

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

令和6年4月～令和7年3月

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

目次

令和6年度（4月～3月）

| (学位記番号) | (氏名) | (論文題目) | (頁) |
|--------------|--------|---|------|
| 博(医)甲第 681 号 | 加藤 紘隆 | Histone methyltransferase SUV420H1/KMT5B contributes to poor prognosis in hepatocellular carcinoma (ヒストンメチル化酵素SUV420H1/KMT5Bの肝細胞癌における予後への関与) | … 1 |
| 博(医)甲第 682 号 | 阪中 俊博 | Double Negativity of MRI-Detected and Pathologically-Diagnosed Extramural Venous Invasion is a Favorable Prognostic Factor for Rectal Cancer (直腸癌において、MRIで検出した壁外静脈浸潤と病理学的に診断した壁外静脈浸潤が共に陰性であった場合は、予後良好因子である) | … 6 |
| 博(医)甲第 683 号 | 小浴 秀樹 | Allosteric Inhibition of c-Abl to Induce Unfolded Protein Response and Cell Death in Multiple Myeloma (c-Ablのアロステリック阻害は多発性骨髄腫において小胞体ストレス応答と細胞死を誘導する) | … 10 |
| 博(医)甲第 684 号 | 村上 恵理子 | Mannitol versus furosemide in patients with thoracic malignancies who received cisplatin-based chemotherapy using short hydration: A randomized phase II trial (ショートハイドレーション法を用いたシスプラチン併用化学療法におけるマンニトールとフロセミドに対する無作為化第II相試験) | … 12 |
| 博(医)甲第 685 号 | 柴木 亮太 | Machine learning analysis of pathological images to predict 1-year progression-free survival of immunotherapy in patients with small-cell lung cancer (小細胞肺癌患者における免疫療法の1年無増悪生存期間を予測する病理画像機械学習解析) | … 15 |
| 博(医)甲第 686 号 | 木下 淳 | Efficacy of the traction method for gastric endoscopic submucosal dissection: A randomized controlled trial (胃上皮性腫瘍に対する内視鏡的粘膜下層剥離術における牽引法の有用性に関する無作為化比較試験) | … 17 |
| 博(医)甲第 687 号 | 玉置 敦之 | Female sex and age-based advantage of simulated electric field in TMS to the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders. (統合失調症および気分障害における前頭前野へのTMSにより生じる誘導電界の女性と年齢の優位性-シミュレーション研究-) | … 20 |
| 博(医)甲第 688 号 | 江守 誠司 | C9orf72 repeat expansions in Wakayama: One potential cause of amyotrophic lateral sclerosis in the Kii Peninsula, Japan (和歌山県におけるC9orf72リピート伸長症例の検討：日本の紀伊半島における筋萎縮性側索硬化症の一因としての検討研究) | … 22 |

目 次

令和6年度（4月～3月）

| (学位記番号) | (氏 名) | (論 文 題 目) | (頁) |
|---------------|-----------------|--|------|
| 博(医)甲第 689 号 | 藤田 恭久 | Observations of cold-induced vasodilation in persons with spinal cord injuries (脊髓損傷を有する方における寒冷時皮膚血管拡張反応の観察) | … 25 |
| 博(医)甲第 690 号 | 田中 顕 | Clinicopathological analysis of CD47 and signal regulatory protein alpha expression in myeloid sarcoma patients: CD47 expression is a favourable prognostic factor. (骨髄肉腫患者組織におけるCD47およびSIRP α 発現の臨床病理学的検討: CD47発現は予後良好因子である) | … 27 |
| 博(医)甲第 691 号 | 高瀬 衣里 | A Phase II Study of High-Flow Nasal Cannula for Relieving Dyspnea in Advanced Cancer Patients. (呼吸困難を有するPS不良の進行癌患者におけるHFNCの有用性を検討する第II相試験) | … 31 |
| 博(医)甲第 692 号 | 栗本 千晶 | Generation of a mouse model of thyroid storm and preliminary investigation of the therapeutic effects of ghrelin. (甲状腺クリーゼモデル作成とグレリン臨床応用への基礎的研究) | … 33 |
| 博(医)甲第 693 号 | 山崎 博史 | Value of image enhancement of endoscopic ultrasound for diagnosis of gastrointestinal subepithelial lesions. (消化管上皮下病変の診断における超音波内視鏡の画像強調の有用性) | … 36 |
| 博(医)甲第 694 号 | 上村 和久 | Dynamics of immune cell infiltration and fibroblast-derived IL-33/ST2 axis induction in a mouse model of post-surgical lymphedema (マウス術後リンパ浮腫モデルにおける免疫細胞浸潤の動態と線維芽細胞由来IL-33/ST2軸の誘導) | … 39 |
| 博(医)甲第 695 号 | Nanushaj Denisa | Nucleic acid sensing Toll-like receptors 3 and 9 play complementary roles in the development of bacteremia after nasal colonization associated with influenza co-infection (核酸認識Toll様受容体3および9はインフルエンザ重感染に関連した鼻腔保菌後の菌血症発症過程において相補的な役割を果たす) | … 42 |
| 博(医)乙第 1049 号 | 田端 佳世子 | Up-regulation of IGF-1, RANTES and VEGF in patients with anti-centromere antibody-positive early/mild systemic sclerosis (抗セントロメア抗体陽性の早期/軽度全身性強皮症の患者におけるIGF-1、RANTES、VEGFのアップレギュレーション) | … 45 |

目 次

令和6年度（4月～3月）

| (学位記番号) | (氏 名) | (論 文 題 目) | (頁) |
|---------------|-------|---|-----|
| 博(医)乙第 1050 号 | 居平 浩延 | Impact of anticancer drugs on the therapeutic efficacy and side effects of hepatic arterial embolization for hepatocellular carcinoma （肝細胞癌に対する肝動脈化学塞栓術における抗癌剤の治療効果や副作用に及ぼす影響） | 48 |

| | | | |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号 | 博(医)甲第681号 | | |
| 学位授与の日 | 令和6年4月16日 | | |
| 氏名 | 加藤 紘隆 | | |
| 学位論文の題目 | Histone methyltransferase SUV420H1/KMT5B contributes to poor prognosis in hepatocellular carcinoma (ヒストンメチル化酵素SUV420H1/KMT5Bの肝細胞癌における予後への関与) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 井上 徳光 | |
| | 副査 | 教授 川井 学 | 教授 北野 雅之 |

論文内容の要旨

【緒言】

肝細胞癌 hepatocellular carcinoma (HCC) は根治的肝切除術後も再発率が高く、予後不良である。切除不能 HCC に対して、ソラフェニブ、レゴラフェニブ、レンパチニブおよびカボザンチニブなどのマルチキナーゼ阻害薬が適用されてきたが、その治療効果は不十分である。HCC に対する既存の分子標的薬は主にリン酸化に依存しているため、予後を改善するためには抗リン酸化とは異なる新しい経路や機構が必要である。癌細胞の進行・発育に重要な役割を果たす遺伝子発現の調節はリン酸化、メチル化、アセチル化およびユビキチン化などの翻訳後修飾 posttranslational modification (PTM) によっても影響を受ける。そこで、我々はメチル化に着目し、いくつかのヒストンメチル化酵素/脱メチル化酵素が様々な癌種において重要な役割を果たすことを報告してきた。PTM の相互作用の1つとして、我々は以前にヒストンメチル化酵素 SMYD2 による RB1 のメチル化が RB1 のリン酸化を促進し、結果として細胞周期を促進することを報告した。ヒストンメチル化は PTM の相互作用を通じてリン酸化を促進する可能性があるが、詳細な分子機構は不明であり、さらなる研究が必要である。

本研究は、ヒストン H4 リジン 20 に対するメチル化酵素である SUV420H1/KMT5B (Suppressor Of Variegation 4-20 homolog 1/Lysine methyltransferase 5B) の機能を解明することを目的とする。肝切除標本を使用した免疫組織化学染色による SUV420H1 の発現解析、*in vitro* での SUV420H1 特異的 siRNA (siSUV420H1) および *in vivo* での SUV420H1 特異的 CRISPR/Cas9 を使用した機能喪失 loss of function 解析を行った。

【方法】

患者

2000年1月から2014年12月までに和歌山県立医科大学附属病院第2外科で肝細胞癌に対して初回肝切除術を施行した350症例を対象とした。

免疫組織化学染色

抗 SUV420H1 ポリクローナル抗体を用いて肝腫瘍と背景肝を含むスライドを染色した。免疫染色スコアリングシステム immunoreactivity scoring (IRS) を使用して、染色結果を以下のように評価した。染色陽性細胞数を 0:陽性細胞なし、1:1~25%の陽性細胞、2:25~50%の陽性細胞、3:51~75%の陽性細胞、4:76~100%の陽性細胞の5段階にスケーリングし、陽性細胞の染色強度も 0:陰性、1:弱い、2:中程度、3:強い、の4段階にスケーリングした。染色陽性細胞数スコア値に染色陽性細胞強度スコア値を乗算しスコアリングした。カットオフ値を AUC 下面積が最高値となる点数に設定した。

肝細胞癌株

非 B 非 C 型肝炎ウイルス由来の肝細胞癌株 Huh-7、B 型肝炎ウイルス由来の肝細胞癌株 SNU475 および非 B 非 C 型肝炎ウイルス由来の肝細胞癌株 HepG2 を使用した。

siRNA のトランスフェクション

ヒト SUV420H1 転写産物を標的とするための siRNA オリゴヌクレオチド二本鎖 (siSUV420H1#1 と #2) とネガティブコントロールとして siRNA オリゴヌクレオチド二本鎖 (siEGFP) を合成した。リポフェクタミ

ン RNAiMAX を用いて siRNA 二重鎖(最終濃度 100nM)を肝細胞癌株にトランスフェクトした。

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

SUV420H1 に対する特異的プライマーを構築し、siRNA で処理後、肝細胞癌株から tRNA を抽出し、相補 DNA (cDNA) を構築した。フォワードプライマー、リバースプライマーおよび逆転写された cDNA を混和し、メッセンジャー-RNA (mRNA) の発現レベルを Δ CT 法にて分析した。

細胞増殖実験

肝細胞癌株をプレインキュベートした後に siRNA をトランスフェクトし、Cell Counting Kit-8 を適用した。マイクロプレートリーダーを使用して 450nm で吸光度を測定した。

免疫細胞化学染色

肝細胞癌株を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、プロテインブロックで処理し、抗 SUV420H1 ポリクローナル抗体とともに 4°C で一晩インキュベートした。肝細胞癌株を EnVision HR および Histofine DAB 基質キットで染色した。

細胞周期解析

肝細胞癌株をプレインキュベートし、無血清培地 Opti-MEM 中で siRNA を添加し、BrdU で標識した。肝細胞癌株を緩衝液で固定および透過処理し、DNase とともにインキュベートした。肝細胞癌株を FITC 結合抗 BrdU 抗体で処理して洗浄し、全 DNA を 7-ADD で染色し、FACS Calibur にて分析した。

創傷治癒解析

500±50µm のギャップを有するカルチャーインサート 2 ウェル 24 シリコンプレートでプレインキュベートし、シリコンプレートを除去し、siRNA を各ウェルに添加した。肝細胞癌株の遊走能を Digitalsight DS-L1 を使用して 6 時間毎に 48 時間記録した。ソフトウェア Fiji/ImageJ を使用してギャップ面積を測定した。

細胞浸潤解析

肝細胞癌株を CytoSelect 24 ウェル細胞浸潤アッセイキットの無血清培地 Opti-MEM を含む上部チャンバーに適用し、下部チャンバーに培地を適用した。肝細胞癌株を上部チャンバーから下部チャンバーに向かって浸潤させた。培地を廃棄し、Cell Stain Solution を上部チャンバーに添加し、染色された細胞を顕微鏡で観察した。また、抽出溶液を下部チャンバー内に加え、マイクロプレートリーダーを使用して 560 nm で吸光度を測定した。

RNA シークエンスを使用した発現変動遺伝子 DEG と GO 解析

Rneasy Micro Kit を用いて肝細胞癌株から tRNA を抽出した。TruSeq Stranded Total RNA および NovaSeq 6000 を使用してライブラリーを構築した。Cytoscape を使用して、siSUV420H1 と siEGFP の間に発現変動遺伝子 differentially expressed gene (DEG) のネットワークを構築した(カットオフ: 2 倍、 $p < 0.05$)。また、ClueGo ソフトを使用して GO 解析を施行した。

ヒト肝細胞癌ゼノグラフト

生後 6 週齢の胸腺欠損ヌードマウス (BALB/cSlc-nu/nu) を用いて動物実験を施行した。SUV420H1 CRISPR/Cas9 KO プラスミドおよび SUV420H1 HDR プラスミドを含む肝細胞癌株を増殖培地および MatriMix で懸濁した。また、コントロール CRISPR/Cas9 プラスミドを含む肝細胞癌株も同様培地および MatriMix で懸濁した。肝細胞癌株を含む懸濁液をマウスの右側背部に皮下注射した。腫瘍サイズを 7 日ごとに測定し、推定腫瘍体積を式: $(\text{幅}^2 \times \text{長さ}) / 2$ で計算した。接種後 28 日目に腫瘍を摘出し、腫瘍径を記録した。

【結果】

SUV420H1 高発現と予後不良の関連

カットオフ値に従って、350 症例を SUV420H1 高スコア群 ($\text{IRS} \geq 4; n=154$) および SUV420H1 低スコア群

(IRS \leq 3;n=196) に分類した。SUV420H1 高スコア群は、SUV420H1 低スコア群と比較して、腫瘍径が大きく、腫瘍数が多く、分化度が低く、脈管侵襲が多かった。無病生存率 (DFS) は、SUV420H1 高スコア群は SUV420H1 低スコア群よりも予後不良であり、全生存率(OS) も、SUV420H1 高スコア群は SUV420H1 低スコア群よりも予後不良であった。DFS の単変量解析では AFP>20 ng/mL、腫瘍径>5cm、多数の腫瘍、低分化、脈管侵襲陽性および SUV420H1 高スコアが予後不良因子であった。また、DFS の多変量解析では多数の腫瘍と脈管侵襲陽性が独立した因子であった。OS の単変量解析では AFP>20ng/mL、腫瘍径>5cm、多数の腫瘍、脈管侵襲陽性、術後補助ケモリビオドール治療なしおよび SUV420H1 高スコアが危険因子であった。また、OS の多変量解析では SUV420H1 高いスコアが最も重要な独立因子であった。さらに再発形式や遠隔転移パターンでは、SUV420H1 高スコア群は SUV420H1 低スコア群と比較して肝内病変個数が多く、肝外病変を有する患者数が多かった。

SUV420H1 による腫瘍増殖能、遊走能および浸潤能の調節

siRNA を肝細胞癌株 Huh-7 にトランスフェクトし、qRT-PCR を施行した。siEGFP と比較して siSUV420H1 で mRNA 発現レベルが著明に減少した。免疫細胞化学染色および細胞増殖実験でも、肝細胞癌株 Huh-7 が siEGFP と比較して siSUV420H1 で有意に減少した。肝細胞癌株 Huh-7 における細胞周期解析では、siSUV420H1 は siEGFP と比較して S 期の割合が減少し、G1 期の割合が有意に増加した。サブ G1 期と G2/M 期の割合は siSUV420H1 と siEGFP の間で有意差を認めなかった。また、肝細胞癌株 Huh-7 における創傷治癒アッセイおよび細胞浸潤アッセイでは、siSUV420H1 は siEGFP と比較してギャップ領域が有意に遅く埋まり、siSUV420H1 は siEGFP と比較して膜に浸潤した細胞数が有意に減少した。

SUV420H1 と腫瘍増殖・細胞接着シグナル経路との関連

肝細胞癌株 Huh-7 および SNU475 において RNA シークエンスおよび Gene Ontology (GO) 解析を施行した。Huh-7 では、siEGFP および siSUV420H1 のトランスフェクト細胞間で 604 個の活性制御系遺伝子と 399 個の抑制制御系遺伝子を含む合計 1003 個の発現変動遺伝子 DEG を同定した。GO 解析により、SUV420H1 は主に extracellular regulated kinase (ERK)、transforming growth factor β receptor (TGF- β receptor)、fibroblast growth factor receptor (FGFR) などの細胞増殖経路に関与することが示唆された。また、カドヘリンによる細胞接着、細胞活性、ヒストン修飾および代謝にも関与することが示唆された。SNU475 でも、siEGFP および siSUV420H1 のトランスフェクト細胞間で 472 個の活性制御系遺伝子と 327 個の抑制制御系遺伝子を含む合計 799 個の DEG を同定した。GO 解析により、SUV420H1 は extracellular regulated kinase (ERK)、fibroblast growth factor receptor (FGFR)、insulin like growth factor receptor (IGFR) などの細胞増殖経路に関与することが示唆された。また、カドヘリンによる細胞接着、細胞活性、ヒストン修飾、形態形成および感染免疫にも関与することが示唆された。

SUV420H1 高発現と E カドヘリン発現減弱の関係性

HCC 切除標本において SUV420H1 と E-カドヘリンの発現関係を評価するために免疫組織化学染色を施行した。SUV420H1 高発現標本では E-カドヘリン発現が減弱されたが、SUV420H1 低発現標本では E-カドヘリン発現が減衰されない標本もあった。

CRISPR/Cas9 による SUV420H1 ノックアウトと HCC ゼノグラフトマウスにおける腫瘍増殖抑制の関係性

肝細胞癌株 Huh-7 および HepG2 において CRISPR/Cas9 SUV420H1 KO および CRISPR/Cas9 Control を用いて無胸腺ヌードマウスに対して HCC 腫瘍の異種皮下移植実験を施行した。CRISPR/Cas9 control と比較して CRISPR/Cas9 SUV420H1 KO で腫瘍増殖は有意に抑制された。

【考察】

SUV420H1 高スコア群は SUV420H1 低スコア群と比較して、腫瘍径が大きく、多数腫瘍が多く、分化度が低く、脈管侵襲陽性が多いなど病理学的に進行した状態が多かった。さらに、SUV420H1 高スコア群は SUV420H1 低スコア群よりも DFS と OS とともに不良であった。DFS と OS に対する多変量解析では、SUV420H1 の高スコアが OS の独立した不良因子であったが DFS の不良因子ではなかった。その理由として、SUV420H1 高スコア群では肝内病変数が多く、肝外転移を認める患者が多かったため、予後不良へ関与すると思われた。

機能喪失 loss of function 解析では siSUV420H1 は細胞周期の G1 期から S 期への移行を阻害することにより肝細胞癌株の増殖を抑制した。GO 経路解析により、腫瘍の発育に必須である ERK、FGFR、TGF β 、IGFR などのリン酸化に関連する経路が明らかになった。SUV420H1 によるタンパク質のメチル化がリン酸化を介した腫瘍の進行に関連している可能性がある。さらに、siSUV420H1 により肝細胞癌株の遊走能および浸潤能を有意に抑制した。DEG では siEGFP と比較して siSUV420H1 で E-カドヘリンが有意に増加したため、E-カドヘリンは SUV420H1 によって抑制制御されている可能性がある。GO 解析により SUV420H1 には E-カドヘリンによる細胞接着に関連する経路があることも示唆された。実際、本研究では SUV420H1 を高発現する腫瘍では E-カドヘリンの発現を認めず、SUV420H1 を低発現する腫瘍には細胞膜に E-カドヘリンを発現する腫瘍も認めた。また、マウス皮下移植後の SUV420H1 高発現腫瘍(コントロール群)には E-カドヘリンの発現を認めず、SUV420H1 ノックアウト腫瘍では細胞膜に E-カドヘリンの発現を認めた。したがって、SUV420H1 は細胞の浸潤または転移に関与する可能性があると考えられた。

SUV420H1 の非ヒストン蛋白を標的とした機能や役割については、ERK 上の 302 番目および 361 番目のリジンのメチル化が報告されているのみで、未だ十分に解明されていない。SUV420H1 には他にも非ヒストン蛋白の標的があると思われるため、腫瘍増殖または浸潤・転移のメカニズムを詳細に解明する必要がある。

また、本研究では SUV420H1 ノックダウンが *in vivo* での腫瘍増殖を抑制することを実証した。SUV420H1 の過剰発現は臨床的に HCC の予後不良に関与する可能性がある。SUV420H1 を阻害すると *in vitro* と *in vivo* の両方で腫瘍の進行と浸潤を阻害できる可能性がある。したがって、将来の分子標的薬を発見のためには SUV420H1 のさらなる解析が必要である。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和6年3月12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。

肝細胞癌 hepatocellular carcinoma (HCC) は根治的肝切除術後も再発率が高く、予後不良で、HCC に対して使用されているマルチキナーゼ阻害薬の治療効果はいまだ十分とはいえない。そこで、外科学第二講座教室では HCC に対する新規分子標的治療薬の開発を目指して、ヒストン翻訳後修飾の 1 つであるヒストンメチル化の研究を行っている。本研究では、ヒストンメチル化酵素の 1 つである SUV420H1 (Suppressor Of Variegation 4-20 homolog 1) の HCC における役割を明らかにするために、肝癌患者の切除標本を使用した免疫組織化学染色による SUV420H1 の発現を評価し、さらに、肝細胞癌株 (Huh-7、SNU475 および HepG2) の SUV420H1 発現抑制株または破壊株を作成し、*in vitro* 実験および xenograft マウスを用いた *in vivo* 実験を行った。

