

博士學位論文

内容の要旨
および
審査の結果の要旨

薬学研究科

第47号

令和6年5月

徳島文理大学

は し が き

この冊子は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、本学において博士の学位を授与した者の「論文内容の要旨および論文審査の結果の要旨」を収録したものである。

目 次

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
甲第60号	内 海 雄 一	医薬品開発での痙攣発作リスクの新評価法：膜電位イメージングによる神経回路機構解析	1
甲第61号	大 橋 拓 人	骨格筋と心筋における亜鉛トランスポーター Slc39a13/ZIP13 の役割	8
乙第50号	岡 村 直 耶	リアルタイムイメージングを用いた脂肪乳剤投与後におけるフラッシング条件の検討	15

氏名 うつみ ゆういち
内海 雄一

本籍 栃木県

学位の種類 博士（薬学）

学位記番号 甲第 60 号

学位授与年月日 令和 6 年 3 月 15 日

学位授与の要件 学位規定第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位授与の題目 医薬品開発での痙攣発作リスクの新評価法：
膜電位イメージングによる神経回路機構解析

指導教員 教授 富永 貴志

論文審査委員 (主査) 教授 山田 麻紀

(副査) 教授 代田 修

(副査) 講師 桐山 賀充

(副査) 外部 高島 一郎
(第一工科大学)

論文の内容要旨

内海雄一

医薬品開発における有害反応は、薬剤の臨床使用の失敗や有望な薬剤の市場撤退、薬剤のセカンドラインへの格下げにつながる可能性がある阻害要因である。重大な有害反応のひとつとして痙攣発作が挙げられる。薬剤誘発性の痙攣発作は、主に脳の興奮性神経伝達の亢進、抑制性神経伝達の低下、又はその両方のアンバランスが原因となる中枢神経毒性によるものである。医薬品の前臨床試験において、簡便な *in vitro* の痙攣発作リスク (seizure-liability) 評価法を開発し、医薬品の痙攣発作危険性を素早く予見することは、企業にとって重要な課題である。

痙攣発作は脳の神経回路機構の破綻によるものであるが、その発生機構が明確ではない現状を考えると、その神経回路機構を解明し得る手法であることが重要である。近年、従来の動物行動試験による *in vivo* 痙攣発作試験法に代わって、*in vitro* 痙攣発作リスク評価の手法として、海馬スライスを用いた電気生理学的手法が提唱されている。しかし、従来の電気生理学的手法では、痙攣発作の神経回路機構を解明することは困難である。ここでは、膜電位変化を光学的に測定する膜電位感受性色素 (VSD) イメージングの手法を利用し、痙攣発作を起こす化合物が引き起こす神経回路の微細な変化の可視化・定量化を行うこととした。

第1章では、医薬品開発において、候補化合物の毒性は、医薬品開発の遅れや中止の原因になっていること、その毒性の中でも、中枢神経系毒性の評価が重要である背景を説明した。また、前臨床試験で良く観察される痙攣の検出に関しては、*in vivo* 試験に頼っていることを言及した。現在、*in vitro* 痙攣発作リスク評価アッセイの需要は高く、

国内外で積極的な研究が展開されている。そこで、本論文では、薬品開発における痙攣発作リスク評価の現状を把握するために PubMed 検索を中心とした先行研究の調査(第2章)を行い、それらの考察を行った。さらに、マウスの海馬スライスにおける神経回路機能を Di-4-ANEPPS を用いた VSD ベースのアッセイによる定量・可視化を検討し(第3章)、痙攣発作リスクの新しい評価法を提案することを目的とした。

第2章では、先行研究文献のキーワード分類を行い、医薬品開発における痙攣発作リスク評価に関する重要な情報及び示唆を得ることができた。試験種に関して、*in vivo* 試験(12報)よりも *in vitro* 試験(24報)が多く報告されていた。EEG を用いた報告が *in vivo* 試験では多かったが、医薬品開発の安全性試験では一般的ではない。通常、医薬品開発における痙攣発作の検出は、ICH S7 ガイドラインに記載されている Irwin 法又は FOB に従い、ラット、マウス、サル又はイヌ等が使用されている。また、FOB は、8 匹/用量、3 用量での実施されることが多いため、必要な薬物量や時間的な制約が考えられる。したがって、痙攣発作リスク評価において、*in vitro* 試験の重要性が示唆された。評価で用いられた動物・細胞等に関して、従来用いられてきた Rat や Rodent cells に加え、Human iPS cells(11報)が最も多く報告された。これは、ヒトと動物の種差を補完する有力なツールとして注目されている。ただし、iPS 細胞や iPS 細胞由来のオルガノイドを用いる場合は、測定までに長期の培養期間が必要である。このため、測定までの期間及びコスト面において、デメリットがあると考えられた。評価方法に関して、Cells MEA (細胞を用いた MEA 計測、13報)が最も多く報告された。これらの評価法は、24~96 well プレートを用いることで、*in vivo* 試験や他の *in vitro* 試験に比べて高いハイスループット性を持ち、近年は国内外で積極的に利用されている。また、Machine learning や Principal component analysis (PCA) を用いた評価法についても報告され、その有用性が

示されている。研究限界に関して、*in vivo* 試験、*in vivo* 試験を問わず、種差 (ヒトと動物の違い)、評価 (実験) デザイン上、痙攣発作リスクを検出できない可能性があること、評価法の検証のためには、より多くの化合物を評価することが挙げられる。現状において、痙攣発作リスク評価 (法) は、発展途上にあり、今後の評価方法の確立や、他の情報 (血中濃度、薬物動態、代謝物) を加味した評価が求められると考えられた。

第3章では、新しい痙攣発作リスク評価法として、マウスの海馬スライスにおける神経回路機能を応答速度の高い膜電位感受性色素の一つである Di-4-ANEPPS を用いた VSD ベースのアッセイによる定量・可視化を検討した。痙攣発作誘発性化合物は、ピクロトキシン (PiTX)、ガバジン (GZ)、4-アミノピリジン (4AP) 及びピロカルピン (Pilo) を用いた。

痙攣発作における神経細胞の異常な興奮を理解するため、VSD イメージングを使用して神経細胞の活動を観察した。Pilo を除き、PiTX、GZ 及び 4AP は、海馬スライスにおける神経細胞活動領域の拡大と応答持続時間の延長が観察され、痙攣発作様反応が検出できることが示された。

CA1 の放射状層における光信号の波形を比較し、各化合物の効果を評価した。VSD 光信号について、即時ピーク値 (immediate peak)、即時後ピーク値 (post-immediate peak) 及び持続反応値 (sustained response) の3つのパラメータを定義し、定量化することにより、痙攣発作誘発性化合物の神経機能に対する薬理学的影響を探索した。放射状層 (SR) の信号は、EPSP に依存し、錐体細胞層 (SP) の信号はスパイク (発火) に依存することが報告されている。そのため、尖端樹状突起で発生する EPSP に対して、SR 応答に対する SP 応答の比 (PR-ratio) を採用し、興奮-スパイク発火関係 (E-S 関係) の解析を行った。

