

第72回 広島大学研究科発表会（医学）

（平成 30 年 1 月 4 日）

1. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells
（オメガ3系多価不飽和脂肪酸は血管内皮細胞における DNA 損傷を軽減する）

坂井 千恵美

医歯薬学専攻・医学講座（心臓血管生理医学）

Fish derived omega-3 fatty acids (n-3PUFAs), particularly eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), likely hinder cardiovascular disease, yet their mechanisms remain unclear. In this study, we investigated the effects of EPA and DHA on DNA damage, which plays a pivotal role in atherosclerosis, in vascular endothelial cells to clarify the cardioprotective mechanisms of n-3PUFAs. The effects of EPA and DHA on H₂O₂-induced DNA damage response in human aortic endothelial cells were examined with immunological techniques. Phosphorylation of the histone H2AX, a marker of DNA damage, and ATM were significantly decreased by EPA and DHA. Next we determined the effects of EPA and DHA on oxidative stress, a cause of DNA damage. CM-H₂DCFDA assay showed that EPA and DHA significantly reduced intracellular reactive oxygen species. The mRNA levels of antioxidant molecules were significantly elevated by EPA and DHA, which was nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)-dependent. EPA and DHA decreased senescence-associated beta-galactosidase activity, a marker of cell senescence, which was also NRF2-dependent. These results suggest that n-3PUFAs attenuate oxidative stress-induced DNA damage and cell senescence in endothelial cells partly via NRF2-dependent antioxidant response. Therefore n-3PUFAs likely help prevent cardiovascular disease in part by their genome protective properties.

2. Incidence and risk factors of colorectal cancer based

on 56 324 health checkups: A 7-year retrospective cohort study

（検診受診者 56324 人における大腸がん新規発生率の推定および大腸がん罹患リスクの疫学的検討：7年間 retrospective cohort study 研究）

藤井 紀子

医歯薬学専攻・医学講座（疫学・疾病制御学）

対策型大腸がん検診受診者 56,324 人（延べ 153,351 人）を対象に、検診情報と精検後臨床診断の情報を連結させた big database を構築し retrospective cohort study による疫学的解析を行った。

FOBT による新規陽転率は、全体では 4,183 /10 万人年、検診受診者 100 人あたり 1 年約 4.2 人に陽転が見いだされることが明らかとなった。男女とも 70 歳以上は 40 歳代と比べ 1.7 ~ 3.2 倍高い FOBT 新規陽転リスクを有することを示した (p<0.0001)。また、大腸がん罹患率は 141.3/10 万人年であり、検診受診者 1000 人換算で 1 年間に約 1.4 人が大腸がん新たに罹患することを示した。男性では、70 歳以上では 50 歳代と比較して 2.1 ~ 3.8 倍高い大腸がんリスクがあり、女性では 60 歳代を境にリスクが上昇する傾向が認められた (p<0.0001)。また、大腸がん罹患リスクは、検診時高血圧が有意に関連していた。精検未受診・未把握から見いだされる大腸癌罹患を補完した大腸がん罹患率を推定することにより、疾病の二次予防としての検診受診と精検受診の重要性を明らかにした。

3. Clinical impact of surveillance colonoscopy using magnification without diminutive polyp removal

（拡大内視鏡を用いたサーベイランス大腸内視鏡検査の臨床的有用性 —微小大腸腺腫の取扱い—）

二宮 悠樹

医歯薬学専攻 医学講座（消化器・代謝内科学）

【背景】 径 5 mm 以下の微小大腸腺腫の取り扱いに関する十分なエビデンスはない。【目的】 拡大内視鏡

による pit pattern 診断を用いたサーベイランス大腸内視鏡検査 (SCS) の臨床的有用性を検討し、特に径 5 mm 以下の大腸腫瘍性病変の取り扱いについて考察する。【対象と方法】拡大内視鏡を用いた大腸内視鏡検査で径 5 mm 以下の大腸腺腫を認め、それらを 5 年以上経過観察した 706 例を対象とした。SCS で新たに内視鏡治療適応病変 (径 6 mm 以上, 陥凹性病変, V 型 pit pattern) が指摘されたのは 68 例であった。既存の微小腺腫から増大した症例は 5 例 (うち Tis 癌 1 例) のみであった。経過観察中に指摘された全ての内視鏡治療適応病変は内視鏡的摘除で根治され以後再発なく経過している。【結語】拡大内視鏡による pit pattern 診断を用いることで、径 5 mm 以下の大腸腺腫を摘除せず (semi-clean colon) に SCS が可能である。

