

AMH 測定における AIA-パック CL AMH とエクルーシス AMH Plus の測定系差の検討

測定系の違いが Follitropin Delta 投与量に及ぼす影響の解析

◎中澤 留美¹⁾、松山 毅彦¹⁾
厚仁病院¹⁾

【目的】 抗ミュラー管ホルモン (Anti-Müllerian hormone : AMH) は卵巣予備能評価に広く用いられ、生殖補助医療における調節卵巣刺激方法の決定に重要な指標である。しかし、AMH は測定機器間で値の乖離が報告されており、臨床判断への影響が懸念される。本研究では、AIA-パック CL AMH (TOSOH) とエクルーシス AMH Plus (Roche) の測定値の相関および差異を検証し、さらにその差が、遺伝子組換えヒト卵巣刺激ホルモン (FSH) 製剤 (Follitropin Delta) 1 日投与量の決定に及ぼす影響を評価した。

【方法】 当院において同一採血検体を用いて AIA およびエクルーシスの両測定系で AMH を測定した 188 例を対象とした。AMH 値および体重に基づき Follitropin Delta の 1 日あたりの投与量を算出し、両測定系間での投与量の一致率および変動症例を抽出した。

【結果】 AIA とエクルーシスの AMH 値には強い相関を認めた ($r=0.979$)。回帰式は $AIA (y) = 1.241x - 0.0137$ (エクルーシス : x) であり、AIA は全体的に高値を示した。Follitropin Delta の 1 日投与量は 47 例 (25.0%) で不一致と

なり、いずれも AIA に基づく投与量がエクルーシスより減量であった。特に低値域では、測定系間のわずかな差異が投与量区分の変動に直結し、Follitropin Delta の投与量決定に直接影響した。

【考察】 両測定系の AMH 値は高い相関を示したものの、AIA の高値傾向により 25% の症例で投与量が変わり、臨床判断に影響を及ぼす可能性が示唆された。特に低値域では測定系の差異が投与量区分に直結するため、測定系の特性を理解し、得られた AMH 値がどの測定法によるものかを臨床側へ明確に伝達することが重要である。測定系の統一や換算式の活用は、調節卵巣刺激方法の精度向上に寄与すると考えられる。

“厚仁病院 培養室— (0877) 23-2525”

乳癌転移阻害因子セマフォリン3Fの機能解析

その1：マウスモデルを用いた *in vivo* 解析

◎武内 綾哉¹⁾、中山 寛尚²⁾

広島国際大学 保健医療学部 医療技術学科 臨床検査学専攻¹⁾、広島国際大学²⁾

【目的】乳癌の罹患率は女性の癌の中で最も高く、現在でも増加の一途をたどっているため、深刻な社会問題となっている。分子標的薬トラスツズマブに代表される種々の抗癌剤の登場によって生存率が大きく改善したが、薬剤抵抗性や転移を伴う悪性度の高い乳癌治療にはさらなる改善が必要である。我々は細胞浸潤能に大きな影響を与える軸索誘導因子に着目して解析を進めており、本研究では乳癌転移・浸潤能を抑制する軸索誘導因子の探索とその機能解析を行った。

【方法】軸索誘導因子の発現量と乳癌患者の無再発生存期間(RFS)の相関関係は、公開されている Kaplan-Meier plotter を利用して解析した。動物実験には、マウス由来乳癌細胞株 4T1 を Balb/c マウス乳腺に同種移植を行った。移植後、経時的に腫瘍サイズを計測し、移植 24 日後に腫瘍を摘出して免疫染色を行った。

【結果】乳癌患者 RFS 解析の結果、軸索誘導因子セマフォリン 3F (SEMA3F)の発現低下と予後の悪化に相関関係が見られた。とくにリンパ節転移を有する患者群においては、

より強い相関が見られた。そこで、4T1 細胞にヒト SEMA3F を遺伝子導入して安定発現株を作成し、Balb/c マウス乳腺に同種移植して腫瘍への影響を検討した。その結果、SEMA3F-4T1 細胞移植マウスでは、親株 4T1 細胞に比べて腫瘍サイズと腫瘍血管新生が低下し、さらに肝臓および肺への遠隔転移が抑制された。また、SEMA3F-4T1 腫瘍では間葉系マーカー *vimentin* 発現が低下していた。

【考察】本研究結果から、軸索誘導因子である SEMA3F は、マウスモデルにおいて乳癌の増殖・転移を阻害する効果を有していることが明らかとなった。つまり、SEMA3F の発現低下によって乳癌の転移・浸潤能が促進されることが想定され、乳癌患者の臨床データと一致する結果であると考えられる。以上のことから SEMA3F を創薬標的とすることによって、転移を伴う悪性度の高い乳癌に対する新たな治療法の開発に繋がる可能性が示唆された。

