
研究助成業績報告集

2021 年度 公募自由課題研究助成
山内進循環器病研究助成

公益財団法人 循環器病研究振興財団

* 目 次 *

No	研 究 課 題	研 究 者	頁
1	深層学習を用いた心筋血流シンチグラフィ自動診断システムの開発	楠本 大	1
2	脳血管内皮を標的とした脳卒中、認知症の革新的治療法の開発	服部 頼都	6
3	エクソソームを介した造血幹細胞と心血管系疾患のクロストークを理解する	山本 玲	11

深層学習を用いた心筋血流シンチグラフィの自動診断システム開発

慶應義塾大学医学部・助教
楠 本 大

I. 緒言

現在日本における死因としては癌が最大であるが、単一の臓器としては心臓が最も多い。心臓による死因として最も多いものは、動脈硬化に起因し心臓に栄養を供給する冠動脈に狭窄ないしは閉塞きたした狭心症、心筋梗塞などの虚血性心疾患が最も多い。虚血性心疾患の診断においては、解剖学的に冠動脈血管がどの程度狭くなっているか、ということは大切であるが、実際に治療法の選択を行う上では狭窄により機能的に心筋血流が不足しているかどうか、ということを確認することが必須である。特に機能的な心筋血流低下を診断するために、現在最も標準的に行われている検査方法は心筋血流シンチグラフィである。心筋血流シンチグラフィ検査では、心筋血流に分布する ^{201}Tl や $^{99\text{m}}\text{Tc}$ などの放射性同位体を用いて、運動負荷時と安静時の心筋血流の画像化を行う。日本全体において年間 20 万件ほどの検査が行われている循環器領域における最も多い検査の一つである。しかし、心筋血流シンチグラフィでは独特のノイズやアーチファクトが多く、得られた画像から正しく虚血性心疾患の診断を行うための画像読影は非常に解釈が難しい。特別な訓練を受けた循環器内科医や放射線科医などが現在読影を行なっているが、全国的に見ると専門的な読影医の数が非常に少ないことが問題となっている。現在の日本では放射線診断専門医は約 5,600 名余りしかおらず、その中でも心筋シンチグラフィ読影に特化した核医学専門医はさらに人数が少なく、深刻な人手不足の状態である。そこで、得られた画像の自動読影を行うことで、訓練を受けていない循環器内科医でも正しい読影を行うことができるような診断補助システム開発が期待されている。近年、人工知能の著しい技術発展が認められているが、その中核となる技術は多層のニューラルネットワークにより構成された深層学習である。特に畳み込みニューラルネットワークを用いた画像分類技術は人間を凌駕する精度での

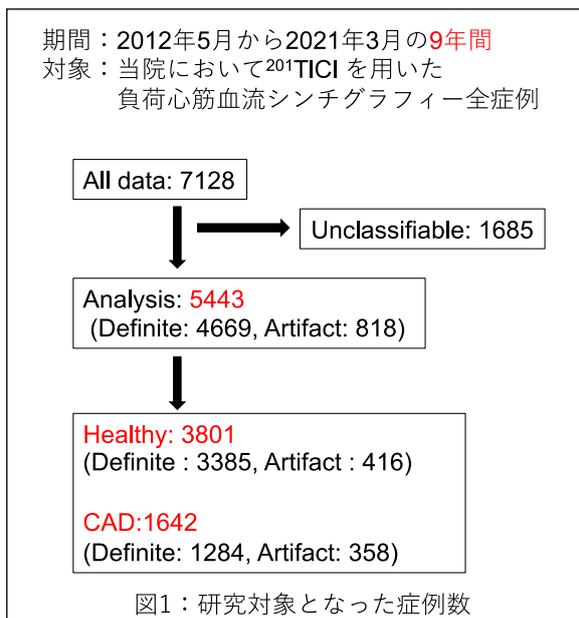
分類が可能とされており、医学分野においても様々な研究開発がなされてきた(1-3)。従来の機械学習ではデータやその特徴を人間が設計してコンピューターに与えていたが、深層学習ではデータの特徴自体を機械に自動的に最適化させる。そのため短期間での学習精度の飛躍的な向上を実現した。深層学習の重要性はその精度にある。特に画像認識のタスクにおいては、人間の認識能力を超えるほどの精度に達している(4-6)。先述の通り心筋シンチの読影医の数は不足しており、休むことなく読影を行うことができる分類器の存在は虚血性心疾患の診断において放射線科医の負担を減らし、人為的なエラーを減らしてより正確な解釈を得るために非常に有用であると言える。医療分野へも積極的に応用がされており皮膚腫瘍の分類を皮膚科医と同等の予測精度を実現している(3)。本研究では慶應義塾大学病院で過去 9 年間に実施された心筋血流シンチグラフィ画像全例を抽出し、最新の畳み込みニューラルネットワークの手法を用いて解析することで、高性能で画像解析可能な自動読影システム構築を行う。さらに同システムを併用することで、非専門医レベルの循環器内科でもシステムの補助により専門医レベルでの読影を可能とすることを目標とした、新規の診断システム開発を行いたいと考えた。

II. 対象・方法

(1) 症例の選択

本研究では、2012 年 5 月から 2021 年 3 月の 9 年間に、当院において ^{201}Tl を用いた負荷心筋シンチグラフィ検査を受けた症例全例 (7128 症例) を対象とした解析を行った。全症例の中からラベル付けが困難であった 1631 症例を除外し、5443 症例を対象とした。放射線診断科の診断レポートを参照して、画像を正常画像群 3801 症例 (確定診断 3385 症例、アーチファクト画像 416 症例)、及び虚血性心疾患群

1642 症例（確定診断 1284 症例、アーチファクト画像 358 症例）に割り付けを行った（図 1）。



(2) 解析環境の構築

深層学習のうち、画像解析に特化した畳み込みニューラルネットワークによる解析を行うため、解析環境の構築を行った。研究室内に、GPU (Graphics Processing Unit)を搭載した解析専用のGPGPUサーバーの設置を行った。設置したサーバー内での解析を行うために、docker システムをベースとした環境構築を行った。科学技術計算を行うパッケージである Anaconda を基本環境とし、さらに Tensorflow、あるいは Pytorch などの深層学習用のフレームワークを用いて、python 言語による解析が可能な環境の構築を行った（図 2）。

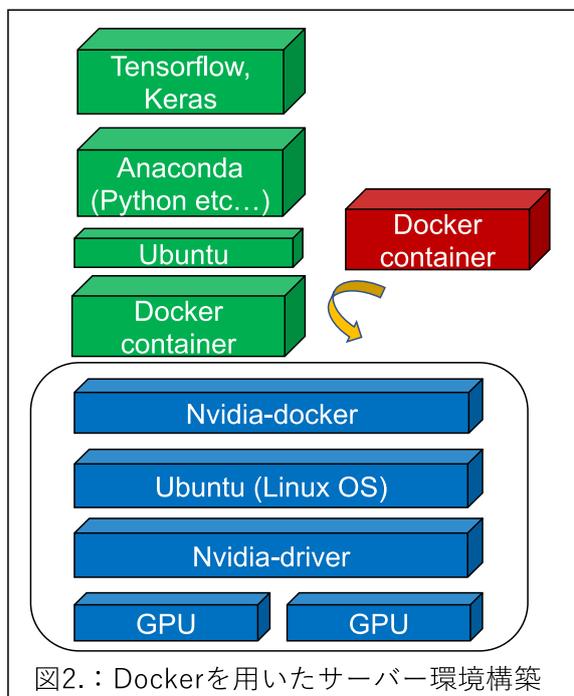
(3) モデルの学習

各症例から画像を抽出し、3次元畳み込みニューラルネットワークを用いて特徴抽出を行った後に、年齢・性別の情報を加えて、「正常画像」と「冠動脈疾患画像」を分類するように学習を行った。判定の汎化性能を向上させるために、データ拡張、L2 正則化、バッチ正規化などの手法を組み合わせた学習を実行した。

