

# 博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

平成21年度

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

# 目 次

平成21年度

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第396号	上 田 和 樹	Adaptive HNE-Nrf2-HO1 pathway against oxidative stress is associated with acute gastric mucosal lesions. (急性胃粘膜障害での酸化ストレスに対するHNE-Nrf2-HO1系の関与) .....	1
博(医)甲第397号	吉 川 和 朗	Dendritic cells with transduced survivin gene inducespecific cytotoxic T lymphocytes in human urologic cancer cell lines (Survivin 遺伝子導入樹状細胞を用いたヒト泌尿器癌細胞株に対する特異的細胞障害性Tリンパ球の誘導) .....	4
博(医)甲第398号	石 田 興一郎	High CCR7 mRNA expression of cancer cells is associated with lymph node involvement in patients with esophageal squamous cell carcinoma. (食道扁平上皮癌におけるCCR7の発現とリンパ節転移との関連) .....	6
博(医)甲第399号	岡 田 規	Tolvaptan, a selective oral vasopressin V2 receptor antagonist, ameliorates podocyte injury in puromycin aminonucleoside nephrotic rats (ピューロマイシンネフローゼモデルラットにおいて、選択的バゾプレッシン V2 受容体拮抗薬であるトルバプタンの経口投与はポドサイト傷害を改善させる) .....	8
博(医)甲第400号	藤 井 令央奈	BCG Cell wall skeleton (BCG-CWS) enhances killing activity of CTL activated human dendritic cells transduced with PSA gene (PSA遺伝子導入樹状細胞による細胞障害活性のBCG Cell wall skeleton (BCG-CWS)による増強) .....	11
博(医)甲第401号	上 中 智香子	Phenol peels as a novel therapeutic approach for actinic keratosis and Bowen disease: Prospective pilot trial with assessment of clinical, histologic, and immunohistochemical correlations (上皮性皮膚腫瘍に対するフェノール治療の効果と免疫組織化学的研究) .....	13
博(医)甲第402号	宗 紗千子	Mechanism of phosphate-induced calcification in rat aortic tissue culture: possible involvement of Pit-1 and apoptosis (ラット血管培養を用いた高リン負荷による血管石灰化機序の検討: Pit-1およびアポトーシスの関与) .....	16
博(医)甲第403号	半 羽 慶 行	Effects of Unfractionated Heparin and Low-molecular-weight Heparin on Bone Metabolism in a Rat Model of Renal Failure (非分画ヘパリン及び低分子ヘパリンが腎不全モデルラットの骨代謝に及ぼす影響) .....	19

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第404号	勘 野 貴 之	Gastric acid reduction leads to an alteration in lower intestinal microflora (胃酸分泌低下による大腸内細菌叢への影響) ……………	21
博(医)甲第405号	廣 野 誠 子	Molecular markers associated with lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma by genome-wide expression profiling (網羅的遺伝子発現解析を用いた膵癌リンパ節転移に関与する分子マーカーの同定) ……………	23
博(医)甲第406号	植 村 志乃美	Identifying molecular markers for chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer. Increased expression of interferon-stimulated gene 15 kd is associated with intrinsic chemoresistance. (膵癌のゲムシタビン感受性分子マーカーの同定—interferon-stimulated gene 15 kd の発現増加と内因性抗癌剤耐性の関連—) ……………	25
博(医)甲第407号	藤 田 恭 子	Sonic hedgehog: its expression in a healing cornea and its role in neovascularization. (角膜新生血管における Sonic hedgehog の役割) ……………	28
博(医)甲第408号	島 田 健	SUMO4 Met55Val polymorphism is associated with coronary heart disease in Japanese type 2 diabetes individuals (日本人2型糖尿病患者において <i>SUMO4</i> 遺伝子 Met55Val 多型は冠動脈疾患と関係する) ……………	31
博(医)甲第409号	国 本 健	BMD Measurement by DXA method is Useful for Estimation of Bone Strength of Lumbar vertebra in CKD-MBD model rats (CKD-MBD モデルラットにおいて DXA 法による骨密度の測定は腰椎の骨強度推定に有用である) ……………	34
博(医)甲第410号	丹 羽 徹	Mixed gastric- and intestinal -type metaplasia is formed by cells with dual intestinal and gastric differentiation (胃腸混合型腸上皮化生を構成する細胞は胃型および腸型形質を共発現する) ……………	36
博(医)甲第411号	藤 田 識 人	Impaired angiogenic response in the cornea of mice Lacking osteopontin (マウス角膜創傷治癒での血管新生反応に対するオステオポンチンの役割) ……………	38
博(医)甲第412号	芳 山 恵	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene polymorphisms in Japanese children with infection-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. (日本人小児における感染症関連血球貪食症候群と CTLA-4 遺伝子多型) ……………	39
博(医)甲第413号	射 場 昭 典	Insulin resistance increases the risk for urinary stone formation in a rat model of metabolic syndrome (インスリン抵抗性が尿路結石形成に及ぼす影響についての基礎的検討) ……………	41

博(医)甲第414号	北野 愛	Emodin suppression of ocular surface inflammatory reaction. (眼表面における炎症性反応に対するエモジンによる抑制効果)	43
博(医)甲第415号	岡田 基宏	Development and optimization of a cell-based assay for the selection of synthetic compounds that potentiate bone morphogenetic protein-2 activity. (BMP-2 作用を増強させる化合物選別のための cell-based assay の確立) ……………	46
博(医)甲第416号	神埜 奈美	Low-echoic lesions underneath the skin in subjects with spinal-cord injury (脊髄損傷者における B モードエコーを用いた褥瘡評価) ………	47
博(医)甲第417号	李 垂 琮	Distinct Clinical, Serological, and Sonographic Characteristics of Hashimoto's Thyroiditis Based With and Without IgG4-positive Plasma Cells (IgG4 陽性プラズマ細胞から見た橋本甲状腺炎の臨床的特色) …	49
博(医)甲第418号	豊 澤 聖 子	Immunohistochemical analysis of CXCR4 expression in fibrohistiocytic tumors (線維組織球系腫瘍における CXCR4 の発現の検討) ……………	52
博(医)甲第419号	山 岡 博 之	Truncal Pruritus of Unknown Origin May Be a Symptom of Diabetic Polyneuropathy (原因不明の体幹部癢痒感は糖尿病性多発神経障害の症状かもしれない) ……………	55
博(医)甲第420号	王 穎	Ghrelin inhibits insulin secretion through the AMPK-UCP2 Pathway in $\beta$ Cells (グレリンによるインスリン分泌抑制機構の解明—AMPK-UCP2 経路の関与) ……………	57
博(医)甲第421号	古 川 安 志	Polymorphisms in the <i>IDE-KIF11-HHEX</i> gene locus are Reproducibly associated with type 2 diabetes in a Japanese population (日本人においても <i>IDE-KIF11-HHEX</i> 遺伝子座の多型は 2 型糖尿病と関連する) ……………	60

(学位記番号)	(氏名)	(論文題目)	(頁)
博(医)乙第838号	林 正 樹	Pathogenic role of tonsillar lymphocytes in associated with HSP60/65 in Pustulosis Palmaris et Plantaris (掌蹠膿疱症における熱ショック蛋白 60/65 に関連する扁桃リンパ球の病態学的役割について) .....	62
博(医)乙第839号	佐 治 史 恵	Regulation of fibroblast growth factor 23 production in bone in uremic rats (二次性副甲状腺機能亢進症モデルラットの骨における FGF23 産生の調節) .....	64
博(医)乙第840号	池 内 佳 子	Factors affecting bone mineral density of young women and predictive factors of low bone mineral density (若年女性における骨塩密度に影響を与える諸因子及び低骨塩密度予測因子に関する検討) .....	66
博(医)乙第841号	岩 本 卓 也	Effectiveness of hepatic arterial embolization on radiofrequency ablation volume in a swine model: relationship to portal venous flow and liver parenchymal pressure (生体豚におけるラジオ波焼灼体積の肝動脈塞栓術の効果について: 門脈血流および肝実質圧との関係も含めて) .....	69
博(医)乙第842号	熊 本 和 正	Identification of radicals formed in the reaction mixture of bovine kidney microsomes with NADPH (牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液中に生成するフリーラジカルの構造決定および生成機構) .....	71
博(医)乙第843号	西 川 徹	Synergistic antitumor effects of fleroxacin with 5-fluorouracil in vitro and in vivo for bladder cancer cell lines (膀胱腫瘍に対する fleroxacin と 5-fluorouracil 併用療法時の相乗的抗腫瘍効果に関する基礎的検討) .....	74
博(医)乙第844号	西 岡 和 哉	Percutaneous Vertebroplasty Using Hydroxyapatite Blocks for the Treatment of Vertebral Body Fracture (椎体骨折に対するハイドロキシアパタイトブロックを用いた経皮的椎体形成術) .....	77
博(医)乙第845号	木 田 真 紀	Impaired cutaneous wound healing with excess granulation tissue formation in TNF $\alpha$ -null mice (皮膚の創傷治癒における腫瘍壊死因子の役割に関する実験的研究) .....	79
博(医)乙第846号	中 村 智 之	Cutaneous polyarteritis nodosa: revisiting its definition and diagnostic criteria (皮膚型結節性多発動脈炎の疾患概念と診断基準) .....	82
博(医)乙第847号	嶋 本 哲 也	MUC1 is a useful molecular marker for malignant intraductal papillary mucinous neoplasms in pancreatic juice obtained from endoscopic retrograde pancreatography. (膵管内乳頭粘液性腫瘍の悪性度に関する術前遺伝子診断) .....	84

博(医)乙第848号	富永敏治	Combination of <i>p53</i> codon 72 polymorphism and inactive <i>p53</i> mutation predicts chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. (大腸癌における <i>p53</i> の不活化型遺伝子変異と遺伝子多型による 5-FU 感受性予測) .....	86
博(医)乙第849号	澤田貴宏	Ternary complex formation of EphA4, FGFR and FRS2 $\alpha$ plays an important role in the proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells (胚性神経幹細胞・前駆細胞の増殖作用において EphA4・FGFR・FRS2 $\alpha$ により形成される複合体が重要な役割を果たす)	89



学位記番号	博(医)甲第396号		
学位授与の日	平成21年4月14日		
氏名	上田和樹		
学位論文の題目	Adaptive HNE-Nrf2-HO1 pathway against oxidative stress is associated with acute gastric mucosal lesions. (急性胃粘膜障害での酸化ストレスに対する HNE-Nrf2-HO1 系の関与)		
論文審査委員	主査	教授 山上裕機	
	副査	教授 覚道健一	教授 一瀬雅夫

## 論文内容の要旨

【緒言】常に外界からの刺激に曝されている胃粘膜では、組織構造、機能の維持に様々な防御機構が働いている。*H. pylori* や胃酸関連以外のストレス、薬物などに起因する胃粘膜障害も少なからず存在し、これらの病態の背景には胃粘膜微小循環障害や酸化的ストレスが関与していることが想定されている。とりわけ、酸化的ストレスが多くの病態や生命現象に関与することが、今日までの多くの研究により明らかにされており、内因性あるいは外因性的の原因により生じる活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) は様々な細胞傷害を惹起し、脂質酸化を介して 4-hydroxy-2,3-nonenal (HNE) など多くの産物を生じ、これらが契機となって転写因子である NF-E2-related factor 2 (Nrf2) が、細胞質から核へ移行し結合することで Hemeoxygenase 1 (HO-1) などの抗酸化物質が誘導されることが知られている。本研究は、胃粘膜傷害過程における酸化的ストレスの役割を明らかにする目的で、塩酸経口投与ラットの急性胃粘膜傷害 (Acute gastric mucosal lesion: AGML) モデルを用いて、HNE、転写因子 Nrf2、そして Nrf2 で誘導される HO-1 などの一連の分子の胃粘膜における発現および局在について形態学的手法を用いて検討した。

【対象と方法】 Wistar rat に 0.6N 塩酸 (0.4ml/100g) を経口投与し、AGML を作製した。AGML の定量的評価とサンプルの採取：経時的に摘出した胃を伸展し、デジタルカメラで撮影、傷害面積を測定することで、傷害の程度を定量的に解析した (lesion index)。また胃体部傷害部分で全層を切り出し、RT-PCR および Western blot 用に -80℃ で保存した。凍結切片を作製し、*In situ* hybridization histochemistry および免疫組織化学用として -80℃ で保存した。実験 1 AGML における HNE、Nrf2、HO-1 の発現と局在の検討：Real time RT-PCR：各サンプルより total RNA を抽出し、cDNA を合成した後、LightCycler (Roche) を用いて SYBR Green 法で定量的 PCR を行った。*In situ* hybridization histochemistry：HO-1 mRNA に対する anti sense oligonucleotide を <sup>35</sup>S-dATP で 3' end labeling した probe を用いて hybridization を後、autoradiography を行い、Hematoxylin で対比染色した。Western blot 法：各サンプルから可溶性タンパクを抽出。サンプルの一部は、核分画と細胞質分画に分けて抽出した。SDS-polyacrylamide gel で電気泳動、Immobilon-P (PVDF) 膜に転写後、以下の 1 次抗体 (抗 HNE 抗体、抗 Nrf2 抗体、抗 HO-1 抗体、抗 Histone H1 抗体、抗 actin 抗体) との反応を行った。次に Peroxidase ラベル抗マウス抗体あるいは抗ウサギ抗体を 2 次抗体として用いて反応後、ECL 法で検出した。HO-1 免疫陽性シグナルの定量は、Lumino analyzer LAS-1000 (Fuji Film) で行い、actin 免疫陽性のシグナルにて補正した。免疫染色：抗 HNE 抗体、抗 Nrf2 抗体、抗 HO-1 抗体と、Vectorstain ABC kit を用いて行い、DAB で発色後、Hematoxylin にて対比染色した。蛍光二重染色：HNE、Nrf2、HO-1 発現細胞の同定のため、蛍光二重染色を行った。上記の抗体に加えて、マクロファージのマーカーである抗 CD68 (ED1, mouse monoclonal) 抗体、抗 CD163 (ED2, mouse monoclonal) 抗体を用いた。Biotin 化二次抗体と反応後、Texas-Red avidin D、FITC、DAPI で発色させた。実験 2 AGML における胃粘膜微小循環と HO-1 発現の検討：薬理的処理を用いて、胃粘膜微小循環を変化させ、AGML の変化と HO-1 の発現レベルを検討した。① CGRP 陽性知覚神経の除神経による検討：Capsaicin (125mg/kg, s.c.) を 3 日間投与し、CGRP 陽性知覚神経の機能的除神経モデルを作製した。一晚絶食させたラットに 0.6N 塩酸 (0.4ml/100g) を経口投与、2 時間後に AGML を評価するとともに、HO-1 mRNA 発現レベルを評価した。② PGI2 (Beraprost) 投与による検討：一晚絶食させたラットに、胃粘膜微小循環を改善する PGI2 を経口投与後、0.6N 塩酸 (0.4ml/100g) を経口投与した。2 時間後 AGML を評価するとともに、胃での HO-1 mRNA 発現レベルを評価した。

【結果】**実験1**：肉眼的に塩酸投与後60分の時点で最も強い出血性びらん形成を認めたが、24時間後の時点では改善を認めた。組織学的には、表層粘液細胞の脱落や粘膜上皮の壊死が観察された。Western blot法の結果、分子量35KdのHNEに一致するバンドは経時的に増加を認めた。免疫染色では傷害粘膜、およびその周辺に散在する細胞にHNEの発現を認めた。Nrf2 mRNA レベルには変化を認めなかったが、塩酸投与後1から3時間で細胞質分画から核分画へのNrf2免疫陽性バンドの移行を認めた。免疫染色では、傷害粘膜および周囲に散在する細胞に認めた。蛍光二重免疫染色ではNrf2免疫陽性反応はHNE免疫陽性細胞と同一であり、ED1およびED2陽性のマクロファージと考えられた。組織学的にもNrf2免疫反応は経時的に核への移行を認めた。Real time RT-PCR法でHO-1 mRNA レベルは、塩酸投与後90分から増加し、3時間の時点で最大(15倍)に達し、その後漸減した。*In situ hybridization histochemistry*では、HO-1 mRNAは粘膜固有層、粘膜下組織、筋層に散在する細胞に発現が認められた。Western blot法でHO-1免疫陽性反応は、塩酸投与後、経時的増加を認め、6から24時間の時点で有意に増加した。HO-1免疫陽性細胞は、HO-1 mRNA発現と同様の粘膜固有層、粘膜下組織、筋層に散在して認められた。蛍光二重染色ではHO-1免疫陽性シグナルは、ED1陽性、ED2陽性マクロファージに一致して認められ、さらにHNE免疫陽性シグナルとも重なって観察された。**実験2**：CapsaicinによりCGRP陽性知覚神経を除神経する事で、塩酸投与後のAGMLが増悪し、PGI2投与で粘膜微少循環を改善する事で、塩酸投与後のAGMLが増悪した。一方、除神経モデルではHO-1 mRNAレベルの増加、PGI2投与では低下を認めた。また、Lesion indexとHNE免疫陽性シグナルおよびHO-1 mRNA発現シグナルとHNE免疫陽性シグナルの間に有意な相関関係を認めた( $r = 0.542, p < 0.01$  および  $r = 0.625, p < 0.01$ )。

【考察】本研究では胃粘膜傷害に際して、作動する防御機構について、生化学的、形態学的手法を用いて検討した。その結果、胃に存在するマクロファージにおいてHNE-Nrf2-HO-1 pathwayが機能していることが明らかとなった。マクロファージは様々なサイトカインを放出、胃粘膜防御に関与していることが知られている。HO-1は酸化作用のあるヘムを、抗酸化作用のあるbiliverdin、CO、Ferritinに分解するところから、胃においてマクロファージが抗酸化的ストレス作用を介して粘膜保護に働いている可能性が強く示唆された。さらに塩酸投与後24時間では肉眼的に粘膜傷害の改善を認めた後も、HO-1の発現が増加しているところから、傷害により誘導されたHO-1は新たな傷害の拡大に対する防御としての役割を担っている可能性が考えられた。CGRP陽性知覚神経を除神経し、血管拡張作用のあるCGRPを減少させると粘膜傷害が増悪、PGI2投与で血管拡張を惹起する事で粘膜傷害が軽減するところから、粘膜防御における胃粘膜微少循環の重要性が確認された。更にHO-1発現が、粘膜傷害の程度、すなわち酸化的ストレスの程度と相関すること、HO-1活性を阻害すると粘膜傷害が悪化することより、胃におけるHO-1発現は酸化的ストレスに対する生体の防御機構としての役割を担っていることが判明した。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成21年1月24日、審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。

常に外界からの刺激に曝されている胃粘膜では、組織構造、機能の維持に様々な防御機構が働いている。本邦における胃潰瘍および胃炎の発症に *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) が関与することが明らかになっているが、一方、酸化的ストレスが多くの病態や生命現象に関与することが、最近注目を集めている。

本研究では塩酸経口投与による急性胃粘膜傷害モデルを用いて、胃粘膜傷害過程における酸化的ストレスの役割を明らかにする目的で、過酸化脂質酸化の最終産物であり、ストレス応答の mediator として機能する、4-hydroxy-2,3-nonenal(HNE)、HNEの刺激により核への移行を起し、酸化的ストレス関連遺伝子群の転写因子として機能する NF-E2-related factor 2(Nrf2)、Nrf2で誘導され、Hemeを分解する Hemeoxygenase1(HO-1)などの一連の酸化的ストレス関連物質の胃における発現と局在を生化学的、形態学的手法を用いて解明した。更にHO-1の生理的意義について検討を加えると共に、HO-1誘導作用有する薬剤を検索した。その結果、

1) AGML発症の背景に胃粘膜組織内に浸潤したマクロファージおよび障害周囲の粘膜上皮において、過酸化脂質酸化の最終産物であるHNEが生成され、転写因子であるNrf2が細胞質から核内に移動し、最終的にHO-1の発現が亢進されるという一連の内因性応答の存在が明らかとなった。

2) 胃粘膜微少循環の増減に伴い、胃粘膜傷害の改善または増悪が認められ、HO-1 発現は傷害の程度に相関することが明らかとなった。

3) HO-1 活性の低下に伴って、胃粘膜傷害が増悪することにより、HO-1 が胃の粘膜防御に関与していることが明らかとなった。

4) 臨床で使用されている Polaprezinc による粘膜保護の機序に HO-1 の誘導が関与していることが明らかとなった。

以上、本研究は、急性胃粘膜傷害での酸化ストレス反応に対する抗酸化物質 HO-1 の誘導メカニズムを解析することで胃粘膜での防御機構の一端を解明したものであり、更に、臨床で使用される Polaprezinc に HO-1 誘導作用を介して胃粘膜傷害予防効果を発揮することを明らかにし、胃粘膜保護薬としての有効性を示したものである。酸化ストレスによる胃粘膜傷害の発症とその予防メカニズムに関する新知見を提供するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第397号		
学位授与の日	平成21年5月12日		
氏名	吉川和朗		
学位論文の題目	Dendritic cells with transduced survivin gene induce specific cytotoxic T lymphocytes in human urologic cancer cell lines (Survivin 遺伝子導入樹状細胞を用いたヒト泌尿器癌細胞株に対する特異的細胞障害性 T リンパ球の誘導)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 山上裕機	教授 原 勲

## 論文内容の要旨

**【目的】** アポトーシス阻害タンパクファミリーの一つである Survivin は多くの癌で発現しているが正常組織では発現がきわめて低く、腫瘍免疫療法の標的抗原として適していると考えられる。本研究ではアデノウイルスベクターを用いて Survivin 遺伝子を導入した樹状細胞(DC)により、Survivin 特異的な細胞傷害性 T 細胞(CTL)が誘導可能か検討し、さらにこの CTL がヒト泌尿器癌細胞株に対して細胞傷害活性を示すか検討した。

**【方法】** ヒト Survivin 遺伝子発現アデノウイルスベクター(AxCA-survivin)を作製した。健常者から採取した DC に AxCA-survivin を遠心法で感染させ、Survivin 遺伝子を導入した。Survivin 遺伝子導入 DC を用いて自己末梢血単核球より Survivin 特異的 CTL を誘導し、<sup>51</sup>Cr-release assay によりこの CTL の癌細胞株に対する細胞傷害活性を測定した。

**【結果】** Survivin 遺伝子を導入した DC により、膀胱癌、腎癌、前立腺癌といった種々の泌尿器癌細胞株に対する Survivin 特異的 CTL が誘導された。この細胞傷害活性は抗 CD8 および抗 MHC class I 抗体により阻害された。また、この細胞傷害活性は Survivin タンパクおよび HLA サブタイプに特異的であった。

**【結論】** Survivin 遺伝子導入 DC により有効な Survivin 特異的 CTL を *in vitro* で誘導することができた。これにより Survivin を標的とした癌免疫療法が種々の泌尿器癌の新しい治療法になる可能性が示唆された。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 21 年 4 月 7 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

アポトーシス阻害タンパクファミリーの一つである survivin は多くの癌で発現しているが正常組織では発現がきわめて低く、癌免疫療法の標的抗原として適していると考えられる。また、抗癌剤耐性癌やホルモン抵抗性前立腺癌における survivin の発現増強も報告されている。臨床上進行性の泌尿器癌に対する治療に難渋することは少なくないため、これらの治療抵抗性癌に対する新しい治療法の確立が必要とされている。強力な抗原提示能をもつ樹状細胞 (DC) を用いた免疫療法がその治療法の一つになる可能性がある。本論文ではアデノウイルスベクターを用いて survivin の遺伝子を導入したヒト末梢血由来 DC により survivin 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導可能かを検討し、さらにこの CTL のヒト泌尿器癌細胞株に対する細胞傷害活性について検討した。

ヒト survivin 遺伝子発現アデノウイルスベクター (AxCA-survivin) を作製し、健常者から採取した DC に AxCA-survivin を遠心法で感染させ survivin 遺伝子を導入した。survivin 遺伝子導入 DC を用いて自己末梢血単核球より survivin 特異的 CTL を誘導し、<sup>51</sup>Cr-release assay によりこの CTL のヒト泌尿器癌細胞株に対する細胞傷害活性を測定した。survivin 遺伝子導入 DC により、膀胱癌、腎癌、ホルモン感受性前立腺癌およびホルモン抵抗性前立腺癌といった種々のヒト泌尿器癌細胞株に対して細胞障害活性を示す survivin 特異的 CTL が誘導された。この細胞傷害活性は CD8 陽性細胞優位であり、HLA サブタイプに特異的であった。また、HLA サブタイプの異なる 3 人の健常者ドナーにおいて同様に survivin 特異的 CTL を誘導することができ、survivin 遺伝子導入 DC による CTL 誘導は HLA サブタイプにより制限されないことが示唆された。

以上、本論文は survivin 遺伝子導入 DC によりヒト泌尿器癌細胞株に対して細胞障害活性を示す

survivin 特異的 CTL が誘導されることを証明し、survivin を標的とした癌免疫療法が泌尿器癌、特に治療抵抗性癌に対して有効な治療法になる可能性を示したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第398号		
学位授与の日	平成21年5月12日		
氏名	石田 興一郎		
学位論文の題目	High CCR7 mRNA expression of cancer cells is associated with lymph node involvement in patients with esophageal squamous cell carcinoma. (食道扁平上皮癌における CCR7 の発現とリンパ節転移との関連)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 一瀬 雅夫	教授 山上 裕機

## 論文内容の要旨

### 研究着想の経緯、特色、目的

近年、リンパ球のホーミング等に重要な働きをするケモカインリセプターが癌の転移において重要な意義をもつことが明らかにされ(Muller et al. Nature, 2001), そのリガンドの発現部位(臓器)と転移形式の関連が注目されている。食道癌においては、食道癌臨床検体における免疫組織学的検討で、CCR7 発現と腫瘍深達度、リンパ管侵襲、stage は有意に相関し、CCR7 高発現例は予後不良と報告されている(Ding et al. Clin Cancer Res, 2003)。

本研究では食道癌切除症例の原発巣における CCR7 mRNA の発現を定量的に評価し、CCR7 の発現とリンパ節転移の関連を検討した。

### 対象と方法

#### 1.対象患者

和歌山県立医科大学第2外科にて根治切除が行われ、病理組織学的に確定診断された食道扁平上皮癌78例を対象とした。

#### 2.腫瘍組織からの RNA の抽出

食道癌摘出標本より2~5mm角で採取した腫瘍組織を Homogenate した後 RNeasy Mini Kit (QIAGEN)にて total RNA を抽出した。また食道癌組織より 3x3x3~10x10x3(mm<sup>3</sup>)で凍結標本を作製した後、Cytostat®(Leica)にて8-10µmに薄切し、Mayer's Hematoxylin 染色後直ちに Leica AS LMD® (Leica)を用いて Laser captured Microdissection 法(LCM)により食道癌細胞を選択的に採取し、RNeasy Micro Kit (QIAGEN)にて total RNA を抽出した。抽出した total RNA は Bioanalyzer®(Agilent), NanoDrop®(SCRUM)にて、RNA の Quality を確認した。

#### 3.Real-time RT-PCR 法による CCR7 mRNA の定量

CCR7, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA の primer, hybridization probe および検量線用人工 RNA 作成し(遺伝子研究所), Light Cycler® (Roche Diagnostics)を用いて、real time RT-PCR を行い、CCR7, GAPDH の mRNA を、人工 RNA を標準としてコピー数で定量した。CCR7 の定量値は GAPDH mRNA との発現比にて解析した。また CCR7 の定量値は対数正規分布していることが想定されるので対数変換値を用いた。CCR7 ratio = log( CCR7 定量値 / GAPDH 定量値 x10<sup>4</sup>) として評価した。

#### 4.CCR7 mRNA 発現量と臨床病理学的因子との関連についての検討

腫瘍組織、癌細胞での CCR7 mRNA の発現量と臨床病理学的因子との関連について検討した。統計解析は t 検定, Mann-Whitney U 検定, ロジスティック回帰分析にて行った。p<0.05をもって有意差ありと判定した。

#### 5.免疫組織化学染色による検討

食道癌組織のホルマリン固定パラフィン包埋固定標本を作製し、酵素標識ポリマー法にて CCR7 と Leucocyte Common Antigen(LCA)の二重染色を行った。腫瘍細胞の10%以上に CCR7 発現陽性像を認める場合を陽性とした。

### 結果

#### 1.食道癌組織中における CCR7 の発現とリンパ節転移との関連

食道癌腫瘍組織において、CCR7 mRNA の発現量とリンパ節転移に有意な関連は得られず、また他の臨床病理学因子との関連も認められなかった。免疫組織化学染色による検討では、CCR7 は腫瘍細胞

質内および細胞膜に heterogeneous に発現する一方、正常のリンパ球においても恒常的に発現していることが確認された。したがって組織中の CCR7 mRNA の発現量には、リンパ球での CCR7 の発現量が含まれており、食道癌細胞固有の CCR7 mRNA の発現量を定量が必要であると考えられた。

## 2.食道癌細胞固有の CCR7 mRNA の発現とリンパ節転移との関連

LCM 法により選択的に回収し RNA を抽出できた 43 症例のうち、Bioanalyzer®を用いて RNA の質、量ともに解析可能と考えられた症例は 33 例であった。腫瘍組織中の CCR7 mRNA の発現量と癌細胞中の CCR7 mRNA の発現量には弱い相関を認めた ( $R=0.443$ ,  $p<0.05$ )。食道癌細胞における CCR7 mRNA の発現量はリンパ節転移(-)群に比してリンパ節転移(+)群で有意に高値を示した ( $p<0.05$ )。臨床病理学的因子の検討では、リンパ管侵襲を認める症例で、有意に CCR7 mRNA の発現量が高値を示したが ( $p<0.05$ )、他の臨床病理学的因子との相関は認めなかった。

## 3.リンパ節転移陽性を指標とした CCR7 mRNA の cut off 値の設定と検証

CCR7 mRNA の定量値より Receiver operating characteristics(ROC) curve を用いて cut off 値を 1.275 に設定すると、sensitivity 61.9%, specificity 83.3%であった。そこで臨床病理学因子とともにリンパ節転移の有無に関与する因子について単変量解析を行ったところ、リンパ管侵襲の有無 ( $p<0.005$ )、CCR7 高発現であることが有意にリンパ節転移の有無に関連していた ( $p<0.05$ )。さらに多変量解析を行うと、CCR7 高発現はリンパ節転移の有無に関与する独立因子であることが示された(オッズ比 41.94,95%信頼区間(1.45-1214.92),  $p<0.05$ )。

## 結語

食道扁平上皮癌において癌細胞における CCR7mRNA の発現はリンパ節転移と相関し、リンパ節転移の独立因子であった。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 21 年 4 月 21 日論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

癌のリンパ節転移において重要な意義を示すケモカインレセプター CCR7 に着目し、食道癌原発巣における CCR7 mRNA の発現を Real-time RT-PCR 法を用いて定量的に評価し、これらの定量値より receiver operating characteristics(ROC) curve を用いてリンパ節転移の cutoff 値を設定し、リンパ節転移の予測因子になるかを検討したものである。

その結果、①食道癌腫瘍組織において、CCR7 mRNA の発現量とリンパ節転移に有意な関連は得られず、また他の臨床病理学因子との関連も認められなかった。免疫組織化学染色による検討では、CCR7 は腫瘍細胞質内および細胞膜に heterogeneous に発現する一方、正常のリンパ球においても恒常的に発現していることが確認された。したがって組織中の CCR7 mRNA の発現量には、リンパ球での CCR7 の発現量が含まれており、食道癌細胞固有の CCR7 mRNA の発現量の定量が必要であると考えられた。②Laser captured microdissection 法により選択的に回収し、Bioanalyzer®を用いて RNA の質、量ともに解析可能と考えられた 33 症例について、腫瘍組織中の CCR7 mRNA の発現量と癌細胞中の CCR7 mRNA の発現量には弱い相関を認めた ( $R=0.443$ ,  $p<0.05$ )。③食道癌細胞における CCR7 mRNA の発現量はリンパ節転移(-)群に比してリンパ節転移(+)群で有意に高値であり ( $p<0.05$ )、臨床病理学的因子の検討では、リンパ管侵襲を認める症例で、有意に CCR7 mRNA の発現量が高値を示したが ( $p<0.05$ )、他の臨床病理学的因子との相関は認めなかった。④ROC curve を用いて cut off 値を 1.275 に設定すると、sensitivity 61.9%, specificity 83.3%であった。臨床病理学因子とともにリンパ節転移の有無に関与する因子について単変量解析を行ったところ、リンパ管侵襲の有無 ( $p<0.005$ )、免疫染色陽性 ( $p<0.05$ )、CCR7 高発現であることが有意にリンパ節転移の有無に関連していた ( $p<0.05$ )。さらに多変量解析を行うと、CCR7 高発現はリンパ節転移の有無に関与する独立因子であることが示された(オッズ比 41.94,95%信頼区間 (1.45-1214.92),  $p<0.05$ )。

以上の結果より、食道扁平上皮癌において癌細胞における CCR7mRNA の発現はリンパ節転移と相関し、リンパ節転移の独立因子であることが示され、食道癌リンパ節転移の補助診断になることが示唆され、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第399号		
学位授与の日	平成21年7月14日		
氏名	岡田 規		
学位論文の題目	Tolvaptan, a selective oral vasopressin V2 receptor antagonist, ameliorates podocyte injury in puromycin aminonucleoside nephrotic rats (ピューロマイシンネフローゼモデルラットにおいて、選択的バゾプレッシン V2 受容体拮抗薬であるトルバプタンの経口投与はポドサイト傷害を改善させる)		
論文審査委員	主査	教授	岸岡 史郎
	副査	教授	村垣 泰光 教授 重松 隆

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

近年、臨床の場では、蛋白尿が腎および心血管系合併症に関与していると言われている。また腎保護として蛋白尿抑制の重要性が言われており、現在まで ACE 阻害薬や ARB など蛋白尿を抑制する様々な薬物が報告されているが、十分に効果があるとは言い難く、新たな腎保護作用を有する薬物の開発が望まれている。

蛋白尿の成因については様々な報告があり、その中でもポドサイト傷害が注目されている。ポドサイト傷害は、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、ループス腎炎などの腎臓病で報告されている。現在までの研究で、実験的ネフローゼラットであるピューロマイシンアミノヌクレオチド (PAN) 腎症ラットでポドサイト傷害が進むことが分かっている。

一方、うっ血性心不全、肝硬変、ネフローゼ症候群などの疾患では、バゾプレッシンの分泌亢進により水分利尿不全(体液貯留状態)や低ナトリウム血症のような電解質異常をきたすとされる。現在、うっ血性心不全や肝性浮腫でバゾプレッシン V2 受容体拮抗薬は有用であることが多数報告されているが、ネフローゼ症候群などの腎性浮腫に対する効果を検討した報告は存在しない。

本研究では、バゾプレッシン分泌亢進を示すネフローゼモデルラットである PAN 腎症ラットを用い、バゾプレッシン V2 拮抗薬 (トルバプタン) を PAN 腎症ラットに投与し、トルバプタンによる腎保護作用・腎臓の組織学的検討・ポドサイトに対する影響の検討・腎性浮腫や尿量に対する効果の検討を行った。

### 【方法】

7 週齢の Sprague-Dawley (SD) ラット (オス、体重 160~180g) を用いた。食餌は、まず粉末餌に慣れさせるため 1 週間粉末餌 (MF 粉末餌) にて飼育し、8 週齢 (day1) の時点で 3 群 (コントロール群、PAN 腎症群、PAN 腎症ラットにトルバプタンを投与した群) に分け、day9~10 の蓄尿検査、day10 に血液検査および腎摘出を行った。さらに各群において、免疫組織染色 (ネフリン・ポドシン・デスミン・WT-1)、real time PCR 法によるネフリンの定量、電子顕微鏡検査を行い、ポドサイト傷害の観察を行った。

### 【結果】

#### 1) 血液・尿・腎重量所見

PAN 腎症群では、尿蛋白量、血清クレアチニン値 (sCr)、血清総コレステロール値 (T-Chol) の増加を認め、血清アルブミン値 (Alb)、尿量の減少を認めた。一方、トルバプタン投与群では、PAN 腎症群と比較し、尿蛋白、sCr、T-Chol の増加抑制を認め、Alb、尿量の減少も抑制されていた。また、腎重量/体重比は、コントロール群と比較し PAN 腎症群では増加を認めたが、トルバプタン投与群では増加の抑制を認めた。

