

# 公益財団法人 寺岡記念育英会

## 2023 年度 研究活動費助成事業 研究活動報告書一覧

ミトコンドリアを標的とした糖尿病関連腎臓病の新規治療戦略 岡山大学 学術研究院医療開発領域 腎臓・糖尿病・内分泌内科 三瀬 広記	・・・ 1
重症自己炎症性疾患「VEXAS 症候群」モデルマウス作製とその病態解析 川崎医科大学 基礎医学 免疫学教室 坂本 祐真	・・・ 5
腫瘍微小環境に着目した ALK 融合遺伝子陽性肺癌の早期薬剤耐性機序の解明と根治戦略の開発 岡山大学病院 呼吸器・アレルギー内科 槇本 剛	・・・ 9
膵癌の発生起源に基づく癌関連線維芽細胞に着目した新規治療戦略の提唱 岡山大学病院 赤穂 宗一郎	・・・ 13
ヒトゲノム解析で明らかにする糖尿病リスクと個別化健康プログラムの開発 岡山大学学術研究院 医療開発領域 薬剤部 濱野 裕章	・・・ 17
選択的オートファジーである“リポファジー”が脂肪肝炎に与える影響 岡山大学学術研究院保健学域検査技術科学分野 細胞生理・免疫学講座 山元 修成	・・・ 22
前皮神経絞扼症候群の外科治療効果予測因子の探索研究 岡山大学学術研究院 医療開発領域 低侵襲治療センター 金谷 信彦	・・・ 27
ヒト吸血ダニにおける媒介感染症の発症リスク予測と AI によるダニ種鑑別カメラアプリの開発 岡山大学学術研究院 医歯薬学域 病原細菌学分野 福島 伸乃介	・・・ 30
最新鋭 X 線 CT 装置を用いた冠動脈プラークの石灰化解析手法の開発 岡山大学学術研究院保健学域放射線技術科学分野 浅原 孝	・・・ 33
IL-6 蛋白発現解析による特発性多中心性キャスルマン病 (iMCD) の治療予測指標の確立 岡山大学学術研究院保健学域 検査技術科学分野 分子血液病理学 錦織 亜沙美	・・・ 37

(表 題)

ミトコンドリアを標的とした糖尿病関連腎臓病の新規治療戦略

(所 属)

岡山大学 学術研究院医療開発領域 腎臓・糖尿病・内分泌内科 研究准教授

(氏 名)

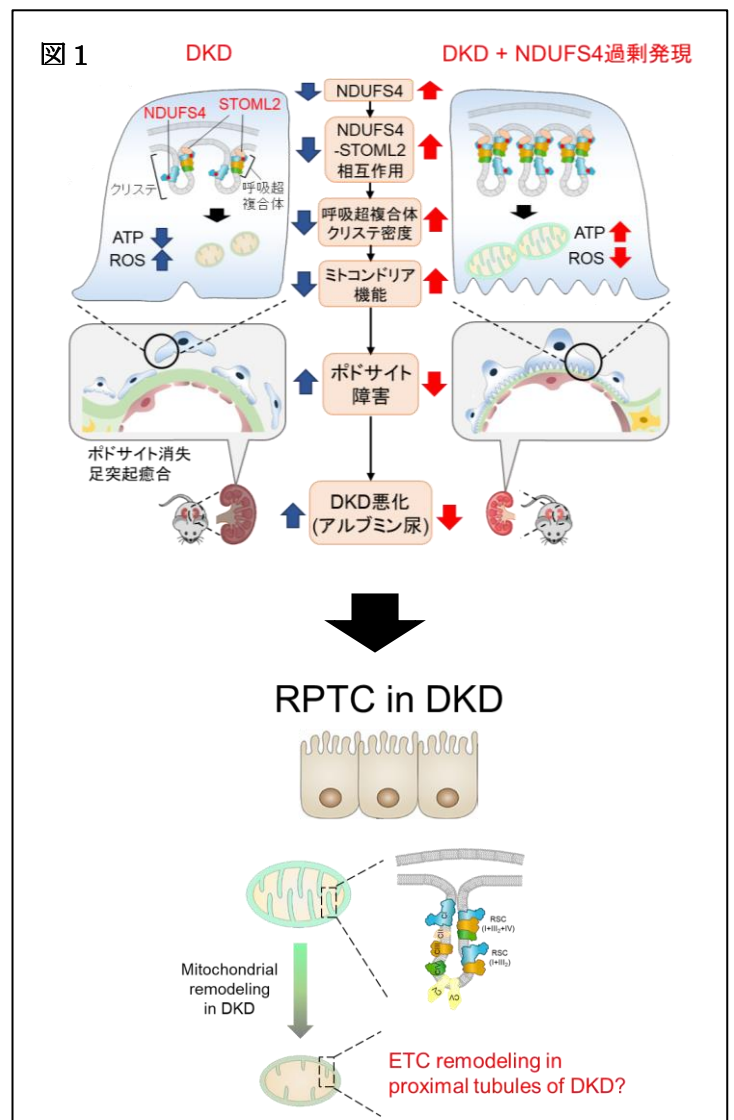
三瀬広記

(研究成果の概要)

DKD(糖尿病関連腎臓病)モデルマウスの近位尿細管ミトコンドリアにおける電子伝達系(ETC)リモデリングの評価を行った結果、呼吸鎖複合体 I (CI)の assembly 不全があることが示唆された。そして、DKD 近位尿細管ミトコンドリア最も低下していた *X* に注目し、ヒト DKD 腎組織を用いた *X* の尿細管での発現と間質の線維化や腎予後との関連を検証した。*X* の発現量の低下は尿細管間質線維化進展や腎予後に強く関連しており、新規治療標的になると考えられた。

(本文)

【背景】ミトコンドリアダイナミクスやマイトファジーに代表されるように、糖尿病関連腎臓病(DKD)進展におけるミトコンドリアの重要性に関する報告は近年増えてきているが、DKD における電子伝達系 (ETC)のリモデリングの実態やメカニズムは詳細に検討されておらず、また糸球体ポドサイトや近位尿細管といった細胞単位での検討も十分になされていなかった (Mise K et al, *Kidney360* 2020 ;1:982-992)。そこで、DKD モデルマウス (*Ins2<sup>Akita/+</sup>*)のポドサイトミトコンドリアにおける ETC の機能解析を行ったところ、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I (Complex I: CI)を構成するサブユニットのタンパク量や CI 活性が DKD ポドサイトで低下していることが分かった。さらに、DKD ポドサイトで低下していた CI サブユニットの NDUFS4 を、ポドサイト特異的に過剰発現するとクリステ構成タンパクの 1 つである STOML2 との相互作用を介して ETC リモデリングの改善が改善し、DKD 進展が抑制されることが分かった(図 1, Mise K et al, *Nat Commun.* 4;15:1965, 2024)。一方、DKD モデルマウス (*Ins2<sup>Akita/+</sup>* 及び *Lepr<sup>db/db</sup>*)やヒト DKD の尿細管における ETC リモデリングの詳細な検討はされておらず、解明の余地があった。



## 【目的】

本研究では、DKD 尿細管における Complex I を中心とした ETC リモデリングの動態を明らかにして、DKD における尿細管間質線維化に寄与する新規ターゲットを探索することを目的とする。また、同定されたターゲットのヒト DKD における臨床的意義についても評価することを目的としている。

## 【方法】

DKD マウスモデル(*Ins2<sup>Akita/+</sup>* 及び *Lepr<sup>db/db</sup>*)の近位尿細管ミトコンドリアを用いてプロテオーム解析や BN-PAGE による呼吸超複合体の評価を行った(図 2)。また、電子顕微鏡によって初代培養近位尿細管におけるミトコンドリアクリステの評価を行った(図 2)。これらの統合的解析によって、DKD 近位尿細管における ETC リモデリング機序を明らかにするとともに ETC リモデリングの原因因子を同定した。次に、腎生検で診断されたヒト DKD 腎組織を用いて免疫組織化学染色を行った。ヒト DKD 腎組織は図 3 に示す臨床研究(NexT-DN Retrospective Study)に参加している 2010 年 12 月から 2019 年までの DKD 患者 36 名とコントロールとしての腎移植ドナー 11 名のホルマリン固定パラフィン切片を用いて行った。尿細管における同定因子の発現量を解析することで、同定された因子が尿細管間質の線維化や腎予後に関連するかを検証した。

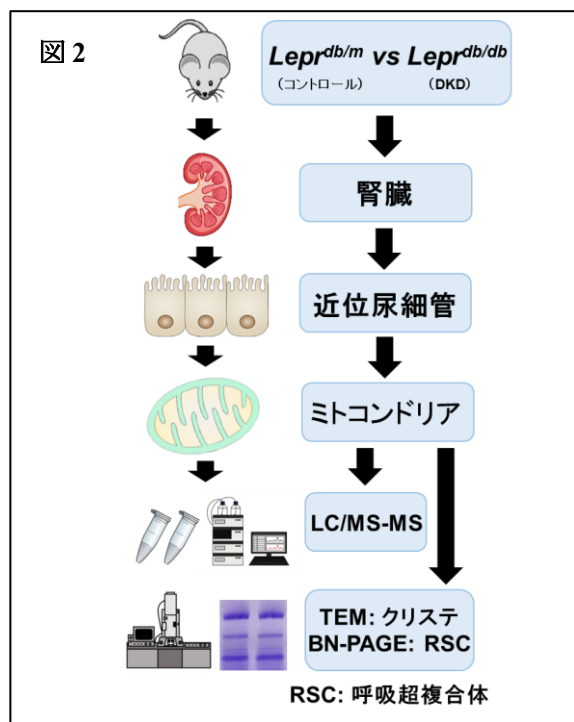
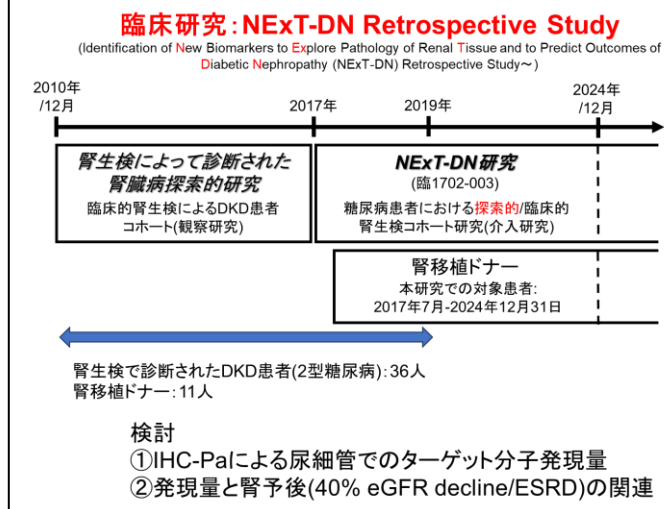


図 3



## 【結果】

肥満DKDモデルマウス(*Lepr<sup>db/db</sup>*:db/db)とコントロールマウス(*Lepr<sup>db/m</sup>*:db/m)から単離した近位尿細管ミトコンドリアにおけるプロテオーム解析の結果、糸球体ポドサイトと異なり、多くの CI subunit のタンパク量は DKD モデルマウスでコントロールマウスに比して軽度上昇していた(図 4)。一方で DKD モデルマウスの近位尿細管ミトコンドリアではコントロールに比して、CI 活性は低下しており(図 5)、尿細管中のクリステや呼吸超複合体(RSC)の密度が低下していた(図 6)。これらの結果から、CI subunit の assembly 不全が背景にあると考え、CI assembly factor に注目してみると、いくつかの CI assembly factor のタンパク発現量が DKD モデルマウスの近位尿細管で低下しており、その中でも最も低下していたのが Xであった(図 7)。

図 4: LC/MS-MS(プロテオーム解析)

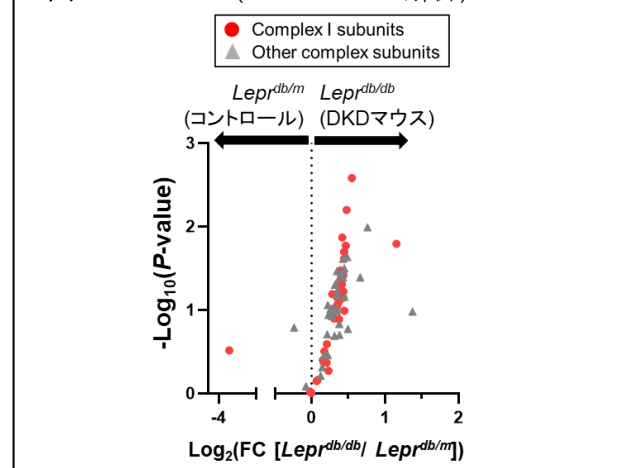


図5: CI 活性評価 (近位尿細管ミトコンドリア)

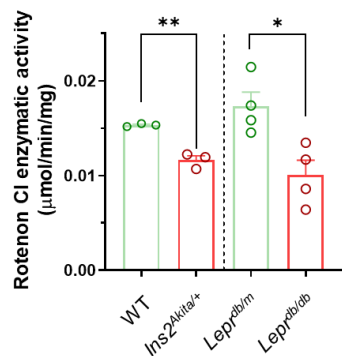
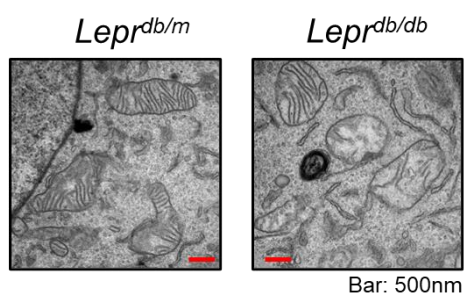
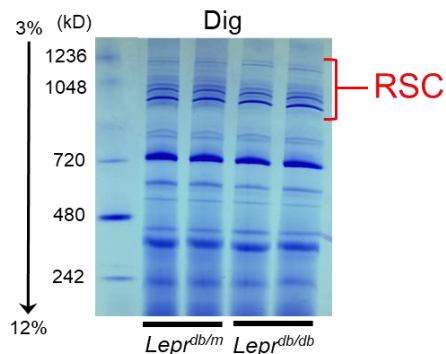


図6

クリステ評価(電子顕微鏡)



BN-PAGE



$X$  の mutation を持つ患者では、著明な CI 機能不全に伴うミトコンドリア機能異常を呈し、中枢神経障害、心筋障害、乳酸アシドーシス等、多彩な症状を伴う事が報告されていることが文献的に分かったが、ヒトにおける  $X$  の mutation に伴う腎障害の報告はなく、 $X$  の腎臓における役割や、発現部位に関しては不明であった。

そこで、公開データベース (図 8: <https://humphreyslab.com/SingleCell/>) を用いて、ヒト DKD 組織上の  $X$  遺伝子発現量を評価したところ、ヒト尿細管においても、 $X$  の遺伝子発現量は低下していることが分かった。

図8

ヒトDKD-scRNA seq データベース

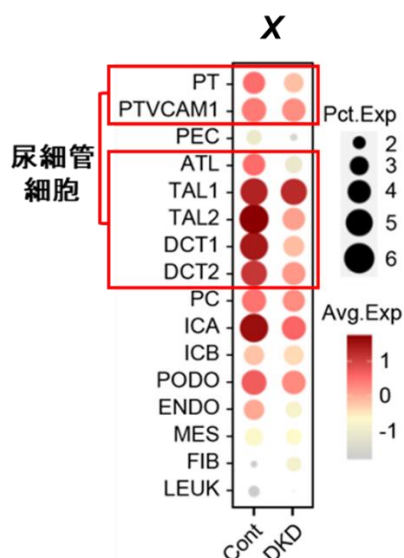
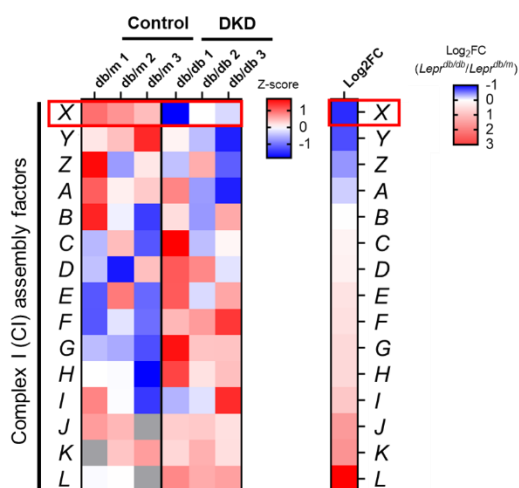


図7

LC/MS-MS (プロテオーム解析)



次に、図3に示した臨床研究の腎生検検体を用いてヒト DKD 尿細管における  $X$  の蛋白発現量を評価したところ、コントロール(腎移植ドナー)に比して DKD 尿細管では  $X$  の発現量は低下しており、間質の線維化・尿細管萎縮の重症度が上がるにつれて  $X$  発現量は低下していることが分かった(図9左)。さらに DKD 尿細管における  $X$  の発現量は腎予後(40% eGFR decline or 末期腎不全)に強く関連していることが分かった(図9右)。

以上の結果より、 $X$  は DKD における尿細管間質病変進展に寄与する重要な分子であることが示唆された。

## 【今後の展望】

今後は、*X* の過剰発現による DKD 進展抑制効果を検証するような実験系で研究を進めていく予定である。

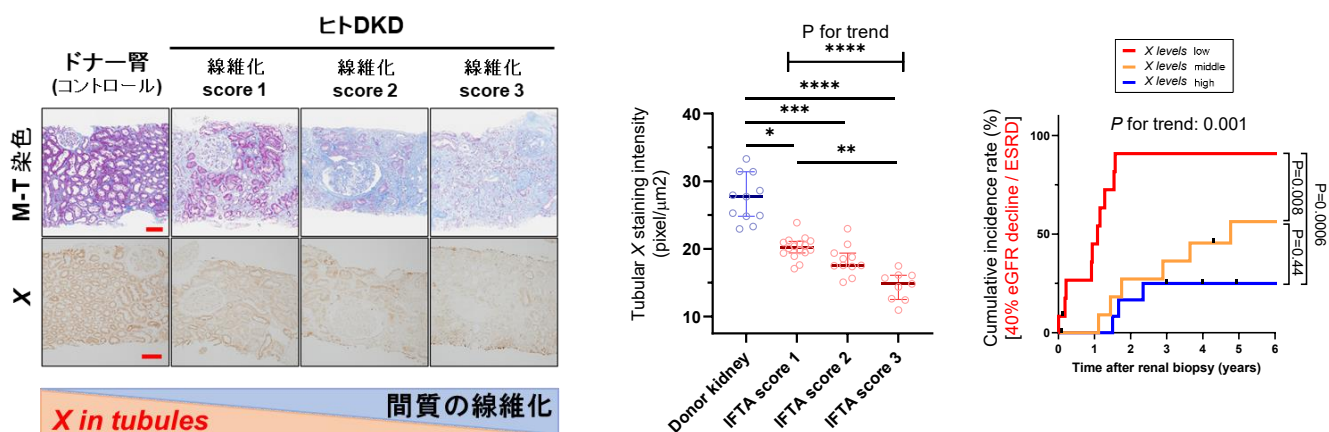
我が国を含めた世界各国で、DKD は末期腎不全の最大の原疾患である。SGLT2 阻害薬や GLP1 受容体作動薬の登場により、DKD による透析導入者数は横ばい〜低下傾向に転じたものの、メタ解析における腎アウトカムの相対リスク減少率は各々の薬剤で 38%、13% しかなく (*Lancet Diabetes Endocrinol* 2019;7:776-85, *Lancet* 2022;400:1788-801)、依然として高い残余リスクを減らすために新規治療標的の探索が必要である。

本研究をさらに発展させていき、DKD の新規治療薬の開発から透析患者数の減少、さらに DKD 患者の QOL や生命予後の改善に繋げていきたいと考えている。

最後に、本研究を進めるにあたっての研究資金を支援していただいた本財団と選考に関わっていただいた方々に心より御礼を申し上げたい。

図 9

### 腎生検で診断されたヒトDKD尿細管での*X*発現と間質の線維化や腎予後との関連



## 【主な発表論文等】

### ②学会発表：

Targeting mitochondrial electron transport chain remodeling as a novel therapeutic strategy of DKD

Koki Mise

The 68th Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology 2025 年 6 月 21 日

# 重症自己炎症性疾患「VEXAS 症候群」モデルマウス作製とその病態解析

川崎医科大学 基礎医学 免疫学教室

坂本 祐真

(研究成果の概要)

VEXAS 症候群 (Vacuoles, E1 enzyme, X-linked, Autoinflammatory, Somatic syndrome) は、治療抵抗性の自己炎症性疾患である。造血幹細胞における *UBA1* 遺伝子の体細胞変異が発症に寄与するが、本疾患における炎症惹起機序や、変異の種類による予後の差異が生じる機序は解明されていない。この課題に取り組むため、申請者らは独自に疾患モデル細胞を作製した。その結果、*UBA1* 変異細胞では細胞死が亢進し、その際、放出される DAMPs を介して炎症が誘導される病態機序が考えられた。さらに現在、モデル動物の作製に取り組んでおり、組織～生体レベルでの炎症惹起機序の解明が期待される。

