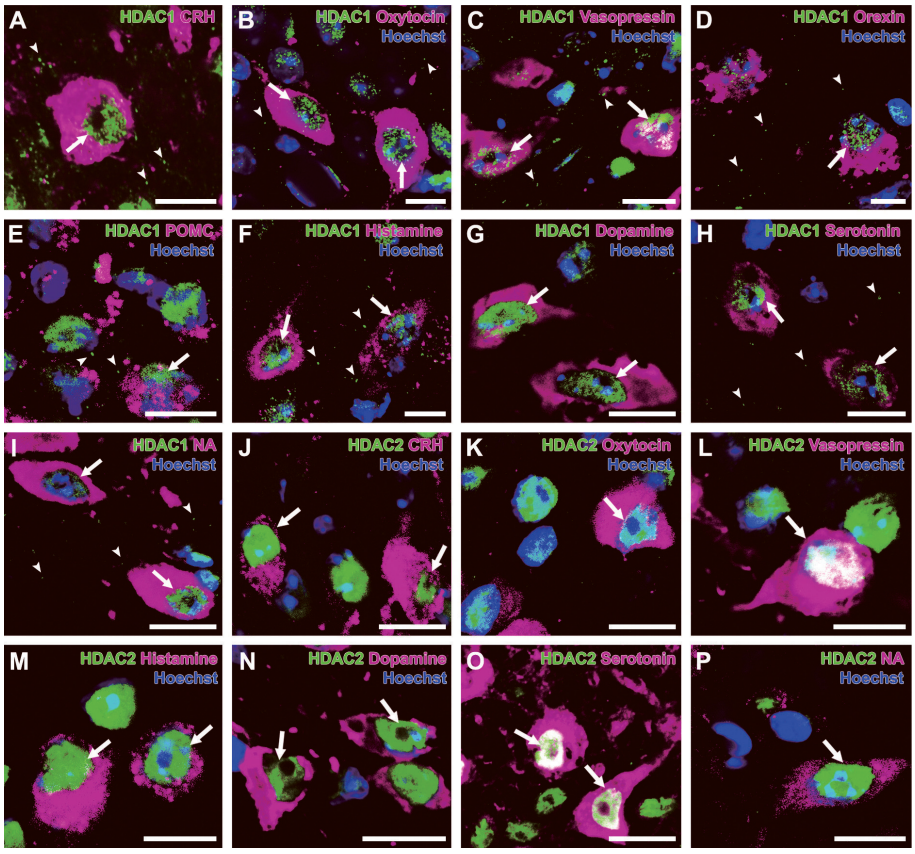
Vol.62

お茶の水醫學雑誌

Ochanomizu igaku zasshi

第 62 巻　第 1 号　2014 年



東京医科歯科大学
お茶の水医学会

目　次

総 説

免疫系の発生・機能発現に関与する分子とその欠陥による疾患 …… 矢田　純一　1

非透析慢性腎臓病の保存療法――35 年間の経験 …… 椎貝　達夫　13

ヘパラン硫酸プロテオグライカンの分子間相互作用の調節 …… 柳下　正樹　27

プレスリリース研究

胎盤における胎児・母体間の相互作用に重要な遺伝子の発見 …… 石野　史敏　35

お茶の水医科同窓会 第 23 回研究奨励賞 受賞論文

オレキシン 2 型受容体シグナルを強めると食餌誘導性肥満を防げる …… 船戸　弘正　45

剖検症例紹介

剖検症例から学ぶ疾病の転帰と病態生理：症例 No.81～94 …… 59

学位論文紹介

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科医学博士学位論文紹介 …… 89

寄付一覧 99

編集後記 101

お茶の水醫學雑誌投稿規程 102

Contents

Review article

Molecules involved in the development and function of the immune system ; their gene abnormalities and related diseases …… Junichi Yata　1

Conservative therapy for chronic kidney disease without using dialysis ; a 35–year experience …… Tatsuo Shiigai　13

Regulation of molecular interactions involving heparan sulfate proteoglycans …… Masaki Yanagishita　27

Press release research

Discovery of an essential placental gene regulating feto-maternal interaction …… Fumitoshi Ishino　35

Research promotion award 2008 from TMDU medical alumm: association

Enhanced orexin receptor–2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity …… hiromasa Funato　45

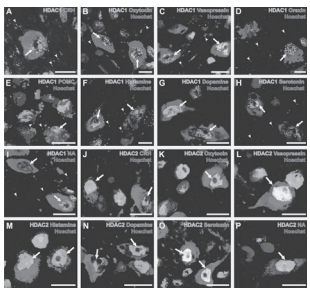
Brief autopsy reports

Clinical course and pathophysiology of diseases reviewed from autopsy cases：No.81～94 …… 59

TMDU PhD Thesis from Graduate School of Medicine …… 89

List of donations to the jounal …… 99

表紙の図



神経細胞集団ごとの HDAC1 および HDAC2 発現を検討した．HDAC1 および HDAC2 を Alexa488（グリーン），神経細胞マーカーは Alexa555（マジェンタ），核を Hoechst33342（ブルー）で可視化している．Alexa488 と Alexa555 の重なりは白色になる．用いた神経細胞マーカーは CRH，オキシトシン，バゾプレッシン，オレキシン，POMC，ヒスタミン，ドパミン，セロトニン，ノルアドレナリンである．

（「オレキシン 2 型受容体シグナルを強めると食餌誘導性肥満を防げる」，55 頁，船戸弘正先生提供）

総　説 Review article　　お茶の水醫學雑誌　62:001–011（2014）

免疫系の発生・機能発現に関与する分子とその欠陥による疾患

矢田　純一　　東京医科歯科大学 名誉教授

要旨：免疫担当細胞の発生や機能発現に，どのような分子がどのような働きをしているか概説した．獲得免疫には抗原レセプターが必須であるが，その多様性は主に遺伝子の再編成により生み出される．免疫グロブリンの各クラスも遺伝子の再編成による．免疫担当細胞の機能は表面の抗原レセプター，サイトカインレセプター，パターン認識レセプターなどさまざまな表面分子への刺激で誘導され，それらからのシグナル伝達には数多くの分子が複雑に関与している．免疫応答は適度に制御される必要があり，それにはさまざまの機構がある．それらに関与する分子の遺伝子異常は原発性免疫不全症の原因となる．各欠陥遺伝子と病型との関係を示した．

Key words：免疫細胞の発生　免疫細胞の活性化　自然免疫の活性化　免疫制御　原発性免疫不全症　遺伝子異常

Ⅰ．はじめに

原発性免疫不全症は，免疫系のいずれかの部分に先天的な欠陥があるため生体防御不全を呈している病気である．現在，責任遺伝子として 170 種ほどが明らかにされている．それは，それらの遺伝子に支配されている分子が免疫系においてどのような役割をはたしているのかを，ヒトにおいて確認する貴重な情報を提供している．免疫系の発生や機能発現に，どのような分子がどのように関与しているのか，その欠陥によってどのような病気が発症するのかについて概説する．本稿では獲得免疫系を中心とし，好中球異常症，補体欠損症，自己炎症性疾患については割愛した．

Ⅱ．抗原レセプターの生成

抗原と 1 対 1 の対応で特異的に反応する細胞は B 細胞と T 細胞だけである．それは，これらの細胞が抗原レセプターを表出しているからである．1 個の B 細胞，T 細胞は原則として 1 種類の抗原レセプターを表出していて，特定の抗原にのみ反応する．他の抗原には別の細胞が対応する．B 細胞の抗原レセプターは細胞膜結合性の免疫グロブリンであるが，B 細胞レセプター（B cell receptor：BCR）ともいう．抗体と同じく 2 本ずつの L 鎖，H 鎖とから形成されている．T 細胞の抗原レセプターは α，β ないし，γ，δ の 2 本のペプチド鎖から形成され，T 細胞レセプター（T cell receptor：TCR）という．抗原レセプターを表出していることが，これらの細胞の特性であるから，抗原レセプターを生成することが B 細胞，T 細胞への分化の基本となる．

対応しなければならない抗原の種類は億に上ぼると予想されるが，ヒトの遺伝子は 3 万足らずしかない．限られた遺伝子を使って無数に近い種類の抗原レセプターを生み出すために，遺伝子の再編成という方法がとられている．L 鎖，α 鎖，γ 鎖については V グループと J グループ，H 鎖，β 鎖，δ 鎖については V グループ，D グループ，J グループそれぞれに属する 1 個の遺伝子を任意に選び，*V* と *J*，あるいは *V* と *D* と *J* の遺伝子を組み合わせて活性遺伝子をつくるのである．組み合わせの原理からいって多種類のものを生み出せる．たとえば，V グループから *V2* を，J グループから *J2* を選んで結びつけるとすると，これらの遺伝子は 1 本の DNA 鎖に並んで存在するので，*V2* 遺伝子の後の部分と *J2* 遺伝子の前の部分を切断し，

連絡先：矢田　純一　ochamed.aps@tmd.ac.jp

前　目次へ　次

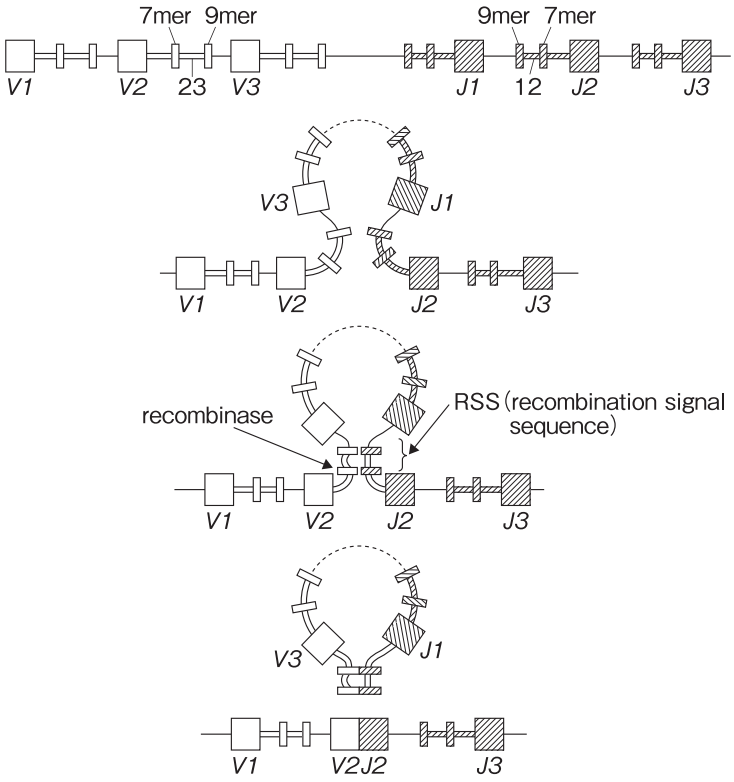


図 1．遺伝子の再編成による抗原レセプターの多様性の生成
免疫グロブリン L 鎖の可変領域の遺伝子には V グループと J グループの遺伝子があり，それぞれから任意の遺伝子を一つ選んで組み合わせる．たとえば，*V2* と *J2* を選び，その介在部を抜き取って，*V2J2* という活性遺伝子をつくる．組み合わせの多様性から多様な抗原レセプターができる．

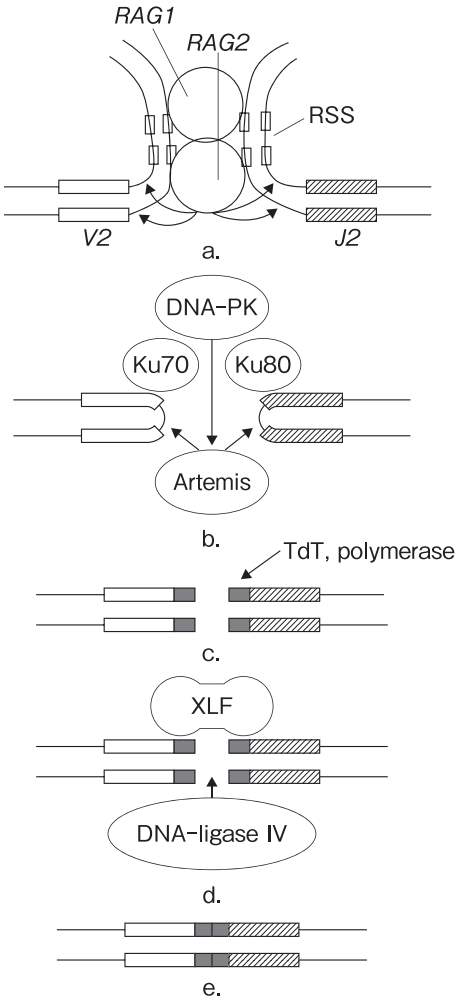


図 2．抗原レセプター遺伝子の再編成の機序
a：組み合わせるべき二つの遺伝子の RSS 領域を近づけ，そこに *RAG1*，*RAG2* が会合し，各遺伝子の後と前とを切断する．b：二本鎖 DNA の断端は互いにつながりヘアピン構造となっているが，Ku70，Ku80 の補助のもと DNA 依存性蛋白キナーゼ，Artemis を活性化，Artemis によりヘアピン部を切断する．c：断端に TdT，ポリメラーゼの働きでいくつかの塩基を付加する．d：XLF の補助で DNA リガーゼ IV が二つの遺伝子を接合させる．e：*V2J2* の活性遺伝子ができる．

介在部を抜き取って接合させるのである．各遺伝子の前後には RSS（recombination signal sequence）と呼ばれる部分があり，*V* 遺伝子の後の RSS と *J* 遺伝子の前の RSS とが接近し，そこに酵素 RAG1，RAG2（recombibase）が結合して，それらの酵素によって両遺伝子の後と前の部分が切断される（図 1）．切断された 2 本鎖 DNA は対になるものの，断端同士がつながりヘアピン構造をつくっているが，Ku70，Ku80 分子の働きでその部に DNA 依存性蛋白キナーゼを集め，それにより酵素 Artemis を活性化してヘアピン部を切断する．そして TdT（terminal deoxynucleotidyl transferase）と polymerase で断端にいくつかの塩基を付加する．さらに XLF 分子の補助のもと DNA ligase IV で *V* と *J* の 2 遺伝子を結合させる（図 2）．かくして抗原レセプターの 1 本のペプチド鎖の活性遺伝子ができる．切断時に，断端のいくつかの塩基が抜き取られること，そこにいくつかの塩基が付加されることでさらなる多様性（junctional diversity）が生まれる．もう一つの抗原レセプターのペプチド鎖についても同様のことが行われる．二つのペプチド鎖の組み合わせによる多様性も加わる．

したがって，この過程に関与する RAG，Artemis，DNA 依存性蛋白キナーゼ，DNA リガーゼ IV，XLF（cemunnos）いずれかの遺伝子異常で抗原レセプターを生成できず，B 細胞も T 細胞も存在しない病気が発症する．重症複合免疫不全症の一部の原因となっている．

Ⅲ．B 細胞の発生

B 細胞はリンパ系前駆細胞由来の pre–B 細胞から分化してくる．pre–B 細胞は IgM の H 鎖と代替 L 鎖（VreB–λ5）とからなる pre–B 細胞レセプターを表出していて，それにはシグナルを細胞内に伝える Igα，Igβ 分子が会合している．レセプターからのシグナ

前 目次へ 次

ルでチロシンキナーゼ Lyn は Ig α，Ig β をリン酸化し，そこに会合するチロシンキナーゼ Syk を活性化し，Syk はアダプター BCAP を介して PI3 キナーゼを活性化する．それにより Akt，mTOR が活性化されて細胞は生存が維持され，増殖する．また Syk はアダプター BLNK をリン酸化し，そこにチロシンキナーゼ Btk を会合させ Lyn によって活性化する．Btk はホスフォリパーゼ C-γ（PLC-γ）を活性化する．Btk，PLC-γ は転写因子 IRF-4 を誘導して代替 L 鎖の発現を抑え，転写因子 Foxo-1 を誘導して *RAG1*，*RAG2* の遺伝子を発現させて L 鎖の遺伝子再編成を導き，L 鎖の生成をもたらす．かくして B 細胞レセプターが表出され，B 細胞に分化する（図 3）．

この過程にかかわる代替 L 鎖（λ 5），IgM の H 鎖（μ），Igα，Igβ，BLNK，Btk，いずれかの遺伝子異常により B 細胞が欠ける病気が発症する．Btk の異常によるのが X 連鎖（Bruton 型）無 γ グロブリン血症である．

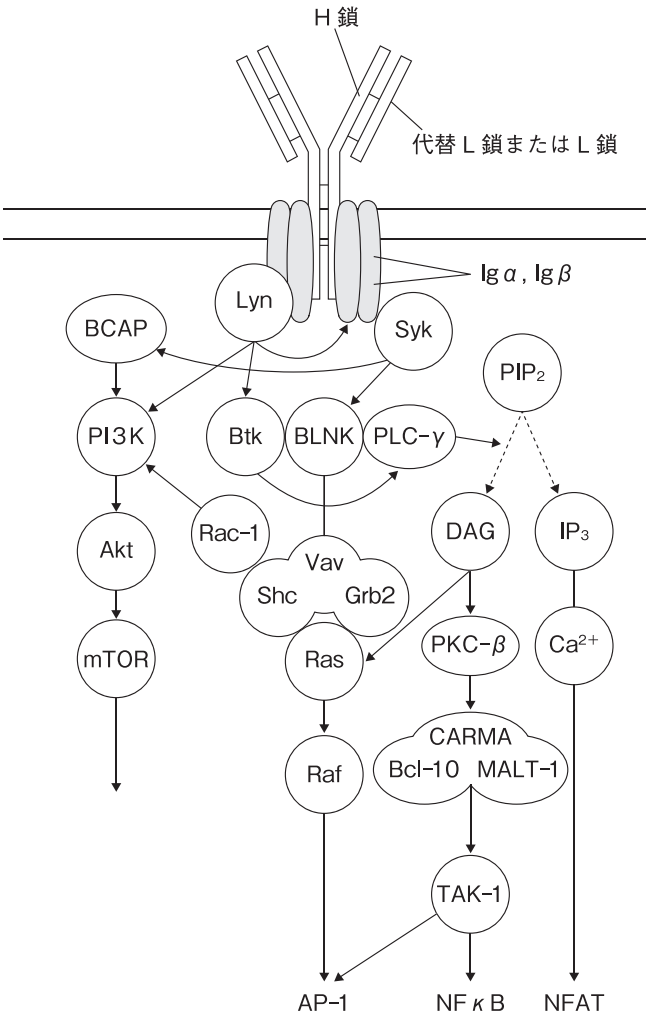


図 3．pre-B 細胞レセプターないし B 細胞レセプターからのシグナル伝達

Ⅳ．T 細胞の発生

T 細胞もリンパ系前駆細胞から分化してくる．それには Notch-1 分子で胸腺上皮細胞の Dll-4（delta like ligand-4）分子に反応すること，胸腺基質細胞が産生するサイトカイン IL-7 の作用を受けることが必要である．Notch-1 の作用で pre-T 細胞レセプター（pre-T 細胞レセプター α 鎖と T 細胞レセプター β 鎖とからなる）や T 細胞レセプターに会合し，それらからのシグナルを伝える CD3 分子群が発現する．pre-T 細胞レセプターからのシグナルで T 細胞レセプター α 鎖が発現し，α，β 鎖の T 細胞レセプターができ T 細胞に分化する．IL-7 はこの間の細胞増殖を支持する．IL-7 のレセプターは α 鎖と γ 鎖との二量体であるが，γ 鎖は IL-2，IL-4，IL-9，IL-15，IL-21 のレセプターにも共通で γc 鎖という（図 4）．IL-7 レセプターへの刺激でチロシンキナーゼ JAK1，JAK3 が活性化され，それにより STAT5 などの転写因子を誘導して細胞増殖を導く．pre-T 細胞レセプターからのシグナルはチロシンキナーゼ Lck を活性化して CD3 分子をリン酸化し，そこに会合したチロシンキナーゼ ZAP70 を活性化して，以下へシグナルを伝える（図 5）．Lck 活性はホスファターゼ CD45 で制御を受ける．

したがって，pre-T 細胞レセプターからのシグナルにかかわる CD3δ，CD3ε，CD3γ，CD3ζ，CD45，IL-7 レセプターからのシグナルにかかわる IL-7 レセプター α 鎖，γc 鎖，JAK3 の遺伝子異常で T 細胞への分化が阻害され，T 細胞が欠ける病気が発生する．B 細胞は発生するが抗体産生不全も伴うので，重症複合免疫不全症に分類される．γc 鎖，JAK3 は NK 細胞の分化に必要な IL-15 のレセプターにも使われているので，それらの遺伝子異常によるものでは NK 細胞も欠損する．細胞骨格アクチンの重合にかかわる Coronin-1A の異常は T 細胞の胸腺からの遊出不全をもたらし，T 細胞の欠損がみられるので，同一の疾患カテゴリーに分類されている．

Ⅴ．免疫グロブリンのクラススイッチ

免疫グロブリンには IgA，IgD，IgE，IgG，IgM の五つのクラス，IgG には四つの，IgA には二つのサブクラスがある．これは同一の B 細胞がそれらをつくりかえることによって生み出している．これらクラスの相違は免疫グロブリン H 鎖の定常部の相違による．H 鎖の遺伝子は可変領域（抗原結合部）の次に，定常域の IgM（μ），IgD（δ），IgG3（γ3），IgG1（γ1），

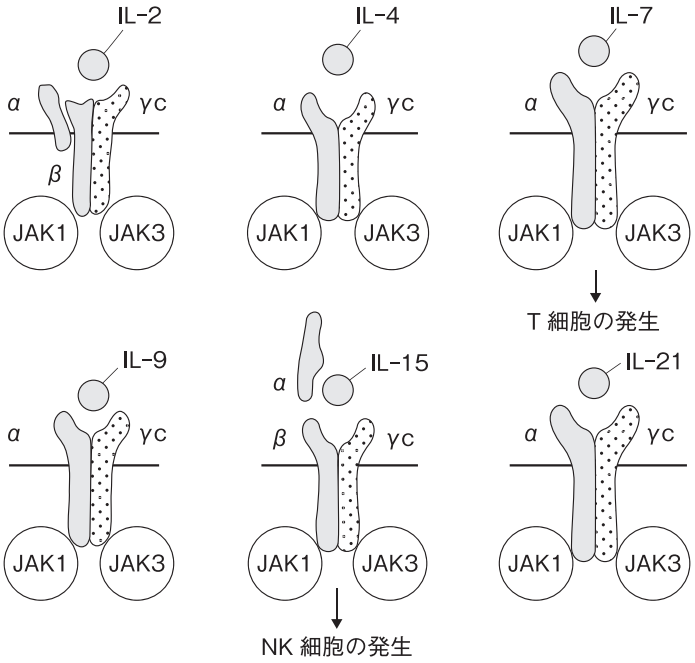


図 4. γc 鎖が使われているサイトカインレセプター
IL-7 は T 細胞の，IL-15 は NK 細胞の分化に必須である．

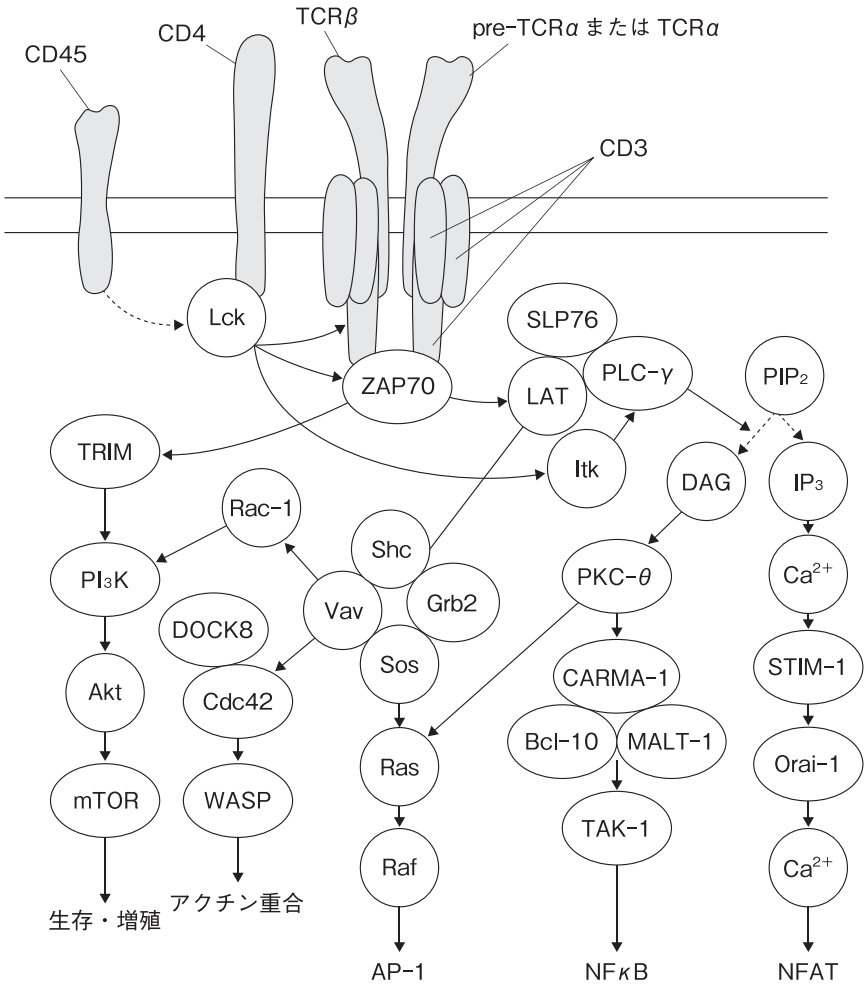


図 5. pre-T 細胞レセプターないし T 細胞レセプターからのシグナル伝達

前 目次へ 次

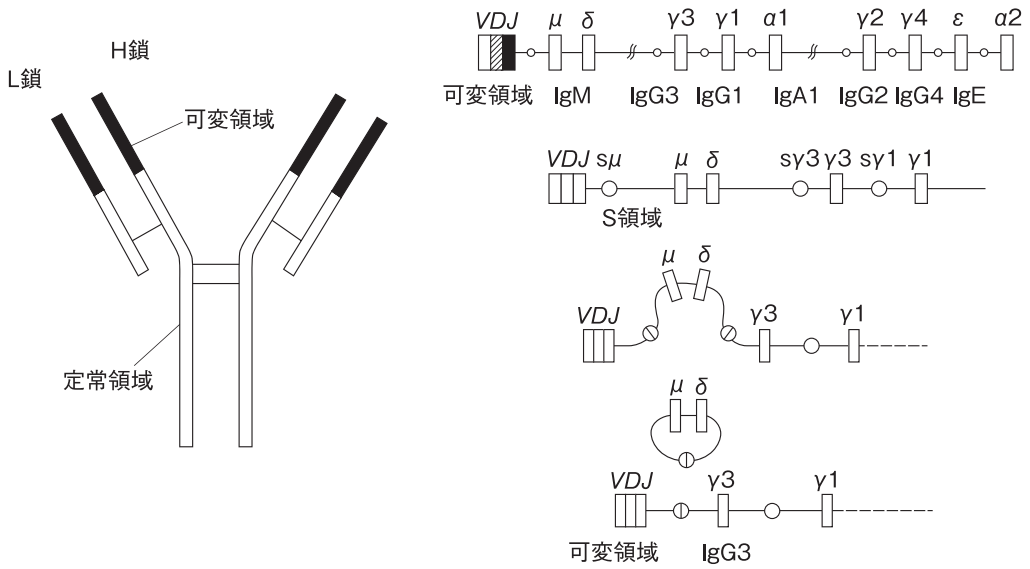


図 6. 免疫グロブリンのクラススイッチ

免疫グロブリンのクラスは H 鎖定常域の違いによる．可変領域の次にどのクラスの定常域遺伝子がつながるかで決まる．それぞれの遺伝子の前の S 領域部を切断し，介在部を抜き取ってつなげることによる．

IgA1（α1）…の順に並んでいる（図 6）．最初は可変領域と μ とがつながっているので，そのまま転写されると IgM がつくられる．IgG3 をつくるためには可変領域の後とγ3 の前で切断し，介在部を抜き取って，可変領域の次にγ3 遺伝子をつなぐ必要がある．各定常域遺伝子の前には S 領域と呼ばれる部分があり，S 領域で切断が行われる．IgG3 の場合，Sμ と Sγ3 とが切断される．

B 細胞がこのクラススイッチを起こすためには，IL–4（T 細胞，好塩基球，NKT 細胞などが産生）などのサイトカインの作用と表面の CD40 分子への刺激（T 細胞上の CD40 リガンドの結合による），あるいはサイトカイン BAFF（樹状細胞などが産生）の作用などが必要である．そのような刺激で B 細胞は AID（activation induced cytidine deaminase）を発現し，AID は S 領域 DNA のシチジンをウラシルに変換する．そのウラシルは UNG（uracil nucleotide glycosylase）によって除かれる．塩基が欠失した DNA 部にはエンドヌクレアーゼ APE（apurinic apyrimidinic endonuclease）が作用し，そこを切断する．どのクラスにスイッチするかは，どの部の S 領域が切断されるかによるが，それは一つには作用するサイトカインの種類による．IL–4 は IgG1，IgE への，TGF–β は IgA への，インターフェロン γ は IgG1 へのスイッチを誘導する．AID が S 領域に作用するには，S 領域の前の I 領域から定常域までの非翻訳転写物がつくられ，それが AID の接近を助ける必要がある．サイトカインの種類によって，どの I 領域からの転写物がつくられるかが異なるので，そのようなことが起きると考えられる．切断された二つの S 領域に対し，CD40 分子に会合していた Ku70，Ku80 分子が核に移行し，両 S 領域をつなぎとめる．そして Ku により DNA 依存性蛋白キナーゼがそこに集まり，DNA リガーゼ IV が作用して二つの S 領域の断端同士を接合させる（図 7）．かくしてクラススイッチが完了する．

したがって，CD40 リガンド，CD40，AID，UNG いずれかの遺伝子異常でクラススイッチが阻害され，IgM はつくれるが，他のクラスの免疫グロブリンはつくれないという病気が発症する．高 IgM 症候群と呼ばれる．

IgE が過剰につくられる病気があり高 IgE 症候群という．チロシンキナーゼ Tyk2 ないし転写因子 STAT3 の遺伝子異常によって発症する．この二つの分子が IL–21，IL–12，IL–10 レセプターからのシグナル伝達にかかわっていることによると考えられる（図 8）．IL–21 は IgE へのスイッチを抑制するし，IL–12 はインターフェロン γ の産生を誘導し，インターフェロン γ も IgE へのスイッチを抑制する．IL–10 には IgE 産生を抑制するレギュラトリー T 細胞を誘導する作用がある．したがって，それらのサイトカインが働けず，IgE が過剰に産生されると考えられる．なお，この病気では細菌，真菌，ウイルスの易感染性があるが，IL–6，IL–23，IL–22 レセプターからのシグナルも阻害されるためと考えられる．IL–17 は線維芽細胞，血管内皮細胞などに好中球を生成，遊走，活性化するサイトカインを産生させるが，その IL–17 を産

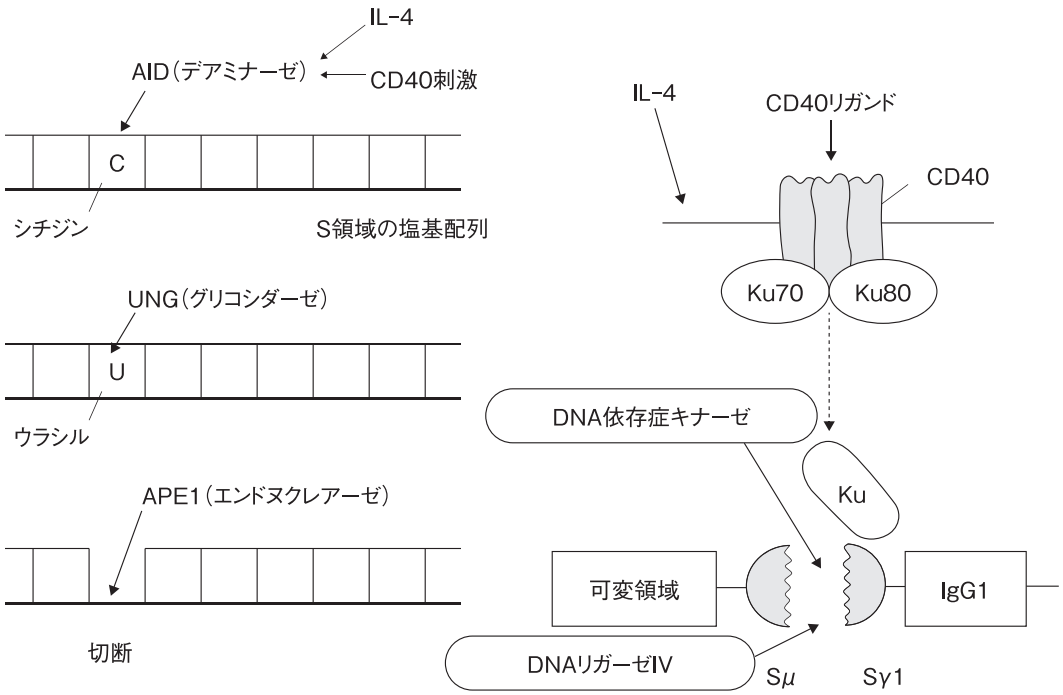


図 7．免疫グロブリンクラススイッチの機序

AID は S 領域 DNA のシチジンをウラシルに変換する．UNG はそのウラシルを抜き取る．塩基の欠けた DNA 部を APE が切断する．可変領域の後，IgM 定常域の前の S 領域断端と目的のクラスの定常域の前の S 領域断端を Ku70 と Ku80 がつなぎとめ，DNA 依存性蛋白キナーゼと DNA リガーゼ IV の働きで両者をつなぐ．

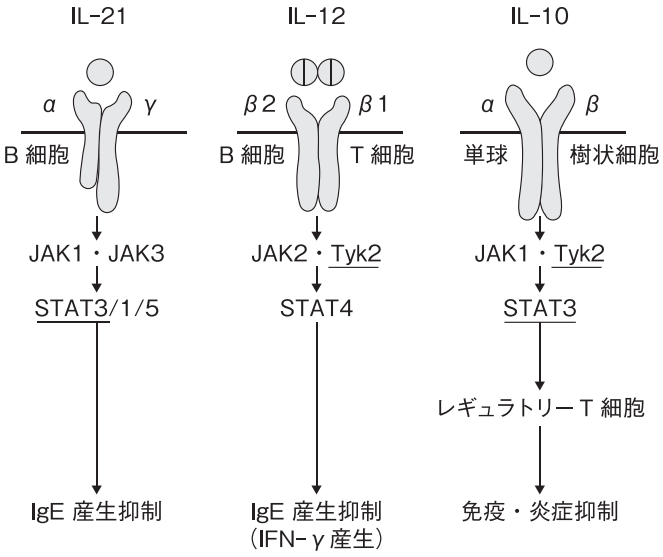


図 8．IgE 産生を抑制するサイトカインとそのレセプターからのシグナル

いずれにも Tyk2，STAT3 が関与している．

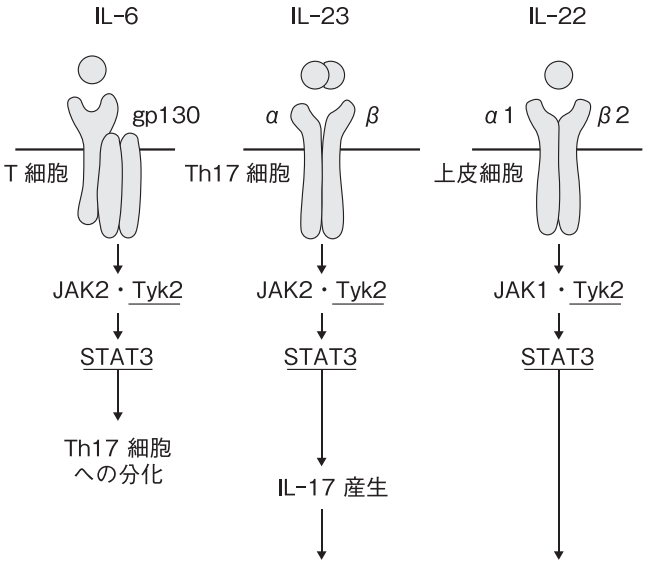


図 9．感染防御にかかわるサイトカインとそのレセプターからのシグナル伝達

いずれにも Ty2，STAT3 が関与している．

生する Th17 細胞の分化に IL-6 が必要なこと，Th17 細胞から IL-17 を産生させるには IL-23 が必要なこと，IL-22 は上皮細胞から抗菌ペプチドを産生させること，IL-12 はマクロファージを活性化するインターフェロン γ の産生を誘導することなどを反映していよう（図 9）．

Ⅵ．B 細胞の活性化と抗体産生

B 細胞は抗原に反応しただけでは通常抗体産生にいたらない．そのほかの刺激を必要とするのである．一つは T 細胞が産生する IL-4，IL-21 などのサイトカインの作用と，B 細胞上の CD40 や B7-H2 分子にそ

前 目次へ 次

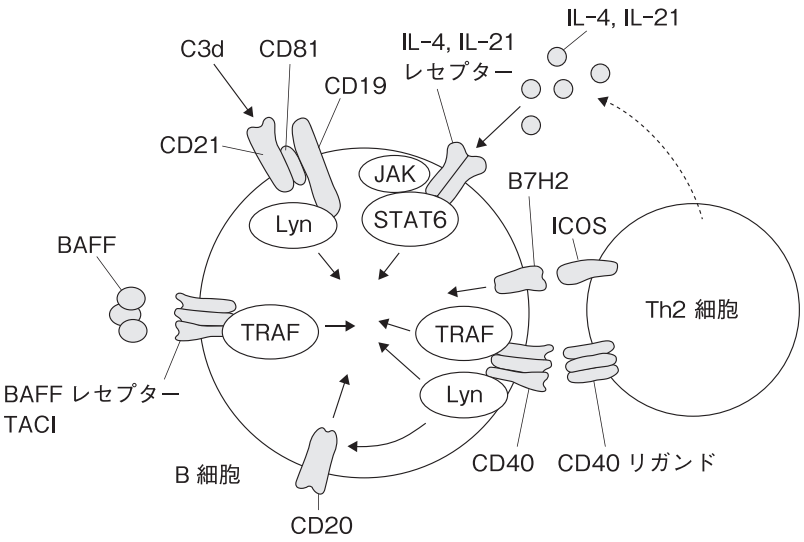


図 10. B 細胞活性化の補助シグナル
CD40，B7–H2，サイトカインレセプター，補体レセプター（CD21），BAFF レセプター /TACI，CD20 への刺激.

れぞれ T 細胞上の CD40 リガンド（CD154）や ICOS 分子が結合する刺激である．ほかに樹状細胞などの産生するサイトカイン BAFF（Blys）が B 細胞のレセプター BAFF レセプター，TACI に作用すること，活性化補体成分（C3d）が B 細胞上の CD21 分子に作用し，それに会合している CD81，CD19 分子を介してシグナルを送ること，チロシンキナーゼで B 細胞の CD20 分子を活性化することも補助刺激になる（図 10）.

このことを反映して，ICOS，CD19，CD81，CD19，CD20，BAFF レセプター，TACI の遺伝子異常で低 γ グロブリン血症が発症する.

Ⅶ. T 細胞の活性化

T 細胞は T 細胞レセプターで抗原提示細胞（初回反応の場合は樹状細胞）上の HLA 分子とそれに結合している抗原との組み合わせに反応する．チロシンキナーゼ Lck は CD3 分子群をリン酸化し，そこに会合したチロシンキナーゼ ZAP70 を活性化する．ZAP70 はアダプター SLP76 をリン酸化し，そこにはアダプター LAT，ホスフォリパーゼ C–γ（PLC–γ），チロシンキナーゼ Itk，G 蛋白変換因子 Vav，Sos，アダプター Grb2，Shc などが会合する．Itk は Lck によって活性化され，PLC–γ を活性化する．PLC–γ はホスファチジルイノシトール 2 リン酸（PIP_2）からジアシルグリセロール（DAG）とイノシトール 3 リン酸（IP_3）とを生成する．IP_3 は小胞体から Ca^{2+} を流出させ，それを察知した STIM–1 は細胞膜の Orai–1 などのカルシウムチャンネルに作用し，Ca^{2+} を細胞内に流入させる．それによりカルシニューリンが働いて転写因子 NFAT を脱リン酸化し核に移行させる．DAG はプロテインキナーゼ C–θ（PKC–θ）を活性化し，それにより CARMA–1・Bcl–10・MALT–1 複合体を介してキナーゼ TAK–1 を活性化，TAK–1 は IKK を活性化して転写因子 NFκB を誘導する．また PKC–θ は G 蛋白 Ras を活性化，セリンスレオニンキナーゼ Raf を介してキナーゼ ERK を活性化する．SLP76，LAT に会合した Grb2，Shc，Sos，Vav により Rac を介してキナーゼ JNK が活性化される．ERK と JNK で転写因子 AP–1 が誘導される．ZAP70 は TRIM を介してホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ（PI3K）を活性化するが，PI3K は Akt，mTOR を活性化して細胞の生存を支持し，増殖を導く（図 5）．G 蛋白変換因子 Vav，DOCK8 が活性化されると，Cdc42，Rac–1 を介し WASP が誘導される．WASP はアクチンの重合化を誘導し T 細胞の活性化にかかわる．T 細胞の活性化は T 細胞レセプターでの反応だけでは不十分で，共刺激が必要である．初回の反応では CD28 分子で樹状細胞上の CD80/CD86 分子に反応することがそれを用意する．CD28 は Lck，Itk，PI3K を活性化し，T 細胞レセプターからのシグナルを補佐する.

このことを反映して，ZAP70，Itk，STIM–1，Orai–1，DOCK8，WASP の遺伝子異常で T 細胞の生成不全，機能不全が生じる．Wiskott–Aldrich 症候群は WASP の遺伝子異常による.

原則として，細胞内で生成された抗原（ウイルス抗原など）は HLA クラス I とともに提示され，外界から侵入してきた抗原は HLA クラス II とともに提示さ

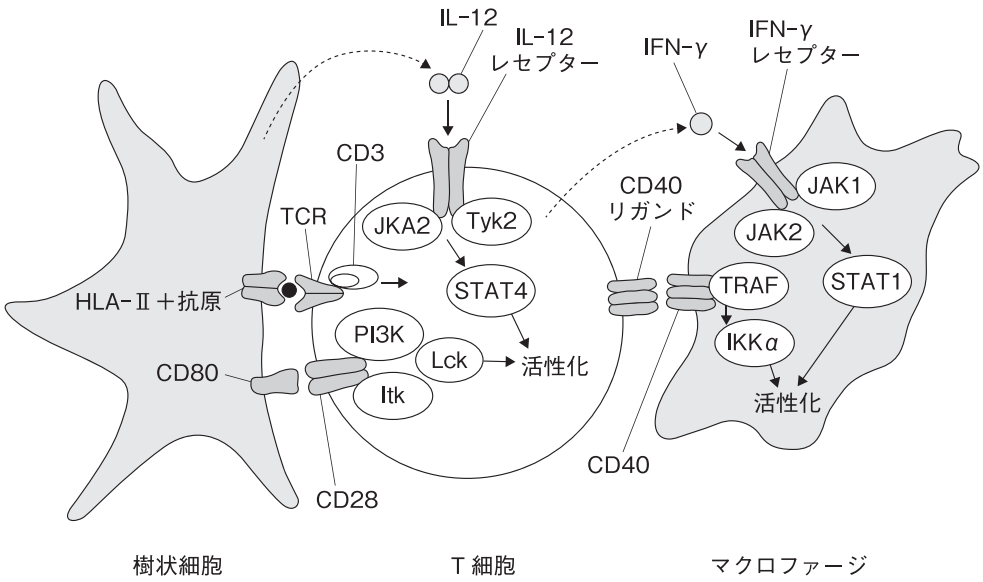


図 11．マクロファージの活性化
T 細胞は樹状細胞の提示する抗原と反応すると同時に，CD28 で CD80/CD86 に反応，IL–12 レセプターに IL–12 の作用を受けて共刺激を得て，インターフェロンγ（IFN–γ）を産生する．IFN–γ の IFN–γ レセプターへの作用と CD40 への T 細胞上の CD40 リガンドの作用はマクロファージを活性化する．

れるが，それぞれに $CD8^+$T 細胞，$CD4^+$T 細胞が反応する．TAP は細胞内で生成された抗原を小胞体に転送する分子であるが，その遺伝子異常による欠損で HLA クラス I の表出が障害される．その結果 $CD8^+$T 細胞の分化不全が生じる．HLA クラス II の遺伝子発現には転写因子 CIITA，RFX5，RFXAP，RFXANK が関与しているが，それらの遺伝子異常による欠損で HLA クラス II の表出が障害され，$CD4^+$T 細胞の生成不全が生じる．HLA が表出されない病気を bare lymphocyte syndrome という．

ウイルス感染の防御には感染細胞を破壊する細胞傷害性（キラー）T 細胞の働きが重要である．この細胞の細胞傷害作用，インターフェロンγ産生には表面の CD244（2B4）分子で抗原提示細胞上の CD48 分子に反応することが関与する．SAP は CD244 からのシグナル伝達にかかわる分子であるが，その遺伝子異常による欠損で EB ウイルス感染が重症化する．EB ウイルスによる B 細胞の異常増殖も生じる．X 連鎖リンパ増殖性疾患という．IL–4 を産生し抗体産生を補助する Th2 細胞の分化は，SLAM 分子で抗原提示細胞上の SLAM に反応することで導かれるが，SLAM のシグナル伝達にも SAP が必要なことを反映し，低γグロブリン血症も伴う．

Ⅷ．マクロファージの活性化

マイコバクテリア，サルモネラ，リステリアなどの細胞内寄生性細菌，真菌の防御にはマクロファージによる殺菌作用が重要である．マクロファージは活性化されてはじめて殺菌作用が十分なものになる．活性化は一つには T 細胞の作用による．T 細胞は抗原提示細胞の HLA 分子とともに提示された抗原に反応する際，抗原提示細胞の産生する IL–12 の作用を IL–12 レセプターに受けると，インターフェロンγ（IFN–γ）を産生するようになる．INF–γ は IFN–γ レセプターに作用し転写因子 STAT1 を誘導してマクロファージを活性化する．また T 細胞は活性化されると CD40 リガンド（CD154）を表出するが，それをマクロファージの CD40 に作用させると，チロシンキナーゼ Lyn，TRAF6，TRAF2 を介して IKK を活性化，転写因子 NFκB を誘導してマクロファージを活性化する（図 11）．

したがって，IL–12，IL–12 レセプター，IFN–γ レセプター，STAT–1，IKKγ の遺伝子異常による欠陥でマイコバクテリア防御不全が生じる．

マクロファージの活性化は，リポ多糖類，ペプチドグリカン，核酸などの病原体に普遍的な分子（病原体関連分子パターン：pathogen associated molecular patterns［PAMPs］）に TLR（toll like receptor）などのパターン認識レセプター（pattern recognition receptor：PRR）で反応することによってももたらされる．TLR からのシグナルはアダプター MAL，MyD88 を介しキナーゼ IRAK を活性化，IRAK はユビキチンリガーゼ活性をもつ TRAF6 を介しキナーゼ

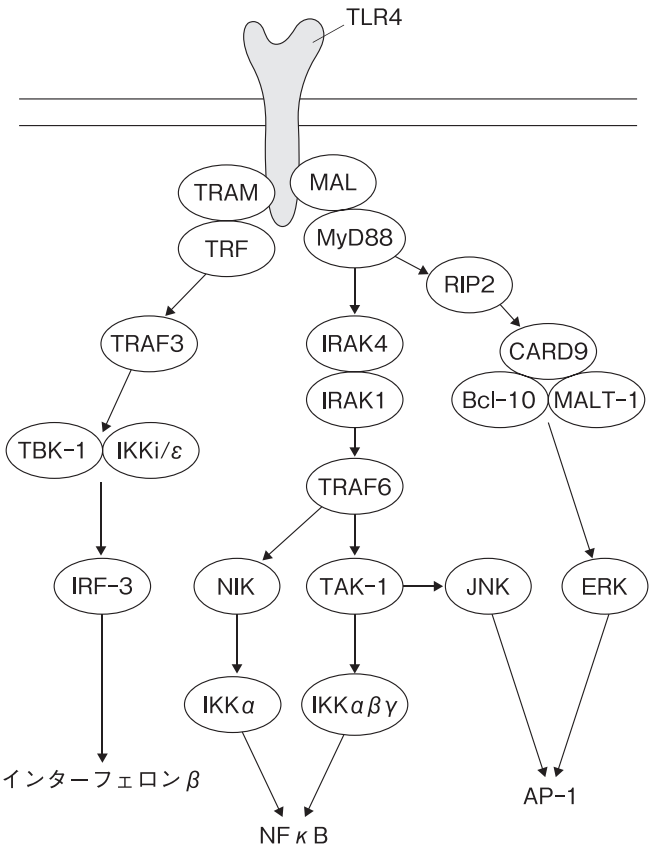


図 12. TLR4 からのシグナル伝達

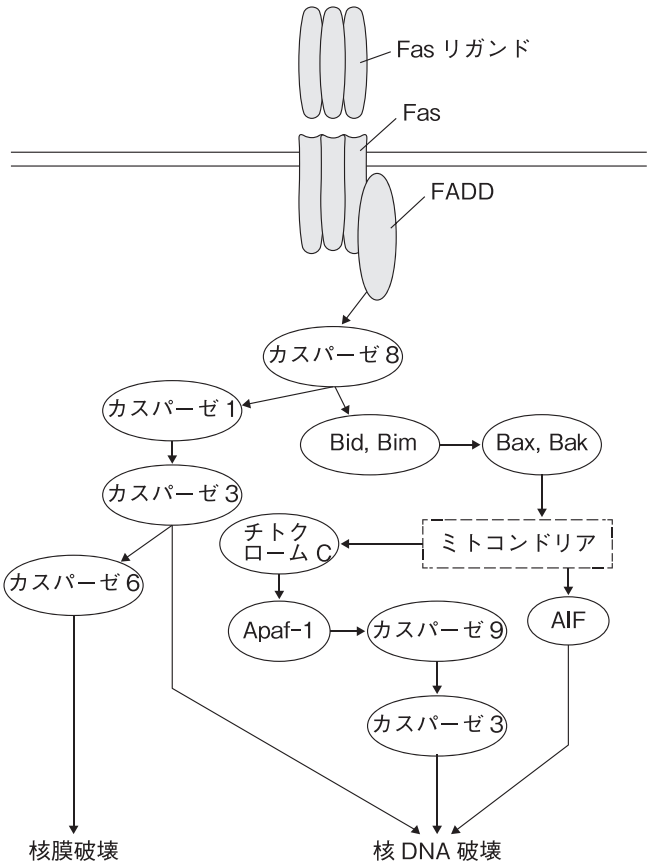


図 13. Fas からのシグナルによるアポトーシスの誘導

TAK-1，NIK を活性化，転写因子 NFκB を誘導する．また MyD88 からキナーゼ RIP2，それによる CARD9・Bcl-10・MALT-1 複合体を介する転写因子 AP-1 の誘導も起きる．これらの転写因子により炎症性サイトカインが生成される．一方，TLR からアダプター TRAM，TRIF を介し TRAF3 が活性化されると，TBK-1，IKKi/ε を介し転写因子 IRF-3 が誘導されインターフェロンβが生成される（図 12）．

TLR2，TLR3，TRAF3 を運搬する UNC9B1，TLR4，TLR5，MyD88，IRAK4，IKKγ，CARD9，TRAF3 の遺伝子異常による欠損や，好中球を骨髄にとどめるサイトカインレセプター CXCR4 の活性増加をもたらす遺伝子異常，NFκB を抑制する IκB の活性増加をもたらす遺伝子異常で，細菌，真菌の防御不全が生じる．

カンジダの防御には，PRR の一つでカンジダのペプチドグリカンに反応する dectin-1 が重要である．dectin-1 からのシグナル伝達にも CARD9 が関与している．IL-17 によるマクロファージの活性化，上皮細胞からの抗菌ペプチドの産生もカンジダの防御にかかわる．なお転写因子 STAT1 は IL-17 を産生する Th17 細胞の分化を阻害する．

CARD9，IL-17F，IL-17 レセプター A の遺伝子異常による欠損，STAT-1 の活性増加をもたらす遺伝子異常で慢性粘膜皮膚カンジダ症が発症する．

マクロファージの活性化は NK 細胞などのパーフォリン（細胞膜傷害物質）によって制御されているらしい．パーフォリン，パーフォリンを含む顆粒を細胞膜に融合させる UNC13D，UNC18-2，syntaxin-11 の遺伝子異常による欠陥でマクロファージの異常活性化が起き，家族性血球貪食症候群が発症する．

Ⅸ．免疫応答の制御

免疫応答は役割がすんだら適当なところで終了することが望ましい．過剰な反応は生体に危害が及ぶし，反応の持続は無駄である．自己抗原に対する応答も制御されなければならない．過剰な反応に歯止めをかけるさまざまな機構が存在する．その一つは，B 細胞，T 細胞が活性化された後に細胞死を起こして反応がとまることである．活性化誘導細胞死（activation induced apoptosis）という．活性化した細胞は Fas 分子を表出するようになるが，それに活性化 T 細胞が表出する Fas リガンドが作用すると，Fas に会合している FADD 分子を介してカスパーゼ 8 が活性化され，Bid，Bim 分子を活性化し，それらは Bax，Bak 分子をミトコンドリア膜に作用させて，チトクローム C や AIF 分子を遊出させる．チトクローム C は Apaf

–1 分子を活性化し，カスパーゼ 9 の活性化を介してカスパーゼ 3 を活性化する．また，カスパーゼ 8 はカスパーゼ 1 も活性化し，それによってもカスパーゼ 3 が活性化される．次いでカスパーゼ 3 はカスパーゼ 6 を活性化する．AIF，カスパーゼ 3 は核の DNA を破壊し，カスパーゼ 6 は核膜を破壊し細胞死を導く（図 13）．

Fas リガンド，Fas，FADD，カスパーゼ 8，カスパーゼ 10，Bim を制御する *N–ras*，*K–ras* の遺伝子異常による欠損で活性化誘導細胞死が起きず，過剰な B 細胞，T 細胞の増殖が生じて，自己免疫疾患が発症する．自己免疫性リンパ球増殖症候群（autoimmune lymphoproliferative syndrome：ALPS）という．

活性化に伴って T 細胞に表出される CTLA–4，PD–1，BTLA 分子は，それぞれ CD80/86，PD–L1，B7–H4 分子に反応すると，ホスファターゼを活性化して，シグナル伝達分子を脱リン酸化し不活化し，細胞の活性化を抑える．活性化リンパ球ではユビキチンリガーゼ ITCH，Cbl–b，GRAIL などが発現し，シグナル伝達分子をユビキチン化して破壊に導き，細胞の活性化を抑える．ITCH の遺伝子異常で自己免疫疾患が発症する．

自己反応性の T 細胞は，胸腺において胸腺上皮細胞が表出する臓器特異的自己抗原に反応することによって細胞死を起こし消去される．この自己抗原の胸腺上皮細胞による表出は転写因子 AIRE の働きによる．また，胸腺の自己抗原に反応し転写因子 Foxp3 の働きで $CD25^{+}CD4^{+}$ レギュラトリー T 細胞が分化するが，この T 細胞は自己抗原反応性 T 細胞を抑制する．このレギュラトリー T 細胞の分化には IL–2 に α，β，γ 鎖がそろった高親和性レセプターで反応する必要がある．

AIRE，Foxp3，IL–2 レセプター α 鎖の遺伝子異常で自己免疫疾患が発症する．

X．DNA の修復

免疫系の細胞では，抗原レセプターの生成や免疫グロブリンのクラススイッチなどに際し DNA の切つなぎが起きるし，抗原の侵入に際して急激な細胞増殖のため DNA 複製を行う．DNA 異常の発生を防ぐには適切な DNA 修復機構が必要である．

DNA の修復にかかわる ATM，MREII，NBS1 の遺伝子異常で，T 細胞の減少，クラススイッチの不全が生じる．PMS2 の異常ではクラススイッチ障害が起きる．Ataxia telangiectasia は ATM の異常による．

文　献

1）今井耕輔：原発性免疫不全症の最新国際分類．臨床免疫・アレルギー科 58：446–466，2012.
2）矢田純一：医系免疫学，13 版，中外医学社，東京，2013.

Molecules involved in the development and function of the immune system ; their gene abnormalities and related diseases

Junichi Yata

Emeritus Professor, Tokyo Medical and Dental University

Summary

The molecules involved in the development and functions of the immune system are described. The antigen rceptors are essential for acquired immunity and their diversity is provided by gene rearrangement. The class-switch of immunoglobulin also depends on gene rearrangement. The functions of immune cells are usually induced by the stimuli to antigen receptors, cytokine receptors and pattern-recognition receptors, and the signals from these receptors are transmitted by various molecules. The immune response should be adequately regulated to avoid self-damage. Several mechanisms and molecules are concerned for that. The gene abnormality of any of these molecules may cause immunodeficiency diseases.

The relationship of defective gene and particular disease is described.

