

樹脂製玉軸受における回転トルクとアキシャル荷重 および回転速度との関係

関東学院大学理工学部・准教授

堀 田 智 哉

(研究目的)

大気汚染の問題を背景に、地球温暖化や資源の枯渇など、多くの課題が浮上し、より一層の省エネルギー化が求められてきている。その中で、樹脂製玉軸受は金属製玉軸受に比べて、非常に軽量で耐食性に優れていることから、自動車産業や航空宇宙産業で使用されるようになってきている。とくに、PEEK (Poly Ether Ether Ketone) やPOM (Polyoxymethylene) などのエンジニアリングプラスチックで内外輪および保持器を製作し、転動体としてSUS316などのステンレス鋼材を使用したものが多い。

しかし、この樹脂製玉軸受は、近年使用されるようになったものであり、金属製玉軸受に比べて、寿命に関する実験が進んでおらず、十分な知見がないことから、寿命の算出が困難であるのが現状である。したがって、どのような材質、材料において、どの程度摩耗するのか明確ではなく、寿命の予測ができない。

そこで本研究では、POM製608およびPEEK製608の寿命を明らかにすることを目的として、軸受組立幅変化量および回転トルクを測定した。これにより、設計者が軸受の材質を特性に応じた用途で選定できるようになる。

(研究方法)

図1に実験装置の概略を示す。試験軸受の内輪を回転させ、外輪が内輪の回転によってつれ回ろうとする力 F [N]をロードセルにて測定した。この力 F に、回転中心から測定位置までの距離 x [mm]を乗じて回転トルク T [N・mm]を算出した。アキシャル荷重は、マイクロメータヘッドを回し、バネを縮めることで50 Nを負荷した。このとき、エアベアリングを介してアキシャル荷重をかけたため、ベアリングカバーとの間は非接触である。また、静電容量式変位計によって、センサとベアリングカバーとの間隔を測定した。センサは回転軸を挟んで対称な位置2箇所を計測し、ベアリングカバーの傾きを補正している。実験開始時のベアリングカバーのトップの位置を0 μm として、このカバーのトップとの距離の変化量を組立変化量 δ とした。

表1に実験条件を示す。試験軸受は、POMとPEEKの2種類を用意した。なお、転動体はSUS316である。また、比較対象として、一般的な小径玉軸受に使用されているSUJ2製のものも用意した。クリーンベンチ内の塵やほこりなどのない雰囲気で洗浄し、POM製の非接触シールを装着した。軸受の洗浄には、POM製608、PEEK製608では無水エタノールを、SUJ2製608ではヘキサンを用いた。各条件で、4個ずつ測定をおこなった。また、回転トルクおよび軸受の組立幅変化量を30分毎に5分間測定し、その平均を算出した。なお、焼付きなどにより回転トルクが10 N・mmを超えトルクが過大になった場合、あるいは運転時間が500 minを超えた場合に実験を打ち切った。

表1 実験条件

呼び	608			
材質	軌道輪	POM	PEEK	SUJ2
	転動体	SUS316	SUS316	SUJ2
	保持器	POM	PEEK	SPCC
アキシアル荷重 [N]	50			
回転速度 [min ⁻¹]	1000			
計測時間 [min]	500			
潤滑剤	なし			
試験個体数 [個]	4			

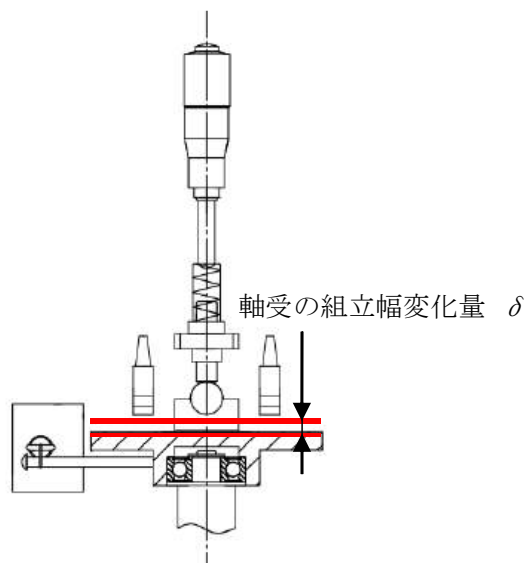
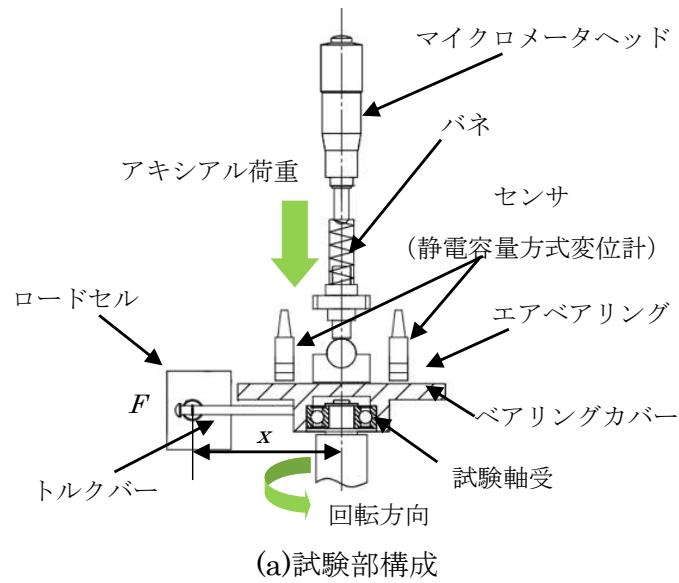


図1 実験装置概略

(結 果)

図2に回転トルクの時間変化を示す。エラーバーは、各時間における個体毎の標準偏差を表している。潤滑剤なしの場合POM製608およびPEEK製608では、0 minから60 minにかけ、回転トルクが急激に上昇し、その後、緩やかに回転トルクが上昇を続けた。SUJ2製608では、実験開始から300 minまで回転トルクの変化がなかったが、300 minを超えたあたりで焼付きが発生し停止した。また、SUJ2製608に比べて、POM製608、PEEK製608は回転トルクが高くなった。一方、これら2種類の樹脂間でのトルクの差は見られなかった。

樹脂製の玉軸受の方が、SUJ2製の玉軸受よりも回転トルクが大きくなった要因として、SUJ2とPOMやPEEKなどの樹脂とでは、縦弾性係数に大きな違いがあるからではないかと考える。一般的に、鉄鋼材料に比べ樹脂材料の方がSUJ2に比べて縦弾性係数が小さい。そのため同一の転動体荷重であれば、軌道面の弾性変形量が大きくなり、接触面積が増大した結果、回転トルクが増大したのではないかと考える。

図3に組立幅の時間変化を示す。エラーバーは、各時間における個体毎の標準偏差を表している。SUJ2製608では、わずかに組立幅が増加しているが、これは、摩耗熱により、寸法増加したのではないかと考える。一方、樹脂軸受では、組立幅が減少した。これは摩耗によるものであると考えられる。

PEEK製608に比べてPOM製608の方が、組立幅の減少量が小さいことから、PEEKよりもPOMの方が高い耐摩耗性を有すると考えられる。

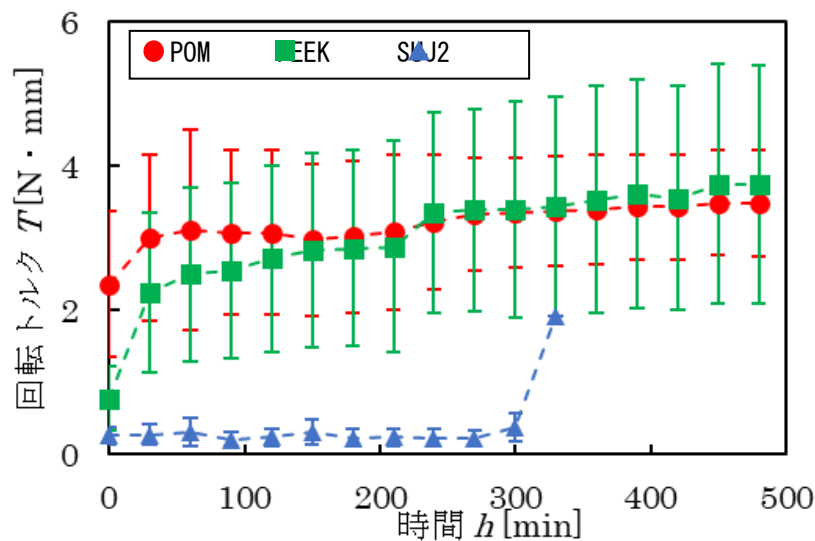


図2 各材料における軸受回転トルクの時間変化

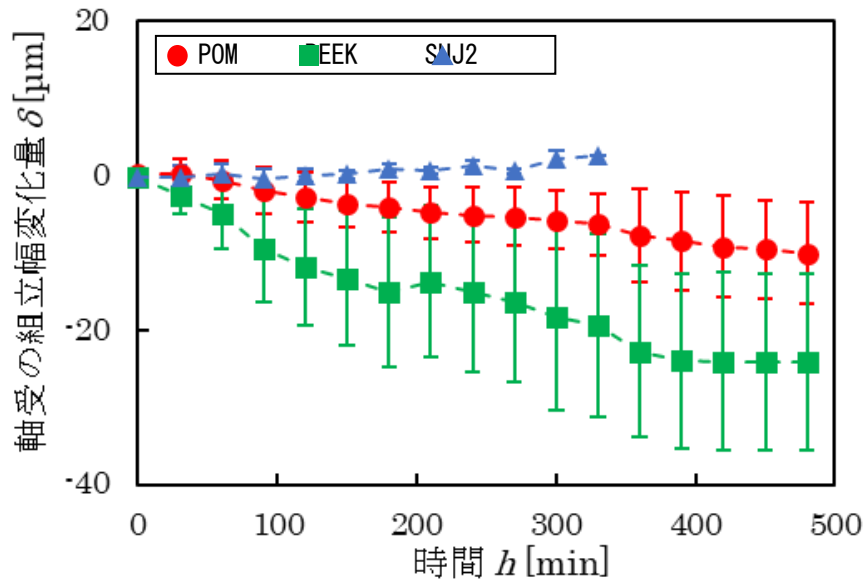


図3 各材料における軸受組立幅の時間変化

(成果・考察)

本研究では、POM、PEEKおよびSUJ2製の小径玉軸受608を、内輪回転速度 1000 min^{-1} 、ラジアル荷重 50 N かつ無潤滑でそれぞれ運転させ、運転中の回転トルクおよび組立幅変化量を測定した。その結果、以下のことが明らかになった。

- (1) SUJ2製では、 30 min 程度でトルクが急激に増大し、停止する。
- (2) SUJ2製では、組立幅の増加が確認された。
- (3) 樹脂製は、SUJ2製に比べて軸受の組立幅の減少量が多い。
- (4) POM製とPEEK製とでは、回転トルクの差はないが、組立幅の変化量はPEEK製の方が大きい。

学会等発表

- 1) 堀田, 鈴木: 樹脂製小径玉軸受 608 のトルク特性と組立幅変化, 公益社団法人 日本設計工学会 東海支部 令和 5 年度研究発表講演会, 2024 年 3 月 2 日 (土), 名城大学天白キャンパス

転写制御因子 BRD4 の立体構造に立脚した中分子すい癌治療薬の開発

横浜市立大学大学院生命医科学研究科・助教

小沼 剛

(研究目的)

膵がんは、患者の5年生存率が12.5%に留まる代表的な難治がんである。我が国を含め先進国において膵がんの死亡者数は増加傾向にあり、膵がんの新規治療法や予防法の開発は喫緊の福祉課題となっている。膵がん細胞では、がん原遺伝子であるMYCが過剰に発現しており、その発現量と膵がん患者の生存率には負の相関があることが知られている。また、転移性の高い膵がんほどMYCの発現量が高いことも確認されている。これらの結果はMYCが膵がんの治療標的の有力な候補であることを示唆しているが、MYCはドメイン構造を有しない典型的な天然変性タンパク質であるため、MYCに直接結合してその活性を阻害する化合物の開発は困難である。

そこで本研究では、MYCを標的遺伝子として発現誘導機能を持つ転写制御因子BRD4 (bromodomain-containing protein 4) に着目し、その阻害剤を膵がんの新規治療薬候補として開発する。申請者はこれまでBRD4のプロモドメインやETドメインに対する阻害剤開発に取り組み、世界に先駆けてETドメイン-低分子化合物複合体の構造解析に成功している。本研究ではこれらの実績に基づき、膵がん治療薬シーズとしてETドメイン阻害剤の創出を目指す。

(研究方法)

NMRサンプルの調整

ヒスチジンタグ (Hisタグ) が融合したBRD4のETドメイン (610-676) の遺伝子を含んだpNIC28-Bsa4ベクターを用いて、BL21 (DE3)大腸菌の形質転換を行なった。安定同位体試薬である ^{13}C グルコースを3 g/L、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を1 g/L含んだM9培地を調整し、37°Cで大腸菌の大量培養を行なった。OD値が0.6に達した後、IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) を入れ、目的蛋白質の発現を誘導した。さらに15°Cで12時間の振とう培養を行なった後、大腸菌を凍結した。Lysisバッファーで懸濁した大腸菌を超音波で破碎後に遠心し、上清を回収した。目的蛋白質をNiアフィニティカラム、ゲルろ過カラムで精製した。ここで融合したHisタグを除くため、TEVプロテアーゼを加え、4°Cで一晩インキュベートした。ゲルろ過カラムでさらに精製した後、濃縮してNMRサンプルとした。

NMR実験

NMR測定は、クライオプローブを備えた、プロトン周波数で500.13 MHz BrukerBioSpin Avance III分光計を利用した。ETドメインについて主鎖の連鎖帰属を行うために、三次元スペクトルのHNCACB、HN(CO)CACB、HNCA、HN(CO)CA、HNCO、HN(CA)COをそれぞれ測定した。これらは全てNon-uniform samplingで測定を行い、スペクトルプロセスはNMRPipe、解析にはNMRViewをそれぞれ利用した。

(結果・考察)

ET ドメインを標的とした化合物スクリーニング

小沼はこれまでに、阻害剤が全く開発されていない ET ドメインに着目し、カルバゾール誘導体が結合することを見出している。さらに ET ドメインとカルバゾール誘導体との複合体について NMR を用いた立体構造解析を行い、結合様式を明らかにした。そこで本研究では、より強く結合するカルバゾール誘導体を探索するため、NMR の二次元スペクトルを利用した化合物スクリーニングを行った。

まずは ^{15}N -ET 単独で ^1H - ^{15}N HSQC の二次元スペクトル測定を行い、リファレンススペクトルとした。続いて 6 種類の ET ドメイン阻害剤の候補化合物をそれぞれ滴定し、同測定を行った (図 1)。その結果、6 種類すべての化合物についてシグナルの化学シフト変化が観測された。中でも、化合物 STOCK7S-53638 や化合物 Z2720617776 (以下 MS776 と表記) は化学シフト変化が大きかった。これは、これらの化合物が他の化合物よりも強く ET ドメインに結合することを示唆している。また、6 種類の化学構造を比較することで、ET への結合に重要なエピトープを発見した。

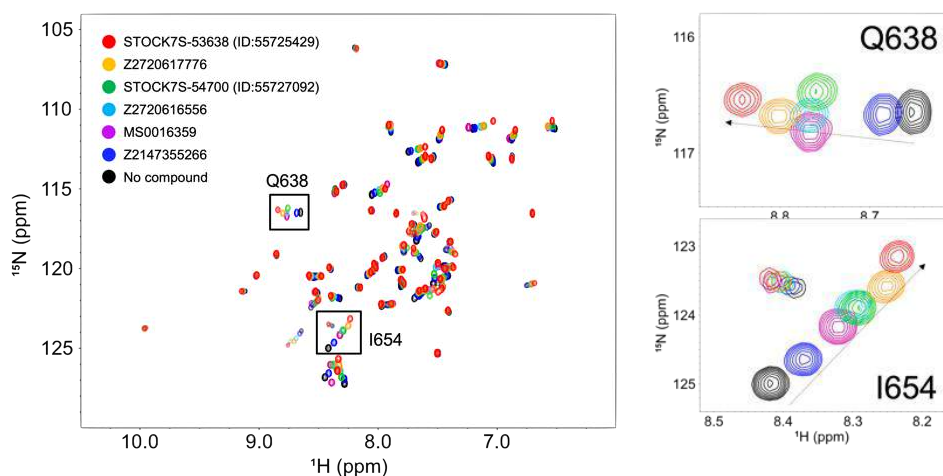


図 1 (左図) 低分子化合物存在下および非存在下における ET ドメインの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。(右図) 化学シフト変化が比較的大きかったシグナル。

ET ドメインへの MS776 結合の NMR 解析

続いて、MS776 の ^{15}N -ET への親和性を見積もるため、異なる濃度の MS776 を滴定し、 ^{15}N -ET の ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行った (図 2 左)。比較的に大きく変化したシグナルについて定量解析を行うことで親和性を見積もり、 $28.2\ \mu\text{M}$ の K_d 値を得た (図 2 右)。

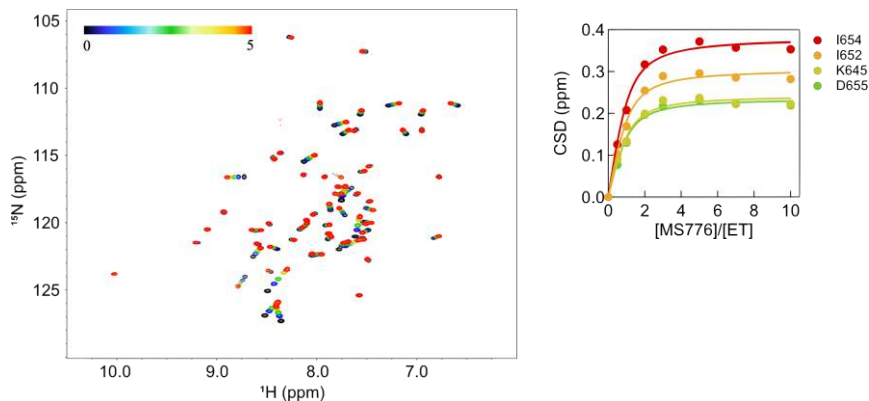


図 2 (左図) 異なる濃度の MS776 存在下における ET ドメインの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。(右図) 代表的なアミノ酸残基の化学シフト変化。

さらに、MS776 の ^{15}N -ET への結合において ET ドメインの重要なアミノ酸残基を同定するため、ET ドメインのアミノ酸配列に対して化学シフト変化をプロットした (図 3)。この結果から、ET ドメインの K645、I652、I654、D655 が相互作用に重要な残基であることが分かった。

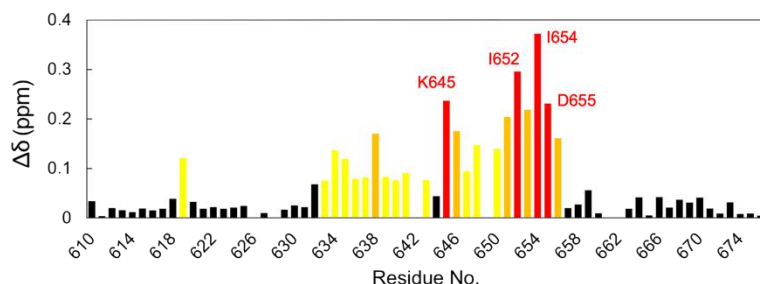


図 3 化合物 MS776 結合による ET ドメインのアミノ酸残基ごとの化学シフト変化。最も大きい化学シフト変化を示した K645, I652, I654, D655 を赤色で表記した。

MS776-ET ドメイン複合体の *in-silico* 解析

MS776 と ET ドメインの相互作用様式を構造学的に理解するため、ET ドメイン複合体のモデル構造を *in silico* ドッキングシミュレーションと分子動力学 (MD) シミュレーションを行った。MS776 は光学異性体であり、R 体 ((R)-MS776) と S 体 ((S)-MS776) が存在する (図 4A, 4B)。まず、過

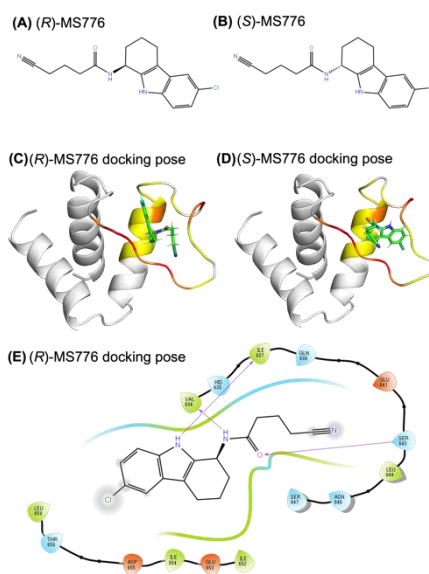


図 4 MS776 と ET ドメインのドッキングシミュレーション。(A) (R)-MS776 と (B) (S)-MS776 の化学構造と ET ドメインとのドッキングモデル構造 (C, D)。(E) (R)-MS776 と ET ドメインの相互作用様式。疎水性残基は緑色、極性残基はシアン色、水素結合はピンク色で表記した。

去に小沼が解析したペプチドと ET ドメイン複合体の NMR 構造に対し(R)-MS776 および (S)-MS776 をそれぞれドッキングさせた (図 4C, 4D)。(R)-MS776 とのドッキングモデルでは、(R)-MS776 は ET ドメインの疎水性残基と親水性残基に囲まれていた (図 4E)。

次に、それぞれのドッキングモデルを初期構造として全原子 MD シミュレーションを行い、複合体構造が溶液中で安定かどうか調べた (図 5A)。1 μ s の MD シミュレーションの間、(R)-MS776 の結合様式は動的に変化したが、 α 2-helix と長いループとの結合は維持された (図 5B-D)。この MD シミュレーションから同定された相互作用に重要な残基は、NMR を用いて実験的に観察された大きな化学シフト変化を示すアミノ酸残基と一致したことから、NMR 結果を説明するモデル構造として妥当であり、この複合体が溶液中で安定であることが示された (図 5E)。

(S)-MS776 については、詳細な結合ポーズは異なるものの、ドッキングモデルおよび MD シミュレーションともに、結合位置は(R)-MS776 と本質的に同じであった。これらの計算結果は、(R)-MS776 と(S)-MS776 の間に厳密な違いを示さなかったことから、どちらの分子も ET ドメインに結合できることが示唆された。

