

様式 4

京都府公立大学法人若手研究者育成支援事業研究成果報告書 (ホームページ用)

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	消化器内科学/感染病態学	助教(併任)	廣瀬 亮平
研究の名称	ヒトインフルエンザウイルスによる腸管感染の証明: 臨床病理学的特徴の解析および発症メカニズムの解明		
研究のキーワード (注 1)	1. インフルエンザウイルス 4. レオロジー	2. 腸管感染症 5. 粘液	3. 粘弹性
研究の概要 (注 2)	<p>季節性インフルエンザウイルス (IAV/IBV) 感染者において便から長期間ウイルスRNAが検出された。 IAV感染後腸炎症例の大腸粘膜組織内にIAV抗原陽性細胞を認めた。⇒腸管感染の可能性を強く示唆</p> <p>Hirose et al. Clinical Microbiology and Infection, 2016.</p> <p>人工粘液に含まれるIAV/IBVは消化液に対して抵抗性を獲得する。抵抗性は人工粘液の粘度との相関が示唆されている。⇒IAV/IBVが感染力を維持したまま腸管に到達する可能性を示唆</p> <p>Hirose et al. Clinical Microbiology and Infection, 2017. Hirose et al. The Journal of Infectious Diseases, 2017.</p> <p>目的 : IAV/IBVの腸管メカニズムを明らかにする ⇒ IAV/IBVによる腸管感染の証明</p> <p>① 初代ヒト呼吸器上皮由来細胞から最もヒトの喀痰に近い性質をもつ人工粘液を作製する ② 作成した人工粘液存在下での消化液耐性試験(in vitro)、耐性と粘度との相関解析 ③ ヒト結腸癌由来細胞(Caco2)・腸管上皮初代細胞を用いたIAV/IBV感染実験 ④ 腸管上皮初代細胞における糖鎖構造解析 ⑤ マウスを用いた粘液条件下のウイルス経口感染実験(ウイルス嚥下モデル)・腸管感染の評価 ⑥ IAV/IBV感染者における臨床研究を行う。「喀痰の粘弹性評価、喀痰・糞便中のウイルス有無(培養・RNA定量)の評価」、「下部消化管内視鏡検査による内視鏡所見と大腸・小腸生検組織の評価」、および「喀痰の粘弹性と腸管感染の相関解析(去痰薬投与群と非投与群の2群間での比較検討)」</p> <p>上気道で感染・増殖したIAV/IBVを高粘度の粘液(喀痰)と共に嚥下した際に、消化液で不活化されず腸管上皮細胞に到達し感染が成立する 《IAV/IBVにより腸炎を起こすことの証明》</p> <p>⑦ ①～⑥を基にインフルエンザ腸炎に対する予防・治療(創薬)の探索と確立を目指す</p> <p>本研究の目的・背景 一般に季節性ヒトインフルエンザA型・B型ウイルス(IAV/IBV)は上気道感染を起こし、上気道症状・発熱・倦怠感などの症状を引き起こす。一方でIAV/IBVの症例の中には、腹痛・嘔吐・下痢といった腹部症状を認める症例が散見される(Chan et al. J Clin Viro 2010)。その病態を考えるにあたって、感染部位は上気道に限定されるものではなく、消化管などの他臓器にも拡がっているのではないかと考えられる。本研究では、『IAV/IBVが腸管内の環境で不活化されずに感染力を有したまま小腸・大腸に到達し腸管上皮に感染を起こすメカニズムを解明すること』、『IAV/IBVの腸管感染を証明すること』を目的とした。</p> <p>本研究テーマに関する国内外の研究状況 過去の後ろ向き研究では、感染性腸炎の疑いで採取された糞便より IAV/IBV の RNA が検出されている(Arena et al. Virol J 2012)。また 2009 年パンデミック株の IAV(H1N1 pdm)においては糞便からの RNA 検出だけでなく分離培養にも成功している(To et al. J Med Virol 2010)。このように IAV/IBV が腸管感染を起こしていることを示唆する報告も散見される。一方、IAV/IBV 感染後に発症した出血性腸炎に対して大腸内視鏡検査を施行した症例は以前にもいくつか報告があるが、腸管での感染が証明された報告は未だ存在しない(Okayama et al. J Microbiol Immunol Infect 2011)。また</p>		