肝切除標本を使用した免疫組織化学染色では、SUV420H1 高スコア群 (n=154) および SUV420H1 低スコア群 (n=196) に振り分けて検討を行った。SUV420H1 高スコア群は、腫瘍径が大きく、腫瘍数が多く、低分化で、脈管侵襲陽性を多く認めた。また、SUV420H1 高スコア群では無病生存率 Disease free survival (DFS) および全生存率 Overall survival (OS) がともに不良であった。DFS の多変量解析では多数の腫瘍と脈管侵襲陽性が独立したリスク因子であり、OS の多変量解析では SUV420H1 高スコア群が独立したリスク因子であった。さらに、再発や転移パターンとして SUV420H1 高スコア群は多発病変としての肝内再発や肝外への遠隔転移を多く認めた。

SUV420H1 に特異的な siRNA (siSUV420H1) とコントロール siRNA (siEGFP) を使用して、肝細胞癌の SUV420H1 発現抑制株を作成し、腫瘍増殖や脈管浸潤に着目して、SUV420H1 の機能解析を行った。リアルタイム PCR による siSUV420H1 の導入により、mRNA 発現レベルが著明に減少したことを確認した。Cell proliferation assay では、siSUV420H1 の導入により肝細胞癌株の細胞数が有意に減少し、cell cycle analysis では siSUV420H1 の導入により S 期の割合が減少し、G1 期の割合が有意に増加した。また、cell invasion assay では、siSUV420H1 の導入により、浸潤する細胞数が有意に減少した。SUV420H1 が関与する pathway を評価するために RNA シークエンスを行い、Gene Ontology (GO) 解析を行った結果、SUV420H1 は主に extracellular regulated MAP kinase (ERK)、transforming growth factor β receptor (TGF- β receptor)、fibroblast growth factor receptor (FGFR) などの細胞増殖や E-カドヘリンによる細胞接着に関与することが示唆された。

そこで、SUV420H1 と E-カドヘリンの関係を評価するために肝切除標本を用いた免疫組織化学染色を行った。SUV420H1 高スコア群標本では E-カドヘリン発現が減弱し、SUV420H1 低スコア群標本では細胞間接着部位に E-カドヘリンが局在している傾向を認めた。

さらに CRISPR/Cas9 を使用して SUV420H1 をノックアウトし、ヌードマウスに HCC 異種皮下移植実験を施行した。その結果、SUV420H1 のノックアウトにより腫瘍増殖が有意に抑制された。

本論文は臨床検体およびマウス実験を通して、SUV420H1 が HCC の腫瘍増殖や浸潤・転移に関連していることを明らかにし、HCC に対する新規分子標的治療薬のターゲットになりうることを示唆する今後の発展性が期待できることを示したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

| | | | |
|---------|---|----------|---------|
| 学位記番号 | 博(医)甲第682号 | | |
| 学位授与の日 | 令和6年6月18日 | | |
| 氏名 | 阪中 俊博 | | |
| 学位論文の題目 | Double Negativity of MRI-Detected and Pathologically-Diagnosed Extramural Venous Invasion is a Favorable Prognostic Factor for Rectal Cancer (直腸癌において、MRI で検出した壁外静脈浸潤と病理学的に診断した壁外静脈浸潤が共に陰性であった場合は、予後良好因子である) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 井上 徳光 | |
| | 副査 | 教授 北野 雅之 | 教授 川井 学 |

論文内容の要旨

【緒言】

大腸癌は本邦において、男女共に罹患率が高い悪性疾患の1つである。その中でも直腸癌は局所再発率が特に高く、予後が不良である。その為、欧米諸国では局所再発率を改善させるための術前補助化学放射線療法 (nCRT) が標準治療となっている。直腸癌において、近年、MRI 検査は術前の深達度やリンパ節転移の有無を診断する際に非常に重要な検査となっている。環状側切除断端 (CRM) や壁外静脈浸潤 (EMVI) などといったMRI所見は、予後のリスク因子として近年報告されている。また、病理学的初見にも予後と関連している因子として、腫瘍の簇出 (BD), リンパ管浸潤 (Ly), 神経浸潤 (Pn) などが報告されている。

近年、EMVI と予後との関連が注目されている。EMVI とは、固有筋層を超えた部位に存在する静脈内への悪性腫瘍細胞浸潤と定義されており、元々はMRI で指摘されていた所見であったが、最近ではこの概念が病理所見で注目されるようになった。以上のことより、EMVI にはMRI による画像所見で検出されるmrEMVI と病理学的に診断されるpEMVI の2種類に分類されている。

既報では、mrEMVI は結腸直腸癌の26-50% で陽性であったと報告されており、pEMVI は17-28% で陽性であったと報告されている。さらには、mrEMVI もしくはpEMVI が陽性であった場合、腫瘍がより進行しており、局所再発率及び遠隔転移再発率がより高くなることや、全生存率の低下を認めたとの報告もある。しかしながら、これらの報告は、mrEMVI とpEMVI をそれぞれ別々に評価された報告であった。また、既報においてmrEMVI とpEMVI を同時に評価した報告がなかったため、今回、我々は本研究において、直腸癌におけるmrEMVI とpEMVI を同時に評価し、それぞれの結果を組み合わせ、予後との関連性を評価した。

【方法】

患者

2010年1月から2018年12月までの和歌山県立医科大学附属病院において、根治切除術を行なった直腸癌患者の内、Stage IV を除いた Stage 0, I, II, III であった278人を登録した。その内、(1) 術前にMRI 検査を受けていなかった患者 (2) 病理標本が存在していなかった患者 (3) 術前に化学療法もしくは放射線療法を単独で施行された患者 (4) 重複癌を認めた患者 (5) 病理検査で扁平上皮癌もしくは神経内分泌癌と診断された患者 以上を除外症例とした。図1に示す通りに、最終的に186人がこの研究に登録された。

対象患者の年齢、性別、nCRT の有無、TNM 分類、mrEMVI の有無、pEMVI の有無、その他の病理所見 (分化度、BD, Ly, Pn) の有無、carcinoembryonic antigen (CEA), CA19-9 等と追跡データを収集し予後との関連性を検討した。

mrEMVI

MRI に関しては、1.5 テスラシステム (ACHIEVA 1.5 T, Philips Healthcare 及び Signa HDxt 1.5T, GE) 及び 3.0 テスラシステム (ACHEVA 3.0 T, Philips Healthcare) を使い、撮影法に関しては T2 強調画像と拡散強調画像 (DWI) を使用した。T2 強調画像の撮影条件は、TE/TR: 70-100 / 4000 - 6000 ms, スライス厚: 3 - 4 mm, エコートレイン長: 10 - 13, マトリックス: 352 × 277 - 448 × 336 で行なった。DWI は b0 及び b1000 で TE/TR: 60-80 / 8000 - 15000 ms, スライス厚: 3 - 5 mm, エコートレイン長: 40 - 90, マトリックス: 118 × 112 - 140 × 98 で行なった。

術前に施行した MRI 画像を 15 年以上の経験を持つ放射線科専門医と共に mrEMVI の有無を、スコアリングシステムを用い判定した。スコアリングシステムに関しては、MRI-EMVI グレーディングシステムに基づき行なった。スコア 1 もしくは 2 は陰性と判定、スコア 3 もしくは 4 は陽性と判定した。

pEMVI

当院における病理組織検査の方法としては、切除検体をまず肉眼視及び触診により、漿膜や腸間膜浸潤及びリンパ節転移の有無を確認する。肉眼的検査の後に、腫瘍から 3 cm 以内の直腸間膜を処理することなく直腸を長軸に沿って切開を行う。そのため、我々の検体処理の方法は欧米諸国で一般的とされている割礼法とほぼ同様に評価できる。この方法で作成した病理スライドは、10 年以上の経験を持つ病理専門医と共に pEMVI をはじめとし、BD, Ly や Pn といった病理因子を評価された。全ての因子はまずは H&E 染色された病理スライドで評価したが、脈管浸潤陽性を疑うものに関しては、エラスチン染色 や podoplanin 染色 (D2-40) を行なった上で評価した。

【結果】

患者背景

mrEMVI と pEMVI の陽性もしくは陰性かの判定の組み合わせにより A-D の 4 グループに分類した。グループ A は mrEMVI と pEMVI が共に陰性であった群、グループ B は mrEMVI が陽性であったが pEMVI が陰性であった群、グループ C は mrEMVI が陰性であったが pEMVI が陽性であった群、グループ D は mrEMVI と pEMVI が共に陽性であった群とした。グループ A は 121 人、グループ B は 20 人、グループ C は 20 人、グループ D は 25 人であった。それぞれのグループ内における患者背景としての年齢、性別、nCRT の有無、ステージ、CEA, CA-19-9, Ly の有無、BD, Pn の有無に関して有意差は認められなかった。**予後 (Overall survival, disease-free survival, local relapse-free survival, hematogenous distant relapse-free survival)**

1. mr-EMVI と p-EMVI をそれぞれ別々に評価した場合

mr-EMVI と予後との関係を検討したところ、mr-EMVI 陽性であった症例は陰性であった症例と比較し、OS, RFS, HD-RFS が有意に予後不良であり ($p = 0.0004, p < 0.0001, p < 0.0001$), L-RFS は予後不良な傾向を認めた ($p = 0.1548$)。

p-EMVI と予後との関係を検討したところ、p-EMVI 陽性であった症例は陰性であった症例と比較し、OS, RFS, L-RFS, HD-RFS の全てにおいて有意に予後不良であった ($p < 0.0001, p < 0.0001, p = 0.0013, p = 0.0013$)。

2. mr-EMVI と p-EMVI をそれぞれ同時に評価した場合 (グループ A-D)

mr-EMVI と p-EMVI をそれぞれ同時に評価し先程分類したグループ A-D 群での予後との関係を検討したところ、グループ A はその他のグループ群と比較し、OS, RFS, L-RFS, HD-RFS の全てにおいて有意に予後良好であった ($p < 0.0001, p < 0.0001, p = 0.0013, p < 0.0001$)。すなわち、mr-EMVI と p-EMVI が共に陰性群はその他のグループと比較した場合、有意に予後が良好であった。

単変量解析と多変量解析

1. mr-EMVI と p-EMVI をそれぞれ別々に評価した場合

OS に関しては、単変量解析では、mr-EMVI 陽性、p-EMVI 陽性、および Pn 陽性の患者は他の患者よりも OS が不良であった (HR 2.78, 95% CI 1.53 - 5.02, $p = 0.0007$; HR 3.59, 95% CI 2.00 - 6.42, $p < 0.0001$; HR 2.15, 95% CI 1.19 - 3.88, $p = 0.0107$)。多変量解析では、p-EMVI 陽性が唯一、統計学的に有意に OS 不良の因子であった (HR 2.54, 95% CI 1.26 - 5.10, $p = 0.0085$)。

RFS に関しては、単変量解析では、ステージ III, mr-EMVI 陽性、p-EMVI 陽性、および Pn 陽性の患者は他の患者よりも RFS が不良であった (HR 2.35, 95% CI 1.33 - 4.15, $p = 0.0003$; HR 3.07, 95% CI 1.74 - 5.42, $p = 0.0001$; HR 3.60, 95% CI 2.04 - 6.35, $p < 0.0001$; HR 2.79, 95% CI 1.59 - 4.90, $p = 0.0003$)。多変量解析では、これらの因子は RFS 不良の傾向があったが、統計的に有意な差は認めなかった。

L-RFS に関しては、単変量解析では、p-EMVI 陽性および Pn 陽性の患者は他の患者よりも L-RFS が不良であった (HR 3.24, 95% CI 1.51 - 6.94, $p = 0.0024$; HR 2.78, 95% CI 1.30 - 5.92, $p = 0.0081$)。多変量解析では、p-EMVI 陽性が唯一、統計学的に有意に L-RFS 不良の因子であった (HR 2.44, 95% CI 1.05 - 5.67, $p = 0.0377$)。

HD-RFS に関しては、単変量解析ではステージ III, mr-EMVI 陽性, p-EMVI 陽性, および Pn 陽性の患者は他の患者よりも HD-RFS が不良であった (HR 4.52, 95% CI 2.00 - 10.2, $p = 0.0003$; HR 4.17, 95% CI 2.01-8.66, $p = 0.0001$; HR 3.21, 95% CI 1.50-6.51, $p = 0.0023$; HR 3.11, 95% CI 1.50-6.47, $p = 0.0023$). 多変量解析では、ステージ III と mr-EMVI 陽性が有意な HD-RFS 不良の因子であった (HR 2.93, 95% CI 1.20 - 7.19, $p = 0.0183$; HR 2.76, 95% CI 1.21 - 6.25, $p = 0.0150$).

2. mr-MEVI と p-EMVI をそれぞれ同時に評価した場合 (グループ A-D)

OS に関しては、単変量解析では、グループ B-D 群, および Pn 陽性の患者は他の患者よりも OS が不良であった (HR 3.61, 95% CI 1.99 - 5.6, $p < 0.0001$; HR 2.15, 95% CI 1.19 - 3.88, $p = 0.0107$). 多変量解析では、グループ B-D 群が唯一、統計学的に有意に OS 不良の因子であった (HR 3.23, 95% CI 1.71 - 6.06, $p = 0.0003$).

RFS に関しては、単変量解析では、ステージ III, グループ B-D 群, および Pn 陽性の患者は他の患者よりも RFS が不良であった (HR 2.35, 95% CI 1.33 - 4.15, $p = 0.0030$; HR 4.39, 95% CI 2.45 - 7.88, $p < 0.0001$; HR 2.79, 95% CI 1.59 - 4.90, $p = 0.0003$). 多変量解析では、グループ B-D 群が唯一、統計学的に有意に RFS 不良の因子であった (HR 3.41, 95% CI 1.79 - 6.46, $p = 0.0002$).

L-RFS に関しては、単変量解析では、グループ B-D 群および Pn 陽性の患者は他の患者よりも L-RFS が不良であった (HR 3.30, 95% CI 1.52 - 7.12, $p = 0.0023$; HR 2.78, 95% CI 1.30 - 5.92, $p = 0.0081$). 多変量解析では、グループ B-D 群が唯一、統計学的に有意に L-RFS 不良の因子であった (HR 2.63, 95% CI 1.15 - 5.99, $p = 0.0212$).

HD-RFS に関しては、単変量解析ではステージ III, グループ B-D 群, および Pn 陽性の患者は他の患者よりも HD-RFS が不良であった (HR 4.52, 95% CI 2.00 - 10.2, $p = 0.0003$; HR 4.30, 95% CI 2.00 - 8.28, $p = 0.0002$; HR 3.11, 95% CI 1.50 - 6.47, $p = 0.0023$). 多変量解析では、ステージ III と グループ B-D 群が有意な HD-RFS 不良の因子であった (HR 2.86, 95% CI 1.18 - 6.96, $p = 0.0198$; HR 2.72, 95% CI 1.18 - 6.25, $p = 0.0177$).

【考 察】

mr-EMVI と p-EMVI の特徴として、それぞれの陽性率に関しては、mr-EMVI の陽性率が p-EMVI の陽性率よりも一般的に高いと報告されている。その理由として、MRI 検査は腫瘍全体を連続データとして評価できる利点があるが、5mm 以下、特に 3mm 以下の小さな病変の評価は困難である。そのため、直接腫瘍浸潤、Pn, Ly などの比較的大きな病変は、MRI 検査で過大評価され、mr-EMVI 陽性と診断される可能性がある。一方、病理検査では腫瘍全体の評価は作製した標本でしか評価できないため困難であるが、小さな病変であっても各種免疫組織化学染色を行うことで真の EMVI を診断することが可能である。したがって、p-EMVI と直接腫瘍浸潤、Pn, または Ly を区別することが可能である。これらが mr-EMVI の陽性率が p-EMVI の陽性率よりも高い理由と考えられる。今回の研究では、上記の mr-EMVI と p-EMVI のそれぞれの利点を活かし、それぞれの欠点を補うために、mr-EMVI と p-EMVI を同時に評価した。

本研究の結果より、mr-EMVI と p-EMVI を別々に評価した場合は、既報と同様に、mr-EMVI 陽性と p-EMVI 陽性の両方が予後不良であることが示されました。さらに、OS と L-RFS に関しては、p-EMVI 陽性は多変量解析において独立した予後不良因子であった。さらに、HD-RFS の場合、mr-EMVI 陽性は多変量解析において独立した予後不良因子であった。一方、RFS と HD-RFS に関しては、p-EMVI 陽性は多変量解析において有意差は示されなかったが、予後不良の傾向が見られた。OS と RFS に関しては、mr-EMVI 陽性は多変量解析で有意差を示さなかったが、予後不良の傾向があった。

mr-EMVI と p-EMVI を同時に評価した場合、mr-EMVI と p-EMVI が両方とも陰性である場合を真の EMVI 陰性と考えた。mr-EMVI と p-EMVI のそれぞれの短所と長所を考慮し、どちらか一方でも陽性であれば、EMVI は陽性であると考えべきと考える。したがって、mr-EMVI と p-EMVI のどちらも陰性であることを 1 つの因子として考慮した場合、多変量解析では、mr-EMVI と p-EMVI の両方が陰性であることが OS、RFS、L-RFS、HD-RFS の全てにおいて統計学的に予後良好因子であることがわかった。

結論として、mr-EMVI と p-EMVI 同時に評価し組み合わせによる分析によって術後予後を判定できることが示唆された。本研究は後ろ向き研究のため今後、前向き研究を行い更なるデータ収集と、EMVI による予後予測を確立していきたい。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和6年5月30日，論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。

大腸癌は本邦において，男女共に罹患率が高い悪性疾患の1つである．その中でも直腸癌は局所再発率が特に高く，予後が不良である．その為，欧米諸国では局所再発率を改善させるための術前補助化学放射線療法（nCRT）が標準治療となっている．直腸癌において，近年，MRI検査は術前の深達度やリンパ節転移の有無を診断する際に非常に重要な検査となっている．環状側切除断端（CRM）や壁外静脈浸潤（EMVI）などといったMRI所見は，予後のリスク因子として近年報告されている．また，病理学的初見にも予後と関連している因子として，腫瘍の簇出（BD），リンパ管浸潤（Ly），神経浸潤（Pn）などが報告されている．

近年，EMVIと予後との関連が注目されている．EMVIとは，固有筋層を超えた部位に存在する静脈内への悪性腫瘍細胞浸潤と定義されており，元々はMRIで指摘されていた所見であったが，最近ではこの概念が病理所見で注目されるようになってきている．以上のことより，EMVIにはMRIによる画像所見で検出されるmrEMVIと病理学的に診断されるpEMVIの2種類に分類されている．

既報では，mrEMVIは結腸直腸癌の26-50%で陽性であったと報告されており，pEMVIは17-28%で陽性であったと報告されている．さらには，mrEMVIもしくはpEMVIが陽性であった場合，腫瘍がより進行しており，局所再発率及び遠隔転移再発率がより高くなることや，全生存率の低下を認めたとの報告もある．しかしながら，これらの報告は，mrEMVIとpEMVIをそれぞれ別々に評価された報告であった．また，既報においてmrEMVIとpEMVIを同時に評価した報告がなかったため，今回，我々は本研究において，直腸癌におけるmrEMVIとpEMVIを同時に評価し，それぞれの結果を組み合わせ，予後との関連性を評価した．

結果に関しては，(1)mrEMVIとpEMVIを別々に評価した場合，mrEMVI陽性であった症例は陰性であった症例と比較し，OS，RFS，HD-RFSが有意に予後不良であり（ $p=0.0004$ ， $p<0.0001$ ， $p<0.0001$ ），L-RFSは予後不良な傾向を認めた（ $p=0.1548$ ）．さらには，p-EMVI陽性であった症例は陰性であった症例と比較し，OS，RFS，L-RFS，HD-RFSの全てにおいて有意に予後不良であった（ $p<0.0001$ ， $p<0.0001$ ， $p=0.0013$ ， $p=0.0013$ ）．これらに関しては既報の報告と同様の結果であった．そこで，(2)mrEMVIとpEMVIを同時に評価した場合，mr-EMVIとp-EMVIが共に陰性であった群はその他のグループ群と比較し，OS，RFS，L-RFS，HD-RFSの全てにおいて有意に予後良好であった（ $p<0.0001$ ， $p<0.0001$ ， $p=0.0013$ ， $p<0.0001$ ）．

さらに，単変量解析と多変量解析を行ったところ，mrEMVIとpEMVIを同時に評価し組み合わせを行い共に陰性であったグループは，OS，RFS，L-RFS，HD-RFSの全てにおいて，独立した予後良好因子であった．すなわちmrEMVIもしくはpEMVIのどちらか一方が陽性であるもしくは共に陽性であることは有意な予後不良因子であったことが示された．

以上により，本論文の検討の結果，これまでのようにmrEMVIとp-EMVIを別々に評価することよりも同時に評価し組み合わせを行うことで，以前よりもさらに正確に術後予後を判定できる可能性が示唆され，学位論文として価値あるものと認めた．

| | | | |
|---------|--|----------|----------|
| 学位記番号 | 博(医)甲第683号 | | |
| 学位授与の日 | 令和6年9月24日 | | |
| 氏名 | 小浴 秀樹 | | |
| 学位論文の題目 | Allosteric Inhibition of c-Abl to Induce Unfolded Protein Response and Cell Death in Multiple Myeloma (c-Abl のアロステリック阻害は多発性骨髄腫において小胞体ストレス応答と細胞死を誘導する) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 藤井 隆夫 | |
| | 副査 | 教授 改正 恒康 | 教授 園木 孝志 |

