

第92回 広島大学研究科発表会（医学）

（2022年 1月 6日）

1. PD1 遺伝子多型が肝細胞癌術後予後に及ぼす影響について

山本 将輝

医歯薬学専攻 消化器・移植外科学

免疫チェックポイント蛋白である programmed cell death protein 1 (PD-1) は T 細胞反応の阻害調節因子である。PD1 遺伝子のプロモーター領域における single nucleotide polymorphism (SNP) による活性は PD-1 の表出率を上昇させ、癌のリスクとの関連性が指摘されている。この研究の目的は、PD-1 の SNP が肝細胞癌 (HCC) 患者の術後予後に関連しているかどうかを調べることである。

当科で肝切除術を行い、HCC と診断した患者 321 人を対象とした。PD-1 -606 SNP の内訳は AA genotype が 90 人、GA genotype が 163 人、GG genotype が 68 人であった。患者背景に差を認めなかった。GG genotype の患者の全生存期間は、他の遺伝子型の患者と比べて有意に低く、多変量解析で独立した危険因子であることを特定した。

2. Clinical significance of small-bowel lesions and evaluation of gastrointestinal motility using capsule endoscopy in systemic sclerosis patients (全身性強皮症患者における小腸病変の臨床的意義と小腸カプセル内視鏡を用いた消化管機能評価)

飯尾 澄夫

医歯薬学専攻 消化器・代謝内科

SSc は皮膚・各種臓器の線維化を特徴とする疾患である。本研究では、SSc の病型及び消化管の線維化別にみた消化管運動機能、小腸病変 (Study 1) と、小腸 angioectasia の特徴と治療成績 (Study 2) についてカプセル内視鏡検査を施行した 65 症例を対象に検討した。

Study 1: びまん皮膚硬化型 SSc および消化管に線維化を有する群で食道のカプセル通過時間が有意に長かった。限局皮膚硬化型 SSc では angioectasia (Type 1b) の頻度が有意に高かった。

Study 2: SSc 患者において、貧血及び皮膚の毛細

血管拡張は、小腸 angioectasia の独立したリスク因子であった。内視鏡的ポリドカノール局注が有効であったが、経過観察中に小腸 angioectasia の新規発生が確認された。

3. Single-cell DNA and RNA sequencing of circulating tumor cells (循環腫瘍細胞の 1 細胞遺伝子解析)

兒島 正人

医歯薬学専攻 外科学

Recently, circulating tumor cells (CTCs) have been considered to represent the precise

tumor heterogeneity and overall tumor characteristics. CTC profiling at the single-cell level most accurately represents tumor heterogeneity and provides useful information for cancer treatment and research. We simulated single-cell sequencing of neuroblastoma circulating tumor cells (CTC) using fluorescence-activated cell sorting and various whole-genome, transcriptome amplification methods (WGA, WTA). After spiking TGW neuroblastoma cells into blood derived from healthy volunteer, the cells were isolated by fluorescence-activated cell sorting using GD2 antibody. DNA and mRNA were amplified by four different WGA and three WTA methods, followed by single-cell DNA and RNA sequencing. The Multiple displacement amplification (MDA)-based WGA method using phi29 DNA polymerase and random primers, the PCR-based WTA method using template switching and LNA technology showed high performance. Our results present a more reliable and adaptable approach for CTC profiling at the single-cell level.

4. Strict control of phosphorus concentration of hemodialysis patients may decrease structural valve deterioration after aortic valve replacement (透析患者のリン値を厳格にコントロールすることは大動脈弁置換術後の構造弁劣化を減少させる可能性がある)

呉 晟名
医歯薬学専攻 外科学

The number of hemodialysis patients requiring aortic valve replacement (AVR) is increasing. Bioprosthetic valves are increasingly popular, yet are associated with risk of structural valve deterioration (SVD). We have examined the outcomes of bioprosthetic valves in hemodialysis patients undergoing AVR and identified treatment strategies that can decrease the risk of SVD.

Between February 2010 and November 2019, 61 patients on hemodialysis underwent AVR using bioprosthetic valves. Five patients died while still in the hospital. Kaplan-Meier estimates of overall survival and Cox proportional hazards regression analyses were performed to the remaining patients.

