

共同研究

目 次

①医学部

1. プロバイオティクスによる下部消化管手術後の感染予防効果の検討	177
2. 自閉性障害患者の syntaxin1A、1B 遺伝子解析と臨床病態との関連性の検討	178
3. 染色体異常のある子どもの保育 ―心疾患の影響―	180
4. ヒト胎児頭蓋の形成過程―CT画像による経時的解析と免疫組織学的観察	181
5. ELKSノックアウトマウス、及び妊娠マウスを用いたインスリン開口放出機構の解明	182
6. 脂肪組織由来間質細胞を用いた難治性肺動脈性肺高血圧症治療の安全性および 有効性に対する研究	184
7. 腎がん臨床サンプルを用いたメタボローム解析	186
8. 前立腺癌患者を対象としたワイヤレス制御マイクロ流路チップ・セルソーターを 用いた循環がん細胞の臨床応用評価	188
9. アリールスルファターゼの機能とVI型ムコ多糖症への関与 ―組織化学的研究	189
10. グライコプロテオミクスによる糖尿病及び関連合併症マーカーの探索	191
11. ショウジョウバエにおける種間浸透	192
12. カイコ $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ β 鎖の機能	193
13. $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ 分子の新たな機能制御機構の探究	194
14. 肺高血圧症に対する基礎的研究	196
15. 左右両循環系（心室、動脈）血行力学の情報論的解析	197
16. セツキシマブの局所浸潤・遠隔転移の抑制効果についての検討	198
17. 高齢ドライバおよび軽度認知症ドライバにおける安全運転支援の評価方法に 関する共同研究	199
18. 先天性内分泌疾患のメダカモデルの作製と解析	200
19. 心不全、心肥大の慢性病態の分子制御機構の病理組織学的解明	201
20. 唾液腺疾患と唾液腺管開口部位の形態構造との関連性について	202
21. 高安大動脈炎の経過に応じた免疫組織化学的变化の相違	204
22. 結腸直腸癌の診断・治療に関するバイオマーカーの探索	205
23. ヒト iPS 細胞から誘導した膝 β 細胞の機能解析	206
24. 熱傷創に対する脂肪由来幹細胞（ADRC）の有効性および安全性の検討	208
25. ヒト iPS 細胞を用いた皮膚付属器再生	210
26. 子宮内膜症の新たな血清診断バイオマーカーの開発	211
27. 肺孤立性毛細血管腫の臨床病理学的研究	212
28. 甲状腺低分化癌と未分化癌の臨床病理学的ならびに分子病理学的研究	213
29. 慢性肺血栓栓症に対する肺動脈血管形成術に関する共同研究	215

②保健学部

30. 糖尿病における運動神経障害の病態生理	219
31. 電子角度計（Electrogoniometer）の開発および信頼性に関する研究	221
32. 子宮頸部における新しいハイリスク型ヒト乳頭腫ウイルスの再考	222

目 次

33. LC-MS/MSによる合成ステロイド剤の高感度微量分析法の開発	224
34. キチンによるアレルギー応答誘導機構の解明	226
35. 放射性医薬品の品質管理手法に関する研究	228
③総合政策学部	
36. 北タイにおけるHIV陽性者への保健医療福祉サービス提供のあり方に関する研究	231
④医学研究科	
37. <i>Helicobacter pylori</i> 感染経路の解明のための家族分離菌株の遺伝子タイピング	235
38. 上皮細胞における尿酸のparacellular輸送	236
39. 腸管神経系異常腸炎発症モデルマウスにおける腸内細菌叢の役割解析	237
40. 百日咳菌Ⅲ型分泌機構の臨床分離株における発現	238
41. マラリア防御免疫におけるミトコンドリア活性酸素関連性	240
42. 妊娠中のマラリアの病態重症化機構の解明	241
43. 三日熱マラリアの重症化機構の解明	243
44. 企業健診におけるCCD特異的IgE抗体測定の有用性に関する検討	245

① 医学部

1. プロバイオティクスによる下部消化管手術後の感染予防効果の検討

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
小林 敬明	医学部総合医療学	助教	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
正木 忠彦	医学部外科学	教授	総括
松岡 弘芳	医学部外科学	准教授	データ処理
朝原 崇	ヤクルト本社中央研究所	主任研究員	便・細菌類の検査

キーワード

プロバイオティクス、下部消化管手術、SSI

研究分野

基礎研究

1. 共同研究の目的

目標症例数 70 症例に対して、現在登録数は 18 例である。今後も該当患者の登録数の増加に努める。

2. 共同研究の内容・計画

直腸癌手術、もしくは人工肛門閉鎖術予定患者を対象とし、服用有り群、服用無し群の 2 群に分け、服用有り群患者には手術前 7 日間、及び手術翌日から 7 日間乳酸菌飲料（ヤクルト 65®）服用して頂く。術後の SSI 発生率、および便・血液検査の変化を比較検討する。

3. 研究成果（経過）

目標症例数 70 症例に対して、現在登録数は 18 例である。今後も該当患者の登録数の増加に努める。

2. 自閉性障害患者の syntaxin1A、1B 遺伝子解析と臨床病態との関連性の検討

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
赤川 公朗	医学部細胞生理学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
林 優子	県立広島大学	教授	患者試料採取、臨床診断
田丸 政男	県立広島大学	名誉教授	患者試料採取
藤原 智徳	医学部細胞生理学	准教授	ゲノム解析
小藤 剛史	医学部 RI 部門	助教	遺伝子発現、ゲノム解析

キーワード

自閉性障害、Syntaxin1A、遺伝子発現異常、Copy number variation

研究分野

神経科学

1. 共同研究の目的

Syntaxin1A 遺伝子群 (syl) の欠失マウスでは情動行動異常が誘起されることが知られている。我々は自閉性障害患者 (ASD) の血球細胞において sylA の発現量が有意に変動していて、syl の遺伝子発現調節に異常がある可能性が示してきた。また一部の ASD ではゲノム DNA に syl の copy number variation (CNV) を見出し、これが情動行動異常の原因であると推定された。

本研究は例数を増やして ASD における血液及び唾液試料を調べて syl 遺伝子の発現異常並びに CNV の出現頻度を検討して、これが精神・神経症状の発症に関与することを明らかにする。

2. 共同研究の内容・計画

インフォームドコンセントを得た ASD から末梢血液試料または唾液を採取する。血液試料に関しては白血球分画より mRNA 及びゲノム DNA を抽出して定量的 PCR 法により sylA mRNA 発現量を検討する。発現異常が推定される試料についてメチル化 DNA 免疫沈降法により syl 遺伝子の異常メチル化の多寡による発現異常を調べる。また唾液試料からゲノム DNA の CNV を推定する方法を確立したので、侵襲的影響を与えることなく簡便に CNV を検討することが可能となった。これらの実験計画により sylA 遺伝子の発現制御系の異常並びに CNV 頻度を検討し、その結果と ASD の臨床症状 (コミュニケーション障害、知的障害、多動性等) との関連を明らかにする。

3. 研究成果 (経過)

これまでに症状の重症度等に関わらず無作為に選んだ自閉性障害患者(ASD)の血液試料を用いた解析により、シンタキシン 1 A (syl1A) の mRNA 発現量に異常がある例を見出し、またその一部で syl1A 遺伝子数が haploid となっている遺伝子数変異 (CNV) が存在することが明らかにした。より多くの ASD 検体で検討するために、患者の協力を得やすい唾液試料の妻子を行い、それを用いたゲノム解析法を確立した。その結果、知的障害の比較的軽い ASD において、より高い頻度で syl1A の CNV が確認された。現在、さらに例数を増やして解析を行っている。また、CNV 以外の syl1A 発現異常の原因について、ゲノム DNA の発現調節領域およびイントロン内の異常メチル化の有無についても検討している。最近の我々の研究で、同じ機能を担うと長年考えられてきた syl1A とシンタキシン 1 B (syl1B)が、中枢神経において異なる機能を持つことが明らかになった。そこで、syl1B についても唾液試

料の ASD における CNV を検討した。これまでのところ、その遺伝子の異常は見つかっていない。今後、sy1A_o および sy1B 遺伝子の発現異常（mRNA 発現量や CNV）と自閉性障害の多様な臨床症状との関連について精査していく予定である。

3. 染色体異常のある子どもの保育 一心疾患の影響―

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
赤木 美智男	医学部医学教育学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
高野 貴子	東京家政大学	教授	研究責任者
高木 晴良	東京医療保健大学	准教授	研究協力者

キーワード

染色体異常、ダウン症候群、先天性心疾患、心臓手術

研究分野

小児科

1. 共同研究の目的

本研究は平成 23～27 年度の科学研究費（基盤研究一般 C 課題番号 23500893）を受けて行う研究[染色体異常のある子どもの保育一心疾患の影響―、研究代表者東京家政大学高野貴子]の一環としての調査である。染色体異常児の心疾患の合併（種類、重症度）、治療、転帰、死亡等に関して、大学付属病院の小児循環器専門医にアンケート調査を行うため、本学との共同研究が必要である。同様に帝京大学医学部附属病院、東京大学医学部附属病院および国立成育医療センターとの共同研究も実施する。

2. 共同研究の内容・計画

1. 研究協力の得られる小児循環器専門医の所属する大学付属病院の倫理委員会に本研究の申請を行い、カルテ情報閲覧の許可を得る。（承認済み）
2. 小児循環器専門医に調査票を郵送し、記入後、返送によるアンケート調査を行う。
3. 調査票の結果の統計解析を行う。
4. 合併する心疾患の種類、重症度や治療方法の予後に与える影響を分析し、公表する。

研究の実施期間は本学共同研究規定では原則 3 年間であるが、科学研究費（基盤研究一般 C 課題番号 23500893）は平成 23～27 年度の 5 年間で予定されているため、上記研究期間として計画している。

3. 研究成果（経過）

ダウン症候群 1310 人（女性 626、男性 684）の先天性心疾患合併の有無、診断名、手術の有無などを調査した。先天性心疾患を有する割合は、女性 354 人（57%）、男性 338 人（49%）で、女性に有意に多かった。手術を受けた割合も有意に女性が多かった。心疾患の種類では、多い順に心室中隔欠損症、心房中隔欠損症、房室中隔欠損症、動脈管開存症、ファロー四徴症であった。動脈管開存症で女性に多い傾向が認められたが、それ以外には性差がなかった。

ダウン症候群に合併する先天性心疾患の性差に関してのデータは少なく、本研究により基礎的なデータが得られた。

本研究の一部は、平成 27 年度の第 62 回小児保健協会学術集会で発表した。

4. ヒト胎児頭蓋の形成過程－CT 画像による経時的解析と免疫組織学的観察

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
松村 譲児	医学部解剖学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
天野 カオリ	医学部解剖学	講師	研究進行・論文執筆
三川 信之	千葉大学	准教授	研究進行・論文執筆

キーワード

ヒト胎児、頭蓋部発生、CT 画像、免疫組織学的観察

研究分野

形態構造・免疫組織学的研究

1. 共同研究の目的

杏林大学に所蔵されている胎児標本ならびに胎児頭蓋晒骨標本（約 1,000 例）を用い、マイクロCT撮影装置によって精細3次元画像データとし、このデータをもとに、ヒト胎児頭頸部領域の発生過程における形態学的変化をコンピュータ上における計測を含めた画像解析手法によって追究、発生学研究の基礎資料とする。

また、骨格標本と同齢の胎児頭頸部組織試料を用いて免疫組織学的染色・観察も同時に行う。

2. 共同研究の内容・計画

杏林大学の胎児標本・胎児頭蓋晒骨標本を、マイクロCT撮影装置を用いて精細画像データとし、ヒト胎児骨格発生過程における頭蓋部経時的形態変化を画像解析する。試料には、胎生3カ月以降の胎児骨格標本を使用する。胎生期には副鼻腔に相当する構造は認められないが、生後の上顎洞形成部位である眼窩下部領域について前後左右径の画像計測を行い、上顎洞の形成過程における経時的観察を行う。さらに胎児頭蓋縫合部領域の形成過程における形態解析と組織構造の解明を目的にマイクロCTにて観察し、同胎齢期の胎児標本から縫合部試料を採取し、FGFなど発育因子を使用し免疫組織学的観察を進行する。

3. 研究成果（経過）

本研究の一環として、胎児頭蓋顔面領域の筋群における発達・発育過程についても同時に観察を行っており、26年度に胎生期鰓弓筋(表情筋・咀嚼筋)の構造について成人との比較・検討することを目的に6カ月胎児と成人を使用し、横断面積1mm²中の筋線維数を計測後、筋線維解析した結果を論文にて報告した(Morphometric aspects of the facial and skeletal muscles in fetuses, Int J Pediatr Otorhinolaryngol. (15)168-8,2015)。

鰓弓筋由来である表情筋の報告についての詳細な報告は少ない。表情筋の成長や加齢による筋線維の変化を明らかにすること、発育段階における筋線維構成を明らかにすることは筋肉の発達や筋疾患を理解する上で有意義である。さらに関連研究として胎児における上眼瞼部筋層構造と機能との関連について胎生4カ月～10カ月胎児を使用して観察を行っている。上・下眼瞼部筋層構造については成人を試料とした報告は多数みられるが、胎生期における眼瞼部の形態構造の詳細を報告したものはみられず、眼瞼部構造の加齢に伴う変化や機能との関連を解明する上で重要課題である。本研究結果の一部について現在海外誌に投稿中である。

5. ELKS ノックアウトマウス、及び妊娠マウスを用いたインスリン開口放出機構の解明

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
永松 信哉	医学部生化学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
今泉 美佳	医学部生化学	教授	β 細胞の機能解析
青柳 共太	医学部生化学	学内講師	ノックアウトマウスの生化学的解析
大塚 稔久	山梨大学	教授	ノックアウトマウスの作製

キーワード

インスリン、開口放出、ELKS、TIRF

研究分野

分子細胞生物学

1. 共同研究の目的

神経伝達物質の放出は、active zone と呼ばれる限定部位で行われている。ELKS は active zone 形成に関わる重要な蛋白質の 1 つであり、我々は、ELKS が β 細胞において発現、インスリン開口放出に関わっていることを発見したが、その詳細な役割は明らかではない。今回、ELKS の conditional knock out mouse を用いて、開口放出のみならず、糖尿病との関連を明らかにする。

2. 共同研究の内容・計画

我が国における糖尿病の主な成因は、インスリン分泌不全にあるが、インスリン分泌の開口放出機構、及び糖尿病における分泌障害のメカニズムの詳細は未だ解明されていない。今回の共同研究に於いては以下の事を行うことにより、インスリン開口放出のメカニズムを明らかにする。我々は、 β 細胞において、CAZ 蛋白質の一員である ELKS が発現しており、TIRF イメージングシステムを用いた解析から、ELKS がインスリン分泌における細胞極性と密接に関連した役割を果たしていることを報告した。そこで、ELKS をクローニングした山梨大・医・生化学・大塚教授より、RIP-Cre を用いた conditional knockout mouse を供与して頂き、これを用いて、ELKS の開口放出における詳細な検討を行う。今年度は膝島でのインスリン顆粒イメージングにより、 β 細胞の血管方向への極性分泌に ELKS が必須であることを組織レベルで明らかにすると共に、ELKS と相互作用する分子を免疫沈降法、質量分析法により同定し、ELKS によるインスリン開口放出制御の分子基盤を解明する。

3. 研究成果（経過）

シナプスからの神経伝達物質放出はプレシナプス膜直下にあるアクティブゾーンと呼ばれる限局した部位で起こることが知られている。このアクティブゾーンには ELKS をはじめとするアクティブゾーン構成タンパク質が局在しており、シナプス小胞の開口放出を調節していると考えられている。前年度までの研究により、私達は ELKS が膵 β 細胞においても発現しており、インスリン開口分泌を増加させる役割を持つことを膵 β 細胞特異的 ELKS 欠損 (ELKS β KO) マウスを用いて明らかにした。今年度はその ELKS によるインスリン開口分泌増強の分子機構について詳細に研究を行った。ELKS β KO マウスから調製した β 細胞ではグルコース刺激に対する分泌第 1 相、および KCl 刺激に対するインスリン分泌が低下しており、この時細胞内 Ca^{2+} 上昇応答も大きく低下していた。また、生化学実験により ELKS が電位依存性 Ca^{2+} チャネルの β サブユニットに選択的に結合していること、さらに電気生理学実験により、ELKS β KO マウス β 細胞では L-type Ca^{2+} チャネルの Ca^{2+} 電流密度が野生型マウス β 細胞に比べて有意に減少していることがわかった。以上の結果より、ELKS は L-type 電位依存性 Ca^{2+} チャネルの β サブユニットに結合

