2024年度

東京慈恵会
総合医学研究センター
研 究 年 報

公益社団法人　東 京 慈 恵 会

序

この度、2024年度東京慈恵会総合医学研究センター研究年報 第40号が発刊される運びとなりました。大変お忙しいなか、ご執筆戴いた諸先生方には心より感謝申し上げたいと思います。

公益社団法人東京慈恵会の事業の大きな柱の一つとして位置付けられる、医学振興事業の嚆矢は心臓センターの開設で、1978年にまで遡る。その後研究部門の拡充が計られ、現在の東京慈恵会総合医学研究センターの名称のもとに各研究部門が置かれるようになったのは1985年である。2012年には、東京慈恵会は一般社団法人から公益社団法人へと移行したが、その定款においても医学振興事業の推進が明確に打ち出されている。

2024年度は、成人病研究部、感染防御研究部、生理学研究部、遺伝子治療研究部の4医学研究部門が設置されており、それぞれの研究テーマに沿って鋭意研究が進められている。これら研究部門の在り方に関しては、紆余曲折があり、このことについては2021年度研究年報「序」において触れられているのでご参照願いたい。本研究年報には、2024年度の研究成果が詳細に報告されており、社会への貢献を目指して例年に倣って国立国会図書館にも納める予定である。多くの方々に読んで戴ければ幸いである。

本総合医学研究センターの事業は当初より民間団体からの経済的ご支援により成り立っており、現在は一般社団法人霞会館様、同昭和会館様より多大なご援助を戴いている。この場をお借りして深甚なる感謝を申し上げる次第である

2025年6月1日

公益社団法人 東京慈恵会
総合医学研究センター
センター長　東條 克能

2024年度
東京慈恵会総合医学研究センター
研 究 概 要

生理学研究部	越　智　小　枝
感染防御研究部	金　城　雄　樹
遺伝子治療研究部	小　林　博　司
成人病研究部	安　保　雅　博
	荒　屋　　潤

慈恵看護専門学校	東　條　克　能

2024年度

東　京　慈　恵　会

総合医学研究センター　研究年報

目　　次

序

生理学研究部　越　智　小　枝 ……1

感染防御研究部　金　城　雄　樹 ……9

遺伝子治療研究部　小　林　博　司 …… 21

成人病研究部　安　保　雅　博 …… 29

荒　屋　　潤 …… 37

慈恵看護専門学校　東　條　克　能 …… 47

生理学研究部

越智小枝

研　究　概　要

ビタミンD関連物質の包括的測定と「正常値」の検証　中間報告

1．血清24,25(OH)D測定法の確立

ビタミンDの体内充足度の指標として、近年その代謝物としての血清24,25$(OH)_2$D測定が注目を集めている。しかし24,25$(OH)_2$D はその血中濃度が微量であることから従来のEnzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法などによる精密測定が困難である。近年Liquid chromatogram- tandem mass spectrum (LC-MS/MS)を用いた24,25$(OH)_2$D測定が注目を集めている。しかしLC-MS/MSの欠点として、その前処理が煩雑であり、臨床現場への導入に適しない点が挙げられる。我々は今回、全自動前処理システム付LC-MS/MS機器を用い、24,25$(OH)_2$D をおよび25$(OH)_2$D/24,25(OH)D比(vitamin D metabolite ratio, VMR)につき、質量分析機を用いた測定を試みた。

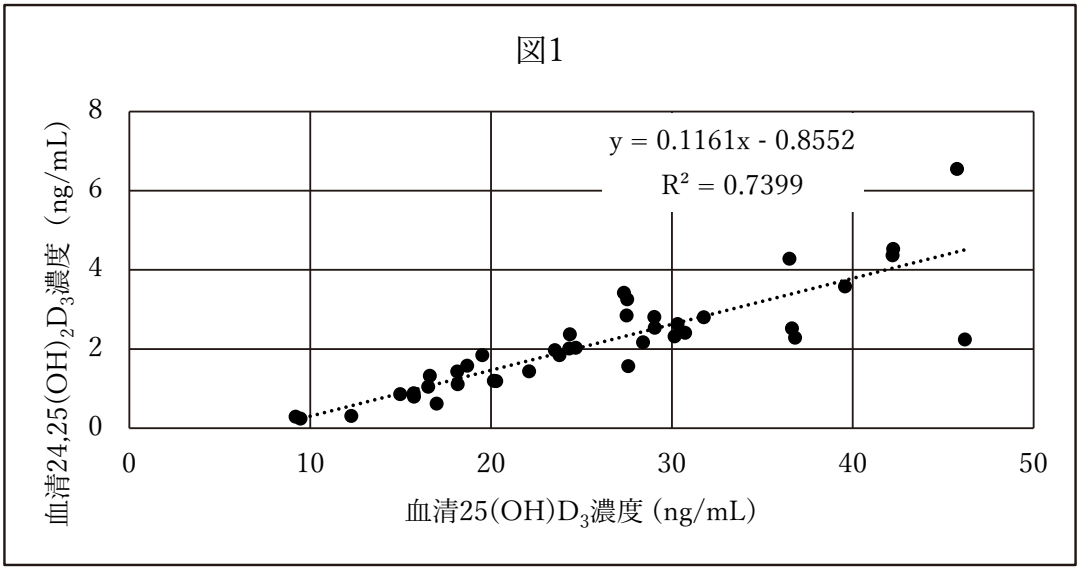
方法：

全自動前処理装置付き超高速LC-MS/MS器（LCMS-8060NXシステム、島津製作所)を用いて血清24,25$(OH)_2$D測定の前処理の条件設定を行った。さらに、東京慈恵会医科大学新橋健診センターの残血清を用い、血清25(OH)D、24,25$(OH)_2$D 濃度を測定し、VMRを計算した。

結果：

LC-MS/MS条件の最適化と分析カラムの最適条件検討により、標準溶液においては0.5-100 ng/mLの領域において良好な直線が得られ、正確さも100±6%以内とであった。

この手法を用い、健診センター受診者40名の採血を行ったところ、血清25(OH)D濃度と24,25$(OH)_2$D濃度にはR2=0.74と強い相関が見られた(図1)。測定に要した時間は約25分であった。



2．血清25(OH)D濃度および24,25(OH)$_2$D とカルシウムバランスとの関連の検証

これまで血清25(OH)Dの基準値設定は、血清副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone, PTH）濃度上昇の閾値、すなわち体内カルシウムバランスの異常を示唆する値を目安とされてきた。

そこで24,25(OH)$_2$D測定の条件設定に用いた40例につき、カルシウムバランスとの相関の有無について調べた。

方法：

マルチモードプレートリーダー（プロメガ社GloMax®Explorer GM3500）を用いてELISA法によるPTH測定を行った。PTH値と25(OH)D、24,25(OH)$_2$D、VMRとPTH濃度の相関とR^2値を算定した。

