

博士學位論文

内容の要旨

および

審査結果の要旨

平成24年度

和歌山県立医科大学

学位記番号	博(医)甲第469号		
学位授与の日	平成24年4月10日		
氏名	雑賀史浩		
学位論文の題目	CC-chemokine ligand 4/macrophage inflammatory protein-1 β participates in the induction of neuropathic pain after peripheral nerve injury (末梢神経傷害後のアロディニア形成に及ぼすケモカイン CCL4(MIP-1 β)の影響)		
論文審査委員	主査	教授 仙波 恵美子	
	副査	教授 近藤 稔和	教授 岸岡 史郎

論文内容の要旨

諸言

痛みは生体に対する警告系として生体防御に重要な役割を果たしているが、その一方で過剰な痛みは生活の質を大きく低下させる。がん性疼痛および糖尿病性神経障害など、末梢神経あるいは中枢神経系の傷害や炎症に起因する神経障害性疼痛はオピオイドを含む従来の鎮痛薬に抵抗性であり、適切な治療法が確立されていない。神経障害性疼痛は自発痛や痛覚過敏に加え、触刺激のような非侵害性の刺激により激しい疼痛が惹起されるアロディニアを特徴とする。その病態生理は未だ十分に理解されていないものの、近年では傷害神経周囲に浸潤するマクロファージなどの免疫細胞の役割が注目されている。これらはサイトカインなどの炎症性メディエーターを介して疼痛閾値に影響を及ぼすことが示唆されている。ケモカインは様々な免疫細胞の遊走や活性化に関与するサイトカインの1つであり、免疫反応に重要な役割を有している。これまでに数多くのケモカインが同定されているが、神経障害性疼痛における役割が明らかにされているものは少ない。本研究では神経障害性疼痛モデルを用いてCCケモカインの1つであるCCL4 (Macrophage inflammatory protein-1 β ; MIP-1 β)の役割について検討を行った。

方法

ICR系雄性マウス右後肢坐骨神経の約1/3を縫合糸で結紮(Partial sciatic nerve ligation: PSL)し、神経障害性疼痛モデルを作製した。対照(Sham)処置としては、坐骨神経の露出のみを行った。神経障害性疼痛は、その特徴的症状である触アロディニアおよび熱痛覚過敏の観察により評価した。触アロディニアは、金網上で馴化させたマウスの後肢を屈曲圧0.16gのvon Freyフィラメントで刺激し、その刺激に対する逃避反応率を指標とした。また、熱痛覚過敏は、透明なガラス板上で馴化させたマウスの後肢に放射熱を照射し、その逃避反応潜時を指標とした。薬物はいずれもPBSに溶解し、投与量を10 μ lとして坐骨神経周囲に局所投与した。坐骨神経を用いたRT-PCR、免疫染色はいずれも定法に従って行った。

結果

PSL処置により2週間以上持続する触アロディニアおよび熱痛覚過敏が惹起された。坐骨神経を用いたRT-PCR解析により、PSL処置6時間後から3日後までMIP-1 β mRNAの有意な増加が認められた。PSL処置1日後の坐骨神経における免疫染色によりMIP-1 β の顕著な増加が観察され、それはGFAP陽性シュワン細胞およびF4/80陽性マクロファージに局在していた。MIP-1 β 中和抗体(1-10ng)をPSL処置直後、3日後および6日後の坐骨神経周囲に3回局所投与すると、用量依存的に触アロディニアの形成が抑制された。しかしながら、PSL処置2週間後にMIP-1 β 中和抗体を局所投与しても、触アロディニアは抑制されなかった。PSL処置後の坐骨神経において炎症性サイトカイン(IL-1 β , TNF- α , IL-6)および炎症性ケモカイン(CCL3, CCL5)の発現増加が認められ、これらの発現増加はいずれもMIP-1 β 中和抗体投与により抑制された。リコンビナントMIP-1 β (1 μ g)を正常マウスの坐骨神経周囲に局所投与すると、2週間以上持続する触アロディニアが惹起された。またリコンビナントMIP-1 β 投与1日後

の坐骨神経において、TNF- α および CCL3mRNA の発現増加が認められた。MIP-1 β の受容体である CCR5 拮抗薬 (DAPTA; 100ng)を PSL 処置直後、3 日後および6 日後の坐骨神経周囲に3 回局所投与すると、触アロディニアおよび熱痛覚過敏が抑制された。

考察

本研究において、CC ケモカインである MIP-1 β が傷害後の坐骨神経においてシュワン細胞およびマクロファージに発現し、その受容体である CCR5 を介してアロディニア形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。またその作用は、炎症性サイトカインやケモカインの発現を介することを見出した。以上の結果より、末梢 MIP-1 β は神経障害性疼痛の新たな増悪因子であり、治療標的としての可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 24 年 4 月 2 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、審査を行った。神経系の傷害や炎症に起因する神経障害性疼痛は従来の鎮痛薬に抵抗性であり、新たな治療法の確立が求められている。一方、近年、神経障害性疼痛発現の機序として傷害神経に浸潤する免疫細胞の役割が注目されており、炎症性メディエーターを介した神経炎症が慢性疼痛の病態に密接に関与することが示唆されている。本論文は、動物実験モデルを用いて神経障害性疼痛における CC-chemokine ligand 4 (Macrophage inflammatory protein-1 β ; MIP-1 β) の役割について検討したものである。

動物は ICR 系雄性マウスを用い、神経障害性疼痛は坐骨神経部分結紮により誘発した。使用薬物はいずれも傷害神経周囲に局所投与した。MIP-1 β とその受容体である CCR5 経路を修飾する薬物として、MIP-1 β 中和抗体、CCR5 拮抗薬 (DAPTA) およびリコンビナント MIP-1 β を用いた。

その結果、

- 1) 傷害後の末梢神経において MIP-1 β の発現増加が認められ、それは傷害神経に遊走するマクロファージおよびシュワン細胞に局在していた。
- 2) 傷害初期に MIP-1 β -CCR5 経路を MIP-1 β 中和抗体または DAPTA で阻害すると、炎症性メディエーターの発現抑制および神経障害性疼痛の形成抑制が認められた。
- 3) リコンビナント MIP-1 β を坐骨神経周囲に局所投与すると、炎症性メディエーターの発現増加および神経障害性疼痛様の持続的な疼痛行動が惹起された。

以上より、学位申請者は、末梢神経の傷害により MIP-1 β が傷害神経周囲に発現増加し、その受容体である CCR5 を介して神経障害性疼痛形成に重要な役割を果たすことを明らかにするとともに、その作用の一部は、炎症性サイトカインやケモカインの発現に基づくことを見出した。

本論文は、神経障害性疼痛の病態生理学的機序の一部を明らかにした点で意義深いものであり、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470号		
学位授与の日	平成24年5月8日		
氏名	倉澤茂樹		
学位論文の題目	Factors influencing caregivers' burden among family caregivers and institutionalization of in-home elderly people cared for by family caregivers (在宅高齢者の家族介護者における介護負担感の変化および介護継続性に影響を与える要因の検討)		
論文審査委員	主査	教授 竹下達也	
	副査	教授 田島文博	教授 宮下和久

論文内容の要旨

【緒言】

在宅で介護する介護者は大きなストレスを経験することが確認されており、介護者の介護負担感の増大は要介護者の施設入所につながるとの報告もある。しかしながら、介護者のストレス軽減あるいは施設入所を予防するための方法は確立されていない。我が国では、今後、認知症高齢者や一人暮らしの高齢者が増加すると予想されており、できうる限り、住み慣れた地域で自立した生活を送ることが大きな課題となっている。本研究は、要介護高齢者の在宅介護についての縦断研究を行い、介護負担感の変化や施設入所に関連する要因を明らかにすることで、介護負担感の増大や施設入所を予防するための専門的介入への端緒を得ることを目的とした。

【方法】

大阪府下6ヶ所の居宅支援事業所を利用する65歳以上の要介護者(要介護1~5)と介護者203組を対象とし、そのうち、同意を得られた133組が調査に参加した(参加協力率65.5%)。調査方法は介護者への自記式アンケート及び、カルテからの書き取りである。1回目調査(T1)は2007年10月1日~10月31日、以降1年ごとに2回目(T2)および3回目(T3)調査を実施した。アンケートは担当介護支援専門員が自宅を訪問のうえ、介護者に手渡し、郵送にて回収した。調査項目は介護者と要介護者の性別および年齢、続柄、同居人数、介護時間、見守り時間、外出可能時間、介護期間、介護者の職業の有無、要介護度、要介護者の基礎疾患、日本語版 Zarit 介護負担尺度(J-ZBI)、抑うつ度(CES-D)、行動障害(NPI-Q 重症度のみ)、介護保険サービスの利用状況、1年ごとの帰結(継続、入所、死亡等)であった。なお、研究参加者と非参加者との間において、要介護者と介護者の年齢・性別、要介護者の要介護度と認知症の有無について、有意な差は認められなかった。

【結果】

ベースライン調査より、調査対象者133名の要介護者の平均年齢は81.9歳で42.1%に認知症が認められた。一方、介護者の平均年齢は63.5歳、67.7%が女性であった。抑うつ尺度により、介護者の42.9%が抑うつ状態であった。介護者の介護負担感が増悪あるいは高いレベルで維持された者はそうでない者と比べ、要介護者の認知症の割合が有意に高く、行動障害スコアも有意に高値であった。介護者では、介護時間が有意に長く、見守り時間も有意に長かった。介護サービスの利用状況は、通所介護の利用者が有意に多く、一方で通所リハビリテーションの利用は少ない傾向が示された。サービス全体の利用率は両群間に有意差は認めなかった。施設に入所した者は在宅介護を継続した者と比べ、要介護者の年齢が有意に高く、認知症の割合および行動障害の程度が有意に高かった。介護者に関しては、嫁であること、抑うつ状態であることが有意に関連していた。介護負担感には両群間で差を認めなかったが、カットオフ値を検討した先行研究から、両群ともに高値であることが推察された。介護サービスの利用状況では、サービス全体の利用率は入所群で有意に高かった。種目別にみると、入所群で短期入所の利用が有意に多く、継続群では住宅改修が有意に高い割合で利用されていた。また、入所群において通所介護の利用が多いとの傾向が示された。

【結語】

認知症の有無と認知症に伴う行動障害は介護負担感および施設入所に関連していた。介護負担感が増悪あるいは高いレベルで持続している者には通所介護を利用している者が有意に多かった。さらに、施設入所となった者でも通所介護を多く使用している傾向があった。介護負担感の軽減あるいは施設入所予防のための介入は、通所介護サービスの場を利用することを考慮すべきである。また、医師の診察や療法士によるリハビリテーションなどの医学的介入が効果的かもしれない。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成24年4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。

在宅で介護する介護者は大きなストレスを経験することが確認されており、介護者の介護負担感の増大は要介護者の施設入所につながるとの報告もある。しかしながら、介護者のストレス軽減あるいは施設入所を予防するための方法は確立されていない。我が国では、今後、認知症高齢者や一人暮らしの高齢者が増加すると予想されており、できうる限り、住み慣れた地域で自立した生活を送ることが大きな課題となっている。本論文は、居宅介護支援事業所を利用する要介護高齢者およびその介護者を2年間追跡した縦断研究である。介護者の介護負担感の増悪あるいは高いレベルでの維持、要介護者の施設入所といった観点から、要介護者および介護者の特性、介護サービスの利用状況などを検討し、専門的介入に向けての端緒を得たものである。

1. ベースライン調査より、調査対象者133名の要介護者の平均年齢は81.9歳で42.1%に認知症が認められた。一方、介護者の平均年齢は63.5歳、67.7%が女性であった。抑うつ尺度により、介護者の42.9%が抑うつ状態であった。
2. 介護者の介護負担感が増悪あるいは高いレベルで維持された者はそうでない者と比べ、要介護者の認知症の割合が有意に高く、行動障害スコアも有意に高値であった。介護者では、介護時間が有意に長く、見守り時間も有意に長かった。介護サービスの利用状況は、通所介護の利用者が有意に多く、一方で通所リハビリテーションの利用は少ない傾向が示された。サービス全体の利用率は両群間に有意差は認めなかった。
3. 施設に入所した者は在宅介護を継続した者と比べ、要介護者の年齢が有意に高く、認知症の割合および行動障害の程度が有意に高かった。介護者に関しては、嫁であること、抑うつ状態であることが有意に関連していた。介護負担感は両群間で差を認めなかったが、カットオフ値を検討した先行研究から、両群ともに高値であることが推察された。介護サービスの利用状況では、サービス全体の利用率は入所群で有意に高かった。種目別にみると、入所群で短期入所の利用が有意に多く、継続群では住宅改修が有意に高い割合で利用されていた。また、入所群において通所介護の利用が多いとの傾向が示された。
4. 介護負担感の軽減あるいは施設入所予防のための介入は、認知症や認知症に伴う行動障害に対処することが重要であり、通所介護サービスの場を活用することを検討すべきと考えられた。

以上、本論文は介護者における介護負担感の変化および要介護高齢者の施設入所に関連する要因を検討したものであり、今後、介護者の介護負担感の軽減や施設入所予防にむけた調査・研究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た。

学位記番号	博(医)甲第471号		
学位授与の日	平成24年5月8日		
氏名	井畑 淳子		
学位論文の題目	Cardio-ankle vascular index measures arterial wall stiffness Independent of blood pressure (心臓足首血管指数(CAVI)は血圧に依存しない動脈スティフネスの指標である)		
論文審査委員	主査	教授 三家 登喜夫	
	副査	教授 赤阪 隆史	教授 村垣 泰光

論文内容の要旨

【諸言】

糖尿病は心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の主要な危険因子であり、糖尿病患者においては動脈硬化症の早期診断が重要である。最近では簡便で非侵襲的な検査法として動脈の脈波伝播速度を測る brachial-ankle pulse wave velocity (baPWV) 法が用いられている。しかし、baPWV は測定時の血圧の影響が大きく経時変化を評価することが困難である。心臓足首血管指数(cardio-ankle vascular index:CAVI)は、動脈硬化を反映する新しい指標として開発された。この指標は、Bramwell-Hill の式とスティフネスパラメータβ理論に基づくものであり、非侵襲的に測定でき、理論上血圧に左右されないと考えられている。

本研究では糖尿病患者および非糖尿病患者において、①CAVI に及ぼす実際の血圧変動の影響を検証、②安静時 CAVI と臨床的因子や頸動脈硬化所見との関連性の検討により、糖尿病患者の動脈硬化症診断における CAVI の有用性を調べることを目的とした。

【対象および方法】

非糖尿病患者 35 例と糖尿病患者 33 例を対象とした。足首上腕血圧指数(ABI)<0.9、心・脳血管障害の既往者は除外した。前増殖期以降の網膜症、腎症 3 期以降の腎症患者は除外した。

① CAVI に及ぼす実際の血圧変動の影響

50 段の階段昇降による血圧上昇時と 10 分間の安静仰臥後に CAVI および baPWV を測定し、血圧変動に伴う変動を観察した。CAVI は血圧脈波検査装置(CAVI-VaSera™, VS-1000, フクダ電子, 東京)、baPWV は血圧脈波検査装置(form PWV/ABI™, コーリン, 東京)を用いて測定した。

② CAVI と臨床的因子や頸動脈硬化所見との関連性

頸動脈 B モード超音波検査にて左右の動脈壁を観察し、内膜中膜複合体肥厚度(intima-media thickness:IMT)やプラークの有無と、安静時 CAVI および baPWV との関連性を検討した。

さらに、安静時 CAVI および baPWV を従属変数、HbA1c、中性脂肪、総コレステロール、年齢、性別、体格指数、収縮期血圧を独立変数とする重回帰分析を行い、それぞれに関連する臨床的因子を検討した。

【結果】

① CAVI に及ぼす実際の血圧変動の影響

非糖尿病患者と糖尿病患者の階段昇降直後の血圧(mmHg)は 140-150/80-85 であったが、10 分間の安静仰臥後には 110-120/70-80 と有意に低下した ($p < 0.0001$)。血圧変動により非糖尿病患者の CAVI は右 $6.24 \pm 0.24 \rightarrow 5.81 \pm 0.16$, $p = 0.087$ (平均値 ± 標準誤差, paired t-test, 血圧上昇時 → 安静時)、左 $6.29 \pm 0.27 \rightarrow 5.81 \pm 0.17$, $p = 0.062$ 、糖尿病患者の CAVI は、右 $6.69 \pm 0.23 \rightarrow 7.07 \pm 0.18$, $p = 0.093$ 、左 $6.76 \pm 0.22 \rightarrow 7.17 \pm 0.17$, $p = 0.113$ と変動したが有意差はみられなかった。一方、baPWV は非糖尿病患者、糖尿病患者のいずれにおいても有意に低下した ($p < 0.001$)。

血圧変化前後の収縮期血圧(Δ SBP)と、CAVI および baPWV の変化量(Δ CAVI、 Δ baPWV)の相関を調べると、 Δ CAVI とは右 $R=0.165$ ($p=0.186$)、左 $R=0.167$ ($p=0.181$)と有意な相関はみられなかったが、 Δ baPWV とは右 $R=0.369$ ($p=0.003$)、左 $R=0.411$ ($p=0.001$)と有意な正相関がみられた。

② CAVI と臨床的因子や頸動脈硬化所見との関連性

安静時 CAVI と頸動脈 IMT の相関は $R=0.415$ ($p=0.0012$)、安静時 baPWV と頸動脈 IMT の相関は $R=0.468$ ($p=0.0002$)ととも有意な正相関を示した。また、頸動脈壁に動脈硬化性プラークを有する群の CAVI および baPWV は有さない群のものより有意に高値であった。

重回帰分析の結果、安静時 baPWV 上昇の有意な危険因子は年齢と収縮期血圧であったが、安静時 CAVI 上昇の危険因子は年齢と糖尿病であり、血圧は有意に関連する因子ではなかった。

【考察】

動脈硬化性疾患を予防するためには早期診断が重要である。動脈硬化の早期から変化をする動脈スティフネスの指標として、baPWV は簡便であるが測定時の血圧により測定結果が左右される点が問題であった。今回の研究成績では CAVI は baPWV とは異なり、血圧変動と有意な関連を示さなかった。

CAVI は測定時の血圧の影響が少ない動脈スティフネスの指標と考えられた。

したがって、個々の患者の動脈硬化の状態の経過観察あるいは治療効果の判定に役立つものと考えられた。

頸動脈超音波検査での IMT やプラークは早期動脈硬化性変化として確立したものである。本研究は CAVI と頸動脈の動脈硬化所見が有意に関連することを初めて示したものであり、CAVI が動脈硬化を反映することを確認することができた。

また、多変量解析で CAVI が HbA1c と有意に関連することを示し、高血糖が動脈スティフネスを上昇させる可能性を示した。

詳細なメカニズムは不明であるが、CAVI は糖尿病患者の早期動脈硬化の指標として有用であると考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 24 年 4 月 19 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

糖尿病は心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の主要な危険因子であり、糖尿病患者においては動脈硬化症の早期診断が重要である。日常臨床において簡便で非侵襲的な検査法として動脈の脈波伝播速度(brachial-ankle pulse wave velocity:baPWV)や頸動脈壁の性状を超音波で調べる頸動脈エコー法があるが、前者は測定時の血圧の影響が大きいこと、後者は検査に十分に習熟する必要があることなどの問題点がある。

本論文は、新しく開発された動脈壁のスティフネスの測定法である心臓足首血管指数(cardio-ankle vascular index:CAVI)に着目して、血圧変動が実際に CAVI に及ぼす影響や CAVI に関連する臨床的因子を糖尿病患者および非糖尿病患者において検討したものである。

最初の検討では、階段昇降直後の血圧上昇時と 10 分間の安静仰臥後に CAVI および baPWV の変動を観察した。その結果、baPWV が血圧変動と有意に相関するのは対照的に、CAVI は血圧変化と有意な関連性を示さなかった。次に、頸動脈超音波検査により測定された内膜中膜複合体肥厚度(intima-media thickness:IMT)やプラークと安静時 CAVI および baPWV との関連性を調べた。その結果、CAVI や baPWV は頸動脈 IMT やプラークの有無と有意に関連していた。

また、重回帰分析の結果、CAVI 上昇の危険因子は年齢と糖尿病であった。すなわち、CAVI は測定時血圧の影響が少ない動脈スティフネスの指標であり、糖尿病では早期から上昇することより、糖尿病患者の早期動脈硬化症の指標として有用であると結論できる。

これらの成績は、CAVI が早期動脈硬化の経時変化を観察する方法として有用であることを示しており、臨床的に非常に重要である。掲載されている Diabetes Research and Clinical Practice 誌のなかで 2008 年の Top-Cited Paper に選ばれたのもこの点が評価されたものと思われる。以上の観点より、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472号		
学位授与の日	平成24年7月10日		
氏名	西澤 哲		
学位論文の題目	HSP DNAJB8 Controls Tumor-Initiating Ability in Renal Cancer Stem-like Cells (熱ショックタンパク DNAJB8 は腎癌幹細胞の造腫瘍能を制御する)		
論文審査委員	主査	教授 山上裕機	
	副査	教授 井原義人	教授 原 勲

論文内容の要旨

緒言

腎癌は放射線療法および化学療法に抵抗性の癌の一つであり、根治切除不能な進行癌の治療に難渋する。近年、分子標的薬の出現により生存期間の延長を認めることが報告され現在の進行癌の標準治療として確立している。しかしながらこれらの治療によっても完全寛解が得られることはまれであり最終的には癌死に至ることがほとんどである。

腎癌は一般に免疫原性が高く、Interleukin-2 (IL-2) や Interferon- α (IFN- α)などのサイトカイン療法により完全寛解や長期生存が得られる症例が報告されてきた。このような非特異的な免疫療法で一部の症例に臨床効果が得られることが証明されているが、さらに癌特異的な免疫療法は進行腎癌に対する新たな治療戦略になりうる。実際、悪性黒色腫をはじめ種々の癌腫において cytotoxic T lymphocyte(CTL)が認識する癌特異抗原を用いた免疫療法により臨床的に腫瘍が縮小する症例が確認されている。しかし進行癌においては限られた CTL の数と比較して莫大な腫瘍細胞が存在するため、癌細胞すべてを傷害することは極めて困難である。

癌は形態学的、機能的に heterogeneous な細胞集団であり、その中に癌幹細胞 (Cancer stem-like cells/Cancer initiating cells; CSCs/CICs) と呼ばれる造腫瘍性の高い細胞集団の存在が報告されている (癌幹細胞仮説)。癌幹細胞は化学療法や放射線療法への抵抗性と関連し、治療後の再発・転移の原因と考えられている。さらに癌幹細胞は造腫瘍性が高く、癌幹細胞を標的とした治療は現在の癌治療の課題を克服する一助となり得る可能性がある。免疫療法として限られた CTL を利用して少数の造腫瘍性の高い細胞を標的とすることは莫大な腫瘍細胞が存在する進行癌の治療戦略としても理にかなっている。

今回我々は腎癌において癌幹細胞を同定し、癌幹細胞に有意に発現する抗原、DNAJB8 を同定した。そこで DNAJB8 の癌幹細胞における機能解析とその免疫原性について検討した。

方法

実験 I. 抗 DNAJB8 monoclonal 抗体の作成

DNAJB8 の recombinant 蛋白を作成し、Balb/c マウスに免疫後、脾臓を採取した。脾細胞を myeloma 細胞株 NS-1 と融合させ、抗体産生を確認した Hybridoma を限界希釈法でクローニングし、抗 DNAJB8 monoclonal 抗体を産生するクローンを得た。この抗体は免疫染色、Western blot に用いた。

実験 II. Side population(SP)法による癌幹細胞の同定

解析する細胞を Hoechst33342 蛍光色素で核を染色した。Flow-cytometer において染色性の弱い領域を Side population(SP)とし、癌幹細胞として同定した。さらに Cell sorter を用いて SP とそのほかの細胞 Main population (MP) を分離した。SP と MP の造腫瘍性を比較するために同系マウスおよび免疫不全マウスにそれぞれの腫瘍を接種した。

実験 III. 癌幹細胞における mRNA の発現の解析

分離した SP、MP から mRNA を採取し、RT-PCR により DNAJB8/Dnajb8、癌幹細胞関連蛋白の mRNA による発現を比較した。

実験 IV. DNAJB8 が SP に及ぼす影響の解析

DNAJB8 の強制発現株、siRNA により DNAJB8 を knock down した細胞株を用いて SP 細胞の増減と造腫瘍性を比較した。

実験 V. Dnajb8 を発現する DNA ワクチンの作成

発現ベクター pcDNA3.1 (Invitrogen) へ Dnajb8 の cDNA を挿入した。DNA プラスミドは大腸菌 BL21 で増幅し、Qiagen Endofree Plasmid Giga Kit (Qiagen) を用いて抽出した。Dnajb8 の発現はプラスミドを 293T 細胞へ transfection させ、Western blot 法で確認した。

実験 VI. Dnajb8 免疫マウスにおける抗原特異的 CTL 誘導の確認

ワクチンを接種した Balb/c マウスの脾細胞から MACS separation system (Miltenyi Biotec) を用いて CD8 陽性 T 細胞を採取し、ELISPOT assay により抗原特異的な IFN- γ の産生を検討した。

実験 VII. DNAJB8 の予防的免疫実験

Balb/c マウスの皮下へ DNA ワクチンを接種し、Balb/c マウス由来の腎癌細胞株 RenCa を接種し腫瘍径を測定した。

結 果

I. DNAJB8/Dnajb8 の発現 (mRNA, 免疫染色)

RT-PCR では正常組織では精巣を除いて発現を認めなかった。癌細胞株では弱い発現も含めすべての細胞株で発現を認めた。DNAJB8 に対する単クローン抗体を用いた免疫染色ではヒト、マウスともに精子・精子細胞に発現を認めた。腎尿管細胞は染色されず、腎細胞癌では一部の細胞の核が染色された。

II. SP 細胞に高発現する mRNA の解析と SP 細胞の造腫瘍性

腎癌細胞株 ACHN、マウス腎癌細胞株 RenCa とともに SP 細胞において幹細胞関連蛋白である SOX2/Sox2 の高発現を認めた。RenCa においては Oct3/4 の高発現を認めた。SP 細胞に DNAJB8/Dnajb8 の高発現を認めた。SP 細胞は MP 細胞と比較して高い造腫瘍性を有した。

III. DNAJB8 の発現が SP および造腫瘍性に及ぼす影響の検討

DNAJB8 の強制発現により SP 細胞の割合が増加し、knock down により SP 細胞は消失した。In vivo での造腫瘍能は強制発現により高くなる傾向を認めた ($p=0.08$)。DNAJB8 の knock down により造腫瘍性が低下した ($p=0.013$)。

IV. IFN- γ ELISPOT assay

Dnajb8 免疫マウスの脾細胞から採取した CD8 陽性細胞に抗原特異的な IFN- γ spot を認めた。

V. Dnajb8 の DNA ワクチン実験

Dnajb8 を含む DNA ワクチンを免疫したマウスにおいて RenCa の造腫瘍性は有意に抑制された。癌幹細胞・非幹細胞に共通に発現する抗原 Survivin を免疫したマウスと比較しても有意な腫瘍増大抑制効果を認めた。抗マウス CD4、CD8 抗体を腹腔内へ接種し CD4 および CD8 陽性 T 細胞を欠失したマウスにおいて DNA ワクチンの腫瘍抑制効果は減弱していた。

考 察

免疫染色において、DNAJB8 は精子もしくは精子細胞中に同定され、減数分裂後の精子形成に重要な役割を担う分子である可能性が考えられる。

Side population 法により腎癌幹細胞を同定した報告は過去にもあるが、癌幹細胞の最も重要な機能である高い造腫瘍能を示したのは、調べた限りでは我々が初めてである。DNAJB8 は腎癌幹細胞に優位に発現し、強制発現、si-RNA の実験により DNAJB8 は癌幹細胞の機能維持に関与することを証明した。DNAJB8 は SP 細胞を増加させるが、DNAJB8 強制発現株 (ACHN/DNAJB8) には MP 細胞も含まれる。ACHN/DNAJB8 の SP 細胞と MP 細胞の造腫瘍性を比較すると、SP 細胞の方が高い造腫瘍性を示すため、幹細胞の機能維持には共作用因子が存在していると考えられる。過去の報告において、DNAJB8 は細胞毒性によるタンパク凝集を抑制する機能を有し、その機能はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC; HDAC4, HDAC6, SIRT2) との相互作用が重要な役割を担っていると考えられている。こうした HDAC が癌幹細胞の機能維持の共作用因子となっている可能性が考えられる。我々は癌幹細胞抗原 (Dnjab8)、癌幹細胞、非幹細胞共通抗原 (Survivin) を用いて、免疫実験を行った結果、癌幹細胞抗原の優位な抗腫瘍効果を確認し、癌幹細胞を標的とした免疫療法が有用である可能性を示した。しかしながら、glioma の癌幹細胞は CTL 誘導を抑制するという報告もある。今回の抗腫瘍効果が確認された実験も予防実験であり、実際の治療では免疫による CTL 誘導がうまくいく保証はない。しかしながら免疫による再発予防や CTL の養子免疫療法は有用である可能性がある。また免疫により CTL をうまく誘導できれば、癌治療の break through となる可能性を秘めている。

