

第65回 広島大学研究科発表会（医学）

（平成 28 年 8 月 4 日）

1. Inhibition of PAI-1 Limits Tumor Angiogenesis Regardless of Angiogenic Stimuli in Malignant Pleural Mesothelioma
 (PAI-1 の阻害は腫瘍に発現する血管新生因子の種類によらず腫瘍血管新生を抑制する：悪性胸膜中皮腫マウスモデルにおける検討)

高山 裕介

展開医科学専攻・病態制御医科学講座（分子内科学）

悪性胸膜中皮腫の進展には多様な血管新生因子が関わっている。Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は線溶系に関わる蛋白であるが、癌の進展や血管新生にも関わることが明らかとなってきている。今回我々は、PAI-1 阻害剤である SK-216 が、血管新生因子の発現形式によらず血管新生を阻害し、悪性中皮腫の進展を抑制するかどうかを検証した。

まず、VEGF と bFGF をそれぞれ高発現する異なる中皮腫細胞株を用いて 2 種類の同所モデルマウスを作製し、SK-216 を経口投与したところ、SK-216 は両マウスモデルにおいて腫瘍進展と血管新生を抑制した。次に SK-216 とシスプラチンを併用したところ、SK-216 はシスプラチンの抗腫瘍活性を増強させ、マウスの生存期間も延長させた。さらに *in vitro* において、SK-216 は複数の血管新生因子によって誘導された血管内皮細胞の遊走と管腔形成を抑制した。以上のことから、SK-216 は広範な抗血管新生作用を有し、SK-216 とシスプラチンの併用投与は悪性中皮腫の有効な治療法となる可能性が示された。

2. Long-term pulmonary complications of chemical weapons exposure in former poison gas factory workers

(旧毒ガス工場労働者における化学兵器曝露の長期肺合併症)

西村 好史

展開医科学専攻・病態制御医科学講座（分子内科学）

【背景】広島県の大久野島にある毒ガス工場ではサルファマスタードやルイサイトといったびらん性化学

兵器が製造されていた。我々のグループはこの毒ガス工場の労働者が呼吸器合併症を高率に発症することを報告してきた。この研究の目的は毒ガス被害者の長期生存者での胸部 CT 所見を明らかにすることである。

【方法】2009 年から 2012 年にかけて胸部 CT を撮影された毒ガス工場旧労働者を対象とした。毒ガス工場就労中に生じた皮膚病変の既往をびらん性化学兵器曝露の指標とした。

【結果】皮膚病変の既往のある者では皮膚病変の既往のない者と比較して肺気腫、蜂巣肺が有意に多く認められた。肺気腫についての多変量ロジスティック回帰では皮膚病変が有意に関連する因子であった。喫煙歴のない対象に限定した結果、皮膚病変のある者では肺気腫が有意に多く認められた。

【結論】びらん性化学兵器への曝露が肺気腫発症に関連する可能性が示唆された。

3. Comparative Study of Circulating MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, and SP-D as Disease Markers of Idiopathic Pulmonary Fibrosis
 (特発性肺線維症の疾患マーカーとしての MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, SP-D の比較検討)

濱井 宏介

展開医科学専攻・病態制御医科学講座（分子内科学）

【背景】特発性肺線維症 (IPF) の血清マーカーとして本邦では KL-6, SP-A, SP-D が広く用いられている。近年 MMP-7, CCL18 が IPF の血清マーカーとして有用であると報告されたが、これらを直接比較した報告はない。

【目的】IPF 患者における上記マーカーの診断能および予後予測能を比較検討すること。

【方法】IPF 患者、細菌性肺炎患者、健常人の血清における上記マーカーを ELISA で測定し、その診断・予後予測能を検証した。

【結果】ROC 解析では MMP-7 と KL-6 が IPF の鑑別に有用であった。多変量解析では MMP-7 と KL-6 が独立した予後予測因子であり、C 統計、Kaplan-Meier 解析の結果から両者の併用により予後予測能が向上する可能性が示された。

【結語】血清 MMP-7 および KL-6 は診断・予後予測マーカーとして有用であり、両者の併用により予後予測能がさらに上昇する可能性がある。

4. Bach1 deficiency reduces severity of osteoarthritis through upregulation of heme oxygenase-1
(Bach1 ノックアウトマウスは加齢性および実験的変形性関節症の症状を軽減する)