There were six SVD events related to the bioprosthetic valves. The survival rate was 67.9% at three years and 39.5% at five years. In all SVD cases, SVD was caused by aortic stenosis. The mean interval between AVR and the discovery of SVD was 41.5 months. The SVD-free rate was 88.6% at three years and 65.3% at five years. Preoperative phosphorus levels are associated with SVD risk. High preoperative phosphorus concentration is associated with elevated SVD risk.

In this study, we determined that the risk of SVD can be influenced by preoperative phosphorus level. Strict control of phosphorus concentration of hemodialysis patients may decrease SVD after AVR.

5. The Lipopolysaccharide Mutant Re-LPS Is a Useful Tool for Detecting LPS Contamination in Rheumatoid Synovial Cell Cultures (LPS 変異体である Re-LPS はリウマチ滑膜細胞培養における LPS 混入の検出に有用である)

河野 紘輝

医歯薬学専攻 リウマチ・膠原病学

背景：近年関節リウマチの病態に TLR4 を介するシグナルの重要性が注目されるが、TLR4 の活性化実験は試薬の LPS コンタミネーションが結果に影響を及ぼす。今回、RA 滑膜細胞における citrullinated Fibrinogen (cit-Fb) の効果を検討したところ、TLR4 を介して CXCL10 を誘導する結果を得たが、その効果は Polymyxin B で減弱し、試薬に混入した LPS によるものと判断した。試薬中 LPS の高感度測定は高価であり、特殊な測定装置を要する。そこで、日常実験で LPS 混入を簡便に検出する方法として、変異型 LPS (Re-LPS) の有用性を検討した。方法：サイトカイン発現は RT-PCR と ELISA で検討した。結果：大腸菌由来 LPS (WT-LPS) は RA 滑膜細胞に作用し CXCL10 発現を誘導した。一方、LPS 変異体の Re-LPS、Re-LPS は誘導しなかった。また、WT-LPS の CXCL10 発現誘導を Re-LPS は濃度依存性に抑制した。さらに cit-Fb 試薬による CXCL10 発現誘導を Re-LPS は濃度依存性に抑制した。考察：Re-LPS は WT-LPS による TLR4 活性化を拮抗的に抑制することが明らかになった。この作用は試薬中の LPS の迅速で簡便な検出に有用と考えられる。

6. Genotype-specific cortisol production associated with Cushing's syndrome adenoma with *PRKACA* mutations

(*PRKACA* 遺伝子変異を有するクッシング症候群における遺伝子変異特異的コルチゾール合成機構の解明)

馬場 隆太
医歯薬学専攻 分子内科学

【目的】コルチゾール産生腺腫 (CPA) の遺伝子変異に基づく細胞内分子機構を明らかにし、遺伝子変異を導入した細胞でコルチゾール合成機構を評価する。

【方法】当院で手術加療を行った CPA (*PRKACA* 変異 15 例, *GNAS* 変異 4 例, *CTNNB1* 変異 1 例, *GNAS* 変異と *CTNNB1* 変異合併例 1 例) を対象に、遺伝子発現解析を行い、評価した。ヒト副腎皮質癌細胞株 (HAC15) に *PRKACA* 変異を導入し、ステロイド合成酵素発現を評価した。

【結果】cAMP-PKA シグナル応答に関連する遺伝子群を用いたクラスタリング解析において、*PRKACA* 変異は *GNAS* 変異と明確に区別された。

HAC15 細胞に *PRKACA* 変異を導入すると、ステロイド合成酵素や *FDX1* の mRNA 発現量が有意に増加した。

【結論】 cAMP-PKA シグナル経路の活性化は、主に *PRKACA* 変異 CPA でみられた。*PRKACA* 変異はステロイド合成酵素や *FDX1* の発現増加を介してコルチゾールの過剰産生をもたらすことが示唆された。

7. 悪性高熱症素因者における 1 型リアノジン受容体変異の有無によるダントロレンの効果の相違

野田 祐子

医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻 麻酔蘇生学

ダントロレンは、筋小胞体からのカルシウム (Ca^{2+}) 放出を抑制する筋弛緩薬で、悪性高熱症 (以下 MH) の治療に使用されている。主に 1 型リアノジン受容体 (*RYR1*) に直接作用しているため、*RYR1* 遺伝子変異の有無により MH 反応に対する効果が異なる可能性がある。しかし、ヒト筋細胞を用いて *RYR1* 遺伝子変異の有無によるダントロレンの効果の違いを検討した報告はない。本研究は、*RYR1* 遺伝子変異が見つかった MH 素因者と、見つからなかった MH 素因者から培養したヒト骨格筋細胞を用い、*RYR1* 遺伝子変異の有無によるダントロレンの効果の差異を検討した。ダントロレンによる効果 (カフェインに対する EC_{50} (50% 効果濃度) の上昇、安静時細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下) は、*RYR1* 遺伝子変異の有無で有意な相互作用はなかった。よって、ダントロレンは *RYR1* 遺伝子変異の有無に関わらず、MH 患者に有効な治療法であると結論した。

