

TABLE 3. SENSITIVITY AND SPECIFICITY ANALYSIS OF DRIED BLOOD ON FLINDERS TECHNOLOGY ASSOCIATES ELUTE MICROCARD

		Freshly prepared DNA		Total
		(+)	(-)	
Card	SMN1 Exon 7 deletion test (+)	5	0	5
blood	SMN1 Exon 7 deletion test (-)	0	15	15
	Total	5	15	20

Sensitivity test =  $5 / (5 + 0) \times 100\% = 100\%$ .

Specificity test =  $15 / (15 + 0) \times 100\% = 100\%$ .

From Fisher analysis, exact Fisher *p* was 0.72. It indicated a nonsignificant difference between the result from DBS on filter paper and EDTA-blood.

Deletion test

To determine the presence and/or absence of SMN exon 7, we performed a PCR-enzyme digestion analysis of these exons by using DNA samples extracted from the FTA Elute microcards. After complete digestion by *DraI*, nondigested PCR products from SMN1 exon 7 (187 bp) could not be observed in five samples (lanes 1–5), although these samples clearly show the presence of digested PCR products from SMN2 exon 7 (163 bp) (Fig. 2). In 13 samples (lanes 6–8, 11–20), nondigested PCR products from SMN1 exon 7 were present along with the digested PCR products from SMN2 exon 7. In two samples (lanes 9 and 10), the presence of nondigested PCR products from SMN1 exon 7 SMN1 were confirmed, but digested PCR products from SMN2 exon 7 could not be observed. These data obtained from analyses using DNA extracted from DBS on the

FTA Elute microcards were compatible with those obtained from analyses using DNA prepared from EDTA-blood (Table 2). In the current study, we compared and evaluated the results of the SMN1 exon 7 deletion test by using DNA extracted from DBS on the FTA Elute Microcard with test results obtained from DNA prepared from EDTA-blood. Both sensitivity and specificity displayed outstanding results at 100% (Table 3). Data obtained from analyses using DNA prepared from EDTA-blood are not shown in this article.

Similar—but not identical—results were obtained from the analysis conducted on SMN exon 8. After complete digestion by *DdeI*, three samples (lanes 1–3) did not have nondigested PCR products from SMN1 exon 8 (189 bp), although the presence of two digested PCR products from SMN2 exon 8 (123 bp, 66 bp) could be detected (Fig. 2). Fifteen samples (lanes 4–8, 11–20) showed the presence of nondigested PCR products from SMN1 exon 8 and two digested PCR products from SMN2 exon 8. Two samples (lanes 9 and 10) showed the presence of a nondigested PCR product from SMN1 exon 8 but did not show digested PCR products from SMN2 exon 8. These two samples were taken from healthy controls. The results obtained using DNA extracted from DBS on the FTA Elute microcards were compatible with those obtained from DNA prepared from EDTA-blood.

Interestingly, two samples (lanes 4 and 5) were absent for SMN1 exon 7, whereas the presence of SMN1 exon 8 could be readily confirmed. These samples were taken from patients with the so-called hybrid SMN genes (Figs. 2 and 3B). To confirm the initial results suggesting the presence of a hybrid SMN gene in DNA samples extracted from DBS on the FTA Elute microcard, we performed a sequence analysis of the PCR product that spanned intron 6, exon 7, intron 7, and exon 8. In the sequence between intron 6 and intron 7, three SMN2

F2 ▶

◀ T2

◀ T3

◀ F3

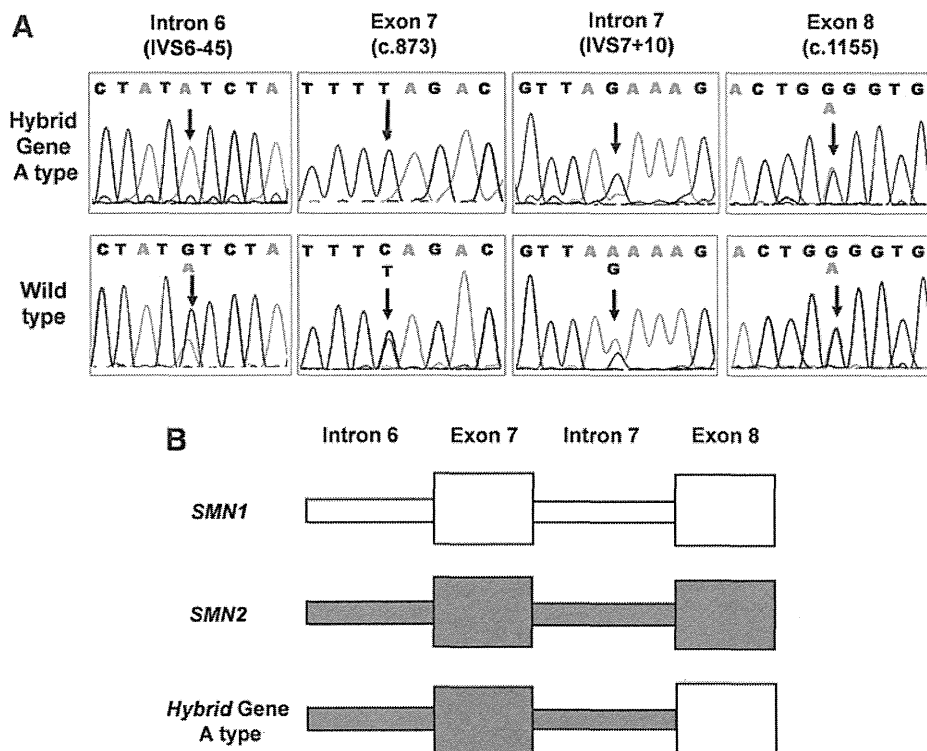


FIG. 3. (A) Direct DNA sequence analysis of the SMN gene: wild-type (lower) and hybrid SMN gene (Personal ID no.4) (upper). In the hybrid SMN gene, we found the following: (1) Intron 6 (–45 bp/exon7)—SMN2 showed nucleotide a, as same nucleotide as SMN2. (2) Exon 7 (nucleotide 873)—SMN2 showed nucleotide T, as same nucleotide as SMN2. (3) Intron 7 (+100 bp/exon7 and +214 bp/exon7)—SMN2 showed nucleotide g, as same nucleotide as SMN2. (4) Exon 8 (nucleotide 1155)—SMN2 showed nucleotide G and A, as same nucleotide as SMN1 and SMN2. (B) Data sequencing analysis showed that the nucleotide sequences of intron 6, exon 7, and intron 7 were identical to those of SMN2, whereas the sequence of exon 8 exhibited both SMN2 and SMN1. Thus, we can conclude that this patient has A type hybrid SMN (Nishio *et al.*, 1999).

◀ AU2

◀ AU2

specific nucleotides were present. In stark contrast, in exon 8, both *SMN1* and *SMN2* specific nucleotides were present in the sequence (Fig. 3A).

In addition, we performed PCR analysis on *NAIP* exon 5. Only 1 out of 20 samples showed the absence of *NAIP* exon 5 (lane 1) (Fig. 2). The sample was obtained from a patient with type I SMA. This result was compatible with a previous result obtained using DNA prepared from EDTA-blood (data not shown).

#### Copy number analysis

Copy number variations in *SMN1* and *SMN2* were determined by a relative quantification method based on the calibrator-normalized ratios (CNR) (Tran *et al.*, 2008). When DNA samples showed CNR values of 0.6–1.4, 1.5–2.4, 2.5–3.4, and 3.5–4.4, it was considered that they carried 1, 2, 3, and 4 copies of the gene, respectively. Copy numbers determined from CNR values obtained for the DBS samples were consistent with those determined for EDTA-blood samples.

In this study, *SMN1* copy number variations in patients with SMA (ID 1–5) was not a major issue, because they had been determined through previous deletion studies that there was a deletion of *SMN1*. For these samples, we only conducted copy number analyses for *SMN2*. In these patients, *SMN2* copy number varied from two to four copies; two copies in Type I, three copies in Type I, II, and III, and four copies in Type III. The results displayed a tendency that *SMN2* copies had a more profound effect on the phenotype (Table 2).

In the present study, 3 out of 15 non-SMA samples (ID 6–8) carried a single copy of *SMN1*. These samples belong to the parents of patients with SMA. Consequently, the parents were also diagnosed as with carrier status of SMA at the molecular genetic level, as well as at the clinical level.

We also examined *SMN1* and *SMN2* copy number variations in 12 controls (ID 9–20). The samples were obtained from healthy persons. With the exception of one sample (ID 20), all control samples had two copies of *SMN1* (Table 2). Sample ID 20, on the other hand, had three copies of *SMN1*. The presence of *SMN2* in control samples varied from 0 to 3 copies.

#### Discussion

We demonstrated the applicability of DBS on filter paper for molecular diagnostic analysis of SMA. In this study, a simple boiling method was applied for DNA extraction from DBS affixed on five  $\phi$ 3 mm-circles of filter paper. This amount corresponds to ~50  $\mu$ L of whole blood, and the method has been adapted from a method previously described (Kogan *et al.*, 1987; Jinks *et al.*, 1989). The total amount of DNA extracted from five  $\phi$ 3 mm-circles was between 6.65 and 32.13  $\mu$ g. The OD260/OD280 ratio of the DNA extracted from DBS was 1.56–1.86 (Table 1), which retained enough purity for subsequent PCR analysis. Without exception, in all samples, we successfully amplified the target genes: *SMN1*, *SMN2*, and *NAIP*. To determine the hybrid *SMN* gene, we amplified a 1011 bp-fragment encompassing intron 6 to exon 8 in the *SMN1* or *SMN2* genes from DBS. Similarly, Chaisomchit *et al.* (2005) amplified a 1039 bp-fragment of the  $\beta$ -globin gene from DBS on filter paper stored for 11 years, thus demonstrating the remarkable stability of DNA in DBS affixed on filter paper.

By conducting PCR using DNA derived from DBS on filter paper, we were successful in demonstrating the existence or

absence of *SMN1*, *SMN2*, and *NAIP*. PCR-enzyme digestion experiments in this study were performed according to the method described by van der Steege *et al.* (1995). To determine the copy numbers of the *SMN* genes, we conducted a set of quantitative real-time PCR studies according to previously described methods (Tran *et al.*, 2008). All data obtained from DBS on filter paper experiments were compatible with those obtained using EDTA-blood samples.

Majumdar *et al.* (2005) used multiplex-PCR to detect zero copies of *SMN1* in patients with SMA and a single copy of *SMN1* in carriers. Their results, combined with the results reported in this study, collectively indicate that the molecular diagnosis of SMA using EDTA-blood samples can be replaced by DBS on filter paper. Wijnen *et al.* (2008) sums up the potential advantages of genotyping with DBS as follows: (1) no phlebotomist is necessary, (2) genotyping results are known when the patient visits the clinician, and the clinician can take these results into account when he/she prescribes (other) drugs, (3) transport is easy, and there is a reduction in transport costs, because only the cost of an envelope and filter paper are incurred, and (4) DNA extraction from DBS is rapid, simple, and expensive DNA isolation kits are unnecessary. Accurate diagnosis based on molecular analysis can be simply obtained by mailing the filter paper with a DBS affixed to a central diagnostic center.

