

# 博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

平成31年4月～令和2年3月

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

# 目 次

平成31年度（平成31年4月～令和2年3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第 586 号	梶岡 大暉	Bmp4 is an essential growth factor for the initiation of genital tubercle(GT) outgrowth (Bmp4は外生殖器原基の伸長開始に必須の細胞増殖因子である) .....	1
博(医)甲第 587 号	吉田 隆紀	A comparative study of gait characteristics associated with and without degenerative lumbar spondylolisthesis in patients with lumbar spinal stenosis (腰部脊柱管狭窄症患者における腰椎変性すべり症の有無で比較した歩行時の特徴の違いについて) .....	4
博(医)甲第 588 号	張 穎哲	Trps1-deficient transplanted skin gave rise to a substantial amount of hair: Trps1 is unnecessary for hair development (Trps1欠損マウスから移植した皮膚から多量の毛髪が生じた: Trps1は毛髪発育に必要な不可欠な遺伝子ではない) .....	6
博(医)甲第 589 号	黒崎 弘倫	Effects of perinatal blood pressure on maternal brain functional connectivity. (妊婦の脳機能的結合に対する周産期血圧の影響) .....	8
博(医)甲第 590 号	魏 冉	Activation of KEAP1/NRF2/P62 signaling alleviates high phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells by suppressing reactive oxygen species production (KEAP1/NRF2/P62シグナルの活性化はROS産生を抑制することにより高リンで誘導される血管平滑筋細胞の石灰化を減弱させる) .....	11
博(医)甲第 591 号	津田 久美	Widespread abnormalities in white matter integrity and their relationship with duration of illness in temporal lobe epilepsy (側頭葉てんかんにおける白質構造異常と罹病期間の有意な相関) .....	14
博(医)甲第 592 号	Alvin R. Acebedo	Mesenchymal actomyosin contractility is required for androgen-driven urethral masculinization in mice (間葉性のアクトミオシン収縮性は、アンドロゲン依存性の尿道雄性化に必要なである) .....	16
博(医)甲第 593 号	出口 剛士	A population-based study identifies an association of THBS2 with intervertebral disc degeneration (一般住民コホートにおけるTHBS2と椎間板変性との相関解析) .....	18
博(医)甲第 594 号	栗栖 清悟	Clinical polyneuropathy does not increase with prediabetes or metabolic syndrome in the Japanese general population (日本人において臨床的多発神経障害は糖尿病前症やメタボリックシンドロームでは増加しない) .....	20

# 目 次

平成31年度（平成31年4月～令和2年3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第 595 号	河井 伸太郎	Imbalanced expression of IGF2 and PCSK4 is associated with overproduction of big IGF2 in SFT with NICTH: a pilot study. (非β細胞腫瘍性低血糖を生じた孤立性線維性腫瘍において、IGF2とPCSK4の発現のアンバランスはbig IGF2の過剰産生に関連している)	23
博(医)甲第 596 号	大星 裕司	Microstructural abnormalities in callosal fibers and their relationship with cognitive function in schizophrenia: a tract-specific analysis study (統合失調症における脳梁白質神経線維の微細構造異常と認知機能障害の関連)	26
博(医)甲第 597 号	辻本 弘	Serum high mobility group box protein 1(HMGB1)levels reflect clinical features of childhood hemophagocytic lymphohistiocytosis (血清HMGB1値は小児血球貪食リンパ組織球症の臨床的特徴を反映する)	28
博(医)甲第 598 号	水本 有紀	Anti-cancer effects of chemokine-directed antigen delivery to a cross-presenting dendritic cell subset with immune checkpoint blockade (ケモカインを介した樹状細胞サブセットへのがん抗原送達による抗腫瘍効果)	31
博(医)甲第 599 号	上田 陽子	Differential role of GPR142 in tryptophan-mediated enhancement of inslin secretion in obese and lean mice (肥満マウスでのトリプトファン刺激性インスリン分泌におけるGPR142の果たす役割の検討)	35
博(医)甲第 600 号	LE THI HUE	Decl deficiency suppresses cardiac perivascular fibrosis induced by transverse aortic constriction (Dec1欠損がマウス心不全モデルTACによる末梢血管囲の線維化を抑制する)	37
博(医)甲第 601 号	平野 優	The role of Fgf signaling on epithelial cell differentiation in mouse vagina. (マウス膺上皮細胞分化におけるFgfシグナルの役割)	40
博(医)甲第 602 号	湯峰 奈都子	Claudin-1 inhibits human parainfluenza virus type 2 dissemination (クローディン1はヒトパラインフルエンザウイルス2型の感染拡大を阻害する)	43
博(医)甲第 603 号	片山 陽介	Feasibility and Clinical Significance of in vivo Cholesterol Crystal Detection using Optical Coherence Tomography (光干渉断層法による生体内コレステロール結晶の検出と臨床的意義)	46

# 目 次

平成31年度（平成31年4月～令和2年3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第 604号	江守 裕紀	Diagnostic accuracy of quantitative flow ratio for assessing myocardial ischemia in prior myocardial infarction  (陳旧性心筋梗塞の虚血評価におけるquantitative flow ratioの診断精度)	49
博(医)甲第 605号	臼井 恵子	Suppression of neovascularization in corneal stroma in a TRPA1-null mouse.  (TRPA1欠失マウスでは角膜実質の血管新生が抑制される)	52
博(医)甲第 606号	中西 隆	Effect of duration from lingual nerve injury to undergoing microneurosurgery on improving sensory and taste actions :retrospective study.  (舌神経修復術後の知覚および味覚機能回復と舌神経損傷から手術までの期間との関係についての研究)	54
博(医)甲第 607号	神藤 一紀	Prevalence of Facet Effusion and Its Relationship with Lumbar Spondylolisthesis and Low Back Pain : The Wakayama Spine Study  (椎間関節水腫の有所見率と、その腰椎すべりや腰痛との関連性)	57
博(医)甲第 608号	中川 雅文	Influence of Sarcopenia on the Effect of Exercise Therapy for Elderly Patients with Chronic Low Back Pain  (高齢慢性腰痛患者に対する運動療法の効果におけるサルコペニアの影響)	60
博(医)甲第 609号	上西 啓裕	Defective arterial blood pressure response during head-up tilt in patients with aneurysm of the aortic arch  (弓部大動脈瘤患者における起立負荷に対する血圧応答の減弱)	63
博(医)乙第 982号	阿部 唯一	Molecular mechanisms of the antispasticity effects of baclofen on spinal ventral horn neurons  (バクロフェンの脊髄前角細胞における抗痙縮メカニズム)	65
博(医)乙第 983号	津田 早耶	Patient self-reported symptoms using visual analog scales are useful to estimate endoscopic activity in ulcerative colitis  (潰瘍性大腸炎におけるVisual Analog Scaleによる自覚症状の評価と内視鏡的活動性との関連)	67
博(医)乙第 984号	楠本 浩貴	Cellular stress induces cancer stem-like cells through expression of DNAJB8 by activation of heat shock factor 1  (細胞ストレスはHSF1の活性化によりDNAJB8の発現を通して癌幹細胞を誘導する)	70

# 目 次

平成31年度（平成31年4月～令和2年3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)乙第 985号	重河 嘉靖	Overexpression of KDM5B/JARID1B is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma (ヒストン脱メチル化酵素KDM5B/JARID1Bの高発現は肝細胞癌における予後不良因子である)	73
博(医)乙第 986号	児玉 芳季	Molecular diagnosis of lymph node metastasis in patients with upper urinary tract cancer who underwent lymphadenectomy (拡大リンパ節郭清術を行った腎盂尿管癌患者におけるリンパ節転移についての分子診断)	76
博(医)乙第 987号	新谷 ゆかり	Comparison of Subjective and Objective Assessments of Neurosensory Function after Lingual Nerve Repair (舌神経障害の術後の主観的および客観的評価の比較検討)	79
博(医)乙第 988号	土岐 明子	Clinical introduction and benefits of non-invasive ventilation for above C3 cervical spinal cord injury (C3以上頸髄損傷に対する非侵襲的人工換気の臨床導入とその利点)	81
博(医)乙第 989号	清野 慧至	Topical hyaluronan alone promotes corneal epithelial cell migration whereas combination with benzalkonium chloride impairs epithelial wound healing (ヒアルロン酸点眼は単独では角膜上皮創傷治癒を促進するが、塩化ベンザルコニウムとの組み合わせでは上皮創傷治癒を遅延させる)	83
博(医)乙第 990号	高田 幸尚	Effects of prostaglandin F2alpha derivative glaucoma drug on EGF expression and E-cadherin expression in corneal epithelial cell line (角膜上皮細胞におけるEGFとE-cadherinの発現に対するプロスタグランジンF2 $\alpha$ 緑内障製剤の効果)	86
博(医)乙第 991号	石橋 達也	Nicotinic acetylcholine receptor signaling regulates inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ activation to protect $\beta$ -cells against terminal unfolded protein response under irremediable endoplasmic reticulum stress (ニコチン性ACh受容体シグナルは不可逆的な小胞体ストレス下でIRE1 $\alpha$ 活性およびT-UPRを制御し膵 $\beta$ 細胞を保護する)	89
博(保)第 6号	寒川 友起子	Brachial-Ankle Pulse Wave Velocity in Healthy Japanese Adolescents: Reference Values for the Assessment of Arterial Stiffness and Cardiovascular Risk Profiles (若年者における上腕-足首間脈波伝播速度の評価基準値の作成と心血管リスクの評価に対する有効性)	92

学位記番号	博(医)甲第586号		
学位授与の日	平成31年4月16日		
氏名	梶岡 大暉		
学位論文の題目	Bmp4 is an essential growth factor for the initiation of genital tubercle (GT) outgrowth. (Bmp4 は外生殖器原基の伸長開始に必須の細胞増殖因子である)		
論文審査委員	主査	教授 平井 秀一	
	副査	教授 原 勲	教授 山田 源

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

外生殖器は、種の保存に関わる重要な器官である。胎仔の外生殖器は、初期の発生過程において雌雄共通に伸長し、胎生後期では男性ホルモン（アンドロゲン）の影響により顕著な性分化を示す。外生殖器原基である生殖結節（GT; Genital tubercle）の伸長は、Fgf（線維芽細胞増殖因子）、Wnt/ $\beta$ -catenin、Shh（ソニックヘッジホッグ）、Bmp（骨形成因子）などの細胞増殖因子群や Hox 遺伝子や p53 ファミリーなどの転写因子により厳密に制御されている。GT は総排泄腔より伸長し、その伸長過程において一過性の構造として遠位尿道上皮（DUE; Distal Urethral Epithelium）が形成される。器官形成過程において一過的に形成される重要な上皮構造は、一般に signaling center とも称され、上皮-間葉相互作用を介した器官構築に不可欠である。

四肢は、外生殖器と同様に体幹部から伸長する器官である。四肢形成を制御する遺伝子は、外生殖器形成に関与する遺伝子群との類似性が報告されている。ヒト発生異常に関する知見から、手足生殖器症候群などの四肢及び外生殖器双方に形態異常を示す例が報告されている。しかしながら、両原基の伸長器官として共通の分子形成基盤の存在は十分に解明されていない。よって、GT 伸長制御機構の理解は、外生殖器などの伸長器官の発生機序の一端を理解するだけでなく、ヒト先天性疾患の病態発症機構解明に繋がると期待される。

Bmp リガンドの一種である Bmp4 は、肢芽の signaling center の形成及びその初期伸長に不可欠な細胞増殖因子である。GT において、Bmp4 と受容体である Bmpr1a を介したシグナルは DUE 及びその周辺の間葉の細胞増殖・細胞死を制御し、GT の伸長を一種抑制的に調節することが報告されている。しかしながら、その知見は概して GT の伸長後の解析結果であり、GT の伸長開始過程における意義は未解明であった。そこで、本研究は GT 伸長開始における Bmp4 を介したシグナル系の意義を理解するために、コンディショナルなミュータントマウス（*Bmp4*cKO）を *Hoxa3<sup>Cre/+</sup>* ドライバーマウスを用いて作製し、その機能の解析を行なった。

### 【材料及び方法】

#### マウス

遺伝子発現解析には、ICR マウス（日本クレア）の胎仔を用いた。GT 伸長開始における Bmp4 の機能を明らかにするため、総排泄腔を含む体幹後部に Cre を発現する *Hoxa3Cre* ドライバーマウス（*Hoxa3<sup>Cre/+</sup>*）及び *Bmp4<sup>flox/flox</sup>* マウスを用いた。他の遺伝子改変マウスは、*R26R-LacZ*、*Shh<sup>neo</sup>* を用いた。

#### 遺伝子発現解析

##### 1) Whole mount *in situ* hybridization for RNA expression.

4%パラホルムアルデヒド（PFA）を含む固定液によりマウス外生殖器試料を固定し、メタノール/PBST により加水処理を施し、6%過酸化水素水で漂白した。その後、0.2%グルタルアルデヒド/4%PFA/PBST で再固定化処理した。0.5mg/ml Digoxigenin (DIG) 標識した RNA プローブをハイブリダイゼーション溶液に添加し、70度で16時間処理し、ブロッキング溶液で希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体を用いて、BM purple AP substrate で発色反応を行った。

##### 2) Section *in situ* hybridization for RNA expression.

パラフィン連続組織切片を作製し親水処理後、4%PFA/PBS 溶液により再固定化し、1.0  $\mu$ g/mL の DIG 標識した RNA プロブ (*Bmp4*, *p63*) を添加し、65°C で 1 晩ハイブリダイゼーションした。その後、ブロッキング溶液で希釈した 0.1% アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体で 60 分間室温にて抗原抗体反応させ、5-Bromo, 4-Chloro, 3-indolylphosphate (BCIP) 及び Nitroblue tetrazolium (NBT) 基質を用いて発色した。

#### 免疫組織化学、H&E (Hematoxylin&Eosin) 染色及び LacZ 染色

パラフィン連続組織切片を作製後親水化し、抗原賦活化処理を行った。ブロッキング溶液で希釈した pERK 抗体を加え、4°C で 1 晩抗原抗体反応し、発色は、ABC と TSA によるシグナル増強処理後、DAB 染色法を用いた。

LacZ 染色の為に Rosa26 レポーターマウス (R26R-LacZ) の胎仔を固定溶液 (1%ホルマリン、0.2%グルタルアルデヒド、0.02%NP40、1xPBS) に浸し 4°C で 1 時間処理し、発色反応を 30°C で 1 晩行い、発色後は、4%PFA により固定処理した。

#### **【結果】**

1. *Bmp4* mRNA は、GT の伸長開始以前の総排泄腔領域に発現していた。
2. *Bmp4* cKO マウスの GT は、間葉性因子 (*Wnt5a*, *Hoxd13*) の発現低下に伴い、野生型マウスの GT に比較して低形成であった。
3. *Bmp4* cKO マウス GT において、*Fgf8* 及びその下流シグナルである活性型 ERK (pERK) の発現が野生型マウス GT よりも低下していた。また、GT の伸長開始以前の総排泄腔領域の *p63* の発現も低下していた。
4. *Bmp4* cKO マウスの GT において、*Shh* は、野生型と同様に総排泄腔領域に発現していた。また、*Shh* KO マウスの GT において、*Bmp4* は、総排泄腔領域に発現し、野生型と比べその顕著な発現の変化は観られなかった。

#### **【考察】**

これまで、上皮分化に重要な転写因子 p63 および Shh は、GT の伸長開始に不可欠な因子であることが判明している。本研究は、*Bmp4* が p63 を介して Shh シグナル非依存的に GT の伸長開始を制御する因子であることを示唆した。GT の伸長後に形成される DUE は、上皮-間葉相互作用を介して *Wnt5a* や *Hoxd13* などの間葉性因子の発現を制御し、伸長維持に重要な一過性の上皮構造であることが知られている。枝芽の伸長過程において間葉細胞由来の *Bmp4* は signaling center の形成に不可欠であり、間葉細胞特異的に *Bmp4* を欠損させたマウス枝芽の低形成が報告されている。今回、総排泄腔及びその周辺間葉において *Bmp4* を欠損させた *Bmp4* cKO マウスの GT は、低形成であることが判明した。同ミュータントマウスは、DUE のマーカー遺伝子である *Fgf8* の発現を消失していた。以上から、*Bmp4* は伸長器官である枝芽及び GT の伸長開始を正に制御する一種共通の制御因子である可能性が示唆された。*Hoxa13* 及び *Hoxd13* は、四肢および外生殖器に異常を呈する手足生殖器症候群 (Hand-Food-Genital Syndrome) の責任遺伝子である。両遺伝子の遺伝子変異マウスでは、四肢及び外生殖器がともに低形成となる。本研究は、*Bmp4* が DUE 形成を介して *Hoxd13* の発現制御する可能性を示唆した。しかしながら、DUE を介した *Hoxd13* の発現制御をはじめ、*Bmp4* が如何に GT の伸長開始及び DUE の形成を制御するのか、その詳細な分子機構は不明である。今後、*Bmp4* による p63 や DUE を介した間葉性因子の詳細な発現制御解析や GT の伸長開始における細胞増殖等に対する評価が課題である。

#### **【結語】**

GT の伸長過程における *Bmp4*/*Bmpr1a* シグナルは、伸長に対して抑制的に制御することが判明していた。本研究から *Bmp4* は、GT の伸長開始に不可欠な因子であることが判明した。よって、*Bmp4* による GT の伸長制御は、伸長開始前後で、その制御において異なる側面を有することが明らかとなった。本研究により、手足生殖器症候群など伸長器官に対して共通に異常を示す先天性疾患の発症機構への理解が進むことが期待される。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 31 年 3 月 13 日及び 15 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。

外生殖器は、種の保存に関わる重要な器官である。胎仔の外生殖器原基である生殖結節（GT； Genital tubercle）は総排泄腔より伸長し、その伸長過程において一過性の構造として遠位尿道上皮（DUE； Distal Urethral Epithelium）が形成される。器官形成過程において一過的に形成される重要な上皮構造は、一般に signaling center と称され、上皮-間葉相互作用を介した器官構築に不可欠である。四肢は、外生殖器と同様に体幹部から伸長する器官である。四肢形成を制御する遺伝子は、外生殖器形成に関与する遺伝子群との類似性が報告されている。ヒト発生異常に関する知見から、手足生殖器症候群などの四肢及び外生殖器双方に形態異常を示す例が報告されている。しかしながら、両原基の伸長器官として共通の分子形成基盤の存在は十分に解明されていない。

Bmp リガンドの一種である Bmp4 は、枝芽の signaling center の形成及びその初期伸長に不可欠な細胞増殖因子である。GT において、Bmp4 と受容体である Bmpr1a を介したシグナルは DUE 及びその周辺の間葉の細胞増殖・細胞死を制御し、GT の伸長を一種抑制的に調節することが報告されている。しかしながら、その知見は概して GT の伸長後の解析結果であり、GT の伸長開始過程における意義は未解明であった。そこで、本研究は GT 伸長開始における Bmp4 を介したシグナル系の意義を理解するために、コンディショナルなミュータントマウス（*Bmp4* cKO）を *Hoxa3*<sup>Cre/+</sup> ドライバーマウスを用いて作製し、その機能の解析を行なった。

本研究の結果、*Bmp4* mRNA は、GT の伸長開始以前の総排泄腔領域に発現していた。*Bmp4* cKO マウスの GT は、間葉性因子（*Wnt5a*, *Hoxd13*）の発現低下に伴い、野生型マウスの GT に比較して低形成であった。*Bmp4* cKO マウス GT において、*Fgf8* 及びその下流シグナルである活性型 ERK（pERK）の発現が野生型マウス GT よりも低下していた。また、GT の伸長開始以前の総排泄腔領域の *p63* の発現も低下していた。*Bmp4* cKO マウスの GT において、*Shh* は、野生型と同様に総排泄腔領域に発現していた。また、*Shh* KO マウスの GT において、*Bmp4* は、総排泄腔領域に発現し、野生型と比べその顕著な発現の変化は観られなかった。

GT の伸長過程における Bmp4/Bmpr1a シグナルは、伸長に対して抑制的に制御することが判明していた。本研究から Bmp4 は、GT の伸長開始に不可欠な因子であることが判明した。よって、Bmp4 による GT の伸長制御は、伸長開始前後で、その制御において異なる側面を有することが明らかとなった。本研究により、手足生殖器症候群など伸長器官に対して共通に異常を示す先天性疾患の発症機構への理解の進展が期待され、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587号		
学位授与の日	平成31年4月15日		
氏名	吉田 隆紀		
学位論文の題目	A comparative study of gait characteristics associated with and without degenerative lumbar spondylolisthesis in patients with lumbar spinal stenosis (腰部脊柱管狭窄症患者における腰椎変性すべり症の有無で比較した歩行時の特徴の違いについて)		
論文審査委員	主査	教授 山田 宏	
	副査	教授 田島 文博	教授 川上 守

## 論文内容の要旨

はじめに：腰椎変性すべり症（DS）は、腰部脊柱管狭窄症（LSS）の典型的な疾患の1つである。

DSの特徴としては、下位腰椎に対する上位腰椎の前方への滑り、腰部不安定性、腰椎前弯角度および体格指数（BMI）の高値が挙げられる。過去の研究では、身体組成や画像所見から得られた骨アライメントなどからDSの特徴的な因子を検討している。またDSの外科的治療の好ましい結果は広く認識されているが、一部の症例は隣接する椎体または手術した椎体の再手術が必要である。したがって、DSの再発を防ぐことは、患部の椎体のアライメントを改善するだけでなく、DS発生のメカニズムに対応することが重要といえる。しかし過去の報告は、DSを引き起こす素因を調べるために歩行など動的な場面を測定して検討したものはない。そのため歩行解析を用いた動的な評価は、DSの予防や治療のためのさらなる情報を提供するかもしれない。そこで本研究の目的は歩行時のDSの特徴を調べることとした。

方法：本研究の参加者は、ミエログラフィー検査目的で入院したLSS患者42名とした。なお脊椎手術の既往者や安静時に腰部や下肢痛が強く歩行困難なものは除外対象とした。測定は、X線画像から決定された腰椎前弯角、仙骨傾斜角、腰椎滑り率やチューリッヒ跛行アンケート（ZCQ）、視覚アナログスケール（VAS）、およびBMIとした。DSを5%以上の滑り率として定義し、参加者をDSおよび非DS群に分類した。歩行解析は、参加者が5mの距離を2往復している間を4台のハイスピードカメラと3次元動作解析機（Frame-DIAS IV：DKH、日本）で撮影して解析した。歩行解析による測定項目は、歩幅、歩行スピード、歩行時の踵接地時（HC）と足尖離地時（TO）における両下肢の股関節、膝関節、足関節の関節角度、体幹傾斜角度を測定した。加えて身体重心（COM）を3次元動作解析機より算出して上半身と下半身の重心位置の特性を知るためにU-COM長とL-COM長を調べた。U-COM長は上半身のCOMと全身のCOMとの矢状面の距離であり、L-COMの長さは下半身のCOMと全身のCOMとの矢状面の距離とし、正規化のために測定された長さを身長で除して参加者の平均身長を積した値を採用値とした。統計学的検討は、Mann-WhitneyのU検定を用いて各DSおよび非DS群の評価項目を比較した。次いで多変量解析（ロジスティック回帰分析）は、U検定で有意差のあった測定項目を説明変数とし、DSと非DSを従属変数として検討した。本研究は、和歌山県立医科大学倫理委員会によって承認されている。

結果：参加者はDS群の21名（男性9名、女性12名、平均年齢77.8歳）、非DS群の21人（男性10人、女性11人、平均年齢80.1歳）に分類された。腰椎前弯角度は、非DS群（ $35.5 \pm 16.0^\circ$ ）に比較してDS群（ $43.1 \pm 12.6^\circ$ ）に有意な高値を認めた。HCおよびTOにおけるDS群にU-COM（HC: DS群（ $-0.8 \pm 0.6$ ）、非DS群（ $-0.3 \pm 0.4$ ）、TO: DS群（ $-0.3 \pm 0.5$ ）、非DS群（ $0.1 \pm 0.1$ ））およびL-COM（HC: DS群（ $1.9 \pm 1.3$ ）、非DS群（ $0.2 \pm 1.1$ ）TO: DS群（ $0.8 \pm 1.1$ ）、非DS群（ $-0.2 \pm 0.1$ ））に有意な延長を認めた。仙骨傾斜角、ZCQ、VASおよびBMI、歩行時における歩幅、歩行スピード、角度評価に有意差はなかった。多変量解析において交絡因子として腰椎前弯角で調整したとき、HCとTOのL-COM長が有意な変数として認められた。

考察：本研究では、LSS 症例の DS の有無で比較することで歩行時における DS の特徴的因子を検討した。DS 群は腰椎の前弯が強く、歩行時に U-COM と L-COM が延長しており、矢状面上で身体は後方に傾いていた。DS 群は、腰椎の前弯が強いため歩行時における踵接地時の体重緩衝作用が脆弱となることが考えられる。また HC に身体が後方傾斜することで床反力によって発生する慣性力により腰椎が並進方向に前進する力が増大すると推定され、これが DS の特徴である下腰椎に対する上腰椎の前方への滑りへと繋がるのではないかと推察される。また我々の研究は、L-COM 長が DS の有無に関係していることを示した。そのため DS は、腰椎のみの問題でなく下肢の影響を受けていることが考えられる。DS 群の腰椎のせん断力は、腰椎に前弯を改善することに加えて、HC 時の床反力を緩衝するように杖などを使うことで DS の予防や症状の進行に役立つ可能性を持つと考えられた。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 31 年 3 月 6 日、7 日、12 日に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。腰部脊柱管狭窄症(LSS)は、間欠性跛行が特徴であり QOL を低下させる。LSS の中でも腰椎変性すべり症 (DS)は、典型的な疾患の 1 つである。その DS の特徴には、腰部の不安定性、腰椎の過前弯、Pelvic incidence や Body Mass Index (BMI)の高値などが報告されている。しかし過去の研究は身体的特徴や静的アライメントの評価であり、動作時の評価で特徴を検討したものはない。そこで本研究は、LSS における DS の有無で歩行時の特徴を検討した。本研究の参加者は、ミエログラフィー検査目的で入院した LSS 患者 42 名とした。なお脊椎手術の既往者や安静時に腰部や下肢痛が強く歩行困難なものは除外対象とした。方法は、X 線画像を使用して腰椎のすべり率、腰椎前弯角、仙骨傾斜角を計測した。DS はすべり率 5%以上とした。加えてチューリッヒ跛行質問表 (ZCQ)、Visual Analogue Scale (VAS)をアンケート調査した。歩行分析は、三次元動作解析装置 (Flam-DiasIV)を使用した。評価項目は、歩行中の踵接地時 (IC)と足尖離地時 (TO)の両下肢関節角度、体幹傾斜度とした。また IC と TO の矢上軸上の上半身質量中心と身体質量中心の距離 (U-COM 長)、下半身質量中心と身体質量中心の距離 (L-COM 長)を各身長で除した補正値を採用値とした。統計学的検討は、マンホイットニーの U 検定を用いて DS 群及び DS のない(Non-DS 群)の各評価を比較した。次いで多変量解析 (ロジスティック回帰分析)は、U 検定で有意差のあった評価項目を説明変数とし、DS 群と Non-DS 群を従属変数して検討した。有意水準は 0.05 とした。参加者は DS 群の 21 名 (男性 9 名、女性 12 名、平均年齢 77.8 歳)、Non-DS 群の 21 人 (男性 10 人、女性 11 人、平均年齢 80.1 歳)に分類された。DS 群は腰椎前弯角が有意な高値 (DS 群 vs Non-DS 群 ; $43.1 \pm 12.6^\circ$  vs  $35.5 \pm 16.0^\circ$ )であり、IC と TO に U-COM 長、L-COM 長の有意差を認めた (DS 群 vs Non-DS 群 :IC ;U-COM 長 ; $0.8 \pm 0.6$  vs  $-0.3 \pm 0.4$ 、L-COM 長 ; $1.9 \pm 1.3$  vs  $0.2 \pm 0.4$ ) (TO :U-COM 長 ; $-0.4 \pm 0.5$  vs  $0.1 \pm 0.1$ 、L-COM 長 ; $0.8 \pm 1.1$  vs  $-0.2 \pm 0.1$ )。その他の項目に有意差はなかった。多変量解析において DS 群と Non-DS 群を従属変数、IC と TO の U-COM 長と L-COM 長を説明変数として腰椎前弯角を交絡因子で調整すると、IC の L-COM 長が有意な変数として認められた (ORs :4.3、 $\beta$  :1.4、95%CI :1.1-17.9)。DS の歩行中の IC および TO において U-COM 長および L-COM 長は両方で延長され、上半身と下半身の身体質量中心を結ぶ線は、矢状面上で後方傾斜していた。IC に身体が後方傾斜することで床反力によって発生する慣性力により上半身が並進方向に前進する力が増大すると推定され、これが DS の特徴である下腰椎に対する上腰椎の前方への滑りへと繋がるのではないかと推察される。また我々の研究は、L-COM 長が DS の有無に関係していることを示した。そのため DS は、腰椎のみの問題でなく下肢の影響を受けていることが推察される。DS の腰椎のせん断力は、腰椎に過前弯を改善することに加えて、IC 時の床反力を緩衝するように杖などを使うことで DS の予防や症状の進行に役立つ可能性を持つと考えられた。本論文は、過去の研究になかった DS 症例の歩行時の特徴を示し、DS 発症や症状進行の予防に対する今後の研究に 貢献できるものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第588号		
学位授与の日	平成31年4月16日		
氏名	張 穎哲		
学位論文の題目	Trps1-deficient transplanted skin gave rise to a substantial amount of hair: Trps1 is unnecessary for hair development (Trps1 欠損マウスから移植した皮膚から多量の毛髪が生じた : Trps1 は毛髪発育に必要不可欠な遺伝子ではない)		
論文審査委員	主査	教授 村田 晋一	
	副査	教授 近藤 稔和	教授 村垣 泰光

## 論文内容の要旨

### [諸言]

Trps1 は毛包形成の間、上皮と間葉細胞との相互作用に関係する重要な遺伝子と考えられている。我々が行った以前の研究より、Trps1 KO 新生児マウスの皮膚では毛包の数が野生型新生児マウスと比較して有意に低下していることが分かっている。これはヒトの毛髪・鼻・指節症候群 (Tricho-rhino-phalangeal syndrome: TRPS) における毛髪形成異常と矛盾しない表現型であり、Trps1 が毛髪形成に重要であることを示唆する現象である。本研究では毛髪形成における Trps1 がどのような役割を果たすのかに関する Trps1 の機能を明らかにする目的で研究を行った。

### [方法]

Trps1 KO マウスは出生後数時間で呼吸不全により死亡してしまうということ、また、ヘテロの Trps1 KO マウスでは毛髪の発現型は野生型と比較してほとんど差を見出せないという理由により Trps1 KO 新生児マウスの皮膚をヌードマウスに移植し、その移植皮膚における毛包および毛髪組織の検索を行った。野生型マウスおよび Trps1 KO マウスはヘテロマウスを交配して得られた新生児マウスを PCR により遺伝子型を決定した。新生児マウスの背中の皮膚を剥離し、6 mm 径の皮膚生検用トレパンにより移植片を作製した。野生型およびホモ Trps1 KO 新生児マウスからそれぞれ20移植片をヌードマウスに移植した。移植皮膚片は移植後継時的に40週まで観察し、HE染色用、免疫組織用およびRNA抽出用に標本を作成した。統計分析には Student-Newman-Keuls テストと Student's t-test を用いて行った。

### [結果]

- Trps1 KO 新生児マウスでは毛包の様相と形態に異常がみられた。  
以前の論文で報告した様に Trps1 KO 新生児マウスでは存在はしていたが、野生型新生児マウスと比較してその数が減少し、分布がまばらでかつ毛包径が小さかった。
- 移植後42日において Trps1 KO マウスから毛髪が野生型と同程度に発育したが、その様相は異なっていた。  
もし Trps1 KO マウスが生存した時、毛髪が発育するかどうかを調べるために、新生児マウスの背部皮膚をヌードマウスに移植した。驚いたことに、移植後42日で比較した時、Trps1 KO マウスから移植した皮膚から野生型マウスと同じ長さかつ同じ密度で毛髪が発育した。しかし、Trps1 KO マウスから発育した毛髪は野生型より柔らかい性状だった。
- Trps1 KO マウスと野生型新生児マウス皮膚の移植後42日の組織学的解析  
毛髪径および毛包径ともに Trps1 KO マウスでは野生型マウスと比較して有意に減少していた。しかしながら、毛包の密度は両者に有意差は認められなかった。

### [考察]

新生児マウスにおいては毛包数が野生型マウスと比較して半数であり、毛髪が発育もみられなかった Trps1 KO マウスの移植皮膚から野生型マウスと同等の毛髪が発育したメカニズムは不明であるが、移植片の環境が Trps1 KO から野生型に変化したことによると考えられた。毛髪が発育そのものに関

して Trps1 は直接必要ないことが本研究から明らかになった。今後さらに毛髪発育についての Trps1 の詳細な機能を解明する必要がある。

#### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成31年3月25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。

毛髪・鼻・指節症候群（Tricho-rhino-phalangeal syndrome:TRPS）は禿頭、洋梨状の鼻等の頭蓋形成異常と指節骨の円錐状骨端を主徴とする常染色体優性遺伝形式を有するヒトの遺伝性疾患である。本症候群の原因遺伝子はTRPS1でありマウスにおける研究より転写調節因子であることが知られている。Trps1を欠損したTrps1KOマウスは頭蓋形成異常、円錐状骨端および毛嚢数の減少等、ヒトのTRPSと類似した表現型を示し、ヒトTRPSの良いモデルマウスであると考えられる。しかしヘテロのTrps1KOマウスにおいてはヒトTRPSの特徴の一つである毛髪異常は明らかではなく、また、ホモのTrps1KOマウスは生後まもなく死亡することから、毛髪発育過程におけるTrps1機能を解析するのが困難である。そこで本研究では、毛髪の発育異常に関するTrps1が果たす役割を知る目的で、ホモTrps1KO新生児マウスの皮膚をヌードマウスに移植し、Trps1欠損で毛髪が発育するのか、もし発育するとすれば野生型と比較してその性状はどうか、またその分子機構は何なのかを検索した。ヘテロTrps1KOマウスを交配し、野生型およびヘテロまたはホモTrps1KO新生児マウスを得、それぞれの背部から皮膚片を剥離してヌードマウス背部に移植した。野生型、ヘテロおよびホモの移植片はそれぞれ20組織片を用いた。移植後1週間隔で42日まで組織片を採取しそれぞれの移植皮膚からHE染色用標本、免疫組織用標本、およびRNAを調整した。移植後42日において野生型、ヘテロおよびホモTrps1KOの移植片で最も肉眼的および組織学的差異が明瞭であったため、解析には移植後42日の皮膚移植片を用いた。

新生児Trps1KOマウスの皮膚では毛嚢の数は野生型と比較して約半数であり、毛髪の発生もほとんどみられなかった。そのことから移植皮膚片でも毛髪の発育異常がみられることを予想したが、移植後Trps1KOマウス皮膚片からも毛髪は発育した。しかしながら肉眼的にはTrps1KOマウスの毛髪の性状は野生型と比較して細く、柔らかい毛髪であった。移植後42日の皮膚における解析において、Trps1KOマウスでは毛嚢の密度は野生型と比較して有意差は認められなかったが、毛嚢の直径および毛髪の直径はTrps1KOマウスにおいて優位に減少していた。両者の違いの原因を探るべく、毛髪サイクルに関与する数ある分子の中からAndrogen ReceptorとWnt inhibitorに注目してReal-timePCRおよび免疫組織化学による解析を行ったが、両者の間に有意差を認めることができなかった。また、新生児マウス皮膚を用いたLacZ染色による解析ではTrps1は真皮乳頭だけでなく、毛嚢周囲の皮膚成分にも発現がみられた。このことからヌードマウスへの皮膚移植により分子機構は不明だが毛嚢周囲の環境が変わり、Trps1欠損した毛嚢からも毛髪が発育し得ることが考えられた。

以上より本論文は、TRPS1は毛髪の発生には必須の分子ではないが、その欠損により正常の毛髪形成が障害され軟毛となることを示すものであり、ヒトTRPSにおける症状の一つである禿頭の病態解明および治療につながる基礎的研究であることから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第589号		
学位授与の日	令和元年5月21日		
氏名	黒崎 弘倫		
学位論文の題目	Effects of perinatal blood pressure on maternal brain functional connectivity. (妊婦の脳機能的結合に対する周産期血圧の影響)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 川股 知之

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

妊娠高血圧症候群は、妊娠中の最も一般的な合併症である。中でも妊娠高血圧症腎症 (Pre-eclampsia; PE) は、脳機能障害や脳血管障害を併発しやすく、長期予後を検討した研究では認知機能障害を起こすことが報告されている。また、妊娠高血圧症候群には、妊娠高血圧腎症だけでなく Gestational Hypertension (高血圧のみ呈するもの) も含まれる。ほとんどが予後良好であるが、PE と同様な脳機能障害を起こすことがある。

一般的に高血圧は認知障害や白質障害発症と関連し、臨床症状出現前に脳の機能的ネットワークの変化が生じることが知られている。したがって、妊娠高血圧症候群においても、PE の合併に関わらず、高血圧それ自体が脳の機能的結合 (Functional Connectivity; FC) に影響を与え、脳機能に障害を引き起こす可能性がある。

そこで、PE 合併妊婦と健常妊婦 (Healthy Control; HC) で、安静時機能的 MRI (functional MRI; fMRI) を用いて、①妊婦において血圧が安静時脳機能的結合に影響を与えるか、②それに PE の有無が関与しているか、を検討した。

### 【方法】

本研究を行うに際して和歌山県立医科大学倫理審査委員会の承認を得た (1198 号)。

#### 1. 被験者

被験者全員に説明を行い、書面による同意を得た。2012年9月から2014年8月までに和歌山県立医科大学附属病院で妊娠管理を受けた妊婦を対象とし、PE と診断された妊婦 21 人 (PE 群)、及び健常妊婦 16 人 (HC 群) からのデータを解析した。PE の診断基準は国際ガイドラインに準拠した。