8. Klotho deficiency intensifies hypoxia-induced expression of IFN- α/β through upregulation of RIG-I in kidneys

(Klotho の発現低下は腎において低酸素によって誘導される RIG-I と IFN- α/β の発現を増強する)

卜部 麻子

医歯薬学専攻 腎臓内科学

腎障害の進展に伴って、低酸素症は進行し、Klotho の発現は低下する。最近、低酸素下で RIG-I が活性化し、Klotho 欠乏で RIG-I を介した慢性炎症が惹起されることが示されたが、腎でのこれらの相互作用は明らかではない。本研究では、低酸素条件下でラット腎

尿細管 (NRK52E) 細胞における RIG-I と IFN- α/β の発現の増加を認めた。また、低酸素刺激におけるこれらの発現亢進は、RIG-I を標的とする siRNA で阻害された。次に IgA 腎症の腎生検サンプルの免疫染色で、RIG-I と IFN- α/β の発現が正の相関を認めた。動物実験においても、RIG-I と IFN- α/β の発現は、腎虚血の Wild type マウスで増加し、Klotho ノックアウトマウスでは、これらのさらなる発現増加を認めた。本研究の結果から、低酸素症が RIG-I の発現を介して IFN- α/β を誘導し、Klotho 欠乏によってこれらの発現が増強することが明らかになった。

9. Klotho overexpression protects against renal aging along with suppression of transforming growth factor- β 1 signaling pathways

(Klotho の過剰発現は、複数の TGF- β 1 シグナル伝達経路の抑制を伴って、加齢に伴う腎の老化性変化を抑制する)

大石 展盟

医歯薬学専攻 腎臓内科学

Klotho is an antiaging protein reported to suppress TGF- β 1 signaling. Aging kidneys are characterized by interstitial fibrosis, accumulation of cell cycle-arrested cells, and increased levels of oxidative stress. TGF- β 1 signaling is involved in these processes. In this study, we investigated whether klotho overexpression improves these features in the kidneys of aging mice and examined the inhibitory effect of klotho on signaling molecules related to TGF- β 1. Klotho transgenic (KLTG) and wild-type (WT) mice were used, and 8-wk-old and 24-mo-old mice were defined as young and aging, respectively. We found that klotho expression was decreased in aging WT mice, but it was maintained in aging KLTG mice. Klotho overexpression improved the survival of 24-mo-old mice. Klotho overexpression attenuated the increases in blood pressure, BUN and creatinine level in aging mice. Interstitial fibrosis, accumulation of cell cycle-arrested cells, and oxidative stress did not differ between young KLTG and WT mice, but they were significantly suppressed in aging KLTG mice compared with aging WT mice. Furthermore, the expression of TGF- β 1-related signaling molecules

was increased in aging WT mice, whereas it was inhibited in aging KLTG mice. These data suggest that *klotho* overexpression protects against kidney aging along with suppression of TGF- β 1 signaling pathways.

10. Overexpression of caspase promotes docetaxel resistance and is associated with prostate-specific antigen recurrence in prostate cancer

(前立腺癌における caspase 高発現はドセタキセル耐性を促進し, PSA 再発に関与する)

馬場崎 隆志

医歯薬学専攻 分子病理学

去勢抵抗性前立腺癌患者の docetaxel (DTX) 耐性メカニズムの解明が求められている。caspase は DNA 複製ストレスおよび DNA 損傷反応において重要な役割を果たし, S 期チェックポイントの調節因子である。本研究では前立腺癌における caspase の臨床病理学的意義, 生物学的機能, DTX 耐性との関係を検討した。免疫組織学的検討では, 前立腺癌組織 89 例中 31 例 (35%) で caspase 陽性であり, 陽性例は Gleason score (GS) \geq 8, 静脈浸潤, 神経周囲浸潤と有意に相関し, PSA 非再発生存期間は予後不良であった。Public database の解析では, *CLSPN* 発現レベルは, GS, T stage, リンパ節転移と正の相関を認め, 高発現での PSA 非再発生存期間は予後不良であった。また去勢抵抗性, 転移性, 神経内分泌変化を呈した前立腺癌において高発現であった。細胞株を用いた検討では, DTX 耐性株で発現亢進を認め, *CLSPN* をノックダウンすると細胞増殖能の抑制と DTX 感受性の有意な増強が認められた。caspase は前立腺癌における新しい治療標的として有用であると考えられた。