GABA_A受容体阻害薬である PiTX と GZ は、EPSP には大きな変化を与えなかったが、

その応答持続時間を顕著に増大させた。また、広い刺激強度の刺激に対するスパイク発火の閾値を下げることで発作反応を引き起こすことが示された。一方、カリウムチャンネル阻害薬として知られる 4AP では低い刺激電圧でスパイク発火の閾値を下げることを特徴とし、痙攣発作反応を誘導する可能性が示唆された。

これらの結果は、膜電位応答を直接反映する VSD アッセイのパラメータを用いて、神経細胞機能に対する直接的な薬理学的影響を捉えることにより、未知の発作原性化合物の作用機序を調べる上で有用であると考えられた。

第4章は、第1章から第3章までで得られた主要な知見をまとめて、本論文の総括とした。このような VSD による痙攣発作が懸念される薬物の検証は、この研究が初めてである。この手法は脳スライス標本を用いる点で他の *in vitro* 試験と同等のスループット性を有しているが、そこから得られる情報は神経回路応答の動態から、個々の錐体細胞における電気応答まで幅広く圧倒的に多くの情報が得られるという点で、痙攣物質が引き起こす痙攣の神経回路機構の解明とその回避法を探索する上で重要である。

論文審査結果の要旨

本論文は4つの章からなり、医薬品開発での痙攣発作リスクの新評価法について述べている。

第1章では、緒論として、研究背景である医薬品開発における痙攣発作リスク評価の重要性や現状、電位感受性色素 (VSD) をリスク評価に応用する意義を述べ、本論文の研究目的を提示した。

第2章では、痙攣発作リスク評価の現状を把握するために、PubMed 検索による先行研究のキーワード分類について述べた。近年の報告数の動向から、*in vitro* 試験の重要性が明らかとなった。評価対象としてヒト iPS 細胞の利用が増えつつあるが、長期の培養期間が必要であることやコスト面でのデメリットを挙げた。細胞系での多電極アレイ (MEA) の利用が増加していた。細胞系では痙攣発作の発生に必要な神経回路機構の検証ができない。痙攣発作リスク評価は、発展途上であり、より包括的な評価法の必要性を示した。

第3章では、新しい *in vitro* の痙攣発作リスク評価法として企画したマウス海馬スライスを用いた VSD アッセイによるイメージング解析結果を示した。4種類の主要な痙攣発作誘発性化合物での試験結果を示した。VSD 波形の解析により、多点での薬理学的影響の探索が可能となることを示した。VSD アッセイは、*in vitro* における痙攣発作リスク評価法として今後の展開が期待されることを示した。

第4章では、総括として第1章から第3章までで得られた主要な知見を述べた。

以上、これらの研究結果は、医薬品開発での痙攣発作リスク評価の現状を明らかにした。

VSD イメージング法の定量的適用は高度な計測技術を必要し、ごく近年まで不可能だった手法である。本研究では計測装置は高度に自動化しており、脳回路機能を保ったまま計測するスライス標本を用いた *in vitro* 系での最高度のスループットを実現している。このような高度な手法を用いることで、本研究は VSD イメージング法を痙攣発作誘発性化合物の検証に応用し薬理効果を示した初めての研究結果となった。この手法は、細胞レベルから神経回路レベルまでの圧倒的に多くの情報が得られるという点で、*in vitro* 痙攣発作リスク評価に関して、新たな知見を提供するものである。本研究で示された手法を応用することで、今後の医薬品開発の毒性評価に貢献すると考えられる。よって本論文は博士(薬学)の学位に値するものと認める。

論文審査委員	主査(教授)	山田 麻紀
	副査(教授)	代田 修
	副査(講師)	桐山 賀充
	副査(外部)	高島 一郎

氏名	おおはし たくと 大橋 拓人
本籍	愛知県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 61 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 1 項該当（課程博士）
学位授与の題目	骨格筋と心筋における亜鉛トランスポーター Slc39a13/ZIP13 の役割
指導教員	教授 深田 俊幸
論文審査委員	（主査）教授 鈴木 真也 （副査）教授 角 大悟 （副査）教授 葛原 隆 （副査）教授 竹谷 豊（徳島大学 医学部）

1. 背景

生体内必須微量元素である亜鉛の欠乏は、成長遅延、免疫応答低下、皮膚炎、味覚障害、不妊、脱毛等の様々な症状を誘導する。生体内亜鉛は、骨格筋に約 60%、骨に約 30%、皮膚や肝臓に約 5%が存在する。細胞内外の亜鉛の恒常性は、亜鉛トランスポーターである Slc39a/ZIP ファミリーと Slc30a/ZnT ファミリーが制御する。本論文の研究対象である Slc39a13/ZIP13 は、間葉系組織を構成する細胞のゴルジ体膜上に局在し、その機能破綻は結合組織の形成異常をもたらすことが、*Zip13* 遺伝子欠損 (KO) マウスとヒト疾患の研究から示されている。具体的には、機能喪失型 ZIP13 に起因する脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群 (Ehlers-Danlos syndrome spondylodysplastic type3 : EDSSPD3) は、成長遅延、皮膚脆弱化、骨軟骨および歯牙形成不全を呈し、*Zip13*-KO マウスの表現型と高い相関性を示す (Fukada T. *et al* PLoS ONE 2008)。一方、EDSSPD3 患者は、筋緊張低下と脳梗塞の既往歴を有するが、骨格筋および心循環器系における ZIP13 の生理的意義は解明されていない。そこで著者は、骨格筋と心筋における ZIP13 の役割を解明するために、以下の検討を行った。

2. 骨格筋における ZIP13 の役割解明

2.1 : *Zip13*-KO マウスを用いた検討

Zip13-KO マウスを用いて、骨格筋に関する表現型解析を行った。具体的には、複数の手法で *Zip13*-KO マウスの筋力を測定し、骨格筋組織の形態解析を行った。

検討の結果、*Zip13*-KO マウスは顕著な体重減少を示し (Figure 1A)、体重非依存的な筋力低下 (Figure 1B-C) と筋線維の矮小化を呈した (Figure 1D)。

