

# 博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

平成25年度

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

# 目 次

平成25年度

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第489号	荒 井 潤	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Isolates from Middle Ear Fluid and Nasopharynx of Children with Acute Otitis Media Exhibit Phase Variation. (急性中耳炎患児の中耳貯留液および鼻咽腔より分離された肺炎球菌フェーズ変化の検討) .....	1
博(医)甲第490号	竹 井 慎	Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i> isolated from middle ear fluids of intractable acute otitis media. (難治性急性中耳炎における無莢膜型インフルエンザ菌の最小バイオフィルム抑制濃度に関する研究) .....	3
博(医)甲第491号	綿 貫 樹 里	Bone marrow large B cell lymphoma bearing cyclin D3 expression: clinical, morphologic, immunophenotypic, and genotypic analyses of seven patient (サイクリン D3 発現を伴う骨髄原発びまん性大細胞型リンパ腫の臨床的特徴) .....	6
博(医)甲第492号	島 貫 栄 弥	Molecular Cloning of <i>IGλ</i> Rearrangements using Long Distance Inverse-PCR(LDI-PCR). (インバース PCR 法による免疫グロブリンλ遺伝子転座点の単離) .....	9
博(医)甲第493号	高 橋 隼	Reduction of cortical GABAergic inhibition correlates with working memory impairment in recent onset schizophrenia (発症早期統合失調症における GABA 性皮質抑制の減弱は作動記憶の障害と関連する) .....	13
博(医)甲第494号	玉 川 俊 次	Role of miR-200c/miR-141 in the regulation of epithelial-mesenchymal transition and migration in head and neck squamous cell carcinoma (頭頸部癌の上皮間葉移行における microRNA200c/141 の役割) .....	15
博(医)甲第495号	菊 池 崇 史	Increase of 27-hydroxycholesterol in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease: possible role of 27-hydroxycholesterol in tissue fibrosis. (慢性閉塞性肺疾患の気道における 27-hydroxycholesterol の上昇および組織線維化に対する 27-hydroxycholesterol の役割についての検討) .....	18

博(医)甲第496号	岩本博光	Antitumor Immune Response of Dendritic Cells (DCs) Expressing Tumor-Associated Antigens Derived from Induced Pluripotent Stem Cells: in Comparison to Bone Marrow-Derived DCs (骨髄細胞由来樹状細胞と比較した、腫瘍関連抗原を発現している iPS 細胞由来樹状細胞の抗腫瘍効果) ……………	21
博(医)甲第497号	川後光正	Intrapleural administration of gelatin-embedded, sustained-release basic fibroblast growth factor for the regeneration of emphysematous lungs in rats (徐放性 b-FGF 製剤の胸腔内投与によるラットの気腫肺の再生) ……………	24
博(医)甲第498号	川端宏樹	Inhibitory effects of theophylline on the peroxynitrite-augmented release of matrix metalloproteinases by lung fibroblasts. (肺線維芽細胞における、パーオキシナイトライトにより惹起されるマトリックスメタロプロテアーゼ産生に対するテオフィリンの抑制効果についての検討) ……………	26
博(医)甲第499号	寺口真年	Prevalence and distribution of intervertebral disc degeneration over the entire spine in a population-based cohort : The Wakayama Spine Study (一般住民コホートをを用いた、全脊柱MRIにおける変性椎間板の分布と有病率について : The Wakayama Spine Study) ……………	29
博(医)甲第500号	上野恵子	Possible Involvement of Endogenous Opioid System Located Downstream of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor in Mice With Physical Dependence on Nicotine (ニコチンの身体的依存形成における $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体の下流に存在するオピオイド神経系の関与) ……………	31
博(医)甲第501号	尾崎雄一	Association between P-selectin glycoprotein ligand-1 and pathogenesis in Acute coronary syndrome assessed by optical coherence tomography (P-selectin glycoprotein ligand-1 と急性冠症候群の発症機序について OCT を用いた検討) ……………	34
博(医)甲第502号	籠谷良平	Prevalence of diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) of the whole spine and its association with lumbar spondylosis and knee osteoarthritis: the ROAD study (全脊柱におけるびまん性特発性骨増殖症の有病率と変形性腰椎症及び変形性膝関節症との関連) ……………	37

博(医)乙第894号	東郷直希	Liver regeneration effect of oncostatin M following hepatectomy for the rat cirrhotic liver model (ラット肝硬変肝切除モデルに対する Oncostatin M の肝再生効果) ……………	39
博(医)乙第895号	早田啓治	Inhibition of IL-17A in Tumor Microenvironment Augments Cytotoxicity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Tumor-Bearing Mice. (担癌マウスにおいて腫瘍微小環境の IL-17A 抑制は腫瘍浸潤リンパ球の細胞傷害活性を増強する。) ……………	42
博(医)乙第896号	井上泉	Elevated risk of colorectal adenoma with <i>Helicobacter pylori</i> -related chronic gastritis: a population-based case-control study (ヘリコバクターピロリ関連慢性胃炎による大腸腺腫リスク増強効果) ……………	43
博(医)乙第897号	森畠康策	Assessment of malignant potential of small hypervascular hepatocellular carcinoma using B-mode ultrasonography. (超音波 B モードを用いた多血性小肝細胞癌の悪性度診断に関する研究) ……………	46
博(医)乙第898号	畑田充俊	Comparison of the waveforms of transit-time flowmetry and intraoperative fluorescence imaging for assessing coronary artery bypass graft patency. (冠動脈バイパスグラフト開存におけるトランジットタイムフローメーター血流波形分析と術中蛍光造影検査の比較) ……………	49
博(医)乙第899号	戸村多郎	Validity of a Diagnostic Scale for Acupuncture: Application of the Item Response Theory to the Five Viscera Score (鍼治療のための診断尺度の妥当性: 五臓スコアへの項目反応理論の適用) ……………	51
博(医)乙第900号	小門正英	Increased fragility, impaired differentiation, and acceleration of migration of corneal epithelium of epiplakin-null mice (エピプラキンノックアウトマウスの角膜上皮での脆弱性、分化の低下、遊走の亢進) ……………	56
博(医)乙第901号	浜武継	Renal biopsy criterion in children with asymptomatic constant isolated proteinuria (小児における持続性無症候性蛋白尿の腎生検基準) ……………	59

博(医)乙第902号	熊谷 健	Correlation between echocardiographic superior vena cava flow and short-term outcome in infants with asphyxia (新生児仮死における心臓エコーによる上大静脈血流量と短期予後の関係) .....	60
博(医)乙第903号	綿貫 匡 則	Radiographic features and risk of curve progression of de-novo degenerative lumbar scoliosis in the elderly:a 15-year follow-up study in a community-based cohort (単純X線像からみた腰椎変性側弯新規発生例の特徴と進行の危険因子—地域コホート15年の追跡より—) .....	61
博(医)乙第904号	渡邊 実 香	Development of gastric cancer in nonatrophic stomach with highly active inflammation identified by serum levels of pepsinogen and <i>Helicobacter pylori</i> antibody together with endoscopic rugal hyperplastic gastritis ( <i>Helicobacter pylori</i> (HP)関連慢性胃炎の中で未分化型胃癌ハイリスク群を同定する研究) .....	63
博(医)乙第905号	那須 亨	Predicting lymph node metastasis in early colorectal cancer using the CITED1 expression (CITED1 発現を用いた早期大腸癌におけるリンパ節転移予測) .....	67
博(医)乙第906号	島本 幸 子	Is Visceral Fat Really a Coronary Risk Factor? - A Multi-detector Computed Tomography Study - (内臓脂肪は独立した冠危険因子か?—MDCTを用いての検討) .....	70
博(医)乙第907号	早田 敦 志	Stratifying a Risk for an Increased Variation of Airway Caliber among the Clinically Stable Asthma. (安定期喘息における肺機能の変動増大を予測する臨床指標の網羅的検討) .....	72

学位記番号	博(医)甲第489号		
学位授与の日	平成25年5月14日		
氏名	荒井 潤		
学位論文の題目	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Isolates from Middle Ear Fluid and Nasopharynx of Children with Acute Otitis Media Exhibit Phase Variation. (急性中耳炎患児の中耳貯留液および鼻咽腔より分離された肺炎球菌フェーズ変化の検討)		
論文審査委員	主査	教授 仙波 恵美子	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 山中 昇

## 論文内容の要旨

### 諸言

肺炎球菌は、小児鼻咽腔に常在するとともに、急性中耳炎の主要な起炎菌となる。1994年にWeiserは、肺炎球菌が莢膜の形成度差により2種類のコロニーの形態(フェーズ)をとることを報告している。すなわち、莢膜が薄く細菌の病原因子の発現が高いため、上皮細胞に付着しやすいTransparent型菌と、莢膜が厚いため補体結合性が低くオプソニン化食食に抵抗を示すOpaque型菌の2種類である。この2つのフェーズは、肺炎球菌が環境に適応しながら変化すると考えられているが、臨床的意義については検討されていない。本研究では、急性中耳炎が鼻咽腔に付着した肺炎球菌が、経耳管的に中耳腔に感染する機序に注目し、鼻咽腔および中耳貯留液での肺炎球菌のフェーズ変化およびその感染病態における意義を検討した。

### 方法

#### 1. 対象

和歌山県立医科大学付属病院および関連施設を受診した小児急性中耳炎重症例で、2週間以内に抗菌薬治療を受けていない42例(0~9歳、中央値1.6歳)から分離された肺炎球菌68株(中耳貯留液分離株37株、鼻咽腔分離株31株)を用いた。

#### 2. 肺炎球菌血清型の検討

Statens Serum Institute社製抗肺炎球菌莢膜多糖体特異抗体を用いた、莢膜膨化反応による血清型の識別を行った。

#### 3. 肺炎球菌フェーズの検討

中耳貯留液および鼻咽腔スワブをcatalase含有Tryptic soy agar寒天培地に塗布した後に、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で18時間培養した後に、位相差顕微鏡下に肺炎球菌フェーズの評価を行った。

#### 4. 肺炎球菌鼻咽腔分離株と中耳貯留液分離株の同一性の検討

同一患児から同時に採取した中耳貯留液・鼻咽腔由来の肺炎球菌について、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE法)およびMultilocus sequence typing法(MLST法)により遺伝子学的な同一性の検討を行った。

### 結果

1. 急性中耳炎患児において、中耳貯留液分離肺炎球菌と鼻咽腔分離肺炎球菌におけるフェーズの検討を行った結果、Opaque型株の割合は鼻咽腔分離菌では52.8%であったのに対して、中耳貯留液分離菌では92.4%であった( $p<0.01$ )。

2. PFGE法およびMLST法では同一患児の鼻咽腔分離菌と中耳貯留液分離菌では、遺伝子学的にも同一の菌株であった。すなわち、鼻咽腔あるいは中耳貯留液内では、Opaque型あるいはTransparent型のフェーズが異なっても、遺伝子学的同一性が認められた。

3. 同一患児から同時に採取した中耳貯留液分離菌と鼻咽腔分離菌における肺炎球菌のOpaque型の割合を比較した場合、中耳貯留液分離菌ではOpaque型の割合が有意に上昇していた(94.9% v.s. 60.7%,  $p<0.05$ )。

## 考 察

急性中耳炎は鼻咽腔にコロニーを形成した肺炎球菌が、経耳管的に中耳腔に感染することにより発症すると考えられている。この急性中耳炎の発症機序の中で、鼻咽腔より分離された肺炎球菌株と中耳腔より分離された肺炎球菌は、遺伝子学的にも同一菌株であるにもかかわらず、異なるフェーズを示した。このことは、肺炎球菌は、鼻咽腔あるいは中耳腔などの定着・感染部位によって、その主な病原因子である莢膜を変化させることで環境に適応していると考えられる。すなわち、鼻咽腔においては上皮細胞への付着に有利に働く莢膜の薄い Transparent 型が主要を占めたが、感染局所である中耳腔では補体結合性に乏しい莢膜の厚い Opaque 型が主要な菌株となっていることが判明した。このフェーズ変化の誘因因子については、同一株が自発的变化により Transparent 型から Opaque 型に変化するのか、あるいは中耳腔において Opaque 型株がより選択されるのか、その機序については未だ不明な点がある。しかし、本研究は急性中耳炎発症において、肺炎球菌の病原性が変化する可能性を臨床分離株により初めて示したものである。このような肺炎球菌の巧妙な感染機序を知ることは、鼻咽腔における肺炎球菌コロニー形成の解明とその予防法の開発、さらに急性中耳炎の難治化の病態の解明や効果的な治療法を探る上で重要な知見となると考える。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成25年4月12日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。肺炎球菌にとって莢膜は最も重要な病原因子のひとつであるが、莢膜の厚さによって Transparent 型と Opaque 型に分類される。Transparent 型肺炎球菌は上皮細胞に付着することに有利に働く一方で、Opaque 型肺炎球菌は、局所組織内に長期に存在することに適する。また、肺炎球菌はその存在環境などによりこの2つの形態が自然変化することが知られている。しかし、この莢膜の変化（フェーズ変化）が小児の急性中耳炎の病態においてどのような役割を演じているのかはまだ不明である。本論文では急性中耳炎患児において、肺炎球菌が鼻咽腔粘膜へ付着する際と中耳局所において病原性を発現する場合の莢膜の形態に着目し、中耳貯留液および鼻咽腔で肺炎球菌のフェーズ変化が存在することを明らかにし、その感染病態における意義を検討したものである。

急性中耳炎患児より分離された鼻咽腔および中耳貯留液からの肺炎球菌 68 株を用いて検討を行った。急性中耳炎患児より分離した肺炎球菌を、莢膜構造が薄いため透光性の高い Transparent 型コロニーと、莢膜構造が厚く透光性の低い Opaque 型コロニーとに catalase を含有した Tryptic soy agar 寒天培地を用いて分類すると、鼻咽腔と比較して中耳貯留液では Opaque 型コロニーで存在する肺炎球菌株が有意に増加していた。さらにパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) および Multilocus sequence typing 法 (MLST 法) を用いて同一患児から同時に採取した中耳貯留液・鼻咽腔由来の肺炎球菌株で遺伝子学的相同性を検討すると、高い遺伝子学的相同性が証明された。以上のことから、急性中耳炎患児における、鼻咽腔から中耳における肺炎球菌の Transparent 型から Opaque 型へのフェーズ変化が証明され、肺炎球菌は感染プロセスにおいて莢膜構造を変化させており、上皮細胞への付着に有利に働く莢膜の薄い Transparent 型から、病原性が高く莢膜の厚い Opaque 型にフェーズ変化を起こし、鼻咽腔から中耳に適合することで、宿主の免疫防御機能から逃れ急性中耳炎を発症すると考えられた。

本論文は急性中耳炎の初期段階である鼻咽腔粘膜への肺炎球菌の付着に莢膜の形態が関与し、さらに中耳局所においてその形態を変化させ、中耳炎を発症する過程で病原性が変化する可能性を臨床分離株で初めて示し、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490号		
学位授与の日	平成25年5月14日		
氏名	竹井 慎		
学位論文の題目	Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i> isolated from middle ear fluids of intractable acute otitis media. (難治性急性中耳炎における無莢膜型インフルエンザ菌の最小バイオフィルム抑制濃度に関する研究)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 近藤 稔和	教授 山中 昇

## 論文内容の要旨

### 諸言

無莢膜型インフルエンザ菌 (nontypeable *Haemophilus influenzae*: NTHi) は、急性中耳炎の主要な起炎菌の一つである。従来まで、NTHiは、抗菌薬に良好な感受性を示してきたが、近年β-lactamase nonproducing ampicillin resistant (BLNAR) 型の薬剤耐性株が増加し臨床上的の問題となっている。一方、急性中耳炎の難治化には、起炎菌の薬剤耐性化のみでなく、NTHiのバイオフィルム形成も大きく関与していることが報告されている。そのため、バイオフィルムによる感染症の難治化に対しては、従来までの分離された浮遊菌に対する抗菌活性の指標である最小発育阻止濃度 (Minimal inhibitory concentration: MIC) のみでなく、バイオフィルムを形成した細菌に対する抗菌薬の感受性を評価する必要がある。

本研究では、難治性中耳炎から分離されたNTHiに対する抗菌薬の有効性について、従来のMICに加え、最小殺菌濃度 (minimal bactericidal concentration: MBC) およびバイオフィルムを形成した細菌に対する最小バイオフィルム抑制濃度 (minimal biofilm eradication concentration: MBE C) の検討を行った。

### 対象と方法

#### 1. NTHi株

本研究には、難治性中耳炎患児の中耳貯留液から得られたNTHi臨床分離株12株を用いた。

#### 2. 抗菌薬

抗菌薬としてβラクタム薬のアモキシシリン (AMPC)、セフジトレン (CDTR-PI)、マクロライド系薬のクラリスロマイシン (CAM)、アジスロマイシン (AZM)、キノロン系薬のトスフロキサシン (TFLX)、レボフロキサシン (LVFX) を用いた。

#### 3. 抗インフルエンザ菌活性の検討

##### ① 最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration: MIC)

日本化学療法学会標準法に準じて測定した。

##### ② 最小殺菌濃度 (minimal bactericidal concentration: MBC)

①と同様の手法で行い、ウェル内培養液10μlをチョコレート寒天培地にて37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で24時間培養し、細菌の発育しない最小の抗菌薬濃度をMBCとした。

##### ③ 最小バイオフィルム殺菌濃度 (minimal biofilm eradication concentration: MBEC)

NTHi懸濁菌液を96ピンレプリケータで37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で18時間振盪培養し、96のピン上に均質なバイオフィルムを形成させた。ピン上バイオフィルムを段階希釈した抗菌薬の96ウェルプレートに移し、さらに18時間反応させた。ピンをリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した後、抗菌薬を含まないBrain heart infusion (BHI) 培養液で37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下でさらに24時間

培養してバイオフィーム内の生菌を遊離させた。生菌の確認は、ウェル内培養液をチョコレート寒天培地に接種し確認し、細菌が発育しない最小の抗菌薬濃度をMBECとした。

#### 4. バイオフィームの定量的検討

AMPCおよびLVFXについては、抗菌薬暴露後にクリスタルバイオレット染色法によるバイオフィームの定量的検討と走査型電子顕微鏡による形態変化の観察を行った。

### 結果

#### 1. 抗バイオフィーム活性の検討

AMPCのMIC<sub>50</sub>は4μg/mlであるのに対し、MBEC<sub>50</sub>は全株で1024μg/ml以上となった。また、CDTR-PIのMIC<sub>50</sub>が0.125μg/mlであるのに対し、MBEC<sub>50</sub>は2048μg/mlであった。βラクタム系抗菌薬ではMICに比べ、MBECは著明に高値であった。

キノロン系薬では、TFLXのMIC<sub>50</sub>は0.008μg/ml、MBEC<sub>50</sub>は0.016μg/mlであり、LVFXのMIC<sub>50</sub>は0.016μg/ml、MBEC<sub>50</sub>は0.016μg/mlであった。キノロン系薬ではMBECはMICに近い濃度であった。

マクロライド系薬では、CAMのMIC<sub>50</sub>は8μg/ml、MBEC<sub>50</sub>は32μg/mlであり、AZMのMIC<sub>50</sub>は1μg/ml、MBEC<sub>50</sub>は0.5μg/mlであった。キノロン系抗菌薬と同様にマクロライド系薬のMBECはMICに近い濃度であった。

#### 2. バイオフィームの定量的評価

AMPCを暴露させた場合には、NTHi 4菌株のうち、2菌株でバイオフィーム形成は抑制されなかった。一方、LVFX暴露では、NTHi 4菌株ともバイオフィーム形成は明らかに抑制されていた。

また、走査型電子顕微鏡による形態学的な検討では、AMPCでは0.5μg/mlおよび1024μg/mlのいずれの濃度でもバイオフィーム構造に変化がないのに対し、LVFXでは0.004μg/mlおよび0.031μg/mlでバイオフィームが減少するとともに、NTHi菌数が減少した。

### 考察

今回、各種抗菌薬のMBECを検討することで、βラクタム系抗菌薬、マクロライド系抗菌薬、キノロン系抗菌薬といった抗菌薬の種類により、バイオフィーム形成NTHi菌に対する抗菌効果は著しく異なることが判明した。すなわち、臨床で使用頻度が高いAMPC、CDTRといったβラクタム系抗菌薬では、従来までの抗菌薬の有効性の指標とされてきたMIC値の抗菌薬濃度では、バイオフィームを形成したNTHi菌には殺菌効果を示さないのに対して、キノロン系薬ではMBECはMICに近い濃度であった。また、マクロライド系抗菌薬においても、バイオフィーム形成菌に対する抗菌作用は見られるものの、βラクタム系抗菌薬と同様に高濃度での暴露が必要となる。以上の成績から、バイオフィーム形成が主要な原因となっている難治性中耳炎では、抗菌薬の抗バイオフィーム作用の特性を考慮し、MBECの低い抗菌薬を選択する必要があると考える。

### 結論

1. 96ピンレプリケータを用いたMBECの計測は、バイオフィームを形成したNTHiに対する抗菌薬の効果のよい指標となる。
2. バイオフィーム抗菌薬の種類によりバイオフィーム内細菌に対する効果が著明に異なる。
3. 難治性中耳炎に対する抗菌薬治療においては、起炎菌のバイオフィーム形成と、抗菌薬の持つ抗バイオフィーム作用の特性を考慮して、抗菌薬を選択することが重要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 4 月 22 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

無莢膜型インフルエンザ菌(NTHi)は急性中耳炎の主要な起炎菌であり、バイオフィルムを形成し急性中耳炎の難治化に大きく関与している可能性が報告されている。従来、感染症治療において、起炎菌に対する薬剤感受性試験は、最小発育阻止濃度（Minimal inhibitory concentration: MIC）が主に用いられていた。しかし MIC は分離された浮遊菌に対する抗菌活性を示すので、バイオフィルムを形成した細菌に対する抗菌活性は評価されていなかった。本論文では難治性中耳炎から分離された NTHi に対する抗菌薬の有効性について、従来の MIC に加え、バイオフィルムを形成した細菌に対する抗菌活性を示す新たなパラメーターとして、最小バイオフィルム抑制濃度（minimal biofilm eradication concentration: MBEC）を用いて検討を行ったものである。

難治性中耳炎患児の中耳貯留液から得られた NTHi 臨床分離株 12 株を用い、抗菌薬として  $\beta$  ラクタム系薬のアモキシシリン、セフトレン、マクロライド系薬のクラリスロマイシン、アジスロマイシン、キノロン系薬のトスフロキサシン、レボフロキサシンを用いた。 $\beta$  ラクタム系薬では MBEC は非常に高値で MIC と強く乖離しているのに対し、キノロン系薬では MIC、MBEC ともに臨床で用いられる濃度よりも低値であった。マクロライド系薬では MIC と MBEC は近い濃度であった。アモキシシリンおよびレボフロキサシンのバイオフィルムに対する作用を、クリスタルバイオレット法および走査型電子顕微鏡により検討した結果、アモキシシリンはバイオフィルム形成を抑制しないのに対し、レボフロキサシンはバイオフィルム形成を強く抑制することを明らかにした。

以上のことから、抗菌薬の種類により、バイオフィルム形成インフルエンザ菌に対する抗菌効果は著しく異なることが判明した。また、 $\beta$  ラクタム系薬では従来までの抗菌薬の有効性の指標とされてきた MIC 値の抗菌薬濃度では、バイオフィルムを形成したインフルエンザ菌に殺菌効果を示さないのに対し、キノロン系薬ではバイオフィルム形成インフルエンザ菌に対する高い抗菌効果が示された。マクロライド系薬も高濃度ではバイオフィルム形成菌に対する抗菌作用が認められた。

本論文は、バイオフィルム形成インフルエンザ菌による難治化の機序として、バイオフィルム内細菌に対する抗菌効果が抗菌薬の種類によって大きく異なることを証明し、MBEC が抗菌薬の臨床的な有効性を示す有用なパラメーターとなり得ることを示し、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491号		
学位授与の日	平成25年6月11日		
氏名	綿貫樹里		
学位論文の題目	Bone marrow large B cell lymphoma bearing cyclin D3 expression: clinical, morphologic, immunophenotypic, and genotypic analyses of seven patient (サイクリンD3発現を伴う骨髄原発びまん性大細胞型リンパ腫の臨床的特徴)		
論文審査委員	主査	教授 井原義人	
	副査	教授 坂口和成	教授 中熊秀喜

## 論文内容の要旨

### 緒言

びまん性大細胞型 B リンパ腫 (以下 diffuse large B cell lymphoma: DLBCL) は、悪性リンパ腫の中でもっとも頻度の高い疾患である。しかし、種々の疾患単位を内包しており、形態・臨床病態・生物学的性状において極めて多様性に富んでいる。現在も疾患単位の抽出が行われ、層別化治療への取り組みが進行している。

悪性リンパ腫は末梢リンパ節組織から発生すると考えられ、初診時にはリンパ節腫大を伴うことが多い。B 細胞性慢性リンパ球性白血病や濾胞性リンパ腫といった疾患では、リンパ節腫大のほかに病初期から腫瘍細胞の骨髄浸潤を伴うことがある。一方、DLBCL においては、病初期から腫瘍細胞の骨髄浸潤がみられることは少ない。しかし稀ではあるが、初診時にリンパ節腫大がなく骨髄浸潤を認める DLBCL の症例報告があり、これらの症例は急速に進行する病状や脾臓腫大といった共通の臨床像がみられている。このような骨髄原発びまん性大細胞型 B リンパ腫 (以下、BM DLBCL) と呼ぶべき一群の発生機序および腫瘍細胞起源は不明である。

我々は、病初期から骨髄浸潤を認め、急激な病状の進行を呈した BM DLBCL の 2 例において 6p21 に位置するサイクリン D3 遺伝子 (以下 cyclin D3 gene: *CCND3*) と 14q32 に位置する免疫グロブリン重鎖遺伝子 (以下 immunoglobulin heavy chain gene: *IGH*) の転座 (t(6;14)(p21;q32)) を同定し、*CCND3* の過剰発現を伴うことを見出した。今回、全国の施設から BM DLBCL の症例 (12 例) を集め、*CCND3* 発現を免疫染色・ノーザン法・ウエスタン法で検討した。その結果、12 例中 7 例で *CCND3* の過剰発現を確認した。また、7 例の臨床像をまとめたところ、病初期からの白血病化、リンパ節腫大を伴わない脾臓腫大、血小板減少、血清 LDH の高値、急激な病状の進行といった共通点がみられた。これらの結果は BM DLBCL の発生機序に *CCND3* 過剰発現が関与していることを示唆したものであった。腫瘍細胞の *IGH* の構造を決定したところ、B 細胞性慢性リンパ球性白血病細胞と同様に辺縁帯由来の B 細胞であることが推測された。

### 症例と方法

- 1、症例：BM DLBCL として学会や専門誌に発表されている症例 (12 例) を発表者に連絡をとって収集した。下記の方法で *CCND3* 発現を検討し *CCND3* 陽性の 7 例をさらに検討した。
- 2、*CCND3* 発現：免疫染色法、ノーザン法、ウエスタン法を用いて *CCND3* の発現を検討した。免疫染色にはマウス抗 *CCND3* 抗体 (1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA) を用い EnVision+kit (Dako Japan, Kyoto, Japan) を用いた。ノーザン法は 3 例で施行可能であった。全 RNA を Trizol を用いて抽出した後、ホルマリン添加アガロースゲルで分離してナイロン膜に転写した。その後、ヒト *CCND3* mRNA 断片をジゴキシゲニンでラベルしたプローブを用い *CCND3* mRNA の発現を検討した。ウエスタン法は 2 例で施行可能であった。
- 3、*IGH* 遺伝子可変部(VH)領域の塩基配列：7 例中 5 例 (症例 1,3,4,5,6) はホルマリン固定組織標本より TaKaRa Gen とるくん TM エタ沈キャリアを用いて DNA を抽出後 semi-nested PCR を用いて VH の塩基配列を分析し、症例 2, 7 は Long distance inverse PCR (LDI-PCR) を用いて VH の塩基配列を増幅した。塩基配列の解析には、Basic Local Alignment Program

Tool (BLAST search program; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) および IMGT/V-QUEST (<http://www.imgt.org>) を用いた。VH の塩基配列の変異レベルは B 細胞性リンパ性白血病細胞におけるカット・オフ値(2%)を用い、2%以上の塩基配列に変異があるものを somatic hypermutation ありとした。

- 4、*IGH* 遺伝子スイッチ再結合：高分子 DNA が抽出できた 3 例で *IGH* 遺伝子のクラススイッチ再結合を検討した。既報のごとく、各スイッチ領域 ( $S_{\mu}$ 、 $S_{\gamma}$ 、 $S_{\alpha}$ ) の 5'側と 3'側を認識する DNA 断片を用いてサザン法を行った。

## 結果

**臨床像：**平均年齢 67.8 歳、男性 3 例 女性 4 例、主訴は、発熱 4 例、倦怠感 2 例、労作時呼吸困難 1 例であった。既往歴は、7 例中 4 例に免疫疾患（慢性関節リウマチ 2 例、自己免疫性溶血性貧血 1 例、IgA 腎症 1 例）、2 例に悪性腫瘍（胃癌 1 例、濾胞性リンパ腫 1 例）を認めた。理学的所見では、全例でリンパ節腫大がなく、肝脾腫を認めた。7 例中 6 例が急速な進行により 3 年以内に死亡した。

**検査所見と形態学的特徴：**全例で血小板が減少していた。7 例中 6 例で末梢血中への腫瘍細胞の出現を認めた。全例で血清 Lactate dehydrogenase (LDH) が上昇していた。腫瘍細胞は、全例で CD20 (+) 成熟 B 細胞であり、7 例中 6 例で CD5(+) であった。染色体検査では、7 例中 3 例で t(6;14)(p21;q32) の染色体転座を認めた。

腫瘍細胞の形態は、7 例中 2 例で核の偏りのあるリンパ形質細胞様細胞であり、4 例で、N/C 比の高い芽球様細胞であった。骨髄の組織標本では 6 症例で異形リンパ球の骨髄浸潤もしくは巣状増殖がみられた。

**CCND3 発現：**全例（骨髄塗抹標本 6 例、リンパ節組織標本 1 例）免疫染色にて核内 *CCND3* を検出した。7 例中 2 例で *CCND3* mRNA 過剰発現があり、1 例で *CCND3* 蛋白を認めた。

***IGH* 遺伝子再構成の解析：**症例 1.3.5.6 では Nested PCR を用いて VH 領域 DNA 断片を増幅できた。塩基配列を決定したところ、VH 変異は症例によって異なっていた (0.0% から 11%)。また、高分子 DNA が抽出できた症例では、既報の LDI-PCR 法を用いて VDJ 再構成の塩基配列を決定した。クラススイッチ再結合を検討できた 3 例では、いずれもクラススイッチ領域に再構成があり、2 例では転座が、1 例では  $S_{\mu}$ 、 $S_{\gamma}$ 、 $S_{\alpha}$  の欠失が確認できた。

## 考察

今回、*CCND3* 発現を示した BM DLBCL (7 例) の臨床像をまとめ、*IGH* 構造を解析することにより腫瘍細胞の起源を検討した。

*IGH* 遺伝子との遺伝子転座によるガン関連遺伝子の過剰発現は悪性リンパ腫の臨床像と強い相関がある。今回、BM DLBCL の 7 例中の 3 例に *CCND3* 遺伝子座(6p21)と *IGH* 遺伝子座(14q32)との染色体転座(t(6;14)(p21;q32))を認めた。一方、悪性リンパ腫においては遺伝子増幅による *CCND3* が過剰発現することも報告されている。t(6;14)(p21;q32)が同定できなかった 4 例では、遺伝子増幅による *CCND3* 過剰発現の可能性がある。本研究でまとめた *CCND3* 陽性 BM DLBCL は、病初期からの白血病化、リンパ節腫大を伴わない脾腫大、血小板減少、血清 LDH の高値、急激な病状の進行といった共通の臨床像がみられた。*CCND3* 陽性の BM DLBCL は特異な臨床亜型の可能性があると考えられる。