	<p>IAV/IBV 感染後に腸炎を起こすのは腸管感染によるものではなく、Th17 細胞等が関与する免疫反応の一環であるとの報告も存在する(Wang et al. J Exp Med 2014)。以上のように腸管感染に肯定的・否定的両方の報告があり、IAV/IBV 腸管感染の可否については未だ結論が出ていない(Minodier et al. Virol J 2015)。</p> <p>以前に我々は、IAV/IBV 感染者において便から長期間ウイルス RNA が検出されること、IAV 感染後腸炎症例の大腸粘膜組織内に IAV 抗原陽性細胞が認められることを発見し報告した(Hirose et al. Clin Microbiol Infect 2016)。この報告は IAV/IBV の腸管感染を強く示唆する臨床データであったが、腸管感染を証明するにはさらなる臨床データの蓄積(臨床研究)と感染を起こすメカニズムの解明(基礎研究)が必須であった。感染機序の解明によって質の高い臨床研究を行うことが可能となり、IAV/IBV の腸管感染の証明および臨床病理学的特徴の解明が期待される(Hirose et al. Clin Microbiol Infect 2017)。</p> <p>そこで我々は IAV/IBV が腸管感染を起こすメカニズム解明の一端として、IAV/IBV が腸管内の過酷な環境に耐え不活化されずに感染性を維持するメカニズムの解明に着手した。上気道で感染・増殖した高力価の IAV/IBV を含んだ痰や鼻汁を嚥下する <i>in vitro</i> モデルを考案し解析を行った。その結果、本来腸管内環境に非常に脆弱な IAV/IBV が粘度の高い粘液に閉じ込められることによって、人工胃酸・胆汁酵素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(Hirose et al. J Infect Dis 2017)。この知見により感染力を維持した IAV/IBV が腸管に到達できる可能性がある事、また同時に便から IAV/IBV が検出される事が明らかになった。今後のこのメカニズムをさらに発展させて解析を進めていき、最終的に IAV/IBV の腸管感染を証明することが本研究の目的である。</p>
研究の背景	「研究の概要」に併せて記載
研究手法	<p>① 最もヒトの喀痰に近い性質をもつ人工粘液の作製</p> <p>現在までに我々は初代ヒト呼吸器上皮由来細胞に対しSV40-T抗原遺伝子を導入することで、数十種類の細胞株樹立に成功している。これら細胞株を用いて気相液相界面培養(ALI : Air-liquid interface culture)を実施し、分化誘導によって線毛上皮やムチン(MUC5AC)が発現することを確認している。これらを応用し、ALIにて分化した細胞から粘液を採取・精製することによって、最も喀痰に近い性質をもつ人工粘液を作製、その粘液を用いて下記の消化液耐性試験を行う。</p> <p>② 人工粘液存在下での消化液耐性試験、耐性獲得と粘度との相関解析</p> <p>粘液に含まれるIAV/IBVが耐性を獲得する機序解明を行う。①で作成した人工粘液を使用することによって、実際にヒトがIAV/IBVを含む喀痰を嚥下して腸管に到達したケースに最も近い条件で、耐性獲得の評価を行うことが可能である。また消化液以外の腸管環境(半消化体等)からもIAV/IBVが保護されるのか評価を行う。最終的に耐性獲得と粘液粘度の相関をピアソンの積率相関分析で評価する。</p> <p>③ ヒト結腸癌由来細胞・腸管上皮初代細胞を用いたIAV/IBV感染実験</p> <p>感染力を有したIAV/IBVが腸管に到達した際、腸管上皮細胞で感染を起こすことが可能かどうか評価するために、腸管上皮細胞を用いたIAV/IBV感染実験を行う。分化させたヒト結腸癌由来細胞(Caco2)と小腸・大腸上皮初代細胞を用いて感染実験を行う。</p> <p>④ 腸管上皮初代細胞における糖鎖構造解析</p> <p>上記の腸管上皮初代細胞において、MAA・SNALレクチン染色によるシアル酸レセプター(SA α 2,6, SA α 2,3)の発現状況の評価とウイルスの細胞侵入効率を解析する。</p>

