

令和 6 年度

研究奨励金研究成果報告書綴

一般財団法人藤原記念財団

令和6年度奨励交付金研究成果報告書

フェロトーシスは、鉄により細胞膜リン脂質中の多価不飽和脂肪酸が酸化・傷害されることで惹起される鉄依存性の細胞死であり、がんや虚血性疾患、神経変性疾患との関連から精力的に解析されている(図1)。フェロトーシスは鉄による脂質過酸化と、セレンタンパク質GPX4などの過酸化脂質抑制系のバランスの乱れによって引き起こされる。

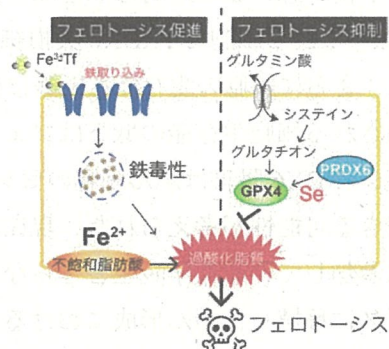


図1: フェロトーシスの制御因子

これまでのフェロトーシス研究は「フェロ=鉄」の名称に相反して、鉄の側面からの研究は行われていなかった。そこで私は、鉄の側面からフェロトーシスを再解析し、新たな鉄毒性・フェロトーシス制御因子を探索するため、鉄添加のみでフェロトーシス様の細胞死を誘導できる新たな系を樹立し、その系を用いたCRISPRスクリーニングにより鉄や脂質などの制御因子を含む多種多様な制御因子の同定に成功した。特に、私は既知のセレンタンパク質合成因子が全て細胞死抑制因子として同定されたことに注目した。セレンタンパク質は21番目のアミノ酸であるセレノシステインを活性中心に持つタンパク質である。セレノシステインはシステインの硫黄が、反応性の高い生命必須元素セレンに置き換わった構造をしており(図2)、セレンタンパク質はその反応性の高いセレノシステイン残基を用いて主に抗酸化作用を発揮する。フェロトーシスのマスター抑制因子であるGPX4もセレンタンパク質であり、活性中心のセレノシステイン残基でフェロトーシスの抑制に関与する。

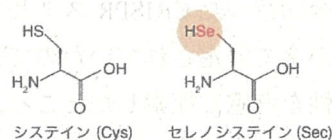


図2: セレノシステインの構造

私はこれまでに、新規セレンタンパク質合成因子が本スクリーニング結果に含まれる可能性を考慮し、GPX4の発現を指標に2ndスクリーニングを行ったところ、新たなセレンタンパク質合成因子としてPRDX6を同定した。PRDX6欠損細胞ではGPX4を含むセレンタンパク質の発現が著減し(図3)、鉄添加によりフェロトーシスが誘導されることを明らかにした。さらにそのメカニズムとして、PRDX6が20年以上未同定であった細胞内セレン輸送体として機能し、セレンタンパク質の原材料となるセレン元素の利用効率



図3: PRDX6欠損細胞でのセレンタンパク質量の減少

を上昇させ、セレンタンパク質の発現を正に制御していることを明らかにした。

がん細胞はセレンタンパク質を高発現することで、酸化ストレスを回避することが知られている。本研究では PRDX6 とがんとの関連についてさらに解析を進行した。データベース解析より、PRDX6 はがん組織で発現が高い傾向があり、PRDX6 高発現のがん患者では予後が悪いことが明らかとなった。

様々ながん細胞で PRDX6 欠損細胞を作成したところ、セレンタンパク質の発現が著減し、さらに細胞の生存能も顕著に傷害されることが明らかとなった。PRDX6 欠損細胞で観察される細胞生存能の低下はフェロトーシス阻害剤やセレン添加によって回復したことから、PRDX6 阻害はがん細胞のセレン利用効率を低下させることで、フェロトーシスを誘発できる可能性が考えられた。現在、PRDX6 とがんの関連に関して、血液内科より本研究室に参加している大学院生とさらなる解析を進めており、PRDX6 欠損がん細胞を免疫不全マウスに移植し、がん形成における PRDX6 の役割などを詳細に解析中である。上記より、PRDX6 阻害剤は有用な抗がん剤になる可能性を秘めており、阻害剤の探索も進めている。これまでに、PRDX6 タンパク質を大腸菌より精製し、その活性をハイスループットに検出する系を作成したので、その系を用いて PRDX6 阻害剤の探索を行っていく予定である。取得した化合物は細胞ベースでの解析に進行予定であるが、これまでの細胞内セレンタンパク質の検出はウェスタンブロッティングなどに限られており、ハイスループット検出系は存在しなかった。そこで、ルシフェラーゼベースのセレンタンパク質を開発・細胞に発現させ、細胞内セレンタンパク質のハイスループット検出系も構築した。これら系を用いて、PRDX6 阻害剤の取得を進めている。

また今回行った CRISPR スクリーニングでは、PRDX6 に加え既知のセレンタンパク質合成因子が全て同定されていたので、新たなセレンタンパク質が本スクリーニングに含まれる可能性を考慮し探索したところ、欠損することでセレンタンパク質の発現が減少する因子を 5 因子同定した。中でも 1 因子は神経変性疾患との関連があり、欠損することでセレンタンパク質の発現量が再現よく減少した。この因子に関しては、欠損細胞に入れ戻し実験を行い、セレンタンパク質の発現制御メカニズムを解析中である。また、フェロトーシスは神経変性疾患との関連も示唆されているので、見出した因子と神経変性疾患との関連についても解析を進行したい。

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

研究課題： 脳幹部形態学的解析による青壮年の原因不明突然死の発生メカニズム解明

研究目的： 原因不明あるいは心臓性に突然死したと推測される患者の脳幹部を免疫組織学的、超微細構造学的に解析し、予期せぬ突然死の発生メカニズムを明らかにする。

研究成果： 本研究により、これまで心臓性に突然死されたと推測されていた患者の一部では、突然の致死性障害が発生する前に、心臓の機能を制御する脳幹部での過剰な神経活動が関与している可能性が示された。

我が国では年間約 1.5 万人が突然死するが、その多くは急性心筋梗塞、心筋炎など形態学的異常を伴う疾病によるものとされる。一方で、若年者や青壮年の突然死においては、解剖によっても原因が同定されないものも多く、このような突然死は除外診断から死後判定不能な突然の心機能異常、例えば不整脈発作が生じたものと判定せざるを得ないのが現状である。しかしながら、青壮年の突然死には夜間や睡眠中の発症例が多く、睡眠・覚醒といった脳機能との関係が疑われる。特に、特定の突然死の疾患概念として乳幼児突然死症候群（SIDS）や、てんかんにおける予期せぬ突然死（SUDEP）があるが、これらが発症しやすくなるリスク因子として脳幹部異常が報告されている。このような背景から、青壮年の突然死の発生メカニズムにも脳幹部の異常が関与するのではないかと考え、本研究を実施した。

2020 年から 2022 年に当講座で施行した法医学解剖症例を対象とした。対象症例を抽出（図 1）し、脳幹部組織に対して HE 染色、KB 染色を実施した。脳幹部形態学的解析には、器質的解析として ChAT、AChE、 β Amyloid、 α synuclein、GFAP、Iba1 の免疫染色を実施し、機能的解析として c-Fos、HIF1 α の免疫染色を行った。

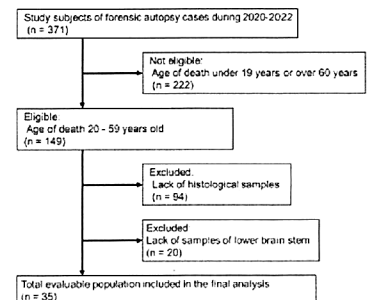


図 1：対象選定のフロー図

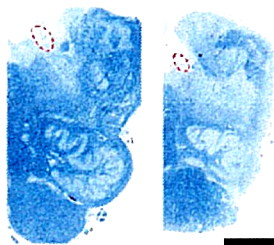


図 2：中部延髄（左）と下部延髄（右）
赤の破線領域内を観察対象とした。
Bar = 3 mm

また、保存された延髄の領域により、中部延髄と下部延髄を分けて解析を行い、迷走神経背側核を観察領域（図 2）とした。

青壮年での突然死群では、その他の死因（感染、窒息、外傷等）群と比較して迷走神経背側核の運動核細胞数（ChAT 陽性細胞）に有意な差はなかった（図 3）。これは SIDS や SUDEP での報告とは異なる結果である。一方で、同領域における c-Fos 陽性細胞

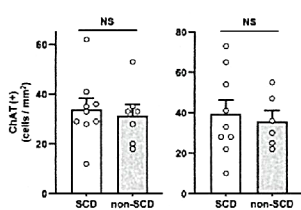


図3: 中部延髄(左)、下部延髄(右) 迷走神経背側核領域における ChAT 陽性細胞密度。SCD, sudden cardiac death.

胞数は中部延髄で増加傾向にあった(図4)。c-Fos は神経活動の分子マーカーであり、数分~数十分前の神経活動状態をよく反映する。迷走神経背側核における c-Fos の発現増加は、迷走神経反射ラットモデルでの上昇でも報告されている。青壮年の突然死には、心臓の不整脈発作に先行して、ストレスや体調不良、睡眠中の低酸素などに伴う副交感神経系の過剰活性状態が生じ

ている可能性が示された。一方で、そのほか酸化ストレス(HIF1 α)、神経変性疾患(β Amyloid、 α synuclein)、グリオース(GFAP)、炎症(Iba1)の発現に差はなかった(data not shown)。ただし、突然死群においてアストロサイトのクラスマトデンドロシスの発現が多い傾向にあった。

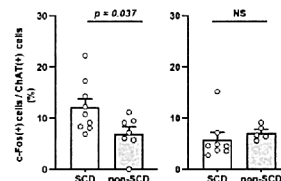


図3: 中部延髄(左)、下部延髄(右) 迷走神経背側核領域における c-Fos 陽性細胞数。ChAT 陽性細胞数で補正。SCD, sudden cardiac death.

本研究によりこれまで原因不明であった突然死例の中に、突然死に先行して脳幹部での迷走神経核の活性に伴う副交感神経の影響が疑われる症例が含まれることが明らかとなった。現在、本結果について症例を追加しつつ、論文執筆中である。ただし、本研究では過去に保存されたサンプルを使用したため、対象となる脳幹部領域(高さ)に差が大きく、また、過固定に伴う染色不良例も多数含まれていた。今後は青壮年死亡例での迷走神経背側核評価を前提とした組織採集と検証を行うとともに、ランスクリプトーム解析による c-Fos 高発現群における遺伝子発現の局所的变化を明らかにする予定である。

論文: [Kawai C, Miyao M, Kotani H, Minami H, Abiru H, Tamaki K, Nishitani Y. Roles of HMGB1 on life-threatening traumatic brain injury and sequential peripheral organ damage. Sci Rep. 2024;14\(1\):21421..](#)

予算執行額: 予算 30 万円は全て消耗品を購入し、全額使用した。内訳としては、免疫染色のための一次抗体 (Anti-AChE 抗体、Anti- β Amyloid 抗体、Anti- α synuclein 抗体、Anti-HIF-1 α 抗体) および免疫染色様の発色キット (DAB Substrate Solution) を購入した。

以上

2025 年 4 月 17 日

分子生体統御学講座医化学分野 助教

宮内英孝

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

研究課題 高ナトリウム環境下におけるマクロファージ炎症促進機構の解明：ER ストレス関連分子 PERK の役割

研究背景と目的

塩分は生物にとって不可欠な要素である一方、過剰摂取は高血圧、心血管疾患、慢性炎症、自己免疫疾患、腎臓病、癌等の病態に影響を及ぼすことが知られている。近年、これらの疾患において「高ナトリウム環境での自然/獲得免疫細胞の炎症促進」が病因の一つとして提唱されている。共同研究者の Müller 教授はこれまで、高塩分食がマクロファージの炎症を促進し細菌感染防御を高めることや、高塩分食が Th17 細胞を介して炎症・自己免疫疾患の悪化を惹起すること、また、その分子メカニズムとしてのミトコンドリアの関与等を明らかにしてきた。

本研究では、留学先での Müller 教授との共同研究で実施した CRISPR ライブラリースクリーニングから同定した小胞体(ER)ストレス関連分子 PERK (分子 X) に焦点を当て、高ナトリウム環境下における ER ストレスの役割を解明し、マクロファージの炎症促進機構の全容解明を目指した。

研究方法

1. CRISPR/Cas9 システムによる PERK ノックアウト骨髄由来マクロファージの作製と、それを用いた炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF) の発現・分泌量の測定
2. 骨髄由来マクロファージを用いた高ナトリウム環境下での PERK とその下流分子 eIF2 α のリン酸化動態解析
3. 骨髄由来マクロファージを用いた eIF2 α 阻害剤(ISRIB)による検証
4. 骨髄由来マクロファージを用いた RNA-seq およびプロテオミクスによる網羅的分子解析

研究結果

CRISPR スクリーニングにより、高ナトリウム環境下でのマクロファージの炎症応答に ER ストレス関連分子 PERK が関与していることを同定した。骨髓由来マクロファージにおいて PERK をノックアウトすると、LPS 存在下における「高ナトリウム環境による炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF) の分泌亢進」が抑制されることを見出した。

興味深いことに、これらの変化は遺伝子発現レベルでは認められず、タンパク質翻訳あるいは分泌過程における変化が示唆された。また、この現象は LPS 単独刺激 (ナトリウム非存在下) では観察されず、高ナトリウム応答に特異的な経路だと考えられた。

PERK は一般的に eIF2 α のリン酸化を担う分子として知られているが、LPS 高ナトリウム環境下では、LPS 単独環境と比較して PERK のリン酸化動態に変化は見られなかった。さらに予想に反して、eIF2 α のリン酸化は減少していた。また、eIF2 α 阻害剤 (ISRIB) は炎症性サイトカインの分泌に影響を与えなかった。これらの結果から、従来知られている PERK-eIF2 α 経路とは異なる、PERK 特有のシグナル経路 (非古典的経路) が高ナトリウム環境下での炎症応答に関与している可能性が示唆された。

当初計画していたマクロファージ特異的 PERK 欠損マウスの解析は技術的制約により実施できなかったが、代替として RNA-seq およびプロテオーム解析を実施し、上記 in vitro 実験での知見を裏付ける結果を得た。

結論と今後の展望

本研究により、高塩分環境下でのマクロファージの炎症応答において ER ストレス関連分子 PERK が重要な役割を果たすことが明らかとなった。特に、PERK は従来から知られる eIF2 α 経路とは異なるメカニズムで機能する可能性が示唆された。PERK のリン酸化状態に変化がない一方で eIF2 α のリン酸化が減少するという予想外の結果は、高ナトリウム環境下における PERK の新規経路の存在を示唆している。

今後の課題として、上記新規シグナル経路の同定を目指す。まずは ER ストレス関連分子、eIF2 α 関連分子の動態を網羅的に検証し、実際にどのシグナル経路がこの現象に関与しているかを同定したい。

本研究成果は、高塩分摂取が関与する様々な炎症性疾患の病態理解と新規治療標的の同定に貢献することが期待される。

2025 年 4 月 7 日

京都大学大学院 医学研究科 脳統合イメージング分野

特定助教 山口 健治

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

小脳は長く運動機能に対する役割にのみ注目されてきたが、運動に依らない認知機能への寄与についても近年研究が進んできた。また、小脳が担う運動学習の重要な情報処理基盤としてシナプス可塑性が知られるが、認知機能の学習との関りについては未だ報告されていない。そのため本研究では、報酬予測学習中のラットにおいて、小脳シナプス可塑性に必要なタンパク質である CaMKII を光プローブ技術を用いて計測することで、小脳の認知的予測を実現すると考えられるシナプス可塑性動態を同定することを目指した。

