

様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	京都府立心身障害者福祉センター附属リハビリテーション病院	歯科医長 助教（併任）	山本健太
研究の名称	細胞運命転換による間葉系幹細胞の創出と骨軟骨再生医療への応用		
研究のキーワード (注 1)	間葉系幹細胞、骨芽細胞、リプログラミング、再生医療		
研究の概要 (注 2)	<p>骨粗鬆症性骨折後の癒合不全や偽関節、重度の変形性関節症や関節リウマチなどの骨軟骨疾患は、とりわけ高齢者に多く、患者に長期臥床や栄養不良をもたらし、著しいADLとQOLの低下を招く。これら疾患に対して、骨芽細胞あるいは軟骨細胞を移植することができれば、高い組織再生と機能予後が得られる再生治療となることが期待される。骨芽細胞と軟骨細胞は、いわゆる間葉系幹細胞から分化する間葉系の細胞であり、間葉系幹細胞を含む骨髄細胞等の移植によって骨再生が促進できることは知られている。</p> <p>最近我々は、ヒト線維芽細胞にRunx2、Osterix、Oct4/3、L-myc遺伝子を導入し培養すると、骨芽細胞が直接誘導できることを見出した。そこで本研究ではこの技術を発展させ、骨髄細胞等に換わる移植に適した間葉系の細胞を誘導する技術を確立することを目的とし、そのための基礎的検討を行った。</p>		
研究の背景	現在、骨肉腫切除後の骨軟骨欠損部に、間葉系細胞を含む骨髄細胞や脂肪由来細胞を移植する治療が行われており、高い効果を挙げている。しかし、高齢者が多い骨粗鬆症性骨折後の癒合不全や重度の変形性関節症の患者から骨髄や脂肪を採取することは、患者への侵襲が大きく、得られる細胞数が十分でなかったり骨芽細胞への分化能が低いことがある。低侵襲に採取できる体細胞から、間葉系細胞を誘導することが出来れば、実現性の高い再生治療を提供できる可能性が考えられる。		

研究手法	RNAを抽出後、種々の遺伝子の発現レベルをqPCRにて評価した。またDNAマイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現パターンを解析した。Alizarin Red S染色、Alcian blue染色、Oil Red O染色等も行った。
研究の進捗状況と成果	ヒト骨細胞の遺伝子発現プロファイルや細胞外基質の産生を変え、間葉系の細胞に特徴的な種々のフェノタイプを誘導しうることを見出した。
地域への研究成果の還元状況	京都府下においても高齢化は益々重要な問題となっている。今後この研究を発展させていくことで、京都府内の多くの骨軟骨疾患患者のQOLとADLの向上に寄与できる可能性が考えられる。
今後の期待	本研究の成果は、新規骨軟骨再生医療の開発につながるのみならず、骨疾患の病態解明、新たな作用原理に基づく創薬等にも結び付くと考えられる。
研究発表 (注3)	<p>論文発表</p> <p>1. Sowa Y, Yamamoto Kなど. Direct Conversion of Human Fibroblasts into Schwann Cells That Facilitate Regeneration of Injured Peripheral Nerve In Vivo. <i>Stem Cells Transl Med</i>, in press, 2017.</p> <p>学会発表</p> <p>1. 山本健太など. 機能性ヒト骨芽細胞のダイレクト・リプログラミングによる創出. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会（シンポジウム1-3 骨・軟骨分化の制御機構）福岡. 2016年10月.</p> <p>2. 松田修、山本健太など. ダイレクト・リプログラミングに基づく骨組織再生. 第34回日本骨代謝学会学術集会（シンポジウム1-3 運動器再生医療の最前線）大阪. 2016年7月.</p>

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	血液内科学教室	病院助教	知念 良顕
研究の名称	PDPK1制御による難治性B細胞性リンパ腫の克服		
研究のキーワード (注 1)	多発性骨髓腫、難治性B細胞腫瘍、PDPK1、microRNA		
研究の概要 (注 2)	<p>申請者は、近年、高度難治疾患である多発性骨髓腫（MM）において、RSK2のN末端の恒常的活性化（Shimura et al. Mol Cancer Ther. 2012）、ならびにその上流のPDPK1の恒常的活性化が病態形成に必須であることを見出した。加えて、PDPK1の恒常的活性化は、MMにおいて、下流のRAS/ERK、PI3K/AKTの両シグナルを同時制御し、細胞増殖および抗アポトーシス活性を導くのみならず治療予後にも影響を与えており、PDPK1の活性化抑制は有望な治療戦略となり得ることを見出した（Chinen et al. Cancer Res. 2014）。今回、申請者らはMMと類縁疾患であるB細胞リンパ腫（BCL）においても、PDPK1が疾患形成において機能的意義を有し、その制御が治療薬開発につながる可能性を想起し、BCLのなかでも既存治療に抵抗性を示す難治病型BCLにおけるPDPK1の臨床的・機能的意義について明らかとした。さらに、新規薬開発の可能性を追求するとともに、PDPK1恒常的活性化の機序を同定し、バイオマーカーとしての有用性などについて包括的に検討した。</p>		
研究の背景	近年の治療強度層別化免疫化学療法の進歩により、造血器悪性腫瘍における最多病型であるBCLの治療成績は向上した。しかし、依然、一部の病型や症例は治療抵抗性・難治性であり、さらなる治療予後の改善を求めるためには、BCLの分子病態の解明に基づ		

