

夫婦のコペアレンティングに関する助産師の認識と 産前教育の実態および関連要因の検討

横浜市立大学大学院医学研究科看護学専攻 母性看護学分野

博士前期課程2年 齊藤 千秋

(研究目的)

近年日本では共働き世帯が増加し、核家族化や晩産化、地域との関係性の希薄化に伴い、育児期の夫婦への親や周囲からの支援が減少している。こうした状況の中、夫婦双方の産後うつ病を予防するためには、夫婦のコペアレンティング（協同育児）を促進することが重要である。妊娠期から夫婦のコペアレンティングを促進することで、夫婦の親密度の向上、夫婦双方の育児ストレスや産後うつ病の減少、子どもの成長と発達の促進、夫の育児時間の増加といった効果があることが報告されている（Feinberg & Kan, 2008 ; Feinberg et al, 2009 ; Takeishi et al, 2019）。したがって、専門職として女性とその家族をサポートする立場にある助産師が、妊娠期から夫婦のコペアレンティング促進支援をしていくことが重要である。しかし現在、各施設で行われている外来の保健指導や集団指導等の産前教育の中で、コペアレンティングに関する内容がどの程度取り入れられているのかは明らかにされていない。そこで本研究では、夫婦を対象とした産前教育に携わる助産師を対象とし、夫婦のコペアレンティングに関する助産師の認識と産前教育の実態および関連する個人・組織要因を明らかにすることを目的とした。

(研究方法)

1. 研究デザイン：無記名自記式質問紙を用いた横断的記述的相関研究
2. 研究対象：研究対象施設は5都府県（東京都、神奈川県、大阪府、埼玉県、愛知県）に位置する分娩取扱施設（病院・診療所）計642施設である。研究対象者は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）による影響がない時期に、夫婦を対象とした産前教育に携わっていた助産師（各施設1名）である。
3. 調査方法・調査項目：研究対象施設の看護管理者宛に研究協力依頼文書、質問紙および返信用封筒を送付し、対象となる助産師1名を選出してもらった。研究対象者から同意が得られた場合に質問紙に回答してもらい、郵送法にて回収した。データ収集期間は2021年3月12日～2021年5月21日である。調査項目は、「夫婦のコペアレンティングに関する認識」、「夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実態」、および対象の個人・組織属性である。
4. 分析方法：統計解析ソフトSPSS Statistics version 27を使用し、各質問項目の基本統計量の算出、産前教育内容の探索的因子分析および下位尺度得点による実践度の比較、産前教育の実践高低群を従属変数、対象の個人・組織要因を独立変数としたロジスティック回帰分析を行った。統計学的有意水準は5%で両側検定とし、欠損値がある項目は除外した。
5. 倫理的配慮：本研究は、横浜市立大学医学研究倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号：A201200015）。

(結 果)

642施設に質問紙を郵送し、回収された133部のうち121部を分析した（回収率20.7%、有効回答率91.0%）。

1. 対象者の背景

対象者の助産師経験年数は平均 17.9 ± 8.08 年、年齢区分は40歳台が57名（47.1%）と最も多く、

次いで50歳以上が31名（25.6%）、30歳台が30名（24.8%）、20歳台が3名（2.5%）であった。

2. 夫婦のコペアレンティングに関する助産師の認識と産前教育の実践度との関連

夫婦のコペアレンティングに関する認識得点（最低得点17点～最高得点85点の尺度）の平均は73.04±5.95点と全体に夫婦のコペアレンティングに関する認識が高かった。夫婦のコペアレンティングに関する認識合計得点と、夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実践合計得点とのSpearmanの順位相関係数は $\rho = -.167$ ($p = .073$) と有意な相関はみられなかった。

3. 夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実態

1) 夫婦のコペアレンティングの関する産前教育内容の構成因子（表1）

「夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実態」尺度13項目の探索的因子分析を行い、3因子12項目が抽出された。因子名は第1因子【夫婦間の課題の説明】、第2因子【夫婦のペアワークの実践】、第3因子【夫婦間コミュニケーションに関する情報提供】と命名した。12項目全体のCronbach's α 係数は $\alpha = 0.812$ であり、内的整合性は高かった。

2) 夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実践度の比較

産前教育内容の各因子項目の平均得点を合計し、項目数で割ったものを各因子の下位尺度得点として分析した結果、第3因子【夫婦間コミュニケーションに関する情報提供】（平均4.29±0.88点）が最も高く、次いで第1因子【夫婦間の課題の説明】（平均3.33±1.28点）、第2因子【夫婦のペアワークの実践】（平均2.0±1.28点）の順であった。

4. 夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実践度に影響を及ぼす関連要因（表2）

多変量解析の結果、夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実践度に影響を及ぼす個人要因は、「産前教育において夫婦一緒に育児指導群」（AOR=3.58、95% CI=1.32–9.74、 $p = .012$ ）、「夫婦への育児支援に関する学習経験あり群」（AOR=4.29、95% CI=1.06–17.45、 $p = .042$ ）の2変数が関連していた。多変量解析の結果、組織要因に関して有意な結果は得られなかった。

（成果・考察）

1. 対象者の背景

対象者の助産師経験年数は平均17.9±8.08年であり、年齢区分は40歳台が57名（47.1%）と最も多く、20歳台は3名（2.5%）であった。2020年の年齢階級別にみた就業助産師の構成割合は、40歳台が25.8%、30歳未満は21.2%であり（厚生労働省、2022）、本研究の対象者は全体に助産師経験の豊富な集団であったと予想される。

2. 夫婦のコペアレンティングに関する助産師の認識と産前教育の実態

1) 夫婦のコペアレンティングに関する助産師の認識と産前教育の実践度との関連

本研究の結果、助産師の夫婦のコペアレンティングに関する認識は高かったものの、認識得点と実践得点との間に有意な相関はみられなかったことから、助産師個人の認識が高いだけでは、夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実践度を高めることにはつながらないと示唆された。その理由として、現状の産前教育は妊娠期・分娩期に関する内容が多く、コペアレンティングに関する内容を提供する機会が少ないことが考えられる。したがって、今後は妊娠中から夫婦のコペアレンティングに関する情報提供や促進支援ができるよう、産前教育において産褥期・育児期に関する内容を増やしていく必要があると考える。

2) 夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実践度の比較

夫婦のコペアレンティングに関する産前教育内容の各因子の実践度の比較において、【夫婦間

コミュニケーションに関する情報提供】と【夫婦間の課題の説明】の実践度が高かった。先行研究より、児の誕生後に夫婦関係が悪化することが明らかになり（ベルスキー、ケリー、1994/1995；小野寺，2005）、この夫婦の危機は「産後クライシス」という言葉によって社会的にも認識されるようになった。夫婦関係はコペアレンティングと双方向的に大きな影響を与えており（Feinberg，2003）、夫婦間コミュニケーションを促進し夫婦関係を維持していくことは、コペアレンティング関係を良好に保っていく上で必要不可欠である。またコペアレンティングとは、夫婦が家事・育児を量的に平等に分担することが目的ではなく、その分担についての公平性や受容性、相互理解のプロセスに対する満足度が重要（Feinberg，2002）とされる。したがって、夫婦がコミュニケーションを通してお互いの考えを共有することは、双方が納得のいく家事・育児の分担や役割調整をしていく上で重要である。さらに夫婦関係に限らず、お互いの育児に関する批判の背景に「親役割観・育児観の違い」がある（清水，2020）ことや、伝統的な性別役割分業観が夫婦の協働感を低下させる（佐藤，2008）ことなど、夫婦間には育児に関する様々な課題が存在している。助産師はこうした夫婦の状況をふまえ、夫婦間のコミュニケーションや夫婦間の課題について産前から説明することを重視していると考えられる。

次に【夫婦のペアワークの実践】の実践度が低い結果となった。その理由として、両親学級や外来の個別指導の限られた時間の中で、コペアレンティングに特化した夫婦間のペアワークを実施するのが難しいという現状が考えられる。しかし助産師からの一方的な知識提供型の指導でなく、夫婦が家事・育児の役割分担について話し合う実践型の演習は、実際の育児のイメージ作りや、夫婦が共に主体的に育児に関与していく姿勢に繋がるため重要である。今後は、自宅でも夫婦が継続して活用できるようなコペアレンティングに関するコミュニケーションツールを提供し、産前から育児の方針の話し合いや夫婦の役割調整を積極的に促していく必要があると考える。

2. 夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実践度に影響を及ぼす関連要因

夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実践度に影響を及ぼす関連要因の1点目に、産前教育において夫婦一緒に育児指導している助産師ほど、夫婦のコペアレンティングに関する産前教育を実践している確率が高いことが示された。先行研究より、夫婦で出産育児準備を多く行った夫ほど、育児意図が有意に高まることが明らかにされている（池田，入山，2014）。また父親となる男性のみを対象とした産前教育プログラムでは、父親の仕事時間と育児・家事時間の調整に関する意識は変化したもの、産後の育児・家事行動を増加させるまでには至らなかった、としている（川口ら，2016）。したがって、夫自身が妻のサポート役でなく第一養育者であると認識すること、そして実際に夫婦のコペアレンティングが促進されるためには、夫のみを対象とするのではなく、産前から夫婦一緒に育児指導等の支援をすることが重要であると考ええる。

また関連要因の2点目に、夫婦への育児支援に関する学習経験がある助産師ほど、夫婦のコペアレンティングに関する産前教育を実践している確率が高いことが示された。先行研究より、講習や研修会の受講経験の有無、研修参加を通じた学習、知識の程度が看護実践に関連することが明らかにされている。（藤塚ら，2019；林，国府，2010；上村ら，2016；米田，2007）。したがって夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実践を高めるためには、助産師が学習経験をすることが重要であり、具体的な夫婦への支援方法についても学ぶ必要があると考える。今後は組織として、施設内での勉強会の開催や、外部の講習会や研修に参加できるように勤務を調整するなど、助産師が夫婦の育児支援に関する学習経験をえられるよう教育サポート体制の充実を図っていくことが重要であると考ええる。

表1 夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の内容：探索的因子分析

N=121

項目	因子負荷量		
	第1因子	第2因子	第3因子
尺度全体 ($\alpha=0.812$)			
第1因子：夫婦間の課題の説明 ($\alpha=0.815$)			
夫婦の育児に関するもめ事への対処方法について説明している	.868	-.096	-.072
夫婦のもめ事による児への影響を説明している	.802	.043	-.250
「男は仕事、女は家庭」といった伝統的性別役割分業観に縛られないことの重要性を説明している	.599	.004	.104
出産を機に夫婦関係が変化することについて説明している	.581	.064	.169
夫婦で共に育児をする際にどのような新たな課題があるのかを説明している	.466	.184	.180
第2因子：夫婦のペアワークの実践 ($\alpha=0.778$)			
育児の方針や役割調整について夫婦で話し合うペアワークを取り入れている	-.021	.842	.069
夫婦がお互いに感謝や愛情を伝えるペアワークを取り入れている	-.035	.778	.105
夫婦に出産後の育児を想定した場面のロールプレイを取り入れている	.105	.655	-.057
実際の夫婦の育児がイメージできるような動画を見せている	-.024	.501	-.224
第3因子：夫婦間コミュニケーションに関する情報提供 ($\alpha=0.609$)			
夫婦間のコミュニケーションの大切さを説明している	-.169	-.018	.811
夫婦間の具体的なコミュニケーション方法について説明している	.379	-.162	.467
夫婦で共に育児をすることの大切さを説明している	.184	.000	.427
回転後の負荷量平方和			
	3.294	2.372	2.428
因子間相関			
第1因子	1.000	.298	.610
第2因子		1.000	.247
第3因子			1.000

重み付けのない最小2乗法、プロマックス回転

Kaiser-Meyer-Olkin の標本妥当性 = .791 Bartlettの球面性検定: $p < .001$

表2 夫婦のコペアレンティングに関する産前教育の実践度の関連要因

N = 121

変数	多変量解析 (変数増加法)			
	偏回帰係数	p値	調整 オッズ比	95%信頼区間 (下限 - 上限)
産前教育において夫婦一緒に育児指導				
なし			1.00	
あり	1.275	.012	3.58	1.32 - 9.74
夫婦への育児支援に関する学習経験				
なし			1.00	
あり	1.457	.042	4.29	1.06 - 17.45

尤度比検定: モデル χ^2 値 $p = .005$ 、Hosmer-Lemeshow検定: $p = .958$ 、判別率: 65.0%

【学会発表・学会誌投稿】

- ・齊藤千秋, 飯田真理子, 竹内翔子, 篠原枝里子, 中村幸代. 乳幼児をもつ夫婦のコペアレンティング—国内研究の動向と課題—. 母性衛生. 2022, 62(4), 811-821. (予備研究)
- ・齊藤千秋, 飯田真理子, 竹内翔子, 篠原枝里子, 中村幸代. 夫婦のコペアレンティングに関する助産師の認識と産前教育の実態および関連要因の検討. 第36回日本助産学会学術集会, 2022年3月.
- ・齊藤千秋, 竹内翔子, 飯田真理子, 篠原枝里子, 中村幸代 (査読中). 夫婦のコペアレンティングに関する助産師の認識と産前教育の実態および関連要因の検討. 母性衛生.