高田 剛志
展開医科学専攻・病態制御医科学講座 (整形外科学)

【目的】変形性関節症 (OA) の発症には、酸化ストレスなど様々な因子が関与している。抗酸化酵素の一つであるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) は、細胞保護作用に働く。HO-1 の転写抑制因子である Bach1 の欠損マウスを用いて、OA 発症との関連について解析した。

【方法】加齢マウスおよび OA 誘導マウスを用いて、膝関節の組織学的変化を評価した。これらのマウスの HO-1 や OA 関連遺伝子の発現を解析した。SOD2 やアポトーシスと HO-1 の関連を、軟骨細胞に siRNA を導入し評価した。

【結果】Bach1 欠損マウスは HO-1 が高発現していた。両モデルともに Bach1 欠損マウスにおいて OA を抑制しており、SOD2 の発現が増加していた。HO-1 は、軟骨細胞における SOD2 の発現やアポトーシスを制御していた。

【結論】Bach1 欠損マウスは、軟骨における HO-1 の発現維持を介して OA を抑制することを示した。

5. *In Vivo* Kinetics of Mesenchymal Stem Cells Transplanted into the Knee Joint in a Rat Model Using a Novel Magnetic Method of Localization
(磁気ターゲティング法を用いたラット膝関節内に投与した骨髄間葉系幹細胞の体内動態解析)

生田 祥也
医歯薬学専攻・医学講座 (整形外科学)

【目的】関節軟骨再生のため、間葉系幹細胞 (MSC) の磁気ターゲティングを開発し臨床応用を目指している。生体蛍光イメージングシステムを用い、膝関節内に投与した MSC の体内動態を調査した。

【方法】ヌードラットを 3 群 (正常軟骨群、軟骨欠損群、磁場群、各群 n=6) へ類別し、DiR で蛍光標識

後、フェルカルボトランで磁性化したヒト MSC を膝関節内へ投与した。細胞投与直後と投与後 1, 3, 7, 14, 21, 28 日目に *in vivo* 撮影 (IVIS Spectrum CT) を行い MSC の分布を 3 次元 CT 画像上で評価した。28 日目には主要臓器を摘出し、*ex vivo* 撮影、PCR、免疫染色にて主要臓器でのヒト MSC 含有を調査した。

【結果】膝関節内の蛍光輝度は投与後 3, 7 日目で磁場群が有意に高値であった。全群の主要臓器で *ex vivo* 撮影での蛍光信号、PCR でのヒト遺伝子発現や免疫染色でのヒト由来細胞の存在は認めなかった。

【考察】磁気ターゲティングにより膝関節内へ投与した MSC は他の主要臓器へ移行せず、細胞のほとんどが軟骨欠損部へ集積することが明らかとなり、安全性・有効性への寄与が推測された。

6. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model
(間葉系幹細胞由来のエクソソームはマウス骨折モデルの骨折治癒を促進させる)

古田 太輔
医歯薬学専攻・医学講座 (整形外科学)

骨髄由来の MSC によるパラクリン信号は組織再生に重要な役割を持つ。一方で MSC 移植の際に組織再生に重要分子であるサイトカインに注目が集まっており、我々はその中でもタンパク質、核酸などを含む微小胞体で細胞間コミュニケーションに関わるエクソソームに注目した。我々はエクソソーム分泌不全と報告されている CD9^{-/-} マウスの骨折モデルを作成し、Wild-type マウスより骨折治癒することが分かった。さらに MSC を培養した上清液 Condition medium (CM) のみを採取し、超遠心して沈殿したエクソソーム (Exo) とエクソソームを除去した上清液 (CM-Exo) を採取した。これらをそれぞれ CD9^{-/-} マウスの骨折部位に注入したところ、CM、Exo 投与群は CD9^{-/-} マウスの骨折治癒遅延が改善した。そして WT マウスの骨折治癒は Exo 投与群の骨折治癒が促進された。エクソソーム内のどの因子が骨折治癒遅延に関与しているかは検討中であるが、MSC 由来のエクソソームは骨折治癒に重要な役割を持つことがわかった。