In conclusion, the evolution of molecular diagnostic studies have been ground breaking rather than incremental; however, the consideration of how these novel techniques can be utilized to exploit their full range of effectiveness has not been granted ample attention. In this study, we showed that DNA samples isolated from DBS serve as a satisfactory source for subsequent SMA molecular diagnosis even after 4 years of storage at room temperature. An SMA-diagnosing system, combined with the mailing of DBS on filter paper, will be beneficial for patients suffering from neuromuscular disorders in areas with limited or no access to diagnostic facilities with molecular capabilities.

#### Acknowledgments

This work was supported by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan and a Grant-in-Aid from the Research Committee of SMA, the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan.

#### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

#### References

- Aggarwal RK, Lang JW, Singh L (1992) Isolation of high-molecular-weight DNA from small samples of blood having nucleated erythrocytes, collected, transported, and stored at room temperature. *Genet Anal Biomol Eng* 9:54–57.
- Beck IA, Drennan KD, Melvin AJ, *et al.* (2001) Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 subtype B DNA in dried blood samples for diagnosis in infants in the field. *J Clin Microbiol* 39:29–33.
- Chaisomchit S, Wichajarn R, Janejai N, *et al.* (2005) Stability of genomic DNA in dried blood spots stored on filter paper. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36:270–273.
- Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, *et al.* (2002) Quantitative analyses of *SMN1* and *SMN2* based on real-time LightCycler

- PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 70: 358–368.
- Glotov AS, Kiselev AV, Ivaschenko TE, *et al.* (2001) Analysis of deletions in SMN1, SMN2, and NAIP genes in spinal muscular atrophy patients from the northwestern region of Russia. *Genetika* 37:1156–1159.
- Harada Y, Sutomo R, Sadewa AH, *et al.* (2002) Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity. *J Neurol* 249:1211–1219.
- Jinks DC, Minter M, Tarver DA, *et al.* (1989) Molecular genetic diagnosis of sickle cell disease using dried blood specimens on blotters used for newborn screening. *Hum Genet* 81:363–366.
- Kogan SC, Doherty M, Gitschier J (1987) An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *N Engl J Med* 317:985–990.
- Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, *et al.* (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80:155–165.
- Lunn MR, Wang CH (2008) Spinal muscular atrophy. *Lancet* 371:2120–2133.
- Mailman MD, Heinz JW, Papp AC, *et al.* (2002) Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genet Med* 4:20–26.
- Majumdar R, Rehana Z, Jumah MA, *et al.* (2005) Spinal muscular atrophy carrier screening by multiplex polymerase chain reaction using dried blood spot on filter paper. *Ann Hum Genet* 69:216–221.
- McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, *et al.* (1997) Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMN1 and SMN2 gene copy number. *Am J Hum Genet* 60:1411–1422.
- Nishio H, Horikawa H, Yakura H, *et al.* (1999) Hybrid survival motor neuron genes in Japanese patients with spinal muscular atrophy. *Acta Neurol Scand* 99:374–380.
- Parsons DW, McAndrew PE, Allinson PS, *et al.* (1998) Diagnosis of spinal muscular atrophy in an SMN non-deletion patient using a quantitative PCR screen and mutation analysis. *J Med Genet* 35:674–676.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, *et al.* (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80:167–178.
- Tran VK, Sasongko TH, Hong DD, Hoan NT, *et al.* (2008) SMN2 and NAIP gene dosages in Vietnamese patients with spinal muscular atrophy. *Pediatr Int* 50:346–351.
- van der Steege G, Grootsholten PM, van der Vlies P, *et al.* (1995) PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 345:985–986.
- Wijnen PAHM, den Buijsch O, Cheung SCY, *et al.* (2008) Genotyping with a dried blood spot method: a useful technique for application in pharmacogenetics. *Clin Chim Acta* 388: 189–191.

Address correspondence to:

Indra Sari Kusuma Harahap, M.D., Ph.D.

Division of Genetic Epidemiology

Department of Community Medicine

and Social Healthcare Science

Kobe University Graduate School of Medicine

7-5-1 Kusunoki-cho

Chuo-ku

Kobe 650-0017

Japan

E-mail: iin\_999@yahoo.com



## Rab27b regulates c-kit expression by controlling the secretion of stem cell factor

Chisato Tanaka<sup>a,b</sup>, Hiroaki Kaji<sup>b</sup>, Jinsong He<sup>b</sup>, Ryoichi Hazama<sup>b,c</sup>, Kunio Yokoyama<sup>b,d</sup>, Emi Kinoshita<sup>c</sup>, Takayuki Tsujioka<sup>e</sup>, Kaoru Tohyama<sup>e</sup>, Hirohei Yamamura<sup>f</sup>, Hisahide Nishio<sup>a</sup>, Yumi Tohyama<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Epidemiology, Department of Community Medicine and Social Healthcare Science, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan

<sup>b</sup> Division of Biochemistry, Department of Pharmaceutical Health Care, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Himeji Dokkyo University, Himeji, Japan

<sup>c</sup> Division of Biochemistry, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan

<sup>d</sup> Department of Surgery, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan

<sup>e</sup> Department of Laboratory Medicine, Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan

<sup>f</sup> Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, Kobe, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 February 2012

Available online 13 February 2012

#### Keywords:

Rab27b

c-Kit

Lysosome

SCF

### ABSTRACT

Rab27b, a subfamily of Rab27 small GTPases, was originally identified in platelets. However, the role of Rab27b in megakaryocytic lineage cells remains unknown. Here, using a human megakaryoblastic cell line, CMK, we show that Rab27b negatively regulates c-kit-expression. We found that transfection of shRNA-Rab27b into CMK cells led to specific increase in the amount of the receptor-type tyrosine kinase c-kit. To elucidate the molecular mechanisms by which Rab27b regulates c-kit expression, we analyzed the dynamics of c-kit by the stimulation with its ligand, stem cell factor (SCF). We found that cell surface expression of c-kit was promptly reduced and rapidly degraded in both CMK and Rab27b-knockdown CMK cells. Pretreatment with a lysosome inhibitor bafilomycin suppressed the degradation of c-kit, indicating that c-kit expression is controlled by SCF-induced endolysosomal degradation system. We therefore focused on the potential involvement of SCF in Rab27b-mediated effects on c-kit expression levels. We found that autocrine secretion of SCF was downregulated in Rab27b-knockdown cells as compared with parental CMK cells. These results suggest that Rab27b negatively regulates the cell surface expression of c-kit via secretion of SCF and that ligation of SCF leads to the endolysosomal degradation system of c-kit.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The Rab27 family is a subfamily of the Rab family of small GTPase proteins and includes two distinct molecules, Rab27a and Rab27b. Rab GTPases control almost all membrane trafficking processes, including vesicle budding, docking and fusion to acceptor membranes, and exosome release [1,2]. Rab27a is involved in the exocytosis of secretory granules in melanocytes and cytotoxic T lymphocytes, and mutations in Rab27a cause type-2 Griscelli syndrome, which is characterized not only by pigment dilution but also by defects in cytotoxic granule transport and by macrophage activation syndrome (known as hemophagocytic syndrome, HS) [3–5]. In addition, we recently found that Rab27a negatively regulates complement-mediated phagocytosis by prolongation of the actin-coating stage in macrophage-like differentiated cell lines [6]. Rab27b was originally identified in platelets [7]. It was reported that the expression of Rab27b increases with terminal differentiation of megakaryocytes, giant bone marrow cells producing platelets,

depending on nuclear factor-erythroid2 (NF-E2), and that Rab27b localizes to both alpha and dense granules in megakaryocytes [8,9].

c-Kit is a receptor-type tyrosine kinase that is composed of an extracellular ligand-binding domain containing five immunoglobulin-like domains, a single transmembrane domain and a cytoplasmic region that contains a tyrosine kinase domain. Binding of the c-kit ligand or stem cell factor (SCF) (also known as mast cell growth factor, steel factor) to c-kit leads to receptor dimerization and induces kinase activation, which results in autophosphorylation and the activation of multiple down-stream signaling cascades. After ligand binding, c-kit is internalized by clathrin-mediated endocytosis and then degraded [10–15].

The SCF/c-kit signaling pathway stimulates the growth of various hematopoietic progenitors *in vitro* and *in vivo*. Previous studies on the effects of SCF on megakaryocytic cell lines and bone marrow megakaryocytes indicated that, in megakaryopoiesis, SCF, in combination with the other hematopoietic growth factors, stimulates megakaryocytic cell growth and colony formation of the megakaryocytic lineage [16–20]. However, the regulation mechanism of SCF/c-kit signaling in megakaryocytic lineage cells has not been fully understood.

\* Corresponding author. Fax: +81 79 285 0352.

E-mail address: [ytohyama@himeji-du.ac.jp](mailto:ytohyama@himeji-du.ac.jp) (Y. Tohyama).

Here, using the human megakaryoblastic cell line, CMK, we show that Rab27b negatively regulates the cell surface expression of c-kit via secretion of SCF and that ligation of SCF leads to the endolysosomal degradation system of c-kit.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents and antibodies

Rabbit anti-human Rab27b polyclonal antibody (polyAb) was purchased from Immono-Biological Laboratories Co., Ltd. and rabbit anti-human Rab27b polyAb for immunofluorescence staining and rabbit anti-human Rab27a polyAb were purchased from Sigma–Aldrich. Mouse anti-human c-kit (clone12A8) monoclonal antibody (mAb) for immunofluorescent staining was purchased from Immono-Biological Laboratories. Rabbit anti-human c-kit polyAb was purchased from Santa Cruz Biotechnology. AlexaFluor488-conjugated mouse anti-human c-kit (cloneAb81) mAb was purchased from Cell Signaling Technology. Mouse anti-human  $\alpha$ -tubulin was purchased from Sigma–Aldrich. HRP-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit antibodies were purchased from Bio-Rad Laboratories. ViraPower lentiviral Directional TOPO Expression kit, AlexaFluor488- or 594-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit antibodies and LysoTracker Red were purchased from Invitrogen. Human recombinant SCF was purchased from ATGen and labeled with AlexaFluor488 Microscale Protein Labeling Kit (Invitrogen). Puromycin and BafilomycinA1 were purchased from Sigma–Aldrich and BlastidicinS was from Invitrogen. Proteasome inhibitor I was purchased from CalbioChem and Polybrene was from Millipore.

### 2.2. Cells and cell culture

Human megakaryocytic cell lines CMK, MOLM1, MEG01, UT7, M-07e and a myelocytic cell line HL60 were maintained in RPMI1640 medium, supplemented with 8% heat-inactivated fetal calf serum(FCS), 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. UT7 and M-07e cell lines were maintained with 25 ng/ml recombinant human IL-3 (R&D Systems).

