

## 信州大学において審査された医学博士論文要旨

氏名	学位授与番号	学位授与年月日	学位論文題目	学位審査委員	
				主査	副査
中嶋伸介	甲第763号	20. 3. 31	IL-15 inhibits pre-B cell proliferation by selectively expanding Mac-1 <sup>+</sup> B220 <sup>+</sup> NK cells (IL-15は選択的に Mac-1 <sup>+</sup> B220 <sup>+</sup> NK 細胞を増殖させ、プレB細胞の増殖を抑制する)	菅根一男	池田宇一 樋口京一
酒井典子	甲第764号	21. 3. 31	High oxygen tension constricts epineurial arterioles of the rat sciatic nerve via reactive oxygen species (活性酸素によるラット坐骨神経線維上膜細動脈微小循環調節)	山田充彦	森泉哲次 池田宇一
小松 哲	甲第765号	21. 3. 31	Identification of novel deletion polymorphisms in breast cancer (乳癌における新規欠失型遺伝子多型の同定)	福嶋義光	谷口俊一郎 中山 淳
齊藤はるな	甲第766号	20. 9. 30	Changes in activities of daily living during treatment of late-life depression (老年期うつ病の治療中における日常生活活動動作の変化)	池田修一	本郷一博 福嶋義光
小松通治	甲第767号	20. 9. 30	Citrin deficiency as a cause of chronic liver disorder mimicking non-alcoholic fatty liver disease (シトリン欠損症では非アルコール性脂肪性肝疾患類似の病態を呈する)	池田修一	宮川真一 中山 淳
田澤浩一	甲第768号	20. 3. 31	Therapeutic outcome of cyclic VAD (vincristine, doxorubicin and dexamethasone) therapy in primary systemic AL amyloidosis patients (原発性全身性ALアミロイドーシス患者におけるVAD療法の効果)	田中榮司	池田宇一 中山 淳
周 博	甲第769号	19. 9. 30	Existence of an immunoglobulin G component of naturally occurring HLA class I antibodies that are not directed against self-antigens in human serum (ヒト血清中に存在する非自己抗原に対するIgG型HLAクラスI自然抗体)	田中榮司	菅根一男 野見山哲生
瀬戸山友一	甲第770号	21. 3. 31	Development of Analysis Procedures for the Simple Visualization of Hospitals' Market Share, Using Hospital Income Calculated by means of the Diagnosis Procedure Combination (DPC) Payment System (DPCから集計した病院の収入データを用いた病院マーケットシェア分析の単純化・可視化手法の開発)	野見山哲生	福嶋義光 大森 栄
掛川 晃	甲第771号	21. 3. 31	Motor neurons essential for normal sciatic function in neonatally nerve-injured rats (正常な運動機能維持に必要な最小運動ニューロン数の決定—新生児ラット坐骨神経における研究—)	加藤博之	本郷一博 佐々木克典

審査学位論文要旨

小山 洋	甲第772号	21. 3.31	Hyperproduction of Hyaluronan in Neu-Induced Mammary Tumor Accelerates Angiogenesis through Stromal Cell Recruitment : Possible Involvement of Versican/PG-M (乳腺腫瘍におけるヒアルロン酸の過剰産生は間質細胞を動員して, 血管新生を促進する: バーシカンの関与を含めて)	中山 淳	鎌田 徹 池田 宇一
矢嶋 紀幸	甲第773号	20. 3.31	Critical role of bone marrow apoptosis-associated speck-like protein, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice (マウス血管傷害後の新生内膜形成における, 骨髄由来のインフラマゾームアダプター分子であるアポトーシス関連スペック様カード蛋白質の重要な役割)	天野 純	久保 惠嗣 大橋 俊夫
森本 創	甲第774号	21. 3.31	Cardiac Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Transgenic Mice Prevents Cardiac Dysfunction and Remodeling after Myocardial Infarction (心筋特異的なMCP-1の過剰発現はマウス心筋梗塞モデルにおける心機能不全とリモデリングを改善する)	山田 充彦	天野 純 中山 淳
小島 洋文	甲第775号	20. 3.31	One third of Japanese patients with Multiple Osteochondromas may have mutations in genes other than <i>EXT1</i> or <i>EXT2</i> (多発性骨軟骨腫の日本人患者の1/3は <i>EXT1</i> や <i>EXT2</i> 以外の遺伝子に突然変異を持っている可能性がある)	加藤 博之	宇佐美 真一 中山 淳
藏井みゆき	甲第776号	21. 3.31	Expression of Aurora kinases A and B in normal, hyperplastic, and malignant human endometrium: Aurora B as a predictor for poor prognosis in endometrial carcinoma (オーロラキナーゼAとBのヒト正常, 増殖症, 悪性子宮内膜における発現: オーロラBは子宮内膜癌における予後不良因子)	宮川 眞一	天野 純 谷口 俊一郎
中村 純子	甲第777号	21. 3.31	Biphasic function of focal adhesion kinase in endothelial tube formation induced by fibril-forming collagens (コラーゲン惹起性内皮細胞管状構造形成における focal adhesion kinase 機能の二面性)	谷口 俊一郎	鈴木 龍雄 樋口 京一
久保 直樹	甲第778号	21. 3.31	Identification of oligopeptide binding to colon cancer cells separated from patients using laser capture microdissection (マイクロダイゼクションを用いたヒト大腸癌細胞への結合ペプチドの同定)	中山 淳	西沢 理 田中 榮司

審査学位論文要旨

村山秀喜	甲第779号	21. 3.31	Deficiency of tumour necrosis factor- $\alpha$ and interferon- $\gamma$ in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury (血管傷害モデルでの骨髄細胞中の TNF $\alpha$ とインターフェロン $\gamma$ の欠如が相乗的に内膜肥厚の増殖を抑制した)	山田充彦	天野 純 竹下敏一
陳 忠	甲第780号	21. 3.31	Role of $\alpha$ 1-Adrenergic Receptors in Detrusor Overactivity Induced by Cold Stress in Conscious Rats (覚醒下ラットにおける冷ストレスによって誘発された排尿筋過活動に対する $\alpha$ 1交感神経受容体の役割)	大橋俊夫	山田充彦 大森 栄
鈴木 滋	甲第781号	21. 3.31	Head-down tilt posture elicits transient lymphocyte mobilization from the iliac, but not mesenteric, lymph nodes of rats (頭部低位姿勢は、ラット腸骨リンパ節から一過性のリンパ球動員を誘発するが、腸間膜リンパ節では誘発しない)	倉科憲治	瀧 伸介 宇佐美眞一
伊東理子	甲第782号	20. 3.31	The Association of Transforming Growth Factor Beta 1 Gene Polymorphisms with the Emphysema Phenotype of COPD in Japanese (日本人における肺気腫と TGF- $\beta$ 1遺伝子多型との関連について)	福嶋義光	宇佐美眞一 浅村英樹
北原 桂	甲第783号	20. 9.30	Microsatellite Scan Identifies New Candidate Genes for Susceptibility to Alcoholic Chronic Pancreatitis in Japanese Patients (アルコール性慢性膵炎の疾患関連遺伝子のゲノムワイド検索)	福嶋義光	樋口京一 田中栄司
寺元 剛	甲第784号	20. 3.31	Role of dexamethasone and oncostatin M on the formation of vacuoles in human fetal liver cells (ヒト胎児肝細胞内巨大空胞様小器官形成におけるデキサメタゾン及びオンコスタチンMの役割)	中山 淳	西澤 理 田中栄司
小林真二	甲第785号	21. 3.31	Interleukin-21 stimulates B-cell immunoglobulin E synthesis in human beings concomitantly with activation-induced cytidine deaminase expression and differentiation into plasma cells (ヒトにおいて IL-21は AID 発現および形質細胞への分化誘導を介しB細胞の IgE 産生を促進する)	瀧 伸介	竹下敏一 本田孝行
芦田敦子	甲第786号	21. 3.31	Pathological activation of KIT in metastatic tumors of acral and mucosal melanomas (肢端型・粘膜型悪性黒色腫の転移腫瘍における KIT の活性化)	中山 淳	田中栄司 新藤隆行

審査学位論文要旨

山浦麻貴	甲第787号	21. 3.31	NADPH oxidase (Nox) 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression (活性酸素産生遺伝子 NOX4の G2-M 期の細胞周期進行の制御による悪性黒色腫の発癌への関与)	谷口俊一郎	中山 淳 瀧 伸介
小松佳道	甲第788号	20. 3.31	Airway hyper-responsiveness in young adults with asthma that remitted either during or before adolescence (若年成人における小児喘息既往者の気道過敏性の検討)	池田修一	菅根一男 田中榮司
百瀬泰行	甲第789号	20. 3.31	Differentiation of Monkey Embryonic Stem Cells into Hepatocytes and mRNA Expression of Cytochrome P450 Enzymes Responsible for Drug Metabolism: Comparison of Embryoid Body Formation Conditions and Matrices (サル胚性幹細胞の肝細胞への分化と薬物代謝に関与するシトクロムP450のmRNA発現: 胚様体作成条件および細胞外マトリックスの比較)	池田宇一	西沢 理 田中榮司
金子 稔	甲第790号	21. 3.31	Prion disease causes less severe lesions in human hippocampus than other parts of brain (ヒトのプリオン病では海馬の障害が脳の他の部位に比べて少ない)	池田修一	森泉哲次 本郷一博
中嶋岳郎	甲第791号	21. 3.31	Bezafibrate at clinically-relevant doses decreases serum/liver triglycerides via down-regulation of SREBP-1c in mice: a novel PPAR $\alpha$ -independent mechanism (臨床用量でのベザフィブラートの中性脂肪低下作用は1c型ステロール調節領域結合蛋白の低下に由来する: $\alpha$ 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体に依存しない新規薬理作用の発見)	大森 栄	田中榮司 山田充彦
西村 繁	甲第792号	20. 9.30	A Cross-Sectional Observation of Effect of Exposure to N-Methyl-2-Pyrrolidone (NMP) on Workers' Health (N-メチル-2-ピロリドン (NMP) 曝露が作業者の健康に及ぼす影響の時間断面研究)	福嶋義光	大森 栄 天野直二
趙 琛	甲第793号	21. 3.31	Immunohistochemical study of hard tissue formation in the rat pulp cavity after tooth replantation (歯の再植後の歯髄腔内に形成される硬組織に関する免疫組織化学的研究)	森泉哲次	佐々木克典 中山 淳
長手寿明	甲第794号	21. 3.31	Therapeutic and preventive effects of methotrexate on zymosan-induced arthritis in SKG mice (SKG マウスのザイモザン誘発関節炎に対するメトトレキサートの治療的及び予防的効果)	樋口京一	山田充彦 加藤博之

審査学位論文要旨

松本竹久	甲第795号	21. 3.31	Phylogeny of a Novel “ <i>Helicobacter heilmannii</i> ” Organism from a Japanese Patient with Chronic Gastritis Based on DNA Sequence Analysis of 16S rRNA and Urease Genes (日本人の慢性胃炎患者から検出された新規“ <i>Helicobacter heilmannii</i> ”の16S rRNA 遺伝子と Urease 遺伝子の DNA 塩基配列解析に基づいた系統発生論)	本田孝行	能勢 博 竹下敏一
川崎健治	甲第796号	21. 3.31	Sialic Acid Moiety of Apolipoprotein E and Its Impact on the Formation of Lipoprotein Particles in Human Cerebrospinal Fluid (ヒト脳脊髄液中リポ蛋白粒子の形成におけるアポリポ蛋白 E のシアル酸成分の影響)	本田孝行	谷口俊一郎 樋口京一
羽生 登	甲第797号	20. 3.31	Characterization of cysteine and homocysteine bound to human serum transthyretin (ヒト血清トランスサイレチンに結合したシステインとホモシステインの特徴について)	本田孝行	池田修一 樋口京一
塩原真弓	甲第798号	21. 3.31	Laboratory appraisal of optimal gaseous conditions for growth of zoonotic <i>Helicobacter felis</i> ATCC 49179 ( <i>Helicobacter felis</i> ATCC 49179株の培養における至適ガス環境に関する検討)	本田孝行	西澤 理 竹下敏一
伴 緑也	甲第799号	21. 3.31	Reflexive contraction of the levator palpebrae superioris muscle to involuntarily sustain the effective eyelid retraction through the transverse trigeminal proprioceptive nerve on the proximal Mueller’s muscle: verification with evoked electromyography (ミューラー筋近位部を横走する三叉神経固有感覚神経を介した, 不随意に有効な開瞼を維持する上眼瞼挙筋の反射的収縮: 誘発筋電図による検証)	池田修一	森泉哲次 本郷一博
青木 薫	甲第800号	21. 3.31	A Thin Carbon Fiber Web as a Scaffold for Bone Tissue Regeneration (骨再生の足場材料として機能する細いカーボンファイバー網)	小池健一	久保惠嗣 中山 淳

IL-15 inhibits pre-B cell proliferation by selectively expanding Mac-1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>NK cells (IL-15は選択的にMac-1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>NK細胞を増殖させ、プレB細胞の増殖を抑制する)

中 嶋 伸 介

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Natural killer (NK) 細胞は同型異種の骨髄細胞において移植した骨髄細胞の再構築を障害するが、自己の細胞に対しては応答しない。この「自己寛容」は、NK細胞上に発現し、自己のMHCクラスIを認識するkiller inhibitory receptor (KIR)からの抑制シグナルによると考えられている。その一方で、特殊な環境下においてはNK細胞の「自己寛容」が克服されインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )の産生を介してNK細胞による免疫調節が行われるという報告がなされており、IL-2のようなNK細胞の活性化に働くサイトカインがそのような克服を誘導する候補分子として挙げられている。しかし、「自己寛容」の克服がどのような条件下で起こるかは依然不明である。そこで、NK細胞の分化、増殖に働くサイトカインであり、IL-2と類似の構造を持つIL-15について、NK細胞の「自己寛容」の克服を引き起こせるか否かを検討した。

【方法】 マウス骨髄細胞をIL-7存在下で培養し、プレB細胞が増殖するin vitro培養系を構築し、そこにIL-15を添加し自己のプレB細胞の増殖が抑制されるか否かを調べた。次に、IL-15がNK細胞の増殖、活性因子であることから、プレB細胞増殖制御へのNK細胞の関与を検討するため、骨髄細胞からNK細胞を除去して同様な検討を行うとともに、NK細胞を再添加して検討を加えた。また、プレB細胞の増殖を抑制する因子とIFN- $\gamma$ の関係を検討するために、IFN- $\gamma$ レセプターを欠損するマウスより単離した骨髄細胞を用いた培養を行うとともに、培養上清中のIFN- $\gamma$ の測定ならびに中和抗体を用いたIFN- $\gamma$ の阻害実験を行った。さらにBrdUの取り込みやCFSEラベルの細胞分裂による希釈を指標にプレB細胞の増殖を調べた。MHCクラスIは「自己寛容」の獲得以外に機能的なNK細胞の成熟にも必須であると提唱されている(ライセンス)。そこで、MHCクラスIを発現しない $\beta$ 2m欠損マウス

の骨髄細胞を用いて同様の検討を行った。

【結果】 骨髄細胞をIL-15存在下で培養するとMac-1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>のNK細胞が特異的に増殖し、IL-7で誘導されるプレB細胞の増殖が抑制された。NK細胞を除去するとIL-15によるプレB細胞の増殖抑制が見られなくなり、逆にNK細胞を添加するとプレB細胞の増殖抑制が増強したことから、IL-15はNK細胞を介してプレB細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。この培養系においてはIFN- $\gamma$ が産生されており、IFN- $\gamma$ レセプター欠損マウスを用いた実験や抗IFN- $\gamma$ 抗体による阻害実験ではプレB細胞の増殖の回復が観察された。また、プレB細胞の増殖を検討したところ、IL-15を添加して培養すると著明な増殖抑制が見られたが、IFN- $\gamma$ レセプター欠損マウス由来の骨髄細胞ではこのような抑制は見られなかった。以上のことから、IL-15によるプレB細胞の増殖抑制はNK細胞が産生するIFN- $\gamma$ を介していることが示された。ライセンスされていない $\beta$ 2m欠損マウスの骨髄細胞においてもIFN- $\gamma$ は産生され、またプレB細胞の増殖が抑制された。

【結論】 In vitro培養系において、IL-15存在下で特異的に増殖するMac-1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>のNK細胞はIFN- $\gamma$ を産生し、自己のプレB細胞の細胞周期を遅延させることで増殖を抑制した。また、 $\beta$ 2m欠損細胞のNK細胞もIFN- $\gamma$ を産生したことから、IL-15による刺激は「自己寛容」や「ライセンス」を超えてNK細胞がIFN- $\gamma$ を産生できる可能性が示唆された。Mac-1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>のNK細胞の亜集団が「自己寛容」の克服を担い、免疫調節作用を有する細胞であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