脳動脈瘤の壁内微小環境と炎症機構

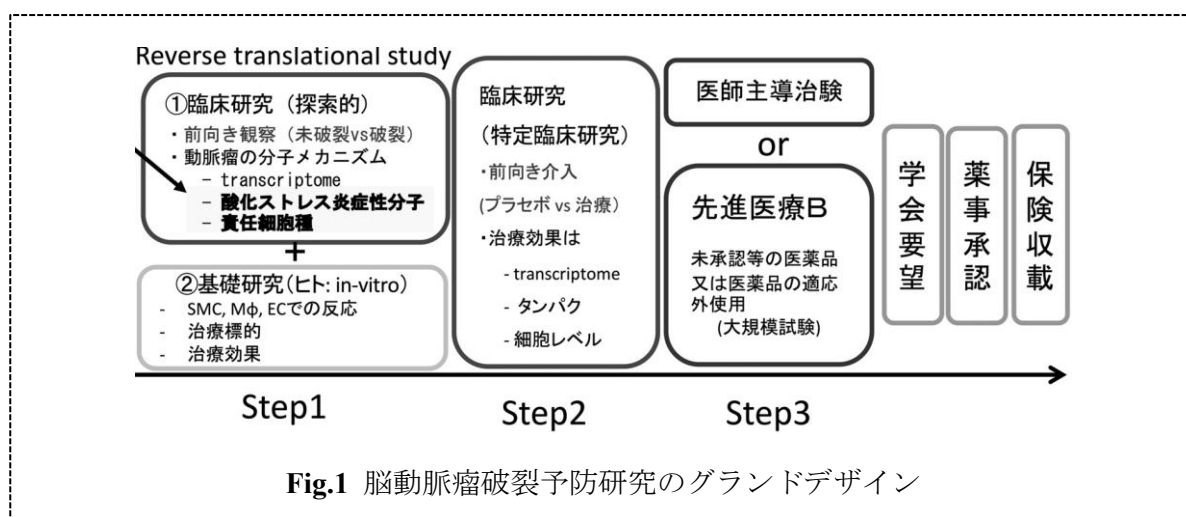
横浜市立大学 次世代臨床研究センター・脳神経外科

高瀬 創

(研究目的)

脳動脈瘤の破裂(くも膜下出血)は、若年でも高率に死亡と機能障害を呈する世界的重大疾病である。破裂後の病態や治療の研究が進む一方でその効果は限定的であることから、近年、破裂前治療(予防)の研究が注目されつつある。しかし、禁煙や降圧等のリスク因子管理による介入治療をもってしても年齢調整死亡率の減少は約 20%に留まったことを踏まえ(*JAMA Neurol*, 2019), 最近では動脈瘤の病態把握が効果的予防として重要視されている。特に流体力学の観点から動脈瘤局所の物理的圧環境の把握を試みる研究は隆盛を極めてい一方、圧変化に伴う分子的微小変化は、治療標的創出や物理的解析との相補的知見にも関わらず、これまで殆ど理解が進んでいない。

本研究では、脳動脈瘤の破裂に関して「治すから防ぐ」を実現する基盤となる研究を行う。ヒト脳動脈瘤検体の臨床検体を用いて、瘤の増大(壁の菲薄化)に関する分子病態の詳細把握を図る。特に、申請者が近年示した新たな神経炎症の概念(Takase et al. *Neurology*, 2020)を更に発展させ、血管壁の微小構造における細胞間結合と免疫担当細胞の相互作用に焦点を当てる。得られた動脈瘤の壁構造に対する障害経路は動脈瘤のRNA-seqの結果とともに細胞実験系で詳細に評価し(別計画, **Fig.1**), 予防的応用にむけた治療標的の最適解を探索し、将来的な脳動脈瘤破裂予防の展開に向けた大きな基盤研究とする。



(研究方法)

研究の全体像: 本研究課題は、脳動脈瘤増大の分子病態に基づいた新たな予防的治療開発を目

指す一連のtranslational studyのうち、Step1(探索的研究)のタンパク発現評価部分である(Fig.1). Step1では治療標的の分子機構と応用可能性の基盤確立を行い、Step2では小規模前向き介入臨床試験で安全性と効果を確認する。最終的には多機関RCTで治療効果を立証して、脳動脈瘤破裂の予防にむけた新治療の創出を目指す。

2020年、申請者らは血管内皮の接着結合由来分子を基軸とした新規の神経炎症機構を明らかにし、血管内皮-免疫細胞の相互作用が炎症反応を惹起して組織損傷に関与することを示した(論文4)。類似の相互作用はあらゆる脳損傷環境で生じている可能性があり、破裂により生命予後に大きく関与する脳動脈瘤は非常に重要な研究対象である。本研究は、申請者のclinician-scientistとしての背景を生かし、同時に確立した実験系を用いるため、大きな優位性をもって推進可能である。

研究内容：動脈瘤増大の微小病態と周辺分子環境の探索的把握を目的とし、症例数を限定して前向き観察研究を行う(n=6 x 2群を予定)。前方循環系の囊状動脈瘤に対して、未破裂群と破裂群で開頭クリッピング後の瘤サンプルを採取する。動脈瘤壁の非菲薄部・菲薄部・破裂部の3箇所空間的に区別し、それぞれを、免疫染色とRNA解析用に保存する。既報では、動脈瘤増大に酸化ストレスと炎症機構の活性化の関与が予想されるため、本研究では申請者らの先行研究を踏まえ、血管壁の細胞間結合と免疫担当細胞の相互作用に焦点を当てた動脈瘤組織のタンパク発現解析を行う。臨床研究の実施は「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(2021年7月1日施行)」を遵守し、患者情報の秘匿取扱いを徹底し、全てに患者保護を優先する。以上により、脳動脈瘤の破裂予防に関する革新的な治療アプローチの創出を目指す。上記の内容(単施設前向き介入試験:介入内容は「(再)破裂予防処置後の動脈瘤のサンプリング」)で当学の当該倫理委員会に倫理申請を予定した。

(結 果)

2021年11月、上記の研究内容を踏まえた課題をコンセプトシートにまとめ、当学における介入試験立案時の相談窓口である次世代臨床研究センターに提出した。申請に必要なコメントを受け、さらに研究チーム内だけでなく倫理審査事務局とも議論を重ねた。これらを全て反映した研究計画書を作成し、2022年2月に、研究課題「脳動脈瘤の増大・破裂に関わる微小環境解析：未破裂・破裂瘤サンプルを用いた探索的2群間比較試験」として当学「人を対象とする生命科学・医学系研究倫理委員会」に諮った(審査番号2021-2685)。しかしながら、万全の術中・周術期管理を行なっても、(再)出血予防処置後の動脈瘤切除であるため、動脈瘤サンプル採取による出血率増加や、出血した場合の因果関係の証明が難しい旨の指摘を受けた。

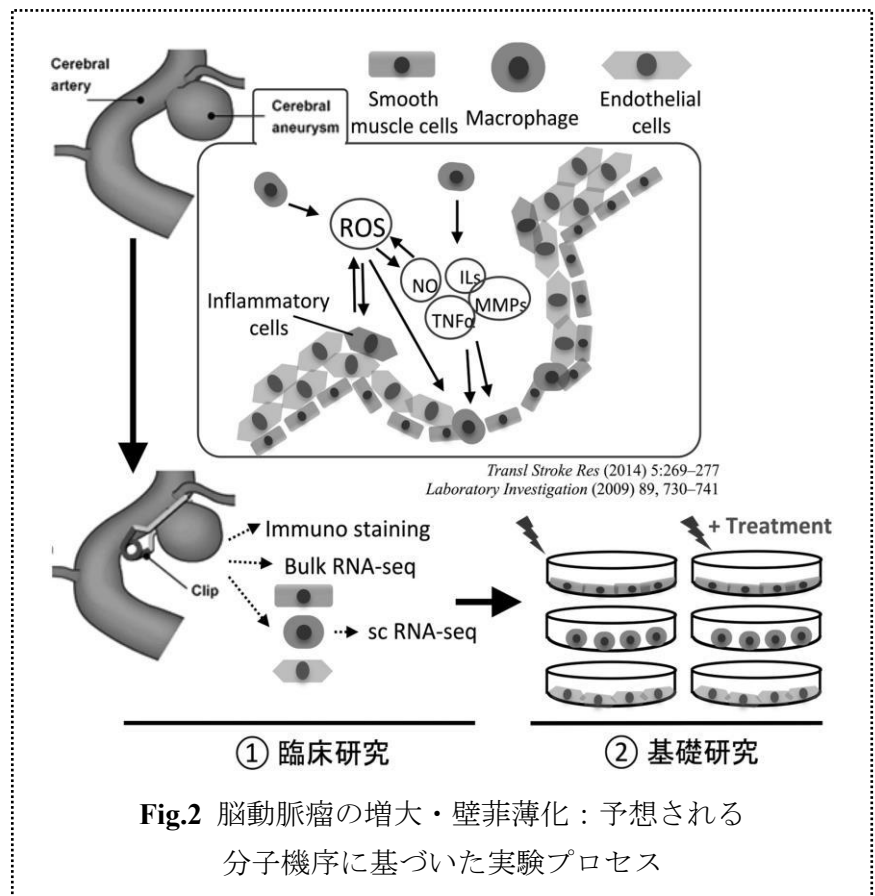
(成果・考察) 等

本研究は動脈瘤内分子変化の詳細な把握を目的としており、そのため RNA-seq (研究目的の参照) を行う必要性から新鮮なサンプル採取を検討していた。目的遂行のためには前向き研究の立て付けで研究を実施する必要があるが、上記の指摘により、直近での研究実施は困難となった。委員会からは後ろ向き観察研究での実施を勧められたが、

- ① 現段階で標本として保存されている嚢状動脈瘤症例を少量したところ極めて少数(2例、さらに標本の程度が不明)であること
- ② 前述の臨床的疑問を明らかにするためには新鮮標本の採取が必要であること
- ③ 後方視研究で一定の知見が得られようとも、結局出口戦略(将来的な臨床応用)を考えた場合には詳細の把握が必要で、やはり最終的には今回申請後不採択となった前向き研究が必要となることが高い確率で予想される。今回、前向き研究の実施に否定的であった委員会コメントは、後方視研究を行なって何らかの知見が得られようとも前向き研究の実施に向けて覆る種類のものではないため、前向きの動脈瘤サンプリングを行う研究実施は現実的ではないと思われること

以上を踏まえると研究アプローチの再検討が必要と考えられた。

Pubmed渉猟では、当該分野の原著は4報のみである。2019年、Landryらは、唯一未破裂と破裂動脈瘤での transcriptome 解析を行ない炎症と低酸素シグナルの破裂への関与を示唆した(*PLoS One*, 2019)。また、Aokiらは未破裂脳動脈瘤の増大にマクロファージの遊走が関与すると報告し(*Sci Rep*, 2019)、炎症性機構が動脈瘤の増大に重要である事を示唆した。これらの知見は本研究の方向性とまさに一致する一方で、破裂動脈瘤特異的な分析や、壁菲薄部に関連する詳細な