Key words : immune cells development, natural immunity activation, immune regulation, primary immunodeficiency diseases, gene abnormalities

非透析慢性腎臓病の保存療法 ――35年間の経験

椎貝　達夫　椎貝クリニック

要旨：筆者は1978年から，慢性腎臓病（CKD）を進行させないCKD保存療法に取り組んできた．35年後の現在，CKDはかなりのレベルまで治療しうる病となった．たとえば糖尿病性腎症の停止＋寛解率は60.5%に達している．停止または寛解は1年間の経過なので，翌年も同じ経過をとる確率が高い．

このような成果をもたらした治療法は4つの部分，①血圧調節，②食事の蛋白・食塩摂取量調節，③CKDで生じた病態異常を治すための薬物療法，④多角的治療法から成り立っている．血圧は家庭血圧法により調節し，食事指導は24時間蓄尿（24hr urine collection at home）の結果に基づいている．いずれも完璧性を求めて行き着いた方法である．

この保存療法を全国に広め患者の不便を少しでも解消したいが，始めようとする医療機関は少ない．理由は保存療法で必要な検査料・投薬料が健康保険では一部認められないためである．当クリニックは絶えず経営改善策を模索している．

Key words：慢性腎臓病，蓄尿，食事療法，家庭血圧，集学療法

Ⅰ．はじめに

日本の透析患者数は30万人を超えている．この人数は今後減少する可能性があるといわれているが，それは患者の高齢化によるもので，治療法の進歩で透析導入数が減るためではない．減少に転じると，数字だけをみて透析の問題は峠を越したという論議が行われるかも知れないが，惑わされることがあってはならない．

筆者は1978年から，透析に入っていない慢性腎臓病（chronic kidney disease：CKD）の進行を抑える治療であるCKD保存療法を行ってきた．当時は透析療法が隆盛をきわめていたために学会で発表しても反響は少なかった．しかし透析患者の生活をみていると，悲惨とまではいえないが，やっと生きている，やっと生かしてもらっている生活で，なんとかこの治療に入らないで患者が一生を終えることはできないかと考えた．

1985年ごろから腎臓病の進行を抑える保存療法が大切だという気運が高まり，学会の演題分類の中に進行（progression）の項目が入るようになった．

1985年に総合病院取手協同病院（現JAとりで総合医療センター）の院長に就任し，1987年秋から本格的に保存療法に取り組んだ．院長退任後の2009年に椎貝クリニックを開設し，引き続き保存療法の開発を続け現在にいたっている．

長い間一つのテーマに専念してきたが，日本腎臓学会をはじめとする学会に毎年発表し，スタッフ，患者とよく話し合ってきたから独善的になることは避けられ，間違った方向にはいっていないと思っている．

CKDは①尿の異常，画像診断，腎病理で腎障害の存在が明らか，②推算糸球体濾過量（estimated glomerular filtration rate：eGFR）が60ml/min/1.73 ㎡未満で，このいずれか，または両方が3ヵ月以上持続したときと定義する．

透析にいたるCKDの上位4疾患は，糖尿病性腎症，慢性糸球体腎炎，腎硬化症，多発性嚢胞腎である．それ以外に間質性腎炎，閉塞性腎障害，腎盂腎炎，膠原病による腎障害，薬剤性腎障害などがある．

なおCKDは近年大きくクローズアップされている．その理由は，①透析患者が増加し，透析医療費がどの

連絡先：椎貝　達夫　ochamed.aps@tmd.ac.jp

前　目次へ　次

表 1．CKD ステージ（2013 年 1 月現在）［n=972］

CKD ステージ	例数（%）
男性	586（60.3%）
女性	386（39.7%）
stage1（eGFR≧90）	89（9.2%）
stage2（eGFR 60～89）	238（24.5%）
stage3（eGFR 30～59）	267（27.5%）
stage4（eGFR 15～29）	158（16.2%）
stage5（eGFR＜15）	220（22.6%）
（うち eGFR＜10）	144（14.8%）

表 2．24hUC とスポット尿の情報量の違い

	24hUC	スポット尿
尿蛋白排泄量	○	○
蛋白摂取量	○	—
塩分摂取量	○	—
リン排泄量	○	—
クレアチニン排泄量	○	—
クレアチニンクリアランス	○	—

国でも大きな財政負担となっている[1]，②日本では CKD 患者のうち成人が 1,330 万人ときわめて多い[2]，③ CKD は心血管疾患（cardiovascular disease：CVD）を発症しやすい[3] による．

多くの CKD 保存療法の終着点は透析療法である．しかし，筆者の保存療法の目標は腎機能の低下を防ぎ，できれば CKD の進行をとめ，生涯にわたって透析に入らない“生涯の透析回避”にある．現在当クリニックに通っている CKD 患者の eGFR の分布を表 1 に示した．CKD ステージ 5（eGFR＜15m*l*/min/1.73 ㎡）が 220 例（22.6%），またその中で最重症の eGFR＜10m*l*/min/1.73 ㎡が 144 例（14.8%）である．つまり筆者の CKD 患者は重症例に偏っている．“そんなに重症の CKD 患者の進行を遅らせてなにになるのか，早く透析療法に踏み切るべきではないか”との批判があるのは承知している．しかし最重症例の進行停止は意味がないという根拠を示せるのだろうか．筆者が知る限りでは根拠となる論文はない．IDEAL 研究[4] は早期導入と晩期導入を無作為に割り付け，7 年間経過をみたものであるが，両群間に生存率の有意差はなかった．つまり CKD 患者をどこまで保存療法で診るべきかについては結論が出ていない．筆者の保存療法は体重の変化，血清アルブミン，尿へのクレアチニン排泄量などで監視しているので，栄養障害を防ぐことができる．ただし身体への尿毒素の貯留は動脈硬化を促進するといわれている．そこで，血清の尿素窒素/クレアチニン比を 10：1 以下に保つように蛋白摂取量を調節している．なお eGFR は estimated GFR（推算糸球体濾過量）で，2007 年に Imai らが日本人向けの推算式を発表し全国に普及している[5]．

また eGFR 6m*l*/min/1.73 ㎡以下になったら透析の準備（内シャント造設または腹腔カテーテル挿入）を行い，その後注意深く症状をみていき，尿毒症のサインが現れたらただちに透析に踏み切る．この方針は，すべてのステージ 5 の患者に徹底している．このような安全策を講じているので，eGFR6 以下でもなお保存療法で診療を続けてもよいと考えている．

Ⅱ．保 存 療 法

1．保存療法の 4 つの柱

保存療法には 4 つの柱がある．どれもが大切で，どれか一つでも欠けると，よい治療成績にはならない（図 1）．

a．血圧コントロール

血圧コントロールは 4 つの柱の中でもっとも大切である[6]．血圧値は，患者が自宅で行う家庭血圧値を中心におく．この方法が外来血圧に比べて精度や信頼度で優れているという報告は多数ある[7]．

高血圧の診療は一般に外来での医師・看護師による測定値“診察室血圧”に基づいている．しかし診察室血圧にはそれを不正確にするさまざまな要素が加わる．白衣を着た人が患者の血圧を測ると血圧値が高くなる，“白衣高血圧”はその一例である．これに対して一定の条件で患者自身が測る“家庭血圧”には不正確となる要素ははるかに少ない．家庭血圧測定は，実際の血圧値をもっともよく反映する測定法である．この方法を外国ではなぜ採用しないかというと，家庭血圧計があまり普及せず，備えている家庭が少ないためである．しかし日本では約 3,500 万台の血圧計が家庭にあり[8]，これを使用しない理由はない．家庭血圧は定められた方法（家庭血圧測定法）で患者自身が測り，用意された「家庭血圧記入用紙」に記入する．

b．食事療法

食事療法は 24 時間蓄尿（24hUC）の結果に基づいて行われている．日本のみならず世界全体でも 24hUC を行う施設は減少しているが 24hUC を採用する理由は，①外来でとるスポット尿は誤差が生じやすい．尿蛋白濃度はとる時間によりいつも一定とはいえない．またスポット尿法は尿クレアチニン濃度により尿の濃さを補正し 1 日尿蛋白排泄量を推定するが，もとになる尿クレアチニン濃度は男性で高く，女性で低いことから正確な補正は不可能，② 24hUC では表 2 のように多くのことがわかるが，スポット尿では尿蛋白排泄量しかわからないことによる．

前 目次へ 次

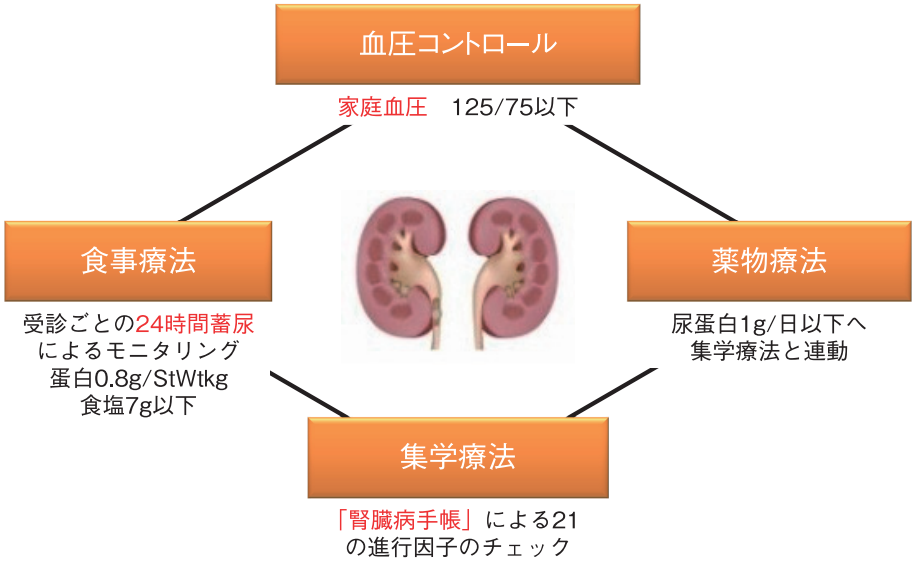


図 1．保存療法の 4 つの柱

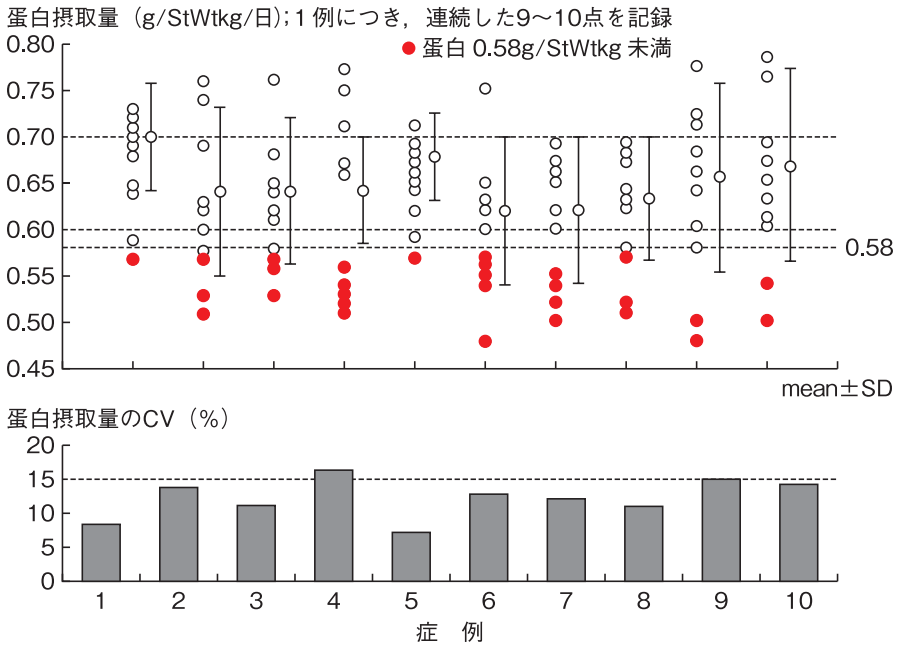


図 2．蛋白摂取量 0.6g/StWtkg を目指した 10 例

1）蛋白摂取量　日本腎臓学会「CKD 診療ガイド 2012」[2] では，CKD では蛋白 0.6〜0.8g/StWtkg となっている．当クリニックは蛋白 0.8g/StWtkg 前後としている．蛋白摂取は少ないほうが効果があるから，0.6g/StWtkg を目指すほうがいいのではないかとの質問をよく受ける．蛋白でも食塩でも，日常生活の中では摂取量がかなり変動する．食事の日ごとの変動の幅（coefficient of variance：CV 値）は 15% 以下までよいとされている．図 2 の 10 例は蛋白 0.6g/StWtkg を目指しているが，摂取量はかなり変動している．下段の CV 値でみると 1 例を除いて 15% 以内におさまっている．つまり許される範囲の変動である．そのとき上段の摂取量は，どの例でも蛋白 0.58g/StWtkg を 1〜5 回下回っている．蛋白 0.58g は，それ以下の蛋白摂取量は体蛋白（体の筋肉量）減少を招く危険が高く，実行すべきではないとされる摂取量である [9]．つまり 0.6g を目指すと体の蛋白量減少を引き起こす危険がかなりある．

しかし 0.8g/StWtkg を目指すと，図 3 に示すように，摂取量の変動は図 2 の例と同じ程度であるが，全例で蛋白摂取量は安全な 0.58g/StWtkg 以上を示しており，からだの蛋白を減少させる危険がない．からだの蛋白を減少させる危険が少ない，より安全な 0.8g/StWtkg を目指すべきと考える．

蛋白制限は 0.5g/StWtkg 以下にしなければ，CKD の進行は抑えられないと唱えているグループがある．

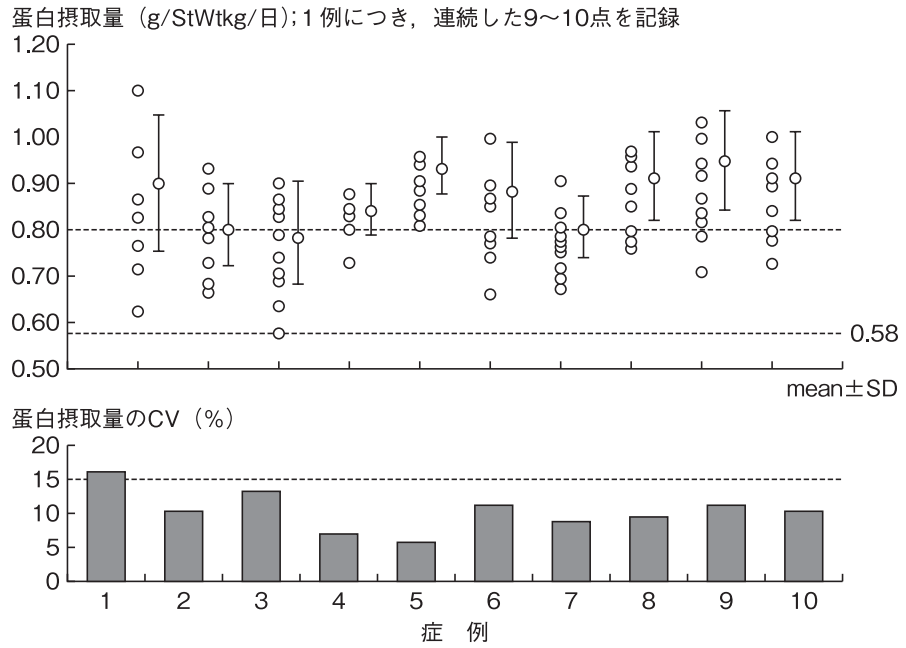


図 3.　蛋白摂取量 0.8g/StWtkg を目指した 10 例

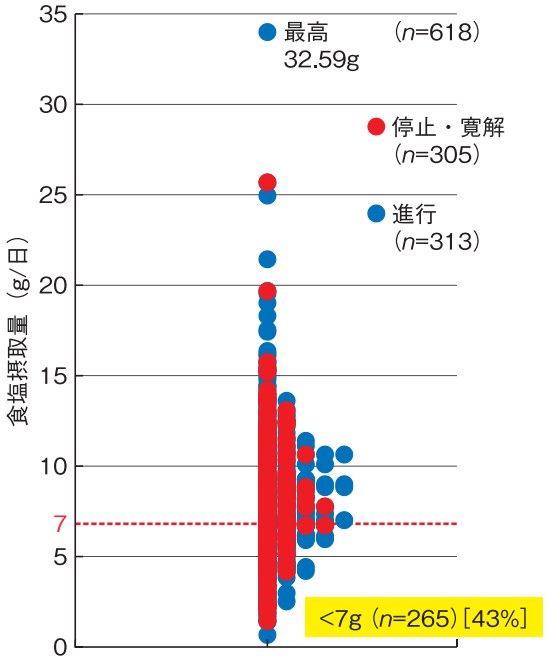


図 4.　食塩摂取量 の集計
2013 年 2〜3 月に受診した 618 例の食塩摂取量を集計した．

進行を抑えることはむずかしいから，苦痛を伴う，からだに危険な，極端な制限でなんとか進行をとめようとの考えである．真剣に病気と闘おうと思うと，なにか極端なことを実行しないと進行はとまらないのではないかとの考えにいたるのは，わからなくはない．しかし極端な蛋白制限を実行すると，簡単にからだの蛋白を減少させてしまう．

0.8g/StWtkg の実行で，CKD 進行は十分にとめることができる．もしどうしても 0.5g/StWtkg を実行するのであれば，必ず 24hUC を行い，からだの筋肉量を表す尿クレアチニン排泄量（UCrV）が減少しないことを確認しつつでなければならない．しかし，そうした予防措置をなにもせずに，蛋白摂取量は 30g にしなさいといった無責任な栄養指導が，いまなお全国で横行している．

いままで他院で蛋白 0.5g/StWtkg 以下を一生懸命実行していた患者が大勢訪れてくる．その極端な蛋白制限を実行しなければ進行がとまらなかった例は 1 人もいなかった．かえって筋肉量を減らし，危険な状態に陥っていた例がかなりあった．ただちに蛋白をもっととるように指導するが，極端な制限から抜け出すのに，6 ヵ月〜1 年はかかってしまう．

2）食塩摂取量　7g/日以下を目指す．日本腎臓学会，日本高血圧学会，日本循環器学会の指針はいずれも“6g/日以下”となっている．蛋白と異なり，食塩は少なければ少ないほどよいと考えられている．7g/日以下としたのは，日本人では 6g/日以下はきわめてむずかしく，実行可能な目標値として 1g 多く設定した．当院では来院ごとに 24hUC の一部を患者に提出させており，1 ヵ月に 500 人以上が来院すると 500 例のデータが得られ，1 年では 6,000 例のデータが得られる．“7g/日以下”という目標値は，蓄積された膨大なデータから得られたものである．図 4 に示すように 2013 年 2〜3 月に受診した 618 例の 1 回の食塩摂取量は，7g/日未満が 265 例（43%）で，残りの 353 例（57%）は 7g/日以上だった．7g/日未満でさえ過半数の患者が実行できていない．

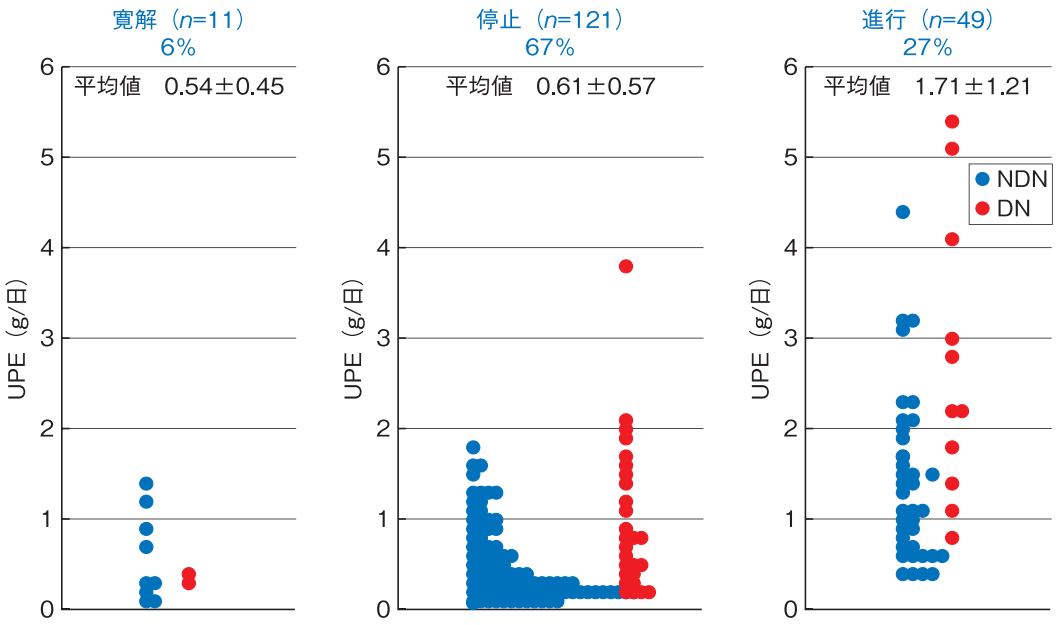


図 5. 尿蛋白排泄量（UPE）平均値（*n*=181）

食塩制限はきわめて大切で，制限により，①血圧が下がり，②それにより尿蛋白が減る．さらに③ARB，ACEI などの抗蛋白尿効果（尿蛋白を減らす効果）を強くする．

食塩制限ができていないのに，進行が停止または寛解を示す例がある．保存療法の一番の目的を達成できているので，ただちに食塩制限ができなくてもよいといえるが，長期的には食塩過剰は①血圧を下がりにくくし，降圧薬を減らすことができない，②胃癌の発症を促すなどの問題があるので，時間をかけても 7g/日以下が達成できるよう指導する．

3）エネルギー量　軽作業の人は 30kcal/StWtkg とする．これより少ないエネルギー量，たとえば 25kcal/StWtkg とすると，多くの場合たえず空腹を覚えるようになり，大変苦しい食事療法になってしまう．日本人の患者には，よく勉強し，栄養指示量を守ろうとする人が多い．どうせ守れないだろうとサバを読み，実際の目標値を下回る指導を安易にすべきではない．一方，高齢者では 30kcal/StWtkg でも多すぎて，実行するのが辛いという人もいる．これは高齢となり，エネルギー消費量が減ったためである．そのときは患者の献立をよく調べ，患者が食べられる範囲のエネルギー量とする．エネルギー量の過不足は，起床時体重を受診ごとに記録する，空腹感，食べ残しの有無を毎回開くことで防ぐことができる．

c. 薬物療法

1）抗蛋白尿・降圧療法　薬物療法の第一の目的は尿蛋白を減らすことである．進行因子は沢山あるが，尿蛋白は最大の進行因子で，これを放置していてはほかでいくら努力しても進行はとまらない．進行が 1 年間停止または寛解状態にある例の尿蛋白は，図 5 に示すように 2g/日の例もある．つまり出来高でみると，Ruggenenti ら[10] がいうように，尿蛋白を 0.5g/日未満あるいは 0.3g/日未満にする必要はないようである．

尿蛋白を減らそうと思ってアンジオテンシン受容体拮抗薬（ARB）などを増やすと血圧が下がりすぎ，立ちくらみ，めまいが生じやすくなる．血圧低下による事故はかなり多く，危険をおかしてまで降圧薬を多く用いるべきではない．では，尿蛋白はどの程度まで減らせばよいかであるが，いまのところ 2g/日以上はそれ未満にすべきと考えている．

「CKD 診療ガイド 2012」[2] の血圧管理：成人の項に，“特に高齢者では投与後 2 週間～1 ヵ月以内に原則として収縮期血圧 10mmHg 未満の過剰降圧がみられた場合には該当の薬剤を減量するか中止して経過を観察する”とある．当院は家庭血圧法を採用しており，このような過剰降圧をいち早く患者自身が発見し，主治医と相談のうえ，薬剤の減量・中止により修正することができる．通院中のリスクを減らせる点からも CKD 診療に家庭血圧法は欠かせない．

2）その他の薬物療法　CKD 診療では病態がきわめて複雑なため，また進行すると複雑さが増すため（図 6），多くの薬剤を用いなくてはならない．10 種類以上となることもある．しかし薬剤の量は常に増えるばかりとは限らない．減らせるチャンスがないかどうかは診療ごとにチェックする．

降圧薬（ARB），アンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACEI），一部のカルシウムチャネル阻害薬（CCB）

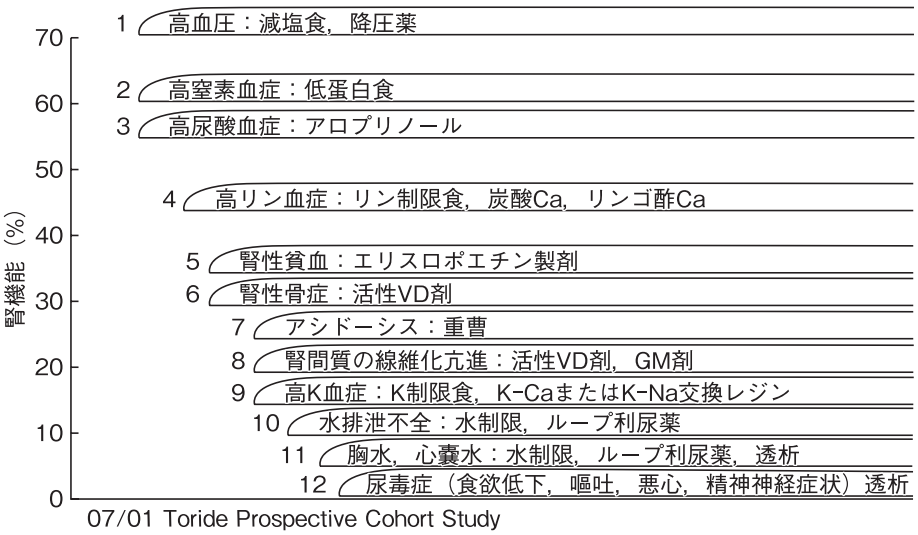


図 6. 腎機能と積算されてくる“病態”の関係

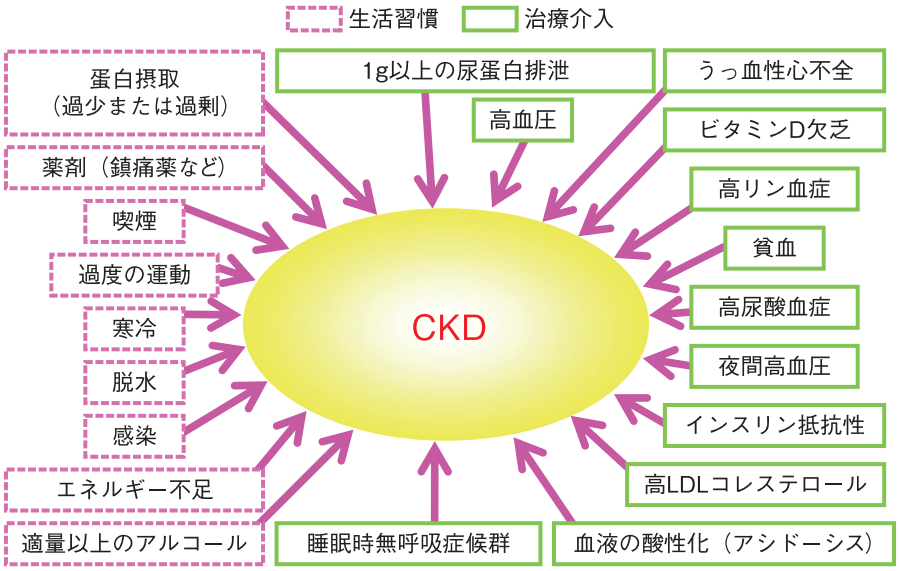


図 7. 腎臓病を進行させる 21 の因子（2013 年 3 月改訂）

をまず投与する．それ以外の降圧薬（β 遮断薬，α 遮断薬，α β 遮断薬，中枢性交感神経抑制薬，血管拡張性降圧薬）には直接の抗蛋白尿作用はないが，降圧を介して尿蛋白を減少させることを期待して用いる．

利尿薬は利尿作用，降圧作用を求めて用いる．フロセミド，アゾセミド，トラセミドが主な利尿薬で，トリクロルメチアジド，ヒドクロロチアジドは eGFR を低下させることがあり，慎重に投与すべきである．

腎不全により生じた病態を修正・治療するために，以下の薬剤を用いる．活性型ビタミン D_3 剤，Na–K 交換レジン，Ca–K 交換レジン，リン結合薬，アルカリ化剤，高尿酸血症治療薬，脂質異常に対する薬，球型活性炭吸着薬，鉄剤などである．

d. 集学療法

集学療法とは，多数の進行因子（図 7）を診療ごとにチェックし，治療により修正することをいう．図 8 は検査結果のプリントから「腎臓病手帳」に抜き書きした主要な検査データである．修正すべき個所に赤の斜線「✓」が入っている．検査値が目標に達すると「✓」が消える．この方法により，きめ細かな修正が可能になった．図 8 の例は，はじめの 4 つの修正すべき項目が診療がすすむにつれて減り，6 回目の診療では 0 になった．なお，当院では大方の検査項目は検体接取後 30～60 分以内に結果が出るので，受診日に対策を立て直すことができる．集学療法は他の三つの療法と同じ程度に重要であるが，他施設でこの方法を採用しているところはほとんどないと思われる．

2. CKD ステージ 5 に入ったら

当院にはステージ 5（eGFR 15m*l*/min/1.73 ㎡以下）

目標蛋白摂取量　45 g

年		2012											
月 / 日		2/9	3/14	4/19	5/31	7/15	8/9	/	/	/	/	/	/
治療													
体重（kg）		56.0	55.8	56.8	57.6	57.0	56.8						
家庭血圧		○△×	○△×	○△×	○△×	○△×	○△×	○△×	○△×	○△×	○△×	○△×	○△×
血液	ヘモグロビン（g/dℓ） 目標＞11	9.9✓	10.7	10.8	9.2✓	9.7	10.7						
	ヘマトクリット（%） 目標＞32	28.1✓	31.2	29.8	27.0✓	28.2✓	30.7						
	尿素窒素（mg/dℓ）	38.9	40.5	49.7	42.3	53.9	42.1						
	クレアチニン（mg/dℓ）	2.67	2.35	2.42	2.54	2.65	2.55						
	尿酸（mg/dℓ） 目標＜6.5	8.6✓	8.3✓	11.6✓	7.3✓	5.3	5.6						
	カリウム(mEq/ℓ) 目標＜5.5	5.3	4.7	5.4	5.5	5.3	5.4						
	リン(mg/dℓ) 目標＜4.5	4.5✓	4.6✓	4.3	4.6✓	4.4	3.7						
	eGFR(mℓ/min/1.73㎡) 中央値80	19.7	22.2	22.0	20.8	19.8	20.7						
蓄尿	ｸﾚｱﾁﾆﾝｸﾘｱﾗﾝｽ(mℓ/min/1.73㎡) 中央値100		37.8	30.3	32.3	33.9	36.3						
	蛋白摂取量(g/日) (g/kg/日)		53.1 (0.95)	61.3 (1.09)	48.6 (0.87)	50.8 (0.91)	55.2 (0.99)						
	食塩摂取量(g/日) 目標＜7		3.8	8.4✓	5.00	4.0	5.26						
	尿蛋白排泄量(g/日)	(±)	0.49	0.96✓	0.66	0.42	1.10						

図 8.　腎臓病手帳

の患者が多く来院していることは先述した（表 1）．筆者は，生命に危険が及ばない万全の対策をとり，いつでも透析を始められる準備をし，尿毒症出現までは透析に踏み切るべきでないと考える．透析は嫌だという患者の声はきわめて強く，また嫌う理由は的外ずれのものもあるが，正しいものもある．

クリニックには透析施設がないために，緊急透析になると，周辺の施設に迷惑をかける．それを避けるためにいろいろな工夫をしている．

ステージ 5 に入ると水の貯留を防ぐ必要が出てくる．食事から 1 日約 800m*l* の水が摂取されるが．それ以外の水摂取は 1 日 600m*l* とすべきである．しかしこれは秋～冬～春にかけての制限で，夏はもっと水をとってよいが，どこまでとれるかは eGFR，尿蛋白排泄量，血清アルブミン，個人の習慣・生活により異なり，個々の患者で決めてゆく．

ステージ 5 では血圧記入用紙が変わる（図 9）．患者に起床時体重を毎朝記入させ，尿毒症の 5 つの症状（食欲不振，食事を残す，体がだるい，足のむくみ，息苦しさ）が現れていないかどうかも毎日チェックする．この用紙に丹念に記入することにより，緊急透析にいたる事態はほとんど予防できるようになった．

起床時体重の急激な 1kg 以上の増加は水貯留以外の何物でもない．1kg 以上の増加があればただちに電話でクリニックに連絡させ，食事時以外は安静臥床とし，水制限とする．

3. 透析導入を考えるとき

a. 透析の準備をしなければならない腎機能

eGFR 6m*l*/min/1.73 ㎡ 以下，Ccr 9m*l*/min/1.73 ㎡ 以下と考えている．この基準を超えたからといって，ただちに透析療法に入る必要はないが，血液透析（hemodialysis：HD）であれば内シャントを造設しておく．腹膜透析（peritoneal dialysis：PD）であればカテーテルを腹腔内に挿入し，カテーテル先端を皮下に埋設しておく．

b. 透析開始のきっかけとなる尿毒症症状

1）消化器症状，倦怠感，精神障害　尿毒素の貯留による症状である．吐き気，嘔吐といった消化器症状が現れても，すぐに透析導入する必要はないが，保存療法の限界が近づいている．言語流出などの精神症状が現れたときは不可逆性となるおそれがあり，緊急に透析導入する．強い倦怠感も尿毒症の症状である．

2）水の貯留　水の貯留も尿毒症の症状である．「2. CKD ステージ 5 に入ったら」（18 頁）のはじめに述べたように，工夫により緊急透析は回避できる．

Ⅲ．保存的治療の成績

一般に CKD 進行速度の減少率で治療効果を判定することが多いが，筆者は進行性の停止・寛解・進行を表 3 の定義に従って 1 年間の経過で判定している．これはその先の長期経過を予測できる信頼性の高い基準

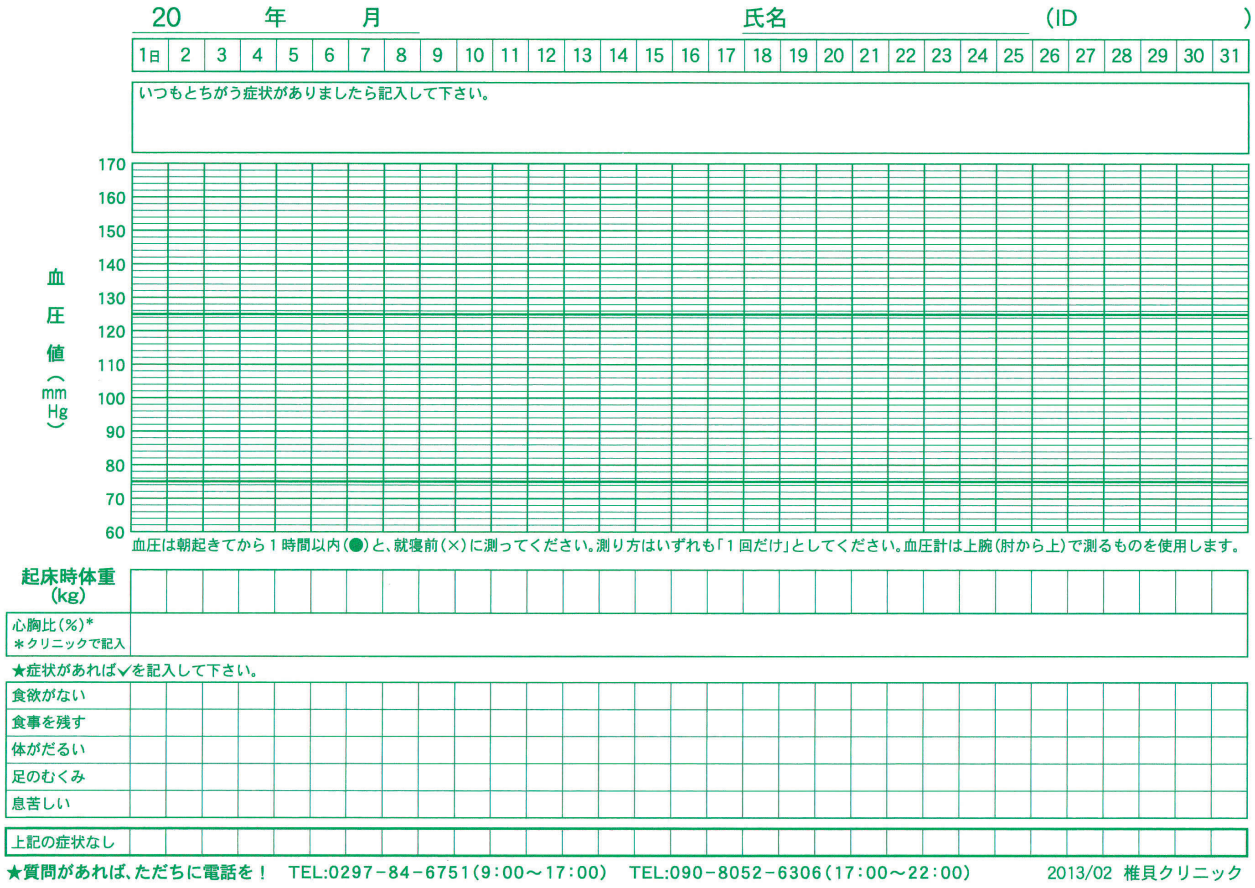


図 9. CKD ステージ 5 記録表

表 3. CKD の停止・寛解・進行の定義

停止：1 年間でみて， 　糸球体濾過量（eGFR）が前値の± 5% 未満の変動
寛解：1 年間でみて， 　糸球体濾過量（eGFR）が 5% 以上の増加
進行：1 年間でみて， 　糸球体濾過量（eGFR）が 5% 以上の低下

と考えている．透析導入の原因となる 4 大 CKD の治療成績を図 10 に示す．透析原因の第 1 位の糖尿病性腎症は停止 58.9%，寛解 1.8% で，合わせた停止＋寛解率は 60.7%，第 2 位の慢性糸球体腎炎は同様に 77%，第 3 位の腎硬化症は 88%，第 4 位の多発性嚢胞腎は寛解がなく停止率が 44% である．多発性嚢胞腎は CT スキャンで明らかな腎容積増加を認めた例で，ほとんどの例が進行すると考えられているが，当クリニックの患者で停止例が多いのは，家庭血圧モニタリングによる厳格な血圧コントロールのためではないかと考えている．

ステージ別の成績をみると，慢性糸球体腎炎ではステージが上がると成績が悪化する（図 11）．図 11 は慢性糸球体腎炎 256 例のステージ別の成績である．ステージ 3，4 では停止＋寛解率は 80% 台で大きな違いはないが，ステージ 5 では 53.2% と大きく低下する．糖尿病性腎症でも同様の傾向がみられる．ステージ 5 の進行因子はいまだ十分に解明されておらず，遅くともステージ 4 までに保存療法を開始する必要があると考えている．

寛解はともかく，停止は翌年も持続する可能性が高く，患者は生涯透析を回避できる期待をもち生活することができる．

取手協同病院在任中に取手市住民を対象として 2005 年度から，透析導入数を 3 年間で 30% 減少させようという「D3–30 プロジェクト」を開始した．取手市住民からの透析導入数はプロジェクト開始時の 2005 年度の 36 例から 2008 年度には 22 例と 39% 減少し，2009 年度の透析導入数は 23 例で 36% の減少であり，プロジェクトの目標は達成された（図 12）．

このように筆者の成績がよい理由は，以下の 6 つによると考える．①家庭血圧法によるより厳密な，より正確な血圧モニタリング，② 24hUC による裏づけのある食事療法，③プログラム化された抗蛋白尿，降圧療法，④集学療法によるきめ細かな受診ごとの修正，⑤測定結果が 30～60 分以内にわかり手帳に記入でき

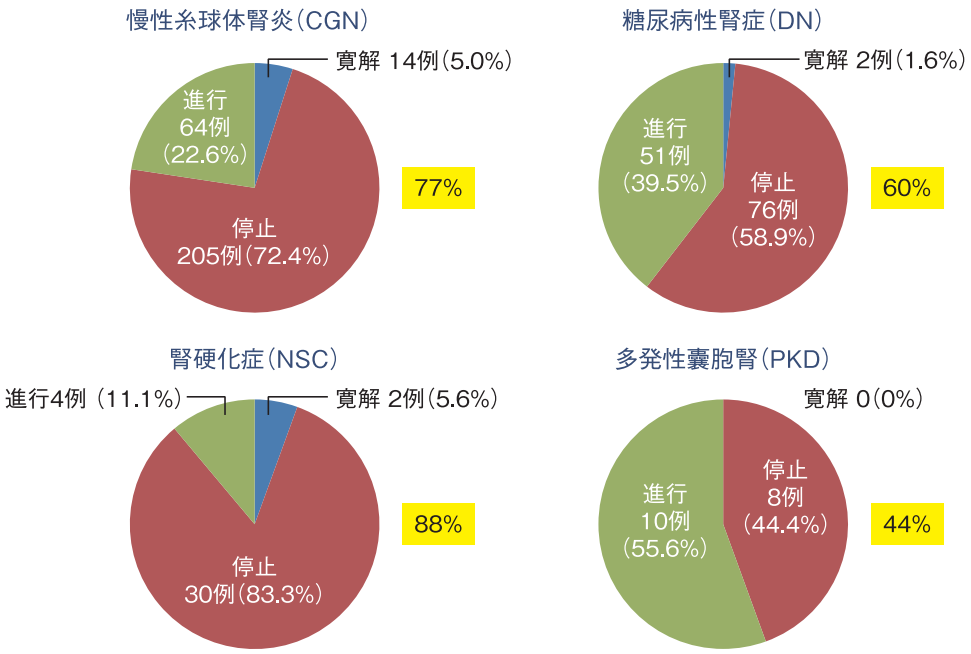


図 10．4 大 CKD の治療成績

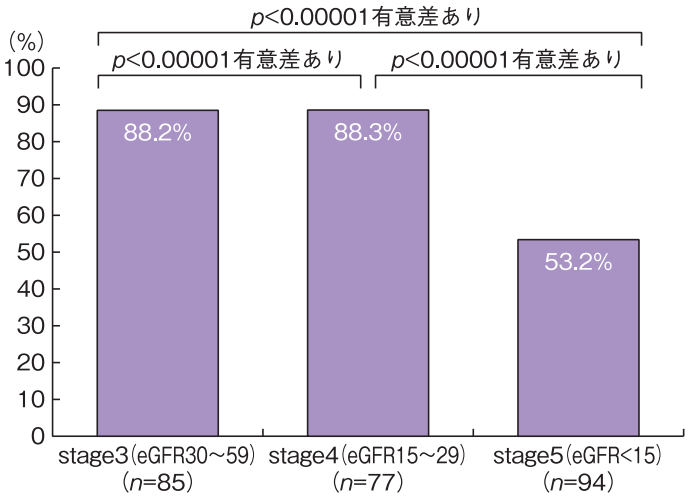


図 11．慢性糸球体腎炎のステージ別停止＋寛解率（*n*=256）

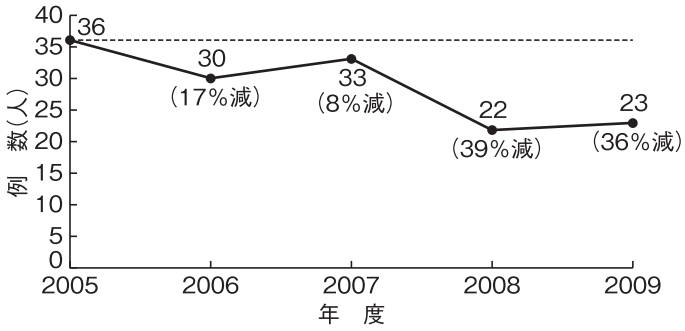


図 12．D3－30 プロジェクト開始後の透析導入数の推移（取手市住民）

る“迅速測定”体制，最後に，⑥治療の目的を理解し，アドヒアランスに優れた患者の存在，である．

Ⅳ．CKD 医療をめぐるいくつかの問題

1．保存療法の普及が CKD 問題を解消させる

保存療法は患者の QOL を高く保つ．日本では 96.9% の末期腎不全患者が血液透析（HD）を受けている．HD は週 3 回，曜日を決めて行われるのが普通である．夜または準夜帯に HD を行う施設は少ないので，午前または午後に組み入れられることが多い．HD に要する時間は 3 時間であるが，前準備，後の休息が必要で，1 回の透析に計 5 時間かかるとみなければならない．自営業ではなんとかやりくりして仕事を続けられるが，会社勤務の場合，会社をやめるにはいたらなくても，大きなハンディキャップを背負っての勤務となる．日本の雇用制度の中ではいつ退職対象となるかわからない．

日本における脳死からの腎提供数は 850 件程度で伸びていないが，他方，生体腎移植数は伸びている．親族から腎提供を受けられるあてのない人は，生涯，透析療法の枠から抜け出すことができない．ここが脳死からの提供が多い欧米との大きな違いで，欧州では年に 11,000 件，米国では年に 15,000 件の脳死からの腎提供がある．透析に要する医療費がほとんど国費で賄われていても，日本の透析患者が“社会に支えられて

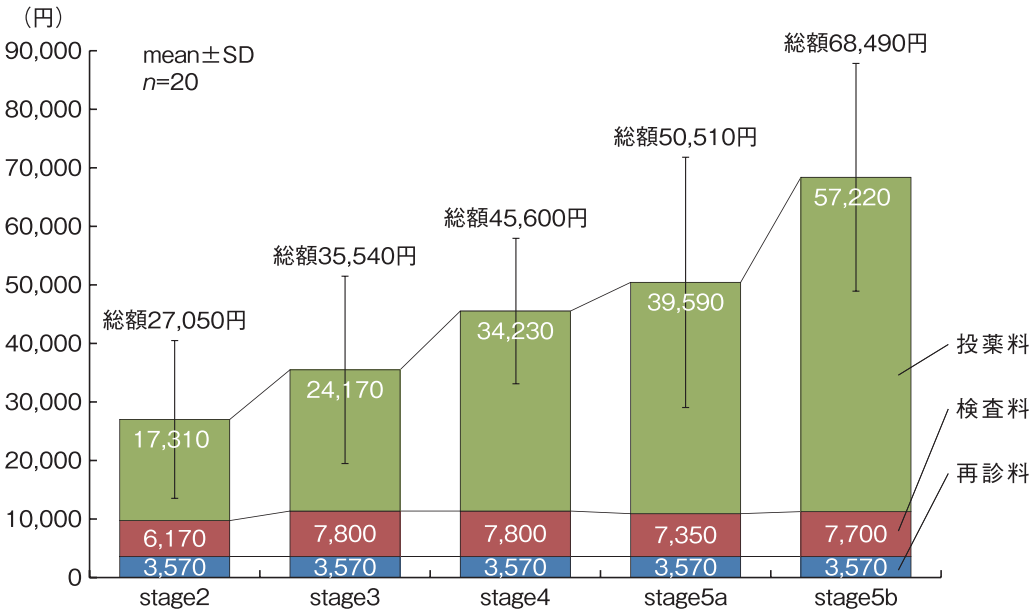


図 13. 保存療法の医療費（月額）
検査料とは尿，血液の検査費用と判断料から，再診料とは診察料および指導料からなる．
ステージ 5a：eGFR10～15，ステージ 5b：eGFR＜10

表 4. 慢性糸球体腎炎の薬剤投与例（85 歳，女性．eGFR 9.1）

薬剤名	数量（錠）
カルベジロール 10mg	1
ランソプラゾール 30mg	1
テルミサルタン 40mg	2
グアナベンズ酢酸塩 2mg	1
ドキサゾシンメシル酸塩 2mg	1
シルニジピン 10mg	2
フェキリフェナジン塩酸塩 60mg	1
センナ顆粒	0.5g
アゾセミド 60mg	1
フェブキリスタット 10mg	1
重曹 500mg	1
イトプリド塩酸塩 50mg	3
ゾルピデム酒石酸塩 5mg	1
パロキセチン塩酸塩 10mg	2
チザニジン塩酸塩 1mg	1

いる”意識をもたないのは，この臓器提供の少なさによる．欧米では，CKD 患者はいつか腎臓を提供される希望があるが，日本では親族からの腎提供の可能性がなければ移植腎で生きられる望みはほとんどない．

日本で臓器提供が増える兆しがみられないとなると，日本は他国と異なる別の道を追求する必要がある．筆者の行ってきた保存療法を国の方針として取り上げることを提案したい．

保存療法も医療費がかかるため，保存療法の患者が増えればその医療費が問題になるのではないかとの危惧もある．図 13 に示すように保存療法の医療費はステージがすすむにつれて増加するが，透析に要する年額 480 万円に比べるとはるかに低額である．ステージ 3 で進行をとめることができれば年に 42 万円の医療費ですみ，透析療法との差額は年に 438 万円となる．ステージ 4 で 426 万円，ステージ 5a では 420 万円，ステージ 5b では 398.4 万円の差額となる．どのステージでとまったとしても莫大な医療費が削減される．

透析に要する医療費（透析医療費）1 兆 5,000 億円（推定）は，国民健康保険（国保）の財政を圧迫している．透析医療費はほとんどが市町村の負担で，患者が月に 1 万円負担する市町村もあるが，これも免除されているところもある．国保財政は赤字が続き，毎年市区町村が 3,500 億円に登る公費を投入している．超高齢社会となり，国保財政はただでさえ出超が多いのに，透析医療費の増加はますます財政を悪化させている．地方の市町村で財政規模の小さいところでは透析患者が 1 人増えるごとに財政への影響が大きく，透析患者は小さくなって生活しているという話を何回か聞いたことがある．保存療法を普及させ，医療費の歪みを早く直したいものである．

それでは保存療法中の患者の生活はどのようなものであろうか．薬の量と種類はどうしても増える．表 4 に示すように，CKD が進行し病態が増えるにつれてそれに対応する薬の量・種類は増やさざるをえない．ステージ 4 で 10 種類が処方されることもめずらしくない．

食事療法は CKD では重要であるが，蛋白摂取量は 0.8g/StWtkg 前後，食塩は 7g/日以下であり，実行す

るのはそれほど大変ではない．CKD ステージ 3，4，5 の通院患者に聞くと，薬が多いのは気になるが，進行をとめるために必要と思うので仕方がない，食事療法も別に大変ではなく，全体としていまの生活に十分に満足しているとの答えが返ってくる．

Ⅲ項で述べたように保存療法は大きく進歩し，透析療法，腎移植でない“第 3 の道”の地位を確保できるものになった．正しい保存療法の普及は日本のみならず，世界の CKD 問題を解決するものになる．

2. 保存療法の普及を阻むもの

ではなぜ保存療法は普及しないのか．答えは簡単で，採算を合わせることがむずかしいからである．当クリニックは開院して 3 年をすぎ，なんとか継続しているが，たえず存続の危機を感じている．保険診療で行う場合，以下のようなハンディキャップがある．①一般の内科診療では再診時間は 1 回 3〜5 分が多いが，保存療法では 1 回 10〜30 分かかる．患者数をこなせないため，単位時間当りの再診療費は低くなる．②1 回に医療保険で認められる生化学検査件数は 10 項目までであるが，保存療法では蓄尿の分析も必要なので，診療ごとに 16〜20 項目の分析を要する．10 項目を超えた試薬代などは医療機関が負担しなければならない．③薬の処方数が増え 7 種類以上となると，院内処方の場合，薬代の 9 割しか基金から支払われない．院外処方の場合は 7 種類を超えると処方料は約 60% に減額される．かつて問題になった投薬過剰による医療費増加は院外処方の増加でほぼ解消しているが，“薬漬け医療退治”と思われる施策がなお行われている．

このような採算割れの逆風の中で，さまざまな工夫でなんとか存続させているのが現状である．以前から保存療法に“指導管理料”をつけることを提案しているが[11]，それに対する国からの返答はない．これでは保存療法を行う施設はまったく増えず，普及は夢のまた夢である．さらにいろいろな提案を行い，保存療法を採算ベースに乗るものにしたいと考えている．

3. 腎臓専門医制度について

「文藝春秋」2011 年 12 月号に筆者の論文「患者よ―あなたに透析は必要か」[12] が掲載されたことをきっかけに，2011 年 12 月〜2013 年 3 月にかけ多くの CKD 患者が当クリニックを訪れた．患者は前医の治療への不信感，不満を口々に述べ，その内容はかなり共通していた．そこで急遽，来院患者を対象としたアンケート調査を実施した．

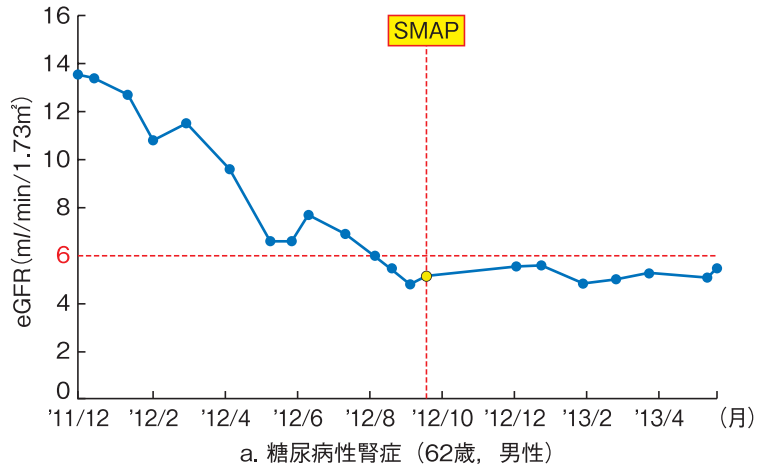
調査は 2011 年 12 月〜2013 年 3 月の 4 ヵ月間にわたり，184 人が回答した．前医の氏名を腎臓専門医名簿で照合し，専門医と特定できたのはうち 79 人であったが，全体の 184 人の回答と大きな差異はなかった．そこで専門医にかかっていた 79 人の回答について述べる．まず“前医の CKD 進行への対策”はよく理解できたが 13%，まあまあ理解できたが 57% だったが，理解できなかったが 28% あった．“診療のどこが不満だったか”については，CKD 進行への具体的対策の説明がないが 39%，前医の態度が信頼できないが 24% であった．“診療全体の評価”は良い・ふつうが 64% であったが，悪い・いちじるしく悪いが 31% あった．

患者の印象に残った前医の言葉のいくつかを取り上げると，腎臓病は治らない，腎機能は限りなく 0 に近づく，透析に入るのもわるくない，日本の透析レベルは世界一，腎不全について（患者は）もっと勉強するように，筋肉トレーニングの腎臓への影響について訊ねたところ，スポーツトレーナーに尋ねてほしいなど，患者の知りたい今後の進行への対策についてまともに回答せず，患者をがっかりさせるもの，自分の知識不足を棚に上げ患者の努力に転化するものがあった．腎専門医をわざわざ選んで受診した結果の，このような対応に大きく失望している患者が多かった．

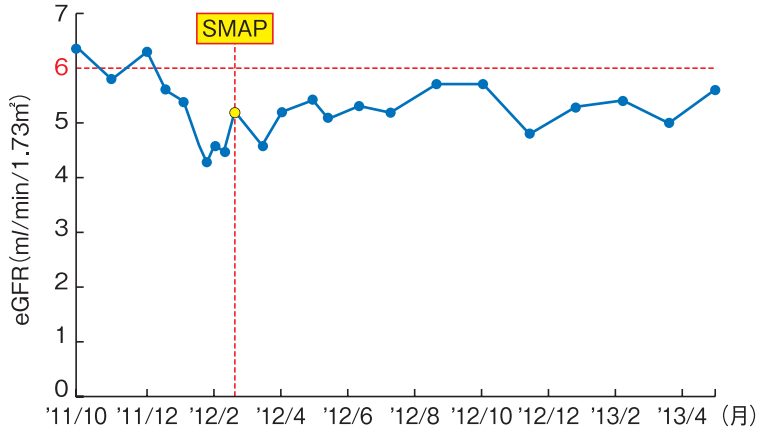
なぜ患者の切実な疑問に専門医は誠実に答えないのか．筆者はそのかなりの原因は専門医教育の不備にあるのではないかと思う．「腎臓病セルフアセスメント 2012」[13] は専門医受験者のための問題集であるが，問題を読むと強い偏りがあるように思える．

CKD のステージ 3，4，5 の患者数は，1,098 万人と推定される[2]．その人達は eGFR が 60ml/min/1.73 ㎡未満であることを強く意識し，多かれ少なかれ，いつかは透析になるかもしれないという不安・おそれを抱いている．問題集にはこの多数の患者にどう対処するのかについての問題と解答がきわめて少ない．腎臓の組織像に関する問題，血中のさまざまな抗体など，血中物質に関する問題は多いが，そのような知識を必要とする CKD 患者は少ない．1,098 万人という大勢の患者は，どうしたら CKD の進行はとまるのか，いまの腎機能は将来どうなるのか，透析しかないのかなどの疑問に率直な答えを求めているが，教育カリキュラムは患者のおかれたそのような状況をほとんど意識していないように思える．

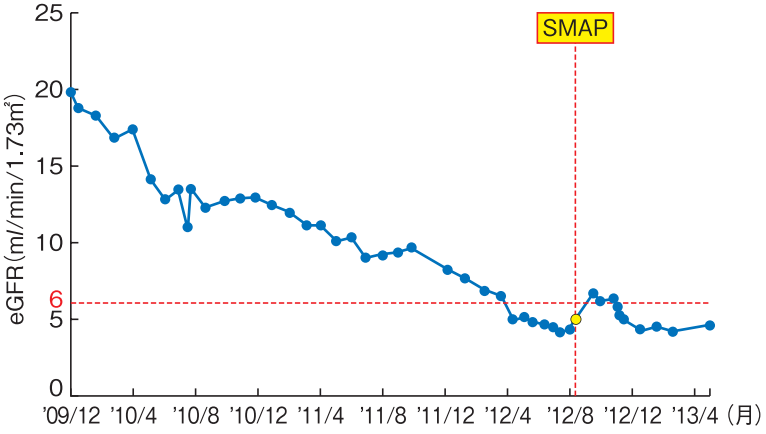
日本専門医制評価・認定機構理事長[14] は，専門医取得は取得の旨を自身の医院の広告に用いることができる利点がある．患者はそれを根拠に受診先を選ぶ．もし患者の期待に応えられない専門医であれば，それを育てた専門医制度に問題があると述べ，患者の信頼をそこなう前に制度の見直しを行い，よい専門医を育



a. 糖尿病性腎症（62歳，男性）



b. 慢性糸球体腎炎（72歳，男性）



c. 慢性糸球体腎炎（62歳，男性）

図 14. 段階的腹膜透析導入法（SMAP）後の eGFR の推移

てられる制度としなければならないとしている．腎臓専門医制度は患者の要求から大きくはずれたものとなっており，認定機構から修正勧告が出る前に，教育カリキュラムの見直しをすすめるべきと思う．

4. 透析導入時期をめぐる混乱

前項の問題と関連するが，いったい血清クレアチニン値がいくつになったら透析導入を考えるのかについて，全国の腎臓専門医の意見はまちまちであり，患者を困惑させている．患者が聞いた透析の準備をすべき値は血清クレアチニン 2〜5mg/dl に分布し，きわめて幅広い．eGFR という便利な指標が導入され混乱は少なくはなったが，相も変わらず血清クレアチニン値のみを透析導入のよりどころとしている専門医も多い．

eGFR 6 未満で透析導入を考えるは日本のエキスパートの一致した意見であり[15,16]，これを早く全国に普

及させる必要がある．

5. 腹膜透析の準備のために，腹腔カテーテル留置を行った例にみられる不思議な現象

どうしても進行をとめることができず，やむをえずPDの準備のために腹腔カテーテル留置を行うことがある．ところが，その手術後CKDの進行が停止し，数ヵ月あるいは1年以上にわたって，透析に移行する機会がみつからない例を少なくとも4例経験している．長年進行停止に取り組んできた筆者には，これは奇妙なきわめて興味を引かれる現象である．図14の3例は進行抑制のためにあらゆる手段を講じた症例で，きわめて強い進行性を示していた．それがほぼ完全に停止している．カテーテルは腹腔内におかれたのみで，まったく使われていない．また術前後で血圧や食事内容に変化がないことは十分確認している．従来考えられてきたCKD進行因子では説明できないとすると，カテーテル留置に伴う心理面，精神面の変化がこのような停止現象をもたらしたのかもしれない．腎動脈周辺の交感神経の除神経術は血圧を下げ，腎機能低下を防ぐ手段として注目を浴びている[17]．交感神経活動と腎機能との関係は以前より知られていた．

カテーテル留置に伴う心理面・精神面の変化は，患者に開くと，透析に入らなければならないという“諦め”と，いつでも透析を開始できるという“安心感”の二つのようである．

前述したようにステージ5の患者は220人ほど通院している．その人達に腹腔カテーテル留置はしないが，留置したときの心理状態に近づくように1日15〜30分の瞑想（meditation）を行うよう指導している．患者の中には座禅に精通している人もおり，時にはその人達に逆に教えを乞いながら，いかにうまく瞑想を行えるかに取り組んでいる．結果が出るにはあと1ヵ月はかかるので，残念ながら本稿に報告することはできない．

文　献

1) El Nahas M：The global challenge of chronic kidney disease. Kidney Int **68**：2918–2929，2005.
2) 日本腎臓学会（編）：CKD診療ガイド2012，東京医学社，東京，2012.
3) Sarnak MJ，Levey AS，Schoolwerth AC et al：Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease；a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease，High Blood Pressure Research，Clinical Cardiology，and Epidemiology and Prevention. Circulation **108**：2154–2169，2003.
4) Cooper BA，Branley P，Bulfone L et al：A randomized，controlled trial of early versus late initiation of dialysis. N Engl J Med 363：609–619，2010.
5) Imai E，Horio M，Iseki K et al：Prevalence of chronic kidney disease（CKD）in the Japanese general population predicted by the MDRD equation modified by a Japanese coefficient. Clin Exp Nephrol **11**：156–163，2007.
6) Bakris GL，Williams M，Dworkin L et al：Preserving renal function in adults with hypertension and diabetes；a consensus approach. National Kidney Foundation Hypertension and Diabetes Executive Committees Working Group. Am J Kidney Dis **36**：646–661 2000.
7) Agarwal R，Anderson MJ：Prognostic importance of clinic and home blood pressure recordings in patients with chronic kidney disease. Kidney Int **69**：406–411，2006.
8) 「家庭での血圧測定が普及するまで」《http://www.healthcare.omron.co.jp》
9) Young VR：Protein and amino acid requirements in humans；metabolic basis and current recommendations. Scand J Nutr **36**：47–56，1992.
10) Ruggenenti P，Cravedi P，Remuzzi G：Mechanisms and treatment of CKD. J Am Soc Nephrol **23**：1917–1928，2012.
11) 椎貝達夫：腎臓病の話，岩波書店，東京，2007.
12) 椎貝達夫：患者よ―あなたに透析は必要か．文藝春秋：12月号，2011.
13) 今井裕一：腎臓病セルフアセスメント問題と解説2012，東京医学社，東京，2012.
14) 池田康夫：週刊医学会新聞，第2997号，2012年.
15) 山縣邦弘：血液透析への導入基準―わが国のエビデンスから．腎と透析 **73**：793–799，2012.
16) 井関邦敏：早期導入と晩期導入―メリット，デメリット．腎と透析 **73**：789–792，2012.
17) 木村玄次郎：腎交感神経アブレーションの現状と展望．医療ジャーナル **48**：93–99，2012.