#### 2. 血圧測定・血清マーカー測定

分娩当日まで、血圧は上昇する傾向にあるため、分娩当日の最も高い血圧を記録した。PE の重症度マーカーとして、静脈血中の可溶性 fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt1) と胎盤性成長因子 (PlGF) の比 (sFlt1/PlGF) を分娩直後に測定した。

#### 3. MRI データ撮像と解析

MRI 撮像は、分娩から 10 日以内に行われた。構造画像と安静時機能画像は 3.0T MRI 装置 (PHILIPS, Amsterdam, the Netherlands) に、32 チャネルのコイルを用いて撮像した。安静時脳機能的結合評価として FC を灰白質ボクセルから算出した。さらに、1 つのボクセルとその他の全灰白質ボクセルとの平均の FC として regional global connectivity (rGC) を算出した。

#### 4. 血圧と rGC との相関

収縮期高血圧よりも拡張期血圧 (dBp) が全身合併症発生と関連があると報告されているため dBp と rGC の関連を検討した。さらに、dBp と rGC が統計学的に有意な相関性を示した領域を特定し、その領域を seed とした。Seed とその他の灰白質ボクセルとの FC を用いて、dBp が FC と関連している領域を調べた。

#### 5. PE の関与についての検討

dBp と rGC および FC との相関に、PE の有無が影響するかを明らかにするために、以下の項目を検討した。

1) dBp と rGC あるいは FC との相関性を、PE 群と HC 群それぞれで検討した。

2) PEの重症度とrGCの関連を検討した。

6. dBPがBOLD信号に与える影響について

fMRIのBOLD信号は脈拍と血管床の修飾を受ける(BOLD信号のvascular coupling)。dBPとrGCあるいはFCの相関が、高血圧によるvascular couplingの影響を受けたかどうかを検討した。Vascular couplingに関しては、variance of the global signal(全脳灰白質信号の分散)とvariance of the white matter signal(前頭葉白質信号の分散)を用いて評価した。

1) 高血圧によるvascular couplingの有無を評価するために、dBPとvariance of the global signal、dBPとvariance of the white matter signalの相関を検討した。

2) 高血圧によるvascular couplingがrGCに影響を与えたかを評価するために、variance of the global signalとrGC、variance of the white matter signalとrGCの相関を検討した。

## 【結果】

1. dBPと関連するrGCの部位の特定

はじめに、全被験者でdBPと相関を示すrGC領域を検索した。その結果、前頭葉の2領域でdBPとrGCが有意な相関を示した(左眼窩前頭野と右眼窩前頭野)。左眼窩前頭野、右眼窩前頭野の中でdBPと最も相関性の高かったボクセルをそれぞれregion of interest A(ROIA)、ROI Bとした。ROIAとROI BでPE群とHC群に分けてdBPとrGCの相関を検討した。その結果、ROIAでは、HC群およびPE群で、dBPはrGCと負の相関を示したが、ROI BではHC群のみでdBPとrGCが負の相関を示した。

2. vascular couplingとdBP、rGCとの関係

variance of global signalはdBPと負の相関を示したが、variance of white matter signalはdBPと有意な相関はなかった。

次に、rGCとvascular couplingの相関を検討した。ROIA、ROI B両方でrGCとvariance of global signalとの間に正の相関を認めた。一方で、rGCとvariance of white matter signalには、ROIAとROI Bいずれにおいても有意な相関を認めなかった。

以上により、高血圧によるvascular couplingがdBPとrGCの相関に影響を与えたことが明らかになった。

3. vascular couplingの影響を除外したdBPとrGCの関係

全被験者で、vascular couplingの影響を除外して、dBPとrGCの相関性を検討した。dBPとrGCの相関性を、variance of the global signal, variance of the mean white matter signalを共変量としたSpearmanの部分相関係数を用いて検討した結果、dBPとrGCは相関を示した。

次に、HC群とPE群に分けて検討した場合、ROIAとROI BではHC群でdBPとrGCが負の相関を示したが、PE群では相関しなかった。

4. dBPとFCとの相関性について

全被験者を対象として、ROI AをseedとしたFCの検討をしたところ、前帯状回と右前頭葉に、dBPとFC値の間に有意な負の相関が認められた。前帯状回と右前頭葉で、HC群とPE群に分けて検討した場合、両群ともにdBPとFC値との間に有意な負の相関が示された。

一方で、ROI BをseedとしたFC値とdBPとが有意な相関性をもつ領域はなかった。

5. rGCとPEの重症度との関係

rGCとsFlt1/PIGFの間には有意な相関関係は認められなかった。これによりrGCはPEの重症度に影響されないことが示された。

## 【考察】

1) 左眼窩前頭野(ROIA)と右眼窩前頭野(ROI B)のrGCのdBPとの間に負の相関があった。

2) ROIAをseedとした場合、ROIAと2領域(前帯状回と右前頭葉)とのFCはdBPとの間に負の相関があった。

3) PEの有無に関わらず、ROIAをseedとしたFCとdBPとの間には負の相関関係が存在した。

以上により、PEの有無に関わらず、周産期の血圧上昇は脳のネットワークに影響を及ぼすことが示された。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 31 年 4 月 1 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。

妊娠高血圧症候群は、妊娠中の最も一般的な合併症である。中でも PE は、脳機能障害や脳血管障害を併発しやすく、長期予後を検討した研究では認知機能障害を起こすことが報告されている。また、妊娠高血圧症候群には、PE だけでなく高血圧のみ呈する Gestational Hypertension も含まれる。ほとんどが予後良好であるが、PE と同様な脳機能障害を起こすことがある。

一般的に高血圧は認知障害や白質障害発症と関連し、臨床症状出現前に脳の機能的ネットワークの変化が生じることが知られている。したがって、妊娠高血圧症候群においても、PE の合併に関わらず、高血圧それ自体が FC に影響を与え、脳機能に障害を引き起こす可能性がある。

そこで、PE 合併妊婦と健常妊婦で、安静時機能的 MRI を用いて、①妊婦において血圧が安静時脳機能的結合に影響を与えるか、②それに PE の有無が関与しているか、を検討した。脳機能の指標として、FC と、rGC を用いた。

その結果、

- 1) 左眼窩前頭野と右眼窩前頭野の rGC と拡張期血圧との間に負の相関があった。
- 2) 左眼窩前頭野を seed とした場合、左眼窩前頭野と 2 領域（前帯状回と右前頭葉）との FC は拡張期血圧との間に負の相関があった。
- 3) PE の有無に関わらず、左眼窩前頭野を seed とした FC と拡張期血圧との間には負の相関関係が存在した。

本論文は、周産期の血圧上昇が脳のネットワークに影響を及ぼすことを示した研究である。現在、PE と診断された患者は、子癇発作などの重篤な中枢神経症状が出現しないように降圧薬を用いて厳格な血圧管理を受ける。本研究は、たとえ PE と診断されていない場合でも、周産期の血圧上昇自体が脳のネットワークを変化させようことをはじめて提示したものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第590号		
学位授与の日	令和元年8月6日		
氏名	魏 冉		
学位論文の題目	<b>Activation of KEAP1/NRF2/P62 signaling alleviates high phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells by suppressing reactive oxygen species production</b> (KEAP1/NRF2/P62 シグナルの活性化は ROS 産生を抑制することにより高リンで誘導される血管平滑筋細胞の石灰化を減弱させる)		
論文審査委員	主査	教授 藤吉 朗	
	副査	教授 近藤 稔和	教授 村垣 泰光

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

動脈石灰化は慢性腎臓病、粥状硬化、糖尿病等の疾患に関連した共通の合併症である。それには酸化ストレス、炎症性サイトカイン、細胞外マトリックスの変化や骨発生に似たカルシウム・リンレベルの増加などを含む異常な環境に対する細胞反応が関係している。この過程で血管平滑筋細胞が脱分化を起こし、骨形成に転換することが血管石灰化を起こすことになる。酸化ストレスは血管平滑筋細胞の骨軟骨分化転換の重要なメディエーターと言われているが、酸化ストレス存在下では活性酸素種(ROS)は脂肪過酸化、DNA や蛋白に対する一連の障害、他の異常生体化学変化を引き起こす。

KEAP1/ NRF2 系は酸化ストレスに対する主な細胞防御機構の一つとして最近明らかとなってきたものであり、古典的経路と非古典的経路を介して活性化される。古典的経路においては NRF2 は生理的条件下で KEAP1 によって負に制御され抑制される。細胞内の酸化還元バランスの変化に曝された時、KEAP1 はシステイン残基の修飾を介して不活性化され、NRF2 と反応する活性を失う。結果として、NRF2 は KEAP1-NRF2 複合体から切り離され核に移行し、そこで抗酸化および抗炎症遺伝子の発現を起こす。他方で非古典的経路は特徴的で KEAP1/NRF2/P62 軸を介する経路である。P62 はオートファジー、酸化ストレスや癌のための多くの細胞機能を担う選択的なオートファジーのアダプター蛋白である。生理学的条件下では、P62 はオートファゴゾームの中へ KEAP1 を隔離させ、NRF2 のユビキチン化を傷害し、NRF2 を核内に遊離して多くの細胞防御遺伝子の発現をすることが示されてきた。NRF2 の集積は細胞防御遺伝子の発現を誘導する一方、NRF2 の標的である P62 の遺伝子のプロモーターには抗酸化反応因子を含んでおり、そこに NRF2 が結合すると P62 遺伝子発現が亢進する。これは KEAP1/NRF2/P62 軸の中に正のフィードバックループが存在することを意味する。本研究では高リンで誘導される血管石灰化と KEAP1/NRF2/P62 経路の相互反応に焦点を当て、血管石灰化が KEAP1/NRF2/P62 抗酸化経路とどの程度関連しているかについて観察を行った。

### 【方法】

カルシウム沈着を検知するためにはアリザリンレッド染色とフォンコッサ染色を用いた。また細胞の ROS レベルを測定するために 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)を使用した。NRF2, P62, KEAP1 と NRF2 の下流遺伝子 NQO-1 と HO-1 や造骨遺伝子である BMP2, CBFA1, osteopontin、そして平滑筋細胞マーカー  $\alpha$ -SMA の mRNA 発現はリアルタイム PCR で測定した。また NRF2, P62, KEAP1 等の蛋白発現はウェスタンブロットにより検索した。平滑筋細胞内の蛋白の発現または局在の検索には蛍光免疫染色を用いた。

### 【結果】

1. 高リン濃度の暴露は血管平滑筋細胞の酸化ストレスと石灰化を促進する。
2. 高リン濃度の暴露は NRF2 の転写活性を亢進し、その核内移行を促進する。
3. 高リン濃度の暴露は血管平滑筋細胞に石灰化を起こす間 KEAP1 と P62 の発現に影響を与える。
4. tBHQ は血管平滑筋細胞の酸化ストレスおよび石灰化を減弱させる。
5. tBHQ は KEAP1/NRF2/P62 シグナルを介して血管平滑筋細胞の石灰化を軽減させる。

6. NRF2 または P62 の発現抑制は高リンにより誘導される血管平滑筋細胞の石灰化を亢進させ、tBHQ による石灰化抑制効果を喪失させる。

#### 【考察】

本研究では高リン濃度で誘導される血管平滑筋細胞の酸化ストレスと、それにより誘発される石灰化が KEAP1/NRF2/P62 シグナルに関連して起こることを示した。高リン刺激により血管平滑筋細胞内で NRF2、P62 発現が亢進し、それと共に血管平滑筋細胞に石灰化が起こることから KEAP1/NRF2/P62 シグナルの亢進が石灰化を起こすシグナルと考えられたが、NRF2 活性を tBHQ によりさらに亢進させることにより石灰化を抑制されたことより、KEAP1/NRF2/P62 シグナルは酸化ストレスと関連して反応性に働く抗酸化シグナルであることが分かった。高リン刺激が酸化ストレスとして働くと KEAP1/NRF2/P62 シグナルが作用して、それとは別経路で働く造骨シグナルに対して抑制をかけていることが考えられた。抗酸化シグナルが十分でない時石灰化が起こるが、そのシグナルを tBHQ でさらに亢進させると石灰化を減弱させることが可能であることが明らかとなった。逆に NRF2 または P62 の発現抑制時には石灰化の程度は増加し、さらに tBHQ の石灰化抑制効果も喪失されたことから、NRF2 と P62 が主な抗酸化シグナルとして血管石灰化に働くものと考えられた。KEAP1/NRF2/P62 シグナルと酸化ストレスおよび血管石灰化との相互反応は複雑であり、さらなる詳細な検討が必要であると考えられる。

#### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和元年7月22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。

各臓器の機能不全を起こす動脈硬化性病変の重要な病態として動脈の石灰化が挙げられるが、糖尿病、腎不全または加齢などが原因となる。その中で腎不全により高リン血症をきたすことにより起こるメンケベルグ型中膜石灰化または粥状硬化内石灰化は循環障害の予後を悪化させる病態として重要であるが、それを起こす詳細な分子機構は不明である。本学位論文では、高リン刺激により血管平滑筋細胞に生じる酸化ストレスに注目し、抗酸化ストレスシグナルである KEAP1/NRF2/P62 シグナルと血管石灰化との関連性についての研究を行った。

ヒト大動脈由来培養血管平滑筋細胞を2.7mMカルシウム、3mMリンを含む培養液で7日間培養し石灰化を誘導した。石灰化の程度はアリザリンレッド染色により定量した。またその時生じる活性酸素種（ROS）を測定した。平滑筋細胞から骨芽細胞への分化転換はBMP2, CBFA1, OPNおよび $\alpha$ SMAの遺伝子発現で、また抗酸化ストレスシグナル分子であるKEAP1, NRF2, P62とその下流遺伝子であるH01, NQO-1の発現をqPCR, Western blotおよび免疫組織化学により検索した。またNRF2の活性化物質にはtert-butylhydroquinone (tBHQ) を0-100 $\mu$ Mの濃度勾配をつけて投与し、平滑筋細胞石灰化との関連性について観察を行った。さらにNRF2とP62に対するsiRNAを用いてノックダウンを行い、石灰化の程度の変化およびKEAP1, NRF2, P62の細胞内クロストークについて検索した。

高リン刺激を7日間行うことにより培養血管平滑筋細胞におけるROSの産生はコントロールと比較して4.3倍に増加し、骨形成遺伝子の発現増加を伴って石灰化を起こした。KEAP1の発現は低下する一方、P62発現量は増加し、細胞質内のNRF2は核内移行を示し下流遺伝子H01, NQO-1発現は増加した。血管平滑筋細胞の石灰化の程度はtBHQの濃度依存性に減弱し100 $\mu$ Mでは石灰化はほとんど認められなかった。またtBHQの細胞毒性との関係で、20 $\mu$ Mが血管平滑筋細胞の石灰化を抑制する至適濃度であることを見出した。tBHQの添加により高リン刺激で誘導されるNRF2の発現量はさらに増加し核内移行するタンパク量が増加した。それに伴いROS量は減少し、骨芽細胞への分化転換は抑制され石灰化の程度は減弱された。P62およびKEAP1発現量は高リン刺激単独投与と比較して正常レベルに回復を示した。逆にNRF2とP62のノックダウンにおいては高リン刺激によるROSレベルは高度に増加し石灰化は増悪した。またNRF2またはP62のノックダウンでは相互の発現を抑制したがKEAP1発現に対してはNRF2とP62ノックダウン両方において著明な蛋白レベルの増加がみられた。

以上より本論文は、高リン刺激による血管平滑筋細胞の石灰化が細胞内酸化ストレスと関連して起こり、抗酸化ストレスシグナルを亢進させることにより ROS を抑制し、血管平滑筋細胞石灰

化の程度を減弱し得ることを示したものである。抗酸化ストレスシグナルの細胞内クロストークは血管平滑筋細胞石灰化に密接に関連しており、将来的に血管石灰化治療につながる可能性があることを示唆したことから、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591号		
学位授与の日	令和元年9月17日		
氏名	津田 久美		
学位論文の題目	Widespread abnormalities in white matter integrity and their relationship with duration of illness in temporal lobe epilepsy (側頭葉てんかんにおける白質構造異常と罹病期間の有意な相関)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 鶴飼 聡

## 論文内容の要旨

### 【諸言】

側頭葉てんかん(temporal lobe epilepsy, TLE)は、成人におけるてんかんの最も一般的な病態であり、慢性の経過をとる重要な疾患である。TLEの慢性の経過中に生じる脳障害の病態生理の解明の手法のひとつとして、近年では脳構造画像を応用した脳全体の構造的結合を評価する手法が用いられている。構造的結合の障害の指標のひとつである白質の障害の定量には、拡散テンソルイメージング(diffusion tensor imaging, DTI)がしばしば使用される。DTIは白質神経線維の微細構造を可視化し、白質の異常を捉えることができる画像解析法であり、その解析法のひとつであるTBSS (tract-based spatial statistics)は全脳を探索的に解析するもので、DTIの定量的解析法の中で再現性と客観性に優れている。

TBSSを用いて、これまでにTLEにおける側頭葉、辺縁系領域を超えた領域での白質障害が報告されている(Liu 2015, Riley 2010)。しかし、この広範な白質変化の病態生理は未だ解明されておらず、さらに、TLEへの長期間の罹患が進行性の脳損傷を引き起こすかどうかについては結論が出ていない。そこで、慢性期のTLE患者を用いてTBSSにおける種々のDTI指標を健常群と比較し、慢性期のTLE患者における脳全体の白質障害を検討するとともに、白質障害とTLEの罹病期間との関連を明らかにすることを目的に本研究をおこなった。

### 【方法】

1989年版の国際抗てんかん連盟のてんかん、てんかん症候群および関連発作性疾患の分類に基づいてTLEと診断され、頭部MRIにて海馬萎縮以外の病変を認めず、精神遅滞・神経症状の異常を合併しない患者で、さらに1年以内にてんかん発作がない者を除外した上で、研究に同意が得られた15例をTLE群とした。TLE群の年齢は $36.2 \pm 14.0$ 歳、罹病期間は $21.6 \pm 15.5$ 年であった。健常対照(HC)群は17名で、年齢・性別をTLE群と合致させた。3テスラのMRI装置でDTIを撮像し、The Oxford FMRIB Software Library (FSL 5.05)のTBSSを用いて解析した。被験者のDTIデータをFSLにて歪み補正し、fractional anisotropy (FA、拡散異方性)、mean diffusivity (MD、平均拡散能)、axial diffusivity (AD、神経線維に沿った方向の拡散係数)、radial diffusivity (RD、神経線維と直交する方向の拡散係数)画像を作成した。解析対象となる個々人の脳画像を、MNI152標準空間上に位置合わせした。各被験者のFA画像は標準脳に変換し、全被験者共通の主要白質領域(スケルトン)を抽出した。そのスケルトン上に各被験者のFA値を投影し、FA値の群間差を解析した。MD、AD、RDのデータについても同様に空間正規化し、FAスケルトンへ投影した。統計解析にはFSLに含まれるrandomiseを用い、並べ替え検定を行った。年齢と性別を共変量としてTLE群とHC群の差異を検討した。TFCE (threshold-free cluster enhancement)を使用して、randomiseは5,000回くり返した。FWE (familywise error)補正を用いて多重比較補正し、 $p < 0.05$ を有意水準とした。同様に、MD、AD、RDの群間比較をそれぞれ行った。TLE群において、4つのDTI指標各々の全脳の平均値と罹病期間との相関を検討した。その際、年齢と性別を共変量とした。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、すべての対象者から文書による同意を取得した。

### 【結果】

TLE群はHC群に比べて両半球での辺縁系領域、側頭葉領域とそれに接続する白質領域だけでなく、

遠隔の白質領域において FA 値の低下、MD 値の上昇、RD 値の上昇が認められた。AD 値では有意差を認めなかった。罹病期間と全脳の前平均 FA 値は有意な負の相関、全脳の前平均 MD 値、RD 値にはそれぞれ有意な正の相関を示した。AD 値は有意な相関を認めなかった。罹病期間と DTI 指標との相関がある脳部位も、辺縁系領域、その接続領域および遠隔の白質領域に広がっていた。

#### 【考察】

TLE 群では発作焦点に隣接する側頭葉・辺縁系の領域と、それらの接続する領域だけではなく、広範囲の白質に障害の存在が示された。この結果は、長期の罹病によって白質の障害が広範囲に及ぶことを示唆する。本研究では、既研究でほぼすべて報告されている FA 値の低下、MD 値の上昇に加えて、ほぼ重なる領域での RD 値が上昇し、AD 値が変化しないことがみられた。

FA 値の低下、MD 値と RD 値の上昇、AD 値の変化なしとのパターンは、ミエリン及び軸索損失の組み合わせを反映しており (Sen 2005)、本研究は TLE の白質神経障害の病態の理解を深める結果を提供した。

また、罹病期間と全脳の前平均 FA 値は有意な負の相関、全脳の前平均 MD 値、RD 値にはそれぞれ有意な正の相関を示した。罹病期間と有意に相関がある部位は、海馬・辺縁系領域を超えた広範囲の白質領域であった。

これらの結果は、長期に罹患によって側頭葉や辺縁系とてんかん発作の焦点活動と直接接続のない白質を含んだ広範囲の白質領域が進行性に障害を受ける可能性を示唆する。

#### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和元年 8 月 5 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

本論文の目的は、拡散テンソルイメージング(diffusion tensor imaging, DTI)の TBSS (tract-based spatial statistics)を用いて、側頭葉てんかん(temporal lobe epilepsy, TLE)における白質線維の変化を健常群との比較で検討するとともに、この変化と罹病期間との関連を明らかにすることである。

1989 年版の国際抗てんかん連盟のてんかん、てんかん症候群および関連発作性疾患の分類に基づいて TLE と診断され、頭部 MRI にて海馬萎縮以外の病変を認めず、精神遅滞・神経症状の異常を合併しない患者で、さらに 1 年以内にてんかん発作がない者を除外した上で、研究に同意が得られた 15 例を TLE 群とした。TLE 群の年齢は  $36.2 \pm 14.0$  歳、罹病期間は  $21.6 \pm 15.5$  年であった。健常対照(HC)群は 17 名で、年齢・性別を TLE 群と合致させた。3 テスラの MRI 装置で DTI を撮像し、The Oxford FMRIB Software Library (FSL 5.05)の TBSS を用いて解析した。TBSS は全脳を探索的に解析し、DTI の定量的解析法の中で再現性と客観性に優れた方法である。拡散異方性(fractional anisotropy, FA)、平均拡散能(mean diffusivity, MD)、神経線維に沿った方向の拡散係数(axial diffusivity, AD)、神経線維と直交する方向の拡散係数(radial diffusivity, RD)の 4 つの DTI 指標を算出し、TLE 群と HC 群の差異を検討した。さらに TLE 群において、4 つの DTI 指標各々の全脳の前平均値と罹病期間との相関を検討した。

TLE 群は HC 群に比べて両半球の辺縁系領域、側頭葉領域とそれに接続する白質線維だけでなく、遠隔の白質線維で FA 値の低下、MD 値および RD 値の上昇を示したが、AD 値では有意差を認めなかった。罹病期間と全脳の前平均 FA 値は有意な負の相関を、MD 値および RD 値はそれぞれ有意な正の相関を示したが、AD 値は有意な相関を認めなかった。罹病期間と DTI の 3 つの指標との間で有意な相関を認めた部位は辺縁系領域とその接続領域および遠隔の白質領域に広がっていた。結果は、TLE の長期の罹患によって発作焦点に隣接する側頭葉・辺縁系領域およびそれらに接続する領域だけではなく、広範囲な白質に障害が及ぶことを示唆する。

本論文は、TLE における大脳白質異常と罹病期間との関係を DTI の 4 つの指標で検討した初めての報告であり、TLE においては側頭葉・辺縁系とそれに接続する領域だけではなく、てんかん発作の焦点活動と直接接続のない白質を含む広範囲な白質領域が進行性に障害を受け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 592号		
学位授与の日	平成元年9月24日		
氏名	Alvin R. Acebedo		
学位論文の題目	Mesenchymal actomyosin contractility is required for androgen-driven urethral masculinization in mice (間葉性のアクトミオシン収縮性は、アンドロゲン依存性の尿道雄性化に必要である)		
論文審査委員	主査	教授 井原 義人	
	副査	教授 山田 源	教授 井上 徳光

## 論文内容の要旨

### Abstract

The morphogenesis of mammalian embryonic external genitalia or genital tubercle (GT) shows dynamic differences between males and females. In genotypic males, GT are masculinized in response to androgen signaling. Disruption of this process can give rise to multiple male reproductive organ defects such as hypospadias. Currently, mechanisms of androgen-driven sexually dimorphic organogenesis are still unclear. We show here that mesenchymal-derived actomyosin contractility, by non-muscle myosin heavy chain IIB (MYH10), is essential for the masculinization of mouse GT. MYH10 is expressed prominently in the bilateral mesenchyme of male GT. Androgen induces MYH10 protein expression and actomyosin contractility in the bilateral mesenchyme. Inhibition of actomyosin contractility through blebbistatin treatment and mesenchymal genetic deletion induced defective urethral masculinization with reduced mesenchymal condensation. We also suggest that actomyosin contractility regulates androgen-dependent mesenchymal directional cell migration to form the condensation in the bilateral mesenchyme leading to changes in urethral plate shape to accomplish urethral masculinization. Thus, mesenchymal-derived actomyosin contractility is indispensable for androgen-driven urethral masculinization.

### Results

1. The GT bilateral mesenchyme condensed close to the urethral plate epithelium during urethral masculinization. The male GT bilateral mesenchyme is defined by increased expression of the cell adhesion protein, N-CADHERIN, and the mesenchymal markers, SALL1 and MAFB.
2. MYH10 showed higher expression in male GT bilateral mesenchyme compared to female. Additionally, actomyosin contractility, as shown by immunostaining for p-MLC, was increased in the male GT bilateral mesenchyme
3. Pharmacologic inhibition of actomyosin contractility by blebbistatin in the GT slice culture inhibited urethral masculinization with reduced mesenchymal condensation as shown by histological analysis and lower N-CADHERIN expression. Additionally, blebbistatin-treatment disrupted directional mesenchymal cell migration.
4. Mesenchymal deletion of *MYH9/MYH10* by the *Sall1<sup>CreERT2/+</sup>* driver mice resulted in defective urethral masculinization with unfused ventral cleft. Mutant mice also showed reduced mesenchymal condensation with lower N-CADHERIN expression.
5. Treatment with the potent androgen, 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone (DHT), induced MYH10 and p-MLC expression in female GT slice cultures.

### Discussion

*Actomyosin contractility* is a highly conserved mechanism underlying cell adhesion, cell migration, cell shape and tissue morphogenesis. In this study, we report a mechanism wherein mesenchymal-derived actomyosin contractility can contribute to the fusion of the midline epithelia during GT urethral masculinization. Disruption in androgen signaling leads to congenital anomalies including hypospadias which encompasses phenotypes involving ventral ectopic urethral openings. MYH10 and p-MLC were expressed prominently in the male

bilateral mesenchyme in an androgen dependent manner. Pharmacologic inhibition of actomyosin contractility by blebbistatin treatment in the GT slice cultures drastically reduced androgen-induced directional cell migration, mesenchymal condensation and prevented urethral masculinization. Furthermore, mesenchymal deletion of *Myh9* and *Myh10* using the *Sall1<sup>CreERT2/+</sup>* driver mice resulted in similar defects in urethral masculinization. Thus, it is suggested that actomyosin-regulated directed cell migration contributes to condensation of the bilateral mesenchyme and to urethral masculinization. These results indicate that androgen-induced, mesenchymal-derived actomyosin contractility is essential for urethral masculinization. Actomyosin contractility thus represents a novel process for the regulation of sexually dimorphic organogenesis.

## Conclusion

Actomyosin contractility is necessary for the androgen-driven and sexually dimorphic condensation of the male mesenchyme. Additionally, actomyosin-regulated mesenchymal condensations contribute to urethral epithelium morphogenesis. These findings further highlight the importance of mesenchymal dynamics for epithelial morphogenesis as a novel mechanism for the regulation of sexually dimorphic organogenesis.

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和 元年 7月 31日、論文審査委員会は、学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

外生殖器形成は、雌雄共通の原器である生殖結節から始まり、男性ホルモンであるアンドロゲンの作用により男性特有の形態、すなわち性差を形成する。尿道形成は、外生殖器に見られる性差の中でも顕著な性差形成過程であるが、アンドロゲンによる尿道形成メカニズムは、ほとんどわかっていない。

アクトミオシン収縮の主要構成因子である非筋細胞ミオシン重鎖 IIB (MYH10) は、尿道形成に不可欠なオスの尿道両側間葉領域に発現していたことから、尿道形成過程におけるアクトミオシン収縮の重要性が想起された。そこで本研究は、器官培養実験および遺伝子改変マウス解析を駆使して、アンドロゲン依存性の尿道形成過程におけるアクトミオシン収縮の意義を検討した。アクトミオシン収縮の阻害剤であるブレビスタチンを用いた阻害実験から、アクトミオシン収縮は、アンドロゲン依存性の尿道両側間葉の凝集形成および方向性を持った細胞移動を制御し、尿道形成に不可欠であることを見出した。さらに尿道両側間葉細胞特異的にアクトミオシン収縮を喪失させた遺伝子改変マウスでは、尿道形成が著しく阻害されたことから、尿道形成過程における間葉性アクトミオシン収縮の重要性が明らかになった。また、アンドロゲンは、非筋細胞ミオシン重鎖 IIB タンパクの発現、アクトミオシン収縮の活性化を促進することが明らかになった。

本研究は、マウス胎仔組織切片を用いた器官培養、ライブイメージングシステム、遺伝子改変マウスを駆使して、間葉性アクトミオシン収縮による尿道両側間葉細胞の凝集形成および細胞移動制御がマウス尿道形成に不可欠であることを明らかにし、アンドロゲンによる性差形成機構の一端を初めて明らかにした。本研究で得られた知見および実験システムを活用することにより、これまで謎に包まれてきたアンドロゲンによる性差形成メカニズムの理解が飛躍的に進むことが期待され、博士論文に値すると考える。

学位記番号	博(医)甲第593号		
学位授与の日	令和元年9月17日		
氏名	出口 剛士		
学位論文の題目	A population-based study identifies an association of <i>THBS2</i> with intervertebral disc degeneration (一般住民コホートにおける THBS2 と椎間板変性との相関解析)		
論文審査委員	主査	教授 雑賀 司珠也	
	副査	教授 伊東 秀文	教授 山田 源

## 論文内容の要旨

### 【目的】

腰痛の原因の一つされる椎間板変性 (DD) は古典的 twins 研究により多因子遺伝疾患であることが明らかとなり、その後いくつかの感受性遺伝子が報告されている。しかし、その多くは再現性に乏しく、感受性遺伝子と DD との臨床的関連性は明らかになっていない。再現性が得られない原因の一つに、DD の疾患概念が明確でなく表現型が統一されていないことが挙げられる。また、DD の発症や進行は椎間板高位の違いに影響される。異なる椎間板高位では、環境要因や遺伝要因の関与の程度も異なることが twins 研究の結果からも推察される。本研究では DD の遺伝的関与を明らかにするために、和歌山県の一般住民コホートである Wakayama Spine Study (WSS) において、既報の SNPs と椎間板変性との関連性を調べた。

### 【方法】

対象は WSS に参加し、全脊柱 MRI 撮像と血液ゲノム抽出を行った 1605 名 (年齢 26-98 歳、平均 67 歳) である。DD の評価には Pfirrmann 分類 (Grades 1-5) を用いた。再現性を検討する遺伝子として生物学的な根拠が認められ、DD との有意な相関が報告されている 8 つの SNPs を選択した。統計解析は Pfirrmann grade を目的変数、各 SNP の発現リスクアレル数を説明変数、年齢・性別・BMI を調整変数とする重回帰モデルを作成し、DD と各 SNP の関連性を検討した。

### 【結果】

頸胸椎移行部 (C7/T1) とその下位 (T3-4 と T4-T5) と胸腰椎移行部 (T12/L1) の DD grade と *THBS2* (Thrombospondin 2) の rs9406328 リスクアレル数との間に有意な相関を認めた。中でも T12/L1 における相関が最も大きかった (OR 1.27, 95%CI 1.05 to 1.53) が、同高位ではリスクアレル数と年齢との間に交互作用を認めた。つまり若年ほどリスクアレル数が DD grade に及ぼす影響が大きく、高齢では SNP の影響が小さくなっており、リスクアレル数の影響を受けるのは 60 歳代以下であることが判明した。遺伝形式は劣性遺伝と推測された。

### 【考察および結論】

*THBS2* は DD と相関があり、60 歳代以下の年齢でその影響が強い。高リスク群では若年で DD となりやすい。また、今回 *THBS2* の有意な影響が確認された椎間高位では全脊柱の中で DD 有病率が低いことが Teraguchi らにより報告されている。中高年の一般住民を対象に DD の遺伝因子検索を行うには、これらの椎間高位に着目するのが良いと考える。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和元年8月8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。

腰痛の原因の一つされる椎間板変性 (Disc Degeneration: DD) は古典的 twins 研究により多因子遺伝疾患であることが明らかとなり、その後いくつかの感受性遺伝子が報告されている。しかし、その多くは再現性に乏しく、感受性遺伝子と DD との臨床的関連性は明らかになっていない。再現性が得られない原因の一つに、DD の疾患概念が明確でなく表現型が統一されていないことが挙げられる。

また、DDの発症や進行は椎間板高位の違いに影響される。異なる椎間板高位では、環境要因や遺伝要因の関与の程度も異なることが双子研究の結果からも推察される。申請者らはDDの遺伝的関与を明らかにするために、和歌山県の一般住民コホートであるWakayama Spine Study (WSS)において、既報のSNPsと椎間板変性との関連性を調べ、その中でも1つのSNPが椎間板変性に寄与していることを明らかにした。

対象はWSSに参加し、全脊柱MRI撮像と血液ゲノム抽出を行った1605名(年齢26-98歳、平均67歳)である。DDの評価にはPfirrmann分類(Grades 1-5)を用いた。再現性を検討する遺伝子として生物学的な根拠が認められ、DDとの有意な相関が報告されている8つのSNPsを選択した。

統計解析はPfirrmann gradeを目的変数、各SNPの発現リスクアレル数を説明変数、年齢・性別・BMIを調整変数とする重回帰モデルを作成し、DDと各SNPの関連性を検討した。

頸胸椎移行部(C7/T1)とその下位(T3-4とT4-T5)と胸腰椎移行部(T12/L1)のDD gradeとTHBS2(Thrombospondin 2)のrs9406328リスクアレル数との間に有意な相関を認めた。中でもT12/L1における相関が最も大きかった(OR 1.27, 95%CI 1.05 to 1.53)が、同高位ではリスクアレル数と年齢との間に交互作用を認めた。つまり若年ほどリスクアレル数がDD gradeに及ぼす影響が大きく、高齢ではSNPの影響が小さくなっており、リスクアレル数の影響を受けるのは60歳代以下であることが判明した。遺伝形式は劣性遺伝と推測された。

本研究では、THBS2はDDと相関があり、60歳代以下の年齢でその影響が強いことを明らかにした。高リスク群では若年でDDとなりやすい。また、今回THBS2の有意な影響が確認された椎間高位では全脊柱の中でDD有病率が低いことが明らかになった。中高年の一般住民を対象にDDの遺伝因子検索を行うには、これらの椎間高位に着目するのが良いと考える。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、椎間板変性の分子機構解明または解析方法に関して、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)甲第594号		
学位授与の日	令和元年9月17日		
氏名	栗栖 清悟		
学位論文の題目	Clinical polyneuropathy does not increase with prediabetes or metabolic syndrome in the Japanese general population (日本人において臨床的多発神経障害は糖尿病前症やメタボリックシンドロームでは増加しない)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 田島 文博	教授 赤水 尚史

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

超高齢社会において、多発神経障害は不快な自覚症状でQOLを低下させると共に、筋力低下や不安定性の原因となり、フレイルや転倒・骨折の危険因子と考えられる。従って、早期に診断し適切に対処することが必要である。先進国においては対称性遠位多発神経障害の原因疾患の第1位が糖尿病(diabetes mellitus: DM)であると報告されている。また、欧米では糖尿病前症(prediabetes: preDM)やメタボリックシンドローム(metabolic syndrome: MetS)において小径神経線維症状を主体とする多発神経障害が増加すること、原因不明の多発神経障害症例の約半数に新規発症DMやpreDMが合併することが報告されている。しかし、我が国ではそのような報告はなく、一般人口における多発神経障害の有病率や危険因子(関連因子)に関する報告はほとんどない。我々は地域の健康診断受診者を対象に、多発神経障害の臨床症候、第1趾振動覚、腓腹神経伝導機能を調べ、その成績により複数の判定基準より診断した臨床症候を呈する多発神経障害(clinical polyneuropathies: ClinPNs)や神経伝導機能異常(nerve conduction abnormality: NCA)の有病率を調べ、人口統計学的因子および耐糖能をはじめとするMetS構成要因との関連性について横断的に検討した。なお、本研究はわかやまヘルスプロモーション研究の一環として実施した。

### 【方法】

地域の健診受診者625人(男260、女365、平均62歳)を対象とした。但し、脳血管障害後遺症、腎不全、甲状腺機能低下症、アルコール依存症は含まれていない。MetS構成要因について、耐糖能はHbA1cとFPGにより耐糖能正常(Normal)群430人、新たに診断された糖尿病(newly diagnosed DM: NDM)群13人、既知の糖尿病(known DM: KDM)群62人、それ以外のpreDM群120人の4群に分けた。血圧はJSH2014の基準に従い、至適/正常血圧(optimal/normal blood pressure: O/NBP)群、正常高値血圧(elevated BP: EBP)群、高血圧(hypertension: HT)群の3群に、血清脂質は脂質異常症、正常脂質の2群、肥満度はBMI $\geq$ 25の肥満と非肥満の2群、さらにIDF基準によりMetSの有/無で2群に分け多発神経障害との関連を調べた。薬剤使用は疾患群とした。

神経機能は1)両足自覚症状(シビレ、痛み、異常感覚)、2)両アキレス腱反射(ATR)低下・消失、3)振動覚計AU02-B(RION)による第1趾先端の振動覚閾値(QVT)、4)POCT型神経伝導検査装置(DPNCheck: フクダ電子)による腓腹神経の活動電位(AMP)、伝導速度(CV)で評価した。QVT、AMP、CVの異常は日本人の正常限界値を用いて判定し、両AMP and /or CVの異常を有する者をNCAとした。ClinPNsは糖尿病神経障害(DPN)に関するToronto consensusに準じ、自覚症状、ATR異常、QVT異常のうち1項目以上満たす者をpossible DSPN(posDSPN)、2項目以上を有する者のprobable DSPN(proDSPN)、1項目以上とNCAを有する者をconfirmed DSPN(conDSPN)と診断した。