研究の進捗状況と成果	<p>粘液(人工粘液・ヒト喀痰)とウイルスを混和した上で、人工消化液によってウイルスやRNAが不活化・分解されないか評価を行った。その結果、粘液非存在下でウイルス・RNAは人工消化液で速やかに不活化・分解された。一方粘液存在下で、粘液粘度が上がるにつれ不活化・分解されないウイルス・RNAの割合が増加し、最終的に高粘度条件下では消化液と4時間反応後もウイルス・RNAは不活化・分解されなかった。</p> <p>ヒト結腸癌由来細胞とヒト小腸・大腸初代細胞を用いて感染実験を行った。感染実験では、ヒト結腸癌由来細胞とヒト小腸・大腸初代細胞すべての腸管細胞にIAV/IBVの感染が認められた。またサイトケラチンカクテル抗体を使用した多重染色にて、腸管粘膜上皮細胞に感染が起こっていることを確認した。さらに、MAA・SNAレクチン染色によるシアル酸レセプター($SA\alpha 2,6$, $SA\alpha 2,3$)の発現状況の評価を行い、腸管上皮細胞にはいずれのレセプター発現も認めることが明らかになった。</p> <p>現在マウス・ハムスターを用いた経口感染モデルを構築中である。また、感染力のある完全なウイルス粒子の時は赤色に蛍光し、ウイルスが不活化されると蛍光しなくなるようにウイルスを処理し、視覚的に評価可能な系を現在作成中である。</p>
地域への研究成果の還元状況	今後の研究によってインフルエンザ関連腸炎の予防・治療基盤確立ができれば、地域の感染症医療の発展におおいに貢献するものと思われる。
今後の期待	<p>ここまで基礎研究の結果に基づき今後はヒトを対象とした臨床研究を行う。インフルエンザ発症時の喀痰粘度・ウイルス量と腸管感染の有無の関係性を評価し、腸管感染の疑われる症例に関しては下部消化管内視鏡検査を施行し粘膜の病理学的評価も行う。さらに去痰薬などの介入による喀痰の粘度低下が、腸管感染の有無や腹部症状の程度にどのくらいの影響を与えるか解析を行う。</p> <p>これらの研究は、インフルエンザ関連腸炎の予防・治療基盤確立を目的としている。インフルエンザ罹患時は他のウイルス性腸炎と同様の治療併用が有効かもしれない。また従来の抗ウイルス薬だけでなく、痰の粘度を下げる薬剤(去痰薬の一部)の併用の有効性も期待される(粘液粘度が下がれば腸管内環境で IAV/IBVは不活化され腸管感染は起こさない)。嚥下する痰の量の減少や粘度の低下を目的とした予防方法確立や創薬への発展も期待される。</p>
研究発表 (注3)	<u>Hirose R, Nakaya T, Naito Y, Daidoji T, Watanabe Y, Yasuda H, Konishi H, Itoh Y.</u> Viscosity is an important factor of resistance to alcohol-based disinfectants by pathogens present in mucus. <i>Scientific Reports</i> , 7:13186, 2017.

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。

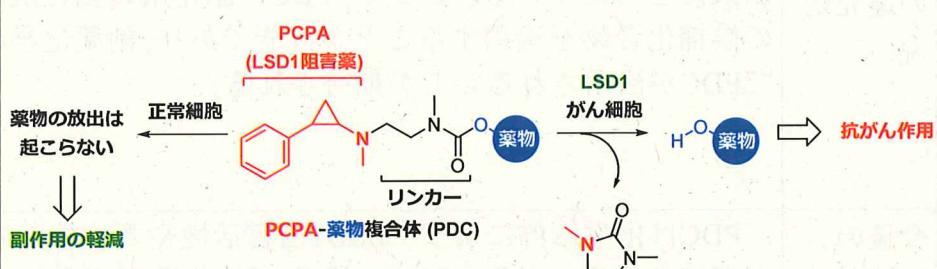
注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

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4

京都府公立大学法人若手研究者育成支援事業研究成果報告書
(ホームページ用)

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	京都府立医科大学大学院 医学研究科医薬品化学	学内講師	太田 康介
研究の名称	新規ドラッグデリバリー小分子化合物の創製		
研究のキーワード (注1)	抗がん剤、ドラッグデリバリー、小分子、		
研究の概要 (注2)	<p>当研究室では、がん細胞に高発現するLSD1とその阻害薬PCPA Aを利用したドラッグデリバリー小分子PCPA-薬物複合体 (PDC) の開発を行ってきた(図1)。PDCはLSD1を過剰に発現するがん細胞で選択的に薬物を放出することが期待される(図1)。これまでに、乳がん治療薬タモキシフェンの活性代謝物を有するP DCを設計・合成し、概念実証研究を行ってきたが、PDCの薬物放出の一般性については明らかになっていなかった。本研究ではPDCの薬物放出の一般性を明らかにし、PDCの有用性について検証する。</p>  <p>図. PCPA-薬物複合体 (PDC) の概念</p>		
研究の背景	<p>抗がん剤は有効な治療効果を示すが、副作用を伴うことがある。最近では副作用の強い抗がん剤をがん病巣に直接送り届けるドラッグデリバリーシステム (DDS) の研究開発が盛んに行われている。一方で、既存のDDSは高分子を利用したものが多く投与方法の制限、生産コスト等課題も残されている。このような背景のもと、当研究室では多くのがん細胞に過剰発現するリシン特異的脱メチル化酵素1 (LSD1) とその阻害薬</p>		