11. Therapeutic effect of targeting Substance P on the progression of osteoarthritis

(変形性膝関節症における Substance P の治療効果の検討)

白川 圭子

医歯薬学専攻 整形外科学

目的: 変形性関節症 (Osteoarthritis:OA) において Substance P (SP) を標的とした治療効果を検討すること。

方法: ヒト膝関節軟骨での SP の発現解析を行った。また, surgical OA model mice \rightarrow NK1 受容体 antagonist (aprepitant), agonist (septide) をそれぞれ腹腔内投与し, 組織学的評価を行った。

結果: 関節軟骨での SP 発現量は正常膝で最も多く, OA 進行と共に低下した。また septide 投与群はコントロール群, aprepitant 投与群と比較し有意に OA 進行と軟骨下骨の骨硬化が抑制された。また関節軟骨での SP の発現量は septide 投与群で保たれていた。

結論: 関節軟骨では SP は軟骨の恒常性維持に関与していると考えられ, SP の発現低下が OA 進行に関与していることが示唆された。SP の制御が OA の治療法となる可能性がある。

12. Anti-seizure effects of medicinal plants in Malawi on pentylentetrazole-induced seizures in zebrafish larvae

(ペンチレンテトラゾール誘発性ゼブラフィッシュけいれん発作モデルによるマラウィ産薬草の抗けいれん作用)

Mayeso Naomi Victoria Gwedela

医歯薬学専攻 神経生物学

In Africa, 68.5% of people living with epilepsy cannot access treatment due to several barriers and use medicinal plants as an alternative. Among the plants used in Malawi are *Margaritaria discoidea*, *Dalbergia boehmii*, *Dalbergia nitidula*, *Catunaregam spinosa*, and *Lannea discolor*. As their anti-seizure efficacy remained unclear, this study screened their effects using the larval zebrafish pentylentetrazole (PTZ) seizure model. In the primary screen, larvae pretreated with *M. discoidea*, *D. boehmii*, and *D. nitidula* suppressed PTZ-induced locomotor activity. *D. boehmii* further increased seizure latency and decreased its frequency. Electrophysiological recordings revealed that *D. boehmii* and *D. nitidula* suppressed seizure-like activity in the optic tectum. Additionally, the two decoctions suppressed expression of *c-fos* and *npas4* transcripts which are upregulated upon seizure induction. *C-fos* protein expression patterns further suggested that anti-seizure effects of the decoctions may be mediated by suppression of neurons localized in the midbrain. Collectively, the

study provided evidence for anti-seizure activity in decoctions of *M. discoidea* leaves, *D. boehmii* roots and *D. nitidula* leaves from a collection of Malawian plants. Uncovering the mechanism underlying their anti-seizure effects would pave the way for understanding the optimal use of a combination of decoctions dependent upon epilepsy subtypes and complications.

13. Electrophysiological and pharmacological characterization of spreading depolarization in the adult zebrafish tectum

(ゼブラフィッシュ成魚視蓋における拡延性脱分極の電気生理学および薬理学的特徴)

寺井 はるひ

医歯薬学専攻 神経生物学

拡延性脱分極 (SD) は神経細胞やグリア細胞の脱分極が波状に伝播していく現象で、片頭痛や脳梗塞、脳外傷で見られる病的脳活動である。SD はこれらの病態の予後に関与するにも関わらず、その発生機構には不明な点が多く残されている。この問題を解決するために遺伝子操作や薬剤スクリーニングに適したゼブラフィッシュをモデル動物として新たな実験系を確立した。同実験系を用いて塩化カリウムにより視蓋を刺激したところ、フィールド電位の直流成分の一過性減少に続いて視蓋半球内の伝播が引き起こされ、その振幅及び持続時間はマウス大脳皮質における SD と高い類似性を認めた。また、ゼブラフィッシュ SD はマウス同様 NMDA 受容体阻害薬の投与により伝播速度が減少した。これらの結果は SD が種間を超えてみられる病的脳活動で、グルタミン酸神経伝達という共通した機構を基盤としており、ゼブラフィッシュを新たな SD モデル動物として利用できる可能性を示唆している。