論文内容の要旨

【緒言】

多発性骨髄腫は、新規薬剤開発により治療成績が向上したが、依然完治を望めない疾患である。骨髄腫細胞は過剰な免疫グロブリン蛋白産生による慢性的な小胞体ストレスに曝されており、小胞体ストレスを回避し腫瘍の生存や増殖を促すため小胞体ストレス応答 (unfolded protein response; UPR) が活性化している。活性化したUPRを標的とした骨髄腫治療薬の開発が注目されているが、臨床応用には至っていない。本研究では、アロステリック ABL 阻害剤の抗骨髄腫作用をUPR活性化の観点から検討し、UPRを標的とした新規骨髄腫治療開発の可能性を模索した。

【方法】

患者由来骨髄腫細胞は、当科で新規に多発性骨髄腫と診断した患者6名の診断時の骨髄液からCD138 マイクロビーズを用いて純化したCD138陽性細胞を使用し、ヒト骨髄腫細胞株はKMS-12-PE、KMS-11、KMS-11/BTZ、IM-9を使用した。アロステリック ABL 阻害剤として、GNF-2及びAsciminibを使用した。骨髄腫細胞の生存率やアポトーシスはMTSアッセイやフローサイトメトリー法等を用いて、遺伝子発現量変化は定量RT-PCR法やRNAシーケンス法を用いて評価した。蛋白発現はウエスタンブロット法を、c-Ablの局在は免疫細胞化学染色を用いて検討した。

【結果】

患者由来骨髄腫細胞及び骨髄腫細胞株において、GNF-2及びAsciminibは、小胞体ストレスセンサーIRE1 α 活性化の特異的指標でadaptive UPR (A-UPR)のマーカーである*XBPI* mRNAのスプライシングを亢進し、アポトーシスを誘導した。RNAシーケンスにより、Asciminibを投与した骨髄腫細胞株KMS-12-PEではUPR及びアポトーシスに関連する遺伝子群の発現変動が上位に位置することが判明し、定量RT-PCR法でもUPR関連遺伝子の発現亢進を確認できた。特に小胞体ストレスセンサーPERKの下流でterminal UPR (T-UPR)及びアポトーシスに関与する*CHOP*遺伝子の発現量は著明に増加していた。c-Ablを強制発現したHEK293T細胞において、Asciminibはc-Ablの小胞体への局在変化を誘導し、UPR活性化との関連が示唆された。AsciminibとIRE1 α 特異的阻害剤KIRA8の併用により、*XBPI* mRNAのスプライシングが阻害され、*CHOP*遺伝子の発現と細胞死が増強した。

【考察】

アロステリック ABL 阻害剤がc-Ablの小胞体への局在変化とT-UPR活性化を誘導し、多発性骨髄腫の新規治療薬となる可能性を示した。さらにAsciminibとKIRA8の併用がA-UPRとT-UPRのバランスを変化させることで抗骨髄腫効果を増強することを示し、UPRを標的とした多発性骨髄腫の新たな治療モデルとなる可能性を示した。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和6年1月5日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

審査の結果、本論文は、アロステリック ABL 阻害剤が T-UPR 活性化という機序で多発性骨髄腫の新規治療薬となり得ること、さらに Asciminib と KIRAS の併用が A-UPR と T-UPR のバランスを変化させ抗骨髄腫効果を増強することを示したことで、UPR を標的とした多発性骨髄腫の新たな治療モデルとなる可能性を提唱したものであり、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684号 | | |
| 学位授与の日 | 令和6年9月24日 | | |
| 氏名 | 村上 恵理子 | | |
| 学位論文の題目 | Mannitol versus furosemide in patients with thoracic malignancies who received cisplatin-based chemotherapy using short hydration: A randomized phase II trial (ショートハイドレーション法を用いたシスプラチン併用化学療法におけるマンニトールとフロセミドに対する無作為化第II相試験) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 北野 雅之 | |
| | 副査 | 教授 川井 学 | 教授 山本 信之 |

論文内容の要旨

【背景】

シスプラチンは強力な抗腫瘍効果を有する白金製剤であり、多くの癌薬物療法において重要な薬剤であるが、強い腎毒性が問題となる。動物モデルにおいて、シスプラチンの投与前後に大量補液および強制利尿を行うことで急性腎障害を回避できるという報告がなされ、臨床応用されてきた。

長時間の大量補液は、患者の QOL を低下させる要因になっていたが、National Comprehensive Cancer Network (NCCN) の化学療法オーダーテンプレートで少量かつ短時間の補液法（ショートハイドレーション法）が推奨されるようになり、本邦でも前向き研究で有用性・安全性が示され手引きも作成されるなど、普及が進んでいる。

強制利尿について、シスプラチンの添付文書では利尿剤としてマンニトールとフロセミドが挙げられている。NCCN の化学療法オーダーテンプレートではマンニトールが唯一推奨されている薬剤であるが、その浸透圧の高さから静脈炎を起こしやすい薬剤であり、患者の QOL を損なうことがある。一方、フロセミドもその簡便性から実臨床では広く使用されているが、両薬剤を前向きに比較検討した試験はいずれも小規模であり、十分な結論は得られていない。

【目的】

ショートハイドレーション法を用いたシスプラチン併用化学療法を行う胸部悪性腫瘍患者における腎毒性抑制効果について、フロセミドのマンニトールに対する非劣性をランダム化非盲検比較試験で明らかにすることを目的とした。

【方法】

シスプラチン ($\geq 60\text{mg}/\text{m}^2$) の投与を予定している胸部悪性腫瘍患者 (Performance Status : 0-1) を 20%マンニトール 300mL を投与する群 (A 群) とフロセミド 20mg を投与する群 (B 群) に 1:1 にランダム割付した。主要評価項目は、1 コース目におけるグレード 1 以上のクレアチニン増加の割合 (Common Terminology Criteria for Adverse Events: CTCAE ver. 4.0, 施設基準値上限をもとに評価) とした。副次評価項目は、1 コース目におけるグレード 2 以上のクレアチニン増加の割合、4 コース終了時におけるグレード 1 以上のクレアチニン増加の割合、試験期間中に静脈炎を認めた患者の割合とした。

ショートハイドレーション法の忍容性に関する先行研究の結果から、1 コース目におけるグレード 1 以上のクレアチニン増加の割合を 10%と仮定し、非劣性マージンを 10%とした。非劣性デザインのもとで、 $\alpha=0.2$, $1-\beta \geq 0.8$ とした時、必要最小症例数は 1 群あたり 51 例 (合計 102) となる。10%程度の脱落を想定して目標登録症例数を 115 例と設定した。

【結果】

2018 年 4 月から 2022 年 3 月にかけて 115 例が登録され、110 例が試験治療を受けた (A 群 : 54 例, B 群 : 56 例。有効性解析集団は A 群 : 52 例, B 群 : 54 例)。患者背景は両群ともに男性が 75%を占め、年齢の中央値は両群ともに 66.5 歳であった。組織型、病期、ベースラインの血清クレアチニン値

とクレアチニン・クリアランス、シスプラチンの投与量など、患者背景は両群で同等であった。1 コース目におけるグレード1以上のクレアチニン増加の割合は、A群で17.3% (95%信頼区間:7.0-27.6), B群で24.1% (95%信頼区間:12.7-35.5), 非劣性検定で $p = 0.34$ と主要評価項目は達成されなかった。4 コース終了時におけるグレード1以上のクレアチニン増加の割合は、A群、B群それぞれ23.1%, 31.5%であった。CTCAE のグレードに基づく評価では、定性的な評価のみとなることから、試験治療期間における血清クレアチニン値とクレアチニン・クリアランスの中央値の変化を検討したところ、両群でほぼ同等であった。静脈炎はA群で28.8%, B群で16.7%と有意差は認めなかったものの、A群で多い傾向を認めた。その他の有害事象は、いずれも両群で有意差を認めなかった。

【考察】

本研究は、フロセミドとマンニトールに対する、世界で初めての100例以上の大規模な前向きランダム化比較試験である。マンニトールに対するフロセミドの非劣性は示されなかったが、治療期間中の血清クレアチニン値とクレアチニン・クリアランスの変化は両群で同等であり、CTCAE のグレードに基づく評価は実際の腎機能の変化を反映していない可能性が考えられた。

【結語】

本試験の結果から、CTCAE のグレード評価に基づく、シスプラチン併用化学療法における標準的な利尿薬は依然マンニトールであるといえる。しかし、実際のクレアチニン値やクレアチニン・クリアランスの変化に基づいて評価した場合、静脈炎や利便性の観点からフロセミドも選択肢の1つになりうる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和6年4月24日、25日、30日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

本研究の意義：

シスプラチン (CDDP) は強力な抗腫瘍効果を有するが、強い腎毒性が問題となる。CDDP の急性腎障害を回避する方法の1つとして、強制利尿がある。NCCN ガイドラインではマンニトールが唯一推奨されている薬剤であるが、静脈炎を起こしやすく患者の QOL を損なうことがある。一方、フロセミドも実臨床では広く使用されているが、両薬剤を前向きに比較検討した試験はいずれも小規模であり、十分な結論は得られていない。そこで、本研究では、ショートハイドレーション法 (SH 法) を用いた CDDP 併用化学療法を行う胸部悪性腫瘍患者における腎毒性抑制効果について、フロセミドのマンニトールに対する非劣性をランダム化非盲検比較試験で明らかにすることを目的とした。

本研究の方法：

CDDP ($\geq 60\text{mg}/\text{m}^2$) の投与を予定している胸部悪性腫瘍患者をマンニトール群 (A群) とフロセミド群 (B群) に1:1にランダム割付した。主要評価項目は、1 コース目におけるグレード1以上のクレアチニン (Cr) 増加の割合とした。副次評価項目は、1 コース目および4 コース終了時におけるCr増加の割合、試験期間中に静脈炎を認めた患者の割合とした。

本研究の結果：

2018年4月から2022年3月にかけて115例が登録され、有効性解析集団はA群:52例、B群:54例であった。患者背景は両群で同等であった。1 コース目におけるグレード1以上のCr増加の割合は、A群で17.3%, B群で24.1%, 非劣性検定で $p = 0.34$ と主要評価項目は達成されなかった。4 コース終了時におけるグレード1以上のCr増加の割合は、A群、B群それぞれ23.1%, 31.5%であった。CTCAE のグレードに基づく評価では、定性的な評価のみとなることから、試験治療期間における血清Cr値とクレアチニン・クリアランス (Ccr) の中央値の変化を検討したところ、両群でほぼ同等であった。静脈炎はA群で28.8%, B群で16.7%と有意差は認めなかったものの、A群で多い傾向を認めた。その他の有害事象は、いずれも両群で有意差を認めなかった。

審査結果：

本研究は、フロセミドとマンニトールに対する、世界で初めての 100 例以上の大規模な前向きランダム化比較試験である。マンニトールに対するフロセミドの非劣性は示されず、本研究の結果から標準的な利尿薬は依然マンニトールであるといえる。しかし、治療期間中の血清 Cr 値と Ccr の変化は両群で同等であり、静脈炎や利便性を考慮した際にフロセミドも選択肢になり得ると考えられる。以上より、本研究の記載論文は、博士学位論文として価値あるものと判断した。

| | | | |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号 | 博(医)甲第685号 | | |
| 学位授与の日 | 令和6年9月24日 | | |
| 氏名 | 柴木 亮太 | | |
| 学位論文の題目 | Machine learning analysis of pathological images to predict 1-year progression-free survival of immunotherapy in patients with small-cell lung cancer (小細胞肺癌患者における免疫療法の1年無増悪生存期間を予測する病理画像機械学習解析) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 川井 学 | |
| | 副査 | 教授 北野 雅之 | 教授 山本 信之 |

論文内容の要旨

【背景】

化学療法と免疫療法の併用療法（化学免疫療法）が、進展型小細胞肺癌の初回治療として推奨されているが、免疫療法の長期効果にもかかわらず、1年無増悪生存が達成されるのは患者の10-20%である。このような状況の中で、免疫療法の効果を予測するバイオマーカーの開発が求められているが、小細胞肺癌に対する決定的なバイオマーカーは未だ確立されていない。近年、腫瘍免疫微小環境が、免疫治療のバイオマーカーとして注目されているが、さまざまな炎症細胞と腫瘍細胞との位置関係を客観的に評価することは人間には困難である。この問題に対して、機械学習により、空間情報を客観的に評価することにより、精度を向上することが期待されている。そこで我々は、質の高い患者情報が収集されている前向きコホート研究を通じて、進展型小細胞肺癌患者の免疫療法の効果を予測するバイオマーカーの開発の実現可能性を探索することを目指した。

【目的】

病理画像を使用した腫瘍免疫微小環境の評価を機械学習解析により、進展型小細胞肺癌症例の前向きコホートにおける免疫療法の1年無増悪生存を予測するバイオマーカー開発の実現可能性を検証することを目的とした。

【方法】

本研究は、2019年から2020年の間に初回治療としてカルボプラチン/エトポシド/アテゾリズマブを受けた進展型小細胞肺癌を対象とし、32施設が参加した前向きコホート研究データを使用した。肺生検組織が使用可能な症例が登録され、HE染色、PD-L1染色、および多重免疫蛍光（CD8&Foxp3）染色標本作製した。HE染色に対して、腫瘍アノテーションを病理医により手動で実施した。機械学習を実行するため、病理画像を128ピクセルのパッチに分割した。患者情報と3種類の病理画像を用いて、365日無増悪生存の達成を予測する機械学習アルゴリズムを訓練し、患者情報モデル、病理画像モデル、および混合モデルを開発した。本研究において、画像認識タスクに広く使用されているEfficientNetモデルとLightGBMを使用した。主要評価項目は開発したモデルのAUCとして、AUCが0.7以上を十分な精度を有すると判断した。予測モデルを用いて、高または低効果群に分類し、それぞれの無増悪生存期間曲線を比較した。

【結果】

78人から得られた100,544の病理画像パッチを使用した。患者背景モデルでは平均AUCが0.789（範囲0.571-0.982）、病理画像モデルでは0.782（範囲0.750-0.911）、組み合わせモデルでは0.868（範囲0.786-0.929）であった。予測モデルによる分類では、高効果群は、低効果群と比較して、PFSが延長していた（患者背景モデル：中央値182日 vs 126日 ハザード比（HR）0.468、病理画像モデル：中央値224日 vs 140日 HR 0.334、組み合わせモデル：中央値182日 vs 133日 HR 0.353）。

【結語】

病理画像を用いた腫瘍免疫微小環境に対する機械学習解析は、免疫治療の効果を高い精度で予測することができた。腫瘍免疫微小環境の客観的な空間解析は、免疫治療効果の予測バイオ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）

令和6年6月24日,25日,26日に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。本研究は、世界で初めて病理画像の機械学習解析により、進展型小細胞肺癌に対する免疫治療の有望なバイオマーカーを開発した研究である。また、本研究は、腫瘍免疫微小環境の客観的な空間解析が、免疫治療効果の予測バイオマーカーとなる可能性を示唆した。以上より、本研究の記載論文は、博士学位論文として価値あるものと判断した。

| | | | |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号 | 博(医)甲第686号 | | |
| 学位授与の日 | 令和6年9月24日 | | |
| 氏名 | 木下 淳 | | |
| 学位論文の題目 | Efficacy of the traction method for gastric endoscopic submucosal dissection: A randomized controlled trial (胃上皮性腫瘍に対する内視鏡的粘膜下層剥離術における牽引法の有用性に関する無作為化比較試験) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 川井 学 | |
| | 副査 | 教授 園村 哲郎 | 教授 北野 雅之 |

論文内容の要旨

【緒言】

内視鏡的粘膜下層剥離術(Endoscopic Submucosal Dissection: ESD)は、消化管の表在型腫瘍を一括切除できる先進的な手技であり低侵襲で良好な治療成績を残している。その一方で胃 ESD はまだ技術的に煩雑で治療時間が長いことが欠点で、この技術的難易度を改善するため様々なトラクションデバイスが開発されたが治療時間の短縮効果は依然として不明である。胃 ESD では切除すべき粘膜下層を描出することが難しい場合があり、腫瘍の位置は治療時間の延長と技術的難易度に関する重要な要素である。例えば胃体上中部大弯病変では切除中の病変の自重によるカウンタートラクションが得られないため切除すべき粘膜下層が虚脱し、病変自体も容易に水没しうる。糸付きクリップを用いた牽引法による無作為化比較試験では全患者での治療時間は短縮しなかったが、体上中部大弯病変の治療時間が優位に短縮した。これは噴門を介した垂直方向への牽引が有効であった可能性がある。エンドトラックは先端が長さの調整できるナイロン糸とプラスチックのシースで構成されており、切開縁を押し引きすることで状況に応じた適切な張力を維持できる牽引デバイスである。胃 ESD におけるエンドトラックの有用性に関しては、後ろ向き試験、無作為化比較試験の報告はまだ無い。本研究は表在型胃上皮性腫瘍を有する患者に対してエンドトラックを用いた牽引補助 ESD の有用性を従来の非牽引による ESD と比較検証することを目的とした。エンドトラックにより治療時間の短縮や合併症頻度の低下が示されれば、患者の身体的負担軽減や、現在のところ胃 ESD を行なえる施設は限られているが国内外において広く普及することにつながることを期待できる。

【方法】

和歌山県立医科大学附属病院と和歌山ろうさい病院の2施設で胃 ESD におけるエンドトラックを用いた牽引法と従来の非牽引法で行う2群での無作為化比較試験を行った。主要評価項目は治療時間(局注開始から剥離終了まで)、副次評価項目は術者(trainee or expert)、病変の大きさ(≤ 20 or >20 mm)、病変の部位、施設間(low volume center or high volume center)による治療時間、エンドトラック装着時間、使用本数、再取り付けの本数、別治療への conversion 率、病理学的評価(一括切除率、R0 切除率、治癒切除率、深達度、標本と腫瘍のサイズ、組織型、潰瘍所見、標本損傷率)、有害事象とした。選択基準は20歳以上の症例、胃癌に対するESD/EMRガイドラインに準じたリンパ節転移の可能性の低い胃上皮性腫瘍病変、Performance status 0-2の症例、試験参加について十分な理解の上患者本人の同意が得られた症例とした。除外基準は、術前精査で粘膜下層深部浸潤が疑われる病変、術前に胃上皮性腫瘍以外の病理的診断をされている病変、全体像を確認できない病変、胃食道接合部や幽門輪にかかる病変、2箇所以上の胃 ESD 適応病変を同日に切除する症例、術後胃の症例、出血傾向のある症例、抗血小板薬を2剤以上もしくは抗凝固薬を内服中の症例、他臓器に重篤な合併症を有する症例、妊娠中の症例、研究責任医師又は研究分担医師が本試験の対象として不適格と判断した症例とした。症例の2群への割付は大学病院医療情報ネットワークセンターのクラウド型臨床・疫学研究症例登録・割付システムを用い、割付調整因子を①ESD術者(trainee/expert)、②腫瘍径(≤ 20 / >20 mm)、③施設(high volume center/low volume center)、④病変部位(upper or middle third/lower third of the stomach)の4因子とする最小化法を用いた。プロトコル治療中の観察・経過項目はあらかじめ

決めたスケジュールに従い、それらの内容を症例記録に記載した。Suzuki らの単施設の後ろ向き解析では、胃 ESD 症例を糸付きクリップ牽引群、非牽引群で 53 例と 185 例を 43 例ずつに背景因子をそろえてプロペンシティスコアマッチングされ、糸付きクリップ群で有意に処置時間が短縮したと報告している(82.2±79.5 vs 118.2±71.6 分、 $p=0.002$)。そのデータを基に必要症例数を算出した結果、142 例(有意水準 0.05、検出力 80%)となり、5%の脱落を見込んで必要症例数を 150 例と設定した。連続変数は平均±標準偏差(95%信頼区間)として報告されスチューデントの t 検定を使用して比較、カテゴリ変数は数値(パーセンテージ [95% CI])として報告されカイ二乗検定を使用して比較した。すべての統計解析は R software (version 4.2.2; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)を使用し、 $P \text{ value} < 0.05$ を統計的に有意とした。

【結果】

2021 年 7 月から 2023 年 5 月までに 150 例の患者が登録された。75 例ずつが 2 群に振り分けられ、牽引群の 2 例が解析から除外された(1 例は参加同意を撤回、もう 1 例は病変が同定できず治療中止)ため最終 148 例が解析された。背景因子は 2 群で有意差を認めなかった。従来群と牽引群の治療時間は同等であった(88.3 分 vs 78.9 分; $p=0.3$)が、胃体上中部の小弯で、牽引群の治療時間は短くなる傾向があった(84.6 分 vs 123.2 分; $p=0.057$)。一括切除率(従来群 75 例 100% vs 牽引群 73 例 100%)などの治療結果や後出血(従来群 2 例 2.7% vs 牽引群 2 例 2.7%; $P > 0.999$)や穿孔(従来群 2 例 2.7% vs 牽引群 0 例 0%; $P=0.488$)などの有害事象に有意差はなかった。従来群の 2 人で穿孔、各群 1 人ずつ後出血を認め、いずれも保存的加療で改善した。牽引群で病変へ近接困難の理由で、2 例で trainee から expert に交代を要した。1 例は体下部前壁の病変(trainee の治療時間 191 分、expert の治療時間 27 分;計 218 分)でもう 1 例は体中部小弯の病変(trainee の治療時間 143 分、expert の治療時間 8 分;計 151 分)であった。従来群の 2 例で、強い呼吸性変動から近接でのアプローチが困難であり牽引法への conversion を必要とした。エンドトラック装着に要した時間は 3.33 ± 1.78 分であった。