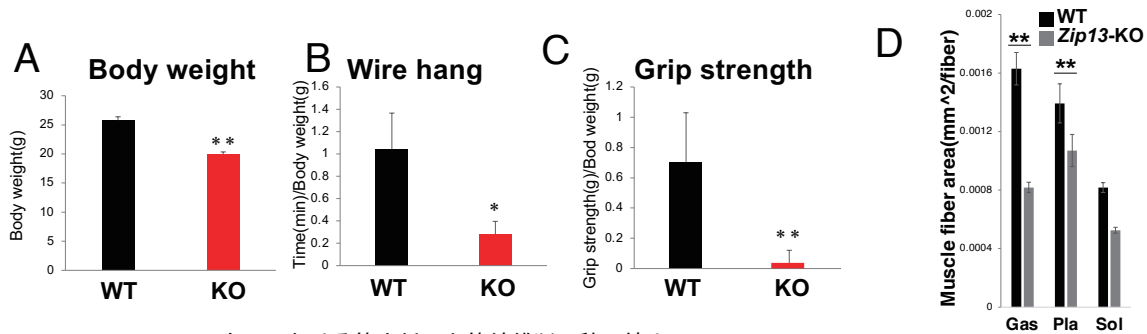


Figure 1. *Zip13*-KO マウスにおける筋力低下と筋線維断面積の縮小

A-C : 体重測定および筋力測定の結果を示す。

A : 体重測定 B : Wire hang test C : Grip Strength test

15-16 週齢の雄マウスの各個体の体重を測定し、筋力測定の測定値を体重で除した (B-C)。 (WT : n=3, *Zip13*-KO : n=3)

D : 筋断面積の解析の結果を示す。

10 週齢の雄マウスの Gas、Pla および Sol の組織切片に蛍光免疫染色を適用し、筋基底膜に高発現している Laminin2 α で骨格筋切片を染色して、画像解析により筋断面積を測定した。 (WT : n=3, *Zip13*-KO : n=3) 各個体における平均値を求め、T 検定を適用して有意差を評価した。 $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$

続いて、筋力低下が骨格筋細胞の異常に起因するのか解析するために、骨格筋の分化における ZIP13 に関与について、骨格筋関連細胞株を用いた検討した。

2.2 : C2C12 筋芽細胞株を用いた検討

マウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞株を用いて、骨格筋分化における ZIP13 の役割を解析した。具体的には、*Zip13* 発現抑制 (KD) 細胞株を作製し、ウマ血清の分化誘導刺激を加えることで、骨格筋分化に伴い変動する筋分化調節因子 (MRFs : Myogenic Regulatory Factors)

の発現を、qPCR法を適用して解析した。

検討の結果、*Zip13*-KD細胞では、対照(Scramble: Scr)細胞で確認された筋管細胞が顕著に減少し(Figure 2A)、MRFsの*MyoD*遺伝子およびMYHタンパク質の発現が低下した(Figure 2B-C)。

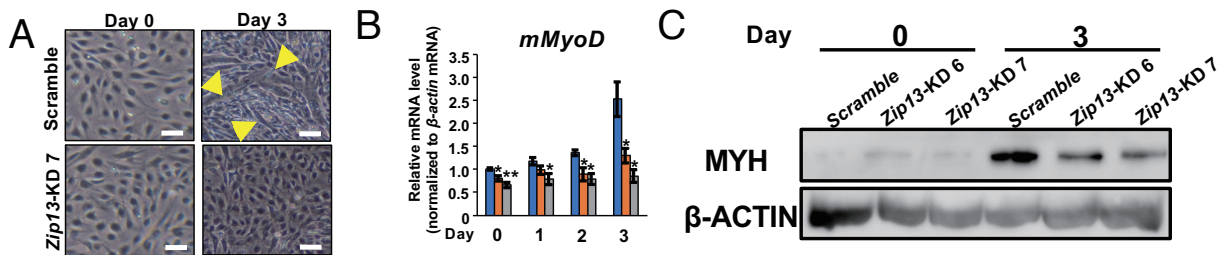


Figure 2. *Zip13*発現低下はC2C12細胞の骨格筋分化を抑制する。

A: 骨格筋誘導時における細胞形態を示す。対照細胞株(Scramble)で観察される筋管構造(黄色矢頭)は、*Zip13*に対するsiRNA発現プラスミドを導入した細胞株(*Zip13*-KD7)では観察されない。

B: MRFs(*MyoD*)の発現状況を示す。*Zip13*-KD6, *Zip13*-KD7細胞では、*MyoD*遺伝子の発現が有意に抑制されている。各指定日についてScrambleとKD細胞を比較し、T検定を適用して有意差検定を行った。n=3 p*<0.05 p**<0.01

C: 骨格筋誘導時におけるMYHタンパク質の発現を示す。

Zip13-KOマウスおよび*Zip13*-KD細胞を用いた実験結果から、ZIP13は骨格筋の分化に関与する可能性が示唆された。これらの結果の一般性を検証するために、EDSSPD3患者の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を作製して、骨格筋分化による影響を検討した。

2.3: EDSSPD3患者由来iPS細胞を用いた検討

2.1および2.2の結果を踏まえて、iPS細胞を用いて骨格筋分化におけるZIP13の役割を精査した。具体的には、EDSSPD3患者由来皮膚線維芽細胞を用いてiPS細胞株を作製し、骨格筋分化に伴うZIP13機能喪失の影響を精査するとともに、機能喪失型変異を遺伝子編集で修復する事によって、骨格筋分化過程におけるZIP13の役割を解析した。検討の結果、EDSSPD3患者由来iPS細胞は、骨格筋分化の後期MRFsである*Myogenin*が顕著な発現減少を示し(Figure 3A)、遺伝子修復で*Myogenin*の発現減少は回復した(Figure 3B)。

2.1-2.3の結果より、ZIP13が骨格筋の正常な分化形成に必要であることが示された。

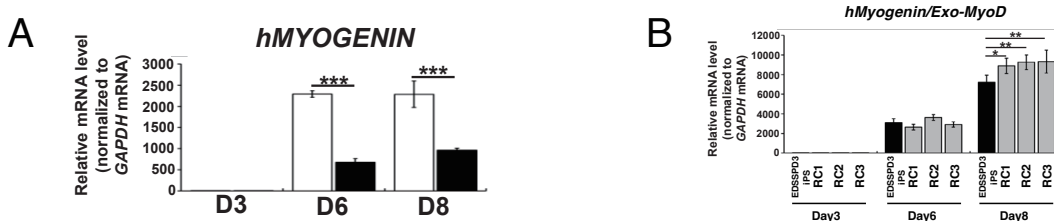


Figure 3. EDSSPD3患者由来iPS細胞における骨格筋分化への影響と、遺伝子修復による回復実験

A: 健常者およびEDSSPD3患者由来iPS細胞における*Myogenin*遺伝子の発現を示す(qPCR法)。各培養日数について健常者とT検定を適用して有意差検定を行った。n=3 p**<0.01 p***<0.001