Natural killer (NK) 細胞は自己の細胞に対しては「自己寛容」を示す。その一方で、特殊な環境下においてはNK細胞の「自己寛容」が克服されNK細胞による免疫調節が行われるという報告がなされているが「自己寛容」の克服がどのような条件下で起こるかは依然不明である。そこで、中嶋はNK細胞の分化、増殖に働くサイトカインであるIL-15について、NK細胞の「自己寛容」の克服を引き起こせるか否かを、in vitroでのプレB細胞の増殖制御を指標に検討した。

中嶋は、マウス骨髄細胞をIL-7存在下で培養し、プレB細胞が増殖するin vitro培養系を構築し、そこにIL-15を添加し自己のプレB細胞の増殖がNK細胞

胞によって抑制されるか否かを調べた。次に、NK細胞の関与を検討するため、骨髄細胞からNK細胞を除去したり、またNK細胞を欠損するIL-15ノックアウトマウスを用いるなどして同様な検討を行い、さらにNK細胞を添加して同様に検討した。また、プレB細胞が増殖を抑制する因子とIFN- $\gamma$ の関係を検討し、プレB細胞の細胞周期を調べた。さらにMHCクラスIを発現しない $\beta 2$ ミクログロブリン ( $\beta 2m$ )欠損マウスの骨髄細胞を用いて同様の実験を行った。

その結果、中嶋は以下の結果を得た。

1. 骨髄細胞をIL-15存在下で培養するとMac-1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>のNK細胞が特異的に増殖し、IL-7で誘導されるプレB細胞の増殖を抑制した。
2. IL-15によるプレB細胞増殖抑制にはNK細胞が必須であり、IL-15はこの細胞を介してプレB細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。
3. プレB細胞の増殖抑制はNK細胞が産生するIFN- $\gamma$ を介していたが、IFN- $\alpha/\beta$ の関与は認められなかった。
4. ライセンシングされていない $\beta 2m$ 欠損マウスの骨髄細胞においてもIFN- $\gamma$ は産生され、またプレB細胞の増殖が抑制された。

以上の結果より、炎症時に産生されるIL-15は、Mac-1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>のNK細胞を選択的に増殖させるとともにIFN- $\gamma$ 産生を誘導し、自己のプレB細胞の細胞周期を遅延させることでその増殖を抑制しうることが示された。また、 $\beta 2m$ 欠損細胞のNK細胞においてもIFN- $\gamma$ を産生したことから、IL-15による刺激は「自己寛容」や「ライセンシング」を超えてNK細胞がIFN- $\gamma$ を産生させる可能性が示唆された。本研究の結果、Mac-1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>のNK細胞亜集団が、炎症時に「自己寛容」の克服を通じて、免疫調節作用を発揮するのではないかと考えられた。この研究は、感染などに伴って観察される骨髄抑制、とくにB細胞産生の抑制の機構の一端を明らかにしたものであり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

High oxygen tension constricts epineurial arterioles of the rat sciatic nerve via reactive oxygen species (活性酸素によるラット坐骨神経線維上膜細動脈微小循環調節)

酒井典子

(論文の内容の要旨)

末梢神経への血流供給は、正常な神経機能維持に重要な働きをしており、末梢神経の血流低下によって運動神経の伝導速度遅延を生ずることが判明している。また、糖尿病性神経障害は、末梢神経の微小循環障害がその一因であることが示唆されており、事実その病態生理において、糖尿病によって発生する活性酸素が糖尿病ラットの坐骨神経血流を著明に減少させることが明らかになっている。一方、末梢神経血流の生体内測定においては、レーザードップラー法や水素クリアランス法が汎用されている。しかしながらこれらの方法では、末梢神経全体としての血流測定を可能とするが、末梢組織血流量を直接決定する因子である抵抗血管(小動脈—細動脈)の収縮—拡張の機能解析は十分に評価することができない。今回我々は、麻酔下ラット坐骨神経線維上膜に走行する細動脈の径変化を生体内で直接観察できる生体顕微鏡システムを開発し、このシステムを用いて活性酸素が末梢神経の微小循環機構に及ぼす影響を検討した。

方法：7週齢の雄Wistarラットにウレタン・ $\alpha$ クロラロースを用いて麻酔を行った。左大腿動脈にカテーテルを挿入し、実験中持続的に体血圧を測定した。生体顕微鏡下、右坐骨神経をマイクロサージェリーの手法を用いて展開した。ラットを37°Cの保温プレート上に保定し、内径 $\sim 26 \mu m$ の坐骨神経線維上膜に走行する細動脈を水浸対物レンズと冷却CCDカメラを通して観察し、内径変化をビデオマイクロスコープシステムによって経時的に計測した。坐骨神経表面には37°C-pH7.4に維持した酸素分圧5 mmHgの低酸素クレブス液と酸素分圧140 mmHgの高酸素クレブス液を灌流し細動脈の径変化を指標として反応性を検討した。本実験において活性酸素の関与を検討するために次の薬物を用いた。ニフェジピン(Ca<sup>2+</sup>チャネル拮抗薬)、ノルエピネフリン、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、テンポール(膜透過性SOD様物質)、カタラーゼ(過酸化水素除去剤)、ディヒドロエチオドニウムおよびアポシニン(NADPHオキシ

ダーゼ阻害薬), アロプリノール (キサンチンオキシダーゼ阻害薬), L-NAME (内因性一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬), 外因性 NO 供与体 (SNAP)。

結果:

1. 低酸素クレス液の坐骨神経への表面灌流は, 細動脈の径変化に影響を与えなかった。
2. ニフェジピンの坐骨神経への表面灌流は, 細動脈に有意な拡張反応を誘起した。
3. ノルエピネフリンの坐骨神経への表面灌流は, 細動脈に有意な収縮反応を誘起した。
4. 高酸素クレス液の坐骨神経への表面灌流は, 細動脈に時間依存的収縮反応を誘起した。
5. SOD, テンポール, カタラーゼ単独, およびSOD+カタラーゼの処置は, 高酸素クレス液による細動脈収縮を解除した。
6. デヒドロエチオドニウムおよびアポシニンの坐骨神経への処置は, 高酸素クレス液による細動脈収縮を解除した。
7. アロプリノールの坐骨神経への処置は, 高酸素クレス液による細動脈収縮を解除した。
8. 高酸素クレス液による細動脈収縮は, L-NAME存在下においても観察された。
9. 高酸素クレス液による細動脈収縮は, SNAPの投与によって解除された。

考察: 麻酔下ラット坐骨神経線維上膜を走行する細動脈は, 筋原性収縮を有していることが判明した。坐骨神経線維上膜周囲の高酸素環境は, 細動脈に収縮反応を誘起し, その作用機序に NADPH オキシダーゼならびにキサンチンオキシダーゼ由来のスーパーオキシド一過酸化水素の関与していることが判明した。また, これら活性酸素による収縮反応は, 内因性・外因性 NO による修飾を受けないことが判明した。従って, 本研究によって活性酸素が末梢神経の微小循環調節機構に重要な働きをしていることが明らかとなった。

#### (論文審査の結果の要旨)

末梢神経への血流供給は, 正常な神経機能維持に重要な働きをしており, 末梢神経の血流低下によって運動神経の伝導速度遅延を生ずることが判明している。また, 糖尿病性神経障害は, 末梢神経の微小循環障害がその一因であることが示唆されており, 事実その病態生理において, 糖尿病によって発生する活性酸素が糖尿病ラットの坐骨神経血流を著明に減少させることが明らかになっている。今回我々は, 麻酔下ラット坐骨神経線維上膜に走行する細動脈の径変化を生体内で

直接観察できる生体顕微鏡システムを開発し, このシステムを用いて活性酸素が末梢神経の微小循環機構に及ぼす影響を検討した。

方法は, 麻酔下 Wistar ラットを用いて, 生体顕微鏡下に内径 $\sim 26 \mu\text{m}$ の坐骨神経線維上膜に走行する細動脈を観察し, 内径変化をビデオマイクروسコープシステムによって経時的に計測した。坐骨神経表面には酸素分圧 5 mmHg の低酸素クレス液と酸素分圧 140 mmHg の高酸素クレス液を灌流し細動脈の径変化を指標として反応性を検討した。本実験において活性酸素の関与を検討するために次の薬物を用いた。ニフェジピン ( $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル拮抗薬), ノルエピネフリン, スーパーオキシドディスムターゼ (SOD), テンポール (膜透過性 SOD 様物質), カタラーゼ (過酸化水素除去剤), デヒドロエチオドニウムおよびアポシニン (NADPH オキシダーゼ阻害薬), アロプリノール (キサンチンオキシダーゼ阻害薬), L-NAME (内因性一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬), 外因性 NO 供与体 (SNAP)。

その結果, 次の結論を得た。

1. 低酸素クレス液の坐骨神経への表面灌流は, 細動脈の径変化に影響を与えなかった。
2. ニフェジピンの坐骨神経への表面灌流は, 細動脈に有意な拡張反応を誘起した。
3. ノルエピネフリンの坐骨神経への表面灌流は, 細動脈に有意な収縮反応を誘起した。
4. 高酸素クレス液の坐骨神経への表面灌流は, 細動脈に時間依存的収縮反応を誘起した。
5. SOD, テンポール, カタラーゼ単独, およびSOD+カタラーゼの処置は, 高酸素クレス液による細動脈収縮を解除した。
6. デヒドロエチオドニウムおよびアポシニンの坐骨神経への処置は, 高酸素クレス液による細動脈収縮を解除した。
7. アロプリノールの坐骨神経への処置は, 高酸素クレス液による細動脈収縮を解除した。
8. 高酸素クレス液による細動脈収縮は, L-NAME存在下においても観察された。
9. 高酸素クレス液による細動脈収縮は, SNAPの投与によって解除された。

これらの結果より, 麻酔下ラット坐骨神経線維上膜を走行する細動脈は, 筋原性収縮を有していることが判明した。坐骨神経線維上膜周囲の高酸素環境は, 細動脈に収縮反応を誘起し, その作用機序に NADPH



オキシダーゼならびにキサンチンオキシダーゼ由来のスーパーオキシド-過酸化水素の関与していることが判明した。また、これら活性酸素による収縮反応は、内因性・外因性 NO による修飾を受けないことが判明した。従って、本研究によって活性酸素が末梢神経の微小循環調節機構に重要な働きをしていることが明らかとなった。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値のあるものと認めた。

## Identification of novel deletion polymorphisms in breast cancer (乳癌における新規欠失型遺伝子多型の同定)

小 松 哲

### (論文の内容の要旨)

【目的】乳癌は増加の一途をたどる疾患で社会的関心が高まっている。マイクロアレイに代表されるゲノム科学の進歩によって、一度に大量の遺伝情報を高速に処理することが出来るようになり、病気を分子レベルで解析することが進められている。その結果、乳癌の発症や進展に関わる遺伝子の増幅や欠失をはじめ DNA レベルでの遺伝子の再構築においても、より詳細な解析が可能になった。

本研究では、乳癌における新規遺伝子異常の同定を目的として、遺伝子のコピー数変化を comparative genomic hybridization (CGH) microarray を用いゲノムワイドに解析した。

【方法】25種類の乳癌培養細胞株から DNA を抽出し、遺伝子コピー数の変化を、Agilent 社製の Agilent Human Genome CGH Microarray Kit 44B を用いて解析し、新規ホモ欠失領域を検索した。また、乳癌培養細胞で選定したホモ欠失領域については、乳癌臨床サンプルを Laser captured micro dissection 技術を用いて、正常細胞と癌細胞に正確に分けて DNA を抽出し、定量 PCR で検証した。さらに、乳癌患者と健常人の末梢血液サンプルを用いて DNA を抽出し、定量 PCR でその出現頻度を解析した。

【結果と考察】乳癌培養細胞の CGH Microarray 解析により、16箇所のホモ欠失領域を同定した。乳癌臨床サンプルの解析により、4領域は2～8 Kbp の狭い範囲の欠失領域をもつ新規欠失遺伝子多型と考えられた。この4領域はそれぞれ4つの異なる遺伝子 (REV1L, ZNF14, NPAS1, APOBEC3B) 上に存

在していた。

このうちの APOBEC3B 遺伝子上に観察された領域は、一部の患者で正常組織と比べ乳癌細胞で特異的にコピー数の減少を認め、乳癌の癌化機構への関与が示唆された。さらにこの領域は、出現頻度の解析で、健常人に比べ乳癌患者に有意に多く認められ、乳癌発症を予測する因子になりうる可能性も示唆された。また、他の3領域の遺伝子多型の出現頻度は、REV1L と ZNF14 遺伝子の2領域で健常人に比べ乳癌患者に多く認められる傾向があった。

近年、コピー数の変化による遺伝子多型が個体の多様性を決定する要因の1つであることが示されており、今回同定したこれらの新規遺伝子多型は、乳癌の発症や進展に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

### (論文審査の結果の要旨)

マイクロアレイに代表されるゲノム科学の進歩により、一度に大量の遺伝情報を高速に処理することが出来るようになり、病気を分子レベルで解析することが進められている。その結果、乳癌の発症や進展に関わる遺伝子の増幅や欠失をはじめ DNA レベルでの遺伝子の再構築においても、より詳細な解析が可能になった。

本研究では、乳癌における新規遺伝子異常の同定を目的として、遺伝子のコピー数変化を comparative genomic hybridization (CGH) microarray を用いゲノムワイドに解析した。

25種類の乳癌培養細胞株から DNA を抽出し、遺伝子コピー数の変化を、Agilent 社製の Agilent Human Genome CGH Microarray Kit 44B を用いて解析し、新規ホモ欠失領域を検索した。また、乳癌培養細胞で選定したホモ欠失領域については、乳癌臨床サンプルを Laser captured micro dissection 技術を用いて、正常細胞と癌細胞に正確に分けて DNA を抽出し、遺伝子コピー数の変化を定量 PCR で検証した。さらに、乳癌患者と健常人の末梢血液サンプルを用いて DNA を抽出し、定量 PCR でその出現頻度を解析した。

その結果、小松は次の結論を得た。

1. 乳癌培養細胞の CGH Microarray 解析により、16箇所のホモ欠失領域を同定した。
2. 乳癌臨床サンプルの解析により、4領域は2～8 Kbp の狭い範囲の欠失領域をもつ新規欠失遺伝子多型と考えられ、この4領域はそれぞれ4

つの異なる遺伝子 (REV1L, ZNF14, NPAS1, APOBEC3B) 上に存在していた。

3. APOBEC3B 遺伝子上で観察された領域は、一部の患者で正常組織と比べ乳癌細胞で特異的にコピー数の減少を認めた。
4. APOBEC3B 遺伝子上で観察された領域は、出現頻度を解析した結果、健常人に比べ乳癌患者に有意に多く認められた。また、他の3領域の遺伝子多型の出現頻度は、REV1LとZNF14遺伝子の2領域で健常人に比べ乳癌患者に多く認められる傾向にあった。

これらの結果より、APOBEC3B 遺伝子上に観察された領域が、乳癌の癌化機構に関与することが示唆された。また出現頻度の解析結果から、この領域の遺伝子コピー数の変化は乳癌発症を予測する因子になりうる可能性も示唆された。

以上のことより近年、コピー数の変化による遺伝子多型が個体の多様性を決定する要因の1つであることが示されており、今回同定されたこれらの新規遺伝子多型も、乳癌の発症や進展に何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。

以上のことから、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Changes in activities of daily living during treatment of late-life depression (老年期うつ病の治療中における日常生活活動動作の変化)

齊藤 はるな

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】老年期うつ病 (late-life depression ; LLD) は、認知機能の欠損と並んで身体能力障害 (disability) との強い関連性が指摘されている。しかし、LLDの重症度の変化(抑うつ症状の変動)に伴う日常生活活動動作 (activities of daily living ; ADL) の変化について具体的に調査した報告は少ない。そこで本研究では、LLDの治療中である患者のうつ病重症度、ADL (basic ADL ; BADL と instrumental ADL ; IADL を含む)、認知機能の経時的変化を同時に評価し統計学的に検討した。

【対象と方法】信州大学医学部附属病院精神科に通院又は入院中の、精神疾患の分類と診断の手引 (DSM-IV) に基づく大うつ病を現在患っているか、同病の既

往を持つ65歳以上の患者を対象とした。著明な身体障害、認知症を合併する者は除外された。うつ病重症度は Hamilton Depression Rating Scale (Ham-D) を、認知機能は Mini Mental State Examination (MMSE) を、ADL は Barthel Index (BI) および Hyogo Activities of Daily Living Scale (HADLS) を使用して、臨床評価を行った。評価は患者の観察と患者又は家族との面接に基づき、約1カ月間に2回施行した。ADLに関する評価と個人の特徴(年齢、教育年数、Ham-D、MMSE)は Spearman's correlation coefficients で、評価毎の baseline score と follow-up score は paired t-test で検討した。また、ADLの変化に Ham-D、MMSE の変化が寄与している程度、および ADL の変化に各抑うつ症状の変化が寄与している程度を重回帰分析にて調べた。