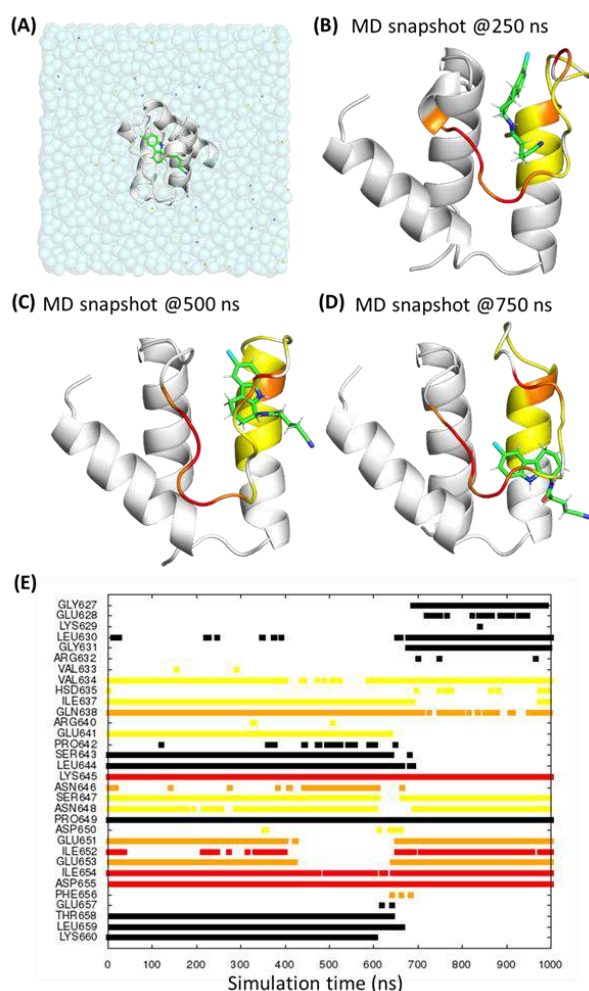


図 5 (R)-MS776 と ET ドメイン複合体の全原子溶液モデル (A)と MD シミュレーション開始から 250 ns (B), 500 ns (C), 750 ns (D)後のスナップショット。(E) MD シミュレーション中に(R)-MS776 が相互作用する ET ドメインのアミノ酸残基。配色は図 3 と同様。

高等植物の精細胞しっぽ構造の起源をたどる萌芽研究

横浜市立大学生命ナノシステム科学研究科 生命環境システム科学専攻 准教授

木原生物学研究所 植物エピゲノム科学部門

丸山 大輔

(研究目的)

コケなど原始的陸上植物は動物のように自走する精子を使って繁殖を行う。これに対し、高等植物とよばれる被子植物は、精細胞に自ら動くためのべん毛をもたず、代わりに花粉管という活発に伸長する細胞の内を通して精細胞を雌しべ内の受精の場へと輸送する仕組みをもつ。この精細胞輸送方式は精子のように泳ぐための水分を多く必要とせず、乾燥する陸上環境で25万種にも拡大した被子植物の繁栄を支えてきた進化上の革新とされている。しかし、受精様式が精子型から花粉管型へと切り替わった節目となる祖先種は現存せず、被子植物が画期的な花粉管型の精細胞輸送方式を獲得した経緯については、植物学の大きな謎である。

多くの被子植物は2個1組の精細胞をもつ。精細胞には突起が存在し、特に片方の精細胞の突起はしっぽ状に伸びて花粉管の細胞核である栄養核と接着した複合構造を形成する(図1)。精細胞のしっぽ構造には細胞骨格である微小管の束が通っており、その形態は原始的陸上植物の精子べん毛と似ている。実際に微小管の成長を阻害する *PHS1AP* 遺伝子の特異的に発現させた精細胞はしっぽ構造欠損がみられた。さらに、微小管構成タンパク質であるチューブリンを花粉で解析すると、動植物の精子べん毛の微小管に特徴的な40番目リジン残基のアセチル化修飾を受けていることが示唆された。これらはしっぽ構造が精子べん毛の痕跡器官として現存する可能性を提示する。本研究は精細胞の微小管の解析から精子べん毛との共通点を探ることで、「しっぽ構造が生殖システム進化の謎を解くミッシングリンクである」可能性を検証する研究の基盤を確立することを目指した。

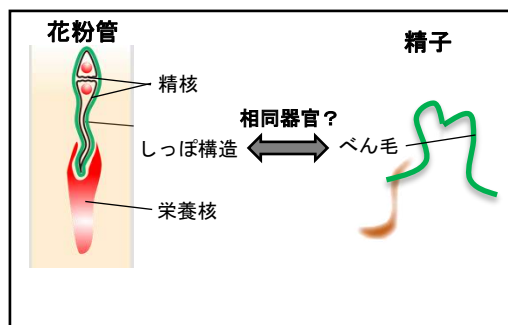


図1： 被子植物の花粉管と原始的陸上植物の精子

(研究方法)

シロイヌナズナの精細胞におけるチューブリンタンパク質の翻訳後修飾を解析するため、アセチル化やポリグルタミン酸化などの修飾を受けたチューブリンに対する特異的な抗体を用いた免疫染色を行う。また、べん毛や繊毛を有する生物と被子植物のゲノム間に共通して保存されている因子について、蛍光タンパク質ラベルによる融合タンパク質を用いた細胞内局在解析と、遺伝子破壊株の表現型解析を行う。

(結 果)

本計画では当初、チューブリンタンパク質のアセチル化やポリグルタミン酸化などの基部植物でも見られる翻訳後修飾がモデル植物のシロイヌナズナにも存在するか検証するとともに、べん毛や繊毛を有する生物のゲノムに共通して保存されている因子の解析を提案していた。チュー

ブリンのタンパク質翻訳後修飾の解析については、動物にも広く利用されている特異的な抗体が販売されているので、これを用いた花粉管の間接蛍光抗体染色によって検出する予定だった。ところが、花粉管の細胞構造の変化を防ぎ、生きた状態に近いかたちに保存する固定操作の条件検討が問題となり、研究期間内に十分な結果を出すことができなかった。そこで、提案していた他方のアプローチである共通べん毛因子の解析に注力することとした。トリパノソーマ原虫や原始的植物の精子など遊走する細胞は、べん毛の鞭打ち運動を制御するために軸糸ダイニンなど多数のべん毛タンパク質をもつ。被子植物はべん毛タンパク質の遺伝子の大半がゲノムから失われているが、BUG22をはじめわずかな遺伝子は保存されており、そのなかでも新規の遺伝子は *CONSERVED IN CILIATED SPECIES AND IN THE LAND PLANTS (CCP)* と命名されている (Hodges et al., 2011, *BMC Plant Biology*)。当研究室では *CCP2* と *BUG22* について、細胞内局在と遺伝子破壊の影響の解析を行った。

細胞内局在

上記の先行研究では特異的な抗体を用いたトリパノソーマ原虫の組織染色によって *CCP2*、*BUG22* の細胞内局在について、トリパノソーマ原虫を用いた検証を行っている。これによると、*BUG22* はべん毛において検出され、*CCP2* はべん毛の基部構造である基底小体において検出されている (Hodges et al., 2011, *BMC Plant Biology*)。 *BUG22* を緑色蛍光タンパク質 Clover でラベルした融合タンパク質 (*BUG22-Clover*) の遺伝子を、本来の組織特異性や量に近い状態で発現させるために *BUG22* 上流配列 (*BUG22* プロモーター) の直下に繋ぎ、全身の細胞核が *tdTomato* という赤色蛍光タンパク質でラベルされたシロイヌナズナ *pRPS5A::H2B-tdTomato* 株に導入した。得られた遺伝子組換え植物の成熟花粉を観察したところ、花粉栄養細胞全体に Clover の蛍光シグナルが観察され、べん毛の相同構造として期待されたような細胞内の特定の繊維状構造への局在は示されなかった。

一方、*CCP2* については既知の遺伝子発現データから花粉栄養細胞や精細胞における発現レベルが他の組織と比較して高くなく、*CCP2* 自身のプロモーターで *CCP2-Clover* 融合タンパク質を発現させても十分な蛍光シグナルの観察ができない恐れがあった。そこで、細胞内におけるタンパク質局在を確認するために十分なレベルの遺伝子発現をさせるため、*CCP2-Clover* をコードする融合遺伝子の上流に、花粉栄養細胞に特異的に発現する *ACA3* プロモーター、および、精細胞に特異的に発現する *HTR10* プロモーターを用いることとした。*pRPS5A::H2B-tdTomato* 株に *HTR10* プロモーターで *CCP2-Clover* を発現する遺伝子を導入した遺伝子組換え植物の成熟花粉を観察すると、精細胞でまったく Clover の蛍光シグナルは観察されなかった (図 2 左)。遺伝子発現量は遺伝子が導入されたゲノムの位置効果によって影響を受けるため、独立に作製した複数の遺伝子組換え植物を調べたが、いずれも同じ結果であった。最近、シロイヌナズナの精細胞における導入遺伝子について、導入遺伝子の塩基配列や DNA メチル化修飾、ヒストンタンパク質の修飾などの影響とは異なる未知の機構によって遺伝子発現抑制がかかる現象が報告された (Ohnishi and Kawashima, *The Plant Cell*, 2023)。 *Geseni* と命名されたこの現象によって、今回の *CCP2-Clover* の発現が抑制された可能性がある。いずれにせよ、精細胞のしっぽ構造における *CCP2-Clover* の局在を観察することはできなかった。次に、*pRPS5A::H2B-tdTomato* 株に *ACA3* プロモーターで *CCP2-Clover* を発現する遺伝子を導入した遺伝子組換え植物の成熟花粉を観察すると、花粉栄養細胞

全体に Clover が拡散し、栄養細胞核にやや強い蛍光シグナルを示すことが明らかとなった(図 2 右)。この花粉栄養細胞の観察実験は、しっぼ構造の形成における CCP2 の役割を直接的に示唆するデータとはならない。しかし、少なくとも精細胞のべん毛の痕跡が期待される細胞器官を持たないことが確実である栄養細胞の結果は対照データとして重要で、CCP2-Clover タンパク質が目立った細胞毒性を示さず、細胞内に拡散することを明らかにした点で意義があった。

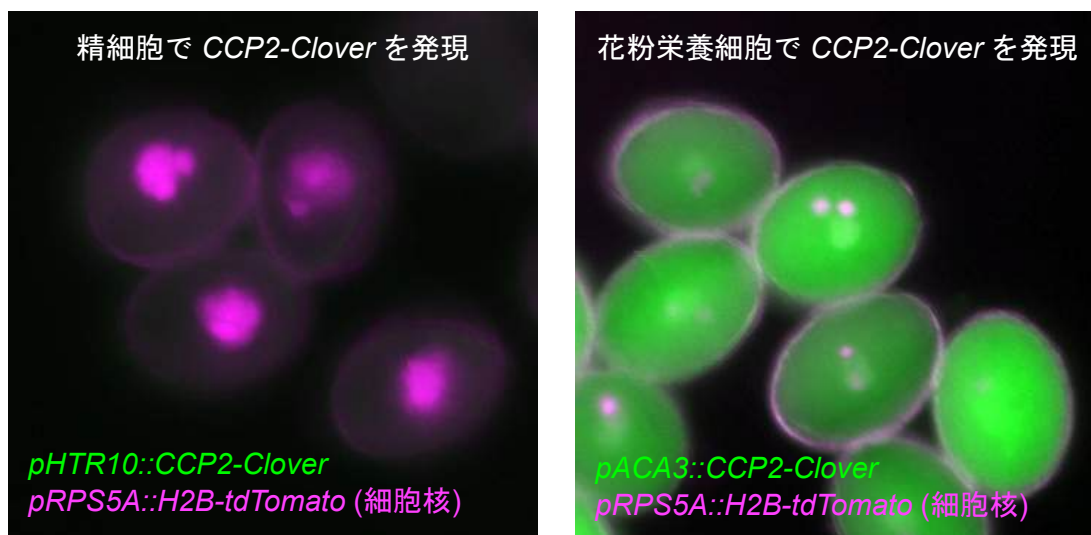


図 2: CCP2-Clover 融合遺伝子を導入した遺伝子組換えシロイヌナズナの成熟花粉の蛍光像

遺伝子破壊

BUG22 の精細胞における機能を調べるため、当研究室では CRISPR/CAS9 によるゲノム編集によって破壊株の作製を進めていた。その結果、開始コドンから 169 番目と 170 番目の 2 塩基の欠損をもつ *bug22^{cri}-9*、開始コドンから 169 番目を 1 塩基欠損する *bug22^{cri}-14*、開始コドンから 169 番目の塩基から 36 塩基が挿入された *bug22^{cri}-19* という 3 種類の対立遺伝子を得た。精細胞のしっぼ構造が破壊されることが既に当研究室で確認済みである *pHTR10::PHS1ΔP* の場合、花粉管の伸長に伴ってしっぼ構造の破断が起こり、稔実率の低下が観察される。そこで、まずはこれら *bug22* 欠損変異体の自家受粉の結果得られた果実の成長を調べた。その結果、いずれの *bug22* 破壊株も受精に異常がなく、ほぼ全ての種子が正常に発達を示すことがわかった。一方、CCP2 についてはシロイヌナズナ種子保管センター (ABRC) より、T-DNA の挿入による遺伝子破壊株 SALK_080681 を取得して観察を行った。しかし、こちらも稔実率に影響はなく、CCP2 遺伝子の受精における役割はわからなかった。

(成果・考察)

被子植物の精細胞のしっぼ構造がべん毛の痕跡器官かどうか調べる研究を立ち上げるため、本研究ではゲノム比較解析によってべん毛を形成する生物と被子植物との間で保存されている遺伝子から *BUG22* と *CCP2* に着目し、機能解析を行った。細胞内局在と遺伝子破壊という 2 つのアプローチの結果、いずれもしっぼ構造がべん毛の痕跡器官であることを示す有効な証拠は得られなかった。

トリパノソーマ原虫ではべん毛に局在する *BUG22* は、べん毛や繊毛の構造形成や動態に必要とされる CFA20 という軸糸タンパク質と共通する領域をもっており、シロイヌナズナでは 190 アミノ酸

残基からなるタンパク質である。BUG22 を欠損する緑藻クラミドモナスの変異体は、野生株のべん毛にある 9 セットの周辺微小管(ダブレット)の片側(B tubule)で観察されるクチバシのような構造を全て欠いており、通常の細胞が示す平面上を動く波打ち運動ではなく、対称的な三次元運動をすることが報告されている(Meng et al., 2014, *Journal of Cell Science*)。また、ショウジョウバエでは BUG22 の欠損によって、チューブリンタンパク質のポリグリン化修飾やポリグルタミン酸化修飾の低下が起こり、繊毛や神経の形成異常が生じる(Mendes Maria et al., 2014, *Biology Open*)。つまり、BUG22 に関していえば、べん毛や繊毛に機能が限定されておらず、チューブリンタンパク質の翻訳後修飾を介してそれぞれの生物の微小管の機能調節を広く行っている様子が伺える。実際、シロイヌナズナの花粉で BUG22 は、べん毛の痕跡器官として期待していた精細胞のしっぽ構造ではなく、花粉栄養細胞に拡散するように存在していた。花粉栄養細胞はやがて活発な先端成長を続ける花粉管を形成し、生殖に必須の細胞である。BUG22 は花粉管の微小管を制御することで、他の生物にはない生理機能を獲得した可能性がある。先行研究では、微小管を破壊する重合阻害剤のオリザリンやコルヒチンを処理しても、花粉管の伸長は停止しないことが知られており、花粉管の伸長という点において微小管は必須ではない。しかしながら、微小管結合タンパク質である MAP18 や MDP25 などが、花粉管先端におけるアクチン繊維重合を制御することで、伸長を調節するという報告もある(Zhu et al., 2013, *The Plant Cell*; Li et al., 2011, *The Plant Cell*)。最近になって、当研究室は微小管が伸長中の花粉管において精細胞や栄養細胞核を先端から近い場所に安定的に留めることで、スムーズな受精を助けることを示し、プレプリントとし公表した(Motomura et al., 2024, <https://doi.org/10.1101/2024.01.31.578224>)。BUG22 が被子植物で独自の機能を獲得したかどうかについては、今後、野生株と *bug22* 変異体について、花粉管の伸長能力や精細胞の輸送能力、チューブリンのポリグリン化修飾やポリグルタミン酸化修飾を解析することで明らかになると期待される。

CCP2 はシロイヌナズナではわずか 93 アミノ酸残基からなるタンパク質で、他のタンパク質と結合して多様な機能調節を担っているユビキチンというタンパク質と似たアミノ酸配列をもつ。トリパノソーマ原虫では基底小体に局在することが示されたものの続報はなく、BUG22 のようにべん毛の形成や機能は未知である。本研究では他にもべん毛や繊毛を持つ生物と被子植物に共通して保存されているものとして、WNK8, KATANIN p80 subunit, INOSITOL PHOSPHORYLCERAMIDE SYNTHASE 1 (IPCS1)、CCP3、Endopeptidase など 5 遺伝子に着目し、*Clover* 融合遺伝子と変異体作製を進めている。これらの比較ゲノムのアプローチによって、べん毛や繊毛を持つ生物のシステムが被子植物ではどのような独自の機能を獲得したのかわかるかもしれない。一方で、より直接的に精細胞のしっぽ構造形成の仕組みに迫る研究が最近報告された。それは原始的陸上植物から被子植物まで広く保存されている MYB 型転写因子である DUO1 のシロイヌナズナの表現型解析である(Rauf et al., 2023, *Plant Reproduction*)。duo1 変異体はもともと、成熟花粉の内部に 2 つ検出される精細胞が分裂異常によって 1 細胞しか作られない DUO POLLEN 変異体シリーズの一部として報告された。この最近の論文では duo1 変異体の作る精細胞のしっぽ構造が短く細いことを示している。つまり、DUO1 が発現制御する下流遺伝子群のなかに、精細胞のしっぽ構造形成に関わる実行遺伝子が含まれる可能性がある。シロイヌナズナを用いた体細胞における DUO1 発現誘導実験によって、それらの DUO1 によって調節される下

流遺伝子群の一部は判明している (Borg et al., 2011, *The Plant Cell*)。下流遺伝子群のリストには配偶子の接着や重複受精に重要な膜タンパク質の遺伝子も多く含まれているが、機能未知のタンパク質をコードするものも存在する。これらの変異体の解析によって、精細胞のしっぽ構造の形成に必要な因子が複数特定されれば、やがて精細胞のしっぽ構造とべん毛の共通点や相違点が自ずと明らかになるであろう。本研究を進めた副産物として、今後の精細胞のしっぽ構造の研究にも基盤的な材料として必要となる、微小管タグラインや精細胞膜をラベルしたレポーターラインも整備することができた。BUG22 や CCP2 の基本的な解析という成果と合わせ、まさに精細胞のしっぽ構造の起源を調べる萌芽的研究を展開することができた。この研究の推進に対して重要な機会を提供してくださった横浜学術教育振興財団の研究助成に改めて深く感謝申し上げたい。

シナプス非依存的なオキシトシン放出メカニズムの解明

神奈川大学理学部特別助教
越智 拓海

(研究目的)

申請者らは最近、間脳視床下部室傍核に存在し、オキシトシン (OXT) を発現するニューロンが脊髄でOXTを放出し、脊髄の性機能中枢ニューロンを活性化することで性機能を促進することを発見した¹⁾。この脊髄からのOXT放出はシナプスに局限せず、軸索からの拡散伝達 (volume transmission) によって放出・作用することも明らかにしたが、シナプス非依存的なOXT放出がどのように制御されるかはよくわかっていない。2007年に、CD38ノックアウトマウスではOXTの放出が特異的に抑制されることが報告された²⁾。CD38はADPリボシル化酵素活性をもち、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) から環状ADPリボース (cADPR) を合成する。cADPRは細胞内カルシウムストアからの Ca^{2+} の放出を促進することで、OXT放出に関わると考えられているが、詳細は不明なままである。これまでに申請者らは、CD38がOXT顆粒小胞膜で発現すること、酵素活性部位が存在するCD38のC末端を小胞の外 (細胞質) 側に向ける膜トポロジーをとることを見出している。そのため、CD38はOXT放出を小胞レベルで制御し、CD38によって放出されたOXTが性機能を調節することが示唆される。そこで本研究では、小胞CD38の酵素活性から性行動時のOXT放出メカニズムを明らかにすることを目的とした。

(研究方法)

① 下垂体後葉におけるCD38酵素活性の測定

OXT小胞が多量に存在する下垂体後葉の懸濁液を作製し、ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド (NGD) を基質として37°Cで1時間反応させた。ADPリボシル化酵素はNGDを環状GDPリボース (cGDPR) に転換し、cGDPRは300 nm励起光を照射すると410 nmの蛍光を発するため、cGDPRの合成量を蛍光値として測定できる。同時にADPリボシル化酵素の阻害剤であるニコチンアミドを加え、cGDPRがADPリボシル化酵素活性 (CD38酵素活性) により合成されたことを確かめた。

② 顆粒小胞におけるCD38酵素活性の測定

エクソソーム単離法を応用し、下垂体後葉抽出液から顆粒小胞画分を作製した。小胞画分においても下垂体後葉懸濁液と同様にcGDPR合成量を測定した。

③ 射精中枢ニューロンが存在する脊髄X層におけるCD38酵素活性の測定

脊髄 (L3-L4レベル) のX層をパンチアウトし、脊髄X層抽出液を作製した。脊髄X層抽出液においても下垂体後葉懸濁液、顆粒小胞画分と同様の解析を行い、脊髄X層のCD38酵素活性を解析した。

④ ニコチンアミド脊髄くも膜下腔投与後の性行動解析

脊髄くも膜下腔にポリエチレンチューブを挿入し、脊髄 (L3-L4レベル) のくも膜下腔に

ニコチンアミドを局所・微量投与した。ニコチンアミド投与15分後に性行動解析を行い、
脊髄のCD38酵素活性を抑制した時の性行動を解析した。コントロールは同一個体で人工脳
脊髄液投与を行った。

(結 果)

① OXT軸索におけるCD38酵素活性

OXT軸索が密に存在する下垂体後葉におけるcGMPの合成を確認するため、下垂体後葉懸濁液でCyclase活性を測定した。下垂体後葉懸濁液にNGDを加えると反応30分以降で蛍光強度の増加がみられた。一方、Nicotinamideを添加すると蛍光強度の増加はみられなかった。