B 細胞は分化にしたがって *IGH* 遺伝子の変化が生じる。たとえば、骨髄において B 細胞分化にコミットした細胞では *IGH* の V-D-J 再結合が生じ、リンパ節胚中心では variable 領域の somatic hypermutation とクラススイッチ再結合が生じる。そのため *IGH* の遺伝子構造を検討することによって腫瘍細胞の起源が胚中心前の段階か胚中心後の段階かを推定することができる。今回の研究でも腫瘍細胞の *IGH* 構造を検討し腫瘍細胞の起源を検討した。7 例中 2 例は VH の somatic mutation 陽性で、7 例中 3 例ではクラススイッチ再結合が確認できた。これらの結果は、B 細胞性慢性リンパ性白血病細胞の *IGH* 構造と類似していた。このため、今回検討した腫瘍細胞は B 細胞性慢性リンパ性白血病と同様にリンパ節辺縁帯の B リンパ球由来ではないかと推察される。

我々の結果は、*CCND3*過剰発現を示す BM DLBCL が一つの臨床亜型であること、および、その腫瘍細胞起源はリンパ節辺縁帯由来であることを示唆した。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成25年5月27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。

びまん性大細胞型 B リンパ腫（以下 diffuse large B cell lymphoma: DLBCL）の多くは、末梢リンパ節腫大より発症する。しかし、初診時にリンパ節腫大がなく骨髄浸潤を認める DLBCL がある。このような骨髄原発びまん性大細胞型 B リンパ腫（以下、BM DLBCL）と呼ぶべき一群の発生機序および腫瘍細胞起源は不明である。

これまでに論文審査申請者らは、BM DLBCL 2 例において 6p21 に位置するサイクリン D3 遺伝子（以下 cycline D3 gene: *CCND3*）と 14q32 に位置する免疫グロブリン重鎖遺伝子（以下 immunoglobulin heavy chain gene: *IGH*）の転座 (t(6;14)(p21;q32)) を同定し、*CCND3*の過剰発現を伴うことを見出した。

今回の上記論文は、*CCND3*発現を示した BM DLBCL（7 例）の臨床像をまとめ、*IGH* 構造を解析することにより腫瘍細胞の起源を検討したものである。これにより、*CCND3* 過剰発現を示す BM DLBCL が一つの臨床亜型であること、および、その腫瘍細胞起源は B 細胞性慢性リンパ性白血病と同様にリンパ節辺縁帯由来であることが示唆された。悪性リンパ腫の新しい疾患亜型を提示し、学位論文として価値あるものと認められる。

学位記番号	博(医)甲第492号		
学位授与の日	平成25年6月11日		
氏名	島 貫 栄 弥		
学位論文の題目	Molecular Cloning of <i>IGλ</i> Rearrangements using Long Distance Inverse-PCR(LDI-PCR). (インバース PCR 法による免疫グロブリンλ遺伝子転座点の単離)		
論文審査委員	主 査	教授 坂 口 和 成	
	副 査	教授 西 尾 真 智 子	教授 中 熊 秀 喜

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 序論

B細胞性腫瘍には免疫グロブリン遺伝子 (Immunoglobulin gene; *IG*) を標的とした染色体転座 (*IG* 転座) が高頻度に見られる。*IG* 転座切断点近傍には増殖・細胞死・分化・シグナル伝達にかかわる重要な遺伝子が存在しており、*IG* 転座切断点の遺伝子単離によって多くのがん関連遺伝子が同定されてきた。*IG* 転座によってがん関連遺伝子が異常発現し、その発現異常が B 細胞性腫瘍発生に深く関与していると考えられている。一方、*IG* 転座と B 細胞性腫瘍の各疾患単位に密接に関係しており、*IG* 転座の検出は確定診断や治療方針決定などに重要な役割を果たしている。

*IG*には免疫グロブリン重鎖遺伝子(Immunoglobulin heavy chain gene; *IGH*)、免疫グロブリンλ遺伝子 (*IGλ*)、免疫グロブリンκ遺伝子 (*IGκ*) があり、各々、14 番染色体長腕 32(14q32)、22 番長腕 11 (22q11)、2 番染色体短腕 12 (2p12)に座位している。*IG* 転座の約 80%は *IGH* 転座であり、約 15%が免疫グロブリンλ遺伝子 (*IGλ*) 転座、のこりの約 5%が免疫グロブリンκ遺伝子 (*IGκ*) 転座である。いずれの転座においても、転座近傍のがん関連遺伝子が *IG* 転座により発現異常を生じている。

Inverse PCR (Polymerase chain reaction)法は既知配列をもとに未知配列を遺伝子増幅する方法で、5kb 以上の DNA 断片を増幅可能な long active Taq DNA 合成酵素と組み合わせた Long Distance Inverse PCR(LDI-PCR)法は染色体転座点の遺伝子単離にきわめて有用である。これまでに、LDI-PCR は *IGH* を標的とした転座切断点と *IGκ* 領域の転座点の解析に応用されている。今回、我々は *IGλ* 転座切断点を遺伝子単離する LDI-PCR 法を初めて確立し、4 つの新規遺伝子転座切断点と 1 つの既知の転座切断点、および *IGλ* 蛋白をコードする生理的な *Vλ/Jλ* 再結合切断点を単離した。

### 材料

今回の研究では 4 つの細胞株と 2 例の症例を用いた。うち 3 例はびまん性大細胞性 B 細胞リンパ腫 (Diffuse Large B-cell lymphoma; DLBCL)、2 例は急性リンパ性白血病 (Acute lymphoblastic leukemia; ALL) (L3)、1 例の成熟 B 細胞リンパ腫を用いた。22q11 に染色体転座を有する細胞が 4 例、細胞表面 *IGλ* 陽性細胞が 4 例であった。

### 方法

#### 1. サザンブロット解析

染色体転座や生理学的 *Vλ/Jλ* 再結合はサザンブロット法により再構成バンドとして検出される。*IGλ* は染色体 22 番長腕 11 (22q11) に座位し、λ1 から λ7 までの 7 つのアイソタイプがある。λ1, λ2, λ3 および λ7 は *IGλ* 蛋白をコードする機能的なエクソンであるが、λ4, λ5 および λ6 は蛋白をコードしない偽エクソンである。いずれのアイソタイプも転座や *Vλ/Jλ* 再結合を起こすので、どのアイソタイプが再構成を起こしているかを確定するために各アイソタイプを認識する DNA 断片をプローブとしてサザンブロット法を行った。

## 2. LDI-PCR

LDI-PCR 法は DNA を制限酵素で切断した後に、DNA 断片を自己環状化して、未知の塩基配列を同定する方法である。この方法を用いれば微量の DNA を鋳型としてごく短時間で未知塩基配列の遺伝子単離が可能である。

IG $\lambda$ 転座においては、派生パートナー遺伝子のテロメア側に 22 番が転座し、標的となった遺伝子が脱制御を受ける。このため、LDI-PCR 用プライマーを各アイソタイプの Joining 領域のテロメア側に互いに逆向きに設定した。

## 3. 塩基配列の決定と解析

得られた PCR 産物をキアゲン社の Gel extraction kit を用いて精製した。精製した PCR 産物の塩基配列はファスマック社にてサンガー法にて決定した。得られた塩基配列を BLAST search program あるいは Human BLAT Search program を用いて解析した。

### 結果

#### 実験 1 : Germ line の遺伝子増幅の結果

IG $\lambda$ の各アイソタイプ用に設定した 9 つの LDI-PCR 用プライマーセット (同 Table S1) を用いて、Germ line 断片を増幅した。各エクソン ( $\lambda$ 1 から  $\lambda$ 7) に対応するサイズの DNA 断片を遺伝子増幅することができた。

#### 実験 2 : IG $\lambda$ 転座切断点の遺伝子単離

##### (1) MD901-t(3;22)(q27;q11), t(8;22)(q24;q11)

MD901 は、両アレルの 22q11 に染色体転座が生じている。 $\lambda$ 1 を認識する IGLC1D プローブを用いたサザンプロット法で約 13.5kb のサイズの再構成バンドを認めた。この再構成バンドを lambda 1 set プライマーにて増幅し、再構成バンドに対応する約 9.9kb の PCR 産物を得た。この PCR 産物の塩基配列を決定したところ、8q24 に座位する *C-MYC* の約 360kb 下流と *IGLL5* (Immunoglobulin lambda like 5) のエクソン 1 が結合していた。また、既報のごとく IGLC3 プローブでのサザン法にて約 4.8kb の再構成バンドが検出された。この再構成バンドを LDI-PCR にて遺伝子増幅し、約 3.6kb の PCR 産物を得た。既報と同様に、*J $\lambda$ 2* と *BCL6* の転座点が単離できた。

##### (2) WILL2-t(8;22)(q24;q11)

WILL2 は細胞表面 IG $\lambda$ 陽性、t(8;22)(q24;q11)を示した腫瘍細胞から樹立された細胞株である。IGLJ2 プローブ (*J $\lambda$ 2* と *J $\lambda$ 3* を認識する) を用いたサザン法で、二本の再構成バンドが検出された。これは一方が転座切断点と他方が *V/J*再結合を反映した再構成バンドであると考えられた。IGLC3 プローブを用いたサザンプロットで、約 4.0kb の再構成バンドが検出された。この再構成バンドを LDI-PCR 法で遺伝子増幅し、対応する約 3.1kb の PCR 産物を得た。塩基配列を決定し、8q24 に座位する *C-MYC* の約 260kb 下流が *J $\lambda$ 2* に結合していることが判明した。転座切断点近傍には推定組み換えシグナル配列 (Recombination Signal Sequence; RSS) に類似の配列がみられ、この染色体転座が *V(D)J*再結合のエラーにより生じたことが推察された。

##### (3) KHM10B-t(8;22)(q24;q11)

KHM10B は、t(8;22)(q24;q11)転座を持ち細胞表面 IG $\lambda$ 陽性の細胞株である。制限酵素 TaqI で切断したのち、IGLJ2 プローブを用いたサザンプロット法で約 3.8kb の再構成バンドが見られた。この再構成バンドを増幅するため、プライマーセット (lambda 3a set) を用いて LDI-PCR を行ったところ、約 2.9kb の PCR 産物を得た。この塩基配列を検索した結果、8q24 に座位する *C-MYC* の約 130kb 下流と *J $\lambda$ 3* とが結合していることが判明した。

##### (4) 患者 1-t(11;22)(q13;q11)

患者 1 の腫瘍細胞は t(11;22)(q13;q11)があり、既に *CyclinD1* の 3'-UTR と免疫グロブリン鎖の  $\lambda$ 7 との転座であることが報告されている。しかし、正確な転座切断点は不明であった。今回、 $\lambda$ 7 に設定したプライマー (lambda 7 set) を用いて LDI-PCR を行った。その結果 *CyclinD1* の 3'-UTR は免疫グロブリン鎖の Constant 領域である *C $\lambda$ 7* と転座を生じていることが判明した。

### 実験 3: *IGλ*の生理的 V/J 再結合である *VλJλ*再構成の遺伝子単離

細胞表面 *IGλ*陽性の細胞株(KHM10B, KHM2B, WILL2, 患者 2)から生理学的 *VλJλ*再構成の塩基配列を決定できた。

#### 結論

我々は *IGλ*転座点を遺伝子単離する LDI-PCR 法を確立し、3つの新規 t(8;22)(q24;q11)切断点と、1つの既知の t(3;22)(q27;q11)切断点、および1つの t(11;22)(q13;q11)切断点を同定した。また本法を用いて *IGλ*蛋白をコードする生理的な *VλJλ*再構成も遺伝子単離した。

WILL2 や KHM10B の *IGλ*転座では転座切断点周辺に推定組み換えシグナル配列 (RSS) 類似の配列が見られた。このため *VλJλ*再構成時のエラーで t(8;22)(q24;q11)転座が起こったと考えられる。しかし、MD901 の一方の *IGλ*転座では遺伝子再構成に関わらない *IGLL5*が含まれており *VλJλ*再構成のエラーが原因ではないことが考えられた。

これまでに転座切断点が同定されている t(8;22)(q24;q11)は4例である。既報の t(8;22)(q24;q11)切断点は、*C-MYC*の下流約 50kbp 内のみ分布していたが、今回、我々が遺伝子単離した t(8;22)(q24;q11)切断点はいずれも *C-MYC*から離れた領域に分布し、*PVT-1* (the human counterpart of the murine plasmacytoma) 領域の広い範囲に渡り分布していることが分かった。*PVT-1*内にはいくつかの microRNA が同定されており、t(8;22)(q24;q11)による *PVT-1* 内の microRNA 発現異常が腫瘍化に関係している可能性がある。

B 細胞性腫瘍に高頻度で見られる *IGH*転座点は FISH 法や LDI-PCR 法等で解析され腫瘍発生のメカニズムや予後との関連が明らかにされつつある。しかし *IGλ*転座点の解析は進んでいないのが現状である。本法を用いれば、B 細胞性腫瘍における未だ遺伝子単離されていない *IGλ*転座点の解析および今後の B 細胞性腫瘍の研究に有用であると考ええる。

#### 審査の要旨 (審査の日, 方法, 結果)

平成25年5月27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。

B 細胞性腫瘍には免疫グロブリン遺伝子 (Immunoglobulin gene; *IG*) を標的とした染色体転座 (*IG* 転座) が高頻度に見られる。*IG* 転座切断点近傍には生物学的に重要な遺伝子が存在しており、*IG* 転座によって異常発現したがん関連遺伝子が B 細胞性腫瘍発生前に深く関与している。このため B 細胞性腫瘍の確定診断や治療方針決定には *IG* 転座の解析は重要な役割を果たしている。*IG*には免疫グロブリン重鎖遺伝子 (Immunoglobulin heavy chain gene; *IGH*)、免疫グロブリンλ遺伝子 (*IGλ*)、免疫グロブリンκ遺伝子 (*IGκ*) がある。いずれの *IG* 転座でもその近傍のがん関連遺伝子は発現異常を生じている。染色体転座点の遺伝子単離に有用な LDI-PCR (Long Distance Inverse Polymerase Chain Reaction)法は、既知配列を元に未知配列を遺伝子増幅する方法であり、これまでに *IGH*転座切断点と *IGκ*転座切断点の解析に応用されている。

今回、論文審査申請者らは、*IGλ*転座切断点を遺伝子単離する LDI-PCR 法を確立するために、*IGλ* が座位する染色体 22 番長腕 11(22q11)に転座や再構成を有する細胞や細胞株などを対象に、*IGλ*に特異的なプローブやプライマーを用いて、サザンブロット法や LDI-PCR 法での検討を行った。

(材料) *IGλ*転座を有する可能性のある細胞が4例で、内3つの細胞株では *C-MYC*が座位する染色体 8 番長腕 24(8q24)に転座を持ち、その全てで *C-MYC* の発現は亢進していた。生理学的 *V/J*再結合を有する可能性のある細胞で細胞表面蛋白が *IGλ*陽性である細胞が4例であった。

(方法) サザンブロット法と LDI-PCR 法を用いた。サザンブロット法では7つのアイソタイプを持つ *IGλ*のいずれかで再構成を起こしているかを同定するために、各アイソタイプを認識する特異的な DNA 断片をプローブとしてサザンブロット解析を用いて再構成バンドを検討した。*IGλ*上に逆向きに設定した LDI-PCR 用プライマーを用いて、未知の転座切断点を含む PCR 産物を増幅した。この塩基配列の決定と解析は、市販キットにて精製した後にファスマック社にてサンガー法を用いて塩基配列を決定し、得られた塩基配列は BLAST search program あるいは Human BLAT Search program を用いて解析した。

(結果) *IGL*転座点を遺伝子単離する LDI-PCR 法を確立することが出来た。3つの新規 t(8;22)(q24;q11)切断点と、1つの既知の t(3;22)(q27;q11)切断点、および1つの t(11;22)(q13;q11)切断点を遺伝子単離出来た。また *IGL*蛋白をコードする生理的な *V<sub>H</sub>/J<sub>H</sub>*再構成も遺伝子単離出来た。転座点近傍の解析では、2つの *IGL*転座では転座切断点周辺に推定組み換えシグナル配列 (RSS) 類似の配列が見られ、これらは *V<sub>H</sub>/J<sub>H</sub>*再構成時のエラーで t(8;22)(q24;q11)転座が起こったと考えられた。しかし、1つの *IGL*転座では遺伝子再構成に関わらない遺伝子が含まれており *V<sub>H</sub>/J<sub>H</sub>*再構成のエラーが原因ではないことが考えられた。

今回、論文審査申請者らが遺伝子単離した t(8;22)(q24;q11)切断点は、*C-MYC*から離れた *PVT-1*(the human counterpart of the murine plasmacytoma) 領域の広い範囲に渡り分布しており、既報とは異なっていた。*PVT-1*内にはいくつかの microRNA が同定されており、t(8;22)(q24;q11)による *PVT-1*内の microRNA 発現異常が腫瘍化に関係している可能性がある。

(結論) 論文審査申請者らは *IGL*転座を解析する LDI-PCR 法を世界で初めて報告した。本法は B 細胞性腫瘍における *IGL*転座点の解析に有用であると考えられ、学位論文として価値あるものと認められる。

学位記番号	博(医)甲第493号		
学位授与の日	平成25年8月6日		
氏名	高橋 隼		
学位論文の題目	Reduction of cortical GABAergic inhibition correlates with working memory impairment in recent onset schizophrenia (発症早期統合失調症における GABA 性皮質抑制の減弱は作動記憶の障害と関連する)		
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 篠崎 和弘

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

統合失調症における認知機能障害は、疾病経過の早期段階より存在し社会機能予後とも関連する中核症状の一つであるが、その病態生理は未だに解明されていない。一方、統合失調症では、多くの死後脳研究や神経生理学的研究によりガンマ-アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 神経系の障害が報告されている。GABA 性介在神経は皮質抑制を調整して情報識別処理や記憶に重要な役割を果たすことから、統合失調症における認知機能障害と GABA 性皮質抑制の減弱との関連が注目されている。2 連発経頭蓋磁気刺激で測定される皮質内抑制 (short-interval intracortical inhibition, SICI) は、GABA 性皮質抑制を反映する神経生理学的指標の一つであり、SICI の減弱が発症早期統合失調症や慢性期統合失調症において報告されている。しかしながら、我々の知る限りこれまでに SICI と認知機能の関連を検討した研究はない。そこで我々は、統合失調症の早期段階における GABA 性皮質抑制の減弱の認知機能障害への関与を明らかにするために、発症早期統合失調症を対象に SICI と認知機能の関連を検討した。

### 【方法】

被検者には健常者 (HC 群) 20 名、統合失調症患者 (SZ 群) 20 名 (罹病期間 3 年以内) を用いた。2 連発経頭蓋磁気刺激では左一次運動野を磁気刺激し、右第一背側骨間筋から運動誘発電位 (motor evoked potential, MEP) を計測した。磁気刺激 (試験刺激) により誘発される MEP は、安静時運動閾値 (resting motor threshold, RMT) より弱い刺激強度の先行刺激により修飾され、先行刺激と試験刺激の刺激間隔 (interstimulus interval, ISI) が 5ms 以下では抑制 (SICI)、7-20ms では促通 (intracortical facilitation, ICF) が生じる。本研究では、先行刺激の刺激強度を 80%RMT、試験刺激の刺激強度を 130% RMT とし、先行刺激による MEP の修飾を MEP 比 (2 連発刺激の MEP / 試験刺激単独の MEP) で評価した。本研究では ISI を 2ms、3ms、10ms、15ms と設定し、ISI が 2ms と 3ms の MEP 比を平均して SICI の MEP 比とし、ISI が 10ms と 15ms の MEP 比を平均して ICF の MEP 比とした。SZ 群の認知機能は The Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia Japanese-language version (BACS-J) を用いて評価した。RMT、SICI の MEP 比、ICF の MEP 比の 2 群間の比較には Mann-Whitney の U 検定を用いた (有意水準  $\alpha = 0.05$ )。また、SZ 群における SICI の MEP 比と BACS-J の下位検査 (言語記憶課題、作動記憶課題、運動課題、言語流暢性課題、注意課題、遂行機能課題) の素点との関連を Spearman の順位相関係数を用いて検討した (6 つの下位検査で検定を行うため、有意水準は  $\alpha = 0.05/6 = 0.008$  (Bonferroni's correction) とした)。SZ 群では SICI の MEP 比と年齢、罹病期間、向精神薬服用量、精神症状評価尺度との関連を Spearman の順位相関係数を用いて検討した (有意水準  $\alpha = 0.05$ )。本研究は和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得ており、すべての被検者から文書による同意を取得して行われた。

### 【結果】

HC 群と SZ 群の RMT はそれぞれ  $55.3 \pm 8.34\%$ 、 $56.8 \pm 7.33\%$  であり、有意な群間差を認めなかった ( $p$

= 0.515)。HC 群と SZ 群の SICI の MEP 比はそれぞれ  $0.271 \pm 0.134$ 、 $0.810 \pm 0.538$  であり、SZ 群では MEP の抑制が有意に減弱していた ( $p < 0.001$ )。HC 群と SZ 群の ICF の MEP 比はそれぞれ  $1.33 \pm 0.549$ 、 $1.48 \pm 0.455$  であり、有意な群間差を認めなかった ( $p = 0.102$ )。SZ 群において SICI の MEP 比と作動記憶課題の素点に有意な負の相関が認められた ( $r = -0.704$ ,  $p = 0.001$ )。SZ 群において SICI の MEP 比と年齢、罹病期間、向精神薬服用量、精神症状評価尺度に有意な相関を認めなかった。

#### 【考察】

SZ 群では HC 群と比較して SICI が有意に減弱し、SICI の減弱と作動記憶課題の低成績が有意に相関した。これらの結果は、発症早期統合失調症における GABA 性皮質抑制の減弱と作動記憶の障害との関連を示唆しており、本研究は統合失調症の早期段階において GABA 神経系の障害が存在し、それが認知機能障害に関与する可能性を示した。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成25年7月2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。

本論文の目的は発症早期統合失調症における認知機能障害とガンマ-アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 性皮質抑制の減弱との関連を明らかにすることである。GABA性皮質抑制を評価する神経生理学的手法として2連発経頭蓋磁気刺激を用い、発症早期統合失調症における認知機能と神経生理学的指標の関連を検討した。

健常者 (HC群) 20名、統合失調症患者 (SZ群) 20名 (罹病期間3年以内) を対象とし、HC 群とSZ群で2連発経頭蓋磁気刺激を施行し、SZ群では認知機能の評価した。2連発経頭蓋磁気刺激では、試験刺激によって生じる運動誘発電位が先行刺激と試験刺激の刺激間隔が5ms以下では抑制 (short-interval intracortical inhibition, SICI)、7-20msでは促通 (intracortical facilitation, ICF) され、SICIはGABA性皮質抑制を反映する。本研究において、SZ群ではHC群と比較してSICIが有意に減弱し、SICIの減弱と作動記憶課題の低成績が有意に相関した。これらの結果は発症早期統合失調症におけるGABA性皮質抑制の減弱と作動記憶の障害との関連を示唆する。

統合失調症における認知機能障害は社会機能予後と関連する中核症状の一つであるが、その病態生理は未解明であり有効な治療法も開発されていない。本論文は、発症早期統合失調症におけるGABA性皮質抑制の減弱と作動記憶の障害との直接的な関連を示唆した初めての報告であり、統合失調症の早期段階における認知機能障害に対するGABA神経系に関連した治療法の開発につながる可能性をもつ知見となることから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第494号		
学位授与の日	平成26年2月12日		
氏名	玉川 俊次		
学位論文の題目	Role of miR-200c/miR-141 in the regulation of epithelial-mesenchymal transition and migration in head and neck squamous cell carcinoma  (頭頸部癌の上皮間葉移行における microRNA200c/141 の役割)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 原 勲	教授 山中 昇

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

頭頸部癌患者の約 2/3 は初診時に進行癌の状態で見られ、転移の有無により予後が大きく影響される。近年、microRNA の発現異常が癌の発現、浸潤、転移と関連することが報告されており、microRNA を癌の治療・診断へ応用しようとする動きが活発化している。

本研究では上皮間葉移行；EMT(Epithelial-Mesenchymal Transition)における microRNA200family の役割について焦点を当て、頭頸部癌細胞株を用いて E-Cadherin 及び E-Cadherin の転写抑制因子である ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現を検討した。次に microRNA200family を頭頸部癌細胞株にトランスフェクションし運動能、浸潤能、増殖能について細胞機能の変化について検討した。さらに、ZEB1、ZEB2 遺伝子のメチル化について検討した。

### 【方法】

1. 頭頸部癌細胞株(UTSCC)における E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子と microRNA200c/141 発現量の検討  
頭頸部癌細胞株(UTSCC series 計 13 株)における E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現、microRNA200c/141 の発現についてリアルタイム PCR を用いて検討した。
2. microRNA141/200c のトランスフェクションによる E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現変化の検討  
舌癌の原発巣・転移巣からそれぞれ樹立された細胞株である UTSCC-24A、UTSCC-24B を用いて microRNA141/200c Precursor をトランスフェクションした。トランスフェクション後に逆転写を行い、リアルタイム PCR を用いて E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現変化を検討した。
3. microRNA141/200c のトランスフェクションによる頭頸部癌細胞株の細胞運動能、浸潤能、増殖能の検討  
UTSCC-24B に microRNA141/200c Precursor をトランスフェクションし、wound assay、migration assay、invasion assay、Wst assay を行い細胞の運動能、浸潤能、増殖能の変化を検討した。
4. 頭頸部癌細胞株における ZEB1、ZEB2 遺伝子のメチル化の検討  
UTSCC-60A、UTSCC-60B をそれぞれ 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC)にて脱メチル化処理し E-Cadherin、ZEB1、ZEB2、microRNA200c/141 の発現変化について検討した。

### 【結果】

1. 頭頸部癌細胞株(UTSCC)における E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子と microRNA200c/141 発現量の検討  
頭頸部癌細胞株(UTSCC series)の内 9/13 株では、基準株とした UTSCC60A と比較して E-Cadherin の発現が高く ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現は低下していた。残りの 3 株では E-Cadherin の発現は低く、ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現が高かった。また、E-Cadherin と microRNA141 及び microRNA200c の発現には正の相関関係を認めた。一方、ZEB1、ZEB2 と microRNA141 及び microRNA200c の発現には負の相関関係を認めた。

2. microRNA141/200c のトランスフェクションによる E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現変化の検討

UTSCC-24A、UTSCC24B への microRNA141/200c Precursor のトランスフェクションにて ZEB1 の発現は低下し、E-Cadherin の発現が亢進した。ZEB2 の発現について統計学的には変化を認めなかった。

3. microRNA141/200c のトランスフェクションによる頭頸部癌細胞株の細胞運動能、浸潤能、増殖能の変化

UTSCC24B への microRNA141/200c Precursor のトランスフェクションにて、wound healing、migration は低下し細胞の運動能低下を認めたが、浸潤能、増殖能に関しては変化を認めなかった。

4. 頭頸部癌細胞株における ZEB1、ZEB2 遺伝子のメチル化の検討

UTSCC60A、UTSCC60B に脱メチル化処理を行うことで ZEB1、ZEB2 の発現は著明に亢進したが、microRNA141/200c は変化を認めなかった。

【考察】

頭頸部癌細胞株において microRNA141/200c と E-Cadherin の発現には正の相関関係、一方 microRNA141/200c と ZEB1、ZEB2 の発現には負の相関関係を示した。また、舌癌の原発巣・転移巣からそれぞれ樹立された細胞株に microRNA141/200c Precursor をトランスフェクションし microRNA141/200c の発現を亢進させることで、ZEB1 の発現が抑制され、E-Cadherin の発現を亢進させることができた。細胞機能に関しては microRNA141/200c Precursor のトランスフェクションによって、運動能を抑制させることができたが、浸潤能、増殖能には変化を認めなかった。これは頭頸部癌に microRNA141/200c を導入することによって細胞の運動能、転移のリスクを低減させる可能性を示している。

一方、頭頸部癌細胞株の中には microRNA141/200c の発現を亢進させても ZEB1、ZEB2、E-Cadherin の発現に影響を及ぼさない細胞株を認めた。それらの細胞株に対して脱メチル化処理を行うと ZEB1、ZEB2 の著しい発現亢進を認めた。これは頭頸部癌細胞株において ZEB1、ZEB2 のメチル化が microRNA200family による E-Cadherin の発現調節を阻害している可能性を示しており、頭頸部癌における EMT の分子生物学機序を解明する上で重要な結果と考えられた。

【結論】

・ 頭頸部癌細胞株において microRNA141/200c と E-Cadherin の発現は正の相関関係、ZEB1 及び ZEB2 とは負の相関関係を認めた。

・ microRNA141/200c の発現を亢進させることで ZEB1 の発現は抑制され、E-Cadherin の発現が亢進した。また、細胞運動能が抑制された。

・ microRNA141/200c の発現を亢進させても E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 の発現が変化しない細胞株を認め、ZEB1、ZEB2 のメチル化が疑われた。

以上から頭頸部癌細胞の上皮間葉移行(EMT)における microRNA141/200c の重要性が明らかとなった。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 26 年 1 月 31 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の審査を行った。

microRNA とは内在性の低分子量 RNA であり、主に翻訳阻害と mRNA の切断・分解により標的となる複数の遺伝子を制御することが報告されている。また、頭頸部癌における転移の有無は予後因子の一つであり、転移メカニズムの解明、制御は臨床的に大切な課題である。本論文では *in vitro* での頭頸部癌細胞株における E-Cadherin の発現と microRNA141/200c との関連、microRNA141/200c が転移機能について果たす役割りについて検討を行ったものである。

頭頸部癌細胞株(UTSCCseries)計 13 株を用い、頭頸部癌細胞株における microRNA141/200c と mRNA レベルでの E-Cadherin 遺伝子の発現、E-Cadherin の転写抑制因子である ZEB1 及び ZEB2 遺伝子の発現についてリアルタイム PCR を用いて検討した。microRNA141/200c と E-Cadherin の発現量は正の相関関係を示すのに対して、ZEB1、ZEB 2 遺伝子の発現量とは負の相関関係を示した。さらに、頭頸部癌細胞株に microRNA141/200c のプレカーサーをトランフェクションし E-Cadherin、ZEB1、ZEB 2 遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR で検討したところ、ZEB1 遺伝子の発現は抑制され、E-Cadherin 遺伝子の発現が有意に亢進した。また、細胞機能の検討では microRNA141/200c の発現を亢進させることで浸潤能、増殖能に変化は認めなかったが、運動能が有意に抑制されていた。一方で microRNA141/200c の発現を亢進させても E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 の発現に変化を認めない細胞株も認め、ZEB1、ZEB2 遺伝子のメチル化が疑われた。

以上の結果より、頭頸部癌の転移メカニズムにおいて microRNA141/200c は E-Cadherin の転写抑制因子である ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現抑制を介して E-Cadherin の発現を亢進させ細胞運動能を調節していると考えられた。一方で、ZEB1、ZEB 遺伝子がメチル化された細胞株は microRNA141/200c による調節を受けにくいと考えられた。

本論文は頭頸部癌転移における microRNA141/200c の役割を解明する上で重要な情報を提供するものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第495号		
学位授与の日	平成26年3月18日		
氏名	菊池崇史		
学位論文の題目	Increase of 27-hydroxycholesterol in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease: possible role of 27-hydroxycholesterol in tissue fibrosis. (慢性閉塞性肺疾患の気道における 27-hydroxycholesterol の上昇および組織線維化に対する 27-hydroxycholesterol の役割についての検討)		
論文審査委員	主査	教授 鶴尾吉宏	
	副査	教授 井原義人	教授 赤水尚史

## 論文内容の要旨

### 緒言

オキシステロールはコレステロールの酸化物であり、胆汁酸の合成過程における中間産物として産生される。27-hydroxycholesterol (27-OHC)はオキシステロールの一つであり、コレステロールが sterol 27-hydroxylase によって酸化を受けることにより産生される。