(4) モデルの性能評価

全症例のうち、あらかじめ 10%のデータセットをテスト用のデータセットとして抽出し、学習に用いるデータセットとは独立して準備を行った。学習済みモデルの性能評価のために、テスト用データセットを用い

て精度の評価を行った。またさらに、テストデータのうち診断が確定的である症例、あるいはアーチファクトやノイズが存在するために核医学専門医であっても診断困難であるような症例を抽出し、それぞれにおける性能の評価を行なった。



(5) 医師との精度比較検証

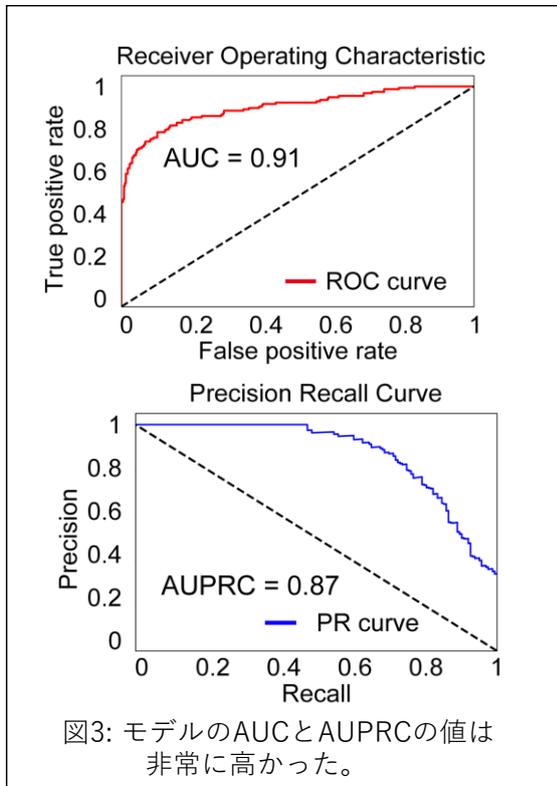
構築したモデルの有用性がどの程度であるか検証を行うため、核医学を非専門とする循環器内科医による読影結果との比較を行った。まずは AI による診断を見ずに循環器内科医が負荷心筋シンチグラフィー検査の読影を行った。次に AI の診断結果を提示して循環器内科医が診断を行った。診断精度、あるいは診断に要する時間など、改善が見られるかどうか検証を行った。

III. 結果

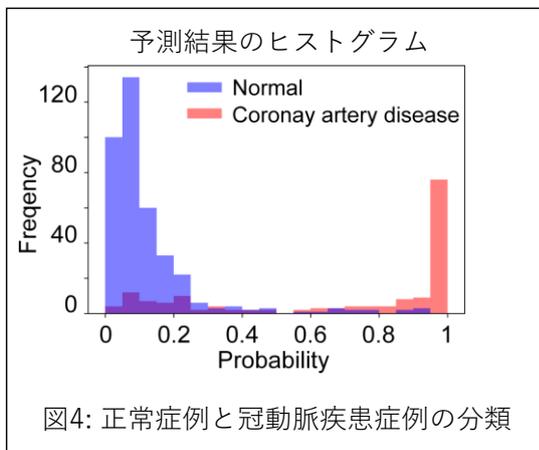
(1) モデルの性能評価

モデルの学習を行い、テストデータにおいて精度の検証を行った。分類の精度検証のために縦軸に感度、横軸に偽陽性率 (False Positive Rate) をプロットした ROC 曲線 (Receiver Operatorating Characteristic curve) を作成し、AUC (Area Under Curve: 曲線の下の面積) を算出した。さらに横軸に再現率、縦軸に適合率をとったグラフである PR curve (Precision-recall

curve)を作成し、AUPRC (Are Under PR curve)を算出した。結果として、AUC 0.91、AUPRC 0.87 という非常に高い精度で、「正常症例」、「冠動脈症例」を診断することが可能であった (図 3)。



また正常症例と、冠動脈疾患をどの程度きれいに分離可能であるか検証するために、診断確度を横軸にとったヒストグラムの作成を行った。正常症例は、冠動脈疾患である確率が非常に低い地点に大多数の症例が位置しており、対して冠動脈疾患症例は、冠動脈疾患である確率が非常に高い地点に大多数の症例が位置していることが判明し、我々の構築したモデルは非常に高い精度で冠動脈疾患の画像を分類可能であることが判明した (図 4)。

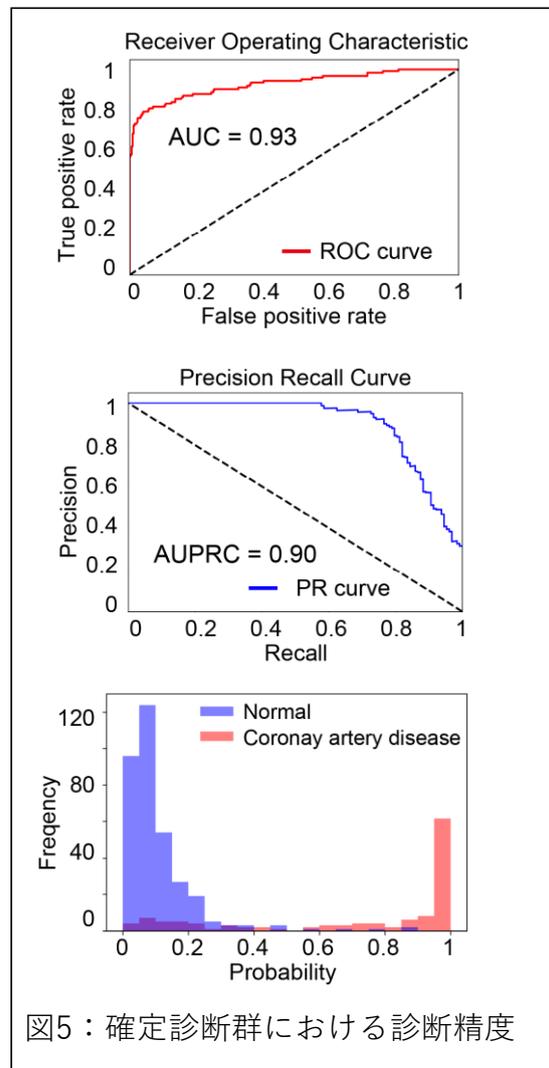


これは過去の研究と比較しても類を見ない高い精度であり、大規模な心筋シンチグラフィ検査の診断システムの中では最も精度が高い。

(2) アーチファクト症例における精度

次に、負荷心筋シンチグラフィ検査の診断レポートをもとに、画像診断が確定的である「確定診断群」と、アーチファクトやノイズが存在するために診断がやや不確かである「アーチファクト群」に分類し、それぞれの群における診断精度の検証を行った。