Conservative therapy for chronic kidney disease without using dialysis ; a 35-year experience

Tatsuo Shiigai, MD

Shiigai-Clinic

Summary

Since 1978, the authors have been engaged in the conservative therapy of chronic kidney disease (CKD) in order to prevent its progression. Now, 35 years on, it has become possible to treat CKD to a significant level. There is, for example, now a 60.5% rate of stopping progession and remission for diabetic nephropathy. Stopping progression or remission normally takes about one year to achieve, so there is a distinct possibility that the trend will continue into the following year.

The treatment methods that brought about these results can be divided into four areas : 1. Control of blood pressure, 2. Restricting protein and salt within the diet, 3. Drug treatment of irregular clinical conditions brought on by CKD, and 4. Multifactorial intervention. Blood pressure is regulated using home blood pressure, while dietary advice is based on the results of 24hr urine collection at home.

In all cases, the authors aimed for perfection while improving the methods in question.

This conservative therapy method has now started to spread around the country, and patient inconvenience has been relieved to a small extent, but few medical institutions seem willing to use this approach. The reasons for this lie in the examination fee required for conservative therapy, and the fact that part of the prescription fee is not approved for coverage by the Japanese health insurance program. At this institution, the authors are constantly searching for new strategies to improve the management of this treatment method.

Key words : chronic kidney disease, 24h urine collection, diet therapy, home blood pressure, multifactorial intervention

ヘパラン硫酸プロテオグライカンの分子間相互作用の調節

柳下　正樹　　東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科硬組織病態生化学分野

要旨：ヘパラン硫酸プロテオグライカンはヘパラン硫酸鎖を糖構成成分の一つとしてもつ多様な糖タンパク質群の総称であり，広く動物細胞に存在している．ヘパラン硫酸鎖のもっとも顕著な生物学的特徴は，分子構造の大きく異なる多種類の生物学的活性分子と高親和性かつ高特異性をもって分子間相互作用を示すことである．本稿では，ヘパラン硫酸の示す分子間相互作用の特徴をその分子構造から説明し，これを可能にするヘパラン硫酸生合成過程に生じる微小構造多様性（microheterogeneity）について，その細胞生物学的意義を考察する．

Key words：ヘパラン硫酸プロテオグライカン，分子間相互作用，微小構造多様性

Ⅰ．はじめに

ヘパラン硫酸プロテオグライカンはヘパラン硫酸鎖を糖構成成分の一つとしてもつ多様な糖タンパク質群の総称であり，広く動物細胞に存在している[1~5]．この分子は通常ヘパラン硫酸鎖以外にもO–結合型，およびN–結合型オリゴ糖をその構成成分としてもっている．ヘパラン硫酸鎖の生物学的機能をもっとも特徴づける性質は，分子構造の大きく異なる多種類の生物学的活性分子と高親和性かつ高特異性をもって分子間相互作用を示すことができることである（表1）．これは一見生物を構成する多くの分子の特徴である生物学的特異性，つまり通常の生命構成分子は特定の（あるいは構造の類似した少数の）分子だけと相互作用を示すことであり，これは生命現象でみられる選択的な化学反応の進行や調節を可能にするという原則から大きく隔たっているようにみえる．本稿ではこのようなヘパラン硫酸の示す分子間相互作用の特徴をその分子構造から説明を試みる．

ヘパラン硫酸の関与する分子間相互作用ではヘパラン硫酸鎖自体はしばしば相互作用の主役分子（結合分子とそのリガンド［ligand］）ではなく，反応の中間段階で結合分子とリガンドに生じる結合反応を修飾したり，結合分子/リガンドの形成する分子複合体の一部に組み込まれることにより，その安定性などに関与したりする補助的な役割であることがみられる[3]．このことは以下に述べるように通常，糖鎖分子が微小構造多様性（microheterogeneity）をもって生合成されるという生物学的な特徴に起因しているものなのかもしれない．すなわち，糖鎖の生合成は核酸やタンパク質の場合と異なり非鋳型依存性であり，その分子構造を一義的に決定する生合成機構が存在しない．この分子構造決定における非一義性（多義性）は逆に，ヘパラン硫酸プロテオグライカンが細胞表面や基底膜を含む細胞外マトリックスなどに発現され，多様な分子間相互作用に利用されることに役立っているのかもしれない．ヘパラン硫酸プロテオグライカンの示す多彩な分子間相互作用を可能にする細胞生物学的な調節機構に関しても以下考察を加える．

連絡先：柳下　正樹　m.yanagishita.bch@tmd.ac.jp

Ⅱ．ヘパラン硫酸の化学構造

ヘパラン硫酸は化学的にグライコサミノグライカン（glycosaminoglycan）と呼ばれる多糖に分類され，基本2糖構造（glucuronic acid–β1, 4–N–acetyl–glucosamine–α1, 4–：図1a）が通常50ないし100回程度繰り返し直鎖状に結合した構造をとる．グライコサミノグライカンは特異的な4糖構造（–glucuronic acid–galactose–galactose–xylose–，結合領域4糖：linkage tetrasaccharideと呼ばれる）を介してコアタンパク質中のアミノ酸コンセンサス配列（Ser/Thr–Gly）中SerあるいはThrに結合する（ヘパラン硫酸–glucuronic acid–galactose–galactose–xylose–コア

前　目次へ　次

表 1．ヘパラン硫酸と分子間相互作用*を示す代表的な分子

1．ヘパリン結合性成長因子
FGF（線維芽細胞成長因子）1，FGF2，PDGF（血小板由来成長因子），KGF（ケラチノサイト成長因子），HGF（肝細胞成長因子），インターフェロンγ，CXC ケモカイン，アンフィレギュリン，ミッドカインなど

2．細胞外マトリックス分子
fibronectin，laminin，collagen（I，III，V），tenascin，thrombospondin，MMP–7

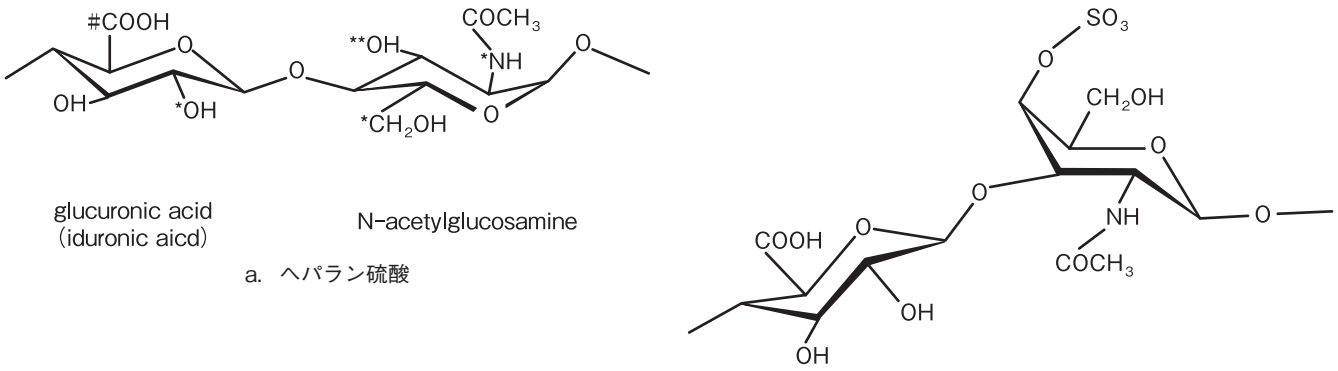
3．細胞接着分子
NCAM，PECAM，L–Selectin

4．ウィルス，プリオン関連分子
HIV（gp 120，Tat），herpes simplex（gC），cytomegalovirus，denguevirus，papillomavirus，prion protein

5．タンパク質分解酵素抑制タンパク質
antithrombin III，heparin cofactor II，plasminogen activator inhibitor–1

6．リポタンパク質，脂質分解酵素
ApoB，ApoE，lipoprotein lipase

*これらの分子は一般的に“高親和性”と呼ばれる結合定数をもち，対応分子により特異的に競合される，有限の結合部位数をもつ．この表に記された分子以外にも親和性の比較的低い非特異的結合を示し，多数の結合部位をもつ分子も存在している．後者の例では，ヘパラン硫酸のもつ陰性荷電を介したイオン性の分子間相互作用に起因することが多い．



a．ヘパラン硫酸

b．コンドロイチン 4 硫酸

図 1．グライコサミノグライカンの基本 2 糖構造

a．ヘパラン硫酸 2 糖（–glucuronic acid–β1, 4–N–acetyl–glucosamine–α1, 4–）：主糖鎖が合成された後，種々の化学修飾を受ける．頻繁に硫酸化のみられる個所を*印で示した（すなわちグルコサミン C2 位の N–硫酸化，C6 位の O–硫酸化，グルクロン酸［あるいはイズロン酸］C2 位の O–硫酸化）．そのほかにグルコサミン C3 位の O（**で示す）–硫酸化は antithrombin III 結合構造を構成するのに必須である．またグルクロン酸 C5 がエピマーである（点線で示した C–#C 結合がα配向となり）イズロン酸（iduronic acid）となる．

b．コンドロイチン(4) 硫酸 2 糖（–glucuronic acid–β1, 4–N–acetyl–glucosamine–4–sulfate–α1, 4–）：N–acetyl–glucosamine C4 位が O–硫酸化されたものがコンドロイチン 4 硫酸，C6 位が O–硫酸化されたものが，コンドロイチン 6 硫酸と呼ばれる．

タンパク質の一般構造となる）．

ヘパラン硫酸の生合成は細胞内 Golgi 装置において行われ，コアタンパク質上に合成された結合領域 4 糖を受容体として行われる．ヘパラン硫酸の基本鎖（バックボーン）が EXT 糖転位酵素群で合成されるのと並行して多くの化学修飾を受ける；化学修飾に含まれるものには，N–acetyl–glucosamine の脱アセチル化およびそれに引き続く N–硫酸化[6,7]，glucuronic acid C5 位のエピマーである iduronic acid への転換[8]，N–acetyl–glucosamine C6 位あるいは C3 位の O–硫酸化[9]，glucuronic acid あるいは iduronic acid C2 位の O–硫酸化[10,11] が含まれる．これらの化学修飾反応は糖鎖全長にわたって一様には起こらず，（現時点ではまだ知られていない）なんらかメカニズムで選択された（あるいは確率的に起こる）一部の N–acetyl–glucosamine に脱アセチル反応が起こり，それに引き

前 目次へ 次

続いてN-硫酸化が起こり，これが開始点となって周囲のglucuronic acid，N-acetyl-glucosamineの化学修飾を加速させる[12,13]．このような反応様式は複合体を形成した化学修飾酵素群によるプロセッシブな過程の関与を示している．

また修飾開始点である脱アセチル反応は限定されたN-Acetyl-glucosamineに対して起こるため，ヘパラン硫酸鎖全体でみると，集中して化学修飾を受ける局部（硫酸基/化学修飾の“クラスター”と表現される）と化学修飾をあまり受けない部分が不規則な斑状に生じる結果となる．また糖鎖長全体からみて，クラスター頻度が高く糖鎖全体として高度に修飾を受けたヘパラン硫酸鎖（これらはとくにヘパリンと呼ばれ通常，2糖当たり2〜3個の硫酸基をもち，生物学的作用として血液抗凝固活性をもつことが特徴である―ヘパリンは生体内では肥満細胞のみが合成する），その対極として，糖鎖あたり2〜3ヵ所程度のクラスターをもつ典型的なヘパラン硫酸鎖（生体内にある大部分のヘパラン硫酸鎖がこれに相当し，通常2糖あたり平均約0.6〜0.8個の硫酸基をもつ）を生じる．クラスター局所内での化学修飾反応も均一でなく一見確率的であり，多彩な糖修飾構造を生じることとなり，ヘパラン硫酸鎖全体としてもきわめて多様な化学修飾構造を生じる．この多様な局所構造（クラスター領域）が各種リガンドの特異的結合部位となる可能性をもっている[14]．ヘパラン硫酸鎖の化学修飾には組織，細胞の種類，細胞の分化程度，代謝状態により一定の傾向がみられるとの研究もあり，その細胞に必要なリガンド結合環境を形成している可能性が考えられている．

ヘパラン硫酸鎖の3次元分子構造の特徴をコンピューターを使用した分子モデリングで類似のグライコサミノグライカンであるコンドロイチン硫酸（chondroitin sulfate*）と比較してみた（図2）．コンドロイチン硫酸もプロテオグライカン（異なる種類のコアタンパク質に結合する）の主要な糖鎖成分であり，glucuronic cidとhexosamineからなる基本2糖構造［(glucuronic acid-β1, 3-N-acetylgalactosamine-β1, 4-) n（図1b），nは通常50〜100程度］繰り返す構造をもつ．動物組織に頻繁にみられるコンドロイチン-4硫酸，-6硫酸はN-acetylgalactosamineのそれぞれC4位，C6位の炭素原子がO-硫酸化されたものである．ヘパラン硫酸骨格との化学構造上の主たる相違は，hexosamine（ヘパラン硫酸ではglucosamine，コンドロイチン硫酸ではgalactosamine）と糖の結合形式（グリコシド結合の配向と関与する炭素原子）である．化学式上これら二つのグライコサミノグライカンは類似した構造をもつような印象を与えるが，細胞内生合成の過程でとくに硫酸化を主体とした化学修飾上大きな差異がみられる．コンドロイチン硫酸におけるO-硫酸化はほぼ規則的であり，典型的には繰り返す基本2糖当たり1個の硫酸基がほぼすべての2糖に転位されることである．このように繰り返す単位をもつ分子は規則的ならせん構造となり，硫酸基の配置は，その荷電およびサイズ効果が最小となるように均等に分布することになる．図2からコンドロイチン硫酸分子が緊密にパックされている（直線性が高く，全長が短い）様子がうかがえる．硫酸基（硫黄原子が黄色の球で表されている）は糖鎖の長軸に対して均等に分布し，よく畳み込まれて分子表面から比較的隠された配置となっている．これに対してヘパラン硫酸では中央部に集中して配置された硫酸基クラスターにより糖鎖バックボーン長軸方向の規則的な構造が乱され，強い屈曲を示している．また硫酸基が高密度で存在するためその配置が制限され，一部の硫酸基は糖鎖分子外側へと押し出されている．この分子モデリングからわかるように，ヘパラン硫酸糖鎖でみられる不規則かつ集中した硫酸基クラスターがこの分子の局所に糖鎖の屈曲，分子表面近くにさまざまに配置された陰性荷電をもつ多様な局所構造を形成する構造的基盤を与えるのである．

その結果ヘパラン硫酸では生物学的に特異性の高い多様な分子間相互作用を可能にする特異的分子構造を生じるのである．さらに1本のヘパラン硫酸は50〜100の繰り返す2糖構造をもつため，このような特異的結合ドメインが1分子の糖鎖上に複数生じる結果となり，すべてのヘパラン硫酸鎖上になんらかのリガンド結合部位が存在する確率を高くしている．さらに，ヘパラン硫酸鎖を複数もつヘパラン硫酸プロテオグライカンにおいては，1分子のプロテオグライカン分子に複数リガンド結合部位が存在する確率が高くなる．

Ⅲ．ヘパラン硫酸の生合成

ヘパラン硫酸を翻訳後修飾における糖鎖成分としてもつことのできるタンパク質（コアタンパク質と呼ばれる）は，これまでに10数種類が知られている．ヘパラン硫酸合成部位はコアタンパク質中のアミノ酸一次配列，Ser/Thr-Glyのコンセンサス配列をもち，ここのSer/Thrの水酸基を介してO結合型糖鎖として合成される．このアミノ酸一次構造コンセンサス配

*本稿ではヘパラン硫酸の特徴を明確化する目的で，類似のグライコサミノグライカンであるコンドロイチン硫酸と分子構造を対比しつつ説明を加える．

前　目次へ　次

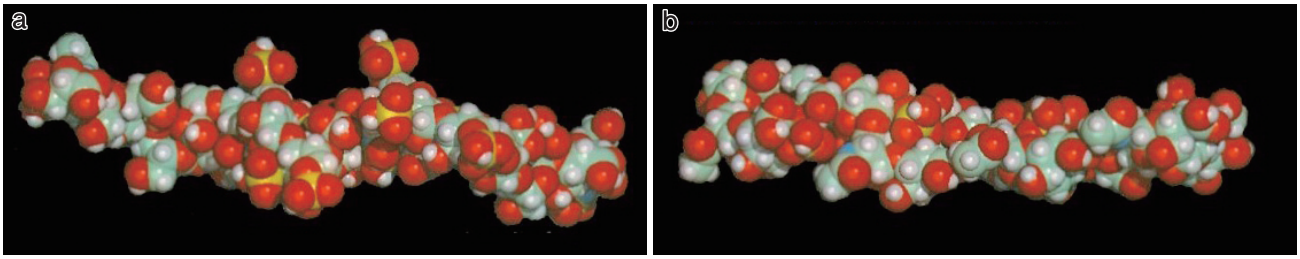


図 2. ヘパラン硫酸とコンドロイチン 4 硫酸の立体構造

ヘパラン硫酸（a）とコンドロイチン 4 硫酸（b）の 8 糖（基本 2 糖の 4 回繰り返し，糖鎖全体長の約 1/10 程度を表す）の立体構造をエネルギー最小化プログラム（CHARMM）で分析したもの．原子は通常のカラーコード（水素：白，炭素：空色，酸素：赤，窒素：青，硫黄：黄色）で表されている．ヘパラン硫酸では antithrombin III 結合に必要な硫酸基集中配列を中央部に配置した．コンドロイチン 4 硫酸においては 4 個の 2 糖単位すべての N-acetylgalactosamine 4 位の炭素にすべて硫酸エステルが導入されている．コンドロイチン 4 硫酸では全体として直線的で短い（規則的ならせん構造）．硫酸基はそのサイズ，陰性荷電の効果が最小化されるように分布しており，内部に畳み込まれて分子表面からはみえにくい配置となっている．ヘパラン硫酸においては，中央部に集中した硫酸基により不規則な曲りを生じ，さらにいくつかの硫酸基が長軸方向から突出し，陰性荷電が分子表面に露出している．

列はコンドロイチン硫酸のものと共通である．一般にコンセンサス配列上に合成されるグライコサミノグライカンの種類（ヘパラン硫酸であるかコンドロイチン硫酸であるか）は生物学的には厳密に決定されており，この決定はコンセンサス配列周囲のタンパク質 3 次元構造によると考えられている．細胞におけるヘパラン硫酸プロテオグライカンの生合成は糖タンパク質一般の生合成過程と同様である．すなわち，粗面小胞体で mRNA から翻訳されたコアタンパク質に粗面小胞体内で N-結合型糖鎖が付加され，ヘパラン硫酸鎖は Golgi 装置において，細胞内輸送されたコアタンパク質上にほかの O-結合型糖鎖と同様 1 糖ずつ糖転位酵素により生合成される．コアタンパク質との結合部分にコンドロイチン硫酸と共通の特異的 4 糖構造が形成され，以降ヘパラン硫酸（あるいはコンドロイチン硫酸）に特異的な繰り返す 2 糖構造がそれぞれの糖転位酵素（ヘパラン硫酸では EXT ファミリーの糖転位酵素）により合成される．ヘパラン硫酸バックボーンの生合成に並行して限定された N-acetylglucosamine に N-脱アセチル/硫酸転位反応（N-deacetylase sulfotransferase：NDST と呼ばれる一つの酵素により行われる）が起こり，隣接する糖に作用するエピマー化酵素，さらに部位特異性をもった O-硫酸転位反応が行われる（前項参照）．ここでヘパラン硫酸鎖上にいかに特定の化学修飾を行うことが可能であるか（言い換えると“いかにヘパラン硫酸鎖を化学修飾も含めて複製できるか”）という基本的問題に遭遇することになる．単純な回答としては，ヘパラン硫酸をはじめとした糖鎖分子の生合成には核酸やタンパク質のように，その分子構造の一義性を保つための鋳型依存的複製機構が存在せず，それらの生合成は非鋳型依存性の酵素反応の結果であり，厳密な意味での複製はできないということである．したがって，生合成された糖鎖の分子構造は生合成酵素の反応条件に規定されており，細胞内糖鎖生合成部位における基質，受容分子，酵素濃度，各種イオン濃度を含めた諸条件に左右され，いずれにしても確率的な化学反応条件の揺らぎにより複数種類の糖鎖構造（microheterogeneity）を発現することとなる．加えて，糖鎖合成における細胞生物学的条件を考慮すると，基質，受容分子，酵素などの細胞内局在とそれらの細胞内輸送条件（ある細胞内区画における分子の滞留時間など）なども，最終的糖鎖構造を左右する条件となりうる．したがって，目的の分子間相互作用に最適である分子構造をもつヘパラン硫酸糖鎖が存在したとしても，その糖鎖だけを生合成する複製機構は存在しないことになる．細胞が特定の分子構造をもつ糖鎖を複製しようとしても，糖転位酵素，化学修飾酵素などの発現の量的調節だけで目的の糖鎖構造を合成することは困難であろう．またそれに付随した多くの細胞生物学的機能を同時に調節するのは，さらに困難なことであろうと想像される．ヘパラン硫酸の生合成に関与する多数の制御因子を一挙に最適化する効率的な細胞生物学的制御機構に関する研究はほとんどなされていないのが現状である．一般に糖鎖の生合成では，目的の分子構造を含む糖鎖が合成される細胞生物学的条件があったとしても，同時に合成される多くの分子間相互作用に適さない糖鎖は，エネルギーの大きな損失になるのではないか，あるいは類似構造をもった糖鎖が dominant negative 効果を示すようになるのではないか等々の疑問も生じる．このようなあいまいな分子構造複製機構をもとにした糖鎖合成機構の全体像が，すなわち糖鎖の関与する分子間相互作用を制御する細胞機能の全体像であると理解するのが現時点では妥当であろう．

Ⅳ．ヘパラン硫酸プロテオグライカンの発現調節

1．コアタンパク質の調節

ヘパラン硫酸プロテオグライカンを（細胞）膜に結合させる分子構造として，コアタンパク質が膜貫通型であるか，コアタンパク質C末端に付加されるGPI（glycosylphosphatidylinositol）アンカーが知られている．このときヘパラン硫酸鎖の細胞生物学的挙動は，それが結合しているコアタンパク質によって規定されることになる．すなわち，ヘパラン硫酸の細胞内ターゲティングはコアタンパク質のそれに従い，細胞内外での存在部位が決定される．コアタンパク質の種類により細胞内ターゲティング，挙動，動態などが異なるから，ヘパラン硫酸鎖を異なるコアタンパク質上に発現することにより，異なる生物学的目的にヘパラン硫酸鎖を使うことが可能である．細胞の種類，代謝状態，分化過程などで異なるコアタンパク質をもつヘパラン硫酸プロテオグライカンが発現しているのはこの事実を示しているであろう．

ヘパラン硫酸鎖はコアタンパク質上に合成されるから，ヘパラン硫酸鎖の生合成量はコアタンパク質の合成量により調節できる可能性がある．ヘパラン硫酸鎖の生合成量は糖転位酵素，化学修飾酵素の活性および各種基質濃度によっても左右されるが，実験的にみると，これらは多くの場合コアタンパク質生合成量に比較して過剰に存在している．実験的にβ-D-xylosideなどの人工的な糖鎖合成受容体を細胞に加えることで糖鎖合成の過剰能力を示すことができる．このような方法で調べると，通常の細胞ではコアタンパク質の生合成量がプロテオグライカン生合成の律速段階となっていることがわかる．すなわち，コアタンパク質の発現量を調節することにより，プロテオグライカン全体の発現量を調節することが可能であることがわかる．このようにコアタンパク質の発現調節によりヘパラン硫酸鎖の局在，発現量を調節することができるということは，コアタンパク質発現は遺伝子発現コントロールによって調節できることと考え合わせると，その調節的な役割の重要性が理解できる．

2．ヘパラン硫酸，ヘパラン硫酸プロテオグライカンの発現調節

上述のように，ヘパラン硫酸糖鎖，ヘパラン硫酸プロテオグライカンの発現調節には重層的な調節メカニズムが必要となる．上記のようにコアタンパク質の発現量で直接ヘパラン硫酸プロテオグライカン生合成量を調節することは可能である．一方，コアタンパク質が一定量生合成される条件で，かつ糖ヌクレオチド，PAPS（3′-phosphoadenosine-5′-phosphosulfate：高エネルギー硫酸供与体）が十分存在する条件では，糖転位酵素量は糖鎖長に影響を与えるかもしれない．遺伝子操作を用いた実験を除くと，細胞内の糖転位酵素量を単独で操作することは困難で，酵素量の調節がヘパラン硫酸量および微細構造にどのような影響を与えるかはよく知られていない．脱アセチル/硫酸転位酵素（すなわちNDST）量の増加あるいはKm値の低いアイソザイムの発現は（この酵素反応がヘパラン硫酸生合成過程における化学修飾の出発点となっているので），全体としてヘパラン硫酸鎖の硫酸化度を上昇させるとも考えられる．実験的には，エピメレースおよび個々の部位特異的硫酸転位酵素の発現調節はヘパラン硫酸鎖全体としてほぼ予測された化学修飾の変化をもたらすが，これらの酵素量を調節するだけで特定の化学修飾を受けたヘパラン硫酸鎖の形成にどの程度関与できるのかは明らかではない．特定の化学修飾を受けたヘパラン硫酸鎖の生合成を調節するためには，糖鎖合成に影響を与える細胞生物学的な調節機構も関与してくる．たとえばコアタンパク質の細胞内での輸送，とくにGolgi装置内での通過時間，ヘパラン硫酸生合成酵素群の局在とコアタンパク質局在部位の相対的関係，糖ヌクレオチド，硫酸供与体を糖鎖合成部位に供給する仕組みなど，これらすべての条件が糖鎖構造に影響を及ぼし，かつ細胞による調節の対象となる．

Ⅴ．おわりに
―多数の細胞生物学的調節パラメーターはどのように一挙に最適化されるのか

ヘパラン硫酸プロテオグライカンはその発現調節にコアタンパク質，ヘパラン硫酸鎖の合成に必要な酵素群，およびそれらを協働的に組織化する細胞生物学的調節機構など，多くの要素が重層的に関与していることを示す好例である．これら諸条件が全体として最適化されるためには，各要素の発現量を（ほかの要素とかかわりをもたない）孤立的に調節するだけで行うことは不十分であるかのように考えられる．この過程が効率よく行われるためには，現在知られているより多くの単純かつ精妙なフィードバック機構の存在を仮定することが必要不可欠であると考えられる．フィードバック機構はすでに古典的概念であり，多くの例が理解されているが，さらに革新的なフィードバック機能への理解，すなわち一つのモデルケースとして，ヘパラン硫酸プロテオグライカンの調節でみられるように多要素を含む局所条件を全体として最適化する仕組みを明確に理解するということが，現在の生命現象の理

前　目次へ　次

解を飛躍的にすすめる鍵となるように思われる．

文　献

1) Yanagishita M, Hascall VC：Cell-surface heparan sulfate proteoglycans. J Biol Chem **267**：9451–9454, 1992.
2) Iozzo RV, Sanderson RD：Proteoglycans in cancer biology, tumor microenvironment and angiogenesis. J Cell Mol Med **15**；1013–1031, 2011.
3) Hacker U, Nybakken K, Perrimon N：Heparan sulfate proteoglycans；the sweet side of development. Nat Rev Mol Cell Biol **6**：530–541, 2005.
4) Inatani M, Irie F, Plump AS et al：Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparin sulfate. Science **302**：1044–1046, 2003.
5) Tumova S, Woods A. Couchman JR：Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface；versatile coordinators of cellular functions. Int J Biochem Cell Biol **32**：269–288, 2000.
6) Ringvall M, Kjellén L：Mice deficient in heparin sulfate N–deacetylase/N–sulfotransferase 1. Prog Mol Biol Transl Sci **93**：35–58, 2010.
7) Crawford BE, Garner OB, Bishop JR et al：Lossof the heparin sulfate sulfotransferase, Ndst1, in mammary epithelial cells selectively blocks lobuloalveolar development in mice. PLos ONE **5**：E10691, 2010.
8) Li JP：Glucuronyl C5–epimerase enzyme converting glucuronic acid to iduronic acid in heparin sulfate/heparin biosynthesis. Prog Mol Biol Transl Sci **93**：59–78, 2010.
9) Habuchi H, Kimata K：Mice deficient in heparin sulfate 6–O–transferase–1. Prog Mol Biol Transl Sci **93**：79–111, 2010.
10) Qu XX, Carbe C, Tao CQ et al：Lacrimal gland development and Fgf10–Fgfr2b signaling are controlled by 2–O– and 6–O–sulfated heparin sulfate. J Biol Chem **286**：14435–14444, 2011.
11) Merry CL, Wilson VA：Role of heparin sulfate 2–O–sulfotransferase in the mouse. Biochim Biophys Acta **1573**：319–327, 2002.
12) Kreuger J, Kjellén L：Heparan sulfate biosynthesis；regulation and variability. J Histochem Cytochem **60**：898–907, 2012.
13) Tamm C, Kjellén L, Li JP：Heparan sulfate biosynthesis enzymes in embryonic stem cell biology. J Histochem Cytochem **60**：943–949, 2012.
14) Lindahl U, Li JP：Interactions between heparan sulfate and protein-design and functional implications. Int Rev Cell Mol Biol **276**：105–159, 2009.

Regulation of molecular interactions involving heparan sulfate proteoglycans

Masaki Yanagishita

Biochemistry, Department of Hard Tissue
Engineering, Division of Bio-Matrix,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University

Summary
Heparan sulfate proteoglycans are a class of glycosylated proteins which carry heparan sulfate as a carbohydrate component, and are widely distributed among animal cells. One of the most prominent biological characteristics of heparan sulfate is that it can interact with many biological molecules with diverse structures with high specificity and high affinity. This paper explains the nature of such molecular interactions, and discusses the cell biological significance of microheterogeneity in heparan sulfate structures generated during its biosynthetic processes.

Key words：heparan sulfate proteoglycan, molecular interactions, microheterogeneity

お茶の水醫學雑誌　62:035–044（2014）

胎盤における胎児・母体間の相互作用に重要な遺伝子の発見

石野　史敏　東京医科歯科大学難治疾患研究所エピジェネティクス分野教授

要旨：ヒト染色体 14 番父親性重複は胎盤形成過剰，ベル型肋骨による呼吸不全を伴った新生児致死，出生後の成長遅延，高度の精神遅滞などの症状を呈する重篤なゲノムインプリンティング疾患である．モデルマウスおよび患者の解析から，父親性発現遺伝子 *PEG11/RTL1* の過剰発現がこの疾患の主要原因であることがわかった．*PEG11/RTL1* は胎盤における胎児毛細血管の維持に機能する母子相互作用に重要な遺伝子であるが，LTR 型レトロトランスポゾンに由来する真獣類特異的遺伝子であるという奇妙な特徴をもっている．これは，哺乳類の胎生進化に外来遺伝子が重要な寄与したことを意味している．

Key words：ヒト染色体 14 番父親性重複，ゲノムインプリンティング疾患，胎盤，胎児毛細血管，LTR 型レトロトランスポゾン，胎生進化

Ⅰ．はじめに

東京医科歯科大学難治疾患研究所エピジェネティクス分野では，哺乳類におけるエピジェネティクス制御の重要性について研究を行っている．エピジェネティクスとは従来のジェネティクス（遺伝学）では説明できない遺伝現象を扱う学問で，ヒト遺伝疾患にも大きく関係している．ゲノムインプリンティングはその代表例の一つで，関連する疾患は多数明らかにされている．しかし，このような概念がなかった 30 年前には，これらは非メンデル遺伝様式をとる不思議な疾患群のカテゴリーに分類されていた．本稿では，表題にある「胎盤における胎児・母体間の相互作用に重要な遺伝子の発見」の主題となる父親性発現インプリント遺伝子 *PEG11/RTL1* の研究を通して，ゲノムインプリンティング研究の医学・生物学における重要性についても紹介したいと思う．

Ⅱ　哺乳類特異的なゲノムインプリンティング機構

ヒトを含む哺乳類には，父親・母親由来の場合にのみ発現するインプリント遺伝子が 100 以上存在している[1]（図 1）．これらの遺伝子の存在により父親・母親由来のゲノムに機能的な差異が生じるため，メンデルの遺伝法則に従わない遺伝現象が出現する．ゲノムインプリンティングは，1984 年にマウスを用いた受精卵の前核移植実験により発見された．この実験から精子由来の雄性前核と卵子由来の雌性前核の両方がそろわなければ，哺乳類では正常な個体発生が起きないことが明らかにされた（図 2）[2~4]．これは哺乳類においては父親・母親由来のゲノムは異なる機能をもち，両者が機能的に補完し合うことが重要であることを意味している．これは当たり前のようであるが，哺乳類の重要な特徴である．爬虫類，鳥類，両生類，魚類などほかの脊椎動物では，実は雌性単為発生で子どもが生まれることが確認されている．

ゲノムインプリンティング機構は，正確にいうと，哺乳類でも胎生の生殖様式をとる真獣類（ヒトやマウスなどを含むグループ）と有袋類（カンガルーやコアラなどを含むグループ）にのみ保存され，卵生の単孔類（カモノハシおよびハリモグラ）にはみられない[5]．このため，哺乳類における胎生の進化との関係が示唆されている．後述するように，生物進化上，真獣類が現れるころには，哺乳類のゲノムに多数の新規遺伝子群の獲得という大規模な変化も生じている．ゲノムインプリンティングの起源は，哺乳類に起きた大規模なゲノム構造の変化と関係していると筆者らは予想している．

連絡先：石野　史敏　fishino. epgn@mri.tmd.ac.jp

前　目次へ　次

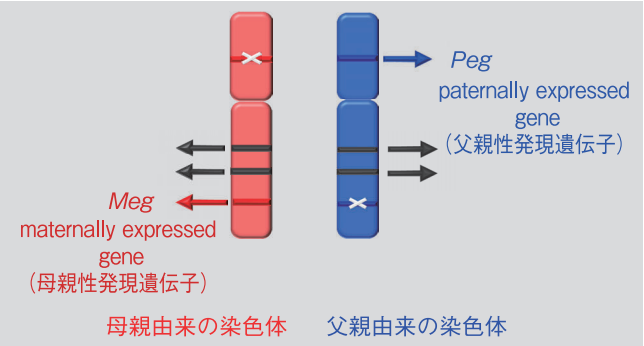


図 1．片親性発現を示すインプリント遺伝子 *Peg* と *Meg*
哺乳類でも大部分の遺伝子は，両親由来の染色体から同等に発現する（黒の遺伝子）．これがメンデルの遺伝法則の前提となっている．インプリント遺伝子は両親由来で伝わっているにもかかわらず，必ずどちらか一方の親由来でしか発現しないように制御されている（青の遺伝子が *Peg* で，赤の遺伝子が *Meg*）．

この図ではわかりにくいが，インプリント遺伝子の発現はインプリント領域全体を制御する DMR（differentially methylated region）の DNA メチル化で制御される．本稿では発現調節機構の詳細にはふれなかったが，DNA メチル化は単なるインプリント遺伝子の発現抑制に機能するのではなく，インプリント領域全体の *Peg* と *Meg* を同時に逆向きに制御する（ON–OFF）メカニズムになっている．具体例については図 4 を参照のこと．

Ⅲ．インプリント領域とインプリント遺伝子

インプリント遺伝子には父親性発現を示す *Peg*（paternally expressed genes）と母親性発現を示す *Meg*（maternally expressed genes）の 2 種類がある（図 1）[6,7]．さらにインプリント遺伝子は染色体上にクラスターをなしてインプリント領域を形成している．そのような染色体領域が片親性 2 倍体になることで Silver–Russell 症候群，Beckwith–Wiedemann 症候群，Prader–Willi/Angelman 症候群，Albright 症候群，父親性・母親性染色体 14 番重複［upd（14）pat・upd（14）mat］などの疾患が生じる．これらの領域には，それぞれ胎児や新生児の成長・発達に関係する重要なインプリント遺伝子が含まれ，父親性または母親性 2 倍体で，これらの発現欠失または過剰発現が起きることが発症の原因となる．インプリント領域には複数（ときには 10 個以上）のインプリント遺伝子が含まれるので，一般には単一の，多くても 2〜3 個の疾患の責任インプリント遺伝子を同定するのは，実際には大変な仕事である．

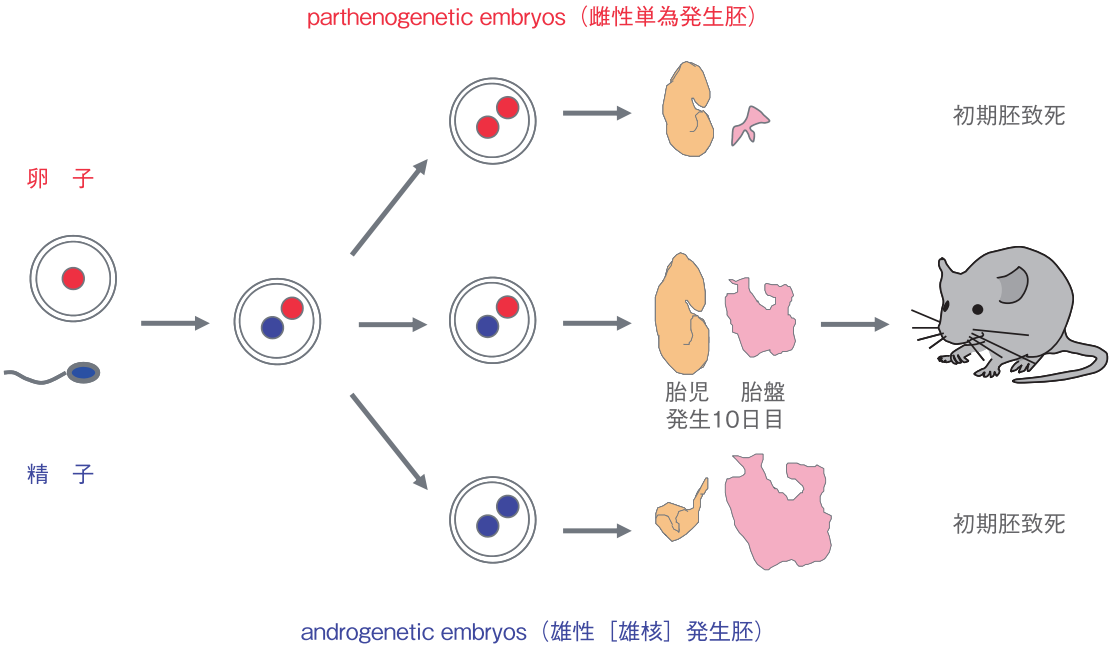
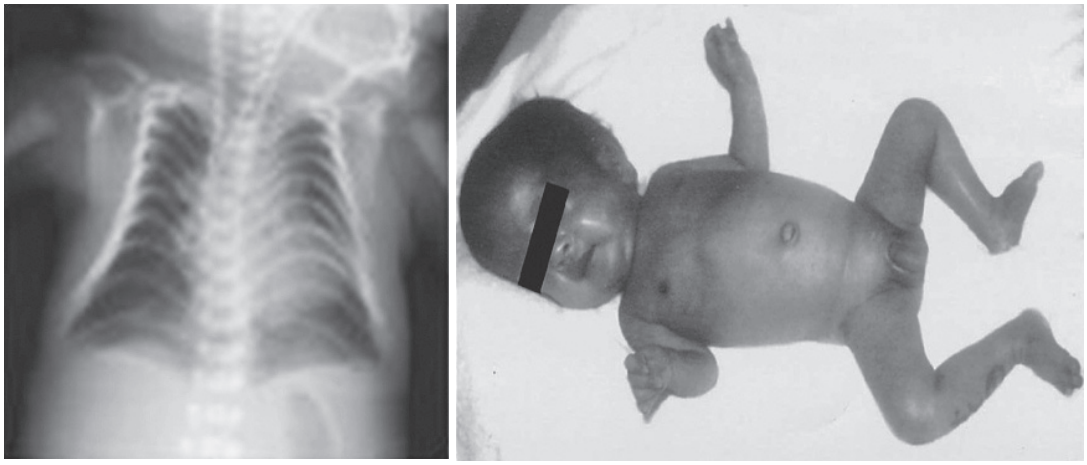


図 2．ゲノムインプリンティングの発見
1984 年に前核移植実験により母親由来のゲノムのみをもつ雌性単為発生胚（上），父親由来のゲノムのみをもつ雄性発生胚（下）が，出生まで発生できずに初期胚致死となることが報告された．これは父親・母親由来のゲノムは個体発生において異なる機能をはたしていることを示している．また，ゲノムには DNA の情報以外に重要な情報が含まれており，それを次世代に伝えていることが明らかになった．この発見により，哺乳類の個体発生に重要な役割をはたしていることがはじめて明らかになり，エピジェネティクスという分野が注目されるきっかけとなった．



a. human upd（14）pat（文献 8 より引用）

b. human upd（14）mat（文献 9 より引用）

図 3. ヒト染色体 14 番父親性・母親性 2 倍体［upd（14）pat と upd（14）mat］の症状
a：ヒト染色体 14 番の父親性 2 倍体の特徴は新生児におけるベル型肋骨形成で，多くの場合呼吸不全を伴い致死となる．胎児期には羊水過多，胎盤形成過剰がみられ，新生児致死を免れた場合にも，成長遅延，重度の精神遅滞がみられる．
b：母親性 2 倍体の場合には，出生前後の重度の成長遅延および思春期の早発などがみられる．

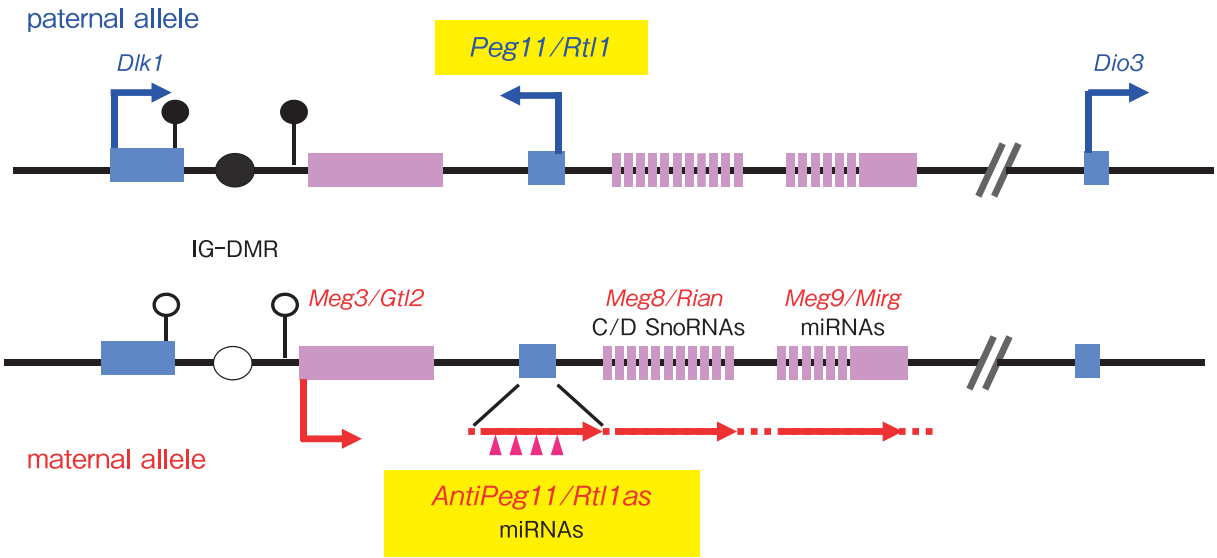


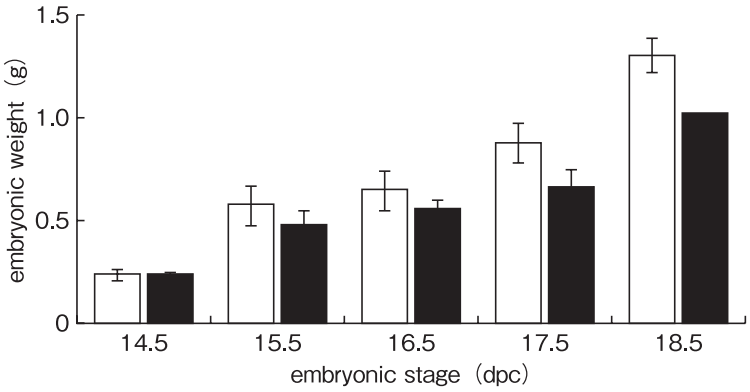
図 4. マウス染色体 12 番のインプリント領域に含まれるインプリント遺伝子
マウス染色体 12 番遠位部はヒト染色体 14 番の相同領域である．このインプリント領域には，タンパク質をコードする三つの *Peg* 遺伝子（*Dlk1*，*Peg11/Rtl1*，*Dio3*），ノンコーディング RNA をコードする 4 つの *Meg* 遺伝子（*Meg3/Gtl2*，*antiPeg11/antiRtl1*，*Meg8/Rian*，*Meg9/Mirg*）が存在する．*Dlk1* と *Meg3/Gtl2* の間に IG-DMR（intergenic differentially methylated region）が存在し，この領域の DNA メチル化の有無によって，これらの *Peg* と *Meg* の発現は制御される．この領域がメチル化されると *Peg* が発現し，*Meg* は抑制される（父親由来のゲノム：上）．一方，非メチル化状態では *Meg* が発現し，*Peg* は抑制される（母親由来のゲノム：下）．
父親性発現遺伝子 *Peg11/Rtl1* と母親性発現遺伝子 *antiPeg11/antiRtl1* は，ほぼ完全に領域が重なっている．このため *antiPeg11/antiRtl1* がコードする六つの miRNA は，すべて *Peg11/Rtl1* mRNA を標的として分解する．すなわち，*antiPeg11/antiRtl1* は *Peg11/Rtl1* の発現量の制御に重要な働きをしている．父親性 2 倍体では *Peg11/Rtl1* を発現するゲノムが 2 倍に増えることに加え，*antiPeg11/antiRtl1* が欠失するために，実際の *Peg11/Rtl1* mRNA の増加は 6〜8 倍にも及ぶ．

Ⅳ. ヒト染色体 14 番重複によるゲノムインプリンティング疾患

ヒト染色体 14 番が父親性重複した upd（14）pat の患者には，妊娠中の羊水過多・胎盤形成過剰に加え，新生児のベル型肋骨奇形による呼吸不全による致死がみられる[8]（図 3）．たとえ致死を逃れたとしても成長遅延と高度の精神遅滞が引き起こされるため，upd

WT　　*Peg11* PatKO

a. 胎仔期致死



b. 胎仔期後期の成長遅延

図 5. *Peg11* PatKO マウスの表現型

a：胎仔期後期致死．胎仔期 16.5 日目では *Peg11* PatKO マウスの胎仔の半数がすでに死亡している（PatKO 真ん中と右）．まだ，半数は生存しており正常にみえる（左）．

b：胎仔期後期の成長遅延．a で正常にみえた個体も次第に成長遅延が顕著になり（黒の棒グラフ），19.5 日目に最終的に出産する際には，正常の 8 割の大きさしかなく，生後 1 日以内に致死となる．

(14) pat はゲノムインプリンティング疾患の中でももっとも重篤度の高い疾患といえる．一方，同じ領域の母親性 2 倍体［upd (14) mat］では，出生前後の重度の成長遅延，思春期の早発など特徴としている[9]．これら疾患の責任インプリント遺伝子の同定は，筆者らの重要な研究目標の一つであった．マウスの相同染色体である染色体 12 番遠位部のインプリント領域はヒト疾患のよいモデル領域になっている．この領域の父親性 2 倍体では体躯が太く短い（ずんぐりむっくりとした）形態形成不全を示し，胎児期後期致死となる．一方，母親性 2 倍体では胎仔期後期/新生仔致死と胎仔期後期の顕著な成長遅延がみられる[10]．筆者らはマウスを用いて網羅的なインプリント遺伝子の探索を行った結果，母親性発現遺伝子 *Meg3/Gtl2* をはじめてこの領域にマップすることに成功した[11]．この遺伝子を拠点にして，周辺領域のインプリント遺伝子探索が海外のいくつかの研究グループを含めてすすみ，最終的に，約 1Mb の間に *Peg9/Dlk1*，*Peg11/Rtl1*，*Dio3* の三つの *Peg* と *Meg3/Gtl2*，*antiPeg11/antiRtl1*，*Meg8/Rian*，*Meg9/Mirg* の四つの *Meg* が含まれる巨大なインプリント領域の存在が明らかになった．このうち三つの *Peg* はタンパク質をコードし，四つの *Meg* は snoRNA や miRNA のクラスターを含む non-coding RNA であった．ヒトのインプリント領域も基本的に同様の構成となっている（図 4）．

インプリント領域から疾患の責任インプリント遺伝子を同定する方法は，地道に一つひとつのインプリント遺伝子のノックアウト（KO）マウスを解析していくことである．*Peg9/Dlk1* のコードする delta-like homologue 1 は，細胞分化決定に重要な Delta–Notch 系にかかわる遺伝子と相同性を示す．*Dio3* も type III iodothyronine deiodinase をコードする遺伝子で成長に関係する機能が予想された．これらは非常によい責任遺伝子の候補であったが，報告されたこれらの KO マウスの結果は，意外なことに前者では出生前の成長遅延と新生仔の 20～30% に致死がみられる程度であり[12]，後者でも新生仔致死がわずかにみられるというものであった[13]．すなわち，この領域の父親性・母親性 2 倍体の強い致死性を説明するには不十分であり，ほかにより重要な責任遺伝子の存在が示唆された．

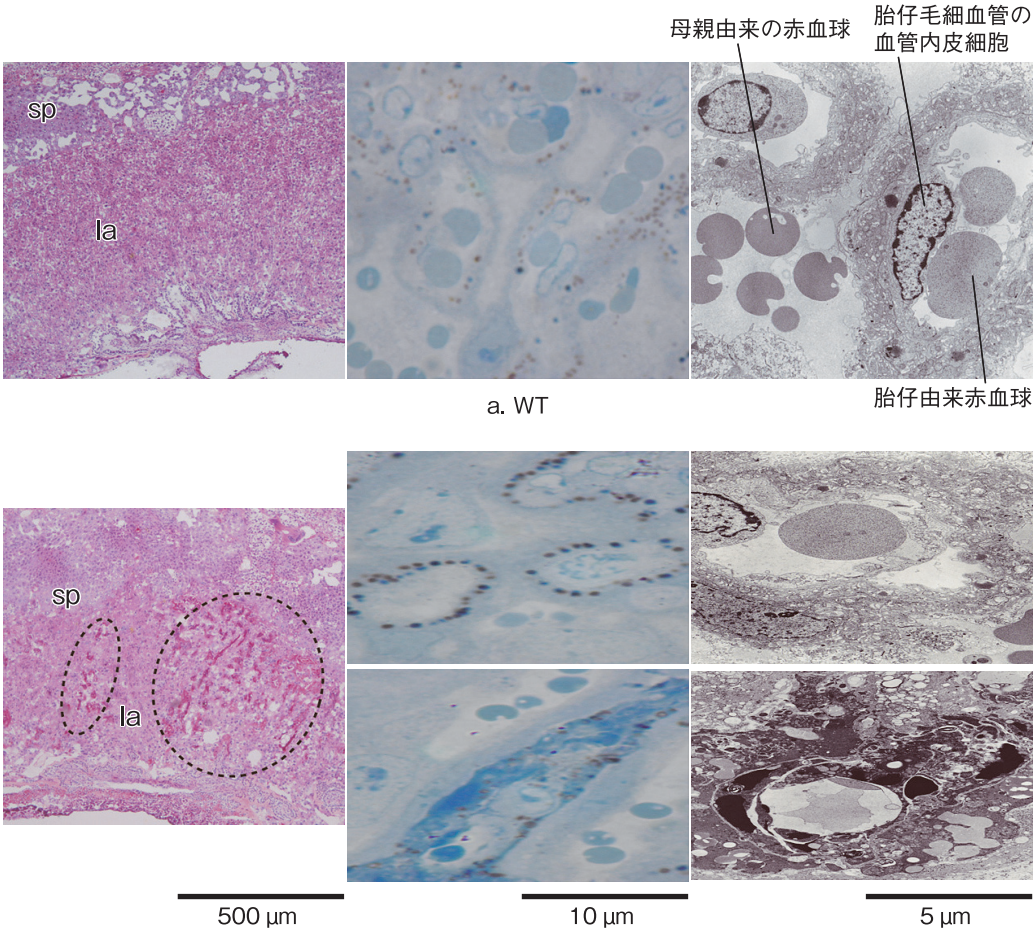


図 6. *Peg11* PatKO マウス胎盤の表現型

a：胎児期 15.5 日目の正常胎盤の HE 染色像と電子顕微鏡像．胎仔毛細血管が母体由来の赤血球に浸たされている構造がわかる．

b：PatKO マウスの胎盤では血管内皮細胞が基底膜からはがれている像（中央）や周囲のトロホブラスト細胞により胎仔毛細血管が埋まっている像がみえる（右）．このような部分は HE 染色（低倍）で濃染された領域としてみえる（左）．