② OXT顆粒小胞におけるCD38酵素活性

小胞膜に存在するCD38のcADPR合成能を明らかにする目的で、下垂体後葉の小胞画分を作製し、Cyclase活性を測定した（図左）。その結果、下垂体後葉小胞画分においても反応30分以降で蛍光強度の有意な増加がみられた（白丸、60分での蛍光強度 下垂体後葉702.80 ± 149.27、 $P < 0.05$ ）。一方、ろ液では蛍光強度の増加はみられなかった（水色丸、60分での蛍光強度 下垂体後葉-137.00 ± 10.44）。

③ 脊髄X層におけるCD38酵素活性

性機能を制御するOXT軸索が存在する腰髄L3-L4レベル中心管周囲部（X層）の懸濁液でもCyclase活性を測定した。腰髄懸濁液の原液では、15分以降、測定上限を超えて蛍光強度が増加していた。10倍希釈した懸濁液と100倍希釈した懸濁液では、60分間、蛍光強度が増加し続けた。100倍希釈腰髄懸濁液と比べ、短時間で蛍光強度の増加し始める10倍希釈腰髄懸濁液を用いて詳細に解析した。

結果、腰髄懸濁液では反応30分以降で、蛍光強度が有意に増加した。一方で、Nicotinamideを同時に添加した懸濁液では、蛍光強度の増加はみられなかった。また、腰髄X層においても小胞画分を作製し、Cyclase活性を測定した（図右）。その結果、腰髄の小胞画分においても反応30分以降で蛍光強度の有意な増加がみられた（白丸、60分での蛍光強度 腰髄X層22285.75 ± 5648.45、 $P < 0.05$ ）。一方、ろ液では蛍光強度の増加はみられなかった（水色丸、60分での蛍光強度 腰髄X層-775.50 ± 136.91）。

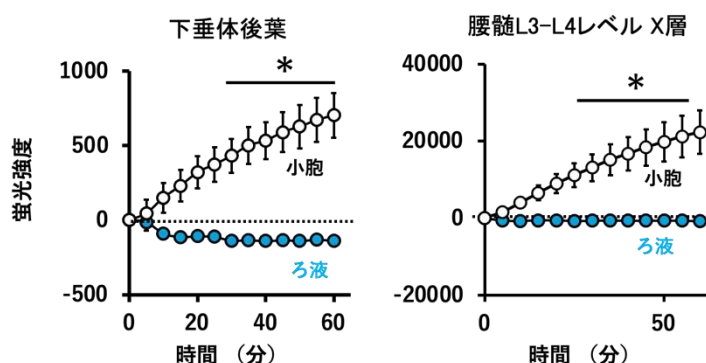


図 小胞画分における Cyclase 活性

左. 下垂体後葉の小胞画分における Cyclase 活性の測定。

右. 腰髄 L3-L4 レベル中心管周囲部（X 層）の小胞画分における Cyclase 活性の測定。小胞画分（白）では、反応 30 分以降蛍光強度が有意に増加した。ろ液では蛍光強度の増加はみられなかった（水色）。各プロットは蛍光強度の平均 ± 標準誤差で示した。n = 5。P < 0.05 vs 0 分。

④ 小胞膜CD38の酵素活性がOXT放出と雄の性行動に与える影響

小胞膜CD38が合成するcADPRがOXT放出を制御するか調べる目的で、脊髄にCyclase阻害剤を

投与し性行動を観察した。腰髄くも膜下腔にCyclase阻害剤のNicotinamideを投与した。Nicotinamide投与群ではコントロール群に比べて射精に至るまでの潜時が有意に短くなった（図10上段、 $P < 0.05$ ）。一方で、性的モチベーションの指標となるマウントや勃起の指標となるイントロミッションの潜時は変わらなかった。また、Nicotinamide投与群ではコントロール群に比べてイントロミッションと射精の回数が有意に減少した。一方で、マウント回数は変わらなかった。

（成果・考察） 等

今回、下垂体後葉の小胞画分を用いてOXT小胞にCyclase活性が存在することを見出した。また、脊髄に存在するOXT軸索においても小胞CD38はCyclase活性を持つことを示した。さらに、OXT小胞に存在するCD38の酵素活性がOXT放出を制御するのか調べる目的で、雄の脊髄にCyclase阻害剤を局所・微量投与し、性行動を解析した結果、Cyclase阻害剤の投与により勃起と射精の回数が減少することを明らかにした。脊髄へのOXT受容体阻害剤投与でも勃起と射精の回数が減少することから、Cyclase阻害剤により小胞CD38のcADPR合成が抑制された結果、OXT放出が抑制され、性機能の発現が阻害されたと考えている。以上の結果から、放出の場である軸索バリコシティにおいて、小胞膜に存在するCD38がcADPRを合成し、合成されたcADPRが細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させることで開口放出を促し、OXTの放出を制御することが示唆された。

一般に、神経伝達物質の放出時にはシナプス前終末の脱分極により、細胞膜に存在する電位依存 Ca^{2+} チャネルが活性化され、細胞外から細胞内へ Ca^{2+} 流入が起こる³⁾。細胞内で増加した Ca^{2+} はシナプス小胞と細胞膜との融合を促進し、開口放出を引き起こす。一方で、OXTの放出はシナプス部に局限せず、樹状突起や軸索バリコシティから拡散伝達によって放出（non-synaptic transmission）される^{1,4)}。OXTの樹状突起からの放出は膜電位に依存しないことが報告されており⁴⁾、OXTの放出においてもシナプス伝達同様に電位依存性 Ca^{2+} チャネルが活性化されているかは不明である。本研究において、CD38が細胞内でcADPRを合成し、小胞体に存在する Ca^{2+} プールから Ca^{2+} を放出させる可能性を示した。CD38 K0マウスではOXTの放出が抑制されるが、CD38 K0マウスの下垂体後葉を薬理的に脱分極させても、 Ca^{2+} 上昇は野生型の半分程度しか起こらない²⁾。そのため、軸索バリコシティからのOXT放出にはCD38-cADPR経路による細胞内 Ca^{2+} プールから Ca^{2+} の放出が重要であり、膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルの活性化はCD38-cADPR経路によるOXT放出を補佐しているのかもしれない。

CD38-cADPR経路は、OXT以外にも、膵臓の β 細胞からのインスリン分泌や下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモンの放出にも関わるということが報告されている。ラット膵臓の β 細胞では温度感受性 Ca^{2+} チャネルTransient Receptor Potential Melastatin 2（TRPM2）が発現しており、培養温度を上昇させると、インスリン放出量が増加する。また、TRPM2 K0マウスではインスリン放出が抑制される。このことから、TRPM2がインスリン分泌の制御に関わることが示唆されている。一方で、発熱時に血中OXT量が増加することが知られており、下垂体後葉を 38.5°C で培養し、cADPRを加えるとOXT放出が増加する。OXT軸索が存在する下垂体後葉においてTRPM2が発現することも報告されており、CD38-cADPR経路は温度依存的に放出が増加するホルモンの産生細胞で働くのかもしれない。また、膵臓の β 細胞では、CD38が細胞膜に発現する一方で、OXTニューロンではCD38は顆粒小胞の膜に存在する。内分泌細胞は

比較的単純な形態をとっており、細胞膜まで分泌小胞が運ばれてくれば、どこからでも放出ができる。一方で、ニューロンの場合、長い軸索や枝分かれした樹状突起など特徴的な構造をしている。そのため、樹状突起や軸索バリコシティーのような放出現場でのみ、小胞と細胞膜を融合させるためにCD38が顆粒小胞の膜に存在しているのかもしれない。

OXT放出の‘場’である下垂体後葉では、放出されなかったOXTを含む余分な顆粒小胞は、リソソームによりオートファジー（自食）される⁵⁾。最近、リソソームの膜に存在するCa²⁺チャネルの二孔チャネル（Two-Pore Channel, TPC）KOマウスで、野生型と比べて血中OXT量が減少すること、下垂体後葉のOXT軸索において顆粒小胞がリソソームに取り込まれ、自食されている様に観察されることが報告された⁵⁾。TPC KOマウスではCa²⁺が上昇せず、OXT放出が抑制された結果、下垂体後葉に小胞が蓄積し、自食作用が促進されると考えられる。CD38はcADPRを合成する以外にニコチン酸アデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）からニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NAADP）を合成する活性ももつ。NAADPはTPCに作用する⁶⁾ことで細胞内Ca²⁺を調節している。一方で、CD38 KOマウスの下垂体後葉を単離・培養し、培養液にcADPRを加えると、培養液中へのOXT放出が増加するが、NAADPを加えてもOXT放出量は変わらない²⁾。これらのことから、CD38のCyclase活性こそがOXT開口放出のキーファクターであり、TPCはCD38によって合成されるNAADPを利用してOXT放出を促進しているのかもしれない。

腰髄におけるOXT放出はシナプスに局限せず、シナプス非依存的に放出されたOXTは性機能中枢ニューロンを活性化することで性機能を促進的に制御している¹⁾。OXTニューロンは視床下部室傍核と視索上核に存在し、このうち、ほんの一部である室傍核尾側亜核の小細胞性のOXTニューロンだけが脊髄に投射している。少ないOXT軸索で多数の性機能中枢ニューロンを活性化するためにシナプスに局限しない1対多な放出メカニズムを利用しているのかもしれない。そして、CD38は細胞膜ではなく小胞の膜に存在することで、小胞が蓄積する放出の場（軸索バリコシティー）でのみ効率的にOXT放出を制御するのかもしれない。

- 1) Oti T, Satoh K, Uta D, Nagafuchi J, Tateishi S, Ueda R, Takanami K, Young LJ, Galione A, Morris JF, Sakamoto T, and Sakamoto H (2021) Oxytocin Influences Male Sexual Activity via Non-synaptic Axonal Release in the Spinal Cord. *Curr Biol* **31**, 103-114 e105.
- 2) Jin D *et al.* (2007) CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion. *Nature* **446**, 41-45.
- 3) Katz B, and Miledi R (1967) Ionic requirements of synaptic transmitter release. *Nature* **215**, 651.
- 4) Ludwig M, Sabatier N, Bull PM, Landgraf R, Dayanithi G, and Leng G (2002) Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature* **418**, 85-89.
- 5) Martucci LL *et al.* (2023) Endolysosomal TPCs regulate social behavior by controlling oxytocin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **120**, e2213682120.
- 6) Calcraft PJ *et al.* (2009) NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature* **459**, 596-600.

染色体分配速度を規定する力学要素の 細胞内直接測定系の樹立

横浜市立大学理学部特任助教

林 華子

(研究目的)

■ 研究背景

「遺伝形質を次の世代へ継承する」という生き物の本質は、染色体分配機構によって実現される。真核生物の染色体分配機構は、紡錘体極へ染色体を正確に輸送するために、有糸分裂期に限定して働く、細胞の中の仕組みである。例えば、脊椎動物の染色体分配は、染色体が1分当たり1～3ミクロンの一定速度で、数分程度かけて紡錘体極へと輸送される。興味深いことに、この染色体分配速度は、異なる大きさの染色体間で変わらない。このように、細胞の中では、染色体分配速度は適切に制御されている。この速度の制御は、正確な染色体分配の実現に必要であると考えられる (Potapova., Biolgy, 2017)。実際に、分配が遅れた染色体は、姉妹細胞に正常に分配されない。実験的に分配が速められた染色体も、染色体分配に失敗する。その生理学的な重要性にも関わらず、染色体分配速度が制御される仕組みは明らかになっていない。

これまで、染色体分配装置を構成する分子やそれらの制御分子が同定され、分子遺伝学、かつ細胞生物学的な解析により、染色体分配現象に寄与する分子の生化学的な性質や機能が明らかになってきた。一方で、染色体輸送を細胞内で直接力学操作することへの技術的困難さがあり、染色体分配速度を制御する力学的な性質は、ほとんど理解されていない。

■ 本研究の目的

本研究は、磁気ピンセットを用いて、染色体の新しい細胞内力学操作系を確立することを目的とする。ここで確立する力学操作系は、染色体分配速度の恒常性を実現する力学基盤を解明することを目指した、申請者の進める研究課題において必須な実験手技となる。

(研究方法)

以下の項目を検討することにより、生きた細胞の中で染色体に直接力学操作をする実験系の構築を進める。

まず、生きた細胞の中で染色体に直接力学操作をする実験系に用いる実験生物を選定する必要がある。具体的には、以下に計画する研究方法で扱う実験手技と分配時の染色体動態の定量的解析を容易にするための適切な細胞種を選定する。

(a) 生きた細胞の中で有糸分裂期の染色体を観察するための準備

染色体分配時の染色体動態の定量的解析において、分配時の染色体の運動速度や、染色体の大きさや形状を、生きた細胞の中で精度よく測定することが第一の必要条件である。そのために、核の大きさや染色体の本数を考慮して、複数の細胞種を用意する。本項目では、生きた細胞で染色体を観察するための細胞株を樹立する。ヌクレオソームや動原体の構成たんぱく質を染色体マーカーとし、それらに蛍光たんぱく質を融合したものを、細胞内で発現させる。この細胞をガラスボトムディッシュ内で培養し、スピニングディスク共焦点顕微鏡により、染色体分配時の染色体動態の経時観察を行う。

(b) 生細胞内で染色体に直接力学操作をするプローブ粒子の導入方法の確立

本研究では、細胞内磁気ピンセットにより、細胞内の染色体一本一本に直接力学操作する系の構築を目指す。自身が所属する研究室では、1~200 pN 以上の広い範囲の外力を細胞内構造に負荷できる細胞内磁気ピンセットが独自に開発されており、利用可能である

(Tanimoto et al., Nat Phys. 2018)。先行研究において、釣り竿のように、やわらかい撓りのあるガラス微細針で、細胞の外から間接的に分配中の染色体を引っ張った実験がある。その結果として、100 pN 程度の外力が染色体運動の遅延を引き起こすことが示されており (Nicklas., JCB, 1983)、本研究で用いる磁気ピンセットの出力は、染色体の力学操作に十分であると考えられる。

本項目では、以下の3点について検討する。

(i) 上述した細胞内磁気ピンセットの手法を発展させ、プローブ磁性粒子を、染色体に作用させる方法を確立する。

(ii) このプローブ粒子を細胞内に導入する方法を確立する。プローブ粒子は、ガラス微細針により顕微下注入する。経験的に、この細胞内へのプローブ粒子の注入操作は、細胞にダメージを与えやすい。このガラス微細針の作成方法や細胞の培養方法を工夫して、極力細胞へのダメージを低減させる手法を探索する必要がある。

(iii) 細胞内に導入したプローブ粒子に、磁気ピンセットから発生される磁場をかけることにより、細胞内のプローブ粒子を動かす。磁気ピンセットから発生させる磁場は、磁気ピンセットの出力を変化させることによって制御する。磁場をかけたプローブ粒子の動きと染色体動態(研究方法(a)を参照)を顕微鏡下で同時に経時観察する。磁場をかけている状況下で、染色体に局在、または近傍に存在するプローブ粒子が、染色体の変形をひき起こす様子が観察されるかにより判断する。

(結果)

■ 実験に用いる細胞種の選定

まず、染色体動態が顕微鏡下で観察しやすく、プローブ粒子の導入が容易な細胞種の候補を探索した。細胞種の候補の選択肢として、染色体動態研究に汎用されているものを優先した。

染色体動態の顕微鏡観察のしやすさの検討は、取得した Z スタック画像から染色体の位置や形がより明瞭に抽出できる細胞種を候補の中から選択した。ここでは、異なる 3 種類の哺乳動物細胞について、蛍光たんぱく質融合型染色体マーカーを恒常的に発現する細胞株を選別した。これらの細胞株に対して、共焦点スピニング顕微鏡下で、染色体の動態を、細胞周期を通じて観察し、Z スタック画像として記録した。まずは、染色体分配の一連の様子を捉えることに成功した。ここで取得した Z スタック画像を用いて染色体の 3D 画像を構築し、その画像から 1 つの細胞の中の全染色体を数えて、細胞ストックのデータベース上で公開されている染色体の本数と一致するかを確認した。3 つのうち、染色体の数が多く、細胞の大きさが比較的小さい細胞種は、染色体 1 本 1 本を区別することが難しく、それゆえ、多くの染色体について、それらの長さを明瞭に区別することが不可能であった。一方、残りの 2 種類の細胞種は、細胞の大きさがより大きく、染色体の数が少ない。上述の細胞と違って、染色体の本数や長さが判定できた。

以上より、3 種類のうち、2 種類の細胞種が本研究の実験に用いる細胞としてより適当であることがわかった。

同時に、生きた細胞にプローブ粒子を導入する操作についても検討した。私が所属する研究室では、これまでにマイクロインジェクションを用いて、生きた細胞へのプローブ粒子の導入に成功している。ただし、上述した実験材料の候補に挙がっている細胞種での経験はなかった。細胞種により、細胞の厚みや大きさ、細胞内の構造の形状や状態等、様々な異なるため、既存の導入条件や操作の難しさは未知であった。まずは、確立された既存の方法を基本とし、マイクロインジェクションによりプローブ粒子を有糸分裂期の細胞の中に導入した。プローブ粒子を染色体近傍に導入させることに成功した。上述で候補と挙げた 2 種類の細胞種の中でも、インジェクションのしやすさやインジェクションによる細胞へのダメージが異なることがわかった。

これらの結果を踏まえて、よりインジェクション操作が容易な細胞種を、本研究では実験材料として用いると結論し、この後続く、染色体にプローブ粒子を作用する方法の検討(研究方法 (b) の (i), (iii))に進んだ。

■ 染色体にプローブ粒子を作用させる方法の検討

プローブ粒子を細胞内に導入し、磁気ピンセットによりこの粒子に外力をかけた。外力下で、染色体に局在しているプローブ粒子の移動を観察できた。同時に、プローブ粒子付近の染色体が変形する様子を捉えることができた。

この観察より、プローブ粒子が染色体に直接作用する状況を実験的につくりだせたと結論づけた。

(成果・考察)

現所属の研究室にて、染色体動態の可視化やプローブ粒子表面の機能化を遂行するために必要な分子細胞生物学的な実験環境の立ち上げを一通り行った。その結果として、所属研究室の強みである、高度な顕微鏡セットアップと精巧な細胞内磁気ピンセット技術を発展させて、染色体への直接的な力学操作の確立は、順調に進んでいる。磁気ピンセットからの外力により、染色体に直接力を作用することに成功した。分配時は、染色体に、紡錘体微小管が結合しているため、微小管から引っ張られる力の影響を受けている。そのため、紡錘体が形成される前の時期に比べて、染色体を実験的に動かすためには新たな工夫が必要であることが予想される。そのために、より大きな力を出せるような磁気ピンセットやビーズの改良、選定を行なっている。

引き続き、染色体分配速度の恒常性を実現する力学基盤を解明することを目指し、研究を進めていく。

(謝辞)

分子生物学的な実験遂行のために、実験機器の貸出、試薬や実験スペースの共有を快く承諾していただいた沓名伸介博士と沓名研究室の皆様に感謝いたします。

日頃の議論や研究室の顕微鏡の維持、その技術発展を通じて、研究全般の円滑な推進に努めていただいている谷本博一博士に感謝いたします。

血液中 RNA による乳癌化学療法副作用予測因子に関する 探索的研究

横浜市立大学附属病院 消化器腫瘍外科学

押 正徳

(研究目的)

本研究は血液検体内のエクソソーム内に存在するRNA (microRNA(miR)および messengerRNA(mRNA)) を用いて化学療法に伴う副作用発症の予測バイオマーカーおよびその生物学的特徴を探索する事を目的とした。

(研究方法)

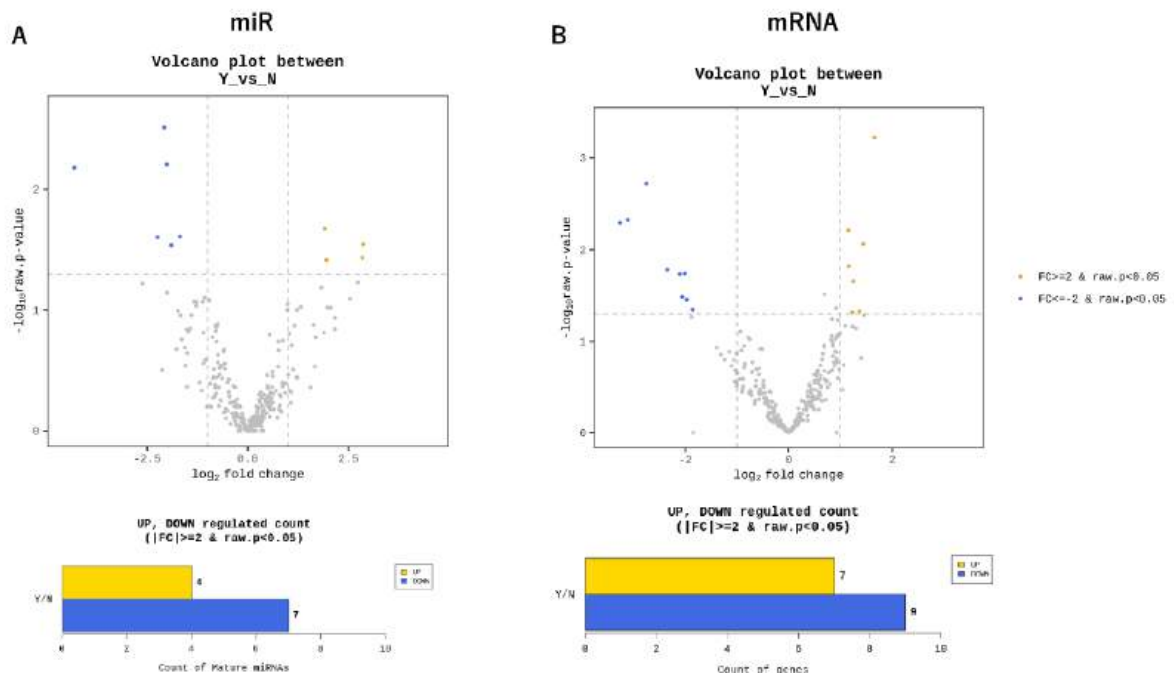
【方法】当教室で周術期化学療法施行前および手術前に採取された血液検体を使用する。収集された検体は立ち入りが管理された当講座研究室で-80℃で保管する。その後、血液血清検体からエクソソームを分離し内部に含まれるmiRおよびmRNAを抽出する。検体数が集まったのち次世代シーケンサーにて解析を行う。次世代シーケンスはマクロジェンジャパン株式会社に委託する。次世代シーケンサーにより血液検体内のRNAの発現を網羅的に解析する。副作用 (G1-4) をきたした乳癌患者群と障害を認めなかった群 (G0) 間における発現の違いを解析しバイオマーカーと成り得るmiRを同定する。さらにmRNAを用いてバイオリジを解析する。臨床病理学的因子の収集は申請者の院内電子カルテからすでに収集され匿名化されたデータベースが作成されているためこちらを使用する。