【結果】対象者は男性22人、女性48人の計70人であり、内59人は外来患者、11人は入院患者であった。平均年齢は  $72.3 \pm 5.3$  歳 (65~87歳) であった。全員が現在の病相に対し、あるいは維持療法としての薬物治療を受けていた。baseline で、Ham-D はさまざまうつ病重症度 ( $13.7 \pm 8.0$ ) を、MMSE は極めて軽度の認知機能欠損 ( $26.9 \pm 1.9$ ) を示した。43人 (61.4%) が HADLS の1つ以上の項目で障害を持っていた。ADLに関する BI、HADLS は Ham-D に baseline score、follow-up score 共に統計学的に有意な相関関係を示した。Ham-D、MMSE、HADLS は、baseline score と follow-up score 間に有意差があり改善を認めたが (それぞれ  $P < 0.001$ ,  $P = 0.003$ ,  $P = 0.017$ )、BI は有意差を認めなかった ( $P = 0.211$ )。HADLS の下位項目である BADL は有意に改善を認めたが ( $P = 0.009$ )、IADL は認めなかった ( $P = 0.078$ )。HADLS の改善に Ham-D の改善が有意に寄与していたが ( $P = 0.017$ )、MMSE は寄与していない結果が得られた ( $P = 0.996$ )。

【結論】本研究の参加者は身体疾患による身体障害がないにもかかわらず、多くの患者が ADL に少なくとも1つ以上の問題を抱えていた。うつ病重症度と ADL の状態は2回の検査を通じて強い関連性を示し、LLD の患者にはうつ病重症度の改善に伴い実質的な ADL の改善が比較的短期間で認められた。また、ADL の改善はうつ病の治療効果によるもので、認知障害からは比較的独立していることが示唆された。以上により、高齢者のうつ病の治療にあたっては、それが身体機能障害の原因となり得ることを念頭に置いて、

患者の ADL について認識することの重要性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

うつ病 (depression) では身体能力障害はとくに注目されなかったが、老年期うつ病 (late-life depression; LLD) において身体能力障害を呈する場合が多い。齊藤は、信州大学医学部附属病院精神科で加療中であり、精神疾患の分類と診断の手引 (DSM-IV) に基づく大うつ病を罹患しているか、その既往を持つ65歳以上の患者について、うつ病重症度、ADL、認知機能の経時的変化を同時に評価し、これらの関係について統計学的に比較検討した。患者の観察と患者又は家族との面接を約1カ月間に2回行い、うつ病重症度はHamilton Depression Rating Scale (Ham-D)、認知機能はMini Mental State Examination (MMSE)、日常生活活動動作 (activities of daily living; ADL) はBarthel Index (BI) とHyogo Activities of Daily Living Scale (HADLS) を用いて、それぞれ臨床評価した。著明な身体障害、認知症を合併する者は除外された。結果として以下のことが明らかとなった。

対象は男性22人、女性48人の計70人、平均年齢は72.3±5.3歳 (65~87歳) であった。baselineで、Ham-Dはさまざまうつ病重症度 (13.7±8.0) を、MMSEは極めて軽度の認知機能欠損 (26.9±1.9) を示し、43人 (61.4%) がHADLSの1つ以上の項目で障害を持っていた。うつ病重症度とADLとの間には2回の検査を通じて強い関連性を認めた。Ham-D、MMSE、HADLSでは、baseline scoreとfollow-up score間に有意な改善を認め、またHADLSの改善にはHam-Dの改善が有意に寄与していたが、MMSEは寄与していない結果が得られた。すなわち、LLDの患者にはうつ病の改善に伴い実質的なADLの改善が比較的短期間で認められ、ADLの改善はうつ病の治療効果によるもので、認知機能からは比較的独立していることが示唆された。

これらの結果より、老年期うつ病の治療にあたっては、それが身体機能障害の原因となり得ることを念頭に置いて、患者のADLを認識する重要性を明示した点で、本研究は意義あるものと考えられた。よって主査、副査は一致して、本論文が学位論文として価値があるものと認めた。

Citrin deficiency as a cause of chronic liver disorder mimicking non-alcoholic fatty liver disease (シトリン欠損症では非アルコール性脂肪性肝疾患類似の病態を呈する)

小松 通治

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】シトリン欠損症 (CD) はSLC25A13遺伝子の変異に起因し、新生児肝内胆汁鬱滞 (NICCD) や成人発症2型シトルリン血症 (CTLN2) の原因となり、高アンモニア血症による精神神経症状が出現すると重篤となり死に至る患者もいる。また脳症発現前から脂肪肝や脂肪性肝炎を合併することが報告されているが、その臨床像は未だ明らかではない。当科において非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) と診断したが、10年後に高アンモニア血症を認めCTLN2と診断された患者を経験した。本研究ではシトリン欠損症に伴う脂肪性肝疾患の特徴を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】1979~2007年に当院へ入院した19名のCD患者 (男性11名、女性9名) を対象とし、身長・体重などの理学所見、偏食傾向・膵炎などの既往歴、血液生化学検査所見を解析した。また、肝組織の得られた14名については組織学的所見も解析対象とした。比較対照群としてSLC25A13遺伝子変異の無いNAFLD患者25名を選び比較検討した。

【結果】CD患者19名中16名 (84%) が脂肪肝を有しており、その内4名が精神神経症状発症以前より脂肪肝を指摘されていた。またNICCDの既往は1例で認め、膵炎の既往も4例で認めた。豆類の嗜好を代表とする偏食傾向を12名に認め、血液生化学検査では16名に肝機能障害、6名に高中性脂肪血症をそれぞれ認めた。脂肪肝と診断された16名中14名では組織学的にも脂肪肝の所見を認め、その内1名は脂肪性肝炎であった。CDに合併した脂肪肝ではSLC25A13遺伝子変異のないNAFLD患者と比較し、肥満 (0 vs 72%,  $P < 0.001$ ) やメタボリック症候群 (0 vs 36%,  $P < 0.001$ ) の頻度は低く、膵炎の既往の頻度 (13 vs 0%,  $P = 0.002$ ) や血清pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) 値 (74 vs 10 ng/mL,  $P < 0.001$ ) が高かった。Receiver operating characteristic curve解析により、Body mass index  $< 20 \text{ kg/m}^2$ , PSTI  $> 29 \text{ ng/ml}$  をcut-off値として用いるとCDに関連する

脂肪肝を鑑別することが可能であった。

【結論】肥満やメタボリック症候群に関連しない非典型的な NAFLD を呈する患者では CD の可能性を考慮する必要がある。また偏食の傾向や既往歴の聴取は CD を診断する上で一助となる。CD による脂肪肝の鑑別には血清 PSTI・BMI が有用である可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

シトリン欠損症 (CD) は SLC25A13 遺伝子変異により aspartate-glutamate carrier (AGC=Citrin) の欠損を生じ、成人発症 2 型シトルリン血症 (CTLN2) の原因となる。その経過の中で脂肪肝や脂肪性肝炎を合併することが報告されているが臨床像は未だ不明な点が多い。また一見健康に過ごしていても、何らかのきっかけで高アンモニア血症による精神神経症状を発症し死に至る場合もあり、临床上注意が必要な疾患である。本研究では CD に伴う肝病変の臨床的特徴を明らかにし、また精神神経症状発現前の患者を非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) より抽出するために有用なパラメーターを検討した。

当院へ入院した 19 名の CD 患者を対象とし、その理学所見、既往歴、血液生化学検査所見、肝組織所見を解析した。また、SLC25A13 遺伝子変異の無い NAFLD 患者 25 名を比較対照とした。

1. CD 患者には高頻度に脂肪肝を認め、精神神経症状の発現前から脂肪肝を合併している可能性が示唆された。
2. CD 患者に合併する NAFLD の特徴としては、肥満やメタボリック症候群の合併が少ないこと、偏食傾向・膵炎の既往を高頻度に認めること、血清 pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) の上昇が挙げられる。
3. Receiver operating characteristic curve 解析により、Body mass index < 20 kg/m<sup>2</sup>, PSTI > 29 ng/ml を cut-off 値として用いると CD に関連する脂肪肝を鑑別することが可能であった。

今回の研究では CD に合併する NAFLD の臨床的特徴を明らかにすることで、精神神経症状発現前の CD 患者の診断に血清 PSTI・BMI が有用である可能性が示唆された。本研究の成果は未だ不明な点の多い CTLN2 の臨床像に注目し、脂肪肝疾患との関連を明らかにした点で極めて意義のあるものである。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。よって主査、副査は一致して本

論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Therapeutic outcomes of cyclic VAD therapy in primary systemic AL amyloidosis patients (原発性全身性 AL アミロイドーシス患者における VAD 反復療法の治療効果)

田澤浩一

(論文の内容の要旨)

【目的】

原発性全身性 AL アミロイドーシスに対しては、plasma cell dyscrasia を標的として、末梢血幹細胞移植を併用した大量メルファラン療法をはじめとした強力な化学療法の有用性が報告されている。今回我々は、VAD 反復療法 (vincristine, doxorubicin, dexamethasone) の有効性について前向きに検討した。

【対象と方法】

対象は、当院で原発性全身性 AL アミロイドーシスと診断され、末梢血幹細胞移植を併用した大量メルファラン療法の適応外と考えられた 8 例 (男性 4 名、女性 4 名、平均年齢 60.4 歳)。何れも plasma cell dyscrasia に対する治療歴はない。全例 2 臓器以上でアミロイドの沈着を確認し、生検組織における特異抗体を用いた免疫染色で AL 型アミロイドと同定した。多発性骨髄腫は International Myeloma Working Group の基準に従って除外した。治療法 (VAD 療法) は、vincristine 0.4 mg/day, doxorubicin 9 mg/m<sup>2</sup>/day を day1-4 に、dexamethasone 40 mg/day を day1-4, day9-12, day17-20 に各々静注した。これらを 4 週毎に血清・尿中の M 蛋白が陰性化するまで繰り返した。重篤な副作用が生じた場合には、M 蛋白が陰性化する前に中止した。完全寛解に至った場合、以後は interferon  $\alpha$  3MIU/week で後療法を行った。

治療前後で performance status, 尿蛋白量, 血清アルブミン, 尿素窒素, 血清クレアチニン, 24 時間クレアチニンクリアランス, 血清 free light chain (FLC), 血清と尿の免疫固定法, 血清 BNP, 心エコー, 骨髄中異常形質細胞を検討した。血液学的完全寛解は、免疫固定法で血清・尿中の M 蛋白がいずれも陰性化することと定義した。

【結果】

治療前には全 8 症例で血清ないし尿中から M 蛋白が検出され、7 例で血清 FLC $\kappa$ / $\lambda$  比は異常値を呈し、かつ骨髄中異常形質細胞の増殖が認められた。8 例中

7例はネフローゼ症候群を呈しており、そのうち1例は心アミロイドを主症状としていた。8例中3例でVADを2ないし3クール施行後に、1例では1クールのみで血液学的完全寛解に至った。これら4例中3例はinterferonによる後療法を施行したが、残りの1例は患者がの希望により行わなかった。4例ともM蛋白の消失と同時に、血清FLC $\kappa/\lambda$ 比が正常化した。VAD終了後4年で全例生存し再発はない。このうち3例では尿蛋白・BNPが改善した。

完全寛解に至らなかった残りの4例では、治療中に脳症やステロイドによる著明な体液貯留などの重篤な副作用を来したため、寛解に至る前に治療を中断せざるを得なかった。これらの症例では、50%生存期間は $7.0 \pm 2.0$ カ月であった。

#### 【考察】

原発性全身性ALアミロイドーシスは、骨髄中の異常形質細胞から産生された免疫グロブリン軽鎖をアミロイド前駆蛋白として、腎臓・心臓・消化管など全身臓器にアミロイドが沈着する予後不良疾患である。治療は、骨髄中の異常形質細胞を標的とした様々な治療薬が試され、自己末梢血幹細胞移植を併用した大量メルファラン療法が現在では最も有効であるとされているが、治療に関連した有害事象も多いため、適応症例は限られる。VAD療法も本疾患において、アミロイド前駆蛋白産生抑制や臓器障害の進行抑制において有効性が期待され、また、移植前の導入療法としても用いられている。本研究では、複数回のVAD単独療法を行うことで、50%の症例で長期間にわたって完全寛解を維持することができ、腎機能や心機能の指標である血清BNPに改善が認められた。しかし、interferon療法の完全寛解維持への寄与は不明であった。VAD療法単独で良好な治療効果を得られた要因の一つとして、多発性骨髄腫に比べALアミロイドーシスでは異常形質細胞数が少ないことが寄与している可能性が考えられた。

一方、副作用としては、腎機能障害と心機能障害を伴う6例でdexamethasoneによる体液貯留作用が認められた。本疾患ではしばしば、腎臓や心臓などの臓器に潜在性にアミロイドが沈着していることもあり、体液負荷がかかるVAD療法では、特に低アルブミン血症や心機能障害などを合併している場合、厳重な水分管理が必要である。

本研究の結果から、自己末梢血幹細胞移植を併用した大量メルファラン療法の適応外と考えられる症例で

も、VAD反復療法は良好な治療効果が期待され、選択肢の一つとして考慮すべき治療法の一つであると考えられた。但し、臓器障害が進行した症例ではVAD療法であってもリスクが高く、適応の決定にあたっては十分な注意が必要である。

#### (論文審査の結果の要旨)

原発性全身性ALアミロイドーシスの治療では、自己末梢血幹細胞移植を併用した大量メルファラン療法などの化学療法の有用性が報告されている。しかし、臓器障害が進行すると副作用のため治療の適応とならない症例も少なくない。本研究では、自己末梢血幹細胞移植を併用した大量メルファラン療法の適応とならない症例について、これに次ぐ治療であるVAD単独療法の有用性を検討した。対象は、自己末梢血幹細胞移植を併用した大量メルファラン療法の適応外であるが、VAD療法は可能であると考えられた8例である。VAD療法は、vincristine 0.4 mg/day, doxorubicin 9 mg/m<sup>2</sup>/dayをday1-4に、dexamethasone 40 mg/dayをday1-4, day9-12, day17-20に各々静注し、完全寛解に至るまで繰り返し施行した。完全寛解後はinterferon  $\alpha$  3MIU/weekで後療法を施行した。治療前後でperformance status, 腎機能各種検査, 血清free light chain (FLC), 血清・尿の免疫固定法, 血清BNP, 心エコー, 骨髄所見を検討した。

その結果、田澤は次の結果を得た。

1. VAD療法により、8例中4例(50%)で血液学的完全寛解に至り、その後4年の経過で全例が生存しており再発はない。
2. 寛解に至った4例中3例はinterferonによる後療法を施行したが本療法の効果は不明であった。
3. 完全寛解に至らなかった4例では、重篤な副作用を来したため、治療を中断せざるを得なく、50%生存期間は $7.0 \pm 2.0$ カ月であった。

これらの結果より、原発性全身性ALアミロイドーシスの治療において、自己末梢血幹細胞移植を併用した大量メルファラン療法の適応外と考えられる症例では、VAD療法は治療選択肢の一つとして考慮すべきであると考えられた。VAD療法単独で良好な治療効果を得られた要因として、ALアミロイドーシスでは標的細胞である異常形質細胞数が少ないことが考えられた。ただし、臓器障害が進行した症例では副作用として高度の体液貯留がみられ、厳重な水分管理が必要と考えられた。よって、主査・副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Existence of an IgG component of naturally occurring HLA class I antibodies that are not directed against self-antigens in human serum (ヒト血清中に存在する非自己抗原に対するIgG型HLAクラスI自然抗体)

周 博

(論文の内容の要旨)

[Introduction] SLE occurs predominantly in young women, particularly in females of child-bearing age. Accumulating data have demonstrated that specific HLA haplotypes are implicated as a key genetic element in the susceptibility to SLE. We speculated on a possible role for antibodies against HLA antigens in the development of SLE. We therefore compared the frequency of IgG type of HLA class I antibodies between SLE patients and healthy controls, using a highly sensitive FlowPRA method for the detection and definition of the antibodies.

[Materials and Methods] Peripheral blood samples were harvested after obtaining fully informed consent from 47 patients with SLE [31 female patients (mean age: 34, range: 11 to 69 years); 16 male patients (31, 9 to 81 years)], and 149 healthy volunteers [19 healthy females (31, 22 to 53 years); 130 healthy control males (35, 20 to 54 years)]. HLA-A, -B, and -Cw loci were determined with DNA-based typing. For the HLA class I antibody screening test, we used a panel of FlowPRA beads, which are microparticles (2 to 4  $\mu\text{m}$  in diameter) coated with purified HLA class I molecules (FlowPRA, code FL1-30, One Lambda Inc.). We used the FlowPRA single-antigen class I HLA antibody detection test (FlowPRA, code FL1HD) to identify the specificity of HLA antibodies in serum samples. For samples with high nonspecific binding, Adsorb Out™ beads were used.