【考察】

全体における従来群と牽引群の治療時間は同等であり(88.3 分 vs 78.9 分; $p=0.3$)、治療結果や有害事象にも有意差はなかった。ただし胃体上中部小弯病変で、牽引群の治療時間が短くなる傾向があった(84.6 分 vs 123.2 分; $p=0.057$)。反転したスコープで繊細な操作を要するため胃体下部よりも胃体上中部の領域は ESD が困難とされ、本研究の結果は、エンドトラックがそのような困難な病変に対して有効と示した。エンドトラックはシースを有していることから治療中に切開縁を押し引きすることができ、状況に応じた適切な張力を切除すべき粘膜下層に対して維持できることが治療時間短縮に有効であったと考えられる。その他の部位では治療時間は短縮しなかった。胃体下部のようなスコープが順方向でアプローチでき難易度が低いとされる部位では牽引法は必ずしも必要でない可能性がある。従来群の 2 例で強い呼吸性変動から安定した近接でのアプローチが困難であり牽引法への conversion を必要とした。従ってエンドトラックによる牽引はそのような困難な状況でより効果的な可能性がある。糸付きクリップ法による胃 ESD における無作為化比較試験では全患者での治療時間は短縮せず、体上中部大弯領域でのみ治療時間が短縮し、これは噴門方向への垂直な牽引が有効であったと考えられる。糸付きクリップは糸の性質上、口側方向への一方向への牽引となり時には過剰な牽引により切除すべき粘膜下層が虚脱しうる。エンドトラックは体外のシースを押し引きすることで口側のみならず肛門側へのトラクションを与える。その結果、過牽引を避けた上で切除すべき粘膜下層が虚脱しないように垂直なトラクションを提供できる。本研究では体上中部小弯領域で治療時間が短縮したものの、同じく困難部位とされる体上中部大弯領域では短縮しなかった。これは体上中部大弯領域の n 数が 2 群全体で 7 例と少なかったことにより有意差に結び付かなかった可能性がある。

【結論】

エンドトラックによる牽引補助 ESD は胃体上中部小弯病変で治療時間を短縮する傾向があった。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和6年7月19日、7月22日に論文審査委員は学位申請者の出席を求め上記論文の審査を行った。

内視鏡的粘膜下層剥離術 (Endoscopic Submucosal Dissection: ESD) は、消化管の表在型腫瘍を一括切除できる先進的な手技であり低侵襲で良好な治療成績を残している。その一方で胃 ESD はまだ技術的に煩雑で治療時間が長いことが欠点であり、この技術的難易度を改善するため様々なトラクションデバイスが開発されたが治療時間の短縮効果は依然として不明である。

エンドトラックは先端が長さの調整できるナイロン糸とプラスチックのシースで構成されており、切開縁を押し引きすることで状況に応じた適切な張力を維持できる牽引デバイスである。本研究は表在型胃上皮性腫瘍を有する患者に対してエンドトラックを用いた牽引補助 ESD の有用性を従来の非牽引の ESD と比較検証することを目的とした。2 施設で従来群と牽引群の 2 群での無作為化比較試験を行い、主要評価項目は治療時間(局注開始から剥離終了まで)とした。

2021 年 7 月から 2023 年 5 月までに 150 例の患者が登録された。75 例ずつが 2 群に振り分けられ、牽引群の 2 例が解析から除外されたため最終 148 例が解析された。年齢、性別、Performance status 等の背景因子は 2 群で有意差を認めなかった。従来群と牽引群の全患者での治療時間は同等であった (88.3 分 vs 78.9 分 ; $p = 0.3$)。ただし胃体上中部の小弯病変で、牽引群の治療時間が短くなる傾向があった (123.2 分 vs 84.6 分 ; $p = 0.057$)。一括切除率(従来群 75 例 100% vs 牽引群 73 例 100%)などの治療結果や後出血(従来群 2 例 2.7% vs 牽引群 2 例 2.7% ; $P > 0.999$)や穿孔(従来群 2 例 2.7% vs 牽引群 0 例 0% ; $P = 0.488$)などの有害事象に有意差はなかった。牽引群の 2 例で病変へ近接困難の理由で trainee から expert に交代を要した。従来群の 2 例で強い呼吸性変動から治療困難であり牽引群への conversion を必要とした。

反転したスコープで繊細な操作を要するため胃体下部よりも胃体上中部の領域は ESD が困難とされる。本研究の結果は、エンドトラックによる牽引がそのような困難な病変に対して有効と示した。切開縁を押し引きすることで、状況に応じた適切な張力を切除すべき粘膜下層に対して維持できることが治療時間短縮に有効であったと考えられる。

本研究は、エンドトラックによる牽引補助 ESD が胃体上中部小弯病変で治療時間を短縮する傾向があることを示した。現在のところ胃 ESD を行える施設は限られているが、技術的難易度を下げることから国内外に普及することの一助となることが期待され、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687号 | | |
| 学位授与の日 | 令和6年10月15日 | | |
| 氏名 | 玉置 敦之 | | |
| 学位論文の題目 | Female sex and age-based advantage of simulated electric field in TMS to the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders. (統合失調症および気分障害における前頭前野への TMS により生じる誘導電界の女性と年齢の優位性 -シミュレーション研究-) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 川股 知之 | |
| | 副査 | 教授 中田 正範 | 教授 紀本 創兵 |

論文内容の要旨

【緒言】

経頭蓋磁気刺激療法 Transcranial magnetic stimulation(TMS)は精神疾患への治療に利用される非侵襲的な磁気刺激療法である。大うつ病性障害ではいくつかのメタ解析で有効性が報告されているが、統合失調症や双極性障害では有効であるとする報告とそうでない報告があり、一致した結果は得られていない。TMS はコイルが生成する磁場を通して電界を生じさせ皮質の活動性を修飾する。電界に影響を与える要因には様々なものが報告されており、頭蓋内容積は電界と特に強い関連があると報告されている。性別・年齢についてもそれぞれの疾患での治療反応性に影響を及ぼすことが報告されているが、TMS で生じる電界においてそれらがどの脳領域で影響を及ぼすのかについては報告が少ない。本研究では統合失調症、大うつ病性障害、双極性障害および健常対照者において左の背外側前頭前野 Dorsolateral Prefrontal Cortex (DLPFC) への TMS で生じる電界値を MRI データを基にしたシミュレーションで評価し、年齢、性別、頭蓋内容積との関連を調査した。

【方法】

23名の統合失調症、23名のうつ病性障害、24名の双極性障害、23名の健常者を被験者とし、3テスラ MRI を使用して MRI 画像を撮像した。刺激位置は左 DLPFC に設定し、TMS による電界値のシミュレーションには SimNIBS 2.1.1 を用いて 2名の調査者が独立して群、年齢、性別を盲検化して行った。頭蓋内容積は画像解析ソフトウェア FreeSurfer 6.0 を用いて得られた。男女の頭蓋内容積の差の分析には Mann-Whitney U 検定を用いた。群間の電界値の比較、全被験者の男女の電界値の比較には FSL の Randomise プログラム 2.9 を使用し、全被験者の男女の電界値の比較には年齢を共変量とした場合と年齢と頭蓋内容積を共変量とした場合に分けて分析した。ボクセルごとに多重回帰分析を行い、性別を共変量として年齢と電界値の関連を分析した。

【結果】

群間の電界値に有意な差は認められなかった。年齢のみを共変量としたとき、女性は広範囲の脳領域で男性よりも高い電界値を示したが、年齢と頭蓋内容積を共変量としたとき有意な差はほとんどの領域でみられなくなった。女性は頭蓋内容積が有意に小さかった。電界値の高さは主に左側海馬傍回領域で年齢の高さと有意な関連を示した。これらの結果は 2名の調査者によって確認された。

【考察】

TMS で生じる電界値は男性より女性でより高い値がみられたが、頭蓋内容積はその男女差に寄与している可能性がある。疾患群と健常者群の間に有意差は認められなかったことから、左 DLPFC への TMS で生じる電界は疾患特異的な変動よりも個人差に基づく変動が優勢であることが示唆される。左海馬傍回領域は加齢に伴う変化の影響を受ける可能性がある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和6年9月20日、同年9月24日、同年9月26日に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。

経頭蓋磁気刺激療法Transcranial magnetic stimulation(TMS)は精神疾患への治療に利用される非侵襲的治療であり、うつ病では有効性が多く報告されているが、統合失調症や双極性障害では有効であるとする報告とそうでない報告がある。TMSはコイルの生成する磁場を通して生じた電界が皮質の活動を修飾するが、電界に影響を与える要因として頭蓋内容積は特に強い関連があるとされている。性別・年齢についてもそれぞれの疾患での治療反応性に影響を及ぼすことが報告されているが、TMSで生じる電界においてそれらがどの脳領域で影響を及ぼすのかについては報告が少ない。本論文では統合失調症、うつ病、双極性障害および健常対照者において左の背外側前頭前野Dorsolateral Prefrontal Cortex (DLPFC) へのTMSで生じる電界値をMRIデータを基にしたシミュレーションで評価し、年齢、性別、頭蓋内容積との関連を調査した。

23名の統合失調症、23名のうつ病、24名の双極性障害、23名の健常者を被験者とし、3テスラMRIを使用してMRI画像を撮像した。刺激位置は左DLPFCに設定し、TMSのシミュレーションにはSimNIBS 2.1.1を用いて2名の調査者が独立して群、年齢、性別を盲検化して行った。頭蓋内容積は画像解析ソフトウェアFreeSurfer 6.0を用いて得られた。全被験者の男女の電界値の比較では年齢を共変量とした場合と年齢と頭蓋内容積を共変量とした場合に分けて分析し、年齢と電界値の関連は性別を共変量として分析した。

群間の電界値に有意な差は認められなかった。年齢のみを共変量としたとき、女性は広範囲の脳領域で男性よりも高い電界値を示したが、年齢と頭蓋内容積を共変量としたとき有意な差はほとんどの領域でみられなかった。女性は頭蓋内容積が有意に小さかった。電界値の高さは主に左海馬傍回領域で年齢の高さと有意な関連を示した。これらの結果は2名の調査者によって確認された。

TMS で生じる電界値は女性でより高い値がみられ、頭蓋内容積はその男女差に寄与している可能性がある。疾患群と健常者群の間に有意差は認められず、左 DLPFC への TMS で生じる電界は疾患特異的な変動より個人差に基づく変動が優勢であることが示唆された。左海馬傍回は加齢に伴う変化の影響を受ける可能性がある。本論文は TMS の治療機序の解明につながる重要な知見を示したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

| | | | |
|---------|--|----------|----------|
| 学位記番号 | 博(医)甲第688号 | | |
| 学位授与の日 | 令和7年1月21日 | | |
| 氏名 | 江守 誠司 | | |
| 学位論文の題目 | <i>C9orf72</i> repeat expansions in Wakayama: One potential cause of amyotrophic lateral sclerosis in the Kii Peninsula, Japan (和歌山県における <i>C9orf72</i> リピート伸長症例の検討: 日本の紀伊半島における筋萎縮性側索硬化症の一因としての検討研究) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 井上 徳光 | |
| | 副査 | 教授 宮本 勝一 | 教授 廣西 昌也 |

論文内容の要旨

【緒言】

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis :ALS) は運動ニューロンが変性し、四肢、嚥下および呼吸筋の麻痺が進行する予後不良の疾患である。日本における有病率は、9.9/10 万人と言われており、うち家族性 ALS が 5.1% を占めると報告されている。日本の紀伊半島南部には、明治時代以前から ALS の集積地帯があることが報告されており、河川や土壌における微量ミネラルの含有量など環境的要因の他、家族歴を有するものが多く、集積地帯から他地域へ転居したものに ALS を発症した例が確認されており、遺伝的要因の関与が示唆されている。そのため遺伝的背景を探索する研究が精力的に行われてきたが、決定的な遺伝素因は確認されていなかった。2012 年に石浦らは、和歌山県の ALS 集積地帯である古座川地区において、本邦においては稀とされる *C9orf72* を原因遺伝子とする ALS が日本の他地域よりも高頻度に見られることを報告した。今回われわれは、紀伊半島南部を含む和歌山県下の ALS 症例 99 名に対して、*C9orf72* 関連の ALS 発症者の有無を検討した。

【対象と方法】

<研究対象>

2013 年から 2020 年までの期間に、和歌山県立医科大学附属病院でインフォームドコンセントを行い、書面で同意が得られた ALS 99 名と、パーキンソン病 90 名、健常対照人 90 名に対して、遺伝子解析を行った。ALS 患者の内訳は、孤発性 ALS 91 名、家族性 ALS 8 名、紀伊半島南部出身者 17 名、男性 65 名、平均発症年齢 65.2 歳、標準偏差 10.8、年齢幅 30~87 歳、改定 El Escorial 基準および updated Awaji 基準に則して診断した症例を対象とした。紀伊半島の南北は日本神経学会によって定義された Kii-ALS and Parkinsonism-Dementia-Complex (ALS/PDC) の診断基準に則り、和歌山県田辺市と三重県松坂市を結ぶ直線の南北によって定義した。

<方法>

ゲノム DNA は、末梢血白血球から抽出した。既報の報告に則り、flanking polymerase chain reaction (PCR) を施行し、蛍光断片長解析にて *C9orf72* intron1 内の (GGGGCC)_n の反復回数を推定した。続いて、flanking PCR で増幅困難な 6 塩基反復配列伸長例 (hexanucleotide repeat expansions: HRE) を検出するため、repeat primed PCR (RP-PCR) を施行し、鋸歯状波の有無を評価した。HRE が示唆された症例には、Nanopore® (Oxford nanopore technologies, software: Guppy, LAST, tandem-genotypes を使用) を用いたロングリードシーケンスを行い反復回数の推定と、連続した領域の一塩基多型を比較検討し、ハプロタイプ解析を行った。統計学的検討は、R を用いて行い、*p* 値 0.05 以下を統計学的有意水準とした。

【結果】

蛍光断片長解析で、PCR で増幅されたアレルサイズから既報の方法に則りリピート数を推定した。結果、ALS、パーキンソン病、健常人の 3 群間で有意な差はみられなかった。RP-PCR か

ら ALS 99 名中 2 名において HRE が示唆された。パーキンソン病症例と、健常人例において HRE は認められなかった。HRE がみられた ALS 2 例（以後 Case 1, Case 2 と表記）の 6 塩基反復回数を推定するため、ロングリードシーケンスを施行した。HRE の反復回数はそれぞれ、Case 1 で 100~1715 回、Case 2 で 578-2249 回と予想された。加えて、ロングリードシーケンスの結果から、ハプロタイプ解析を行い Case 1 と Case 2 は *C9orf72* の遺伝子座を挟んで、44-kilo-base-pair (kbp) にわたって連続した一塩基多型を共有していることを確認し、これらは既報のフィンランド人由来のリスクハプロタイプと同一であった。

Case 1 は 65 歳時に構音障害で発症し、67 歳で呼吸不全にて逝去した男性で、66 歳時に精査をうけ、ALS と診断されていた。紀伊半島南部にて生育し、父親も同地域出身であった。母がパーキンソン病に罹患し、76 歳で逝去していた。血族婚はなく、その他認知症を含め神経変性疾患の家族歴はなかった。Case 2 は 55 歳で構音障害にて発症し、嚥下障害と四肢の麻痺が加わり、58 歳で呼吸不全にて逝去した女性で、56 歳時に精査を受け ALS と診断されていた。紀伊半島北部で出生し、父親も同地域出身で、父親にパーキンソン病の罹患歴があったが、血族婚はなく、家系内にその他神経変性疾患の家族歴はなかった。Case 1, Case 2 いずれも錐体外路徴候や認知症の合併はみられず、Dopamine transporter imaging with single-photon emission computed tomography は正常で、頭部 magnetic resonance imaging, susceptibility weighted imaging で、一次運動野に帯状の低信号を認めた。

【考察】

ALS 症例 99 名中 2 名に *C9orf72* intron 1 内の HRE を確認し、反復回数は 30 回以上で ALS あるいは FTD の病原変異と考えられることから、それぞれ *C9orf72* 関連の ALS と考えられた。両者ともに古典的 ALS の臨床像を呈し、認知症や錐体外路徴候の随伴は認められず、いずれも家族歴はなく孤発例と考えられた。Case 1 は紀伊半島南部の集積地帯近傍で生育し、Case 2 は紀伊半島北部で生育し集積地帯での生育歴はなかった。今回解析した 99 名のうち、全 ALS 症例の 2.0%、孤発性 ALS 症例のうち 2.4% が *C9orf72* 関連の ALS と考えられた。

本邦と欧米を比較したとき、ALS のうち家族性 ALS が 5~10% を占めることに大きな人種差や地域差はないとされているが、ALS の原因となる遺伝子の内訳には差異があることが知られている。本邦の家族性 ALS では頻度が多い順に、*SOD1*(32-36%)、*FUS*(8-11%)、*TARDBP*(2-3%) と続き、*C9orf72* については既報をまとめると家族例の 2.6% 程度で、孤発例では 0.4% と稀な原因遺伝子と考えられてきた。一方、欧州に起源を持つ人種においては、家族性 ALS では順に *C9orf72*(33.7%)、*SOD1*(14.8%)、*TARDBP*(4.2%) と続き、*C9orf72* は孤発性 ALS の 10.4~21% に観測され、ALS 発症により大きな影響力をもつことが報告されている。本研究結果から、*C9orf72* 関連の ALS の頻度が、和歌山県において日本の他地域と比較して高い可能性が示唆された。また、新たに *C9orf72* 関連の ALS と診断した 2 例と、フィンランド人リスクハプロタイプとが、44-kbp にわたって同一のハプロタイプを共有したことは、創始者効果を示唆するものと考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和6年12月4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。

本論文は、紀伊半島南部に多発する筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) において、ALS の原因遺伝子である *C9orf72* の影響を検討することを目的としている。

2013年から2020年の間に、インフォームドコンセントを行い、書面で同意が得られた ALS 99名と、パーキンソン病 90名、健常対照人 90名に対して、遺伝学的解析を行った。ALS 患者は、孤発性 ALS 91名、家族性 ALS 8名、紀伊半島南部出身者 17名であった。遺伝学的解析は、蛍光断片長解析にて *C9orf72* intron1 内の (GGGGCC)_n 反復回数を推定し、hexanucleoti de repeat expansions: HRE の有無を repeat primed PCR (RP-PCR) で評価した。HRE が示唆された症例には、ロングリードシーケンスを行い反復回数の推定と、ハプロタイプ解析を行っ

た。本研究は和歌山県立医科大学附属病院倫理審査委員会の承認を得ており、すべての対象者から文書による同意を得て行われている。

蛍光断片長解析の結果、ALS、パーキンソン病、健常人の3群間で反復回数に有意差はみられなかった。RP-PCRではALS 2症例においてHREが示唆され、ロングリードシーケンスの結果、反復回数は100~1715回、578-2249回と推定された。ハプロタイプ解析の結果、HREがみられたALS 2例は*C9orf72*の遺伝子座を挟んで、44-kilo-base-pair (kbp) にわたり連続した一塩基多型を共有し、既報のフィンランド人由来のリスクハプロタイプと同一であった。

今回検討したALS 99症例中 2例が*C9orf72*関連のALSと考えられた。いずれも古典的ALSの臨床像を呈し、認知症や錐体外路徴候の随伴は認められず、家族歴はなく孤発例と考えられた。また、2例中1例が紀伊半島南部で生育していた。検討した全ALS症例の2.0%、孤発性ALS症例のうち 2.4 %が*C9orf72*関連のALSと考えられ、既報では孤発例の0.2~0.4%と比較的稀な原因遺伝子と考えられていることを考慮すると、*C9orf72*関連のALSの頻度が、日本の他地域で行われたコホート研究と比較して高い可能性が示唆された。2症例が、フィンランド人リスクハプロタイプを44-kbpにわたって共有していたことは、創始者効果を示唆するものと考えられた。

本論文は、本邦では稀とされていた *C9orf72* 関連の ALS 頻度が、和歌山県では日本の他地域と比較して高い可能性を示唆し、原因不明とされている紀伊半島南部の ALS 多発の一因になっている可能性を示したことから、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689号 | | |
| 学位授与の日 | 令和7年3月25日 | | |
| 氏名 | 藤田 恭久 | | |
| 学位論文の題目 | Observations of cold-induced vasodilation in persons with spinal cord injuries (脊髄損傷を有する方における寒冷時皮膚血管拡張反応の観察) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 山田 宏 | |
| | 副査 | 教授 中田 正範 | 教授 神人 正寿 |

論文内容の要旨

【緒言】

皮膚への局所冷却刺激(Local cooling: LC)は、皮膚血管の収縮反応が初期に起こり皮膚血流量(Skin blood flow: SkBF)を減少させる。冷却負荷が続くと収縮から反転して、皮膚血管拡張反応(Cold-induced vasodilation: CIVD)が起こり SkBFは増加する。CIVDはヒトにおける凍傷の予防としての役割があり、発現部位は無毛部(手指、足趾、手掌、足底)で、動静脈吻合部が豊富な領域である。発現機序は局所の脈管現象であるとされているが、これらの機序は明らかにされていない。頸髄完全損傷を有する方(spinal cord injuries: SCIc)は、中枢神経を介した交感神経の活動が遮断され、全身の交感神経や損傷高位以下の感覚神経も障害される。一方、胸腰髄損傷者(SCITL)は、損傷レベルに合わせた(損傷高位とは必ずしも一致しない)交感神経活動の障害が生じ、損傷高位以下の感覚神経も障害される。SCIの麻痺領域へのLC時のSkBF応答が、非麻痺領域と異なるかどうかはこれまで比較されていない為、CIVDの有無が発現機序の要因の検証につながる可能性がある。SCIcとSCITLの、胸部(Chest)と大腿部(Thigh)にLCを実施したとき、SkBFの増加を認めCIVDが残存しているか、また残存している場合、反応が両群間で異なるかを検証すること。