### 2.3. Plasmids and transfection

To inhibit *Rab27b* gene expression, a vector for short-hairpin RNA(shRNA) incorporated in pLKO.1-puro (Sigma–Aldrich, Mission shRNA code: TRCN0000047689) was transfected into CMK cells by electroporation and positive clones were selected with 1  $\mu$ g/ml puromycin. To support the knockdown effects of shRNA-Rab27b, we constructed Flag-rescue-Rab27b.

Human Rab27b was amplified from cDNA Library of CMK with the following primer pair: 1–29 sense primer 5'-ATGACCGATGGAGACTATGATTATCTGAT-3' and 628–657 antisense primer 5'-TTAGCAGATACATTTCTTCTCTGGTGGCTT-3'. CMK cDNA was isolated by Micro-FastTrack (Invitrogen). The second amplification reaction was performed with primers that contained Flag tag and BamHI and EcoRI restriction sites and the amplified products were cloned into pcDNA4/TO (Invitrogen) and then subcloned into pcDNA6/V5-HisA and pLenti6/V5-D-TOPO vector(Invitrogen). Flag-rescue-Rab27b containing 4 silent mismatches in the shRNA target sequence, 5'-GATACAGTGAACGGAGGAAAT-3', corresponding to nucleotides 586–606 (mutation points are indicated by underscores) was purified with 1–29 sense primer and 573–657 antisense primer including the specific mutation: 5'-TTAGCAGATACATTTCTTCTCTGGTGGCTTTTCCCATCCAAGTTCCAGAATTCCTCCGTTCACTGTATCAGGGATTTGTGTC-3'. This plasmid was introduced into shRNA-Rab27b/CMK cells by lentiviral system and positive clones were selected with 5  $\mu$ g/ml Blastidicine.

### 2.4. Immunoblotting analysis

Immunoblotting analysis was performed as previously described [6]. Briefly, cell lysates obtained with 1xSDS PAGE buffer (50 mM Tris–HCl(pH 6.8), 2% SDS, 10% Glycerol, BPB, 2ME) were separated by SDS–PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). After blocking, the membrane was incubated with the appropriate antibodies in T-TBS (25 mM Tris–HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% Tween20) for 1 h at room temperature, and after washing, incubated with HRP-conjugated secondary antibody for 30 min, and specific proteins were detected using an enhanced chemiluminescence immunoblotting system and a lumino-image analyzer (LAS-3000, Fuji Film).

### 2.5. Flowcytometry

The cells were incubated with primary antibody for 30 min at 4 °C. After washing, the cells were incubated with secondary antibody for 30 min at 4 °C and analyzed using FACS Calibur flowcytometer (Becton Dickinson).

### 2.6. Internalization and recovery assay of c-kit

For c-kit internalization assay, the cells were incubated in culture medium for 1 h at 37 °C. The cells were treated with 27 nM SCF for indicated times and cold PBS was added. To analyze the recovery of c-kit, the cells were treated with 27 nM SCF for 1 h and after removing the supernatant, the cells were incubated in culture medium for indicated times at 37 °C. Samples were analyzed by flowcytometry for analysis of the surface expression of c-kit. For total expression of c-kit, the samples were lysed and analyzed by immunoblotting. For microscopic analysis, the cells were incubated in culture medium for 1 h at 37 °C, treated with 27 nM AlexaFluor488-labeled SCF for indicated times and fixed with 3.3% paraformaldehyde for 20 min.

### 2.7. Measurement of SCF released from the cells into the culture medium

The cells were incubated in RPMI1640 medium without FCS for 3 h at 37 °C. After centrifugation, the supernatants were measured by Human SCF ELISA Development Kit (PEPROTECH) according to manufacturer's method.

### 2.8. Immunofluorescence microscopic analysis

The cells were fixed with 3.3% paraformaldehyde for 5 h and permeabilized with 0.2% TritonX-100 in PBS containing 0.05% BSA for 2 min. After blocking the cells were incubated with primary antibody for 1 h and further incubated with AlexaFluor488-conjugated secondary antibody for 30 min. These samples were observed by a confocal laser-scanning microscope (LSM510 META, Carl Zeiss).

### 2.9. Real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis

The real-time quantitative reverse transcription-PCR was performed using TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit(Life Technologies). In brief, using RNA extracted from  $1 \times 10^5$  cells, the reverse transcription reaction was done at 37 °C for 1 h and 95 °C for 5 min. Next, 4  $\mu$ l of complementary DNA was amplified at 60 °C using TaqMan Expression Master Mix and indicated probes (SCF: Hs00241497\_m1 KITLG, GAPDH: Hs02758991\_g1 GAPDH) by Applied Biosystems 7500 real-time PCR system. These data were quantified by correcting the measured values by the expression levels of GAPDH mRNA.

### 2.10. Statistical analysis

In some experiments, statistical significance was determined by the Student's *t*-test.

## 3. Results

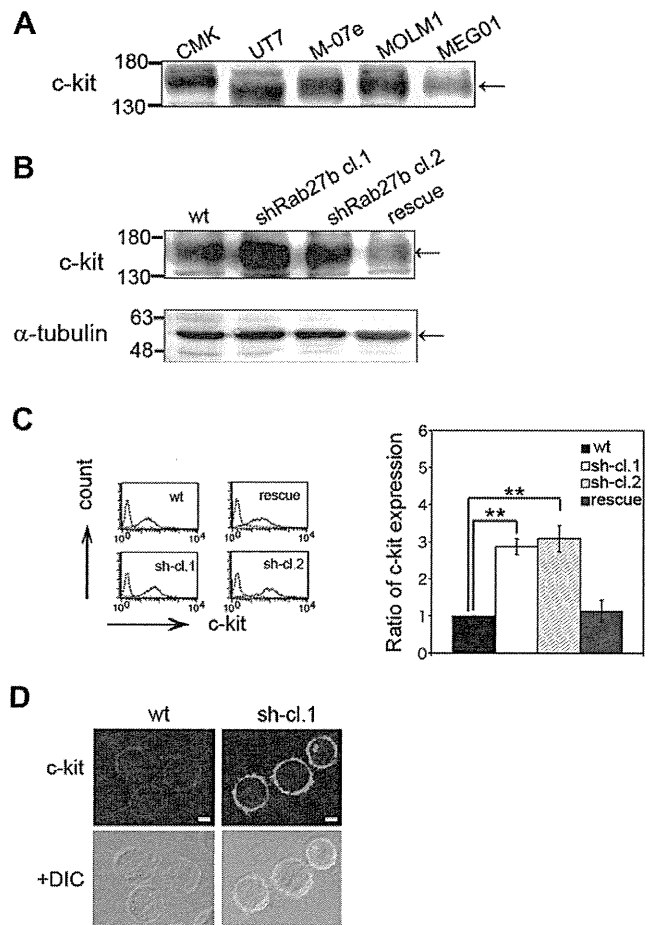
### 3.1. Establishment of Rab27b-knockdown CMK cells

We first examined the expression level of Rab27b in various human hematopoietic cell lines by immunoblotting analysis. Rab27b was clearly detected in megakaryocytic lineage cell lines such as CMK, UT7 and M-07e, faintly detected in MOLM1 and MEG01 (Fig. 1A) but not detected in the myelocytic cell line HL60 (data not shown). Rab27a was not detected in megakaryocytic lineage cell lines but detected in HL60 cells (data not shown). These results suggested that Rab27b, but not Rab27a plays a critical role in the intracellular signaling of megakaryocytic lineage. To investigate this role of Rab27b, we therefore established Rab27b-knockdown CMK cell clones by transfecting shRNA-Rab27b into CMK cells using an electroporation method (shRNA-Rab27b/CMK or Rab27b-knockdown CMK cells). Transfection of shRNA-Rab27b successfully reduced the expression of endogenous Rab27b protein in CMK cells (clone1: 80% decrease; clone2: 90% decrease). Additionally, flag-tagged Rab27b designed to be resistant to this shRNA sequence was transfected into shRNA-Rab27b/CMK cells for rescue experiments (Fig. 1B).

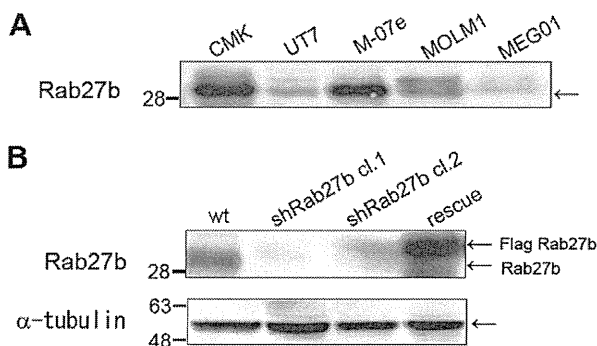
### 3.2. Rab27b-knockdown upregulates c-kit expression in CMK cells

To clarify the role of Rab27b in megakaryocytic cells, we focused our analysis on c-kit, a receptor-type protein tyrosine kinase, which play an important role in hematopoiesis including megakaryopoiesis. We first analyzed the expression level of c-kit in various human hematopoietic cell lines by immunoblotting analysis. c-kit expression was clearly detected in CMK, UT7, M-07e, MOLM1 cells, faintly detected in MEG01 cells (Fig. 2A) but was not detected in HL60 cells (data not shown).

We next assessed the effect of Rab27b-knockdown on c-kit expression in CMK cells using immunoblotting analysis and immunofluorescence study. Rab27b-knockdown resulted in enhanced c-kit expression both in whole cell lysates (Fig. 2B), on the cell surface (Fig. 2C) and intracellular distribution (Fig. 2D). Upregulation of c-kit in Rab27b-knockdown cells was reversed by transfection of the rescue-Rab27b construct (Fig. 2B and C). These results



**Fig. 2.** Rab27b-knockdown upregulates c-kit expression in CMK cells. (A) c-kit expression in human megakaryocytic cell lines (CMK, UT7, M-07e, MOLM1, MEG01) was analyzed by immunoblotting. Arrows indicate c-kit. (B) c-Kit expression in CMK (wt), shRNA-Rab27b/CMK (shRab27b cl.1 and cl.2) and rescue-shRNA-Rab27b/CMK (rescue) was analyzed by immunoblotting.  $\alpha$ -Tubulin expression was indicated as a loading control. (C) Surface expression of c-kit on CMK (wt), shRNA-Rab27b/CMK (sh-cl.1 and sh-cl.2) and rescue-shRNA-Rab27b/CMK (rescue) was analyzed by flow cytometry and the ratio of c-kit expression was indicated with the data of parental CMK cells as the standard. The data are the mean with SD from three independent experiments. The asterisks (\*\*) means that the difference is statistically significant (*p*-values < 0.01). (D) Intracellular distribution of c-kit in CMK (wt) and shRNA-Rab27b/CMK (sh-cl.1) was analyzed by immunofluorescent staining using anti-c-kit mAb. The bar indicates 5  $\mu$ m.