	<p><i>trans</i>-2-phenylcyclopropylamine (PCPA)を用いたドラッグデリバリー小分子PCPA-薬物複合体 (PDC) を考案した。PDCはLSD1を過剰に発現するがん細胞においてはLSD1の阻害に伴い薬物を放出する。一方で、LSD1をほとんど発現しない正常細胞では薬物の放出が起こらないと期待される。これまでに当研究室では乳がん治療薬タモキシフェンの活性代謝物を含むPDCを設計・合成し、概念実証研究を行ってきた。しかし、PDCの薬物放出の一般性については明らかになっていなかった。本研究ではPDCの薬物放出の一般性を明らかにし、PDCの有用性について検証した。</p>
研究手法	<p>ヒストン修飾酵素や核内受容体を標的とした抗がん剤や細胞毒性型抗がん剤を組み込んだ新規PDCを設計・合成した。合成した新規化合物を市販の評価系を用いてLSD1阻害活性やHPLCを用いたLSD1存在下における薬物放出能について評価を行った。さらに、LSD1阻害活性と薬物放出が確認された新規PDCの一部は、がん細胞と正常細胞に対する効果を評価した。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>上述した抗がん剤を含む新規PDCを設計し、それらの合成を達成した。合成した新規化合物の多くは強いLSD1阻害活性が認められ、LSD1存在下において対応する薬物を放出することが明らかとなった。さらに、一部の新規化合物に関してはがん細胞に対して増殖抑制効果を示す一方で、正常細胞に対してはほとんど毒性を示さなかった。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>本研究によりPDCの薬物放出の一般性を確認することができ、PDCのドラッグデリバリー小分子としての有用性を示すことが出来たと考えている。従って、PDCに副作用の強い抗がん剤やその候補化合物を適用することが可能であり、創薬化学の研究分野でPDCが活用されることが期待される。</p>
今後の期待	<p>PDCは化学修飾により、LSD1阻害活性や薬物放出効率の向上が期待される。今後、PDCの構造-活性相関研究を行うことで、最適化された新規PDCが得られると期待される。</p>

研究発表 (注3)	<p>1. <u>Yosuke Ota</u>, Yukihiro Itoh, Takayoshi Suzuki "Controlled Release of Anticancer Drugs by LSD1 Inhibition" 4th International Symposium for Medicinal Sciences 27O-ISMS10 Mar 2018 (Kanazawa)</p> <p>2. 中村有沙、<u>太田庸介</u>、伊藤幸裕、鈴木孝禎 「PCPA-drug conjugate を利用した細胞毒性型抗がん剤デリバリー」第7回4大学連携研究フォーラム A-21 2017年11月 京都府立医科大学</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 4

京都府公立大学法人若手研究者育成支援事業研究成果報告書
(ホームページ用)

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	呼吸器外科	助教	常塚 啓彰
研究の名称	N2-3A/3B期非小細胞肺癌に対する術前化学療法、根治切除、および術後放射線治療による集学的治療の忍容性試験		
研究のキーワード (注 1)	3期非小細胞肺癌、集学的治療		
研究の概要 (注 2)	病理学的に縦隔リンパ節転移を証明された臨床病期3A/3B期の非小細胞肺癌症例を対象とする多施設共同の前向き試験で、CBDCA + nab-PTX併用術前化学療法、外科的切除、術後胸部放射線照射をプロトコール治療と定義する。主要評価項目は治療完遂、副次評価項目を術前化学療法の奏功、治療関連有害事象、無増悪生存期間とする。		
研究の背景	臨床病期3期の非小細胞肺癌の治療としては手術を含む集学的治療が勧められ、実地臨床において術前導入療法として化学療法又は放射線化学療法が行われていることが多い。しかし、これまで術前導入療法として化学療法と放射線化学療法のどちらが良いかという点についてのデータに基づいた根拠はなかった。集学的治療としての外科的切除、化学療法、胸部放射線照射のいわゆるTrimodalityの治療順序に関しては未だ標準化されていない。		
研究手法	多施設共同介入研究である。 術前に縦隔リンパ節転移が証明されたN2-3A/3B期非小細胞肺癌で完全切除が可能と判断された症例を登録し、術前化学療法としてカルボプラチニン(CBDCA)+ナブパクリタキセル(nab-PTX)を3コース投与した後、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST)基準にてPDでない症例に対して肺葉切除以上の肺癌根治術を施行し、さらに術後放射線照射50Gy (腫瘍遺残を認めた場合		