【方法】

研究協力者は American Spinal Injury Association Impairment Scale (AIS)で Grade A と診断された SCIc(9名: 年齢 39 ± 9; C5-7)と SCITL(9名: 年齢 42 ± 8; Th5-L5)であった。本研究は、和歌山県立医科大学の研究倫理審査委員会の承認(2837)を受けた。LCは Peltier 素子のプレート(径 4 cm)を C4 領域 (Chest)、麻痺領域である L2-5 (Thigh) の皮膚表面に当てて実施した。プロトコルは、始め Peltier 素子の温度を 33°C に設定し安静 10 分後、0.045°C/秒で 33°C から 15°C に温度を下げ、15°C で 15 分間、さらに 8°C まで下げ、8°C で 15 分間維持した。測定項目は、冷却部位の SkBF、舌下温(T_{SL})、局所平均皮膚温(T_S)、心拍数(HR)、平均血圧(MAP)を測定した。解析は安静最終 5 分間の平均値を baseline として 1 分毎の変化率(%Δ)を算出した。皮膚血管コンダクタンス(CVC)は SkBF/MAP で算出し、%ΔCVC を各 stage の最初と最後の 5 分間の平均値(15°Cst・end、8°Cst・end)で比較した。CIVD のパターン解析は 15°C と 8°C の LC 開始から拡張までの時間を onset time、SkBF の最下点を最小値(Min)とし、拡張開始時点から増加の最大値(Max)より Amplitude(Amp)を算出し比較した。Time_{peak} は Min の時点から Max までの時間とした。測定値は mean ± SD で示し、統計処理には SPSS を使用し ANOVA の後、事後検定に Bonferroni を用いた。

【結果】

Chest の %ΔSkBF は、15°C では両群で有意な変化がなかったが、8°C においては SCIc で 9-15 分、SCITL では 12-15 分で baseline より有意な増加を認めた。Thigh では、15°C と 8°C において baseline と差を認めなかったが、8°C 開始 1 分前の値との比較では、SCIc(8-15 分)と SCITL(6-15 分)ともに有意な増加を認めた。Chest の %ΔCVC は両群とも 8°C end で baseline より有意に増加した。Thigh では 15°Cst・end と比べると 8°C end で両群とも有意に増加した。群間差はともになかった。CIVD のパターンは群間に差はないが、Time_{peak}、Max 値、Amp 値で Chest、Thigh において 15°C より 8°C で有意に高値を示した。T_{SL}、T_S、HR、MAP は LC 中に有意差を認めなかった。

【考察】

LC 時の SkBF の増加は、15°C より 8°C で Chest と Thigh において研究協力者全員に認めた。麻痺領域で CIVD が観察されたことは、発現に中枢神経系を介した交感神経および感覚神経の活動が関与していないと考えられ、皮膚血管の内皮細胞や軸索反射を介した感覚神経から放出される拡張物質が、関与していることが想定された。8°C における SkBF 増加のパターンに群間差はなかったが、baseline との比較では、SCI_C において Thigh より Chest で大きく増加した。従って、CIVD の大きさには感覚神経の活動が関与している可能性も示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和 6 年 7 月 23、24、25 日に論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

皮膚への局所冷却刺激(Local cooling: LC)時には、皮膚血管の収縮反応が初期に起こり皮膚血流量(Skin blood flow: SkBF)を減少させる。冷却負荷が続くと収縮から反転し血管拡張反応(Cold-induced vasodilation: CIVD)が起こり、SkBF が増加する。CIVD は、10°C 以下の LC が 5-10 分続いた後に発現し、凍傷の予防としての役割がある。発現機序は、交感神経活動の制御からの離脱や局所の脈管現象であるとされているが、これらの機序は明らかでない。頸髄完全損傷を有する方(spinal cord injuries: SCI_C)は、中枢神経を介した交感神経の活動が遮断され、全身の交感神経や損傷高位以下の感覚神経も障害される。一方、胸腰髄損傷者(SCI_{TL})は、損傷高位以下の交感神経活動や感覚神経が障害される。SCI の麻痺領域への LC 時の SkBF 応答が、非麻痺領域と異なるかは比較されていない為、SCI_C と SCI_{TL} の、胸部(Chest)と大腿部(Thigh)に LC を実施した時、SkBF の増加を認め CIVD が残存しているか、残存している場合、反応が両群間で異なるかを検証すること。

研究協力者は AIS スコアで Grade A と診断された SCI_C(9 名: 年齢 39 ± 9; C5-7)と SCI_{TL}(9 名: 年齢 42 ± 8; Th5-L5)であった。LC は Peltier 素子のプレート(径 4 cm)を C4 領域の Chest、麻痺領域である L2-5 の Thigh の皮膚表面に当てて実施した。プロトコルは、始め Peltier 素子の温度を 33°C に設定し安静 10 分後、0.045°C/秒で 33°C から 15°C に温度を下げ、15°C で 15 分間、さらに 8°C まで下げ、8°C で 15 分間維持した。測定項目は、冷却部位の SkBF、舌下温(T_{SL})、局所平均皮膚温(T_S)、心拍数(HR)、平均血圧(MAP)をモニターした。各測定項目は安静最終 5 分間の平均値を baseline として 1 分毎の変化率(% Δ)を算出した。統計処理は SPSS を使用し ANOVA の後、事後検定に Bonferroni を用いた。

% Δ SkBF の Chest は、15°C では両群とも差がなかったが、8°C においては SCI_C(9-15 分)と SCI_{TL}(12-15 分)ともに baseline より有意な増加を認めた。Thigh は、15°C と 8°C ともに baseline との差を認めなかったが、8°C 開始 1 分前の値と 8°C stage との比較では、SCI_C(8-15 分)と SCI_{TL}(6-15 分)の両群に有意な増加を認めた。群間差はともになかった。LC 中に T_{SL}、T_S、HR、MAP は有意差を認めなかった。

麻痺領域で CIVD が観察されたことは、発現に中枢神経系を介した交感神経および感覚神経の活動が関与していないと考えられ、皮膚血管の局所機能により拡張物質が放出される可能性が想定された。8°C における SkBF 増加のパターンに群間差はなかったが、baseline との比較では、SCI_C において Thigh より Chest で大きく増加した。従って、CIVD の大きさには感覚神経の活動が関与している可能性がある。SCI の麻痺領域でも凍傷に対する防御機能が存在することを示した。CIVD の発現機序は中枢神経より局所の脈管機能により制御され、感覚神経活動も関与することが示唆された。

本論文は脊髄完全損傷を有する方の凍傷の予防機能が残存していることを証明し、脊髄損傷患者へのリハビリテーション治療の寒冷療法として応用されうるものであり、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690号 | | |
| 学位授与の日 | 令和7年3月25日 | | |
| 氏名 | 田中 顕 | | |
| 学位論文の題目 | Clinicopathological analysis of CD47 and signal regulatory protein alpha expression in myeloid sarcoma patients: CD47 expression is a favourable prognostic factor. (骨髄肉腫患者組織における CD47 および SIRP α 発現の臨床病理学的検討: CD47 発現は予後良好因子である) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 村田 晋一 | |
| | 副査 | 教授 江楮 正悟 | 教授 園木 孝志 |

論文内容の要旨

【緒言】

骨髄肉腫(Myeloid sarcoma, MS)は WHO 分類改定第 4 版で骨髄芽球を起源とし骨髄外に発生する造血器腫瘍と定義された稀な悪性腫瘍の 1 つである。この腫瘍の治療は急性骨髄性白血病(AML)に準じた治療が有効とされ、化学療法や同種造血幹細胞移植による治療が行われることが多いが、標準治療は確立されておらず予後不良である。

CD47 は血液細胞を含む様々な細胞に発現しており、signal regulatory protein α (SIRP α) はマクロファージや顆粒球、単球、樹状細胞などに発現している。CD47 が SIRP α に結合すると貪食作用を阻害する SHP-1 と SHP-2 を活性化させる。この CD47-SIRP α interaction によって貪食細胞に”don't eat me signal”が伝達され、CD47 陽性細胞が宿主免疫から回避すると考えられている。

卵巣癌や非小細胞肺癌などで CD47 陽性腫瘍は予後不良と報告されており、AML や急性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫で CD47 陽性症例は予後不良と報告されている。CD47-SIRP α interaction を標的とした治療法の開発がすすんでおり、AML では抗 CD47 抗体を使った治療法の臨床試験が行われ、その効果が期待されている。

MS は希少な腫瘍であるため、まとまった報告は少なく、予後因子も解明されていないことが多い。これまでに MS における CD47-SIRP α interaction を評価・検討した報告はない。稀少疾患である MS の新たな予後因子の解明や治療介入の方法を検討することが本研究の目的である。

【材料と方法】

1. 患者由来骨髄肉腫検体

2005 年～2019 年間で久留米大学において新たに診断した MS 患者 84 症例を評価・検討した。久留米大学での以前の研究で作成された tissue microarray specimen(TMA)と formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks の薄切標本に免疫組織化学(IHC)染色を行い、評価した。MS は過去の報告に従い、Type 1 (denovo MS)、Type 2 (MS concurrent with AML)、Type 3 (MS that develops during the course of CML/MDS/MPN)、Type 4 (MS as a recurrence after remission of AML)の 4 つの Type において評価した。評価した MS 患者の臨床情報は診療録を確認し、84 例中 48 例で得られた。

2. CD47 の IHC 染色

抗 CD47 抗体は anti-CD47 rabbit monoclonal antibody (SP279; Abcam, Cambridge, Massachusetts)を使用した。CD47 の染色性は症例によって様々であり、Score 0(腫瘍に完全に陰性)、Score 1(細胞膜に不完全に微弱に陽性)、Score 2(細胞膜に弱～中等度に陽性)、Score 3(細

胞膜に高度に陽性)の4段階にスコアリングした。400倍の高倍率 (HPF)のホットスポットで評価し、腫瘍細胞の30%以上でScore 2-3の症例をCD47陽性症例と定義し、その他の症例をCD47陰性症例と定義した。

3. SIRP α の IHC 染色

抗SIRP α 抗体は anti-SIRP α /SHPS1 rabbit monoclonal antibodies (D613M, Cell Signalling Technology)を使用した。SIRP α は腫瘍細胞で陽性となる症例(neoplastic SIRP α ; nSIRP α)と腫瘍微小環境の非腫瘍細胞で陽性となる症例(microenvironmental SIRP α ; miSIRP α)に分けて評価した。

400倍の高倍率 (HPF)のホットスポットで評価し、腫瘍細胞の10%以上のものをnSIRP α 陽性症例と定義した。miSIRP α 陽性細胞は形態から非腫瘍と判断した陽性細胞数を3か所のHPFでカウントし、最大値で評価した。中央値をcut-offとしてmiSIRP α -high群と-low群にわけて評価した。腫瘍微小環境に浸潤する炎症細胞の種類をHE標本の形態を参考に判別し、炎症細胞の種類の内訳についても評価した。腫瘍細胞の大部分がnSIRP α 陽性の症例(8例)についてはmiSIRP α の評価が困難であったため、miSIRP α の解析からは除外した。

4. 統計解析

得られた臨床病理学的な特徴についての差異は χ^2 検定もしくはFisherの正確確率検定で比較して検定した。腫瘍微小環境の炎症細胞浸潤(好中球、リンパ球、好酸球、形質細胞)についてはWilcoxonの順位和検定で検定した。全生存率(OS)と無増悪生存率(PFS)をKaplan-Meier法を用いて評価し、生存曲線はlog-rank試験で比較した。Cox比例ハザードモデルをもちいて予後因子の解析を行った。全ての統計解析はJMP, version 16 (SAS Institute, Tokyo, Japan)を使用して行った。 P valueが0.05未満の場合を統計学的有意差ありと定義し、0.1未満で傾向ありと定義した。

【結果】

1. CD47 陽性症例と陰性症例での臨床病理学的特徴

CD47陽性群と陰性群で年齢や性別、MSのType、Performance status (PS)、寛解導入療法の種類に統計学的有意差はなかったが、寛解導入療法に対する治療効果はCD47陽性群において良い傾向($P=0.0845$)があった。CD47陽性症例では腫瘍微小環境におけるリンパ球浸潤が陰性症例に比べて有意に多かった($P=0.0137$)。

2. nSIRP α 陽性症例と陰性症例での臨床病理学的特徴

nSIRP α 陽性群と陰性群で年齢や性別、MSのType、PS、寛解導入療法の種類、治療効果に統計学的有意差はなかった。nSIRP α 陽性症例は有意にCD33陽性の症例が多く(P value = 0.0307)、CD34陰性症例が多い傾向(P value = 0.0911)にあった。腫瘍微小環境の炎症細胞浸潤については両群間で有意差は見られなかった。

3. miSIRP α -high 症例と-low 症例での臨床病理学的特徴

miSIRP α 高値群と低値群で年齢や性別、MSのType、PS、寛解導入療法の種類、治療効果に有意差はなく、腫瘍微小環境の炎症細胞浸潤については両群間で有意差は見られなかった。

4. CD47 陽性症例と陰性症例の予後の比較

CD47陽性症例は陰性症例と比較し、OSが有意に良好であり(P value = 0.0425)、PFSについても良い傾向にあった(P value = 0.0957)。

5. nSIRP α 陽性症例と陰性症例およびmiSIRP α -high 症例と-low 症例での予後の比較

nSIRP α 陽性群と陰性群でOSおよびPFSに有意差は見られず、miSIRP α 高値群と低値群でも同様にOSおよびPFSに有意差は見られなかった。

6. MS の予後因子に関する単変量解析および多変量解析の結果

CD47 陽性もしくは陰性、年齢、性別、PS、MS の Type の項目で単変量解析を行うと CD47 陽性症例は統計学的に有意に予後が良く、Type3 の症例は有意に予後が悪いことが示された。しかし、多変量解析を行うと CD47 陽性症例は独立した予後良好因子とはならず、Type3 であることも独立した予後不良因子ではなかった。

【考察】

MS において CD47-SIRP α interaction を検討した研究は、本報告が初めてである。本研究結果より MS において、CD47 陽性となる症例は一定数存在することが判明し、抗 CD47 抗体を含む化学療法が MS の治療選択肢となる可能性があることを示した。

MS 患者において腫瘍細胞が CD47 陽性であることは予後良好な因子であることが示唆された。CD47 陽性群では腫瘍微小環境においてリンパ球浸潤が多く認められたことが予後良好に寄与している可能性がある。しかし、過去の報告で AML を含む造血器腫瘍においては CD47 陽性症例の予後は不良であり、既報の AML での結果と今回の結果が異なった理由は不明である。今後、AML と MS を比較検討した研究を行う必要があると考える。

また、nSIRP α 陽性群は陰性群と比較しても予後に差は見られなかったが、CD33 陽性で CD34 陰性の症例が多いことが示された。SIRP α は正常細胞の中で CD33+/CD34low の myelo/monocytic precursors で最も強く発現されるとされており、nSIRP α 陽性 MS は myelo/monocytic precursors を起源としている可能性が示唆された。腎細胞癌や悪性黒色腫において、SIRP α が発現している群が存在し、それらの腫瘍に対して抗 SIRP α 抗体が有効であるという報告が存在しているため、nSIRP α 陽性 MS への治療にも発展させられる可能性があると考えられる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和6年12月20日に論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

骨髄肉腫はWHO分類改訂第4版において、骨髄芽球を起源とし、骨髄外に発生する造血器腫瘍と定義されている希少な悪性腫瘍である。この腫瘍はその希少性ゆえに、発症のメカニズムや予後因子の解明、治療法の確立に必要な大規模の研究が現状ほとんど報告されていない。昨今、様々な悪性腫瘍において、腫瘍免疫微小環境をターゲットとした治療開発がすすんでおり、CD47-SIRP α の相互作用が注目されている。多数の悪性腫瘍細胞においてCD47が高発現していることが報告されており、腫瘍細胞に発現するCD47は貪食細胞に発現するSIRP α と結合し、貪食細胞に” don’ t eat me” のシグナルが伝達されることで腫瘍細胞が宿主免疫から逃避すると考えられている。骨髄肉腫におけるCD47-SIRP α について検討した報告はなく、本研究が初めての報告である。

患者検体は2005年～2019年の間で、申請者が国内留学していた久留米大学において新たに診断した骨髄肉腫患者検体84症例を用いた。これらの組織検体をもちいて、HE染色や免疫組織染色を行い病理学的に評価した。CD47は悪性腫瘍における染色性の違いや陽性率をもとにスコア化して評価した。SIRP α については腫瘍微小環境における非腫瘍細胞と腫瘍細胞での陽性細胞を分けて評価を行った。腫瘍微小環境における炎症細胞の種類は形態を参考に判別し、その内訳についても評価した。得られた病理学的所見と患者情報や予後などの臨床所見と合わせて得られたデータを JMP, version 16 (SAS Institute, Tokyo, Japan) を使用して統計解析を行った。

CD47陽性症例と陰性症例では寛解導入療法に対する治療効果がCD47陽性症例で良い傾向にあり、腫瘍微小環境におけるリンパ球浸潤が多いことが分かった。CD47陽性症例は陰性症例と比較し、全生存率が統計学的に有意に良好であることが示され、無増悪生存率についても良い傾向があることが示された。この結果は骨髄肉腫の類縁疾患とされる急性骨髄性白血病での結果とは異なる結果であった。また、腫瘍免疫微小環境におけるS

IRP α 陽性細胞が多い症例と少ない症例で比較しても予後に関しては統計学的有意差が見られなかったことが示された。

以上の結果から、骨髄肉腫においてはその他の悪性腫瘍とは異なり、CD47 が陽性となる症例ではむしろ予後良好となることが示された。骨髄肉腫において 84 例を集積して行った研究は世界に目をむけても最大規模の研究である。本論文は今後の骨髄肉腫の治療法開発にも有用となる可能性を示したものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

| | | | |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号 | 博(医)甲第691号 | | |
| 学位授与の日 | 令和7年3月25日 | | |
| 氏名 | 高瀬 衣里 | | |
| 学位論文の題目 | A Phase II Study of High-Flow Nasal Cannula for Relieving Dyspnea in Advanced Cancer Patients. (呼吸困難を有するPS不良の進行癌患者におけるHFNCの有用性を検討する第II相試験) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 川股 知之 | |
| | 副査 | 教授 川井 学 | 教授 山本 信之 |

論文内容の要旨

【背景】

呼吸不全を有する進行癌患者に対して呼吸困難緩和における高流量鼻カニューラ酸素療法 (High-Flow Nasal Cannula:HFNC) の有用性・忍容性に関する検討は十分されていない。

【目的】

中等度の呼吸困難、呼吸不全を有する進行癌患者に対する、呼吸困難緩和における HFNC の有用性・忍容性を検討することである。

【方法】

Numeric Rating Scale (NRS) が3以上の安静時呼吸困難と呼吸不全を有する進行癌患者を対象に、HFNCを5日間施行した。主要評価項目は24時間での modified Borg scale (mBorg scale) 変化量平均値とした。主な副次評価項目は各時点での mBorg scale の変化量や快適度 NRS の推移、オピオイドの使用状況、治療完遂割合とした。

【結果】

2019年2月から2022年2月の間に25例が登録され、21例が解析対象となった。平均年齢(範囲)は72歳(48-92)、PS 3/4は17/4例であった。ほぼ全例で酸素療法がされており(平均FiO₂:0.34)、登録時の平均呼吸困難 mBorg scale (範囲)は5.2(2-10)、平均呼吸困難 NRS (範囲)は5.9(3-10)であった。生存期間中央値(範囲)は19日(3-657)であった。主要評価項目である24時間での mBorg scale 変化量平均値は1.4(80%信頼区間:0.8-1.9)であった。57%(12例)で mBorg scale の minimally clinically important difference (MCID) である1.0以上の改善を認めた。1時間後の mBorg scale が1.0以上改善していた7例では24時間後も効果が維持しており、効果予測因子となりうる可能性が示唆された。忍容性に関して、79%(19例)が24時間、46%(11例)が5日間 HFNC を継続することが可能であった。

【結語】

本試験は呼吸困難を有する進行癌患者に対する HFNC を5日間施行した初めての前向き試験である。主要評価項目を達成しなかったものの、約半数の患者で mBorg scale の MCID である1.0以上の呼吸困難改善を認めた。一方、8割が24時間以上、約半数が5日間治療を受けることができ、従来の報告より長時間の忍容性が確認された。また治療開始1時間後の mBorg scale 変化量は24時間以降の効果予測因子である可能性がある。以上より HFNC が進行癌患者における緩和治療の選択肢となることが示された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和7年1月27日、29日に論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

【目的】

進行癌患者を対象に呼吸困難緩和における HFNC の有用性を検討した臨床試験は少ない。医師視点で評価し、対象が担癌患者全体と幅広く使用意図、効果が一定しない後方視的研究の他、重度の呼吸困難、呼吸不全を有する患者を対象に、最長2時間で検討された前向き試験しかない。本研究では重度および中等度の呼吸困難を有する進行癌患者において、中長期にわたる呼吸困難に対する HFNC の有用性と忍容性を評価することを目的とした。

【方法】

Numeric Rating Scale (NRS) が3以上の呼吸困難と呼吸不全を有する進行癌患者を対象に HFNC を5日間施行した。主要評価項目として24時間での modified Borg scale (mBorg scale) 変化量平均値を検討した。主な副次評価項目は、各時点での mBorg scale 変化量平均値、快適度 NRS の推移、呼吸数などバイタルサインの推移、オピオイドの使用状況、治療完遂割合であった。

