

# 平成 29 年度医学部奨学賞・東北医学会奨学賞・医学部学生奨学賞

## 授与式並びに第 396 回東北医学会例会

日 時：平成 30 年 1 月 18 日（木）午後 1 時 00 分から

場 所：東北大学医学部大会議室（1 号館 2 階）

- 1 開 会
- 2 挨拶
- 3 審査報告

- 4 医学部奨学賞（金賞・銀賞）授与

### 【金賞受賞者】

Nrf2 による代謝恒常性維持機構の解明

東北メディカル・メガバンク機構 ゲノム解析部門  
准教授 宇留野 晃

低侵襲硝子体手術の開発と視機能バイオマーカーの確立

眼科学分野 准教授 國方彦志

非手術適応慢性血栓塞栓性肺高血圧症に対する新たな治療法の確立

循環器内科 講師 杉村 宏一郎

### 【銀賞受賞者】

脂肪肝における胆石形成メカニズムの発見

糖尿病代謝科 助教 浅井 洋一郎

ヒト胎盤幹細胞の樹立

情報遺伝学分野 助教 岡江 寛明

腸腎連関に基づく慢性腎臓病の病態解明と新規治療法の開発

腎・高血圧・内分泌科 助教 三島 英換

- 5 東北医学会奨学賞授与

### 【奨学賞 A 受賞者】

転写因子 AhR を介した大気汚染によるアトピー性皮膚炎発症機序の解明

皮膚科学分野 日高 高德

人工呼吸管理を要する敗血症患者に対するデクスメトミジンをを用いた鎮静による転帰への効果：ランダム化比較研究

救急医学分野 川 副 友

薬剤耐性菌の分子疫学研究および医療関連感染の予防戦略の確立

総合感染症科 金 森 肇

【奨学賞 B 受賞者】

冠攣縮における冠動脈周囲脂肪組織の炎症性変化の役割とその画像研究

循環器内科学分野 大 山 宗 馬

長鎖非コード RNA HOTAIR は IGFBP2 を介して腎癌進展に寄与する

泌尿器科学分野 方 山 博 路

Scurfy マウスにおける全身性 NRF2 活性化がもたらす炎症抑制作用の解析

血液・免疫病学分野 鈴 木 琢 磨

6 医学部学生奨学賞授与

【受賞者】

フェルラ酸とその誘導体の  $\alpha$ -シスクレインの凝集・線維化に対する阻害効果の検討

最優秀賞 5 年 陳 夢 格

Histamine N-methyltransferase regulates aggression and the sleep-wake cycle

優秀賞 6 年 矢 内 敦

A novel Mitochondria-homing drug, Mitochonic acid-5 (MA-5) improves cell viability of fibroblast from hearing mitochondrial disease with m.1555 A>G mutation

優秀賞 4 年 小 松 弘 香

アルドステロン産生線腫における病理組織学的定量解析

優秀賞 4 年 東 いぶき

Alagille 症候群を背景にした慢性腎臓病の長期経過観察例

奨学賞 6 年 大 庭 慎 也

Takayasu arteritis coexisting with sclerosing osteomyelitis

びまん性硬化性骨髄炎と高安動脈炎における相同性の検討

奨学賞 6 年 花 岡 理以沙

肺小細胞癌および神経内分泌大細胞癌における腫瘍内炎症細胞浸潤と PD-L1 発現

奨学賞 4 年 岩 田 彩 加

乳癌におけるコレステロール代謝およびサブタイプによるコレステロール代謝の変化

奨学賞 4年 上野寛之

トリプルネガティブ乳がん (TNBC) におけるグルココルチコイドの動態とその臨床的重要性

奨学賞 4年 熊田理名

アルドステロン産生線腫における形態学的・免疫組織学的・遺伝学的 intratumoral heterogeneity の検討

奨学賞 4年 穴戸悠華

7 祝 辞

8 受賞者講演 (金賞・銀賞)

9 閉 会

## Nrf2 による代謝恒常性維持機構の解明

宇留野 晃

東北大学東北メディカル・メガバンク機構 ゲノム解析部門

東北大学大学院医学系研究科 医化学分野



### はじめに

CNC (Cap'n'collar) 群転写因子の Nrf2 (NF-E2-related factor 2) は、ストレス応答性に解毒代謝および抗酸化酵素群の遺伝子発現を誘導する<sup>1,2)</sup>。Nrf2 は Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) を介したプロテアソーム分解により転写活性が抑制されているが<sup>3)</sup>、親電子性分子や活性酸素種などの存在下では Keap1 システイン残基がストレス性分子を感知して Nrf2 のプロテアソーム分解が抑制されることで安定化して、強力な転写活性を發揮する<sup>4)</sup>。そのストレス応答性遺伝子発現制御機構は Keap1-Nrf2 系と呼ばれ、生体防御機構に重要な役割を果たしている<sup>5)</sup>。Nrf2 は多くの病態の発症予防に貢献していることが報告されてきたものの、代謝恒常性維持における役割は知られていないことから、その解明に取り組んだ。

### 糖尿病モデルマウス膵β細胞における Nrf2 の役割

糖尿病モデル *db/db* マウスに、遺伝子改変および薬剤による Nrf2 活性化を導入し解析を行った。遺伝子改変による Nrf2 活性化モデルとして *Keap1* 遺伝子発現低下 *Keap1<sup>fllox/-</sup>* 変異を、また薬剤による Nrf2 活性化モデルとして CDDO-Im (oleanolic acid 1-[2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole) 経口投与を利用した。対照群の *db/db::Keap1<sup>fllox/+</sup>* マウスは膵β細胞障害を認めたが、遺伝子改変による Nrf2 活性化群である *db/db::Keap1<sup>fllox/-</sup>* マウスでは形態学的に膵β細胞は保たれ、インスリン分泌も保持され、糖尿病発症が予防された<sup>6)</sup>。同様に薬剤投与による Nrf2 活性化群である CDDO-Im 投与 *db/db* マウスでも膵β細胞は保護され、血糖降下作用を認めた。

さらに、膵β細胞酸化ストレス障害モデル iNOS ト

ランスジェニックマウスの解析を行ったところ、同マウスは膵β細胞の酸化ストレスマーカーの増加と膵β細胞障害を認めたが、膵β細胞 *Keap1* 欠失を導入したところ、それらは軽減した。以上から Nrf2 は、酸化ストレス軽減を介して膵β細胞障害を抑制することが明らかとなった<sup>7)</sup>。

### 糖尿病モデルマウス肝臓における Nrf2 の役割

次に *db/db* マウスの肝臓における Nrf2 の役割を検討した。*db/db::Keap1<sup>fllox/-</sup>* マウスの肝臓では、*db/db::Keap1<sup>fllox/+</sup>* マウスと比較して糖新生酵素遺伝子 *G6pc* の発現が抑制され<sup>6)</sup>、代謝を制御する液性因子遺伝子 *Fgf21* の発現の増加を認めた<sup>8)</sup>。同様に Nrf2 活性化剤 CDDO-Im 投与 *db/db* マウスの肝臓でも *G6pc* 発現抑制と *Fgf21* 発現増加を認めた。ピルビン酸負荷試験で *db/db::Keap1<sup>fllox/-</sup>* マウスは、対照群と比較して血糖値上昇が軽度であり、糖新生が抑制されていた。また、*db/db::Keap1<sup>fllox/-</sup>* マウスは血漿 FGF21 濃度の増加を認め、さらに血漿トリグリセリド濃度低下を認めた。マウスへの FGF21 持続投与は血漿トリグリセリド濃度の低下を認めた。以上から、肝臓の Nrf2 活性化は、*G6pc* 発現抑制および *Fgf21* 発現誘導により糖新生やトリグリセリド代謝恒常性維持に貢献していることが明らかとなった。

### 骨格筋における Nrf2 の役割

骨格筋における Nrf2 の役割を検討する目的で、骨格筋特異的 *Keap1* 欠失マウスを作出した。骨格筋特異的 *Keap1* 欠失マウスは対照群マウスと比較して、グルコース負荷試験における耐糖能改善作用を認めた<sup>9)</sup>。骨格筋によるマイクロアレイ解析を行ったところ、骨格筋特異的 *Keap1* 欠失マウスでグリコーゲン分枝鎖酵素 (*Gbe1*) およびホスホリラーゼキナーゼ  $\alpha 1$  (*Phka1*) 遺伝子発現の誘導を認めた。CDDO-Im 投与マウスの骨格筋でも同様に *Gbe1* および *Phka1* 発

現誘導を認めた。C2C12 筋管細胞を用いた ChIP-seq およびマニュアル ChIP 解析では、*Gbe1* および *Phka1* 近傍への Nrf2 結合を認めた。生化学的解析では Nrf2 活性化は骨格筋におけるグリコーゲン蓄積量を低下させた。さらに、マウスにトレッドミル試験を行ったところ、CDDO-Im 投与は運動能の改善作用を認めた。以上から、骨格筋における Nrf2 活性化はグリコーゲン分枝鎖酵素およびホスホリラーゼキナーゼ発現を増加させ、グリコーゲン代謝を促進することで、グルコース代謝および運動能を改善させていた。

### 視床下部における Nrf2 の役割

全身性 Nrf2 活性化モデル *Keap1<sup>fllox/-</sup>* マウスに対して、高カロリー食負荷による肥満モデルを導入したところ、同マウスでは肥満は強力に抑制された。一方、レプチン受容体の異常による肥満モデルである *db/db* マウスの検討では、*db/db::Keap1<sup>fllox/-</sup>* マウスは肥満は若干抑制されたものの、軽度の抑制にとどまった<sup>6)</sup>。このため、Nrf2 はレプチンシグナルに関連した抗肥満作用があると予想され、視床下部の酸化ストレスモデルマウスを作出し、視床下部における Nrf2 の役割を解析した。