B: ドキシサイクリン添加8日後のEDSSPD3患者由来iPS細胞および遺伝子修復細胞における相対的ヒト*Myogenin*(*hMyogenin*)の発現量を示す(RT-qPCR法)。*hMyogenin*発現を薬剤誘導的に発現させた外来性*MyoD*(*Exo-MyoD*)発現量で除して算出した。遺伝子修復前iPS細胞を標準として各クローンにおける*Myogenin*の発現を、T検定を適用して有意差検定を行った。n=3 p*<0.05 p**<0.01

一方、我々の報告した症例のEDSSPD3患者は、2名とも脳梗塞や脳出血の既往歴があり、心機能の異常は心原性の二次性脳梗塞の原因となることから、ZIP13の失調が心機能に与える影響を解析した。

3. 心筋における亜鉛恒常性制御と ZIP13 の意義

Zip13-KO マウスの心機能解析

Zip13-KO マウスと Zip13-KO マウス由来初代培養心筋細胞を用いて、ZIP13 の機能破綻と心筋機能との関係性を解析した。具体的には、野生型 (WT) および Zip13-KO マウスより初代培養心筋細胞 (Primary neonatal cardiomyocyte : PNC) を調整した。WT の PNC に心毒性モデルとして使用されるドキソルビシンを添加して、Zip13 遺伝子の発現を解析した。さらに、WT および Zip13-KO マウス由来 PNC の拍動動画を撮影し、拍動に伴うピクセルの変化を、画像解析ソフトを用いて定量的に解析した。さらに、WT および Zip13-KO マウスも腹腔内に Wireless radiofrequency telemetry device を外科的に埋め込み、心電図を 24 時間モニタリングした。また、WT および Zip13-KO マウス由来 PNC より全 RNA を抽出して、RNA-seq による網羅的な遺伝子の発現状況を解析した。

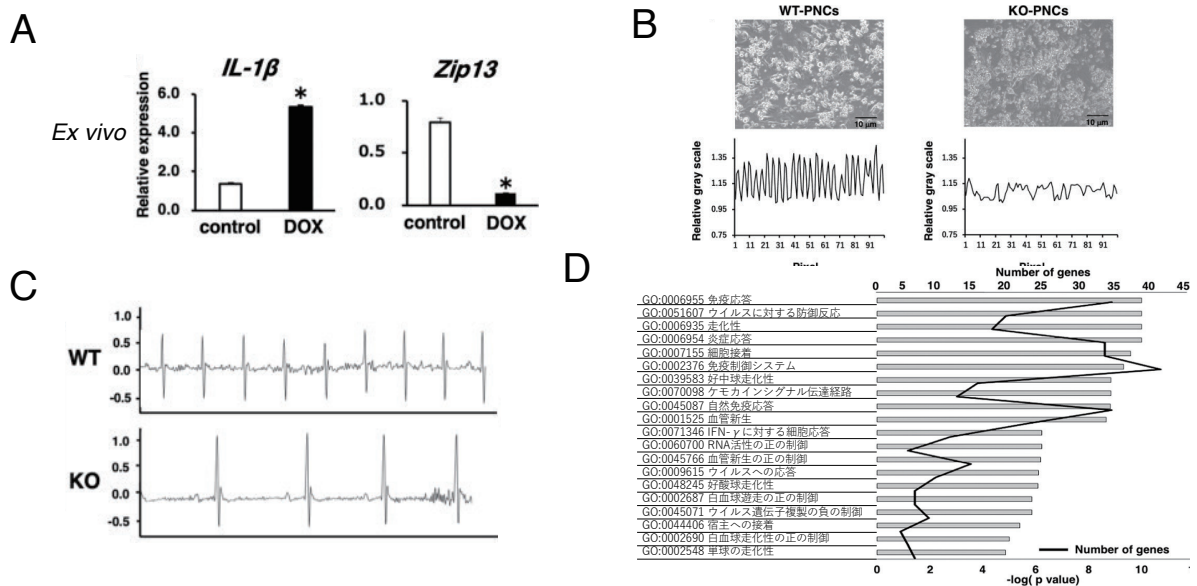


Figure 4. 心臓の拍動における ZIP13 の役割解析

A : 初代培養心筋細胞のドキソルビシンによる心負荷モデルの影響解析

初代培養心筋細胞におけるドキソルビシンによる *Zip13* の発現を示す (qPCR)。

B : Zip13-KO マウス由来初代培養心筋細胞における拍動現象の異常

3 日齢の野生型 (WT) および Zip13-KO マウス (KO) 心臓由来の初代培養心筋細胞を培養し、播種後 3-4 日目に観察された拍動を動画撮影して、ピクセル解析で得られたデータをキモグラフで表示した。

C : WT および Zip13-KO マウスの心電図検査

WT および Zip13-KO マウスの心電図を解析結果を示す。7-10 週齢の雄マウスの腹腔内に心電図測定装置を埋め込み、傷の回復後に心電図を 24 時間記録した。KO マウスは不整脈の傾向を示した。

D : Zip13-KO マウス由来初代培養心筋細胞における網羅的な遺伝子の発現解析

RNA-seq における GO 解析結果を示す。WT および Zip13-KO マウス (3 日齢, n=3) の心臓から調製した初代培養心筋細胞を用いて RNA-seq を実施し、遺伝子発現の網羅的解析を行った (D : 発現上昇した遺伝子群)。

解析の結果、炎症反応の亢進に伴い、*Zip13* の発現は顕著に低下した (Figure 4A)。また、*Zip13*-KO マウス由来 PNC の拍動は、対照 PNC と比較して規則性を失っており (Figure 4B)、*Zip13*-KO マウスの心電図は不整脈の兆候を示した (Figure 4C)。さらに *Zip13*-KO マウス由来 PNC は、炎症応答に関連する遺伝子の発現亢進を示した (Figure 4D)。以上の結果より、ZIP13 は心筋において、炎症応答の制御と、心筋の正常な拍動に必要であることが示唆された。

4. 【結論】

骨格筋に関する *Zip13*-KO マウス (Figure 1) と、C2C12 細胞 (Figure 2) を用いた研究から、ZIP13 が正常な骨格筋の分化と機能に必要であることが示された。ZIP13 が正常な骨格筋分化誘導に必要であることは、病原性変異型 ZIP13 を保持する EDSSPD3 患者から作成した iPS 細胞を用いた実験でも立証した (Figure 3)。心筋に関する研究では、ZIP13 が炎症反応の軽減に関与するとともに、心臓の正常な拍動に必要であることが示唆された (Figure 4)。すなわち、ZIP13 は正常な骨格筋の形成と機能に必要であるとともに (Figure 5 上)、心筋においては心筋の正常な拍動の制御および心毒性を軽減化する役割を演じていることが明らかとなった (Figure 5 下)。