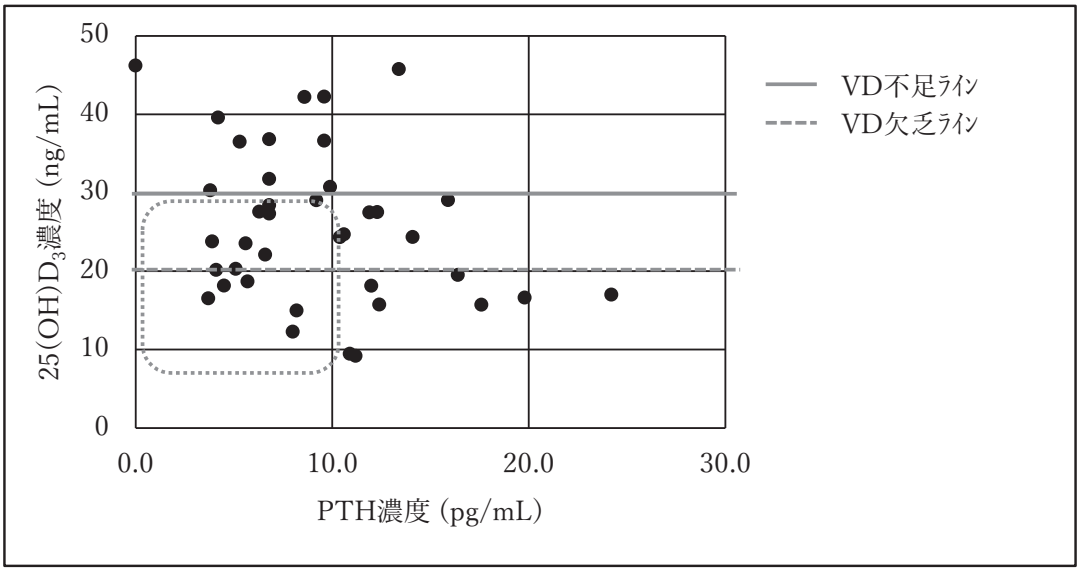
結果：

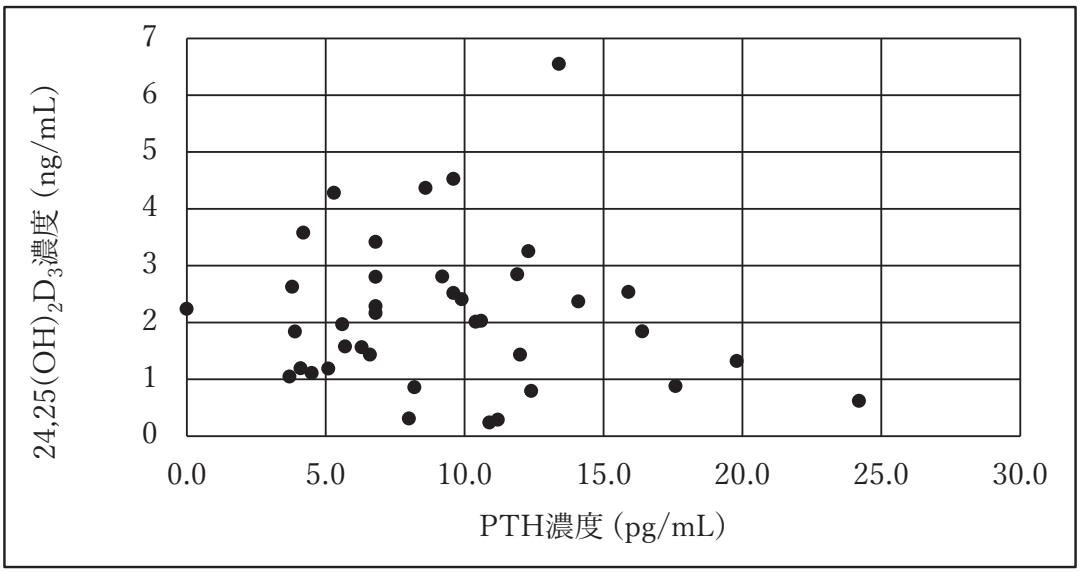
PTHと各指標との相関を図２～４に示す。興味深いことに、従来定義されるビタミンD不足[25(OH)D＜30ng/mL]、ビタミンD欠乏[25(OH)D＜20ng/mL]に含まれるサンプルでは、必ずしも血中PTH濃度は上昇していなかった。これは、25(OH)Dが低値でもカルシウムバランスが保たれている群の存在を示している。24,25(OH)$_2$Dでも同様の検討を行ったが、やはり明らかなPTHとの相関は見られなかった。

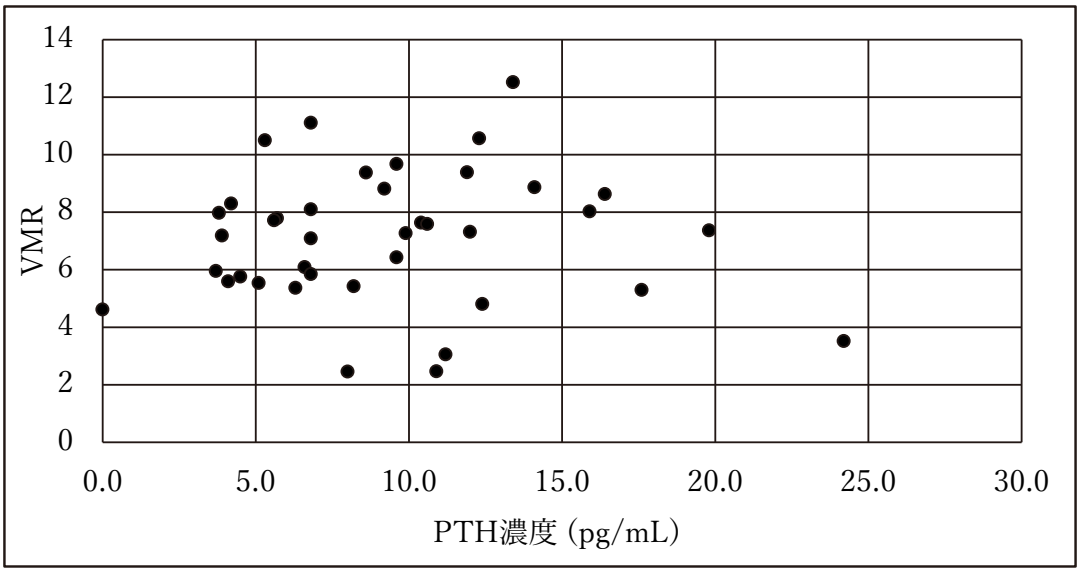
カルシウムバランスだけがビタミンDの作用ではないものの、これらの群を詳細に検討することによって、より精密なビタミンD充足度を測定できる可能性がある。

今後サンプル数を増加し、かつ他健診データと統合することによってよし詳細な解析を進めていく予定である。

今回の結果から多くの患者においては血清25(OH)D濃度がビタミンD充足度を反映し得るが、25(OH)Dが比較的高値にもかかわらず24,25$(OH)_2$D濃度が低値の症例やその逆の症例も見られ、VMRがビタミンD中毒のリスク予測などにも用いられ得ることが示唆される。今後同自動測定器を用いたマススクリーニングにより日本人における血清24,25$(OH)_2$D濃度およびVMRの基準値の設定も望まれる。




24,25(OH)$_2$D$_3$濃度 (ng/mL)
0
1
2
3
4
5
6
7
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
PTH濃度 (pg/mL)


VMR
0
2
4
6
8
10
12
14
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
PTH濃度 (pg/mL)

研　究　業　績

学会発表

1. 越智小枝, 古谷裕, 宮坂政紀, 目崎喜弘, 政木隆博, 永森收志, 宮本博康, 池田勇一, 國澤研大, 川上大輔, 中西豪, 花房信博, 松浦　知和.　LC-MS/MSを用いた血清25(OH)D測定における採血管の影響～検査前プロセス標準化への提言～．第49回日本医用マススペクトル学会．2024年9月14日, 京都.

2. 越智　小枝, 國澤研大, 古谷裕, 宮本博康, 宮坂政紀, 目崎喜弘, 野尻明由美, 政木隆博, 永森收志, 花房信博,池田勇一, 松浦知和. 全自動前処理装置付きLC-MS/MS システムを用いた血清25(OH)D、24,25$(OH)_2$Dの測定．第71回日本臨床検査医学会学術集会，2024年12月1日，大阪.

感染防御研究部

金　城　雄　樹

研　究　概　要

成人の侵襲性肺炎球菌感染症由来菌株の細菌学的・免疫学的解析

肺炎球菌は、市中肺炎および医療・介護関連肺炎の原因菌として最も頻度が高い。肺炎球菌は中耳炎や副鼻腔炎の起炎菌としても重要であり、時に菌血症や髄膜炎などの侵襲性肺炎球菌感染症（invasive pneumococcal diseases; IPD）を起こす。年齢別のIPD罹患率は5歳未満および65歳以上で多く、5歳未満では1歳前後が特に多い。

肺炎球菌の菌体表層に存在する莢膜は、好中球やマクロファージなどの食細胞の貪食に抵抗性を示す主な病原因子である。肺炎球菌は莢膜の主な構成成分であるポリサッカライドの構造の違いにより、約100種類の血清型に分類される。現在用いられているワクチンは莢膜ポリサッカライドを用いたワクチンであり、23種類の血清型の莢膜ポリサッカライドを含む23価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン（23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine; PPSV23）および、15または20種類の血清型の莢膜ポリサッカライドと変異型毒素タンパクを結合した15価または20価肺炎球菌結合型ワクチン（15-valent pneumococcal conjugate vaccine; PCV15またはPCV20）が、それぞれ65歳以上成人および小児に対して定期接種されている。小児では肺炎球菌ワクチンの定期接種導入によりIPD罹患率の低下を認めた。しかし、近年、小児および成人において肺炎球菌ワクチンに含まれない血清型（非PCV15、非PCV20、非PPSV23）によるIPDが増加している。

私達は肺炎球菌ワクチンの効果を明らかにすることを目指し、国立感染症研究所との共同研究にて、成人IPD症例から分離された肺炎球菌株を用いて細菌学的・免疫学的解析を行なった。肺炎球菌に対する感染防御には、好中球やマクロファージなどの食細胞による貪食殺菌が重要であり、そのためには抗体結合および補体結合による菌のオプソニン化が重要である。私達はヒトPPSV23免疫血清、ウサギ補体、成人IPD症例由来菌株を用いて、菌株に対する免疫血清（抗体）を介した補体C3の沈着について解析を行なった。本解析は、2020年度に導入された免疫学的解析装置一式（ハイブリッド高速