結 語

1. 腎癌細胞においても癌幹細胞の存在が示され、同細胞群において DNAJB8/Dnjab8 の高発現を認めた。
2. DNAJB8/Dnjab8 は癌幹細胞の機能維持に重要な役割を担っている可能性が示された。
3. DNABJ8/Dnjab8 を標的とした DNA ワクチン療法はマウス腎癌細胞に対し有用であることが示された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 24 年 6 月 8 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。

高い造腫瘍能を有し、放射線療法や化学療法抵抗性とされる癌幹細胞を標的とした免疫療法を確立することを目的として、癌幹細胞優位に発現する抗原 DNAJB8 を同定し、その機能解析と免疫原性を検討したものである。

RT-PCR により DNAJB8 は正常組織において精巣のみに発現し、種々の癌細胞に発現を認める癌精巣抗原であることを示した。また免疫染色において腎尿細管細胞には DNAJB8 の発現を認めず、腎癌細胞では核における発現を確認した。癌幹細胞を分離・同定する代表的な手法である Side population (SP) 法を用いて、ヒト腎癌細胞株 ACHN、マウス腎癌細胞株 RenCa から、癌幹細胞が濃縮されているとされる SP 細胞を分離した。腎癌 SP 細胞は幹細胞様の発現を認め、かつ高い造腫瘍能を示し、癌幹細胞の濃縮集団であることを確認した。また SP 細胞に DNAJB8 が高発現していることを示した。腎癌細胞株に DNAJB8 を強制発現させると SP 分画が増加し、si-RNA を用いて knock down させると、SP 分画が消失した。DNAJB8 を強制発現させた細胞株は高い造腫瘍能を示し、knock down させた細胞は造腫瘍能を低下させた。したがって、DNAJB8 は癌幹細胞の機能維持に関わる分子である可能性が示され、癌幹細胞を標的とした免疫療法において、優れた標的抗原であると考えられた。さらに DNAJB8 の免疫原性を検討するために DNA ワクチンを用いた実験を行った。DNAJB8 由来の cDNA を含む DNA プラスミドワクチンを Balb/c マウスに接種したところ、免疫マウスの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) において抗原特異的な IFN- γ の産生を ELISPOT assay で確認した。また、DNAJB8 を免疫したマウスにおいて、in vivo で高い抗腫瘍効果を確認した。免疫マウスに抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体を i.p. することにより、CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞をそれぞれ欠失させると、腫瘍は増大し、この抗腫瘍効果は T 細胞依存性であることを確認した。

以上より本論文は、癌幹細胞抗原 DNAJB8 が癌幹細胞の機能維持に関わり、癌幹細胞を標的とした免疫療法の標的抗原となり得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473号		
学位授与の日	平成24年7月10日		
氏名	清水 敦史		
学位論文の題目	Coexpression of MUC16 and mesothelin is related to the invasion process in pancreatic ductal adenocarcinoma. (浸潤性膵管癌における浸潤に関与する遺伝子群の同定－MUC16 と mesothelin)		
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、Pancreatic intraepithelial neoplasms (PanIN)と称される前駆病変を経て浸潤癌へと進展するが、これまで浸潤癌とPanIN-3（上皮内癌）のマイクロアレイデータを比較した報告はなく、今回これを試みた。また、同定された遺伝子よりMUC16とmesothelinに着目し、それらの機能解析および臨床学的意義について検討した。

【方法】同一個体の切除膵癌組織より浸潤癌とPanIN-3細胞をマイクロダイセクションにより回収し、GeneChip Human U133 plus 2.0 array(Affymetrix社)によるマイクロアレイアッセイを行い、遺伝子発現を比較すると、浸潤癌でPanIN-3に比べて有意にup-regulateした18遺伝子が同定された。

同定された遺伝子の中で、浸潤癌で最も特異的に発現を認めたMUC16と、その相互作用が報告されているmesothelinに着目し、膵癌切除標本103例について免疫染色を行った。また両者の相互作用を検討する目的で二重蛍光染色、免疫沈降法を行った。MUC16/mesothelinによる膵癌における浸潤能を検討する目的で膵癌細胞株を用いて浸潤能アッセイを行った。

【結果】免疫染色において、MUC16とmesothelinは浸潤癌でのみ染色され、PanIN-3では染色されなかった。二重免疫染色、免疫沈降法によって両者は膵癌において結合していることが分かった。また、高頻度に浸潤先進部で腫瘍中心部より強発現し、膵癌の浸潤に関与することが推測された。さらに膵癌細胞株PK-9にshRNAを用いてMUC16を抑制させると、浸潤能、遊走能ともに抑制され、MUC16、mesothelinのblocking抗体OC125、M11を用いてMUC16とmesothelinの結合をブロックすると、同様に浸潤能、遊走能ともに抑制されたことから、MUC16、mesothelinは膵癌において相互に作用し、浸潤・転移に重要な役割を担っていることが分かった。切除膵癌症例103例におけるMUC16/mesothelinの発現と臨床病理学的因子との相関では、MUC16/mesothelin高発現群は、腫瘍径が大きく、膵前方組織浸潤、多臓器浸潤、リンパ管侵襲を高頻度に認め、生存因子解析ではMUC16/mesothelin高発現は独立した予後不良因子であった ($p=0.02$, HR 1.94, 95%CI 1.13-3.31)

【考察】浸潤性膵管癌において、MUC16とmesothelinは予後予測マーカーのみならず、新規膵癌治療ターゲットとなりうることが分かった。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成24年6月26日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

上記の内容は、膵浸潤癌とPanIN-3の遺伝子発現プロファイルを比較し、同定されたMUC16とmesothelinは膵癌において浸潤過程に関与し、その予後を不良とすることを初めて明らかにした。また、これらは新規治療標的となる可能性があり、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)甲第474号		
学位授与の日	平成24年7月10日		
氏名	李 洪 錦		
学位論文の題目	Severe ulceration with impaired induction of growth factors and cytokines in keratinocytes after trichloroacetic acid application on TRPV1-deficient mice (TRPV1 欠損マウスにおけるトリクロロ酢酸ピーリング後の角化細胞からの成長因子とサイトカインの誘導低下を伴う激しい潰瘍形成)		
論文審査委員	主 査	教授 雑 賀 司 珠 也	
	副 査	教授 近 藤 稔 和	教授 古 川 福 実

論文内容の要旨

研究の背景

カプサイシンの受容体として発見された Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)は、カプサイシンのほか熱、酸などさまざまな環境刺激によって活性化し、カルシウムイオンなどのカチオン流入を来すポリモーダル侵害受容チャネルである。神経における痛みやかゆみの受容だけでなく、上皮細胞や免疫細胞にも発現し、それらの細胞の活性化に働くことが分ってきている。我々は、外来異物に対する皮膚反応における TRPV1 の役割を明らかにすることを目指し、トリクロロ酢酸 (TCA) によるケミカルピーリングをモデルに、TRPV1 遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。

研究の方法

正常マウスの脳を陽性コントロールに、TRPV1 欠損マウスの組織を陰性コントロールに、マウス皮膚、表皮における TRPV1 の発現を RT-PCR によって検討し、さらに抗体を用いた免疫染色によってマウス皮膚、表皮シートにおける TRPV1 発現細胞をさらに詳細に検索した。

マウス足底の皮膚に 40% TCA を塗布した後の細胞傷害を TUNEL 法で、各種成長因子・サイトカインの産生を RT-PCR と免疫組織染色にて検討し、さらに背部皮膚に塗布した後の潰瘍形成と創傷治癒過程を検討し、TRPV1 欠損マウスとコントロール C57BL/6 マウスで比較した。

研究の結果

1) TRPV1 はマウス足底の表皮角化細胞に発現する

RT-PCR により野生型マウス皮膚と表皮での TRPV1 の mRNA の発現を認め、足底皮膚切片の免疫組織染色により、野生型マウス表皮角化細胞での TRPV1 蛋白の発現を認めた。

2) TRPV1 は TCA による表皮細胞障害に関与しない

40% TCA を塗布した足底皮膚において、TUNEL 法で検討した細胞傷害の誘導は野生型マウスと TRPV1 遺伝子欠損マウスで有意な差を認めなかった。

3) TRPV1 は TCA による表皮細胞由来成長因子・サイトカインの産生に必須である

40% TCA を塗布した足底皮膚を用いた RT-PCR による検討では、PDGF・VEGF・FGF・IL-1・TGF の mRNA の発現が、野生型マウスでは TCA 塗布 6 時間後をピークに一過性に上昇するのに対し、TRPV1 遺伝子欠損マウスでは TCA 塗布前は野生型よりもむしろ強いが、TCA 塗布後は上昇することなく速やかに低下した。

一方、野生型マウスでは塗布前後とも変わらず認めた IFN \cdot と IL-10 の mRNA の発現は、TRPV1 遺伝子欠損マウスでは塗布前は認めなかったが、塗布後間もなく野生型マウスと同レベルに達した。

さらに、免疫組織染色による検討では、PDGF-B、VEGF、FGF1/2、IL-1 \cdot 、TGF \cdot 蛋白の表皮細胞での発現が、野生型マウスでは塗布 6 時間後をピークに一過性に増強するのに対し、遺伝子欠損マウスでは変わらないかむしろ減弱していた。

4) TRPV1 は TCA ピーリング後の創傷治癒の促進に寄与する

背部皮膚を剃毛し 40% TCA を塗布して経時的に観察したところ、塗布 5 日後以降の潰瘍形成と創傷

治癒過程においては、遺伝子欠損マウスにおいて明らかに激しい潰瘍形成と治癒の遅延を認めた。

研究の考察

以上の結果から、表皮角化細胞に発現する TRPV1 は、TCA によって表皮角化細胞から産生される PDGF などの成長因子や炎症性サイトカインの産生に必須であり、創傷治癒を促進することで美容的効果を発揮することが示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 24 年 6 月 25 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め上記論文の審査を行った。カプサイシンの受容体として発見された Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) は、カプサイシンのほか熱、酸などさまざまな環境刺激によって活性化し、カルシウムイオンなどのカチオン流入を来すポリモーダル侵害受容チャネルである。我々は、外来異物に対する皮膚反応における TRPV1 の役割を明らかにすることを目指し、トリクロロ酢酸 (TCA) によるケミカルピーリングをモデルに、TRPV1 遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。

その結果として、TRPV1 は恒常的に表皮角化細胞に発現する。TCA 塗布後の表皮細胞傷害は TRPV1 に依存しないが、表皮細胞からの成長因子と一部のサイトカインの産生は TRPV1 に依存しており、それに伴い TCA 塗布後の潰瘍形成は TRPV1 欠損により増悪し治癒も遅延した。

これらの結果より、表皮角化細胞に発現する TRPV1 は、TCA によって表皮角化細胞から産生される PDGF などの成長因子や炎症性サイトカインの産生に必須であり、創傷治癒を促進することで美容的効果を発揮することが示唆され、臨床的に非常に重要である。以上の観点より、学位として価値があるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第475号		
学位授与の日	平成24年7月10日		
氏名	長田圭司		
学位論文の題目	Prevalence of cervical cord compression and its association with physical performance in a population-based cohort in Japan: the Wakayama Spine Study. (日本における一般住民の頸髄圧迫の有所見率と運動機能との関連)		
論文審査委員	主査	教授 仙波恵美子	
	副査	教授 金桶吉起	教授 吉田宗人

論文内容の要旨

頸髄症は発育性脊柱管狭窄を基盤とする病態であり、椎間板変性・骨棘形成・椎間関節変性などの頸椎症性変化、後縦靭帯骨化などから頸髄の圧迫を来し、その圧迫が高度になれば歩行障害を含めたADL障害が惹起される。慢性の頸髄圧迫は脊髄障害に伴う神経脱落症状を起こすが、その疫学的実態に関する研究は、世界的にみても存在しない。頸髄症の主因である頸髄圧迫の評価を行うにはMRIやミエログラフィーなどを用いた形態学的な画像が必須である。しかし、これまでの頸髄症に関する研究は病院症例を対象とした臨床研究が主流であるため、有病率、発症率や予後などの疫学指標を確定できなかった。そのため、効率的な予防対策を立てることも原因療法を開発することも困難であった。このような現状を打破し、効率的な予防対策に結びつけるため、本論文において、申請者らは頸髄症に関するMRI studyを行った。

その結果、

- 1) 頸髄圧迫病変の有病率は24.4%（男性29.4%、女性22.4%）で、男性に有意に多かった。
- 2) 年代別の有病率は、男女とも50歳代以降で年代の上昇にともない有病率が高くなった。
- 3) 頸髄圧迫ありの群でBabinski反射が陽性であるものはわずか3.4%であり、頸髄圧迫を有するものの、ほとんどがmyelopathic signを呈していなかった。
- 4) 頸髄圧迫を予見する運動機能は10秒テスト、6m最大歩行速度、5回椅子立ち上がりテストであり、いずれの項目も俊敏性を示す指標であった。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成24年6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。今回の結果は、頸髄圧迫はmyelopathic signを示す以前に運動機能に重要な影響を及ぼしていることを示唆するものである。上述のように住民検診において頸髄のcriticalな圧迫がある例はわずかであり、大半は軽度な圧迫である。しかしながら、subclinicalに頸髄圧迫が運動機能の低下を起こしていることは興味深く、今後早期発見・早期治療をすることにより、大きなテーマである介護予防の一助となりうる可能性がある。

本論文は、頸髄症の疫学的実態を一般住民を用いて、明らかにした点で意義深いものであり、学位論文として価値あるものであると認めた。

学位記番号	博(医)甲第476号		
学位授与の日	平成24年7月10日		
氏名	速水晋也		
学位論文の題目	Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers (LSD1の高発現はさまざまながん種において、染色体の制御を通してがん化に寄与する)		
論文審査委員	主査	教授 原 勲	
	副査	教授 近藤稔和	教授 山上裕機

論文内容の要旨

癌における epigenetic な異常は、癌研究において最も焦点の当たっている分野の一つである。タンパクメチル化、特にヒストンメチル化はヘテロクロマチン形成機構を通して癌化に寄与していると考えられている。cDNA microarray の data を基に、正常と比して癌において高発現しているタンパクメチル化に関与するメチル基置換酵素・脱メチル化酵素の中から、以下に示す3つの criteria に則って選別を行った。

1. 候補となる酵素の発現レベルは非腫瘍部と比較し、腫瘍部で著明に上がっている
2. 候補となる酵素の発現レベルは、正常組織においては非常に低いか、もしくは検出不可
3. 候補となる酵素は癌細胞の増殖に寄与している
(その酵素の発現を抑制することにより癌細胞の増殖を抑制することができる)

この criteria に基づき、膀胱癌・結腸/直腸癌・小細胞肺癌において正常と比較して著明に癌における発現が亢進していた LSD1 に着目した。LSD1 は膀胱癌・結腸/直腸癌・小細胞肺癌において、正常群と比較して腫瘍群では LSD1 の発現が統計学的有意に高くなっていた (それぞれ $p = 0.0004$, $p = 0.0009$, $p < 0.0001$)。膀胱臨床検体を用いて行った quantitative real-time PCR でも正常群と比して腫瘍群でその発現レベルが統計学的有意に高くなっていた ($p < 0.0001$)。免疫組織染色も行ったが、正常では LSD1 が局在する核において染色されないのに対し、膀胱癌では核が強く染色されており、タンパクレベルにおいても LSD1 の高発現が確認できた。また LSD1 を抑制する SW780・RT4 膀胱癌細胞株や A549・LC319 非小細胞癌細胞株・SBC 小細胞癌細胞株の細胞増殖を抑制することができた ($p < 0.05$)。細胞周期解析を行うと、LSD1 を抑制すると G₀/G₁ 期が増加し、逆に S 期が減少しているのが確認できたが、Caspase-3 活性は認めなかったため、LSD1 は G₁ 期から S 期へと進める役割を果たしている可能性が示唆された。さらに LSD1 抑制系を用いて microarray を施行したところ 72 遺伝子が up-regulate、198 遺伝子が down-regulate され、計 270 遺伝子が下流遺伝子として同定された。この下流遺伝子から pathway 解析を行うとクロマチンリモデリングやメチル化によるヘテロクロマチン形成といったクロマチン機能に関わるものが同定され、クロマチン制御によってヒトの癌化に関わってい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24年6月17日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。LSD1は正常組織と比較して癌組織において高発現し、LSD1を抑制することによって癌細胞の増殖を抑制することが可能であり、その機序としてLSD1はG₁期からS期へと進める役割を果たしている可能性が示唆された。LSD1を抑制する新規分子標的治療剤は正常細胞には最低限の影響で癌を抑制する可能性が期待され、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477号		
学位授与の日	平成24年8月7日		
氏名	黒井章央		
学位論文の題目	Clinical Characteristics of Patients With Kawasaki Disease and Levels of Peripheral Endothelial Progenitor Cells and Blood Monocyte Subpopulations (遠隔期川崎病患者における末梢血中血管内皮前駆細胞と単球サブセットの病態的意義に関する検討)		
論文審査委員	主査	教授 岡村吉隆	
	副査	教授 村垣泰光	教授 赤阪隆史

論文内容の要旨

【背景】

川崎病は1967年に発表された、いまだに原因不明の全身性血管炎であるが、近年も増加の一途をたどっている。発見当初の症例は、成人期に達し、今後生活習慣病を含めた動脈硬化因子の予防が必要になりつつあるが、遠隔期川崎病患者の心血管イベントリスクは不明な点が多い。炎症の後遺病変が遠隔期の動脈硬化の進展にどのような影響を与えるかを明らかにすることは、将来の心血管イベントリスクを予測することにつながり、川崎病の長期管理を考える上で小児科医のみでなく循環器内科医にとっても重要な課題である。

動脈硬化、特に粥状動脈硬化の初期段階において、血管内皮細胞の機能低下と、それに伴う単球の血管壁への浸潤は重要な過程である。近年、末梢血の単核球分画には血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) が存在することが報告され、これらの細胞は血管障害部位の内皮細胞を補充する作用があると考えられている。事実、EPCが末梢血中に少ない群では多い群に比し、有意に血管内皮機能が低下し、また心血管イベントが多いことが報告されており、EPCは血管内皮障害のバイオマーカーとなりうる。他方、ヒトの単球は大きく2つのサブセット、CD14+CD16⁻とCD14⁻CD16⁺に分類される。個々の単球サブセットは異なるケモカイン受容体を使い分け、病態や状況に応じて制御されていることが明らかになりつつあるが、川崎病において、どのように関与しているかは解明されていない。

本研究では遠隔期川崎病患者において、その重症度とEPCの量的変化にどのような関連性を有するかをフローサイトメトリー法にて検討した。また、遠隔期川崎病の重症度と単球サブセットとの関連性についてもフローサイトメトリー法を用いて検討した。

【方法】

対象：和歌山県立医科大学小児科外来通院中の遠隔期川崎病患者（発症後1年以上経過）31名と対照群10名の計41名を対象とした。川崎病患者群は、1)冠動脈瘤残存群（14名）、2)冠動脈瘤消退群（9名）、3)冠動脈瘤を形成しなかった群（8名）の3群とし、対照群を合わせた計4群間で比較検討を行った。

1. 遠隔期川崎病患者における冠動脈疾患危険因子と炎症マーカーの検討
収縮期血圧、拡張期血圧、総コレステロール、中性脂肪、LDLコレステロール、HDLコレステロール、body mass index (BMI)、高感度CRPの測定を行った。

2. EPCの量的変化と川崎病重症度の関連性の検討
EPCの表面マーカーであるCD34、KDR(Kinase insert domain receptor)に対する抗体を用い、フローサイトメトリー法を用いて、CD34+KDR+をEPCと定義し、その細胞数を測定した。

3. 単球サブセットと川崎病重症度の関連性の検討
単球の表面マーカーであるCD14、CD16に対する抗体を用い、フローサイトメトリー法にて単球サブセットの比率を検討した。

【結果】

1. 遠隔期川崎病患者における一般的な冠動脈疾患危険因子と炎症マーカーの検討

遠隔期川崎病患者群では対照群に比べ、脂質プロファイル、血圧、BMI、高感度CRPに関して有意な差をみとめなかった。

2. EPCの量的変化と川崎病重症度の関連性の検討

EPC数は冠動脈瘤残存群と冠動脈瘤消退群において対照群より有意に低下していた。また、冠動脈瘤を形成しなかった群と対照群ではEPC数に有意な差をみとめなかった。

3. 単球サブセットと川崎病重症度の関連性の検討

遠隔期川崎病患者3群と対照群において、単球サブセットの比率に有意な差はみとめられなかった。

【考察】

川崎病患者においては、脂質プロファイルの異常がみられ、それ自体が動脈硬化のリスクファクターであるとの報告もある。しかしながら、本研究においては冠動脈瘤残存群、冠動脈瘤消退群では脂質異常の有無に関係なく、EPCの減少を認め、血管内皮機能の障害が残存していることが示唆された。遠隔期川崎病患者、特に冠動脈瘤残存群や冠動脈瘤消退群では注意深い冠動脈リスクの経過観察と生活習慣に関する患者教育が必要であると考えられた。

末梢血中単球サブセットの検討に関しては、遠隔期川崎病患者3群と対照群において有意な差をみとめなかったが、粥状動脈硬化における単球の動態に関しては不明な点も多く、さらなる研究が必要である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成24年7月18日、審査委員は学位申請者の出席を求めて論文審査を行った。

川崎病は1967年に発表された、いまだに原因不明の全身性血管炎であるが、近年も増加の一途をたどっている。発見当初の症例は、成人期に達し、今後生活習慣病を含めた動脈硬化因子の予防が必要になりつつあるが、遠隔期川崎病患者の心血管イベントリスクは不明な点が多い。

動脈硬化、特に粥状動脈硬化の初期段階において、血管内皮細胞の機能低下と、それに伴う単球の血管壁への浸潤は重要な過程である。近年、末梢血の単核球分画には血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell: EPC）が存在することが報告され、これらの細胞は血管障害部位の内皮細胞を補充する作用があると考えられている。他方、ヒトの単球は大きく2つのサブセット、CD14+CD16-とCD14-CD16+に分類される。個々の単球サブセットは異なるケモカイン受容体を使い分け、病態や状況に応じて制御されていることが明らかになりつつあるが、川崎病において、どのように関与しているかは解明されていない。

本論文は遠隔期川崎病患者において、その重症度とEPCの量的変化や単球サブセットにどのような関連性を有するかをフローサイトメトリー法にて検討したものである。

遠隔期川崎病患者群では対照群に比べ、脂質プロファイル、血圧、BMI、高感度CRPに関して有意な差をみとめなかった。EPC数は冠動脈瘤残存群と冠動脈瘤消退群において対照群より有意に低下していた。また、冠動脈瘤を形成しなかった群と対照群ではEPC数に有意な差をみとめなかった。遠隔期川崎病患者3群と対照群において、単球サブセットの比率に有意な差はみとめられなかった。

川崎病患者においては、脂質プロファイルの異常がみられ、それ自体が動脈硬化のリスクファクターであるとの報告もある。しかしながら、本研究においては冠動脈瘤残存群、冠動脈瘤消退群では脂質異常の有無に関係なく、EPCの減少を認め、血管内皮機能の障害が残存していることが示唆された。以上より、遠隔期川崎病患者、特に冠動脈瘤残存群や冠動脈瘤消退群では注意深い冠動脈リスクの経過観察と生活習慣に関する患者教育が必要であると考えられた。本論文は川崎病遠隔期の病態に新たな知見を加えたものであり、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478号		
学位授与の日	平成24年11月13日		
氏名	石元優々		
学位論文の題目	Prevalence of symptomatic lumbar spinal stenosis and its association with physical performance in a population-based cohort in Japan: the Wakayama Spine Study (一般住民コホートにおける症候性腰部脊柱管狭窄症とその身体機能との関係: The Wakayama Spine Study)		
論文審査委員	主査	教授 仙波 恵美子	
	副査	教授 雑賀 司珠也	教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

<緒言>

近年 LSS は、腰下肢痛やしびれ、歩行障害により高齢者の生活の質 (quality of life; QOL) を著しく低下させる疾患であることが判明し、医療福祉のみならず社会経済的にも対策が重要な運動器疾患との認識が広がりつつある。退行変性に起因する LSS は今後ますます増加していくものと推察される。しかし現在に至るまで一般住民における LSS の有病率についてはあまり知られていない。本研究の目的は大規模コホートをを用い、LSS の有病率を調査すると共に LSS が高齢者の身体運動機能にどのような影響を与えているかを明らかにすることである。

<方法>

The Research on Osteoarthritis/osteoporosis Against Disability (ROAD) study は 2005 年より開始された、都市型コホート・山村型コホート・漁村型コホートの 3 地域から構成される骨関節疾患における大規模臨床研究である。The Wakayama Spine Study は 2008-2010 年に ROAD Study 第 1 次追跡調査の際、このサブコホートとして開始している。対象者は和歌山県の 2 地域 (山村型コホートと漁村型コホート) で行われた ROAD-study に参加した 1607 人のうち、MRI 検診の参加に同意した 1011 人 (男性 335 人、女性 676 人) である。この中で 2 人がペースメーカーを装着していたため、最終的には 1009 人 (男性 335 人、女性 674 人、平均年齢 66.3 歳) を対象に分析を行った。対象者は本体の ROAD study において、生活習慣など 400 項目を含む自己式質問票を記入し、身体測定値、足関節-上腕血圧比 (以下、ABI) を計測された。また身体運動機能調査では、6 m 歩行 (通常速度と最大速度)・いす立ち上がりテスト・片足立ちテストを実施した。また全参加者対象に、車両搭載型 MRI (東芝エクセラ-ト、1.5T) を使用し、診察と同日に撮影を行った。矢状面は全脊椎撮影を行い、横断面においては腰椎の各高位 (L1/2-5/S1) において撮影を行った。参加者全員に対し、脊椎外科医による腰・下肢症状に対する問診と診察を行った。また本研究では LSS を診断するにあたって独自の LSS の定義を作成した。これは臨床症状と画像所見の両方から成り立っている。臨床症状は、「殿部・下肢の痛み、もしくはしびれ、下肢神経脱落症状、会陰部症状のいずれかが存在する。またこれらの症状は、歩行・立位により誘発あるいは増悪し、前屈、坐位、臥位にて軽減が得られるという特徴がある。」であり、画像上の狭窄としては、「MRI 画像において、上記臨床症状がその狭窄病変で説明出来る」症例に対し、LSS と確定診断を下した。

<結果>

LSS 有病率は全体で 9.3%、男性 10.1%、女性 8.9%であった。女性は経年的に有意に有病率が高くなっていったが、男性では有意ではなかった。また LSS と診断された 94 人のうち 55 人 (58.5%) が間歇跛行を伴っていた。身体運動機能テストにおいて、最大歩行速度のみが LSS 群において非 LSS 群と比し有意に遅くなっていた。

<考察>

本研究の結果、世界で初めて一般住民における LSS 有病率が明らかになった。本コホートにおいて男

女とも約 10%が LSS を有していた。また有病率の分布においては男女差があり、女性は経年的に有病率が増加していたのに対し、男性では 60 歳代が最も高くその後は漸減していた。また身体運動機能と LSS との関係について、最大歩行速度のみ LSS と有意に関連していた。

現在に至るまで、LSS の有病率に関する報告はない。本研究が本邦・海外通じて初めの一般住民における LSS 有病率の報告である。有病率は男性の方が女性より少し高かったが有意な差は認めなかった。また男女で有病率の分布の違いを認めたが、この分布のパターンは男女とも変性腰椎症のそれと酷似していた。腰部脊柱管狭窄は腰椎の退行変性より生じるが、このことが分布のパターンが似ていることに影響しているかもしれない。

これまでに一般地域住民を対象に、LSS と身体運動機能との関連を調査した報告はない。本研究では身体運動機能テストのうち最大歩行速度においてのみ LSS 群が非 LSS 群と比し有意に低下していたが、他の身体運動機能は両群とも有意差がないことから、LSS を有していても一見日常生活動作には影響がないように思われる。しかしながら、通常歩行速度では有意差を認めず、最大歩行速度では有意差を認めたということは、LSS による機能低下はより負荷がかかるようなテストにより鋭敏に検出されると考えられた。