連絡先：0823-70-4640

乳癌転移阻害因子セマフォリン3Fの機能解析

その2：乳癌細胞株を用いた *in vitro* 解析

◎北浦 悠¹⁾、中山 寛尚²⁾

広島国際大学 保健医療学部 医療技術学科 臨床検査学専攻¹⁾、広島国際大学²⁾

【目的】軸索誘導因子であるセマフォリン3F (SEMA3F)はもともと、軸索伸長を負に制御する因子として同定されたが、これらの因子は神経細胞のみならず血管内皮細胞、がん細胞、免疫細胞など様々な細胞に働きかけ、多様な機能を持ち合わせていることが分かってきた。我々は、乳癌に対するSEMA3Fの効果を検証するため、マウスを用いた乳癌細胞移植モデルによる検討を行ってきた。その結果、SEMA3Fは乳癌の増殖および転移を阻害する効果があることが分かってきた。本研究ではSEMA3Fがどのような分子メカニズムによって乳癌の転移・浸潤を抑制したのかを明らかにする。

【方法】細胞実験にはヒト乳癌細胞株MDA-MB-231を用いた。遺伝子編集技術CRISPR-Cas9によってSEMA3Fの受容体neuropilin-2 (NRP2)を欠損した細胞を作成した。繊維状アクチンはファロイジン染色にて評価した。細胞浸潤能はトランスウェルアッセイにて測定した。細胞内シグナルはウェスタンブロット法にて解析した。

【結果】乳癌細胞MDA-MB-231の培地中にSEMA3F蛋白

質を添加したところ、細胞運動に重要な繊維状アクチンの形成を阻害することによって細胞浸潤能が低下した。また、細胞内シグナル解析から、SEMA3Fは細胞増殖シグナルAktおよびmTOR下流因子S6Kのリン酸化を抑制した。さらにSEMA3Fは、浸潤・転移に関わるTGF β 刺激によって活性化したsmad2のリン酸化を阻害した。また、SEMA3FはTGF β 刺激によって誘導された細胞浸潤能を抑制した。一方で、NRP2欠損細胞では上記で示したSEMA3Fによる抑制効果は見られなかった。

【考察】以上の結果から、SEMA3FはNRP2受容体を介して乳癌細胞内において2種のシグナル経路Akt-mTORおよびTGF β シグナルの両方を抑制することが明らかになった。よって、SEMA3Fは乳癌細胞の増殖・転移シグナルを抑制する効果を有しており、これらの分子メカニズムによってマウス乳癌モデルにおいて増殖・転移を阻害したことが明らかとなった。

連絡先：0823-70-4640

血管内皮細胞の低温障害を引き起こす分子機構

◎新美 健太¹⁾
香川県立保健医療大学¹⁾

【背景】

臓器移植の際に生じる大きな問題の1つとして移植組織の低温障害が挙げられる。移植組織は通常の場合ドナーから摘出された後、保存液中で氷冷され搬送される。この氷冷は組織の代謝を抑制するうえで必要不可欠なものであるが、長時間におよぶ場合組織に低温障害をもたらす。細胞の低温障害の分子機構は不明な点が多いが、近年の冬眠動物を使用した研究によると鉄依存性脂質過酸化による細胞死であるフェロトーシスが細胞の低温障害の主体であると報告されている。移植組織に含まれる様々な種類の細胞の中でも血管内皮細胞は特に温度の変化に敏感な細胞として知られているが、血管内皮細胞の低温障害がフェロトーシス依存性であるかは不明であるため、本研究で検討した。

【方法】

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を使用しポリ-L-リジンでコートしたディッシュに低密度で播種した。翌日過酸化脂質蛍光プローブ C11-BODIPY を含む完全培地中で 37℃

においてインキュベートし、その後さまざまな濃度の Ferrostatin-1（フェロトーシス阻害剤）を含む低血清培地に置換し、約 16 時間 37℃または 4℃でインキュベートした。細胞を 4%パラフォルムアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡観察により細胞の生存数および脂質過酸化を評価した。

【結果・考察】

4℃でインキュベートした HUVEC はほとんど生存しておらず、わずかな生存細胞においては過酸化脂質の蓄積が観察された。一方である一定の濃度で Ferrostatin-1 を添加した場合は 4℃でも多数の細胞が生存しており、過酸化脂質の蓄積はほとんど見られなかった。このことから HUVEC の低温障害を引き起こすメカニズムは、少なくとも部分的にはフェロトーシスに依存していることが示唆された。

連絡先：087-870-1268