Ⅳ．*Peg11/Rtl1* ノックアウト（KO）マウスの解析

筆者らは三つの *Peg* の中から *Peg11/Rtl1* を選び KO マウスの解析を行った．この遺伝子は LTR レトロトランスポゾンに由来した遺伝子であり，レトロトランスポゾンのもつ Gag–Pol に相同性の高いタンパク質をコードするという非常に奇妙な性質をもっていた．当然，その生物学的機能はまったく未知であった．筆者らがこの遺伝子に注目した理由については後述するが，この遺伝子こそが父親性・母親性 2 倍体の症状を引き起こす主要責任遺伝子であった[14]．

父親性発現遺伝子 *Peg11/Rtl1* は，ほぼ全長にわたって逆向きに転写されるアンチセンス RNA をコードする母親性発現遺伝子 *antiPeg11/antiRtl1* と重なっている（図 4）．*AntiPeg11/antiRtl1* には 6 つの miRNA が含まれ，そのすべてが *Peg11/Rtl1* mRNA を標的として分解する活性をもつ[15]．筆者らの作製した KO マウスは *Peg11/Rtl1* と *antiPeg11/antiRtl1* の大部分を欠失しているため，父親から欠失が伝わる場合（PatKO）には *Peg11/Rtl1* KO マウスに，母親から伝わる場合（MatKO）には *antiPeg11/antiRtl1* KO マウスということになる．MatKO では *Peg11/Rtl1* mRNA の分解がなくなるため *Peg11/Rtl1* mRNA が過剰発現し，Peg11/Rtl1 タンパク質量も 2.5〜3 倍に増加する．

Peg11/Rtl1 の PatKO マウスは約半数が胎仔期致死となり，残り半数も胎仔期後期から成長遅延が始り，約 80% の大きさで出生後，すべて 1 日以内に致死となった[14]（図 5）．一方の，*antiPeg11/antiRtl1* KO である MatKO マウスもほぼ 100% が出生仔致死を示した．これにより，*Peg11/Rtl1* は欠失，過剰発現のどちらの場合も重篤な表現型を起こすことが確認できた[14]．

胎仔期致死，胎仔期後期の成長遅延の原因の解析から，PatKO の胎盤では迷路層（ラビリンス層）における胎仔毛細血管に目詰まりが生じていることが判明した（図 6）．マウスでは，胎仔毛細血管は血管内皮細胞とそれを囲む 3 層のトロフォブラスト細胞によって構成され，これが母体血液に浸かる構造をとっている．これらの 4 層の細胞を通して，母体と胎仔間の酸素や栄養の交換が行われる．PatKO の胎盤では胎仔期後期からその機能が低下するため，これらの障害が引き起こされたことがわかった．表題にあるように，「胎盤における胎児・母体間の相互作用に重要な遺伝子」と表現したのは，このような意味である．

抗 Peg11/Rtl1 タンパク質抗体をもちいた免疫染色から，実際に Peg11/Rtl1 タンパク質が胎仔毛細血管の血管内皮細胞に限局して存在することが示された．また，PatKO で Peg11/Rtl1 タンパク質がなくなると，トロフォブラスト細胞が血管内皮細胞を貪食し，血管内部を塞いでいる像が確認できた（図 6）．逆に MatKO（*antiPeg11/antiRtl1*）KO マウスの胎盤では，血管内皮細胞で Peg11/Rtl1 タンパク質が過剰生産され，逆にこれを取り囲むトロフォブラスト細胞のほうの状態不良がみられた．このことから Peg11/Rtl1 タンパク質は浸潤性の高いトロフォブラスト細胞から血管内皮細胞を守る機能をはたしていると考えている [14]．

Ⅴ．ヒト upd（14）pat-like の解析

インプリント領域の特徴は，その中に DNA メチル化の状態が父親・母親由来のゲノムで異なる部位（differentially methylated region：DMR）があることで，このメチル化状態によってその領域内のすべてのインプリント遺伝子の発現が制御される．*Peg11/Rtl1* を含むインプリント領域における DMR は *Peg9/Dlk1* と *Meg3/Gtl2* の間にあり，intergenic（IG）DMR と呼ばれている．国立成育医療研究センター研究所の緒方 勤部長（現浜松医科大学教授）との共同研究では，父親性 2 倍体ではなく，両親由来の 14 番染色体をもつにもかかわらず upd（14）pat と同じ症状を示す upd（14）pat-like 患者の解析を行った．その結果，これらの症例の多くでインプリント領域の制御領域である IG–DMR の欠失がみつかった（図 7）[16]．母親由来で IG–DMR 欠失が伝わると，インプリント制御が父親型になる（*PEG* が発現し，*MEG* が抑制される）ため，父親性 2 倍体の症状が出現する．患者ごとに欠失する領域の大きさが異なり，症状の重篤度にも違いがみられた（図 8）．

重要なことは，X 線画像診断によるベル型肋骨の異常度を指標にすると，IG–DMR とともに *DLK1* を欠失した症例では，通常どおりの upd（14）pat の重度の症状がみられたが，*DLK1* とは反対側の *MEG3* から *PEG11/RTL1* を含む欠失例では症状が軽減されていることである．また，二つの家族例がみつかったが，*DLK1* の欠失か父親由来で伝わった際には軽度の成長不全が，*DLK1* と *PEG11/RTL1* の両者の欠失例では upd（14）mat 同様の重度の成長不全がみられた．これらの患者とノックアウトマウスでの解析結果を合わせると，upd（14）pat の主要原因は *PEG11/RTL1* の過剰発現であり，その重篤度は PEG11/RTL1 タンパク質の発現量に比例している（重篤例では 6〜8 倍の発現，軽症例では 3〜4 倍）．upd（14）mat の原因は *DLK1* と *PEG11/RTL1* の二つの *PEG* の発現欠失であると結論した [16]．

Ⅵ．真獣類で新規に獲得された LTR 型レトロトランスポゾン由来の遺伝子群

はじめに紹介したように，哺乳類ゲノムには大きな変化が生じていることが近年のゲノム解析から明らかになってきた．ヒトおよびマウスを含む哺乳類のグループである真獣類には，2 種類の LTR 型レトロトランスポゾンに由来した遺伝子群が存在している．*PEG11/RTL1* はそのうちスシイチというレトロトランスポゾン（フグから分離されたのでこの名称がある）に相同性を示す *SIRH*（sushi-ichi retrotransposon homologues）遺伝子群の一つである．このグループでもっとも有名なのが，筆者らが発見した父親性発現遺伝子の *PEG10* で，これは胎盤形成そのものに重要な機能をはたしてる [17,18]．有袋類や単孔類との比較ゲノム解析を行った結果，*PEG10* は胎生の有袋類と真獣類の二つのグループに共通して獲得された遺伝子であることがわかったが [19]，*PEG11/RTL1* およびそれ以外の *SIRH* 遺伝子（*SIRH3–11*）は，真獣類にのみ存在することもわかった [20,21]．一方で，有袋類には真獣類とは別の *SIRH12* 遺伝子が存在している [22]．もう一つの LTR 型レトロトランスポゾンに由来する遺伝子群 *PNMA*（paraneoplastic Ma antigen）遺伝子でも，圧倒的に真獣類のほうが有袋類よりも新規獲得遺伝子数が多いことがわかった [23]．これは真獣類のほうが複雑な構造で，かつ非常に効率的な絨毛膜胎盤をもつのに対し，有袋類は簡単な卵黄嚢胎盤しかもたないことと関係している可能性が高いのではないかと思われる．実際，*PEG11/RTL1* は真獣類にのみ存在し，真獣類の絨毛膜胎盤の特徴である胎児毛細血管の維持に関係する機能を有している．ほ

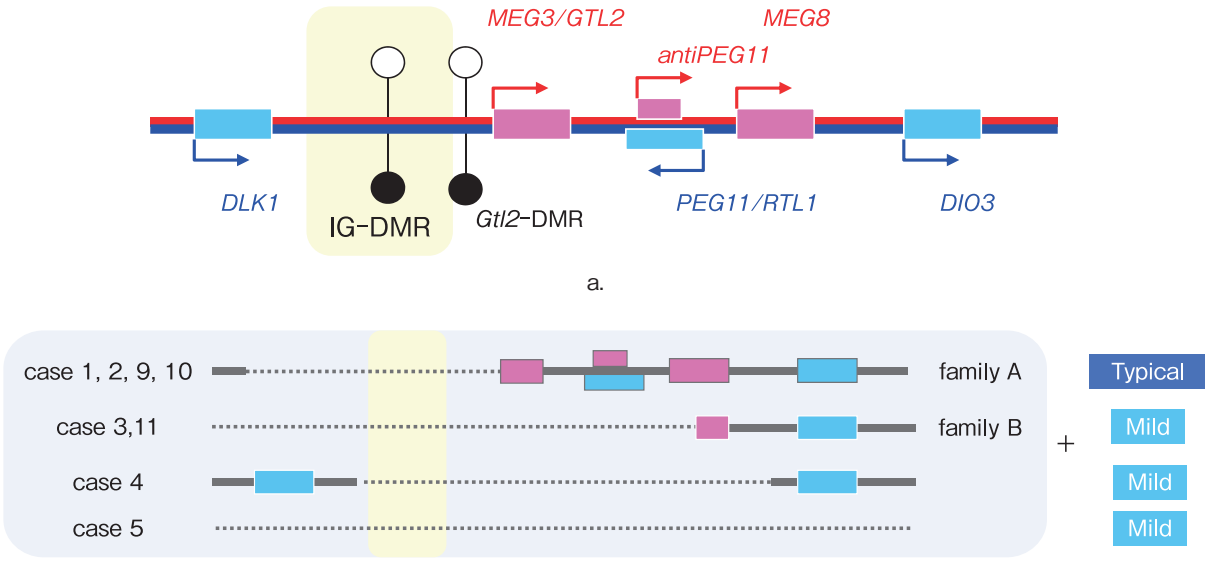
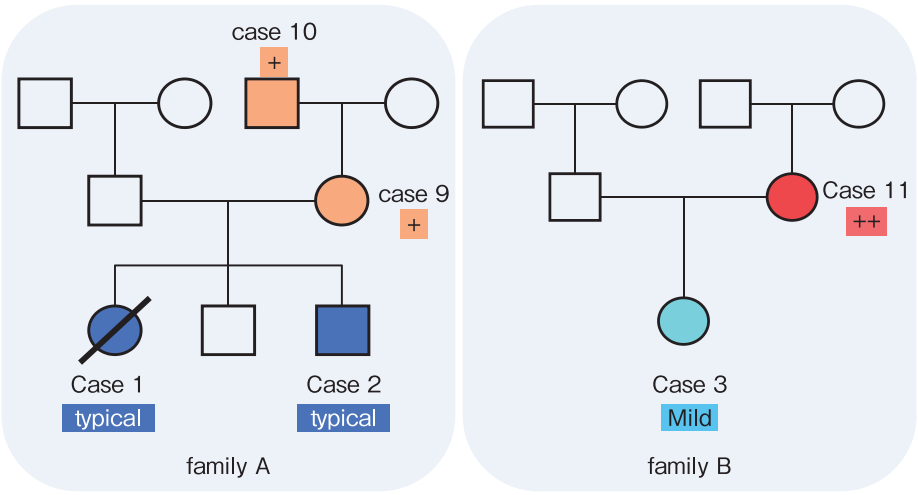


図 7. ヒト UPD（14）pat-like 患者の解析

a：ヒト染色体 14 番のインプリント領域

b：upd（14）pat-like 患者で欠失があった領域 case 1，2，9，10 と case 3，11 はそれぞれ同一家系（family A と family B），case 4 と 5 は孤発例．ここに示した全例で IG-DMR の欠失がみられた．IG-DMR の欠失が母親から伝わる場合，このインプリント領域は父親型のインプリント遺伝子の発現を示すため，父親性 2 倍体と同様の症状が出現する．IG-DMR より左側の *DLK1* 遺伝子を同時に欠失しても症状の重篤度はかわらない（Typical）が，欠失が *PEG11/RTL1* を含む場合には症状が軽減する（Mild）．前者の場合，*PEG11/RTL1* の発現量は 6～8 倍となり，後者の場合は 3～4 倍となっている（図 8 参照）．



Case 1, 2 and 3 : upd（14）pat-like,
Case 9,10 and 11 : upd（14）mat-like

図 8. IG-DMR 欠失の二つの家族例の解析

Family A（図 7 と同じ）では IG-DMR と *DLK1* が欠失している．父親由来でこの欠失が伝わった場合（case 9）では軽度の upd（14）mat の症状が出ている．おそらく case 10 の場合も父親由来で伝わったと考えられる．このため *DLK1* は upd（14）mat の責任遺伝子の一つと考えられるが，ほかにも責任遺伝子の存在が示唆される．一方で，母親から欠失が由来した場合，典型的な重度の upd（14）pat の症状が出る．このため *DLK1* の過剰発現自体は upd（14）pat の症状の重篤度には関係しないと結論される（case 1，2）．Family B では IG-DMR と *DLK1* に加えて，さらに *PEG11/RTL1* も欠失している．この case 11 はおそらく父親由来で欠失が伝わった例と考えられ，*DLK1* と *PEG11/RTL1* の両方の発現がなくなるため典型的な（重度の）upd（14）mat の症状を示すと考えられるため，*DLK1* と *PEG11/RTL1* の両方が upd（14）mat の責任遺伝子と結論した．一方で，母親由来の場合には，軽度の upd（14）pat の症状が出る（case3）．これは母親由来の染色体が父親型化したが，そこに *PEG11/RTL1* が欠失しているため，*anti-PEG11/antiRTL1* の発現の欠失効果が父親側の *PEG11/RTL1* mRNA のみに限られたため（結果として発現量が 3～4 倍になる）と考えらえる．

かの *SIRH* 遺伝子群，*PNMA* 遺伝子群の機能解析からは，さらなる胎盤進化の詳細や脳の機能進化などが明らかになる可能性が高いと考えている．

Ⅶ. おわりに

本稿では，*PEG11/RTL1* の胎盤における機能を中心に紹介したが，この遺伝子が胎児，新生児においても重要な機能をはたすことは upd（14）pat の解析結果から十分に推測され，患者の治療に直接関係してくる大切なところである．ヒツジの *PEG11/RTL1* は成長期の大殿筋の発達を促す遺伝子として畜産学的にも注目されている[24]．2013 年，*PEG11/RTL1* は肝臓癌の主要原因遺伝子の一つとしても報告された[25]．胎児，新生児における機能の解析は現在すすめており，*PEG11/RTL1* 遺伝子の欠失，過剰発現によるこれらの症候群の全貌を明らかにしたいと考えている．

筆者の共同研究者である東海大学健康科学部の金児–石野知子教授は，1990 年に英国ケンブリッジで，筆者がゲノムインプリンティングの研究を始める際に，インプリント遺伝子はレトロトランスポゾンの挿入によって生じるというアイデアをもっていた．ゲノムインプリンティングの起源の解明のためには，レトロトランスポゾン由来のインプリント遺伝子が重要な意味をもつため，常に筆者らの網羅的インプリント遺伝子探索の重要なターゲットであった．*Peg11/Rtl1* と *Peg10* は長年探し求めていた遺伝子であったわけである．本稿ではふれなかったが，これらの遺伝子は実際にゲノムインプリンティングの進化にも重要な知見を与えてくれた．インプリント制御には，DMR 配列が重要であることは前述したが，これらの DMR 配列自体がその領域のインプリント制御が始まった時期に新たにゲノムに挿入されているのである[5, 19, 26]．哺乳類の進化上，とくに真獣類，有袋類が誕生するころには，ゲノム DNA に大きな変化が起こっており，それが新規遺伝子獲得と新規エピジェネティック機構の獲得を通じて，新しい生殖様式である胎生の獲得に関係したのだと考えている．

文　献

1) MouseBook Impringin Gatalog, Medical Reseach Council《http://www.mousebook.org/catalog.php?catalog=imprinting》
2) Surani MA, Barton SC, Norris ML：Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. Nature **308**：548–550, 1984.
3) McGrath J, Solter D：Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. Cell **37**：179–183, 1984.
4) Mann JR, Lovell-Badge RH：Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm. Nature **310**：66–67, 1984.
5) Kaneko-Ishino T, Ishino F：Retrotransposon silencing by DNA methylation contributed to the evolution of placentation and genomic imprinting in mammals. Develop Growth Differ **52**：533–543, 2010.
6) Kaneko-Ishino T, Kuroiwa Y, Miyoshi N et al：*Peg1/Mest* imprinted gene on chromosome 6 identified by cDNA subtraction hybridization. Nat Genet **11**：52–59, 1995
7) Miyoshi N, Kuroiwa Y, Kohda T et al：Identification of the *Meg1/Grb10* imprinted gene on mouse proximal chromosome 11, a candidate for the Silver-Russell syndrome gene. Proc Natl Acad Sci USA **95**：1102–1107, 1998.
8) Kagami M, Nishimura G, Okuyama T et al：Segmental and full paternal isodisomy for chromosome 14 in three patients；narrowing the critical region and implication for the clinical features. Am J Med Genet A **138**：127–132, 2005.
9) Miyoshi O, Hayashi S, Fujimoto M et al：Maternal uniparental disomy for chromosome 14 in a boy with intrauterine growth retardation. J Hum Genet **43**：138–142, 1998.
10) Georgiades P, Watkins M, Surani MA et al：Parental origin-specific developmental defects in mice with uniparental disomy for chromosome 12. Develop **127**：4719–4728, 2000.
11) Miyoshi N, Wagatsuma H, Wakana S et al：Identification of an imprinted gene, *Meg3/Gtl2* and its human homologue *MEG3*, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. Genes Cells **5**：211–220, 2000.
12) Moon YS, Smas CM, Lee K et al：Mice lacking paternally expressed *Pref-1/Dlk1* display growth retardation and accelerated adiposity. Mol Cell Biol **22**：5585–5592, 2002.
13) Hernandez A, Martinez ME, Fiering S et al：Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. J Clin Invest **116**：476–484, 2006.
14) Sekita Y, Wagatsuma H, Nakamura K et al：Role of retrotransposon-derived imprinted gene, *Rtl1*, in the feto-maternal interface of mouse placenta. Nat Genet **40**：243–248, 2008.
15) Davis E, Caiment F, Tordoir X et al：RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted *Rtl1/Peg11* locus. Curr Biol **15**：743–749, 2005.
16) Kagami M, Sekita Y, Nishimura G et al：Deletions and epimutations affecting the human chromosome 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd（14）-like pheno-

types. Nat Genet 40：237–242, 2008.
17) Ono R, Kobayashi S, Wagatsuma H et al：A retrotransposon-derived gene, *PEG10*, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21. Genomics **73**：232–237, 2001.
18) Ono R, Nakamura K, Inoue K et al：Deletion of *Peg10*, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. Nat Genet **38**：101–106, 2006.
19) Suzuki S, Ono R, Narita T et al：Retrotransposon silencing by DNA methylation can drive mammalian genomic imprinting. PLoS Genetics **3**：E55, 2007.
20) Edwards CA, Mungall AJ, Matthews L et al：The evolution of the *DLK1*–*DIO3* imprinted domain in mammals. PLoS Biol ***6***：E135, 2008.
21) Kaneko-Ishino T, Isihino F：The role of genes domesticated from LTR retrotransposons and retroviruses in mammals. Front Microbiol **3**：262, 2012.
22) Ono R, Kuroki Y, Naruse M et al：Identification of *SIRH12*, a retrotransposon-derived gene specific to marsupial mammals. DNA Res **18**：211–219, 2011.
23) Iwasaki S, Suzuki S, Clark H et al：Identification of novel *PNMA-MS1* and *PNMA-MS2* in marsupials suggests the LTR-retrotransposon-derived *PNMA* genes evolved differently in marsupials and eutherians. DNA Res **18**：211–219, 2013.
24) Byrne K, Colgrave ML, Vuocolo T et al：The imprinted retrotransposon-like gene *PEG11* (*RTL1*) is expressed as a full-length protein in skeletal muscle from Callipyge sheep. PLoS One **5**：E8638, 2010.
25) Riordan JD, Keng VW, Tschida BR et al：Identification of *Rtl1*, a retrotransposon-derived imprinted gene, as a novel driver of hepatocarcinogenesis. PLoS Genet **9**：E1003441, 2013.
26) Suzuki S, Shaw G, Kaneko-Ishino T et al：The evolution of mammalian genomic imprinting was accompanied by the acquisition of novel CpG islands. Genome Biol Evol **3**：1276–1283, 2011.

Discovery of an essential placental gene regulating feto-maternal interaction

Fumitoshi Ishino

Professor, Department of Epigenetics, Medical Research Institute,
Tokyo Medical and Dental University

Summary
Human paternal uniparental disomy for chromosome 14 [upd (14) pat] causes placentomegaly, neonatal lethality associated with skeletal abnormalities, developmental delay and severe mental retardation. We demonstrated that its major cause is overproduction of *PEG11/RTL1,* one of paternally expressed imprinted genes located on 14q32. *PEG11/RTL1* play an essential role in feto-maternal interaction during pregnancy via maintaining fetal capillary in placenta. Interestingly, it is one of LTR retrotransposon-derived genes conserved in eutherian mammals, suggesting that such exogenous genes deeply contributed to the evolution of mammalian viviparity.

Key words : human paternal uniparental disomy for chromosome 14, upd (14) pat, genomic inprinting disese, placenta, fetal capillary, LTR retrotransposon, evolution of viviparity

お茶の水医科同窓会 第23回研究奨励賞 受賞論文 Research promotion award 2009 from TMDU medical alumm: association
お茶の水醫學雑誌　62:045–057（2014）

オレキシン２型受容体シグナルを強めると食餌誘導性肥満を防げる

船戸　弘正　東邦大学医学部解剖学講座微細形態学分野
筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構（IIIS）分子行動科学研究コア

要旨：視床下部に発現する神経ペプチドであるオレキシンは，摂食行動促進作用を示すにもかかわらず，オレキシン機能が低下すると肥満する．オレキシンの長期的な体重制御，エネルギー代謝への作用についてはよくわかっていない．本研究では，複数のオレキシン関連遺伝子改変マウスを用いて，オレキシン過剰発現によって高脂肪食誘導性肥満に抵抗性を示す，つまり高カロリーの餌で飼育しても太りにくくなることを明らかにし，このオレキシン過剰発現による太りにくさには，オレキシン２型受容体が重要であることを示した．また，このオレキシンによる体重制御にはレプチンの作用を必要としている．オレキシン２型受容体アゴニスト投与によって太りにくくなることから，オレキシン２型受容体アゴニストは抗肥満薬の候補となる．

Key words：オレキシン，代謝，レプチン，体重，HDAC

Ⅰ．はじめに

「お茶の水醫學雑誌」に第23回（平成21年度）医科同窓会研究奨励賞受賞論文掲載のご依頼をいただいた．Elsevier社の許諾を得てfigureを使用し，論文の内容をそのままに記載する．しかし，論文掲載は2009年でありだいぶ時間も経過しているため，後半では関連するその後の研究内容や，現在取り組んでいる睡眠研究の紹介もさせていただいた．

Ⅱ．体重制御とオレキシン

エネルギーのインテイクとアウトプットの差が生じると，エネルギーの主なストックである脂肪量が変化し，ひいては体重の増加や減少となる．本来，われわれの身体にはエネルギーストックもしくは体重を一定に保つシステムが備わっており，エネルギーが不足すると，お腹が空いて食物を摂取する欲求が強くなり，エネルギーを取り込もうとする．反対に，食べすぎると食欲が低下してエネルギーインテイクが減少する．

連絡先：船戸　弘正　hiromasa.funato@med.toho-u.ac.jp

エネルギーの調節は，摂食に加えて運動や熱量産生も関与する．このようなエネルギーバランスを保つシステムが機能しているおかげで，ほとんどの人は１年後にもほぼ同じ体重を維持することができる．しかし，この体重の恒常性を保つシステムは，エネルギーが不足するときには強く働くが，エネルギーが過剰になる方向には弱い制御しか働かない．その理由は，地球上に動物が現れて以来，エネルギー不足が個体や種族の存続の課題であり続けたが，エネルギー過剰問題になることはなかったからである．しかし，高カロリーの食事を安価に簡単に享受できる現代社会では，エネルギーの過剰による肥満，糖尿病が蔓延している．とくに，米国ではこの10年の間に肥満人口が激増しているが，発展途上国でも肥満が激増しており，WHOも肥満はパンデミックの状態にあると警告している．

エネルギーが過剰になったときにシグナルとなるのは，白色脂肪組織から分泌されるレプチンというホルモンである．レプチンは，脳に作用して摂食量を抑え，エネルギー産生を亢進させ，その結果としてエネルギー出納がマイナスになるように効果を示す．食べすぎると脂肪量が増加し，脂肪組織から分泌されるレプチン量が増加し，レプチンの作用が強まって食欲が下がる．こうして体重はほぼ一定に保たれる．しかし，こ

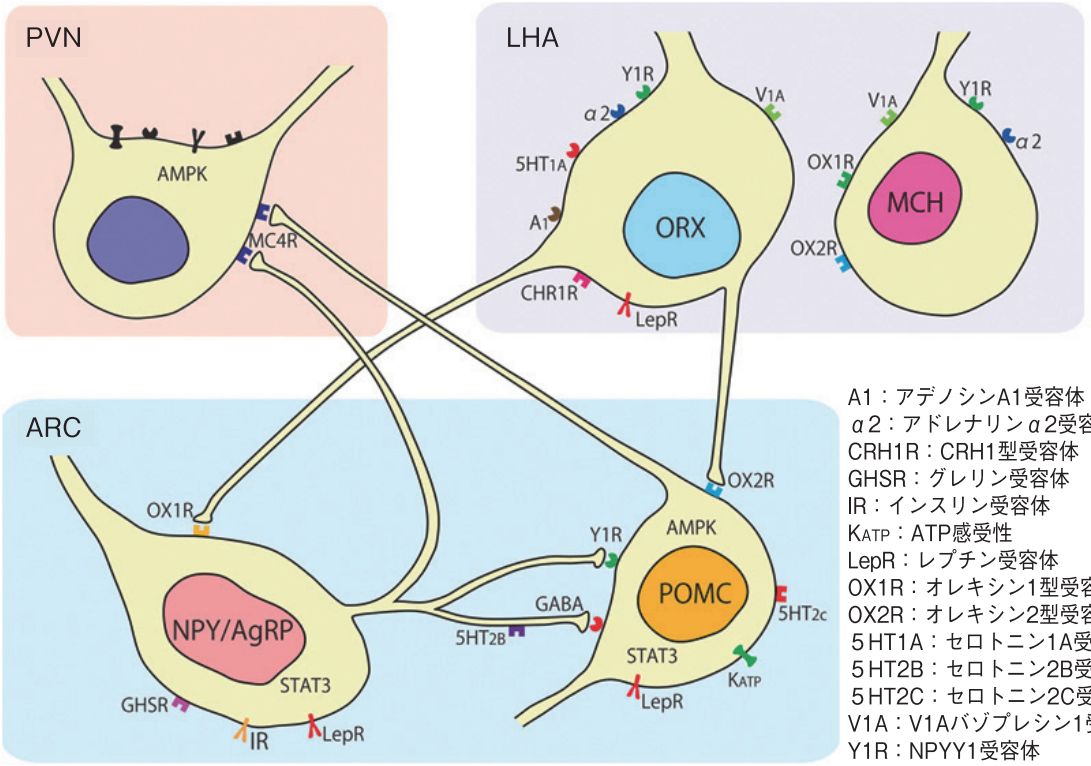


図 1．NPY/AgRP 神経と POMC 神経を中心とした視床下部内の神経回路
（脳科学辞典《http://bsd.neuroinf.jp/》：摂食制御の神経回路［船戸弘正］より転載）

の仕組みには個人差が大きく，太りやすい人と太りにくい人という体質の違いの一要因となっている．肥満している人は，脂肪量が多く，レプチン濃度も高いにもかかわらず太ったままであるのは，レプチンの作用と矛盾しているようであるが，肥満してしまった人はレプチンへの感受性が低下したために，レプチン濃度が高くてもレプチンの作用が弱くなっていると考えられている．これは，糖尿病患者では，インスリン濃度が高くなっているにもかかわらず血糖が高いこととのアナロジーで理解されている[1]．

オレキシンは神経ペプチドと呼ばれる神経細胞が分泌するペプチドの一つである．もともと摂食行動を促進する作用があると考えられ，食欲を意味するギリシャ語からオレキシンと名づけられたが，その後の研究から，睡眠覚醒制御に重要な役割をもち，オレキシンを産生する神経細胞が脱落すると過剰な眠気と情動脱力発作を症状とするナルコレプシーという睡眠障害を引き起こすことがわかっている[2]．オレキシンを欠損したマウスは，睡眠覚醒行動異常のほかにエネルギー代謝制御にも問題があるらしく，肥満傾向を示す[3]．摂食行動が抑制され体重が低くなるのではないかという予想とは反対である．オレキシンの受容体は，1 型受容体と 2 型受容体の 2 種類あり，この 2 種の受容体は発現部位に違いがある．現在，摂食行動の中枢は視床下部の弓状核にあると考えられており，弓状核には摂食を促進する作用をもつニューロペプチド Y（NPY）とアグーチ関連ペプチド（AgRP）を産生する NPY/AgRP 神経と，摂食を抑制する作用をもつプロオピオメラノコルチン（POMC）を産生する POMC 神経が存在する（図 1）．つまり，弓状核には摂食行動を拮抗的に制御する 2 種類の神経細胞群がある．これらの神経細胞群はレプチン受容体をもち，レプチンの作用を受けるとともに，オレキシン受容体とくに 2 型受容体をもち，オレキシンの作用も受ける[4]．本研究では，オレキシンによる体重制御の仕組みを明らかにするために，まずさまざまな遺伝子改変マウスを用いて，1 型受容体と 2 型受容体のどちらが体重制御に重要であるのかを検討した．

Ⅲ．研究に用いたオレキシン遺伝子改変マウス

本研究には複数の遺伝子改変マウスを用いた．まず，オレキシンをサイトメガロウイルスのエンハンサー，チキンβアクチンのプロモーターを組み合わせた CAG プロモーターの下流にオレキシンをつないだトランスジェニックマウスである．この CAG オレキシンマウスは，オレキシンを過剰発現させており，オレキシンの作用を強めた効果を検討するために用いる．次に，オレキシン 1 型受容体欠損マウスおよびオレキシン 2 型受容体欠損マウスである．オレキシン 1 型受

容体欠損マウスでは2型受容体のみが働いており，オレキシン2型受容体欠損マウスでは1型受容体のみが働いている．さらに，CAGオレキシントランスジェニックマウスをオレキシン1型受容体欠損マウスと掛けたマウス，以下ではオレキシン過剰発現＋オレキシン1型受容体欠損マウスと記載するものも用意した．このオレキシン過剰発現＋オレキシン1型受容体欠損マウスと，ただのオレキシン1型受容体欠損マウスを比較することで，オレキシン2型受容体の作用のみを強めた効果を検討することができる．同様に，オレキシン過剰発現＋オレキシン2型受容体欠損マウスと，ただのオレキシン2型受容体欠損マウスを比較することで，オレキシン1型受容体の作用のみを強めた効果を検討することができる[5]．

Ⅳ．オレキシン2型受容体作用と肥満抵抗性

一般に実験に用いるマウスはインブレッドであり，系統内の遺伝的多様性はほとんどない状態に維持されている．つまり，C57BL/6という系統のマウスはどれも遺伝子的にはほぼ同一であり，いわばヒトの一卵性双生児のようなものである．実験に用いるマウスは系統によって，見掛けも大きさも性質も異なる．C57BL/6マウスは現在もっともよく遺伝子改変マウスの研究に用いられる系統である．このマウスは，高カロリーの高脂肪餌を投与すると肥満する（図2a）．成長への影響も考えて，体長の伸びのとまった8週齢から，餌を通常の餌から高脂肪食に変更すると体重が増加していき，25週齢で通常餌で飼育したマウスが32gであるのに対して，高脂肪餌で飼育したマウスは45gに肥満する．通常餌はカロリーの13％が脂肪であるのに対して，高脂肪餌は45％が脂肪である．これは，一般的な和食とハンバーグなどの洋食の脂肪量とに相当する．したがって，C57BL/6マウスは食事という環境によって体重が変化することから，ヒトの肥満のよいモデルとなる．ヒトの急激な肥満の増加は遺伝子の変化ではなく，食事やモータリゼーションなどの環境の変化によって生じたものであるからである．また，環境の変化によって明らかになった，太りやすい遺伝的性質をもっていたという言い方もできる．

このC57BL/6にCAGオレキシントランスジーンによってオレキシン過剰発現させると，高脂肪食でも通常餌でもほぼ同じ体重を維持する（図2a）．つまり，オレキシン過剰発現したマウスは，太りにくくなったことになる．では，このオレキシン過剰発現による太りにくさはオレキシン1型受容体を介する作用なのか，2型受容体を介する作用なのか．まず，オレキシン過剰発現＋オレキシン1型受容体欠損マウスとただのオレキシン1型受容体欠損マウスに，通常餌と高脂肪餌を与えて肥満するかどうかを調べた．その結果，オレキシン1型受容体欠損マウスは高脂肪食によって肥満したが，オレキシン過剰発現＋オレキシン1型受容体欠損マウスは肥満しなかった（図2c）．このマウスは2型受容体しか発現していないため，オレキシン過剰発現による肥満抵抗性は2型受容体を介した効果である．

次に，オレキシン過剰発現＋オレキシン2型受容体欠損マウスとただのオレキシン2型受容体欠損マウスとに，通常餌と高脂肪餌を与えて肥満するかどうかを調べた．その結果，オレキシン2型受容体欠損マウスもオレキシン過剰発現＋オレキシン2型受容体欠損マウスもともに肥満した（図2e）．このマウスは1型受容体しか発現していないため，オレキシン過剰発現により1型受容体シグナルを強めても肥満抵抗性を獲得しないことになる．

以上はすべて雄マウスを使用した結果であるが，雌マウスでも同様の結果を得た（図2b，d，f）．このことから，性別にかかわらずオレキシン2型受容体の作用を強めると太りにくくなることがわかる．同じマウスについて，体重だけではなく脂肪重量，血清レプチン濃度，除脂肪重量を測定した．その結果，脂肪重量は高脂肪食を投与したマウスで増大していたが，オレキシンを過剰に発現させると有意に低下していた．オレキシン過剰発現による脂肪重量抑制効果は，オレキシン1型受容体欠損マウスにおいても認められたが，オレキシン2型受容体欠損マウスには認められなかった（図3a）．脂肪重量を反映して，血清レプチン濃度も同じ結果であった（図3c）．高脂肪食投与により除脂肪体重も軽度に増加する．脂肪組織が増加し肥満すると，皮膚，結合組織，筋組織もある程度増えるためであろう．脂肪量と同様にオレキシン過剰発現によって除脂肪体重の増加が抑えられ，この効果はオレキシン1型受容体欠損マウスでも認められた（図3e）．雌でもほぼ同様の結果であった（図3b，d，f）．

Ⅴ．オレキシン2型受容体作用とエネルギー出納

体重増加はカロリーの摂取が増加するか，またはエネルギー消費が減少することで生じる．オレキシン過剰発現による高脂肪餌飼育での肥満抑制は，エネルギーインテイクの減少なのか，エネルギーアウトプットの増大なのかを検討した．マウスのエネルギー消費を測定するために，マウスが消費する酸素量と産生する二酸化炭素量を持続的に測定できる特殊なチャンバー

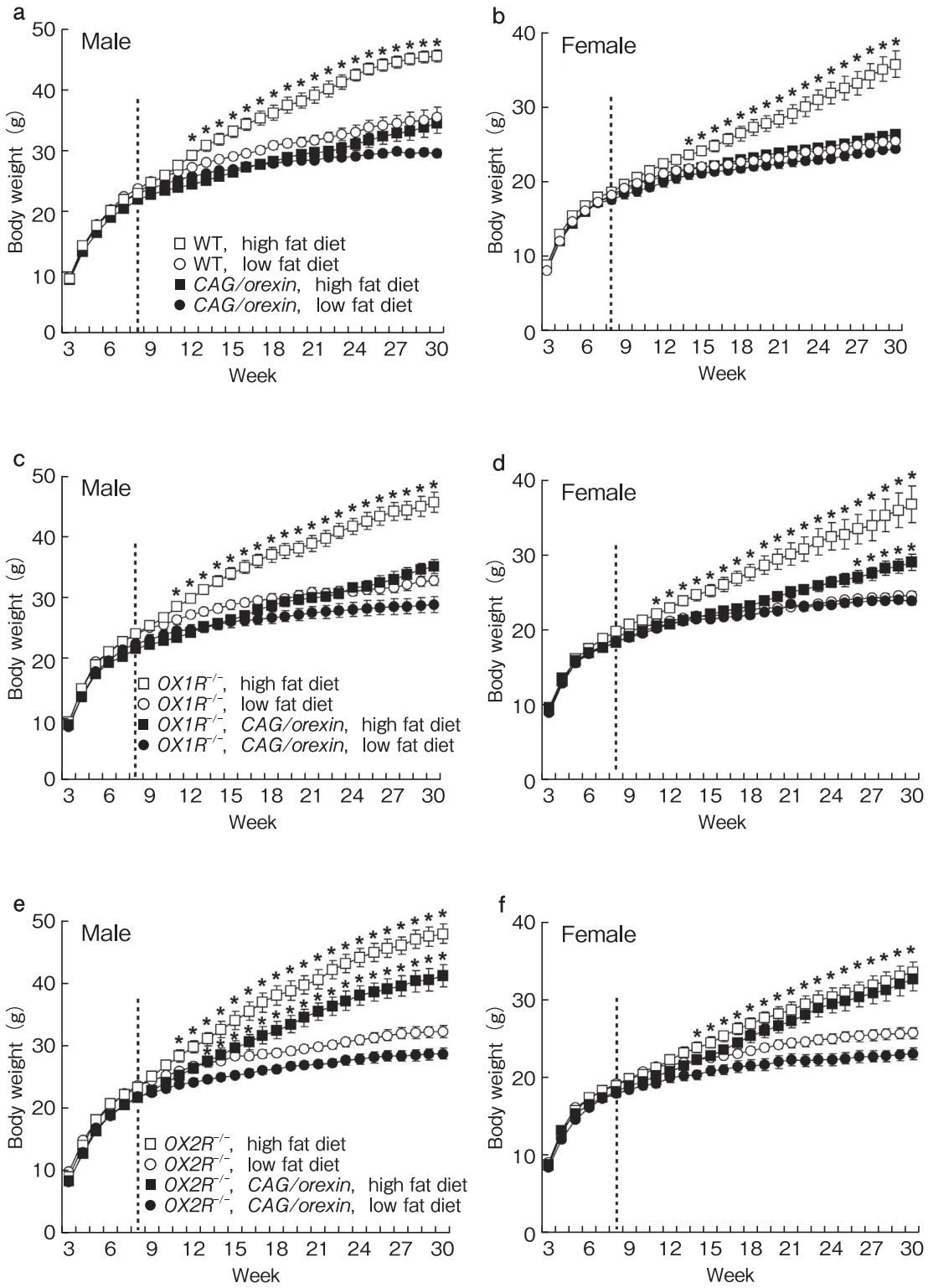


図 2. オレキシン関連遺伝子改変マウスの体重増加（Elsevier 社より許諾を得て転載）
高脂肪餌飼育した野生型雄マウス（a）と雌マウス（b）の体重は，通常餌飼育群に比べて増加する（$p<0.0005$）．オレキシン過剰発現マウスの体重は，高脂肪餌飼育群と通常餌飼育群で有意な違いを認めない（$p=0.51$ male：$p=0.13$ female）．高脂肪餌飼育したオレキシン 1 型受容体欠損雄マウス（c）と雌マウス（d）の体重は，通常餌飼育群に比べて増加する（$p<0.0001$ male：$p<0.01$ female）．オレキシン 1 型受容体欠損マウスにオレキシン過剰発現させると体重増加が抑えられる（$p<0.0001$ male：$p<0.01$ female）．高脂肪餌飼育したオレキシン 2 型受容体欠損雄マウス（c）と雌マウス（d）の体重は，通常餌飼育群に比べて増加する（$p<0.0001$ male：$p<0.005$ female）．オレキシン 2 型受容体欠損マウスにオレキシン過剰発現させても体重増加は認められる（$p<0.0005$ male：$p<0.001$ female）．

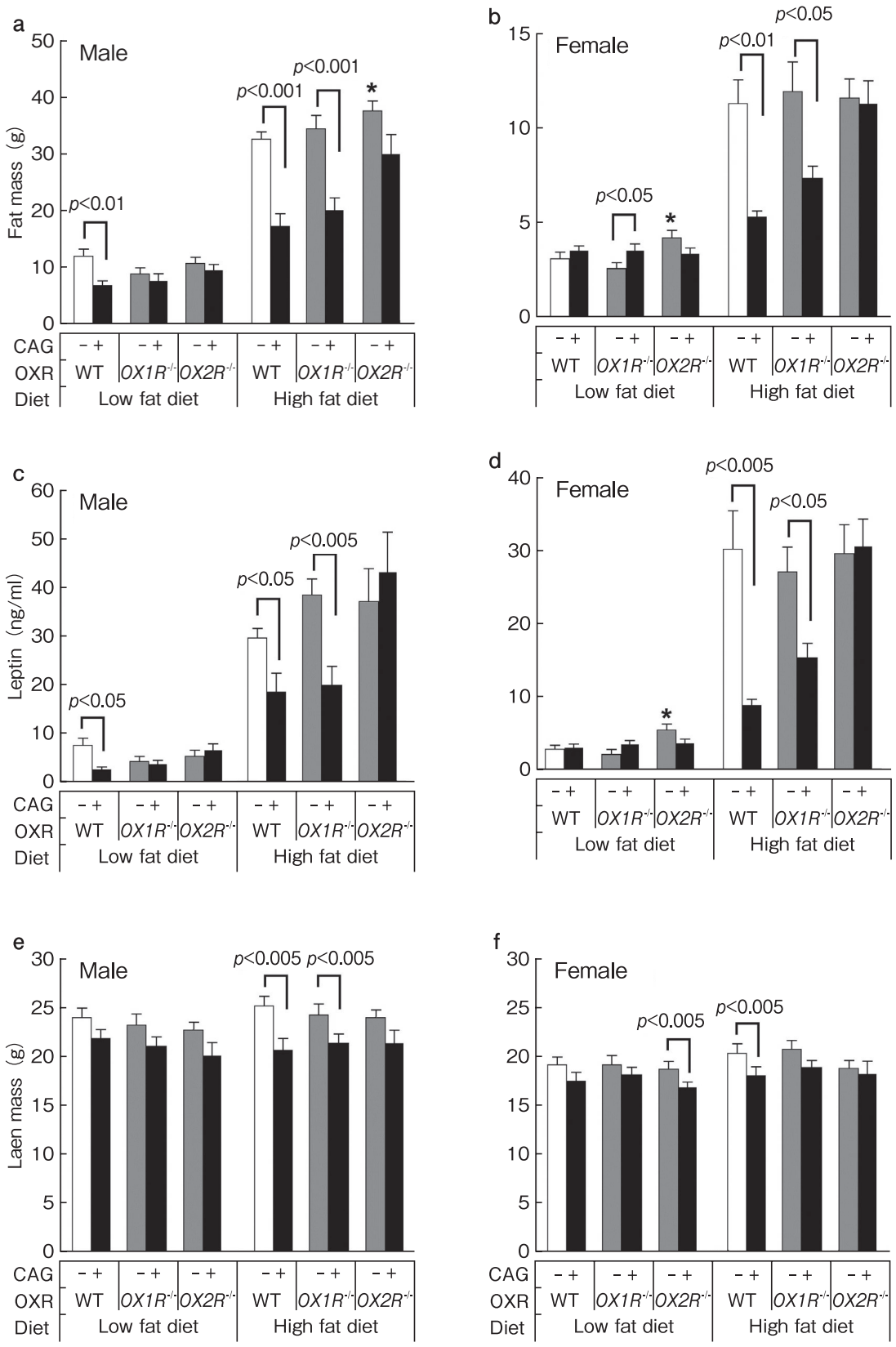


図 3. オレキシン関連遺伝子改変マウスの脂肪関連パラメータ（Elsevier 社より許諾を得て転載）

a, b：28 週齢での雄マウス（a）と雌マウス（b）の脂肪重量 .

c, d：30 週齢での雄マウス（c）と雌マウス（d）の血清レプチン濃度.

e, f：28 週齢での雄マウス（e）と雌マウス（f）の除脂肪重量.

*$p<0.05$

を使用した．ものが燃えるときに酸素を消費して，二酸化炭素と熱を出すように，われわれも食事によって摂取した栄養素を酸素を消費してエネルギーおよび熱にかえているが，このときに二酸化炭素を産生する．消費する酸素量と産生する二酸化炭素量がわかれば，計算式によりエネルギー消費量を算出することができる．

オレキシン過剰発現マウスは野生型 C57BL/6 マウスに比べて，高脂肪餌飼育でのエネルギー消費量が大きかった（図 4a，g）．オレキシン過剰発現によるエネルギー消費量増加は，オレキシン 1 型受容体欠損マウスにも認められたが（図 4c，g），オレキシン 2 型受容体欠損マウスには認められなかった（図 4e，g）．二酸化炭素量産生量を酸素消費量で除した値である呼吸商は，エネルギー源が炭水化物か脂肪を示す目安となる．理論上，炭水化物利用時の呼吸量は 1 になり，脂肪利用の呼吸商は 0.7 になる．オレキシン過剰発現は呼吸量には影響を与えなかった（図 4b，d，f，h）．食事によるエネルギー摂取は，オレキシン過剰発現マウスは野生型よりも少なかった．以上から，オレキシン過剰発現によって，エネルギーのインテイクが減少するとともに，エネルギーのアウトプットが増加して体重が増えにくくなっていることが明らかになった．

Ⅵ．オレキシンと糖代謝

C57BL/6 マウスは高脂肪餌飼育によって肥満すると，糖代謝異常も生じるが，オレキシンを過剰発現させると，血中グルコース濃度の上昇が抑制された（図 5a）．血糖の変化よりも初期に生じる血清インスリン上昇は，オレキシン過剰発現によって抑制された（図 5b）．オレキシン 1 型受容体欠損マウスは高脂肪餌によって肥満を示すものの，血中グルコースや血清インスリンの上昇は抑制されていた．耐糖能を調べるために，グルコース負荷による血中グルコース濃度変化を調べたところ，野生型 C57BL/6 マウスよりもオレキシン過剰発現マウスのほうが負荷後の血中グルコース上昇程度が低く，より早く定常レベルに戻った（図 5c）．オレキシン 1 型受容体欠損マウス，オレキシン 2 型受容体欠損マウスにはオレキシン過剰発現による効果はみられなかった．オレキシンによる糖代謝への影響は，肥満からの二次的な結果というだけでは説明がつかない．

Ⅶ．オレキシン 2 型受容体アゴニスト

オレキシンは中枢神経系では視床下部に限局した発現をしている．オレキシン過剰発現に用いた CAG プロモーターは神経系に特異的なプロモーターではないため，全身的にオレキシン発現が過剰になっている．末梢組織でのオレキシンの作用は知られていないが，オレキシン過剰発現による肥満抵抗性の作用点が脳内であることを確認するために，オレキシン 2 型受容体アゴニストを脳室内に 2 週間持続的に投与した．その結果，コントロール投与群は高脂肪食飼育によって体重が増加したのに対して，2 型受容体アゴニスト投与群は体重増加が抑制された（図 6a）．2 型アゴニスト投与群は，脂肪重量の増加が抑えられていた（図 6b）．2 型アゴニスト投与群は酸素消費量が増えており（図 6c），呼吸商は変化しなかった（図 6d）．さらに，カロリー摂取量も低下していた（図 6e）．これらの 2 型受容体アゴニストの効果は，遺伝子改変マウスを用いた結果と同じである．2 型受容体アゴニスト投与後の視床下部弓状核での摂食関連遺伝子である *NPY*，*AgRP*，*POMC*，*Stat3*，*Socs3*，レプチン受容体の発現を検討した．摂食促進作用のある *NPY* と *AgRP* の発現がオレキシン 2 型受容体アゴニスト投与した高脂肪餌マウス群で低下していた．また，弓状核での *c-Fos* 発現をみると，2 型受容体アゴニスト投与群で減少していた（図 6g，h）．

Ⅷ．オレキシンによる体重調節とレプチン

オレキシン 2 型受容体を介したマウス個体への影響が摂食行動抑制とエネルギー産生促進であり，レプチンの作用と同じである．オレキシンによる体重制御作用がレプチンとは独立したものかどうかを検討した．

まず，野生型マウスとオレキシン過剰発現マウスに同量のレプチンを持続的に脳室内に投与した．その結果，レプチンによる体重減少効果はオレキシン過剰発現マウスに強く現れた（図 7a）．レプチンによる摂食量抑制も，オレキシン過剰発現マウスに強く認められた（図 7b）．オレキシン過剰発現マウスは *NPY* および *AgRP* 発現レベルが高かったが，レプチン投与によって減少した．野生型マウスにはレプチン持続投与による摂食行動関連遺伝子発現に変化はなかった（図 7c）．また，元の論文中に示しているが，レプチン作用が欠如した ob/ob マウスにオレキシン過剰発現させても体重増加はかわらないことから，オレキシンによる体重増加抑制にはレプチンの作用が必要であると考えている．

以上のことから，オレキシンはオレキシン 2 型受容体を介して，レプチンの作用を強めることによって，太りにくさをもたらしていると結論した．その後，オ

前 目次へ 次

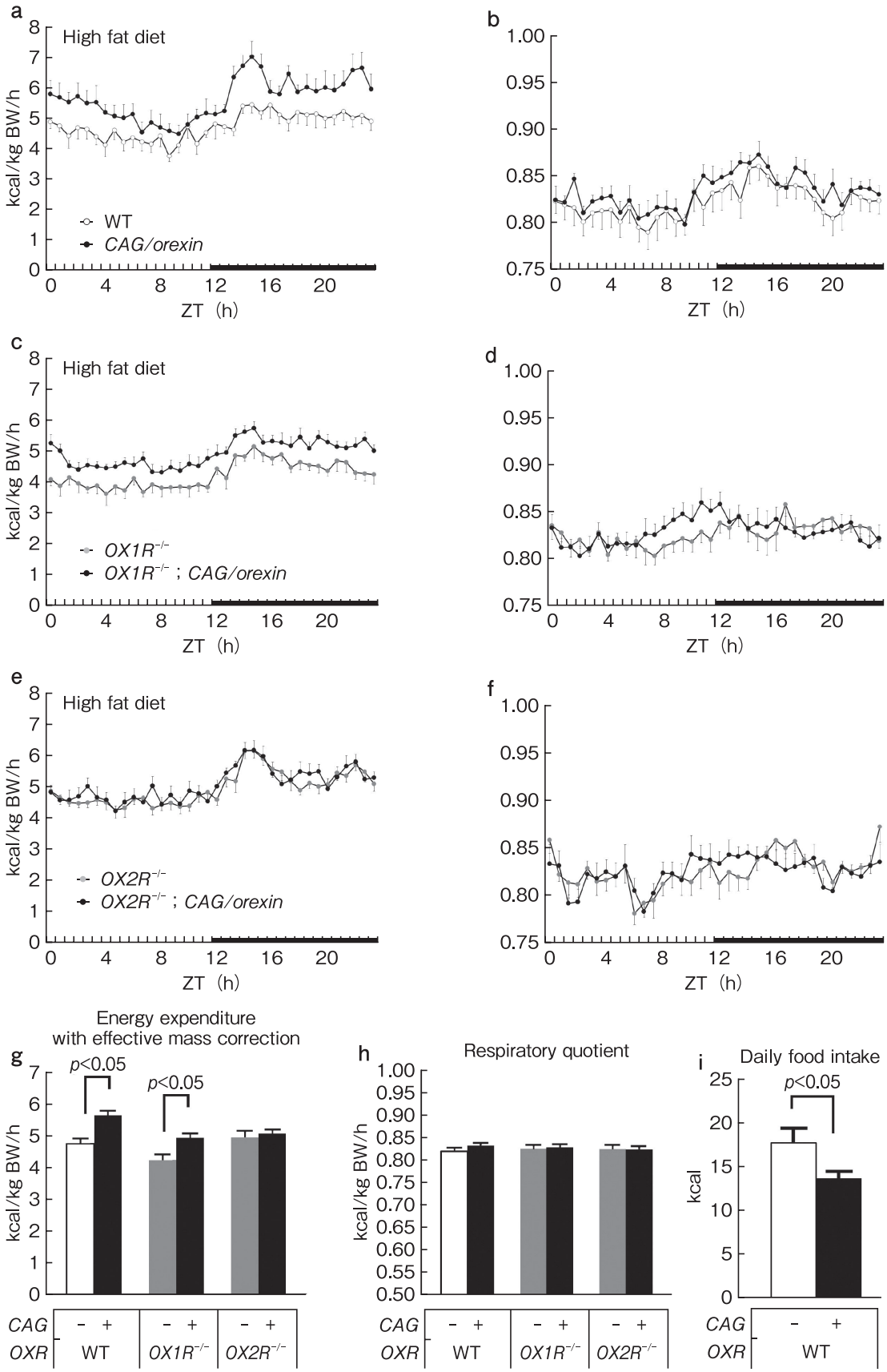


図 4. オレキシン関連遺伝子改変マウスのエネルギーパラメータ（Elsevier 社より許諾を得て転載）

a, b：野生型マウスとオレキシン過剰発現マウスの 16〜20 週齢マウスのエネルギー消費量（a）と呼吸商（b）の日内変動.

c, d：オレキシン 1 型受容体欠損マウスとオレキシン過剰＋オレキシン 1 型受容体欠損マウスの 16〜20 週齢マウスのエネルギー消費量（c）と呼吸商（d）の日内変動.

e, f：オレキシン 2 型受容体欠損マウスとオレキシン過剰＋オレキシン 2 型受容体欠損マウスの 16〜20 週齢マウスのエネルギー消費量（e）と呼吸商（d）の日内変動.

g：エネルギー消費量，h：呼吸商，i：野生型マウスとオレキシン過剰発現マウスの高脂肪餌摂餌量.