含セレンタンパク質群は多くの抗酸化酵素を含むが、そのタンパク質合成にはセレノシステイン転移 RNA が必須である。このため、セレノシステイン転移 RNA をコードする *Trsp* 遺伝子を欠失させると複数の抗酸化酵素発現が低下し、酸化ストレスが増加する。視床下部全域で Cre リコンビナーゼを発現するラット *Ins2* プロモーター (RIP)-Cre マウスを利用して、視床下部 *Trsp* 欠失 *RIP-Cre::Trsp<sup>fllox/fllox</sup>* (*Trsp<sup>RIP</sup>KO*) マウスを作出した。*Trsp<sup>RIP</sup>KO* マウスは対照群の *Trsp<sup>fllox/fllox</sup>* マウスと比較して、高脂肪食負荷で引き起る肥満とインスリン抵抗性の悪化を認めた。

RIP-Cre は視床下部と膵β細胞の両方で Cre リコンビナーゼを発現することから、大腸菌人工染色体 *Ins1* 制御下に膵β細胞のみで Cre リコンビナーゼを発現する *Ins1-Cre* マウスを利用し、膵β細胞特異的 *Trsp* 欠失 *Ins1-Cre::Trsp<sup>fllox/fllox</sup>* (*Trsp<sup>Ins1</sup>KO*) マウスを作出したところ代謝の悪化は認めず、*Trsp<sup>RIP</sup>KO* マウスの表現系は視床下部の *Trsp* 組換えによることが明らかとなった。

*Trsp<sup>RIP</sup>KO* マウスの詳細な解析では、視床下部で酸化ストレスが増加し、レプチン作用に重要なプロオピオメラノコルチン (POMC) 陽性神経数が減少し、その結果レプチン抵抗性が悪化していることが明らかと

なった<sup>10)</sup>。*Trsp<sup>RIP</sup>KO* マウスと *Keap1<sup>fllox</sup>* マウスを交配し、*RIP-Cre::Trsp<sup>fllox/fllox</sup>::Keap1<sup>fllox/fllox</sup>* マウスを作出したところ、*Trsp<sup>RIP</sup>KO* マウスで認めた視床下部の酸化ストレスは抑制され、レプチンおよびインスリン抵抗性の改善を認めた。以上から、視床下部における酸化ストレスは、肥満や糖尿病の発症を促進したが、視床下部における Nrf2 は、これらの病態を抑制することが解明された。

### おわりに

これまでに、転写因子 Nrf2 の役割は解毒代謝酵素および抗酸化酵素の発現誘導であることが知られてきた。本研究においても、Nrf2 は脳視床下部と膵β細胞で抗酸化機能を増強し、細胞保護を介して代謝恒常性維持に貢献していた。さらに Nrf2 が抗酸化機能と独立して、糖新生やグリコーゲン代謝酵素遺伝子発現を制御していた。以上より Nrf2 は、解毒代謝酵素や抗酸化酵素の遺伝子に加え、代謝系遺伝子発現も制御することで、複数の機序により代謝恒常性維持に寄与していることが明らかとなった (図 1)<sup>11)</sup>。

CNC 群転写因子の一つである Nrf1 (NF-E2-related factor 1) の過剰発現マウスを作出したところ、Nrf2 と逆に糖尿病発症を促進した<sup>12)</sup>。Nrf1 は Nrf2 と同じ DNA 結合配列を持つが、代謝制御においては逆の役割を持つことから、今後両転写因子間の機能の差異の解明が待たれる。

現在、Nrf2 活性化剤のフマル酸ジメチルが多発性硬化症で臨床応用されているが<sup>13)</sup>、さらに新規 Nrf2 活性化剤 TFM-735 も開発され、マウス実験の自己免疫性脳脊髄炎で良好な成績を収めている<sup>14)</sup>。また、Nrf2 活性化剤バルトキシロンメチルが 2 型糖尿病を合併した慢性腎臓病に対して臨床治験が行われた<sup>15)</sup>。

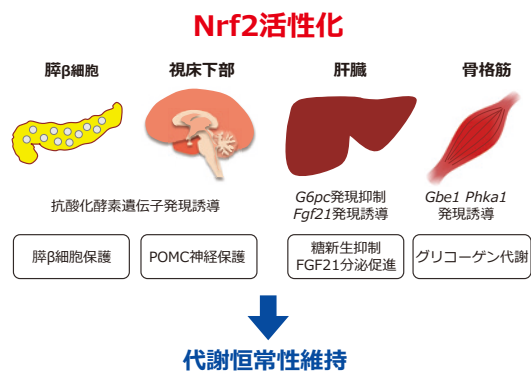


図 1. Nrf2 による代謝恒常性維持機構

このように臨床応用に向けた取り組みが進められていることから、今後 Nrf2 を標的とした新たな代謝性疾患の治療法の開発が期待される。

## 謝 辞

本研究は山本雅之教授をはじめとする医学系研究科および東北メディカル・メガバンク機構の先生方にご指導をいただき、また共同研究していただいた先生方に多大なご尽力を頂きながら進めてまいりました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Itoh, K., Igarashi, K., Hayashi, N., et al. (1995) Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4184-4193.
- 2) Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., et al. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 313-322.
- 3) Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., et al. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.*, **13**, 76-86.
- 4) Saito, R., Suzuki, T., Hiramoto, K., et al. (2015) Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response. *Mol. Cell. Biol.*, **36**, 271-284.
- 5) Uruno, A. and Motohashi, H. (2011) The Keap1-Nrf2 system as an *in vivo* sensor for electrophiles. *Nitric Oxide*, **25**, 153-160.
- 6) Uruno, A., Furusawa, Y., Yagishita, Y., et al. (2013) The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 2996-3010.
- 7) Yagishita, Y., Fukutomi, T., Sugawara, A., et al. (2014) Nrf2 protects pancreatic  $\beta$ -cells from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice. *Diabetes*, **63**, 605-618.
- 8) Furusawa, Y., Uruno, A., Yagishita, Y., et al. (2014) Nrf2 induces fibroblast growth factor 21 in diabetic mice. *Genes Cells*, **19**, 864-878.
- 9) Uruno, A., Yagishita, Y., Katsuoka, F., et al. (2016) Nrf2-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Glycogen Metabolism. *Mol. Cell. Biol.*, **36**, 1655-1672.
- 10) Yagishita, Y., Uruno, A., Fukutomi, T., et al. (2017) Nrf2 Improves Leptin and Insulin Resistance Provoked by Hypothalamic Oxidative Stress. *Cell Rep.*, **18**, 2030-2044.
- 11) Uruno, A., Yagishita, Y. and Yamamoto, M. (2015) The Keap1-Nrf2 system and diabetes mellitus. *Arch. Biochem. Biophys.*, **566C**, 76-84.
- 12) Hirotsu, Y., Higashi, C., Fukutomi, T., et al. (2014) Transcription factor NF-E2-related factor 1 impairs glucose metabolism in mice. *Genes Cells*, **19**, 650-665.
- 13) Fox, R.J., Miller, D.H., Phillips, J.T., et al. (2012) Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, **367**, 1087-1097.
- 14) Higashi, C., Kawaji, A., Tsuda, N., et al. (2017) The novel Nrf2 inducer TFM-735 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **802**, 76-84.
- 15) de Zeeuw, D., Akizawa, T., Audhya, P., et al. (2013) Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *N. Engl. J. Med.*, **369**, 2492-2503.

# 低侵襲硝子体手術の開発と視機能バイオマーカーの確立

國 方 彦 志

東北大学大学院医学系研究科 眼科学分野



## はじめに

外界からの情報の 80% を占める視覚を維持することは、自立した生活を送る上で必須である。本邦は世界に類を見ない超高齢社会を迎え、神経変性疾患である緑内障が失明原因一位になり、また加齢に伴う内眼手術は年間 130 万人以上と増加の一途を辿っている。よって、失明を予防するためには、早期発見早期治療を行い、内眼手術の成績も最大限向上するべく低侵襲化を図る努力が必要である。そこで私は、「低侵襲硝子体手術の開発と視機能バイオマーカーの確立」を研究目標として掲げている。即ち、患者の視機能を最高のものにするため、低侵襲硝子体手術を開発し、さらに眼内サンプル・眼血流・酸化ストレスの解析を行うことで病態理解に努め、早期診断と予後予測に有用な視機能バイオマーカーの創出を目指し、日々精進してきた。

## 低侵襲硝子体手術の開発

網膜硝子体手術を最小切開かつ精度の高いレベルで行うことは重要である。我々は、巨大裂孔網膜剥離など難症例でも極小切開手術の有用性を見出し<sup>1-5)</sup>、後囊切除併用トーリック眼内レンズ固定法<sup>6,7)</sup>、落下眼内レンズに対する小切開縫着法<sup>8)</sup>、眼内異物に対する triple C-through 法<sup>9)</sup>、いずれも患者に優しい低侵襲手術法を提唱しその標準化に努めてきた。最近では、世界最小径 27 ゲージを用いて術中 OCT 併用硝子体手術や<sup>10)</sup>、光毒性を低減した 27 ゲージ極低照明 3D 硝子体手術も報告し<sup>11)</sup>、手術精度のみならず神経保護にも着目している。失明に至る多くの眼疾患において、網膜細胞死が直接的な視力障害の原因になるため、細胞死を抑制する研究を行い<sup>12-16)</sup>、周術期神経保護治療法や新規酸化眼内灌流液の開発に繋げている。