耐糖能などMetS構成要因で層別化した群間で、各ClinPNsおよびNCAの有病率の差異を調べ、各ClinPNs、NCAに関連する因子を多重ロジスティック回帰分析で検討した。また、原因不明のClinPNs(posDSPN、proDSPN)を呈する群におけるpreDM、NDMの合併率を調べた。さらに、非DM者(550人)においてQVT、AMPとCVの実測値とDM以外のMetS構成要因との関連性を調べ、ステップワイズ重回帰分析により機能低下に関連する因子を調べた。

## 【結果】

Normal、preDM、NDM、KDM群のposDSPNとproDSPN、conDPNの有病率(%)は17.4、19.2、7.7、41.9と2.1、0.8、0、9.7および2.1、1.7、0、16.1でKDM群のみ有意に高値であった。同様にNCA有病率は7.2、10.0、23.1、24.2でNDM群は高値傾向でありKDM群は有意に高値であった。血圧、血清脂質、肥満度、MetSとClinPNs、NCAの間には有意な関連性はなかった。多重ロジスティック回帰分析では糖尿病と喫煙がClinPNs、NCAに共通した関連因子であった。

原因不明posDSPN群のpreDM、NDMの合併率(%)は23.2、1.0で、非posDSPN群での合併率(20.9、2.6)と同等であった。同様に原因不明proDSPN群のpreDM、NDM合併率(10.0、0)も非proDSPN群(20.5、2.4)で有意差を認めなかった。

非DM者における検討では、preDM群のQVT、AMPはnormal群より有意に悪化しており、HT群のQVT、AMP、CVは0/NBP群より有意に悪化していた。ステップワイズ重回帰分析では、QVTは年齢、身長、飲酒習慣と正相関し、AMPとCVは年齢、身長、高血圧と負の相関を示した。

## 【考察】

本研究は、我が国の一般人口における多発神経障害の有病率と関連する因子を明らかにするために、神経伝導検査を含めた客観的方法を用いて実施された。さらに、欧米で報告されているようなpreDMやMetSにおけるClinPNsの有病率の増加の有無を検証し、以下のような知見が得られた。

第1の知見は、ClinPNsの有病率はpreDMやNDMでは上昇せず、KDMとなって有意に上昇することである。このことは、日本人では臨床的に明らかな神経障害症候は糖尿病発症直後ではなくしばらく経過して出現することを示唆するのかもしれない。一方、NCA有病率はNDMでKDMと同程度に上昇し、KDMで有意な高値となった。NDMが13人と少数であり有意差には達しなかったが、神経伝導障害はDM発症早期から発症するのかもしれない。また、診断法が異なるので断言はできないが、ClinPNs有病率が欧米より低い傾向にあり、preDMでは全く上昇しなかった。このような欧米からの報告との違いは、欧米の方が高身長で肥満度は高いことが関連するかもしれない。

第2の知見は、ClinPNsやNCAに関連する因子がKDMと喫煙であり、HT、脂質異常、肥満、MetSとは有意な関連を示さなかったことである。日本人では多発神経障害を予防するには、DM予防と禁煙が重要であることが示唆される。また、原因不明ClinPNs症例で早期耐糖能障害は多いという所見も得られなかった。しかし、症例数が少なくさらに大規模な検討は必要であろう。

非DM者での検討では、加齢、飲酒習慣、高身長はQVT上昇と、加齢と高血圧がAMPおよびCV低下に関与することが明らかとなった。ClinPNsに先立って起こると考えられる振動覚や神経伝導機能のサブクリニカルな低下を予防するには、血圧管理と節酒も必要と考えられる。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和元年9月6日学位審査担当者が学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

欧米では糖尿病前症(preDM)やメタボリックシンドローム(MetS)において臨床的多発神経障害(ClinPN)が増加し、原因不明のClinPNの多くにpreDMやMetsの合併が報告されている。しかし我が国では一般人口でのClinPNの有病率や関連因子は不明であった。本研究は、日本人におけるClinPNや神経伝導機能異常(NCA)の有病率とその関連因子を調べることを目的とした。

対象は地域の健診受診者625人(男260、女365、平均62歳)で複数の神経機能検査でClinPNおよびNCAを診断し、耐糖能異常を含むMetS関連要因との関連性について横断的に検討した。

神経機能は1)両足自覚症状、2)両アキレス腱反射低下・消失、3)振動覚計AU02-Bによる第1趾先端の振動覚閾値(QVT)、4)POCT型神経伝導検査装置による腓腹神経の活動電位(AMP)と伝導速度(CV)で評価した。NCAは両AMP and /or CVの異常と定義した。ClinPNは糖尿病性神経障害(DSPN)の国際的診断基準であるToronto consensusに準じ、1)~4)の結果から診断した。

MetS構成要因として、耐糖能はHbA1cとFPGにより耐糖能正常(Normal)群、新たに診断された糖尿病(NDM)群、既知の糖尿病(KDM)群、それ以外のpreDM群の4群に層別化した。血圧は至

適/正常血圧 (0/NBP) 群、正常高値血圧 (EBP) 群、高血圧 (HT) 群の3群に層別化した。脂質異常症と正常脂質の2群、BMI  $\geq 25$  の肥満とそれ以外の非肥満の2群、MetSの有/無で2群にそれぞれ層別化した。これら各群間でClinPNおよびNCAの有病率を比較し、多重ロジスティック回帰分析を用いて関連因子を検討した。さらに非DM者(550人)において、QVT、AMPとCVの実測値とMetS構成要因との関連をステップワイズ重回帰分析で調べ、神経機能低下に関連する因子を検討した

結果：ClinPNやNCAの有病率はKDMになると有意に高値となり、preDM群ではNormal群と差を認めなかった。また、他のMetS構成因子とも関連しなかった。多重ロジスティック回帰分析ではKDMと喫煙がClinPNおよびNCAに共通した関連因子であった。非DM者における検討では、preDM群のQVT、AMPはNormal群より有意に悪化しており、HT群のQVT、AMP、CVは0/NBP群より有意に悪化していた。ステップワイズ重回帰分析では、QVTは年齢、身長、飲酒習慣と正相関し、AMPとCVは年齢、身長、高血圧と負の相関を示した。

結論：日本の一般人口においてはClinPNやNCAの有病率がPreDMやMetSでは上昇せず、確立した糖尿病 (KDM) で上昇すること、ClinPNやNCAの関連因子がKDMと喫煙であることが判明した。また、非DM者での観察で飲酒習慣が振動覚の、高血圧が神経伝導機能の悪化因子と考えられた。多発神経障害防止には糖尿病予防と禁煙が重要で、高血圧予防や節酒も必要と思われた。

本論文は日本人における多発神経障害の有病率や関連因子を明らかにし、神経障害防止の方策を考える一助となる臨床的に意義深いものであり、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595号		
学位授与の日	令和元年10月15日		
氏名	河井 伸太郎		
学位論文の題目	Imbalanced expression of IGF2 and PCSK4 is associated with overproduction of big IGF2 in SFT with NICTH: a pilot study. (非β細胞腫瘍性低血糖を生じた孤立性線維性腫瘍において、IGF2 と PCSK4 の発現のアンバランスは big IGF2 の過剰産生に関連している)		
論文審査委員	主査	教授 村田 晋一	
	副査	教授 中田 正範	教授 赤水 尚史

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

非β細胞腫瘍性低血糖(Non-islet cell tumor hypoglycemia 以下 NICTH)は、膵外巨大腫瘍に関連する極めて稀な腫瘍随伴症候群である。薬物療法による低血糖の是正は困難であり、原因腫瘍の完全摘出が唯一の根治療法である。NICTH では、腫瘍から高分子量の IGF2、すなわち big IGF2 が産生され、これがインスリン受容体を介した重篤な低血糖の発症に関与すると考えられている。しかし、NICTH における big IGF2 産生の詳細なメカニズムは不明である。

標準分子量の IGF2 は、肝臓などを中心に全身に広く発現しているホルモンであり、IGF2 遺伝子の転写産物である pro-IGF2 がプロセッシングを受けて生成される。既報の細胞実験で、proprotein convertase subtilisin/kexin type 4(PCSK4)と呼ばれる変換酵素が pro-IGF2 のプロセッシングを担うことが示唆されている。しかし、実際の NICTH における pro-IGF2 のプロセッシングを検討した報告は皆無である。

本研究は、NICTH における big IGF2 産生のメカニズムを pro-IGF2 のプロセッシングの観点から明らかにすることを目的とした。そのために NICTH の原因腫瘍として最も報告の多い孤立性線維性腫瘍(Solitary fibrous tumor 以下 SFT)を対象とした。低血糖の有無で2群に分け、big IGF2 の産生レベルや腫瘍における IGF2 と PCSK4 の発現レベルに着目し、比較検討を行った。

### 【方法】

2003年5月から2017年2月に当院を、2016年5月から2017年2月に天理よろづ相談所病院ないしは神戸中央市民病院を受診した SFT 患者の中から術前血清、術後の凍結腫瘍組織、ホルマリン固定パラフィン包埋(以下 FFPE)組織のいずれかが入手可能であった14例を本研究に登録した。低血糖のエピソードがなかった9例を non-NICTH 群、重篤な低血糖を契機に腫瘍が発見された5例を NICTH 群として2群に分類し、以下の検討を行った。

#### 1) NICTH 群の臨床的特徴の検証

性別、年齢、血液検査データ(空腹時血糖(FPG)、HbA1c、空腹時 IRI、GH、IGF1、IGF2)、腫瘍サイズについて両群で比較した。

#### 2) SFT 症例登録要件の妥当性の検証

近年、SFT の病因として腫瘍における *NAB2-STAT6* という遺伝子融合の関連が指摘されており、多数の融合遺伝子 variant が報告されている(Robinson DR *et al. Nat Genet* 2013)。これを踏まえ、FFPE 組織が得られた12例(non-NICTH 群8例、NICTH 群4例)について定性 PCR、シーケンス解析を行い、登録症例の病理診断を分子学的にも検証した。

#### 3) 血清 IGF2 分画の評価

術前血清が得られた8例(non-NICTH 群5例、NICTH 群3例)について、既報(Enjoh T *et al. J Clin Endocrinol Metab* 1993)に従って western immunoblot を行い、big IGF2 および標準分子量の mature IGF2 を検出した。それらのバンドの intensity を解析ソフト(CS analyzer version 3.00.1023; ATTO Co., Ltd.,

Tokyo, Japan)によって定量化し、さらに big IGF2/mature IGF2 比を算出し、両群で比較した。

#### 4) 腫瘍における IGF2、PCSK4 遺伝子発現量の 2 群間比較

凍結腫瘍組織が得られた 6 例(non-NICTH 群 4 例、NICTH 群 2 例)について定量 real-time PCR を行った。腫瘍組織における IGF2 mRNA、PCSK4 mRNA の発現量を測定し、さらに IGF2/PCSK4 比を算出し、両群で比較した。

#### 5) 腫瘍における IGF2、PCSK4 蛋白発現量の 2 群間比較

FFPE 組織が得られた 12 例(non-NICTH 群 6 例、NICTH 群 6 例)について、big IGF2 と mature IGF2 の両方を認識する抗 IGF2 抗体および抗 PCSK4 抗体を用いた免疫組織化学(以下 IHC)を行った。顕微鏡および解析ソフト(BZ-X700; Keyence, Tokyo, Japan)を用いて両抗体の陽性細胞の輝度定量を行い、さらに IGF2/PCSK4 比を算出し、両群で比較した。

### 【結果】

#### 1) 本研究の NICTH 症例は、既報に矛盾しない臨床的特徴を有していた

NICTH 群の空腹時血糖 ( $P<0.001$ )、HbA1c ( $P=0.003$ )、空腹時 IRI ( $P=0.004$ )、血清 IGF1 ( $P=0.047$ )、血清 IGF2 ( $P=0.041$ )は、non-NICTH 群に比して有意に低下していた。腫瘍サイズは、NICTH 群の方が有意に大きかった ( $P=0.002$ )。

#### 2) 本研究登録症例は、分子学的にも SFT であることが確認された

non-NICTH 群の 1 例を除く 11 例 (non-NICTH 群 7 例、NICTH 群 4 例) すべてで、同一の *NAB2* exon4 と *STAT6* exon 3 の融合遺伝子が検出された。

#### 3) NICTH 症例において、pro-IGF2 のプロセッシングが有意に障害されていた

NICTH 群の全 3 例で big IGF2 が検出された。non-NICTH 群においても big IGF2 が検出される症例が 5 例中 2 例存在したが、intensity の 2 群間比較では NICTH 群が有意に大きかった ( $P=0.004$ )。一方、mature IGF2 は両群 8 例すべてで検出されたが、その intensity は NICTH 群で有意に低下していた ( $P=0.042$ )。big IGF2/mature IGF2 比は NICTH 群で有意に大きく ( $P=0.012$ )、NICTH 群では pro-IGF2 のプロセッシング過程に、より大きな異常を生じていることが示唆された。

#### 4) NICTH 群では、腫瘍における IGF2 遺伝子と PCSK4 遺伝子の発現バランスが大きく崩れていた

NICTH 群の IGF2 および PCSK4 の mRNA の発現レベルは、それぞれ non-NICTH 群の 8.2 倍、0.48 倍であった。NICTH 群の IGF2/PCSK4 比は non-NICTH 群の 10.4 倍であり、腫瘍において IGF2 と PCSK4 の発現バランスが崩れることで pro-IGF2 のプロセッシングが障害されることが示唆された。

#### 5) NICTH 群では、IGF2 蛋白と PCSK4 蛋白の発現のアンバランスが有意に示された

IGF2 の発現レベルは NICTH 群において有意な亢進がみられたが ( $P=0.043$ )、PCSK4 の発現抑制はみられなかった。4)の結果と同様、IGF2/PCSK4 比は NICTH 群において有意に亢進していた ( $P=0.021$ )。これらの結果も、腫瘍における IGF2 と PCSK4 の発現バランスの崩れが pro-IGF2 のプロセッシングを障害し、結果的に big IGF2 の産生を引き起こすことを示唆するものであった。

### 【考察・結論】

本研究は、big IGF2 産生のメカニズムに関して、NICTH の代表的な原因腫瘍である SFT 症例を対象として、NICTH 症例と non-NICTH 症例に分けて検討した初の試みである。その結果、NICTH 症例において pro-IGF2 のプロセッシングは有意に障害されていた。さらに、血清中に big IGF2 が出現する non-NICTH 症例の存在が示され、NICTH の発症を規定するのは big IGF2 の多寡であることが考えられた。また、NICTH 症例では、IGF2 と PCSK4 の発現のアンバランスが示され、big IGF2 の過剰産生の一因である可能性が考えられた。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和元年9月26日、27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。

非β細胞腫瘍性低血糖(NICTH)は、膵外巨大腫瘍に関連する極めて稀な腫瘍随伴症候群である。プロセッシング異常によって生じた高分子量のIGF2(big IGF2)が腫瘍から産生され、これがインスリン受容体を介した重篤な低血糖の発症に関与すると推測されているが、実際のNICTH症例におけるbig IGF2の産生メカニズムを詳細に検討した報告はこれまでにない。本論文では、NICTHの原因腫瘍として報告が最多である孤立性線維性腫瘍(SFT)の症例を対象とし、NICTHにおけるbig IGF2の産生メカニズムを、IGF2の前駆体であるpro-IGF2のプロセッシングの観点から明らかにすることを目的としている。

本研究に登録されたSFT症例14例を、低血糖症の有無でnon-NICTH群(9例)とNICTH群(5例)に群分けし、術前血清が得られた症例については、western immunoblotを行い、big IGF2の産生レベルを測定した。さらに、凍結腫瘍組織やパラフィン包埋組織が得られた症例については、real-time PCR、免疫組織化学により、腫瘍におけるIGF2と、pro-IGF2のプロセッシング酵素であるPCSK4の発現レベルを測定した。これらのデータについて2群間で比較検討を行い、結果は以下のようになった。

①NICTH症例では、pro-IGF2のプロセッシングが有意に障害されている：

すべてのNICTH症例で、血中にbig IGF2が高濃度に検出された。一部のnon-NICTH症例でも極少量のbig IGF2が検出されたが、NICTH群の血中big IGF2のレベルは有意に上昇していた。

②NICTH症例では、IGF2とPCSK4の遺伝子発現にアンバランスを生じている：

NICTH群のIGF2/PCSK4比はnon-NICTH群の10.4倍であり、腫瘍においてIGF2とPCSK4の発現バランスが大きく崩れることで、pro-IGF2のプロセッシングが障害されることが示唆された。

③NICTH症例では、IGF2とPCSK4の蛋白発現にアンバランスを生じている：

腫瘍におけるPCSK4の蛋白発現レベルは2群間で有意差がなかったものの、IGF2/PCSK4の蛋白発現レベルの比は、遺伝子発現の検討でみられた傾向と同様に、NICTH群で有意に上昇していた。

以上の結果から、NICTHを発症したSFT症例において、IGF2とPCSK4の発現のアンバランスが示され、big IGF2の血中レベルの増加を引き起こしている可能性が示唆された。本論文は、詳細なメカニズムが未だ不明であるNICTHにおいて新た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596号		
学位授与の日	令和元年11月19日		
氏名	大星 裕司		
学位論文の題目	Microstructural abnormalities in callosal fibers and their relationship with cognitive function in schizophrenia: a tract-specific analysis study (統合失調症における脳梁白質神経線維の微細構造異常と認知機能障害の関連)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 鶴飼 聡

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

脳梁は最大の交連線維であり、相同領域の感覚、運動、認知的情報の中継を果たしている。diffusion tensor imaging の進歩により微細な白質線維の異常をとらえることが可能になっており、近年では脳梁線維を複数の領域に区分した解析が行われている。本研究では tract-specific analysis を用いて脳梁線維を区分し、統合失調症における脳梁線維の微細構造異常と認知機能障害との関連を検討した。

### 【方法】

健常群 19 名、統合失調症群 19 名を対象として、two ROI s approach 法を用いて 7 つの領域（眼窩前頭皮質、前頭皮質、上前頭皮質、上頭頂皮質、後上頭皮質、側頭皮質、後頭皮質）別に脳梁白質線維を描出し、算出された fractional anisotropy (FA) 値を独立変数、6 つの認知機能（言語記憶、ワーキングメモリー、Token 運動課題、言語流暢性、注意、遂行機能）得点と composite score を従属変数として、全被験者を対象とした多重回帰分析を施行した。有意な関連がみられた脳領域では、統合失調症群を対象として同様の分析を施行し、統合失調症群でも有意な関連がみられた脳領域では、統合失調症群と健常群で FA 値に有意な差がみられるかを検討した。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、すべての対象者から文書による同意を得ている。

### 【結果】

多重回帰分析の結果、側頭皮質を交通する線維の FA 値と Token 運動課題得点、遂行機能得点、composite score に有意な関連がみられた。統合失調症群においては、側頭皮質を交通する線維路の FA 値と遂行機能得点の間に有意な関連がみられ、さらに、側頭皮質を交通する線維路の FA 値は陰性症状と有意な関連がみられた。側頭皮質を交通する線維路において、統合失調症群では健常群と比べて FA 値が有意に低下していた。

### 【考察】

本研究では、統合失調症における側頭皮質を連絡する脳梁線維の微細構造異常が、遂行機能障害と陰性症状に関与することが示唆された。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和元年 10 月 29 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、拡散テンソルイメージング(diffusion tensor imaging, DTI)の TSA (tract-specific analysis)を用いて、統合失調症における脳梁白質線維の微細構造異常と認知機能障害の関連を明らかにすることである。

精神障害の診断と統計マニュアルの第 4 版に基づいて統合失調症と診断された患者で、研究に同意が得られた 19 例を統合失調症(SZ)群とした。SZ 群の年齢は 44.16±7.98 歳、罹病期間は 18.58±10.12 年であった。健常対照(HC)群は 19 名で、年齢・性別を SZ 群と合致させた。3 テスラの MRI 装置で

DTI を撮像し、Philips Extended Workspace (2.6.3.1)を用いて解析した。DTI の定量的解析法の中で、TSA は特定の白質線維を機能領域ごとに検討可能な方法である。two -ROIs approach 法を用いて7つの脳領域（眼窩前頭皮質、前頭皮質、上前頭皮質、上頭頂皮質、後上頭皮質、側頭皮質、後頭皮質）と交通する脳梁白質線維を描出し、最も代表的な DTI の指標である拡散異方性(fractional anisotropy, FA)を脳領域ごとに算出した。各 FA を独立変数、6つの認知機能（言語記憶、ワーキングメモリー、Token 運動課題、言語流暢性、注意、遂行機能）得点と composite score を従属変数として、全被験者を対象とした多重回帰分析を施行した。さらに、有意な関連がみられた認知機能得点に限り、SZ 群を対象とした多重回帰分析を施行した。また、認知機能得点と有意な関連がみられた SZ 群の FA では、HC 群と有意差がみられるかを検討した。本研究は和歌山県立医科大学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いる。

全被験者において、側頭皮質と交通する脳梁白質線維の FA と Token 運動課題得点、遂行機能得点、composite score で有意な正の関連がみられた。SZ 群においては、側頭皮質と交通する脳梁白質線維の FA と遂行機能得点で有意な正の関連がみられた。SZ 群の側頭皮質と交通する脳梁白質線維の FA は、HC 群と比べて有意に低下していた。

結果は、統合失調症患者の側頭皮質と交通する脳梁白質線維で有意な微細構造異常がみられ、その微細構造異常が遂行機能の障害と関連していることを示唆する。

本論文は、脳梁白質線維の微細構造という解剖学的なレベルの異常が統合失調症の認知機能障害に関与していることが示された初めての報告であり、統合失調症の病態解明につなが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597号		
学位授与の日	令和2年3月10日		
氏名	辻本 弘		
学位論文の題目	Serum high mobility group box protein 1 (HMGB1) levels reflect clinical features of childhood hemophagocytic lymphohistiocytosis (血清 HMGB1 値は小児血球貪食リンパ組織球症の臨床的特徴を反映する)		
論文審査委員	主査	教授 園木 孝志	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 鈴木 啓之

## 論文内容の要旨

### 【背景と目的】

自然免疫系の解明が進むにつれ、病原性微生物由来の pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) や自己組織由来の信号分子である alarmin による炎症反応が注目されている。有核細胞の核内に存在する非ヒストンクロマチン結合タンパクである High mobility group box1 (HMGB1) は代表的な alarmin の1つで、細胞内では遺伝子転写制御やクロマチン構造の維持に関与している一方、マクロファージや樹状細胞などの自然免疫担当細胞から細胞外に分泌され、炎症細胞の遊走や分化調節など様々な疾患の炎症病態に関与していることが明らかにされている。血球貪食リンパ組織球症 (Hemophagocytic lymphohistiocytosis; HLH) は、過剰に活性化された単球やマクロファージ、T細胞、NK細胞がもたらす高サイトカイン血症を基盤とする致死的な過炎症症候群である。

本研究では、小児 HLH における HMGB1 の関与を明らかにするため、HLH と診断された小児 28 例における血清 HMGB1 値を測定し、臨床症状及び検査所見との相関について後方視的解析を行った。

### 【対象と方法】

#### 1. 症例

2006年から2016年に和歌山県立医科大学附属病院小児科で HLH と診断した 28 名の患者血清で HMGB1 値を測定した。HLH の診断は Histocyte Society の HLH2004 診断基準に準拠し、患者情報、臨床症状、検査データ、転帰は診療録から収集した。合併症の定義として、痙攣または意識障害を呈した症例を中枢神経 (CNS) 障害合併例、播種性血管内凝固 (Disseminated Intravascular Coagulation; DIC) は厚生労働省の診断基準を用い診断、酸素投与を必要とした症例を呼吸障害合併例と定義した。

#### 2. HMGB1 の測定方法

各症例において、HLH 診断時の血清を用い HMGB1 値を測定した。血液は非ヘパリン含有容器に採取し、遠心分離した血清を測定まで -40°C で保存した。HMGB1 測定は ELISA キット (Shino-Test, Tokyo) を用いた。正常対象群として健常児 6 名について測定した。

#### 3. 統計学的解析

各合併症の有無と血清 HMGB1 値の関連について Mann-Whitney U 検定を用いて解析し、 $p$  値 < 0.05 を統計学的に有意とした。血清 HMGB1 値と臨床検査値との相関は、Spearman の順位相関係数で表し、 $r_s > 0.4$  を有意な相関と判断した。統計解析は EZR を用いた。

### 【結果】

#### 1. 患者の特性

患者年齢は生後 10 日から 21 歳 (中央値 8.5 歳) で、男性 21 例、女性 7 例であった。HLH の原因は、感染症関連 18 例、悪性腫瘍関連 7 例、遺伝性 HLH 3 例であった。死亡は 2 例で、原因は多臓器不全、急性呼吸窮迫症候群各 1 例であった。

#### 2. 血清 HMGB1 値と臨床症状

患者血清 HMGB1 値は健常児よりも有意に高かった (中央値 6.5ng/mL [1.1-574] vs 0.25ng/mL

[0.2-0.4]、 $p < 0.01$ )。HLH の原因別による血清 HMGB1 値に差は認めなかった。

CNS 障害合併、DIC 合併は、それぞれ 10 例 (35.7%)、15 例 (53.6%) にみられた。血清 HMGB1 値は、CNS 合併例と DIC 合併例でそれぞれ非合併例と比較し有意に高値であった。HMGB1 が著明高値を示した 2 例で白質脳症を発症し、そのうち 1 例に人工呼吸管理、血液透析を要した。呼吸障害合併および死亡と HMGB1 値には相関は認めなかった。

### 3. HMGB1 と臨床検査との相関

HLH 患者の血清 HMGB1 値は、血清 AST と正の相関 ( $r_s = 0.48$ 、 $p < 0.01$ )、血漿フィブリノーゲン及びヘモグロビンと負の相関 (前者  $r_s = -0.475$ 、 $p = 0.011$ 、後者  $r_s = -0.465$ 、 $p = 0.013$ ) を示した。

#### 【考察】

現在まで HLH における HMGB1 の報告は殆どなされていない。本研究における HLH 患者の血清 HMGB1 値は、1.1~574 ng/ml と広く分布し、中央値は過去の報告例と同様の値を示した。本研究では、3 症例で HMGB1 は著明高値を示し、うち 2 例は重篤な臨床経過を呈した。また、HLH の症状改善とあわせて血清 HMGB1 値が低下した症例を認めた。これらのことから、HMGB1 は HLH の臨床経過を反映するバイオマーカーとなる可能性がある。

また本研究では HMGB1 値と DIC 合併および CNS 障害合併との関連が示された。HMGB1 は単球の細胞表面に組織因子発現を促進し、プロテイン C による抗凝固経路を阻害することから、DIC の病態に関与することが従来報告されている。本研究の結果から、HLH における DIC 発症機序に HMGB1 が重要な役割を果たしていると考えられた。

HMGB1 は CNS 障害を惹起することが動物実験等で報告されているが、本研究においても CNS 合併例の血清 HMGB1 値は非合併例より有意に高値であった。また、白質脳症を合併した 2 例で HMGB1 が著明高値であったことから、HLH における CNS 障害発生に HMGB1 が関与している可能性が考えられた。

本研究では血清 HMGB1 値は血清 AST 値、血漿フィブリノーゲン値、ヘモグロビン値と相関を認めた。症例数が少ないため今後さらなる検討が必要である。

HMGB1 は多様な疾患への関与が証明され、抗 HMGB1 抗体などによる HMGB1 を標的とした新規治療法の開発研究が行われている。本研究は HMGB1 が小児 HLH の病態に関与していることを示し、HLH においても HMGB1 が治療標的分子となりうることを示すものと考えた。

#### 【結論】

HMGB1 は小児 HLH の臨床像を反映することが示された。HMGB1 は小児 HLH の病態に関与する重要なメディエーターと考えられた。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 2 年 2 月 20 日、28 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

生体内においてマクロファージなどの自然免疫担当細胞から分泌される High mobility group box1(HMGB1)は様々な疾患の炎症病態に関与することが報告されているが、過炎症症候群である小児血球貪食リンパ組織球症 (Hemophagocytic lymphohistiocytosis; HLH) の病態への関与は明らかでない。本論文では、HLH と診断された小児 28 名における診断時の血清を用いて HMGB1 濃度を測定し、合併症の有無や他の生化学所見と血清 HMGB1 値の関連について検討したものである。

小児 HLH 患者の血清 HMGB1 値は対照群とした健常児 6 名よりも有意に高値であった。HLH の原因は感染症、悪性腫瘍、遺伝性がみられたが、これら原因による血清 HMGB1 値に差を認めなかった。中枢神経系 (CNS) 障害合併例と DIC 合併例において血清 HMGB1 値はそれぞれ非合併例と比較し有意に高値であった。呼吸障害合併および死亡と HMGB1 値に相関を認めなかった。また、血清 HMGB1 値は血清 AST 値、血漿フィブリノーゲン値、ヘモグロビン値と相関を認めた。

本研究で HLH 患者の血清 HMGB1 値が健常児よりも有意に高値で、著明な高値を示した 2 例が重

篤な臨床経過を呈したこと、HLH の改善に伴い血清 HMGB1 値が低下する例を認めたことは、HMGB1 が HLH の臨床経過を反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆している。HMGB1 がプロテイン C による抗凝固経路を阻害することで DIC の病態に関与することや、動物実験において HMGB1 が CNS 障害を惹起することが報告されており、本論文で HMGB1 値と DIC 合併および CNS 障害合併との関連が示されたことは、HLH における DIC 発症機序、CNS 障害発生に HMGB1 が重要な役割を果たしていることを示すものと考えられる。

以上のことから、HMGB1 が小児 HLH の臨床像を反映し、その病態に関与する重要なメディエーターであることが示された。現在、HMGB1 は多様な疾患への関与が証明され、抗 HMGB1 抗体など HMGB1 を標的とした新規治療法の開発研究が行われている。本論文は小児 HLH の病態解明に寄与するとともに、将来的に HMGB1 が小児 HLH における治療標的分子とな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598号		
学位授与の日	令和2年3月10日		
氏名	水本 有紀		
学位論文の題目	Anti-cancer effects of chemokine-directed antigen delivery to a cross-presenting dendritic cell subset with immune checkpoint blockade (ケモカインを介した樹状細胞サブセットへのがん抗原送達による抗腫瘍効果)		
論文審査委員	主査	教授 井上 徳光	
	副査	教授 改正 恒康	教授 山上 裕機

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

がん免疫療法において、当教室では、がん抗原ペプチドをワクチンとして用いることにより、免疫応答を確認してきたがその効果は限局的であった。がんペプチドワクチンの効果が発揮されるためには抗原提示細胞、特に樹状細胞(Dendritic cell: DC)によりペプチド抗原が適切に細胞傷害性 T 細胞(Cytotoxic T lymphocyte: CTL)に提示されることが重要である。近年、DC は不均一な集団であること、またそのサブセットによる機能的多様性が明らかになっている。その中で抗原提示能が高く CTL を効率的によく誘導する Classical DC type 1(cDC1)は、マウスでは CD8<sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>DC、ヒトでは CD141<sup>+</sup>(BDCA3<sup>+</sup>)DC に相当するが、いずれもケモカイン受容体 XCR1 を選択的に高発現する。そこで我々は、XCR1 のリガンドであるケモカイン XCL1 とがん抗原ペプチドを連結させたがん抗原ペプチドを作成することで生体内で抗原を XCR1<sup>+</sup>DC へ特異的に送達させ、効率的に CTL を誘導し強力な抗腫瘍効果が得られるのではないかと考えた。また近年、免疫チェックポイント阻害薬(Immune checkpoint inhibitor: ICI)が注目され、様々な癌種で臨床効果を示しているもののその効果はまだ十分とは言えない。ICI の多くは T 細胞を再活性化することで抗腫瘍効果をもたらすが、がん特異的な T 細胞を誘導する免疫療法との併用療法により強力な抗腫瘍効果の相乗効果が得られる可能性がある。

本研究では、XCL1-XCR1 システムを利用した、XCL1-がん抗原ペプチドワクチンを連結させたワクチンによる、抗原特異的 CTL を介した抗腫瘍効果、および、ICI の一つである抗 PD-1 抗体との併用療法による相乗効果を検討した。

### 【方法】

#### 実験 I. XCL1-がん抗原ペプチド連結ワクチンの作成と遊走能の検討

##### I-1. XCL1-OT-I の作成

抗原として卵白アルブミン(Ovalbumin, OVA)由来の MHC class I 拘束性ペプチドである OT-I(OVA<sub>257-264</sub>)を用い、マウス XCL1 と連結させたワクチン(XCL1-OT-I)の作成を計画した。そして、マウス XCL1 の C 末端に linker を介して OT-I 及び標識 FLAG が付加したタンパク質をコードする発現プラスミドを作成し、ヒト胎児腎細胞株 HEK-293T に transfection し、培養上清中に産生される XCL1-OT-I を精製した。XCL1-OT-I の精製の確認は、Coomassie Brilliant Blue(CBB)staining と western blotting により行った。

##### I-2. XCL1-OT-I の遊走能の検討

XCL1-OT-I が XCR1 との結合能を保持しているかどうか、XCR1<sup>+</sup>DC の遊走能を検討することにより確認した。C57BL/6 マウスから骨髓細胞を採取し、fms-related tyrosine kinase 3 ligand(Flt3L)を 100ng/ml 添加後 8 日間培養して骨髓由来樹状細胞(BMDC)を得た。1×10<sup>6</sup> 個の BMDC を、pore サイズ 5.0µm の transwell の upper chamber に載せ、lower chamber は 0、10、30、100、300ng/ml の濃度を振ったマウス XCL1 または XCL1-OT-I を含む medium で満たした。2 時間培養した後、lower chamber の細胞数、細胞集団をフローサイトメーター(FACS)により測定した。

#### 実験 II. XCL1-OT-I による XCR1<sup>+</sup>DC 上での OT-I 抗原提示能の検討

XCL1-OT-I が XCR1 を介して XCR1<sup>+</sup>DC に送達され、MHC class I 上に OT-I 抗原が提示されるかどうか検討した。XCR1 ヘテロマウス(コントロール)と XCR1 欠損マウスを用いて、前述のごとく BMDC を誘導し、0、

0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 $\mu$ g/mlに濃度を振ったXCL1-OT-Iを含むmediumで6時間培養した。その後、MHC class I上に提示されたOT-Iを同定できる抗体(OT-I/H-2K<sup>b</sup>, clone: eBio25-D1.16)を用いFACSで解析した。

### 実験 III. XCL1-OT-I 投与による抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞誘導能の検討

XCL1-OT-I が *in vivo* において抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を誘導しうるかどうかが検討した。XCR1<sup>+</sup>DC はパターン認識受容体として Toll Like Receptor3(TLR3)を発現しておりその agonist である poly(I:C)をアジュバントとして使用した。野生型 C57BL/6 マウスに、濃度を振った XCL1-OT-I のみ、または poly(I:C):20 $\mu$ g を併用して皮下投与し、7 日目に脾細胞を採取・調整し、OVA<sub>257-264</sub> ペプチド 1 $\mu$ g/ml で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で 6 時間刺激して得られた回収した CD8<sup>+</sup>T 細胞において、抗 IFN- $\gamma$  抗体で細胞内染色を行い、FACS で評価した。次に、この抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導が XCR1 依存性であるかどうかを検討した。野生型 C57BL/6 マウス、または XCR1-欠損マウスにそれぞれ XCL1-OT-I:2 $\mu$ g と poly(I:C):20 $\mu$ g を併用して皮下投与し、7 日目のマウス脾細胞を採取・調整し、上記と同様に、抗 IFN- $\gamma$  抗体で細胞内染色を行い、FACS で評価した。

### 実験 IV. XCL1-OT-I と他のがん制御剤との抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞誘導能の比較検討

他のがん制御剤との比較として、マウスに PBS (コントロール)、または OT-I ペプチド:15  $\mu$ g (16  $\mu$ mol)+poly(I:C)、または OVA タンパク:6.7  $\mu$ g (0.16  $\mu$ mol)+poly(I:C)、そして XCL1-OT-I:2 $\mu$ g (0.16  $\mu$ mol)+poly(I:C)を投与し、*in vivo* において抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導を比較検討した。7 日目に脾細胞を採取・調整し OVA tetramer 抗体で染色し抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導を FACS で評価した。また実験 III 同様に、7 日目に採取した脾細胞を用いて抗 IFN- $\gamma$  抗体で細胞内染色を行い、誘導された抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を FACS で評価した。

### 実験 V. XCL1-OT-I の腫瘍増殖抑制効果の検討

XCL1-OT-I による腫瘍増殖抑制効果を予防モデルと治療モデルで検討した。予防モデルでは、野生型 C57BL/6 マウスに腫瘍接種 14 日前(day-14)と 7 日前(day-7)に XCL1-OT-I+poly(I:C)、また比較群として PBS のみ、OT-I ペプチド+poly(I:C)、OVA タンパク+poly(I:C)をそれぞれ皮下投与した後、day0 に OVA 抗原を発現するマウス腫瘍細胞株 B16-OVA を皮下に 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 個/匹 接種し、継時的に腫瘍径を測定した。

治療モデルでは B16-OVA 腫瘍細胞株を野生型 C57BL/6 マウスの皮下に 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 個/匹 接種し、XCL1-OT-I+poly(I:C)、また比較群として PBS のみ、OT-I ペプチド+poly(I:C)、OVA タンパク+poly(I:C)をそれぞれ 7 日目と 14 日目に皮下投与し、腫瘍径を継時的に測定し、腫瘍増殖抑制効果の検討を行った。

腫瘍増殖抑制効果が CD8<sup>+</sup>T 細胞を介しているかどうか明らかにするために、CD8<sup>+</sup>T 細胞を欠く  $\beta$ 2-microglobulin( $\beta$ 2m-) 欠損マウスにおいて、PBS、または XCL1-OT-I+poly(I:C)を皮下投与し、予防モデル、または治療モデルを適用して検討した。