<結論>

一般住民コホートにおける LSS 有病率調査を行った。LSS 有病率は男女とも約 10%であったが、その分布に差がみられた。身体運動機能において最大歩行速度が LSS に有意に関連していた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 24 年 10 月 22 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

本論文は、一般住民コホートにおける、腰部脊柱管狭窄症の有病率とその運動機能との関連を調査したものである。

腰部脊柱管狭窄症（以下 LSS）は、腰下肢痛やしびれ、歩行障害により高齢者の生活の質（quality of life; QOL）を著しく低下させる疾患であり、今後ますます増加していくものと推察される。しかし現在に至るまで一般住民における LSS の有病率についてはあまり知られていない。これは過去の LSS 研究では病院を訪れた外来患者を対象としており、病院を訪れない軽症の患者は含まれていないからである。さらに LSS の確定診断を下す際に脊髄造影や MRI といった特殊画像検査が必要となる。しかしながら現在に至るまで地域住民を対象とした MRI を用いた LSS 調査は行われたことがない。今回の研究では一般住民コホートにおいて、車両搭載型 MRI を用い、LSS の有病率を調査するとともに、LSS が高齢者の身体運動機能（6 m 通常速度歩行と 6 m 最大速度歩行・いす立ち上がりテスト・片足立ちテスト）にどのような影響を与えているかを明らかにした。

本コホートにおいて LSS 有病率は全体で 9.3%、男性 10.1%、女性 8.9%であった。女性は経年的に有意に有病率が高くなっていったが、男性では有意ではなかった。また LSS と診断された 94 人のうち 55 人（58.5%）が間歇跛行を伴っていた。身体運動機能テストにおいて、最大歩行速度のみが LSS 群において非 LSS 群と比し有意に遅くなっていた。

現在に至るまで LSS の有病率についての報告はなく、また一般高齢者の身体運動機能への影響についても調査されたことはない。今回の疫学コホート研究により、今後ますます増加していくであろう LSS の予防・治療に対する必要不可欠な情報を提供していることから本論文を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479号		
学位授与の日	平成24年11月13日		
氏名	栗本美和		
学位論文の題目	Pretreatment of Leukemic Cells with Low-dose Decitabine Markedly Enhances the Cytotoxicity of Gemtuzumab Ozogamicin (白血病細胞において少量のデシタビン前投与はゲムツズマブ・オゾガマイシンの殺細胞効果を高める)		
論文審査委員	主査	教授 坂口和成	
	副査	教授 一瀬雅夫	教授 中熊秀喜

論文内容の要旨

【目的】

再発・難治性急性骨髄性白血病(Acute myeloid leukemia, AML)は薬剤耐性のため予後不良である。この耐性克服のため開発された新しい薬の1つである Gemtuzumab ozogamicin (GO)は、AML 細胞表面に高発現する CD33 蛋白を認識するモノクローナル抗体とカリケアマイシン毒素がリンカーを介して結合した分子標的薬である。しかし、再発・難治性 AML 患者に対する単剤での奏効率は 30%弱に止まっている (Cancer 2005)。

そこで、治療抵抗性白血病細胞に対して GO とは異なる作用機序で、骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndromes, MDS)で既に臨床応用されている Decitabine (DAC)や Valproic acid (VPA)や Azacitidine (AZA)を用いて最も効率よく GO の殺細胞効果を高める方法の開発を試みた。

【方法】

再発・難治性白血病のモデルとして、MDS 由来難治性白血病細胞や複雑な染色体異常を持つ AML 細胞株を 6 株(SKNO-1, SKK-1, SKM-1, U-937, K052, Kasumi-3)用いた。また、この研究は和歌山県立医科大学の倫理委員会の承認(No. 565)に基づき、同意の得られた再発・難治性白血病患者の単核球を使用した。

1. 殺細胞効果

細胞傷害を測定するために AnnexinV/PI 二重染色法とフローサイトメトリーを用いた。細胞浮遊液に 100 nM DAC を添加し、最大 72 時間まで培養した。次に 2.5 µg/ml の GO を添加して、さらに 24 時間培養した。DAC の代わりに 2 µM AZA または 1 mM VPA も用いた。それぞれ triplicate assay を少なくとも 2 回以上繰り返し再現性を確認した。

2. DAC の GO 効果増強機序

(1) CD33 膜発現と細胞内への取り込み: DAC を 48 時間処理前後での CD33 細胞表面抗原の発現をフローサイトメトリー法で調べた。また、DAC を 48 時間前処理した細胞に、抗 CD33 抗体を 1µg 添加しさらに 4 時間培養した。この処理前後の細胞に Biotin 結合ラット抗マウス IgG 抗体 (5 µg/ml in 2%BSA, PBS)を加え、その後、PE 結合 Streptavidin (5 µg/ml in 2%BSA, PBS)で標識し、フローサイトメトリーで測定した。

(2) 細胞外への薬剤くみ出し: 抗がん剤の細胞外くみ出しにかかわる蛋白質 MDR1 および MRP1 活性について、DAC 48 時間処理前後の細胞をフローサイトメトリーで解析した。また、DAC 48 時間培養前後の細胞から抽出された mRNA を RT-PCR を用いて解析した。

(3) DNA 傷害活性: 100 nM DAC で 48 時間処理前後の細胞から DNA を抽出し、37°C で 90 分または 120 分間 150µg/ml の GO を加えた。0.8% agarose gel 電気泳動後、エチジウムブロマイド染色した。

統計解析: 2 群間の比較には Student unpaired *t* test を行い、*P* 値が 0.05 以下を有意とした。

【結果】

GO, DAC, VPA, AZA は単剤では殺細胞効果は乏しかった。また、DAC は GO 投与の 48 時間前に投与すると併用効果が最大となり、DAC 前処理は全ての AML 細胞株の GO 効果を増強した。その効果の程度には細胞間で差があった。特に、K052 細胞と SKM-1 細胞では GO 単剤投与に比し 2 倍以上に GO 効果を増強した。

VPA と AZA も同様に調べたが、有意に増強効果を認めた細胞は 6 株中 DAC が 4 株、VPA が 3 株、AZA が 1 株で、その増強効果の平均は、DAC が 2.02、VPA が 1.87、AZA が 1.27 であった。これらより、DAC の前投与が最も GO の効果を高めることがわかった。

次に、DAC が GO の効果を高める機序について調べた。(1) CD33 膜発現と細胞内への取り込み：CD33 発現は全ての細胞株で認め、その発現量と GO 感受性に相関はなかった。DAC 前処理による CD33 発現増強や、GO の取り込み増加はみられなかった。(2) 細胞外への薬剤くみ出し：K052 細胞でのみ、DAC 前処理により薬剤のくみ出しタンパクである MRP1 活性および MRP1 発現量が低下した。(3) DNA 傷害活性：K052 細胞と SKM-1 細胞においてのみ、DAC 前処理により、DNA 傷害が増強された。

最後に、臨床検体を用いて DAC の GO 効果増強を調べたところ、難治性 AML の患者から分離した腫瘍細胞では、14 例中 4 例(29%)で増強効果が認められ、その程度は様々であった。

【考察】

epigenetic な異常を是正する薬剤 (DAC, VPA, AZA) は、難治性 AML 由来細胞株に対する GO の殺細胞効果を増強させた。特に、少量の DAC 前投与が最も GO の効果を高めた。併用効果の少なくとも一部は、DNA 傷害増強や薬剤くみ出し抑制によるものであった。また、再発・難治性 AML 患者から分離した新鮮な白血病細胞においても、14 例中 4 例 (29%) で DAC 前投与による GO 増強効果が生体外で確かめられた。

これは DAC, AZA が脱メチル化等を通じて何らかの細胞応答を促し、その結果 GO 作用増強に至っていることを示唆する。しかし、MDS や AML において、genetic および epigenetic 変化は多岐にわたるため、我々が見出した以外の機序により GO 作用が増強されている可能性も残る。

我々は、少量の DAC による前処置と、それに続く GO の併用が再発・難治性 AML に対して有望な治療薬となる可能性を示した。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成24年10月26日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

Gemtuzumab ozogamicin (GO)は、AML 細胞表面に高発現する CD33 蛋白に対するモノクローナル抗体とカリケアマイシン毒素が結合した分子標的薬である。予後不良である再発・難治性 AML の克服のため開発された分子標的薬の 1 つであるが、単剤での奏効率は 30%弱である。

上記論文において、治療抵抗性白血病細胞に対して GO とは異なる作用機序で、MDS で既に臨床応用されている DAC や AZA や VPA は GO の殺細胞効果を高めることが示された。特に、少量の DAC による前処置と、それに続く GO の併用が最も GO の効果を高めた。以上の結果は、少量の DAC による前処置と、それに続く GO の併用が再発・難治性 AML に対してすぐにも臨床応用可能な新しい治療法になることを示しており、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480号		
学位授与の日	平成25年1月8日		
氏名	谷島裕之		
学位論文の題目	Snail protein expression as a hallmark of gastric carcinoma in biopsy samples (Snail タンパクの発現は生検組織で胃癌と診断する上での有用なマーカーである)		
論文審査委員	主査	教授 村田晋一	
	副査	教授 山上裕機	教授 村垣泰光

論文内容の要旨

[背景・目的]

転写因子である Snail は、E-cadherin の E-box と呼ばれるプロモーター領域に結合することで、E-cadherin 遺伝子の発現を抑制する働きを持つ。癌細胞が浸潤、転移していく際には、E-cadherin が抑制されることで細胞間接着が失われ、さらに形態的にも上皮系細胞から紡錘型の間葉系細胞の様に変化することが知られており、これは EMT (epithelial-mesenchymal transition) と呼ばれている。Snail は EMT を調整する重要な因子の一つである。また、上皮系細胞が EMT を起こすと、間葉系細胞のマーカーの一つである Vimentin の発現が増強されることも知られている。

以前より胃癌において、Snail の過剰発現と転移、予後不良因子との関連が示されているが、これらの報告では外科的切除が行われた標本を用いての検討であった。本研究では、胃粘膜の生検材料を用いて Snail タンパクの免疫組織染色を行い、Snail タンパクの発現が胃癌の診断をするうえで重要なバイオマーカーになり得るかどうかを検討する目的で、その発現と組織学的因子との関連を検討した。

[材料と方法]

和歌山県立医科大学第1病理科にて得られた、249 個の胃粘膜の生検標本を対象とした。そのうち 43 例が胃炎、41 例が胃腺腫、そして 165 例が胃癌と診断された。

免疫組織染色は、生検組織を 4%ホルマリンで固定しパラフィン包埋切片を作成。4 μ m に薄切し、スライドガラスに固定した。抗 Snail 抗体、抗 E-cadherin 抗体、抗 Vimentin 抗体による一次抗体反応 4°C で over night した。二次抗体反応の後、En Vision HRP system を用いて発色し、核染を行った。

免疫組織染色の評価は、標本の臨床病理学的データを知らされていない 2 名の病理医によって行われた。Snail に関しては細胞の核が染色されている場合を陽性細胞とした。染色陽性細胞数が 1% 以下の場合、Snail 陰性とし、10% 未満を陰性、10% 以上 20% 未満を低発現、20% 以上を高発現と定義した。E-cadherin、Vimentin に関しては 10% 以上の細胞が染色されている場合を陽性と定義した。

Snail の発現と胃癌の組織型、性別、腫瘍の局在との関連性、胃炎、胃腺腫、胃癌それぞれの病理診断における Snail の発現と E-cadherin、Vimentin 発現との関連性について χ^2 test で検討した。いずれのデータも SPSS (version 13.0 SPSS Inc, Chicago, USA) を用いて解析し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

[結果]

1. Snail 発現と胃炎、胃腺腫、胃癌との関連性

Snail の発現は胃炎 43 例中 4 例 (9%)、胃腺腫 41 例中 7 例 (17%) で認められた。一方胃癌では 165 例中 155 例 (93.9%) で陽性であり、有意に高率に発現していた ($P < 0.001$)。

2. 胃癌での Snail 発現と組織型、性別、腫瘍の局在との関連性

高分化型腺癌 36 例中 35 例 (97.2%)、中分化型腺癌 48 例中 48 例 (100%)、低分化型腺癌 51 例中 51 例 (100%)、印環細胞癌 30 例中 21 例 (70%) で Snail の発現が認められたが、組織型

と Snail 発現の間に有意な相関関係は認められなかった ($P=0.362$)。また、Snail の発現と性別、腫瘍の局在部位の間に相関関係は認められなかった ($p=0.771$ 、 $p=0.381$)。胃癌組織では癌細胞だけではなく間質細胞にも Snail 発現が認められた。

3. 胃腺腫と胃炎での Snail と E-cadherin、Vimentin 発現の関連性

胃腺腫ならびに胃炎で、E-cadherin の発現と Snail 発現との間に負の相関が示された ($p=0.024$ 、 $p=0.034$)。一方 Vimentin の発現と Snail 発現との間には正の相関関係が認められた ($p=0.021$ 、 $p=0.031$)。

4. 胃癌組織型別の Snail と E-cadherin、Vimentin 発現の関連性

高分化型胃癌では Snail と E-cadherin 発現の間に負の相関が ($p=0.031$)、Snail と Vimentin 発現の間には正の相関が認められた ($p=0.025$)。他の組織型でも同様に、中分化型腺癌 ($p=0.039$ 、 $p=0.032$)、低分化型腺癌 ($p=0.019$ 、 $p=0.023$)、印環細胞癌 ($p=0.042$ 、 $p=0.044$) と全ての組織型において有意な相関が認められた。

[結語]

胃癌組織において癌細胞が浸潤性に増殖する際に EMT により癌細胞が紡錘形細胞に変形するが、その癌細胞の形質変化に Snail 遺伝子の発現が関係することが知られていた。胃正常組織または良性腺腫では、腺上皮細胞は間質浸潤しないことより Snail 発現はみられない。本研究では、その Snail に関する理論的発想に基づき、胃の生検組織において Snail タンパクの発現が良性胃粘膜と胃癌組織を免疫染色によって判別可能であるかを検証したものである。結果として胃生検組織において、核内に陽性反応が見られる Snail の免疫組織染色により、完全には染め分けられないにしても、胃炎や胃腺腫を含む良性病変と、胃癌とを判別するのに有用であることが示された。このことから、胃生検組織診断の際の腺腫と癌の境界病変において、p53 や Ki67 に加えて有効な補助マーカーになる可能性が考えられた。

また Snail 発現と E-cadherin 発現との負の相関、並びに Snail 発現と Vimentin 発現との正の相関が証明された。このことから胃の生検組織標本においても癌の転移や浸潤に強く関連する EMT が起こってい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24年12月12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。

SnailはE-cadherin遺伝子のE boxに結合し、E-cadherinの発現を抑制する転写抑制因子であり、上皮性悪性腫瘍における上皮間葉移行 (EMT) において中心的な働きを有する分子である。種々の癌組織において癌細胞の浸潤とSnail発現との関連について報告されており、胃癌の切除標本においても、Snailの過剰発現と転移、予後不良因子との関連が示されてきた。本研究では、胃粘膜の生検材料を用いてSnailタンパクおよびEMTにおける上皮、間葉細胞のマーカーであるE-cadherinとVimentinの免疫組織学的検索を行い、Snailタンパクの発現が胃癌の診断をするうえで重要なバイオマーカーになり得るかどうかを検討する目的で、その発現と組織学的因子との関連を検討した。

249例の胃粘膜の生検標本を対象とし、そのうち43例が胃炎、41例が胃腺腫、そして165例が胃癌と診断された。免疫組織染色の結果、Snailの発現は胃炎43例中4例 (9%)、胃腺腫41例中7例 (17%) で認められたのに対し、胃癌では165例中155例 (93.9%) で陽性であり、有意に高率に発現していた ($P<0.001$)。胃癌でのSnail発現と組織型、性別、腫瘍の局在との関連性に関しては、高分化型腺癌36例中35例 (97.2%)、中分化型腺癌48例中48例 (100%)、低分化型腺癌51例中51例 (100%)、印環細胞癌30例中21例 (70%) でSnailの発現が認められたが、組織型とSnail発現の間に有意な相関関係は認められなかった ($P=0.362$)。また、Snailの発現と性別、腫瘍の局在部位の間に相関関係は認められなかった ($p=0.771$ 、 $p=0.381$)。胃癌組織では癌細胞だけではなく間質細胞にもSnail発現が認められ、EMTにより間質へ浸潤した癌由来細胞と考えられた。

胃腺腫と胃炎でのSnailとE-cadherin、Vimentin発現の関連性に関しては、E-cadherinの発現とSna

il発現との間に負の相関が示され ($p=0.024$ 、 $p=0.034$)、Vimentinの発現とSnail 発現の間には正の相関関係が認められた ($p=0.021$ 、 $p=0.031$)。また、胃癌組織型別において高分化型胃癌ではSnailとE-cadherin発現の間に負の相関が ($p=0.031$)、Snail とVimentin発現の間には正の相関が認められた ($p=0.025$)。他の組織型でも同様に、中分化型腺癌($p=0.039$ 、 $p=0.032$)、低分化型腺癌($p=0.019$ 、 $p=0.023$)、印環細胞癌($p=0.042$ 、 $p=0.044$)と全ての組織型において有意な相関が認められた。

これらのことより、胃生検組織において、Snailの免疫組織染色を行うことは胃病変の良性・悪性の判定に有用であること、特に境界領域病変においてp53やKi67と併用することにより良性病変と胃癌とを判別する有用マーカーになり得ることが示された。

以上より本論文は、胃癌組織において癌細胞がEMTにより間質浸潤し、Snailが胃癌診断における有効な補助マーカーになる可能性を示し、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481号		
学位授与の日	平成25年3月5日		
氏名	生駒 顕		
学位論文の題目	Ischemic effects of transcatheter arterial embolization with N-butyl cyanoacrylate-lipiodol on the colon in a Swine model. (豚モデルにおける結腸枝に対するNBCA-Lipiodolを用いた経カテーテル動脈塞栓術による虚血性変化の検討)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕 機	
	副査	教授 加藤 正 哉	教授 佐藤 守 男

論文内容の要旨

【緒言】消化管出血に対する経カテーテル動脈塞栓術(Transcatheter arterial embolization: TAE)の有用性が、1972年に Rosch らによって報告された。最初は凝血塊が塞栓物質として使用され、その後、一時的塞栓物質であるゼラチンスポンジ細片(gelatin sponge particle: GSP)が使用されるようになり、その他、永久塞栓物質である金属コイルが使用されてきた。現在では、金属コイルはマイクロカテーテルの発展によりマイクロコイルとして使用される。最近、永久液体塞栓物質である N-butyl cyanoacrylate ; NBCA の使用が制御不能な急性期動脈出血に対して報告されるようになり、GSP やマイクロコイルにとってかわるようになった。

NBCA は脳外科領域の動静脈奇形・動静脈瘻や仮性動脈瘤に対して高い有用性が報告されている。NBCA は Na⁺ と反応し、重合することにより即効性の塞栓物質となる。また、リピオドール (lipiodol: Lp) と混合することにより X 線にて確認可能となる。Lp との混合割合により、NBCA の重合時間が変化する。最近では、凝固障害を伴う消化管出血の止血に対して有効な塞栓物質として報告されている。

臨床的に上腸間膜動脈 (superior mesenteric artery: SMA) の塞栓は不整脈を誘発したり、小腸の壊死を招く。Jae らは NBCA-Lp を用いて SMA を塞栓し、vasa recta 3 本までの塞栓なら犬モデルでは小腸壊死は起こらないと報告している。虚血に関して、大腸は毛細管レベルで側副路発達が少なく、小腸よりも弱いと考えられている。大腸の NBCA-Lp を使用した急性期出血に対する塞栓術がしばしば行われるが、その安全性に関する基礎的研究は行われていないのが実情である。

本研究の目的は、大腸に対する NBCA-Lp を用いた TAE における安全性を明らかにし、正常豚における NBCA-Lp に対する生体反応を調査することである。

【対象と方法】対象は正常豚 9 頭 (57~64kg) である。まず、全例に前投薬として、ケタミン 5mg/kg と硫酸アトロピン 0.08mg/kg を筋注後、5%isoflurane を吸入させた後に気管挿管し、2%isoflurane と酸素 2L/min で全身麻酔下に手技を行った。アプローチは右大腿動脈から Seldinger 法にて 5Fr. シース (SuperSheath, Medikit, Tokyo, Japan) を留置し、手技を開始した。塞栓血管は腸間膜動脈分枝 9 本とした。内訳は下腸間膜動脈 (inferior mesenteric artery: IMA) の分枝 6 本。右結腸動脈の分枝が 2 本。左結腸動脈の分枝が 1 本である。5Fr. shepherd hook type catheter (Medikit) を使用して SMA あるいは IMA にカテーテリゼーションを行い、その後、2.5Fr. マイクロカテーテル (Renegade-18, Boston Scientific, Natick, MA, USA) と 0.014-inch マイクロガイドワイヤー (Transend EX, Boston Scientific) を用いて目的血管を選択した。

1ml の NBCA と 4ml の Lp を、三方活栓を用いて混合し、混合比 20% の NBCA-Lp の液体塞栓物質を作製した。混合比の決定には以前の報告を参考に行った。

塞栓物質の注入前に、まず、標的血管を確認し、造影剤にて test injection を行い、注入速度を確認した。その後、5% の glucose を NBCA の重合を防ぐために注入した。塞栓物質の注入は、塞栓物質の注入を他分枝に逆流しないように血管撮影下で行い、注入量は 0.1~0.4ml とした。まず 0.1ml から注入を開始し、数本の vasa recta の閉塞をもって手技を終了とした。

遅発性の穿孔、出血・壊死も考慮して TAE 後の完全な組織学的梗塞を確認するため、すべての豚を塞栓後 72 時間後に殺した。その後、臓器摘出を行い、肉眼的観察を行った。また、摘出した臓器

の X 線撮影を行い、Lp の分布を確認すると同時に、標本作成範囲を決定した。その後、摘出した臓器は 10%formalin にて固定した。その後、パラフィン切片を作製し、Hematoxylin-Eosin(H-E)染色にて組織障害の程度をそれぞれのグループで比較検討した。

粘膜層、粘膜下層、筋層の虚血性変化を比較するために、統計学的解析は Mann-Whitney U test を用い、有意水準 5% で検討した。

【結果】9 頭の正常豚のうち、8 頭は塞栓後無症状であったが、1 頭 (sigmoid-rectal branch より 0.4ml 注入した例) で多量の下血がみられたが、バイタルは変化しなかったため、3 日後にすべてと殺できた。

① 切除大腸の X 線写真による検討

Sigmoid-rectal branch より塞栓した 6 頭のうち、1 頭 (NBCA-Lp を 0.1ml 注入) はカテーテリゼーション時に根元部が spasm になった。2 頭 (NBCA-Lp 0.1ml 注入) は marginal artery を含む vasa recta 3 本の塞栓となった。残り 3 頭 (NBCA-Lp を 0.4ml 注入) は marginal artery を含む vasa recta 5 本の塞栓となった。右結腸動脈の分枝を塞栓 (NBCA-Lp を 0.1ml, 0.2ml 注入) した 2 頭では、marginal artery を含む vasa recta 3 本の塞栓となった。左結腸動脈の分枝を塞栓した 1 頭 (NBCA-Lp を 0.1ml 注入) では、marginal artery を含む vasa recta 5 本の塞栓となった。

以上、NBCA-Lp 塞栓の程度により、3 つのグループに分類した。すなわち、group A : vasa recta に NBCA-Lp が認められなかったもの、group B : vasa recta 3 本以上の塞栓が確認されたもの、group C : vasa recta 5 本以上の塞栓が確認されたもの、の 3 グループである。Vasa recta 4 本の塞栓は確認されなかった。

② 肉眼的所見の検討

凝固・浮腫は切除結腸の全ての塞栓領域で観察された。Group A と Group B では結腸壁の壊死は観察されなかった。Sigmoid-rectal branch より NBCA-Lp を 0.4ml 注入した Group C の 3 頭では、結腸壁の過度な壊死が認められた。左結腸動脈より NBCA-Lp を 0.1ml 注入した 1 頭では結腸壁の中等度の壊死が認められた。

③ 組織学的所見の検討

Group A では、壊死巣は結腸全体に観察されなかった。Group B では、3 頭の豚で結腸全体に組織障害は観察されなかったが、1 頭の豚では、粘膜層、粘膜下層の壊死がみられ、一部に筋層壊死もみられた。壊死範囲は、約 1/4 周にわたる範囲であった。Group C では 4 頭全てに粘膜層、粘膜下層、筋層の全周性の壊死が認められた。Group B と Group C では、粘膜層 ($p=0.011$)、粘膜下層 ($p=0.015$)、筋層 ($p=0.015$) と壊死範囲に有意差が認められた。Group B の 2 頭、Group C の 4 頭では粘膜下層に NBCA-Lp による塞栓血管が観察された。塞栓血管の内腔は bubble-like-space が認められ、血管内皮細胞は脱落し、炎症性細胞の浸潤が増生していた。中膜は薄くなり、炎症性細胞で置換されていた。NBCA-Lp 塞栓子が偏在性に見られる動脈では、塞栓子と中膜が近接するに従って、中膜壊死が塞栓子の存在する内腔側から広がる様子が観察された。しかし、このような中膜壊死は凝血に接した部位では認められなかった。

【結語】結腸枝の動脈塞栓術は、小腸と同様、marginal artery や vasa recta 3 本までの塞栓なら虚血に耐えられるが、5 本以上の塞栓になると虚血障害がおこりえる。今回の我々の実験は正常豚での実験であるが、実際の臨床場においては、できるだけ選択的な塞栓を心がけ、多くの vasa recta を閉塞させないように心掛ける必要がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成24年5月29日、論文審査委員は学位申請者の出席のため、上記論文について審査を行った。本論文は、結腸枝に対する N-butyl-2-cyanoacrylate-Lipiodol 混合液 (以下、NBCA-LPD) を用いた経カテーテル的動脈塞栓術 (transcatheter arterial embolization:以下、TAE) の安全性について述べたものである。近年、マイクロカテーテルの発達とその技術の進歩により、上部消化管出血のみならず、憩室出血等の下部消化管出血に対しても、TAE が施行されつつある。しかし、結腸は小腸に比し、marginal artery を含む capillary level での吻合が少ないため、より虚血に弱いと考えられてきた。それにもかかわらず、結腸に関する安全性について、いまだ基礎的検討がなされていない。学

位申請者は、正常豚を用いて、結腸枝における NBCA 塞栓術を行い、塞栓術後の結腸に関して、病理組織学的に虚血性変化の有無、程度について検証し、安全性について基礎的に検討した。

正常豚 9 頭の結腸動脈 9 本（下腸間膜動脈の分枝 6 本、左結腸動脈の分枝 1 本、右結腸動脈の分枝 2 本）を lipiodol で 4 倍希釈した NBCA を用いてそれぞれ塞栓した。4 倍希釈の根拠は文献的に最も使用されていたからに依る。塞栓 72 時間後に結腸を摘出し、組織標本を作製し、H・E 染色にて組織障害の有無、程度を評価した。近位塞栓の 1 例では、結腸の壊死は認められなかった。Marginal artery を含む vasa recta 3 本の塞栓を行った 4 例中、3 例では異常なく、1 例では粘膜下層までの表層壊死と限局的な筋層壊死が認められた。Marginal artery を含む vasa recta 5 本以上の塞栓を行った 4 例では、全例で結腸壁の全層壊死が認められた。

以上の結果より、結腸枝の NBCA-LPD を用いた腸間膜動脈塞栓術は、vasa recta 3 本までの塞栓では比較的安全であるが、限局性筋層壊死の生じる場合があり、安全性を確保するためにはできるだけ選択的な塞栓術を行うべきであると思われた。今回の動物実験による基礎的検討は、今後の臨床応用の基盤となるものであり、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482号		
学位授与の日	平成25年3月5日		
氏名	桂 婷		
学位論文の題目	MicroRNAs that target Ca ²⁺ transporters are involved in vascular smooth muscle cell calcification (カルシウム輸送体を標的とするマイクロ RNA は血管平滑筋細胞石灰化に関与する)		
論文審査委員	主査	教授 村田 晋一	
	副査	教授 井原 義人	教授 村垣 泰光