検討が課題であったため本研究を提案するに至った。

本研究では、上記(Fig.2)の①②のうち、①を中心として動脈瘤壁の空間的な解析を行なって動脈瘤内微小環境の変化の解明を目指す予定であったが、現在、②に重点を移した研究を実施すべく分子生物学的な解析を行う準備をしている。具体的には各種関連の(初代)培養細胞に虚血、酸化ストレスを加えることで動脈瘤破裂を模した分子環境を作成し、各種細胞種の反応性を観察する。細胞間の相互作用が疑われる場合には培養環境を検討のうえ共培養の系での反応性確認を行う。また①に予定していた動脈瘤サンプルは、実験動物を用いたin-vivo動脈瘤モデルから採取して②の結果と合わせて考察を行う。(主に細胞や組織の免疫組織学的染色、タンパク発現変動の解析となるため、蛍光染色やWestern blotting用の抗体を購入している)

以上、当初予定していた臨床研究部分の実施は困難となったが、それをin-vivo研究に置き換えつつ細胞を用いたin-vitro研究に主体を移すことで、動脈瘤壁の微小環境と炎症機構に関する知見の獲得を試みている。得られる知見は、将来的に未来の大きな臨床応用展開の基盤となるだけでなく、動脈瘤の物理的流体解析など幅広い関連分野との相互的研究促進への貢献も期待できる。究極的には、破裂脳動脈瘤患者数の減少により、世界の医療現場に革新的な結果をもたらす可能性も有すると考えられる。

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人横浜学術教育振興財団から横浜学術教育振興財団研究助成を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

心筋炎後拡張型心筋症の制御

横浜市立大学医学部講師

西井 基継

(研究目的)

心筋炎後拡張型心筋症制御に有用な治療ターゲットの同定を目的とする。

(研究方法)

全ての実験は、横浜市立大学動物実験倫理委員会における承認を受けており (license number: F-A-18-043)、同施設動物実験倫理指針を遵守し行われる。

(A) 健常6-8週齢Balb/C マウスにミオシン免疫により自己免疫性心筋炎モデル (experimental autoimmune myocarditis:EAM) を作成する。

(B) EAMに対する選択的プロスタグランジンE2 type 4 受容体 (EP4) 作動薬 (ONO-0260164, Ono Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka, Japan) 20 mg/kg 或いはその選択的拮抗剤 (CJ-42794, Ann Arbor, MI, USA) 30 mg/kg、溶媒の連日経口投与。

(C) 疾患表現型解析

心エコー (VisualSonics, Fujifilm, Tokyo, Japan) による心機能及び心室径の評価。テールカフ法による血圧評価 (MK-2000; Muromachi Kikai Co., Tokyo, Japan)。ヘマトキシリン・エオジン染色およびシリウス染色による心臓組織炎症および心臓線維化の評価。

(D) 免疫組織染色 ホルマリン固定した心臓切片に、EP4一次抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) を反応させ、the VECTASTAIN ABC Kitにて可視化した。

(D) RNAおよびタンパク抽出

(E) Gelatin Zymography によるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 活性解析
心臓組織ホモジネートのタンパク質分解活性は、製造元のプロトコールに従ってゼラチンザイモグラフィーで調べた (コスモバイオ株式会社、東京、日本)。サンプル (25 μ g/well) を、0.1%ゼラチンを含むゲルを用いて10%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。ゲルは酵素反応バッファー中で37℃、24時間インキュベートした後、50%メタノールと10%酢酸中の0.5% Coomassie Brilliant Blue R-250で1時間染色し、MMPマーカー (コスモバイオ株式会社) をマトリックスメタロプロテアーゼマーカーとして使用した。MMP-2, Pro-MMP-2, Pro-MMP-9 の活性型に相当する 62, 66, 92 kDa のタンパク質分解バンドをそれぞれ Photo scanner でスキャンした。

(F) RT-quantitative PCR/ウエスタンブロット

TGF-beta、レニン・アンジオテンシン系 (RAS)、内因性組織型MMP阻害因子 (Tissue inhibitor of MMP) およ膜型MMP (membrane type-MMP: MT-MMP) のRNA・タンパクレベルを解析する。

(結 果)

(1) EAMの心臓組織におけるEP4発現を確認

(2) EP4選択刺激剤の連日経口投与による健常マウスにおける血圧及び脈波数に対する大きな影響は確認されなかった。

(3) EP4選択阻害剤の連日経口投与は、EAMの急性期における心原性ショックを誘発した一

方、選択刺激剤の経口投与はショックを改善した。

(4) EP4選択阻害剤の連日経口投与は、心臓Rorgamma T 発現を増加させた。故に、EP4シグナルは、Th17T細胞免疫を制御することでEAM急性期における心筋組織炎症を抑制し、結果的に心原性ショックからの回復を促した。

(5) EP4選択刺激剤の連日経口投与は、選択的阻害剤投与と反対に、EAM慢性期の心筋細胞外マトリックス (ECM) の崩壊による心機能障害、心拡大および心臓線維化によって特徴づけられ特発性拡張型心筋症 (IDC) への進展を抑制した。

(6) EP4選択刺激剤の連日経口投与は、ECM崩壊に重要な心臓組織MMP-2活性を抑制した。

(7) EP4選択刺激剤の連日経口投与は、MMP-2活性を抑制するTIMPsの内TIMP3の発現を極端に抑制した。

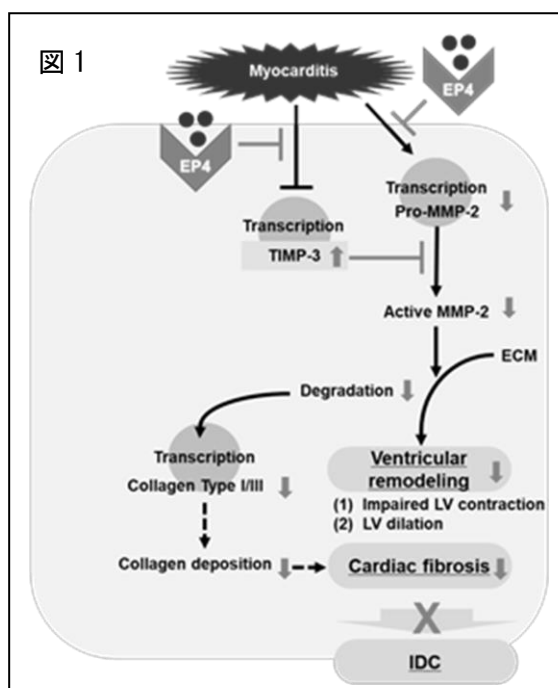
我々は、EAMを用いた解析により、心筋炎と引き続く心筋症におけるEP4経路の治療的意義とその分子機序を初めて明らかとした。心筋細胞外基質の過剰な分解亢進は、特発性拡張型心筋症の主病態である心室再構築と線維化を誘導することが知られており、この病的な基質分解の分子機序において持続的なMMP2活性が重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、EP4作動薬は、TIMP3の発現を増加し、MMP2の活性を制御することで、過剰な心筋細胞外基質分解を抑制し、特発性拡張型心筋症の発症を抑制する可能性が示された (図1)。

(考察)

EP4受容体刺激薬が急性心筋炎の治療に有効であることは、ラットの心筋炎モデルを用いた過去の報告で明らかにされている。

しかし、我々の知る限り、急性心筋炎後のDCM発症に対するEP4受容体刺激薬の治療効果とその分子機構を明確にした報告はない。心筋炎からDCMへの表現型の移行を研究できるBALB/cマウスEAMモデルのデータから、EP4刺激薬の継続投与が心筋炎時の血行動態の悪化を伴う心機能不全を改善するだけでなく、MMP-2活性化の抑制と関連して心筋炎に罹患した心臓をDCM発症から保護することを初めて明らかにした。

EP4シグナルは、実験的自己免疫性脳脊髄炎において、免疫時に末梢リンパ節でのTh17細胞の生成を促進する一方で、脳へのTh17細胞の浸潤を抑制するという二重の免疫機能を持つことが示されている。我々は、EP4受容体の薬理的遮断が、EAMマウスの心臓において、EAM誘導性Th17特異的転写因子であるROR γ tのタンパク質発現を増加させることを見いだした。この事実は、EP4受容体刺激がTh17 T細胞の心筋への浸潤を抑制することを意味すると考えられる。これと同様に、Ngocらは、EP4刺激剤がラットの心筋炎モデルにおいて、心筋へのT細胞浸潤を抑制し、心機能と血行動態に正の影響を与えることを報告している。この抗炎症作用は、急性心筋炎時の心不全の改善に寄与し、心筋炎の重大な合併症である心原性ショックからの回復につながると考えられる。さらに、EAMマウスの血管における



EP4の発現と血管機能への影響を評価することにより、EP4刺激薬が血行動態の悪化に直接作用することを明らかにできるかもしれない。

EP4受容体刺激を継続すると、EAMマウスの心筋線維化およびLVリモデリングが抑制された。心筋炎では、浸潤した細胞を介したIL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1などの炎症反応が線維化過程を開始させることが示されている。従って、我々や先行研究で示されたように、EP4刺激薬の細胞浸潤抑制作用は、EAMマウスの心筋コラーゲン沈着を軽減させる可能性がある。あるいは、MMPによる心筋ECMの消化は、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1などの炎症反応、マトリキン、インスリン様成長因子、線維芽細胞成長因子などの線維化プロセスに重要な生理活性因子をマトリックス成分から放出することによっても心室リモデリングのみならず線維化につながる。我々は、EP4刺激剤がEAMマウスのMMP-2の持続的な活性化を抑制することを見出した。従って、MMP-2の不活性化は、EP4刺激剤の抗線維化効果の重要な分子機構である可能性がある。我々のデータは、ONO-0260164による処置が、MMP-2活性化を厳密に制御するMT1-MMPおよびTIMP-3/4の遺伝子発現に影響を与えることを示した。特に、EP4とTIMP-3との関連は解明されてこなかったが、我々の検討において、EAMマウスの心臓ではTIMP-3の発現が低下しており、ONO-0260164の投与により、その低下が回復することを見出した。これまで、MT1-MMPとTIMP-3/4が心筋疾患の進行に因果関係があることが証明されている。これらの知見から、心筋炎によるTIMP-3-MMP-2制御経路の破綻とMMP-2の発現増加は、心筋ECMの分解を引き起こし、心室リモデリングを促進し、I型およびIII型コラーゲンの新規合成を刺激すると考えられる一方、EP4受容体を刺激してMMP-2の発現を抑制し、TIMP-3の発現を正に制御することは、MMP-2の心筋ECMを分解する能力を奪うことにより、心筋炎後のDCMを予防すると考えられる。我々のデータは、心筋炎後の心室リモデリングと線維化に関する新しいメカニズム的洞察を提供し、心筋炎後のDCMを予防するための治療標的としてのEP4受容体に新たな光を当てたものであった。

EAMマウスのエフェクター期における14日目から21日目までの心臓EP4発現の急激な上昇とその後の持続性は、ONO-0260164を14日目から継続投与することでEAMマウスの疾患進行を抑制することを裏付けている。故に、ヒト急性心筋炎患者へのEP4刺激薬の投与は、心原性ショックを特徴とする劇症型への進行だけでなく、その後のDCMの発症を防ぐ治療効果が期待できる。

培養ヒト大動脈平滑筋細胞または平滑筋細胞とマクロファージを含むヒト腹部大動脈瘤組織培養物を用いた以前の研究では、ONO-AE1-329によるEP4刺激はMMP-2活性化を増加させ、EP4拮抗薬のONO-AE3-208はその活性化を減少させた。これらの観察は、我々の結果とは対照的であった。しかし、心筋線維芽細胞を用いた別の研究では、EP4アゴニストは、MMP-2の活性化およびその主要な活性化因子であるMT1-MMPの発現を減少させた。さらに、心筋細胞におけるEP4受容体を欠く高齢マウスは、左心室においてMMP-2およびMT1-MMPの発現の増加と相まって、拡張型心筋症の表現型を示す。EP4受容体の刺激は、細胞や臓器の種類によって、異なる表現型をもたらす可能性がある。

EP4選択的アゴニストの長期投与は、心肥大や脂質異常症を引き起こす可能性がある。健康なマウスを用いた *in vivo* 実験では、ONO-0260164を50 mg/kg/dayで49日間継続投与すると、LVの寸法よりもLV壁の厚さが増加し、LV mass indexが有意に増加した。EP4受容体の活性化は、PGE2を介した心肥大に寄与し、心筋細胞の断面積を大きくするこ