確定診断群は、全データセットのうち 86%を占めていた。確定診断群においては、AUC=0.93, AUPRC = 0.90 という非常に高い精度での分類が可能であった。またヒストグラムの結果からもほとんどの症例がきれいに分類可能であることが示されている (図 6)。



一方、全体のデータセットのうち 14%をしめるアーチファクト画像においては、AUC = 0.74, AUPRC = 0.78 と診断精度はやや低下した。今後さらにアーチフ

アクト画像をどのように見抜いていくかさらなる検討が必要だと思われる。

(3) 医師との診断精度比較

核医学非専門である循環器内科医による負荷心筋シンチグラフィと、AI による診断精度の比較を行った。また実際の診療現場において AI を活用する際に、AI をガイドとした臨床医の診断を行うことが想定されるため、AI ガイドによる臨床医の診断も同時に行った。診断精度は、AI 診断が最も高く、AI ガイド、循環器内科と続いた。また診断に要した時間は、通常の診断では 30 分程度かかっていたのに対して、AI ガイドでは 10 程度で実施が可能であり、実際の診療現場に非常に有用である可能性が示された。

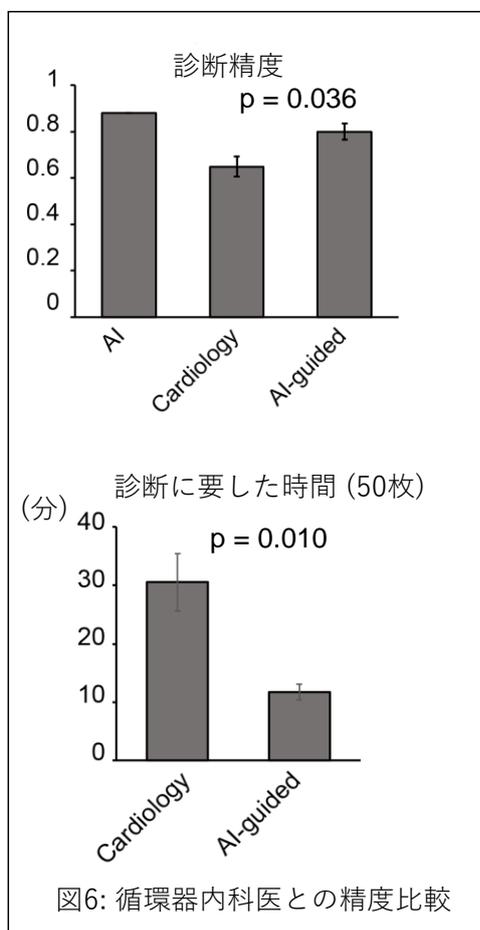


図6: 循環器内科医との精度比較

IV. 考察

本研究において、最新の人工知能技術を用いることで、負荷心筋シンチグラフィ検査に対する高精度での自動診断システムが構築できたことが判明した。今までに負荷心筋シンチグラフィ検査に対する自動診断として、人工ニューラルネットワークを用いたシステムが開発されているが、畳み込みニューラルネッ

トワークが登場する以前のシステムである(7, 8)。畳み込みニューラルネットワークの登場により画像解析精度が劇的に改善していることが報告されていることから、最新のネットワークを用いたシステム開発が必要とされている。負荷心筋シンチグラフィの画像解析は、テクニカルに難しいこともあってか今まで人工知能を用いた解析の報告は多くはなかった。類似研究としては、2021年 Liu Hらが *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 誌に報告した論文がある(9)。同論文では 37243 症例もの症例に対して診断レポートを指標として正常画像か、冠動脈疾患画像か判定を行っており、我々の研究に類似しているが、テストデータでの AUC 0.872 と、我々の AUC 0.91 よりも精度が劣る。理由としては、彼らは心筋シンチ画像を 2D profile 画像という特殊な画像に変換して 2D の画像として処理を行なっていることから画像の特徴を失った状態での解析を行なっていることが考えられる。対して、我々は画像の 3 次元情報を保ったまま解析を行なっている事から、画像の情報を損なう事なく解析できたために精度が非常に高かったのではないかと考えられる。また同様に 2021 年に Otaki H らも *JACC Cardiovascular imaging* 誌に自動診断システムの投稿を行なっている(10)。同論文では、各冠動脈の枝の異常を予測している事からより難しい予測を行なっていることもあるが、AUC 0.8 であった。先行研究の精度も実用レベルとしては十分高いと考えられるが、我々の研究での精度はそれをさらに上回る結果であった事から、実用面での活用が非常に期待される。

また実際の臨床医の診断精度の比較により、AI を用いたほうが、診断精度も、診断に要した時間も格段に上がることが証明されており、今後本システムを導入することで診断補助システムとして非常に有用であることは間違いがないと考えられる。

一方本システムの最も大きいリミテーションは、単施設での研究であることである。実際に他施設において有用なシステムであるかどうかはまだ検証されておらず、今後検証が待たれるところである。複数施設での大規模データセットを加えることで、今後真に汎用性のあるシステムを構築し、実臨床でも有用性の高い負荷心筋シンチグラフィ検査の自動診断システムを構築していきたい。

V. 結論

我々は、人工知能を用いた画像解析技術である畳み

込みニューラルネットワークを用いて、高い精度で冠動脈疾患を自動診断するシステムの構築に成功した。同システムを用いることで循環器内科医の診断精度が向上することが示されており、今後臨床現場における補助システムとして非常に有望であると考えられる。実臨床応用に向けてさらなる改良を進めていきたい。

VI. 研究協力者

秋山 工・慶應義塾大学・学生
岩渕 雄・慶應義塾大学・助教
橋本正弘・慶應義塾大学・助教
陣崎雅弘・慶應義塾大学・教授
福田恵一・慶應義塾大学・教授

VII. 参考文献

1. Ting DSW, Cheung CY, Lim G, Tan GSW, Quang ND, Gan A, et al. Development and Validation of a Deep Learning System for Diabetic Retinopathy and Related Eye Diseases Using Retinal Images From Multiethnic Populations With Diabetes. *Jama*. 2017;318(22):2211-23.
2. Ehteshami Bejnordi B, Veta M, Johannes van Diest P, van Ginneken B, Karssemeijer N, Litjens G, et al. Diagnostic Assessment of Deep Learning Algorithms for Detection of Lymph Node Metastases in Women With Breast Cancer. *Jama*. 2017;318(22):2199-210.
3. Esteva A, Kuprel B, Novoa RA, Ko J, Swetter SM, Blau HM, et al. Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature*. 2017;542(7639):115-8.
4. Krizhevsky A, Sutskever I, Hinton GE. ImageNet classification with deep convolutional neural networks. *Proceedings of the 25th International Conference on Neural Information Processing Systems; Lake Tahoe, Nevada*. 2999257: Curran Associates Inc.; 2012. p. 1097-105.
5. He K, Zhang X, Ren S, Sun J. Deep Residual Learning for Image Recognition. *ArXiv e-prints [Internet]*. 2015 December 1, 2015; 1512. Available from: <http://adsabs.harvard.edu/abs/2015arXiv15120338>

5H.