	いた至適治療標的分子の探索が喫緊の課題である。近年、BCLの病態解明のために網羅的な遺伝子解析が行われ、多数の遺伝子異常が同定されているが、遺伝子異常のみでは病態を十分に説明できていないのが現状であり、エピジェネティック異常による細胞増殖因子、抗アポトーシス分子の異常活性化が腫瘍の病態形成に関与している可能性について検討されている。
研究手法	<p>①PDPK1発現抑制によるBCL細胞株の影響に関する解析 申請者の研究室に有するBCL細胞株10種を用いて解析した。</p> <ul style="list-style-type: none"> i) 小分子阻害剤およびsiRNAによるPDPK1阻害の効果の検討 細胞増殖アッセイやウエスタンプロット、リアルタイムPCRを用いたBCLにおけるPDPK1活性化の解明 ii) PDPK1活性化亢進機序の解明 リアルタイムPCRを用いたPDPK1を主な標的遺伝子とする各micro RNAの発現レベル解析 iii) microRNA導入細胞株におけるPDPK1抑制効果 <p>②患者血漿を用いたBCLにおける新規バイオマーカーの検討 患者血漿中のmicroRNAの発現レベル解析</p>
研究の進捗状況と成果	今回の研究では、PDPK1が種々のBCLにおいて、ほぼ例外なく高発現していることを見いだした。加えて、PDPK1はMMのみならずBCLにおいても細胞増殖、抗アポトーシスを制御する主要分子であり、PDPK1活性化抑制はBCLの治療戦略において有効な治療標的となる可能性を示すものであった。さらに、MMよりも低濃度のPDPK1阻害剤によってBCL細胞株の増殖抑制効果見られたことから、PDPK1阻害剤がBCLの新たな治療標的ターゲットとして期待できる結果を得た。現在、PDPK1活性化の原因としてmicroRNAの関与を検討するため、microRNAを導入した実験を行い、研究を継続中である。
地域への研究成果の還元状況	現在、研究成果を当科のホームページに掲載できるよう準備中である。

今後の期待	<p>近年の分子標的治療薬の開発によりB細胞リンパ腫の治療成績は著しく改善した。しかし、未だに完治は困難であり、更なる治療法の開発は喫緊の研究課題である。本研究では、PDPK1を標的とした分子標的薬が、難治性BCLに対する新規の治療法となりえることを明らかとした。さらに、PDPK1活性化のメカニズムとしてエピジェネティック異常の関与がBCLの病態形成ならびに進行に関わっていることが明らかとなれば、不均一な疾患であるBCLにおける普遍的治療ターゲットや診断マーカーとしての可能性を秘めており、BCLの治療成績向上の糸口になるよう、さらに研究を継続する。</p>
研究発表 (注3)	<ul style="list-style-type: none"> ・第78回日本血液学会（2016年） <p>最終的にデータがそろった段階で、これらの研究結果は最終的には英文医学雑誌への投稿を行う予定である。</p>

- 注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。
- 注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。
- 注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。
- 注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。
- 注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職名・学年)	(氏名)			
研究者	形成外科学	講師	素輪 善弘			
研究の名称	ダイレクト・リプログラミングによるシュワン細胞の調整と多彩な神経障害に対する神経再生の挑戦					
研究のキーワード (注1)	<ul style="list-style-type: none"> ・ ダイレクト・コンバージョン ・ シュワン細胞 ・ 末梢神経 					
研究の概要 (注2)	<p>シュワン細胞は、神経の再生に決定的に重要な役割を果たしている。神経欠損やシュワン細胞の機能不全に関連する疾患も多く、これらに正常なシュワン細胞を移植できれば画期的な治療につながる。また最近では、脊髄損傷や脳神経障害に対してもその治療効果が報告されている。</p> <p>我々は、ヒト正常線維芽細胞からシュワン細胞へのダイレクト・リプログラミングを試みた。その結果、ヒト線維芽細胞に2つの遺伝子を導入することで、その約43%をシュワン細胞に直接誘導する技術を確立した（図A）。得られたシュワン細胞（dSC）はシュワン細胞特異的な遺伝子群(S100β、p75NTR)を強発現する（図B、C、D）。さらにマウス坐骨神経欠損モデルを作成し、神経欠損部にconduitとともにdSCを移植すると、神経再生が著明に亢進され、ミエリン鞘が形成し、歩行機能と除神経筋萎縮が有意に改善することを見出した。このような技術はこれまで全く報告がない。</p>					
<p>A) ヒトのシュワン細胞を線維芽細胞から直接誘導する技術を確立した。 B, C) 誘導シュワン細胞(iSC)は、シュワン細胞特異的マーカーを強発現する。 D) iSCは、神経細胞に作用して神経突起を誘導する液性因子を産生する。</p>						