【結果】

2019年2月から2022年2月の間に25例が登録され21例が解析対象となった。平均年齢（範囲）は72歳（48-92）、PS 3/4は17/4例であった。ほぼ全例で酸素療法がされており（平均 FiO₂:0.34）、登録時の平均呼吸困難 mBorg scale（範囲）は5.2（2-10）、平均呼吸困難 NRS（範囲）は5.9（3-10）で、中等度の呼吸困難、呼吸不全を有する患者が集積された。生存期間中央値（範囲）は19日（3-657）で、予後の限られた患者が対象となった。24時間での mBorg scale 変化量平均値は1.4（80%信頼区間:0.8-1.9）、57%（12例）で mBorg scale の minimally clinically important difference (MCID) である1.0以上の改善を認めた。また1時間後の mBorg scale が1.0以上改善していた7例では24時間後も効果が維持されていた。忍容性に関しては、90%（19例）で24時間、52%（11例）で5日間の HFNC を行うことができた。

【審査結果】

本研究は、呼吸困難を有する進行癌患者に対する HFNC を5日間施行した初めての前向き試験である。主要評価項目は達成しなかったものの、約半数が HFNC によって呼吸困難の改善を認めた。疾患特異性や、登録患者のほとんどが既に通常酸素療法を開始されている状況で HFNC により mBorg scale の MCID である1以上呼吸困難が改善したことを鑑みると臨床的意義の高い結果である。一方で、約8割が24時間以上、約半数が5日間治療を受けることができた。全生存期間が1ヶ月未満と、結果的に予後の限られた患者が集積された中で、従来の報告より長時間の忍容性が確認された。以上より、本研究の記載論文は、博士学位論文として価値あるものと判断した。

| | | | |
|---------|---|----------|----------|
| 学位記番号 | 博(医)甲第692号 | | |
| 学位授与の日 | 令和7年3月25日 | | |
| 氏名 | 栗本 千晶 | | |
| 学位論文の題目 | Generation of a mouse model of thyroid storm and preliminary investigation of the therapeutic effects of ghrelin. (甲状腺クリーゼモデル作成とグレリン臨床応用への基礎的研究) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 藤井 隆夫 | |
| | 副査 | 教授 保富 宗城 | 教授 松岡 孝昭 |

論文内容の要旨

【背景】

甲状腺クリーゼ (Thyroid storm : TS) とは、甲状腺中毒症に感染症などの身体的ストレスが重なったときに複数臓器が機能不全に陥り致死的となる病態である。甲状腺ホルモン作用過剰により肝障害や交感神経活性亢進による頻脈・心不全といった徴候を呈し、病態のひとつとしてサイトカインストームが推察されている (Pokhrel, Thyroid S. StatPearls; 6 Oct,2022)。サイトカインストームの経過で最も重要な因子は IL-6 であり、甲状腺中毒症の患者で血清 IL-6 の上昇が認められることは既に知られているが (A.Siddiqi ,J Clin Endocrinol Metab 84:435-439,1999)、TS において IL-6 が上昇しているかどうかは不明である。

TS の病態解明や治療薬開発のため動物モデルの作成が望まれているが、これまでにその報告はない。TS の発症には必ずしもバセドウ病で認められる抗 TSH 受容体抗体などの免疫学的異常を呈する必要はなく、甲状腺ホルモンの外因性投与により基礎疾患としての甲状腺中毒症を作成することは可能である。また、TS の最も頻度の高い誘因は感染症であるため、敗血症モデルとして利用され、IL-6 を含む種々の炎症性サイトカイン上昇も報告されている LPS (Yang J, Front Immunol 23 April,2020) の併用も TS モデル作製に有用と考えられる。一方、グレリンは抗炎症作用や交感神経抑制作用などの多彩な生理作用を有することが示されており (Van der Lely, Endocr Rev 25:426,2004)、これまでに敗血症モデルにおいてグレリン投与による抗炎症効果も認められている (Chorny, A, J Immunol 180 :8369-8377,2008)。

本研究ではまず TS 患者の血清 IL-6 を測定し、バセドウ病患者と比較して有意な上昇が認められるか検証した。次に動物実験において、外因性に甲状腺ホルモンを投与することで甲状腺中毒症を惹起し、誘因として LPS 投与による敗血症を発症させることで、TS に類似した致死的モデルを作成した。同モデルにおいて IL-6 を含む血中バイオマーカーを測定し、ヒトの TS と同様の変化がみられるか確認した。さらに、グレリンを投与することで IL-6 の低下や生存率の改善などの有効性が認められるか検証した。

【方法】

<TS 患者を対象とした検討>

2018年5月から2020年1月に和歌山県立医科大学附属病院を受診した TS 患者4名の治療前の末梢血サンプルを収集し、血清 IL-6 を測定した。未治療バセドウ病患者4名の末梢血サンプルで同様に血清 IL-6 を測定し、TS 群との差を比較検討した。研究計画は和歌山県立医科大学の倫理委員会の承認を受けて実施した (承認番号 3714)。

<TS モデルの作成>

TS モデルマウス作製のため、7週齢の雄 C57BL/6 マウスを購入し1週間の馴致期間の後実験に使用した。血液サンプリングはイソフルラン吸入麻酔下に下大静脈から行った。全ての動物実験は和歌山県立医科大学の動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号 819)。敗血症の重症度の評価と人道的エンドポイントには Murine Sepsis Score(MSS)を使用した。MSS 21 点以上は 24 時間以内の死亡率が 100%であると報告されている (Shrum B, BMC Research Notes 2014, 7:233) ため、MSS 21 点を超えた個体は安楽死させた。

①甲状腺中毒症モデルの作成

8週齢の雄 C57BL/6 マウスに対して Triiodothyronin (T3; Sigma Aldrich) を計7日間皮下注射し、8日目に採血し FT3 を測定した。T3 の投与量は既報 (A. Chabowski, Lipids 48:697-704, 2013) を参考に 1.0mg/kg もしくは 3.0mg/kg とし、対照群と比較して 2~5 倍の血中濃度になるように T3 投与量を決定した。

②TS モデルの作成

実験①で作成した甲状腺中毒症モデルマウスに対し、7日目に LPS (serotype O55:B5 ; Sigma Aldrich) を腹腔内投与した。LPS の投与量は既報 (Hataya, Endocrinology 144:5365-71,2003) を参考に 0.3mg/kg もしくは 0.5mg/kg とし、投与 24 時間後の生存率が約 30 %となるような LPS 投与量を決定した。また、生存個体において LPS 投与 24 時間後まで 4 時間毎に MSS を評価した。

③TS モデルにおける血中バイオマーカー測定

実験②と同様の手法で作成した TS モデルマウスにおいて LPS 投与 4 時間後に採血を行い、血液検体にて IL-6、Metanephrine、ALT を測定した。

④TS モデルにおけるグレリン投与

TS モデルマウスにおいて、7日目にグレリン (PEPTIDE INSTITUTE, INC) を皮下注射した。投与量は既報 (Hataya, Endocrinology 144:5365-71,2003) を参考に 300 μ g/kg とした。グレリン投与により MSS および生存率、生存個体において各種バイオマーカーがどのように変化したかを解析した。

【結果】

<TS 患者を対象とした検討>

未治療バセドウ病患者 4 名についての IL-6 値は平均 3.13pg/mL(\pm 1.41)と既報と同程度であったのに対し、TS 患者では平均 55.7 pg/mL(\pm 69.0) と有意な上昇が認められた。FT3, FT4 値は両群で有意差はなかった。

<TS モデルの作成>

①甲状腺中毒症モデルの作成

T3 1.0mg/kg 投与群で血中 T3 濃度はコントロール群の約 3 倍となり、T3 3.0mg/kg 投与群では約 5 倍となった。3.0mg/kg 投与群では 5 匹中 2 匹の個体が死亡し、1.0mg/kg 投与群では 8 匹中死亡個体はなかった。T3 投与のみでは死亡せず誘因が重なって初めて致死的となる必要があるため、本研究の甲状腺中毒症モデルのための T3 投与量は 1.0mg/kg 投与群に設定した。

②TS モデルの作成

コントロール群、T3 単独投与群、LPS 0.5mg/kg 単独投与群の生存率は 100%であった。T3 +LPS 0.2mg/kg 投与群では投与 24 時間後の生存率が 60%、T3 +LPS 0.5mg/kg 投与群では 33 %となった。MSS はコントロール群、T3 単独投与群では上昇せず、T3 +LPS 0.2mg/kg 投与群、T3 +LPS 0.5mg/kg 投与群では 15 点以上に上昇する個体が複数認められた。これらの結果から、重症敗血症の徴候を呈する致死的な TS モデルとして T3 +LPS 0.5mg/kg 投与群を採用した。

③TS モデルにおける血中バイオマーカー測定

T3 単独投与群、LPS 単独投与群と比較し、TS モデル群では血中 IL-6、Metanephrine、ALT の有意な上昇を認めた ($p<0.05$)。

④TS モデルにおけるグレリン投与

TS モデル群と比較し、グレリン投与群では MSS が有意に低下し ($p<0.05$)、生存率も 66.7% (vs 0%, $p<0.01$) に改善した。血中バイオマーカーに関しては、血中 IL-6 と Metanephrine はグレリン投与群で有意な低下を認めたが、ALT は有意差がなかった。

【考察】

T3 と LPS それぞれ単独投与では MSS 上昇や死亡個体は見られなかったが、併用することで重症化・致死的となり、甲状腺ホルモン過剰と感染症の相乗効果で重症化するヒトの TS と合致していた。TS モデルでの ALT と Metanephrine の上昇は、ヒト TS における肝障害や交感神経活性亢進の病態に類似していると考えられた。IL-6 の著明な上昇も TS 患者での検討結果と一致した。甲状腺中毒症

の患者では T3 に応答してマクロファージや骨芽細胞などが IL-6 を放出することが知られており (M Salvi, Eur J Endocrinol 143:197-202,2000)、甲状腺中毒症に感染症が併発することで IL-6 の放出はさらに亢進し、サイトカインストームにまで発展した状態が TS と考えられる。

グレリンは、単球やマクロファージに発現する GHS-R1a に結合し、直接的に IL-1 β や IL-6 の産生を抑制することが知られている (Dixit.V.D, J.Clin Invest 114:57-66,2004)。また、迷走神経求心路の神経終末に発現する GHS-R1a にグレリンが結合することによって迷走神経が活性化し、間接的にマクロファージにおける NF-kB シグナルを抑制させる (Rongqian Wu, Ann Surg 245: 480-486 2007)。グレリン投与により IL-6 や Metanephrine が有意に低下し、生存率や MSS が改善した今回の結果から、グレリンの抗炎症作用や交感神経活性抑制作用が TS に有効であることが推測された。

【結論】

マウスに T3 と LPS を併用投与することにより TS を模した動物モデルを作成し、ヒトの TS に類似した病態を呈することを実証した。また、グレリンが TS の生存率改善に寄与する可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 7 年 2 月 3 日,4 日,6 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。

甲状腺クリーゼ (Thyroid storm : TS) は、甲状腺ホルモン過剰状態に感染症などの誘因が重なり発症する複数の臓器障害を呈する致死性疾患である。TS は甲状腺ホルモン作用過剰により肝障害や交感神経活性亢進による頻脈・心不全といった徴候を呈し、病態のひとつとしてサイトカインストームが推察されているが、実際にサイトカインが上昇しているかどうか検証した報告はなかった。また、治療法の開発に有用な動物モデルの作成が望まれているが、未だ確立されていない。一方グレリンは、抗炎症作用や交感神経抑制作用などの多彩な生理作用を有することが示されており、TS の治療に有益な可能性がある。本論文は TS の動物モデルを作成し、それをを用いてグレリンの有効性を検討することを目的としている。

方法は、まず TS 患者 (n=4) においてサイトカインストームの指標として血中 IL-6 を測定し、クリーゼではない未治療バセドウ病患者と比較した。次に、8 週齢の雄 C57BL/6 マウスにトリヨードサイロニン 1.0mg/kg を 7 日間皮下投与し、7 日目にリポポリサッカライド(LPS)0.5mg/kg を腹腔内投与することで 24 時間後の生存率約 30%の致死性モデルを作成 (T3+LPS 群) し、LPS 投与 4 時間後の血中生化学マーカー (IL-6、ALT、Metanephrine) と経時的な敗血症スコアを評価した。このモデルに対し 7 日目にグレリン 300 μ g/kg を皮下投与し、各指標や 24 時間後の生存率が改善するか検討した。

その結果、未治療バセドウ病患者の IL-6 値は平均 3.13pg/mL(\pm 1.41)と既報と同程度であったのに対し、TS 患者では平均 55.7 pg/mL(\pm 69.0) と有意な上昇が認められた ($p<0.05$)。マウスにおいて、T3 単独投与群、LPS 単独投与群と比較し、T3+LPS 群では血中 IL-6、Metanephrine、ALT の有意な上昇を認め ($p<0.05$)、これを TS モデルとした。TS モデルにグレリンを投与したところ、グレリン投与群では TS モデル群と比べて敗血症スコアが有意に低下し、生存率も 66.7% (vs 0%, $p<0.01$) に改善した。血中生化学マーカーに関して、血中 IL-6 と Metanephrine はグレリン投与群で有意な低下を認めた。ALT は有意差がなかったが、これは半減期が約 47 時間と長くグレリン投与後 4 時間では低下しなかったことが要因と推測している。

以上の結果から、同モデルはサイトカインストーム、肝障害、交感神経活性亢進を呈するヒトの TS に類似した病態を呈しており、グレリンの抗炎症作用や交感神経活性抑制作用が TS モデルの生存率を改善させたと考えられた。本論文は、マウスに T3 と LPS を併用投与することにより TS モデルを作成できることを実証したとともに、グレリンが TS の治療に有用である可能性を示唆しており、学位論文として価値あるものと認めた。

| | | | |
|---------|--|----------|----------|
| 学位記番号 | 博(医)甲第693号 | | |
| 学位授与の日 | 令和7年3月25日 | | |
| 氏名 | 山崎 博史 | | |
| 学位論文の題目 | Value of image enhancement of endoscopic ultrasound for diagnosis of gastrointestinal subepithelial lesions. (消化管上皮下病変の診断における超音波内視鏡の画像強調の有用性) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 川井 学 | |
| | 副査 | 教授 北野 雅之 | 教授 村田 晋一 |

論文内容の要旨

【緒言】

粘膜下腫瘍(subepithelial lesions: SELs)には平滑筋腫や迷入腺などの良性病変と悪性ポテンシャルのある消化管間葉系腫瘍(Gastrointestinal stromal tumor: GIST)が含まれている。GISTと診断された場合には手術加療がガイドラインで推奨されているため、SELsの鑑別診断は重要である。しかしながら超音波内視鏡下穿刺吸引生検(Endoscopic ultrasound guided tissue acquisition: EUS-TA)での診断能は53.9%-62.0%程度であると報告されており、診断能は高くなく、出血などの合併症を生じうる。造影超音波内視鏡検査(造影EUS検査)は、ソナゾイド造影剤を用いて腫瘍内血流を評価する検査であり低侵襲な検査である。GISTは他のSELsに比べ造影効果はHypervascular enhancementを示すことが知られており、最近のメタ解析ではSELsの鑑別診断に造影EUS検査が有用であったと報告されている。超音波内視鏡エラストグラフィー(Endoscopic ultrasound elastography: EUS-EG)は近年低侵襲な検査として施行されている。EUS-EGでは組織の硬度値を数値として計測することが可能である。EUS-EGにはEUS strain elastography (SE)とEUS shear-wave elastography (SWE)がある。硬度値としてEUS-SEではStrain ratio、SWEでは剪断波速度(Velocity of shear-wave; Vs)の計測を行うことができる。SEを用いてSELsの鑑別を行った既報があり、GISTは一般的に固いSELsであると報告されているが詳細な検討まではされていない。一方でSWEのSELsの鑑別診断能に関して評価及び検討した報告は未だない。また、造影EUS検査の造影効果やEUS-EGで測定した硬度値と病理学的線維化の相関関係に関して検討した報告もまだない。

本研究の目的はSELsの鑑別診断における低侵襲な造影EUS検査・SE・SWEの鑑別診断能及び各検査の組み合わせによるSELsの鑑別診断能を検討することとした。さらに、造影EUS検査での造影効果及びSE・SWEで測定された硬度値とGIST組織の線維化率の相関についても検討した。造影EUS検査・SE・SWEによるSELsの高い鑑別診断能が示されれば、腫瘍径が小さいSELsの段階でGISTと鑑別診断できることで予後が改善することが期待される。

【方法】

和歌山県立医科大学附属病院において2019年1月から2023年6月の期間にSELsの精査のためにEUS-TA・造影EUS検査・SE・SWEを全て施行した症例を対象とした。手術またはEUS-TAで得られた病理診断の結果からGIST群と非GIST群に分類した。主要評価項目は、造影EUS検査・SE・SWEにおけるSELsの鑑別診断能を評価した。副次評価項目は各検査の組み合わせによるSELsの鑑別診断能を検討すること、造影EUS検査の造影効果及びSE・SWEで測定したGISTの組織硬度値とGISTの手術病理組織における線維化率との関係を検討した。GISTの線維化率は、Masson trichrome染色を行った標本とキーエンス社の蛍光顕微鏡BZ-800を用いて膠原線維の400倍視野内に占める割合を測定し評価を行った。カテゴリ変数の比較には、質的変数についてはフィッシャーの正確検定、量的変数についてはマン・ホイットニーのU検定を用いた。SE及びSWEで測定した組織硬度値によるSELsの鑑別診断能はYouden indexを用いcut-off値を決定し、receiver operating characteristic curve(ROC)を描き評価した。硬度値と病理組織の線維化率の相関は、Spearmanの順位相関係数を用いて評価した。すべての統計解析はJMP Pro version 13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用い、P value < 0.05を統計的に有意とした。

【結果】

GIST 群は 29 症例、非 GIST 群は 14 症例であった。非 GIST 群の内訳は平滑筋腫 8 症例、迷入腓 4 症例、脂肪腫 1 症例、神経鞘腫 1 症例であった。手術を行った GIST 症例は 29 症例中 27 症例であった。背景因子は 2 群で有意差を認めなかった。造影 EUS 検査の感度・特異度・正診率は (79.3%, 92.3%, 83.7%) であった。20mm 未満の症例に限定すると、感度・特異度・正診率は (88.9%, 83.3%, 86.7%) であった。GIST 群と非 GIST 群で Strain ratio はそれぞれ (8.15 ± 5.22 vs 4.56 ± 3.97 ; $p=0.03$) であり GIST 群で有意に高かった。一方で SWE の組織硬度値 (V_s 値) は (2.39 ± 0.73 (m/s) vs. 2.42 ± 0.81 (m/s) ; $p=0.89$) で有意差は認めなかった。20mm 未満の SELs に限定すると、Strain ratio は (8.13 ± 5.03 vs 3.62 ± 2.07 ; $p=0.06$) であり GIST 群で高い傾向があったが、 V_s 値は GIST 群と非 GIST 群で (2.38 ± 0.72 (m/s) vs. 2.23 ± 0.71 (m/s) ; $p=0.69$) で有意差は認めなかった。SELs の鑑別診断における SE・SWE の感度・特異度・正診率・AUROC はそれぞれ (93.1%, 64.3%, 83.7%, 0.78), (28.6%, 86.2%, 34.9%, 0.50) であった。20mm 未満の症例において GIST の診断における SE・SWE の感度・特異度・正診率・AUROC はそれぞれ (88.9%, 83.3%, 86.7%, 0.81), (77.8%, 83.3%, 80.0%, 0.67) であった。SELs のサイズに関わらず、造影 EUS 検査と SE は高い診断能を示した。さらにこれら検査の組み合わせ (造影 EUS 検査+SE), (造影 EUS+SWE), (SE+SWE) を考えるとそれぞれ感度・特異度・正診率は (96.7%, 64.3%, 86.0%), (86.2%, 64.3%, 79.1%), (93.1%, 50.0%, 73.1%) であった。20mm 未満の症例に限定すると (100%, 66.7%, 86.7%), (100%, 66.7%, 86.7%), (100%, 83.3%, 93.3%) であった。造影 EUS 検査と SE の組み合わせでは SELs の大きさに関係なく高い鑑別診断能を認めた。GIST 症例の造影 EUS 検査の造影効果と線維化率を見ると、GIST 手術症例の 27 例のうち Hypervascular enhancement は 23 例、Non-hypervascular enhancement は 4 例と少ないが、Hypervascular enhancement 例と Non-hypervascular enhancement 例ではそれぞれ線維化の平均は $4.61 \pm 4.97\%$, $15.0 \pm 19.5\%$ であり、Non-hypervascular enhancement を示す例で線維化は強い傾向があった。SE と SWE で測定した組織硬度と GIST 手術症例の線維化率の相関係数 (r) はそれぞれ $r=0.43$, $r=0.17$ であり、線維化率と SE の間にはやや相関が見られた。

【考察】

GIST の鑑別において SE の方が SWE より有用であった。この理由は、SWE では ROI (Resion of interest) の大きさが固定されていたが、SE では腫瘍に合わせて ROI を設定することができるためと考えられる。SE と SWE で測定した組織硬度値と GIST の線維化率の相関を見ると、SE は線維化率と緩やかな相関を示すが、SWE では相関を示さなかった。この結果は ROI の設定方法や低い V_s/N 値が関係しているかもしれない。