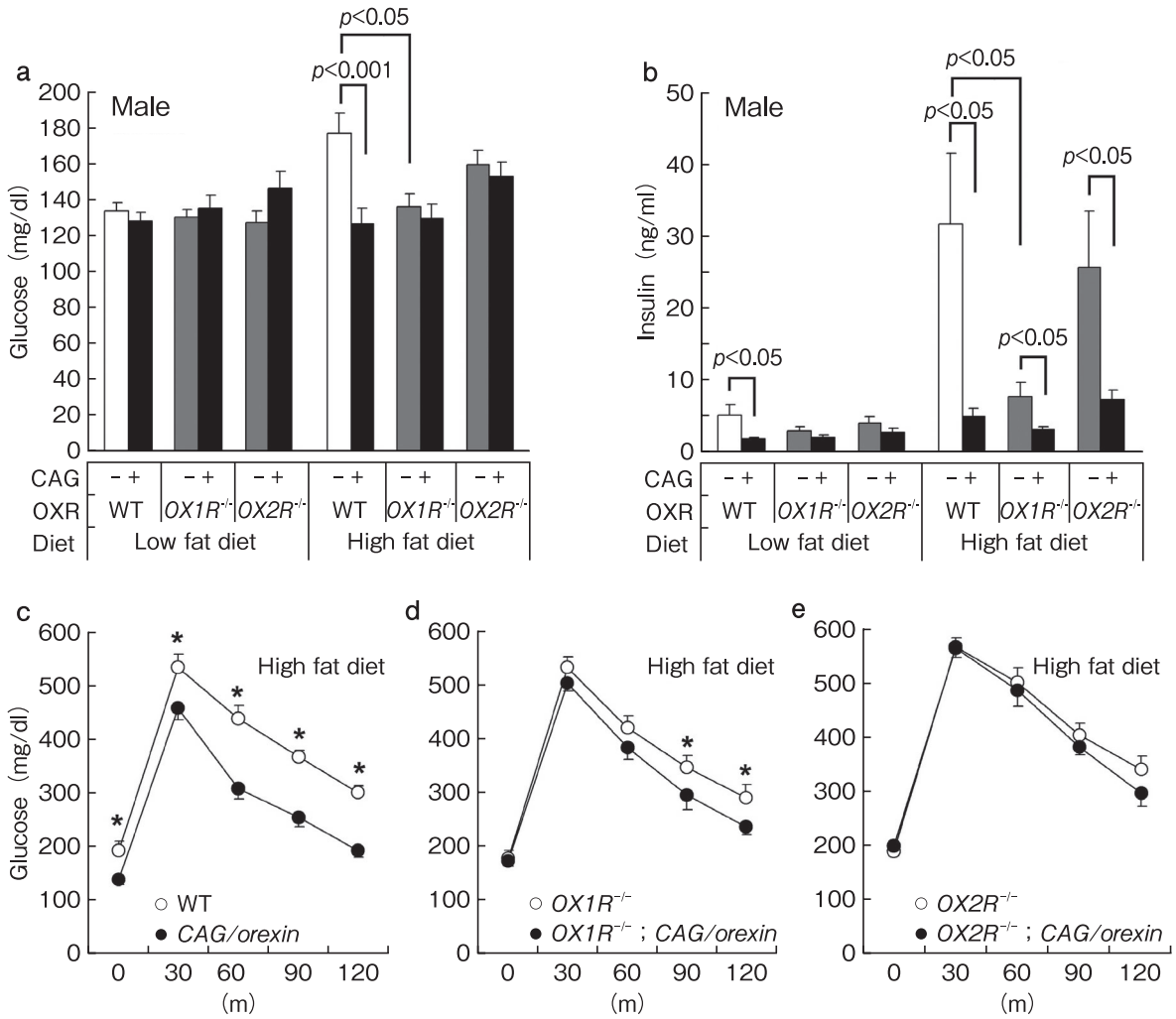


図 5. オレキシン関連遺伝子改変マウスの糖代謝パラメータ（Elsevier 社より許諾を得て転載）
a：血中グルコース濃度，b：血清インスリン濃度，c：野生型マウスとオレキシン過剰発現マウスのグルコース負荷試験，d：オレキシン 1 型受容体欠損マウスとオレキシン過剰＋オレキシン 1 型受容体欠損マウスのグルコース負荷試験，e：オレキシン 2 型受容体欠損マウスとオレキシン過剰＋オレキシン 2 型受容体欠損マウスのグルコース負荷試験．*$p<0.05$

レキシン 2 型受容体が体重を制御する神経回路の同定をすすめている．候補部位は絞られ，ウイルスベクターを用いた検討を準備している段階である．また，筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構では，オレキシン 2 型受容体作動薬の創薬プロジェクトが進行している．

Ⅸ．神経集団ごとのヒストン脱アセチル化酵素発現プロファイル

食事，ストレス，養育環境などさまざまな環境要因が幅広い個体行動に影響を与えることは，われわれ自身を振り返っても理解できることであるが，この機構はよくわかっていない．以上に記したように，オレキシン神経は餌という環境要因へのエネルギー代謝システムの反応を調整している．さらに，オレキシン神経は，睡眠覚醒および体重制御以外にも薬物依存，情動行動，ストレス応答など多様な行動に関与している[2]ことから，オレキシン神経が環境要因と個体行動とのインターフェイスの一つとなっている可能性がある．神経細胞も長期的には遺伝子発現によって機能が規定されるため，環境要因がオレキシン神経へ作用した結果は，ヒストンアセチル化状態などの変化として遺伝子発現に長期的な影響を与えていることが予想される．オレキシン神経のように，中枢神経系の中には特定の神経ペプチドやモノアミンを産生する神経細胞集団が存在する．先に述べた視床下部弓状核の NPY/AgRP 神経および POMC 神経，多くの抗うつ薬の作用に関わるセロトニン神経，意欲にかかわるドパミン神経，覚醒維持にかかわるヒスタミン神経，ノルアドレナリン神経などであり，これらもオレキシン神経と同様に，環境要因と個体行動とのインターフェイスを形成する

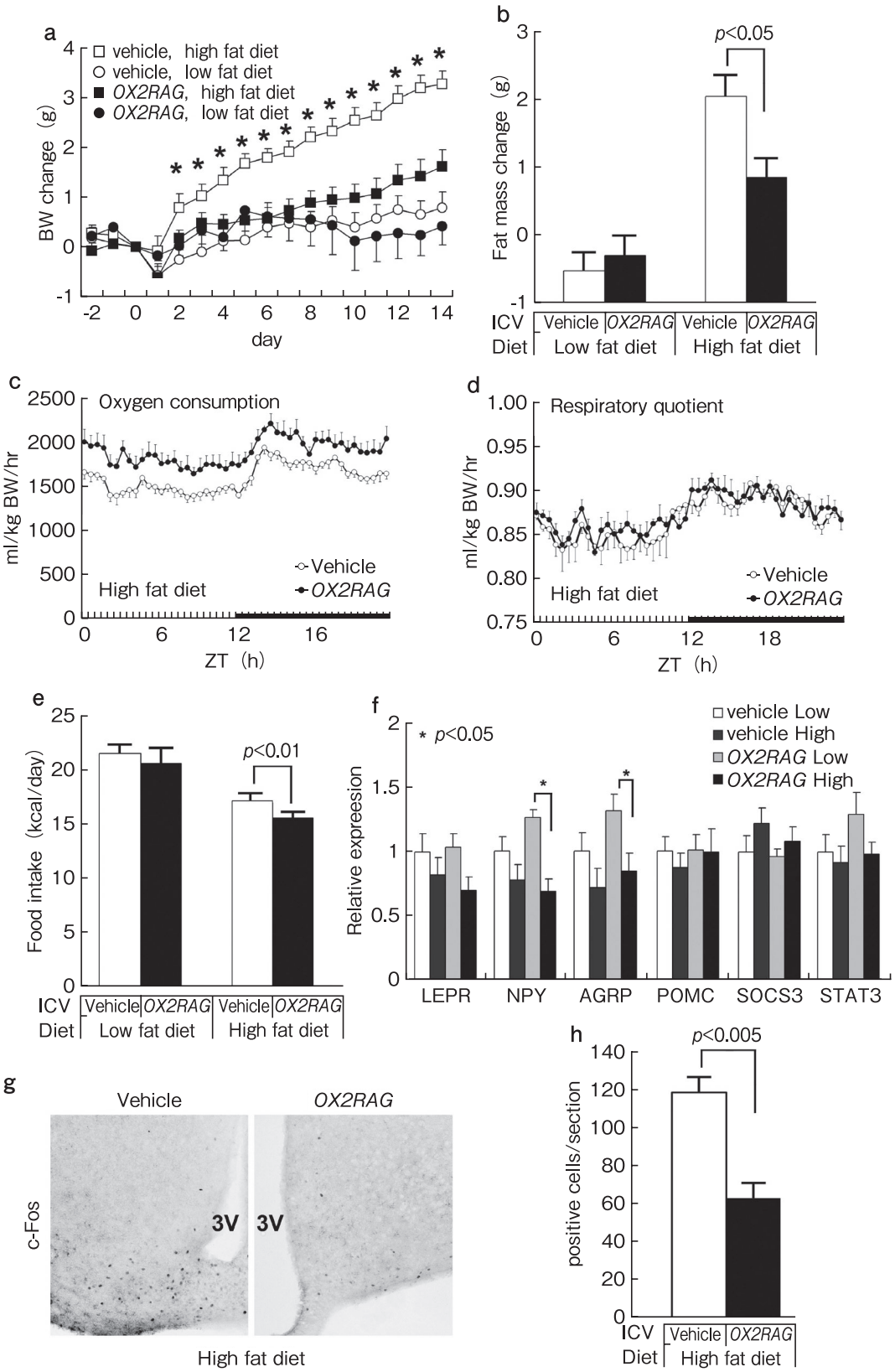


図 6. オレキシン 2 型受容体アゴニストの効果（Elsevier 社より許諾を得て転載）

a：慢性脳室内投与による体重変化．高脂肪餌群は，day 0 より高脂肪餌投与を開始している．2 型受容体アゴニスト投与群は，コントロール投与群に比べて有意に体重増加が抑制されている（$p<0.0005$）．

b：14 日間の実験前後での脂肪重量変化．

c：2 型受容体アゴニスト投与群は，コントロール投与群に比べて有意に酸素消費量が大きい（$p<0.0005$）．

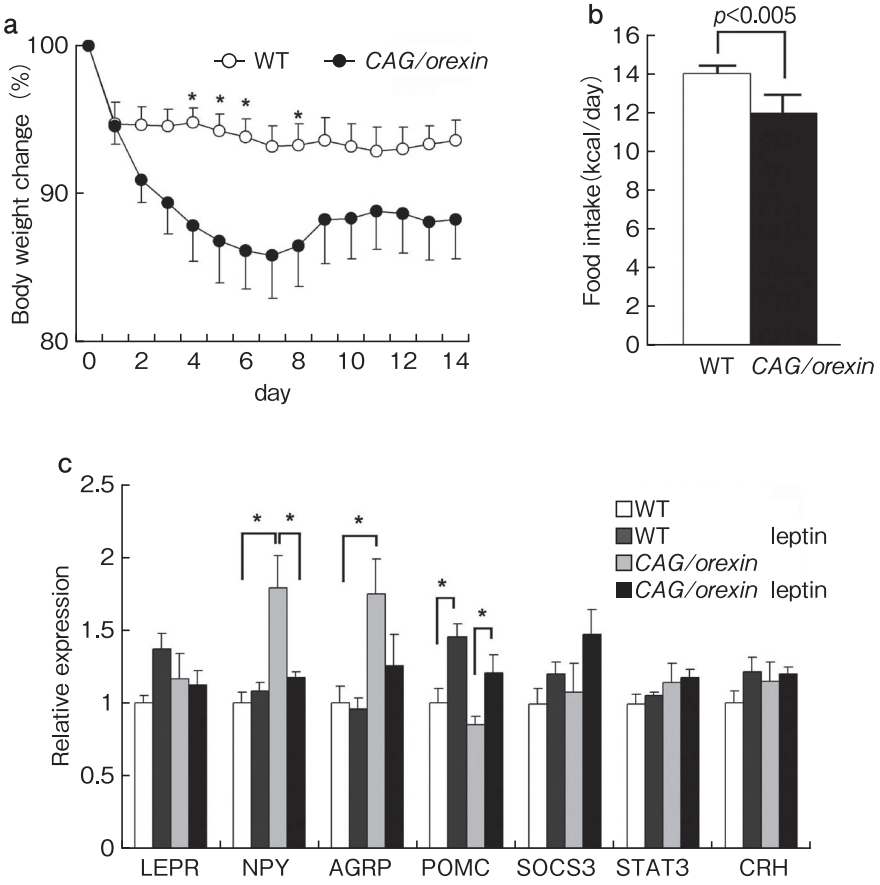


図 7. オレキシン過剰発現マウスのレプチン感受性（Elsevier 社より許諾を得て転載）
a：レプチン慢性投与による体重変化．オレキシン過剰発現マウスは野生型マウスに比べて大きく体重減少する（$p<0.05$）．
b：レプチン慢性投与中の摂餌量．
c：レプチン慢性投与後の視床下部摂食関連遺伝子発現．
*$p<0.05$

ものとして自然な位置にある．環境要因が遺伝子発現に短期的または長期的に影響を与える仕組みの一つとしてヒストンアセチル化が知られている．ヒストンアセチル化状態を調節する代表的な酵素はヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）ファミリーであり，HDAC1～11 まである．われわれは，オレキシン神経などの神経細胞集団ごとの HDAC ファミリー発現を検討した（図 8）[6]．その結果，HDAC1，2 などはどの神経細胞集団にも同じように発現していたが，HDAC4, 8, 11 は神経細胞集団によって発現の有無や細胞内局在が異なっていた．神経細胞集団は，HDAC 発現プロファイルによっていくつかのグループに分けることが可能である（図 9）．この神経細胞集団ごとの HDAC 発現の違いのもつ意義は今後検討していく．

X．フォワード・ジェネティクスによる新規睡眠覚醒制御遺伝子の同定

最後に，現在進行中の研究を紹介させていただく．睡眠と覚醒の仕組みについては，ほとんどの睡眠薬が $GABA_A$ 受容体を標的にしていること，抗ヒスタミン薬が眠気をもたらすこと，オレキシン神経が脱落するとナルコレプシーにあることから，GABA 作動性神経，ヒスタミン作動性神経，オレキシン神経が重要な役割を担っていることは認められているものの，睡眠覚醒がどのような神経回路で制御されているのか，睡眠と覚醒のスイッチの仕組みはなにか，ノンレム睡眠とレム睡眠の切り替えスイッチを押すものがなにか，眠気とはなにか，睡眠覚醒制御にかかわる細胞内シグナル伝達系はどのようなものか，そもそもわれわれはなぜ眠るのかという基本的な問いにも，明快な答えをもっていない．睡眠覚醒研究は個体での研究が不可欠であるため，遺伝子欠損マウスを用いた研究が期待されたが，オレキシン欠損マウスがナルコレプシー病態解明を導いたことを除くと，期待したような成果をあげていない．その代表的な例は，ヒスタミンを合成する酵素の欠損したマウスの覚醒時間が正常範囲だった[7]ことである．この結果はヒスタミンが生理的な覚醒にかかわっていないことを示すのではなく，睡眠

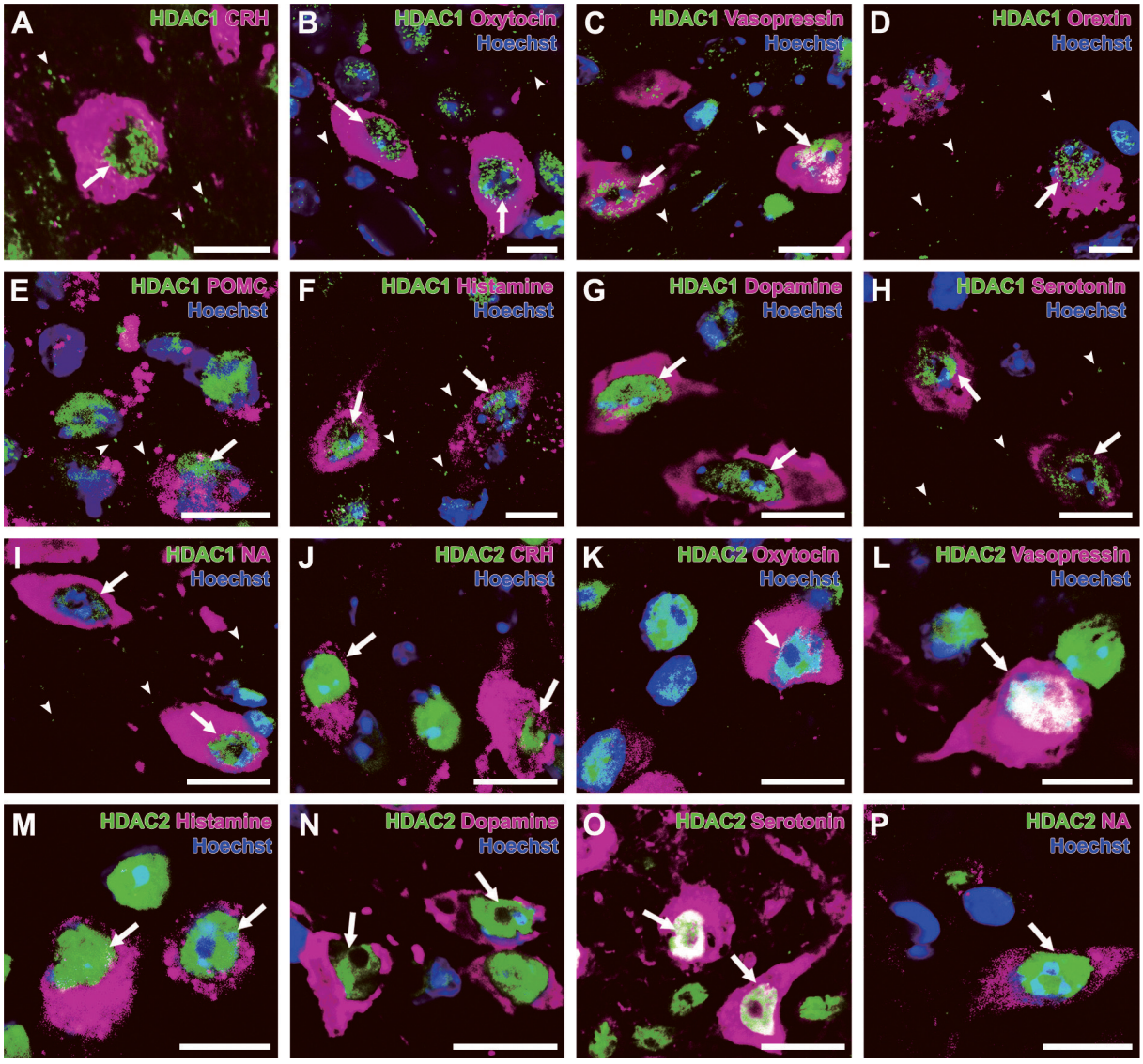


図 8. HDAC1，2 の発現（文献 6 より転載）
HDAC は緑で，各神経細胞マーカーはマジェンタで示している．青はヘキスト染色．CRH: 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン．スケールバー：10mm.

覚醒制御には多くの代償が働いた結果として理解されるが，遺伝子からスタートする研究の限界を示すものかもしれない．

この状況を打開するため，筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構（機構長 柳沢正史教授）では，睡眠異常という表現型をもとにして原因遺伝子を探るフォワード・ジェネティックス研究に取り組んでいる．具体的には，雄マウスに化学変異原エチルニトロソウレア（ENU）を腹腔内注射することから始まる．ENU の強い作用によって数ヵ月精子がつくられない時期の後に精子がつくられるようになるが，その精子の DNA には変異がランダムに入っている．この精子を使って IVF（体外受精）をして得られる仔は，父由来染色体に多数の遺伝子変異をもっている．この仔世代マウスの頭部に脳波筋電図測定ができる電極を外科的に装着して生じた多数のマウスに脳波筋電図電極を埋め込み，

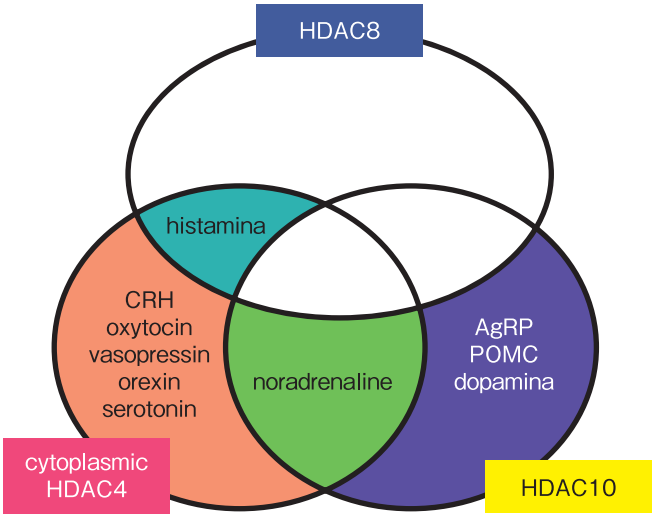


図 9. 神経細胞集団の HDAC 発現プロファイル（文献 6 より転載）

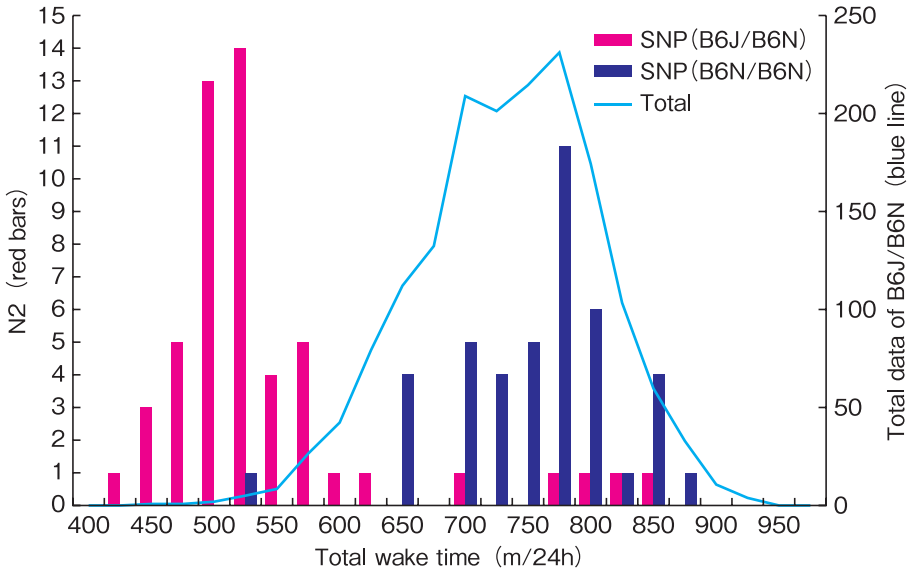


図 10. ある SNP マーカーと覚醒時間の分布（Funato H, Sato M, Miyoshi C et al：Neuro 2013, 学会演題より改変し転載）
この SNP マーカーに B6J 由来の多型をもつマウス（ピンク）の覚醒時間は，B6J 由来の多型をもたないマウス（ネイビー）の覚醒時間に比べて大幅に減少している．B6J 由来の多型をもたないマウスの覚醒時間は，マウス全体の覚醒時間分布と重なる．

睡眠覚醒に異常がないかを検討する．現在までに，睡眠異常スクリーニングを終えた仔世代のランダム突然変異マウスは 5,000 匹を超えており，最終的には 6,500 匹程度となる予定である．マウスを用いたこのような規模の研究はほかに存在しない．もし，仔世代マウスに睡眠覚醒異常が認められると，さらに交配させて孫世代マウスに睡眠異常がみられるかどうか検討する．孫世代においても仔世代と同様の睡眠異常が認められれば，遺伝子変異によって遺伝性に睡眠異常を示す家系が樹立されたと考える．この家系のマウスを用いて，リンケージアナリシスや候補遺伝子アプローチ，次世代シーケンスを用いたエクソームシークエンスを組み合わせた解析をすることによって，睡眠異常をもたらしている遺伝子変異を同定することができる．

睡眠異常を示すマウスが得られた場合，その仔世代マウスの睡眠覚醒を検討し，仔世代においても親と同様の睡眠異常がみられた場合に，睡眠異常家系が樹立できたとみなす．これまでに 10 家系以上の睡眠異常マウス家系を樹立することができた．その代表が，睡眠時間延長を示す *Sleepy* 変異家系である（図 10）．答えとなる遺伝子変異の同定まで 3 世代以上はかかるが，IVF を行った時点から，生まれたマウスが成長し手術をして脳波測定を終えて睡眠覚醒異常の判定ができるまでに 6〜7 ヵ月かかることから，3 世代でも 1 年半かかる．最近ようやく睡眠覚醒異常をもたらす遺伝子変異が同定できた．*Sleepy* 家系の遺伝子変異なので *Sleepy* 遺伝子変異と呼んでいる．この変異をヘテロ接合でもつマウスは野生型マウスに比べて顕著な覚醒時間の減少，ノンレム睡眠時間の増加を示す．目下，この *Sleepy* 遺伝子の機能について研究をすすめている．

文　献

1) Myers MG, Cowley MA, Münzberg H：Mechanisms of leptin action and leptin resistance. Annu Rev Physiol **70**：537–556, 2008.
2) Sakurai T：The neural circuit of orexin (hypocretin)；maintaining sleep and wakefulness. Nat Rev Neurosci **8**：171–181, 2007.
3) Hara J, Beuckmann CT, Nambu T et al：Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. Neuron **30**：345–354, 2001.
4) 船戸弘正：脳科学辞典；摂食制御の神経回路《http://bsd.neuroinf.jp/wiki/摂食制御の神経回路》
5) Funato H, Tsai AL, Willie JT et al：Enhanced orexin receptor–2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity. Cell Metab **9**：64–76, 2009.
6) Takase K, Oda S, Kuroda M et al：Monoaminergic and neuropeptidergic neurons have distinct expression profiles of histone deacetylases. PLoS One **8**：E58473, 2013.
7) Parmentier R, Ohtsu H, Djebbara-Hannas Z et al：Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice；evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control. J Neurosci **22**：7695–7711, 2002.

Enhanced orexin receptor–2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity

hiromasa Funato

Department of Anatomy, Toho University School of Medicine
International Institute for Integrative Sleep Medicine (IIIS),
Center for Behavioral Molecular Genetics, University of Tsukuba

Summary
The hypothalamic orexin neuropeptide acutely promotes appetite, yet orexin deficiency in humans and mice is associated with obesity. Prolonged effects of increased orexin signaling upon energy homeostasis have not been fully characterized. Here, we examine the metabolic effects of orexin gain of function utilizing genetic and pharmacologic techniques in mice. Transgenic orexin overexpression confers resistance to high-fat diet-induced obesity and insulin insensitivity by promoting energy expenditure and reducing consumption. Genetic studies indicate that orexin receptor–2 (OX2R), rather than OX1R signaling, predominantly mediates this phenotype. Likewise, prolonged central administration of an OX2R–selective peptide agonist inhibits diet-induced obesity. While orexin overexpression enhances the anorectic-catabolic effects of central leptin administration, obese leptin-deficient mice are completely resistant to the metabolic effects of orexin overexpression or OX2R agonist infusion. We conclude that enhanced orexin–OX2R signaling confers resistance to diet-induced features of the metabolic syndrome through negative energy homeostasis and improved leptin sensitivity.

Key words：orexin, metabolism, leptin, body, weight, HDAC

剖検症例から学ぶ疾病の転帰と病態生理

剖検症例 No.81～94

臨床現場で多くの患者さんを診断し治療する過程では，教科書だけでは学べない経験に基づく推論や知識も必要となります．若手医師は大学卒業後，研修病院で症例経験を重ねていきますが，患者さんが来院し種々の検査の後に診断を受けて治療が開始されるプロセスを経験するだけでは，最前線の病院で長く勤めてきたベテラン医師の臨床力にはなかなか到達できません．治療に伴う副作用や合併症あるいは病気の進行に伴って種々の病態が引き起こされて，患者さんが死にいたるまでの全過程を多く経験しているベテラン医師は，目の前にいる患者さんに起こりうるさまざまな病態の変化に対して，即座の推論のもとに検査を行い適切に対応しています．患者さんが診断・治療を受けた後，どのような経過をたどって最終的に死にいたるかという“疾病の転帰”を体験するためには，自分が診断した患者さんの，その後の経過を担当医としてすべて見届ける必要があります．しかしながら，そのような経験をできる環境は限られており，若い研修医時代においては，まず不可能に近いことだと思います．研修中には，患者さんの診断や治療にあたるか，治療後の病気の再発で来院した後を担当するか，死亡にいたる最終段階で患者さんを担当するかなど，“疾病の転帰”を部分的に経験するしかなく，多数の症例で部分的な経験を重ね合わせることにより“疾病の転帰”なるものを理解せざるをえないのが現状です．

研修期間中に自分が経験した病理解剖例の臨床経過と剖検所見をまとめることが義務づけられている大きな理由は，一人の患者さんが来院し死にいたるまでの全経過を俯瞰することで，“疾病の転帰”や病態生理を理解することにあります．しかしながら，研修医が経験できる症例は限られており，多種多様な疾病の転帰をこれからの診療に役立てるレベルにはなかなか達しないのが現状です．

「お茶の水醫學雑誌」では，とくに若手医師への教育的な観点から，病理解剖例の簡単なサマリーを紹介しています．日常診療の場で診断や治療に携わるような病気の患者さん達が，どのような経過をたどり死にいたったのか，経過中にどのような事態が発生したのかなどを，簡単に読み流す程度で理解できるような内容を掲載しています．通常作成されている病理解剖報告書ではなく，患者さんの臨床経過と病理所見との対応を意識して，豊富な画像所見を呈示しながら症例の概要を紹介します．

本企画では，とくに若い先生方に通常経験する症例の全経過を紹介することで，一般的な病気の転帰を効率的に理解いただきたいと考えています．このような病気のときには，こういう事態が発生しうるとか，病気の進行につれてどのような展開がありうるのかなど，若い先生方がこれから診療を行ううえで必ずや参考になるものと信じています．最後に，本企画に協力していただいている病理部の先生方や病理学関連分野の先生方には紙面を借りて御礼申し上げます．

編集長 江石義信

症例 No. 81　ACNA 関連血管炎の治療中に真菌感染を合併し死亡した症例

剖検依頼科：膠原病内科

【概要】 これまでとくに健診や医療機関への受診歴はない 76 歳・男性である．2 ヵ月ほど前から発熱，炎症反応高値，腎機能障害が出現した．血液検査で MPO-ANCA 陽性であり，ANCA 関連血管炎と診断され治療を開始したが，呼吸状態が悪化し，徐々に血圧低下をきたして死亡した．剖検では，顕微鏡的多発血管炎（MPA）に合致する所見であった．両肺にはアスペルギルス感染が著明であり，左下葉は著しい壊死性肺炎に陥り，さらに真菌血症となっていた．原病（血管炎）の治療のため，ステロイド・免疫抑制薬を使用せざるをえない状況で，急速に感染症が悪化し死亡した症例である．

【症例】 76 歳，男性．

主　訴：発熱，呼吸困難．

既往歴：6 歳時，肺結核．

【臨床経過】

1 ヵ月前：38℃ の発熱．血液検査で CRP 16mg/d*l*，Cre1.7mg/d*l* と炎症反応が高値で，および腎機能障害を認めた．感染症を疑い，抗菌薬を投与されたが，症状は改善しなかった．尿検査で，潜血 3+，尿蛋白 3+，血液検査で MPO-ANCA 陽性（193U/m*l*）であり，ANCA 関連血管炎と診断した．

1 日前：ステロイドの内服開始．

入院当日：排便後より呼吸困難，喘鳴が出現した．肺水腫による急性心不全の診断であった（図 1）．しかし酸素化せず，同日精査治療目的で当院へ転送となった．

入院後：ステロイド内服を継続としたが，炎症反応は改善しなかった．

1 週間後：シクロホスファミド投与．喀痰の培養により MRSA，緑膿菌を検出した．

10 日後：アスペルギルス抗原およびカンジダ抗原は陽性であった．

2 週間後：徐々に血圧・酸素化は低下し（図 2），死亡した．

【検索希望事項】

肺の状態，血管炎・CMV 感染の有無，死因．

【剖検診断】

1. 顕微鏡的多発血管炎（ステロイドおよび免疫抑制薬治療後）と日和見感染症．

【剖検所見】

A. 顕微鏡的多発血管炎（ステロイドおよび免疫抑制薬治療後）

1. 血管炎の状態（図 3）

肉眼的に，両側ともに皮髄境界はやや不明瞭となる．梗塞（−）．組織学的には，左右腎の小葉間動脈のレベルで動脈壁の弾性板の断裂，フィブリノイド変性，内腔の閉塞，再疎通像がみられる．周囲に比較的ヘモジデリンの沈着は目立たない．被膜直下には全節性に硬化した糸球体が散見されるとともに，糸球体の 3〜4 割において，細胞性〜一部線維性半月体の形成を認める．そのほか肝，脾，副腎，膀胱周囲，精巣などに血管炎後の変化があった．

2. 日和見感染症

a. 侵襲性肺アスペルギルス症および真菌血症（図 4）：左肺下葉底区を主体に，広汎に灰白色調領域が広がる．内部には空洞形成を伴う．組織学的には，同部位に一致して，肺胞腔内に壊死物・滲出物が充満しており，Grocott 染色で無数のアスペルギルスと考えられる真菌が認められる．血管侵襲像（太いレベルの肺動脈）が目立つ．右肺下葉においても，軽度であるが同様の炎症所見および真菌の定着を認める．肺組織培養では，両肺から *A. flavas* が検出された．そのほか心筋や甲状腺内に膿瘍形成があった．肺動脈弁および肺動脈弁直下の心内膜に真菌塊を伴う疣贅の付着がある．

b. サイトメガロウイルス（CMV）感染症：肺の炎症巣内部，および胃粘膜の一部に核内封入体がみられ，サイトメガロウイルス抗体の免疫染色により陽性像が認められる．

【病理所見まとめ】

1. 多臓器の小血管（細動脈）レベルの血管に血管炎あるいは血管炎後の変化が認められた．なかでも腎臓には小葉間動脈レベルの小血管に障害が多数認められるとともに，半月体形成を伴う糸球体腎炎が認められた．中型〜大型の動脈に炎症所見は認めず，臨床像と合わせ，顕微鏡的多発血管炎（MPA）に合致する所見である．
2. MPA では肺胞壁の毛細血管炎によるびまん性肺胞出血を併発する（30〜70%）ことがよく知られているが，本例に明らかな毛細血管炎は認められなかった．
3. 両肺にはアスペルギルス感染が認められ，とくに左下葉は著しい壊死性肺炎に陥っていた．血管侵襲像に加え，心筋や甲状腺などにも真菌感染が認められた．
4. サイトメガロウイルス感染については，肺の炎症巣内や胃粘膜に感染の所見が認められた．
5. 直接死因は，原病（血管炎）の治療のため使用せざるをえなかったステロイド・免疫抑制薬を背景とした侵襲性肺アスペルギルス症および真菌血症に伴う敗血症性ショックである．

臨床画像

図 1．胸部 CT（入院時）．肺門部優位の浸潤影と胸水貯留を認める．

図 2．胸部 CT（入院 2 週間後）．左下葉に浸潤影の増悪を認める．

病理画像

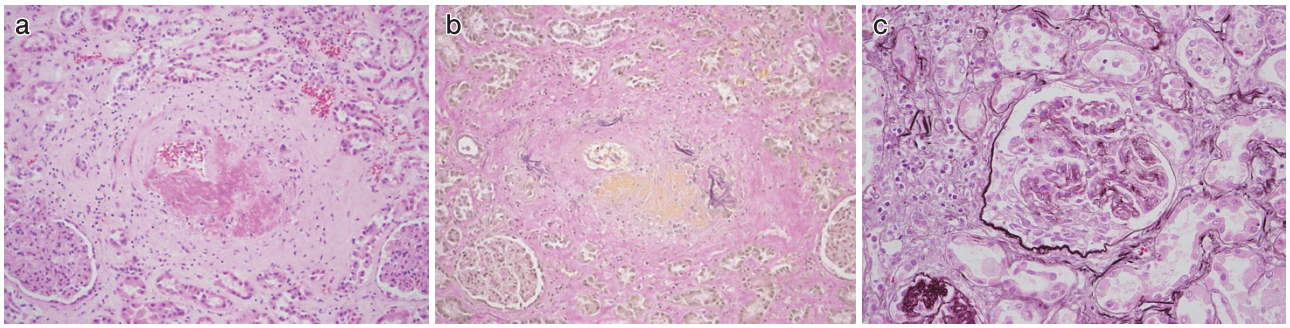


図 3．剖検時の腎病理組織像（a：HE 染色，b：EVG 染色，c：PAM 染色）．a，b：動脈壁の弾性板は断裂し，フィブリノイド変性を伴う．c：糸球体には細胞性～一部線維性半月体の形成を認める．

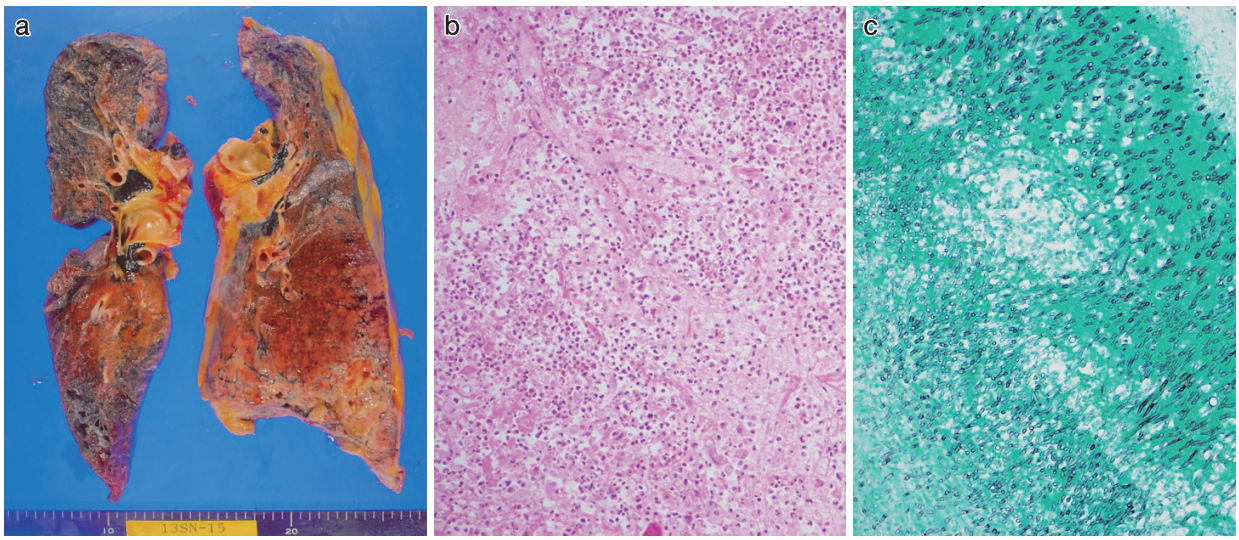


図 4．剖検時の肺摘出肉眼標本（a），病理組織像（b：HE 染色，c：Grocott 染色）．左肺下葉底区を主体に広範に灰白色調領域が広がり，同部位に一致して著明な炎症細胞浸潤とともに，Grocott 染色により無数のアスペルギルス真菌菌糸が認められる．

症例 No. 82　術後イレウスに対し解除術を施行後，数日間で腎機能障害，肝障害が出現し死亡した症例

剖検依頼科：練馬光が丘病院消化器外科

【概要】 直腸癌の術後 15 年目にイレウスを発症し，イレウス解除術を施行した．術中に小腸を穿孔したが手術は問題なく終了した．術後，硬膜外麻酔導入を契機に血圧が不安定となり，その後，腎機能低下，肝機能低下をきたし死亡した．剖検所見では，腹膜炎の残存とともに，肝臓の広範な壊死がみられた．肝機能低下の発症契機からは，腹膜炎により播種性血管内凝固症候群（DIC）を発症し肝臓壊死をきたした可能性が考えられたが，硬膜外麻酔による血圧低下によって肝臓壊死が引き起こされた可能性も残り，原因の特定にはいたらなかった．

【症例】 81 歳，男性．

主　訴：嘔吐，食事摂取不可能．

家族歴：特記すべきことはない．

既往歴：糖尿病性腎症，多発性脳梗塞，脳血管性パーキンソニズム，65 歳時に直腸癌手術．

生活歴：喫煙歴，飲酒歴はない．

【臨床経過】

入院 2 日前：嘔吐が出現した．その後排便がなく，食事摂取困難となる．

入院当日：精査の結果（図 1），腸閉塞の診断で入院となる．経鼻胃管挿入，絶食により経過観察とした．

3 日後：改善がないためイレウス管を挿入し，造影により小腸内の造影剤停滞を確認した．

5 日後：腹腔鏡下イレウス解除術施行．術中に小腸の穿孔確認，開腹に切り替え修復し，手術を終了した．術後，硬膜外麻酔を導入したところ血圧が低下し，呼吸状態が悪化し人工呼吸器管理となる．

6 日後：腎機能が低下し，透析（SHDF7 時間）施行．その後状態は安定したが，硬膜外麻酔導入後，再度血圧が低下した．

7 日後：重度の肝障害，凝固異常，代謝性アシドーシスが出現した．再度透析を行ったが改善しなかった．

8 日後：状態はそのまま悪化した．心室細動をきたし，死亡した．全経過 10 日間である．

【検索希望事項】

直接死因，心筋の状態，門脈血栓症の有無．

【剖検診断】

1. 術後小腸イレウス，小腸穿孔修復後，化膿性汎発性腹膜炎．
2. 広汎肝臓虚血壊死，直腸吻合部壊死．
3. 直腸癌術後治癒．
4. 前立腺 latent 癌．
5. 糖尿病性腎症．

【剖検所見】

1. 術後小腸イレウス，小腸穿孔修復後，化膿性汎発性腹膜炎
   肉眼的に小腸腸間膜に強い癒着があり，数ヵ所修復後の穿孔部があり，穿孔部の離解はみられない（図 2）．腹水は 800m*l* で膿性のものも混在していた．組織学的にも縫合不全の徴候はみられないものの，強い好中球浸潤が残存しており，菌塊の付着を伴う（図 3）．また，縫合部以外の個所でも，腹膜には広範な化膿性腹膜炎の所見がある．
2. 広範肝臓虚血壊死
   肝臓は地図状にやや白色調となる個所が広範に広がっており（図 4），組織学的にはこうした個所は肝細胞は凝固壊死に陥っている（図 5）．残存肝組織と思われる赤褐色調個所は散在性に認められるのみである．
3. 直腸吻合部壊死
   直腸吻合部の口側 9cm にわたり，全周性に組織が壊死に陥っている．直腸癌の再発はみられない．
4. 前立腺 latent 癌
   死後変化が強く判定がむずかしいが，前立腺内に Gleason score 3+3 の腺癌がある．pT2aN0M0 に相当する．
5. 糖尿病性腎症
   糸球体内に fibrin cap や capsular drop などの滲出性変化が強くみられ，硬化に陥る糸球体も目立つ．
6. その他
   心臓に求心性肥大があり，虚血性変化はみられない．

【病理所見まとめ】

1. 臨床的には DIC の診断であったが，組織学的には微小血栓を指摘できず，DIC を証明するにいたらなかった．化膿性汎発性腹膜炎の存在し，DIC の原因となったものと推測される．広範な肝臓壊死の原因としては，肝機能低下の発症契機を考慮すると，腹膜炎による DIC によって肝臓壊死をきたした可能性が考えられるが，硬膜外麻酔による血圧低下によって肝臓壊死をきたした可能性も残り，確定は困難であった．ただし，壊死のパターンは，いわゆるショック肝にみられる肝静脈周囲中心の壊死とはやや異なるようにみえ，前者のほうがより考えやすい．
2. 死亡直前に起きた心室細動に関しては，死亡直前のショック状態による虚血を反映していたものと推測される．直腸の吻合部壊死も同様と思われる．
3. 臨床的には門脈血栓症による肝臓壊死が疑われたが，剖検時には門脈内に血栓は確認できなかった．

臨床画像

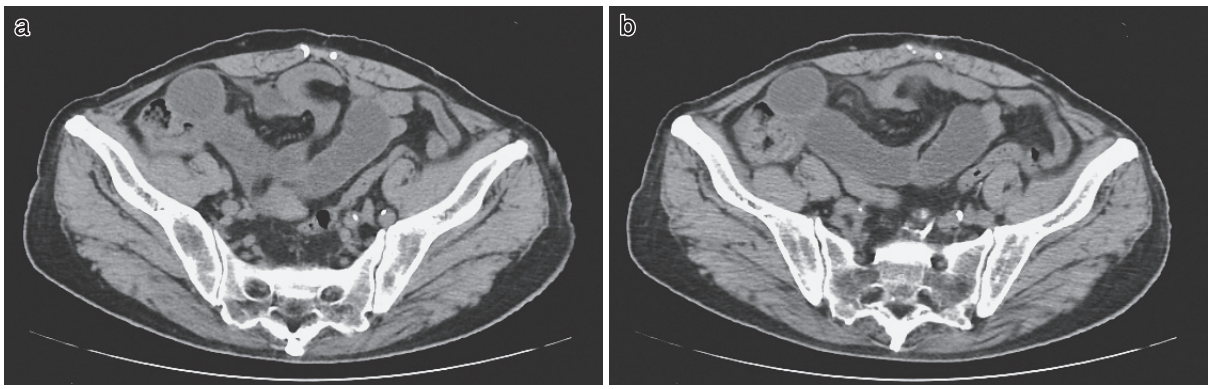


図 1. 入院時の腹部 CT. Caliber change を伴う小腸拡張を認める. Closed loop や腸管浮腫は認めない.

病理画像

図 2. 摘出肉眼標本（1）. 小腸修復部ホルマリン固定後. 縫合不全は認められない

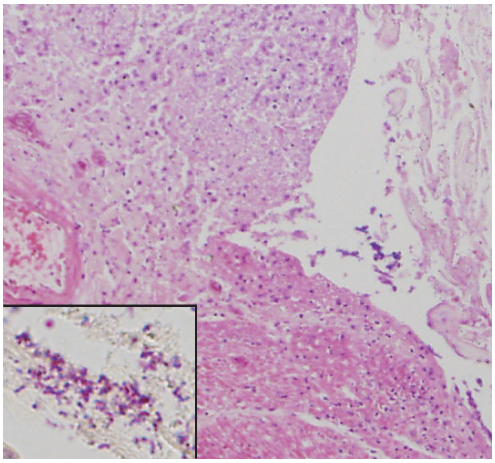


図 3. 小腸縫合部の病理組織像（HE 染色）. 急性炎症は残存し, Gram 陰性桿菌が付着している（左下囲み：Gram 染色）

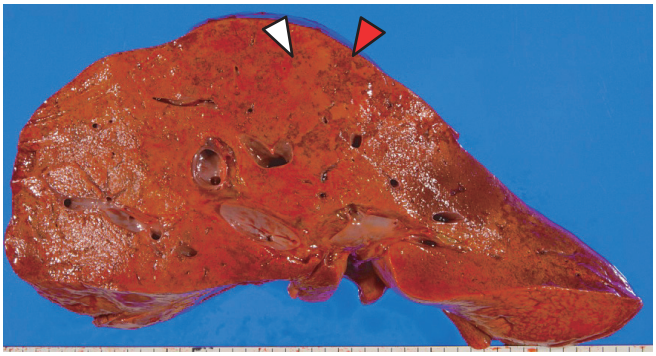


図 4. 摘出肉眼標本（2）. 肝臓生割面. 赤褐色調個所（赤矢頭）は肝細胞が残存するが, やや白色調の個所（白矢頭）は肝細胞が広範に壊死している.

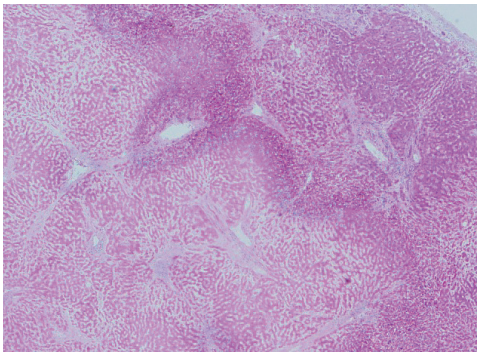


図 5. 病理組織像（HE 染色）. 肝細胞の壊死. 左下方向は肝細胞がほぼ全域で壊死している.

症例 No. 83　血球貪食症候群で，化学療法中に突然心室細動が出現し死亡した腫瘍化を伴う慢性活動性 EB ウイルス感染症の症例

剖検依頼科：血液内科

【概要】 10 年前に慢性活動性 EB ウイルス感染症（CAEBV）と診断されており，4 ヵ月前に CAEBV の悪化と血球貪食症候群を発症し，化学療法を行ったが血球貪食症候群のコントロールが困難で骨髄移植施行前に死亡した．解剖時には画像で指摘されていた肺の結節をはじめ，肝臓，脾臓，腸管，心臓など全身の臓器に異型の強い腫瘍細胞の浸潤がみられた．小腸の浸潤巣は潰瘍化し，消化管出血をきたしていた．骨髄では血球貪食像が目立った．CAEBV は予後不良な比較的まれな疾患であり，本例では血球貪食症候群の発症と腫瘍化により治療が困難であった．

【症例】 28 歳，女性．

主　訴：発熱，肝機能障害．

既往歴：伝染性単核球症．

生活歴：機会飲酒，喫煙歴はない．

【臨床経過】

死亡 10 年前：39℃ の発熱，倦怠感，頸部リンパ節腫脹があり，近医で伝染性単核球症と診断された．その後も微熱が持続し肝機能障害も認めたため精査し，慢性活動性 EB ウイルス感染症（CAEBV）と診断した．

1 年前：心窩部痛を自覚した．

4 ヵ月前：他院で上部消化管生検時に出血によりショック状態をきたし緊急入院となった．入院時，脾腫と汎血球減少，EBV-DNA 増加，フェリチン高値から CAEBV の悪化と血球貪食症候群が疑われた．当院転院後，化学療法を開始し，炎症反応は低下し，肝酵素も漸減した．

3 ヵ月前：再び肝酵素上昇と血球貪食症候群の再燃を認め，EB ウイルス量の低下もみられず，化学療法を開始した．

2 ヵ月前：胸腹部造影 CT で左肺舌区と右肺 S10 に結節影を認め（図 1），真菌による感染を疑い抗生物質の内服を開始したが，結節影は増大し，CT ガイド下生検にて異常リンパ球浸潤があり，CAEBV の臓器浸潤と判断した．

1 ヵ月前：化学療法のプロトコルを変更したが，血球貪食のコントロールが困難であった．移植のドナーが得られず，臍帯血造血幹細胞移植を 5 月を目処に行う方針とした．

死亡前日～当日：午後から倦怠感を訴え，翌日未明より黒色便を数回認めた．朝の診察で頻脈，頻呼吸を認めたが，意識は保たれていた．40 分後に心電図で心室細動の波形を認め，蘇生を試みたが死亡した．

【検索希望事項】

原疾患の広がりと状態，直接死因（心室細動の原因）．

【剖検診断】

1. NK-cell type CAEBV/TNK-lymphoproliferative disorders with overt leukemia/lymphoma.
2. 血球貪食症候群．

【剖検所見】

A. NK-cell type CAEBV/TNK-lymphoproliferative disorders with overt leukemia/lymphoma

1. 既往：死亡 1 ヵ月半前の肺生検，NK/T cell neoplasm of the lung，biopsy.
2. 病変部組織像：腫瘍細胞は中型～一部大型で，核は不明瞭な核小体を有し，くびれを伴って不整形を呈する．時に多核様の大型細胞も混在する．びまん性ないし結節状に浸潤し，壊死をきたす部分もあり，核片が目立つ．免疫染色結果（図 2）は CD3(+)，CD56(+)，CD5(−)，CD7(−)，CD4(+)，CD8(+)，CD20(−)，CD30(±)，TIA1(+)，GranzymeB(+)，EBV-ISH(+)．
3. 原疾患の広がり：肉眼的臓器浸潤

   肝臓：門脈域および中心静脈周囲を主体に浸潤し，下大静脈近傍に 1.5cm 大の不明瞭な結節性病変の形成がある．

   脾臓：著明に腫大し，割面では白皮髄の構造が不明瞭となる．組織学的には白皮髄を置換するような浸潤が主体である．

   肺（図 3）：左上葉と右下葉に境界明瞭な結節性浸潤巣がある．臓側胸膜に浸潤し胸腔に濾出する．周囲にも散在性に浸潤する．

   腸管（図 4）：腫瘍細胞の浸潤による小潰瘍性病変が回盲弁より 150cm 口側，回腸末端（1.5cm 大），大腸に散在性にみられる．

   心臓（図 5）：心室中隔の 1cm 大を最大として左室壁主体に結節状に浸潤し，結節部以外にも散在性に浸潤する．

   リンパ節：頸部や縦隔，腸間膜などにほぼ腫瘍細胞に置換された 1cm 程度に腫大するリンパ節を多数認める．

   顕微鏡的臓器浸潤：腎臓，骨髄，膵臓，乳腺，副腎，副甲状腺にはいずれも比較的少量の腫瘍細胞が浸潤する．
4. 関連所見

   腸管出血：回腸小潰瘍より口側の部分では，腸管内容に血液が混入するが，解剖時の腸管内血液量は多くない．

   血球貪食症候群：骨髄で血球貪食像が目立つ．

【病理所見まとめ】

1. 原疾患について：診断名については，経過や臨床所見から慢性活動性 EBV 感染症の診断基準を満たしており，解剖時点では浸潤細胞の異型が強く，多臓器への浸潤がみられることから，腫瘍化していると判断され上記診断名（Int J Oncol 24：1165-1174, 2004）とした．
2. 直接死因について：死亡朝の時点での頻脈，頻呼吸は，腸管からの出血や血球貪食症候群による貧血であったと推測されるが，直接の死因となった心室細動の誘因としては，腫瘍細胞の心臓浸潤が関与したと考える．
3. その他：死亡 1 ヵ月半前の生検では採取された腫瘍量が少なく確定できなかったが，剖検時の所見と比較すると，この時点ではすでに腫瘍化していたと考えられた．

臨床画像

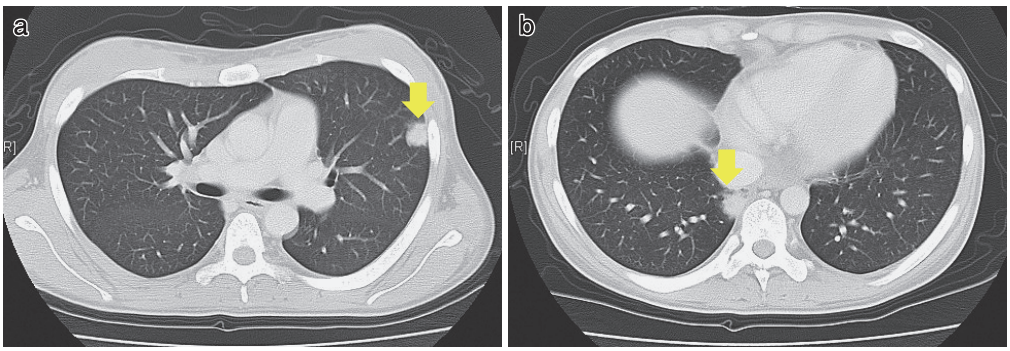


図 1．胸部造影 CT．左肺舌区と右肺 S10 に結節影（矢印）がみられる．

病理画像

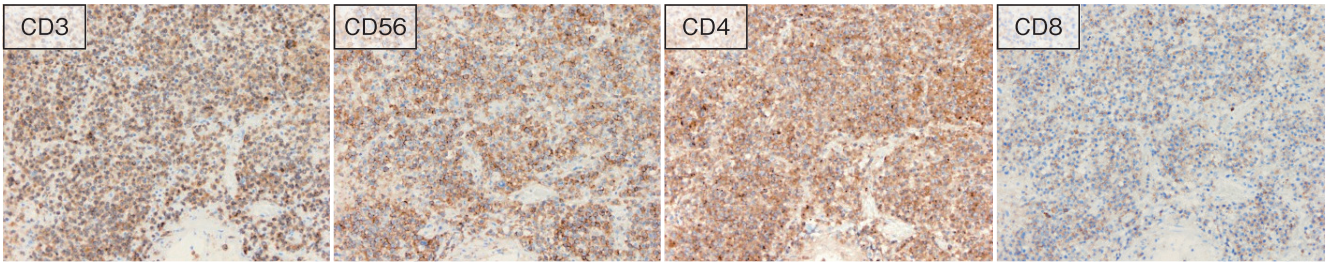


図 2．病理組織像（1）．免疫染色結果．CD3(＋)，CD56(＋)，CD4(＋)，CD8(＋)．

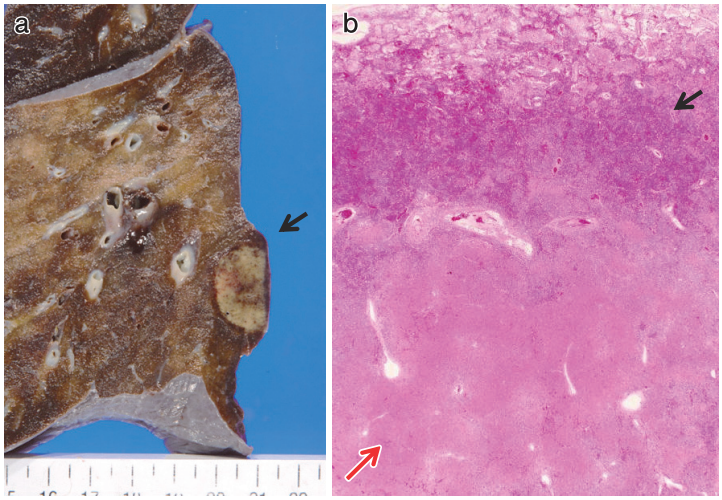


図 3．摘出肉眼標本・病理組織像（1）．a：右肺割面，S10 の結節性病変（矢印），b：中心は壊死し（赤矢印），周辺には出血を伴う（黒矢印）［HE 染色］．

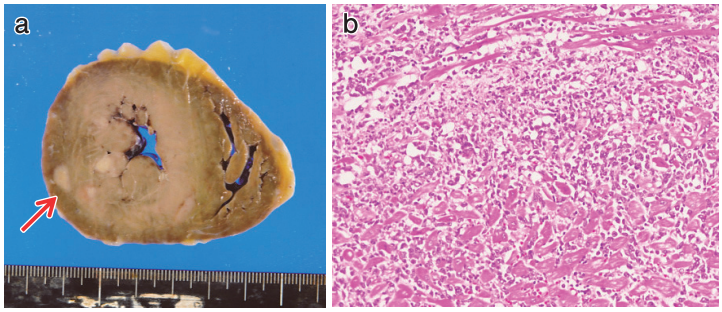


図 5．摘出肉眼標本・病理組織像（3）．a：心臓割面．数個の白色結節，b：心筋間に腫瘍が浸潤し，心筋は変性脱落する．

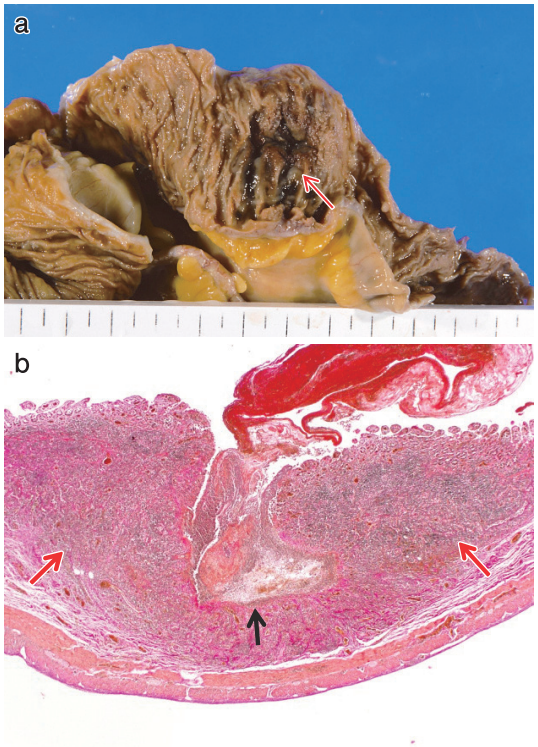


図 4．摘出肉眼標本・病理組織像（2）．a：回盲部潰瘍性病変（赤矢印），b：粘膜下層の浸潤巣中心（赤矢印）に深掘れ潰瘍（黒矢印）を形成する（EVG 染色）．

症例 No. 84　Myeloid NK-T precursor cell leukemia が疑われ，治療中に敗血症，真菌感染症，ウィルス活性化をきたし死亡した症例

剖検依頼科：血液内科

【概要】 頸部腫瘤で発症し，T-lymphoblastic lymphoma（T-LBL）の診断で化学療法，非血縁者骨髄移植を繰り返していた症例である．治療中，CD3，5 など T 細胞性の表面マーカーが陰性化しており，CD33 陽性であったことから myeloid NK-T precursor cell leukemia に相当する腫瘍の可能性が疑われた．最終的には化学療法および移植片対宿主病（GVHD）に対するステロイド使用による免疫不全の状態下で敗血症，真菌感染症，ウイルス活性化により全身状態が悪化し，死にいたった症例である．骨髄移植患者における GVHD 発症時のコントロールのむずかしさがうかがわれる．

【症例】 30 歳，男性．
主　訴：頸部腫瘤，
家族歴：父方の祖父は糖尿病，母方の祖父は脳梗塞，父は胃癌．
既往歴：18 歳時に膝半月板損傷，25 歳から 2 型糖尿病．
生活歴：喫煙歴，飲酒歴ともにない．

【臨床経過】
入院 4 年 1 ヵ月前：頸部腫瘤および白血球減少で発症し，LBL stage Ⅳの診断により化学療法を開始し，8 ヵ月後 CR を得た．
3 年 2 ヵ月前：1 回目の非血縁者骨髄移植を施行したが，11 ヵ月後に再発した．
1 年 10 ヵ月前：2 回目の非血縁者骨髄移植を施行した．
入院当日：再発の診断で，化学療法およびドナーリンパ球注入（DLI）を施行した．
6 ヵ月後：3 回目の非血縁者骨髄移植を施行し CR を得た．
8 ヵ月後：GVHD を発症し，ステロイド治療を開始した．その後，肺アスペルギルス症，cytomegalovirus（CMV），Epstein-Barr virus（EBV），JC virus，BK virus の再活性化を認めた．
9 ヵ月 11 日後：敗血症による意識障害が出現し，2 日後に痙攣が出現した．CT では血腫は認めなかった（図 1）．肺病変も悪化していた（図 2）．
9 ヵ月 15 日後：消化管出血が出現した．
9 ヵ月 18 日後：徐々に全身状態が悪化し死亡した．全経過 4 年 9 ヵ月．

【検索希望事項】 感染症の状態・原因，痙攣の原因，リンパ腫/白血病の状態，GVHD の状態．

【剖検診断】
1. Immature lymphoid/myeloid cell neoplasm 移植後，化学療法後の状態．
2. GVHD 治療後．
3. 日和見感染症：侵襲性肺アスペルギルス症，JC virus/BK virus 再活性化の疑い，敗血症．
4. くも膜下出血．

【剖検所見】
A. Immature lymphoid/myeloid cell neoplasm
1. 過去検体：初発時の異型細胞は CD3，CD5，CD7，CD33，CD56，TdT 陽性，CD20 陰性であったが（図 3，4），2 回目の骨髄移植後再発時は CD3，CD5 は陰性化していた．3 回目の骨髄移植後には異型細胞は確認できなかった．
2. 剖検時所見：全身のリンパ節に腫大がみられるものの，組織学的にリンパ球はほとんど消失しており，骨髄を含め腫瘍細胞は確認できなかった．
3. 治療関連所見：GVHD 治療後，死亡 1 ヵ月前の検体には下行結腸～直腸粘膜上皮にアポトーシス像の増加を認めたが，剖検時には確認できなかった．
4. 日和見感染症：侵襲性肺アスペルギルス症，消化管カンジダ症，JC virus/BK virus 再活性化の疑い，敗血症
・右肺下葉に 4cm 大膿瘍（図 6）と，気管まで連続する偽膜様の滲出物があった．膿瘍部および両肺にアスペルギルスの菌糸が散見する．
・胃・小腸・大腸に多数のびらん潰瘍．血管内およびその周囲に *Aspergillus* の増殖がある．小腸では組織破壊が強く，表層～粘膜下層までの領域が全体に壊死に陥っており（図 7），表層にはカンジダもみられる．腸管内容は血性であった．
・膀胱，腎盂，尿管の壁肥厚・壊死，出血（図 8），小腸粘膜上皮の decoy cell 様変化（図 7）などウイルス感染が示唆される．
・剖検時の血液培養から *Staphylococcus* を検出した．

B. くも膜下出血
脳は respirator brain の状態で，右側頭葉～頭頂葉にくも膜下出血があり，組織学的には神経細胞に虚血性変化が目立つ．

【病理所見まとめ】
1. 当初，T-LBL と診断されていたが，組織学的にはリンパ球系あるいは骨髄球系の中間的な性質をもつ腫瘍と思われ，腫瘍の lineage の確定は困難であった．ただし，CD7，CD33，CD56，TdT が一貫して陽性である点からは，現在提唱されている myeloid/NK cell precursor acute leukemia という概念に属する腫瘍の可能性があると思われる．剖検時には腫瘍の残存は認めなかった．
2. 剖検時の血液培養から *Staphylococcus* が検出され，敗血症であった可能性があるが，汎血球減少により組織反応がみられなかったものと推測される．感染源としては，真菌およびウィルスにより破綻した気道，消化管，尿路粘膜いずれも考えられる．
3. 剖検時には GVHD を示唆する所見はみられなかった．
4. 痙攣発症時に CT 上血腫はみられず，くも膜下出血が原因とはしがたい．敗血症に伴う全身状態悪化を反映したものと推測する．

臨床画像

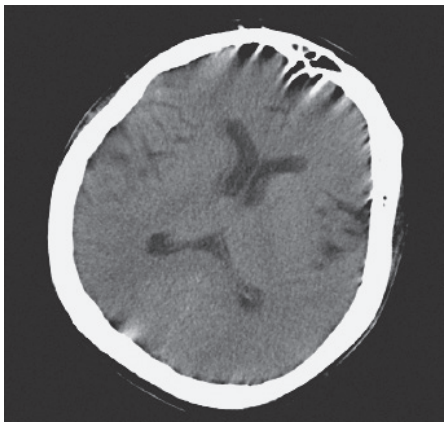


図 1. 痙攣出現時の頭部 CT. 明らかな血腫は認めない.