以前に、我々は quantitative polymerase chain reaction (qPCR)を用いた検討において、慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) 患者の肺組織においていくつかの酸化還元関連遺伝子および炎症惹起性サイトカイン、ケモカイン遺伝子の発現が上昇していることを報告した。発現が増加していた遺伝子群の中で、cholesterol 25-hydroxylase の発現が健常者に比べて COPD 患者の肺組織において上昇していることを見出した。この知見を元に最近我々が行った研究において、cholesterol 25-hydroxylase によって産生されるオキシステロールである 25-hydroxycholesterol の産生が COPD 患者の気道において亢進していることを示した。しかしながら、加齢性疾患である COPD の肺において sterol 27-hydroxylase の発現が上昇しているか、また COPD の気道において 27-OHC の産生が亢進しているか否かは不明である。

COPD は、肺がタバコ煙を主とする有害物質に長期に吸入曝露されることで生じる疾患である。COPD の肺の病理組織学的特徴は、好中球や CD8 陽性リンパ球、マクロファージが関与する慢性炎症によって生じてくる末梢気管支周囲と上皮下の線維化および気道のリモデリングであり、これらの病理組織学的変化が気道制限に関与していると考えられている。肺の構成細胞の中において、線維芽細胞は細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) タンパクを分泌することで組織修復に関与しており、組織のリモデリングおよび線維化に中心的な役割を担っていると考えられている。

本研究では①COPD 患者の肺における sterol 27-hydroxylase の発現の程度と部位を特定すること、②COPD 患者の気道における 27-OHC の産生量と呼吸機能との相関を検討すること、③27-OHC の線維化における作用およびその情報伝達経路について検討することを目的とした。

### 方法

肺組織における sterol 27-hydroxylase の発現を検討するために、COPD を有しない肺癌患者 (対照群) 6名および COPD 合併肺癌患者 (COPD 群) 6名の手術検体から、腫瘍の浸潤を認めない肺組織を用いて sterol 27-hydroxylase に対する免疫組織染色を施行した。気道における 27-OHC の産生量を測定するために、免疫組織染色の対象者とは異なる 11名の健常人と 15名の COPD 患者を対象として、呼吸機能を評価後に高張食塩水吸入による誘発喀痰を採取した。喀痰細胞中の sterol 27-hydroxylase 発現を免疫細胞染色で検討した。誘発喀痰上清中の 27-OHC 濃度は液体クロマトグラフ・タンデム質量分析により測定し、呼吸機能検査値との相関を検討した。

27-OHC が肺組織の線維化に及ぼす影響を調べるために、ヒト胎児肺線維芽細胞 (human fetal lung fibroblasts: HFL-1)を種々の濃度の 27-OHC で刺激し、細胞溶解物中の  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)の発現を western blot 法で測定した。ECM タンパクの産生を調べるために培養上清中の fibronectin 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)で測定し、細胞溶解物中の collagen I の発現を western blot 法で測定した。さらに、線維化における情報伝達経路を調べるために培養上清中の transforming growth factor (TGF)- $\beta$  1 濃度を ELISA で測定し、nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) p65 の核内への移行を western blot 法で検討した。

## 結果

肺組織における sterol 27-hydroxylase に対する免疫染色では、対照群で陽性細胞をほとんど認めなかったが、COPD 群では肺泡マクロファージに sterol 27-hydroxylase に対する強い免疫活性を認めた。誘発喀痰中でも同様に、COPD において免疫染色陽性を示すマクロファージ数の有意な上昇を認めた。喀痰上清中の 27-OHC 濃度は健常人と比較して COPD 患者で有意に上昇していた ( $97.8 \pm 38$  vs.  $2.98 \pm 1.2$  ng/ml,  $p < 0.001$ )。喀痰中の 27-OHC 濃度と呼吸機能との相関を検討したところ、percent predicted forced vital capacity (%FVC)の値 ( $r = -0.751$ ,  $p < 0.01$ ) および percent predicted forced expiratory volume in one second (%FEV1.0)の値 ( $r = -0.664$ ,  $p < 0.01$ )とは有意に負の相関関係を示したが、percent predicted diffusing capacity of the lung for carbon monoxide divided by the alveolar volume (%DLCO/VA)の値とは有意な相関関係を示さなかった ( $r = -0.455$ )。

筋線維芽細胞は線維芽細胞と比較し、より強い ECM タンパク産生能を有している。27-OHC が線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を誘導するか否かを検討するため、HFL-1 を 27-OHC で刺激した際の  $\alpha$ -SMA の発現を調べた。その結果、濃度依存性に  $\alpha$ -SMA の有意な発現増強を認めた ( $10^{-7}$  M, 1.75-fold increase,  $p < 0.01$ )。さらに ECM タンパクの産生についても検討を行ったところ、27-OHC は濃度依存性に fibronectin の産生を促進し ( $10^{-7}$  M,  $476 \pm 19$  ng/ml vs.  $294 \pm 26$  ng/ml,  $p < 0.01$ )、collagen I の発現を増強した ( $10^{-7}$  M, 3.25-fold increase,  $p < 0.01$ )。

TGF- $\beta$  1 は線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促す重要なメディエーターである。HFL-1 に対して 27-OHC を外因性に投与したところ、濃度依存性に TGF- $\beta$  1 の有意な増加を認めた ( $10^{-7}$  M,  $863 \pm 29$  vs.  $224 \pm 7.6$  pg/ml,  $p < 0.01$ )。NF- $\kappa$ B は TGF- $\beta$  1 の発現を調節することで組織のリモデリング形成に関わる重要な転写因子である。27-OHC が線維芽細胞において NF- $\kappa$ B の核内移行を促進するか否かについて検討したところ、27-OHC の外因性投与によって、NF- $\kappa$ B p65 タンパクの有意な核内移行を認めた (90 minutes, 1.43-fold increase,  $p < 0.01$ )。本研究で認められた TGF- $\beta$  1 の過剰産生が NF- $\kappa$ B により制御されているか否かを評価するために、NF- $\kappa$ B の inhibitor である caffeic acid phenethyl ester (CAPE)を用いた際の TGF- $\beta$  1 の産生について検討した。その結果、CAPE は 27-OHC による TGF- $\beta$  1 の産生を有意に抑制した ( $1 \mu$ g/ml,  $674 \pm 83$  vs.  $270 \pm 17$  pg/ml,  $p < 0.01$ )。27-OHC による  $\alpha$ -SMA の発現増強が TGF- $\beta$  1 による調節を介しているか否かを検討するために、抗 TGF- $\beta$  中和抗体を投与したところ、抗 TGF- $\beta$  中和抗体は 27-OHC による  $\alpha$ -SMA の発現増強をほぼ完全に抑制した ( $10^{-7}$  M, 1.54 vs. 1.05-fold increase,  $p < 0.01$ )。

## 考察

COPD 患者において肺組織における sterol 27-hydroxylase の発現が増強しており、喀痰上清中の 27-OHC 濃度が健常人に比較して有意に上昇していた。喀痰中の 27-OHC 濃度は%FVC および%FEV1.0 と負の相関関係を示しており、27-OHC が COPD における気流制限に関与している可能性が示唆された。27-OHC はヒト肺線維芽細胞において、筋線維芽細胞への分化を促し、ECM タンパクの産生を促進させたことから、肺組織のリモデリングおよび線維化に関与している可能性が示唆され、この生物活性は NF- $\kappa$ B を介した TGF- $\beta$  1 の産生により調節されている可能性が考えられた。27-OHC と COPD の関連について報告した研究は本研究が初めてであり、27-OHC が COPD の重症度を測る新たなバイオマーカーとなり得ると共に、27-OHC の制御が COPD の新たな治療戦略に結びつく可能性が考えられた。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 25 年 7 月 29 日 論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

27-hydroxycholesterol(27-OHC)はコレステロールが酸化を受けることにより合成されるオキシステロールの一つであり、アテローム性動脈硬化やアルツハイマー病などの加齢性疾患との関連が報告されている他、種々の細胞において炎症性変化の惹起やアポトーシスの誘導などといった生物活性が報告されている。慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease: COPD)は肺がタバコ煙を主とする有害物質に長期に吸入曝露されることで生じる肺の炎症性疾患である。COPD 肺の病理組織学的特徴の一つとして末梢気管支周囲と上皮下の線維化および気道のリモデリングが挙げられ、この病理学的変化には線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化、線維芽細胞からの細胞外基質タンパクの分泌が重要な役割を担っている。COPD の気道における 27-OHC の産生や 27-OHC が気道の線維化に与える影響についてはこれまで検討されていない。

本論文では 27-OHC の合成酵素である sterol 27-hydroxylase の COPD 肺における発現および COPD 患者の気道における 27-OHC 産生量と呼吸機能との関連の検討を行い、ヒト胎児肺線維芽細胞(HFL-1)を用いて 27-OHC が筋線維芽細胞への分化および細胞外基質タンパクの分泌に与える影響について検討を行った。

手術肺組織検体を用いて免疫組織染色で sterol 27-hydroxylase の発現を検討したところ、対照群では陽性細胞をほとんど認めなかったが、COPD 群では肺泡マクロファージにおいて sterol 27-hydroxylase に対する強い免疫活性を認めた。誘発喀痰検体を用いて 27-OHC の定量を行ったところ、対照群と比較して COPD 群で有意に 27-OHC 濃度の上昇を認め、呼吸機能との関連では、27-OHC 濃度と percent predicted forced vital capacity (%FVC)および percent predicted forced expiratory volume in one second (%FEV1.0)との間に有意に負の相関関係を認めた。HFL-1 を用いた in vitro の検討では、27-OHC が NF- $\kappa$ B と TGF- $\beta$ 1 の経路を介して筋線維芽細胞への分化、collagen I や fibronectin などの細胞外基質タンパクの分泌を促進させることを示した。

以上のように、本論文は COPD の気道において 27-OHC の産生が亢進しており、その濃度は呼吸機能と負の相関関係を示すこと、27-OHC が筋線維芽細胞への分化、細胞外基質タンパクの分泌を促すことで気道のリモデリングに寄与している可能性があることを示した初めての論文である。27-OHC が COPD の重症度を測る新たなバイオマーカーとなり得る可能性を有するほか、この経路の制御が COPD の新たな治療戦略に結びつくことも期待され、学位論文に値するものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第496号		
学位授与の日	平成26年3月18日		
氏名	岩本博光		
学位論文の題目	Antitumor Immune Response of Dendritic Cells (DCs) Expressing Tumor-Associated Antigens Derived from Induced Pluripotent Stem Cells: in Comparison to Bone Marrow-Derived DCs (骨髄細胞由来樹状細胞と比較した、腫瘍関連抗原を発現している iPS 細胞由来樹状細胞の抗腫瘍効果)		
論文審査委員	主査	教授 近藤稔和	
	副査	教授 一瀬雅夫	教授 山上裕機

## 論文内容の要旨

### 緒言

樹状細胞 (DCs) は、抗原提示細胞 (APC) として、抗腫瘍免疫反応において非常に重要な役割を果たしている。これまで当教室では、DCs ワクチン療法の基礎研究及び臨床研究を行ってきた。臨床において、DCs ワクチン療法は多量の DCs が必要であるが、担癌患者から誘導した DCs はその数、ワクチン効果が一定ではなく、安定した DCs の供給が課題である。

そのような中、2006 年に多様な細胞分化能力と無限増殖能力を併せ持つ iPS 細胞の樹立が報告され、2009 年には iPS 細胞由来 DCs (iPSDCs) の分化誘導が報告された。そこで我々は、もしこの iPSDCs が従来の naive な DCs と、APC として同等の機能を有し、同等の抗腫瘍効果を示すならば、現在の DCs ワクチン療法の問題を解決し、その臨床応用に向けて大きく前進できると考えた。

本研究ではマウス iPS 細胞から TAA 遺伝子導入 iPSDCs を分化誘導し、APC としての機能及び抗腫瘍効果を BMDCs と比較検討した。

### 方法

#### 実験 I. マウス iPSDCs の分化誘導

マウス iPS 細胞 (iPS-MEF-*Ng-20D-17*) を 4 ステップで iPSDCs へ分化誘導した。第 1 は iPS 細胞を、OP9 細胞を feeder 細胞として培養する。第 2 は 7 日目に細胞を回収し、それらの細胞を、2ME、rmGM-CSF を含む培地上で、新たな OP9 細胞を feeder 細胞として培養する。第 3 は 14 日目に浮遊細胞を回収し、rmGM-CSF を含む培地上で培養する。第 4 は 26 日目に浮遊細胞を回収し、新たな rmGM-CSF、rmTNF- $\alpha$  を含む培地上で培養する。そして 28 日目に浮遊細胞を回収する。

#### 実験 II. iPSDCs と BMDCs の APC としての機能の評価

##### 1. 成熟能の比較検討

iPSDCs と BMDCs の成熟能を比較検討するためにそれぞれの未成熟、成熟 DCs にて表面マーカーの発現 (CD11c、CD80、CD86、MHC class II) を flow cytometry にて比較検討した。

##### 2. サイトカイン分泌能の比較検討

iPSDCs と BMDCs のサイトカイン分泌能を比較検討するためそれぞれの未成熟、成熟 DCs にてサイトカインの分泌 (IL-12、IFN- $\gamma$ ) を ELISA 法にて比較検討した。

##### 3. 遊走能の比較検討

iPSDCs と BMDCs の遊走能を比較検討するために、adenovirus vector で gp100 遺伝子導入したそれぞれの DCs に PKH67 で蛍光標識して、マウス (C57BL/6(H-2b)) の右下腹部に皮下投与し、3 日後に所属リンパ節 (鼠径リンパ節) を回収した。回収したリンパ節は凍結切片を作成し、HE 染色したものと比較して、蛍光顕微鏡にて観察した。さらにホモジナイズしたものを flow cytometry にて比較検討した。

#### 実験 III. TAA 遺伝子導入 iPSDCs と BMDCs の抗腫瘍効果の評価

##### 1. In vitro による比較検討

それぞれ DCs をワクチン投与した際の gp100 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTLs) の誘導能を比較検討するために、gp100 遺伝子導入したそれぞれの DCs をマウスに皮下投与し、14 日後に脾臓を回収

した。そして抽出した脾細胞を tetramer assay で解析した。さらに残りの脾細胞を B16 細胞 (gp100(+)) と、5 日間共培養した。これにより得られた細胞を MACS にて CD8(+) CTLs を抽出した。これを B16 細胞、MC38 細胞、YAC-1 細胞で、<sup>51</sup>Cr-release assay にて TAA 特異的細胞傷害活性を解析した。

## 2. In vivo による比較検討

それぞれの DCs をワクチン投与した際の腫瘍増殖抑制効果を比較検討するため、gp100 遺伝子導入したそれぞれの DCs を、B16 皮下腫瘍モデルマウスに、1 回皮下投与し、皮下腫瘍の大きさを経時的に測定し解析した。

## 結 果

### 実験 I. マウス iPSDCs の分化誘導

接着細胞である iPS 細胞をプロトコールに基づき培養すると、第 2 ステップの終わりの 14 日目には、明るく、小さい、類縁形の浮遊細胞が得られた。さらに第 3 ステップの終わりの 26 日目には、一部に突起の様な不整な部位を有する未成熟 iPSDCs が得られた。そして第 4 ステップの終わりの 28 日目には、従来の BMDCs と同様に、著明な樹状突起を有する成熟 iPSDCs が得られた。

### 実験 II. iPSDCs と BMDCs の APC としての機能の評価

#### 1. 成熟能の比較検討

DCs の表面マーカーである CD11c は、iPSDCs では BMDCs と同等の発現率を認めた。また co-stimulatory molecule である CD80、CD86 は、TNF- $\alpha$  により成熟化することで、iPSDCs は BMDCs と同等の発現率の上昇を認めた。MHC class-II も同様に、同等の発現率の上昇を認めた。

#### 2. サイトカイン分泌能の比較検討

IL-12、IFN- $\gamma$  共に、iPSDCs、BMDCs 両方で、成熟化により、有意なサイトカインの分泌の上昇を認めた ( $p < 0.001$ )。またそれぞれの成熟 DCs のサイトカイン分泌能に有意な差は認められなかった ( $p > 0.05$ )。

#### 3. 遊走能の比較検討

回収した所属リンパ節を凍結標本にして、薄切したものと、それをさらに HE 染色したものを、蛍光顕微鏡で観察すると、gp100 遺伝子を導入したそれぞれの DCs どちらにおいても、遊走してきた蛍光標識された DCs を T-cell rich zone に認めた。また回収した所属リンパ節をホモジナイズし、PBS で懸濁したものを flow cytometry で解析すると、コントロールとして用いた、治療していないマウスのリンパ節と比較して、PHK67 陽性細胞の比率は、PBS 群 3.0%であるのに対し、BMDCs-gp100 群 11%、iPSDCs-gp100 群 9.9%と、同等の発現率の上昇を認めた。

### 実験 III. TAA 遺伝子導入 iPSDCs と BMDCs の抗腫瘍効果の評価

#### 1. In vitro による比較検討

tetramer assay では、iPSDCs 群と BMDCs 群では同等の tetramer 陽性リンパ球を認めたが、Negative コントロール群である PBS 群では認めなかった。gp100 遺伝子を発現している B16 細胞を標的細胞にした場合には、iPSDCs-gp100 群と BMDCs-gp100 群において、他の 3 群に比べ、有意に高い細胞傷害活性を認めたが ( $p < 0.001$ )、これら 2 群の間には有意差は認めなかった ( $p > 0.05$ )。gp100 陰性の MC38 細胞ではどの群においても有意な細胞傷害活性は、認めなかった。さらに YAC-1 細胞でもどの群においても有意差は認めず、NK 活性は認めなかった。

#### 2. In vivo による比較検討

B16 細胞の TAA 遺伝子である gp100 遺伝子を導入した iPSDCs-gp100 群と BMDCs-gp100 群では、他の 3 群と比べ、有意に高い腫瘍増殖抑制効果を認めたが ( $p < 0.001$ )、これら 2 群の間には有意差は認めず ( $p > 0.05$ )、全く同等であった。

## 考 察

今回のわれわれの研究により、iPSDCs は、従来の BMDCs と、APC として同等の機能を有し、同等の抗腫瘍効果を有することが分かった。千住らは、DNA microarrays で iPSDCs と BMDCs の遺伝子発現プロファイルがほぼ同じであると報告している。今回の結果により、遺伝子のみならず機能も同等であることが証明され、iPSDCs が naive DCs の代わりとなり得ると考える。これにより iPSDCs という、十分な量の、機能的な DCs を得ることができ、DCs 癌ワクチン療法の研究を大き

く前進させることができる。そして未来のテーラーメイド治療として TAA 遺伝子導入 iPSDCs 癌ワクチン療法の実現を目指す。具体的には患者の体細胞から iPS 細胞を作成し、次に TAA 遺伝子を、iPS 細胞に導入する。そして遺伝子導入された iPS 細胞を iPSDCs に分化誘導し、この iPSDCs をワクチンとして投与するという戦略である。そのため今後は、まず transgenic mouse を用いた preclinical study に取り組み、臨床応用へと研究を進めて行く予定である。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成25年10月17日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

本論文は tumor associated antigen（以下 TAA）遺伝子導入 dendritic cells（以下 DCs）癌ワクチン療法の問題点を解決するために、iPS 細胞由来 DCs（以下 iPSDCs）に着目したものである。

iPSDCs を 4 ステップで iPS 細胞から分化誘導し、抗原提示細胞としての機能を naive な DCs である骨髄細胞由来樹状細胞（以下 BMDCs）と全く同等の条件で比較検討した。まず成熟能を比較検討するために、それぞれの未成熟、成熟 DCs での表面マーカーの発現率を flow cytometry で比較検討すると、表面マーカーの発現率はすべて同等であった。次にサイトカイン分泌能を比較検討するため、それぞれの未成熟、成熟 DCs でのサイトカインの分泌能を ELISA 法にて比較検討すると、サイトカインの分泌能は同等であった。さらに遊走能を比較検討するために、adenovirus vector で gp100 遺伝子を導入したそれぞれの DCs に PKH67 で蛍光標識して、マウスの右下腹部に皮下投与し、3 日後に所属リンパ節を回収した。そして凍結切片を作成し、HE 染色したものと比較して、蛍光顕微鏡にて観察すると、それぞれの DCs での遊走能は同等であった。以上の結果より、iPSDCs が naive な DCs と全く同等の抗原提示細胞としての機能を有することが明らかになった。

次に抗腫瘍効果についても、iPSDCs を BMDCs と全く同等の条件で比較検討した。まずそれぞれの DCs をワクチン投与した際の TAA 特異的細胞傷害性 T 細胞（以下 CTLs）の誘導能を比較検討するために、gp100 遺伝子を導入したそれぞれの DCs をマウスに皮下投与し、14 日後に脾臓を回収した。そして抽出した脾細胞を tetramer assay で解析した。さらに残りの脾細胞を B16 細胞 (gp100(+)) と、5 日間共培養し、これにより得られた細胞を MACS にて CD8(+) CTLs を抽出した。これを B16 細胞、MC38 細胞、YAC-1 細胞で、51Cr-release assay にて TAA 特異的細胞傷害活性を解析すると、iPSDCs は BMDCs と同等の TAA 特異的細胞傷害活性を認めた。次にそれぞれの DCs をワクチン投与した際の腫瘍増殖抑制効果を比較検討するため、gp100 遺伝子導入したそれぞれの DCs を、B16 皮下腫瘍モデルマウスに、1 回皮下投与し、皮下腫瘍の大きさを継時的に測定し解析すると、iPSDCs は BMDCs と同等の腫瘍増殖抑制効果を認めた。以上の結果より、iPSDCs が naive な DCs と全く同等の抗腫瘍効果を有することが明らかになった。

これらの結果により、これまでの TAA 遺伝子導入 DCs 癌ワクチン療法に代わって、TAA 遺伝子導入 iPSDCs 癌ワクチン療法が、癌治療における新たな治療法となり得る可能性があることと認められ、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497号		
学位授与の日	平成26年3月18日		
氏名	川後光正		
学位論文の題目	Intraleural administration of gelatin-embedded, sustained-release basic fibroblast growth factor for the regeneration of emphysematous lungs in rats (徐放性 b-FGF 製剤の胸腔内投与によるラットの気腫肺の再生)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 岸岡史郎	教授 岡村吉隆

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

肺気腫はこれまで肺移植以外に根本的な治療法がなく薬物などによる対症療法が主体であった。組織学的に見ると肺胞・気道の不可逆的破壊であるため、理論的には肺組織を再生させることが有望な治療法であると考えられる。肺気腫に対する肺組織の再生医療は、動物実験では HGF の遺伝子導入や骨髄幹細胞の移植など既に複数の成功の報告がある。ゼラチンハイドロゲルを用いて徐放化した basic-fibroblast growth factor (basic-FGF) もまた、肺胞内あるいは肺動脈投与に投与することで、気腫化した肺胞が回復させることが動物実験で示されている。しかし、高度の呼吸困難を有する患者の気道内や肺動脈内へゼラチンハイドロゲルを注入することは高いリスク（無気腫や肺梗塞）を伴うことから、臨床応用の可能性は極めて低いと考えられている。肺気腫患者では高頻度に気胸が発生する。当研究室では、手術不能難治性気胸に対する希釈フィブリン糊胸腔内大量注入療法を開発し、その有用性を報告してきた。そこで我々は、希釈フィブリン糊胸腔内大量注入療法を受ける患者に、徐放性 basic-FGF 製剤の同時投与を行うことを計画した。この strategy を用いた場合、①患者は気胸の治療に付随して薬剤の投与を受けるだけであるので、新たな侵襲を与えられる必要がない。②実質の再生が生じれば、気胸の再発の防止、治癒率の向上につながる可能性がある、などの利点が考えられ、肺気腫の臨床応用が早期に実現可能になると考えた。徐放性 basic-FGF 製剤が、胸腔内投与でも同様に肺胞の再生が生じるかは確認されていなかった。本研究は、徐放性 basic-FGF 製剤の胸腔内投与で肺胞の再生が生じるかを確認する目的の臨床試験を前提とした動物実験である。

### 【方法】

18 匹の Sprague-Dawley (SD) ラットを使用し、まず 2 匹は正常肺の標本採取のため用いた。残りの 16 匹の SD ラットに対し、豚の膵臓由来のエラスターゼを注入後、8 週間経過観察することで、肺気腫モデルを作成した。そのうち、2 匹のラットで肺気腫モデルの確認をした。14 匹が実験群で、7 匹が control (FGF(-)群)。7 匹に徐放性 basic-FGF を投与した (FGF(+))群。FGF(+))群には 4 倍希釈フィブリン糊 0.5ml とともにゼラチンハイドロゲル 20mg と混和した徐放性 basic-FGF 製剤 200  $\mu$ g を左胸腔内へ注入した。FGF(-)群は、FGF を含まないゼラチンハイドロゲルをフィブリン糊とともに注入した。14 日後にラットを sacrifice して肺を取り出し、組織学的に評価した。指標としては、肺胞径を評価する標準的方法である平均肺胞隔壁間距離 mean linear intercept (Lm) を用い、徐放性 basic-FGF 製剤の治療効果を評価した。

### 【結果】

肺気腫モデルの Lm は正常肺の Lm に比べ、有意に延長しており、肺胞隔壁の破壊が確認された。FGF(-)群は、右肺と左肺は同等に肺胞壁の破壊が確認されたが、FGF(+))群では、右肺に比し実際に basic-FGF 投与した左肺では肺胞壁の破壊の修復が確認された。FGF(+))群では、左肺において右肺に比し有意に短縮を認めた。群間の比較では左肺の Lm は、FGF(-)群に比べ FGF(+))群で短縮していたが、無処置群より長く、修復は生じているが、その効果は、肺胞数を正常化されるに至っていないと思われる。また、無処置の右肺では、FGF(-)群と FGF(+))群で有意差はなく、無処置側には修復は生じないと考えられた。また、肺胞の再生は胸膜直下のみではなく、肺の中心ま

で均等に生じていた。

#### 【結論】

ラット肺気腫モデルにおいて、徐放性 basic-FGF 製剤の胸腔内投与は破壊された肺胞隔壁の修復をもたらすことが確認された。肺気腫を伴う難治性気胸に対する徐放性 basic-FGF 製剤の胸腔内投与の臨床試験を開始する根拠を得た。現在、臨床試験を施行中である。

#### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 26 年 1 月 29 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行なった。

肺気腫はこれまで肺移植以外に根本的な治療法がなく薬物などによる対症療法が主体であった。組織学的に見ると肺胞・気道の不可逆的破壊であるため、理論的には肺組織を再生させることが有望な治療法であると考えられる。肺気腫に対する肺組織の再生医療は、動物実験では HGF の遺伝子導入や骨髄幹細胞の移植など既に複数の成功の報告がある。ゼラチンハイドロゲルを用いて徐放化した basic-fibroblast growth factor (basic-FGF) もまた、肺胞内あるいは肺動脈投与に投与することで、気腫化した肺胞が回復させることが動物実験で示されている。しかし、高度の呼吸困難を有する患者の気道内や肺動脈内へゼラチンハイドロゲルを注入することは高いリスク（無気肺や肺梗塞）を伴うことから、臨床応用の可能性は極めて低いと考えられている。徐放性 basic-FGF 製剤が、胸腔内投与でも同様に肺胞の再生が生じるかは確認されていなかった。

本研究は、ラット肺気腫モデルにおいて、徐放性 basic-FGF 製剤は胸腔内投与でも破壊された肺胞隔壁の修復をもたらすことを確認したはじめてのものであり、臨床試験を開始する根拠を得たという点で、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498号		
学位授与の日	平成26年3月18日		
氏名	川端宏樹		
学位論文の題目	Inhibitory effects of theophylline on the peroxynitrite-augmented release of matrix metalloproteinases by lung fibroblasts. (肺線維芽細胞における、パーオキシナイトライトにより惹起されるマトリックスメタロプロテアーゼ産生に対するテオフィリンの抑制効果についての検討)		
論文審査委員	主査	教授 赤水尚史	
	副査	教授 岸岡史郎	教授 山本信之

## 論文内容の要旨

### 背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、持続性の気流閉塞を特徴とする慢性炎症性疾患で、タバコ煙をはじめとした有害な粒子やガスにより惹起される気道および肺の慢性炎症が、気流閉塞の進行と関連があるとされている。COPDにおける気流閉塞は、弾性収縮力の消失を伴う肺胞破壊による気腫化や、末梢気道の線維化などの肺の構造変化の結果生じる。現在のCOPDの治療は気管支拡張薬による臨床症状の緩和が中心であるため、疾病の進行を抑制し、長期予後を改善する新しい治療法の開発が必要である。

COPDにおける気腫化や末梢気道の線維化のような肺の構造変化は、炎症細胞や錠剤細胞から放出されたプロテアーゼや毒性分子による組織障害の結果生じると考えられており、これらの分子の中で、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)は、気腫化の発症・進展において重要なメディエーターと考えられている。

また、COPD患者の気道では、気道炎症が遷延した結果、活性窒素種と過剰なNOが産生され、さらに強力なオキシダントである活性窒素種が産生され、組織の炎症や障害を引き起こすことが報告されている。好中球や肺胞上皮細胞・肺胞マクロファージにおいては、活性窒素種がMMPsの活性化に関与することが報告されているが、肺の構造変化において重要な役割を果たしている肺線維芽細胞におけるMMPsの活性化に活性窒素種が及ぼす影響については不明である。

テオフィリンは、以前から気管支拡張薬としてCOPDの治療に用いられてきたが、近年では抗炎症効果が注目されている。テオフィリンによる炎症抑制の機序として、マクロファージ・好中球からの炎症性メディエーターの放出を抑制することが報告されている。我々の教室では、低容量テオフィリンが、安定期COPDの好中球性炎症と活性窒素種の産生を減少させることを報告した。さらに近年、テオフィリンがHDAC活性を回復させることで抗炎症効果を示すことが報告されている。しかし、テオフィリンがMMPsの産生や活性化を抑制するか否かは不明である。

本研究では、代表的な活性窒素種であるパーオキシナイトライト(ONOO<sup>-</sup>)が、ヒト肺線維芽細胞においてMMPsの産生及び活性化を促進するか否かを検討した。さらに、テオフィリンがONOO<sup>-</sup>によるMMPsの活性化に及ぼす影響を検討した。

### 方法

胎児ヒト肺線維芽細胞(HFL-1)をONOO<sup>-</sup>で処理して、48時間後の培養上清中のMMP-2とMMP-9の活性をゼラチンザイモグラフィで評価した。TGF-β中和抗体やNF-κB阻害剤であるMG-132の投与を行って、ONOO<sup>-</sup>投与時のMMPs活性への影響を検討した。

テオフィリンのONOO<sup>-</sup>によるMMPs活性化に対する抑制効果について検討するため、テオフィリンで前処理したHFL-1をONOO<sup>-</sup>で刺激し、48時間後の培養上清を用いて同様に検討した。また、ONOO<sup>-</sup>による細胞内シグナル伝達経路を調べるために、①ONOO<sup>-</sup>で刺激後、培養上清中のTGF-β1濃度をELISAで測定した。②さらに、ONOO<sup>-</sup>で刺激後、画分画を抽出し、NF-κBの核内移行をウ

エスタンブロット法で抽出した。③また、抽出した画分画における HDAC 活性を市販のキットで測定した。

### 結果

ゼラチンザイモグラフィーによる検討で、 $10^{-5}$ M の ONOO<sup>-</sup> は MMP-2,9 活性を有意に亢進させた。ONOO<sup>-</sup> の投与で NF- $\kappa$ B p65 の核内移行が増強し、NF- $\kappa$ B の阻害剤である MG132 を投与しておく、ONOO<sup>-</sup> による MMP-2,9 活性促進効果が抑制された。ONOO<sup>-</sup> の投与により、HFL-1 からの TGF- $\beta$ 1 の分泌が濃度依存性に亢進し、MG132 により ONOO<sup>-</sup> による TGF- $\beta$ 1 の分泌促進作用は抑制され、TGF- $\beta$  中和抗体の投与で ONOO<sup>-</sup> による MMP-2,9 活性化が有意に抑制された。

テオフィリンは、ONOO<sup>-</sup> による MMP-2,9 の活性促進作用を抑制した。ONOO<sup>-</sup> 投与により HDAC 活性が低下したが、テオフィリンで前処置しておく、HDAC 活性の低下が回復した。さらにテオフィリンは ONOO<sup>-</sup> による HDAC による NF- $\kappa$ B の核内移行及び TGF- $\beta$ 1 の分泌亢進作用を抑制した。また、テオフィリンは ONOO<sup>-</sup> による HDAC 不活化を回復させ、NF- $\kappa$ B の核内移行を抑制し、TGF- $\beta$ 1 の放出を抑制した。