論文内容の要旨

緒言

klotho 変異マウス (*kl/kl*) は、慢性腎疾患 (CKD) により起こる骨・電解質代謝障害に類似した、高リン血症に起因する早期老化と血管石灰化を現わす。この血管石灰化は、ミネラル代謝調節異常に大きく影響されており、Pi と Ca 濃度の上昇によりその程度が加速されることが疫学研究からわかってきた。しかしながら血管石灰化に Pi と Ca の異常がどの様に関与するのかはまだ完全に分子レベルで理解されていない。マイクロ RNA (miRNA) は約 22 ヌクレオチドの大きさの、内因性で蛋白をコードしない一本鎖 RNA で、新しいクラスの遺伝子調節因子と見なされている。miRNA は正常な発生過程と生理的条件下だけでなく病的な過程でも重要な役割を果たしている。心臓血管生物学でのそれらの役割の研究は今まさに始まったばかりである。miRNA は心血管系で発現されているが、血管病における miRNA の役割は依然として不明である。本研究では、*kl/kl* マウスを使用して、miRNA が血管平滑筋細胞石灰化に関与しているかどうかを調べた。また、miRNA が *in vitro* および *in vivo* で、Pi と Ca により誘発される血管平滑筋細胞石灰化に対して調節効果を持っているかどうかを検討した。miRNA の中の特定のグループが血管石灰化において重要な役割を果たしているという仮説を立て研究を行った。

方法

実験動物

kl/kl マウスは日本クレア株式会社から購入した。ホモ接合マウスはヘテロ接合マウスを交配して得た。

細胞培養および石灰化の誘導

大動脈血管平滑筋細胞は 7 週齢の野生型 (WT) マウスから酵素解離法により得た。Pi と Ca の傾斜濃度は、塩化カルシウムとリン酸二水素一ナトリウムを使用して、10%FBS 添加ダルベッコ変法イーグル培地を含む次の 4 種の溶液を作成した。コントロール溶液 (1.0 mM Pi + 1.8 mM Ca)、高 Pi 溶液 (2.0 mM Pi + 1.8 mM Ca)、高 Ca 溶液 (1.0 mM Pi + 2.7 mM Ca)、高 Ca + Pi 溶液 (2.0 mM Pi + 2.7 mM Ca)。すべての実験で、これらの培養液で血管平滑筋細胞を 7 日間インキュベートした。

石灰化の定量

血管平滑筋細胞の石灰化は、フォン・コッサ染色によって同定した。血管平滑筋細胞におけるカルシウム沈着の定量は、カルシウムの比色アッセイキットを用いて決定した。

Fluo4 染色

細胞内カルシウム濃度は、Fluo-4 NW キットを用いて測定した。平均蛍光レベルは、ツァイス LSM 700 顕微鏡システムを用いて 3 つの別々の実験で各時点での細胞に対して計算された。 $[Ca^{2+}]_i$ の実験値を計算するために方程式 $[Ca^{2+}]_i = K_{dCa} \cdot (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ を使用した。

培養平滑筋細胞における miRNA のノックダウンと過剰発現

miRNA の模倣と阻害は、(キアゲン、バレンシア、CA)、製造元の指示に従ってトランスフェクション試薬 (Qiagen) を用いてトランスフェクトすることにより行った。

マイクロアレイ解析

3 週齢の WT と *kl/kl* マウスの大動脈中膜から単離した血管平滑筋細胞から miRNeasy キット (Qiagen) を使用して total RNA を抽出した。Total RNA 500ng を Hy5 で標識し、3D-Gene (東レ) にハイブリダイズさせた。

ウエスタンブロット分析

大動脈中膜および培養血管平滑筋細胞から単離されたタンパクは、NCX1 (1:2000、サンタクルス)、NCKX4 (1:2000)、または PMCA (1:2000、アブカム) 抗体で反応させた。

統計分析

すべての実験は、少なくとも3つの独立した実験で繰り返し行った。データは平均±SD で表し、t 検定とニューマン・クールズテスト (SPSS、13.0) と一方向 ANOVA によって分析した。データは $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

結果

1. Pi と Ca は in vivo および in vitro で血管平滑筋細胞石灰化の誘導に相乗効果を持つ。

kl/kl マウスの大動脈中膜の石灰化は3週令から観察されたが、WT の大動脈では観察されなかった。フォン・コッサ染色は、高 Pi と Ca の培地で処理した培養血管平滑筋細胞における石灰化を示した。高 Pi と Ca で処理した培養血管平滑筋細胞は Ca 単独処理と比べて Ca 含量の増加を示した。

2. 多くの miRNA が *kl/kl* マウスの大動脈中膜平滑筋細胞で発現される

miRNA アレイの結果、17種の miRNA が WT マウスと比較して3週齢 *kl/kl* マウスでは3倍 (LOG₂ 比) 以上に増加したことがわかった。その中の miR-135a *, miR-762、miR-714、および miR-712 * の標的遺伝子として、カルシウム輸送蛋白質をコードする遺伝子である NCX1、PMCA1 および NCKX4 がデータベース miRanda-mirSVR を使用することにより見つけられた。miR-135a *, miR-762、miR-714、および miR-712 * は、3週齢と4週齢の *kl/kl* マウスの大動脈中膜平滑筋細胞に高発現された。miR-135a *, miR-762、miR-714、および miR-712 * の発現レベルは、高 Pi・高 Ca の培地で処理した培養血管平滑筋細胞において上昇したが、高 Ca 培地のみのもの有意な変化は検出されなかった。

3. NCX1、PMCA1、と NCKX4 は、miR-135a *, miR-762、miR-714 および miR-712 * の標的遺伝子である可能性がある。

NCX1、PMCA1 と NCKX4 の発現レベルは WT マウスと比較して3週齢と4週齢の *kl/kl* マウスから大動脈中膜の mRNA およびタンパクレベルで減少された。培養血管平滑筋細胞における、NCX1、PMCA1 と NCKX の mRNA および蛋白レベルは、高 Pi と高 Pi・高 Ca の培地で処理した後に減少した。

4. miR-135a *, miR-762、miR-714、および miR-712 * の過剰発現は血管平滑筋細胞における NCX1、PMCA1 と NCKX4 のタンパクレベルを減少させる。

miRNA mimics によって個々の miRNA の過剰発現は NCX1、PMCA1 と NCKX4 の mRNA レベルを減少させた。また、これらの miRNAs の発現増加は NCX1、PMCA1 と NCKX4 のタンパク発現を抑制した。

5. miRNA の阻害は、カルシウムポンプのタンパクレベルを復元し、Pi と Ca 誘発性血管平滑筋細胞石灰化の程度を減少し得る。

miR-135a *, miR-762、miR-714、および miR-712 * の阻害剤は miRNA レベルを抑制するが、ネガティブコントロールでは miRNA レベルに影響を及ぼさなかった。さらに、miRNA の阻害剤は、高 Pi・高 Ca で処理された血管平滑筋細胞における NCX1、PMCA1、と NCKX4 のタンパクレベルを復元させた。mRNA レベルでは NCX1 のみの増加が観察された。また、4種全ての miRNA の阻害剤で処理したものと処理しない培養血管平滑筋細胞を高 Pi・高 Ca 処理後のカルシウム含有量の定量により比較すると、阻害剤で処理したもので適度な減少を示した。この結果は、フォン・コッサ染色により得られた結果と一致した。さらに miRNA の阻害剤の混合物で培養血管平滑筋細胞を処理すると、高 Pi 負荷後の最大細胞内 Ca 濃度を約 20% 低下させた。これらの結果は、Ca²⁺輸送体は、Pi 誘発性血管平滑筋細胞石灰化に関与していることを示唆している。miRNA を阻害することが細胞内 Ca 濃度を減少させることによって石灰化の程度を減らすことができることを示すものである。

結論

1. *kl/kl* マウスの大動脈の中膜平滑筋細胞と高リンと高カルシウムで誘導される培養血管平滑筋細胞内で miR-135a *, miR-762、miR-714 および miR-712 * の発現が増加する。

2. NCX1、PMCA1 と NCKX4 はそれぞれの miR-135a *, miR-762、miR-714、および miR-712 * の標的遺伝子である。

3. miR-135a *, miR-762、miR-714、および miR-712 * とその標的遺伝子である PMCA1、NCX1

と NCKX4 は、高リン高カルシウムで誘導される血管平滑筋細胞石灰化との関連を持ち、治療標的物質としての可能性を有する。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成24年7月17日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

粥状硬化症やメンケベルグ型動脈硬化症における血管石灰化は血管病変の予後を不良にする合併症として重要な病態であるが、その成因については十分わかっていないのが現状である。

klotho変異 (*kl/kl*) マウスでは高リン・高カルシウム血症により早期（生後3週令）から大動脈に高度な石灰化を発症し、血管石灰化の良いモデルとなる。また、マイクロRNA (miRNA) は新しいクラスの遺伝子調節因子であり、正常な発生過程と生理的条件下だけでなく病的な過程でも重要な役割を果たしていることがわかってきた。本研究では *kl/kl* マウスと培養血管平滑筋細胞を用いて、高リン・高カルシウムで誘導される血管平滑筋細胞石灰化における miRNA の変動を検索した。まず生後3週令の野生型および *kl/kl* マウスから大動脈中膜を単離した後、RNA を抽出して miRNA アレイを行った。その結果、*kl/kl* マウスにおいて17種の miRNA が WT マウスと比較して3倍 (LOG₂比) 以上に増加し、それらの miRNA の標的遺伝子をデータベース miRanda-mirSVR を使用して検索すると、4種の miRNA (miR-135a*、miR-762、miR-714、miR-712*) の標的遺伝子はカルシウム輸送蛋白質をコードする NCX1、PMCA1 および NCKX4 であった。高リン・高カルシウムを負荷して石灰化を起こした培養血管平滑筋細胞においても4種の miRNA の発現が増加し、標的遺伝子のタンパク量が減少していた。これら4種の miRNA の標的遺伝子がそれぞれ NCX1、PMCA1 および NCKX4 であることを実証するために、*in vitro* の実験系において、miRNA mimics と inhibitors を用いて標的遺伝子の mRNA およびタンパク発現を検索した。その結果、miRNA mimics 処理した細胞での標的遺伝子発現は石灰化状態の細胞と同様に mRNA とタンパクレベル両方において抑制され、miRNA inhibitors では非石灰化状態の発現量に復活した。またその時、石灰化を示す細胞内カルシウム含量も減少していた。さらに培養血管平滑筋細胞を用いて Fluo-4 染色をすることで miRNA inhibitors によって最大細胞内カルシウム濃度が約70%減少することを示した。これらの事から *kl/kl* マウスの大動脈中膜平滑筋細胞と、高リン・高カルシウムで誘導される培養血管平滑筋細胞内で miR-135a*、miR-762、miR-714 および miR-712* の発現が増加し、これらが標的遺伝子である NCX1、PMCA1 と NCKX4 の発現を抑制することにより細胞内カルシウム濃度が増加して血管平滑筋細胞の石灰化が生じるという分子メカニズムが考えられた。

以上の結果より、高リン・高カルシウムで誘発される血管平滑筋細胞石灰化の病因として、カルシウムポンプを標的とする miRNA 発現が関与し、これらの miRNA に対する阻害剤が将来的に血管石灰化の治療標的物質の一つとして用いられる可能性が示されたことから、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483号		
学位授与の日	平成25年3月5日		
氏名	瀧口 登		
学位論文の題目	Distinct degree of radiculopathy at different levels of peripheral nerve injury. (腰神経傷害部位で根性疼痛の発現強度に差が生じるのか - 動物モデルを用いた行動学、組織学、電気生理学的解析 -)		
論文審査委員	主査	教授 仙波 恵美子	
	副査	教授 中尾 直之	教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

【目的】

整形外科の診療において根性疼痛を訴える患者は少なくない。一般的に後根神経節 (Dorsal Root Ganglion; DRG) が傷害されると強い根性疼痛が生じるとされているが、DRG、及び DRG 周辺の腰神経傷害部位の違いにより、その疼痛発現強度に差が生じるかは不明である。今回我々は成熟ラットを用いた傷害部位の異なる根性疼痛モデルを作成し、行動学、組織学、電気生理学的観点から、根性疼痛発現強度について評価、検討をした。

【方法】

5週齢 Sprague-Dawley ラットを使用した。ペントバルビタール (50mg/kg) にて腹腔内麻酔し、腹臥位で背側中央を約 3cm 皮切し、エピネフリン添加 0.5% リドカインを棘突起の両側に局注し、傍脊柱筋群を腰椎から剥離した。5 倍の顕微鏡下で右半椎弓切除し、椎間孔を開窓することで右第 5 腰神経を露出した。そして DRG より中枢側 2mm を結紮した群を C 群、DRG を結紮した群を D 群、DRG より末梢側 2mm を結紮した群を E 群とした。非手術群を A 群、右第 5 腰神経を露出のみ施行した群を B 群とした。各群の選択はランダムに行った。処置後 7 日で、以下の 3 項目について評価した。

1. von Frey hair を用いた疼痛誘発試験

傷害側である右足底を 10g von Frey hair を用いて 10 回刺激し、逃避反応回数を記録した。処置前と比較して処置後反応回数が増加したものをアロディニアの発現と捉えた。

2. L5 髄節の脊髄後角における活性化ミクログリアの発現数

ミクログリアに特異的なカルシウム結合タンパク質である抗 Iba 1 抗体 (Anti ionized calcium binding adaptor molecule 1) を用いて免疫組織染色を行い、L5 髄節の脊髄後角における活性化ミクログリアの発現数を計測した。

3. インビボ・パッチクランプ法による脊髄後角細胞における興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current; EPSC) の記録

ウレタン腹腔内麻酔 (1.2g/kg) にて、胸腰移行部を中心に背側中央を皮切し傍脊柱筋群を剥離した。さらに胸腰椎移行部を椎弓切除し、固定器に設置後、右 L5 髄節の脊髄膠様質細胞にインビボ・パッチクランプ法を適用して EPSC の頻度、振幅を記録した。

統計学的処理は Student's t test、ANOVA、Tukey-Kramer 法を用いた。

【結果】

von Frey hair (各 n=10) を用いた逃避回数は、A 群 0.3±0.2 回、B 群 1.1±0.5 回、C 群 3.9±0.5 回、D 群 7.9±0.5 回、E 群 6.2±0.3 回であった。活性化ミクログリア数 (各群 n=5) は A 群 77.2±2.5、B 群 80.0±2.1、C 群 202±8.0、D 群 354±8.1、E 群 292±6.6 であった。EPSC (各 n=10) の頻度は A 群 9.0±1.4Hz、B 群 9.4±1.3Hz、C 群 14.6±1.7Hz、D 群 19.2±2.0Hz、E 群 17.3±2.1Hz であった。また振幅は A 群 12.3±0.6pA、B 群 14.4±1.0pA、C 群 19.8±1.6pA、D 群 37.7±2.2 pA、E 群 28.3±2.4pA であった。

各項目で A-B 群間で有意差はなく、B 群と結紮群間 (C、D、E 群) で有意差を認めた。さらに興味深いことに各項目で結紮群間に有意差を認め、その程度は D 群、E 群、C 群の順であった。

【考察】

末梢神経損傷モデルを用いた種々の論文が散見されるが、DRG から近位、遠位へ同距離 (2mm)、同程度の結紮モデルを使用して疼痛を評価した報告は渉猟しえる範囲では存在せず、我々は成熟ラットを用いて傷害部位の異なる根性疼痛モデルを作成し、行動学、組織学、電気生理学的観点から、根性疼痛について多角的に解析した。von Frey hair を用いた機械刺激による疼痛誘発試験、脊髄後角における活性化ミクログリア発現数、及び EPSC の頻度、振幅ともに、傷害部位が DRG、DRG より末梢、DRG より中枢の傷害順でそれぞれ一致して有意に増加していた。本結果から、腰神経傷害部位によって誘発される疼痛の程度と脊髄内変化に差が生じることが明らかとなり、腰神経傷害部位によって根性疼痛の発現強度が異なることが示唆された。

腰神経傷害部位の違いにより各項目で差が生じた原因として、血流と栄養分布の違いが挙げられる。DRG より中枢の腰神経は DRG より末梢の腰神経に比べ血流が多い。また DRG より中枢の腰神経の栄養分布は脳脊髄液から 58%、血管から 38%であるのに対し、DRG より末梢の腰神経は血管栄養が 95%である。つまり腰神経結紮により血流が低下しても、DRG より中枢では脳脊髄液からも栄養されるため、結紮による神経損傷程度に差が生じるのではないかと推測された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 24 年 8 月 8 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

近年、根性疼痛の発現には脊髄後角におけるミクログリアが関係していることが報告されており、末梢神経が傷害されるとミクログリアは細胞の肥大化とアミーバ状の突起を呈した形態学的変化をきたすとされている。また末梢神経で得た疼痛の情報は A δ 、C 線維を経て、脊髄後角でグルタミン酸によるシナプス伝達を介して中枢へ伝達され、その程度は patch clamp 法から EPSC を記録することで観察可能とされている。今回学位請求者は傷害部位の異なる根性疼痛モデルを作成して、行動学、組織学、電気生理学的観点から根性疼痛の発現強度について評価、検討をした。その結果は von Frey hair を用いた疼痛誘発試験、L5 髄節の脊髄後角における活性化ミクログリアの発現数、in vivo patch clamp 法による脊髄後角細胞における EPSC の頻度・振幅、いずれの項目においても DRG での傷害、DRG より末梢での傷害、DRG より中枢での傷害の順で症状や傷害の程度が大きかった。

根性疼痛発現強度に差が生じた理由としては、DRG より中枢側は DRG より末梢側に比べ血流が豊富であるということ、また DRG より中枢は脳脊髄液、血管から栄養分布されているのに対し、DRG より末梢では血管栄養のみであるということなど解剖学的特徴の違いが可能性として考えられた。

以上、学位請求者の論文は腰神経傷害部位の違いにより根性疼痛の発現強度に差が生じることを行動学、組織学、電気生理学的観点から証明した最初の論文である。本論文は根性疼痛のメカニズム解明の一助となり得る可能性を示唆するものであり、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484号		
学位授与の日	平成25年3月5日		
氏名	池田敬子		
学位論文の題目	Arginine inactivates <i>human herpesvirus 2</i> and inhibits genital herpesvirus infection (アルギニンによるヒトヘルペスウイルス2の不活化ならびに性器ヘルペス感染の抑制)		
論文審査委員	主査	教授 岩橋秀夫	
	副査	教授 岸岡史郎	教授 西尾真智子

論文内容の要旨

【緒言】

一般に、ウイルス不活化薬（消毒薬）は薬剤耐性ウイルスの出現の可能性を考える必要がなく、また、ウイルス種を越えて多様なウイルスに有効で、細菌の二次感染や混合感染にも使える点に大きな利点があるが、組織障害性も持つため利用法が限定され治療薬として用いることはできない。我々は、微酸性アルギニンが種々のエンベロープウイルスに対して不活化作用を持つことを明らかにしてきたが、タンパク質を構成するアミノ酸のひとつであるアルギニンは相対的に穏和な条件でウイルス不活化作用を示し、全身投与はできないが体表面における表在性ウイルス感染に対しては化学療法薬（予防薬・治療薬）として使える可能性も考えられた。そこで、抗ウイルス活性についても検討すると同時に、マウスを用いた性器へのヒトヘルペスウイルス2感染に対する作用を検討した。

【材料と方法】

ウイルスとしてはヒトヘルペスウイルス2 186株（以下、HHV-2と略）を用いた。アルギニンは、20mM 酢酸緩衝液に規定濃度に溶かしたものを塩酸でpHを正確に調整して用いた。アルギニンのウイルス不活化作用は、アルギニンを含む各種被検緩衝液190 μ lにHHV-2 10 μ lを加えて混和し指定条件下で保温したあと、残存感染性ウイルス量を測定した。また、アルギニンの抗ウイルス作用は、HHV-2感染HEp-2細胞の培養液にアルギニン溶液（pH7.0）を加えて培養し、指定の時間に生じた感染性子孫ウイルス量を測定した。マウス（Balb/c、4週齢メス）を用いた性器への感染阻止作用は、マウス性器にHHV-2を接種後2、12、24時間、2、3、4、5、6、7、8日後に種々の条件のアルギニン溶液及び対照溶液を性器に投与し、感染マウスの生存日数を調べた。HHV-2のヒト性器への感染は表在感染にとどまるが、マウス性器への感染では性器でのウイルス増殖と病変に続いて脳炎を起こし、死亡することが知られている。

【結果と考察】

(1)HHV-2はpH4.3という弱酸性条件下では弱い不活化を受けるだけであるが、1Mアルギニン（pH4.3）はウイルスを効果的に不活化した。不活化の程度はアルギニン濃度に依存する。同じpHでも1MNaClでは不活化がみられず、0.1Mクエン酸でも弱い不活化しか見られなかったことから、ウイルス不活化にとって酸性pHやイオン強度だけでは十分ではないことが明らかとなった。

(2)アルギニンによるHHV-2不活化は急速に起こる反応であり、酸性pHで効果的であるが、アルギニンによる不活化をNaClやクエン酸と比べると、これらよりは穏やかな酸性条件下でも顕著な不活化が進み、中性pHでも濃度依存的にウイルスを不活化できることを見出した。

(3)ウイルスを不活化するだけでなく、細胞の生存率に有意の影響を与えない濃度下でアルギニンはHHV-2増殖を抑制した。子孫ウイルスの収量はアルギニンの存在下では同じ濃度のNaCl存在下よりも有意に低く、アルギニン濃度に依存して増殖抑制が見られた。

子孫ウイルス収量に与えるアルギニン添加時期の効果とウイルスの一段増殖曲線とを比べた結果、ウイルス DNA 合成の完了する感染 6 時間目までの添加では強い阻害がみられるが、6 時間目以降も 12 時間目に至るまで明瞭な阻害効果が認められ、アルギニンが HHV-2 の増殖において DNA 複製以後の後期過程でもウイルス増殖を阻害することを見出した。

(4) マウスに経膣ルートで HHV-2 を感染すると脳炎を起こしてマウスは死ぬが、感染後に膣内に酸性アルギニン溶液を投与すると感染マウス死が顕著に抑制され、アルギニンは性器での HHV-2 感染を抑制できる可能性が示唆された。

【まとめ】

体表での表在性ウイルス感染に対する予防・治療薬としての応用を念頭に、微酸性アルギニンの HHV-2 に対する不活化作用（消毒作用）とウイルス増殖抑制作用（抗ウイルス作用）について検討し、微酸性条件下でアルギニンが顕著で即効性の消毒作用を持つこと、弱いながらも抗ウイルス作用を示すことを明らかにした。マウスを用いた実験的 HHV-2 性器感染系でのアルギニンの効果を調べたところ、*in vivo* における性器感染成立阻止効果が明瞭に示された。限定的な疾患に対してのみであっても消毒薬（不活化薬）を微生物感染の予防薬または治療薬として用いることができれば緒言で指摘した通り、その意義は大きい。看護の立場からも組織障害の少ない手指の消毒薬としての広範なニーズが考えられ、組織障害のない病原微生物不活化薬の探索とその応用法について今後も研究が必要であると考えている。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成24年12月26日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。ウイルス不活化薬（消毒薬）は、安価、且つ、薬剤耐性変異株を生じる可能性のない点に利点があるが、組織障害性を持つため治療薬として用いることはできない。申請者らは、これまでにアルギニンが種々のエンベロープウイルスに対して不活化作用を持つことを明らかにしてきた。アルギニンはタンパク質を構成するアミノ酸のひとつであり組織障害性は低いと思われることから、体表面での表在性ウイルス感染に対する化学療法薬として使える可能性も考えられた。そこで、アルギニンのヒトヘルペスウイルス-2（HHV-2）の抗ウイルス活性について検討すると同時に、マウスを用いた性器への HHV-2 感染に対するアルギニンの作用を検討した。

(1)HHV-2 は 1M アルギニン (pH4.3) により効果的に不活化され、不活化の程度はアルギニン濃度に依存した。同じ pH でも 1M NaCl では不活化がみられず、0.1M クエン酸でも弱い不活化しか見られなかったことから、ウイルス不活化にとって酸性やイオン強度だけでは十分ではない。(2)アルギニンによる不活化反応は急速であり、高濃度では中性 pH でもウイルスを不活化した。(3)細胞の生存率に影響を与えない濃度下でアルギニンは HHV-2 増殖を抑制した。子孫ウイルス収量に与えるアルギニン添加時期の効果とウイルスの一段増殖曲線とを比べた結果、ウイルス DNA 合成の完了する感染 6 時間目以降も明瞭な阻害効果が認められ、アルギニンが HHV-2 の増殖において DNA 複製以後の後期過程でもウイルス増殖を阻害することを見出した。(4) マウスに経膣ルートで HHV-2 を感染するとマウスは脳炎を起こして死ぬが、感染後時間を追って膣内を酸性アルギニン溶液で洗浄すると感染マウス死が顕著に抑制され、アルギニンは性器での HHV-2 感染を抑制できる可能性が示唆された。

本論文は、アルギニンのヒトヘルペスウイルス-2 に対する抗ウイルス作用を見出すとともにその表在性ウイルス感染症に対する予防・治療薬としての可能性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485号		
学位授与の日	平成25年3月5日		
氏名	村木洋介		
学位論文の題目	Diazepam during endoscopic submucosal dissection of gastric epithelial neoplasias (胃上皮性腫瘍に対する内視鏡的粘膜下層剥離術の鎮静に関する遡及的検討)		
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

【緒言】

内視鏡的粘膜下層剥離術 (Endoscopic Submucosal Dissection : ESD)は1990年代後半に開発された内視鏡的治療手技であり、各種高周波ナイフを用いて粘膜切開や粘膜下層剥離ができることを特徴とする。ESDは切除する腫瘍の大きさや形をコントロールすることができ、従来の内視鏡的粘膜切除術 (Endoscopic Mucosal Resection : EMR)では困難と考えられた病変でも一括切除を可能とする。ESDによる腫瘍の一括切除によって病変の詳細な病理学的評価が可能となり、そして遺残再発を防ぎ治療による根治性を高めることが可能になった。

ESDはEMRと比し高い根治性が達成される一方で、高い技術的習熟度が要求される。大型の病変や潰瘍瘢痕所見を有する病変を治療対象とすることが可能となった結果、出血や消化管穿孔などの偶発症の危険性が高まり、長い施行時間を要するようになった。

このため、偶発症を起こすことなく安全に ESD を完遂するためには適切な鎮静法が必須となる。胃上皮性腫瘍が出現する患者は高齢者であることが多く、高齢者は鎮静剤に対する感受性が高く、呼吸循環抑制など副作用出現のリスクが高い。我々は ESD の鎮静にベンゾジアゼピン系薬剤である Diazepam を使用している。Diazepam はその安全性から内視鏡検査で頻用されている薬剤のひとつであるが、投与量が過量になると不穏状態になる等の問題が生じる。そこで Diazepam 投与量が多い症例の特徴とその副作用について遡及的解析を行い、胃 ESD における Diazepam の有効性と限界について検討した。

【対象と方法】

ESD 時の鎮静に関して、2002年2月から2009年12月に当科で施行した胃上皮性腫瘍の ESD 331 症例 (331 病変) につき検討した。鎮静剤は経静脈的に Diazepam を 5-7.5 mg/body で導入し、体動出現時に Diazepam を 2.5-5 mg/body ずつ間欠的に追加投与した (最大使用量 40 mg)。鎮静レベルとして moderate sedation を目指し、Diazepam の間欠的投与は非麻酔科医によって投与された。対象を Diazepam 低用量投与群 (17.5 mg 以下 : L 群) 252 例と高用量投与群 (17.5 mg より多い : H 群) 79 例に分け比較検討した。

【結果】

積算飲酒量 (L 群/H 群 : $0.30 \pm 0.48 / 0.44 \pm 0.52$ t : $P = 0.032$)、体重 ($58.4 \pm 10.3 / 62.0 \pm 9.9$ kg : $P = 0.006$)、腫瘍径 ($15 \pm 10 / 23 \pm 18$ mm : $P < 0.001$)、病変部位 (U・M/L 領域 : $P < 0.001$)、UL 所見 (有 / 無 : $P < 0.001$) は、単変量解析で Diazepam 投与量に有意に関連する因子であった。多変量解析では、それらの 5 因子全てが Diazepam 高用量投与に関連する独立した因子であった。積算飲酒量を 0.4 t、体重を 60 kg でそれぞれ 2 群に分けた 4 つのサブグループでの比較では、飲酒量が 0.4 t 以下かつ体重が 60 kg 以下のグループを基準にしてオッズ比は段階的に上昇し、飲酒量が 0.4 t より多くかつ体重が 60 kg より大きいグループでのオッズ比は 4.52 と最大値となった。Diazepam 投与による副作用では H 群に不穏状態の出現が有意に多かったが ($P < 0.001$)、呼吸抑制、循環抑制、過鎮静の出現に 2 群間で有意差を認めなかった。