#### 2) トルバプタンのネフリン・ポドシンに対する効果

ポドシン・ネフリンは、正常糸球体では、係蹄壁に沿った線状のパターンで観察され、PAN 腎症群では、不連続な顆粒状のパターンとして観察された。トルバプタン投与群では、係蹄壁に沿った線状のパターンで観察された。

また real time PCR 法における腎皮質におけるネフリンの発現は、コントロール群と比較し PAN 腎症群においてネフリンの発現は低下していたが、トルバプタン投与群ではネフリンの発現の低下が抑制されていた。

### 3) トルバプタンのデスミン・WT-1 に対する効果

ポドサイト傷害で染色されるデスミンの免疫染色では、正常糸球体のデスミン染色は陰性であったが、PAN 腎症群では糸球体のデスミン染色は陽性であった。また PAN 腎症にトルバプタンを投与した群ではデスミン染色は陰性であった。

WT-1 の免疫染色は、ポドサイト傷害のある PAN 腎症群で陽性細胞数の減少を認めたが、トルバプタン投与群で陽性細胞数の減少抑制を認めた。

### 4) トルバプタンの電子顕微鏡に対する効果

コントロール群では、糸球体足突起の構造は保たれていたが、PAN 腎症群では糸球体足突起の融合や消失を認めた。PAN 腎症にトルバプタンを投与した群では、糸球体足突起の構造は保たれていたが一部に糸球体足突起の融合や消失を認めた。

#### 【考察】

本研究では、免疫組織染色、real time PCR 法、電子顕微鏡において、PAN 腎症で認められるポドサイト傷害がトルバプタン投与により抑制されることが示された。また、血液・尿検査上もトルバプタンは腎保護作用（ネフローゼ状態の改善）を有することが示唆された。さらにトルバプタン投与により尿量の優位な増加および腎重量/体重比増加の抑制が認められたことより、腎性浮腫にも有用な薬剤であることが示唆された。作用機序としては、ラット糸球体にバゾプレッシン V2 受容体が存在しないことより、トルバプタンのポドサイトによる作用は間接的なものであると推測され、トルバプタンが尿素窒素の再循環と糸球体内圧に関与し腎保護作用を示すと考えられた。

しかしトルバプタンの腎保護作用は完全なものではなく、またポドサイト傷害を完全に抑制する訳ではないため、今後新たな作用機序を持つ薬剤の開発が必要であると思われる。

#### 【結論】

バゾプレッシン V2 受容体拮抗薬であるトルバプタンをピューロマイシンアミノヌクレオシド腎症に投与したところ、ポドサイト傷害を抑制した。トルバプタンはピューロマイシンアミノヌクレオシド腎症ラットにおいて、腎保護作用・尿量増加を有し、今後の蛋白尿抑制および腎性浮腫治療の有用な治療薬になりえる可能性が示唆された。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 21 年 6 月 22 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

近年、慢性腎臓病進展に蛋白尿の関連が強いことが証明されており、腎保護として蛋白尿を抑制することが重要とされている。また蛋白尿の成因として、糸球体上皮細胞傷害（Podocyte Injury）が注目されており、Podocyte Injury を抑制することが重要とされている。Vasopressin は、ネフローゼ症候群、うっ血性心不全などで血中濃度が高くなり、Vasopressin 2 受容体（V2R）を介して浮腫を形成する。近年、うっ血性心不全に対する V2R 拮抗薬の有用性が認められているが、ネフローゼ症候群を代表とする腎性浮腫に対する有用性は明らかにされていない。

その上で、本研究は Podocyte Injury および Vasopressin 分泌亢進を示すネフローゼモデルラットである Puromycin aminonucleoside nephrotic rats（PAN 腎症ラット）を用い、V2R 拮抗薬（トルバプタン）を PAN 腎症ラットに投与し、トルバプタンによる腎保護作用・腎臓の組織学的検討・Podocyte に対する影響の検討・腎性浮腫や尿量に対する効果の検討したものである。

コントロール群、PAN 腎症ラット群、PAN 腎症ラット+トルバプタン投与群を作成し、尿蛋白量、尿量、腎重量、体重、血清 Alb、血清 Cr、血清 T-Chol の測定を行った。さらに、腎組織の nephrin の発現の検討、免疫染色や電子顕微鏡を用いて、トルバプタン投与下での Podocyte Injury の傷害度の検討を行った。

その結果、

- 1) PAN 腎症ラット群と比較して、トルバプタン投与群では、ネフローゼ状態および腎機能の改善を認める。

- 2) PAN腎症ラット群と比較して、トルバプタン投与群では、尿量の増加、浮腫の改善を認める。
- 3) PAN腎症ラット群と比較して、トルバプタン投与群では、Podocyte Injuryの抑制効果を認める。

という知見が得られた。

以上、本論文は、ネフローゼモデルラットへのトルバプタン投与により、蛋白尿減少、糸球体上皮細胞保護、尿量増加、浮腫改善効果を有する事を明らかにした。Vasopressin はV2受容体を介し腎臓に悪影響を及ぼし、V2R拮抗薬（トルバプタン）はネフローゼ症候群を代表とする腎性浮腫に有用な治療薬となる可能性を示唆したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第400号		
学位授与の日	平成21年8月4日		
氏名	藤井 令央奈		
学位論文の題目	BCG Cell wall skeleton (BCG-CWS) enhances killing activity of CTL activated human dendritic cells transduced with PSA gene (PSA 遺伝子導入樹状細胞による細胞障害活性の BCG Cell wall skeleton (BCG-CWS)による増強)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 山上 裕機	教授 原 勲

## 論文内容の要旨

### 【背景】

樹状細胞 (DC) は成熟化により抗原提示能の増強が認められることが知られているが、成熟化に関して Toll Like Receptor ; TLR の関与が報告されている。泌尿器科領域で膀胱癌の治療に用いられている BCG の壁成分である BCG-CWS は TLR 2 および 4 との関与が示唆されている。本研究では前立腺癌の組織特異抗原である Prostate Specific Antigen ; PSA の遺伝子情報をヒト末梢血より誘導した DC に導入し、この DC により誘導される CTL による *in vitro* での抗腫瘍効果の確認を行った。さらに BCG-CWS を DC の成熟化に対するアジュバントとして使用し、より強力な抗腫瘍免疫応答が得られるかについての検討を行った。

### 【方法】

#### (1) 樹状細胞の成熟化についての検討

未熟樹状細胞を健常人末梢血より誘導し、これらの細胞に BCG-CWS を添加した。回収した DC を FACSscan flow cytometry を用いて表面抗原解析を行い、培養上清中の Th1 系サイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IL-12) を ELISA を用いて計測した。

#### (2) PSA 遺伝子導入 DC (DC-PSA) の作製

COS-TPC 法を用いてヒト PSA 発現 adenovirus vector AxCAPSA を作成し、ヒト DC に AxCAPSA を感染させ評価を行った。導入効率、DC の viability を確認し感染至適 MOI を決定した。目的遺伝子導入の確認は PCR 法により行った。

#### (3) DC-PSA による CTL 誘導

作製した DC-PSA を用いて細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を誘導した。その傷害活性を PSA 発現前立腺癌細胞株 (LN-Cap) を標的とした 4 時間  $^{51}\text{Cr}$ -release assay により検討し、更に antibody blocking assay で MHC 拘束性および CTL の phenotype を解析した。

#### (4) BCG-CWS による細胞傷害活性増強についての検討

DC-PSA を BCG-CWS により成熟化させ、同様に 4 時間  $^{51}\text{Cr}$ -release assay を行い傷害活性の増強が得られるかについての検討を行った。

### 【結果と考察】

#### (1) 樹状細胞の成熟化についての検討

未熟 DC と比較して BCG-CWS 添加により CD83 の発現増強を認め、成熟 DC が誘導されることが確認された。更に DC-PSA、BCG-CWS 添加 DC いずれにも Th1 サイトカインの上昇が認められ、両者を併用した群で最もサイトカインの産生が多いことが確認された。

#### (2) PSA 遺伝子導入 DC (DC-PSA) の作製

AxCAPSA の遠心法による遺伝子導入効率は MOI 依存性に上昇し MOI50 以上では差を認めなかった。一方 viability は MOI 依存性に低下を認め、MOI200 で一番低値となった。以上より、導入効率、viability 共に高値である MOI50 を AxCAPSA の至適 MOI とした。

#### (3) DC-PSA による CTL 誘導

DC-PSA 由来の CTL は LN-Cap に対しては E/T 比 50 で約 90% の細胞傷害活性を認めた。antibody blocking assay では CD8、class I 抗体で細胞傷害活性の抑制を認め、DC-PSA 由来の CTL による LN-Cap に対する細胞傷害活性が CD8 陽性細胞由来であることが示された。

#### (4) BCG-CWS による細胞傷害活性増強についての検討

BCG-CWS による成熟化をさせただけの DC 由来の CTL では細胞傷害活性は認められなかった。

これに対し DC-PSA に BCG-CWS を添加した場合、DC-PSA 由来の CTL の細胞傷害活性が BCG-CWS 添加により増強を認めた。このことから BCG-CWS 添加により PSA に特異的な CTL の細胞傷害活性の増強がおこることが確認された。更に単離した CD8 陽性細胞のみでも同様に BCG-CWS 添加により細胞傷害活性の増強を認め、BCG-CWS による細胞傷害活性の増強には CD8 陽性細胞自体の障害活性の増強が大きく関与していることが示唆された。

#### 【結語】

DC-PSA により PSA に特異的な CTL の誘導が得られることが示唆され、その細胞傷害活性が HLA サブタイプ拘束性であることが示された。また BCG-CWS の DC-PSA への添加により細胞傷害活性の増強を認め、これには CD8 陽性細胞自身による細胞傷害活性増強の関与が示唆された。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成21年 6月24日論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

本論文では前立腺癌の組織特異抗原である Prostate Specific Antigen (PSA) の遺伝子情報をヒト末梢血より誘導した樹状細胞 (DC) に導入し、作製した PSA 遺伝子導入 DC (DC-PSA) により誘導される細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) についての検討を行った。さらに BCG-CWS を DC の成熟化に対するアジュバントとして使用し、より強力な細胞傷害活性が得られるかについての検討を行っている。

PSA 発現 adenovirus vector AxCAPSA を用いて、PSA 遺伝子導入 DC (DC-PSA) を作成した。これを用いて CTL を誘導し、その傷害活性は 4 時間  $^{51}\text{Cr}$ -release assay と antibody blocking assay で検討した。DC-PSA 由来の CTL は PSA 特異的な細胞傷害活性を示し、さらに CD8 陽性細胞由来であることを示した。また 3 人の HLA タイプの異なる健康者ドナーの実験でそれぞれの細胞傷害活性が HLA サブタイプ拘束性であることが示され、PSA 特異的 CTL 誘導には HLA サブタイプによる制限を受けないことが示された。

BCG-CWS による細胞傷害活性増強についての検討では、健康人末梢血より誘導された未熟 DC が、BCG-CWS 添加により CD83 の発現増強を認め、成熟 DC に誘導されることを確認した。更に未熟 DC と比較して BCG-CWS 添加により Th1 サイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-12) 産生の上昇を認めた。BCG-CWS の添加のみでは細胞傷害活性の増強は認めなかったが、DC-PSA に BCG-CWS を添加した場合、PSA に特異的な CTL の細胞傷害活性の増強がおこることが確認された。更に単離した CD8 陽性細胞のみでも同様に BCG-CWS 添加により細胞傷害活性の増強を認め、BCG-CWS による CD8 陽性細胞自体の障害活性の増強が関与していることが示唆された。

以上、本論文は PSA 遺伝子導入 DC により PSA 特異的 CTL が誘導されることを証明し、さらに BCG-CWS を併用することでその傷害活性を増強させることを示した。その作用増強には CD8 陽性細胞自体の障害活性増強効果があることを示唆した。これらの結果は前立腺癌の遺伝子免疫治療に対して新たな治療戦略の可能性を提示したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第401号		
学位授与の日	平成21年9月24日		
氏名	上中 智香子		
学位論文の題目	Phenol peels as a novel therapeutic approach for actinic keratosis and Bowen disease: Prospective pilot trial with assessment of clinical, histologic, and immunohistochemical correlations (上皮性皮膚腫瘍に対するフェノール治療の効果と免疫組織化学的研究)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕 機	
	副査	教授 村垣 泰 光	教授 古川 福 実

## 論文内容の要旨

**【緒言】** フェノールは光老化皮膚の治療に使われているケミカルピーリング剤のひとつで、組織障害機序として、蛋白変性と真皮毛細血管内皮細胞を障害し、真皮やメラノサイトにも影響を及ぼす薬剤である。

今日、高齢化社会に伴って皮膚腫瘍の患者は増加傾向にあり、それとともに入院や手術を拒否する患者が多くみられるようになった。当科では、さまざまな理由で手術のできない患者の治療方法の1つとして、フェノールを用いた非観血的治療を試みることにした。

本研究では、過去7年間に当科で治療を行い、治療終了後1年以上観察した前癌病変である日光角化症とボーエン病の症例において、本治療の有効性と無効であった症例との差異について臨床病理学的・組織学的に検討した。

### 【方 法と対象】

**施術方法：** 施術前に十分な説明と同意を得、皮膚生検を施行した。使用試薬は主に無水フェノールを用い、単純塗布を基本とした。約1ヶ月ごとに治療効果を判定し、complete response (以下CR)と判定した際に皮膚生検を行った。尚、下記に述べる様に、無効症例においても皮膚生検を行った。

**対 象：** 2001年より2008年までに、当科で治療を行ったのは、日光角化症32例とボーエン病14例(計46例)で、平均年齢は75.1歳であった。施術前の腫瘍の長径、病変部位、皮膚癌の既往歴の有無を確認した。また治療終了後1年間CRを認めた症例を、施術回数により3群(施術回数が2回以下、3回～5回以下、6回以上)に分類し、無効症例をprogressive disease (以下PD)群とした。

**組織学的検討：** 各群の初診時生検標本の角層と腫瘍の厚さをマイクロメーターで測定し、病巣の厚さと治療効果との関連性を検討した。

**免疫組織学的染色での検討：** Proliferating cell nuclear antigen (以下PCNA)、cyclin A、p53、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling (以下TUNEL)を用いて、各群の初診時生検標本の免疫組織化学的染色を施行し、治療効果との関連性を検討した。

### 【結 果】

**フェノール治療の効果：** 治療終了後1年間CRを認めた症例は、46例中39例(84.8%)であり、そのうち施術回数が2回以下の群は17例(37%)、3回～5回以下の群は15例(32.6%)、6回以上の群は7例(15.2%)であった。PD群は7例(15.2%)で、全例外科的に切除を施行した。観察期間は平均2.8年で、再発率は2例(4.3%)であった。

施術回数は、日光角化症では2.9回、ボーエン病では5.5回であり、ボーエン病では、有意に多くの施術回数を要した( $p=0.005$ )。また皮膚癌を既往にもつ群は有意に本治療抵抗性であったが、年齢や腫瘍の長径には有意差を認めなかった。

なお全身的な副作用は認めなかったが、皮膚の色素脱失や持続紅斑という局所の副作用は、ほぼ全例で認めた。

**組織学的検討の結果：** PD群ではCR群に比較して、角層の厚さは高値を示すものの、各群と角層の厚さには関連は認めなかった。

一方腫瘍の厚さにおいては、施術回数2以下の群( $164.2 \pm 18.4 \mu\text{m}$ )は、3回～5回以下の群( $264.6 \pm 24.7 \mu\text{m}$ ,  $p=0.024$ )や6回以上の群( $346.4 \pm 43.5 \mu\text{m}$ ,  $p=0.001$ )、PD群( $570.7 \pm 164.7 \mu\text{m}$ ,  $p=0.009$ )

と比較して有意に低値を示した。また施術回数と腫瘍の厚さにおいても関連性を認めたが( $p=0.0002$ )、角層の厚さには関連性は認めなかった。以上より腫瘍の厚さに相関して、施術回数は有意に多くを要し、また難治例や無効症例の多くは腫瘍の厚さが  $400 \mu\text{m}$  をこえる症例であった。

**免疫組織学的染色での検討:** 施術回数 6 回以上の群や PD 群は、施術回数 2 以下の群や 3～5 回の群より PCNA の陽性率が高かったが、各群で有意差は認めなかった。cyclin A の陽性率においては、施術回数 2 以下の群( $10.5 \pm 1.2\%$ )は、3 回～5 回以下の群( $16.2 \pm 1.9\%$ ,  $p < 0.01$ )や 6 回以上の群( $25.8 \pm 3.1$ ,  $p < 0.001$ )、PD 群( $24.7 \pm 2.9$ ,  $p < 0.001$ )と比較して有意に低値を示した。また 3 回～5 回以下の群においても、6 回以上の群や PD 群と比較して有意に低値を示した( $p < 0.05$ )。施術回数と cyclin A の陽性率においても関連性を認めた( $p < 0.0001$ )。なお p53 や TUNEL の陽性率においては、各群で有意差は認めなかった。以上より cyclin A の陽性率が高い症例ほど、施術回数は有意に多くを要し、本治療方法には抵抗性であると考えられた。

#### 【考察】

- ① 前癌病変である日光角化症とボーエン病の治療としてフェノールを用いた治療は、治療終了後 1 年以上の経過観察をした結果、46 例中 39 例 (84.8%) が有効であり、簡便で有用性の高い治療法であると考えられた。
- ② 本治療の奏効度について臨床病理学的に検討したところ、無効と考えた症例では奏効した症例と比較して、既往に皮膚癌をもつ症例が有意に多かった。
- ③ 腫瘍の厚さが  $400 \mu\text{m}$  以下の症例では、本治療が奏効し、その判断基準の一助としては施術前の cyclin A の発現の検討が重要であると示唆された。

#### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年6月24日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

フェノールは光老化皮膚の治療に使われているケミカルピーリング剤のひとつである。組織障害機序として、表皮細胞に先行して真皮毛細血管内皮細胞のアポトーシスと壊死を誘導することが判っている。

今日、高齢化社会に伴って皮膚腫瘍の患者は増加傾向にあり、それとともに手術を拒否する患者が多くみられるようになった。当科では、さまざまな理由で手術のできない患者の治療方法のひとつとして、フェノールを用いた非観血的治療を試みている。

本研究では、2001年から2008年に当科でフェノールによる治療を行い、治療終了後1年以上観察した前癌病変である日光角化症とボーエン病の症例において、本治療の有効性と無効であった症例との差異について臨床病理学的・組織学的に検討した。

7年間の研究期間において、治療を行った日光角化症 32 例とボーエン病 14 例 (計 46 例) が対象であった。平均年齢は 75.1 歳で、治療終了後の観察期間は平均 2.8 年であった。施術前の腫瘍の長径、病変部位、皮膚癌の既往歴の有無を確認した。

日光角化症とボーエン病の治療としてフェノールを用いた治療は、治療終了後1年以上の経過観察をした 46 例中 39 例 (84.8%) に有効であった。また無効と判断した症例は再度の患者への説明の後、全例外科的に切除を施行した。治療終了後の再発率は 2 例 (4.3%) であり、日光角化症やボーエン病に対するフェノールを用いた治療は、簡便で有用性が高いため、試みるべき治療法のひとつであると考えられた。

本治療の奏効度について臨床病理学的に検討したところ、無効と考えた症例では奏効した症例と比較して、既往に皮膚癌をもつ症例が有意に多かったが、年齢や腫瘍の長径とでは有意差を認めなかった。

組織学的検討として、各群の初診時生検標本の角層と腫瘍の厚さをマイクロメーターで測定し、病巣の厚さと治療効果との関連性を検討した。また Proliferating cell nuclear antigen、cyclin A、p53、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL) を用いて、各群の初診時生検標本の免疫組織化学的染色を施行し、治療効果との関連性を検討した。この結果、腫瘍の厚さが  $400 \mu\text{m}$  以下の症例では、本治療が奏効することが示唆された。また、施術前の免疫組織化学的検討において、腫瘍増殖性のマーカーのひとつである cyclin A の陽性率が高値な症例ほど、本治療に抵抗性を示すことが見出された。

以上、本研究は、前癌病変である日光角化症とボーエン病に対するフェノール療法の有用性を科学的に解明した、新規性の高い独創的研究であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第402号		
学位授与の日	平成21年10月13日		
氏名	宗 紗千子		
学位論文の題目	Mechanism of phosphate-induced calcification in rat aortic tissue culture: possible involvement of Pit-1 and apoptosis (ラット血管培養を用いた高リン負荷による血管石灰化機序の検討: Pit-1 およびアポトーシスの関与)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 赤坂 隆史	教授 重松 隆

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

慢性腎臓病 (CKD) 患者、特に維持血液透析 (HD) 患者では、全身の血管に高度な石灰化が認められる。HD患者では、高リン血症は血管石灰化のリスクファクターであるばかりでなく、生命予後の増悪因子であることが報告されている。

最近の研究で、血管石灰化は従来考えられていたような単なる動脈中膜壁の変性・壊死過程ではなく、骨・軟骨組織の生理的石灰化と多くの共通点を有していることが明らかになってきている。高リン血症が血管石灰化を導く詳細な機序は未だ明らかではないが、*in vitro*の血管平滑筋細胞を用いた実験系において、平滑筋細胞のアポトーシスおよび骨・軟骨様細胞への分化の関与が報告されている。しかし、血管平滑筋細胞では細胞の形質転換や、*in vivo*での石灰化部位である細胞外マトリックスを欠くという問題点があり、また*in vivo*では安定した石灰化モデルがなかなか開発されなかったため、血管石灰化の発症機序についての詳細は明らかにされていない。

本研究では、*ex-vivo*のモデルとして、ラット大動脈の血管培養を用い、①高リン (P) 負荷により血管石灰化を誘導できるかどうか、②このモデルにおけるⅢ型ナトリウム依存性リントランスポーター (Pit-1) の役割、③このモデルにおける血管石灰化の発症機序について検討した。

### 【方法】

#### 血管培養

7週齢雄性SDラットの大動脈を摘出、結合組織を取り除き、数ミリ長の切片とし、培養液中で10日間培養した。通常の培養液のP濃度は0.9mMであるが、高P負荷による石灰化モデルにはP濃度3.8mMに上昇させた培養液を使用した。また、ナトリウム依存性リントランスポーター阻害薬 (phosphonoformic acid, PFA) にてリン輸送を阻害し、血管石灰化に与える影響を検討した。10日間の培養後、血管を①パラフィン固定し、組織学的に検討、②total RNAを抽出し遺伝子発現を検討、③カルシウム含量の定量の3方法にて評価した。また、アポトーシスについては、①パラフィン固定後の組織切片においてTUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 法にてDNA断片化の有無を検索、②Real-time PCR法にてアポトーシス関連のcaspase 3の発現を検討、③caspase阻害剤を培養液に添加し血管石灰化を抑制できるか、を検討した。

### 【結果】

#### 1. 高Pによる石灰化の誘導

正常P濃度で10日間培養した血管は、HE染色では摘出直後に固定した血管と比較して大きな差は認めなかった。von Kossa染色での石灰化は認めなかった。高P濃度での培養群ではvon Kossa染色で中膜石灰化を認めた。石灰化組織像は、HD患者や腎不全ラットで認められる中膜石灰化像と類似していた。血管内カルシウム含量は高P群にて有意に増加した。

#### 2. 中膜石灰化におけるPit-1の役割

Pit-1の阻害剤であるPFAを高Pの培養液に加えて血管を培養したところ、von Kossa染色にて石灰化を認めず、血管内カルシウム含量も有意に減少を認めた。

#### 3. 血管内mRNA発現

骨関連遺伝子の発現 (Cbfa-1、オステオカルシン(OCN)、オステオポンチン(OPN)) をreal time PCR法にて確認したが、高P群、高P+PFA群にて有意差は認められなかった。

#### 4. アポトーシスの検討

TUNEL法でDNA断片化の有無を検索したところ、高P群で有意に多くの中膜平滑筋細胞が陽性に染色され、高P+PFA群では陽性細胞が有意に減少した。

Caspase 3の発現をreal time PCR法にて確認したところ、高P群に比較し高P+PFA群にて、6日目で有意な低下が認められた。

さらにアポトーシスの関与を検討するために、caspase阻害剤を添加し培養を行ったところ、石灰化の抑制が認められた。

##### 【考察】

本研究では、大動脈の組織培養を行い、高リン負荷にて安定して中膜石灰化を誘導することができた。また、ナトリウム依存性リントランスポーターの阻害により、中膜石灰化がほぼ完全に抑制でき、高リン負荷による血管中膜石灰化にはⅢ型ナトリウム依存性リントランスポーター (Pit-1) が関与していると考えられた。

血管石灰化にかかわる血管平滑筋細胞の変化としては、平滑筋細胞の骨・軟骨様細胞への形質転換およびアポトーシスが報告されているが、本研究での血管石灰化モデルにおいては、アポトーシスの関与が考えられた。

血管平滑筋細胞のアポトーシスは初期石灰化に関与し、骨・軟骨様細胞への分化は石灰化の進展に重要な役割を果たすと考えられている。本研究でも血管中膜石灰化の前段階である培養6日目においてTUNEL法で顕著な差が認められ、又caspase 3の発現にも差が認められたことと、caspase阻害剤を添加し培養を行ったところ石灰化の抑制が認められたことから、急性リン負荷による中膜石灰化にはアポトーシスの関与が示唆された。

##### 【結論】

高リン負荷により、ラット大動脈血管培養において血管中膜石灰化が誘導され、この石灰化はPFAによるナトリウム依存性リントランスポーターの阻害により抑制された。又、その血管石灰化発症機序の初期にはアポトーシスの関与が考えられた。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成21年9月30日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

慢性腎臓病（CKD）患者、特に維持血液透析（HD）患者では、全身の血管に高度な石灰化が認められることはよく知られている。HD患者において、高リン血症は血管石灰化のリスクファクターであるばかりでなく、生命予後の増悪因子であることが報告されている。高リン血症が血管石灰化を導く詳細な機序は未だ明らかではないが、in vitroの血管平滑筋細胞を用いた実験系において、平滑筋細胞のアポトーシスおよび骨・軟骨様細胞への分化の関与が報告されている。しかし、血管平滑筋細胞では細胞の形質転換や、in vivoでの石灰化部位である細胞外マトリックスを欠くという問題点があり、またin vivoでは安定した石灰化モデルがなかなか開発されなかったため、血管石灰化の発症機序についての詳細は明らかにされてこなかった。

その上で、本研究では、ex-vivoのモデルとして、ラット大動脈の血管培養を用い、培養液にPit-1の阻害剤であるphosphonoformic acid (PFA) を添加し、石灰化が抑制されるかどうか検討した。石灰化の評価は組織学的検討（HE染色、von Kossa染色）とCa含量測定で行なった。また、骨関連遺伝子の発現とアポトーシスの関与を検索した。

これらの実験により

- ①高リン（P）負荷により血管中膜石灰化を誘導できるかどうか、
- ②このモデルにおけるⅢ型ナトリウム依存性リントランスポーター（Pit-1）の役割、
- ③このモデルにおける血管石灰化の発症機序、について検討した。

その結果、

- ①高P負荷により中膜石灰化が誘導された。
- ②Pit-1の阻害剤であるPFAにより石灰化が抑制された。
- ③石灰化部分でアポトーシスの増加が認められ、Caspase 3の発現の検討、caspase阻害剤添加による培養でも、このモデルにおけるアポトーシスの関与が確認できた。

以上より、本論文は、高リン負荷によりラット大動脈血管培養において血管中膜石灰化が誘導され、この石灰化にはナトリウム依存性リントランスポーターを介したリンの取り込みが関与していること、又、その血管石灰化発症機序の初期にアポトーシスが関与していることを示したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第403号		
学位授与の日	平成21年10月13日		
氏名	半羽慶行		
学位論文の題目	Effects of Unfractionated Heparin and Low-molecular-weight Heparin on Bone Metabolism in a Rat Model of Renal Failure (非分画ヘパリン及び低分子ヘパリンが腎不全モデルラットの骨代謝に及ぼす影響)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 坂口和成	教授 重松 隆

## 論文内容の要旨

### 【背景】

非分画ヘパリン(Unfractionated heparin :UH)や低分子ヘパリン(Low molecular weight heparin: LMWH)などの抗凝固剤は血液透析施行時に不可欠な薬剤であるが、長期間のヘパリン投与は骨代謝に影響を与え、ヘパリン起因性の骨粗鬆症を引き起こす可能性が示唆されている。

一方、腎不全患者はカルシウム・リン代謝異常、ビタミンD欠乏などから二次性副甲状腺機能亢進症を引き起こし、腎性骨異常栄養症による骨代謝異常を伴うことが知られている。

またLMWHはUHに比べ、骨代謝への影響が少ないことが報告されているが、腎不全患者におけるLMWHとUHの骨への影響は十分に検討されていない。

### 【目的】

腎不全状態でのLMWHおよびUHの骨代謝に与える影響を、腎不全ラットを用いて骨形態計測学的手法で検討する。

### 【方法】

7週齢雄性SDラットに5/6腎摘術を施行後、LMWH投与群(L群)、UH投与群(H群)、非投与群(Nx群)に群分けした。L群にはreviparin(1000 U/Bwt. kg)を、H群にはheparin sodium(1000 U/Bwt. kg)を各々隔日に尾静脈内投与した。8週後に屠殺し、血液生化学および大腿骨2次海綿骨の形態学的変化を検討した。正常対照群には同週齢の偽手術ラット(Control群)を用いた。

### 【結果】

腎不全ラットはいずれも高PTH(parathyroid hormone)血症であった。骨形態計測において、骨形成系パラメータはH群L群ともNx群に比べて低く、H群に顕著な低下を認めた。また骨吸収系パラメータは、H群とL群ともNx群より低下傾向を示した。

### 【結論】

高PTH血症下においてUHおよびLMWHは骨形成を抑制し、骨吸収を亢進させなかった。LMWHはUHに比べてその効果が緩やかであり、骨代謝への影響は少ないと思われた。UH及びLMWHは何らかの作用機序により、直接的あるいは間接的に腎不全の骨代謝回転を抑制させる可能性が示唆されたため、今後さらなる検討が必要である。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年9月24日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。非分画ヘパリン(Unfractionated heparin :UH)や低分子ヘパリン(Low molecular weight heparin: LMWH)などの抗凝固剤は血液透析施行時に不可欠な薬剤であるが、長期間のヘパリン投与は骨代謝に影響を与え、ヘパリン起因性の骨粗鬆症を引き起こす可能性が示唆されている。

一方、腎不全患者はカルシウム・リン代謝異常、ビタミンD欠乏などから二次性副甲状腺機能亢進症を引き起こし、腎性骨異常栄養症による骨代謝異常を伴うことが知られている。

またLMWHはUHに比べ、骨代謝への影響が少ないことが報告されているが、腎不全患者におけるLMWHとUHの骨への影響は十分に検討されていない。

その上で、本研究は腎不全モデルラットである5/6腎摘ラットを用い、腎不全状態でのLMWHおよびUHの骨代謝に与える影響を、骨形態計測学的手法で検討したものである。7週齢雄性SDラットに5/6腎摘術を施行後、LMWH投与群 (L群)、UH投与群 (H群)、非投与群 (Nx群) に群分けした。L群にはreviparin (1000 U/Bwt. kg)を、H群にはheparin sodium (1000 U/Bwt. kg) を各々隔日に尾静脈内投与した。正常対照群には同週齢の偽手術ラット (Control群) を用いた。投与開始から8週後に採血、屠殺し大腿骨を摘出した。株式会社クレハ生物医学研究所クレハ分析センター東京分室にて採取した大腿骨から非脱灰薄切標本を作成し、Villanueva Goldner染色を行い、2次海綿骨の骨形態計測を行った。

その結果

- 1) 腎不全ラットにおいて、LMWH および UH は骨形成を抑制し、健常腎ラットを用いた既報の結果とは相違なかった。
- 2) 腎不全ラットにおいて、LMWH および UH は骨吸収を亢進させず、健常腎ラットを用いた既報の結果とは相違が認められた。
- 3) LMWH は UH に比べてその効果が緩やかであり、骨代謝への影響は少なかった。

という知見が得られた。

また UH 及び LMWH が何らかの作用機序により PTH の骨に対する反応性を低下させる可能性も示唆されたが、ヘパリンの PTH に対する作用については不明な点が多いため、今後の新たな検討課題となる。

以上、本論分は LMWH および UH 投与が腎不全モデルラットの骨代謝に与える影響を明らかにした。ヘパリンを継続的に使用している血液透析患者の骨代謝異常の病態を解明する上で有用な報告であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第404号		
学位授与の日	平成21年11月10日		
氏名	勘野 貴之		
学位論文の題目	Gastric acid reduction leads to an alteration in lower intestinal microflora (胃酸分泌低下による大腸内細菌叢への影響)		
論文審査委員	主査	教授 三家 登喜夫	
	副査	教授 山上 裕 機	教授 一瀬 雅夫

## 論文内容の要旨

腸内細菌叢(腸内フローラ)は多彩で、400種類以上の菌種が棲息しているが、それらを規定する因子として腸管内pH、酸素分圧、nutrient availability、colonic physiology、bacterial interferenceなどが挙げられている。胃酸による細菌繁殖バリアもそのひとつであり、その崩壊によって胃・十二指腸・小腸内の細菌が異常に増殖する現象bacterial overgrowthはよく知られている。しかし胃酸分泌低下によって大腸細菌叢が受ける影響について分子生物学的手法を用いて検討した報告はこれまでなかった。そこで申請者らは、ラット及びヒトを対象とした腸内細菌数および叢構成の変化について調べた。ラットは胃酸分泌抑制薬であるオメプラゾールまたはラニチジン混餌投与し、盲腸、下行結腸、直腸の3領域から内容物を採取し、ヒトは胃酸分泌の低下した無症候性慢性萎縮性胃炎患者及び性、年齢を一致させたコントロール健常者を対象に糞便を回収した。慢性萎縮性胃炎の有無は空腹時に採血を行い、血清ペプシノゲンI・IIを測定したうえ、以前より申請者の所属教室が提唱している方法に則り、評価した。糞便中のDNAを抽出し、そこから定量的real-time PCR法を用いて大腸細菌叢を構成する12菌属・菌群の菌数を半定量した。

コントロールラットでは各菌属・菌群の菌数は、下行結腸、直腸に比べ盲腸において少なかったが、有意差は認めなかった。オメプラゾール投与ラット、胃炎患者いずれにおいても通性、偏性嫌気性を問わず、測定した大部分の菌属・菌群で菌数が増加した。特に口腔咽頭常在菌である *Veillonella*、*Lactobacillus* groupはラット、胃炎患者共にコントロール群に比し、有意に増加した。ラットにおいては、他に *Prevotella*、*Atopobium* group、*C. coccoides* group、*Enterobacteriaceae*、*B. fragilis* groupの5菌属・菌群がコントロール群に比べ有意に増加しており、そのうち *Enterobacteriaceae*、*Atopobium* group、*C. coccoides* group、*Veillonella*、*Lactobacillus* groupについては、オメプラゾール投与で用量依存的に菌数が増加した。しかしラニチジン投与ラットではいずれの菌属・菌群においても、コントロール群に比し、菌数は有意に増加しなかった。

胃酸分泌が低下することにより、胃酸バリアが崩壊する。今回の結果は、口腔咽頭常在菌が胃で殺菌されずに大腸へ到達、定着・増殖しえたこと、および食餌由来の栄養素、特にタンパク質の消化吸収不良により、大腸内に流入する基質が増え、それをエネルギー源とする大腸内定住菌が増加したことが要因であると考えられた。またラットモデルがヒトに比べ、より多くの菌属・菌群において有意差が生じたという相違については、種差、食餌の違い、生育環境、対象年齢などの差が要因として挙げられた。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年9月24日、審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