(本文)

## 1. 背景

自己炎症性疾患は、発熱と眼、関節、皮膚、漿膜などに及ぶ全身性の炎症エピソードを特徴とする疾患である。自然免疫に関与する遺伝子の異常（生殖細胞系列変異）により、自然免疫が過剰に活性化することで、炎症が生涯持続する難病群である。この疾患群において近年、*UBA1* (*Ubiquitin-like modifier activating enzyme 1*) 遺伝子の体細胞変異が同定された。本変異を有する患者は特徴的な臨床病態を示すことに加え、「体細胞変異が慢性炎症や免疫不全を起こす」という新規概念から、VEXAS 症候群 (Vacuoles, E1 enzyme, X-linked, Autoinflammatory, Somatic syndrome) として、2020 年末に提唱された (Beck et al. *N Eng J Med.* 2020)。VEXAS 症候群は成人後期に発症し、多彩な全身性炎症症状を呈し、高頻度に血球減少や骨髓異形成などの造血障害を合併する。現在、有効な治療法は確立されておらず、長期予後は不良である (Ferrada et al. *Blood.* 2022; Georgin-Lavialle et al. *Br J Dermatol.* 2022)。

本疾患の根本原因は、骨髓造血幹細胞における *UBA1* 遺伝子の体細胞変異である。*UBA1* は蛋白質のユビキチン化を開始させる E1 酵素をコードしている。現在明らかにされている VEXAS 症候群症例の多くは、*UBA1* exon3 の選択的転写開始点であるメチオニン 41 番 (*M41*) に変異が生じることで、機能低

下型の新規アイソフォームを獲得することが報告されている (Beck et al. *N Eng J Med.* 2020)。本変異を有する骨髓球系細胞が、何らかの分子や経路を介して炎症を惹起すると考えられるが、その詳細な機序は不明である。さらに、*UBA1 M41* 変異には、*M41V*, *M41T*, *M41L* の 3 種類の遺伝子型が同定されており、特に *M41V* は、*M41T* や *M41L* と比較し、予後を含む臨床的重症度が高い (Ferrada et al. *Blood.* 2022; Georgin-Lavialle et al. *Br J Dermatol.* 2022)。しかしながら、遺伝子型間で予後の違いを生み出す機序は十分に解明されていない。疾患モデル細胞や動物の欠如がその主要因である。

これらの課題に取り組むため、申請者らは、ヒト由来単球性細胞株 U937 にゲノム編集で *UBA1 M41* 変異を導入した VEXAS 症候群モデル細胞を独自に作製した。

## 2. 目的

- ① 作製したモデル細胞を解析し、*UBA1* 変異による“分子～細胞レベル”での炎症惹起機序を解明する。
- ② *M41V*, *M41T*, *M41L* 変異における臨床的重症度の違いについて、比較・検討する。
- ③ 本疾患モデルマウスを作製する。

## 3. 方法

*UBA1* 変異が細胞増殖や細胞死、細胞周期、DAMPs



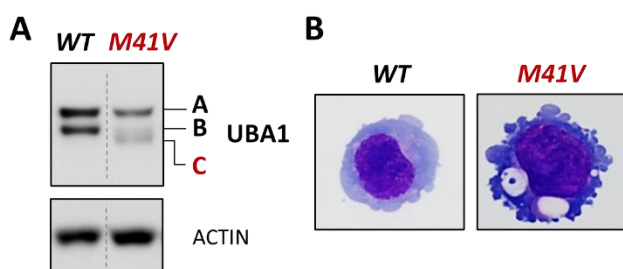
(Damage-Associated Molecular Patterns) 放出、炎症性サイトカイン産生などに及ぼす影響を解析した。

#### 4. 研究成果

##### 結果

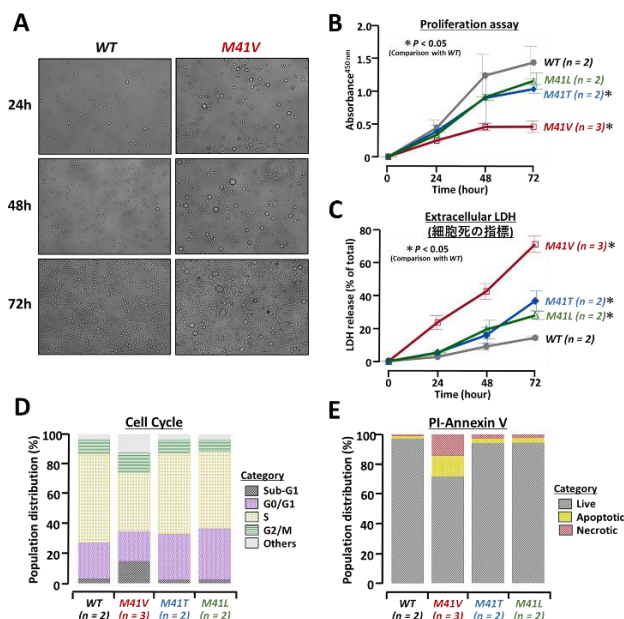
##### A) 本細胞モデルは、VEXAS 症候群患者細胞の特徴を再現する

本細胞モデルは、VEXAS 症候群でこれまでに報告されている患者細胞の特徴を再現した。具体的には、UBA1b アイソフォーム発現が低下し、新規に UBA1c アイソフォーム発現を獲得した (A)。また、細胞に異常空胞形成を認めた (B)



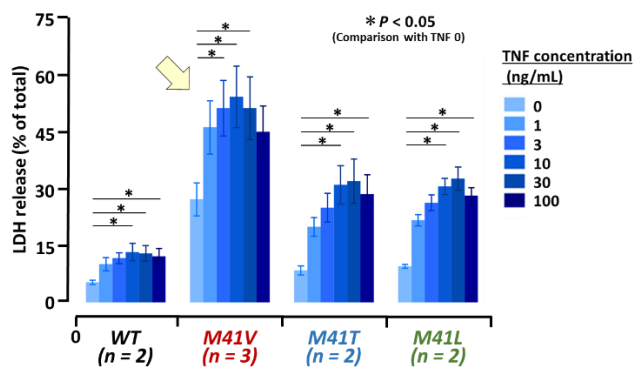
##### B) UBA1 M41 変異細胞は、細胞死が亢進する

細胞培養実験において、細胞形態や増殖を観察したところ、変異株では大型細胞や、背景に断片化した細胞が経時的に増加し、細胞死の亢進が示唆された (A)。増殖アッセイにおいて、変異株では細胞増殖の低下を認めた (B)。細胞外 LDH 放出 (細胞死の指標として) において、変異株では細胞外 LDH の増加を認めた (C)。変異間比較では、M41V で顕著な細胞死を認めた。細胞周期解析において、M41V で Sub-G1 領域割合の増加を認め、アポトーシス増加が示唆された (D)。PI-Annexin V の解析において、細胞死の種類はアポトーシスおよびネクローシスであることが示された (E)。



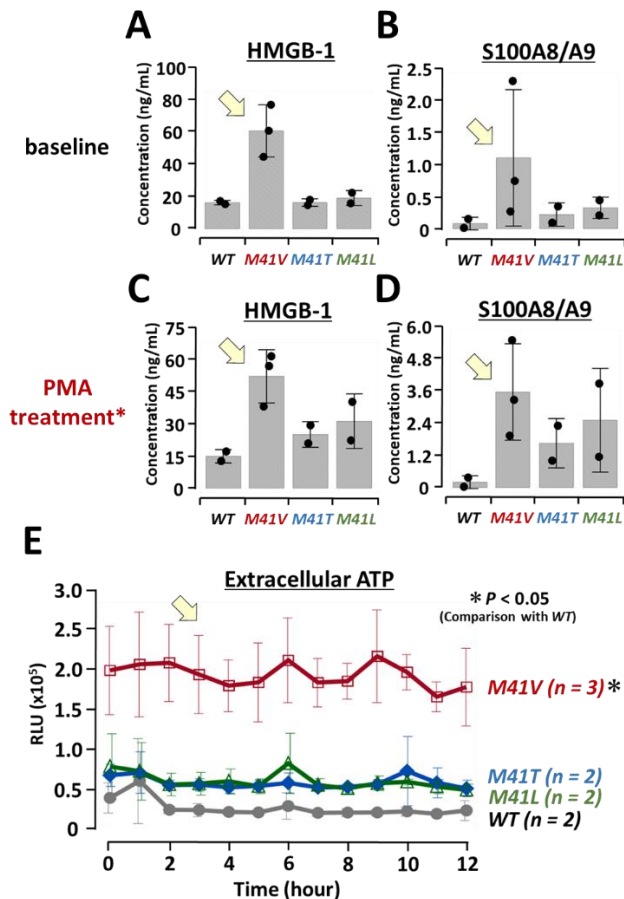
##### C) UBA1 M41 変異細胞は、TNF 誘導細胞死が増加する

TNF に対する反応性を解析するために、TNF を用いて種々の濃度で 24 時間刺激し、細胞死割合を細胞外 LDH 放出により算出した。その結果、変異株では、TNF に対する反応性が増強し、細胞死がさらに亢進した。変異間比較では、M41V で顕著な変化を認めた。



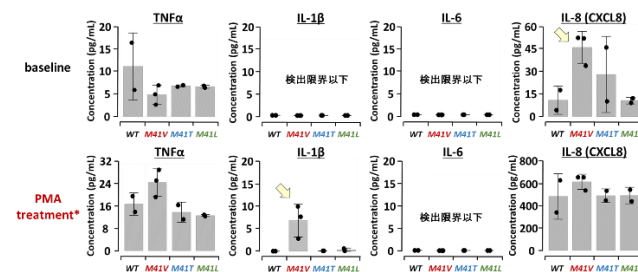
##### D) UBA1 M41 変異細胞は DAMPs 放出が増加する

培養上清中の DAMPs 濃度を測定した結果、baseline では M41V で HMGB-1 (A) および S100A8/A9 (B) の増加を認めた。PMA による分化誘導処理をすると、M41V に加え、M41T, M41L においてもそれぞれ増加した (C, D)。細胞外 ATP 放出において、変異株では増加を認め、その程度は M41V で顕著であった (E)。



#### E) UBA1 M41 変異細胞は炎症性サイトカイン産生が増加する

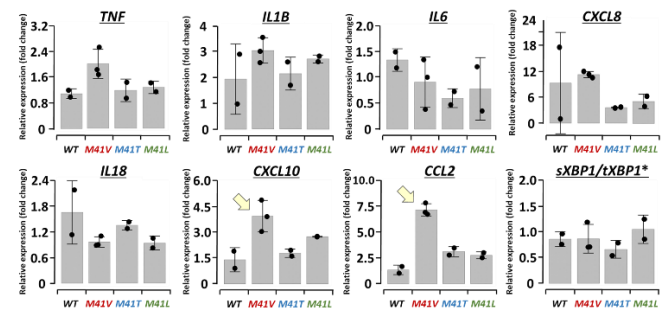
ELISA で炎症性サイトカイン産生を解析した結果、baseline では M41V で IL-8 産生の軽度上昇を認めた (下図)。一方で、TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 産生に差を認めなかった。PMA による分化誘導処理を加えると、M41V で IL-1 $\beta$  の軽度上昇を認めたが、検出限界付近であり、病的意義は今後検証する必要がある。



#### F) UBA1 M41 変異細胞はケモカインの遺伝子発現が増加する

予備実験データであり今後さらなる検討が必要であるが、baseline において、変異株で CXCL10 や CCL2

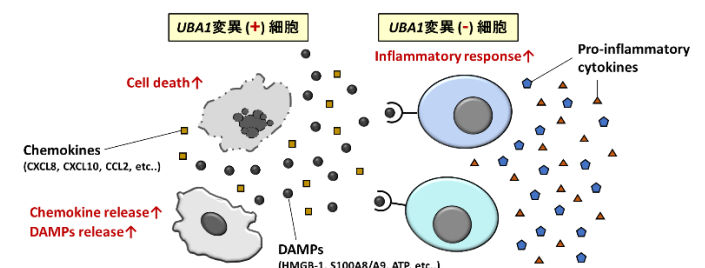
などケモカインの遺伝子発現の上昇を認めた (下図)。TNF, IL1B, IL6, CXCL8, IL18 では差を認めず、VEXAS 症候群で関与が示唆される小胞体ストレス応答のマーカーである XBP1 では差を認めなかった。



#### 得られた成果の学術的意義と、今後の展望

本研究結果を総合し、VEXAS 症候群では UBA1 変異を有する細胞はケモカインを産生し、免疫細胞を誘引する。その際、細胞死亢進による DAMPs を介して、UBA1 変異を有さない免疫細胞の炎症応答を増強するという病態が考えられた (下図)。しかしながら、ケモカインや IL-1 $\beta$  の病的意義など幾つかの事項については更なる検討が必要である。また、遺伝子型による予後の違いを生み出す機序として、UBA1 M41 変異による細胞死の程度の違いが、臨床的重症度を規定する可能性があることが示された。

本研究は、細胞死抑制や DAMPs 中和が治療標的として有望である可能性を示している。今後は、細胞死様式やそれに関わる経路の同定に加え、炎症性サイトカイン・ケモカイン産生の網羅的解析から、病態に関与するものを同定する。動物モデルについては、現在実験を遂行中であり、未発表データであるため記載を控えていただく。



#### 5. 主な発表論文等

- ① 発表論文 — 現時点でなし
- ② 学会発表 — 4 編



国際学会および国内学会で、本研究成果に関し、  
4 編の発表をおこなった。その際、本財団による研究費助成を受けて実施した研究であることを明記した。

- i. Yuma Sakamoto, Masanori Iseki, Eisei Kondo, and Tomoyuki Mukai. 「Somatic *UBA1* mutations responsible for VEXAS syndrome enhance cell death and inflammatory response」 第 87 回日本血液学会学術集会 (2025 年 10 月 10 日～12 日、神戸) ポスター発表
- ii. 坂本祐真、馬場伸育、向井知之. 「VEXAS 症候群モデル細胞を用いた *UBA1* 変異の機能解析」 第 53 回日本臨床免疫学会総会 (2025 年 10 月 9 日～11 日、幕張) ワークショップでの口頭発表
- iii. Yuma Sakamoto, Masanori Iseki, and Tomoyuki Mukai. 「Somatic *UBA1* mutations, the gene responsible for VEXAS syndrome, elicit inflammatory response by enhancing cell death」 第 27 回アジア太平洋リウマチ学会 (APLAR 2025) (2025 年 9 月 3 日～7 日、福岡) ポスター発表
- iv. 坂本祐真、向井知之. 「VEXAS 症候群の責任遺伝子 *UBA1* 変異は、細胞死を亢進することで炎症反応を惹起する」 第 46 回日本炎症・再生医学会 (2025 年 7 月 31 日～8 月 1 日、京都) ポスター発表

③ 図書 — なし

④ 知的財産権 — なし

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成のご支援を賜りました公益財団法人 寺岡記念育英会に深く感謝申し上げます。ありがとうございます。

# 腫瘍微小環境に着目した ALK 融合遺伝子陽性肺癌の早期薬剤耐性機序の解明と根治戦略の開発

岡山大学病院 呼吸器・アレルギー内科

槇本 剛

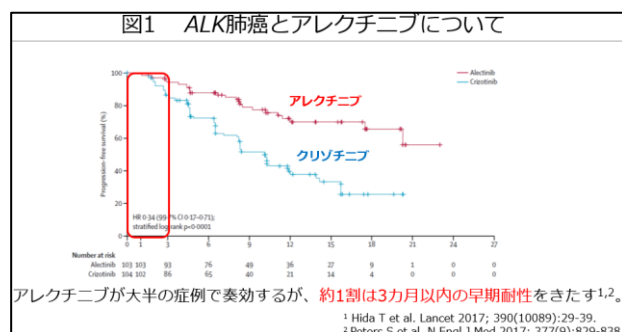
## (研究成果の概要)

ALK 融合遺伝子陽性肺癌（ALK 肺癌）は、EGFR 変異肺癌に次いで高頻度なサブタイプであり、非喫煙者、若年に多く認める重要な疾患である。ALK 選択的阻害薬のアレクチニブは ALK 肺癌に優れた効果を示すが、未だ根治できず、早期耐性化を約 10%に認め、臨床上の未解決課題である。本研究において、ALK 肺癌組織・患者情報 103 例の解析を行い、早期耐性患者では脳転移が多く、好中球リンパ球比上昇と炎症関連遺伝子発現亢進が認められることを見いだした。現在さらに治療標的候補の阻害効果の検証を行っている。

## (本文)

### 1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌において、ALK 融合遺伝子は EGFR 変異について 2 番目に高頻度な発癌遺伝子であり、毎年新規発生が本邦で約 3800 人、米国では約 8000 人と推計される。ALK 融合遺伝子陽性肺癌（ALK 肺癌）は若年の非喫煙者に発生するため、根治的な治療戦略の確立が強く求められる。選択的 ALK チロシンキナーゼ阻害剤のアレクチニブは ALK 肺癌に対して高い奏効率および優れた無病生存期間（95.7%、34.8 か月）を示し、ALK 肺癌の治療の第一選択薬である。しかしながら、アレクチニブに 3 か月以内に早期耐性化する症例が約 10%も存在し、臨床未解決の重要課題である（Hida T, Lancet 2017, Peters S, N Engl J Med 2017）。(図 1)



申請者は、先行研究としてアレクチニブに早期耐性を来した ALK 肺癌患者由来の組織および細胞株を用いて、次世代シーケンサーによる RNA sequencing を行い、早期耐性に腫瘍遺伝子変異量を表す tumor mutation burden (TMB) が関与することを世界で初めて報告した (Makimoto G, J Thorac Oncol 2019)。またアレクチニブ早期耐性の ALK 肺癌は TMB が高い

のみならず、ALK G1202R 耐性変異、EGFR, MET といった ALK 以外の生存シグナルの活性など多様なゲノムレベルの変化を認めた。そのため選択的 ALK 阻害薬アレクチニブ単剤では、多様に変化する腫瘍の病勢を制御できず、EGFR や MET 阻害薬との併用が有効と考えられた。しかしながら、ALK 肺癌におけるアレクチニブ早期耐性の病態はまだ十分に解明されているとはいえない。

### 2. 研究の目的

本申請において、岡山大学バイオバンク、中国四国肺癌研究ネットワークを利用し、アレクチニブ早期耐性となった肺癌組織の網羅的遺伝子解析を拡大し、早期耐性のさらなる病態解明、治療標的の同定を目指す。さらに in vitro、in vivo で治療標的候補の阻害効果を検証し、革新的治療効果が期待できる新規治療法の臨床開発への橋渡しを目標とする。

### 3. 研究の方法

2013/1/1～2021/12/31 に岡山肺癌治療研究会の 9 施設で ALK-TKI の一次治療としてアレクチニブによる治療を受けた ALK 陽性肺癌症例を対象とした。PFS はアレクチニブ開始日から病勢増悪または死亡日、OS はアレクチニブ開始日から死亡日または最終生存確認日までとした。早期耐性の定義として PFS 3 ヶ月以下とした。これらのデータをもとに、アレクチニブ長期奏効群と、早期耐性群の臨床的背景の差異について検証を行った。また、次に分子生物学的特徴を明らかにするために

早期耐性及び奏効例の一部の病理組織標本を用いて GeoMx デジタル空間プロファイラーによる空間トランスクリプトーム解析及び免疫組織化学染色を行った。Pan-CK、CD45 等を用いて蛍光標識を行い、ROIを指定し、Pan-CK 陽性領域の遺伝子発現を解析し、長期奏効例と早期耐性例での遺伝子発現差について検証を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) 臨床的背景に関する検証

合計 103 例の、アレクチニブによる治療を行った ALK 肺癌患者についての臨床情報を収集した。患者背景に関しては、年齢中央値は 65 歳で、43%が男性、87%が ECOG PS 0-1、93%が腺癌であった。肝転移を 21%に認め、脳転移は 17%に認めた (図 2)。

患者数	103例
年齢中央値 (範囲)	65歳 (24-89歳)
性別 (男性/女性)	44 (43%)/59 (57%)
病期 (Ⅲ,Ⅳ期/再発)	76 (74%)/27 (26%)
PS (0-1/2-3)	90 (87%)/13 (13%)
組織型 (腺癌/その他)	96 (93%)/7 (7%)
喫煙歴 (あり/なし/不明)	46 (45%)/56 (54%)/1 (1%)
脳転移 (あり/なし)	22 (21%)/81 (79%)
肝転移 (あり/なし)	17 (17%)/86 (83%)