また、造影 EUS 検査と SE の組み合わせは SELs の高い鑑別診断能を示した。造影 EUS 検査と SE の組み合わせは超音波内視鏡穿刺吸引生検の補助的な役割を果たすと考えられ、造影 EUS 検査で Non-hypervascular enhancement であった場合でも、SE を併用することで診断の難しい GIST 症例を拾い上げることができる可能性がある。

【結論】

造影 EUS 検査で Hypervascular enhancement を示す場合には、GIST である可能性が高い。SE で測定した組織硬度値は GIST の線維化を適切に反映している可能性があり、さらに SELs に対して高い鑑別診断能を有する。造影 EUS 検査と SE は相補的な役割を果たしており、組み合わせることで SELs の鑑別診断能は向上すると考えられる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和7年1月29日、1月30日、2月3日に論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

SELsは病変が小さい場合には診断に苦慮することがあるが、悪性ポテンシャルを持ったGISTもあるため、早期診断が重要である。SELsの確定診断にEUS-TAは有用であるが、穿刺を行うため比較的侵襲的な検査であり、出血などの合併症が生じる場合や腫瘍の存在位置によっては穿刺ルートの確保が困難なことがある。造影EUS検査とEUS-EGはSELsが超音波画像として描出できれば施行することが可能な低侵襲の診断ツールとして現在用いられている。EUS-EGにはSEとSWEがある。造影EUS検査はSELsの鑑別診断に有用であることが報告されているがEUS-EGに関してはまだ報告は少ない。

本研究は、SELsの鑑別診断における造影EUS検査・SE・SWEの鑑別診断能及び各検査の組み合わせによるSELsの鑑別診断能を検討することとした。さらに、造影EUS検査での造影効果及びSE・SWEで測定された硬度値とGIST組織の線維化率の相関についても検討した。GISTの線維化率は、Masson trichrome染色行い膠原線維の400倍視野内に占める割合を測定し評価を行った。

本研究では、2019年1月から2023年6月の期間にSELsの精査のために造影EUS検査・SE・SWEを全て施行した43症例を対象とした。GIST群は29症例、非GIST群は14症例であった。非GIST群の内訳は平滑筋腫8症例、迷入腺4症例、脂肪腫1症例、神経鞘腫1症例であった。手術を行ったGIST症例は29症例中27症例であった。背景因子は2群間で有意差を認めなかった。SELsの鑑別診断における造影EUS検査の感度・特異度・正診率は(79.3%, 92.3%, 83.7%)であった。20mm未満の症例に限定すると、感度・特異度・正診率は(88.9%, 83.3%, 86.7%)であった。GIST群と非GIST群でStrain ratioはそれぞれ(8.15±5.22 vs 4.56±3.97; p=0.03)でありGIST群で有意に高かった。一方でVs値は(2.39±0.73(m/s) vs. 2.42±0.81(m/s) ; p=0.89)で有意差は認めなかった。20mm未満のSELsに限定すると、Strain ratioは(8.13±5.03 vs 3.62±2.07; p=0.06)でありGIST群で高い傾向があったが、Vs値はGIST群と非GIST群で(2.38±0.72(m/s) vs. 2.23±0.71(m/s) ; p=0.69)で有意差は認めなかった。さらにこれら検査の組み合わせ(造影EUS検査+SE), (造影EUS+SWE), (SE+SWE)を考えるとそれぞれ感度・特異度・正診率は(96.7%, 64.3%, 86.0%), (86.2%, 64.3%, 79.1%), (93.1%, 50.0%, 73.1%),であった。20mm未満の症例に限定すると(100%, 66.7%, 86.7%), (100%, 66.7%, 86.7%), (100%, 83.3%, 93.3%)であった。造影EUS検査とSEの組み合わせではSELsの大きさに関係なく高い鑑別診断能を認めた。GIST症例の造影EUS検査の造影効果と線維化率を見ると、GISTの手術を施行した27症例のうちHypervascular enhancementは23例、Non-hypervascular enhancementは4例と少ないが、Hypervascular enhancement例とNon-hypervascular enhancement例ではそれぞれ線維化の平均は4.61±4.97%, 15.0±19.5%であり、Non-hypervascular enhancementを示す例で線維化は強い傾向があった。SEとSWEで測定した組織硬度とGIST手術症例の線維化率の相関係数(r)はそれぞれr=0.43, r=0.17であり、線維化率とSEの間にはやや相関が見られた。

本研究では、造影EUS検査でHypervascular enhancementを示す場合には、GISTである可能性が高いと考えられた。また、SEで測定した組織硬度値はGISTの線維化を反映している可能性があり、さらにSELsに対して高い鑑別診断能を有すると考えられた。造影EUS検査とSEは相補的な役割を果たしており、組み合わせることでSELsの鑑別診断能は向上すると考えられた。本研究は低侵襲な検査である造影EUS検査とSEのSELsの鑑別診断への有用性を示した。さらにはSEで測定した硬度値がGISTの線維化と関連している可能性を示した。現在これらの検査ができる施設は限られているが、今後SELsの診療に重要な役割を担うことが期待され、学位論文として価値のあるものとして認めた。

| | | | |
|---------|--|-----------|----------|
| 学位記番号 | 博(医)甲第694号 | | |
| 学位授与の日 | 令和7年3月25日 | | |
| 氏名 | 上村 和久 | | |
| 学位論文の題目 | Dynamics of immune cell infiltration and fibroblast-derived IL-33/ST2 axis induction in a mouse model of post-surgical lymphedema (マウス術後リンパ浮腫モデルにおける免疫細胞浸潤の動態と線維芽細胞由来 IL-33/ST2 軸の誘導) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 齋藤 伸一郎 | |
| | 副査 | 教授 江幡 正悟 | 教授 朝村 真一 |

論文内容の要旨

【緒言】

リンパ浮腫は、がん治療におけるリンパ節郭清などが原因となるリンパ管の機能障害により、リンパ液と脂肪が四肢の間質に蓄積する疾患である。リンパ浮腫は一度発症すると根治が難しく、繰り返す蜂窩織炎や、浮腫による四肢の運動障害により、患者の生活の質を低下させるが、現在の治療法は保存的治療や手術療法の組み合わせが主で、根本治療には至っていない。

リンパ浮腫患者の患部皮膚および皮下組織ではマクロファージ、好中球、リンパ球など様々な免疫細胞の浸潤による慢性炎症が起こっている。特に2型ヘルパーT細胞(Th2細胞)がリンパ浮腫進行に関与するとされているが、その浸潤のタイミングや他の免疫細胞との関係は十分に解明されていない。

IL-33は通常、上皮や血管内皮の細胞核に存在し、細胞損傷時に放出されST2受容体を介して免疫反応を引き起こす。この免疫反応は、喘息、アトピー性皮膚炎、硬膜外繊維症など様々な疾患に関わっている。特に、IL-33はST2受容体を発現する2型自然リンパ球を介して、Th2型免疫応答を強力に誘導することが知られているため、リンパ浮腫の進行においてもIL-33/ST2軸が関与する可能性が考えられる。

【目的】

マウス尾部リンパ浮腫モデルを用いて、リンパ浮腫の進行過程における免疫細胞の動態およびIL-33/ST2軸の誘導を明らかにし、リンパ浮腫の病態における免疫メカニズムの解明に寄与することである。

【方法】

1. マウス尾部リンパ浮腫モデル

9-10週、雄のC56BL6/Jマウスで、尾部リンパ浮腫モデルを作製した。表在性リンパ管を除去するために、幅3mmの全周全層皮膚切除を尾の基部から1cm遠位で行った。深在性リンパ管を尾の手術部位から2cm遠位にパテントブルー色素を皮下注射しリンパ管を特定し、それらを10-0ナイロン糸で結紮した。創部は、乾燥を防ぐため術後1日までポリウレタンフィルムでドレッシングを行った。

2. 尾の径と線維化面積の計測

リンパ浮腫モデル作製後、尾の厚みおよび線維化面積を計測した。手術部位から4mm遠位で作成した組織標本にMasson's trichrome染色を施した。染色画像で真皮および皮下組織の厚みを計測した。また線維化についてはImageJソフトウェアにより青色のコラーゲン染色領域を抽出し、筋肉と骨を除いた領域における線維化面積を算出することで定量的に評価した。

3. マウス尾部リンパ浮腫組織における免疫細胞の浸潤解析

リンパ浮腫組織における免疫細胞の浸潤およびサイトカインの発現を評価するため、手術を行わないコントロール群と、手術を行い術後2日目から42日目の各時点で採取したマウス尾部のリンパ浮腫組織で、蛍光免疫組織染色およびreal-time RT-PCRを実施した。また術後2日目の皮下組織におけるIL-33を発現する細胞を同定するために、線維芽細胞と免疫細胞マーカーで検討した。蛍光免疫

染色の一次抗体染色には、抗 CD4（ヘルパーT 細胞）、CD11c（樹状細胞）、CD8（キラーT 細胞）、B220（B 細胞）、Ly6G（好中球）、F4/80（マクロファージ）、IL33、CD45（血球）、 α SMA（筋線維芽細胞）、Vimentin・HSP47・S100A4（線維芽細胞）を使用した。real-time RT-PCR は、*Il13*、*Ifng*、*Il33* および *Il1r1* 用の TaqMan プライマーおよびプローブセットを使用して実施した。

【結果】

1. マウス尾部リンパ浮腫モデルにおける術後早期からの浮腫発症

術後 2 日目から尾の真皮および皮下組織の厚さが増加し、以降も時間の経過とともに尾の厚みが増加した。Masson's trichrome 染色により、真皮および皮下組織における線維化が術後 7 日目から認められ、浮腫の進行に伴って線維化面積が顕著に増加していることが示された。これにより、本モデルでは術後早期から浮腫および線維化の進行が観察され、リンパ浮腫の病態解析に適したモデルであることが確認された。

2. CD4⁺T 細胞と CD11c⁺樹状細胞の増加

リンパ浮腫組織における CD4⁺T 細胞と CD11c⁺樹状細胞の浸潤のタイミングを解析した結果、CD4⁺T 細胞は術後 14 日目から増加が確認され、その後も術後 42 日目まで持続的に増加した。一方、抗原提示細胞である CD11c⁺樹状細胞は術後 21 日目から増加が見られ、CD4⁺T 細胞の増加に対して遅れて浸潤が始まることが示された。この結果より、リンパ浮腫の進行において CD4⁺T 細胞の活性化に、CD11c⁺樹状細胞による抗原提示以外の経路があることが示唆された。

3. Th1/2 サイトカインの増加

リンパ浮腫の進行における CD4⁺T 細胞の変動を明らかにしたため、次に CD4⁺T 細胞のサブセットである Th2 および Th1 細胞に注目し、それらが分泌するサイトカイン（Th2 サイトカイン：*Il13*、Th1 サイトカイン：*Ifng*）の発現を real-time RT-PCR で解析した。術後 21 日目に *Il13* および *Ifng* の mRNA 発現が上昇し、Th1/Th2 混合型免疫応答の誘導が確認された。

4. 自然免疫から獲得免疫への移行

リンパ浮腫組織において Ly6G⁺好中球は術後 2 日目にピークに達し、その後減少したが、F4/80⁺マクロファージは術後 5 日目まで増加し、その後も 21 日目まで持続的に検出され早期から自然免疫の活性化を確認した。さらに、術後 42 日目には、CD8⁺T 細胞および B220⁺B 細胞が増加し、後期段階での獲得免疫の活性化が確認された。

5. IL-33/ST2 軸の誘導

術後 2 日目に皮下組織の Vimentin、HSP47、S100A4 陽性の線維芽細胞内に IL-33 が誘導され、7 日目には ST2 の発現が増加した。IL-33/ST2 軸は、獲得免疫への橋渡しに関与している可能性が示唆された。

【考察】

本研究では、マウス尾部リンパ浮腫モデルにおける自然免疫から獲得免疫への移行が段階的に進行することを確認した。術後早期には好中球とマクロファージが浸潤し、初期の炎症反応を引き起こした。その後、14 日目以降に CD4⁺T 細胞が増加し、さらに 42 日目には CD8⁺T 細胞および B 細胞が増加することで、獲得免疫の関与が強まることが示された。また、線維芽細胞由来の IL-33/ST2 軸が自然免疫から獲得免疫への橋渡しに重要な役割を果たす可能性が示唆された。本研究の結果を基に、IL-33/ST2 軸の機能的役割を解析することで、リンパ浮腫の予防や進行抑制につながる新しい治療法の開発に寄与するものと考えられる。本研究により、マウス尾部リンパ浮腫モデルにおいて、自然免疫から獲得免疫への段階的に移行することが明らかになり、線維芽細胞由来の IL-33/ST2 軸が自然免疫と獲得免疫の橋渡しに寄与する可能性が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和7年2月14日及び2月17日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の口頭審査を行った。

リンパ浮腫は、がん治療に伴うリンパ節郭清などによるリンパ管の機能障害により、四肢の間質にリンパ液と脂肪が蓄積する疾患である。一度発症すると完治が困難で、運動障害や繰り返す蜂窩織炎を伴い、患者の生活の質を著しく低下させる。現行の治療法は保存的治療や手術療法が主であり、根本的治療には至っていない。リンパ浮腫の患部では好中球、マクロファージ、リンパ球などの免疫細胞が浸潤し、慢性炎症を引き起こす。特にTh2細胞が病態進行に関与するとされるが、その浸潤のタイミングや他の免疫細胞との関係は不明である。またIL-33は細胞損傷時に放出され、ST2受容体を介してTh2型免疫応答を誘導することが知られているため、リンパ浮腫の進行においてもIL-33/ST2軸が関与する可能性がある。本研究では、マウス尾部リンパ浮腫モデルを用い、リンパ浮腫進行における免疫細胞の動態およびIL-33/ST2軸の誘導について解析を行った。

本研究では、9-10週齢のC56BL/6J雄マウスで尾部リンパ浮腫モデルを作製し、真皮および皮下組織の厚さと線維化面積をMasson's trichrome染色で評価した。免疫細胞の浸潤とサイトカイン発現を、蛍光免疫組織染色およびreal-time RT-PCRで評価した。

本研究では、マウス尾部リンパ浮腫モデルにおいて術後2日目から真皮および皮下組織の厚さが増加し、術後7日目から線維化が進行した。術後2日目に好中球が増加し、術後2から5日目にマクロファージが増加した。CD4⁺T細胞は術後14日目以降に増加し、樹状細胞は術後21日目から増加したことから、CD4⁺T細胞活性化には樹状細胞以外の経路が関与する可能性が示唆された。術後21日目にTh1/Th2サイトカイン(*Il13/Ifng*)のmRNAの発現上昇を認めた。術後2日目にIL-33は線維芽細胞の核で発現し、術後7日目にST2をコードする*Il1rl1*のmRNAの発現上昇を認めたことから、IL-33/ST2軸が自然免疫から獲得免疫への移行中に誘導されることが判明した。

本論文は、マウス尾部リンパ浮腫モデルにおける自然免疫から獲得免疫への移行とIL-33/ST2軸の誘導を明らかにし、リンパ浮腫進行の病態解明に寄与することが期待され、博士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695号 | | |
| 学位授与の日 | 令和7年3月25日 | | |
| 氏名 | Nanushaj Denisa | | |
| 学位論文の題目 | Nucleic acid sensing Toll-like receptors 3 and 9 play complementary roles in the development of bacteremia after nasal colonization associated with influenza co-infection (核酸認識 Toll 様受容体 3 および 9 はインフルエンザ重感染に関連した鼻腔保菌後の菌血症発症過程において相補的な役割を果たす) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 井上 徳光 | |
| | 副査 | 教授 神人 正寿 | 教授 保富 宗城 |

論文内容の要旨

[緒言] Introduction

Recent advancements in molecular biology have allowed for a detailed understanding of disease mechanisms. However, creating animal models remains crucial to accurately reflect disease progression, especially for infectious diseases that involve evaluating host-pathogen interactions. *Streptococcus pneumoniae*, a challenging Gram-positive bacterium, poses a significant threat to neonates and the elderly. While previous studies focused on colonization and transmission, understanding events post-nasopharyngeal invasion by *S. pneumoniae* is still lacking.

Invasion is a major contributor to *S. pneumoniae* morbidity, as the bacterium can migrate to sterile sites like the blood or central nervous system. Host responses to pathogens primarily involve innate immune receptors, such as Toll-like Receptor (TLR) families. TLR2 and TLR4 recognize pneumococcus through lipoteichoic acid and pneumolysin, respectively. Other TLRs located in endosomes recognize nucleic acids from pathogens. TLR3 responds to viral double-stranded RNA, TLR7/8 recognize single-stranded viral RNA, and TLR9 activates in response to DNA with CpG motifs.

Despite previous studies exploring the impact of nucleic acid sensing receptors on pneumococcal infections, there's disparity in conclusions. This study utilizes a mouse model to assess the roles of nucleic acid sensing TLRs in the development of pneumococcal invasive infections arising from nasal carriage.

[方法] Materials and Method

Mice: C57BL/6/J mice were obtained from Charles River Laboratories, and TLR3, TLR7, TLR9, and Unc93b1 KO mice were kindly provided by Prof. Tsuneyasu Kaisho, Prof. Shizuo Akira, and Prof. Kensuke Miyake, respectively. All mice were maintained in a specific pathogen-free environment.

Pathogen Strains and Growth Conditions: Strain P2431 (serotype 6A) and TIGR4 (serotype 4) of *S. pneumoniae*, along with influenza A/HKx31 (H3N2) virus, were used. These pathogens are kind gift from Prof. Jeffrey N Weiser. Bacteria were cultured in Tryptic Soy Broth, and viral concentrations were adjusted by titration in Madin-Darby Canine Kidney cells.

Murine Infection Model: The infection model involved intranasal inoculation of mice with pneumococcal suspension, with or without prior influenza treatment. After 48 hours, mice were euthanized for nasal lavage, lung homogenization, and blood collection.

Nasal Lavage Sample Collection: Nasal lavages were collected, and bacterial density was determined by serial dilution with sterile PBS. The samples were plated on sheep blood agar for quantification of bacteremia.

Blood Sample Collection: Blood samples obtained by cardiac puncture were collected in tubes

containing EDTA to avoid coagulation. After serial dilution with sterile PBS, samples were plated on sheep blood agar for quantification of bacteremia.

Flow Cytometry: Neutrophil and macrophage cell counts in nasal lavages were assessed using flow cytometry. Absolute cell numbers in each sample were determined.

Statistical Analysis: Statistical analyses utilized Kaplan-Meier Log Rank test, Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison, and Fisher's exact test, with GraphPad Prism 8. The significance threshold was set at $p < 0.05$.

[結果] Results

1. Nasal Colonization of Virulent and Less Virulent *S. pneumoniae* Strains: Both the virulent serotype 6A and less virulent TIGR4 strains successfully established stable nasal colonization in all mouse strains, irrespective of TLR activity. Even influenza co-infection did not significantly alter colonization density.

2. Blood Invasion in TLR9 KO Mice after Pneumococcal Mono-infection: TLR9 knockout mice exhibited significantly higher incidence of bacteremia (84.2%) compared to other strains after nasal inoculation with the virulent 6A strain. Co-infection with influenza increased the bacteremia rate in TLR3 KO mice, while TLR9 KO mice showed low bacteremia rates.

3. Impact of Influenza Co-infection on Bacteremia Rate in TLR3 KO Mice: Influenza co-infection, particularly before pneumococcal inoculation, increased the incidence of invasive pneumococcal infection. TLR3 KO mice demonstrated a higher bacteremia rate and density compared to wildtype, while TLR9 KO mice had lower rates. Co-infection timing influenced bacteremia development.

4. Immune Cell Influx in Nasal Cavity: In mono-infection, neutrophil numbers did not vary between mouse strains. However, in pre-infection with influenza, TLR3 KO and Unc93b1 KO mice exhibited inhibited neutrophil migration. The timing of co-infection affected neutrophil migration in TLR3 KO and Unc93b1 KO strains.

5. Worsening Prognosis in TLR KO and Unc93b1 KO Mice: In the mono-infection model, all TLR KO and Unc93b1 KO mouse strains showed poorer survival compared to wildtype. This suggests TLR3, TLR7, and TLR9 signaling are important in preventing the progression from bacteremia to lethal infection.

6. Effect of Influenza Co-infection on Pneumococcal Invasive Infection: Pre-infection with influenza before pneumococcal inoculation decreased survival rates in all mouse strains. Notably, wildtype mice showed significantly poorer survival when infected with influenza before *S. pneumoniae*. Co-infection timing influenced TLR3 KO mice's susceptibility to invasive infection.

[考察と結論] Discussion and Conclusion

Nasal colonization is critical in the onset of pneumococcal diseases, with bacteria facing a 'bottleneck effect' during the transition to bacteremia. TLRs, particularly TLR3, play a role in regulating this bottleneck in the setting of pneumococcal prior infection.

Knockout mice for TLR3, TLR7, and Unc93b1 exhibit poor prognosis, highlighting the significance of TLR signaling in preventing sepsis from bacteremia. Co-infection with influenza alters disease dynamics, with TLR9 KO mice showing no bacteremia, indicating potential compensation by other TLRs activated during influenza. TLR3 KO mice, lacking viral recognition, display increased bacteremia.

Neutrophil influx in the nasal cavity is impaired in TLR3 KO mice, contributing to uncontrolled bacterial dissemination, while TLR9 KO mice show increased neutrophils in co-infection, potentially influencing lower bacteremia rates.

MyD88-dependent signaling, involving TLR7 and TLR9, impacts survival from pneumococcal infection. TLR3 KO mice, with disrupted signaling in viral recognition, fare poorly in co-infection, emphasizing TLR3's role in preventing bacteremia.