研究の背景	<p>シュワン細胞は、神経栄養および神経保護因子の産生、ラミニン等の細胞外マトリックスの産生、ミエリン形成等を行うことにより、末梢神経再生に重要な役割を担う。そこで外傷に伴う神経欠損や様々なシュワン細胞機能不全症に対して、自家シュワン細胞を移植することができれば理想的な再生医療になると期待され、実際、外傷や悪性腫瘍切除に起因する神経損傷に対しては、自家神経よりシュワン細胞を分離・培養して移植する治療が効果を上げている。しかし神経の採取は患者への侵襲が大きく、どうしても二次的な神経損傷を回避できない。また供給できるシュワン細胞の数が不十分なことが多い。</p> <p>最近、心筋細胞や肝細胞などが、線維芽細胞から直接誘導できることが示された（ダイレクト・リプログラミングまたはダイレクト・コンヴァージョン）。もし、患者から低侵襲に採取できる線維芽細胞から、シュワン細胞を直接作り出すことができれば、侵襲が低く癌化の危険性も低い、新しい移植用自家シュワン細胞を作り出す技術につながると期待できる。</p>
研究手法	<p>得られた直接誘導シュワン細胞 (directly converted Schwann cells (dSC)) の神経再生促進効果など期待される細胞機能の検証を、遺伝子プロファイリング、Neurite outgrowth assay、ミエリン化能の確認、産生・放出される神経保護因子の計測を行った。</p> <p>dSC が移植後に神経再生にどのような影響を与えるかを、免疫不全マウス坐骨神経欠損モデルを用いて検討した。その時、陽性コントロール細胞として培養シュワン細胞を使用した。移植足場は薬剤徐放作用を持つゼラチンチューブを用いた。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>得られた直接誘導シュワン細胞 (directly converted Schwann cells (dSC)) は、シュワン細胞特異的マーカーを強発現し、BDNF、GDNF、NGF 等の神経栄養・保護因子を多量に産生・分泌する。また、神経細胞と共に培養すると、神経突起を伸長させる神経再生活性を有し、ミエリン鞘を形成した。さらに、マウス坐骨神経欠損モデルを作成し、神経欠損部にconduitとともにdSC を移植すると、神経再生が著明に亢進され、ミエリン鞘が形成され、歩行機能と除神経筋萎縮が有意に改善することを見出した。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>本研究では、この技術を神経障害および損傷の治療に応用展開することを目指して、その基礎技術を確立することを目的とする。本研究の成果は、正常シュワン細胞を均一かつ安定的に提供できるのみならず、将来的には神経再生医療に応用し、健康で幸福な地域社会の招来に貢献するものと期待できる。</p> <p>対象疾患としては、腫瘍、外傷や神経炎等にともなう末梢神経欠損や損傷が挙げられる。また、中枢神経の再生もシュワン細胞は促進することが報告されており、脊髄損傷に対しても効果が期待できる。本研究成果は京都府において、これら様々な神経障害を伴う病態に、全く新しい治療手段を提供する可能性があり、京都府民に還元されると思われる。</p>

今後の期待	我々が作製したシュワン細胞は、①患者本人から低侵襲に採取できる線維芽細胞から作り出すことができ、②迅速かつ低成本で高効率に作れ、③iPS細胞も体性幹細胞も含まないので、癌化のリスクが低いシュワン細胞を提供できる。倫理的な障壁も少ないため、本技術は比較的すみやかに臨床応用に移行できるものと期待できる。
研究発表 (注3)	Sowa Y, Kishida T, Tomita K, Yamamoto K, Numajiri T, Mazda O. Direct Conversion of Human Fibroblasts into Schwann Cells That Facilitate Regeneration of Injured Peripheral Nerve In Vivo. <i>Stem Cells Transl Med.</i> 6(4):1207-1216, 2017. 素輪善弘 岸田綱郎 田畑 泰彦 沼尻敏明 松田 修 末梢神経欠損損傷における自作シュワン細胞付加型ゼラチンハイドロゲルチューブ移植 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016.11.22 博多

- 注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。
- 注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。
- 注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。
- 注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。
- 注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

様式3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告(ホームページ用)

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	京都府立医科大学 ゲノム医科学部門	大学院4年	足立博子
研究の名称	血管新生に関する新規シグナル分子の機能解析		
研究のキーワード (注1)	血管新生、血管内皮細胞、siRNA、コラーゲンゲル培養		
研究の概要 (注2)	<p>血管新生は、血管内皮細胞が増殖することで既存の血管から血管枝が発芽・増殖・伸長することで新たな血管のネットワークを形成する生理的な現象である。血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は血管新生を調節する主要な分子であり、抗VEGF抗体は異常な血管新生を抑制するための分子標的薬として臨床利用されているが、治療効果が低い場合や重篤な有害事象も報告されており、血管新生を調節している複雑な分子メカニズムの解明は極めて重要である。</p> <p>我々は、血管新生に関する新規遺伝子を同定するために、出生前後に生理的な血管新生が観察されるマウス網膜を用いた網羅的発現解析を実施した。その結果、これまでに血管新生との関連性が報告されていない<u>5つの血管新生関連候補遺伝子</u>を抽出することに成功している。本研究では、候補遺伝子の一つである細胞接着因子関連遺伝子(遺伝子X)の発現をsiRNAにより抑制したマウス血管内皮細胞株(TKD2)をコラーゲンゲル上で培養し、その血管新生能を検討した。</p>		
研究の背景	<p>我々は、生理的血管新生に関する新規遺伝子を同定するため、出生前後のマウス網膜を用いた網羅的発現解析により23,474遺伝子の発現データを取得し、クラスター解析、パスウェイ解析およびアノテーション解析を駆使した多面的解析の結果、これまで血管新生に関連することが報告されていない新規血管新生関連候補遺伝子の獲</p>		

	得に成功している。本研究では、血管を構成する血管内皮細胞において新規血管新生関連候補遺伝子が与える血管新生に関連する機能を同定することを試みた。
研究手法	本研究では、平成26年度の若手研究者育成支援費の成果として申請者自身が構築したTKD2における血管新生能を評価する実験系を用いて、新規血管新生関連候補遺伝子の一つ、細胞接着因子に関連する遺伝子Xの発現を特異的に抑制するsiRNA (Accell siRNA, GEヘルスケア) をTKD2に導入し、細胞増殖量および伸長量を測定する。 ① siRNA導入による遺伝子Xの発現抑制効率の測定（図①） ② コラーゲンゲル培養および画像解析ソフトにより、細胞ネットワーク構造の面積および長さを定量（図②）
研究の進捗状況と成果	TKD2における遺伝子Xの発現を、siRNAを導入することで一時的に抑制することに成功した。さらに、遺伝子Xの発現が抑制されたTKD2をコラーゲンゲル上で24時間培養し、蛍光染色および固定した後に蛍光顕微鏡で撮影・画像解析した結果、遺伝子Xを一時的に抑制したTKD2のネットワーク構造の面積および長さはコントロールと比較して有意に抑制されることを初めて発見した。 今後は、遺伝子Xが血管新生に与える影響を長期的に検討するために、遺伝子X欠損血管内皮細胞株の樹立に取り組む予定である。
地域への研究成果の還元状況	本研究結果は第6回4大学連携研究フォーラムにて報告し、ポスター優秀賞を受賞した。
今後の期待	本研究において血管新生との関連性が示唆された、細胞接着に関連する遺伝子Xは、血管新生の主要な調節経路であるVEGFシグナルとは異なる経路から血管新生を制御している可能性がある。したがって、遺伝子Xは既存の抗血管新生治療薬で問題とされる抗VEG F抗体薬が時として起こり得る有害事象を克服する、新しい抗血管新生分子標的となり得る。
研究発表(注3)	足立博子, 富永洋之, 丸山悠子, 米田一仁, 丸山和一, 外園千恵, 木下茂, 中野正和, 田代啓, 新規生理的血管新生関連候補遺伝子が血管新生に与える影響の解析, 第6回4大学連携研究フォーラム, 京都(平成28年12月7日, ポスター優秀賞受賞)