4. Polysaccharides derived from *Ganoderma lucidum* fungus mycelia ameliorate indomethacin-induced small intestinal injury via induction of GM-CSF from macrophages

(靈芝菌糸体培養基熱水抽出物 (MAK) 由来 Polysaccharides はマクロファージから GM-CSF を誘導しマウスインドメサシン小腸炎を改善する)

永井 健太
創生医科学専攻・先進医療開発科学講座
(分子病態制御内科学)

緒言: NSAIDs 起因性小腸粘膜傷害の病態及び予防法は不明であり治療法が確立していない。**目的:** マウスのインドメサシン誘発小腸粘膜傷害における MAK の予防効果及び免疫学的機能の検討を行い、抗炎症機序について検討した。**方法:** マウスの腹腔内マクロファージ (PMs) を *in vitro* で MAK 刺激後、腹腔内移入し粘膜傷害を評価した。また抗 GM-CSF 抗体を前投与し GM-CSF の予防効果を検討した。さらに *in vitro* で MAK 特異的 polysaccharides 分解能をもつ pectinase 処理した MAK 刺激後の PMs を養子移入し、粘膜傷害を評価した。**結果:** MAK 刺激された PMs の養子移入により小腸粘膜傷害は抑制された。この移入モデルにおいて MAK 刺激された PMs 移入による抗炎症効果は、抗 GM-CSF 抗体の前投与により、また MAK の pectinase 処理により減弱した。**結論:** MAK 刺激された PMs 移入はインドメサシン誘発小腸粘膜傷害に対して抗炎症効果を示し GM-CSF の関与が示唆された。MAK に含まれる polysaccharides がその抗炎症効果の成分のひとつである可能性が推測

された。

5. Calneuron 1 Increased Ca^{2+} in the Endoplasmic Reticulum and Aldosterone Production in Aldosterone-Producing Adenoma (カルシウム結合タンパク Calneuron 1 は小胞体 Ca^{2+} 増幅を介しアルドステロン産生腺腫におけるアルドステロン合成を促進する)

小武家 和博
医歯薬学専攻・医学講座 (内分泌糖尿病内科)

【目的】 アルドステロン産生腺腫 (APA) におけるアルドステロン (Aldo) 過剰合成時の鍵分子を同定し、新たな Aldo 合成分子機序を同定する。

【方法】 副腎皮質癌細胞株 (HAC15) に、遺伝子発現調節を行い、Aldo 合成や局在、細胞内シグナルについて検討した。

【結果】 APA と非機能性副腎皮質腺腫 (NFA) の microarray 解析から、Calneuron 1 をコードする CALN1 がアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) と最も関連していた。CALN1 は APA および副腎皮質球状層で高発現し、CYP11B2 と発現部位が一致した。HA15 で、CALN1 強制発現 / 抑制にて Aldo 合成は促進 / 抑制された。CALN1 は小胞体 (ER) に存在し、細胞質および ER 内の Ca^{2+} 濃度を上昇させた。

【結語】 Calneuron 1 は ER に局在し ER 内 Ca^{2+} 貯蔵増加を介して、Aldo 合成促進にはたらく。

6. Activation of Classical Brown Adipocytes in the Adult Human Perirenal Depot Is Highly Correlated with PRDM16-EHMT1 Complex Expression (成人腎周囲領域の古典的褐色脂肪細胞活性は PRDM16-EHMT1 複合体の発現と高度に相関する)

長野 学
医歯薬学専攻・医学講座 (分子内科学)