図 2. 痙攣出現時の胸部 CT. 両側肺野に強い浸潤影，すりガラス影を認める.

病理画像

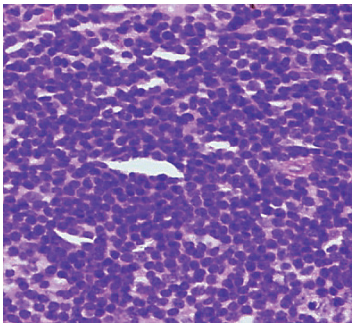


図 3. 病理組織像（1）. 1 回目再発時リンパ節（HE 染色）. 中型のリンパ球がびまん性に増殖している

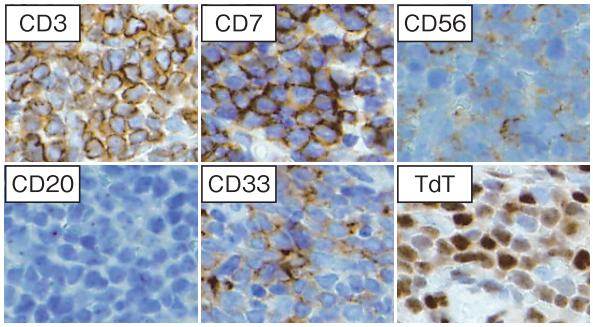


図 4. 病理組織像（2）. 1 回目再発時リンパ節（免疫染色）. LBL としても合致する所見であるが，一方で骨髄球マーカーの CD33 が陽性である.

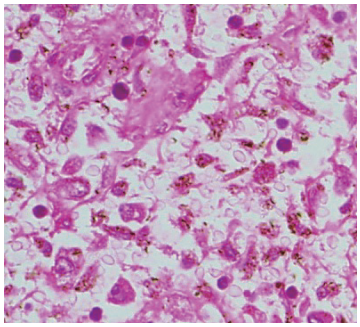


図 5. 病理組織像（3）. 剖検時腫大リンパ節（HE 染色）. リンパ球はほぼ消失しており，治療効果によるものと思われる.

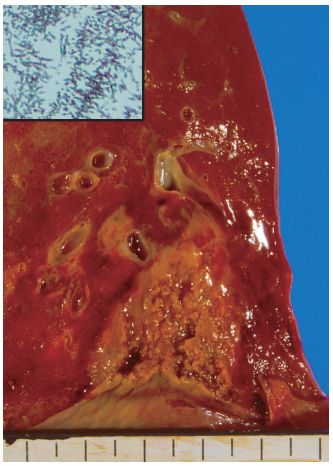


図 6. 摘出肉眼標本（1）. 右肺下葉の膿瘍. アスペルギルスによる膿瘍形成，左上囲みは Grocott 染色で，菌糸が黒く染まる.

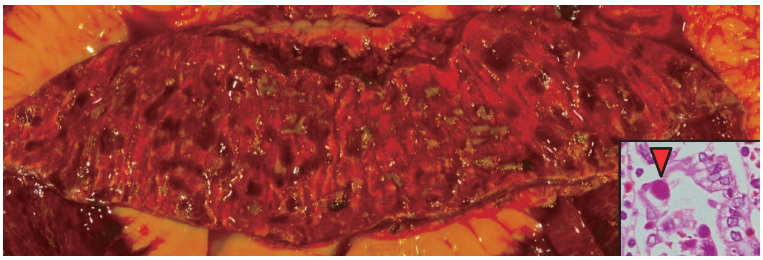


図 7. 摘出肉眼標本（2）. 広範小腸壊死. 真菌およびウィルス感染によるものと推測される. 右下囲みは decoy cell（赤矢頭）[HE 染色].

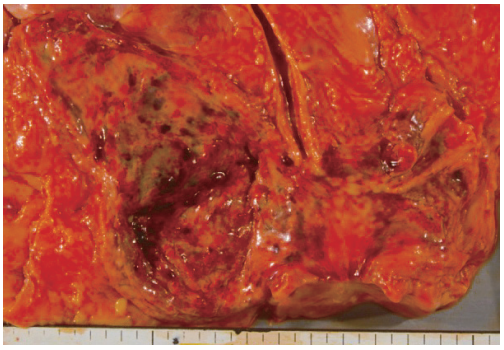


図 8. 摘出肉眼標本（3）. 出血性膀胱炎，尿管炎. JCV/BKV の関与が考えられた.

症例 No. 85　左乳癌肝転移の化学療法中に重症肺炎を起こし感染性ショックにより死亡した症例

剖検依頼科：乳腺外科　　臨床担当医：中川剛士，細矢徳子，七松　東

【概要】

初診時に皮膚潰瘍・浸潤を伴った進行乳癌で，化学療法を行ったが他臓器への転移も伴い，重篤な肺炎と敗血症を合併し全経過 2 年で死亡した症例である．化学療法中の骨髄抑制による好中球の減少を背景に，肺炎の発症・重症化をきたしたと考えられる．胸膜炎にいたるほどの重度の肺炎から敗血症となり，敗血症性ショックおよびびまん性肺胞傷害（DAD）をきたし呼吸不全で死亡したと考えられる．

【症例】 62 歳，女性．

主　訴：左乳癌肝転移化学療法中の発熱．

家族歴：特記すべきことはない．

既往歴：Basedow 病（6 年前からチアマゾールを内服中），高血圧（降圧薬内服治療中）．

生活歴：喫煙歴は過去にあるが現在はなく，飲酒歴はない．

【臨床経過】

2 年前：左乳房腫瘤を自覚した．

1 年前：腫瘍の増大を自覚し，他院を初診した．皮膚潰瘍を伴う左乳癌，cT4cN3M1（肺）stage Ⅳと診断される．

11 ヵ月前：治療目的に当院を紹介され受診した（図 1）．化学療法の方針となる．Bmab＋w–PTX を開始した．

6 ヵ月前：局所の増大と LDH 上昇を認めたため中止した．カペシタビンを開始した．

1 ヵ月前：疼痛・潰瘍の増大を認めたためカペシタビンを中止し EC 療法を開始した．直後より食欲不振が出現した．

入院時：39.8℃ の発熱があり，当院に救急要請．WBC100/μ 以下により発熱性好中球減少症と診断され，当科に入院した．

2 日後：酸素化不良が進行し，胸部 X 線像で肺炎像を認め抗生物質の投与を開始した（図 2）．同日，酸素化不良が進行，血圧低下があり，敗血症性ショック，DIC の併発と判断し，気管挿管後 ICU に転棟し集中管理を開始した．

20 日後：病態の改善は乏しく（図 3），血液透析は行わなかった．同日夜，徐脈，血圧低下，心停止にいたった．

【検索希望事項】

乳癌の広がり，骨髄の状態，貧血の原因，肺炎の程度，肺以外の感染巣の有無，急性腎不全の原因，遷延した DIC の原因．

【剖検診断】

1. 左乳癌（肝，肺，リンパ節転移）．
2. 右肺中葉膿瘍，化膿性胸膜炎，器質化肺炎，びまん性肺胞傷害（滲出期）．

【剖検所見】

A　左乳癌とその広がり（図 4）

1. 原発巣：左乳房は乳頭部（E 領域）を中心に 8×7cm 大の皮膚潰瘍の形成を伴った 10cm 大の腫瘍性病変を認める．大胸筋への浸潤がある．組織型は invasive ductal carcinoma，sci，核グレードは 2（nuclear atypia 2＋，mitotic counts 2＋），治療効果判定は grade 1b である．
2. 転移：肝（1,380g）転移の 3cm 大まで多数．右肺下葉に 2mm 大の転移巣 1 個．リンパ節転移は左右腋窩，膵周囲，右傍気管支周囲．

B　敗血症に伴う所見

1. 右肺中葉膿瘍，化膿性胸膜炎，器質化肺炎，びまん性肺胞傷害（625/855g）．
   右中葉から下葉に含気の低下と硬化を認める．左下葉を主体に同様の変化がある．左右気管支粘膜は発赤し，内部には粘稠な膿性痰がある．組織学的には硬化した部分には器質化肺炎の像を認める（図 5）．一部硝子膜の出現を伴う滲出期のびまん性肺胞傷害を認める．右中葉に 4×2×3cm 大の膿瘍の形成があり（図 6），一部が破綻し胸膜に化膿性胸膜炎をきたしている．黄色透明な胸水がある（左 900/右 100m*l*）．右肺中葉からの肺細菌培養は陰性．
2. 過形成性骨髄（C：F=5：1，M：E=5：1）：成熟した顆粒球が多数含まれる．赤芽球島の形成があり，巨核球はやや少ない．
3. 脾腫（250g）：多数の好中球浸潤を伴う．
4. 急性腎盂腎炎（225/200g）：糸球体・尿細管はおおむね保たれる．一部尿細管と間質に好中球の浸潤巣がある．

【病理所見まとめ】

1. 乳癌の広がり：大胸筋への浸潤を伴う浸潤性乳管癌．肝と肺，リンパ節への転移を認めた．化学療法の効果は軽度～中等度である．
2. 骨髄の状態，貧血の原因：過形成性骨髄（感染に伴う）．貧血の原因は，はっきりした出血源はなく，慢性炎症に伴う貧血と考える．
3. 肺炎の程度：右肺中葉には膿瘍の形成および化膿性胸膜炎を認めた．肺全体に器質化肺炎およびびまん性肺胞傷害を認めた．
4. 肺以外の感染巣の有無：腎盂腎炎を認めた．
5. 急性腎不全の原因：形態学的には尿細管および間質に好中球浸潤巣があった．膀胱や腎盂粘膜は炎症は乏しく，逆行性の炎症により敗血症に伴う血行性の腎盂腎炎を発症し，腎不全の遷延につながった可能性を考える．播種性血管内凝固症候群（DIC）による血栓は解剖時には認めなかった．
6. 遷延した DIC の原因：胸膜炎にまでいたる重篤な肺炎による敗血症が原因と考える．

臨床画像

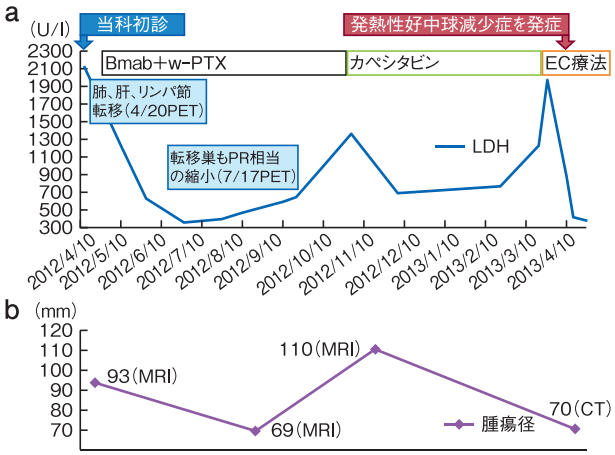


図 1. 乳癌の臨床経過. a：腫瘍マーカーの LDH の推移, b：CT 上での腫瘍径の推移.

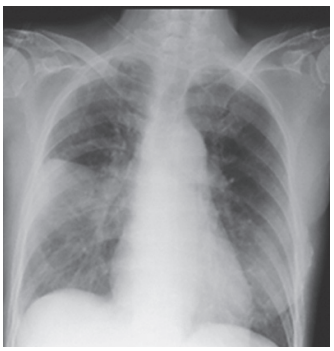


図 2. 入院 2 日後の胸部 X 線像. 右肺野の浸潤影がある.

図 3. 死亡直前の胸部 X 線像. ほぼ全肺野の透過性低下がある.

病理画像

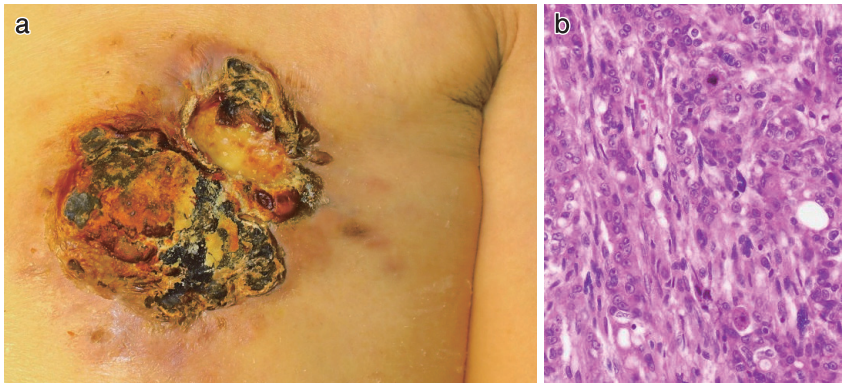


図 4. 左乳癌の外表所見（a），病理組織像（b：HE 染色）. 左乳頭部を主体に皮膚潰瘍を伴う乳癌の形成がある. 組織学的には硬癌の所見である.

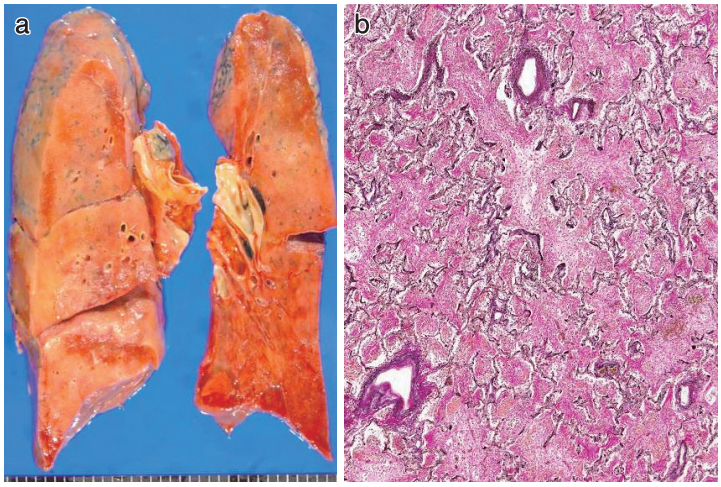


図 5. 器質化肺炎の摘出肉眼標本（a：固定前の割面像），病理組織像（b：EVG 染色）. 全体に含気が低下し発赤調を呈する（a）. 組織像では腔内に線維化を認める（b）.

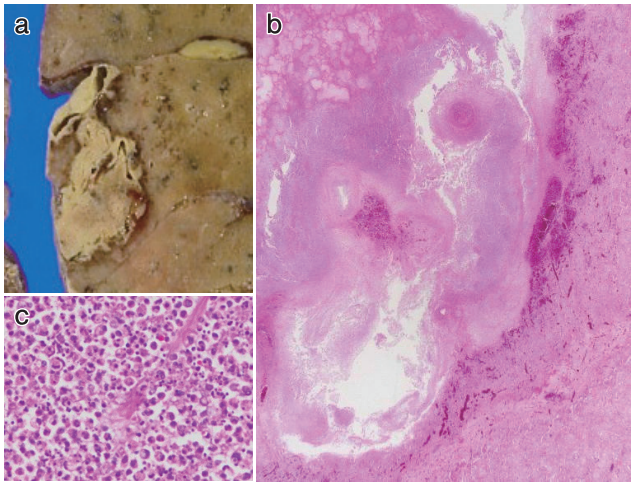


図 6. 肺中葉膿瘍の摘出肉眼標本（a：固定後の割面像），病理組織像（b：膿瘍の組織像［HE 染色］），c：膿瘍の強拡大［HE 染色］. 肺実質の破壊，好中球の充満が認められる.

症例 No. 86　腹腔動脈，上腸間膜動脈の閉塞に伴い多臓器に虚血・壊死をきたして死亡した症例

剖検依頼科：血管外科

【概要】 左変形性膝関節症に対する手術後に，腹腔動脈（CA）および上腸間膜動脈（SMA）の血栓塞栓症を発症し，多臓器に虚血性変化をきたして死亡した 83 歳・女性である．剖検では，腸管，肝臓，脾臓に広範な虚血性変化や壊死が認められた．腸管壊死が原因と思われる敗血症の所見もみられ，直接死因は敗血症，肝不全と考えられた．また，右肺には小細胞癌と扁平上皮癌が混在した混合型小細胞癌が認められた．

【症例】 83 歳，女性．

主　訴：腹痛．

家族歴：詳細不明．

既往歴：乳癌（81 歳），左変形性膝関節症（83 歳）．

生活歴：喫煙歴はない．

【臨床経過】

入院 22 日前：左変形性膝関節症に対し他院で人工膝関節置換術を施行した．術後，しぶり腹，下痢，食欲不振が出現した．

4 日前：腹痛が出現したが，造影 CT で特異的所見はなかった．

1 日前：腹痛憎悪．造影 CT で CA および SMA の血栓塞栓症，腸管気腫症，肝血流障害が疑われた．

入院時：当院を紹介され受診．CA および SMA の血栓塞栓症，腸管虚血，肝虚血の疑いで，CA・SMA の血栓除去およびステント留置，壊死回腸の切除術を施行した．

1 日後：腸管壊死所見の拡大に対し回腸および上行結腸の追加切除を施行した．術後，補充療法を施行したが肝不全は進行（図 1，2）した．腹腔内からの血性排液もみられた．

27 日後：死亡した．全経過 1.5 ヵ月．

【検索希望事項】

CA，SMA 閉塞による虚血・壊死の広がり，CA・SMA ステント留置後，再閉塞の有無．

【剖検診断】

1. 腹腔動脈，上腸間膜動脈閉塞による虚血性変化，敗血症
   ステント留置後，小腸・右半結腸切除術後，吻合不全，出血を伴う肝梗塞，黄疸を伴う広範性肝壊死　脾梗塞．
2. 右肺癌（混合型小細胞癌），陳旧性肺結核症．

【剖検所見】

A. 腹腔動脈（CA），上腸間膜動脈（SMA）閉塞による虚血性変化，敗血症

1. 既往標本：CA 起始部血栓は新鮮血栓の所見であった．切除された回腸および上行結腸には広範な虚血性変化を認める．
2. 小腸・右半結腸切除術後，吻合不全：残存する腸管粘膜には変色や脱落，壁の菲薄化などの虚血性変化が広範に認められる．吻合部の結合性は弱く，離開がみられる（図 3）．腸間膜内の動脈内に新鮮な血栓を認める（図 4）．
3. 肝梗塞，黄疸を伴う広範性肝壊死（1,480g）：著明な軟化が認められる．右葉被膜下に大型の血腫が形成され，血腫の一部に約 8 ㎝長の裂隙がみられる．肝細胞はほぼ全体が凝固壊死に陥り（図 5），肝門部門脈内に器質化血栓の形成がある（図 6）．
4. 脾梗塞（55g）：軟化は目立たない．広範な壊死が認められる．うっ血，出血，ヘモジデリン沈着を伴う．
5. CA，SMA に留置されたステント内の血栓形成や閉塞所見はない．動脈の起始部には高度の石灰化変性像がある（図 7）．
6. 敗血症：剖検時の血液培養で *Enterococcus sp.* を検出した．

B. 右肺癌，陳旧性肺結核症

1. 右肺癌：rtL，B10，9×4×3cm，combined small cell carcinoma，Ly0，V0，pl0，pm0，br(－)，pa(－)，pv(－)，pT3．右肺下葉の後肺底区（S10）に灰白色調の不整結節状腫瘤が認められる．組織学的には，腫瘤の大部分は異角化傾向を伴う充実性胞巣が増殖する中分化型扁平上皮癌からなる．腫瘍の頭側寄りの一部に，微細顆粒状のクロマチン増生を伴う N/C 比の高い細胞が増殖する肺小細胞癌が認められる．
2. 陳旧性肺結核症：右上葉には約 2cm 大の石灰化した結節が認められる．背景の肺組織では，右肺下葉末梢に，虚脱線維化と残存気腔の拡張，扁平上皮化生などを呈する蜂巣肺様の変化がみられる．上葉には気腫性変化がある．

【病理所見まとめ】

1. CA，SMA の閉塞に伴う著明で広範な虚血性変化が多臓器（腸管，肝臓，脾臓）に認められた．腸管は小腸・右半結腸切除術後の状態で，吻合不全がみられた．剖検時の血液培養より検出された *Enterococcus sp.* は腸管の吻合不全に起因していると考えられる．
2. CA，SMA に留置されたステント内の血栓形成や閉塞所見は，剖検時には認められなかった．
3. 右肺下葉の末梢～中葉にかけて肺癌（混合型小細胞癌）が認められた．右上葉に陳旧性結核症がある．
4. 腸管膜内の動脈の新鮮血栓は経過の後半，肝門部門脈内の器質化血栓は経過の前半に形成されたと思われる．
5. CA，SMA 起始部には高度な石灰化変性がみられるため血栓症の可能性も考えられるが，人工膝関節置換術後の塞栓症の可能性も否定できないと考える．

臨床画像

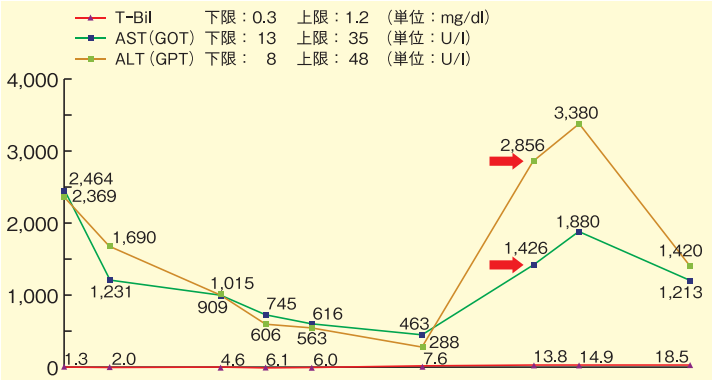


図 1．肝機能臨床経過．術後 AST/ALT は低下傾向であったが，入院 3 日後に急激な上昇がみられる（矢印）．

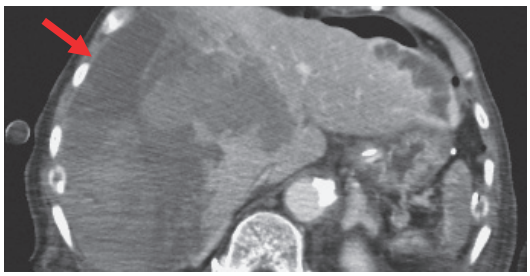


図 2．入院 3 日後の腹部造影 CT．肝臓は広範囲に壊死している（矢印）．

病理画像

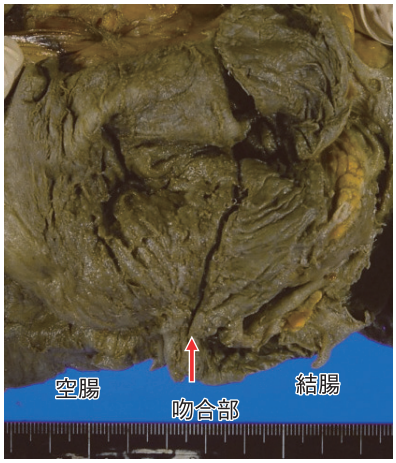


図 3．摘出肉眼標本（1）．空腸–横行結腸吻合部．吻合部の結合性は弱く，離開がみられる（矢印）．

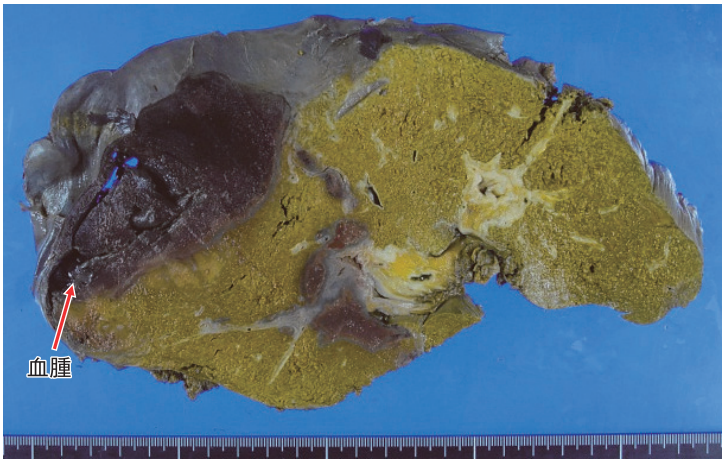


図 5．摘出肉眼標本（2）．肝臓の割面．右葉被膜下に大型の血腫が形成されている（矢印）．肝実質は著明に軟化し，ほぼ全体が凝固壊死に陥っている．

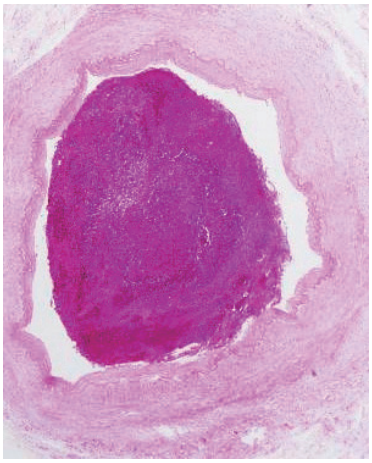


図 4．病理組織像（1）［HE 染色］．腸間膜内の動脈内の新鮮血栓．

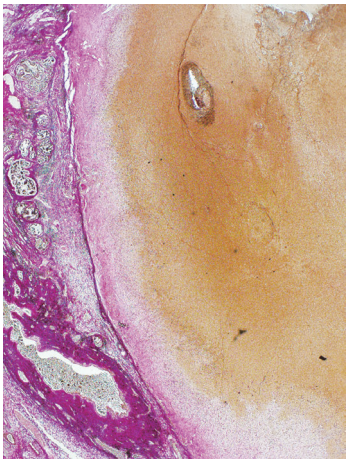


図 6．病理組織像（2）［EVG 染色］．肝門部門脈内の器質化血栓．

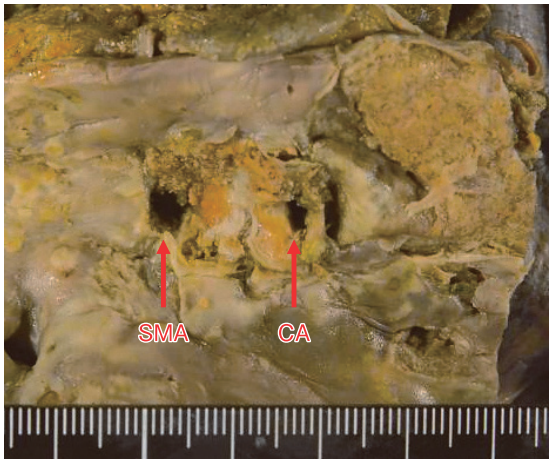


図 7．摘出肉眼標本（3）．CA，SMA 起始部．留置されたステント内の血栓形成や閉塞所見はない．血管壁には高度の石灰化変性がみられる．

症例 No. 87　治療抵抗性の間質性肺炎で死亡した症例

剖検依頼科：練馬光が丘病院総合内科

【概要】 入院 6 ヵ月前から労作時の呼吸苦を認めていた．近医で好酸球性肺炎と診断されプレドニゾロン 20mg/日を内服していた．入院の 3 週間前から労作時の呼吸苦が増悪し，練馬光が丘病院を受診した．入院時の各種検査で間質性肺炎とニューモシスチス肺炎が認められ，治療されたが呼吸状態は増悪し死亡した．剖検時，両肺には間質性肺炎の所見を認めた．*Pneumocystis* の菌糸は認めず，肺以外に死につながる病変は認めなかった．

【症例】 78 歳，女性．

主　訴：呼吸苦．

既往歴：高血圧，子宮筋腫．

生活歴：喫煙 10 本/日×45 年，アスベスト曝露はない．

【臨床経過】

6 ヵ月前：労作時の呼吸苦を自覚し．近医を受診して末梢血好酸球増加を指摘された．好酸球性肺炎の診断でプレドニゾロン 20mg/日を内服していた．ST 合剤の予防内服はしていなかった．

3 週間前：呼吸苦の増悪を自覚した．

入院時：練馬光が丘病院を受診した．間質性肺炎，ニューモシスチス肺炎と診断され入院となった（図 1，2）．プレドニゾロン 60mg/日，レボフロキサシン 500mg/日，ST 合剤 20mg/kg で治療を開始した．

3 日後：呼吸状態が増悪し，気管挿管を行った．急性呼吸促迫症候群（ARDS）と診断し，ARDS プロトコールに沿って治療を開始した．

6 週間後：呼吸状態が徐々に悪化し死亡した．

【検索希望事項】

基礎疾患としてあった肺疾患の状態，ニューモシスティス肺炎の状態，敗血症の所見の有無，死因について．

【剖検診断】

1. 間質性肺炎
2. 陳旧性心筋梗塞

【剖検所見】

A. 間質性肺炎（510g/775g）

1. 肉眼所見：両側とも収縮し，鮫肌状の外観を呈している．割面では胸膜側から線維化した領域が広がっていて，両側ともに横隔膜面～背側に 5mm 大までの蜂巣肺の形成を認める．線維化のみられる領域は右上葉（70%），右中葉（60%），右下葉（90%），左上葉（70%），左下葉（90%）であり，肺門側に肺実質は含気の保たれた領域がみられたが，発赤，ぬめりを伴っている．病変はおおむね左右対称性にみられる（図 3）．
2. 組織所見：蜂巣肺領域では，虚脱線維化，残存気腔の拡張を認める．拡張した気腔は気管支線毛上皮化生や扁平上皮化生した上皮によっておおわれていて，マクロファージや好中球，リンパ球などの炎症細胞を含む滲出物・粘液が貯留している．間質では平滑筋の増生と細血管の拡張，およびリンパ球主体の炎症細胞浸潤を認める（図 4）．蜂巣肺の目立たない肺実質においては肺胞隔壁は肥厚していて，リンパ球を主体とする炎症細胞浸潤が中等度認められる（図 5）．肺胞隔壁には浮腫状の幼弱な線維化が認められる．好酸球浸潤は目立たない．硝子膜の形成は認めない．*Pneumocystis* の菌糸は明らかではなく，ウイルス（CMV，VZV，HSV1，2）の感染を示唆する所見は認めない．

B. 亜陳旧性～ 陳旧性心筋梗塞（425g）

左室壁（14mm），右心室（6mm）と軽度の壁肥厚を認める．左房は軽度拡張する．左室壁の側壁～後壁に心内膜下に帯状の線維化（左室の 1/3 周程度）を認める．亜急性～陳旧性心筋梗塞の所見（図 6）．冠動脈には粥状硬化が認められ，左回旋枝，第 1 対角枝ではその程度は強く，90% 程度狭窄している．

C. その他の所見

胸部，腹部大動脈に中等度～高度の粥状硬化を認める．

【病理所見まとめ】

1. 基礎疾患としてあった肺疾患の状態について：両肺ともに進行した間質性肺炎を認めた．肉眼的には線維化，蜂巣肺形成の目立つ領域と肺胞構造の保たれている領域が隣り合って認められ，組織でも典型的な fibroblastic foci に相当する所見は明らかではないものの，肺胞隔壁には幼弱な線維化と炎症細胞浸潤が認められる．線維化型非特異性間質性肺炎（fibrotic NSIP）と通常型間質性肺炎（UIP）との鑑別が問題となるが，上記の組織所見からは UIP をより考えたい．剖検時の所見ではびまん性肺胞傷害（DAD）に相当する硝子膜形成などの所見は明らかではなく，成人 ARDS とする根拠は乏しいと思われる．好酸球浸潤は目立たず，好酸球性肺炎（CEP）とはいえない．
2. ニューモシスティス肺炎について：生前確認されていたニューモシスティス肺炎は剖検時の検体や培養では確認されなかった．治療に伴い十分治療されていたと考えられる．そのほか，細菌性，真菌性，ウイルス性の肺炎についても剖検時の検体には明らかな所見は認めなかった．
3. 敗血症は認められなかった．
4. 最終的な死因は間質性肺炎の進行による呼吸不全と考える．そのほかの臓器に死因となりうる病変は認められない．

臨床画像

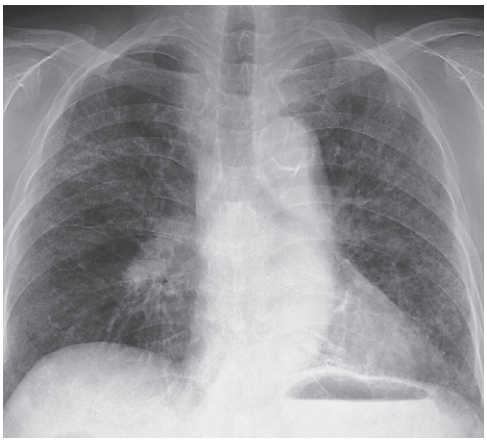


図 1. 入院時の胸部 X 線像

図 2. 入院時の胸部 CT. 両側のすりガラス影.

病理画像

図 3. 摘出肉眼標本（1）. 肺の割面. 両側に蜂巣肺の形成と発赤を認める.

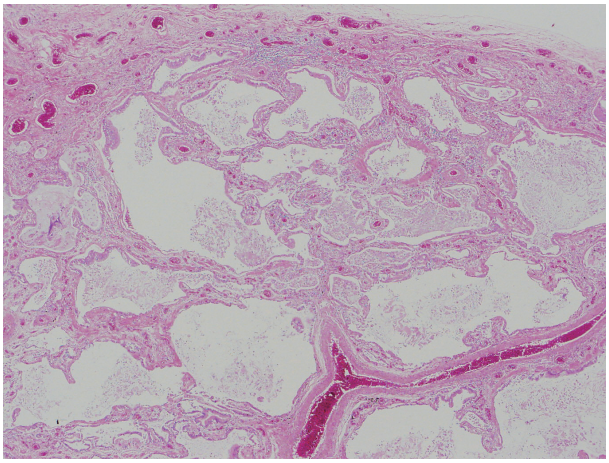


図 4. 肺の病理組織像（1）[HE 染色]. 蜂巣肺の形成を認める.

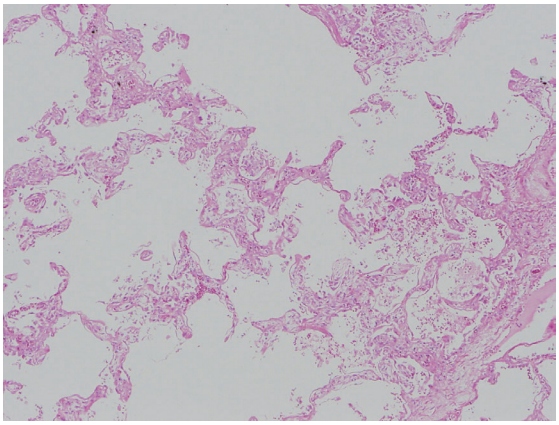


図 5. 肺の病理組織像（2）[HE 染色]. 肺胞隔壁の肥厚とリンパ球浸潤を認める.

図 6. 摘出肉眼標本（2）. 心臓の割面. 線維化巣（陳旧性心筋梗塞）を認める（矢印）.

症例 No. 88　約 20 年の経過を経て心不全で死亡したアントラサイクリン関連心筋症の症例

剖検依頼科：循環器内科

【概要】 20 年前に急性骨髄性白血病に対してアントラサイクリン系抗癌薬で治療された症例である．治療の 2 年後から心機能低下が認められ，薬剤性心筋症と診断された．その後心機能は改善していたが，死亡 1 年前から心不全が徐々に増悪した．死亡 3 日前には咳嗽，体動困難が出現し緊急入院となった．肺炎に伴った心不全の急性増悪が疑われ，治療を受けたが死亡した．剖検時，心には斑状の線維化や心筋線維の大小不同・変性像が認められ，アントラサイクリン関連心筋症（慢性期）に合致する所見であった．しかし，1 年前からの心機能低下を説明しうる形態学的変化は認めなかった．

【症例】 40 歳代，男性．

主　訴：咳嗽，体動困難．

既往歴：20 年前に急性骨髄性白血病（M2）．

生活歴：飲酒，喫煙歴なし，輸血歴あり．

【臨床経過】

20 年前：急性骨髄性白血病（M2）に対してダウノルビシン（アントラサイクリン系抗癌薬）を含む抗癌薬で治療された．

18 年前：完全左脚ブロック，心収縮能低下を認め，白血病に対するダウノルビシン投与に伴った薬剤性心筋症と診断された．その後，内服薬での治療を継続し，状態は安定していた．

1 年前：左室駆出率 30% 前後，BNP500 台と心機能が低下し，心室性期外収縮，持続性・非持続性心室頻拍を認めた．Tl 心筋シンチグラフィーで広範な集積低下も認められた（図 1）．

3 ヵ月前：当院循環器内科を紹介され受診した．

入院時：咳嗽，体動困難で緊急入院となった．肺炎に伴った心不全の急性増悪が疑われ治療を開始した（図 2）．

3 日後：呼吸状態が増悪したため，心肺補助装置や大動脈バルーンパンピングも挿入し治療したが死亡した．

【検索希望事項】

薬剤性心筋症以外の心機能低下の原因，心嚢液貯留の原因，肺炎の有無．

【剖検診断】

1. アントラサイクリン関連心筋症（慢性期）．
2. 心肺蘇生による右心室破裂．
3. 両側気管支肺胞性肺炎．
4. 急性骨髄性白血病（寛解期）．

【剖検所見】

A. アントラサイクリン関連心筋症（慢性期）：心重量 410g．両側心房および左室の拡張がある．心筋割面はほぼびまん性にやや白色調を呈している（図 3）．組織学的には左室心筋間には斑状あるいは網状に伸び出す線維化を認める（図 4）．心筋細胞には径の大小不同，核形不整がある（図 4）．心筋線維の錯綜配列はない．炎症細胞浸潤はほとんどない．肉芽腫はない．冠動脈は三枝とも開存しており，狭窄はごく軽度（最大約 25%）である．

B. 心肺蘇生による右心室破裂

1. 右心室破裂：右室前壁の心室中隔近傍には約 2.0cm 大の右室壁の破綻を認める（図 3）．また，三尖弁直上の右房前壁には，4.0cm にわたる内膜および右房心筋の裂傷がある．心基部には外膜下出血がある．
2. 出血の広がり：心嚢水は血性 250m*l*，右胸水は血性 2,700m*l*．心嚢周囲～縦隔～頸部の結合組織に 25×15×15cm の範囲に血腫の形成がある．

C. 両側気管支肺胞性肺炎：肺重量は右 570g，左 765g．割面は左肺を優位として，両側とも全体にうっ血調である．左肺上葉を主体に出血を伴って硬度を増す地図状～巣状の局面が散在し，それに一致して出血を伴う気管支肺胞性肺炎を認める（図 5）．

D. 急性骨髄性白血病（寛解期）：再燃はない．血球貪食像がある（図 6）．

【病理所見まとめ】

1. 心臓には斑状～網状の線維化，心筋線維の大小不同・変性がみられ，ダウノルビシン投与に伴ったアントラサイクリン関連心筋症（慢性期）に合致する所見である．死亡 1 年前からの心機能の増悪の原因は形態学的には明らかでないが，虚血性心疾患，活動性の炎症所見，肉芽腫形成など，心機能の低下に関与する所見は認められなかった．アントラサイクリン関連心筋症により変性・障害を伴った心筋線維が長期にわたる病悩期間を経て特別な誘因なく機能低下に陥ったとも考えうる．
2. 右室前壁には壁の破綻が認められ，心嚢腔，右胸腔，および縦隔に出血が確認された．破綻部の心筋に壊死・炎症などの病的所見は認められず，心肺蘇生時の機械的刺激に伴った右室破裂と考える．
3. 左上葉優位に出血・うっ血を伴う気管支肺胞性肺炎がみられ，肺炎が死亡 3 日前からの心機能増悪の誘因となっていたものとして矛盾しない．肺炎病巣の広がりは限局的であり，致死的な呼吸不全をきたしうるほどの肺炎ではない．

臨床画像

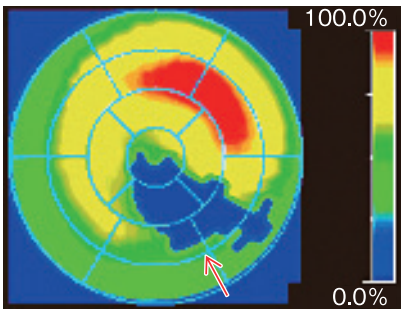


図 1. 死亡 1 年前の心筋シンチグラフィー．広範な集積低下がある（赤矢印）．

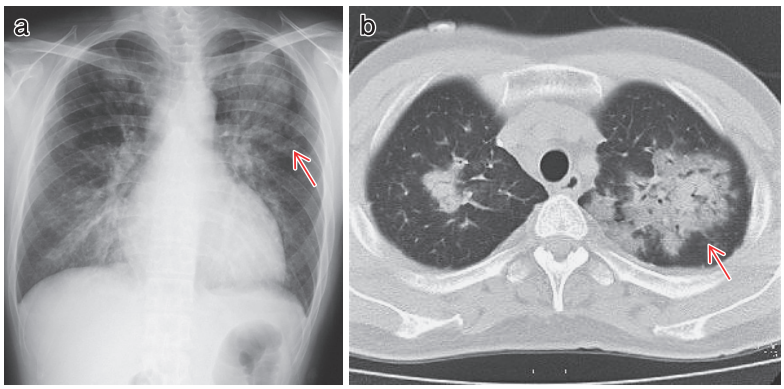


図 2. 入院時の胸部 X 線像（a）および胸部 CT（b）．左肺優位に浸潤影，すりガラス影を認める（赤矢印）．

病理画像

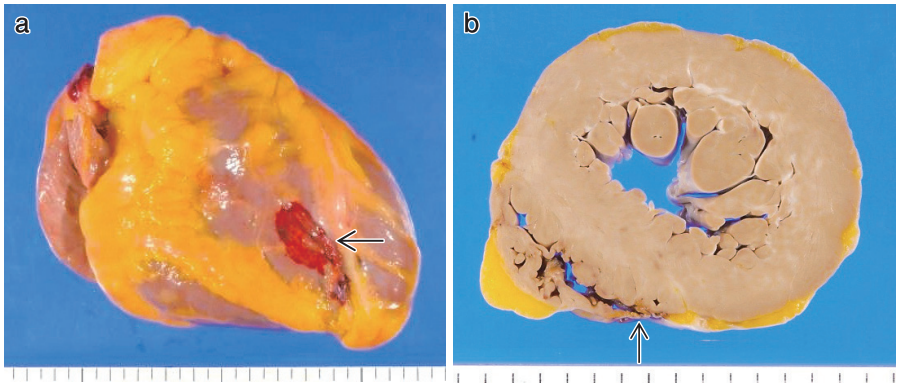


図 3. 摘出肉眼標本．心筋表面（a）および割面（b）．a：右室前壁には 2cm 大の壁破綻部を認める（矢印）．b：心筋割面は，ほぼびまん性にやや白色調を呈している．矢印は，壁破綻部の割面部位．

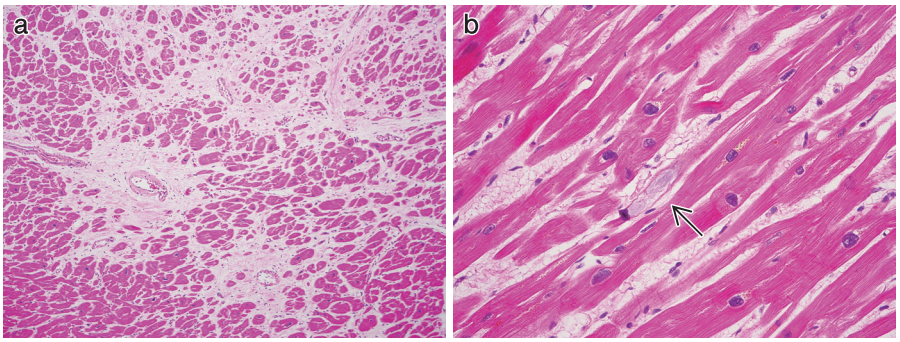


図 4. 心筋の病理組織像（HE 染色）．a：心筋間に斑状あるいは網状に伸び出す線維化をびまん性に認める．b：心筋細胞の径には大小不同がみられ，核形不整，好塩基性変性（矢印）などの変性所見が確認される．

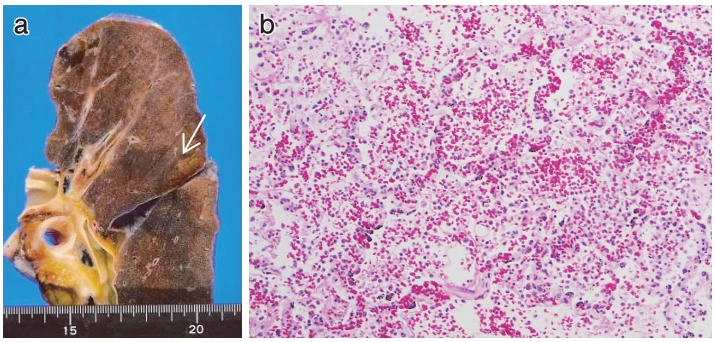


図 5. 左肺上中葉の摘出肉眼標本（割面）［a］と肺の病理組織像（b）［HE 染色］．肉眼的な出血調の局面（矢印）に一致して出血を伴う気管支肺胞性肺炎を認める．

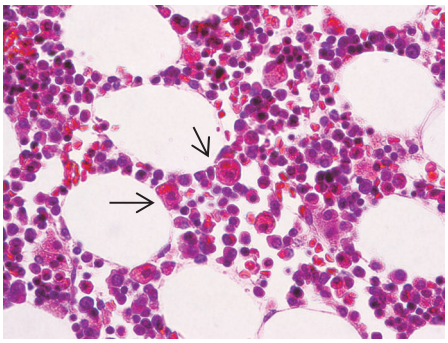


図 6. 骨髄の病理組織像（HE 染色）．白血病の再燃はない．血球貪食像を認める（矢印）．

症例 No. 89　膵頭部癌術後再発で高度の横行結腸浸潤を認め化膿性胆管炎により死亡した症例

剖検依頼科：肝胆膵外科

【概要】膵頭部癌術後間もなく，経過観察の CT で多数の腹膜播種がみられ，化学療法を行うが腫瘍が横行結腸へ浸潤し，多量の出血および化膿性胆管炎をきたし死亡した症例である．解剖時には膵臓～横行結腸に浸潤する癌を認め，腸管は狭窄し，胃，小腸，大腸に多量の血性内容物を認めた．また胆管吻合部周囲には腫瘍の浸潤があり，胆管狭窄，膿瘍形成があり化膿性胆管炎を認めた．

【症例】65 歳，男性．

主　訴：背部痛．

家族歴：父，母は脳梗塞，祖母は脳出血，弟は脳梗塞．

既往歴：高血圧，脂質異常症，糖尿病，下垂体腫大．

生活歴：喫煙歴 20 本/日を 25 年間，飲酒歴は機会飲酒．

【臨床経過】

3 年前：肝機能障害を指摘され，消化器内科で経過観察とされていた．

2 年前：腹部 CT で膵癌の診断を受け，肝胆膵外科受診した．膵頭十二指腸切除術を施行された．術後化学療法を行ったが（GEM4 コース），CT で腹膜播種が多数みられた（図 2）．

1 年前～：化学療法（TS-1，CDDP5 コース）を施行した．

2 ヵ月前：新鮮血下血で入院．胃空腸吻合部の露出血管および横行結腸肝彎への腫瘍浸潤による狭窄・出血を認めた．出血源は横行結腸と考えられた．輸血を行い退院した．

1 週間前：発熱，血圧低下があり緊急入院．皮膚黄染，腹部膨満が著明であった．Best supprtive care の方針となる．徐々に全身状態が悪化し，200m*l* の赤褐色調の吐血の後，死亡した．

【検索希望事項】

腫瘍の広がり．

【剖検診断】

1. 膵頭部癌化学療法後再発，化膿性胆管炎．
2. 肺炎（軽度）．
3. 食道炎．

【剖検所見】

A. 膵頭部癌化学療法後再発，化膿性胆管炎

1. 手術標本：Invasive ductal carcinoma of the pancreas（図 3）：pPh，42×40×25mm（TS3），浸潤型，adenocarcinoma：tub1>muc>tub2，sci，INFr，ly0，v2，ne3，mpd+，pT3，pPCM－，pBCM－，pDPM+．組織学的には間質増生を伴い小型不規則腺管状に浸潤する管状腺癌である．剝離断端では，ところどころで癌の粘液結節が剝離面に接しており，断端陽性を疑う．
2. 解剖時の状態

原発巣：膵～横行結腸に浸潤する癌を認める．胃，小腸，大腸には多量の血性内容物がある．割面では膵～膵周囲結合組織，横行結腸，空腸，肝臓に浸潤する腫瘍組織を認める．癌は横行結腸粘膜まで浸潤し内腔に及ぶ（図 4）．明らかな露出血管はみられない．癌は腎周囲脂肪組織にも浸潤するが，腎実質への浸潤はない．腫瘍の大きさは約 10×6.0×6.0cm に及ぶ．胃空腸吻合部には著変はない．

胃幽門部前面には径 1.0cm の結節があり，腹膜播種の所見である．

膵周囲結合組織中のリンパ節に転移がある．

関連所見：肝臓は緑色調で胆汁うっ滞を高度に認める．胆管拡張が目立つ．胆管空調吻合部周囲に腫瘍浸潤がみられ，好中球が浸潤する，一部膿瘍形成があり，化膿性胆管炎の所見である．肝臓には架橋性線維化および偽胆管増生がみられる（図 5）．

B. 肺炎（左：630g，右：535g）：左肺上葉にはやや硬化する部位がある．組織学的には左肺上葉には好中球浸潤を伴う線維化，肺胞の虚脱がある．左右下葉には肺胞実質に好中球浸潤がある．Gram 陽性の球菌があり，肺炎（軽度）の所見である．

C. 食道炎：粘膜にはびらん，出血が目立つ．上皮はびらん状で，出血，壊死がみられ，好中球浸潤を高度に伴う．酵母様真菌がある．

【病理所見まとめ】

1. 膵臓～周囲結合組織，横行結腸，肝臓に浸潤する腫瘍組織を認める．横行結腸は 2 ヵ所で強い狭窄がみられ，内腔に及ぶ腫瘍細胞浸潤を認めた．腸管内容物は多量で血性であった．また，食道炎が高度にみられ，吐血の一因とも考えられる．死因は腫瘍の浸潤による出血を主とし，化膿性胆管炎による全身状態悪化と考えられる．
2. 胆管空腸吻合部周囲の腫瘍浸潤および高度の炎症，吻合部より中枢の胆管拡張，胆汁うっ滞が高度にみられた．また，肝臓には偽胆管増生や架橋性線維化を認め，腫瘍の浸潤による胆管狭窄を主とし，PD 後の胆汁うっ滞の影響も加わり胆管炎を繰り返していたと考えられる．