- 注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるよう
に、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。
- 注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、
表、グラフ、図などを用いて、作成すること。
- 注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述す
ること。
- 注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表に
より、新規性の喪失となるため注意すること。
- 注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	京都府立医科大学 消化器外科	大学院生	今村泰輔
研究の名称	膵癌患者血漿における癌抑制型microRNAの発現解析と抗がん核酸治療法の開発		
研究のキーワード (注 1)	膵癌、血中遊離マイクロRNA、癌抑制型マイクロRNA、バイオマーカー		
研究の概要 (注 2)	<p>膵癌は早期から局所進行のみならず遠隔転移を高率に引き起こす極めて予後不良な難治性の癌である。膵癌治療の現状は非常に厳しく早期診断法や新規治療法の開発が急務である。</p> <p>機能性の短鎖型non-coding RNAであるmicroRNA(miRNA)は、標的遺伝子のmRNAの3'末端の非翻訳領域に結合してmRNAの分解や転写の抑制を行うことで全遺伝子の約30%もの発現調節に関わり (Lewis et al. Cell 2005) 、様々な生命現象の維持に深く関与している。特に癌においては癌の発症や進展に働く癌遺伝子型miRNAと、癌の発症や進展を抑制する働きを持つ癌抑制型miRNAの存在が同定されている(He L et al. Nature 2005, Lu J et al. Nature 2005, Croce CM. Nature 2006)。さらに、近年、血中遊離miRNAが細胞間の情報伝達を目的として細胞から能動的に体液中に分泌されていることが明らかとなり、癌のバイオマーカーとしての有用性が注目されている。</p> <p>今回我々は、癌抑制型miRNAの血中での減少が癌の増殖、浸潤、転移、抗癌剤耐性などの悪性化に寄与しており、これらのmiRNAを血液中で高濃度に維持することで抗腫瘍効果が得られる可能性を考え、膵癌患者において血液中で減少している癌抑制型miRNAを網羅的に探索し、この癌抑制型miRNAの血中での濃度低下の臨床的意義、膵癌細胞での機能解析、およびモデルマウスを用いた生体における体液を介した腫瘍への送達と抗腫瘍効果を評価した。</p>		
研究の背景	<p>膵癌は早期から局所進行のみならず遠隔転移を高率に引き起こす極めて予後不良な難治性の癌である。従来から、膵癌に対して様々な診断、治療法が開発されてきたが、膵癌治療の現状は非常に厳しく早期診断法や治療成績の改善が急務とされている。</p> <p>今回我々は、血液中遊離核酸のうち癌抑制型miRNAに注目し、膵癌の新規バイオマーカー、並びに、がん抑制型miRNAを用いた新規抗癌治療の可能性を探索した。</p>		

研究手法	<p>1. 膀胱患者と健常人における血液中での miRNA の発現を、miRNA アレイ法を用いて網羅的に評価し、膀胱患者の血中で濃度低下している癌抑制型 miRNA を探索した。これにより選出された候補の癌抑制型 miRNA の発現量を臨床検体を用い、定量的 RT-PCR で test scale study を行い有意に癌患者血中で低下している候補への絞り込みを行った。</p> <p>2. 1.にて選出された候補 miRNA において、当施設及び共同研究施設からの多数の臨床検体を用いて、当該 miRNA が血中で健常人と比較し癌患者で有意に発現が低下していることを確認し、さらに、膀胱患者における血中濃度と癌の悪性度、予後との相関を評価する。</p> <p>3. 膀胱細胞株を用いて当該 miRNA の癌抑制機能の評価、その分子機序の探索を行う。</p> <p>4. 担癌モデルマウスに当該 miRNA を全身投与することで血中濃度を維持し、癌抑制型 miRNA の体液を介した腫瘍への送達と抗腫瘍効果を評価する。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>①網羅的microRNAアレイ解析により健常人群に比して膀胱患者群の血漿中で高度に低下していた6種類の癌抑制型miRNAを選出した。②qRT-PCRによるtest-scale解析、validation解析(膀胱患者100例、健常人80例)により、健常人血漿に比し膀胱患者で血漿濃度が低く、最も有意な差を認めたmiR-107を同定した($p<0.0001$, AUC=0.85)(図1)。③膀胱患者血漿miR-107低濃度群は全膀胱症例において独立した予後不良因子となり($p=0.042$, HR=2.95, 95%CI: 1.03-9.46)、切除症例における検討でも血漿miR-107低濃度はT因子、N因子の進行と有意に相関し、有意な予後短縮を認めた(図2)。④膀胱細胞株を用いてmimic-miRNAによりmiR-107を過剰発現させたところ、コントロール群と比較して著しい細胞増殖抑制が認められた(図3)。⑤膀胱細胞株を皮下移植したSCIDマウスに、アテロコラーゲンを用いてmiR-107を腫瘍周囲に皮下投与したところ、血中miR-107の濃度回復(図4)と有意な腫瘍抑制効果が認められた(図5)。血漿中miR-107は、膀胱の新規のバイオマーカーとして極めて有望である。また、膀胱患者で高度に低下している癌抑制型miR-107を導入することで次世代型の抗がん核酸治療への応用も期待できる。</p>

