

第100回 広島大学研究科発表会（医学）

（令和5年8月3日）

1. Capture and neutralization of SARS-CoV-2 and influenza virus by algae-derived lectins with high-mannose and core fucose specificities
 （高マンノースおよびコアフコース特異性を有する藻類由来レクチンによる SARS-CoV-2 およびインフルエンザウイルスの捕捉と中和反応）

Tanuz Nazumul
 医歯薬学専攻 ウィルス学

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is an enveloped virus with bearing surface (S) proteins on its surface. S proteins are predicted to have 22 N-glycosylation sites and at least two O-glycosylation sites, and the attached N-glycans have been confirmed to be both the complex and high-mannose (HM) types. Our study focused mainly on glycan-binding proteins and lectins that target glycans and could serve as viral growth inhibitors and diagnostic tools. With this study, we report that algal-derived lectins' neutralizing and trapping activity against SARS-CoV-2.

We have isolated and analyzed nine different types of lectins from marine algae and have shown that lectins from algae have unique molecular structures and carbohydrate-binding specificities that differ from those of known lectins from other groups of organisms.

The SARS-CoV-2/JP/Hiroshima-46059T/2020 strain was grown in VeroE6/TMPRSS2 cells and used as the experimental virus. All experiments using infectious SARS-CoV-2 were performed under Biosafety Level 3 (BSL3) containment measures at the P3 experiment facility of Hiroshima University.

Seven of the nine algal lectins used in this study bind specifically to HM-type N-glycans; one binds weakly to complex-type N-glycans in addition to HM-type N-glycans; another one binds to the complex-type N-glycan core fucose.

To see the binding capacity of Lectins with SARS-

CoV-2, we performed a Column Binding experiment and we found that three of them (OAA, KAA-1 & HypninA-2) can bind with SARS-CoV-2.

Next, we performed the neutralization test of nine lectins against SARS-CoV-2, and three of them (KAA-1, ESA-2& HypninA-2) showed neutralization activity.

To evaluate the neutralizing ability of these specific glycans, competition experiments using foreign glycoproteins were conducted. Results showed that these lectins neutralize the virus via HM-type glycans (KAA-1 and ESA-2) or core fucose-type glycans (HypninA-2).

Enriched SARS-CoV-2 was treated with three lectins, OAA, KAA-1, and HypninA-2, and observed under an electron microscope. The virus particles were dispersed in the micrographs of lectin-untreated SARS-CoV-2, but in the lectin-treated samples, the virus particles were aggregated.

Based on the above, the neutralization of SARS-CoV-2 by lectins is thought to occur because factors such as the molecular weight of lectins, the number of binding sites, and the position of the sugar chains on the S protein to which lectins bind are related, causing steric hindrance of the S protein and viral aggregation.

2. Treatment Outcomes in the Baerveldt Trabeculectomy Comparison Study on Neovascular Glaucoma

（血管新生緑内障に対する線維柱帯切除術とバルベルトインプラント手術の無作為比較試験）

徳毛 花菜
 医歯薬学専攻 視覚病態学

目的：血管新生緑内障に対して、バルベルトインプラント手術と線維柱帯切除術（TLE）の手術成績を比較した。

方法：前向き無作為割付前向き臨床試験を行った。患者をバルベルト群（23人）またはTLE群（27

人)に割り付けた。主要評価項目は、眼圧コントロール、副次的評価項目は合併症と再手術数とした。

結果:術後の平均経過観察期間は、バルベルト群で26.6 ± 19.4 カ月、TLE 群で27.3 ± 20.1 カ月であった。術後の眼圧に有意差はなかった。生存率、緑内障点眼数、視力、再手術数は2群間で同等であった。後期合併症が、バルベルト群で13眼、TLE 群で4眼に出現した。バルベルト群で8眼、TLE 群で3眼の視力が低下した。

結論:TLE とバルベルトインプラント手術後の成績は同等であった。再手術数はTLE 群のほうが多かったが、晩期合併症や視力低下を起こした症例が少なかった。このことから、血管新生緑内障に対する手術はTLE のほうが侵襲の少ないより安全で優れた術式であると考えられる。