上記の目的達成のために、CaMKII を記録するシステムであるファイバーフォトメトリー法のセットアップと、遺伝子組み換えのための組換え遺伝子作成、実験動物の小脳内に導入するためのウイルス作成を行った。ファイバーフォトメトリー法では、CaMKII センサーの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) プローブである Camui をプルキンエ細胞特異的に発現させたラットに刺入した光学ファイバーから、CaMKII の活性に応じて励起光に対して発せられる FRET 蛍光信号を読み取り、相対的な CaMKII 活性の変化を定量化する。これを実現するため、励起光となる LED 光源をミラーとレンズを使って増幅し、ファイバーケーブルを通してラットに刺入する光学ファイバーに送る。また、この光学ファイバーおよびファイバーケーブルから得た蛍光を光学フィルターを通して光電子増倍管へ送り、アナログ信号としてデータ取得システムで記録する。このシステムに使用するミラーやレンズ、ファイバー、光源、ケースなどを本交付金で購入することで、装置を構築することが出来た。また、遺伝子組み換えによって、FRET プローブ Camui を小脳プルキンエ細胞特異的に発現させるため、プルキンエ細胞特異プロモーターである L7 と Camui を組み合わせ、組換え遺伝子を作成した。この組換え遺伝子をアデノ随伴ウイルスに導入し、ラットの脳内に投与する実験系を確立した。

また、この遺伝子組み換えラットに訓練する報酬予測学習課題の系を確立した。この課題では、摂水制限を施したラットを頭部固定し、手掛かり音を呈示して、2 秒以内にレバーを引けばレバーの先から報酬として 1 滴のサッカリン水が出てくるようにした。この課題の訓練によって報酬予測学習が頭部固定下ラットで確立されることを実際に確認した。この行動課題実行中の LTD 動態を CaMKII 活性変化から推定し、報酬予測運動学習に対していつ、どれくらい、どのようなパターンで働くのかを引き続き調査していく。

2025 年 4 月 9 日 提出

(採択時) 京都大学大学院医学研究科神経生物学・助教

(現職)

北里大学医学部生理学・講師

笠井 昌俊

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

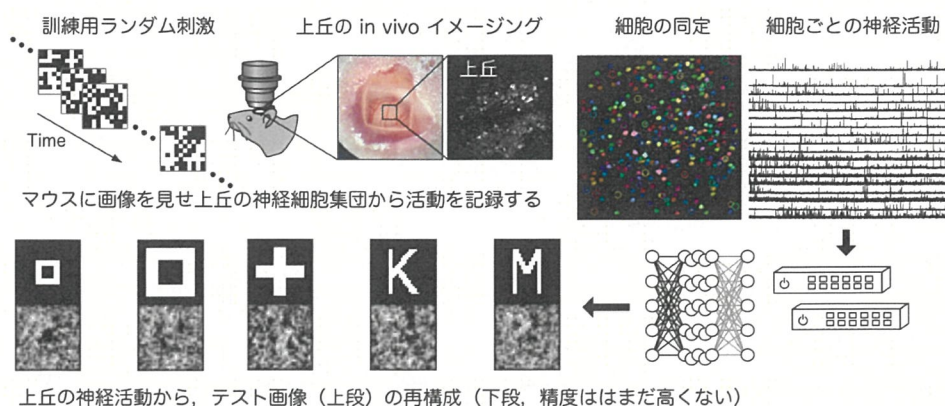
研究課題名「新旧の脳内視覚表現の解読」

本研究の目的は、哺乳類の脳内における視覚情報の表現様式と、その性能を明らかにすることである。

哺乳類の中でもヒトを含めた霊長類では大脳皮質の発達にともない、優れた視覚機能を獲得したと考えられている。一方で、進化的に古い動物や、哺乳類の中でも視覚野があまり発達していない動物種では、大脳皮質のかわりに「古い視覚系」である中脳の上丘の機能が重要であると予想される。本研究では、大脳皮質視覚野（新しい視覚系）と中脳の上丘（古い視覚系）をターゲットとし、(1) マウスが実際に視覚刺激を見ている間にこれらの脳領域がどのように活動するのかを、個々の神経細胞レベルかつその集団的な活動パターンレベルで明らかにすることを試みた。(2) さらに京大情報学研究科の神谷教授らとの共同研究を開始し、得られた細胞集団の神経活動から、最新の機械学習や深層学習などの情報学的な手法により、実際の刺激を解読（デコーディング）する方法の開発をおこなった。

(1) マウスの上丘および視覚野からの視覚応答を記録した。これまでに開発してきた 2 光子顕微鏡による in vivo カルシウムイメージング法によって、マウスの上丘と大脳皮質の第一次視覚野にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを局所注入し神経細胞にカルシウムセンサー (GCaMP) を発現させた。視覚刺激としては、白と黒のランダムなチェッカーパターンを 1000 枚以上提示し、機械学習等で必要な学習データを取得した。テスト用の視覚刺激としては、単純な図形やアルファベットを提示した（図左上）。視覚刺激提示の時間間隔が短い場合、神経活動に同期した蛍光上昇が分離できないため、刺激間隔を 8 秒程度に設定した場合、1000 枚以上の学習データを取得するためには非常に時間かかるため、動物の状態を安定に保持する必要がある。そのため実験は 0.5 % 程度のイソフルラン または、三種混合麻酔下で実験をおこなった。長時間の記録中にマウスが見ている場所や単純な刺激に対する活動が変化していないことおさえておくため、視野空間マッピング用の刺激や、動く刺激に対する反応の変化を記録し実験後データの正当性を検証した。

上丘の神経細胞集団からの視覚応答記録とデコーディングの実験



(2) 上記で得られた、第一次視覚野と上丘の視覚応答データをもとに、学習用の刺激で得られた脳活動をもとに、各神経細胞の反応の重みづけをおこない、テスト刺激に対する脳活動から与えた視覚刺激が復元できるかどうかを試した。手法としては、まず神谷グループが以前にヒトの fMRI のデータをもとにおこなった手法 (Miyawaki et al., 2008) を 2 光子カルシウムイメージングデータでも使えるように調整し、画像再構成を試みた。まだ記録できる細胞数や試行数に偏りがあるため、fMRI の解析と比べ、再現度は低いが、刺激の周波数成分ごとに再現度を比較したところ、上丘、第一次視覚野ともに低周波数成分の再現度はチャンスレベルよりも高く、一方で高周波成分については再現度がチャンスレベル以下になっていた（図下部）。現状ではこれが先行研究であるヒトと、本研究でもちいているマウスの間の、異なる動物種の脳活動の違い、記録方法の違い、解析手法のチューニングによるものかを明らかにするために現在解析を継続している。さらに新たな試みとして、より複雑な刺激として自然画像のデータベースから、約 2500 枚の画像をピックアップし、それらをランダムに多数の学習用データと少数のテスト用データとして視覚応答を取得し、学習用のデータから得られた神経活動をもとに作成したモデルが、テスト用画像をどの程度再現できるかについても解析を進めている。深層学習を組み合わせた解析では、ランダムチェッカー刺激よりも画像再構成の精度の高い結果が得られたことから、こちらのデータ取得を重点的にこなす予定である。今後はこれらの記録・解析手法のブラッシュアップをさらに進めて、新旧の視覚系の情報処理やその生理学的な機能に違いがあるのかについてさらに深く調べていく。また、光遺伝学や化学遺伝学的な神経活動の操作を組み合わせることで、2つの視覚系の一方の神経活動を抑制した場合に、残された視覚系での脳内視覚情報表現がどのように変化するかを明らかにしていきたいと考えている。

二〇二五年三月二四日

京都大学大学院医学研究科 附属ゲノム医学センター 特定研究員

岩崎毅

令和6年度奨励交付金研究成果報告書

単一細胞大規模並列レポーターアッセイによる自己免疫疾患の原因遺伝子変異の同定

関節リウマチやクローン病などの自己免疫疾患は、免疫系の調節障害が生じ、それにより自身の体が免疫により攻撃される疾患群である。その病因は不明確であるが、広い意味では、遺伝的要因と環境要因の相互作用によって引き起こされると言える。実際、ゲノムワイド関連解析を通じて、リスクに関連している遺伝的変異が何千と特定されている。したがって、それらの遺伝的変異が環境因子に反応しながらそれぞれ特定の効果を示し、その総和と時間経過に伴う蓄積が疾患の発症につながると考えられる。しかし、現在まで、各遺伝的変異がどのように疾患につながるかについて、その詳細なメカニズムが十分に理解されていない。この精緻なメカニズムを明らかにすることが困難な理由はいくつかある。第一に、連鎖不平衡のためリスク変異は互いに関連しており、真に原因となる遺伝子変異を特定することが困難である。第二に、変異の大部分は非翻訳領域に位置しており、その機能を評価することが困難である。第三に、結合可能な転写因子やクロマチン構造やメチル化などのエピジェネティック修飾が細胞ごとに異なるため、変異の遺伝的効果は異なる細胞タイプによって異なる。これらの課題に対応するため、研究代表者は単一細胞大規模並列アッセイを提案した。

大規模並列アッセイは、DNA 配列の調節活性を同時に大規模に評価することを可能にする分子生物学的技術である。候補 DNA 配列の下流にバーコードを持つレポーター遺伝子を持つプラ

スミドライブラリを構築し、細胞に導入する。その後、次世代シーケンシングによってバーコードの数を定量化することで、各 DNA 配列の活性を測定する。このアッセイにより連鎖不平衡の影響を取り除きながら非翻訳領域の機能を効率的に評価することができる。ここで、研究代表者はこのアッセイを単一細胞 RNA シーケンシング技術と組み合わせ、様々な細胞集団において DNA 配列の活性を評価できる実験系を構築することを試みた。

まず研究代表者はバルク大規模並列アッセイ研究で用いられてきた構造を持つプラスミドライブラリを細胞に導入し、単一細胞解析を行うことで、どの程度信頼性のある情報が得られるかを評価した。実験対象は三種類の培養細胞株とし、これまでのバルク大規模並列アッセイの結果 DNA 配列に制御活性があり、かつ参照対立遺伝子と代替対立遺伝子の間で制御活性に差があることが確認されている配列を抽出しプラスミドライブラリを作成した。作成したライブラリを培養細胞株に導入し、二十四時間後に細胞を回収し単一細胞 RNA シークエンス解析を行った。転写物はポリ A 尾部で捕捉し、プラスミド由来の転写物はレポーター遺伝子特異的なプライマーを用いて増幅した。また一方でプラスミド由来でない遺伝子由来の転写物は鋳型スイッチオリゴ上に設計したプライマーで増幅することにより次世代シーケンサー用のライブラリを作成した。ライブラリをシーケンシング解析した結果、レポーター遺伝子由来の転写物の発現量は、概ねバルクの実験で得られたものと相関していた(三種類の培養株毎にそれぞれ $r=0.64, 0.71, 0.63$)。ただ詳細な解析を進めたところ、次世代シーケンサー用ライブラリを作成する過程で生じたと思われるキメラ産物、つまり細胞バーコードと転写物由来のバーコードのスワッピングが存在していることが判明し、それを如何に効率良く除けるかが、良質な情報を得るための課題であると考えられた。

そこで研究代表者は、DNA 配列の制御活性に関わらず、細胞内に入った後に強く発現するような配列を DNA 配列の上流に挿入し、その配列由来の転写物の発現量を参照することにより、バーコードスワッピングにより生じた偽陽性を除去できるか検討した。この考えに基づいたプラスミドを設計・構築し、同様に三種類の培養細胞に導入して単一細胞 RNA シークエンス実験を行った。その結果、この手法を用いることによりバルクの実験で得られた結果との相関は上昇し($r=0.85, 0.81, 0.83$)、偽陽性の転写物発現を効率的に除去することができたと考えられた。

今後この手法を用いて様々な細胞集団における自己免疫疾患関連遺伝子の機能の解析を進めていく予定である。

多剤併用(ポリファーマシー)のパターンとパーキンソン病の発症リスクとの関連性: 日英の大規模診療データベースを用いた臨床疫学研究

2025 年 4 月 25 日

医療疫学分野

板谷崇央

1. 研究の背景

いくつかの薬剤では、長期的な使用が疾患の発症リスクを上げることや下げること
に影響すると示唆されている。なかでも、薬剤曝露とパーキンソン病の発症リスクと
の研究は 2000 年代から数多く報告されてきている。しかしながら、それらの研究の
ほとんどが単一の薬剤使用に焦点を当てた研究であり、実際の臨床現場でよく出会う
多剤併用（ポリファーマシー）など複数の薬剤使用は考慮されていない。

本研究では、日本と英国における大規模な診療データベースを用いて、臨床疫学と
機械学習の手法を組み合わせることによって、パーキンソン病発症前におけるポリフ
ァーマシーのパターンを明らかにする。そして、それらの処方パターンとパーキンソ
ン病発症リスクとの関連性を定量的に検証することを目的とする。

本研究の核心は「どのような薬の飲み合わせがその後のパーキンソン病の発症リス
クになるのか」という問いである。

2. 目的

以下 3 点を本研究の目的とする。

1. パーキンソン病患者における発症前のポリファーマシー有病割合を明らかにする
こと【研究①】
2. パーキンソン病患者における発症前の処方パターンを明らかにすること【研究②】
3. 研究②で同定した処方パターンのパーキンソン病発症リスクを明らかにすること
【研究③】

3. 研究の内容・成果

本研究では、日本は 2014 年から 2023 年まで、英国は 1999 年から 2020 年までの
データをそれぞれ用いた。研究①について、日本と英国のいずれにおいても、パーキ
ンソン病を有する患者のポリファーマシーの有病割合は年々増加傾向となっており、
2020 年時点の日本では全体で約 86% であり、英国では全体で約 80% であった。

研究②の処方パターンの分析では、主たる分類では日本と英国のポリファーマシー
を有する集団をそれぞれ 5 グループに分類した。主な特徴として、いずれにおいても
最も多かった集団では、スタチンや高血圧症治療薬・糖尿病治療薬等の生活習慣病に
関係する薬剤を複数処方されているパターンが同定された。さらに、睡眠薬や緩下剤
等の病状や治療薬の副作用に対する薬剤の処方が多く認められた。詳しく分析すると、

睡眠薬や緩下剤も複数の種類が同時に処方されている場合や一般的な処方量を超える処方がされている場合があることが明らかになった。また、英国のデータにおいて特筆すべき点として、オピオイド鎮痛薬を中心とした処方パターンが観察されたことである。

研究③に関して、顕著であった結果は、糖尿病治療薬のうち GLP-1 受容体作動薬や DPP-4 阻害薬を含む処方パターンを有するグループでは、パーキンソン病発症リスクが低かった。いずれの薬剤の分子メカニズム的な機序を考慮しても神経保護作用が示唆されているため、理にかなった結果と考えることができる。一方、同じ糖尿病治療薬の中でもメトホルミンを使用しているグループでは、パーキンソン病発症が多く、適切に病状のコントロールができる場合は古典的によく使われるメトホルミンよりも新興治療薬である GLP-1 受容体作動薬や DPP-4 阻害薬の方がパーキンソン病発症リスクの観点からは良い可能性が示唆された。その他には β 遮断薬を含む処方パターンではパーキンソン病発症リスクを増大させる方向に作用した。詳細な分析結果については現在論文投稿準備中である。

4. 今後の研究の方向・課題

以上から、本研究では日本と英国の診療データベースを用いて、パーキンソン病患者におけるポリファーマシーについて同じ定義をもとに有病割合を推定して、それぞれの処方パターンを分析した。ポリファーマシーは英国よりも日本での有病割合が高かった。また本研究におけるポリファーマシーの定義は薬剤の処方数に基づいているため、臨床的な処方の適切性を厳密に評価しているものではないが、各国全体での処方パターンの把握をすることを可能にした。今後処方パターンの実態をより厳密に調査することに加えて、ポリファーマシーが与える影響について、他の疾患についてもさらに詳細に分析していきたい。