することで Ca^{2+} チャネルを介する Ca^{2+} 流入を増加させ、第1相インスリン開口分泌を増強していることがわかった。ELKS はインスリン顆粒とともに β 細胞の毛細血管側の細胞膜近傍に偏って局在していることから、 β 細胞の血管方向へのインスリン開口放出調節に ELKS が重要な役割を果たしていることが示唆された。

6. 脂肪組織由来間質細胞を用いた難治性肺動脈性肺高血圧症治療の安全性および有効性に対する研究

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
佐藤 徹	医学部内科学Ⅱ	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
吉野 秀朗	医学部内科学Ⅱ	教授	研究指導者
松下 健一	医学部内科学Ⅱ	講師	研究指導者
伊波 巧	医学部内科学Ⅱ	助教	研究実施者
柳津 亮爾	医学部内科学Ⅱ	医員	研究実施者
百瀬 裕一	医学部内科学Ⅱ	医員	研究実施者
上杉 陽一郎	医学部内科学Ⅱ	医員	研究実施者
大谷 伸久	自由が丘 MC クリニック	院長	研究指導者
前村 浩二	長崎大学	教授	研究指導者
江口 正倫	長崎大学	医員	研究実施者

キーワード

脂肪組織由来間質細胞、肺動脈性肺高血圧症

研究分野

循環器

1. 共同研究の目的

本臨床研究は臨床応用のために準備を進めている。共同研究施設として長崎大学循環器内科では小動物の肺高血圧症モデルに、脂肪組織由来間質細胞を投与して有効との治験を得ている。このため、同じ研究目標を有する施設同士で知見を共有し、研鑽を重ねることは本研究の臨床応用の発展に大きく寄与する。

2. 共同研究の内容・計画

本治療法の安全性と有効性を検証することにより、現在の治療法で不応性または難治性の患者に対して生命予後を改善する画期的治療となる可能性が高い。

3. 研究成果（経過）

共同研究施設である長崎大学病院循環器内科では 小動物の肺高血圧症モデルに対して、脂肪組織由来間質細胞の投与による実際の

効果を論文化し、杏林大学医学部内科学（Ⅱ）としても学術的協力を行いながら取り組んでいる。厚生労働省のヒト幹細胞臨床研究審査会は廃止され、施設ごとの再生医療委員会で審議することとなり、名古屋大学における委員会への審査の申請準備をしている。

7. 腎がん臨床サンプルを用いたメタボローム解析

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
桶川 隆嗣	医学部泌尿器学	臨床教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
原 隆人	武田薬品工業株式会社	主席研究員	研究データ管理、総括
山岡 万寿夫	武田薬品工業株式会社	主席研究員	代謝酵素あるいは遺伝子変異の有無
森本 恵	武田薬品工業株式会社	研究員	免疫不全動物への腎がん移植

キーワード

腎がん、メタボローム解析

研究分野

臨床研究

1. 共同研究の目的

近年がん領域では、cancer metabolism についての研究が増加し、重要視されている。この研究領域での課題は、臨床・in vivo 実験系・in vitro 実験系をつなぐ薬物評価実験系が確立していないことであり、また、臨床癌における代謝パターンの情報も少ない。一部の腎がんについては VHL 変異に起因する解糖系および脂質生合成型の充進が癌増殖に関与するとの仮説が考えられている。腎がんにおける代謝パターンの解析を行う。

2. 共同研究の内容・計画

- 1) 腎癌の血液および腫瘍代謝パターンの解析、病理組織像、代謝酵素発現量、遺伝子変異の有無を調べ、正常組織と比較する。
- 2) 免疫不全動物に腎癌あるいは、樹立した株化細胞を生着させ、その血液および腫瘍代謝パターンの解析、病理組織像、代謝酵素発現量、遺伝子変異の有無を調べ、腎癌と比較する。
- 3) 腎癌から直接あるいは、免疫不全動物に移植した腎癌から樹立した培養細胞の代謝パターンの解析、代謝酵素発現量、遺伝子変異の有無を調べ、腎癌と比較する。

3. 研究成果（経過）

欧米腎癌患者の腫瘍内代謝パターンの解析結果は報告されているが、日本人の腎癌患者の腫瘍内代謝パターンの報告はない。また、腎癌がもつ遺伝子変異と代謝パターンとの関係についても不明である。本研究の目的は、1) 日本人の腎癌患者の腫瘍内代謝パターンを調べることで、2) 腎癌がもつ遺伝子変異と代謝パターンとの関係を調べることで、3) 腎癌患者の腫瘍内代謝の特徴を反映した前臨床腎癌モデルの構築と性格付け、である。

日本人腎癌患者 11 名から腫瘍組織とその近傍の正常組織を得た。それら組織を用い、metabolomics 解析、遺伝子変異解析、異種移植片樹立、および樹立したモデルの性状解析を行った。

1) 正常組織と癌組織とで大きく代謝パターンが異なり、正常組織は患者間の差が小さく癌組織では患者間の差が大きかった。癌代謝パターンは大きく二つのクラスターに分かれた。

2) 腎癌関連遺伝子の変異と代謝パターンに明確な相関は見出せなかった。

3) 樹立できた異種移植片は腎癌患者の腫瘍組織と類似の代謝プロファイルを示すものがあった。スニチニブあるいはテムシロリムスによる移植片増殖の抑制を観察した。

本試験は症例数が少なく追加解析が必要であるが、日本人の腎癌患者の腫瘍内代謝パターンのヘテロ性が確認でき、腎癌における遺伝子変異と代謝パターンとの強い相関はないことが示唆された。また、腎癌患者の腫瘍内代謝的特徴を反映する前臨床モデルが構築でき、腎癌における代謝を標的にした創薬に用いることができる可能性が示された。

8. 前立腺癌患者を対象としたワイヤレス制御マイクロ流路チップ・セルソーターを用いた循環がん細胞の臨床応用評価

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
桶川 隆嗣	医学部泌尿器学	臨床教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
小林 雅之	(株)オンチップ・バイオテク ノロジーズ	取締役	On-chip Sort Wi-Fi の機器管理

キーワード

前立腺癌、循環がん細胞、マイクロ流路

研究分野

臨床研究

1. 共同研究の目的

去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）患者を対象として、化学療法開始前の循環癌細胞（CTC）数を測定し、全生存期間（OS）を予測可能か評価することである。副次的目的は、PFSやOSに関して、CTC数と前立腺特異抗原（PSA）との関係性を評価することである。

2. 共同研究の内容・計画

- 1.全血 4.0mL にワイヤレス制御マイクロ流路チップ・セルソーターを用いた循環がん細胞を測定する。測定の前処理として、CD45 ビーズを用いた白血球除去法（ビーズ法）とカラムを用いた白血球除去法（カラム法）を行う。
- 2.PFS 及び OS に関して、患者背景、CTC 数と PSA との関係について、Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量分析する。

3. 研究成果（経過）

【目的】
末梢循環癌細胞（circulating cancer cell : CTC）クラスター(集合体) は CTC 孤立癌細胞に比較して予後に強く関与しているとの報告がある（Cell, 2014;158(5):1110.）。今回、去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)における治療経過において CTC クラスターおよび CTC 遺伝子解析の治療効果判定を検討した。

【対象と方法】
CRPC と診断されてドセタキセル(TXT)治療前の患者 12 例と TXT 治療後の 11 例を対象にセルソーターシステムでの CTC クラスターおよび遺伝子解析を行った。セルソーターシステムは CTC を計量的に分析し、特定の細胞を分離することができるシステムである。

【結果】
血中循環癌細胞(Circulating Tumor Cells ; CTC)検出により、転移細胞の細胞特性を解析し、転移の動態を個体レベルで計量的に分析することが可能になった。CTC をドセタキセル療法の施行前後で測定した。多変量解析ではドセタキセル治療前の CTC の数は、予後の予測因子だったが PSA(Prostate Specific Antigen)値は予測因子ではなかった。治療開始早期での CTC 数は治療効果を予測するマーカーであることが示唆された。

平成 27 年 10 月 29 日から 31 日にかけて行われた第 53 回日本癌治療学会学術集会において、優秀演題賞を受賞した。

9. アリールスルファターゼの機能と VI 型ムコ多糖症への関与 — 組織化学的研究

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
川上 速人	医学部解剖学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
秋元 義弘	医学部解剖学	教授	解剖学、細胞生物学、組織細胞化学
赤坂 甲治	東京大学大学院	教授	分子発生学
大森 紹仁	東京大学大学院	特任助教	発生生物学

キーワード

アリールスルファターゼ、細胞外基質、ER ストレス、免疫電顕

研究分野

組織化学

1. 共同研究の目的

硫酸化多糖の硫酸基を加水分解する酵素であるアリールスルファターゼ A, B (ARSA, ARSB) の存在様式を明らかにすることにより、細胞外マトリックスとしてのこれらの機能を解明する。また、ARSB-KO マウス、MPSVI モデルラットを用い、VI 型ムコ多糖症を発症した個体の組織における ARSB の量的変化と局在変化を免疫組織化学的に解析し、VI 型ムコ多糖症発症の分子機構についての解明を目指す。

2. 共同研究の内容・計画

アリールスルファターゼ (ARS) は、コラーゲンにはない ARS 特有の、突起形成などのダイナミックな細胞形態の形成にかかわる細胞外マトリックス機能を有することが示唆されている。これは ARS が細胞外で不溶性マトリックス構成成分として機能することを示している。しかし一般的には、ARSA、ARSB はリソソーム酵素であるとの認識がいまだに根強い。我々は、血管内皮細胞表面に ARSA と ARSB が局在していることを報告しているが、他の組織においても ARS が細胞表面に局在しているかは検証していない。ARSA と ARSB が一般的に細胞表面・細胞外に存在することを確認するため、消化管、腎臓、肺、軟骨組織、中枢神経系など、マウスのさまざまな組織における ARSA、ARSB の存在様式を、特異抗体を用いて免疫蛍光組織学、免疫電顕組織学的に解析する。また、硫酸化ムコ多糖と結合した状態では、人工基質に対する酵素活性を失うことを確認する。さらに ARSB ノックアウトマウスと VI 型ムコ多糖症のモデルである MPSVI ラットを用い、各組織における ARSA、ARSB の存在様式を正常組織と比較することにより、ムコ多糖症発症の分子機構を、臓器特異的变化に留意しつつ明らかにする。

3. 研究成果（経過）

アリールスルファターゼ(ARS)は細胞の形態形成にかかわる細胞外基質として機能することが示唆され、その局在が注目されている。我々は特に ARS-B タンパク質(ARSB)がラットの血管内皮細胞、肝実質細胞の主として細胞表面に存在し、特に血管内皮細胞では ARSB の大部分が細胞表面に存在することを、特異抗体を用いた免疫電顕により示した。さらに ARSB 突然変異モデルラット 15 週令のホモ個体組織の電顕観察では、軟骨細胞と血管内皮細胞に多数の空胞が見られることが明らかとなった。ARSB 変異モデルラットのヘテロ個体においても血管内皮細胞と軟骨細胞の細胞質に空胞が生じていた。これは、変異遺伝子の産物自体が細胞障害を引き起こすことを示している。なお、ヘテロ個体は外見上野生型個体と同じであった。現在、ARSB-ノックアウトマウスを用いて研究を進めているが、生後 7 ヶ月でも外見上変化はなく、電顕レベルでの細胞障害がどの程度進行しているかに注目

して検討中である。

10. グライコプロテオミクスによる糖尿病及び関連合併症マーカーの探索

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
秋元 義弘	医学部解剖学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
川上 速人	医学部解剖学	教授	研究の立案、指導
遠藤 玉夫	東京都健康長寿医療センター研究所	副所長	研究の立案、指導
三浦 ゆり	東京都健康長寿医療センター研究所	研究副部長	プロテオーム研究の指導、遂行
千葉 優子	東京都健康長寿医療センター研究所	副部長	プロテオーム研究の指導、遂行

キーワード

糖尿病、O-GlcNAc、複合糖質、糖鎖生物学、グライコプロテオミクス

研究分野

組織化学

1. 共同研究の目的

これまで我々は、細胞質の O-GlcNAc 修飾異常タンパク質の解析を行い、糖尿病に伴い腎臓において細胞骨格タンパク質であるアクチン、チューブリン、ミオシン、アクチニンなどに顕著な O-GlcNAc 修飾の変化が生ずることを明らかにしてきた。さらに本研究では、糖尿病及び合併症により発現変動する O-GlcNAc 化蛋白質をグライコプロテオミクス法により網羅的に解析し、糖尿病の診断、治療に役立つマーカーとなる蛋白質を明らかにする。

2. 共同研究の内容・計画

糖尿病モデル動物の網膜、腎臓、神経、脾臓、血液並びにヒトの血液を用いて、O-GlcNAc の修飾が変化する蛋白質を調べる。この際、東京都健康長寿医療センター研究所プロテオミクス共同センターに設置されている機器および本学の共同研究施設の LC-MS (LTQ-Orbitrap Velos)を使用してプロテオーム解析を行う。

3. 研究成果（経過）

研究代表者らは、これまで正常 Wistar ラットおよび糖尿病 GK ラットの腎臓を材料にして、プロテオミクスにより O-GlcNAc 化タンパク質の解析を行い、アクチン、 α -アクチニン 4 など細胞骨格タンパク質や、ATP synthase などミトコンドリアタンパク質に糖尿病腎症で O-GlcNAc 化の有意な増加が生ずることを見出し、O-GlcNAc 化の変化が糖尿病腎症の一因になっていることを明らかにした。本研究ではさらに、糖尿病合併症における糖修飾アクチンの役割を解明することを目的に、O-GlcNAc 化ペプチドを抗原として特異的 O-GlcNAc 化アクチン抗体を作製し、糖尿病モデル GK ラットの腎臓における局在の変化を免疫組織化学的に検討した。その結果、O-GlcNAc 化アクチンは、糖尿病に伴い増加し、糸球体や尿細管における局在が変化することが判明した。今後、リン酸化アクチン、非修飾アクチンについても比較、検討する予定である。

11. ショウジョウバエにおける種間浸透

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
佐藤 玄	医学部生物学	講師	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
澤村 京一	筑波大学大学院	准教授	DNA 多型の解析
上村 佳孝	慶應義塾大学	准教授	雑種の形態
戸張 よし子	NPO 科学教育研究所	理事	雑種の妊性
松田 宗男	医学部生物学	客員教授	染色体多型

キーワード

染色体多型、核遺伝子多型、核外遺伝子多型、雑種形成、ショウジョウバエ近縁種

研究分野

進化遺伝学

1. 共同研究の目的

2000年以降、従来生息の記載がない熱帯種のショウジョウバエが、亜熱帯の沖縄諸島だけでなく鹿児島でも採集されるようになった。温暖化の影響か、温度感受性などの遺伝的変異により生息域を拡大しているのかは不明である。熱帯種で同胞種でもある、*D. parapallidosa*、*D. aananassae*、*D. parabipectinata* の日本で採集された系統と熱帯で採集された系統の遺伝的変異を調べ、雑種形成の可能性と侵入種の特徴を明らかにすることを目的としている。

2. 共同研究の内容・計画

既に維持されている系統及び、2012年に採集した沖縄、マレーシア（アルコール標本）の系統を中心に上記3種とその近縁種系統について、以下の遺伝的変異について調査をする。1）mtDNA の *COI* 領域、2）Y-染色体上の *kl-1* 領域、第4染色体上の偽遺伝子、3）唾腺染色体、4）寄生している細菌 *Wolbachia* の有無、5）生殖的隔離、6）外部形態。これらの遺伝的変異と、遺伝子頻度と遺伝子型頻度を推定し、種の分布域拡大化と、雑種形成、種間の遺伝子移入の結果などから種分化の萌芽について研究を行う。