[Result] Sixteen of 130 normal healthy males and two of 10 normal females without a history of pregnancy (none had ever been transfused) possessed HLA class I antibodies. In SLE, male, but not female patients, showed a significant increase in the

frequency of the antibodies, as compared with the corresponding controls. However, the antibodies did not appear to be involved in the development of SLE because of no substantial relationship to the incidence of cytopenia or SLE disease activity index score. Each individual had 1 to 31 types of HLA class I antibodies. Interestingly, HLA class I antibodies did not correspond to the individual's own HLA antigens. Eight of 32 types of HLA class I antigens detected were rare in the Japanese population: HLA-A23, -A25, -A34, -B8, -B18, -B45, -B49, and -B57.

[Discussion & Conclusion] There are several possibilities for the production of HLA class I antibodies. (1) Feto-maternal immunization. In our results of family analysis, the son carried 4 types of HLA antibodies that did not correspond to the antigens of the mother. (2) Antibody response arising through sexual contact. Eight types of HLA class I antigens to which serum samples responded were rare in the Japanese population. (3) Autoantibodies. HLA class I antibodies did not correspond to the individual's own HLA antigens. These results suggest that an IgG component of naturally occurring HLA class I antibodies exists in human serum and that these antibodies are not antibodies against self-antigens. Scofield et al. demonstrated that HLA-B27 shares short amino acid sequences with proteins from enteric bacteria. In addition, segment 807-816 of the EB virus glycoprotein gp110 has been shown to contain a six-amino acid stretch (EQKRAA) that perfectly matches HLA Dw4. Therefore, it is likely the antibodies are generated as a result of an immune response to environmental agents such as bacteria and viruses, which are antigenetically identical with or similar to HLA antigens. These antibodies may be an important part of the first line of defense against hematological spreading infections.

(論文審査の結果の要旨)

SLEは若い妊娠可能年齢の女性に好発する自己免疫疾患である。症状としては、発熱、多関節痛など多彩で、白血球・リンパ球減少、血小板減少が15%から45%の患者で認められている。リンパ球減少の原因の1つとして、抗SSA-Ro抗体、抗RNP抗体及

び抗 dsDNA 抗体が細胞周期を阻害したり、細胞中に侵入して apoptosis を起こすことが報告されている。近年、特異的な HLA ハプロタイプが本症の疾患感受性に重要であると報告されている。輸血や妊娠などにより産生される HLA クラス I 抗体は、血小板輸血不応の原因としても重要である。本研究では、SLE の発症における HLA 抗体の関与について検討した。

高感度の FlowPRA 法を用いて、SLE 患者と健常対照者の中で IgG タイプの HLA クラス I 抗体の頻度を比較した。HLA クラス I タイピングを Luminex LABScreening, PCR-SSOP 法により、抗体スクリーニングを FlowPRA Screening Test, 抗体の同定を FlowPRA Single 法により実施した。

その結果、周 博は次の結論を得た。

- 1) 女性の SLE 患者 31 名のうち 11 名 (35.5%) と男性患者 16 名中 6 名 (37.5%) が HLA クラス I 抗体陽性であった。一方、正常対照女性では、妊娠歴を持つ 9 名のうち 4 名と、妊娠歴も輸血歴も持たない 10 名のうち 2 名が HLA クラス I 抗体を保有していた。興味深いことに、130 名の健常男性の中で 16 名 (12.3%) が HLA クラス I 抗体陽性であった。
- 2) 統計学的には、男性の SLE 患者における抗体保有率は男性の正常対照よりも明らかに高かったが、女性の SLE 患者と女性の正常対照との間には有意差は認められなかった。17 名の無治療の SLE 患者において、抗体保有と血球減少あるいは SLE の疾患活動スコアとの間には関連はみられなかった。また、HLA クラス I 抗体は免疫抑制療法後の血清中にも認められた。これらのことから、HLA クラス I 抗体は SLE の発症には関与していないと思われる。
- 3) HLA クラス I 抗体保有者は、1 から 31 種類の抗体を持っていた。これらの HLA クラス I 抗体は抗体保有者自身の HLA 抗原には対応していなかった。また、HLA A23, A25 などの 8 種類の HLA クラス I 抗原は日本人にはまれなものであった。
- 4) ファミリー分析では、息子は母親の HLA クラス I 抗原とは無関係の 4 種類の HLA 抗原に対する抗体を持っていた。

これらの結果から、母児間免疫反応、性的接触を介した反応、あるいは自己免疫反応として HLA クラス I 抗体が産生されたとは考えにくかった。腸内細菌のタンパクの一部は HLA-B27 と、EB ウイルス糖蛋白の一部は HLADw4 とアミノ酸配列が完全一致してい

ることから、HLA クラス I 抗体は細菌やウイルスなどの環境因子に対する免疫応答の結果である可能性が考えられた。これらの抗体は、血液伝播性の感染症に対する防御の第 1 線として重要な役割を演じていることが示唆された。

このように、正常ヒト血清中に IgG タイプの HLA クラス I 抗体が自然抗体として存在を明らかにしたことは重要な知見と思われ、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Development of Analysis Procedures for the Simple Visualization of Hospitals' Market Share, Using Hospital Income Calculated by means of the Diagnosis Procedure Combination (DPC) Payment System (DPC から集計した病院収入データを用いた病院マーケットシェア分析の単純化・可視化手法の開発)

瀬戸山 友一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】新たな診療報酬制度である DPC 制度が日本の国立大学病院において平成 15 年から開始されたことにより、この DPC データを中心に病院情報システムに保存されたデータを活用し、病院収益の分析を効果的に行える環境が整ってきた。これまで報告されてきた分析内容は、自院の収益分析を中心に行われてきた。しかし、病院運営の意思決定において、自院の状況だけでなく、マーケティング的な視点から、地域医療圏の中の位置付けや他施設との比較が必要と考えられる。こうしたなかで、DPC データに記録されている ICD-10 コード (国際疾病分類コード) を利用することで、厚生労働省の公的統計資料である「患者調査」と関係づけることが可能であり、疾患ごとの患者シェア (自院患者数/地域の総患者数) が容易に算出できることに注目した。

今回、これらの病院情報システムのデータを用いて、病院のマーケティング分析を実施可能とすることを目的に、地域医療圏における患者シェア分析について病院の状況を容易に推定できる単純な可視化手法の開発を行った。

【方法】可視化の手段として、(1) 患者シェアマップ、及び (2) 患者ポートフォリオ・マネジメント (PtPM) 図を開発した。PtPM 図は、ボストン・コンサルティ

ング・グループ (BSG) が提唱し、産業界でポピュラーな手法であるプロダクト・ポートフォリオ・マネジメント (PPM) 図のテクニックを基に、病院市場への導入を試みたものである。これら手法について、信州大学医学部附属病院の2004年4月から2005年9月までの13,187人の入院患者データを適用し、その有用性を評価した。

【結果】患者シェア算出により、信州大学医学部附属病院の患者シェアが松本医療圏で12.9%、長野県内(三次医療圏)で3.9%であることがわかった。これを患者シェアマップ及びPtPM図化することにより、西に高く東に低い患者偏在(高速道路の影響が示唆される)や長野県全体をカバーしていない実際の診療圏が明らかとなるとともに、がん診療によって安定的に収益を獲得する大学病院としての特徴や、資源投入の可否判断が求められる疾患群(循環器系疾患等)が明らかとなった。

【結論】患者シェアマップにより、一目で自院の患者状況の把握が可能であり、なおかつ、PtPM図を確認することにより、診療の特徴を把握し、病院資源をどの分野に投入するかを効果的に判断できた。このように、患者シェアマップとPtPM図の組み合わせによって患者シェアを表現することにより、効果的な分析ができることを示した。また、これらの可視化は、病院環境変化に対する病院の迅速な意思決定に有用な資料として利用できる可能性を示した。

#### (論文審査の結果の要旨)

新たな診療報酬制度であるDPC制度が日本の国立大学病院において平成15年から開始されたことにより、記録されたDPCデータを中心に病院情報システムに保存されたデータを活用し、病院の経営分析を効果的に行える環境が整ってきた。経営分析においては、自施設内部の詳細な分析だけでなく、マーケティングの視点から地域医療圏の中で患者の動態や自施設の特徴を明らかとすることが重要と考えられる。本制度が設計された当初から、DPCデータは病院のマーケティング分析に活用されるようになることが予見されていたが、これまでの報告は自施設内部の経営分析に限られており、他施設との比較や医療マーケティングに関するものは見当たらない。そこで、瀬戸山は、病院に蓄積されたDPCデータが、病院のマーケティング分析に有効活用できるかどうかを検討した。

瀬戸山は、DPCデータに記録されるICD-10コード(国際疾病分類コード)をKeyとすることで、厚生労

働省の公的統計資料である「患者調査」と関係づけられることに注目し、(1)患者シェアを算出、(2)情報を加工し、病院のマーケティング課題を容易に把握可能な表現手法を開発、(3)開発した表現手法を信州大学医学部附属病院(以下、信州大学病院)のDPCデータ(13,187人の入院患者)に適用し、有用性を評価した。

その結果、瀬戸山は以下の結果を得た。

1. 分析手法として「患者シェアマップ」及び「患者ポートフォリオ・マネジメント (PtPM) 図」を導き出した。
2. 開発した分析手法をもって、信州大学病院の患者シェアの状況を明らかとした。
3. 信州大学病院の入院患者の地理的・物理的位置条件による患者動態を可視化し、説明可能とした。
4. 信州大学病院の地域別・疾患別の実際の診療圏を可視化し、説明可能とした。
5. 信州大学病院の疾患別の収益性や診療の特長を可視化し、説明可能とした。

以上の結果より、提示された「患者シェアマップ」及び「患者ポートフォリオ・マネジメント (PtPM) 図」という二つの分析手法の組み合わせにより、地域における患者の状況、診療圏の設定、シェア算出、自院診療の特長の把握など、病院のマーケティング分析で要求される多くの内容が提供され、DPCデータの活用が病院マーケティング分析に有効であることが確認された。さらに、情報の可視化がされたことにより、直感的に診療サービスや地域患者の動態を把握が可能であり、病院経営上、より迅速な意思決定に役立つと考えられた。このようなマーケティング分析手法の開発はDPC制度においては本研究が初めての試みである。また、これらの理論と手法を活用して他の医療機関や地域医療へ展開することにより、地域医療全体の向上に寄与する可能性を示唆するものであり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。



Motor neurons essential for normal sciatic function in neonatally nerve-injured rats (正常な運動機能維持に必要な最小運動ニューロン数の決定—新生児ラット坐骨神経における研究—)

掛川 晃

(論文の内容の要旨)

【目的】

新生児期の坐骨神経に損傷を加えると運動ニューロンは細胞死をおこす。出生直後のラットの坐骨神経に程度の異なる圧迫損傷 (Crush injury) を加え、成熟期まで生存させ、正常な運動機能維持に最低限必要な運動ニューロン数を決定することを目的として本研究を行った。

【方法】

生後1日のWistar系ラットを用いて、坐骨神経に程度の異なるCrush injuryを加えた坐骨神経損傷モデルラットを作成した。坐骨神経の運動機能評価は、Footprintを採取し、SSI (Static Sciatic Index) 法を用いて評価した。運動ニューロンの計測は、神経軸索輸送能を利用し、逆行性神経トレーサー (BDA-3000) で標識されたBDA (+) 運動ニューロンを計測して行った。8週間経過後、神経トレーサーを総腓骨神経に48時間浸潤させ、その後還流固定を行い、脊髄を採取し、厚さ50 μmの凍結切片を作成し、ABC-DABにて反応し、細胞核を有するBDA (+) 運動ニューロンを計測した。

【結果】

Control群のSSIは-20以上であった。Crush群は、SSIが-20以上の機能正常群、SSIが-20~-60の機能障害群、SSIが-60以下の高度機能障害群に分類された。Control群の運動ニューロン数は、385~571 (平均442) であった。Crush群の機能正常群は74~383、機能障害群は14~61、高度機能障害群は0~32であった。なお、神経切断群は、0~8であった。Control群の平均値を100%とすると、Crush群の機能正常群は17~87%、機能障害群は3~14%、高度障害群は0~7%、神経切断群は0~2%であった。

【結論】

新生児期の坐骨神経損傷においては、運動ニューロンが約15%以上存在すれば、運動機能は正常に維持されるものと結論された。非常に少ない運動ニューロ

ン数で正常機能が維持されており、新生児期の坐骨神経運動ニューロンの高い神経可塑性を示しているものと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

神経損傷後の運動機能回復については、生存する運動ニューロン数や損傷時の神経の成熟度により異なる。本研究で掛川は、生後1日目のラットの坐骨神経に程度の異なる損傷を加え、8週間経過後の坐骨神経運動機能と生存する運動ニューロン数について検討し、正常運動機能を維持するための最小限のニューロン数を求めることを目的とした。坐骨神経の機能評価は、Footprintを採取しStatic Sciatic Index (SSI) を用い算出した。運動ニューロン数の計測は、軸索の逆行輸送能を利用し坐骨神経の分枝である総腓骨神経に神経トレーサー (BDA-3000) を投与し脊髄まで運ばれた運動ニューロンをカウントした。

その結果、掛川は以下の結果を得た。

- (1) Control群のSSIは-5.49~-17.66であり、神経損傷群は、-5.21~-100.00であった。また、神経切断群は-88.63~-100.00と高度機能障害を呈した。これらのことからSSI: -20.00以上が運動機能正常、SSI: -20.00未満が機能障害であることが確認された。
- (2) 神経トレーサーで標識された運動ニューロン数は、Control群では385~571 (平均442) であることが分かり、正常であっても神経細胞数に個体差があることが確認された。
- (3) 神経損傷ラットのうち、機能正常群の運動ニューロン数は74~383、機能障害群の運動ニューロン数は14~61、高度機能障害群の運動ニューロン数は0~32であった。

Control群の運動ニューロン数の平均442 (100%) に比べ、機能障害群で最も多かったものは61 (13.8%) であった。また、運動機能正常で最も少なかったものは74 (17.5%) であった。

従って、正常機能を維持する為に必要最小限の運動ニューロン数は正常の約15%程度だという事が確認された。

以上より、生後間もないラットにおいて神経損傷後に正常機能を維持するための運動ニューロンの必要最小限数が明らかにされた。これまでに坐骨神経を用いた同様の研究はなく、生物学的にも臨床医学的にも意義があるものと考えられ、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PG-M (乳腺腫瘍におけるヒアルロン酸の過剰産生は間質細胞を動員して血管新生を促進する：バーシカンの関与を含めて)

小 山 洋

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】ヒアルロン酸 (HA) は生体に広く分布する主要な細胞外マトリックス成分として、組織の構造維持に重要な役割を果たしている。一方、癌細胞周囲に形成される HA 糖鎖に富んだ細胞外マトリックスは、癌化に伴ってその形成が増大し、癌の未分化度やリンパ節転移率と密接な相関をもつことが示されている。そこで、癌における HA 産生と癌進展との関係解明を進めることが、新たな治療戦略の糸口となりうると考え、乳腺上皮及び乳腺腫瘍で HA を過剰産生するトランスジェニックマウスを樹立し、癌進展における HA の影響を検討した。

【方法と結果】癌の発生と進展における HA 細胞外マトリックスの役割を解明する為に、乳腺上皮及び乳腺腫瘍においてヒアルロン酸合成酵素 2 (Has2) を強発現するトランスジェニックマウス (Has2<sup>dNeo</sup>) を作製した。Has2<sup>dNeo</sup>に発生した乳癌では、Has2の発現と腫瘍内 HA 量ともに対照群 (Has2<sup>+Neo</sup>) よりも著明に上昇した。Has2<sup>dNeo</sup>では、Has2<sup>+Neo</sup>に比べ癌発生までの期間が短く、急速な腫瘍増大を認めた。病理組織学的解析の結果、Has2<sup>dNeo</sup>腫瘍では細胞間結合の弱い腫瘍細胞からなる低分化型腺癌の像を示し、Has2<sup>+Neo</sup>腫瘍に比べ著明な腫瘍間質の形成を認めた。血管内皮特異的な CD31について免疫染色により解析したところ、Has2<sup>+Neo</sup>腫瘍組織では比較的大きな血管が散見されたのに対し、Has2<sup>dNeo</sup>では微小な血管が多数認められた。Real time 定量 RT-PCR 法により、腫瘍での血管新生因子の発現を検討した結果、代表的な血管新生因子である VEGF-A とその転写因子 HIF-1 $\alpha$  の発現は、Has2<sup>dNeo</sup>と Has2<sup>+Neo</sup>において転写レベルで有為な差を認めなかった。これに対して、間質由来の血管新生因子である bFGF 及び SDF-1 $\alpha$ /CXCL12の発現は、Has2<sup>dNeo</sup>腫瘍組織では HAS2<sup>+Neo</sup>に比べて転写レベルで約 2 倍亢進していた。以上の結