冷却遠心機など）およびフローサイトメーターを用いて行なった。非特異的な補体の沈着を減らすための検討を行ない、独自の解析系を構築した。国立感染症研究所所から成人IPD由来菌株を入手し、PPSV23に含まれる血清型のうち、20血清型、73菌株を用いて、成人IPD由来菌株に対する抗体依存性補体沈着活性の解析を行なった。その結果、ほとんどの血清型および菌株において、PPSV23免疫血清による補体C3の結合の増強作用を認めた。しかし、一部の菌株では、PPSV23免疫血清の非存在下においても、補体沈着作用が強く、免疫血清による補体沈着の増強効果を認めなかった。今後も肺炎球菌ワクチンの効果について細菌学的・免疫学的観点から明らかにしたい。

感染防御に重要な抗体を産生するBリンパ球の分化機構の解析

肺炎球菌や新型コロナウイルスなどの感染症に対する防御免疫において、抗体は重要な役割を担っている。私達は、肺炎球菌表層タンパク質をワクチン抗原、リンパ球のナチュラルキラー T（NKT）細胞を活性化する糖脂質をアジュバントとして用いた新規肺炎球菌ワクチンの研究を行なってきた。本ワクチンは肺炎球菌感染防御に重要な抗原特異的IgG抗体産生を持続させることを見出し、その抗体産生をもたらす胚中心B細胞の誘導には濾胞性ヘルパー NKT細胞が重要であること、さらにNKT細胞から濾胞性ヘルパー NKT細胞への分化にはGr-1陽性細胞が産生するインターロイキン(IL)-27が重要な役割を担うことを明らかにした（Kamii, Hayashizaki et. al. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2024）。

また、2020年度に導入された免疫学的解析装置一式（ハイブリッド高速冷却遠心機、PCR システムなど）を用いて、マウス骨髄におけるB細胞の解析を行なったところ、骨髄にてNKT細胞がB細胞の分化に寄与する可能性を示唆する結果を得た。現在、東京理科大学との共同研究を行なっている。引き続き解析を行ない、感染防御に重要な役割を担う抗体を産生するB細胞の分化におけるNKT細胞の役割を解明したい。

APLICoT法の確立とヌクレオチド交換因子GrpEの必須機能の解明

GrpEは、分子シャペロンDnaKのヌクレオチド交換因子であり、広範な細菌や真核生物のミトコンドリアに保存されている。興味深いことに、DnaKは大腸菌の生育に必須ではないが、GrpEは必須である。しかし、なぜGrpEが不可欠なのかは長らく謎とさ

れてきた。本研究では、ATP依存性プロテアーゼClpXPがC末端SsrAタグ標識タンパク質を特異的に分解する機構と、ライブセルイメージング技術を組み合わせた「Aimed Proteolysis and Live Cell Imaging Coupled Technology（APLICoT）」法を確立し、GrpEの必須機能の解明に取り組んだ。

まず、細胞分裂に必須なFtsZをモデルとして用い、APLICoT法の妥当性を検証した。大腸菌ΔclpP株のftsZ遺伝子の3'末端にSsrAタグを挿入し、アラビノース誘導型プラスミドを用いてClpXPを発現させることで、FtsZのノックダウン株を作製した。この株をアラビノース添加培地で培養すると、10分以内にClpXPの発現が誘導され、細胞内FtsZが顕著に分解された。ライブセルイメージングによる観察の結果、細胞分裂の阻害により菌体がフィラメント状に伸長し、細胞伸長が停止した後、しばらくして細胞膜の破綻（溶菌）が引き起こされることが確認された。また、細胞伸長が停止したタイミングで細胞質に不溶性タンパク質凝集体が出現することがわかった。

同様の手法を用いてGrpEノックダウン株を構築し観察したところ、FtsZノックダウン株と同様に細胞がフィラメント化し、最終的に細胞膜が破綻して溶菌する様子が観察された。さらに、DnaKと相互作用できない変異型GrpEをGrpEノックダウン株に発現させたところ、正常な細胞分裂と増殖が回復した。また、GrpEノックダウン株では、一部の細胞分裂関連タンパク質の分裂面への局在化が阻害され、ペプチドグリカンの新生合成にも影響が及んでいることが明らかとなった。

本研究に関する発表は、第20回21世紀大腸菌研究会にてトラベルアワード（重盛林太郎、他）、第107回日本細菌学会関東支部総会にて若手優秀発表賞（石川 李津、他）をそれぞれ受賞した。

大腸菌の細胞外アミロイド産生における分子シャペロンDnaKのヌクレオチド交換因子GrpEの機能解析

Curliは、大腸菌のバイオフィルム形成に重要な細胞外アミロイドである。Curliの主要構成タンパク質であるCsgAは、リボソームで翻訳された後、Sec膜透過装置によってペリプラズムへ輸送され、外膜に局在するCsgG輸送体を介して細胞外へ分泌される。これまでに我々は、(1) 分子シャペロンDnaKがCurli産生に必須であること（Arita-Morioka et al. Antimicrob. Agents Chemother. 2015）、(2) DnaKが細胞質内でのCsgA

の凝集を抑制し、ペリプラズムへの輸送を助けること（Sugimoto et al. Commun. Biol. 2018）、(3) DnaKと協調して働く3つのJドメインタンパク質のうち、DnaJとCbpAがCurli産生において相補的に機能することを報告してきた（Sugimoto et al. J. Mol. Biol. 2021）。本研究では、DnaKのヌクレオチド（ATP/ADP）交換因子であるGrpEのCurli産生への関与を解析した。

大腸菌C600株（親株）およびDA259株（grpE欠損株）をCongo Red含有寒天培地で培養し、Curli産生を評価した。その結果、野生株のコロニーのみがアミロイド線維特有の赤色を呈し、Western blotting によりCsgAの発現が確認された。一方、grpEをプラスミドで相補してもgrpE欠損株のCurli産生は回復しなかった。これは、DA259株にはgrpE以外の遺伝子に変異や欠損がある可能性を示唆している。そこで、PCRおよび次世代シーケンス解析を用いてCurli関連遺伝子の有無を調べた結果、DA259株においてcsgABCDEFGの欠損が確認された。次に、csgABCDEFGを共発現するプラスミドをDA259株に導入したところ、Curli産生が確認されたが、その産生量は親株に比べて低かった。さらに、grpEとcsgABCDEFGを共発現するプラスミドを構築し、DA259株に導入したところ、Curli産生が親株レベルまで回復した。

これらの結果から、GrpEはCurli産生に必須ではないものの、その存在によってCurli産生の効率が向上することが示唆された。すなわち、GrpEはCurli産生のファインチューニングに関与していると考えられる。なお、本研究に関する発表は、第141回成医会総会において優秀学生ポスター賞を受賞した（藤田かのん 他）。

長期間の培養で誘導されるバイオフィルムの型破りな抗菌薬感性化現象

従来、バイオフィルムは時間の経過とともに成熟し、その内部の細菌は抗菌薬に対する耐性を増すと考えられてきた。しかし、我々は黄色ブドウ球菌Xen36株を用いたバイオフィルムモデルにおいて、培養期間を延長するとバイオフィルム内部の細菌がゲンタマイシンに対して感受性を示すことを発見した。本研究では、この現象の普遍性とそのメカニズムを解析した。

Xen36株以外の複数の菌種・菌株を用い、異なる培養期間のバイオフィルムに対し、最小発育阻止濃度（MIC）の100倍濃度のゲンタマイシンを24時間作用させた後、回収

した細菌のコロニー形成能を評価した。その結果、培養期間を延長してもバイオフィルム内部の細菌の生存率（コロニー形成数）自体には変化がみられなかったが、ゲンタマイシン処理後のコロニー形成数は著しく低下した。この現象は、黄色ブドウ球菌だけでなく、表皮ブドウ球菌、腸球菌、肺炎桿菌においても確認された。さらに、抗菌薬の種類や濃度、バイオフィルムの培養期間や培地の条件を変更しても同様の傾向が認められた。

以上の結果から、バイオフィルムの培養期間が延長すると、その内部の細菌が抗菌薬に対して感受性を示すという、従来の常識とは異なる現象を発見し、その普遍性を明らかにした。本研究は、第38回日本バイオフィルム学会においてトラベルアワードを受賞した（原 慧一郎 他）。

研　究　業　績

原著論文

1. Yoshida S, Kawamura A, Aoki K, Wiriyasermkul P, Sugimoto S, Tomiyoshi J, Tajima A, Ishida Y, Katoh Y, Tsukada T, Tsuneoka Y, Yamada K, Nagamori S, Nakayama K, Yoshida K. Positive regulation of Hedgehog signaling via phosphorylation of GLI2/GLI3 by DYRK2 kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2024, 121(28):e2320070121.

2. de Castro P, Akiyama D, Pinzan C, dos Reis T, Delbaje E, Izidoro M, Schenkman S, Sugimoto S, Norio T, Steffen K, Aycock J, Dolan S, Rokas A, Fill TP, Goldman G. *Aspergillus fumigatus* secondary metabolite pyripyropene is important for the dual biofilm formation with *Pseudomonas aeruginosa*. mBio. in press.