6. Szegedy C, Liu W, Jia Y, Sermanet P, Reed S, Anguelov D, et al. Going Deeper with Convolutions. *ArXiv e-prints [Internet]*. 2014 September 1, 2014; 1409. Available from: <http://adsabs.harvard.edu/abs/2014arXiv1409.4842>
7. Nakajima K, Matsuo S, Wakabayashi H, Yokoyama K, Bunko H, Okuda K, et al. Diagnostic Performance of Artificial Neural Network for Detecting Ischemia in Myocardial Perfusion Imaging. *Circ J*. 2015;79(7):1549-56.
8. Nakajima K, Okuda K, Matsuo S, Kiso K, Kinuya S, Garcia EV. Comparison of phase dyssynchrony analysis using gated myocardial perfusion imaging with four software programs: Based on the Japanese Society of Nuclear Medicine working group normal database. *J Nucl Cardiol*. 2017;24(2):611-21.
9. Liu H, Wu J, Miller EJ, Liu C, Yaqiang, Liu, et al. Diagnostic accuracy of stress-only myocardial perfusion SPECT improved by deep learning. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021;48(9):2793-800.
10. Otaki Y, Singh A, Kavanagh P, Miller RJH, Parekh T, Tamarappoo BK, et al. Clinical Deployment of Explainable Artificial Intelligence of SPECT for Diagnosis of Coronary Artery Disease. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2021.

脳血管内皮を標的とした 脳卒中、認知症の革新的治療法の開発

国立循環器病研究センター脳神経内科・医長
服部 頼 都

I. 緒言

頸動脈狭窄/閉塞症は、脳梗塞の主要な原因疾患であり、かつ、脳梗塞を発症せずとも認知機能障害を惹起し、血管性認知障害(VCI)の原因疾患の1つである。世界における本疾患の患者数は、515報のメタ解析等の結果から、30~79歳において、1.5%程度と推定されており、約5,779万人と推計される(1)。当該推定に基づくと、日本における患者数は、約130~250万人と推計される。

脳梗塞の発症のリスクについて、無症候性の頸動脈狭窄患者を対象に米国及びカナダで実施された大規模な臨床試験であるACASにおいて、中等度以上(径狭窄率60%以上)の頸動脈狭窄患者では、内科治療(アスピリン及びリスクファクターの管理)における5年間の脳梗塞のリスクが11.0%であることが報告されている。また、認知機能障害の発現リスクについて、無症候性高度頸動脈狭窄症患者(210例)を対象に認知機能の変化を前向きに36ヶ月間評価した結果、健康成人と比較して認知機能が低下した患者(Mini mental state examination 3点以上低下)が多く(2)、無症候性の中等度以上(径狭窄率50%以上)の頸動脈狭窄症患者(82例)において、コントロール群と比較して認知機能の低下が認められ(3)、さらに、中等度以上頸動脈狭窄症患者(25例)において、コントロール群と比較してストループ検査の結果が有意に悪化し(5)、無症候性頸動脈狭窄/閉塞症はVCIの代表的な原因疾患の1つである。

現在、頸動脈狭窄/閉塞症に対して、認知機能を改善する有効な治療法は確立されておらず、新たな治療法の開発が期待されている。

頸動脈狭窄/閉塞症の原因として、血管内皮傷害が重要な役割を果たしており(4)、血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現が低下し血管内皮機能低下が発症を惹起することが報告されている(5)。eNOSは、NOによる血管拡張を介して血流を改善

すると共に、血管内皮傷害の修復にも関与し、更にeNOS自身を活性化する。我々は、頸動脈狭窄症モデルマウスにおいて、「長寿遺伝子」*SIRT1*がeNOSを脱アセチル化(活性型)し、脳血流増加を介して認知機能が改善し(6)、頸動脈閉塞症モデルマウスにおいて、脳血流量の低下を抑制して海馬の虚血性遅発性神経細胞死を抑制した(7)ことを報告しており、頸動脈狭窄/閉塞症における*SIRT1*の有効性の非臨床POCが得られている。

以上より、血管内皮を標的として脳血流量を増加させる新たな治療法として、NAD⁺/SIRT1経路を活性化させる作用を有するレスベラトロールに着目した。トランスレスベラトロールの薬理作用は、ホスホジエステラーゼ4に結合し、活性を阻害するとcAMPが上昇する。cAMPの上昇にてCamKKβ-AMPK経路を活性化し、その結果、細胞内NAD⁺を増加させ、SIRT1活性を上昇させる(8)。その後、*SIRT1*はeNOSの脱アセチル化を介して活性型へ変換し、eNOS-NO軸によって脳血管を拡張させる(6,9)ことが期待される。

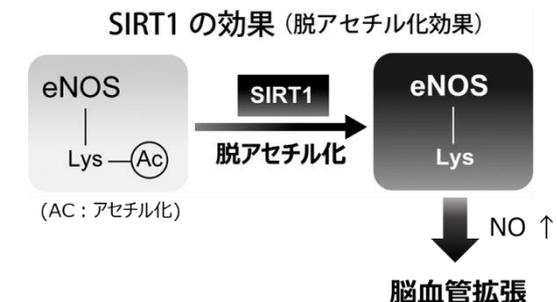
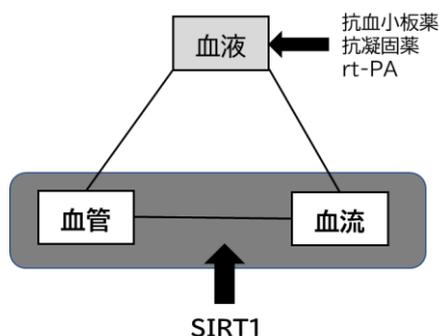


図1 SIRT1は、血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)を脱アセチル化し、活性型eNOSへ変換し、一酸化窒素(NO)を増加し脳血管拡張へ導く。

動物性脂肪を大量摂取するフランス人の心血管疾患、脳卒中の発症率・死亡率が低いのは、適度な赤ワイン摂取によるとされる「フレンチパラドックス」(10)において、ブドウの果皮や赤ワインに含まれるポリフェノールの一種のレスベラトロールが動脈硬化を来すメカニズムを抑制していると考えられるようになり、細胞内 NAD⁺ の増加を介して長寿遺伝子と称される SIRT1 を活性化させる(8,11)。