褐色脂肪細胞は寒冷や肥満に抗して熱産生し、 β アドレナリン刺激によって活性化される。今回我々は褐色脂肪組織活性化モデルである成人褐色細胞腫患者 11 例と、非機能性副腎腫瘍患者 7 例の腎周囲脂肪組織を採取し、その分子的特徴を検討した。褐色細胞腫患者群では古典的褐色脂肪細胞様の特徴をもった褐色脂肪細胞が再誘導されていた。その再誘導レベルはアドレナリン刺激の指標である尿中カテコラミン量とは

相関していなかった。しかい褐色脂肪細胞の重要な転写因子である PRDM16-EHMT1 複合体の発現量と、褐色脂肪特異的の遺伝子群の発現量が有意に相関していた。これらの結果から、ヒト腎周囲の褐色脂肪細胞は齧歯類と同様に古典的褐色脂肪細胞の特徴を持ち、さらに PRDM16-EHMT1 複合体はヒト褐色脂肪細胞の分化・誘導においても重要な役割を果たしていることが示唆された。

7. Alpha-2-macroglobulin as a Promising Biological Marker of Endothelial Function

(血管内皮機能の有望なバイオマーカーとしての $\alpha 2$ マクログロブリン)

下村 怜

医歯薬学専攻・医学講座 (脳神経内科学)

$\alpha 2$ マクログロブリンは、主に肝臓で合成されるプロテアーゼ阻害タンパクの一つであり、凝固線溶系の調節や慢性炎症、脳細小血管障害の重症度に関連している。血管内皮機能障害は脳・心血管リスク因子や慢性炎症、凝固線溶系と関連しており、血管内皮機能障害を基盤として、動脈硬化は発生、進展する。最終的に動脈硬化が破綻すると、脳・心血管病を発症する。脳血管障害の既往もしくは脳・心血管リスク因子を有する患者を対象に血清 $\alpha 2$ マクログロブリン値と flow mediated dilation (FMD) および血管内皮前駆細胞数の関連性を検討した。血清 $\alpha 2$ マクログロブリン高値は FMD で評価した血管内皮機能障害と有意に相関 ($\beta -0.185$, $p=0.033$) した。 $\alpha 2$ マクログロブリンが血管内皮機能障害を反映する血液バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

8. Spatial electromyography distribution pattern of the vastus lateralis muscle during ramp up contractions in Parkinson's disease patients

(パーキンソン病患者の漸増的筋出力発揮中の空間的な筋活動分布パターン)

西川 裕一

医歯薬学専攻・医学講座 (脳神経内科学)

背景：パーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) に対して、多チャンネル表面筋電図法を用いて筋活動中の時間的・空間的な筋活動パターン変化を明らかにすることを本研究の目的とした。

方法：女性 PD 患者 25 名 (年齢 66.8 ± 6.8 歳) と健常高齢女性 25 名 (67.3 ± 5.8 歳) を対象とした。全ての対象者は、等尺性膝関節伸展運動において最大随意筋力の発揮および漸増的筋出力発揮課題を行った。課題中、外側広筋から多チャンネル表面筋電図信号を記録した。PD 患者ではより症状が強い側の外側広筋を測定した。筋活動パターンの評価には、modified entropy, coefficient of variation (CoV), correlation coefficient を用いた。

結果：PD 患者は、健常者と比較して modified entropy, CoV, correlation coefficient の変化が低値を示し、筋活動パターンの変化が乏しいことが示唆された。

結論：PD 患者は、健常者と比較して筋出力時の運動単位の動員に制限が生じていることが示唆され、同疾患における運動症状の一因と考えられた。

9. Hepatectomy leads to loss of TRAIL-expressing liver NK cells via downregulation of the CXCL9-CXCR3 axis in mice

(肝切除後は CXCL9-CXCR3 経路を介して肝臓内の TRAIL 陽性 NK 細胞が消失する)

矢野 琢也

医歯薬学専攻・医学講座 (消化器・移植外科学)

マウス肝切除後に抗腫瘍活性を持つ TRAIL 陽性 NK 細胞がケモカインを介して肝臓内から消失するメカニズムの解析を行った。

肝臓内 TRAIL 陽性 NK 細胞のケモカインレセプター網羅解析では、CXCR3 が強発現していた。CXCL9 (CXCR3 のリガンド) と IFN- γ の発現は、肝切除後に有意に低下した。遊走試験で、肝臓内 TRAIL 陽性 NK 細胞は CXCL9 への遊走能を認めた。肝臓内免疫細胞のうち、マクロファージのみが IFN- γ 依存性に CXCL9 を産生した。肝切除後に poly I:C を投与し肝臓内の CXCL9 を増加させた。CXCR3 ノックアウトマウスと比較し、野生型マウスは TRAIL 陽性 NK 細胞が肝臓内に維持された。