【主要評価項目】miRおよびmRNAの発現と化学療法に伴う副作用 (末梢神経障害) 発現の相関関係。【副次的評価項目】mRNAを用いたバイオリジの解析にて相関関係を示すmiRに関連するバイオリジを解析する。

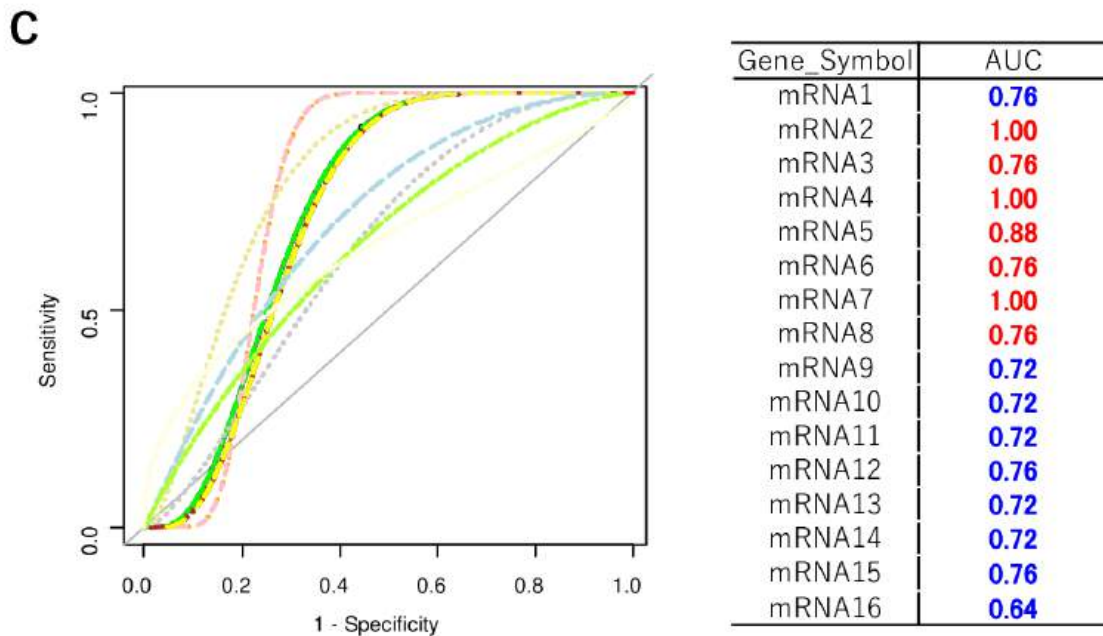
【解析方法】副作用とmiRおよびmRNA発現量との相関をPearsonのカイ 2 乗検定を用いる。共変量の調整のためにLogistic回帰分析を行う。2群間 (G2-4 vs. G0-1) の平均値の比較にはt検定またはMann-Whitney_U検定を用いる。共変量の調整のために共分散分析を行う。上記解析で選択されたmiRと癌や宿主におけるバイオリジをmRNAの発現を用いてgene set enrichment analysisおよびgene set variation analysisを用いて解析する。解析にはフリーソフトRを使用する。実験データの管理は申請者が所属する講座医局内に設置されたパスワード管理がされたパソコンで行う。

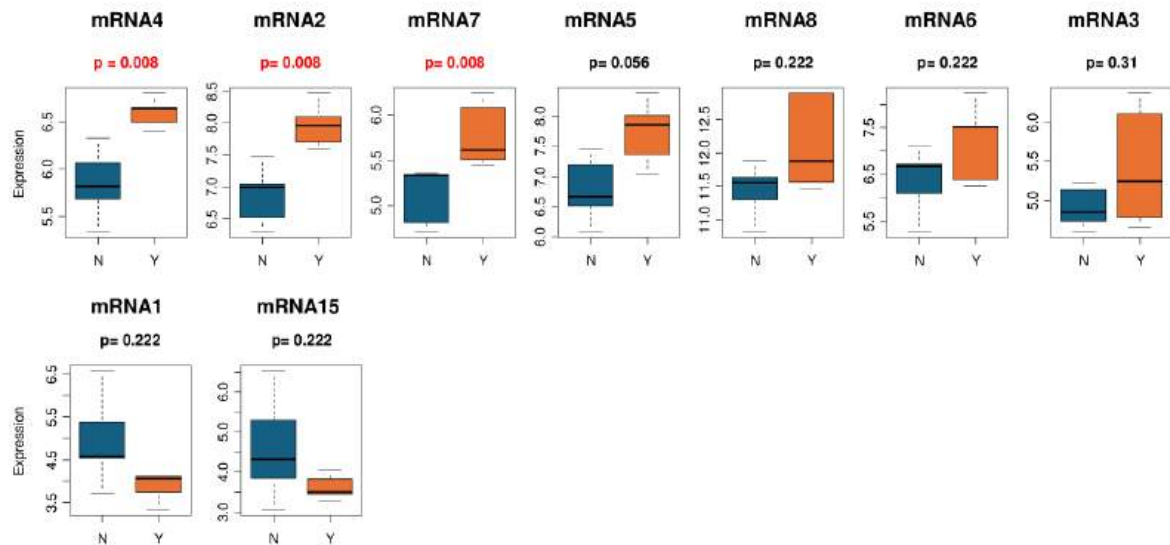
本研究はヘルシンキ宣言に基づいた倫理原則を順守し、「臨床研究に関する倫理指針」に従って実施する。

(結 果)



タキサン系薬剤を使用した乳癌患者のうち、G2以上の副作用を認めた5症例とG1以下であった5症例におけるRNA発現の比較を行った。2群間で臨床病理学的因子に差を認めなかった。RNA発現の2群間比較 (DEG) では副作用発症群でmRNAの7遺伝子が有意に発現が高く9遺伝子が有意に発現が低かった (Figure A)。またmiRの4遺伝子が有意に発現が高く7遺伝子が有意に発現が低かった (Figure B)。特にmRNAでは3遺伝子の発現に副作用発現との強い相関を認めた (Figure C, D)。mRNAを用いたバイオロジー解析ではエクソソーム内に十分量のmRNA発現が抽出されなかったため試行しなかった。





(成果・考察) 等

乳癌における化学療法は標準治療として多くの患者で選択され再発抑制・生存率の向上に寄与しているが、副作用による生活質の低下が問題となっており、時に症状が重度および長期にわたる場合もある。特にタキサン系薬剤によるしびれの症状は治療後も長期間続くことも稀ではなく、患者によっては生涯付き合わなければならない副作用である。よって、化学療法加療前に副作用リスクの高い患者を同定することが出来れば副作用対策を行いながらの治療が可能となる。しかしこれまで乳癌に対する化学療法の副作用発現を予測する臨床因子や遺伝子発現マーカーの十分な研究はなされていない。そこで本研究では、患者への侵襲の少ない血液検体を使用して、治療効果および副作用の発現の予測因子を開発することを目指し立案された。更に遺伝子解析により副作用の背景となる生物学的特徴を理解することで副作用自体の治療に結び付く可能性もあり、患者ごとの乳癌治療の最適化に貢献したいと考えた。また、今回は血中のエクソソーム内のmiRおよびmRNAなど遺伝子発現を中心に解析を行ったが、遺伝子発現は民族集団差があることが知られており、日本人集団コホートで検討することは重要となる。またLiquid biopsy, 特に血液検体には宿主の癌細胞のみならず免疫細胞を含めた様々な細胞に関わる遺伝子情報が含まれていることが知られている。抗癌剤の副作用は宿主の正常細胞の傷害に伴うものであり、全身の細胞の遺伝子状態の変化をとらえることのできるLiquid biopsyは様々な副作用反応の情報を把握することができる。更に術前化学療法前後に施行される血液検体の残血を使用して解析することが出来るため、患者に余剰な侵襲を与えることがない。

本研究によりタキサン系薬剤にともなうしびれの副作用に関連する遺伝子群を同定することができた。さらにその多くが神経系に関連することが報告されていることも発見した。これらのことから、今回同定された遺伝子発現が副作用発症の予測バイオマーカーとなりえる可能性が示唆された。今後はこれらの遺伝子をターゲットとしてPCR等でvalidationされるかどうかの研究を進めていく方針である。そして、前向き研究で副作用発症者に対して事前対策を行う(化学療法投与中にグローブを使用する等)ことで発症率が減少できるかどうかの臨床研究も行いたいと考える。本研究結果によるバイオマーカーを臨床応用することが出来れば、副作用に対する事前対策を個別に行うことができるようになり、重篤

な副作用を回避すべく代替の治療方法を提案することができるようになることが期待される。乳癌の好発年齢は40-60歳の働き盛りの年代であり、化学療法によって乳癌の生存率改善のみならず、適切な副作用対策により治療後のQOLの改善が見込めれば、社会全体の生産性が向上することが期待される。本研究がその一翼が担えれば幸いである。

術後急性期における鎮痛薬の投与タイミングによる鎮痛効果の検討—慢性術後疼痛への移行予防を目指して

横浜市立大学医学研究科看護学専攻看護生命科学分野博士前期課程 2 年

近藤 友美

(研究目的)

慢性術後疼痛 (CPSP) は術後患者の約30%に発症し、そのうち2～10%が日常生活に支障をきたしていると報告されており、術後患者の長期的なQOL低下が社会問題となっている。CPSPの発症要因の1つとして術後24時の不十分な鎮痛が挙げられ、術後急性期の適切な疼痛管理は手術からの回復だけでなく患者予後の観点からも重要といえる。そこでCPSP発症予防のため、術後24時間の効果的な鎮痛薬の投与タイミングを明らかにする必要がある。しかしマルチモーダル鎮痛の初回投与タイミングの違いに伴う鎮痛効果の持続時間及びその鎮痛効果の違いが明らかになっていないため、術後24時間の反復投与の間隔を検討することは困難である。

そこで、本研究では術後痛に対し、病棟で使用される、アセトアミノフェンとNSAIDsを併用したマルチモーダル鎮痛の、初回投与における最適な投与タイミングを検討することを目的とする。

(研究方法)

8週齢の雄性SDラット（日本SLC，静岡）を15匹使用した。ラットを1週間馴化させた後、右総頸静脈にカテーテルの挿入を行った。カテーテル挿入による疼痛および感染徴候がないことを確認し、1週間後に慢性術後痛モデルである、Skin/muscle incision and retraction (SMIR) モデルを作成した。モデル作成後に鎮痛薬を投与し、その鎮痛効果を測定した。アセトアミノフェン（アセリオ®，テルモ株式会社，東京）16.67 mg/kg、NSAIDsとしてフルルビプロフェンアキシチル（ロピオン®，科研製薬株式会社，東京）0.83 mg/kgを頸静脈カテーテルより投与した。同時投与群では、SMIRモデル作成直後にアセトアミノフェンおよびフルルビプロフェンアキシチルを、交互投与群では、モデル作成直後にアセトアミノフェン、3時間後にフルルビプロフェンアキシチルを投与した。コントロール群には、モデル作成直後に0.9%生理食塩水を投与した。

刺激誘発性疼痛（体動時痛）は、SMIR モデル作成前(base)、作成後 1, 3, 6, 12, 24 時間に Von Frey テストを実施し、up-down 法で評価した。さらに非刺激誘発性疼痛（安静時痛）を SMIR モデル作成後 1, 3, 6, 12, 24 時間のラットの疼痛関連行動の観察により評価した。金網の上に置かれた足底の状態を次のようにスコア化した；0 = 創傷部がメッシュによって白化または歪んでいる，1 = 創傷部がメッシュに触れ、白化や歪みがない，2 = 前足が完全にメッシュから外れている

経時変化の比較は、一元配置反復分散分析および Dunnett 検定を行った。群間比較は、一元配置分散分析および Tukey 検定を行った。統計解析は GraphPad Prism 10.1.0 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて実施した。いずれも統計学的有意水準は $p = 0.05$ とした。

(結 果)

術後24時間において、コントロール群は術後1時間から有意に50%疼痛閾値が低下し、その後も横ばいであった（いずれの時点も $p < 0.0001$ ）。同時投与群は、術後1時間では術前と比較して一時的に50%疼痛閾値が上昇したが、術後3時間以降は50%疼痛閾値が有意に低下していた（術後3時間以降いずれの時点も $p < 0.0001$ ）。交互投与群は、術後1時間から50%疼痛閾値が有意に低下し、術後3時間ではさらに50%疼痛閾値が低下していた。その後は術後24時間まで横ばい状態であった（1時間後のみ $p = 0.0061$ ，その他の時点は $p < 0.0001$ ）。

術後 1 時間では同時投与群とコントロール群、交互投与群とコントロール群、同時投与群と交互投与群のすべての群間において有意差が認められた（ $p < 0.0002$ ， $p = 0.0304$ ， $p = 0.0140$ ）。また術後 6 時間において、交互投与群とコントロール群で50%疼痛閾値に有意差を認めた（ $p = 0.0106$ ）。術後 12 および 24 時間では、交互投与群の 50%疼痛閾値が同時投与群およびコントロール群と比較し高い傾向が見られた。

足底の置き方から算出した疼痛関連行動スコアでは、いずれの投与群においても経時変化に有意差は認められなかった。各時点の群間比較では、術後 6 時間で同時投与群はコントロール群と比較し、スコアの有意な低下を認めた（ $p = 0.0301$ ）。同時投与群とコントロール群、交互投与群とコントロール群では、術後 24 時間においてスコアに有意差を認めた（いずれも $p = 0.0034$ ）。

術後 6 時間および 24 時間の血清 TNF- α の定量結果より、同一投与タイミング群内では、術後 6 時間と術後 24 時間の TNF- α 濃度に有意差は認められなかった。術後 6 時間の TNF- α 濃度（コントロール群 27.2 ± 14.2 ，同時投与群； 62.2 ± 24.5 ，交互投与群 61.7 ± 18.9 pg/ml，各群ともに Mean $\pm$ SE ）、術後 24 時間の TNF- α 濃度（コントロール群； 21.5 ± 10.9 ；同時投与群； 74.2 ± 22.4 ，交互投与群； 52.0 ± 20.3 pg/ml）は 3 群間で有意差は認められなかった。

(成果・考察) 等

本研究で使用したアセトアミノフェンは、半減期が 2.59 時間であり、効果時間が 0.25～6 時間と示されている¹⁰⁾。またフルルビプロフェンアキセチルは、3 時間後には鎮痛効果が約 50%になること、効果時間が 0.5～6 時間であることが認められた¹¹⁾。さらに、アセトアミノフェンと NSAIDs の組み合わせ効果を検証した研究では、同時併用で相乗効果が認められることを示した¹³⁾。これらのことから同時投与群では、アセトアミノフェンと NSAIDs 両方の鎮痛効果が認められる術後 1 時間においては、相乗効果も認められるため、経時的および 3 群比較において 50%疼痛閾値が最も高くなったと考えられる。一方、術後 3 時間は、アセトアミノフェン、NSAIDs ともに鎮痛効果が半減する時点¹²⁾であり、50%疼痛閾値が減少したと推測される。

また交互投与群では、コントロール群と比較し術後 6 時間で 50%疼痛閾値の有意な上昇を、術後 12 時間および 24 時間では 50%疼痛閾値が高い傾向を認め、鎮痛効果

が長時間持続したといえる。先行研究¹⁴⁾では、炎症性疼痛モデルラットに対し、NSAIDs が早期に投与することで鎮痛効果が高く、低用量で十分な鎮痛効果が望めることが示唆された。さらに本研究の交互投与群は、術直後にアセトアミノフェンを投与し、術後3時間でNSAIDsを追加投与したため、術直後の最も疼痛が強い時点でNSAIDsを投与するよりも、鎮痛効果の持続時間が長くなったと考えられる。

足底の疼痛関連行動をスコア化したところ、同時投与群、交互投与群の術後24時間の疼痛関連行動スコアはコントロール群と比較し、有意に小さいことが示された。先行研究によると、足底切開による術後痛モデルラットに対し、術後にモルヒネを投与したところ、24時間後の疼痛関連行動スコアは減少した¹⁴⁾。マルチモーダル鎮痛の目的の1つとして、麻薬使用量の減少が挙げられている。そのため本研究の結果は、アセトアミノフェンおよびNSAIDsの術後初回投与によっても、術後24時間の疼痛を改善させ、マルチモーダル鎮痛による麻薬使用量の減少に寄与することが推察される。

本研究ではSMIRモデルにおける、鎮痛薬による炎症反応を評価するため、術後6時間と24時間で血清中のTNF- α 濃度を測定した。その結果、術後6時間および24時間において各群のTNF- α 濃度に有意差は認められなかった。そのため、鎮痛薬投与の有無にかかわらず、術後24時間では炎症が持続していることが考えられる。足底切開により誘発された術後痛モデルラットの創部組織におけるTNF- α 濃度を定量した結果、術後6時間、24時間ともに術直後と発現量は同程度であった^{15, 16)}。したがって、本研究においても術後6時間、24時間で発現量は大きく変わらず、術後痛モデルラットを用いた結果としては妥当であると考えられる。

以上の結果・考察よりCPSP発症予防には、術後24時間の疼痛の持続時間が重要であり、鎮痛効果の持続時間が長い交互投与の方が適した投与タイミングである可能性が示唆された。今後はCPSP発症予防に向けて、術後24時間での反復投与による鎮痛効果の違いを検証し、臨床への応用を目指す。

(引用文献)

- 1) テルモ株式会社. (2021). アセリオTM静注液 1000 mgバッグ (3rd ed.) . Retrieved from https://www.info.pmda.go.jp/go/pack/1141400A2020_1_06/ (2023年11月30日)
- 2) 科研製薬株式会社. (2023). 静注用非ステロイド性鎮痛剤 フルルビプロフェン アキシチル注射液 ロピオン[®]静注 50 mg (12th ed.) Retrieved from https://www.info.pmda.go.jp/go/pack/1149407A1040_1_10/ (2023年11月30日)
- 3) Miranda, H. F., Puig, M. M., Prieto, J. C., & Pinardi, G. (2006). Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain*, 121 (1), 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.11.012>

- 4) 北原美優, 関桂子, 翠川辰行, 有田淳哉, 内山章. (2020). ラット炎症性疼痛モデルにおける痛みの程度・服用タイミングによるアスピリンの鎮痛効果の検討. *YAKUGAKUZASSHI*, 140 (1) , 91-97.
<https://doi.org/10.1248/yakushi.19-00168>
- 5) Zahn, P. K., Gysbers, D., & Brennan, T. J. (1997). Effect of systemic and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology*, 86 (5), 1066-1077.
<https://doi.org/10.1097/00000542-199705000-00010>
- 6) Furlan, B., Torres, B., Zampoli, J., Sperandio, M., Juliana Damasceno Oliveira, Eneida de Paula, Saia, M., & Giovana Radomille Tófoli. (2020). Pre-clinical evaluation of new dibucaine formulations for preventive analgesia. *Journal of Liposome Research*, 31 (3), 230-236.
<https://doi.org/10.1080/08982104.2020.1785494>
- 7) Marcos Aurélio Teixeira, Zampoli, J., Aguinaldo Silva Garcez, & Giovana Radomille Tófoli. (2021). Comparative analysis of two laser wavelengths in the stimulation of acupuncture points for analgesic effects in an animal model. *Journal of Biophotonics*, 15 (1).
<https://doi.org/10.1002/jbio.202100213>

免疫チェックポイント阻害薬による心臓有害事象に対する 新規バイオマーカーの開発

横浜市立大学医学部 循環器内科
峯岸 慎太郎

(研究目的)

がん対策の進歩により国内の全がんの5年生存率は50%を超えたが、がん患者に合併する循環器疾患や、高齢がんサバイバーに合併する循環器疾患が臨床現場での新たな課題となり、専門的な医療需要が拡大している。がん患者の生存率の改善には、外科的な医療技術の進歩のみならず、分子生物学や発生工学の進歩による、分子標的薬の開発によるものが大きい。なかでも、免疫チェックポイント阻害薬（Immune Checkpoint Inhibitors, ICIs）は、がん細胞の非自己である腫瘍抗原に対する、宿主であるがん患者に認められる免疫寛容状態を解消することで、がん患者自身のもつ免疫機能による抗腫瘍効果を発揮する、新しい抗腫瘍薬である。ICIs特有の有害事象として、免疫関連有害事象があり、心筋炎は致死率が高く予測不可能な合併症である。

本研究では、ICIsによる心筋炎の分子病態をもとに、抗原化するタンパク質を探索し、ICIsを投与された患者に起こる免疫状態を診断するバイオマーカーを開発することで臨床応用を目指す。

(研究方法)

本邦では、PD-1阻害薬であるオプジーボを始めとして、数々のICIsが上市され、使用されている。ICIsは、当初悪性黒色腫に、その適応が限定されていたが、適応拡大に伴い、非小細胞肺癌、腎細胞がん、ホジキンリンパ腫、頭頸部がん等に使用されている。腫瘍抗原は、抗原提示細胞（APC）のII型主要組織適合遺伝子複合体（MHC）により、T細胞に対して抗原提示される。がん抗原を異物と認識するT細胞は、細胞表面のT細胞受容（TCR）、副経路である CD80-CD28 の結合を介して、がん抗原に対する細胞障害性T細胞を介する免疫を獲得するが（priming phase）、CTLA-4, PDL-1, PD-1 を介した免疫シナプスが形成されることで、腫瘍抗原に対する免疫応答（effector phase）が抑制されてしまう。

このようにICIsの抗腫瘍効果は、抑制性の免疫シナプスによる、がん細胞に対する、免疫寛容状態を解消することにある。ICIsの使用の増加により、従来の抗がん剤にない、特有の免疫関連有害事象（immune related adverse events, irAEs）の発生が認められる。頻度が高い代表的なirAEsとして、大腸炎が知られているが、致死率は低い。一方、ICIsによる心筋炎はまれに発生するものの、劇症型心筋炎は致死率が高く、その病態の解明と治療法の確立が急務である。劇症例が、氷山の一角であるかのように、非特異的で、重症化に至らないくすり型・不全型を呈する可能性もある。