3. 研究成果（経過）

既に維持されている系統及び、2012年以降に採集したマレーシア、パナマ島の系統を中心に上記2種について、以下の遺伝的変異について調査をした。1）第4染色体の偽遺伝子(*qCOI*)、2）Y-染色体上の *kl-1* 領域、3）唾腺染色体、4）生殖的隔離、5）外部形態。これらの遺伝的変異と、遺伝子頻度と遺伝子型頻度を推定し、種の分布域拡大化と、雑種形成、種間の遺伝子移入の結果などから種分化の萌芽について研究を行なった。従来の分子レベルだけの解析から導き出された仮説の検証を、外部形態、染色体逆位、妊性の研究結果などを加えることにより行なった。結果は論文の形にまとめ投稿し、アクセプトされたところである。

12. カイコ Na⁺/K⁺-ATPase β 鎖の機能

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
丑丸 真	医学部化学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
菅田 晴夫	医学部泌尿器科学	非常勤講師	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase 活性・分子量 測定、免疫染色観察
原 諭吉	東京医科歯科大学	客員教授	カイコ Na ⁺ /K ⁺ -ATPase の培養細胞内発現

キーワード

カイコ、Na⁺/K⁺-ATPase、β 鎖

研究分野

生化学

1. 共同研究の目的

カイコには神経組織にのみ Na⁺/K⁺-ATPase が見られること、神経組織以外の組織には Na⁺/K⁺-ATPase を構成する α、β サブユニット（鎖）のうち、β 鎖のみ存在することを明らかにしてきた。昨年度の研究では、カイコ由来培養細胞にカイコ神経からクローニングした α、cDNA を導入し Na⁺/K⁺-ATPase を発現させることに成功した。しかし、外来性 β 鎖の分子量は内在性 β 鎖よりも小さかった。今年度はこの系を用い、β 鎖の機能についてさらに調べる。

2. 共同研究の内容・計画

カイコ由来培養細胞に内在する β 鎖の機能について引き続き研究する。まず、内在する β 鎖の細胞内局在を組織免疫染色法で観察し、α 鎖なしでも細胞膜に局在するかどうか確かめる。次に、外来性 β 鎖の分子量が内在性 β 鎖より小さい原因の一つとして、外来性 β 鎖には糖鎖がなく膜を貫通していないことが考えられるので、C 末端側にタグを付けた β 鎖を培養細胞で発現させ、細胞外側からのタグに対する抗体との反応の有無をたしかめる。次に RNAi 法によって内在性 β 鎖の発現を抑制し、増殖、形態、細胞間の接触状態等の細胞生育に及ぼす影響を観察する。

3. 研究成果（経過）

- 1) カイコ神経組織からクローニングした Na⁺/K⁺-ATPase α および β 鎖 cDNA から、アミノ酸配列を推定した。β 鎖には N 末端とその近傍に Met が存在した。そこで翻訳上どちらが読み始め Met が決定するため、カイコ神経組織から単離した β 鎖のエドマン分解および Mas スペクトロ分析を行った。その結果、初めの Met が翻訳開始点であることが明らかになった。
- 2) 独自に作製した精製抗体を用いて、β 鎖の体内分布を調べた。β 鎖は神経組織にのみ存在し、腸管、筋肉、血管、マルピーギ管、絹糸腺には存在しないことが明らかになった。
- 3) β 鎖の分子量は 35K だった。これは、これまで知られていた哺乳類 Na⁺/K⁺-ATPase β 鎖の分子量 55K よりも小さかった。糖鎖切断酵素で処理した後 SDS-PAGE で分析した結果、カイコ β 鎖も哺乳類 β 鎖と同様、糖タンパク質であることが明らかになった。
- 4) カイコ卵巣由来の培養細胞 BM-N 細胞（Na⁺/K⁺-ATPase 活性はない）に cDNA を挿入して発現させ、細胞内分布を蛍光抗体法で、Na⁺/K⁺-ATPase 活性を Fiske-Subbarow 法で測定した。その結果、α および β 鎖は細胞膜に局在し、カイコ神経組織 Na⁺/K⁺-ATPase 活性と同様の特性（K⁺に対する低親和性、ウアバインに対する高親和性）を示すことが明らかになった。

13. Na⁺/K⁺-ATPase 分子の新たな機能制御機構の探究

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
丑丸 真	医学部化学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
林 雄太郎	理化学研究所	客員主管研究員	ATPase 標品の精製と活性測定・解析
原 諭吉	東京医科歯科大学	客員教授	ATPase 分子の機構解析
菅田 晴夫	医学部泌尿器科学	非常勤講師	酵素反応と基質結合の解析

キーワード

Na⁺/K⁺-ATPase、レクチン親和性クロマトグラフィー、オリゴマー構造、基質結合、酵素機能制御

研究分野

生化学

1. 共同研究の目的

あらゆる動物細胞に存在する Na⁺/K⁺-ATPase は、細胞膜に Na⁺およびK⁺の電気化学勾配を形成し、神経興奮、Na⁺再吸収、栄養素の吸収などの生理機能を担っている。また、本態性高血圧症や癌の発症に関与していることが明らかになりつつある。このことは、この ATPase 活性の制御機構の異常が、疾病に関わる可能性を示している。制御の分子機構の解明には、各種組織からの単離・精製が不可欠である。これまで精製が事実上不可能であった微量の組織から、林らは新しく、当該タンパク質の迅速単離を可能とする方法を開発した。この方法を用いて、各種組織からこの ATPase 分子を単離し、新たな制御因子の探索、新たな制御機構の解明および、それらの結果と疾病との関係を探究する。

2. 共同研究の内容・計画

ブタ腎を用いて整備されたレクチン・アフィニティクロマトグラフィー (LAC) 法を、種々の組織またはそのホモジネートを界面活性剤で可溶化したものに適用する。すなわち、この ATPase が糖タンパク質であることを利用して、LAC 法およびゲルろ過法によって、種々の組織からこの ATPase 分子の単離を可能にする。単離した ATPase 分子を用いて、1) ATPase 活性測定、2) 基質およびその類似体との結合能の測定、3) オリゴマー構造の同定、4) この ATPase 分子と共に単離される、制御分子候補の検出、5) 制御分子による制御機構の解析を行う。さらに、6) 疾病モデル動物の組織や培養細胞からの単離を行い、健常組織から単離された ATPase 分子との、上記の観点からの比較を行う。

3. 研究成果（経過）

当膜タンパク質の単離法としての、レクチン親和性クロマトグラフィー (LAC法) を、種々の動物組織を使って試みる前に、ブタ腎を使って単離された標品の特性を調べた。

1. LAC 法の条件を改善した結果 (プロピオン酸塩を添加せず、界面活性剤の濃度を低くし、溶液の pH を 5.6 から 7.0 にした)、得られた当タンパク質標品は、ほとんど四量体成分 (分子量 64 万、オリゴマー構造: (αβγ)₄) のみで、共存する二量体や単量体は微量であった。

2. この四量体は、凍結保存することによって、そのオリゴマー構造も ATPase 活性も、安定に維持できた。

3. この標品は、一価カチオンとして、Na⁺のみが存在する時、K⁺のみが存在する時、両方存在する時、いずれの場合もオリゴマー構造が変化することはなかった。

4. 原子間力顕微鏡法 (Atomic Force Microscopy, AFP 法) で、この標品を溶液中で観測することができた。X 線結晶構造解析で報告されている単量体や二量体の大きさと比較することにより、四量体中で、これら低オリゴマー成分が解離・会合の動きをしているとの結論に至った。

以上により、Na/K-ATPase の機能単位は、四量体であることが強く示唆された。

14. 肺高血圧症に対する基礎的研究

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
佐藤 徹	医学部内科学Ⅱ	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
田中 宏明	アクトリオンファーマシューティカルズ ジャパン株式会社	副本部長	研究方針等の検討及び研究関連 最新情報収集・提供

キーワード

肺高血圧症、基礎的研究、新規治療戦略、トランスレーショナルリサーチ

研究分野

循環器内科学

1. 共同研究の目的

肺高血圧症、基礎的研究、新規治療戦略、トランスレーショナルリサーチ。

2. 共同研究の内容・計画

肺高血圧症に関する学会報告及び研究内容を精査し、十分な議論の上、基礎的研究計画を作成する。その後、肺高血圧症の病態に関する基礎的研究を遂行し、その基礎的研究から得られた知見をもとに、肺高血圧症の新規治療法開発に向けたトランスレーショナルリサーチを行う。

3. 研究成果（経過）

心エコーを病棟に購入し、肺高血圧患者の臨床データをベッドサイドでも逐一、収集した。これにより更に細かい臨床病態の変化を捉えられるようになり、肺高血圧症の基礎的研究における臨床的な対応を検討することが可能となった。これに関連した臨床データの整備を行った。

15. 左右両循環系（心室、動脈）血行力学の情報論的解析

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
赤木 美智男	医学部医学教育学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
阿波 彰一	太陽こども病院 (元杏林大学医学部教授)	非常勤医師	研究責任者、動物実験、データ解析、論文執筆
保崎 明	医学部小児科学	講師	動物実験、データ解析
中村 嘉宏	宮内庁	侍医	動物実験、データ解析

キーワード

体・肺各心室圧、大（肺）動脈血流量、周波数領域、伝達関数、線形性

研究分野

循環器力学

1. 共同研究の目的

イヌを用いて、全身麻酔・開胸陽圧呼吸下で、大・肺両循環系の圧・流量・心室容積の関係を異なる心拍数下で実測し、①心室流入量、心室圧、心室流出量、動脈圧等のフーリエ変換を用いた周波数解剖析値からこれらの関係の線形性を確認する。②これらの変数の関係を、周波数領域で定義する。③関係式におけるパラメーターを決定し両循環系の力学的特性を明らかにする。

2. 共同研究の内容・計画

リタイヤビーグル犬をペントバルビタールによる静脈麻酔で麻酔し、気管挿管して陽圧呼吸管理する。心電図および総頸動脈もしくは大腿動脈から挿入したカテーテルにより大動脈圧をモニターする。胸骨正中切開により心臓に至り、圧および流量（または流速）センサーを大動脈と左心室流入部に、左神経の計測終了後は肺動脈と右心室流入部に装着し、それぞれの部位における圧と流量（または流速）を同時記録（紙および A/D 変換してコンピューターに）する。一方、thermal dilution 法により心拍出量を計測し、心室容量の変化と動脈への流出量の calibration とする。洞結節部の冷却および心房ペーシングにより、心拍数を変化させて記録する。また、ドブタミン負荷による強心時にも同様の計測を行う。

データは自作のソフトウェアによりフーリエ変換し、上記①、②、③の解析を行う。

3. 研究成果（経過）

平成 27 年 3 月 2 日から実験を開始し、平成 27 年 3 月末までに 16 回行った。

解析に必要なデータが採取できており、あと 3 頭程度で良好なデータが採取できれば実験を終了できる見込みである。

データの解析については、自作のソフトウェアにより解析を開始している

16. セツキシマブの局所浸潤・遠隔転移の抑制効果についての検討

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
松本 吉史	医学部耳鼻咽喉科学	助教	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
浅野 正岳	日本大学	教授	動物実験
塩野目 尚	日本大学	専修医	動物実験

キーワード

セツキシマブ、頭頸部癌、局所浸潤、遠隔転移

研究分野

癌の浸潤・転移

1. 共同研究の目的

頭頸部癌におけるセツキシマブは、他の抗癌剤との併用で再発・転移症例に有効なことや、放射線照射に上乗せ効果があることが証明されているが、単剤における有効性は確立されていない。そこでセツキシマブの有効性は、局所浸潤・遠隔転移の抑制によるものではないかと考え、*in vitro*において局所浸潤抑制効果を証明した。さらに*in vivo*において同様の効果や遠隔転移の抑制効果が生じるかどうかを検討することが、本共同研究の目的である。

2. 共同研究の内容・計画

高転移性の細胞株を用いた *in vitro* での実験系は本学で施行する予定である。同様の細胞株とヌードマウスを用いた *in vivo* の実験は日本大学で施行することとする。本学で施行する実験はセツキシマブの細胞に対する増殖・遊走・浸潤抑制効果を検討する。日本大学で施行する実験は、ヌードマウスの舌に細胞を注射し、同所移植モデルを作成し、コントロール群とセツキシマブ、投与群に分けて、局所浸潤の程度や遠隔転移について比較し、セツキシマブの浸潤・転移抑制効果を検討する。

3. 研究成果（経過）

頭頸部癌におけるセツキシマブ(Cmab)は、他の抗癌剤との併用で再発・転移症例に有効なことや、放射線照射に上乗せ効果があることが証明されているが、単剤における有効性は確立されていない。そこでセツキシマブの有効性は、局所浸潤・遠隔転移の抑制によるものではないかと考え、*in vitro*において局所浸潤抑制効果を証明した。さらに*in vivo*において同様の効果や遠隔転移の抑制効果が生じるかどうかを検討することが、本共同研究の目的である。*In vitro*の研究では、Cmabは増殖抑制に対して耐性を持つ細胞株に対して、遊走、浸潤、上皮間葉転換(EMT)抑制効果を認めた。さらにその責任分子について研究を行った結果、近年乳癌において報告されているEGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 pathwayが関与することが示唆された。*In vivo*では、*nude mouse*を用いた発癌モデルを作成し、Cmab投与群とコントロール群の2群に分けて検討した結果、Cmab投与群で有意に頸部リンパ節転移抑制効果が認められた。以上より、Cmabは頭頸部癌に対して、増殖抑制効果よりも、主に局所浸潤、EMT、転移抑制効果が作用している可能性があり、EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 pathwayを介した作用であることが示唆された。現在まで上記のような報告はされておらず、現在英文雑誌に投稿中である。

17. 高齢ドライバおよび軽度認知症ドライバにおける安全運転支援の評価方法に関する共同研究

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
長谷川 浩	医学部高齢医学	准教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
関根 道昭	交通安全環境研究所	主席研究員	運転能力評価・運転支援方法の評価

キーワード

高齢者、認知症、運転能力評価、運転支援方法の評価

研究分野

高齢者安全運転

1. 共同研究の目的

自動車の安全運転支援システム（自動ブレーキ、車間距離維持装置、車線逸脱防止装置など）の開発が進んでいる。これらの技術は、運転が難しくなった高齢者や軽度の認知症患者において事故の予防やモビリティ確保の観点から特に有効であると考えられる。一方で、運転支援技術を利用するドライバの行動についてはまだ十分に解明されておらず、これらは国際的にも関心が高い現在進行中の議論である。本研究では、高齢ドライバ、特に軽度認知症ドライバにおける運転支援方法のあり方について解明することを目的とする。

2. 共同研究の内容・計画

杏林大学もの忘れセンターを受診し、正常から軽度認知機能低下と診断された患者さんの中で、本人の希望があり協力の得られた方につき、三鷹市内の交通安全環境研究所へ行っていただく。ここで定置型ドライビングシミュレータ用い高齢者や軽度認知症の患者が苦手とする運転場面を再現し、運転の様子を定性的、定量的に解析する。例えば、見通しが悪い交差点における飛び出してくる車両へのブレーキ操作や信号や歩行者など、複数の対象に対して適切に注意を向けなければならない場面などにおける運転行動を観察する。さらに、運転支援システムが導入された場合の運転の様子や支援システムが急に効かなくなった場合の対処方法などを観察する。

3. 研究成果（経過）

本年度は杏林大学において本研究参加可能な対象者 3 名を選出し、交通安全環境研究所において運転シュミレーターに乗っていただき運転の能力を分析した。また、高齢者の運転特性に合わせたシュミレータープログラムの再構築を行った。

