標的の開発に貢献する基盤が得られた。

謝辞

本研究は令和6年度医学部小澤研究費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) Kobayashi H, Looker HC, Satake E, et al. Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 is a circulating protein associated with progression to end-stage kidney disease in diabetes. *Sci Transl Med* 2022;14(657):eabj2109.
- 2) Kobayashi H, Satake E, Murata Y, et al. Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 is associated with the severity of interstitial fibrosis and kidney function decline in IgA nephropathy. *J Nephrol* 2023;36(8):2245-2256.

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, 正田雅之, 藤田順一

(50音順)

※2025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, Masayuki SHODA, Jun-ichi FUJITA

発行者	日本大学医学部総合医学研究所長 松本 太郎
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	Taro MATSUMOTO 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