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

【研究課題】新型コロナウイルス感染症の死亡リスクに対する治療薬投与タイミング効果の推定

【研究成果報告】本研究では新型コロナウイルス感染症の死亡リスクに対する治療薬投与タイミング効果の推定を実施予定であったが、投与タイミングが家庭内伝播に与える影響を定量化することとした。現在日本では 4 種類の抗ウイルス薬と 3 種類の中和抗体薬が承認されている。抗ウイルス薬投与によって、投与者における体内のウイルス量の減少や重症化、死亡リスクの減少が報告されてきた。早期薬物療法が投与者の感染性(他者に感染させる力)をどの程度低下させ、2 次感染を防ぐかについては、インフルエンザ領域で長く議論がなされており、重要な公衆衛生上の課題である。本研究の目的は家庭内での 2 次感染リスクが投与タイミングによってどの程度変動するかを定量化し、政策立案に資するエビデンスを確立することである。

【方法】2 人以上で居住しており、2023 年 5 月 1 日から 2024 年 10 月 11 日までの間に家庭内で最初に COVID-19 に感染した 60 歳以上の人、もしくはその人と同居または 1 週間に 1 度は会っている家族の人を対象とするインターネット社会調査を実施した。家庭内で最初に発症した人は年齢、性別、発症月、治療薬種類、発症から治療薬投与までの日数、解熱鎮痛薬投与の有無、ワクチン接種歴、自然感染歴、居住している家の部屋数、発症した際の隔離対策の有無を調査項目とした。また、世帯同居人の年齢、性別、2 次感染の有無、発症間隔、ワクチン接種タイプを調査した。家庭内での 2 次感染確率を $p_{(i,j,t)}$ とするとき、数式(1)のようにモデル化した。

$$p_{(i,j,t)} = \beta_{i,j,t} \gamma_j \left(\int_0^{x_i} g_\tau d\tau + (1 - \alpha) \int_{x_i}^{\infty} g_\tau d\tau \right) \quad (1)$$

i は家庭内最初の発症者(index case)、 j は同居人、 β は投与者のワクチン接種効果、 γ は同居人のワクチン接種効果、 x_i は発症から投与までの時間、 g_τ は世代時間(1 次感染から 2 次感染が起こるまでの時間間隔)、 τ は感染からの経過時間、 α は投与直後の瞬間的な 2 次感染減少度である。また感染から発症までの潜伏期間は日本の既報研究を参照し、潜伏期間の確率密度関数を畳み込むことで感染から投与までの時間を考慮した。家庭内で同居人の

うち何人が2次感染したかと、2次感染を引き起こす前に抗ウイルス薬を投与したかどうかの情報をを用いて尤度を計算し、パラメーター推定を Markov chain Monte Carlo を用いて実施した。また、世代時間の確率密度関数を Gamma, Lognormal, Weibull 分布としてそれぞれ推定し、WAIC によるモデル比較を行った。また、Bridgesampling による周辺尤度推定と posterior probability の比較も実施した。推定は cmdstanr 2.34.0 を用いて実施した。

本研究は京都大学医の倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号: R4613）。

【結果】調査には 2630 人の index case と 4927 人の同居人が含まれた。Index case の中で、経口抗ウイルス薬を投与された人は 894 人であり、そのうちニルマトレルビル/リトナビルの処方割合は 15.4%、エンシトレルビルは 47.1%、モルヌピラビルは 37.4%であった。世代時間の確率密度関数は 3 つの経口抗ウイルス薬において lognormal 分布の WAIC が最も低く、posterior probability から lognormal 分布が最適なモデルと選択された。世代時間の確率密度関数が lognormal 分布に従うとき、瞬間的な 2 次感染減少度合い(α)はニルマトレルビル/リトナビルで 7.2% (95%信用区間(CI): 2.1-14.9)、エンシトレルビルは 6.1% (95% CI: 2.9-10.3)、モルヌピラビルは 2.7% (95% CI: 0.6-6.3)であった。感染から発症までの潜伏期間を 2.6 日と仮定し、発症から 24 時間以内の投与による 2 次感染の減少割合はニルマトレルビル/リトナビルで 2.2% (95% CI: 0.6-4.6)、エンシトレルビルは 2.0% (95% CI: 0.9-3.3)、モルヌピラビルは 0.8% (95% CI: 0.2-2.0)であった。また、COVID-19 の実行再生産数を 2.5 としたとき、発症から 24 時間以内の経口抗ウイルス薬投与によってニルマトレルビル/リトナビルで 2.44、エンシトレルビルは 2.45、モルヌピラビルは 2.49 となった。

【考察】本研究は COVID-19 における経口抗ウイルス薬投与によって家庭内伝播抑制効果を定量化した初めての研究である。3 つの経口抗ウイルス薬投与の早期投与は家庭内の 2 次感染の減少度合いは最も効果のあるニルマトレルビル/リトナビルであっても 2.2%であり、抗ウイルス薬のみでは COVID-19 アウトブレイクをコントロールすることはできないことが示唆された。経口抗ウイルス薬投与によって体内ウイルス量が減少することは確認されているが、ウイルス量減少と 2 次感染リスク減少は必ずしも比例することがないことは多くの研究で示唆されており、本研究の結果と一致する。本研究では同居人のワクチン接種からの経過時間と家庭内での隔離対策の影響を考慮できていないという限界がある。

【結論】COVID-19 における経口抗ウイルス薬投与による家庭内 2 次感染に与える影響は小さく、経口抗ウイルス薬投与のみでは感染症コントロールはできないと考えられる。本研究で確立した推定手法は、次の新興感染症によるパンデミック時にも適用でき、最適な感染症政策立案に寄与できる。本研究内容は公衆衛生上の重要な要素を推定するモデルを実装できた重要な知見として、論文投稿予定である。本研究は貴財団のご支援を得て実施することができた。この場を借りて改めて深く感謝申し上げます。

令和 7 年 4 月 25 日

京都大学大学院医学研究科 血液内科学 助教

松本 忠彦

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

研究課題: 遺伝子不安定性を有する癌の生存メカニズムの解明

本研究では、癌における遺伝子不安定性のモデルとして、多くの癌で発現が亢進しており、またそれによるパターンの遺伝子変異が多く見られる APOBEC3B の過剰発現モデルを選択した。また、本研究では APOBEC3B による発癌メカニズムの解明を目的としているため、ベースラインの APOBEC3B 発現が低く非癌細胞の細胞株である HEK293T と hRPE-1 を用いることとした。

APOBEC3B の恒常的発現細胞は、APOBEC3B による持続的な遺伝子損傷応答の活性化によると思われる細胞死が起こるため、作成できないことが知られている。そこで我々は、ドキシサイクリン誘導性に APOBEC3B が発現する tet-on システムの樹立を目指した。

まず tet-on システムのプラスミドとして、pCW ベクターを用いることとした。このベクターはレトロウイルスベクターで、APOBEC3B の C 端側に IRES 配列を挟んで ZsGreen という緑の蛍光色素を有しており、APOBEC3B の発現を蛍光色素でモニター可能なシステムである。まずは InFusion システムにより pCW-APOBEC3B-3xFLAG-IRES-ZsGreen ベクターを作成した。APOBEC3B は N 端と C 端にシチジン脱アミノ化酵素ドメイン(CDD)を 2 つ有しており、N 端は 1 本鎖 DNA への結合に、C 端は酵素活性に関与している。APOBEC3B の酵素活性を DNA 結合能と別個に評価するために、APOBEC3B 野生型と不活性化変異体を作成した。

まず、ベクターからの DOX 誘導性 APOBEC3B 発現を ZsGreen の蛍光とウェスタンブロッティングで、APOBEC3B が有するシチジン脱アミノ活性を in vitro シチジン脱アミノ化活性で確認した (図 1)。

pCW ベクターはウイルスベクターであるが、APOBEC3 ファミリーは抗レトロウイルス因子であり、ウイルス感染による導入が困難であることが知られている。そこでまず

Nucleofector4D システムを用いたエレクトロポレーションによる遺伝子導入を試みた。pCW を制限酵素で線状化し、Nucleofector4D により 293T と hRPE-1 細胞に遺伝子導入したが、ZsGreen の蛍光を見る

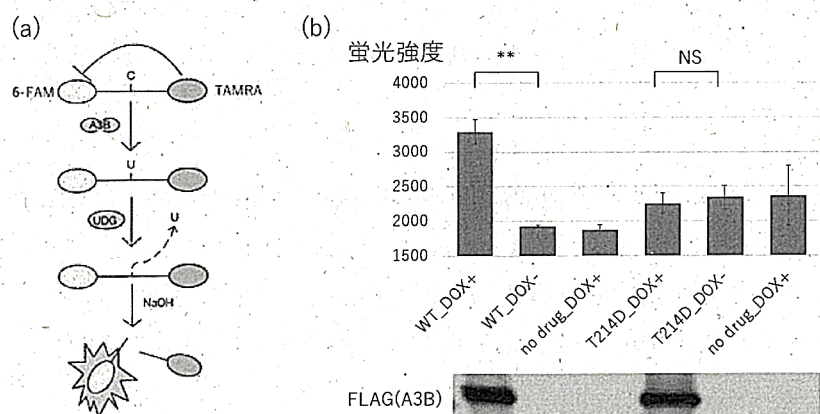


図1 (a) in vitro Cytidine deaminase assay. CDA活性が強いほど6-FAMの蛍光強度が高くなる。(b) in vitro Cytidine deaminase assayの結果. WT APOBEC3Bのみ活性が確認できた。

限りごく限られた細胞のみしか発現していなかった。そこで限界希釈により ZsGreen 発現の良好なクローンを選択した。この細胞を用いて、DOX 誘導により細胞増殖抑制が見られるか、MTS アッセイを用いた細胞増殖アッセイで確認したが、細胞増殖抑制は見られなかった。

細胞増殖抑制が見られなかった原因が APOBEC3B 発現の不足であると考え、エレクトロポレーションでなくウイルス感染を試みることとした。APOBEC3B 発現による感染の不成立のリスクを最小限とするため、ウイルス作成の際に用いる全ての培地を使用した FBC をテトラサイクリン非含有のものを用いた。この培地を用いて作成したウイルスは 293T に感染が成立し、DOX 処理により A3B 発現が確認できた。当初増殖抑制が確認できなかったが、再度ウイルス感染を行うことにより細胞増殖抑制を確認することができた(図 2)。

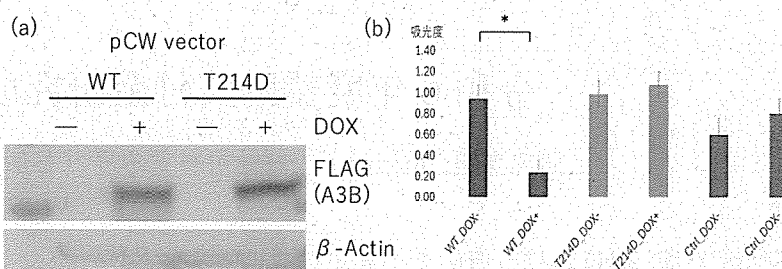


図2. ウイルス感染によるtet-onシステムを用いた293T-A3B細胞の樹立 (a) ウイルス感染により樹立した293T-A3B細胞株でDOXにより、A3B WTと不活性化変異体の発現が確認できた (b) MTSアッセイを用いた細胞増殖実験。293T-A3B WT, 不活性化変異体、293T細胞をDOXで処理し、day6でMTSアッセイを行った。WTでのみ細胞増殖抑制効果が見られた。

この pCW システムを用いた 293T-A3B 細胞を用いて CRISPR スクリーニングを計画したが、CRISPR スクリーニングに使用する sgRNA ライブラリーも pCW システムと同じピューロマイシン耐性遺伝子を使用している上、293T-A3B 細胞が増殖しなくなったため、別の DOX 誘導性システム(pBIB)を用いて 293T-A3B 細胞株の樹立を試みた。

pBIB ベクターはブラストサイジン耐性を有していたが、ブラストサイジンは Cas9 発現ベクターの選択薬剤であった為、ハイグロマイシン耐性遺伝子と交換したベクターを作成した。pBIB もウイルスベクターであり、やはりテトラサイクリン非含有 FBS を用いてウイルスを作製し、4 回ウイルス感染を繰り返すことで 293T-A3B 細胞を樹立した。この細胞株においても増殖抑制が確認できた。

今後は細胞増殖抑制の機序を明らかにするため、DNA 損傷を γ H2AX や p53 のリン酸化などにより、また DNA 損傷応答を ATM-Chk2 や ATR-Chk1 経路の活性化をウェスタンブロッティングにより解析する。細胞周期は Click-iT EdU cell cycle assay により解析する。細胞死に関してはアポトーシス検出キット(AnnexinV)や、カスパーゼ、p16、LC-3 などのウェスタンブロッティングによってどの細胞死経路が活性化しているかを解析する。

癌化過程における細胞増殖抑制回避機構の解明のために、CRISPR スクリーニングを行う。293T-A3B Cas9 細胞に MOI 0.3 程度となるよう sgRNA ライブラリーウイルスを感染させ、ピューロマイシンでセクションをした後、10-14 日間程度培養し、ライブラリーの変化を観察する。このスクリーニングで抽出された遺伝子やパスウェイをこの細胞を用いて詳細に解析し、細胞死経路への関与やその機序を解明する予定である。

提出日 2025年3月24日

京都大学大学院医学系研究科 循環器内科学 助教 山下 侑吾

令和6年度奨励交付金研究成果報告書

研究課題: 血栓症発症の多遺伝子スコア導出による精密医療の実現

癌と並び世界中で大きな健康問題の一つである循環器疾患については、これまで遺伝子レベルの異常に比べて後天的な環境要因の影響が大きいと考えられていたことから、遺伝的要因の影響を加味した精密医療の導入は進んでこなかった。しかし近年、大規模バイオバンクデータの整備やゲノムデータを含めた大規模データの統計解析方法が発展したことで、ゲノムワイド関連解析(GWAS)とよばれる網羅的な遺伝的要因の解析により、疾患発症と関連する SNP(一塩基多型)が数多く明らかとなった。循環器疾患では、一つ一つの SNP の影響は小さくとも、SNP が重複する事により個体として相応の影響を有する事も明らかとなり、それらは Polygenic risk score(PRS: 多遺伝子スコア)という概念で提唱されている。循環器疾患の中で、血栓症(特に静脈血栓塞栓症)については、比較的頻度の多い疾患に関わらず、その発症メカニズムについては未だ未解明な部分が多く、どのような人が発症しやすく、どのような人が再発しやすいのかについてよくわかっていないのが現状である。また、人種差も大きい疾患であると考えられているにも関わらず、未だ日本人で GWAS はされていない。さらに海外には「ゲノム情報」を含む大規模なバイオバンクが存在するが、臨床情報については十分に収集されておらず、実際に臨床応用できるリスク層別化の検討は困難な状況である。そこで、本研究では、静脈血栓塞栓症を発症した患者の「詳細な臨床情報」と「ゲノム情報」を含む大規模なバイオバンクデータを構築し静脈血栓塞栓症の GWAS を実施することで、臨床的予測スコアと PRS の融合による患者層別化を行い、個別化医療・精密医療の実現を目指した。

今回は、大規模な研究の予備的段階の研究として、疾患レジストリから遺伝的情報を集めたレジストリ構築の準備を予定通り進め、その研究が無事開始となっている。そして、本研究助成を用いる事により、関連学会への参加・情報収集、および関連領域の論文報告を行う事により、本研究データの解析の準備が予定通り進んでいる。今後、同研究からの論文発表のみならず、関連学会での発表、市民団体での発表なども目指しており、本研究が医学研究に幅広く役立つ事になる事が期待される。この度は、このような貴重な取り組みを御支援頂きました藤原記念財団および関係者各位様に改めて厚く御礼申し上げます。

(文献) 関連する領域での論文報告(筆頭著者もしくは責任著者の論文)

Yamashita Y, Morimoto T, Muraoka N, Shioyama W, Chatani R, Shibata T, Nishimoto Y, Ogihara Y, Doi K, Oi M, Shiga T, Sueta D, Kim K, Tanabe Y, Koitabashi N, Takada T, Ikeda S, Nakagawa H, Tsukahara K, Shoji M, Sakamoto J, Hisatake S, Ogino Y, Fujita M, Nakanishi N, Dohke T, Hiramori S, Nawada R, Kaneda K, Ono K, Kimura T; ONCO PE Trial Investigators. Rivaroxaban for 18 Months Versus 6 Months in Patients With Cancer and Acute Low-Risk Pulmonary Embolism: An Open-Label, Multicenter, Randomized Clinical Trial (ONCO PE Trial). *Circulation*. 2024 Nov 18. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.124.072758. Epub ahead of print. PMID: 39556015.