18. 先天性内分泌疾患のメダカモデルの作製と解析

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
谷口 善仁	医学部衛生学公衆衛生学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
長谷川 奉延	慶應義塾大学	教授	臨床病理的研究
石井 智弘	慶應義塾大学	講師	遺伝子工学的研究
天野 直子	慶應義塾大学	共同研究員	遺伝子工学的研究
鳴海 覚志	慶應義塾大学	特任助教	遺伝子工学的研究

キーワード

先天性内分泌疾患、細胞周期、臓器形成、メダカ

研究分野

小児内分泌学

1. 共同研究の目的

慶應義塾大学小児科長谷川研究グループでは先天性内分泌疾患の新規原因遺伝子を単離した。これまでに、臨床症状や *in vitro* での実験結果から当該遺伝子が細胞周期や臓器形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている。本研究は、脊椎動物モデルであるメダカを使用し、この遺伝子の *in vivo* での機能を調べることを目的とする。

2. 共同研究の内容・計画

これまでの研究成果として、新規遺伝子をヒートショックプロモーター下に接続したプラスミドを作製し、メダカ卵へ顕微注入した。この系統を用いて、ヒートショックの条件検討、さらに、ウェスタンブロットや蛍光観察などによる発現誘導されたタンパク質の検出法の確立を行う。ゲノムへの安定な遺伝子挿入を確認するとともに、高温下、および、一般的なメダカ飼育、繁殖に関する技術を習得する。最終的に、ヒートインダクションした個体の成長や病理組織像から、導入した遺伝子の *in vivo* での機能を解析する。

3. 研究成果（経過）

慶應義塾大学小児科長谷川研究グループでは先天性副腎低形成に免疫不全や MDS を伴う新たな疾患単位である MIRAGE 症候群を確立した。その原因遺伝子を単離したところ、エンドソームの融合に関与する **SAMD9** 遺伝子の変異が明らかになった (Narumi, et al., Nature Genetics, 2016)。正常型の **SAMD9** を細胞に強制発現すると細胞の増殖は若干遅くなるが、変異型の **SAMD9** を発現させた場合は細胞は巨大な初期エンドソームを形成し増殖が著しく遅くなる。しかし、これらの現象が、個体レベルでの表現型にどのように貢献しているかは明らかではない。我々は発生期の臓器の観察が容易であるメダカ胚を用いた疾患モデルの作製を試みた。**EGFP** に融合させた変異型 **SAMD9** をアクチンプロモーターにより全身に発現させると微弱な **EGFP** 蛍光が確認できるが、発生が進むと蛍光陽性細胞が減少した。また、発生異常の個体が高頻度に出現した。このことは、変異型 **SAMD9** は細胞毒性が強いという培養細胞を用いた実験結果と矛盾しない。変異型 **SAMD9** を発現誘導できるように停止コドンを loxP で挟んだコンストラクトを作製した。今後はトランスジェニック系統を確立し、肝臓特異的に **Cre** を発現させて変異型 **SAMD9** を誘導し、個体における表現型を観察する予定である。

19. 心不全、心肥大の慢性病態の分子制御機構の病理組織学的解明

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
菅間 博	医学部病理学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
仲矢 道雄	九州大学	准教授	標的因子探索、抗体分与
仲矢 丈雄	医学部病理学	助教	人体病理学的解析

キーワード

心肥大、心不全

研究分野

病理学

1. 共同研究の目的

心不全、心肥大の慢性病態の分子制御機構の多くは、依然未解明である。本研究では、心筋梗塞後、あるいは高血圧による心肥大時などの慢性的な病態に注目する。そして、マウスの心肥大モデル（圧負荷モデル）において、心肥大の病態で発現が上昇、あるいは減少しているか、かつ心臓の病態に重要と予想される候補分子群を選定する。それらが心肥大、心不全等の心臓でどのような変化が起こっているのかについて免疫組織染色などを用いて病理組織学的に検討し、心臓の慢性病態の分子制御機構の解明につなげる。

2. 共同研究の内容・計画

マウスの心肥大モデル（圧負荷モデル）において、心肥大の病態で発現が上昇、あるいは減少する分子を DNA マイクロアレイ等により同定する。この結果に基づき、発現に変化の認められる分子の中で心臓の病態に重要と予想される候補分子群を探索し、選定する。選定した分子に関して、ヒトの病理組織検体に対して免疫組織染色が可能な抗体を選定し、それらを用いて、心肥大検体、慢性心臓病態検体と正常対照群を用いて染色を行う。そのことで、これらの分子が心臓の慢性病態でどのように発現が制御されているかについて解析を行う。

3. 研究成果（経過）

マウスの心肥大モデル（圧負荷モデル）において、心肥大の病態で発現が上昇、あるいは減少する分子を DNA マイクロアレイ等により同定した。この結果に基づき、発現に変化の認められる分子の中で心臓の病態に重要と予想される候補分子群を探索し、選定した。選定した分子に関して、ヒトの病理組織検体に対して免疫組織染色が可能な抗体を選定し、それらを用いて、心肥大検体、慢性心臓病態検体と正常対照群を用いて染色を行った。申請者の移動により、本学での研究は事実上終了しているが、今後、心肥大検体、慢性心臓病態検体、正常対照群を用いて免疫染色等による解析を継続して行い、結果がまとまり次第発表する予定である。

20. 唾液腺疾患と唾液腺管開口部位の形態構造との関連性について

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
天野 カオリ	医学部解剖学	講師	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
相澤 信	日本大学	教授	試料提供（日大）：研究助言
島田 和幸	日本大学	名誉教授	試料採取（日大）研究指導
松村 譲児	医学部解剖学	教授	研究用遺体試料管理責任者

キーワード

ヒト、唾液腺管開口部形態、唾液腺疾患、SEM、神経分布、平滑筋分布

研究分野

臨床解剖

1. 共同研究の目的

唾液腺における感染性疾患は耳下腺に多く、唾石症や嚢胞は顎下腺での高い発症率となっている。耳下腺の感染経路に関しては主導管の開口部形態、すなわち耳下腺と口腔をつなぐ位置関係が原因であることが考えられすでに報告している。唾石症は顎下腺に多く発症するが、原因として顎下線からの唾液成分や、口腔細菌などの係わりが報告されている。顎下腺に関する動物実験は多数報告されているが、症例以外でのヒトに関連する報告はわずかで、特に舌下腺管との共通開口部である舌下小丘の形態構造に関する詳細は不明である。この領域に関する形態構造を解明することは臨床的にも有意義であるといえる。

2. 共同研究の内容・計画

ヒト成人ならびに胎児顎下・舌下腺管を試料として使用し、開口部位（耳下腺乳頭・舌下小丘部）に関する肉眼形態学的ならびに走査型電子顕微鏡による形態観察を行う。試料は日大医学部研究用成人遺体と、杏林大学医学部寄贈研究用胎児遺体を使用する。

また唾液腺管開口部位における神経分布を観察するために免疫組織学的染色を行う。

免疫染色用試料の遺体は10時間以内に頸部のみ4%パラホルムアルデヒド／PBS溶液にて固定し、摘出後、凍結試料を作成する。神経分布の染色にはProtein Gene Product (PGP)9.5, Tyrosin Hydroxylase (TH), Choline acetyl transferase (ChAT)と、感覚線維の同定にはSubstance P(SP)を使用する。

3. 研究成果（経過）

ヒト唾液腺管の特異な構造と機能の関連を解明することを目的とし研究を進行している。

ヒト成人ならびに胎児顎下・舌下腺管を試料として使用し、開口部位（耳下腺乳頭・舌下小丘部）に関する肉眼形態学的ならびに走査型電子顕微鏡による形態観察を行った。試料は日大医学部研究用成人遺体と、杏林大学医学部寄贈研究用胎児遺体を使用した。

また唾液腺管開口部位における神経分布を観察するために免疫組織学的染色を行った。

神経分布の染色にはProtein Gene Product(PGP)9.5, Tyrosin Hydroxylase(TH), Choline acetyl transferase(ChAT)と、感覚線維の同定にはSubstance P(SP)を使用する。また導管壁に分布する平滑筋線維の同定には α -SMA抗体を使用した。

以上の研究結果の一部は論文としてまとめたものを、現在海外誌に投稿中である。

Title: Study of human Wharton's duct structure and its relationship with salivary flow

Authors: Kaori Amano, Nobuyuki Mitsukawa, Tomonori Harada, Shin Aizawa, George Matsumura

胎児試料を使用した研究結果の一部についても現在論文執筆中であり、近日投稿予定である。

21. 高安大動脈炎の経過に応じた免疫組織化学的变化の相違

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
菅間 博	医学部病理学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
寺戸 雄一	医学部病理学	講師	検体の選定
倉田 厚	東京医科大学	准教授	内膜肥厚部の解析

キーワード

高安大動脈炎、免疫組織化学、平滑筋分化、抗原提示

研究分野

病理学

1. 共同研究の目的

高安大動脈炎は、東洋の若年女性に好発する、大動脈およびその一次分枝を侵す炎症性疾患である。その時相は急性期、亜急性期、慢性期に分類されるが、時相に応じた病理学的解析は十分になされていない。組織学的および免疫組織化学的検索から、高安大動脈炎の時相を推定することがどの程度、可能かを解析する。また、高安大動脈炎の病因として弾性線維に対する自己免疫性の炎症が疑われているが、その妥当性を免疫組織化学的検索から解析する。

2. 共同研究の内容・計画

関連病院で得られた約 10 例の高安大動脈炎の大動脈組織を用いる。平滑筋や各種炎症性細胞の免疫組織化学的検索を施行する。病期の進行度は、中膜弾性線維の破壊や内膜および外膜の線維化の程度で判別する。病期の進行度に対応して、多核巨細胞がどの程度出現するか、中膜での弾性線維の貧食像がどの程度認められるか、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、成熟樹状細胞などの炎症性細胞がどの部位にどの程度出現するか、内膜の平滑筋の成熟度が増すか、などを解析する。

3. 研究成果（経過）

高安大動脈炎は、東洋の若年女性に好発する、大動脈およびその一次分枝を侵す炎症性疾患である。その時相は急性期、亜急性期、慢性期に分類されるが、時相に応じた病理学的解析は十分になされていない。また、高安大動脈炎の病因として弾性線維に対する自己免疫性の炎症が疑われているが、その妥当性は十分には解析されていない。杏林大学を含む関連病院で得られた 7 例の高安大動脈炎の大動脈組織を用いて、平滑筋や各種炎症性細胞の免疫組織化学的検索を施行した。その結果、病期が進行するに連れて、中膜弾性線維の破壊と、内膜および外膜の線維化が進行すること、また、多核巨細胞は急性期にのみに出現し、中膜外側で弾性線維を食食すること、また、急性期および亜急性期を主体に、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、成熟樹状細胞などの炎症性細胞が中膜外側を主体に出現することなどを明らかにした。これら組織学的および免疫組織化学的検索から、高安大動脈炎の時相を推定することが可能と考えられた。また、高安大動脈炎の病因として弾性線維に対する自己免疫性の炎症が示唆された。

2) 口頭発表

- ① 倉田厚，真村瑞子，藤田浩司，平野和彦，長尾俊孝，黒田雅彦．高安大動脈炎の進展に関わる病理像の変化．第 104 回日本病理学会総会（2015 年 5 月 1 日，名古屋）

22. 結腸直腸癌の診断・治療に関するバイオマーカーの探索

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
小林 敬明	医学部総合医療学	助教	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
表 和範	オリエンタル酵母株式会社 長浜生物科学研究所	研究員	実験・研究の実施
榎本 哲郎	オリエンタル酵母株式会社	主任	実験・研究の支援
保田 尚孝	オリエンタル酵母株式会社 長浜生物科学研究所	所長	実験・研究の管理

キーワード

結腸直腸癌、バイオマーカー、基礎的研究、HiCEP

研究分野

消化器外科学

1. 共同研究の目的

結腸直腸癌の診断・治療に関するバイオマーカーの探索を行うこと。

2. 共同研究の内容・計画

検出感度の良い遺伝子検出法である HiCEP 技術を有するオリエンタル酵母様と共同で、結腸直腸癌の診断・治療に関するバイオマーカーの探索を行う。まず、当科先行研究“膵管分離法とマイクロアレイを用いた大腸癌浸潤部・族出での浸潤能の解明”で用いた大腸癌組織検体を用い、先駆的緩急として大腸癌部・正常部における遺伝子発現の差を検討する。ここで検出感度、必要量などの技術的ノウハウを獲得し、解析対象の選定を含め研究計画の立案を行い、バイオマーカー検索を行う。

3. 研究成果（経過）

外科切除検体 2 例を用いて、パラフィン切片、凍結切片を用い HiCEP 解析を行った。RNA の分解が進んでいるパラフィン切片での解析は不可能であったが、凍結切片での解析は可能であった。このため今後は凍結切片からの RNA 採取する方針となり、現在他凍結切片標本の作成中である。

23. ヒト iPS 細胞から誘導した膵β細胞の機能解析

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
今泉 美佳	医学部生化学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
青柳 共太	医学部生化学	講師	インスリン分泌解析
大河内 仁志	国立国際医療センター	部長	iPS β 細胞の調製
矢部 茂治	国立国際医療センター	上級研究員	iPS β 細胞の調製

キーワード

iPS 細胞、膵β細胞、インスリン、開口分泌

研究分野

分子細胞生物学

1. 共同研究の目的

ヒト iPS 細胞から誘導した膵β細胞は糖尿病における再生医療、また糖尿病の病態解析や薬効分析への応用が期待されている。iPS 細胞のβ細胞への分化誘導法の開発は急速に進展してきたが、得られた iPS β 細胞が正常な膵β細胞と同等のインスリン分泌機能を有するのかを詳細に検証する必要がある。本研究ではβ細胞のインスリン分泌機能の評価指標として、正常膵β細胞に特徴的に見られるグルコース応答に対する 2 相性インスリン開口分泌機能に着目し、私達が独自に構築しているインスリン顆粒開口分泌イメージング解析システムを主に用いて検証する。得られた結果はより質の高い iPS β 細胞の作製法に反映させる。

2. 共同研究の内容・計画

1. 国立国際医療センター細胞組織再生医学研究部において、ヒト iPS 細胞から膵β細胞を調製する。
2. 杏林大学医学部生化学教室において、iPS β 細胞のインスリン発現解析、および生理学的解析である perfusion 実験によるインスリン分泌 2 相性の解析、全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) イメージングシステムを用いたインスリン顆粒の 2 相性開口分泌機能解析、細胞内 Ca²⁺、ATP 変動イメージング解析を行い、iPS β 細胞の 2 相性インスリン開口分泌機能を検証する。
3. 得られた結果をより質の高い iPS β 細胞の作製法に反映させる。
4. これら in vitro で検証した細胞を糖尿病モデルマウスに細胞移植することで、iPS β 細胞の生体内でのインスリン分泌機能を検証する。

3. 研究成果（経過）

ヒト iPS 細胞から誘導した膵β細胞は糖尿病における再生医療、また糖尿病の病態解析や薬効分析への応用が期待されている。iPS 細胞のβ細胞への分化誘導法の開発は急速に進展してきたが、得られたヒト iPS β 細胞が正常な膵β細胞と同等のインスリン分泌機能を有するのかを詳細に検証する必要がある。本研究ではβ細胞のインスリン分泌機能の評価指標として、正常膵β細胞に特徴的に見られるグルコース応答に対する 2 相性インスリン開口分泌機能に着目し、検討を行った。国立国際医療センター細胞組織再生医学研究部から提供された iPS β 細胞の分泌機能について、2 相性インスリン開口分泌機能の評価のために私達が独自に開発した Cell chamber 方式による Perfusion 実験装置を用いて調べたところ、細胞当たりのインスリン分泌量は細胞調製ごとに大きく異なっていたが、2 相性インスリン分泌を検出することができた。そこで次のステップとして、より詳細な 2 相性インスリン顆粒開口分泌機能が測定できる全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) イメージングシステムを用いた分泌機能評価を計画している。現

在、ヒトインスリン顆粒を光学的にラベルするためのプローブである human insulin promotor(HIP)の insulin-GFP アデノウイルスベクターを作製中であり、来年度はこのアデノウイルスベクターを用いた TIRFM イメージングによる行い、iPS β 細胞の分泌機能評価を進める計画である。