果は、HA の過剰産生が腫瘍間質の形成を伴って血管新生の促進に働くことを示唆している。そこで次に、Has2<sup>dNeo</sup>腫瘍内で血管新生に働く HA の分子種を特定するため、マトリゲルに bFGF と様々な分子種の HA を添加してマウス皮下に移植し、マトリゲル内ヘモグロビン含有量を指標に血管新生の程度を評価した (マトリゲルプラグアッセイ)。鶏冠由来の高分子 HA を添加しても血管新生の促進は認められなかったが、低分子の HA オリゴ糖を低濃度で添加した場合には、以前の報告にある様に bFGF 単独に比べて顕著に血管新生を亢進した。また、臍帯由来の HA を用いた場合には、高分子であっても濃度依存的に血管新生が促進されることが今回新たに分かった。ヒトバーシカン抗体を用いたドットプロット分析から、用いた臍帯由来の HA 標品中にヒアルロン酸結合性プロテオグリカンであるバーシカンが混入していることが判明し、血管新生の促進に HA とバーシカンが協調的に作用した可能性が考えられた。そこで、マトリゲルプラグアッセイにより HA-バーシカン複合体の血管新生作用を検討したところ、複合体が筋線維芽細胞と CD31 陽性細胞のマトリゲル内への動員を促進することを明らかにした。実際に、Has2<sup>dNeo</sup>及び Has2<sup>+Neo</sup>の腫瘍抽出液を HA プローブ及びバーシカン抗体を用いてドットプロット分析を施行したところ、Has2<sup>dNeo</sup>では HA の過剰産生と一致して Has2<sup>+Neo</sup>に比べ約 6 倍高いバーシカンの集積を認めた。また、HA プローブ及びバーシカン抗体の二重染色を施行した結果、Has2<sup>dNeo</sup>腫瘍では HA リッチマトリックスにバーシカンの共局在を明らかにした。

【考察】乳癌におけるヒアルロン酸の過剰産生が、腫瘍間質の形成を強力に惹起し、それに関連して腫瘍血管の新生に働くことを明らかとなった。そして、腫瘍内への間質細胞や血管内皮細胞の動員に、HA とその結合分子のバーシカンが細胞外マトリックスとして共同して働くことが示唆された。今後は腫瘍間質の形成機構と腫瘍間質が血管形成に働く分子機構の解明を進める計画である。今回示した血管新生機構の更なる解明が新たな治療戦略の開発に繋がり、また、HA 過剰産生乳癌発症マウスがヒト進行性乳癌の病態を反映した動物モデルとして、新たな発見をもたらしてくれることを期待している。

(論文審査の結果の要旨)

ヒアルロン酸 (HA) は生体に広く分布する主要な細胞外マトリックス成分として、組織の構造維持に重

要な役割を果たしている。一方、癌細胞周囲に形成される HA 糖鎖に富んだ細胞外マトリックスは、癌化に伴ってその形成が増大し、癌の未分化度やリンパ節転移率と密接な相関をもつことが示されている。そこで、癌における HA 産生と癌進展との関係解明を進めることが、新たな治療戦略の糸口となりうると考え、本研究において我々は、乳腺上皮及び乳腺腫瘍で HA を過剰産生するトランスジェニックマウス (Has2<sup>dNeo</sup>) を樹立し、癌進展における HA の影響を検討した。また、マトリゲルプラグアッセイを用い、血管新生に働く HA 分子種の同定及び HA-バーシカン複合体の血管新生作用を検討した。

その結果、小山は次の結論を得た。

1. Has2<sup>dNeo</sup>では Has2<sup>+Neo</sup>コントロール群に比べ、腫瘍発生までの期間が短く、急速な増大を認めた。
2. Has2<sup>dNeo</sup>腫瘍では細胞間結合の弱い腫瘍細胞からなる低分化型腺癌の像を示し、Has2<sup>+Neo</sup>腫瘍に比べ著明な腫瘍間質の形成を認めた。また、Has2<sup>dNeo</sup>の腫瘍では腫瘍細胞の境界部と間質に HA の蓄積が認められた。
3. Has2<sup>+Neo</sup>腫瘍では比較的大きな血管が散見されたのに対し、Has2<sup>dNeo</sup>では微小な血管が多数認められた。また、間質由来の血管新生因子である bFGF 及び SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 の発現は、Has2<sup>dNeo</sup>腫瘍組織では Has2<sup>+Neo</sup>に比べ転写レベルで約 2 倍亢進していた。
4. HA-バーシカン複合体による筋線維芽細胞と CD31陽性細胞のマトリゲル内への動員の促進が認められた。
5. ドットプロット分析にて、Has2<sup>dNeo</sup>では HA の過剰産生と一致して Has2<sup>+Neo</sup>に比べ約 6 倍高いバーシカンの集積を認めた。また、Has2<sup>dNeo</sup>組織では HA リッチマトリックスにバーシカンの共局在が明らかとなった。

今回の実験より、乳癌における HA の過剰産生が、腫瘍間質の形成を強力に惹起し、それに関連して腫瘍血管の新生に働くことを明らかとなった。そして、腫瘍内への間質細胞や血管内皮細胞の動員に、HA とその結合分子のバーシカンが細胞外マトリックスとして共同して働くことが示唆された。

以上のことから、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Critical role of bone marrow apoptosis-associated speck-like protein, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice (マウス血管傷害後の新生内膜形成における、骨髄由来のインフラマゾームアダプター分子であるアポトーシス関連スペック様カード蛋白質の重要な役割)

矢 嶋 紀 幸

(論文の内容の要旨)

動脈硬化性病変や、冠動脈ステント留置術など冠動脈形成術後の再狭窄における病理学的機序は、血管内皮傷害後の炎症性反応によって生じる新生内膜形成によると考えられているが、その詳細な機序はよくわかっていない。

インターロイキン (IL) -1 $\beta$  や IL-18 といった炎症性サイトカインは、動脈硬化や再狭窄の進展といった、生体内の広範な免疫応答や炎症反応などを制御しているが、活性型の IL-1 $\beta$  と IL-18 の産生には、インターロイキン変換酵素として知られるカスパーズ-1 による、その前駆体のプロセッシングが必要であり、最近の研究では、カスパーズ-1 は、インフラマゾームと名付けられたアダプター分子の多量体において活性化されていることが報告されている。

アポトーシス関連スペック様カード蛋白質 (ASC) は、1999年に信州大学で発見されたアダプター分子であり、インフラマゾームの構成分子のひとつである。ASC は、その C 末にカスパーズやアポトーシス・シグナル経路の調節蛋白質に存在する結合モチーフである caspase-recruitment domain (CARD) が、N 末には、遺伝性の炎症疾患である家族性地中海熱の原因遺伝子産物である pyrin の N 末領域と高い相同性を示す pyrin-like domain (PYD) が存在している。CARD や PYD は同種結合活性をもつ結合ドメインであり、ASC は CARD と PYD から構成されるシグナル伝達経路の仲介者としての役割を担っている。さらに、ASC は同じ CARD を持つカスパーズ-1 のリクルートメントと活性化を制御しているため、カスパーズ-1 を介した IL-1 $\beta$  と IL-18 の活性化を制御することで、炎症やアポトーシスに関わっていると考えられている。

血管傷害における ASC の役割については解明され

ておらず、本研究では、ASC 遺伝子欠失マウスを用いて、血管傷害後に生じる新生内膜形成における ASC の関与を詳細に検討した。

ASC は正常血管において内皮細胞で発現しており、炎症や細胞死で発現が誘導されることが知られている。マウス大腿動脈にワイヤー傷害を加え、1週間後と3週間後の傷害血管における ASC の顕著な発現を、免疫組織学的手法を用いて確認した。ワイヤー傷害後の新生内膜形成は、ASC 遺伝子欠失マウスで野生型マウスに比べて有意に減弱していた ( $P < 0.01$ )。野生型マウスの新生内膜病変では、IL-1 $\beta$  と IL-18 が発現していたが、ASC 遺伝子欠失マウスでは発現が低下していた。アポトーシスの関与を検討するため、傷害2時間後の野生型マウスと ASC 遺伝子欠失マウスの血管壁で TUNEL 陽性細胞の数を比較したところ差がなかった。新生内膜形成への影響を、野生型と ASC 遺伝子欠失マウスの傷害1週間後の再内皮化と、傷害3週間後の血管平滑筋細胞数とマクロファージ数で比較したが差はなかった。

骨髄細胞由来細胞の関与を検討するため、放射線照射したマウスに、予め採取した他の骨髄細胞を移植することで、野生型から野生型、野生型から ASC 遺伝子欠失マウス、ASC 遺伝子欠失マウスから野生型マウスの三種類の骨髄置換マウスを作製した。それぞれにおいてワイヤー傷害3週間後の新生内膜形成を比較したところ、ASC 遺伝子欠失マウスの骨髄細胞を野生型マウスに移植したマウスで、内膜形成の有意な減少を認めた ( $P < 0.05$ )。

ASC を発現している骨髄由来細胞の種類を検討するため、末梢血単核球をフローサイトメトリーで検証したところ、ASC は T 細胞、単核球、顆粒球で発現していた。

血管傷害後の新生内膜病変は、増殖した血管平滑筋細胞で構成されている。mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーは、細胞外からの刺激を核内の転写機構制御にまで変換、伝達するリン酸化酵素群であり、血管平滑筋細胞の増殖において中心的な役割を演ずる重要な酵素である。野生型マウス及び ASC 遺伝子欠失マウス培養血管平滑筋細胞における、血清と成長因子の刺激による extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 と p38 MAPK (p38) 活性化の影響を、ウェスタンブロット法を用いて検討した。ウシ胎児血清と血小板由来増殖因子 BB アイソフォーム (PDGF-BB) によって、野生型マウスと

ASC 遺伝子欠失マウス由来の血管平滑筋細胞の双方で、同様に ERK1/2 と p38 の顕著なリン酸化を認めた。

BrdU 取り込み分析を用いて、ASC 遺伝子欠失マウス培養血管平滑筋細胞の増殖能を検討したところ、野生型と ASC 遺伝子欠失培養血管平滑筋細胞で PDGF-BB の刺激による活性の差はなかった。また、IL-1 $\beta$  と IL-18 の刺激では、増殖能の亢進を認めなかった。核内増殖抗原 (PCNA) の免疫組織染色では、ASC 遺伝子欠失マウスの新生内膜病変においては、PCNA 陽性細胞数の減少を認めた。

以上の結果から、ASC は傷害血管で著しく発現していること、ASC の欠失は新生内膜病変における IL-1 $\beta$  と IL-18 の発現を減少させ、血管傷害後の新生内膜形成を減弱すること、特に骨髄細胞における ASC の欠失が、新生内膜形成を減少したこと、in vitro の実験で、ASC 遺伝子欠失マウス由来の血管平滑筋細胞の増殖能は障害されていないこと、が新たな知見として示された。

以上の結果より、骨髄細胞由来の ASC が、血管傷害後に生じる新生内膜形成において重要な役割を持つことが示唆された

#### (論文審査の結果の要旨)

動脈硬化性病変や冠動脈形成術後の再狭窄における病理学的機序は、血管内皮傷害後の炎症性反応によって生じる新生内膜形成によると考えられている。

アダプター分子であるアポトーシス関連スペックカード蛋白質 (ASC) は、シグナル伝達経路の仲介者として、同じ CARD を持つカスパーズ-1 のリクルートメントと活性化を制御しているため、カスパーズ-1 を介して炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  と IL-18 の活性化を制御することで、炎症やアポトーシスに関与している。血管傷害における ASC の役割については解明されておらず、本研究では、ASC 遺伝子欠失マウスを用いて、血管傷害後に生じる新生内膜形成における ASC の関与を検討した。

8週齢から12週齢のオスのマウス大腿動脈にワイヤー傷害を加え、1週間後と3週間後の傷害血管における ASC の顕著な発現を免疫組織学的手法を用いて確認した。ワイヤー傷害後の新生内膜形成は、ASC 遺伝子欠失マウスで野生型マウスに比べて有意に減弱していた ( $P < 0.01$ )。野生型マウスの新生内膜病変では、IL-1 $\beta$  と IL-18 が発現していたが、ASC 遺伝子欠失マウスでは発現が低下していた。骨髄細胞由来細胞の関与を検討するため、三種類の骨髄置換マウスを作製

し、それぞれにおいてワイヤー傷害3週間後の新生内膜形成を比較したところ、ASC 遺伝子欠失マウスの骨髄細胞を野生型マウスに移植したマウスで、内膜形成の有意な減少を認めた ( $P < 0.05$ )。

血管平滑筋細胞の増殖能を検証するため、野生型マウス及び ASC 遺伝子欠失マウス培養血管平滑筋細胞における、血清と成長因子の刺激による ERK1/2 と p38 活性化の影響を、ウェスタンブロット法を用いて検討した。ウシ胎児血清と PDGF-BB によって、野生型マウスと ASC 遺伝子欠失マウス由来の血管平滑筋細胞の双方で、同様に ERK1/2 と p38 の顕著なリン酸化を認めた。

その結果、矢嶋紀幸は次の結論を得た。

1. ASC は傷害血管で著しく発現している。
2. ASC の欠失は新生内膜病変における IL-1 $\beta$  と IL-18 の発現を減少させ、血管傷害後の新生内膜形成を減弱する。
3. 特に骨髄細胞における ASC の欠失が、新生内膜形成を減少する。
4. *in vitro* の実験で、ASC 遺伝子欠失マウス由来の血管平滑筋細胞の増殖能は障害されていない。

これらの結果から、骨髄細胞由来の ASC が、血管傷害後に生じる新生内膜形成において重要な役割を持つことが示唆された。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Cardiac Overexpression of MCP-1 in Transgenic Mice Prevents Cardiac Dysfunction and Remodeling after Myocardial Infarction (心筋特異的な MCP-1 の過剰発現はマウス心筋梗塞モデルにおける心機能不全とりモデリングを改善する)

森 本 創

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】単球やリンパ球の走化性を亢進させるケモカインである monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CC ligand-2) は、炎症や創傷治癒において重要な役割を果たしている。最近、骨髄由来の単球系細胞も血管内皮前駆細胞 (EPC) に分化することが報告され、さらに MCP-1 が血管新生作用を示すことも報告されている。しかし、ケモカインである MCP-1 は局所での濃度勾配によりその作用が制御されていることから、心筋そのものの MCP-1 が心筋

梗塞の病態においてどのような役割を果たしているかはわかっていない。そこで本研究では、 $\alpha$ -cardiac myosin heavy chain プロモーター下にマウス *JE-MCP-1* 遺伝子を導入した心筋特異的 MCP-1 発現 (MHC/MCP-1) マウスを用いて、心筋梗塞後の心機能やリモデリングにおける心筋 MCP-1 の役割を明らかとすることを目的とした。

【方法と結果】8~12週齢の雄性 MHC/MCP-1 マウス ( $n=191$ ) を用いた。心筋梗塞は吸入麻酔下にマウスの左冠状動脈前下行枝を結紮することにより作製し、梗塞24時間及び14日後に組織学的評価を行い、梗塞24及び48時間後、7, 14, 21, 28日後に心機能評価を行った。MHC/MCP-1 マウスは、梗塞14日後に野生型に比べて梗塞領域の有意な減少 ( $P < 0.01$ ) と心機能不全の抑制 (% FS: 42.6 vs. 34.1,  $P < 0.001$ ) を示し、組織学的には梗塞境界領域におけるマクロファージ及び血管内皮細胞の有意な増加を示した ( $P < 0.05$ )。この血管新生の増加に骨髄由来の EPC が関与しているかを確認するため、血管内皮マーカーである Tie-2 のプロモーター下にマーカー遺伝子である LacZ を発現させた Tie-2/LacZ マウスの骨髄細胞を用いて骨髄置換マウスを作製し、同様に組織学的評価を行った。MHC/MCP-1 マウスの心臓において LacZ 陽性の血管内皮細胞が確認されたが、その数は少数であった。そこで MHC/MCP-1 マウスでは末梢血中に EPC を動員するのか検討するために、経時的に末梢血を採取し、フローサイトメトリーを用いて細胞表面マーカーを確認したところ、心筋梗塞後の末梢血には単球 (Mac-1<sup>+</sup>/Gr-1<sup>-</sup> cells) は増加するが EPC (CD34<sup>+</sup>/Flk-1<sup>+</sup> cells) は増加しないことがわかった。血清中の炎症性サイトカイン濃度を cytometric beads array 法を用いて測定したところ、MHC/MCP-1 マウスは、血清中に MCP-1 以外の IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12 及び TNF- $\alpha$  の上昇を認めないが、梗塞後には IL-6 濃度の著しい上昇を示した。さらに、梗塞後の MHC/MCP-1 マウス心臓で STAT3 の活性化と心筋細胞の肥大が認められた。マウス新生仔単離心筋細胞における IL-6 による STAT3 のリン酸化をウェスタンブロット法を用いて検出したところ、MCP-1 共存下には STAT3 の持続的な活性化が明らかとなった。また、MHC/MCP-1 マウス心では心筋梗塞後に筋線維芽細胞の数が増加することも明らかとなった。