Ikeda S, Yamashita Y, Morimoto T, Chatani R, Kaneda K, Nishimoto Y, Ikeda N, Kobayashi Y, Ikeda S, Kim K, Inoko M, Takase T, Tsuji S, Oi M, Takada T, Otsui K, Sakamoto J, Ogihara Y, Inoue T, Usami S, Chen PM, Togi K, Koitabashi N, Hiramori S, Doi K, Mabuchi H, Tsuyuki Y, Murata K, Takabayashi K, Nakai H, Sueta D, Shioyama W, Dohke T, Nishikawa R, Ono K, Kimura T. Association Between White Blood Cell Counts at Diagnosis and Clinical Outcomes in Venous Thromboembolism – From the COMMAND VTE Registry-2. *Circ J*. 2024 Oct 22. doi: 10.1253/circj.CJ-24-0581. Epub ahead of print. PMID: 39443129.

Nishikawa R, Yamashita Y, Morimoto T, Kaneda K, Chatani R, Nishimoto Y, Ikeda N, Kobayashi Y, Ikeda S, Kim K, Inoko M, Takase T, Tsuji S, Oi M, Takada T, Otsui K, Sakamoto J, Ogihara Y, Inoue T, Usami S, Chen PM, Togi K, Koitabashi N, Hiramori S, Doi K, Mabuchi H, Tsuyuki Y, Murata K, Takabayashi K, Nakai H, Sueta D, Shioyama W, Dohke T, Ono K, Kimura T; COMMAND VTE Registry-2 Investigators. Selection of Home Treatment and Identification of Low-Risk Patients With Pulmonary Embolism Based on Simplified Pulmonary Embolism Severity Index Score in the Era of Direct Oral Anticoagulants. *J Am Heart Assoc*. 2024 Oct;13(19):e034953. doi: 10.1161/JAHA.124.034953. Epub 2024 Sep 30. PMID: 39344589.

Xiong W, Yamashita Y, Morimoto T, Muraoka N, Umetsu M, Nishimoto Y, Takada T, Ogihara Y, Nishikawa T, Ikeda N, Otsui K, Sueta D, Tsubata Y, Shoji M, Shikama A, Hosoi Y, Tanabe Y, Chatani R, Tsukahara K, Nakanishi N, Kim K, Ikeda S, Ono K, Kimura T; ONCO DVT Study Investigators. Utility of the modified Ottawa score for identification of more preferable candidates of extended anticoagulation therapy in cancer-associated isolated distal deep vein thrombosis: insight from the ONCO DVT Study. *J Thromb Haemost*. 2024 Sep 14:S1538-7836(24)00537-3. doi: 10.1016/j.jth.2024.09.003. Epub ahead of print. PMID: 39284385.

2025 年 4 月 25 日提出

京都大学大学院医学研究科消化器内科学

特定助教

牟田 優

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

大腸癌は悪性腫瘍の死因の第 3 位を占め、罹患数・死亡数ともに本邦で増加している。抗癌剤の多剤併用療養や分子標的薬の導入など治療成績の改善を目指した開発がすすめられているものの、遠隔転移を伴う進行期の予後は依然不良であり新規治療戦略の開発は喫緊の課題の一つである。多様な発癌様式をしめす大腸癌において Adenoma-Carcinoma Sequence と呼ばれる多段階発癌モデルは主要な発癌様式と考えられている。このモデルでは、Wnt/ β カテニン経路上のいずれかの分子に遺伝子変異が認められる。この変異により、 β カテニンの生理的な分解機構が阻害されて細胞内に異常蓄積し、核内で転写因子と協調して下流遺伝子の発現亢進と無秩序な細胞増殖を誘導し腫瘍進展に大きく寄与している。このことから、 β カテニンの細胞内蓄積は大腸癌の有望な標的と考えられる一方、殺細胞性抗癌剤や小分子阻害薬、抗体製剤といった従来の創薬モダリティでは β カテニン蓄積そのものを標的とすることは原理的に困難であった。

これらの背景にもとづき本研究は細胞内に異常蓄積した β カテニンを分解誘導する機構を開発し、その抗腫瘍効果を実証することを目的とした。

この目的の達成のために本研究ではまず、細胞内の Wnt/ β カテニン経路活性を正確に反映するレポーターを複数の異なる大腸癌細胞株に導入し、細胞間での Wnt シグナルの違いを観察した。非癌細胞株である HEK293 細胞にレポーターを導入したところ、定常状態ではレポーターの蛍光は検出されない一方、塩化リチウムにより薬理的に β カテニンの分解を阻害すると容量依存的にレポーター発現が上昇した。これにより、非癌細胞の定常状態では Wnt/ β カテニン経路のシグナルは低値で維持されていることを確認した。つぎに大腸がん細胞株として HCT116 細胞株と SW480 細胞にそれぞれレポーターを導入し Wnt/ β カテニンシグナル活性の違いを観察した。HCT116 細胞では Wnt/ β カテニン経路シグナルは中程度で薬理的な Wnt/ β カテニン経路刺激に反応した一方、SW480 細胞では Wnt/ β カテニン経路は定常状態で高いシグナルを示し Wnt/ β カテニン経路刺激に反応

しなかった。SW480 細胞ではシグナル活性が飽和しており上昇余地がない事を示しており、SW480 細胞では APC 変異が見られるのに対して HCT116 細胞では β カテニンに変異が見られるという遺伝子変異プロファイルの違いによるものだと考えられた。

今後は Wnt レポーターを安定発現した大腸がん細胞に細胞内の β カテニンを効率的に分解する degrader のプロトタイプを導入する予定である。具体的には報告されている β カテニンの VHH 抗体より β カテニン結合配列を同定し、E3 ユビキチンリガーゼに融合する。この degrader を高効率で発現するレンチウイルスベクターに搭載し培養細胞に安定発現させる。さらに、 β カテニンの分解誘導効果をレポーターアッセイ、qPCR、Western blot 等で評価し degrader の最適化設計を進める予定である。

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

【研究課題】

ヒト iPS 細胞を用いた気道多繊毛細胞の分化・成熟メカニズムの解明

【背景と目的】

多繊毛細胞は、気道上皮において粘液流を生み出し、異物や病原体の排除に寄与している。原発性繊毛機能不全症候群（PCD）は、繊毛関連遺伝子のバリエーションにより粘液繊毛クリアランスが障害され、慢性呼吸器感染症を引き起こす遺伝性疾患であり、有効な治療法は限られている。これまでに PCD の原因遺伝子として約 50 種類が報告されているが、多繊毛細胞の分化・成熟に関与すると考えられる遺伝子の機能については未解明な点が多い。多繊毛形成過程では、デューテロソームと呼ばれる細胞内構造体が中心体増幅を支え、これに関連する遺伝子を発現するデューテロソーマル細胞の存在が近年ヒト気道でも確認されている。我々はヒト iPS 細胞由来気道上皮細胞に対してシングルセル RNA シークエンス（scRNA-seq）解析を行い、デューテロソーマル細胞の出現を確認した。本研究では、デューテロソーム関連遺伝子バリエーションを有する PCD 患者由来 iPS 細胞および遺伝子修復 iPS 細胞を用いて、多繊毛細胞の分化・成熟機構および PCD 発症メカニズムの解明を目指す。

【成果】

1. デューテロソーマル細胞に特異的な表面抗原マーカーの同定

デューテロソーマル細胞の特性を詳細に解析することを目的として、iPS 細胞から誘導した気道上皮細胞に対する scRNA-seq 解析の結果から、デューテロソーマル細胞に特異的と考えられる細胞表面マーカーの候補遺伝子群を抽出し、iPS 細胞由来気道上皮細胞におけるタンパク質レベルでの発現を検証した。これにより、デューテロソーマル細胞に特異的に発現する細胞表面抗原マーカーを同定した。加えて、マーカー陽性細胞および陰性細胞について RNA-seq 解析を行った結果、マーカー陽性細胞ではデューテロソーマル細胞特異的遺伝子および多繊毛発生に関与する遺伝子が有意に高発現していることが確認された。

2. 気道多繊毛細胞の分化・成熟過程における CCNO の分子機能の解明

デューテロソーム関連遺伝子の一つである CCNO の分子機能の解析を行うために、CCNO 遺伝子に疾患原因と考えられるバリエーションを有する PCD 患者から iPS 細胞を樹立し、さらに CRISPR-Cas9 システムを用いて CCNO 遺伝子バリエーションを修復した iPS 細胞株も樹立した。これらを気道上皮細胞へ分化誘導し比較した結果、疾患 iPS 細胞由来の気道上皮細胞では繊毛数の著明な減少を認めた一方、遺伝子修復 iPS 細胞由来の気道上皮細胞では繊毛数が正常レベルへ回復していることを確認した。また、デューテロソーマル細胞が出現すると考えられる早期の分化段階の細胞を対象に、両細胞株において scRNA-seq 比較解析を行った。その結果、疾患 iPS 細胞由来のデューテロソーマル細胞では、CCNO 以外に複数のデューテロソーム関連遺伝子の発現が低下しており、これらの遺伝子は CCNO の下流で多繊毛発生を制御している可能性が示唆された。また、遺伝子修復 iPS 細胞ではデューテロソーマル細胞を経由して多繊毛細胞へ分化する通常の経路が認められたのに対し、疾患 iPS 細胞では、遺伝子修復 iPS 細胞にほとんど見られない別の細胞群を経由する異なる多繊毛細胞分化経路が観察され、デューテロソーム形成の重要性が示唆された。

これらの成果について、現在論文執筆中である。

以上、ご報告申し上げます。本奨励金のご支援に心より感謝申し上げます。

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

研究課題「大腸癌肝転移における腫瘍微小環境での骨髄細胞のおよぼす影響」

研究成果

腫瘍微小環境では腫瘍細胞のみならず、免疫細胞をはじめとした宿主細胞が複雑にネットワークを形成し、癌の進展に深く関与する。骨髄系の単球や好中球は感染症の初期免疫をつかさどり、ヒトの生存には必須である。担癌患者においては、血中の好中球/リンパ球比(Neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR)が高い患者の予後が悪いことが知られているが、一方で単球系細胞の役割関しては不明な点が多い。当研究室では大腸癌の腫瘍微小環境中の骨髄由来細胞に焦点を当て、大腸癌の進展に関与するサイトカイン・ケモカインの働きに関して研究してきた。今回は大腸癌、特に肝転移の腫瘍微小環境中の単球 (Tumor-associated macrophage, TAM) の働きに着目し、腫瘍微小環境に特異的な単球/TAM の働きと、その阻害による抗腫瘍効果に関して検証した。

RANKL (Receptor Activator of Nuclear Kappa-B[RANK] ligand) は腫瘍微小環境中で単球/TAM 活性化因子として知られている。実際に単球/TAM の cell line として用いられる文化型 THP-1(differentiated THP-1, dTHP-1)を RANKL で刺激すると、Transwell migration assay で遊走能が亢進した。Denosumab は抗 RANKL 抗体として実臨床で使用される。この dTHP-1 の遊走能は denosumab で阻害された。また RANKL には Osteoprotegerin(OPG)と呼ばれる内因性のデコイ受容体がある。癌細胞に OPG を過剰発現させ Transwell migration assay で dTHP-1 の遊走能を評価すると、OPG 発現細胞において dTHP-1 の遊走能が阻害された。そこで大腸癌における OPG 発現を評価すると、肝転移において有意に OPG 発現が低下していた。

ヒト大腸癌細胞株 HCT116 とマウス大腸癌細胞株 MC38 にそれぞれヒト OPG とマウス Opg を過剰発現させて、マウス肝転移モデルを作成した。ヒトではヌードマウスを使用し、マウスでは C57/BL6 野生型マウスを使用した。すると、ヒトでは OPG 過剰発現細胞株の肝転移抑制効果が限定的であったのに対して、マウス Opg 過剰発現株では有意に肝転移が抑制された。これらの異種移植(ヒト細胞株→ヌードマウス移植系)と同種移植(マウス細胞株→野生型マウス移植系)における相違点はヌードマウスによる T 細胞の免疫不全であるため、Opg 発現による肝転移抑制効果は単球/TAM の抑制単独の作用のみではなく、単球/TAM 抑制を通して腫瘍抑制性 T 細胞の機能を促進している可能性が示唆された。実際に Opg を過剰発現させた同種移植のマウス大腸癌肝転移巣では、過剰発現させていないものに比べて CD8 陽性 T 細胞が顕著に腫瘍内に集積していた。

以上より、大腸癌肝転移の腫瘍微小環境では、OPG の発現低下により単球/TAM が RANKL-RANK 経路を介して活性化され、T 細胞を抑制し腫瘍促進的に作用すると考えられた。今後はさらに単球/TAM が血液中から腫瘍微小環境中に移行する過程でどのような発現変化を生じるのか、単球/TAM が T リンパ球をどのように抑制するのかを解明し、宿主の自然免疫を抑制することなく腫瘍微小環境中の単球/TAM の T 細胞抑制作用を効率よく阻害する経路を同定し、臨床応用可能な治療ターゲットの検証を進める予定である。

2025 年 4 月 30 日

京都大学医学研究科

肝胆膵・移植外科 助教

西尾 太宏

令和 6 年度 研究奨励金 研究成果報告書

研究課題：肝癌微小環境における癌関連線維芽細胞を標的とした肝癌治療戦略の探求

代表研究者：西尾 太宏 所属：京都大学 肝胆膵・移植外科

【背景】肝細胞癌(HCC)において癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast; CAF)は癌微小環境(tumor microenvironment; TME)を構成する主要な細胞集団である。CAF は背景肝の非癌組織の活性化された myofibroblast を由来としてその機能を模倣し、癌細胞の増殖と浸潤、癌免疫応答に影響を及ぼす。CAF を標的とする診断的・治療的バイオマーカーは明らかでない。本研究は、肝癌の動物実験モデルおよびヒトの検体を用いて、myofibroblast/CAF の活性化と肝発癌ならびに癌増殖の関連性を遺伝子発現レベルで解析し、治療標的となる分子マーカーを探索することを目的とする。

【方法】実験①マウス肝線維化・肝癌モデル：I 型コラーゲンの発現を GFP で標識した reporter マウス (Col-GFP マウス) に対して、diethylnitrosamine 投与による肝発癌を誘発するとともに、CCl₄ や NASH の肝障害による肝線維化を誘導し、マウス肝臓組織の病理学的特徴を解析する。

実験②ヒト手術検体を用いた空間トランスクリプトーム解析：ヒト HCC に対する肝切除症例の組織切片 (N=7) に対して空間トランスクリプトーム解析を行い、COL1A1 と ACTA2 を共発現する切片上のスポットにより、背景肝の myofibroblast と腫瘍を構成する CAF のクラスターの組織学的局在と遺伝子発現の特徴を分析した。また、HCC 肝切除症例 96 例の組織切片に対して免疫組織染色を行い、CAF による癌免疫修飾と HCC 切除後の予後との関連性を検証した。

【結果】①マウス肝癌モデルにおいて、背景肝の線維化と myofibroblast の増殖をきたすとともに、腫瘍内にも線維沈着と Col-GFP 陽性かつ α SMA を発現する活性化された CAF の浸潤が認められた。この結果により、マウス肝癌における CAF 誘導モデルを確立した(図 1)。