## 視機能バイオマーカーの確立

早期診断と予後予測に有用な簡便なバイオマーカーがあれば患者への福音となる。我々は、非侵襲的に眼血流を計測するレーザースペックルフローグラフィに着目し、臨床応用に向け正常基準値の確立<sup>17-19)</sup>、さらに個人間比較を可能とするパラメータを動物実験からも明らかにした<sup>20)</sup>。緑内障など様々な眼疾患の血流解析も行い、病態解明と新しい診断法開発に繋げている<sup>21-39)</sup>。また、糖尿病網膜症患者の眼内で抗酸化イオウ分子種が上昇していることや<sup>40)</sup>、酸化ストレスが網膜症や緑内障の病態に深く関わっていることも明らかにした<sup>26,28,41-43)</sup>。このように、眼血流や酸化ストレスなどの臨床データが眼疾患病態や視機能予後に深く関わることを突き止め、新しいバイオマーカーを多数提唱している<sup>17-39)</sup>。

## おわりに

これまで患者の視機能を最高のものにするため、低侵襲硝子体手術を開発し、眼内サンプル・眼血流・酸化ストレスの解析を行うことで病態理解に努め、早期診断と予後予測に有用な視機能バイオマーカーを創出することを考え、研究を続けてきた。本受賞を励みに、引き続き研究に取り組み、眼科学の発展に貢献したい。

## 謝 辞

東北大学医学部奨学賞は、戦後まもなく昭和 23 年に制定され 70 年間、今日も続けられている歴史ある学術賞であるが、歴代受賞者一覧をみても権威ある賞であることが改めて分かり、本当に身が引き締まる思いである。今回、私が医学部奨学賞金賞を受賞できたのは、いつもご指導いただいている中澤徹主任教授、阿部俊明教授のお蔭であり、心から感謝の意を表したい。東北大学眼科学教室は昨年、開講 100 周年を迎えたことも記憶に新しいが、小柳美三初代教授、玉井信五代教授（私が入局時の主任教授）、西田幸二第六

代教授をはじめ歴代の大先輩方にも深い感謝を申し上げます。また、いつも快く協力して下さる共同研究者の皆様、東北医学会の皆様、眼科学教室同窓会の諸先輩方、眼科学教室医局員に対しても、この場をお借りして厚く御礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) Kunikata, H. (2014) Management of giant retinal tears using microincision vitrectomy surgery. *Dev. Ophthalmol.*, **54**, 182-187.
- 2) Kobayashi, W., Kunikata, H., Abe, T., et al. (2014) Retrospective Comparison of 25- and 23-Gauge Microincision Vitrectomy Surgery and 20-Gauge Vitrectomy for the Repair of Macular Hole Retinal Detachment. *Asia Pac. J. Ophthalmol. (Phila.)*, **3**, 331-336.
- 3) Kunikata, H., Nitta, F., Meguro, Y., et al. (2011) Difficulty in inserting 25- and 23-gauge trocar cannula during vitrectomy. *Ophthalmologica*, **226**, 198-204.
- 4) Kunikata, H., Abe, T. and Nishida, K. (2011) Successful outcomes of 25- and 23-gauge vitrectomies for giant retinal tear detachments. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging*, **42**, 487-492.
- 5) Kunikata, H. and Nishida, K. (2010) Visual outcome and complications of 25-gauge vitrectomy for rhegmatogenous retinal detachment ; 84 consecutive cases. *Eye (Lond.)*, **24**, 1071-1077.
- 6) Kunikata, H., Aizawa, N., Meguro, Y., et al. (2013) Combined 25-gauge microincision vitrectomy and toric intraocular lens implantation with posterior capsulotomy. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging Retina*, **44**, 145-154.
- 7) Aizawa, N., Kunikata, H., Abe, T., et al. (2012) Efficacy of combined 25-gauge microincision vitrectomy, intraocular lens implantation, and posterior capsulotomy. *J. Cataract Refract. Surg.*, **38**, 1602-1607.
- 8) Kunikata, H., Fuse, N. and Abe, T. (2011) Fixating dislocated intraocular lens by 25-gauge vitrectomy. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging*, **42**, 297-301.
- 9) Kunikata, H., Uematsu, M., Nakazawa, T., et al. (2011) Successful removal of large intraocular foreign body by 25-gauge microincision vitrectomy surgery. *J. Ophthalmol.*, **940323**.
- 10) Kunikata, H. and Nakazawa, T. (2015) Intraoperative Optical Coherence Tomography-Assisted 27-Gauge Vitrectomy in Eyes with Vitreoretinal Diseases. *Case Rep. Ophthalmol.*, **6**, 216-222.
- 11) Kunikata, H., Abe, T. and Nakazawa, T. (2016) Heads-Up Macular Surgery with a 27-Gauge Microincision Vitrectomy System and Minimal Illumination. *Case Rep. Ophthalmol.*, **7**, 265-269.
- 12) Tsuda, S., Tanaka, Y., Kunikata, H., et al. (2016) Real-time imaging of RGC death with a cell-impermeable nucleic acid dyeing compound after optic nerve crush in a murine model. *Exp. Eye Res.*, **146**, 1791-188.
- 13) Kunikata, H., Yasuda, M., Aizawa, N., et al. (2013) Intraocular concentrations of cytokines and chemokines in rhegmatogenous retinal detachment and the effect of intravitreal triamcinolone acetonide. *Am. J. Ophthalmol.*, **155**, 1028-1037 e1.
- 14) Kunikata, H., Tomita, H., Abe, T., et al. (2007) Hypothermia protects cultured human retinal pigment epithelial cells against indocyanine green toxicity. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **23**, 35-39.
- 15) Kunikata, H., Tomita, H., Murata, H., et al. (2006) Hypothermia protects cultured human retinal pigment epithelial cells against trypan blue toxicity. *Ophthalmologica*, **220**, 114-117.
- 16) Kunikata, H., Abe, T., Murata, H., et al. (2006) Hypothermia of 8 degrees C protects cultured retinal pigment epithelial cells and retinal ganglion cells against trypan blue toxicity. *Am. J. Ophthalmol.*, **141**, 754-756.
- 17) Tsuda, S., Kunikata, H., Shimura, M., et al. (2014) Pulse-waveform analysis of normal population using laser speckle flowgraphy. *Curr. Eye Res.*, **39**, 1207-1215.
- 18) Aizawa, N., Kunikata, H., Nitta, F., et al. (2016) Age- and Sex-Dependency of Laser Speckle Flowgraphy Measurements of Optic Nerve Vessel Microcirculation. *PLoS One*, **11**, e0148812.
- 19) Shiga, Y., Asano, T., Kunikata, H., et al. (2014) Relative flow volume, a novel blood flow index in the human retina derived from laser speckle flowgraphy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **55**, 3899-3904.
- 20) Aizawa, N., Nitta, F., Kunikata, H., et al. (2014) Laser speckle and hydrogen gas clearance measurements of optic nerve circulation in albino and pigmented rabbits with or without optic disc atrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **55**, 7991-7996.
- 21) Aizawa, N., Kunikata, H., Nitta, F., et al. (2015) The relationship between laser speckle flowgraphy-measured optic disc microcirculation and postoperative visual recovery in rhegmatogenous retinal detachment. *Acta Ophthalmol.*, **93**, e397-9.
- 22) Aizawa, N., Kunikata, H., Omodaka, K., et al. (2014) Optic disc microcirculation in superior segmental optic hypoplasia assessed with laser speckle flowgraphy. *Clin. Exp. Ophthalmol.*, **42**, 702-704.
- 23) Aizawa, N., Kunikata, H., Shiga, Y., et al. (2017) Preperimetric Glaucoma Prospective Observational Study (PPGPS) : Design, baseline characteristics, and therapeutic effect of tafluprost in preperimetric glaucoma eye. *PLoS One*, **12**, e0188692.
- 24) Aizawa, N., Kunikata, H., Shiga, Y., et al. (2014) Correlation between structure/function and optic disc microcirculation in myopic glaucoma, measured with laser speckle flowgraphy. *BMC Ophthalmol.*, **14**, 113.