7. Different sensitivity of rituximab-treatment to B-cells between ABO-incompatible kidney and liver transplantation
(ABO 血液型不適合移植における B 細胞のリツキ

シマブ感受性は腎移植症例と肝移植症例では異なる)

森本 博司

創生医科学専攻・先進医療開発科学講座 (外科学)

リツキシマブ (RTX) を用いた脱感作療法は ABO 血液型不適合 (ABO-I) 腎移植症例 (KT) や肝移植症例 (LT) で行われるが, B 細胞除去効果が KT と LT 間で同等であるか否かは証明されていない。また抗原提示細胞である B 細胞が消失することによる T 細胞免疫応答への影響も解明されていない。そこで我々は RTX 投与前後の末梢血中の B 細胞の存在比率の推移を KT と LT の間で比較し, さらに同種異系 T 細胞応答を, RTX を使用する ABO-I 症例と使用しない ABO 血液型適合 (ABO-C) 症例の間で比較検討した。その結果, 末梢血中の B 細胞は KT では全例 RTX 投与後 1 週には消失していたが, LT では残存する症例を散見した。また KT では術後 1 年間は末梢血中に B 細胞は検出しなかったが, LT では術後 6 ヶ月より検出可能となった。同種異系 T 細胞応答は術後 1 年間にわたり ABO-I と ABO-C の間で有意差がないことを明らかにした。

8. Radiopaque biodegradable stent for duct-to-duct biliary reconstruction in pigs

(バリウム含有吸収性胆管ステントを用いた豚胆管-胆管吻合の安全性に関する研究)

谷本 新学

創生医科学専攻・先進医療開発科学講座 (外科学)

生体肝移植の術後合併症の中で胆管狭窄は予後を大きく左右する。術後胆管狭窄の予防のため, 以前生体吸収性胆管ステントの安全性を確認したが, ステントがレントゲン検査で観察できず, ステントの位置や吸収期間が不明であった。今回我々は放射線非透過性吸収性胆管ステントを開発し, その開存性と安全性を検討した。

放射線不透過性の硫酸バリウムを含有した生体吸収性ステントを作製し, プタ 11 頭の総胆管に手術的に留置した。術後 2 か月の CT 検査では, 全例でステントは吻合部に存在し形状は保たれていた。1 頭に経静脈的胆管造影を行い肝内, 肝外胆管は造影され, ステントの開存性が確認された。6 か月後にステントの遺残は認めず, 吻合部の総胆管と肝組織に病理学的に異常所見を認めず, 安全性が確認された。

バリウム含有吸収性胆管ステントの安全性と開存性が確認された。今後胆管狭窄モデルにおいて本ステントが胆管狭窄を予防するか検討が必要である。

9. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer

(膵癌術後患者における circulating tumor DNA 検出の意義)

羽田野 直人

医歯薬学専攻・医学講座 (外科学)

【背景, 目的】膵癌はヒト固形がんの中でも極めて予後不良な難治癌である。本研究は既存のリアルタイム PCR の限界を超える能力を有する Droplet Digital PCR システムを用いて, 膵癌患者の血液中における癌細胞由来の遺伝子変異 (circulating tumor DNA: 以下 ctDNA) の検出を行い, 膵癌治療におけるバイオマーカーとしての有用性を検討した。広島大学病院にて切除した浸潤性膵管癌を対象とし, ctDNA 陽性群と陰性群に分類, 既存の腫瘍マーカーを含む各種臨床病理学的因子と長期予後との関連性を検討した。

【結果】 ctDNA 陽性群の全生存期間中央値は陰性群と比し有意に予後不良であり (13.6M vs 27.7M, $P < 0.0001$), 多変量解析においても ctDNA 陽性は独立した予後不良因子であった。ctDNA の検出は術前評価可能となるバイオマーカーとして有用な指標になる可能性が示唆された。

10. KRAS mutation leads to decreased expression of regulator of calcineurin 2, resulting in tumor proliferation in colorectal cancer

(大腸癌において, KRAS 遺伝子変異は, regulator of calcineurin 2 蛋白質の発現抑制を誘導し, その結果, 腫瘍が増殖する)