②ヒト HCC 切片において背景肝の線維性架橋および腫瘍内の線維沈着部、腫瘍隔壁に一致して COL1A1⁺ACTA2⁺のスポットを認め、7 症例の統合解析により非癌部の myofibroblast と腫瘍を構成する CAF は組織空間的な局在と遺伝子発現によって特徴的なサブクラスターに分類された(図 2,3)。CAF のサブクラスターには、腫瘍組織内に直接浸潤して細胞外基質産生に寄与する myofibroblastic CAF (myCA), 腫瘍実質を取り囲む隔壁内の炎症性反応に寄与する inflammatory CAF (iCAF)、腫瘍隔壁で物理的なバリアを形成する myCAF、腫瘍隔壁周堤で T 細胞と相互作用して癌免疫修飾を担う

antigen-presenting CAF(apCAF)が含まれた(図4)。Trajectory 解析により非癌部の星細胞由来の myofibroblast が起源となり、myCAF、iCAF、apCAF のクラスターに分化誘導している可能性が示唆された。また、腫瘍被膜周堤の apCAF は CXCR4 を発現し、腫瘍被膜外周に遊走する CD8 リンパ球と CXCR4-CXCL12 axis を介した相互作用を示した。HCC 肝切除症例 96 例において、腫瘍内/腫瘍外 CD8 比は予後不良因子であり、CXCR4⁺apCAF の増殖と負の相関を示した(図5)。腫瘍外縁の apCAF の活性化によって CD8 の腫瘍内浸潤が被膜にてブロックされている組織像を呈し、apCAF の癌免疫バリアとしての機能が示唆された(図6)。

【結論】HCC の TME において CAF は機能的・空間的極性化を示した。腫瘍外縁に浸潤する apCAF は CXCR4 発現を介して immune-exclusive に機能し、TME 修飾による癌免疫制御の治療標的となる可能性が示唆された。

図1 マウス肝癌モデルにおける CAF 誘導

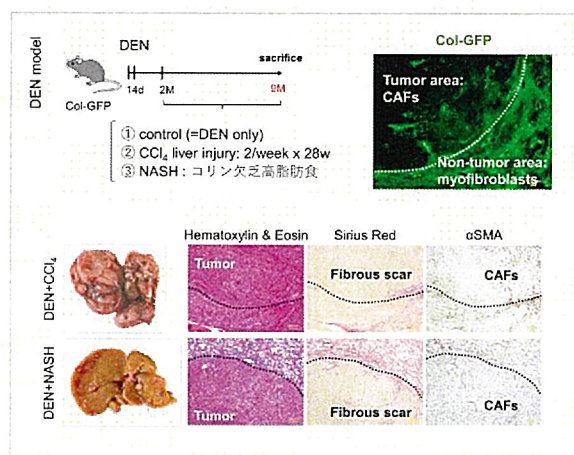


図2 空間トランスクリプトームによるヒト肝癌 CAF のサブクラスター

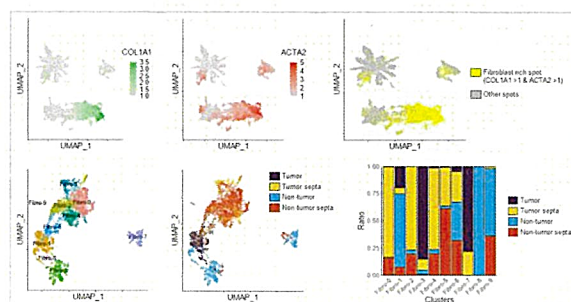


図3 ヒト肝癌 CAF のサブクラスター GO 解析

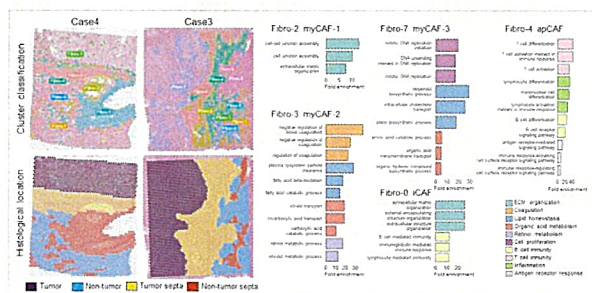


図4 ヒト肝癌 CAF のサブクラスター機能的・空間的極性

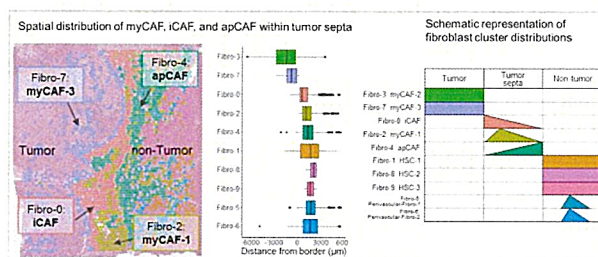


図5 ヒト肝癌組織切片の免疫染色と予後解析

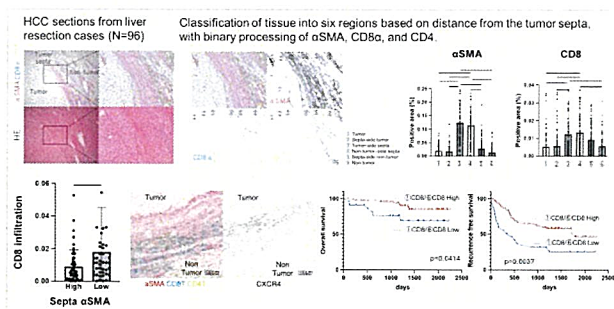
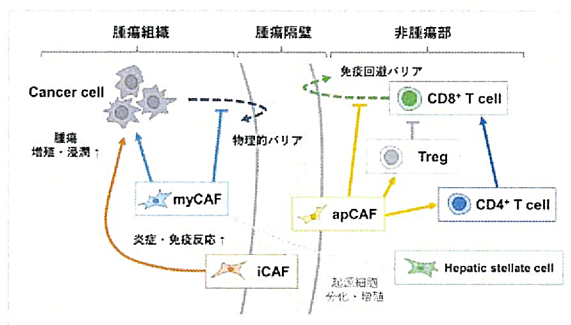


図6 研究結果の概要図



令和 7 年 3 月 21 日

京都大学医学部附属病院 侵襲反応制御医学講座 麻酔科学分野

特定病院助教 楠戸絵梨子

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

COVID-19 は、その原因ウイルスである SARS-CoV-2 の構造タンパクのひとつであるスパイクタンパクの変異により、依然として流行を続けている。初期の研究では、野生株由来スパイクタンパク 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が血小板を活性化することが報告された。しかし現在の主要な流行株であるオミクロン株由来のスパイクタンパクの血小板への影響を調べた研究は少ない。我々は以前、アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ株由来のスパイクタンパクが血小板を直接的には活性化しないと結論付けた。しかしこの研究ではパワー解析が実施されたとはいえ多群比較が用いられたため、スパイクタンパクの血小板への影響が過小評価されている可能性が考えられた。そこで本研究では、オミクロン株（親株である B. 1. 1. 529 系統）由来のスパイクタンパクが血小板に与える影響について、コントロールまたは野生株由来スパイクタンパクとの間の 2 群間比較を行った。

同意を得られた健常成人 10 名の血液を用いた。血液サンプルを野生株またはオミクロン株由来スパイクタンパクとインキュベートし、フローサイトメトリーを用いてスパイクタンパクの血小板への結合および P-セレクトリン（血小板活性化マーカー）の発現を測定した。また、透過光法を用いて血小板凝集能を評価した。Wilcoxon signed rank test を用いて統計解析を行い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

野生株およびオミクロン株由来スパイクタンパクは、いずれもコントロールと比較して血小板への結合および P-セレクトリン発現を有意に増加させた。オミクロン株由来スパイクタンパクは野生株由来スパイクタンパクと比較して血小板への結合親和性が低かった。しかし、血小板活性化や凝集能に関しては、両群

間に有意な差は認められなかった。

本研究の結果から、オミクロン株由来スパイクタンパクは野生株由来スパイクタンパクと同様に血小板に結合すること、また血小板活性化を引き起こすことが示された。特に、オミクロン株由来スパイクタンパクの血小板への結合親和性が低いにもかかわらず、血小板活性化作用が同等であることは、結合親和性とは異なるメカニズムを介して血小板を活性化する可能性を示唆する。例えば、スパイクタンパクによる細胞内シグナル伝達の活性化や、補助的な受容体との相互作用が関与している可能性がある。この結果は、スパイクタンパクによる血小板の活性化は、血小板との結合の度合いに厳密に依存するものではない可能性を示唆している。

B. 1. 1. 529 はスパイクタンパクに 32 もの変異があるため、世界を驚かせた変異株であった。スパイクタンパクの受容体結合部位 (RBD) は ACE2 と結合し、SARS-CoV-2 が宿主に侵入する際に重要な役割を果たす。オミクロン株由来スパイクタンパクにおける変異の半分は RBD にあり、そのほとんどが ACE2-RBD 結合界面の近くに位置している。したがって、分子構造の観点から、オミクロン株は感染力と免疫学的耐性において野生株と異なる可能性がある。

我々が行った過去の研究ではアルファ、ベータ、ガンマ、デルタ株由来スパイクタンパクは血小板を活性化しないと結論付けられたが、本研究ではオミクロン株 (B. 1. 1. 529) 由来スパイクタンパクが野生株由来スパイクタンパク同等に血小板を活性化すると結論付けられた。さらに、スパイクタンパクの血小板への結合親和性と血小板活性化効果は比例しないことも示唆された。これはスパイクタンパクと血小板の相互作用に関する今後の研究のヒントとなるかもしれない。

令和 7 年 4 月 7 日

京都大学医学部附属病院 放射線治療科

特定助教 岸 徳子

令和6年度 奨励交付金 研究成果報告書

研究課題

免疫チェックポイント阻害薬耐性肺がん患者における放射線治療成績と線量分布の検討

研究概要および成果

本研究では、オリゴ転移非小細胞肺がん(OM-NSCLC)患者に対する定位放射線治療(SBRT)の治療成績と、免疫チェックポイント阻害薬(ICI)使用歴が予後に及ぼす影響を検討した。人を対象とする生命科学・医学系研究「原発性・転移性肺癌に対する放射線治療の治療成績および線量分布の解析」(京都大学医の倫理委員会 IRB 承認番号:R3039)の一部として行った。

まず OM-NSCLC 患者を対象としてデータベースを構築し、患者因子、治療因子および治療成績(局所制御割合、無再発生存期間、全生存割合、有害事象)の評価を行った。対象となったのは 25 例 29 病変であった。病変の内訳は、骨転移と副腎転移の 2 病変が 1 例、リンパ節転移 2 病変が 1 例、肺、リンパ節転移、骨転移の 3 病変が 1 例のであった。観察期間の中央値は 12.9 カ月(四分位範囲 7.4–18.4 か月)であり、全生存割合(OS)は 6 カ月で 100%、12 カ月で 92.3%(95%信頼区間[CI]:100–100%、78.9–100%)であった(Figure 1)。無増悪生存割合(PFS)は 6 カ月で 76.2%、12 カ月で 50.2%(95% CI:59.9–97.0%、30.9–81.3%;Figure 2)であった。いずれの症例においても、ICI またはチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)使用歴にかかわらず、Grade 2 以上の有害事象は認めなかった。以上より、OM-NSCLC に対する SBRT 後の OS および PFS は過去の第 II 相試験と同等であり、重篤な副作用も認められなかったことから、SBRT は OM-NSCLC に対して有望な治療選択肢となりうると考えられた。

本研究の結果は、"Clinical outcomes of stereotactic body radiotherapy for oligometastatic

non-small cell lung cancer: a Japanese institutional study”として、2025 年 5 月 2 日–6 日にオーストリアのウィーンで開催される欧州放射線腫瘍学会で発表予定である。

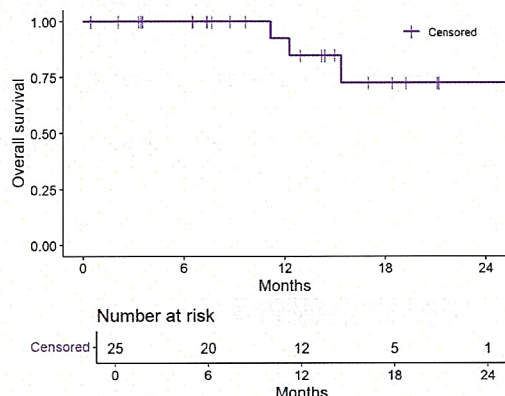


Figure 1. 全生存割合

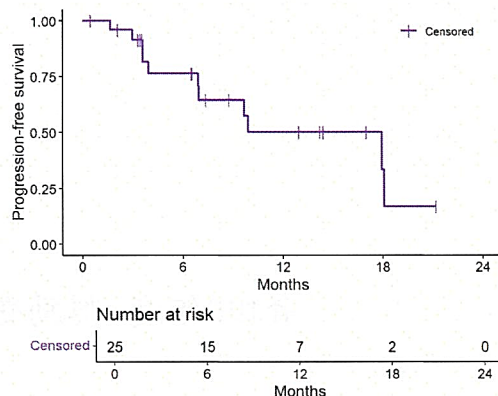


Figure 2. 無増悪生存割合

この検討を踏まえ、我々は 免疫チェックポイント阻害薬の治療歴が、EGFR/ALK 遺伝子変異陰性の IV 期非小細胞肺癌患者において、放射線治療後の予後に与える影響について詳細な検討を行った。対象は、当院において 2022 年 4 月から 2024 年 7 月の間に放射線治療を受けた EGFR/ALK 陰性の IV 期非小細胞肺癌患者 60 例とした。ICI の投与歴の有無による選択バイアスを補正するため、年齢、性別、PS、喫煙歴、組織型、PD-L1 発現状況、照射病変、原発性／再発、オリゴ転移／多発転移の各因子に基づき傾向スコアマッチング (PSM) を実施した。評価項目は PFS、OS、および Grade 2 以上の有害事象とした。ICI+群は 22 例、ICI-群は 38 例であり、観察期間中央値は全体で 12.3 カ月 (ICI+群で 11.1 カ月、ICI-群で 18.6 カ月) であった。放射線治療に関連する Grade 2 以上の有害事象は、ICI 投与歴の有無にかかわらず認めなかった。PSM 前では、PFS 中央値は ICI+群 13.5 か月、ICI-群 17.5 か月 ($P = 0.30$)、OS 中央値は ICI+群 12.0 カ月、ICI-群 19.0 カ月 ($P = 0.70$) であった。PSM により各群 13 例がマッチされ、ベースライン因子に有意差はなかった。PSM 後では、PFS は ICI+群が ICI-群よりも良好であった (8.9 カ月 vs. 5.1 カ月、 $P = 0.09$)。一方、OS は 2 群間で有意差を認めなかった (9.1 カ月 vs. 8.0 カ月、 $P = 0.30$)。放射線治療前の ICI 使用は、PFS の改善に寄与する可能性が示唆され、Grade 2 以上の有害事象は認められなかった。症例数が少ないため、線量体積指標と治療成績の相関の評価は困難であったが、症例数を増やした検討および機械学習を用いた有害事象低リスクの線量分布モデルの作成を進めている。

本研究の成果は、"Effect of immune checkpoint inhibitor in patients with EGFR/ALK driver mutation-negative stage IV non-small cell lung cancer who received radiotherapy."として、第 63 回日本癌治療学術集會に演題登録を行い、報告予定である。