- 25) Aizawa, N., Kunikata, H., Yokoyama, Y., et al. (2014) Correlation between optic disc microcirculation in glaucoma measured with laser speckle flowgraphy and fluorescein angiography, and the correlation with mean deviation. *Clin. Exp. Ophthalmol.*, **42**, 293-294.
- 26) Hashimoto, K., Kunikata, H., Yasuda, M., et al. (2016) The relationship between advanced glycation end products and ocular circulation in type 2 diabetes. *J. Diabetes Complications*, **30**, 1371-1377.
- 27) Himori, N., Kunikata, H., Inoue, M., et al. (2017) Optic nerve head microcirculation in autosomal dominant optic atrophy and normal-tension glaucoma. *Acta Ophthalmol.*, **95**, e799-e800.
- 28) Himori, N., Kunikata, H., Shiga, Y., et al. (2016) The association between systemic oxidative stress and ocular blood flow in patients with normal-tension glaucoma. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **254**, 333-341.
- 29) Inoue, M., Himori, N., Kunikata, H., et al. (2016) The reduction of temporal optic nerve head microcirculation in autosomal dominant optic atrophy. *Acta Ophthalmol.*, **94**, e580-e585.
- 30) Kiyota, N., Kunikata, H., Shiga, Y., et al. (2017) Relationship between laser speckle flowgraphy and optical coherence tomography angiography measurements of ocular microcirculation. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **255**, 1633-1642.
- 31) Kiyota, N., Kunikata, H., Shiga, Y., et al. Ocular microcirculation measurement with laser speckle flowgraphy and optical coherence tomography angiography in glaucoma. *Acta Ophthalmol.*, 2018.
- 32) Kiyota, N., Kunikata, H., Takahashi, S., et al. Factors associated with deep circulation in the peripapillary chorioretinal atrophy zone in normal-tension glaucoma with myopic disc. *Acta Ophthalmol.*, 2017.
- 33) Kobayashi, W., Kunikata, H., Omodaka, K., et al. (2014) Correlation of optic nerve microcirculation with papillomacular bundle structure in treatment naive normal tension glaucoma. *J. Ophthalmol.*, 468908.
- 34) Kunikata, H., Aizawa, N., Kudo, M., et al. (2015) Relationship of ocular microcirculation, measured by laser speckle flowgraphy, and silent brain infarction in primary aldosteronism. *PLoS One*, **10**, e0117452.
- 35) Kunikata, H. and Nakazawa, T. (2016) Recent Clinical Applications of Laser Speckle Flowgraphy in Eyes with Retinal Disease. *Asia Pac. J. Ophthalmol. (Phila.)*, **5**, 151-158.
- 36) Nitta, F., Kunikata, H., Aizawa, N., et al. (2014) The effect of intravitreal bevacizumab on ocular blood flow in diabetic retinopathy and branch retinal vein occlusion as measured by laser speckle flowgraphy. *Clin. Ophthalmol.*, **8**, 1119-1127.
- 37) Shiga, Y., Omodaka, K., Kunikata, H., et al. (2013) Waveform analysis of ocular blood flow and the early detection of normal tension glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **54**, 7699-7706.
- 38) Yui, R., Kunikata, H., Aizawa, N., et al. (2016) Anterior chamber aqueous flare and optic nerve microcirculation in eyes with rhegmatogenous retinal detachment. *Acta Ophthalmol.*, **94**, e520-1.
- 39) Shiga, Y., Kunikata, H., Aizawa, N., et al. (2016) Optic Nerve Head Blood Flow, as Measured by Laser Speckle Flowgraphy, Is Significantly Reduced in Preperimetric Glaucoma. *Curr. Eye Res.*, **41**, 1447-1453.
- 40) Kunikata, H., Ida, T., Sato, K., et al. (2017) Metabolic profiling of reactive persulfides and polysulfides in the aqueous and vitreous humors. *Sci. Rep.*, **7**, 41984.
- 41) Asano, Y., Himori, N., Kunikata, H., et al. (2017) Age- and sex-dependency of the association between systemic antioxidant potential and glaucomatous damage. *Sci. Rep.*, **7**, 8032.
- 42) Himori, N., Kunikata, H., Kawasaki, R., et al. (2017) The association between skin autofluorescence and mean deviation in patients with open-angle glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.*, **101**, 233-238.
- 43) Yamada, E., Himori, N., Kunikata, H., et al. (2018) The relationship between increased oxidative stress and visual field defect progression in glaucoma patients with sleep apnoea syndrome. *Acta Ophthalmol.*

# 非手術適応慢性血栓塞栓性肺高血圧症に対する新たな治療法の確立

杉 村 宏 一 郎

東北大学病院 循環器内科



## はじめに

慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: CTEPH) は肺動脈内の器質化血栓により血流が妨げられ、肺血管抵抗が上昇することによる肺高血圧症から右心不全に至る、予後不良の疾患である。昨今、外科的治療法である肺血栓内膜摘除術 (Pulmonary endarterectomy: PEA) が主流であった CTEPH の治療に対して、新たな肺血管拡張薬であるリオシグアトが使用可能となり、また日本を中心にカテーテルによる肺動脈拡張術の成績の報告により、その治療法は変革を迎えたと言っても過言ではない。

## CTEPH における新たな診断法

CTEPH は器質化血栓により肺血管症が減少することで肺高血圧症に至る疾患である。器質化血栓の存在部位としては、肺動脈中樞側に造影 CT で明確に認識できる症例と、比較的肺動脈末梢側に病変の主座がある症例に分けられる。我が国では、末梢側有意に病変が存在する症例が多いとされているが、肺動脈性肺高血圧症との鑑別が重要となってくる。我々は、血管内イメージングの一つである光干渉断層像 (Optical coherence tomography: OCT) を用いて、肺高血圧症 (Pulmonary hypertension: PH) の肺動脈内の観察を行ってきた。肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary arterial hypertension: PAH) 例とコントロールに比較し、CTEPH では壁在血栓、メッシュ様所見をすべての観察血管で確認でき、OCT は PH の鑑別に有用な詳細な所見を得られることが分かった<sup>1-3)</sup>。また、CTEPH では区域性の血流欠損を肺換気血流シンチのミスマッチにより評価することが診断において重要であるが、近年では、Dual-energy CT を用いて、肺動脈の三次元構築だけでなく、肺野の血流評価も同時に行うことが可能となった。CTEPH 患者 48 人における検討では、

肺野還流血流量は、平均肺動脈圧や肺血管抵抗と相関を示し、CTEPH の重症度を評価できることを報告した<sup>4)</sup>。

## CTEPH の病態・リスク因子

我が国における特定疾患 CTEPH 治療給付対象者は、推移をみると増加が認められており、平成 28 年度の指定難病患者数は 3,200 人まで増えている。女性の頻度が多いのが我が国の特徴であるが、欧米の大規模レジストリーでは性差を認めないことから、欧米との患者背景に差がある可能性が推察される。急性肺血栓塞栓症からの CTEPH への移行が主な病態であると考えられてきたが、静脈血栓症の一般的なリスクファクターを認めない症例も多く、CTEPH 患者において急性肺血栓症の既往を認めない割合が 25%~75% との報告もあり、肺塞栓や下肢深部静脈血栓症に単純に続発する疾患ではないことが推定されている。我々の研究では、血小板の活性化や統合失調症患者における使用薬剤が CTEPH の発症に関与している可能性が示唆された<sup>5,6)</sup>。また、Thrombin activated fibrinolysis inhibitor (TAFI) はフィブリン塊上のリジン残基を切除し、フィブリンを線溶系に対して安定化させる作用を持つが、CTEPH 患者ではその抗原量が高く、CTEPH 患者の線溶系抵抗性に TAFI が関与していることを示した<sup>7)</sup>。これは CTEPH の病態に線溶抵抗性が関与していることを示していると考えられる。以上のように、静脈血栓症に何らかの因子が加わることで CTEPH が発症すると考えられるが、いまだ明確な機序が明らかにされていないのが現状である。

## CTEPH の従来の治療法

外科的治療法である PEA は、経験の多い施設での院内死亡は 5% 以下と報告されており、また、長期の成績も良好であることが知られているため、現時点での第一選択の治療法となっている<sup>8)</sup>。形態学的には、肺葉動脈から区域動脈に病変がある中枢型が PEA の

よい適応と考えられるが、実際には国際レジストリーによると約 1/3 以上の患者が手術非適応と診断されている<sup>9)</sup>。そして PEA の非適応例とされた患者の予後は決して満足できるものではないことも報告されている。これまでは外科的な治療が選択できない症例に対し、PAH に使用される PGI<sub>2</sub> 製剤、PDE-5 阻害薬、エンドセリン受容体拮抗薬の off label で投与されてきた。その後、2013 年に発表された CHSET-1 試験において、新規の肺血管拡張薬である可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激薬リオシグアトの有効性が世界で初めて

報告された<sup>10)</sup>。この研究では、リオシグアトはプラセボに比し、平均肺動脈圧を 5 mmHg 低下させ、6 分間歩行距離を 46 m 延長し、自覚症状も有意に改善していた。この研究は CTEPH に対する薬物治療の有効性を証明した最初の研究であり、本症に対する肺血管拡張薬は、リオシグアトのみが世界的にも認められる肺血管拡張薬となっている。しかし、PEA に比較し、その成績は決して満足できるものではない。