24. 熱傷創に対する脂肪由来幹細胞（ADRC）の有効性および安全性の検討

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
山口 芳裕	医学部救急医学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
樽井 武彦	医学部救急医学	准教授	動物及び基礎実験の施行・結果解析
海田 賢彦	医学部救急医学	助教	動物及び基礎実験の施行・結果解析
朝日 通雄	大阪医科大学	教授	動物及び基礎実験の施行・結果解析
伊井 正明	大阪医科大学	講師	動物及び基礎実験の施行・結果解析

キーワード

熱傷治療、脂肪由来幹細胞（ADRC）、創傷治癒、安全性

研究分野

再生医療

1. 共同研究の目的

ヒト脂肪由来幹細胞（ADRC）の熱傷創に対する治療効果と安全性を検討する。

2. 共同研究の内容・計画

内容）熱傷治療において ADRC の有用性と安全性を確認するために、小動物（マウス）と大動物（ブタ）を用いた動物実験を、大阪医科大学薬理学教室との共同研究として行う。

計画）実験 1）ヒトの脂肪吸引から得られた脂肪組織を原料とし、Cytori 社製 Celution を用いて ADRC を分離し、ヌードマウスの熱傷モデルに皮下注射して、熱傷創の治癒過程に対する有効性を評価する。動物実験は大阪医科大学の動物実験施設にて計 4 回施行の予定。同時に ADRC を用いた *in vitro* の基礎実験も行う（大阪医科大学および杏林大学にて施行）。

実験 2）実験 1 で有効性が示された場合、熱傷患者治療の臨床応用に向けて、大動物を用いた安全性の確認実験を行う。ブタの脂肪吸引を行い、上記 Celution を用いて ADRC を分離し、同じブタ個体に皮下注射して、一定期間飼育後、安全性の確認を行う（同実験は外部委託する予定）。実験期間は、上記を含めて 1 年間の予定である。

3. 研究成果（経過）

< 予備実験 1 >

ヌードマウスに対して安定した 3 度熱傷を形成する実験モデルを作成するにあたり、様々な条件を試み、組織学的な評価を行い、3 度熱傷実験モデルを作成した。

< 予備実験 2 >

ADRC の局所投与が熱傷創の治癒に対して有効であることを示すために、ヌードマウスに 3 度熱傷作成し熱傷創を筋膜上で切除後、ヒト ADRCs を局所投与し、創傷治癒への影響を肉眼的、組織学的に評価した。ADRCs 投与により肉眼的に創面積の縮小が加速し、組織学的にも皮下組織は厚く構築されており、ADRCs 投与により創傷治癒は促進している可能性が示唆された。

< 予備実験 3 >

凍結 ADRCs の局所投与が熱傷創の治癒に有効であることを示すために予備実験 2 と同様に評価を行った。凍結 ADRCs におい

ても創面積の縮小、皮下組織の構築を認め、凍結 ADRCs が熱傷創の創傷治癒に有効である可能性が示唆された。

25. ヒト iPS 細胞を用いた皮膚付属器再生

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
大 山 学	医学部皮膚科学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
岡野 栄之	慶應義塾大学	教授	ヒト iPS 細胞の供給・分化誘導法指導
馬 淵 洋	東京医科歯科大学大学院	助教	iPS 細胞の分化誘導効率の解析
塚島 明希	慶應義塾大学	実験助手	iPS 細胞の運搬/管理・分化誘導の補助

キーワード

再生医学、ヒト iPS 細胞、分化誘導、皮膚、付属器

研究分野

再生医学・皮膚科学

1. 共同研究の目的

本研究は癬癩性脱毛症をはじめとする難治性皮膚疾患の再生医療実現の技術的基盤としてヒト iPS 細胞を用いた皮膚付属器の再生法の確立を目的とする。共同研究者の施設はヒト iPS 細胞研究の本邦における拠点の一つであり、申請者は既に共同研究を続けている。共同研究者からヒト iPS 細胞の供給と分化誘導に関する技術支援を受けることで安定した実験計画の遂行が可能になる。共同研究者には我々が新たに開発した皮膚付属器再生技術を還元する。

2. 共同研究の内容・計画

既にライン化され多施設にて研究に用いられているヒト iPS 細胞の供給を共同研究者からうける（本計画では新規 iPS 細胞の作成は行わない）。申請者らは供給されたヒト iPS 細胞をフィーダーフリー化した上で、組織特異的マーカーの発現をモニタリングしながら上皮系細胞（ケラチノサイト）と間葉系細胞（毛乳頭細胞・線維芽細胞など）に分化誘導する。得られた上皮・間葉系両方の細胞を毛包をはじめとする皮膚付属器の3次元構造を再現するようコラーゲンゲルに封入し共培養あるいは *in vivo* の環境に移植することで器官再生を試みる。再生された構造体の形態的・分子生物学的解析は本学と共同研究者ら両方の施設で行う。

3. 研究成果（経過）

本研究は共同研究者から既にライン化されたヒト iPS 細胞の提供を受け、培養を容易にするためフィーダーフリーの条件で生育可能にした上でヒト付属器・特に毛包を構成する二つのコンポーネント（上皮系・間葉系細胞）を分化誘導しそれらを用いて皮膚付属器を再現することである。

共同研究初年度となる本年度は異なるヒト iPS 細胞から安定して発育するフィーダーフリーの iPS 細胞を作成することができた。また、得た細胞から上皮系細胞であるケラチノサイト、間葉系細胞を誘導した。誘導された細胞はそれぞれケラチン 14、毛包幹細胞マーカーであるケラチン 15、間葉系幹細胞のマーカーである CD44、CD90、CD105、CD166 などのマーカーを発現していることをリアルタイム PCR、フローサイトメトリーで確認した。また、間葉系細胞については脂肪、骨、軟骨組織に分化する多分化能をもつことを確認し、次年度以降の再生実験に用いる素材をそろえることができた。

26. 子宮内膜症の新たな血清診断バイオマーカーの開発

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
小林 陽一	医学部産科婦人科学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
福田 道子	産業技術総合研究所	フェロー	ペプチド探索、解析

キーワード

子宮内膜症、疾患特異的バイオマーカー、糖蛋白、ファージディスプレイ

研究分野

産婦人科学

1. 共同研究の目的

子宮内膜症は近年増加傾向にあり、良性疾患ではあるが月経困難症や不妊症の原因となり女性の QOL を著しく損なう疾患である。しかしながら現在、子宮内膜症の有効な血清診断マーカーはなく、その開発が切望されている。本研究では子宮内膜症の新規血清バイオマーカーを探索し、診断に応用することを目的とする。

2. 共同研究の内容・計画

子宮内膜症患者の血清をレクチンコートしたマルチウェルプレートに加え、糖タンパク質を選択的にプラスチックに吸着させる。ファージライブラリーは非特異的ファージ除去後に子宮内膜症患者血清を吸着したウェルに加え結合したクローンを選択し、ファージの DNA がコードするインサートのペプチド配列を決定する。その後、ペプチドが認識する血清糖蛋白質を血清あるいは病変組織から単離しプロテオミクスで同定する。糖蛋白質バイオマーカー候補の検出系をファージライブラリースクリーニングを応用して作製しその適用範囲や有効性等について検証する。

3. 研究成果（経過）

現在、引き続き検体収集と解析を行っているところである。

27. 肺孤立性毛細血管腫の臨床病理学的研究

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
菅間 博	医学部病理学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
藤原 正親	医学部病理学	准教授	検体の選定
橋本 浩次	NTT 東日本関東病院	医師	検体の解析
倉田 厚	東京医科大学	准教授	文献的検索

キーワード

肺孤立性毛細血管腫、病理組織学、免疫組織化学、臨床病理学

研究分野

病理学

1. 共同研究の目的

肺孤立性毛細血管腫は 2006 年に初めて 2 例の報告がなされて、これまで英文で 10 例程度しか報告されていない稀な疾患である。しばしば検診の胸部 CT で発見され、極めて緩徐な増大傾向を示し、肺癌が疑われて切除されることが多い。しかし、稀であるがゆえに、その臨床病理学的、組織学的、免疫組織化学的特徴は十分に検討されていない。我々は病理部に保存されたホルマリン固定パラフィン包埋組織（FFPE 組織）を用いて、この解析を行う。

2. 共同研究の内容・計画

毛細血管の増生パターンや範囲などを組織学的に判定し、また、免疫組織化学的に血管内皮マーカーや、他の腫瘍で染色されることが分かっているマーカーなどの発現を検索する。また、適宜、その臨床所見や経過などを参照する。

これにあたって、症例の集積のため杏林大、NTT 東日本関東病院、東京医科大学で共同研究を行う。

具体的には、杏林大学での手術例での肺孤立性毛細血管腫の症例に関する、個人を特定できる内容の除外された臨床経過と、FFPE 組織から薄切された未染色標本を染色し、組織学的・免疫組織化学的に解析する。

3. 研究成果（経過）

肺孤立性毛細血管腫は、2006 年に初めて 2 例の報告がなされて、これまで英文で 10 例程度しか報告されていない稀な疾患である。しばしば検診の胸部 CT で発見され、極めて緩徐な増大傾向を示し、肺癌が疑われて切除されることが多い。しかし、稀であるがゆえに、その臨床病理学的、組織学的、免疫組織化学的特徴は十分に検討されていない。我々は杏林大学医学部付属病院病理部などに保存されたホルマリン固定パラフィン包埋組織（FFPE 組織）を用いて、この解析を行った。毛細血管の増生パターンや範囲などを組織学的に判定し、また、免疫組織化学的に血管内皮マーカーや、他の腫瘍で染色されることが分かっているマーカーなどの発現を検索した。また、適宜、その臨床所見や経過などを参照した。その結果、画像の年次経過などから、肺孤立性毛細血管腫は緩徐進行性の良性的腫瘍性、ないしは腫瘍様病変であることを示唆し、病理学的に肺孤立性毛細血管腫は血管内伸展や細気管支壁を involve するという組織学的特徴や、SMA を発現するという免疫組織化学的特徴を見出した。

これらの結果は、英文誌に投稿中である。

28. 甲状腺低分化癌と未分化癌の臨床病理学的ならびに分子病理学的研究

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
菅間 博	医学部病理学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
岡本 高宏	東京女子医科大学	教授	臨床病理学的解析
石井 順	医学部病理学	助教	遺伝子工学的解析、免疫組織化学的解析
堀内 喜代美	東京女子医科大学	講師	臨床病理学的解析
平野 浩一	医学部外科学	教授	臨床病理学的解析、免疫組織化学的解析
中里 陽子	医学部外科学	助教	臨床病理学的解析、免疫組織化学的解析

キーワード

甲状腺癌、低分化癌、未分化癌、悪性転化、分子標的治療

研究分野

医科学

1. 共同研究の目的

甲状腺癌未分化癌は極めて予後が悪く、一般に手術の適応にならない。甲状腺分化癌あるいは低分化癌から未分化癌へ変化することを、悪性転化と呼ぶが、その分子生物学的な機序は解っていない。甲状腺低分化癌と未分化癌の標本を集積し、臨床病理学的、病理組織学的ならびに分子病理学的に解析して、甲状腺癌の悪性転化の機序を明らかにする。

2. 共同研究の内容・計画

1. 甲状腺低分化癌と未分化癌の臨床病理学的ならびに病理組織学的検討

杏林大学付属病院ならびに東京女子医科大学付属病院で生検ないし手術された低分化癌と未分化癌の症例を集積し、臨床病理学的ならびに病理組織学的に解析する。

2. 低分化癌と未分化癌の分子生物学的解析

生検あるいは手術標本を対象として、免疫組織化学的ならびに分子病理学的により蛋白、RNA、DNA レベルの解析をおこなう。さらに甲状腺癌由来の培養細胞株を用いて遺伝子工学的ならびに分子生物学的な解析をおこなう。

3. 研究成果（経過）

甲状腺癌低分化癌と未分化癌は、頻度が低い。東京女子医科大学 内分泌外科と共同して、甲状腺低分化癌と未分化癌の症例を集積し、臨床的、組織学的ならびに分子遺伝学的な特徴を明らかにすることを目的として、継続して研究を行っている。

今年度は、鑑別が問題となる低分化癌と充実型乳頭癌を対象とした研究をおこなった。その結果、低分化癌と充実型乳頭癌の病理組織学的な鑑別点を整理するとともに、臨床的特徴と術後の予後の違いを明らかにした。さらに、背景の腫瘍関連遺伝子の異常の解析を進めた。

1)学会誌等

①加藤良平, 菅間博：【甲状腺癌の病理診断:新たな展開】 乳頭癌特殊型、日本甲状腺学会雑誌 6 巻 2 号 109-112,2015.10.

②千葉知宏、菅間博 「甲状腺低分化癌について」 日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌、33 巻 2 号 In press
また、今年度発刊予定の甲状腺腫瘍診療ガイドラインに反映される予定である。

2)口頭発表

①菅間博「甲状腺低分化癌の病理診断基準 Update」第 28 回日本内分泌外科学会総会
(2016 年 5 月 26 日、横浜)ワークショップ 1.

②菅間博「甲状腺腫瘍の組織診断基準について第」57 回日本臨床細胞学会春期大会 (2016 年 5 月 28 日、横浜)
シンポジウム 1.

29. 慢性肺血栓塞栓病に対する肺動脈血管形成術に関する共同研究

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
佐藤 徹	医学部内科学Ⅱ	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
柳澤 亮爾	医学部内科学Ⅱ	特任助教	形成術指導・普及、研究施行
吉野 秀朗	医学部内科学Ⅱ	教授	研究統括
伊波 巧	医学部内科学Ⅱ	助教	形成術指導、統括
Sandhu S G	Mayo Clinic	准教授	形成術施行・普及、研究施行
Franz P R	Mayo Clinic	教授	形成術施行・普及、研究施行

キーワード

慢性肺血栓塞栓症、肺動脈形成術、前向き研究

研究分野

臨床研究

1. 共同研究の目的

当教室は、慢性肺血栓塞栓症の先進的治療法であるカテーテルによる肺動脈形成術を発展させ、その有用性と安全性を検討してきたが、アメリカでは未だ普及しておらず、この手技のメーヨークリニックにおける指導、アメリカを中心とした全世界への普及と症例登録、アメリカおよび全世界の慢性肺血栓塞栓症治療における肺動脈形成術の前向き研究の企画・準備。更に、慢性肺血栓塞栓症の病態解明。

2. 共同研究の内容・計画

柳澤亮爾がアメリカ・メーヨークリニックに勤務し、肺動脈血管形成術の開始、発展を指導し、ここを拠点として、この治療法のアメリカおよび世界への普及活動、慢性肺血栓塞栓症治療におけるこの治療法の前向き研究開始のための準備および企画を行う。更に、メーヨークリニックと共同で本疾患の病態解明のため、臨床的・基礎的研究を施行する。杏林大学循環器内科との Web conference を定期的に開催して、杏林スタッフも研究に参加して研究を推進する。

3. 研究成果（経過）

平成28年1月より柳澤がアメリカの Mayo clinic に留学し、研究を開始した。Mayo clinic では今までに約10件の慢性肺血栓塞栓症に対してカテーテルによる形成術を施行し、柳澤は計画通りに、指導、および前向き研究の準備を開始している。Web conference も準備中で、もう暫くしたら開始される。これにより、杏林と Mayo clinic との共同研究は更に促進される。

②保健学部

30. 糖尿病における運動神経障害の病態生理

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
丹羽 正利	保健学部作業療法学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
村松 憲	健康科学大学	准教授	共同実験者
生友 聖子	健康科学大学	助教	共同実験者
玉木 徹	健康科学大学	助手	共同実験者
大城 直美	保健学部作業療法学	助教	共同実験者