### 考察

ONOO<sup>-</sup> は MMP-2,9 活性を有意に亢進させ、ONOO<sup>-</sup> の投与で NF- $\kappa$ B の核内移行が亢進し、NF- $\kappa$ B の阻害剤である MG-132 の投与で ONOO<sup>-</sup> による MMP-2,9 の活性化が抑制されたことから、ONOO<sup>-</sup> による放出抑制効果は、NF- $\kappa$ B を介していることが示唆された。

HFL-1 において、ONOO<sup>-</sup> が TGF- $\beta$ 1 の発現を増強することが示唆され、さらに、MG132 の投与で TGF- $\beta$ 1 の発現亢進が抑制された。TGF- $\beta$  中和抗体の投与により ONOO<sup>-</sup> による MMP-2,9 活性化亢進作用が抑制された。以上より、ONOO<sup>-</sup> は NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta$  の経路を介して MMPs 活性の亢進を抑制することが示唆された。

テオフィリンは ONOO<sup>-</sup> による HFL-1 からの MMPs 活性化を抑制した。ONOO<sup>-</sup> により HDAC 活性が有意に低下し、テオフィリンは ONOO<sup>-</sup> による HDAC 不活化を回復させた。テオフィリンの NF- $\kappa$ B 核内移行への影響についても検討したところ、テオフィリンは ONOO<sup>-</sup> により促進される NF- $\kappa$ B の転写を有意に抑制した。さらに、テオフィリンが ONOO<sup>-</sup> による TGF- $\beta$ 1 の発現亢進効果を抑制した。これらの結果より、テオフィリンは HDAC 活性の回復や NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta$ 1 の経路を介したメカニズムにより ONOO<sup>-</sup> による MMPs 活性の亢進を抑制することが示唆される。

本研究の結果より、活性窒素種が肺線維芽細胞において NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta$ 1 の系を介して MMPs の活性化を促進し、肺構造の改変に関与する可能性が示唆された。さらに、テオフィリンは、NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta$ 1 シグナリングを抑制することや HDAC 活性を回復することで活性窒素種による MMPs を介した肺構造の変化を抑制する可能性が示唆された。

### 結語

活性窒素種は、MMPs の産生を介して COPD における気腫化やリモデリングに関与し、テオフィリンは、活性窒素種による肺の構造変化を抑制する可能性がある。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成26年1月22日 論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) はタバコ煙を主とする有害物質に長期に吸入暴露されることで生じる肺の慢性炎症性疾患である。現行の治療法は気管支拡張薬などの対症療法であり、COPD の長期予後を改善させる新たな治療薬の開発が望まれている。

COPD における肺の構造変化のうち、気腫化の原因としては以前から、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases: MMPs) などのプロテアーゼによる肺の構造蛋白の破壊や、酸化窒素化ストレスの関与が示唆されてきたが、両者がどのように関連しているかはこれまで検討されていない。

本論文では、両者の関係を検討するために、活性窒素種の peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) で胎児ヒト肺

線維芽細胞(HFL-1)に刺激を行い、ゼラチンザイモグラフィーでMMPs活性を測定した。その結果、ONOO<sup>-</sup>で刺激することによりMMPs活性が有意に亢進することが示された。さらにその機序を明らかにするために、ONOO<sup>-</sup>で刺激したNF- $\kappa$ B p65の核内移行を免疫染色とwestern blot法を用いて検討し、ELISAを用いてONOO<sup>-</sup>投与下のTGF- $\beta_1$ を測定し、MMPs活性との関係を検討した。その結果、ONOO<sup>-</sup>によるMMPs活性亢進が、NF- $\kappa$ Bの核内移行やTGF- $\beta_1$ の産生亢進を介して起こることが分かった。

また近年、低用量テオフィリンがヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase:HDAC)の活性化を通じて抗炎症効果を示すことが明らかになってきた。本論文では、テオフィリンを培養したHFL-1に投与して、ONOO<sup>-</sup>によるMMPsの産生亢進への影響をゼラチンザイモグラフィーで検討した。その結果、ONOO<sup>-</sup>によるMMPsの産生がテオフィリンの投与で抑制されることが明らかとなった。このテオフィリンによるMMPs産生抑制の機序を明らかにするために、テオフィリン投与による画分画内のNF- $\kappa$ B p65の発現をwestern blot法で検討し、ELISAを用いてTGF- $\beta_1$ の産生に対する影響を検討した。また、テオフィリン投与によるHDAC活性に与える影響についても検討した。その結果、活性窒素種によるMMPs産生亢進がNF- $\kappa$ Bの核内移行の阻害、TGF- $\beta_1$ 産生抑制やHDACの不活化を介してテオフィリンにより抑制されることが明らかとなった。

以上のように、本論文は活性窒素種がNF- $\kappa$ B/TGF- $\beta_1$ の経路やHDACの不活化を介してMMPs産生を亢進させることで気腫化などの構造変化が起こり、COPDに至る可能性を示した。さらに、テオフィリンが活性窒素種によるMMPs産生を抑制することで、肺の構造変化を抑制し、COPDの長期予後を改善する可能性を示した。テオフィリンに限らず、NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta_1$ の経路やHDAC活性に影響を与える薬剤がCOPDの新たな治療戦略になる可能性を示した。以上より、本論文が学位論文に値するものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第499号		
学位授与の日	平成26年3月18日		
氏名	寺口真年		
学位論文の題目	Prevalence and distribution of intervertebral disc degeneration over the entire spine in a population-based cohort : The Wakayama Spine Study (一般住民コホートをを用いた、全脊柱 MRI における変性椎間板の分布と有病率について : The Wakayama Spine Study-)		
論文審査委員	主査	教授 中尾直之	
	副査	教授 前田正信	教授 吉田宗人

## 論文内容の要旨

【背景と目的】椎間板は脊椎の可動性・安定性に重要な役割を果たす臓器であり、その変性と腰痛との関連が報告される。また脊椎退行性変化は椎間板変性から開始し、変形性脊椎症や脊柱管狭窄症に至り、四肢のしびれや痛みなど種々の症状を惹起することが報告されている(Boo, Spine 2002)。椎間板変性の段階で、今後の脊椎退行性変化が進行する危険性の高い集団を抽出して予防することが出来れば健康増進に大きな役割を果たすと考えられるが、過去の報告においては解析対象となる集団に偏りが存在するため、結果が一般化されてはいない。申請者は選択の偏りを無くして椎間板変性の予防につながる疫学データを提示するため、The Wakayama Spine Study で撮像した住民 1,011 例の全脊柱 MRI データの椎間板変性の読影を行った。本研究の目的は、全脊柱における椎間板変性の有病率と分布、関連因子そして椎間板変性と頸部痛および腰痛の関係について明らかにすることである。

【対象と方法】2008 年に和歌山県の日高川町（山村地域）と太地町（漁村地域）で実施した The Wakayama Spine Study に参加した一般住民ボランティア 1011 名の内、全脊柱 MRI が撮像可能であり画像の明瞭であった 975 名（男性 324 名、女性 651 名；平均年齢 66.0 歳）を対象とした。椎間板変性は T2 強調矢状断像を Pfirrmann 分類に従い評価し、grade1-3 を『椎間板変性なし』、grade4-5 を『椎間板変性あり』として、各分節（頸椎・胸椎・腰椎）および各椎間高位(23 椎間)における有病率を算出した。また、頸椎・胸椎・腰椎の各分節における変性椎間板の有無を目的変数、各年代（50 歳未満、50 代、60 代、70 代、80 歳以上）、性別、BMI カテゴリー（低体重、普通体重、過体重、肥満）を説明変数としてそれぞれ補正し、ロジスティック解析を行った。加えて、各分節における椎間板変性の有無と頸部痛および腰痛の有無の関係について性別、年齢、BMI を補正し、ロジスティック解析を行った。サブ解析として、椎間板変性数と頸部痛もしくは腰痛の有無の関連をロジスティック解析にて検討した。

【結果】年代ごとの椎間板変性の有病率は、80 歳以上で腰椎において低下していることを除いては、年代の増加に比例して上昇した。また、椎間板変性を有する割合の多い上位 3 椎間は、頸椎：C5/6（男性 51.5% 女性 46.0%）、C4/5（男性 38.6% 女性 35.8%）、C6/7（男性 43.5% 女性 33.3%）、胸椎：T6/7（男性 32.4% 女性 37.7%）、T7/8（男性 31.8% 女性 36.2%）、T5/6（男性 28.4% 女性 35.9%）、腰椎：L4/5（男性 69.1% 女性 75.8%）、L5/S1（男性 66.7% 女性 70.9%）、L3/4（男性 59.3% 女性 61.9%）の順であった。

椎間板変性の関連因子については、頸椎・胸椎・腰椎すべてにおいて性別の違いでは有意な差を認めなかった。しかしながら、頸椎・胸椎・腰椎において年代が高くなると有意に椎間板変性を有する可能性が高かった(オッズ比 頸椎 50 代;2.45、60 代;3.62、70 代;7.87、80 歳以;16.9/ 胸椎 50 代;4.60、60 代;12.0、70 代;24.9、80 歳以;47.0/ 腰椎 50 代;4.47、60 代;9.95、70 代;15.0、80 歳以上;2.94 : すべて 50 歳未満の有病割合をオッズ比 1 とした)。加えて、BMI が上昇すると有意に椎間板変性を有する可能性が高かった (オッズ比 頸椎 低体重;0.91、過体重;1.38、肥満;1.60/ 胸椎 低体重;1.36、過体重;1.64、肥満;3.12/ 腰椎 低体重;0.81、過体重;1.14、肥満;2.56 : すべて普通体重の有病割合をオッズ比 1 とした)。また、腰椎分節に椎間板変性を 1 つでも有する場合は、腰痛を有する可能性が高か

った（オッズ比 1.57）。さらに腰椎分節の椎間板変性数が増加することにより、腰痛を有する可能性が高かった（変性数3つ以上；オッズ比 1.75、変性数1つもしくは2つ；オッズ比 1.34：椎間板変性が腰椎分節に1つも無い場合をオッズ比1とした）。

【考察・結論】従来の椎間板変性に関する疫学研究は頸椎および腰椎に焦点が当てられ、全脊柱を系統的に評価した報告は存在しない。申請者は全脊柱における椎間板変性について一般住民コホートをを用いて調査、研究を行い、全脊柱の椎間板変性の有病率が加齢によって増加することや、有病率の分布が脊柱アライメントに類似していることなどの基礎データをまず明らかにした。そして、肥満の被験者が全脊柱、特に胸椎分節における椎間板変性を有する可能性が高いことを明らかにした。この結果は、椎間板変性は可動性による力学的負荷を非常に影響されやすく、頸椎や腰椎において起こりやすいと考えられてきた。しかしながら、肋骨に囲まれた可動性の少ない胸椎において椎間板変性の高い有病率を認めたことや肥満と有意に関連していることは、力学的負荷以外に動脈硬化や糖尿病など生活習慣に関わる因子と椎間板変性に関連している可能性を示唆する。加えて、未だ確立したエビデンスのない腰痛の原因に関して、腰椎における椎間板変性数の増加と腰痛の有無が有意に関連していることは、腰痛研究において一石を投じる物である。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 26 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。

【背景と目的】脊椎退行性変化は椎間板変性から始まり、変形性脊椎症や脊柱管狭窄症に至り四肢のしびれや痛みなどの症状を惹起する。椎間板変性の段階で、今後の脊椎退行性変化が進行する危険性の高い集団を抽出して予防することが出来れば健康増進に大きな役割を果たすと考えられる。しかし過去の報告においては解析対象となる集団に偏りが存在するため、結果が一般化されてはいない。申請者は一般住民 1,011 例を対象に全脊柱 MRI における椎間板変性の有病率と分布、関連因子そして椎間板変性と腰痛の関係について明らかにした。

【結果】①椎間板変性の有病率は、年齢の増加に比例して上昇した（50 才以上で 90%を超える）。  
②椎間板変性の有病率は C5/6、T6/7、L4/5 で最も高く、各々の隣接椎間で次に高かった。  
③頸椎・胸椎・腰椎すべてにおいて性別の違いでは有意な差を認めなかった。  
④頸椎・胸椎・腰椎すべてにおいて肥満は有意に椎間板変性と関連を認めた。  
（オッズ比 頸椎；肥満:1.60/ 胸椎；肥満:3.12/ 腰椎；肥満:2.56）  
⑤腰椎に椎間板変性を 1 つでも有する場合は、腰痛を有する可能性が高く（オッズ比 1.57）、椎間板変性数の増加によって、腰痛のオッズ比がさらに増加した（変性数 3 つ以上；オッズ比 1.75）。

【考察・結論】従来の椎間板変性に関する疫学研究は頸椎および腰椎に焦点が当てられ、全脊柱を系統的に評価した報告は存在しない。申請者は一般住民コホートをを用いて、全脊柱の椎間板変性の有病率が加齢によって増加することや、有病率の分布が脊柱アライメントに類似していることなどの基礎データを明らかにした。また肥満が全脊柱、特に胸椎において影響していることを明らかにした。この結果は、椎間板変性は可動性による力学的負荷に影響されやすい頸椎や腰椎において起こりやすいと考えられてきた概念を変えることになる。なぜなら肋骨に囲まれた低可動性の胸椎において椎間板変性と肥満の有意な関連は、可動性による力学的負荷以外の因子が関連している可能性を示唆する。加えて、未だ確立したエビデンスのない腰痛の原因に関して、椎間板変性数の増加と腰痛が関連していることは、腰痛解明の一助となりうる可能性がある。

本論文は、椎間板変性の疫学的実態に関して、一般住民コホートを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のあるものであると認めた。

学位記番号	博(医)甲第500号		
学位授与の日	平成26年3月18日		
氏名	上野恵子		
学位論文の題目	Possible Involvement of Endogenous Opioid System Located Downstream of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor in Mice With Physical Dependence on Nicotine (ニコチンの身体的依存形成における $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体の下流に存在するオピオイド神経系の関与)		
論文審査委員	主査	教授 篠崎和弘	
	副査	教授 平井秀一	教授 岸岡史郎

## 論文内容の要旨

### [緒言]

ニコチンの抗侵害刺激作用は、ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)拮抗薬のみならずオピオイド受容体拮抗薬によっても抑制されること、ニコチンの全身投与により脊髄後角の内因性オピオイドペプチドが遊離されることから、ニコチンの抗侵害刺激作用にオピオイド神経系が関与する可能性が示唆されている。さらに、ニコチンは、視床下部-下垂体-副腎皮質系を賦活し、副腎皮質ステロイド(齧歯類におけるコルチコステロン)の分泌を亢進させる。この作用はnAChR拮抗薬により拮抗されるが、オピオイド受容体拮抗薬では抑制されないことから、ニコチンのコルチコステロン上昇作用にはオピオイド神経系が関与しないと報告されている。

中枢神経系におけるnAChRとして $\alpha 4\beta 2$ および $\alpha 7$  nAChRサブタイプの役割がよく知られている。ニコチンの抗侵害刺激作用は $\alpha 4\beta 2$ および $\alpha 7$  nAChR拮抗薬により拮抗されるが、コルチコステロン上昇作用は $\alpha 4\beta 2$  nAChR拮抗薬により拮抗されるものの、 $\alpha 7$  nAChR拮抗薬では拮抗されない。これらの結果より、 $\alpha 7$  nAChRの下流にオピオイド神経系が存在する可能性が示唆されている。

一方、ニコチンの反復投与により身体的依存が形成され、禁煙治療の妨げになっているが、その機序については明らかでない。そこで、ニコチンによるオピオイド神経系の活性化がニコチン依存に関与しているとするれば、ニコチン反復投与後のオピオイド受容体拮抗薬投与により、ニコチン禁断が惹起されるとの仮説を立てた。本研究では、オピオイド禁断症状の一つである血清コルチコステロン(SCS)上昇を指標として、ニコチンの身体的依存形成には、 $\alpha 7$  nAChRの下流に存在するオピオイド神経系が関与する可能性について検討した。

### [方法]

実験にはICR系雄性マウス(25-35 g)を使用した。オピオイド受容体拮抗薬としてナロキソンおよびナルトレキソンを用いた。また、 $\alpha 7$  nAChR拮抗薬としてメチルリカコニチン(MLA)を、 $\alpha 4\beta 2$  nAChR拮抗薬としてジヒドロ $\beta$ エリスロイジン(DH $\beta$ E)を用いた。薬物は全て生理食塩水に溶解し、投与液量を0.2 ml/10 g体重として背部皮下に投与した。SCS値の定量は、蛍光法に従った。

#### <ニコチン反復投与後のナロキソン誘発ニコチン禁断の検討>

##### 1) ナロキソン誘発 SCS 上昇の経時変化

ニコチン(3 mg/kg)を1日2回9日間反復投与した。10日目にナロキソン(3 mg/kg)を投与し、その30、60、120および180分後のSCS値を測定した。

##### 2) ナロキソン誘発 SCS 値上昇に及ぼすナロキソン投与量の影響

ニコチン(3 mg/kg)を1日2回7日間反復投与した。8日目にナロキソン(0.01、0.1、1および

び5 mg/kg) を投与し、その30分後のSCS値を測定した。

3) ナロキソン誘発SCS値上昇に及ぼすニコチン投与期間の影響

ニコチン(3 mg/kg)を1日2回3、5、7または9日間反復投与した。最終投与翌日にナロキソン(3 mg/kg)を投与し、その30分後のSCS値を測定した。

4) ナロキソン誘発SCS値上昇に及ぼすニコチン投与量の影響

ニコチン(1、3または5 mg/kg)を1日2回9日間反復投与した。10日目にナロキソン(3 mg/kg)を投与し、その30分後のSCS値を測定した。

<ニコチン反復投与後のナロキソン誘発禁断に及ぼすナルトレキソン、DH $\beta$ EおよびMLA併用投与の影響>

1) ナロキソン誘発SCS値上昇に及ぼすナルトレキソン併用投与の影響

ナルトレキソン(1、3または10 mg/kg)をニコチン(5 mg/kg)と1日2回5日間併用反復投与した。6日目にナロキソン(3 mg/kg)を投与し、その30分後のSCS値を測定した。

2) ナロキソン誘発SCS値上昇に及ぼすDH $\beta$ EおよびMLA併用投与の影響

DH $\beta$ E(3 mg/kg)またはMLA(3 mg/kg)をニコチン(5 mg/kg)と共に1日2回5日間併用反復投与した。6日目にナロキソン(3 mg/kg)を投与し、その30分後のSCS値を測定した。

[結果]

<ニコチン反復投与後のナロキソン誘発ニコチン禁断の検討>

ニコチン(3 mg/kg)を1日2回9日間反復投与し、10日目にナロキソンを投与すると、ナロキソン投与30分後を最大とするSCS上昇が認められた。その後、徐々にSCS値は低下し、120分後には基礎値まで回復した。このナロキソン誘発ニコチン禁断によるSCS上昇の程度は、ナロキシンの投与量、ならびにニコチンの投与期間と投与量に相関した。

<ニコチン反復投与後のナロキソン誘発禁断に及ぼすナルトレキソン、DH $\beta$ EおよびMLA併用投与の影響>

ニコチン(5 mg/kg)を1日2回5日間反復投与し、6日目にナロキソンを投与すると、有意なSCS上昇が認められた。このナロキソン誘発SCS上昇は、ニコチンと併用投与したナルトレキシンの用量依存的に抑制された。一方、ニコチン反復投与後のナロキソン誘発SCS上昇は、MLAの併用投与により抑制されたが、DH $\beta$ Eを併用投与しても抑制されなかった。

[結論]

ニコチン反復投与後にナロキソンを投与すると、オピオイド禁断時に見られるSCS上昇が惹起された。このニコチン反復投与後のナロキソン誘発SCS上昇は、1)ナロキシンの投与量、2)ニコチンの投与期間、および3)ニコチンの投与量に相関した。さらに、オピオイド受容体拮抗薬のナルトレキソンをニコチンの反復投与に併用投与すると、ナルトレキシンの用量依存的にナロキソン誘発SCS上昇が抑制された。これらの結果は、ニコチンによるオピオイド神経系の賦活が、少なくともニコチンの身体的依存形成に関与することを示唆している。

さらに、ニコチン反復投与後のナロキソン誘発SCS上昇は、DH $\beta$ Eの併用投与によっても惹起されたが、MLAの併用投与では認められなかった。この結果は、 $\alpha$ 7 nAChRの下流にオピオイド神経系が存在することを示している。以上の結果より、 $\alpha$ 7 nAChRの下流に存在するオピオイド神経系の賦活が、ニコチンの身体的依存形成に関与していることが明らかとなり、この $\alpha$ 7 nAChRの下流に存在するオピオイド神経系が禁煙治療の新たな標的となる可能性が示唆された。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 26 年 2 月 14 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、中枢神経系にて内因性オピオイドペプチドを遊離させ、オピオイド神経系を活性化させることはよく知られている。また、ニコチンの抗侵害刺激作用はオピオイド受容体拮抗薬（ナロキソン）により抑制されるが、副腎皮質ホルモン（コルチコステロン）分泌作用は抑制されないことが明らかにされている。さらに、中枢神経系におけるニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）サブタイプとして、 $\alpha 4\beta 2$  および  $\alpha 7$  nAChRs の存在がよく知られており、ニコチンの抗侵害刺激作用は  $\alpha 4\beta 2$  および  $\alpha 7$  nAChR 拮抗薬により拮抗されるが、コルチコステロン上昇作用は  $\alpha 4\beta 2$  nAChR 拮抗薬で拮抗されるものの、 $\alpha 7$  nAChR 拮抗薬では拮抗されないことが報告されている。すなわち、 $\alpha 7$  nAChR の下流にオピオイド神経系が存在する可能性が示唆されている。一方、ニコチンの反復投与により身体的依存が形成されるが、その機序については明らかではない。本研究は、ニコチンによるオピオイド神経系の活性化がニコチンの身体的依存形成に関与し、このオピオイド神経系は  $\alpha 7$  nAChR の下流に存在する可能性について検討したものである。

### <方法>

動物は ICR 系雄性マウスを使用した。ニコチン反復投与後のナロキソン誘発ニコチン禁断の指標として、オピオイド禁断時に認められる血清コルチコステロン上昇を用いた。ナルトレキソン（オピオイド受容体拮抗薬）、dihydro- $\beta$ -erythroidine (DH $\beta$ E :  $\alpha 4\beta 2$  nAChR 拮抗薬) および methyllycaconitine (MLA :  $\alpha 7$  nAChR 拮抗薬) は、ニコチンと併用して反復投与した。血清コルチコステロン値の測定は蛍光法に従った。

### <結果>

- 1) ナロキソン誘発ニコチン禁断による血清コルチコステロン上昇の程度は、ナロキシンの投与量、ならびにニコチンの投与期間と投与量に相関した。
- 2) ニコチンと併用投与したナルトレキシンの用量に依存して、ナロキソン誘発ニコチン禁断は抑制された。
- 3) MLA の併用投与によりナロキソン誘発ニコチン禁断は抑制されたが、DH $\beta$ E の併用投与では抑制されなかった。

以上の結果より、ニコチンの身体的依存形成には、ニコチンによって活性化されるオピオイド神経系が関与し、このオピオイド神経系は  $\alpha 7$  nAChR の下流に存在することが明らかになった。この研究は、オピオイド神経系が禁煙治療の新たな標的となる可能性を示唆したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第501号		
学位授与の日	平成26年3月18日		
氏名	尾崎 雄一		
学位論文の題目	Association between P-selectin glycoprotein ligand-1 and pathogenesis in acute coronary syndrome assessed by optical coherence tomography (P-selectin glycoprotein ligand-1と急性冠症候群の発症機序についてOCTを用いた検討)		
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

### [緒言]

剖検例での病理学検討において、冠動脈内の薄い線維性被膜をもつアテロームの破綻とそれに続いて起こる血栓形成が、急性冠症候群(acute coronary syndrome; ACS)を引き起こす最も重要なメカニズムであることが報告されている。プラーク破裂に引き続いて起こる血栓形成により、冠動脈が完全閉塞に陥れば急性心筋梗塞(acute myocardial infarction; AMI)、高度狭窄または亜完全閉塞でとどまれば不安定狭心症(unstable angina pectoris; UAP)となり、また一部の症例では破裂部位が自然修復され症状を呈さない。従って、どの様な因子が、プラーク破綻後のACS発症に関与しているかを解明することは臨床的に重要である。

一方で、冠動脈プラーク破綻から血栓性閉塞に至る急性冠症候群発症の一連の過程において、循環血中単球の関与が指摘されている。最近の研究により、末梢血単球の不均一性が主にそのエフェクター機能を決定づけるという概念に注目が集まっている。すなわち、単球は、自然免疫反応の際に中心的な働きをするToll様受容体Toll-like receptor (TLR)などのパターン認識受容体の細胞表面上の発現を増強することにより、病変局所の炎症および血小板との相互作用(P-selectinとその受容体であるP-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1))により、血栓形成を促進することが明らかにされている。

また、近赤外線を用いて冠動脈内を観察する血管内光干渉断層法(optical coherence tomography; OCT)が臨床応用され、約10-20 $\mu$ mという高い解像度により、ACSの責任病変に高頻度に認められるプラーク破裂や冠動脈内血栓などの同定が可能となった。

本研究では、ACSにおける末梢血および責任冠動脈血の単球上のPSGL-1の発現と冠動脈内血栓の関係についてOCTを用いて検討した。

### [方法]

和歌山県立医大附属病院に入院したAMI 25例、UAP 20例、安定狭心症(stable angina pectoris; SAP) 35例、コントロール群 20例の計100例を対象とした。

入院時の末梢血およびAMI症例についてはカテーテルインターベンション施行時に血栓吸引カテーテルを用いて責任冠動脈血を採取した。フローサイトメリー法でPE、PE-Cy5、FITCの蛍光抗体を用いて単球サブセットの解析と単球上のPSGL-1の発現を測定した。

また、冠動脈造影検査にてACSの責任病変を同定し、引き続きカテーテルインターベンション治療の施行前にOCTイメージングを施行した。2.7FのOCTカテーテル(RX ImageWire II; LightLab Imaging, Westford, Massachusetts, USA)を病変の遠位部まで進め、ガイディングカテーテルからのflashにて冠動脈内の赤血球を除去した上でイメージングを施行した。OCTイメージ解析については、プラーク破裂、冠動脈内血栓の有無を評価し、単球上のPSGL-1の発現と比較検討した。

## [結果]

AMIにおいて20例(80%)、UAPでは12例(60%)に冠動脈内に血栓が認められた。さらにAMIにおいて21例(84%)、UAPでは12例(60%)に冠動脈内のプラーク破裂が認められた。

フローサイトメリーによる単球および単球上のPSGL-1発現についての検討では、ACSにおいてPSGL-1の発現はSAPおよびコントロール群と比較して有意に上昇していた(ACS; 23.5 [14.1-41.0]%, SAP; 9.1 [5.7-15.4]%, コントロール群; 4.3 [2.0-7.8]%,  $p<0.001$ )。単球をCD14+CD16+、CD14++CD16+、CD14++CD16-の3つのサブセットに分類して検討した結果、全症例およびコントロール群においてCD14++CD16+単球上のPSGL-1の発現頻度がその他の単球サブセットと比較して有意に高かった。また、CD14++CD16+単球上のPSGL-1の発現頻度はAMIにおいてUAP、SAP、コントロール群と比較して有意に上昇していた(AMI; 12.8 [6.8-21.1]%, UAP; 10.9 [6.6-12.5]%, SAP; 4.9 [3.0-7.8]%, コントロール群; 2.0 [1.0-3.5]%)。さらにAMIにおいてCD14++CD16+単球上のPSGL-1の発現は血栓吸引カテーテルで採取した責任冠動脈血で末梢血と比較して有意な上昇が認められた(責任冠動脈血; 18.5 [11.6-33.3]% vs. 末梢血; 12.8 [6.8-21.1]%,  $p=0.015$ )。

また、AMI発症から2週間後のCD14++CD16+単球上のPSGL-1の発現は急性期と比較して有意に減少していた(急性期; 12.8 [6.8-21.1]% vs. 2週間後; 6.2 [3.2-8.5]%,  $p<0.001$ )。さらにACS症例においてCD14++CD16+単球上のTLR-4とPSGL-1の発現頻度の比較に関しても有意な相関関係が認められた( $r=0.633$ ,  $p<0.001$ )。

OCT所見とPSGL-1の発現について検討した結果、ACSでは冠動脈内に血栓およびプラーク破裂を認めた群では認めなかった群と比較してCD14++CD16+単球上のPSGL-1の発現頻度が有意に上昇していた( $p<0.001$ )。また、多変量解析においてもACS症例でCD14++CD16+単球上のPSGL-1の発現が冠動脈内血栓の独立した寄与因子であった。

## [考察と結語]

今回の研究では、AMIにおいて単球上のPSGL-1の発現がUAPやSAPと比較して上昇していた。また、急性冠症候群において、プラーク破裂や冠動脈内血栓を認める症例ではPSGL-1がより多く発現しており、AMIでは末梢血と比較しても責任冠動脈血の単球上のPSGL-1発現は有意に上昇していた。この結果から、単球上のPSGL-1のup-regulationがプラーク破裂後の冠動脈内血栓形成に重要な役割を担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26年2月17日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

冠動脈内の薄い線維性被膜をもつアテロームの破綻とそれに続いて起こる血栓形成が、ACSを引き起こす最も重要なメカニズムであることが報告されている。血栓形成により、冠動脈が完全閉塞に陥ればAMI、高度狭窄または亜完全閉塞にとどまればUAPとなり、また一部の症例では破裂部位が自然修復され症状を呈さない。よって、どのような因子がプラーク破裂後の冠動脈内血栓形成に関与しているかを調べることは有用であると考えられる。

一方で、冠動脈プラーク破綻から血栓性閉塞に至るACS発症の一連の過程において、循環血中単球の関与が指摘されている。すなわち、単球は、自然免疫反応の際に中心的な働きをするTLRなどのパターン認識受容体の細胞表面上の発現を増強することにより、病変局所の炎症および血小板との相互作用(P-selectinとその受容体であるPSGL-1)により、血栓形成を促進することが明らかにされている。

本論文はACSにおいて末梢血および責任冠動脈血における単球上のPSGL-1の発現頻度と責任冠動脈内の血栓およびプラーク破裂の関係について、約10-20 $\mu$ mという高い解像度をもつOCTを用いて明らかにしたものである。その結果、AMIにおいて単球上のPSGL-1の発現頻度がUAPやSAPと比較して有意に

高かった。また、ACSにおいて冠動脈内血栓またはプラーク破裂を有した症例ではそれらを認めなかった症例と比較して単球上の PSGL-1 の発現頻度が有意に高く、AMI では末梢血よりも冠動脈病変局所で単球上の PSGL-1 発現が有意に高いことが明らかになった。さらに急性期の PSGL-1 の発現は 2 週間後には有意に低下していた。

以上、本論文は ACS において単球上の PSGL-1 の発現頻度と OCT を用いて観察した責任病変のプラーク破裂、冠動脈内血栓の有無との関係を初めて報告したものである。単球上の PSGL-1 の発現がプラーク破裂後の冠動脈内血栓形成に重要な役割を担っている可能性を提示したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第502号		
学位授与の日	平成26年3月25日		
氏名	籠谷良平		
学位論文の題目	Prevalence of diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) of the whole spine and its association with lumbar spondylosis and knee osteoarthritis: the ROAD study (全脊柱におけるびまん性特発性骨増殖症の有病率と変形性腰椎症及び変形性膝関節症との関連)		
論文審査委員	主査	教授 中尾直之	
	副査	教授 前田正信	教授 吉田宗人