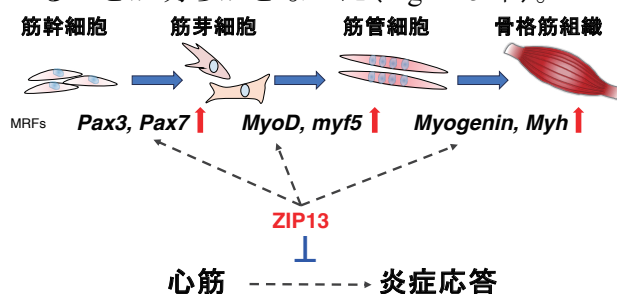


Figure 5. ZIP13 は、筋分化関連遺伝子群の発現制御を介して、骨格筋の正常な形成と機能制御に関わり、心筋における炎症反応の軽減に関与する。

一方、ZIP13 を介する亜鉛恒常性が、どのように骨格筋の形成や機能の制御に関与するか、その詳細な分子メカニズムはまだ十分に解明されていない。これらの疑問を解決するためには、各 MRFs と ZIP13 の相互の遺伝子発現調節機構の解明が必要であり、ZIP13 を介するシグナル因子としての亜鉛 (亜鉛シグナル) がどのように各 MRFs の遺伝子発現を調節するのか、亜鉛を透過しない ZIP13 変異体を用いた各 MRFs のプロモータ領域の解析や、ZIP13 に結合するタンパク質の同定とその特徴を解析する必要がある。さらに、*MyoD* をはじめとする MRFs を発現抑制した *Zip13*/MRFs ダブルノックダウン細胞を *Zip13*-KD 細胞を用いて作製し、その性状を解析することで、骨格筋の各分化段階における ZIP13 の役割に関する理解がさらに深まるものと考えられる。また、本研究結果では、骨格筋の初期分化段階における ZIP13 の意義は不明であり、現在はマウスの骨格筋より筋衛生細胞をソーティングして、性状の解析を進めている。

心筋における検討では、ZIP13 が正常な心機能に必要であることが判明した。しかし、ZIP13 の失調による心機能の異常が、EDSSPD3 患者の脳梗塞と関連するのかは現時点で不明であり、*Zip13*-KO マウスおよび心臓組織特異的 *Zip13*-KO マウス等を用いた今後の更なる検討が必要である。

新たな問題の解決には、現在解析中の骨格筋特異的 *Zip13* 欠損マウスに加えて、間葉系前駆細胞特異的 *Zip13* 欠損マウスと、ZIP13 発現細胞で GFP が発現する *Zip13*-GFP-knockin (KI) マウスが有用であると考えられる。特に、*Zip13*-GFP-KI マウスは、ZIP13 発現細胞の特徴を解明するだけでなく、その子孫細胞の追跡にも有用であり、器官形成や創薬研究への応用も期待できる。本研究で開発した EDSSPD3 由来 iPS 細胞は、本論文の目標である骨格筋における ZIP13 の役割解明において重要な知見を提供した。また、遺伝子修復型 EDSSPD3 由来 iPS 細胞は、今後の臨床関連研究の展開に大きく貢献すると思われる。具体的には、本細胞は、*in vitro* における組織再生実験で正常な器官形成を確認した上で、ヒト化マウスを用いた移植実験による機能的な各種間葉系組織の再生実験等を可能にするものである。本研究で開発した一連の iPS 細胞株の使用によって、結合組織の形成と機能における ZIP13 のさらなる理解と、その失調による EDSSPD3 の病態形成の解明、および、新規治療法の開発が進展すると考える。

論文審査結果の要旨

申請者は、亜鉛トランスポーターSlc39a13/ZIP13（以下 ZIP13）の生体における機能解析を主題として、特に本研究では骨格筋の筋分化および心筋機能における ZIP13 の寄与にフォーカスをあて、以下のような解析を行った。

初めに *Zip13*-KO マウスの phenotype 解析を行い、*Zip13*-KO マウスの顕著な筋力低下、筋繊維の矮小化、および骨格筋の分化調節因子(myogenic regulatory factors : MRFs)の制御異常を見出した。

次いで、マウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞株の *Zip13* 発現抑制(KD)細胞を作製し、その骨格筋分化時における MRFs の発現を精査した。野生型 C2C12 細胞では骨格筋分化（筋管形成）に伴う MRFs の発現上昇および *Zip13* の発現上昇を見出したが、KD 細胞において筋管形成の減少を認め、MRFs の発現は顕著に低い値を示し、ZIP 13 が骨格筋の正常な分化に必要であることを提示した。

さらに、ZIP13 の遺伝子異常に由来する脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群 (EDSSPD3) 患者由来細胞より iPS 細胞を作製し、その骨格筋分化時における MRFs の発現を確認した結果、健常者 iPS 細胞と比較して患者 iPS 細胞は主たる MRFs である *Myogenin* の発現が顕著に低かったが、患者由来 iPS 細胞の ZIP13 遺伝子を健常型へ修復した iPS 細胞では *Myogenin* の発現が健常者レベルまで回復した。これらの結果から、EDSSPD3 における筋力低下の原因として ZIP13 の失調が MRFs の制御異常をもたらした結果、骨格筋形成に異常を伴う筋力低下を呈することを明らかにした。

一方、心筋機能における ZIP13 の寄与に関して、*Zip13*-KO マウスの心臓の解剖学的な所見および心電図を解析した結果、*Zip13*-KO マウスの心臓重量は野生型マウスに比較して有意な差を示さなかったが、心電図は不整脈の兆候を示し、また *Zip13*-KO マウス由来初代培養心筋細胞(Primary neonatal cardiomyocyte : PNC)が野生型 PNC と比較して不規則な拍動を示したことから、ZIP13 が心筋の正常な拍動に必要であることが示唆された。さらに、*Zip13*-KO マウスの PNC における遺伝子の発現状況を RNA-seq により網羅的に解析した結果、ZIP13 の欠損が炎症応答に関連する遺伝子群の発現上昇を誘導している現象を見出し、ZIP13 が正常な心筋の拍動と炎症応答の抑制に必要であり、言い換えれば心筋における恒常性の維持に必要であることを明らかにした。

本研究において申請者は希少疾患である EDSSPD3 の患者より採取した皮膚線維芽細胞より、世界で初めて iPS 細胞の作製に成功した。iPS 細胞はさまざまな細胞への分化が可能であることから、種々の細胞（組織）ごとの ZIP13 失調に伴う影響の解析が可能となる他、薬物スクリーニングによる治療薬の開発や、再生医療を見据えた検討が可能となるため、今後の ZIP13 に関する研究の進展に大きく貢献するものと考えられる。

本審査会における質疑応答では、変異 ZIP13 の構造に関する質問や、細胞内亜鉛動態に係

る内容など多岐にわたる質問に対し、自身の実験結果から成るエビデンス、文献上のエビデンスを明確に区別して提示し、明瞭に弁証できていたことより、申請者は、当該研究領域において必要な知識や研究技術が十分に備わっているものと評価できる。