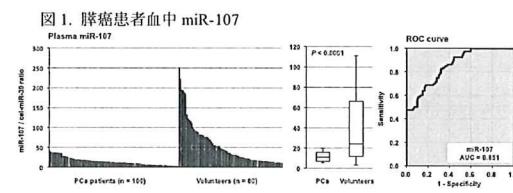


図 1. 膀胱患者血中 miR-107

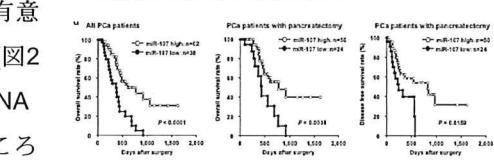


図 2. 血中 miR-107 と膀胱患者の予後

図 3. miR-107 過剰発現に伴う膀胱細胞

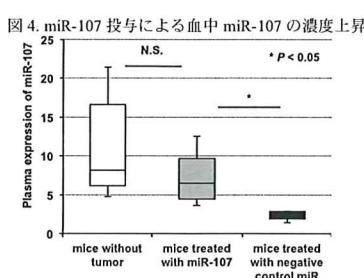
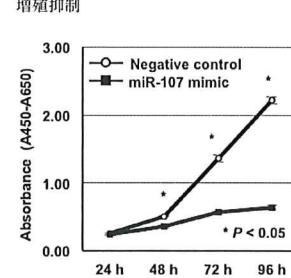
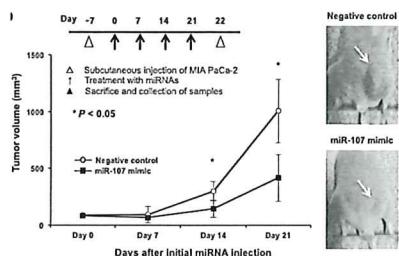


図 4. miR-107 投与による血中 miR-107 の濃度上昇



地域への研究成果の還元状況	現時点では特になし
今後の期待	膵癌診断、予後予測のバイオマーカーとして有用である血中癌抑制型miRNA、miR-107を同定した。miR-107は健常人の血液中に豊富に存在しており、膵癌患者血中で低下し、病期の進行とともにさらに低下する。血中miR-107を高濃度に維持することは、安全かつ、治療効果をモニタリングすることも可能な膵癌の新たな治療法となりうることを示唆するものと考えられる。
研究発表 (注3)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 2015年 日本癌学会総会 膵癌患者血中 microRNA の網羅解析により、患者血中で枯渇した癌抑制型 miR-107 は不良な予後に関連する 2. 2015年 International conference of Asian clinical Oncology Plasma microRNA profiles; down-regulation of plasma miR-107 level contributes poor outcomes in pancreatic cancer 3. 2015年Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum Plasma microRNA profiles; down-regulation of plasma tumor suppressive miRNA level contributes poor outcomes in pancreatic cancer 4. 2016年 日本外科学会総会 膵癌患者血漿における癌抑制型miRNAの発現解析と抗がん核酸治療への応用

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	感染病態学教室 消化器内科学教室	大学院生	廣瀬 亮平
研究の名称	粘液に含まれる病原体に対する消毒薬の効果判定と粘液による耐性獲得のメカニズム解析		
研究のキーワード (注 1)	院内感染予防、アルコール消毒薬、手指衛生 粘液、粘弾性		
研究の概要 (注 2)	指消毒のガイドラインは 2002 年に CDC(米国疾病予防センター)より発表されており、アルコールベースの擦り込み式手指消毒薬を用いた手指衛生が全世界に広まった。現在国内においてもこのガイドラインに基づき手指消毒および院内感染予防対策がとられている。一方、医療施設内の手指消毒順守率が向上しつつある現在においても院内感染はあまり減少しておらず、多くの社会的損失が生じており、現行のガイドラインによる消毒方法や使用している消毒薬では院内感染対策には不十分な可能性がある。⇒消毒薬・消毒薬の効果判定の再評価・改良が必要である。		
研究の背景	<p>我々は以前に季節性インフルエンザウイルスが腸管感染を起こすことを発見し報告した。（Clinical Microbiology and Infection, 22: 813, e1-7, 2016.）同時に、上気道で感染・増殖した高力価のインフルエンザウイルスを含んだ痰や鼻汁を嚥下するモデルを考案し、インフルエンザウイルスが胃酸・胆汁・膣液で不活化されずに感染力を有したまま小腸・大腸に到達するメカニズムの解明を行った。その結果、粘度の高い粘液に閉じ込められたウイルス</p> <p>以前の研究：粘度の高い粘液に閉じ込められたインフルエンザウイルスは、人工胃酸・胆汁膣液に対して耐性を獲得し不活化されず感染力を保ち続ける</p> <p>↓</p> <p>人工消化液で不活化されないということは、消毒液でも不活化されないのではないか？</p> <p>インフルエンザウイルスに限らず、細菌も含めた多種の病原体も不活化・殺菌されないのではないか？</p> <p>↓</p> <p>先行実験：高粘度条件下ではインフルエンザウイルスやブドウ球菌はエタノールで不活化・殺菌されない</p> <p>↓</p> <p>粘性のある喀痰等の体液中の病原体は消毒液（アルコール）で不活化されない</p> <p>↓</p> <p>① CDCガイドラインによる消毒方法では院内感染対策には不十分である ② 消毒薬の効果判定の見直しが必要である</p>		