新津 宏明

医歯薬学専攻・医学講座 (消化器・移植外科学)

KRAS 遺伝子変異型大腸癌の新規標的分子の探索を目的に, Apc 欠損を背景とした *Kras* 野生型および *Kras* 変異型大腸癌マウスモデルの大腸癌遺伝子発現プロファイルを Oligonucleotide Microarray により網羅的比較解析した。約 34,000 個の転写産物のうち *Kras* 変異型腫瘍で 5 倍以上変化し, 定量的 RT-PCR で検証された候補遺伝子を 4 つ認めた。その一つ

regulator of calcineurin 2 (*RCAN2*) は、ヒト大腸癌組織の免疫組織化学染色法で *KRAS* 変異により有意な発現低下を示し、大腸癌培養細胞株において Calcineurin-NFAT 経路依存性に腫瘍増殖能や形成能を抑制し、がん抑制遺伝子として機能することが示された。*KRAS* 変異は *RCAN2* の発現抑制を介し、Calcineurin 依存性に細胞増殖に寄与する可能性が示唆された。

11. Human Cytotoxic T Lymphocyte-Mediated Acute Liver Failure and Rescue by Immunoglobulin in Human Hepatocyte Transplant TK- NOG Mice (ヒト肝細胞キメラマウスを用いた B 型急性肝炎モデルの構築と CTLA4Ig による肝炎制御)

内田 宅郎

医歯薬学専攻・医学講座 (消化器・代謝内科学)

【目的】ヒト肝移植キメラマウスを用いた肝炎モデルの構築と B 型劇症肝炎に対する新規治療法の探索を行う。

【方法】HBV 感染ヒト肝細胞移植 TK-NOG マウスに B 型急性肝炎治療後の患者から分離した PBMC を腹腔内移植した。移植後は血中ウイルス量・ヒトアルブミン値の測定を行い、移植 2 週間後には擬死し、組織学的および肝灌流液中のリンパ球の表現型解析を行った。また、本モデルマウスに CTLA4Ig を投与し、肝障害抑制効果を評価した。

【結果】ヒト PBMC を移植 2 週間後には肝炎が惹起され、HBV 感染 PBMC 投与マウスの肝灌流液中には HBV 特異的 CTL を検出した。本モデルマウスに CTLA4Ig を投与すると PBMC 投与による肝炎が抑制された。

【結論】ヒト肝細胞キメラマウスを用いて HBV 特異的 CTL による HBV 感染肝細胞障害を起こす急性肝炎モデルを構築した。CTLA4Ig は HBV 特異的 CTL による肝障害を抑制した。

12. The therapeutic effect of CD133⁺ cells derived from human umbilical cord blood on neonatal mouse hypoxic-ischemic encephalopathy model (新生児低酸素性虚血性脳症モデルマウスに対するヒト臍帯血由来 CD133 陽性細胞投与の治療効果)

木谷 由希絵

医歯薬学専攻・医学講座 (産科婦人科学)

低酸素性虚血性脳症 (HIE) は脳性麻痺の一因である。確立された治療法はなく、さらなる治療法の開発が求められている。再生医療分野で幹細胞を用いた治療法の開発がなされており、その中で血管内皮前駆細胞を含む CD133⁺ 細胞は血管再生分野での研究がなされている。そこでヒト臍帯血より CD133⁺ 細胞を採取し、HIE モデルマウスに投与して効果を検討した。7 生日の免疫不全マウスを低酸素性虚血性障害に曝露しモデルとした。偽手術のみの対照群、障害曝露 24 時間後に生理食塩水を投与した低酸素虚血群、障害曝露 24 時間後に CD133⁺ 細胞を投与した群 (CD133⁺ 群) で運動機能と大脳の病理組織学的評価を行った。運動機能および大脳障害は CD133⁺ 群で有意に改善していた。病理組織学的には CD133⁺ 細胞による脳保護効果が関連する可能性が考えられた。CD133⁺ 細胞の投与は HIE の治療法となりうる可能性が示唆された。