以上、本博士論文は、研究目的、方法、結果、考察が適切に記述されており、博士論文として十分な水準にあり、申請者は博士の学位授与に値するものと評価された。

論文審査委員	主査（教授）	鈴木真也
	副査（教授）	角 大悟
	副査（教授）	葛原 隆
	副査（外部）	竹谷 豊

氏名 おかむら なおや
岡村 直耶

本籍 兵庫県

学位の種類 博士（薬学）

学位記番号 乙第 50 号

学位授与年月日 令和 6 年 3 月 15 日

学位授与の要件 学位規定第 4 条第 2 項該当（論文博士）

学位授与の題目 リアルタイムイメージングを用いた脂肪乳剤投与後におけるフラッシング条件の検討

論文審査委員

（主査）教授 山本 博文

（副査）教授 四宮 一昭

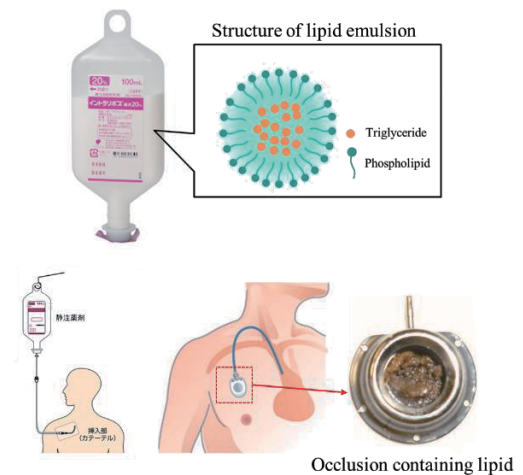
（副査）教授 角 大悟

（副査）教授 石澤 啓介（徳島大学病院 薬剤部長）

論文の内容要旨

岡村 直耶

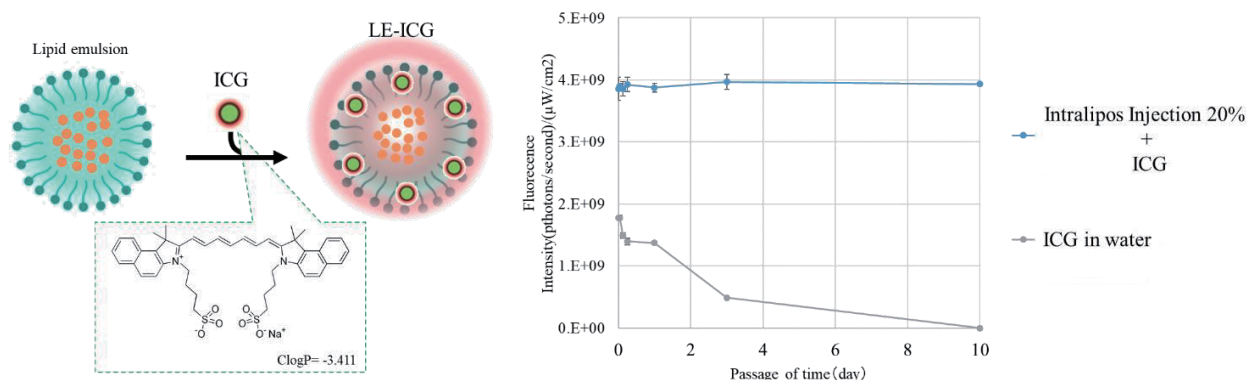
臨床における栄養管理は、疾患の治療効果の向上を図り、健康状態を維持するために重要である。経静脈栄養において、本邦で静注用脂肪乳剤として製造販売されている製剤はイントラリポス輸液のみである。イントラリポス輸液の有効成分である大豆油は、エマルションの状態で均一に分散している。脂肪乳剤はエネルギー密度の高い



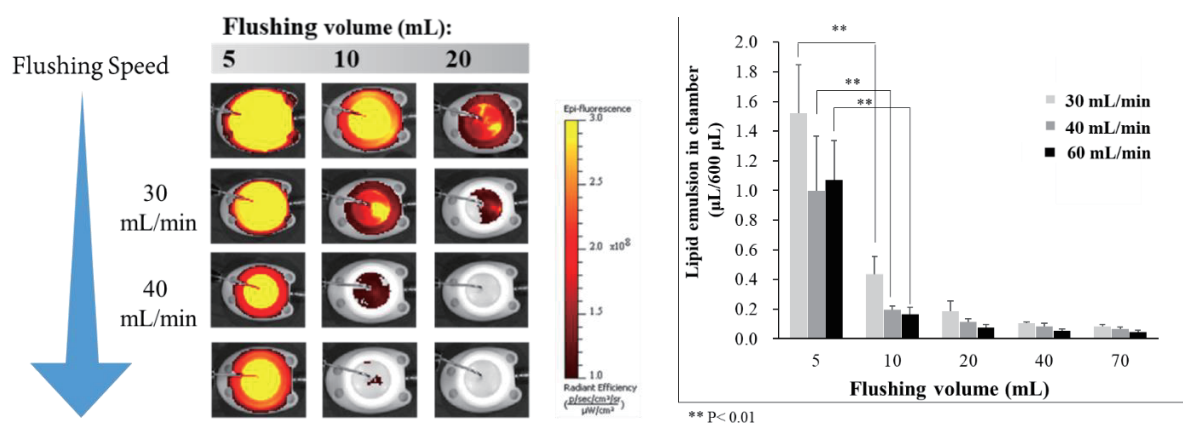
非タンパク質カロリーの供給源であり、必須脂肪酸を補給できる唯一の輸液である。一方で、脂肪乳剤の影響で生じる凝集体、血栓、薬剤の沈殿は、薬剤投与デバイスの閉塞を引き起こすことがある。また、脂肪乳剤は微生物の増殖因子の一つであると特定されている。そのため、脂肪乳剤を安全に投与するには、投与後のフラッシングによる残渣低減が重要である。そこで本研究では、様々な薬剤投与デバイス、投与場面における効果的なフラッシング条件を検討した。また、複数の先行研究から、フラッシングのみではカテーテル内の残渣を 100%排出することは困難であると報告されている。そこで著者は、フラッシング後の残渣を非破壊的に可視化し、残留機序を考察できる評価手法が望ましいと考え、新たにインドシアニンググリーン (ICG) を用いたリアルタイムイメージング法を提案した。

第一章では、ICG を混合した脂肪乳剤において、脂質エマルションと ICG との相互作用による特異的な蛍光発光を確認し、ICG 蛍光強度や安定性を評価した。その結果、イントラリポス輸液 20% に混合した ICG は、イントラリポス輸液の主成分であるトリグリセリド (TG) 自体を蛍光標識する特性は有していなかった。しかし、脂質エマルションのリン脂質と素早く、かつ安定な結合を形成して蛍光標識していることが示唆された。したがって、ICG は、「閉塞や感染を促進する因子である脂質エマルション