3. Resting-state functional connectivity disruption between the left and right pallidum as a biomarker for subthreshold depression

(閾値下うつのバイオマーカーにおける左右淡蒼球間の安静時脳機能結合異常)

佐藤 陽介
医歯薬学専攻 精神神経医科学

思春期後期の閾値下うつの同定は、その機能障害の改善やうつ病の発症予防につながる効果的な介入を開発する事に役立つが、閾値下うつの診断に有用なバイオマーカーは存在しない。そこで本研究では、閾値下うつ者30名と健常者61名を対象に安静状態における自発的な脳活動の脳領域間の時間的な同期関係(機能的結合)を測定し、2つの機械学習アルゴリズムを組み合わせて適用することで、8つの機能的結合を選択しバイオマーカーを作成した。作成したバイオマーカーを検証用の独立データ(閾値下うつ者16名、健常者27名)に適用したところ、有意な汎化性能が確認された。また、バイオマーカーを構成する8つの機能的結合と、アンヘドニアおよび報酬反応性との相関を検証したところ、閾値下うつの判別に最も寄与する左右淡蒼球間の機能的結合が、アンヘドニアや報酬反応性の低下など、閾値下うつの臨床的に重要な機能障害に関連することが示唆された。

4. Descending thoracic aortic repair outcomes for chronic aortic dissection: a single-centre experience

(慢性大動脈解離に対する、胸部下行大動脈人工血管置換術の成績)

山根 吉貴
医歯薬学専攻 外科学

<背景>胸部ステントグラフト内挿術(TEVAR)が広く普及されるようになり、大動脈解離に対する治療戦術が変わってきている。慢性大動脈解離(CAD)に対する治療として、開胸(OSR)による人工血管置換術が標準術式であるが、近年ではTEVARが行われつつあり、さまざまな成績が報告されるようになった。しかし、CADに対するTEVARは早期成は良好であるものの、遠隔期成績については不透明である。

<方法>川崎幸病院大動脈センターではCADに対してはOSRを基本術式としている。その早期・中長期成績を報告し、OSRの妥当性について検討した。

<結果>2012年から2020年まで、CADに対するOSRを492例行った。早期死亡は10人(2%)、脳梗塞は17人(3.5%)、脊髄障害は30人(6.1%)であった。早期に主要有害事象(MAEs)を認めたのは62人(12.6%)で、その予測因子は年齢と非予定手術が挙げられた。CADに関連した再手術は5年で7.9%であった。

<結語>CADに対しては(特に低リスク患者)は開胸手術がまだまだ標準術式であると考えられる。

5. Peripheral T cell profiling reveals downregulated exhaustion marker and increased diversity in lymphedema post-lymphatic venous anastomosis (リンパ管静脈吻合術によりリンパ浮腫患者の末梢血T細胞の疲弊マーカーが低下し多様性が上昇した)

今井 洋文
乙申請 血液・腫瘍内科学

【背景】リンパ浮腫の合併症に蜂窩織炎と血管肉腫があり免疫不全の存在が示唆される。リンパ管静脈吻合術(LVA)は、これらを消退させることが報告されているが、その機序は明らかになっていない。

【方法】リンパ浮腫群21例と健常者群20例を対象とし、リンパ浮腫群に対してLVAを行い術後1年で採血を行った。T細胞上の疲弊因子(PD-1)とT細胞受容体(TCR)の多様性指数を算出した。

【結果】リンパ浮腫群とLVA術後群および健常者

群の CD4⁺T 細胞上の PD-1 発現量 (%) はそれぞれ 30.7 と 27.1 および 19.9 であった。TCR の多様性指数はそれぞれ 44.1 と 200.5 および 151.0 であった。

【考察】リンパ浮腫群では健常者群と比較して、T 細胞の PD-1 発現量が多く TCR の多様性が低下していた。一方、LVA 後には疲弊因子の発現が減少し、TCR の多様性が回復したことから免疫能が改善されることが示唆された。