つまり、肝切除後に肝臓内 IFN- γ が低下してマクロファージからの CXCL9 産生が低下する。その結果 CXCR3 発現 TRAIL 陽性 NK 細胞が肝臓内から消失すると考えられた。

10. Multicentric Glioma Develops via aMutant IDH1-Independent Pathway: Immunohistochemical

Study of Multicentric Glioma.

(多中心性グリオーマの発生機序は IDH-1 と無関係である：多中心性グリオーマの免疫組織学的検討)

VEGA KARLOWEE

医菌薬学専攻・医学講座 (脳神経外科学)

Mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH) plays an important role in the glioma pathogenesis and classification. We studied molecular profile of multicentric gliomas and compared with that of solitary gliomas.

Our study included 6 male and 8 female patients (8 glioblastomas, 2 anaplastic astrocytomas, 4 diffuse astrocytomas), with the ages ranging from 27 to 75 years, who were treated between 2004 and 2016. Immunohistochemical analysis consisted of mutant IDH1, ATRX, p53, EGFR, and PTEN. FISH was used to detect 1p/19q codeletion.

The results showed that all patients were negative for mutant IDH1 in immunohistochemical detection. Of the 14 patients, four (28.6%) were ATRX-negative, five (35.7%) were p53-positive, 9 (64.3%) were EGFR-positive, and all 14 were PTEN-cytoplasmic negative. MIB-1 labeling index ranged from 0.9-15.6% for grade II and III and 17.3-52.4% for grade IV glioblastoma. There were no 1p/19q codeletions in all the 11 examined samples.

Our data indicated that the multicentric gliomas develop via molecular pathways that not require IDH mutation regardless of their histological grades, different from common solitary low grade gliomas. Further studies are necessary to understand the mechanism.

11. Nonenhancing peritumoral hyperintense lesion on diffusion-weighted imaging in glioblastoma: a novel diagnostic and specific prognostic indicator.

(膠芽腫周辺の造影効果を伴わない拡散強調画像高信号域：診断と特異的予後因子としての所見)

MANISH KOLAKSHYAPATI

医菌薬学専攻・医学講座 (脳神経外科学)

Background

The purpose of this study is to evaluate the

diagnostic-value of high-b-value-DWI for differentiation of glioblastoma and identify a feature that is efficient for its preoperative differentiation.

Materials and Methods

Preoperative-MRIs including DWI ($b=1000$ and $4000s/mm^2$) in newly-diagnosed malignant tumor were analyzed. Histologically confirmed 64 patients of glioblastoma. 32 malignant-lymphoma and 46 brain-metastases were included. Presence of non-enhancing-peritumoral DWI-hyper-intense lesion (NePDHL) was confirmed in both DWI-sequences. Lesions weretermed "Definite" (Definite-NePDHL) if present within 3cm of the enhanced tumor as hyper-intensity with signal-intensity-ratio (SIR) of $>30\%$ compared to contralateral-normal-white-matter in both sequences. Discriminant analysis between histological diagnosis and presences of Definite-NePDHL and Kaplan-Meier survival-analysis incorporating existence of Definite-NePDHL was performed.

Results

DWI-SIR of $>30\%$ in both sequences enabled differentiation between definite and probable DWI-hyper-intense lesions. In 25% of glioblastoma patients, Definite-NePDHL wae present while it was conspicuously absent in malignant-lymphoma and metastatic-brain-tumors. Specificity and positive predictive values were 100%. Cases with Definite-NePDHL had significantly early local ($p=0.0467$) and distant/dissemination recurrence ($p<0.0001$) and carried poor prognosis ($p=0.0007$).