【結語】

約8割の胃ESD症例は低用量のDiazepamによる鎮静で安全に施行可能であることを示した。積算飲酒量が0.4t以上、体重が60kg以上、技術的に難易度の高いESDが必要な患者は、Diazepam高用量投与のハイリスク群であることを明らかにした。このようなDiazepam高用量投与が必要となる因子が複数存在する場合は、不穏などの副作用を考慮して最初からプロポフォールの持続投与なども検討すべきであると考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成25年1月23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。内視鏡的粘膜下層剥離術（Endoscopic Submucosal Dissection：ESD）は、内視鏡の鉗子口から挿入した高周波ナイフを用いて粘膜切開や粘膜下層剥離ができることを特徴とする内視鏡的治療手技である。ESDは切除する腫瘍の大きさや形をコントロールすることができ、従来の内視鏡的粘膜切除術（Endoscopic Mucosal Resection：EMR）では困難と考えられた病変でも一括切除を可能とする。ESDはEMRと比し高い根治性が達成される一方で、高い技術的習熟度が要求され長い施行時間を要する。このため、偶発症を起こすことなく安全にESDを施行する上で適切な鎮静法が必須となる。胃上皮性腫瘍が出現する患者は高齢者であることが多く、高齢者は鎮静剤に対する感受性が高く、呼吸循環抑制など副作用出現のリスクが高い。申請者らはESD施行時の鎮静にベンゾジアゼピン系薬剤であるDiazepamを使用している。Diazepamはその安全性から内視鏡検査で頻用されている薬剤のひとつであるが、投与量が過量になると不穏状態になる等の問題が生じる。そこでDiazepam投与量が多い症例の特徴とその副作用について遡及的に検討した。

その結果、

- (1) ESD施行時間が1.5時間以上におけるDiazepam平均投与量は17.5mgであった。
- (2) 患者因子として積算飲酒量と体重が、病変因子として腫瘍径・局在性・潰瘍所見の有無が、Diazepam投与量に有意に関連する因子であり、これら5因子全てがDiazepam高用量投与に関連する独立した因子であったが、基礎疾患（高血圧・糖尿病・心疾患・呼吸器疾患・慢性腎不全・肝硬変）との関連性は認められなかった。
- (3) 積算飲酒量を0.4t、体重を60kgでそれぞれ2群に分けた4つのサブグループでの比較では、飲酒量が0.4t以下かつ体重が60kg以下のグループを基準にしてオッズ比は段階的に上昇し、飲酒量が0.4tより多くかつ体重が60kgより大きいグループでのオッズ比は4.52と最大値となった。
- (4) 副作用では、Diazepam高用量投与症例に不穏状態の出現が有意に多かったが、呼吸抑制・循環抑制・過鎮静の出現には有意差を認めなかった。

以上より本論文は、大酒家・肥満者・技術的に難易度の高いESDを要する患者は、Diazepam高用量投与のハイリスク群であることを示すと共に、Diazepam高用量投与によって不穏状態により多く陥ることを明らかにすることによって、胃上皮性腫瘍に対するESD施行時の鎮静におけるDiazepamの有効性と限界について新しい知見を提示する研究であり、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486号		
学位授与の日	平成25年3月26日		
氏名	木岡直美		
学位論文の題目	Chemokine expression in human astrocytes in response to shiga toxin 2 (ヒトアストロサイトにおける志賀毒素によるケモカイン発現の検討)		
論文審査委員	主査	教授 仙波 恵美子	
	副査	教授 近藤 稔和	教授 吉川 徳茂

論文内容の要旨

(諸言)

ケモカインは白血球走化活性化作用を有し、炎症反応のメディエーターとして重要な役割を果たしている。最近、中枢神経疾患と脳内ケモカインとの関連が数多く報告され新たな治療法の確立の可能性が示唆されている。溶血性尿毒症症候群 (HUS) とは急性腎不全、血小板減少、微小血管障害の溶血性貧血を 3 徴とする症候群である。志賀毒素 (Stx) 産生菌による下痢症に伴うものが 90%以上を占めており、その大部分が腸管出血性大腸菌 (STEC) 感染症によるものである。また HUS ではその 3 割が急性脳症を合併するといわれており、HUS 死亡例の半数が脳症によるため、患者の生命予後を左右する重大な合併症である。その病態は不明な点が多く、治療法も確立されていない。STEC 感染症に伴う HUS では、Stx 受容体 (Gb3) に結合した Stx が腸管上皮細胞や、腎臓または脳の血管内皮細胞などで TNF- α や IL-1 β 、MCP-1、IL-8 などの発現を促すことが知られている。今回、我々は HUS 脳症の発症機序と脳内ケモカインの関連性を解明するために、ヒトアストロサイト (NHA) 培養系を用いた検討を行った。

(方法)

- IL-1 β 添加による Gb3 発現誘導の検討。
細胞は LONZA 社から購入した正常ヒトアストロサイトを使用した。ヒトアストロサイトをチャンバースライドに播種し、播種 2 日後に IL-1 β を 10⁻⁶mg/ml の濃度で添加した。IL-1 β 添加 72 時間後に 4%PFA で固定した。一次抗体は Rat のモノクローナル抗体を使用し、室温で 8 時間インキュベートした。ビオチン標識二次抗体を使用し、ABC 法で増感し、DAB により発色反応を行った。
- 炎症性サイトカイン (IL-1 β 、TNF- α) による Gb3 産生酵素 (GalT6) の mRNA 誘導の検討。
ヒトアストロサイトを 6 well culture plate に培養し、サブコンフルエント状態で TNF- α と IL-1 β を 10⁻⁵mg/ml~10⁻⁷mg/ml の濃度で添加し、添加前、8hr 後、24hr 後に total RNA を抽出した。逆転写反応を行い、リアルタイム PCR 法で mRNA の発現を定量した。
- Stx2 刺激による培養ヒトアストロサイトのケモカイン mRNA 発現の誘導の検討。
ヒトアストロサイトを 6 well culture plate に播種し、サブコンフルエント状態で 10⁻⁹M と 10⁻¹⁰M の濃度の Stx2 を添加した。添加前、8 時間後、24 時間後に total RNA を抽出し、逆転写反応を行い、リアルタイム PCR 法で IL-8 と MCP-1 の mRNA の発現を定量した。
- Stx2 刺激による培養ヒトアストロサイトのケモカインの産生。
ヒトアストロサイトを 6 well culture plate に播種し、サブコンフルエント状態で 10⁻⁹M と 10⁻¹⁰M の濃度の Stx2 を添加した。添加前、24 時間後、48 時間後に培養上清を回収し、ELISA 法で IL-8 と MCP-1 を測定した。
- Stx2 と IL-1 β の刺激による IL-8 の発現の誘導の検討。
ヒトアストロサイトを 6 well culture plate に播種し、サブコンフルエント状態で 10⁻⁹M の濃度の Stx2 と 10⁻⁶M の IL-1 β を添加した。
添加前、8 時間後、24 時間後に total RNA を抽出し、逆転写反応を行い、リアルタイム PCR 法で IL-8 の mRNA の発現を定量した。

(結果)

1. IL-1 β 添加による Gb3 発現誘導の検討。

IL-1 β を添加したヒトアストロサイトで免疫組織染色により Gb3 の発現の増加が認められた。

2. 炎症性サイトカイン (IL-1 β 、TNF- α) による GalT6 mRNA 誘導の検討

IL-1 β 10⁶mg/ml と IL-1 β 10⁷mg/ml を加えたときの GalT6 mRNA の発現がコントロール (IL-1 β 添加なし) に比べて有意に増加しており、特に 10⁶mg/ml の濃度では約 6.5 倍発現が増加していた。TNF- α を加えたときの GalT6 mRNA の発現は増加する傾向が見られたがコントロールに比べて有意な増加ではなかった。

3. Stx2 刺激による培養ヒトアストロサイトのケモカイン mRNA 発現の誘導の検討。

Stx2 を添加したときの IL-8 mRNA と MCP-1 mRNA の発現がコントロール (Stx2 添加なし) に比べて有意に増加していた。特に IL-8 mRNA は 10⁻¹⁰mol/l の添加 8 時間後で約 256 倍、10⁻⁹mol/l の添加 8 時間後で約 1155 倍の増加が見られた。

4. Stx2 刺激による培養ヒトアストロサイトのケモカインの産生。

Stx2 を添加後 24 時間と 48 時間後の培養上清において IL-8 と MCP-1 がコントロール (Stx2 添加なし) に比べて有意に増加していた。

5. Stx2 と IL-1 β の刺激による IL-8 の発現の誘導の検討。

Stx2 と IL-1 β を同時に添加した細胞では、Stx2、IL-1 β 単独で添加した細胞に比べて 24 時間後に IL-8 mRNA の発現が有意に増加していた。

(考察)

溶血性尿毒症症候群 (HUS) の中枢神経合併症の病態については十分解明されていない。STEC 感染症に伴う HUS では、Stx 受容体 (Gb3) に結合した Stx が腸管上皮細胞や、腎臓または脳の血管内皮細胞などで TNF- α や IL-1 β 、MCP-1、IL-8 などの発現を促すことが知られている。これまで脳の実質細胞における Stx2 の免疫応答は検討されていない。今回、我々は脳の実質細胞であるヒトアストロサイトの培養系を使って、炎症性サイトカインである IL-1 β により Gb3 の発現が増加すること、また Stx2 によりケモカインである MCP-1 と IL-8 の発現が増加することを証明した。グリア細胞における脳内のケモカインの増加が HUS の中枢神経合併症の病態に関わっている可能性を示した。さらに、グリア細胞における Stx2 による免疫応答を検討することにより、まだ確立されていない HUS の中枢神経合併症の治療法の解明につながるのではないかと考えている。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成25年3月4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の審査を行った。

本論文は、溶血性尿毒症症候群 (HUS) 脳症の発症機序と脳内ケモカインの関連性を解明するために、ヒトアストロサイト (NHA) 培養系を用い志賀毒素 (Stx) によるケモカインの発現を検討したものである。

溶血性尿毒症症候群 (HUS) とは急性腎不全、血小板減少、微小血管障害の溶血性貧血を 3 徴とする症候群である。また HUS ではその 3 割が急性脳症を合併するといわれており、HUS 死亡例の半数が脳症によるため、患者の生命予後を左右する重大な合併症である。その病態は不明な点が多く、治療法も確立されていない。STEC 感染症に伴う HUS では、Stx 受容体 (Gb3) に結合した Stx が腸管上皮細胞や、腎臓または脳の血管内皮細胞などで TNF- α や IL-1 β 、MCP-1、IL-8 などの発現を促すことが知られている。

今回、申請者は脳の実質細胞であるヒトアストロサイトの培養系を使って Stx による免疫応答の検討を行った。ヒトアストロサイトにおいて、炎症性サイトカインである IL-1 β により Stx 受容体である Gb3 の発現が増加することを免疫組織染色法を用いて示した。また、Gb3 の産生酵素である GalT6 の mRNA の発現が増加することをリアルタイム PCR を用いて示した。さらに Stx2 によりアストロサイトにおける IL-8 と MCP-1 の産生が増加することを ELISA を用いて示し、mRNA の発現が増加することをリアルタイム PCR を用いて示した。特に IL-8 の発現の増加が著明に認められ、炎症性サイトカインである IL-1 β により増強されることも示した。以上の結果により、脳の実質細胞であるヒトアストロサイトにおいて炎症性サイトカインにより Gb3 の発現が増加すること、Stx により過剰なケモカインが発現されることを証明した。

今回の研究により、グリア細胞における脳内のケモカインの増加が HUS の中枢神経合併症の病態に関わっている可能性を示した。HUS の中枢神経合併症の治療法の解明につながる結果を示していることから、本論文を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487号		
学位授与の日	平成25年3月26日		
氏名	田中貴美		
学位論文の題目	Safety of bronchial arterial embolization with n-butyl cyanoacrylate in a swine model (NBCAによる気管支動脈塞栓術の有用性と安全性に関する基礎的研究)		
論文審査委員	主査	教授 鶴尾吉宏	
	副査	教授 村垣泰光	教授 佐藤守男

論文内容の要旨

【緒言】

最近、咯血に対する気管支動脈塞栓術(Bronchial arterial embolization; 以下BAE)に液状塞栓物質であるn-butyl cyanoacrylate(以下NBCA)が用いられてきている。Pumpは剖検肺の検討で気管支動脈と肺動脈との吻合が72-325 μ mと24-48 μ mの各レベルで存在することを報告した。IvanickらはBAEに液状塞栓物質(アルコール)を用いた気管支壊死の合併症を報告し、BAEには350 μ m以上の塞栓物質を使用するべきと述べている。これらの報告にも関わらず、液状塞栓物質のNBCAによるBAEは使用されており、その安全性に関する基礎的報告はみられない。

そこで、正常豚を用い、標準的塞栓物質のゼラチンスポンジ(Gelatin sponge particles; 以下GSP)を対照群とし、NBCAを用いたBAEの有用性、及び安全性を明らかにすることを目的として本研究を行った。

【対象と方法】

対象は正常豚6頭(体重56kg~65kg、平均60kg)を用いた。豚をそれぞれ3頭ずつ以下の2群に分け、透視下で閉塞を確認しながら左右の気管支動脈(各々計6本)にBAEを施行し、左右肺(各々計6肺)の画像学的、および病理学的検討を行った。なお、同一豚の左右気管支動脈には同一の塞栓物質を使用した。NBCAのLipiodolによる希釈度は、臨床的な使用の報告と、より末梢側への塞栓を考慮し用いた。

①NBCA群; NBCA:Lipiodol=1:7の混合液(以下、NBCA-Lp)0.2ml

②GSP群; 1mm角GSP

BAE48時間後に、気管支動脈造影を施行し、閉塞した気管支動脈の再開通の有無を確認した。その後、豚から両肺を取り出し、ホルマリン固定後、病理医と確認しながら両葉の主気管支から後葉に連続する気管支樹に沿って、(1)主気管支から葉気管支、(2)区域気管支、(3)区域下気管支、(4)区域下気管支より末梢側の気管支周囲で各々約3×2cmの病理切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)を行った。

以下の項目について検討を行った。

1)BAE前後の生理的变化を検討するため、白血球数、赤血球数、動脈血酸素飽和度、及び直腸温測定(BAE前後と24時間後、48時間後)を行った。

2)気管支や肺実質の障害の有無を検討するため、豚の肺領域のX線撮影、CT撮影(BAE前後、及び24時間後、48時間後)を行った。なお、NBCA-Lp群には豚からとりだした肺組織にもX線撮影を施行した。

3)塞栓の持続性、及び再開通の有無を検討するため、気管支動脈造影(BAE前後、及び48時間後)を行った。

4)摘出肺での気管支と肺実質の障害の有無、気管支動脈の塞栓物質の同定、および塞栓による気管支動脈の変化を病理学的に検討した。

【結果】

1)BAE前後の生理的变化の指標とした白血球数、赤血球数、動脈血酸素飽和度、及び直腸温に有意な変化は認められなかった。

2)BAE後の肺のX線撮影、CT撮影の所見

CT撮影において、NBCA群ではBAE直後、24時間後、及び48時間後で主気管支から葉気管支、区域気管支、区域下気管支に沿って、NBCA-Lpの集積が認められた。集積部位は主気管支周囲で6本中6本、葉気管支周囲では18本中13本、区域気管支周囲では59本中12本、区域下気管支周囲には126本のうち3本にNBCA-Lp集積の高吸収域が同定できた。両群ともに塞栓後のX線、CTにて肺領域にBAEによると考えられる異常所見の出現は認められなかった。

3)BAE後の気管支動脈造影での閉塞及び再開通の有無

BAE 48時間後の気管支動脈造影で、NBCA群では全例で左右気管支動脈の閉塞が持続していた。しかし、GSP群では48時間後の気管支動脈造影で、気管支動脈に再開通が認められた。すなわち、GSP群の主気管支周囲の気管支動脈では、狭窄なし、または軽度の狭窄は1本、中等度以上の狭窄は4本、閉塞持続は1本で、再開通は6本中5本に認められた。同様に、葉気管支周囲の動脈では、3本、5本、6本で、14本中8本に再開通、区域気管支周囲の気管支動脈には2本、6本、9本で、17本中8本に再開通が認められた。

4)摘出肺の肉眼的及び組織学的所見

摘出肺には肉眼的に異常所見は認められなかった。標本の気管支動脈径の分布は主気管支周囲で720 μm -1240 μm 、葉気管支周囲で407 μm -700 μm 、区域気管支周囲で142 μm -413 μm 、区域下気管支周囲で40-184 μm であった。

組織学的検討で、NBCA及びGSPは主気管支周囲から区域下気管支周囲の気管支動脈内腔にそれぞれ35標本(127 μm -1240 μm)、6標本(107 μm -853 μm)でその存在を同定できた。このうち、100 μm から350 μm 径の間ではNBCA群で17標本、GSP群で3標本の塞栓部位が認められた。NBCA群に比較して、GSP塞栓が認められた標本数は少ないが、これは血流の再開通のため、血管網にGSPが分散したためと考えられた。

NBCA-Lpの気管支動脈内の塞栓部位は、赤色血栓と炎症性細胞の浸潤を含んだ血管内腔辺縁の開存として描出された。一方、血管内のGSPは網状から不整形に広がる青紫色の物質として描出された。GSP周囲には赤色血栓や炎症性細胞が認められた。両群とも塞栓を伴った気管支動脈には内皮細胞の消失や、気管支動脈内腔や動脈壁への炎症性細胞の浸潤がみられた。

気管支壁の粘膜下及び、気管支軟骨間に多数の50 μm 以下の小血管が認められた。これらの気管支壁の小血管を含め、NBCA並びにGSPの塞栓物質は直径が100 μm 以下の気管支動脈内、及び組織標本内の肺動脈や肺静脈内には同定できなかった。

両群で病理学的に、気管支及び肺実質に壊死等の異常所見は認められなかった。

【結語】

今回のBAEにおいてNBCA群はGSP群と比べ、塞栓の閉塞能は高度で、持続性に優れていた。両群とも100 μm から350 μm 径の気管支動脈内腔に塞栓物質が認められ、100 μm 以下の内腔には塞栓物質はみられなかった。また両群とも気管支壁、肺実質には異常所見は認められなかった。よって、NBCA塞栓はBAEの塞栓物質として比較的安全に施行できるものと考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成25年3月13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。

本論文は気管支動脈に対するn-butyl cyanoacrylate(以下、NBCA)を用いた気管支動脈塞栓術(Bronchial arterial embolization;以下、BAE)の安全性について述べたものである。近年、塞栓術に塞栓物質としてNBCAが用いられてきている。NBCAによるBAEは、今まで考えられてきたよりも、より末梢の気管支動脈閉塞を安全に行えると予想されているが、いまだ基礎的検討がなされていない。学位申請者は、正常豚を用いて、標準的塞栓物質のゼラチンスポンジ(Gelatin sponge particles、以下GSP)を対照群とし、NBCAによるBAEを行い、BAE前後の気管支動脈造影や肺CTの画像所見、気管支動脈、肺動脈、肺静脈、気管支、肺実質の病理組織学的所見について検証し、有用性、安全性について基礎的に比較検討した。

正常豚6頭を3頭ずつ2群、①NBCA群；NBCA:Lipiodol=1:7の混合液(以下、NBCA-Lp)、②GSP群；1mm角GSP、の塞栓物質使用群に分け、透視下で閉塞を確認しながら左右の気管支動脈(各々計6本)にBAEを施行した。NBCA-Lpをこの希釈度にしたのは臨床的な使用の報告を考慮し、より末梢側への塞栓が予想されたためである。塞栓前後、24時間後、48時間後のCT撮影、塞栓48時間後に気管

支動脈造影を施行したあと、肺を摘出し、病理標本で検討した。NBCA塞栓後のCTでは、主気管支周囲で6/6本、葉気管支周囲では13/18本、区域気管支周囲では12/59本、区域下気管支周囲では3/126本にNBCA-Lp集積の高吸収域が同定できた。両群肺領域にBAEによる異常所見は同定できなかった。BAE 48時間後の気管支動脈造影で、NBCA群では全例に左右気管支動脈の閉塞が持続していた。GSP群では、主気管支周囲の気管支動脈では5/6本、葉気管支周囲では8/14本、区域気管支周囲では8/17本と、中枢側優位に再開通が認められた。組織学的検討でNBCA-LpおよびGSPは主気管支周囲から区域下気管支周囲の気管支動脈内腔にそれぞれ35標本(127 μ m-1240 μ m)、6標本(107 μ m-853 μ m)でその存在を同定できた。このうち、100 μ mから350 μ mの間ではNBCA群は17標本、GSP群では3標本の塞栓部位が認められた。両群とも気管支動脈の閉塞部位には内腔に赤色血栓や炎症性細胞の浸潤、内皮細胞の消失、及び気管支動脈壁には炎症性細胞の浸潤が認められた。一方、気管支壁の粘膜下及び、気管支軟骨間に50 μ m以下の多数の小血管が認められたが、これらの血管に両群の塞栓物質は到達していなかった。また、肺動脈、肺静脈内に両群の塞栓物質は同定できなかった。

以上の結果より、NBCAを用いたBAEではGSP群と比べ、塞栓の閉塞能は高度で持続性に優れていた。両群とも100 μ m以下の気管支動脈内腔には塞栓はみられなかった。また、両群とも気管支壁、肺実質にBAEによる異常所見は認められなかった。よって、NBCA塞栓は、BAEの塞栓物質として比較的安全に施行できるものと考えられた。今回の動物実験による基礎的検討は、今後の臨床応用の基盤となるものであり、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)甲第488号		
学位授与の日	平成25年3月26日		
氏名	山名 暁子		
学位論文の題目	The Kir6.2 E23K polymorphism is related to secondary failure of sulfonylureas in non-obese patients with type 2 diabetes (非肥満2型糖尿病患者における Kir6.2E23K 遺伝子多型とスルホニル尿素薬2次無効との関連)		
論文審査委員	主査	教授 赤水 尚史	
	副査	教授 古川 福実	教授 三家 登喜夫

論文内容の要旨

《緒言》

2型糖尿病の治療に、インスリン分泌促進を主作用とするスルホニル尿素(SU)薬が汎用されている。しかし、その効果は時間の経過や種々の要因により低下し、ついにはSU薬2次無効に陥りインスリン治療が必要となることが多い。SU薬は膵β細胞ATP感受性Kチャンネル(KATPチャンネル)のSU受容体サブユニット(SUR1)に結合しインスリン分泌を促進することでその効果を発揮するが、KATPチャンネルはSUR1サブユニットとその内側にあるKir6.2サブユニットとの八量体により構成されている。Kir6.2遺伝子に存在するE23K多型に関しては、白人や日本人を対象とした検討にて2型糖尿病発症との関連が示唆されている。長期間にわたる膵β細胞への過度の刺激はβ細胞を疲弊させ機能低下を引き起こすことが想像され、このことがSU薬2次無効の要因の一つである可能性も考えられる。しかし、本多型と2型糖尿病発症後のSU薬2次無効等の臨床経過との関連についての報告はない。

《目的》

日本人非肥満2型糖尿病患者において、Kir6.2 E23K遺伝子多型とSU薬2次無効との関連を検討した。

《対象と方法》

和歌山県立医科大学附属病院に通院するBody Mass Index(BMI)30kg/m²以下で26歳から59歳の間に糖尿病と診断された2型糖尿病患者485名(男性287名)を2型糖尿病群(T2D群)とし本検討の対象とした。対象者の末梢白血球から単離したゲノムDNAをKir6.2 E23K多型の遺伝子型判定の対象とし、Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)法にて判定した。RFLP法にても明確でない場合はダイレクトシーケンス法にて判定した。T2D群のうち278名のSU薬治療歴を有し、10年以上外来通院にて経過観察し得た患者をSU薬治療群(SU群)とし、SU薬2次無効の頻度を調査した。なおチアゾリジン、グリニド、αグルコシダーゼ阻害薬、DPPIV阻害薬、GLP-1受容体作動薬による治療を受けている患者は除外した。SU群のうちSU薬2次無効と判断され最終的にインスリン治療を受けた214名をSU薬2次無効群(SUF群)とし治療期間の比較に用い、インスリン治療に至らなかった64名をSUC群とした。

治療方針：糖尿病診断後、食事運動療法を開始するとともに一部の患者にはメトホルミン500～750mg/日を投与した。その後HbA1cが6.9%未満になるようにSU薬を追加投与した。

SU薬2次無効の判定：グリメピリド6mg/日またはグリベンクラミド5mg/日以上を投与してもHbA1c9.4%以上が6ヶ月以上もしくはHbA1c8.4%以上が12ヶ月以上続続した場合、SU薬2次無効と判定し抗GAD抗体測定後インスリン治療を開始した。

CDKAL1 c/g一塩基多型(SNP)は、SUF群を対象とし、ダイレクトシーケンス法により判定した。

C-ペプチドは免疫酵素法を用いて測定した。HbA1cはすべてNGSP値で示した。

結果はすべてMean±SDで示した。カテゴリー変数はχ²検定を用いた。治療法の変化の比較はカ

プランマイヤー (KM) 法を用いた。2 群間の比較は Student もしくは Welch の “t” 検定を用い、3 群間の比較は多重比較 (Sheffer) を用いて検討した。P<0.05 を有意とした。

《結果》

T2D、SU、SUF 各群における Kir6.2 E23K の 3 つの遺伝多型 (EE、EK、KK) の頻度に差はなく、それらは Hardy-Weinberg の法則に矛盾せず、以前に行われた他の研究と同程度であった。SUC 群における KK 遺伝子型頻度は SUF 群に比しわずかに低かったが著しい差はなかった。Kir6.2 E23K 多型による、食事運動療法から SU 薬治療、SU 薬治療からインスリン治療への治療法の変更を KM 法によって分析したところ、糖尿病診断後 SU 薬治療の開始には差を認めないが、KK 保持者は他 (EE、EK 保持者) に比し SU 薬治療後インスリン治療への変更が有意に早かった (Log-rank test : P=0.0043)。性、BMI を調整したハザード比は 1.712 (95 %信頼区間 : 1.18-2.48) であった。SU 群を用いて空腹時 C-ペプチドを比較したところ罹病期間、BMI は 3 つの遺伝子型に差はないが KK 保持者は EE、EK 保持者と比較して C-ペプチドが有意に低値であった。SUF 群を用いた治療期間の比較では、糖尿病診断後から SU 薬治療を開始するまでの期間は 3 群間 (EE、EK、KK) に有意差を認めなかったが、KK 保持者の SU 薬治療期間は 7.7 ± 4.6 年と EE (11.1 ± 6.1 年、P=0.015)、EK (11.2 ± 6.3 年、P=0.024) よりそれぞれ有意に短かった。一方、CDKAL1 の 3 つの遺伝子型間にはこの 2 つの治療期間にはそれぞれ有意な差を認めなかった。また、重回帰分析より Kir6.2 E23K 多型 (EE,EK=0, KK=1) は性、診断時年齢、BMI で調整しても SU 薬治療期間と有意な関連を認めた (標準回帰係数=-0.2047, P=0.002)

《考察》

今回の検討で、KK 保持者は EE、EK 保持者に比べ有意に早くインスリン治療になっており、KK 保持者の空腹時 C-ペプチドは他の遺伝子型保持者に比べ有意に低値であった。また SUF 群における治療期間の比較検討にて、SU 薬治療期間のみ KK 保持者で有意に短期間であった。また、日本人を対象とした Genome-Wide Association Study (GWAS) にて Kir6.2 と同様に 2 型糖尿病の発症との関連が指摘された CDKAL1 の SNP についても同様の検討を行ったが、Kir6.2 E23K 多型とは異なり、遺伝子型による治療期間の差は認めなかった。また CDKAL1 と同様に 2 型糖尿病との関連が指摘されている TCF7L2 についても検討したが遺伝子型による治療期間の差は認めなかった。このことは、SU 薬治療と Kir6.2 E23K 遺伝子多型の関連が特有であることを示すものと考えられた。また、ヒトの単離腓ラ氏島を用いた検討にて、高濃度グルコース刺激後の SU 薬 (グリベンクラミド) によるインスリン分泌は、本多型の K allele 保有者で減弱していることが報告されており、E23K 遺伝子多型はインスリン分泌の低下と SU 薬 2 次無効に関連しているのではないかという我々の考えを支持するものである。

近年、日本人を含む GWAS によって 2 型糖尿病と関連する多型が発見されているが、2 型糖尿病患者の診断後の臨床経過、特に SU 薬 2 次無効との関連を長期の観察研究にて検討した報告はなく、この点において我々の結果は重要であり、2 型糖尿病の治療選択の指針になると思われる。

《結語》

日本人非肥満 2 型糖尿病患者において Kir6.2E23K 遺伝子多型は SU 薬 2 次無効の促進と関連があることが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 25 年 3 月 11 日。論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。2 型糖尿病の治療に、インスリン分泌を促進するスルホニル尿素 (SU) 薬は多く用いられている。しかし、その効果は時間の経過や種々の要因により低下し、ついには SU 薬 2 次無効に陥りインスリン治療を必要とすることが多い。SU 薬は膵β細胞の KATP チャンネルの結合しインスリン分泌を促進する