腸内細菌叢は、400種類以上の菌種から構成されており、その菌数の多寡は多くの因子によって規定される。胃酸による細菌繁殖バリアもそのひとつとして挙げられる。このバリアの崩壊により、胃・十二指腸・小腸内細菌が異常に増殖する現象“bacterial overgrowth”は広く知られている。しかしバリアの崩壊が大腸細菌叢に与える影響について分子生物学的手法を用いて検討した報告はこれまで皆無であった。そこで申請者らは、ラット及びヒトを対象とした腸内細菌数及び構成の変化について次のように検討した。ラットは胃酸分泌抑制薬であるオメプラゾール(OPZ)またはラニチジン(RAN)を混餌投与し、盲腸、下行結腸、直腸の3領域から腸管内容物を採取した(I)。ヒトは胃酸分泌の低下した無症候性の慢性萎縮性胃炎(CAG)患者及び性、年齢を一致させたコントロール健常者を対象に糞便を採取した(II)。CAGの有無は血清ペプシノゲン(PG)I・IIを測定する事で評価した。腸管内容物、糞

便中のDNAを抽出した後、定量的real-time PCR法を用いて大腸細菌叢を構成する12菌属・菌群の菌数を測定し、胃酸分泌低下による影響を検討した。その結果、

(I-1) コントロールラットでは各菌属・菌群の菌数は、部位によって有意差は認められなかった。

(I-2) OPZ投与ラットでは通性、偏性嫌気性を問わず、測定した大部分の菌属・菌群で菌数が増加した。特に*Prevotella*、*Atopobium* group、*C. coccoides* group、*Enterobacteriaceae*、*B. fragilis* group、さらに口腔咽頭常在菌でもある*Veillonella*、*Lactobacillus* groupの7菌属・菌群はコントロールに比し、有意に増加した。これらのうち、5菌属・菌群については、OPZ投与の用量依存的に菌数が増加した。一方善玉菌であるとされる*Bifidobacterium*では菌数に変化はなかった。

(I-3) 酸分泌抑制力の弱いRAN投与ラットではいずれの菌属・菌群においても、コントロールに比し、有意な変化は認められなかった。

(II) ヒトにおいても胃酸分泌の少ないCAG患者においてOPZ投与ラットと同様に腸内細菌数が増加した。CAG患者がコントロール健常者に比し、有意に増加したのは*Veillonella*、*Lactobacillus* groupの2菌属・菌群であった。

以上より、本論文はCAG患者、胃酸分泌抑制薬投与ラットの大腸細菌叢を構成する菌属・菌群をコントロールと比較し、解析することで胃・十二指腸・小腸と同様に大腸内の多数の菌属・菌群の菌数増加が認められたこと、一方胃酸分泌の程度により菌属・菌群間においても増殖に相違が認められたことを分子生物学的手法によって明らかにし、新しい知見を提示した研究であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第405号		
学位授与の日	平成21年11月10日		
氏名	廣野 誠子		
学位論文の題目	Molecular markers associated with lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma by genome-wide expression profiling (網羅的遺伝子発現解析を用いた膵癌リンパ節転移に関与する分子マーカーの同定)		
論文審査委員	主査	教授 一瀬 雅夫	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 山上 裕機

## 論文内容の要旨

【緒言】 外科的切除術を受けた膵癌患者の最も予後を規定する因子であるリンパ節転移の有無であることに着目し、網羅的遺伝子発現解析を用いて、膵癌におけるリンパ節転移関連分子マーカーの同定を試みた。

【方法】 手術で摘出した膵癌凍結サンプル 20 例(リンパ節陽性群 11 例、陰性群 9 例)を用い、マイクロダイセクションにより膵癌細胞のみを回収した後、RNA を抽出し、Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip (Affymetrix)にて網羅的遺伝子解析を行った。

【結果】 リンパ節転移陽性群で 20 遺伝子が低発現を、31 遺伝子が高発現を認め、これら 51 遺伝子による supervised cluster 解析では、リンパ節転移陰性群が同じ集団として同定された。これらの遺伝子群に対し、膵癌組織 63 例を用いて、免疫染色による蛋白発現解析を行った。その結果、*AP2a* 低発現 ( $P=0.0115$ ) と *MUC17* 高発現 ( $P=0.0089$ ) の 2 因子は独立した膵癌リンパ節転移予測因子であった。さらに 63 例の disease-specific survival について検討した結果、*AP2a* と *MUC17* の発現と生存曲線との関係では、*AP2a* 低発現、*MUC17* 高発現で生存期間が短いことが明らかになった ( $P=0.0013$ ,  $P=0.0433$ )。さらに *AP2a* 低発現かつ *MUC17* 高発現群と *AP2a* 高発現かつ *MUC17* 低発現群の生存期間の比較においても有意差を認めた ( $P=0.0010$ )。

【考察】 外科手術で摘出した膵癌組織からマイクロダイセクションにより選択的に採取した膵癌細胞の RNA を用いた網羅的遺伝子発現解析により、膵癌リンパ節転移関連遺伝子を同定し、それらの遺伝子群の蛋白発現解析により *AP2a* と *MUC17* は膵癌リンパ節転移予測マーカーであることを明らかにした。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年10月23日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

外科的切除術を受けた膵癌患者の最も予後を規定する因子であるリンパ節転移に着目し、マイクロダイセクションにより選択的に回収した膵癌細胞のRNAを用い、膵癌リンパ節転移陽性群と陰性群の網羅的遺伝子発現プロファイルを比較し、さらに蛋白発現解析によるvalidationを行い、より信頼性の高い膵癌リンパ節転移予測マーカーの同定を試みたものである。手術で摘出した膵癌凍結サンプル20例(リンパ節陽性群11例、陰性群9例)を用い、マイクロダイセクションにより膵癌細胞のみを回収した後、RNAを抽出し、Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip (Affymetrix)にて網羅的遺伝子解析を行った。その結果、リンパ節転移陽性群で20遺伝子が低発現を、31遺伝子が高発現を認め、これら51遺伝子によるsupervised cluster解析では、リンパ節転移陰性群が同じ集団として同定された。これらの遺伝子群に対し、膵癌組織63例を用いて、免疫染色による蛋白発現解析を行った。その結果、*AP2a*はリンパ節転移陽性群で有意に低発現し、*LI cadherin*・*MUC17*・*XK*はリンパ節転移陽性群で高発現していた。さらに膵癌転移リンパ節においても、同様の結果であった。これらの

分子マーカーに臨床病理学的因子を加え、膵癌リンパ節転移との関係を多変量解析にて検討した結果、AP2 $\alpha$ 低発現 (P=0.0115) とMUC17高発現 (P=0.0089) の2因子のみが独立した膵癌リンパ節転移予測因子であった。

さらに63例のdisease-specific survivalについて検討した結果、リンパ節転移陽性群と陰性群では、陽性群で生存期間が短く (P=0.0154) 、AP2 $\alpha$ とMUC17の発現と生存曲線との関係では、AP2 $\alpha$ 低発現、MUC17高発現で生存期間が短いことが明らかになった (P=0.0013, P=0.0433) 。さらにAP2 $\alpha$ 低発現かつMUC17高発現群とAP2 $\alpha$ 高発現かつMUC17低発現群の生存期間の比較においても有意差を認めた (P=0.0010) 。

以上より、本論文は、外科手術で摘出した膵癌組織からマイクロダイセクションにより選択的に採取した膵癌細胞のRNAを用いた網羅的遺伝子発現解析により、膵癌リンパ節転移関連遺伝子を同定し、それらの遺伝子群の蛋白発現解析によりAP2 $\alpha$ とMUC17は膵癌リンパ節転移予測マーカーであることを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第406号
学位授与の日	平成21年12月8日
氏名	植村志乃美
学位論文の題目	Identifying molecular markers for chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer. Increased expression of interferon-stimulated gene 15 kd is associated with intrinsic chemoresistance. (膵癌のゲムシタビン感受性分子マーカーの同定—interferon-stimulated gene 15 kd の発現増加と内因性抗癌剤耐性の関連—)
論文審査委員	主査 教授 村垣泰光 副査 教授 一瀬雅夫 教授 山上裕機

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

膵癌はもともと予後不良な悪性疾患であり、その頻度は年々増加している。gemcitabine は進行膵癌の第一選択薬であり、かつ術後補助療法としても唯一有効性が確認された抗癌剤であるが、進行膵癌の生存期間中央値は 5.7 か月、5 年生存率は 1–4 % と極めて予後不良な癌腫である。したがって膵癌の gemcitabine 感受性規定因子を同定することは膵癌治療における治療効果予測や効果を増強させる分子標的となりうる。本研究ではまず膵癌細胞株の gemcitabine 耐性株を作成し、薬剤耐性に関与する遺伝子を同定したが、耐性株の作成には 6 ヶ月以上の高濃度 gemcitabine 投与下での細胞培養が必要であり、臨床的な自然耐性に関する遺伝子変化を反映していない可能性ある。臨床応用を目指す目的で 11 種類の膵癌細胞株を用いて gemcitabine 感受性と遺伝子発現プロファイリングにより内因性 gemcitabine 感受性（自然耐性）を規定する遺伝子を同定した。

### 【方法】

#### 1. 獲得耐性規定遺伝子の同定

##### 【gemcitabine 獲得耐性膵癌細胞株の作成と感受性試験】

膵癌細胞株 CIPT1, MiaPaCa2 に gemcitabine を 1ng/ml を投与し、徐々に gemcitabine 濃度を増加させ、約 6 か月培養し、それぞれの耐性株を作成した。

薬剤感受性は WST1 assay (Roche)にて IC50 値を測定した。

##### 【遺伝子発現プロファイリング】

親株、10 倍耐性株、100 倍耐性株の RNA を抽出し、PCR にて増幅、ビオチンでラベルした後、Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip (Affymetrix)にハイブリダイズさせ Fluidics Station 400 を用いて洗浄、染色し、GeneArray Scanner にてスキャンした。DNA-Chip Analyzer にて 2 種類の細胞株で共通して親株と比較して耐性株で発現が変化した遺伝子を抽出した。

#### 2. 内因性感感受性規定遺伝子の同定

##### 【感受性規定遺伝子の同定】

11 種類の膵癌細胞株の薬剤感受性を WST1 assay で測定した。Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip (Affymetrix)を用いて遺伝子発現プロファイリングを行った。38500 個の各遺伝子につき、細胞株の gemcitabine IC50 値と遺伝子発現値の線形回帰分析により相関の高い遺伝子を抽出した。薬剤低感受性に関与する遺伝子の中から、さらに、膵癌組織の遺伝子発現解析データより、膵癌組織において正常膵管よりも 2 倍以上高発現している遺伝子を同定した。

##### 【RNA 干渉法を用いた gemcitabine 感受性変化の確認】

内因性 gemcitabine 低感受性寄与することが同定された遺伝子に対し、siRNA を Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) を用いて transfection して遺伝子発現を抑制し、gemcitabine 感受性の変

化を測定した。遺伝子発現抑制効果は Real-time RT-PCR、Western Blotting にて確認した。

#### 【結果】

##### 【gemcitabine 耐性株の作成】

CIPT1 の 10 倍耐性株、100 倍耐性株、および MiaPaCa2 の 10 倍耐性株、250 倍耐性株を作成した(Table1)。

##### 【gemcitabine 獲得耐性規定遺伝子の同定】

CIPT1 および MiaPaCa2 両方の細胞株において 100 倍耐性株、250 倍耐性株で親株と比較して発現差が 2 倍以上の遺伝子を抽出すると、157 遺伝子が抽出され、そのうち耐性度とともに変化する遺伝子を抽出すると耐性株で過剰発現する遺伝子 5 つ、耐性株で低発現な遺伝子 18 個が同定された (Table2)。この中に gemcitabine 代謝関連遺伝子である DCK、RRM1 が含まれ、両耐性株ともに親株と比べて、DCK は耐性株で発現が低下、RRM1 は発現が増加していた。

##### 【内因性 gemcitabine 感受性を規定する遺伝子群の同定】

11 種類の膵癌細胞株はそれぞれ異なる gemcitabine 感受性を示した(Table3)。gemcitabine IC50 値は最も感受性の良い細胞株 CIPT1 で 5.2ng/ml、最も悪い細胞株 PK1 で 76.4ng/ml であった。Scatter plot 解析と線形回帰解析により、カットオフを p 値 0.05、coefficient 値 0.5 と設定し、低感受性株で発現の高い 15 遺伝子(Table4)、高感受性株で発現の高い 49 遺伝子(Table5) を抽出した。

##### 【gemcitabine 獲得耐性規定遺伝子群と内因性感受性規定遺伝子群の比較】

同定した 23 個の Gemcitabine 獲得耐性規定遺伝子が内因性感受性を規定しているかどうか、11 膵癌細胞株での発現を調べた(Table6)。線形回帰解析を行ったところ、p 値 > 0.2、coefficient 値 ± 0.24 以下であり、獲得耐性規定遺伝子は内因性感受性を規定していないことが分かった。

逆に内因性感受性を規定する 64 遺伝子に関して、獲得耐性を規定しているか、親株と獲得耐性株における発現を調べ(Table7)、同様に内因性感受性規定遺伝子群は獲得耐性を規定していないことが分かった。

##### 【ISG15 は gemcitabine 内因性耐性細胞において過剰発現していることを同定】

膵癌組織のマイクロアレイデータを用いて、gemcitabine 低感受性株で発現の高い 15 遺伝子の中で、膵癌組織で正常膵管と比較して過剰発現している遺伝子を同定した。カットオフ値を signal intensity > 500、正常膵管と癌組織の発現差が 2 倍以上と設定し、LY6D と ISG15 の 2 遺伝子を抽出した(Table8, Fig.1)。LY6D と ISG15 の膵癌細胞株における発現を RT-PCR で確認し、マイクロアレイデータと一致することを確認した(Fig.2)。LY6D と ISG15 は gemcitabine 感受性細胞株では発現が低く、低感受性株では発現が高かった。

##### 【ISG15 の発現抑制が gemcitabine 感受性を関与していることを同定】

LY6D と ISG15 の siRNA を用いて gemcitabine 低感受性細胞株 T3M4, PK1 の感受性変化を検討した。siRNA により LY6D, ISG15 の発現が抑制されることは quantitative real-time RT-PCR, Western blotting により確認した。LY6D siRNA を T3M4, PK1 に投与したが gemcitabine 感受性は変化しなかった(Fig.3)。ISG15 siRNA を投与した T3M4, PK1 は gemcitabine 感受性が著しく増加し、IC50 値は T3M4 で 88.24 から 6.8ng/ml に、PK1 で 99.02 から 9.13ng/ml になった(Fig.4,5)。

##### 【ISG15 と ISGlation のターゲット遺伝子の発現が gemcitabine 投与により増加する】

CIPT1 に gemcitabine を投与すると、ISG15 の発現が増加していることをマイクロアレイで同定した(Table9)。同時に、ISGlation のターゲット遺伝子である JAK1、ERK1、PLCG1,14-3-3 sigma の発現も gemcitabine 投与により増加していることを同定した(Table9)。

#### 【考察】

膵癌細胞株の網羅的遺伝子発現解析により、gemcitabine 獲得耐性規定遺伝子および内因性感受性規定遺伝子を同定した。gemcitabine 長期持続投与によって獲得した耐性株の遺伝子発現解析で得ら

れた獲得耐性規定遺伝子と、複数の膵癌細胞株の発現解析から得られた内因性感受性（自然耐性）規定遺伝子は全く異なる遺伝子であった。内因性 gemcitabine 感受性を規定する遺伝子群から、膵癌組織においても発現の多い遺伝子を同定し、さらに RNA 干渉法を用い、ISG15 が内因性 gemcitabine 感受性に関与することを同定した。

ISG15 はインターフェロン  $\alpha \cdot \beta$  刺激により誘導される遺伝子の一つであり、さまざまなタンパクと結合して活性化し、ウイルス感染や様々な外的ストレスに対する反応を調節している。このタンパクとの結合、活性化は ISGlation といわれ、そのターゲットには JAK1、STAT1 などのシグナル伝達における重要な因子や、膵癌では過剰発現が報告されている癌抑制遺伝子である 14-3-3 $\sigma$  などが含まれている。ISG15 がどのように gemcitabine 感受性に関与しているかは今後の検討課題であるが、膵癌細胞株に gemcitabine を投与すると、ISG15 および ISGlation のターゲット遺伝子の発現が増加することを同定した。ISG15 や ISG15 関連遺伝子が gemcitabine 感受性に関与していることが推察された。

現在、今回得られた遺伝子の臨床的意義を、膵癌切除標本における遺伝子発現解析により検討中であり、さらに本研究は将来に向けて gemcitabine との併用薬に関する分子標的療法の探索的研究に発展すると考えられる。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成21年11月16日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

本論文は、膵癌の抗癌剤治療の第一選択薬である gemcitabine の感受性規定因子を、膵癌細胞株の網羅的遺伝子発現プロファイリングを用いて検討したものである。gemcitabine の内因性感受性（自然耐性）と長期使用による獲得耐性の双方に着目し、それぞれに関与する遺伝子発現を比較検討した。

その結果、①内因性感受性を規定する遺伝子群64個（カットオフ:線形回帰分析で

$p$ 値 $\leq 0.05$ , coefficient値 $>0.5$ , もしくは $<-0.5$ ), 獲得耐性を規定する遺伝子群23個(親株と耐性株とで発現差 $\geq 2$ 倍, 耐性度に伴って発現が変化)を同定した。②2遺伝子群間の比較を行ったところ、相関を認めず、内因性感受性を規定する遺伝子群と獲得耐性を規定する遺伝子群は全く異なる遺伝子であった。このことから内因性感受性と獲得耐性は異なる機序によることが示唆された。また、従来研究されてきた手法である細胞株で獲得耐性を得るには非常に高濃度の gemcitabine の長期投与が必要であることが分かり、臨床上の獲得耐性を反映していない可能性が示唆された。③膵癌組織の網羅的遺伝子発現解析を用いて、gemcitabine 内因性低感受性株で発現の高い15遺伝子の中で膵癌組織において正常膵管と比較して過剰発現している遺伝子を2個 (LY6D, ISG15) 同定した(カットオフ:正常膵管と癌組織の発現差 $\geq 2$ 倍, signal intensity $\geq 500$ )。④siRNAを用いてISG15の発現を抑制したところ gemcitabine 感受性が増加することを同定した。⑤膵癌細胞株に gemcitabine を投与したところ、ISG15の発現が増加し、同時にISG15が関与するシグナル伝達にかかわる遺伝子の発現が増加していることを同定した。

以上の結果より、膵癌の gemcitabine 内因性感受性において ISG15 の発現が関与していることが示され、今後の gemcitabine との併用薬に関する分子標的療法の探索的研究に発展すると考えられ、学位論文として価値のあるものと認められた。

学位記番号	博(医)甲第407号		
学位授与の日	平成21年12月22日		
氏名	藤田 恭子		
学位論文の題目	Sonic hedgehog: its expression in a healing cornea and its role in neovascularization. (角膜新生血管における Sonic hedgehog の役割)		
論文審査委員	主査	教授 仙波 恵美子	
	副査	教授 前田 正信	教授 雑賀 司珠也

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

角膜が外傷を受けると創傷治癒過程でしばしば新生血管が生じてしまい、角膜の透明性を維持できず視機能が損傷されてしまう。したがって角膜外傷創傷治癒過程における血管新生の抑制は大変重要であると考えられる。

今回 Sonic hedgehog(Shh)に焦点を当て、まず血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養系を用いて新生血管における Shh の役割を把握し、次にアルカリ外傷後角膜における新生血管、ラット角膜における外因性 Shh から誘導された新生血管において Shh の発現を検討し、最後に Shh 阻害剤である Cyclopamine を用いて Shh をブロックすることで角膜新生血管が抑制されるかを検討した。

### 【方法】

#### 1. 血管内皮細胞における管腔形成

血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養系において各ウエルを培養液のみ群、Shh5nM 群、Shh5nM+Cyclopamine2.5nM、Shh5nM+Cyclopamine10nM 群に分け、特定日に各培養液を添加し、一定期間後に固定後 CD31 で免疫染色学的に検討した。そして各群で形成された新生血管の長さと同数とを比較した。また Shh が血管内皮成長因子 VEGF と関連性があるか調べるために、VEGF 群、VEGF+Cyclopamine 群で同様の実験を行った。

#### 2. マウスアルカリ外傷モデル

全身麻酔、点眼麻酔下でマウスの角膜 (n=42) に 1 NaOH を 3 $\mu$ l 点眼し外傷を作成し、一定期間後眼球摘出し、凍結切片、パラフィン切片を作成し、Shh、Ptc の発現を検討した。また HE 染色を用いて組織学的に検討した。また Real-time RT-PCR を用いて Shh と Ptc の mRNA の検出を行った。

#### 3. 培養細胞における外因性 Shh の血管因子への影響

Shh が他の血管因子の誘導に関与しているかを調べるために Araki-Sasaki ヒト角膜上皮株とマウス線維芽細胞株を培養しリコンビナント Shh を添加し、ELISA を用いて TGF $\beta$ 1、VEGF、MCP-1 の吸光度に影響するか調べた。また Real-time RT-PCR を用いて mRNA についても検討した。

#### 4. vivo における角膜新生血管への Cyclopamine の影響

Wistar rats(n=20)に全身麻酔下にて角膜周辺部より中央部に向かってポケットを作成し、ペレットを挿入後、各群において 10 日後に輪部からの新生血管長を比較した。ペレットはコントロール、recombinant Shh 含有、Cyclopamine 含有、recombinant Shh+Cyclopamine 含有の 4 種類を用いた。

#### 5. vivo における角膜新生血管への Cyclopamine の影響

全身麻酔、点眼麻酔下でマウスの角膜 (n=42) に 1 NaOH を 3 $\mu$ l 点眼し外傷後、一方には Cyclopamine を結膜下注射し、一定期間後眼球摘出し、両群における CD31 と Gli3 の発現と角膜輪部からの新生血管の長さを検討した。

### 【結果】

#### 1. HUVEC での管腔形成について

Shh5nM の群は培養液のみの群に比べて血管の長さ、分岐ともに増加していた。また Shh に Cyclopamine を添加することにより血管の長さ、分岐はともに減少した。

Shh と VEGF に関連性があるかどうか調べるために同様の実験を VEGF 添加群、VEGF+Cyclopamine 添加群でそれぞれ検討したが、いずれの群においても血管長、新生血管の枝分かれの総

数ともに有意差は認められなかった。

## 2. マウスアルカリ外傷角膜の組織像、Shh mRNA の発現、免疫組織学的検討

マウスのアルカリ外傷角膜 H.E.染色では、アルカリ点眼後 5 日目の角膜輪部に新生血管がわずかに生じており、20 日目には角膜輪部から中央部にかけて多数の新生血管が生じており、血管腔の断面がみとめられた。

Real-Time RT-PCR において Shh mRNA は正常角膜では検出レベル以下であったが、アルカリ外傷角膜では著しく検出レベルが上昇した。Ptc のレベルには変化がなかった。

免疫組織学的ではアルカリ点眼後 5～20 日の角膜新生血管と実質細胞に Shh と CD31 の二重染色にて CD31 の染色部位に一致して Shh の発現が認められた。

## 3. 培養細胞での内因性 Shh の血管因子への影響

Araki-Sasaki ヒト角膜上皮細胞、マウス線維芽細胞のどちらにおいても TGF $\beta$ 、VEGF、MCP-1 の mRNA 発現レベルに差は見られなかった。

コントロール群ではペレット挿入の異物反応によるものと思われる血管新生がみられた。Shh 混入群では血管新生が著明に生じており、Shh+Cyclopamine 群では血管新生がほぼ消失していた。

## 4. vivo における外因性 Shh の角膜新生血管への影響

リコンビナント Shh 含有ペレット移植角膜ではコントロールに比べて著しく新生血管が生じており、Cyclopamine 含有ペレット移植角膜では新生血管形成が抑制されていた。

## 5. vivo における角膜新生血管への Cyclopamine の影響

Cyclopamine を結膜下注射したマウスアルカリ外傷角膜における新生血管

の長さはコントロールに比べて減少していた。免疫組織学的検討においても Shh、Gli3 ともに Cyclopamine 結膜注射群は発現が抑制されていた。

### 【考察】

まず in vitro において外因性 Shh が新生血管を誘導するかを血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養系において検討した結果リコンビナント Shh は血管形成を促進したことから Shh は新生血管発達に関与していると思われる。Cyclopamine 添加培養細胞や Shh+Cyclopamine 添加培養細胞ではコントロールと比べて新生血管長や分岐数が著しく減少しており、また VEGF で誘導された新生血管は Cyclopamine を添加しても変化が現れなかったことから Shh は VEGF 非依存的に新生血管を誘導すると考えられる。

次に in vivo においてもこの現象が生じるか検討したところマウスアルカリ外傷後治癒過程の角膜新生血管において Shh が発現したことから角膜創傷治癒過程で生じる新生血管の発達に Shh が関与している可能性があることが示唆された。また内因性 Shh は Cyclopamine により抑制され、新生血管発達を抑制すると考えられる。

これらの結果から Shh を抑制することで角膜血管新生を抑制できる可能性を仮定し In vivo においてこの仮説の検討をおこなった。マウスアルカリ外傷角膜治癒での新生血管で Shh の発現が促進し、リコンビナント Shh 含有ペレット移植角膜において新生血管発達が著しく増加することから in vivo においても Shh が血管新生を制御している可能性を示唆した。Cyclopamine 含有ペレット移植角膜では新生血管発達が減少していたことから内因性 Shh が角膜血管新生を制御していると考えられる。さらにアルカリ外傷後 Cyclopamine を結膜下注射した角膜において血管新生が抑制されたことから Cyclopamine の血管新生抑制作用は in vivo のにおいても明らかになった。

これらのことから内因性 Shh は実際に角膜血管新生の発達に作用している可能性があり、角膜血管新生形成のターゲットのひとつとして重要ではないかと思われる。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 21 年 7 月 23 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

角膜は視機能を良好に保つために透明であることが重要であるが、外傷を受けると創傷治癒過程においてしばしば新生血管が生じてしまい、角膜の透明性を維持できず視機能が損傷されてしまう。したがって角膜外傷後の創傷治癒過程における血管新生の抑制は大変重要である。

Sonic hedgehog(Shh)は蛋白質の一つで、これまで細胞増殖促進や発癌との関連が証明されているが、

外傷後などの治癒過程における角膜血管新生ではどのような働きをするのかは証明されていない。そこで、本研究では Shh が角膜新生血管にどのように作用するのかを検討することを目的とした。

方法として、まず血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養系を用いて新生血管における外因性 Shh の役割を把握し、次に、アルカリ外傷後角膜における新生血管とラット角膜における外因性 Shh から誘導された新生血管において Shh の発現を検討し、最後に、アルカリ外傷後角膜において Shh 阻害剤である Cyclopamine を用い内因性 Shh をブロックすることで、角膜新生血管が抑制されるかを検討した。

その結果、

1. *in vitro* において外因性 Shh 刺激により新生血管が誘導され、Shh 阻害剤である Cyclopamine で抑制された。また Cyclopamine には Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF)の抑制効果はなく、Shh は VEGF 非依存的であった。

2. *in vivo* においても外因性 Shh が角膜血管新生の促進に関与することが示唆された。

3. *in vivo* において Cyclopamine により角膜血管新生が抑制され、内因性 Shh が血管新生を制御していると考えられた。

これらのことから内因性 Shh は実際に角膜新生血管の発達に作用している可能性があり、角膜新生血管形成のターゲットのひとつとして重要であると考えられる。したがってこれらを抑制することで角膜の透明治癒に結び付くことが期待され、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第408号		
学位授与の日	平成22年1月12日		
氏名	島田 健		
学位論文の題目	SUMO4 Met55Val polymorphism is associated with coronary heart disease in Japanese type 2 diabetes individuals (日本人2型糖尿病患者において <i>SUMO4</i> 遺伝子 Met55Val 多型は冠動脈疾患と関係する)		
論文審査委員	主査	教授 井原 義人	
	副査	教授 三家 登喜夫	教授 南 條 輝志男

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

SUMO4 は small ubiquitin-like modifier (SUMO) family の一員であり、IκBα に結合することによって NF-κB 転写活性を抑制し、NF-κB 依存性炎症関連因子の遺伝子発現を負に調節することが知られている。これまでに、同遺伝子の 55 番目のアミノ酸が Met から Val に置換する多型 (Met55Val) (rs237025、163A>G) が 1 型糖尿病の発症に関連し、疾患感受性アリルである G アリルを有する SUMO4 タンパク (Val55) は A アリルを有する SUMO4 タンパク (Met55) に比して機能が減弱していることが報告されている。さらに、同多型に関しては 2 型糖尿病の発症や糖尿病腎症の進展と関連するといった報告もなされているが一定のコンセンサスが得られるまでには至っていない。NF-κB の活性化はインスリン分泌障害やインスリン抵抗性に関与するのみならず、糖尿病血管障害の病態における主要な経路の 1 つでもある。今回、*SUMO4* 遺伝子 Met55Val 多型と 2 型糖尿病の発症及び糖尿病血管障害との関連をさらに明らかにすることを目的に 2 つの比較的大きな日本人集団を対象に検討を行った。

### 【対象と方法】

[対象]①和歌山県立医科大学第一内科通院中の患者 859 名 (2 型糖尿病患者 423 名、非糖尿病患者 436 名) と、②国際医療センター (東京) 通院中の患者 920 名 (2 型糖尿病患者 451 名、非糖尿病患者 469 名) を対象とした。なお、glutamic acid decarboxylase (GAD) 抗体陽性あるいは糖尿病診断時から 3 年以内でインスリン治療を開始された糖尿病患者は 1 型糖尿病の可能性があることから除外した。また、非糖尿病患者は 50 歳以上かつ HbA1c 5.6% 以下を満たすものを選んだ。

[方法]ゲノム DNA を末梢血から分離した後、*SUMO4* 遺伝子 Met55Val 多型 (rs237025、163A>G) を TaqMan allelic discrimination 法と direct sequencing 法でタイピングを行い、2 型糖尿病の発症ならびに糖尿病血管障害 (脳梗塞、狭心症・心筋梗塞、網膜症、腎症) との関連を検討した。なお、脳梗塞は神経学的異常と共に頭部画像所見で所見を有するもの、狭心症・心筋梗塞は胸痛等の症状と心電図あるいは冠動脈造影検査で所見を有するもの、網膜症は単純網膜症以上、腎症は微量アルブミン尿以上 (糖尿病腎症第 2 期以上) を「合併症有り」とした。統計学的検討では、患者対照相関解析においては、アリル頻度の比較にはカイ 2 乗検定を、ジェノタイプ頻度の比較にはロジスティック回帰分析を用いた。糖尿病血管障害との関連解析では、血管障害の有無を従属変数に、ジェノタイプ、性別、罹病期間、喫煙歴の有無、高血圧の有無、脂質異常症の有無を独立変数に設定した多重ロジスティック回帰分析を用いた。2 型糖尿病発症に関するメタ解析は Mantel-Haenszel 検定を用いた。統計学的有意水準は  $p < 0.05$  を有意とした。

### 【結果】

- ① *SUMO4* 遺伝子 Met55Val 多型 (rs237025、163A>G) と 2 型糖尿病の発症との関連  
和歌山群を用いた検討では、以前の報告と同様に非糖尿病群に比し 2 型糖尿病群で G アリルの頻度が高かったが有意ではなかった (30.0 vs. 33.6%、 $p=0.12$ )。一方、東京群を用いた検討では、G アリルは、逆に 2 型糖尿病群に比し非糖尿病群で高頻度に認められた (31.2 vs. 33.0%、 $p=0.38$ )。その結果、和歌山群と東京群を合わせた場合、2 型糖尿病の発症との関連は認められなかった (オッズ比 (OR) 1.03 [95% C.I. 0.90-1.19]、 $p=0.65$ )。
- ② *SUMO4* 遺伝子 Met55Val 多型と糖尿病血管障害との関連

多重ロジスティック回帰分析で他の危険因子（性、罹病期間、喫煙歴、高血圧、脂質異常症）を補正した場合においても、和歌山群（OR1.64 [95% C.I. 1.02-2.64]、 $p=0.041$ 、additive model）、東京群（OR1.58 [95% C.I. 1.07-2.34]、 $p=0.021$ ）、いずれの群でも、Gアリルは冠動脈疾患の有意な危険因子であった。一方、脳梗塞に関しては、和歌山群において有意な関連を認めたものの（OR1.86 [1.03-3.36]、 $p=0.041$ 、additive model）、東京群では認められなかった（OR0.74 [95% C.I. 0.36-1.51]、 $p=0.41$ ）。さらに、腎症に関しては、以前の報告とは異なり、東京群ではGアリルを有する者で腎症が有意に少なかった（OR0.66 [95% C.I. 0.44-0.98]、 $p=0.040$ 、additive model）。しかしながら、この関連は、和歌山群では認められず（OR1.28 [95% C.I. 0.87-1.89]、 $p=0.22$ ）、2群を合わせた場合においても有意な関連は認められなかった（OR0.84 [95% C.I. 0.65-1.09]、 $p=0.19$ ）。最後に、網膜症との間にはいずれの群においても有意な関連は認めなかった。

#### 【考察】

SUMO4遺伝子Met55Val多型が日本人2型糖尿病の発症に関連するという他施設からの報告は本研究では再現できず、本研究とのメタ解析においても有意な関連は認められなかった（OR1.10 [95% C.I. 0.98-1.24]、 $p=0.11$ 、Mantel-Haenszel法）。また、糖尿病腎症との関連も本研究では再現できず、同遺伝子多型は2型糖尿病の発症および糖尿病腎症の進展の主要な遺伝因子では無いと考えられた。

SUMO4遺伝子Met55Val多型と冠動脈疾患の発症との関連に関してはこれまで報告がなされていないが、本研究で比較的大きな2つの日本人集団のいずれにおいても関連を認めたことより、同多型は冠動脈疾患の発症に関連する新たな遺伝素因のひとつであると考えられた。高血糖によりNF- $\kappa$ Bが活性化され、その結果、NF- $\kappa$ B依存性炎症関連因子の発現が亢進することが、糖尿病状態における動脈硬化進展の主要経路のひとつであると考えられている。SUMO4はI $\kappa$ B $\alpha$ に結合しNF- $\kappa$ Bの転写活性を抑制すること、疾患感受性アリルのGアリルを有するSUMO4タンパクはAアリルを有するSUMO4タンパクに比してその機能が減弱していることなどが報告されており、Gアリルを有する患者では血管壁における炎症反応が生じやすいことがその理由ではないかと考えられた。

一方、脳梗塞の発症との関連は和歌山群で認められたが、東京群では、認められなかった。脳梗塞の有病率は冠動脈疾患より低いことから（7.0% V.S. 18.5%）、結論を得るにはさらに大きなサンプル集団での検討が必要であり、さらに、非糖尿病患者における同遺伝子多型と血管障害との関連に関する検討も今後必要と考えられた。

#### 【結論】

SUMO4遺伝子Met55Val多型が2型糖尿病患者において冠動脈疾患の発症に関与する可能性が示唆された。一方、既報の2型糖尿病の発症または糖尿病腎症との関連は本研究では再現できなかった。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成21年12月7日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

SUMO4はsmall ubiquitin-like modifier (SUMO) familyの一員であり、NF- $\kappa$ B転写活性を抑制しNF- $\kappa$ B依存性炎症関連因子の遺伝子発現を負に調節することが知られている。NF- $\kappa$ Bの活性化により惹起される炎症は、インスリン分泌障害や抵抗性さらには糖尿病合併症の進展に深く関与していることから、SUMO4の遺伝子多型と糖尿病の病態との関係に興味を持たれている。これまでに同遺伝子の55番目のアミノ酸がMetからValに置換する多型（Met55Val）において、Valアリルを有するSUMO4蛋白はMet5アリルを有するSUMO4蛋白に比して機能が減弱していること、Valアリルを有する者では1型糖尿病の発症リスクが高いことが報告されている。一方、2型糖尿病に関しては、その発症や糖尿病腎症の進展と関連するといった報告もなされているが一定のコンセンサスは得られていない。

本論文は、SUMO4遺伝子Met55Val多型と2型糖尿病の発症及び糖尿病血管障害との関連を明らかにすることを目的に検討を行ったものである。その結果、他施設から報告のある2型糖尿病の発症や糖尿病腎症の進展との関連に関しては本研究では確認できなかったが、Valアリルが冠動脈疾患の危険因子であることが新たに見出された。本研究の対象は、和歌山県立医科大学通院中の患者859名（2型糖尿病患者423名、非糖尿病患者436名）と国際医療センター通院中の患者920名