とを特徴とすることが、いくつかの報告で示されている。さらに、我々の研究では、高用量の継続投与により体重も増加した。これは、EP4欠損動物モデルマウスが野生型マウスと比較して、高脂肪食負荷により体重増加が遅く、脂肪率が減少したという以前の報告と一致している。PGE2-EP4 シグナルの活性化は、心機能、構造、脂質代謝を含む複数の生化学的影響を及ぼす可能性があるため、疾患に対する適切な治療用量を設定することが非常に重要である。

以上、EAMマウスを用いた本研究により、MMP-2の持続的な活性化による心筋ECM代謝が心筋炎後の心室リモデリングの基盤となる重要かつ新規な分子機構であること、選択的EP4受容体刺激薬の継続投与が心筋炎時の心機能不全を救済し、心筋炎後の心室リモデーションや心線維化に対して、TIMP-3-MMP-2の制御経路に関連して強固な予防効果を示すことがはじめて明らかにされた。EP4受容体刺激薬は、炎症性心疾患による心不全や心筋梗塞を予防する新しい戦略の一部となる可能性がある。

(成果)

本研究成果は、ヒト心筋炎患者においてEP4選択的作動薬の臨床研究を推進していくための研究体制を構築し、若年者における重症心不全に対する治療法の確立に貢献する。

本研究成果は、国際論文掲載にて広く世界的に発信された。また、国内においても多数のメディアに取り上げられ、多くの患者から問い合わせを頂いた。

成果論文

Takakuma A, Nishii M, Valaperti A, Hiraga H, Saji R, Sakai K, Matsumura R, Miyata Y, Oba N, Nunose F, Ogawa F, Tamura K, Takeuchi I. Prostaglandin-E2 receptor-4 stimulant rescues cardiac malfunction during myocarditis and protects the heart from adverse ventricular remodeling after myocarditis. Sci Rep. 2021 Oct 26;11(1):20961. doi: 10.1038/s41598-021-99930-5.

メディア

- (1) 日本経済新聞
- (2) Medical Tribune
- (3) 医療NEWS
- (4) 沖縄タイムス
- (5) 時事メディカル

(研究目的)

近年の小児がんの飛躍的な治療成績向上は、成人含めすべてのがん治療の中で最も成功した取り組みの1つとして認識されている。しかしながら、小児急性骨髄性白血病(AML)の症例の長期生存率は60%程度であり小児がんの中で治療に難渋するがんの1つであり、また成人AMLの治療成績は極めて不良である。

申請者はこれまでに再発難治小児AMLの網羅的ゲノム解析を通じて、*PRDM16*、*MECOM*遺伝子の高発現が小児AMLの難治化に寄与する重要な分子異常であることを報告してきた。*PRDM16*高発現の再発難治小児AMLでは、高率にエピジェネティクス制御に関わるゲノム異常が同定されることから、そのメカニズムを解明することは、難治小児AMLのさらなる病態の解明及び治療法の開発につながることを期待される。さらには、*PRDM16*遺伝子自身の発現をsiRNAで落とすことで、白血病細胞の幹細胞性が解除され、既存の抗がん剤の効果が回復することを確認し、核酸医薬の開発を行いたいと考えている。

(研究方法)

(1) ATAC-seq

ATAC-seq(Assay for Transposase-Accessible Chromatin Sequencing)は、トランスポゼースを利用して、シーケンス用のプライマーをオープンクロマチン領域に挿入し、次世代シーケンサーを用いて網羅的にオープンクロマチン領域を決定する手法である。オープンクロマチン領域、すなわち活性化領域を同定することで、エピゲノムな変化を検出するとともに結合している転写因子を同定したり、強調して白血病化に寄与していると考えられる遺伝子群の抽出が可能となる。本研究において5例で実施する。

(2) CHIP-seq

PRDM16 に対する抗体を利用して、CHIP-seq を施行する。PRDM16 が下流のシグナルとして、どのような遺伝子に作用しているかを検証する。

(3) プロテオーム解析(RIME 法)

*PRDM16*の近傍に存在する共役因子を同定する目的で、Rapid immunoprecipitation mass Spectrometry of endogeneous proteins (RIME)法により、PRDM16に対する抗体を用いてプロテオーム解析を実施する。RIME法による解析により、転写因子相互作用因子および共役因子を同定を試みる。

(4) PRDM16に対するsiRNA

*PRDM16*遺伝子は核内転写因子として機能し、AML細胞において幹細胞性の維持、細胞増殖に関与していることがこれまでの研究で明らかとなっている。この幹細胞性の維持機構が各種既存の抗がん剤(Ara-C、DNR等)に対する耐性に関与していると考えられるため、siRNAを用いて*PRDM16*遺伝子の発現を低下させることで、既存の抗がん剤への効果を増強させることが可能かどうかを検討したいと考えている。慶応義塾大学谷口博昭先生のご協力のもと、*PRDM16*に対するsiRNAを設計する。一方、HEK293T細胞株に対して遺伝子導入により*PRDM16*を過剰発現させた細胞株を作製し、RNAi活性について検証を行う。

(結 果)

(1) ATAC-seq

ATAC-seqにて、*PRDM16*高発現遺伝子AML群ではプロモーター領域がオープンとなっていることを突き止め、同領域のDNA低メチル化とあわせ、*PRDM16*の活性化によりAMLの難治化に寄与していることを証明した(図1)。

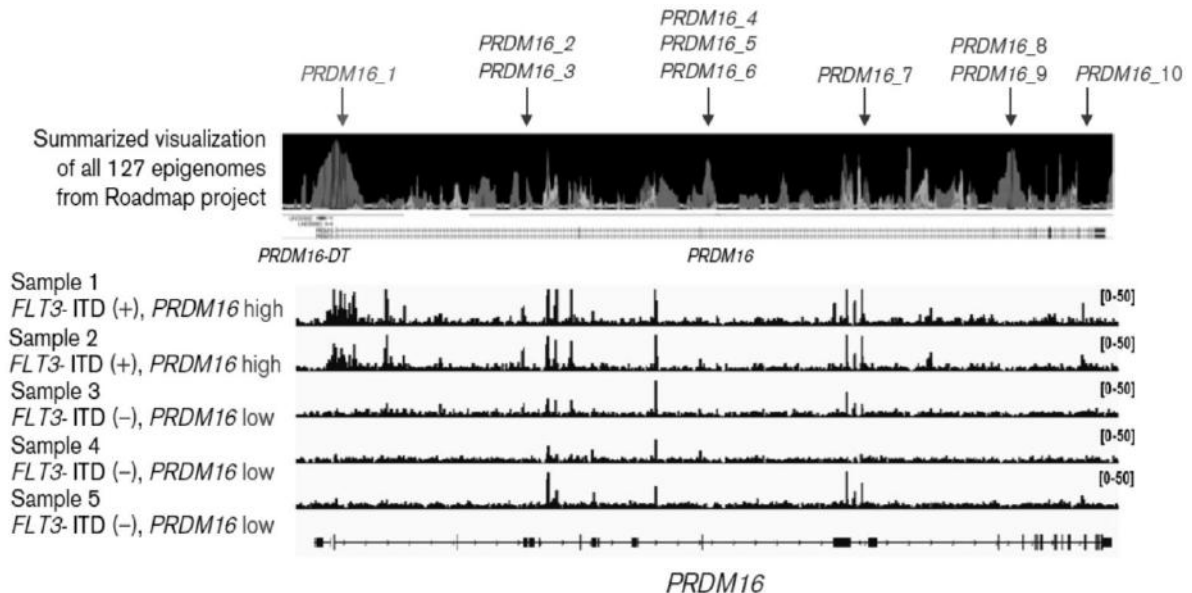


図1. 遺伝子異常に基づいた*PRDM16*遺伝子のメチル化状態とオープンクロマチン領域

また、*PRDM16*高発現AMLでは*PRDM16*のgene body自体もクロマチンがオープン状態になっており、特に抑制性ポリコームとの結合領域に一致して開存が見られた(図1)。しかしながら、メチル化解析の結果からはこの領域は高度にメチル化されており、*PRDM16*高発現が抑制性ポリコームとの結合を阻害することで、*PRDM16*発現が高値で維持されているものと考えられた。

(2) CHIP-seq

PRDM16 高発現である *NUP98-NSD1* 陽性 AML 症例の検体を用いて、CHIP-seq を施行した。その結果、*SKI*、*RUNX1* 等の既知のがん関連遺伝子に加え、複数の新規候補遺伝子を同定した(図2)。今後、Western blotting 法にて標的遺伝子の検証を行う。

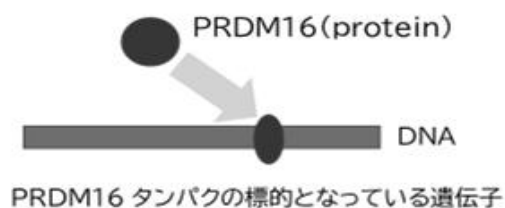


図2. PRDM16 の標的遺伝子の同定

(3) プロテオーム解析(RIME 法)

転写因子の DNA への結合は遺伝子調節の中心的なメカニズムの一つであるが、転写因子は、単独で作用することではなく、複合体として機能していることが多い。つまり関連する共役因子と結合して適切な遺伝子発現プロファイルを導いているものと考えられる。よって、PRDM16 の共役因子を同定することは間接的に PRDM16 の働きを抑えられる可能性がある。現在、得られた遺伝子リストに対して、重要と考えられる遺伝子の絞り込みを行い、標的となる遺伝子の同定の検証を行っている。

(4) PRDM16 に対する siRNA

small interfering RNA (siRNA; 低分子干渉RNA) は2塩基突出した3'末端をもつ片側21塩基長程度の2本鎖RNAで、一方のRNA鎖が標的遺伝子のmRNAと相補的に塩基対合することで機能を抑制する。siRNAはガイド鎖(標的mRNAと塩基対合するRNA鎖)、シード領域(ガイド鎖の5'末端から2~8番目の領域で標的mRNA認識に重要)からなり、RNAi活性はsiRNA配列に大きく依存する。また、シード領域は短い配列のため相補的配列を有する多数のmRNAと相互作用するため、意図しないmRNAの翻訳抑制や分解を誘導してしまう可能性(オフターゲット効果)がある。その回避方法として、オフターゲット効果の弱いsiRNA配列を設計するか化学修飾(2'-OMe修飾など)をする方法が知られている。図2に5組のsiRNA配列(OMe修飾なし、あり)によるPRDM16の抑制効果を示す(図3)。

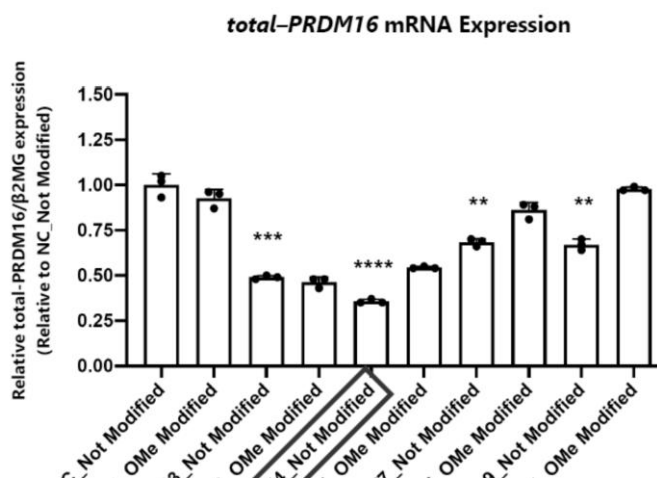


図3. siRNAによるPRDM16の発現抑制効果(左から5組の異なった配列を示す;各組の左がOMe修飾なし、あり)

今回、接着細胞を用いた5組のsiRNA実験により、最大で約70%程度のPRDM16発現低下効果が見られた。今後は、このsiRNAを用いて、浮遊系の白血病細胞株を用いてsiRNA実験を行う予定である。