	<p>は人工胃酸・胆汁胰液に対して耐性を獲得し不活化されず感染力を保ち続けることが判明した。</p> <p>この結果は、粘性を帯びたウイルスが外部環境から防御されていることを示しており、消化液に限らずウイルスを不活化させるような消毒液についてもウイルスが不活化されない可能性を示唆している。またインフルエンザ等のウイルスのみならず細菌などの病原体に関しても、同様の現象が成り立つ可能性があるものと思われる。</p>
研究手法	<p>粘液中の病原体（インフルエンザウイルスおよび大腸菌）のアルコール性消毒剤または紫外線照射に対する耐性獲得を調査した。ピアソンの相関係数を用いて、粘液の粘弾性と病原体の生存との相関を評価した。粘液はカルボキシメチルセルロース、グーガム、キサンタンガム、ゼラチン、喀痰サンプルを使用した。アルコール性消毒剤は80w/w%エタノール、70w/w%2-プロパノール、60w/w%の1-プロパノールを使用した。</p> <pre> graph TD A[粘性を帯びた体液中の病原体は耐性を獲得し消毒液で殺菌・不活化されないのか？] --> B[人工粘液の作成] A --> C[急性上気道患者から採取した臨床検体(喀痰/粘液)] B --> D[粘液存在下で殺菌・不活化試験] C --> D D --> E[in vitroでの解析 ① 細菌に対する消毒液の効果判定 ② ウィルスに対する消毒液の効果判定] D --> F[in vivoでの解析(臨床研究) ① 細菌に対する消毒液の効果判定 ② ウィルスに対する消毒液の効果判定] E --> G[「粘液に含まれる病原体が、消毒液に耐性を示し、殺菌・不活化されずに生き残る」事の証明] F --> G </pre>
研究の進捗状況と成果	<p>人工粘液中の病原体はアルコール消毒剤によって完全に不活性化されず、病原体の生存は粘液の粘弾性と強く相關した。人工粘液では、アルコール消毒剤の反応時間を延長することで病原体の生存率が低下した。一方、完全な不活性化は、粘弾性に依存しない紫外線照射によって達成された。さらに、喀痰サンプルは人工粘液と同様に効果的にアルコール消毒剤から病原体を保護したが、プロナーゼ処理によって喀痰サンプルの粘弾性および病原体生存率の両方を減少させた。</p> <p>以上の結果より、現行のアルコール性消毒剤は、粘液中の病原体を不活性化し院内感染を予防するには不十分であることを示唆している。また、粘弾性は、病原体中のアルコール性消毒剤に対する耐性獲得に寄与する重要な因子であることが示唆された。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>今後実際のヒトの手指を用いて、より実地に即した臨床研究を行い解析を進めていく。より有効な消毒液の開発・消毒方法の開発を行うことにより院内感染の発生率低下を目指し、地域の感染症医療の発展に貢献する。</p>

今後の期待	我々の研究は、アルコール性消毒剤が粘液中の病原体を不活性化し、院内感染を予防するには不十分であることを示唆している。これらの知見は、新規消毒剤の開発含む院内感染を克服するための新しい戦略を開発するための基礎を提供することができる。今後実際のヒトの手指を用いて、より実地に即した臨床研究を行い解析を進めていく。
研究発表 (注3)	現在上記内容の論文をEuropean Respiratory Journal (IF:8.3) に投稿中である。 今年の秋以降の感染症学会・環境感染症学会で上記内容を発表予定である。

- 注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。
- 注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。
- 注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。
- 注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。
- 注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	血液内科	大学院生 3年	立川 章太郎
研究の名称	リンパ系造血器悪性腫瘍におけるエピジェネティック異常を介したPDPK1発現制御異常		
研究のキーワード (注 1)	多発性骨髓腫、PDPK1、miRNA-375、エピジェネティック異常		
研究の概要 (注 2)	<p>我々は、多発性骨髓腫(Multiple Myeloma; MM)において、RSK2のN末端の恒常的活性化(Shimura et al. Mol Cancer Ther. 2012など)、ならびにその上流のPDPK1の恒常的活性化が病態形成に必須であることを見出してきた。またMMにおいて、PDPK1の恒常的活性化は下流のRAS/ERK、PI3K/AKTの両シグナルを同時制御し、細胞増殖および抗アポトーシス活性を導くのみならず治療予後にも影響を与えており、PDPK1の活性化抑制は有望な治療戦略となり得る(Chinen et al. Cancer Res. 2014など)。さらに、現在、我々はPDPK1を制御するメカニズムとしてmicroRNAを含むエピジェネティック異常の関与、ならびにその診療への応用に注目し、予備的検討において、既にヒト由来MM細胞株11種並びに患者臨床検体109例で数種のmicroRNAの発現レベルを定量的PCRで検討し、正常と比し患者由来形質細胞では有意にmiR-375発現低下が認められること、miR-375遺伝子導入によりMM細胞株7/8種でPDPK1発現低下効果を認め、miR-375がPDPK1を制御する重要な因子であることを見出している。また、疾患特異的な発現異常の機序の解明をもとに新たな治療戦略の開発も期待できることから、本研究ではMMにおけるmiR-375のエピジェネティック異常を介したPDPK1発現制御異常について研究した。</p>		