全体集団における PFS 中央値は 28.7 ヶ月、OS の中央値は 80.6 ヶ月であり、概ね既報と同様の結果であった。

次に、103 例のうち、3 ヶ月以内に早期耐性を来した 19 例 (19%) と、長期奏効を認めた 84 例 (82%) について臨床的背景の差異について検証を行ったところ、早期耐性群では長期奏効群と比較して、脳転移を有意におおきみとめた。その他年齢や性別、ECOG PS 等に関しては両群間で差は認めなかった (図 3)。

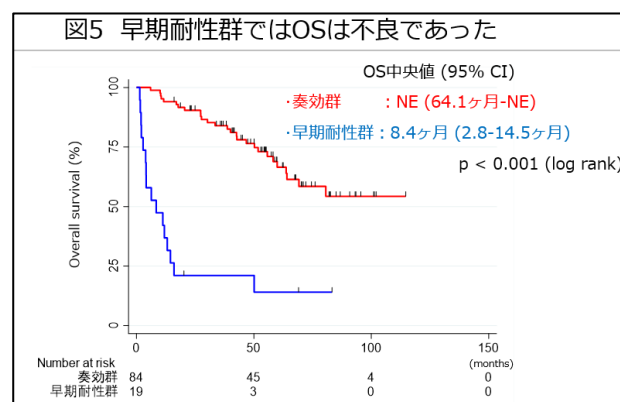
	早期耐性群 (n=19)	奏効群 (n=84)	p
年齢中央値 (範囲)	63 (36-79)	65 (24-89)	
年齢 (≥ 65 歳/< 65 歳)	9 (47%)/10 (53%)	43 (51%)/41 (49%)	0.804
性別 (男性/女性)	8 (42%)/11 (58%)	36 (43%)/48 (57%)	1.000
Stage (Ⅲ,Ⅳ期/再発)	17 (89%)/2 (11%)	59 (70%)/25 (30%)	0.146
PS (0-1/2-3)	16 (84%)/3 (16%)	74 (88%)/10 (12%)	0.703
組織型 (腺癌/その他)	17 (89%)/2 (11%)	79 (94%)/5 (6%)	0.610
喫煙歴 (あり/なし)	9 (47%)/10 (53%)	37 (44%)/46 (55%)	1.000
脳転移 (あり/なし)	8 (42%)/11 (58%)	14 (17%)/70 (83%)	0.027
肝転移 (あり/なし)	6 (32%)/13 (68%)	11 (13%)/73 (87%)	0.081

続いて、血液検査データに関して比較検証を行った。アレクチニブ投与開始前の血液検査では、早期耐性群では長期奏効群と比較して好中球リンパ球比(NLR)

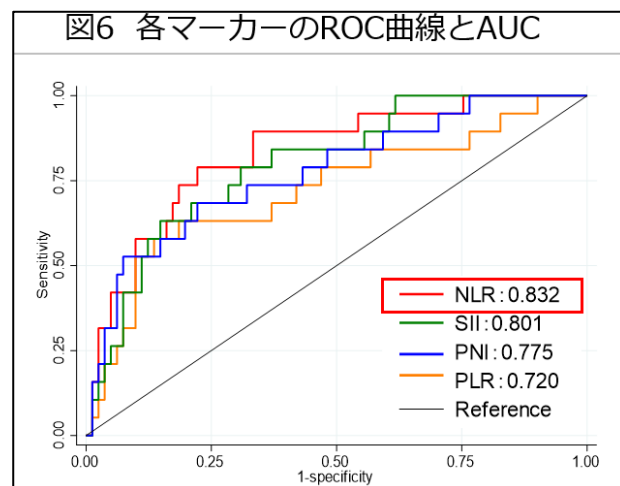
や血小板リンパ球比などの炎症性マーカーが有意に高値であり、アルブミンなどの栄養指標は有意に低地であった (図 4)。

	早期耐性群	奏効群	p
WBC, / $\mu$ L	9480 (6600-13970)	6620 (5000-8200)	0.004
Plt, $\times 10^4$ / $\mu$ L	28.6 (20.9-41.4)	25.0 (19.7-31.2)	0.269
Neut, / $\mu$ L	7074 (4970-12125)	4364 (3230-5872)	<0.001
Lym, / $\mu$ L	1022 (866-1561)	1474 (1112-1734)	0.010
NLR	7.60 (4.29-13.35)	3.07 (2.18-4.20)	<0.001
PLR	326 (178-393)	175 (133-230)	0.002
SII	2384 (1091-3542)	804 (505-1249)	<0.001
PNI	35.1 (30.1-45.3)	45.8 (42.2-50.2)	<0.001
Alb, g/dL	2.9 (2.5-3.9)	3.9 (3.5-4.2)	<0.001
ALT, U/L	23 (14-36)	14 (12-20)	0.020
Cre, mg/dL	0.63 (0.53-0.82)	0.67 (0.59-0.80)	0.642
LDH, U/L	230 (181-419)	194 (165-232)	0.049
CRP, mg/dL	2.00 (0.31-7.36)	0.15 (0.05-1.32)	<0.001
CEA, ng/mL	7.70 (2.64-78.2)	9.40 (2.60-23.2)	0.781

また、アレクチニブ早期耐性群ではアレクチニブ長期奏効群と比較し OS も有意に短かった (図 5)。



続いて、早期耐性群における各種マーカーに着目して ROC 曲線を作成し、カットオフ値の決定を行った。NLR, SII, PNI, PLR の AUC はそれぞれ 0.832, 0.801, 0.775, 0.720 であり、NLR が最も有用な指標と考えられ、NLR に着目することとした。Youden 法を用いてカットオフ値は 4.24 とした (図 6)。



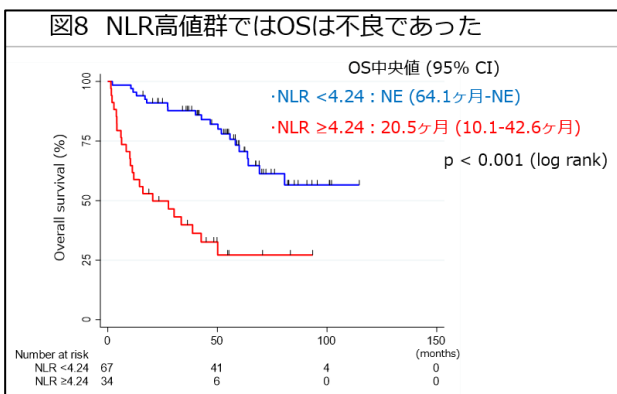
このカットオフ値も含めて、アレクチニブの PFS に対する単変量解析と多変量解析を行った。単変量解

析ではPFSの良好因子として65歳以上、PS0-1、脳転移なし、肝転移なし、NLR<4.24が挙げられた(図7)。また、NLR高値群ではOSも有意に不良であった(図8)。

図7 PFSに対する単変量解析と多変量解析

	単変量解析		多変量解析	
	HR	p	HR	p
年齢 (≥ 65歳 vs. < 65歳)	0.524 (0.318-0.863)	0.011	0.683 (0.399-1.168)	0.164
性別 (男性 vs. 女性)	0.912 (0.555-1.499)	0.718	0.503 (0.286-0.885)	0.017
PS (2-3 vs. 0-1)	2.197 (1.133-4.261)	0.020	1.825 (0.917-3.633)	0.087
組織型 (その他 vs. 腺癌)	2.332 (1.000-5.438)	0.050	excluded	
喫煙歴 (あり vs. なし)	1.416 (0.868-2.309)	0.163	1.852 (1.056-3.248)	0.031
脳転移 (あり vs. なし)	2.326 (1.356-3.988)	0.002	excluded	
肝転移 (あり vs. なし)	2.530 (1.374-4.658)	0.003	2.477 (1.275-4.810)	0.007
NLR (≥4.24 vs. <4.24)	3.423 (2.051-5.714)	<0.001	3.204 (1.877-5.468)	<0.001

Cox比例ハザードモデル



## 2) 分子生物学的背景に関する検証

次に早期耐性群から2例、長期奏効群から4例を抽出し、分子生物学的特徴について病理組織標本を用いたGeoMx デジタル空間プロファイラーを用いて検証を行った。

いずれの症例もPS0-1で腺癌であった。脳転移はいずれも認めず、肝転移は早期耐性で1例、奏効で2例認めた。

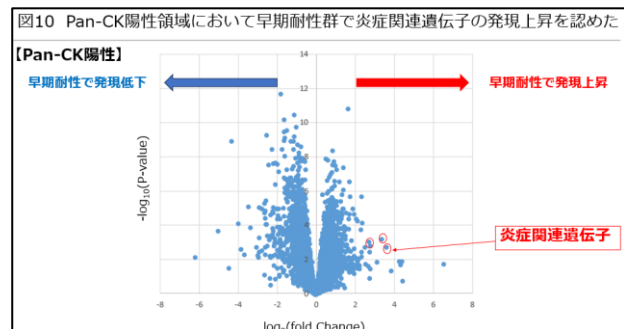
NLR高値は早期耐性で1例認めた。使用した組織は早期耐性ではリンパ節、肺、奏効群ではリンパ節1例、腹壁腫瘍1例、肺2例であった。ROIの数は4-7個とした(図9)。

図9 GeoMX患者背景

症例	年齢	性別	PS	組織	病期	喫煙	脳転移	肝転移	NLR	PFS	OS	奏効	後治療	組織	ROI
1	42	女	1	腺癌	IVB	-	-	-	High	1	81	PD	Crizo	Lym	6
2	75	男	0	腺癌	Rec	+	-	+	Low	3	19	NE	Lorla, Alec	Lung	7
3	76	女	1	腺癌	IVA	-	-	-	Low	56	56	NE	-	Lung	6
4	53	女	0	腺癌	Rec	-	-	-	Low	64	66	PR	-	Abd	4
5	66	女	0	腺癌	Rec	-	-	+	Low	40	40	CR	-	Lung	4
6	69	男	0	腺癌	Rec	-	-	+	Low	76	99	CR	Briga	Lym	7

※Rec, Recurrence; Crizo, Crizotinib; Lorla, Lortatinib; Alec, Alectinib; Briga, Brigatinib; Lym, Lymph node; Abd, abdominal wall

腫瘍細胞領域を示すPan-CK陽性領域において、早期耐性群と長期奏効群での遺伝子発現量の違いをもとに、ボルケーノプロットを作成したところ、複数の炎症関連遺伝子の発現の上昇を認めた(図10)。



本研究で着目したNLRは全身性炎症マーカーであり、非小細胞肺癌の予後因子の一つとされている。ALK肺癌の後向研究においてもNLRはクリゾチニブやアレクチニブのPFSと関連することが報告されている。本研究においても多変量解析においてNLR高値はPFSの不良因子であり、早期耐性群においても有意に高値でした。好中球等の炎症性因子が初期の耐性に関与している可能性が考えられる。

またGeoMxを用いた分子生物学的検討においても、複数の炎症関連遺伝子の発現の上昇が、早期耐性群においてみとめられたことから、炎症関連遺伝子の阻害がアレクチニブ早期耐性の克服に寄与する可能性が予想された。現在これらの阻害を、in vivo, in vitroの系で検証中である。

## 5. 主な発表論文等

論文発表 : 0 (投稿中 : 2)

学会発表 : 3件

1. Go Makimoto, Tadahiro Kuribayashi, Toshihide Yokoyama, Shoichi Kuyama, Yuka Kato, Kenichiro Kudo, Naokatsu Horita, Hiroe Kayatani, Masaaki Inoue, Keisuke Sugimoto, Kadoaki Ohashi, Katsuyuki Hotta. A Retrospective Study to Determine the Characteristics of Early Resistance to Alectinib in ALK-Positive NSCLC. JSMO 2024 (第21回日本臨床腫瘍学会学術集会) 名古屋 2024年.

2. 横山俊秀、栗林忠弘、榎本剛、久山彰一、加藤有加、工藤健一郎、堀田尚克、萱谷紘枝、井上政昭、

杉本啓介、大橋圭明、堀田勝幸. ALK 融合遺伝子変異陽性非小細胞肺癌におけるアレクチニブ早期耐性患者の臨床的特徴を明らかにするための後ろ向きコホート研究. 第 64 回日本呼吸器学会学術講演会. ミニシンポジウム 横浜 2024 年.

3. 栗林忠弘, 榎本剛, 富田秀太, 井上博文, 二宮貴一郎, 横山俊秀, 久山彰一, 加藤有加, 工藤健一郎, 堀田尚克, 萱谷紘枝, 井上政昭, 杉本啓介, 大橋圭明, 堀田勝幸. ALK 融合遺伝子変異陽性非小細胞肺癌におけるアレクチニブ早期耐性患者の特徴の検討. 第 65 回日本肺癌学会学術集会 横浜 2024



## (表題) 膵癌の発生起源に基づく癌関連線維芽細胞に着目した新規治療戦略の提唱

(所属) 岡山大学病院

(氏名) 赤穂 宗一郎

### (研究成果の概要)

膵癌は膵腺管細胞だけでなく膵腺房細胞からも発生し得ることが示されており、その発生起源により腫瘍の性質や予後が大きく異なる。申請者はヒト膵癌手術検体 40 症例の網羅的遺伝子発現解析に基づき、膵腺管細胞由来膵癌 (Ductal cell 由来膵癌) と膵腺房細胞由来膵癌 (Acinar cell 由来膵癌) の分類法を確立し、Ductal cell 由来膵癌が予後不良であることを明らかにした。さらに癌微小環境、とりわけ癌関連線維芽細胞 (CAF) の分布に着目し、Ductal cell 由来膵癌では腫瘍促進性に働く炎症性 CAF が多く形成されることを示した。

RNA-seq データ解析においても、炎症性 CAF のマーカー (LIF, IL-11) が Ductal cell 由来膵癌で高発現していることが確認され、膵癌細胞株では Ductal cell 由来膵癌に分類される細胞株で化学療法薬 (ゲムシタビン、パクリタキセル) への感受性が低いことが判明した。また、膵星細胞を用いた検討では、Ductal cell 由来膵癌が腫瘍抑制性である筋線維芽細胞性 CAF の誘導能に乏しいことが分かった。

これらの結果から、Ductal cell 由来膵癌は腫瘍細胞自体の悪性度が高いのみならず、炎症性 CAF の増加と筋線維芽細胞性 CAF の低形成を伴うことで、より悪性度の高い腫瘍微小環境を構築していると考えられる。本研究は、膵癌の発生起源に基づき CAF 形成の違いを明らかにし、予後不良群に対して CAF を標的とした新規治療戦略の可能性を提唱するものである。

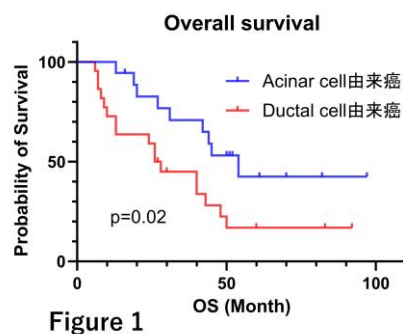
(本文)

### 【研究の学術的背景と特色】

#### ➤ 膵癌の発生起源に関する変遷

膵腺癌 (Pancreatic ductal adenocarcinoma: PDAC) の発生起源細胞としては、最近までは膵腺管細胞 (Ductal cell) からのみ発生するものと一般的に考えられてきた。しかし、近年になり膵腺管細胞 (Ductal cell) と膵腺房細胞 (Acinar cell) の 2 種類の異なる細胞から PDAC が発生し得ることが判明した。さらに、膵腺管細胞もしくは膵腺房細胞に選択的に KRAS 変異と TP53 変異を導入して PDAC を発生させたマウス研究の結果から、膵腺管細胞を起源とした PDAC (Ductal cell 由来膵癌) の生存期間が短く悪性度が高いことが分かっている。これは、膵癌の発生起源によって予後や癌の性状が異なることを示す重要なデータである。しかし、両者はともに病理学的に Adenocarcinoma であり、病理標本上では判別する方法がない。そこで、申請者はこれまでに初期治療として手術を行われた患者検体 40 症例の遺伝子発現を網羅的に解析し、膵腺管細胞由来膵癌 (Ductal cell 由来膵癌) と膵腺房細胞由来膵癌 (Acinar cell 由来膵癌) に分類する方法を確立した。さらに、これに

基づくヒト臨床での「Ductal cell 由来膵癌」では術後再発が短く、全生存期間が有意に短いことを示し、膵癌の発生起源が膵癌の進展に及ぼす重要性を示している (Figure1)。



### 癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblasts: CAF) を中心とした癌微小環境の重要性

近年、癌微小環境が癌細胞の増殖・進展に及ぼす影響に注目されている。中でも、癌関連線維芽細胞 (CAF) は膵癌組織の約 80% を占め膵癌の進展に重要な役割を担っている。膵癌での CAF は大きく分けて腫瘍促進性に働く「炎症性 CAF」と腫瘍抑制性に働く「筋線維芽細胞性 CAF」の 2 種類が腫瘍内に混在していることが分かっており、それらをターゲットにした膵癌治療が

期待されている。現在までの報告では、炎症性 CAF は腫瘍促進性に働き、筋線維芽細胞性 CAF は腫瘍抑制性に働くと考えられている。しかし、これまで膵癌の発生起源と CAF の形成の関連に着目した報告はない。申請者はヒト膵癌組織中の炎症性 CAF・筋線維芽細胞性 CAF の分布を評価し、Ductal cell 由来膵癌では腫瘍促進性に働く iCAF の割合が多いことを新規知見として得ている(Figure 2)。

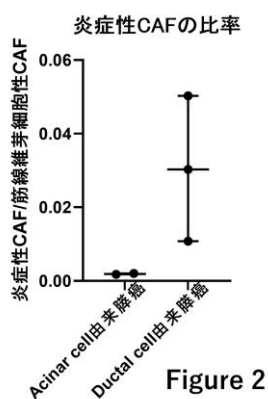


Figure 2

### 【研究の目的】

膵癌の中でも予後不良である Ductal cell 由来膵癌は腫瘍促進性の炎症性 CAF を形成することで生存しやすい環境を形成していることが考えられる(Figure3)。本研究では膵癌の発生起源とその膵癌細胞が形成する CAF を中心に予後不良のメカニズムを明らかにする。さらに Ductal cell 由来膵癌では、既存の化学療法に加え「炎症性 CAF」の形成を抑制することでより効果的な治療となることを証明する。

### 【研究方法】

#### ・細胞生存率アッセイ

細胞は 12 ウェルプレートに  $5 \times 10^4$  個ずつ播種した培養した。翌日、ゲムシタビン塩酸塩 (FUJIFILM Wako, 073-06631)、パクリタキセル (163-28163)、または 5-フルオロウラシル (068-01401) を、それぞれ DMSO に溶解し、 $10^{-10}$  から  $10^{-2}$  mol/L の濃度範囲で添加処理し 72 時間後に、MTT アッセイにより細胞生存率を評価した。

#### ・免疫蛍光染色

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を用いて免疫蛍光染色を行った。まず、エタノールを用いて脱パラフィンおよび水処理を行い、PBS で洗浄した。クエン酸緩衝液中でオートクレーブ処理 (120°C、20 分) にて抗原賦活化を行い、過酸化水素水と反応させることで内因性ペルオキシダーゼを不活化した。透過化は 0.3-0.4% Triton X-100/1% BSA/PBS、ブロッッキングは 5% BSA/PBS を用いた。一

次抗体は 1% BSA/0.1% Triton X-100/PBS に希釈し、4°C で一晩反応させた。二次抗体は 1% BSA/0.1% Triton X-100/PBS に希釈し、遮光下で室温 2 時間反応させた。核染色には DAPI を用いカバーガラスで封入後、蛍光顕微鏡 (ZEISS Axio Observer 7 microscope) にて観察を行った。

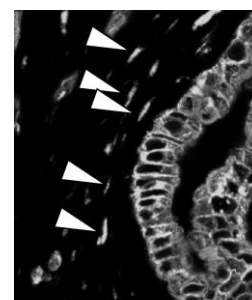
#### ・膵癌細胞株の遺伝子発現による分類

遺伝子改変マウスモデルで同定された遺伝子セットを発生起源シグネチャーとして用いた (Cancer Discovery2021)。マウス由来の遺伝子発現プロファイルは対応するヒトのオルソログに変換し Gene Set Variation Analysis (GSVA) を用いて分類した。

### 【研究成果】

#### 1) 免疫染色による CAF の同定

基礎となるデータを蓄積するために、ヒト膵癌手術検体の免疫蛍光染色を行い、Ductal cell 由来膵癌・Acinar cell 由来膵癌における差異を評価した。炎症性 CAF のマーカーとして Leukemia Inhibitory Factor (LIF) を、線維芽細胞性 CAF のマーカーとして Alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) を用いた。腫瘍内全般に  $\alpha$ SMA を認めたが、Ductal cell 由来膵癌では腫瘍細胞の近傍に多数の炎症性 CAF の存在を確認した。