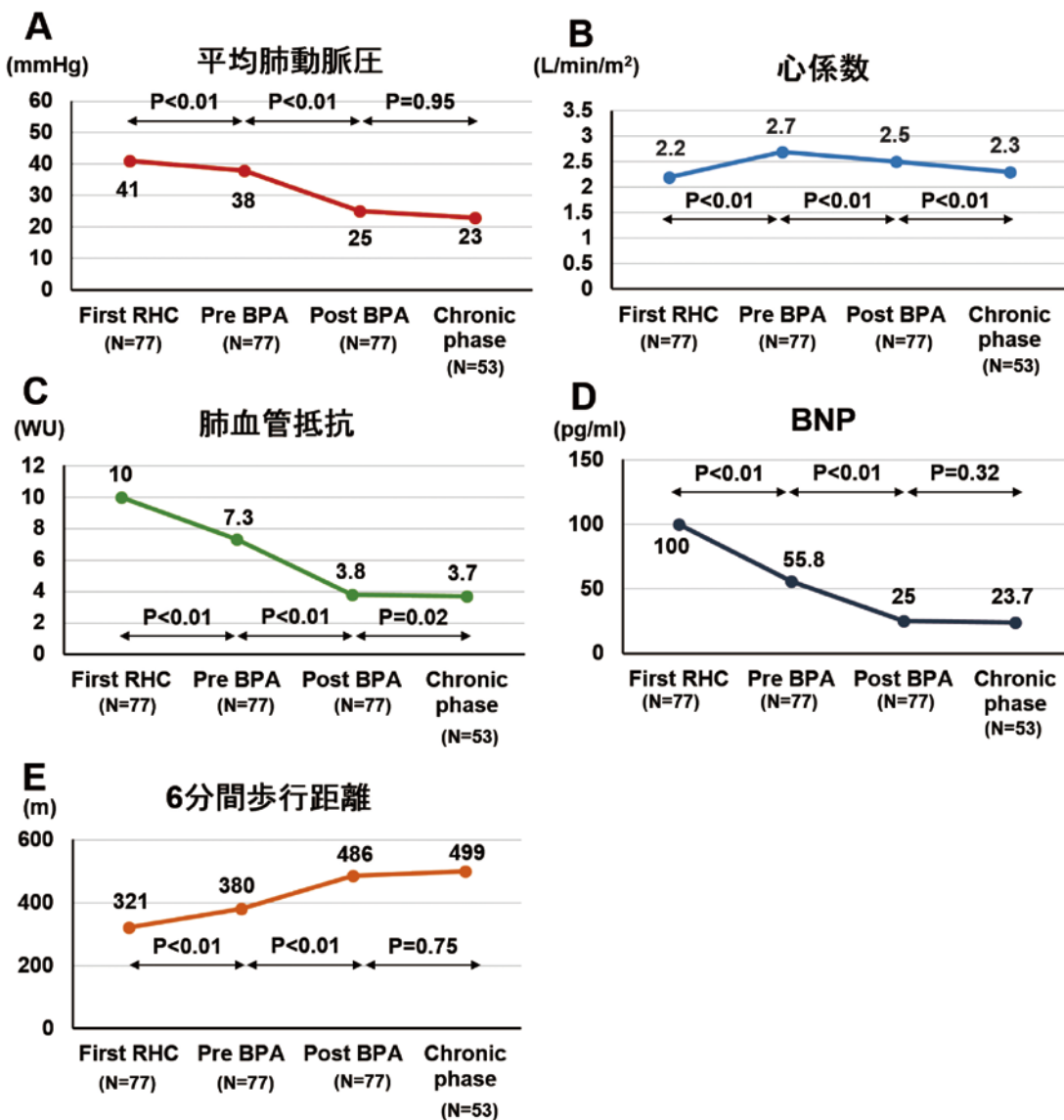


図. BPA による長期成績<sup>17)</sup>

### CTEPH におけるバルーン肺動脈形成術

近年、手術が困難な患者に対してバルーン肺動脈形成術 (Balloon pulmonary angioplasty: BPA) の成績が日本を中心に報告されている。2001 年に Feintein らが 18 名に対して行ったカテーテル治療の成績を報告しているが、血行動態的な改善は認められるものの、61% に肺水腫を認め、1 人の患者は周術期に死亡している<sup>11)</sup>。効果と合併症のバランスの問題から、欧米ではこれ以降、この治療法は広がりを見せていなかったが、我々は 2009 年より BPA を開始し、12 名の CTEPH に対する 1 年生存率 100% という初期成績を報告した<sup>12)</sup>。また以下の BPA による効果を報告してきた: 1) 血流を可視化する 4D-Flow MRI では、BPA 施行前後で肺動脈主管部における血流の停滞が改善する<sup>13)</sup>。2) BPA は血行動態の改善に伴い、糖代謝、腎機能、血管機能、栄養状態が改善する<sup>14)</sup>。3) BPA 施行後は酸素化が改善し、在宅酸素療法施行率も減り、その酸素化の改善は肺内シャントの改善によるものであり、平均肺動脈圧の低下と相関する<sup>15)</sup>。4) BPA により右心機能は改善し、また心室中隔壁の形態変化により左心機能も改善する<sup>16)</sup>。その後も各国より初期成績が報告されたが、長期成績の報告がなされていなかったため、2009 年 7 月から 2016 年 10 月までの間に初回の BPA を施行した 84 名のうち治療が完了した 77 例を対象に、長期の治療効果を評価した。BPA を行った結果、平均肺動脈圧は  $38 \pm 10$  mmHg から  $25 \pm 6$  mmHg に、6 分間歩行距離は  $380 \pm 138$  m から  $486 \pm 112$  m にそれぞれ改善した (図)。また、これらの改善は慢性期においても持続していた (追跡期間  $43 \pm 27$  ヶ月)。合併症については 84 例 (424 セッション) 中、血痰を 14% (60 セッション) で認め、マスク式の人工呼吸器は 8% (33 セッション) で施行され、経口挿管による人工呼吸器管理を必要としたのは 0.2% (1 セッションのみ) であり、手技に関連した死亡は認めなかった。さらに、初回 BPA 施行後の 5 年生存率は 98.4% ( $N=77$ ) であり、肺動脈バルーン形成術が施行可能となる以前の患者 (未施行群) の 5 年生存率 (77.5%) と比較すると、肺動脈バルーン形成術が有意に予後を改善していることが明らかになった<sup>17)</sup>。

### おわりに

これまで取り組んできた BPA は新たな CTEPH の治療となりえる可能性を秘めている。この手技の確立

により外科的治療が受けられず、予後不良とされていた患者の QOL ばかりでなく予後も改善することを示すことができた。しかし、BPA は、非常に有効な治療であることと同時に、合併症での死亡例も報告されていることから、やはり、慎重に安全な手技を心がける必要がある。末筆となるが、平素よりご指導頂いている循環器内科学分野の下川宏明教授をはじめ、共に診療と研究に携わってきた循環グループの先生方、放射線診断科の高瀬圭教授、大田英揮先生に最大限の感謝の意を表したい。今回の医学部奨学賞受賞にあたり、選考の労をお取り頂いた先生方に厚く御礼を申し上げます。

### 文 献

- 1) Tatebe, S., Fukumoto, Y., Sugimura, K., et al. (2013) Optical coherence tomography is superior to intravascular ultrasound for diagnosis of distal-type chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ. J.*, **77**, 1081-1083.
- 2) Sugimura, K., Fukumoto, Y., Miura, Y., et al. (2013) Three-dimensional-optical coherence tomography imaging of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur. Heart J.*, **34**, 2121.
- 3) Dai, Z., Sugimura, K., Fukumoto, Y., et al. (2014) Visualization of complete regression of pulmonary arterial remodeling on optical coherence tomography in a patient with pulmonary arterial hypertension. *Circ. J.*, **78**, 2771-2773.
- 4) Takagi, H., Ota, H., Sugimura, K., et al. (2016) Dual-energy CT to estimate clinical severity of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: Comparison with invasive right heart catheterization. *Eur. J. Radiol.*, **5**, 1574-1580.
- 5) Yaoita, N., Shirakawa, R., Fukumoto, Y., et al. (2014) Platelets are highly activated in patients of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **34**, 2486-2494.
- 6) Suzuki, H., Sugimura, K., Tatebe, S., et al. (2016) Chronic thromboembolic pulmonary hypertension and schizophrenia. *Int. J. Cardiol.*, **207**, 363-364.
- 7) Yaoita, N., Satoh, K., Satoh, T., et al. (2016) Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **36**, 1293-301.
- 8) Jamieson, S.W., Kapelanski, D.P., Sakakibara, N., et al. (2003) Pulmonary endarterectomy: experience and lessons learned in 1,500 cases. *Ann. Thorac. Surg.*, **76**, 1457-1462.
- 9) Pepke-Zaba, J., Delcroix, M., Lang, I., et al. (2001) Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): results from an international prospective

- registry. *Circulation*, **124**(18), 1973-1981.
- 10) Ghofrani, H.A., D'Armini, A.M., Grimminger, F., et al. (2013) Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.*, **369**, 319-329.
  - 11) Feinstein, J.A., Goldhaber, S.Z., Lock, J.E., et al. (2011) Balloon pulmonary angioplasty for treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation*, **103**, 10-13.
  - 12) Sugimura, K., Fukumoto, Y., Satoh, K., et al. (2012) Percutaneous transluminal pulmonary angioplasty markedly improves pulmonary hemodynamics and long-term prognosis in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ. J.*, **76**, 485-488.
  - 13) Ota, H., Sugimura, K., Miura, M., et al. (2015) Four-dimensional flow magnetic resonance imaging visualizes drastic change in vortex flow in the main pulmonary artery after percutaneous transluminal pulmonary angioplasty in a patient with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur. Heart J.*, **36**, 1630.
  - 14) Tatebe, S., Sugimura, K., Aoki, T., et al. (2016) Multiple beneficial effects of balloon pulmonary angioplasty in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ. J.*, **80**, 980-988.
  - 15) Aoki, T., Sugimura, K., Nochioka, K., et al. (2016) Effects of balloon pulmonary angioplasty on oxygenation in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension—Importance of intra-pulmonary shunt—. *Circ. J.*, **80**, 2227-2234.
  - 16) Sato, H., Ota, H., Sugimura, K., et al. (2016) Balloon pulmonary angioplasty improves biventricular functions and pulmonary flow in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ. J.*, **80**, 1470-1477.
  - 17) Aoki, T., Sugimura, K., Tatebe, S., et al. (2017) Comprehensive evaluation of the effectiveness and safety of balloon pulmonary angioplasty for inoperable chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension : long-term effects and procedure-related complications. *Eur. Heart J.*, **38**, 3152-3159.

## 脂肪肝における胆石形成メカニズムの発見

浅井 洋一郎

東北大学病院 糖尿病代謝科



### はじめに

非常に有病率の高い胆石症は、胆嚢炎・胆管炎・膵炎・胆嚢癌などの原因となる消化器疾患としてのみならず、近年は肥満/メタボリックシンドロームや2型糖尿病に合併しやすい代謝疾患としても認識されてきている。とりわけ、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD; non-alcoholic fatty liver disease) においては、胆石症の合併率が高い事が疫学的に知られていたが、その機序はこれまで十分に明らかとされていなかった。今回、脂肪肝に伴う肝臓の低酸素が胆石形成に重要である事がわかり、その研究内容について紹介する。

### 脂肪肝と肝臓内低酸素応答

肝小葉内において、血液は門脈領域より灌流され、中心静脈領域へ向かって類洞を通過し、中心静脈より流出する。それに伴って、組織中の酸素分圧は門脈域から中心静脈域へ徐々に低下し、酸素勾配が形成される。比較的低酸素である中心静脈領域では、生体の低酸素応答において中心的な役割を果たす転写因子である低酸素誘導因子 Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) が発現している。脂肪肝においては、脂肪の蓄積による肝細胞の肥大化に伴って類洞が狭小化し、肝組織内の血流が低下する事で、低酸素領域が拡大し HIF-1 $\alpha$  が更に活性化する事が知られている。今回、下記の研究により、脂肪肝に伴う HIF-1 $\alpha$  活性化が胆石症の形成に重要な因子である事が明らかとなった<sup>1)</sup>。