## 論文内容の要旨

【背景と目的】びまん性特発性骨増殖症(diffuse idiopathic skeletal hyperostosis : DISH)は椎体前面にある前縦靭帯骨化が連続して起こることにより脊椎の可動性が低下する病態である。体幹の柔軟性が失われるのみならず、前縦靭帯骨化の連続性が途絶えている部位に体動時の応力が集中するため軽微な外傷で脊椎骨折が生じる。さらに DISH に伴う脊椎骨折は通常の脊椎骨折と違い、四肢の長管骨骨折の様な横断した骨折が生じ、脊椎が椎体から後方成分まで連続した骨折を引き起こすため脊髄損傷を引き起こしやすく重篤な脊髄麻痺が生じる (Westerveld et al. Eur Spine J, 2009)。また、初診時脊椎骨折があるが重篤な神経症状を生じなかった症例においても、骨折部の不安定性が強い事に加え骨折部にストレスが集中する事による骨癒合不全を引き起こし、遅発性の脊髄麻痺が続発することが問題となる。このように DISH に伴う脊椎骨折が大きな問題となっている上、高齢者の増加に伴い臨床における DISH に伴う脊椎骨折の報告が増加の一途をたどっているにも関わらず、地域住民を対象とした疫学調査は皆無であり、有病率さえ明らかにされていない。一方、変形性腰椎症(lumbar spondylosis:LS) や変形性膝関節症(knee osteoarthritis:KOA) などの変形性関節症(osteoarthritis:OA)も同様に軟骨が変性すると共に骨棘が形成される骨増殖性疾患である。そのことから骨増殖性疾患である DISH 及び OA はお互いに関連していると考えられるが、現在に至るまで DISH と OA の関連に示した論文はほとんど存在しない。本研究の目的は地域住民を対象としたコホートをを用いて DISH の有病率と LS 及び KOA との関連を明らかにする事である。

【方法】2005-2006 年度に和歌山県の山村・漁村地域で実施した Research on Osteoarthritis/osteoporosis Against Disability (ROAD) Study に参加した一般住民 1,690 人に全脊柱側面及び両膝正面像のレントゲンを撮影し、読影が困難であった 43 名を除き 1,647 人(男性 573 人、女性 1,074 人、平均年齢 65.3 歳)を対象としレントゲン解析を行った。すべての参加者にインフォームドコンセントを行い、書面による同意を得た。読影は脊椎外科医 1 名により行い、Resnick の診断基準を用いて年齢別、男女別の DISH の有病率を明らかにした。腰椎の L1/2 から L5/S1 椎間及び膝関節を Kellgren-Lawrence 分類を用いて分類を行った。

【結果】DISH の有病率は男性 21.7%、女性 4.6%であり年代別有病率(男:女)は 50 歳未満(1.8%:0.7%)、50 歳代(11.7%:1.5%)、60 歳代(14.8%:3.1%)、70 歳代(32.6%:7.3%)、80 歳以上(35.9%:11.8%)であり加齢と共に増加し、男性に有意に有病率が高かった( $p < 0.01$ )。その分布は主に胸椎(88.7%)にあり特に下位胸椎(Th7-Th9)に多く分布していた。DISH の有無を目的変数、LS の及び KOA を説明変数として、性、年齢、BMI、地域、喫煙有無、飲酒の有無で補正しロジスティック回帰分析にて解析を行ったところ、LS は DISH と有意な関連が認め(vs. KL 0-1; KL=2, Odds ratio, 5.50, 95% confidence interval, 2.81-10.8,  $p < 0.001$ ; KL $\geq$ 3, 4.09, 2.08-8.03,  $p < 0.001$ )、さらに KOA においても DISH と有意な関連を認めた(vs. KL 0-1 ; KL $\geq$ 3, オッズ比 (OR) 1.89, 95%信頼区間(CI) 1.14-3.10,  $p < 0.01$ )。

【考察・結論】一般住民において、全脊柱側面及び両膝正面像のレントゲン撮影を行い、DISHの有病率とLS及びKOAとの関連を調査した。70歳以上の男性で有病率は約30%でありDISHは決して稀な疾患でないこと、男性に多く加齢と共に増加する事が明らかになった。DISHの有病率は人種差に関連があると報告されているが、本研究の有病率は同じ黄色人種であるKimらの報告より明らかに高く(Kim et al. J Rheumatol, 2004) DISHの発生には人種差よりむしろ遺伝的素因が強く関係しているのではないかと考えられた。さらにDISHの分布が後彎を呈しもっとも力学的ストレスの強い下位胸椎に多い事から力学的ストレスがその発生に関与しているのではないかと考えられる。DISHとLS及びKOAの間には有意な関連が見られ、このことより、これらの疾患は類似疾患であり共通の素因が関連しているのではないかと考えられた。本研究は日本人における基本的な疫学データを提供するばかりではなく、臨床現場への啓蒙に寄与すると考える。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成26年3月11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。

びまん性特発性骨増殖症(diffuse idiopathic skeletal hyperostosis:DISH)は椎体前面にある前縦靱帯骨化が連続して起こることにより脊椎の可動性が低下する病態である。時に脊髄損傷を伴う脊椎骨折を引き起こし受傷者の生活の質を著しく低下させることが報告されている。DISHの疫学報告は数少なく、未だDISHの病態は不明な部分が多い。一方、変形性腰椎症(lumbar spondylosis:LS)や変形性膝関節症(knee osteoarthritis:KOA)は軟骨変性と共に骨棘が形成される骨増殖性疾患である。そのことから骨増殖性疾患であるDISHとLSやKOAはお互いに関連していると考えられるが、その関連に示した論文はほとんど存在しない。申請者らは地域住民1,690例を対象とした大規模コホートを用いてDISHの有病率とLS及びKOAとの関連を明らかにした。DISHの有病率は男性21.7%、女性4.6%であり年代別有病率(男:女)は50歳未満(1.8%:0.7%)、50歳代(11.7%:1.5%)、60歳代(14.8%:3.1%)、70歳代(32.6%:7.3%)、80歳以上(35.9%:11.8%)であり加齢と共に増加し、男性に有意に有病率が高かった( $p < 0.01$ )。その分布は主に胸椎(88.7%)にあり特に下位胸椎(Th7-Th9)に多く分布していた。LSはDISHと有意な関連を認め(vs. KL0-1; KL=2 Odds ratio, 5.50) (vs. KL0-1; KL $\geq$ 3 Odds ratio, 4.09)、KOAにおいてもDISHと有意な関連を認めた(vs. KL0-1; KL $\geq$ 3, Odds ratio, 1.89)。本研究にてDISHは70歳以上の男性での有病率は約30%でありDISHは決して稀な疾患でないこと、男性に多く加齢と共に増加する事を明らかにした。さらにDISHの分布が後彎を呈しもっとも力学的ストレスの強い下位胸椎に多い事から力学的ストレスがその発生に関与しているのではないかと考えられた。DISHとLS及びKOAの間には有意な関連が見られ、このことより、これらの疾患は類似疾患であり共通の素因が関連しているのではないかと考えられた。本研究は日本人における基本的な疫学データを提供するばかりではなく、臨床現場への啓蒙に寄与すると考える。

本論文は、DISHの疫学実態に関して、一般住民コホート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のあるものであると認めた。

学位記番号	博(医)乙第894号		
学位授与の日	平成25年4月9日		
氏名	東郷直希		
学位論文の題目	Liver regeneration effect of oncostatin M following hepatectomy for the rat cirrhotic liver model (ラット肝硬変肝切除モデルに対する Oncostatin M の肝再生効果)		
論文審査委員	主査	教授 一瀬雅夫	
	副査	教授 仙波恵美子	教授 山上裕機

## 論文内容の要旨

### 緒言

肝細胞癌に対する手術は、局所制御には有効な治療法であるが、本邦では肝細胞癌の多くは肝硬変を合併しており、肝再生能不良状態であるため切除量が大きくなってしまうと術後肝不全が懸念され切除不能と判断される場合がある。

この課題に対して、教室では肝再生を促進させる生理活性を有する肝細胞増殖因子

(Hepatocyte Growth Factor, HGF) を用いた研究を行ってきた。即ち、70%肝切除を行う肝硬変ラットモデルを対象に、術前肝葉選択的にHGF発現アデノウイルスベクターを投与することで、良好な成績が得られているが、発癌の可能性があり、未だ臨床応用に至っていない。

Oncostatin M(OSM)は IL-6ファミリーに属するサイトカインであり、発見当初はA135メラノーマや他のヒト腫瘍細胞の複製を抑制する因子としてU-937hystiocytic lymphoma cellより分離・同定された物質であるが、その後の研究でHGFとは異なる機序で肝細胞増殖促進、抗アポトーシス、肝細胞分化作用を有し、急性肝障害モデルに対して投与することにより、肝再生効果と肝機能改善効果が得られることが明らかになった。

また、OSM receptor knockout miceでは肝細胞増殖遅延、肝壊死遷延や組織破壊などの肝再生の障害を認めることが指摘されており、HGFの作用で指摘された発癌作用はみられていないという特色を併せ持つ。

本研究では、adenovirus vectorを用いてOSMを発現する遺伝子を肝硬変ラットモデルに導入することにより、肝再生を促進するとともに肝機能を改善することを確認し、肝切除術の適応拡大に寄与することを目的としている。

### 対象と方法

#### ・ラット肝硬変モデルの作成

8週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットに対し、dimethylnitrosamine1%溶液を Kg 体重当たり 1mL の腹腔内投与を 3日間連続×3週間かけて施行して肝硬変を作成した。

#### ・OSM発現アデノウイルスベクター（以下AdOSM）、及びLacZ発現アデノウイルスベクター（以下AdLacZ）の調整

各ウイルスベクターは、理研BRCより供与を受け、当施設内にて増幅・精製し実験に使用した。

#### 実験 I：肝硬変モデルに対する治療実験

慢性肝疾患に対する OSM の肝機能改善効果を評価する目的に、肝硬変ラットに対し、DMN 最終投与後 5 日目に開腹する。肝硬変を肉眼的に評価後、 $5 \times 10^8$ PFU の力価の AdLacZ 或いは AdOSM ウイルス液

0.5mL, PBS液0.5mLを門脈本幹に注入する。

adenovirus投与後7日目よりDMNの腹腔内投与をさらに2週間続けて施行して肝硬変を進行させた後、3週間目に屠殺し、3群(AdOSM群, AdLacZ群, PBS群)に群分けして肝機能改善効果並びに肝再生効果を以下について検討した。

1. 肉眼所見及び体重, 肝重量, 腹水の比較
2. H-E染色とAzan-Mallory染色で肝線維化, 肝障害の程度を病理学的に検討, pathological gradeの決定
3. 組織中の線維化面積を測定し線維化を定量
4. 血液検査による肝機能障害について各群との比較検討

#### 実験II：肝葉選択的遺伝子導入による70%肝切除術の術後動態の検討

肝硬変ラットに対し、DMN最終投与後4日目に開腹して肝硬変を肉眼的に評価後、切除予定肝葉を支配する門脈枝を遮断し、AdOSM, AdLacZ, 及びPBSを門脈本幹に注入。5分間血流遮断を継続した後に開放して閉腹した。門脈投与後4日目に70%肝切除を施行した。術後4日目に屠殺し、各群における手術後の肝機能改善効果並びに肝再生効果を実験Iと同様に検討した。統計学的検討

なおPathological gradeについては $\chi^2$ testで検討し、血清生化学検査の検討はstudent-t testを用いた。いずれのデータもStat View program (version 5 Hulinks, Tokyo, Japan)を用いて解析し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

## 結 果

#### 実験I：

1. 肉眼的所見では、OSM投与群では他群と比較して肝表面は比較的平滑で肝の萎縮も軽度であった。体重はAdLacZ群が $238 \pm 29$ g, PBS群が $244 \pm 10$ gに対し、AdOSM群は $286 \pm 53$ gで ( $p=0.019$  vs PBS,  $p=0.048$  vs AdLacZ), 肝重量はAdLacZ群が $3.9 \pm 0.8$ g, PBS群が $3.9 \pm 0.1$ gに対し、AdOSM群は $6.1 \pm 2.7$ gで ( $p=0.050$  vs AdLacZ,  $p=0.041$  vs PBS), AdOSM群で増加傾向が見られた。
2. 線維化に関しては、Image analysisによる線維化定量(%)では、AdOSM群で $13.4 \pm 4.9$ , AdLacZ群で $30.1 \pm 0.5$ , PBS群で $26.8 \pm 4.3$ とOSM群で線維化の改善が認められた ( $p=0.024$  vs AdLacZ,  $p=0.027$  vs PBS)。
3. 血液生化学所見では、ヒアルロン酸 (ng/mL) がAdOSM群で $322 \pm 179$ , AdLacZ群で $843 \pm 297$ , PBS群で $1243 \pm 444$  ( $p=0.002$  vs AdLacZ,  $p=0.017$  vs PBS), AST (IU/L) がAdOSM群で $157 \pm 53$ , AdLacZ群で $247 \pm 71$ , PBS群で $183 \pm 43$  ( $p=0.026$  vs AdLacZ), 更に、アルブミン (g/dL) がAdOSM群で $3.5 \pm 0.3$ , AdLacZ群で $3.0 \pm 0.3$ , PBS群で $3.0 \pm 0.4$  ( $p=0.012$  vs AdLacZ,  $p=0.042$  vs PBS)と、AdOSM群で良好な結果が認められた。

#### 実験II：

1. 70%肝切除後の生存成績では術後4日目に屠殺するまでに生存したAdOSM群7例, PBS群6例, AdLacZ群5例を検討対象症例とした。肉眼的所見では、OSM投与群では他群と比較して肝表面は比較的平滑で肝の萎縮も軽度であった。体重はAdLacZ群が $230 \pm 6$ g, PBS群が $282 \pm 32$ gに対し、AdOSM群は $301 \pm 41$ gで ( $p=0.004$  vs AdLacZ) 残肝重量はAdLacZ群が $2.5 \pm 0.6$ g, PBS群が $4.6 \pm 1.5$ gに対しAdOSM群は $6.9 \pm 2.0$ gで、 ( $p=0.041$  vs PBS,  $p < 0.001$  vs AdLacZ) ともにAdOSM群で増加傾向が見られた。
2. 線維化に関しては、Image analysisによる線維化定量(%)では、AdOSM群で $21.3 \pm 4.6$ , AdLacZ群で $35.2 \pm 4.5$ , PBS群で $31.5 \pm 5.2$ とOSM群で線維化の改善が認められた ( $p=0.020$  vs AdLacZ)。

3. 血液生化学所見では総ビリルビン (mg/dL) がAdOSM群で $0.14 \pm 0.03$ , AdLacZ群で $0.17 \pm 0.07$ , PBS群で $0.38 \pm 0.14$  ( $p=0.020$  vs AdLacZ) で, AST (IU/L) がAdOSM群で $112 \pm 43$ , AdLacZ群で $240 \pm 30$ , PBS群で $185 \pm 57$  ( $p=0.023$  vs PBS,  $p<0.001$  vs AdLacZ), ALT (IU/L) がAdOSM群で $39 \pm 25$ , AdLacZ群で $106 \pm 29$ , PBS群で $79 \pm 23$  ( $p=0.012$  vs PBS,  $p=0.002$  vs AdLacZ), さらに, ヒアルロン酸 (ng/mL) がAdOSM群で $215 \pm 141$ , AdLacZ群で $1963 \pm 1225$ , PBS群で $395 \pm 226$  ( $p=0.034$  vs AdLacZ) とAdOSM群で良好な結果が認められた。

### 結 論

1. OSM導入により, 現在まで報告のある急性肝障害に対する効果のみならず, 肝硬変モデルにおいても肝機能や背景肝の線維化の改善が認められることを明らかにした。
2. 肝硬変モデルに対する70%肝切除においても, OSM導入により肝機能, および背景肝の線維化の改善を初めて明らかにした。
3. OSMはHGFのような発癌のリスクが指摘されておらず, 肝硬変合併症例に対する肝切除後の肝不全を抑制する可能性も示唆され, 今後, 硬変肝の肝切除への臨床症例への応用が期待される。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成25年3月19日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

IL-6 family である Oncostatin M(OSM)が、肝細胞の増殖活性を促す作用を有していることに着目し、これを肝硬変の線維化改善・肝切除後の肝再生促進に応用できないかと考え、ラット肝硬変モデルを対象に OSM 遺伝子が搭載された adenovirus vector (AdOSM) を導入して、肝硬変における肝切除の適応拡大の可能性を検討した。

まず、ラット肝硬変モデル作成において、Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用し、DMN の腹腔内投与を4週間行い、肝硬変を作成した。

肝硬変ラットに対する OSM の線維化抑制効果を解析するために、AdOSM を門脈内投与し、PBS・LacZ 発現 adenovirus vector (AdLacZ) を対照群において、その効果を比較検討した。肉眼的所見では、AdOSM 群では他群と比較して肝の萎縮は軽度で、肝重量は維持された ( $p<0.05$ )。さらに線維化の程度を Image analysis を用いて定量化して比較検討した。その結果、AdOSM 群で有意な線維化の改善が得られていることを確認し ( $p<0.05$ )、血液検査所見においても線維化マーカーであるヒアルロン酸と、肝予備能を示すアルブミン値の改善を AdOSM 群に認めた ( $p<0.05$ )。

さらに、ラット肝硬変モデルに AdOSM を投与したのちに、70%肝切除を加えて、OSM の残肝再生促進効果を検討したところ、肉眼的所見では AdOSM 群は他群と比較して肝の萎縮は軽度であった。残肝重量も AdOSM 群で有意な増加を認めた ( $p<0.05$ )。Image analysis による線維化の比較では、OSM 群で有意な線維化の改善が認められた ( $p<0.05$ )。血液生化学所見では、術後総ビリルビンの上昇の有意な抑制、肝逸脱酵素である AST・ALT の上昇の有意な抑制を AdOSM 群に認め、OSM の肝臓保護作用を確認した ( $p<0.05$ )。さらに、ヒアルロン酸値の上昇も抑えられ、肝切除後においても線維化改善作用が確認された ( $p<0.05$ )。

これらの実験の結果から、AdOSM を肝硬変モデルや肝硬変肝切除モデルに投与することで、肝線維化の抑制と肝機能改善効果が期待され、将来的に肝切除適応拡大に寄与する可能性が示唆されたことから、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895号		
学位授与の日	平成25年4月9日		
氏名	早田啓治		
学位論文の題目	Inhibition of IL-17A in Tumor Microenvironment Augments Cytotoxicity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Tumor-Bearing Mice. (担癌マウスにおいて腫瘍微小環境の IL-17A 抑制は腫瘍浸潤リンパ球の細胞傷害活性を増強する。)		
論文審査委員	主査	教授 近藤 稔 和	
	副査	教授 村田 晋 一	教授 山上 裕 機

## 論文内容の要旨

【緒言】慢性炎症を惹起する炎症性サイトカイン IL-17A と腫瘍増殖との関連が報告されているが、IL-17A が腫瘍増殖促進に作用するのか、腫瘍増殖抑制に作用するのかは一定の見解を得られていない。本研究では腫瘍微小環境での IL-17A に着目し、IL-17KO マウスのように全身で IL-17A を抑制するのではなく、腫瘍局所でのみ IL-17A を抑制することで、腫瘍増殖を抑制できるか否かを検討した。

【方法】腫瘍局所の IL-17A を抑制するために IL-17A siRNA 遺伝子発現 Adenovirus vector (Ad-si-IL-17) を作製した。マウス皮下腫瘍モデル(MC38, B16 腫瘍細胞株)で、Ad-si-IL-17 を腫瘍内投与し、腫瘍局所の IL-17A を抑制し、腫瘍増殖抑制効果についてコントロール群と比較検討した。さらに腫瘍増殖抑制のメカニズムの解明のために、同マウス皮下腫瘍モデルを用いて腫瘍局所の IL-17A 抑制が血管新生と抗腫瘍免疫に及ぼす影響について検討した。新生血管の評価のために免疫組織化学染色法、ELISA 法によって腫瘍組織 CD31, MMP9, VEGF の発現を解析した。また抗腫瘍免疫の評価のために、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)と脾細胞を抽出した後、CD8 陽性細胞を分離し、<sup>51</sup>Cr 遊離試験を行い、細胞傷害活性について検討した。さらに抗腫瘍免疫の活性化にメカニズムとして Th1/2 バランス、免疫抑制性細胞(resulatory T cell(Treg), myeloid-derived suppressor cell(MDSC))について TIL と脾細胞を用いて Flow cytometry で解析した。

【結果】マウス皮下腫瘍モデル(MC38, B16 腫瘍細胞株)で、Ad-si-IL-17 を腫瘍内投与し、腫瘍局所の IL-17A を抑制することでコントロール群と比較し有意に腫瘍増殖を抑制することがわかった。腫瘍局所の IL-17A を抑制した腫瘍組織では CD31, MMP9, VEGF の発現を有意に抑制されていることが明らかとなった。また、腫瘍局所の IL-17A を抑制にすることで脾臓 CD8 陽性細胞の細胞傷害活性に変化を及ぼさないが、腫瘍浸潤 CD8 陽性細胞の細胞傷害活性は有意に増強することが明らかとなった。さらに腫瘍局所の IL-17A 抑制は脾細胞では Th1, Th2 細胞, Treg 細胞, MDSC ともに変化なかったが、TIL においては Th2 細胞の変化はないが Th1 細胞の有意な増加を認め、Treg 細胞、MDSC の有意に減少していることが明らかとなった。

【考察】腫瘍局所の IL-17A を抑制することで、新生血管の抑制、腫瘍微小環境での抗腫瘍免疫の活性化し、腫瘍増殖を抑制した。さらに、腫瘍局所の IL-17A の抑制は免疫抑制性細胞である MDSC, Treg 細胞を抑制し、また Th1 優位な環境とすることで、抗腫瘍免疫環境を改善し、腫瘍浸潤リンパ球の細胞傷害活性を増強したことが示唆された。腫瘍微小環境の IL-17A は腫瘍増殖促進に関与することが明らかとなり、腫瘍局所の IL-17A は腫瘍増殖抑制の新たな分子ターゲットとなり得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 3 月 18 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。

上記の内容は、腫瘍局所の IL-17A を抑制することで、新生血管の抑制、腫瘍微小環境での抗腫瘍免疫の活性化することが明らかになった。つまり腫瘍微小環境の IL-17A は腫瘍増殖促進に関与することを明らかとし、腫瘍局所の IL-17A は腫瘍増殖抑制の新たな分子標的となり得る可能性があり、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)乙第896号		
学位授与の日	平成25年5月14日		
氏名	井上 泉		
学位論文の題目	Elevated risk of colorectal adenoma with <i>Helicobacter pylori</i> -related chronic gastritis: a population-based case-control study (ヘリコバクターピロリ関連慢性胃炎による大腸腺腫リスク増強効果)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕 機	
	副査	教授 竹下 達也	教授 一瀬 雅夫

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

*Helicobacter pylori* (HP) 感染症は、胃癌をはじめとする上部消化管疾患の発生に関与すると共に、他の全身疾患の原因となることが明らかにされている。一方、近年 HP 感染による大腸腫瘍リスク増強についての報告が散見される。

HP 持続感染が惹起する HP 関連慢性胃炎が、本邦胃癌発生のメインルートである「萎縮性胃炎→腸上皮化生→胃癌発生」過程の主要な推進力であることは広く認識されている。筆者らも健常人男性コホートを対象とした長期観察研究を行い、HP 感染成立群で年率 0.1%、萎縮性胃炎群では年率 0.24% と HP 関連慢性胃炎で高率に胃癌発生を認めること、血清 HP 抗体価と Pepsinogen (PG) 値を指標に決定される HP 関連慢性胃炎の病期進展に伴い胃癌リスクが段階的に上昇することを以前に報告した。

胃癌患者で最も高率に認められる同時性・異時性癌は大腸癌であり、日本の 47 都道府県で和歌山県のように胃癌の年齢調整死亡率の高値 (51.1/100000 person-years) を有する地域は、大腸癌の年齢調整死亡率が高値 (38.4/100000 person-years) であるなど、胃癌発生と大腸癌発生との密接な関連が指摘されていることより、胃癌と大腸癌は、HP 関連慢性胃炎のような共通の危険因子を有する可能性が想定される。HP 関連慢性胃炎の病期進展に伴う胃酸分泌低下は、大腸粘膜の潜在的 trophic factor である高ガストリン血症や腸内細菌叢の変化を誘導し、大腸発癌に関係する可能性がある。

今回、HP 関連慢性胃炎と前癌病変である大腸腺腫の罹患リスク増強効果との関連について、population-based 症例対照研究により検証することを目的とした。

### 【対象と方法】

#### 1.対象

1996 年 4 月から 2004 年 3 月に和歌山市の某職域で定期健康診断を受診した中年男性 (平均年齢  $49.5 \pm 4.6$ ) のうち大腸内視鏡による大腸癌検診を受診した 1019 人を対象とした。胃切除・腎不全・大腸新生物・炎症性腸疾患の既往、注腸内視鏡陽性所見、proton pump inhibitor (PPI)、H2 拮抗薬、nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) 服用、HP 除菌後の者は除外した。大腸内視鏡検査結果に基づいて、腺腫が同定された 239 人 (腺腫群) と、年齢をマッチさせた (3 歳以内) 腫瘍のない 239 人 (対照群) をランダムに選択し、解析対象とした。大腸癌 (4 人) は少数のためスタディから除外した。

#### 2.方法

一般健診プログラムとして、問診・アンケート、身体検査、胸部 X 線検査、心電図、空腹時血液検査、尿検査、上部消化管バリウム検査を施行した。

HP 感染と慢性萎縮性胃炎 (chronic atrophic gastritis: CAG) は、血清 HP IgG 抗体価と血清 PG 値に基づき診断した。血清 HP IgG 抗体価は ELISA (MBL, Nagoya, Japan) 法を用い測定し、 $>50\text{U/ml}$  を HP 感染陽性とした (感度・特異度: 93.5%・92.5%)。血清 PG 値は RIA-Bead Kits (Dainabbot, Tokyo, Japan) を用い測定し、CAG は PG 法陽性の基準値 ( $\text{PG I} \leq 70$  かつ  $\text{PG I/II} \leq 3.0$ ) に基づき診断した (感度・特異度: 70.5%・97%)。さらに、血清 HP 抗体価と PG 値を指標に、HP 関連慢性胃炎の

病期を、A群 (HP感染のない健常胃): HP(-) CAG(-)、B群 (HP関連非萎縮性胃炎): HP(+) CAG(-)、C群 (HP関連萎縮性胃炎): CAG(+) の3群に分類した。

適切な前処置で全大腸内視鏡検査を施行した。腫瘍は存在部位により近位 (盲腸、上行結腸、肝彎曲、横行結腸)、遠位 (脾彎曲、下行結腸、S状結腸、直腸)、両側 (両側に位置する) に分類され、生検組織の病理学的診断が施行された。

データはSPSSとSTATAを用い解析した。統計学的有意差は、2群間比較はt検定、多群間比較は分散分析(ANOVA)、分類変数の比較は $\chi^2$ 検定を用いた。odds ratio(OR)と95% confidence interval(CI)はロジスティック回帰分析によりえられた。両側検定で $p<0.05$ を統計学的有意とした。

## 【結果】

### 1.対象の背景因子

喫煙率とtotal cholesterol(TC)は、腺腫群でより高値であった( $p<0.1$ )。胃炎の活動度と関連するPGⅡ値は腺腫群で有意に高く、萎縮の程度を反映するPGⅠ/Ⅱは腺腫群で有意に低かった。腺腫の臨床病理学的特徴(大きさ、個数、異型度、組織病理)による明らかな有意差はなかった。

### 2.HP感染、CAGと大腸腺腫罹患リスクとの関連

HP感染は、腺腫罹患リスクを有意に増大させた(crude OR: 2.26; 95%CI: 1.44-3.55)。PG法陽性の基準値に基づいて決定されるCAGは、腺腫罹患リスクを有意に増大させなかった。但し、近位腺腫では、CAGにより腺腫罹患リスクが有意に増大した。

### 3.HP関連慢性胃炎の病期と大腸腺腫罹患リスクとの関連

HP関連慢性胃炎は、腺腫罹患リスクを有意に増大させた(B群: crude OR; 2.61, 95%CI: 1.54-4.41)(C群: crude OR: 2.30, 95%CI: 1.38-3.83)。B・C群間に有意差はなく、HP関連慢性胃炎の進展に伴う腺腫罹患リスクの増大はなかった。但し、近位腺腫では、HP関連慢性胃炎の進展に伴い腺腫罹患リスクが段階的に増大した。

### 4. HP関連慢性胃炎の病期と大腸腺腫罹患リスクとの関連：広範囲に進展したCAG診断基準(PGⅠ $\leq$ 30かつPGⅠ/Ⅱ $\leq$ 2.0)を用いた場合

腫瘍部位にかかわらず、HP関連慢性胃炎の進展に伴い腺腫罹患リスクが段階的に増大した。

## 【結語】

1、HP感染、HP関連慢性胃炎は大腸腺腫の罹患リスク増強に有意に関連した。

2、大腸近位部では、HP関連慢性胃炎の病期進展に伴い大腸腺腫の罹患リスクが有意に増強した。

3、高度に胃酸分泌が低下した広範囲進展CAG診断基準を用いた場合、腫瘍部位にかかわらず、HP関連慢性胃炎の病期進展に伴い大腸腺腫の罹患リスクが有意に増強した。

4、血清学的マーカーにより決定されるHP関連慢性胃炎の病期は、大腸腺腫の罹患リスク評価に有用であると考えられた。

論文はInternational Journal of Cancer 2011;129:2704-11に掲載された。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成25年4月2日、審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。

*Helicobacter pylori* (HP) 感染症は、胃癌をはじめとする上部消化管疾患の発生に関与すると共に、他の全身疾患の原因となることが明らかにされている。一方、近年HP感染による大腸腫瘍リスク増強についての報告が散見される。

*HP* 持続感染が惹起する *HP* 関連慢性胃炎が、本邦胃癌発生のメインルートである「萎縮性胃炎→腸上皮化生→胃癌発生」過程の主要な推進力であることは広く認識されている。筆者らも健常人男性コホートを対象とした長期観察研究を行い、*HP* 感染成立群で年率 0.1%、萎縮性胃炎群では年率 0.24%と *HP* 関連慢性胃炎で高率に胃癌発生を認めること、血清 *HP* 抗体価と Pepsinogen (PG) 値を指標に決定される *HP* 関連慢性胃炎の病期進展に伴い胃癌リスクが段階的に上昇することを以前に報告した。

胃癌患者で最も高率に認められる同時性・異時性癌は大腸癌であり、日本の 47 都道府県で和歌山県のように胃癌の年齢調整死亡率の高値を有する地域は、大腸癌の年齢調整死亡率が高値であるなど、胃癌と大腸癌との密接な関連が指摘されていることより、胃癌と大腸癌は、*HP* 関連慢性胃炎のような共通の危険因子を有する可能性が想定される。*HP* 関連慢性胃炎の病期進展に伴う胃酸分泌低下は、大腸粘膜の潜在的 trophic factor である高ガストリン血症や腸内細菌叢の変化を誘導し、大腸発癌に関係する可能性がある。

本研究では、*HP* 関連慢性胃炎と前癌病変である大腸腺腫の罹患リスク増強効果との関連について、population-based 症例対照研究により検証することを目的とした。

その結果、

- (1) *HP* 感染、*HP* 関連慢性胃炎は大腸腺腫の罹患リスク増強に有意に関連した。
- (2) 大腸近位部では、*HP* 関連慢性胃炎の病期進展に伴い大腸腺腫の罹患リスクが有意に増強した。
- (3) 高度に胃酸分泌が低下した広範囲進展慢性萎縮性胃炎診断基準を用いた場合、腫瘍部位にかかわらず、*HP* 関連慢性胃炎の病期進展に伴い大腸腺腫の罹患リスクが有意に増強した。

以上より本論文は、*HP* 関連慢性胃炎が大腸腺腫の罹患リスク増強に重要な役割をはたしている可能性を示すと共に、*HP* 関連慢性胃炎の病期が、大腸腺腫の罹患リスクを反映する可能性があるという新しい知見を提供するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第897号		
学位授与の日	平成25年5月14日		
氏名	森 畠 康 策		
学位論文の題目	Assessment of malignant potential of small hypervascular hepatocellular carcinoma using B-mode ultrasonography. (超音波 B モードを用いた多血性小肝細胞癌の悪性度診断に関する研究)		
論文審査委員	主 査	教授 村 垣 泰 光	
	副 査	教授 山 上 裕 機	教授 一 瀬 雅 夫