キーワード

糖尿病、運動ニューロン、神経科学、リハビリテーション

研究分野

総合領域

1. 共同研究の目的

糖尿病性神経障害は糖尿病発症直後から観察される障害の一つで、初期の遠心性・求心性線維の伝導速度の低下に始まり、慢性期には神経線維の脱落が生じる事が知られている。筋力低下、筋萎縮などの運動障害は多くの場合慢性期まで観察されないために、運動ニューロンは糖尿病性神経障害に対して強い耐性を持つと考えられてきた。しかし、最近、脊髄運動ニューロンや脳神経細胞にも変性が生じることが報告されている。これらの点を明らかにすることを目的に、糖尿病ラットを用いて糖尿病性神経障害による神経細胞や線維の障害様式を調べる。

2. 共同研究の内容・計画

実験にはストレプトゾドシンの投与によってⅠ型糖尿病を発症した Wister 系ラット(糖尿病群)とⅠ型糖尿病を発症した Wister 系ラット (糖尿病群)、及びそれぞれ健常なコントロールラット (対照群)を用いる。それぞれにおいて、脊髄運動ニューロンと脳神経細胞の形態を比較する。運動ニューロンの標識はイソフルレン麻酔下で行う。麻酔下のラット腓腹筋筋枝・腹壁筋筋枝を切断して、その断端を 10%Dextran 溶液に 2 時間浸す。その後、Dextran の拡散を防ぐために神経断端をスポンゼルで覆い、術創を縫合する。必要に応じてラットには輸液、消炎鎮痛剤、抗生物質を投与する。2～3 週間の生存期間の後、ネンブタール麻酔による深麻酔下において 10%パラフォルムアルデヒド溶液による灌流固定を行い、脊髄を取り出す。後固定の後、腰髄から仙髄までの脊髄の連続切片 (100 μ m) を作成し、標識された運動ニューロン像をデジタルカメラで撮影し解析する。脳神経細胞は、ネンブタール麻酔による深麻酔下において 10%パラフォルムアルデヒド溶液による灌流固定を行い、脳を取り出す。後固定の後、脳の連続切片 (100 μ m) を作成し、ニッスル染色を施し、神経細胞像を解析する。

3. 研究成果(経過)

26 年度は、糖尿病発症後 1 ケ月程度生存させたラットの腹壁筋の運動ニューロンについて解析し、細胞数と細胞体径はともに健常群より有意に減少していることを報告した。27 年度は、糖尿病発症後 3 ケ月程度長期生存させたラットについて形態の変化を調べた。実験にはストレプトゾドシンの投与によってⅠ型糖尿病を発症した Wister 系ラット (糖尿病群) と健常なコントロールラット (対照群) を用いた。運動ニューロンの標識はイソフルレン麻酔下で行った。麻酔下のラットの腹壁筋筋枝を切断して、

その断端を 10%Dextran 溶液に 2 時間浸した後、術創を縫合した。2〜3 週間の生存期間後、ネンブタール麻酔による深麻酔下において 10%パラフォルムアルデヒド溶液による灌流固定を行い、脊髄及び筋組織を取り出した。後固定の後、腰髄から仙髄までの脊髄の連続切片 ($100\mu\text{m}$) を作成し、標識された運動ニューロン像及び筋組織を解析した。その結果、糖尿病発症長期の腹壁筋の運動ニューロンについて、初期のラットに比べてさらに細胞数と細胞体径が健常群より有意に減少していることを発見した。

31. 電子角度計（Electrogoniometer）の開発および信頼性に関する研究

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
八並 光信	保健学部理学療法学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
渡辺 一弘	創価大学	学部長	解析ソフトの開発
佐々木 博幸	コアシステムジャパン	開発部長	解析ソフトの開発
前 錠一	北浦通信	技術部長	電子角度計のプロトタイプ製作

キーワード

電子角度計、関節可動域、被検者間信頼性

研究分野

複合領域

1. 共同研究の目的

リハビリテーション医学において、筋力と関節可動域の測定は、患者の残存能力を知る上で重要な指標となる。筋力に関しては、様々な定量的測定を可能にする機器が普及している。他方、関節可動域の測定は、30 年以上、金属製の東大式角度計で測定している。リハビリテーション医学の進歩に関わらず、ゴニオメーターはアナログの域を出ていなし、学生にとっても非常に使用しづらいものである。本研究は、プロトタイプの電子角度計を用いて、その信頼性や操作性を検証する。

2. 共同研究の内容・計画

- (1) 前年度（平成 26 年度）の基礎的実験により、機器の操作性については、東大式より同電子角度計の優位性が確認された。
- (2) しかしながら、検者間信頼性においては、東大式も電子角度計も低く、検者内信頼性は、東大式より、電子角度計の方が優位であった。主な原因は、検者が学生であった点と考えられる。
- (3) 本年度は、検者および被検者数を増やし、なおかつ学生（アマチュア）と教員間（プロフェッショナル）での相違を検討していきたい。

3. 研究成果（経過）

- (1) 電子角度計（プロトタイプ）の制作は完了した。機器の構成は、軸心(本体)、測定アーム 2 本（基本軸、移動軸）の 3 つのコンポーネントから成る。軸心部分は、CPU、角度検知器、ブルーツース送信器から構成される。角度はブルーツースで、スマートフォンへ転送される。測定精度は 1 度である。
- (2) 前年度と同様に、再度、電子角度計の信頼性と操作性に関して東大式角度計と比較検討した。方法は、検者 5 名が、東大式と電子角度計を用いて、被検者 10 名の股関節外転角度と膝関節屈曲角度を 3 回繰り返し測定した。終了後、ユーザビリティに関するアンケート調査を行った。その結果、ICC(1,3)は、両角度計とも 0.90 以上であった。ICC(2,5)は、電子角度計の方が信頼性は高かった。アンケート調査は、電子角度計が有意に高かった。総合的に判断して、電子角度計の方が、東大式角度計に比べて、信頼性・ユーザビリティにおいて優位であることが確認できた。
- (3) 今後、電子角度計による関節角度測定後の送信データを、スマートフォンで受け取り、さらにデータベースに格納して、解析できるアプリケーションを開発する。また、臨床の現場で理学療法士に使用してもらい完成度を高めたいと考える。

32. 子宮頸部における新しいハイリスク型ヒト乳頭腫ウイルスの再考

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
大河戸 光章	保健学部臨床検査技術	講師	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
笹川 寿之	金沢医科大学	臨床教授	総括・プライマー・プローブ設計
小田 瑞恵	こころとからだの元気プラザ	婦人科診療部長	検体採取
藤井 雅彦	保健学部臨床検査技術	教授	細胞診・組織診判定

キーワード

ハイリスク型 HPV、子宮頸部上皮内腫瘍

研究分野

病理学

1. 共同研究の目的

細胞診で上皮内病変(SIL)、組織診で子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)と判定された病態は human papillomavirus (HPV) (HR-HPV13)による細胞変化であるが、HR13 陰性例が少なからず存在する。現在、細胞診検体で保険適応となっている HPV 検査法はハイブリッドキャプチャー法など主に HR13 の有無を調べる方法であるが、ASC-US 症例のうち、組織診で浸潤癌と診断される症例が実在することからも、HPV 検査による誤陰性を避けるべく、HR13 以外の型の存在をスクリーニングする必要がある。

そこで我々は子宮頸癌および HR-HPV13 陰性の上皮内病変 (SIL) および CIN 症例を用いて HR を疑う HPV (26, 30, 34, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85 型等) を検出し、ハイリスク型 HPV を再考する。この研究によって新たなハイリスク型 HPV が加わり、より一層の異型細胞の検出感度向上に寄与すると考える。

2. 共同研究の内容・計画

研究内容はハイリスク型 HPV の 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 型 (HR13) 陰性の SIL (細胞診) および CIN 症例を用いてハイリスク型を疑う HPV の 26, 30, 34, 66, 67, 69, 70, 73, 82 型等 (HR-susp.9) を検出し、ハイリスク型 HPV を再考する内容である。

昨年度は HPV genotyping 解析として、(1) HR-susp. 9 に対するプライマーおよびプローブの作製 : HPV26, 30, 34, 66, 67, 69, 70, 73, 82 型を特異的に検出するためのプライマーおよびプローブを設計して作製した。(2) HPV-DNA の抽出 : 約 3,500 症例の分注済みの子宮頸部細胞浮遊液から、DNA を抽出し、PCR 法によって B アクチンを検出した。(3) HR-susp.9 および HR13 の感染率の調査 : 細胞診で SIL と判定された症例および NILM と判定された症例に対して、特異的プライマーを用いた PCR で HR-susp.9 と HR13 の有無を調査した。本年度は昨年度に引き続き、上記の (2) を行い、得られたデータに基づき以下の (4)、(5) を実施する。(4) HR-susp.9 の型別リスク評価 : HR-susp.9 陽性症例を経過観察し、上皮内腫瘍の発症、消退および進展からハイリスクを疑う HPV の型別リスクを計る。(5) HR-susp.9 と HR13 の複合感染によるリスク評価 : HR13 存在下で複合感染している HR-susp.9 の型別を調べ、HR13 との関連性について解析する。

なお、本研究は平成 26 年度から平成 30 年度 (平成 26 年 4 月 1 日から平成 31 年 3 月 31 日) の研究計画における 2 年目の計画である。

3. 研究成果（経過）

子宮頸癌および HR13（16,18,31,33,39,45,51,52,56,58,59,68）陰性の上皮内病変（SIL）および CIN 症例を用いて HR を疑う HPV（26,30,34,66,67,69,70,73,82,85 型等：HR-susp.9）を検出し、ハイリスク型 HPV を再考する目的で平成 27 年度は HPV genotyping 解析として以下を実施した。

(1)HR-susp.9 および HR13 の感染率の調査：組織診で CIN1～3 と診断された 150 症例(450 検体)の子宮頸部細胞浮遊液から DNA を抽出し、PCR 法によって HR13 を検出後、HR13 陰性症例において、HR-susp.9 を検出した。その結果、150 症例中 23 症例（15%）が HR13 陰性であり、陰性症例の約 50%で 30,34,53,66,67,70 型が検出された。さらにこの結果は、金沢医大で行った Gene search 35（多種 HPV 検出法，MBL 社開発中）を用いた再現性実験でも同様の結果を得た。この結果より、CIN は HR13 だけでなく、HR-susp.9 によっても生じることが明らかになった。これまで組織診の裏付けがない検体での検討であったが、CIN の検出感度を高めるためには HR13 以外の HPV を検出する必要があると考えた。引き続き、症例数を増やして検討する。

(2)リスク評価解析：CIN のグレードに応じて、HR-susp.9 の混合感染割合を調査した。CIN1（70 例）では、HR-susp.9 陽性が 14 例、CIN2（30 例）では 10 例、CIN3（43 例）では 4 例の結果が得られた。この結果により、HR-susp.9 は CIN の発症に強く関連するものの、進行には関与せず、進行と共に淘汰されて HR13 が残る傾向にあることが解った。しかしながら現在 HR-susp.9 陽性症例で CIN も維持した状態であることから、個々の結果をさらに合わせ今後もリスク評価を行っていく所存である。平成 28 年度は昨年に引き続き上記の(1)(2)を行い、得られたデータに基づき更なる解析を行う予定である。

33. LC-MS/MS による合成ステロイド剤の高感度微量分析法の開発

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
石井 和夫	保健学部診療放射線技術	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
細田 香織	保健学部診療放射線技術	講師	LC-MS/MS によるフルチカゾンの定量法の開発
柴崎 浩美	東京薬科大学	准教授	LC-MS/MS によるフルチカゾンの定量法の開発
横川 彰朋	東京薬科大学	助教	体内動態解析

キーワード

LC-MS/MS、合成ステロイド剤、血中濃度推移、体内動態解析

研究分野

臨床薬学

1. 共同研究の目的

合成ステロイドは、吸入剤として気管支喘息の治療に、また、点鼻剤としてアレルギー性鼻炎の治療に広く用いられている。吸入および点鼻ステロイド剤は、局所作用を示し、低用量での薬効発現が期待されるが、小児における低身長などの副作用を懸念する患者も多い。本研究では、吸入および点鼻ステロイド剤の血中濃度推移を把握し、体内動態解析を行うことにより、全身作用を予測することを目指し、LC-MS/MS 法によるベクロメタゾンとフルチカゾンの高感度測定法の開発を目的とする。

2. 共同研究の内容・計画

吸入および点鼻ステロイド剤使用時の血中ステロイド濃度はピコグラムオーダーであることから、超微量分析法の開発が必要となる。血液試料からの抽出法、LC-MS/MS 分離分析条件の検討を行い、高い精度・再現性および感度の分析法を確立する。

- 1) 抽出法の検討：マトリックス効果が少ない固相抽出とし、適切な抽出カートリッジおよび抽出溶媒を選択する。
- 2) LC 条件の検討：目的物質を内因性のステロイドなどの生体成分と分離し、感度・精度よく測定するためのカラム、移動相を検討する。
- 3) MS/MS 条件の検討：ポジティブあるいはネガティブイオンモードについて比較検討し、最適なプレカーサーイオンとプロダクトイオンが得られる条件を確立する。測定モードには MRM モードを用いる。

3. 研究成果（経過）

本研究では、吸入および点鼻ステロイド剤の血中濃度推移を把握し、体内動態解析を行うことにより、全身作用を予測することを目指し、LC-MS/MS 法によるベクロメタゾンとフルチカゾンの高感度測定法の開発を行う。

平成 27 年度には、フルチカゾンを中心に LC-MS/MS 条件の検討を行った。fragmentor voltage 125 V、collision energy 9 V とした時の、precursor ion および product ion は、fluticasone propionate で m/z 501.2→313.1、fluticasone propionate- 2H_3 で m/z 504.2→313.1 と最適化された。カラムには phenomenex® Gemini-NX C18 (50×2.0 mm I.D., 5 μ m) を使い、流速は 0.2 mL/min に設定した。移動相に 10 mM 酢酸アンモニウム+0.2% 酢酸水溶液及びメタノールを用いたグラジエント測定法により、保持時間 10.8 分に fluticasone propionate の良好なピークが得られた。fluticasone propionate- 2H_3 を内標準物質とし、3.066～255.5 pg の範囲で作成した検量線は、良好な相関関係 ($r=0.9998$) が得られた。今後、生体成分からの抽出法の検討、感度及び精度の検討を行う予定である。ステロイド剤の高感度微量定量法は、患者の負担を少なくし、ステロイド薬投与後の体内動態解

析を行う上で、有用な手段となる。

34. キチンによるアレルギー応答誘導機構の解明

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
新江 賢	保健学部臨床検査技術	講師	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
中江 進	東京大学医科学研究所	准教授	遺伝子改変マウスの提供
松本 健治	成育医療研究センター	研究部長	実験機器等の研究支援
須藤 カツ子	東京医科大学	講師	遺伝子改変マウスの作製

キーワード

キチン、アレルギー

研究分野

免疫・アレルギー

1. 共同研究の目的

ダニはアレルギー性喘息のもっとも高頻度な抗原であるが、その発症に関わるダニ成分は不明である。申請者は、タンパク質抗原単独ではアレルギーは誘導されないが、ダニの外殻構成成分「キチン」の存在下では、Th2 サイトカイン誘導因子である IL-33 の発現誘導を介して、マウスにアレルギー応答が惹起されることを見出した。そこで、ダニによるアレルギー応答誘発機序を明らかにするために、アレルギー応答における 1) キチンおよび IL-33 の標的細胞の同定と活性化機構の解明、2) キチン受容体の同定およびキチン受容体のシグナル伝達経路の解明を目的とする。

2. 共同研究の内容・計画

1. キチンおよび IL-33 の標的細胞の同定と活性化機構の解明：現在、IL-33 の存在下でキチンに応答する細胞として樹状細胞が同定できている。キチン・IL-33 刺激によって活性化された 樹状細胞による Th2 細胞の分化機構や Th2 型免疫応答の誘導機構を明確にする。

2. キチン受容体の同定およびキチン受容体のシグナル伝達経路の解明：キチン・IL-33 刺激による樹状細胞の活性化は、TLR2 欠損および Dectin-1 欠損樹状細胞でも観察されており（未発表）、未知のキチン受容体の存在が示唆されている。申請者らがキチンに結合する分子として LC-MS/MS 解析により捉えた分子群のうち（未発表）、実際にキチンに結合する分子機能を in vitro 及び in vivo で評価する。