心血管障害のみならず脳血管障害関連疾患において、これまで、Virchow の血栓形成の 3 要因(血液、血管、血流)の中でも血液成分のみに注目し、種々の抗血小板療法、抗凝固療法が現在実臨床で行われている。しかしながら、この血液成分のみを標的とした従来の治療戦略では、治療中、常に出血という重篤な合併症の危険性が懸念される。さらに、VCI の予防において、抗血栓薬使用のエビデンスは乏しい(12)。このような状況の中で、2014 年に初めてレスベラトロールによる VCI または血管内皮機能改善の報告を認めた。レスベラトロールは、高齢マウス(24 か月齢)の酸化ストレスを軽減して血管内皮機能を改善させることで Neurovascular function を救済した(13)。さらに、レスベラトロールは、抗アポトーシス効果によって VCI モデルラットの認知機能を改善された(14)。さらに、我々は、前述のごとく、頸動脈狭窄症モデルマウスを使用して、SIRT1 が eNOS を脱アセチル化(活性型)し、脳血流増加を介して認知機能が改善し(6)、頸動脈閉塞症モデルマウスにおいて、脳血流量の低下を抑制して海馬の虚血性遅発性神経細胞死を抑制した(7)ことを明らかにした。つまり、レスベラトロールは、Virchow の血栓形成の 3 要因の血液以外の「血管」と「血流」に焦点を当てた血栓防止機構によって、



認知機能の改善/悪化予防に貢献できることが期待される。

図2 Virchow の血栓形成の 3 要因

II. 対象・方法

本研究では、SIRT1 活性化薬レスベラトロールを使用して、人の生体内でレスベラトロールが SIRT1 活性化を介して脳血流を増加させ、そして最終的に認知機能障害の軽減に寄与するかどうかの追求を行う。

脳血流低下、知機能低下を惹起しうる、径狭窄率 >50% の内頸動脈狭窄症の患者を選択基準とし、インフォームドコンセントで事前同意が得られた患者をレスベラトロール群(150 mg/日)、対照薬群(プラセボ)に無作為に割り付けるランダム化比較試験を施行する。レスベラトロール群の 150 mg/日の設定根拠として、以下の 2 報告がある。50~75 歳の健常な男女(23 例)を対象として、レスベラトロール 200 mg/日を 26 週間投与した無作為化プラセボ対照並行群間試験において、記憶の保持は、プラセボと比較してレスベラトロール群は有意に改善し(15)、45~85 歳の健常女性 80 名(プラセボ群 41 例、レスベラトロール摂取群 39 例)を対象として、レスベラトロール 150 mg/日を 14 週間投与した無作為化プラセボ対照並行群間試験を行ったところ、即時記憶、遅延再生、カテゴリの記憶の流暢さ、名称記憶、図形、文字の記憶テスト、視覚探索と注意機能評価、総合的認知機能について、プラセボと比較してレスベラトロール群は有意に改善した(16)。

本特定臨床研究を行うに際して、至適サンプルサイズを決定するために、国立循環器病研究センター単施設後ろ向き観察研究を行った。2020 年 7 月より 2021 年 8 月までに国立循環器病研究センターを受診した、トランスレスベラトロール 30mg/日を摂取、または、非摂取の無症候性の中等度以上頸動脈狭窄症または閉塞症患者を対象とした。選択基準は、(1) 90 歳未満、(2) 頸動脈エコーにおいて、狭窄部の peak systolic velocity が 130 cm/s 以上(径狭窄率 >50% に相当(17)) の無症候性頸動脈中等度以上狭窄症または閉塞症、(3) 認知機能検査(Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive subscale 13: ADAS-Cog 13 と Montreal Cognitive Assessment: MoCA) を 6 か月から 1 年のインターバルにおいて測定している、(4) ¹⁵O ガス positron emission tomography (PET) も同様に、6 か月から 1 年のインターバルにおいて測定している患者である。主要アウトカムは、観察期間における ADAS-Cog 13 の変化量(差分解析)の比較である。副次アウトカムは、(1) 観察期間にお

ける MoCA の変化量 (差分解析) の比較、(2) ¹⁵O ガス PET での脳血流量の変化量 (差分解析) の比較である。国立循環器病研究センター研究倫理審査委員会での承認を受けて本研究を開始した (研究課題番号: R20113)。

III. 結果

1. 患者背景

34人のレスベラトロール摂取患者 (RES 群) と 26人のレスベラトロール非摂取患者 (Non-RES 群) が、選択基準を満たした。平均年齢は、Non-RES 群で 75.8 歳、RES 群で 77.8 歳であり、男性の割合は、Non-RES 群で 76.9%、RES 群で 73.5%であった。ベースラインの ADAS-Cog 13 は、Non-RES 群で 15.7±6.4 点、RES 群で 17.0±8.5 点であった。MoCA は、Non-RES 群で 23.4±3.7 点、RES 群で 23.6±3.7 点であった。ADAS-Cog 13、MoCA ともに両群で有意差は認めず、MoCA の点数を MMSE に換算すると、MMSE<28 点となり (18)、軽度認知障害 (MCI) の範疇であった。表 1 の患者背景で 2 群で有意差は認めなかった。

表 1 患者背景

	Non-RES (n=26)	RES (n=34)
年齢 (歳)	75.8	77.8
男性 (%)	2 (76.9)	25 (73.5)
喫煙 (%)	13 (50.0)	15 (44.1)
飲酒 (%)	18 (69.2)	17 (50.0)
冠動脈疾患 (%)	4 (15.3)	5 (14.7)
心房細動 (%)	8 (30.8)	10 (29.4)
抗血小板療法 (%)	6 (23.1)	5 (14.7)
抗凝固療法 (%)	9 (34.6)	10 (29.4)
降圧療法 (%)	22 (84.6)	30 (88.2)
スタチン内服 (%)	21 (80.8)	25 (73.6)
収縮期血圧 (mmHg)	137.7±19.9	139.4±22.3
拡張期血圧 (mmHg)	72.0±13.9	69.3±13.6
HbA1c (%)	6.3±0.6	6.1±0.7
中性脂肪	126.3±67.7	139.4±82.4
LDL-C	78.5±21.3	82.8±28.0
HDL-C	40.2±11.2	53.9±14.9
CRP	0.07±0.09	0.11±0.17

2. 認知機能の変化

ADAS-Cog 13 で測定した認知機能の変化について、遅延再生、再認、記憶ドメイン (遅延再生、見

当識、再認、教示再起)、合計点で、RES 摂取と認知機能改善に有意な関連を認めた (表 2)。MoCA については、遅延再生、合計点を含め、いずれの項目においても 2 群で有意差を認めなかった (表 3)。

表 2 ADAS-Cog 13 で測定した認知機能の変化量

	Non-RES (n=26)	RES 30mg/day (n=34)	p value	95% CI	
遅延再生	0.54 ± 1.865	-0.94 ± 2.088	0.007	0.415	2.551
再認	0.46 ± 2.064	-0.76 ± 2.284	0.041	0.050	2.396
記憶ドメイン	0.92 ± 3.463	-1.62 ± 2.861	0.004	0.800	4.269
合計	1.13 ± 4.774	-2.48 ± 5.043	0.008	0.974	6.245

表 3 MoCA で測定した認知機能の変化量

	Non-RES (n=26)	RES 30mg/day (n=34)	p value	95% CI	
遅延再生	-0.15 ± 1.736	0.41 ± 1.672	0.207	-1.452	0.321
合計	-0.08 ± 2.799	0.24 ± 3.660	0.719	-1.981	1.357