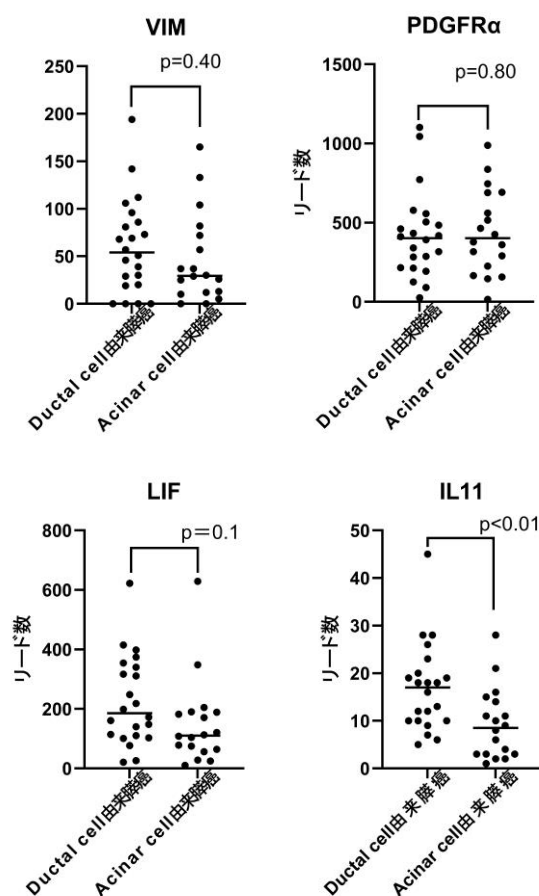
矢印：炎症性CAF

#### 2) RNA-seq データによる CAF 関連遺伝子の評価

上記「研究の学術的背景と特色」に提示した、40 症例のヒト膵癌臨床検体の RNA-seq データより、CAF 関連遺伝子に関して、Ductal cell 由来膵癌・Acinar cell 由来膵癌における差異を確認した。

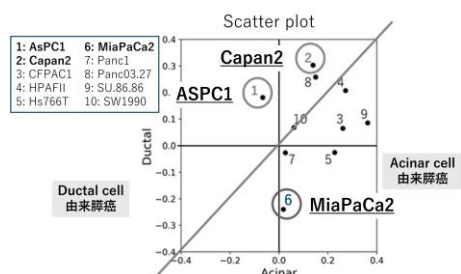
図に示すように、CAF 全般のマーカーであるビメンチン (VIM) および Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha (PDGFR $\alpha$ ) の発現は、Ductal cell 由来膵癌と Acinar cell 由来膵癌では発現量に差異は認めなかった ( $p=0.04$ ,  $p=0.80$ )。一方で、炎症性 CAF のマーカーである LIF およびインターロイキン 11 (IL-11) では Acinar cell 由来膵癌に比し、Ductal cell 由来膵癌で発現量が多いという結果であった

( $p=0.1$ ,  $p<0.01$ )。



### 3) ヒト膵癌細胞株の分類と治療奏功性

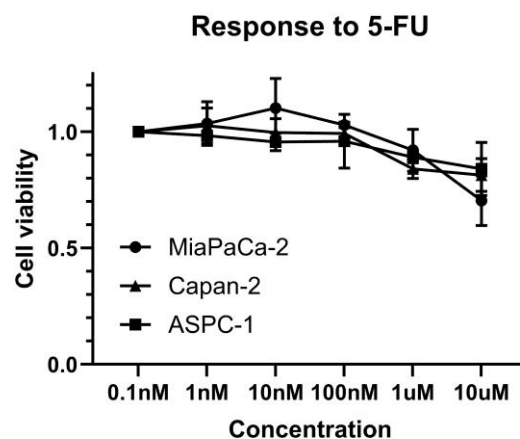
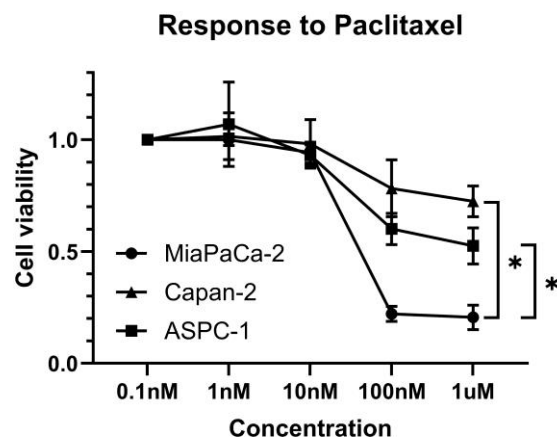
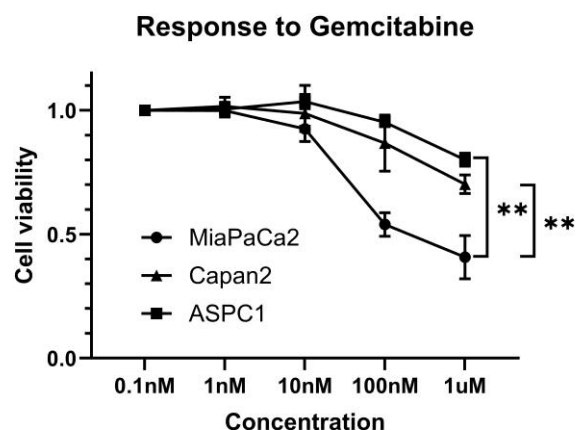
ヒト膵癌細胞株を用いて実験が行われているが、それらが、Ductal cell 由来膵癌・Acinar cell 由来膵癌に分類されてはいない。申請者は膵癌細胞株の遺伝子発現のパブリックデータを用いて、10 種類の膵癌細胞株を評価した。図の如く、4 種類の膵癌細胞株が Ductal cell 由来膵癌に該当し、6 種類の膵癌細胞株が Acinar cell 由来膵癌に該当した。



まず、臨床データと同様に膵癌細胞株において治療奏功性を確認するため、Ductal cell 由来膵癌に該当する膵癌細胞株のうち ASPC1、Capan2 を、Acinar cell 由来膵癌に該当する膵癌細胞株のうち MiaPaCa2 を用いて、膵癌の標準治療薬である 5-FU、

Gemcitabine、Paclitaxel の薬剤感受性を MTT assay により評価した。

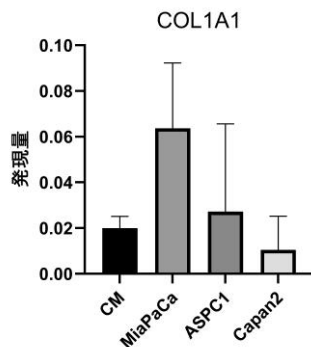
図のごとく、Gemcitabine・Paclitaxel は 10nM 以上で Acinar cell 由来膵癌に該当する MiaPaCa2 では、Ductal Cell 由来膵癌に該当する ASPC1・Capan2 に比し腫瘍増殖が抑制され、高濃度である 100nM もしくは 1  $\mu$ M では有意差を持って、腫瘍増殖を抑制することが明らかとなった (\*\*: $p<0.01$ , \*: $p<0.05$ )。このことから、Ductal cell 由来膵癌に該当する癌細胞株はより悪性度が高いと考えられた。



#### 4) 膵癌細胞株による CAF 形成の評価

Ductal cell 由来膵癌に該当する膵癌細胞株は Acinar cell 由来膵癌に該当する膵癌細胞株に比し、悪性度が高いことが分かった。次に、膵癌細胞株が癌微小環境にどのように作用するか、上記で用いた MiaPaCa2、ASPC1、Capan2 の細胞培養上清を線維芽細胞の前駆細胞であるヒト膵星細胞に添加し評価した。

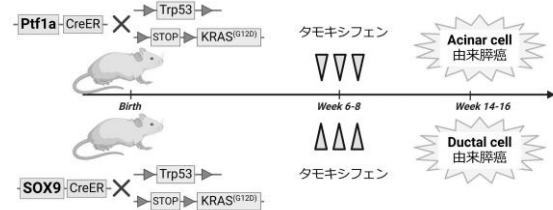
右図の如く、筋線維芽細胞性 CAF のマーカーである Collagen Type I Alpha 1 Chain (COL1A1) は Acinar cell 由来膵癌に分類された MiaPaCa2 の上清では発現が高く、Ductal cell 由来膵癌に分類された ASPC1、Capan2 の上清では低いことがわかった。そのため、予後の悪い Ductal cell 由来膵癌は、腫瘍抑制性の筋線維芽細胞性 CAF の形成が低い可能性が示唆された。一方で、腫瘍促進性である炎症性 CAF のマーカーである IL6 や LIF の発現は細胞間で有意な差は認めなかった。



以上から、①Ductal cell 由来膵癌は手術後の全生存期間が短く予後の悪い、②Ductal cell 由来膵癌に分類されたヒト膵癌手術検体では膵癌細胞の周囲に腫瘍促進性である炎症性 CAF を多く認める、③ヒト膵癌手術検体の RNA-seq データにて Ductal cell 由来膵癌に分類された症例では炎症性 CAF マーカーが高値である、④Ductal cell 由来膵癌に分類される膵癌細胞株では Gemcitabine と Paclitaxel への感受性が Acinar cell 由来膵癌に分類される膵癌細胞株に比し悪い、⑤Ductal cell 由来膵癌に分類された膵癌細胞株は腫瘍抑制性である筋線維芽細胞性 CAF の誘導が弱い。ということが分かった。よって、予後の悪い Ductal cell 由来膵癌は癌細胞自体の悪性度が高く、さらに悪性度の高い癌微小環境を形成することが分かった。

現在、申請者は異なる CRE 系統のマウスを用いることで、Ductal cell 由来膵癌、Acinar cell 由来膵癌

の形成が可能な遺伝子改変マウスを飼育中である (下図)。今後、これらのマウスを用いて、Ductal cell 由来膵癌、Acinar cell 由来膵癌より Organoid を作成し、それらがどのような癌微小環境を形成するかを調べる予定としている。



#### 【主な発表論文等】

現在、データを蓄積している段階であり、マウスを用いた研究を行った後に、論文発表を予定している。

# ヒトゲノム解析で明らかにする糖尿病リスクと個別化健康プログラムの開発

岡山大学学術研究院 医療開発領域 薬剤部

濱野 裕章

## (研究成果の概要)

本研究は、岡山県玉野市で Genovision®を用いて糖尿病の遺伝的リスクを評価し、個別化支援で行動変容を促すことを目的とした。2024 年度は抽選で選ばれた 55 名に、特定健診と遺伝子解析に基づく面談・電話支援を行い、運動・食事・睡眠の改善を促した。効果は HbA1c の経時変化で評価し、遺伝的リスク群別の傾向を可視化した。得られた知見は、個別化予防戦略のモデルとして地域医療政策・予防医学の実装に資する。

## (本文)

### 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は、日本国内では約 1,000 万人、世界では 4 億人以上がこの病を患っていると推測され、世界的な医学的課題となっている。2 型糖尿病は遺伝要因と環境要因によって引き起こされる多因子疾患であり、個々の遺伝要因の影響は小さいものの、複数の遺伝要因が組み合わさり、さらに環境要因(生活習慣)が加わることで発症に至る。そのため、個々の患者の遺伝的リスク、生活習慣などを総合的に評価し、最も効果的な治療プランを提供するアプローチが必要不可欠である。特に、遺伝的リスクが高い個人に対しては、生活習慣の改善や早期の介入を通じて、疾患の発症を遅らせるか、防ぐことに繋がり、健康寿命の延伸に寄与することが期待される。

食事の改善、定期的な運動、適切な体重管理などの生活習慣の見直しは、疾患リスクを低減させることが科学的に証明されている。遺伝子解析によって高リスクが示された個人に対して、生活習慣を改善するための行動変容は特に重要であり、遺伝的リスクに対する防御策として機能し、疾患の発症を遅らせるか、完全に防ぐ可能性がある。しかし、現在のところ、遺伝子リスクと生活習慣の見直しまで一貫して指導ができるシステムは存在しない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子解析技術と定期健康診査を統合し、糖尿病発症リスクの早期特定と、行動変

容支援による生活習慣病予防の有効性を検証することである。2 型糖尿病は遺伝要因と環境要因が複雑に関与する多因子疾患であり、発症抑制には個別リスクに応じた対応が求められる。そこで本研究では、NTT プレシジョンメディシンが提供する Genovision®により取得した 53 種類の疾患感受性遺伝子多型データと、特定健康診査から得られる生活習慣情報を統合し、対象者に個別化された行動支援を実施して、糖尿病の予防および進行抑制効果を評価する。最終的には、地域規模で機能する個別化医療モデルを構築し、それを支える人材育成と自治体との連携体制を整備することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 研究対象と選定基準

本研究の対象は、岡山県玉野市在住の 40～72 歳の市民であり、2024 年 10 月 15 日から同年 12 月末までに「人間ドック」「生活習慣病予防健診」「国民健康保険特定健康診査」または「国保特定セットけんしん」のいずれかを受診した者とした。

参加条件は、2024 年 9 月 23 日または 29 日に開催した事業説明会に本人が出席し、研究の趣旨を理解したうえで文書同意を提出したことである。説明会参加者から抽選により研究対象者を選定し、募集規模は 2024 年度 55 名、2025 年度および 2026 年度は各 100 名とした。

#### 3.2 研究デザインと介入内容



本研究は、前向きコホート研究として岡山県玉野市で実施した。特定健康診査受診者の中から Genovision®を用いた遺伝子解析を行い、糖尿病におけるハイリスク群を特定したうえで、個別のフィードバックと生活習慣改善支援を提供した。

対象者の検査プロセスは玉野市民の健診受診を起点とし、図1に示すとおり医療機関（玉野医療センター）での採血後に検体を NTT プレジジョンメディシンへ輸送し、同社で遺伝子情報の抽出と解析を実施した。解析には、東京大学医科学研究所が開発した独自アルゴリズムと遺伝子事業者のシステムを用い、得られた遺伝子情報をデータベースに格納したうえで、解析結果を岡山大学および対象者に提供した。

フィードバックは、認定遺伝カウンセラー、臨床遺伝専門医、薬剤師からなる専門職チームが実施した。内容は、糖尿病発症に関与する個別の遺伝的リスク要因に基づく生活習慣の見直しであり、特に食事・運動・定期的な血糖管理を中心とした支援を行った。また、在宅で自己採血によるヘモグロビン A1c（HbA1c）値の経時的測定を3か月ごとに行い、生活支援の効果を定量的に評価した。なお、2025年度以降は唾液による遺伝子検査を導入し、採血に比して被験者負担の軽減と参加率の向上を図る予定である。

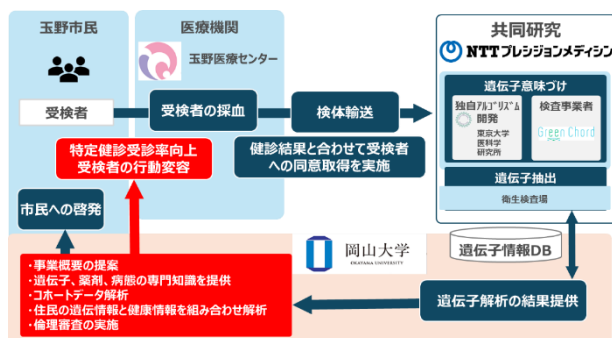


図1. 研究の実施体制と解析プロセス

### 3.3 データ収集と統計解析

本研究では、特定健康診査および質問票を用いて以下の情報を収集した。

質問票情報としては、性別、年齢、既往歴、運動習慣、食習慣、飲酒歴、喫煙歴、内服薬、健診受診歴、さらに遺伝子検査に対する関心や認識を含めた。

健診データとしては、身長、体重、BMI、腹囲、血圧、脈拍に加え、血液検査（空腹時血糖、HbA1c、中性脂肪、HDL-C、LDL-C、GOT、GPT、 $\gamma$ -GTP など）、尿検査、聴力、胸部X線、心電図、身体診察を収集した。

さらに、HbA1cの経時データについては、Self Dock Clubによる在宅自己採血キットを用い、0、3、6、9、12か月時点で測定した値を記録した。

ゲノム解析には、糖尿病リスクに関連すると報告されている KCNQ1、TCF7L2、CDKAL1、DUSP9、FTO を含む全 53 種類の遺伝子を対象とした。解析結果に基づき Genetic Risk Score（GRS）を算出し、対象者を高リスク、平均リスク、低リスクの3群に分類した。各群のHbA1c値について経時的平均値を算出し、群間の傾向を比較した。なお、欠測値がある場合は、原則として完全ケース分析（欠測データを含む症例を除外）を採用した。

### 3.4 倫理的配慮

本研究は、岡山大学病院倫理審査委員会の承認を得たうえで実施した。研究対象者には、文書および口頭により研究目的、手続、想定される利益と不利益、撤回権を含む十分な説明を行い、自由意思に基づく文書同意を取得した。試料・情報には個人識別番号を付与し、リンク可能匿名化を行って個人が特定されないよう配慮した。成果の公表時においても、個人情報情報は匿名化された形式で取り扱う。

なお、採血を含む介入による侵襲は軽微であり、リスクは最小限に抑えられると判断した。有害事象が発生した場合には、速やかな報告と適切な医療的対応が可能となる体制を整備している。

## 4. 研究成果

### 4.1 参加者の募集・実施状況とフィードバック実施

2024年度においては、広報たまの（紙媒体・月1回配布）、玉野市公式LINE、Facebook、X（旧Twitter）などの多様な広報手段を活用し、事業に関する啓発と参加募集を行った。さらに、2024年8月18日には市民公開講座「聞いてみられー！来てみられー！遺伝の話」を開催し（図2）、岡山大学病院の認定遺伝カウンセラーらが遺伝と健康管理に関する基礎知

識を市民向けに講演した。



図2. 市民公開講座「聞いてみられー！来てみられー！-遺伝の話」の風景

左：地域住民の参加風景、右：ワークショップ（遺伝子パスタ）

2024年9月23日および29日に実施した事業説明会では、研究の目的・意義、解析内容、個人情報の取扱いについて丁寧な説明を行った。その結果、合計150名の市民から文書による参加希望の意思を得た。抽選により55名を研究対象者として選定し、各自が「人間ドック」「生活習慣病予防健診」「特定健康診査」を受診したのち、NTTプレジジョンメディシンが提供するGenovision®による遺伝子解析を10月～翌年1月にかけて実施した。2025年1月23日時点における健診予約率およびGenovision®受検率はいずれも90%を超え、生活改善アドバイスの実施率も高水準で推移し、1月22日から3月5日分はすべて満席であった。

生活改善アドバイスは、受検月に応じて以下のとおり個別対応とした。具体的には、10月受検者には1月、11月受検者には2月、12月受検者には3月、1月受検者には4月に生活支援指導を行った。

#### 4.2 行動変容支援の内容とHbA1cの変化

本研究では、Genovision®による遺伝的リスク評価に基づき、参加者を「高リスク」「平均リスク」「低リスク」の3群に分類したうえで、生活習慣の見直しを支援する行動変容プログラムを提供した。各参加者には、特定健康診査および遺伝子解析の結果を踏まえたフィードバックを行い、運動習慣、食事内容、睡眠、飲酒・喫煙習慣の改善について、専門職（保健師、薬剤師、認定遺伝カウンセラー）による

面談または電話の個別支援を実施した。なお、本プログラムではアプリ等のICTツールは使用せず、対面または電話による直接支援に特化した。

HbA1cの変化は、Self Dock Club HbA1c検査キットを用いた在宅自己採血により、0、3、6、9、12か月の5時点で測定した。HbA1cの推移は、Genetic Risk Score (GRS) に基づく3群で可視化した（図3）。その結果、高リスク群では年齢が高い層ほどHbA1cの上昇傾向が相対的に大きく、一方で低リスク群では緩やかな上昇にとどまった。これらは記述統計に基づく層別分析の結果であり、HbA1cの年齢別変化傾向を示したものである。定量的な有意差検定は、症例の蓄積と追跡期間の延長後に実施予定である。

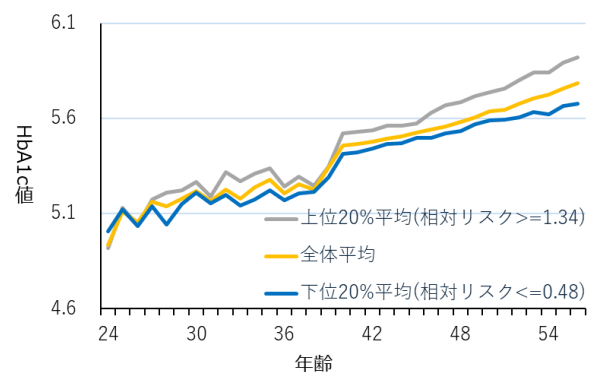


図3. GRS分類別の年齢階層におけるHbA1c累積推移

#### 4.3 考察

本研究は、糖尿病発症リスクを遺伝的背景に基づいて層別化し、個別フィードバックを通じて生活習慣改善を支援することを目的として実施した。遺伝的リスク評価はGenovision®を用いた日本人向け多因子疾患対応の遺伝子解析により行い、参加者を高リスク・平均リスク・低リスクの3群に分類した。解析の結果、HbA1cの経時的推移には群間で差がみられ、高リスク群では年齢とともに累積的な上昇が観察され、低リスク群では比較的緩やかな変化にとどまった。この所見は、遺伝的リスクに基づく層別化が将来の健康指導や介入対象の選定に活用できる可能性を示唆する。