総説

1. Hayashizaki K, Kamii Y, Kinjo Y. Glycolipid antigen recognition by invariant natural killer T cells and its role in homeostasis and antimicrobial responses. Front Immunol. 2024;15:1402412.

2. Abe M, Kinjo Y, Koshikawa T, Miyazaki Y. Basic Research on *Candida* Species. Med Mycol J. 2024;65(3):67-74.

学会発表

1. 林﨑浩史, 菅野敏生, 遠藤裕介, 築地信, 北村大介,　金城雄樹. （口頭発表）NKT細胞が起点となるB細胞多様性獲得機構の解析. 第33回Kyoto T cell conference.2024年6月，京都.

2. 重盛林太郎，杉本真也，金城 雄樹．（口頭発表）DnaKのコシャペロンGrpEの大腸菌の生存に必須な細胞機能の解明．第20回21世紀大腸菌研究会．2024年6月，宮崎.

3. 本真也，山中邦俊，金城雄樹．（ポスター）アミロイド線維形成タンパク質CsgAの分解におけるプロテアーゼPrcと分子シャペロンCsgCの協同性．第20回21世紀大腸菌研究会．2024年6月，宮崎．

4. 原慧一郎，杉本真也，金城雄樹．（口頭発表）長期間の培養で誘導される、バイオフィルムの型破りな抗菌薬感性化現象．第38回日本バイオフィルム学会学術集会，2024年7月，大阪．

5. 佐藤主税，納谷昌実，杉本真也，佐藤啓子，佐藤真理．（口頭）腸上皮における細菌バイオフィルム形成の法則性：ASEM水中観察．日本顕微鏡学会第80回学術講演会．2024年6月，千葉．

6. 杉本真也，金城雄樹．（口頭発表）黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成における細胞外リン脂質のムーンライト機能．第38回日本バイオフィルム学会学術集会，2024年7月，大阪．

7. 金城雄樹．（シンポジウム）肺炎球菌タンパク質・糖脂質ワクチンによる抗体産生誘導機構．第97回日本細菌学会総会．2024年8月，札幌．

8. 原慧一郎，杉本真也，金城雄樹．（ポスター発表）培養時間の延長によって誘導されるバイオフィルムの非カノニカルな抗菌薬感性化．第97回日本細菌学会総会．2024年8月，札幌．

9. 藤田かのん，奈良萌子，大瀧琴音，重盛林太郎，杉本真也，金城雄樹．（ポスター発表）大腸菌の細胞外アミロイド線維産生におけるGrpEの必須性の解析．第97回日本細菌学会総会．2024年8月，札幌．

10. 大瀧琴音，奈良萌子，重盛林太郎，藤田かのん，杉本真也，金城雄樹．（ポスター発表）大腸菌ゲノムに存在するGrpE遺伝子欠損時に致死性を発揮するエレメントの探索．第97回日本細菌学会総会．2024年8月，札幌．

11. 重盛林太郎，杉本真也，金城雄樹．（ポスター発表）分子シャペロンDnaKのヌクレオチド交換因子GrpEの大腸菌の生存に必須な細胞機能の解明．第97回日本細菌学会総会．2024年8月，札幌．

12. 杉本真也．（招待講演）難治性感染症を引き起こすバイオフィルムのAMR対策．第76回日本生物工学会．2024年9月，東京．

13. 杉本真也，金城雄樹．（口頭発表/ポスター）瞬間バイオフィルム透明化イメージング法の開発．第35回日本生体防御学会学術総会．2024年9月，札幌．

14. 杉本真也．（招待講演）アミロイドの制御分子に着目した感染症・神経変性疾患の分野横断的研究．第507回熊本大学発生研セミナー．2024年9月，熊本．

15. 藤田かのん，奈良萌子，大瀧琴音，重盛林太郎，原慧一郎，杉本真也，金城雄樹．（ポスター発表）分子シャペロンDnaKのヌクレオチド交換因子GrpEは大腸菌の細胞外アミロイド産生のファインチューニングに必要である．第141回成医会総会．2024年10月，東京．

16. 杉本真也．（招待講演）バイオフィルムを可視化する新技術の開発と応用．第8回結核菌研究会．2024年11月，東京．

17. 杉本真也，山中邦俊，金城雄樹．（ポスター）アミロイド線維形成タンパク質CsgAの大腸菌ペリプラズム内品質管理．第47回日本分子生物学会年会．2024年11月，福岡．

18. 石川李津，重盛林太郎，原慧一郎，金城雄樹，杉本真也．（口頭発表）大腸菌の必須タンパク質の機能を解き明かすAPLICoT法の開発．第107回日本細菌学会関東支部総会．2024年12月，東京．

19. 重盛林太郎，石川李津，原慧一郎，金城雄樹，杉本真也．（口頭発表）APLICoT法を用いたヌクレオチド交換因子GrpEの必須機能の解明．第107回日本細菌学会関東支部総会．2024年12月，東京．

20. 林﨑浩史, 高塚翔吾, 菅野敏生, 杉本真也, 明田幸宏, 大石和徳, 遠藤裕介, 金城雄樹.（口頭発表）糖脂質アジュバントを用いた新規肺炎球菌ワクチンの作用機序の解明. 2024年度日本細菌学会関東支部インターラボセミナー. 2024年12月，東京.

21. 林﨑浩史.（シンポジウム）肺炎球菌感染症の現状と新規肺炎球菌ワクチンの開発. 第8回東京慈恵会医科大学・東京理科大学合同シンポジウム. 2024年12月，東京.

22. 金城雄樹.（教育講演）抗体産生の増強をもたらす免疫機構の解析?新規肺炎球菌ワクチンの開発を目指して?．第1回免疫衛生学研究会独自集会．2024年12月，東京.

23. 杉本真也.（招待講演）バイオフィルム内部の微生物細胞の不均一な挙動を可視化するiCBiofilm法の開発と応用．日本農芸化学会2025年度大会．2025年3月，札幌.

遺伝子治療研究部

小　林　博　司

研　究　概　要

当研究部では先天代謝異常症であるライソゾーム病および悪性腫瘍を主な標的とした新規治療法開発を行なっており、遺伝子治療を軸とした研究開発を進めている。主たる治療標的であるライソゾーム病とは、細胞内小器官であるライソゾームに存在する酵素の機能不全を原因とする遺伝性の疾患群であり、50種類以上の疾患から構成される。酵素欠損のため分解されなかった各種基質がライソゾーム内に蓄積することにより様々な臓器障害を来し、中枢神経症状を含む多彩な症状を全身性に呈する疾患が多い。現在、一部のライソゾーム病に対しては組換え酵素製剤を用いた酵素補充療法が確立されており、内臓への有効性が示されている一方で中枢神経系などへの効果は乏しく、より効果的な治療法の開発が望まれている。また、酵素補充療法は頻回な点滴投与が必要となる点や薬価が極めて高額である点なども課題であり、1度の治療介入で長期間有効性をもたらす遺伝子治療はこれらを解決し得る治療法と考えられる。当研究部では、昨年度から引き続き、レンチウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を用いる治療法を中心に研究および開発を進めた。

GM1-gangliosidosisに対するAAV遺伝子治療法の開発

通常、ライソゾーム酵素は血液脳関門（BBB）を通過できないため中枢神経系には到達しない。近年、トランスフェリン受容体に対する抗体（TfR）とライソゾーム酵素を融合することでBBB通過能が付与されることが明らかとなったことから、我々はTfR融合ライソゾーム酵素遺伝子を作成し、遺伝子治療への応用性を検討した。GM1-gangliosidosisはβgalactosidase（βgal）酵素の欠損により主に脳へ基質であるGM1ガングリオシドが蓄積する疾患であり、現在までに有効な治療法は存在しない。我々はTfR融合βgal発現AAVを用いたGM1-gangliosidosisモデルマウスの遺伝子治療の検討を進めており、本年度は生化学的な薬効評価に加えて行動表現型に対する有効性評価を行なった。生化学的な薬効評価解析には、実体顕微鏡システム(Leica社S9D、J-scope社CCDカメラ

システム、HOZAN社L-703など)を用いたマイクロサージャリーでマウス脳脊髄液などを微量採取し、βgal活性やGM1ガングリオシド蓄積の解析を行った。その結果、AAVにて治療を行なったマウスでは中枢神経系におけるGM1ガングリオシド蓄積の改善と共に、行動表現型の改善も得られることを見出した。