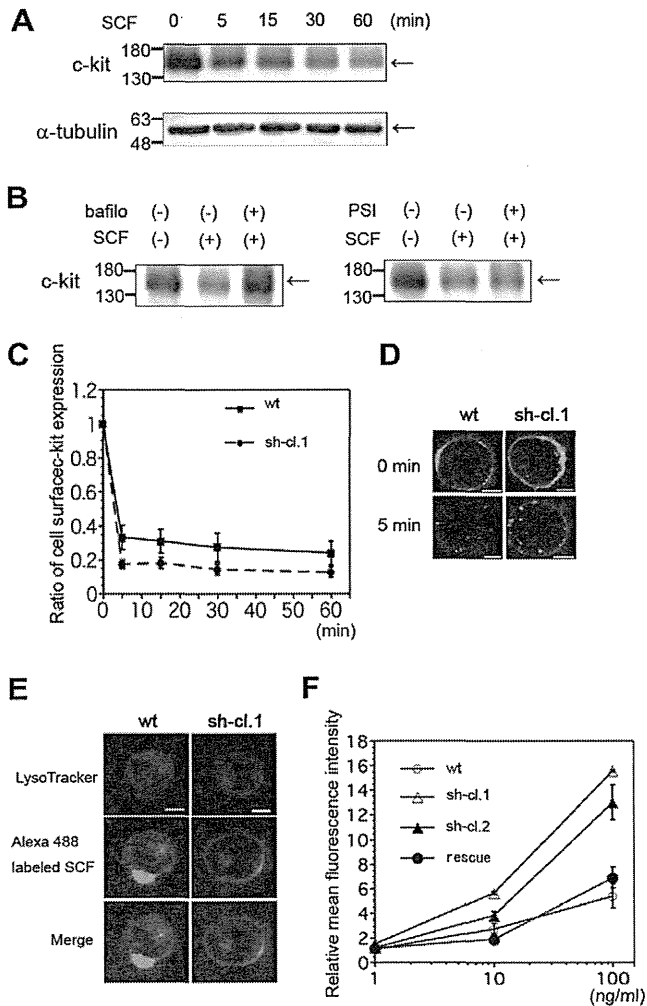
**Fig. 1.** Establishment of Rab27b-knockdown CMK cells. (A) Expression of Rab27b in human leukemia cell lines (CMK, UT7, M-07e, MOLM1, MEG01) was analyzed by immunoblotting. The arrows indicate Rab27b. (B) Decreased expression of Rab27b by shRNA-Rab27b transfer into CMK (shRab27b cl.1 and cl.2) and its recovery by Flag-rescue-Rab27b (rescue) into Rab27b-knockdown cells were shown by immunoblotting analysis.  $\alpha$ -Tubulin expression was shown as a loading control.

suggest that Rab27b negatively regulates c-kit expression in CMK cells.

To further investigate the mechanism by which Rab27b regulates c-kit expression, we analyzed the effect of Rab27b-knockdown on the expression and cellular localization of c-kit over time following treatment of cells with the c-kit ligand SCF.

### 3.3. c-Kit is degraded through an endolysosomal pathway following stimulation of both the parental CMK and Rab27b-knockdown CMK cells with SCF

SCF stimulation induced a rapid decrease in c-kit protein expression levels in CMK cells that was maintained for up to 60 min after stimulation (Fig. 3A). To clarify the mechanism of SCF-induced c-kit degradation, the cells were pretreated with the lysosomal inhibitor bafilomycin or the proteasome inhibitor PSI. Bafilomycin completely blocked SCF-induced c-kit degradation but PSI showed no inhibition, suggesting that SCF-induced c-kit



**Fig. 3.** c-Kit is degraded through endolysosomal pathway by SCF stimulation. (A) c-Kit expression after the stimulation with 27 nM SCF at the indicated time points was analyzed by immunoblotting. The arrow indicates c-kit.  $\alpha$ -Tubulin expression was indicated as a loading control. (B) Effects of the lysosome inhibitor bafilomycin (1  $\mu$ M, left) and the proteasome inhibitor PSI (10  $\mu$ M, right) on SCF-induced c-kit degradation at 37  $^{\circ}$ C for 1 h were analyzed by immunoblotting. Arrows indicate c-kit. (C) Surface expression of c-kit on CMK (wt) and shRNA-Rab27b/CMK (sh-cl.1) after SCF stimulation was analyzed by flowcytometry at the indicated time points. The ratio of c-kit expression was indicated with the data of CMK and shRNA-Rab27b/CMK before SCF treatment as the respective standards. The data are the mean with SD from three independent experiments. (D) CMK(wt) and shRNA-Rab27b/CMK (sh-cl.1) were incubated with AlexaFluor488-labeled SCF at 4  $^{\circ}$ C for 30 min (indicated as 0 min) and subsequently at 37  $^{\circ}$ C for 5 min (indicated as 5 min) and observed by a confocal microscope. The bars indicate 5  $\mu$ m. (E) CMK (wt) and shRNA-Rab27b/CMK (sh-cl.1) were incubated with AlexaFluor488-labeled SCF and LysoTracker Red at 4  $^{\circ}$ C for 30 min and subsequently at 37  $^{\circ}$ C for 15 min and observed by a confocal microscope. The bars indicate 5  $\mu$ m. (F) Binding of the indicated concentrations of AlexaFluor488-labeled SCF to CMK (wt), shRNA-Rab27b/CMK (sh-cl.1 and sh-cl.2) and rescue-shRNA-Rab27b/CMK (rescue) was quantified by flowcytometry. The mean fluorescence intensity (MFI) of parental CMK cells at 1 ng/ml labeled SCF was adjusted to 1 MFI level. The data are the mean with SD from three independent experiments.

degradation is mediated by the lysosomal pathway (Fig. 3B). Flow-cytometric analysis demonstrated that the kinetics of the decrease in cell surface expression of c-kit over time of SCF stimulation was similar in CMK and Rab27b-knockdown CMK cells (Fig. 3C).

We next examined the kinetics of c-kit using fluorescence-labelled SCF. Microscopic analysis showed that cell-surface bound SCF was promptly internalized (Fig. 3D) and fused with lysosomes (Fig. 3E) in both CMK and Rab27b-knockdown CMK cells. The levels of fluorescence-labelled SCF bound to the cell surface c-kit

reflected the levels of the cell surface c-kit expression between the parental CMK and Rab27b-knockdown cells (Fig. 2C and Fig. 3F). These results suggested that up-regulation of c-kit expression in Rab27b-knockdown cells is not due to inhibition of SCF-induced c-kit degradation via an endolysosomal pathway.

#### 3.4. Recovery of cell surface expression of c-kit is mediated by autocrine secretion of SCF and regulated by Rab27b

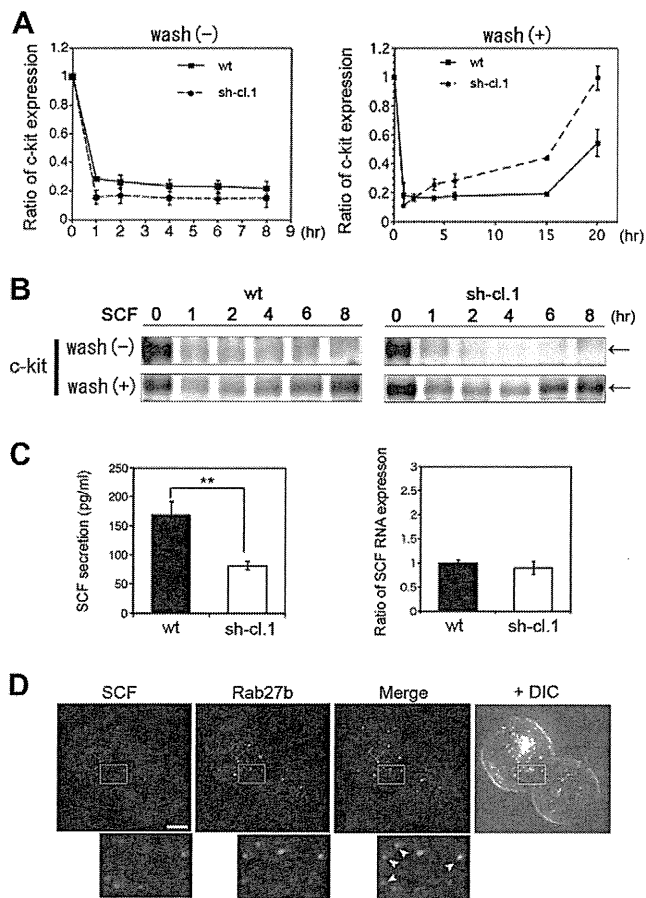
To further examine the mechanism by which c-kit is up-regulated in Rab27b-knockdown CMK cells, we analyzed c-kit expression over time in the presence of SCF, or following withdrawal of SCF from the culture medium, which allows recovery of c-kit at the cell surface. In the presence of SCF, the surface expression of c-kit was continuously down-regulated in both parental and Rab27b-knockdown CMK cells, whereas, after the removal of added SCF, the c-kit surface levels gradually increased over time. This recovery process was faster in Rab27b-knockdown cells than in the parental CMK cells (Fig. 4A), even though immunoblotting analysis indicated that the total amount of c-kit protein was similar in both cell types at each time point (Fig. 4B). These results suggest that up-regulation of c-kit in Rab27b-knockdown cells is not caused by delayed endocytosis but by a more rapid recovery of c-kit levels at the cell surface. We next determined the effect of Rab27b-knockdown on the dynamics of SCF. We assessed cellular SCF secretion into the culture medium using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). During the first 3 h after removal of FCS, the concentration of SCF secreted from Rab27b-knockdown cells was approximately half that of the parental cells (Fig. 4C, left). However, the real-time quantitative RT-PCR analysis revealed that the expression level of SCF mRNA was similar in both cell types (Fig. 4C right). These results suggest that the synthesized SCF is accumulated within the cells and decreased secretion of SCF leads to decreased degradation of c-kit, and consequently the remaining c-kit is accumulated in Rab27b-knockdown CMK cells. Further, in a search for the mechanism by which Rab27b might regulate SCF kinetics, we microscopically observed that a part of SCF existed within the Rab27b-positive vesicles (Fig. 4D).

## 4. Discussion

In this study we showed that Rab27b regulates c-kit-expression by controlling the secretion of SCF in CMK cells and investigated the underlying mechanism. We confirmed that Rab27b is expressed in most megakaryocytic cell lines and then we established Rab27b-knockdown CMK cells to investigate its role in the megakaryocytic lineage. We found that c-kit expression was increased in Rab27b-knockdown CMK cells. Based on this result we focused our analysis on the possible mechanism of Rab27b in regulating c-kit expression from the view point of dynamic change of intracellular traffic.