14. Effect of region-wide use of prehospital stroke triage scale on management of patients with acute stroke

(地域全体での病院前脳卒中分類スケールの使用が急性期脳卒中患者の管理へ与える影響)

荒木 勇人

医歯薬学専攻 脳神経外科学

脳卒中とその病型の可能性を予測できる病院前脳卒中分類スケールである JUST スコアを 2019 年 4 月より広島市へ導入して前後 1 年間で比較して影響を調べた。2018 年 4 月 1 日から 2020 年 3 月 31 日まで、広島市消防局の救急隊が脳卒中対応可能な 13 の病院へ直接搬送した全ての脳卒中疑い患者 5141 名 (JUST スコア導入前後: 2735 名 vs. 2406 名) を対象とした。JUST スコアの導入が、救急搬送システムと受け入れ病院に与える影響を評価した。JUST スコア導入後、救急隊の初回要請での搬送先決定率は有意に上昇した (76.3% vs. 79.7%, $p=0.004$)。受け入れ病院においては、主幹動脈閉塞症に対する血栓回収療法施行例で予後因子とされる「病院到着から治療開始までの時間」が有意に短縮した (84 分 vs. 73 分, $p=0.03$)。しかしながら予後改善には至らず、さらなる時間短縮への努力が必要である。

15. Short stature is associated with low flow-mediated vasodilation in Japanese men

(日本人男性において低身長は血流依存性血管拡張反応が低値となることと関連している)

原田 崇弘

医歯薬学専攻 循環器内科学

身長と心血管疾患のリスクとの間には逆相関があることが報告されている。本研究では、血流依存性血管拡張反応 (FMD) によって評価される内皮機能と身長との関連を検討した。日本人男性 7682 名を対象に、身長と FMD の関連性を横断的に評価した。全参加者を身長によって <155.0cm 未満, 155.0 ~ 164.9cm, 165.0 ~ 174.9cm, 175.0cm 以上の 4 つのグループに分けた。FMD の値が低い四分位の被験者を FMD の値が低い被験者と定義した。単変量回帰分析の結果、身長は FMD と有意に相関し ($r=0.14$, $p<0.001$)、FMD は身長の増加に伴い有意に増加した。多重ロジスティック回帰分析では、調整後、身長の高いグループは 155.0cm 未満のグループと比較して FMD 値が低いリスクの減少と有意に関連していた。低身長の人には心血管イベントのリスクを低減するために集中的な介入が必要であると考えられる。

16. Pre-impaired fasting glucose state is a risk factor for endothelial dysfunction: Flow-mediated Dilation Japan (FMD-J) study

(和訳：空腹時血糖 95-99mg/dL は血管内皮機能障害のリスクである)

山路 貴之
医歯薬学専攻 循環器内科学

【背景】糖尿病が血管内皮機能障害のリスクであることが報告されている一方で、どの段階の空腹時血糖値 (FBG) から血管内皮機能が障害されるのかを検討した報告は認めない。【目的】本研究の目的はFBGと血管内皮機能障害について右上腕動脈のflow-mediated vasodilation (FMD) を用いて検討することである。【方法】FMDを測定し得た7265人を対象と

した。対象者をFBG<90 mg/dL, FBG: 90-94 mg/dL, FBG: 95-99 mg/dL, FBG: 100-109 mg/dL, FBG: 110-125 mg/dL, FBG ≥ 126mg/dLもしくは糖尿病を有する群の6群に分類しFMD値を比較した【結果】FMDの値はFBG <90mg/dL群で6.9 ± 3.1%, FBG: 90-94 mg/dL群で6.7 ± 3.1%, FBG: 95-99mg/dL群で6.3 ± 3.1%, FBG: 100-109 mg/dL群で5.9 ± 2.8%, FBG: 110-125 mg/dL群で5.7 ± 3.1%, FBG ≥ 126mg/dLもしくは糖尿病群で5.1 ± 2.6%であった。FBG<90mg/dL群と比較してFBG: 90-94 mg/dL群ではFMD値に有意差を認めないものの (p=0.28), FBG: 95-99mg/dL群を含むそれ以外の群では有意にFMD値が低下していた。【結論】FBG<90 mg/dL群と比較してFBG: 95-99mg/dL群ではFMDが有意に低下していることが示された。