Limitations include single TLR KO effects not fully replicating in Unc93b1 knockout mice. The study calls for future investigations with triple TLR knockout models to unravel nuanced mechanisms and factors influencing pneumococcal invasion.

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

On 2025/02/18, and 03/04, the thesis examiners examined the above-mentioned thesis in the presence of the degree applicant.

Streptococcus pneumoniae poses a severe health threat, particularly to infants, the elderly, and immunocompromised individuals, due to its ability to invade the lungs, brain, and bloodstream. Understanding how pneumococci persist in the host and progress to invasive infections is critical for developing effective treatment strategies.

Toll-like receptors (TLRs) are essential components of the innate immune system, with endosomal TLRs specifically recognizing nucleic acids from pathogens. However, their precise roles in pneumococcal diseases remain unclear. This research investigates the impact of TLR3 and TLR9 on the development of bacteremia following nasal colonization, particularly in the context of influenza virus co-infection. Using a mouse model, we analyzed bacterial progression in TLR3 and TLR9 knockout (KO) mice compared to wild-type controls.

Our results revealed distinct roles for TLR3 and TLR9 in regulating bacteremia. In pneumococcal mono-infections, TLR9 KO mice exhibited a higher frequency of bacteremia than wild-type mice, indicating its protective role. Conversely, in influenza-pneumococcal co-infections, TLR3 KO mice showed increased bacteremia, suggesting that TLR3 signaling is particularly important when viral infections precede bacterial colonization. Regardless of infection type, all TLR KO strains displayed poorer survival rates than wild-type mice once bacteremia was established.

These findings demonstrate that nucleic acid-sensing TLRs play complementary roles in preventing pneumococcus-associated bacteremia. While TLR9 is crucial for controlling pneumococcal infections, TLR3 plays a key role in managing secondary bacterial infections following viral illness. This study contributes to our understanding of innate immunity in bacterial infections with/without viral co-infection and highlights the potential for TLR-targeted therapies to mitigate the risk of sepsis and invasive pneumococcal diseases.

By elucidating the mechanisms of TLR3 and TLR9 in bacteremia progression, this research provides valuable insights into host defense of nucleic acid-sensing system against pathogens and paves the way for further studies on immune-modulating strategies for pneumococcal infections. This study is valuable as a doctoral dissertation because it is expected to clarify the involvement of nucleic acid-sensing TLRs in invasive pneumococcal infections and contributes to establish the strategy to prevent disease development by stimulating innate immunity.

This study is considered to be valuable as a doctoral dissertation because it is expected to clarify the involvement of nucleic acid-sensing TLRs in invasive pneumococcal infections and contributes to establish the strategy to prevent disease development by stimulating innate immunity.

| | | | |
|---------|---|-----------|----------|
| 学位記番号 | 博(医)乙第1049号 | | |
| 学位授与の日 | 令和6年7月16日 | | |
| 氏名 | 田端 佳世子 | | |
| 学位論文の題目 | Up-regulation of IGF-1, RANTES and VEGF in patients with anti-centromere antibody-positive early/mild systemic sclerosis (抗セントロメア抗体陽性の早期/軽度全身性強皮症の患者における IGF-1、RANTES、VEGF のアップレギュレーション) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 齋藤 伸一郎 | |
| | 副査 | 教授 井上 徳光 | 教授 藤井 隆夫 |

論文内容の要旨

【背景】

全身性強皮症 (Systemic sclerosis; SSc)は、免疫異常・炎症、血管障害、線維化の3つの病態に特徴づけられている。血管障害の中でも、SScの約80%の患者でレイノー現象が初期症状としてみられ、これらの患者では通常爪郭部毛細血管異常がみられる。遺伝的/環境因子により引き起こされた毛細血管障害が血管内皮細胞を刺激し、血管新生の異常をもたらす、皮膚や臓器において毛細血管拡張、細動脈の狭小化、小血管の消失が起こる。従って、血管障害は早期の段階で生じ、早期診断が重要になる。アメリカリウマチ学会 (American College of Rheumatology; ACR) 1980分類基準と比較してACR/ヨーロッパリウマチ学会 (European League Against Rheumatism; EULAR) 2013分類基準では血管障害を示すより多くの項目が含まれているため早期/軽度SScの診断が可能になった。血管障害のメカニズムとして血管新生因子と抗血管新生因子のアンバランスが重要な役割を果たしており、また複数のサイトカインが血管障害の病態に関与している可能性があると考えられている。そのため本研究では抗セントロメア抗体陽性、レイノー現象を認める患者を pre-clinical stage、mild/early SSc、typical lcSScの3つのgroupに分け、血管新生サイトカインプロファイルを比較し、早期の段階で血管障害に重要なサイトカイン・ケモカインネットワークを決定するために検討を行った。

【方法】

当科通院中のSSc疑いとSScと診断した抗セントロメア抗体陽性の9人の患者の血清を用いて、患者を3つのgroup (Group1はACR/EULAR2013、ACR1980の両基準を満たさない pre-clinical stageの群、Group2はACR/EULAR2013を満たすが、ACR1980は満たさない mild/early SSc群、Group3はACR/EULAR2013、ACR1980の両基準を満たす typical lcSScの群)に分けて検討を行った。20種類のサイトカイン・ケモカイン (angiogenin, EGF, ENA-78, bFGF, GRO, IFN- γ , IGF-I, IL-6, IL-8, LEPTIN, MCP-1, PDGF-BB, PIGF, RANTES, TGF- β 1, TIMP-1, TIMP-2, thrombopoietin, VEGF and VEGF-D)を市販のarray kit (human angiogenesis antibody Array-Membrane, Abcam, Cambridge, UK)を使用して測定した。それぞれのモノクローナル抗体がWellの中にコーティングされているため、患者の血清をそれぞれの膜に加え、その膜上に20種類のサイトカインに対するビオチン化抗体を室温で反応させた。そしてさらにストレプトアビジンでラベルし、detection bufferを加え、ChemiDoc XRS Plus/Gel Doc XR Plus (BioRad, Hercules, CA)を使って可視化した。さらにimage Jソフトウェアを使ってそれぞれのサイトカイン・ケモカインのレベルを定量化した。なお統計解析には、Mann-Whitney U testを行い、相関に関してはピアソンの相関係数を用いて計算した。p値は<0.05を有意差ありとした。

【結果】

PDGF-BB、RANTES、TIMP2 のスポットは group 1-3 いずれも著明に陽性となった。

Group2 における EGF, ENA-78, bFGF, IGF-I, IL-8, MCP-1, TGF β 1, thrombopoietin, VEGF の平均値は Group1 と比べて 2 倍以上であった。Group1 と Group2 の間で統計的に有意差があったのは IGF-1, RANTES, VEGF であった。また Group1 と Group3 の間では VEGF で有意差を認めたが、Group2 と Group3 の間で有意差を認めたサイトカインはなかった。

さらにわれわれは 3 種類の early/mild SSc 関連血管新生サイトカイン間の相関について調べた。IGF-1 と RANTES 間では軽度ではあるが有意な相関を認めたが、RANTES と VEGF 間、VEGF と IGF-1 間では有意な相関は認めなかった。

【考察】

pre-clinical stage (group1)、early/mild SSc (group2)、typical lcSSc (group3) における血管新生関連サイトカインの発現を解析することによって、われわれは 3 つの新しい知見を示すことができたと考えている。まず第一は、group2 における EGF, ENA-78, bFGF, IGF-1, IL-8, MCP-1, TGF- β 1, thrombopoietin, VEGF and VEGF-D の血中レベルが group 1 と比較して増加していて、IGF-1, RANTES and VEGF が有意に増加していたことである。SSc 患者における IGF-1 の血中レベルは正常範囲内であり、IGF-1 と臨床的特徴との間には相関はなかったという報告もあれば、一方で SSc 患者では SLE や健常者に比べて有意に増加し、IGF-1 の血中レベルは dcSSc で、重症な間質性肺疾患を有する患者でより増加していたという報告もある。また RANTES は SSc 患者の皮膚や BALF において過剰に発現していて、その発現が皮膚硬化や間質性肺疾患の進展の予測となりうる。さらに、重度の PAH を有する患者の肺組織には RANTES が発現しているため、RANTES が PAH のバイオマーカーとして役立つかもしれない。さらに VEGF の血中レベルは罹患期間や肺動脈圧、皮膚硬化、爪郭部毛細血管の密度と有意な相関を示すと報告もある。以上より、われわれはこれらのサイトカインが pre-clinical stage から mild/earlySSc への進展に関与する血管新生サイトカインと考えた。

第 2 に、group1 と group3 間で VEGF の血中レベルで有意差を認めたことから、VEGF は typical SSc でさえも持続的に発現が上昇し、上記で述べた見解に一致していると考えられる。一方で group2 と group3 間で有意差を認めたサイトカイン・ケモカインはなかった。従って、血管新生サイトカイン・ケモカインの異常な発現は、すでに early/mild SSc で確立している可能性がある。

第 3 は、IGF-1 と RANTES の血中レベル間で有意な相関があった点である。この結果は early/mild SSc 患者において、これらのサイトカイン・ケモカインは独立して制御されているのではなく、共通の上流因子によって制御されている可能性を示唆する。

以上より、われわれの結果は、3 種類のサイトカイン・ケモカインの血中レベルが、pre-clinical stage SSc と比較して early/mild SSc において変化するため、SSc の進展に関連することが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 6 年 6 月 18 日、20 日、25 日に、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

全身性強皮症 (Systemic sclerosis; SSc) は、免疫異常・炎症、血管障害、線維化の 3 つの病態に特徴づけられる。遺伝/環境因子により引き起こされた毛細血管障害が血管内皮細胞を刺激し、血管新生の異常をもたらし、皮膚や臓器において毛細血管拡張、細動脈の狭小化、小血管の消失が起こる。従って、血管障害は早期の段階で生じ、早期診断が重要になる。

本研究では抗セントロメア抗体陽性、レイノー現象を認める患者を分類基準より pre-clinical stage、mild/early SSc、typical lcSSc の 3 つの group に分け、血管新生サイトカインプロファイルを比較した。早期の段階で血管障害に重要なサイトカイン・ケモカインネットワークを決定するために、20 種類のサイトカイン・ケモカイン (angiogenin, EGF, ENA-78, bFGF, GRO, IFN- γ , IGF-I, IL-6, IL-8,

LEPTIN, MCP-1, PDGF-BB, PIGF, RANTES, TGF- β 1, TIMP-1, TIMP-2, thrombopoietin, VEGF and VEGF-D) を array kit を使用して検討を行った。その結果、PDGF-BB、RANTES、TIMP2 のスポットは group 1-3 いずれも著明に発現が上昇していた。early/mild SSc における EGF, ENA-78, bFGF, IGF-I, IL-8, MCP-1, TGF β 1, thrombopoietin, VEGF の平均値は pre-clinical stage と比べて 2 倍以上であった。

pre-clinical stage と early/mild SSc の間で統計的に有意差があったのは IGF-1, RANTES, VEGF であった。また pre-clinical stage と typical lcSSc の間では VEGF で有意差を認めたが、early/mild SSc と typical lcSSc の間で有意差を認めたサイトカインはなかった。さらに 3 種類の early/mild SSc 関連血管新生サイトカイン間の相関について調べた結果、IGF-1 と RANTES 間では有意な相関を認めたが、RANTES と VEGF 間、VEGF と IGF-1 間では有意な相関は認めなかった。以上より、3 種類のサイトカイン・ケモカインの血中レベルが、pre-clinical stage SSc と比較して early/mild SSc において変化するため、SSc の進展に関連することが示唆された。

本研究は、SSc の病態に対する新たな知見を示しており、学会誌に掲載されたことから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1050号 | | |
| 学位授与の日 | 令和6年10月15日 | | |
| 氏名 | 居平 浩延 | | |
| 学位論文の題目 | Impact of anticancer drugs on the therapeutic efficacy and side effects of hepatic arterial embolization for hepatocellular carcinoma (肝細胞癌に対する肝動脈化学塞栓術における抗癌剤の治療効果や副作用に及ぼす影響) | | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 北野 雅之 | |
| | 副査 | 教授 園村 哲郎 | 教授 川井 学 |

論文内容の要旨

【緒言】

肝細胞癌 (HCC) の治療には、種々の抗癌剤を用いた肝動脈化学塞栓術 (TACE) がしばしば行われている。TACE の抗腫瘍効果には、肝動脈の閉塞による虚血効果と抗癌剤による効果の 2 つの要素があると考えられている。TACE では、エピルビシン (EP)、マイトマイシン C (MMC)、シスプラチン、ドキシソルビシンなどの抗癌剤が用いられてきた。しかし、抗癌剤が TACE の抗腫瘍効果や肝障害に及ぼす影響についてはよくわかっていない。

本研究の目的は、HCC に対する抗癌剤を併用する TACE と抗癌剤を併用しない肝動脈塞栓術(TAE) の治療効果と副作用を比較し、抗癌剤が塞栓術に及ぼす影響を明らかにすることである。

【方法】

■患者

対象は HCC の症例で、標的結節は 1 症例当たり最大 5 個とした。乱数表を用いた完全無作為化デザインで、症例を抗癌剤を併用する TACE 群と抗癌剤を併用しない TAE 群に割り付けた。適格基準は、①造影 CT/MRI で多血性 HCC と診断された症例、②Barcelona Clinic Liver Cancer(BCLC) stage A または B、③TACE や TAE のみで治療予定、④前治療の影響がない(前治療と 4 週間以上の間隔をあける)、⑤患者本人から文書による同意が得られている症例とした。除外基準は、① 門脈 1 次分枝や本幹への浸潤(Vp3 Vp4)、② 肝静脈本幹や下大静脈への浸潤(Vv2 Vv3)、③ 著明な動脈-門脈シャントや動脈-肝静脈シャント、④ 多数の肝外栄養動脈、⑤ T-bil 値>3、⑥ eGFR<30、⑦ 大量の腹水、⑧ ヨードアレルギー、⑨ TACE や TAE 後に RFA や放射線治療などを追加した症例とした。

■治療手技

局所麻酔下に大腿動脈から 4Fr シースを留置し、腹腔動脈や上腸間膜動脈に 4Fr カテーテルを挿入した。CT during hepatic arteriography(CTHA)と CT during arterial portography(CTAP)で肝腫瘍の大きさ、部位や門脈、肝静脈への浸潤の有無などを評価し、腫瘍の栄養動脈を同定した。栄養動脈にマイクロカテーテルを選択的に挿入し治療した。TACE 群では、Lipiodol(Lp)-emulsion(Lp 10mL、造影剤 10mL、EP 40mg、MMC 10mg、ミリプラチン 70mg)を使用した。塞栓物質には、約 2 日で溶解する soluble gelatin sponge(SGS)を用いた。TAE 群では、Lp-emulsion (Lp10mL、造影剤 10mL) を使用し、SGS で塞栓した。塞栓術後の単純 CT で腫瘍への Lp の集積を確認し、手技を終了した。

■検討項目

術後 3 ヶ月の造影 CT または MRI で、抗腫瘍効果を判定した。画像評価は放射線科医 3 名で行い、意見を統合させた。Response evaluation criteria in cancer of the liver(RECICL)を用いて標的結節を Treatment effect(TE)¹⁻⁴ で評価した。Modified Response evaluation criteria in solid tumors(mRECIST)を用いて症例単位の抗腫瘍効果を評価した。Complete response(CR)と Partial response(PR)を効果あり、Stable disease(SD)と Progressive disease(PD)を効果なしとした。治療前と 3 ヶ月後に血液検査を行い、変化量(治療 3 ヶ月後の値-治療前の値)を 2 群間で比較した。

■結節数の設定

Kawai らの報告(*J Vasc Interv Radiol.* 2013;24:1383-90)から、TACE の抗腫瘍効果は 50%、TAE の抗腫瘍効果は 40%と仮定した。TAE が TACE に対して 10%の範囲内で非劣性であることを検証する非劣性試験には、片側有意水準 5%、検出力 80%で 154 結節の治療が必要である。

■統計分析

標的結節治療効果度は治療を固定効果、患者を変量効果とした混合効果モデル解析で評価した。mRECIST による抗腫瘍効果の判定は、Fisher の正確検定を用いて評価した。血液検査値は、t 検定により比較された。各解析において有意水準を 0.05 に設定し、JMP Pro 14.1.0 ソフトウェアを用いて解析した。

【結果】

2012 年 9 月から 2017 年 8 月の間に 59 名の患者が登録され、年齢は 77±8(53-91)歳、男性 43 名、女性 16 名であった。そのうち 5 名が除外された。治療 3 ヶ月後に CT/MRI で評価が行われなかったのが 3 名、治療時の CT で骨転移が認められたのが 1 名、治療時に腫瘍の viable lesion がみられなかったのが 1 名であった。最終的に、54 症例、標的結節 161 個が対象となり、TACE 群は 28 症例 75 結節、TAE 群は 26 症例 86 結節であった。TACE 群では TE4 が 39、TE3 が 7、TE2 が 28、TE1 が 1 結節で、TAE 群では TE4 が 52、TE3 が 7、TE2 が 25、TE1 が 2 結節であった。両群に有意差はなかった ($P=0.877$)。また、効果ありと判定したのが TACE 群で 25/28 例、TAE 群で 19/26 例であり、効果なしと判定したのが TACE 群で 3/28 例、TAE 群で 7/26 例であった。両群に有意差は認められなかった ($P = 0.168$)。血液検査の治療前後の変化量(治療 3 ヶ月後の値－治療前の値)の平均は 10 項目全てにおいて、2 群間に有意差は認められなかった。

【考察】

TACE と TAE の抗腫瘍効果の比較は、TACE の抗腫瘍効果の方が良いとする報告もあれば、両者に差がないとする報告もある。今回の臨床試験では、TACE 群と TAE 群で抗腫瘍効果に有意差はなかった。抗腫瘍効果の差は、使用した抗癌剤と塞栓物質の種類や用量の違いによるものかもしれない。抗癌剤による有害事象について、急性期の肝障害や肝動脈の異常が起こるとする報告がある。今回の臨床試験では、塞栓術後 3 ヶ月の時点で肝障害はなかった。しかし、複数の抗癌剤を大量に投与すると肝障害を起こす可能性がある。HCC に対する TACE では、塞栓物質として Gelpart などの不溶性ゼラチンスポンジがよく用いられるが、その動脈閉塞時間は約 2 週間と考えられている。不溶ゼラチンスポンジを用いた TACE を頻繁に行うと肝動脈閉塞を起こし、治療が困難になることがある。このような事態を避けるため、本臨床試験では約 2 日で溶解する SGS を使用した。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 6 年 9 月 27 日と 10 月 2 日に、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。

肝細胞癌 (HCC) の治療には、種々の抗癌剤を用いた肝動脈化学塞栓術 (TACE) がしばしば行われている。TACE の抗腫瘍効果には、肝動脈の閉塞による虚血効果と抗癌剤による効果の 2 つの要素があると考えられているが、抗癌剤が TACE の抗腫瘍効果や肝障害に及ぼす影響についてはよくわかっていない。本研究では、HCC に対する抗癌剤を併用する TACE と抗癌剤を併用しない肝動脈塞栓術(TAE)の治療効果と副作用を比較し、抗癌剤が塞栓術に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

対象は HCC の症例で、標的結節は 1 症例当たり最大 5 個とした。乱数表を用いた完全無作為化デザインで、症例を抗癌剤を併用する TACE 群と抗癌剤を併用しない TAE 群に割り付けた。TACE 群では、Lipiodol(Lp)-emulsion(Lp 10mL、造影剤 10mL、EP 40mg、MMC 10mg、ミリプラチン 70mg)を使用した。塞栓物質には、約 2 日で溶解する soluble gelatin sponge(SGS)を用いた。TAE 群では、Lp-emulsion (Lp10mL、造影剤 10mL) を使用し、SGS で塞栓した。術後 3 ヶ月の造影 CT または MRI で、抗腫瘍効果を判定した。Response evaluation criteria in cancer of the liver(RECICL)を用いて標的結節を Treatment effect(TE)1-4 で評価した。Modified Response evaluation criteria in solid

tumors(mRECIST)を用いて症例単位の抗腫瘍効果を評価した。Complete response(CR)と Partial response(PR)を効果あり、Stable disease(SD)と Progressive disease(PD)を効果なしとした。治療前と3ヵ月後に血液検査を行い、変化量(治療3ヵ月後の値-治療前の値)を2群間で比較した。Kawaiらの報告(J Vasc Interv Radiol. 2013;24:1383-90)から、TACEの抗腫瘍効果は50%、TAEの抗腫瘍効果は40%と仮定した。TAEがTACEに対して10%の範囲内で非劣性であることを検証する非劣性試験には、片側有意水準5%、検出力80%で154結節の治療が必要であった。

54症例、標的結節161個が対象となり、TACE群は28症例75結節、TAE群は26症例86結節であった。TACE群ではTE4が39、TE3が7、TE2が28、TE1が1結節で、TAE群ではTE4が52、TE3が7、TE2が25、TE1が2結節であり、有意差はなかった。mRECISTによる評価は「効果あり」がTACE群で25/28例、TAE群で19/26例で、「効果なし」がTACE群で3/28例、TAE群で7/26例であり、有意差は認められなかった。血液検査の治療前後の変化の平均は、10項目全てにおいて、有意差は認められなかった。

本研究で、HCCに対する肝動脈塞栓術において、抗癌剤は塞栓術後3ヵ月での治療効果や副作用に影響を与えなかった。肝機能の低下した患者において、抗癌剤を併用しないTAEは1つの選択肢となりうると考えられることから、学位論文として価値あるものと認めた。