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【緒言】

肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma ; HCC) は、慢性肝炎、肝硬変を背景とした発癌リスクの高い肝臓から発生する。たとえ根治的に切除が行えても、5年以内に約80%が再発し、さらに切除を行っても繰り返し再発するため、繰り返し行える根治性の高い局所療法の開発が求められてきた。経皮的ラジオ波焼灼療法 (Radiofrequency ablation ; RFA) は、切除リスクの高い小肝癌に対する根治的治療として確立され、従来のアルコール注入療法と比較して、根治性に優れ、予後も良好であり、現在の局所療法の主流となっている。しかしながら、RFA後の脈管浸潤再発や播種、転移の危険性が報告されており、特に組織学的低分化型肝癌は播種のリスクが高く、予後不良である。

肝細胞癌の発癌様式は多段階であり、経時的に腫瘍径が大きくなるほど脱分化し、生物学的悪性度が高くなる傾向がある。低分化型肝癌は、単に増殖速度が速いだけでなく、浸潤傾向が強く、高い転移能を有する。3cm、3個以内、5cm以下単発肝細胞癌の肝切除245例中33%に脈管浸潤があり、低分化型の50%に脈管浸潤が認められたと報告されており (J Gastrointest Surg. 2002;6:224-32), RFAの適応内であってもすでに脈管に浸潤し、転移を来している可能性のある肝癌は決して少なくない。それ故、3cm以内の小肝癌であっても治療前に悪性度を評価し、最適な治療方針を決定することが重要である。治療前に腫瘍生検を行えば分化度診断は可能であるが、侵襲的である上、生検による播種の危険もあり、画像による悪性度診断法を確立すべきである。

本研究では、超音波 B モード画像を用いた多血性小肝細胞癌の悪性度評価法を確立するため、小肝細胞癌における超音波 B モード画像分類を作成し、悪性度の指標である組織学的分化度および AFP-L3 分画との関係について検討した。また、この分類を用いて肝細胞癌の RFA 後の再発・予後予測ができるかどうか検討した。

### 【対象と方法】

#### 1. 超音波 B モード分類と悪性度の関係についての検討

##### 1) 対象病変

2001年3月から2006年4月の間、当科にて超音波検査で腫瘍が描出され、組織学的に確定診断した3cm以下の動脈多血性肝細胞癌113例113結節を対象とした。多発例では最大腫瘍を解析の対象とした。

##### 2) 超音波装置

Siemens 社製 SONOLINE Elegra™ Ultrasound Platform または東芝社製 SSA-770A ultrasound system を用い、Bモードは Tissue Harmonic Imaging を用いた。

##### 3) 組織評価

組織学的分化度診断には、針生検または切除標本から得られた組織を用い、針生検110結節、手術標本3結節であった。組織評価は原発性肝癌取扱い規約に準じ、高分化型、中分化型、低分化型の3つに分類した。

##### 4) 超音波分類

超音波 B モード像におけるハローの有無、内部エコーレベル、辺縁の性状により以下のように超音波 B モード分類を作成した。ハローを伴う結節を1型とし、ハローを伴わない結節を2型とした。さ

らに 2 型を内部エコーレベルと辺縁の性状により分類し、均一な高エコー結節を 2a 型、低エコーで辺縁が整な結節を 2b 型、低エコーで辺縁が不整で境界不明瞭な結節を 2c 型に分類した。超音波 B モード像分類と組織学的分化度と、AFP-L3 分画との関係について検討した。尚、AFP-L3 分画のカットオフ値は 15%に設定した。

## 2. 超音波 B モード分類と RFA 後の再発・予後の関係についての検討

2001 年 3 月から 2006 年 3 月まで当内科で RFA 単独で治療を行った初発、3cm、3 個以内、Child A または B の多血性肝細胞癌 97 例を対象とした。超音波 B モード分類別では 1 型 (29 例)、2a 型 (9 例)、2b 型 (43 例)、2c 型 (16 例) であり、2a 型は症例数が少ないため解析の対象外とした。超音波 B モード分類別に RFA 後の再発率及び生存率を比較し、再発・予後に寄与する因子 (年齢、性、腫瘍数、腫瘍径、Child-Pugh 分類、進行度 (Stage)、背景肝の活動度、線維化の程度、AFP、AFP-L3、PIVKA-II) について検討した。

### 【結果】

#### 1. 超音波 B モード分類と腫瘍径の関係

113 結節中、高分化型、中分化型、低分化型はそれぞれ、47 結節、57 結節、9 結節であり、平均腫瘍径はそれぞれ、 $18.4 \pm 5.8$ 、 $22.0 \pm 6.5$ 、 $21.7 \pm 5.5$  mm であった。中分化型と高分化型の間に有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。超音波 B モード画像より 1 型 27 結節、2a 型 9 結節、2b 型 35 結節、2c 型 42 結節に分類された。それぞれの平均腫瘍径は  $22.4 \pm 6.6$ 、 $14.4 \pm 4.6$ 、 $18.3 \pm 5.4$ 、 $22.3 \pm 5.9$  mm であり、2a 型と 1 型、2a 型と 2c 型、2b 型と 1 型、2b 型と 2c 型の間に有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

#### 2. 超音波 B モード分類と組織学的分化度および AFP-L3 分画の関係

超音波 B モード分類別の低分化型の頻度は 1 型、2a 型、2b 型、2c 型で、それぞれ 0%、0%、3%、19% であり、1 型、2a 型には低分化型が含まれず、2c 型が有意に低分化型が多く含まれた ( $p < 0.01$ )。1 型の 67% は中分化型であり、残りの 33% で高分化型であった。2a 型は全て高分化型肝癌であった。2b 型は 1 型同様ほとんどが高または中分化型であった。低分化型の 9 結節中 8 結節が 2c 型を呈した。2c 型の低分化型肝癌の診断感度 89%、特異度 67% であった。また、エコー型分類別 AFP-L3 分画陽性率は、1 型、2a 型、2b 型、2c 型で、それぞれ 4%、11%、9%、55% であり、2c 型の AFP-L3 陽性率が有意に高かった ( $p < 0.01$ )。

#### 3. 超音波 B モード分類と RFA 後の再発・予後の関係

B モード分類別背景因子の比較では、腫瘍径、腫瘍数、進行度、背景肝の活動度に有意差がみられ、2b 型に比べ、1 型、2c 型のほうが進行した症例が多かった。

2 年以内の早期再発率は 1 型 42%、2b 型 26%、2c 型 69% と 2c 型が最も高く、2b 型と 2c 型および 1 型と 2c 型の間に有意差が認められた。5 年生存率は、1 型 43%、2b 型 89%、2c 型 65% と 2b 型が最も高く、2b 型と 1 型および 2b 型と 2c 型の間に有意差が認められた。再発に寄与する因子の単変量解析では、腫瘍の数、進行度、AFP-L3、エコー型に有意差がみられたが、多変量解析ではエコー型のみ独立した因子であった。予後に寄与する因子の単変量解析では、進行度、エコー型に有意差がみられたが、多変量解析ではエコー型のみ独立した因子であった。

### 【結語】

小肝細胞癌の超音波 B モード画像分類と組織学的分化度との関係、および RFA 後の再発・予後との関係を検討した結果、以下の結論が得られた。

1. 多血性小肝癌における超音波 B モード分類と、腫瘍径、組織学的分化度、AFP-L3 分画の間には有意な関係があり、超音波 B モード画像を用いた悪性度診断が可能であると考えられた。
2. 2a 型の平均腫瘍径は最も小さく、すべて高分化型であったため、最も悪性度が低いと考えられた。
3. 2c 型は他の画像型よりも有意に分化度が低く、AFP-L3 分画が高い傾向があり、最も悪性度が高いと考えられた。
4. 超音波 B モード画像型は RFA 後の再発、生存に関係する独立因子であった。
5. 2b 型は、1 型や 2c 型に比べ再発率が低く、予後良好であり、悪性度が低いと考えられた。
6. たとえ小肝癌であっても 2c 型および 1 型の肝細胞癌は悪性度が高く、RFA の適応は慎重に考える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 4 月 30 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文の審査を行った。

肝細胞癌（Hepatocellular carcinoma ; HCC）は、慢性肝炎、肝硬変を背景とした発癌リスクの高い肝臓から発生し、たとえ根治的に切除が行えたとしても、残肝に繰り返し再発する。経皮的ラジオ波焼灼療法（Radiofrequency ablation ; RFA）は、小肝癌に対する根治的治療として確立され、現在のガイドライン上、局所療法の主流となっている。しかしながら、RFA 後の問題としては、脈管浸潤再発や播種、転移の危険性が報告されており、特に組織学的低分化型肝癌は播種のリスクが高く、予後不良となる。そのため、治療前の悪性度評価が必要とされる。

本研究では、多血性小肝細胞癌の悪性度評価法を確立するため、小肝細胞癌における超音波 B モード画像分類を作成した。ハローを伴う結節を 1 型とし、ハローを伴わない結節を 2 型とした。さらに 2 型を内部エコーレベルと辺縁の性状により分類し、均一な高エコー結節を 2a 型、低エコーで辺縁が整な結節を 2b 型、低エコーで辺縁が不整で境界不明瞭な結節を 2c 型に分類した。この分類と悪性度の指標である組織学的分化度および AFP-L3 分画との相関関係を検討した。また、小肝細胞癌に対する RFA 後の再発・予後との関連性についても検討を行った。

その検討の結果、

（1）多血性小肝癌における超音波 B モード分類と、腫瘍径、組織学的分化度、AFP-L3 分画の間には有意な関係があり、超音波 B モード画像分類では、2a 型が最も悪性度が低く、2c 型が最も悪性度が高いと考えられた。

（2）2b 型は、1 型や 2c 型に比べ再発率が低く、予後良好であり、2c 型および 1 型の肝細胞癌は悪性度が高く、これらの肝癌は、たとえ小肝癌であっても RFA の適応は慎重にすべきであると考えられた。

（3）超音波 B モード画像型は RFA 後の再発、生存に関係する独立因子であった。

以上より、本研究で、多血性小肝癌における超音波 B モード画像を用いた悪性度診断の有用性を示し、今後の肝細胞癌の最適な治療方針を決定することに寄与する研究であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第898号		
学位授与の日	平成25年8月6日		
氏名	畑田充俊		
学位論文の題目	<b>Comparison of the waveforms of transit-time flowmetry and  intraoperative fluorescence imaging for assessing coronary artery  bypass graft patency.</b> (冠動脈バイパスグラフト開存におけるトランジットタイムフローメ ーター血流波形分析と術中蛍光造影検査の比較)		
論文審査委員	主査	教授 前田正信	
	副査	教授 赤阪隆史	教授 岡村吉隆

## 論文内容の要旨

### 緒言

冠動脈バイパス術(coronary artery bypass grafting: CABG)におけるグラフトの開存は、患者の予後やQOLに大きく影響を与える。そのためにグラフト不全、つまりグラフトの開存か閉塞を予知することは重要である。グラフト開存を術中に評価することができれば、CABGの治療成績向上に寄与できる以上に患者の予後を改善する可能性がある。

今まで、トランジットタイムフローメーター (transit-time flowmeter: TTF)、電磁波によるグラフト血流測定、超音波によるグラフト血流測定、術中グラフト造影検査を使用した評価が行われてきた。この中で TTF が簡便で有用であると報告されてきた。また最近、術中蛍光造影検査 (intraoperative fluorescence imaging system: IFI system) が有用と言う報告がある。しかし、どの方法もグラフト開存予測を十分には出来ていない。

我々は TTF で測定した血流波形を高速フーリエ変換 (fast Fourier transformation: FFT) で解析し、算出した指標がグラフト開存予測に有効であると以前より報告してきた。

そこで、我々の方法と IFI system のどちらがグラフト開存予測に有効か調べた。

### 対象

6例の単独 CABG 患者を対象とした。使用したグラフトは、内胸動脈グラフト (internal thoracic artery: ITA) が8本、大伏在静脈グラフト (saphenous vein graft: SVG) が10本であった。

### 方法

#### 1. 血流波形分析

CABG 手術ですべての血管吻合が終了し、人工心肺装置から離脱した後の血行状態が安定した時に、TTF で血流波形を測定した。測定後に TTF で一般的にグラフト評価法として使用されている平均血流量 (mean graft flow: MGF) と pulsatility index (PI) を算出した。

測定した血流波形を FFT で解析し、ハーモニックを算出した。第5から第11ハーモニックの和を Ha とした。

#### 2. IFI system

TTF での測定と同時期に IFI system の撮影を行なった。インドシアニングリーンを中心静脈ラインより注入して、1吻合部分に対して数分ずつの撮影を行なった。

#### 3. 術後評価

すべての症例は退院後1-2ヶ月で冠動脈造影検査にてグラフトの評価を行なった。

### 結果

IFI system では、すべてのグラフトの開存を認めた。

術後冠動脈造影検査で、1本の SVG に75%の吻合部狭窄を認めた。

吻合部狭窄の SVG では、他の SVG に比して Ha が有意に高値を示した。MGF と PI に関しては、吻合部狭窄の SVG と他の SVG で優位さを認めなかった。

### 考察

IFI system では術後グラフト不全を予測することが出来なかったが、我々の方法では予測することが出来た。

IFI system は簡便で、視覚的に判り易い反面、心臓の裏側や深部の血管は見えないと言った欠点がある。このために今回の症例では吻合部狭窄がわからなかった可能性があった。

TTF は簡便で、客観性があるが、グラフト不全の原因がわからないと言った欠点がある。我々の方法は、TTF のみや IFI system では予測できないグラフト不全を予測することが出来た。

### 結論

TTF の波形分析を使用した我々の方法と IFI system のどちらがグラフト開存予測に有効か調べた。IFI system では術後グラフト不全を予測することが出来なかったが、我々の方法では予測することが出来た。

FFT を用いたグラフト血流波形分析は、グラフト開存の予測に有用となる可能性が示された。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 25 年 7 月 12 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

本論文は、冠動脈バイパス術(coronary artery bypass grafting: CABG)におけるグラフトの開存を術中に予測できるかを検討したものである。

CABG におけるグラフト開存は、手術成績を向上させるだけでなく患者の予後や QOL に大きく影響を与える。そのためにグラフト開存を予測することは重要である。CABG での術中グラフト評価法としてトランジットタイムフローメーター (transit-time flowmeter: TTF) から算出される平均血流量 (mean graft flow : MGF) と pulsatility index (PI) がガイドラインで奨励されている。しかし、MGF や PI が良好であっても術後にグラフト不全に陥っている場合もあり、すべてのグラフトで十分に評価出来ているとは言えない。また最近では、術中蛍光造影検査 (intraoperative fluorescence imaging system: IFI system) が有用と言う報告があり、術中グラフト評価法はいまだ確固たるものがない。

申請者は術中グラフト血流波形を高速フーリエ変換 (fast Fourier transformation : FFT) で解析し、算出した指標がグラフト開存予測に有効である可能性を報告してきた。TTF で測定されたグラフト血流波形を FFT で解析し、フーリエスペクトルとハーモニックを算出した。血流波形の高周波成分である第 5 から第 11 ハーモニックの和を Ha とした。この Ha が術中グラフト評価法として有効であり、術後グラフト不全を予測できる可能性がある。

今回、申請者は開存グラフトと狭窄グラフトの血流波形を FFT で解析し、比較検討した。さらに、IFI system と申請者の方法のどちらがグラフト開存予測に有効かを検討した。

内胸動脈グラフト、大伏在静脈グラフトでの開存グラフトと狭窄グラフトの間に、MGF と PI は有意差を認めなかった。Ha では、狭窄グラフトの方が有意に高値であった。また、IFI system ではすべてのグラフトの開存を認め、術後グラフト不全を予測できなかった。

これまでの研究では、MGF、PIやIFI systemでは術後グラフト不全を予測することが出来なかったが、申請者の提唱する方法Haでは予測することが可能であった。FFTを用いたグラフト血流波形分析は、グラフト開存の予測に有用となる可能性が示され、新たなグラフト開存予測指標を作成できる可能性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)乙第899号		
学位授与の日	平成25年8月6日		
氏名	戸村多郎		
学位論文の題目	Validity of a Diagnostic Scale for Acupuncture: Application of the Item Response Theory to the Five Viscera Score (鍼治療のための診断尺度の妥当性: 五臓スコアへの項目反応理論の適用)		
論文審査委員	主査	教授	竹下達也
	副査	教授	篠崎和弘
		教授	宮下和久

## 論文内容の要旨

### 【背景】

中国医学 (Traditional Chinese Medicine: TCM) の起源は、紀元前2世紀ごろに書かれた『黄帝内経』である。この本では、すべての構成の基礎である「陰」と「陽」から5つの要素 (例: 肝、心、脾、肺、腎 [解剖学的臓器とは異なる]) が生じると説明した。この五臓から生成される「気」や「血」が、経絡を通して体表にある経穴 (ツボ) を結び流れる。病気は、気・血の滞りによるものとされ、その診察方法が記されている。日本の鍼治療も中国の古典文献の理論に基づくアプローチで、気・血を生成する五臓のどこに原因があるのか診断がきわめて重要である。

鍼治療では、一人の患者や同じ疾患の患者に対し、術者の間で診断や方法が異なることがしばしばある。科学者たちは、鍼治療の有効性を検討するため、特定の疾患を対象にした介入研究を実施しているが、前述の理由で介入の方法が均質でないため結果が影響を受けている可能性がある。この原因の1つに、TCMにはエビデンスに基づく診断方法が少ないことが挙げられる。一方、画一的な診断方法はTCMの有益性を排除するかもしれないが、研究が進むことで鍼治療の一般化が期待できる。

これまで我々は、東洋医学的五臓の診断尺度「五臓スコア (The Five Viscera Score: FVS)」を開発してきた。FVSの作成は一般的な尺度と同様、調査対象となった母集団から収集した情報を探索的に因子分析し、クロンバックの $\alpha$ 係数など古典的テスト理論 (Classical Test Theory: CTT) に基づいて一般化している。しかし、CTTでは精度の高い尺度を作るほど、尺度を作成した際の集団の能力に影響を受け、他の集団では使用できない可能性を内包している。そのため近年では、尺度への集団の影響を除外して、「尺度項目の特性」および「個人の症状の特性」を能力特性値 ( $\theta$ ) として個別に推定し、評価できる項目反応理論 (Item Response Theory: IRT) が用いられるようになってきた。これまでTCMの診断方法がいくつか検討されているが、IRTを適用した研究は現時点では極めて少ない。

そこで本研究では、まずFVSにIRTモデルを適用し (Phase1)、尺度項目および個人ごとの特性を評価することで尺度としての妥当性を検討する。さらに、FVSが患者の健康に関連した診断ができるのか、外的基準として鍼治療の評価に適した健康関連 QOL 尺度 (Medical Outcome Study Short-Form 36-Item Health Survey version 2: SF-36) を使用し評価した (Phase2)。

### 【方法】

#### 1. 対象者と研究手続き

Phase1の対象は、日本の大阪市にある医療系専門学校の生徒739名、および学校スタッフ42名の合計781名 (男性560名、女性221名) である。無記名の質問紙を配布し、調査の依頼をおこなった。調査の実施は2010年5月下旬で、回収期間を2週間とした。

Phase2は、Phase1と同じ方法で2011年5月下旬、同じ専門学校の生徒291名および学校スタッフ30名の合計321名 (男性208名、女性113名) に実施した。このうち193名は前年のPhase1にも参加していた。

全ての対象者には、調査の目的について文章と口頭で説明を実施し、賛同した者のみ質問紙を回収箱に投函させた。

## 2. 質問紙

五臓スコア (FVS) は、過去1ヵ月間の体調について20の質問項目に答える自己記入式の質問紙である。その作成は、質問項目が偏らないように日本と中国の古典から近代までの過去2000年間に記されたTCM文献から、773の五臓症状を抽出している。続いて、重複や内容の不明確なものを除き、111項目のアンケート調査を実施した。アンケートの結果、CTTによる検討で残った28項目に5因子で探索的因子分析をおこない、20項目で最適解を得ている。尺度の質問項目は5件法で、選択肢は「全然ない(0点)」「まれに(1点)」「ときどき(2点)」「ほとんどいつも(3点)」「いつも(4点)」である。下位尺度得点は項目合計得点(0点から16点)で、値が高いほど症状が強い状態を表す。

SF-36は、主観的な健康度と日常生活機能を評価する健康関連QOL尺度で、代替医療における質的評価でも世界で頻繁に用いられている。SF-36は、過去1ヵ月間の身体的および精神的な健康状態に関して36の質問項目に答える自己記入式質問紙で、その日本語版は十分な信頼性と妥当性が確認され標準化されている。SF-36は、8つの下位尺度「身体機能(PF)、日常役割機能(身体)(RP)、体の痛み(BP)、全体的健康感(GH)、活力(VT)、社会生活機能(SF)、日常役割機能(精神)(RE)、心の健康(MH)」で構成される。下位尺度得点は50点を中心に高いほど健康な状態を表す。

## 3. 統計解析

Phase 1: FVSにIRTモデルが適用できるのか以下の項目で検討した。

「項目識別力(a)」: 項目の臨床尺度としての能力の程度を表し、値が大きいほど症状の有無が弁別できる。本研究では0.35を受容できる識別力の下限とし、1.0以上を良好とした。あわせて識別力の推定時に出力される標準誤差(SE)が0.3未満を良好とした。

「項目困難度(b)」: 質問項目の選択肢ごとに推定した「答えにくさ」を $\theta$ で表す。FVSは5件法のため、選択肢の境界を示す困難度はb1からb4の4段階である。困難度は同時に回答者の特性「症状の強さ」を示す。よって困難度と症状の強さは同軸上にあり、値が大きいほど症状がある者には答えやすい項目であることを意味する。困難度が-4.0を超え4.0未満にあるもの、そして推定時に出力される標準誤差(SE)が0.3未満のものを良好とした。

「テスト情報曲線(Test information curve: TIC)」: 尺度および個人固有の性質として $\theta$ ごとの測定精度をグラフで示したもので、CTTにおける信頼性係数に相当する。縦軸がテスト情報量、横軸が $\theta$ でFVSが適用できる対象者の範囲を示す。本研究では、 $\theta$ が0の位置は一般的な健常者である。

「個人の $\theta$ と生の尺度得点との相関」: FVSは、下位尺度ごとに項目得点の合計で評価する。しかし、同じ生の下位尺度得点をもつ被検者が、推定された $\theta$ では異なる反応をする可能性がある。ここでは、FVSの生の下位尺度得点の妥当性を $\theta$ との相関で検討することにより確認した。

Phase 2: FVSを健康に関係する診断に用いることができるのか、さらに、有症者と健常者とを弁別できるかをSF-36を外的基準尺度として検討した。

上記の統計処理において、IRTで各項目を良好と判定する基準は、一般に用いられている値を採用した。その他の有意水準は5%とした。

### 【結果】

Phase 1: 質問紙には727名(93.1%)の回答があり、欠損値があった89名、記入ミスがあった2名、有症者42名(質問項目「病気のため通院している」「病気のため服薬している」のいずれかにおいて、「いつも」「ほとんどいつも」に該当した者)、合計133名を除いた健常者594名(76.1%)で検討した。対象は、男性430名(72.4%)、女性164名(27.6%)であった。対象者の平均年齢は、男性27.5(SD 8.0)歳、女性26.0(SD 8.5)歳であった。

項目識別力は、下限の0.35を全て満たしていた。さらに、識別力が1.0を超えた項目が20項目中13項目あり(65.00%)、下位尺度それぞれに最低2項目以上含まれていた。

項目困難度の平均は、様々な値をとっていた。各下位尺度の中で最も平均困難度が高い質問項目が、Q4、Q7、Q12、Q16、Q19であった。中でもQ4(b4: 5.32)およびQ16(b3: 5.95, b4: 7.30)の困難度が特に高く、Q16のb4では標準誤差(SE)が、基準値である0.3を超えていた。

TIC は、IRT による下位尺度の測定情報量を表す。そこで隣り合う  $\theta$  ごとの情報量を比較し、その変化量が最も増加する点から、最も減少する点までの 2 点の間で特に測定情報量が高く、有効能力特性区間と命名した。肝は -0.50 から 1.60、心は -1.00 から 1.80、脾は -1.50 から 2.00、肺は -1.50 から 2.80、腎は -1.00 から 2.60 であった。全ての有効能力特性区間が、0 を含み正の方向に広がっていた。また、最大測定情報量は、肝が 10.28、心が 9.24、脾が 6.59、肺が 3.18、腎が 5.89 であった。

個人の  $\theta$  と生の尺度得点の相関係数が、男性で肝 0.77 から腎 0.95、女性で肝・心 0.92 から腎 0.97 を示し、強い関係があった。また、 $\theta$  と生の得点の両値とも女性が男性より有意に高い評価で症状が強かった。年代の比較では、 $\theta$  と生の得点との相関係数が、青少年の男性が肝 0.73 から腎 0.95、女性が肝・心 0.91 から腎 0.97、壮年以上の男性が心 0.82 から腎 0.96、女性が肺 0.92 から肝・心・腎 0.97 で、両年代とも強い関係があった。また、 $\theta$  と生の得点とも壮年以上で青少年と比べ有意な男女差は少なかったが、両年代とも女性が高値であった。

Phase 2: 質問紙には 302 名 (94.1%) の回答があり、欠損値のあった 26 名を除いた 274 名 (85.4%) で検討した。対象者は男性 175 名、女性 99 名で、平均年齢は男性 28.6 (SD 7.8) 歳、女性 28.5 (SD 8.6) 歳であった。274 名のうち、男性の 120 名、女性の 66 名が、Phase 1 にも参加していた。Phase 2 の検討には、Phase 1 の結果から FVS の生の下位尺度得点を採用した。

FVS の下位尺度の平均値は、Phase 1 と同様に女性が男性より全て高値で症状が強くなっていた。肝で男性の 6.38 (SD 3.64) に対し女性が 7.40 (3.44) の有意な差があり (P=0.022)、腎でも 6.07 (3.28) に対し 6.97 (3.31) (P=0.051) と同様に境界域の有意差があった。SF-36 の下位尺度の平均値は、女性が男性より全て健康関連 QOL が低値で健康度が低かった。RP では、男性の 47.30 (SD 11.65) に対し女性が 45.01 (12.25) (P=0.040)、BP では、49.25 (10.04) に対し 43.58 (10.60) (P<0.001)、SF では、48.83 (11.35) に対し 45.55 (13.13) (P=0.031)、RE では、47.95 (11.40) に対し 43.68 (13.08) (P=0.003) で有意差があった。VT では、男性の 44.03 (10.28) に対し女性が 41.38 (11.15) (P=0.065)、MH では、44.98 (10.60) に対し 41.95 (11.56) (P=0.054) と同様に境界域の有意差があった。

FVS が、健康に関連する診断尺度として使用できるのか、SF-36 との相関を妥当性係数として検討した。男女とも、FVS の全ての下位尺度が、SF-36 の下位尺度ひとつ以上との有意な相関があった。FVS の心、脾、腎が、SF-36 と多く関連がみられた。特に男性の「心」と「MH」、女性の「心」と「VT」および「MH」、「脾」と「VT」が、相関係数 0.60 を超え強い関連性がみられた。年代の比較では、壮年以上の女性の肺以外、青少年と壮年以上の男女とも、FVS の下位尺度が SF-36 の下位尺度ひとつ以上との有意な相関があった。

最後に「病気のため通院している」「病気のため投薬を受けている」のどちらかで、「いつも」「ほとんどいつも」に該当した者を治療群、それ以外を健康群として FVS と SF-36 を比較した。男女とも、FVS の全下位尺度が治療群で高く、SF-36 の全下位尺度が治療群で低くなっていた。また、両尺度とも女性で治療群と健康群の差が明瞭であった。また、各年代の両尺度とも同様の観察がされた。

#### 【考察】

本研究は、TCM の診断尺度である FVS に IRT を適用して、尺度項目の特性および個人の症状の特性を個別に評価した最初の研究である。

一般的に TCM は、「望診 (視診)」「聞診 (聴診と臭気)」「問診 (問診)」「切診 (触診)」の 4 つの方法で総合的に患者を診断するため、問診である FVS のみで診断することが可能かどうか判断できない。しかし、他の鍼研究が FVS を使用することで研究の再現性が高まれば、FVS が問診の標準となる可能性がある。FVS は、五臓の状態を診断に適用する全ての TCM および補完代替医療 (Complementary and Alternative Medicine: CAM) で使用することができる。さらに FVS は、これまで検討されてきた TCM 診断方法と組み合わせることで有益となる可能性がある。

FVS の質問項目には、1.0 を超える大きな識別力を持つ項目が、20 項目中 13 項目 (65.00%) あった。うつ病の診断で広く使用されている「Beck Depression Inventory (BDI)」に IRT を適用した先行研究では、識別力が 1.0 を超える項目が、21 項目中 9 項目 (42.86%) であったことを考えると、FVS

は比較的高い識別力をもっていた。これら 13 項目に症状の有無を判定するカットオフ値を設定する際のポイントがある。

さらに各下位尺度において、最も平均困難度が高い項目が被験者の回答で高値となった場合、その「臓」が重症であるとみなされる。なかでも肝の Q4、肺の Q16 に一部基準を超える困難度とばらつきが見られたが、他の項目と比べより強い症状を持つ者が答えやすい項目であった。また、FVS の質問項目が様々な困難度を示したことから、様々な症状が潜在する対象者を適切に評価できると考えられる。

FVS の測定精度を表す TIC では、全ての有効能力特性区間が 0 を含み正の方向に広く分布していた。したがって FVS は、健常者から有症者、そしてその間の病気の前段階にある者を測定できることが明らかになった。

次に FVS の得点に関して、 $\theta$  は CTT によって直接観測することができないため、生の下位尺度得点との間で反応が異なった場合、FVS を使用する度に  $\theta$  へ換算しなければならず、臨床応用への障害となるおそれがあった。しかし本研究の結果から両者の相関が高く、FVS は生の尺度得点をそのまま利用できることが証明された。

今回、FVS の外的基準妥当性を評価するために SF-36 を同じ対象者に使用した。結果、女性が少なく対象者に偏りがあったが、両尺度とも女性は男性に比べて主観的健康度が低いと感じている点について一致していた。一般的に、尺度の外的基準妥当性を検討する際、基準となる尺度と検証したい尺度で関連性が強すぎる場合は、新しい尺度の開発は不要である。FVS と SF-36 では、多くの項目が有意な相関を示したが、すべて強すぎる相関ではなかった。これらのことから、FVS は、性差も含め健康に関連する診断に用いることができると明らかになった。

FVS は、これまで TCM 治療者の主観に頼っていた診断に、客観性を持たせるための尺度である。TCM は、病気にならないために「未病」の治療を目的とし、予防を最高の治療と考える。「未病」とは、西洋医学における病気の前段階のことで、その訴えは日常遭遇する主観的な不定愁訴が主体である。FVS は、構成する項目のほとんどが不定愁訴である。西洋医学でも TCM でも、不定愁訴は病気の重要なサインであるから、TCM の五臓症状が、西洋医学の健康評価にも有効に活用できることを明らかにした本研究の結果は妥当と考える。Schiff ら (2011) の研究にあるように、西洋医学と CAM の連携は重要で、FVS は TCM 治療者の間だけではなく東西両医学の架け橋となり、相互に有益な情報をもたらすと期待できる。

本研究の限界として、対象者数が男女で大きく異なること、年齢による個人の症状の違いが検討できていないことが挙げられる。しかしながら、IRT による尺度項目の識別力と困難度は、個人の特性に影響を受けない。また、尺度の信頼性や妥当性の検討は、尺度を進化させ一般化させるために常に実施されなければならないが、肝の適用範囲の狭さや肺の測定精度の低さが、それぞれ肝の Q4、肺の Q16 に影響を受けている可能性がある。今後、これらの項目を入れ替える必要が生じた場合には、今回の結果が参考になる。