心筋炎の組織診断には、心内膜生検が有効であるが、侵襲性が高く、適応が限られており、irAEs疑い例全てに施行できない。そこで、本研究では、侵襲性が低く、繰り返し検査

が可能であり、心筋・腫瘍に共通する抗原を特定することのできる、特異性の高い γ グロブリン型自己抗体ならびに、可溶性T細胞受容体に着目した研究を計画した。神奈川県立がんセンターおよび、横浜市立大学附属病院では、独自に生体試料センター・バイオバンクを運営しており、神奈川県内のがんの専門医療機関・高度医療機関として先端医療を提供している。本研究では、生体試料センター・バイオバンクのリソース（腫瘍組織、残余血清、メディカル・レコード）を活用し、ICIs使用がん患者における心筋炎ないし、疑い例における、腫瘍組織ならびに、心筋組織由来の抗原化したたんぱく質を探索し、生物学的な異常を示すバイオマーカーとなりうる、自己抗体・可溶性T細胞受容体を特定する。

1. ICIs使用がん患者に発生した心筋炎(疑い例を含む)の検索

神奈川県立がんセンター・横浜市立大学附属病院のバイオバンクデータのレビューを実施し、irAEsに関連した心筋炎には、特異的な所見がないことから、不整脈の出現、重大な心エコー所見、心臓マーカー（Troponin I, BNP, NT-pro BNPほか）が基準値上限を上回る値に該当する症例を抽出し、本研究の解析対象とすることを計画した。

2. 心筋炎/心筋炎疑い症例の抗原化したタンパク質の探索

以下#1～#3の方法により、ICIs使用がん患者における心筋炎/心筋炎疑い症例における、腫瘍組織ならびに、心筋組織由来の抗原化したたんぱく質を探索し、生物学的な異常を示すバイオマーカーとなりうる、自己抗体・可溶性T細胞受容体を特定することを計画した。

#1 腫瘍組織・心筋組織から、Plasma Membrane Protein Extraction Kit（K268-50, Vio Vision）をもちいて、細胞膜タンパクを抽出する。抽出した、細胞膜タンパクは0.5% Triton X-100 を加えた PBSに溶解して次の実験に用いる。

#2 細胞膜タンパクは濃度測定測定せず3xSBを加えて混和した後、95℃で変性させ、SDS-PAGE に用いる。転写装置を用いて、PVDF膜に転写したのち、Western Blotting を行う。一次抗体には ICIs治療を受けた患者の血清を用い、二次抗体にはHRP conjugated抗ヒトIgG抗体またはHRP conjugated抗ヒトsoluble TCR抗体にメンブレンを浸し、4℃で一晩反応させる。TBSTで洗浄し、検出試薬をもちいて検出し、撮影する。抗原タンパク質と反応した、 γ グロブリン型自己抗体・可溶性T細胞受容体を特定する。さらに、撮影後のメンブレンをCBB染色し、タンパクの位置を確認する。

#3 《ゲルの切り出し》ウエスタンブロットに用いたサンプルを再度SDS-PAGEで流し、CBB 染色を行う。ウエスタンブロットで検出されたバンドと同じ位置のバンドを切り出し、質量分析を行う。

（結 果）

1. 横浜市立大学附属病院におけるirAEs発生率

本研究実施のために、横浜市立大学附属病院のデータベースを用いて、irAEs発生率の調査を行った。承認されたICIs（ニボルマブ、ペムブロリズマブ、イピリムマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ）の投与を受けたがん患者を対象とした。2014年12月から2021年7月までにICI単剤療法または併用療法を開始した症例に対して、臨床データ、検査結果、治療データをカルテから抽出した。

合計369症例が同定され、325例はPD-1またはPD-L1阻害薬による治療を受け、44例は

ICIとCTLA-4阻害薬の併用による治療を受けていた。この中で、CTCAE（Common Terminology Criteria for Adverse Events）でGrade2以上のirAEsの発生は170例で見られた。さらに、ICIsを開始してからCKの著明な上昇を認めた症例は3例であった。3例ともアジア系日本人で、1例は女性、2例は男性、平均年齢71±6.6歳であった。ICIs開始からの平均治療期間は13.7週（範囲3-34）であった。これらの患者はCK上昇を伴う筋力低下を認め、心筋炎の合併も疑われたが、ICIsに関連した筋炎と臨床診断された。全例がグルココルチコイドで治療され、1例は免疫グロブリン静注療法と血漿交換が追加された。全例でCKは低下し、筋炎症状は改善が得られたが、2例の患者は経過中に死亡となった（1人は肺炎、1人は腫瘍の進行）。

2. 心筋炎/心筋炎疑い症例に対するバイオマーカーの検索

自験例のICIsによる心筋炎/心筋炎疑い症例は限られており、より多くの患者集団におけるICIs関連の症例報告による臨床的特徴を評価した。その結果、心筋炎はICIs関連筋炎の頻度の高い致死的な合併症であることが明らかとなった¹。さらに、ICIs関連筋炎発症時の臨床的特徴では、眼瞼下垂と呼吸筋麻痺は心筋炎群で有意に頻度が高く、心筋炎を合併した筋炎に対しては、血漿交換や生物学的製剤などの積極的な治療を受けているにも関わらず、予後不良であることが判明した。これらのデータは、心筋炎がICI関連筋炎の重篤な合併症であり、その発症は眼瞼下垂の発症によって予測できることが示唆された²。

今後、神奈川県立がんセンター・横浜市立大学附属病院のバイオバンクデータを用いて、ICIsに関連した心筋炎/心筋炎疑い症例に対する腫瘍組織ならびに、心筋組織由来の抗原化したたんぱく質の検索実施していく計画であり、現在予備検討を行っている。今回得られた知見をもとに、筋炎や重症筋無力症の合併の有無や予後など、包括的な解析を実施していく予定である。

（成果・考察）

がんの予後が改善するに伴い、心血管疾患を有するがん患者が増え、臨床の間でもその対応が課題になっている。米国心臓病協会（AHA）から2023年にがんと合併する血圧管理に関する勧告が出された³。現代の多くのがん治療薬は心血管毒性を伴い、心臓病、血栓塞栓症、血圧上昇を引き起こす可能性がある。そのため、AHAは、がん治療前の心血管疾患のリスク評価、がん治療中の血圧管理、がん治療終了後のリバウンド性低血圧など、血圧とがんの間に存在する複雑な関係を、がん治療による最適な治療効果を確保しながら、集学的なチームアプローチで管理することを提唱しており、日本高血圧学会もこの提案に賛同している^{4,5}。

チロシンキナーゼ阻害薬をはじめとする分子標的薬に伴う心毒性や、血管内皮増殖因子阻害剤による血圧上昇に対するモニタリングや対処が重要なのは疑いのない事実であり、5年ぶりに改訂された2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertensionでもまとめられている⁶。一方で、ICIsに伴う心毒性については、臨床症例の蓄積が始まったばかりであり、今後の展開が期待されている領域である。我々はこれまでにICIsと高血圧に関する検証を実施した⁷。その結果、ランダム化比較試験32件・被験者総数19,810人のがん患者を対象としたシステマティック・レビューとメタ解析を行い、ICIsを開始しても、短期的には血圧が上昇しないことを証明している。

ICIsは、今後も臨床応用が拡大し、投薬を受けるがん患者も増大することが見込まれている。循環器免疫関連有害事象についての基礎研究は限られており、本研究のように、生物学的機序を明らかにする試みにより、理論的に整合性の高い診断や、治療への展開が期待される。

1. Aldrich J, Pundole X, Tummala S, et al. Inflammatory Myositis in Cancer Patients Receiving Immune Checkpoint Inhibitors. *Arthritis Rheumatol* . 2021 May;73(5):866-874.
2. Hamada N, Maeda A, Takase-Minegishi K, et al. Incidence and Distinct Features of Immune Checkpoint Inhibitor-Related Myositis From Idiopathic Inflammatory Myositis: A Single-Center Experience With Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Front Immunol*. 2021 Dec 6;12:803410.
3. Cohen JB, Brown NJ, Brown SA, et al. Cancer Therapy-Related Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*. 2023 Mar;80(3):e46-e57.
4. Kidoguchi S, Sugano N, Tokudome G, et al. New Concept of Onco-Hypertension and Future Perspectives. *Hypertension*. 2021 Jan;77(1):16-27.
5. Minegishi S, Nishiyama A, Yano Y, et al. Future Prospects of Onco-Hypertension. *Hypertension*. 2023 Jul;80(7):e123-e124.
6. Mancia G, Kreutz R, Brunström M, et al. 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension: Endorsed by the International Society of Hypertension (ISH) and the European Renal Association (ERA). *J Hypertens*. 2023 Dec 1;41(12):1874-2071.
7. Minegishi S, Kinguchi S, Horita N, et al. Immune Checkpoint Inhibitors Do Not Increase Short-Term Risk of Hypertension in Cancer Patients: a Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Hypertension*. 2022 Nov;79(11):2611-2621

レミマゾラムを用いた薬力学試験

①レミフェンタニルとの相互作用試験

②覚醒濃度予測のための探索的試験

横浜市立大学医学部附属病院麻酔科講師
東條 彩子

(研究目的)

レミマゾラムは2020年に世界で初めて日本で臨床使用が承認された全身麻酔薬である。このレミマゾラムを用いて二つの臨床研究を計画した。それぞれの研究目的は以下のとおりである。

研究①

全身麻酔導入では急速に全身麻酔薬および麻薬鎮痛薬が投与される。患者を確実に意識消失状態にすることが求められるため、全身麻酔薬および麻薬鎮痛薬が過量投与されやすく、循環抑制のため低血圧・徐脈のリスクとなる。一方、麻酔導入時の循環抑制を懸念するケースにおいては、全身麻酔薬および麻薬鎮痛薬の不足により、刺激が強い気管挿管刺激後に高血圧・頻脈が生じることがある。

全身麻酔薬と麻薬鎮痛薬は相乗的に作用し、意識消失および刺激に対する交感神経反応抑制効果を発揮することが知られており、全身麻酔患者の麻酔導入時の安全性向上のためには、麻酔導入時の適切なレミマゾラム投与濃度とオピオイド濃度の組み合わせを知る必要がある。しかしながらレミマゾラムとオピオイドの相互作用についての臨床研究は行われておらず、適切な投与方法が確立されていない。そこで、全身麻酔導入時の適切なレミマゾラム濃度と麻薬性鎮痛薬の濃度の組み合わせは明らかにするために、本研究ではレミマゾラムと麻薬性鎮痛薬レミフェンタニルの全身麻酔導入時の薬力学的相互作用を検討することを目的とする。

研究②

レミマゾラムの効果は個人差が大きいため、適切な麻酔維持濃度の決定に何らかの指標や情報が必要となる。レミマゾラムと同様に効果の個人差が大きい静脈麻酔薬プロポフォールでは、効果の判定に脳波を用いて適切な麻酔維持濃度を決定する。しかし、レミマゾラム麻酔では脳波の解読が難しいことから、適切な麻酔維持濃度の決定が難しいのが現状であり、術中覚醒を避けようとすれば投与濃度が高くなり、結果として覚醒遅延や術後の効果遷延が生じてしまうことがある。また逆に、覚醒遅延や効果遷延を避けようとすれば投与濃度が低くなり、術中覚醒のリスクが高くなる。つまり覚醒濃度を予測することがで

できれば、高すぎる維持濃度または低すぎる維持濃度を避けることができ、適切な維持濃度を決定する良い指標となる。そのため、本研究では麻酔導入開始から意識消失までに観察できる変数とレミマゾラムの覚醒濃度の関係を検討し、レミマゾラムを用いる麻酔において覚醒濃度を予測する方法を構築することを目的とする。

(研究方法)

二つの研究はいずれも単施設・非盲検・薬力学試験である。いずれも、主要評価項目の評価方法のばらつきを抑制するため、単施設での試験としている。

研究①

対象は、横浜市立大学附属病院において全身麻酔下予定手術を受ける成人患者である。研究において血圧をタイムリーに観察する必要があることから、手術中・手術後の血圧測定や採血のために橈骨動脈に動脈カテーテルを挿入する症例が対象となっている。

本研究は、レミフェンタニル濃度を一定とし、レミマゾラム濃度を徐々に増加させる投与レジメ、およびレミマゾラム濃度を一定とし、レミフェンタニル濃度を徐々に増加させる投与レジメ、によるクリスクロスデザインを用いた。

目標症例数はレミフェンタニル濃度一定・レミマゾラム濃度漸増群 20 名、レミマゾラム濃度一定・レミフェンタニル濃度漸増群 20 名である。20 名は、一定とする薬物濃度が二つの年齢層（65 歳未満、65 歳以上）に 5 段階、男女各 1 名ずつ必要であることから算出している。

対象患者の初めの 20 名はレミフェンタニル濃度一定・レミマゾラム濃度漸増群、次の 20 名はレミマゾラム濃度一定・レミフェンタニル濃度漸増群と設定した。同意が得られた後、患者は、調整因子である年齢および性別により①65 歳未満女性、②65 歳以上女性、③65 歳未満男性、④65 歳以上男性、いずれかに無作為に割り付けされた。

どちらの群もレミマゾラム投与開始後、連続的に意識を mOAA/S スコアで評価して意識消失を確認した。意識消失後、筋弛緩薬を投与し、喉頭鏡による喉頭展開操作を行った。操作により心拍数または血圧が 20%以上上昇した場合は操作をいったん止め、循環動態が落ち着いてから喉頭展開操作を行った。

主要評価項目は「意識消失」、「喉頭鏡による喉頭展開操作に対する交感神経反応抑制」、「気管挿管刺激に対する交感神経反応抑制」時のレミマゾラム効果部位濃度およびレミフェンタニル効果部位濃度である。「意識消失」は、mOAA/S スコア 2 点未満、「交感神経反応抑制」は、各刺激(喉頭展開操作および気管挿管刺激)による心拍数および平均血圧の上昇率 20% 未満、とそれぞれ定義した。副次評価項目は、麻酔導入開始前から挿管完了 5 分後まで(意識消失評価時、喉頭展開時、挿管時を含む)の①脳波モニタリング ②観血的動脈圧、心拍数 ③レミマゾラムおよびレミフェンタニル効果部位濃度である。

安全性評価項目として、臨床研究への参加によって研究対象者に生じたあらゆる医療上有害な事象を収集した。

主要な解析は、「意識消失」、「喉頭鏡による喉頭展開操作に対する交感神経反応抑制」、「気

管挿管刺激に対する交感神経反応抑制」の発生要因について、患者背景、レミマゾラム効果部位濃度、レミフェンタニル効果部位濃度を説明変数候補とした多変量ロジスティック回帰分析を行い、 $p<0.25$ を満たす変数を応答反応曲面作成時の共変量候補とする。その後「意識消失」、「喉頭鏡による喉頭展開操作に対する交感神経反応抑制」、「気管挿管刺激に対する交感神経反応抑制」の有無を z 軸、レミマゾラム効果部位濃度・レミフェンタニル効果部位濃度を xy 軸とした応答反応曲面を作成する。

研究②

対象は、横浜市立大学附属病院において全身麻酔下予定手術を受ける成人患者である。また、意識レベルの変化を評価していく研究のため、選択基準として、意識清明の患者を設定している。

目標症例数は 18～54 歳、55～74 歳、75～89 歳の各年齢区分ごとに 18 例（男性 9 例、女性 9 例）の合計 54 例とした。

麻酔導入において、レミマゾラムをあらかじめ決定した投与レジメ (60kg 未満, 60kg 以上で初回投与量を) に従ってボーラス投与し、意識状態の変化を mOAA/S スコアで評価する。麻酔導入開始から意識消失するまでに、レミマゾラム投与量, mOAA/S スコアの変化, レミマゾラム投与開始からレミマゾラム効果発現開始までの時間、レミマゾラム投与開始から意識消失までの時間、脳波モニタリングの変数を観察する。その後はレミマゾラムで麻酔管理を行い、手術終了後、いつも通りに覚醒させていく。

主要評価項目は覚醒時のレミマゾラム効果部位濃度とした。副次評価項目は手術室在室時の①脳波モニタリング ②非観血的動脈圧, 心拍数 ③レミマゾラム効果部位濃度である。

安全性評価項目として、臨床研究への参加によって研究対象者に生じたあらゆる医療上有害な事象を収集した。

主要な解析は、覚醒レミマゾラム効果部位濃度に関する記述統計を行う。次に主要評価項目である覚醒レミマゾラム効果部位濃度の予測因子を求める。予測因子候補は年齢、性別、術前のスクリーニングで収集したデータ、レミマゾラム投与量, mOAA/S スコア, 脳波モニタに表示される指標, レミマゾラム投与開始からレミマゾラム効果発現開始 (mOAA/S スコア <5) までの時間, レミマゾラム投与開始から意識消失 (mOAA/S スコア <2) までの時間, レミマゾラム投与量, mOAA/S スコアの変化速度とする。単変量解析 (線形回帰分析またはロジスティック回帰分析) において、 $p<0.25$ の因子を多変量解析の説明変数候補とし、多変量重回帰分析または多変量ロジスティック解析により解析を行い、覚醒レミマゾラム効果部位濃度の予測因子を求めていく。

研究①はレミマゾラム及びレミフェンタニルの用法用量が添付文書の適用外に該当するため、研究②はレミマゾラムの用法用量が添付文書の適用外に該当するため、どちらも特定臨床研究として施行する。また、ヘルシンキ宣言に基づいた倫理原則に則り、臨床研究法、同法施行規則、個人情報保護法及びその他関連通知に従って実施する。

(進行状況)

現在、二つの研究は下記の通りに進行中であり、結果として明記できる結果は得られていないため、進行状況を報告する。

研究①

本研究は2023年7月の横浜市立大学臨床研究審査委員会での承認を受け、Japan Registry of Clinical Trials 臨床研究等提出・公開システム (jRCT) <https://jrct.niph.go.jp>に登録されている (jRCTs031230301)。2023年7月の医薬品開発業務受託機関 (CRO) との相談を経て、症例報告書 (CRF) の雛形を作成し、試験開始の準備が整った2024年6月より症例登録を開始した。

研究②

本研究は2024年5月の横浜市立大学臨床研究審査委員会での承認を受け、jRCT <https://jrct.niph.go.jp>に登録されている (jRCTs031240098)。2024年7月にCROとの相談を実施予定であり、その後CRFの雛形を作成し、試験開始の準備が整い次第 (目安としては2024年9月頃)、症例登録開始予定である。

重粒子照射が細胞外小胞分泌に与える影響と治療効果予測 マーカーの探索

神奈川県立がんセンター 任期付研究員

関原 和正

(研究目的)

重粒子線治療は炭素イオンなどの重粒子を加速させ病巣に照射する放射線治療の一種である。X線やγ線などの光子線は体表付近で吸収線量が最大となるので皮膚などの正常組織にも強い影響を与える上に深部では吸収線量が減少することから腫瘍へ十分な線量を照射することが出来ない。それを改善するために、照射野内の放射線の強度に強弱をつけつつ色々な方向から照射する強度変調放射線治療 (Intensity Modulated Radiation Therapy: IMRT) が導入され、周囲の正常組織に当たる放射線量を最小限に抑えながら腫瘍に線量を与えられるようになった。しかし、光子線を使う以上それにも限界がある。一方、重粒子線は体表付近での吸収線量は小さく、体内深部で吸収線量がピークに達し（ブラッグピーク）、その後急激に減衰するという性質を持つことから、その性質を利用して正常組織を避けつつ腫瘍に高い線量を照射できる（図1）。また光子線と比較して、生物学的効果（細胞殺傷能力）が高く（Matsumoto et al. J. Pers. Med. 2021）、低酸素細胞や細胞周期がDNA合成期（S期）の細胞、がん幹細胞などの光子線に抵抗性を示す腫瘍に対しても有効で、がんの浸潤、転移を抑制することも知られている（Cui et al. Cancer Res 2011, Ogata et al. Cancer Res 2005）。さらに従来の光子線を用いた放射線治療と比較して治療期間が短く患者負担が軽いというメリットもある。このように現在非常に注目を浴びる重粒子線治療であるが、我が国が世界をリードする数少ない治療法の一つである。当初はアメリカで試験的に産声を上げた治療法であるが、1993年に千葉の放射線医学総合研究所（現・量研機構）に世界初の医療用重粒子加速装置（HIMAC）が導入され、翌年炭素イオンを用いた重粒子線治療が開始されたのが契機となり、全世界に広がりを見せている。現在世界で稼働している施設のうちの約半数の7施設が我が国にあり（図2）、神奈川県および横浜市においてはそのうちの1つを有していることから、県民市民の健康増進の観点からも今後さらなる普及、適応拡大が望まれる。

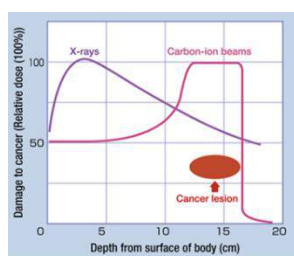


図1:X線および重粒子線の線量分布



図2 (左)全国の重粒子線治療施設
原子力産業新聞 2020.10.06.
記事より
(右)i-ROCK治療装置

そのためには、重粒子線の生物作用メカニズムに基づく最適な治療法の開発が必要不可欠であり、その礎となる基礎研究を進めていくことが非常に重要である。基礎研究において治療有効性を評価するために従来から単層細胞培養系が用いられてきたが、腫瘍の適切

な構造および細胞間接触が失われるため、生体内の腫瘍の状況を忠実に反映することができず、抗腫瘍効果を過大評価してしまうことがわかってきた。また腫瘍単独でなく、腫瘍が存在する微小環境の役割についても検討すべきであるが、単層細胞培養系では限界がある。そこで抗腫瘍効果を正確に評価でき免疫系を含めたがん間質相互作用を観察することが出来るin vivoマウスモデルを用いる。本研究において、野生型および細胞外小胞分泌に関わる因子をノックアウトした細胞を移植したマウスモデルを用いて、**X線、重粒子線照射前後のがん細胞と間質細胞のクロストークの変化**について、特に細胞外小胞の役割に焦点を当てて検証することを目的とした。

(研究方法)

①細胞外小胞分泌関連因子Rab27A/B KO細胞の作製

マウス肺がん細胞株LLC LMNからCRISPR-Cas9を用いてRab27AおよびRab27Bをダブルノックアウトした細胞 (LLC LMN Rab27A/B KO) を作製した。