	は60Gy) を行う集学的治療の忍容性を明らかにすることを目的として本研究を計画した。主要評価項目は治療完遂割合とし、副次評価項目として術前化学療法奏効割合、治療関連有害事象 (Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v4.03 - JCOGのGrade分類)、術後2年無増悪生存割合を解析する。各施設の担当医は、対象患者が選択基準を全て満たし、除外基準のいずれにも抵触しないことを確認し、EDCシステム上の「症例登録」画面に必要事項をすべて入力しWeb登録し、研究開発・質管理向上統合センター (CQUARD) でのデータ管理を行う。倫理的な観点から全参加施設からの登録開始後5例で中間解析を行い安全性と無効性の評価を実施し、目標症例数は25例とし術後2年の追跡期間を予定している。
研究の進捗状況と成果	本学をはじめ大阪大学、滋賀医科大学、京都府立医科大学の連携病院で各施設の倫理委員会へ申請を行い、承認が得られた施設から症例登録が開始されている。
地域への研究成果の還元状況	現在は症例登録を行っている状況である。今後データの解析を行い局所進行肺癌患者に対し治療法に還元させていく方針である。
今後の期待	今後この研究により局所進行肺癌に対する治療法の確立に寄与するものと考える。

研究発表 (注3)	未発表である。
--------------	---------

- 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 4

京都府公立大学法人若手研究者育成支援事業研究成果報告書
(ホームページ用)

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)																																				
研究者	京都府立医科大学大学院 医学研究科内分泌代謝内 科学	客員講師	大坂貴史																																				
研究の 名称	新規サルコペニアバイオマーカーの検討																																						
研究のキ ーワード (注 1)	サルコペニア 筋萎縮 バイオマーカー																																						
研究の 概要 (注 2)	<p>超高齢社会の日本において要介護の原因となるサルコペニア(筋萎縮)の早期診断・予防は重要な課題と考える。そのため血液検査で診断可能な簡便なバイオマーカーが必要と思われる。我々はマウスサルコペニアモデルのヒラメ筋よりサルコペニア特異的microRNA (マイクロRNA) を明らかにしている。microRNAはヒト血清にも存在するため、我々が実施している糖尿病患者のコホート研究による多くの症例の保存血清を用いてサルコペニア診断のバイオマーカーとなりうるかを検討した。</p> <p>結果、各microRNAでサルコペニアと非サルコペニアの群間差は認めず、骨格筋量や握力や他パラメーターとも関連は認められなかった。</p> <table border="1"> <caption>Estimated microRNA expression levels from the chart</caption> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>miR-1</th> <th>miR-23a</th> <th>miR-23b</th> <th>let-7e</th> <th>let-7f</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Group 1</td> <td>6.5</td> <td>2.5</td> <td>2.5</td> <td>3.5</td> <td>4.0</td> </tr> <tr> <td>Group 2</td> <td>5.5</td> <td>1.5</td> <td>1.5</td> <td>2.5</td> <td>3.0</td> </tr> <tr> <td>Group 3</td> <td>3.5</td> <td>1.0</td> <td>1.0</td> <td>1.5</td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>Group 4</td> <td>2.5</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> <td>1.0</td> <td>1.5</td> </tr> <tr> <td>Group 5</td> <td>1.5</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> <td>1.0</td> </tr> </tbody> </table>			Group	miR-1	miR-23a	miR-23b	let-7e	let-7f	Group 1	6.5	2.5	2.5	3.5	4.0	Group 2	5.5	1.5	1.5	2.5	3.0	Group 3	3.5	1.0	1.0	1.5	2.0	Group 4	2.5	0.5	0.5	1.0	1.5	Group 5	1.5	0.5	0.5	0.5	1.0
Group	miR-1	miR-23a	miR-23b	let-7e	let-7f																																		
Group 1	6.5	2.5	2.5	3.5	4.0																																		
Group 2	5.5	1.5	1.5	2.5	3.0																																		
Group 3	3.5	1.0	1.0	1.5	2.0																																		
Group 4	2.5	0.5	0.5	1.0	1.5																																		
Group 5	1.5	0.5	0.5	0.5	1.0																																		