13. Macular Choroidal Thickness and Volume in Healthy Pediatric Individuals Measured by Swept-Source Optical Coherence Tomography (スウェプトソース網膜断層撮影による健常小児の脈絡膜厚・体積の測定)

長澤 利彦

医歯薬学専攻・医学講座 (視覚病態学)

【目的】脈絡膜構造の健常小児の報告は少ない。我々は健常小児と成人の脈絡膜厚および体積を比較検討した。

【対象と方法】健常小児 100 眼、健常成人 83 眼。SS-OCT を用いて黄斑部を測定。検討項目は視力、等価球面度数、眼軸長、年齢、身長、体重。

【結果】黄斑部直径 1.0 mm 円内の平均脈絡膜厚は、小児 $260.4 \pm 57.2 \mu\text{m}$ 、成人 $206.1 \pm 72.5 \mu\text{m}$ で有意な差があった。同部位の脈絡膜体積は、小児で $0.205 \pm 0.045 \text{ mm}^3$ 、大人の $0.160 \pm 0.056 \text{ mm}^3$ より有意に大きかった。小児脈絡膜厚は単回帰分析にて年齢、眼軸長、身長、体重、BMI と有意な相関があったが、重回帰分析にて眼軸長・BMI との相関が高かった。また、小児の年齢を 3 - 5 歳、6 - 9 歳、10 - 15 歳に分類して脈絡膜の鼻側、中心、耳側を比較すると中心部が鼻耳側に比べ急速に薄くなっていた。

【結論】小児の黄斑部脈絡膜厚・体積は、成人より大きく小児で脈絡膜厚が BMI と相関するのは、眼軸長が成長とともに伸長し、眼軸は年齢よりも身長・体重と相関するためと思われる。

14. Correlation between optic nerve head circulation and visual function before and after anti-VEGF therapy for central retinal vein occlusion: prospective, interventional case series

(網膜中心静脈閉塞症における抗 VEGF 薬治療前後の視神経乳頭循環と視機能の相関: 前向き, 介入ケースシリーズ)

永里 大祐

医歯薬学専攻・医学講座 (視覚病態学)

【目的】網膜中心静脈閉塞症 (CRVO) による黄斑浮腫 (ME) に対する抗血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 薬硝子体注射前後の視機能と網膜血流速度の関係を検討した。

【方法】対象は CRVO に伴う ME に対し抗 VEGF 薬硝子体注射を施行し 6 ヶ月以上経過観察できた 31 例 31 眼 (男性 20 人, 女性 11 人, 平均 66.9 歳)。注射前に動脈循環時間と網膜静脈蛇行度を測定し, 注射前, 注射後 1, 3, 6 ヶ月に矯正視力と網膜感度, 網膜血流速度を測定し, 比較検討した。網膜感度は Microperimetry を, 網膜血流速度は Laser Speckle Flowgraphy による MBR の MV から MT を差し引いた相対値を僚眼のそれで割った値 (Corrected MBR) を用いた。

【結果】注射前の Corrected MBR と, 網膜動脈循環時間, 網膜静脈蛇行度は有意に相関していた。どの時点でも Corrected MBR と矯正視力, 網膜感度は相関していた。注射前の Corrected MBR と施行後 6 ヶ月の矯正視力, 網膜感度は相関していた。

【結論】CRVO における注射前の視神経乳頭の網膜血流速度は, 注射後の視機能の予後予測に有用である可能性がある。

15. Ionic basis for membrane potential resonance in neurons of the inferior olive

(神経細胞膜の resonance 特性に関わるイオンチャネルの解明)

楨殿 佳子

医歯薬学専攻・医学講座 (神経生理学)

一部の神経細胞は, 細胞膜にある特定の周波数の入力信号を増幅して, 大きな電圧変化として出力するという電気特性を持つ。この電気特性は resonance 特性と呼ばれている。本研究は, resonance に関わる分子の同定を目的とした。マウス延髄下オリーブ核ニュー