（成果・考察）等

これまでに施行していた網羅的DNAメチル化解析の結果とあわせ、ATAC-seqによりPRDM16高発現症例ではPRDM16遺伝子自身がクロマチンからオープンとなっていることを見出した。PRDM16高発現症例では低発現症例に比べ、プロモーター領域のみ低メチルとなっており、一方でPRDM16遺伝子全長に渡って高度にメチル化され、特にポリコム遺伝子群との結合部位のメチル化が顕著であり、interactionが阻害されている可能性を見出した。ポリコム遺伝子群はHOX遺伝子群に作用し、幹細胞制御にかかわる重要な遺伝子群である。また、PRDM16抗体を用いたCHIP-seqの結果からは、SKI、RUNX1といった複数の既存の骨髄系腫瘍の発症・進展に関わる遺伝子に加え、新規の標的遺伝子候補を複数同定し、現在Western blot法にて検証を進めている。

転写因子のDNAへの結合は遺伝子調節の中心的なメカニズムの1つであるが、転写因子は単独で作用することは少なく、しばしば複合体として機能している。つまり、関連する共役因子(コファクター)と結合して遺伝子調節が行われている。今回、Rapid Immunoprecipitation Mass Spectrometry of Endogenous Proteins (RIME)法を用いて、転写因子相互作用因子および共役因子の候補を見出し、その同定を進めている。PRDM16は核内転写因子として機能し、AML細胞において幹細胞性の維持、細胞増殖に関与していることがこれまでの研究で明らかとなっている。この幹細胞性の維持機構が各種既存の抗がん剤(Ara-C、DNR等)に対する耐性に関与していると考えられるため、siRNAを用いてPRDM16遺伝子の発現を低下させることで、既存の抗がん剤への効果を増強させることが可能かどうかを検討中である。

開発を目指す核酸医薬は、PRDM16 分子に対するキメラ型 siRNA とナノキャリアーから構成される化合物である。東京大学で開発されたキメラ型 siRNA は高い安全性にを有する特許出願技術である。この核酸ナノキャリアーである分岐型 PEG-ポリオルニチンブロックポリマー(GL2-800) は、核酸と単分散(均一の粒形分布)を示す安定な複合体を形成し、高い安全性、優れた血中滞留性とがん組織への高い集積性を示す。すでに PRDM14 分子に対する核酸医薬であるキメラ型 siRNA は乳がん細胞で形成される腫瘍サイズの縮小および肺の転移巣形成の抑制が認められており、現在、がん研有明病院で医師主導治験が行われ、重篤な有害事象をきたすことなく安全に遂行されている。

PRDM16分子に対する核酸医薬の開発に成功すれば、小児のみならず、多くの成人AML患者が恩恵を受けられることとなり、白血病治療に大きな変革をもたらす可能性があるものと考えられる。

神奈川県内病院における術前禁煙指導内容と 看護師の背景に着目した実態調査

横浜市立大学大学院 医学研究科看護学専攻 博士前期課程

伊藤 梨絵

(研究目的)

全身麻酔による手術を受ける患者は、呼吸器合併症、循環動態の変調などの様々な合併症リスクを抱えており、それらのリスクの原因の1つに喫煙がある。術前禁煙について、周術期禁煙ガイドラインでは「可能な限り長期の術前禁煙は周術期合併症をより減少させる」などが示されている(公益財団法人日本麻酔科学会, 2015)。一方で、2017年の周術期管理センターにおける調査では、術前禁煙がされなかったために手術を延期した症例が報告されている(日野幸一ら, 2019)。このように国内において手術日の時点で術前禁煙ができていない事象が起きており、改善すべき課題である。術前禁煙を達成する上で術前に実施される禁煙指導が重要であり(守正浩ら, 2012)、術前禁煙指導はプライマリケア医、外科系医師、麻酔科医、看護師などすべての医療従事者の協力が重要である(公益財団法人日本麻酔科学会, 2015)。なかでも、看護師は教育的役割を持つとされているため(Nancy I et al, 1996)、術前禁煙指導を実施する上で重要な役割を担っていると考えた。しかし、看護師の術前禁煙指導の実施率を示した研究はあるが(高坂梓ら, 2012)、看護師が行う術前禁煙指導の実態については明らかになっていない。全身麻酔による手術を受ける患者が1日でも早く禁煙を開始し、継続できるような術前禁煙指導を普及させるためには、どのような看護師がどのように術前禁煙指導を行っているか、その実態を明らかにする必要がある。

周術期禁煙ガイドラインや先行研究では、標準的な禁煙介入の方法として提唱された5Aアプローチ(Ask: 初診時に必ず喫煙の有無を尋ねる、Advice: 喫煙者には禁煙を強く指導する、Assess: 禁煙の意思があるかを評価する、Assist: 禁煙を援助する、Arrange: フォローアップの予定を設定する)と共にAARアプローチ(Ask、Advice、Refer: 専門機関へ紹介をする)、AACアプローチ(Ask、Advice、Connect: 専門機関へ連絡する)が推奨されている(公益財団法人日本麻酔科学会, 2015 Amir.Y, 2016)。AARアプローチは、5Aアプローチと比較すると、禁煙介入を専門としない医療者であっても現実的に実施可能な方法とされている(公益財団法人日本麻酔科学会, 2015)。また、AACアプローチは、禁煙支援を実施する患者数を増加できる、より有効な方法とされている(Amir.Y, 2016)。そこで本研究では、周術期禁煙ガイドラインや先行研究で推奨される術前禁煙指導方法の実施について、および指導に関わる看護師の背景についての実態を明らかにすることを目的とした。

(研究方法)

- 1.対象: 日本麻酔科学会に登録されている神奈川県内の病院90施設において、全身麻酔による手術が決定した入院前患者に対して術前禁煙指導を実施する全ての看護師を対象とした。
- 2.調査方法: データ収集は、自作の無記名自記式質問紙を用いて実施した。各施設の看護部責任者に調査依頼書面を送付した。同意が得られた施設へ質問紙を郵送し、当該対象者へ配布した。対象者へは、説明文書を配布し、質問紙の同意欄への記入と返送をもって同意取得とみなした。
- 3.調査内容: 推奨される術前禁煙指導の実施については5Aアプローチ、AARアプローチの

「Refer」、AACアプローチの「Connect」の計7項目の実施状況を、「常に実施する」「よく実施する」「時々実施する」「全く実施しない」の4段階リッカート尺度を使用し調査した。また、指導マニュアル、パンフレットの有無とそれらの使用状況について調査した。指導に関わる看護師の背景として、基本属性、術前禁煙に関する知識(知っている、少し知っている、あまり知らない、全く知らないの4段階リッカート尺度を使用)、自己効力感(一般セルフエフェカシー(GSES))を調査した。

4.分析方法:調査項目は、統計解析ソフトSPSS version28.0を使用し、各質問項目別に単純集計を行った。

5.倫理的配慮:本研究は、公立大学法人横浜市立大学「人を対象とする生命科学・医学系研究倫理委員会」の承認を得て実施した(承認番号220500055)。

(結果)

1. 同意取得率と回収率

27施設の看護師329名に質問紙を配布し、有効回答145名(有効回答率63.0%)を分析対象者とした。

2. 推奨される術前禁煙指導の実施

推奨される術前禁煙指導方法の実施状況について図1に示す。「常に実施する」「よく実施する」と回答した看護師を合計すると、5Aアプローチの「Ask」は91.7%、「Advice」では66.9%、「Assess」53.1%、「Assist」2.8%、「Arrange」0%であった。禁煙介入を専門とする部署へ連携するAARアプローチの「Refer」は3.5%、AACアプローチの「Connect」では1.4%であった。術前禁煙指導マニュアルが「ある」と回答した看護師は22.9%であり、そのうち、指導にマニュアルを使用していたのは81.8%であった。パンフレットについては、「ある」と回答した看護師は64.6%、そのうち、指導にパンフレットを使用していた看護師は82.8%であった。

3. 指導に関わる看護師の背景

3-1 対象者の基本属性

対象者の性別は、男性4名(2.8%)女性140名(97.2%)、年齢は40歳代が最も多かった。経験年数の中央値は20.0(四分位範囲13.0-25.0)であり、外来に所属していた看護師が55.9%と半数以上を占めており、禁煙外来に所属していた看護師は0%であった。術後看護を行う病棟の経験があった看護師は75.7%であった。周術期に関する資格取得をしていない看護師は82.7%、勉強会を受講したことがない看護師は69.9%であった。

3-2 術前禁煙に関する知識

1) 推奨される術前禁煙指導に関する知識

推奨される術前禁煙指導に関する知識を図3に示す。「Ask」を「知っている」と回答した看護師は、79.0%であった。禁煙を専門とする部署へ連携する項目を「知っている」と回答した看護師は「Refer」では29.4%、「Connect」は27.3%であった。

2) 術前喫煙リスクに関する知識

術前喫煙リスクに関する知識について図2に示す。術前喫煙リスクに関する知識11項目のうち、80%以上の看護師が「知っている」と回答した項目は5項目であった。60~80%程度の看護師が「知っている」と回答した項目はその他の5項目であった。15%の看護師しか「知っている」と回答しなかった項目は「偽関節形成の増加」の1項目のみであった。

3-3. 自己効力感(GSES)

GSES (16点満点) の5段階による判定では、「非常に低い」10.5%、「低い傾向」30.1%、「普通」29.4%、「高い傾向にある」25.9%、「非常に高い」4.2%であった。

図1 推奨される術前禁煙指導実施状況

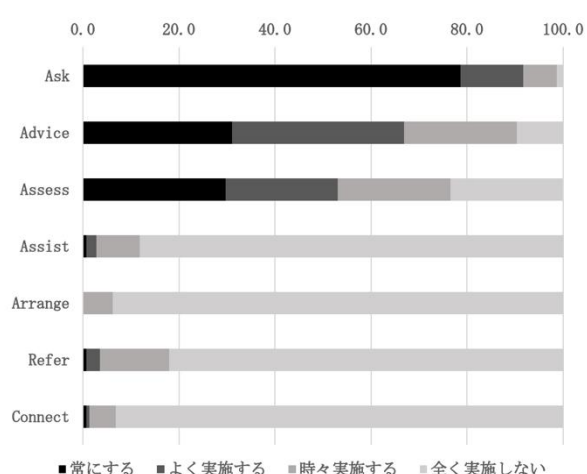


図2 推奨される術前禁煙指導に関する知識

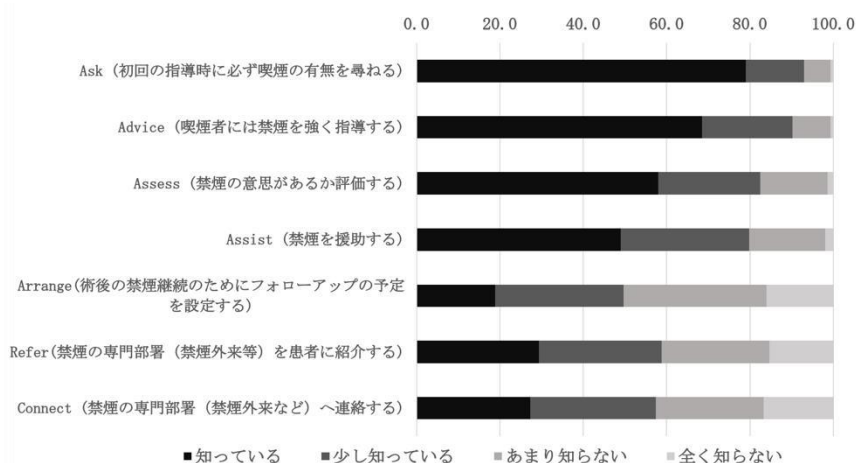
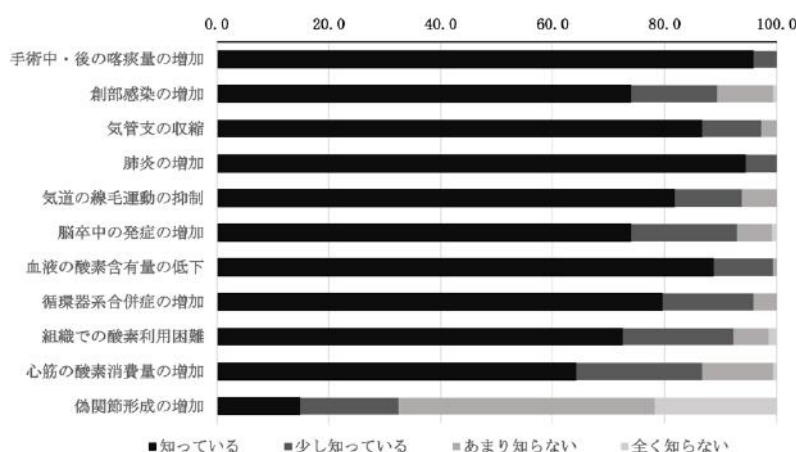