	しかし、血清microRNAはばらつきを持った値を示し、何らかの病態による変化を表している可能性が示唆された。また、miR-1を除いて各microRNA間での関連は強く認められ、血清中のmicroRNAが他のmicroRNAと相互に影響し合い何らかの遺伝子を調整している可能性が示唆された。
研究の背景	日本人の平均寿命の延長に伴う急激な高齢化が進んでおり、高齢者問題は喫緊の重要な課題である。高齢者問題の一つとして要介護者数の増加が挙げられ、要介護の原因である脳血管疾患、認知症、骨折の主因がサルコペニア(筋萎縮)である。サルコペニアは筋力及び筋量の低下を背景にした症候群であるが有効な治療法はなく予防が肝要である。 サルコペニアの診断にはBIA法、CT、MRIによる評価が必要だが、診断時にはすでに病態が完成しており、治療介入による効果を上げにくい。このため、サルコペニアを早期発見できる、できれば発症前診断が可能なバイオマーカーが必要である。
研究手法	当研究室で実施しているKAMOGAWA-DMコホート研究(No. RBMR-E-466-1)において保存された血清よりサルコペニア群16名、非サルコペニア16名を対象とした。まず、サルコペニアと診断された者の中から16名(男性6名、平均年齢73.6±5.2歳)を無作為に選出し、その16名と性別・年齢でマッチされた非サルコペニア患者を同一コホート内より無作為に抽出した。血清よりmiRNeasy Serum/Plasma Kitを用いて、microRNAを含めたtotalRNAを抽出した。miR-1, miR-231, miR-23b, let-7a, let-7fについてrtPCRでCT値を算出後、cel-mir39をコントロールとして $\Delta\Delta CT$ 法で評価した。各microRNAの発現量をサルコペニア及び非サルコペニア群で比較した。また、SMIや骨格筋量、握力に加えて血清学的パラメーターについて各microRNAの発現量と関連を検討した。
研究の進捗状況と成果	現在までに血清中のmicroRNAの発現量を評価したところである。結果として、各microRNAでサルコペニアと非サルコペニアの群間差は認めず、骨格筋量や握力や他パラメーターとも関連は認められなかった。しかし、血清microRNAはばらつきを持った値を示し、何らかの病態による変化を表している可能性が示唆された。また、miR-1を除いて各microRNA間での関連は強く認められ、血清中のmicroRNAが他のmicroRNAと相互に影響し合い何らかの遺伝子を調整している可能性が示唆された。今後は糖尿病患者以外の健常人の血清やサルコペニアがさらに進んだ寝たきり患者の血清との比較で血清中におけるmicroRNAがサルコペニアに与える影響を調べていく方針である。

地域への研究成果の還元状況	現状は糖尿病患者においてmicroRNAの発現が様々にみられるという事を確認した所である。今現在上記の結果を踏まえて、健常人や寝たきりの患者の血清を収集中である。それらのmicroRNAの発現を比較する予定としている。その結果により研究結果を還元できると考える。
今後の期待	現在の結果からマウスサルコペニアモデルのヒラメ筋より明らかにしたサルコペニア特異的microRNAが血清中でもばらつきを持った発現をする事を示された。今後は様々な層の血清で比較する事でサルコペニア特異的なバイオマーカーとして有用性を検討する事でサルコペニアの早期診断につながると考えられる。
研究発表(注3)	現在は予定中。近日中の学会にて成果を報告し、その後論文を作成する予定である。