We investigated the specific effects of Rab27b on c-kit levels, focusing on the intracellular transport of c-kit. Although degradation of c-kit by the ubiquitin-mediated degradation pathway was previously reported in several cell lines including the megakaryocytic M-07e cell line [10,11], our data using the CMK cell line indicated that c-kit is degraded in the lysosomal pathway from the experiments using the specific lysosomal inhibitor, bafilomycin and a fluorescent lysosomal indicator, LysoTracker (Fig. 3B and E). Thus, c-kit was internalized and degraded in the lysosomes in an SCF ligation-dependent fashion. However, we did not find any difference in the pattern of c-kit down-regulation between CMK cells and Rab27b-knockdown cells (Fig. 3).

We therefore focused on the potential involvement of the c-kit ligand SCF in Rab27b-mediated effects on c-kit expression levels.



**Fig. 4.** Recovery of cell surface expression of c-kit is mediated by autocrine secretion of SCF and regulated by Rab27b. (A) Change of cell surface expression of c-kit on CMK (wt) and shRNA-Rab27b/CMK (sh-cl.1) after SCF treatment (wash –) or after subsequent removal of SCF 1 h after SCF treatment (wash +) was chased by flowcytometry in time-course study. The ratio of c-kit expression was indicated with the data of CMK and shRNA-Rab27b/CMK before SCF treatment as the respective standards. The data are the mean with SD from three independent experiments. (B) Recovery of the amount of c-kit in CMK (wt) and shRNA-Rab27b/CMK (sh-cl.1) after SCF treatment (wash –, upper) or after subsequent removal of SCF 1 h after the stimulation (wash +, lower) was chased by immunoblotting analysis. Arrows indicate c-kit. (C) Secretion of SCF into culture medium after removal of FCS from CMK (wt) and shRNA-Rab27b/CMK (sh-cl.1) was quantified by ELISA assay (left). The data are the mean with SD from three independent experiments. The asterisks (\*\*) means that the difference is statistically significant ( $p$ -values < 0.01). Expression of SCF mRNA was measured by a real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis in CMK (wt) and shRNA-Rab27b/CMK (sh-cl.1) (right). The expression level of CMK was considered as the standard. The data are the mean with SD from three independent experiments. (D) Co-localization of SCF (red) and Rab27b (AlexaFluor488-labeled anti-Rab27b antibodies; green) after removal of FCS for 3 h was detected by a confocal microscope together with the DIC images. The bar indicates 5  $\mu$ m. The outlined areas are indicated below as the close-up images. Arrowheads indicate the co-localization of SCF with Rab27b.

We showed that both c-kit and SCF are expressed in CMK cells and assumed that the level of SCF secretion affects the level of c-kit expression by an autocrine secretion mechanism. As shown in Fig. 4C, the level of SCF secretion was decreased in Rab27b-knockdown cells regardless of the fact that the SCF transcription level was almost the same in Rab27b-knockdown and parental cells. Together with these results, we hypothesized that the high level of c-kit expression was maintained in Rab27b-knockdown cells as a result of decreased secretion of SCF, as compared with parental CMK cells. In other words, c-kit is internalized and degraded in an SCF secretion and ligation-dependent fashion in CMK cells.

We actually found that SCF is contained in Rab27b-positive vesicles (Fig. 4D). The possible mechanism of SCF secretion by Rab27b may involve Munc13–4, since this molecule has been reported to be involved in Rab27-related exocytosis in blood cells [21]. Further investigation on the relation of Munc13–4 to Rab27b-mediated SCF secretion is needed.

Interestingly, Rab27b and c-kit show similar expression patterns: both are functionally expressed in secretory organs such as pituitary gland [22,23], thyroid gland [22,24], pancreas [22,25], besides bone marrow megakaryocytes [8,9,18], mast cells [14,15,26], skin keratinocytes [22,27], endometrium epithelium [22,28], and the cells in the seminiferous duct [22,29]. In addition, mutations in Rab27a cause type-2 Griscelli syndrome, which is characterized by pigment dilution due to a defect in melanocyte transport [3–5], and previous reports have demonstrated the importance of SCF/c-kit signaling in melanocyte function [30,31]. These findings suggest that regulation of SCF/c-kit signaling by Rab27b plays an important role in the development of various tissues. The present study focused on the role of Rab27b in megakaryocytic lineage cells, and furthermore it is suggested that Rab27b-mediated control of c-kit expression might lead to the fine regulation of hematopoiesis in the bone marrow.

#### Acknowledgment

This study was supported in part by KAKENHI; a Grant-in-Aid for Scientific Research from Japan Society for the Promotion of Sciences (to Y.T. and K.T.).

#### References

- [1] H. Stenmark, Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 513–525.
- [2] M. Ostrowski, N.B. Carmo, S. Krumeich, I. Fanget, G. Raposo, A. Savina, C.F. Moita, K. Schauer, A.N. Hume, R.P. Freitas, B. Goud, P. Benaroch, N. Hacohen, M. Fukuda, C. Desnos, M.C. Seabra, F. Darchen, S. Amigorena, L.F. Moita, C. Thery, Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway, *Nat. Cell Biol.* 2 (2010) 19–30.
- [3] T.S. Kuroda, M. Fukuda, Rab27A-binding protein Slp2-a is required for peripheral melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes, *Nat. Cell Biol.* 6 (2004) 1195–1203.
- [4] G. Ménasché, E. Pastural, J. Feldmann, S. Certain, F. Ersoy, S. Dupuis, N. Wulffraat, D. Bianchi, A. Fischer, F. Le Deist, G. De Saint Basile, Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome, *Nat. Genet.* 25 (2000) 173–176.
- [5] M.M. Ménager, G. Ménasché, M. Romao, P. Knapnougol, C.H. Ho, M. Garfa, G. Raposo, J. Feldmann, A. Fischer, G. De Saint Basile, Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 257–267.
- [6] K. Yokoyama, H. Kaji, J. He, C. Tanaka, R. Hazama, T. Kamigaki, Y. Ku, K. Tohyama, Y. Tohyama, Rab27a negatively regulates phagocytosis by prolongation of the actin-coating stage around phagosomes, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 5375–5382.
- [7] K. Nagata, H. Itoh, T. Katada, K. Takenaka, M. Ui, Y. Kaziro, Y. Nozawa, Purification, identification, and characterization of two GTP-binding proteins with molecular weights of 25,000 and 21,000 in human platelet cytosol. One is the rap1/smg21/Krev-1 protein and the other is a novel GTP-binding protein, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 17000–17005.
- [8] S. Tiwari, J.E. Italiano Jr., D.C. Barral, E.H. Mules, E.K. Novak, R.T. Swank, M.C. Seabra, R.A. Shivdasani, A role for Rab27b in NF-E2-dependent pathways of platelet formation, *Blood* 102 (2003) 3970–3979.
- [9] T. Tolmachova, M. Abrink, C.E. Futter, K.S. Authi, M.C. Seabra, Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 5872–5877.
- [10] N.S. Yee, C.W. Hsiao, H. Serve, K. Vosseller, P. Besmer, Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 31991–31998.
- [11] K. Miyazawa, K. Toyama, A. Gotoh, P.C. Hendrie, C. Mantel, H.E. Broxmeyer, H.E. Broxmeyer, Ligand-dependent polyubiquitination of c-kit gene product: a possible mechanism of receptor down modulation in M07e cells, *Blood* 83 (1994) 137–145.
- [12] V.C. Broudy, N.L. Lin, W.C. Liles, S.J. Corey, B. O'Laughlin, S. Mou, D. Linnekin, Signaling via Src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-Kit, *Blood* 94 (1999) 1979–1986.



- [13] T. Jahn, P. Seipel, S. Coutinho, S. Urschel, K. Schwarz, C. Miething, H. Serve, C. Peschel, J. Duyster, Analysing c-kit internalization using a functional c-kit-EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain, *Oncogene* 21 (2002) 4508–4520.
- [14] J. Kalesnikoff, E.J. Rios, C.C. Chen, S. Nakae, B.A. Zabel, E.C. Butcher, M. Tsai, S.Y. Tam, S.J. Galli, RabGEF1 regulates stem cell factor/c-Kit-mediated signaling events and biological responses in mast cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 2659–2664.
- [15] Z. Orinska, N. Föger, M. Huber, J. Marschall, F. Mirghomizadeh, X. Du, M. Scheller, P. Rosenstiel, T. Goldmann, A. Bollinger, B.A. Beutler, S. Bulfone-Paus, 1787 Provides signals for c-Kit receptor internalization and functionality that control mast cell survival and development, *Blood* 116 (2010) 2665–2675.
- [16] R.A. Briddell, E. Bruno, R.J. Cooper, J.E. Brandt, R. Hoffman, Effect of c-kit ligand on in vitro human megakaryocytopoiesis, *Blood* 78 (1991) 2854–2859.
- [17] H. Avraham, E. Vannier, S. Cowley, S.X. Jiang, S. Chi, C.A. Dinarello, K.M. Zsebo, J.E. Groopman, Effects of the stem cell factor, c-kit ligand, on human megakaryocytic cells, *Blood* 79 (1992) 365–371.
- [18] Z.B. Hu, W. Ma, C.C. Uphoff, H. Quentmeier, H.G. Drexler, C-kit expression in human megakaryoblastic leukemia cell lines, *Blood* 83 (1994) 2133–2144.
- [19] V.C. Broudy, Stem cell factor and hematopoiesis, *Blood* 90 (1997) 1345–1364.
- [20] N.S. Weich, M. Fitzgerald, A. Wang, J. Calvetti, J. Yetz-Aldape, S. Neben, K.J. Turner, Recombinant human interleukin-11 synergizes with steel factor and interleukin-3 to promote directly the early stages of murine megakaryocyte development in vitro, *Blood* 95 (2000) 503–509.
- [21] R. Shirakawa, T. Higashi, A. Tabuchi, A. Yoshioka, H. Nishioka, M. Fukuda, T. Kita, H. Horiuchi, Munc13-4 is a GTP-Rab27-binding protein regulating dense core granule secretion in platelets, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 10730–10737.
- [22] H. Gomi, K. Mori, S. Itoharu, T. Izumi, Rab27b is expressed in a wide range of exocytic cells and involved in the delivery of secretory granules near the plasma membrane, *Mol. Biol. Cell.* 18 (2007) 4377–4386.
- [23] S. La Rosa, S. Uccella, L. Dainese, S. Marchet, C. Placidi, D. Vigetti, C. Capella, Characterization of c-kit (CD117) expression in human normal pituitary cells and pituitary adenomas, *Endocr. Pathol.* 19 (2008) 104–111.
- [24] O. Aydin, L. Yildiz, M. Kefeli, B. Kandemir, CD117 expression in normal, neoplastic, inflammatory, and reactive lesions of the thyroid, *Pathol. Res. Pract.* 204 (2008) 359–365.
- [25] J. Li, J. Quirt, H.Q. Do, K. Lyte, F. Fellows, C.G. Goodyer, R. Wang, Expression of c-Kit receptor tyrosine kinase and effect on beta-cell development in the human fetal pancreas, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293 (2007) 475–483.
- [26] K. Mizuno, T. Tolmachova, D.S. Ushakov, M. Romao, M. Abrink, M.A. Ferenczi, G. Raposo, M.C. Seabra, Rab27b regulates mast cell granule dynamics and secretion, *Traffic* 8 (2007) 883–892.
- [27] M.R. Hussein, Expression of KIT receptor tyrosine kinase protein in normal human skin: preliminary observations, *Cell. Biol. Int.* 31 (2007) 748–751.
- [28] L.W. Elmore, K. Domson, J.R. Moore, M. Kornstein, R.T. Burks, Expression of c-kit (CD117) in benign and malignant human endometrial epithelium, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125 (2001) 146–151.
- [29] C. Mauduit, S. Hamamah, M. Benahmed, Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis, *Hum. Reprod. Update* 5 (1999) 535–545.
- [30] Y. Kitamura, S. Hirotab, Kit as a human oncogenic tyrosine kinase, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 2924–2931.
- [31] G. Imokawa, Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders, *Pigment Cell Res.* 17 (2004) 96–110.