Conclusion

Presence of Definite-NePDHL is very specific for glioblastoma and indicates poor prognosis. Definite-NePDHL is a significant indicator for early local and distant/dissemination recurrence. Study of peritumoral high-b-value-DWI is beneficial for tumor differentiation.

12. Evaluation of autologous skeletal muscle-derived factors for regenerative medicine applications

(自己骨格筋由来因子を利用する再生利用のための新規アプローチの検討)

好川 真弘

医歯薬学専攻・医学講座（整形外科学）

【目的】自己組織から成長因子等を特別な操作なくその場で利用する、point-of-care の概念に基づく組織修復・再生促進療法が望まれる。本研究は採取容易な骨格筋に着目し、そこから得られる因子を検討した。【方法】膝前十字靭帯（ACL）再建時に廃棄される半腱様筋を使用した。骨格筋 500mg を生理食塩水 1 ml に入れ、破碎・遠心後の上清を ELISA, フローサイトメトリー（FACS）で解析した。生物活性は骨髄間葉系幹細胞（MSC）を用いて細胞増殖、骨分化能に及ぼす影響を調べた。【結果】ELISA で bFGF, IGF-1 が、FACS で CD34, CD44 陽性細胞の存在が明らかになった。MSC の増殖能は有意に亢進し、骨分化も促進されることが明らかになった。【考察】骨格筋抽出液は成長因子、前駆・幹細胞画分を含み、細胞増殖亢進、骨分化促進が確認できた。今後、組織修復・再生療法の一つの選択肢となりうる。

13. Impedance-based living cell analysis for clinical diagnosis of Type I Allergy

（インピーダンスセンサを利用した I 型アレルギー診断法の開発）

入福令子

医歯薬学専攻・医学講座（皮膚科学）

従来の I 型アレルギー診断法には、特異的 IgE 検査、皮膚テスト、負荷試験があるが、それぞれ、低感度、ショックの危険性がある。本研究では、物理センサであるインピーダンス（IMP）センサを利用して、細胞の形態変化・付着面積等に由来する、センサ上のインピーダンス変化を無標識、経時的に検出できる新規 I 型アレルギー診断法を確立した。センサ上に RBL-2H3 細胞を播種し、翌日、刺激・阻害薬を加え、その後のインピーダンス変化を確認し、刺激濃度依存性のインピーダンス変化や、阻害薬による形態変化抑制等を示すことを確認した。次に、RBL-48 細胞と患者血清を用いて、高感度なアレルギー診断に応用できることを確認した。IMP センサは複数の刺激に対する細胞応答を同時に検出するための高集積化が容易な為、今回開発した新規アレルギー診断法は、従来法よりも高信頼性でハイスループットなアレルギー診断となる可能性がある。

14. Chronic Kidney Disease Is Associated with

Vascular Smooth Muscle Dysfunction But Not with Endothelial Dysfunction

（慢性腎臓病は血管平滑筋機能障害と関連があるが内皮機能障害とは関連がない）

岩本 由美子

展開科学専攻・病態情報医科学講座（循環器内科学）

Backgrounds: Nitroglycerine-induced vasodilation (NID) is usually assessed as a control test for flow-mediated vasodilation (FMD). However, NID per se is impaired in patients with high cardiovascular risk. The purpose of this study was to investigate the associations of chronic kidney disease (CKD) with NID and FMD.

Methods: We measured NID and FMD in a total of 1567 adult subjects without end-stage renal disease (ESRD), 28% of whom had CKD as judged by measurements of estimated glomerular filtration rate.

Results: NID was significantly smaller in patients with CKD than in those without CKD. The prevalence of vascular smooth muscle dysfunction was significantly higher in patients with CKD than in those without CKD. Multivariate analysis revealed that CKD was independently associated with vascular smooth muscle dysfunction. FMD was significantly smaller in patients with CKD than in those without CKD. The prevalence of endothelial dysfunction was significantly higher in patients with CKD than in those without CKD. However, CKD was not independently associated with endothelial dysfunction in an age- and sex-adjusted model.

Conclusions: Non-ESRD CKD is independently associated with vascular smooth muscle dysfunction but not with endothelial dysfunction.