(2型糖尿病患者451名、非糖尿病患者469名)で、この比較的大きな2つの日本人集団のいずれにおいてもValアレルと冠動脈疾患の間に有意な関連が認められていることは興味深い。

以上、本論文は*SUMO4*遺伝子Met55Val多型が2型糖尿病患者において冠動脈疾患の発症に関与する可能性を初めて示したものであり、糖尿病合併症に関連した新たな遺伝子多型を提示したものとして、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第409号		
学位授与の日	平成22年1月12日		
氏名	国本 健		
学位論文の題目	BMD Measurement by DXA method is Useful for Estimation of Bone Strength of Lumbar vertebra in CKD-MBD model rats (CKD-MBD モデルラットにおいて DXA 法による骨密度の測定は腰椎の骨強度推定に有用である)		
論文審査委員	主査	教授 吉田 宗人	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 重松 隆

## 論文内容の要旨

### [緒言]

末期腎不全患者特に維持透析患者では CKD-MBD(Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder)の進展に伴い骨折のリスクが増加する。骨折のリスクを評価するために BMD 測定がよく用いられているが CKD-MBD においては BMD 評価法に一定のコンセンサスがなく、また BMD 値と骨折の発生の関係も研究により様々な結果であり一定の結果を見ていない。

また血清 intact-PTH と BMD、骨折の発生に関しても同様に一定の結果を見ていない。

### [方法]

食餌および副甲状腺摘出にて PTH 値をコントロールした腎不全ラットを作成、大腿骨・腰椎を摘出し DEXA 法により測定した BMD と骨強度を直接測定し比較検討した。

### [結果]

- ① 高 intact-PTH の腎不全ラットでは他群と比較して、腰椎の BMD が有意な低下を示したが、大腿骨では差を認めなかった。
- ② 高 intact-PTH の腎不全ラットでは腎不全ラット群と比較して、腰椎の垂直方向の骨強度の低下を認めたが、大腿骨の3点折り曲げ法による中央部の骨強度は、群間差を認めなかった。
- ③ 腰椎と大腿骨の BMD 測定値は正の相関関係を示した。(r=0.51,p=0.002)
- ④ 全てのラットにおいて BMD は測定部位によらず腰椎の骨強度を反映していたが(r=0.55,p=0.0007vs L2-4BMD; r=0.40p=0.018vs femurBMD)が、大腿骨の骨強度と BMD は関連しなかった。

### [結語]

高 intact-PTH 状態の腎不全ラットでは腰椎の BMD・骨強度が共に低下している可能性が示された。また BMD は部位による変化の差がないが腰椎の骨強度は大腿骨と比較して早期に低下する可能性が示唆された。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 21 年 12 月 21 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

末期腎不全患者特に維持透析患者では CKD-MBD(Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder)の進展に伴い骨折のリスクが増加する。透析患者の骨折では ADL の低下・医療費の増加・生命予後に結びつくとしてされており重大な問題である。

骨折のリスクを評価するために BMD 測定がよく用いられているが CKD-MBD においては BMD 評価法に一定のコンセンサスがなく、これまでの研究でも BMD 測定法・測定部位は研究によって様々であり、また BMD 値と骨折の発生の関係も研究により様々な結果であり一定の結果を見ていない。

また血清 intact-PTH と BMD、骨折の発生に関しても同様に一定の結果を見ていない。

CKD-MBD を管理する上で、この点をはっきりさせることは重要な課題である。

この問題を解決するために、本研究では食餌および副甲状腺摘出にて PTH 値をコントロールした腎不全ラットの大腿骨・腰椎を摘出し DEXA 法により測定した BMD と骨強度を直接測定し比較検討した。

これらの実験により

- ① 高 intact-PTH の腎不全ラットでは他群と比較して、腰椎の BMD が有意な低下を示したが、大腿骨では差を認めなかった。
- ② 高 intact-PTH の腎不全ラットでは腎不全ラット群と比較して、腰椎の垂直方向の骨強度の低下を認めたが、大腿骨の 3 点折り曲げ法による中央部の骨強度は、群間差を認めなかった。
- ③ 腰椎と大腿骨の BMD 測定値は正の相関関係を示した。(r=0.51,p=0.002)
- ④ 全てのラットにおいて BMD は測定部位によらず腰椎の骨強度を反映していたが (r=0.55,p=0.0007vs L2-4BMD; r=0.40p=0.018vs femurBMD)が、大腿骨の骨強度と BMD は相関しなかった。

以上より、本論文は、高 intact-PTH 状態の腎不全ラットでは腰椎の BMD・骨強度が共に低下している可能性が示された。また BMD は部位による変化の差がないが腰椎の骨強度は大腿骨と比較して早期に低下する可能性が示唆された。腎不全モデルラットにおける、測定部位毎の BMD、BMD と骨強度の関係について一定の見解を示唆するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第410号		
学位授与の日	平成22年1月12日		
氏名	丹羽 徹		
学位論文の題目	Mixed gastric and intestinal -type metaplasia is formed by cells with dual intestinal and gastric differentiation (胃腸混合型腸上皮化生を構成する細胞は胃型および腸型形質を共発現する)		
論文審査委員	主査	教授 覚道 健一	
	副査	教授 山上 裕機	教授 一瀬 雅夫

## 論文内容の要旨

【緒言】腸上皮化生は、慢性胃炎、萎縮に伴う形質変化であり、分化型腺がんの前癌病変であると広く信じられている。組織学的には、胃腺管の構成細胞が小腸型細胞である吸収上皮細胞や杯細胞に置換される状態と定義される。腸上皮化生は、免疫組織学的手法を用いた分化マーカーの検討により、腸上皮化生は胃型と腸型の形質が腺管レベルで種々の程度で混在する胃腸混合型腸上皮化生と腸型形質のみからなる腸単独型腸上皮化生の2種類の大別できる事が報告されている。胃腸混合型腸上皮化生は、1腺管に少数の杯細胞が見られる程度のもの(杯細胞化生)から腺管を構成するすべての細胞が杯細胞と吸収上皮細胞からなるものまで多種多様である。

【方法】蛍光免疫組織化学染色の手技を用いて多重染色を行い、正常胃腺管および胃腸混合型腸上皮化生腺管および腸単独型腸上皮化生腺管における胃型および腸型形質の発現を検討した。胃癌にて手術を施行した患者20例の非腫瘍部粘膜を凍結切片として保存し用いた。腸型形質を同定するために腸型ムチンコア蛋白である MUC2 コア蛋白(Ccgp58)に対する抗体を用い、刷子縁に対する抗体として villin(BDID2C3)および CD10(56C6)に対する抗体を用いた。また、胃型形質を同定するために胃型ムチンコア蛋白である MUC5AC コア蛋白(CLH2)に対する抗体を用いた。核染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を用いた。

【結果】胃腸混合型腸上皮化生では MUC5AC は MUC2 だけでなく villin および CD10 とも共発現していることが明らかになった。goblet 細胞では、MUC5AC と MUC2 の共発現が認められ、円柱上皮細胞では MUC5AC と villin および CD10 が共発現していた。MUC5AC の発現が減弱していくことで示される腸単独型への推移において villin と CD10 の発現は増強していた。胃腸混合型から腸単独型への phenotypic shift してゆくことを考慮に入れると、CD10 は villin に遅れて出現する腸分化マーカーであることが示唆された。

【結論】胃腸混合型腸上皮化生では、腺管レベルばかりでなく、細胞レベルで種々の程度で胃型形質と腸型形質(杯細胞形質と吸収上皮細胞形質)が混在していることが証明された。また胃腸混合型腸上皮化生を構成する杯細胞および刷子縁は、機能的には未成熟な段階にあること、一方、腸単独型腸上皮化生腺管では形態ばかりでなく機能的にも胃腸混合型腸上皮化生腺管に比べ成熟していると事を示した。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年12月14日、審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。

胃粘膜上皮では、*Helicobacter pylori* 感染を主因とする慢性炎症を背景として、胃粘膜から腸上皮粘膜への形質変化である腸上皮化生が起こり、分化型腺がんの前癌病変であると広く信じられている。腸上皮化生は、組織学的には、胃腺管の構成細胞が小腸型細胞である吸収上皮細胞や杯細胞に置換される状態と定義される。

最近の免疫組織学的手法を用いた分化マーカーの検討により、腸上皮化生は胃型と腸型の形質が腺管レベルで種々の程度で混在する胃腸混合型腸上皮化生と腸型形質のみからなる腸単独型腸上皮化生の2種類の大別でき、胃腸混合型腸上皮化生は、1腺管に少数の杯細胞が見られる程度のもの(杯細胞化生)から腺管を構成するすべての細胞が杯細胞と吸収上皮細胞からなるものまで多種多様であるこ

とが知られている。

そこで、胃癌にて手術を施行した患者の非腫瘍部粘膜の凍結切片を用いて、蛍光免疫組織化学染色の手技を用いて多重染色を行い、正常胃腺管および胃腸混合型腸上皮化生腺管および腸単独型腸上皮化生腺管における胃型および腸型形質の発現を検討した。

その結果、

- 1) 胃腸混合型腸上皮化生では MUC5AC は MUC2 だけでなく villin および CD10 とも共発現していることを明らかにした。
- 2) goblet 細胞では、MUC5AC と MUC2 の共発現が認められ、円柱上皮細胞では MUC5AC と villin および CD10 が共発現していることを示した。
- 3) MUC5AC の発現が減弱していくことで示される腸単独型への推移において villin と CD10 の発現は増強しており、胃型形質と腸型形質の発現は逆相関することを示した。

以上より、本論文は胃腸混合型腸上皮化生では、腺管レベルばかりでなく、細胞レベルで種々の程度で胃型形質と腸型形質(杯細胞形質と吸収上皮細胞形質)が混在していることが証明された。また胃腸混合型腸上皮化生を構成する杯細胞および刷子縁は、機能的には未成熟な段階にあること、一方、腸単独型腸上皮化生腺管では形態ばかりでなく機能的にも胃腸混合型腸上皮化生腺管に比べ成熟していると事を示しており、今後の慢性胃炎における形質変化および胃癌発癌研究に寄与するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第411号		
学位授与の日	平成22年1月12日		
氏名	藤田 識人		
学位論文の題目	Impaired angiogenic response in the cornea of mice lacking osteopontin (マウス角膜創傷治癒での血管新生反応に対するオステオポンチンの役割)		
論文審査委員	主査	教授 仙波 恵美子	
	副査	教授 井原 義人	教授 雑賀 司珠也

### 論文内容の要旨

角膜は外界からの光線刺激が透過する無色透明な組織であり、そのために無血管である。しかし、角膜表面の障害の治癒過程でしばしば周辺部から新生血管が侵入して、その透明性を損ねる。

オステオポンチン (osteopontin, OPN) はシアル酸に富む糖蛋白であり、細胞挙動を調整するインテグリン結合能を有するリガンドとしての機能を持ち、骨形成や癌組織内での血管新生において促進的役割を担うことが報告されている。

学位申請者は、マウス眼組織線維芽細胞でのTGF $\beta$ 1によるVEGF発現誘導における内因性OPNと、マクロファージのサイトカイン発現における外因性OPNの効果を調べるために、生後2日の野生種 (C57BL/6, WT) マウス及びOPN欠失 (KO) マウスの眼球から得られた線維芽細胞、WTマウスとKOマウスの腹膜腔からグリコーゲン刺激4日後に得られたマクロファージを培養し、2.0 ng/mlのTGF $\beta$ 1を添加後24時間でtRNAを抽出し、VEGF mRNAをリアルタイム逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR) で測定した。TGF $\beta$ 1シグナル伝達に対する内因性OPNの役割を検討するためWTマウス及びKOマウスから得られた眼線維芽細胞を培養し、5.0 ng/mlのTGF $\beta$ 1を添加した。0.5、1.0、3.0時間後にp38 MAPキナーゼとSmad3のリン酸化をウェスタンブロット法を用いて検討した。また、角膜電熱線焼灼で得られる角膜新生血管に対するOPNの役割を検討するためWT及びKOマウスそれぞれについて、角膜中央部を電熱線で焼灼し、創傷治癒反応として角膜輪部から誘導される新生血管を観察した。焼灼後3、5、7、10、14日に屠殺して摘出されたマウス眼から凍結切片を作成し、CD31による免疫組織化学染色を行い、角膜輪部から角膜中央部へ伸展した血管の長さを測定した。

これらの方法を用いて、以下のような結果を得た。WTマウスから培養された眼線維芽細胞ではTGF $\beta$ 1の添加により、VEGFのmRNA発現が促進されたが、KOマウスからの眼線維芽細胞ではVEGF mRNAの発現促進は見られなかった。外因性オステオポンチンの欠如は、TGF $\beta$ 1投与後のTGF $\beta$ 1、MCP-1とVEGFのmRNA発現に影響を及ぼさなかった。TGF $\beta$ 1添加後にリン酸化されるSmad3は0.5時間でピークに達するが、WTマウス由来の細胞に比してKOマウス由来線維芽細胞では活性化が減少し、p38MAPKでは1.0時間後にリン酸化がピークに達するが、KOでは活性化が減少していた。WTマウスでは角膜輪部から焼灼部位に伸展する新生血管長は、3日後には約0.2mmであったが7日後にはピークに達し、14日後には減少していた。KOマウスでは、7日後でも増加が見られず、WTに比して7日後で有意に抑制されていた。

これらの結果から内因性オステオポンチンは、TGF $\beta$ 1刺激による血管新生関連サイトカインの発現の増強に促進的に働き、オステオポンチンが血管新生に促進的な役割を担う事が示された。またその発現経路にはTGF $\beta$ 1を介したSmad3及びp38MAPKの活性化においてOPNが促進的に働くことが示唆されたが詳細な経路については今後の課題と考えられる。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年12月25日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、筆答及び口頭で上記学位論文に関する質疑を行い、本論文は角膜新生血管に対するOPNの役割を明らかにし、角膜の病的新生血管に対する治療薬としてのOPNの可能性を導き出したものであり、学位論文としての価値があると認めた。

学位記番号	博(医)甲第412号		
学位授与の日	平成22年3月9日		
氏名	芳山 恵		
学位論文の題目	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene polymorphisms in Japanese children with infection-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. (日本人小児における感染症関連血球貪食症候群と CTLA-4 遺伝子多型)		
論文審査委員	主査	教授 中熊 秀喜	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 吉川 徳茂

## 論文内容の要旨

### [序文]

血球貪食症候群 (hemophagocytic lymphohistiocytosis, 以下 HLH と略す) は過剰な活性化状態に陥った T 細胞, 組織球がもたらす高サイトカイン血症により生じる致命的な疾患群である. HLH は原発性 HLH と二次性 HLH に大別され, 原発性 HLH では *PFR1*, *UNC13D*, *STX11* などの責任遺伝子の同定により病態が明らかになりつつある. しかし, 疾患頻度の高い二次性 HLH の発症機序については依然不明である. 本研究では T 細胞抑制性補助シグナル分子である Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (以下 CTLA-4) に着目し, 二次性 HLH で最も頻度の高い感染症関連血球貪食症候群 (infection-associated HLH, 以下 IHLH) における CTLA-4 遺伝子多型について検討した.

### [対象と方法]

小児 IHLH 患者 43 例, 正常コントロール群 100 例の CTLA-4 遺伝子多型を解析し, 患者群とコントロール群における genotype 分布, allele 頻度を比較した. また, 患者群の臨床検査値と CTLA-4 遺伝子多型との相関について検討した. CTLA-4 遺伝子多型は機能解析が報告されている -318CT, +49AG, CT60, (AT) リピート数; (AT)<sub>n</sub>, の 4 部位について PCR, PCR-RFLP 法で解析した. (AT)<sub>n</sub> は最小リピート数 AT<sub>7</sub> とそれ以外の AT<sub>>7</sub> の 2 群に分けて解析した.

### [結果]

(AT)<sub>n</sub> において患者群とコントロール群に genotype 分布, allele 頻度に有意差を認めた (各々  $p=0.028$ ,  $p=0.007$ ; Fisher's exact test). 患者群に活性化 T 細胞抑制効果の弱い AT<sub>>7</sub> の allele 頻度が高かった (odds 比 2.46). 臨床検査値と遺伝子多型との解析では AT<sub>>7</sub> を homo に持つ症例の HLH 診断時血清 LDH 値, 可溶性 IL-2 レセプター値が, 他の多型を持つ症例より有意に高値を示した.

### [考察]

1) IHLH 患者群で活性化 T 細胞抑制シグナルが弱くなる CTLA-4 遺伝子多型が多くみられたこと, 2) 活性化 T 細胞抑制シグナルが弱くなる CTLA-4 遺伝子多型をもつ症例の血清 LDH 値, 可溶性 IL-2 レセプター値が高値を示したことから CTLA-4 遺伝子多型が小児 IHLH の病態に関与していることが示唆された. 今後二次性 HLH の病態解析に T 細胞免疫応答補助シグナルの解析が必要と考えられた.

### [結語]

CTLA-4 遺伝子多型が二次性 HLH の病態に関与していることを初めて明らかにした.

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年2月16日、審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

血球貪食症候群 (hemophagocytic lymphohistiocytosis, 以下 HLH) は過剰な活性化状態に陥った T 細胞, 組織球がもたらす高サイトカイン血症により生じる致命的な疾患群である. 原発性 HLH では責任遺伝子の同定により病態が明らかになりつつあるが, 疾患頻度の高い二次性 HLH の発症機序は依然不明である. 本研究では T 細胞抑制性補助シグナル分子である Cytotoxic T

lymphocyte-associated antigen 4 (以下 CTLA-4) に着目し、二次性 HLH で最も頻度の高い感染症関連血球貪食症候群 (infection-associated HLH, 以下 IHLH) における CTLA-4 遺伝子多型について着目した。

本論文は 小児 IHLH 患者 43 例, 正常コントロール群 100 例の CTLA-4 遺伝子多型 (機能解析が報告されている、-318CT, +49AG, CT60, (AT) リピート数 ; (AT)<sub>n</sub>, の 4 部位) について解析し, 患者群とコントロール群における genotype 分布, allele 頻度を比較した。また, 患者群の臨床検査値と CTLA-4 遺伝子多型との相関について検討したものである。

その結果、(A T) n において患者群とコントロール群に genotype 分布, allele 頻度に有意差を認めた(各々 $p=0.028$ ,  $p=0.007$ ; Fisher's exact test)。患者群に活性化 T 細胞抑制効果の弱い AT<sub>>7</sub> の allele 頻度が高かった(odds 比 2.46)。臨床検査値と遺伝子多型との解析では AT<sub>>7</sub> を homo に持つ症例の HLH 診断時血清 LDH 値, 可溶性 IL-2 レセプター値が, 他の多型を持つ症例より有意に高値を示した。

以上の結果から、①IHLH 患者群で活性化 T 細胞抑制シグナルが弱くなる CTLA-4 遺伝子多型が多くみられたこと, ② 活性化 T 細胞抑制シグナルが弱くなる CTLA-4 遺伝子多型をもつ症例の血清 LDH 値, 可溶性 IL-2 レセプター値が高値を示したこと, から CTLA-4 遺伝子多型が小児 IHLH の病態に関与していることが初めて示唆され, 学位論文として十分に価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第413号		
学位授与の日	平成22年3月9日		
氏名	射場 昭典		
学位論文の題目	Insulin resistance increases the risk for urinary stone formation in a rat model of metabolic syndrome (インスリン抵抗性が尿路結石形成に及ぼす影響についての基礎的検討)		
論文審査委員	主査	教授 重松 隆	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 原 勲

## 論文内容の要旨

【目的】近年、肥満、糖尿病、高血圧などの生活習慣病を有する患者では尿路結石の発生率が高いことが報告されている。こうした疫学的知見は、尿路結石症が他の生活習慣病と共通の発症メカニズムを有している可能性を示唆している。最近では、複数の生活習慣病が合併した状態はメタボリックシンドロームと呼ばれ、動脈硬化性疾患の危険因子として注目されている。本研究ではメタボリックシンドロームモデルラットを用いてメタボリックシンドロームと尿路結石症の関連およびその主たる病態であるインスリン抵抗性が尿中結石関連物質の排泄および尿路結石形成に及ぼす影響についての検討を行った。

【方法】過食による内臓脂肪蓄積型肥満から高トリグリセリド血症、2型糖尿病、高血圧を引き起こし、ヒトのメタボリックシンドロームに類似した病態を呈する OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima fatty) ラットおよび耐糖能異常を発症しない対照の LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) ラットを用いて以下の検討を行った。

(1) 体重、血液検査、24時間尿検査の経時的変化

(2) インスリン抵抗性改善剤 pioglitazone 投与による尿中結石関連物質の変化

【結果】(1) OLETF ラットの体重は4週齢より、血清トリグリセリド値は8週齢より、血糖値および血清インスリン値は12週齢より LETO ラットに比較して有意に高値であった。24時間尿検査では、OLETF ラットの尿 pH および尿中クエン酸排泄量は経時的に低下傾向を示し、それぞれ8週齢および12週齢以降は LETO ラットに比較して有意に低かった。一方、OLETF ラットの尿中尿酸排泄量およびカルシウム排泄量は経時的に増加傾向を示し、それぞれ4週齢および20週齢以降は LETO ラットに比較して有意に高かった。尿中シュウ酸およびマグネシウム排泄量は一部で両ラットに差はみられたものの一定の傾向は認められなかった。(2) Pioglitazone を投与した OLETF ラットでは、体重および血糖値の変化はみられなかったが、血清インスリン値およびトリグリセリド値は濃度依存性に有意な低下が認められ、LETO ラットと同程度まで改善していた。尿中結石関連物質については、尿 pH は pioglitazone の投与により LETO ラットと同等までの改善には至らなかったものの濃度依存性に有意な上昇がみられた。一方、尿中クエン酸、尿酸、カルシウム、シュウ酸、マグネシウム排泄量に変化はみられなかった。

【結論】(1) メタボリックシンドロームのモデルである OLETF ラットでは、体重増加、高トリグリセリド血症、高血糖、高インスリン血症の出現とともに、尿 pH および尿中クエン酸排泄量の低下、尿中尿酸およびカルシウム排泄量の増加がみられ、尿酸結石およびカルシウム結石の発症リスクが高くなることが示された。(2) インスリン抵抗性改善剤である pioglitazone の投与により OLETF ラットにおける尿 pH 低下に改善が認められたことから、メタボリックシンドロームの本態と考えられているインスリン抵抗性は尿 pH を低下させることによって尿路結石形成に関与していることが示唆された。(3) 本研究の結果から、尿路結石症もメタボリックシンドロームの1疾患として捉え食事指導や生活指導によってインスリン抵抗性を改善することが本症の予防に繋がるものと思われた。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年2月25日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

近年、肥満、糖尿病、高血圧など生活習慣病を有する患者では尿路結石症の発症率が高いこと

が報告されている。こうした疫学的知見は、尿路結石症が他の生活習慣病と共通の発症メカニズムを有している可能性を示唆している。最近では、複数の生活習慣病が合併した状態はメタボリックシンドロームと呼ばれ、動脈硬化性疾患の危険因子として注目されている。本論文ではメタボリックシンドロームモデルラットを用いてメタボリックシンドロームと尿路結石症の関連およびその主たる病態であるインスリン抵抗性が尿中結石関連物質の排泄および尿路結石形成に及ぼす影響について検討した。

その結果、

- ① メタボリックシンドロームモデルラットでは、体重増加、高トリグリセリド血症、高血糖、高インスリン血症の出現とともに、尿pHおよび尿中クエン酸排泄量の低下、尿中尿酸およびカルシウム排泄量の増加がみられ、尿酸結石およびカルシウム結石の発症リスクが高くなることが示された。
- ② インスリン抵抗性改善剤であるpioglitazoneの投与によりメタボリックシンドロームモデルラットにおける尿pH低下に改善が認められたことから、メタボリックシンドロームの本態と考えられているインスリン抵抗性は尿pHを低下させることによって尿路結石形成に関与していることが示された。

以上より、本論文はメタボリックシンドロームでは尿酸結石およびカルシウム結石の発症リスクが高くなることおよびインスリン抵抗性と尿pH低下との因果関係を明らかにした初めてのものであり、尿路結石症もメタボリックシンドロームの1疾患として捉え食事指導や生活指導によってインスリン抵抗性を改善することが本症の予防に繋がる可能性を示唆しており、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第414号		
学位授与の日	平成22年3月16日		
氏名	北野 愛		
学位論文の題目	Emodin suppression of ocular surface inflammatory reaction. (眼表面における炎症性反応に対するエモジンによる抑制効果)		
論文審査委員	主査	教授 近藤 稔 和	
	副査	教授 井原 義 人	教授 雑賀 司珠也

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

アルカリ外傷などの重症の眼表面（角結膜）癒痕化疾患は、難治性でしばしば失明の危機をもたらす。これらの病態に共通する機序は、炎症の遷延化を伴った各所の線維芽細胞の活性化による筋線維芽細胞への変化による各種細胞外マトリックスの沈着と過剰な組織収縮である。

非外科的にこれらの過剰な重症の眼科癒痕化疾患を予防・治療する方法の検索は一部の医療先進地域だけでなく広く社会での視覚障害者の救済という観点から非常に重要な課題である。眼科線維化疾患の予防という方面でのこれまでの研究発表は薬剤の細胞毒性や遺伝子治療ベクターの関係で、実験レベルでの有効性が臨床に応用されるに至っていない。

我々の研究室では、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入による角膜などの眼組織の線維化疾患の治療の開発と平行して、臨床で使用されている漢方製剤のこれらの疾患の治療法の開発を目的として、いくつかの漢方製剤の成分の有効性を培養細胞や動物実験で検討している。

茵陳蒿湯（いんちんこうとう）は、黄疸を指標に利胆効果を主眼として、古くから肝疾患などに用いられてきた漢方薬であり、胆汁うっ滞の改善や肝細胞保護作用や星細胞の活性化抑制作用を有すると報告されている。茵陳蒿湯は、3つの生薬（インチンコウ、サンシシ、ダイオウ）から構成されている。サンシシの主要な生理活性成分のゲニポシドは体内ではゲニピンに変化して薬理作用を発揮する。肝線維化の担当細胞である培養肝星細胞の活性化による筋線維芽細胞への変化や細胞外マトリックス成分の発現増強をゲニピンが抑制することが知られている。また、ダイオウの生理活性成分であるエモジンは、炎症性疾患に効果があると報告されている。本研究では、エモジンの抗炎症効果が、角膜・結膜の炎症／癒痕化疾患に治療効果を発揮するか否かをヒト結膜下由来線維芽細胞およびC56BL/6 マウスを用いて検討した。

### 【材料および方法】

#### 1. ヒト結膜下由来線維芽細胞の増殖能、遊走能、細胞外マトリックスに対する影響

小児斜視手術時に同意のもとで、結膜下組織を採取、培養し線維芽細胞を得た。培養液中にエモジンを各濃度（0～5 $\mu$ g/ml）で添加し、線維芽細胞の増殖能、遊走能、細胞外マトリックス産生に対する効果を検討した。増殖能は、線維芽細胞を96ウェルプレートに播種し各濃度のエモジンを添加し24時間後にアラマーブルーアッセイで検討した。遊走能は線維芽細胞層をシリコン針でスクラッチして作成した鎖の創閉を観察することで検討した。細胞外マトリックスはI型コラーゲンとフィブロネクチンをELISAで定量し、免疫組織化学的検討もおこなった。

#### 2. monocyte/macrophage chemoattractant protein-1(MCP-1)の発現に対する影響

マクロファージ誘導因子であるMCP-1の遺伝子発現、タンパク発現をreal-time RT-PCRおよびELISAで定量した。

#### 3. 培養血管内皮細胞の血管様構造形成に対する影響

血管内皮細胞と線維芽細胞フィーダーの共培養をおこない、vascular endothelial growth factor (VEGF)存在下でエモジンを各濃度で添加し、血管内皮細胞の管腔形成に対する影響を検討した。

#### 4. シグナル伝達に対する影響

癒痕化に関与する因子であるtransforming growth factor  $\beta$ 1(TGF $\beta$ 1)由来のSmadシグナル伝達と、tumor necrosis factor  $\alpha$ (TNF $\alpha$ )に誘導されるNf- $\kappa$ BとC-Jun N-terminal kinase(JNK)のシグナル伝達を、ウェスタンブロットと免疫組織化学的検討で検討した。8ウェルチャンバースライドに線維芽細胞を播種し、コンフルエントの状態でもエモジン各濃度添加し、TGF $\beta$ またはTNF $\alpha$ を添加した。0.5、

1、2時間後のリン酸化 Smad2、リン酸化 p65RelA、リン酸化 JNK の核内移行を免疫組織化学で検討した。60mm シャーレに播種した線維芽細胞をエモジン各濃度で培養し、TGFβ または TNFα を添加し、1、2時間後の細胞層からウェスタンブロットで Smad2 およびリン酸化 Smad2、Nf-κB およびリン酸化 p65RelA、JNK およびリン酸化 JNK のタンパク発現を定量した。

#### 5. アルカリ外傷モデルマウスを用いた検討

全身、および局所麻酔下に C56BL/6 マウスに 0.5N NaOH 点眼でアルカリ外傷を作成し、エモジンを 40mg/kg/day で腹腔内投与をおこない、5、10、15 日後に屠殺した。角膜の創傷治癒過程を観察した上で、パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色および αSMA と F4/80 の免疫組織化学的検討をおこなった。また、real-time RT-PCR で組織中の TGFβ1、MCP-1 の発現を検討した。

#### 【結果】

##### 1. ヒト結膜下由来線維芽細胞の増殖能、遊走能、細胞外マトリックスに対する影響

添加されたエモジンは、ヒト結膜下由来線維芽細胞の遊走能や αSMA の発現を抑制し、増殖能とコラーゲン産生に影響しなかった。またフィブロネクチンの培養液中の濃度に優位な変化を与えなかったが、その細胞層への沈着を抑制した。

##### 2. MCP-1 の発現にたいする影響

添加されたエモジンはマクロファージ誘導因子である MCP-1 の遺伝子発現、タンパク発現を抑制した。

##### 3. 培養血管内皮細胞の血管様構造形成に対する影響

血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養で、エモジンは VEGF に誘導される血管新生を抑制した。

##### 4. シグナル伝達に対する影響

添加されたエモジンは TGFβ 由来の Smad シグナル伝達には影響しないが、TNFα に誘導される Nf-κB や JNK のシグナル伝達を抑制した。

#### 5. アルカリ外傷モデルマウスを用いた検討

アルカリ外傷モデルのマウスのエモジン腹腔内投与群では眼表面の血管新生や角膜混濁や潰瘍が抑制された。組織学/免疫組織化学を用いた検討の結果、エモジン投与群では、角膜、結膜ともに αSMA 陽性筋線維芽細胞の形成および F4/80 陽性マクロファージの浸潤が抑制されていた。real-time RT-PCR では、癒痕化関連遺伝子であるコラーゲン I α2、TGFβ1、MCP-1 の発現が抑制された。

#### 【考察】

エモジンは、ヒト結膜下由来線維芽細胞において、遊走能、筋線維芽細胞 (αSMA 陽性) の形成、フィブロネクチンの細胞層への沈着、マクロファージ誘導因子である MCP-1 の遺伝子発現およびタンパク発現を抑制した。これらの効果は、培養線維芽細胞での線維化反応抑制効果と言える。血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養で、エモジンは VEGF に誘導される血管新生を抑制した。

これらの効果がどのようなサイトカインシグナルの変化を伴って現れたものかをウェスタンブロットで検討した。その結果、TGFβ 由来の Smad シグナル伝達には影響しないが、TNFα に誘導される Nf-κB や JNK のシグナル伝達を抑制した。筋線維芽細胞の形成には、Smad2 シグナルが必須であるという報告がある一方で、同時に細胞外のフィブロネクチンが重要な役割を演じていると報告されている。エモジンは、フィブロネクチンの培養液中の濃度に優位な変化を与えなかったが、その細胞層への沈着を抑制した。このことが、筋線維芽細胞の形成が抑制されたことの原因である可能性がある。

アルカリ外傷モデルマウスのエモジン腹腔内投与で、角膜の血管新生や混濁が抑制されれば透明治癒しており、組織学的には角膜、結膜ともに筋線維芽細胞の形成、およびマクロファージの浸潤が抑制されていた。以上の *in vitro* および *in vivo* の結果から、エモジンは眼表面の過剰癒痕疾患に対して、予防や治療として臨床応用できる可能性が示唆された。

#### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年12月17日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査をおこなった。

アルカリ外傷などの重症の眼表面 (角結膜) 癒痕化疾患は、難治性でしばしば失明の危機をもたらす。これらの病態に共通する機序は、炎症の遷延化を伴った各所の線維芽細胞の活性化による筋線維芽細胞への変化による各種細胞外マトリックスの沈着と過剰な組織収縮である。エモジンは漢方製剤であ

る茵陳蒿湯の成分、ダイオウの生理活性成分で、炎症性疾患に効果があると報告されている。本研究では、エモジンの抗炎症効果が、角膜・結膜の炎症／瘢痕化疾患に治療効果を発揮するか否かをヒト結膜下由来線維芽細胞および C56BL/6 マウスを用いて検討した。

エモジンは、ヒト結膜下由来線維芽細胞において、遊走能、筋線維芽細胞 ( $\alpha$ SMA 陽性) の形成、フィブロネクチンの細胞層への沈着、マクロファージ誘導因子である MCP-1 の遺伝子発現およびタンパク発現を抑制した。これらの効果は、培養線維芽細胞での線維化反応抑制効果と言える。血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養で、エモジンは VEGF に誘導される血管新生を抑制した。シグナル伝達では、TGF $\beta$  由来の Smad シグナル伝達には影響しないが、TNF $\alpha$  に誘導される Nf- $\kappa$ B や JNK のシグナル伝達を抑制した。

アルカリ外傷モデルマウスのエモジン腹腔内投与で、角膜の血管新生や混濁が抑制されほぼ透明治癒しており、組織学的には角膜、結膜ともに筋線維芽細胞の形成、およびマクロファージの浸潤が抑制されていた。

以上のように、*in vitro* および *in vivo* の結果から、エモジンは眼表面の過剰瘢痕疾患に対して、予防や治療として臨床応用できることが期待され、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第415号		
学位授与の日	平成22年3月16日		
氏名	岡田基宏		
学位論文の題目	Development and optimization of a cell-based assay for the selection of synthetic compounds that potentiate bone morphogenetic protein-2 activity. (BMP-2作用を増強させる化合物選別のための cell-based assay の確立)		
論文審査委員	主査	教授 板倉 徹	
	副査	教授 仙波 恵美子	教授 吉田 宗人

## 論文内容の要旨

Bone Morphogenetic Protein-2(BMP-2)は強力な骨形成誘導物質であり、米国においてすでに脊椎固定術などに臨床応用されているが大量使用が要求され、コストがかかるという問題点があった。一方LIM Mineralization Protein-1(LMP-1)はBMP-2活性増強作用を持つことが証明され、BMP-2のコストを下げるができる物質として期待されている。しかしそれは細胞内において作用し、Smad Ubiquitin Regulatory Factor-1(Smurf-1)と結合する必要があるため細胞内へのtransporterが必要であった。本論文ではcell-based assayを確立し、それを使用することにより、LMP-1のSmurf-1 binding siteを模倣し、かつ細胞透過性のある既存の安価な薬剤を簡便に選別することを目的とした。そのassayは9xGCCG reporter plasmidをC2C12細胞にtransfectionすることによるluciferase assayに基づいたものであった。結果は以下の通りであった。

- 1, 9xGCCG reporter plasmidを用いたluciferase assayはBMP-2に濃度依存性に反応した。
- 2, 同様のassayにより、LMP-1 Δ Smurf-1(LMP-1のSmurf-1 binding site mutant)はLMP-1のwild typeと比較し、有意にBMP-2活性増強作用が減弱することが示された。
- 3, 2の結果は、Alkaline phosphatase(ALP)、Osteocalcin(OCN)のmRNA発現に対するReal-time PCRおよびALP enzyme assayにより証明された。
- 4, コンピュータシミュレーション技術によりLMP-1のSmurf-1 binding siteを模倣しているものとして選別された54の薬剤(SVAK1-54とする)に対し2と同様にluciferase assayを行った結果、複数の薬剤に活性が見られた。
- 5, 4により選別された薬剤のうちSVAK-3に対して複数の濃度で同様のcell-based assayを行った結果、濃度依存性の反応が見られ、この結果もALP,OCNのmRNA発現に対するReal-time PCRおよびALP enzyme assayにより証明された。