# 尊厳死論を超える

緩和ケア、難病ケアの視座

中島 孝

## 医療アウトカムの混乱

現代では、あらゆる患者が外来や救急を通して病院に集まり、病院は悲鳴をあげていると言われている。けっして治癒することのない、慢性疾患患者、難病患者、認知症患者、治らないがん患者、超高齢障害者などがその多数を占めている。治せない病気を治して欲しいと依頼された病院は苦悩し、限られた資源で運用されている。医療は疲弊し、質が低下し、混乱が起きているとされている。この問題を解決する為に、社会は、どのくらいの人や費用を医療に分配すれば良いのか分からないまま、「高齢者医療」、「難病医療・緩和医療」、「終末期医療」の現場で、多様な問題が顕在化し、先鋭化している。一般的には、現代医療の進歩、特に延命治療技術の進歩と社会の超高齢化がこの問題の原因と言われている。しかし、実は、この考え方は間違っているばかりか、自ら解決の道を閉すという、二重の誤

りをおかしている。

医療により人は「健康」になれるという幻想の下で、「健康」を増進するために作られた地域保健医療計画と診療報酬体系のパラダイムによって、あらゆる人々が無意識的に、一律に病院に導かれているのである。そこで、多数を占めている治癒を目指せない患者に対して、数としては少数ではない治る患者向けの医療モデルが標準適用され、平均在院日数の短縮を目標に医療がおこなわれている。治る患者を早く治し、治らない患者は早く医療の領域から出すことが、理想の医療の姿となっているが、治せる患者が極めてすくないため、うまくいかず、ひどい混乱となっている。現代日本の医療システムは他国のモデルを表面的に導入してきたが、このような問題に対して、自ら解決するための研究をアカデミアも研究所も行なっていない。こなかつた。

さらに悪い事は、現代医療を改善するための科学的方法と呼ばれ

るものには、認識論上の問題があつて、かえつて混乱をひきおこし、医療カタストロフィーをむしろ悪化させている。医療経済論議で使われる「効率性」は、追求すればするほど医療現場の混乱を招いている。効率性を論じているはずの病院経営管理指標や機能評価では、評価対象、すなわち分子として費用で割られるものが本来何であるのか一切定義せず、代理指標（サロゲート）のみが提示され、医療の意味、真の医療アウトカムは論じられていないからである。

この様な状況においても、保健医療従事者は、治癒を目指せなくても患者の Quality of Life (QOL: 生活の質) は高められると信じ努力している。しかし、どんなにがんばっても治らず、症状が良くならず、QOLすら悪化し続ける患者に直面すると、自分の仕事の評価ができなくなるばかりか、意味すら分からなくなる。「治らない患者をケアし続けることは医療の無駄ではないか」「この患者はどうせ死ぬのだから本人が希望すれば、無駄な延命はせず、早く死ぬ方がよいのではないか」「QOLが向上しないなら、死なせてあげたほうがよいのではないか」と葛藤することになる。誠実で真面目な医師や看護師ほど、解決できない課題によって自ら燃え尽きることになる。ここに「尊厳死問題」に医療従事者が関心を寄せる理由がある。しかし、そこには、医療におけるQOL概念の誤解がある上、真の医療アウトカムや意味を考えないまま、仕事をしている現場の混乱がある(1)(2)。

私が、八年前に副院長として病院に赴任した際に直面した問題はまさにこれであり、病床利用率は低いにもかかわらず、看護師など医療スタッフは重症者の対応で慢性的に疲れ切り対立しあい、管理

職は患者の満足度を高める方法も、医療内容を改善する方法も分からないまま、看護職員が毎年、多数辞職する悪循環におちいつていた。

医療における健康概念、アウトカム概念を見直し、ケア方法の理論的再構成をおこない、この問題を解決する実践モデルを確立することで、職員と患者の笑顔と共に医療を再生することができた。問題の源泉は「尊厳死」ではなかった。現代医学における科学的方法のほとんどは似非科学でしかなく、現代医療は科学の名の下で、主観と客観を逆転させるといふ間違つた歩みをしていたことが原因だった。この倒立状態の再逆転さえできれば、医療は真の科学性を取り戻せると考えた。

#### 現代医療のイノベーション

いわゆる科学的な現代医療モデルとは根拠に基づく医療 (EBM: Evidence based medicine) のことであり、すなわち、臨床試験 (治験) により何らかの臨床結果 (アウトカム) の改善が確率的に証明された治療法を、患者はインフォームド・コンセントの下で自己決定し、多専門職種 (multidisciplinary team) が協働し、クリティカルパス (critical path) により、最短経路で安全かつ効率的に実施するものとされる。

現代医療は、このモデルで解決できない問題に直面すると、医療費の分配の問題にすり変えるか、倫理委員会に投げかけるか、法的問題にしようとするが、それらは完全に誤りである(3)。本来はこの医療モデル自体を科学的に変えて、問題が起きない構造にすべき

だからである。しかし、現代ではこのモデルを盲信し、「健康」を目指す医療をおこなうことが前提とされているため、まじめに行うほど、治療を目指せず、健康になれない患者の医療は空回りとなり、医療の無駄 (medical futility) を生み出していると思われることになる。その場合にこそ適切な医療が必要なのでどうすればいいか分からず混乱してしまうことになる。「健康概念」に基づくアウトカム評価によれば、どんな熱心な医療によっても、これらの患者は常に悪化するだけなのである。これは、「健康概念」自体がおかしいからおきるのだが、ほとんどの人はそれに気がつかず、その様な治らない患者は十分に説明を受け「死を選ぶ」か「延命治療を選ぶ」かを自己決定すべきで、自己決定能力がなくなる前に、事前にそれを自分の選好により決定するのが良いという考えが論理的に正しいとされてしまう。

人は本来、自ら人生を放棄したり、死を自己決定したりする必要はなく、人は誰でも死を迎えるまで活き活きと生きることが可能なのである。そのための医療は工夫すれば可能はずなのである。実は、この問題を解決するために医療でイノベーションされたものが、一九六七年に英国のロンドン郊外シデナムで生まれた緩和ケアであり、それは今でも、現代の医療問題を根本から解決する力をもっている。しかし、この緩和ケアは日本を含む全世界で誤解され続けられており、我々は混乱の中にいる<sup>(4)</sup>。

#### 本来の緩和ケア運動

日本の緩和医療制度では、医療内容は実質的に制限され、対象患

者は「がん」にほぼ限られ、本来の緩和ケアとはまったく違うものになってしまった。一方、緩和ケア発祥の英国ホスピスや英国在宅ケアでは、小児領域や難病を含むあらゆる治らない病態が緩和ケアの対象となっている<sup>(4)</sup>。シデナムのセントクリストファーホスピスの創立者であるシリリーソンダースは「人は治療困難な病気に直面した時、無駄な治療を続け苦痛に満ち希望のない療養をすべきか? 『死を受容』し、あきらめて死を早く迎えるべきか? 苦悩する問題に着目し、この苦悩に対してどのようなケアを行えば解決できるのか」を考えた。彼女は、治療概念をやめ枠組みを変え、全人的苦痛 (トータルペイン) に対する緩和概念に変えればこの問題を一気に解決できると考えた。人は健康な人も、病気の方もすべて最終的に、治らない病気になって死ぬ。もともと生命は潜伏期間や発症時期は不明だが、すべて致死率一〇〇パーセントの難病に一〇〇パーセント罹患するのである。このため、治らない病気になるなら、生きることをあきらめる (abandon life) という考えはおかしく、どんな場合でも死を迎えるまで、全人的苦痛の緩和をおこなうケアを続けられれば生を肯定して生きられる (affirm life) はずだと考えた。多専門職種 (multidisciplinary team) のケアにより、症状がコントロールされ、身体的、心理・社会的な苦悩が除去されると、患者、家族は、死を受容するか否かではなく、治らない病気、死に至る病気と共に生きる人生であっても、再び肯定し活き活きと生きられるようになるのである。そして、死別したあとも、残された人は、悲しみから再生し生きて行くことを支援されるのである。医療技術は全人的ケアの文脈で使われるなら「単なる延命治療」ではなくなり、化

学療法、外科手術、放射線療法、胃瘻造設術、人工呼吸器療法も緩和になるのである。日本の緩和医療制度では残念ながら、そのようになっっていないが、本来のこの緩和ケアを行えば、がんはもちろん、慢性疾患や認知症、あらゆる治癒を目指せない疾患に対しても、災害時においても、ケアの質が改善し、患者と家族、保健医療従事者だけでなく、地域社会全体に笑顔がもどり、人は世代を交代しながらも、肯定的に生きて行けることは明白なのである。

英国の緩和ケア運動は全世界に広がったが、WHOは緩和ケアを、*An approach that improves the quality of life of patients and their families facing problems associated with life-threatening illness...*（人生を脅かす疾患による問題に直面している患者と家族のQOLを改善するアプローチである）。と定義した（二〇〇二年）。緩和を患者・家族のQOLの向上としたため、QOL概念を誤解すると緩和ケアも同時に理解できなくなる問題がおきている。不幸なことに、現代において一般的に誤解されているQOL概念によって「緩和ケアとは痛みをコントロールし、QOLが向上できない場合に、無駄な延命をせず死を受容するためのケア」と誤解されることになった。このため、QOL概念の誤解を解く必要がある。

#### 誤解された尊厳

QOLは、緩和ケアのみならず、様々な領域に使われているが、意味も計量性についても完全に誤解されている(5)。医療でQOLの向上という際には、何らかの手法により順位付けるか、計量可能な科学概念と考えられ、「生活の質」と翻訳される。一方、「生命の

尊厳 (SOL: Sanctity of Life)」の尊厳は、科学的評価・測定が不能な対象に対する哲学概念であり、宗教的な接点も持つ。「人自体の価値は計量できず、人は相互に置き換えられない存在」という意味が尊厳なのである。しかし、両者を混同し、SOLの代理指標をQOLと誤解すると、QOLが低い人は尊厳が少ないので生きる価値が少ないと誤って考えてしまう。一方、「人の命の質は計られるものでなく、良い命とか悪い命とかいう評価はできない」という文脈での「命の質」は実は、QOLではなく、尊厳 (SOL) のことである。しかし、QOLを間違って「命の質」と訳す誤解が絶えないのは残念である。この様な尊厳概念の誤解によって、「尊厳ある死」は医学的、客観的に定義でき、計画的に実行できるとする誤解が生まれ、一般市民だけでなく、医師、政治家、法学者も混乱することになった。