ロンからホールセルパッチクランプ法で電気記録を行った。野生型マウスにおいて, 一定の振幅だが周波数が徐々に増すサイン波状 (チャープ) 電流を加え, 出力される電圧変化を計測したところ, 3-6Hz の周波数部分の電圧応答が増幅された。この増幅は Cav3.1 T 型電位依存性 Ca^{2+} チャネル欠損マウスでは著減したが消失はしなかった。残存したレゾナンスは HCN チャネルの阻害剤で完全消失し, HCN1 欠損マウスで消失した。上記の結果より, resonance には HCN1 チャネルが必須であり, Cav3.1 はそれを増強する役割を持つことが判明した。

16. Manipulation of Cell Cycle and Chromatin Configuration by Means of Cell-Penetrating Geminin

(膜透過型ジェミニンによる細胞周期およびクロマチン構造の操作)

竹立 恭子

原爆放射線医科学研究所 (幹細胞機能学研究分野)

Geminin は DNA 複製ライセンス化とクロマチンリモデリングを制御することが知られており, 幹細胞の増殖と分化を制御していることが予測される。本研究では, membrane translocating motif 配列を融合することで, Geminin タンパク質を細胞内に直接導入できる遺伝子組換え型 cell-penetrating (CP-) Geminin を開発した。CP-Geminin は, 培養液中に添加すると, 細胞内に導入され, S 期への移行を阻害すると共に, クロマチンリモデリングを抑制することが解った。また, 培養液中から CP-Geminin を除くと, CP-Geminin は速やかに減少することから, CP-Geminin を用いて細胞内の Geminin 発現量を迅速に操作できる。今後, CP-Geminin が幹細胞制御における Geminin の機能解析や幹細胞活性を操作するために役立つことが期待される。

17. High Initial-dose Dependency of Cerebrovascular Disease Mortality among Female Survivors of the Hiroshima Atomic Bomb Exposed in Teens: A Cohort Study, 1970-2010

(広島原爆被爆者における脳血管疾患死亡率の高い初期線量依存性が被爆時年齢 10 歳代の女性で検出された: コホート研究 1970-2010)

松葉 潤治

展開医科学専攻・放射線医科学講座 (分子疫学)

原爆被爆者のコホート研究において脳血管疾患による死亡は、被爆線量と超過相対危険度との有意な関連が報告されている。ただし、これらの研究では初期放射線被爆線量と死亡危険の関係について調べられたものである。本研究の目的は、広島原爆被爆者を対象として脳血管疾患死亡危険度を初期放射線被爆線量依存性のみで説明することが妥当であるか検討することである。

広島大学の原爆被爆者データベースに登録された被爆者のうち、初期放射線被爆線量を推定できた被爆距離が3.5 km以内の30378人（男性11683人、女性18695人）を対象としてCoxの時間依存型部分尤度法を用いて男女別、被爆時年齢階級別に解析した。説明変数は、初期放射線被爆線量（ABS93D）、あるいは被爆距離を用いた距離関数とした。その結果、女性の被爆時年齢が10歳代の場合以外は、直接被爆および間接被爆の超過危険度への有意な寄与は検出されなかった。

18. High Excess Risk of Heart Disease Mortality among Hiroshima Atomic Bomb Male Survivors Exposed Near the Hypocenter
(広島原爆男性近距離被爆者における高い心疾患死亡危険度)

原 憲行
原爆放射線医学研究所・放射線医学講座
(計量生物)

放射線影響研究所の報告によれば、原爆被爆者における心疾患死亡危険度は、初期線量に対して統計的に有意な影響を受けている。しかしながら近年、被爆者における固形がんの死亡リスクが初期線量だけでは説明できないことが、Tonda et al. (2012) や Ohtaki et al. (2015) の研究等で示唆された。我々は、被爆距離（被爆時にいた地点と爆心地との地上距離）を放射線量の代替指標とすることで、心疾患死亡に対する線量効果の再評価を行った。解析対象としたのは、1970年1月1日時点で生存していた、爆心地から3.5 km以内で被爆した29605名である。観察期間は1970年1月1日から2010年12月31日までとした。解析の結果、初期線量は男性の被爆時年齢10未満でのみ統計的な有意性を示した。被爆距離は男性の被爆時年齢10歳代以外と女性の被爆時年齢30歳以上で統計的に有意となった。初期線量以外の、被爆距離に関係する何かしらのリスク要因が、男性被爆者の心疾患死亡危険度を高めていると考えられる。