2025 年 6 月 30 日

京都大学大学院医学研究科医学専攻脳病態生理学講座臨床神経学

大学院生

高橋俊哉

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

【研究課題】MRI を用いた軽度認知機能障害の早期診断手法の開発

【研究概要】

軽度認知機能障害(MCI)は認知症の前段階とされ、早期発見と早期介入が極めて重要である。従来、脳血流評価には SPECT が用いられてきたが、被曝の問題があり、非侵襲的かつ短時間で実施可能な MRI の Arterial Spin Labeling(ASL)法による代替が期待されている。本研究では、MCI と健常群の間で ASL による脳血流の違いを解析し、MCI スクリーニングにおける ASL の有用性を検討した。

【研究デザインおよび参加者】

被験者は健常群 21 名(平均年齢 58.6 歳, 27-83 歳)および MCI 群 22 名(平均年齢 74.0 歳, 60-84 歳)とした。MCI の診断基準は、MMSE-J 22-27 点かつ MoCA-J 18-25 点を満たす者とした。構造画像(3D-T1WI)、灌流画像(pCASL)は Siemens MAGNETOM Lumina 3T MRI で撮像を行った。

【MRI 解析処理および統計解析】

解析には FSL(FMRIB Software Library)を用い、Harvard-Oxford および Juelich Atlas により関心領域を定義した。群間比較には Welch の t 検定(関心領域, $p < 0.0005$)および voxel-wise t 検定($p < 0.01$)を実施した。

【主要な研究成果】

Juelich Atlas 解析では、両側海馬嗅内皮質、下頭頂小葉両側 PFm、両側 PGp、上頭頂小葉両側 7A、左 7PC、右 7P、左視覚野 V2BA18 において、MCI 群での有意な脳血流低下を示した。Harvard-Oxford Atlas 解析では、前頭極、下側頭回後部、上頭頂小葉、外側後頭皮質上部、前楔前皮質、海馬傍回前部において、MCI 群での有意な脳血流低下を示した。平均脳血流量では群間に画像上の差が見られたが、年齢と CBF との相関は弱く、個人差の影響が大きい可能性が示唆された。

【考察】ASL は 3 分程度で撮像可能であり、一般臨床でも実用的である。本研究では、MCI 群で有意な血流低下を示す複数の脳領域が確認された。年齢の影響が小さい一方で、個体差によるばらつきも大きく、今後の大規模研究での検証が必要である。

【結論】ASL による脳血流測定は、非侵襲的かつ短時間で実施可能であり、MCI においても SPECT に代わる有効な手法となり得る。特定の領域における血流低下が MCI の識別に有用であることが確認され、ASL のスクリーニングツールとしての可能性が示唆された。

【研究課題】 MCI 患者におけるレカネマブ治療の縦断的複合画像解析

【研究概要】

本研究では MCI 患者においてレカネマブ治療前後の脳体積、脳血流(CBF)、および白質微細構造の指標(FA, MD)を 12 ヶ月まで縦断的に多モダリティ MRI を用いて評価を行った。

【研究デザインおよび参加者】

本研究は MCI 患者 8 名(女性 6 名, 男性 2 名, 年齢 60–79 歳)を対象とし, 2 週間ごとのレカネマブ投与を実施した。評価は治療前, 6 か月, 9 か月, 12 か月に行った。診断基準は MMSE-J 22–28 点, MoCA-J 18–25 点, CDR-GS 0.5–1, GDS $\leq$ 8, 髄液バイオマーカー($A\beta$ 42/40 $\leq$ 0.67, p-tau181 $\geq$ 59.0 pg/mL)とした。構造画像(3D-T1WI), 灌流画像(pCASL), 白質微細構造画像(DTI)は Siemens MAGNETOM Lumina 3T MRI で撮像を行った。

【MRI 解析処理および統計解析】

CBF は pCASL を oxford_asl(BASIL)で計算, DTI は FSL の topup, eddy, dtifit で処理を行った。

CBF, FA, MD は FreeSurfer 空間へ resample され, ROI 解析には FreeSurfer 定義の海馬, 後部帯状回, 楔前部を用いた。統計解析は R(Wilcoxon 符号付順位検定, 補正なし)により実施された。

【主要な研究成果】

- ・体積: 全脳および 3 領域(海馬, 後部帯状回, 楔前部)で 6 か月以降一貫した有意な体積減少を示した。
- ・CBF: 全時点で全脳・ROI とともに有意な変化は認められず, 安定性が示唆された。
- ・DTI: FA はおおむね保たれたが, MD は海馬および左楔前部で有意な上昇を示し, 白質微細構造の増悪が示唆された。
- ・神経心理検査: MMSE-J, MoCA-J, CDR-SB は安定, ADAS-J Cog は 12 か月時点で有意な改善を示した。
- ・CSF バイオマーカー: $A\beta$ 42, $A\beta$ 42/40 比, p-tau181 は 6 か月および 12 か月で有意に改善した(9 ヶ月は実施なし)。

【考察】

AD の進行過程において脳血流は一般的に低下あるいは一過性の増加を認める。CBF の安定性は, 特に早期病期における代謝・血行動態の維持を反映し, レカネマブによる血流保存効果の可能性がある。

MD は FA より白質微細構造変化に対する感受性が高いとされており, FA と MD の乖離は構造変化の早期の段階を見ている可能性がある。

【結論】

レカネマブ治療開始から 12 か月の間に, 体積および MD には進行的変化が見られた一方, CBF と FA は比較的保たれていた。これらの結果は, CBF と白質微細構造の一部がレカネマブにより部分的に保護され, MCI における認知機能の安定維持に寄与する可能性を示唆している。マルチモダリティ MRI は, MCI 患者における治療反応性の早期指標として有用である可能性がある。

令和 7 年 4 月 30 日
京都大学医学部附属病院
医療安全管理部・助教
森下真理子

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

表記の件について、研究成果を下記の通り報告いたします。

研究課題：法律が医療に及ぼす影響に関する調査研究

本研究の目的は法律が医療に及ぼす影響に関して明らかにすることである。日本において、保険医療制度や医療職の資格制度・職務範囲、医療機関の設置基準、地域医療体制など医療の構造や仕組みは国に定められた法・制度が規定している。それらに加え、医療実践の中で起きた医療事故において、患者、家族と医療者の間で紛争が生じた場合には、事象および関与した医療者に対して時に民法さらには刑法、その他医療関連法（医師法、医療法など）が適用され得る。本年度の調査研究では「法律・制度が医療にどのような影響を及ぼしているのか」を問いとして、この問いに関係する先行研究の文献調査を実施しつつ、予備調査として医療安全管理部で取り扱われる、法的根拠が必要となる事例の類型化とその帰結に関する情報収集を開始した。

文献調査においては法学側および医学側の 2 つの分野から、日本における「法律が医療におよぼす影響」に関連する文献を収集した。医学側の文献の中では『医療法学入門』（大磯・大滝・荒神, 2020）を主な手がかりとし、医療法学のトピックと医療法学の教育実践から、医療と法の関係について論じる文献に着目した。「医療法学」とは、「医療法を始めとした健康保険法、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律、予防接種法、母体保護法等医療関連法規及び民事責任、刑事責任、行政責任といった医療紛争、患者の権利並びに医療安全、医療倫理、医療管理学等近接領域における法的側面を対象とした学問領域である」（平山・大磯, 2020）。医学教育の中で、これまでも医療に関連した法は学ばれるべきものとされてきたが、医学教育における法学教育の必要性を説く論者らは近年、医療について法整備や法の適応の厳格化が起き、医師自身が法律に関する知識や運用についても知る必要性がでてきていることを指摘していた。近年（2021-2024 年）発行された医療実践と法との関係について述べた医学文献の検索では産婦人科、麻酔科、小児科、耳鼻咽喉科領域の医学雑誌に医療訴訟に関する話題が記載されていた。これらの記載は、具体的な裁判例をもとに、医療者に対して事例・判例について解説する内容

となっており、臨床医が事故を予防し訴訟に備えるという意味合いも含んでいると考えられた。

法学側では、法学の中に医療関連法規を扱う分野として「医事法学」があり、その中で、医療に関連した法律とその適用に関する解説・議論が実施されている。医事法学分野では、医療事故における賠償に関わる課題、終末期医療やその他意思決定場面における患者の権利、医師—患者関係における契約関係、事故調査制度やカルテ記載（特に改ざん）、医療における科学的根拠、など、医事紛争において争点となる点についてこれまで文献上、取り上げられていた。ここから医学、法学の双方において医療に法が適用される際の考え方（例、事例・判例に対する法を用いた解釈）は議論されるが、その考え方の根底にある概念（例、権利、契約の定義、期待権等）に関する議論は法学側で主に実施されていることが窺われた。

以上より医学、法学どちらの学問を背景学問とするかによって、医療現場で生じた事例の見方が異なる可能性があり、医療現場に法律が及ぼす影響を考える際、医学・法学側双方の立場からの見方を明らかにし、その背景にある考え方について検討するアプローチを取る必要があると考えた。また今回、医療法学を医学側に位置付けたが、医療法学と医事法学とが重なる部分は多いと考えられ、相違点について更に検討していくことは課題として残っている。今後はこの相違点の検討を行いつつ、病院内で生じた事例の中で法的根拠が用いられる事例を収集し、医学、法学双方から検討しつつ、法的根拠に加えその背後にある考え方が医療現場にどのように影響を及ぼすのかについて記述、分析していく予定である。

参考文献

大磯義一郎・大滝恭弘・荒神裕之. (2021) 『医療法学入門』 第3版, 医学書院.

平山陽示・大磯義一郎. (2021). 医学教育における行動科学・社会科学等の概念整理.

委員会報告：第20期（前期）プロフェッショナリズム・行動科学委員会（行動科学班）. 『医学教育』. 52巻2号 pp. 140-144.

令和 7 年 3 月 23 日

京都大学大学院医学研究科 人間健康科学系専攻

生活習慣病看護学分野 助教 森西可菜子

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

研究テーマ

2 型糖尿病を持つ人の生活における食事療法の自律的動機づけの変化：ライフストーリー研究

背景

2 型糖尿病を持つ人の Quality of Life(QOL)向上のためには、日々のセルフケア行動が不可欠である。しかしセルフケア行動の中で、食事療法を行うことは患者の負担となりやすく、日々の QOL を損ねる側面があることが知られている。よって医療者は、2 型糖尿病を持つ人が食事療法に取り組みつつも、日々の QOL を維持向上できるように支援する必要がある。

食事療法を含む健康行動に取り組む際には、その行動に対する自律的動機づけ、つまり「自己にとって価値ある行動を自己の意思で選択していると感じて行う際の動機づけ」の程度が高いほど QOL が高いことが示されている。しかし 2 型糖尿病を持つ人が生活を営む中でいつどのように食事療法の自律的動機づけが変化するかは示されておらず、食事療法の自律的動機づけを高める支援方法も明らかでない。よって本研究では、2 型糖尿病を持つ人の生活の中でどのように食事療法の自律的動機づけが変化するかを明らかにし、支援方法の示唆を得た。

方法

本研究はライフストーリー法を用いた質的研究である。A 病院の糖尿病内科に入院中で 18 歳以上の 2 型糖尿病を持つ者に 2～3 回の半構造化面接調査を行った。主な質問は「糖尿病と診断されてから、食事療法への思いはいつどのように変化しましたか」とした。面接の逐語録はライフストーリー法という、人生における経験の語りからその人の経験的真実を表現する方法で分析した。逐語録から 1 つの意味を表すストーリーごとに語りを抽出してコードを生成し、コードを時間的順序と意味の類似性に基づいて分類して各分類のテーマを生成した。各参加者におけるテーマを基に、個人の自律的動機づけの変化を表すストーリーを生成した。各参加者のストーリーを比較対照し、

参加者全体に共通するストーリーを生成した。結果の厳密性確保のために、語りの意味が不明瞭な点があれば追加面接を実施し、参加者全員に結果に納得がいくものであるか確認をした。分析は質的研究の経験がある研究者3名でデータを確認し、議論を重ねながら進めた。

結果

参加者は4名で、うち男性が2名、50歳代が3名、40歳代が1名であった。参加者全体に共通する自律的動機づけの変化を表すストーリーは、【診断初期は発症が受け入れられず、家族や仕事などの他の優先事項もあり、医療者の指導だけでは自律的動機づけが高まりにくかった。入院時に食事療法の効果を実感して自律的動機づけが高まったが、元来もつ食事に関する価値観と相容れる方法が見つからず自律的動機づけは変動した。長い経過の中で、試行錯誤により満足できる方法を発見したことや、加齢やライフイベントに伴い健康の重要性や人生の目標を明確に意識するようになったことで、自律的動機づけが高まった。】であった。

考察

2型糖尿病を持つ人の食事療法の自律的動機づけはすぐには高まらない可能性が示された。医療者は患者がすぐに自律的に食事療法に取り組めないことを理解し、患者の価値観に合う食事療法の見つけ方を助言して、患者が納得いく方法を確立できるよう時間をかけて援助する必要がある。また、加齢やライフイベントが自律的動機づけを高める契機になりうることが示された。医療者は患者が価値観の変化を自覚する機会を待つことも重要で、その際に改めて患者が大事だと捉えていることや目標を聴くことが食事療法の自律的動機づけを高める可能性がある。

研究成果の公表

本研究は、2025年2月13日～14日に開催された the 15th International Nursing Conference and the 28th East Asian Forum of Nursing Scholars にて発表した。

一般財団法人 藤原記念財団

提出年月日：令和7年4月25日

所属研究分野名：京都大学大学院医学研究科

放射線医学講座（画像診断学・核医学）

職名：講師

氏名：三宅可奈江

令和6年度奨励交付金研究成果報告書

研究課題「エストロゲン受容体標的 18F-FES PET を用いた乳癌診断法の構築」の令和6年度の研究成果を報告する。2021年度から実施している臨床研究を継続し、令和6年期間中に京都大学医学部附属病院にて38例の症例を登録し、18F-FES PET (PET/CT、乳房専用PET、PET/MRI)検査を実施した。また、期間中、2本の英文症例報告が受理され、2つの国際学会発表、4つの国内学会発表を行った。

英語症例報告

- Kitano Y, Miyake KK, Shimizu Y, Kawashima M, Nakamoto Y. Intratumoral Heterogeneity of Primary Breast Cancer on 18F-FES PET/CT and dbPET Anticipated a Heterogeneous Response to Chemotherapy. Clin Nucl Med. 2025 Jan 20.
- Yasumura S, Miyake KK, Shimizu Y, Nobashi T, Nakamoto Y. Collagen Vascular Disease-Associated Interstitial Pneumonia with Accumulation of 18F-fluoroestradiol. Clin Nucl Med. 2025;50(5):428-430.

学会発表

- Kanae K, Miyake, Yoichi Shimizu, Masahiro Kawashima, Shunsuke Yuge, Yurika Kitano, Tae Oishi, Koji Itagaki, Masako Kataoka, Yuji Nakamoto. Changes in tumor uptake and physiological uptake over time in dual-time-point 18F-FES PET/CT in patients with breast cancer. 37th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine 2024, October 19-23, 2024 Hamburg, Germany.
- Yoichi Shimizu, Kanae Kawai Miyake, Yuji Nakamoto. In-house manufacturing system and clinical research of PET imaging agents for precise diagnosis of breast cancer at Kyoto University Hospital. Asian International Session 2024, June 21, China
- 板垣孝治、仲地翔太、三宅可奈江. 18F-FES PET/CT 検査において肝臓の生理的高集積が SUV 測定に与える影響 (Effect of High Physiological 18F-FES Uptake in the Liver

on the SUV Measurements in 18 F-FES PET/CT) 第 80 回日本放射線技術学会総会学術大会 2024 年 4 月 11-14 日

- 安村純佳、三宅可奈江、北野香雪、弓削瞬介、田中寛彬、中本隆介、野橋智美、子安翔、中谷航也、石守崇好、大野和子、中本裕士. 慢性間質性肺炎の線維化巣に [18F]-fluoroestradiol (FES) の集積を認めた 1 例. 第 6 回日本核医学会近畿支部会 2024 年 7 月 13 日.
- 広瀬奈緒子、川島雅央、三宅可奈江、片岡正子、中本裕士、志水陽一、米田真知、前島佑里奈、山口あい、福井由紀子、清水華子、石井慧、山口絢音、川口展子、増田慎三. FES-PET による評価が Luminal-Her2 type 再発乳癌の治療選択に有効だった一例. 第 80 回京滋乳癌研究会 2024 年 9 月 5 日.
- 三宅可奈江、志水陽一、川島雅央、弓削瞬介、北野香雪、大石妙枝、板垣孝治、片岡正子、中本裕士. Dual [F-18]FES PET/CT における肝集積の経時的変化とその関連因子. 第 64 回日本核医学学術総会 2024 年 11 月 7-9 日.