図3 術前喫煙リスクに関する知識



(成果・考察) 等

① 推奨される術前禁煙指導の実施に関する実態と指導する看護師の背景

推奨される術前禁煙指導である「5Aアプローチ」「AARアプローチ」「AACアプローチ」の実態としては、共通している「Ask」は91.7%「Advice」は66.9%実施されていたが、その他の項目の実施率は非常に低かった。術前禁煙指導を実施している看護師には、禁煙指導を専門とする禁煙外来看護師は含まれていなかったことから、周術期禁煙ガイドラインや先行研究において近年推奨されているAACアプローチが適していると言える

(Amir, Y, 2016)。医療者が禁煙外来に直接連携する「Connect」の実施率を改善することによって、患者の自発的な行動の有無に左右されず術前禁煙につなげることが可能となる。

指導の実態として、マニュアルが「ない」と回答したのは37.5%、「わからない」と回

答した看護師は39.6%を占めていた。また指導を実施していた看護師は半数以上が外来看護師であった。外来看護は、限られたスタッフの人数で多岐にわたる業務を迅速に遂行しなければならない(楠葉ら, 2010)。そして、術前患者に関わる外来看護師に対し、禁煙支援マニュアルを作成した結果、煩雑な外来業務の中でも短時間で均一な禁煙支援が行え、外来から禁煙外来への紹介人数が増加したことが示されている(松本夏子ら, 2018)。今回の結果では、術前禁煙指導マニュアルの作成が少なく、周知が十分でないことが示された。外来看護師による術前禁煙指導において有用とされる指導マニュアルの作成と周知が必要であると考ええる。

② 術前禁煙指導マニュアルの方向性

次に、マニュアル作成の方向性について考察する。術前禁煙指導を実施する看護師の背景として「推奨される術前禁煙指導に関する知識」について、「Ask」「Advice」を「知っている」と回答した看護師は60%以上であったのに対し、禁煙介入を専門とする部署へ連携する「Refer」「Connect」の項目は30%以下と不十分であった。また、喫煙患者は術前禁煙指導の実施により周術期喫煙リスクの認知度が向上し、禁煙達成される(Ashley R. W, 2013)。そこで、指導を実施している看護師が「術前喫煙リスクに関する知識」を持っているか検証したが、多くの看護師が知識を有していた。自己効力感については、「非常に低い」「低い傾向にある」の割合が40%を超えていた。また、周術期や禁煙の資格や、勉強会の受講経験などがない看護師が多く含まれていた。GSESにて測定した自己効力感の先行研究では、仕事のモチベーションや多重課題に関する困難感に影響があると示されている(中西順子ら, 2008; 小口翔平ら, 2020)。そのため、資格取得や勉強会参加などの積極的に知識を得る行動を促すよりも、シンプルな内容の指導マニュアルを活用する教育体制を整えることが有用と考える。マニュアルでは、指導を行う看護師の知識が不十分であった「Connect」の項目に重点を置き、周知することで禁煙介入を専門とする部署による介入へつなげることができる。そのことにより、全身麻酔による手術を受ける患者が1日でも早く禁煙を開始、継続できる術前禁煙指導へ改善できる可能性ある。今後は、「Connect」の実施を目指すと同時に、「Connect」に必要な禁煙外来における受け入れ体制や術前禁煙に対応したシステムの構築も課題となる。

(結論)

神奈川県内の術前禁煙指導に関わる看護師は、外来看護師が半数以上を占めており、禁煙指導の専門ではない部署に所属していること、また推奨される「AACアプローチ」の「Connect」の知識が不十分で、実施率も非常に低かったこと、指導マニュアル作成や周知が十分でないことなどの実態が明らかになった。本研究の結果から、術前禁煙指導は「AACアプローチ」の「Connect」実施を促進する必要性が示唆された。そのために、推奨される術前禁煙指導のうち、特に「Connect」に着目し、マニュアルを作成することが望まれる。また、作成にとどまらず、マニュアルの周知を行うことで、推奨される術前禁煙指導の普及につながる事が考えられる。

頸髄慢性圧迫モデルラットに対する顆粒球コロニー刺激因子 髄注療法の有効性の検討

横浜市立大学医学部博士後期課程

横井 育宝

(研究目的)

交通事故などによる脊髄損傷は、四肢麻痺や膀胱直腸障害など生涯にわたる障害をもたらす、社会復帰が困難となる例が少なくない。本邦において脊髄損傷患者は現在15万人以上おり、毎年5000人の脊髄損傷患者が新たに発生している。脊髄損傷治療において近年、再生医療に期待は寄せられているが、実臨床で脊髄を回復させる有効な治療法は未だ見いだせていない。一方で、急性脊髄損傷に対して造血サイトカインの効果が注目されており、本邦では2015年から顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)静注療法の第III相臨床試験(参加19施設)が行われた。私達も慢性脊髄圧迫モデルラットを用いて、G-CSFの皮下投与で脊髄症改善の高い効果を見出し、論文を発表した。しかし一方で、皮下注射により明確な効果を発揮するためにはG-CSFは臨床で適用される最大量以上の高用量の投与が必要となる。G-CSFは分子量が大きく(G-CSF 19.4kD)、血液脳関門を介した髄液移行性は乏しいためである。これは副作用も看過できない量であり、そこで今回当グループでは、頸髄慢性圧迫性脊髄症モデルラットに対して直接髄腔内にG-CSFを投与することで効率的に脊髄損傷部位に薬剤を到達させ、効率的に神経保護作用を誘導し、それぞれの薬剤の治療効果と適切投与量を判定することを目的とする。

(研究方法)

頸髄慢性圧迫モデル及び凍結急性頸髄損傷モデルラットを作成した後、経脳室的にG-CSFの持続髄注投与を行い、慢性及び急性脊髄損傷に対するG-CSF髄注療法の有効性と安全性を明らかにする。

●頸髄慢性圧迫ラットモデルの作成(Ann Neurol,2004)

ラット頸髄慢性圧迫モデルを作成する。Wister ratの第5,6頸椎椎弓下に0.7mm厚の吸水膨張性ポリマー(アクアブレン-C^R)を挿入して局所脊髄圧迫を作成する。

●頸髄慢性圧迫モデルに対する治療効果の検討

頸髄慢性圧迫モデルでは、個体により運動機能の低下を呈するタイミングは異なるため、モデル作成手術後毎週ロータロッド歩行時間を測定し、歩行時間が100秒を下回った週とその2週後にG-CSFの髄腔内投与を行う。髄腔内へは浸透圧ポンプ(alzet社製)を用いて左側脳室経由で行う。そのため運動機能の低下を認めた時点で浸透圧ポンプ(200 μ L/week)の植え込み手術を行い投与開始とする。

G-CSF髄注群(20 μ g,2 μ g,0.5 μ g,0.2 μ g,0.05 μ g/week)、vehicle群(PBS 200 μ L)の各群5匹ずつを、ロータロッド歩行時間(1週毎)、Ladder-rung walking task(1週毎)、病理学的評価(HE染色:脊髄前角細胞数、NeuN染色,chat染色:運動ニューロン、TUNEL:アポトーシス)、電気生理学的評価(MEP:

術後 6 週)の評価を行い、G-CSF による治療効果の有無を検討する。

(結 果)

・ 治療実験 (n=5)

ロータロッド歩行時間が100秒を下回った週 (0週) からG-CSFの投与を開始すると、治療群 (G-CSF髄注群) でロータロッドのパフォーマンスの向上を認めた。

Vehicle群の0週のロータロッド歩行時間51秒から6週後同歩行時間が72 秒であった。

G-CSF20 μ g/week群は0週 : 59秒→6週後 : 87秒 ($p=0.6942$) であり、有意な改善は認め

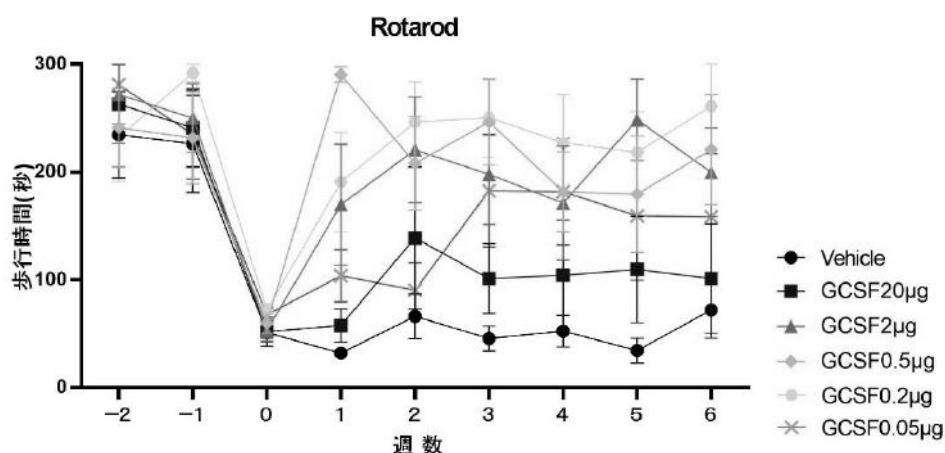
なかったが、G-CSF2 μ g/week群は0週 : 52.8秒→6週後 : 199.8秒 ($p=0.0247$)、G-CSF1

μ g/weekは0週 : 79.2秒→6週後 : 161.6秒、G-CSF0.5 μ gは0週 : 59.8秒→6週後 : 220.8

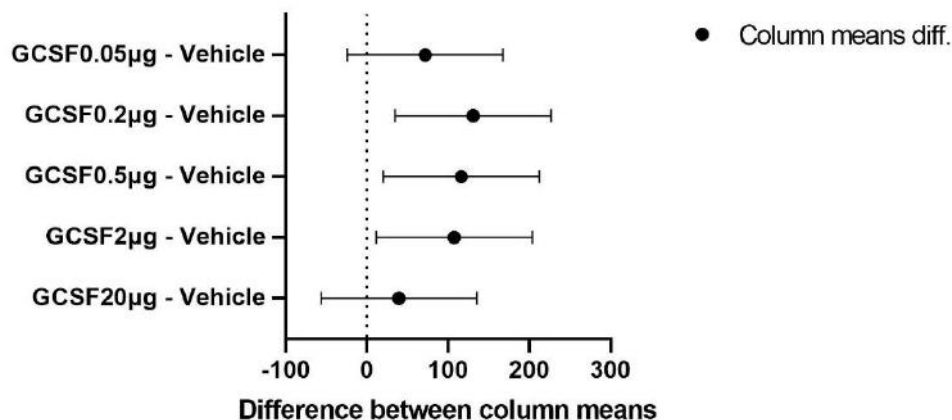
秒 ($p=0.0145$)、G-CSF0.2 μ g/weekは0週 : 71.8秒→6週後 : 261.2秒 ($p=0.0057$) と有

意な改善を認めた。さらにG-CSF濃度を薄めたG-CSF0.05 μ g/weekでは0週 : 67.6秒→6週後 : 158.6秒 ($p=0.1885$) と有意差は認めなかった。

結果として、ロータロッド歩行に関しては、G-CSFの髄注治療は有効な改善効果認め、0.2 μ g/weekが最も歩行能の改善効果が大きかった。



95% Confidence Intervals (Dunnett)



- ・ 脊髄前角細胞数 (n=5)

ロータロッド歩行時間が100秒を下回った週から髄注治療を開始し、6週後に脊髄組織を採取した。頸髄圧迫部のHE染色組織切片100枚の脊髄前角細胞数の合計平均がvehicle群652.8個に対して、G-CSF0.5 μ g/weekでは1225個 (n<0.0001) と有意に前角細胞数を多く認めた。

- ・ 電気生理学的評価
未評価。

(成果・考察) 等

本研究では、遅延型進行性脊髄症に特徴的な慢性脊髄圧迫モデルラットにおいて、G-CSFの有益な効果を明らかにした。G-CSFは運動機能の低下と運動ニューロンの喪失を防ぎ、脊髄症を発症している状態でも、かなりの期間、運動機能を速やかに回復させた。組織学的な検査では、G-CSFの投与により運動ニューロンが十分に保存されていることが確認された。