②X線と重粒子線の抗腫瘍効果の相違

まず、LLC LMN細胞において、X線と重粒子線の生物学的効果を調べるため、X線もしくは炭素線を照射し、コロニー形成能アッセイを行った。それを基に、LLC LMNおよびLLC LMN Rab27A/B KO細胞にX線および炭素線を照射したときの抗腫瘍効果をCell Counting Kit-8 (CCK-8)を用いて調べた。

③X線、重粒子線照射前後のがん細胞と間質細胞のクロストークの変化

次に、放射線照射によるがん細胞と間質細胞のクロストークの変化を調査するため、LLC LMNおよびLLC LMN Rab27A/B KO細胞に対し、X線もしくは炭素線を照射し、それぞれ照射した細胞および対照群として非照射細胞をC57BL/6マウスに移植した (図3)。早期として移植2日後、晚期として移植10日後に腫瘍組織を採取し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。放射線照射後の病巣の組織学的変化と病巣への免疫担当細胞の浸潤を評価した。

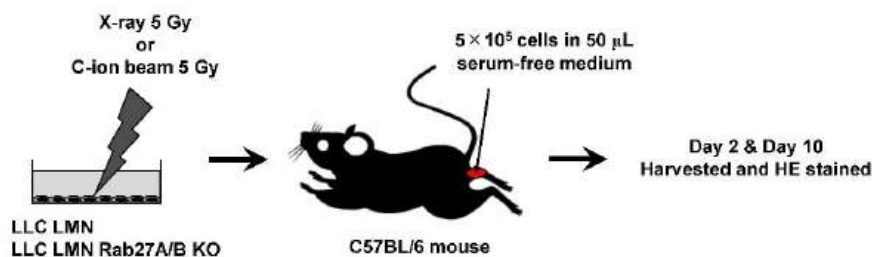


図3：マウス移植実験の概要

(結 果)

LLC LMN細胞において、X線もしくは炭素線を照射し、コロニー形成能アッセイを行った。細胞生存率曲線 (図4) を描き、D₁₀ (10%の細胞が生存する線量) における生物学的効果比 (Relative Biological Effectiveness (RBE) : X線と比べて重粒子線の生物学的な効果の強さを表す指標) を算出したところ、D₁₀はX線で4.79 Gy、炭素線で2.65 Gyなので、炭

炭素線の RBE 値は約1.8となった。つまり、炭素線はX線の約半分の線量で同等の効果を得られるということである。次に、LLC LMNおよびLLC LMN Rab27A/B KO細胞に対し、X線もしくはX線の半分の線量の炭素線を照射し、照射4日後の細胞生存率をCCK-8 assayを用いて計測した。LLC LMN細胞においてRab27A/Bをノックアウトし細胞外小胞分泌を阻害すると、放射線の種類を問わず放射線感受性を増強することが分かった（図5）。

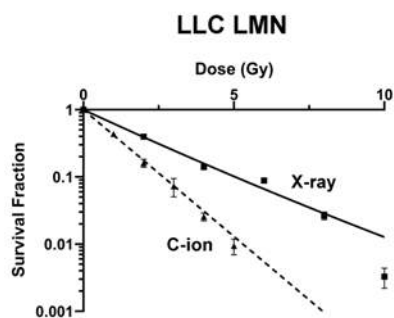


図4：放射線照射されたLLC LMN細胞の細胞生存率曲線

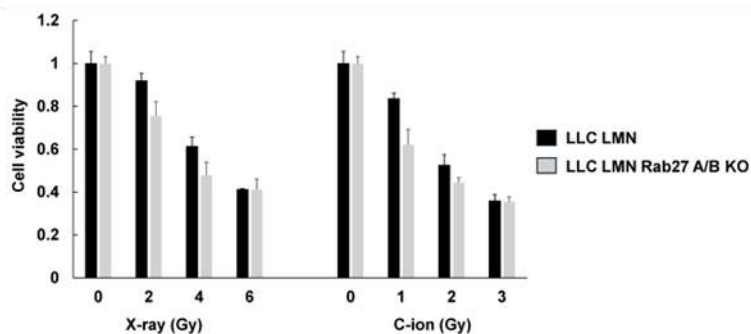


図5：放射線照射4日後におけるLLC LMNおよびLLC LMN Rab27A/B KO細胞の細胞生存率

続いて、放射線照射によるがん細胞と間質細胞のクロストークの変化を調査するため、LLC LMNおよびLLC LMN Rab27A/B KO細胞に対し、X線 5 Gyもしくは炭素線 5 Gyを照射し、すぐにX線照射細胞、炭素線照射細胞および対照群として非照射細胞をC57BL/6マウスに移植した。早期として移植2日後、晚期として移植10日後に腫瘍組織を採取し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い、放射線照射後の病巣の組織学的変化と病巣への免疫担当細胞の浸潤を評価した（図6）。移植2日後では、腫瘍が定着して間もないことから、Rab27A/Bの存在および照射の有無にかかわらず、すべての群において腫瘍の大きさはほぼ変わらなかった。またどの群においても好中球およびリンパ球の浸潤がみられた。炭

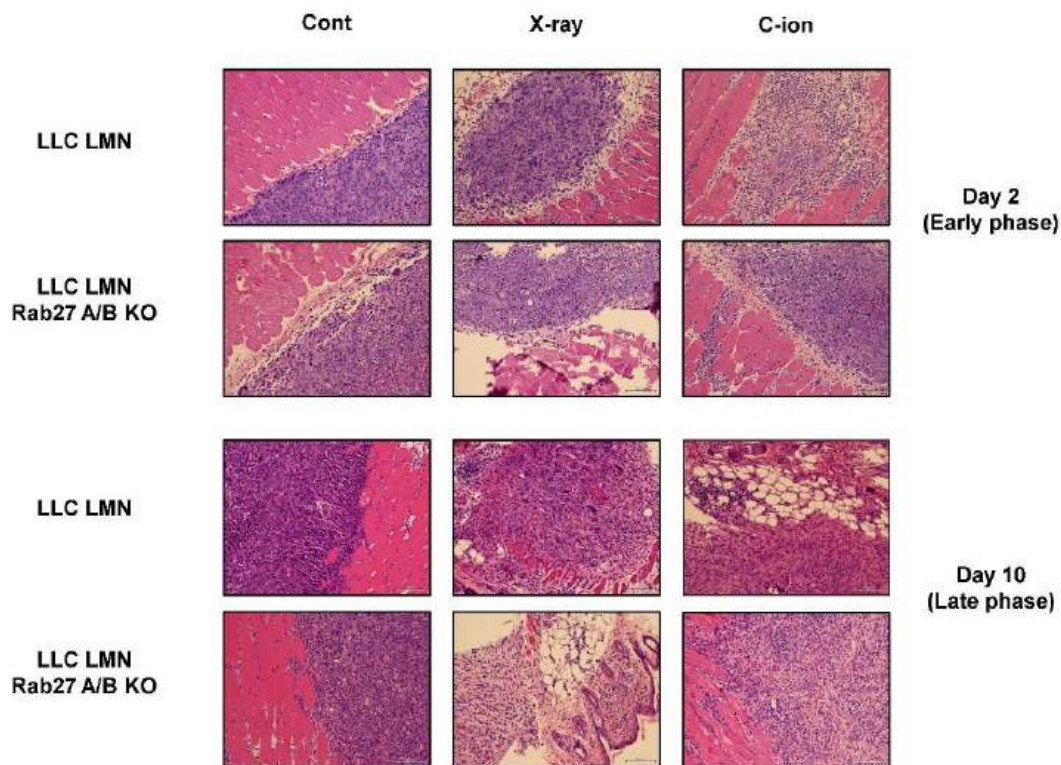


図6：放射線照射後の病巣の組織学的変化と病巣への免疫担当細胞の浸潤

素線照射群で細胞質が拡大していることが観察されたことから細胞老化の誘導が示唆された。またLLC LMN Rab27A/B KO 炭素線照射群においては腫瘍内部が凝固壊死に陥っていた。一方、移植10日後では、LLC LMN Rab27A/B KO群はLLC LMN群と比較して、腫瘍の大きさが小さかった。また非照射（対照）群と比べ、X線照射群および炭素線照射群では、腫瘍の大きさが小さかった。さらに炭素線照射群ではがん細胞が死滅していることが顕著に確認できた。

（成果・考察等）

本研究では、野生型および細胞外小胞分泌に関わる因子をノックアウトした細胞を移植したマウスモデルを用いて、X線、重粒子線照射前後のがん細胞と間質細胞のクロストークの変化について、特に細胞外小胞の役割に焦点を当てて検証した。in vitroおよび放射線照射後細胞を移植したin vivoモデルにおいて、細胞外小胞の分泌を抑制すると腫瘍の増殖、成長を抑制することを明らかにした。さらに細胞外小胞分泌の抑制は、X線および重粒子線の抗腫瘍効果を高めるということも見出した。炭素線照射で細胞老化が誘導されることを示唆する結果については、現在p21 waf1/cip1抗体およびp16 INK4a抗体を用いた免疫染色を行い、精査しているところである。また合わせて凝固壊死に関してもさらなる解析を行っているところである。

昨今の電気料金の高騰に伴う重粒子線照射装置のマシントイム減少により、実験が研究計画申請で記載したほど進捗しなかったため、治療効果予測マーカーの探索までは手が回らなかった。今回得られた結果を踏まえて、今後進めていければと考えている。

末筆ではございますが、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研究助成を賜りましたこと、ここに厚く御礼申し上げます。

神奈川県内の診療所におけるプロポフォールによる 血管痛の実態 —基礎的検討から新たなケアの臨床応用に向けて—

横浜市立大学医学研究科看護学専攻 生命科学研究分野 博士後期課程
須田 千啓

1. 研究目的

全身麻酔導入時に使用されている静脈麻酔薬であるプロポフォールには、副作用として血管痛があり、その発生率は約60%である（Bakhtiari et al., 2021）。現在、麻酔導入時にはオピオイドを前投与するケースが多く、血管痛軽減に有効とされるが（Bakhtiari et al., 2021）、未だ血管痛を感じる患者が存在する。それは、オピオイドが血管痛の発生機序を直接阻害しないためと考えられる。また、円滑な麻酔導入を妨げないためには、より簡易的な方法が求められる。以上より、血管痛の発生機序をターゲットとし、血管痛を確実に抑える簡易的なケアの確立が必要である。

全身麻酔手術を実施する診療所では、入院施設がないため患者は術後に帰宅する必要がある。呼吸抑制等の重篤な副作用発現リスクがあるオピオイドの使用により、患者の帰宅遅延の発生が高まる（白神、2006）。そのため、オピオイド使用量を最小限にし、血管痛を軽減する方法が必要である。したがって、血管痛を確実に抑える簡易的なケアは診療所で必要とされる。

これまで申請者は、血管痛の発生機序に着目し、細胞実験にて「プロポフォールの温度変化がヒトTRPA1活性化に及ぼす影響」について検討を行った。その結果、35℃以上ではプロポフォールによるTRPA1の活性化が著しく小さくなることが明らかとなった（未発表）。このことから、加温したプロポフォールを投与することにより血管痛が軽減する可能性が示唆された。これは、薬剤を使用せず簡易的に血管痛を軽減することが期待できる。

今後は我々が基礎研究で明らかにしてきた知見を臨床へ還元するため、加温したプロポフォールを投与することにより血管痛が軽減するかをヒトで検証する必要がある。しかし、点滴刺入部の静脈周囲温度ならびに静脈周囲温度により血管痛の程度に違いがあるかは明らかとなっていない。そのため、点滴刺入部の静脈周囲温度と血管痛の程度の関連についても調査が必要である。

以上のことから、本研究では、診療所におけるプロポフォールによる血管痛の実態およびその関連要因について明らかにすることとする。

2. 研究方法

2.1 研究デザイン、研究対象者および研究期間

研究デザインは横断的観察研究であり、神奈川県内においてプロポフォールによる全身麻酔で日帰り手術を実施しているAクリニックを対象とした。対象者はプロポフォールを使用して全身麻酔を受ける患者とし、意思疎通が難しい患者および18歳以下の患者は除外した。

本研究の副次評価項目である血管痛との因子の解析について、弱い相関を示す相関係数

$r=0.4$ とした時、検出力80%、有意水準5%と設定すると必要症例数は44症例と算出される。本研究は実態調査であり可能な限り症例を集積し、且つ途中離脱者を考慮し対象症例は60症例とした。

調査は2024年2月～2024年6月まで実施した。

2.2 調査方法

2.2.1. 診療録情報の収集

診療録から以下に沿って対象者の基本情報および手術情報を収集した。

- 1) 背景情報：年齢、性別、身長、体重、喫煙歴、飲酒歴、既往歴、合併症
- 2) 手術情報：術式、手術時間、バイタルサイン、体温、使用した麻酔薬の種類・投与量、点滴刺入部の位置（血管）

2.2.2. 血管痛の評価および点滴刺入部の皮膚温測定

プロポフォール投与直後に患者に痛みの程度について質問し、研究者が主観的疼痛の値として4段階（0:痛みなし、1:軽度の痛み、2:中程度の痛み、3:重度の痛み）で評価した。今回、静脈内温度を測定することは困難なため、表在静脈の直上およびその周囲の皮膚温を測定することとした。点滴刺入部の皮膚温は、サーモグラフィカメラ（FILRONE PRO）を使用し、プロポフォール投与直前および投与直後の点滴刺入部を撮影した。合わせてプロポフォールの温度を計測するため、プロポフォールが封入されているシリンジを撮影した。

2.3. 主要評価項目・副次評価項目

以下の通りに主要評価項目・副次評価項目を設定した。

- ・主要評価項目：

プロポフォール投与直後の主観的疼痛の値（疼痛の程度および発生率を算出する）

- ・副次的評価項目：

血管痛の有無に影響を及ぼす因子を明らかにするため、主観的疼痛の値と以下の項目について評価する。基本属性（年齢、性別、BMI、バイタルサイン）、プロポフォールの温度、点滴刺入部の皮膚温、前投与薬の有無、点滴刺入部の位置（手背か前腕か）

2.4. 統計解析方法

血管痛の程度を4段階で評価し、各段階における患者の割合を算出した（中央値 $\pm$ SD、統計解析は実施しない）。また、主観的疼痛の程度と各副次評価項目の間に関連があるかを明らかにするため、相関分析または2群比較を行う。相関分析はピアソンの相関係数またはスピアマンの相関係数を用いる。2群比較はStudent's t検定またはMann-Whitney U検定を用いる。

2.5. 倫理的配慮

本研究は横浜市立大学 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。（変F240400031）

3. 結果

本研究は予定症例数を60症例としていたが、取得された症例数が少ないため、今回は主観的疼痛の程度と副次評価項目に関連があるかどうかについて統計解析を実施せず、記述

統計のみ示す。

3.1 対象者の基本属性および麻酔の状況

対象者の基本属性を表1に示す。

年齢は47.2±14.3歳、性別は女性が14名（93.3%）、男性が1名（6.7%）であり、大半が女性であった。
プロポフォールは全症例でプロポフォール1%静注（VTRS）を使用し、30 ml/hで持続投与された。プロポフォールは冷所保存され、使用時に室温に放置して使用された。

平均血圧および脈拍数は、プロポフォール投与前から投与後5分間まで大きな変化は生じなかった。点滴刺入部は、前腕正中皮静脈、肘正中皮静脈、撓側皮静脈の3か所が選択されており、肘正中皮静脈に点滴刺入されている割合が最も高かった。前投薬はペンタゾシンを投与された。

3.2 血管痛の発生状況および関連する項目

プロポフォール投与直後の主観的疼痛の値を表2に示す。プロポフォール投与後に痛みがなかった患者（スコア0）は33.3%、痛みを感じた患者（スコア1,2,3）は66.7%だった。血管痛の程度は、痛みスコア2（少し痛い）が40%と最も多かった。

具体的には、痛みスコア1の【違和感】について対象者から『熱くなってきた』と発言があり、痛みではないもののプロポフォールが投与されることによる感覚の変化が観察された。また、痛みスコア2の【少し痛い】については、対象者から痛みの訴え以外に『ピリピリとしびれる感じがあった』『ちくちくする』との発言があり、プロポフォールの投与により刺激を受けている様子が見られた。痛みスコア3の【すごく痛い】は、『肩の方まで痛い』との発言があり、顔をしかめている様子が観察された。

表 1. 対象者の基本属性および麻酔状況

		N = 15, 平均値±SD	%
年齢		47.2±14.3	
性別	男	1	6.7
	女	14	93.3
BMI		21.0±2.9	
バイタルサイン 平均血圧	投与前	92.0±13.8	
	投与2.5分後	90.7±12.8	
	投与5分後	86.8±12.9	
脈拍	投与前	82.6±13.3	
	投与2.5分後	82.8±13.1	
	投与5分後	78.7±12.8	
点滴刺入部	前腕正中皮静脈	3	20.0
	肘正中皮静脈	7	46.7
	撓側皮静脈	5	33.3
前投薬（ペンタゾシン）	あり	3	20.0
	なし	12	80.0

表 2. 血管痛の発生状況

Pain score	N = 15	%
0	5	33.3
1	3	20.0
2	6	40.0
3	1	6.7

表 3. 血管痛の有無と各項目の比較

		N = 15, 平均値±SD	
		痛みなし (Score 0)	痛みあり (Score 1,2,3)
年齢(歳)		41.4±9.1	49.2±16.0
BMI		21.0±3.5	20.5±2.3
プロポフォールの温度 (°C)		22.2±2.3	25.1±0.7
刺入部皮膚温 (°C)	投与前	28.7±2.2	30.8±1.0
	投与後	29.6±1.1	30.6±0.8
点滴刺入部	前腕正中皮静脈 (%)	1 (20.0)	2 (20.0)
	肘正中皮静脈 (%)	3 (60.0)	4 (40.0)
	撓側皮静脈 (%)	1 (20.0)	4 (40.0)
平均血圧 (mmHg)	投与前	93.5±9.8	89.8±14.9
	投与後2.5分	86.5±11.9	90.6±13.3
	投与後5分	82.0±13.6	86.1±12.5
脈拍 (回/分)	投与前	88.8±11.0	77.3±10.9
	投与後2.5分	821.8±11.5	80.9±11.9
	投与後5分	76.0±15.3	76.2±10.4
前投薬	あり (%)	1 (20.0)	2 (20.0)
	なし (%)	4 (80.0)	8 (80.0)

また、血管痛の有無に影響を及ぼす因子を明らかにするため、主観的疼痛の値とプロポフォールの温度、点滴刺入部の皮膚温、点滴刺入部位、基本属性（年齢、性別、BMI、バイタルサイン）、前投与薬の有無について示した（表 3）。プロポフォールの温度は痛みなし、痛みありの両群で 25.0℃程度だった。点滴刺入部の皮膚温は、痛みなし、痛みありの両群で 30℃前後であり同等の数値であった。点滴刺入部については、痛みなし群で肘正中皮静脈、痛みあり群で肘正中皮静脈および撓側皮静脈の割合が高かった。平均血圧および脈拍は、両群で投与前・投与後 2.5 分・投与後 5 分で大きな変化はなく、2 群間においても各測定時点の数値は同等であった。また、痛みなし、痛みありの両群で対象者の 20% が前投薬を使用していたが、前投薬の使用に関わらず血管痛が生じていた。

4. 成果・考察

本研究は、プロポフォールによる全身麻酔で日帰り手術をする診療所に焦点を当て、プロポフォールによる血管痛が患者の約60%に生じていることを初めて明らかにした。本研究で得られた血管痛が生じる割合は先行研究と類似していた（Bakhtiari et al., 2021）。診療所における血管痛の実態について明らかにする研究は本研究が初めてであり、診療所における血管痛に対する介入の必要性が示された。

点滴刺入部の静脈周囲温と血管痛との関連については、血管痛の有無に点滴刺入部の皮膚温は影響していないことが明らかとなった。本調査における対象施設では室温のプロポフォールを使用しており、前腕の皮膚温よりも点滴刺入部（血管直上）の皮膚温が低い傾向にあった。このことから、使用しているプロポフォールの温度により点滴刺入部の皮膚温および血管痛の程度は変化する可能性が考えられるため、更なる調査が必要である。また、今後は本データを参考に、加温されたプロポフォールを投与して血管内温度が変化することで、血管痛が軽減するかを検証していく必要がある。

また、前投薬を使用していても血管痛が生じる患者がいることが明らかになった。今回症例数が少ないため、正確に前投薬の有無と血管痛の関連について評価は困難である。しかし、血管痛が生じている患者がいる事実が示されたため、介入の必要性があると考えられる。

5. 参考文献

- 白神 豪太郎 (2006) 日帰り麻酔—安全で質の高いケアの提供体制構築が必須—. 日臨麻会誌. 36(5):567-575
- Bakhtiari E, Mousavi SH, Gharavi Fard M (2021) Pharmacological control of pain during propofol injection: a systematic review and meta-analysis. Expert Rev Clin Pharmacol. 14(7):889-899.