臨床画像

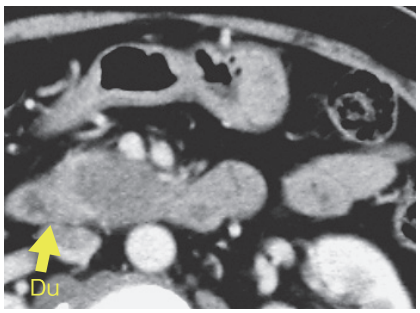


図 1．術前の CT

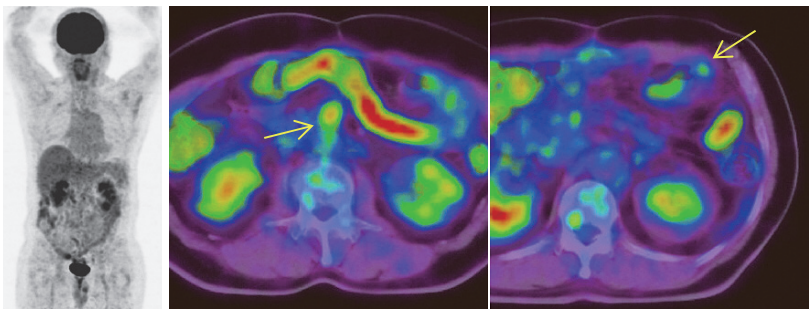


図 2．術後の PET CT．腹膜播種（矢印）

病理画像

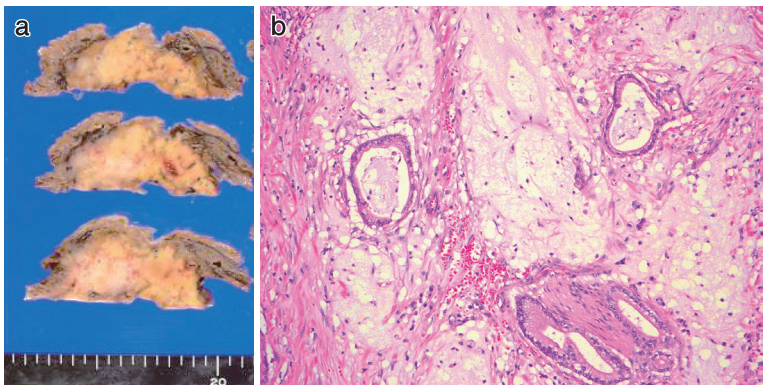


図 3．摘出肉眼標本（a），病理組織像（b）［HE 染色］（1）．a：膵臓割面．左側に灰白色調の癌の広がりを認める．b：膵癌．癌腺管と粘液結節を認める．

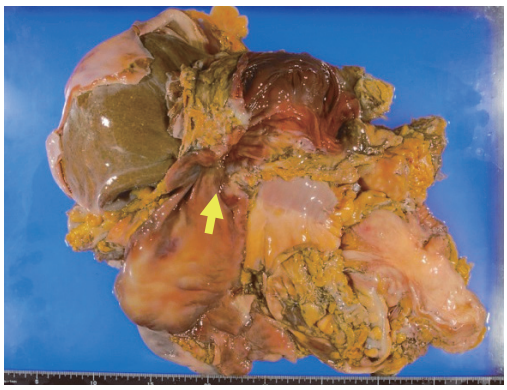


図 4．解剖時の摘出肉眼標本．腫瘍浸潤による横行結腸の狭窄（矢印）．

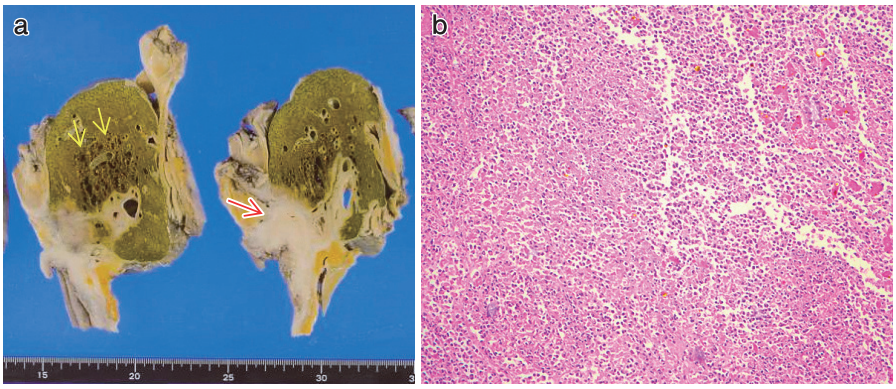


図 5．摘出肉眼標本（a），病理組織像（b）［HE 染色］（2）．a：胆管空腸吻合部を含む肝臓割面．胆管空腸吻合部周囲への浸潤（赤矢印）と胆管拡張（黄色矢印），b：胆管空腸吻合部周囲の膿瘍．

症例 No. 90　胃癌に対し化学療法を施行したが病勢を抑えられず死亡した症例

剖検依頼科：食道胃外科

【概要】 食欲不振，体重減少により精査の結果胃癌がみつかり，その時点で後腹膜浸潤，多発リンパ節転移，腹膜播種を認めたため化学療法で治療していた症例である．化学療法の初期には一定の効果がみられたものの，最終的には病勢を抑えられず死亡した．

【症例】 59 歳，女性．

主　訴：食欲不振，全身倦怠感，体重減少．

家族歴：特記すべきことはない．

既往歴：48 歳時～脂質異常症，50 歳時～高血圧，58 歳時～糖尿病．

生活歴：喫煙 20～30 本/日×40 年，飲酒はビール 700m*l*+焼酎コップ 1 杯/日．

【臨床経過】

入院 1 年前：食欲不振，全身倦怠感，体重減少が出現した．

10 ヵ月前：かかりつけの内科で胃癌の診断となる．

9 ヵ月前：当院を紹介され受診し精査（図 1）．後腹膜浸潤，多発リンパ節転移，腹膜播種を認めたため TS-1+CDDP の化学療法を施行した．2 コース施行時は PR であったが（図 2），その後 7 コース施行した時点で PD（図 3）であった．

10 日前：通過障害が出現したため，症状緩和を目的に手術が考慮された．

入院当日：手術目的に入院したが炎症反応が高値で手術延期となり，PTX 単剤投与を行ったが効果はなかった．

28 日後：徐々に状態が悪化し，緩和ケア主体の治療に切り替わる．

56 日後：死亡した．

【検索希望事項】

癌の広がり，化学療法の効果．

【剖検診断】

1. 胃癌化学療法後．
2. 肝臓，骨，尿管，膀胱転移．
3. リンパ節転移，腹膜播種．

【剖検所見】（注：腹部のみの局所解剖）

A. 胃癌化学療法後

1. 既往標本（当院施行）：当院初診時施行の生検では，中～低分化腺癌であった（図 4）．TS-1+CDDP 投与後の生検では低分化腺癌が主体であった．
2. 剖検時所見

原発巣：胃は全域にわたり硬化，肥厚しており，胃体上部小彎～後壁に 4cm 大の潰瘍形成がある（図 5）．組織学的には小型不明瞭な腺腔を形成をしながら，あるいは微小胞巣状に浸潤する中～低分化腺癌が胃全域に広がっていた．さらに直接浸潤を後腹膜側に認めるとともに（十二指腸，膵，左副腎，左腎 Gerota 筋膜，右副腎周囲間膜，脾門部～脾柱内，横隔膜，大動脈や下大静脈周囲［図 6］），肝十二指腸間膜に沿って肝内・胆嚢壁内に達する浸潤もみられた．

血行性転移：肝臓（最大 3cm 大），脊椎，膀胱，尿管に転移がある．

リンパ行性転移：胃所属リンパ節に加え，肝門部，膵周囲，脾門部，傍大動脈リンパ節に転移がある．

播種性転移：腸間膜および大網に 4mm 大までの播種巣が散在し，黄色混濁した 4,900m*l* の腹水貯留を伴っていた．

3. 化学療法の効果について：上記肝臓外側区域の病変は広範な凝固壊死に陥り，それ以外の個所でも凝固壊死巣が散在してみられ，そうした個所の近傍に密な瘢痕状の膠原線維増生，腫瘍細胞の核の変性像も確認できる個所がみられた（図 7）．これらの変化は癌巣全体の 1～2 割程度の領域に観察された．異物反応はない．これらの変化の一部は化学療法によるものと考えるが，虚血性壊死や死後変性との鑑別は困難である．

B. その他の変化

肝，脾にヘモジデローシスがあり，輸血による変化と思われた．左腎に重複尿管があった．るいそうが著明であった．

【病理所見まとめ】

1. 腹部のみの局所解剖であったが，癌は広範な直接浸潤に加え，血行性，リンパ行性転移や播種をきたした状態であることが確認された．後腹膜や肝・胆嚢への直接浸潤も高度であり，入院時にはすでに手術は不可能であったものと推測される．
2. 癌の壊死，変性が目立つ領域や，癌が消失した可能性のある瘢痕の領域は癌巣全体の体積 1～2 割程度であった．ただし，そのうちどの程度が化学療法による変化なのかの評価は困難である．
3. 壊死，変性，瘢痕巣以外の癌細胞は viable であることも考慮すると，化学療法の効果は限定されていたものと推測される．

臨床画像

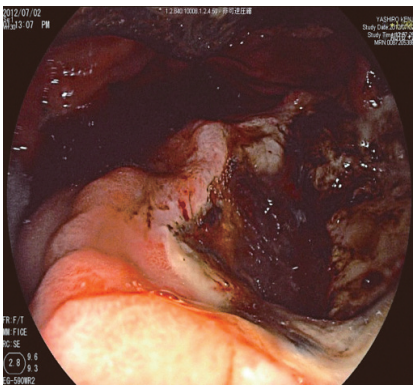


図 1. 当院来院時の胃内視鏡像．噴門直下～胃角部に 3 型腫瘍を認める．

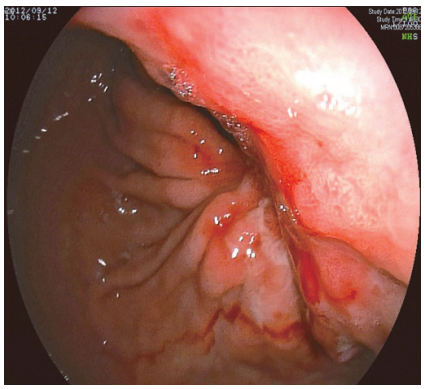


図 2. TS-1+CDDP 2 クール施行後の内視鏡像．病変の縮小があり，PR と判断された．

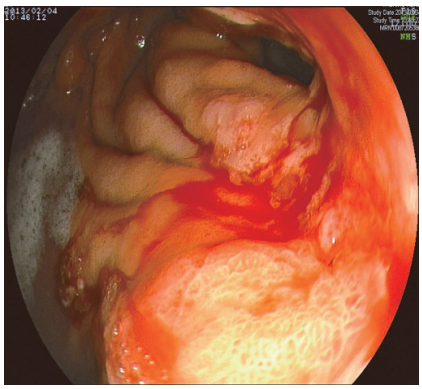


図 3. TS-1+CDDP 7 クール施行後の内視鏡像．粘膜下に腫瘍が進展し，PD と判断された

病理画像

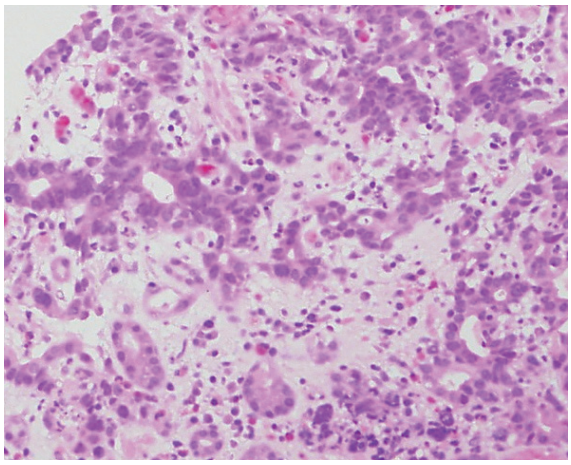


図 4. 来院時の病理組織像（HE 染色）．不整形の癒合腺管あるいは微小胞巣状を形成する中～低分化腺癌である．

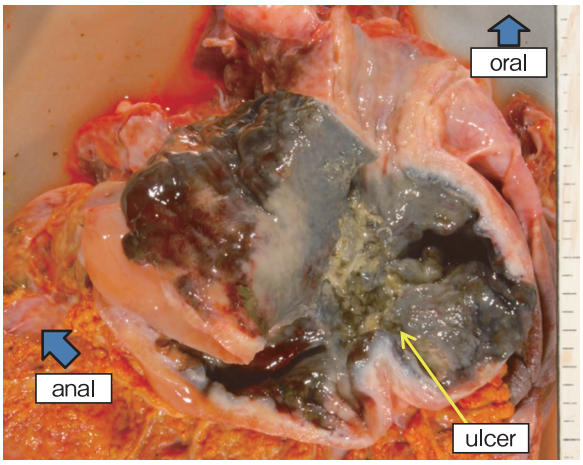


図 5. 摘出肉眼標本（1）．剖検時の胃粘膜面．体上部小彎～後壁に潰瘍形成がみられ，その周囲の粘膜には出血が広がっている．胃の全域にわたり硬化，壁肥厚がある．

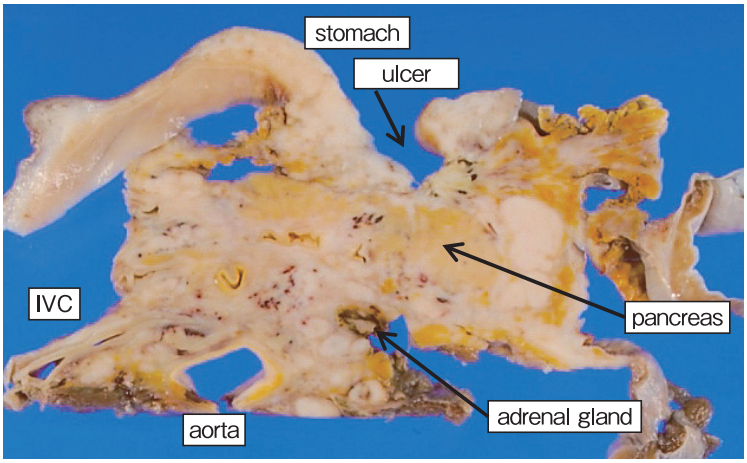


図 6. 摘出肉眼標本（2）．剖検時腹部臓器の水平断割面．腫瘍は胃の全域に広がり，また後腹膜側に広い直接浸潤を認める．

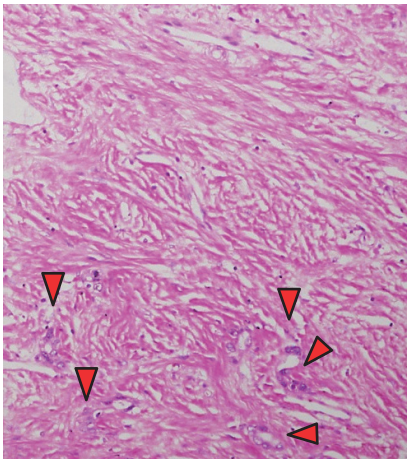


図 7. 腫瘍組織内瘢痕部の病理組織像（HE 染色）．癌細胞（赤矢頭）はわずかにみられるのみである．化学療法の効果か．

症例 No. 91　特発性拡張型心筋症による心原性ショックに対して両心補助人工心臓を装着したが敗血症により死亡した症例

剖検依頼科：心臓血管外科　　臨床担当医：水野友裕，八丸　剛，藤原立樹

【概要】 特発性拡張型心筋症による重症心不全に対し両心補助人工心臓を装着し，心臓移植待機となっていたが，敗血症をきたし死亡した症例である．剖検では，心臓は拡張型心筋症として矛盾しない所見を示し，人工血管の一部には感染性血栓が付着していた．肺には両側にわたる広範な肺炎と多発膿瘍が認められ，肺培養および血液培養から同種の菌（緑膿菌）が検出されたことから，肺炎，肺膿瘍が敗血症の原因と考えられた．

【症例】 47 歳，男性．

主　訴：左腰背部痛．

既往歴：健診の心電図で不整脈を指摘された（詳細不明，治療歴なし）．

【臨床経過】

1 ヵ月前：倦怠感，浮腫を自覚した．近医で心拡大と不整脈を指摘され，専門医受診をすすめられていた．

入院時：左腰背部痛が出現し，当院に救急搬送された（図 1）．

1 日後：左腎梗塞，左房内血栓にて緊急手術を施行した（左房内血栓除去，僧帽弁形成術，三尖弁輪縫縮術，Maze 手術）［図 2］．

1 ヵ月後：術後も心不全の改善はなく，肝機能も悪化した．血行動態が破綻し，大動脈内バルーンパンピング（IABP），経皮的心肺補助法（PCPS）により救命．その後，両心補助人工心臓を装着した．一時は肝不全，腎不全となり透析も導入されたが，数ヵ月かけて回復した．心臓移植適応と判定され，移植待機となっていた．

6 ヵ月後：39℃ の発熱があり．血液培養から Gram 陰性桿菌が検出された．末梢点滴ラインが感染源として疑われた．敗血症性ショックとなり，エンドトキシン吸着療法を施行した．さらに 10 日後には多発性脳出血を発症した．

7 ヵ月後：重症の誤嚥性肺炎（図 3），敗血症となる．痰培養・血液培養より多剤耐性緑膿菌を検出した（MDRP）．腹部 CT で膵炎の疑いがあった．

8 ヵ月後：呼吸不全が進行し，多臓器不全からのアシドーシスもコントロールできず，死亡した．

【検索希望事項】

感染巣の検索，心臓の状態，肝不全・腎不全の程度，膵炎または胆嚢炎の有無とその周囲の膿瘍形成の有無．

【剖検診断】

1. 拡張型心筋症術後．
2. 両側器質化肺炎，多発小膿瘍，敗血症（心筋微小膿瘍，送血管内感染性血栓）．
3. 軸捻転による小腸梗塞，化膿性腹膜炎．
4. 左腎梗塞，右腎の代償性肥大．
5. 黄疸（敗血症に伴う細胆管炎）．

【剖検所見】

1. 拡張型心筋症術後：両心補助人工心臓（RVAD［右房脱血，肺動脈送血］，LVAD［左室心尖部脱血，上行大動脈送血］）が装着されている（図 4）．両側心房・心室は拡張性肥大を呈する（図 5）．組織学的には，心筋線維周囲間質に線維化，脂肪浸潤が認められる（図 6）．一部に錯綜配列がみられる．
2. 両側器質化肺炎，多発小膿瘍，敗血症（心筋微小膿瘍，送血管内感染性血栓）：両側に広範な器質化肺炎を認める．最大 12mm 大の膿瘍が両肺に散見される（図 7）．肺培養および血液培養により *Pseudomonas aeruginosa* を検出した．心筋内に微小膿瘍が散見される．上行大動脈送血管内に多量の Gram 陰性桿菌塊を含む感染性血栓がある．
3. 軸捻転による小腸梗塞，化膿性腹膜炎：小腸の一部は線維性に癒着し，癒着部の腸管が捻転しながら膀胱直腸窩に嵌頓していた（図 8）．捻転部の小腸は梗塞に陥り，その炎症が波及した化膿性腹膜炎の所見がある．
4. 左腎梗塞，右腎の代償性肥大：左腎は著明に萎縮し（60g），広範な線維化を伴っており，梗塞後の状態である．右腎は代償性に肥大している（235g）．糸球体は比較的保たれている．
5. 黄疸（敗血症に伴う細胆管炎）：肝臓の重量は増加している（2,390g）．組織学的には，門脈域での胆汁栓を伴う胆管増生と中等度の炎症が認められ，敗血症による細胆管炎の所見と考えられた．

【病理所見まとめ】

1. 感染巣の検索：培養結果と合わせると，敗血症の原因は肺炎，肺膿瘍と思われる．小腸壊死による化膿性腹膜炎の所見は比較的新しく，敗血症の原因としては臨床経過と合致しない．
2. 心臓の状態：間質の線維化や脂肪浸潤は拡張型心筋症として矛盾しない所見であるが，錯綜様構造など，やや非典型的な所見も一部にみられる．上行大動脈送血管内に感染性血栓の形成がある．
3. 肝不全，腎不全の程度：肝臓には敗血症による細胆管炎に伴う黄疸が認められた．左腎は著明に萎縮し，広範な梗塞巣が認められたが，残存する糸球体は比較的保たれていた．
4. 膵炎，胆嚢炎とその周囲の膿瘍形成の有無：膵臓および胆嚢には亜急性の炎症は認められたが，膿瘍形成はなく，敗血症の原因となるほどの炎症は指摘できなかった．

臨床画像

図 1. 入院時の胸部 X 線像. 心拡大がある.

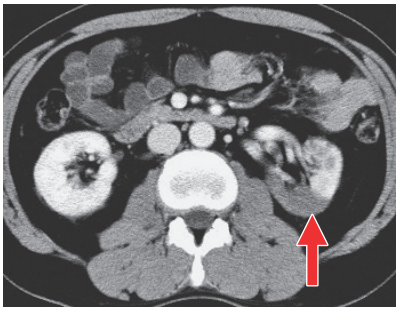


図 2. 入院時の腹部造影 CT. 左腎梗塞を認める（矢印）.

図 3. 入院 8 ヵ月後の胸部 CT. 両側に広範な肺炎像を認める.

病理画像

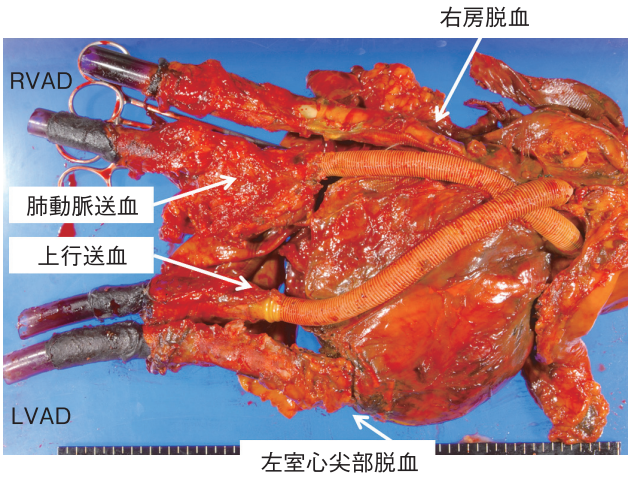


図 4. 摘出肉眼標本（1）. 両心補助人工心臓を装着した心臓.

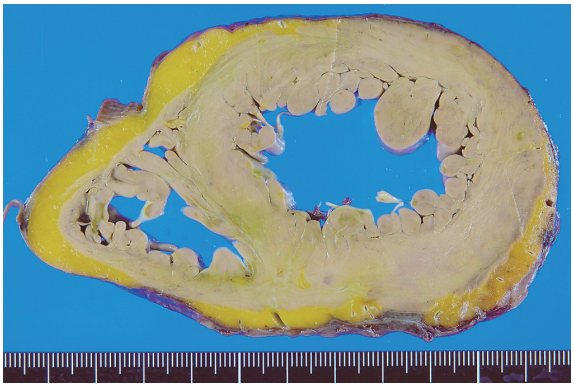


図 5. 摘出肉眼標本（2）. 心臓の割面. 両心室の拡張性肥大がある.

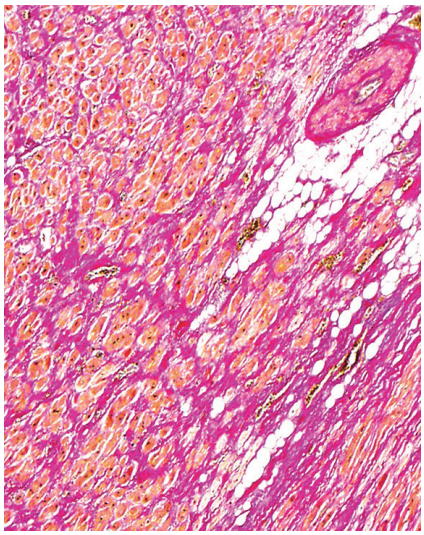


図 6. 病理組織像（EVG 染色）. 心室中隔部心筋. 間質の線維化, 脂肪浸潤を認める.

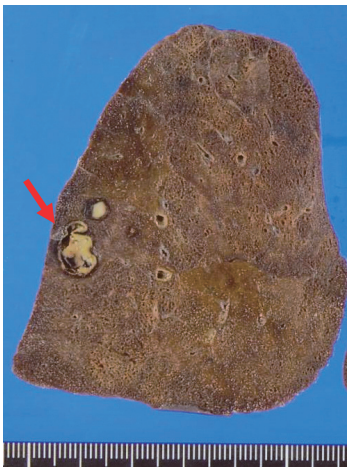


図 7. 摘出肉眼標本（3）. 肺割面に散在する膿瘍（矢印）

図 8. 摘出肉眼標本（4）. 小腸梗塞部

症例 No. 92　食道癌の化学放射線療法中に食道気管瘻の形成を認め細菌性肺炎により死亡した症例

剖検依頼科：食道胃外科

【概要】右肩甲骨部痛の精査から，左主気管支および心嚢への浸潤を伴う食道癌と診断された．化学療法を施行したが食道気管瘻による肺炎のため治療を中断し気管支ステントを挿入した．治療休止期間を経て治療を再開したが，再び呼吸状態の悪化がみられ，人工呼吸器管理なども奏効せず死亡した．剖検では，食道癌は 1cm 大の食道気管瘻孔を形成し，左主気管支，壁側心外膜，左房壁へ直接浸潤していた．肺には瘻孔近傍領域を主体として高度の気管支肺炎が認められ，感染のフォーカスとなったと考えられた．

【症例】65 歳，男性．
主　訴：右肩甲骨部痛．
家族歴：姉が大腸癌．
既往歴：血小板減少（21 年前，全身化学療法施行，詳細不明）．
生活歴：喫煙歴は 20 本強×20 年，飲酒歴はビール 500m*l*＋日本酒，水割りなど/日．

【臨床経過】
死亡 8 ヵ月前：右肩甲骨部痛を自覚し，数週後には喉のつかえ感も出現した．近医を受診したが異常はなかった．
6 ヵ月前：上部消化管内視鏡で食道癌を指摘され，当院を紹介され受診した．精査により，左主気管支および心嚢への浸潤を伴う食道癌と診断される（図 1）．
5 ヵ月前：化学放射線療法を開始した．
4 ヵ月前：発熱，肺炎症状を認め，造影検査で食道気管瘻を同定した．その 1 週間後に喀血し，原発巣からの消化管出血および瘻を介した肺への血液流入による呼吸不全と判断した．挿管し人工呼吸器管理を開始した．化学放射線療法は中断．
3 ヵ月前：左主気管支ステント挿入．
1 ヵ月前：全身状態が改善したため退院となった．
半月前：再入院し化学療法を再開したが 2 日後に呼吸状態が悪化し，肺網状影と肺紋理増強を認めた．治療を契機とした間質性肺炎，肺気腫を基盤とした気道感染の急性増悪などを考え，ステロイドパルスおよび抗生物質治療を開始した．
10 日前：アスペルギルス抗原陽性にて抗真菌薬を開始し，呼吸状態はいったん改善した．
5 日前：全身状態・呼吸状態が再度悪化し（図 2），人工呼吸器管理なども奏効しなかった．
死亡日：呼吸不全により死亡した．

【検索希望事項】
食道癌の広がりおよび治療効果，呼吸不全の原因，食道気管瘻およびステントの状態．

【剖検診断】
1. 食道扁平上皮癌（化学放射線療法後）．
2. 気管支肺炎．
3. 気腫性変化，間質肺炎様変化，陳旧性肺結核．

【剖検所見】
A. 食道扁平上皮癌（化学放射線療法後）
1. 食道および周囲臓器（原発巣および直接浸潤）：胸部食道主体に白色顆粒状の癌の増殖が認められ，著明な角化を伴って中小の胞巣を形成する（図 4）．病変中心部では全層性の壁欠損がある（図 3）．食道気管間には長径 1.0cm の瘻が存在し，癌浸潤と炎症性滲出物の出現をみる．癌は食道外膜に及び，左主気管支，壁側心外膜，左房壁へ浸潤する．癌細胞は部分的に変性・壊死に陥る．左主気管支ステントに感染は認められない．
2. リンパ行性転移：小彎リンパ節は最大径 7cm 大と腫大し，癌の転移を伴う．原発巣周囲の小リンパ節にも癌の転移がある．
3. 血行性転移，播種性転移はない．

B. 気管支肺炎
1. 肺（610g/1,080g）：右気管支からは漿液性褐色の喀痰が排出される．両側に白色調で弾性硬の領域が存在し，とくに右下葉の食道気管瘻に近接した領域では所見が高度で，多数の膿瘍形成を伴う（図 5，6）．一部器質化を伴う．真菌感染は認めない．
2. 胸水（250m*l*/150m*l*）：両側とも黄色で，軽度混濁する．
3. 培養：血液および両側肺組織を提出．*Corynebacterium sp.*，*Pseudomonas aeruginosa*，*Enterococcus sp.* を検出した．

C. 気腫性変化，間質肺炎様変化および陳旧性肺結核
背景肺には上葉主体に気腫性変化がみられ，肺胞の拡張，血管周囲主体の炭粉沈着を伴う．左上葉には硝子化と凝固壊死を伴う病巣が存在する．Tb1 抗体（東京医科歯科大学人体病理学分野で作製された抗体で，抗酸菌が陽性となる）を用いた免疫染色により凝固壊死巣内に陽性像が認められる（図 7）．一方で，下葉主体に胸膜直下の虚脱・瘢痕化がみられ，左下葉の一部では肺胞腔の不規則な拡張，軽度の腔内器質化，肺胞上皮の気管支上皮化生など間質肺炎様変化が認められる．

【病理所見まとめ】
1. 食道癌の広がりは直接浸潤とリンパ行性転移からなっていた．癌巣の一部には変性・壊死がみられ，化学放射線療法による効果と考えられた．左主気管支ステント部に感染は認めなかった．
2. 肺には高度の気管支肺炎が認められ，直接死因となったと考えられる．炎症の主体は食道気管瘻の近接した領域にみられ，この部位が感染のフォーカスとなったと推測される．好中球の著明な浸潤，培養検査で細菌が複数検出されていることから細菌性肺炎と考えられる一方，真菌の活動性感染は認めなかった．背景肺には気腫性変化および一部に間質性肺炎の像がみられ，これらも呼吸不全に関与したと考えられる．

臨床画像

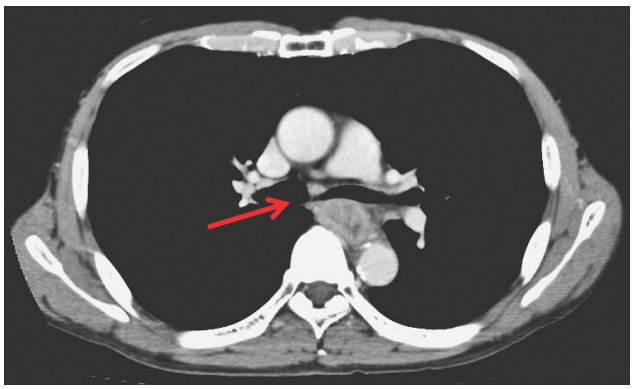


図 1. 死亡 6 ヵ月前の胸部造影 CT. 胸部食道に病変を認める（矢印）.

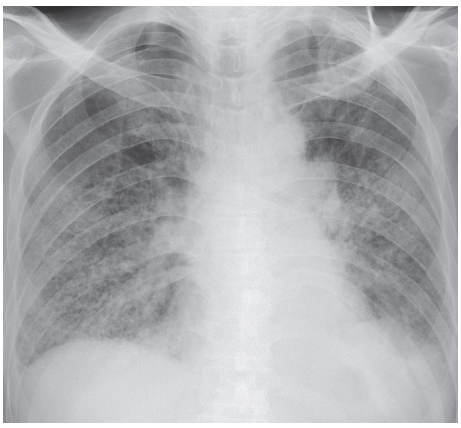


図 2. 死亡 2 日前の胸部 X 線像. 中下肺野に浸潤影の増強を認める.

病理画像

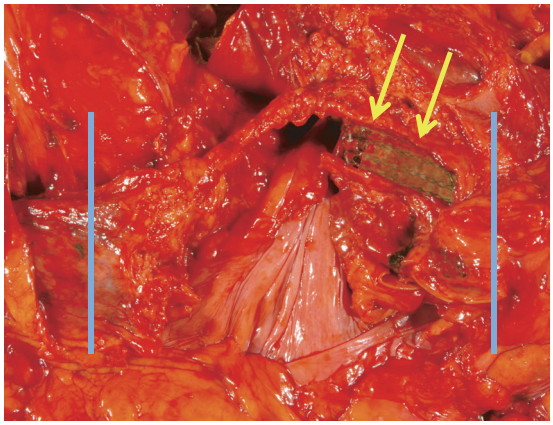


図 3. 摘出肉眼標本（1）. 食道癌. 縦線（水色）で囲った範囲に癌が広がるが，大部分で壁の欠損を伴う. 左主気管支ステントを矢印（黄色）で示す.

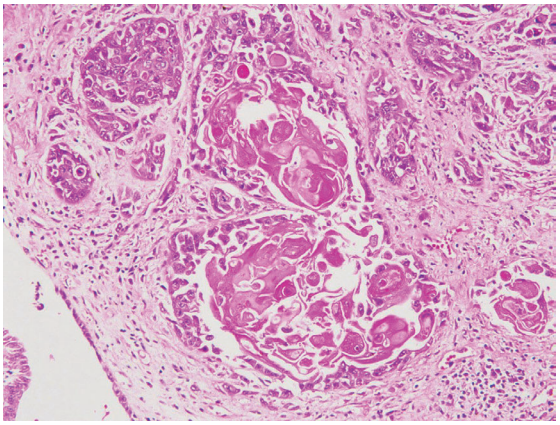


図 4. 病理組織像（1）[HE 染色]. 食道癌. 角化の目立つ扁平上皮癌の組織像である.

図 5. 摘出肉眼標本（2）. 右肺割面. 下葉に膿瘍を伴う肺炎，上葉主体に気腫性変化を認める.

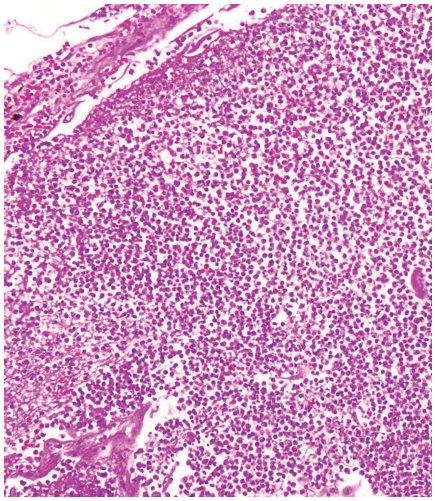


図 6. 病理組織像（2）[HE 染色]. 肺の膿瘍. 肺胞腔内には好中球が充満する.

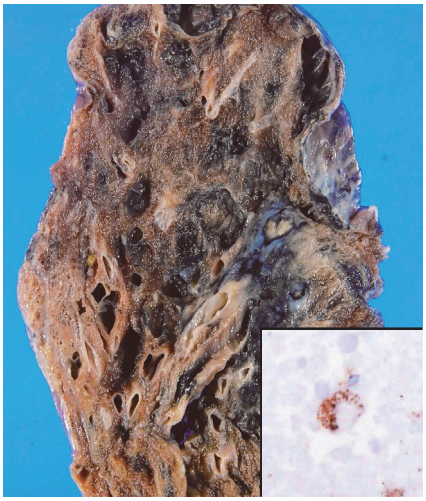


図 7. 摘出肉眼標本（3）. 左肺上葉. 凝固壊死を伴う弾性硬の黒色調領域が存在する. Tb1 抗体にて陽性像が認められる（右下囲み）.

症例 No. 93　悪性リンパ腫に対する治療中に重度の真菌感染症を発症し死亡した症例

剖検依頼科：血液内科

【概要】 悪性リンパ腫の再発を繰り返し，治療中に重度真菌感染症を合併した 70 歳代・男性である．悪性リンパ腫は当初は低悪性度に分類される濾胞性リンパ腫であったが，再発を繰り返すうちに高悪性度のびまん性大細胞型リンパ腫へ形質転換を起こしていた．入院時にみられた全身状態悪化，腰痛などの症状は抗癌化学療法でいったん軽快傾向にあったが，血球減少に伴い重度の真菌（アスペルギルス）感染を合併し，抗真菌薬投与を行ってもコントロールできなかった．最終的には抗癌化学療法は続行不可能となり，緩和医療への方針転換を余儀なくされた．易感染性状態での真菌感染症コントロールのむずかしさを確認する症例であった．

【症例】 70 歳代，男性．

主　訴：食欲低下，全身倦怠感，腰痛．

既往歴：境界型糖尿病（20 歳代，体重制限で軽快），右眼外傷性白内障・緑内障（30 歳代，手術），急性肝炎（40 歳代，治癒）．

【臨床経過】

6 年前：白血球数増多，全身リンパ節腫脹，脾腫があり，リンパ節生検で濾胞性リンパ腫（grade 2）の診断であった．化学療法によりいったん寛解したが，以後再発を繰り返す．

15 ヵ月前：3 度目の再発で，びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫への形質転換を起こし．以後化学療法を継続した．

入院時：全身状態が悪化し，血中カルシウム値高値にて入院し，化学療法を行った．

20 日後：傾眠傾向，左肺上葉浸潤影，血中アスペルギルス抗原の高値があった．化学療法を変更し，抗真菌薬により軽快した．

40 日後：再び傾眠傾向となり，またB–D グルカン高値があった（図 1）．リンパ腫コントロール不良と真菌性肺炎・敗血症の合併があり，治療継続は不可能と判断し，緩和医療の方針となった．

53 日後：全身衰弱にて死亡した．

【検索希望事項】

リンパ腫の広がり，中枢神経浸潤の有無，左肺上葉浸潤影の原因はリンパ腫か真菌か．

【剖検診断】

1. 悪性リンパ腫（びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫）．
2. 浸潤性肺アスペルギローシス．
3. 真菌による多発梗塞．

【剖検所見】

A．悪性リンパ腫（びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫）

1. 既往検体：6 年前，follicular lymphoma，grade 2（図 3）．
2. 組織像：大型のリンパ球様異型細胞がびまん性に浸潤する（図 4）．リンパ腫細胞の免疫染色：CD20(+)，CD79α(+)，Bcl–2(+)，Bcl–6(+)，CD3(−)，CD5(−)，CD10(−)，MIB–1 index 30%．
3. 全身臓器へのリンパ腫浸潤（図 2）：リンパ節（頸部，縦隔，腹腔内），骨（頭蓋骨，椎骨，肋骨，胸骨，大腿），肝，腎，脾，副腎，膵，精巣，体幹皮膚，脳下垂体．
4. 治療関連所見：浸潤性肺アスペルギローシス，真菌による多発梗塞（図 5，6，7）．左肺上葉を主体とし，両肺，腎，心，胃，脳，縦隔リンパ節，甲状腺に真菌塊を認めたが，周囲に好中球はほとんどみられず梗塞様であった．左肺培養検査で *Aspergillus fumigatus* を検出した．

【病理所見まとめ】

1. リンパ腫の広がりは，上記のとおり頸部～腹腔内にいたる多数のリンパ節，全身骨および臓器に広がっていたが，中枢神経への浸潤は，下垂体後葉で少量認めたのみであった．
2. リンパ腫の組織像はびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫であったが，生前の経過および Bcl–6 などの免疫染色所見より濾胞性リンパ腫由来であると考えられる．
3. 左肺上葉には真菌感染巣がみられ，この真菌感染が全身臓器に広がっており，真菌血症・敗血症の状態にあった．
4. 真菌症は血中アスペルギルス抗原高値および左上葉浸潤影の出現した入院 20 日ころ，β–D グルカン高値を認めた入院 40 日ころに二度悪化したと考えられ，この時期に一致して傾眠傾向が出現していることから，傾眠傾向の原因はリンパ腫の悪化よりも，真菌症の悪化が関連したと考えられる．また，真菌感染巣は大脳白質主体にみられたが脳幹部にはなく，脳感染巣自体が傾眠傾向をもたらしたというより，真菌血症，敗血症による全身状態悪化に伴って意識低下が出現したものと思われる．
5. 死因は，全身に広がった悪性リンパ腫による全身衰弱，および血球減少による免疫力低下を背景とした重度の真菌感染症によるものである．

臨床画像

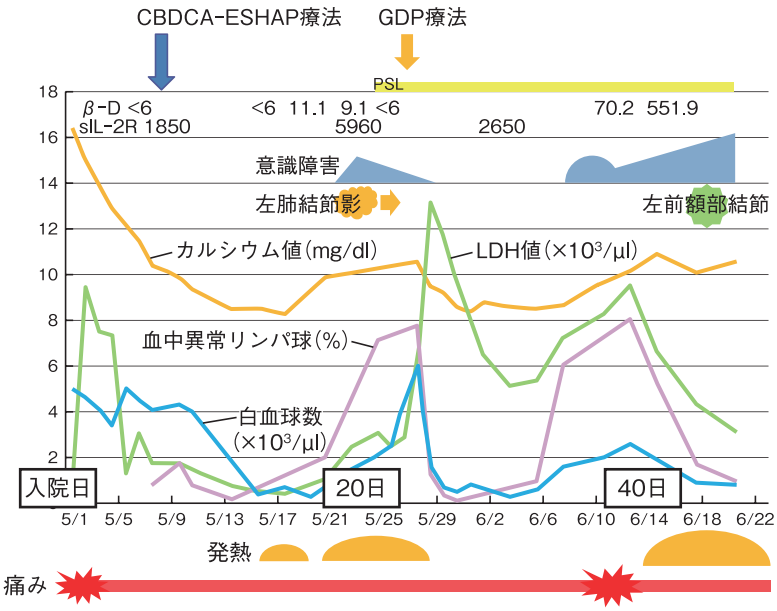


図 1. 入院中の経過．悪性リンパ腫の骨浸潤によると考えられるカルシウム値高値（黄線）は改善傾向にあったが，入院 20 日後，40 日後ころに意識障害・発熱および β-D グルカンの上昇がみられ，真菌感染症の悪化が示唆される．

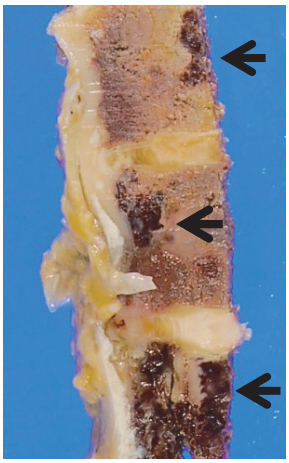


図 2. 摘出肉眼標本（1）．椎骨へのリンパ腫浸潤．出血・壊死を伴う浸潤がみられる（矢印）．腰痛，高カルシウム血症の原因はこのような骨浸潤である．

病理画像

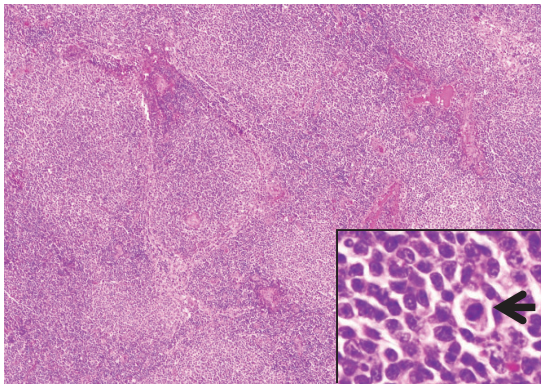


図 3. 病理組織像（1）［HE 染色］．初発時のリンパ腫（鼠径リンパ節）．濾胞構造が特徴的な濾胞性リンパ腫である．右下の拡大図では centroblast 様の大型細胞の混在がみられる（矢印）．

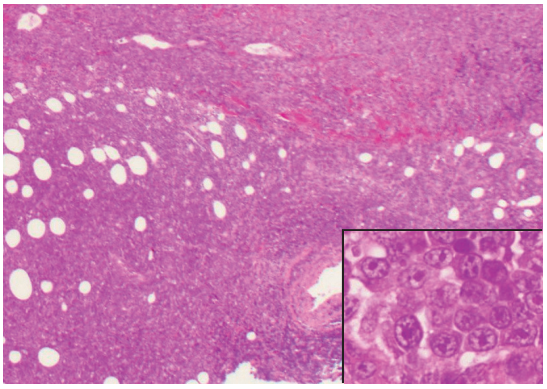


図 4. 病理組織像（2）［HE 染色］．形質転換後のリンパ腫（下肢皮膚）．濾胞構造はみられず，右下囲みのような大型で核小体の明瞭な細胞からなり，びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の組織像を示す．

図 5. 摘出肉眼標本（2）．左肺上葉にみられた多結節癒合状の真菌感染巣（矢印）．

図 6. 摘出肉眼標本（3）．左側頭葉にみられる真菌感染巣．このような病巣が大脳全体に多数みられる．

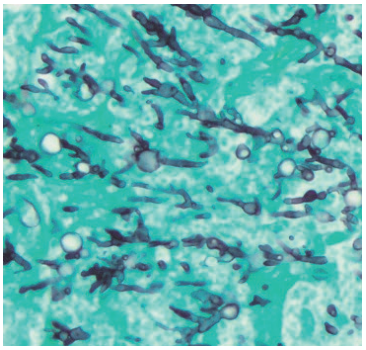


図 7. 病理組織像（3）［Grocott 染色］．真菌感染巣（左肺）．*Aspergillus* 菌糸が観察される．

症例 No. 94　記銘力障害で発症し，開頭腫瘍切除と放射線化学療法を施行し 2 年の経過で死亡した膠芽腫の症例

剖検依頼科：脳神経外科

【概要】記銘力障害で発症した膠芽腫に対し開頭腫瘍切除と放射線化学療法を施行し，以後維持療法を継続していたが，術後 1 年で再発した．その後腫瘍は増大し，発熱と呼吸状態の悪化があり発症後 2 年で死亡した．解剖時には大きな壊死巣を伴ってほぼ全脳に腫瘍が浸潤していた．脳室内には播種巣が目立ち，脳底部には高度の髄膜炎がみられた．髄膜炎が死因に関与した可能性もあるが，直接死因と考えられる肺炎の程度と比較できないため評価はむずかしい．

【症例】81 歳，男性．

主訴：記憶喪失．

既往歴：脊柱管狭窄症，前立腺肥大症．

【臨床経過】

死亡 2 年前：記銘力障害を主訴とし，他院で MRI により右海馬に病変を指摘される（図 1）．

1 年 9 ヵ月前：開頭腫瘍摘出術を行い，放射線化学療法を施行した．これ以降テモゾロミドによる維持療法を継続した．

8 ヵ月前：MRI で右側脳室後角に造影病変があり，放射線療法を施行した．

6 ヵ月前：腫瘍の増大，右前頭葉内側に新規造影病変が出現し，意識レベルが低下した．

3 ヵ月前：徐々に意識レベルの低下があり，家族との話し合いにより DNR の方針となる．MRI で右後頭葉の腫瘍増大，側脳室内への浸潤（図 2），脳幹への著明な播種を認める．

3 日前：発熱があり抗生物質を投与した．

1 日前：呼吸状態の悪化があり経管栄養を中止した．

死亡：呼吸状態がさらに悪化し死亡した．

【検索希望事項】

原疾患の広がりと状態．

【剖検診断】

1. 膠芽腫，放射線化学療法後．
2. 化膿性髄膜炎．

【剖検所見】

A. 膠芽腫

1. 既往：死亡 1 年 9 ヵ月前の腫瘍摘出材料 glioblastoma，Ki-67 陽性率：39.7%．
2. 病変部組織像：腫瘍細胞密度の高い部分では，長い好酸性突起を有する不整な紡錘形核からなり，時に多核や巨核の大型細胞が混在する（図 4）．このような部分では pseudopalisading necrosis が目立つが，微小血管増生は目立たない．核分裂像が散見され，一部目立つ．周辺部の細胞密度の低い部分では，腫瘍細胞はクロマチンが濃染する細い紡錘形～多辺形核を呈する（図 5）．免疫染色では，GFAP 陽性の豊富な突起を有するが，部分的には GFAP が陰性となる．IDH1 は陰性．
3. 広がり：腫瘍の広がりは右半球を主体とし，右側脳室は圧排されほぼ消失している．右側脳室のあった場所～その内側にかけては広範な壊死巣が広がる．この壊死巣は側脳室前角のレベル～後頭葉先端まで広がる．大脳縦裂の偏位やヘルニアの形成は目立たない．腫瘍が高密度で浸潤する部分は，右半球の壊死巣周辺部に広がる．低密度の浸潤は大脳白質の大部分で確認できるが，左前頭葉先端や側頭葉の一部で浸潤を確認できない（図 3）．左半球には脳梁を介して浸潤するが，左脳室周囲の，とくに後側では播種からの浸潤が主体となる．第四脳室周囲の小脳脚部分にも播種からの腫瘍浸潤巣を認めるが，直接浸潤は確認できない．

B. 化膿性髄膜炎

脳底部のとくに脳幹～小脳にかけて白色に混濁する（図 6）．組織学的に強い好中球浸潤がみられる．好中球浸潤は白濁していた部分に強いが，左側脳室内でも強い炎症がみられる．また大脳周囲にも軽度の好中球浸潤がみられる．炎症の強い部分では，脳実質内への好中球浸潤やグリオーシス，浮腫を認める．

【病理所見まとめ】

1. 腫瘍はほぼ全脳に広がっていたが，再発巣の確認された右後角と右前頭葉内側において，腫瘍の増生と壊死が目立った．
2. 髄膜炎の所見から発症後それほど時間は経過しておらず，3 日前からの発熱に対応していると推測される．局所解剖のため肺の検索はなされていないが，呼吸状態の悪化もみられていることから，肺炎もきたしていたと考えられる．
3. 腫瘍が大きく増生するにもかかわらず，術後のスペースや脳室を埋めるように進展したために，大脳裂溝の偏位や脳ヘルニアはほとんどみられなかった．
4. 直接死因としては，経過から肺炎による呼吸不全が主因と考えられるが，髄膜炎の存在も影響していた可能性がある．

臨床画像

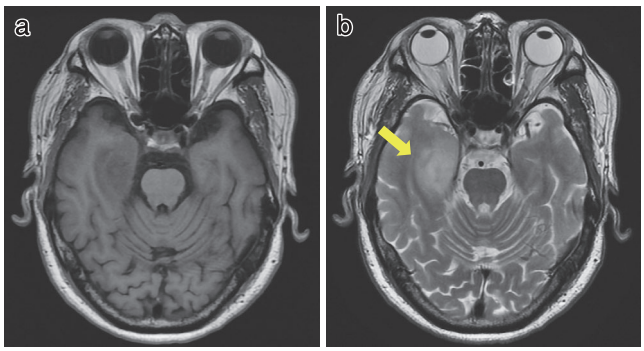


図 1. 初診時 MRI（a：T1 強調画像，b：T2 強調画像）．b の矢印は右海馬の病変．

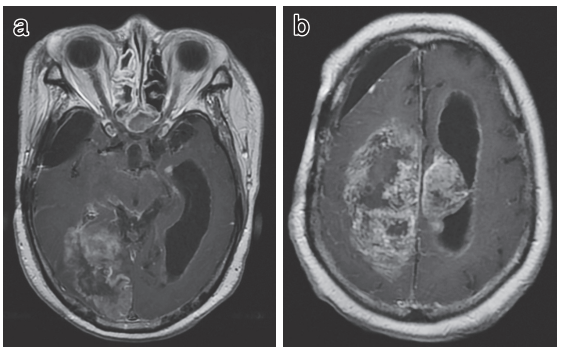


図 2. 死亡 1 ヵ月前の MRI

病理画像

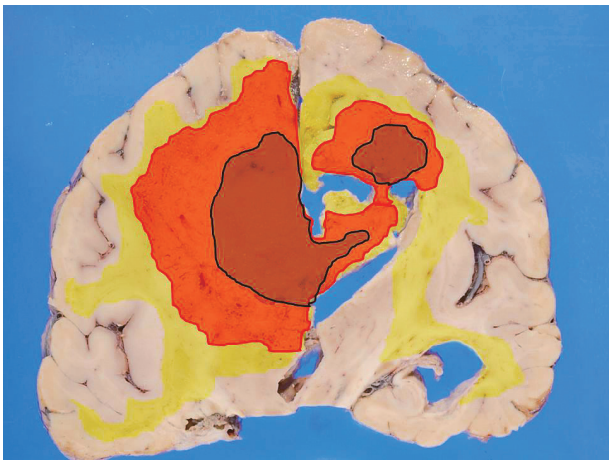


図 3. 摘出肉眼標本（1）．前額断割面（腫瘍の分布）．黒：壊死，橙：腫瘍高密度，黄：腫瘍低密度を示す．

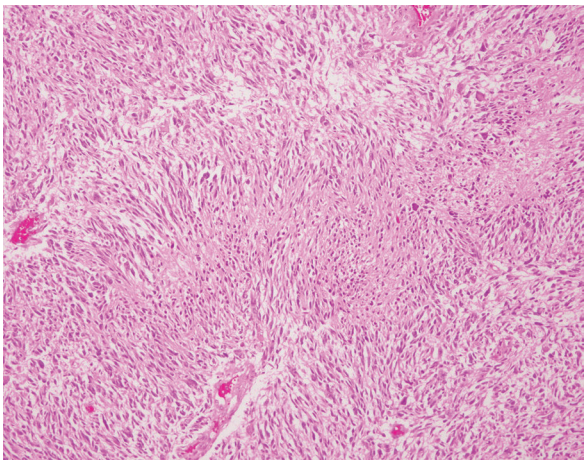


図 4. 腫瘍の病理組織像（HE 染色）．紡錘形状の腫瘍細胞が密に増生する．中央には pseudopalisading necrosis を伴う．

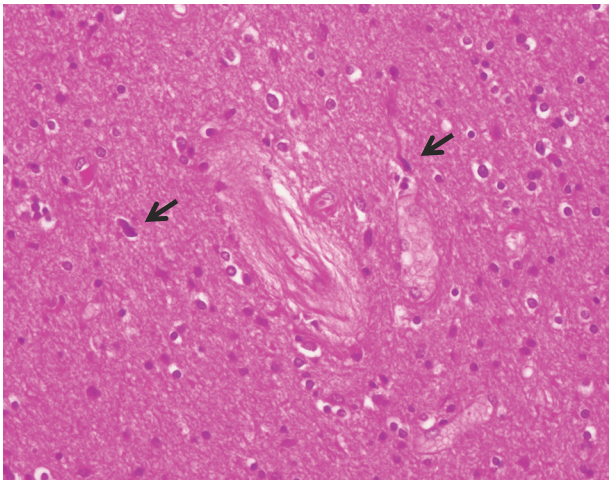


図 5. 腫瘍周辺の病理組織像（HE 染色）．一見正常の白質にも腫瘍細胞（矢印）がまばらに浸潤する．中央には放射線療法により壁の肥厚した血管がみられる．

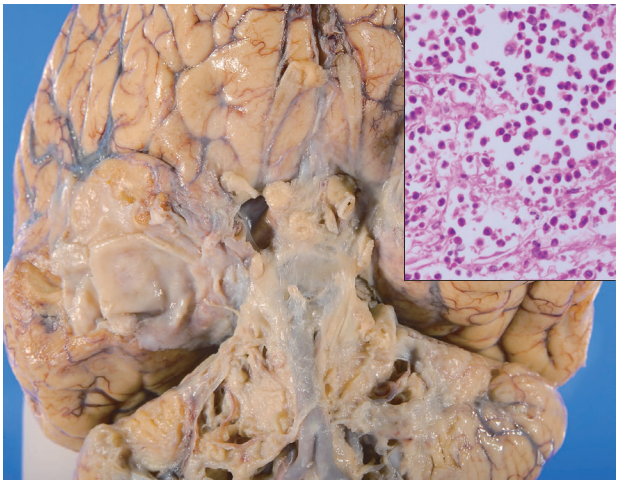


図 6. 摘出肉眼標本（2）．化膿性髄膜炎．脳底部は白濁する．右側頭葉は手術切除により欠損している．白濁する部分には著明な好中球浸潤がみられる（右上囲み：HE 染色）．

お茶の水醫學雑誌　62:089–098（2014）

堀　恭徳 博士（医学）　Takanori Hori

学位記番号　／乙第 1756 号　　学位授与　／平成 25 年 7 月 17 日

学位論文　／A carboxy-terminally truncated human CPSF6 lacking residues encoded by exon 6 inhibits HIV–1 cDNA synthesis and promotes capsid disassembly
（Exon 6 にコードされる領域を欠損するヒト CPSF6 カルボキシ末端欠損体は HIV–1 cDNA 合成過程を阻害すると共にウイルスコアの崩壊を促進する）
Journal of Virology　第 87 巻第 13 号 7726–7736 頁　平成 25 年 7 月発表