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 4

京都府公立大学法人若手研究者育成支援事業研究成果報告書
(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	馬庭 淳之介
研究の名称	マウス由来間葉系幹細胞を用いた神経芽腫への ドラッグデリバリーシステムの構築		
研究のキーワード (注 1)	神経芽腫,間葉系幹細胞, ホーミング, ドラッグデリバリーシステム		
研究の概要 (注 2)	頭蓋外小児固形悪性腫瘍で最も頻度の高い神経芽腫は、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、高リスク群では未だ予後不良であり、さらに治療毒性により、二次がんなどの晚期合併症が生じている現状がある。間葉組織に存在する間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) は、組織損傷部位へ遊走する特徴的な能力 (Homing effect) が知られており、我々はその能力に着目した。我々は、今までに神経芽腫モデルマウス (MCYN-TgM) を用いて、腹腔内投与したヒト脂肪組織由来MSC (hMSC) が腫瘍へ特異的に homing する可能性があることを示した(Kimura K et al, J Pediatr Surg 2016)。しかし、長期生着は認めず、ヒトマウス間の異種間移植のため、拒絶反応を惹起し阻害された可能性が考えられた。そこで本研究は、今後の臨床応用を考慮した場合に同種間移植が必須であると考えられ、MCYN-TgMに対してマウス間葉系幹細胞 (mMSC) を用いて施行した。		
研究の背景	高リスク神経芽腫に対して日本においてもJCCG神経芽腫委員会 (JNBSG) においてより短期間に治療強度を高めたレジメンが開発されており、治療成績の向上が期待できるが、同時に治療毒性も強くなり、二次がんなどの晚期合併症のリスクが上がることが懸念される。腫瘍選択性が高く、安全で、これまでの治療概念とは異なる新規治療法の開発が喫緊の課題であった。		
研究手法	近赤外線蛍光色素 (DiR) で染色した mMSC を生後 5 週の homotype MYCN-TgM に腹腔内投与 (3×10^6 個/mouse) ・ 静脈投与 (1×10^6 個/mouse) の 2 経路にて投与を行い、腫瘍への homing を蛍光イメージング装置の <i>in vivo imaging system (IVIS®)</i> を用いて経時的に解析を行う。 また、mMSC 投与後に犠牲死させ、腫瘍組織を採取し、免疫染色を行い腫瘍への mMSC の生着を解析する。mMSC の homing が確認されたのちに IFN β を遺伝子に形質導入(transfection)させ発現させた mMSC (IFN β -mMSC) を		

	MYCN-TgM に既存の 2 経路を用い投与を行い、PBS 対照群と生存曲線を比較検討し DDS としての有効性を解析する。
研究の進捗状況と成果	<p>IVISにてmMSCの動態をマウス生存下にて検証すると、mMSCが腹腔内投与直後より時間経過とともに腫瘍部位へ移動していることが確認された。その後、投与12時間後にMYCN-TgMを犠牲死させ、摘出した腫瘍及び各臓器に対してIVISにて解析を行い、摘出した腫瘍においてmMSCの集積を確認した（下図）。静脈投与でも同様に腫瘍への集積を認めた。以上より MYCN-TgMに投与したmMSCがIVISにおいて神経芽腫へhomingしていることが確認された。</p> <p>現在、mMSC投与後の腫瘍組織を採取し、免疫組織化学染色を行い腫瘍へのmMSCの生着状況を解析している。そして、MYCN-TgMに対してIFNβ発現 mMSC投与を開始している。</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 10px; margin-top: 10px;"> <p style="text-align: center;">mMSCの神経芽腫へのhoming効果(腹腔内投与)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>A:</p> <p>tumor (h:min) 00:00 00:01 00:30 01:00 06:00 12:00</p> <p>Dil-labeled mMSCs 3×10^6 cells</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>B:</p> <p>heart liver rt.lung lt.lung tumor spleen rt.kidney lt.kidney</p> </div> </div> <p style="text-align: center;">A: 繰時的に腫瘍へ蛍光が移動・集積している B: 12時間後 肿瘍に蛍光を認める</p> </div>
地域への研究成果の還元状況	本研究によりmMSCをドラッグデリバリーシステムのプラットホームとして利用することで、将来的に新規薬剤とコラボレーションした新規治療法としての意義が確立できることが期待できる。
今後の期待	本研究の臨床応用実現により、神経芽腫罹患児への投薬による副作用を最大限抑えながら、さらに十分な薬効をもたらすことが期待され、多くの患児のQOL向上につながることが期待される。

研究発表 (注3)	<p>学会発表</p> <p>1. Maniwa Jなど.「Investigation of homing effect on mouse neuroblastoma by mouse-derived mesenchymal stem cells using model mouse」 the 3rd Asia-Pacific International Symposium of Neuroblastoma 東京. 2017/10</p> <p>.</p> <p>2. 馬庭 淳之介など.「神経芽腫発生モデルマウスを用いたマウス由来間葉系幹細胞の神経芽腫へのhoming効果の検討」 第59回日本小児血液・がん学会学術集会.愛媛.2017/11.</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 4

京都府公立大学法人若手研究者育成支援事業研究成果報告書
(ホームページ用)