### 肝臓 HIF-1 $\alpha$ が胆石形成に重要

高コレステロール/コール酸含有の食餌負荷を行ったマウスにおいて、肝臓内低酸素/HIF-1 $\alpha$  活性化を伴う脂肪肝が誘導され、同時にコレステロール胆石が形

成された。一方、Cre/loxP システムを用いて肝細胞選択的な HIF-1 $\alpha$  の誘導性ノックアウト (iH-HIFKO; inducible hepatocyte-selective HIF-1 $\alpha$  knockout) を行ったマウスにおいては、コレステロール胆石の形成が著明に抑制される事がわかった (図1)。この事から、脂肪肝における胆石形成においては、肝臓の HIF-1 $\alpha$  が重要である事が示された。iH-HIFKO マウスの胆汁を解析したところ、胆汁脂質である、コレステロール、胆汁酸、リン脂質の濃度がいずれも低値であり、その総和である総脂質濃度が有意に低い事がわかった (図2)。脂質濃度の高い胆汁では胆石形成が促進される事が知られており<sup>2,3)</sup>、iH-HIFKO マウスにおける胆汁脂質濃度の低下が、胆石症の抑制された原因と考えられた。

### HIF-1 $\alpha$ は肝細胞から胆汁への水排出を抑制

次に iH-HIFKO マウスにおいて胆汁脂質濃度が低下した機序を検討した。肝細胞から毛細胆管腔への胆汁脂質排出を担う各輸送体の発現を解析したところ、肝臓における各輸送体の発現は、iH-HIFKO マウスと対照群で全く同等であった。そこで、脂質濃度の低下は胆汁における溶質である脂質よりも、溶媒である水の量が増加したのではないかと考え、細胞膜の水チャネルであるアクアポリン (AQP: aquaporin) の解析を行った。肝細胞から胆管腔への水の排出は AQP8 が担っており、肝臓の AQP8 を解析したところ、iH-HIFKO マウスで発現が亢進していた (図3)。実際に胆汁流量を測定したところ、iH-HIFKO マウスでは胆汁流量が有意に増加している事がわかり、また、単離した初代培養肝細胞からの胆汁産生も亢進している事が観察された (図3)。これらの事から、肝臓 HIF-1 $\alpha$  のノックアウトによって肝臓 AQP8 の発現が亢進し、肝細胞から胆汁への水排出が亢進した結果、胆汁が水で希釈され、胆汁脂質濃度が低下する事により、胆石形成が抑制される事が考えられた。また、マウス培養肝細胞を用いた in vitro 実験において、HIF-1 $\alpha$  自体が細胞自律的に AQP8 の発現を抑制している事も明らか

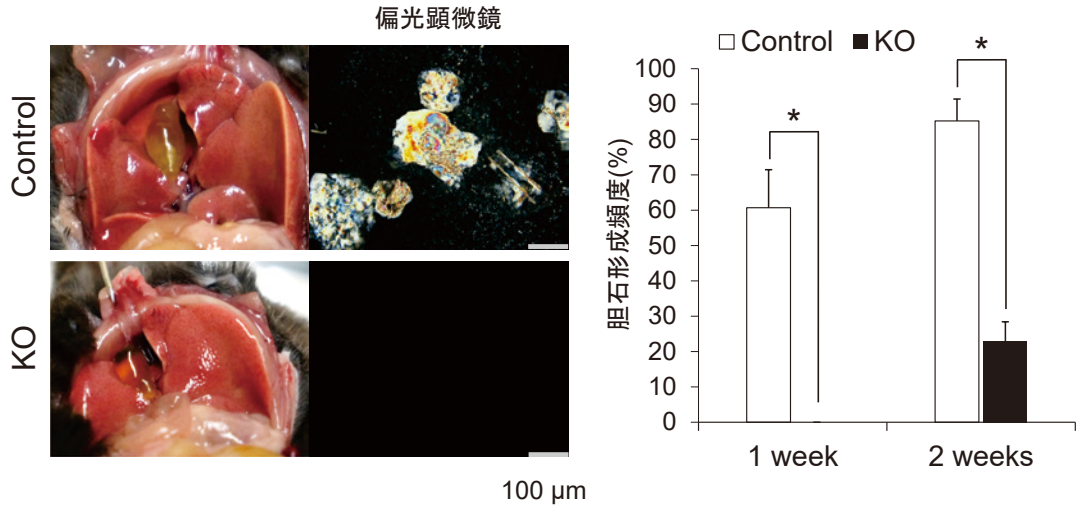


図 1. 肝臓 HIF-1 $\alpha$ KO による胆石抑制 (文献 1 より)

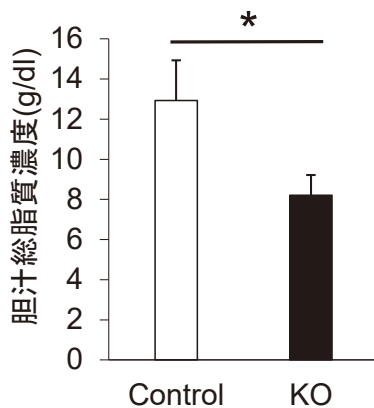


図 2. 肝臓 HIF-1 $\alpha$ KO における胆汁総脂質濃度の低下 (文献 1 より)

となった。以上の実験により、脂肪肝においては、活性化した HIF-1 $\alpha$  が AQP8 を抑制する事により、肝臓から胆汁への水排出を抑制し、胆汁が濃くなる事によって胆石形成が促進される機序が明らかとなった。

### 胆石合併 NAFLD 患者では肝臓 HIF-1 $\alpha$ が亢進

さらに、マウスを用いた実験でわかった肝臓 HIF-1 $\alpha$  と胆石症との関連がヒトにおいても認められるか検討を行った。NAFLD 患者より採取した肝生検サンプルを用いて、肝臓の遺伝子発現と胆石症の合併について解析を行った。その結果、胆石を合併する群では、胆石を有しない群と比較し、肝臓の HIF-1 $\alpha$  と

その下流遺伝子の発現が有意に亢進していた (図 4)。このことから、ヒトにおいても脂肪肝に伴う胆石症に HIF-1 $\alpha$  活性化が寄与している可能性が示唆された。

### 考 察

脂肪肝における胆石形成に HIF-1 $\alpha$  が AQP8 を抑制する機序が重要である事が明らかとなった (図 5)。本機構の生理学的な意義として、脂肪肝に伴う局所の血流低下に対して、肝細胞の HIF-1 $\alpha$  が水の出口である AQP8 を抑制し、胆汁への水排出を減少させる事で、細胞内水分量を維持する様な防御機構の存在が推測された。しかしながら皮肉にも、HIF-1 $\alpha$  の防御機構の結果、脂肪肝においては胆汁が濃縮され、胆石形成への感受性が高まる事が推測された。

### おわりに

脂肪肝に伴う胆石症の発症機序において、肝臓の低酸素応答とそれによりもたらされる細胞内外の水の移動が重要である事が明らかとなった。今後、このメカニズムへ介入する事が胆石症に対する新たな予防・治療戦略の開発につながる事が期待される。

最後に、東北大学医学部奨学賞という伝統ある賞を受賞出来ました事を大変光栄に思うと共に、本研究を行うにあたり多大なご指導を頂きました片桐秀樹教授、山田哲也准教授、並びに教室員各位に心より感謝を申し上げます。また、ヒト肝生検サンプルの解析は、

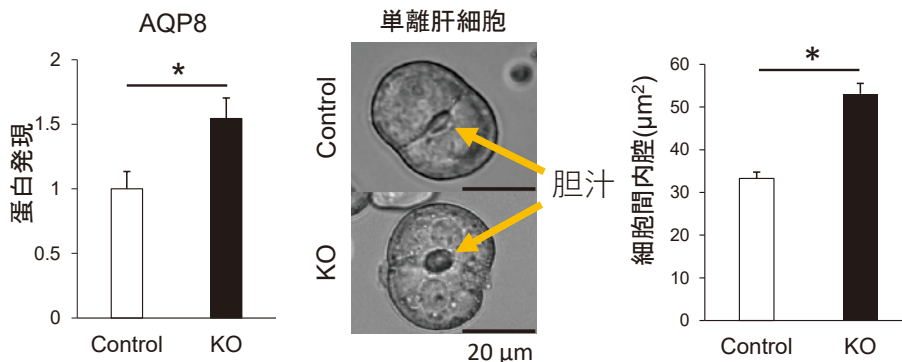


図 3. 肝臓アクアポリン 8 の発現と胆汁産生 (文献 1 より)

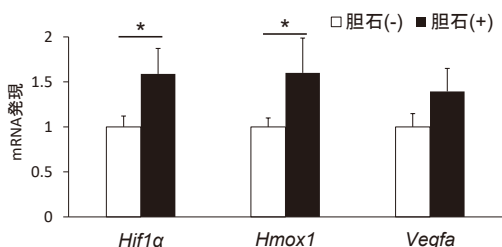


図 4. NAFLD 症例における肝臓の遺伝子発現 (文献 1 より)

東北大学大学院医学系研究科消化器病態学分野 (下瀬川徹教授), 山形大学医学部内科学第二 (消化器内科学) 講座 (上野義之教授) の先生方に, 胆汁酸の LC/MS を用いた解析を東北大学病院薬剤部 (眞野成康教授), 胆汁・胆石の解析を東北大学大学院医学系研究科病理診断学分野 (笹野公伸教授), 胆汁分泌の解析を東北大学加齢医学研究所分子腫瘍学研究分野 (田中耕三教授) の先生方にご協力を頂きました事を, 厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Asai, Y., et al. (2017) Activation of the Hypoxia Inducible Factor 1alpha Subunit Pathway in Steatotic Liver Contributes to Formation of Cholesterol Gallstones. *Gastroenterology*, **152**, 1521-1535 e1528.
- 2) Matsumoto, K., et al. (2014) Claudin 2 deficiency reduces bile flow and increases susceptibility to cholesterol gallstone disease in mice. *Gastroenterology*, **147**, 1134-1145 e1110.
- 3) van Erpecum, K.J., van Berge Henegouwen, G.P., Stoelwinder, B., et al. (1990) Bile concentration is a key factor for nucleation of cholesterol crystals and cholesterol saturation in gallbladder bile of gallstone patients. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **11**, 1-6.