さらに、本研究では自治体（玉野市）、大学（岡山

大学)、民間企業 (NTT プレシジョンメディシン) の連携体制により、地域住民を対象とした個別化医療の試みを具体化できた点も意義深い。参加率や受検率の高さ、生活改善アドバイス実施率の維持は、地域住民との信頼関係に基づく医療モデルの構築に資する基盤となったと考えられる。

一方で、本研究にはいくつかの限界がある。対象者数はまだ限定的であり、統計学的有意差の検出には今後の参加者拡大と長期追跡が不可欠である。現時点では症例数と観察期間が十分でなく、行動変容支援の効果を統計的に結論づける段階には至っていない。また、自己採血データや質問票の解析と行動支援の関連付けは限定的であり、データ蓄積が必要である。さらに、生活支援が HbA1c に及ぼす影響については、他の生活因子や社会環境の影響を排除できていないため、因果関係の検証には追加研究が求められる。加えて、デジタルツール (アプリやウェアラブル端末) は本年度には導入されなかったが、今後段階的に導入することで、自己管理能力を補完し、行動変容の持続・強化に寄与する可能性がある (図 4)。

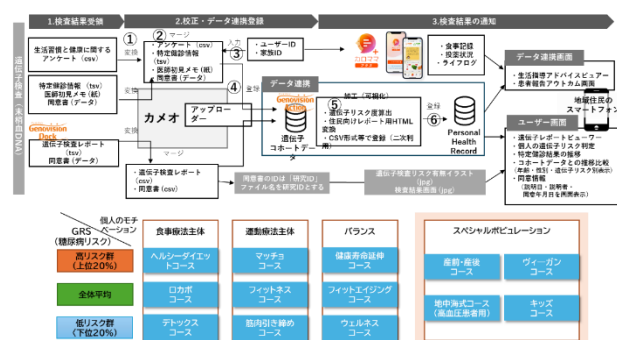


図 4. GRS 分類に基づく健康管理アプリの連携と支援コース一覧

上：遺伝子解析結果を連携し、スマートフォンで個人に応じた情報を提供する仕組み。下：GRS に基づいて提案される生活改善コースを分類。

#### 4.4 今後の展望

本研究は、糖尿病の遺伝的リスク評価に基づいた個別化健康支援の枠組みを、岡山県玉野市の地域住民を対象に実施したものである。NTT プレシジョンメディシンが提供する Genovision®を用いて複数の

疾患関連遺伝子を解析し、算出した Genetic Risk Score (GRS) により対象者を高リスク・平均リスク・低リスクに分類した。参加者には、遺伝子解析結果と特定健診データに基づくフィードバックを行い、運動・食事・睡眠・飲酒・喫煙に関する行動目標を設定・振り返る形で、対面または電話による個別支援を実施した。

HbA1c の経時的変化を収集し、GRS 層別に可視化した結果、高リスク群では累積的上昇傾向が確認され、層別支援の必要性を示唆した。ただし、現段階では症例数および観察期間が限られており、行動変容支援の有効性を統計的に検証するには至っていない。今後は参加者の拡充と長期追跡により、介入効果の定量評価が課題となる。

本研究は、自治体・大学・企業の公民学連携に基づく予防医療モデルの実装に向けた第一歩である。今後得られる成果は、より効果的かつ持続可能な個別化予防戦略の確立に貢献することが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

玉野市民における遺伝子活用事業の認知度向上を目的として、広報たまの (紙媒体・月 1 回、全戸配布) に加え、玉野市公式 LINE、Facebook、X (旧 Twitter) を活用した啓発活動を実施した。さらに、2024 年 8 月 18 日には市民公開講座「聞いてみられー！来てみられー！遺伝の話」を開催した (図 5)。当日は、岡山大学病院の認定遺伝カウンセラーによる「遺伝てなんじゃろ?」「遺伝情報を使った健康管理」の講演が行われ、遺伝に関する基礎知識、遺伝情報を用いた健康管理の種類の種類とその仕組みについて体系的に説明した。



図 5. 2024 年 8 月 18 日実施の市民公開講座のポス

ター

2024 年は、玉野市の広報誌「広報たまの」（紙媒体・月 1 回、全戸配布）において、表紙に岡山大学の事業関係者を掲載し、冊子本文で事業内容を解説した（図 6）。さらに、玉野市公式 LINE、Facebook、X（旧 Twitter）も活用して周知を行い、多チャネルでの広報体制を構築した。



図 6. 遺伝子についてのリテラシー向上・本プロジェクトの認知向上に向けた広報

2024 年 9 月 23 日および 29 日に事業説明会を実施した。説明会では、本研究の概要、遺伝子解析の内容、参加同意に関する事項について説明を行った（図 7）。



図 7. 2024 年 9 月 29 日の事業説明会の様子



# 選択的オートファジーである“リポファジー”が脂肪肝炎に与える影響

岡山大学学術研究院保健学域検査技術科学分野 細胞生理・免疫学講座

山元 修成

## (研究成果の概要)

本研究は、脂肪滴を分解するオートファジーの一種である“リポファジー”が、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の進行に与える、『悪』の側面を検証することを目的とした。高脂肪・高コレステロール食を給餌すると NAFLD/NASH を発症するモデルラットを用い、生理学・病理学・生化学・遺伝子学的解析を実施したところ、肝臓でリポファジー関連遺伝子や酸化反応酵素の遺伝子発現量が亢進した。さらに、脂肪毒性の強い飽和脂肪酸が肝臓中で増加していた。これにより、リポファジーが NAFLD/NASH の悪化に関与する可能性が示唆された。

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、2016 年に大隅良典教授がノーベル生理学・医学賞を受賞されたことで注目された、細胞内で不要物質を分解し、恒常性維持に関与する機能のことである。2016 年以降、盛んに研究が行われ、現在では分解される標的によって、ヌクレオファジー (核が対象) やフェリチノファジー (フェリチンが対象) などに細分化されている。

このうち、脂肪滴を分解するものは“リポファジー”と称されており、細胞内に異常に蓄積する脂肪滴 (中性脂肪) を分解し、脂質代謝異常の予防など、生体に対して『善』の作用を発揮するとされている (Chao X et al., *Liver Int.*, 2018; Gao Y et al., *Redox Biol.*, 2020)。そのため、現在ではリポファジーを亢進させることで、過食などにより発症する非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) をはじめとする、脂質代謝異常の予防・治療に繋がるという研究成果が散見されるようになっている (Mei Y et al., *Sci. Rep.*, 2022)。

一方で、リポファジーによって生じる遊離脂肪酸は脂質毒性を有しているため、生体に対しては『悪』の作用が大きい。リポファジーで増加した遊離脂肪酸は、肝細胞内のミトコンドリアで  $\beta$  酸化されると言及されているが、 $\beta$  酸化の亢進は酸化ストレス (ROS) の増加にもつながり (Lau JK et al., *J. Pathol.*, 2017)、こちらも生体に対して『悪』の作用を発揮する。つまり、リポファジーについて科学的に考察すれば、NAFLD を奏効するよりむしろ悪化させる可

能性が高い。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、一般的に『善』としての認識が広がりつつあるオートファジーのうち、リポファジーがもつ NAFLD や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の進行に関与する『悪』としての側面を追求することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3.1. 実験動物

動物実験は、環境省が公表した「実験動物の飼養及び管理並びに苦痛の軽減に関する基準 (2006 年)」の勧告に厳格に従って実施した。本研究では、すべてのラットを温度 ( $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ )、湿度 ( $55\% \pm 2\%$ )、12 時間の明暗サイクルがコントロールされている本学動物資源部門の施設内で管理した。本実験は、岡山大学動物実験委員会の承認を得て行っている (承認番号 OKU-2025485)。

本研究で使用する SHRSP5/Dmcr ラットは、高脂肪・高コレステロール (HFC) 食を給餌することで、NAFLD/NASH を発症する (Kitamori K et al., *Environ. Health Prev. Med.*, 2012)。雄性の SHRSP5/Dmcr ラット ( $n=10$ ) は、9 週齢で SHR 等疾患モデル共同研究会 (京都, 日本) から購入した。普通 (SP) 食および HFC 食は、フナバシファーム (千葉, 日本) から購入した。食餌の組成は次の通りである。SP 食: 粗た



んぱく質 20.8%, 粗脂質 4.8%, 粗繊維 3.2%, 粗灰分 5.0%, 水分 8.0%, 炭水化物 58.2%. HFC 食: 粗たんぱく質 9.6%, 粗脂質 24.0%, 粗繊維 1.5%, 粗灰分 2.3%, 水分 3.7%, 炭水化物 26.9%, パーム油 25.0%, コレステロール 5.0%, コール酸 2.0% (Kitamori K et al., 2012).

ラットは、最初の一週間は水と SP 食を自由摂取させ、飼育環境に慣れさせる馴化を行った。10 週齢開始時に、摂食量および体重に有意差が生じないように、SP 食給餌群 (CONT 群) と HFC 食を給餌する NAFLD 群に群分けを行い、摂食量および体重を毎週計測した (各群 n = 5)。

### 3.2. 病理学的解析

最終終齢時に、麻酔条件下で、右頸動脈から全採血を実施した。その後、肝臓および腸間膜脂肪を摘出して秤量し、脛骨長を計測した。肝臓は、病理組織学的解析のために切片化し、パラフィン包埋を行った。病理染色は、Masson-Trichrome 染色を行った。パラフィン包埋に使用しなかった肝臓は凍結保存した。

### 3.3. 生化学解析

解剖時に右頸動脈から採取した血液は、直ちに遠心し (2,500 rpm, 20 分)、血清を分離した。取得した血清を用いて、オリエンタル酵母 (東京, 日本) に生化学解析を依頼した。また、同じく採取した血液および肝臓を用いて、脂肪酸の分析を金城学院大学の北森一哉先生に依頼した。

### 3.4. 遺伝子学的解析

RNase Mini Kit (Qiagen, ドイツ) を用いて、凍結保存した肝臓 (30 mg) から全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA (1000 ng) を PrimerScript RT Reagent Kit (Takara, 日本) を用いて逆転写を行った。定量的 PCR 分析は、FastStart Essential DNA Green Master (Roche, ドイツ) および StopOnePlus Real-Time PCR システム (Thermo Fisher Scientific K. K., 日本) を用いて行った。内部標準には、GAPDH を用いた。

### 3.5. 統計解析

取得したデータは、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。統計解析は、Mann-Whitney U-test を用いて、 $p < 0.05$  を統計的に有意と判定した。

## 4. 研究成果

摂食量は、NAFLD 群では食餌変更を行った 10 週齢時に一度減少したが、それ以外は概ね横ばいに推移した (図 1A)。体重変化は有意差がついたものの、2 群間に目立った差はなく、ほぼ同じ傾向を示した (図 1B)。これら変化は、先行研究とも一致する (Watanabe S et al., Int J Exp Pathol, 2018)。

生化学解析の結果、血清 AST 値の平均値は NAFLD 群で上昇したが、統計的有意差はなかった。血清中の ALT および総コレステロール値は、NAFLD 群で有意に高かった。AST/ALT 比とトリグリセリドは、NAFLD 群で有意に低い結果となった。

肝臓の外観は CONT 群と NAFLD 群で大きく異なっていた。NAFLD 群では肝臓が白色腫大し、重量も増加していた (図 1C, G)。Masson Trichrome 染色により、NAFLD 群ではバルーン状の肝細胞と重度の肝線維化が認められた (図 1D, E)。内臓脂肪の一種である腸間膜脂肪は、両群に差は認めなかった (図 1H)。これら肉眼的所見や解剖学的所見も、先行研究と一致している。生化学解析の結果と合わせ、NAFLD 群は NAFLD/NASH を発症していると判断できる。

血中と肝臓中の脂質プロファイルは、血中では不飽和脂肪酸の一部に有意差が生じたが、2 群間に目立つ変化は認められなかった。一方で、肝臓では飽和脂肪酸が増加していた。一般的に、飽和脂肪酸は不飽和脂肪酸よりも脂肪毒性が強いと言われている。そのため、肝臓においてリポファジーが亢進し、脂肪毒性を有する脂肪酸が多く生じていることが示唆される。実際にリポファジーが亢進していることを確認するため、遺伝子解析を実施したところ、リソソーム関連遺伝子 (*Cln3*, *Lamp2*, *Trpml1*) の mRNA 発現量は NAFLD 群で有意に上昇した (図 2A-C)。オートファジー関連遺伝子である *Ulk1* も同様の結果を示した (図 2D)。さらに、NAFLD 群ではリポフ

アジギー関連遺伝子 (*Atgl*, *Rab10*, *Dnm2*) が有意に発現上昇し、有意差はなかったが *Sirt1* も発現が上昇した (図 2E-H)。酸化反応酵素である *Nox2*, *Cox2*, *Cyp2e1* は NAFLD 群で顕著に増加した (図 2I-K)。このことから、肝臓中でリポファジギーが亢進し、それによって生じた遊離脂肪酸が NAFLD 進行に影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後は、得られた脂質プロファイルの詳細な検討を行い、特に影響を及ぼし得る脂肪酸種の推定、およびリポファジギーによる NAFLD/NASH 進展の機序をより詳しく明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

当該研究について、学会発表等を行っていない。研究成果は、現在、論文投稿に向けてまとめている最中である。

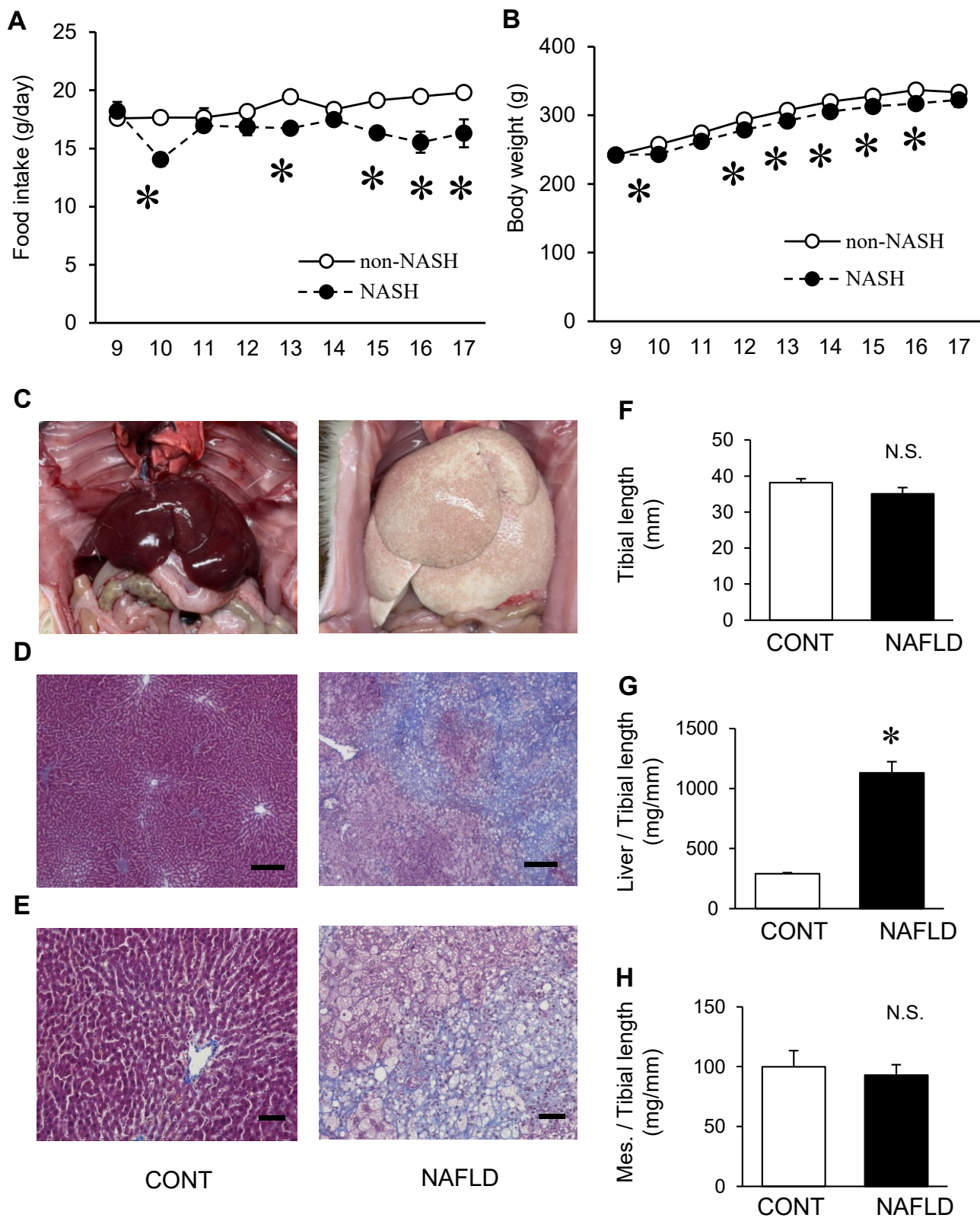


図1. 生理学的解析結果および病理学的解析結果

A: 摂食量の推移, B: 体重の推移, C: 肝臓の肉眼的所見, D: Mason-Trichrome染色像 (Scale bar= 200 μm), E: Dと同じ (Scale bar = 50 μm), F: 脛骨長, G: 肝臓重量 / 脛骨長 (mg/mm), H: 腸間膜脂肪 / 脛骨長 (mg/mm)

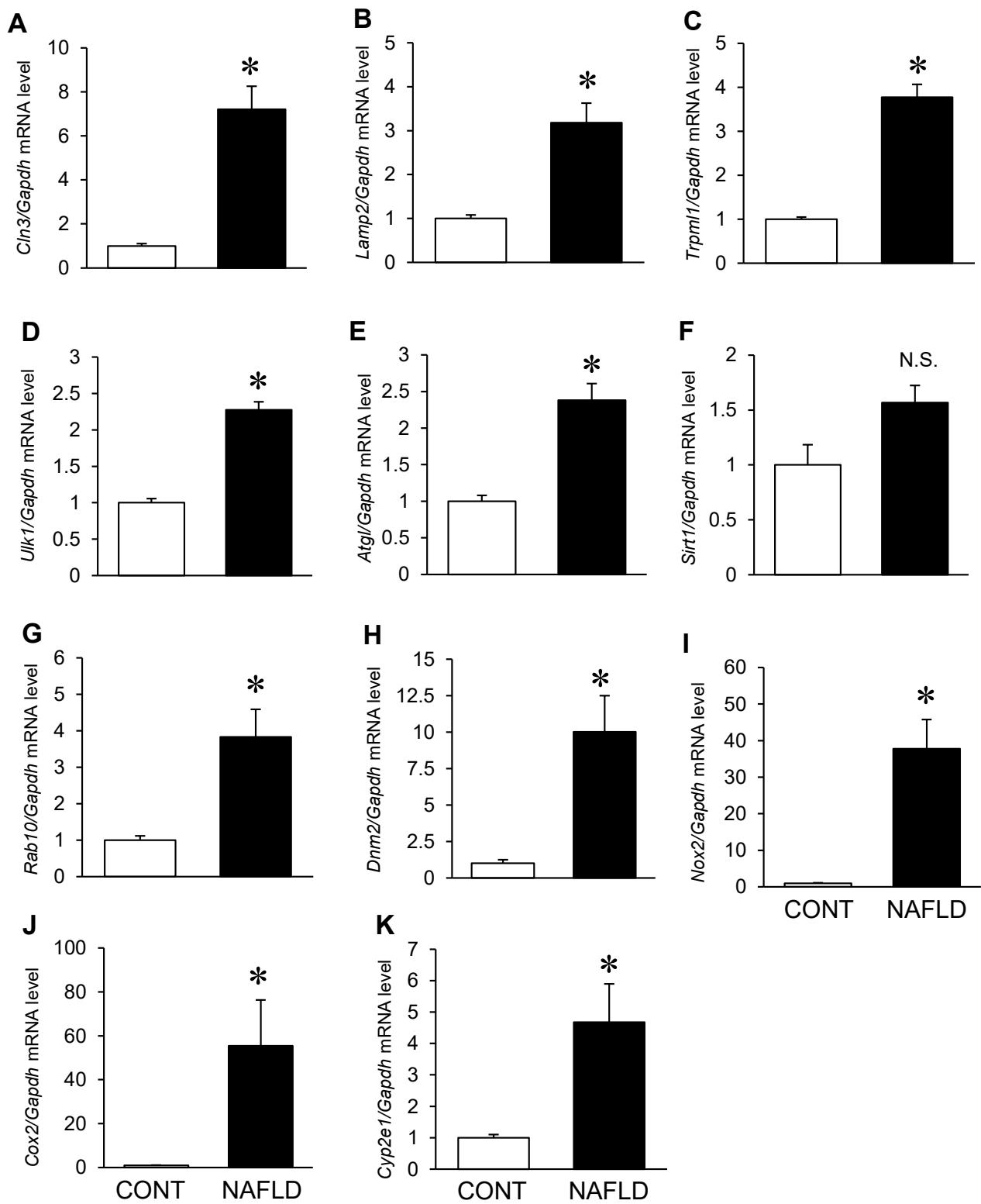


図2. 遺伝子解析の結果

## (表 題) 前皮神経絞扼症候群の外科治療効果予測因子の探索研究

(所 属) 岡山大学学術研究院 医療開発領域 低侵襲治療センター

(氏 名) 金谷 信彦

### (研究成果の概要)

本研究では、前皮神経絞扼症候群 (ACNES) の外科治療成績向上に資する因子の探索を目的とした。予定していた神経組織の分子解析は、サンプル数不足により次年度以降に継続することとしたが、術前トリガーポイント注射 (ブロック) の奏効性が外科治療成績を予測する有力因子であることを見出した。この成果は論文化され、外科治療の適応判断に有用な臨床的知見を提供する。今後はサンプル数を集積し、神経周囲微小環境を細胞・分子レベルで解析する予定である。