	<p>The diagram shows a complex signaling network. At the top, various growth factors (IL-6, IGF, FGF, HGF) bind to their respective receptors (IL-6R, IGF-R, FGFR, MET). These receptors activate downstream pathways involving GRB2, SOS, RAS, Raf, MEK, and ERK 1/2. A red box labeled 'Epigenetic deregulation' contains 'miR-375'. A red arrow points from this box to 'PDPK1', which is shown with a yellow starburst indicating its activation. PDPK1 has two main targets: 'NTKD' and 'RSK2'. 'NTKD' is associated with 'Substrate phosphorylation' leading to 'Transcription independent' and 'Transcription dependent' outcomes, both of which contribute to 'Myeloma proliferation and survival'. 'NTKD' also has phosphorylation sites T265, S369, S386, Y529, T577, and Y707. 'RSK2' is associated with 'Transcription independent' outcomes. A red dashed arrow points from 'PDPK1' to 'NTKD'. Another red dashed arrow points from 'PDPK1' to 'ERK 1/2'. A red box labeled 't(4;14)' is shown at the bottom right, with a red dashed arrow pointing to 'ERK 1/2'.</p>
研究の背景	<p>多発性骨髄腫や悪性リンパ腫などは発症頻度の高いリンパ系造血器悪性腫瘍であり、なかでも高齢者における発症頻度が高いことから、その患者数は増加の一途である。近年、thalidomideやlenalidomideなどの免疫修飾薬、プロテアソーム阻害剤であるbortezomib、各種抗体治療薬などの新規薬剤の開発・臨床応用により治療予後は大幅に改善したが、依然として既存の抗がん剤治療では治療困難な難治性疾患であり、その分子病態の解明と新規の治療戦略開発は喫緊の課題である。</p>
研究手法	<ul style="list-style-type: none"> (i) methylation-specific PCR ならびに bisulfite sequenceを用いたmiR-375遺伝子上流のDNAメチル化の解析 (ii) 定量的PCRによる脱メチル化剤ならびにヒストン脱アセチル化阻害剤を用いたmiR-375発現解析 (iii) クロマチン免疫沈降法を用いた定量的PCRによるmiR-375上流のヒストン修飾解析
研究の進捗状況と成果	<p>MM細胞株と患者由来MM細胞から抽出したDNAを用いてbisulfite処理を行い、プロモーター領域を含む上流のメチル化の程度をmethylation-specific PCR ならびに bisulfite sequence で解析したところ、84.5%(49/58)の患者でmiR-375の上流において高メチル化を認めた。このことは、MMにおけるmiR-375発現低下の要因としてmiR-375上流のメチル化が関与している可能性を示唆している。また、DNAメチル化と並び遺伝子発現に重要なエピジェネティック制御機構であるヒストン修飾の関連を、クロマチン免疫沈降法を用いたリアルタイムPCRで検討した。MM細胞株において、HDAC阻害剤であるトリコスタチンA並びにメチル化阻害剤であるSGI-110で治療した際のmiR-375発現レベルの変化とmiR-375周辺のヒストン修飾(H3K4m3, H3ac)について評価したところ、miR-375発現上昇とともに、miR-375の上流の検討した3か所にお</p>

	いてトリコスタチンAを用いた際に未治療ならびにSGI-110単剤と比してH3K4m3, H3acの増加を認めた。以上より、miR-375発現低下の要因としてヒストン修飾の関与も示唆された。さらにMM細胞株において、SGI-110とトリコスタチンAによる治療は相加的にPDPK1発現を低下させ、JAK2やIGF1Rの発現レベルも低下させた。これらの所見は、異なる機序のエピジェネティック薬剤による併用療法がMMにおける新たな治療戦略となる可能性を示唆している。
地域への研究成果の還元状況	現在、研究成果を当科のホームページに掲載できるよう準備中である。
今後の期待	今回の研究で、MMにおいて腫瘍制御に関わるmicroRNAの発現異常に関してもエピジェネティック異常の関連が示唆され病初期からの病態形成に関連している可能性が示された。悪性腫瘍全体に共通するメカニズムの可能性もあり、他悪性腫瘍の発生機序の解明や新薬開発への手がかりとなる可能性もあると思われる。
研究発表 (注3)	<ul style="list-style-type: none"> ・第41回骨髄腫学会学術集会(2016) ・第78回日本血液学会学術集会(2016) ・58th ASH annual meeting and exposition(2016) ・British Journal of Haematology (Feb 2017 accepted)

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	小児外科	大学院 3年	田中智子
研究の名称	新規MEK阻害剤の神経芽腫に対する <i>in vivo</i> 効果検討およびヒト検体を用いた効果予測因子の検討		
研究のキーワード (注 1)	神経芽腫、分子標的薬、MAPK経路		
研究の概要 (注 2)	<p>【背景】高リスク神経芽腫は、現在でも3年生存率約40%と予後不良で、新規治療薬の開発が望まれる。一昨年、再発神経芽腫の約80%にMAPK経路に関わる遺伝子変異が報告され、新たな治療ターゲットと考えられる。我々はMAPK経路の阻害剤として2種のMEK阻害剤を神経芽腫細胞株に用いた先行研究を行い、<i>in vitro</i>での治療効果を報告した。これを踏まえ、本研究では神経芽腫モデルを作成し、<i>in vivo</i>での治療効果を検討した。</p> <p>【方法】先行研究でも使用した3種を神経芽腫細胞株(IMR5, NLF, SK-N-AS)をnude mouseに皮下注射し、生着を確認した。pilot studyとしてまずSK-N-ASにMEK阻害剤(TrametinibおよびCH5126766)を投与し、対照群と腫瘍サイズおよび体重減少を比較した。2週間の連続経口投与後に腫瘍を摘出し、リン酸化ERK免疫染色を含む病理学的検討を行った。またヒト神経芽腫検体でもリン酸化ERK免疫染色を行った。</p> <p>【結果】</p> <p>全ての細胞株で腫瘍生着が確認できた。また腫瘍のpERK免疫染色は、<i>in vitro</i>の結果と一致した。SK-N-ASモデルでは、Trametinib, CH5126766とも、薬剤投与群では著明な増殖抑制効果がみられた。ヒト神経芽腫検体では5検体中3例でpERK陽性細胞が観察された。</p> <p>【考察】</p> <p>MEK阻害剤(Trametinib, CH5126766)は<i>in vivo</i>でも神経芽腫細胞(SK-N-AS)に対する増殖抑制効果を示したため、その他の細胞株も含めた本試験を実施中である。また、臨床検体でもpERKの検出が可能であったことから、今後例数を増やして予後との相関を解析し、臨床応用へのステップを進めていく。</p>		