さらに腫瘍増殖抑制効果が XCR1 に依存するかどうか明らかにするために、XCR1-欠損マウスにおいて、PBS、または XCL1-OT-I+poly(I:C)を皮下投与し、予防モデル、または治療モデルを適用して検討した。

### 実験 VI. 抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞における PD-1 分子の発現と抗 PD-1 抗体併用による腫瘍増殖抑制効果の検討

XCL1-OT-I により誘導された抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞において、immune checkpoint 分子である PD-1 分子の発現を検討した。また、XCL1-OT-I と抗 PD-1 抗体併用による腫瘍増殖抑制効果を検討した。

#### VI-I. 抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞における PD-1 分子の発現の検討

XCL1-OT-I+poly(I:C)、または比較群として PBS のみ、または OT-I ペプチド+poly(I:C)を野生型 C57BL/6 マウスに皮下投与し 7 日目に脾細胞を採取・調整し、実験 III 同様に抗 IFN- $\gamma$  抗体で細胞内染色を行うとともに抗 PD-1 抗体での染色も行い、誘導された抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞における PD-1 の発現を FACS により評価した。

#### VI-II. XCL1-OT-I と抗 PD-1 抗体併用による腫瘍増殖抑制効果の検討

B16-OVA 腫瘍細胞を野生型 C57BL/6 マウスの皮下に 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 個/匹 接種し、腫瘍接種後 7 日目と 14 日目に XCL1-OT-I+poly(I:C)を、14、17、21 日目に抗 PD-1 抗体を腹腔内投与し腫瘍増殖抑制効果を検討した。PBS 投与群、抗 PD-1 抗体のみ投与群、XCL1-OT-I+poly(I:C)のみ投与群、または XCL1-OT-I+poly(I:C)+抗 PD-1 抗体投与群で腫瘍増殖抑制効果を比較検討した。

## 【結果】

### 実験 I. XCL1-がん抗原ペプチド連結ワクチンの作成と遊走能の検討

#### I-1. XCL1-OT-I の作成

XCL1-linker-OT-I ペプチド-linker-FLAG tag の構造をもつ連結ワクチンを作成した。Coomassie Brilliant Blue staining と western blotting を用いて期待通り 12.7kDa のタンパク質が発現されていることを確認した。

#### I-2. XCL1-OT-I の遊走能の検討

XCL1-OT-I の濃度依存的に、XCR1<sup>+</sup>DC は遊走能を示した。これは XCL1 に対する XCR1<sup>+</sup>DC の遊走能とほぼ同様であり、XCL1-OT-I は XCL1 としての活性を持つと考えられた。

### 実験 II. XCL1-OT-I による XCR1<sup>+</sup>DC 上での OT-I 抗原提示能の検討

BMDC において CD11c<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD11b<sup>int</sup> 細胞は cDC1 細胞つまり XCR1<sup>+</sup>DCs に相当する。XCL-OT-I の刺激により OT-I/H-2K<sup>b</sup> の発現が濃度依存的に XCR1 ヘテロマウス(コントロール)で増加し、特に 1μg/ml 以上では有意な発現の増加がみられた。一方、XCR1-欠損マウス由来の BMDC では XCL-OT-I 刺激でも発現の増加はみられなかった。また CD11c<sup>+</sup>CD24<sup>int</sup>CD11b<sup>high</sup> 細胞、つまり XCR1<sup>-</sup>DC 細胞に相当する DC 上では XCL1-OT-I の刺激でも OT-I/H-2K<sup>b</sup> の発現の増加はみられなかった。一方、OVA タンパクで BMDC を刺激した場合には CD11c<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD11b<sup>int</sup> 細胞、CD11c<sup>+</sup>CD24<sup>int</sup>CD11b<sup>high</sup> 細胞共に OT-I/H-2K<sup>b</sup> の発現の増加はみられなかった。以上から XCL1-OT-I は OT-I 抗原を XCR1 依存性に XCR<sup>+</sup>DC(cDC1)細胞に提示することが示された。

### 実験 III. XCL1-OT-I 投与による抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞誘導能の検討

XCL1-OT-I のみを野生型 C57BL/6 マウスに投与した場合、20 μg/匹まで投与量を増加させても抗原特異的 CD8<sup>+</sup>細胞の誘導はみられなかった。XCL1-OT-I と poly(I:C)を併用した場合、XCL1-OT-I を 1μg 以上投与した群で有意に抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導が認められた。一方、XCR1 欠損マウスに XCL1-OT-I と poly(I:C)を併用して投与したところ、抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導は有意に障害されており、この誘導は XCR1 依存性であることが示された。

### 実験 IV. XCL1-OT-I と他の制御剤との抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞誘導能の比較検討

抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導を OVA tetramer、または抗 IFN-γ 抗体で細胞内染色を行って検討したところ、PBS や OT-I ペプチド+poly(I:C)、また OVA タンパク+poly(I:C)と比較して XCL1-OT-I+poly(I:C)群で有意に強い抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞が誘導された。

### 実験 V. XCL1-OT-I の腫瘍増殖抑制効果の検討

XCL1-OT-I 投与群では、PBS のみ、OT-I ペプチド+poly(I:C)、OVA タンパク+poly(I:C)投与群と比較して、予防モデル、治療モデルともに有意に腫瘍の増殖が抑制された。

また XCR1 欠損マウスを用いた場合、PBS 投与群と比較して XCL1-OT-I+poly(I:C)投与群では予防モデル、治療モデルともに腫瘍増殖抑制効果が認められず、XCL1-OT-I の腫瘍増殖抑制効果は XCR1 依存性であることが示された。

### 実験 VI. 抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞における PD-1 分子の発現と抗 PD-1 抗体併用による腫瘍増殖抑制の相乗効果の検討

#### VI-I. 抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞における PD-1 分子の発現の検討

XCL1-OT-I+poly(I:C)投与群では、PBS のみ、または OT-I ペプチド+poly(I:C)投与群と比較して、抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の 90%以上と高率に PD-1 発現を認めた。

#### VI-II. XCL1-OT-I と抗 PD-1 抗体併用による腫瘍増殖抑制の相乗効果の検討

腫瘍増殖抑制効果の検討をマウス治療モデルで行った。PBS 投与群、抗 PD-1 抗体のみ投与群、XCL1-OT-I+poly(I:C)のみ投与群、または XCL1-OT-I+poly(I:C)+抗 PD-1 抗体投与群でマウス治療モデルを用いて腫瘍増殖抑制効果を検討した。XCL1-OT-I+poly(I:C)投与群、または XCL1-OT-I+poly(I:C)+抗 PD-1 抗体投与群では腫瘍接種後の day15 までは腫瘍増殖の抑制効果は変わらなかったが、day17 以降では抗 PD-1 抗体併用群では有意に腫瘍増殖の抑制効果が認められた。また XCL1-OT-I+poly(I:C)+抗 PD-1 抗体投与群において有意に生存率の改善が認められた。

## 【考察】

今回、XCL1 との融合タンパク質を作成することにより、がん抗原ペプチド(OT-I)を、生体内で効率的に、XCR1<sup>+</sup>DC に送達し、MHC class I 上に提示させることが可能になり、抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞応答および腫瘍増殖抑制を強く誘導させることができた。また、XCL1-OT-I と poly(I:C)を投与した後、抗 PD-1 抗体を投与することで抗腫瘍効果を相乗的に高めることができた。

XCR1 はマウスでもヒトでも高い crosspresentation 活性を持つことが知られており、今回マウスモデルで認めた効果はヒトにも応用できる可能性が高い。今後、neoantigenをはじめとする様々ながん抗原を、ヒト XCL1 を介して、CD141<sup>+</sup>(BDCA3<sup>+</sup>)DC に送達させることにより、強力かつ効率的な抗腫瘍効果が得られることが期待される。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年2月19日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

本論文は、がん抗原ペプチドを、cross-presentation 能に優れた XCR1 を発現する樹状細胞(DC)サブセットに送達させることで、効率的な抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導と腫瘍増殖抑制効果を示し、そのメカニズムを解析・証明したものである。

まず、XCR1 のリガンドであるケモカイン XCL1 に、がん抗原として卵白アルブミン(OVA)由来の MHC class I 拘束性ペプチドである OT-I を連結させたワクチン(XCL1-OT-I 連結ワクチン)を作成した。XCL1-OT-I 連結ワクチンを野生型マウス C57BL/6 に、XCL1-OT-I と、アジュバント(poly(I:C))を併用して皮下投与し、脾細胞を用いて FACS で評価したところ、抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導が認められた。しかし XCR1 欠損マウスでは抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞が誘導されず、この誘導は XCR1 依存的事であることが示された。また、OT-I ペプチドワクチンまたは OVA タンパクワクチンと、XCL1-OT-I 連結ワクチンをそれぞれアジュバントと共に野生型マウスに皮下投与したところ、XCL1-OT-I 連結ワクチン投与群で有意に抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞が誘導された。次に XCL1-OT-I 連結ワクチンの腫瘍増殖抑制効果を検討した。予防モデルでは、野生型マウスに XCL1-OT-I 連結ワクチンをアジュバントと共に皮下投与した後、腫瘍細胞 B16-OVA(melanoma)を接種し、腫瘍増殖を検討した。また治療モデルでは、野生型マウスに腫瘍細胞 B16-OVA を接種後、XCL1-OT-I 連結ワクチンをアジュバントと共に皮下投与し腫瘍増殖を検討した。いずれのモデルでも、OT-I ペプチドワクチンや OVA タンパクワクチンと比較して、XCL1-OT-I 連結ワクチン群で有意に腫瘍増殖抑制効果を認めた。しかし XCR1 欠損マウスでは予防モデル、治療モデルともに、XCL1-OT-I 連結ワクチンによる腫瘍増殖抑制効果は認められず、この効果は XCR1 依存的事であることが示された。次に、XCL1-OT-I 連結ワクチンにより誘導された抗原特異的

CD8<sup>+</sup>T 細胞における PD-1 発現を FACS で検討したところ、誘導された抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞のうち、90%以上で PD-1 の発現を認めた。さらに、野生型マウスを用いて治療モデルで XCL1-OT-I 連結ワクチンとアジュバント投与に加え抗 PD-1 抗体投与の併用による腫瘍増殖抑制効果を検討した。抗 PD-1 抗体投与群、または XCL1-OT-I 連結ワクチンとアジュバント投与群と比較して、有意に腫瘍増殖抑制効果を認め、XCL1-OT-I 連結ワクチンに抗 PD-1 抗体を併用することで腫瘍増殖抑制の上乗せ効果が認められた。

以上の結果より、がん抗原ペプチドを XCL1 を介して生体内で XCR1+DC に送達させるシステムは、著明に抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を誘導し強力な腫瘍増殖抑制効果を示した。さらに XCL1-OT-I 連結ワクチンと抗 PD-1 抗体を併用することで、腫瘍増殖抑制効果を相乗的に高められたことから、がん免疫治療における有望な治療戦略となり得ると認められ、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599号		
学位授与の日	令和2年3月17日		
氏名	上田 陽子		
学位論文の題目	Differential role of GPR142 in tryptophan-mediated enhancement of insulin secretion in obese and lean mice (肥満マウスでのトリプトファン刺激性インスリン分泌における GPR142 の果たす役割の検討)		
論文審査委員	主査	教授 井原 義人	
	副査	教授 中田 正範	教授 赤水尚史

## 論文内容の要旨

### 【背景】

トリプトファン (Trp) は、必須アミノ酸の一つであり、その代謝物がセロトニンやキヌレニンなどとして生理作用を発揮するだけでなく、Trp 自身が生理活性を持ち、消化管ホルモン分泌調節などの生体機能調節に関わることが報告されてきた。GPR142 は、オーファン GPCR として 1994 年にクローニングされたが、近年、Trp が最も強いリガンドであると報告された (Lin HV ら、PLoS One: 2016)。マウスにおいて GPR142 は、少なくとも膵β細胞で発現しており、Trp は GPR142 を介してグルコース応答性のインスリン分泌 (GSIS) を増強することが報告されている。

これまで、肥満状態での GPR142 発現変動や、糖代謝における意義を詳細に検討した報告はなく、本研究では肥満モデル動物および GPR142KO マウスを用いて検討を行った。

### 【目的】

・肥満状態の糖代謝において、Trp、GPR142 シグナルがもつ病態生理学的意義を明らかにする。

### 【方法】

・正常マウス、肥満モデルとして、食餌性肥満 (Diet-Induced Obesity, DIO) マウス (60%高脂肪食を 14-22 週間負荷) および遺伝性肥満 ob/ob マウスの臓器における GPR142mRNA 発現を、定量 PCR にて検討。

・DIO、ob/ob マウス、GPR142KO マウスを用いて経口糖負荷試験を行い、Trp を同時投与した際の血糖、血清インスリン、血漿 GIP、GLP1、グレリン濃度を測定。

### 【結果と考察】

1) マウス組織における GPR142 の発現分布

GPR142 mRNA の発現をマウスの組織において検討したところ、胃、腸管、膵臓、特に膵島にて高発現であった。

2) マウス胃、膵臓での GPR142 の発現調節

摂食による GPR142 発現調節について検討を行ったところ、胃においては、絶食で GPR142 発現が上昇し、再摂食によって発現低下が認められた。このとき、Trp 投与によっても GPR142 発現低下が認められたため、少なくとも再摂食による発現低下の一部は食事の Trp によることが示唆された。一方で、膵臓においては絶食後の再摂食でのみ GPR142mRNA の発現低下が認められた。

慢性的なエネルギーバランスによる調節を検討するため DIO マウスおよび、ob/ob マウスにおいて、GPR142 発現の検討を行った。DIO マウスでは、胃の GPR142 mRNA は、対照マウスと比較して有意に低下していたが、膵臓での発現は、有意に上昇していた。ob/ob マウスにおいては、胃での有意な発現変化は認めなかったが、膵臓においての発現が有意に上昇していた。これらの結果から、肥満マウスにおいては、膵臓での GPR142 発現が上昇することが示された。

4) Trp 負荷が肥満マウスの耐糖能に与える影響の検討

経口糖負荷の際に Trp を同時投与することによって正常マウス・DIO マウスはどちらも耐糖能が有意

に改善したが、DIO マウスでは改善の程度が大きく、GSIS も DIO マウスでより増強していた。GIP、GLP-1、グレリン分泌には、Trp 投与による分泌増強は認めなかった。ob / ob マウスでも DIO マウスと同様に、耐糖能の改善の程度が大きく、GSIS の増強効果も強かった。GIP、GLP-1、グレリン分泌の有意な増強は認められなかった。次に、肥満マウスにおける Trp による GSIS 増強が GPR142 を介したものであるかどうかを検討するために、GPR142 KO マウスを用いて、同様の検討を行った。GPR142KO マウスにおいては、標準食摂取下では Trp による有意な GSIS 増強効果は認められなかったが、高脂肪食摂取下では GPR142 欠損にも関わらず、Trp の GSIS 増強作用が残存した。高脂肪食摂取下の GPR142KO マウスの膵臓では、標準食摂取下の KO マウスと比較して CaSR mRNA の発現が有意に上昇していたことから、CaSR アンタゴニストを同時に投与したところ、高脂肪食負荷 GPR142KO マウスにおける Trp による耐糖能改善作用が減弱した。肥満マウスにおける Trp 刺激性の GSIS の増強の程度が大きい理由として、少なくとも CaSR を介したシグナルが関与していることが示唆された。

#### 【結語】

正常マウスでは、Trp 刺激性の GSIS 増強は主に GPR142 を介したシグナルを介するが、肥満状態においては、CaSR を介したシグナルも重要であり、このことが肥満マウスにおける Trp 刺激性 GSIS 増強の亢進に寄与している。

#### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和元年11月26, 27, 28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。

GPR142は、最近トリプトファン (Trp) がリガンドであることが明らかとなったG蛋白共役型受容体であり、正常マウスにおいてはTrpがGPR142を介してグルコース応答性のインスリン分泌(GSIS)を増強することが既に報告されており、糖尿病治療薬の薬剤標的分子として注目されている。一般的に2型糖尿病患者は肥満を伴うことが多いが、肥満状態でのTrp、GPR142シグナルがもつ病態生理学的意義を検討した報告はなく、申請者らは肥満動物モデルにおけるGPR142発現変動や、糖代謝における意義を詳細に検討することを目的として研究を行った。

方法として、申請者らはob/obマウスや食餌性肥満(DIO)マウスといった肥満モデルマウスを用いて臓器におけるGPR142mRNA発現を、定量PCRにて検討した。また、上記マウスや遺伝子改変GPR142ノックアウト(KO)マウスを用いて経口糖負荷試験を施行し、Trpを同時投与した際の血糖、血清インスリン、血漿GIP、GLP-1、グレリン濃度を測定し、検討を行った。

結果、①マウスの組織のGPR142 mRNAの発現は、胃、腸管、膵臓、特に膵島にて高発現であった。胃では、絶食でGPR142発現が上昇し、再摂食によって発現が低下した。Trp投与によってもGPR142発現は低下しており、再摂食による発現低下の一部は食事のTrpによることが示唆された。②DIOマウス、ob/obマウスではいずれも膵臓におけるGPR142発現が上昇していた。③経口糖負荷試験ではTrpの同時投与によって正常マウス、肥満モデルマウスはともに耐糖能が有意に改善したが、肥満モデルマウスでは改善の程度が大きく、GSISもより増強していた。GIP、GLP-1、グレリン分泌においては、Trp投与による分泌増強効果は認めなかった。④GPR142 KOマウスの標準食摂取下ではTrpによる有意なGSIS増強効果は認められなかったが、高脂肪食摂取下ではGPR142欠損にも関わらず、TrpのGSIS増強作用が残存した。⑤Trpをリガンドとして認識するものにCa感受受容体(CaSR)が知られているが、高脂肪食摂取下のGPR142KOマウスの膵臓では、標準食摂取下のKOマウスと比較してCaSR mRNAの発現が有意に上昇していたことから、CaSRアンタゴニストを同時に投与したところ、高脂肪食負荷GPR142KOマウスにおけるTrpによる耐糖能改善作用が減弱した。

以上の結果から、肥満モデルマウスにおいては Trp 刺激性の GSIS の増強の程度が大きく、その理由の一つに GPR142 に加えて、CaSR を介したシグナルが関与していることが示唆された。本論文は、肥満状態での糖代謝における Trp シグナルの意義の解明に貢献し、糖尿病の新たな治療法開発に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士の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600号		
学位授与の日	令和2年3月17日		
氏名	LE THI HUE (レ ティ フォエ)		
学位論文の題目	<i>Dec1</i> deficiency suppresses cardiac perivascular fibrosis induced by transverse aortic constriction. ( <i>Dec1</i> 欠損がマウス心不全モデルTACによる末梢血管圏の線維化を抑制する)		
論文審査委員	主査	教授 山田 源	
	副査	教授 中田 正範	教授 村田 晋一

## 論文内容の要旨

### 【Introduction】

Cardiac fibrosis was reported as a major character of ventricular remodeling in cardiac hypertrophy, resulting in cardiac dysfunction at the chronic stage of transverse aortic constriction (TAC) in mice. An increase in the fibrosis and inflammation has shown in mice treated with TAC, involving S100 calcium binding protein A4 (S100A4), alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA), transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1), phosphorylation of Smad family member 3 (pSmad3), tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and cyclin-interacting protein 1 (p21). S100A4 and  $\alpha$ SMA were suggested as markers of cardiac fibrosis. TGF $\beta$ 1/pSmad3 signaling has been reported to be as main pathway of cardiac fibrosis. Smad3 knock out (Smad3KO) mice has previously shown an attenuation of  $\alpha$ SMA, TNF $\alpha$  and TGF $\beta$ 1 expressions in cardiac fibrosis induced by angiotensin II or TAC. Dec1 (Differentiated embryonic chondrocyte gene1), a basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptional factor, can directly bind to E-boxes and Sp1 sites of the target genes to repress and activate their transcriptions, respectively. Additionally, Dec1 was known as a clock gene which has rhythmic expression in many tissue such as heart, kidney, oral mucosa and suprachiasmatic nucleus (SCN). It has been shown that Dec1 expression was induced by inflammatory factors and hypoxia such as TNF $\alpha$  in breast cancer cells, TGF $\beta$ 1 in pancreatic cells, hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) in oral cancer cells. Previous reports showed that Dec1 deficiency has a protective role in periodontitis, obesity and hypertension, however, it has still unknown about its role in cardiac diseases. In this study, to examine the significant role of Dec1 on cardiac fibrosis, we evaluated cardiac fibrosis and associated molecules as well as cardiac function in wild-type (WT) and Dec1KO mice treated with TAC.

### 【Materials and Methods】

#### Animal and tissue preparation

In this study, we used male WT and Dec1KO of whole Dec1 gene deletion mice with a C57BL/6 background. All mice were kept in accommodation with 12:12 light/dark cycles and ad libitum feeding. Transverse aortic constriction surgery was performed using male mice (6-7 weeks old, 19-24 g body weight). Transverse aorta was tightly ligated around 27G blunt needle. A constriction 0.4 mm in diameter in transverse aorta was generated after removing the needle. Sham mice was performed with the same TAC protocol but without tight of transverse aorta. The heart were collected from WT and Dec1KO mice between 9 AM and 12 AM at one and four weeks after TAC and sham surgery. To analyze circadian expression of clock genes, the ventricular hearts were obtained from WT mice every four hours at four weeks after surgery.

#### Echocardiography

Transthoracic echocardiography was examined by using a two-dimensional (2D) echocardiogram (Sonoscape. Co. Ltd., Shenzhen, China) with a 12L MHz transducer.

#### Quantification of H&E and MT staining

To quantify the ratio of lumen to wall's perimeter, three different vascular cross-sections in Hematoxylin and Eosin staining were chosen randomly from each mouse. For calculation of cardiac perivascular fibrosis, the area of cardiac perivascular fibrosis was evaluated in images of Masson's Trichrome (MT) by using ImageJ with threshold from 50 to 200 (software from National Institutes of Health, USA). The number of mice was set as four mice per group.

## Immunohistochemistry (IHC)

We performed immunohistochemical staining of Dec1, S100A4,  $\alpha$ SMA, TGF $\beta$ 1, pSmad3, TNF $\alpha$  and p21 using a Discovery Auto-Stainer with automated protocols for the 4  $\mu$ m paraffinized sections of heart tissues (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ; Roche, Mannheim, Germany),

## Real-time PCR

Real-time PCR was performed with 1X SYBR Premix Ex Tap II using a TP850 Thermal Cycle Dice Real Time System (Takara Bio, Inc., Kusatsu, Japan. To analyze gene expression levels, Gapdh was considered as control.

## Statistical analysis

All tests were performed by using JMPpro software, version 13.0 (SAS Institute Inc., North Carolina, USA). Data are shown as means  $\pm$  SEM.  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## **【Results】**

### **1. Dec1 deficiency prevents cardiac function against TAC**

We could not observed significant differences in heart weight to body weight ratio or fractional shortening (FS) between Dec1KO mice and WT mice. Therefore, we evaluated cardiac function and histology using the mice with TAC or sham surgery. At one week after TAC, both WT and Dec1KO mice developed cardiac hypertrophy with an increase in HW/BW ratio, left ventricular size; the hypertrophic markers of atrial natriuretic peptide (ANP) and B-type natriuretic peptide (BNP) expression and the thickness of left ventricular post wall at the end-diastole (LVPWd) and at the end-systole (LVPWs), as evaluated by echocardiogram. On the other hand, cardiac function was maintained in both WT and Dec1KO mice with no significant change in FS or left ventricular internal dimension at the end-systolic (LVIDs). However, there is not significant distinct in cardiac morphology and function between WT and Dec1KO mice at one week after surgery. At four weeks after TAC, Dec1KO mice revealed severer hypertrophy of the heart than WT mice. As previous reports, cardiac dysfunction was observed in TAC-treated WT mice with a decrease of FS and an increase of LVIDs significantly. In addition, neither FS nor LVIDs was significantly changed in TAC-treated Dec1KO mice compared with sham mice. Collectively, these results showed that Dec1KO mice preserved cardiac function until four weeks after TAC, suggesting Dec1 deficiency prevents cardiac function against TAC.

### **2. Dec1 expression is induced by TAC.**

The rhythmic mRNA expression of Dec1, Dec2, Bmal1 and Per2 all maintained in WT mice at four weeks after TAC and sham surgery. However, only Dec1 circadian expression significantly increased by TAC among these genes at mRNA level. Moreover, an increase in Dec1 expression at protein level was revealed in both myocardial and stromal cells after TAC surgery using IHC staining.

### **3. Dec1 deficiency inhibits cardiac perivascular fibrosis induced by TAC**

At one week after TAC, moderate to severe inflammation and mild fibrosis was observed in WT mice whereas Dec1KO mice revealed mild inflammation and little fibrosis. The ratio of perimeter in lumen to wall was not significantly difference between WT and Dec1KO mice after TAC. Quantification of perivascular fibrosis by TAC trend to decrease in Dec1KO mice compared with in WT mice ( $p = 0.07$ ). At four weeks after TAC, WT mice showed severe cardiac perivascular fibrosis, in spite of a unserious inflammation. Because of the endowed vascular wall, its lumen became more narrow in WT mice at four weeks after TAC than in Dec1KO mice. In addition, the extent of cardiac perivascular fibrosis by TAC was inhibited in Dec1KO mice compared with in WT mice. Taken together, these results indicate that Dec1 deficiency attenuates cardiac perivascular fibrosis induced by TAC.

### **4. Dec1 deficiency suppresses the expression of molecules associated with cardiac fibrosis**

At one week, TAC induced expression of S100A4, TGF $\beta$ 1, pSmad3, TNF $\alpha$  and p21 in both of WT and Dec1KO mice whereas the expression of  $\alpha$ SMA was barely altered. The increase of expression of these molecules is lower in Dec1KO mice than in WT mice at protein and mRNA level. Moreover, the expression of theses molecules were not significant different between WT and Dec1KO mice after sham surgery. At four weeks, an increase in the expression of S100A4,  $\alpha$ SMA, TGF $\beta$ 1, pSmad3,

TNF $\alpha$  and p21 was also observed in both of WT and Dec1KO mice with TAC surgery. These increased expressions were significantly attenuated in Dec1KO mice at protein level. Additionally, the mRNA expression of  $\alpha$ SMA and TGF $\beta$ 1 decreased in Dec1KO mice compared with WT mice after TAC surgery whereas the mRNA expression of S100A4, TNF $\alpha$  and p21 was barely changed. Taken together, these results suggest that Dec1 deficiency attenuates the expression of molecules associated with cardiac fibrosis and inflammation.

## 【Conclusion】

In conclusion, we revealed that Dec1 deficiency inhibited cardiac perivascular fibrosis induced by TAC, resulting in to maintained cardiac function. We suggest that Dec1 could be a new molecular target in cardiac fibrosis.

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和元年 11 月 28 日、論文審査委員会は学位申請者の出席を求め論文の審査を行った。

Dec1 (Differentiated embryonic chondrocyte gene 1)は、basic helix-loop-helix 構造を有する転写因子であり時計遺伝子の一つである。一方、Dec1 は肥満、高血圧等の慢性炎症における組織の線維化との関連も報告されてきている。しかしながら心不全における心臓内線維化との関連はほとんどわかっていない。そこで本研究は、TAC (transverse aortic constriction)による心不全モデルを用いて、心臓内線維化における Dec1 の病態的意義を検討した。

野生型マウスの心臓における Dec1 mRNA 発現の日内変動は、TAC 処置によりその振幅が減少し、持続的に有意に高値を示した。一方、他の時計遺伝子の発現の日内変動は Sham 処置群と有意な差を認めなかった。このことから、TAC 処置は非概日リズム的に Dec1 の発現亢進を誘導する事が示唆された。次に Dec1KO (knockout)マウスを用いて TAC 誘発心不全の病態を野生型マウスと比較検討した。TAC 処置により野生型マウスに比べ Dec1 KO マウスの心臓は高度に肥大したが、心機能の低下は有意に減弱していた。さらに免疫組織染色と定量的遺伝子発現の解析から、Dec1KO マウスの心臓では血管周囲の線維化が有意に抑制され、線維化関連分子 S100A4,  $\alpha$ SMA の発現は有意に抑制されていた。さらに線維化に関連する TGF $\beta$ 1 の発現も有意に Dec1KO マウスで減弱していた。さらに TGF $\beta$ 1 のシグナリング分子である Smad3 のリン酸化も Dec1 KO マウスで減弱していた。これらの結果から、TAC 誘発心不全の病態に置いて、Dec1 は TGF $\beta$ 1 のシグナリングの活性化を介して線維化を促進している事が明らかになった。さらに Dec1KO マウスでは炎症性サイトカインの TNF $\alpha$  とアポトーシス関連分子 p21 の発現も減弱しており、Dec1 は多面的に TAC 誘発心不全の病態に関与している事も示唆された。

本論文は、Dec1KO マウスに心不全を誘発し、その病態解明を行う事で、Dec1 が TGF $\beta$ 1シグナリングを増強し線維化を促進させる事を明らかにした。本研究で得られた知見をもとに、心不全における線維化進行の病態メカニズムの解明に繋がる事が期待されるものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第601号		
学位授与の日	令和2年3月17日		
氏名	平野 優		
学位論文の題目	The Role of Fgf Signaling on Epithelial Cell Differentiation in Mouse Vagina. (マウス膣上皮細胞分化における Fgf シグナルの役割)		
論文審査委員	主査	教授	平井 秀一
	副査	教授	井篁 一彦
		教授	山田 源

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

子宮や膣などの女性生殖器官 (FRT) において、上皮細胞の分化及び増殖は、エストロゲンによって厳密に制御されている。よって、エストロゲンによる上皮の恒常性維持の破綻は、がんをはじめとする様々な病態発症につながる。マウスの膣組織は、基底層、基底上層、角質層より構成される重層扁平上皮と間質から成る。エストロゲン受容体(ノックアウト (ER(-null) マウスを用いた古典的な組織組み替え実験により、上皮細胞の分化は、上皮性のエストロゲンシグナルにより制御されている可能性並びに、上皮細胞の増殖は、間質性のエストロゲンシグナルにより制御されている可能性が示唆されている。しかしながら、エストロゲンによる分化及び増殖制御の詳細なメカニズムはわかっていない。

我々は、膣上皮細胞特異的に ER(-を欠損させたコンディショナルノックアウト (上皮特異的-ER(-cKO) マウスの解析から、膣上皮細胞の分化誘導に必要な因子として、上皮成長因子受容体リガンドである Amphiregulin (AREG) を見いだした。しかし、AREG は初期段階の膣上皮分化に必要なであるが、その最終分化誘導には不十分であり、AREG に加え最終分化を制御する他の因子の存在が示唆されていた。

そこで私は、エストロゲンによる膣上皮最終分化制御因子を同定するため、DNA マイクロアレイにより上皮特異的-ER(-cKO) マウスの膣上皮で発現が変化している遺伝子を網羅的に調べた。その結果、線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor; Fgf) の一種である Fgf22 及び Fgf18 を候補因子として見いだした。本研究ではこれらの Fgf に着目し、膣上皮における Fgf リガンドの発現及びエストロゲン応答性、さらに膣上皮細胞の最終分化における Fgf シグナルの関与について、上皮特異的-ER(-cKO) マウスを用いて検討した。

### 【材料及び方法】

#### 実験動物及び薬物投与

すべての動物実験は、和歌山県立医科大学動物実験指針に基づいて実施した (実験承認番号; 28-2 及び 28-9)。膣上皮細胞特異的に Cre recombinase を発現する K5-Cre ドライバーマウス及び、ER(-null) 及び ER(-floxed) マウスを用いて、膣上皮細胞特異的 ER(-コンディショナルノックアウト (K5-Cre/+; ER(-flox/-) マウスを作製した (以後、上皮特異的-ER(-cKO) と表記する)。マウスに対して生後 6 週齢目に卵巣切除 (Ovariectomy; OVX) を行い、8 週齢目に 0.1 µg エストロゲン (17β-estradiol; E2) を 3 日間投与し、最終投与の 24 時間後に膣組織を採取し実験に用いた。

#### 免疫組織化学染色及び HE (Hematoxylin and eosin) 染色

膣組織を 4% パラホルムアルデヒド/PBS で固定後にパラフィン連続組織切片を作製し、親水化及び抗原不活化処理を行った。0.3% H2O2/メタノールで 30 分処理することで内在性ペルオキシダーゼを失活させ、1.5% ウシ胎児血清/PBS を用いて 1 時間のブロッキング処理を行った。ブロッキング溶液で希釈した pFRS2 抗体または pERK1/2 抗体を加え、4°C で 1 晩抗原抗体反応を行った。DAB 染色法により発現細胞を可視化し、顕微鏡下で観察した。

## DNA マイクロアレイ

臆組織から RNA を抽出し、逆転写により cDNA を合成後、さらに RNA ポリメラーゼで増幅しながら cRNA を作製した。作製した cRNA と DNA をハイブリダイズさせた DNA マイクロアレイから、マイクロアレイスキャナーを用いて、自然科学研究機構・基礎生物学研究所にてデータを取得し、その解析を行った。

## 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR)

DNA マイクロアレイに用いた cDNA を反応試薬と混合し、PCR 反応及び定量化を行った。内在性コントロールとして L8 を用いて定量化した。Fgf リガンドの発現及びエストロゲンによる応答性を調べるために Fgf3、Fgf7、Fgf8、Fgf10、Fgf17、Fgf18、Fgf22 のプライマーをそれぞれ用いた。

## 統計解析

DNA マイクロアレイのデータの解析には、Student's t-test を使用した。qRT-PCR のデータ解析には、二元配置分散分析 (two-way ANOVA) の結果より交互作用が有意であったため、多重比較として Tukey-Kramer's test を用いた。統計学的有意水準は 5% 未満とした。

### 【結果】

1. 臆上皮において、Fgf22 及び Fgf18 の発現が認められた。
2. 臆上皮における Fgf22 mRNA の発現は、エストロゲンにより有意に上昇し、上皮特異的-ER $\langle$  cKO マウスにおいて、その発現は有意に低下した。
3. 最終分化が生じる臆上皮の基底最上層において、pFRS2 及び pERK1/2 の発現が認められ、その発現は、上皮特異的-ER $\langle$  cKO マウスでは認められなかった。

### 【考察】

我々の先行研究から、上皮の ER $\langle$  は、AREG を介して臆上皮細胞の初期分化を誘導することが示唆されていた。FGF-ERK/MAPK シグナルは、発生段階におけるマウスのミューラー管上皮から臆上皮への分化誘導に関与することが知られているが、成体マウスにおけるその機能は不明であった。本研究により、成体臆上皮細胞の最終分化には、上皮の ER $\langle$ により発現誘導される Fgf22 を介した ERK/MAPK の活性化が必要である可能性が示唆された。また、Fgf22 と同じサブファミリーに属する Fgf7 は、エストロゲンと同様の臆上皮分化増殖を誘導することが報告されている。本研究の結果では、エストロゲンによる Fgf7 の発現誘導は認められず、Fgf22 のみが発現誘導された。以上のことから、Fgf22 がエストロゲン依存的に臆上皮の最終分化を誘導する重要な因子であると考えられる。しかしながら、実際に生体内で Fgf22 が、最終分化を誘導するかどうかは不明である。今後、生体の組織状態を模した臆の器官培養系などを利用して、Fgf22 の作用を検証する必要があると考える。

### 【結語】

臆上皮細胞の分化及び増殖には、上皮と間質それぞれに発現する ER $\langle$ が必要不可欠であることが知られている。しかしながら、実際に生体内における臆上皮細胞の分化や増殖が、如何なるメカニズムで制御されているかは明らかにされていなかった。本研究から、上皮の ER $\langle$ は Fgf22 の発現を誘導し、ERK/MAPK シグナルの活性化を介して臆上皮細胞の最終分化を制御している可能性を示唆することができた。さらに私は、間質に発現する ER $\langle$ の遺伝的な機能解析を行うために、間質特異的-ER $\langle$  cKO マウスを作製し、その解析を現在進めている。FRT におけるがん発症及び進展においても、上皮と間質の相互作用の重要性が示唆されている。本研究から得られた知見、さらに私が樹立した臆間質特異的-ER $\langle$  cKO マウスを用いることで、エストロゲンが関与する FRT 疾患の病態解明が進展することが期待される。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年1月10日、21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。

雌性外生殖器である膣は、エストロゲン依存的な細胞の分化及び増殖機構を理解する上で有用なモデルである。膣の間質細胞にエストロゲンが作用することで上皮細胞の増殖が促進され、その後上皮細胞にエストロゲンが作用することで上皮細胞の分化が促進することが示唆されているが、詳細な分子機構は不明であった。近年、膣上皮細胞特異的にエストロゲン受容体(ER)を欠損させたコンディショナルノックアウト(膣上皮特異的-ER(cKO)マウス)の解析により、膣上皮細胞の分化に必要な因子として、上皮成長因子受容体リガンドである **Amphiregulin (AREG)** が同定されていた。しかしながら、AREG だけでは膣上皮細胞の最終分化には不十分であり、さらなる別の因子の関与が示唆されていた。

本研究では、膣上皮細胞の最終分化機構を明らかにする目的で、膣上皮特異的-ER(cKO)マウス膣を用いて、DNA マイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析、定量的リアルタイム PCR による mRNA の発現解析、そして免疫化学染色による組織学的解析を行った。

本研究により、マウス膣上皮には、繊維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor; Fgf) である **Fgf22** 及び **Fgf18** が発現しており、また **Fgf22 mRNA** の発現は、エストロゲン依存的に上昇することが明らかとなった。さらに、膣上皮細胞の最終分化が生じる領域において、**Fgf** の下流シグナルである **pFRS2** 及び **pERK1/2** の発現が認められた。一方で、膣上皮特異的-ER(cKO)マウス膣上皮では、これらの **Fgf** リガンドやその下流シグナルの発現は認められなかった。

以上より、膣上皮細胞の最終分化には、上皮性の **ER** によって発現誘導される **Fgf22** が関与すること並びに、**ERK/MAPK** の活性化を介して膣上皮細胞の最終分化を誘導する可能性が示唆された。本研究は、これまで未解明であった膣上皮細胞の分化制御機構の解明に新たな知見を与えるものであり、エストロゲンの関与するがんをはじめとする多くの病態解明に貢献することが期待され、博士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602号		
学位授与の日	令和2年3月17日		
氏名	湯峰 奈都子		
学位論文の題目	Claudin-1 inhibits human parainfluenza virus type 2 dissemination (クローディン1はヒトパラインフルエンザウイルス2型の感染拡大を阻害する)		
論文審査委員	主査	教授 山田 源	
	副査	教授 竹下 達也	教授 西尾 真智子