6. Intestinal overgrowth of *Candida albicans* exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice with dysbiosis

(腸内 *Candida albicans* の増殖はマウスブレオマイシン肺線維症を悪化させる)

山田 貴弘

医薬学専攻 分子内科学

【緒言】マウスを用いて腸内真菌叢が肺線維症に与える影響を検証した。【結果】抗菌薬と *C. albicans* を経口投与して腸内 *C. albicans* を増殖させたマウスでは、*C. albicans* を投与しないマウスと比較して、ブレオマイシン肺線維症が悪化した。この変化は IL-17A 中和抗体により軽減したことから、本病態に IL-17A が関与することを見出した。腸内で *C. albicans* が増殖すると、腸だけでなく肺のリンパ球の *Rorc* 発現が亢進し、そこにブレオマイシンの刺激が加わることでそれらのリンパ球が IL-17A を産生することを示した。さらに IL-17A は、既報にある上皮間葉転換や線維芽細胞活性化のみならず、内皮間葉転換をも誘導した。【結論】腸内 *C. albicans* 増殖は IL-17A による内皮間葉転換を介して肺線維症の悪化に寄与しており、肺線維症の治療標的となりうる。

7. Selective activation of PPAR α maintains thermogenic capacity of beige adipocytes

(PPAR α の選択的活性化はベージュ脂肪細胞の熱産生能を維持する)

江草 玄太郎

医薬学専攻 分子内科学

【目的】ベージュ脂肪機能維持機構についての探索
【方法・結果】不死化脂肪前駆細胞や野生型マウス (C57BL/6) へ Rosiglitazone (PPAR γ アゴニスト) や CL316,243 (β アドレナリン受容体刺激薬) を用い

てベージュ脂肪細胞を生合成し、分化刺激を除去し変化した遺伝子群を RNA-Seq で解析し、ベージュ脂肪機能維持に関連する転写因子として *Ppara* を同定した。次に、分化刺激を除去したベージュ脂肪細胞へベマフィブラートをを用いると、熱産生遺伝子の発現や酸素消費量は増加した。*De novo* モチーフ解析から、ベマフィブラート標的遺伝子群の転写調節領域に存在する転写因子 ELK1 に着目した。クロマチン免疫沈降法により、*Ucp1* プロモーター領域近傍へ PPAR α , ELK1 の enrichment を確認した。【考察】ベマフィブラートの転写調節には、PPAR α -ELK1 複合体の関与が示唆された。

8. Residual risk of mother-to-child transmission of HBV despite timely Hepatitis B vaccination: a major challenge to eliminate hepatitis B infection in Cambodia

(カンボジアにおける B 型肝炎ワクチン定期接種導入後も残存している母子感染リスク：B 型肝炎ウイルス撲滅に向けた課題と考察)

E Bunthen

医歯薬学専攻 疫学・疾病制御学

Background: Cambodia has paucity of information on hepatitis B virus (HBV) mother-to-child transmission (MTCT). This study aimed to investigate the prevalence of HBV infection among pregnant women and to ascertain if MTCT of HBV is occurring in Cambodia.

Methods: This longitudinal study conducted in three hospitals in Siem Reap, Cambodia, from February 2020 to December 2021 had two parts. Study-1 screened HBsAg among pregnant women, while study-2 followed up all babies of HBsAg-positive and one-fourth of HBsAg-negative mothers. Serum or dried blood spot (DBS) samples were collected for HBV sero-marker detection, viral load quantification, and genotype identification.

Results: Out of 1,565 pregnant women screened, 4.3% (67/1,565) were HBsAg-positive. Among them, 41.8% (28/67) were HBeAg-positive and 28.4% (19/67) had high viral load ($>10^6$ copies/mL). Genotype C was predominant (68.9%), followed by genotype B (31.1%). Despite fully vaccination, one of 35 babies born to HBsAg-positive mothers tested

positive for HBsAg at 6 months old, resulting in 2.9% risk of MTCT.