提出日 令和 7 年 4 月 30 日
京都大学医学研究科創薬医学講座
博士後期課程 2 年（奨励金受給時 1 年）
彦坂 桃花

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

研究課題名： 母体免疫活性化および社会的敗北ストレスによる複合ストレスが引き起こす小脳依存性学習障害の神経機構の解明

研究目的

胎児期・幼少期の感染症や、発達期のいじめや虐待、戦争などのトラウマ経験は、自閉症やうつ病、統合失調症などの精神疾患発症リスクを高める。これまでの疫学調査から、精神疾患は単一のストレスによって発症するものではなく、複数の要因が累積することで発症に至ると考えられている。例えば、出生前感染と思春期のトラウマ経験という 2 つのストレス要因は、男性の統合失調症の発症リスクを増加させる (Debost et al., 2017 *Schizophrenia Bull*)。したがって、複合的な環境ストレスは性差を伴って脳内神経回路を変容させ、認知機能や学習能力を障害すると考えられる。ストレスに起因する神経回路の機能障害には、脳内の主要な免疫細胞であるミクログリアが寄与することが示唆されている (Paolicelli et al., 2022 *Neuron*)。しかし、複合ストレスの作用機序は未だ十分に理解されていない。一方、臨床研究や遺伝子改変マウスを用いた基礎研究から、小脳は学習障害を含む発達障害や統合失調症に寄与する脳領域であることが示唆されている (Tsai et al., 2012 *Nature*)。そこで、母体免疫活性化 (MIA) と発達期の社会敗北ストレス (RSDS) という 2 つの精神疾患リスク因子を負荷した雌雄の 2HIT ストレスモデルマウスを用い、小脳を含む全脳の免疫環境や神経活動を調査することで、複合ストレスに起因する精神疾患の分子・細胞機序の全容解明と治療法の開発を目指した。

研究実施内容及び成果

妊娠期のウイルス感染症を模倣した母体免疫活性化と、発達期に社会的敗北ストレスを繰り返し与えることで、2HIT 精神



図1 2HIT マウスの作製

疾患モデルマウスを雄と雌の両性別で作製した（図1）。2HIT マウスでは、特に小脳のミクログリアの数とそのターンオーバーが増加し、細胞形態が鈍化した。超多重抗体染色によって「ストレス関連ミクログリア」と呼ばれる新たなミクログリア分画を発見した。また、小脳の神経細胞が脱落していること、小脳の神経細胞の活動電位発火が低下していること、そして生体下での小脳に関わる機能回路が低下していることも見出した。動物の社交性や自由探索行動、不安様行動を網羅的に調べた結果、オスとメスのストレスマウスの広範な行動異常が見られ、特にメスの方が高いストレスレジリエンスを示すことが分かった。これらの精神疾患様行動異常に関わる小脳機能の低下は、全身のミクログリア・マクロファージおよび小脳のミクログリアを特異的に除去し新生させる「ミクログリア置換」によって回復させることができた。これら成果は、所属グループのメンバーや共同研究者の協力の元得られたものであり、2025年3月3日に Communications Biology 誌に掲載された (Hikosaka et al., 2025 *Commun Biol* PMID: 40033126 ; 京都大学プレスリリース <https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2025-03-05>)。

さらに、小脳に関わる運動協調学習をロータロッドを用いて調べた（申請項目（1））。各種ストレスモデルマウス（RSDS、MIA、2HIT）は小脳に関わる運動協調学習に障害を示した（図2）。運動協調学習障害の神経生理学的機序を明らかにするため、小脳プルキンエ細胞の興奮性やシナプス伝達、およびその可塑性を調べた（申請項目（2））。その結果、急性切片下での小脳プルキンエ細胞の発火頻度、膜特性、興奮性シナプス伝達、代謝型グルタミン酸受容体応答、樹状突起 Ca^{2+} 流入が低下しており、シナプスおよび非シナプス可塑性の誘導不全が生じた。本研究成果は現在投稿準備中である。申請項目（3）に記載の他の小脳運動学習としての測定運動についても、必要な装置およびカメラを購入し、セットアップを終えた。マウスの測定運動についての条件検討を現在進捗させている。

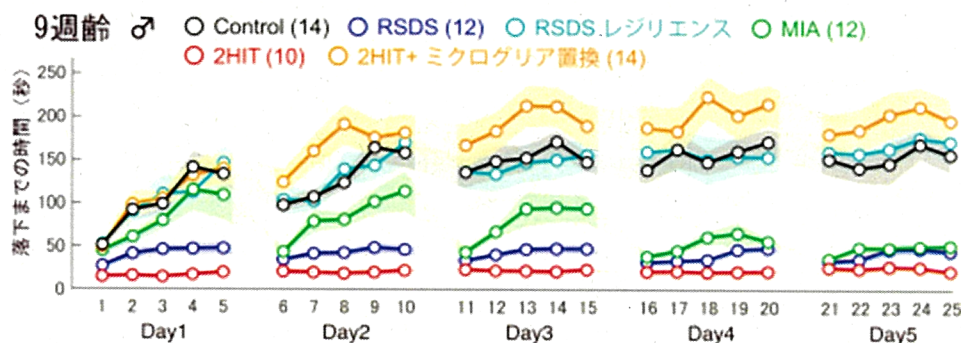


図2 ロータロッド運動学習曲線

Control（黒）では落下までに要する時間が延長して運動協調学習が成立するが、2HIT（赤）は学習しない。RSDS（青）も学習不全を示し、MIA（緑）は記憶保持できない。一方、2HITの全身ミクログリア置換（黄）によって学習不全が改善した（Mean±SEM）。

2025 年 4 月 30 日

京都大学医生物学研究所

幹細胞遺伝学分野

助教

青木 一成



令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

研究課題：多発性骨髄腫細胞における cBAF 複合体の機能解析

canonical BRG1/BRM-associated factor (cBAF) はクロマチンリモデリング複合体のひとつで、スクレオソームを除去・スライドさせることで、転写因子などのゲノムへのアクセスを容易にする。近年 cBAF が、アンドロゲン受容体 (AR) 陽性前立腺癌細胞では AR 結合領域 (Xiao, Nature 2022)、急性白血病細胞では RUNX1 結合領域 (Aoki, Blood 2024) のクロマチンアクセシビリティを特異的に制御していることが明らかになってきた。cBAF 阻害薬は、AR 陽性前立腺癌および急性白血病細胞において、これらの転写因子のゲノムへの結合を障害させ、抗腫瘍効果を示す。

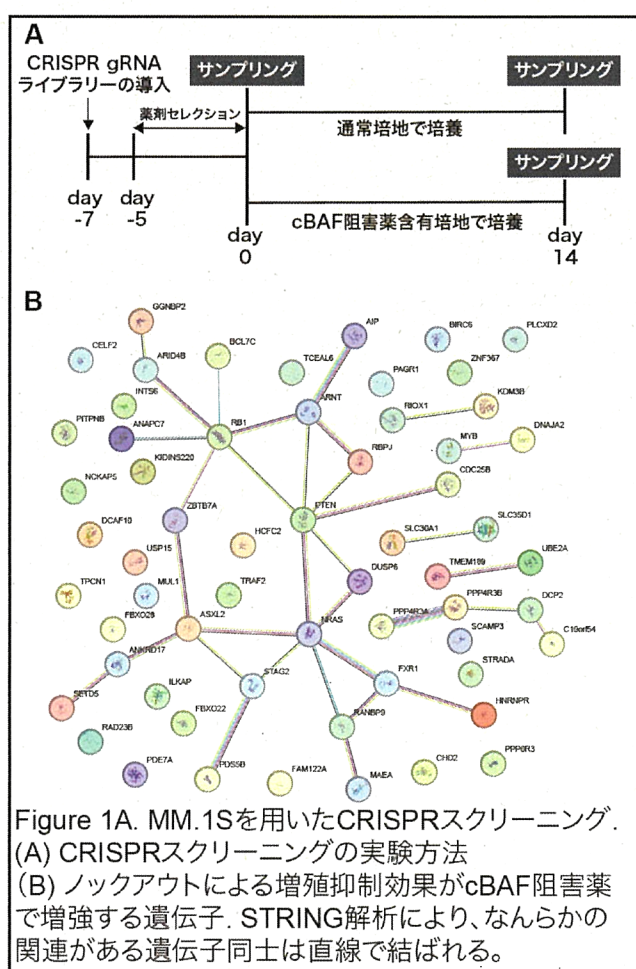
cBAF 阻害薬が強い抗腫瘍効果を示すがん種を in vitro で探索した結果、多発性骨髄腫がヒットした。多発性骨髄腫は形質細胞が悪性化したもので、造血器腫瘍の中では3番目に多く、完治が得られない難治性のがんであり、新たな治療戦略の開発が望まれている。

cBAF 阻害薬を基軸とした多発性骨髄腫の新規治療戦略を考案するため、cBAF 阻害薬治療効果に影響を与える遺伝子の網羅的探索を行った。多発性骨髄腫細胞株 MM.1S を用いて、通常の培養条件下と cBAF 阻害薬を添加した条件下で並行して CRISPR スク

リーニングを行い、cBAF 阻害薬含有培地で遺伝子破壊による増殖抑制効果が増強あるいは減弱する遺伝子を探索した。Day -7 に MM.1S 細胞に、CRISPR gRNA ライブラリーを形質導入し、Day -5 から Day 0 に薬剤選択した。Day 0 に一部細胞をサンプリングした後に 2 群に分け、一方は通常培地で、もう一方は cBAF 阻害薬含有培地で培養し、Day 14 にそれぞれからサンプリングを行った (Figure 1A)。ゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、gRNA の定量を行った。カウントデータは、MAGeCK を用いて統計学的に処理した。

cBAF 複合体と機能的に無関係な増殖必須遺伝子においては、遺伝子破壊による増殖抑制効果が cBAF 阻害薬の有無で変化しない。一方、cBAF 複合体と協調的に機能している遺伝子においては、遺伝子破壊による増殖抑制効果が cBAF 阻害薬の存在により増強あるいは減弱する。興味深いことに、遺伝子破壊による増殖抑制効果が cBAF 阻害薬の存在により増強する遺伝子として、60 遺伝子がヒットした (Figure 1B)。その中には、5 つの転写因子が含まれていた (RBPJ、ZBTB7A、ARNT、ZNF367、MYB)。多発性骨髄腫においてこれらの転写因子と cBAF との機能的関連はこれまで報告がなく、今後、これらの転写因子と cBAF

複合体がどのような分子メカニズムで多発性骨髄腫細胞の生存増殖を制御しているのか、解析を進めていく。本研究は、多発性骨髄腫細胞における生存増殖必須遺伝子の発現制御メカニズムを明らかにするのみならず、cBAF 阻害薬を基軸とした新規多発性骨髄腫治療戦略の開発に繋がるものである。



2025 年 4 月 30 日
京都大学 iPS 細胞研究所
未来生命科学開拓部門
特定拠点助教 大野博久

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

【研究課題】 発現持続型 RNA ベクターの開発

【背景と目的】

近年、安全な遺伝子導入ベクターとして RNA が注目されている。ウイルスやプラスミド DNA を用いる既存のベクターと比べて、RNA はゲノム DNA に組み込まれて変異を生じさせる可能性がないため、遺伝子治療や遺伝子ワクチンのように、特に高い安全性が必要とされる生体への利用が期待されている。しかし、RNA は非常に不安定な分子であるため生体内半減期が短く、したがって遺伝子発現の持続時間が短い。実際の医療応用においては、繰り返し投与を行うといった方法も考えられるが、根本的な解決策とは言い難い。

そこで本研究では、RNA ウイルスの自己複製システムを応用・改良することで、細胞内で持続的に目的遺伝子を発現できる RNA ベクターの開発に挑む。また、より高い安全性を確保するため、任意のタイミングでベクターの複製を停止させ、細胞内からベクターを除去できるシステムの開発や、新規な RNA ウイルス種由来の RNA 複製系を利用した RNA ベクターの開発にも挑戦する。

【結果と考察】

上記目的を達成するため、現在最もよく使われているアルファウイルス (Venezuelan equine encephalitis virus : ベネズエラ馬脳炎ウイルス) 由来の自己増幅型 RNA に着目し、その改良に取り組んだ。この自己増幅型 RNA はプラス鎖 (ポジティブ鎖) であり、そこにコードされたウイルス由来の非構造タンパク質が RNA 依存性 RNA 合成を担う。非構造タンパク質の発現は一般的な mRNA と同様、5'キャップ構造およびポリ A テイルに依存することが報告されている。そこでまず、5'キャップ部位の構造の最適化を行った。また、ポリ A テイル部の合成法についても複数の方法を比較し、最適化を行った。さらに、免疫原性を低減するために塩基修飾の可否を調べた。人工 mRNA では、ウリジンのメチルシュードウリジンやそのアナログといった修飾塩基への置換により、

免疫原性を低下させ、タンパク質発現効率を大きく改善できることが良く知られている。そこで、タンパク質発現の増進効果が mRNA で確認できたシトシンおよびウラシルの修飾塩基を自己増幅型 RNA にも導入してみた。その結果、ウラシルの各種修飾は自己増幅型 RNA の機能を大きく阻害した一方で、シトシンの 5-メチル化および 5-ヒドロキシメチル化誘導体は自己増幅型 RNA の機能を阻害せず、タンパク質発現レベルや持続性を向上させることを見出した。これらの改良を組み合わせることで、ヒト培養細胞において、通常の人工 mRNA よりも高いタンパク質発現レベルを 1 週間以上にわたって持続させられる自己増幅型 RNA ベクター及びその合成法を確立できた。

マウスを用いた *in vivo* での性能評価でも通常の人工 mRNA よりも高く持続的な遺伝子発現を確認できた。現在心疾患モデルマウスにおいて実際に治療用タンパク質を発現させることで疾患治療効果の検証を行っており、通常の mRNA では効果が見られないのに対し、自己増幅型ベクターでは良好な結果が得られつつある。

しかしながら、自己増幅型 RNA ベクターからの遺伝子発現は時間経過とともに低下し、2 週間後にはほぼ完全に消失していた。おそらく哺乳類細胞が持つ免疫機構により除去されるためだと考えられる。したがって、当初計画していた自己増幅型 RNA ベクターの除去技術の必要性は低く、それよりもより長期間にわたってヒト細胞内で維持される自己複製型 RNA を開発することを次の目標とした。ここでは、アルファウイルス以外の RNA ウイルスをもとに、全く新規な自己増幅型 RNA ベクターの構築を試みた。あるウイルスは哺乳類細胞において高い遺伝子発現活性および感染持続性を示すことが知られている。しかし、そのゲノム RNA からの遺伝子発現や RNA 複製にはウイルスが持つ複数のタンパク質因子が必要であるため、原理的に RNA 成分のみを抽出又は合成して細胞に導入しても遺伝子発現は生じずベクターとしては機能しない。そこで、それらタンパク質因子をコードする人工 mRNA を合成し、RNA として導入することを思いついた。ヒト培養細胞を用いた検証において、それらタンパク質因子をコードした人工 mRNA 共導入により、発現させたい目的遺伝子をコードした複製型 RNA からの遺伝子発現が確認できた。さらに、複製型 RNA の 5' 端及び 3' 端の化学構造や塩基修飾を最適化することで、遺伝子発現効率も大きく改善できることが確認できた。該当するウイルスやその近縁種をもとに、RNA のみからなる複製型 RNA ベクターを構築した例はなく、本システムは全く新規なモダリティとなりうる。今後、様々な細胞種における遺伝子発現特性や持続性などを評価していく予定である。