## 【結論】

FVS に IRT を適用し、潜在的な特性を評価することができた。FVS の全 20 項目には識別力があり、その内 13 項目には特に強い識別力が認められた。測定精度は、健常者から有症者までの範囲で実施することに適していた。また、推定した潜在特性と生下位尺度得点の間には高い相関が認められ、FVS の得点はそのまま臨床的に使用できることが明らかとなった。さらに、FVS と HR-QOL 尺度である SF-36 を同じ対象者に使用した結果、両尺度に関連性があり、有症者と健常者で比較しても同じ評価が得られた。以上のことから FVS は、TCM の臨床診断に有用であ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 7 月 16 日、審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

日本の鍼治療は、中国の古典文献の理論に基づくアプローチで、気や血などを生成する五臓のどこ

に原因があるのか、診断がきわめて重要とされている。しかし、一人の患者や同じ疾患の患者に対し、施術者の間で診断が異なることがあり、特定の疾患への介入研究でも診断が統一されず、その結果に影響を与えている可能性があり、大きな課題となっている。

本論文は、エビデンスに基づく東洋医学的診断尺度「五蔵スコア (The Five Viscera Score: FVS) 」開発の最終検討と位置づけている。検討に用いた項目反応理論 (Item Response Theory: IRT) は、FVS 開発時の対象集団の影響を除外して尺度項目の特性を個別に推定・評価でき、近年における診断尺度の開発で活用されている。しかし、東洋医学の診断に IRT を適用した研究は極めて少ない。さらに、FVS で健康に関連した診断ができるのか、外的基準妥当性を評価するために健康関連 QOL 尺度 (SF-36) を用いて検討し、臨床応用に向けての端緒を得たものである。

1. IRT の適用により FVS の全 20 項目には、症状の有無を識別する識別力があり、その内 13 項目 (65.0%) には 1.0 を超える強い識別力が認められた。先行研究のうつ病診断尺度「Beck Depression Inventory (BDI) 」では、強い識別力が 21 項目中 9 項目 (42.9%) であったことを考えると、FVS は比較的良好であった。

2. IRT の適用により FVS の項目は、一部基準を超える困難度 (質問への答えにくさ) とばらつきが見られたが、様々な困難度を示したことから、様々な症状が潜在する対象者を適切に評価できると考えられた。

3. IRT の適用により示された FVS の測定精度を表すテスト情報曲線では、五臓全ての有効能力特性区間が一般的な対象者を示す 0 を含み、正の方向に広く分布していた。したがって FVS は、健常者から有症者までの範囲で実施することに適していると考えられた。

4. FVS と SF-36 とを同じ対象者に使用した結果、両尺度とも女性は男性に比べて主観的健康度が低いと感じている点について一致していた。また、有症者と健常者と比較しても、男女とも同じ評価が得られた。FVS は、性差も含め健康に関連する診断に用いることができると示唆された。

以上、本論文は、エビデンスに基づく東洋医学的診断尺度「五蔵スコア」を評価するために、項目反応理論を適用して尺度項目の潜在的な特性を評価し、さらに、健康関連QOL尺度との関連性を示し、臨床的に用いることの可能性を示したものである。今後、鍼治療の有効性を検討するための介入研究に向けた調査・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)乙第900号		
学位授与の日	平成25年9月3日		
氏名	小門正英		
学位論文の題目	Increased fragility, impaired differentiation, and acceleration of migration of corneal epithelium of epiplakin-null mice (エピプラキンノックアウトマウスの角膜上皮での脆弱性、分化の低下、遊走の亢進)		
論文審査委員	主査	教授 山田 源	
	副査	教授 平井 秀一	教授 雑賀 司珠也

## 論文内容の要旨

### 緒言

角膜上皮は非角化性の重層扁平上皮で、4~5層で構成される。角膜上皮の機能は体表面組織としてのバリア機能と視力のための透明性と平滑性の維持である。角膜の透明性の維持は臨床的に非常に重要であるが、角膜上皮の障害が遷延化し、角膜実質部分に及ぶと感染等の原因が治癒しても角膜混濁が残ることとなる。角膜上皮障害の早期の治癒は角膜障害の保護と治癒の両方において重要な役割を果たすこととなる。

エピプラキン(Epiplakin, EPPK)とは、自己免疫性表皮下水疱症の自己抗原として同定された分子量55.2kDaのたんぱく質である。細胞骨格結合蛋白の中で中間径フィラメント結合蛋白の一種でプラキンファミリーに属し、BPAG1(水疱性類天疱瘡抗原)、プレクチンなど他のプラキンファミリー分子と同様に、そのプラキン繰り返しドメインはリンカーとともに、ケラチン、ビメンチンなどの中間径フィラメントと相互作用をしている。EPPKと中間径フィラメントはケラチン、ビメンチン、デスミンの順で相互作用が強い。皮膚、食道等の重層扁平上皮の他、胃、小腸、大腸、唾液腺等の単層上皮等に局在することが確認されている。またマウスにおいてEPPKの除去はケラチノサイトの遊走を加速させるとの報告がある。

本研究では、EPPK遺伝子欠損マウスを用いて、角膜の恒常性維持におけるEPPKの役割の検討を行った。

### 方法

#### 1. 正常マウス(WT)とEPPK遺伝子欠損マウス(EPPK KO)上皮の形態

WTにおけるEPPKの局在を確認し、成獣WTとEPPK KOの角膜をHE染色、透過型電子顕微鏡(電顕)、免疫組織化学(K14, 各種junctional protein, E-cadherin), real time RT-PCR法(各種junctional protein, E-cadherin)で差異を評価した。角膜上皮のDAPI染色で細胞核の形態を検討した。

生後1日、7日、14日の角膜についても同様にEPPK KOとWTでHE染色での形態の比較および、DAPIでの角膜上皮細胞核の形態を評価し、発生過程での角膜上皮の異常の有無を検討した。

#### 2. WTとEPPK KOでの角膜上皮の脆弱性

EPPK欠損での角膜上皮の脆弱性をWTおよびEPPK KOの角膜上皮をブラシで擦過し、直後に摘出した眼球の角膜上皮の状態を透過電顕で比較検討した。方法の詳細は既報に準じた。

#### 3. WTとEPPK KOとの角膜上皮創傷治癒

直径2mmのトレパンとメスで円形角膜上皮欠損を作製し、経時的(6, 12, 18, 24, 30時間後)に、残存上皮欠損部の面積を測定することによりWTとEPPK KOとの創傷治癒の速度の違いを比較した。この時

の上皮細胞の増殖を BrdU ラベルで欠損作成直後、12、24、36 時間後に比較した。ANOVA で統計処理を行った。

## 結果

### 1. 正常マウス (WT) と EPPK 遺伝子欠損マウス (EPPK KO) 上皮の形態

WT マウスの角膜上皮の基底細胞に EPPK の発現を確認した (表皮では表層細胞に発現すると報告されている)。透過電顕と光学顕微鏡 HE 染色で基底細胞様細胞の重層化を示す所見が観察された。免疫組織化学で KO マウスでの重層化した基底細胞様細胞が K14 陽性であることが確認できた。DAPI での角膜上皮の基底細胞より上の縦/横比率での比較では、KO マウスは WT マウスより低かった。生後 1 日、7 日、14 日の角膜については縦/横比率に差異がなかった。

透過電顕では、KO 角膜上皮の上層の細胞でデスモゾームと付着するケラチン線維の減少を認めた。ヘミデスモゾーム構造は WT マウスと KO マウスで差異がなかった。

免疫組織化学で角膜上皮での E-cadherin 染色性は染色が减弱していたが、Desmocollin1、Desmocollin3、Desmoglein1&2、Desmoplakin1、Desmoplakin1&2、Plakoglobin、Occludin、Keratin10、keratin12 の染色性に WT マウスと KO マウスで差異はなかった。この変化は mRNA レベルでの発現の変化であることを real-time RT-PCR で確認した。

### 2. WT と EPPK KO での角膜上皮の脆弱性

角膜上皮をブラシで擦過して、上皮の脆弱性を透過電顕で検討した。WT マウスでは角膜上皮の障害が、角膜上皮のごく表層に留まるのに対して、KO マウスでは角膜上皮のより深い層まで脱落し、翼細胞が露出していた。脱落した細胞のデスモゾームと細胞膜の一部が残存細胞側に残っていた。

### 3. WT と EPPK KO との角膜上皮創傷治癒

角膜上皮剥離作成後 48 時間までの経時的な観察の中で、上皮修復は KO マウスで促進されているようで、18 時間後で有意差が検出された。この経過中、KO マウスで BrDU 陽性細胞数が減少していた (24 時間後で有意差が得られた)。細胞増殖が抑制されているにもかかわらず、上皮治癒が促進していたことから、細胞遊走が EPPK 欠損で促進されたと考えた。

## 考察

マウスで EPPK の欠損により、(1) 基底細胞様の角膜上皮細胞の重層化、(2) DAPI での角膜上皮細胞での縦横の長さの縦/横比率で KO 上皮では WT 上皮の細胞より低かった、(3) 免疫組織化学にて KO マウスで K14 の重層化を認めたことから、角膜上皮細胞の基底細胞様細胞が重層化していることが確認できた。

また、角膜上皮の外力に対する構造維持が障害されていた。同様の障害はこれまで角膜上皮特異的なケラチンであるケラチン 12 のノックアウトマウスや、ヒトの遺伝性疾患であるケラチン 12 遺伝子変異 (Meesmann 角膜ジストロフィー) でも観察されていることから、EPPK 欠損によるケラチン細胞骨格の構造異常が関係している可能性が考えられた。透過電顕でも KO マウスの角膜上皮では中間系フィラメント細胞骨格が障害されたと考えられ、さらには、KO 上皮で脱落細胞の細胞膜が残存細胞に付着していたことも、細胞骨格の脆弱性を示唆する所見と考えた。

免疫組織化学と real-time RT-PCR で KO 角膜上皮では E-cadherin の発現低下を検出した。E-cadherin 発現低下は細胞の運動性を亢進させる可能性があることが以前から培養細胞を用いた研究などから報告されているので、角膜上皮の創傷治癒に対する EPPK 欠損の影響を検討した。その結果、上皮細胞の遊走が KO マウスで促進されていた。この時の上皮細胞の増殖は抑制されていた。増殖抑制の機序は不明であるが、種々の細胞間接着分子が細胞増殖に正または負に影響することが報告されているので、今後、この機序解明が必要である。

## まとめ

本研究で EPPK の角膜上皮の恒常性維持での役割を解明できた。ヒトでは EPPK 遺伝子変異が皮膚疾患を起こす事が報告されているが（自己免疫性表皮下水疱症）、これらの症例での角膜の合併症は報告されていない。K0 マウスにおいても、何らかの外的侵襲の無い状態では角膜構造は維持されていたこともこれに矛盾しない。しかし、なんらかの外的要因で角膜が障害されやすい可能性が示唆されたことは、自己免疫性表皮下水疱症の臨床症例では、眼科での角膜検査も必要であることを示す。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 25 年 8 月 9 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

角膜上皮の機能は体表面組織としてのバリア機能と視力のための透明性と平滑性の維持である。角膜の透明性の維持は臨床上に非常に重要であるが、角膜上皮の障害

エピブラキン(Epiplakin, EPPK)とは、自己免疫性表皮下水疱症の自己抗原として同定されたたんぱく質である。細胞骨格結合蛋白の中で中間径フィラメント結合蛋白の一種でケラチン、ビメンチンなどの中間径フィラメントと相互作用をしている。

本研究では、EPPK 遺伝子欠損マウス上皮の形態、脆弱性、創傷治癒に対する EPPK の役割の検討を行ったものである。その結果、

- 1) 透過電顕と光学顕微鏡 HE 染色で基底細胞様細胞の重層化を示す所見が観察され、K0 マウスでの重層化した基底細胞様細胞が K14 陽性であることが確認できた。DAPI での角膜上皮の基底細胞より上の縦／横比率での比較では、K0 マウスは WT マウスより低かった。透過電顕では、K0 角膜上皮の上層の細胞でデスモゾームと付着するケラチン線維の減少を認めた。免疫組織化学で角膜上皮での E-cadherin 染色性は染色が減弱、この変化は mRNA レベルでの発現の変化であることを real-time RT-PCR で確認した。
- 2) 角膜上皮をブラシで擦過して、上皮の脆弱性を透過電顕で検討、K0 マウスでは WT と比較して、角膜上皮のより深い層まで脱落し、翼細胞が露出していた。脱落した細胞のデスモゾームと細胞膜の一部が残存細胞側に残っていた。
- 3) 角膜上皮剥離作成後の経時的な観察の中で、上皮修復は K0 マウスで促進され、18 時間後で有意差が検出された。この経過中、K0 マウスで BrDU 陽性細胞数が減少していた。

という知見が得られ、EPPK の角膜上皮の恒常性維持での役割の一端を解明できた。

以上、本論分は、EPPK 欠損による角膜上皮の形態異常、脆弱性、創傷治癒の促進とその機序を初めて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)乙第901号		
学位授与の日	平成25年9月3日		
氏名	浜 武 継		
学位論文の題目	Renal biopsy criterion in children with asymptomatic constant isolated proteinuria (小児における持続性無症候性蛋白尿の腎生検基準)		
論文審査委員	主査	教授 重 松 隆	
	副査	教授 井 原 義 人	教授 吉 川 徳 茂

## 論 文 内 容 の 要 旨

持続性無症候性蛋白尿とは、尿蛋白を認めるが腎泌尿器系疾患の既往がなく診察所見や血液検査所見でも異常が認められない状態で、しばしば予後不良の腎疾患の初期症状として認められる。

近年、蛋白尿を評価する方法として尿蛋白クレアチニン比(urinary protein/creatinine ratio: uP/Cr)が広く使われている。小児ではuP/Cr 0.2 [g/g]未満が正常であるため、我々はuP/Cr 0.2以上が持続する場合に腎生検の適応と考え実施してきたが、この基準には議論もあり、持続性無症候性蛋白尿患者における腎生検の適応基準には明らかなエビデンスがないのが現状である。

そこで小児の持続性無症候性蛋白尿における腎生検の適応基準として最適なuP/Crを決定することを目的とし、2000年9月から2010年4月の10年間に、4施設(和歌山県立医科大学、神戸大学、兵庫県立こども病院、姫路日赤病院)にて腎生検を実施された患者1186人のうち持続性無症候性蛋白尿で初回腎生検を受けた小児44人を対象とした。Receiver Operating Characteristic Analysis(ROC解析)を用いて、糸球体疾患と微小糸球体変化を分類する最適なuP/Crを決定し、その値をもとに患者を2群に分類し、腎病理組織・予後との関係を後方視的に解析した。

その結果、最適なcut off値は0.5であった。この値を基準に、44人を2群に分類した。腎生検前のuP/Crが常に0.5未満の15人では、巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)が1人で、その他14人が微小糸球体変化(MC)であった。一方、腎生検前にuP/Cr 0.5以上を認めた29人では、MCは17人で、FSGSが5人、IgA腎症を含む種々の腎炎が7人であり、将来腎機能低下を来す可能性のある疾患が有意に高かった( $P = 0.016$ )。なお、腎生検前のuP/Cr 0.5未満であったFSGSの1人は、経過中にuP/Cr 0.5以上を示した。また31人のMC患者において、仮に腎生検の適応基準をuP/Cr 0.2から0.5以上とした場合、腎生検施行率を31人から17人へと減少させることができ、有意に腎生検施行率を下げるができることが判明した( $P < 0.001$ )。両群をフォローアップした結果、uP/Cr 0.5以上の群に1人腎不全患者が発生したが、その他、予後に関して両群で明らかな有意差は見られなかった。結論として、持続性無症候性蛋白尿の腎生検基準は、uP/Cr 0.5以上が妥当と考えられた。

### 審査の要旨(審査の日、方法、結果)

平成25年8月8日、学位審査対象者が学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

本論文は小児における持続性無症候性蛋白尿の腎生検の基準として、最適なuP/Crを決定することを目的としている。持続性無症候性蛋白尿で初回腎生検を受けた小児44名を対象にROC解析を用いて、糸球体疾患とMC群を分ける最良uP/Crを決定し、腎組織・予後との関係を解析した。ROC解析の結果、最適なcut off値は0.5であった。生検前uP/Crが常に0.5未満の15例では、FSGS 1例、MC 14例で、生検前uP/Cr 0.5以上の29例では、FSGS 5例、腎炎 7例、MC 17例で、MC以外の比率が有意に高かった( $P = 0.016$ )。またMCでは腎生検の適応をuP/Cr 0.5以上とすることで、腎生検施行率が有意に減少した( $P < 0.001$ )。よって小児無症候性蛋白尿の腎生検の適応はuP/Cr 0.5以上が妥当であることを明らかにした。

以上、当論文は持続性無症候性蛋白尿患者における腎生検の基準をuP/Cr 0.5以上と示した初めての論文であり、学位論文として十分価値のあるものとして認めた。

学位記番号	博(医)乙第902号		
学位授与の日	平成25年9月3日		
氏名	熊谷 健		
学位論文の題目	Correlation between echocardiographic superior vena cava flow and short-term outcome in infants with asphyxia (新生児仮死における心臓エコーによる上大静脈血流量と短期予後の関係)		
論文審査委員	主査	教授 井 籠 一 彦	
	副査	教授 近 藤 稔 和	教授 吉 川 徳 茂

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【背景】

新生児仮死は、出生時に皮膚刺激だけで回復するような極軽症例から、呼吸循環補助にもかかわらず神経学的後遺症を残す重症例まで様々な程度がある。重症の低酸素性虚血性脳症に対し脳低温療法の有効性が証明され、生後6時間以内に開始することが推奨されている。近赤外光分析を用いると、脳低温療法中は脳血流が減少し復温とともに上昇すると報告されているが、新生児の脳低温療法における脳血流量と予後に関する報告はみられない。Evansらは新生児の脳血流量評価に、上大静脈血流(SVC flow)を測定する方法を発表した。Suganamiらは近赤外光分析を用いて、SVC flowと脳血流量の指標であるTissue Oxygen Indexに正の相関があることを報告している。

そこで新生児仮死におけるSVC flowの生後変化はその短期予後に関係するという仮説をたて、2005年5月から2010年9月までに当院NICUに入院した在胎35週以降、出生体重2000g以上の児で、Apgar score1 分值が7点以下のため陽圧換気蘇生を要した新生児仮死24症例を対象とし、生後6時間以内、12、24、48、72時間にSVC flowをエコーで測定した。退院前に頭部MRIを撮影し、異常所見がある場合を短期予後不良、それ以外を短期予後良好と定義した。超重症新生児仮死の2例は、検討から除外した。脳低温療法を実施した9例(予後良好群4例、予後不良群5例)、軽度新生児仮死で脳低温療法を施行しなかった13例の計22例についてSVC flowの変化を検討した。

その結果、軽度新生児仮死群13例のSVC flowは生後5、12、24、48、72時間で $86 \pm 20$ ,  $111 \pm 39$ ,  $101 \pm 32$ ,  $94 \pm 20$ ,  $123 \pm 32$  ml/kg/minだった。脳低温療法を施行した9例の内、予後良好群のSVC flow値は予後不良群に比べ生後12時間( $36 \pm 7$  vs  $113 \pm 42$  ml/kg/min ( $p=0.01$ )), 24時間( $75 \pm 25$  vs  $155 \pm 45$  ml/kg/min ( $p=0.03$ )), 48時間( $92 \pm 34$  vs  $161 \pm 46$  ml/kg/min ( $p=0.01$ ))が有意に低値だった。予後良好群のSVC flow値は、脳低温療法導入後急激に減少し、その後時間経過とともに徐々に増加した。予後不良群のSVC flow値は脳低温療法導入後も時間経過とともに徐々に増加していった。短期予後良好群では脳低温療法導入後に脳血流量が低下したことは、脳血管が冷却に対し反応し、脳血流制御能が作動していると考えられる。一方短期予後不良群では、脳血管が冷却に対し反応せず、脳血流制御能が障害されている可能性が考えられる。神経学的予後の悪い新生児仮死は、脳血流量の制御能が障害されて脳低温療法が奏功しない可能性が考えられた。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成25年8月23日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

本論文はエコー検査から脳低温療法中の脳血流量変化を把握し、脳低温療法の効果や予後を予測することを目的としている。脳低温療法を施行した9例の内、予後良好群4例のSVC flow値は脳低温療法導入後急激に減少し、その後時間経過とともに徐々に増加した。一方予後不良群5例のSVC flow値は脳低温療法導入後も低下することなく、時間経過とともに徐々に増加していった。脳低温療法導入後の生後12、24、48時間で予後良好群は予後不良群に比べ有意にSVC flowが低値だった。症例数が少ない問題はあるが、短期予後との関連も統計的に有意差があり興味深い結果となった。

以上より本論文は脳低温療法を施行した低酸素性虚血性脳症における脳血流量の変化と短期予後をエコーで検討した初めての論文であり、学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第903号		
学位授与の日	平成25年11月12日		
氏名	綿貫匡則		
学位論文の題目	Radiographic features and risk of curve progression of de-novo degenerative lumbar scoliosis in the elderly:a 15-year follow-up study in a community-based cohort (単純X線像からみた腰椎変性側弯新規発生例の特徴と進行の危険因子—地域コホート15年の追跡より—)		
論文審査委員	主査	教授 中尾直之	
	副査	教授 仙波恵美子	教授 吉田宗人

## 論文内容の要旨

【目的】高齢者にみられる腰椎変性側弯は、思春期からの側弯の遺残に変性の伴ったものと、成人後新規に発生した側弯例 (de novo degenerative lumbar scoliosis, DNDLS) が混在しているため、加齢現象に伴い新規に発生する腰椎変性側弯の発症メカニズムおよび自然経過についてはいまだに不明な点が多い。本研究の目的は、地域住民コホートを用いて DNDLS の累積罹患率を縦断的に調査し、その X 線学的特徴と発症に関する危険因子を調査することである。

【方法】1990年に和歌山県美山村(現日高川町)にて40-79歳の全住民から男女各年代50人ずつ計400人を無作為抽出した骨折予防検診参加者のうち、15年後に同地域で再度行われた骨関節疾患予防検診にも参加した200人を調査対象とした。本研究におけるDNDLSの定義は「2005年の検診においてCobb角10°以上の側弯を有するもので、かつ1990年の初回調査時のCobb角より5°以上進行したもの」とし、DNDLSの性、年齢、Cobb角、カーブパターン、頂椎の位置と回旋度を記録した。また、腰椎変性側弯の新規発生の危険因子を解明するために、対象をDNDLS(+群)とDNDLS(-群)の2群に分類し、以下の項目に関して比較検討を行った。検討項目はCobb角、椎体傾斜角、椎間傾斜角、側方すべり、椎体回旋度、骨棘左右差、L1側方偏位、前弯角、L1前方偏位、骨盤傾斜角である。

【結果】1990年にCobb角10°以上の側弯を認めた6人を除いた194人に関して調査した結果、DNDLS(+群)は33人でDNDLS(-群)は161人であり、本集団における累積罹患率は33/197(17.0%)となる。男女比は約1対2で女性に多く発生する傾向がみられた。また、各年代の罹患率は年齢が上がるにつれて罹患率が高くなっていった。DNDLS(+群)のCobb角は10-26°(平均13.5±4.4°)で、回旋度は0-15°(平均5.2±3.3°)と比較的軽度の側弯変形にとどまった。一方、初回検診時のX線像の比較では、DNDLS(+群)がDNDLS(-群)に比して有意に各椎体傾斜角、L1/2、L2/3椎間楔状角、L3側方すべりおよび回旋度、L1/2、L2/3、L3/4骨棘の左右差において高い数値を示していた。

【考察】DNDLSの特徴は比較的軽度の側弯変形であることが判明した。過去においてDNDLS発症の危険因子として非対称性の椎間板変性の存在が指摘されているが、われわれの調査では非対称性の椎間板変性を示す指標である下位腰椎部における椎間楔状角の存在はDNDLS(+群)とDNDLS(-群)の両者に認められ、明らかな差を見いだせなかった。むしろ、両者の相違はL3椎体にみられる回旋および側方へのすべり変形、すなわちL3/4椎間に回旋不安定性が生じているか否かであった。通常、下位腰椎部より発生する椎間板変性が非対称性に発生しても良好なバランスを維持するために、その代償は上位の健常な椎間が担う。L3椎体の回旋および側方すべり変形は、この代償作用に破綻を来した結果生じると推察できるため、同所見が認められる場合は、DNDLS発症の危険度が高いと考える。

【結語】DNDLSの特徴として発生率は加齢とともに増加するものの椎体回旋、側弯変形は軽度にとどまり、その発生の危険因子としてL3椎体の回旋および側方すべりの存在が重要であることが判明した。本研究結果は、腰椎変性側弯の診断および治療戦略を構築する一助になると考える。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成25年10月22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。

上記論文は地域住民コホートをを用いて、加齢現象に伴い新規に発生する腰椎変性側弯（de-novo degenerative lumbar scoliosis:DNDLS）の特徴とその進行の危険因子を検討したものであり、本集団における累積罹患率は17.0%であり男女比は約1対2で女性に多く発生する傾向を認めた。そして、各年代の罹患率は年齢が上がるにつれて罹患率が高くなり、DNDLSのX線学的特徴は比較的軽度の側弯変形であることが判明した。また、過去においてDNDLS発症の危険因子として非対称性の椎間板変性の存在が指摘されているが、本研究では非対称性の椎間板変性を示す指標である下位腰椎部における椎間楔状角の存在はDNDLS群と対照群の両者に認められ、明らかな差を見いだせなかった。むしろ、両者の相違はL3椎体にみられる回旋および側方へのすべり変形、すなわちL3/4椎間に回旋不安定性が生じているか否かであった。同所見が認められる場合は、DNDLS発症の危険度が高いことが示唆された。

本論文は地域住民コホートをを用いてDNDLSの特徴を明らかにし、進行の危険因子としてL3椎体の回旋および側方すべりの存在が重要であることを明らかにした。本研究結果は腰椎変性側弯の診断および治療戦略を構築するうえで意義深いものであり、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904号		
学位授与の日	平成25年11月12日		
氏名	渡邊実香		
学位論文の題目	Development of gastric cancer in nonatrophic stomach with highly active inflammation identified by serum levels of pepsinogen and <i>Helicobacter pylori</i> antibody together with endoscopic rugal hyperplastic gastritis ( <i>Helicobacter pylori</i> (HP)関連慢性胃炎の中で未分化型胃癌ハイリスク群を同定する研究)		
論文審査委員	主査	教授 山上裕機	
	副査	教授 村垣泰光	教授 一瀬雅夫

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

胃癌発生には、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染が胃粘膜に慢性の炎症を引き起こし「萎縮性胃炎進展→腸上皮化生→高分化型胃癌発生」という Correa のメインルートは広く認識されている。我々の教室では、健康人男性コホートを対象とした長期観察研究を行い、*H. pylori* 関連胃炎の診断で、A群 *H. pylori* 陰性 PG (ペプシノゲン) 陰性 (*H. pylori* 感染陰性健常胃群)、B群 *H. pylori* 陽性 PG 陰性 (*H. pylori* 感染成立群)、C群 *H. pylori* 陽性 PG 陽性 (萎縮性胃炎群)、D群 *H. pylori* 陰性 PG 陽性 (化生性胃炎群) と4群に分類し、胃癌発生年率を検討してきた。ペプシノゲン (PG) とは胃で特異的に産生される消化酵素ペプシンの不活性型前駆体である。産生された PG は微量ながら血中に存在し、血清 PG 値として測定される。コンゴレッドを用いた色素内視鏡検査にて診断した萎縮進展に伴う腺境界の上昇と、血清 PG I 値および PG I/II 比の段階的な低下には高い相関を認める。このことは、血清 PG I 値と PG I/II 比によって胃癌発生母地となる萎縮性胃炎の進展度判定が可能であることを意味する確立された検査方法である。胃癌発生年率の結果は A 群 (*H. pylori* 感染陰性健常胃群) では年率 0%、B 群 (*H. pylori* 感染成立群) で年率 0.1%、C 群 (萎縮性胃炎群) では年率 0.24%、D 群 (化生性胃炎群) では年率 1.3% と段階的に上昇し、*H. pylori* 関連慢性胃炎の進展に伴い高率に胃癌発生のリスクが上昇する結果を報告した。(Ohata H, et al. Int J Cancer. 2004; 109: 138-43.)

上記 Correa のメインルートからの胃癌発生は、*H. pylori* 関連慢性胃炎の主に C 群 (萎縮性胃炎群) と D 群 (化生性胃炎群) からあたり、大部分は分化型胃癌である。しかし、このメインルートで発見される胃癌は全体の 60%に過ぎず、残り 40%にあたる未分化型胃癌は Correa のルートとは異なる経路で発生する可能性がある。未分化型胃癌は、胃固有粘膜組織 (胃底腺粘膜、幽門腺粘膜) から発生し萎縮性胃炎の進展よりも *H. pylori* 感染により惹起される胃炎活動度との関連が強いと考えられている。胃炎活動度が高いと胃 X 線検査所見で胃の皺襞肥大形成に至る。この皺襞肥大型胃炎症例での胃癌合併を検討した症例対照研究の結果は、胃体部の皺襞幅が太くなるほど胃癌のリスクが増加し、特に発生胃癌の病理組織型の検討では、皺襞幅が 6 mm 以上で胃体部に未分化型胃癌発生が有意に増加することが報告されている。しかし、皺襞肥大型胃炎から未分化型胃癌へ進展する詳細な経緯は未だ不明である。

本研究では、*H. pylori* 関連慢性胃炎の中に、これまで未知であった悪性度の高い未分化型胃癌のハイリスク群を同定するために、萎縮性胃炎が進展する前の *H. pylori* 陽性 PG 陰性の B 群 (*H. pylori* 感染成立群) について PG 値や、*H. pylori* 抗体価、皺襞肥大型胃炎等の指標で検討を行った。

### 【対象と方法】

#### 1.対象

1999 年 1 月から 2000 年 12 月に和歌山市の某職域で定期健康診断を受診した中年男性 (平均年齢 52.2±5.1) のうち胃内視鏡検診による胃癌検診を受診した 3334 人を対象とした。胃切除・腎不全の既往、PPI (proton pump inhibitor)、H2 受容体拮抗薬、NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) 服用者、は除外した。この中で、血清 *H. pylori* 抗体陽性、血清 PG 陰性、すなわち B 群 (*H. pylori* 感染成立群) の被

験者 937 名を選別, 除菌治療群 399 名と非除菌治療群 538 名に分け, 平均 5.4±4.0 年間に内視鏡検査で経過観察し, 胃癌発生を検討した.

## 2.方法

一般健診プログラムとして, 問診・アンケート, 身体検査, 胸部 X 線検査, 心電図, 空腹時血液検査, 尿検査, を施行した. *H. pylori* 感染と慢性萎縮性胃炎 (Chronic atrophic gastritis: CAG) は, 血清 *H. pylori* IgG 抗体価と血清 PG 値に基づき診断した. 血清 *H. pylori* IgG 抗体価は ELISA (MBL, Nagoya, Japan) 法を用い測定し, >50U/ml を *H. pylori* 感染陽性とした (感度・特異度: 93.5%・92.5%).

血清 PG 値は RIA-Bead Kits (Dainabbot, Tokyo, Japan) を用い測定し, CAG は PG 法陽性の基準値 (PG I ≤50 かつ PG I/II ≤3.0) に基づき診断した (感度・特異度: 69%・80%).

これらの血清 *H. pylori* 抗体価と PG 値を指標に, *H. pylori* 関連慢性胃炎の病期を,

A 群 (*H. pylori* 感染陰性、健常胃群) : *H. pylori* (-) CAG (-),

B 群 (*H. pylori* 感染成立群) : *H. pylori* (+) CAG (-),

C 群 (萎縮性胃炎群) : *H. pylori* (+) CAG(+),

D 群 (化生性胃炎群) : *H. pylori* (-) CAG(+) の 4 群に分類した.

以前の cohorts 研究の結果 (Yanaoka K, et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008; 17: 838-45.) , 上記 B 群の中でも PG 値により胃癌発生のリスクが異なることが明らかとなったため, PGI=50, PGI/II ratio=3 で B 群をさらに下記の 3 群に分け,

B-α 群(n=111) (PGI<50 and, PGI/II ratio >3.0),

B-β 群(n=235) (PGI>50 and, PGI/II ratio >3.0),

B-γ 群(n=150) (PGI<50 and, PGI/II ratio ≤3.0) とし, 検討した.