15. SUMO modification facilitates the exchange of histone variant H2A.Z-2 at DNA damage sites

（SUMO 化システムは DNA 損傷部位におけるヒストンバリエント H2A.Z-2 の交換反応を促進する）

福戸 敦彦

医歯薬学専攻・放射線医科学講座（細胞修復制御）

ヒストンの翻訳後修飾や交換反応によるクロマチン

再構成は、DNA修復において重要な役割を果たす。我々はヒト細胞ではヒストンバリエントH2A.Z-2がDNA二本鎖切断(DSB)の誘導部位で速やかに交換反応を示すことを報告している。しかし、DNA損傷依存的なH2A.Z-2の交換反応を制御するメカニズムについては不明であった。我々は、H2A.Z-2がDNA損傷依存的にSUMO化修飾されることを見出した。DNA損傷依存的なH2A.Z-2のSUMO化修飾は、SUMO化酵素PIAS4の発現抑制により抑制された。さらに我々は、PIAS4発現抑制によってDNA損傷部位におけるH2A.Z-2の交換反応が抑制されることを見出した。これらの結果から、DNA損傷部位におけるH2A.Z-2の交換反応には、PIAS4によるH2A.Z-2のSUMO化が関与することが強く示唆された。

16. Effect of FGF23 in maintenance hemodialysis patients

(維持透析患者におけるFGF23の影響)

山下 和臣
一陽会 横川クリニック

- ① Addition of novel biomarkers for predicting all-cause and cardiovascular mortality in prevalent hemodialysis patients
(維持透析患者の新規バイオマーカー追加での全死亡死、心血管死予測)
- ② Oral iron supplementation with sodium ferrous citrate reduces the serum intact and c-terminal FGF23 levels of maintenance hemodialysis patients
(クエン酸第一鉄ナトリウムによる経口鉄補充は維持透析患者のiFGF23とcFGF23を低下させる)

The purpose of this study was to whether the addition of 5 biomarkers [serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), intact fibroblast growth factor-23 (iFGF23), β 2-microglobulin (β 2MG), cystatin C, and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP)] could improve the prediction of 2-year all-cause and/or cardiovascular mortality in maintenance hemodialysis (MHD) patients. Furthermore, to whether oral ferrous iron (Fe^{2+}) supplementation with sodium ferrous citrate reduces the serum

FGF23 levels of MHD patients with iron deficiency in the same way as oral ferric iron (Fe^{3+}). The addition of novel biomarkers, i.e., NT-proBNP alone or NT-proBNP, hsCRP, and β 2MG as a panel, to a conventional risk model (age, presence of diabetes, serum albumin) significantly improved the prediction of 2-year all-cause mortality, and the addition of novel biomarkers, i.e., NT-proBNP and hsCRP as a panel, to a conventional risk model (age) significantly improved the prediction of 2-year CV mortality in MHD patients. Neither FGF23 nor cystatin C improved mortality prediction. Short-term oral iron supplementation with sodium ferrous citrate replenished the iron stores and reduced the serum iFGF23 and C-terminal FGF23 levels of MHD patients with iron deficiency without affecting their serum phosphate, albumin-adjusted serum calcium, or intact parathyroid hormone levels.

17. Identification of genes regulating GABAergic interneuron maturation

(GABA作動性介在神経細胞の成熟を制御する遺伝子の同定)

福本 景太
インテグリカルチャー株式会社

GABAergic neuronの神経突起伸長に重要なシグナル分子はあまり知られていない。そこで生後0日齢のGAD67-GFPノックインマウスを用いてFACS-arrayを行うことで、成熟期に重要なシグナル分子を探索した。その結果、GABAergic neuron特異的に発現が上昇した遺伝子群において、機能未知なDgkg, Vstm2a, AW551984を同定した。これら各遺伝子を過剰発現したところ、Dgkgが突起伸長を促進し、ノックダウンにより伸長が抑制された。本結果より、DgkgはGABAergic neuronの神経突起伸長を正に制御することが明らかとなった。

Dgkgはホスファチジン酸(PA)を産生し、突起伸長を促進する事が知られているが、PAを産生しない変異型Dgkgでも突起形成に影響する事が知られている。以上からDgkgによる突起伸長制御には二つのメカニズムの関与が示唆された。