まとめと展望

現在最もよく用いられているアルファウイルス由来の自己増幅型 RNA について、末端部の化学構造や塩基修飾、合成法を検討・最適化し、機能性を改善することに成功した。また、全く別種のウイルスをもとに、RNA のみからなる新規な自己増幅型 RNA ベクターの開発にも成功した。これらの RNA ベクターは、基礎的な生命科学研究から遺伝子治療まで、幅広い応用が期待できると考える。

令和 6 年度奨励交付金研究成果報告書

研究課題名：短期間で乳癌を誘導できる新しい乳癌マウスモデルを用いた早期乳癌発生の時系列解析

学術的背景 1 — 全ゲノムシーケンスの発達により癌の悪性化に関わる変異の同定が進むが、時系列解析は容易でない

近年、遺伝子の個別解析だけでなく、全ゲノムの変異解析が可能になった。新規早期乳癌マーカー変異の発見が期待されている。しかし、検証は容易でない。発癌ドライバー変異と同時に、発癌に無関係なジャンク配列の変異が大量に検出されることに加え、発癌前からの癌の時系列データが限られるからである。

学術的背景 2 — 早期乳癌の研究基盤となる乳癌マウスモデルが必要

癌の治療効果を高め、予後を改善する癌の早期発見は重要である。しかし、早期癌の発見につながるバイオマーカーの同定は難しく、確立された早期乳癌のバイオマーカーがない。要因の一つは、癌が長い年月で確率的に発生することである。癌の発生時期が予想できないため、特に早期癌の発見が難しく、解析が難しい。この問題を解決する一つの方法が、短期間で癌を誘導でき、癌の発生時期が短期間に絞れる発癌モデルの解析である。

本研究では、短期間で乳癌を誘導できる新しい乳癌マウスモデルを用いて、早期乳癌発生の時系列解析を行うことで、早期乳癌のバイオマーカー候補の探索を行った。京都大学高等研究院ヒト生物学高等研究拠点の村川泰裕教授と、オランダがんセンターの Jos Jonkers 教授と共同した。

学術的背景 3 — ATM や BRCA1、BRCA2 の変異は、乳癌・卵巣癌の発癌率を特異的に高める

ATM、BRCA1、BRCA2 は、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の代表的な原因遺伝子である。これらは全て、発癌性が非常に強いゲノム損傷（ゲノム二重鎖切断）を修復する主要経路の鍵遺伝子である。ゲノム切断の修復は、全ての増殖細胞で重要である。そのため、上記の遺伝子変異が、乳癌・卵巣癌の発癌率を臓器特異的に強く上昇させる分子機構は、全く不明であった。

これまでの成果 1：ATM のゲノム修復能が、女性ホルモンによる癌遺伝子の過剰発現を防ぐ

= 発癌の臓器特異性のメカニズムの一端を解明（*Cell Rep* 2023, PMID: 36640339、責任著者）

これまでに、村川泰裕教授との共同研究により、ATM が欠損すると、女性ホルモン（エストロゲン）暴露後に *c-MYC* 癌遺伝子が過剰発現すること、そして *c-MYC* の転写調節領域（エンハンサー）にゲノム切断が蓄積することを見出した。このゲノム切断は、エストロゲンの標的遺伝子である

c-MYC が活性化される際に生じること、その修復に ATM が重要なことも分かった。*c-MYC* のエンハンサーを人為的に切断すると *c-MYC* が過剰発現した。以上より、ATM は、エストロゲン暴露後にエンハンサーに入るゲノム切断を速やかに修復し、*c-MYC* 癌遺伝子の過剰発現を抑制すると結論した。*Atm* 欠損マウスにエストロゲンを腹腔投与すると、乳腺上皮細胞のゲノム損傷が蓄積し、*c-MYC* の発現も上昇し、*c-MYC* 依存的な細胞増殖も亢進した (図 1)。このことから、乳腺上皮細胞において、ATM のゲノム修復能は女性ホルモン暴露後の異常な細胞増殖を防ぐと分かり、ATM が女性臓器特異的に発癌を抑制する新しい機構が示唆された (図 2)。

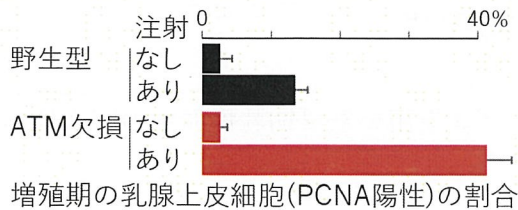


図 1. ATM はエストロゲン暴露後の過剰な細胞増殖を防ぐ
野生型と *Atm* 欠損の雌マウス 3 匹ずつに、生理濃度のエストロゲンを毎日 3 日間注射し、4 日目に乳腺上皮中の PCNA 陽性増殖細胞の割合を調べた。*Atm* 欠損マウスではエストロゲン暴露後に異常な細胞増殖がみられた。

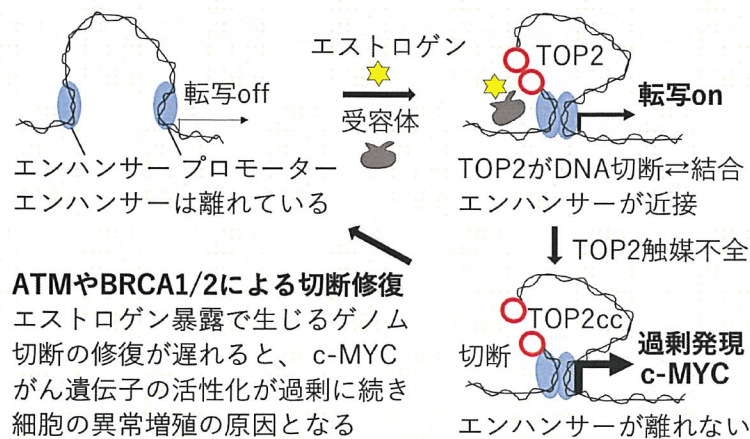


図 2. ATM が *c-MYC* 癌遺伝子の過剰発現を抑え、過剰な細胞増殖を防ぐモデル

ヒトの遺伝子はエンハンサーが転写開始点(プロモーター)を活性化して開始する。転写 off 時はエンハンサーがプロモーターから離れている (左)。エストロゲンが受容体に結合すると、エンハンサーに作用し、TOP2 酵素を活性化する。TOP2 はゲノムの切断と再結合を繰り返してゲノム構造変化を促す。エンハンサーがプロモーターに近接し、転写が誘導される (右上)。

TOP2 はしばしば触媒不全を起こす (*Mol Cell* 2016, PMID: 27912094)。すると TOP2 がゲノムの切断端に結合した TOP2cc (TOP2 cleavage complex) が生じる。ATM や BRCA1/2 は TOP2cc を除去する鍵因子であり、欠損すると TOP2cc が残ってゲノムが切断されたままになる。エンハンサーもプロモーターに近接したままになり転写誘導が続く (右下)。これまでに ATM が欠損した乳腺上皮細胞で、エストロゲン暴露後のゲノム修復が遅れ、*c-MYC* 癌遺伝子が過剰発現することを発見した。*c-MYC* の過剰発現は細胞の異常増殖を引き起こし、女性ホルモン依存的な発癌の一因となる。

これまでの成果 2 : 新しい乳癌マウスモデルの樹立

上記の発見に基づき、Jos Jonkers 博士との研究により、BRCA2 の乳腺特異的欠損マウスにエストロゲンを注射することで、乳癌の形成が早まるかを調べた。結果、生理濃度のエストロゲンを毎日、注射することで、数ヶ月で乳癌が発生すると分かった。短期間に乳癌が発生するマウスモデルは早期乳癌の解析に有用であり (学術的背景 2)、本研究では、本マウスモデルのさらなる解析を行った。

本研究の目的

上記の新しいマウスモデルを用いた乳癌経時解析により、特に早期乳癌の有用な基礎データを取り、乳癌の新たな治療法や診断法の開発基盤を作ることとした。上記のマウスを用いることで、乳癌発生時期を制御できる系を確立すること、乳癌発生前から発癌までの乳腺組織の変化を特徴づけること、そしてこれら乳腺の解析により、早期乳癌のバイオマーカーを探索する基盤を作ることを目指した。

結果 1. 乳腺臓器特異的 *Brca2* 欠損マウスを用いて、乳癌発生時期を制御できる系を確立した

ウイルスを注射して乳腺上皮細胞特異的に *Brca2* を欠損させた雌マウスに対して、エストロゲンを腹腔投与し、6 時間後の c-MYC 陽性の乳腺上皮細胞の割合を調べた (図 3 上左)。 *Brca2* が欠損したマウスでは、エストロゲン注射後すぐに c-MYC 陽性乳腺細胞の割合が著しく増加した。図左と同様に *Brca2* を欠損させた雌マウスに対し、毎日 3 日間エストロゲンを腹腔注射し、4 日後の増殖乳腺上皮細胞の割合を調べた (図 3 上中)。 *Brca2* が欠損したマウスでは増殖細胞の増加がみられた。これらの結果は、*Atm* 欠損マウスの結果と同様であった。 ATM と BRCA2 が同様の経路で *c-MYC* の過剰発現を促し、乳腺の異常な細胞増殖を引き起こす仮説を示唆した。

Brca2 を欠損させた後、毎日 1 ヶ月間のエストロゲンを腹腔注射し、その後 5 ヶ月間、腫瘍のサイズを計測した。エストロゲンを 17 匹のマウスに注射し、3 つの腫瘍が観察された。溶媒のみ注射した 17 匹のマウス (陰性対照) に腫瘍は観察されなかった (図 3 上右)。このことから、本研究の系で乳癌が早期に発生することを確認した。

結果 2. 乳腺臓器特異的 *Brca2* 欠損マウスでみられた乳癌の特徴を解析

マウスにみられた乳癌を調べた結果、ウイルスを注射して乳腺上皮細胞特異的に *Brca2* を欠損させてエストロゲンを投与すると、微小な初期の癌が数ヶ月で形成することが分かった。微小な癌は、乳癌が直径 1cm 以上大きくなる約 2 ヶ月前から確認できた。エストロゲン投与の発癌への効果を正確に測るため、内在性エストロゲンを抑えた卵巣摘出マウス 10 匹でも実験した。結果、エストロゲン投与により発癌みられた (図 3 下左) が、エストロゲンを投与しないと実験期間中に発癌を確認できなかった (図 3 下右)。エストロゲン投与による発癌は、BRCA2 の欠損で早まった (図 3 下、実線：野生型 BRCA2 マウスと、点線：*Brca2* 欠損マウスの比較)。エストロゲンの投与と BRCA2 の欠損の両方が早い乳癌発生に重要と分かった。

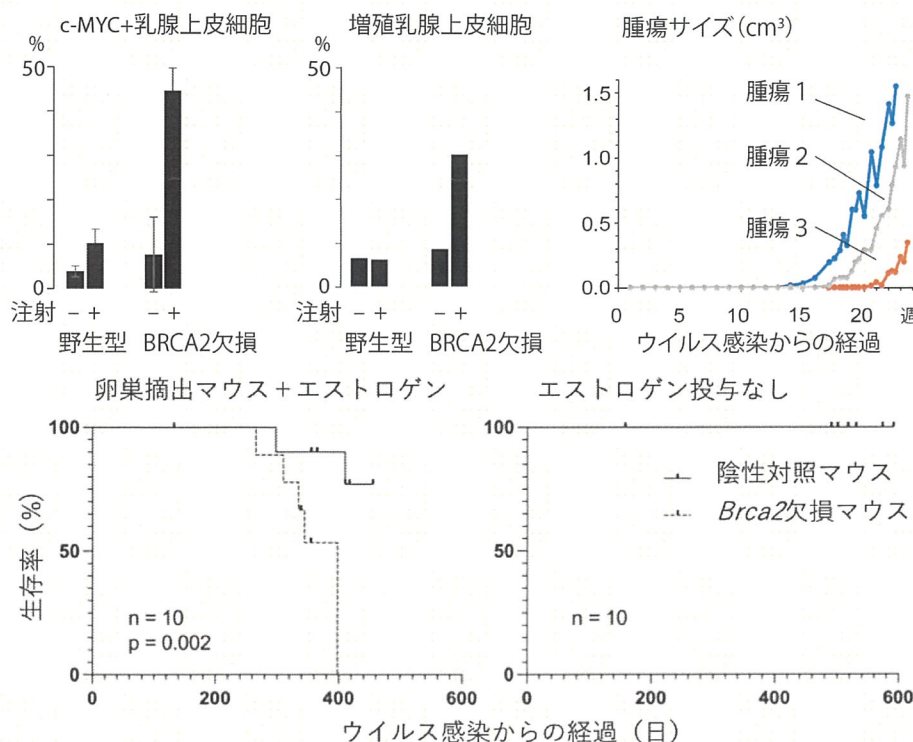


図 3. Jos Jonkers 教授と行った、乳腺特異的 *Brca2* 欠損マウスの発癌実験 *Brca2* が欠損したマウスにエストロゲンを投与すると *c-MYC* 癌遺伝子が高発現し、乳腺上皮細胞が異常増殖した。さらに数ヶ月で乳癌も発生した。内因性のエストロゲンがほとんどでない卵巣摘出マウスを用いても、エストロゲン投与依存的に乳癌が発生した。陰性対照 (野生型 BRCA2) に比べ、乳腺上皮細胞特異的に BRCA2 を欠損させた卵巣摘出マウスでは、エストロゲン投与後の乳癌発生が早かった。

結果 3. 発癌前から乳癌の発生にいたる経時解析と、早期バイオマーカーの探索

上記の結果をふまえ、12 週と 24 週、発癌時のマウスの 3 匹ずつから組織サンプルを得た（マウスの乳腺は 10 箇所あり、1 匹から複数の乳癌発生を解析できる）。乳腺組織のヘマトキシリン・エオジン染色と免疫組織化学染色により、異形成やマイクロ腫瘍を検出している（継続中）。c-MYC、エストロゲン受容体、その他の腫瘍マーカーと、癌の転移に関連する上皮間葉転換のマーカーの免疫染色を現在、行っており、乳腺組織の変化を特徴づけている。得られた乳腺組織の組織学的な状態や腫瘍マーカーの染色結果を時系列にまとめ、乳腺組織の遺伝子発現の変化を調べることで、今後はさらに早期乳癌の変化の特徴を調べ、バイオマーカーの候補を増やす。

まとめと展望

確立された早期乳癌のバイオマーカーはまだない。本研究により、短期間に乳癌を誘導できる新しいマウスモデルの確立と、発生する乳癌の解析を行った。乳癌の発生時期を絞り込める本マウスモデルを用いた経時解析で早期乳癌の変化やバイオマーカーを経時的にリスト化すれば、早期乳癌の有用な基礎データになり、乳癌の新たな治療法や診断法の開発基盤となる。手法は、男性ホルモン依存的な前立腺癌の早期癌の解析にも応用でき、男性女性臓器特異的な発癌機構の解明に貢献する。

乳癌のマウスモデルは、培養細胞やオルガノイドのモデルに比べて個体で研究できる優位性がある。一方で、マウスで得られた知見が、ヒトで使えるのか否かが分からない、進化的保存性の課題がある。この重要な問題は、ヒトの乳癌データベースを用いて回避する。すなわちヒトの乳癌の全ゲノム解析で見つかった変異遺伝子（早期乳癌マーカーの可能性はあるがヒト乳癌の経時データが少ないのでヒトでは検証できない）に焦点を絞って、その遺伝子発現の経時変化を本マウスモデルで調べることにより、臨床（早期乳癌のバイオマーカー候補の抽出）に貢献できると考えている。