また, *H. pylori* 抗体価と胃癌発生のリスクについても以前の研究結果で *H. pylori* 抗体価が 500U/ml 以上の群で胃粘膜の炎症が強く胃癌発生のリスクが高いことを報告しているため, *H. pylori* 抗体価 500U/ml 以上の群と未満の群 2 群に分け検討した.

さらに, 今回は内視鏡下で十分な送気の下で胃内腔を拡張し, 胃壁を進展させた状態で胃体部を見下ろし Sydney system に準じ, 皺襞肥大, 屈曲を認める症例を皺襞肥大型胃炎 (Rugal hyperplastic gastritis) 陽性と診断し, 検討を行った.

## 【結果】

### 1. 対象の背景因子

年齢やフォローアップ期間においては各群で有意差を認めなかった.

観察期間平均 5.4 (±4.0) 年で胃癌発生を 7 例認め, その内 6 例が未分化型胃癌であった.

### 2. PG 値で 3 群にわけ (α、β、γ 群) 検討

非除菌治療群の B 群全体(n=496)を

B-α 群(n=111) PGI<50 and, PGI/II ratio >3.0,

B-β 群(n=235) PGI>50 and, PGI/II ratio >3.0,

B-γ 群(n=150) PGI<50 and, PGI/II ratio ≤3.0 に分類し検討,

B-γ 群に 6 例の胃癌発生を認めた. その内 5 例が未分化型胃癌であった.

胃癌発生年率 0.75% HR10.0(95%CI;1.19-84.05)との結果で,

B-γ 群に有意に未分化型胃癌発生のリスクが増大した.

### 3. *H. pylori* 抗体価 500U/ml 以上、未満の 2 群にわけ検討

*H. pylori* 抗体価 500u/ml 以上の群(n=159)と未満の群(n=337)の 2 群に分け検討,

*H. pylori* 抗体価 500u/ml 以上の群で 5 例の胃癌発生を認め,

胃癌発生年率 0.57% HR6.51(95%CI;1.24-34.17)との結果で,

*H. pylori* 抗体価 500U/ml 以上の群に有意に胃癌発生のリスクが増大した.

### 4. PG 値と *H. pylori* 抗体価 500U/ml の 2 つの指標で検討

B-γ 群かつ *H. pylori* 抗体価 500U/ml 以上の群(n=65)に胃癌発生 5 例,

B- $\gamma$  群かつ *H. pylori* 抗体価 500U/ml 未満の群(n=85)に胃癌発生 1 例と胃癌発生年率 1.52%vs 0.21%と有意に B- $\gamma$  群かつ *H. pylori* 抗体価 500U/ml 以上の群に胃癌発生リスクが増大した。

#### 5. 内視鏡的皺襞肥大型胃炎の有無で検討

Sydney system による皺襞肥大型胃炎陽性群(n=58), 陰性群(n=438)の 2 群に分け検討。皺襞肥大型胃炎陽性の所見は B 群全体の 11.7% (58 名) に認める。胃体部の炎症を強く表す所見であるが、この群に 6 例の胃癌発生を認め、皺襞肥大型胃炎陽性群で胃癌発生年率 1.74%, HR43.32(95%CI;5.16-363.41)有意に内視鏡的皺襞肥大型胃炎陽性群に胃癌発生のリスクが増大した。

#### 6. 未分化型胃癌のハイリスク群の検討

以上の結果すべてをあわせて、血清 PG 値で B- $\gamma$  群を絞り込み、その上で *H. pylori* 抗体価 500U/ml 以上の基準さらに内視鏡的皺襞肥大型胃炎陽性所見をプラスすることで B 群全体の約 5%にあたる (23 名) 中、胃癌発生 4 例、内 3 例は未分化型胃癌を認める結果となり上記の指標を用いることで、胃癌発生年率 2.8%と効率的に胃癌のハイリスク群、特に、未分化型胃癌のハイリスク群を絞り込むことが可能である。

#### 7. 除菌群について検討

対照となる B- $\gamma$  群(n=149)に対し除菌治療を施行。観察期間中に除菌群では 1 例も胃癌発生を認めなかった。

#### 【結 語】

- 1 *H. pylori* 関連胃炎の活動指標と考えられる血清 PGII 値高値と *H. pylori* 抗体価高値、内視鏡的皺襞肥大型胃炎所見を用いて診断し得る、軽度萎縮性胃炎の集団の中に、胃癌ハイリスク群を同定することが可能であった。
- 2 同群は胃炎活動度が高く、特に、未分化型胃癌を高頻度に発生する特徴を有していた。
- 3 本邦の胃癌発生のメインルートである  
*H. pylori* 感染→萎縮性胃炎→腸上皮化生→分化型胃癌の経路以外に  
*H. pylori* 感染→軽度萎縮性胃炎→慢性活動性胃炎 (皺襞肥大型胃炎を含む) →未分化型胃癌の新たなルートが存在する可能性が考えられる。
- 4 本ハイリスク群において除菌治療は胃癌予防に有効である可能性が強く示唆された。

本研究の一部は、2012 年度欧州消化器病学会週間、日本癌学会学術総会(札幌)、日本消化器病学会週間(神戸)にて発表した。また、論文は International Journal of Cancer 2012;131:2632-2642, に掲載された。

#### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成25年10月22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。胃癌発生には、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染が胃粘膜に慢性の炎症を引き起こし「萎縮性胃炎進展→腸上皮化生→分化型胃癌発生」という Correa のメインルートは広く認識されている。*H. pylori* 関連慢性胃炎の進展に伴い高率に胃癌 (分化型胃癌) 発生のリスクが上昇する結果は、申請者ら健康人男性コホートで長期観察研究を行い、*H. pylori* 感染成立群で年率 0.1%、萎縮性胃炎群で年率 0.24%と既に報告し、多施設からも同様のデータが報告されるに至っている。前述の Correa のメインルートからの胃癌発生は、*H. pylori* 関連慢性胃炎の主に、萎縮性胃炎群と

化生性胃炎群からにいたり、大部分が分化型胃癌である。このメインルートで発見される胃癌は全体の60%に過ぎず、残り40%にあたる未分化型胃癌はCorreaのルートとは異なる経路で発生する可能性が高い。

未分化型胃癌は、胃固有粘膜組織（胃底腺粘膜、幽門腺粘膜）から発生し、萎縮性胃炎の進展よりもむしろ *H. pylori* 感染により惹起される胃炎活動度との関連が強いと想定されている。

高い活動性胃炎の結果、胃 X 線検査で同定される、皺襞肥大形成に至ることが知られている。

この皺襞肥大胃炎症例での胃癌合併を検討した症例対照研究が報告されている。

しかし、皺襞肥大胃炎から未分化型胃癌発生に進展する詳細は未だ不明である。

そこで本研究は、*H. pylori* 関連慢性胃炎の中に未分化型胃癌ハイリスク群を同定するために、

*H. pylori* 陽性 PG（ペプシノーゲン法）陰性で同定される萎縮性胃炎軽度の *H. pylori* 感染成立群

937 人を 約 5 年間にわたり追跡し、調査検討した。

その結果、

(1) 観察期間平均 5.4 (±4.0) 年で胃癌発生を 7 例認め(年率 0.26%)、

その内 6 例が未分化型胃癌であった。

(2) *H. pylori* IgG 抗体価と血清 PG 値（ペプシノーゲン法）の 2 つの血液検査と皺襞肥大胃炎の内視鏡画像所見を駆使することで同定できる一群、全体の 5% に当たる 23 人中、

胃癌発生 4 例のうち未分化型胃癌 3 例を認める結果となり、胃癌発生年率 2.8% と

高率に胃癌のハイリスク群、特に、未分化型胃癌を絞り込むことが可能であると考えられた。

(3) *H. pylori* 感染成立群、中でも上記ハイリスク群は除菌により観察期間中の

胃癌発生を完全に抑制できた。

以上より、本邦の胃癌発生のメインルートである *H. pylori* 感染→萎縮性胃炎→腸上皮化生→分化型胃癌の経路以外に *H. pylori* 感染→軽度萎縮性胃炎→慢性活動性胃炎（皺襞肥大胃炎を含む）→未分化型胃癌の新たなルート存在の可能性が想定された。

また、本ハイリスク群において除菌治療は胃癌予防に有効である可能性が強く示唆された。

本研究は、これまで未知であった悪性度の高い未分化型胃癌のハイリスク群を具体的に同定する知識を提供するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第905号		
学位授与の日	平成25年11月12日		
氏名	那須 亨		
学位論文の題目	Predicting lymph node metastasis in early colorectal cancer using the CITED1 expression (CITED1 発現を用いた早期大腸癌におけるリンパ節転移予測)		
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

大腸癌においてリンパ節転移の有無は重要な予後因子である。とくに粘膜下層浸潤癌 (SM 大腸癌) のリンパ節転移率は 10%程度であり、内視鏡治療を行うか、リンパ節郭清を伴う外科的切除を行うかは浸潤距離や脈管侵襲などの病理因子によって判断されている。これは個々の患者にとって至適治療が行われているとは言いがたい状況であり、SM 大腸癌のリンパ節転移の有無を予測する分子生物学的マーカーの開発が急務である。

当教室ではこれまで、「癌先進部での癌の脱分化」という大腸癌のリンパ節転移に関与するとされる現象に着目し(Dis Colon Rectum 2007, Clin Cancer Res 2008), 網羅的遺伝子発現解析を行い、この現象に関わる 10 個の候補遺伝子を選定してきた。大腸癌にリンパ節転移をきたす過程においてこれらの遺伝子群は重要であると考え、大腸癌のリンパ節転移との関連性について検討した。

### 対象と方法

#### 【対象】

和歌山県立医科大学第2外科にて2003年9月～2004年12月に手術を施行した進行大腸癌(壁深達度SS,SE,A)66症例と、1999年11月～2009年5月に手術を施行したSM大腸癌(壁深達度SM)126症例を対象とした。

#### 【サンプリング】

mRNA の遺伝子発現解析に用いる進行大腸癌サンプルを摘出直後に OCT コンパウンドに包埋し、すみやかに液体窒素で凍結させ、-80℃で保存した。また免疫化学組織染色のための早期癌を含む全症例は摘出後すみやかに10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した後に常温で保存した。

#### 【Laser Microdissection】

OCT コンパウンドに包埋した進行大腸癌組織を、ライカクリオスタットを用いて 10 μm の厚さの薄切切片を作成した。この薄切切片に対し、ライカ LMD を用いて Laser Microdissection (LMD) を施行し、癌組織のみを選択的に採取した。

#### 【t-RNA の抽出・real time RT-PCR】

癌組織の LMD サンプルから t-RNA を抽出した。逆転写反応を行い、cDNA を作製した。Lightcycler を用いて 10 遺伝子の PCR 反応を行い、mRNA の発現を定量した。検量線は Human Reference total RNA で作成し、各サンプルの mRNA 発現量は GAPDH で補正した相対的定量にて行った。

#### 【免疫染色】

パラフィン包埋した癌組織から薄切切片を作成し、脱パラフィン後にクエン酸バッファー内で 121℃30 分間熱処理を行い抗原賦活化した。メタノール処理後に Protein Block を用いてブロッキングし、一次抗体を滴下し一次抗体反応 (4℃, over night) を行った。TTBS で洗浄後に二次抗体(Hist Fine)を滴下し室温で 30 分間静置した。TTBS で洗浄後に DAB で発色を行った。蛋白発現量は Allred 法に基づき、陽性細胞染色濃度 (intensity score; IS) と陽性細胞占有比率 (proportion score; PS) を計測し、

定量化した。

#### 【統計】

単変量解析 (univariate logistic regression model) および多変量解析 (multiple logistic regression model) を行った。

## 結 果

#### 【real time RT-PCR 法による進行大腸癌の検討】

10 候補遺伝子の mRNA 発現量および臨床・病理因子のうちリンパ節転移に関与する因子を検討したところ、単変量解析ではリンパ管侵襲陽性 ( $p=0.003$ ; odds ratio [OR], 24.9; 95% confidence interval [95% CI], 3.03-204) と Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich COOH-terminal domain 1 (CITED1) mRNA 高発現 ( $p=0.043$ ; OR, 5.56; 95% CI, 1.05-29.4) がリンパ節転移の危険因子であった。多変量解析では CITED1 mRNA 高発現 ( $p=0.040$ ; OR, 4.51; 95% CI, 1.07-19.1) のみがリンパ節転移の独立した危険因子であった。

#### 【免疫染色法による進行大腸癌の検討】

免疫組織化学染色を用いて、mRNA 発現量の解析でリンパ節転移の独立因子であった CITED1 発現量を定量し、臨床病理因子とともにリンパ節転移に関与する因子を検討した。単変量解析ではリンパ管侵襲陽性 ( $p=0.003$ ; OR, 24.9; 95% CI, 3.03-204) と CITED1 高発現 ( $p=0.014$ ; OR, 5.59; 95% CI, 1.41-22.3) がリンパ節転移の危険因子であった。多変量解析においても同様にリンパ管侵襲陽性 ( $p=0.007$ ; OR, 18.9; 95% CI, 2.19-163) と CITED1 高発現 ( $p=0.035$ ; OR, 5.05; 95% CI, 1.13-22.7) がリンパ節転移の独立した危険因子であった。

#### 【免疫染色法による SM 大腸癌の検討】

免疫組織化学染色を用いて CITED1 発現量を定量し、臨床病理因子とともに SM 大腸癌のリンパ節転移に関与する因子を検討したところ、単変量解析では静脈侵襲陽性 ( $p=0.012$ ; OR, 4.27, 95% CI, 1.38-13.2), CITED1 高発現 ( $p=0.009$ ; OR, 7.94; 95% CI, 1.69-37.0) がリンパ節転移の危険因子であった。多変量解析では静脈侵襲陽性 ( $p=0.018$ ; OR, 4.27, 95% CI, 1.28-14.3) と CITED1 高発現 ( $p=0.010$ ; OR, 7.94; 95% CI, 1.64-38.5) がリンパ節転移の独立した危険因子であった。

## 考 察・結 語

進行大腸癌を用いた mRNA の測定による検討で、リンパ節転移に関与するとされた CITED1 は免疫組織学的検討においてもリンパ節転移の独立した因子であることが示された。さらに SM 大腸癌でも免疫組織学的検討においてリンパ節転移の独立した因子であることを明らかにした。CITED1 は TGF- $\beta$  のシグナル伝達において核内での転写活性に寄与しているとされ、甲状腺癌や Wilms 腫瘍で CITED1 が高発現していると報告されているが、大腸癌に関する報告はない。また、癌の悪性度やリンパ節転移との関連性を示した報告はこれまでになく、CITED1 と大腸癌リンパ節転移との関連性は新たな知見である。特に SM 大腸癌での検討において CITED1 高発現はリンパ節転移の危険因子となることから、CITED1 が SM 大腸癌の治療方針を決定する分子マーカーとなる可能性が示唆された。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成25年10月22日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。大腸癌においてリンパ節転移の有無は重要な予後因子である。とくに粘膜下層浸潤癌 (SM 大腸癌) のリンパ節転移率は 10%程度であり、内視鏡治療を行うか、リンパ節郭清を伴う外科的切除を行うかは浸潤距離や脈管侵襲などの病理因子によって判断されている。これは個々の患者にとって至適治療が行われているとは言いがたい状況であり、SM 大腸癌のリンパ節転移の有無を予測する分子生物学的マーカーの開発が急務である。これまで、「癌先進部での癌の脱分化」という大腸癌のリンパ節転移に関与するとされる現象に着目し、網羅的遺伝子発現解析を行い、この現象に関わる 10 個の候補遺伝子を選定してきた (Clin Cancer

Res 2008). 大腸癌にリンパ節転移をきたす過程においてこれらの遺伝子群は重要であると考え、大腸癌のリンパ節転移との関連性について検討した。

進行大腸癌 66 症例の手術摘出標本より Laser Microdissection を用いて癌組織のみを選択的に採取し t-RNA を抽出した。real time RT-PCR により 10 候補遺伝子の PCR 反応を行い、mRNA の発現を定量した。多変量解析によりリンパ節転移との関連を検討したところ、CITED1 mRNA 高発現 ( $p=0.040$ ; OR, 4.51; 95% CI, 1.07-19.1) のみがリンパ節転移の独立した危険因子であった。さらに免疫組織化学染色を用いた検討でも、CITED1 高発現 ( $p=0.035$ ; OR, 5.05; 95% CI, 1.13-22.7) がリンパ節転移の独立した危険因子であった。次に SM 大腸癌 95 症例を対象とした免疫組織化学染色による検討でも、多変量解析で CITED1 高発現 ( $p=0.010$ ; OR, 7.94; 95% CI, 1.64-38.5) がリンパ節転移の独立した危険因子であった。

CITED1 は TGF- $\beta$  のシグナル伝達において核内での転写活性に寄与しているとされ、甲状腺癌や Wilms 腫瘍で CITED1 が高発現していると報告されているが、大腸癌に関する報告はない。また、癌の悪性度やリンパ節転移との関連性を示した報告はこれまでになく、CITED1 と大腸癌リンパ節転移との関連性は新たな知見である。

以上の結果により、SM 大腸癌において CITED1 高発現はリンパ節転移の危険因子となることから、CITED1 が SM 大腸癌の治療方針を決定する分子マーカーとなる可能性が示唆され、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第906号		
学位授与の日	平成26年2月12日		
氏名	島本幸子		
学位論文の題目	Is Visceral Fat Really a Coronary Risk Factor? - A Multi-detector Computed Tomography Study - (内臓脂肪は独立した冠危険因子か? -MDCTを用いての検討)		
論文審査委員	主査	教授 岡村吉隆	
	副査	教授 佐藤守男	教授 赤阪隆史

## 論文内容の要旨

**【目的】** 食習慣の乱れと運動不足が原因のメタボリック症候群（MS）は動脈硬化の危険因子として注目されている。MSの診断基準の必須項目として内臓脂肪の蓄積がある。内臓脂肪の蓄積は糖尿病や高脂血症、高血圧などを引き起こし、動脈硬化を引き起こすとともに、直接作用して動脈硬化を進展させると言われている。内臓脂肪の蓄積は、抗動脈硬化作用や抗糖尿病作用があるとされるアディポネクチンを低下させる。その他さまざまな因子を介して、内臓脂肪は血管壁に作用して動脈硬化をきたすとされている。本研究の目的は多列CT（MDCT）を用いて、内臓脂肪（面積など）を評価し、その蓄積は独立した冠危険因子であるかどうかを明らかにする。

### 【方法】

**対象：**2005年11月から2012年6月までの期間、冠動脈病変の評価目的で和歌山南放射線科クリニックに紹介されMDCTを施行した4395人を対象とした。診断が困難になる高度石灰化例と冠動脈治療歴のある1238人は除外し、3157人について検討した。冠危険因子として高血圧、高脂血症、糖尿病、家族歴、喫煙についてカルテより調査した。

**MDCTの撮影とデータ解析：**フィリップス社製64列多列CTを用いて撮影し、心臓用アルゴリズムを用いて再構成の後、ワークステーションにて解析した。心拍数が70/分より多い場合はβ遮断薬の投与にて心拍数の調節を行った。当院の診断精度は、感度97%、特異度90%、陰性的中率97%であった。同時に内臓脂肪も撮影し、膈レベルの画像を解析し-130から-80HUのCT値を脂肪とした。

**統計解析：**二群の比較はt検定を行い、三群以上の比較はANOVAを行った後、Bonferroni testを行った。冠動脈狭窄の因子の検定は多変量解析を行いp値<0.05を統計学的有意とした。

**【結果】** 患者背景を表1に示した。内臓肥満群は1130人で非内臓肥満群と比較して若年男性が多く、高血圧や高脂血症、糖尿病、喫煙などの冠危険因子を多く有した。内臓肥満群は冠動脈狭窄も多く有した。

冠動脈狭窄を有する割合は冠危険因子の数に相関し（図1-A）、内臓肥満者の割合は冠危険因子の数に相関した（図1-B）。

単変量解析を行うと年齢、男性、内臓脂肪量、高血圧、高脂血症、糖尿病、喫煙、V/S比が冠動脈狭窄に影響を与えた。単変量解析でp<0.05の因子で多変量解析を行うと年齢、男性、高脂血症、糖尿病、そしてV/S比が冠動脈狭窄に影響を与えた。（表2）

冠危険因子の数と冠動脈狭窄のオッズ比を表3に示した。危険因子の数が増加すると冠動脈狭窄のリスクは増加した。

冠危険因子なし群（892人）についての検討を表4-a、表4-bに示した。

脂肪は年齢と性別に影響を受けることから、脂肪分布について検討した（図2）。女性は総脂肪量と皮

下脂肪量が男性に比較して多く、男性は内臓脂肪量が大きい結果であった。男性において、総脂肪量は50-54歳をピークに減少した。女性は閉経後に総脂肪、皮下脂肪、内臓脂肪が増加する傾向であり、70歳以降減少傾向であった。

【考察】 本研究において内臓脂肪の蓄積は冠動脈狭窄の独立した危険因子ではなかった。しかし、内臓肥満者は冠危険因子を有し、冠動脈狭窄が進行するリスクが高いことが示唆された。年齢と性別による脂肪分布を示すことにより脂肪量は年齢、性別により異なるということを明らかにした。いくつかの基礎的研究で内臓脂肪の蓄積は様々な内因性因子を介して動脈硬化の原因になるといわれている。内臓脂肪の蓄積が不安定プラークに関連があるとの報告や、低CT値のプラークが急性冠症候群の予測因子になるとの報告があることから、プラーク性状を評価することも必要かもしれない。

【結論】 内臓脂肪は独立した冠危険因子ではなかったが、内臓肥満者は冠動脈病変を有する可能性が有意に高いことが示された。内臓肥満は他の冠危険因子の原因となし、冠動脈狭窄に進展していく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12月9日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

近年、メタボリック症候群（MS）は動脈硬化の危険因子として注目されている。MSの診断基準の必須項目として内臓脂肪の蓄積がある。内臓脂肪の蓄積は糖尿病や高脂血症、高血圧などを引き起こし、動脈硬化を引き起こすとともに、血管壁に作用して動脈硬化を進展させると言われている。内臓脂肪の蓄積は、抗動脈硬化作用や抗糖尿病作用があるとされるアディポネクチンを低下させる。その他さまざまな因子を介して、血管壁に作用し、動脈硬化をきたすとされている。

本論文は多列CTを用いて冠動脈疾患の有無を評価した4395例のうち石灰化病変などにより判定できなかった1238人を除く3157例を対象に、内臓脂肪（脂肪面積など）を評価し、その蓄積は独立した冠危険因子であるかについて検討したものである。冠危険因子としての高血圧、高脂血症、糖尿病、家族歴、喫煙についてはカルテより調査した。CT撮影はフィリップス社製64列多列CTを用い、冠動脈は心臓用アルゴリズムを用いて再構成の後、ワークステーションにて解析した。内臓脂肪は膈レベルの画像を解析し、-130から-80HUのCT値を脂肪とした。内臓肥満群（1130例）は非内臓肥満群（2027例）と比較して若年男性が多く、高血圧や高脂血症、糖尿病、喫煙などの冠危険因子を多く有し、冠動脈狭窄も多く有した。単変量解析では、年齢、男性、内臓脂肪量、高血圧、高脂血症、糖尿病、喫煙、内臓脂肪と皮下脂肪の比（V/S比）が冠動脈狭窄に影響を与えた（ $p < 0.01$ ）。それらの因子で多変量解析を行うと年齢（Odds比1.04）、男性（2.84）、高脂血症（1.26）、糖尿病（1.96）、そしてV/S比（1.33）が冠動脈狭窄に影響を与えたとの結果で、内臓脂肪は独立した冠危険因子ではなかった。しかし、冠動脈狭窄を有する割合は冠危険因子の数に相関し、内臓肥満者の割合は冠危険因子の数に相関したとの結果から、内臓肥満者は冠危険因子を有し、冠動脈狭窄が進行するリスクが高いことが示唆された。また、脂肪は年齢と性別に影響を受けることから脂肪分布について検討した。女性は総脂肪量と皮下脂肪量が男性に比較して多く、男性は内臓脂肪が多い結果であった。男性において、総脂肪量は50-54歳をピークに、以降減少した。女性は閉経後に総脂肪、皮下脂肪、内臓脂肪が増加する傾向であり、70歳以降減少傾向であった。

以上、本論文は本邦のMSの診断基準の必須項目である内臓脂肪と冠動脈狭窄との関係について多列CTを用いて検討し、内臓脂肪は独立した冠危険因子でないことを明らかにしたものである。しかし、冠動脈狭窄を有する割合は冠危険因子の数に相関し、内臓肥満者の割合は冠危険因子の数に相関したとの結果から、内臓肥満者は冠危険因子を多く有し、冠動脈病変を有する可能性が高いことが示され、内臓肥満は他の冠危険因子の原因となり、冠動脈狭窄に進展していく可能性を示したものである。また、脂肪の分布は性別・年齢により異なることから、これらを考慮した上での検討の必要性が示唆されたものであり、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907号		
学位授与の日	平成26年2月12日		
氏名	早田 敦志		
学位論文の題目	Stratifying a Risk for an Increased Variation of Airway Caliber among the Clinically Stable Asthma. (安定期喘息における肺機能の変動増大を予測する臨床指標の網羅的検討)		
論文審査委員	主査	教授 岡村 吉隆	
	副査	教授 前田 正信	教授 井原 義人

## 論文内容の要旨

### (背景)

臨床的には安定期の喘息患者であっても気道過敏性は残存しており、喘息の重症化や増悪などと関連することが報告されている。しかしながら気道過敏性試験は負荷試験であり、一般臨床において繰り返し測定することは容易ではない。ピークフローメーターによる Peak Expiratory Flow(PEF)週内変動率は気道過敏性と良好に相関するため、より簡便な生理学的指標として代用できることが報告されている。また近年、PEF のデータにより将来の喘息コントロール悪化の予測を容易にすることが実証されている。これらのことから PEF 週内変動率が增大している症例は気道過敏性が残存しており、将来増悪のリスクが高い症例と考えられる。そのため PEF 週内変動率増大の予測に有用な臨床的指標を同定することは、将来の喘息コントロール悪化のリスクを評価するために有用である可能性がある。

### (目的)

標準治療を行っている安定期の非喫煙喘息患者において、臨床指標と PEF 週内変動率との関連を網羅的に検討し、PEF 週内変動率増大の予測に有用な臨床的指標を同定する。

### (方法)

標準治療および PEF 測定を行っている安定期の非喫煙喘息患者を対象とした。1 週間の PEF 最低値を最高値で除した Min%Max を PEF 週内変動率とし、Min%Max PEF<80%を PEF 週内変動率増大と定義した。背景因子の調査、Asthma Control Questionnaire(ACQ)、肺機能検査、呼気 NO 濃度測定を行い、その後 1 週間の Min%Max PEF との関連について検討した。

### (結果)

対象症例数は 297 例であった。その中で PEF 週内変動率が增大している症例は 52 例(17.5%)であった。PEF 週内変動率が增大している群は変動率が增大していない群と比べると、有意に既喫煙者の割合が高かった。治療に関しては有意に吸入ステロイド薬のステロイド量が多く、長時間作用型気管支拡張薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬の使用割合が高かった。しかしながらより気流制限が強く、より呼気 NO 濃度、ACQ が高かった。多変量ロジスティック回帰分析により、PEF 週内変動率増大の独立した規定因子としては ACQ、対標準 1 秒量、呼気 NO 濃度が抽出された。ROC 曲線を用いて、Min%Max<80%を予測するカットオフ値としては ACQ では 0.4、対標準 1 秒量では 85%、呼気 NO 濃度では 40ppb と算出された。それぞれのカットオフ値による感度・特異度は ACQ では感度 96.2%、特異度 58.8%、対標準 1 秒量では感度 61.5%、特異度 89.0%、呼気 NO 濃度では感度 75.0%、特異度 89.8%であった。これらの指標を組み合わせた中で、対標準 1 秒量 $\leq$ 85%かつ呼気 NO 濃度 $\geq$ 40ppb を組み合わせた指標が最も特異度が高くなった(98.4%)。対標準 1 秒量 85%と呼気 NO 濃度 40ppb を用いて症例を層別化すると、陽性的中率は 84.6%であった。一方、対標準 1 秒量>85%かつ呼気 NO 濃度<40ppb を満たした場合には、陰性的中率が 98.5%と高かった。

## (考察)

今回の検討は、ACQ、対標準1秒量、呼気NO濃度が肺機能の変動増大を予測する独立した予測因子であることを示した初めての検討である。

安定期でも将来喘息コントロールが悪化する可能性のある、PEF週内変動率が增大している症例が17.5%に認められた。PEF週内変動率が增大している群は変動率が增大していない群と比べると、有意に既喫煙者の割合が高く、より強力な治療を受けているにも関わらず気流制限が強く、より気道炎症が亢進し症状が強かった。多変量ロジスティック回帰分析により、PEF週内変動率増大の独立した規定因子としてはACQ、対標準1秒量、呼気NO濃度が抽出され、ACQは感度が高く、対標準1秒量と呼気NO濃度は特異度が高いという特性が認められた。ACQは5項目の質問票で簡便であり、スクリーニングに適するが特異度が低いため過大評価に注意が必要であると考えられる。またこれらの指標の中で呼気NO濃度と対標準1秒量がともにカットオフ値より悪化している場合には、最も特異度が高くなるためPEF週内変動率が增大している可能性が高いと考えられる。一方、対標準1秒量と呼気NO濃度がともにカットオフ値より良い場合には陰性的中率が高いため、PEF週内変動率が增大していない可能性が極めて高いと考えられる。この呼気NO濃度と対標準1秒量を組み合わせた指標について、Gelbらが将来の喘息増悪の予測に関して、両指標がカットオフ値より悪化していれば陽性的中率85%、カットオフ値より良ければ陰性的中率100%であったと報告しており、この指標の組み合わせは有用と考えられる。

## (結論)

ACQ、対標準1秒量、呼気NO濃度を用いて、安定期喘息患者における肺機能の変動増大のリスクを層別化できる。これらの指標を評価することは、将来喘息コントロール悪化のリスクが高く、継続してピークフローメーターによるモニタリングが必要と思われる症例の選別に有用と考えられる。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成26年1月10日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

気管支喘息は治療薬の開発やガイドラインにより、その死亡者数は順調に減少しているが現在死亡者数はゼロには至っていない。臨床的には安定期でも気道過敏性は残存し、喘息の重症化や増悪など将来の喘息コントロール悪化と関連することが報告されている。Peak Expiratory Flow(PEF)週内変動率は気道過敏性と良好に相関することが報告されており、また喘息の悪化を予測しうるとも報告されていることから、肺機能の変動増大は増悪のリスクと考えられる。しかしどのような臨床的指標が肺機能の変動増大を予測できるかについては検討されていない。

本論文は、安定期の非喫煙喘息患者を対象とし、PEF週内変動率増大を予測しうる臨床的指標について検討した。

結果は、PEF週内変動率増大の独立した予測因子として、Asthma Control Questionnaire (ACQ)、対標準1秒量、呼気NO濃度が抽出された。ROC曲線を用いて、PEF週内変動率増大を予測するカットオフ値としてはACQでは0.4、対標準1秒量では85%、呼気NO濃度では40ppbと算出された。それぞれのカットオフ値による感度・特異度はACQでは感度96.2%、特異度58.8%、対標準1秒量では感度61.5%、特異度89.0%、呼気NO濃度では感度75.0%、特異度89.8%であった。これらの指標を組み合わせた中で、対標準1秒量 $\leq$ 85%かつ呼気NO濃度 $\geq$ 40ppbを組み合わせた指標が最も特異度が高くなった(98.4%)。対標準1秒量85%と呼気NO濃度40ppbを用いて症例を層別化すると、陽性的中率は84.6%であった。一方、対標準1秒量 $>$ 85%かつ呼気NO濃度 $<$ 40ppbを満たした場合には、陰性的中率が98.5%であった。

以上のように、本論文はACQ、対標準1秒量、呼気NO濃度を用いて、安定期喘息患者における肺機能の変動増大のリスクを層別化できることを示し、今後の喘息コントロール悪化のリスクを評価するのに有用と考えられ、学位論文として価値のあるものと認めた。