が、KATP チャンネルのサブユニットである Kir6.2 遺伝子に認められる E23K 多型は、2型糖尿病との関連性が示唆されているが、発症後の SU 薬治療との関連性については不明である。

本論文は著しい肥満のない ($BMI \leq 30 \text{kg/m}^2$) 日本人 2 型糖尿病患者を対象に、長期臨床観察により SU 薬 2 次無効と Kir6.2 遺伝子 E23K 多型との関連性を検討したものである。

SU 薬による治療歴を有する患者 278 名における、Kir6.2 遺伝子 E23K 多型の遺伝子型による SU 薬 2 次無効の頻度は、KK 保有者では EK や EE 保有者に比べ有意に高値であった (Log-rank test : $P=0.0043$ 、性、BMI を調整したハザード比は $1.712 : 95\%$ 信頼区間は $1.18-2.48$)。なお、これら 2 群における非薬物療法から SU 薬治療になる頻度には有意差を認めなかった。上記対象者のうち SU 薬 2 次無効となりインスリン治療を施行した 214 名において E23K 多型の遺伝子型による非薬物療法治療期間 (診断から SU 薬治療開始までの期間) および SU 薬治療期間 (SU 薬治療開始からインスリン治療開始までの期間) を、Kir6.2 遺伝子 E23K 多型のみならず 2 型糖尿病発症と関連するとされている他の遺伝子多型 (SNP) である、CDKAL1 (g/c) および TCF7L2 (c/t) の遺伝子型により比較すると、Kir6.2E23K 多型においてのみ SU 薬治療期間が KK 型で有意に短期であった (KK : 7.7 ± 4.6 年*#, EK : 11.2 ± 6.3 年#, EE : 11.6 ± 6.1 年*、* : $P=0.015$ 、# : $P=0.024$)。さらに、重回帰分析にて Kir6.2E23K 多型は、性、年齢、BMI にて調整しても SU 薬治療期間と有意な関連性を示した。

以上、本論文は 2 型糖尿病の診断後の臨床経過、特に SU 薬 2 次無効と関連する遺伝子多型を初めて明らかにしたものであり、2 型糖尿病の治療法選択の指針として重要になると思われ、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883号		
学位授与の日	平成24年4月10日		
氏名	西村行秀		
学位論文の題目	Cardiovascular responses to static muscle contraction in patients with brachial plexus injury treated with intercostals nerve transfer (腕神経叢損傷患者に肋間神経移行を行い、術後再獲得した筋群に等尺運動をさせた際の循環応答の検討)		
論文審査委員	主査	教授 吉田宗人	
	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、再生医療の進歩は目覚しく、神経再生医療もそのひとつである。その先駆けとして、神経移植術が末梢神経損傷の治療として以前より行われてきた。また、節前タイプ腕神経叢損傷 (BPI : Brachial plexus injury) 患者の肘屈曲機能再建方法として肋間神経を筋皮神経に移行する肋間神経移行術 (ICNT : Intercostal nerve transfer) が行われている。BPI は神経根以遠の節後損傷と、それより中枢側での節前損傷とに大別され、節前タイプの BPI の治療は困難で、自然回復は見込めない。節前損傷タイプ BPI の肘屈曲機能再建方法として ICNT が行われることがある。ICNT は第3、4肋間神経を切離し、その断端を筋皮神経に直接縫合する手術法である。この手術により一度失われた肘屈曲機能の再獲得が可能となる。一度切離された神経は神経の連続性が完全に断たれるので、移行した肋間神経により縫合された筋皮神経によって神経が遠心性に再生されたこととなる。神経の求心路を確認する一つの指標として血圧変化等の循環応答がある。正常四肢の場合、筋の持続等尺運動をさせると筋内の化学受容体が刺激され末梢神経の求心路を経て中枢神経系の延髄から大脳を經由して遠心性の刺激となり末梢血管を収縮させる。末梢血管が収縮することによって血圧が上昇することとなる。BPI 患者に ICNT を施行すると一度失われた肘屈曲力が再獲得されるので神経の遠心路が再生されていることは明らかである。しかし、求心路の再生の有無は未だ不明である。

そこで本研究では、一度完全損傷された末梢神経を切離し別神経にて神経移行した後、求心路の再生の有無をみるために BPI 患者に ICNT を施行した際の再獲得筋持続等尺運動時の循環応答を調べた。

【対象・方法】

対象は7名 (男性6名、女性1名) の全型 BPI 患者であり全例に ICNT を施行した。で受傷時年齢は3歳から30歳であった。全例に対し、最大肘屈曲力 (MVC : Maximum voluntary contraction)、収縮期血圧 (SBP : Systolic blood pressure)、拡張期血圧 (DBP : Diastolic blood pressure)、心拍数 (HR : Heart rate) を測定した。測定方法は対象を仰臥位に寝かせ、肘関節90度屈曲、前腕回外位で測定し、血圧、心拍数は反対側の指にて持続測定をした。測定プロトコールは事前に最大肘屈曲力を測定し、3分間の安静の後、最大筋力のそれぞれ20%MVCと35%MVCで2分間持続等尺運動させ、その後10分間の回復期間をとった。この測定を健側、ICNT側の両側に施行した。その間、持続的に血圧 (SBP、DBP) と心拍数の測定を行った。

統計解析は運動前、運動時、回復期の検定に分散分析 (repeated ANOVA) を用い、多重比較検定として Tukey-Kramer 法を用いた。また、ICNT側と健側の比較検定として Mann-Whitney U test を用いた。有意水準は1%未満とした。

【結果】

測定は手術後2から10年で ICNT 側の最大筋力は18から59Nm (健側比8.7~36.5%)であった。健側の20%MVCにおけるSBP、DBP、HRの変化は、安静時、運動時、回復期ともにいずれにおいても有意差はなかった。ICNT側の20%MVCにおけるSBP、DBP、HRの変化は、健側と同様に安静時 (130.3±5.6、67.4±3.8mmHg、67.7±2.9bpm)、運動時 (131.6±2.7、68.8±1.9mmHg、67.7±1.3bpm)、回復期 (128.8±1.2、67.2±0.9mmHg、66.8±0.7bpm) とともにいずれにおいても有意

差はなかった。健側の 35%MVC における SBP、DBP、HR の変化は、安静時 (120.5±1.5、59.3±2.6mmHg、68.3±2.7bpm) に比して運動時に (131.7±3.2、70.4±1.8mmHg、79.1±1.3bpm) 有意に上昇がみられ (p<0.01)、回復期 (120.5±1.5、60.6±0.7mmHg、68.0±0.8bpm) に速やかに安静時と同等の血圧へ低下した。一方、ICNT 側の 35%MVC における SBP、DBP、HR の変化は、安静時 (130.6±3.4、68.1±3.3mmHg、67.6±2.6bpm)、運動時 (133.0±1.6、71.3±1.6mmHg、70.4±1.4bpm)、回復期 (130.9±1.0、68.4±1.0mmHg、66.3±0.7bpm) とともにいずれにおいても有意差はなかった。

【考察】

BPI 患者に対する ICNT の適応は 40 歳未満であること、手術を受傷後 6 ヶ月以内に行うことが最適と報告しており、我々の対象も全例この範疇に入っていた。また ICNT 後、3 ヶ月から 6 ヶ月で再支配された筋の収縮が得られ始め、24 ヶ月程度で再獲得筋力は頭打ちとなると報告されており、今回我々の検討した症例は測定時にいずれも術後 24 ヶ月以上経過しているものであった。等尺運動時における血圧と心拍数の変化は、Bruce らによると健常者は血圧、心拍数ともに増加すると報告しており、脊髄損傷者は山本らによると血圧は上昇するが、心拍数は変化しなかったと報告している。今回我々の検討では BPI 患者の ICNT 後には血圧、心拍数ともに変化しないことがわかった。ICNT 群の血圧と心拍数が不変であった理由として、末梢神経の遠心路は再建されたが求心路は再建されない、または末梢神経は再建されたが、再建された筋力では循環応答を起こさせるだけの受容体刺激になっていないということが考えられた。

【結語】

健常側の肘屈曲筋に持続等尺運動を行うと循環応答が引き起こされるが、BPI 患者に ICNT を施行し再獲得された肘屈曲筋に持続等尺運動を行っても循環応答は起こらないということが明らかとなった。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 24 年 3 月 22 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め上記論文の審査を行った。節前損傷タイプ腕神経叢損傷 (BPI) 患者の肘屈曲機能再建方法として肋間神経移行術 (ICNT) が行われることがある。この手術を行うことにより一度失われた肘屈曲筋が肋間神経により再支配され肘屈曲機能が再建される。ICNT を行うことにより一度失われた肘屈曲力が再獲得されるので神経の遠心路が再生されていることは明らかである。しかし、求心路の再生の有無を調べた報告はない。本研究は BPI 患者に ICNT を施行した際の再獲得筋に持続等尺運動を行わせ、その際の血圧変化、心拍数変化を調べることで求心路の一つである循環応答の有無を調べたものである。

検討の結果、健常側の肘屈曲筋に持続等尺運動をさせると、最大肘屈曲力 (MVC) の 20% で持続等尺運動をさせても血圧上昇、心拍数増加は引き起こされないが、35%MVC で持続等尺運動をさせると持続等尺運動時には安静時に比して有意に血圧の上昇と心拍数の上昇がみられた。一方、ICNT 側では 20%MVC、35%MVC とともに再獲得された肘屈曲筋に持続等尺運動をさせても血圧、心拍数ともに不変であったことが示された。

以上より、本論文は BPI 患者に ICNT を施行した際の再獲得筋持続等尺運動時の循環応答を調べ、求心路の再生の有無を明らかにしたものである。筋等尺運動時における血圧と心拍数の変化は健常側では血圧、心拍数ともに増加したが、BPI 患者の ICNT 後、再獲得された筋に持続等尺運動させた際の血圧、心拍数はともに変化せず循環応答がおこらないことから、求心路は再生されていない可能性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して認めた。

学位記番号	博(医)乙第884号		
学位授与の日	平成24年5月8日		
氏名	山本修司		
学位論文の題目	In Vitro Evaluation of the Effect of Cardiac Surgery on Cancer Cell Proliferation. (心臓外科手術の手術侵襲が悪性腫瘍に与える影響に関する研究)		
論文審査委員	主査	教授 赤阪隆史	
	副査	教授 前田正信	教授 岡村吉隆

論文内容の要旨

【緒言】

悪性腫瘍を有する患者の心臓外科手術を行う機会が増加してきた。心臓外科手術を癌治療に先行して施行することが悪性腫瘍の面からみて適切かどうかの判断根拠となるデータは存在しない。growth factor や cytokine など、癌細胞に影響を与える可能性のある多数の物質の血中濃度が様々な手術の前後で変化することは知られているが、これらの変化が総和として癌細胞にどのような影響を与えるのかは、これまで評価されていない。今回、実際の心臓外科手術患者の術前後の血清を、培養癌細胞を使用した in vitro の実験系に投入して癌細胞の反応を観察した。

【対象と方法】

当科において心臓外科手術を行った症例で、採血に同意の得られた 22 例を対象とした。年齢は平均 68 (38-80) 歳。男性 14 例、女性 8 例。体外循環使用手術 (CPB 群) が 11 例、非使用手術 (OPCAB 群) が 11 例であった。

1. 血清の採取：術前、術直後および ICU 帰室後に動脈血を約 5ml ライン採血した。採取した血液は、直ちに遠心分離の後、血清を deep freezer で凍結保存した。凍結保存された検体は全症例を同時に解凍して実験に用いた。

2. 培養細胞：癌細胞として、ヒト non-small cell lung cancer 細胞株 EBC-1 および PC-14 を使用。

3. 増殖能の評価：96 well microplate を用い、細胞数を 5×10^3 個/well とし、10%FBS, DMEM, 5%CO₂, 37°C の条件下にて、それぞれ 10%, 20%, 30% の濃度の患者血清存在下に 48 時間培養を行った。培養後に MTT assay を行い、microplate reader で 540nm (対照 630nm) の吸光度 (O. D.) を測定し細胞数の評価とした。術前血清をコントロールとした場合の術後血清の増殖促進率を $100 \times (\text{術後 O. D.} - \text{術前 O. D.}) / \text{術前 O. D.}$ として計算した。

【結果】

①術前後における評価：EBC-1, PC-14 とともに、血清濃度 0% の well (control) に比し、患者血清を加えた well で濃度依存性に O. D. の低下が認められ、患者血清の存在により癌細胞の増殖が抑制されることが確認された。術前後の比較では、術前 O. D. に比し術後の O. D. が有意に高値であった。さらに術後に関しては、術直後のほうが ICU 帰室後よりも O. D. が高値であった。術後の血清は、術前に比し癌細胞の増殖に有利な環境であると考えられた。

②術式における評価：術前血清をコントロールとした場合の術後血清の増殖促進率を CPB 群と OPCAB 群について比較したところ、PC-14, EBC-1 とともに、全血清濃度において、OPCAB 群が CPB 群に比し増殖促進率が低値であり、PC-14 (10%, 20%) および EBC-1 (10%) において有意差を認めた。

【考察】

今回の研究結果から、心臓血管外科手術の侵襲は、体内の癌細胞に対し増殖を促進する方向に働く可能性があること、また、その増殖促進効果は、体外循環を併用することによってより強くなる可能性があることが確認された。担癌患者であれば、本研究結果に基づいて可及的に体外循環を避けるなど低侵襲な術式を選択することが、生命予後の向上に寄与する可能性があると思われる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 24 年 4 月 6 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。

悪性腫瘍を有する患者の心臓外科手術を行う機会が増加してきた。心臓外科手術を癌治療に先行して施行することが悪性腫瘍の面からみて適切かどうかの判断根拠となるデータは存在しない。growth factor や cytokine など、癌細胞に影響を与える可能性のある多数の物質の血中濃度が様々な手術の前後で変化することは知られているが、これらの変化が総和として癌細胞にどのような影響を与えるのかは、これまで評価されていない。今回、実際の心臓外科手術患者の術前後の血清を、培養癌細胞を使用した in vitro の実験系に投入して癌細胞の反応を観察した。

当科において心臓外科手術を行った症例で、採血に同意の得られた 22 例を対象とした。年齢は平均 68 (38-80) 歳。男性 14 例、女性 8 例。体外循環使用手術 (CPB 群) が 11 例、非使用手術 (OPCAB 群) が 11 例であった。

1. 血清の採取:術前、術直後および ICU 帰室後に動脈血を約 5ml ライン採血した。採取した血液は、直ちに遠心分離の後、血清を deep freezer で凍結保存した。凍結保存された検体は全症例を同時に解凍して実験に用いた。2. 培養細胞:癌細胞として、ヒト non-small cell lung cancer 細胞株 EBC-1 および PC-14 を使用した。3. 増殖能の評価:96 well microplate を用い、細胞数を 5×10^3 個/well とし、10%FBS, DMEM, 5%CO₂, 37°Cの条件下で、それぞれ 10%, 20%, 30%の濃度の患者血清存在下に 48 時間培養を行った。培養後 MTT assay を行い、microplate reader で 540nm (対照 630nm) の吸光度 (O. D.) を測定し細胞数の評価とした。術前血清をコントロールとした場合の術後血清の増殖促進率を $100 \times (\text{術後 O. D.} - \text{術前 O. D.}) / \text{術前 O. D.}$ として計算した。

その結果、①術前後における評価:EBC-1, PC-14 とともに、血清濃度 0%の well (control) に比し、患者血清を加えた well で濃度依存性に O. D. の低下が認められ、患者血清の存在により癌細胞の増殖が抑制されることが確認された。術前後の比較では、術前 O. D. に比し術後の O. D. が有意に高値であった。さらに術後に関しては、術直後のほうが ICU 帰室後よりも O. D. が高値であった。術後の血清は、術前に比し癌細胞の増殖に有利な環境であると考えられた。

②術式における評価:術前血清をコントロールとした場合の術後血清の増殖促進率を CPB 群と OPCAB 群について比較したところ、PC-14, EBC-1 とともに、全血清濃度で、OPCAB 群が CPB 群に比し増殖促進率が低値で、PC-14 (10%, 20%)、EBC-1 (10%)において有意差を認めた。

今回の研究結果から、心臓外科手術の侵襲は、体内の癌細胞に対し増殖を促進する方向に働く可能性があること、また、その増殖促進効果は、体外循環を併用することによってより強くなる可能性があることが確認された。担癌患者であれば、本研究結果に基づいて可及的に体外循環を避けるなど低侵襲な術式を選択することが、生命予後の向上に寄与する可能性があると思われた。

本研究は、心臓外科手術の侵襲が体内の癌細胞に対し増殖を促進する方向に働く可能性があることを in vitro で示したはじめてのものである。また、担癌患者の冠動脈バイパス手術において体外循環使用手術よりも OPCAB を選択するほうが癌の増殖を少なくするという観点において妥当である事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)乙第885号		
学位授与の日	平成24年7月10日		
氏名	桑原次郎		
学位論文の題目	1) Prednisolone therapy for auricular hematomas in dogs and cats: effects and cosmetic outcome on the basis of intrinsic etiology 2) Attempts to induce auricular hematoma in a mouse model of collagen-induced arthritis (耳血腫の成因と治療に関する動物実験による研究)		
論文審査委員	主査	教授 山中 昇	
	副査	教授 藤田 茂之	教授 古川 福実

論文内容の要旨

犬猫に発症する耳血腫 (auricular hematoma, AH と略) は、外来患者のうち 0.1% を占め、極めて難治性の疾患である。また、人においても同様な病態が報告されている。本症の原因は耳介への外傷に起因する血腫であるとする外傷性病因論が 19 世紀に確立し、現代に至る。物理的誘発実験による再現性がないことなど外傷性病因論は多数の矛盾点があり、極めて科学的根拠に乏しい。最近、学位申請者はその背景に免疫学的あるいは炎症反応異常がある事が明らかとした。今回の研究では、以前発表した dexamethasone による治療的効果の成果を踏まえて、より有効で安全な prednisolone による治療方法を確立する事とマウスを用いた動物モデルを作成する事で本症の成因に迫ろうとした。

1) 免疫抑制量が確立している prednisolone 投与による犬猫の耳血腫への臨床的効果 -治療的効果と美容的成果-

方法：228 匹の犬と 56 匹の猫を対象として、投与群を 5 つの実験群に区分した。

- (1) 従来からの外科的な治療
- (2) prednisolone 2.2mg/kg 皮下注と病変部の貯留液排液
- (3) prednisolone 2.2mg/kg 皮下注と病変部の貯留液排液と局所の生食洗浄
- (4) prednisolone 6.6mg/kg 皮下注後 2.2mg/kg の皮下注に減量及び病変部の貯留液排液と局所の生食洗浄後、同剤 1-3mg 注入
- (5) prednisolone 6.6mg/kg 皮下注後、通院不能のため病変治療まで 3.3mg/kg 経口投与 (局所療法未試行)

結果：犬においても猫においても同様な傾向を認めた。以下、犬についての結果をしめす。治療後 6 日以内に完全治癒となったのは、グループ 4 で 48.4% (31/64) 以下、グループ 3 が 31.0% (14/45)、グループ 2 が 22.2% (10/45) で、グループ 1 と 5 では 0 であった。一方、治療までに 20 日以上必要であったのは、グループ 1 で 54.8% (23/42)、グループ 5 は 9.4% (3/32) であったが、グループ 2, 3, 4 は 0 であった。すなわち、prednisolone 投与群のグループ 2, 3, 4 で、全例 8 日以内に完全治癒していた。グループ 2, 3, 4 の中でも、「prednisolone 6.6mg/kg 皮下注後 2.2mg/kg の皮下注に減量及び病変部の貯留液排液と局所の生食洗浄後、同剤 1-3mg 注入」の群 (グループ 4) が最も短期間で治癒し、有効性も高かった。さらに、最終的な治療効果と整容的な結果を判定基準に照らしてみると、外科的な治療群では 0% であったのに対して、prednisolone 投与群の奏功群は 80.6% で極めて満足すべきものであり、本症の難治性は解決された。同時に行った血液検査において免疫学的ルーチン検査は改善していた。安全性についても特に問題は認められなかった。

2) マウスへの耳血腫発症誘導の試み

方法：耳血腫に極めて類似した耳介の疾患に relapsing auricular chondritis (RAC) が存在する。RAC は、耳介軟骨に存在する type II collagen が炎症等により変性し、その結果生じた抗体が発症に関与すると考えられる。耳血腫にも同様な抗体の存在が報告されている。そこで、collagen 誘発関節炎モデルマウスを作成し、本症の前駆病変として外耳道炎が最も高頻度である事を踏まえて実験を行

った。

結果: BALB/c マウスの耳介に菌体成分である lipopolysaccharide を皮下投与して, AH 類似の病態を誘発できた。興味深い事に type II collagen に対する抗体の前処置のみならず同量の IgG の前処置においても類似の病態を誘発できた。PCR では, MCP-1, TGF β , や IL-1 α に発現量の差があることが確認された。

考察: 耳血腫と RAC は、ともに耳介に発症し、臨床症状、病変部が耳介軟骨、難治性、自己免疫性、ならびにステロイドが奏功するといった点で類似している。耳血腫と RAC は本質的に異なる clinical entity であるとしても、MCP-1, TGF β , and IL-1 α などの解析から耳血腫の成因が明らかになる可能性がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成24年6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。

犬猫に発症する耳血腫 (auricular hematoma, AH と略) は、難治性疾患であり、ヒトにおいても同様な病態が報告されている。本症の原因として耳介外傷性病因論が支持されていたが、学位申請者はその発症の背景に免疫学的あるいは炎症反応異常がある事を明らかとしてきた。今回の研究では、prednisolone による治療方法を確立する事とマウスを用いた動物モデルを作成する事を試みた。

Prednisolone 投与による臨床的効果は、従来からの標準的外科治療および4種類の prednisolone 投与方法で比較検討した。最終的な治療効果と整容的な有用性は、prednisolone 投与群で 80.6%の奏功率を示したのに対して、同等の基準で判断した外科的な治療群での奏功率は 0%であった。投与方法の中では、「prednisolone 皮下注 6.6mg/kg 投与後、同 2.2mg/kg に減量及び病変部の貯留液排液と局所の生食洗浄後、同剤 1-3mg 注入」の群の有用性が最も優れていた。

Collagen 誘発関節炎モデルマウスを用いて、lipopolysaccharide を耳介部に皮下投与することにより、真皮及び皮下組織の炎症細胞浸潤と軽度の赤血球漏からなる AH 類似の病態を誘発できた。本動物モデルにおいて、type II collagen に対する抗体の前処置 (腹腔内投与) のみならず同量の nonfunctional IgG の前処置においても類似の病態を誘発できた。病態部位の PCR では、MCP-1, TGF- β , や IL-1 α に発現量の差があることが確認された。

これらの研究は、AH の病態に免疫異常やアレルギー性炎症異常が関与している事を明らかにしたものである。ヒトにおいても同様な病態がある事から、成因と治療を解析した本研究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)乙第886号		
学位授与の日	平成24年10月9日		
氏名	中瀬 隆之		
学位論文の題目	Expression of Cyclooxygenase-2 and Transforming Growth Factor-Beta 1 in Patients with the Early Recurrence of Hepatocellular Carcinoma Following Hepatectomy (肝細胞癌に対する肝切除後の早期再発における COX-2 と TGF-β1 の発現)		
論文審査委員	主査	教授 井原 義人	
	副査	教授 一瀬 雅夫	教授 山上 裕機

論文内容の要旨

【諸言】 肝細胞癌に対する外科的切除は手術手技や周術期管理の進歩により安全な治療となってきたが、再発率が高く、長期生存は満足できるものではない。Cyclooxygenase-2(COX-2)は炎症や癌化に関連する種々のサイトカインや成長因子を誘導する。Transforming growth factor-β(TGF-β)は細胞増殖抑制に関与しているといわれている。本研究では、肝細胞癌における COX-2 と TGF-β の各蛋白の発現を癌部、非癌部においてそれぞれ免疫組織染色を施行し、その染色発現と臨床病理学的因子との関連、未だ明確にはされていない2年以内の再発・予後との関連性について検討した。

【対象と方法】 和歌山県立医科大学第二外科で2000年2月～2003年12月の間に施行した初回肝細胞癌手術症例60例の手術摘出標本を対象とした。手術摘出標本を20%ホルマリンで固定しパラフィン包埋切片を作成し、スライドガラスを作成した。それぞれ抗COX-2抗体及び抗TGF-β抗体により免疫染色した。

【統計学的検討】 Stat View program (version 5 Hulus, Tokyo, Japan)を用いて解析し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】 COX-2の発現程度と臨床病理学的因子との関連性を検討すると、非癌部でのHigh COX-2群は、脈管浸潤のあるもの、肝内転移を認めるもの(IMs以上)および腫瘍径が5cm以上の症例において陽性を示した(各々、 $p=0.004$ 、 $p=0.001$ 、 $p=0.005$)。また癌部でのHigh COX-2群は、肝内転移IMs以上において陽性であった($p=0.007$)。術後2年以内の再発危険因子を検討すると、単変量解析ではAFP100ng/ml以上、800mlをこえる術中輸血、脈管浸潤あり、肝内転移IMs以上、腫瘍径 >5 cm、非癌部でのHigh COX-2群、癌部でのHigh COX-2群が有意な規定因子であり、多変量解析では、800mlをこえる輸血あり、脈管浸潤あり、非癌部でのHigh COX-2群の3因子が独立危険因子として認められた(各々、 $p=0.003$ 、 $p=0.025$ 、 $p=0.029$)。無再発生存率について、Low COX-2群、High COX-2群を比較検討したところ、非癌部及び癌部でのHigh COX-2群は無再発生存率が有意に不良であった($P < 0.001$ 、 $P=0.002$)。また、TGF-β陰性群、TGF-β陽性群を比較検討したところ、非癌部でのTGF-β陰性群は無再発生存率が有意に不良であった($p=0.045$)。更に、非癌部におけるTGF-β陽性・Low COX-2群、TGF-β陰性・High COX-2群を比較検討したところ、非癌部でのTGF-β陰性・High COX-2群はTGF-β陽性・Low COX-2群に比べ無再発生存率及び生存率が有意に不良であった(各々、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$)。非癌部のTGF-β陰性症例は5例に過ぎなかったが、その中でHigh COX-2群は4例(80%)にみとめ、非癌部でTGF-β陰性とHigh COX-2群の間には有意な相関関係がみとめられた($P=0.02$)。

【結語】 以上の結果より、非癌部でCOX-2が強陽性であり、TGF-βが陰性であれば肝切除術後に再発する危険が高くかつ予後不良因子であることが推察された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成24年9月18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。

本研究により肝細胞癌の摘出標本よりCOX-2とTGF-βを免疫染色することで、再発リスクの推測が可能となった。今後、COX-2阻害剤の投与により肝細胞癌術後患者の再発予防に寄与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られた。

学位記番号	博(医)乙第887号		
学位授与の日	平成24年10月9日		
氏名	大沢 龍 司		
学位論文の題目	Identification of HLA-A24-restricted novel T cell epitope peptides derived from P-cadherin and kinesin family member 20A. (Pカドヘリンおよびキネシンファミリーメンバー20A由来のHLA-A24拘束性新規T細胞エピトープペプチドの同定)		
論文審査委員	主査	教授 原 勲	
	副査	教授 村垣泰光	教授 山上裕機

論文内容の要旨

【緒言】 膵臓がんは予後不良ながんとして知られており、有効性の高い新規治療法の確立が望まれている中で、がんワクチン療法に対する期待が高まっている。ゲノム包括的な遺伝子発現解析より、膵臓がんを高頻度・高発現し、重要な正常臓器での発現を認めずさらに、重要な機能を有する遺伝子として、CDH3 (Cadherin-3) および KIF20A (Kinesin family member 20A) が同定されている。今回、膵臓がんに対する有効性の高いワクチン療法の開発を目指し、CDH3 および KIF20A を標的としたエピトープペプチドの同定を行った。

【方法】 BIMAS を用いた HLA-A*2402 に対する結合予測から、エピトープ候補ペプチドを選定した。それら候補ペプチドと HLA-A*2402 陽性の健常人由来 PBMC を用いて、CTL 誘導および CTL クローンの樹立を行い、腫瘍細胞株および強制発現細胞に対する CTL 活性を測定した。さらに、ペプチド-HLA-A24 複合体からなるデキストラマー試薬を用いたフローサイトメトリー法での解析により、CTL クローンにおける T 細胞受容体の発現解析を行った。