### (本文)

#### 1. 研究開始当初の背景

前皮神経絞扼症候群 (anterior cutaneous nerve entrapment syndrome: ACNES) は、慢性腹痛の原因としてしばしば見過ごされる疾患である。腹直筋を貫く胸腹神経前枝の絞扼によって局所痛を生じるが、臓器由来の腹痛と誤診されやすく、診断の遅れや不要な検査・治療が行われることも少なくない。診断および初期治療としてトリガーポイント注射 (trigger point injection: TPI) が用いられるが、持続的な効果を得られるのは 25~33%にとどまり、多くの症例では一時的な改善に留まる。

難治例に対しては神経切除術 (neurectomy) (図 1) が行われるが、その短期・長期成績は報告により一貫しておらず、最適な治療戦略は明確ではない。当

科では 2015 年より外科治療を導入し一定の効果をみてきたが、

術後再発率が高く、予後予測因子の解明が急務であった。そのため神経周囲微小環境を分子レベルで解析し、外科治療効果を規定する因子を探索する研究を計画した。

#### 2. 研究の目的

外科治療の効果予測因子を同定し、再発を減少させる治療戦略を確立することを目的とした。研究開始当初、特に神経周囲の免疫細胞やシュワン細胞に注目し、再発予測バイオマーカーを探索する。

細胞レベルの解析に先立ち、まず本研究は、2016 年から 2023 年に岡山大学病院で ACNES に対し、神経切除術を受けた患者を後方視的に解析し、治療成績を評価するとともに、新たな治療アルゴリズムを提案することを目的とした。

#### 3. 研究の方法

外科切除した ACNES 患者の原因神経組織を収集し、免疫染色・RNA 解析を実施する計画とした。また、本研究に先立ち、2016 年から 2023 年に岡山大学病院で ACNES に対し神経切除術を受けた患者を後方視的に解析し、患者背景と治療成績を比較検討した。

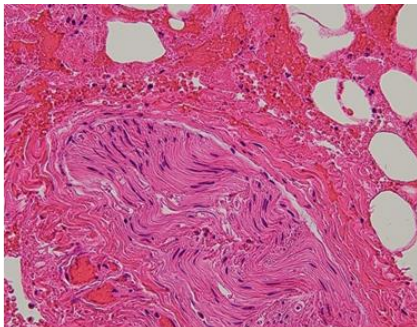


図 1 : 当科ACNES患者の切除された前皮神経のHE染色。神経の周囲には脂肪組織や免疫細胞が散在する。



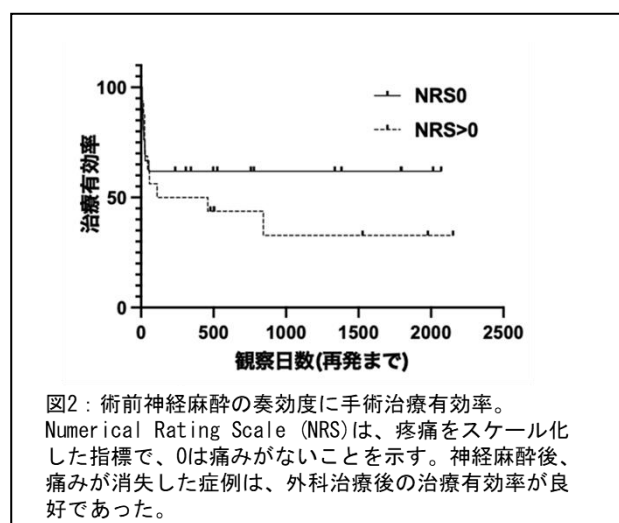
対象は診断基準を満たし、かつ術後1週間以内の早期再発例や長期未診断例を除いた37例であった。

#### 4. 研究成果

ACNES 診断時の平均年齢は33.8歳、女性が60%を占めた。初診時の平均疼痛スコア (numeric rating scale: NRS) は8.5であったが、TPI 後には平均0.95まで低下し、TPI の有効性が確認された。

外科的治療は局所麻酔下での前方神経切除術 27例、腹腔鏡下神経切除術 10例で行われた。手術手技としては、最大圧痛点を中心に皮膚切開を加え、腹直筋鞘前面で神経を同定・切除する方法、あるいは蛍光色素を指標に腹腔鏡下で横筋と内腹斜筋間の神経を切除する方法を用いた。術後合併症は認めなかった。

結果として、37例中23例(62.2%)が長期的にNRS 0を達成し寛解した。一方、14例は再発を経験した。初回手術後に再発した29例のうち22例に再切除を施行し、15例で寛解、7例は無効であった。統計解析では、術前TPIでNRSが0~1まで低下した症例は、術後寛解率が有意に高かった(図2)。また高年齢群においても寛解率が高い傾向が認められた。ただ性別、既往歴、体重などは有意な予測因子ではなかった。



考察として、本研究はTPIが診断のみならず術後

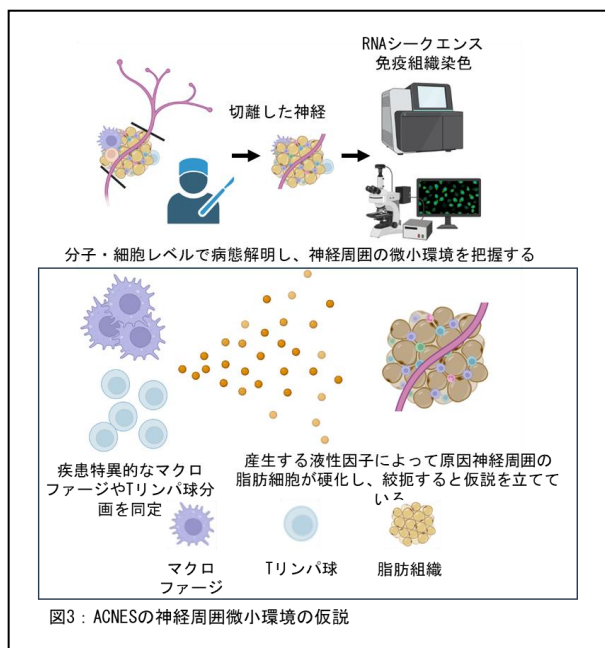
成績予測に極めて有用であることを示した。特にTPIで完全もしくはほぼ完全な疼痛消失を得られた症例は、神経切除術の良好な適応と考えられる。再切除術も一定の有効性を示したが、初回切除で前鞘レベルに留まった場合に不十分な切除となり、後鞘レベルを含む追加切除で改善する可能性があると考えられた。過去の報告と比較しても本研究の成績は妥当であり、Boelensらの71%の有効率、Stirlerらの腹壁補強術と同等の短期成績と整合する。

しかし、本研究は単施設・後方視的解析であり、症例数も限定されることから、前方アプローチと腹腔鏡アプローチの優劣比較や長期再発抑制効果の検証には今後の前向き多施設研究が必要である。

結論として、TPIの有効性は神経切除術の予後を強く予測する指標であり、術前評価における重要な位置づけが明らかになった。本研究に基づき、診断・治療を段階的に進める新しいアルゴリズムが提案される。すなわち、①TPIによる診断と反応性の評価、②有効例への外科的神経切除術の適応、③再発時の再切除や補助的治療の検討、であると考ええる。本アルゴリズムを用いることで、ACNES患者に対する治療成績の向上と標準化が期待される。

本研究は、サンプル数不足により分子・細胞解析は次年度以降に継続することとしたが、今後、神経剥離術後の再発予測・手術適応のバイオマーカー開発することで、将来の医療の進歩に大きく貢献できる可能性がある。現状、外科治療以外の根治的治療の選択肢がなく、ACNES特異的な因子の発見により新規治療薬開発の可能性も秘めている。ACNESは、主に子供から比較的若年層に発症し、患者の社会活動に影響が出ることが多い。この疾患概念の周知も乏しい状況で、新たな分子メカニズムに基づく疾患概念や治療戦略を提示することで、本邦だけでなく世界的にも貢献度は高い研究と位置付けられる。今後は症例数を増やし、神経周囲微小環境を免疫組織染色やRNAシーケンスを用いて、細胞・分子レベルで解析し、再発予測や新規治療ターゲットの同定

を目指すと同時に、ACNES の発症機序について解明したいと考えている(図3)。



## 5. 主な発表論文等

### ① 雑誌論文

Kondo Y, Kanaya N, Kobayashi A, Arakawa K, Matsuoka Y, Mimata Y, Kakiuchi Y, Shigeyasu K, Kuroda S, Kagawa S, Fujiwara T. Novel Therapeutic Algorithm in Patients With Anterior Cutaneous Nerve Entrapment Syndrome. *Neurology and Clinical Neuroscience*. 2025. In press. IF:0.4.

### ② 学会発表

なし

### ③ 図書

なし

### ④ 産業財産権

なし

# (表題) ヒト吸血ダニにおける媒介感染症の発症リスク予測と AI による ダニ種鑑別カメラアプリの開発

(所 属) 岡山大学学術研究院 医歯薬学域 病原細菌学分野

(氏 名) 福島 伸乃介

## (研究成果の概要)

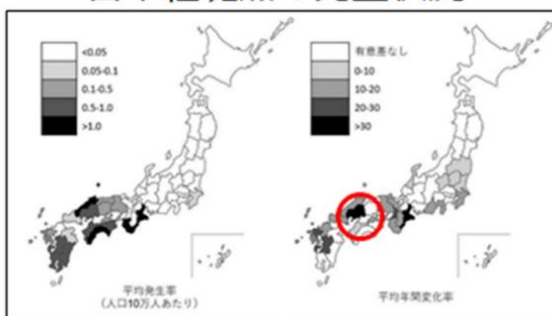
2023 年から 2024 年にかけてダニ咬傷をきたした患者 181 名からダニ検体 191 匹の収集を行った。収集した 191 匹中、形態学的評価で 152 匹がタカサゴキララマダニ、34 匹がチマダニ属、2 匹がマダニ属、1 匹がカクマダニ属で、分類不能が 2 匹で、日本紅斑熱を保有するダニは認めず、リケッチア種を有するマダニは 28 匹 (14.7%) であった。この収集したダニ種の形態評価、保有病原微生物情報を元に、選択的にダニからの疾病発症予測評価を目的に岡山大学学術研究院 環境生命自然科学学域と連携して、ViT (vision transformer) を用いた解析により正確度約 90% で得られたマダニ属の鑑別ができるプログラムを開発した。本アプリにより①写真を撮る・位置情報を入力、②Cloud 上にアップロード、③画像解析を行い学習および識別、④識別結果をスマホにフィードバック・Google マップへの情報の蓄積、の行程を可能にした。

## (本文)

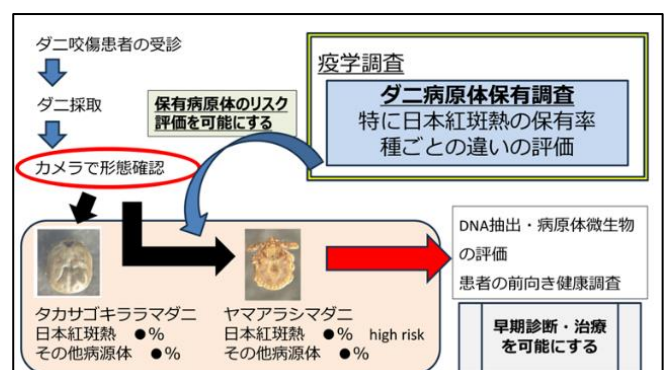
### 1. 研究開始当初の背景

近年、地球温暖化に伴いダニ種及びマダニ類の生息区域の拡大が報告され、ダニ媒介感染症に関しての注目は高まっている (Can Commun Dis Rep. 2019. Microorganisms. 2023.). ダニ媒介感染症の中でも日本紅斑熱は、特に患者数が年々増加傾向にある疾患であり、全国規模で向かい合う必要のある問題であるとされている。特に広島県においては 2001 年から 2020 年にかけての平均年次増加率は 38.6% と日本で最も高く (下図) (Fukushima S et al. Am J Trop Med Hyg. 2023.), さらに広島県の中でも福山市周辺が好発地域である可能性が示されている (Open Forum Infectious Diseases, 2024;11, ofae025.).

### 2001年-2020年における 日本紅斑熱の発生状況



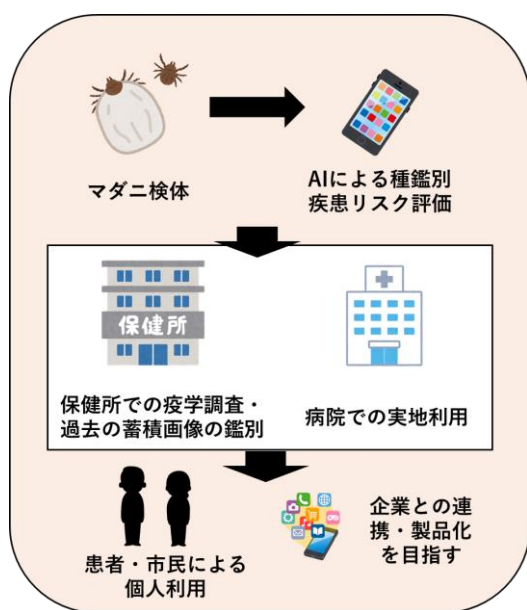
野生のダニに関する疫学研究は、臨床医療、感染症分野のみならず、産業、獣医学分野でも注目される (日農医誌. 2004, Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health. 2016.) が、一方で実臨床においては、ダニ咬傷で受診する患者、ダニを対象とした研究やリスク評価はほとんど行われていないのが現状である。ダニ種の病原体保有状況を評価して、さらにダニ種を簡便に鑑別することができれば、ヒトに吸着したダニを利用することで、感染症の早期診断、治療に寄与する可能性があると考えられる。本研究により、これまでは発症しないと診断できなかったダニ媒介感染症の予防、予後改善に大きく貢献することが期待される。



## 2. 研究の目的

本研究は、ダニを検査素材として咬傷による媒介感染症の発症リスクの評価、ひいては新たな簡便な臨床感染症検査・迅速診断の可能性を示し、早期診断、治療を可能にすることで、患者予後の改善を目指す。

まずダニ媒介感染症の好発地域において、ダニ咬傷をきたして受診した患者からダニ種及びマダニ類を採取し、既知の PCR 法により、近年特に増加傾向を示す好発地域である広島県を含む中国・四国地方において、病原性微生物の検索とその保有率を明らかにする。次に調査した病原体保有率、ダニ形態情報をもとに、これまで困難であったダニ種、マダニにおける病原体リスク評価、AI カメラアプリによるマダニ鑑別法を提唱することを目指す（下図）。



## 3. 研究の方法

本研究では、2023年5月から2024年12月にかけて広島、岡山、香川の10つの医療機関を受診したマダニ咬傷患者からマダニを収集した。採取は診察時に皮膚へ付着した状態で除去するか、患者が自ら外して持参したもので、いずれも咬痕の確認により付着を判断した。得られたマダニは $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し、咬傷部位や日時、患者属性、マダニ種、病原体の有無を記録した。

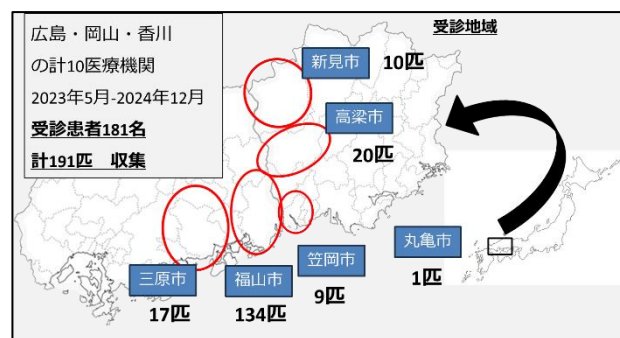
プールされたマダニを粉碎後、遠心分離を行い、その上清を核酸抽出の試料としてQIAmp DNA mini

Kit (QIAGEN)を用いてDNA抽出を行い、病原体検索を行う。抽出DNAを鋳型としてPCRを行い、野兔病菌はSingle-PCRで、エーリキア属・アナプラズマ属および紅斑熱群リケッチア (SFGR) はNested-PCRで検出した。得られたPCR産物はシーケンス解析を行い、BLASTにより同定した。さらにMEGA11ソフトを用いて系統解析を行い、SFGR同定の陽性対照には岡山環境保健センターより提供を受けた *Rickettsia japonica* の核酸を使用した。

さらに得られたダニ検体については、DNA抽出前に腹側・背側の写真を撮影し、画像をGoogle driveに保管した。この収集したダニ種の形態評価、保有病原微生物情報を元に、カメラ機能を利用したダニ種の判別、保有微生物リスク評価を行うアプリ開発を行う。本アプリのAIプログラミングと解析ソフトは、岡山大学学術研究院 環境生命自然科学学域に依頼を行い、共同研究としてのアプリ開発を進めた。

## 4. 研究成果

①岡山県、広島県、香川県の計10か所の医療機関に協力依頼を行い、2023年から2024年にかけてダニ咬傷をきたした受診患者181名からダニ検体191匹の収集を行った（下図）。



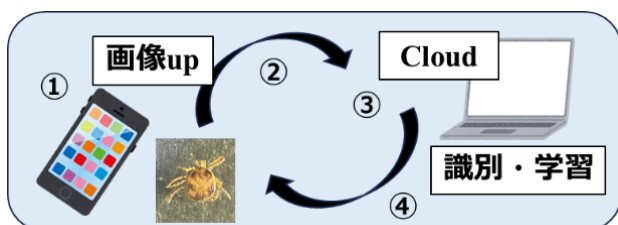
収集した191匹中、形態学的評価で152匹がタカサゴキララマダニ、34匹がチマダニ属、2匹がマダニ属、1匹がカクマダニ属で、分類不能が2匹であった。日本紅斑熱を保有するダニは認めず、リケッチア種を有するマダニは28匹 (14.7%) で、タカサゴキララマダニ23匹からは *Rickettsia tamurae*, ヤマアラシチマダニ4匹からは培養分離されていない未同定のリケッチア種、タネガタマダニ1匹から



は *R. monacensis* を同定した（下表）。

リケッチア種	保有マダニ	匹数
<i>Rickettsia tamurae</i>	タカサゴキラマダニ	23
Uncultured <i>Rickettsia</i> sp.	ヤマアラシチマダニ	4
<i>Rickettsia monacensis</i>	タネガタマダニ	1

さらにこの収集したダニ種の形態評価、保有病原微生物情報を元に、カメラ機能を利用したダニ種の判別、保有微生物リスク層別化を行うことで、より選択的にダニからの疾病発症予測評価を目的に岡山大学学術研究院 環境生命自然科学学域と連携して、ViT (vision transformer) を用いた解析により正確度約 90%で得られたマダニ属の鑑別ができるプログラムを開発した。



本アプリにより、①写真を撮る・位置情報を入力する→②Cloud (Firebase) 上にアップロードする→③画像解析を行い学習および識別→④識別結果をスマホにフィードバック・Google マップへの情報の蓄積、の行程を可能にした（上図）。今後は追加機能として鑑別したダニ種に応じて、AI ツールである Gemini を用いた解説やその後の対応指示ができるようなシステム構築を準備している。以下にマダニ画像解析結果とマッピング例を示す。