9xGCCG reporter plasmidを用いたtransfected cell systemはosteoblast differentiationの遺伝子発現モニタリングのためのcell-based assayとして感度が高く、有用であることが証明され、さらにその方法により選別された、SVAK-3という化合物はBMP-2の作用を増強させる可能性があることが示された。それは今後、BMP-2の必要量を減少させる低コストで安定な化合物として期待できる。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年12月25日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。今回の研究は BMP-2 作用を増強させる安価な物質を探し出すための第一歩とも言える、cell-based assay を確立したという点において非常に重要で応用範囲も広く、発展性の高いものと考えられるため、本論文は学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第416号		
学位授与の日	平成22年3月16日		
氏名	神 埜 奈 美		
学位論文の題目	Low-echoic lesions underneath the skin in subjects with spinal-cord injury (脊髄損傷者における B モードエコーを用いた褥瘡評価)		
論文審査委員	主 査	教授 古 川 福 実	
	副 査	教授 前 田 正 信	教授 田 島 文 博

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【緒言】

近年、医学的管理とリハビリテーションの進歩によって、脊髄損傷者（脊損者）の生存率と生活の質（Quality of Life、QOL）は著しく改善されてきた。しかし、脊損者にとって褥瘡は依然として金銭的にも肉体的にも、そして精神的にも QOL を低下させる深刻な問題のままである。

一般に、長時間の同一部位圧迫による組織の虚血が褥瘡の発生要因と考えられている。脊損者においては、対麻痺による感覚障害と運動麻痺により麻痺部の同一部位圧迫を長時間にわたり引き起こしやすい。さらに、自律神経障害や、内分泌系、免疫系の統合が障害されているため、創傷治癒を遅らせる可能性も報告されている。すなわち、脊損者は褥瘡を形成しやすく、治癒しにくい。従って、脊損者の褥瘡対策は、早期発見・早期治療が重要であり、早期発見法の確立が急がれている。

早期発見のためには、褥瘡発症機序を臨床的な観点から考える必要がある。しかし、その発生様式には様々な議論があり、皮膚から形成されるという考えと皮下から形成されるという考えが対立している。従来、National Pressure Ulcer Advisory Panel (NPUAP)は、褥瘡が皮膚表面から深部に進展するという考えに基づき、深達度による分類を提唱していた。しかし、2007年には、変色した完全な皮膚の下に既に損傷を受けている「Deep tissue injury」や、創床が痂皮で覆われ深達度の判断が不能である「Unstageable」という、新しい概念を加えた。

本研究では、脊損者に視診・触診・Bモードエコーによる褥瘡検診を行い、褥瘡発生様式を検討すると共に、Bモードエコーが褥瘡の早期発見に役立つツールとなりうる可能性を検討した。

### 【対象・方法】

C5 レベル～L1 レベルの脊損男性 43 名が本研究に参加した。

方法は、被験者にベッド上腹臥位になってもらい、まず初めに、一人の検者が仙骨部・左右坐骨部の視診を行い、発赤や紫色などの変色、腫脹や創傷の有無をチェックした。古い傷による癒痕や色素沈着は異常として扱わなかった。次に、他の検者が同部位を触診し、熱感及び浮動感の有無をチェックした。最後に同部位は、Bモードエコーで注意深く検査され、別の医師が得られたデータをみて、骨直上から皮膚にかけての低エコー域の有無を判断した。

低エコー域が認められた場合は、その低エコー域の縦径、横径および皮膚から低エコー域上縁までの距離（深さ）を測定した。統計学的検討には、post hoc Scheffe's test を用い、有意水準 5%未満を有意差有りとした。

なお、本研究は和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得た上で行った。

### 【結果】

本研究では、43 名の被験者より合計 129 部位について評価された。視診、触診、エコー検査による結果では、視診によって認められた異常部位は 2 部位と最も少なく、エコー検査によって認められた異常部位は 17 部位と最も多かった。

視診、触診、エコー検査の結果の組合せは 4 グループに分けられ、112 部位は、全ての検査において正常であった。視診、触診で正常、エコー検査で低エコー域を認めたものは 9 部位であった。視診で正常、触診で浮動感、エコー検査で低エコー域を認めたのは 6 部位で、視診上発赤あるいは創傷、触診で浮動感、エコー検査で低エコー域を認めたのは 2 部位であった。

正常エコー検査所見では、皮膚から骨直上にかけて、均一にきれいな筋層が認められた。それに対して、エコー検査で異常を認めた部位は全て骨直上にあり、筋層の乱れと低エコー域を認めた。触診

とエコー所見で異常が認められた部位の低エコー域の大きさは、エコー所見のみで異常が認められた部位の低エコー域と比較して、縦径と横径に有意差がなかった。しかし、皮膚からの深さに関しては有意に浅かった。

#### 【考察】

本研究では、視診上は明らかに正常な皮膚で覆われているように見える場合も、エコーでは皮下に低エコー域が存在することがあるという事実が示された。逆に、エコー検査で正常で視診や触診で異常を認める部位はなかった。このことより、脊損者における褥瘡は、まず初めに皮下で形成され、表面に広がってくる可能性が高いということが示唆された。

我々は、本研究で認められた低エコー域を早期の褥瘡や **deep tissue injury** であると信じているが、直接、その低エコー域が皮膚にまで達して、視診上や触診上明らかな褥瘡になるのを証明したわけではない。また、その証明には倫理上問題があるため、我々は低エコー域を認めた被験者に対しては除圧を行うよう指導した。今後、この点に関しては、臨床的に適切な褥瘡モデルを用いてさらに検討していく必要がある。

また、一般的には、毎日の褥瘡自己チェック法として、手鏡による視診が推奨されているが、本研究の結果では、触診によって異常が指摘された 8 部位の内 6 部位が視診では異常がなかった。このことから、褥瘡に関係する早期深部組織損傷の発見には、視診よりも触診が臨床的に重要であると考えられる。さらに、早期の褥瘡と考えられる低エコー域の有無を検査するために、定期的なエコー検査の実施が薦められる。

#### 【結論】

脊損者に対して、視診、触診、エコー検査による褥瘡検診を実施した結果、**deep tissue injury** や早期の褥瘡と考えられる低エコー域は、骨直上から皮膚に向かって大きくなっていく可能性が高いことが示唆された。また、エコー検査は、**deep tissue injury** や早期の褥瘡を見つけ出すのに役立つツールであると考えられた。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 22 年 2 月 19 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

脊髄損傷者の褥瘡易形成性と難治性は、脊髄損傷者自身の QOL を低下させるだけでなく、医療経済上も大きな問題となっている。褥瘡はその発生様式もまだ未解明な点が多く、早期発見できれば、治癒までの期間、その治療にかかるコストを大幅に減少させることができる。本論文は脊髄損傷者に視診・触診・B モードエコーによる褥瘡検診を行い、褥瘡発生様式を検討すると共に、B モードエコーが褥瘡の早期発見に役立つツールとなりうるかを検討したものである。

その結果、

1. 視診によって認められた異常部位数は最も少なく、エコー検査によって認められた異常部位数は最も多かった。
2. 視診、触診、エコー検査の結果の組合せは 4 群に分けられ、①全ての検査において正常であった群②視診・触診で正常、エコー検査で異常を認めた群③視診で正常、触診・エコー検査で異常を認めた群④全ての検査で異常であった群、の 4 群であった。
3. エコー検査で認めた異常は全て骨直上であり、触診とエコー所見で異常が認められた部位の低エコー域の大きさは、エコー所見のみで異常が認められた部位の低エコー域と比較して、縦径と横径に有意差がなかったが、皮膚からの深さに関しては有意に浅かった。

以上の結果より、脊髄損傷者における褥瘡は、まず初めに皮下で形成され、表面に広がってくる可能性が高いということが示唆され、褥瘡早期発見のツールとしてエコー検査が最も役立つのではないかという結論であった。

今回の研究は、褥瘡の発症様式について、「皮膚表面から深部へ」ではなくて、「骨直上から皮膚表面へ」という新しい概念の裏付けを証明しただけではなく、褥瘡の早期発見ツールとして、非侵襲的検査であるエコー検査の有用性を示唆したという点において、非常に臨床の場で応用しやすく、広く用いられるものになると考えられるため、本論文は学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第417号		
学位授与の日	平成22年3月16日		
氏名	李 亜 琮		
学位論文の題目	Distinct Clinical, Serological, and Sonographic Characteristics of Hashimoto's Thyroiditis Based With and Without IgG4-positive Plasma Cells (IgG4 陽性プラズマ細胞から見た橋本甲状腺炎の臨床的特色)		
論文審査委員	主査	教授 村 垣 泰 光	
	副査	教授 三 家 登喜夫	教授 覚 道 健 一

## 論 文 内 容 の 要 旨

### Introduction

IgG4-related sclerosing disease is a recently recognized syndrome characterized clinically by mass-forming lesions in the exocrine glands and extranodal tissue, elevated serum IgG4 level, and good response to steroid therapy. Histopathologically, it is featured by lymphoplasmacytic infiltration and sclerosis, as well as IgG4-positive plasma cell infiltration. Recently, the first description was made by our group of a subsection of patients with Hashimoto's thyroiditis (HT) might have close relationship with IgG4-related sclerosing disease. It was found that immunohistochemistry can help subclassify HT into two groups, IgG4 thyroiditis and non-IgG4 thyroiditis by our criteria.

The purpose of this study is to analyze the immunophenotypic features of IgG4 in large number of patients and to clarify the clinical, serological, and sonographic characteristics of the patients with IgG4 thyroiditis.

### Patients and methods

#### Individuals, tissue preparation of thyroid and blood samples

Seventy patients with HT from Kuma Hospital who underwent thyroidectomy between 1983 and 2006 were studied (Female/male: 62/8; Average age at surgery: 57.73±8.598). Resected thyroid tissue were fixed in formalin and embedded in paraffin. Serial sections were cut from each paraffin block for H&E staining, Masson's trichrome staining and immunohistochemistry. In addition, serum samples from 12 patients (12/70) who received thyroidectomy in 2005-2006 were used for measurement of serum IgG4 and the other subclasses of IgG concentrations.

#### Histopathologic evaluation and immunohistochemistry

H&E and Masson's trichrome sections were reviewed to confirm previous diagnosis and the degree of stromal fibrosis, lymphoplasmacytic infiltration, follicular cell degeneration and lymphoid follicle formation. Immunostaining for IgG4 and IgG was performed using EnVision system.

#### Clinical, serological, and sonographic evaluation

Clinical, serological and sonographic characteristics of these patients, including: age, gender, disease duration of HT, indication for thyroidectomy, weight of resected thyroid gland, thyroid functional status, thyroid autoantibodies (Tg-Ab and TPO-Ab), ESR, and echogenicity were compared statistically.

#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the Mann-Whitney *U* test, chi-square test, Fisher exact test, Wilcoxon matched-pairs signed-rank test and Spearman's  $\rho$  test.  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

### Results

#### Immunohistochemical and histopathological findings

1) According to the previous criteria (cut-off: >20/HPF IgG4-positive plasma cells and >30%

IgG4/IgG ratio), 19 cases of IgG4 thyroiditis (50.40±22.29/HPF; 50.08±17.79%) and 51 cases of non-IgG4 thyroiditis (7.773±6.929/HPF; 10.63±8.784%) were identified in the 70 patients with HT (Figure 1).

- 2) IgG4 thyroiditis showed significantly higher grade of stromal fibrosis, lymphoplasmacytic infiltration and follicular cell degeneration than non-IgG4 thyroiditis (Figure 2).

#### **Serum IgG4 concentration**

- 1) Preoperative serum IgG4 concentrations were significantly higher in IgG4 thyroiditis than non-IgG4 thyroiditis ( $P=0.0303$ ) (Figure 3).
- 2) After total thyroidectomy, the serum IgG4 concentration of 3 patients (3/5) decreased markedly to the reference range (Figure 4).

#### **Clinical, Serological, and Sonographic findings**

- 1) There are greater proportion of male gender in IgG4 thyroiditis ( $P=0.0296$ ). And, IgG4 thyroiditis group had significantly shorter disease duration than non-IgG4 thyroiditis ( $P=0.0051$ ). No significant differences of patients' age, weight of thyroid glands and indications for thyroidectomy were identified.
- 2) Thyroid autoantibodies, both Tg-Ab and TPO-Ab, were significantly higher in IgG4 thyroiditis than non-IgG4 thyroiditis ( $P=0.0108$ ,  $P=0.0088$ , respectively). Distribution of thyroid functional status were significantly different between the two groups ( $P=0.0243$ ) and there were more patients with subclinical hypothyroidism in IgG4 thyroiditis than non-IgG4 thyroiditis.
- 3) Ultrasound examination revealed that IgG4 thyroiditis was significantly correlated with diffuse low echogenicity, while non-IgG4 thyroiditis showed association with diffuse coarse echogenicity ( $P=0.0008$ ).

#### **Conclusions**

The present study confirmed the previous findings that HT can be subclassified into two groups: IgG4 thyroiditis and non-IgG4 thyroiditis. Histopathologically, IgG4-positive plasma cell infiltrate may be a marker of more fibrotic disease in HT. Furthermore, the two groups presented significantly distinct clinical, serological, and sonographic Characteristics and measuring serum IgG4 concentration provide a practical method to distinguish these new entities.

#### **審査の要旨（審査の日、方法、結果）**

平成 22 年 2 月 19 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

IgG4 関連硬化性疾患 (IgG4-related sclerosing disease) は血中 IgG4 高値、病変臓器における IgG4 陽性形質細胞浸潤、線維化を特徴とする。学位申請者は、橋本病 (Hashimoto's thyroiditis, HT) の一部が IgG4-related sclerosing disease である可能性を指摘し IgG4 と IgG 免疫組織化学の結果より、IgG4 甲状腺炎と non-IgG4 甲状腺炎の両群があることを報告し、HT の亜分類を提案した。

本論文では 70 例の HT のホルマリン固定パラフィン切片を用い、免疫染色により IgG と IgG4 陽性プラズマ細胞の有無を検索し、IgG4 陽性細胞数、IgG4/IgG の比率、病理組織学的なパラメーターを定量解析した。さらに 12 例の HT の術前術後の保存血清を用い、IgG のサブクラスを測定した。さらに、甲状腺機能、自己抗体を含めた、その他の臨床的パラメーターの解析を行い IgG4 甲状腺炎の特色を明らかにした。

結果：

- 1) >20/HPF IgG4-positive plasma cells かつ >30% IgG4/IgG ratio で分類したところ、70 例の HT の中に 19 例の IgG4 甲状腺炎と 51 例の non-IgG4 甲状腺炎を認めた。
- 2) 病理組織学的に IgG4 甲状腺炎は強い線維化、リンパ球形質細胞浸潤、濾胞細胞変性との関連を認めた。
- 3) IgG4 甲状腺炎 (5 例) の術前血清 IgG4 値は non-IgG4 甲状腺炎 (7 例) と比較し有意に高かった ( $P=0.0303$ )。IgG4 甲状腺炎の術後血清 IgG4 値は低下傾向を示した。
- 4) IgG4 甲状腺炎では、発症から手術までの罹病期間が有意に短く、潜在性甲状腺機能低下症が有意

に高頻度で、抗甲状腺自己抗体価が有意に高値、低エコー領域が有意により広い範囲で認められた。さらに、男性患者は IgG4 甲状腺炎が好発傾向を示した。以上より本論文は橋本病に IgG4 甲状腺炎と non-IgG4 甲状腺炎の亜型があり、IgG4 甲状腺炎は臨床的、血清学的、超音波検査的に異なることを明らかにし、学位論文をして価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第418号		
学位授与の日	平成22年3月16日		
氏名	豊澤聖子		
学位論文の題目	Immunohistochemical analysis of CXCR4 expression in fibrohistiocytic tumors (線維組織球系腫瘍におけるCXCR4の発現の検討)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 近藤稔和	教授 古川福実

## 論文内容の要旨

### 【諸言】

近年、様々な腫瘍でのケモカイン、ケモカインレセプターの発現が報告されており、腫瘍の増生、浸潤、転移においても重要な役割が報告されている。CXCR4はケモカインSDF-1特異的レセプターであり、白血球や未分化造血細胞などの細胞膜上に発現している。SDF-1の刺激により走化性が誘導され、さらに増殖、生存が促進される。近年の報告では、乳癌、悪性黒色腫、大腸癌などの転移例において発現が上昇しており、腫瘍の転移に関与している可能性がある。

しかし、CXCR4の詳細な機能については未解明な点も多く、線維組織球系腫瘍での報告例は未だない。皮膚科領域での線維組織球系腫瘍には代表的なものとして隆起性皮膚線維肉腫 dermatofibrosarcoma protuberans(DFSP)、悪性線維性組織球腫 malignant fibrous histiocytoma(MFH)、異型線維黄色腫 atypical fibroxanthoma(AFX)、皮膚線維腫 dermatofibroma(DF)がある。DFSPは稀な疾患で、局所浸潤は強く、手術後の局所再発率が高いが転移は少ない。しばしば局所再発を繰り返す例があり、治療に難渋することがある。MFHは悪性度が高く転移しやすいため予後不良である。一方、DFは良性腫瘍である。

本研究では、DFSP、MFH、DFの手術標本についてCXCR4、CCR6、CCR7の免疫組織染色を施行しその結果と臨床的悪性度の相関を検討した。

### 【方法】

#### 1) 組織標本

患者は和歌山県立医科大学附属病院を受診した患者である。

組織は、DFSP 8例、MFH 6例、DF 14例について原発巣の初回手術において切除されたものを使用した。ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋処理した。尚、症例は臨床像、およびHE組織像(一部免疫染色を含む)で診断が確定したものをを用いた。また、正常成人皮膚をコントロールとして用いた。

#### 2) 免疫組織学的染色

パラフィン切片を作成し、ケモカインレセプターであるCXCR4、CCR6、CCR7とDFSPの指標として使用されるCD34に対する一次抗体と反応させた。その後、LSAB法による増幅発色を行い、発現を評価した。

#### 3) 評価方法

それぞれの切片につき、無作為に3名の皮膚科専門医が5視野を選択し、×400倍で観察した。各々の視野につき染色された腫瘍細胞数が5%未満は0点、5%以上～50%未満は1点、50%以上～70%未満は2点、70%以上～90%未満は3点、90%以上～100%は4点とし、それらを合計し1標本のスコアとした。さらにそれらは、各腫瘍群において平均値を算出した。

#### 4) 検定方法

多重検定(Scheffe's F test)を施行した。p値が0.05以下を統計学的に有意差があると判定した。

### 【結果】

#### ・対象

DFSP8例のうち3例は手術後3年以内に再発したが、リンパ節転移や遠隔転移例はみられなかった。MFH6例については、2例が術後3年以内に再発し、1例が術後3年以内に肺転移がみられた。DFについては全例において再発はみられなかった。

・免疫組織染色

a. CXCR4 の発現

CXCR4 の発現は、DFSP では 8/8 例、MFH では 6/6 例、DF では 12/14 例で陽性であった。染色スコア（陽性細胞の率）は、DF に比して MFH と DFSP において有意な差をもって発現が高値であった ( $p<0.01$ )。さらに、非再発例の DFSP に比べて再発例の DFSP が有意に高値であった ( $p<0.01$ )。染色の強度については明らかな差はみられなかった。

b. CCR6 の発現

MFH において、DF に比して有意に染色スコアが高値であった ( $p<0.01$ )。一方、DFSP においては再発例と非再発例において染色スコアに有意な差はみられなかった。

c. CCR7 の発現

MFH と DFSP において、DF に比して有意に染色スコアが高値であった ( $p<0.01$ )。しかし、DFSP においては再発例と非再発例において染色スコアに有意な差はみられなかった。

d. DFSP における CD34 の発現

DFSP の 7/8 例において CD34 の発現がみられたが、再発例と非再発例においてスコアに有意な差はみられなかった。

【考察】

- 1) 一般に悪性度が高い MFH においては CXCR4, CCR6, CCR7 の発現が良性である DF に比して上昇しており、これらのマーカーが悪性を指標する可能性が示唆された。
- 2) DFSP においては、再発例において非再発例に比して CXCR4 の発現率が上昇していたが、CD34 の発現率には差がみられなかった。このことより CXCR4 が DFSP における腫瘍の局所的悪性度を予測するマーカーとなり得ることが示唆された。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 22 年 2 月 22 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

ケモカインは特定の白血球、リンパ球の遊走作用をもつ物質であるが、様々な悪性腫瘍においてケモカイン、ケモカインレセプターの発現が増生、浸潤、転移において重要な役割を担っていることが報告されている。皮膚悪性腫瘍の中で、悪性黒色腫、有棘細胞癌において、CXCR4, CCR7 などのケモカインレセプターの発現が転移に関与しているという報告がある。しかし詳細な発現の分布や機能についてはいまだ未解明である。また、比較的稀で診断治療が困難とされる線維組織球系腫瘍においてはケモカインの発現を検討した報告はこれまでにない。皮膚科領域の線維組織球系腫瘍として隆起性皮膚線維肉腫 dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP), 悪性線維性組織球腫 malignant fibrous histiocytoma (MFH), 異型線維黄色腫 atypical fibroxanthoma (AFX), 皮膚線維腫 dermatofibroma (DF) などがある。DFSP は局所での浸潤は強く、手術後の再発率が高いが遠隔転移は少なく中間悪性度群に分類される。実際の臨床の場合においても、十分な余裕をもって切除したにも関わらず、局所での再発を繰り返し QOL の低下がみられ治療に難渋することが多い。一般に多能性幹細胞のマーカーである CD34 は DFSP 細胞に発現しており MFH 等の線維組織球系腫瘍との鑑別診断に用いられるが、腫瘍の悪性度を示す指標ではない。そこで本研究では、再発例を含めた DFSP、MFH、DF の初回手術標本について CXCR4, CCR6, CCR7 の免疫組織染色を施行し、線維組織球系腫瘍において、これらのケモカインレセプターの発現が臨床的悪性度と相関しているかどうか、治療方針を決定するうえで悪性度のマーカーとなり得るか否かを検討した。

その結果、①一般に悪性度が高い MFH においては、CXCR4 の発現率が良性である DF と中間悪性度を示す DFSP に比べて有意に上昇していた。CCR6, CCR7 の発現率は MFH において DF に比べて有意に上昇していたが、DFSP に比べて有意差はみられなかった。②DFSP においては CXCR4 と CCR7 の発現率が DF に比べて有意に上昇していたが、CCR6 の発現率には有意差はみられなかった。③DFSP の再発例群においては非再発例群に比べて CXCR4 の発現率が有意に上昇していたが、CCR6, CCR7 の発現率には差がみられなかった。④DFSP における CD34 の発現は再発例群と非再発例群間において発現細胞率に有意差はみられなかった。⑤各抗体によ

る染色強度については疾患群間において明らかな差はみられなかった。

これらの結果より、CXCR4,CCR6,CCR7はMFHにおいてDFに比べて高い発現がみられ悪性度を指標する可能性があると考えられた。さらにCXCR4はDFSPの再発例群において非再発例群よりも高い発現を示すことが明らかとなった。即ち、本論文はDFSPにおいて一般に用いられる診断マーカーであるCD34に加えて、本研究で検討したCXCR4が腫瘍の局所的悪性度を予測する免疫染色マーカーの一つとなり得ることを示唆したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第419号		
学位授与の日	平成22年3月23日		
氏名	山岡博之		
学位論文の題目	Truncal Pruritus of Unknown Origin May Be a Symptom of Diabetic Polyneuropathy (原因不明の体幹部痒痒感は糖尿病性多発神経障害の症状かもしれない)		
論文審査委員	主査	教授 古川 福実	
	副査	教授 三家 登喜夫	教授 南 條 輝志男

## 論文内容の要旨

### 緒言

糖尿病患者において痒痒感が一般人口より多いという漠然とした概念があり、糖尿病学の教科書にも「頻度は不明であるが、多くの人が糖尿病患者において全身的痒痒感の頻度が高くなると信じている」と記述されている。しかし、糖尿病患者における痒痒感の実態について調べた報告はほとんどない。痒痒感は無髄小径神経線維によって伝達されると考えられており、無髄小径神経線維は糖尿病性多発神経障害 (DPN) で早期から障害されることから、痒痒感が DPN の徴候である可能性も考えられる。本研究は DPN との関連を調べる観点から、糖尿病患者における痒痒感の臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

まず、糖尿病患者および非糖尿病患者における痒痒感の有症状率および DPN の自・他覚症状との関連性を大規模アンケート調査で検討した [調査 I : 痒痒感の頻度と DPN 症状との関連]。次に、糖尿病患者において痒痒感と客観的・定量的神経機能との関連性を検討した [調査 II : 痒痒感に関連する神経機能異常]。

### 対象および方法

#### [調査 I] . 痒痒感の頻度と DPN 症状との関連

和歌山県医師会内科医会と共同して、和歌山県内 48 施設に痒痒感を含めた DPN 症状に関するアンケート用紙を配布し、糖尿病患者 2656 名 (DM 群) から回答を得た。同様の神経症状アンケートを実施した事業所健診受診者 499 名を非糖尿病患者 (非 DM 群) とした。調査項目は、年代、性別、HbA1c、罹病期間、アキレス腱反射 (ATR)、C128 音叉による外踝部振動覚 (VP)、神経症状 (足先・足底のしびれ・痛み、こむらがえり、痒痒感) である。DM 群と非 DM 群から年齢を対応させた 319 例を、層化抽出法を用いて抽出し、自覚症状の有症状率を比較した。DM 群では糖尿病に特徴的な痒痒感と DPN の自・他覚症状 (自覚症状、ATR)、HbA1c 値、糖尿病罹病期間との関連を検討した。

#### [調査 II]. 痒痒感に関連する神経機能異常

自覚症状の聴取、定量的神経機能検査を行った糖尿病患者 105 例 (平均年齢 56 歳 : 70 歳未満限定) を対象とした。定量的神経機能検査として尺骨神経の運動神経伝導速度および複合筋活動電位 (MCV、CMAP)、正中神経の感覚神経伝導速度および感覚神経活動電位 (SCV、SNAP)、深呼吸時の心電図 R-R 間隔変動係数 (CV-DB)、足趾定量的振動覚閾値 (QVT)、ヘッドアップティルト試験時の収縮期血圧低下幅 ( $\Delta$ BP) を測定し、これら神経機能と痒痒感との関連性を検討した。

統計学的検定にはカイ 2 乗検定、分散分析、多重ロジスティック回帰分析を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 結果

#### [調査 I]. 痒痒感の頻度と DPN 症状との関連

DM 群の足先のしびれ・痛み・異常感覚、痒痒感是非 DM 群と比較して有意に高頻度であり、痒痒感是非 DM 群の約 26% に見られた。痒痒感の中で DM 群と非 DM 群で有意差を認められたのは、原因の明らかでない体幹部の痒痒感 (Truncal Pruritus of Unknown Origin: TPUO) のみで、TPUO は約 11% に認められた。下肢や頭頸部の痒痒感は有意差を認めなかった。従って、以降の検討では TPUO について解析を行った。DM 群において TPUO (+) 群の神経症状、両側 ATR 低下の頻度は TPUO (-) 群より有意に高く、糖尿病罹病期間は有意に長期であった。多変量解析の結果、TPUO の独立した危険因子は足先・足底のしびれと ATR 消失であった。

## [調査II]. 癢痒感に関連する神経機能異常

TPUO (+) 群では $\Delta$ BP が有意に高値で、CV-DB 異常率と $\Delta$ BP 異常率は有意に高頻度であった。TPUO の有無を従属変数、年齢、性別、罹病期間、SCV 異常、CV-DB 異常、QVT 異常および $\Delta$ BP 異常を独立変数とした多重ロジスティック回帰分析の結果、TPUO に最も関連するのは $\Delta$ BP 異常であった。

## 考 察

### [調査I]. 癢痒感の頻度と DPN 症状との関連

糖尿病患者では非糖尿病患者と比べて癢痒感が有意に高頻度にみられ、特に TPUO が特徴的症状であることが明らかとなった。TPUO は DPN に特徴的な自覚症状、ATR 低下、外踝振動覚低下と関連しており DPN の徴候である可能性が高いと考えられた。また、一般臨床医に通院している糖尿病患者の少なくとも 11% にみられ、決して稀な症状ではないと考えられた。

### [調査II]. 癢痒感に関連する神経機能異常

TPUO は客観的・定量的な神経機能のなかでは、主に交感神経機能異常を反映する起立性低血圧と密接に関連していた。交感神経の節後線維は無髄小径神経線維であり、TPUO の成因を考えるうえで興味深い。

これらの成績より、TPUO は DPN の徴候であり、特に交感神経障害が TPUO 発症に関与している可能性が考えられた。その機序としては、①交感神経機能低下による発汗低下が皮膚乾燥を惹起し、皮膚のバリア機能の低下による皮膚癢痒閾値の低下、②DPN の表在性疼痛でみられるような、皮膚の無髄小径神経線維の異常発火 の 2 つが想定され、その解明のために皮膚生検による神経の形態学的検討を予定している。

臨床的な観点からは、TPUO の有無を聴取することが DPN の見落としを防止する意味で有用と考えられる。一般的に DPN 診断に用いられる両側性 ATR 低下および振動覚低下を有する症例の約半数は両足の感覚異常を認めないと報告されており、TPUO が DPN の徴候であると認識し、DPN 診断の契機とすることが重要である。

## 結 語

明らかな原因のない体幹部の癢痒感は、一般外来糖尿病患者の少なくとも 11% にみられ、非糖尿病患者の約 4 倍の高頻度であった。また、神経症状や交感神経機能異常（起立性低血圧）と密接に関連しており、糖尿病性多発神経障害による自覚症状である可能性が考えられた。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 22 年 3 月 11 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文について審査を行った。糖尿病患者において癢痒感が一般人口より多いという漠然とした概念があり、糖尿病学の教科書にも「頻度は不明であるが、多くの人が糖尿病患者において全身的癢痒感の頻度が高くなると信じている」と記述されている。しかし、糖尿病患者における癢痒感の実態について調べた報告はほとんどない。癢痒感は無髄小径神経線維によって伝達されると考えられており、無髄小径神経線維は糖尿病性多発神経障害（DPN）で早期から障害されることから、癢痒感と DPN の関連を調べることは糖尿病の病態解明に有用と考えられる。

本論文は DPN との関連を調べる観点から、多数例のアンケート調査と詳細な定量的神経機能検査により、糖尿病患者における癢痒感の臨床的意義を明らかにしたものである。その結果、糖尿病患者では非糖尿病患者と比べて癢痒感が有意に高頻度にみられ、特に明らかな原因のない体幹部の癢痒感（TPUO）が特徴的症状であること、TPUO は DPN に特徴的な自覚症状、アキレス腱反射低下、外踝振動覚低下と関連しており、DPN の徴候である可能性が考えられた。TPUO は一般臨床医に通院している糖尿病患者の少なくとも 11% にみられ、決して稀な症状ではないことも明らかになった。また、TPUO は客観的・定量的な神経機能のなかでは、主に交感神経機能異常を反映する起立性低血圧と密接な関連がみられた。交感神経の節後線維は無髄小径神経線維であり、TPUO の成因を考えるうえで興味深い。

以上、本論文は TPUO と DPN との関連性を初めて報告したものであり、TPUO が DPN 診断の契機となりうる可能性を提示したものとして、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第420号		
学位授与の日	平成22年3月23日		
氏名	王 穎		
学位論文の題目	Ghrelin inhibits insulin secretion through the AMPK-UCP2 Pathway in $\beta$ Cells (グレリンによるインスリン分泌抑制機構の解明-AMPK-UCP2経路の関与)		
論文審査委員	主査	教授 仙波 恵美子	
	副査	教授 三家 登喜夫	教授 南 條 輝志男

## 論文内容の要旨

### 【Introduction】

Ghrelin, the only circulating orexigenic hormone, was first identified in rat stomach as an endogenous ligand of growth-hormone secretagogue receptor (GHSR). It has been reported that ghrelin plays important roles on the pathogenesis of obesity and diabetes. One major point among these is that ghrelin suppressed insulin secretion in vitro and vivo in mammals. Ghrelin and GHSR are expressed in a variety of tissues, including the pancreatic islets. We found that ghrelin inhibited glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in mouse insulinoma cell line MIN6 cells via induction of IA-2 $\beta$  (Doi A. et al, PNAS, 2006). Recently the orexigenic effect of ghrelin on AgRP cells of the arcuate nucleus has been demonstrated to be dependent on the induction of uncoupling protein 2 (UCP2) by AMP-activated protein kinase (AMPK) activation. Furthermore, AMPK and UCP2 were suggested to contribute to the inhibition of insulin secretion in  $\beta$  cells. In addition, ablation of ghrelin gene in mice led to reduced UCP2 mRNA expression, whereas there is no report about how ghrelin affects AMPK activity in pancreatic  $\beta$  cells till now.

The purpose of this study is to identify the signal transduction pathway of ghrelin's inhibitory effects on insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells, with the special interest in AMPK activity and UCP2 expression.

### 【Materials and Methods】

Cell line

Mouse insulinoma MIN6 cells

Methods

AMPK activity and UCP2 expression levels: MIN6 cells were treated with different doses of ghrelin (0.01-10nM) for 1 hour, and then total protein and total RNA were extracted respectively. Phosphorylated and total AMPK were assessed by western blot analysis, while the mRNA expression levels of UCP2 and IA-2 $\beta$  were measured by real-time PCR. AMPK activity was determined by using the Cyclex AMPK kinase assay kit and was normalized to the protein concentration of the cell lysate.

UCP2 overexpression and RNA interference: Full length mouse UCP2 or IA-2 $\beta$  clones were subcloned into the plasmid pcDNA3.1 respectively. Constructed plasmids were transfected to MIN6 cells by using a FuGENE6 transfection reagent 24hours before glucose and ghrelin stimulation to study the effect of overexpression of UCP2 or IA-2 $\beta$  on insulin secretion. The transfection of pcDNA 3.1 vector alone was used as control. Small interfering RNA (siRNA) of a specific sequence of mouse UCP2 was transfected into MIN6 cells by using a RNAiFect transfection reagent to study the effect of downregulation of UCP2 on insulin secretion. Negative-control siRNA Alexa Fluor 488 were used as control.

Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS): MIN6 cells were incubated 1 hour in KRBH with indicated concentration (3.3, 5.5, 8.3, 11.1, or 22.2 mmol/liter) of glucose in the presence or absence of ghrelin or AMPK activator, 5-Aminoimidazole-4- carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside

(AICAR), the insulin contents of the supernatant quantified by an ELISA kit were normalized by the protein contents and were expressed as ng/mg protein.

Statistical analysis

Data are expressed as means  $\pm$  SE. Variance in different groups were analyzed by Student's t test or one-way ANOVA for unpaired comparisons. P value  $<0.05$  was accepted as significant..

### **【Results】**

#### 1. Ghrelin upregulates UCP2 in pancreatic $\beta$ cells

Administration of different doses of ghrelin (0, 0.01, 0.1, 1, or 10nmol/l) for 1 hour increased UCP2 mRNA expression in a dose dependent manner. However, desacyl-ghrelin 10nmol/l didn't show any effect on UCP2. Our data are consistent with the view that the acylation is essential for the bioactivity of ghrelin.

#### 2. Effect of UCP2 overexpression or downregulation on insulin secretion

Overexpression of UCP2 attenuated GSIS in MIN6 cells with little or no effect on basal insulin secretion, and administration of ghrelin did not show significant further decrease of GSIS. Downregulation of UCP2 by siRNA, which decreased endogenous UCP2 mRNA 71%, enhanced GSIS in MIN6 cells, and completely abolished ghrelin's inhibitory effect on GSIS.

#### 3. Ghrelin elevates AMPK phosphorylation and activate AMPK in MIN6 Cells

Administration of ghrelin with indicated doses for 1 hour stimulated AMPK phosphorylation above the dose of 1nmol/l ghrelin. Accompanying with this, AMPK activity was enhanced by ghrelin, too. AMPK activator, AICAR, was used as positive control.