プロスタグランジンE1誘導体のリマプロストやホスホジエステラーゼ阻害剤のシロスタゾールを含む様々な薬理学的薬剤に関するこれまでの研究で、これらの薬剤がこの慢性圧迫モデルにおいて頸髄症を予防的に防ぐことが確認されている。しかし、これらの研究では、圧迫性脊髄症の進行に対する治療効果は得られていない。本研究は、G-CSFが発症した圧迫性脊髄症の回復治療薬として有望であることを実証している。

急性脊髄損傷におけるG-CSFの有益な効果の多面的なメカニズムには、骨髄由来細胞の遊走促進、オリゴデンドログリア前駆細胞の増殖誘導、アポトーシス細胞死の抑制、血管新生、炎症性サイトカインの抑制が含まれる。本研究では、G-CSFは、発症した圧迫性脊髄症の運動機能を速やかに回復させ、慢性頸髄圧迫における前角のアポトーシス細胞死を抑制した。これらの知見は、G-CSFが脊髄のニューロンやオリゴデンドロサイトに直接作用することを示唆している。

この結果から当教室は、今回と同モデルである頸髄慢性圧迫モデルラットに対するG-CSF皮下投与で脊髄症改善の高い効果を見出し、論文を発表した。しかし一方で、皮下注射により明確な効果を発揮するためにはG-CSFは臨床で適用される最大量以上の高用量の投与が必要であった。これはG-CSFは分子量が大きく (G-CSF 19.4kD)、血液脳関門を介した髄液移行性は乏しいためであると考えられた。

一方で本邦では急性脊髄損傷患者に対して2015年からG-CSF静注療法の第III相臨床試験(参加19施設)が行われ、2021年にこの結果の報告がされ、G-CSF静注療法の有効性を示すことができなかった。多数の神経保護作用が報告されているG-CSFの投与にて、今回有効性を示せなかった要因の一つとして、これも分子量が大きく、血液脳関門を介した髄液移行性が乏しいためであると考えられる。

今回、本研究により、G-CSFの髄注療法の有効性が証明されれば、今まで臨床応用が実現できていなかったG-CSFによる神経保護作用を脊髄障害にあてることができうる。またG-CSFは、顆粒球減少患者に対してすでに臨床使用されている薬剤であり、髄腔内投与に関しても脳神経外科医が臨床で日常に使用している手技で行うことができ、新たなデバイス開

発も不要であるため、すぐに臨床試験に進むことができ、停滞していた脊髄損傷治療のブレイクスルーになりうる治療法であると期待できる。

学習者が看護技術の「段取り」をデザインする 学習プログラムの開発と評価

横浜市立大学大学院医学研究科看護学専攻 博士後期課程
飯島 由理子

(研究目的)

「段取り」は、複雑な課題への対応において不可欠な能力のひとつであり、看護技術学習の初期段階から「段取り」を意識できるような働きかけが必要である。看護技術教育において、時間的制約により主体的に思考して学ぶ機会が減少しており、「段取り」を考えそれをもとに看護技術を実践するといった学習の機会が必要である。

本研究の目的は、学習者が看護技術の「段取り」をデザインする学習プログラム（以下、「段取り」デザイン学習プログラム）を開発し、その有効性を評価することとした。

(研究方法)

1. 「段取り」デザイン学習プログラムの開発

1) 「段取り学習」の検討

一時的導尿における物品準備の清潔操作の学習動画視聴と実技練習で看護学生が作成した段取り学習シートの記載内容と清潔操作を実施した実技内容の2次分析により、学習動画と学習シートの学習教材としての適切性、および、Endsley (1995) の意思決定における状況認識モデル（状況認識モデル）が、「段取り」の学習プロセスの枠組みとして適用可能かを評価した。

分析対象は、2019年11月から2020年1月に「段取り学習」を実施した看護系大学1年生15名の清潔操作の実技と、参加者により作成された学習シートであり、学習の範囲は、ベッドサイドでの滅菌セットの設置から採尿前の滅菌物の準備までとした。清潔操作の実技の分析は、看護技術に関する先行研究（野口ら、2011）を参考に、清潔操作の実施率、正確性、時間を評価した。学習シートの分析には、Endsley (1995) の状況認識モデルのうち、『レベル1：現状の認識』、『レベル2：現状の理解』、『レベル3：将来の予測』の3段階のプロセスを分析に用いた。学習シート毎に『現状の認識』『現状の理解』『将来の予測』の3分類に該当する内容を抽出し、予め想定した内容と比較した。状況認識モデルが、「段取り」の学習プロセスの枠組みとして適用可能かを評価した。

2) 「段取り」デザイン学習プログラムの作成

学習者である看護大学生が、「一時的導尿における滅菌物の清潔操作（清潔操作）」の「段取り」を思考し表現できることを学習目標に、「段取り学習」の2次分析の結果を踏まえ、学習教材である学習シートと学習動画を改良した。「段取り」デザイン学習プログラムの設計基盤には、ガニエの9教授事象（Gagne, 2005）とARCS動機づけモデル（Keller, 1987）を用いた。

(結 果)

1. 「段取り」デザイン学習プログラムの開発

1) 「段取り学習」の2次分析

清潔操作を実施した実技の実施率の平均は84.6%、正確性の平均は88.8%、時間の平均は2分42秒であった。看護技術に関する先行研究（野口ら，2011）では、指導のもとであれば、清潔操作の実施が確実にできると回答した新卒看護師は41.3%と半数以下であり、清潔操作は、技術習得に一定の時間を要する難易度の高い看護技術のひとつである。参加者は清潔操作の学習経験のない初学者であったことから、高い実施率や正確性であったことが確認された。

学習シートに表現された主な内容は、『現状の認識』では、「滅菌包を1回開き清潔部分が出てきた」「6点がきちんと入っている」、『現状の理解』では、「滅菌包の外側は不潔・内側は清潔」「手袋の外側に素手で触れない」、『将来の予測』では、「中途半端だともう一度袋が戻ってきてしまう恐れがある」「腕が滅菌包の上で交差してしまうと不潔になる」など、いずれも想定内の記載であった。

2) 「段取り」デザイン学習プログラムの作成

清潔操作の学習動画と学習シートにより、清潔操作の実技は実施できた。また、状況認識モデルの『現状の認識』『現状の理解』『将来の予測』の枠組みで学習シートの記載内容が分類でき、「段取り」の学習プロセスに状況認識モデルが適用可能であり、学習プロセスの評価の視点としても活用可能と判断できた。学習動画と学習シートは、看護技術学習のための学習教材としての適切性は確認されたが、学習者が「段取り」を思考し表現できるようになるためには、状況認識モデルの枠組みをもとに、改良していく必要があることが明らかになった。

学習シートは、学習者が目標とする看護技術を達成するために、どのような「段取り」があるかを思考し、さらに状況認識モデルの『現状の認識』『現状の理解』『将来の予測』の3要素をもとに整理することができ、目標達成に至るまでの「段取り」を学習者自らデザインできる枠組みとし、「段取りデザインシート」と命名した（図1）。学習者によ

段取りデザインシート (案)

名前: _____

● 段取りの3つの要素 (①気づく②解釈③予測) を用いて、目標達成のための手順を組み立てましょう！ 作成日: ○月○日 (/)

目標: _____

学習内容 (計画): _____

✓ 一度書いたら実践してみましょう
✓ 実践で新たに考えられたことを追加・修正してみましょう

図1. 検討中の「段取りデザインシート」のフォーマット（作成中）

るシート作成時は、紙媒体のみでなく、PCやタブレット、スマートフォンなどでの作成を学習者自身が選択できる方法を検討中である。

次に、学習目標に沿って、ガニエの9教授事象（Gagne, 2005）とARCS動機づけモデル（Keller, 1987）の【注意（Attention）】【関連性（Relevance）】【自信（Confidence）】【満足感（Satisfaction）】をもとに学習プログラムを設計した（表1）。学習プログラムの「意図する内容」に沿って、学習者が「段取り」をデザインできるようになるためのインストラクションを作成し、インストラクション部分を学習動画として作成中である。

表1. 学習プログラムの内容（作成中）

理論的基盤			意図する内容
ガニエの9教授事象		ARCSモデル	
導入	1 注意を獲得	注意	・段取りに注意を向ける
	2 目標を知らせる	注意 関連性	・「段取りを学ぶ」ことを理解できるよう、学習プログラムの目標を提示し、目標の共有をする ・「自分にもできるかもしれない」「これを学べば看護の学習の役に立つかもしれない」と思えるようにする
	3 前提条件を思い出させる	注意 関連性 自信	・身近な例から段取りに関心を向けられるようにする ・段取りと看護との関連を示し、なぜ段取りを学ぶ必要があるのかを示す ・「段取りってなんだろう」と、今までの生活や学習経験から段取りを考える態勢を整える ・段取りに関する考え方がどのようなものか客観視できるようにする ・今までに学んだことを思い出させる ・身近な事例で3つの要素に触れる
情報提示	4 新しい事項を提示	注意 関連性	・状況認識モデルを用いて説明し、3つの要素を理解できるようにする ・段取りを考えるための基盤を作る
	5 学習の指針を与える	関連性、注意	・段取りを自分で考えられるようになるには、どのように学ぶか理解できるようにする ・「段取りデザインシート」を使って段取りを考え表現するプロセスを学べるよう示す（完成形だけでなく、何から書き始めて、分からないところはどこで、どうやって分かるようになって、どこを追加し

			たか書いていくプロセスが分かるように示す) ・段取りデザインシートという形で、学習プロセスを残すことで、自分の知的財産になることを伝える
学習活動	6 練習の機会を与える	関連性、自信	・実際に段取りを考え、段取りデザインシートに表現するよう促す
	7 フィードバックを与える	自信、満足感	・清潔操作を実施する機会を提供し、段取りデザインシートに書いた内容の確認ができるようにする
まとめ	8 学習成果の評価	自信、満足感	・自己と他者から評価する

(成果・考察)

学習動画と学習シートは、看護技術学習のための学習教材としての適切性は確認され、加えて、「段取り」の学習プロセスに状況認識モデルを用いることで、学習者にとっては看護技術の「段取り」の思考や表現がしやすくなり、学習プロセスの評価も可能になると考える。

本研究では、開発した学習プログラムを対象者に実施し、有効性の検討を行う予定であったが、COVID-19の影響により学習プログラム開発が遅延し、有効性の検討まで実施できなかった。今後は、「段取り」デザイン学習プログラムの開発をさらに進め、対象である看護系大学生1～4年次生を対象に「段取り」デザイン学習プログラムを実施し、ランダム化比較試験により有効性の検討を行う予定である。また、「段取り」デザイン学習プログラム開発の一部を、日本看護学教育学会第32回学術集会（2022年8月開催）にて発表予定である。

(参考文献)

- Endsley, M. R., 1995. Toward a Theory of Situation Awareness in Dynamic Systems. HUMAN FACTORS 37(1), 32-64.
- Gagne, R. M., Keller, J. M. and Golas, C. L., 2005. インストラクショナルデザインの原理. 鈴木克明, 岩崎信 (監訳), 北大路書房, 京都.
- Keller, J. M., and Kopp, T., 1987. Application of the ARCS model of motivational design. In C. M. Reigluth (Ed.), Instructional theories in action: Lessons illustrating selected theories and models. Lawrence Erlbaum Associates, U.S.A
- 野口英子, 當目雅代, 金正貴美ら, 2011. 新卒看護師の看護技術習得の実態と指導者・看護師長の期待に関する研究. 日本看護研究学会雑誌, 34(4) : 73-82.