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	女性生涯医科学 感染病態学教室	大学院生	秋山 鹿子
研究の名称	子宮内膜症患者における子宮頸管粘液細菌叢の解析		
研究のキーワード (注 1)	子宮内膜症、子宮頸管粘液、細菌叢		
研究の概要 (注 2)	<p>子宮内膜症は性成熟期女性の約10 %に発症する慢性疾患である。発症機序は諸説あり依然として不明な部分が多い。子宮内膜症患者の月経血中には大腸菌が多く検出されることが報告されており、子宮内膜症の発症と細菌叢の変化の関係が示唆されている。子宮内膜症は本来無菌とされる腹腔内子宮周辺組織で多く見られ、バリア機構として働く子宮頸管粘液の細菌叢が子宮内膜症患者においては腔からの逆行性感染等により破綻していることが考えられる。特に、子宮により近い子宮頸管粘液の細菌叢の変化が影響している可能性が高い。</p> <p>本研究は、子宮内膜症患者の子宮頸管粘液中の細菌叢解析を行う。子宮頸管粘液の細菌叢解析はほとんど行われていないため、最適化された解析方法にて、子宮内膜症発症と関与する候補となる細菌の探索を行う。</p>		
	<p>子宮内膜症</p> <ul style="list-style-type: none"> ・月経血逆流説が有力だが、説明として不十分 ・月経血から検出される大腸菌が多い ・子宮内膜炎との関連がある <p>細菌感染により炎症を起こした内膜組織が腹腔内に逆流 内膜組織が生着しやすくなり、内膜症を発症する？</p> <p>子宮頸管粘液 (逆行性感染のバリア機構)</p> <p>細菌叢の網羅的解析</p>		

研究の背景	<p>子宮内膜症患者での月経血中には大腸菌が非内膜症患者に比べて有意に高く検出される。また、子宮内膜炎と子宮内膜症は強く関連するという報告があり、子宮内膜症発症に慢性炎症がかかわることが示唆されている。細菌感染は炎症発生のトリガーとなり、子宮内膜への感染経路は腔および子宮頸管からの逆行性感染の可能性が高い。</p> <p>子宮頸管粘液は、子宮腔内への逆行性感染を防ぐ役割を果たすとされ、子宮内膜症患者ではその機構の破綻が考えられる。子宮頸管粘液中の細菌叢を解析することにより、子宮内膜症患者特有の細菌叢変化を検出することを目的とした。</p>
研究手法	<p>当院産婦人科外来患者(内膜症群30検体、非内膜症群39検体)から子宮頸管粘液を採取した。Gram染色を行い細菌の存在を確認後、核酸抽出を行い、16S rRNA遺伝子のV5-V6領域を標的としたNGS解析を行った。子宮内膜症群と非内膜症群で比較を行い、子宮内膜症群で特徴的に検出される細菌群を抽出し、特異的プライマーを用いたrealtime PCRにてNGS結果の裏付けを行った。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>NGS解析により、非内膜症群を、月経周期の増殖期、分泌期に分類した細菌叢の比較解析では、細菌叢は月経周期に依存せず個人差が大きいことが見られた。同様に両群の細菌叢の比較解析では各群に特徴的な細菌叢は認められなかった。</p> <p>患者個人の検体中の多様性に着目し解析を行ったところ、検体中の細菌叢の多様性は内膜症群で有意に高く、その多様性指数と子宮内膜症の重症度の指標である rASRM 分類スコアは相関しなかった。これら結果から、ある特定の細菌の増殖が子宮内膜症の症状の悪化ではなく発症に関与することが示唆された。</p> <p>そこで、内膜症群で増殖が見られる細菌属をNGS結果から探索したところ過去の大腸菌が多く検出される報告と一致し、腸内細菌科を含む複数の細菌属が内膜症発症の起因菌候補として見られた。以上の結果より、子宮内膜症の発症に特定の細菌属の増加が関与する可能性が示唆された。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>今後、子宮内膜症の発症機序の解明および、根治が難しいとされる子宮内膜症の新たな治療方針を開発する一助となることが想定される。</p>

今後の期待	<p>今回の研究で内膜症発症に関与する可能性がある細菌属の候補を抽出できたが、今後内膜症モデルマウス等を使用し、<i>in vivo</i>でもその関与を確認する必要がある。</p> <p>また、子宮頸管粘液中の細菌叢のさらなる解析により、周産期分野での切迫早産と感染との関連等の研究の一助となることが期待される。</p>
研究発表 (注3)	<p>現在予定中。</p> <p>今後学会にて成果を報告および論文作成する予定である。</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。