Conclusion: This study revealed a 4.3% prevalence of HBV infection among pregnant women and remaining risk of HBV MTCT in Cambodia. In addition to HepB vaccination, universal HBsAg screening and linkage to antiviral prophylaxis among pregnant women in Cambodia should be considered.

9. Diagnosis of gastritis and identification of gastric cancer risk, based on serological gastritis markers and endoscopic findings

(血清学的検査と内視鏡検査に基づく胃炎診断と胃癌リスクの識別)

長崎 直子

医歯薬学専攻 消化器内科学

血清マーカーによる胃癌リスク分類法である ABC 分類では、低リスクとされる A 群でも発癌リスクを有することが報告されている。今回、ABC 分類に内視鏡検査を併用し、発癌リスクを検証した。また、病理学的非胃炎症例を用いてガストリンの正常値を求めた。

Study 1: 真の HP 未感染胃 (true A 群) に発癌は見られず、その他群との比較で無胃癌発生生存率が有意に低かった。

Study 2: 病理学的非胃炎症例でのガストリン正常域 126 pg/mL を求め、他集団で validation として胃炎診断能を評価したところ、AUC 0.80、特異度 92.6%、陽性的中率 97.0% であった。

以上、胃癌のリスク評価には、血清マーカーと内視鏡所見の組み合わせが有用であり、血清マーカー陰性で内視鏡萎縮がなければ発癌リスクはほぼなかった。また、病理学的非胃炎症例から算出したガストリン正常値は胃炎診断のための有用なマーカーと考えられた。

10. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody suppresses colorectal cancer growth in an orthotopic transplant mouse model

(同所移植マウスモデルにおいて抗 TNF α 抗体製剤は大腸癌の成長を抑制する)

高砂 健

医歯薬学専攻 消化器内科学

【背景と目的】 抗 TNF α 抗体製剤は免疫抑制による悪性腫瘍増悪のリスクが懸念されてきたが、実際の影響については様々な見解がある。今回、我々は腫瘍微小環境 (TME) の評価に適した大腸癌同所移植マウスモデルにおいて初めて、腸炎がない状態での抗 TNF α 抗体製剤が腫瘍に与える純粋な影響を評価することを目的とした。**【方法】** BALB/c マウスの盲腸に大腸癌細胞株 CT26 を移植し同所移植モデルを作成した。抗 TNF 抗体製剤を腹腔内投与し、移植 3 週後に腫瘍を摘出し、RNA シークエンス、免疫組織学的染色を行った。**【結果】** 抗 TNF α 抗体製剤群では腫瘍は縮小し、RNA シークエンス解析では免疫関連のパスウェイ、アポトーシスが亢進し、間質関連、腫瘍増殖に関連したパスウェイが抑制され、Gene Ontology 解析ではそれらに加え血管新生の抑制を認めた。免疫組織化学染色でも同様の結果であった。**【結論】** 大腸癌同所移植マウスモデルでは抗 TNF α 抗体製剤は腫瘍を縮小し、TME において腫瘍抑制に働いていた。

11. Impact of Lipoprotein (a) on Long-Term Outcomes in Patients With Acute Myocardial Infarction

(急性心筋梗塞における Lipoprotein (a) の長期予後に与える影響)

臺 和興

医歯薬学専攻 循環器内科学

Background: Lipoprotein (a) (Lp (a)) is a complex circulating lipoprotein; increasing evidence has demonstrated its role as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease.

Methods and Results: This study aimed to investigate the influence of Lp (a) on long-term outcomes after acute myocardial infarction (AMI). Between January 2015 and January 2018, we enrolled 262 AMI patients who had available Lp (a) data. These patients were divided into two groups according to Lp (a) levels into high Lp (a) (≥ 32 mg/dL; n=76) and low Lp (a) (< 32 mg/dL; n=186) groups. The primary endpoint was major adverse cardiac events (MACE), which was defined as a composite of cardiac death, non-fatal myocardial infarction, and readmission for heart failure. Multivariate Cox regression analysis was performed to identify the predictors of MACE. The incidence of

MACE was significantly higher in the high Lp (a) group than in the low Lp (a) group (32.8% vs 19.6%, $p=0.004$). Multivariate analysis showed that an Lp(a) level of ≥ 32 mg/dL was an independent predictor of MACE (HR 2.84, 95%CI 1.25-6.60, $p=0.013$).