ヒトがんオルガノイドを用いた がん遺伝子パネル検査意義不明遺伝子変異の解析

横浜市立大学附属病院 臨床腫瘍科
鈴木 章浩

(研究目的)

がんゲノム検査では、患者のがん細胞において変異のある遺伝子に標的薬剤があっても、起きている変異が既知のものでなければ厳密に『標的薬剤あり』と判定されない。そしてその頻度は10-20%程度と低い現状である。標的薬剤のある遺伝子(Druggable gene)に検出された意義不明変異(VUS; variant of unknown significance)の解析を行うことで、がんゲノム検査の有用性を拡大することができる。

オルガノイド作成技術は、生体より単離した細胞をマトリゲル内で幹細胞の性質を維持したまま培養する技術である。通常の平面培養に比較して、継代に伴う遺伝子変異の蓄積が極めて少なく、単離した際の遺伝子変異情報を維持できることが特徴である。本研究では、当院でがんゲノム検査を受けた患者のがん組織からオルガノイドを作成し、薬剤感受性に着目して解析を行う。特に、変異の起きている遺伝子には標的薬剤が存在するものの、起きている変異が意義不明であるという症例を中心に、in vitroでの薬剤感受性の評価を行う。そして、感受性のある群とない群での発現解析(RNA sequence)を行い、その機序解明を行う。

(研究方法)

本研究では、横浜市立大学附属病院において診断や治療に必要な際に検体採取をする患者を対象とする。その余剰検体を用い、前述のオルガノイドを作成しておく。がんゲノム検査を施行し、標的薬剤のある遺伝子(Druggable gene)に検出された意義不明変異(VUS; variant of unknown significance)がある場合、in vitroでオルガノイドに抗癌剤を投与し、その感受性を評価する。感受性のばらつきが出ることが予想されるので、その原因の解明において発現解析(RNA sequence)を行い、その差異を観察し、新たなバイオマーカーを探索していく。

オルガノイド作成に関する消耗品は、横浜市先進医療による助成金で賄える。そのために、新たなバイオマーカーを探索するためのRNA sequenceの助成を行っていただければ、さらなる飛躍した解析が可能となる。

倫理面でまず問題となるので、個人情報の保護である。研究対象者の氏名やカルテID等は外部に漏洩することがないように厳重に保管管理を行う。検体の情報に関しては、鍵が付随しているキャビネットにセキュリティロックを付けたUSBや印刷物を保存する。具体的には、個人を特定できる情報に関しては、電子カルテ上でしか取り扱わないようにする。

次に危険性であるが、本研究では、診断や治療に必要な際の余剰検体を基本的には用いるので、危険性や不利益はなしと考える。しかしがんゲノム検査が保険適応化され、ゲノム検査のための生検を施行する症例が増えてきている。その際は、出血や感染などのリスクを十分説明し、同意を得たうえでやっていく。がん細胞における遺伝子変異を検出し、新規の治療法の選択に用いるが

んゲノム検査が2019年6月に保険適応化された。がんゲノム検査の課題の一つは、新たな治療法が見つかる可能性が約10-20%と低いことであり、この割合を増加させる手法の開発が望まれている。がんゲノム検査では、患者のがん細胞において変異のある遺伝子に標的薬剤があっても、起きている変異が既知のものでなければ厳密に『標的薬剤あり』と判定されない。標的薬剤のある遺伝子 (Druggable gene) に検出された意義不明変異 (VUS; variant of unknown significance) の解析を行うことで、がんゲノム検査の有用性を拡大することができる可能性があり、極めて意義深い。加えて、がんゲノム検査の次なる到達点は、感染症領域における血液培養・抗菌薬感受性試験の様な、抗腫瘍製剤の感受性の体外診である。がんゲノム検査の結果の紐づいたヒトがんオルガノイドを保有しておくことで、より発展的ながんゲノム医療への体制も構築できるものと考える。当院では、他の施設に先駆けてがんゲノム検査を行って来た。その経験の中で、Druggable geneにVUSが検出された症例を数多く経験した。がんゲノム検査は、患者がわずかな可能性に期待して受けるものであるため、このような症例では本当に『標的薬剤なし』としてしまってよいのか、判断に迷う症例も多かった。また、がんゲノムのデータベースも完全なものは存在せず、データベース間で記載のことなる変異も数多く存在した。本研究は、このような判断に迷う症例に対し、臨床判断をサポートする基礎解析を行うことが目的であり、迅速な診療への還元が期待できる。また感受性のある群とない群での発現解析を行うことで、新たなバイオマーカーの探索を行うことが可能となる。

(結 果)

まず、がんゲノム検査を受ける患者で、診断や治療の方針を決定するに生検が必要であった4症例について、同意を取得したうえで、オルガノイドを作成した。内訳は、胆のうがん、前立腺がん、膵臓がん、肝内胆管がんの4例である。

がんゲノム検査は現在、Foundation Oneと、NCCパネルが使用できるが、患者と相談し、Foundation Oneを選択した。変異が検出されたのは右のようである (表1)。

検査した中で、VUSと考えられたのは前立腺がんのAPC、前立腺がんのBRCA2、膵臓がんのAPC、膵臓がんのCDKN2A、肝内胆管がんのAKT3、肝内胆管がんのBRIP1、胆のうがんのROS1であった。

がん腫	遺伝子	変異パターン	がん腫	遺伝子	変異パターン
前立腺がん	TP53	p. K132E	肝内胆管がん	KRAS	p. G12V
前立腺がん	APC	p. C420Y	肝内胆管がん	AKT3	p. P310S
前立腺がん	ASXL1	p. G646fs*12	肝内胆管がん	BAP1	p. E402D
前立腺がん	BRCA2	p. I1929V	肝内胆管がん	BRIP1	p. G481D
前立腺がん	CREBBP	c. 2881-1G>A p. ?	肝内胆管がん	MAP2K2	p. P298L
前立腺がん	HSD3B1	p. S330C	肝内胆管がん	PIK3CB	p. G165E
前立腺がん	KDM6A	p. Q1229*	肝内胆管がん	RAC1	p. N92S
前立腺がん	RAD52	p. R55H	肝内胆管がん	TET2	p. E433D
前立腺がん	RNF43	p. R519Q	肝内胆管がん	IDH2-C1B1	転座
前立腺がん	CUL3	増幅	肝内胆管がん	TSC2	p. R1159W
膵臓がん	KRAS	p. Q61H	肝内胆管がん	BTG2	増幅
膵臓がん	APC	p. Q2322R	肝内胆管がん	CDC73	増幅
膵臓がん	CDKN2A	p. D84G	肝内胆管がん	CDKN2A	欠失
膵臓がん	DAXX	p. E457del	肝内胆管がん	CDKN2B	欠失
膵臓がん	ERCC4	p. I232S	肝内胆管がん	DDR2	増幅
膵臓がん	KEL	p. R14H	肝内胆管がん	MTAP	欠失
膵臓がん	KIT	p. T84M	肝内胆管がん	PIK3C2B	増幅
膵臓がん	MAP3K1	p. R288*	肝内胆管がん	SDHC	増幅
膵臓がん	MAP3K13	p. R914H	胆のうがん	TP53	p. P151S
膵臓がん	MERTK	p. D898N	胆のうがん	ACVR1B	p. R205*
膵臓がん	TP53	p. C176R	胆のうがん	GATA3	p. A396T
膵臓がん	POLD1	p. R177H	胆のうがん	INPP4B	p. K803Q
膵臓がん	PTCH1	p. K353R	胆のうがん	PIK3CA	p. H1047L
膵臓がん	SMAD4	p. V506_P511delinsA	胆のうがん	PIK3CA	p. E726K
膵臓がん	TSC2	p. P1145L	胆のうがん	ROS1	p. R863W
膵臓がん	MYD88	p. I130T	胆のうがん	RAC1	増幅
膵臓がん	NOTCH1	p. E1148K			
膵臓がん	CRKL	増幅			
膵臓がん	MYC	増幅			
膵臓がん	RAD21	増幅			

表1 がんゲノム検査の結果

これらの遺伝子やその Pathwayの遺伝子発現に 着目するために、作成し ているオルガノイドから RNAを抽出した。その 後、外注でRNAシークエ ンスを施行した。その結 果から得られた発現値、	遺伝子	前立腺がん	膵臓がん	肝内胆管がん	胆のうがん
	AKT3	18.43905	3.82534	5.54223	9.95495
	APC	7.71704	8.36157	4.71877	8.03917
	ROS1	3.68778	0.02916	0.20853	0.07739
	CDKN2A	1.22238	0.85345	1.10525	0.60671
	BRCA2	3.54602	2.56016	1.85006	2.92975
	BRIP1	2.21161	2.49969	1.86319	3.27551

RPKMは以下のものであった

表2 遺伝子変異のあったものの発現値

(表2)。残念ながら変異による明らかな発現を認めなかった。次に同じPathwayで発現の変化があるかどうか調べた。AKT3・ROS1のPathway、APCのPathway、BRCA2・BRIP1のPathwayに関して、主だった遺伝子のRPKMを調べ、表3、4、5のような結果であった。

遺伝子	前立腺がん	膵臓がん	肝内胆管がん	胆のうがん
PIK3CA	21.31624	8.18248	9.53566	11.22649
BRAF	4.90565	3.88399	5.36125	5.14719
PTEN	48.50088	33.28607	27.06034	35.2285
KRAS	33.95222	28.26581	15.13183	23.54634
AKT1	4.07433	8.31145	24.24945	11.89228
AKT2	0.85055	1.89867	6.06018	3.28357

表3 AKT3やROS1のPathwayの遺伝子変化

遺伝子	前立腺がん	膵臓がん	肝内胆管がん	胆のうがん
WNT3A	0	0	0	0
CTNNB1	136.55976	128.759	118.33131	119.03525
WNT1	0	0.0076	0.03402	0.01965
AXIN1	1.01686	2.20081	6.21455	2.22301
AXIN2	5.15028	12.58222	4.78722	4.9885

表4 APCのPathwayの遺伝子変化

遺伝子	前立腺がん	膵臓がん	肝内胆管がん	胆のうがん
ATM	15.48379	6.17268	7.74164	17.39389
BRCA2	3.54602	2.56016	1.85006	2.92975
PALB2	8.86163	6.3329	6.09508	6.94484
BRCA1	6.58605	4.18202	6.21427	6.20266
RAD51C	9.76746	3.99935	9.28907	8.50679

表5 BRCA2・BRIP1のPathwayの遺伝子変化

(成果・考察) 等

AKT3であるが、AKTキナーゼは、インスリンおよび成長因子に応答する細胞シグナル伝達の調節因子であることが知られている。それらは、細胞増殖、分化、アポトーシス、腫瘍形成、ならびにグリコーゲン合成およびグルコース取り込みを含む多種多様な生物学的プロセスに関与している。上流に、RAS、BRAF、PI3Kがあるが、これらは活性化することにより、発がんに関与すると考えられている。しかし、変異のあった肝内胆管がんでは高発現している証拠は得られなかった。

ROS1はチロシンキナーゼ活性を持つI型内在性膜タンパク質である。他の遺伝子と融合したことによってROS1融合遺伝子が発現するが、過剰発現することで細胞増殖に関与すると考えられている。非小細胞肺癌の領域ではクリゾチニブ、エヌトレクチニブという分子標的薬が保険適用となっているため注目されている。この遺伝子も下流にRAS、BRAF、PI3Kといった遺伝子があるが、変異のあった胆のうがんではこれらの過剰発現は認めなかった。

APCは大腸がんや家族性大腸腺腫症の原因遺伝子として有名であり、がん抑制遺伝子でもある。Wntシグナル伝達経路のアンタゴニストとして作用する腫瘍抑制タンパク質をコードしている。また、細胞の遊走と接着、転写活性化、アポトーシスなどの他のプロセスにも関与している。この変異があった前立腺がんや膵臓がんではAPCの発現低下は見られず、またWNTのPathwayの発現にも影響しなかったことがわかった。

BRCA2やBRIP1はBRCAのpathwayにあり、遺伝性乳がん卵巣がん症候群の原因となっている。乳がんや卵巣がん、最近では前立腺がんや膵臓がんではオラパリブが保険適用となっている。BRCA遺伝子から作られるタンパク質には変異を起こしたDNAを修復する機能があり、その機能が欠損することにより発がんに関与するので、がん抑制遺伝子として考えられている。変異のあった前立腺がんや肝内胆管がんでは、その遺伝子らの発現低下を認めなかった。

今回の解析結果では、残念ながらVUSと考えられた遺伝子変異では、その遺伝子の発現の制御や、Pathwayの遺伝子発現に変化を及ぼしていないと考えられた。しかしこういった研究は大切であり、地道に続けていく必要があると考えられた。また、遺伝子発現の制御はエピジェネティックな因子も深くかかわるので、そちらに目を向けつつ今後も研究していきたい。この度は貴重な研究の場をいただき、深く感謝いたします。