#### 効用≠QOLの誤解

厚生経済学は社会全体が幸福になるための所得の分配を研究する学問であり、ベンサムが功利主義で論じた「最大多数の最大幸福」を実現するために、個人の幸福、福利を効用値 (utility) として計量しようとする。そして、効用値を算出する際に、健康な生を1、死を0とし、ゲーム理論に由来する期待効用理論を使うことでおかしな理論となった(6)。まず、健康とはなにかが問題なのだが、その前に、期待効用理論は計量心理学的に正しいかという方法的問題が注目された。

その解決のため、国民データから計量心理学的に標準化された効

用値を算出するために開発されたのが、EuroQoL (EQ-5D) であり、そこでは効用値とQOLは同じとみなされている。EQ-5Dでは事前に決められた健康に関する五分野を人が自ら三段階評価し、標準化された変換テーブルを参照し効用値を算出する。五分野すべてを最低評価とすると、効用値は0(=死)以下となる。これは、国民データは健康集団であり、重篤な病気を不安に感じ、死より悪いと考え、忌避したいという意識を持っていることを反映している。この効用値は健康集団の集合意識を統計学的に標準化したのであり、病気の方の健康意識は反映されない。このため、治療を目指せない患者のアウトカム評価には本来使えない。しかし、このモデルを使い、医療費の支払いモデルをつくろうという誘惑が歴史上絶えたことがない。効用値の低い人には医療費の支払いを少なくするという、効用値を利用した質調整年 (QALY: Quality adjusted life year) の利用はオバマ大統領が二〇一〇年に行った医療保険改革の「患者保護と入手可能なケア法 (Patient Protection and Affordable Care Act)」中で禁止されたが(5)、我が国では最近評価される逆転がおきている。注意すべき点は、この効用値を人の存在価値、尊厳の代理指標と誤解し、医療費分配に使うと、ナチのホロコーストの理論である「Lebensunwertes Leben (生きるに値しない生命) 理論」と差がなくなり、大変危険である。

#### 健康関連QOLの問題

医療におけるQOL評価は、健康関連QOL評価 (HR-QOL: Health related QOL) が標準とされている。代表的なHR-QOL評価

尺度におけるSF-36の八領域、EQ-5Dの五領域はいずれもWHOの健康概念「健康状態とは、身体的、精神のおよび社会的に完全に良好であること (well-being)」であり、単に病気や病弱ではないことではない(一九四八年世界保健機関憲章前文)に由来し、計量心理学的な検討を経て作られたもので、それらを患者が主観評価することをQOL評価としている。治療し得ない進行性の疾患では、いくら治療しケア介入しても、客観的な「健康状態」になれないが、健康概念を使う限り、HR-QOL評価でも同様である。治らない病気で治療やケア効果の評価として、HR-QOL評価尺度を使う妥当性がない。HR-QOLが低い患者ほど、医療が必要であることは明白であるがその効果は示しえないのである。難病ケアや緩和ケアの目標はQOLの向上だが、HR-QOL評価尺度では決して医療による介入効果を示しえないことを第一に科学的に理解しておく必要がある(6)。

#### 健康概念の見直し

あらゆる人は、不定の時期にだが、必ず死ぬのであり、その過程で、すべての人が治らない疾患になる。このため、国民全体、全年齢、全疾患を対象とする保健医療福祉政策を立案するためには、この問題に対応できていないWHOの健康概念からできる限り早く、抜け出し、治療しない疾患にも対応できる健康概念を確立する必要がある。二〇一一年にBMJ (British Medical Journal) で提案された新しい健康概念はWHOの健康概念を変え、新たに、社会的、身体的、感情的な問題に直面した際の適応能力や自己を管理する能力

(the ability to adapt and self manage in the face of social, physical, and emotional challenges) という考えで健康をとらえようとしている(7)。この定義であれば、正常状態に、または健康状態に戻す事が医療なのではなく、問題に対する適応能力を改善したり、補ったりすることが医療の目的となり、治癒を目指せない疾患の医療は理論的な破綻なく構成できるようになる。これにより、「健康になれない人、治らない人への医療は本来不要なのだ」という医療の無駄論議にも終止符をうつことができる。

#### 客観から主観へ

本来の医療の目的は人が主観的に改善することであり、客観指標は単なる代理指標にすぎないのだが、現代医学においては戦前のドイツ医学由来の伝統から、あらゆる国で、患者の主観よりも、客観評価の重視が当たり前となった。患者の主観評価、自己評価は心理状態によって変化するため、信用できず、科学評価に値しなれないと思われた。そのため、現代医学は客観指標のみ基づいて行われ、患者のナラティブ (narrative) を聞くのは付け足しでしかなく、画像や検査データに基づいて医療は進められている。しかし、二〇〇〇年代に入り、臨床試験 (治験) で、介入や治療効果の評価指標として、主観評価として「患者の報告するアウトカム (PRO: patient reported outcome)」評価が提唱され、QOLもPROの一つとして概念整理された。現代医療において、患者の主観評価はようやく復権したのだが、治癒を目標にできない領域ではとりわけPROは重要になった(5)。

PROは患者の主観的評価を自己記入式や面接法によりおこなうもので、症状、機能、健康状態、QOL、医療内容などあらゆるものが評価対象となる。QOL (生活の質) はPROであり、患者の人生・生活に対する主観的評価であり、他者が判断する「人間らしさ」の評価ではない。現在、PROは医薬品や医療機器の治験・臨床試験における評価項目として重視されている。

#### レスポンスシフトの評価

現代医療が患者のナラティブを聞かなかつたのは、患者の主観評価を科学的に扱う際に問題となるレスポンスシフト (反応シフト: response shift) 現象の研究が不十分だったからである。人は同じ事象に対しても、時間や状況が異なれば、異なつた主観評価をする特徴を持つ。それをレスポンスシフト現象と呼ぶ(5)(6)(8)。代表例は薬理反応試験におけるプラセーボ効果である。時と場合により、患者自身の内的な評価尺度が変わるためにおきるが、生活分野の重みづけが変化したり、痛みの閾値が変わったり、再解釈のためにおきる。レスポンスシフトが科学的に解明されるにつれて、PROは臨床評価として使える様になった。PROを臨床評価として使うことで、改善効果だけでなく、良いレスポンスシフトをおこす治療か否かも分かる様になった。本来、医療・ケア技術の善し悪しは主観や客観による介入評価ではなく、人に良いレスポンスシフトをひき起こせるかどうか評価すべきなのである(5)。

SEIQoL: The Schedule for the Evaluation of Individual Quality of Life (個人の生活の質評価法) はアイルランドのダブリンの王立外

科大学病院のオ・ボイル教授らにより、従来の健康概念の縛りが無いQOL評価尺度として作られたが、レスポンスシフト現象も科学的に評価できる方法として高く評価されている(5)(6)(8)。これはQOL評価尺度であるがPRO評価の代表であり、緩和ケア領域や難病ケア領域においてケアによるPRO/QOLの改善を評価できると考えられている。SEIQOLは半構造化面接法によりおこなうものである。患者の最も大切に考えている生活の領域を五個引き出し、患者自身により内容を定義してもらい、それぞれ名付けてもらう。次にそれぞれの生活領域がどの程度うまくいっているか/満足しているかをVAS(例、0-100)により評価してもらう。次に、五個のそれぞれの領域がその人の生活においてどのような重みで意識されているかを計測する。重みが分かれば、一次元的なQOLとしてSEIQOL-indexが算出できる。重みを計測するためには原法では判断分析法という多変量解析を利用する。この場合、妥当性評価と信頼性評価が同時に数値的に算出される。この方法では時間がかかるため、実際の臨床場面では直接的に重みづける方法(DW法: direct weighting法)が頻用される。被検者にパイチャートに類似した円盤を操作してもらい、重みを直接表してもらう方法である。

治癒を目指せない進行性の疾患では、人は症状の変化に応じて、自分自身の生活領域の重要度を変化させながら生きている。健康関連QOL評価尺度は生活領域が固定されているために、その人にとってすでに無関係な生活領域を評価対象とする場合がある。SEIQOLは動的に生活領域が変化している状態でも評価可能であり、計量心理学的にも正しい評価方法である(1)(5)(6)。

#### 喪失を捉え直す

実際のケアにおいてこれらの理論を実践するためにはまず、治癒しないということに人はどう向き合うかを研究する必要がある。人は喪失(loss)の中にあってもどのように生き、サポートしあうのかというテーマは悲嘆ケアとして研究されてきたが、今まで、愛する人の喪失すなわち死別(Bereavement)研究がほとんどだった。実際の喪失研究は、人のあらゆる喪失に対して行われるべきである。身体機能の喪失、治癒しない病氣、老化、死という喪失があるし、災害の中での人命、財産、社会機能の喪失もある。個人が喪失から再生に向かうだけでなく、社会や世代が喪失から再生に向かうという普遍的なテーマを地域や時代を超えて、医療機関、福祉施設、地域社会でどのように科学的にアプローチできるのかどうか現代の喪失研究であり、その中で医療は病氣、老化、死をあつかうため大きな役割を担わされている。

#### キューブラーロスを超える

我が国では、喪失研究において、ステージ理論や受容理論が多く使われているが、それが現代医療の混乱の原因となっている。たとえば、治らない病氣を患者・家族に知らせること、告知(Breaking the news)の目的を「治らないことを伝え、死を受容させる」、「生きることを諦めさせるギアチェンジ」と誤解している医師、看護師が多い。本来、緩和ケア、難病ケアにおける告知の目的は、患者との信頼関係を作ることにある。説明しづらい良くない話を相手の



心を思いやりながら工夫し、知らせる過程で医療従事者は患者から信頼を得るのである。予測できない、不可逆的に悪化して行く病態に対して適切な援助を継続するためには患者・家族との信頼関係が必要であるから重要なのである。告知の第一目的は、「死の受容」や「疾患の受容」ではなく信頼関係のもとで、人は生きている限り適切なケアが受けられ、幸福に過ごせるはずだという価値の共有にある。

医療における受容理論は、障害受容概念として、一九五〇年に Grawson が提唱した(9)。ステージ理論は社会科学や力動的心理学の影響により提唱されたが、そこでは受容概念ではなく、最初は、適応概念だった。しかし、一九六九年、Kubler-Ross は『死ぬ瞬間——死にゆく人々との対話』において、ステージ理論と受容理論を合わせたモデルを提唱した(10)。これは否認、怒り、取引、抑鬱、受容の五段階を経て人は希望に至るという心理モデルであり、世界に大きな影響を与えた。この影響の下で、一九八〇年、リハビリテーション医学指導者の上田敏は「障害受容」とは「あきらめ」でも「居直り」でもなく価値転換であるとし、患者が障害や疾患の受容に至ることがリハビリテーションや治療に必須であるとした(11)。日本では緩和医療で、この受容理論を導入した。しかし、個別ケアにこの Kubler-Ross の受容理論を当てはめれば当てはめるほど、受容できない患者に無理に受容を促すだけで、患者のナラティブをケアチームが傾聴しなくなり、受容できない患者とレットルを貼ることで、関係性が崩れ、その結果、患者は自らを言語化し再構成して生きて行くことがむずかしくなるという問題がおきた。本来、価値観