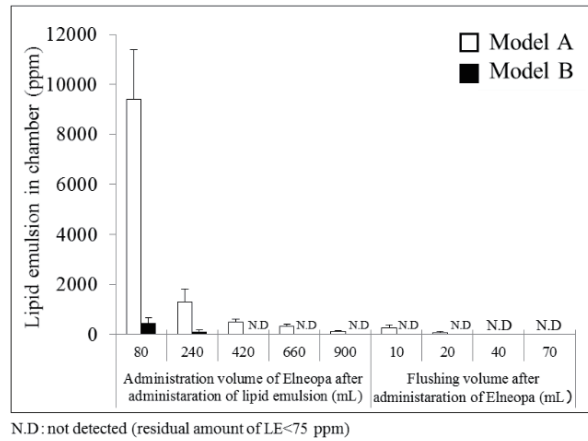
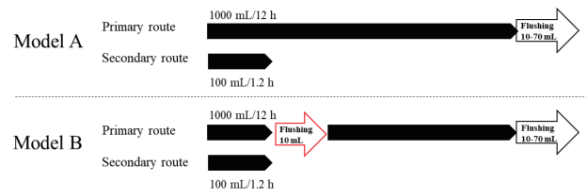
を検出することで効果的なフラッシング条件を探索する」という本論文の目的に合致した蛍光試薬であることを見出した。



第二章では、リアルタイムイメージングを用い、各条件でフラッシングした完全皮下埋め込み型血管アクセスデバイス(TIVAD)チャンバー内の脂肪乳剤の残渣を評価することで効果的なフラッシング条件や手技を探索した。リアルタイムイメージングは、血管アクセスデバイス内における、フラッシング後の脂肪乳剤の分布を高解像度で示し、微量な残渣も定量できる精度を示す有用な評価手法であることを見出した。TIVAD内の脂肪乳剤は、パルスフラッシュではなく、40 mL/min以上の速度で勢いよくボーラスフラッシュをすることが効果的であった。また、フラッシング量は10 mL以上が望ましかった。

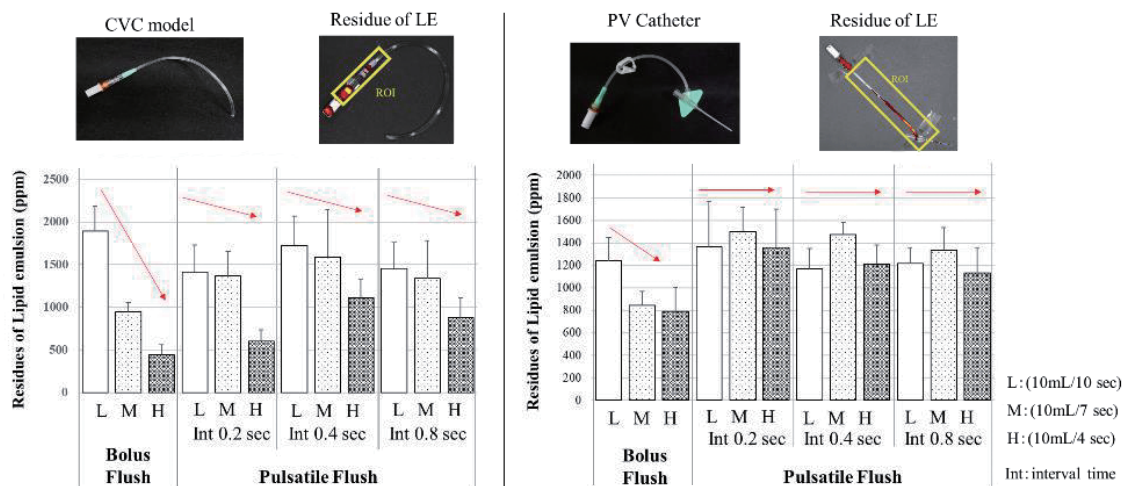


第三章では、臨床で散見される脂肪乳剤の側管投与時のフラッシング方法を探索した。その結果、脂肪乳剤を側管投与した際は、投与後直ちに 10 mL の生理食塩液でフラッシングし、その後 420 mL 以上のメイン輸液を滴下することでカテーテルおよび血管アクセスデバイス内の脂肪乳剤の残渣を最小限に低減できることが分かった。脂肪乳剤の投与後にメイン輸液を継続して滴下できない場合

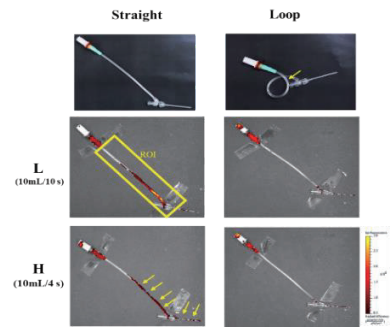


は、側注口以降の内径が細い輸液ラインを用いて脂肪乳剤を投与し、投与後直ちに 20 mL 以上の生理食塩液で勢いよくボラスフラッシュすることが効果的であった。

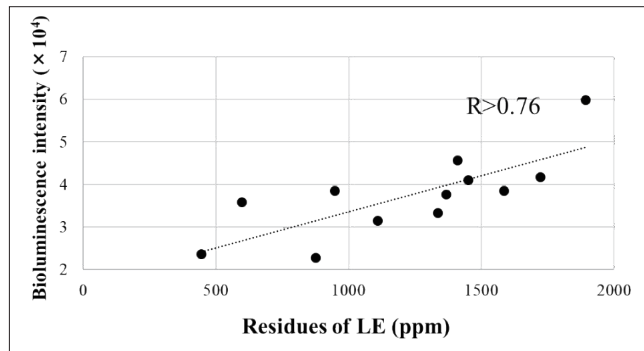
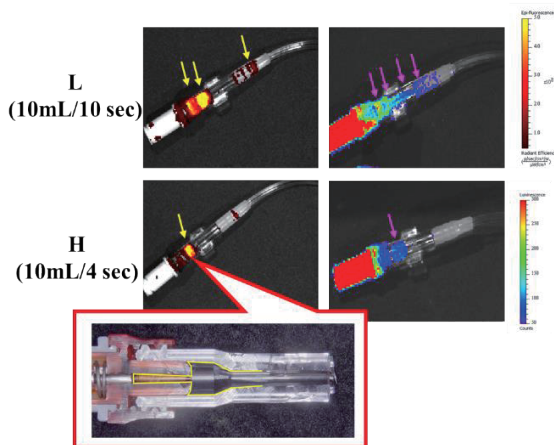
第四章では、TIVAD よりも一般的な血管アクセスデバイスである CVC および延長チューブ付き末梢留置針における効果的なフラッシング条件を探索するとともに、フラッシング後の残渣がカテーテル内の微生物増殖の程度に及ぼす影響についても検証した。その結果、いずれのカテーテルにおいても、勢いよくボラスフラッシュすることで脂肪乳剤の残渣を効果的に低減できることが明らかとなった。パルスフラッシュの有効性は認められなかった。しかし、パルスフラッシュは、カテーテル内壁の付着物を剥離する効果が高いことから、必要に応じてパルスフラッシュで付着物を剥離させ、次に勢いよくボラスフラッシュする手順がカテーテル内から残留物を除去するために望ましいと結論付けた。