3. 脳血流量の変化

¹⁵O ガス PET で脳血流量を測定した。当センターの診療で用いられている ROI (図 3) を元に、変化量を解析した。表 4 のように、脳血流量の前後差は、右視床、右前大脳動脈領域、右中大脳動脈領域、右後大脳動脈領域で RES 摂取と脳血流量増加との有意な関連を示した。

このことから、RES は、脳血流量を増加させ、認知機能を改善することを示唆する結果を得た。

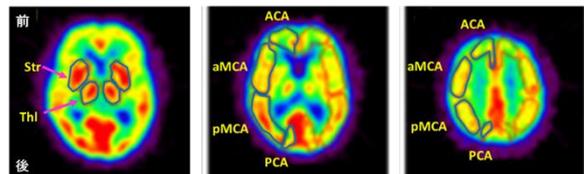


図 3 ¹⁵O ガス PET の脳血流量の ROI

Str: 基底核、Thl: 視床、ACA: 前大脳動脈、

MCA: 中大脳動脈、PCA: 後大脳動脈、a: 前方領域、

p: 後方領域

表 4 ¹⁵O ガス PET で測定した脳血流量の変化量 (前後差)

	Non-RES (n=26)	RES 30mg/day (n=34)	p value	95% CI	
右視床	0.147	0.926	0.048	-0.1549	-0.0008
右前大脳動脈	-0.538	0.605	0.010	-0.1999	-0.2868
右中大脳動脈前部	-0.0316	0.551	0.028	-0.1636	-0.0098
右中大脳動脈後部	-0.0319	0.564	0.035	-0.1701	-0.0065
右後大脳動脈	-0.0549	0.471	0.038	-0.1982	-0.0591

4. 特定臨床研究を行うためのサンプルサイズ測定と準備状況

本研究は、RES 投与群とプラセボ群を比較する二重盲検ランダム化比較試験の予備実験として行い、

本研究の主要アウトカムの ADAS-Cog 13 の合計点の変化量を元に、次相の臨床試験のサンプルサイズ算出を行った。

主要評価項目の解析の際にはベースライン時の ADAS-Cog 13 の合計点を共変量とした共分散分析により群間の比較を行う。ただし、限定的なデータから推定された相関係数の点推定値は参考にしにくいことから、保守的に無相関を仮定する。この下で、両側有意水準を 5%、見込みの対立仮説上での検出力を 80%とした場合に必要な症例数は片群 64 例となる。以上の根拠と 10%程度の脱落等を想定し、次相の介入試験における目標登録症例数を 142 例とする。

この目標症例数を元に、国立循環器病研究センターデータサイエンス部の支援の下、介入試験のプロトコル作成を行うことができ、臨床研究倫理審査委員会へ提出する。

IV. 考察

本研究で、(1) レスベラトロールと脳血流増加、(2) レスベラトロールと認知機能（特に記憶）の改善、に関連を認めることができた。レスベラトロールは、ホスホジエステラーゼを阻害して cAMP を分解抑制し、NAD⁺/SIRT1 経路を活性化させて、eNOS を活性化型に変換し脳血管拡張を介して脳血流を改善し、最終的に認知機能改善に寄与したことが考えられた。

この予備研究の結果を元に、レスベラトロール 150mg/日の投与が VCI の予防に寄与するかどうかを特定臨床研究で検討していく。

NAD⁺/SIRT1 経路を活性化可能な要素として、レスベラトロールのほかに、nicotinamide、nicotinamide mononucleotide の投与が挙げられる。VCI のモデルである慢性脳低灌流モデルマウスに nicotinamide を投与すると、oligodendrocyte 分化のマーカーの CnPase や軸索障害でも減少しうる synaptophysin が増加し、虚血性白質傷害を軽減する(19)。しかしながら、nicotinamide は、人での至適用量、至適投与期間が検討されていない。nicotinamide mononucleotide に関しては、VCI モデルへの投与研究は行われていない。一方、レスベラトロールはすでに健常者での至適用量、至適投与期間が検討されている。さらに、レスベラトロールの安全性も特筆すべきである。重篤な有害事象は、再発難治性の多発性骨髄腫患者に高用量のレスベラ

トロール (5,000 mg/日) を投与した非盲検非対照試験において、腎障害が発現し、試験が中止された(20)のみであり、150 mg/日の長期投与で有害事象は認められていない。このことから、レスベラトロールは、VCI の一次予防、二次予防に安全に貢献する可能性がある。

V. 結論

レスベラトロールは、頸動脈狭窄症または閉塞症を原因とする VCI の認知機能悪化予防に有意に関連しており、前向きの特定期臨床研究においてもレスベラトロールの VCI における予防効果が十分に期待される。

VI. 研究協力者

吉本武史・国立循環器病研究センター 脳神経内科 医師

VII. 参考文献

1. Song P, Fang Z, Wang H, et al. Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, meta-analysis, and modelling study. *Lancet Glob Heal*. 2020;8:e721–9.
2. Balestrini S, Perozzi C, Altamura C, et al. Severe carotid stenosis and impaired cerebral hemodynamics can influence cognitive deterioration. *Neurology*. 2013;80:2145–50.
3. Lal BK, Dux MC, Sikdar S, et al. Asymptomatic carotid stenosis is associated with cognitive impairment. *J Vasc Surg*; 2017;66:1083–92.
4. Ross R. Inflammation or Atherogenesis. *N Engl J Med*. 1999;340:115–26.
5. Rundek T, Hundle R, Ratchford E, et al. Endothelial dysfunction is associated with carotid plaque: A cross-sectional study from the population based Northern Manhattan Study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2006;6:35.
6. Hattori Y, Okamoto Y, Maki T, et al. Silent information regulator 2 homolog 1 counters cerebral hypoperfusion injury by deacetylating endothelial nitric oxide

- synthase. *Stroke*. 2014;45:3403–11.
7. Hattori Y, Okamoto Y, Nagatsuka K, et al. SIRT1 attenuates severe ischemic damage by preserving cerebral blood flow. *Neuroreport*. 2015;26:113–7.
 8. Park SJ, Ahmad F, Philp A, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*. 2012;148:421–33.
 9. Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:14855–60.
 10. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992;339:1523–6.
 11. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003;425:191–6.
 12. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2011;42:2672–713.
 13. Toth P, Tarantini S, Tucsek Z, et al. Resveratrol treatment rescues neurovascular coupling in aged mice: Role of improved cerebrovascular endothelial function and downregulation of NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306:H299-308.
 14. Zhang Y, Li Y, Wang Y, et al. Effects of resveratrol on learning and memory in rats with vascular dementia. *Mol Med Rep*. 2019;20:4587–93.
 15. Veronica Witte A, Kerti L, et al. Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *J Neurosci*. 2014;34:7862–70.
 16. Evans HM, Howe PRC, Wong RHX. Effects of resveratrol on cognitive performance, mood and cerebrovascular function in post-menopausal women: a 14-week randomised placebo-controlled intervention trial. *Nutrients*. 2017;9:27.
 17. Jahromi AS, Cinà CS, Liu Y, et al. Sensitivity and specificity of color duplex ultrasound measurement in the estimation of internal carotid artery stenosis: A systematic review and meta-analysis. *J Vasc Surg*. 2005;41:962–72.
 18. Bergeron D, Flynn K, Verret L, et al. Multicenter Validation of an MMSE-MoCA Conversion Table. *J Am Geriatr Soc*. 2017;65:1067–72.
 19. Liu B, Zhao G, Jin L, et al. Nicotinamide Improves Cognitive Function in Mice With Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Front Neurol*. 2021;12:596641.
 20. Popat R, Plesner T, Davies F, et al. A phase 2 study of SRT501 (resveratrol) with bortezomib for patients with relapsed and or refractory multiple myeloma. *Br J Haematol*; 2013:714–7.