【結論】MHC/MCP-1 マウスでは、心筋梗塞後に

MCP-1によるマクロファージの浸潤と血管新生の増加, 心筋での IL-6産生による STAT3の活性化を介した心筋細胞肥大作用, 細胞保護作用や心線維芽細胞の蓄積により, 心筋梗塞における心機能不全とリモデリングが改善されることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

本論文はケモカインである monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1) の虚血性心疾患に対する有益な作用を示したもので, その価値は非常に高い。また, 論文審査にあたっては, 各審査委員がそれぞれの専門の立場から本学位申請者に対し, 口頭試問を行った。

MCP-1は, 主に単球やリンパ球の走化性を亢進させるケモカインであるが, 虚血性心疾患に対する作用については, 抗 MCP-1遺伝子治療や MCP-1受容体である CCR2欠損マウスを用いた基礎研究において MCP-1の有害な作用が報告されている。しかしながら, MCP-1が血管新生を亢進させるなど有益な作用も報告されている。さらに, 最近, 骨髄由来の単球系細胞が血管内皮前駆細胞 (EPC) に分化することも報告されているが, MCP-1はケモカインであるため局所での濃度勾配によりその作用が制御されていることから, 心筋そのものの MCP-1が心筋梗塞の病態においてどのような役割を果たしているかはわかっていない。そこで本研究では,  $\alpha$ -cardiac myosin heavy chain プロモーター下にマウス *JE-MCP-1* 遺伝子を導入した心筋特異的 MCP-1発現 (MHC/MCP-1) マウスを用いて, 心筋梗塞後の心機能やリモデリングにおける心筋 MCP-1の役割を明らかとすることを目的とした。心筋に MCP-1が発現しているが心筋障害を起こしていない 8~12週齢の雄性 MHC/MCP-1マウスと同一週齢の野生型マウスを用いて心筋梗塞モデルを作成し, 経時的に心機能測定と末梢血の細胞表面マーカー評価, 炎症性サイトカイン濃度測定を行った。さらに, 心筋梗塞14日目の心臓を摘出し, 免疫組織学的評価を行った。その結果, MHC/MCP-1マウスでは心筋梗塞後に MCP-1によるマクロファージの浸潤と血管新生の増加, 心筋での IL-6産生による STAT3の活性化を介した心筋肥大作用, 直接的な細胞保護作用や心線維芽細胞の蓄積により, 心筋梗塞における心機能不全とリモデリングが改善されることを示唆した。

以上の審査結果をもとに, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

One third of Japanese patients with Multiple Osteochondromas may have mutations in genes other than *EXT1* or *EXT2* (多発性骨軟骨腫の日本人患者の1/3は *EXT1* や *EXT2* 以外の遺伝子に突然変異を持っている可能性がある)

小 島 洋 文

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】多発性骨軟骨腫は四肢の長管骨の骨端付近に膨隆した骨軟骨腫が生じる比較的頻度の高い常染色体優性遺伝病であり, 骨性隆起や骨変形が主な症状であるが, 患者のうち0.5から5%で軟骨肉腫やその他の肉腫への悪性化を呈することが知られている。この疾患の責任遺伝子として現在2つの遺伝子 *EXT1* (8q24.11-q24.13), *EXT2* (11p12-p11) が単離されている。多発性骨軟骨腫の日本人患者43家系について以前に同教室の研究で Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 法を使って遺伝子変異解析を行い23家系に変異が認められた。今回我々は本邦における *EXT1*, *EXT2* 遺伝子変異のスペクトラムを明らかにする目的で, これらの43家系の検体を使って遺伝子変異スクリーニングとして検出率が高い Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) 法を用いて遺伝子変異解析を行った。【材料及び方法】単純 X 線検査にて骨軟骨腫を2個以上認める多発性骨軟骨腫の43家系 (家族例19, 散発例24) の患者を対象とした。同意を得た上でこれらの患者の末梢血から DNA を抽出し, タンパク翻訳領域を網羅するように *EXT1* では17組の, *EXT2* では16組のプライマーセットを作成し Polymerase Chain Reaction (PCR) で増幅し, DHPLC法にてスクリーニングを行い陽性パターンの波形を呈したものについて sequence を行い変異を解析した。さらに DHPLC法にて境界型の波形を呈した検体については mismatch-specific endonuclease を用いて PCR 産物を切断してから DHPLC 法で解析する方法も補足的に行った。【結果】43家系中 DHPLC 法で陽性パターンを含む異常波形を呈したものはすでに SSCP 法で変異が確認されていた23家系を含む36家系であり, 前者の23家系中2家系に境界型の波形が認められたため mismatch-specific endonuclease を用いた DHPLC 法で解析した結果, 明らかな陽性パターンの波形が認められた。

これらの36家系の検体について sequence を行って変異を調べた結果、SSCP法ですでに変異が見つかった23家系以外に、SSCP法では変異が見つからなかった7家系で新たに変異が発見された。その他の陽性パターンを呈した6家系は多型であることが判明した。この新たに変異が見つかった7家系のうち3家系の変異は今まで報告されていなかった新しい変異であることがわかった。

【結論】SSCPによる解析では変異の検出率は43家系中23家系56%であったが、今回我々の用いたDHPLC法では30家系70%であり、さらに6家系に多型ではあったが塩基配列異常を検出したことよりこの解析方法はSSCP法よりも感受性が高い方法であり本疾患の遺伝子変異スクリーニングとして有用である。*EXT1*と*EXT2*の変異検出率について白人を対象としてもものでは*EXT1*では41から66%、*EXT2*では29から33%であり、今回の我々の結果では*EXT1*が44%、*EXT2*が26%であり白人の検出率とほぼ一致している。今回の研究で変異が検出されなかった13家系(30%)については、我々の用いたDHPLC法では検出の出来ない大きな欠失の可能性はあるが、これまでの報告によると、その頻度は高くはない。よって、我々の研究結果は日本人の多発性骨軟骨腫については約30%が*EXT1*、*EXT2*以外の遺伝子に変異があることを示唆している。

#### (論文審査の結果の要旨)

多発性骨軟骨腫は四肢長管骨の骨端付近に膨隆した骨軟骨腫が生じる比較的頻度の高い常染色体優性遺伝病であり数%の確率で悪性化することが報告されており、現在2つの遺伝子*EXT1* (8q24.11-q24.13)、*EXT2* (11p12-p11)が単離されている。日本人患者の43家系についてすでにSingle Strand Conformation Polymorphism (SSCP)法を使って遺伝子変異解析を行い23家系に変異が認められているが、今回は遺伝子変異スクリーニングとして検出率が高いとされているDenaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)法を用いて遺伝子変異解析を行った。

単純X線検査にて骨軟骨腫を2個以上認める多発性骨軟骨腫の43家系(家族例19, 散発例24)の患者を対象とし、これらの患者の末梢血からDNAを抽出し、*EXT1*では17組の、*EXT2*では16組のプライマーセットを作成しPolymerase Chain Reaction (PCR)で増幅し、DHPLC法にてスクリーニングを行い陽性波

形を呈したものについて sequence を行い変異を調査した。

その結果、小島洋文は次の結果を得た。

1. 43家系のうちSSCP法で変異が見つかった23家系に加え7家系で新たに変異が発見され、このうち3家系の変異は今まで報告されていなかった新しい変異であった。
2. SSCP法の検出率23/43 (53%)に比べてDHPLC法の検出率30/43 (70%)は高く変異のスクリーニングとして有用であった。
3. 変異の分布の比率*EXT1* (19/43)、*EXT2* (11/43)は欧米の多発性骨軟骨腫のものと同様の傾向であった。
4. 遺伝子変異と臨床症状や悪性化との関連は現時点では判明されなかった。

これらの結果よりDHPLC法が変異解析のスクリーニングとして有用であり、患者およびその家系の血液を解析することによりこの疾患の発症の予測が可能となると思われた。大きな欠失の報告が少ないことと未検出率が約30%であることを考えると日本人の多発性骨軟骨腫の患者の約3分の1は*EXT1*、*EXT2*以外の遺伝子に変異を持つ可能性があり、さらなる解析には第3の遺伝子の同定が待たれることがわかった。以上の結果より、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Expression of Aurora kinases A and B in normal hyperplastic, and malignant human endometrium: Aurora B as a predictor for poor prognosis in endometrial carcinoma (オーロラキナーゼAとBのヒト正常, 増殖症, 悪性子宮内膜における発現: オーロラBは子宮内膜癌における予後不良因子)

藏 井 みゆき

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】オーロラキナーゼ(以下オーロラと略)は細胞分裂時のクロマチン分離と細胞質分裂に必要であり“細胞分裂の鍵分子”といわれている。乳癌, 大腸癌, 膵臓癌などでその過剰発現が報告されているが, 子宮内膜組織におけるオーロラの発現や意義は不明である。本研究では正常子宮内膜, 子宮内膜増殖症, 子宮内膜癌におけるオーロラAとBの発現を免疫組織学的方法によって観察し, その結果を増殖マーカーで

ある Ki67発現および臨床病理学的因子と比較することによって、子宮内膜組織におけるオーロラ発現の意義を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】正常子宮内膜40例，増殖症30例，内膜癌73例を対象としてオーロラAおよびBの免疫染色を施行した。免疫染色の結果は細胞質染色を Positivity index (PI：強陽性細胞の% $\times$ 1 + 弱陽性細胞の% $\times$ 0.5, 満点100) として記載し，核染色は陽性細胞の%数を記載した。またオーロラ蛋白の特異性と発現機序を検討するために，7例の新鮮組織（増殖期2例，分泌期2例，内膜癌3例）を用いて Western blot, RT-PCR を施行した。これらの検体は患者の同意を得て使用した。

【結果】オーロラAの陽性染色は細胞質に観察された。正常内膜腺上皮では分泌期より増殖期に強く染色され，分裂期の細胞も陽性であった。内膜癌におけるオーロラA発現は増殖期内膜と比して有意に増強した ( $P=0.049$ )。組織分化度では grade 1 および 2 の症例で発現が高い傾向にあったが Ki67 および患者予後との間には明らかな相関は見られなかった。オーロラA mRNA の発現は正常，悪性ともに蛋白質と相関していた。

オーロラBの陽性染色は主に核に観察された。正常内膜腺上皮では，分泌期に対して増殖期で有意に強く ( $P<0.0001$ )，分裂期の細胞も染色された。また増殖期腺上皮のオーロラB陽性細胞は高頻度に Ki67 も陽性であった。一方，内膜癌におけるオーロラBの発現は増殖期内膜より有意に低下したが ( $P<0.0001$ )，grade 3 における発現は grade 1 および 2 より有意に高く ( $P<0.028$ )，Ki67 と相関し ( $P=0.0003$ )，オーロラB陽性の患者生存は陰性患者に比べ有意に短期間であった ( $P=0.0135$ )。Western blot でのオーロラBの蛋白質発現は増殖期内膜と比較して内膜癌で低下し免疫染色と相関していたが，オーロラB mRNA の発現は内膜癌でむしろ増加する傾向がみられた。

【考察】オーロラAの発現が正常内膜増殖期腺上皮細胞で増加し分泌期で低下したことから，分裂期細胞で陽性であったことから，オーロラAが正常子宮内膜腺上皮の性ステロイド依存性の増殖に関与していると考えられた。内膜癌ではオーロラAの発現は正常内膜に比して増加しており，細胞増殖促進因子であるオーロラAとして妥当であると考えられたが，内膜癌においてはオーロラA発現は増殖能と相関しなかった。この原因としては，内膜癌においてはオーロラA発現が細胞

増殖に直接作用するのでなく，オーロラAの過剰蓄積による遺伝子不安定性によって引き起こされる2次の遺伝子変化が関与しているのかもしれない。また正常内膜および内膜癌での蛋白質と mRNA の発現がよく相関していたことから，オーロラA発現が主に転写によって制御されていることが示唆された。

オーロラBの発現は核に優位に観察された。オーロラBの基質は核蛋白ヒストンH3であるので，オーロラBの核局在は機能的に重要であると考えられる。正常内膜腺上皮におけるオーロラBの発現は増殖期で増強し分泌期に減弱したことから，分裂期細胞は陽性であったこと，さらにオーロラB陽性細胞はKi67も陽性であったことから，オーロラBが正常内膜腺上皮の増殖に深く関与していると考えられる。加えて正常内膜ではオーロラBのmRNAと蛋白質が類似した発現パターンを呈したことから，正常内膜ではオーロラBが転写により制御されていることが示唆された。一方，予想に反して内膜癌ではオーロラBの免疫組織学的発現は増殖期内膜と比較して低下した。この原因は不明であるが，内膜癌ではオーロラBのmRNAと比較して蛋白質の発現が低下していることから，内膜癌にはオーロラB蛋白質に対する何らかの翻訳後修飾機構があるのかもしれない。内膜癌におけるオーロラBの免疫組織学的発現は grade 3 症例で有意に上昇し，また予後不良因子であったことから，オーロラBが子宮内膜癌の異常増殖に関与していることが示唆された。結論：本研究によって内膜癌におけるオーロラAとBの発現異常が明らかとなった。特にオーロラB発現が内膜患者生存との相関を示したことから，臨床的応用の可能性が示された。

#### (論文審査の結果の要旨)

オーロラキナーゼ（以下オーロラと略）は分裂期の進行に重要な細胞周期調節因子で，ヒト癌における発現異常が報告されている。本研究では子宮内膜組織におけるオーロラAとBの発現とその意義を明らかにするために，正常内膜および腫瘍性内膜におけるオーロラの発現と局在を免疫組織化学および分子生物学的に検討した。

正常子宮内膜40例，子宮内膜増殖症30例，内膜癌73例を対象としてオーロラA，Bの発現を免疫組織学的に観察し，結果を増殖マーカーである Ki67 および患者生存と比較した。またオーロラの発現機序を解析するために，増殖期2例，分泌期2例，内膜癌3例の新鮮組織を用いて Western blot, RT-PCR を施行した。



その結果臧井は次の結論を得た。

#### 1. オーロラA

- 1) 染色は細胞質に観察された。
- 2) 正常内膜腺上皮では増殖期に発現が増加し、分泌期で低下したので、正常子宮内膜の性ステロイド依存性増殖に関与していると考えられた。
- 3) 内膜癌で発現が増強したことから、癌遺伝子的な機能を有すると予想された。しかしKi67とは相関がみられなかったので、オーロラAが細胞増殖に直接作用するというよりは、過剰な蓄積に基づく遺伝子不安定性による2次的な遺伝子変化の関与が示唆された。
- 4) 蛋白質と m-RNA の発現が相関したことから、転写による発現の制御が示された。

#### 2. オーロラB

- 1) 染色は主に核に観察された。
- 2) 正常内膜腺上皮では増殖期で増強、分泌期で減弱したことから腺上皮の増殖に関与していると考えられた。
- 3) 内膜癌では正常内膜と比較して発現が減弱した。しかし内膜癌症例のなかでは増殖能と相関し、また組織学的 grade の高い症例に高頻度に発現し、予後不良因子であった。
- 4) 正常内膜では蛋白質と m-RNA の発現パターンが一致したので、転写による発現の制御が示唆された。一方、内膜癌では m-RNA に比して蛋白質発現が低いことから、何らかの翻訳後修飾機構の存在が示唆された。

これらの結果より正常子宮内膜の性ステロイド依存性増殖においてはオーロラA, Bが関与していること、また、子宮内膜癌ではオーロラA, Bの発現異常が存在し、これが内膜癌の増殖に関与していることが明らかになった。

特にオーロラB発現が内膜癌患者の予後不良因子であったことから臨床的応用の可能性が示された。

以上より主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### Biphasic function of focal adhesion kinase in endothelial tube formation induced by fibril-forming collagens

(コラーゲン惹起性内皮細胞管状構造形成における focal adhesion kinase 機能の二面性)

中 村 純 子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Angiogenesis (血管新生) とは既存の脈管構造から新しい毛細血管が成長する過程であり、創傷治癒の際などに生じる生理的な現象である一方で、様々な疾患の病態に関与している。血管内皮細胞を取り巻く細胞外基質は、増殖因子等の液性因子と同様に Angiogenesis を制御する因子であり、インテグリンを代表とする細胞膜受容体を介して細胞-細胞外基質間の相互的なシグナル伝達が行われている。Focal adhesion kinase (FAK) は接着斑に局在し、インテグリンと細胞外基質の結合により活性化する非受容体型チロシンキナーゼであり、細胞骨格の再編成や遊走、増殖に関わるシグナル伝達の中心的役割を果たしており、angiogenesisの過程において重要な役割を担っていることが知られている。血管内皮細胞の遊走や管状構造の形成 (tube formation) といった機能は angiogenesis の重要なプロセスであるが、特に代表的な細胞外基質であるコラーゲンが内皮細胞の管状構造形成を惹起することが知られており、angiogenesis のモデルとして研究されてきた。我々はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、コラーゲン惹起性の tube formation における FAK の機能について研究した。