Pompe病に対する*ex vivo*遺伝子治療法の開発

Pompe病は酸性α-グルコシダーゼの遺伝的欠損により生じる常染色体潜性遺伝形式のライソゾーム病で、主に筋組織のライソゾーム内にグリコーゲンが蓄積することで起こる進行性の筋疾患である。酵素補充療法により生命予後は改善するものの、筋組織への酵素の取り込み効率が悪いことが問題となっている。GM1-gangliosidosisの項で記載したTfR融合技術はBBB通過能が向上するだけでなく、筋組織を含めたトランスフェリン受容体を発現する組織への取り込み能上昇も期待される。そこでTfR融合GAAを発現するレンチウイルスベクターを用いてPompe病マウスのex vivo遺伝子治療法の開発を行っている。本年は、治療効果の高いレンチウイルベクター構造の検討を進めるべく、LEDトランスイルミネーター(BioTools社Lti-ExMB)を用いて治療遺伝子を搭載したレンチウイルスベクター作製用プラスミドを構築し、同ベクター作成を行なった。その後、自動細胞数計測装置Countess3などを用いて測定した造血幹細胞に一定の割合でレンチウイルスベクターを感染させ、遺伝子導入を行なった同細胞をPompe病モデルマウスに移植を行うことで治療効果の評価を行なった。いくつかの構造で比較検討を行い、治療効果に優れた構造を見出した。

研　究　業　績

原著論文

1) Higuchi T, Shimada Y, Takahashi Y, Kato F, Ohashi T, Kobayashi H. Restoration of peripheral neuropathy in Fabry mice via intrathecal administration of an adeno-associated virus vector encoding mGLA cDNA. Mol Genet Metab. 2024;143:108545.
2) Ogata J, Shimada Y, Ohashi T, Kobayashi H. Usefulness of antibody-drug conjugate as preconditioning for hematopoietic stem cell-targeted gene therapy in wild-type and Fabry disease mouse models. Mol Genet Metab. 2024;142:108494.
3) Nojiri A, Morimoto S, Fukuro E, Okuyama T, Anan I, Kawai M, Sakurai K, Kobayashi M, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Yoshimura M, Eto Y, Hongo K.
   Role of Longitudinal Strain in the Evaluation of Contractile Dysfunction in Japanese Fabry Disease Patients. Circ J. 2024 Dec 25;89(1):53-61. PMID: 39631936
4) Kobayashi H, Nakata N, Izuka S, Hongo K, Nishikawa M. Using artificial intelligence and promoter-level transcriptome analysis to identify a biomarker as a possible prognostic predictor of cardiac complications in male patients with Fabry disease. Mol Genet Metab Rep. 2024 Oct 13;41:101152. doi: 10.1016/j.ymgmr.2024.101152. eCollection 2024 Dec. PMID: 39484074

総説

1) 小林博司. 特集　ライソゾーム病2024　―最新情報と将来展望―　IV 治療の最前線　３（1）．ライソゾーム病の遺伝子治療　総論　日本臨牀 2024; vol.82(5): 743－748.
2) 嶋田洋太.　特集　ライソゾーム病2024　―最新情報と将来展望―　IV 治療の最前線　３（３）．レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療　日本臨牀 2024; vol.82(5): 755－760.

3) 小林博司. 特集　拡大スクリーニング検査の成果と展望　ライソゾーム病の新生児スクリーニングの実際　週間　医学のあゆみ 2024; vol.290（11): 987－994.

4) 小林博司. 特集　ここまで来た！新生児マススクリーニングと対象疾患の治療　先天代謝異常症の最新治療　遺伝子治療、遺伝子編集の進歩　小児内科 2024; vol.56（12): 1863-1868.

講演

1) Yohta Shimada. Development of hematopoietic stem cell gene therapy for mucopolysaccharidosis type II. The 7th International Lysosomal Disease Forum. Tokyo. 2024.7.12-13.

2) 嶋田洋太, 林晋一郎, 斎藤良彦 木下正文, 飯塚俊輔, 松島小貴, 樋口孝, 薗田啓之, 西野一三, 小林博司. レンチウイルスベクターによるポンペ病に対する造血幹細胞遺伝子治療. 第30回日本遺伝子細胞治療学会. シンポジウム8 Genetic Diseases.　横浜. 2024.7.16-18

3) 小林博司. ポンペ病に対する酵素製剤の長期使用成績. 第65回日本先天代謝異常学会. 東京. 2024.11.7-9.

4) 小林博司、薗田啓之　ライソゾーム病におけるJ-Brain Cargo技術と遺伝?治療の可能性　遺伝性筋疾患の根治を目指した新しい造血幹細胞遺伝子治療の開発　第29回日本ライソゾーム病研究会. 東京. 2024.11.29.

5) Yohta Shimada. Hematopoietic stem cell gene therapy for mucopolysaccharidosis type II. 15th International Collaborative Forum of Human Gene Therapy for Genetic Disease, Tokyo. 2025.1.24

6) Saki Matsushima. Complete normalisation of GM1 ganglioside storage through AAV expressing a blood-brain barrier-penetrating enzyme in mice. 15th International Collaborative Forum of Human Gene Therapy for Genetic Disease, Tokyo. 2025.1.24

学会発表

1) 松島小貴, 飯塚佐代子, 木下正文, 高木春奈, 飯塚俊輔, 大月孝太, 樋口孝, 嶋田洋太, 薗田啓之, 大橋十也, 小林博司. 血液脳関門通過型酵素によるライソゾーム病中枢神経症状の小容量in vivo遺伝子治療法の確立. 第３０回日本遺伝子細胞治療学会. 横浜. 2024.7.16-18.
2) 松島小貴, 飯塚佐代子, 樋口孝, 嶋田洋太, 小林博司. ライソゾーム病に対する造血幹細胞ex vivo遺伝子治療の実用化に向けた基礎研究. 第３０回日本遺伝子細胞治療学会. 横浜. 2024.7.16-18.
3) Saki Matsushima, Sayoko Iizuka, Masafumi Kinoshita, Haruna Takagi, Shunsuke Iizuka, Kota Ohtsuki, Atsushi Imakiire, Takashi Higuchi, Yohta Shimada, Hiroyuki Sonoda, Toya Ohashi, Hiroshi Kobayashi. Gene therapy for GM1 gangliosidosis mediated by AAV vector carrying BBB-penetrable enzyme. Annual symposium of the Society for the study of inborn errors of metabolism (SSIEM). Porto. 2024.9.3-6.
4) Higuchi T, Shimada Y, Matsushima S, Ohashi T, Kobayashi H. Mapping Lentiviral Integration Sites in Ex Vivo Gene Therapy for Inborn Errors Metabolism. Annual symposium of the Society for the study of inborn errors of metabolism (SSIEM). Porto. 2024.9.3-6.
5) Yohta Shimada, Takashi Higuchi, Saki Matsushima, Toya Ohashi, Hiroshi Kobayashi. Preclinical development of a hematopoietic stem cell gene therapy for mucopolysaccharidosis type II. 31st annual congress of European Society of Gene and Cell Therapy. Rome. 2024.10.22-25.
6) 嶋田洋太, 樋口孝, 松島小貴, 小林博司. ムコ多糖症 II 型に対する造血幹細胞遺伝子治療実現に向けた非臨床安全性試験. 第65回日本先天代謝異常学会. 東京. 2024.11.7-9.
7) 深川真夢, 嶋田洋太, 石井瑛啓, 冨藤萌瑛, 松島小貴, 樋口孝, 小林博司. ムコ多糖症Ⅱ型に対する遺伝子治療への応用を目指した改変型酵素の開発. 第65回日本先天代謝異常学会. 東京. 2024.11.7-9.
8) 樋口　孝, 嶋田洋太, 松島小貴, 小林博司. レンチウイルスベクターのウイルスゲノム挿入部位解析によるヒト造血幹細胞遺伝子治療の安全性評価　第29回日本ライソゾーム病研究会. 東京. 2024.11.29.