腫瘍由来血中遊離遺伝子による新規個別化バイオマーカーの確立と薬剤耐性化機序の解明

横浜市立大学附属市民総合医療センター がんゲノム診療科・ゲノム検査部
杉森 慎

(研究目的)

胆膵領域の悪性腫瘍は、解剖学的な複雑さも相まって診断時には手術適応のない進行例であるケースが数多く見受けられる。これまでに進行胆道癌に対するゲムシタビン+シスプラチン+デュルバルマブ療法，進行膵癌に対する5-FU+イリノテカン+オキサリプラチン+レボホリナート療法，ゲムシタビン+ナブパクリタキセル療法等の化学療法レジメンが開発されてきたが，未だ極めて予後不良な難治癌である。将来的には新規分子標的治療薬の開発が必要不可欠であるが，既存の化学療法レジメンの有効活用を図ることが実臨床上で早急に求められる責務であり，よりの確に腫瘍病勢を把握し，治療効果を予測するバイオマーカーの確立，及び，薬剤耐性化機序の解明は極めて重要である。

担癌患者の血液中には微量の腫瘍由来血中遊離遺伝子（circulating tumor DNA: ct-DNA）が循環していることが明らかにされ，非侵襲的に腫瘍遺伝子解析が見込める生体試料として注目を集めている。これまでに癌細胞由来抗原であるCEA，CA19-9等の腫瘍マーカーが臨床応用されてきたが，いずれも絶対的なユニバーサルマーカーではなく，病態による修飾も加わることから，腫瘍病勢を的確・鋭敏に反映するとは言い難い。一方のct-DNA量は腫瘍細胞量を直接的に反映することが想定されるが，腫瘍マーカーとしての臨床応用は未だなされていない現状にある。測定指標とするドライバー変異遺伝子は各々で異なるため個別化に係るコストは生じるものの，よりの確な患者毎のバイオマーカーの確立は患者利益に資するとともに，次世代の個別化医療を推し進めると考えられる。

化学療法不応となるタイミングは劇的で，耐性化機序の解明と検出は極めて重要である。薬剤耐性化研究が困難を極める最大の要因は，既存の多くの研究が切除検体や診断時の生検検体を用いて行われ，化学療法後の腫瘍組織解析を紐付けした検討が不足してきた点が挙げられる。実臨床において化学療法不応となった進行担癌患者から再度の腫瘍組織検体の採取することは現実的でないが，化学療法施行過程における経時的なct-DNA検体の解析により，化学療法後の遺伝子変化を同定することが可能であると考えられる。

本研究課題では，ct-DNAの腫瘍マーカーとしての臨床応用と薬剤耐性化責任遺伝子の同定を目標とした。

(研究方法)

1. 検体の収集

横浜市立大学附属市民総合医療センターにて，胆道癌，膵癌が疑われる，あるいは診断された症例に対し，説明を行い，本研究への参加同意を得た（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，承認番号：B160804006）。

2. 次世代シーケンサー解析

診断時の腫瘍組織検体由来DNA及び血中遊離遺伝子 (cell free DNA; cf-DNA) に対し、次世代シーケンサー (Next-Generation Sequencer: NGS) による網羅的遺伝子解析を行なった。QIAamp DNA Mini Kit (#51304; Qiagen)を用いてDNA抽出を行なったのち、Qubit dsDNA HS Kit and a Qubit 3.0 fluorometer (#Q33231; Thermo Fisher Scientific)を用いてDNAの定量を行なった。NGS解析については、AmpliSeq™ Library PLUS (24 Reactions) for Illumina(#20019101; Illumina), Ion Ampli-seq Cancer Hotspot Panel version 2 (CHPv2) (#20019161; Illumina)を用いてライブラリ調整を行い、iSeq100 system (Illumina)を用いてシーケンスを行なった。データ解析については、BaseSpace Sequence Hub software (Illumina)を用いて検討を行なった。

3. 血中遊離遺伝子のdigital droplet PCR解析

セルフリーDNA抽出用採血管 (Roche)を用いて検体採取を行い、2段階遠心法により末梢血単核球を分離した後、cf-DNAの抽出を行なった。Qubit dsDNA HS Kit and a Qubit 3.0 fluorometerを用いてDNAの定量を行ない、digital droplet PCR (Bio-rad, QX200TM Droplet Digital™ PCR) でPrimePCR for ddPCR (Bio-rad) を用いて変異検出、定量を行なった。Validationの検討、及び陽性コントロールには、cf-DNAを模して対象とする変異をフラグメントの中央位置に導入した181bpの合成DNAフラグメント (IDT gBlocks Gene Fragments dsDNA, Integrated DNA Technologies) を用いた。

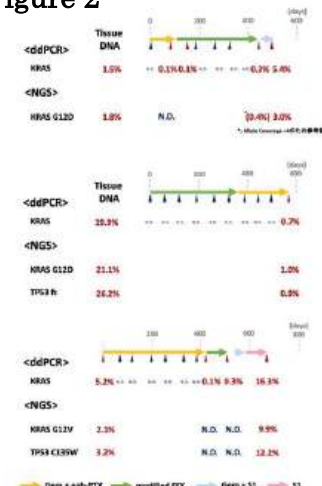
(結 果)

膵癌15例、胆道癌2例に対し検討を行なった。膵癌コホートは、いずれの症例も*KRAS*変異を有する膵癌として典型的な遺伝子変化が確認された。診断時のcf-DNAにおいてdigital PCRで*KRAS*変異が検出されたのは、Ⅲ期：2/5例、Ⅳ期：9/10例であった (Table 1) . 化学療法中の経時的なcf-DNA 検体におけるdigital PCRでの*KRAS*変異検出値は、概ね、病勢及びCA19-9と関連した推移を示した。*KRAS*変異検出値が上昇を示したタイミングの10検体 (3症例) に対してNGS解析を行った結果、6/10検体で*KRAS*変異を検出し、digital PCRでの*KRAS*変異のMAF値が0.7%以上の検体についてはNGSでの変異検出が可能であった。 (Figure 1) .

Table 1

症例#	UICC (7th.)	Stage	組織検体由来DNAにおける <i>KRAS</i> 変異の検出	診断時 cf-DNA 検体における digital PCR での <i>KRAS</i> 変異検出割合 (・MAF) (%)
1	T4N0M0	Ⅲ	+	0.0
2	T4N1M0	Ⅲ	+	0.0
3	T4N0M0	Ⅲ	+	0.0
4	T4N1M0	Ⅲ	+	0.1
5	T4N1M0	Ⅲ	+	0.2
6	T2N1M1	Ⅳ	+	0.0
7	T4N1M1	Ⅳ	+	0.1
8	T3N1M1	Ⅳ	+	5.2
9	T4N0M1	Ⅳ	+	0.1
10	T3N1M1	Ⅳ	+	0.2
11	T4N1M1	Ⅳ	+	14.5
12	T3N1M1	Ⅳ	+	3.9
13	T2N1M1	Ⅳ	+	3.3
14	T4N1M1	Ⅳ	+	0.4
15	T4N0M1	Ⅳ	+	0.1

Figure 2



胆道癌コホートは*KRAS*変異陽性例1例と陰性例1例であった (Table 2) . 症例#17は, がんゲノムプロファイリング検査の結果, 病的遺伝子変化として*EGFR*増幅, *TP53 C135fs*35*変異, *CDKN2A R80**変異を認めた症例であった (Table 3) . うち, *TP53 C135fs*35*変異に対するddPCRでの検出系構築し, 変異導入合成フラグメントを用いてアニーリング温度についてのPCR条件のバリデーションを行なった (Figure 2) . 本症例では, 当時の標準治療 (1次治療: ゲムシタビン+シスプラチン療法, 2次治療: S1単剤療法) 終了後, 係る臨床倫理委員会の承認を経て, オフラベルでネシツムマブ+ゲムシタビン+シスプラチン療法が実施された. 2c終了後には腫瘍縮小傾向を認め, 一定の治療効果が確認された. 同治療実施中の経時的cf-DNA検体におけるdigital PCRでの*TP53*変異の検出値の推移は, 臨床経過および腫瘍マーカーの推移と概ねの一致を示した (Figure 3) . また, 同治療に不応となり, digital PCRでの*TP53*変異のMAF値が再上昇したタイミングでcf-DNAに対するNGS解析により, *KRAS*, *CTNNB1*, *EGFR*等の多様な病的遺伝子変化を検出した (Table 4) .

Table 2

症例#.	UICC(7th.)	Stage	組織検体由来DNAにおける <i>KRAS</i> 変異検出の有無
16	T4N1M1	IV	+
17	T4N1M1	IV	-

Table 3

Mutation	Gene	change	MAF (%)	in germline DNA MAF (%)
<i>TP53</i>		<i>C135fs*35</i>	68.5	N.D.
<i>CDKN2A</i>		<i>R80*</i>	63.3	N.D.
Amplification	Gene	Copy number	(MAF: mutation allele frequency)	
<i>EGFR</i>		42.6		

Figure 2

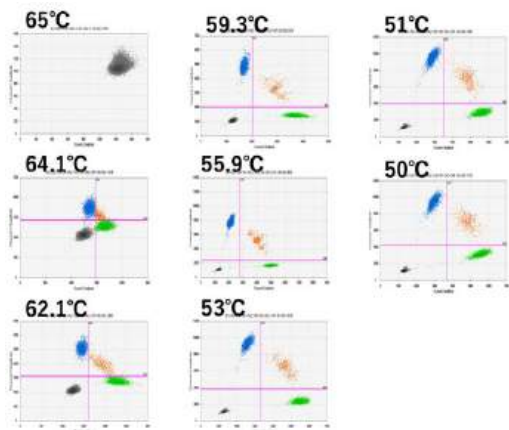


Figure 3

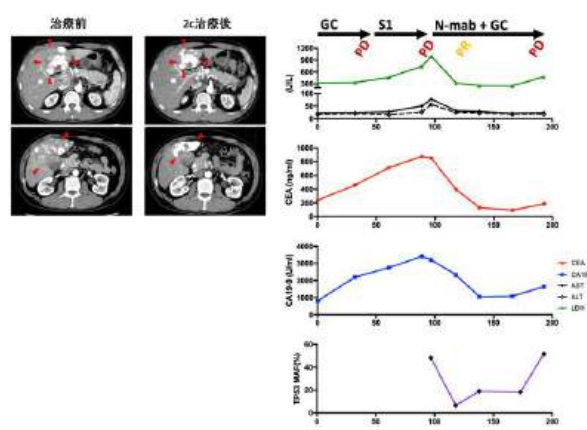


Table 4

Mutation	Gene	change (MAF%)	
	TP53	C135fs*35(48.23)	
	CDKN2A	R80*(28.37)	
	EGFR	S229C(0.07), G719A(0.07)	
	CTNNB1	G34R(0.32), T41I(0.13), S33C(0.21), S33A(0.5), S33F(0.43), D32V(0.33), S33P(0.61), S29F(0.13), S37F(0.28), D32G(1.08), D32H(0.52)	
	KRAS	Q61H(6.62, 0.37)	
Amplification	Gene	Copy number	Covered by NCP
	EGFR	6.96	Yes
	TERC	4.63	No
	PRDM1	1.99	No
	FGF10	2.48	No
Rearrangement	Gene	Breakpoint (MAF%, supporting read count)	
	ASXL1	ASXL1(NM_015338) inversion intron 6 - intron 11(4.01, 52)	
	RET	CCDC6(NM_005436)-RET(NM_020630) fusion (C1: R12)(1.88, 91)	
	FH	FH(NM_000143) rearrangement exon 5(5.88, 84)	
	EGFR	EGFR(NM_005228) deletion intron 1 - intron 7(0.66, 136)	
	EGFR	EGFR(NM_005228) inversion intron 1 - intron 7(0.33, 104)	
	EGFR	EGFR(NM_005228) duplication intron 1 - intron 7(0.23, 49)	
	EGFR	EGFR(NM_005228) rearrangement intron 26(0.23, 20)	
	EGFR	EGFR(NM_005228) deletion intron 13 - intron 15(0.14, 53)	
	EGFR	EGFR(NM_005228) rearrangement intron 25(0.04, 12)	
	EGFR	EGFR(NM_005228) duplication intron 17 - exon 27(0.03, 61)	
	EGFR	EGFR(NM_005228) rearrangement exon 27(0.03, 11)	
	SECR1G	SECR1G(NM_014302)-EGFR(NM_005228) fusion (S2: E13)(0.46, 206)	

(成果・考察) 等

血液中を循環するct-DNA量は腫瘍細胞量を直接的に反映することが想定されているものの、バイオマーカーとしての臨床応用は未だなされていない現状にある。本研究では膵癌と胆道癌を対象としたが、膵癌では90%以上の症例で*KRAS*変異が検出されることが知られており、*KRAS*変異検出系は比較的汎用性の高い測定系であると考えられる (Table 1)。

ddPCRは、特定の変異箇所のみを検出であるものの、高感度かつ高い定量性を有した測定系であるとともに、NGS解析に比してコスト的に安価な検出系である。digital PCRでの*KRAS*変異検出値は、概ね、病勢及びCA19-9の推移と関連した推移を示すとともに、少数例の比較であるが、NGSより高感度な検出が可能であった (Figure 1)。

胆道癌のゲノム異常は多様性に富むことが報告されており、プレシジョン・メディシンの必要性が提唱されてきた。今回のコホートでは*TP53*変異に着目し、*TP53 C135fs*35*変異のddPCR検出系をバリデーション・構築し、1症例ではあるものの病勢及び腫瘍マーカーと関連した推移が示された (Figure2, 3)。各々の症例にカスタムでの検出系を確立する必要性があるものの、ct-DNA量の定量化は有効な病勢把握ツールとなる可能性が示唆された。こうしたct-DNA量の定量化を検査体系として臨床応用するためには、検出限界 (Limit of detection: LoD)、ブランク上限 (Limit of blank: LoB)、定量限界 (Limit of Quantification :LOQ)等の精度管理・検定が必要不可欠であり、現在、これらの追加の検討を行なっている。

一方で、ct-DNAに対する網羅的なNGS解析は、検出感度、定量性、コスト面ではddPCRに劣るものの、薬剤抵抗性に係る責任遺伝子同定のため有望なツールと考えられている。胆道癌症例では、抗EGFR抗体薬であるネシツムマブによる治療後に、*KRAS*, *CTNNB1*, *EGFR*等の遺伝子変化が検出された (Table 4)。薬剤耐性化への責任性の有無については更なる検討を要するものの、*KRAS*変異のような*EGFR*経路下流の変化や、*EGFR*自体の変化は抗EGFR抗体薬に対する抵抗性機序である可能性が強く示唆された。

今後、検討を拡充し、ct-DNA定量値の個別化バイオマーカーとして有用性を確立し、臨床検査としての臨床応用を図るとともに、臨床経過の紐付け可能な経時的ct-DNA検体に対する網羅的なNGS解析を行うことで、薬剤耐性化や腫瘍増悪に係る責任候補遺伝子群の同定を予定している。

新規胃発癌モデルの開発

横浜市立大学附属市民総合医療センター消化器病センター内科

露木 翔

(研究目的)

近年、早期胃癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術が普及し、現在では90%を超える5年生存率が報告されている。しかし一方で、進行胃癌に対して未だ有効な分子標的治療薬や根治治療法はなく、国内外の臨床試験成績からは生存期間中央値は約6～14カ月と報告され

(ASCO 2002; 21(1): 54-59, Lancet 2010; 376(9742): 687-97), 我が国においても癌死亡率の2位を占める予後不良の難治疾患である(厚生労働省 2018年度人口動態統計によるがん死亡データ)。

近年、進行胃癌における遺伝子プロファイルが報告され、その多様性が明らかにされるとともに、ゲノム安定型・EBウイルス関連型・マイクロサテライト不安定型・クロマチン不安定型(chromosomal instability: CIN)の4グループへの分類が提唱されてきた(Nature 2014; 513: 202-209)。本邦における腸型・分化型胃癌の多くはCINグループに該当することが予想されるが、その特徴として1.)高頻度にTP53変異を認めること(71%), 2.)ERBB2(HER2)を含むRTK-RAS経路やPI3K経路の高頻度かつ排他的なコピーナンバー変化を有することが報告されている。申請者らはこれまでに、本邦における胃癌90症例(H. Pylori 現感染胃癌: 55症例, 過去感染胃癌: 35症例)に対し、次世代型シーケンサーによる網羅的遺伝子解析を実施し、ERBB2増幅を6.7%に認めることを報告してきた(Tsuyuki, S, et al. Sci. Rep. 2021; 11(1): 23443)。また、胃発癌初期の遺伝子変化を明らかにするため、内視鏡的に切除された高分化型早期胃癌16例の病理検体を用いて、次世代型シーケンサーによる網羅的遺伝子解析と、digital PCRによるRTK-RAS経路及びPI3K経路遺伝子のコピー数解析を実施した。結果、TP53変異を高頻度(66.6%)に認め、コピー数解析についてはERBB2増幅例3例のみを検出し、いずれもTP53変異の併存を認めている(未発表データ)。これまで一般的に、コピー数異常については発癌段階ではなく、癌の進行(増悪)に係る遺伝子変化として扱われることが通説であったが、一部の胃癌においては早期癌の段階からERBB2増幅を伴っており、ドライバー遺伝子であることが示唆される。

ERBB2に対しては、これまでに分子標的薬としてTrastuzumabが臨床応用され(Lancet 2010; 376(9742): 687-97), 最近では抗体薬物複合体薬であるTrastuzumab deruxtecanが登場し、注目を集めている(N Engl J Med. 2020; 382(7): 610-21)。さらなる新規治療薬開発を進める上で、詳細な発癌・浸潤・転移メカニズムの解明は急務であり、その疾患モデル動物の創出は必要不可欠であるが、ERBB2増幅タイプの胃癌マウスモデルは未だ報告がない。

本研究課題では、TP53変異及びERBB2過剰発現が胃発癌にもたらす影響について分子生物学

的検討を行うとともに、マウスの胃においてプロモータ活性の報告されているSox2及びLgr5のCreマウスと、*TP53* floxマウス、及び当教室で独自に作成した*ERBB2* transgenicマウスの交配実験を行い、新規*ERBB2*増幅型胃癌マウスモデルの構築を目的とする。

(結 果)

マウスの胃体部においてプロモータ活性が報告されている Sox2, 及び, 前庭部においてプロモータ活性の報告されている Lgr5 の 2 系統の Cre-ERT マウスと, *TP53* flox マウス, 及び当教室で独自に作成した *ERBB2* transgenic マウスの交配実験を行い, 病理学的アプローチによって, その表現系を明らかにすることを試みる. 致死的であった場合には, これらのマウスモデルより胃腺を採取して 3 次元オルガノイド培養を行い, 40H-Tamoxifen 処置による in vitro での遺伝子改変オルガノイド細胞株を樹立し, 腫瘍原生の評価を行う. マウスモデル組織検体あるいは 3 次元オルガノイド培養株に対して RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析の実施し, 発癌に関わる分子基盤解明を試みる.

また, 臨床的に胃発癌においては *H. Pylori* 感染に伴う慢性胃炎が極めて重要であることから, 適宜, マウスへの長期感染と胃炎惹起が可能な *H. Felis* 感染モデルによる検討を追加する.

Helicobacter 感染には, マウスモデルにおけるヘリコバクター誘発発癌に利用される *Helicobacter felis* を使用し, 1 回 100 μ l 計 3 回の投与を行っている. 投与に要する *Helicobacter felis* の立ち上げと培養には成功し, ストックから起こした後, 菌体を鏡検で確認して投与を行っている.

Sox2 及び *Lgr5* の Cre マウスと, *TP53* flox マウス, 及び当教室で独自に作成した *ErbB2* transgenic マウスの交配実験を行い, 生後およそ 6-12 週頃から適宜間隔をあけて計 3 回 *Helicobacter felis* の経口投与を開始している.

同時にマウステイルより抽出した DNA を用いて *Cre*, *TP53*, *ErbB2* 遺伝子を中心にジェノタイプピングも並行して施行している. 目的としないフェノタイプ(*Cre* and/or *Her2*)は投与後半年を目安に解剖をして, 慢性胃炎発症を病理学的に確認中の状況である.

同様に感染成立の有無については *Helicobacter felis* 特異的な PCR primer (Forward: 5'-AAAATCCACGAAGACTGG GG-3', Reverse: 5'-CTTTTATCCAAGTGGTGGCACACC-3')を用いての PCR を実施中である. 必要に応じて追加で培養による生菌数測定を検討している. (K D'Costa, et al. J Vis Exp. 2018; 140: 56985)

目的とするフェノタイプ(*Cre*⁺, *Her2*⁺)には生後およそ 26-30 週頃を目安に Tamoxifen 投与を行い発癌の有無を確認中となっている. 発癌が確認できたところで, 病理学的な検討を追加する.

上記のごとく進行中の状況となっている.