【材料及び方法】 ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。細胞外基質分子による管状構造の誘導実験には、タイプ I, II, IVコラーゲン、ビトロネクチン、フィブロネクチンを用い、培地に加える手法で比較を行った。インテグリンの機能の評価にはインテグリンのブロッキング抗体を用いた。FAK をノックダウンした細胞は、siRNA を発現するアデノウイルスベクターを構築して HUVEC に感染させる手法で作成した。FAK 蛋白質の定量は Western blotting 法で行い、FAK の mRNA の測定には定量的 RT-PCR を行った。細胞の migration の評価には healing-assay 法を用いた。FAK の分解抑制実験にはカルパインインヒビターを用いた。また、FAK cDNA を cationic pol-

ymer を用いて HUVEC にトランスフェクションし、FAK を過剰発現する細胞を作成した。

【結果】まず、HUVEC を各種細胞外基質で刺激したところ、線維形成型コラーゲンであるタイプ I, II コラーゲンのみが管状構造の形成を誘導した。この現象は  $\alpha 2$  インテグリンブロック抗体により阻害された。次に、FAK をノックダウンした HUVEC において、migration および線維形成型コラーゲンによる tube formation の誘導実験を行ったところ、両方とも抑制・阻害されることが確認できた。しかしその一方で、通常の HUVEC において、線維形成型コラーゲンに誘導される tube formation の過程で FAK 蛋白質が経時的に減少していくことを認めた。このとき FAK の mRNA 合成は、コラーゲン刺激後には一過性に増加していたため、FAK 蛋白質の減少は分解の亢進によるものと考え、FAK 蛋白質の分解の抑制、および、FAK の過剰発現によって、FAK 蛋白質を維持するように保った状態を作ることを試みた。その結果、FAK 蛋白質の分解を減少させたカルパインインヒビターを与えた細胞では、線維形成型コラーゲンによる tube formation の誘導が阻害された。また、FAK を過剰発現した細胞は、管状構造の形成に加わらない様子が観察された。

【考察】線維形成型コラーゲンによる、 $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンを介したシグナルが、HUVEC に tube formation を惹起することが示唆された。このモデルの中で FAK の機能について検討したところ、FAK 蛋白質を抑制した場合には細胞の migration や tube formation が阻害されるのにもかかわらず、tube formation の過程で FAK 蛋白質は著明に減少しており、その減少を抑制、または FAK 蛋白質の発現を増大した場合でも、tube formation が阻害されるという、一見矛盾した結果が得られた。この実験結果は、FAK は内皮細胞の tube formation の初期に細胞が動き始めるための initiator として重要であるが、その後、速やかに低下することが管状構造の形成において必要であることを示唆するものであると考える。FAK 蛋白質発現量の適切な調整は血管新生の過程において重要であると考えられ、そのメカニズムの追求は血管新生のプロセスの解明に有用であると考えられる。また、コラーゲンゲルという生体内とは異なる条件が FAK 蛋白質の発現を修飾している可能性についても検討が必要であるが、細胞外基質組成の差異による血管新生の組織特異性の考察に有用であると思われる。

#### (論文審査の結果の要旨)

細胞外基質の angiogenesis の制御因子としての機能は近年注目され明らかにされてきている。特に、コラーゲンゲル内で培養した内皮細胞が管状の構造をとってくることは以前から確認されており、angiogenesis のひとつのステップのモデルとして実験に用いられてきている。本実験で中村は、ヒト臍帯静脈内皮細胞における、コラーゲン惹起性の tube formation について、特に細胞外基質とのシグナル伝達に関わる FAK の機能を中心に検討した。

細胞外基質分子の中でも tube formation を誘導するのは、立体構造が正常に保たれた線維形成型コラーゲンであり、そのシグナルは  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンを介して細胞内に伝達され、接着斑に局在する FAK が重要な役割を果たすことで細胞の移動が開始することを、各細胞外基質分子の誘導実験の比較・インテグリンブロック抗体を用いた実験・FAK のノックダウン実験から確認した。しかし一方で、この tube formation の過程において、重要であるはずの FAK 蛋白質が著明に減少することが認められた。コラーゲン刺激後に mRNA 合成が増加しているにもかかわらず FAK 蛋白質の減少が進行していることから、分解が著しく亢進している可能性があった。この矛盾にも見える現象に注目し、FAK の degradation の抑制効果があるカルパインインヒビターの投与、および FAK の過剰発現を HUVEC に対して行い、その条件下で線維形成型コラーゲンによる tube formation を誘導したところ、双方において阻害される傾向がみられた。

これらの実験の結果から、中村は次の結論を得た。

ヒト臍帯静脈内皮細胞において、

- 1) 線維形成型コラーゲンによる  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンを介した刺激が、tube formation の誘導に重要である。
- 2) FAK は tube formation の初期に、migration を開始する段階において重要な存在であるが、tube formation が進行していく過程においては速やかに減少することが必要であることが示唆される。

線維形成型コラーゲンに限定して tube formation が観察されたことは、細胞外基質の組成や質の差が、angiogenesis に影響を与える可能性を示唆する。また本実験結果および考察は、FAK 蛋白質が非常に緻細にコントロールされることが、angiogenesis のスムーズな進行に必要であることを示すものである。細胞外基質による内皮細胞の制御に関して、検討すべき

課題を浮き彫りにした側面もあり、今後メカニズムの解明に向けて発展性のある内容であるとして、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Identification of oligopeptide binding to colon cancer cells separated from patients using laser microdissection (マイクロダイゼクションを用いたヒト大腸癌細胞への結合ペプチドの同定)

久保直樹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】大腸癌は比較的頻度の高い悪性腫瘍であり切除不能または、再発に対して一般的に抗癌剤治療が行われているが、その予後はいまだ満足できるものではない。最大の問題は、抗癌剤等の薬剤もしくは治療遺伝子等を癌選択的に運搬できるベクターが存在しないことである。そこでペプチド提示ファージライブラリーを用いて標的組織や細胞に結合する未知のペプチドを同定する分子生物学的手法としてバイオパンニング法が用いられた。実際のヒトの手術検体を用いたバイオパンニング法の報告はほとんどないが、我々はヒトの大腸癌の新鮮摘出検体からマイクロダイゼクションを利用したバイオパンニング法によりヒト大腸癌結合ペプチドの同定を目的に研究を行った。

【方法】進行大腸癌を摘出後、検体の一部を採取し凍結保存した。約20枚の連続切片を作製してからマイクロダイゼクションで切り取った癌組織と7つのアミノ酸配列を持つペプチド提示ファージライブラリーと *in vitro* で共培養し、癌組織に結合したファージのみを抽出した。このファージを増幅した後、さらに癌組織と培養した。この操作を3回繰り返し最終的に得られたファージのDNA配列を解読しペプチドの7個のアミノ酸配列を同定した。同定した結合ファージを切除検体の癌組織と培養し先端にペプチドを発現していないファージをコントロールとして比較すると同時に、蛍光免疫染色を行って、実際の大腸癌組織に対する大腸癌結合ペプチド提示ファージの結合性を検討した。同定された大腸癌結合ペプチド提示ファージの各種細胞株への結合性を検討するため、DLD-1, HCT-15, Colo205, LoVo (大腸癌由来細胞株), AZ521 (胃癌由来細胞株) Huh-7 (肝癌由来細胞株), Panc-1 (膵癌由来細胞株), RBE (胆管癌由来細胞株), HeLa (子

宮癌由来細胞株) を用いてペプチド提示ファージと共培養してその回収量を測定した。次いで切除検体と DLD-1, HCT-15 (大腸癌由来細胞株) に対する大腸癌結合ペプチド提示ファージとコントロールファージの蛍光免疫染色とフローサイトメトリーを行い、結合性を検討した。また実際に大腸癌結合ペプチドを合成し、合成ペプチドの前投与により大腸癌結合ペプチド提示ファージの DLD-1 への結合阻害を測定し、合成ペプチドの大腸癌細胞結合性を検討した。MTS アッセイにおいて各種濃度の大腸癌結合ペプチド、コントロールペプチド存在下での癌細胞増殖を測定して、合成ペプチドの癌細胞増殖に対する影響を検討した。

【結果】バイオパンニング法により切除検体の癌組織への大腸癌結合ペプチドとして、共通の3アミノ酸配列のモチーフ SPT を含む SPTKSNS が同定された。SPTKSNS ファージはコントロールファージと比べ、バイオパンニングを行った切除検体に対して約10倍集積した ( $P < 0.05$ )。別の2例の切除検体への結合率はバイオパンニングを行った切除検体のそれぞれ1/10, 1/4であった。また、SPTKSNS ファージの各種ヒト悪性腫瘍(大腸癌, 胃癌, 肝癌, 膵癌, 胆管癌, 子宮癌)由来細胞株への結合能を *in vitro* で測定すると、大腸癌細胞株に有意に多く結合しており DLD-1 と HCT-15 ではコントロールファージと比較し約7倍であった ( $P < 0.05$ ) が、大腸癌以外の細胞株では有意な結合は認めなかった。蛍光免疫染色とフローサイトメトリーにおいても、SPTKSNS ファージはコントロールファージに比べより強い大腸癌結合性を示した。合成 SPTKSNS ペプチドの前投与により、SPTKSNS ファージの結合性は有意に阻害された ( $P < 0.01$ )。MTS アッセイにおいては、SPTKSNS ペプチド投与により癌細胞増殖能に有意な影響は認められなかった。

【考察】マイクロダイゼクションを併用したバイオパンニング法によりヒト手術検体から大腸癌細胞に選択的に結合するペプチド SPTKSNS が同定された。今回の手法により臨床検体から癌細胞に結合するペプチドが同定され患者個人ごとのテーラーメイド治療への応用が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

バイオパンニング法はペプチド提示ファージライブラリーを用いて標的組織や細胞に結合する未知のペプチドを同定する分子生物学的手法である。そこで久保は、まずヒト大腸癌の新鮮摘出検体からマイクロダイ

ゼクションの手技を用いて大腸癌組織のみを分離した。次いで、バイオパンニング法により大腸癌選択的結合性を有すると考えられるオリゴペプチド (SPTKSNS) を同定し、(1) SPTKSNS フェージの大腸癌切除検体に対する結合度の検討、(2) SPTKSNS フェージの各種細胞株に対する結合度の比較、(3) 蛍光免疫染色、フローサイトメトリーによる SPTKSNS フェージの大腸癌細胞への結合性の評価、(4) 合成ペプチドによる SPTKSNS フェージの結合阻害の測定、(5) MTS アッセイによる SPTKSNS ペプチドの癌増殖に対する影響の評価を行い、SPTKSNS ペプチドの大腸癌選択的結合性ならびに大腸癌治療への応用における意義を検討した。

その結果以下の成績を得た。

- 1) 3ラウンドのバイオパンニングにより切除検体の癌組織への大腸癌選択的結合性を有するペプチドとして共通の3アミノ酸配列のモチーフ SPT を含む SPTKSNS が同定された。
- 2) SPTKSNS フェージはコントロールフェージと比べ、バイオパンニングに用いた切除検体に対して約10倍集積した ( $P < 0.05$ )。別の2例の切除検体への結合率はバイオパンニングを行った切除検体のそれぞれ1/10, 1/4であった。
- 3) SPTKSNS フェージの各種ヒト悪性腫瘍 (大腸癌, 胃癌, 肝癌, 膵癌, 胆管癌, 子宮癌) 由来細胞株への結合能を *in vitro* で測定すると、大腸癌細胞株に有意に多く結合しており DLD-1 と HCT-15 ではコントロールフェージと比較し約7倍であった ( $P < 0.05$ )。大腸癌以外の細胞株では有意な結合は認めなかった。
- 4) 蛍光免疫染色とフローサイトメトリーにおいても、SPTKSNS フェージはコントロールフェージに比べより強い大腸癌結合性を示した。
- 5) 合成 SPTKSNS ペプチドの前投与により、SPTKSNS フェージの結合性は有意に阻害された ( $P < 0.01$ )。一方で、コントロールフェージでは、合成 SPTKSNS ペプチドの前投与による有意な結合阻害を認めなかった。
- 6) MTS アッセイにおいては、SPTKSNS ペプチド投与により癌細胞増殖能に有意な影響は認められなかった。

以上より、マイクロダイゼクションを併用したバイオパンニング法によってヒト手術検体から大腸癌細胞に選択的に結合するペプチド SPTKSNS が同定され、

SPTKSNS ペプチドは大腸癌選択的結合性があるものと考えられた。今回の手法により臨床検体からその患者の癌細胞に結合するペプチドが同定され、患者個人ごとのテーラーメイド治療への応用が期待される可能性があるという点において有用な研究と考えられる。したがって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Deficiency of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury (血管傷害モデルでの骨髄細胞中の TNF $\alpha$  とインターフェロン  $\gamma$  の欠如が相乗的に内膜肥厚の増殖を抑制した)

村山 秀喜

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】

経皮的冠動脈形成術 (PCI) 後の再狭窄は、臨床的に大きな問題である。この再狭窄の機序として、血管傷害後の炎症反応の関与が示唆されている。組織壊死因子アルファ (TNF $\alpha$ ) とインターフェロンガンマ (IFN $\gamma$ ) は、代表的な炎症性サイトカインであり、血管傷害後の再狭窄部位に発現していることが示されている。しかし、これまでの報告では、これらサイトカインをそれぞれ抑制した場合の再狭窄への影響については、一定の結論が出ていない。この原因として、TNF $\alpha$  と IFN $\gamma$  がそれぞれ違う炎症シグナルを活性化している可能性が考えられた。そこで、本研究では、PCI 後再狭窄のモデルであるマウス血管傷害後の新生内膜形成における TNF $\alpha$  と IFN $\gamma$  の役割について検討した。

【方法と結果】

コントロール (cont: BALB/c), TNF $\alpha$  欠損 (*Tnf*<sup>-/-</sup>), IFN $\gamma$  欠損 (*Ifng*<sup>-/-</sup>), TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$  欠損 (*Tnf*<sup>-/-</sup>*Ifng*<sup>-/-</sup>) マウスの右大腿動脈にワイヤーを用いた血管傷害を作製して評価した。cont の新生内膜では、TNF $\alpha$  および IFN $\gamma$  が強く発現していたが、*Tnf*<sup>-/-</sup> と *Tnf*<sup>-/-</sup>*Ifng*<sup>-/-</sup> では TNF $\alpha$  の発現を認めず、*Ifng*<sup>-/-</sup> と *Tnf*<sup>-/-</sup>*Ifng*<sup>-/-</sup> IFN $\gamma$  の発現を認めなかった。新生内膜面積は、cont, *Tnf*<sup>-/-</sup>, *Ifng*<sup>-/-</sup> と比較して *Tnf*<sup>-/-</sup>*Ifng*<sup>-/-</sup> で有意に減少しており、中膜面積はどの群でも同等であった。これから求めた新生

内膜の程度の指標である I/M は,  $Tnf^{-/-}Ifng^{-/-}$  で他の 3 群に比較して有意に減少していた。4 群において、傷害後早期の再内皮化や新生内膜構成細胞の割合（多くは血管平滑筋細胞, 一部はマクロファージ）に有意な差を認めなかった。PCNA 染色を用いた細胞増殖活性は,  $Tnf^{-/-}Ifng^{-/-}$  で有意に減少していた。さらに, 9 Gy の放射線照射後に骨髄細胞を移植して, 3 種類の骨髄移植マウス (BMTcont  $\rightarrow$  cont, BMTcont  $\rightarrow$   $Tnf^{-/-}Ifng^{-/-}$ , BMT  $Tnf^{-/-}Ifng^{-/-}$   $\rightarrow$  cont) を作製して検討したところ, BMT  $Tnf^{-/-}Ifng^{-/-}$   $\rightarrow$  cont では BMTcont  $\rightarrow$  cont よりも ( $P < 0.01$ ), また, BMTcont  $\rightarrow$   $Tnf^{-/-}Ifng^{-/-}$  よりも ( $P < 0.05$ ), 血管傷害後の新生内膜形成が有意に抑制されていた。

#### 【考察】

本研究では以下の実験結果を得た。

- 1) cont では新生内膜で  $TNF\alpha$  と  $IFN\gamma$  を発現していたが, それぞれの遺伝子欠損マウスでは発現しないことを確認した。
- 2) cont,  $Tnf^{-/-}$ ,  $Ifng^{-/-}$  に比較して  $Tnf^{-/-}Ifng^{-/-}$  では血管傷害後の新生内膜形成が抑制された。
- 3) 傷害後早期の再内皮化に差を認めなかった。
- 4) 新生内膜の細胞増殖活性は  $Tnf^{-/-}Ifng^{-/-}$  で減少していた。
- 5)  $Tnf^{-/-}Ifng^{-/-}$  の骨髄を移植したマウスでは, 新生内膜形成が抑制された。