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

ヒトパラインフルエンザウイルス2型(hPIV2)は、ヒトに呼吸器感染症を引き起こすウイルスで、小児が罹患することが多く、主に上気道感染を引き起こし、まれに重症化することもある。hPIV2 はマイナス一本鎖 RNA ウイルスで、NP、P、M、F、HN、L の6つの遺伝子をコードしており、そのうちP遺伝子からはRNA編集と呼ばれる機構によりゲノム上にない塩基が挿入され、アミノ酸の読み枠がシフトし、N末端に共通のアミノ酸配列を持つ2つの蛋白(P蛋白とV蛋白)が作られる。これまでの本教室の研究によりV蛋白はSTAT1/2、MDA-5、AIP1/Alix、TRAF6、Tetherin、Graf1などの宿主蛋白と結合し、宿主細胞の持つ免疫機能を抑制したり、ウイルス増殖を促進させたりする機能があることが明らかになっている。

HeLa細胞を使用したhPIV2野生株感染とhPIV2 V欠損組み換えウイルス株感染のマイクロアレイの結果を比較したところ、細胞のタイトジャンクション構成蛋白のひとつである claudin-1(CLDN1)に顕著な変化が認められた。その結果を基に本研究では、CLDN1がhPIV2増殖に与える影響を検討した。

### 【方法】

hPIV2は野生株(Toshiba strain)と、V蛋白に変異の入った組換えウイルス(V変異ウイルス株、rPIV2/V<sub>C193/197A</sub>)を使用した。hPIV2は臨床的には上皮細胞に感染するため、細胞極性のあるA549細胞(ヒト肺胞上皮癌細胞)とMDCK細胞(イヌ腎臓尿細管上皮細胞)を用いた。また、CLDN1過剰発現細胞株(A549/CLDN1)、CRISPR/Cas9系を用いたCLDN1ノックアウト細胞株(MDCK/CLDN1-KO)ならびにhPIV2 V蛋白過剰発現細胞株(A549/V)を作製し、使用した。hPIV2の定量はVero細胞を使用し、プラークアッセイ法により行った。遺伝子発現は定量リアルタイム逆転写PCR法、蛋白発現はウェスタンブロット法を用いて行った。ウイルス感染拡大については1%アガロース加培地を使用し培養した後、免疫染色し、顕微鏡で観察し判定を行った。

### 【結果】

hPIV2感染によるタイトジャンクション構成蛋白CLDN1、ZO-1、ZO-2 および Occludin の遺伝子発現変化を検討したところCLDN1のみが有意に上昇した。CLDN1のmRNAの上昇はhPIV2 V変異ウイルス株感染ではさらに有意に上昇した。ウイルス感染によりmRNAの上昇だけでなく、CLDN1蛋白量の増加も確認できた。

次に、CLDN1がウイルス増殖に与える影響を検討した。CLDN1過剰発現細胞株(A549/CLDN1)では上清ウイルス量は約1/3に低下した。MDCK細胞は元々、CLDN1発現量の多い細胞であるが、CLDN1ノックアウト細胞株(MDCK/CLDN1-KO)を使用すると上清ウイルス量は約10倍に増加した。したがって、CLDN1蛋白の発現はhPIV2の増殖を抑制することがわかった。

CLDN1蛋白の発現がどのようにhPIV2の増殖を抑制するのかを検討するために、隣接する細胞への感染の広がりについて検討した。1個の感染細胞から隣接する細胞へcell-to-cellでの感染拡大のみを検出するために非常に低いmultiplicity of infectionで細胞にウイルスを感染させ、培養液に1%のアガロースを添加し、免疫染色により感染細胞集塊を検出し、細胞集塊あたりの感染細胞数をカウントした。感染細胞集塊あたりの感染細胞数は、CLDN1過剰発現細胞株(A549/CLDN1)では感染後24時間で有意に差が認められ、集塊あたりの平均感染細胞数はコントロール細胞と比べて6.35より1.95に減

少しした。CLDN1 ノックアウト細胞株(MDCK/CLDN1-KO)では感染後 36 時間で有意に差が認められ、集塊あたりの平均感染細胞数はコントロール細胞と比べて 1.98 より 6.98 に増加した。これらの結果より CLDN1 蛋白の発現によって hPIV2 の隣接する細胞への感染拡大は抑制されることが明らかになった。

さらに、hPIV2 V 変異ウイルス株感染では hPIV2 野生株感染より CLDN1 が増加したことより、V 蛋白に CLDN1 発現を抑制する能力があるのではないかと考えた。V 蛋白過剰発現細胞株(A549/V)に hPIV2 V 変異ウイルス株を感染させても CLDN1 の発現量は hPIV2 野生株感染とほぼ同等であった。この結果は、V 蛋白はウイルス感染による CLDN1 の発現を抑制する働きがあることを示している。

#### 【結語】

上皮細胞のタイトジャンクションは感染防御のバリアとして機能している。本研究では CLDN1 と hPIV2 の増殖について焦点を当てた。ヒト免疫不全ウイルスやウエストナイル熱ウイルス、デング熱ウイルスなどのウイルスにおいても、CLDN1 は細胞間のウイルス伝播の阻害に関与していることが報告されている。hPIV2 はこれらのウイルスと違い、ウイルス蛋白と CLDN1 の結合や CLDN1 蛋白分解などの直接的な関係は認められなかったが、CLDN1 の発現により、hPIV2 感染時の隣接細胞へのウイルスの伝播が阻害されることが示された。

CLDN1 発現は TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインにより促進されることが報告されている。本教室では、V 蛋白は caspase-1 と結合し、活性化 IL-1 $\beta$  の産生を抑制することを報告している。このことから、V 蛋白による IL-1 $\beta$  阻害により間接的に CLDN1 の発現を抑制している可能性があると考えられる。また、TNF $\alpha$  の mRNA は hPIV2 野生株感染で増加し、hPIV2 V 変異ウイルス株感染ではさらに増加することを確認している。しかし、TNF $\alpha$  を作用させると CLDN1 以外のタイトジャンクション構成蛋白の発現も増加する。したがって、V 蛋白が CLDN1 のみの発現量を低下させるメカニズムはまだ不明な点が多く、これからの研究課題と考えている。

#### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和2年1月9日、10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。

ヒトパラインフルエンザウイルス2型(hPIV2)は、ヒトに呼吸器感染症を引き起こすウイルスである。これまでの研究により hPIV2 の V 蛋白は STAT1/2、MDA-5、AIP1/Alix、TRAF6、Tetherin、Graf1 などの宿主蛋白と結合し、宿主細胞の持つ免疫機能を抑制したり、ウイルス増殖を促進させたりする機能があることが明らかになっている。hPIV2 野生株感染細胞と hPIV2 V 欠損組み換えウイルス株感染細胞を用いたマイクロアレイの結果を比較したところ、タイトジャンクション構成蛋白の claudin-1(CLDN1)に顕著な変化が認められた。そこで、本研究では CLDN1 が hPIV2 増殖に与える影響を検討した。

ヒト肺胞上皮細胞(A549細胞)を使用し、hPIV2 野生株感染によって生じるタイトジャンクション構成蛋白(CLDN1、ZO-1、ZO-2、occludin)の mRNA の変化を検討したところ、CLDN1 の mRNA のみが有意に上昇し、hPIV2 V 変異ウイルス株感染では CLDN1 のみがさらに顕著に上昇した。また、hPIV2 感染による CLDN1 蛋白量の増加も確認できた。次に、CLDN1 がウイルス増殖に与える影響を検討するため A549細胞を使用し CLDN1 過剰発現細胞株、イヌ腎臓尿管上皮細胞である MDCK細胞を使用し CRISPR/Cas9 系を用いた CLDN1 ノックアウト細胞株を作製し、プラークアッセイ法を用いて検討した。培養上清中のウイルス量は A549/CLDN1 過剰発現細胞株では約 3 分の1に減少し、MDCK/CLDN1 ノックアウト細胞株では約 10 倍に増加した。このことから、CLDN1 蛋白の発現は hPIV2 の増殖を抑制することがわかった。さらに、そのメカニズムを検討するため、アガロースゲルを細胞培養液に加え隣接細胞への拡大のみを観察する実験系を構築した。その結果、CLDN1 蛋白は hPIV2 感染が隣接細胞へ拡大する事を抑制していることが明らかになった。また、hPIV2 V 変異ウイルス株感染では hPIV2 野生株感染より CLDN1 が顕著に増加したことより、V 蛋白に CLDN1 発現を抑制する能力があるのではないかと考え hPIV2 V 蛋白過剰発現 A549 細胞株を作製した。その細胞に、hPIV2 V 変異ウイルス株を感染させても CLDN1 の顕著な上昇は見られず、V 蛋白はウイルス感染による CLDN1 の発現を抑制する働きがあることも明らかにした。

以上の実験より、宿主細胞は CLDN1 を増加させ hPIV2 感染拡大を防いでいるが、hPIV2 は CLDN1

の発現によりウイルス増殖が抑制されてしまうため、hPIV2のV蛋白によってCLDN1増加を抑制することによりウイルスが増殖しやすい環境にしていると考えられた。  
本論文では宿主蛋白であるCLDN1がウイルス感染制御の因子となりえる可能性を示し、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第603号		
学位授与の日	令和2年3月17日		
氏名	片山 陽介		
学位論文の題目	Feasibility and Clinical Significance of in vivo Cholesterol Crystal Detection using Optical Coherence Tomography (光干渉断層法による生体内コレステロール結晶の検出と臨床的意義)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 西村 好晴	教授 赤阪 隆史

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

心疾患は、日本を含む世界各国の主要な死因の一つである。その代表的疾患である急性心筋梗塞は、主に **plaque rupture** を契機に発症するため、**plaque rupture** の発生メカニズムに関し研究が続けられてきた。病理学的研究では、菲薄化した線維性被膜を有するプラーク (**thin-cap fibroatheroma; TCFA**) から **plaque rupture** が発生すると報告された。しかし、最近の冠動脈内イメージング研究から、このパラダイムに疑問が投げかけられている。電子顕微鏡を用いた研究結果から、コレステロール結晶 (**cholesterol crystal: CC**) が、直接プラークを貫き **plaque rupture** を起こしている可能性が示された。しかし剖検例での検討では、大多数の **CC** は病理標本作製時の有機溶媒固定により溶出し、その存在は何も無いスペース、いわゆる“**cleft**”となる。また標本作成時の冷却や **pH** の変化により、新たに **CC** が析出することも知られており、生体内における **CC** と **plaque rupture** との関係は不明である。

高解像度生体内画像診断法である光干渉断層法 (**optical coherence tomography: OCT**) の登場により、生体内での **CC** 評価の可能性が示された。しかし病理との比較データは存在せず、生体内における **OCT** による **CC** 検出精度に関しては不明である。

そこで、我々は、**OCT** の **CC** に対する診断能力を病理診断と比較検討し、**OCT** を用いて生体内における **plaque rupture** と **CC** の関係について検討を行った。

### 【方法】

本研究は剖検心を用いた病理学的研究と臨床研究の2つの研究から構成される。

#### ・病理学的研究：OCTによるCC検出精度の検討

非心臓死検体の剖検心11例から10-20mm長程度の冠動脈病変(n=45)を切り出し、それぞれに**OCT**を施行して冠動脈の観察を行った。その後ホルマリン固定および脱灰を行い、パラフィン包埋し5μm長の切片に切り出し**Masson trichrome**染色を行った。**OCT**で診断した**CC**と作成した病理標本における“**cleft**”を比較し、**OCT**における**CC**の診断精度を検討した。**OCT**での**CC**はプラーク内に存在する高輝度の薄い線状構造物と定義した。

#### ・臨床研究：生体内CCとplaque ruptureの関係の解明

2016年1月から2017年12月にかけて和歌山県立医科大学附属病院に入院し加療を行った急性心筋梗塞患者152症例と安定狭心症患者41症例を解析対象とした。**OCT**コンセンサス文書の病変性状分類に則り、急性心筋梗塞患者を、**plaque rupture**を原因とする①**Plaque rupture**群(n=112)、プラークびらんを原因とする②**OCT-erosion**群(n=40)の2群に分類した。また**CC**の局在に関して、線維性被膜に穿通している群(**Superficial type**)としていない群(**Deep type**)の2群に分類した。

また、**OCT**による**CC**評価における検者間および検者内の診断一致度も評価した。

### 【結果】

#### ・病理学的研究

病理組織断面45切片のうち19切片(42%)で**CC**が確認された。病理診断をゴールドスタンダードとした際の、**OCT**による**CC**診断の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、診断精度はそれぞれ

68%、92%、87%、80%、82%であった。

・臨床研究

冠動脈の責任病変における CC は plaque rupture 群で高頻度に確認された(Plaque rupture 群: 81% vs. OCT-erosion 群: 48% vs. 安定狭心症群: 39%,  $p < 0.001$ )。Superficial type の CC は plaque rupture 群で高頻度に確認された(Plaque rupture 群: 70% vs. OCT-erosion 群: 23% vs. 安定狭心症群: 7%,  $p < 0.001$ )。CC の平均数は plaque rupture 群で最も多く確認された(Plaque rupture 群:  $10 \pm 10$  vs. OCT-erosion 群:  $4 \pm 6$  vs. 安定狭心症群:  $2 \pm 4$ ,  $p < 0.001$ )。3 群間で CC の長さには明らかな違いはなかった(Plaque rupture 群:  $192 \pm 48 \mu\text{m}$  vs. OCT-erosion 群:  $207 \pm 50 \mu\text{m}$  vs. 安定狭心症群:  $192 \pm 41 \mu\text{m}$ ,  $p = 0.377$ )。多変量解析の結果、TCFA と superficial type の CC がプラーク破裂の独立した予測因子であった。

OCT による CC 評価の再現性( $\kappa$  係数)は検者間において 0.760、検者内において 0.837 であった。

【考察】

本研究は、世界で初めて、病理学的診断と比較して OCT による CC の診断精度を明らかにした。OCT は CC に対し、92%と高い特異度を有するが、68%と感度は中等度であることが明らかとなった。また、OCT による CC 評価の検者間および検者内の一致率は良好であった。以上より、生体内 CC の診断における OCT の利用は妥当と考えられた。

本研究は、生体内 CC が plaque rupture 発症に関与をしていることを世界で初めて示した。CC が plaque rupture を引き起こす機序として以下の 3 つが考えられる。まず、CC 形成時に、CC が直接線維性被膜を破砕し plaque rupture を起こす機械的な機序が考えられる。Ex vivo 研究ではコレステロールが結晶化する際に、45%までも体積が増加し線維性被膜を引き裂くことが報告されている。次に構造力学的ストレスの集中である。これまでの ex vivo 研究から、CC が内腔に近い部位に存在する場合、その近辺の血管壁の壁応力が著明に上昇するため、plaque rupture が生じている可能性が示唆されている。最後に無機結晶の炎症惹起性である。近年、CC は NLRP3 インフラマソームを介して IL-1 $\beta$  や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を亢進させることが明らかとなった。炎症反応はプラークを不安定化させるため、CC が惹起する炎症が、プラークを不安定化させ plaque rupture 発生に寄与している可能性が考えられる。

【結論】

線維性被膜に穿通した CC は plaque rupture とそれに続く急性心筋梗塞と強く関連している。OCT によって診断された線維性被膜に穿通した CC と TCFA を組み合わせることで破裂を引き起こしうるプラークが特定できる可能性が示された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和元年 12 月 24 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。

急性心筋梗塞の主因である plaque rupture の発生メカニズムに関し研究が続けられてきた。病理学的研究では、菲薄化した線維性被膜を有するプラーク(thin-cap fibroatheroma; TCFA)から plaque rupture が発生するとされてきたが、最近の冠動脈内イメージング研究から、このパラダイムに疑問が投げかけられている。電子顕微鏡の研究成果より、コレステロール結晶 (cholesterol crystal: CC) が plaque rupture を起こしている可能性が示唆されている。しかし、生体内で CC を観察する方法がなく、生体内における CC と plaque rupture との関係は不明である。近年、光干渉断層法(optical coherence tomography: OCT)の登場により、生体内での CC 評価の可能性が示された。しかし病理との比較データは存在せず、生体内における OCT による CC 検出精度に関しては不明である。本論文は、OCT の CC に対する診断能力を病理診断と比較検討し、OCT を用いて生体内における plaque rupture と CC の関係について検討した。

本研究は剖検心を用いた病理学的研究と臨床研究の 2 つの研究から構成される。

- ・病理学的研究：非心臓死検体の剖検心 11 例から 10-20mm 長程度の冠動脈病変(n=45)を切り出し、

それらに OCT を施行して冠動脈を観察した。OCT で診断した CC と作成した病理診断による CC を比較し、OCT における CC の診断精度を検討した。

・臨床研究：急性心筋梗塞患者 152 症例と安定狭心症患者 41 症例を解析対象とした。急性心筋梗塞患者を、plaque rupture を原因とする①Plaque rupture 群 (n=112)、プラークびらんを原因とする②OCT-erosion 群(n=40)の 2 群に分類した。また CC のプラーク内局在について、線維性被膜を穿通している群(Superficial type)としていない群(Deep type)の 2 群に分類した。OCT による CC 評価における検者間および検者内の診断一致度も評価した。OCT 画像上で、高輝度の薄い線状構造物を CC と定義した。

病理学的研究では、病理組織断面 45 切片のうち 19 切片(42%)で CC が確認された。OCT による CC 診断の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、診断精度はそれぞれ 68%、92%、87%、80%、82% であった。臨床研究では、冠動脈の責任病変における CC は plaque rupture 群で高頻度に確認された (Plaque rupture 群: 81% vs. OCT-erosion 群: 48% vs. 安定狭心症群: 39%、 $p < 0.001$ )。Superficial type の CC は plaque rupture 群で高頻度に確認された (Plaque rupture 群: 70% vs. OCT-erosion 群: 23% vs. 安定狭心症群: 7%、 $p < 0.001$ )。多変量解析の結果、TCFA と superficial type の CC が plaque rupture の独立した予測因子であった。OCT による CC 評価の再現性( $\kappa$  係数)は検者間で 0.760、検者内で 0.837 であった。

以上、本論文は病理学的診断と比較して OCT による CC の診断精度を明らかにした。また、線維性被膜に穿通した CC が plaque rupture とそれに続く急性心筋梗塞と強く関連していることを示したものである。本研究は OCT によって診断された線維性被膜に穿通した CC と TCFA を組み合わせることで破裂を引き起こしうるプラークが特定できる可能性があること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604号		
学位授与の日	令和2年3月17日		
氏名	江守 裕紀		
学位論文の題目	Diagnostic accuracy of quantitative flow ratio for assessing myocardial ischemia in prior myocardial infarction (陳旧性心筋梗塞の虚血評価における quantitative flow ratio の診断精度)		
論文審査委員	主査	教授 加藤 正哉	
	副査	教授 西村 好晴	教授 赤阪 隆史

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

安定冠動脈疾患に対する血行再建をおこなうにあたり、解剖学的な評価だけでなく機能的な心筋虚血の証明が必要不可欠である。現在、心筋血流予備量比(FFR)は冠動脈狭窄病変の機能的重症度を表す確立された指標である。FFRは、心拍数・血圧・心拍出量などの心血行動態に影響を受けず、灌流域・灌流量(生存心筋量)・側副血行を加味した値である。しかし、FFRを計測するにあたり、冠動脈内への圧センサー付きガイドワイヤーの挿入や最大充血を得るための血管拡張薬の投与が必要であり、世界規模でも普及率はまだ高くないのが現状である。近年登場した Quantitative flow ratio (QFR)は、冠動脈造影(CAG)より FFR 値を非侵襲的かつ簡便にバーチャルで算出することが可能である。QFRは、少なくとも25度以上離れた角度で撮像された2方向のCAG画像より解析血管を3次元構築し、TIMI (Thrombolysis in myocardial infarction) フレームカウントから最大充血時の冠血流速を推定・加味することで FFR 値を高速計算する新しい虚血診断ツールである。陳旧性心筋梗塞(OMI)関連血管では生存心筋量が減少しているため、CAGの狭窄重症度とFFRの機能的重症度の間には誤差が生じることがしばしば存在し、虚血評価を正確におこなうことは重要である。QFRはおもに心外膜冠動脈の解剖学的情報から機能的虚血評価をおこなう指標であり、生存心筋量を加味できていない可能性がある。そこで、我々は OMI 関連血管における QFR の診断精度について、FFR と比較検討した。

### 【方法】

本研究は、CAGとFFRを施行した患者を対象とした後ろ向き、単施設研究である。2012年6月から2016年12月にかけて登録したOMI関連血管75例(75患者)と2015年10月から2016年12月にかけて登録した非OMI関連血管75例(75患者)においてFFRとQFRをそれぞれ比較検討した。FFR計測は、冠動脈造影で中等度狭窄病変(目視で40-70%の狭窄度)に施行した。QFRは、Medis社のソフトウェア(Medis社)を用いて解析し、2種類の異なる血流モデル(fixed-flow QFR[fQFR]とcontrast-flow QFR[cQFR])を用いた。OMIの定義として、①CAGとFFRを施行する30日以上前に発症した心筋梗塞であること②心電図で異常Q波があること③経胸壁心エコー検査で左室収縮能の低下および局所壁運動異常があること④心筋梗塞の原因となる1血管の冠動脈疾患を有することとした。本研究の除外基準として、①不完全な冠動脈造影画像(例、不十分な造影剤注入、複数の冠動脈造影像の欠如)②冠動脈の起始部病変③側副血行路を有する冠動脈④冠動脈バイパスグラフト血管⑤慢性心房細動患者⑥非対象血管の心筋梗塞の既往を有する患者とした。

## 【結果】

OMI 関連血管において、fQFR と cQFR の両者とも FFR と良好に相関した(fQFR:  $r=0.84$ ,  $P<0.001$ 、cQFR:  $r=0.88$ ,  $P<0.001$ )。非 OMI 関連血管においても同様に、fQFR と cQFR の両者とも FFR と良好に相関した(fQFR:  $r=0.91$ ,  $P<0.001$ 、cQFR:  $r=0.94$ ,  $P<0.001$ )。OMI 関連血管において fQFR は FFR よりも有意に低値であった( $0.73\pm 0.14$  vs.  $0.79\pm 0.11$ ,  $P=0.002$ )が、非 OMI 関連血管において fQFR と FFR に有意な差は認めなかった。非 OMI 関連血管と比較して OMI 関連血管において、cQFR と FFR の差は大きい傾向にあった( $-0.02\pm 0.06$  vs.  $0.00\pm 0.04$ ,  $P=0.010$ )。OMI 関連血管において、cQFR と FFR の差は fQFR と FFR の差より有意に低かった (fQFR-FFR vs. cQFR-FFR;  $-0.02\pm 0.06$  vs.  $0.00\pm 0.04$ ,  $P=0.010$ )(図表 1)。FFR $\leq 0.80$  を予測する fQFR $\leq 0.80$  と cQFR $\leq 0.80$  の診断精度は、非 OMI 関連血管と比較して、OMI 関連血管において低かった(fQFR: 77% vs. 87%; cQFR: 87% vs. 92%)

## 【考察と結語】

中等度狭窄病変を有する OMI 関連血管の虚血評価において、QFR は FFR と良好に相関し、良好な診断能を有することが明らかとなった。さらに、fQFR よりも cQFR のほうが、FFR との誤差は少ないことも明らかとなった。fQFR と異なり、cQFR は TIMI フレームカウントという患者固有の冠血流パラメーターを用いており、そのため、OMI 関連血管において fQFR よりも FFR との誤差が少なかったと考えられた。そのため、OMI 関連血管の虚血評価においては、cQFR を用いるほうがよいと示唆される。しかしながら、cQFR を用いても、非 OMI 関連血管と比較して OMI 関連血管において、FFR との差は大きかった。そのため、QFR の診断精度は、非 OMI 関連血管と比較して OMI 関連血管において低下する可能性があり、注意を有する必要があると考えられた。

FFR を虚血診断のゴールドスタンダードとしたとき、QFR の機能的虚血評価における診断精度は、非 OMI 関連血管と比較して OMI 関連血管において低下する可能性が示唆された。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和元年12月10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。

安定冠動脈疾患に対する血行再建をおこなうにあたり、解剖学的な評価だけでなく機能的な心筋虚血の証明が必要不可欠である。現在、心筋血流予備量比(FFR)は冠動脈狭窄病変の機能的重症度を表す確立された指標である。近年登場した Quantitative flow ratio (QFR)は、冠動脈造影(CAG)より FFR 値を非侵襲的かつ簡便にバーチャルで算出することが可能である。QFR は、少なくとも 25 度以上離れた角度で撮像された 2 方向の CAG 画像より解析血管を 3 次元構築し、TIMI (Thrombolysis in myocardial infarction) フレームカウントから最大充血時の冠血流速を推定・加味することで FFR 値を高速計算する新しい虚血診断ツールである。

陳旧性心筋梗塞(OMI)関連血管では生存心筋量が減少しているため、CAG の狭窄重症度と FFR の機能的重症度の間には誤差が生じることがしばしば存在し、虚血評価を正確におこなうことは重要である。QFR はおもに心外膜冠動脈の解剖学的情報から機能的虚血評価をおこなう指標であり、生存心筋量を加味できていない可能性がある。本論文は、OMI 関連血管 75 例(75 血管)と非 OMI 関連血管 75 例(75 血管)における QFR の診断精度について、FFR と比較検討した。QFR は、Medis 社のソフトウェア(Medis 社)を用いて解析し、2 種類の異なる血流モデル(fixed-flow QFR[fQFR]と contrast-flow QFR[cQFR])を用いた。

OMI 関連血管において、fQFR と cQFR の両者とも FFR と良好に相関した。非 OMI 関連血管においても同様に、fQFR と cQFR の両者とも FFR と良好に相関した。非 OMI 関連血管と比較して OMI 関連血管において、cQFR と FFR の差は大きい傾向にあった。OMI 関連血管において、cQFR と FFR の差は fQFR と FFR の差より有意に低かった。FFR $\leq$ 0.80 を予測する fQFR $\leq$ 0.80 と cQFR $\leq$ 0.80 の診断精度は、非 OMI 関連血管と比較して、OMI 関連血管において低かった。

中等度狭窄病変を有する OMI 関連血管の虚血評価において、QFR は FFR と良好に相関し、良好な診断能を有することが明らかとなった。さらに、fQFR よりも cQFR のほうが、FFR との誤差は少ないことも明らかとなった。fQFR と異なり、cQFR は TIMI フレームカウントという患者固有の冠血流パラメーターを用いており、そのため、OMI 関連血管において fQFR よりも FFR との誤差が少なかったと考えられた。そのため、OMI 関連血管の虚血評価においては、cQFR を用いるほうがよいと示唆された。しかしながら、cQFR を用いても、非 OMI 関連血管と比較して OMI 関連血管において、FFR との差は大きかった。以上、本論文は、QFR の診断精度が、非 OMI 関連血管と比較して OMI 関連血管において低下する可能性があり、臨床で使用する際は注意を有する必要があること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605号		
学位授与の日	令和2年3月24日		
氏名	臼井 恵子		
学位論文の題目	<b>Suppression of neovascularization in corneal stroma in a TRPA1-null mouse.</b> (TRPA1 欠失マウスでは角膜実質の血管新生が抑制される)		
論文審査委員	主査	教授 平井 秀一	
	副査	教授 山田 源	教授 雑賀 司珠也

## 論文内容の要旨

角膜は本来透明で無血管の組織であるが、外界に直接面しているため障害を受けやすく、生じた炎症により血管新生を引き起こす。この血管新生は視力維持に好ましくなく、治療法の開発は重要である。これまで、血管内皮細胞成長因子(VEGF)を標的とした治療が行われているが、炎症に伴う血管新生では、炎症細胞が産生する種々の成長因子が血管新生に関与していると考えられるため、過剰な炎症の制御による血管新生の制御が必要であると考えられる。

近年感覚神経に特異的に発現して侵害刺激受容に関わるイオンチャンネル型受容体が明らかにされつつある。その中心的な分子群が transient receptor potential (TRP) チャンネルである。その中の TRP ankyrin 1 (TRPA1) は感覚神経細胞に発現し種々の化学刺激や寒冷刺激、Ca<sup>2+</sup>イオンなど様々な物質により活性化し、陽イオン流入から細胞興奮をもたらす。角膜上皮にも TRPA1 発現が検出され、TRPA1 ノックアウトマウス由来培養細胞での Smad シグナルの抑制と同ノックアウトマウスでの角膜アルカリ外傷後の局所炎症の軽減を当教室から報告している (Okada Y, et al, Lab Invest. 2014)。

本研究では角膜焼灼新生血管モデルを用いて VEGFR と TRPA1 の相互作用が新生血管と炎症性細胞浸潤の調節機構に関わっているかを検討した。

マウス角膜中央部を焼却により発生した新生血管は TRPA1 欠失マウスでは有意に抑制されており、角膜 mRNA ではマクロファージマーカー (F4/80)、VEGF、TGFβ-1 の発現レベルが低下していた。焼灼7日後角膜において、TRPA1 と CD31 の共染色は認められなかったが、TRPA1 陽性細胞は CD31 陽性細胞周囲や上皮細胞および間質細胞において検出された。培養マクロファージにおける TRPA1 発現の有無にかかわらず、VEGF-A および TGFβ-1 の mRNA 発現レベルに差はなかった。VEGFR を発現する眼球線維芽細胞において、WT および KO 眼球線維芽細胞における VEGF 発現に対する外因性 VEGF の効果を検討したが、TRPA1 発現の有無に関わらず、VEGF は VEGF 添加によって変化しないままであった。一方、TGFβ-1 は、KO 眼線維芽細胞において WT 線維芽細胞より発現が少なかった。

TRPA1 アンタゴニストが線維芽細胞フィーダー上に培養したヒト臍帯静脈内皮細胞の管腔形成を抑制していたが、VEGF 暴露による Erk と Akt の活性化は TRPA1 アゴニストおよびアンタゴニスト添加で影響されなかった。アラマーブルーアッセイ、スクラッチアッセイで TRPA1 アゴニスト、アンタゴニスト投与で HUVEC の増殖、遊走能に影響はなかった。

上記結果より血管内皮細胞に隣接する TRPA1 陽性細胞の活性化が血管内皮の VEGFR を活性化して新生血管形成を誘導すると考えた。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年2月7日、論文審査委員会は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

申請者から論文要旨の説明後、主査、副査から申請者へ口頭審問が行われた。

1. 角膜において炎症と新生血管をつなぐシグナル伝達系について説明せよ。
2. TRP チャンネル全般と血管新生、角膜再生全般について概説せよ。
3. 各 TRP メンバーの共通性と違いについて説明せよ。

この他、本研究において申請者が直接実施した実験内容に関して、今後の展望や臨床応用に関する質問があったが、申請者の質問への応答、態度は良好で適切に返答していた。

本論文では TRPA1 シグナルの抑制が角膜新生血管の抑制に働く可能性が示唆され、角膜透明治癒の新しい治療標的になる可能性がある。本論文が学位授与に十分な内容を有していると判断した。

学位記番号	博(医)甲第606号		
学位授与の日	令和2年3月24日		
氏名	中西 隆		
学位論文の題目	Effect of duration from lingual nerve injury to undergoing microneurosurgery on improving sensory and taste functions: retrospective study (舌神経修復術後の知覚および味覚機能回復と舌神経損傷から手術までの期間との関係についての研究)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 藤田 茂之

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

舌神経は、口腔顎顔面外科学領域の手術において損傷するリスクがあり、損傷した際は一時的な知覚障害が生じ、ほとんどが数週間後には回復するが、一部の舌神経損傷では、団神経腫を形成し手術なしでは改善しない永久的な舌神経障害が生じる。これらの症例に対して、断端神経腫を除去し、神経断端を吻合するマイクロ顕微鏡視下の舌神経修復術を施行する。しかし、術後の神経機能の回復には個人差が生じる。この舌神経修復術による神経機能の回復に関与する因子の探索は以前より行われているが、一致した見解が得られていない。また、舌神経修復術後の味覚の回復についての報告はほとんどない。そこで本研究では、損傷から手術までの期間が舌神経修復術後の機能的回復に関与するかを明らかにするため、知覚と味覚の回復を評価基準として解析を行った。また、神経再生には神経軸索を誘導させるシュワン細胞の存在が重要であるが、軸索を失ったシュワン細胞はアポトーシスを起こすことが報告されており、舌神経損傷後長期にわたる症例では、シュワン細胞の減少が予想される。そこで本研究では、舌神経修復術の際に切除した断端神経腫を組織学的に解析し、舌神経損傷から神経修復術を行うまでの期間が長期の症例で、シュワン細胞の存在比率が低下するかを検討した。

### 【方法】

対象は、2004年7月から2016年12月までに和歌山県立医科大学付属病院歯科口腔外科にて、下顎水平埋伏歯抜歯による舌神経損傷症例に対し舌神経修復術を施行した患者とした。一人の術者がすべての症例の舌神経修復術を施術し、二点識別域試験(2PD)とallodyniaの有無によるFSRの達成を確認した知覚試験およびテーストディスクを用いた味覚試験を術前、術後12か月、術後24か月で施行した。

2013年1月以降に舌神経修復術で切除され、断端神経腫30標本について、組織中のシュワン細胞の存在比率を測定するために、免疫組織化学を施行した。症例毎に3視野をランダムに撮影し、組織面積あたりの抗S100β抗体に対する免疫反応した割合を測定した。

舌神経損傷から手術までの期間が6か月以内の症例を短期症例とし、損傷から6か月超の症例を長期症例とした。統計学的解析では、短期症例と長期症例における舌神経修復術12か月後および24か月後の二点を識別できる最短の距離、allodyniaの存在率、味覚の改善率と舌神経修復術時に切除した断端神経腫内におけるシュワン細胞の存在比率について、平均値の差についてはStudentのt検定、存在比率の差についてはFisherの正確検定を用いて統計解析を行った。

### 【結果】

対象となる患者は70人で、そのうち65人は舌神経修復術後24ヵ月まで経過観察したが、残りの5人は追跡調査ができなかったため、術後24か月の評価からは除外した。男性が19人、女性が51人で、平均年齢は36.2±11.7歳であった。手術前に36人の患者に異痛感覚があり、2PD検査の平均値は18.7±4.5mmであった。短期症例46症例と長期症例24症例あり、短期症例と長期症例との間に、年齢、

性別、損傷側、および完全断裂・不完全断裂の項目で有意な差を認めなかった。

舌神経修復術後 12 か月目の知覚及び味覚試験では短期症例と長期症例の間に有意差は認められなかったが、術後 24 か月まで追跡調査したところ、味覚試験において術後 12 か月以内に改善した症例に対する、術後 12 か月超 24 か月以内に改善した症例の比率が、長期症例で有意に高かった ( $P = 0.016$ )。

断端神経腫におけるシュワン細胞の存在比は、短期症例 ( $n=22$ ) で  $55.3 \pm 17.6\%$ 、長期症例 ( $n=8$ ) で  $27.9 \pm 5.5\%$  と、組織中のシュワン細胞の存在比率は、長期症例で有意に少なかった ( $P = 0.002$ )。

### 【考察】

舌神経修復術後の知覚機能の回復に関する研究では、舌神経機能評価方法や損傷から手術までの期間について、研究間で差があった。Susarla らは、損傷から舌神経修復術まで 3 か月以内に有意に FSR の達成率が良いと報告しているが、Vincent らは損傷から 3 か月までは自然に回復する可能性があるとして報告しており、Sursal らの研究では自発的に回復するはずの症例も手術対象としているため、本来の手術対象である症例に対する回復率とは言い難い。我々は、明らかに舌神経を切断した症例を除き、少なくとも損傷から 3 か月経過観察し、舌神経修復術を施行した。このため、舌神経損傷後 6 か月以内と損傷後 6 ヶ月超に分類し、知覚と味覚の機能改善について比較検討した。本研究においても、他の報告と同様に術後 12 か月目での機能評価において有意な差は認められなかったが、さらに術後 24 か月目まで追跡調査したところ、味覚の回復を認めた長期症例の 4 割は回復に 24 か月要しており、舌神経損傷後から手術までの期間が延長することで、味覚の回復にかかる期間が延長する可能性を示した。長期症例において、味覚の回復が遅延する要因として、切除した断端神経腫について、免疫組織学的に評価を行ったところ、短期症例と比較して長期症例において断端神経腫内におけるシュワン細胞の存在比率が有意に減少した。末梢神経損傷において、シュワン細胞は末梢神経の軸索伸長と髄鞘形成の促進させる役割がある。Hall らは、ラットの末梢神経において、有髄化されなかったシュワン細胞がアポトーシスを誘導し消失したと報告している。このため、舌神経損傷から手術までの期間が延長することで、断端神経腫を含め、損傷部位付近のシュワン細胞が減少し、その結果として軸索伸長の足場の低下により神経再生が遅れ、味覚機能回復が遅延する可能性が考えられる。

本研究では、舌神経損傷から手術までの期間が知覚と味覚の改善率に影響しなかったが、フォローアップ期間を従来の 12 か月から 24 か月に伸ばすことで、長期症例で味覚の回復に時間を要す可能性を見出した。この味覚回復の遅延には、断端神経腫内のシュワン細胞の減少と関連する可能性がある。このため、舌神経断端の吻合の際にシュワン細胞から分泌される内因性物質が神経再生促進させ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2年3月2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。

下顎智歯抜歯術の際に舌神経を損傷するおそれがあり、大多数の損傷症例は一過性だが、一部は神経修復術なしには回復を期待できない永久的な舌神経障害が生じる。このような症例では、舌神経修復術を施行し、舌神経の回復を期待するが、術後の機能的回復には症例間に個体差が生じる。舌神経修復術の予後に関連する因子の研究は以前より広く行われており、損傷から手術までの期間との関連性についての研究は多々報告されているが、一致した見解は未だ得られていない。また、知覚検査による解析は多数報告されているが、手術後の味覚の改善についての報告はない。