#### 4. AICAR inhibited glucose-stimulated insulin secretion in MIN6 cells

The activating effect of AICAR can be detected by AMPK phosphorylation at Thr172. In order to study if the stimulating effect of ghrelin on AMPK is related with pancreatic beta cell insulin secretion, we used AICAR to activate AMPK and test the effect of AMPK on glucose-stimulated insulin secretion in MIN6 cells. AICAR 0.4mmol/liter suppressed the insulin secretion that was induced by 22.2mmol/liter glucose but left the insulin secretion in 3.3 mmol/l glucose intact, mimicking the effect of ghrelin.

#### 5. Effect of AICAR on UCP2, IA-2 $\beta$ and IA-2 expression in MIN6 cells

The dosage 0.4 mmol/liter of AICAR also increased UCP2 mRNA expression in MIN6 cells significantly in one hour like ghrelin, suggesting that UCP2 is located downstream of AMPK. But AMPK activation by AICAR didn't change IA-2 $\beta$  and IA-2 mRNA levels. Additionally, neither UCP2 overexpression nor did the depletion of UCP2 by siRNA transfection affected IA-2 $\beta$  mRNA levels in MIN6 cells, and vice the versa. So it seems that there is no correlation between UCP2 and IA-2 $\beta$ .

### **【Conclusion】**

1. ghrelin (acylated) activates AMPK and upregulates UCP2 mRNA expression in MIN6  $\beta$  cells.
2. Ghrelin's inhibitory effect on insulin secretion is partly mediated by AMPK-UCP2 pathway which is independent of IA-2 $\beta$  pathway.

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成22年3月11日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

グレリンは摂食亢進ホルモンであり、エネルギー代謝や肥満・糖尿病の病態に関与していると考えられている。グレリンは膵 $\beta$ 細胞のインスリン分泌を抑制する。1型糖尿病の自己抗原のひとつであるIA-2 $\beta$ がグレリンによるインスリン分泌抑制に関与していることが報告されている。一方最近グレリンの食欲増進効果がAMPキナーゼ(AMPK)–脱共役タンパク質(UCP2)経路を介することが報告され、またAMPKやUCP2ともインスリン分泌への影響があることも判明している。しかし膵 $\beta$ 細胞において、グレリン、AMPK、UCP2の関連やインスリン分泌に与える影響は明らかではない。

本論文は、グレリンのインスリン分泌抑制作用におけるAMPK-UCP2経路の関与を検討した。

マウスインスリンノーマ MIN6 細胞において、グレリン刺激により UCP2 mRNA 発現量は濃度依存的に上昇した。また、グレリン投与や UCP2 の過剰発現によりグルコース応答性インスリン分泌は抑制された。逆に、siRNA により、UCP2 発現を抑制すると、グレリンのインスリン分泌抑制効果がブロックされた。一方、グレリン刺激により AMPK リン酸化やキナーゼ活性が増強した。さらに、AMPK の活性化剤はグレリンと同じようにグルコース刺激によるインスリン分泌を抑制し、UCP2 の発現量も増加させた。以上の結果より、AMPK-UCP2 経路はグレリンにより活性化されることが明らかになった。よって、グレリンによるグルコース応答性インスリン分泌抑制の少なくとも一部は本経路によるものと考えられた。しかしながら、AMPK の活性化剤投与あるいは UCP2 過剰発現や siRNA により UCP2 の発現を変化させても、IA2B の発現量には影響を及ぼさなかった。逆に IA2B の発現量を変化させても、UCP2 の発現量には影響を及ぼさなかった。そこで AMPK-UCP2 経路は IA-2B とは独立していると考えられた。

以上、本論文はグレリンのインスリン分泌抑制効果に AMPK-UCP2 経路の関与を実証したものであり、糖尿病におけるインスリン分泌異常の機序解明の新たな手がかりとなる研究であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第421号		
学位授与の日	平成22年3月23日		
氏名	古川安志		
学位論文の題目	Polymorphisms in the <i>IDE-KIF11-HHEX</i> gene locus are Reproducibly associated with type 2 diabetes in a Japanese population (日本人においても <i>IDE-KIF11-HHEX</i> 遺伝子座の多型は2型糖尿病と関連する)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 三家登喜夫	教授 南條輝志男

## 論文内容の要旨

### 緒言

2型糖尿病の発症には過食や運動不足などの環境因子に加え遺伝因子が深く関係しており、その解明は新規治療薬や発症リスク評価を基にした効率的な予防法の開発に繋がることから精力的に研究が行われている。ヒトの全ゲノム配列が決定されゲノム情報が蓄積されるに伴い、ゲノム上には多数の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)が存在すること、それらが親から子へと伝わるときには近接する SNP はひとかたまりの状態でも遺伝すること、さらに、かたまりの中の代表的な幾つかの SNP(TagSNP)を調べることで同じかたまりの中に位置している他の SNP の遺伝情報を間接的に調べることが可能であることなどが明らかになってきている。このような背景の下、ゲノムワイドで多数の TagSNP をタイピングし患者・非糖尿病患者間でアリル頻度を比較、患者群においてより頻度の高いアリルを有する SNP を探索するゲノムワイド患者・対照相関解析(Genome wide association study: GWAS)が行われるようになり、フランス人を対象とした GWAS により *IDE*, *KIF11*, *HHEX* 遺伝子を含む領域および *SLC30A8* 遺伝子を含む領域に位置する SNP が2型糖尿病の発症と関連することが報告されている (Sladek R., et al. Nature 445:881,2007)。

今回、これら *IDE-KIF11-HHEX* 遺伝子座および *SLC30A8* 遺伝子座の SNP が、人種的に大きく異なる日本人の2型糖尿病の発症と関連するか否かについて検討を行った。

### 対象と方法

(対象)

和歌山県立医科大学倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントが得られた2型糖尿病患者405名[年齢 47.3±10.8歳、body mass index (BMI) 23.9±3.6、HbA1c 7.4±1.4%、平均±SD]、非糖尿病患者340名 (BMI 22.3±3.3、HbA1c 5.0±0.4%、平均±SD)。糖尿病の診断には1998年のWHOの診断基準を用い、GAD抗体陽性者あるいは糖尿病診断後3年以内にインスリン治療を開始された者は1型糖尿病の可能性があるため除外した。非糖尿病患者は50歳以上でHbA1c5.6%以下を満たす者を選んだ。

(SNPタイピング)

末梢血有核細胞からゲノムDNAを抽出した後、フランス人において2型糖尿病の発症との関連が報告された3つの多型 (*IDE-KIF11-HHEX* 遺伝子座の rs7923837 および rs1111875、*SLC30A8* 遺伝子座の rs13266634) のタイピングを TaqMan allelic discrimination 法を用いて行った。得られた結果は Hardy-Weinberg 平衡と矛盾していないことを確認した後、患者・対照相関解析により日本人2型糖尿病の発症との関連を検討するとともに、糖尿病の診断年齢、BMIなどの臨床像との関連を検討した。ジェノタイプ頻度とアリル頻度の比較には $\chi^2$ テストを、糖尿病診断年齢の比較には one-way ANOVA を、BMIの比較には年齢と性差を補正するために多変量解析を用いた。解析には StatView version 5.01 を用い、統計学的有意水準は  $p < 0.05$  とした。

### 結果

*IDE-KIF11-HHEX* 遺伝子座の rs7923837(A/G多型)においてGアリル頻度は、フランス人の報告と同様に非糖尿病群(15.9%)に比し糖尿病群(23.8%)において有意に高頻度であり [odds ratios (OR) 1.66、95% confidence interval (CI) 1.28-2.15、 $P=0.00014$ ]、ジェノタイプで見た場合でも、A/A型

に比してA/G型、G/G型を有する人の糖尿病に関するORは、各々、1.57 (95%CI 1.15-2.16、P=0.005)、3.16 (95%CI 1.40-7.16、P=0.0038)であった。rs1111875(A/G 多型)のGアリル頻度もフランス人の報告と同様に非糖尿病群 (25.3%) に比し糖尿病群 (32.5%) において高頻度であり(OR 1.42、95%CI 1.13-1.78、P=0.0024)、ジェノタイプで見た場合でも、A/A型に比してA/G型、G/G型を有する人の糖尿病に関するORは、各々、1.31 (95%CI 0.97-1.77、P=0.081)、2.40 (95%CI 1.34-4.32、P=0.0028)であった (TABLE1)。以上より、日本人においても *IDE-KIF11-HHEX* 遺伝子座の二つの遺伝子多型はフランス人と同様に2型糖尿病の発症に関連すると考えられた。なお、フランス人2型糖尿病患者では両多型のGアリル頻度は約65%と報告されていることから、日本人でのリスクアリル頻度はフランス人よりも低いと考えられた。

さらに、臨床像との関連では、rs7923837のGアリルと過去の最高BMI(P=0.028)、rs1111875のGアリルと糖尿病診断年齢(P=0.027)との間に負の関係が認められた (TABLE2)。

一方、*SLC30A8*遺伝子座のrs13266634(C/T 多型)に関しては、フランス人における検討でリスクアリルとして報告されているCアリルの頻度は、同様に非糖尿病群 (59.3%) に比し糖尿病群(61.6%)において高頻度ではあったが統計的に有意ではなく(OR 1.10、95%CI 0.90-1.36、P=0.3573) (TABLE1)、同多型と臨床像との間にも有意な関連は認められなかった (TABLE2)。

## 結論

フランス人と人種的に大きく異なる日本人においても、少なくとも *IDE-KIF11-HHEX* 遺伝子座内に位置する二つのSNPは同様に2型糖尿病の発症に関係しており、ヨーロッパ人とアジア人が分かれる以前の早い段階に生じた遺伝子変異が我々の体質に関係しているものと考えられた。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年3月11日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

2型糖尿病の発症には、過食や運動不足といった環境因子とともに遺伝因子が深く関係する。本論文は、フランス人を対象としたゲノムワイド患者・対照相関解析(Genome wide association study:GWAS)において2型糖尿病との関連が報告された二つの遺伝子領域 (*IDE-KIF11-HHEX* 遺伝子領域および *SLC30A8* 遺伝子領域)の一塩基多型(SNP)と、日本人2型糖尿病の病態との関連について検討を行ったものである。その結果、*IDE-KIF11-HHEX* 遺伝子座のSNPにおいて、リスクアリルを一つ有する者、二つ有する者の全く有さない者に対するオッズ比は、各々、1.57、3.16倍と段階的に高くなっており、同遺伝子座のSNPは人種の異なる日本人においても同様に2型糖尿病の発症リスクに関連していることが示された。しかしながら、そのリスクアリル頻度はフランス人では65%であるのに比べ日本人では24%と低いことも同時に明らかとなった。さらに2型糖尿病の臨床像との関連における検討では、リスクアリルを有する患者では過去の最高body mass index(BMI)が有意に低いことから肥満が軽度な状態から糖尿病を発症してしまう危険が高いことや糖尿病診断年齢が有意に若いことなどが明らかとなった。

以上、本論文は *IDE-KIF11-HHEX* 遺伝子座に位置するSNPが人種を超えて我々日本人においても同様に2型糖尿病の発症に関係していることを初めて示したもので、日本人の2型糖尿病発症に関係する遺伝因子を考える上で重要な研究であることから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第838号		
学位授与の日	平成21年4月14日		
氏名	林 正 樹		
学位論文の題目	Pathogenic role of tonsillar lymphocytes in associated with HSP60/65 in Pustulosis Palmaris et Plantaris (掌蹠膿疱症における熱ショック蛋白 60/65 に関連する扁桃リンパ球の病態学的役割について)		
論文審査委員	主 査	教授 古川 福 実	
	副 査	教授 岸 岡 史 郎	教授 山 中 昇

## 論 文 内 容 の 要 旨

(背 景) 扁桃病巣性疾患は、「扁桃自体はほとんど無症状であるにもかかわらず、遠隔臓器である腎臓、骨関節、皮膚などに器質的あるいは機能的障害をおこす状態」と定義される。掌蹠膿疱症 (Pustulosis palmaris et plantaris: PPP) は、難治性の無菌性膿疱が手掌・足蹠に好発する代表的な扁桃病巣性疾患であり、扁桃を中心とする自己免疫反応の関与が考えられている。熱ショック蛋白 (Heat shock protein: HSP) は、原核細胞から哺乳類細胞に至るまでアミノ酸配列の相同性が高く保存されているにもかかわらず、免疫原性が強いという相反する特徴を持つことから、自己免疫疾患の原因抗原として注目されている。PPP と HSP の関連については、PPP 患者の末梢血中で細菌性 HSP60 (GroEL) に対する IgG 抗体が上昇していることが報告されている。しかし、これら抗 HSP 抗体の産生と扁桃リンパ球、HSP60 ファミリーとの関連についてはいまだ報告がない。本研究では、PPP 患者皮膚を移植した SCID マウス (ヒト/SCID キメラ・マウス) を作成するとともに、PPP 由来の扁桃リンパ球と HSP60 の関連について検討した。

(対 象) 和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科において口蓋扁桃摘出術を行った PPP 患者 11 名より採取した口蓋扁桃、末梢血リンパ球、足蹠皮膚 (肉眼的正常部分) を用いた。コントロールとしては、睡眠時無呼吸症候群 (Obstructive Sleep Apnea Syndrome: OSAS) 患者 9 名より採取した末梢血リンパ球と口蓋扁桃を用いた。すべての検体は、和歌山県立医科大学倫理委員会の指針に基づき、患者あるいは患者家族に対して文書による十分な説明を行い、同意を得た上で採取した。

(方 法) 実験 1. 足蹠皮膚を SCID マウス (CB-17 系, 6~8 週齢, 雌: 日本クレア社) の背部に移植するとともに、PPP の口蓋扁桃あるいは末梢血から Ficoll 比重遠心法で分離したリンパ球  $1\sim 3\times 10^7$  個をマウス腹腔内に移入した。皮膚移植—リンパ球移入より 4 週間後に、移植皮膚片および血液を採取し、移植足蹠皮膚へのリンパ球浸潤を免疫組織染色にて検討した。また、血清中のヒト IL-6、ヒト IFN- $\gamma$ 、ヒト TNF- $\alpha$ 、およびヒト抗 HSP60-IgG 抗体価を、ELISA 法にて測定した。  
実験 2. PPP および OSAS の口蓋扁桃および末梢血から分離したリンパ球  $1\sim 3\times 10^7$  個を、SCID マウスの腹腔内に移入するとともに、recombinant HSP60 をマウス背部に皮下注射した。移植 4 週間後に SCID マウス血清中のヒト抗 HSP60-IgG 抗体価を、ELISA 法にて測定した。

### (結 果)

実験 1. PPP の扁桃リンパ球と皮膚を移植した SCID マウス群では、移植皮膚の真皮乳頭部に CD4 陽性 T 細胞の浸潤を強く認め、PPP の末梢血リンパ球と皮膚を移植した群に比較して、有意に多くの浸潤リンパ球が確認された。浸潤した T リンパ球数と、SCID マウス末梢血中のヒト抗 HSP60-IgG 抗体価の間に有意な正の相関を認めた。また、ヒト抗 HSP60-IgG 抗体価と IL-6、IFN- $\gamma$  の間に有意な正の相関を認めた。

実験 2. PPP の扁桃リンパ球を移植し、recombinant HSP60 刺激した SCID マウス群において、PPP の扁桃リンパ球を移植し刺激を行わなかったコントロール群、PPP の末梢血リンパ球あるいは OSAS の扁桃リンパ球を移植し recombinant HSP60 刺激したコントロール群と比較し、SCID マウス血清中でヒト抗 HSP60-IgG 抗体価が有意に上昇していた。

(考 察) 掌蹠膿疱症の発症機序については、ヒト/SCID キメラ・マウスの移植実験で PPP 患者の扁桃リンパ球が標的臓器である手掌・足蹠皮膚に直接反応し浸潤することが無菌性膿疱発症の初期段階と考えられる。さらに、この扁桃リンパ球の主な感作免疫原として、口腔内細菌からヒト皮膚細胞に広く存在する抗原の一つである HSP60 に注目した。リンパ球の移植皮膚への浸潤を認めた症例では、SCID マウス血清中のヒト抗 HSP60-IgG 抗体が高値であること、また HSP60 刺激により PPP 由来の扁桃リンパ球を移入した SCID マウス血清中のヒト抗 HSP60-IgG 抗体価が上昇したことから、扁桃リンパ球、特に Tリンパ球が、扁桃陰窩内に存在する細菌由来の HSP60 に感作された後、HSP60 の発現部位である掌蹠あるいは足蹠の皮膚に反応し、IL-6 などのサイトカインを介し B 細胞と相互作用し、抗 HSP60 特異的免疫応答を誘発することが掌蹠膿疱症の発症機序の一つと考えられた。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年3月20日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め論文の審査を行った。

掌蹠膿疱症 (Pustulosis Palmaris et Plantaris: PPP) は、手掌、足蹠に無菌性膿疱が出現する難治性の慢性皮膚疾患である。PPPの発症機序は未だ解明されていないが、扁桃摘出術が有効な治療法となることが知られている。本論文は、PPPの発症に関係があるといわれる熱ショック蛋白60 (HSP60) に注目し、PPP患者の扁桃リンパ球が、患者の足蹠皮膚に発現しているHSP60に対し強く免疫応答していることを、SCIDマウスを用いた動物実験で明らかにしたものである。

本研究では、まず、PPP患者から採取した扁桃リンパ球または末梢血リンパ球と、同一患者の足蹠皮膚をSCIDマウスに移植し、4週間後SCIDマウスから移植皮膚を採取し、抗ヒトCD4マウスモノクローナル抗体で免疫染色した。さらにSCIDマウス血清中のヒト抗HSP65-IgG抗体、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ をELISA法で測定した。次にPPPまたは睡眠時無呼吸症候群 (対照群) の扁桃リンパ球をSCIDマウスに移植するとともに、リコンビナントHSP60をマウス皮下に投与し、4週間後、マウス血清中のヒト抗HSP65-IgG抗体を測定した。

その結果、PPP患者の扁桃リンパ球と皮膚を移植したSCIDマウスグループでは、PPP患者の末梢血リンパ球と皮膚を移植したグループに比較して、移植皮膚上皮に有意に多くのTリンパ球の浸潤を認めた。さらにSCIDマウス血清中には、ヒト抗HSP65-IgG抗体が検出され、同抗体価は移植皮膚へ浸潤したTリンパ球数やIL-6、IFN- $\gamma$ と正の相関関係を示した。扁桃リンパ球を移植し、リコンビナントHSP60刺激したSCIDマウスの血清中のヒト抗HSP65-IgG抗体を検討した結果、末梢血リンパ球を移植したグループよりも有意に高値であった。

以上の結果から、本論文はPPP患者の扁桃リンパ球が、PPP患者の手足の皮膚に存在するHSP60に対し強く免疫応答していることを初めて明らかにしたものであり、PPPの発症機序を解明するための重要な知見と考えられ、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第839号		
学位授与の日	平成21年5月12日		
氏名	佐治史恵		
学位論文の題目	Regulation of fibroblast growth factor 23 production in bone in uremic rats (二次性副甲状腺機能亢進症モデルラットの骨における FGF23 産生の調節)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 井原義人	教授 重松 隆

## 論文内容の要旨

【緒言】 fibroblast growth factor-23 (FGF23) は PTH とは独立したリン調節因子として発見された因子であり、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の産生を抑制し、尿中リン排泄促進による低リン血症を引き起こす。このため、低リン血症性くる病、骨軟化症、特に腫瘍性骨軟化症の原因因子とされている。腎不全患者においても血中の FGF23 の上昇がいわれており、FGF23 の本疾患における関与が注目されている。FGF23 産生の調節因子としてはビタミン D によるネガティブフィードバック作用や、腎不全における高リン食による上昇などが確認されている。副甲状腺機能亢進症患者において副甲状腺摘出術後の血中 FGF23 の低下が確認されているが、どの因子が腎不全患者における血中 FGF23 の上昇を規定しているかはいまだ不明な点が多い。また腎不全においてどの臓器における発現が血中 FGF23 の上昇に深く関与しているかはいまだ解明されていない。よって本研究では二次性副甲状腺亢進症モデルラットにおける各臓器での FGF23 発現の変化を比較し、腎不全病態における血中 FGF23 の上昇に寄与する因子を検討する。

【方法】腎不全に伴う二次性副甲状腺機能亢進症モデルラット（7週齢 SD ラットを 5/6 腎摘後高リン飼料にて8週間飼育）における血中因子の経時的変化及び、その後の副甲状腺摘出術による変化を確認した。また各ラット群のさまざまな臓器における FGF23 発現を比較、上昇の原因となる臓器の特定を行った。

【結果】二次性副甲状腺機能亢進症モデルラットにおいて骨における FGF23 発現増加に伴った血中 FGF23 濃度の上昇が確認された。また同様に血中リン濃度及び PTH 濃度の上昇も確認された。血中  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  濃度においては高リン負荷6週目までは同様の上昇が見られたが8週目において腎機能低下に伴う低下がみられた。さらに副甲状腺摘出後は上昇した血中 FGF23 濃度の著しい低下が確認され、これは骨における発現の低下に付随したものであった。また副甲状腺摘出後の血中 PTH 濃度の著しい低下及びそれにともなった血中  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  濃度の低下が確認されたのに対し、血中リン濃度の有意な変化は確認されなかった。

【考察】以上の結果より、腎不全に伴う二次性副甲状腺機能亢進症モデルラットにおける血中 FGF23 濃度の上昇は骨における FGF23 の発現の上昇が寄与していることが明らかとなった。さらにこの副甲状腺機能亢進症モデルラットの骨における FGF23 の発現は PTH により制御されているものと考えられた。また PTH による制御には  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  を介した  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  依存経路及び、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  を介さない  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  非依存経路の存在が考えられた。これらの経路は腎機能障害の程度により決定されるものと考えられる。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成21年4月20日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

Fibroblast Growth Factor-23 ( FGF23 ) は PTH とは独立したリン調節因子として発見された因子であり、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の産生を抑制し、尿中リン排泄促進による低リン血症を引き起こす。腎不全患者においても血中の FGF23 の上昇がいわれており、FGF23 の本疾患における関与が注目されている。しかしながら、どの因子が腎不全患者における血中 FGF23 の上昇を規定しているかはいまだ不明な点が多い。また腎不全においてどの臓器における発現が血中 FGF23 の上昇に深く関与して

いるかはいまだ解明されていない。

本研究は二次性副甲状腺亢進症モデルラットにおける各臓器でのFGF23発現の変化を比較し、腎不全病態における血中FGF23の上昇に寄与する因子を検討したものである。

5/6腎摘の後、高リン飼料で8週間飼育することにより、二次性副甲状腺機能亢進症モデルラットを作成し、Ca, リン代謝に関連する血中因子の経時的変化を確認した。さらにその後の副甲状腺摘出術による血中因子の変化を確認した。また各ラット群のさまざまな臓器におけるFGF23の発現を比較することにより、変化の原因となる臓器の特定を行った。

その結果、

- 4) 二次性副甲状腺機能亢進症モデルラットにおいて血中リン及びPTH濃度の上昇とともに血中FGF23の上昇が確認された。
- 5) 血中1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度は高リン負荷6週目まではFGF23と同様の上昇が見られたが8週目において腎機能低下に伴って低下した。
- 6) 副甲状腺摘出後は上昇した血中FGF23濃度の著しい低下が血中PTH及び1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度の低下とともに確認された。
- 7) 副甲状腺摘出後の血中リン濃度の有意な変化は確認されなかった。
- 8) 骨における発現の変化に伴って、血中FGF23濃度が変化する。

という知見が得られた。

以上より本論文は、腎不全に伴う二次性副甲状腺機能亢進症モデルラットにおける血中 FGF23 濃度の上昇は骨における FGF23 の発現の上昇が寄与していること、またその調節機構として PTH および 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> が主として関与していることを示唆したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第840号		
学位授与の日	平成21年5月12日		
氏名	池内佳子		
学位論文の題目	Factors affecting bone mineral density of young women and predictive factors of low bone mineral density (若年女性における骨塩密度に影響を与える諸因子及び低骨塩密度予測因子に関する検討)		
論文審査委員	主査	教授 竹下達也	
	副査	教授 三家登喜夫	教授 吉田宗人

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

高齢化社会を迎えたわが国では骨粗鬆症の有病率が増加しており、高齢者の骨粗鬆症による健康障害が深刻な社会問題となることが予想される。日本人女性は18歳頃に最大骨量(peak bone mass)に達し、以後40歳頃まで最大骨量が持続するとされている。このことから将来の骨粗鬆症を予防するためには若い世代から最大骨量を高めることが重要な対策の一つとなる。最大骨量を高めるには栄養、運動などの生活習慣が重要な因子であり、また女性においてはエストロゲンが骨塩密度(bone mineral density: BMD)の維持に深く関わっていることも指摘されている。我々はすでに若年女性のBMDに与える諸因子、特に体格因子、生活因子、卵巣機能因子などを検討し、体重や初経からの期間がBMDと有意に相関することを報告してきた(和歌山医学第58巻第2号)。

本研究では、これらの因子に加え、性ホルモン、下垂体ホルモン、さらに骨代謝マーカーを測定し、BMDとの相関性を検討するとともに、これらの因子を用い低BMD群を選別する可能性について検討した。

本研究は、将来の骨粗鬆症予防を目指した健康づくりへの指標を確立するとともに、その成果を若年女性の健康教育に活かす目的で行った。

### 【研究方法】

対象: W大学在籍の19~24歳の看護学生105人を対象とした。対象者には調査の目的・方法などを説明した後、文書にて同意を得た。なお、本研究は本学の倫理委員会の承認を得ている。

研究方法:

1. BMD、体重、初経からの期間および性ホルモン値(estradiol: E<sub>2</sub>)、下垂体ホルモン値(FSH、Prolactin)、骨代謝マーカー(bone-specific alkaline phosphatase: BAP、serum N-terminal telopeptide of type I collagen: NTx)を測定した。なお、採血は学生の利便性、およびNTxの日内変動を勘案して午前の授業の終了後(正午頃、食事前)に行った。BMDは、第2から第4腰椎をdual-energy X-ray absorptiometry(DXA)を用いて測定し、その平均値(g/cm<sup>2</sup>)で示した。DXA測定装置はGE社DXP-NTを使用した。

2. 低BMD群を選別するため、体重とNTx値の平均値を境に2つにわけ、合計4群に分類し検討した。また、各群における低BMD群女性の数を比較した。なお、低BMDの基準は対象女性の平均値-1SDとした。

3. 分析方法: BMDまたはNTx他の各因子との相関は単変量解析および多変量解析を用いて行った。

4群の比較は、one-way factorial ANOVA解析とmultiple comparison testを用いた。また、D群とABC群との比較はFisher's exact methodを用いた。p<0.05を統計学的有意差ありとした。統計ソフトは、Statview ver.5.0を使用した。

### 【結果】

1. 対象者の属性とBMDの測定値について

体重の平均値は51.6 kg(36.1~93.9 kg)、BMDの平均値±SDは、1.10±0.117 g/cm<sup>2</sup>で、最高値は1.41 g/cm<sup>2</sup>、最低値は0.828g/cm<sup>2</sup>であった。

2. BMDと各要因の関連性について

BMDと諸因子(体重、FSH、Prolactin、E<sub>2</sub>、NTx、BAP)との相関を単変量解析で検討すると、

体重 ( $p=0.0034$ )、NTx ( $p=0.0044$ ) で有意な相関があった。さらに、多変量解析でみると、体重は BMD に対し有意に正の相関 ( $p=0.0018$ ) を、NTx ( $p=0.0061$ ) と BAP ( $p=0.021$ ) は有意に負の相関を示した。

### 3. NTx と他因子との関連性について

単変量解析では Prolactin のみが NTx と負の相関 ( $p=0.039$ ) を示した。しかし、多変量解析で NTx との相関を示す因子はなかった。

### 4. リスク群 (低 BMD 群) の検討

対象者の体重の平均値が 51kg、NTx が 10nmolBCE/L であったので、次のような 4 群を作製した。

A 群：体重が 51kg 以上で NTx が 10nmolBCE/L 以下

B 群：体重が 51kg 以上、NTx が 10nmolBCE/L 以上

C 群：体重が 51kg 以下、NTx が 10nmolBCE/L 以下

D 群：体重が 51kg 以下、NTx が 10nmolBCE/L 以上

4 群を比較してみると D 群の BMD が有意に低値であった ( $p=0.0013$ )。また、低 BMD 者の占有率は、A 群で 4.5%、B 群で 4%、C 群で 14%、D 群で 43%であった。D 群と A・B・C 群との比較検定をした結果、D 群における低 BMD 者の比率が有意に高かった ( $p=0.004$ )。低 BMD 者の 87.5% は、C 群及び D 群に含まれていた。

#### 【考 察】

健全な若年女性の平均的な集団と考えられる看護学生を対象に、BMD に影響を与える諸因子を検討した結果、BMD と相関するのは体重および骨代謝マーカートの NTx および BAP であった。この成績より若年女性での BMD に骨代謝マーカートが有意に相関することがはじめて認められた。また、従来から BMD との相関性が報告されている  $E_2$  および Prolactin との相関性は見出せなかったが、これは高い異常値を示さない健全女性ではこれらの影響は少ないものと推察された。

最後に BMD と相関性の高い体重および NTx を取り上げて 4 群を作製し、BMD が有意に低値である群を検討したところ、体重が 51kg 以下で NTx が 10nmolBCE/L 以上の群において有意 ( $p=0.0013$ ) に低値を示した。また、将来骨折の危険度が 2~3 倍高くなると考えられている、平均値より 1SD 減じた低 BMD 群女性の比率がこの群では他群に比べ有意に高かった ( $p=0.004$ ) ことから、この群に含まれる若年女性は将来骨粗鬆症になる可能性が高く、骨粗鬆症予防の健康教育が必要と考えられた。

#### 【結 論】

若年女性において体重と骨代謝マーカートが BMD に有意に影響する因子であった。体重と NTx の 2 因子を指標にして低 BMD 者が抽出できれば、適正体重を維持するための生活習慣の確立やリスク因子の回避行動など骨粗鬆症予防のための健康教育に活かすことができる。また、測定手段が限定され、方法も多様であるという欠点を有する DXA 法などによる BMD 測定を行わなくても、測定が容易で単純であるという長所を有する体重と NTx を指標にしてのリスク群 (低 BMD 群) の抽出は可能であることが本研究から示唆された。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 21 年 4 月 23 日、論文審査担当者は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。女性の骨塩密度 (BMD) のピークは 20 歳代に認められる。高齢女性における骨粗鬆症を予防するには、このピークにおける BMD をできるだけ高値に保つことが重要と考えられている。しかし、一般的に健康と考えられている若年者における BMD に影響を与える因子については明確ではない。

本論文では 105 人の看護学生を対象に BMD に影響を与える因子につき検討され、さらにこれらの成績をもとに low BMD 群を選別するための基準について検討したものである。なお low BMD 群とは mean-1SD とした。今回因子として取り上げられたのは体重 (BW)、女性ホルモン (estradiol:  $E_2$ )、下垂体ホルモン (Prolactin, FSH)、そして骨代謝マーカートの bone-specific alkaline phosphatase: BAP および serum N-terminal telopeptide of type I collagen: NTx である。また、low BMD 群を選別するために BW の平均値、および NTx の平均値を求め、それをもとに 4 群を作製し、その各々の群における BMD および low BMD を示す学生数を比較した。

その結果、BMD と各種因子との相関性を単変量解析で検討すると、BW とは正の相関 ( $p=0.0034$ )、NTx とは負の相関 ( $p=0.0044$ ) が認められた。さらに BMD と相関する独立変数を重回帰分析にて検討すると、BW ( $p=0.0018$ )、NTx ( $p=0.0061$ )、そして BAP ( $p=0.021$ ) が抽出された。そこで、BMD

に相関する NTx を取り上げ相関する因子を検討したところ単回帰分析では Prolactin のみが負の相関 ( $p=0.039$ ) が認められたが、多変量解析では相関する因子は認められなかった。Low BMD 群の検討では、one-way factorial ANOVA 解析および multiple comparison test で、D 群 ( $BW < 51\text{kg}$ ,  $NTx \geq 10\text{ nmolBCE/L}$ ) の BMD が他の群と比較し有意に低値であった。さらに、low BMD 女性の占有率の検討において D 群では 43% と、他の群と比較し有意 ( $p=0.004$ ) に高かった。さらに C 群 ( $BW < 51\text{kg}$ ,  $NTx < 10\text{ nmolBCE/L}$ ) を加えると、low BMD 女性の 87.5% がこの中に含まれていた。

本論文では健康と考えられている若年女性において BMD に関連する因子として、BW 以外に NTx や BAP などの骨代謝マーカーが関与していること、また、BW が 51kg 未満、NTx が 10nmolBCE/L 以上の女性は low BMD である可能性が高いことを明らかとした。

この結果は健康と思われている女性の中にも low BMD を示す女性がいること、この時期においても骨代謝マーカーが BMD に影響を与えていること、さらに比較的容易に測定できる BW と NTx という指標を用いることで low BMD 女性をスクリーニングすることができるなど有意義な知見が得られており学位論文として価値あるものと認められた。

学位記番号	博(医)乙第841号		
学位授与の日	平成21年10月13日		
氏名	岩本卓也		
学位論文の題目	Effectiveness of hepatic arterial embolization on radiofrequency ablation volume in a swine model: relationship to portal venous flow and liver parenchymal pressure (生体豚におけるラジオ波焼灼体積の肝動脈塞栓術の効果について:門脈血流および肝実質圧との関係も含めて)		
論文審査委員	主査	教授 山上裕機	
	副査	教授 覚道健一	教授 佐藤守男

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

ラジオ波焼灼術 (RFA) は小肝細胞癌に適用されるようになったが、肝動脈塞栓術 (TAE) 併用の意義についての報告はない。TAE時にゼラチンスポンゼルだけでなく、リピオドールを使用することによりどの程度の焼灼範囲の増大が得られ、門脈圧、肝実質圧にどのような関連があるかについて基礎的に検討した。

### 【方法】

基礎的検討は、8頭の生体雌豚を用い次の4群に区分して行った。RFA単独群とゼラチンスポンジのみでTAEを行いRFAを併用する群(TAE併用群)、リピオドールとゼラチンスポンジで肝動脈のTAEを行いRFAを行う群(リピオドールTAE併用群)、門脈塞栓を併用しリピオドールとゼラチンスポンジで肝動脈のTAEを行いRFAを行う群(リピオドールTAEと門脈塞栓併用群)とした。各豚には5ヶ所ずつ2cmのLeVeen針を用いてRFAを行った。

### 【結果】

その結果、リピオドールTAEと門脈塞栓併用群が最大焼灼体積 (18410.1mm<sup>3</sup>±2788.3) を示した。RFA単独群、TAE併用群およびリピオドールTAE併用焼灼群の中で、リピオドールTAE併用群の焼灼体積 (14835.5 mm<sup>3</sup>±2743.2) は、RFA単独群 (8002.6mm<sup>3</sup>±2788.3) とTAE併用群の焼灼体積 (10398.5 mm<sup>3</sup>±2965.8) より大きく、有意差がみられた (p<.05/3)。即ちリピオドールTAE併用焼灼群の焼灼体積はRFA単独群とTAE併用焼灼群の焼灼体積に比べ、それぞれ約1.85倍、1.43倍の焼灼体積が得られた。また門脈圧の検討では、リピオドールTAEと門脈塞栓を併用した群とリピオドールTAE併用群において、門脈圧はTAE前に比べTAE後で有意な上昇がみられた (p<.01)。しかしTAE併用群とRFA単独群では上昇がみられなかった。このことからリピオドールTAEを行うことにより、門脈圧は有意に上昇し、焼灼体積は有意に増大した。組織学的検討でも、リピオドールTAEと門脈塞栓併用群では類洞にリピドールの集積が認められた。リピオドールをTAE時に用いることにより、門脈血流の遅延の生じることが組織学的に示された。RFA中には肝実質圧の著明な上昇が各群でみられたが、有意差はみられなかった。肝実質圧の上昇は焼灼範囲とは無関係であった。

### 【考察】

以上の結果により、ラジオ波焼灼術を施行する前にリピオドールを用いて肝動脈を塞栓すると門脈血流を遅延させ、焼灼体積を増大させることが基礎的検討により示された。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年9月18日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