解析結果例	
	
ダニの種類:	Haemaphysails
場所:	okayama University of science
緯度:	34.696438199999996
経度:	133.9307556
投稿日時:	2025-08-10 18:57:37.326



## 5. 主な発表論文等

### ①雑誌論文 (0 件)

報告書作成時に該当論文なし（投稿中 1 件）

### ②学会発表 (3 件)

- 第 99 回日本感染症学会学術講演会 2025 年 5 月 8 日、「日本紅斑熱好発地域におけるヒト吸血ダニの疫学調査 とダニ媒介感染症発症リスクの層別化の実現」、福島伸乃介、Young Challenger Award 受賞
- 第 36 回日本臨床微生物学会総会 2025 年 1 月 25 日、「日本紅斑熱好発地域においてヒト吸血を きたしたダニ種、保有病原体の検討」、福島 伸乃介、後藤 和義、辻 秀真、角南 博、中野 靖浩、中本 健太、萩谷 英大、Best Presentation Award 受賞
- 第 28 回リケッチア研究会・第 15 回リケッチア症臨床研究会合同研究発表会 2024 年 12 月 7 日、「ヒト吸血をきたしたマダニが保有する リケッチア種の検討」、福島 伸乃介、後藤 和義、辻 秀真、角南 博、中野 靖浩、中本 健太、萩谷 英大

### ③図書 (0 件)

特記なし

### ④産業財産権 (特許権、実用新案権、意匠権) (0 件)

特記なし



# 最新鋭 X 線 CT 装置を用いた冠動脈プラークの石灰化解析手法の開発

(所 属) 岡山大学学術研究院保健学域放射線技術科学分野

(氏 名) 浅原 孝

(研究成果の概要)

冠動脈プラークは心疾患の要因であり、定量的な評価が求められる。本研究では、近年実用化されたフォトンカウンティング CT 装置で得られたデータから実効原子番号( $Z_{\text{eff}}$ )画像の生成アルゴリズムを新たに開発し、臨床画像への適用することで定量解析を試みた。提案アルゴリズムは約 0.8% の不確かさで  $Z_{\text{eff}}$  値を決定できた。64 個のプラークを解析した結果、 $Z_{\text{eff}}$  値に基づいた  $Z_{\text{eff}}$  スコアは従来法と高い相関を示した。また、プラーク全体のボクセルを反映した評価指標であるため、低密度成分も含めた評価が可能であり、有用な定量指標となることが示された。

(本文)

## 1. 研究開始当初の背景

日本における死因の第 2 位である心疾患は、早期診断および早期治療が重要である。動脈硬化の進行に伴って冠動脈に生じるプラークは、心疾患のリスク指標となることが知られている。石灰化を伴った冠動脈プラークはハイドロキシアパタイトやコラーゲンなどで構成されるが、現在の臨床検査では成分解析はされていない。X 線 CT 検査では、プラークの評価としてアガストンスコアが用いられている。この指標は、重みづけをした画素値(CT 値)の総和であり、半定量的な指標である(図 1-a)。CT 値は物質の組成と密度をラフに反映し、詳細な定量解析に耐えられる精度はない。また、重みづけは 5 段階と粗く、経験的な裏付けで使用されてきた指標である。

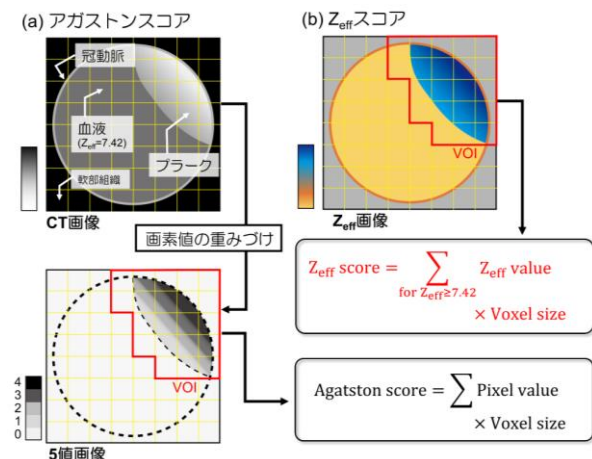


図 1 従来のアガストンスコアと提案する  $Z_{\text{eff}}$  スコアの算出方法の概念図

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、近年実用化されたフォトンカウンティング CT(PC-CT)装置を用いて定量画像を生成する手法を開発し、臨床的有用性を示すことである。具体的には、実効原子番号( $Z_{\text{eff}}$ )画像を解析するアルゴリズムを開発し、冠動脈プラークの組成分析に応用することである。

## 3. 研究の方法

### 3.1. $Z_{\text{eff}}$ 画像に基づいたプラーク評価手法の概念

図 1-b は  $Z_{\text{eff}}$  画像を用いたプラークの評価指標である“ $Z_{\text{eff}}$  スコア”の概念を示している。この指標は本研究によって初めて提案された。右上のイラストは、プラークを有する冠動脈の  $Z_{\text{eff}}$  画像の断面図を表している。 $Z_{\text{eff}}$  画像の生成手法は次段落で説明する。 $Z_{\text{eff}}$  画像上にプラーク領域を含むように関心領域 (Volume of Interest: VOI) を設定し、以下の式によって  $Z_{\text{eff}}$  スコアを計算する。

$$Z_{\text{eff}} \text{ score} = \sum_{\text{for } Z_{\text{eff}} \geq 7.42} Z_{\text{eff}} \text{ value}$$

$Z_{\text{eff}}$  値を合算する際に、 $Z_{\text{eff}} \geq 7.42$  のボクセルを選択する。血液の  $Z_{\text{eff}}$  値から決定されたこの値は、プラーク領域を識別する閾値として用いる。この計算により、プラーク領域の  $Z_{\text{eff}}$  値を選択的に加算することができる。

### 3.2. $Z_{\text{eff}}$ 画像生成アルゴリズムと 3 次元解析の手順

次に、PC-CT 装置(NAEOTOM Alpha, Siemens 社, 独国)を用いて  $Z_{\text{eff}}$  画像を生成するために使用したア

ルゴリズムについて説明する．画像解析は Mathematica プログラミングソフトウェア(Wolfram Research 社, 米国)を用いてコーディングしたプログラムを用いて実施した．アルゴリズムは次の手順で構成される．①PC-CT 装置のアプリケーションを用いて低および高エネルギーの仮想単色 X 線画像 (Virtual monoenergetic image: VMI)を再構成する．②2 つの VMI から線減弱係数( $\mu$ )画像を計算する．③これらの  $\mu$  画像の比を計算する．④ $\mu$  の比を  $Z_{\text{eff}}$  値に変換することで  $Z_{\text{eff}}$  画像を得る．

本研究で対象とする冠動脈プラークは，複雑な形状で非常に小さいため， $Z_{\text{eff}}$  画像を 3 次元的(3D)に解析する必要があった．3D 解析が可能な実臨床で利用されている画像ビューアを使用するために，[図 2](#) に示す画像処理を行った．VMI は医用画像の規格である DICOM(Digital Imaging and Communications in Medicine)形式で画像再構成されている． $Z_{\text{eff}}$  画像は DICOM ヘッダー部分を除いて自作プログラムで計算されているため，元の DICOM ヘッダー情報を  $Z_{\text{eff}}$  画像に追加することで医用画像解析ソフトウェアを使用して 3D データとして解析した．本研究では ZioCube ソフトウェア(Ziosoft 社, 日本)を使用した．

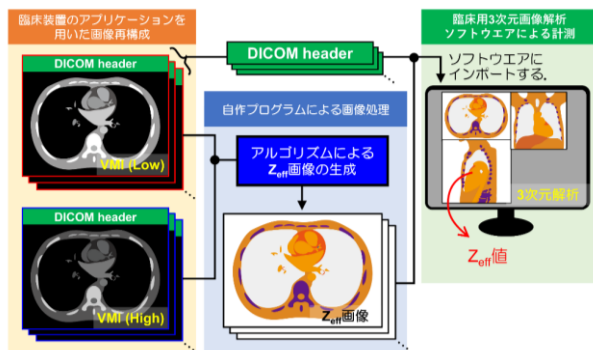


図 2 マルチスライス  $Z_{\text{eff}}$  画像を解析する手順．

### 3.3. $Z_{\text{eff}}$ 画像の生成アルゴリズムの実証および最適化実験

次に， $Z_{\text{eff}}$  画像生成アルゴリズムの実証実験について説明する．[図 3](#) に示すマルチエネルギーCT ファントム(Model 1472, Sun Nuclear 社, 米国)を PC-CT 装置でスキャンした．このファントムには，5 mg/ml～300 mg/ml の様々なカルシウム濃度を持つサンプルと約 40 HU の血液模擬物質を挿入した．これらのサンプルの元素組成はメーカーから公開されており，

$Z_{\text{eff}}$  値の理論値を算出できる．この値とアルゴリズムによって解析した  $Z_{\text{eff}}$  値を比較することで精度を検証した．さらに，アルゴリズムで使用する低および高エネルギーの VMI のエネルギーの組み合わせを変えて検証し，最適な条件を決定した．エネルギーの組み合わせは 40 keV から 190 keV まで 10 keV 間隔で解析し，120 通りの組み合わせで得られた  $Z_{\text{eff}}$  画像を評価した．

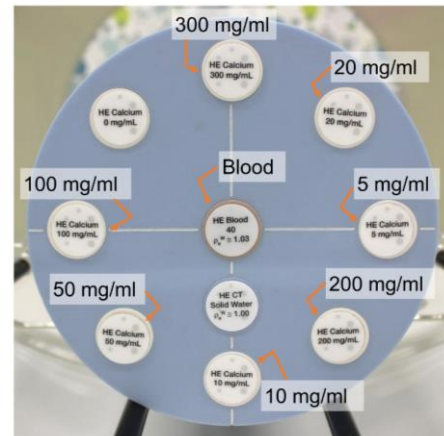


図 3 マルチエネルギーCT ファントムの写真．

### 3.4. 実臨床画像の解析

次に，非造影冠動脈 CT 検査を受けた 10 名の患者画像を用い，64 個のプラークを評価した．本研究は後ろ向き臨床研究として実施され，岡山大学倫理審査委員会の承認を得ている(承認番号: KEN2409-017)．対象患者は男性 8 名と女性 2 名で，年齢は 46～93 歳(平均: 72.1±11.9 歳)であった．組み入れ基準は，冠動脈プラークが明瞭に描出されていること，および金属や体動による画像アーチファクトが存在しないことであった．40 keV, 70 keV および 190 keV の VMI が再構成された．40 keV と 190 keV の VMI は  $Z_{\text{eff}}$  スコアの算出に用いられ，70 keV の VMI(従来画像)をアガストンスコアの算出に用いた．プラークの存在する部位において，各プラークを含むように 3 次元 VOI を設定し，[図 1](#) に示す手順に従ってアガストンスコアおよび  $Z_{\text{eff}}$  スコアを算出した．

## 4. 研究成果

### 4.1. $Z_{\text{eff}}$ 画像生成アルゴリズムの最適化

マルチエネルギーCT ファントムを用いて，VMI のエネルギー組合せを変えて生成した  $Z_{\text{eff}}$  画像の画質を評価した．典型例を[図 4](#) に示す．60&70 keV，

40&50 keV, 40&190 keV の条件を比較したところ、二乗平均平方根誤差(RMSE)はそれぞれ $\pm 0.08$ ,  $\pm 0.42$ ,  $\pm 0.08$ , 平均 SD(画像の標準偏差)は 0.58, 0.06, 0.16 であった。40 keV~190 keV の組み合わせで 120 通りの  $Z_{\text{eff}}$  画像を評価したところ、40&190 keV が精度(RMSE)とノイズ(SD)特性が良好である最適条件と判断された。

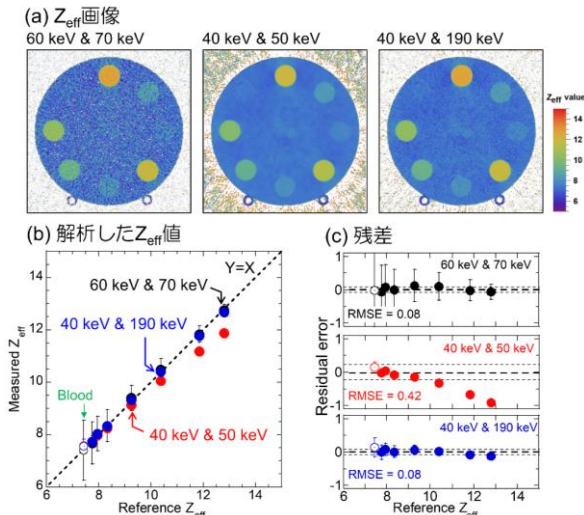


図4 様々な VMI エネルギーの組み合わせで生成した  $Z_{\text{eff}}$  画像の例。エネルギーの組み合わせによって精度と画像ノイズが異なることがわかる。

#### 4.2. 臨床データによる $Z_{\text{eff}}$ スコア解析

図5は典型的な臨床画像を示す。この例では、大きなプラークと小さなプラークが確認される。それぞれのアガストンスコア(AS),  $Z_{\text{eff}}$  スコアおよび平均  $Z_{\text{eff}}$  値が示されている。

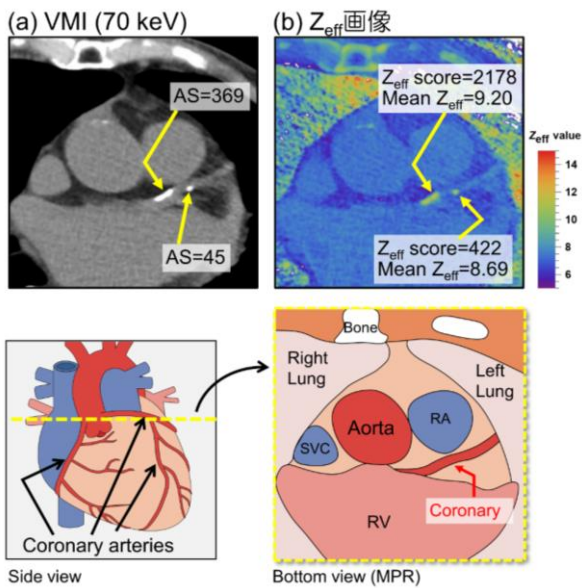


図5 プラークの CT 画像と  $Z_{\text{eff}}$  画像の典型例。

次に、64 個のプラークのアガストンスコアと  $Z_{\text{eff}}$  スコアを比較した結果を図6に示す。(a)に示すように、両スコアには極めて高い相関( $R=0.99$ )が確認された。このことは、 $Z_{\text{eff}}$  スコアが従来のアガストンスコアの代替指標となり得ることを意味している。相関直線との残差(図6-b)を解析すると、大部分のプラークが  $\Delta AS = \pm 40$  の範囲に含まれたが、大きな残差を示す例が検出された。図7にこれらの詳細な解析結果を示す。(A)低密度プラークでは、CT 値が 130 HU 未満の領域が多く、アガストンスコア法では重み係数が“×0”となるためスコア算出に反映されないボクセルが多数存在した。その結果、アガストンスコアが過小評価されていることが明らかになった。(B)高密度プラークでは、400 HU 以上のボクセルが多く、“×4”の係数が適用された結果、アガストンスコアが過大評価されていることがわかる。これに対して  $Z_{\text{eff}}$  スコアは、閾値以上のボクセルを連続的に反映するため、幅広いプラークを定量的に評価できることが示された。

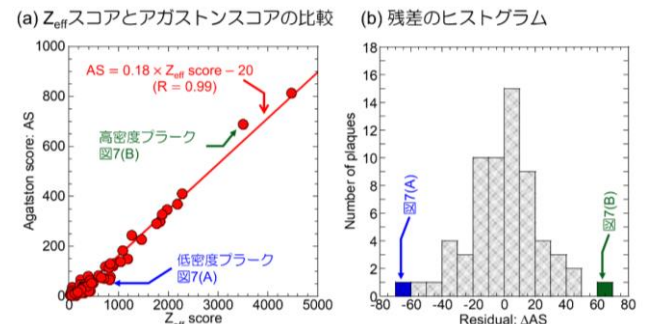


図6 アガストンスコアと  $Z_{\text{eff}}$  スコアの比較

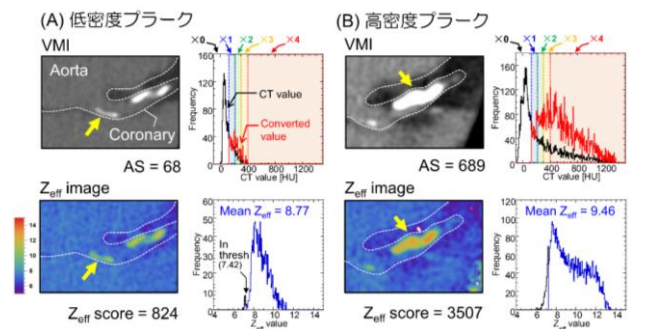


図7 相関直線から大きな残差を示したプラークの詳細な解析。

図8に  $Z_{\text{eff}}$  スコアで解析されたプラークの体積とアガストンスコア解析で得られた体積の比較を示す。アガストンスコアで算出された体積は、 $Z_{\text{eff}}$  スコアよりも約 39%小さい値を示した。これは、アガストン



スコアにおける重みづけ係数の適用により、多くのボクセルが“×0”として扱われたためであり、実際には血液よりも高い  $Z_{\text{eff}}$  値を有するボクセルが無視されていることを意味する。一方、 $Z_{\text{eff}}$  スコアでは、プラーク領域内の全ボクセル情報を反映しているため、より正確にプラークの評価が可能となる。

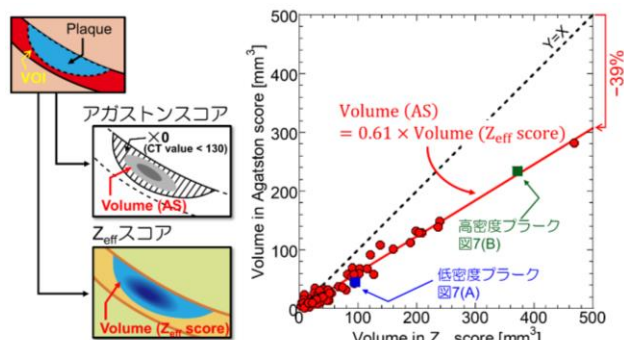


図8 アガストンスコアと  $Z_{\text{eff}}$  スコアにおけるプラーク体積の比較。

本研究で得られた成果は、論文として放射線医学領域の先進的ジャーナルである *Investigative Radiology* (IF=8.0, Q1) に掲載された。また、世界最大規模の医療放射線学会 RSNA (Radiological Society of North America) 2025 において、最新の研究が選抜される Cutting-Edge セッションに採択された。さらに、医療放射線の全国学会である JRC2025 において、国際学会 ICRPT で Certificate of Merit Award を受賞しており、本研究の独創性と先進性が広く認められた。

## 5. 主な発表論文等

[論文雑誌] (総件数: 6 件, 主要なもの: 2 件)

1. **T. Asahara**, M. Mitani, N. Kimoto, R. Nishigami, K. Takegami, Y. Morimitsu, N. Akagi, T. Miyoshi, Y. Kanazawa, T. Iguchi, **H. Hayashi**. *Applicability of effective atomic number ( $Z_{\text{eff}}$ ) image analysis of coronary plaques measured with photon counting computed tomography*. *Investigative Radiology*, in press, 2026.  
doi: 10.1097/RLI.0000000000001237
2. **T. Asahara**, S. Okada, **H. Hayashi**, T. Maeda, R. Nishigami, D. Kobayashi, C. Kurose, N. Kimoto, **S. Goto**, M. Hisatomi, Y. Yanagi, T. Iguchi. *Helpfulness of effective atomic number image in forensic dental identification: photon-counting computed tomography is suitable*. *Computers in Biology and Medicine*, 184, 109333, 2025.  
doi: 10.1016/j.compbimed.2024.109333

109333, 2025.

doi: 10.1016/j.compbimed.2024.109333

[学会発表] (5 件)

1. **T. Asahara**, M. Mitani, N. Kimoto, R. Nishigami, Y. Morimitsu, N. Akagi, T. Miyoshi, T. Iguchi, **H. Hayashi**. *Quantitative CT Imaging of Coronary Plaque based on Effective Atomic Number Image using Photon-Counting CT*. Radiological Society of North America (RSNA), Nov. 2025.
2. M. Mitani, **T. Asahara**, Y. Morimitsu, N. Akagi, T. Inoue, T. Miyoshi, M. Honda, T. Iguchi, N. Kimoto, R. Nishigami, **H. Hayashi**. *Application of hydroxyapatite imaging to quantitative coronary plaque evaluation: A new approach to use information from photon counting CT*. Radiological Society of North America (RSNA), Nov. 2025.
3. **T. Asahara**, M. Ikegami, N. Kimoto, R. Nishigami, Y. Morimitsu, N. Akagi, M. Honda, T. Miyoshi, **H. Hayashi**, T. Iguchi. *Effective Atomic Number Score in Calcified Plaque Evaluation: Approach Using Photon-Counting CT*. The 4th International Conference on Radiological Physics and Technology (ICRPT), Apr., 2025.
4. 池上 愛, **浅原 孝**, 森光 祐介, 赤木 憲明, 井上 智洋, **林 裕晃**, 本田 貢. Photon Counting Detector CT で生成したハイドロキシアパタイト画像を用いた冠動脈プラーク定量評価の臨床試験. 第 81 回日本放射線技術学会総会学術大会(JRC2025), 2025 年 4 月.
5. 池上 愛, **浅原 孝**, 森光 祐介, 赤木 憲明, 井上 智洋, **林 裕晃**, 本田 貢. Photon Counting Detector CT を用いた冠動脈プラークの解析手法の提案. 第 20 回中四国放射線医療技術フォーラム CSFRT2024, 2024 年 10 月.