そこで学位申請者は、損傷から手術までの期間が舌神経修復術後の機能的回復に関与するかを明らかにするため、舌神経修復術を施行した症例 70 例を対象に、損傷から手術までの期間が 6 か月以内の症例を短期症例群、6 か月超の症例を長期症例群とし、短期症例群と長期症例群における知覚と味覚機能の回復率について比較検討した。また、末梢神経再生では軸索成長と髄鞘形成を促すシュワン細胞の存在が重要であるが、軸索を失ったシュワン細胞はアポトーシスを引き起こすことが報告されており、舌神経損傷後の期間が長い症例においてシュワ

ン細胞の減少が予想される。そこで、舌神経修復術の際に切除した断端神経腫30標本を対象に、長期症例群において、シュワン細胞の存在比率が低下するか解析した。

その結果、術後12か月目の知覚機能は短期症例群と長期症例群ともに90%以上の回復率を認めたが、両群間の回復率に有意な差は認められなかった。さらに、術後24か月まで追跡調査し機能改善するのに要した期間について解析したところ、知覚検査では有意な差は認められなかったが、長期症例群における味覚の回復は有意に遅延した。また、短期症例群と比較した長期症例群における断端神経腫内のシュワン細胞の存在比率は、有意に減少した。

長期症例群における断端神経腫内のシュワン細胞の存在比率は減少しており、味覚機能回復の遅延をもたらした要因のひとつであると考えられる。また、従来、舌神経修復術は舌神経損傷から6か月以内に施行すべきであるとされていたが、本研究の長期症例の機能回復率から、損傷からの時間の経過に関わらず、長期症例においても積極的に舌神経修復術を推奨する結果となった。これは長期症例において、損傷をうけた軸索中枢側の神経細胞では再生能を維持しており、適切な舌神経修復術を施行することで、術後の機能的回復をもたらす可能性を示した。以上のように学位申請者は、舌神経修復術における予後因子解析において、長期症例の味覚回復には時間を要するが、損傷してからの時間経過に関わらず機能的回復を期待できることを見出し、学位論文にふさわしい価値があるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第607号		
学位授与の日	令和2年3月24日		
氏名	神藤 一紀		
学位論文の題目	Prevalence of Facet Effusion and Its Relationship with Lumbar Spondylolisthesis and Low Back Pain: The Wakayama Spine Study (椎間関節水腫の有所見率と、その腰椎すべりや腰痛との関連性)		
論文審査委員	主査	教授 川上 守	
	副査	教授 中尾 直之	教授 山田 宏

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

腰痛は矢状面バランス不良、神経根、硬膜管の圧迫や、椎間板、椎間関節等の傷害、変性などの複数の原因がある症状である。腰痛を診療する際、身体所見や MRI 等の画像所見が病因を決定するためには重要となる。腰椎椎間関節水腫は、椎間関節などの後方要素に由来する腰痛を示している可能性があると考えられている MRI 所見である。しかし、実際に腰痛との関連を指摘する報告の数は少なく、その解釈も意見が分かれている。また、腰椎すべり患者においては、椎間関節水腫が腰椎すべり、特に椎間不安定性と関連すると報告されている。従って、椎間関節水腫が椎間不安定性に伴う腰痛を示唆しており、手術治療に椎間固定を追加する根拠の一つと捉える脊椎外科医もいる。過去の報告は患者やボランティアを対象としており、選択バイアスの可能性や得られた知見が必ずしも一般住民に当てはまらない可能性がある。本研究では、一般住民コホートをを用いて椎間関節水腫の有所見率を調査するとともに、腰痛や腰椎すべりとの関連を検討した。

### 【対象・方法】

Wakayama Spine Study は脊椎加齢変性に関する、一般住民を対象とした調査である。本研究では 2013 年に実施された Wakayama Spine Study 参加者 857 名から、MRI 撮影ができなかった 42 名、MRI が椎間関節の評価に適さなかった 6 名、腰椎固定術を実施していた 1 名を除外した 808 名を対象とした。また、自記式アンケートを用いて一ヶ月以内の腰痛の有無、単純 X 線(立位全脊柱側面)にて 3 mm 以上の第 4 腰椎すべりの有無、MRI にて椎間関節水腫の有無を調査した。椎間関節水腫は椎間関節間に存在する、計測可能な、T2 強調画像において脳脊髄液と同程度に高輝度な曲線と定義した。左右何れかの椎間関節に椎間関節水腫があれば、その椎間高位に「椎間関節水腫あり」とした。記述統計の手法で対象集団の特徴や椎間関節水腫の有所見率を検討した。名義変数はカイ二乗検定を用いて分析し、連続変数の分析には Student-t 検定を使用した。加齢とともに椎間関節水腫有所見率が増減する傾向があるか、Cochran-Armitage の傾向検定を用いて分析した。多変量ロジスティック回帰分析を用いて腰椎椎間関節水腫と腰痛、腰椎すべりとの関連を検討した。まず、腰痛の有無を目的変数、各高位(L1/2-L5/S)の椎間関節水腫有無を説明変数としたモデルを椎間高位別に 5 つ作成し、椎間関節水腫と腰痛の関連を検討した。次に、第 4 腰椎すべり有無を目的変数、L4/5 椎間関節水腫の有無を説明変数としたモデルを用いて、L4/5 椎間関節水腫と第 4 腰椎すべりの関連を検討した。最後に、第 4 腰椎すべり有所見者間で、腰痛の有無を目的変数、L4/5 椎間関節水腫の有無を説明変数としたモデルを作成して、腰痛と椎間関節水腫の関連を検討した。各モデルは性、年齢、BMI で調整した。

### 【結果】

腰椎における椎間関節水腫の有所見率は 34.3%(男性 38.1%, 女性 32.6%)で、男女間に統計学的有意差は無かった( $p=0.13$ )。第 4 腰椎すべりの有所見率は 11.3%で、腰痛の有訴者率は 38.7%であった。男女ともに、椎間関節水腫の年代別有所見率が変化する傾向は認めなかった(男性  $p=0.81$ , 女性

p=0.65). 椎間高位別の椎間関節水腫を比較すると, 男女ともにL2/3, L3/4, L4/5 で多い傾向があった. 性, 年齢, BMI で調整した多重ロジスティック回帰分析では各椎間高位の椎間関節水腫と腰痛には統計学的に有意な関連は認めなかった(L1/2 椎間 オッズ比 1.08; 95%信頼区間 0.57-2.01; p=0.80, L2/3 椎間 オッズ比 1.32; 95%信頼区間 0.85-2.06; p=0.22, L3/4 椎間 オッズ比 1.11; 95%信頼区間 0.73-1.69; p=0.62, L4/5 椎間 オッズ比 1.04; 95%信頼区間 0.67-1.61; p=0.85, L5/S 椎間 オッズ比 1.49; 95%信頼区間 0.84-2.64; p=0.17). L4/5 椎間関節水腫と第4腰椎すべりにも統計学的に有意な関連を認めなかった(オッズ比 1.53; 95%信頼区間 0.78-2.81; p=0.20). 第4腰椎すべり有所見者 90 名を抽出した層別解析においても, L4/5 椎間関節水腫と腰痛に統計学的に有意な関連は無かった(オッズ比 1.26; 95%信頼区間 0.37-4.27; p=0.70).

#### 【考察】

本研究では, 一般住民コホートをを用いて椎間関節水腫の有所見率と椎間関節水腫と腰痛の関連性について検討した. 椎間関節水腫の有所見率は 34.3%で, 性差は無かった. 先行研究に比べると, 本研究における椎間関節水腫の有所見率は低かったが, これについては先行研究がボランティアや患者を対象としているのに対して本研究が一般住民を対象としていることや人種の違いが理由として考えられた. また, 男女ともに, 年代により椎間関節水腫の有所見率が変化する傾向は無かった. 先行研究では椎間不安定性と椎間関節水腫の幅や大きさが相関することが報告されており, 椎間関節水腫が椎間の再安定化に伴って消退する一過性の変化であることが関与している可能性を考えた. 今回, 椎間関節水腫の有無と腰痛に統計学的に有意な関連は認めなかった. 腰痛の有無に関わらず, 椎間関節水腫は高齢者において一般的な所見である可能性が示唆されたものと思われた. 椎間関節水腫と腰椎すべりにも統計学的に有意な関連はなく, すべり有所見者間でも腰痛と統計学的に有意な関連は認めなかった. 単純な椎間関節水腫の有無では術後成績に差が無いことが過去に報告されており, 本研究の結果も関節水腫の有無に基づいて固定術を選択することを支持するものではなかった. 本研究の **limitation** としては横断研究であること, 対象が単一地域の住民であること, 単純 X 線の前後屈像が無いため, 椎間関節水腫が実際に椎間不安定性と関連するか検討出来ないこと, 椎間関節の関節症性変化など, 椎間関節水腫と関連があると思われる他の画像所見が検討できていないことが挙げられる.

#### 【結論】

一般住民コホートにおける腰椎椎間関節水腫の有所見率は 34.3%で, 有所見率に性差や, 年代により変化する傾向は認めなかった. 腰椎椎間関節水腫の有無と腰痛や腰椎すべりに統計学的に有意な関連は認めなかった.

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 2 年 3 月 2 日, 3 月 5 日, 論文審査委員は学位請求者の出席を求め, 上記論文についての審査を行った.

椎間関節水腫は腰椎椎間関節の MRI 所見のひとつで, 椎間不安定性との関連が示されている. 本論文の目的は一般住民コホートをを用いて椎間関節水腫の有所見率を調査するとともに, 腰痛や腰椎すべりとの関連を検討することである.

Wakayama Spine Study は脊椎加齢変性に関する, 一般住民を対象とした調査である. 今回は 2013 年に実施された Wakayama Spine Study 第 2 次調査に参加した太地町の住民 808 名を対象とした. 本研究では, 自記式アンケートにて一ヶ月以内の腰痛の有無, 単純 X 線にて第 4 腰椎すべり(3mm 以上)の有無, MRI にて椎間関節水腫の有無を調査した. 椎間関節水腫は椎間関節裂隙に存在する, 計測可能な, T2 強調画像において脳脊髄液と同程度に高輝度な曲線と定義した. 左右何れかの椎間関節に椎間関節水腫があれば, その椎間高位に「椎間関節水腫あり」とした. 記述統計により, 対象集団の特徴や椎間関節水腫の有所見率を検討した. 加齢とともに椎間関節水腫有所見率が増減する傾向があるか, Cochran-Armitage の傾向検定を用いて分析した. 多変量ロジスティック回帰分析を用いて

腰椎椎間関節水腫と腰痛、腰椎すべりとの関連を検討した。各回帰モデルは性、年齢、BMI で調整した。

結果、腰椎における椎間関節水腫の有所見率は 34.3%(男性 38.1%, 女性 32.6%)で、男女間に統計学的有意差は無く( $p=0.13$ )、男女ともに、椎間関節水腫の年代別有所見率が増減する傾向は認めなかった(男性  $p=0.81$ , 女性  $p=0.65$ )。多重ロジスティック回帰分析では各椎間高位の椎間関節水腫と腰痛には統計学的に有意な関連は認めなかった(L1/2 椎間 オッズ比 1.08; 95%信頼区間 0.57-2.01;  $p=0.80$ , L2/3 椎間 オッズ比 1.32; 95%信頼区間 0.85-2.06;  $p=0.22$ , L3/4 椎間 オッズ比 1.11; 95%信頼区間 0.73-1.69;  $p=0.62$ , L4/5 椎間 オッズ比 1.04; 95%信頼区間 0.67-1.61;  $p=0.85$ , L5/S 椎間 オッズ比 1.49; 95%信頼区間 0.84-2.64;  $p=0.17$ )。L4/5 椎間関節水腫と第 4 腰椎すべりにも統計学的に有意な関連を認めなかった(オッズ比 1.53; 95%信頼区間 0.78-2.81;  $p=0.20$ )。第 4 腰椎すべり有所見者 90 名を抽出した層別解析においても、L4/5 椎間関節水腫と腰痛に統計学的に有意な関連を認めなかった(オッズ比 1.26; 95%信頼区間 0.37-4.27;  $p=0.70$ )。腰椎椎間関節水腫の有無と腰痛や腰椎すべりに統計学的に有意な関連を認めなかった。

椎間関節水腫に関する報告は患者やボランティアを対象としたものが多く、選択バイアスの可能性や得られた知見が必ずしも一般住民に当てはまらない可能性がある。本論文は地域住民を対象とした、椎間関節水腫の貴重な報告であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第608号		
学位授与の日	令和2年3月24日		
氏名	中川 雅文		
学位論文の題目	Influence of Sarcopenia on the Effect of Exercise Therapy for Elderly Patients with Chronic Low Back Pain (高齢慢性腰痛患者に対する運動療法の効果におけるサルコペニアの影響)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 山田 宏	教授 川上 守

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

腰痛はわが国において有病率 37.7%と高く、年度別の国民生活基礎調査でも腰痛が男性の1位、女性の2位と高い有訴率が示されている。腰痛は日常生活を著しく障害し、生活の質(QOL)に悪影響を与える。また、経済性、生産性の低下を引き起こすため、世界的な健康問題となっている。その治療方針には運動療法が有効な手段であることが知られている。一方で、近年骨格筋量の減少や身体機能障害をもたらすサルコペニアは高齢化率 27.7%となったわが国でも注目されてきている。腰痛と骨格筋が関連することが報告されているが、その因果関係は不明であり、サルコペニアに対する運動量法の効果は筋肉量や筋力を向上させるのに対して、慢性腰痛 (CLBP)に対する効果については明らかではない。本研究の目的は CLBP 患者に対して短期的運動療法を行い、その治療効果およびサルコペニアによる治療成績の差異を検討することである。

### 【対象】

2017年9月から2018年11月までに当院に入院加療した65歳以上の連続症例CLBP患者28人(男性8人、女性20人)を対象とした。腰痛は肋骨最下部から殿溝までの間の痛みと定義し、痛みの強度が Numerical Rating Scale (NRS)で3以上で、12週間以上持続し、他院での治療効果が認められないものを包括基準とした。除外基準は、急性腰痛症例、治療が必要な下肢の変形性関節症例、脊椎手術既往症例、神経症状がある症例、認知症や精神科受診既往例、外傷や疾病利得の影響が考えられる労働災害、交通事故による症例とした。

### 【方法】

全ての患者は2週間入院し、運動療法を中心とした保存治療を受けた。運動療法としてストレッチング、腹横筋や多裂筋強化を含む筋力強化運動、有酸素運動の他に個人に合わせた運動をブラインド化された理学療法士による指導のもと行われた。退院後は入院中に行った運動を継続するように指導された。

調査項目は年齢、性別、身長、体重、Body mass index (BMI)、骨格筋量 (InBody S10)、腰痛罹病期間、腰痛 NRS、Roland-Morris Disability Questionnaire (RMDQ)、日本整形外科学会腰痛疾患質問票 (JOABPEQ)、Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)、体幹筋力 (BIODEX)、the 5-level version of the EuroQol 5-dimension (EQ-5D-5L)、治療満足度とした。

サルコペニアは骨格筋量指数により男性 7.0kg/m<sup>2</sup> 未満、女性 5.7kg/m<sup>2</sup> 未満を筋量サルコペニアと定義し、サルコペニア(S)群と非サルコペニア(NS)群の2群に分けた。各群の入院時から退院、退院1ヶ月後、退院3ヶ月後までの治療成績ならびに群間の各時期の治療成績を比較検討した。また、NRSとRMDQのMCIDは、それぞれ2点の改善、30%の改善とした。

### 【結果】

サルコペニアの有病率は42.9%だった(S群12人;平均年齢74.7 ± 9.7歳、%女性83.3%、腰痛の罹病期間129.8 ± 126.0ヶ月、NS群16人;年齢67.7 ± 9.1歳、%女性62.5%、腰痛罹病期間101.9 ± 127.9ヶ月)。年齢はS群の方が高齢となる傾向があった(P < 0.1)が、性別と腰痛罹病期

間に差はなかった。腰痛 NRS, RMDQ に群間差はなく、いずれも治療 2 週間後には MCID よりも改善し、3 ヶ月後まで維持した。入院時の JOABPEQ の各下位尺度に群間差はなかったが、JOABPEQ の獲得点数(S 群 vs. NS 群)では疼痛関連障害(11.9 ± 20.0 vs. 29.5 ± 22.6; P < 0.1)、腰椎機能障害(-4.2 ± 18.3 vs. 10.6 ± 19.5; P < 0.1)、心理的障害(5.3 ± 10.8 vs. 17.0 ± 13.0; P < 0.05)において、S 群が NS 群より低値であった。しかしながら、歩行機能障害については両群共に 20 点以上の改善がみられた。体幹筋力では群間差はなかったが、NS 群で腹筋筋力が退院 1 ヶ月後 (88.2 ± 9.9 NM/kg×10<sup>2</sup> vs. 113.4 ± 9.9 NM/kg×10<sup>2</sup>), 3 ヶ月後 (88.2 ± 9.9 NM/kg×10<sup>2</sup> vs. 113.4 ± 9.9 NM/kg×10<sup>2</sup>)に増加した。一方 S 群は腹筋、背筋共に筋力の向上がみられたが、有意な差はなかった。入院以降の HADS 不安・抑うつや EQ-5D-5L、治療満足度においては S 群が低い傾向にあった。

#### 【考察】

本研究では、CLBP 患者に対する運動療法の効果とサルコペニアの有無によって治療効果に差があるかを検討した。CLBP 患者のサルコペニアの有病率は 42.9%で、性差はなかったが、高齢者に多い傾向がみられた。体幹筋力はサルコペニア患者では有意な向上は認められなかったが、腰痛や日常生活動作障害、歩行機能障害はサルコペニアの有無にかかわらず改善した。治療効果は得られているものの、サルコペニア患者では QOL や治療満足度が低い傾向があり、サルコペニアを有する慢性腰痛患者では治療効果の自覚が低い可能性がある。サルコペニアと心理は関連し、腰痛と心理も関連することから、サルコペニアを呈する CLBP 患者の不安やうつ、QOL はサルコペニアおよび腰痛それぞれから相加相乗的な影響を受けている可能性がある。

#### 【結論】

CLBP 患者のサルコペニアの有病率は 42.9%と高かった。高齢の CLBP 患者に対する運動療法はサルコペニアに関係なく腰痛や日常生活動作障害、歩行機能障害を改善させるが、サルコペニア患者は同等の効果が得られても治療満足度や QOL が低い傾向となる可能性がある。

### 審査の要旨 (審査の日, 方法, 結果)

令和 2 年 3 月 11 日および 13 日, 論文審査委員は学位申請者に出席を求め上記論文の審査を行った。

慢性腰痛 (以下 CLBP) 患者に対する運動療法の効果は、疼痛や機能障害に対して有効であることが知られている。腰痛と筋との関連性が報告されている一方で、高齢社会となったわが国で注目されてきているサルコペニアに対する運動療法の効果については、筋力や筋量が改善する報告があるが、サルコペニア患者の CLBP に対する運動療法の有効性についての報告はない。

本論文では、CLBP 患者に対し 2 週間入院し、運動療法を行い、退院 3 ヶ月後まで追跡調査を行うことにより、CLBP に対する運動療法の効果およびサルコペニアによる運動療法の効果への影響を検討することを目的とした。

対象は、腰痛の程度が Numerical Rating Scale (NRS) で 3 以上、他院でも治療効果がなかった 12 週以上腰痛が継続した CLBP 患者とし、除外項目は、認知症例、急性腰痛症例、治療が必要な下肢の変形性関節症例、脊椎手術既往例、神経症状のある症例、精神科受診既往症例、交通外傷のような疾病利得が考えられる症例とした。運動療法はブラインド化された理学療法士により体幹筋力強化やストレッチ、腰痛体操、有酸素運動、その他個人に合わせた運動療法を入院中週 5 回、2 回/日、40~60 分/回の頻度で行われ、退院後は入院中の運動を継続するように指導された。調査項目は年齢、性別、身長、体重、BMI、骨格筋量指数(SMI)、腰痛罹病期間、腰痛 NRS、Roland-Morris Disability Questionnaire (RMDQ)、日本整形外科学会腰痛疾患質問票 (JOABPEQ)、不安抑うつ尺度 (HADS)、体幹筋力、5-level version of the EuroQol 5-dimension (EQ-5D-5L)、治療満足度とした。サルコペニアは Asia Working Group の分類により、SMI が男性 7.0kg/m<sup>2</sup> 未満、女性 5.7kg/m<sup>2</sup> 未満をサルコペニアとして S 群、基準を超えるものを非サルコペニアとして NS 群に分け、入院、退院、退院 1 ヶ月後、退院 3 ヶ月後の各群の治療成績および群間の比較検討をおこなった。有意水準は 5%とした。また、minimal clinically important difference (MCID)を NRS は 2 点、RMDQ は 30%、JOABPEQ は 20 点、EQ-5D-5L は 0.03 点として臨床的有効性を検討した。

結果は、高齢 CLBP のサルコペニアの有病率は 42.9%だった。腰痛 NRS や RMDQ は群間差なく、入院時から比べて退院時には MCID を上回る有意な改善を示し、3 ヶ月間状態を維持した。JOABPEQ の獲得点数では NS 群の疼痛関連障害、両群の歩行機能障害において運動療法の有効性を示したが、疼痛関連障害、心理的障害、腰椎機能障害の獲得点数は S 群で低い傾向を示した。NS 群では背筋は退院 1 ヶ月後から著明に増強し、不安や抑うつは退院時に改善した(P<0.05)。治療満足度は両群とも 7 点以上の高い満足度が得られたが、S 群の EQ-5D-5L は NS 群と比べて低かった。

本論文は、CLBP 患者に対して 2 週間の理学療法士によって管理された運動療法を行い、その後 3 ヶ月の追跡を行ったものだが、サルコペニアに関係なく 3 ヶ月という短期的に痛みや日常生活動作は改善することを示し、サルコペニアを有する CLBP に対しても運動療法が有効であることを示した。高齢社会の CLBP に対して、理学療法士が介入する有効な運動療法を明らかにしたものであり、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609号		
学位授与の日	令和2年3月24日		
氏名	上西 啓裕		
学位論文の題目	Defective arterial blood pressure response during head-up tilt in patients with aneurysm of the aortic arch (弓部大動脈瘤患者における起立負荷に対する血圧応答の減弱)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 西村 好晴	教授 田島 文博

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

血圧調節における大動脈圧受容器の貢献度は頸動脈圧受容器と比較して決して小さくない。弓部大動脈瘤患者は大動脈圧受容器が正常に機能しないため、血圧応答が減弱している可能性がある。ところが、こうした患者において起立負荷が血圧応答に与える影響についてこれまで報告がなかった。そこで我々は、弓部大動脈瘤患者において起立負荷に対する血圧応答を検討した。

### 【方法】

被験者は2007～2010年に和歌山県立医科大学附属病院に入院した弓部大動脈瘤患者13名(平均年齢72±5歳、体重65.3±10.8kg [平均値±標準偏差])と年齢と体格が一致する健常高齢者13名であった。弓部大動脈瘤患者13名の詳細については、当院心臓血管外科で弓部人工血管置換術施行のためリハ科紹介者50名(男性37名、女性13名)中、術前測定可能であった男性18名のうち、除外対象者5名(重度不整脈2名、CVA既往者2名、若年者1名)を除く13名であった。測定は25℃の部屋において起立台上で仰臥位(0度)を取り、両膝と骨盤を圧迫しない程度に固定した。十分安静を取った後、3分間の測定を行い、その後、速やか(約40秒)に起立台を60度まで挙げて被験者の足底はフットボードに接地した状態で起立位を採らせた(ヘッドアップティルト、以下HUT)。5分間経過後、約30秒かけて仰臥位に戻し、3分間の回復期を設けた。血圧、脈拍数はHUT前後に1分毎に計測した。解析はTwo-way ANOVAを行い、Post-hocはTukey-Kramerを使用した。

### 【結果】

安静臥位において、健常者では心拍数は67±2拍/分(平均値±標準誤差)、収縮・拡張期血圧、脈圧はそれぞれ124±4、73±2、51±4mmHgであり、患者との間に有意差を認めなかった。健常者では収縮・拡張期血圧はHUT時に維持されたが、患者ではHUTにより血圧低下による失神症状は認めなかったが、収縮期血圧が約20mmHg有意に低下し、5分間のHUTの間回復せず、拡張期血圧も約9mmHg低下した。一方、HUTにより両群共に心拍数は約10拍/分上昇しHUT終了まで維持された。

### 【考察】

患者におけるHUT時の血圧低下は、圧受容器からの求心性の入力の低下による血圧低下に対する心拍数応答や総末梢血管抵抗の上昇の劣化よって説明できる。健常者において、起立時には心拍数上昇を促したり、交感神経活動の上昇が総末梢血管抵抗を上昇させ、下肢への体液シフトを軽減させて起立時の静脈還流量低下を緩和し、さらに前庭系や抗重力筋の収縮、心肺圧受容器脱伸展自体が血圧反射の応答を代償する。一方、患者では、起立負荷に対する血圧応答への大動脈圧受容器脱伸展の貢献度は頸動脈圧受容器以上と言われるため、求心性入力信号の減弱が血圧反射による反応を減弱させていた可能性がある。

本研究の患者は、5分間のHUTでは失神を引き起こすことはなかったが、起立時に失神を引き起こすリスクは高いと推測される。先行研究では、45分間の起立負荷をするとき、始めの15分間で失神した患者は臥位安静時の最低値を下回る血圧低下が平均で300回以上あり、残りの30分間で失神した患者は15分の時点での血圧が臥位安静時から約10mmHg低下していたが、失神しなかった患者

はこのような血圧低下を認めなかった。

#### 【結語】

弓部大動脈瘤患者は、起立負荷に対する血圧応答が減弱している。この減弱には、大動脈圧受容器からの求心性活動の低下が関与している。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年3月12日、13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。

血圧調節における大動脈圧受容器の貢献度は頸動脈圧受容器と比較して決して小さくないことが報告されている。しかし、弓部大動脈瘤患者は大動脈圧受容器が正常に機能しないため、血圧応答が減弱している可能性がある。ところが、こうした患者において起立負荷が血圧応答に与える影響についてこれまで報告がなかった。本論文は、弓部大動脈瘤患者において起立負荷に対する血圧応答を検討した。

対象は、2007～2010年に和歌山県立医科大学附属病院に入院した弓部大動脈瘤患者13名(平均年齢 $72\pm 5$ 歳、体重 $65.3\pm 10.8$ kg [平均値 $\pm$ 標準偏差])と年齢と体格が一致する健常高齢者13名であった。弓部大動脈瘤患者13名の詳細については、当院心臓血管外科で弓部人工血管置換術施行のためリハビリテーション科紹介者50名(男性37名、女性13名)中、術前測定が可能であった男性18名の内、除外対象者5名(重度不整脈2名、CVA既往者2名、若年者1名)を除く13名とした。

測定は、 $25^{\circ}\text{C}$ の部屋において起立台上で仰臥位(0度)を取り、両膝と骨盤を圧迫しない程度に固定した。十分安静を取った後、3分間の測定を行い、その後、速やか(約40秒)に起立台を60度まで挙げて被験者の足底はフットボードに接地した状態で起立位を採らせた(ヘッドアップティルト、以下HUT)。5分間経過後、約30秒かけて仰臥位に戻し、3分間の回復期を設けた。血圧、脈拍数はHUT前後に1分毎に計測した。解析はTwo-way ANOVAを行い、Post-hocはTukey-Kramerを使用し、有意水準を5%とし比較検討を行なった。

結果は、安静臥位において、健常者では心拍数は $67\pm 2$ 拍/分(平均値 $\pm$ 標準誤差)、収縮・拡張期血圧、脈圧はそれぞれ $124\pm 4$ 、 $73\pm 2$ 、 $51\pm 4$ mmHgであり、患者との間に有意差を認めなかった。健常者では収縮・拡張期血圧はHUT時に維持されたが、患者ではHUTにより血圧低下による失神症状は認めなかったが、収縮期血圧が約20mmHg有意に低下し、5分間のHUTの間回復せず、拡張期血圧も約9mmHg低下した。一方、HUTにより両群共に心拍数は約10拍/分上昇しHUT終了まで維持された。

本研究では、弓部大動脈瘤患者は起立負荷に対する血圧応答が減弱しており、この減弱には大動脈圧受容器からの求心性活動の低下が関与していることが示唆された。

本論文は、リハビリテーションにおいて理学療法等を実施する上で、最もリスク管理を要する血管系疾患に対し、特に重要である離床時の血圧調節等の病態理解に繋がる貴重な研究であり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第982号		
学位授与の日	平成31年4月16日		
氏名	阿部 唯一		
学位論文の題目	Molecular mechanisms of the antispasticity effects of baclofen on spinal ventral horn neurons (バクロフェンの脊髄前角細胞における抗痙縮メカニズム)		
論文審査委員	主査	教授 川股 知之	
	副査	教授 田島 文博	教授 中尾 直之

## 論文内容の要旨

### 【はじめに】

γアミノ酪酸(Gamma-Amino Butyric Acid: GABA)の受容体にはイオンチャネル型であるGABAA受容体と、Gタンパク質共役型受容体であるGABAB受容体がある。バクロフェンはGABAB受容体の選択的作動薬であり、痙縮に対する治療として臨床の現場ですでに髄注療法(intrathecal baclofen[ITB]therapy)として用いられている。また、バクロフェンは鎮痛作用も示すことも知られており、その脊髄後角におけるシナプス伝達の抑制作用機序が明らかとなっている。痙縮は伸張反射の過興奮により生じる腱反射亢進を伴った速度依存性の強直性の伸張反射および筋緊張亢進と定義され、様々な中枢神経系疾患が原因となり、患者のADLを低下させQOLを著しく損なう状態である。ITB療法は、バクロフェンを直接脊髄髄腔内に持続的に投与する方法であり、経口投与では治療に難渋する重度痙縮にも効果的な治療法である。しかし、バクロフェンの細胞レベル、シナプスレベルでの脊髄前角に対する抗痙縮の作用機序はいまだ明らかになっていない。

### 【目的】

脊髄前角細胞に近赤外微分干渉(infra-red differential interference contrast: IR-DIC)顕微鏡を用いてホールセル・パッチクランプ法を適用し、バクロフェンの脊髄前角細胞に対する作用を単一細胞レベル、シナプスレベルで解析し、抗痙縮の作用機序を明らかにすることである。

### 【方法】

幼若Sprague-Dawley系雄性ラット(8-12日年齢)から脊髄を摘出し、マイクロスライサーを用いて、約500μmの厚さの脊髄横断スライス標本作製した。脊髄スライスを記録用チャンバーに移し、人工脳脊髄液で灌流した。赤外線システム含有の顕微鏡を用いて、脊髄前角のIX層の細胞をモニターで観察しながら、微小ガラス電極を刺入し、ホールセル・パッチクランプ法を適用した。-70mVで膜電位を固定し、単一細胞からデータ記録を行った。バクロフェンの灌流投与および関連試薬によって得られる電流の変化について比較検討した。

### 【結果】

バクロフェン単剤(100mM)を灌流投与したところ、細胞膜の過分極を表す外向き電流の発生を認めた。その大きさは平均19.9pA(n=49)であった。Na<sup>+</sup>チャネル拮抗薬であるテトロドトキシン(TTX 5μM)存在下でも、バクロフェンによる外向き電流の大きさは減弱せず、その大きさは平均20.7pA(n=8)であった。グルタミン酸受容体拮抗薬であるCNQX(10μM)及びAP5(50μM)存在下においても、バクロフェンによる外向き電流の大きさは平均19.0pA(n=9)と、減弱しなかった。Gタンパク質阻害薬であるGDPβSを記録電極内に混入して記録を行ったところ、バクロフェンによる外向き電流の大きさは有意に低下し、その大きさは平均5.5pA(n=10)であった。さらにK<sup>+</sup>チャネルを阻害するセシウム電極で記録を行ったところ、バクロフェンによる外向き電流は有意に低下を認めた。その大きさは平均4.1pA(n=17)であった。最後にGABAB受容体拮抗薬であるCGP35348(50μM)存在下では、バクロフェンによる外向き電流は有意に低下を認め、平均0.6pA(n=7)であった。

一方、興奮性シナプス後電流(excitatory postsynaptic current: EPSCs)にバクロフェンが与える

影響についても解析を行った。バクロフェン単剤灌流すると、EPSCs の頻度の減少 ( $n=26$ ;  $64.5 \pm 6.5\%$ ) および振幅の減少 ( $n=26$ ;  $87.1 \pm 3.9\%$ ) が観察された。TTX 存在下では活動伝播が阻害されるため、神経終末の作用のみが解析でき、微小自発性興奮性シナプス後電流 (miniature EPSCs 以下、mEPSCs) が観察できる。バクロフェン灌流により mEPSCs の頻度 ( $n=11$ ;  $73 \pm 6\%$ ) と振幅 ( $n=11$ ;  $94 \pm 2.4\%$ ) の減少がみられた。CGP35348 存在下ではバクロフェンによる EPSCs の抑制効果はみられなかった (頻度  $n=7$ ;  $112.1 \pm 12.1\%$ , 振幅  $n=11$ ;  $105 \pm 8.2\%$ )。

#### 【考察】

本研究の結果からバクロフェンは脊髄前角細胞に対して外向き電流を発生させることが判明したが、この作用は細胞膜の過分極を意味し、抑制的に働くことが判明した。この作用は活動伝播を阻害するナトリウムチャネルブロッカーであるテトロドトキシン存在下、また、グルタミン酸受容体拮抗薬である CNQX・AP5 存在下でも変化しなかった。このことから、バクロフェンによる外向き電流はシナプス後性の作用であることが判明した。GABAB 受容体拮抗薬である CGP35348 存在下では、バクロフェンの作用は減弱された。よってバクロフェンは GABAB 受容体に直接作用していることが分かった。さらにバクロフェンによる外向き電流は、GABAB 受容体に作用した後、G タンパクを介してカリウムチャネルが開くことにより発現することが分かった。

一方、シナプス前性の影響も検討を行った。バクロフェン単剤投与では EPSCs の頻度は減少し、その効果は TTX 存在下でもみられた。さらに CGP35348 存在下では減少しなかったことより GABAB 受容体はシナプス前の神経終末にも存在し、バクロフェンは興奮性神経伝達物質のグルタミン酸放出を抑制する作用があることが判明した。

このように、バクロフェンには脊髄前角において、シナプス前性にもシナプス後性にも GABAB 受容体に作用し、運動神経の抑制作用を有しており、これが抗痙縮作用のメカニズムと考えられた。

#### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 31 年 3 月 20 日および 26 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

本論文は、GABAB 受容体選択的作動薬であるバクロフェンの、脊髄前角におけるシナプスレベルでの作用機序を、幼若ラットの脊髄スライスを用いた whole-cell patch-clamp 法を適応して、電気生理学的に解析したものである。

バクロフェン単剤を還流すると、細胞膜の過分極を表す外向き電流の発生を認めた。この外向き電流の大きさは、Na<sup>+</sup>チャネル拮抗薬であるテトロドトキシン (以下 TTX) 存在下においても、グルタミン酸受容体拮抗薬である CNQX 及び AP5 存在下においても減弱を認めなかった。G タンパク質阻害薬である GDPβS を記録電極内に混入して記録を行ったところ、バクロフェンによる外向き電流の大きさは有意に低下し、K<sup>+</sup>チャネルを阻害するセシウム電極での記録においても、バクロフェンによる外向き電流は有意に低下を認めた。GABAB 受容体拮抗薬である CGP35348 存在下では、バクロフェンによる外向き電流は有意に低下を認めた。一方、バクロフェンが興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current: EPSCs) に与える影響についても解析を行った。バクロフェン単剤灌流すると、EPSCs の頻度の減少および振幅の減少が観察された。TTX 存在下では EPSCs の頻度と振幅の減少がみられ、CGP35348 存在下ではバクロフェンによる EPSCs の抑制効果はみられなかった。以上の結果より、バクロフェンは GABAB 受容体に直接作用し、GABAB 受容体に作用した後、G タンパクを介してカリウムチャネルが開くことにより過分極させることが分かった (シナプス後性作用)。さらに、GABAB 受容体はシナプス前の神経終末にも存在し、バクロフェンは興奮性神経伝達物質のグルタミン酸放出を抑制する作用があることも判明した (シナプス前性作用)。

本論文は、バクロフェンの抗痙縮作用機序を細胞レベルで明らかにしており、今後の痙縮治療の発展において有意義なものであり、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983号		
学位授与の日	平成31年4月16日		
氏名	津田 早耶		
学位論文の題目	Patient self-reported symptoms using visual analog scales are useful to estimate endoscopic activity in ulcerative colitis (潰瘍性大腸炎における Visual Analog Scale による自覚症状の評価と内視鏡的活動性との関連)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 藤井 隆夫	教授 北野 雅之

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

潰瘍性大腸炎(ulcerative・UC)は、比較的若年者に発症し、生涯にわたり再燃と寛解を繰り返す難治性疾患である。適切に病勢をコントロールするためには、病変の活動度と罹患範囲を把握し、治療方針を決定することが重要である。また、近年、UC の治療目標として粘膜治癒の重要性が指摘されている。このように粘膜の状態を評価するためには下部消化管内視鏡検査(CS)が必要であるが、前処置の煩雑さや時間的・身体的拘束、侵襲性、経費など、患者への負担が否めない。このため、CS の代替検査として腸管粘膜の状態を評価できるマーカーが望まれる。

本研究の目的は、UC 患者の一般状態を Visual Analog Scale(VAS)で定量化し、(1)粘膜病変の活動性との相関を明らかにし、非侵襲的な評価法となり得るか評価を行い、さらに、(2)粘膜治癒の予測と、(3)罹患範囲の予測をすることにある。