ラジオ波焼灼術 (RFA) は小肝細胞癌に適用されるようになったが、肝動脈塞栓術 (TAE) 併用の意義についての報告はない。本研究ではTAE時にゼラチンスポンゼルだけでなく、リピオドールを使用により焼灼範囲の増大がどの程度得られ、また門脈圧、肝実質圧に関連があるかについて基礎的に検討したものである。

基礎的検討は、8頭の生体雌豚を用い次の4群に区分して行った。RFA単独群とゼラチンスポンジ

のみでTAEを行いRFAを併用する群(TAE併用群)、リピオドールとゼラチンスポンジで肝動脈のTAEを行いRFAを行う群(リピオドールTAE併用群)、門脈塞栓を併用しリピオドールとゼラチンスポンジで肝動脈のTAEを行いRFAを行う群(リピオドールTAEと門脈塞栓併用群)とした。各豚には5ヶ所ずつ2cmのLeVeen針を用いてRFAを行った。

その結果、

- 1、リピオドール TAE と門脈塞栓併用群が最大焼灼体積を示した。RFA 単独群、TAE 併用群およびリピオドール TAE 併用群の中では、リピオドール TAE 併用群の焼灼体積は、RFA 単独群と TAE 併用群の焼灼体積より大きく有意差がみられた ( $p<.05/3$ )。
- 2、門脈圧の検討では、リピオドール TAE と門脈塞栓を併用した群とリピオドール TAE 併用群において、門脈圧は TAE 前に比べ TAE 後で有意な上昇がみられた ( $p<.01$ )。しかし TAE 併用群と RFA 単独群では上昇がみられなかった。
- 3、組織学的検討でも、リピオドール TAE と門脈塞栓併用群では類洞にリピドールの集積が認められた。リピオドールを TAE 時に用いることにより、門脈血流の遅延の生じることが組織学的に示された。
- 4、RFA 中には肝実質圧の著明な上昇が各群でみられたが、有意差はみられなかった。肝実質圧の上昇は焼灼範囲とは無関係であった。

以上の結果により、ラジオ波焼灼術を施行する前にリピオドールを用いて肝動脈を塞栓すると門脈血流を遅延させ、焼灼体積を増大させるうことが基礎的検討により示され、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第842号		
学位授与の日	平成21年10月13日		
氏名	熊本和正		
学位論文の題目	Identification of radicals formed in the reaction mixture of bovine kidney microsomes with NADPH (牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液中に生成するフリーラジカルの構造決定および生成機構)		
論文審査委員	主査	教授 井原 義人	
	副査	教授 岩橋 秀夫	教授 岸岡 史郎

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

横紋筋融解症やクラッシュ症候群においては、骨格筋細胞より漏出したミオグロビン(Mb)が腎毒性物質となり、腎尿細管を傷害すると言われている。このMbによる腎障害においてフリーラジカルの関与がよく言われている。しかし、フリーラジカルの検出および同定に関してはほとんど行われていない。そこで本研究では、Mbによる腎障害のメカニズムを明らかにするために、牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液中に生成するラジカルを検出・同定し、その生成に対するMbの影響を検討した。

### 【方法】

#### 1. ラジカルの検出・同定

牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液中に生成するラジカルをスピントラッピング法により比較的安定なラジカル付加体にし、EPR (電子常磁性共鳴)、HPLC-EPR (高速液体クロマトグラフィー/電子常磁性共鳴) および HPLC-EPR-MS (高速液体クロマトグラフィー/電子常磁性共鳴/質量分析) 法により検出・同定を行った。コントロール反応溶液の組成は、牛腎ミクロソーム (2.0 mg protein/ml)、スピントラップ剤  $\alpha$ -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitron (4-POBN) (0.1 M)、NADPH (5 mM)、pH 7.4 リン酸緩衝液 (29 mM) とし、反応温度は 37 °C、反応時間は 60 分間とした。EPR 測定によるラジカル種の検出、HPLC-EPR 法によるラジカル種の分離、HPLC-EPR-MS 法によるラジカル種の分子量決定および同定を行った。

#### 2. ラジカル生成機構の検討

コントロール反応溶液に Mb、FeCl<sub>3</sub>、Adenosine、AMP、ADP、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、NTA (nitritotriacetic acid disodium salt)、DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid)、DFO (deferoxamine mesylate salt) をそれぞれ添加したときの EPR 測定を行い、ラジカル生成へのそれぞれの物質の影響を検討した。さらに、Mb に対して金属キレート剤である EDTA がどのように影響するかを検討するため、Mb/EDTA 混合溶液の可視吸収スペクトル測定を行った。

ラジカルが生成される過程を、i) 牛腎ミクロソームの脂質過酸化反応、ii) 過酸化脂質からのラジカル生成反応の二つに分けて検討した。Mb あるいは鉄イオンが過酸化脂質からのラジカル生成に関与するかどうか検討するため、過酸化脂質 (13-HPODE) 溶液に Mb あるいは FeCl<sub>3</sub> を添加したときの EPR 測定を行った。

### 【結果および考察】

#### 1. ラジカルの検出・同定

牛腎ミクロソーム/NADPH/ADP/FeCl<sub>3</sub> 反応溶液の HPLC-EPR 分析を行うと、P<sub>1</sub> (保持時間 29.4 分)、P<sub>2</sub> (保持時間 32.4 分) および P<sub>3</sub> (保持時間 46.6 分) の 3 つのピークが検出され、HPLC-EPR-MS 分析による分子量測定により P<sub>3</sub> はペンチルラジカル、P<sub>1</sub> および P<sub>2</sub> はヒドロキシペンチルラジカルであると推定された。ペンチルヒドラジンおよび 1-ペンタノールを用い、ペンチルラジカルおよびヒドロキシペンチルラジカルを合成し、HPLC-EPR 分析の保持時間を比較し、P<sub>1</sub> および P<sub>2</sub> がヒドロキシペンチルラジカルであり、P<sub>3</sub> がペンチルラジカルであると同定した。

#### 2. ラジカル生成機構の検討

牛腎ミクロソームからラジカルが生成される過程を、i) 牛腎ミクロソームの脂質過酸化反応、ii) 過酸化脂質からのラジカル生成反応の二つに分けて検討した。

コントロール反応溶液に EDTA を添加するとラジカル種の EPR ピークが消失し、ADP と FeCl<sub>3</sub> を共に添加すると EPR ピーク高は約 3.4 倍に増大したことより、本反応に鉄イオンの関与が示唆された。鉄イオンは過酸化脂質からのラジカル生成過程も触媒するが、EDTA はこの反応に大きく影響しないことより、鉄イオンは牛腎ミクロソームの脂質過酸化反応および過酸化脂質からのラジカル生成反応両方に関与することが分かった。

一方、コントロール反応溶液（牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液）に Mb を添加すると EPR ピーク高が増大し、Mb がこのラジカル生成反応を促進することがわかった。過酸化脂質（13-HPODE）溶液に Mb(5 μM)を添加すると顕著なラジカル生成が認められ、Mb は過酸化脂質からのラジカル生成過程を触媒する可能性が示唆された。Mb/EDTA 混合溶液の可視吸収スペクトル測定より、EDTA が Mb に大きく影響しないことが分かった。EDTA が Mb に大きく影響せず、EDTA が牛腎ミクロソームからのラジカル生成を完全に阻害することより、Mb は過酸化脂質からのラジカル生成反応のみに関与することが示唆された。

#### 【まとめ】

##### 1. ラジカルの検出・同定

牛腎ミクロソーム/NADPH/ADP/FeCl<sub>3</sub> 反応溶液より、ペンチルラジカルおよびヒドロキシペンチルラジカルが検出・同定された。

##### 2. ラジカル生成機構の検討

牛腎ミクロソームからラジカルが生成される過程を、i) 牛腎ミクロソームの脂質過酸化反応、ii) 過酸化脂質からのラジカル生成反応の二つに分けて検討し、Mb は後半の過程を触媒することを明らかにした。以上のことより、Mb が過酸化脂質からのラジカル生成反応を促進することにより腎毒性を発現する可能性が示唆された。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 21 年 9 月 14 日、論文審査担当者は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

本論文は、横紋筋融解症やクラッシュ症候群に伴う急性腎障害における、ミオグロビン(Mb)関与の可能性を明らかにするため、牛腎ミクロソーム/NADPH/ADP/FeCl<sub>3</sub> 反応溶液中のフリーラジカルを検出・同定し、ラジカル生成機構およびその生成に及ぼす Mb の影響を検討したものである。その結果、

##### 1. ラジカルの検出・同定

牛腎ミクロソーム/NADPH/ADP/FeCl<sub>3</sub> 反応溶液の HPLC-EPR 分析により、P<sub>1</sub>（保持時間 29.4 分）、P<sub>2</sub>（保持時間 32.4 分）および P<sub>3</sub>（保持時間 46.6 分）の 3 つのピークが検出され、HPLC-EPR-MS 分析による質量測定により P<sub>3</sub> はペンチルラジカルであり、P<sub>1</sub> および P<sub>2</sub> はヒドロキシペンチルラジカルであると推定された。ペンチルヒドラジンおよび 1-ペンタノールを用いてペンチルラジカルおよびヒドロキシペンチルラジカルを合成し、HPLC-EPR 分析の保持時間を比較したところ、P<sub>1</sub> および P<sub>2</sub> がヒドロキシペンチルラジカルであり、P<sub>3</sub> がペンチルラジカルであると同定した。

##### 2. ラジカル生成機構の解析、ならびにラジカル生成に及ぼす Mb の影響

牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液に EDTA を添加するとラジカル種の EPR ピークが消失し、ADP および FeCl<sub>3</sub> を添加すると EPR ピーク高は約 3.4 倍に増大したことより、ラジカル生成反応における鉄イオンの関与が明らかとなった。

次に、牛腎ミクロソームからラジカルが生成される過程に及ぼす Mb の影響を、i) 牛腎ミクロソームの脂質過酸化反応、ii) 過酸化脂質からのラジカル生成反応の二つに分けて検討した。

牛腎ミクロソーム/NADPH 反応溶液に Mb を添加すると EPR ピーク高が増大し、Mb がラジカル生成反応を促進した。一方、過酸化脂質(13-HPODE)溶液に Mb(5 μM)を添加するとラジカル生成が認められ、Mb は過酸化脂質からのラジカル生成過程を触媒する可能性が示唆された。EDTA は Mb の可視吸収スペクトルに大きく影響しないが、牛腎ミクロソームからのラジカル生成を完全に阻害した。これらの結果より、Mb は主として過酸化脂質からのラジカル生成反応に関与し、この反応を促進する可能性が示唆された。

以上、牛腎ミクロソームからラジカルが生成される過程において、Mb が過酸化脂質からのラジカ

ル生成反応を促進することにより腎毒性を発現する可能性を示唆した論文であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第843号		
学位授与の日	平成21年12月8日		
氏名	西川 徹		
学位論文の題目	Synergistic antitumor effects of fleroxacin with 5-fluorouracil in vitro and in vivo for bladder cancer cell lines (膀胱腫瘍に対する fleroxacin と 5-fluorouracil 併用療法時の相乗的抗腫瘍効果に関する基礎的検討)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕 機	
	副査	教授 村垣 泰 光	教授 原 勲

## 論文内容の要旨

【緒言・目的】 泌尿器科領域において、膀胱に発生する尿路上皮癌患者は多く、初回経尿道的手術によって治癒切除が可能であるが、その生物学的特性から術後再発率は高く、いかにして切除後の再発を抑制するか、また浸潤癌や低分化癌への移行を抑制するかが問題となる。現在、この問題を解決する手段として、侵襲的な薬剤の膀胱内注入療法が行われているが、必ずしも十分とは言えない。そこで尿中薬物濃度が高く、膀胱癌細胞に対して十分な殺細胞効果をもつ経口投与剤が望まれる。近年、*In vitro* の実験系において、ニューキノロン系抗菌薬が膀胱癌細胞に対しても殺細胞効果をもっているという報告がみられる。本剤の特徴としては、細菌の DNA gyrase (topoisomerase type II) を抑制すること、経口投与時における尿中薬物濃度がかかなり高いことなどがあげられる。本研究では、ニューキノロン系抗菌薬 fleroxacin (FLRX) 単独および 5-FU 併用療法時の膀胱腫瘍に対する抗腫瘍効果について、膀胱癌細胞株 (MBT-2、T-24) および BHBN 誘発マウス膀胱癌モデルの実験系で検討した。

【方法】 *in vitro* の実験として、膀胱癌細胞株 (MBT-2 および T-24) に対して FLRX 単独の濃度 (50~800 $\mu$ g/ml) による抗腫瘍効果について MTT assay 法で検討した。次に FLRX の膀胱癌細胞株に対する経時的抗腫瘍効果増強作用について、その接触時間を 12 時間、24 時間、48 時間の 3 群に設定し、MTT assay 法にて検討した。さらに FLRX と 5-FU 併用療法時の膀胱癌細胞株に対する抗腫瘍効果増強作用について、FLRX 濃度 (50~800 $\mu$ g/ml) に 5-FU 濃度 (0.05~1.0 $\mu$ g/ml) を同時に添加し、接触時間 48 時間後に MTT assay 法にて検討した。FLRX と 5-FU 併用療法時の抗腫瘍効果の検討として、CalcuSyn という computer program (Biosoft, Cambridge, United Kingdom) を用いて 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) の併用効果を normalized isobologram で、また各濃度の組み合わせによる併用効果を combination index (CI 係数) にて検討した。

*in vivo* の実験として、BHBN 誘発マウス膀胱癌に対する FLRX 単独および 5-FU 併用療法時の発癌抑制効果について検討した。50 匹の 4 週齢の C57BL/6 雌性マウス (日本チャールズリバー) を用いた。膀胱癌は 0.05% BHBN 含有水を 12 週間自由摂取させ、その後は水道水を屠殺するまでの期間自由摂取させることにより誘発させた。上記マウスを 5 群に分け、BHBN 投与 1 週間前より第 1 群 (対照群) は distilled water、第 2 群は 10mg/kg FLRX、第 3 群には 10mg/kg 5-FU、第 4 群には 10 mg/kg の FLRX と 10 mg/kg の 5-FU、治療モデルとして第 5 群には、BHBN 投与終了後より 10 mg/kg の FLRX と 10 mg/kg の 5-FU を強制経口投与し、実験終了まで連日投与した。マウスは BHBN 投与終了後、第 8 週目に屠殺し、その膀胱粘膜の変化を顕微鏡的に観察した。その結果は、normal, simple hyperplasia, dysplasia, carcinoma in situ (CIS), invasive carcinoma の 5 群に分類した。

【結果】 FLRX は膀胱癌細胞株 (MBT-2 および T-24) に対して濃度依存性的および時間依存的に細胞増殖を抑制した。また FLRX に微量の 5-FU を使用することによって、程度の差は認めるものの細胞増殖抑制を増強する傾向が認められた。CalcuSyn for Windows computer program を使用して 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) の併用効果を normalized isobologram、各濃度の組み合わせによる併用効果を combination index (CI) で検討した結果、FLRX と 5-FU 併用療法は相乗的に作用しているものと考えられた。

BHBN 誘発マウス膀胱癌 (12 週間投与) に対する FLRX 単独および 5-FU 併用療法との抗腫瘍効果

についての検討では、膀胱癌は、Control 群での腫瘍発生率は 90%であり、そのほとんどが浸潤性病変であった。10mg/kg の FLRX 単独投与時および 10mg/kg の 5-FU 単独投与時、発癌抑制効果は明らかではなかったが、5-FU を併用することにより、第 4 群において腫瘍発生率および浸潤癌への進行が Control 群と比べ有意に抑制された。また治療群としての第 5 群では腫瘍発生率は Control 群に比べて抑制されている傾向は認められたが、統計学的有意差は認められなかった。

【考察】膀胱癌細胞に対して濃度依存的かつ時間依存的に細胞増殖抑制効果を示した FLRX は経口投与薬剤でありながら、尿中排泄濃度が 200 $\mu$ g/ml 以上と高いため膀胱内注入療法と同等の効果が期待できる。また微量の 5-FU を併用することによってその細胞増殖抑制効果をさらに増強する傾向を認めた。また動物実験として BHBN 誘発マウス膀胱癌モデルにおいて FLRX と 5-FU 併用療法時、その発癌抑制効果を認めた。これら 2 剤の相乗的な抗腫瘍効果に関する詳細なメカニズムは明らかではないが、膀胱癌細胞に対する各々の作用機序の違いおよび異なった代謝経路の違いが重要であると考えられる。どちらの薬剤も今までの豊富な臨床経験よりその安全性も確立されているため、臨床応用された場合その有用性は高いと思われる。

【結論】膀胱癌細胞に対する FLRX と 5-FU 併用療法時の抗腫瘍効果について *in vitro* と *in vivo* の実験モデルにて検討した結果、その相乗作用を認めた。膀胱腫瘍に対する経尿道的手術後、これら 2 剤の併用療法は術後補助療法としての有用性が示唆された。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成21年11月13日、審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。

泌尿器科領域において、膀胱に発生する尿路上皮癌患者は多く、初回経尿道的手術によって治癒切除が可能であるが、その生物学的特性から術後再発率は高く、いかにして切除後の再発を抑制するか、また浸潤癌や低分化癌への移行を抑制するかが問題となる。現在、この問題を解決する手段として、侵襲的な薬剤の膀胱内注入療法が行われているが、必ずしも十分とは言えない。そこで尿中薬物濃度が高く、膀胱癌細胞に対して十分な殺細胞効果をもつ経口投与剤が望まれる。近年、*In vitro* の実験系において、ニューキノロン系抗菌薬が膀胱癌細胞に対しても殺細胞効果をもっているという報告がみられる。本剤の特徴としては、細菌の DNA gyrase (topoisomerase type II) を抑制すること、経口投与時における尿中薬物濃度がかかなり高いことなどがあげられる。本論文では、ニューキノロン系抗菌薬 fleroxacin (FLRX) 単独および 5-FU 併用療法時の膀胱腫瘍に対する抗腫瘍効果について、膀胱癌細胞株 (MBT-2、T-24) および BHBN 誘発マウス膀胱癌モデルの実験系で検討を行っている。

*in vitro* の実験として、膀胱癌細胞株 (MBT-2 および T-24) に対して FLRX 単独の濃度 (50~800 $\mu$ g/ml) による抗腫瘍効果と FLRX の膀胱癌細胞株に対する経時的抗腫瘍効果増強作用について MTT assay 法にて検討した。さらに FLRX と 5-FU 併用療法時の膀胱癌細胞株に対する抗腫瘍効果増強作用について検討した。FLRX と 5-FU 併用療法時の抗腫瘍効果の検討として、CalcuSyn という computer program (Biosoft, Cambridge, United Kingdom) を用いて 50% inhibitory concentration (IC50) の併用効果を normalized isobologram で、また各濃度の組み合わせによる併用効果を combination index (CI 係数) にて検討した。その結果、FLRX は膀胱癌細胞株に対して濃度依存的および時間依存的に細胞増殖を抑制した。また FLRX に微量の 5-FU を使用することによって、程度の差は認めるものの細胞増殖抑制を増強する傾向が認められた。CalcuSyn for Windows computer program を使用して 50 % inhibitory concentration (IC50) の併用効果を normalized isobologram、各濃度の組み合わせによる併用効果を combination index (CI) で検討した結果、FLRX と 5-FU 併用療法は相乗的に作用しているものと考えられた。

*in vivo* の実験として、BHBN 誘発マウス膀胱癌 (12 週間投与) に対する FLRX 単独および 5-FU 併用療法時の発癌抑制効果について検討した。その結果、膀胱癌は、Control 群での腫瘍発生率は 90% であり、そのほとんどが浸潤性病変であった。10mg/kg の FLRX 単独投与時および 10mg/kg の 5-FU 単独投与時、発癌抑制効果は明らかではなかったが、5-FU を併用することにより、腫瘍発生率および浸潤癌への進行が Control 群と比べ有意に抑制された。

以上、本論文は膀胱癌細胞に対する FLRX と 5-FU 併用療法時の抗腫瘍効果について *in vitro* と *in vivo* の実験モデルにて検討した結果、その抗腫瘍効果が増強することを提示したものである。FLRX と 5-FU 併用療法は、膀胱腫瘍に対する経尿道的手術後の補助療法として有効な治療法となる可能性

を提示したものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第844号		
学位授与の日	平成22年2月9日		
氏名	西岡和哉		
学位論文の題目	Percutaneous Vertebroplasty Using Hydroxyapatite Blocks for the Treatment of Vertebral Body Fracture (椎体骨折に対するハイドロキシアパタイトブロックを用いた経皮的椎体形成術)		
論文審査委員	主査	教授 吉田宗人	
	副査	教授 板倉 徹	教授 鶴尾吉宏

## 論文内容の要旨

【緒言】椎体圧迫骨折に対する椎体形成術では、椎体内への充填物として polymethylmethacrylate(PMMA)や calcium phosphate paste(CPC)などの液状の材料が用いられることが一般的である。従来の方法では良好な除痛が得られる一方、重篤な合併症の報告もあり、これらの合併症を避けるべく、固形であるハイドロキシアパタイト(HA)ブロックを用いた椎体形成術が開発された。原法では正中部を5センチ程度切開しブロックの充填を行っているが、経皮的に行うべく手術方法の工夫と新たな器具の開発を行い、原法と同様の良好な手術成績を得た。本手術方法につきわれわれの開発した手技を示し、これまでの自験例の結果と、本手術法の問題点につき検討した。

【対象と方法】2003年2月から2007年3月まで椎体圧迫骨折(椎体の前面にのみ骨折を認めるもの)または破裂骨折(椎体後壁にも骨折を認めるもの)で入院した患者のべ30名32椎体に手術を施行した。男性のべ7名、女性のべ23名。平均年齢72.3歳。転倒等の明らかな受傷機転のあった症例23名、骨粗鬆症例7名。認知症で原因不明のものが1名あった。圧迫骨折のべ19名20椎体、破裂骨折11名12椎体。このうち初期の2例は原法に基づき開創して行い、28例30椎体について経皮的に行った。追跡期間は0.7-49.7ヶ月(平均16.6ヶ月)。手術適応の必要条件として、疼痛以外の神経症状がないこと、全身麻酔が可能であること、椎弓根の最狭部の太さが7ミリ以上あることとした。診断は全例MRIを撮影し、T1強調像で低信号を呈することを確認した。〈手術手技〉術前に3ミリスライスのCTを撮影し、椎体内へブロックを挿入する方向を作図しておく。挿入方向は椎弓根の中央を通り、矢状面に対して内側へ10~15度傾いた角度となる。手術は全身麻酔下に腹臥位で上体を挙上し、Cアームを前後方向に合わせ、椎弓根直上に1.2センチの皮膚切開を左右2箇所おき、φ1.5ミリのキルシュナー鋼線を手動的に左右の皮切部より椎弓根内へ挿入する。次にX線透視を側面方向にし、左側からキルシュナー鋼線をガイドとして Vertebroplasty Guidance system(Sofamor Danek製)を用い、リーマーで椎弓根直上の皮質骨に穴を開ける。次にポータル(Koshiya製)を留置し、これをブロック挿入のためのツールの外套とする。ガイド棒で皮質骨の穴をφ6ミリまで拡大し、インサータを椎体中程まで挿入後、ハイドロキシアパタイトブロックを椎体内へ誘導し、インパクトでブロックを充填していく。この操作を繰り返し、3~6個ずつブロックを密に充填していく。右側も同様にしてブロックを充填する。最後にハイドロキシアパタイトプラグで椎弓根部に栓をし、両側のポータルを抜去し、筋膜、皮下を吸収糸で縫合し手術を終了する。

術前に硬性コルセットを採寸しておき、これが出来次第装着し歩行も許可している。痛みの評価は術前後に visual analogue scale(VAS)10点法(最大痛10, 無痛0)で行った。術前後の椎体の高さの変化は、単純X線側面像で椎体前縁の高さを測定し検討した。椎体形成術を施行したのべ30例につき、術前後の疼痛の評価、隣接椎体への影響および合併症につき検討した。X線で3ヶ月以上経過観察ができていた26例26椎体につき、整備後椎体再圧潰の程度につき検討した。独立2群間のt-testを統計学的処理に用い、 $P<0.05$ を有意差ありとした。

【結果】平均手術時間57分、平均出血量85ml、1椎体あたり使用したブロックの個数34-240個(平均104個)。術前VAS; 4.0-10(平均7.0)、術後VAS; 0-7.0(平均1.6)、受傷前に歩行可能であった症例は、全例手術翌日には起立可能となった。術後多くの症例で椎体前縁が再圧潰し、ほとんどの症例で術後2ヶ月目にプラトーに達した。術後椎体高の減少率は平均13%であった。椎体高の減少率は圧迫骨折群に比較して破裂骨折群で有意に高かった(圧迫骨折群:平均9%、破裂骨折群:平均

18%)。術後椎体高の変化がプラトーに達した症例について、術直前の椎体高に近いところに落ち着く傾向がみられた。術後に新たな椎体骨折が2名3椎体に生じた。椎体外へブロックが漏れたもの3例、術後プラグが折損したものの1例であった。

【考察】椎体へのブロックの充填量には相関なく、最終的に術直前の高さに近いところに収束するものが多くみられたことから、HAブロックそのものには椎体高を維持するだけの強固な支持性は期待できず、椎体高の維持は骨折した椎体自身の強度によるところが大きいのと思われる。術後新たな椎体骨折が2症例3椎体に生じたが、術後平均で13.7ヶ月目に新たな骨折を生じていた。陳急性圧迫骨折を有する症例が1年以内に新たな椎体骨折を生じる確立は18%程度との報告があり、自験例での再骨折が生じた全例に、1回目の手術時に他椎体の陳旧性圧迫骨折が認められており、手術により新たな椎体骨折を惹起したとは考えがたい。HAブロックを使用した場合、PMMA程強固に固まらないため、術後椎体の再圧潰をきたす一方で隣接する椎体への影響が少ないものと考えている。3椎体に椎体外へのHAブロックの漏出がみられ、内1例は術後に生じた。術中にブロックを漏出させないポイントとしては、椎体中央くらいから充填を始め、追加充填するブロックで前方へブロックを移動させるように充填していくことが大切である。術後に椎体外へブロックの漏出が生じた例では術直後のCT検査で傍椎体に気腫が認められ、このような所見をみた場合、術後の安静度を再考する必要があると思われる。本3例については全て無症候性であり、保存的に経過観察中である。HAプラグの折損が1例みられたが、ブロック充填のために設けた小孔からプラグが出ないように、十分奥まで挿入することで、以後、プラグの折損は生じていない。ハイドロキシアパタイトブロックは、骨セメントと同様に術直後から良好な除痛が得られ、流動体の骨セメントと比較して肺塞栓や脊柱管内への漏出などの重篤な合併症がなく、椎体形成術における有効な充填材料である。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成22年1月25日に学位論文審査担当者は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。

近年本邦でも脊椎圧迫骨折に対して椎体形成術が施行されることが増加してきた。充填物としては一般的に polymethylmethacrylate や calcium phosphate paste などの液体の充填物が使用されている。これらを用いたときに脊柱管への流入による対麻痺や、静脈への流入による肺塞栓等の重篤な合併症の報告がある。これらの合併症を避けるべく新たな充填物として固形物であるハイドロキシアパタイトブロックが開発された。

今回、新たに工夫した手術手技を示した上で、椎体形成術で広く用いられている液体の充填物である骨セメントと比較し、ハイドロキシアパタイトブロックの利点と欠点を検討した。

原法では骨折椎体レベルを開創し椎弓を露出させ行っていたが、既成のツールの流用と新たに作成したツールを用いてX線透視下に経皮的に行えるように手術方法を工夫した。ハイドロキシアパタイトブロックを用いた椎体形成術で骨セメントを用いたものと同様に良好な除痛が得られ、高齢者でも早期の離床が可能であった。術後整復された骨折椎体の再圧潰がみられることが多く、約2ヶ月の経過で術前の椎体高と同程度になったところで固定する症例が多かった。術後の再圧潰率は骨折の程度に関連し、ブロックの充填数には関連しなかった。椎体形成術後隣接椎体の新たな骨折が骨セメントでは問題とされることがあるが、本法では明らかな関連はみられなかった。約10%の症例で椎体外へのブロックの漏出があったが全て無症候性であり、重篤な合併症はみられなかった。

以上より、本論文はハイドロキシアパタイトブロックが椎体形成術の充填物として良好な除痛が得られ、重篤な合併症がなく、隣接椎体の新たな骨折も少ない点で、骨セメントと比較して有効であることを示したものとして、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第845号		
学位授与の日	平成22年2月9日		
氏名	木田真紀		
学位論文の題目	Impaired cutaneous wound healing with excess granulation tissue formation in TNF $\alpha$ -null mice (皮膚の創傷治癒における腫瘍壊死因子の役割に関する実験的研究)		
論文審査委員	主査	教授 吉田宗人	
	副査	教授 村垣泰光	教授 篠崎正博

## 論文内容の要旨

### 【背景】

皮膚の素早い創傷治癒は過剰な細胞反応（炎症）や感染を回避するために不可欠である。しかし、創傷治癒反応がうまく制御されなければ、過剰な肉芽組織が形成され、後に組織の癒痕・線維化をきたすことがある。

皮膚の創傷治癒において、線維芽細胞の活性化は創傷の閉鎖に重要な役割を演じる筋線維芽細胞を産生するが、遷延化した筋線維芽細胞の残存は好ましくない癒痕・線維化とそれによる組織の収縮、変形を助長させる。腫瘍壊死因子(TNF) $\alpha$  は、多形質発現性のサイトカインであるが、皮膚の創傷治癒過程での炎症、線維化におけるその役割の詳細は明らかではない。

### 【目的】

皮膚での創傷治癒過程での TNF $\alpha$  の影響を培養線維芽細胞と TNF $\alpha$  ノックアウト (KO) マウスを用いて検討した。

### 【方法】

#### 1. マウスの上皮全層切除モデル

KO マウスと野生 (WT) マウスの背部の上皮全層を径 5mm の円形に切除した。経時的に創部の面積を測定し、肉眼的観察を行った。組織病理学的観察を HE 染色で行い、上皮全層切除後の肉芽組織を創部の辺縁と創部の中心の 2 箇所を観察し、その厚さを測定した。ラットモノクローナル F4/80 抗マクロファージ抗体を使用し、単球/マクロファージの浸潤を観察した。また組織の癒痕化の指標となる線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化をウサギモノクローナル抗 $\alpha$ 平滑筋アクチン (SMA) 抗体を使用し、 $\alpha$ SMA の発現で観察した。また Real-time RT-PCR を用いて、治癒部組織のコラーゲン I $\alpha$ 2 およびトランスフォーミング成長因子 (TGF)  $\beta$ 1 の mRNA 発現を検討した。

#### 2. 培養線維芽細胞に対する TNF $\alpha$ の効果

皮膚線維芽細胞株 (3T3 細胞) を用い、TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 1 の有無によるコラーゲン I $\alpha$ 2 の mRNA の発現の差異について検討した。TNF $\alpha$  を添加した培養細胞に TGF $\beta$ 1 を添加し、real-time RT-PCR を用いてコラーゲン I $\alpha$ 2 の mRNA の発現を検討した。

#### 3. Smad7 遺伝子導入の影響

アデノウイルスベクターによるマウス Smad7 遺伝子導入を Takara 社 Cre/LoxP システムで行った。LNL-Smad7-Ad (5 $\mu$ L、総ウイルス濃度 2 X 10<sup>7</sup> PFU/ml) のウイルスベクターを創周囲の皮下組織に局所注射した。コントロールには、Cre-Ad (濃度 2 X 10<sup>7</sup> PFU/ml) を同様に投与した。8 日後に組織学的に検討した。

### 【結果】

#### 1. 上皮全層切除モデルにおける肉眼的観察、組織像、免疫組織学的検討および mRNA の発現

肉眼的に全層上皮の切除後 6 日後、8 日後では KO マウスでの創部の閉鎖は明らかに WT マウスに比べ遅延していた。

組織では WT マウスと KO マウスに共通して、肉芽組織の形成が欠損した上皮の外側からと創部底から起こり、その肉芽組織の上を覆うように上皮が再生され、創部が閉鎖、修復された。創部の辺縁の肉芽組織は 8 日後、10 日後で WT マウスに比べ KO マウスの方が有意に厚く、創部の中央部も同様に 6、8 日後では有意に KO マウスの方が厚かった。

細胞分布は KO マウスと WT マウスともに抗 $\alpha$ SMA 抗体陽性線維芽細胞が多数観察されたものの、

どの時間経過でもその分布に両群間で大きな違いを認めなかった。また、マクロファージの浸潤の指標となる F4/80 陽性細胞の出現は KO マウスと WT マウスの間で顕著な差異は観察されなかった。

コラーゲン I $\alpha$ 2 の mRNA 発現は KO マウスで全層上皮切除 3 日後、8 日後で WT マウスに比べ有意に増強していた。また TGF $\beta$ 1 の発現は KO マウスにおいて WT マウスに比べ 8 日後で増強していた。

## 2. 培養線維芽細胞による in vitro での TNF $\alpha$ の役割

培養 3T3 細胞に TGF $\beta$ 1 のみを添加した群でのコラーゲン I $\alpha$ 2 の mRNA の発現は TGF $\beta$ 1、TNF $\alpha$  を添加した群に比べて有意に増強していた。同様に TGF $\beta$ 1 のみを添加した群は TNF $\alpha$  を添加した群に比べて培養 3T3 細胞におけるコラーゲン I $\alpha$ 2 の mRNA の発現が増強していた。

## 3. Smad7 遺伝子導入の影響

KO マウスでの治癒の遅延を TGF $\beta$ /Smad シグナルの阻害で回避できるか否かをアデノウイルスベクターによる Smad7 遺伝子導入で検討した。創部の面積は上皮切除 8 日後では Smad7-Ad を皮下に投与した群と Cre-Ad を投与した群では差はなかった。一方、Smad7 遺伝子導入の肉芽形成への影響を評価するために肉芽組織の厚さを創部辺縁と中心部で測定した。創部辺縁および中心部の肉芽の厚さは KO マウスの Smad7 投与群の方がコントロールアデノウイルス (Cre-Ad) 投与群に比べて薄かった。

### 【考察】

背部全層皮膚切除後の創傷治癒過程において、KO マウスでは WT マウスと比較して肉芽組織が著しく増大し、逆に表皮を含む表層部の創閉鎖は遅延した。免疫組織化学的には肉芽組織の質 (筋線維芽細胞とマクロファージの分布) は WT マウスと KO マウスでは顕著な差はなかったものの、創傷治癒においてコラーゲン I $\alpha$ 2 の mRNA の発現は増強していた。このことは、肉芽組織の形成 (増大) 速度が TNF $\alpha$  欠損により促進されていたことを示すと考えられる。通常では、円形の欠損創を取り囲んで形成される肉芽組織の収縮が創の閉鎖に重要な役割を担っていると考えられる。KO マウスでの欠損した創部内での過剰な肉芽形成が創周囲の肉芽組織の収縮による閉鎖を抑制していた可能性が考えられた。

培養細胞による検討と過去の様々な報告から TNF $\alpha$  が TGF $\beta$  に拮抗する作用を有しうると考えられている。In vivo においても、同様の機序が適応できるか否かを Smad7 遺伝子導入で評価した。その結果、KO マウスへの Smad7 遺伝子導入影響は肉芽組織の増強を抑制した。これは KO マウスの肉芽過剰形成が TNF $\alpha$  欠損による TGF $\beta$  作用の過剰な発現によると考えられた。

皮膚の創傷治癒過程での瘢痕収縮の助長は健常時の皮膚の正常へ回復することはなく、機能的障害をもたらす。皮膚の創傷治癒のメカニズムを理解することは、医学的にも、社会的にも重要であり、TNF $\alpha$  の皮膚創傷治癒における役割の解明は、皮膚損傷や遷延性潰瘍に対する新たな治療法に寄与すると考えられる。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年1月25日、論文審査委員会は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

皮膚の速やかな創傷治癒は免疫学的に重要である一方、その過剰な瘢痕・線維化は組織の正常な機能の損失を招く。皮膚の瘢痕収縮の助長は機能的障害をもたらすことになり、皮膚の創傷治癒のメカニズムを理解することは重要である。