3. 研究成果（経過）

これまでに、キチンは単独では骨髄由来樹状細胞（BMDC）を活性化しないが、IL-33 存在下では IL-1b の産生を強く誘導することを見出している。IL-1b は Th2 細胞の活性化にも関わるため、キチン+IL-33 刺激により樹状細胞から産生される IL-1b が、Th2 細胞の誘導促進とそれに続くアレルギー応答誘導に関わっている可能性がある。そこで、野生型および IL-1a/b 欠損マウス由来の BMDC をキチン+IL-33 で刺激し、その後、OVA 特異的 T 細胞受容体を発現する OTII マウスの T 細胞と OVA ペプチド存在下で共培養することにより、BMDC 由来 IL-1b の Th2 細胞活性化に対する効果について in vitro で検討した。キチンもしくは IL-33 単独で刺激した野生型マウス由来 BMDC と比べて、キチン+IL-33 で刺激した野生型マウス由来 BMDC では、共培養後の OTII 由来 T 細胞による IL-13 産生が有意に増加した。この時、Th1 細胞由来の IFN- γ や Th17 細胞由来の IL-17 といったサイトカインは、いずれの刺激においてもほとんど産生されなかった。また、キチン+IL-33 で刺激した IL-1a/b 欠損マウス由来 BMDC

では、野生型マウス由来 BMDC のような IL-13 産生の有意な増加は観察されなかった。この結果から、キチン+IL-33 刺激により樹状細胞から産生される IL-1 が、抗原特異的な Th2 細胞の活性化を促進できることが明らかとなった。そこで現在、キチン+IL-33 刺激により樹状細胞が産生する IL-1 が、アレルギー応答誘導に関与するかどうかについて *in vivo* で検討中である。

35. 放射性医薬品の品質管理手法に関する研究

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
山本 智朗	保健学部診療放射線技術	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
對間 博之	茨城県立医療大学	准教授	実験分担

キーワード

放射性医薬品、品質管理手法、クロマトグラフィ、放射化学的純度

研究分野

なし

1. 共同研究の目的

放射性医薬品の品質管理手法について、臨床に広く普及させたいと考えていると同時に、学部教育にも反映させるために、他大学との共同で研究することで、実践教育にも反映させることができる。

2. 共同研究の内容・計画

本邦では 2011 年 6 月 10 日に放射性医薬品取り扱いガイドラインが日本核医学会等の関係学会が共同で作成していたが、放射性医薬品に関する品質管理においては脆弱な状況が続いている。核医学検査で使用される放射性医薬品には完成製剤とキット製剤がある。キット製剤の調整方法は日本核医学会からガイドラインが出されているが、施設内で放射化学的純度や pH 測定などの検定は行われていないのが現状である。そこで我々は放射化学的純度測定が簡易的に行える、放射性医薬品の安全管理に関する基礎検討を行うこととした。

3. 研究成果（経過）

実表題、研究打ち合わせを平成 28 年 2 月 6 日（秋葉原 U D I X）にて開催した。

【打ち合わせ内容】

- 1) 放射線従事者登録
- 2) 研究方針と今後の予定
- 3) 共同研究施設の拡充

【打ち合わせ結果】

- i) 茨城県立医療大での登録に時間がかかったため、年内の先方の施設で行う研究は次年度に引き継ぐこととした。（3 月に井の頭キャンパスでテスト実験を行い、良好な結果を得た）
- ii) 放射性医薬品のキット製剤において、標識エラーを起こしやすい状況を検討し、要加熱、要還元剤添加、過剰希釈、過剰攪拌、規定時間超過の 5 項目について、合計 8 製剤の検証を行うことが検討された。
- iii) 研究施設ではエラーを人為的に起こさせる研究をし、臨床施設では実際の検査薬の残りでデータを取ることを検討したいため、3 施設を共同研究施設追加として検討した。

③ 総合政策学部

36. 北タイにおける HIV 陽性者への保健医療福祉サービス提供のあり方に関する研究

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
北島 勉	総合政策学部	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
Malcolm Field	総合政策学部	教授	研究計画作成、データ分析
岡村 裕	総合政策学部	准教授	研究計画作成、データ分析
Saiyud Moolphate	チェンマイラチャパット大	講師	研究計画作成、データ収集
Chittima Katanyu	チェンマイラチャパット大	講師	研究計画作成、データ収集

キーワード

HIV、抗 HIV 多剤併用療法、高齢化、タイ

研究分野

国際保健

1. 共同研究の目的

近年、途上国においても抗 HIV 多剤併用療法の普及が進み、HIV 陽性者の余命は延伸され、HIV 陽性者の高齢化への対応が新たな課題となりつつある。しかし、途上国における高齢 HIV 陽性者の医療や介護ニーズに関する研究は少なく、高齢化が進む HIV 陽性者に適切に対応するために必要な情報が不足している。そこで本研究は、タイ国チェンマイ県において、高齢 HIV 陽性者に特徴的な医療及び介護ニーズを把握することを目的とする。

2. 共同研究の内容・計画

調査対象地域は、タイ国チェンマイ県サンパトン郡である。調査対象者は、サンパトン病院で治療をうけている 50 歳以上の高齢 HIV 陽性者である。調査対象者からインフォームドコンセントを得た後、質問票による面接調査を実施し、対象者の人口社会的属性、家族構成、健康状態、慢性疾患の有無と種類、医療サービスの医療状況、日常動作能力などについて調べる。それらの情報について高齢 HIV 陽性者の医療及び介護ニーズの特徴を明らかにするとともに、今後の対応について検討を行う。

3. 研究成果（経過）

平成 26 年度から継続して、タイ国チェンマイ県のサンパトン郡において、地域病院で抗 HIV 多剤併用療法を受けている患のうち 50 歳以上の患者 252 人を対象に、身体的及び精神的な健康状態を把握するために、質問票による面接調査を行った。対象者の特性は、男性 136 人（54%）、50-59 歳が 84.1%と大半を占め、79.4%が何らかの仕事に従事していた。自分の健康状態については、91%が「大変良い」又は「良い」と回答していたが、7.9%が糖尿病、30.2%高血圧症、39.3%が脂質異常症に罹っていた。日常生活動作のスコアは高く、大半が自立した生活を送っていた。介助が必要と回答した人数は、移動 6 人、家事 5 人、料理 5 人、買い物 5 人、服薬 2 人、家計 1 人であった。また、10.7%がうつ状態が疑われる状況であった。今後は、彼らの健康状態の推移を観察して行きたい。これらの結果は、2015 年 10 月にインドネシア国で行われた第 47 回 Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health の学術大会で発表した。また、昨年度の研究成果を論文として出版できた(Satisfaction of HIV patients with task-shifted primary care service versus routine hospital service in northern Thailand. The Journal of Infection in Developing Countries. 2015; 9(12):1360-1366.)

④ 医学研究科

37. *Helicobacter pylori* 感染経路の解明のための家族分離菌株の遺伝子タイピング

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
神谷 茂	医学部感染症学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
今野 武津子	札幌厚生病院	主任部長	菌株の分離、選定、データ解析
小林 一三	東京大学大学院	教授	菌株の分離、選定、データ解析
矢野 大和	東京大学大学院	特任研究員	ピロリ菌全ゲノムの解読
大崎 敬子	医学部感染症学	准教授	データ解析、動物実験
米澤 英雄	医学部感染症学	講師	データ解析、動物実験

キーワード

Helicobacter pylori、全ゲノム解読、家族内感染

研究分野

細菌学、遺伝学

1. 共同研究の目的

Helicobacter pylori は WHO により胃がんの definite carcinogen group1 として認定されている。しかし、わが国の *H. pylori* 感染源に関する研究は少なく、感染の実態は明らかにされていない。*H. pylori* 感染小児のいる家族で、家族全員の感染調査を行って得た菌株の、遺伝子タイプを決定する。また、全ゲノム解読を実施して、家族内感染状況の実態を明らかにする。ゲノムの解読により、家族内の *H. pylori* 菌株間でみられる遺伝子の伝達等の現象について詳細な解析を実施する。

2. 共同研究の内容・計画

本研究課題は、杏林大学医学部倫理委員会（No.537）および札幌厚生病院倫理委員会（No.215）の承認をうけて実施している。家族内からの菌株は MLST 解析および全ゲノム解析を終えて、今年度はメチローム解析を実施する予定である。さらに、杏林大学においてはそれらの菌株を使った動物実験を計画している。結果は、杏林大学と、東京大学においてデータ解析を実施し、札幌厚生病院を加えた 3 施設共同での研究発表を予定している。

3. 研究成果（経過）

わが国の *H. pylori* 感染源に関する研究は少なく、感染の実態は明らかにされていない。本研究は、*H. pylori* の感染ルートを明らかにする目的で、*H. pylori* 感染小児のいる家族で、家族全員の感染調査を行って得た菌株を使ってそれぞれの遺伝子タイプを決定した。遺伝子タイプの結果から、家族内感染においては母子感染が最も頻度が高いことが示され、父子間の感染や同胞間の感染も示された。また、同じ菌株から全ゲノム解読を実施して、家族内感染状況の実態を明らかにし、これらの研究成果を論文発表した（Osaki T., et. al., *J Med Microbiol*, 64 : 67-73. 2015; Furuta Y et. al., *PLoS ONE*, 10(5): e0127197.2015）。

現在、菌株の動物感染性の比較などの実験を実施しているが、今後は共同研究としてでなく、感染症学教室の研究テーマとして実施されることとなった。

38. 上皮細胞における尿酸の paracellular 輸送

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
櫻井 裕之	医学部薬理学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
市田 公美	東京薬科大学	教授	研究取りまとめ
中村 真希子	東京薬科大学	助教	安定発現細胞の作製、輸送実験
塚田 愛	東京薬科大学	研究生	qPCR、プロテオミクス
木村 徹	医学部薬理学	学内講師	安定発現細胞の作製、輸送実験

キーワード

尿酸輸送、上皮細胞、paracellular 輸送

研究分野

薬理学

1. 共同研究の目的

上皮細胞における有機イオンや電解質の輸送ルートは大きく2つに分類される。1つは、細胞を横切って輸送される transcellular ルートであり、トランスポーターやチャネルを介する輸送である。もう1つが細胞と細胞の間を通る paracellular ルートである。種々の上皮由来細胞を用いた結果、いくつかの細胞で paracellular ルートによる尿酸輸送が見られた。本研究では、上皮細胞における尿酸の paracellular 輸送形式およびそれに関与する分子について検討を行う。

2. 共同研究の内容・計画

東京薬科大学薬学部病態生理学教室において、尿酸の paracellular 輸送を行う候補分子（claudin 等）の発現解析を qPCR、プロテオミクスにて行う。また、それらによって絞られた候補分子の安定発現細胞の樹立を行う。杏林大学においては、作製された安定細胞を用いて尿酸の paracellular 輸送実験を行う。

3. 研究成果（経過）

上皮細胞における有機イオンや電解質の輸送ルートは大きく2つに分類される。1つは、細胞を横切って輸送される transcellular ルートであり、トランスポーターやチャネルを介する輸送である。もう1つが細胞と細胞の間を通る paracellular ルートである。本研究では、上皮細胞における尿酸の paracellular 輸送形式およびそれに関与する分子について明らかにすることを目的とする。paracellular 輸送は、タイトジャンクションを形成する claudin の種類によって調節されていることが知られている。腎臓由来の MDCK, LLC-PK1 細胞では尿酸をほとんど通過させなかったが、胎盤由来の BeWo 細胞では 4℃でも尿酸の上下間での輸送が観察され、paracellular 経路での輸送が示唆された。腸管由来の Caco-2 細胞には、尿酸を通過させるクローンとそうでないクローンがあった。尿酸の paracellular 輸送が見られた BeWo 細胞、Caco-2 細胞には claudin 1, 3, 4, 6, 7, 12 の発現が確認できたが、これらの claudin を尿酸の paracellular 輸送が見られない MDCK 細胞に過剰発現させても、尿酸の輸送に変化は見られなかった。現在、claudin 以外の分子の関与に関して検討を行っている。

39. 腸管神経系異常腸炎発症モデルマウスにおける腸内細菌叢の役割解析

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
神谷 茂	医学部感染症学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
幡野 雅彦	千葉大学バイオメディカル研究センター	教授	Ncx KO マウス系統維持と解析
藤村 理紗	千葉大学バイオメディカル研究センター	助教	Ncx KO マウス腸管細菌等試料の調整と提供
大崎 敬子	医学部感染症学	准教授	腸内細菌叢の解析

キーワード

腸管神経、一酸化窒素、粘膜傷害、腸内細菌叢、DSS 腸炎

研究分野

生理学、細胞生物学、細菌学

1. 共同研究の目的

共同研究者らにより作製された Ncx KO マウスは腸管神経細胞の増加と機能異常を認める (Hatano et al. J Clin Invest, 1997)。今回共同研究者は Ncx KO マウスに腸管炎症が自然発症すること、DSS 投与による実験的腸炎に対する感受性が高いこと、腸管神経細胞由来の一酸化窒素が腸管において増加していることを新たに見出した。本研究では Ncx KO の腸内細菌叢を細菌学的・分子生物学的に解析することにより腸管神経・一酸化窒素増加による腸内細菌叢への影響と腸炎発症機序への関与について明らかにすることを目的とする。

2. 共同研究の内容・計画

Ncx KO マウスおよび野生型マウス、さらにはそれらのマウスに nNOS 阻害剤を投与し、腸内細菌叢について量的・質的な差が認められるかを検討する。これまでに実施した腸内細菌叢解析、細菌属特異的な 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした定量的リアルタイム PCR からは、数種類の細菌の小腸内菌数の差を認めている。そこで、腸内フローラの構成の変化を網羅的に解析するために、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を杏林大学にて実施する。炎症の程度に関連する菌種が同定されることが予想される。

3. 研究成果（経過）

共同研究者らにより作製された Ncx KO マウスは腸管神経細胞の増加と機能異常を認める (Hatano et al. J Clin Invest, 1997)。今回共同研究者は Ncx KO マウスに腸管炎症が自然発症すること、DSS 投与による実験的腸炎に対する感受性が高いこと、腸管神経細胞由来の一酸化窒素が腸管において増加していることを新たに見出した。本研究は Ncx KO の腸内細菌叢を細菌学的・分子生物学的に解析することにより腸管神経・一酸化窒素増加による腸内細菌叢への影響と腸炎発症機序への関与について明らかにすることを目的として実施された。Ncx KO マウスおよび野生型マウス、さらにはそれらのマウスに nNOS 阻害剤を投与し、腸内細菌叢を解析して比較したところ、Ncx KO マウスに Firmicutes 門と Tenericutes 門細菌の比率が上昇することが明らかとなった。さらに細菌科レベルの比較では、Peptococcaceae, Peptostreptococcaceae のグラム陽性球菌の有意な増加と、Enterobacteriaceae の検出率の増加が認められた。

本研究成果は、第 19 回腸内細菌学会(平成 27 年 6 月 18 日、19 日)において発表され、現在論文発表に向けて準備中である。

40. 百日咳菌Ⅲ型分泌機構の臨床分離株における発現

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
神谷 茂	医学部感染症学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
蒲地 一成	国立感染症研究所	室長	臨床分離株の提供および細菌学的性状の解析
大塚 奈緒	国立感染症研究所	主任研究官	臨床分離株の提供および遺伝学的性状の解析
花輪 智子	医学部感染症学	講師	Ⅲ型分泌装置の発現解析

キーワード

百日咳菌、Ⅲ型分泌機構、遺伝子発現、臨床分離株、病原性関連因子

研究分野

細菌学

1. 共同研究の目的

細菌のⅢ型分泌機構（TTSS）はニードル状の分泌装置によりエフェクターとよばれる蛋白質を宿主細胞に直接打ち込むものである。注入されたエフェクターは細菌の感染に有利となるよう宿主の生理機能を修飾するが、その作用は多様であり解明されていないものも多い。百日咳菌 TTSS は病原性に関連しており、その発現量は新鮮分離株では高い。しかし継代回数の増加と共に減少するため実験室株では極めて低い。TTSS 発現を制御する因子について詳細が明らかにされていないことから本研究では臨床分離株を用いてその制御機構を解析する。