成人病研究部

安保雅博

研　究　概　要

当講座が進める反復性経頭蓋磁気刺激法を軸としたリハビリテーション治療

当講座では、経頭蓋磁気刺激（transcranial magnetic stimulation：TMS）を世界で初めて体系化して臨床導入している[1)]。経頭蓋磁気刺激装置と刺激用コイルを使用し、Faraday の電磁誘導の法則に基づいて脳を刺激する治療技術であり、非侵襲的に脳機能の低下による麻痺の改善を認め、これまで多数の論文を発表してきている。2008 年から、脳卒中後遺症である上肢麻痺に対して rTMS と集中的リハビリテーションを組み合わせた治療（NovEl intervention Using Repetitive transcranial magnetic stimulation andOccupational therapy, NovEl intervention UsingRepetitive transcranial magnetic stimulation and One-to-one training：NEURO®）を行なっている。10 Hz は，脳活動に促進的に作用し，1Hz は脳活動に抑制的に作用する性質を利用し、上肢麻痺の機能回復とそれに伴う能力の向上が認められている。上肢麻痺に対する治療効果を軸として、我々はそれ以外の障害である下肢麻痺、失語症、嚥下障害、高次脳機能障害に対する治療展開を模索し取り組んでいる。特に、片麻痺患者で最も問題となる下肢機能障害をもとにした。s

これまでに当講座で解明しした慢性期上肢麻痺の改善効果

慢性期上肢麻痺は，集中的な訓練だけでも改善がみられるが、訓練の前後に sham 刺激をした群と低頻度 rTMS 治療を実施した群とのrandomized trialによって，訓練の前後に低頻度 rTMS をした群のほうが，有意差をもって訓練の前後にsham刺激をした群よりも機能改善があることが示されれた．麻痺側の前角細胞の興奮性が落ち[2 3)]，痙縮が改善されること[2-5)]，BDNFの増加[6)]、rTMSの併用治療はBDNFの増加が機能改善と結びついていたこと，左右の刺激部位によりkynurenine pathway に差が出ること[7)]や脳卒中後うつの改善における D-セリンと L-セリンの関係[8)]なども明らかにした．NERUO®に

より脳卒中後上肢麻痺が改善した患者は，患側中心後回・縁上回の皮質厚と運動機能改善度の相関（構造画像）がみられ，患側の中心後回や縁上回が運動機能改善に関与していることが示唆され[9]，大脳全体の神経接続ネットワーク変化（拡散テンソルと構造画像）がみられ，グラフ理論解析によって，磁気刺激治療が神経経路長を増加させより複雑な神経回路をもたらされることがわかり，神経線維の可塑的変化が示唆された[10]．患側内包前脚・前視床放線の白質微細構造が変化（拡散テンソル）し，磁気刺激治療によって深部白質の微細構造が強化されることも示唆された[11]．

購入した三次元動作解析装置で解明した麻痺の改善作用

これまで我々は、購入した三次元動作解析装置を使用して以下の作用を証明し、学会並びに論文にて報告している。

1）ハムストリングスの出力強化でぶん回しを軽減させる研究

「ぶん回し」とは、片麻痺患者の多くが苦しむ異常歩行の一つである。麻痺側下肢を振り出す際、足尖部の引っ掛かりを避けるために下肢を外側に大きく振り回して歩くことである。原因は、下肢を振り出すために必要な機能が低下することにあるが、一般的な対応は足部装具の利用や杖の利用といった方法にとどまる。細かい機能向上が異常歩行を改善することに関する報告はない。我々は下肢の振り出しに必要な機能の一つである膝関節屈曲の主動作筋であるハムストリングスの強化がこのぶん回しを軽減できる可能性があると考察し、研究を進めている。本研究は科研費の研究課題としても採択されており、購入いただいた三次元動作解析装置を使用することで、日本スティミュレーションセラピー学会における演題発表を経て論文化、本年10月に医学中央雑誌への収載をすませている[12]。慢性期の患者でもただ歩かせればいいということではなく、機能評価をもとに適切な機能改善を図ることを示した形となった。

2）上肢帯を背面で固定して歩行練習をするトレーニングに関する研究

上肢に痙縮を伴う患者では、ウエルニッケマン肢位という、体の前で肘が曲がった姿勢を呈する患者がいる。原因は痙縮による筋緊張異常であり、理学療法におけるストレッチやボツリヌス製剤を用いた治療などが行われる。慢性期において、この痙縮によ

るウエルニッケマン肢位を呈する患者は少なくない。ウエルニッケマン肢位は上肢帯が体の前面に常に位置するため、物理的に体幹の回旋や上肢の懸垂を阻害する。結果的に足の振り出しが困難となり、歩行能力が低下することになる。我々は、上肢帯を背面で固定することによる位置エネルギーを利用して、体幹回旋の運動エネルギーを生み出す方法を研究してきた。上肢帯を背面に配置することで、体幹の回旋はスムーズにいきやすくなり、それによる下肢の振り出しも左右強調が得られやすくなるという理論で、rTMS治療を行った後で上肢帯の緊張が軽減した状態でより効果が得られることも示し、日本スティミュレーションセラピー学会への投稿を済ませており、3月末に論文化され、医学中央雑誌へ掲載される予定である。また、経頭蓋磁気刺激治療と併用する理学療法について報告した英文での総説論文でも、その作用のメカニズムを解説している[13)]。

3）症例報告

慈恵医大リハビリテーション科は、難病をはじめとして希少症例、難治症例に対するリハビリテーション治療を積極的に検討しており、症例ベースでの情報発信に努めている。今年度は、脳卒中後遺症としても特異的症状である上肢麻痺患者に特有のウエルニッケマン肢位の特殊なタイプとして、肩関節伸展位を呈する希少症例を経験している。我々は、上肢帯へのボツリヌス治療と集中的理学療法を組み合わせた試行し、上肢の懸垂が改善した治療経過についても購入いただいた三次元動作解析装置を使用して計測し英文にて投稿、現在アンダーレビューの状態となっている。

今後の研究計画

使用させていただいている三次元動作解析装置は、これまでの身体に多数のマーカーを接着させて行う装置と比べて、スーツを着るだけで計測ができるため非常に簡便に計測が可能であり、患者に負担をかけることがないという利点がある。ハムストリングスの出力強化でぶん回しを軽減させる研究については症例が蓄積され次第、年内に論文化する方向である。現在15症例を蓄積している。また、上肢帯を背面で固定して歩行練習するトレーニングに関する研究についても症例を増やし、臨床導入を図る報告で進める。

当院は、難治性の症状を示す片麻痺患者が多く来院する。希少症例に関する治療について国内のみならず世界的にリードするという意識の元、購入いただいた三次元動作改易装置を用いることで、原因のみならず治療方法を検討し、発信し続けたいと考えている。引き続き臨床における治療の効果判定に使用する予定である。

1） Abo M, Kakuda W, Momosaki R, Harashima H, Kojima M, Watanabe S, Sato T, Yokoi A, Umemori T, Sasanuma J：Randomized, multicenter, comparative study of NEURO versus CIMT in poststroke patients with upper limb hemiparesis：the NEUROVERIFY Study. Int J Stroke 2014；9：607-612.

2） Kondo T, Kakuda W, Yamada N, Shimizu M, Hagino H, Abo M：Effect of low-frequency rTMS on motor neuron excitability after stroke. Acta Neurol Scand 2013；127：26-30.

3） Kondo T, Kakuda W, Yamada N, Shimizu M, Abo M：Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation and intensive occupational therapy on motor neuron excitability in poststroke hemiparetic patients：a neurophysiological investigation using F-wave parameters. Int J Neurosci 2015；125：25-31

4） Kakuda W, Abo M, Kobayashi K, Momosaki R, Yokoi A, Fukuda A, Ito H, Tominaga A, Umemori T, Kameda Y：Anti-spastic effect of low-frequency rTMS applied with occupational therapy in post stroke patients with upper limb hemiparesis. Brain Inj 2011；25：496-502.

5） Kakuda W, Abo M, Kobayashi K, Takagishi T, Momosaki R, Yokoi A, Fukuda A, Ito H, Tominaga A：Baseline severity of upper limb hemiparesis influences the outcome of low-frequency rTMS combined with intensive occupational therapy in patients who have had a stroke. PM R 2011；3：516-522.

6） Niimi M, Hashimoto K, Kakuda W, Miyano S, Momosaki R, Ishima T, Abo M：Role of Brain Derived Neurotrophic Factor in Beneficial Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Upper Limb Hemiparesis after Stroke. PLoS One 2016；11：e0152241.

7） Niimi M, Fujita Y, Ishima T, Hashimoto K, Sasaki N, Hara T, Yamada N, Abo M：

Role of D-serine in the beneficial effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in post-stroke patients. Acta Neuropsy chiatr 2020：1-22.

8） Niimi M, Ishima T, Hashimoto K, Hara T, Yamada N, Abo M：Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on the kynurenine pathway in stroke patients. Neuroreport 2020；31：629-636.

9） Ueda R, Yamada N, Abo M, Senoo A：Correlation analysis of motor function improvement and brain structure for upper limb paralysis. Neuroreport 2019；30：77-81.

10) Ueda R, Yamada N, Abo M, Senoo A：Relationship between motor function improvements and white matter structure after low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation plus intensive occupational therapy in chronic subcortical stroke patients. Neuroreport 2019；30：485-490.

11) Ueda R, Yamada N, Abo M, Senoo A：White matter changes follow low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation plus intensive occupational therapy for motor paralysis after stroke a DTI study using TBSS. Acta Neurol Belg 2021；121：387-396.

12) 中山恭秀, 坂本大悟, 安保雅博．ハムストリングスの筋力強化が歩行時ぶん回しに及ぼす影響:即時効果の検証．Japanese journal of stimulation therapy．5（1）, 17-22, 2024.