エクソソームを介した造血幹細胞と心血管系疾患の クロストークを理解する

京都大学高等研究院・特定拠点准教授
山本 玲

I. 緒言

造血幹細胞は、自己複製能と多分化能という特徴を有した細胞であり、一生涯にわたって、あらゆる造血系を維持している(1)。加齢に伴い造血幹細胞に特異的な遺伝子変異が蓄積し、血液疾患の発症のみならず動脈硬化・心血管障害などに関与することが近年明らかになってきている(2)。しかし、その詳細なメカニズムは未だ不明であり、このような生活習慣病を、造血幹細胞を中心とした造血系から捉え、解明し、治療しようという試みは非常に新規性が高い。本研究では、加齢に伴い造血幹細胞に蓄積する遺伝子変異と動脈硬化の関連を明らかにし、そのメカニズムの解明を行う。新たな治療戦略構築の基盤ともなり得ると期待できる。

造血幹細胞は、健常者においても加齢に伴って DNMT3A や TET2 や RNA スプライシング分子 (SF3B1、SFRS2、U2AF1) などの遺伝子変異が蓄積することが近年明らかとなり、これはクローナル造血と呼ばれる(3)。このクローナル造血は将来の血液疾患のリスクにもなり、さらに興味深いことに、心血管障害のリスクにもなることが近年明らかとなっている。申請者らの知見により、若齢造血幹細胞を骨髄移植することにより心不全や動脈硬化モデルが軽快することが分かっている(論文投稿中)。一方、iPS 細胞などを用いた幹細胞治療による心機能や心臓修復に関する研究はなされているが、そのメカニズムは注入された幹細胞からのエクソソームなどの分泌因子によるものであると考えられている。そこで申請者は、これらの知見を統合し、造血幹細胞から産生されるエクソソームを若齢・加齢・加齢特異的な遺伝子変異を有した個体で比較することにより、心機能や心血管障害に影響するエクソソームを同定できると仮説を立て、本研究課題を立案した。エクソソーム解析には大量の細胞が必要とされるが、造血幹細胞は骨髄有核細胞の 0.004% しか存在しない(4)。しかし、申請者らにより 2019 年に液体糊の成分であるポリビニルアルコール

を用いることで造血幹細胞の増幅培養が初めて可能となり(5)、造血幹細胞を 1 ヶ月で 900 倍に増幅することができるようになった。さらに、現在、別のポリマーを用いることにより 2000 倍の増幅培養も可能となっており、この新規技術を用いることにより非常にまれな細胞集団である造血幹細胞のエクソソーム解析が初めて可能となる。

造血幹細胞という非常にまれな細胞を対象としたエクソソーム研究はこれまで行われておらず、さらに、心疾患など生活習慣病を造血幹細胞の加齢の観点から捉える点は非常に独創性が高い。エクソソーム研究の先駆者である Raffai 教授と、画期的な造血幹細胞増幅培養の技術を組み合わせることにより、かつて困難とされていた造血幹細胞におけるエクソソーム解析を世界に先駆けて実行させることができる。

以上のように、(1) 造血幹細胞から産生されるエクソソームに着目 (2) そのエクソソームの加齢や加齢特異的な遺伝子変異による変化に着目 (3) 造血幹細胞を増幅培養できる新規培養技術 (4) 造血幹細胞から産生されるエクソソームをマウスに注入し心血管系疾患に対する影響を検討 という特色があり、これらを統合することにより心血管系疾患と造血幹細胞の新しいクロストークを提唱できると期待できる。

II. 対象・方法

マウス骨髄採取

マウスの下肢・骨盤・背骨より骨髄を採取し、cKit-APC (2B8) 抗体で 10^7 細胞あたり 0.2 uL の量で 30 分 4°C で染色する。PBS wash 後、Anti-APC beads で 10^7 細胞あたり 0.2 uL の量で 15 分 4°C で染色する。PBS wash 後、LS カラムで cKit 陽性細胞を濃縮する。その後、CD34-FITC (RAM34) 2.5 uL、CD150-PE-Cy7 1.0 uL、CD41-BV421 1.0 uL、cKit-APC 0.5 uL、Sca1-PE 0.5 uL、Lineage マーカー 2.5 uL で染色する (抗体量は 10^7 細胞あたり)。30 分染色後、ソーティングを行った。

造血幹細胞の培養・培地回収

マウス造血幹細胞 (CD150⁺CD34⁺sKit⁺Sca1⁺Lineage⁺) を、F12 基本培地に 0.1% ポリマー、マウス TPO 100 ng/mL、マウス SCF 10 ng/mL 存在下で培養する。1 日おきに培地を交換する。1 週間後より、培地交換の際に培地を回収し、4°C で保存する。培養開始後 4 週間培地を集め、800g x 30 min で遠心し、0.45 μm フィルターで細胞残渣物などを除去する。

III. 結果

マウス造血幹細胞の培養系の確立

エクソソームを単離・解析及びマウスに輸注するためには大量のエクソソームが必要であり、必要細胞数は 10⁷ のオーダーである。しかし、マウス造血幹細胞は骨髄中の CD150⁺CD34⁺CD41⁺cKit⁺Sca1⁺Lineage⁺ に濃縮 (図 1) されるが、骨髄有核細胞の 0.004% 以下と非常にまれな細胞であり、マウス 1 匹より 10³ のオーダーでしか採取できず、1000 匹のマウスを使うのは現実的ではない。そこで我々が近年開発したポリビニルアルコールを用いた造血幹細胞の維持増幅培養法(5)をさらに改善した。これは、ポリビニルアルコールと同様にポリマーの一種であり、これを用いることにより造血幹細胞を半年以上にわたり培養可能で、さらに 2000 倍以上に増幅できる。実際、これにより造血幹細胞画分が非常に増幅され (図 2)、約 1 ヶ月間培養し、定期的に培養液を回収することにより、解析に必要な量を確保できる。