### 【方法】

1. 対象患者：2015年4月から2015年11月の間に、通常診療でCSを予定されたUC患者で、研究参加に同意の得られた166例のうち、他の要因で腹部症状を来たし得る16例を除外した150例を解析の対象とした。
2. VASによる自覚症状の評価：全般の状態、便の性状、血便の程度、腹痛の程度につき、各症状のレベルを主観的な評価として患者自身が10cmの線上にVASで記した。
3. 内視鏡評価：盲腸から上行結腸・横行結腸・下行結腸・S状結腸・直腸の、各箇所粘膜の状態を、Mayoの内視鏡サブスコア(Mayo endoscopic subscore; MES)で評価し、うち最も高スコアで解析を行った。粘膜治癒は全大腸でMES0と定義した。罹患範囲については、従来の病型分類(全大腸炎型・左側大腸炎型・直腸炎型)ではなく、局所療法が有効な炎症の範囲がS状結腸までに留まるdistal colorectum alone typeと、下行結腸から口側に及ぶdescending colon or more proximal typeの2群に分けて評価を行った。評価は、2名の医師が臨床情報を伏せた状態でそれぞれ行い、スコアが両者で異なった場合は、協議の上再評価を行い、コンセンサスを得た。
4. 統計解析：VASとMESの相関について、Spearman's rank correlation testで評価した。Mann-WhitneyのU検定で、VASスコアの中央値の差を評価した。有意な指標と判定したVASスコアについては、ROC解析を用いてカットオフ値を設定した。

### 【結果】

- (1) VASスコアと内視鏡的重症度の相関：各症状のVASスコアとMESはいずれも有意な相関を示した(全般の状態・血便の程度・便の性状・腹痛の程度； $r=0.63 \cdot 0.64 \cdot 0.58 \cdot 0.43$ 、いずれも $P < 0.001$ )。診断時の病型が全大腸炎型または左側大腸炎型では、全般の状態・血便・便の性状のVASスコアとMESは、相関係数が約0.6を示した。直腸炎型においては、全般の状態以外のVASスコアとMESに有意な相関を示さなかったが、対象が少ないためと考えられた。治療の強さに関わらず、各VASスコアとMESは相関を示した。
- (2) VASスコアによる粘膜治癒の予測：粘膜治癒の患者では、活動期(MES 1-3)に比べて有意にVASスコアは低かった( $P < 0.001$ )。粘膜治癒予測のため、各VASスコアでROC解析を用いてカット

オフ値を設定したところ、VAS が全般の状態  $\leq 1.5$  と血便 = 0 では、粘膜治癒の患者を予測する AUC が最大 (0.82) となり、各 VAS の感度は 0.84 と 0.76 で、特異度は 0.66 と 0.77 だった。全般の状態がよく、血便のない患者は粘膜治癒であることが示唆される。

- (3) VAS スコアによる活動病変範囲の予測：正確に活動性病変の範囲を評価することは、UC の適切な病勢コントロールに影響を与える。特に、遠位のみ炎症の患者においては局所製剤の使用が有効であり、鑑別することは重要である。そこで、S 状結腸より遠位にのみ炎症がある群を distal colorectum alone type、下行結腸から口側に炎症が及ぶ群を descending colon or more proximal type とし、各 VAS スコアの比較を行ったところ、便の性状の VAS スコアのみ有意な差があった (1.5 vs. 3.0,  $P=0.03$ )。便の性状で ROC 解析を用いてカットオフ値を設定したところ、VAS スコアが 2.5 以下であれば、炎症は遠位に留まっていると予測される(感度 0.67、特異度 0.66)。このため、便の性状が比較的保たれている場合に、局所療法が良い適応であることが示唆される。

### 【考察】

潰瘍性大腸炎の内視鏡的活動性と症状の VAS スコアは、いずれも相関が見られた。粘膜治癒の予測には全般の状態が良好であることと血便がないことが指標となり、活動性病変のうち罹患範囲の予測には便の性状が良い指標となる。

潰瘍性大腸炎の診療において、患者の訴えによく耳を傾けることで、不要な内視鏡検査を減らしつつ、適切な治療の選択が可能である。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 31 年 3 月 22 日、3 月 25 日、3 月 29 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。

潰瘍性大腸炎(ulcerative:UC)は、比較的若年者に発症し、生涯にわたり再燃と寛解を繰り返す難治性疾患である。適切に病勢をコントロールするためには、病変の活動度と罹患範囲を把握し、治療方針を決定することが重要である。また、近年、UC の治療目標として粘膜治癒の重要性が指摘されている。このように粘膜の状態を評価するためには下部消化管内視鏡検査(CS)が必要であるが、患者への負担が否めず、代替となるマーカーが望まれる。そこで、本論文では、UC 患者の症状を Visual Analog Scale(VAS)で定量化し、(1)粘膜病変の活動性ととの相関を明らかにし、非侵襲的な評価法となり得るか評価を行い、さらに、(2)粘膜治癒の予測能と、(3)罹患範囲の予測能について検討を行った。

- (1) VAS スコアと内視鏡的活動度の相関：全般の状態・血便の程度・便の性状・腹痛の程度の 4 症状について、患者自身が VAS で記載した。内視鏡的活動度は、各箇所を Mayo の内視鏡サブスコア (Mayo endoscopic subscore; MES) で評価し、うち最も高スコアで解析を行った。各症状の VAS スコアと MES はいずれも有意な相関を示した (全般の状態・血便の程度・便の性状・腹痛の程度； $r=0.63 \cdot 0.64 \cdot 0.58 \cdot 0.43$ 、いずれも  $P<0.001$ )。

- (2) VAS スコアによる粘膜治癒の予測：粘膜治癒は全大腸で MES 0 と定義した。粘膜治癒の患者では、活動期 (MES 1-3) に比べて VAS スコアは有意に低かった ( $P<0.001$ )。粘膜治癒予測のため、各 VAS スコアで ROC 解析を用いてカットオフ値を設定したところ、全般の状態  $\leq 1.5$  と血便 = 0 では、粘膜治癒の患者を予測する AUC が最大 (0.82) となり、各 VAS の感度は 0.84 と 0.76 で、特異度は 0.66 と 0.77 だった。全般の状態がよく、血便のない患者は粘膜治癒であることが示唆される。

- (3) VAS スコアによる活動病変範囲の予測：遠位にのみ炎症がある患者には局所製剤が有効であるなど、UC の治療において罹患範囲を把握することは重要である。そこで、S 状結腸より遠位にのみ炎症がある群と、下行結腸から口側に炎症が及ぶ群の 2 群に分けて各 VAS スコアの比較を行ったところ、便の性状のみ有意な差があった (1.5 vs. 3.0,  $P=0.03$ )。便の性状の VAS スコアが 2.5 以下であれば、炎症は遠位に留まっていると予測される(感度 0.67、特異度 0.66)。

以上より、UC の症状の VAS スコアと、内視鏡的活動度について検討を行った結果、以下の結論が得られた。(1)症状の VAS スコアは粘膜病変の活動性と相関する (2)粘膜治癒の予測には全般の状態と

血便の VAS スコアが指標となり得る (3)罹患範囲の予測には便の性状の VAS スコアが指標となり得る。これらの結果は潰瘍性大腸炎の病勢把握において新しい知見を提示するものであり、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)乙第984号		
学位授与の日	令和元年5月21日		
氏名	楠本 浩貴		
学位論文の題目	Cellular stress induces cancer stem-like cells through expression of DNAJB8 by activation of heat shock factor 1 (細胞ストレスはHSF1の活性化によりDNAJB8の発現を通して癌幹細胞を誘導する)		
論文審査委員	主査	教授 近藤 稔和	
	副査	教授 山上 裕機	教授 原 勲

## 論文内容の要旨

### 【背景】

癌細胞集団の中に造腫瘍性が高く、幹細胞様の発現を示すとされる癌幹細胞(Cancer stem-like cell/Cancer initiating cell; CSC/CIC)と呼ばれる少数の集団が存在することが示されている。我々は今までに正常組織に発現を認めず、癌幹細胞に発現する新規癌幹細胞抗原 DNAJB8 を同定し、さらにDNAを用いた免疫により強力な抗腫瘍効果を認めることをマウスの実験で示した (Nishizawa et al. Cancer Res, 2012)。このDNAJB8の機能について解析することは、癌幹細胞を標的とした新たな治療法を確立するうえで重要である可能性がある。

多くのheat shock protein(HSP)は細胞保護に働く。種々のストレスによってHSF1がリン酸化され、DNA上のheat shock element (HSE)に結合後HSPが転写される。DNAJB8はHSP 40 familyの一つであり、癌幹細胞の機能維持に働いていることがわかったが、その機能については詳細にはわかっていない。ストレスと癌幹細胞との関係について解析した。

### 【方法】

#### 1) 細胞の培養

ヒト腎癌細胞株であるACHNをRPMI1640に10%FBSを加えた培地で培養した。また、45度のインキュベーターに1時間入れることでheat shock (HS)を与えた。

#### 2) SP細胞の分離

解析する細胞をHoechst33342蛍光色素で核を染色した。Flow-cytometerにおいて染色性の弱い領域をSide population(SP)とし、CSC/CICとして同定した。さらにCell sorterを用いてSP細胞とそのほかのMain population (MP)細胞を分離した。

#### 3) Apoptosis assay

熱ショックによるSP細胞、MP細胞のアポトーシスを確認するためにAnnexin V binding assayを行なった。Hoechst33342で染色後、室温でAnnexin VとPIで15分間染色を行ない、FACS Aria II cell sorterでsortingを行い解析した。

#### 4) リアルタイム-PCR (qRT-PCR)

DNAJB8、SOX2のmRNA発現量をTaqManプローブを用いて検討した。95°C15分間、60°C1分間を40サイクル行い、GAPDHで補正した。

#### 5) ウェスタンブロット法

培養細胞から蛋白を抽出し、蛋白量の比較を行った。抗体には抗HSF1抗体、抗326リン酸化HSF1抗体、抗HSP72抗体、抗 $\beta$ -actin抗体を使用した。

#### 6) siRNA-mediated knockdown

解析の72時間前に siRNA をトランスフェクションした。DNAJB8、HSF-1 がノックダウンされていることを RT-PCR で確認した。

#### 7) DNAJB8、HSF1 overexpression

レトロウイルスを用いて遺伝子の導入を行った。Lipofectamine 2000 を用いて FLAG のタグをつけた DNAJB8 を発現するレトロウイルスベクターをパッケージング細胞である PLAT -A 細胞に一時的に導入した。48 時間後にレトロウイルス上清を回収し、ACHN に導入した。

#### 8) 統計学的解析

S tat Mate III を用いて解析。実験は最低 3 回以上繰り返し行いデータを得た。データは平均  $\pm$  SD で表し、2 群間の検定には Student's T 検定を用いて、P 値が 0.05 未満を有意とした。

### 【結果】

#### 1) HS による SP 細胞の誘導

HS により SP 細胞が増加した(A)。リアルタイム-PCR(B)、ウエスタンブロット(C)でも HS により DNAJB8、幹細胞関連因子である SOX2 の発現も増加していることを確認した。

#### 2) HS が MP 細胞から SP 細胞を誘導する

HS により SP 細胞が増加する理由として①non-CSC/CIC が細胞死することで相対的に CSC/CIC の割合が増加する、②non-CSC/CIC から CSC/CIC が誘導される、という二つの仮説が考えられる。

45 度の HS では、ネクローシスがみられ、アポトーシスはわずかであった。

Apoptosis assay により SP 細胞、MP 細胞は HS によるアポトーシスはほとんどみられていなかった。MP 細胞が SP 細胞に比べて HS に感受性があるため、SP 細胞が増加するという仮説は否定された。今度は MP 細胞を回収してから、HS を加えると、SP 細胞が増加していることがわかった。このことから MP 細胞から SP 細胞が誘導されるということがわかった。

#### 3) HS による癌幹細胞の誘導に DNAJB8 が働いている

DNAJB8 をノックダウンすると、幹細胞関連因子である SOX2 の発現が低下した。さらに HS を与えても siDNAJB8 株は DNAJB8、SOX2 の発現は増加しなかった。siDNAJB8 株では HS による SP 細胞の増加もわずかであった。これらは、DNAJB8 は HS による SP の増加に役割を持つことを示している。

#### 4) HSF1 の活性化が癌幹細胞を誘導する

HS により mRNA の発現はわずかに増加した。HSF1 のタンパク発現は著変なかったが、HS によりリン酸化 HSF1 のタンパク発現は増加した。HSF1 をノックダウンした細胞株を作成した。HSF1 をノックダウンしても DNAJB8 の発現は著変なく、また HS を与えても DNAJB8 の増加はみられなかった。SOX2 については、未処理の細胞株、HS 処理の細胞株のどちらも発現が低下した。

HSF1 の過剰発現株を作成した。非ストレス下でも SP 細胞の増加を認めた、HS を加えることで、SP 細胞の増加も確認した。

#### 5) mTOR が HSF1 を活性化させ、SP 細胞を誘導する

mTOR protein kinase が HSF1 の 326 セリン残基のリン酸化に必要であることは知られている。mTOR 阻害剤であるテムスロリムスを用いると、HSF1 のリン酸化が阻害された。DNAJB8、SOX2 の発現を減少させ、SP 細胞も減少させた。

## 【考察】

CSC/CIC は化学療法や放射線療法に治療抵抗性であると報告されていたが、我々の研究は治療による cellular stress においても non-CSC/CIC から CSC/CIC へと誘導される可能性を示唆している。この non-CSC/CIC から CSC/CIC への脱分化を抑制する治療について注目される。

DNAJB8 は SOX2 の発現を誘導しており、さらに HSF1、DNAJB8、SOX2 の流れが、cellular stress における CSC/CIC の誘導に重要な可能性がある。HSF1、HSP については通常ストレス応答に関連しているため、治療のターゲットとすることは難しいが、一方で、DNAJB8 は癌幹細胞特異抗原であり、癌免疫療法のターゲットとなりえ、また cellular stress により誘導された CSC/CIC にも有効である可能性がある。

## 【結語】

1. cellular stress が non-CSC/CIC から CSC/CIC を誘導する。
2. HSF1 を活性化させることで、DNAJB8、癌幹細胞を誘導することができる。
3. mTOR 複合体が HSF1 を活性化させ、CSC/CIC を誘導する。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 31 年 3 月 19 日、論文審査担当者は学位新申請者の出席を求め上記学位論文の審査を行った。

癌幹細胞(Cancer stem-like cell/Cancer initiating cell; CSC/CIC)に発現する新規癌幹細胞抗原 DNAJB8 は HSP 40 family の一つであり、癌幹細胞の機能維持に働いているが、その機能については詳細にはわかっていない。本論文では、ストレスと癌幹細胞との関係について検討した。

ヒト腎癌細胞株である ACHN を 45 度のインキュベーターに 1 時間入れることで heat shock (HS) を与えた。HS により SP 細胞が増加した。リアルタイム-PCR、ウエスタンブロットでも HS により DNAJB8、幹細胞関連因子である SOX2 の発現も増加していることを確認した。HS により SP 細胞が増加する理由として①non-CSC/CIC が細胞死することで相対的に CSC/CIC の割合が増加する、②non-CSC/CIC から CSC/CIC が誘導される、という二つの仮説が考えられる。Apoptosis assay により SP 細胞、MP 細胞は HS によるアポトーシスはほとんどみられていなかった。MP 細胞が SP 細胞に比べて HS に感受性があるため、SP 細胞が増加するという仮説は否定された。今度は MP 細胞を回収してから、HS を加えると、SP 細胞が増加していることがわかった。このことから HS により MP 細胞から SP 細胞が誘導されるということがわかった。DNAJB8 をノックダウンすると、幹細胞関連因子である SOX2 の発現が低下した。さらに HS を与えても siDNAJB8 株は DNAJB8、SOX2 の発現は増加しなかった。siDNAJB8 株では HS による SP 細胞の増加もわずかであった。これらは、DNAJB8 は HS による SP 細胞の増加に役割を持つことを示している。HS により活性型でリン酸化 HSF1 のタンパク発現は増加した。ある HSF1 をノックダウンすると、HS を与えても DNAJB8 の増加はみられなかった。HSF1 の過剰発現株については、非ストレス下でも SP 細胞の増加を認めた、HS を加えることで、SP 細胞の増加も確認した。DNAJB8、SOX2 の上流に HSF1 が存在していることがわかった。mTOR protein kinase が HSF1 の 326 セリン残基のリン酸化に必要であることは知られている。mTOR 阻害剤であるテムスロリムスを用いると、HSF1 のリン酸化が阻害された。また DNAJB8、SOX2 の発現を減少させ、SP 細胞も減少させた。まとめると、熱ショックが HSF1 を活性化させることによって、DNAJB8 と癌幹細胞を誘導することを示唆している。

本論文は HSF1、DNAJB8、SOX2 の流れが、cellular stress における CSC/CIC の誘導に重要であ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)乙第985号		
学位授与の日	令和元年5月21日		
氏名	重河 嘉靖		
学位論文の題目	Overexpression of KDM5B/JARID1B is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma (ヒストン脱メチル化酵素KDM5B/JARID1Bの高発現は肝細胞癌における予後不良因子である )		
論文審査委員	主査	教授 近藤 稔和	
	副査	教授 井原 義人	教授 山上 裕機

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

エピジェネティクスは、癌研究の中で最も注目されている分野の1つであるが、癌において果たす役割・その機序においては不明な点が多い。本研究では、タンパクメチル化について着目し、ヒストン脱メチル化酵素KDM5Bが世界第三位の死因となっている肝細胞癌に対しどのような役割を担っているのかを検討した。これにより、KDM5Bをターゲットとした肝細胞癌に対する新規分子標的治療剤の開発の端緒となることを目的とする。

### 【方法】

cDNA microarrayのdataを基に、正常と比して癌において高発現しているタンパクメチル化に関するメチル基置換酵素・脱メチル化酵素の中から、以下に示す3つのcriteriaに則って選別を行った。

1. 候補となる酵素の発現レベルは非腫瘍部と比較し、腫瘍部で著明に上がっている
2. 候補となる酵素の発現レベルは、正常組織においては非常に低いか、もしくは検出不可能である
3. 候補となる酵素は癌細胞の増殖に寄与している

(その酵素の発現を抑制することにより癌細胞の増殖を抑制することができる)

このcriteriaに基づき、肝細胞癌において、正常と比較し著明に発現が亢進していたKDM5Bに着目した。KDM5Bは前立腺癌・乳癌・膀胱癌・肺癌において腫瘍の増殖・癌化に寄与していることが報告されていたが、肝細胞癌臨床検体を用いた検討は認めなかったため、今回の研究対象とした。

### <実験方法>

#### 1、臨床検体とKDM5Bとの関連

2000年1月～2006年12月に和歌山県立医科大学第2外科にて施行した105例の初発肝細胞癌症例を対象とした。薄切スライドを作成し、抗KDM5B抗体を用いて免疫染色を施行した。免疫染色の強度と染色された割合よりスコアを算出し、当科で作成しているデータベースと突合し、KDM5Bの発現と患者・臨床病理因子・予後との関連を検討した。

#### 2、肝細胞癌培養細胞株を用いた機能解析

細胞培養・siRNA transfection : 肝細胞癌細胞株 (HepG2、HuH7) をそれぞれ適した培地で培養し、細胞実験に使用した。KDM5Bに特異的なsiRNAを2種類、negative controlとなるsiRNAを1種類用意してLipofectamine 2000でtransfectionを行い、KDM5B抑制系の構築を行った。

細胞増殖実験 : Cell counting kit-8を用いて細胞増殖実験を行い、KDM5Bの抑制による肝細胞癌増殖への影響を検討した。

細胞周期解析 : BrdU flow kitを用いて細胞周期解析を行い、KDM5Bの抑制によって癌細胞の細胞周期にどのような影響を及ぼすかを検討した。

Invasion assay : KDM5B抑制後にinvasion assayを施行し、肝細胞癌細胞株の浸潤に対する影響を検討した。

### 3. KDM5B の pathway 解析

当科の速水らは膀胱癌細胞株と肺癌細胞株を用いた microarray 解析において、E2F1、E2F2 が KDM5B の下流遺伝子であることを同定した (Hayami S. et al. Mol Cancer. 2010. 13; 9:59.)。肝細胞癌においてこれらを再検討するため、real time PCR と Western Blotting を施行した。

**Western Blotting**:細胞から抽出した総量 60 $\mu$ g のタンパクを loading して電気泳動、membrane に転写、抗 KDM5B 抗体・抗 E2F1 抗体・抗 E2F2 抗体・抗 Rb 抗体および internal control として抗 actin 抗体を用いて抗体反応を行い、酵素標識したそれぞれに適した動物種の二次抗体で反応、検出を行った。

#### 【結果】

##### 1. 臨床検体と KDM5B との関連

KDM5B 陽性例 (陽性群) は 54 例、陰性例 (陰性群) は 51 例であった。5 年生存率では陽性群が有意に予後不良であった (61% vs 77%,  $p=0.047$ )。背景因子として、AFP は陽性群が統計学的に有意に高値であり (88.0ng/ml vs 11.5ng/ml,  $p=0.002$ )、低分化な症例が多く (well/moderately/poorly = 7/38/9 vs 13/36/2,  $p=0.04$ )、血管浸潤例が多かった (yes/no = 16/38 vs 7/44,  $p=0.049$ )。

さらに KDM5B 陽性群においてウイルス感染が有意に多かったため (HBV/HCV/nBnC=13/35/9 vs 5/28/18,  $p=0.03$ )、ウイルス感染群に絞って同様の検討を行った。5 年生存率は陽性群が有意に予後不良であった (54% vs 78%,  $p=0.015$ )。AFP が有意に高値であり (136.2ng/ml vs 18.0ng/ml,  $p=0.0007$ )、最大腫瘍径が大きく (4.0cm vs 3.0cm,  $p=0.04$ )、低分化な症例が多く (well/moderately/poorly = 5/31/9 vs 7/25/1,  $p=0.049$ )、血管浸潤例が多かった (yes/no = 13/32 vs 3/30,  $p=0.03$ )。多変量解析を行うと、KDM5B が最も強い予後不良因子であった (HR: 2.076 95%CI: 1.645-2.506,  $p=0.04$ )。

##### 2. 肝細胞癌培養細胞株を用いた機能解析

細胞増殖実験では、siEGFP 群 (control 群) と比較して siKDM5B 群で有意に細胞増殖が抑制され ( $p<0.01$ )、細胞周期解析では、control 群と比べ siKDM5B 群にて G1 期の割合が増え、S 期の割合が減っていることから ( $p<0.01$ )、KDM5B は G1 から S 期への移行を担っていると示唆された。また invasion assay では、siKDM5B 群において浸潤能が抑制されていることが確認でき、臨床データと矛盾のないものであった ( $p<0.001$ )。

##### 3. KDM5B pathway 解析

肝細胞癌細胞株を用いた mRNA、タンパクレベルでの検討では、KDM5B を抑制すると、E2F1・E2F2 いずれも発現が抑制されたことから、肺癌・膀胱癌と同様に E2F1・E2F2 が KDM5B の下流遺伝子であることが示唆された。

#### 【考察・結語】

1. KDM5B の発現は肝細胞癌において亢進していた。また既報より KDM5B の正常組織における発現は非常に低い (Hayami S. et al. Mol Cancer. 2010. 13; 9:59.)。

2. 肝細胞癌において KDM5B 高発現は予後不良因子であった。特に、HBV・HCV を背景とした肝細胞癌では、その傾向が顕著であった。

3. 肝細胞癌培養細胞を用いた機能解析において、KDM5B は細胞増殖と浸潤に関与している可能性が示唆された。KDM5B を抑制することによって、これらの細胞増殖・浸潤を抑制することが可能であった。

4. E2F1・E2F2 は肝細胞癌においても KDM5B の下流遺伝子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)

令和元年5月8日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め論文審査を行った。

本論文は、ヒストン脱メチル化酵素KDM5Bが肝細胞癌に対する役割・そのメカニズムを解析・証明したものである。KDM5Bは前立腺癌・乳癌・膀胱癌・肺癌において腫瘍の増殖・癌化に寄与していることが報告されていたが、肝細胞癌臨床検体を用いた検討は認めなかつ

たため、今回の研究対象とした。

まず、臨床検体と KDM5B との関連について調査した。対象は、2000 年 1 月～2006 年 12 月に和歌山県立医科大学第 2 外科で施行した 105 例の初発肝細胞癌症例で、抗 KDM5B 抗体を用いて免疫染色を施行し、当科のデータベースと突合し、評価した。結果、KDM5B 陽性例（陽性群）は 54 例、陰性例（陰性群）は 51 例であった。5 年生存率では陽性群が有意に予後不良であった。背景因子として、AFP は陽性群が統計学的に有意に高値であり、低分化な症例が多く、血管浸潤例が多かった。さらに KDM5B 陽性群においてウイルス感染が有意に多かったため、ウイルス感染群に絞って同様の検討を行った。5 年生存率は陽性群が有意に予後不良であった。AFP が有意に高値であり、最大腫瘍径が大きく、低分化な症例が多く、血管浸潤例が多かった。多変量解析を行うと、KDM5B が最も強い予後不良因子であった。次に、肝細胞癌培養細胞株を用いて、細胞増殖実験、細胞周期解析、invasion assay を行い、機能解析を施行した。結果、細胞増殖実験では、siEGFP 群（control 群）と比較して siKDM5B 群で有意に細胞増殖が抑制され、細胞周期解析では、control 群と比べ siKDM5B 群にて G1 期の割合が増え、S 期の割合が減っていることから、KDM5B は G1 から S 期への移行を担っていると示唆された。また invasion assay では、siKDM5B 群において浸潤能が抑制されていることが確認でき、臨床データと矛盾のないものであった。さらに、当科の速水らは膀胱癌細胞株と肺癌細胞株を用いた microarray 解析において、E2F1、E2F2 が KDM5B の下流遺伝子であることを同定した。肝細胞癌においてこれらを再検討するため、real time PCR と Western Blotting を施行した。結果、肝細胞癌細胞株を用いた mRNA、タンパクレベルでの検討では、KDM5B を抑制すると、E2F1・E2F2 いずれも発現が抑制されたことから、肺癌・膀胱癌と同様に E2F1・E2F2 が KDM5B の下流遺伝子であることが示唆された。

以上より、肝細胞癌において KDM5B 高発現は予後不良因子であり、特に HBV・HCV を背景とした肝細胞癌では、その傾向が顕著であることが判明した。また、肝細胞癌培養細胞を用いた機能解析において、KDM5B は細胞増殖と浸潤に関与している可能性が示唆された。さらに、E2F1・E2F2 は肝細胞癌においても KDM5B の下流遺伝子である可能性が示唆された。

本論文は、KDM5B を抑制する新規分子標的治療剤は、副作用が少なく、癌の増殖を抑制するという理想的な新規分子標的薬となる可能性が期待され、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)乙第986号		
学位授与の日	令和元年7月16日		
氏名	児玉 芳季		
学位論文の題目	Molecular diagnosis of lymph node metastasis in patients with upper urinary tract cancer who underwent lymphadenectomy (拡大リンパ節郭清術を行った腎盂尿管癌患者におけるリンパ節転移についての分子診断)		
論文審査委員	主査	教授	山上 裕機
	副査	教授	村田 晋一
			教授 原 勲

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

最近の文献では、膀胱癌患者における総腸骨・仙骨前面リンパ節を含む拡大リンパ節郭清の診断的・治療的意義が支持されている。しかし、稀な尿路上皮癌である腎盂尿管癌 (UTUC) 患者においては、症例数の少なさゆえにリンパ節郭清の意義はまだ解明されていない。これらを検証するため、我々は腎盂尿管癌患者に対する拡大リンパ節郭清術の前向き臨床試験を行った。

また、現在リンパ節転移の診断は、HE 染色を用いた通常の病理組織学検査に限定されている。しかし、近年では定量的 RT-PCR などの分子生物学的手法が、通常の病理診断では検出できない微小転移の存在を証明するために適用されるようになってきている。膀胱癌のリンパ節転移に関するいくつかの論文において、リンパ節組織内の尿路上皮癌細胞を検出するための有用なバイオマーカーが報告されている。そこで、組織型が類似している腎盂尿管癌についても、これらのバイオマーカーを用いて微小転移を検出できないかと考えた。

### 【目的】

拡大リンパ節郭清術によって摘出された腎盂尿管癌患者のリンパ節に定量的 RT-PCR 法を適用し、微小転移についての分子診断の有用性を検証すること。

### 【方法】

2009年12月から2013年6月に、和歌山県立医大と東京女子医科大学において51名の腎盂尿管癌患者に対し、腎尿管全摘除術と同時に拡大リンパ節郭清術を施行した。各患者から摘出したリンパ節を2つの切片に分け、一方から mRNA を抽出して定量的 RT-PCR を行い、もう一方は HE 染色して通常の病理組織学検査を行った。

リンパ節内の尿路上皮癌細胞を検出するために、バイオマーカーの候補として4種類の分子 (FXD3、KRT19、KRT20、UPK2) を選択した。これらの分子の遺伝子発現の定量化は、TaqMan Gene Expression Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) および Applied Biosystems StepOne™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて行った。全てのサンプルを二重に解析し、cycle threshold (Ct) の平均値を求めた。endogenous control として  $\beta$ -actin を使用し、calibrator sample として組織学的に明らかに転移が証明された腎盂尿管癌患者のリンパ節を全ての実験で使用した。各サンプルにおけるバイオマーカー候補遺伝子の相対発現レベルは、 $\beta$ -actin の平均 Ct 値とマーカー遺伝子の平均 Ct 値を用いて  $\Delta$ Ct 法によって計算した。簡便性から相対発現率ではなく  $\Delta$ Ct 値で解析を行った。

病理組織学的検査と定量的 RT-PCR それぞれで同定したリンパ節転移と、腎盂尿管癌の予後予測因子との関連性の比較には、Kruskal-Wallis 検定を行った。また、ベイズ情報量基準 (Bayesian information criteria; BIC) を用いて、微小転移の検出に最も有用と考えられるバイオマーカー候補分子の組み合わせを検討した。さらに各症例を後述する3群に分け、Kaplan-Meier 法を用いて無増悪生存率を算出し、log-rank 検定を用いて各群間の生存率の比較を行った。P<0.05 を統計学的有意差ありと判定した。

### 【結果】

51名の腎盂尿管癌患者の平均年齢は68歳(51-86歳)で、男性41名(80.4%)であった。腫瘍の部位は、

腎盂が 30 名 (58.8%)、上部尿管が 9 名 (17.7%)、下部尿管が 12 名 (23.5%) であった。平均の摘出リンパ節数は 18.3 個であった。4 名 (7.8%) の 5 個のリンパ節において病理組織学的検査で転移を認めた。17 名 (33.3%) に LVI (lympho-vascular invasion) を認めた。また 12 名 (23.5%) に癌の進行を認めた。原発巣別の摘出リンパ節数は計 932 個であった。腫瘍の位置と摘出リンパ節数に有意差はみられなかった。

RT-PCR 法を用い、病理組織学的に転移を認めたリンパ節と転移なしと判断されたリンパ節それぞれについて、4 種類のバイオマーカー候補分子の相対発現レベルを評価した。増幅が見られなかったものを微小転移なしと判断した。FXD3、KRT19、UPK2 に比べ、KRT20 の発現レベルは低かった。

また、4 種類の分子のうちいずれの組み合わせがリンパ節転移の検出に影響を与えるかを検討した。それぞれの分子を共変量 (covariate) にしたときのロジスティック回帰モデルにおけるベイズ情報量基準 (BIC) を算出した。BIC は数値が低いほど良いモデルとして解釈される。複数の候補分子の組み合わせよりも UPK2 単独での BIC が最も低かったため、UPK2 を微小転移検出のバイオマーカーとして採用した。

さらに、UPK2 の  $\Delta$ Ct の cut-off 値を 6.0 に設定したところ、11 名、21 個のリンパ節に RT-PCR における微小転移が認められた。そのうち病理組織学的に pN1/2 と診断された 4 名、5 個のリンパ節が含まれていた。

これらの結果を踏まえ、我々は患者を 3 群に分類した。1 つ目は N(+)/PCR(+) 群 4 名、2 つ目は N(-)/PCR(+) 群 7 名、3 つ目が N(-)/PCR(-) 群 40 名で、N(+)/PCR(+) 群、N(-)/PCR(+) 群について、リンパ節のマッピングを行った。N(+)/PCR(+) 群 4 例中 2 例で、通常の病理検査で転移が認められたリンパ節の周囲あるいは上流において、それぞれ 4 個のリンパ節で微小転移が認められた。N(-)/PCR(+) 群は 7 例であった。うち 3 例は腎盂癌で、いずれも所属リンパ節である腎門部リンパ節に微小転移が認められた。下部尿管癌の 2 例では拡大リンパ節郭清でしか郭清しない総腸骨リンパ節に微小転移が認められた。

また、これら 3 群間において病理組織学的特徴について比較検討した。T stage については 3 群間に有意差は認めなかった。Tumor grade と LVI については、N(+)/PCR(+) 群と N(-)/PCR(+) 群間に有意差を認めたが、N(-)/PCR(+) 群と N(-)/PCR(-) 群間には有意差を認めず、後の 2 群には類似した傾向がみられた。

さらに、この 3 群における無増悪生存期間を比較した Kaplan-Meier 曲線を示した。平均のフォローアップ期間は 46.4 ヶ月で、いずれの群間にも有意差は認められなかったが、N(+)/PCR(+) 群において予後不良な傾向がみられた。また N(-)/PCR(+) 群と N(-)/PCR(-) 群は同様の傾向がみられ、予後良好だった。

## 【考察】

尿路上皮癌において微小転移を認めた患者の予後に関しては、不良とする報告と不良でないとする報告が認められるが、我々の研究では微小転移を認めた患者の予後は良好であった。胃癌に関しても同様の研究がなされており、systematic review によると 18 の報告では微小転移を有する患者の予後は不良であったが、8 つの報告では予後に影響を与えないという結論であった。

我々の研究で微小転移が予後に影響を与えなかった理由として、1 つには PCR 法で同定されるような微小な尿路上皮癌の存在は、例えば免疫系の細胞などがこうした微小転移を攻撃することにより、必ずしも臨床的なリンパ節転移にならない可能性がある。2 つ目には、拡大リンパ節郭清術を施行し微小転移を有するリンパ節を早期に摘出することにより、治療効果を発揮できた可能性がある。しかし実際の臨床的有用性に関しては無作為化試験が必要である。

我々の研究の限界としては、まず症例数が少ないことが挙げられる。特に病理学的にリンパ節転移が証明された症例が 4 名と少なかったため、予後に関する検討で有意差を出すことができなかった。また微小転移に関して qRT-PCR 法での検討しかできていないため、免疫組織学的にも検討を加えられれば良かった。さらに、採取したリンパ節を 2 等分し、1 つを病理に提出し残りを使用して研究を行ったが、この時点で 2 等分されたリンパ節の性状に違いがあったのかもしれない。

## 【結論】

今回我々は、定量的 RT-PCR 法を用いることにより、拡大リンパ節郭清術を施行した腎盂尿管癌患者における微小転移の存在を同定した。

微小転移があった患者群は組織学的に明らかでないリンパ節転移があった患者群より予後が良い傾向にあり、微小転移がなかった患者群に類似していた。

## 審査の要旨(審査の日、方法、結果)

2019年6月11日と6月20日に、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。

稀な尿路上皮癌である腎盂尿管癌患者においては、症例数の少なさゆえにリンパ節郭清の意義はまだ解明されていない。これを検証するため、腎盂尿管癌患者に対する拡大リンパ節郭清術の前向き臨床試験を行った。その際に摘出されたリンパ節に定量的 RT-PCR 法を適用し、微小リンパ節転移検出についての分子診断の有用性を検討した。

51名の腎盂尿管癌患者から摘出したリンパ節を2つの切片に分け、一方から RNA を抽出して定量的 RT-PCR を行い、もう一方には通常の HE 染色による病理組織学検査を行った。リンパ節内の微小な尿路上皮癌細胞を検出するために、バイオマーカーの候補として4種類の分子(FXYD3, KRT19, KRT20, UPK2)を選択した。計932個のリンパ節において定量的 RT-PCR 法を用いてこれらの分子の遺伝子発現レベルを測定した。この結果を踏まえ、統計学的手法を用いて4つの分子いずれの組み合わせが微小リンパ節転移の検出に影響を与えるかを検討した結果、UPK2 単独をバイオマーカーとして採用することになった。

定量的 RT-PCR において微小リンパ節転移と診断されたものは11名、21個のリンパ節であった。そのうち病理組織学的に pN1/2 と診断された4名、5個のリンパ節が含まれていた。さらに患者を N(+)/PCR(+ )群4名、N(-)/PCR(+ )群7名、N(-)/PCR(- )群40名の3群に分け比較検討した。N(+)/PCR(+ )群4例中2例で、通常の病理検査で転移が認められたリンパ節の周囲あるいは上流において、それぞれ4個のリンパ節で微小転移が認められた。N(-)/PCR(+ )群は7例であった。うち3例は腎盂癌で、いずれも所属リンパ節である腎門部リンパ節に微小転移が認められた。下部尿管癌の2例では拡大リンパ節郭清でしか郭清しない総腸骨リンパ節に微小転移が認められた。3群間における病理組織学的特徴について比較したところ、T stage については3群間に有意差は認めなかった。Tumor grade と LVI については、N(+)/PCR(+ )群と N(-)/PCR(+ )群間に有意差を認めたが、N(-)/PCR(+ )群と N(-)/PCR(- )群間には有意差を認めなかった。また、3群間における無増悪生存期間を比較したところ、いずれの群間にも有意差を認めなかったが、N(+)/PCR(+ )群において予後不良な傾向がみられた。また N(-)/PCR(+ )群と N(-)/PCR(- )群の予後には同様の傾向がみられ、今回の検討では RT-PCR における微小転移の有無は予後に影響を与えないという結論になった。

以上より本論文は、定量的 RT-PCR による分子診断が、腎盂尿管癌患者における微小リンパ節転移検出について有用である可能性を示したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第987号		
学位授与の日	令和2年3月10日		
氏名	新谷 ゆかり		
学位論文の題目	Comparison of Subjective and Objective Assessments of Neurosensory Function after Lingual Nerve Repair (舌神経障害の術後の主観的および客観的評価の比較検討)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 近藤 稔和	教授 藤田 茂之

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

下顎智歯抜歯後に出現する一時的な舌神経障害は2.1-2.5%、永続的な舌神経障害は0-0.37%とされている。Diasらは、下顎智歯歯槽頂から舌神経までの水平的な距離は、0.57-9.30mmであり、最も近いものでは0mmであったと報告した。垂直的な距離は、2.28-16.8mmであり、最も近いものでは1.13mmであったと報告されている。また、別の報告では、舌神経は歯槽頂を走行していることもあり、智歯抜歯時の障害の可能性について警告されていた。