(成果・考察) 等

現時点では、未だ進行中の状況であり、この一連の研究において学会発表などの成果発表は行っていない。実験結果が確立した段階で精力的な学会発表、論文発表などの学術的活動を行なっていく。

PI3K 亢進型肝内胆管癌の病態解明と新規治療法の開発

横浜市立大学大学院 医学研究科 医科学専攻
土屋 洋省

(研究目的)

胆道癌の2023 年罹患数予測は 23,700 人で、全癌罹患数予測の2.2%(第15位)を占める比較的稀な癌種であるが、死亡予測数は18,300人と日本の癌死因の第6位を占める。世界的に増加傾向にあり、我が国を始めとするアジアや南米で特に罹患率が高いことが知られている。胆道癌におけるゲノム異常は、大腸癌や膵癌などに比して多様性に富むことが知られ、高度に個別化したプレジジョン・メディシンの必要性が提唱されてきた(J Clin Oncol. 2022;40(24):2716-2734.)。

本邦においても、2019年より標準治療終了あるいは終了見込みの固形癌患者を適応として、がんゲノムプロファイリング検査が保険承認され、検査結果に基づくコンパニオン診断薬としてFGFR2融合遺伝子陽性胆道癌に対するペミガチニブ、*NTRK1/2/3* 融合遺伝子陽性の固形癌に対するエヌトレクチニブ及びラロトレクチニブ、また、上述のGCD療法の保険承認後の臨床的意義は乏しいが、TMB-H (Tumor mutation burden High) 及び MSI-H

(Microsatellite instability High) の固形癌に対するペムブロリズマブがコンパニオン化されてきた。しかしながら、胆道癌におけるこれらの遺伝子変化の頻度は各々、*FGFR2* 融合遺伝子：10-20%程度、*NTRK1/2/3*融合遺伝子：極めて希少、TMB-H及びMSI-H 症例：2-5%程度とされ、薬剤到達性は未だ低い現状にあり、一刻も早い薬剤・レジメン開発が求められている。

肝内胆管癌に対する大規模なゲノム解析の結果、*PTEN*, *PIK3CA*, *PIK3R1*, *AKT*, *LKB1*等の、PI3K経路の亢進を導く遺伝子の変異や増幅を認めるケースは相当数(11.8- 22.2%程度)存在することが報告されている(Nat Commun. 2014;5:5696)。PI3K経路は、細胞増殖やエネルギー代謝に深く関わる癌化経路の一つとして知られてきたが、最近、FDAにおいて新規PI3K阻害薬のAlpelisibが乳癌に対して認可され、今後のPrecision medicineの実装においては有望な治療標的の一つとして期待されている。また*TP53*は、かつてより癌抑制遺伝子の一つとして知られ多くの癌種において変異が報告され、肝内胆管癌においても最多変異遺伝子として報告されている(38.2%, Nat Commun. 2014;5:5696)。Tp53を標的とした薬剤開発は困難を極めてきたが、最近、Tp53欠損腫瘍に対するWee1阻害薬Adavosertibの有用性が報告されている。Tp53 機能欠損細胞ではDNA 損傷応答(DNA Damage Response: DDR)時にG1 check pointが機能せず、G2/M check pointのみに依存するが明らかとなっているが、Wee1阻害薬(Adavosertib)は、G2/M check pointの中心を担うWee1を阻害することで、DNA修復を阻害してアポトーシスへと導くことを狙った新機軸の阻害薬であり、シスプラチンや放射線治療等との併用が模索されている。

本研究課題では、未だ困難を極める進行胆道癌の化学療法において、Precision medicineの実践を図るべく、PI3K経路亢進・Tp53欠損型の肝内胆管癌に着目しPI3K阻害薬の臨床応用、並びにWee1阻害薬の臨床応用に向けた基盤研究の実施を主たる目的とした。

(研究方法)

1. 新規PI3K亢進・Tp53欠損型胆道癌マウスモデルの創出

胆管上皮細胞においてプロモータ活性を有するFoxa3-Creマウス (Klaus H Kaestner教授 (University of Pennsylvania Perelman School of Medicine) より提供) と, *ROSA26-LSL-Pik3ca*^{H1047R/+}マウス (Strain #:016977, The Jackson Laboratory), *PTEN* floxマウス (BRC No. RBRC02300, 理化学研究所バイオリソースセンター), *TP53* floxマウス (Strain #:008462, The Jackson Laboratory) の交配実験を行なった。

2. ヒト培養胆道癌細胞株に対する薬剤実験

ヒト培養胆道癌で*PIK3CA*変異・*TP53*変異を有するHuh28 (JCRB細胞バンクより分譲) と, *KRAS*変異・*TP53*変異を有するHuCCT1 (JCRB細胞バンクより分譲), 及び新規PI3K亢進・Tp53欠損型胆道癌マウスモデルより樹立した3次元オルガノイド細胞株に対し, PI3K阻害薬 (Alpelisib, HY-15244, MedChemExpress), Wee1阻害薬 (Adavosertib, S1525, Selleck) の薬剤実験を行い, WST-8 assay (CK04 Cell Counting Kit-8, DOJINDO) を用いて細胞増殖抑制効果を検討した。

(結 果)

1. 新規PI3K亢進・Tp53欠損型胆道癌マウスモデルの創出

Foxa3-Creマウスと, *ROSA26-LSL-Pik3ca*^{H1047R/+}マウス, *PTEN* floxマウス, *TP53* floxマウスの交配実験を行った結果, Foxa3-Cre; *ROSA26-LSL-Pik3ca*^{H1047R/+}; *TP53*^{f1/f1}マウス, Foxa3-Cre; *PTEN*^{f1/f1}; *TP53*^{f1/f1}マウスの2系統の肝内胆管癌マウスモデルを創出した。いずれの系統も4-5ヶ月齢で肝に多発の腫瘍性病変の出現を認め, 免疫組織化学染色の結果, 腫瘍細胞はPan-CK (AE1/AE3) 陽性・CK7陽性, Albumin陰性であり, 肝内胆管癌と判断された。Foxa3-Cre; *ROSA26-LSL-Pik3ca*^{H1047R/+}マウス, Foxa3-Cre; *PTEN*^{f1/f1}マウスは, いずれも脂肪肝を認めるのみで, 4-5ヶ月齢での腫瘍形成を認めなかった。また, Foxa3-Cre; *TP53*^{f1/f1}マウスでは, 明らかな形態学的異常を認めなかった。Foxa3-Cre; *ROSA26-LSL-Pik3ca*^{H1047R/+}; *TP53*^{f1/f1}マウス, Foxa3-Cre; *PTEN*^{f1/f1}; *TP53*^{f1/f1}マウスの腫瘍組織では, Akt Ser473のリン酸化が認められた (Figure 1)。

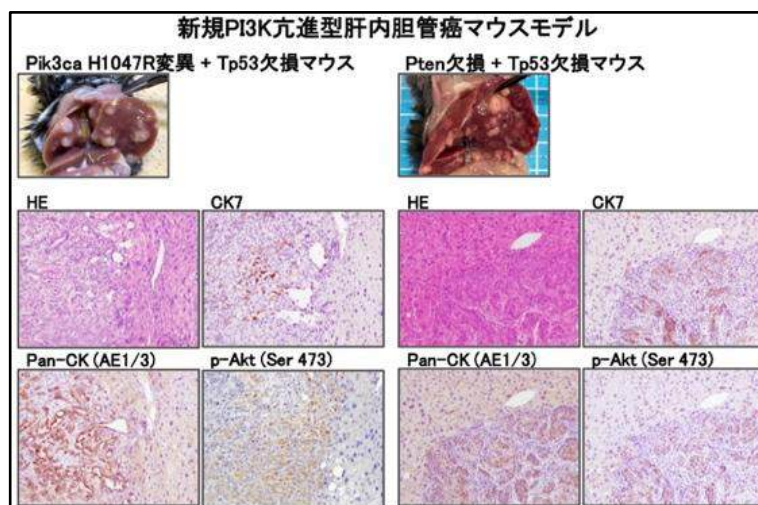


Figure 3: 新規PI3K亢進・Tp53欠損

2. ヒト培養胆道癌細胞株、及び新規PI3K亢進・Tp53欠損型胆道癌マウスモデル由来オルガノイドを用いた薬剤実験

Alpelisib, Adavosertibに対する50%増殖阻害濃度 (IC₅₀) をWST-8 assayにより検討した結果、各々、Huh28細胞株でAlpelisib(IC₅₀): 1.48 μ M, Adavosertib(IC₅₀): 0.142 μ M, HuCCT1細胞株でAlpelisib(IC₅₀): 2.36 μ M, Adavosertib(IC₅₀): 0.0737 μ Mであった。(Figure2)

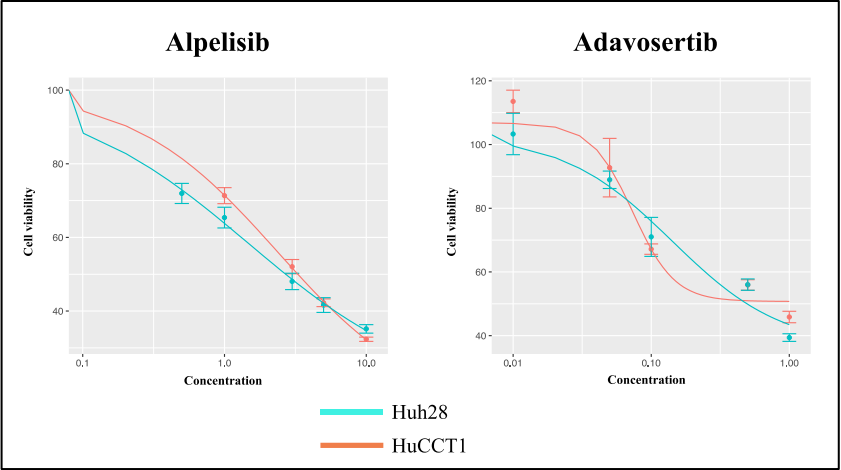


Figure 2: 薬剤投与実験

また、Alpelisib, Adavosertibの2剤併用実験では、いずれの細胞株においても相乗的な増殖抑制効果が確認された (Figure3).

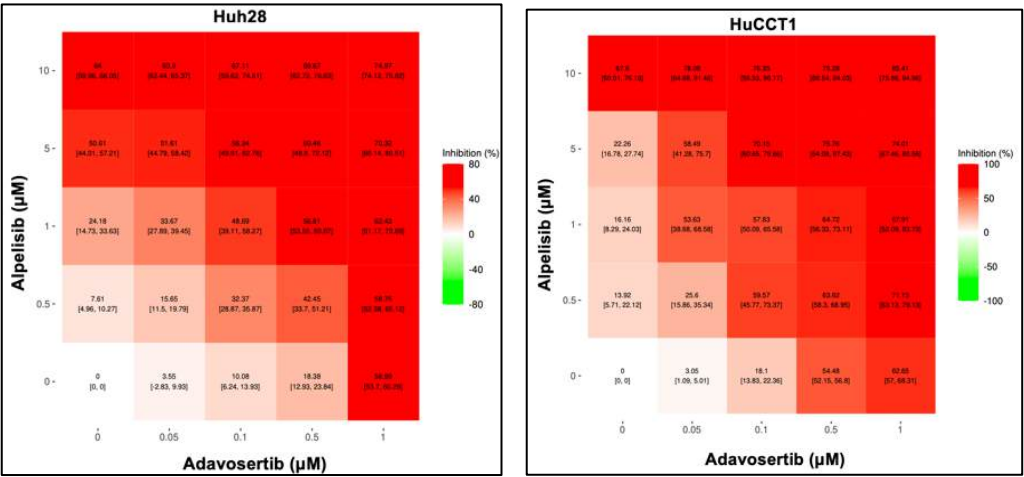


Figure 3: Huh28 及び HuCCT1 に対する Alpelisib と Adavosertib 併用による増殖阻害

(成果・考察) 等

Foxa3-Creマウスと、*ROSA26-LSL-Pik3ca*^{H1047R/+}マウス、*PTEN* floxマウス、*TP53* floxマウスの交配実験により、Foxa3-Cre; *ROSA26-LSL-Pik3ca*^{H1047R/+}; *TP53*^{f1/f1}マウス、Foxa3-Cre; *PTEN*^{f1/f1}; *TP53*^{f1/f1}マウスの2系統の肝内胆管癌マウスモデルを創出した。*PIK3CA*変異単独、*PTEN*欠損単独では、いずれも脂肪肝を認めるものの腫瘍形成を認めず、*TP53*欠損を並存させることにより4-5ヶ月齢で肝に多発の腫瘍性病変の出現を認めたことから、PI3K亢進とTP53機能喪失の双方が、発癌に重要であることが示唆された。

本マウスモデルの背景肝には脂肪肝が見られ、発癌への寄与を否定できないと考えられた。Foxa3-Creマウスが胆管上皮細胞だけでなく、肝細胞にもプロモータ活性を有することが脂肪肝をきたす要因と考えられ、現在、胆管上皮細胞特異的なプロモータ活性を有するK19-Creマウスを用いた同様の交配実験を行うとともに、食餌性脂肪肝が腫瘍発生にもたらす影響についても追加の検討を行なっている。

*PIK3CA*変異を有するHuh28細胞株では、*KRAS*変異を有するHuCCT1細胞株に比して低濃度のAlpelisibでの増殖阻害効果が確認され、*PIK3CA*変異型胆道癌に対するAlpelisibの有効性が示唆された。一方、Adavosertibについては、Huh28細胞株に比してHuCCT1細胞株の方が、より低濃度で増殖阻害効果が確認された。DNA複製ストレスが惹起された腫瘍細胞はWee1阻害薬に脆弱であることが知られていることから、Huh28細胞株に比してHuCCT1細胞株の増殖サイクルが短いことに起因する可能性が示唆される。

現在、新規PI3K亢進・Tp53欠損型胆道癌マウスモデル由来オルガノイド細胞株を樹立し、Alpelisibの増殖抑制効果について検討を進めており、*PIK3CA*変異型は、*PTEN*欠損型に比して低濃度のAlpelisibで増殖抑制効果がもたらされる傾向を確認している。複数のオルガノイド細胞株を樹立して検証を行ない、今後、マウスモデルでの薬剤投与実験により、その薬剤治療効果の検証を予定している。

マウスモデルを用いた淡明細胞型腎癌の 発生機序の解明

横浜市立大学医学部博士後期課程

川浦 沙知

(研究目的)

腎細胞癌の最も一般的なタイプは淡明細胞型腎癌(ccRCC)であり、散発性ccRCCの約80%に von Hippel-Lindau(VHL) 遺伝子変異を認め、10%はVHL遺伝子のメチル化で不活性化されている。しかしVHLのみの不活性化ではccRCCの発生には不十分とされている。4つの癌抑制遺伝子 (VHL, BAP1, PBRM1, SETD2) は染色体3pの小さな領域に同定されており、散発性 ccRCCの90%でこの領域が失われている。PBRM1は50%、SETD2、BAP1は15%に変異を認めており、VHLと同時に欠損している頻度が高い。VHL及びPBRM1や、VHL及びBAP1を腎特異的にノックアウトし腎腫瘍を発生したマウスモデルが報告されている。

KDM5CはX染色体上に存在する遺伝子であり、ヒストン脱メチル化酵素として働く。KDM5CはccRCCにおいて約3%欠損している。そこでKDM5C腎特異的ノックアウト、VHL及びKDM5C腎特異的ダブルノックアウトを行いccRCCのマウスモデルを作成し、腎癌発生機序の解明を行なっていく。

(研究方法)

VHL, KDM5C 遺伝子配列に loxP 配列を含む遺伝子改変動物を用いる。そこに、腎特異的に Cre 組み換え酵素を発現するトランスジェニックマウスを交配させていく。腎特異的な Cre マウスとして、KSP-Cre, Pax8-Cre, PEPCK-Cre マウスを使用する。KSP-Cre は遠位尿細管、ヘンレループ、集合管に有意に、Pax8-Cre は近位尿細管、遠位尿細管、集合管に有意に、PEPCK-Cre は近位尿細管有意に発現し、それぞれ Cre/loxP システムで Cre 組み換え酵素が有意に発現する部位で特異的に VHL, KDM5C をノックアウトしていく。

loxP 配列や Cre 発現遺伝子が挿入されているかは PCR にて確認する。生後6週の時点で解剖を行い、腎臓における表現型を確認していく。また表現型の経時的変化を確認するため、イソフルラン吸入麻酔下でエコーを用いて腎臓の表現型を確認していく。VHL, KDM5C それぞれの発現低下は Western Blot で確認していく。表現型が確認できた時点で RNA sequence を試行し、表現型が認められた機序の解明を行う。

ダブルノックアウトマウスが生まれない場合は胎生致死を考慮し、膣栓を確認し交配開始からの日齢を計算し、Cre 組み換え酵素が発現する時点から数日経過したところで解剖し胎児の腎臓を評価していく。

(結 果)

KDM5CはX染色体上に遺伝子のため、floxマウスの表記を、メスではKDM5Cf/f、オスではKDM5Cfとする。

KDM5Cf, KSP-Creマウス3匹、KDM5Cf/f, Pax8-creマウス及びKDM5Cf, Pax8-Creマウス3匹、KDM5Cf/f, PEPCK-Cre1匹を生後6週の段階で解剖したが、明らかな異常を認めず、採血にて

腎機能障害を認めなかった。同時期に生まれた同胞マウスを対象マウスとして同時に解剖しているが、対象マウスと比較しても明らかな違いを認めなかった。KDM5Cf/f, Pax8-Creマウスはさらに18週の段階で解剖したが明らかな腫瘍形成を認めなかった。

そこでKDM5Cf/f, KSP-Creマウス、KDM5Cf/f, Pax8-Creマウス、KDM5Cf/f, PEPCK-Creマウスを長期的に観察することとした。KDM5Cf/f, KSP-Creマウスは明らかな体重減少などの衰弱が見られることなく24ヶ月経過したため解剖を行った。9匹のKDM5Cf/f, KSP-Creマウスを解剖したところ、全例で腎臓にmicro cystを認めたが明らかな腫瘍形成を認めなかった。1例に腎梗塞と思われる腎萎縮像を認め、1例に尿細管上皮細胞の核腫大を伴い急性炎症を疑う所見を認め、1例にボーマン嚢の拡張を認めたが、いずれもKDM5C欠損による有意な所見とは言い難く、加齢に伴う影響を否定できない所見であった。採血では明らかな腎機能障害を認めなかった。KDM5Cf/f, Pax8-Creマウスが現在4匹おり経過観察を継続しているが明らかな衰弱は見られていないため、解剖は現時点では行なっておらず12ヶ月経過した時点での解剖を検討している。KDM5Cf/f, PEPCK-Creマウスは現在交配がうまくいかず産仔が得られていない状態である。

VHLf/f, KDM5Cf/f, KSP-Creマウスが生まれてきているが、現時点では明らかな衰弱は見られていない。現時点で生後3ヶ月経過したところであり経過観察を継続している段階である。

VHLf/f, KDM5Cf/f, PBRM1f/+, Pax8-Creマウスが生後12ヶ月で衰弱して死亡したため死後1日経過したところで解剖を行ったところ、著明な水腎症が両側腎に見られたが明らかな腫瘍性変化は見られなかった。このマウスに関しては生後30日の段階でエコー上著明な水腎症を認めており、解剖によりHE染色で改めて水腎症が確認されたことになる。

同時期に生まれた同胞マウスは上記のマウスを含め6匹おり、交配中や途中で死亡したマウスを除いた3匹を解剖したところ、KDM5Cf, VHLf/f, PBRM1f/+, Pax8-Cre(-)マウス、

KDM5Cf, VHLf/f, PBRM1+/+, Pax8-Cre(-)マウスと比較し、KDM5Cf/+, VHLf/f, PBRM1f/+, Pax8-Creでは腎臓の腫大があるが明らかな水腎症や腫瘍性病変を認めなかった。

現在KDM5Cf/f, VHLf/f, Pax8-Creマウスが1匹おり経過観察を行なっているが、明らかな衰弱は見られていない。

(成果・考察) 等

淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC)では、腫瘍抑制因子であるVHLの不活性化が見られccRCCの病因に関与している。大規模ゲノムシーケンスでは、KDM5CやMLL2などのヒストンH3リジン4トリメチル化(H3K4Me3)を調整する酵素がccRCCで変異していることが明らかになった。既存の報告ではVHL-/- ccRCC細胞におけるKDM5Cのノックダウンは異種移植モデルにおいて腫瘍成長を有意に促進し、KDM5Cが腫瘍抑制的であることが示されている(X niu. Oncogene. 2012)。

またccRCCの特徴的な組織学的所見は、脂質およびグリコーゲンの蓄積が豊富な細胞質沈着物の増加である。KDM5Cはヒストン脱メチル化酵素であるが、そのヒストン脱メチル化活性を通して、グリコーゲンの代謝を調整しているとされている。KDM5Cの欠乏によって引き起こされる代謝変化は、腫瘍細胞のROSおよびフェロプトーシス誘導因子に対する反応を変化させ、腫瘍形成能を高めることが示されている。KDM5Cノックアウトマウスの報告では、

KDM5Cノックアウトマウスの腎組織において、グリコーゲンレベルの上昇、脂質過酸化の減少、および腎嚢胞から過形成病変への変化を示されている。KDM5Cノックアウトマウスの腎嚢胞に過増殖領域が含まれているかどうか調べるためKi67で免疫染色を行い、腎嚢胞の内腔に面する多数の上皮細胞が強いKi67染色を示し対象マウスではほとんど見られなかったことが示されている。またCaki-1 ccRCC細胞株では、KDM5C, VHLどちらか一方をノックダウンするとグリコーゲンレベルが上昇し、両方ノックダウンすると相乗効果が得られたことから、KDM5CはVHL/HIFと独立してグリコーゲンを調整する能力を持っているとされている(Q Zheng, Theranostics, 2021)。

現時点では、KDM5Cf/f, KSP-Creマウス、KDM5Cf/f, Pax8-Creマウス、KDM5Cf/f, PRPCK-Creマウスにおいて腎特異的なノックアウトでの表現型は確認されていない。KDM5Cf/f, KSP-Creマウスにおいて生後24ヶ月の時点で腎嚢胞所見は認めたが、加齢にともなう所見の可能性もありKDM5C欠損による表現型とは言い難く、KDM5C単独欠損により腎腫瘍形成に至る可能性は否定的と考えられる。既存の報告ではKDM5Cノックアウトマウスにおいて生後10ヶ月の時点で腎嚢胞所見を認め、腎嚢胞内腔がKi67染色にて強い染色能を認めたとしており、KDM5Cf/f, KSP-Creマウスの腎嚢胞形成細胞の過増殖能を確認しうるため今後免疫染色の追加を検討していく。

ccRCC では、染色体 3p の喪失を頻繁に伴い一般的に変異する 4 つの遺伝子 VHL, PBRM1, BAP1, SETD2 を含んでいる。ccRCC マウスモデルでは、VHL 及び BAP1、VHL 及び PBRM1 を腎特異的にノックアウトしたマウスで腎腫瘍の形成が報告されている。

VHLf/f, PBRM1f/f, Pax8-Cre マウスでは生後 9 ヶ月頃より微小腫瘍形成が見られはじめ、生後 13 ヶ月で微小腫瘍の形成を全例で認めており、また VHLf/f, BAP1f/f, Pax8-Cre マウスでは生後 10 ヶ月ころから非定型嚢胞が見られはじめ、生後 11 ヶ月頃から微小腫瘍形成を認めるとされている(YF Gu, Cancer Discov, 2017)。また VHLf/f, PBRM1f/f, KSP-Cre マウスでは 10 ヶ月以降で 50%に腫瘍の形成を認め、近位尿細管由来であり、高いグリコーゲン含有量が確認されたと報告されている(AM Nargund, Cell report, 2017)。このことから

VHLf/f, KDM5Cf/f, Cre マウスも 12 ヶ月程度経過観察が必要であると考えられる。

VHLf/f, KDM5Cf/f, KSP-Creに関しては生後3ヶ月経過したところであり、現在衰弱しているマウスがいないことから経過観察を継続している。VHLf/f, KDM5Cf/f, Pax8-Creマウスに関しては、VHLf/f, KDM5Cf/f, PBRM1f/+, Pax8-Creマウスが衰弱して生後12ヶ月で死亡したため死後1日経過したところで解剖を行ったところ、著明な水腎症が両側腎に見られた。

VHLf/f, KSP-Cre マウスでは水腎症を形成すると報告されており (AM Nargund, Cell report, 2017)、当研究室でも VHLf/f, KSP-Cre マウスにおける水腎症の形成はエコー上観察されている。しかし VHLf/f, Pax8-Cre マウスでの水腎症の形成の報告はなく(YF Gu, Cancer Discov, 2017)、今回 VHLf/f, KDM5Cf/f, PBRM1f/+, Pax8 における水腎症の形成は、KDM5C の欠損もしくは PBRM1 のヘテロによる欠損の影響があると考えられる。しかし水腎症の形成は認めたが腫瘍形成には至らなかったため、今後 n 数を増やして経過を見ていく予定である。また今回は PBRM1 がヘテロで欠損していたため VHLf/f, KDM5Cf/f の影響の評価が困難であり、VHLf/f, KDM5Cf/f, Pax8-Cre マウスの作成を行い、12 ヶ月程度は経過観察を行い、適宜

エコーで評価していく予定である。

現時点では PCR によりマウスに flox, Cre が挿入されていることを確認しているが、タンパク質レベルで VHL, KDM5C が欠失していることは確認できていない。抗体を依頼している段階であり、購入でき次第タンパク質レベルでの欠失を確認していく予定である。また腫瘍形成などの表現型を認めることができれば RNA-seq を追加し遺伝子発現変動を確認していく予定である。