Conclusions: High Lp (a) levels are associated with worse long-term outcomes after AMI. Lp (a) may be useful for stratifying the risk of long-term MACE after AMI.

12. Comparison of the mechanical properties and mechanical damages to tendon tissue in three suspensory fixation techniques

(3つのsuspensory fixation deviceの力学的特性と腱組織に及ぼす損傷程度の比較)

加納 利哉

医歯薬学専攻 整形外科学

3つの異なるsuspensory fixation device (SFD)の引張り試験における長さ変化を比較すると共に、SFDと腱組織が接触する部位における腱組織の表面構造の比較検討を行った。

fixed length loop deviceとしてのsimple loop device (SLD)と第一世代および第二世代のadjustable length loop device (AD1, AD2)の3種類を用い、デバイス単体および各デバイスとウシ腱を組み合わせたものの比較検討を行った。50Nで30秒予備張力負荷後、50N～250Nの繰り返し張力を2000cycle行い、長さ変化を計測した。ウシ腱を用いたcyclic試験後に、Optical Coherence Tomography (OCT)と独自の組織学的スコアリングシステムを用いて腱の表面構造を定量的に評価した。

デバイス単体と試験片試験において、SLDが最も変位が少なく、次いでAD1, AD2の順であった。OCT値は、AD1の方がSLDとAD2よりも有意に高く、腱表面の構造がより乱れており、組織学的には、AD1はSLDとAD2よりも有意にスコアが低く、表面形態が損傷していた。

ループ構造の違いにより調節時の摩擦応力または反復的な緊張応力により、移植片の損傷が増大した可能性がある。

13. The Subchondral Bone Condition During Microfracture Affects the Repair of the Osteochondral Unit in the Cartilage Defect in the

Rat Model

(ラット軟骨欠損モデルにおけるマイクロフラクチャー後の軟骨下骨の状態が骨軟骨組織の修復に及ぼす影響)

住井 淳一

医歯薬学専攻 整形外科学

【目的】ラットモデルにて全層軟骨欠損を作成した後、異なる時期にマイクロフラクチャー (MF) を行い、軟骨下骨の変化と軟骨修復を評価する、またMF孔に β -TCPを充填することで軟骨下骨へ与える影響を評価する。

【方法】ラットの両膝関節に軟骨欠損を作成してから0, 2, 4週間後にMF孔を作成。片側のMF孔には β -TCPを充填した。MF孔作成後2, 4週で評価。 μ CTで骨量を、HE, Safranin-O染色を行い軟骨と軟骨下骨の状態をスコア化した。各時点でのMF孔の直径、TRAP染色にて破骨細胞数を同定し計測した。

【結果】軟骨欠損作成後2週でMFを行うと、MF孔の直径は最大となり、軟骨スコアも最も悪かった。 β -TCPを充填すると、MF孔の拡大が抑制され、軟骨スコアも改善。破骨細胞の割合も有意に少なく骨量も高かった。

【考察】MF孔に β -TCPを充填することで骨孔内への関節液の流入を抑制し、破骨細胞の活性を抑え、骨芽細胞を誘導しMF孔の拡大を抑制することができる可能性がある。

14. High-fat diet-induced obesity accelerates the progression of spontaneous osteoarthritis in Senescence-Accelerated Mouse Prone 8 (SAMP8)

(高脂肪食による肥満誘導は早期に変形性関節症 (OA) を示す老化促進マウス (SAMP8) のOA重症度を促進する)

Ding Chenyang

医歯薬学専攻 整形外科学

Objectives: Aging and obesity are major risk factors for osteoarthritis (OA), a widespread disease currently lacking efficient treatments. Senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) display early-onset aging phenotypes, including OA. This study investigates the impacts of high-fat diet (HFD)

-induced obesity on OA development in SAMP8.