[受賞] (1 件)

1. Certificate of Merit Award. *Effective Atomic Number Score in Calcified Plaque Evaluation: Approach Using Photon-Counting CT*. JRC2025, The 4th International Conference on Radiological Physics and Technology (ICRPT).

# IL-6 蛋白発現解析による特発性多中心性キャッスルマン病 (iMCD) の治療予測指標の確立

岡山大学学術研究院保健学域 検査技術科学分野 分子血液病理学

錦織 亜沙美

## (研究成果の概要)

特発性多中心性キャッスルマン病 (iMCD) は 3 つの亜型 (IPL, TAFRO および NOS) に分類されている。IL-6 は iMCD で上昇することが知られているが、各亜型における IL-6 産生細胞の違いは不明である。免疫染色および ISH の結果、IPL では形質細胞が主要な IL-6 産生細胞であるのに対し、TAFRO では血管内皮細胞が IL-6 を産生することが明らかになった。遺伝子発現解析により、IPL では *XBPI* などの ER ストレス関連遺伝子の発現亢進を認めた。本研究の結果、*XBPI* を介した IL-6 産生が IPL の病態形成に寄与しており、IL-6 阻害剤に対する良好な反応性に関連している可能性がある。

## (本文)

### 1. 研究開始当初の背景

特発性多中心性キャッスルマン病 (iMCD) は本邦において難病指定 (#331) されている原因不明のリンパ増殖性疾患であり、特徴的なリンパ節の組織像と臨床所見により 3 つの亜型 (IPL, TAFRO および NOS) に分類されている。

しかし、いずれの亜型においても明確な診断基準や疾患特異的バイオマーカー、ならびに根治療法が確立されていないため、診断や治療法を巡り混乱が生じている。

現在、iMCD の病態の一部には炎症性サイトカインである IL-6 が関与していると考えられており、日本では抗 IL-6 受容体抗体 (tocilizumab) が治療薬として承認、汎用されている。また、世界的にも IL-6 を対象にした治療が中心である。一方で、IL-6 阻害剤は対症療法であるため生涯にわたって投薬が必要である点や、一度投与を開始すると休薬・中止にリスクが伴う点から、治療開始には慎重な判断が必要となる。しかし、iMCD は患者によって抗 IL-6 療法に対する反応性に差異があることが報告されており、反応性を治療前に予測できないことが問題となっている。さらに、根治療法の確立につながる治療標的分子の発見も喫緊の課題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、iMCD 症例を対象に IL-6 の免疫染色

を行い、バーチャルスライドスキャナを用いて標本をデジタル化する。さらに、画像解析ソフトを用いてデジタル化した標本を評価することで、定量化を行う。また、IL-6 阻害剤による治療効果との関連性を解析することで、IL-6 免疫染色結果と治療効果の関連性を検討する。

本研究は、先行研究にて実施した iMCD の全トランスクリプトーム解析結果も合わせて解析可能であり、IL-6 免疫染色と治療効果の関連性に加え、遺伝子発現レベルによる比較検討を行うことで、治療反応性の違いをもたらす因子の同定および病態解明に繋がることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### 3.1. 症例選択

岡山大学第二病理の病理コンサルテーションファイルより、64 例の iMCD リンパ節症例 (IPL 50 例、TAFRO 14 例) を対象とした。全ての症例は iMCD のコンセンサス診断基準<sup>1</sup>を満たしており、KSHV/HHV8 は陰性であった。

#### 3.2. IL-6 免疫染色、デジタル化

全てのリンパ節症例において、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体を用いて IL-6 免疫染色を実施した。免疫染色は自動染色装置 Bond-III (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) を用いて行い、一次抗体は IL-6 (10C12, 1:200, Leica Biosystems)



を使用した。

染色後の標本はNanozoomer whole-slide scanner (Hamamatsu Photonics) を用いて 40×で読み込み、画像解析ソフトウェアであるQuPath(University of Edinburgh, UK) を用いて解析を行った。染色強度を 0 (陰性) ～3 (強陽性) の 4 段階でスコアリングを行い、H スコアを算出した。臨床情報および組織所見の解析は、R Studio ソフトウェア (v4.3.0) を用いて行った。連続変数の比較には Wilcoxon の順位検定を使用し、カテゴリ変数の解析には Fisher の正確確率検定を用いた。P 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意と判断した。

### 3.3. In situ hybridization (ISH)

IPL 2 例、TAFRO 2 例のリンパ節 FFPE 検体を用いて、IL-6 および IL-6 受容体 (IL-6R) の ISH を行い、mRNA のシグナルを検出した。染色には、ViewRNA ISH Tissue Evaluation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、プローブは IL-6 (VA1-13526-VT) と IL-6R (VA1-11611-VT) を使用した。

### 3.4. 遺伝子発現解析

IPL 24 例、TAFRO 7 例を用いて、nCounter (NanoString Technologies) による遺伝子発現解析を行った。先行研究によって実施した全トランスクリプトーム解析の結果に基づき、IPL に特徴的な遺伝子群 105 遺伝子を含めたカスタムパネルを作製し解析を行った。

## 4. 研究成果

### 4.1. 臨床病理学的特徴

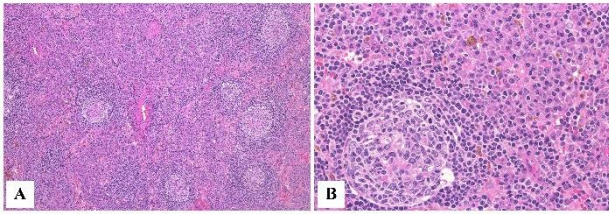
臨床病理学的解析の結果【表 1】、IPL と TAFRO の間に有意な年齢差は認められなかった ( $p = 0.644$ )。また、IPL 患者は TAFRO 患者と比較して血小板数および免疫グロブリン (IgG、IgA、IgM) レベルが優位に高値であった ( $p < 0.001$ )。血清 IL-6 値はサブタイプ間で有意な差は認められなかった ( $p = 0.234$ )。

組織学的に、IPL は、正常から過形成性の胚中心を示し、濾胞間領域の拡大および成熟形質細胞のシート状増生を特徴としており、一部の症例ではヘモ

ジデリンの沈着を認めた【図 1】。対して、TAFRO では萎縮した胚中心と顕著な血管増殖が認められた【図 2】。萎縮した胚中心内には渦巻き状の血管が認められた。一部の TAFRO 症例では顕著な血管新生を伴う形質細胞増殖が認められた

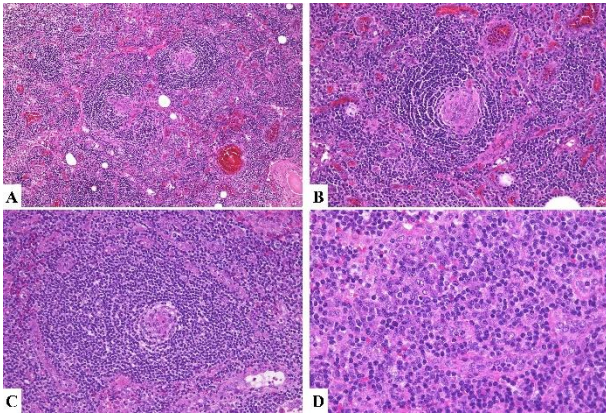
表 1. IPL と TAFRO の臨床所見の比較

	IPL (n=50)	TAFRO (n=14)	p-value
年齢	54.0	49.0	0.644
(median [IQR])	(62.0–44.5)	(65.5–41.8)	
性別 (M/F)	27/23	11/3	
<b>検査所見</b>			
<b>(median [IQR])</b>			
WBC, $\times 10^3/\mu\text{L}$	8.0	9.0	0.456
[n=43]	(9.6–5.7)	(12.4–5.7)	
Plt, $\times 10^3/\mu\text{L}$	387	35	<0.001
[n=56]	(439–286)	(54–22)	
Hb, g/dL	10.3	9.0	0.269
[n=57]	(11.5–9.1)	(11.3–7.5)	
CRP, mg/dL	6.5	6.0	0.992
[n=55]	(8.8–3.4)	(16.1–1.9)	
血清 IL-6, pg/mL	37.5	15.6	0.234
[n=16]	(52.5–23.6)	(26.6–10.7)	
IgG, mg/dL	4727.0	1317.7	<0.001
[n=52]	(6014.5–4274.3)	(1560.3–1193.1)	
IgM, mg/dL	215.0	73.7	<0.001
[n=41]	(271.2–154.0)	(96.3–63.0)	
IgA, mg/dL	553.6	188.6	<0.001
[n=41]	(686.0–450.0)	(227.3–169.0)	



【図 1】 IPL の組織像

A: 濾胞間領域が拡大し、正常～過形成の胚中心を認める。B: 濾胞間領域における成熟形質細胞のシート状増殖とヘモジデリン沈着が認められる。



【図 2】 TAFRO の組織像

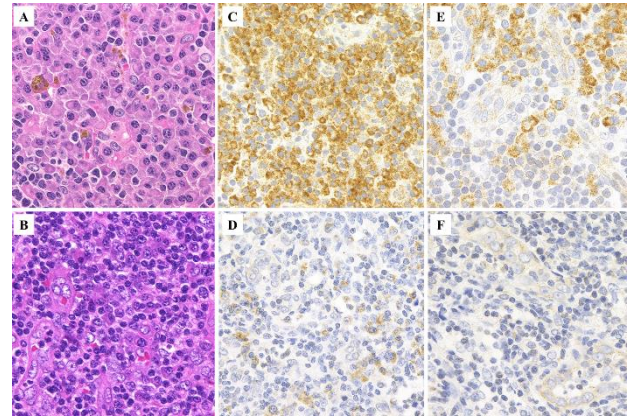
A, B: 形質細胞増多を伴わない TAFRO。萎縮性胚中心と著明な血管新生が認められる。胚中心内において、渦状血管の増生が認められた。C, D: 形質細胞増多を伴う TAFRO。渦状血管を伴う萎縮した胚中心が認められた。濾胞間領域では、著明な血管増殖とリンパ球に混在して形質細胞が認められた。

#### 4.2. 免疫染色・ISH

IL-6 免疫染色の結果、IPL において TAFRO よりも有意に高強度の IL-6 蛋白発現が認められた【図 3】。IPL では、濾胞間領域にシート状の成熟形質細胞増生が認められ、細胞質に顆粒状の IL-6 陽性像を示した。TAFRO では、一部の症例で濾胞間における形質細胞増生と IL-6 陽性形質細胞が認められ、血管内皮細胞にも同様に IL-6 陽性を示した。IL-6 の H スコアは TAFRO と比較して IPL で有意に高かった ( $p < 0.001$ )。

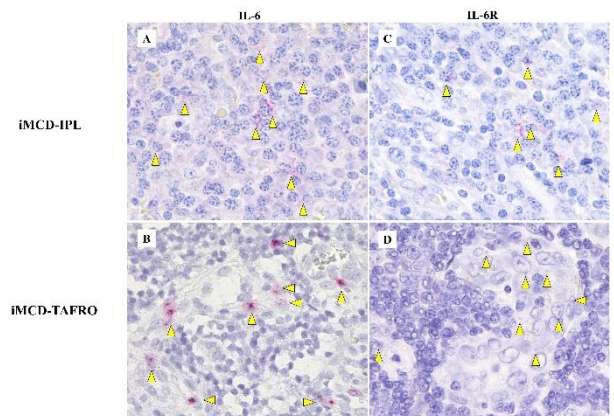
ISH の結果、IPL では IL-6 mRNA シグナルが主に形質細胞において認められたのに対し、TAFRO では血管内皮細胞において検出された。同様に、IL-6R の mRNA は IPL において形質細胞に、TAFRO において血

管内皮細胞で認められた【図 4】。



【図 3】 iMCD における IL-6 免疫染色結果

A: IPL。濾胞間領域に成熟形質細胞のシート状増生が認められた。B: TAFRO。濾胞間領域に顕著な血管新生と形質細胞増生が認められた。C: IPL の IL-6 免疫染色。濾胞間領域における形質細胞の細胞質は顆粒状の陽性像を示した。D: TAFRO における IL-6 免疫染色。形質細胞において、IPL よりも弱い IL-6 陽性像を示した。E: IPL の血管内皮細胞は形質細胞よりも弱い IL-6 陽性像を示した。F: TAFRO の血管内皮細胞において IL-6 陽性像を認めた。

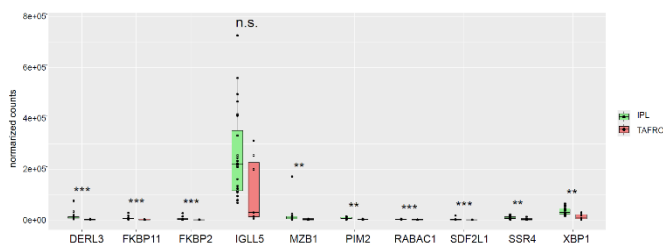


【図 4】 IL-6 および IL-6R の ISH

A: IPL。IL-6 mRNA シグナルは主に形質細胞で認められた (黄色矢印)。B: TAFRO。IL-6 mRNA シグナルは血管内皮細胞において認められた (黄色矢印)。形質細胞において IL-6 mRNA シグナルは検出されなかった。C: IPL。IL-6R mRNA シグナルは主に形質細胞で認められた (黄色矢印)。D: TAFRO。IL-6R mRNA シグナルは血管内皮細胞において認められた (黄色矢印)。形質細胞において IL-6R mRNA シグナルは検出されなかった。

### 4.3. 遺伝子発現解析

先行研究において同定した IPL に特徴的な 105 遺伝子を対象として、nCounter を用いた遺伝子発現プロファイリングを実施した。全サンプルで発現量が高値であった上位 10 遺伝子は、*IGLL5*、*XBPI*、*MZB1*、*DERL3*、*SSR4*、*FKBP11*、*PIM2*、*FKBP2*、*RABAC1*、*SDF2L1* であった。特に、これらの遺伝子のうち 9 つ (*XBPI*、*MZB1*、*DERL3*、*SSR4*、*FKBP11*、*FKBP2*、*PIM2*、*RABAC1*、*SDF2L1*) は、TAFRO と比較して IPL で有意に高発現していた【図 5】。



【図 5】 IPL および TAFRO における遺伝子発現解析

発現量トップ 10 遺伝子 (*IGLL5*、*XBPI*、*MZB1*、*DERL3*、*SSR4*、*FKBP11*、*PIM2*、*FKBP2*、*RABAC1*、*SDF2L1*) における IPL と TAFRO の発現値比較。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 。

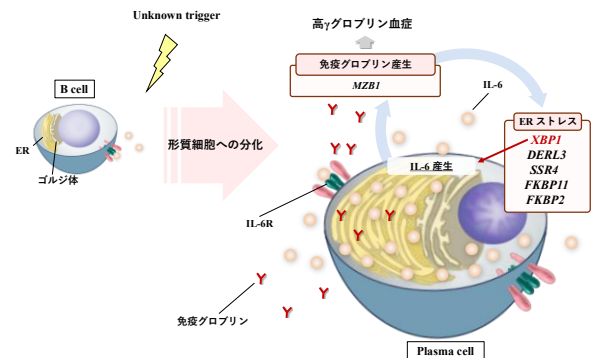
### 4.5. 総括と今後の展望

本研究は、免疫染色、ISH、および遺伝子発現解析により、IPL と TAFRO における IL-6 産生経路が異なる可能性を見出した。

本検討では、TAFRO において、血管内皮細胞による IL-6 産生が顕著であることを明らかにした。また、TAFRO では PI3K-Akt 経路の活性化および TNF  $\alpha$ 、IL-1R、MTOR、VEGFA などのサイトカインストーム関連遺伝子の発現亢進が認められている<sup>2,3</sup>が、IL-6 の遺伝子発現に有意差は認められなかった。したがって、TAFRO における血清 IL-6 の上昇はサイトカインストームの結果であることが示唆された。

対して、IPL では形質細胞において IL-6 蛋白、ならびに IL-6 および IL-6R の mRNA を検出した。これらの結果から、形質細胞による IL-6 の自己分泌が示唆される。特に、IPL において *XBPI* 遺伝子の高発現が認められた。*XBPI* が IL-6 分泌を促進することが知られており<sup>4</sup>、本研究の結果は IPL における IL-

6 の自己分泌および傍分泌を示唆していると考えられる【図 6】。



【図 6】 IPL の病態メカニズムの仮説

また、本検討で算出した IL-6 の H スコアは、TAFRO と比較して IPL において有意に高値であった。現在、iMCD のサブタイプごとに IL-6 阻害剤に対する治療効果が異なることが示唆されており、将来的には治療効果の予測に有用である可能性がある。

今後は、より詳細な病態メカニズムの解明を目指し、空間的トランスクリプトーム解析やシングルセル解析を組み合わせた解析を検討している。これにより、本研究により同定した遺伝子群の細胞間相互作用や発現細胞が同定可能となり、病態理解や根治療法につながる新規治療分子の発見に繋がることが期待される。

### 【参考文献】

1. Fajgenbaum DC, Uldrick TS, Bagg A, et al. International, evidence-based consensus diagnostic criteria for HHV-8-negative/idiopathic multicentric Castleman disease. *Blood*. Mar 23 2017;129(12):1646-1657. doi:10.1182/blood-2016-10-746933
2. Haratake T, Nishimura MF, Nishikori A, et al. The involvement of PI3K-Akt signaling in the clinical and pathologic findings of TAFRO- and NOS-type iMCD. in press; 2025.
3. Nishikori A, Nishimura MF, Tomida S, et al. Transcriptome analysis of the cytokine storm-related genes among the subtypes of idiopathic multicentric

Castleman disease. *J Clin Exp Hematop*. Dec 25 2024;64(4):297-306. doi:10.3960/jslrt.24061

4. Iwakoshi NN, Lee AH, Glimcher LH. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev*. Aug 2003;194:29-38. doi:10.1034/j.1600-065x.2003.00057.x

Castleman disease subtypes . The 2nd International Symposium on Castleman Disease. 2025 年 2 月 7 日

【図書】 なし

【産業財産権】 なし

## 5. 主な発表論文等

【雑誌論文】 (2 件)

1. Nishikori A, Nishimura MF, Nishimura Y, Yamada R, Haratake T, Ennishi D, Chijimatsu R, Ito T, Koga T, Ochi S, Kawahara Y, Ueta H, Takeda Y, Gonzalez MV, Fajgenbaum DC, Van Rhee F, Momose S, Sato Y. Distinct interleukin-6 production in IPL and TAFRO subtypes of idiopathic multicentric Castleman disease. *Haematologica*. 2025 Sep 11. Online ahead of print.
2. Nishimura MF, Haratake T, Nishimura Y, Nishikori A, Sumiyoshi R, Ujiie H, Kawahara Y, Koga T, Ueki M, Laczko D, Oksenhendler E, Fajgenbaum DC, van Rhee F, Kawakami A, Sato Y. International Consensus Histopathological Criteria for Subtyping Idiopathic Multicentric Castleman Disease Based on Machine Learning Analysis. *Am J Hematol*. 2025 Sep;100(9):1502-1512.

【学会発表】 (2 件)

1. 錦織亜沙美, 西村碧フィリーズ, 佐藤康晴. 特発性多中心性キャスルマン病の病態形成における IL-6 の役割. 第 114 回日本病理学会総会. 2025 年 4 月 17 日
2. Asami Nishikori, Midori Filiz Nishimura, Ryota Chijimatsu, Tomoka Haratake, Daisuke Ennishi, Naoya Nakamura, Shuji Momose, Yasuharu Sato. Role of IL-6 in the pathogenesis of idiopathic multicentric