舌神経障害に対する治療としては、理学療法、薬物療法、星状神経節ブロック、外科療法があり、重篤な症例には、外科療法が推奨されている。外科療法後の知覚検査や味覚検査などの客観的評価における回復の報告は散見されるが、主観的評価の検討を行っている報告が少ないのが現状である。今回われわれは、下顎智歯抜歯後の舌神経障害患者に対して外科療法前後の主観的評価と客観的評価の比較検討を行ったので報告する。

### 【材料および方法】

対象は2008年12月1日から2015年12月31日の7年間で、和歌山県立医科大学歯科口腔外科を受診した下顎智歯抜歯後の舌神経障害患者のうち、顕微鏡視下で神経吻合術を行い術後1年以上観察可能であった52例とした。

主観的評価として、日常生活支障度をVisual Analog Scale (以下VAS) を用いて0-10の間(0:支障なし, 10:これ以上ないほど生活に支障を感じている)で患者自身で評価し、それらを0:0%, 10:100%として検討した。

客観的評価として、触圧感覚は患側と健側にて20段階のモノフィラメント (North Coast Medical, Inc. Gilroy) を用いて値を測定した。二点識別域は、患側と健側にて識別可能な距離を測定し、二点識別域より、Medical Research Council Scale (以下MRCS) を用いて評価した。方向感覚は、舌の前方と後方でそれぞれ筆を任意の方向へ動かしその方向性の認知の有無を確認し、縦・横・回転すべての方向で確認できたものを3, 2方向を2, 1方向を1, 認識できないものを0として、前方・後方で合計を判定値とした。評価時期は術前、術後6か月、術後1年とし、診療録をもとに後ろ向きに調査を行った。

統計学的解析は、主観的評価と客観的評価の比較にはスピアマンの順位相関係数の検定、主観的評価・客観的評価それぞれでの検討ではWilcoxonの符号付順位検定、McNemar検定を用いた。統計解析ソフトはJMP Pro13を用いて行った。

### 【結果】

男性15例、女性37例、平均年齢は $36.8 \pm 11.9$ 歳、主観的評価のVASでは、術前の平均値は61.49%、術後1年では53.87%と改善は認めなかったものの、統計学的に有意差は認めなかった( $p > 0.05$ )。客観的評価では、触圧感覚の平均値は、術前64.36gf/mm<sup>2</sup>、術後1年では19.34gf/mm<sup>2</sup>へ有意差をもって改善を認めた( $p < 0.05$ )。方向感覚の平均値は、術前1.15、術後1年では5.22へ有意差をもって改善を認めた( $p < 0.05$ )。MRCSはS3, S3+, S4が神経の回復として有効とされている。本検討では、術後45例(86.5%)がS3, S3+, S4であった。

本検討では、主観的評価のVASと客観的評価の触圧覚で比較検討を行ったが、相関関係があるという根拠は得られなかった ( $\rho = -0.09$ ,  $p = 0.52$ )。

#### 【考察】

下顎智歯抜歯後の舌神経障害患者に対する神経吻合術前と術後の主観的評価と客観的評価の改善においては、統計学的に相関関係があるという根拠は得られなかった。

主観的評価には、体調や係争中など複雑な患者背景が関係していることが考えられ、評価は困難であるが、定量的知覚検査だけでは知ることのできない知覚異常を把握することができるため、客観的評価と合わせて重要であると考え。今後は、客観的評価は改善しているのにも関わらず、主観的評価が改善していない症例に対してさらなる検討が必要であると考え。

#### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年2月7日、18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。

下顎智歯抜歯は口腔外科診療において重要な手術であるが、極まれに医原性に生じる舌神経障害が合併症として挙げられる。智歯抜歯後に出現する永続的な舌神経障害は0-0.37%といわれており、知覚の脱出、摂食障害のみならず、ブラシやぬるま湯、水などの非侵害刺激となるもので引き起こされる痛み（Allodynia）を併発する症例も散見され、患者のQuality of Lifeの低下につながる。外科療法後の知覚検査や味覚検査などの客観的評価における回復の報告は散見されるが、主観的評価の検討を行っている報告が少ないのが現状である。本論文は、下顎智歯抜歯後の舌神経障害患者に対して外科療法前後の主観的評価と客観的評価の検討を行ったものである。その結果、

- 1) 客観的評価である触圧感覚（20段階のモノフィラメント（North Coast Medical, Inc. Gilroy））の平均値は術前64.36gf/mm<sup>2</sup>、術後1年では14.72gf/mm<sup>2</sup>へ有意差をもって改善を認めた。方向感覚（ブラシストローク）も、術前から術後1年にかけて有意差をもって改善を認めた。
- 2) 二点識別域より、Medical Research Scaleを用いて評価を行い、本研究では術後52例中45例（86.5%）が神経の回復として有効とされているS3、S3+、S4であった。
- 3) 主観的評価として、Visual Analog Scaleを用いた。術前から術後1年にかけて改善を認めたものの、統計学的に有意差は認めなかった。また、主観的評価と客観的評価の触圧感覚において術前、術後6か月、術後1年の改善をスピアマンの順位相関係数の検定を用いて比較検討を行ったが、相関関係があるという根拠は得られなかった ( $\rho = -0.09$ ,  $p = 0.52$ )。

以上の結果より、下顎智歯抜歯後の舌神経障害患者に対する外科療法術前と術後の主観的評価と客観的評価の改善においては、統計学的に相関関係があるという根拠は得られなかった。主観的評価には、体調や係争中など複雑な患者背景が関係していることが考えられ、評価は困難であるが、定量的知覚検査だけでは知ることのできない知覚異常を把握することができるため、客観的評価と合わせて重要であると考え。

本論文は、下顎智歯抜歯後の舌神経障害患者に対する外科療法において重要な情報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988号		
学位授与の日	令和2年3月24日		
氏名	土岐 明子		
学位論文の題目	Clinical introduction and benefits of non-invasive ventilation for above C3 cervical spinal cord injury ( C3 以上頸髄損傷に対する非侵襲的人工換気の臨床導入とその利点 )		
論文審査委員	主査	教授 山田 宏	
	副査	教授 山本 信之	教授 田島 文博

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

第3頸髄節より上位の高位頸髄損傷患者のほとんどは、換気不全のため長期人工呼吸器管理を必要とする。本研究の目的は最適な非侵襲的人工換気（NIV）の導入時期、NIVの導入および使用継続による呼吸機能の変化、合併症や死亡に与える影響を明らかにすることである。

### 【方法】

2005年～2010年に気管切開下人工呼吸からNIVへの移行を希望した第1～3頸髄節レベル残存ASIA Aの14名の患者を対象とした。すべての対象患者は1996年～2010年に急性期治療を受けた後、関西労災病院に入院した。プロトコルに従って移行を進めた。長期間のNIVの効果を調査するため、退院後2年以上経過した時点の状況を調べた。

### 【結果】

11名の患者はNIVへの移行に成功したが、1名は移行できず、2名は移行を拒否した。気管切開下人工呼吸を受けた期間が1年以内の場合は7名中7名（100%）でNIVへの移行に成功したが、1年以上経過していた場合は7名中4名（57%,  $P < 0.05$ ）の移行率であった。NIV移行に成功したC2 ASIA Aの患者のほとんどがNIV移行後数時間の人工呼吸器離脱が可能となった。C1 ASIA Aの患者でも数分から数時間の人工呼吸器離脱が可能となり、舌咽呼吸によって数分間の離脱が可能となった。退院後、すべての患者は地域生活者となり、3名は大学に入学し、1名は会社経営者となった。

### 【考察】

頸髄損傷受傷後1年以内が移行の最善の時期であると考えられる。NIVへの移行は胸鎖乳突筋や僧帽筋が強められ、胸壁の拡張、自力呼吸の強化につながったと考えられる。気管切開を閉鎖すると短時間であっても舌咽呼吸を行えるので、人工呼吸器の蛇管外れや故障による致命的な事故のリスクは減ると考えられる。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年2月6日、2月13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。

整形外科科学講座教授山田宏先生からは「NIVの今後の展望について述べよ」と質問があった。受審者は「今後は広く本方法によるNIVが周知されるように脊髄損傷急性期の治療にかかわる医療者に広めていきたい。また急性期の気管切開を避けるためにNIVを利用していきたい」と述べた。内科学第三講座教授山本信之先生は「NIVプロトコルの改善点について考察せよ」と質問した。受審者は「省略可能なStageを見極め、より簡便なものにしていきたい」と述べた。リハビリテーション医学講座

教授田島文博先生は「脊髄損傷患者と頸髄損傷患者の呼吸機能についてそれぞれ比較しながら述べよ」と質問した。受審者は「胸髄レベル以下の脊髄損傷患者では吸気には問題がないが、腹筋や肋間筋麻痺により咳の力が低下する。頸髄損傷では吸気、呼気ともに障害され、咳の力の低下に加えて換気障害も呈する」と答えた。

本論文は、長期気管切開チューブ留置による合併症が問題となりやすい人工呼吸器依存高位頸髄損傷患者における NIV への移行のプロトコルをまとめ、最適な導入時期、効果を示したもので、高位頸髄損傷患者における呼吸管理の治療戦略に応用されうるものであり、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989号		
学位授与の日	令和2年3月10日		
氏名	清野 慧至		
学位論文の題目	Topical hyaluronan alone promotes corneal epithelial cell migration whereas combination with benzalkonium chloride impairs epithelial wound healing (ヒアルロン酸点眼は単独では角膜上皮創傷治癒を促進するが、塩化ベンザルコニウムとの組み合わせでは上皮創傷治癒を遅延させる)		
論文審査委員	主査	教授 平井 秀一	
	副査	教授 山田 源	教授 雑賀 司珠也

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

角膜では上皮が障害されると、まず速やかに周囲の上皮細胞が遊走し、障害部位を覆う。その後、分裂と分化を経て重層扁平上皮が再生する。角膜上皮の創傷治癒が遅延すると、感染リスクの増加や露出した角膜実質の融解や角膜穿孔を引き起こし、視機能を重篤に低下させる。従って、角膜上皮の創傷は速やかに治癒する必要がある。

角膜上皮障害の原因は外傷や乾燥などの要因以外に、点眼剤に含まれる防腐剤である塩化ベンザルコニウムによる上皮細胞の障害が挙げられる。BACは抗菌性や相溶性に優れるため点眼剤に広く配合される一方、長期にわたり点眼を要する場合は薬剤性角膜上皮障害を誘発する。

ヒアルロン酸ナトリウムはN-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の繰り返し構造を持つ、直鎖状の多糖類である。その溶液は粘弾性および保水性に優れるため、生体内では組織の構造維持や皮膚の保湿、関節の潤滑性維持に寄与している。ヒアルロン酸ナトリウム点眼は涙液分泌減少(ドライアイ)およびそれに伴う角膜上皮障害の治療目的で処方される。臨床上的効果はヒアルロン酸ナトリウムによる角膜表層での保水効果に起因すると考えられている。しかし、基礎研究レベルでは細胞表面のヒアルロン酸ナトリウム受容体CD44を介した上皮創傷治癒(遊走)促進作用が報告されている。一方、メチルセルロースやカルボキシメチルセルロース等の粘稠化剤が塩化ベンザルコニウムの毒性を強調することが報告されているが、ヒアルロン酸ナトリウム点眼薬と塩化ベンザルコニウムを含む点眼薬を併用した際の相互関係についての報告は無い。そこで本研究では、ヒアルロン酸ナトリウム点眼と塩化ベンザルコニウム点眼の併用が角膜上皮の創傷治癒にどのように影響するかを明らかにすることを目的とした。はじめに*in vitro*, *in situ*および*in vivo*のモデルを確立し、ヒアルロン酸ナトリウム自身の創傷治癒促進作用を追試・確認した。次に、同様のモデルで本研究の主たる目的であるヒアルロン酸ナトリウムと塩化ベンザルコニウムを併用した際の角膜上皮創傷治癒を評価した。

### 【方法】

#### 培養角膜上皮細胞の創傷治癒に対するヒアルロン酸ナトリウムと塩化ベンザルコニウムの影響

*in vitro*では、ヒト角膜上皮細胞株のHCE-Tを用いてスクラッチアッセイを実施した。単層培養したHCE-Tの培養表面をピペットチップで擦過し、細胞を剥離した。経時的に画像を取得し、細胞の遊走による剥離部分の残存率を評価した。細胞剥離後にヒアルロン酸ナトリウムおよび塩化ベンザルコニウムを含む培地で処理することにより、これらの細胞遊走に及ぼす影響を評価した。

#### 器官培養角膜上皮の創傷治癒に対するヒアルロン酸ナトリウムと塩化ベンザルコニウムの影響

*in situ*ではウサギ(日本白色種, 2.5 kg, 雄)摘出角膜ブロックの器官培養を実施し、角膜上皮の伸展を評価した。採取した角膜を2×4 mmのブロックに分割し、24時間培養した後にホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織切片(厚さ5 μm)を作製した。ヘマトキシリン-エオシン染色し、顕微鏡観察により角膜上皮の伸展距離を評価した。ブロック作成後にヒアルロン酸ナトリウムおよび塩化ベンザルコニウムで処理し、これらの角膜上皮伸展に及ぼす影響を評価した。

### マウス角膜上皮の創傷治癒に対するヒアルロン酸ナトリウムおよび塩化ベンザルコニウムの影響

*in vivo* では、角膜上皮障害モデルマウスを用いて創傷治癒を評価した。C57BL/6J マウス (8 週齢, 雄) の角膜上皮を、トレフィンおよびサージカルナイフを用いて 2 mm 径の円形に剥離した。

1 mg/mL フルオレセインにより剥離部位を染色し、経時的に画像を取得することで創傷部位の面積を評価した。角膜上皮剥離後にヒアルロン酸ナトリウムおよび塩化ベンザルコニウムを点眼することにより、これらの角膜上皮創傷治癒に及ぼす影響を評価した。試験実施後に眼球を採取し、FFPE 組織切片 (厚さ 5  $\mu$ m) を作製し、免疫組織化学的解析に供した。

### ヒアルロン酸ナトリウムが点眼薬の眼表面における滞留性に及ぼす影響

マウスで *in vivo* imaging system (IVIS) を用いて評価した。C57BL/6J マウス (8 週齢, 雄) の片眼に、3 mg/mL のヒアルロン酸ナトリウム, 1 mg/mL のフルオレセインを含む生理的リン酸緩衝液 (PBS) を点眼薬代用として点眼した。眼表面の蛍光強度を経時的に IVIS により測定した。反対の眼には同濃度のフルオレセイン-PBS 溶液を点眼し、蛍光強度の変化を測定した。

#### 【結果】

- (1) HA の創傷治癒促進作用が *in vitro*, *in situ*, *in vivo* で確認され、モデルが確立された。
- (2) 同モデルでヒアルロン酸ナトリウムと塩化ベンザルコニウムを併用した場合の影響を評価した結果、*in vitro* で塩化ベンザルコニウムにより細胞遊走が遅延したのに対し、ヒアルロン酸ナトリウムを塩化ベンザルコニウムに先立ち添加しておくことで細胞遊走遅延がキャンセルされた。
- (3) *in vivo* では 0.02% の塩化ベンザルコニウム点眼に対し、3 mg/mL のヒアルロン酸ナトリウム点眼は細胞保護作用を示さず、反対に創傷治癒の遅延および cleaved caspase-3 陽性細胞数を増加させた。
- (4) IVIS による滞留性評価では、点眼 15 分後におけるフルオレセインの蛍光強度が 3 mg/mL のヒアルロン酸ナトリウムを含む点眼において、HA を含まない点眼と比較して有意に高値を示した。

#### 【考察】

モデルの確立において、ヒアルロン酸ナトリウムの創傷治癒促進作用が追試・確認されたことから、改めてヒアルロン酸ナトリウム点眼薬の角膜上皮障害の治療に対する有用性が示された。*in vitro* ではヒアルロン酸ナトリウムが塩化ベンザルコニウムに対して細胞保護的に働く可能性が示唆された。しかし一方で、*in vivo* において同濃度のヒアルロン酸ナトリウムは角膜上皮の創傷治癒を遅延させた。さらに、IVIS による滞留性評価の結果から、3 mg/mL のヒアルロン酸ナトリウムは点眼薬の眼表面における滞留性を上昇させることが示唆された。これらのことから、ヒアルロン酸ナトリウムが塩化ベンザルコニウムの滞留性を上昇させ、塩化ベンザルコニウムの細胞傷害性を強調することが示唆された。

本研究において塩化ベンザルコニウムとヒアルロン酸ナトリウムの点眼間隔 5 分間としたが、これは臨床で一般的に患者に対して指導される間隔と同一である。このことから、3 mg/mL のヒアルロン酸ナトリウムと塩化ベンザルコニウムを含有する点眼薬と併用する場合、5 分間隔で点眼するのは短い可能性がある。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和2年2月20日、論文審査委員は、上記論文についての審査を行った。

角膜では上皮が障害されると、まず速やかに周囲の上皮細胞が遊走し、障害部位を覆う。その後、分裂と分化を経て重層扁平上皮が再生する。角膜上皮の創傷治癒が遅延すると、感染リスクの増加や露出した角膜実質の融解や角膜穿孔を引き起こし、視機能を重篤に低下させる。従って、角膜上皮の創傷は速やかに治癒する必要がある。

ヒアルロン酸ナトリウムは多糖類の一種で、その溶液は粘弾性および保水性に優れる。ヒアルロン酸ナトリウムは点眼薬の原薬として涙液分泌減少（ドライアイ）およびそれに伴う角膜上皮障害の治療目的で活用される。一方、点眼薬に粘稠化剤を添加することで、防腐剤である塩化ベンザルコニウムの毒性を強調し、角膜上皮創傷治癒が遅延することが報告されている。しかし、粘稠なヒアルロン酸ナトリウム点眼薬と塩化ベンザルコニウムを含む点眼薬を併用した際の相互関係についての報告は無い。そこで本研究では、ヒアルロン酸ナトリウムと塩化ベンザルコニウム点眼の併用が角膜上皮の創傷治癒にどのように影響するかを明らかにすることを目的とした。

ヒアルロン酸ナトリウム単独およびヒアルロン酸ナトリウムと塩化ベンザルコニウムを組み合わせた際の創傷治癒に及ぼす影響を評価した。*in vitro*では、ヒト角膜上皮細胞株のHCE-Tを用いてスクラッチアッセイを実施した。*in situ*ではウサギ摘出角膜ブロックの器官培養を実施し、角膜上皮の伸展を評価した。*in vivo*では、角膜上皮障害モデルマウスを用いて創傷治癒を評価した。

その結果、ヒアルロン酸ナトリウム単独ではいずれの試験系においても、上皮細胞の遊走を促進し、創傷治癒促進作用を示した。ヒアルロン酸ナトリウムと塩化ベンザルコニウムを組み合わせた場合、*in vitro*では塩化ベンザルコニウムによる細胞遊走遅延がヒアルロン酸ナトリウムにより軽減されたのに対し、*in vivo*では創傷治癒の遅延およびcleaved caspase-3陽性細胞数の増加を誘導した。さらに、*in vivo imaging system*による滞留性評価の結果から、ヒアルロン酸ナトリウムは点眼薬の眼表面における滞留性を上昇させることが示唆された。

以上のように、ヒアルロン酸ナトリウムは塩化ベンザルコニウムと組み合わせると点眼した場合に、塩化ベンザルコニウムの滞留性を上昇させ細胞傷害性を強調することが示唆された。本論文はヒアルロン酸ナトリウム点眼薬の使用方法が、角膜上皮における創傷治癒の制御に結びつくことを示し、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第990号		
学位授与の日	令和2年3月10日		
氏名	高田 幸尚		
学位論文の題目	Effects of prostaglandin F2alpha derivative glaucoma drug on EGF expression and E-cadherin expression in corneal epithelial cell line (角膜上皮細胞におけるEGFとE-cadherinの発現に対するプロスタグランジンF2 $\alpha$ 緑内障製剤の効果 )		
論文審査委員	主査	教授	神人 正寿
	副査	教授	山田 源
		教授	雑賀 司珠也

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

厚労省発表の緑内障治療患者数は2005年の約54万人から2014年の106万人に約10年で倍増した。未治療の緑内障を含めた推定患者は400万人といわれ、緑内障は失明原因の第一位である。緑内障のエビデンスのある治療は眼圧下降であり継続的かつ安定した眼圧下降が求められる。臨床の間では眼圧を下げる手段としてまず点眼薬が選択される。その中でもprostaglandin(以下、PG) F2 $\alpha$ 製剤は眼圧下降作用が高いため第一選択とされることが多い。一方、PGF2 $\alpha$ 製剤は副作用としてしばしば角膜上皮障害を発症するため継続的な点眼治療を行ううえで問題となっている。

PGF2 $\alpha$ 製剤点眼薬の角膜上皮障害の機序として点眼薬に含有される防腐剤の塩化ベンザルコニウムの関連が示唆されているが、いまだ詳しい機序は不明な部分が多い。今回、我々はPGF2 $\alpha$ 製剤主薬の角膜上皮への影響について注目した。PGF2 $\alpha$ 製剤による角膜上皮障害機序を解明することで角膜上皮障害の予防が望まれ、その結果継続的かつ安定した眼圧下降を得ることで緑内障治療に大きく貢献できると考える。

### 【目的】

PGF2 $\alpha$ 製剤の細胞動態(細胞増殖、細胞間接着、細胞シグナルなど)に対する影響を培養細胞、器官培養を用いて検討した。角膜上皮障害の原因と成り得る現象をシグナルレベルで調節することで角膜上皮障害の予防を目指した。

### 【方法】

予備実験:

各種PGF2 $\alpha$ 製剤(100倍希釈濃度)と各種PGF2 $\alpha$ 製剤主薬(製剤中に含有するPGF2 $\alpha$ 濃度の100倍希釈濃度)の不死化ヒト角膜上皮細胞に対する影響の検討

\*増殖能への影響:

不死化ヒト角膜上皮細胞培養後に各種PGF2 $\alpha$ 製剤、PGF2 $\alpha$ 製剤主薬添加後、24時間培養し、アラマーブルーアッセイで細胞増殖を検討した。各種PG製剤(防腐剤含有)では増殖能の変化はみられなかったが、各種PGF2 $\alpha$ 製剤主薬では増殖能の亢進が確認された。なかでも最も高い増殖亢進作用を示したPGF2 $\alpha$ 製剤主薬のトラボプロストを以後の実験に用いた。

\*PGF2 $\alpha$ 製剤主薬の細胞増殖因子に対する影響:

PGF2 $\alpha$ 製剤主薬の増殖亢進作用からEpidermal Growth Factor(以下、EGF)に着目して検討した。不死化ヒト角膜上皮細胞にトラボプロスト(0.04g/l)を添加し、24時間追加培養し、細胞を回収しreal time RT-PCRを施行した。その結果、EGF mRNAの発現亢進が確認された。

上記の予備実験よりPGF2 $\alpha$ 製剤主薬はEGFの過剰な発現を惹起する可能性が示唆された。EGFは創傷治癒には促進効果が知られているが、正常な状態では過剰な増加は上皮組織の恒常性の破綻につながる可能性が示唆されている。このEGFの過剰発現をシグナルレベルで調節することが角

膜上皮障害の予防につながると想定した。そのため、EGF に関連する増殖のシグナルを検討し EGF シグナルの調節がトラボプロストの過剰な EGF 発現作用を抑制し角膜上皮障害発症予防につながるか検討した。以下、実験にはトラボプロストとともにシグナル EGF 受容体阻害薬 (PD186393、以下 PD、10  $\mu$ M) を用いた。角膜上皮障害の評価のマーカーとして細胞間接着にも着目した。

### ex vivo 器官培養

野生型マウス (n=24) の摘出眼球をトラボプロスト、PD 添加・非添加 (上記濃度) 後 24 時間器官培養、細胞動態 (増殖、接着、シグナル) に対する影響を以下の方法で検討した。

- ・免疫組織化学法
  - ・EGF 受容体 (リン酸化 EGF 受容体)
  - ・細胞増殖 (Ki67) : 中央角膜の陽性細胞数を計測し、多重比較検討
  - ・細胞間接着因子 (E-cadherin)
- ・EGF で直接・間接的に活性化されるシグナル経路 (リン酸化 Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK))
- ・リン酸化 Focal Adhesion Kinase (FAK)

### in vitro 培養細胞

不死化ヒト角膜上皮細胞をコンフルエントに培養後、トラボプロスト、PD 添加・非添加 (上記濃度) 後 24 時間培養、同様に細胞動態 (増殖、接着、シグナル) に対する影響を以下の方法で検討した。

- ・real time RT-PCR: E-cadherin
- ・ウェスタンブロッティング: E-cadherin
- ・細胞増殖 (アラマーブルーアッセイ)
- ・免疫組織化学法: E-cadherin

### 【結果】

#### ex vivo 器官培養

トラボプロストにより EGF 受容体の発現増強、細胞増殖 (Ki67 陽性細胞) 亢進と EGF により活性化される Erk、細胞間接着因子である E-cadherin の発現低下をみとめた。PD によりトラボプロストによる細胞増殖亢進作用、EGF 発現亢進作用と EGF に関与するシグナル経路亢進作用、細胞間接着低下作用はそれぞれ抑制された。

#### in vitro 培養細胞

トラボプロストにより細胞増殖亢進、EGF 発現亢進をみとめ、E カドヘリン発現低下をみとめた。PD によりトラボプロストの細胞増殖亢進作用、EGF 発現亢進作用、細胞間接着低下作用はそれぞれ抑制された。しかし、トラボプロストによる細胞間接着因子の量的変化 (mRNA、蛋白質) や PD によるトラボプロスト作用の抑制効果はみとめなかった。

### 【考察】

トラボプロストは PGF2 $\alpha$  受容体を介して ERK の活性化が起こり、ERK が EGF 活性化させ、E-cadherin に作用することで E-cadherin の局在性変化が生じたと考えた。その結果、細胞骨格の変化が起こり、細胞間接着が減弱した可能性がある。また、PGF2 $\alpha$  受容体は EGF 受容体を活性化し、EGF 受容体を介して ERK/MAPK の活性化が起こり E カドヘリンの活性化を低下する可能性がある。E-cadherin 発現は PGF2 $\alpha$  受容体を介した経路と EGF 受容体を介した経路の関与が考えられる。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和2年2月21、27日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め論文審査を行った。

本論文の目的は、PGF2 $\alpha$  製剤主薬による角膜上皮障害の機序解明を目的としたものである。

本研究の予備実験として、PGF2 $\alpha$  製剤トラバタンズ® (Alcon) の主薬のトラボプロスト (SIGMA) はヒト不死化角膜上皮培養細胞 (in vitro) におけるEGF亢進作用と細胞増殖亢進作用がみられた。そこから発展して本研究の目的は、in vitro (ヒト不死化角膜上皮培養細胞) とex vivo (マウス角膜) でトラボプロストおよびEGF受容体阻害薬を用いて、角膜上皮細胞の増殖、細胞間接着因子への影響を検討した。

in vitro:トラボプロストおよびEGF受容体阻害薬 (PD168393) のE-cadherinの発現効果についてヒト不死化角膜上皮培養細胞を用いて免疫組織化学染色で検討した。また、ウェスタンブロッティング法で定量化して検討したところ、トラボプロスト添加にてE-cadherinの細胞間の発現は低下したが、トラボプロストとEGF受容体阻害薬をともに添加するとその発現低下はみられなかった。また、ウェスタンブロッティング法で蛋白量はトラボプロスト単独添加もEGF受容体阻害薬をともに添加してもコントロールと比較して変化がなかった。

ex vivo:トラボプロストおよびEGF受容体阻害薬 (PD168393) の各種 (p-EGR、p-ERK、Ki67、E-cadherin) 発現効果について添加した培養液で摘出したC57/BL6マウス眼球を器官培養して検討した。Ki67は角膜中央部の陽性細胞数を計測して多重比較検定で統計学的比較検討を行った。

免疫組織化学染色でトラボプロスト添加にてp-EGFR、p-ERKは発現増強、E-cadherinの細胞間の発現低下がみられたが、トラボプロストとEGF受容体阻害薬をともに添加するとそれらの作用は抑制された。Ki67はトラボプロスト添加にて陽性細胞が有意に増加し、トラボプロストとEGF受容体阻害薬をともに添加すると有意な増加はみられなかった。

前述の結果から、トラボプロストの細胞増殖作用、EGF亢進作用、E-cadherinの発現低下作用はEGF受容体阻害薬を併用することでその作用がキャンセルされた。

本論文は、PGF2 $\alpha$  製剤による薬剤性角膜上皮障害の機序について、PGF2 $\alpha$  製剤主薬のEGF亢進作用とE-cadherinの減弱化が関与し、EGFを制御することで角膜上皮障害を制御できる可能性を示唆された初めての報告であり、今後のPGF2 $\alpha$  製剤による薬剤性角膜上皮障害の予防戦略につなが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みとめた。

学位記番号	博(医)乙第991号		
学位授与の日	令和2年3月24日		
氏名	石橋 達也		
学位論文の題目	Nicotinic acetylcholine receptor signaling regulates inositol - requiring enzyme 1 $\alpha$ activation to protect $\beta$ - cells against terminal unfolded protein response under irremediable endoplasmic reticulum stress (ニコチン性 ACh 受容体シグナルは不可逆的な小胞体ストレス下で IRE1 $\alpha$ 活性および T-UPR を制御し膵 $\beta$ 細胞を保護する)		
論文審査委員	主査	教授 井原 義人	
	副査	教授 中田 正範	教授 赤水 尚史

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

細胞内オルガネラである小胞体は蛋白折りたたみ需要に対処する。蛋白折りたたみ需要の過剰な負荷は小胞体ストレスと呼ばれ、細胞の機能低下および細胞死に関連する。一般に、膵 $\beta$ 細胞などの分泌細胞は一定量の分泌蛋白を細胞内に備蓄する必要があることから、小胞体ストレスに対し脆弱であることが知られている。IRE1 $\alpha$  は小胞体膜上蛋白の1つであり過剰な小胞体ストレスが加わると IRE1 $\alpha$  は重合化、リン酸化を経て活性化される。その結果 Terminal-Unfolded Protein Response (T-UPR) と呼ばれる応答が引き起こされ細胞機能の低下や細胞死が引き起こされる。喫煙者においては非喫煙者に比べ糖尿病の発症リスクが 1.4 倍増加するといわれ、その機序としては疫学研究で明らかにされた喫煙によるインスリン抵抗性の関与が考えられる。一方、ウサギ膵組織片における低濃度ニコチンがインスリン分泌を促進させることや、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) が膵 $\beta$ 細胞を含む非神経細胞に発現することが報告されたことから nAChR シグナルが膵 $\beta$ 細胞機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。また、STZ 誘発糖尿病モデルマウスにおける耐糖能悪化を nAChR $\alpha 7$  アゴニスト PNU-282987 (PNU) にて改善させ、この作用は残存 $\beta$ 細胞量と関連するとして報告もみられる。いくつかの非膵 $\beta$ 細胞においては nAChR シグナルが小胞体ストレスにより引き起こされたアポトーシスを減弱させ細胞保護的に働くことを示した報告がみられるが詳細な機序について十分に解明されておらず、膵 $\beta$ 細胞での検討は検索のかぎり認められない。我々は nAChR シグナルが IRE1 $\alpha$  活性を制御し、小胞体ストレス下での T-UPR から膵 $\beta$ 細胞を保護するという仮説を立て検討をおこなった。

### 【対象と方法】

ラットインスリノーマ由来 INS-1 細胞、DOX inducible IRE1 $\alpha$  過剰発現 INS-1 細胞、およびヒト膵 $\beta$ 細胞株 EndoC- $\beta$ H1 細胞を用いた。小胞体ストレス誘発剤として Tunucamycin(Tm)または Thapsigargin(Tg)を用い、nAChR アゴニストとして Nicotine を用いた。IRE1 $\alpha$  活性化マーカーとして XBP1 splicing レベル、IRE1 $\alpha$  リン酸化レベルを測定した。T-UPR マーカーとしてアポトーシス前駆物質 TXNIP(Thioredoxin-interacting protein)、Insulin1 (Proinsulin)の mRNA および蛋白発現量を用いた。アポトーシスマーカーとしてフローサイトメトリーを用いた FITC 蛍光色素標識 AnnexinV 抗体陽性細胞率、蛍光アッセイを用いた Caspase3/7 substrate 活性を測定した。nAChR $\alpha 7$  の機能調節のために特異的アゴニストである PNU282987、特異的阻害薬である  $\alpha$  Bungarotoxin( $\alpha$  BTX)、nAChR $\alpha 7$  特異的 siRNA を用いて検討を行なった。

### 【結果】

#### 1. IRE1 $\alpha$ 過剰発現細胞において Nicotine が T-UPR に及ぼす影響

まず、ラットインスリノーマ由来 INS-1 細胞およびヒト膵 $\beta$ 細胞株 EndoC- $\beta$ H1 細胞に nAChR が発現していることを確認した。次に、IRE1 $\alpha$  過剰発現 INS-1 細胞において nAChR アゴニストである Nicotine は IRE1 $\alpha$  過剰発現に伴う TXNIP mRNA 量の増加と、Insulin1 (Ins1) mRNA 量の減

少を抑制した。同様の影響は蛋白レベルにおいても確認された。

## 2. 小胞体ストレス下における Nicotine の IRE1 $\alpha$ シグナル抑制効果

Nicotine は Tg による IRE1 $\alpha$  特異的な XBP1 splicing の上昇を抑制した。また、Nicotine は Tg および Tm によってひき起こされる spliced XBP1 mRNA 量の増加を抑制した。さらに Nicotine は Tg による IRE1 $\alpha$  のリン酸化を抑制した。

## 3. 小胞体ストレスによって引き起こされた Nicotine の T-UPR 抑制効果

Nicotine は小胞体ストレス誘発薬である Tg または Tm によって引き起こされる T-UPR マーカーである TXNIP mRNA 量の増加と、Ins1 mRNA の減少を抑制することを確認した。また、蛋白レベルにおいても同様の結果を確認した。

## 4. nAChR シグナルサブユニットの検討

nAChR サブユニットの検討では Nicotine の小胞体ストレスによる T-UPR を抑制する作用は nAChR $\alpha$ 7 特異的アゴニストである PNU においてもみとめられ、nAChR $\alpha$ 7 サブユニット特異的 antagonist である  $\alpha$ -BTX にて消失した。さらに、nAChR $\alpha$ 7 特異的 siRNA を導入した INS-1 細胞において nAChR シグナルがもたらす IRE1 $\alpha$  過剰発現下での T-UPR 抑制効果は減弱した。

## 5. 小胞体ストレスによって引き起こされたアポトーシスに対する Nicotine の抑制効果

アポトーシスのマーカーである Caspase3/7 活性および AnnexinV 陽性細胞率の検討にて Nicotine は IRE1 $\alpha$  過剰発現または Tm で誘導された小胞体ストレスによるアポトーシスマーカーの増加を抑制した。

### 【結論と考察】

小胞体ストレス下のラットおよびヒト膵 $\beta$ 細胞において nAChR シグナルは IRE1 $\alpha$  活性の調節を介して T-UPR を制御し、最終的にアポトーシスを抑制し、この nAChR シグナルによる IRE1 $\alpha$  活性制御は少なくとも  $\alpha$ 7 サブユニットを介していることが示唆された。本研究結果より、nAChR シグナルは小胞体ストレス下における膵 $\beta$ 細胞の細胞保護的因子であることが解明された。また、nAChR シグナルは糖尿病における膵 $\beta$ 細胞の消失や機能低下を防ぐ治療的ターゲットとなる可能性を見出した。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和2年3月13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。本論文の目的は膵 $\beta$ 細胞においてニコチン性 ACh 受容体(nAChR)シグナルが小胞体ストレスセンサー蛋白である IRE1 $\alpha$  活性、および小胞体ストレス下での細胞機能低下や細胞死を引き起こす過剰な小胞体ストレス応答 (T-UPR) に及ぼす影響明らかにすることである。膵 $\beta$ 細胞株であるラットインスリノーマ由来 INS-1 細胞、DOX inducible IRE1 $\alpha$  過剰発現 INS-1 細胞、およびヒト膵 EndoC- $\beta$  H1 細胞を用いて研究をおこなった。IRE1 $\alpha$  過剰発現 INS-1 細胞において nAChR アゴニストである Nicotine は IRE1 $\alpha$  過剰発現に伴う TXNIP mRNA 量の増加と、Insulin1 (Ins1) mRNA 量の減少を抑制した。同様の影響は一般的な小胞体ストレス誘発薬である Tg または Tm の刺激において、さらにヒト膵 EndoC- $\beta$  H1 細胞においてもみられ、Nicotine は T-UPR によって引き起こされた IRE1 $\alpha$  活性を抑制することが示された。また、IRE1 $\alpha$  活性の検討では Nicotine は小胞体誘導薬 Thapsigargin (Tg) および別の小胞体誘導薬 Tunicamycin (Tm)による IRE1 $\alpha$  特異的な XBP1 splicing mRNA 量の増加を抑制、さらに Nicotine は Tg による IRE1 $\alpha$  のリン酸化を抑制し、Nicotine は小胞体ストレス下における IRE1 $\alpha$  シグナルを抑制することが示された。nAChR サブユニットの検討では Nicotine の小胞体ストレスによる T-UPR を抑制する作用は nAChR $\alpha$ 7 特異的アゴニストである PNU においてもみとめられ、

nAChR $\alpha$ 7 サブユニット特異的 antagonist である  $\alpha$ -BTX にて消失した、nAChR $\alpha$ 7 特異的 siRNA を導入した INS-1 細胞において nAChR シグナルがもたらす IRE1 $\alpha$  過剰発現下での T-UPR 抑制効果は減弱した。アポトーシスの検討ではアポトーシスのマーカーである Caspase3/7 活性および AnnexinV 陽性細胞率の検討にて Nicotine は IRE1 $\alpha$  過剰発現または Tm で誘導された小胞体ストレスによるアポトーシスマーカーの増加を抑制した。

以上の結果より、小胞体ストレス下のラットおよびヒト膵 $\beta$ 細胞において nAChR シグナルは IRE1 $\alpha$  活性の調節を介して T-UPR を制御し、最終的にアポトーシスを抑制することが示された。本論文は、nAChR シグナルが糖尿病における膵 $\beta$ 細胞の消失や機能低下を防ぐ治療的ターゲットとなる可能性を見出したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。