	<p style="text-align: center;">trametinib CH5126766 control</p>	図 1
研究の背景	<p>神経芽腫は、頭蓋外小児固形悪性腫瘍で最も頻度の高い疾患である。集学的治療の進歩により全体としての治療成績は向上しているが、<i>MYCN</i>増幅例に代表されるような高リスク群においては、3年生存率は約40%と予後不良で、新規治療薬が求められる。</p> <p>MAPK 経路は細胞増殖に関わるシグナル伝達経路であり、様々ながんでこの経路に関わる遺伝子異常が報告されている。このため、本経路を阻害する分子標的薬は、現在新たながん治療薬として注目されている。</p> <p>神経芽腫においては本経路に関する遺伝子異常は少ないと報告されていたが、一昨年、再発腫瘍においては80%近くに本経路に関わる遺伝子異常が起こっていることが報告された(Eleveld TF et al. Nat Genet, 2015)。このことから、再発および難治性神経芽腫に、本経路の阻害剤が有効である可能性が示唆される。</p>	
研究手法	<p>nudeマウスの背部に3種の神経芽腫細胞株を皮下注射する。細胞株はIMR5, NLF, SK-N-ASを用い、RPMI1640培地(10% FBS添加)で培養し、5×10^6個/匹を使用する。腫瘍体積が100mm^3に到達した時点からマウスに薬剤を連日経口投与する。薬剤は0.2mL/20gを投与することとし、下記の投与量となるように希釈する【Trametinib: 3mg/kg, CH5126766: 1.5mg/kg, control: DMSO】。2週間の連続投与を行い腫瘍サイズに有意差が生じるかを解析する。また、副作用についても測定を行う。投与終了後に腫瘍を摘出し、HE染色、免疫組織化学染色を行う。さらに、過去に生検もしくは手術によって採取された神経芽腫臨床検体の保管パラフィンブロック検体を用いてリン酸化ERKやKi67の免疫染色を行い、臨床経過との相関を解析する。本研究から有意な結果が得られれば、MEK阻害剤を組み込んだ臨床試験を計画する。</p>	
研究の進捗状況と成果	<p>神経芽腫細胞株のうち、先行研究にてTrametinibおよびCH5126766に対する感受性の有無が明らかとなっている3種類の細胞株(IMR5, NLF, SK-N-AS)を用いて、xenograft mouse modelを作成した。自然経過を観察し、全例で腫瘍が増大することを確認できた。また、生着した腫瘍検体から組織標本を作成し、HE染色およびKi67、pERKの免疫染色を行った。HE染色ではヒト神経芽腫のなかでもundifferentiated typeに類するようなsmall round cell tumorの形成を認め、Ki67では腫瘍細胞のほとんどが陽性であつ</p>	

	<p>た。pERKは、<i>in vitro</i>での結果と同様にNLFとSK-N-ASのみで陽性細胞が見られたため、xenograft組織標本においても、pERK免疫染色によってMAPK pathwayの活性化が判断できると稽えられた。そこで、SK-N-AS xenograftを使用してpilot studyを行った。薬剤投与群には1日1回Tremetinib 3mg/kg、CH5126766 1.5mg/kgを投与し、対照群にはDMSOを投与した。腫瘍サイズが100mm³に到達した時点から薬剤投与を開始し、2週間の連日投与後に、対照群では著明な腫瘍増大を認めた一方で、薬剤投与群はTrametinib、CH5126766とも、投与開始時からほとんど増大が見られなかつた。また、投与終了時に採取した腫瘍組織では、pERK陽性細胞が薬剤投与前に比して減少していた。以上より、<i>in vivo</i>でもTrametinibおよびCH5126766もpERK陽性神経芽腫に対する増殖抑制効果が期待できると考えられたため、現在は、xenograft生着が確認できたすべての細胞株で<i>in vivo</i>の本実験を行っている。また、ヒト神経芽腫検体も、まずpilot studyとしてstage4の症例5検体を使用してpERKの免疫染色を行った。3例で、腫瘍内にpERK陽性細胞を認めた。このうち1例は、化学療法前にはpERK陽性細胞が認められなかつたが、化学療法後の検体ではpERK陽性細胞が出現しており、化学療法後の残存腫瘍細胞でMAPK pathwayの活性化が高まつたものと考えられた。現在、例数を増やして検討中である。</p>
地域への研究成果の還元状況	まだ実験が終了しておらず、具体的な還元は出来ていない。
今後の期待	マウスを用いた実験でも、MEK阻害剤のpERK陽性神経芽腫に対する効果が確認できれば、ヒト神経芽腫におけるpERK陽性率検討後に、臨床試験へ応用したい。
研究発表 (注3)	<p>【発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1)新規神経芽腫治療薬としてのMEK阻害剤の<i>in vitro</i>での治療効果検討. 第57回日本小児血液・がん学会学術集会 2)MEK阻害剤の神経芽腫に対する<i>in vitro</i>治療効果検討. 第53回日本小児外科学会学術集会 3)MEK inhibitors as a novel therapy for neuroblastoma: Their <i>in vitro</i> effects & predicting their efficacy. 49th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons <p>【論文】</p> <ol style="list-style-type: none"> 4)Tanaka T, Higashi M, Tajiri T, et al: MEK inhibitors as a novel therapy for neuroblastoma: Their <i>in vitro</i> effects and predicting their efficacy. J Pediatr Surg 2016