論文審査委員／主査：神奈木　真理　　副査：中村　正孝　　副査：森尾　友宏

〈論文要旨〉

HIV–1 はその増殖に多数の宿主細胞因子を必要としている．新規治療法の開発には，ウイルス増殖機構に関わる宿主細胞因子の更なる解明とその制御法の開発が必要である．HIV 感染特異的な分子間相互作用を網羅的に解析する目的で，ヒト cDNA 発現ライブラリーを用いた HIV 感染制御因子群の探索を行った結果，HIV–1 感染を抑制する因子として human Cleavage and Polyadenylation Specific Factor 6（CPSF6）のアミノ末端 375 アミノ酸からなるポリペプチド CPSF6–375 を見出した．既報のマウス由来アミノ末端 358 アミノ酸からなるポリペプチド mCPSF6–358 は，HIV–1 の生活環において逆転写産物合成を阻害せず HIV–1 cDNA の核移行過程を阻害する．一方 hCPSF6–375 は，HIV–1 逆転写産物合成効率を著しく低下させた．hCPSF6–375 は CPSF6 のヒト–マウス間でみられる 2 アミノ酸配列の差異を含んでおり，また CPSF6–375 と CPSF6–358 間でのアミノ酸配列の差異を比較すると，hCPSF6–375 は CPSF6 の exon 6 にコードされる領域（Ex6）を欠き，またそのカルボキシ末端側は 54 アミノ酸残基分長かった．これらの差異をもとに変異体を作製し HIV–1 逆転写反応過程に影響をおよぼす領域を比較検討した結果，Ex6 を欠く変異体では HIV–1 cDNA 合成効率が低下することがわかった．その原因としてウイルスコアの安定性変化を想定し細胞侵入後の多量体カプシドタンパク質を定量したところ，hCPSF6–375 発現細胞内ではウイルスコアの崩壊が促進されている事が示唆された．

〈緒言〉

HIV–1 は細胞侵入後，脱殻，逆転写，核移行，組み込みの過程を経て感染を成立させる．効率的な感染の成立にはウイルスタンパク質だけでなく多数の宿主因子を必要とする．ウイルス感染に関与する宿主因子の探索のために，これまでに siRNA や cDNA 発現 library を用いたスクリーニングが試みられている．既報の論文でマウス cDNA 発現ライブラリーを用いたスクリーニングによりカルボキシ末端を欠損した CPSF6 変異体（mCPSF6–358）が報告されており，これを発現する細胞では逆転写の後期産物量に変化はないが，核内に 2–LTR form で存在するウイルス DNA 量が減少することから，mCPSF6–358 は感染の核移行段階を阻害していると考えられている．我々は，ヒト cDNA 発現ライブラリーを用いたスクリーニングで得られた Ex6 を欠く CPSF6 のカルボキシ末端欠損体がウイルス cDNA 合成およびウイルスコアの崩壊に及ぼす影響を解析し，新たな知見を得た．

〈方法〉

HIV–1 ベクター VSV–G/NL4–3 感染感受性である HEK293 細胞株に，レトロウイルスを用いてヒト T 細胞株である MT–1 由来 cDNA 発現ライブラリーを導入した．その後ヒト単純ヘルペスウイルス Thymidine kinase（TK）遺伝子を組み込んだ HIV–1 ベクター VSV–G/NL4–3TK を感染させ，ガンサイクロビル存在下で非感染細胞を選択培養する操作を複数回繰り返した．生存した細胞の中で感染感受性が著しく低下した細胞クローンからライブラリー由来 cDNA を回収し，発現ベクターに組み込んだ後 HEK293 細胞へ再導入し，HIV–1 感染感受性への影響を VSV–G/NL4–3luc ベクターを用いて検討した．

感染抑制宿主因子として見出された hCPSF6–375 が逆転写反応過程に影響を与える領域を特定するため，hCPSF6–375 と mCPSF6–358 間のアミノ酸配列の差異をもとに変異体を作製した．逆転写反応過程におけるウイルス cDNA 合成効率の比較は，感染後 6，12，24 時間後に細胞から DNA を抽出し，そこに含まれるウイルス cDNA 量を U5–gag 領域を増幅する定量 PCR 法によって評価した．また細胞侵入後のウイルスコアの崩壊については，ショ糖密度勾配超遠心法による Fate-of-capsid assay で評価した．

〈結果〉

VSV–G/NL4–3luc を用いた感染実験において，hCPSF6–375 発現細胞は既報の mCPSF6–358 発現細胞と同様に HIV–1 感染を抑制したが，CPSF6–h375 のみが後期逆転写産物量を減少させた．hCPSF6–375 と mCPSF6–358 の局在はいずれも主に細胞質であった．mCPSF6–358 に対する逃避変異として知られる CA N74D 変異を持つ VSV–G/NL4–3luc CA N74D を感染させた場合，hCPSF6–375 発現細胞の感染感受性はコントロール細胞や mCPSF6–358 発現細胞と同程度である事が確認された．また，内在性の CPSF6 に関して shRNA による発現抑制と全長 CPSF6 の強制発現により検討したが，HIV–1 感染への有意な影響は見られなかった．

hCPSF6–375 はヒト–マウス間で異なる 2 アミノ酸を含んでおり，mCPSF6–358 と比較して Ex6 をコードしておらず，またその C 末端側は 54 アミノ酸残基分長い．これらの違いを基に hCPSF6–375 の変異体を作製した．ウイルス cDNA 合成効率の比較では，特筆すべき事として Ex6 が無い場合ウイルス cDNA 合成効率が感染後早期（6 時間）で既に著しく低下していた．カルボキシ末端 54 アミノ酸が存在する場合，Ex6 ほどではないがウイルス cDNA 合成効率が低下する事が確認された．またヒト–マウス間での 2 アミノ酸の差異はウイルス cDNA 合成効率に影響していなかった．

Fate-of-capsid アッセイによって感染細胞内でのウイルスコアの崩壊を細胞間で比較した場合，hCPSF6–375 発現細胞では 4，8 時間ともにウイルスコアとして存在する p24 タンパク質量が減少している事が，ウエスタンと p24 ELISA 法により示された．

HIV–1 本来の宿主細胞により近い T 細胞株である MOLT–4，MT–4/CCR5 においても，hCPSF6–375 は強い感染抑制作用を示していた．複製可能なウイルスを用いた MT–4/CCR5 の感染実験において，hCPSF6–375 発現細胞では mCPSF6–358 発現細胞と同様にウイルス増殖が強く抑制された．

〈考察〉

hCPSF6–375 は既知の mCPSF6–358 同様に HIV–1 感染を抑制したが，mCPSF6–358 の作用点である核移行より前段階であるウイルス cDNA 合成段階に作用することがわかった．CPSF6 はそのカルボキシ末端に核移行配列を持っており核に局在するが，hCPSF6–375 は mCPSF6–358 と同様その配列を欠失しておりその局在が両方とも細胞質であったことは，局在の違いが HIV–1 感染における作用点の違いになっていないことを示唆している．既報の結果同様，shRNA による内在性 CPSF6 の発現抑制と，全長 CPSF6 の安定発現は HIV–1 感染に大きな影響を与えず，この抑制効果はこれらの CPSF6 変異体に特異的なものである事が示唆された．既報において mCPSF6–358 による感染抑制に HIV–1 CA の N74D 変異が抵抗性であることが示されており，hCPSF6–375 も VSV–G/NL4–3luc CA N74D 変異体の感染を抑制しなかった．この結果から hCPSF6–375 による感染抑制にはウイルス側のカプシドの配列が重要である事が示唆される．hCPSF6 変異体によるウイルス cDNA 合成の阻害に Ex6 の欠失が重要である事は，293 細胞以外に T 細胞株でも示された．他の研究グループの報告では，CPSF6–358 の 313–327 アミノ酸残基が抗 HIV–1 作用を示すのに十分な配列とされている．我々の hCPSF6–375 をもとに作製した変異体は全てこの領域を含んでいること，Ex6 をコードする hCPSF6–358 と hCPSF6–412 は cDNA 合成を阻害せず，Ex6 をコードしない hCPSF6–321 と CPSF6–375 がウイルスの感染は抑制することから，Ex6 は HIV–1 感染抑制の必要条件ではない事が示唆された．

Fate-of-capsid アッセイの結果，hCPSF6–375 発現細胞ではコントロール，hCPSF6–412 あるいは mCPSF6–358HA 発現細胞に比較してウイルスコアを形成する多量体 p24 の量が減少しており，ウイルスコアの崩壊が促進されている事が示唆された．過去の報告で mCPSF6–358 は CA–NC のチューブに結合することが示されており，CA と mCPSF6–358 の結合に必要な CPSF6 の 313–327 番の配列は hCPSF6–375 にも存在しているため，hCPSF6–375 も CA と結合する可能性がある．hCPSF6–375 と mCPSF6–358 間でウイルスコア崩壊への影響が異なる要因として，Ex6 の有無によってウイルスコアとの結合状態が変わっている可能性があるが，その分子機構の解明にはより詳細な解析が必要である．

〈結論〉

発現クローニング法により HIV–1 感染抑制因子 hCPSF6–375 が得られた．hCPSF6–375 の発現は感染後のウイルス cDNA の合成効率を著しく低下させ，感染細胞内でのウイルスコアの崩壊は促進されていた．その作用には Ex6 の欠如が大きく寄与していた．

金井　康真 博士（医学）　Yasumasa Kanai

学位記番号　／甲第 1954 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）／生態環境応答学系専攻（皮膚科学分野）

学位論文　／Impaired expression of Tim-3 on Th17 and Th1 cells in psoriasis
（尋常性乾癬患者における末梢血 Th17 および Th1 細胞上の Tim-3 発現障害）
Acta Dermato-Venereologica　第 92 巻第 4 号 367–371 頁　平成 24 年 7 月発表

論文審査委員／主査：烏山　一　　副査：水谷　修紀　　副査：木村　彰方

〈論文要旨〉

尋常性乾癬は Th17 や Th1 細胞により誘発される慢性皮膚疾患である．Th17 および Th1 細胞表面には選択的に Tim-3 が発現しており，Tim-3 リガンドとの相互作用でサイトカイン産生が抑制することが明らかになっている．乾癬患者の末梢血における Th17，Tc17，Th1 および Tc1 細胞上の Tim-3 発現をフローサイトメトリー法にて検証することで，乾癬患者の T 細胞における機能的障害の評価を試みた．一般的に乾癬患者では健常人に比べ，Th17，Tc17，Th1 および Tc1 細胞数が増加していることが知られている．しかしながら，乾癬患者では健常人もしくはアトピー性皮膚炎患者に比べて Th17，Th1 および Tc1 細胞上の Tim-3 発現は低下していた．Tim-3 非発現細胞は Tim-3 発現細胞よりもサイトカイン産生能が高いことから，乾癬では T 細胞の Tim-3 発現不全のためアポトーシスを回避した Th17，Th1 および Tc1 細胞が病態形成に関与している可能性が示唆された．

〈緒言〉

尋常性乾癬は複数の鱗屑を伴う紅斑を特徴とする慢性多遺伝子疾患である．乾癬の病因はあまり解明されていない．Th1 細胞は長い間，乾癬における重要な細胞と考えられていた．しかしながら，乾癬患者の病態局所に IL-23p19 が亢進することやマウスの皮膚に IL-23 を投与すると乾癬様皮疹を呈することから増殖に IL-23 が関与する Th17 細胞が Th1 細胞よりも乾癬の病態形成に重要であるとされている．それにも拘わらず，Th1 細胞や IFNγ は乾癬皮疹で亢進しており，IFNγ が IL-1 や IL-23 を介して Th17 細胞を誘導する抗原提示細胞を活性化したり，IL-17 と相乗的に角化細胞からの CCL20 や β-defensin 産生を補助したりすることから Th1 細胞の関与も重要である．

T-cell Ig- and mucin domain-containing molecule（Tim）-3 は，マウスにおいて Th1 細胞に発現しているが Th2 細胞には発現しておらず，Tim-3 リガンドとの相互作用により Th1 細胞免疫応答を制御することが知られる．加えて Th17 細胞においても発現が認められ，Th17 細胞のシグナルを負に制御する．ヒトにおいても同様に Tim-3 は活性化 Th1 細胞および Th17 細胞において発現していることが報告されており，Tim-3 の阻害は CD4 陽性 T 細胞からの IFNγ および IL-17 産生を亢進させる．CD8 陽性細胞にも同様に Tim-3 が発現しており，HCV や HIV 感染患者においては健常人よりも発現が亢進する．Tim-3 発現 CD8 陽性細胞は，非発現細胞に比べて IFNγ 産生能が低く，この状態がウィルス感染防御障害を引き起こすと考えられている．

Tim-3 の生理的リガンドの 1 つが galactin-9 であり，Tim-3 に結合することで Th1 および Th17 細胞のアポトーシスを誘導したり，細胞分化を抑制したりする．Galactin-9 の発現は IFNγ により亢進するため，galactin-9 による Tim-3 発現 Th1 および Th17 細胞の抑制はネガティブフィードバック機構の 1 つである可能性がある．すなわち，galactin-9 と Tim-3 の相互作用に障害が起き恒常性が破綻することで，自己免疫疾患などの病態が惹起されることが推察される．

本論文では乾癬が Th17 および Th1 細胞による炎症であることから，Tim-3 を介した T 細胞の調節機構に異常があるのではないかと仮説を立て，末梢血中の T 細胞における Tim-3 発現を検討した．

〈方法〉

インフォームドコンセントにて同意を得た 15 名の乾癬患者（男性 9 名，女性 6 名，平均 56.1 歳，24～78 歳）および 9 名のアトピー性皮膚炎患者（AD，男性 4 名，女性 5 名，平均 35.8 歳，29～44 歳）から採血を行い，Ficoll-Paque PLUS を用いた密度勾配法により末梢血中単核球（PBMC）を単離した．乾癬患者は局所ステロイド and/or ビタミン D3 誘導体にてコントロールされており，5 例は narrowband UVB 治療を受けていた．乾癬の病勢スコアである PASI は 7.4 ± 3.74 であった．なお，経口ステロイド，etretinate，cyclosporine および抗 TNF-α 抗体のような全身性処置を受けている患者は除外した．AD 患者は局所ステロイド and/or H1 受容体拮抗薬処置を受けており，AD の病勢スコアである EASI は 17.1 ± 7.16 であった．コントロールには 12 名の健常人（男性 4 名，女性 8 名，平均 28.7 歳，21～39 歳）の PBMC を用いた．単離したそれぞれの PBMC は，細胞表面染色もしくは PMA およびイオノマイシンにて刺激し表面抗原および細胞内染色を実施し FACSCalibur にて測定した．

〈結果〉

乾癬患者は健常人に比べて Th17，Th1 および Tc1 細胞の割合が亢進していた．Tc17 細胞も乾癬患者で亢進していたが AD 患者においてより強い亢進が認められた．

まず，乾癬患者の PBMC の Tim-3 発現を検討した結果，乾癬患者の CD4 陽性細胞上の Tim-3 発現は，健常人と比較するとわずかに低い傾向にあり，AD 患者と比較すると明らかに低かった．PMA/ イオノマイシンにて刺激すると健常，乾癬および AD の CD4 陽性細胞において Tim-3 発現量は亢進したが，乾癬患者では健常人および AD 患者に比べて明確な Tim-3 発現の低下が認められた．一方，CD8 陽性細胞上の Tim-3 発現は未刺激では健常，乾癬および AD 間で差はなかった．CD4 陽性細胞とは対照的に CD8 陽性細胞上の Tim-3 発現量は PMA/ イオノマイシン刺激により健常，乾癬および AD の全てで低下した．各群間の発現量は CD4 陽性細胞と同様に，乾癬患者では健常人および AD 患者に比べて明確な Tim-3 発現抑制が認められた．次に各 T 細胞サブタイプ上の発現を検討したところ，Th17，Th1 および Tc1 細胞上の Tim-3 発現は，乾癬患者が健常人および AD 患者よりも低かった．特に，乾癬患者におけるこれらの細胞は，健常人よりも割合が亢進しているにも拘わらず，Tim-3 発現が減っているため，病態への関与が推察される．

残念ながら PASI スコアとこれら Tim-3 発現細胞との相関は認められなかった．しかしながら Tim-3 非発現細胞は Tim-3 発現細胞に比べて CD4 および CD8 陽性細胞からの IL-17 および IFNγ 産生能が高いことが明らかとなったため，病態形成に何らかの寄与があると推察される．

〈考察〉

乾癬は Th17 や Th1 細胞免疫による慢性疾患であり，Tim–3 は T 細胞を負に制御する分子である．本論文では乾癬患者における IFNγ および IL–17 産生 T 細胞上の Tim–3 発現が障害されていることを明らかにした．

乾癬患者の PBMC では Th17，Th1，Tc17 および Tc1 細胞が健常人に比べて増加していた．これらのデータは乾癬病変局所において Th17，Th1 および Tc1 細胞が AD 病変局所よりも増加しているという報告に一致する．

AD は Th2 および Th1 が関与する疾患である．しかしながら，近年，AD 患者において Th17 細胞が亢進しており，病態の重症度と相関することが報告されている．本論文では統計学的有意差はないものの Th17 細胞の増加傾向にあった．おそらく Th17 細胞の多様性によるものか症例数の少なさに起因していると考えられる．興味深いことに AD 患者の Tc17 細胞は健常人や乾癬患者より多かった．Tc17 細胞は乾癬より AD における重要性が報告されており，マウスの接触性皮膚炎モデルの惹起相にて重要な役割を示していることも報告されている．

in vitro における刺激は CD4 陽性細胞の Tim–3 発現を亢進させ，CD8 陽性細胞の発現を低下させた．細胞表面への Tim–3 発現機構は不明であるが，これらのデータから CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞間で異なった Tim–3 発現機構があることを示唆される．

驚くことに乾癬患者における Th17，Th1 および Tc1 細胞の Tim–3 発現は，数が増加しているにも拘わらず低下していた．Tc1 細胞の乾癬に対する関与は不明であるが，Tim–3 を欠損した IL–17 および IFNγ 産生 T 細胞は Tim–3 による負の免疫応答から回避していると推察される．

乾癬の病変部では galactin–9 の発現が亢進している．Galactin–9 の主産生原は線維芽細胞であり IFNγ の刺激で亢進することが報告されている．乾癬では Th1 細胞からの IFNγ 産生により galactin–9 の産生が亢進されるが，Th1，Th17 および Tc1 細胞は Tim–3 の発現が低下しており，制御されないと推察される．さらに，Tim–3 非発現細胞のサイトカイン産生能が Tim–3 発現細胞よりも高いことを考慮すると，この IFNγ を中心とした悪循環が，乾癬病態を悪化させる 1 つの原因である可能性がある．

〈結論〉

乾癬患者における T 細胞上の Tim–3 発現は低下していた．乾癬では Tim–3 シグナルを介した免疫応答制御が行われず，サイトカイン産生能が高い Tim–3 非発現細胞が生き残り，病態形成に関与していることが推察された．

Kanchanamala　Withanage 博士（医学）

学位記番号　／甲第 1955 号　　学位授与　／平成 26 年 3 月 31 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）／生体支持組織学系専攻（病態代謝解析学分野）

学位論文　／Expression of RASSF6 in kidney and the implication of RASSF6 and the Hippo pathway in the sorbitol-induced apoptosis in renal proximal tubular epithelial cells
（腎臓における RASSF6 の発現，およびソルビトールによる腎臓近位尿細管上皮細胞の細胞死に対する RASSF6 とヒッポ・パスウエイの関与）
Journal of Biochemistry　第 152 巻第 1 号 111–119 頁　平成 24 年 7 月発表

論文審査委員／主査：仁科　博史　　副査：清水　重臣　　副査：内田　信一

〈論文要旨〉

RASSF6 はヒッポ・パスウエイの中核キナーゼ MST1/2 と結合し，HeLa 細胞，ラット肝細胞ではヒッポ・パスウエイと協働して細胞死を起す．RASSF6 は細胞膜裏打ち蛋白 MAGI–1 をバイトとする酵母ツーハイブリッド法を通じヒト腎臓ライブラリーから MAGI–1 結合候補分子として得られていたが，MAGI–1 結合分子であるかは結論されていなかった．RASSF6 とヒッポ・パスウエイが腎臓で果たす役割も不明だった．今回，内在性 RASSF6 が内在性 MAGI–1 と免疫共沈すること，C 末端の PDZ 結合配列で MAGI–1 の PDZ 領域に結合すること，腎臓糸球体に発現するがスリット膜が破壊されると消失すること，近位尿細管上皮細胞では頂端面に分布し megalin と重なること，高濃度ソルビトールが不死化ヒト近位尿細管上皮 HK–2 細胞に引き起こす細胞死に RASSF6 とヒッポ・パスウエイが関与すること，ソルビトールに曝露された HK–2 細胞では RASSF6 は Rab4，Rab11 と部分的に重なる集積像を示すこと，一次線毛の基底部にも集積することを明らかにした．これにより RASSF6 は MAGI–1 結合分子であることと，腎臓スリット膜の構造に密接に関係していることと，腎臓近位尿細管上皮細胞が高浸透圧に曝露されるような病的状態（造影剤腎症）では RASSF6 とヒッポ・パスウエイによって細胞死が起こる可能性が示された．

〈緒言〉

ヒトゲノムには Ras 結合領域をもち RASSF と表記される遺伝子が RASSF1–RASSF10 の 10 個ある．このうち RASSF1–RASSF6 は C 末端に SARAH という蛋白相互作用領域をもち C–terminal RASSF と呼ばれる．RASSF はいずれも腫瘍抑制分子とされているが，C–terminal RASSF は腫瘍抑制シグナル，ヒッポ・パスウエイの中核キナーゼ MST1/2 に結合する．MST1/2 は別のキナーゼ NDR1/2，LATS1/2 をリン酸化，活性化する．LATS1/2 は，転写コアクチベーター TAZ，YAP をリン酸化し負に制御する．TAZ，YAP は一般的に抑制細胞増殖促進，細胞死阻止に働く遺伝子転写を上昇させるので，TAZ，YAP を抑制するヒッポ・パスウエイは腫瘍抑制的に機能する．C–terminal RASSF のうち，RASSF1A，RASSF2，RASSF5 は MST1/2 を活性化しヒッポ・パスウエイを介して細胞死を誘導するが，RASSF6 は MST1/2 を抑制する．一方，RASSF6 はヒッポ・パスウエイと独立に細胞死を起す機能があり，この細胞死は MST1/2 により抑制される．以上の観察をもとに私たちは，RASSF6 と MST1/2 は複合体を作って相互に抑制しあい，ヒッポ・パスウエイが活性化するような条件下では，ヒッポ・パスウエイと同時並行して RASSF6 による細胞死が起こるというモデルを提唱し，HeLa 細胞，ラット肝細胞でモデルを支持する結果を得てきた．RASSF6 はヒト腎臓ライブラリーを対象とする酵母ツーハイブリッド法で，腎臓スリット膜の構成分子 MAGI–1 に結合する候補分子として得られたという経緯がある．しかし，RASSF6 が真に MAGI–1 結合分子かは立証されていない．RASSF6 の腎臓における局在，RASSF6 とヒッポ・パスウエイが腎臓で果たす役割についても明らかでない．これらを解明するため，本研究を行った．

〈方法〉

プラスミドの構築：PCR など一般的な分子生物学的方法で行った．
酵母ツーハイブリッド法，蛋白相互作用解析：MAGI–1 をバイトとしてヒト腎臓ライブラリーを用いて行った．免疫沈降法，プルダウンアセイで試験管内蛋白相互作用を解析した．
細胞培養，遺伝子導入，ノックダウン：HK–2 細胞，HEK293FT 細胞に Lipofectamine2000 でプラスミドベクターを導入した．ノックアウトには二重鎖 RNA を用いた．前者にレンチウイルスベクターで遺伝子導入を行い目的とする蛋白を恒常的に発現する細胞を樹立した．
RT–PCR：HK–2 細胞から mRNA を回収して RT–PCR を行った．
組織染色，細胞染色，ネフローゼモデル：一般的な免疫蛍光染色方法で行った．ラット腹腔に puromycin minonucleotide（PAN）を注射してネフローゼモデルを作成した．
細胞死：HK–2 細胞を高濃度ソルビトールに曝露して細胞死を誘導し細胞核凝集，TUNEL アセイ，caspase–3 の切断で細胞死を評価した．

〈結果〉

RASSF6 は MAGI–1 と結合する

RASSF6 の C 末端を抗原として新しくウサギで抗体を作成し，ラットの各種臓器から RASSF6 を免疫沈降し，従来使用していたマウスモノクローナル抗体でブロットし，肺，肝，腎，胸腺，脾臓に発現していることを確認した．ラット肝臓から免疫沈降すると内在性 MAGI–1 が共沈した．HEK293FT 細胞に RASSF6，MAGI–1 を発現させ，C 末端の PDZ 結合モチーフが相互作用に必要であることを確認した．大腸菌から調製した maltose–binding protein 融合 RASSF6 と glutathione S–transferase 融合 MAGI–1 を用いて試験管内実験を行い，MAGI–1 の三番目，四番目の PDZ 領域に結合することを確認した．

RASSF6 は腎臓の糸球体と近位尿細管上皮細胞に発現する

ラット腎臓の免疫蛍光染色を行った．糸球体の RASSF6 は PAN 処理でスリット膜を破壊すると検出されなくなり，スリット膜の裏打ち蛋白 MAGI–1 と類似の挙動を示した．近位尿細管上皮細胞の頂端面に強い集積を示し，megalin と重なった．ネフローゼを起こすと endocytotic vacuoles と表現される特徴的な分布を示した．

HK–2 細胞には RASSF1 から RASSF6 まで各種 RASSF の mRNA がある

HK–2 細胞を用いて近位尿細管上皮細胞における RASSF6 の役割を解析するのに先立って，HK–2 細胞から mRNA を回収し，RT–PCR を行い，RASSF1 から RASSF6 までの mRNA が発現していることを確認した．

高濃度ソルビトールは HK–2 細胞に細胞死を起こしヒッポ・パスウエイを活性化する

HK–2 細胞を 500 mM ソルビトールに曝露すると細胞核凝集が起こり，TUNEL 陽性細胞が出現し，caspase–3 の切断が起こった．このとき，ヒッポ・パスウエイを構成する MST2，LATS2 を発現させておくと，これらのキナーゼがリン酸化，活性化した．MST2 によって活性化される NDR1 も活性化した．

高濃度ソルビトールよる HK–2 細胞の細胞死にはヒッポ・パスウエイと RASSF6 が関与する

HK–2 細胞の LATS1/2，RASSF6 をノックダウンする前処置の後，高濃度ソルビトールに曝露すると細胞死が抑制された．MST1/2 と NDR1/2 のノックダウンでは影響が出なかった．

HK–2 細胞における RASSF6 の細胞内局在

高濃度ソルビトールに HK–2 細胞を曝露すると，30 分後には RASSF6 はクラスター状に集積し，その後，細胞核周辺に集積する．このとき Rab5a，Rab7 とは一致せず，Rab4 と部分的に一致し，Rab11 とはさらによく一致した．また，興味深いことに一次線毛の基底部にも RASSF6 が集積した．

〈考察〉

ヒト腎臓ライブラリーを対象とする酵母ツーハイブリッド法で MAGI–1 結合候補分子として得られていた RASSF6 であるが，ラット肝臓を用いて，今回初めて内在性の RASSF6 と MAGI–1 の免疫共沈が確認された．腎臓の MAGI–1 は非常に難溶性であるため肝臓を用いた．ラット糸球体の RASSF6 がスリット膜破壊と機を一つにして消失する事実は，RASSF6 が MAGI–1 と同様にスリット膜と密接に関係することを支持する．試験管内の相互作用実験とあわせて，以上から RASSF6 は真の MAGI–1 結合分子と結論される．意外にも RASSF6 は近位尿細管上皮細胞の頂端面に強く分布し megalin と一致し，ネフローゼを起こすと endocytotic vacuoles に集積した．

MAGI–1 は極性のある上皮細胞ではもっぱら密着帯にあり頂端面への分布は観察されていないが，MAGI–1 が megalin と結合するという報告もあり，MAGI–1 には多数の splicing variants があるので，密着帯以外に分布する MAGI–1 もある可能性がある．MAGI–1 と RASSF6 の相互作用の意味は不明である．MAGI–1 は caspase によって切断され，糸球体上皮細胞の細胞死に関係すると報告されているが，私たちの実験では，MAGI–1 が RASSF6 の細胞死に影響するという結果は得られなかった．Megalin と RASSF6 は MAGI–1 の異なる PDZ 領域に結合するので，megalin と RASSF6 をつなぐ足場として機能する可能性はある．

RASSF6 とヒッポ・パスウエイが高濃度ソルビトールによる HK–2 細胞の細胞死に関わることは，造影剤腎症のような病態に RASSF6 とヒッポ・パスウエイが関係する可能性を示唆する．MST1/2 によって活性化されながら，一般にヒッポ・パスウエイの構成要素とされない NDR1/2 をノックダウンしても HK–2 細胞の細胞死は抑制されず，NDR1/2 が LATS1/2 とは異なる役割をもつことが，改めて示された．MST1/2 のノックダウンでも細胞死が抑制されないことは，MST1/2 のノックダウンがヒッポ・パスウエイとは独立して起こる RASSF6 による細胞死を抑制することをあわせ考えると説明される．

高濃度ソルビトールに曝露された HK–2 細胞において RASSF6 が特徴的分布を示し，Rab4，Rab11 と重なる事実は，RASSF6 が何らかの受容体の recycling に関係する可能性を示唆する．また，一次線毛の基底部に集積する観察は，Rab11 が Rab8 を介して一次線毛の形成に関係すること，ヒッポ・パスウエイの構成分子 FAT4，TAZ の欠損マウスが，腎臓において polycystic kidney diseases 類似の変化を起すこととあわせて，興味深く，RASSF6 と一次線毛の関係は今後の重要な研究課題である．

〈結論〉

RASSF6 は細胞膜裏打ち蛋白 MAGI–1 結合分子で腎臓の糸球体と近位尿細管上皮細胞に発現する．高濃度ソルビトールが引き起こす不死化ヒト近位尿細管上皮細胞の細胞死には RASSF6 とヒッポ・パスウエイが関与する．

片桐　洋樹 博士（医学）　Hiroki　Katagiri

学位記番号　／甲第 1956 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）／生体支持組織学系専攻（運動器外科学分野）

学位論文題目／Transplantation of aggregates of synovial mesenchymal stem cells regenerates meniscus more effectively in a rat massive meniscal defect
（ラット半月板切除モデルにおける滑膜由来間葉系幹細胞凝集体移植による半月板再生）
Biochemical and Biophysical Research Communications　第 435 巻第 4 号 603–609 頁　平成 25 年 6 月発表

論文審査委員／主査：野田　政樹　　副査：淺原　弘嗣　　副査：秋田　恵一

〈論文要旨〉

私たちはこれまでラット半月板切除モデルに対して，大量の滑膜由来間葉系幹細胞（滑膜 MSCs）浮遊液の関節内投与により半月板再生が促進されることを報告した．滑膜 MSCs を凝集体にすることにより，肉眼的な観察を可能とし，半月板欠損部に表面張力で接着させることにより，より効率良く半月板再生促進できることが期待される．今回，ラット内側半月板前節切除モデルに対し人間とラットの膝関節の大きさを考慮し実用化可能な同数の滑膜 MSCs を使用して凝集体移植群，浮遊液移植群，未治療群の間で比較し半月板再生に対する効果，移植細胞の生体内動態と，その機序に関して検討した．

〈方法〉

Lewis ラット 12–14 週の雄の内側半月板前節を切除した．同種ラットの滑膜から MSCs を調整し 500 細胞からなる凝集体 50 個移植群，5,000 細胞からなる凝集体 5 個移植群，25,000 細胞からなる凝集体 1 個移植群，25,000 細胞の浮遊液を関節内投与した群，及び細胞未投与群で比較した．凝集体は hanging drop culture により滑膜 MSCs を 3 日間培養し作成した．GFP または luciferase を全身で発現する transgenic ラットの滑膜 MSCs 及び DiI で標識した MSCs を使用し移植細胞の動態を観察した．再生半月板はマクロ，組織染色，免疫染色で 4 週（n＝8），12 週（n＝4）時に評価した．

〈結果〉

再生半月板は 4 週，12 週ともに浮遊液移植群，未投与群に比べ凝集体移植群で有意に面積の増大を認めた．再生半月板および隣接関節軟骨の組織評価でも凝集体移植群で良好であった．Luciferin の発光強度は 3 週以降，凝集体移植群が浮遊液移植群よりも強かった．4 週，12 週ともに再生半月板内に移植 MSCs を部分的に認めた．

〈結論〉

ラット内側半月板前節切除モデルに対し人間とラットの膝関節の大きさを考慮し実用化可能な同数の滑膜 MSCs を使用した凝集体移植群，浮遊液移植群，未治療群にて検討した結果，滑膜 MSCs を使用した凝集体による移植群において良好な半月板の再生を認め，移植細胞は長期生存した．凝集体移植群では，細胞活性がより長期間持続することが要因のひとつと考えられる．

〈緒言〉

半月板は膝関節の衝撃吸収等に関する重要な役割を果たしている．半月板損傷及び半月板切除術は変形性膝関節症の要因となる．半月板欠損に対して，同種半月板移植術，人工半月板移植術が試みられているが安全性，侵襲性，耐久性は未だ議論の余地がある．半月板再生に対する新規治療法の開発が望まれている．

滑膜 MSCs は優れた増殖能と軟骨分化能を有し半月板再生のために魅力的な細胞である．我々は以前，ラット半月板切除モデルに対して，大量の滑膜 MSCs 浮遊液の関節内投与により半月板再生が促進されることを報告した．一方，少量の滑膜 MSCs 浮遊液の関節内投与では半月板再生が促進されなかった．人とラットの膝関節の容積を比較すると人が約 1,000 倍大きく，人では約 1,000 倍の滑膜 MSCs が必要であると試算されるが，臨床において大量の滑膜 MSCs を準備することは容易ではない．この問題を解決するために新たな戦略が必要である．

滑膜 MSCs の hanging drop culture による凝集体は一つの解決策となりうる．滑膜 MSCs の凝集体は肉眼的な観察が可能となり，より効率よく表面張力で細胞を半月板欠損部に接着させることが可能となる．また軟骨形成関連遺伝子発現の増強を認める（Suzuki et al. Arthritic res Therapy. 2012）．本研究では，ラット内側半月板前節切除モデルに対し人間とラットの膝関節の大きさを考慮し実用化可能な同数の滑膜 MSCs（25,000 細胞）を使用した半月板再生における凝集体移植群，浮遊液移植群，未治療群での滑膜 MSCs の半月板再生に対する効果を比較し，さらに移植細胞の生体内動態と，半月板再生に対する機序に関して検討した．

〈方法〉

Wild type または全身に GFP 或いは luciferase を発現する transgenic Lewis ラット（12–14 週齢雄）の両側滑膜を採取した．3 時間のコラゲナーゼ処理後，有核細胞を培養した．70% subconfluency 時に回収後，500，5,000，2,5000 の MSCs を 30μL の培養液に懸濁し培養皿の蓋に播種し，すぐに蓋を反転させ，3 日間培養し凝集体を作成した．
Lewis ラット（12–14 週齢雄）の内側半月板前節を切除した後に 500 細胞からなる凝集体 50 個移植群，5,000 細胞からなる凝集体 5 個移植群，25,000 細胞凝集体を 1 個移植した群，25,000 細胞の浮遊液を関節内投与した群，及び細胞未投与群を作成し，4 週後及び 12 週後に比較検討した．

再生半月板面積・脛骨軟骨変性面積は面積計測ソフト ImageJ で計測し，統計学的に検討した．各再生組織に対し組織学的検討として，サフラニン–O，Type II collagen 染色を施行し，modified Pauli's score を使用して比較した．

Luciferase transgenic ラットより採取した滑膜 MSCs を使用し，投与された滑膜 MSCs の生体内での長期生存を経時的に発光イメージング機 IVIS にて計測した．

GFP transgenic ラットより採取した滑膜 MSCs を使用し，投与された滑膜 MSCs の再生半月板内局在を組織学的に検討した．
細胞遊走に関与するケモカイン CXCR4 の投与された滑膜 MSCs 内での発現を免疫組織学的に解析した．

〈結果〉

凝集体の形態

500，5,000，25,000 細胞の滑膜 MSCs 凝集体の大きさは容量依存的に増大し，容易には壊れず扱うことが可能であった．500 細胞の滑膜 MSCs 凝集体では細胞は円形であり，5,000，25,000 細胞の滑膜 MSCs 凝集体では表層の細胞は紡錘形で，深層の細胞は円形であった．TUNEL 染色陽性細胞はほとんど認めなかった．

移植後 4 週時における半月板再生

移植後 4 週時，未治療群並びに浮遊液移植群に比して 500 細胞からなる凝集体 50 個移植群並びに 5,000 細胞からなる凝集体 5 個移植群において再生半月板面積は有意に大きかった．再生半月板に対し，サフラニン-O 染色，Type II collagen 免疫染色を施行し，未治療群，浮遊液移植群に対し凝集体移植群において組織学的形態，軟骨細胞様細胞，Type II collagen の染色が良好であった．Modified Pauli's score を用いた評価においても有意に凝集体群にて良好な成績を残した．

移植後 12 週時における半月板再生

最も良好であった 500 細胞からなる凝集体 50 個移植群を用い長期的に有効性を検討するために，未治療群と比較した．再生面積は未治療群に比して 500 細胞からなる凝集体 50 個移植群において有意差を持って大きかった．組織学的にも未治療群に対し凝集体移植群において組織学的形態，軟骨細胞様細胞，サフラニン-O の染色性，type II collagen の染色性が良好で，modified Pauli's score の評価にて有意に良好であった．移植後 12 週時の脛骨内側領域における軟骨変性の検討で変性領域は未治療群に対し凝集体移植群において有意に小さく軟骨変性予防効果を認めた．

移植細胞生体内動態

Luciferase transgenic ラットより採取した滑膜 MSCs を使用し，投与された滑膜 MSCs の生体内での長期生存を経時的に発光イメージング機 IVIS にて計測した．

500 細胞からなる凝集体 50 個移植群においては浮遊液移植群に比べ投与時（1 週，2 週）は発光がやや弱かったが，3 週以降は逆転し長期に安定して発光を認めた．

移植細胞の生体内動態組織学的検討

Dil と GFP 陽性滑膜 MSCs は，4 週並びに 12 週で再生半月板内に一部認めた．

免疫組織学的検討

500 細胞からなる凝集体 50 個移植群において，細胞遊走に関与するケモカイン CXCR4 は移植直後から発現を認め，移植細胞の生着への関与が示唆された．

〈考察〉

再生医療実用化に向け，ラット内側半月板前節切除モデルに対し人とラットの膝関節の大きさを考慮し実用化可能な数の滑膜 MSCs を使用した移植を検討した．滑膜 MSCs を使用した凝集体による移植群において良好な半月板の再生ならび再生組織内での移植細胞の生存を認めた．凝集体にすることにより軟骨分化能が上昇することが報告されており，今回の実験でも再生面積の検討，組織学的検討で示されるように，滑膜 MSCs の凝集体は有用な半月板再生の素材と考えられる．

〈結論〉

ラット内側半月板前節切除モデルに対し，人とラットの膝関節の大きさを考慮し実用化可能な数の滑膜 MSCs 使用した移植における，滑膜 MSCs の凝集体移植群，浮遊液移植群，未治療群にて検討した結果，滑膜 MSCs を使用した凝集体による移植群において良好な半月板の再生を認めた．

宮部　斉重 博士（医学）　Yoshishige　Miyabe

学位記番号　／甲第 1957 号　　学位授与年月日　／平成 25 年 3 月 31 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）　／生体環境応答学系専攻（膠原病・リウマチ内科学分野）

学位論文　／Necessity of lysophosphatidic acid receptor 1 for development of arthritis
（関節炎の発症にリゾホスファチジン酸受容体 LPA_1 は重要である）
Arthritis & Rheumatism　第 65 巻第 8 号 2037–2047 頁　平成 25 年 8 月発表

論文審査委員／主査：横関　博雄　　副査：鍔田　武志　　副査：森尾　友宏

〈論文要旨〉

リゾホスファチジン酸（LPA）は生理活性を有する脂質メディエーターであり，血管新生，慢性炎症や悪性疾患への関与が報告されている．今回，関節リウマチ（RA）滑膜組織で LPA 受容体 1（LPA_1）が高発現し，LPA_1 阻害によりマウスコラーゲン関節炎が抑制される事を発見した．また，LPA_1 阻害により炎症細胞の滑膜組織への浸潤，ヘルパー T（Th）17 細胞や破骨細胞の分化が抑制される事も新規に見出した．以上より，LPA–LPA_1 シグナルは炎症細胞の遊走，Th17 や破骨細胞の分化に寄与し関節炎の発症に関与している事が示唆される．

〈緒言〉

RA は関節の滑膜への炎症細胞浸潤と骨破壊をきたす慢性炎症性疾患である．近年，生物学的製剤の導入により，関節炎や骨破壊が著明に改善されるようになった．しかし，生物学的製剤は薬価が高額であること，また，生物学的製剤に対する抵抗症例や重篤な感染症の合併などが報告され，より安価で安全且つ有効性の高い新規治療の開発が望まれている．

LPA は生理活性を有する脂質メディエーターであり，血管新生，慢性炎症や悪性疾患への関与が報告されている．LPA はオートタキシン（ATX）により合成され，LPA 受容体（LPA_{1-6}）を介して作用する．RA の領域では，RA 線維芽細胞様滑膜細胞（FLS）で ATX や LPA_{1-3} mRNA が発現している事や，LPA が RA FLS の細胞遊走や IL–6，IL–8 産生を促進する事が報告されている．昨年，RA 滑膜組織及び関節液中の ATX が変形性関節症患者（OA）と比べ高発現している事，更に間葉系細胞の ATX 遺伝子欠損させたマウスにおいてコラーゲン誘導関節炎（CIA）が抑制される事が示され，ATX–LPA シグナルの阻害が関節炎の治療になりうる事が示唆された．しかし，ATX 遺伝子欠損マウスは血管形成不全を呈し，胎生致死であることが知られている．ATX の阻害は，LPA 産生を抑制し，結果的にすべての LPA 受容体からのシグナルを抑制する事が推測される．この事から ATX を標的とした治療は副作用を生じさせる可能性がある為，治療標的としては不適切な可能性がある．治療標的の観点から関節炎の病態形成に関与する LPA 受容体を同定する事が重要であると考えられた．

本研究では LPA_1 の炎症細胞遊走，Th 分化，破骨細胞分化への関与と関節炎モデルマウスを用いて関節炎発症における LPA_1 の重要性を検討した．

〈方法〉

RA および OA 患者由来の滑膜組織における ATX，LPA_1 の発現を免疫染色，LPA_{1-6} の発現を realtime–RT PCR を用いて解析した．また，蛍光 2 重染色を用いて RA 滑膜組織における ATX，LPA_1 の発現細胞を同定した．マウス CIA は，DBA/1J マウスに対してはウシ II 型コラーゲン，C57/BL6 マウスに対してはチキン II 型コラーゲンを免疫し発症させた．野生型（WT）および LPA_1 遺伝子欠損（KO）マウスにコラーゲン免疫を行い，関節炎発症を評価した．また CIA マウスに LPA_1 阻害薬を投与し，関節炎スコア，組織学的な炎症細胞の浸潤，X 線による骨破壊，脾細胞をコラーゲン刺激した際の IFN–γ，IL–17 産生を解析した．LPA_1 KO または WT 脾臓由来 CD11b 陽性細胞を蛍光標識し，WT CIA マウスに移入した．また，WT 脾臓由来 CD11b 陽性細胞を LPA_1 阻害薬を投与または未投与の CIA へ移入し，滑膜に浸潤した細胞数を蛍光顕微鏡で計測した．

LPA_1 KO または WT マウスの CD4 陽性ナイーブ T 細胞を Th1/Th2/Th17 分化条件下で培養後，Th 分化を FACS を用いて解析した．同様に WT マウス CD4 陽性ナイーブ T 細胞を用いて LPA_1 阻害薬添加群および非添加群で Th 分化を FACS を用いて解析した．

LPA_1 KO または WT マウス骨髄細胞を RANKL と M–CSF で刺激し，TRAP 染色，pit formation assay を用いて破骨細胞分化を解析した．また WT マウス骨髄細胞を用いて LPA_1 阻害薬添加群および非添加群での破骨細胞の分化も同様に解析した．

〈結果〉

免疫染色にて OA 滑膜組織と比べ RA 滑膜組織では ATX，LPA_1 の発現が増強していた．RA 滑膜組織における ATX，LPA_1 発現細胞は CD68 陽性マクロファージ，血管内皮細胞であった．また，real time–RT PCR で，各 LPA 受容体の発現を RA と OA で比較したところ，LPA_1 が RA 滑膜組織で有意に発現上昇していた．

CIA マウスにおいても滑膜組織で LPA_1 の発現が亢進していた．LPA_1KO マウスではコラーゲン免疫による関節炎の発症がみられなかった．また CIA マウスに LPA_1 阻害薬を投与すると，関節炎が抑制された．LPA_1 阻害により，組織学的な滑膜組織への炎症細胞浸潤や X 線上の骨破壊が抑制された．コラーゲン刺激した際に，LPA_1 阻害薬の非投与群と比べ，投与群では脾臓細胞からの IFN–γ 産生には変化がなかったが，IL–17 産生は低下していた．

蛍光標識した LPA_1 KO 由来の CD11b 陽性細胞を CIA に移入すると WT 由来 CD11b 陽性細胞と比較し，移入細胞の滑膜組織への浸潤が抑制された．また，WT 由来 CD11b 陽性細胞を CIA へ移入した際，LPA_1 阻害薬投与群では非投与群と比較して CD11b 陽性細胞の滑膜組織への浸潤が阻害された．

次に，Th 分化への LPA_1 の関与を解析した．WT と比べ，LPA_1 KO 由来 CD4 陽性ナイーブ T 細胞では Th17 への分化が抑制されたが，Th1，Th2 への分化は変化を認めなかった．また，WT と比較して LPA_1 KO 由来 CD4 陽性ナイーブ T 細胞では Th17 の転写因子である RORγt 発現は低下したが，Th1 の転写因子である T–bet，Th2 の転写因子である GATA–3 発現に変化はなかった．LPA_1 阻害薬の投与群でも同様に，非投与群と比べて Th17 の分化，RORγt 発現の低下が見られた．

破骨細胞分化においては，WT 由来骨髄細胞と比較し LPA_1 KO 由来骨髄細胞は，RANKL+M–CSF 刺激による TRAP 陽性多核細胞への分化が抑制され，pit formation assay による resorption area が減少し，破骨細胞分化が抑制された．LPA_1 阻害薬でも同様の結果が得られた．

〈考察〉

今回，我々はLPA–LPA_1シグナルが関節炎の発症に重要である事を見出した．これまでにRAとCIAの滑膜組織でATXの発現が亢進されている事が報告されている．RA，CIA滑膜組織で，LPA_1の発現が亢進していた結果から，関節炎の発症にATX–LPA–LPA_1カスケードが関与していると推測される．CIAでLPA_1阻害により，滑膜への炎症細胞の浸潤，コラーゲン刺激による脾細胞からのIL–17産生，X線上の骨破壊の抑制が見られた．これらの結果から，LPA–LPA_1シグナルは炎症細胞の遊走，Th17や破骨細胞への分化に関与し，関節炎の増悪に寄与していると考えられた．

RA滑膜組織に浸潤しているマクロファージはTNFやIL–6などの炎症性サイトカインを産生しRA病態形成に関与することが知られている．RA滑膜組織に浸潤しているCD68陽性マクロファージはLPA_1を発現していた．また，CIAに移入したCD11b陽性マクロファージのLPA_1を阻害することで，滑膜への浸潤が抑制された．以上よりLPAはLPA_1を介してマクロファージの滑膜組織への浸潤に関与する事が示唆された．

また，Th17が産生するIL–17はRA FLSを活性化しサイトカインやケモカイン産生を促進し，IL–17欠損マウスではCIAが抑制されることが知られている．LPA_1を阻害したCIAの脾細胞をコラーゲン刺激すると，コントロール脾細胞と比較しIL–17産生が抑制された．さらに，*in vitro*においてもLPA_1を欠損もしくは阻害されたCD4陽性ナイーブT細胞はTh17への分化が抑制され，その転写因子であるRORγtの発現も低下することを見出した．これらの結果より，LPA–LPA_1シグナルの阻害はRORγt発現を低下させ，Th17分化を抑制したと考えられる．Th17分化抑制も関節炎の改善に寄与していると推測される．

最後に，LPA–LPA_1シグナルは破骨前駆細胞におけるNFATc1の発現に関与し，破骨細胞の分化に寄与している事が報告されている．我々の研究においてもCIAにおいてLPA_1阻害によりX線上の骨破壊が抑制された．また，*in vitro*でもLPA_1阻害により破骨細胞の分化が抑制される事を確認した．これらの事から，LPA_1阻害はRAにおける骨破壊の抑制作用も有することが期待できる．

〈結論〉

本研究結果より，LPA–LPA_1シグナルは炎症細胞の滑膜への浸潤，Th17や破骨細胞への分化誘導を促進し，関節炎の病態形成に寄与していると考えられた．LPA_1を標的とした治療はRAの新規治療法になりうる事が示唆された．

お茶の水医学会にご寄附をいただいた法人、団体および個人

◎一般社団法人 お茶の水会医科同窓会

◎財団法人 和同会

◎公益財団法人 薬力学研会

◎伊藤内科小児科クリニック
　院長　伊藤眞一　先生

（順不同）

編集後記

発刊から60周年を記念して，第60巻1号より新生「お茶の水醫學雑誌」となって以来，本号で3度目の新年を迎えることになりました．改めて通覧すると，内容としては十分であるものの，雑誌としての体裁が整っているとは言い難かった最初期から本誌を見守って下さった同窓会員の皆様には，感謝の言葉もありません．本誌に対して向けられる暖かいお褒めの言葉や厳しいご苦言は，私たち編集委員の背中を常に押してくれました．総説，原著，症例報告という内容でスタートを切った新生「お茶の水醫學雑誌」ですが，少しずつ新しい企画を取り入れ，第60巻2号より，お茶の水会医科同窓会研究奨励賞受賞論文の梗概紹介，学位審査合格論文の筆者本人による内容紹介，第60巻4号からは剖検症例の連載を始めました．またこの号には，本学卒業生より投稿のあったレビュー論文が掲載されています．

新しい企画は好評で，今年に入ってからは，電子版を大学ホームページ経由よりも少ない手順で読みたいという要望もあり，本誌のホームページを作成しました．昨年最終発行の第61巻4号からは，梗概のみだった研究奨励賞受賞論文の全文掲載を始めました．プレスリリース研究論文同様，これからも順次紹介をしていく予定です．

内容を充実させることと並行し，雑誌としての体裁や読みやすさも追求をしてきました．当初は多くのカラー頁を想定していませんでしたが，論文中の写真や図をより正確に，判別しやすくすることも重要と考え，カラーのオリジナル写真や図はそのままカラー印刷とすることになりました．経費など心配もありましたが，読者諸氏から情報がわかりやすく，コンパクトにまとめられていて読みやすいというご意見をいただくようになり，心配は氷解いたしました．

約2年間，新しいことや変化を追求し試行錯誤の面はありましたが，現状に安住することなく今年も新しいことへのチャレンジを続けていきたいと思っています．ご意見・ご要望など，折に触れお聞かせいただければ幸甚です．

新生「お茶の水醫學雑誌」の発行以降現在まで，一般財団法人和同会からは継続して寄附をいただき，お茶の水会医科同窓会からは寄附と雑誌配送のサポートをいただいています．また公益財団法人薬力学研究会からも寄附をいただいています．良い雑誌を作るためには財政基盤も大切ですので，関係機関のご配慮に感謝申し上げるとともに，これまで以上に連携を取りながら3年目をスタートさせてゆく所存です．

最近，“「お茶の水醫學雑誌」は，捨てられない雑誌です”というコメントを読者からいただきました．このような評価は，執筆者の諸先生方，寄附を下さった関係機関，そして，時に激励とご叱正を賜った先生方のお陰と，編集委員一同心より感謝しております．

平成26年1月　編集委員長
江 石 義 信

お茶の水醫學雑誌投稿規程

1. 投稿は原則としてお茶の水医学会会員に限る．
2. 日本語で書かれた学位申請論文，および総説，原著論文，症例（事例）報告，資料，教室研究業績等を受け付ける．
3. 論文の採否は編集委員会が決定する．掲載は採択順とする．特別掲載については別途考慮する．
4. 原稿は，A4 の用紙を用い，ワードプロセッサーを用いて作成する．原文と複写 2 部，計 3 部を投稿する．原稿の構成は表紙，要旨，本文，引用文献表，図の説明，表，図の順序とする．
   1）表紙：分類，論文題名，著者名，所属，連絡先，別冊希望部数を明記する．
   2）和文要旨：400 字以内で作成し（ダブルスペース），下に 5 語以内の key word を日本語と英語で付記する．
   3）英文要旨：300 語以内で作成する（ダブルスペース）．これに英文題名，ローマ字による著者名および所属名を付記する．なお英文については，native speaker による校閲済の証明を必要とする．この証明が無い場合には編集委員会が校閲を依頼し，その費用を別途著者に請求する．
   4）本文：ダブルスペースで作成する．新かなづかい，横書で原稿サイズは A4 判，文字サイズは 12 ポイントとする．改行は 1 字下げ，大見出しは Ⅰ．Ⅱ．Ⅲ.‥‥，中見出しは 1. 2. 3. ‥‥，小見出しは ⅰ．ⅱ．ⅲ．‥‥，細見出しは a．b．c．‥‥とする．文中を欧文およびその仮名書きはできる限り避ける．
   なお省略語は初筆時に「正式名（省略語）」の形で記述することにより，それ以降用いても良い．
   5）文献表：引用文献は既刊あるいは掲載決定（要掲載証明）の著書，原著，総説に限る．本文中に引用順に 1），2），3）と番号を入れ，その順に整理する．
   ＊原著（雑誌名の省略は，医学中央雑誌および Index Medicus に準ずる．）
   例：1）鈴木太郎，山田花子：糖尿病性神経障害の発生機序について．糖尿病 29：975–982,1986.
   2）Suzuki T, Yamada H: A study of mechanisms causing diabetic disorders of peripheral neurons. Diabetes 29：975–982, 1986.
   ＊著書（分担執筆）
   引用文献の著者に関しては，3 名まで記述する．
   和文では，4 名以下の方は，ほか．
   英文では，4 名以下の方は，et al と表記する．
   6）図，写真，表
   ①そのまま縮小して印刷できる大きさ・画質の原画または表を本文とは別に作成する．
   ②図については，その上に図の番号を「図 1」,「図 2」のように記載する．なお図の説明は別紙にまとめて記載することとし，図番号，図の表題，図の説明文を和文で記載する．
   ③写真については，縮小印刷にも耐える鮮明な写真（デジタル写真の場合は十分な解像度で撮影した写真）として作成する．なおカラー写真の場合は別途費用を請求する．
   ④表については表番号，表題をまず記し，その下に表，表の下に表の説明を入れる．
5. 費用
   ①掲載料は 1 頁 12,000 円とする．ただし編集委員会から依頼した原稿については徴収しない．
   ②別刷代は実費を著者が負担する．
   ③カラー図版がある場合はその印刷にかかる実費を著者が負担する．
   ④英文要旨の校閲を編集委員会から依頼する場合には，その費用を別途著者が負担する．

6. 症例における患者情報保護に関する指針
   社団法人日本病理学会より症例報告における患者情報保護に関する指針が，「診断病理」vol.29, No.1, January 2012 に公表されている．
   従って，以下の基準を順守のこと．

   ①患者の氏名，イニシャル，雅号は記述しない．
   ②患者の人種，国籍，出身地，現住所，職業歴，既往歴，家族歴，宗教歴，生活習慣・嗜好は，報告対象疾患との関連性が薄い場合は記述しない．
   ③日付は，記述せず，第一病日，3 年後，10 日前といった記述法とする．
   ④診断科名は省略するか，おおまかな記述とする（たとえば，第一内科の代わりに内科）
   ⑤既に診断・資料を受けている場合，他病名やその所在地は記述しない．
   ⑥顔面写真を提示する際には目を隠す．眼疾患の場合は，眼球のみの拡大写真とする．
   ⑦症例を特定できる生検，剖検，画像情報の中に含まれる番号などは削除する．

7. 施設会員
   お茶の水医学会の施設会員となっている病院に勤務する職員による投稿は，原則これを無料とする．又，二人以上の投稿があった場合も追加で料金を請求することはない．

東京医科歯科大学
お茶の水医学会

The Ochanomizu Medical Society

Tokyo Medical and Dental University, School of Medicine

Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo

Japan

編集委員会

委員長
江石 義信

委　員
河野 辰幸　　秋田 恵一
古川 哲史　　宮崎 泰成
明石　巧　　沢辺 元司

Editorial Committee

Editor in chief
Yoshinobu Eishi

Editors
Tatsuyuki Kawano
Keiichi Akita
Tetsushi Furukawa
Yasunari Miyazaki
Takumi Akashi
Motoji Sawabe

お茶の水醫學雜誌　第 62 巻　第 1 号

発　行　　2014 年 1 月 20 日

編集権
発　行　　お茶の水医学会
会 長　湯浅 保仁

〒113-8519
東京都文京区湯島 1-5-45
東京医科歯科大学
人体病理学分野研究室内
TEL:03-5803-5172
ochamed.aps@tmd.ac.jp

印　刷　　理想社

前　目次へ