マウス造血幹細胞からのエクソソーム単離

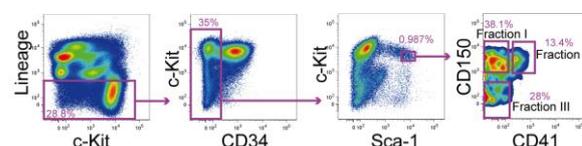
以下のマウスよりまず造血幹細胞をフローサイトメトリーにて分取した。使用したマウスは、C57BL/6 (10 週齢、加齢マウス C57BL/6 (60 週齢)、共同研究者の京都大学医学部教授 小川誠司先生よりいただいた Dnmt3a コンディショナルノックアウトマウス、Tet2 コンディショナルノックアウトマウス (10-20 週齢) である。各々のマウス造血幹細胞を確立した新規増幅培養法を用いて培養した。培養 1 週間後より、隔日で培養液を回収した。培養液は遠心及び 0.22 μm の濾過フィルターを用いて細胞を除去した。定期的に培養開始後 4 週まで培養液を回収を継続した。エクソソームは 4°C 保存で安定しており、回収した培養液を共同研究者であるカリフォルニア大学サンフランシスコ校 Professor of Surgery Division of Vascular and Endovascular Surgery の Robert Raffai 先生へエクソソーム単離をお願いした。Robert

Raffai 先生は、高品質のエクソソーム単離法を開発している (図 3)。

マウス造血幹細胞由来エクソソームの輸注

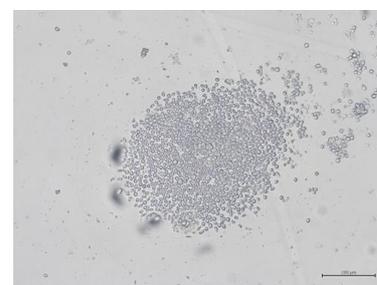
エクソソームを単離しエクソソームが実際、単離できたか確認を行った (図 4)。実際、エクソソームが単離されたことを確認し、その in vivo における意義を確認するために、野生型マウス及び動脈硬化モデルマウスにエクソソームの輸注を行った。動脈硬化モデルマウスとして Western diet 下の ApoE ノックアウトマウスを用いた。エクソソームの役割をみるために、骨髄や末梢血中の血液細胞の内訳や動脈硬化の進展を評価する必要がある。輸注後、3 ヶ月後に解析予定である。具体的には、各血液細胞の割合や特に造血幹・前駆細胞の割合や血液中のコレステロール量、動脈の組織切片によるプラーク形成・ネクロシス領域の測定を行う。これにより、どの加齢特異的遺伝子変異が動脈硬化の増悪に関与するか同定することができる。さらに、輸注後定期的に末梢血の血液細胞の細胞数を計測しているが末梢血においては有意な差は現時点 (輸注後 3 週) では認められていない。

図 1 造血幹細胞の分取



マウス造血幹細胞は CD150⁺CD34⁺CD41⁺sKit⁺Sca1⁺Lineage⁺ の中に存在する細胞であり、フローサイトメトリーにて図のようなゲーティングストラテジーで分取した。

図 2 マウス造血幹細胞の増幅培養



マウス造血幹細胞 CD150⁺CD34⁺sKit⁺Sca1⁺Lineage⁺ をフローサイトメトリーにて分取後、F12 基本培地にポリマー、マウス TPO 100 ng/mL、マウス SCF 10 ng/mL 存在下で培養。1 週間培養したところの画像。

図 3 エクソソーム分離法

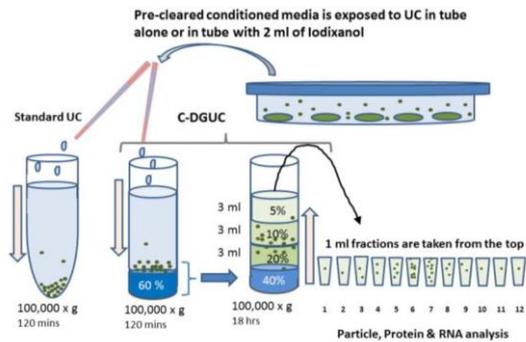
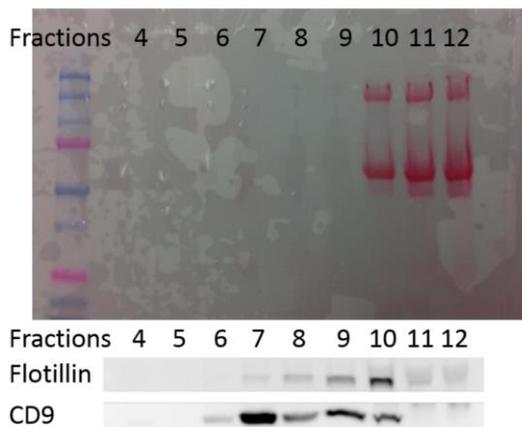


図4 マウス造血幹細胞より産生されたエクソソームの単離



蛋白のポンソー染色および Flotillin/CD9 のウェスタンブロットングにてエクソソームが単離できたことが分かる。

IV. 考察

エクソソーム研究には多数の細胞を必要とするが、本研究により、造血幹細胞の新規培養法を確立し、それにより解析に必要十分量のエクソソームを確保することができた。

最近、我々は、エクソソームが造血幹・前駆細胞に作用しアテローム性動脈硬化症の炎症状態に影響することを示した(6)。これは、様々な疾患状態におけるエクソソームが造血幹・前駆細胞を介した全身への影響が重要であることを示唆している。本研究をさらに展開し、慢性炎症（加齢）という観点より骨髓（造血幹細胞）と心臓（心血管）の臓器連関を捕らえ、従来の視点とは異なり、動脈硬化や心血管などの生活習慣病を一見無関係である造血幹細胞の加齢に伴う遺伝子変異や慢性炎症による造血幹細胞の変化に注目し捉え直すことも可能となる。造血幹細胞から様々な「生活習慣病」を再定義し病態を解明することで、治療戦略を構築する上での新しいアプローチ方法を創成できる。

V. 結論

本研究により、新規造血幹細胞培養法を用いることにより、非常にまれな細胞集団のエクソソームを解析できることが分かった。さらに、未発表データではあるが、糖尿病モデルから単離されたエクソソームが造血系に影響することも分かっており、エクソソームを介した疾患と造血幹細胞の関連は興味深いところである。

VI. 研究協力者

Robaert Raffai, Ph.D., カリフォルニア大学サンフランシスコ校 Professor of Surgery Division of Vascular and Endovascular Surgery, Professor 小川誠司先生、京都大学医学部、教授

VII. 参考文献

1. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010 Nov 1;2(6):640-53.
2. Warren LA, Rossi DJ. Stem cells and aging in the hematopoietic system. *Mech Ageing Dev.* 2009 Jan;130(1-2):46-53.
3. Steensma DP. Clinical Implications of Clonal Hematopoiesis. *Mayo Clin Proc.* 2018 Aug;93(8):1122-30.
4. Ema H, Morita Y, Yamazaki S, Matsubara A, Seita J, Tadokoro Y, et al. Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays. *Nat Protoc.* 2006;1(6):2979-87.
5. Wilkinson AC, Ishida R, Kikuchi M, Sudo K, Morita M, Crisostomo RV, et al. Long-term ex vivo haematopoietic-stem-cell expansion allows nonconditioned transplantation. *Nature.* 2019 Jul;571(7763):117-21.
6. Bouchareychas L, Duong P, Covarrubias S, Alsop E, Phu TA, Chung A, et al. Macroph

Age Exosomes Resolve Atherosclerosis by Regulating Hematopoiesis and Inflammation via MicroRNA Cargo. Cell Rep. 2020 Jul 14;32(2):107881.