【結果】 CDH3 由来の 21 ペプチド、および KIF20A 由来の 28 ペプチドの中から、CDH3-10-807 および KIF20A-10-66 特異的な IFN- γ 産生能を有する CTL クローンを樹立した。樹立した CTL クローンをを用いて ^{51}Cr release assay を行ったところ、CDH3 または KIF20A を内在性に発現している HLA-A24 陽性腫瘍細胞 (PK-45P および MKN-45) に対する細胞傷害活性を認めた。また、強制発現細胞を用いた IFN- γ ELISA において、標的分子および HLA-A24 分子の両方を強制発現させた COS7 細胞に対してのみ IFN- γ 産生を認めたことから、CDH3-10-807 および KIF20A-10-66 にて誘導された CTL は、CDH3 または KIF20A を発現する HLA-A24 陽性腫瘍細胞を特異的に認識することが明らかとなった。さらに、デキストラマー試薬を用いた解析の結果、IFN- γ 産生能を有する CTL クローンにおいて、ペプチド特異的な T 細胞受容体の発現を確認した。

【考察】 膵臓がんを高頻度・高発現が認められる CDH3 および KIF20A 由来の HLA-A*2402 拘束性エピトープペプチドとして、CDH3-10-807 および KIF20A-10-66 を同定した。各ペプチドにて樹立した CTL クローンが CDH3 または KIF20A を内在性に高発現する HLA-A*2402 陽性の腫瘍細胞に対して、特異的に細胞傷害活性を示したことから、CDH3-10-807 および KIF20A-10-66 は、膵臓がんに対するがんペプチドワクチン療法に臨床応用可能であることが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 24 年 9 月 14 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。口頭による学術試問として、ペプチドワクチンを臨床応用するにあたって留意すべき点、およびそれらに対する今後の対策に関する考察、ならびに、新規エピトープペプチドと従来のペプチドで膵臓がんペプチドワクチンにおける有効性について比較説明を求めた。また、筆答による学術試問として、ペプチドワクチンにおける至適なアジュバントの条件について考察を求めた。その結果、上記審査において、科学的知見を踏まえた説明および回答を、学位請求者より得た。以上より、当該論文は、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888号		
学位授与の日	平成24年10月9日		
氏名	辻 俊明		
学位論文の題目	An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer (スロンボスポンディン発現腫瘍溶解性ヘルペスウイルスのヒト胃癌に対する抗腫瘍効果の増強)		
論文審査委員	主査	教授 原 勲	
	副査	教授 鶴尾吉宏	教授 山上裕機

論文内容の要旨

緒言

進行胃癌は腹膜転移や遠隔リンパ節転移のために手術治療が困難であることも多く、手術後の再発率が高いため、その予後は不良である。そのため、集学的治療が行われているがその効果も十分ではないため新規治療法の開発が望まれている。近年、遺伝子工学の発展により、制限増殖型ウイルスを用いた癌治療 (oncolytic virotherapy) が行われており、新規治療法の候補の一つとして考えられる。

本研究では、既に臨床試験として脳腫瘍の治療に用いられている腫瘍溶解性ヘルペスウイルス 1 型 (oncolytic HSV-1) G47Δ の改変型である T-01 を用いて、胃癌細胞に対する抗腫瘍効果を確認し、アポトーシス作用および腫瘍血管抑制作用などが報告されているヒト thrombospondin-1 (TSP-1) 遺伝子をウイルスゲノムに組み込み、oncolytic HSV-1 を増幅型ベクターとしても機能させ、外来遺伝子の発現効果を付加した機能分子搭載型腫瘍溶解性ヘルペスウイルス (arming oncolytic HSV-1) の開発を行うことを目的とした。

方法

1. 第3世代腫瘍溶解性ヘルペスウイルス T-01 の胃癌細胞株に対する殺細胞効果の検討

1x10⁴個のヒト胃癌細胞株を24ウェルプレートで培養し、24時間後に T-01 を、multiplicity of infection (MOI) = 0, 0.01, もしくは 0.1 で1時間感染させた。その後、感受性を確認するために、24時間毎に MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) アッセイで MOI=0 のコントロール群と比較して殺細胞効果を検討した。

2. ヒト TSP-1 発現型腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (T-TSP-1) の作成

RNA Blood kit (QIAGEN) を用いて健常ヒト血液より total RNA を抽出し、逆転写反応によりヒト TSP-1 の mRNA から cDNA を合成した。次に、シヤトルベクタープラスミド SV-01 に TSP-1 cDNA を遺伝子組換えし TSP-1 発現型プラスミド SV-TSP-1 を作成した。その後、BAC (bacterial artificial chromosome) プラスミド T-BAC と SV-TSP-1 を Cre リコンビナーゼにより組換えしてプラスミド T-BAC/SV-TSP-1 を作成し、制限酵素解析で確認した。T-BAC/SV-TSP-1 とプラスミド pOG44 (Invitrogen) をリポフェクション法でアフリカミドリザル腎細胞株 Vero 細胞に導入し、37°C の CO₂ インキュベーター内でインキュベートして FLP/FRT 組換えを行った。その後、細胞変性効果を認め、かつ、蛍光観察下で蛍光の無いプラークを選択して Vero 細胞に感染させて増幅し、目的ウイルス T-TSP-1 を得た。この T-TSP-1 を Vero 細胞およびヒト胃癌細胞株 TMK-1 細胞、ヒト胃癌細胞株 MKN74 細胞に MOI = 0.01 で感染させて抗 TSP-1 抗体 (R&D) を用いて免疫染色を行い、TSP-1 の発現を確認した。また、PBS(-)、T-01、T-TSP-1 に感染させた TMK-1 細胞よりタンパク質を抽出してウェスタンブロット法で TSP-1 蛋白の発現を確認した。

3. T-01 と T-TSP-1 の *in vitro* における抗腫瘍効果およびウイルス複製能の検討

1x10⁴個の胃癌細胞株を24ウェルプレートで培養し、24時間後に T-01 または T-TSP-1 を MOI=0.01, 0.1 で感染させた後、培養を続けた。その後、24時間毎に MTS アッセイを用いてコントロール群と比較して殺細胞効果を検討した。

次に、 1×10^5 個の胃癌細胞株を 24 ウェルプレートで培養し、24 時間後に T-01 および T-TSP-1 を MOI = 0.1 で感染させた後、培養を続け、48 時間後にスクレイパーで細胞を回収して 3 回凍結融解を繰り返して得られたウイルス液のウイルス力価を 6 ウェルプレートの Vero 細胞で測定して T-01 と T-TSP-1 のウイルス複製能を比較した。

4. 胃癌細胞株における TSP-1 発現腫瘍溶解性ヘルペスウイルスによるアポトーシスの検討

胃癌細胞株 TMK-1 細胞、胃癌細胞株 MKN1 細胞に T-TSP-1 および T-01 を MOI = 0.1 で感染させ、ApoBrdU キット (BD) を用いて TUNEL 染色を行い、フローサイトメリー法でアポトーシス細胞を測定した。

5. 皮下腫瘍モデルにおける *in vivo* 抗腫瘍効果、ウイルスの発現および血管新生抑制効果の検討

BALB/c nu/nu マウスに TMK-1 細胞を皮下接種し、 1×10^7 pfu の T-TSP1 および T-01 および PBS(-) を腫瘍内に注射した。腫瘍径を週 2 回測定し、長径 \times (短径)²/2 の計算式で腫瘍体積を計算して比較した。

また、BALB/c nu/nu マウスの一部をウイルス接種後 1 週間後に犠牲死させ、皮下腫瘍の一部は OCT コンパウンドに包埋して液体窒素で凍結し、4 μ m に薄切して HE 染色、抗 TSP-1 抗体 (R&D)、抗マウス CD31 抗体 (BD) を用いて免疫染色を行い、T-TSP-1 による遺伝子発現の確認および T-TSP-1 による腫瘍血管新生抑制効果を検討した。

結果

1. 第 3 世代腫瘍溶解性ヘルペスウイルス T-01 の胃癌細胞株に対する殺細胞効果の検討

T-01 の胃癌細胞株に対する抗腫瘍効果はウイルス量に依存的であった。さらに、胃癌細胞の分化度別での殺細胞効果の検討では一定の傾向は認めなかったことから、殺細胞効果は細胞株ごとの感受性の違いやその他のメカニズムによるものと考えられた。

2. ヒト TSP-1 発現型腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (T-TSP-1) の作成

T-BAC への SV-TSP-1 の組み込みを制限酵素解析で確認した。Vero 細胞、TMK-1 細胞および MKN74 細胞について免疫染色を行い T-TSP-1 感染細胞でのみ TSP-1 の発現を認めた。

TMK-1 細胞についてウエスタンブロット法を行い、T-TSP-1 感染細胞のみに TSP-1 の発現を確認した。

3. T-01 と T-TSP-1 の *in vitro* における抗腫瘍効果およびウイルス複製能の検討

いずれの胃癌細胞株でも T-TSP-1 の抗腫瘍効果は T-01 よりも高く、特に、MOI=0.01 では有意差を認めた。また、ウイルス複製能については T-01 に比べて T-TSP-1 では低下が認められる傾向を示した。

4. 胃癌細胞株における TSP-1 発現腫瘍溶解性ヘルペスウイルスによるアポトーシスの検討

ヒト胃癌細胞株 TMK-1 とヒト胃癌細胞株 MKN1 を比較すると、MKN1 ではコントロールウイルス T-01 と比べて T-TSP-1 でアポトーシス誘導が認められたが TMK-1 細胞では認められなかった。

5. 皮下腫瘍モデルにおける *in vivo* 抗腫瘍効果、ウイルスの発現および血管新生抑制効果の検討

コントロール治療群の PBS(-) 群と比較し、ウイルス治療群 (T-01 および T-TSP-1 群) では有意に抗腫瘍作用を認め、T-TSP-1 治療群では T-01 治療群と比較して有意に抗腫瘍効果が高いことがわかった。さらに、PBS (-) 群と比べてウイルス治療群 (T-01 および T-TSP-1 群) では有意な腫瘍血管新生抑制作用を認め、T-TSP-1 治療群では T-01 治療群に比べて腫瘍血管新生抑制作用が有意に高いことが判明した。

結語

1. TSP-1 発現型腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスを作成し、TSP-1 遺伝子の発現を免疫染色およびウエスタンブロットで確認した。
2. TSP-1 発現による抗腫瘍効果の増強を認めたが、TSP-1 の発現型ウイルス T-TSP-1 では T-01 と比較してウイルス複製能の低下を認めた。
3. TSP-1 発現による抗腫瘍効果増強の機序としてアポトーシスの関与は少なく、HSV-1 によるアポトーシスの制御機構と、胃癌細胞株の HSV-1 に対する感受性の差異が関与している可能性が示唆された。
4. *in vivo* モデルにおける T-TSP-1 の抗腫瘍効果の増強および TSP-1 による腫瘍血管新生抑制作用が認められた。

癌細胞では正常細胞と比べて TSP-1 の発現が低下し、oncolytic HSV-1 に感染した細胞は TSP-1 の発現が低下するという諸家の報告を踏まえて、TSP-1 発現型腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (T-TSP-1) を作成

し、TSP-1 発現による抗腫瘍効果の増強を *in vitro* と *in vivo* で確認した。その機序に関しては、*in vitro* における検討から、TSP-1 発現によるアポトーシス誘導のため、ウイルス複製能が減弱する傾向から、その抗腫瘍効果の増強は TSP-1 発現により胃癌での阻害が認められる TGF- β シグナル伝達の正常化など、アポトーシス以外の機序によると考えられた。また、*in vivo* では T-TSP-1 による抗腫瘍効果の増強は主に TSP-1 発現による腫瘍血管新生抑制作用が考えられた。

以上より、本研究において開発した T-TSP-1 により、胃癌細胞に対する強力な抗腫瘍効果が得られたことから、今後、消化管癌領域での機能遺伝子搭載型腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス療法が期待される。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成24年9月14日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

腫瘍微小環境において抗腫瘍効果を有するヒト thrombospondin-1 (TSP-1) 遺伝子をウイルスゲノムに組み込んだ機能分子搭載型腫瘍溶解性ヘルペスウイルス(arming oncolytic herpes simplex virus: HSV)の開発を行った。

1. コントロールの第3世代腫瘍溶解性ヘルペスウイルス T-01 の胃癌細胞株に対する感受性の検討を行い、胃癌細胞株に対する抗腫瘍効果はウイルス量に依存的であった。

2. ヒト TSP-1 cDNA を血液からの逆転写反応で作成し、シャトルベクターSV01 に組み込み、Bacterial artificial chromosome (BAC)システム、Cre 組換え、FLP/FRT 組換えを用いて TSP-1 発現型腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス(T-TSP-1)を作成した。さらに、PBS(-)、T-01、T-TSP-1 感染細胞で TSP-1 の発現を免疫染色法およびウエスタンブロット法を用いて T-TSP-1 感染細胞でのみ TSP-1 発現を確認した。

3. T-01 と T-TSP-1 の *in vitro* における抗腫瘍効果およびウイルス複製能の検討を行い、胃癌細胞株では T-TSP-1 の抗腫瘍効果は T-01 よりも高く、multiplicity of Infection (MOI) = 0.01 では有意差を認めた ($p < 0.05$)。一方ウイルス複製能は T-01 に比べて T-TSP-1 では低下が認められる場合もあった ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。

4. TSP-1 発現型腫瘍溶解性ヘルペスウイルスによるアポトーシス誘導効果を胃癌細胞株 TMK-1 と MKN1 で比較し、MKN1 では T-01 と比べて T-TSP-1 でアポトーシス誘導が認められたが TMK-1 では認められなかった。

5. 皮下腫瘍モデルで T-TSP-1 の抗腫瘍効果および血管新生抑制効果の検討を行い、コントロールの PBS (-) 群と比べてウイルス治療群 (T-01 群および T-TSP-1 群) では抗腫瘍効果の増強を認め ($p < 0.01$)、T-TSP-1 群では T-01 群と比較して抗腫瘍効果の増強を認めた ($p < 0.05$)。さらに PBS(-)群に比べて T-01 群では血管新生抑制作用を認め ($p < 0.01$)、T-TSP-1 群では T-01 群に比べて血管新生抑制作用の増強を認めた ($p < 0.05$)。

以上の結果より、TSP-1 発現により腫瘍溶解性ヘルペスウイルスの抗腫瘍効果の増強を認め、*in vitro* ではアポトーシス以外の機序、*in vivo* では主に腫瘍血管新生抑制作用が機序として考えられた。TSP-1 発現型腫瘍溶解性ヘルペスウイルスにより胃癌細胞に対する強力な抗腫瘍効果が得られ、今後、消化管領域での機能遺伝子搭載型腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス療法が期待されることから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889号		
学位授与の日	平成24年10月9日		
氏名	栗山俊之		
学位論文の題目	Propofol attenuates angiotensin II-induced vasoconstriction by inhibiting Ca ²⁺ -dependent and PKC-mediated Ca ²⁺ sensitization mechanisms (血管平滑筋収縮に及ぼす静脈麻酔薬プロポフォールの抑制作用の機序に関する研究)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡史郎	
	副査	教授 赤阪隆史	教授 西川光一

論文内容の要旨

【序論】

全身麻酔による低血圧の一因として、麻酔薬による血管拡張作用がある。さまざまな受容体刺激による血管収縮反応を全身麻酔薬が抑制することは知られているが、その機序については明らかでない。血管平滑筋の収縮作用は、細胞内カルシウム濃度 ([Ca²⁺]_i) の上昇とミオシン軽鎖のカルシウム感受性の増加によって調節されている。我々は、アンギオテンシンII (Ang II) 刺激による血管収縮反応に対するイソフルラン・セボフルランの抑制作用を検討し、イソフルラン・セボフルランは[Ca²⁺]_i 上昇およびカルシウム感受性調節を抑制することを明らかにした。しかしながら、静脈麻酔薬として頻用されているプロポフォールでの Ang II 刺激による血管収縮反応に及ぼす影響については、十分検討されていない。

本研究の目的は、プロポフォールによる Ang II 惹起性平滑筋収縮反応の抑制機序を、血管等尺性張力・細胞内カルシウム濃度同時測定、平滑筋培養細胞を用いたライブセルカルシウムイメージング法、Western blotting 法によるプロテインキナーゼ C (PKC) を測定することにより、明らかにすることである。

【方法】

1) 等尺性張力・[Ca²⁺]_i 同時測定

Wistar 雄性ラット (250g - 350g) をハロタンで麻酔したのちに、胸部下行大動脈を摘出し 3.5×5.0mm の内皮除去短冊標本を作成した。標本を Ca²⁺ 蛍光試薬である Fura-2/AM に 6 時間曝露した。95% O₂ - 5% CO₂ で飽和した 37°C リンゲル液を満たした恒温槽内に、張力トランスデューサーと蛍光測定装置を設置し、標本を 3.0g 静止張力で懸垂した。340 および 380nm の波長励起による 510nm の蛍光強度 (F340 および F380) を記録し、F340 と F380 の比 (R340/380) を [Ca²⁺]_i の指標とした。Ang II (10⁻⁷M) による [Ca²⁺]_i 変化をプロポフォール (10⁻⁶M) 存在下および非存在下で測定した。血管張力と [Ca²⁺]_i 変化はおのおの KCl (30mM) による張力変化と [Ca²⁺]_i を 100% とした。

2) ライブセルイメージング法を用いた細胞内カルシウム動態の観察

ガラスボトムディッシュ上で培養した、A-10 細胞 (DB1X embryonic rat の胸部大動脈平滑筋細胞からの培養細胞) の第 2~3 継代細胞を Ca²⁺ 蛍光試薬である Fluo-3/AM に 30 分曝露した。共焦点レーザー顕微鏡 (FV500, Olympus 社製) を使用し、プロポフォール (10⁻⁷~10⁻⁶M) 存在下あるいは非存在下で Ang II (10⁻⁷M) を適用し、A-10 細胞内でみられる 506nm の励起光に対する 526nm の蛍光強度を測定した。

3) Western blotting 法を用いた Ang II 惹起 PKC リン酸化の測定

Wistar 雄性ラット胸部下行大動脈を摘出し、内皮除去短冊標本を作成した。95% O₂ - 5% CO₂ で飽和した 37°C リンゲル液中で 60 分間平衡させたのち、プロポフォールおよび PKC 選択的阻害薬である bisindolylmaleimide 1 (BIS 1) を以下のとおり 15 分間曝露させた。

- ① vehicle
- ② vehicle
- ③ プロポフォル 10⁻⁶M
- ④ プロポフォル 10⁻⁷M
- ⑤ bisindolylmaleimide 1 (BIS 1) 10⁻⁵M

その後、①には vehicle、②～⑤には Ang II (10⁻⁷M) を適用し、4 分後に標本を急速凍結し反応を停止させた。凍結標本を lysis buffer (10⁻³M Tris-HCl pH7.5, 5×10⁻³M MgCl₂, 2×10⁻³M EDTA, 10⁻¹M NaCl) 中でホモジナイズし、10,000×g で 30 分 4℃にて遠心分離をおこない、上清を回収した。BCA 法でタンパク濃度を測定したのちに、SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に転写した。その後、抗 PKC 抗体・抗 phospho-PKC (pPKC) 抗体・抗β-actin 抗体に 1 時間曝露し、HRP-Gout Anti-Mouse IgG 抗体に 2 時間曝露し、化学発光免疫測定法を用いてタンパク測定を行った。total PKC に対する pPKC の比を PKC 活性の指標とした。

結果は中央値（四分位範囲）で統計処理として、2 群比較には Mann-Whitney U test、多群比較には Kruskal-Wallis test をおこない、p<0.05 を有意とした。

【結果】

1) Ang II (10⁻⁷M) 適用によるラット大動脈血管平滑筋収縮は、114% (103-128%) (n =6) で、プロポフォル (10⁻⁶M) 存在下では 42% (32-58%)であった。プロポフォルは濃度依存性にアンジオテンシン収縮を抑制した (P<0.01)。また、Ang II (10⁻⁷M) 適用によるラット大動脈血管平滑筋の[Ca²⁺]_i 変化は、139% (123-155%) (n =6)、プロポフォル (10⁻⁶M) 存在下では 92% (69-100%) であった (P<0.05)。

2) ラット A-10 細胞に Ang II (10⁻⁷M) 適用すると、細胞質均一に適用直後から一過性 (5~10 秒) の Fluo-3/AM による 520nm 励起光に対する 526nm 蛍光強度の上昇が観察され、適用 5 秒後には F/F₀=2.1 (1.6-2.2) となった。また、プロポフォル (10⁻⁷~10⁻⁶M) 存在下でも Ang II (10⁻⁷M) 適用による 526nm 蛍光強度の上昇は観察されたが、10⁻⁷M では F/F₀=1.3 (1.3-1.4), P<0.05、10⁻⁶M では F/F₀=1.3 (1.3-1.4), P<0.05 とその上昇はプロポフォル非存在下に比べ有意に小さかった。

3) Ang II (10⁻⁷M) 適用によりラット大動脈平滑筋における pPKC/total PKC は 1.1 (1.0-1.2)から 1.6 (1.5-1.7)にまで上昇し、PKC 活性の上昇が認められた。プロポフォルは濃度依存性に PKC リン酸化を抑制し、プロポフォル 10⁻⁶M 存在下では Ang II による PKC 活性の上昇をほとんど抑制した。

【考察】

今回の結果から、Ang II による血管平滑筋収縮は、プロポフォルによって抑制されることが観察された。プロポフォルは Ca²⁺チャネルに抑制的に作用して、[Ca²⁺]_i の上昇を抑制しているといった報告がされていた。本研究では Ang II 惹起平滑筋収縮の抑制は、Ang II で惹起される細胞質内で均一にみられる一過性の Ca²⁺上昇をプロポフォルが抑制するだけでなく、PKC pathway を介したミオシン軽鎖のカルシウム感受性の抑制も関与することを、はじめて示した。

【結語】

プロポフォルは、血管平滑筋[Ca²⁺]_i の上昇と PKC を介した収縮タンパクの Ca²⁺感受性の双方を抑制することによって、Ang II 収縮を抑制していることが示された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 24 年 9 月 20 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め上記学位論文について審査を行った。

静脈麻酔薬のプロポフォールは、本邦においてほぼ全例で全身麻酔導入に使用されている静脈麻酔薬であるが、低血圧をきたすことが多い。血管平滑筋の収縮作用は細胞内カルシウム濃度上昇と、PKC 経路が大きく関与するミオシン軽鎖のカルシウム感受性の増加によって調節されている。プロポフォールがさまざまな受容体刺激による血管収縮反応を抑制することは知られているが、その機序については明らかでない。

本論文では、ラット胸部下行大動脈を用いた血管等尺性張力・細胞内カルシウム濃度同時測定、平滑筋培養細胞を用いたライブセルカルシウムイメージング法、Western blotting 法によるプロテインキナーゼ C (PKC)測定をおこない、プロポフォールによるアンギオテンシン II 惹起性平滑筋収縮反応の抑制機序を検討した。

その結果、

- (1) プロポフォールは濃度依存性に、アンギオテンシン II によって惹起される平滑筋収縮と細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制した。
- (2) A-10 細胞 (DB1X embryonic rat の胸部大動脈平滑筋細胞からの培養細胞)にアンギオテンシン II を適用することによって、適用直後から細胞質均一に一過性 (5-10 秒) の細胞内カルシウム濃度上昇が観察されたが、プロポフォールはその細胞内カルシウム濃度上昇を抑制した。
- (3) プロポフォールは濃度依存性に、アンギオテンシン II 適用によるラット大動脈平滑筋の PKC リン酸化を抑制した。

以上より本論文は、プロポフォールはラット大動脈平滑筋においてアンギオテンシン II によって惹起される細胞内カルシウム濃度上昇を抑制するばかりでなく、PKC 経路を介したミオシン軽鎖のカルシウム感受性の抑制も関与することをはじめて示したものであり、学位論文としては価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第890号		
学位授与の日	平成24年12月11日		
氏名	山本明弘		
学位論文の題目	Pharmacological relationship between nicotinic and opioid systems in analgesia and corticosterone elevation (鎮痛作用およびコルチコステロン上昇作用におけるニコチン系とオピオイド系との薬理学的関係)		
論文審査委員	主査	教授 吉田宗人	
	副査	教授 前田正信	教授 岸岡史郎

論文内容の要旨

【緒言】

ニコチンはニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を介して、中枢神経系 (CNS) における様々な神経作用を調節することが知られている。中でも、ニコチンによる鎮痛作用や依存形成については、これまでも多くの関心が向けられてきた。さらに、ニコチンの全身投与により、脊髄で内因性オピオイドペプチドの mRNA が増加するとの報告があり、CNS におけるニコチン作用とオピオイド神経系との間に、薬理的相互作用が存在する可能性が考えられている。一方、モルヒネをはじめとするオピオイド系薬物は、視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA axis) を活性化させ、血清コルチコステロン (SCS) 値を上昇させるが、ニコチンもまた HPA axis の活性化を通じて SCS 値を上昇させることが知られている。本研究では、ニコチンの鎮痛作用および SCS 値上昇作用における、内因性オピオイド系の関与を明らかにするとともに、それらに関わる nAChR サブタイプについて検討した。

【方法】

本実験では ICR 系雄性マウスを使用した。鎮痛作用は Tail-Pinch 法に従い、ニコチンまたはモルヒネ投与後 15 分間隔で 120 分間逃避反応潜時を測定し評価した。SCS 値測定のための採血は、ニコチンまたはモルヒネ投与 30 分後に行い、蛍光法に従って定量した。nAChR またはオピオイド受容体拮抗薬として、それぞれメカミラミンまたはナロキソンを使用した。薬物はすべて生理食塩水に溶解し、投与量を 0.2 ml/10 g として背部皮下に投与した。

1) ニコチンおよびモルヒネの鎮痛作用

ニコチン 5 mg/kg またはモルヒネ 5 mg/kg 単回投与の鎮痛作用を検討した。メカミラミン 1 mg/kg またはナロキソン 1 mg/kg は、ニコチンまたはモルヒネ投与の 15 分前に処置した。

2) ニコチンおよびモルヒネの SCS 値上昇作用

ニコチン 5mg/kg またはモルヒネ 10 mg/kg 単回投与 30 分後の SCS 値上昇作用を検討した。メカミラミン 1 mg/kg またはナロキソン 1 mg/kg は、ニコチンまたはモルヒネ投与の 15 分前に処置した。

3) モルヒネまたはニコチン慢性投与後のそれぞれの鎮痛作用および SCS 値上昇作用

モルヒネ耐性は、モルヒネ 40 mg/kg を 1 日 2 回、4 日間投与することにより、また、ニコチン耐性は、ニコチン 5 mg/kg を 1 日 2 回、4 日間投与することにより形成した。最終投与翌日のニコチン 5 mg/kg およびモルヒネ 5mg/kg (または 7mg/kg) の鎮痛作用を測定した。同様に、ニコチン 5 mg/kg およびモルヒネ 7 mg/kg (または 10 mg/kg) 投与 30 分後の SCS 値を測定した。

4) ニコチンの鎮痛作用および SCS 値上昇作用に関与する nAChR サブタイプ

特異的 $\alpha 4\beta 2$ nAChR 受容体拮抗薬 (DH β E : 0.3~3 mg/kg) または特異的 $\alpha 7$ nAChR 受容体拮抗薬 (MLA : 0.3~3 mg/kg) をニコチン単回投与の 15 分前に投与し、ニコチン 5 mg/kg の鎮痛作用および SCS 値上昇作用に及ぼすこれら拮抗薬の影響を検討した。

【結果】

ニコチンおよびモルヒネの単回投与により、投与後 15 分から鎮痛作用が認められ、その作用は投与後 2 時間以内に消失した。ニコチンの鎮痛作用は、メカミラミンおよびナロキソンにより抑制され、さらに、モルヒネまたはニコチンの反復投与によっても抑制された。一方、モルヒネの鎮痛作用は、

ナロキソンまたはモルヒネ反復投与により抑制されたが、メカミラミンまたはニコチン反復投与の影響を受けなかった。ニコチンによる SCS 値上昇作用はメカミラミンまたはニコチン反復投与により抑制されたが、ナロキソンまたはモルヒネ反復投与の影響を受けなかった。一方、モルヒネによる SCS 値上昇作用は、ナロキソンまたはモルヒネ反復投与により抑制されたが、メカミラミンまたはニコチン反復投与の影響を受けなかった。ニコチンの鎮痛作用は、DH β E および MLA により抑制された。一方、ニコチンの SCS 値上昇作用は、DH β E により抑制されたが MLA の影響を受けなかった。

【結論】

本研究において、ニコチンの鎮痛作用は、 α 4 β 2 および α 7nAChR を介して発現し、そこには内因性オピオイド系の関与が示唆された。一方、ニコチンの SCS 値上昇作用は、 α 4 β 2nAChR を介して発現し、そこには内因性オピオイド系の関与は認められなかった。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成24年11月26日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。

ニコチンはニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を介して、中枢神経系 (CNS) における様々な神経作用を調節することが知られている。一方、ニコチンの全身投与により脊髄で内因性オピオイドペプチドの mRNA が増加するとの報告があり、CNS におけるニコチン作用とオピオイド神経系との間に、薬理的相互作用が存在する可能性が考えられている。また、モルヒネをはじめとするオピオイド系薬物は、視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA axis) を活性化させ、副腎皮質ホルモンを分泌させるが、ニコチンもまた HPA axis の活性化により副腎皮質ホルモンを分泌させることが知られている。本研究は、マウスをもちいて、ニコチンの鎮痛作用および血清コルチコステロン (SCS) 値上昇作用における内因性オピオイドシステムとの関与を明らかにするとともに、それらに関わる nAChR サブタイプについて検討したものである。

動物は ICR 系雄性マウスを使用した。鎮痛作用は Tail-Pinch 法に従い、ニコチンまたはモルヒネ投与後 15 分間隔で 120 分間逃避反応潜時を測定し評価した。SCS 値測定のための採血は、ニコチンまたはモルヒネ投与 30 分後に行い、蛍光法に従って定量した。nAChR またはオピオイド受容体拮抗薬として、それぞれメカミラミンまたはナロキソンを使用した。特異的 α 4 β 2nAChR 拮抗薬として dihydro- β -erythroidine (DH β E) を、また特異的 α 7nAChR 拮抗薬として methyllycaconitine (MLA) を使用した。

その結果、1) ニコチンの鎮痛作用は、メカミラミンおよびナロキソンにより抑制され、またモルヒネまたはニコチンの反復投与によっても抑制された。一方、モルヒネの鎮痛作用は、ナロキソンまたはモルヒネ反復投与により抑制されたが、メカミラミンまたはニコチン反復投与の影響を受けなかった。2) ニコチンによる SCS 値上昇作用はメカミラミンまたはニコチン反復投与により抑制されたが、ナロキソンまたはモルヒネ反復投与の影響を受けなかった。一方、モルヒネによる SCS 値上昇作用は、ナロキソンまたはモルヒネ反復投与により抑制されたが、メカミラミンまたはニコチン反復投与の影響を受けなかった。3) ニコチンの鎮痛作用は、DH β E および MLA により抑制された。一方、ニコチンの SCS 値上昇作用は、DH β E により抑制されたが MLA の影響を受けなかった。

以上より、ニコチンの鎮痛作用は、 α 4 β 2 および α 7nAChR を介して発現し、そこには内因性オピオイド系が関与すること、一方、ニコチンの SCS 値上昇作用は、 α 4 β 2nAChR を介して発現し、そこには内因性オピオイド系が関与しないことを明らかにしており、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第891号		
学位授与の日	平成25年2月12日		
氏名	松野正平		
学位論文の題目	Pro198Leu missense polymorphism of the glutathione peroxidase 1 gene might be a common genetic predisposition of distal symmetric polyneuropathy and macrovascular disease in Japanese type 2 diabetic patients (Gpx-1 遺伝子 Pro198Leu 遺伝子多型は日本人2型糖尿病における遠位対称性多発神経障害および大血管障害の進展に関与する)		
論文審査委員	主査	教授 前田正信	
	副査	教授 田島文博	教授 赤水尚史

論文内容の要旨

【緒言】糖尿病性神経障害は、その進行によってしびれや疼痛のみならず糖尿病足壊疽、シャルコー関節、致死性不整脈などを引き起こし、糖尿病患者の生命予後およびADLを著しく低下させる要因となり得ることが知られており、その発症および進展に関わるリスクを明らかにし、早期から適切に対応することが求められている。今回、糖尿病神経障害の進展に関与する遺伝素因として glutathione peroxidase-1 (GPx-1) を1つの候補遺伝子とし、同遺伝子多型が種々の臨床的危険因子とともに、その病態にどのような影響を与え得るのかを定量的神経障害評価項目を用いて検討した。GPx-1は活性酸素の一種である過酸化水素や過酸化脂質を還元型グルタチオンを補酵素として水やアルコールに還元する酵素であり、抗酸化機構の中で重要な働きを担うものである。同遺伝子における Pro198Leu ミスセンス多型の Pro/Leu 型では、GPx-1の転写活性が30%、酵素活性が40%低下することで、酸化ストレスに対する脆弱性が高まることが予想され、同多型が糖尿病神経障害の進展に影響を与える可能性が示唆される。

【方法】主観的症候として、下肢のしびれ・疼痛・頻回のこむら返り・立ちくらみ・周期性の便秘/下痢を問診にて聴取し評価を行い、客観的神経機能評価項目として、第1趾の定量的振動覚閾値、安静時心電図R-R間隔変動係数、head up-tilt試験の収縮期血圧降下度、尺骨神経の運動神経伝導速度、複合筋活動電位、正中神経の感覚神経伝導速度、感覚神経活動電位を測定、その上で糖尿病性多発神経障害を遠位対称性多発神経障害、糖尿病性自律神経障害、神経伝導障害に分類し、各病型と GPx-1 遺伝子 Pro198Leu ミスセンス多型および臨床因子との関連性を単変量解析および多変量解析にて評価を行った。

【結果】GPx-1 遺伝子多型は有痛性筋痙攣、下肢振動覚閾値の低下と有意に関連し、Pro/Leu 型が糖尿病性神経障害のなかでも遠位対称性感覚障害の危険因子であることが判明した。しかし一方で、同多型が糖尿病性自律神経障害、神経伝導障害には有意な影響を及ぼさず、末梢神経のコンポーネントにより神経障害の増悪因子が異なるという結果が導かれた。

【考察】特に GPx-1 遺伝子多型の影響を大きく受けた有痛性筋痙攣、下肢振動覚閾値の低下といったパラメータは、一般に末梢循環不全の影響をより強く受けるものと考えられており、GPx-1 遺伝子多型による酸化ストレス脆弱性の惹起が血管内皮機能低下と末梢循環不全を引き起こし、酸化ストレスによる直接的神経線維障害に加え、その血管因子が神経障害をより促進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25年1月11日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

論文の要旨としては、糖尿病神経障害の進展に関与する遺伝素因として glutathione peroxidase-1 (GPx-1) を1つの候補遺伝子とし、同遺伝子多型が種々の臨床的危険因子とともに、その病態にどのよ

うな影響を与え得るのかを定量的神経障害評価項目を用いて検討したものである。GPx-1 は活性酸素の一種である過酸化水素や過酸化脂質を還元型グルタチオンを補酵素として水やアルコールに還元する酵素であり、抗酸化機構の中で重要な働きを担うものである。同遺伝子における Pro198Leu ミスセンス多型の Pro/Leu 型では、GPx-1 の転写活性が 30%、酵素活性が 40%低下することで、酸化ストレスに対する脆弱性が高まることが予想され、同多型が糖尿病神経障害の進展に影響を与える可能性が示唆される。

今回の検討で用いられた糖尿病性神経障害の評価項目としては、主観的症候として、下肢のしびれ・疼痛・頻回のごむら返り・立ちくらみ・周期性の便秘／下痢を問診にて聴取し評価を行い、客観的神経機能評価項目として、第 1 趾の定量的振動覚閾値、安静時心電図 R-R 間隔変動係数、headup-tilt 試験の収縮期血圧降下度、尺骨神経の運動神経伝導速度、複合筋活動電位、正中神経の感覚神経伝導速度、感覚神経活動電位を測定、その上で糖尿病性多発神経障害を遠位対称性多発神経障害、糖尿病性自律神経障害、神経伝導障害に分類し、各病型と GPx-1 遺伝子 Pro198Leu ミスセンス多型および臨床因子との関連性を単変量解析および多変量解析にて評価している。

解析の結果、この GPx-1 遺伝子多型は有痛性筋痙攣、下肢振動覚閾値の低下と有意に関連し、Pro/Leu 型が糖尿病性神経障害のなかでも遠位対称性感覚障害の危険因子であることが判明した。しかし一方で、同多型が糖尿病性自律神経障害、神経伝導障害には有意な影響を及ぼさず、末梢神経のコンポーネントにより神経障害の増悪因子が異なるという結果が導かれた。この結果から、特に GPx-1 遺伝子多型の影響を大きく受けた有痛性筋痙攣、下肢振動覚閾値の低下といったパラメータは、一般に末梢循環不全の影響をより強く受けるものと考えられており、GPx-1 遺伝子多型による酸化ストレス脆弱性の惹起が血管内皮機能低下と末梢循環不全を引き起こし、酸化ストレスによる直接的神経線維障害に加え、その血管因子が神経障害をより促進する可能性が示唆された。

糖尿病性神経障害は、その進行によってしびれや疼痛のみならず糖尿病足壊疽、シャルコー関節、致死性不整脈などを引き起こし、糖尿病患者の生命予後および ADL を著しく低下させる要因となり得ることが知られている。よって、その発症および進展に関わるリスクを明らかにし、早期から適切に対応することが求められており、その候補遺伝因子の 1 つを提起するものとして、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892号		
学位授与の日	平成25年2月12日		
氏名	高木 伴幸		
学位論文の題目	Clinical and functional characterization of the Pro1198Leu ABCC8 gene mutation associated with permanent neonatal diabetes mellitus (ABCC8遺伝子変異 (Pro1198Leu) による新生児糖尿病の臨床的特徴と 機能解析)		
論文審査委員	主査	教授 三家 登喜夫	
	副査	教授 吉川 徳茂	教授 村垣 泰光

論文内容の要旨

【緒言】

新生児糖尿病は、新生児期から乳児期に発症する糖尿病のうち1型糖尿病を除外できる糖尿病の総称で、その臨床経過から、永続型新生児糖尿病と発症後に寛解が認められる一過性新生児糖尿病の2群に分類される。これまでの検討から、膵β細胞のATP感受性K⁺チャンネル(K_{ATP}チャンネル)の構成タンパクであるKir6.2とSUR1をコードする*KCNJ11*遺伝子や*ABCC8*遺伝子などいくつかの遺伝子が原因として報告されているがいまだ不明な点が多い。

新生児糖尿病は著明な高血糖あるいはケトアシドーシスを契機に発見され、これまでは、一生涯にわたりインスリン治療が必要と考えられてきた。しかしながら、原因遺伝子の解明とともに、前述の*KCNJ11*遺伝子や*ABCC8*遺伝子異常を有する患者において、経口血糖降下薬の一つであるスルホニル尿素(SU)薬を比較的高用量投与することでインスリン治療から離脱できた例が報告され、その原因を遺伝子レベルで明らかにしていくことは実際の治療を行う上においても重要であると考えられてきている。

今回、新生児糖尿病の原因・病態をさらに明らかにすることを目的に本研究を行った。

【方法】

1. 原因遺伝子検索

対象は生後7ヶ月目に新生児糖尿病の診断を受けた12歳女性とその家族。インフォームドコンセントを得た後、末梢血有核細胞からゲノムDNAを抽出、新生児糖尿病の原因遺伝子として報告されている*KCNJ11*遺伝子、*ABCC8*遺伝子、インスリン遺伝子の蛋白翻訳領域をPCR-直接シーケンス法を用いて検索を行った。シーケンス反応試薬としてBigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kitを用い、解析にはApplied Biosystemsの3100-Avant Genetic Analyzerを用いた。

2. 変異遺伝子の機能解析

CMVプロモーターを有する哺乳動物細胞発現プラスミドにすでに組み込まれているhuman*ABCC8*cDNAにQuick-Change site-directed mutagenesis kitを用いてPro1198Leu変異を導入した。

その後、COS1細胞に*KCNJ11*遺伝子と正常もしくは変異*ABCC8*遺伝子をlipofectamine2000を用い導入、パッチクランプ法にて種々のATP濃度における正常型および変異型のK_{ATP}チャンネル活性を測定した。さらに、SU薬であるトルブタミド(TOLB)(100μM)とグリベンクラミド(GBCM)(30nM)の投与によりK_{ATP}チャンネル活性がどの程度抑制されるかを比較検討した。

【結果】

1. 原因遺伝子検索

患者DNAにおいて、SUR1をコードしている*ABCC8*遺伝子にミスセンス変異(Pro1198Leu変異)が認められた。1198番目のProは種を超えて保存されており、機能的に重要な部位に位置すると考えられた。同じ遺伝子変異は食事療法のみでコントロールが可能な軽症の糖尿病を有している兄にも認められたが、非糖尿病者である母親には認められなかった。なお、新生児糖尿病の原因遺伝子としてこれ

まで報告のある、*KCNJ11* 遺伝子、インスリン遺伝子に関しても遺伝子変異の検索を行ったが特記すべき変異は認められなかった。

2. 変異遺伝子の機能解析

グルコース刺激による膵β細胞からのインスリン分泌反応では、グルコースが代謝を受け膵β細胞内の ATP 濃度が上昇、それを K_{ATP} チャネルが感受しチャネルが閉鎖、その結果、細胞膜が脱分極する経路が主要経路であると考えられている。また、SU 薬は K_{ATP} チャネルに結合しチャネルを閉鎖させインスリンを分泌させる薬剤である。

本研究において、 K_{ATP} チャネル活性を 50%に減少させる ATP 濃度 (IC_{50}) は正常型 ($23.4 \pm 2.5 \mu M$) に比し変異型 ($164.7 \pm 19.3 \mu M$) で高値であり、変異型では ATP に対する K_{ATP} チャネルの感受性が低下していると考えられた。さらに、SU 薬である TOLB ($100 \mu M$) と GBCM ($30nM$) の投与による K_{ATP} チャネル活性抑制効果は、いずれも正常型にくらべ変異型で低下していたが、TOLB に比し GBCM の効果がより残存していた。

3. 遺伝子診断後の臨床経過

原因遺伝子判明後、投与されていた混合型インスリンを中止し、SU 薬への変更を試みた。グリクラジド (GCZ) ($160mg/day$) 投与により、内因性インスリン分泌の指標である尿中 C ペプチドは $27.8 \mu g/day$ から $58.1 \mu g/day$ に増加、1 日尿糖は減少した。さらに GBCM ($0.625mg/day$) に変更したところ、1 日尿糖のさらなる減少および尿中 C ペプチドの著明な増加 ($83 \mu g/day$) が認められた。本変異は SUR1 の TOLB 結合部位に位置することから、同部位にのみ結合する TOLB や GCZ に比し、2 カ所で結合する GBCM の方がより有効であることが臨床的にも確認された。

【結 論】

永続型新生児糖尿病の原因となる *ABCC8* 遺伝子変異 (Pro1198Leu 変異) を同定した。本症例のように、 K_{ATP} チャネルを構成する遺伝子の変異が原因である場合にはインスリン治療から離脱できる可能性が高いことから、本疾患では、遺伝子診断が今後ますます重要になってくるものと思われる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成25年1月21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。

新生児糖尿病は新生児期から乳児期に発症する糖尿病のうち 1 型糖尿病を除外できる糖尿病の総称で、膵β細胞の ATP 感受性 K^+ チャネル (K_{ATP} チャネル) を構成する遺伝子 (*KCNJ11* 遺伝子と *ABCC8* 遺伝子) を含むいくつかの遺伝子が原因遺伝子として報告されているが、いまだ不明な点が多い。今回、新生児糖尿病の病態をさらに明らかにすることを目的に本研究を行った。

まず、生後 7 ヶ月目に新生児糖尿病の診断を受けた 12 歳女性を対象に、*KCNJ11* 遺伝子、*ABCC8* 遺伝子、インスリン遺伝子に関し遺伝子変異の検索を行った。その結果、SU 受容体 (SUR1) をコードしている *ABCC8* 遺伝子にミスセンス変異 (Pro1198Leu 変異) が認められた。

次に、変異遺伝子の機能解析を行うにあたり、発現プラスミドに組み込まれている human *ABCC8* cDNA に Quick-Change site-directed mutagenesis kit を用いて Pro1198Leu 変異を導入した。その後、COS1 細胞に *KCNJ11* 遺伝子発現プラスミドと正常もしくは変異 *ABCC8* 遺伝子発現プラスミドを lipofectamine2000 を用い導入、パッチクランプ法にて種々の ATP 濃度における正常型および変異型 SU 受容体の K_{ATP} チャネル活性を測定した。さらに、SU 薬であるトルブタミド (TOLB) ($100 \mu M$) とグリベンクラミド (GBCM) ($30nM$) の投与により K_{ATP} チャネル活性がどの程度抑制されるかを比較検討した。その結果、 K_{ATP} チャネル活性を 50%に減少させる ATP 濃度 (IC_{50}) は正常型 ($23.4 \pm 2.5 \mu M$) に比し変異型 ($164.7 \pm 19.3 \mu M$) で高値であり、変異型では ATP に対する K_{ATP} チャネルの感受性が低下していると考えられた。さらに、SU 薬である TOLB ($100 \mu M$) と GBCM ($30nM$) の投与による K_{ATP} チャネル活性抑制効果は、いずれも正常型にくらべ変異型で低下していたが、TOLB に比し GBCM の効果がより残存していた。

原因遺伝子判明後、インスリン治療を中止し SU 薬への変更を試みた。グリクラジド

(GCZ) (160mg/day) 投与により、内因性インスリン分泌の指標である尿中 C ペプチドは 27.8 μ g/day から 58.1 μ g/day に増加、1 日尿糖は減少した。さらに SU 薬を GBCM(0.625mg/day) に変更したところ、1 日尿糖のさらなる減少および尿中 C ペプチドの著明な増加(83 μ g/day) が認められた。本変異は SUR1 の TOLB 結合部位に位置することから、同部位にのみ結合する TOLB や GCZ に比し、TOLB 結合部位に加え benzamide 結合部位にも結合する GBCM の方がより有効であることが臨床的にも確認された。

本研究において、永続型新生児糖尿病の原因となる *ABCC8* 遺伝子変異の K_{ATP} チャネル機能に与える影響や遺伝子変異部位と薬剤反応性との関係などが明らかとなった。本結果は新生児糖尿病の診断、治療に対し重要な知見を与えるものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第893号		
学位授与の日	平成25年3月7日		
氏名	宮嶋正康		
学位論文の題目	Crosstalk of Humoral and Cell-Cell Contact-Mediated Signals in Postnatal Body Growth. (出生後の体成長における液性及び細胞間接触性シグナル伝達のクロストーク)		
論文審査委員	主査	教授 赤水尚史	
	副査	教授 山田源	教授 坂口和成

論文内容の要旨

緒言

Growth hormone (GH) は、主として growth hormone receptor (GHR)–Janus kinase (JAK2)–STAT5B を介して、Insulin-like growth factor 1 (IGF1) を産生することにより出生後の動物の成長を司っている。この GH-IGF1 軸に関連する分子の変異は小人症を来すことになるが、原因不明の低身長症患者も少なくない。

Ephrin 受容体 (Eph 群) は、受容体チロシンリン酸化酵素群に属し、その ligand である Ephrin と結合することにより、神経軸索誘導、境界形成、細胞移動・増殖及び血管新生を含む多彩な機能を伝達する。しかし、その機能にはまだ不明の点が多い。

本論文では、GH 刺激が JAK2 依存的及び非依存的に STAT5B を活性化し、IGF1 合成を誘導する過程における EphA4 の新規機能を報告する。

方法

Epha4 遺伝子欠失マウスを繁殖し、餌及び飲水は自由摂取条件下で飼育した。マウスは体重を測定し、血清及び臓器を採取した。血中 GH、thyroxine、corticosterone、IGF1、IGF binding protein 3 (IGFBP3) は ELISA 法により測定した。IGF acid-labile subunit (IGFALS) は、免疫ブロット法及びデンシトメトリーにより測定した。*Epha4*(-/-)線維芽細胞は 14.5 日令胎児より採取し、培養し、実験に供した。遺伝子発現回復操作は、retrovirus を vector として培養細胞に感染させて行った。*Gh*、*Ghr*、*Igf1* 及び *Igf1r* mRNA は各臓器より抽出し、RT-PCR により測定した。EphA4、GHR、JAK2 及び STAT5B の相互作用、リン酸化については、免疫沈降法及び免疫ブロット法により検出した。II型コラーゲン *Col2a1* の in situ hybridization は定法に従って行った。統計処理は、Student t-test あるいは Bonferroni post-test を使用した。

結果および考察

Epha4(-/-)マウスにおける小人症

出生前胎児の体重は、*Epha4*(+/+)、(+/-)及び(-/-)個体において差はなかったが、出生後の *Epha4*(+/-)及び(-/-)マウスは、遺伝子量依存的に有意に骨格、臓器を含む体格、体長及び体重において成長遅延を示した。骨端部成長板の HE 染色及び *Col2a1* の in situ hybridization により *Epha4*(-/-)の成長板の全ての層に重度の縮小が認められた。一方 *Epha4*(-/-)及び(+/-)マウスの体重当たりの摂食量は野生型マウスとの比較において減少していなかった。*Epha4*(-/-)及び(+/-)マウスの間には、血清 GH、*Gh* mRNA、thyroxine あるいは corticosterone に有意な変化はなかった。

Epha4(-/-)マウスにおける血清 IGF1、IGFBP3、IGFALS 及び肝臓 *Igf1* mRNA の減少

IGF1、IGFBP3 及び IGFALS において *Epha4*(-/-)マウスは野生型マウスと比較して有意に少なかった。雌の *Epha4*(-/-)マウスの血清 IGF1 値は野生型の 49.7%であり、雄では 36.5%であった。雌の IGFBP3 値は野生型の 34.1%であり、雄は 60.3%であった。また、雌の IGFALS 値は野生型の 53.2%であり、雄は 57.2%であった。*Igf1* mRNA の産生に関しては、肝臓及びその他の多くの組織において *Epha4*(-/-)マウスは野生型マウスに比べて有意に少なかった。しかしながら、肝臓の *Ghr* mRNA 及び *Igf1r* mRNA は、*Epha4*(-/-)マウスと野生型マウスの間に差はなかった。従って、*Epha4* 遺伝子欠損マウスでは、GH による IGF1 産生が障害されていることが推測された。

EphA4、GHR 及び JAK2 の相互作用及び GHR の刺激伝達系下流に対する EphA4 の効果

EphA4、GHR、及び JAK2 を内在性に発現している線維芽細胞を用いて、これらの分子の相互作用を免疫沈降および Western blotting により調べたところ、3 者は互いに直接結合をして複合体を形成していた。*Epha4*(-/-)線維芽細胞は、GH 刺激に対し、GHR 及び JAK2 のチロシンリン酸化反応の低下を

示したが、*Epha4* 遺伝子発現を回復させることにより、反応が回復した。また、GH 刺激の前に ephrin-A1 との前培養を行うことにより、GHR/JAK2/STAT5B の著しく持続するリン酸化が認められた。このことは、EphA4 が ephrin-A1 に刺激され、GHR 刺激伝達系に関与することにより、GH 刺激を増大させることを示唆している。

Jak2(-/-)線維芽細胞を用いた実験では、JAK2 の非存在下で EphA4 は GHR と結合し、ephrin-A1 及び GH と前培養を行うことによりこの結合が更に増強された。また、STAT5B は、*Jak2*(-/-)線維芽細胞においてもリン酸化されており、そのリン酸化は EphA4 の過剰発現により増強された。これは EphA4 により誘導される JAK2 非依存性の STAT5B 活性化経路の存在を示唆している。

EphA4 下流シグナルと IGF1 受容体下流シグナルのクロストーク

Ephrin/Eph 系下流シグナルと IGF1 受容体下流シグナルのクロストークも線維芽細胞で調べた。ephrinA1 刺激下では EphA4 発現の有無により IGF1 シグナル下流の MAPK は変化しなかったが、PI-3 kinase 系シグナル分子である AKT の活性化に関しては EphA4 非発現の状態が増強された。これらの結果から、IGF1 受容体の下流においても Ephrin/Eph 系シグナルとのクロストークの存在が示唆されるが、このレベルでのクロストークは細胞増殖や個体成長には直接関与しないものと考えられた。

以上から、EphA4 は、GH 受容体、JAK2 及び STAT5B と個々に複合体を形成することができ、直接的 (JAK2 非依存性) および JAK2 依存性の STAT5B の活性化を介して *Igf1* mRNA 発現を増強する。*Epha4* 遺伝子欠失マウスでは、肝臓からの IGF1 産生が減少することにより血清 IGF1 値が低下し、また、肝臓以外の末梢組織における IGF1 発現も減少することにより、*Epha4* 遺伝子量依存的に体格が小さくなる。これらの知見は、GH/GHR を介する液性シグナルが ephrin/Eph を介する細胞接触性シグナルにより調節され、これにより体および臓器の大きさが決定されるというシステムが存在することを示唆している。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 25 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。

Growth hormone (GH) は、主として Growth hormone receptor (GHR)- Janus kinase 2 (JAK2)- Signal transducers and activators of transcription 5B (STAT5B) のシグナル伝達系を介して、Insulin-like growth factor 1 (IGF1) 産生を促し成長を司る。このシグナル伝達系は GH-IGF1 軸と呼ばれ、その関連分子の変異は小人症を来す。しかし、これらの分子に変異が認められない原因不明の低身長症患者も少なくない。

Eph 群はチロシンキナーゼ型受容体群に属し、そのリガンドである ephrin の刺激により神経軸索誘導、境界形成、細胞増殖、細胞遊走、血管新生など多彩な機能を発揮するが、その機能の全てが解明されたわけではない。*Epha4* 遺伝子改変マウスでは、胎児期および出生時の体重は野生型と比べて差はないが、出生後は遺伝子量依存的に有意な成長遅延を示し、骨端部軟骨成長板の全層に重度の縮小が認められた。しかし、野生型マウスと比べて、摂食量に変化はなく、血清 GH、thyroxine 及び corticosterone 値にも有意差はなかった。脳下垂体 *Gh* mRNA 発現も正常であった。GH-IGF1 軸関連分子を調べたところ、血中 IGF1、IGF acid-labile subunit (IGFALS) 及び IGF binding protein 3 (IGFBP3) の濃度は有意に低値で、肝臓での *Igf1* mRNA 発現も低下していた。肝臓 *Ghr* mRNA 及び *Igf1r* mRNA の発現には差はなかった。以上のことから、*Epha4*(-/-)マウスでは、GH 刺激による IGF1 産生が障害されていることが推測された。

分子生物学的な研究では、細胞内在性 EphA4、GHR 及び JAK2 の複合体形成の有無を調べるため、免疫沈降および Western blotting を行い、これらの分子の直接結合による複合体形成を証明した。*Epha4*(-/-)線維芽細胞では、GH 刺激に対する GHR、JAK2 および STAT5B の活性化反応は低下していたが、*Epha4* 遺伝子導入によりこの反応が回復し、ephrin-A1 刺激により GHR/JAK2/STAT5B 活性化のさらなる増強が認められた。これらのことは、リガンドにより刺激された EphA4 が GHR 刺激伝達系の活性化増強に関与することを示唆している。

次に、JAK2 非依存性 STAT5B 活性化経路の有無を *Jak2*(-/-)線維芽細胞を用いて調べた。EphA4 は JAK2 の非存在下でも GHR と結合し、この結合は EphA4 および GHR をリガンドで刺激することにより更に増強された。また、*Jak2*(-/-)線維芽細胞においても、ephrin-A1 刺激により STAT5B のリン酸化および *Igf1* mRNA の発現は上昇し、EphA4 の過剰発現により更に増強された。以上から、JAK2 非依存性の EphA4 による STAT5B 直接活性化経路が存在することが示唆された。

さらに、IGF1 受容体 (IGF1R) 下流シグナルと EphA4 下流シグナルの相互作用を、*Epha4*(-/-)およびこの遺伝子発現を補完した線維芽細胞において、両受容体に対するリガンドの刺激下で調べた。これらの 2 種類の細胞で MAPK の反応には差はなく、PI-3 kinase の活性化は EphA4 発現下で減弱した。これらの結果から、IGF1R の下流においても Ephrin/Eph 系シグナルとのクロストークの存在が示唆されるが、このレベルでのクロストークは細胞増殖や個体成長には直接関与しないものと考え

えられた。

以上より、本論文は、活性化された EphA4 が GH 受容体、JAK2 及び STAT5B と複合体を形成し、JAK2 依存적および JAK2 非依存的に STAT5B を活性化することにより、*Igf1* 転写促進を介して IGF1 産生を促進し、体の成長に関わることを示した研究である。この研究は、GH/GHR 液性シグナル伝達系と ephrin/Eph 細胞接触性シグナル伝達系とのクロストークを明らかにし、GH-IGF1 軸による体格決定の定説を修正するシグナル伝達機構の存在を証明したものであり、学位論文として価値あるものと認められた。