ただし、末梢静脈では静脈炎のリスクからゆっくりフラッシュする必要がある。そこで、留置針に接続する延長チューブをループ状にしてフラッシュすることで、フラッシング速度が遅い場合であっても効果的に洗浄できることを見出した。



フラッシング後の残渣と、その後の微生物増殖の相関から、感染リスクを低減するためには、脂肪乳剤の残渣をより減らすフラッシング手技が望ましいことが分かった。また、コネクター部の残渣が微生物増殖の温床となることから、コネクター部の清潔操作が重要であること明らかにした。さらに、デバイスの設計上の課題を示す知見が得られた。



以上、本研究では、各種投与デバイス、投与場面における脂肪乳剤の適切なフラッシング条件を検討した。評価手法として、新たに ICG を用いたリアルタイムイメージング法を提案し、有用であることを見出した。本研究によって得られた知見は、脂肪乳剤の蛍光標識に対する極めて有用な情報であり、類似する研究の重要な基盤を提供した。各種血管アクセスデバイス中の脂肪乳剤は、いずれも、勢いよくポーラスフラッシュすることが効果的なフラッシング条件であった。末梢静脈ではゆっくりフラッシュする必要があるが、接続するチューブをループ状にすることで効果的に洗浄できることを明らかにした。輸液ラインごとフラッシュする際は、メイン輸液の滴下による洗浄や、内径が細い輸液ラインを用いる必要があることを明らかにした。本研究は、脂肪乳剤の最適なフラッシング方法を明確にすることで、より安全な脂肪乳剤の投与に貢献し、脂肪乳剤による治療効果の向上や患者の QOL 向上につながると考える。

論文審査結果の要旨

本論文は、様々な薬剤投与デバイス、投与場面を想定した脂肪乳剤の効果的なフラッシング条件の探索を目的として行われた研究について論じている。脂肪乳剤の残渣は、閉塞や微生物の増殖因子の一つであると特定されている。そのため、脂肪乳剤を安全に投与するには、投与後のフラッシングによる残渣低減が重要である。また、先行研究において、フラッシングのみでは血管アクセスデバイス内の残渣を100%排出することは困難であると報告されている。そこで著者は、フラッシング後の残渣を非破壊的に可視化し、残留機序を詳細に考察できる評価手法が望ましいと考え、新たにインドシアニンググリーン(ICG)を用いたリアルタイムイメージング法を提案している。

本研究で著者は、ICGを用いたリアルタイムイメージング法がデバイス内の脂肪乳剤の残渣評価に有用であることを見出し、フラッシング後の残渣を可視化して定量することで脂肪乳剤の効果的なフラッシング条件を明らかにした。これらをまとめた本論文は、四つの章で構成されている。

第一章では、ICGが、閉塞や微生物の増殖因子である脂質エマルジョンを蛍光標識し、イメージング技術によってデバイス内の脂肪乳剤の残渣を検出できる可能性を見出している。脂肪乳剤に混合したICGは、脂質エマルジョンの膜を形成するリン脂質と素早く、かつ安定な結合を形成して標識していることを示唆する結果が得られている。これにより、ICG水溶液よりも蛍光強度が増大し、長期間安定となることを明らかにしている。

第二章では、TIVAD(完全皮下埋め込み型血管アクセスデバイス)を用いたリアルタイムイメージング法の有用性を明らかにしている。リアルタイムイメージングは、血管アクセスデバイス内の脂肪乳剤の残渣を高解像度で示すこと、微量な残渣も定量できる精度を示す有用な評価手法であることを見出している。また、TIVAD内の脂肪乳剤に対する効果的なフラッシング条件を検証している。その結果、先行研究で有用性が示されているパルスフラッシュよりも、勢いよくボーラスフラッシュした方が効果的であることを明確にしている。さらに、適切なフラッシング量についても示している。

第三章では、臨床で散見される脂肪乳剤の側管投与において、投与直後のフラッシングのみでは不十分であることを示し、新たにメイン輸液で洗浄する手技が有用であることを見出している。さらに、脂肪乳剤の投与後にメイン輸液で洗浄できない場合を想定し、内径が細い輸液ラインを用いた場合には、脂肪乳剤の投与直後に勢いよくボーラスフラッシュすることが効果的であることを明らかにしている。

第四章では、中心静脈カテーテル(CVC)および延長チューブ付き末梢留置針における効果的なフラッシング条件を探索し、第二章、第三章と同様に勢いよくボーラスフラッシュすることで脂肪乳剤の残渣を効果的に低減できることが明らかにしている。ただし、末梢静脈では静脈炎のリスクからゆっくりフラッシュする必要があるため、対策として留置針に接続する延長チューブをループ状にする手法が有用であることを見出している。ま

た、フラッシング後の残渣と微生物増殖の相関から、感染リスクを低減するためには、脂肪乳剤の残渣をより減らすフラッシング手技が望ましいことを明らかにし、検証したフラッシングの臨床的意義を見出している。

以上、これらの研究結果より、ICG を用いたリアルタイムイメージング法がデバイス内の脂肪乳剤の残渣評価に有用であることを見出し、臨床で想定される様々な場面におけるフラッシング後の残渣の挙動を明らかにしている。本研究で得られた結果は、未検証であった脂肪乳剤の効果的なフラッシング条件を明確にすることで、より安全な脂肪乳剤の投与に貢献できるものと判断できる。また、筆頭著者として査読付きの学術論文 3 報を既に発表しており、業績としても十分である。よって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと認める。

論文審査委員	主査（教授）	山本 博文
	副査（教授）	四宮 一昭
	副査（教授）	角 大悟
	副査（外部）	石澤 啓介

博士学位論文 内容の要旨および審査の結果の要旨(第47号)

令和6年5月 発行

編集・発行

徳島文理大学大学院薬学研究科
徳島市山城町西浜傍示180
〒770-8514 TEL 088-602-8210

印刷

原田印刷出版株式会社
徳島市西大工町4丁目5
〒770-0903 TEL 088-622-2356
FAX 088-622-2357
E-mail: haradapp@khf.biglobe.ne.jp