13) Nakayama Y, Abo M.: Physical Therapy Combined with Transcranial Magnetic Stimulation Therapy: Treatment Practice Considering the Effect of Reducing Upper Limb Spasticity on Gait. Phys Ther Res. 26(2), 44-49, 2023

成人病研究部

荒屋　　潤

研　究　概　要

慢性閉塞性肺疾患（COPD）および特発性肺線維症（IPF）は、根本的な治療法がなく、終末期には呼吸不全に至る予後不良な難治性呼吸器疾患である。これらはいずれも加齢と細胞老化の亢進が病態進展に寄与する老化関連呼吸器疾患であり、我々はこれまでにミトコンドリア異常や不適切なオートファジー活性がCOPDおよびIPFの病態に関与することを報告してきた。

ミトコンドリアは酸化的リン酸化を通じてATPを生成し、エネルギー代謝を支えるとともに、細胞内の主要な活性酸素（ROS）の発生源として機能する。ミトコンドリア障害による過剰なROSの産生は、タンパク質、脂質、DNAの酸化修飾を誘導し、適応的細胞ストレス応答の一環として細胞老化を引き起こす。我々は、ミトコンドリア恒常性維持機構（mitochondrial quality control, MQC）を中心に病態解明を進めてきた。p53標的遺伝子であるMieap（mitochondria-eating protein）は、損傷ミトコンドリアの修復や除去を含む複数のメカニズムを介してMQCに関与し、その病理学的意義は主に悪性腫瘍において研究されてきた。しかし、呼吸器疾患の病態形成における役割は明らかにされていなかった。オートファジーは、リソソーム依存性の細胞内タンパク質・小器官分解系であり、細胞の代謝や恒常性維持に関与するとともに、ミトコンドリアの品質管理にも重要な役割を果たす。そのため、オートファジー・リソソーム系を制御する中心的な転写因子であるTranscription factor EB（TFEB）の役割が近年注目されている。我々は、細胞老化の制御を中心に、Mieap機能およびTFEBによるオートファジー誘導の役割について検討を行ってきた。

Mieapによるミトコンドリア恒常性維持機構に関する検討

p53はDNA損傷応答の一環として、複数の下流遺伝子の転写を活性化する。最近の研究により、p53標的遺伝子であるMieapがミトコンドリア恒常性維持機構（MQC）に関与することが報告されている。Mieapは、損傷ミトコンドリアの修復や除去を含む複

数のメカニズムを介してミトコンドリアの統合性を維持する。Mieap欠損細胞では、ミトコンドリア由来の活性酸素（mtROS）産生の増加およびミトコンドリアATP合成の低下が観察されている。修復機構として、MieapはMieap誘導性リソソーム様オルガネラのミトコンドリア内蓄積（MALM）を介し、酸化されたミトコンドリアタンパク質を除去することで機能する。また、異常なミトコンドリアの除去は、Mieap誘導性空胞（MIV）の形成、すなわち非典型的マイトファジーを介して行われる。さらに、Mieapはカルジオリピンの生合成およびリモデリングを促進し、ミトコンドリアの呼吸活性とATP産生を維持することが明らかになった。しかしながら、COPD病態形成におけるMieapの関与や、喫煙曝露下でのMieap介在MQCの詳細なメカニズムはほとんど未解明であった。本研究では、ヒト気管支上皮細胞（HBEC）における喫煙誘導性ミトコンドリア損傷および細胞老化に対するMieapの役割を検討した。ヒトCOPDサンプルにおけるMieapの発現レベルを評価するとともに、Mieapノックアウトマウスを用いた喫煙曝露モデルを用いて、COPD病態形成におけるMieapの関与を解析した。

その結果、タバコ煙抽出物（CSE）曝露により、HBECsにおいてMieapの発現が増加し、p53ノックダウンによってその誘導が抑制された。この結果から、Mieap発現がp53依存的に調節されることが確認された。また、Mieapノックダウンにより、CSE曝露時の細胞内およびミトコンドリアROS産生が増加した。さらに、酸素消費率（OCR）解析により、Mieapノックダウンが喫煙によるミトコンドリア機能障害を増強することが示された。Mieapノックダウンにより、老化関連β-ガラクトシダーゼ（SA-β-gal）陽性細胞の増加、p16およびp21の発現上昇が観察された。一方で、Mieapの過剰発現はこれらの変化を抑制した。つまり、喫煙刺激時におけるMieapによるMQCが、ミトコンドリアの恒常性維持、ROS産生制御、および細胞老化抑制に重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、COPD患者の肺ホモジネートではMieap発現が低下し、分離したCOPD患者の気管支上皮細胞においてもMieap発現の低下が認められた。シングルセルRNAシーケンス解析により、肺の上皮細胞の中でも特に線毛上皮細胞においてMieapが高発現していることが明らかになった。さらに、Mieapノックアウトマウスを用いた検討では、長期間の喫煙曝露により、Mieapノックアウトマウスでは肺気腫の進行が顕著であり、炎症細胞の増加も確認された。これらの結果は、MieapがCOPD病態進行を抑制する保護的役割を持つ可能性を示唆している。

本研究により、MieapがMQCを介して細胞老化を制御し、COPD病態に関与する可能性が示された。Mieapの発現はp53依存的に調節され、喫煙曝露により上昇するが、COPD患者の肺では低下している。この発現低下は、遺伝子メチル化やp53変異などのエピジェネティックな機構による可能性があるが、さらなる研究が必要である。

TFEB発現誘導による老化関連呼吸器疾患新規治療法の開発

ミトコンドリアのMQCに関して、我々は以前に、PTEN誘導性キナーゼ1（PINK1）とParkin RBR E3ユビキチンリガーゼ（PRKN）によるミトコンドリア選択的オートファジー（マイトファジー）の不全が、COPD肺の上皮細胞におけるミトコンドリア損傷の蓄積に寄与することを報告した。オートファジーは、オートファゴゾーム形成による分解標的の隔離と、その後のリソソームとの融合によるオートライソソーム形成という一連の流れによって機能する。このオートファジー・リソソーム系の中心的な調節転写因子がTFEBである。TFEBは、リソソームの生合成、リソソーム内の酵素産生・酸性化、オートファジー関連タンパクの発現、さらにはオートファジー・リソソーム融合をも制御する重要な転写因子であると考えられている。これまでの研究から、TFEBの発現誘導・活性化が、オートファジー・リソソーム系の亢進を通じて老化関連呼吸器病態を改善する可能性が示唆されている。Peroxisome proliferator-activated receptor α（PPARα） 活性化薬であるGemfibrozilにはTFEB発現誘導作用があり、Gemfibrozil投与によりオートファジー活性が亢進し、喫煙曝露による細胞老化や、COPDモデルの改善が認められることが報告されている。このように、TFEB発現の誘導・活性化はCOPDの治療法開発において有望な標的となる可能性がある。

我々は、本邦で開発された選択的PPARαモジュレーターである薬剤Xに着目し、TFEBの発現誘導・活性化によりオートファジー活性を亢進させ、細胞老化を抑制することで、COPD病態に有効な治療となりうるかを明らかにすることを目的に検討を行った。結果薬剤Xは濃度依存的にTFEBの発現を誘導し、オートファジーを活性化した。また、タバコ煙抽出物（CSE）刺激により誘導されるオートファジー、特にミトコンドリア選択的なマイトファジー活性を薬剤Xは増強させ、同時に細胞老化を抑制した。次に、喫煙曝露COPDモデルに対する薬剤Xの有効性を検討した。COPDモデルとして6か月間の喫煙曝露を行った結果、有意な肺胞径の拡大と閉塞性呼吸機能障害を認め、肺気

腫様病変の進展が確認された。一方、薬剤Xの混餌投与により、これらの指標はいずれも明らかな改善を示した。さらにIPFモデルにおいて、ブレオマイシン投与により形態学的およびヒドロキシプロリン測定の結果から肺線維化が誘導されたが、薬剤Xの混餌投与により、有意な抑制が認められた。本研究の結果から、PPARαモジュレーターは高脂血症治療薬としてだけでなく、TFEB発現誘導を介してCOPDやIPFに対する新規治療薬となる可能性が示唆されたと考えられる。今後は、呼吸器疾患治療薬として吸入療法など肺局所療法の開発が重要な課題となると考えている。