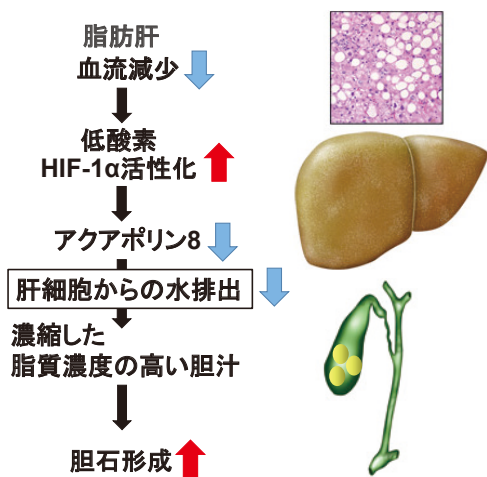


図 5. 脂肪肝に伴う胆石形成メカニズム (文献 1 より)



## ヒト胎盤幹細胞の樹立

岡 江 寛 明

東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野



### はじめに

胎盤は母体と胎児をつなぐ重要な器官であり、胎児の呼吸器・消化器・内分泌器として働くとともに、母体の免疫系から胎児を守る役割を担う。胎盤の主要な構成細胞は栄養膜細胞と呼ばれ、栄養膜幹 (TS) 細胞より発生する。マウスにおいて TS 細胞の培養技術が確立されて 20 年近く経つが<sup>1)</sup>、これまでヒト TS 細胞の樹立に成功したという報告はなかった。

### 栄養膜細胞の増殖を制御するシグナルの同定

ヒトの胎盤を構成する栄養膜細胞は、細胞性 (CT)・絨毛外性 (EVT)・合胞体性 (SynT) の 3 種類に大別される (図 1)。CT 細胞は高い増殖能力を持ち、幹細胞もしくは前駆細胞を含む細胞集団であると考えられている。EVT 細胞は子宮内膜へと浸潤し、らせん動脈を再構築することで、母体の血流を制御する働きを持つ。SynT 細胞は CT 細胞が融合することによってつくられる多核の細胞で、胎児血と母体血の間の栄養・ガス交換や、ホルモン産生に働く。

CT 細胞は生体内では高い増殖能力を持つものの、試験管内で維持することはできなかった。我々は、CT 細胞の増殖制御機構を理解するため、ヒト胎盤より 3 種類の栄養膜細胞を単離し、RNA-seq 解析を行った (図 2)。CT 細胞特異的に発現する遺伝子を抽出してパスウェイ解析を行ったところ、Wnt シグナルと EGF シグナルが活性化されている可能性を突き止めた。

### ヒト TS 細胞の樹立

パスウェイ解析の結果をもとに、Wnt 活性化剤である CHIR99021 と EGF の存在下で CT 細胞を培養したが、細胞増殖はほとんど見られなかった。そこで、体

性幹細胞の増殖を促進することが知られている因子を、様々な組み合わせで培養液に添加した。その結果、CHIR99021 と EGF に加え、TGF- $\beta$  阻害剤・ROCK 阻害剤・HDAC 阻害剤を用いることで、CT 細胞を 5 ヶ月以上の長期に渡って培養することに成功した。得られた細胞株は、栄養膜細胞特異的のマーカーである KRT7 や GATA3 を高発現していた。

CT 細胞を含む全ての栄養膜細胞は、胚盤胞期の栄養外胚葉に由来する。そこで、ヒト胚盤胞から CT 細胞株に似た細胞株が樹立可能かどうかを検討した。16 個の胚盤胞を培養したところ、CT 細胞株に類似した細胞株を 8 系統樹立することに成功した。RNA-seq 解析の結果、これらの細胞株は CT 細胞株とほぼ同じ遺伝子発現パターンを持つことが明らかとなった。以下に示すように、CT 細胞株および胚盤胞由来の細胞株は多分化能を持つことから、我々はこれらの細胞株をヒト TS 細胞と名付けた。

### ヒト TS 細胞の分化能

我々はヒト TS 細胞の樹立を行う過程で、TGF- $\beta$  阻害剤が EVT 細胞への分化を促進することを見出した。また、ヒト胎盤絨毛を用いた過去の研究から、NRG1 とマトリゲルが EVT 細胞への分化を促進することが知られていた<sup>2,3)</sup>。そこで、ヒト TS 細胞を TGF- $\beta$  阻害剤・NRG1・マトリゲルの存在下で培養したところ、紡錘形の EVT 様細胞へと分化することを見出した。この細胞は遊走能を持ち、EVT 細胞特異的のマーカーである HLA-G を高発現していた。さらに、RNA-seq 解析により、生体の EVT 細胞とよく似た遺伝子発現パターンを持つことを確認した (図 2)。

SynT 細胞への分化には cAMP が重要な働きを担うことが、ヒト絨毛癌細胞株を用いた研究から明らかとなっていた<sup>4)</sup>。そこで、細胞内の cAMP 濃度を上昇させる作用を持つフォルスコリンでヒト TS 細胞を処理したところ、細胞融合が起こり、SynT 様細胞へと分化することを見出した。さらに、SynT 様細胞は生体の SynT 細胞とよく似た遺伝子発現パターンを持つこ

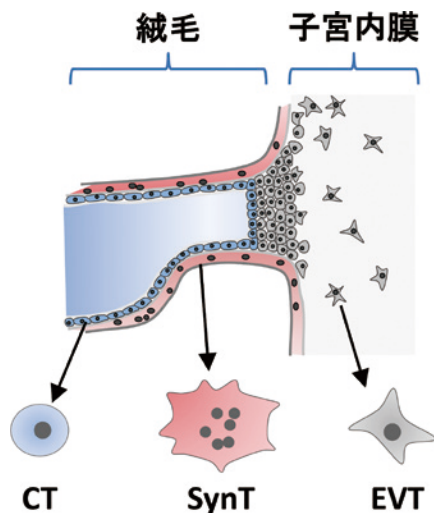


図 1. ヒト胎盤の構造

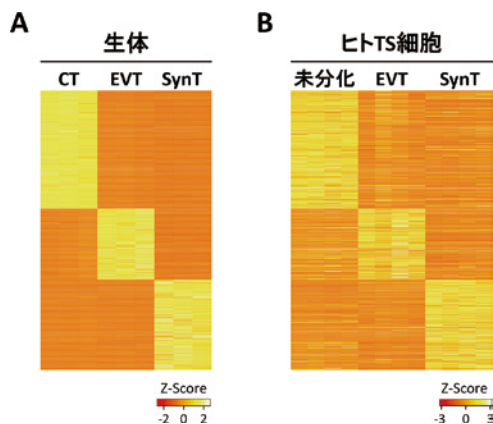


図 2. ヒト TS 細胞の遺伝子発現解析

(A) 生体より単離した栄養膜細胞の RNA-seq 解析。CT, EVT, SynT 特異的に発現する遺伝子を抽出した。  
(B) 分化誘導前後のヒト TS 細胞の RNA-seq 解析。図 A と同じ遺伝子を示す。

とを、RNA-seq 解析を用いて確認した (図 2)。

### 免疫不全マウスを用いたヒト TS 細胞の機能解析

ヒト TS 細胞の生体内での機能を解析するため、NOD-SCID マウスの皮下への移植実験を行った。移植した細胞は皮下組織および真皮へと浸潤し、辺縁部の細胞の一部は EVT 様細胞や SynT 様細胞へと分化した。また、ヒト TS 細胞を移植したマウスの血液中

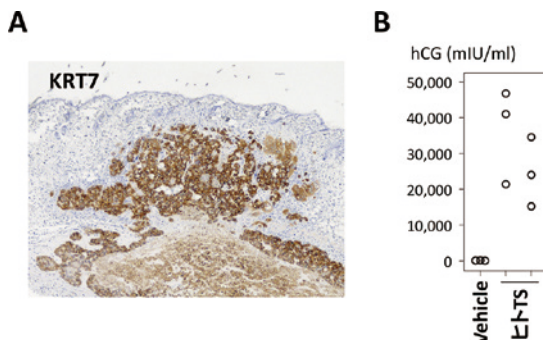


図 3. ヒト TS 細胞の NOD-SCID マウスへの移植  
(A) 栄養膜細胞特異的のマーカである KRT7 の免疫染色。  
(B) ヒト TS 細胞を移植したマウスの血中における hCG 濃度。

には、多量のヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) が認められた (図 3)。以上の結果から、本実験系を用いることで、着床現象の一部を再現できることが明らかとなった。

### おわりに

ヒト TS 細胞は胎盤の発生および機能を研究するうえで優れたモデルとなるとともに、流早産や妊娠高血圧症候群など、胎盤の形成不全によって引き起こされる様々な疾患の病態解明や治療法開発に役立つと期待される。最後に、本研究を行うにあたりご指導頂きました有馬隆博教授はじめ、情報遺伝学分野の皆様へ感謝申し上げます。

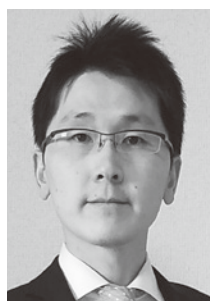
### 文 献

- 1) Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A.K., et al. (1998) Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*, **282**, 2072-2075.
- 2) Miller, R.K., Genbacev, O., Turner, M.A., et al. (2005) Human placental explants in culture: approaches and assessments. *Placenta*, **26**, 439-448.
- 3) Fock, V., Plessl, K., Draxler, P., et al. (2015) Neuregulin-1-mediated ErbB2-ErbB3 signalling protects human trophoblasts against apoptosis to preserve differentiation. *Journal of Cell Science*, **128**, 4306-4316.
- 4) Strauss, J.F., 3rd, Kido, S., Sayegh, R., et al. (1992) The cAMP signalling system and human trophoblast function. *Placenta*, **13**, 389-403.