2. 共同研究の内容・計画

【研究内容】百日咳菌は炭素源として主にグルタミン酸をエネルギー産生に利用している。これまでグルタミン酸濃度を低下させることによりⅢ型分泌機構の発現が上昇することを見いだした。この応答が菌株特異的であるかについて複数の臨床分離株を用いて検討する。

【計画】百日咳菌臨床分離株 5 株を通常の培地またはグルタミン酸の濃度を 20%に低下させた培地で培養を行い、菌体の除去および濃縮により培地中のタンパク質を回収する。それらを SDS-PAGE で展開し、特異抗体を用いて TTSS 発現量を比較する。さらに鉄欠乏またはアミノ酸欠乏等グルタミン酸以外の栄養枯渇による TTSS 産生量への影響について調べる。

3. 研究成果（経過）

Ⅲ型分泌装置は宿主標的細胞にエフェクタータンパク質を直接打ち込む分泌系でありグラム陰性菌に広く保存されている。これまで本研究では、ワクチン株と比較して臨床分離株型の分泌装置の発現が高く、さらにグルタミン酸枯渇によりその産生が顕著に亢進することを明らかにした。平成 27 年度には百日咳菌におけるⅢ型分泌装置の役割を明らかにするため、その欠損変異株の作成および性状解析を行った。その結果、Ⅲ型分泌装置がバイオフィーム形成に重要な働きを示すことを明らかにした。さらに臨床分離株のバイオフィーム形成能をワクチン株と比較したところ、有意にバイオフィーム形成能が高いものの、Ⅲ型分泌装置発現量の高い株が厚いバイオフィームを形成する傾向はみられず、Ⅲ型分泌装置が直接バイオフィーム構成成分である可能性は低いものと推察された。

Ⅲ型分泌装置遺伝子群に含まれる *bspR* の遺伝子産物は分泌タンパク質であると共にⅢ型分泌装置遺伝子の転写因子としての機能をもつ。近年、*BspR* の欠損株が複数の百日咳菌病原因子の発現に影響を与えることが報告されたことからⅢ型分泌装置がバ

イオフィルム形成に関与する因子の発現にも影響を与えている可能性が考えられる。今後さらに検討を進める予定である。

41. マラリア防御免疫におけるミトコンドリア活性酸素関連性

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
小林 富美恵	医学部感染症学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
林 純一	筑波大学	名誉教授	データ解析
中田 和人	筑波大学	教授	マウス病態解析
井上 信一	医学部感染症学	助教	感染実験、免疫細胞の機能解析

キーワード

マラリア、ミトコンドリア、活性酸素、防御免疫

研究分野

寄生虫免疫学、分子細胞生物学

1. 共同研究の目的

生体が免疫機能を発揮する際に、免疫細胞内のミトコンドリアが産生する活性酸素種（ROS）がどのようにして関与しているのかを解明する。特に、マラリア原虫感染における宿主の免疫応答に注目する。①ミトコンドリア由来の ROS 産生がマラリア原虫感染に与える影響（過剰免疫病態）②ミトコンドリア由来の ROS 産生がマラリア感染防御免疫の獲得に与える影響（防御免疫）等がみられるのかを検討する。

2. 共同研究の内容・計画

筑波大学の林・中田教授より、ミトコンドリア活性酸素が過剰産生しているミトコンドリア DNA 変異マウス（A11 マウス）を譲り受ける。①ミトコンドリア由来の ROS 産生がマラリア原虫感染に与える影響をしらべるため、A11 マウスと野生型マウスに強毒株マラリア原虫を感染させて、過剰免疫による病態を比較する。次に、②ミトコンドリア由来の ROS 産生がマラリア感染防御免疫の獲得に与える影響を調べるため、A11 マウスと野生型マウスに非致死性マラリア原虫を感染させて末梢血中の感染赤血球の割合を経時的に測定し、比較する。上記の検討によって変化が見られた場合、順次、各種免疫細胞の機能解析（抗体産生・サイトカイン産生）をおこなう。

3. 研究成果（経過）

生体が免疫機能を発揮する際に、免疫細胞内のミトコンドリアが産生する活性酸素種(ROS)がどのようにして関与しているのかを解明することを研究目的とする。特に、マラリア原虫感染における宿主の免疫応答に注目する。

本研究を進めるにあたり、筑波大学の林教授と中田教授より、ミトコンドリア活性酸素が過剰産生しているミトコンドリア DNA 変異マウス(A11 マウス)が分与された。ミトコンドリア由来 ROS 産生がマラリア原虫感染に与える影響を調べるため、脳マラリアを起こす強毒株マラリア原虫を A11 マウスと野生型マウスに感染させて、免疫病態を比較した。強毒株マラリア原虫感染によって、野生型マウスと A11 マウスは共に全個体が死亡したが、A11 マウスで延命がみられた。また、A11 マウスでは、野生型マウスに比べて脳組織に浸潤する IFN- γ 産生細胞数とグランザイム B 産生細胞数が低下していることが明らかとなった。さらに A11 マウスでは、弱毒株マラリア原虫感染による patent period が短縮され、原虫抗原特異的抗体の産生能が上昇していることが確認された。今後は、ミトコンドリア由来 ROS 産生と抗体産生機構との関連性について調べる予定である。

42. 妊娠中のマラリアの病態重症化機構の解明

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
小林 富美恵	医学部感染症学	教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
新倉 保	医学部感染症学	助教	妊娠中のマウスマラリアモデルの病態解析
井上 信一	医学部感染症学	助教	妊娠中のマウスマラリアモデルの病態解析
朝日 博子	医学部感染症学	非常勤講師	妊娠中のマウスマラリアモデルの病態解析
峯尾 松一郎	東京医科大学	実験助手	組織標本作成

キーワード

マラリア、妊娠、重症化、胎盤

研究分野

寄生虫感染症

1. 共同研究の目的

我々が独自に確立した妊娠中のマウスマラリアモデルを用いて、原虫血症増悪直前の宿主体内におけるマラリア原虫の局在を解析することで、妊娠中のマラリアの病態重症化機序を明らかにする。

2. 共同研究の内容・計画

妊娠中のマラリアにおいて、マラリア原虫はまず胎盤で増殖すると推測される。そこで、宿主体内での原虫の局在を容易に捉えられるように、ルシフェラーゼ遺伝子 (*luc2*) をマラリア原虫に導入し、感染赤血球が胎盤組織に蓄積するかどうかを明らかにする。

妊娠中のマラリアにおける胎盤組織の傷害は、胎盤に蓄積した感染赤血球によって宿主の炎症反応が活性化されることで引き起こされると推測される。そこで、細胞傷害に関わると考えられている一酸化窒素 (NO) 合成不全マウス、炎症性サイトカイン IFN- γ に対する受容体 (IFN- γ R1) を欠損したマウス、抗原提示細胞上に発現し CD4⁺T 細胞の活性化に関わる MHC class II を欠損したマウス等を用いて、マラリア原虫感染赤血球の胎盤への蓄積を伴う胎盤組織傷害機構を明らかにする。

3. 研究成果(経過)

妊娠中のマラリアで頻発する流産や死産、胎児の発育不全は、マラリア原虫感染赤血球の胎盤組織への集積によって引き起こされる胎盤の組織傷害に起因すると考えられる。胎盤組織の傷害は、胎盤に蓄積した感染赤血球によって宿主の炎症反応が活性化されることで引き起こされると推測されているが、その傷害機構は明らかにされていない。そこで本研究では、妊娠中のマラリアのマウスモデルを用いて、炎症性サイトカイン IFN- γ と胎盤機能障害との関係を明らかにすることを目的とした。

マラリア原虫を感染させた妊娠マウスでは、非妊娠マウスと比較して赤血球感染率が増加し、流産や死産が高率に認められた。組織切片を作製し胎盤組織を観察したところ、絨毛部にマラリア原虫感染赤血球の集積と組織傷害が認められた。次に、胎盤絨毛組織の傷害と IFN- γ との関係を明らかにするために、IFN- γ 受容体 (IFN- γ R1) 欠損マウスを用いて妊娠中のマラリアの病態を解析したところ、赤血球感染率は野生型の妊娠マウスと同様に増加したが、胎児死亡率は野生型マウスと比較して有意に低下した。胎盤組織を観察したところ、マラリア原虫を感染させた IFN- γ R1 欠損マウスの胎盤では、野生型の妊娠マウスと同様、絨毛

部にマラリア原虫感染赤血球が認められたが、絨毛組織の著しい傷害は認められなかった。これらの結果から、妊娠中のマラリアにおける胎盤機能障害には炎症性サイトカイン $\text{IFN-}\gamma$ が関わることが示された。

43. 三日熱マラリアの重症化機構の解明

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
小林 富美恵	医学部感染症学	准教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
朝日 博子	医学部感染症学	非常勤講師	マラリア原虫培養条件の確立
新倉 保	医学部感染症学	助教	マラリア原虫培養条件の確立
井上 信一	医学部感染症学	助教	マラリア原虫培養条件の確立
滝澤 始	医学部内科学 I	教授	実験材料の確保
皿谷 健	医学部内科学 I	学内講師	実験材料の確保
松田 剛明	医学部救急医学	教授	実験材料の確保
河合 伸	医学部総合医療学	教授	実験材料の確保
渡邊 卓	医学部臨床検査医学	教授	実験材料の確保
本郷 偉元	武蔵野赤十字病院	副部長	実験材料の確保
今村 顕史	がん・感染症センター都立駒込病院	部長	実験材料の確保
鯉渕 智彦	東京大学医科学研究所附属病院	診療科長	実験材料の確保
城戸 康年	東京大学医科学研究所附属病院	研修医	実験材料の確保

キーワード

三日熱マラリア、重症化、マラリア罹患者、継代培養

研究分野

寄生虫感染症

1. 共同研究の目的

三日熱マラリアの重症化機構を解明するための第一段階として、国内で発症したマラリア罹患者の血液から得た原虫を用い、三日熱マラリア原虫の継代培養法の確立を目指す。

2. 共同研究の内容・計画

近年になってインドやブラジルを中心に重症三日熱マラリアの症例報告が増加している。この三日熱マラリアの重症化機構は明らかにされていない。熱帯熱マラリア原虫は、継代培養法が確立されていることから、*in vitro* 実験系による病原性の解析等が可能である。実際に、本学感染症学講座寄生虫学部門においても、*in vitro* 実験系により、熱帯熱マラリア原虫の分化・増殖の分子機構を解析している。一方、三日熱マラリア原虫の培養系は未だに確立されていないため、三日熱マラリア原虫の病原性の解析は困難を極めている。そこで本研究では、三日熱マラリアの重症化機構を解明するための第一段階として、本学付属病院及び近隣の医療機関に来院したマラリア罹患者の血液から得た原虫を用いて、三日熱マラリア原虫の継代培養法の確立を目指す。

3. 研究成果（経過）

本研究では、三日熱マラリアの重症化機構を解明するための第一段階として、本学付属病院及び近隣の医療機関に来院したマラリア罹患者の血液から得た原虫を用いて、三日熱マラリア原虫の継代培養法を確立することを目的とした。本年度は、三日熱マラリア罹患者の血液が得られなかったため、熱帯熱マラリア原虫を用いて継代培養の培養条件を検討した。その結果、無血清培地を用いて、長期的に安定して熱帯熱マラリア原虫を培養できる条件を確立した。また、熱帯熱マラリア原虫の生殖母体を安定して誘導することができた。

44. 企業健診における CCD 特異的 IgE 抗体測定の有用性に関する検討

研究代表者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
横井 秀格	医学部耳鼻咽喉科学	准教授	統括

共同研究者

氏 名	所 属	職 名	研 究 分 野
松本 祐磨	医学部耳鼻咽喉科学	助教	データ解析
櫻井 裕之	医学部薬理学	教授	データ解析アドバイス
齋藤 康一郎	医学部耳鼻咽喉科学	教授	データ解析アドバイス
大沢 琢雄	シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社	—	特異的 IgE 抗体の測定とデータ解析

キーワード

花粉症、特異的 IgE 抗体、Cross-reactive Carbohydrate Determinant (CCD)、企業健診

研究分野

アレルギー

1. 共同研究の目的

花粉症患者ならびに果物植物性の食物アレルギー患者において、特異的 IgE 抗体価と臨床症状が一致しない、いわゆる False Positive が見受けられる。その原因の一つに花粉や野菜に共通する糖鎖 Cross-reactive Carbohydrate Determinant (CCD) に対する IgE 抗体の影響が従来から指摘されているが、わが国での臨床の現場における応用例は少ない。そのため、CCD に対する特異的 IgE 抗体の検出頻度と花粉アレルギー特異的 IgE 抗体検査へ及ぼす影響、および回避方法について検討する。

2. 共同研究の内容・計画

〈研究の実施期間〉2015 年 12 月 1 日から 2017 年 3 月 31 日

〈研究の対象〉調査研究対象：シダックス株式会社にて上記期間中に健診を受けた患者を対象にする。いずれも本学の倫理委員会の承認を得た上で、本試験の内容と趣旨について十分な説明を受け、理解かつ同意の得られた患者のみを対象とする。

〈研究の方法〉シダックス株式会社の 2015 年度健康診断対象者の内、本研究の参加に同意した受診者を対象として、スギ、ヒノキ、カモガヤ、ブタクサ、ハウスダスト、小麦、大豆、MUXF、Bromelain、HRPO、Ascorbate oxidase に対する特異的 IgE 抗体をシメンス HCD (株) にて測定し、各抗体の保有率およびアンケートによる症状の有無と CCD 抗体の保有率を検討する。

〈予想される結果〉過去の検討において、花粉アレルギーによって CCD に対する特異的 IgE 抗体の検出頻度に差異があること、また、小麦や大豆特異的 IgE 抗体陽性者においては、CCD が関与していることが示唆された。本研究を通して、花粉および穀物アレルギー特異的 IgE 抗体検査への CCD 関与が明らかになれば、アレルギー患者に対する診断精度の向上が期待されるだけでなく、患者に対する治療方針の決定や服薬ならびに生活指導において非常に有意義であると考えられる。

3. 研究成果(経過)

受診者：347 名(男 252 名、女 95 名、年齢分布 17 歳～68 歳)なお、内 173 名は 2012 年にも受診していた。

測定項目：以下の特異的 IgE 抗体 スギ、ヒノキ、カモガヤ、ブタクサ、ハウスダスト、小麦、大豆、MUXF、Bromelain、HRPO、ASOD

結果：花粉症あり群(医師の診断あり)66 名における各抗体の陽性率は、スギ 96%、ヒノキ 83%、カモガヤ 30%、ブタクサ 3%、

ハウスダスト 48%、小麦 0%、大豆 3%、MUXF:3%、Bromelain:3%、HRPO:9%、ASOD:0%であった。花粉症なし群 127 名における各抗体の陽性率は、スギ 49%、ヒノキ 29%、カモガヤ 12%、ブタクサ 2%、ハウスダスト 43%、小麦 2%、大豆 2%、MUXF:3%、Bromelain:3%、HRPO:3%、ASOD:5%であった。特異的 IgE 抗体価と花粉症症状には相関があり花粉症診断の補助的指標として有用と考えられたが、CCD 抗体の陽性率には差が見られなかった。

しかし、いずれかの CCD 抗体がクラス 1 以上の集団における小麦、大豆特異的 IgE 抗体陽性率は 7%、18%と高率であり、花粉特異的 IgE 抗体陰性群における CCD 抗体の陽性率は、MUXF:0%、Bromelain:0%、HRPO:0%、ASOD:1%とほぼ検出されなかった。以上のことから、CCD 抗体は花粉特異的 IgE 抗体陽性者において多く産生され、CCD 抗体の濃度が高くなるにしたい、大豆や小麦などの特異的 IgE 抗体を陽性化させることが示唆された。