Methods: SAMP8 at five weeks were fed either a normal chow diet or an HFD for ten weeks to induce obesity. Parameters related to obesity, liver function, and lipid and glucose metabolism were analyzed. At 14 weeks of age, knee joint pathology, bone mineral density, and muscle strength were assessed. Immunohistochemistry and TUNEL staining were performed to evaluate markers for cartilage degeneration and chondrocyte apoptosis.

Results: At 14 weeks of age, HFD-induced obesity increased liver and adipose tissue inflammation in SAMP8 without further exacerbating diabetes. Histological scoring revealed aggravated cartilage, menisci deterioration, and synovitis, while no further loss of bone mineral density or muscle strength was observed. Increased chondrocyte apoptosis was detected in knee joints following HFD feeding.

Conclusions: Ten weeks of HFD feeding promotes spontaneous OA progression in 14-week-old SAMP8, potentially via liver damage subsequent chondrocyte apoptosis. This aging-obese mouse model may prove valuable for further exploration of spontaneous OA pathophysiology.

15. Identification of protein kinase C domains involved in its translocation induced by propofol (プロポフォール誘発性プロテインキナーゼCトランスロケーションに関与するドメインの同定)

梶崎 壮志
医歯薬学専攻 麻酔科学

我々はこれまでに、プロポフォールがプロテインキナーゼC (PKC) を活性化し、そのトランスロケーションを誘導することを明らかにした。本研究では、この現象にPKCのどのドメインが関係しているかを調べるため、各ドメインを欠失させたPKC α とPKC δ を緑色蛍光タンパク質 (GFP) と融合させてHeLa細胞に発現させ、プロポフォール誘発性PKCトランスロケーションを蛍光顕微鏡で観察した。その結果、PKC α ではC1, C2ドメイン、PKC δ ではC1Bドメイ

ンが関係していることが明らかになった。また、C1ドメイン阻害剤であるカルホスチンCはプロポフォール誘発性PKC δ トランスロケーションを抑制し、プロポフォールによるPKCを介した内皮型一酸化窒素合成酵素のリン酸化を抑制した。本研究によって、プロポフォール誘発性PKCトランスロケーションに関与するPKCドメインが明らかになり、またそのドメインを調節することでプロポフォールの作用を変化させることができる可能性が示唆された。

17. Heterophile carbohydrate antigen N-glycolylneuraminic acid as a potential biomarker in patients with hepatocellular carcinoma (肝細胞癌患者における異好糖鎖抗原Nグリコリルノイラミン酸のバイオマーカーとしての可能性)

秋本 修志
医歯薬学専攻 消化器・移植外科学

異好糖鎖抗原N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) は、ヒトの正常組織には発現なく、NeuGc欠損はシチジン-5'-リン酸-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) 水酸化酵素 (CMAH) をコードする遺伝子の欠失 (CMAH偽遺伝子 (CMAHP)) による。肝細胞癌患者でのNeuGc発現が報告され、切除肝組織のNeuGc抗原発現と術前血清抗NeuGc抗体価が肝細胞癌術後の予後に影響を及ぼすか検討した。

切除肝組織のNeuGc抗原発現を免疫染色し、術前血清抗NeuGc抗体をELISAで測定、肝切除患者の臨床的特徴をNeuGc抗原や抗NeuGc抗体の有無と比較した。また、切除肝組織のCMAHP mRNA発現をRT-qPCRで測定した。

初回肝切除患者でNeuGc抗原陽性群と抗NeuGc抗体陽性群は、有意に無再発生存期間が短縮した。一方、NeuGc抗原陽性群と抗NeuGc抗体陽性群は腫瘍組織において正常組織よりも有意に高いCMAHP mRNA発現を示した。

肝細胞癌患者で術前血清中抗NeuGc抗体価高値および肝細胞癌組織上のNeuGc抗原陽性発現は、肝切除後の早期再発および予後を予測しうる因子であることが示唆された。