TFEBによるII型肺胞上皮細胞の幹細胞性の制御

IPFは、進行性の肺線維化を引き起こす予後不良な呼吸器疾患であり、その病態解明と新規治療法の開発は喫緊の課題である。近年、II型肺胞上皮細胞（AT2）の異常分化に起因する異常基底細胞（aberrant basaloid cell）の出現が、肺線維化病態において重要な役割を果たすことが明らかとなっており、AT2の幹細胞性がこのプロセスに関与している。オートファジーはAT2の幹細胞性制御に関与することが知られており、その中心的な制御転写因子がTFEBである。我々のシングルセル解析の結果、IPF患者のAT2におけるTFEB発現およびオートファジー活性の低下が明らかとなっている。そこで、本研究では、TFEBがAT2の幹細胞性や細胞系譜の変化、異常基底細胞（aberrant basaloid cell）への分化、cell-cell interaction、および肺線維化の進展に与える影響を解明することを目的として、AT2オルガノイド培養、肺組織培養（PCLS）、およびAT2特異的TFEBノックアウトマウスを用いた病態解明に加え、AT2の幹細胞性を標的としたTFEB制御による新規セノセラピー（Senotherapy）の開発に向けた検討を行っている。現在、正常およびIPF患者を含む肺切除検体（肺癌手術検体）からAT2を分離し、自己複製・分化能を有する3Dオルガノイド培養の作成に成功している。幹細胞性の評価として、増殖能をKi67染色、colony-forming efficiency（CFE）、およびコロニーサイズにより検討の結果、TFEBを活性化するTorin1処理によりKi67陽性細胞数が増加し、一方でbafilomycin処理によるオートファジー阻害によりKi67陽性細胞数が低下することが確認され、CFE及びコロニーサイズに関しても同様の傾向を認めた。また、SFTPC発現および細胞老化マーカー（CDKN1A）についても、Torin1処理により改善が認められ、オートファジーがAT2の幹細胞性に影響を与えてことは確認できている。肺組織培

養（PCLS）およびAT2特異的TFEBノックアウトマウスを用いた研究が現在進行中であり、TFEBの制御がIPFの新規治療戦略となる可能性を探るべく検討を進めている。

研　究　業　績

原著論文

1. Clinical features in patients with COVID-19 treated with biologics for severe asthma. Numata T, Okuda K, Miyagawa H, Minagawa S, Ishikawa T, Hara H, Araya J. *J Allergy Clin Immunol Glob*. 2024 Jan 28;3(2):100219.
2. IL-27 regulates the differentiation of follicular helper NKT cells via metabolic adaptation of mitochondria. Kamii Y, Hayashizaki K, Kanno T, Chiba A, Ikegami T, Saito M, Akeda Y, Ohteki T, Kubo M, Yoshida K, Kawakami K, Oishi K, Araya J, Kuwano K, Kronenberg M, Endo Y, Kinjo Y. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024 Feb 27;121(9):e2313964121.
3. Mitigation of acute lung injury by human bronchial epithelial cell-derived extracellular vesicles via ANXA1-mediated FPR signaling. Fujita Y, Kadota T, Kaneko R, Hirano Y, Fujimoto S, Watanabe N, Kizawa R, Ohtsuka T, Kuwano K, Ochiya T, Araya J. *Commun Biol*. 2024 May 6;7(1):514.
4. Proposed Clinical Algorithm for Pleuroparenchymal Fibroelastosis (PPFE). Yamakawa H, Oda T, Sugino K, Hirama T, Komatsu M, Katano T, Fukuda T, Takemura T, Kubota Y, Kishaba T, Norisue Y, Araya J, Ogura T. *J Clin Med*. 2024 Jun 24;13(13):3675.
5. Usefulness of Transbronchial Lung Cryobiopsy When Starting Antifibrotic Treatment and Predicting Progressive Fibrosing Interstitial Lung Disease: Descriptive Research.Takatsuka M, Yamakawa H, Takemura T, Sato S, Ohta H, Kusano K, Oba T, Kawabe R, Akasaka K, Sasaki H, Amano M, Araya J, Matsushima H. *Clin Respir J*. 2024 Jul;18(7):e13809.
6. Nodular-bronchiectatic pattern in pulmonary nocardiosis: Immune status and treatment outcomes in a multicenter retrospective study. Hasegawa A, Tone K, Baba Y, Saito Z, Akutsu T, Kitayama T, Inaki S, Gochi M, Yaguchi T, Makimura K, Takagi M, Araya J. *Respir Med*. 2024 Dec 23;237:107922.

総説

Pathological mechanisms and novel drug targets in fibrotic interstitial lung disease.
Nishioka Y, Araya J, Tanaka Y, Kumanogoh A. Inflamm Regen. 2024 Jul 19;44(1):34.

慈恵看護専門学校

東　條　克　能

研　究　概　要

教育課題

看護学生が情報通信技術（ICT）を活用するために必要な基礎的能力の育成

1．はじめに

令和2年保健師助産師看護師養成所指定規則の一部を改正する省令が公布され、令和3年4月1日から施行された。改正の趣旨は、少子高齢化が一層進む中、地域医療構想を実現するにあたり、看護師が多様な臨床現場で多職種と連携して適切な保健・医療・福祉を提供することが期待されている。一方、医療や介護の分野において急速に進む、AI（Artificial Interlligence:人工知能）、IoT（Ｉnternet of Ｔhings:モノのインターネット）等の情報通信技術（ICT）の導入に合わせた対応が看護学生の教育にも望まれていた。また、専門分野の基礎看護学の教育内容には、「臨床判断能力や看護の基盤となる基礎的理論や技術、看護の展開方法等を学ぶ内容とし、シュミレーション等を活用した演習を強化する内容とする。」ことが留意点として述べられている。

本校では、令和3年度以降、授業や演習の中で情報通信機器等を用いて学生が自ら学習できるよう教育内容・方法を検討し実践してきた。毎年（一社）昭和会館より多くの機器の寄贈を受け、看護基礎教育における学習に欠かせない物品として講義、演習で幅広く活用させていただいている。2023年度に続き、2024年度は、タブレット端末９台を寄贈いただいた。様々な授業・演習の中でこれらの器材を使い、実践に即した学習内容を展開し、学生が体験学習をすることによって、情報通信技術を活用するための基礎的能力を養うこと、科学的根拠に基づいた看護の実践に必要な臨床判断を行うための基礎的能力を養うことにつながると考える。以下、活用状況について報告する。

２．活用状況

Surface　Go４（SSD 128GB,メモリ8GBモデル）　９台　付属品（ソフトウエア等）

充電保管庫（タブレットPC保管庫ES―Ｍ２２Ｃ/ＴＮ）１台

１）学科目「看護における臨床判断１　15時間1単位」

タナーの臨床判断モデルを用い、胃がんの幽門側切除術後の事例を通して、早期離床の看護が実施できることを学習目標に演習を実施している。一クラス（50名）を９Gに分ける（１Ｇ５名）。各自、離床時に予測されること（身体的、心理的に起きること）、その要因、援助方法を事前学習し、グループで検討する。メンバー間で看護師役、患者役、観察者役を決定する。術後一日目、援助計画に則り看護師役が、患者への援助を実施する。患者役には予め、離床に伴う身体的変化（血圧の変動に伴うふらつき、痛みの出現など）を演じるよう伝える。ギャッジベッドを段階的にあげ、起立、歩行を行う患者は、歩行途中で痛みが出現し、歩行ができなくなる。観察者はその一部始終を撮影する。今回、寄贈頂いたタブレット９台を撮影に活用した。撮影した映像は援助の振り返りの際、使用した。（写真１・２）

演習後に、臨床の看護師から同様の事例への看護を、何を思考しながら行っているか説明していただきながら実践してもらう。（写真３）

その後、グループ間で援助場面を振り返り、術後離床時の看護を学ぶ協同学習を実施した。各グループには教員・看護師のファシリテーターが指導に入る。演習の中で学生は、患者の変化に気づき、その変化を解釈し、反応して、それを省察することを行う。援助の実施、振り返りと看護師の思考発話を通して得た学生の学びの一部を以下に示す。

学生の学び

・患者さんに入っている管が何なのか、何のためにあるのか、分かるように説明されていたのですが、私にはその説明を患者さんにする余裕すらありませんでした。
患者さんが行っている治療についての知識も足りていないと感じました。
正しい知識がないと伝えられないし、患者さんの安心にもつながらないことを学びました。

・看護師の援助をみて何を伝えたら患者さんが安心できるのか、患者さんが自分の状態について知ることができるのかもっと考えられるようになりたいと思いました。ただ管が入っていますと伝えるだけでなくそれが何のためにいつごろまで挿入が続くのか伝えることの大切さ学びました。

・1人でできることや必要なことを明確に伝えていて、看護師がいないときの患者さんの過ごし方もわかりやすいと思った。患者の安心につながるし、共に行うことは寄り添うことだと思った。

この演習後の実習では、受け持ち患者の看護の実践に演習での学びを活かした学生がいたことが報告された。演習での体験が臨床実習の場で活かされたことは意義深い。

今後も情報通信機器を活用し、実践に即した学びの機会を設けることにより、科学的根拠に基づいた看護の実践に必要な臨床判断を行うための基礎的能力を養うことを継続し行っていきたいと考える。

〔非売品〕

2024 年度
東京慈恵会 総合医学研究センター
研 究 年 報

発 行 日　2025 年 6 月 1 日
発 行 者　髙 木 公 寛
編集責任者　東 條 克 能
発 行 所　公益社団法人 東京慈恵会
〒105-8461　東京都港区西新橋3-25-8
電話 03（3431）0427

印刷・製本　株式会社 アイワエンタープライズ