## 腸腎連関に基づく慢性腎臓病の病態解明と新規治療法の開発

三 島 英 換

東北大学病院 腎・高血圧・内分泌科



### はじめに

慢性腎臓病 (Chronic kidney disease, CKD) は糖尿病や高血圧などを原因として慢性に腎機能が徐々に低下していく進行性疾患であり、いまや我が国の成人の 8 人に 1 人が発症する国民病でもある。CKD の進行は透析が必要となる末期腎不全に陥るのみならず心血管死も増加する。そのため CKD 病態の進行抑制は健康維持の観点から重要であるにも関わらず、現状では特異的治療薬は乏しく進行を完全に止めることはできない。この CKD 治療における unmet medical needs を打破すべく未だ明らかでない側面から CKD の病態解明を行うことで進行を抑制する治療法の創出が渴望されている。

近年、腸内細菌叢は腸疾患のみならず肥満、糖尿病や発癌など様々な全身疾患と深く関与することが分かってきている。CKD の病態においても腸内細菌叢や腸内環境は大きく変化していることが報告されている。この CKD における腸管及び腸内細菌叢の様々な変化や悪化は慢性炎症や尿毒素蓄積、免疫制御などの機序を介して CKD の病態に影響を及ぼしているという「腸腎連関」の連関が注目されている<sup>1)</sup> (図 1)。これまで我々はこの「腸腎連関」のアプローチから CKD の病態解明、新規治療薬の開発について研究を行い以下の成果を挙げた。

### CKD 病態における腸内細菌叢の関与： 無菌腎不全マウスの解析から

CKD 時には本来尿中へと排泄すべき種々の代謝物が体内や血中に蓄積する。これらの腎機能低下時の蓄積物質の内、毒性を発揮するものを尿毒素と呼ぶ。尿毒素の蓄積は腎障害のさらなる進行を引き起こす悪循環を形成するとともに、心血管疾患、骨ミネラル代謝異常など種々の腎不全関連症状にも関与する。この尿

毒素の内インドキシル硫酸、p-クレシル硫酸、トリメチルアミン-N-oxide (TMAO) といった代表的尿毒素は腸内細菌代謝によって産生される代謝物であることが知られてきた。しかし多数ある尿毒素における腸内細菌叢の体系的関与は不明であった。そこで我々は、CKD の病態、特に CKD 時に体内に蓄積する種々の尿毒素物質の産生における腸内細菌叢の関与を同定するため、腸内細菌叢をもたない無菌の腎不全モデルマウスを作成し、腸内細菌叢を有する個体と比較を行った。マウスの血液、尿、糞便サンプルのメタボローム解析によって生体内代謝物を網羅的に解析した結果、CKD 時の体内代謝物は腸内細菌叢の有無で大きく異なっており、尿毒素物質においても既知の尿毒素以外にも多数の尿毒素が腸内細菌由来であることを同定した (図 2)。また、これまでも腸内細菌叢は尿毒素産生を介して CKD 進行に対して負に作用することは知られていたが、さらに本検討からは腸内細菌叢は短鎖脂肪酸産生やアミノ酸利用を介して腎保護的に作用しており、その結果、腸内細菌叢が消失した状態ではむしろ腎障害が悪化することを見出した。このように腸内細菌叢は CKD に対して正負両側面からその病態に関与しておりそのバランスが重要であることを明らかにした<sup>2)</sup>。

### 腸管に作用する薬剤による腎不全進行抑制効果

このように腸内細菌叢は CKD の病態に深く関与するため腸管への介入が CKD の治療法となる可能性がある。われわれは、腸管をターゲットした薬剤の腎障害抑制効果を探した結果、慢性便秘治療薬であるルビプロストン (商品名：アミティーザ<sup>®</sup>) が CKD で悪化した腸内環境を是正することで尿毒素の蓄積を軽減し CKD の進行を抑制しうることを腎不全マウスモデルを用いた研究から見出した (図 3)。この腸管の Cl<sup>-</sup>チャネルアクチベータでありルビプロストンは、腎不全病態において小腸での腸液分泌の促進、大腸の線維化の軽減、悪化した腸内細菌叢の是正 (特に *Lactobacillus* や *Prevotella* といった短鎖脂肪酸産生菌の

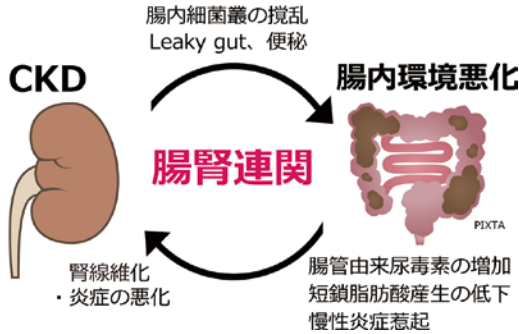


図 1. 慢性腎臓病 (CKD) における腸腎連関

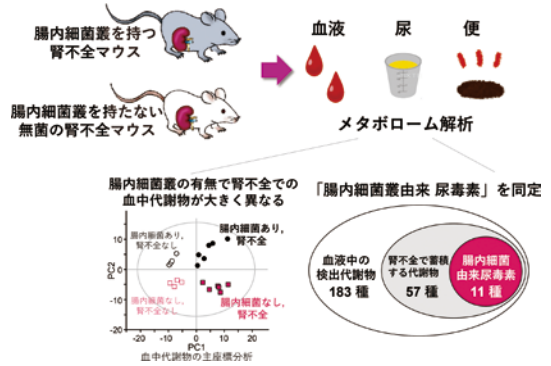
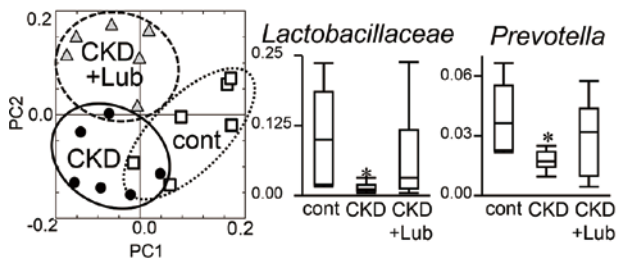
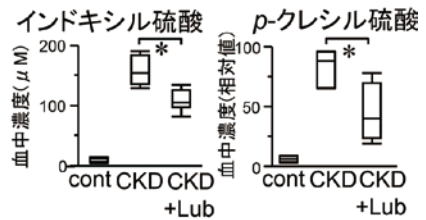


図 2. 無菌腎不全マウスを用いた代謝物解析

**A 腸内細菌叢の変化**



**B 尿素素の減少**



**C 腎障害の進行抑制**

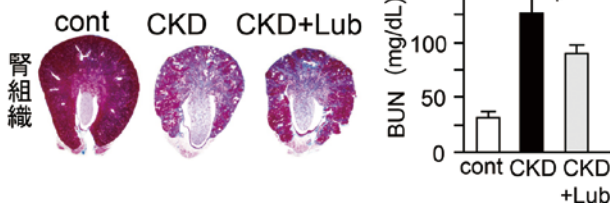


図 3. ルビプロストンの腸内環境改善を介した CKD 進行抑制効果  
 アデニン誘発腎不全マウスにルビプロストン (Lub) を投与した影響を検討  
 (文献 1 を元に作成)

増加) といった腸管作用を介して、腸内細菌由来尿素素の蓄積を軽減させ、その結果腎障害の進行抑制効果があることを示した<sup>3)</sup>。また、糖尿病治療薬である sodium glucose cotransporter (SGLT) 阻害薬の内、血糖降下作用を示す SGLT2 阻害能に加えて腸管に発現する SGLT1 の阻害能も有するカナグリフロジンは、CKD 時における腸内細菌叢を変化させ、腸内細菌由来尿素素を減少させるとともに、腸管内短鎖脂肪酸を増加させる作用があることを明らかにした<sup>4)</sup>。このように他疾患での既承認薬の腎保護効果を見出すことは CKD 治療薬へのドラッグリポジショニングが期待さ

れる。そのためルビプロストンの腎障害進行抑制効果を実際の CKD 患者でも検証し適応拡大のために、CKD 患者を対象にした多施設共同の医師主導治験を申請者らのグループの主導で現在進行中でもある (UMIN 試験 ID 000023850)。

今後の展望, 謝辞

本研究から CKD の病態には腸内細菌叢が深く関与していること、さらに腸管をターゲットした治療介入が CKD の治療法となりうることを見出した。今後は

腸腎連関の更なる解明を行うことで CKD の新たな治療法が創出されることが期待される。最後に今回、東北大学医学部奨学賞という栄えある賞を受賞できたことに対し、本研究を実施するにあたりご指導賜りました東北大学大学院医工学研究科の阿部高明教授、腎・高血圧・内分泌学分野の伊藤貞嘉教授をはじめ共同研究者の皆様に深い感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Vaziri, N.D., Wong, J., Pahl, M., et al. (2013) Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int.*, **83** (2), 308-315.
- 2) Mishima, E., Fukuda, S., Mukawa, C., et al. (2017) Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach. *Kidney Int.*, **92** (3), 634-645.
- 3) Mishima, E., Fukuda, S., Shima, H., et al. (2015) Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **26** (8), 1787-1794.
- 4) Mishima, E., Fukuda, S., Kanemitsu, Y., et al. (2017) Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota composition in a chronic kidney disease mouse model. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* ajrenal003142017.