の転換（ギアチェンジ）は患者に要求するものではなく、医療従事者がまずする必要があるものなのである。

英国緩和ケアではもとよりこの理論は使わなかったし、この理論の科学性への疑問、疾患受容の行動化の困難、障害受容に至らない人への蔑視がおきる悪影響があるために廃れた。それではこの領域ではどのようなアプローチが有効なのだろうか。

#### ナラティブアプローチ

紀元前五〇〇年頃のインドで、シッタールタは、人は古い、病み、死ぬことで喪失することを思い悩んだ。自分も古い、病み、死するものにかかわらず、他人の古い、病み、死を嫌悪し、自分はそれらの運命から自由になれる様に思うが、実際にはこの運命からだれも自由ではないはずで、どうしてこんな心の矛盾を自分は持つて生きているのだろうかとさらに悩んだ。人間は生きる中で、物事の認識、解釈をつねに変えながら、世界を再解釈し、この矛盾に対応し日々を過ごしているが、これがナラティブアプローチのはじまりであるといわれている(13)。

一九九〇年、構成主義（constructivism）の影響の下でエプストンとホワイトは精神科家族療法を改善するために、『Narrative means to therapeutic ends（物語としての家族）』で、ナラティブ療法を発売した(14)。解決困難な問題とはドミナント・ストーリー（主要なストーリー）が十分に生きられた経験を表していない状態ととらえる。汲み残された経験に光があたると、オルターナティブ・ストーリー（もう一つの代替ストーリー）が創生される。問題は患者個人や家族・

介護者の属性として存在しているのではない。問題が外在化できると、新たな意味を見いだしながら、患者自身はストーリーを書き換え生きて行くことができるようになると考えた。これは治らない病気と共に生きる生活を支援する方法としても有効な方法といえる。

一九九九年に Greenhalgh はプライマリケア領域で「ナラティブに基づく医療(NBM: narrative based medicine)」を提唱した(15)(16)。診療を改善するためには、患者と医療チームとの心理的な協力関係の促進のためだけでなく、診断、治療のために、西洋医学の中で失われてしまった、患者の語るナラティブの意味を再構成する技術が必要であるとした。

二〇〇一年に、ニーマイヤらは、『喪失と悲嘆の心理療法——構成主義からみた意味の探究 (Meaning Reconstruction and the Experience of Loss)』を発表した(17)。治らない疾患や死別における悲嘆ケアとしてはステージ理論や受容理論は有用ではなく、患者のナラティブから、意味の再構成を行いながら心理支援して行く方法が重要であるとした。

二〇〇九年にオリビエらは『保健医療におけるナラティブと物語 (Narrative and stories in health care)』で、シシリオンダースが英国緩和ケアで行ってきた基本的な方法はナラティブアプローチであることを表明した(18)。

ナラティブアプローチは治癒を目指せない緩和ケアや難病ケアの領域で医療を成功に導く支援方法であり、ステージ理論や受容理論の問題点を乗り越え、患者・家族・地域社会を支援することができると。このため、現代医療の必須技術になった。しかし、未だに医学

や看護学の標準的教育カリキュラムに組み込まれておらず問題である。

#### 変わり続ける人・社会

医療は本来患者の報告するアウトカム (PRO) を改善すべきだが、現代医学では代理指標でしかない客観的エビデンスを尊重する逆転がおきた。医師や看護師は客観指標のみを意識し、患者の主観的な改善感やナラティブを重視しなくなった。そのため、患者が生きて行く内的な力は奪われてしまった。これが現代の医療問題の根本原因である。この問題を解決するためには、PROを科学的にアプローチし、最初から、患者と関係者(家族など)の主観的な満足度を高めるための医療を提供する医学に作り替える必要がある。

この新しい流れを確立できれば、がん、非がん、難病、認知症、生活習慣病、高齢者医療、post-ICU 医療、障害児(者)医療、小児慢性疾患医療、救急医療などすべてが同じ基盤で、地域で行うことができると考えられる。適切なケアさえあれば、どんな病気であっても、患者や関係者は生きる事をあきらめるのではなく、治らない病気と共に人生を肯定して生きられるようになる。どんな年齢であっても、どんな病気と共にあっても、たとえ意識障害が合併しているとしても、人は死を迎えるまで、変化し成長発達することができる。残された人々は喪失を乗り越え、継承し発展させられる。これが本当の自律概念であり、本来の緩和ケア、すなわち喪失から再生へのケアであり、地域を再生させる力となる。

この様に医療を再構成 (reconstruct) するだけで、もともと医療

従事者が持っていた力や現代の医療技術は再び意味付けられ、医療はたちまち改善する。医療は人や社会を自律的に成長させ再生する力として再評価され、「尊厳死」問題は消失するだろう。同時に、経済学者のハイエクが「設計主義の誤り」と言った様に、高齢化社会において、効率良く尊厳死するために必要な合理的医療の制度設計を議論する厚生経済学はもはや不要となるだろう。その時には医療における分配や価格の問題も自然に解決されると思われる。このパラダイムチェンジには教育や研究やグループワークは必要だが、基本的に追加の費用はかからないはずである。

註

- (1) 中島孝、難病におけるQOL研究の展開、保健の科学 2009 : 51-83-92.
- (2) 中島孝・川口有美子、QOLと緩和ケアの奪還、現代思想 2008 : 36: 148-173.
- (3) 中島孝、ALSケアをめぐる問題——倫理から緩和ケアへ、臨床神経学 2008 : 48: 958-960.
- (4) 中島孝・白井良子、セントクリストファーホスピスから日本へ吹く風、ホスピス緩和ケアの誤解をとく、訪問看護と介護 2010 : 15: 864-872.
- (5) 中島孝、医療におけるQOLと緩和についての誤解を解くために、医療ジャーナル 2011 : 47: 218-224.
- (6) 中島孝、ALS患者の在宅医療 QOL評価、Journal of Clinical Rehabilitation 2010 : 19: 589-596.
- (7) Huber M, Knotnerus JA, Green L, et al. How should we define health? Bmj 2011 : 26.
- (8) Ring L, Hofer S, Heuston F, Harris D, O'Boyle CA. Response shift masks the treatment impact on patient reported outcomes (PROs) : the example of individual quality of life in edentulous patients. Health Qual Life Outcomes 2005 : 3: 55.
- (9) Grayson M. The concept of "acceptance" in physical rehabilitation. Military surgeon 1950 : 107 : 221-226.
- (10) キューブラーロス、死ぬ瞬間——死にゆく人々との対話(邦訳) : 読売新聞社、1971.
- (11) 上田敏、障害の受容 : その本質と諸段階について、総合リハビリテーション 1980 : 8: 515-521.
- (12) Lazarus RS, DeLongis A. Psychological stress and coping in aging. The American psychologist 1983 : 38: 245-254.
- (13) 中島孝、関係性を紡ぎ出す——臨床における意味と物語の復権、医師の視点、仏教看護・モニター 2011 : 6: 26-41.
- (14) エンストーン・ホワイト、物語としての家族(邦訳) : 金剛出版、1992.
- (15) Greenhalgh T. Narrative based medicine : narrative based medicine in an evidence based world. BMJ 1999 : 318 : 323-325.
- (16) Greenhalgh T, Hurwitz B. Narrative based medicine : why study narrative? BMJ 1999 : 318 : 48-50.
- (17) ニーマイヤ、喪失と悲嘆の心理療法——構成主義からみた意味の探究(邦訳) : 金剛出版、2007.
- (18) Gunaratnam Y, Oliviere D. Narrative and Stories in Health Care. Illness, dying and bereavement. London : Oxford University Press, 2009.
- (19) ハイエク、思想史論集、第一部、設計主義の源流、春秋社、2009.  
(なかじま たかし・医師、国立病院機構新潟病院)

# 患者もスタッフもいきいきとするケアを行なうために 治らない病気とともに生きる 患者の QOL を考える



中島 孝

国立病院機構新潟病院 副院長

## はじめに —— ケアの意味を再考しよう

医療を改善するための科学的方法・指標といわれているものには、かえって混乱を引き起こすものがある。例えば効率性を論じている病院経営管理指標や機能評価には、効率性評価のための対象、ケアの意味、真の医療アウトカムは定義されておらず、代理指標のみが提示されているだけである。このため、代理指標の改善が医療の質改善に対応しない問題が起きている。

現代では、あらゆる患者が救急や外来を通して急性期病院に集中し、問題となっているが、いわゆる治癒をめざせない慢性疾患患者、難病患者、認知症患者、がん患者、超高齢者もそのなかの大きな割合を占める。これは社会の高齢化によって起きた現象ではない。「健康」を増進するための地域保健医療計画と診療報酬体系のパラダイムによって、あらゆる人々が急性期病院に一律に導かれているのだ。上記の治

癒をめざせない患者に対して、治る患者向けの医療モデルとクリティカルパスが標準適用され、効率性を高めるために平均在院日数短縮という代理指標が使われる。そこでは、患者は早く病院から外に出すことが、理想の病院医療の姿とされている<sup>1)</sup>。

## 慢性疾患患者のケアに無力感を感じるスタッフを救いたい

このような状況であっても看護師は、治癒をめざせなくても患者のQOLはケアによって高められると信じて努力している。しかし、どんなに熱心にケアしても治らず、QOLまでも悪化し続ける患者に直面すると、自分の仕事の意味、ケアの意味がわからなくなり、「治らない患者をケアし続けることは医療の無駄ではないか」「この患者はどうせ死ぬのだから無駄な治療はしなくてもよいのではないか」「QOLが向上しないなら、早く死なせてあげたほうがよいのではないか」と葛藤することになる。真面目な医療従

事者ほど、自ら燃え尽きてしまう。

8年前、私が国立病院機構新潟病院（以下、当院）に副院長として赴任した際にみた光景はまさにこれであり、病院の病床利用率は低いにもかかわらず、看護師は疲れきっていて、管理職は患者の満足度を高める方法も、医療内容を改善する方法もわからない状況だった。その結果、看護師が多数辞職する悪循環に陥っていた。その後、本稿で紹介する医療におけるケア概念や健康概念の再構成を行ない、この問題を解決する実践モデルを確立し、看護師と患者の笑顔とともに病院を再生することができた。

## 現代医療の イノベーションとしての 緩和ケア

現代医療の科学モデルは「根拠にもとづく医療（EBM）」である。すなわち、臨床試験（治験）により何らかのアウトカムの改善が確率的に証明されている治療法を、患者はインフォー