腫瘍壊死因子(TNF) $\alpha$ は多形質発現性のサイトカインであるが、皮膚の創傷治癒に与える影響についての報告はなく、本研究では培養細胞、TNF $\alpha$ ノックアウト (KO) マウスを用いて皮膚の創傷治癒過程におけるTNF $\alpha$ の役割について検討したものである。

方法としてまずマウス上皮全層切除モデルを作成し、創部の肉眼的、組織学観察、免疫組織化学的な細胞分布、瘢痕・線維化反応で重要といわれているトランスフォーミング成長因子 (TGF)  $\beta$ 1 およびコラーゲン I $\alpha$ 2 の mRNA の発現を検討した。次に皮膚線維芽細胞株 (3T3 細胞) を用い、TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 1 の有無による mRNA の発現を検討した。最後に TNF $\alpha$  の皮膚創傷治癒での表現型における TGF $\beta$ /Smad シグナルの役割を知る目的で、Smad7 遺伝子導入の創部の治癒に対する影響を検討した。その結果、

1.in vivoにおいてTNF $\alpha$ が欠如した状態では肉芽が厚く、創部閉鎖は遅延していた。免疫組織化学的には筋線維芽細胞とマクロファージの分布に顕著な差はなかったが、TGF $\beta$ 1、コラーゲンI $\alpha$ 2のmRNAの発現は増強していた。

2.in vitroにおいても培養3T3細胞にTGF $\beta$ 1のみを添加した群でのコラーゲンI $\alpha$ 2のmRNAの発現はTGF $\beta$ 1、TNF $\alpha$ を添加した群に比べて有意に増強していた。同様にTGF $\beta$ 1のみを添加した群はTNF $\alpha$ を添加した群に比べて培養3T3細胞におけるコラーゲンI $\alpha$ 2のmRNAの発現が増強していた。

3.創部辺縁および中心部の肉芽の厚さはKOマウスのSmad7投与群の方がコントロールアデノウイルス(Cre-Ad)投与群に比べて薄く、過剰な肉芽形成が抑制されていた。

これらのことからTNF $\alpha$ 欠損によりTGF $\beta$ の過剰な発現により肉芽過剰形成(筋線維芽細胞の生成とマクロファージの浸潤)がおこり、過剰な肉芽形成が創周囲の肉芽組織の収縮による閉鎖を抑制していた可能性が考えられた。したがって、TNF $\alpha$ の皮膚創傷治癒における役割の解明は、皮膚損傷や遷延性潰瘍に対する新たな治療法に寄与することが期待され、学位論文として価値があるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第846号		
学位授与の日	平成22年2月9日		
氏名	中村智之		
学位論文の題目	Cutaneous polyarteritis nodosa: revisiting its definition and diagnostic criteria (皮膚型結節性多発動脈炎の疾患概念と診断基準)		
論文審査委員	主査	教授	村垣泰光
	副査	教授	一ノ瀬正和 教授 古川福実

## 論文内容の要旨

結節性多発動脈炎 (polyarteritis nodosa ; PN) は全身の中小動脈に壊死性血管炎を来す予後不良な疾患で、皮膚症状は25～60%にみられるとされる。一方、PNと同様の皮膚症状と組織所見を呈するものの内臓病変を伴わない病型として皮膚型結節性多発動脈炎 (cutaneous polyarteritis nodosa; CPN) が従来から知られている。CPNは予後良好であるが、PNの皮膚症状と鑑別することが困難であることから、その独立性を含めて未だ疾患概念が確立しておらず、診断基準も存在しない。また、CPNは皮膚症状以外にも末梢神経症状や筋症状などの軽度な随伴症状を伴うことがあるとされるが、厚生労働省やアメリカリウマチ学会のPN診断基準に従うと、随伴症状を伴うCPNはPNと診断される。しかしPNとCPNでは予後が大きく異なり、治療方針も異なってくるため、その独立性を明確にすることの意義は大きい。

本研究ではCPNの疾患概念を明確にし、CPNの診断基準を作成することを目的として、国内複数施設のCPNと考えられる22症例について臨床および病理組織所見を詳細に解析した。その結果、男女比は3:19と女性に多く、平均発症年齢は男性が56歳、女性は46.6歳であった。皮膚症状は皮下結節が86%の症例に認められ最も多く、その出現部位の95%は下腿であった。他にリベド(45%)、紫斑(45%)、潰瘍(23%)が認められ、これらも下腿に多くみられた。平均経過観察期間は3.1年で、PNへ移行した例や死亡例は存在しなかった。なお末梢神経・筋・関節症状など何らかの随伴症状が64%の症例に認められたが、それらは皮疹部に限局していた。

以上より、CPNの疾患概念を「PNの皮膚症状(皮下結節・リベド・紫斑・潰瘍)のみを主要症候とし、内臓病変を認めず、特徴的な組織所見を認める例、ただし皮疹部に限局した末梢神経・筋・関節症状を伴うことがある」とし、CPNは独立疾患であると結論した。さらに、その判断のもとに診断基準を作成した。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年1月25日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

結節性多発動脈炎 (polyarteritis nodosa ; PN) は全身の中小動脈に壊死性血管炎を来す予後不良な疾患で、皮膚症状は25～60%にみられるとされる。一方、PNと同様の皮膚症状と組織所見を呈するものの内臓病変を伴わない病型として皮膚型結節性多発動脈炎 (cutaneous polyarteritis nodosa; CPN) が従来から知られている。CPNは予後良好であるが、PNの皮膚症状と鑑別することが困難であることから、その独立性を含めて未だ疾患概念が確立しておらず、診断基準も存在していない。また、CPNは皮膚症状以外にも末梢神経症状や筋症状などの軽度な随伴症状を伴うことがあるとされるが、厚生労働省やアメリカリウマチ学会のPN診断基準に従うと、随伴症状を伴うCPNはPNと診断される。しかしPNとCPNでは予後が大きく異なり、治療方針も異なってくるため、その独立性を明確にすることの意義は大きい。

本研究ではCPNの疾患概念を明確にし、CPNの診断基準を作成することを目的として、国内複数施設のCPNと考えられる22症例について臨床および病理組織所見を詳細に解析した。その結果、男女比は3:19と女性に多く、平均発症年齢は男性が56.0歳、女性は46.6歳であった。皮膚症状は皮下結節が86%の症例に認められ最も多く、その出現部位の95%は下腿であった。他にリベド(45%)、紫斑(45%)、潰瘍(23%)が認められ、これらも下腿に多くみられた。平均経過観察期間は3.1年で、

PNへ移行した例や死亡例は存在しなかった。なお末梢神経・筋・関節症状など何らかの随伴症状が64%の症例に認められたが、それらは皮疹部に限局していた。

これらより、CPNの疾患概念を「PNの皮膚症状（皮下結節・リベド・紫斑・潰瘍）のみを主要症候とし、内臓病変を認めず、特徴的な組織所見を認める例、ただし皮疹部に限局した末梢神経・筋・関節症状を伴うことがある」とし、CPNは独立疾患であると結論した。さらに、その判断のもとに診断基準を作成した。

以上、本研究はCPNの独立性を明確にし、診断基準を示した新規性の高い有意義な研究であり、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)乙第847号		
学位授与の日	平成22年3月9日		
氏名	嶋本哲也		
学位論文の題目	MUC1 is a useful molecular marker for malignant intraductal papillary mucinous neoplasms in pancreatic juice obtained from endoscopic retrograde pancreatography. (膵管内乳頭粘液性腫瘍の悪性度に関する術前遺伝子診断)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 一瀬雅夫	教授 山上裕機

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm:IPMN) は通常高分化な粘液性細胞で構成され、同一腫瘍内においてもさまざまな異型度を示し、過形成から腺腫、異型性、上皮内癌、微小浸潤癌、浸潤癌へと進展することが報告され、1つの腫瘍内にさまざまな異型度の病変が混在していることが多い。IPMNは膵癌と比べて切除後の予後が良いとされるが、浸潤癌となれば通常型膵癌である浸潤性膵管癌と同様に予後は不良である。現在、様々な画像診断法が開発され、IPMNの癌化診断を行っているが必ずしもその正診率は高くない。IPMNで明らかに浸潤癌となったものは画像診断が可能なが、上皮内癌や微小浸潤癌の段階での質的診断はしばしば困難である。そのため、術前の内視鏡的逆行性膵管造影 (endoscopic retrograde pancreatography: ERP) の際に採取した膵液で細胞診がおこなわれているが、偽陰性が多く癌の確定診断は困難である。我々は膵液中の細胞診だけでなく、膵液中の carcinoembryonic antigen (CEA)、carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) 値を測定し cut-off level を設定して癌化の指標としてきた。 (*Arch Surg 2004;139 (2):188-92*)。しかし、膵液中の CEA 値は検査時に希釈されている可能性があり、希釈の影響を受けない方法が求められた。そこで ERP 時に採取される膵液を用いて膵液中細胞の癌関連遺伝子である CEA、human telomerase reverse transcriptase(hTERT)、および mucin family のひとつである MUC1 の messenger ribonucleic acid (mRNA) の定量的に測定し、術前に IPMN の癌化診断が可能であるか否かを分子生物学的に検討した。

### 【方法】

ヒト膵癌株化腫瘍細胞である PK-8 と、和歌山県立医科大学第2外科において本研究に対し同意が得られた膵腫瘍患者で、術前の ERP で膵液を採取した後に手術を施行した 34 例を対象とした。

#### 1. ヒト膵癌株化腫瘍細胞ならびに膵液中細胞の real-time RT-PCR による mRNA の定量

ヒト膵癌株化腫瘍細胞である PK-8 ならびに膵液を遠沈して得られた細胞から total RNA を抽出し、癌関連遺伝子である CEA、hTERT、MUC1、およびハウスキーピング遺伝子である GAPDH の real-time RT-PCR を施行した。ヒト膵癌株化腫瘍細胞を用いて各測定系の感度を検証した。

#### 2. CEA、CA19-9 値、各癌関連遺伝子の発現と癌化との検討

膵液中の CEA、hTERT、MUC1 mRNA 発現量を GAPDH の mRNA の発現量で除し、100 倍したものをそれぞれ CEA ratio、hTERT ratio、MUC1 ratio とし、血中および膵液中の CEA、CA19-9 値とともに病理組織学的結果との関連を検討した。さらに receiver operating characteristics curve (ROC curve) を用いてカットオフ値を設定して癌化の予測因子となり得るかを検討した。

### 【結果】

#### 1. ヒト膵癌株化腫瘍細胞を用いた検討

ヒト膵癌株化腫瘍細胞である PK-8 を用いて CEA、MUC1、hTERT、GAPDH mRNA の検出限界を検討した。1x10<sup>6</sup> 個の末梢単核球中 CEA、GAPDH mRNA は 1x10<sup>1</sup> 個まで、MUC1、hTERT mRNA は 1x10<sup>2</sup> 個まで腫瘍細胞を定量することが可能であった。

#### 2. 膵液中の CEA、CA19-9 値と各癌関連遺伝子の定量

膵液中の CEA、MUC1、GAPDH mRNA の発現量の定量は全例で可能であった。hTERT mRNA は 34 例中 14 例 (膵癌 7 例、膵管内乳頭粘液腺癌 5 例、膵管内乳頭粘液腺腫 2 例) のみ定量可能

であったが、有意に悪性疾患に陽性であった ( $p=0.0356$ )。

IPMA 群 7 例と IPMC 群 9 例では、MUC1 が IPMC 群に有意に高発現していた (727(58.2-2,223.9) vs. 4710.7(307.4-26,490),  $p=0.023$ )。さらに、IPMC 9 例の内、浸潤癌を除いた上皮内癌 2 例と微小浸潤癌 4 例の計 6 例と IPMA 7 例でも MUC1 mRNA の発現量に有意差を認めた ( $p=0.0152$ )。

### 3. 癌化診断の検討

IPMC と IPMA および上皮内癌 2 例と微小浸潤癌 4 例の計 6 例と IPMA 7 例との検討で、膵液中細胞の MUC1 mRNA 発現量が IPMN の癌化の指標となるかを検討した。ROC curve を用いて IPMN の癌化に対するカットオフ値を求めると 1,600 となり、その感度は 88.9%、特異度は 71.4%、陽性反応予測値は 80%、陰性反応予測値は 83.3%、正診率は 81.3%であり、CEA mRNA の感度 55.6%、特異度 57.1%、陽性反応予測値 62.5%、陰性反応予測値 58.3%、正診率 68.8%に比べ良い指標となることが明らかになった。

#### 【考察】

IPMN の膵液細胞診の陽性率は 11.1%と極めて低かったが、膵液中 MUC1 mRNA 定量はカットオフ値を設定することにより、膵液中の CEA 値や CEA mRNA の定量よりも高率に膵管内乳頭粘液腺癌の正診率が高く、癌化予測因子として遺伝子診断が有用であり、IPMN の悪性度診断ならびに治療方針を決定する指針になることが判明した。膵切除術は侵襲の大きい手術であり、合併症の併発から術死に至ることもあるが、術前に癌化していることを正しく診断できることで、手術が必要な患者をより適切に選択できるものと考えられる。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年2月5日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

本論文は、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm: IPMN) の術前癌化診断を、内視鏡的逆行性膵管造影 (endoscopic retrograde pancreatography: ERP) で採取した膵液中の癌関連遺伝子である carcinoembryonic antigen (CEA)、human telomerase reverse transcriptase (hTERT)、ムチン関連遺伝子である MUC1 および house keeping gene である GAPDH の messenger ribonucleic acid (mRNA) を定量し、分子生物学的に検討したものである。

その結果、①膵液中細胞より total RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA を作製、real-time RT-PCR を施行し、CEA、hTERT、MUC1、GAPDH mRNA の real-time RT-PCR による測定系を確立した。②ヒト膵癌株化腫瘍細胞である PK-8 を用いた CEA、hTERT、MUC1、GAPDH mRNA の検出限界同定で、健常人末梢単核球  $1 \times 10^6$  個中、CEA、GAPDH は PK-8 が  $1 \times 10^1$  個まで、MUC1、hTERT は PK-8 が  $1 \times 10^2$  個まで定量可能な測定系を確立した。③術前に ERP で膵液を採取後に手術した 34 例 (膵癌 13 例、膵管内乳頭粘液腺癌 9 例、膵管内乳頭粘液腺腫 7 例、慢性膵炎 5 例) で CEA、MUC1、GAPDH mRNA は全例定量可能であった。hTERT は 14 例 (膵癌 7 例、膵管内乳頭粘液腺癌 5 例、膵管内乳頭粘液腺腫 2 例) のみ定量可能であったが、有意に悪性疾患に陽性であった ( $p=0.0356$ )。④膵管内乳頭粘液腺癌 9 例と膵管内乳頭粘液腺腫 7 例で、MUC1 mRNA は有意に悪性群である膵管内乳頭粘液腺癌に高発現していた ( $p=0.023$ )。さらに膵管内乳頭粘液腺癌 9 例のうち、浸潤癌 3 例を除いた上皮内癌 2 例と微小浸潤癌 4 例の計 6 例と膵管内乳頭粘液腺腫 7 例でも MUC1 mRNA は有意に悪性群で高発現していた ( $p=0.0152$ )。⑤ROC curve を用いて MUC1 mRNA の IPMN の癌化に対するカットオフ値を求めると 1,600 となりその感度は 88.9%、特異度は 71.4%、陽性反応予測値は 80%、陰性反応予測値は 83.3%、正診率は 81.3%であり、IPMN 癌化の良い指標となることが示唆された。

以上の結果より、膵液中の MUC1 mRNA の定量は、IPMN の術前癌化診断の良い指標と考えられ、IPMN の治療方針や予後の向上に寄与すると考えられ、学位論文として価値あるものと認められた。

学位記番号	博(医)乙第848号		
学位授与の日	平成22年3月9日		
氏名	富永敏治		
学位論文の題目	Combination of <i>p53</i> codon 72 polymorphism and inactive <i>p53</i> mutation predicts chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. (大腸癌における <i>p53</i> の不活化型遺伝子変異と遺伝子多型による 5-FU 感受性予測)		
論文審査委員	主査	教授 一瀬雅夫	
	副査	教授 村垣泰光	教授 山上裕機

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

*p53* 遺伝子多型と化学療法に対する応答性に関しての報告が増えている。しかし、大腸癌と *p53* 遺伝子多型との関係や、大腸癌化学療法において用いられる 5-FU との関連は未だ詳しく解明されていない。そこで、*p53* exon4 codon72 遺伝子多型および遺伝子変異と大腸癌との関係を調べ、さらに 5-FU の感受性との関連を検討した。

### 【方法】

#### 1. 抗癌剤感受性試験

大腸癌摘出標本より、5mm 大の腫瘍組織を採取し、Collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST)法にて 5-FU の感受性試験を施行した。

#### 2. *p53* exon4 codon72 遺伝子多型の解析

大腸癌手術患者の末梢血より単核球を分取し DNA を抽出し、LightCycler (Roche) を用いて PCR を施行し、融解曲線分析で *p53* exon4 codon72 遺伝子多型を検索した。

#### 3. *p53* 遺伝子変異の検索

方法 1 と同様に採取した腫瘍組織から DNA を抽出し、*p53* exon2-11 に対しそれぞれ PCR を施行して増幅させ、Direct Sequence を施行し、*p53* 遺伝子変異を検索した。

また、hot spot と呼ばれる codon 175、245、248、249、273、282 の部位に遺伝子変異を認めるものを不活化型変異と定義して解析した。

#### 4. 腫瘍細胞のアポトーシスの定量

5-FU に 7 日間暴露させた大腸癌組織のパラフィン包埋固定標本を作製し、TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL) 染色を施行した。核が茶褐色に染色されたものをアポトーシス陽性細胞とし、光学顕微鏡下で腫瘍細胞 1000 個中の陽性細胞数をアポトーシス指数 (AI) とし計測した。

#### 5. Bax および Bcl-2 の免疫組織化学染色

Bax、Bcl-2 について、酵素標識抗体法にて二重染色を施行した。一次抗体として、Bax は polyclonal antibody (DAKO) を、Bcl-2 は monoclonal antibody Clone-124 (DAKO) を使用した。Bax 染色指数 (BSI) は腫瘍細胞の染色の強さと陽性率により分類した。

Bcl-2 は腫瘍細胞の細胞質の染色率により分類し、低発現群、高発現群として比較検討した。

### 【結果】

#### 1. *p53* exon4 codon72 遺伝子多型の解析と臨床病理学的因子に関する検討

大腸癌患者106人の遺伝子型の内訳はArg/Argが40人(37.7%)、Arg/Proが50人(47.2%)、Pro/Proが16人(15.1%)であった。

各々の遺伝子型間で、臨床病理学的因子 (年齢、性別、腫瘍占拠部位、腫瘍最大径、肉眼型、組織型、壁深達度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移、肝転移、病期) について解析したが、有意差を認めるものはなかった。

#### 2. *p53* 遺伝子変異の解析

p53 遺伝子変異は 38.7% (41/106 例) に認め、不活化型変異は 26.4% (28/106 例) に認めた。不活化型変異の有無別に、結果 1 と同様に臨床病理学的因子について解析したが、有意差を認めるものはなかった。

3. p53 遺伝子多型および p53 遺伝子変異と 5-FU の感受性との関連

p53 遺伝子多型と 5-FU の感受性との関連は認めなかった。

p53 遺伝子変異 (-) 群の方が (+) 群より高感受性であった (p=0.037)。

p53 遺伝子変異の有無別に Arg/Arg、Arg/Pro、Pro/Pro の 3 群を比較しても有意差を認めなかったが、遺伝子型 3 群を p53 遺伝子変異の有無別に比較したところ、Arg/Arg 群では、p53 遺伝子変異 (-) 群の方が (+) 群より 5-FU の感受性が高かった (p=0.008) が、Arg/Pro 群と Pro/Pro 群では有意差を認めなかった。

p53 遺伝子変異のある Arg/Arg 群はすべての Arg/Pro、Pro/Pro 群よりも感受性が低かった (p=0.036)。

4. p53 遺伝子多型および不活化型変異と 5-FU の感受性との関連

不活化型変異 (-) 群の方が (+) 群より高感受性であった (p=0.044)。

Arg/Arg 群では、不活化型変異 (-) 群の方が (+) 群より 5-FU の感受性が非常に高かった (p<0.001) が、Arg/Pro 群と Pro/Pro 群では有意差を認めなかった。

さらに、不活化型変異のない Arg/Arg 群はすべての Arg/Pro、Pro/Pro 群よりも感受性が高く (p=0.022)、不活化型変異のある Arg/Arg 群はすべての Arg/Pro、Pro/Pro 群よりも感受性が低かった (p=0.002)。

5. 腫瘍細胞のアポトーシスの定量

p53 遺伝子変異 (-) 群の方が (+) 群よりアポトーシス陽性細胞数が多かった (p=0.019)。

また、不活化型変異 (-) 群の方が (+) 群よりアポトーシス陽性細胞数が多かった (p=0.017)。

Arg/Arg 群では、不活化型変異 (-) 群の方が (+) 群よりアポトーシス陽性細胞数が多かった (p=0.037) が、Arg/Pro 群と Pro/Pro 群では有意差を認めなかった。

さらに、不活化型変異のない Arg/Arg 群はすべての Arg/Pro、Pro/Pro 群よりもアポトーシス陽性細胞数が多かった (p=0.014)。

6. Bax および Bcl-2 の免疫組織化学染色

BSI は高感受性 (p<0.001) と AI 高値 (p<0.001) に相関していた。逆に、Bcl-2 は、低感受性 (p=0.017) と AI 低値 (p=0.005) に相関していた。

不活化型変異のない Arg/Arg 群の 70% は BSI 高値であり、不活化型変異のある Arg/Arg 群のすべてで BSI は低値であった。

不活化型変異のない Arg/Arg 群の 60% は Bcl-2 低発現であり、不活化型変異のある Arg/Arg 群の 75% は Bcl-2 高発現であった。

【結論】

p53 遺伝子多型と p53 遺伝子変異の組み合わせは、大腸癌患者において 5-FU の感受性と関連があり、さらに、不活化型変異は p53 遺伝子変異よりも重要である可能性が示唆された。また、この感受性の相違はアポトーシスの誘導による相違であることが示された。

p53 遺伝子多型解析に不活化型変異解析を組み合わせることにより、大腸癌の抗癌剤感受性を予測できる可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年2月22日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

本研究は癌抑制遺伝子である p53 の exon4 codon72 遺伝子多型と化学療法に対する応答性に注目し、大腸癌化学療法において用いられる 5-FU との関連について、p53 遺伝子多型および遺伝子変異と 5-FU の感受性との関連を検討したものである。

その結果、p53 遺伝子多型と 5-FU の感受性との関連は認めなかったが、p53 遺伝子変異 (-) 群の方が (+) 群より高感受性であった (p=0.037)。また、p53 遺伝子変異の有無別に Arg/Arg、Arg/Pro、Pro/Pro の 3 群を比較しても有意差を認めなかったが、遺伝子型 3 群を p53 遺伝子変異の有無別に比較したところ、Arg/Arg 群では、p53 遺伝子変異 (-) 群の方が (+) 群より 5-FU の感受性が高かつ

たが ( $p=0.008$ )、Arg/Pro 群と Pro/Pro 群では有意差を認めなかった。さらに、p53 遺伝子変異のある Arg/Arg 群はすべての Arg/Pro、Pro/Pro 群よりも感受性が低かった ( $p=0.036$ )。

hot spot と呼ばれる codon 175、245、248、249、273、282 の部位に遺伝子変異を認めるものを不活化型変異と定義して解析したところ、不活化型変異 (-) 群の方が (+) 群より高感受性であった ( $p=0.044$ )。また、Arg/Arg 群では、不活化型変異 (-) 群の方が (+) 群より 5-FU の感受性が高かったが ( $p<0.001$ )、Arg/Pro 群と Pro/Pro 群では有意差を認めなかった。さらに、不活化型変異のない Arg/Arg 群はすべての Arg/Pro、Pro/Pro 群よりも感受性が高く ( $p=0.022$ )、不活化型変異のある Arg/Arg 群はすべての Arg/Pro、Pro/Pro 群よりも感受性が低かった ( $p=0.002$ )。

腫瘍細胞のアポトーシス細胞数を定量したところ、p53 遺伝子変異 (-) 群の方が (+) 群よりアポトーシス陽性細胞数が多く ( $p=0.019$ )、不活化型変異 (-) 群の方が (+) 群よりアポトーシス陽性細胞数が多かった ( $p=0.017$ )。Arg/Arg 群では、不活化型変異 (-) 群の方が (+) 群よりアポトーシス陽性細胞数が多かったが ( $p=0.037$ )、Arg/Pro 群と Pro/Pro 群では有意差を認めなかった。さらに、不活化型変異のない Arg/Arg 群はすべての Arg/Pro、Pro/Pro 群よりもアポトーシス陽性細胞数が多かった ( $p=0.014$ )。

以上より、p53 遺伝子多型と p53 遺伝子変異の組み合わせは、大腸癌患者において 5-FU の感受性と関連があり、さらに、不活化型変異は p53 遺伝子変異よりも重要である可能性が示唆され、この感受性の相違はアポトーシスの誘導による相違であることが示された。p53 遺伝子多型解析に不活化型変異解析を組み合わせることにより、大腸癌の抗癌剤感受性を予測できる可能性が示唆され、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第849号		
学位授与の日	平成22年3月9日		
氏名	澤田 貴宏		
学位論文の題目	Ternary complex formation of EphA4, FGFR and FRS2 $\alpha$ plays an important role in the proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells (胚性神経幹細胞・前駆細胞の増殖作用において EphA4・FGFR・FRS2 $\alpha$ により形成される複合体が重要な役割を果たす)		
論文審査委員	主査	教授 井原 義人	
	副査	教授 覚道 健一	教授 坂口 和成

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

学位請求者等は先の研究において Yeast Two-Hybrid 法によりチロシンキナーゼ型受容体の1つである FGFR への結合分子として、異なるファミリーに属する EphA4 を発見し、以下の結果を報告した。HEK293 細胞での発現実験において、EphA4 と FGFR はヘテロ結合により複合体を形成し、両受容体は直接的に相互に活性化する。また、種々の EphA4 変異体をもちいた発現実験において FGFR に対する作用を検討した結果、この結合には EphA4 の Juxta-Membrane (JM) domain に存在する Tyr 残基がリン酸化を受けることによる EphA4 の活性化が必須である。さらに、それぞれの受容体の野生型および不活性型を発現させた細胞株 L6 をもちいた実験において、これら受容体のリガンドである FGF2 および ephrin-A1 による刺激は相乗的に FRS2 $\alpha$ のリン酸化を増強し、その下流の Ras-MAPK 経路を活性化する (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18866-18871, 2005)。

近年これらの知見をふまえ、Yeast Two-Hybrid 法により EphA4 と FRS2 $\alpha$ が直接的な結合を見出した。つまりこれは、FGFR-EphA4-FRS2 $\alpha$ がヘテロ複合体を形成することを示唆する。この仮説に基づき、本研究では、これらの結合様式を詳細に解明するとともに神経幹細胞をもちいて EphA4 による下流シグナルに与える影響を検討した。

神経幹細胞はこれらの分子を発現しており、その増殖や分化は FGF-FGFR を介したシグナルに依存していることが知られている。種々の幹細胞が多様な受容体やシグナル分子を発現し調節されていることから、本研究は胚発生を初めとした各種生命現象を理解する上で非常に重要であると考えられる。

### 【方法】

#### 細胞培養

HEK293、293gpIRES細胞株は10% FBSを添加したDMEMで培養した。マウス神経幹細胞は胎生14.5日齢の線条体より採取し、5mM HEPES buffer(pH7.5)、0.6% glucose、25 $\mu$ g/ml insulin、100  $\mu$ g/ml transferrin、20 nM progesterone、60  $\mu$ M putrescine、30 nM sodium selenite、20ng/ml FGF2、20 ng/ml EGFを添加したDMEM/F12混合培地でneurosphereとして培養した。Neurosphere法で培養した神経幹細胞に対しレトロウイルスをMOI=5で感染させ、遺伝子が導入された各クローンをもちいて増殖の測定を行なった。

#### プラスミドベクターの構築

HEK293細胞において一過性の発現を得るため、野生型および変異型のEphA4、FGFRおよびFRS2 $\alpha$  cDNAのそれぞれの3'末端に、Myc、FlagおよびHAのいずれかのタグを付加し、pcDNA3.1に組み込んで使用した。野生型および変異型組換えタンパク質を得るため、上記の各cDNAをPCR法にて適切な領域を増幅し、MBP融合タンパク質を合成するpMal-C2および6xHis-Xpress融合タンパク質を合成するpBAD-Hisに組み込んだ。また、Yeast Two-Hybridに利用するため、PCR法にて増幅したcDNAをpLexAに、およびpB42ADに組み込んだ。PCR法で増幅したすべてのcDNAは、pCR-Blunt II-TOPOクローニングベクターに組み込んだのち、シーケンサーにて配列を確認した。

#### Yeast Two-Hybrid system

Baitタンパク質cDNAを組み込んだpLexAベクターおよびFishタンパク質cDNAを組み込んだpB42AD

ベクターを、レポーター遺伝子を含むp8op-lacZベクターと共に酵母に導入したのち、それぞれの発現を確認し、X-galを含む選択培地にて結合の有無を確認した。

#### In vitro binding assay と In vitro kinsase assay

アフィニティーカラムを利用して大腸菌溶解物よりMBPおよび6xHis-Xpressタグが付加された組換えタンパク質を精製した。これらをSDS-PAGEで分離したのちCBB染色およびウェスタンブロット法により定量したのち、一定量をチューブ内で反応させウェスタンブロット法にて結合を見た。また精製した組換えタンパク質の一方をキナーゼ、もう一方を基質とし、<sup>32</sup>PでラベルしたATPを加えた条件下で反応させ、SDS-PAGEで分離したのちウェスタンブロット法およびオートラジオグラフィーにて検出した。

#### トランスフェクション、免疫沈降およびウェスタンブロット法

各種cDNAを組込んだpcDNA3.1をPerFectin transfection試薬をもちいてHEK293細胞へ導入し、48時間後にLysis A bufferで溶解物を得た。細胞溶解物はタンパク質濃度を測定し、一定量を適切な抗体とProtein A-agaroseと共に、4°Cでインキュベートして試料とした。細胞溶解物より得た試料はまず、SDS-PAGEにより分離したのち、ウェスタンブロット法にてPVDF膜に転写し、適切な抗体とECL検出試薬をもちいて目的のバンドを可視化した。

#### レトロウィルスベクターの構築

野生型および変異型のEphA4およびFRS2α cDNAを組込んだpMXs-IGベクターをpCAG /VSV-Gベクターとともに293gpIRES細胞に導入し、48時間後の培養上清からウィルス粒子を得た。

#### **【結 果】**

#### FGFR と FRS2αはそれぞれ EphA4 と直接的な相互作用をもつ

FGFR JM ドメインおよびFRS2α PTB ドメインがJM ドメインを欠くEphA4細胞内ドメインと直接結合することを発見し、さらにそれぞれの結合部位を特定した。また、FGFR と EphA4 が相互にリン酸化すること、またEphA4 がFRS2αを直接リン酸化することを発見した。

#### FGFR-EphA4-FRS2α ヘテロ複合体の形成

EphA4 はFGFR JM ドメインのC端側と、FRS2αは同N端側に結合することが分かり、それぞれ異なる部位で結合することを発見した。また、これらの分子が相互に結合していることも発見した。

#### FGFR-EphA 受容体の結合は普遍的である

EphA4 はすべてのFGFR と結合することが分かり、また、FGFR1は使用した全てのEphA受容体と結合を示した。さらにEphA4のドミナントネガティブ分子であるEphA4(ΔJM,KD)の量依存的にFGFR-EphA4の結合が阻害され、またリガンドによる刺激下においても両受容体のリン酸化が阻害された。

#### FGFR は EphA4 JM ドメインをリン酸化する

FGFR はEphA4(WT)を直接リン酸化したが、EphA4 (ΔJM)はリン酸化しないことを発見した。さらにHEK293細胞をもちいた発現実験においてもFGFRの量依存的にEphA4のリン酸化が認められた。

#### FRS2αはFGFR および EphA4 のリン酸化を増強する

野生型FRS2αおよびそのドミナントネガティブ分子であるFRS2α(myrPTB)を高発現させると、それらの量依存的にFGFRおよびEphA4との結合が増強し、これら受容体のリン酸化も亢進した。マウス神経幹細胞の増殖はFGFR-EphA4-FRS2αヘテロ複合体シグナルに依存する

FGF2刺激と同様にephrin-A1刺激により増殖能が有意に増加を示し、さらに両リガンドで同時に刺激することにより相乗的な増加が認められた。さらにEphA4(ΔJM,KD)を導入した細胞では、FRS2αのドミナントネガティブ分子であるFRS2α(myrPTB)を導入したものと同様に、細胞増殖が顕著に抑制された。

#### **【結 論】**

EphA、FGFR およびFRS2αの3分子は異なる領域で結合することでヘテロ複合体を形成する。FGFR と EphA は結合することで相互にリン酸化し、活性化し合う。FRS2αは両受容体に結合することによりそれらの活性化を増強する。さらに、FRS2αはFGFRの主要なドッキングプロテインであることはよく知られているが、それだけではなく、EphA4とも結合することでそのシグナルを伝達することを実証した。

機能的にもEphA4のドミナントネガティブ分子およびFRS2αのドミナントネガティブ分子が

FGFR および EphA4 の活性化を阻害することを明らかにした。神経幹細胞ではこれらのドミナントネガティブ分子により増殖が顕著に抑制された。このことは神経幹細胞の増殖に EphA-FGFR-FRS2 $\alpha$ 複合体シグナルが重要な役割を果たしていることを意味する。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成22年2月19日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行なった。

近年、学位請求者等はレセプター型チロシンキナーゼ（RTK）であるFGF受容体（FGFR）に対して結合する新たな分子として、異なるRTKファミリーに属するEphA4を見だし、これらが互いの細胞内ドメインを介して結合し、相互に活性化することでFRS2 $\alpha$ -Ras-MAPKを介する増殖シグナルを増強することを発見した。しかし、詳細な分子メカニズムや生理的作用に関してはさらなる探究が必要である。

本研究では、EphA4、FGFR、FRS2 $\alpha$ の3分子間における結合領域を、Yeast Two-Hybrid法および組換えタンパク質をもちいて詳細に解析するとともに、HEK293細胞をもちいた発現実験にてこれら3分子の細胞内での相互作用を検討した。さらに、これらの分子で構成される複合体の生物学的意義を調べるため、これら3分子を全て発現している神経幹細胞にレトロウイルスによるドミナントネガティブ分子の導入を行い、リガンドによる刺激下でのBrdUの取り込みを指標として、幹細胞の増殖という観点からこの複合体シグナルの重要性を検討した。

その結果、以下のことを新たに発見した。

- ① 従来 FRS2 $\alpha$ が FGFR の主要なドッキングプロテインであることは知られているが、それに加えて FRS2 $\alpha$ は EphA4 にも直接結合し、この受容体によりリン酸化を受ける。結合には EphA4 の活性化が必要である。
- ② EphA4 および FRS2 $\alpha$ は FGFR の JM ドメインの異なる領域に結合することで、ヘテロ 3 量体を形成する。
- ③ FGFR は EphA4 の JM ドメインに存在する Tyr 残基をリン酸化することにより EphA4 を活性化する。
- ④ EphA4 は全ての FGFR ファミリーメンバーと結合する。また、EphA4 のドミナントネガティブ分子は EphA4 と全ての FGFR との結合を阻害するだけでなく、両受容体の活性化をも強力に阻害する。
- ⑤ EphA4 および FGFR それぞれのリガンドである ephrin-A1 および FGF2 の刺激により、神経幹細胞が有意に増殖亢進を示し、それらの併用により相乗的な増殖亢進効果を示した。
- ⑥ 神経幹細胞に EphA4 または FRS2 $\alpha$ のドミナントネガティブ分子を発現させると、リガンド刺激の有無に関わらず細胞増殖を顕著に抑制した。

以上より、EphA4、FGFR、FRS2 $\alpha$ の3分子が複合体を形成することを明らかにし、この複合体を介したシグナルが神経幹細胞の増殖において重要な役割を担うという新たな知見を示した研究であり、学位論文として価値あるものと認めた。