これらのことより, 血管傷害後の新生内膜形成の病態に骨髄由来の  $TNF\alpha$  と  $IFN\gamma$  が重要な役割を果たしていることが示された。

動脈硬化や PCI 後の再狭窄に炎症反応が重要であるとの証拠が蓄積されてきている。しかし, 炎症性サイトカインである  $TNF\alpha$  と  $IFN\gamma$  の正確な役割については分かっていない。この原因の一つとして,  $TNF\alpha$  は転写因子 NF- $\kappa$ B を介して,  $IFN\gamma$  は転写因子 STAT-1 や IRF-1 を介してそれぞれ炎症シグナルを伝達していること, これら  $TNF\alpha$  の NF- $\kappa$ B シグナルと  $IFN\gamma$  の STAT-1/IRF-1 シグナルとは相互作用して相乗的に作用していることが考えられた。つまり, 一方が阻害されると, 他方が代償的に活性化しているため, それぞれのシグナル阻害実験の結果に条件によるばらつきが出るのではないかと考えられた。そこで,  $TNF\alpha$  と  $IFN\gamma$  の両方の遺伝子欠損マウスで検討したところ, 血管傷害後の新生内膜形成が相乗的に抑制されることが明らかとなった。血管傷害後の新生内膜形成の機序は明らかではないが, 傷害された

血管壁が活性化されて接着分子やサイトカイン/ケモカインの発現が亢進し, 流血中の単球やリンパ球といった骨髄由来の炎症細胞がリクルートされて血管壁へと接着・浸潤する。浸潤したこれら骨髄由来細胞がさらにサイトカインや増殖因子を産生することで, 中膜平滑筋細胞の内膜への遊走・増殖が誘導されて新生内膜が形成されると考えられる。そこで, 骨髄細胞のみで  $TNF\alpha$  と  $IFN\gamma$  の欠損したマウスで検討したところ, 骨髄細胞由来の  $TNF\alpha$  と  $IFN\gamma$  が血管傷害後の新生内膜形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これらの知見は, PCI 後再狭窄の新たな機序の解明と新たな治療戦略に大きく役立つものと期待される。

#### (論文審査の結果の要旨)

経皮的冠動脈形成術 (PCI) 後の再狭窄は, 臨床的に大きな問題となっている。この再狭窄の機序として, 血管傷害後の炎症反応の関与が示唆されている。そこで, 本研究では, 血管傷害後の新生内膜形成における組織壊死因子アルファ ( $TNF\alpha$ ) とインターフェロンガンマ ( $IFN\gamma$ ) の役割について検討した。

コントロール (cont: BALB/c),  $TNF\alpha$  欠損 ( $Tnf^{-/-}$ ),  $IFN\gamma$  欠損 ( $Ifng^{-/-}$ ),  $TNF\alpha/IFN\gamma$  欠損 ( $Tnf^{-/-}Ifng^{-/-}$ ) マウスの右大腿動脈にワイヤーを用いた血管傷害を作成した。免疫組織染色において,  $TNF\alpha$  と  $IFN\gamma$  は cont の新生内膜部位に発現していたが, それぞれの遺伝子欠損マウスでは発現していないことを確認した。新生内膜形成は, cont や  $Tnf^{-/-}$ ,  $Ifng^{-/-}$  と比較して  $Tnf^{-/-}Ifng^{-/-}$  で有意に抑制されていた。いずれのグループ間においても再内皮化は同等であった。新生内膜形成部位での細胞核増殖抗原 (PCNA) を発現している細胞数は,  $Tnf^{-/-}Ifng^{-/-}$  で有意に減少していた。さらに, 骨髄移植モデルを用いた検討により, 骨髄細胞での  $TNF\alpha/IFN\gamma$  の欠損が血管傷害後の新生内膜形成を抑制することが示された。これらの結果から, 骨髄細胞由来の  $TNF\alpha$  と  $IFN\gamma$  が血管傷害後の新生内膜形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなり, PCI 後再狭窄の新たな機序の解明への一助となった。

よって主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Role of  $\alpha_1$ -Adrenergic Receptors in Detrusor Overactivity Induced by Cold Stress in Conscious Rats (覚醒下ラットにおける冷ストレスによって誘発された排尿筋過活動に対する  $\alpha_1$ 交感神経受容体の役割)

陳 忠

(論文の内容の要旨)

Aims:  $\alpha_1$ -Adrenergic receptors (ARs) are involved in micturition control both centrally and peripherally.  $\alpha_1$ -AR antagonists improve not only voiding but also storage symptoms in patients with bladder outlet obstruction. We investigated the role of  $\alpha_1$ -AR mechanisms involved in detrusor overactivity induced by cold stress in conscious rats. Methods: Continuous cystometry was performed at room temperature (RT,  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and for 40 min at cold temperature (CT,  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Voiding interval (VI), micturition volume (MV), and bladder capacity (BC) were evaluated before and after intravenous administration of KMD-3213 (selective  $\alpha_{1A}$ -AR antagonist), naftopidil (selective  $\alpha_{1D}$ -AR antagonist), tamsulosin (selective  $\alpha_{1A/1D}$ -AR antagonist), and prazosin (non-selective  $\alpha_1$ -AR antagonist). Blood pressure (BP), cumulative voided volume and body temperature were also evaluated.

Results: At RT, none of the AR antagonists caused significant change in the cystometric parameters. During 40 min of cold stress cumulative voided volume and body temperature did not change, but there were significant decreases in VI, MV, and BC. Low doses of the AR antagonists had no effect on CT-induced decreases of these variables. However, high doses of KMD-3213, tamsulosin, naftopidil and prazosin significantly inhibited the CT-induced decreases in VI, MV, and BC. CT caused a significant increase in BP, and this was not affected by low doses of the AR antagonists. However, high doses of prazosin significantly lowered the CT-induced increase of BP.

Conclusions: Cold stress induces detrusor overactivity and increases BP in conscious rats. These

effects are mediated, at least in part, by  $\alpha_{1A}$ -AR and  $\alpha_{1D}$ -AR subtypes and can be prevented/reduced by  $\alpha_1$ -AR antagonists.

(論文審査の結果の要旨)

$\alpha_1$ -Adrenergic receptors (ARs) are involved in micturition control both centrally and peripherally.  $\alpha_1$ -AR antagonists improve not only voiding but also storage symptoms in patients with bladder outlet obstruction. We investigated the role of  $\alpha_1$ -AR mechanisms involved in detrusor overactivity induced by cold stress in conscious rats.

Continuous cystometry was performed at room temperature (RT,  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and for 40 min at cold temperature (CT,  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Voiding interval (VI), micturition volume (MV), and bladder capacity (BC) were evaluated before and after intravenous administration of KMD-3213 (selective  $\alpha_{1A}$ -AR antagonist), naftopidil (selective  $\alpha_{1D}$ -AR antagonist), tamsulosin (selective  $\alpha_{1A/1D}$ -AR antagonist), and prazosin (non-selective  $\alpha_1$ -AR antagonist). Blood pressure (BP), cumulative voided volume and body temperature were also evaluated.

Results:

1. At RT, none of the AR antagonists caused significant change in the cystometric parameters. During 40 min of cold stress cumulative voided volume and body temperature did not change.
2. Cold caused significant decreases in VI, MV, and BC.
3. Low doses of the AR antagonists had no effect on CT-induced decreases of these variables. However, high doses of KMD-3213, tamsulosin, naftopidil and prazosin significantly inhibited the CT-induced decreases in VI, MV, and BC.
4. Cold caused a significant increase in BP, and this was not affected by low doses of the AR antagonists. However, high doses of prazosin significantly lowered the CT-induced increase of BP.

Conclusions:

Cold stress induces detrusor overactivity and increases BP in conscious rats. These effects are mediated, at least in part, by  $\alpha_{1A}$ -AR and  $\alpha_{1D}$ -AR subtypes and can be prevented/reduced by  $\alpha_1$ -AR

antagonists.

以上より主査，副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Head-down tilt posture elicits transient lymphocyte mobilization from the iliac, but not mesenteric, lymph nodes of rats (頭部低位姿勢は，ラット腸骨リンパ節から一過性のリンパ球動員を誘発するが，腸間膜リンパ節では誘発しない)

## 鈴木 滋

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】宇宙飛行中，微小重力は人体の生理機能に影響を与え，宇宙飛行士が著明な顔面の浮腫をおこすことはよく知られている。リンパ管系は，組織間隙からの細胞外液や高分子物質の輸送に重要な役割を担い，浮腫を防ぐ重要な因子の一つとして機能している。同時に免疫機能の維持と調節にも寄与している。しかしながら，模擬微小重力環境下におけるリンパ管系のリンパ循環の反応については，未だ十分に解明されてはいない。そこで我々は，短時間の模擬微小重力が，ラットリンパ節のリンパ動態に与える影響を，ボールマンケージと頭部低位 (HDT) 姿勢刺激を用いて，無麻酔 in vivo の状態で検討した。ボールマンケージは，無麻酔 in vivo の状態におけるラットのリンパ液を収集する手段として有用であり，腸間膜リンパ管や胸管へカニューレを施すことで，リンパ流量やリンパ液の成分を無麻酔環境下で解析することが可能になる実験方法である。

【材料及び方法】まず最初に，水平位 (コントロール) と頭部低位 (HDT) 姿勢での，腸骨ならびに腸間膜リンパ節の輸出リンパ管からのリンパ流量とリンパ球動員数を，1時間毎に計3時間計測し検討した。次に，頭部低位 (HDT) 姿勢刺激のリンパ循環変化が，免疫学的な特異反応を通じて生じているか否かを判断する為に，アジュバントを用いて免疫化したラットを使用し，同様の実験を行い，リンパ節から動員されるリンパ球の細胞サブセット (CD3+, CD4+, CD8a+, CD45R+) の変化を検討した。すなわち，コントロール群と HDT 群でリンパ節から動員された細胞のサブセットを，それぞれ1時間毎に計1時間，フローサイトメトリーを用いて解析し，検討した。さらに，コントロール群と HDT 群で，リンパ節の輸入及び輸

出リンパ管内のアルブミン濃度を，1時間毎に計3時間計測し検討した。

【結果】腸骨リンパ節輸出リンパ管からのリンパ流量は，コントロール群と HDT 群の間に有意な差は認められなかった。腸間膜リンパ節輸出リンパ管からのリンパ流量は，コントロール群よりも，HDT 群の方が多傾向が認められた。一方，腸骨リンパ節から動員された細胞数は，コントロール群よりも HDT 群のほうが有意に多かった。それに対し，腸間膜リンパ節から動員された細胞数は，コントロール群と HDT 群との間に有意な差異は認められなかった。腸骨リンパ節から動員された細胞は，ほとんどがリンパ球であった。その動員されたリンパ球のサブセット (CD3+, CD4+, CD8a+, CD45R+) を解析したところ，コントロール群と HDT 群の間に有意差はなかった。アジュバントによる免疫化をラットに施して同様の実験を行ったが，腸骨リンパ節から動員されたリンパ球のサブセットは，コントロール群と HDT 群の両群とも，非免疫化下の実験との間に有意な差異は認められなかった。腸骨リンパ節輸入リンパ管および輸出リンパ管内のアルブミン濃度は，コントロール群と HDT 群の間に有意差は認められなかった。

【結論】以上の結果から，ボールマンケージを用いた短時間の頭部低位刺激は，リンパ液のアルブミン濃度やリンパ流量を変化させることなく，ラット腸骨リンパ節からのリンパ球の動員を一過性に誘発することが示唆された。

### (論文審査の結果の要旨)

宇宙飛行中，微小重力は人体の生理機能に影響を与え，宇宙飛行士が著明な顔面の浮腫をおこすことがよく知られている。リンパ管系は，組織間隙からの細胞外液や高分子物質の輸送に重要な役割を担い，浮腫を防ぐ重要な因子の一つとして機能し，免疫機能の維持と調節にも寄与している。しかし，模擬微小重力環境下におけるリンパ管系のリンパ循環の反応については，未だ十分に解明されてはいない。そこで鈴木らは，短時間の模擬微小重力が，ラットリンパ節のリンパ動態に与える影響を，ボールマンケージと頭部低位 (HDT) 姿勢を用いて，無麻酔 in vivo の状態で検討した。

以下に研究結果を示す。

- 1) ボールマンケージと頭部低位 (HDT) 姿勢を用い，リンパ管にポリエチレンチューブを挿入することで，ラット模擬微小重力負荷実験系を作製した。

本実験系において、短時間（3時間以下）、無麻酔下、in vivo の条件下で、コントロール（水平位）及び頭部低位（HDT）姿勢（模擬微小重力負荷）の両者で、ラット腸骨リンパ節輸入及び輸出リンパ管あるいは腸間膜リンパ節輸出リンパ管から、リンパ液を継続的に回収可能なことを確認した。

- 2) 腸骨及び腸間膜リンパ節輸出リンパ管からのリンパ流量の変化を解析した。腸骨リンパ節からのリンパ流量は、コントロール群とHDT群の間に有意な差は認められなかった。腸間膜リンパ節からのリンパ流量は、コントロール群よりも、HDT群の方が高い傾向が認められたものの、有意な差は認められなかった。
- 3) 腸骨及び腸間膜リンパ節輸出リンパ管から動員された細胞数の変化を解析した。腸骨リンパ節から動員された細胞数は、1時間時で、コントロール群よりもHDT群の方が有意に増大し、3時間経過後も有意差が認められた。それに対し、腸間膜リンパ節から動員された細胞数は、コントロール群とHDT群との間に有意な差は認められなかった。
- 4) 腸骨リンパ節輸出リンパ管から動員された細胞数の中に占めるリンパ球の割合と、そのリンパ球のサブセットを解析した。腸骨リンパ節から動員された細胞は、ほとんどがリンパ球であり、そのリンパ球の割合はコントロール群とHDT群の間に有意な差はなかった。動員されたリンパ球のサブセット（CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8a<sup>+</sup>、CD45R<sup>+</sup>）についても、コントロール群とHDT群の間に有意な差はなかった。
- 5) アジュバントによる免疫化をラットに施し、リンパ球の割合とサブセットの解析を同様に行った。腸骨リンパ節から動員されたリンパ球の割合とサブセットは、コントロール群とHDT群の両群ともに、非免疫化下の実験との間に有意な差は認められなかった。
- 6) 腸骨リンパ節輸入リンパ管および輸出リンパ管のアルブミン濃度を解析した。腸骨リンパ節輸入リンパ管のアルブミン濃度は、コントロール群とHDT群の間に有意差は認められなかった。腸骨リンパ節輸出リンパ管のアルブミン濃度は、コントロール群よりも、HDT群の方が高い傾向が認められたものの、有意差は認められなかった。

以上の結果から、ボールマンケージを用いた短時間の頭部低位（HDT）刺激は、リンパ液のアルブミン

濃度やリンパ流量を変化させることなく、ラット腸骨リンパ節からのリンパ球の動員を一過性に誘発することが示された。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## The Association of Transforming Growth Factor Beta 1 Gene Polymorphisms with the Emphysema Phenotype of COPD in Japanese (日本人における肺気腫と TGF-β1 遺伝子多型との関連について)

伊 東 理 子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、世界中で毎年約百万人が死亡する重大な健康問題で、2020年には全死亡原因の第3位になることが予想されている。喫煙は主要なリスク要因であるが、重喫煙者であってもCOPDを発症する者とならない者がいることから遺伝的要因の関与が考えられている。Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) は、免疫応答や細胞増殖・分化、組織修復、細胞外基質産生などを調節する多機能なサイトカインで、TGF-β1活性を低下させたマウスでは加齢に伴って肺気腫を発症すること、COPD患者の気道上皮ではTGF-β1活性が増加し気道狭窄と相関することから、TGF-β1遺伝子(TGFB1)はCOPD発症の候補遺伝子の一つと考えられる。白人種、韓国人、中国人でTGFB1多型とCOPDとの関連が検討されているが、結果に相違がある。人種差の他、調査対象が肺気腫病変と気道病変を含む多様な集団であったことが原因と推測されたため、本研究では日本人の肺気腫に焦点をあて、TGFB1多型との関連を検討した。

【方法】調査対象は、肺気腫群70名、対照群99名で、肺気腫群は信州大学医学部附属病院を受診した患者で、呼吸機能検査で閉塞性換気障害を認め、高分解能CTで、両側上肺野、中肺野、下肺野の計6スライスのうち少なくとも1スライスでlow attenuation area (LAA)を5%以上認める者、対照群は近隣病院の人間ドックを受診した8.5 pack year以上の喫煙歴を有し、呼吸機能検査が正常の者とした。両群の血液サンプルよりDNAを抽出し、TaqMan assayを用いて、TGFB1の8つの単塩基多型(SNPs) (Promoter region : rs2241712, rs1982072, rs1800469 Exon 1 :



*rs1982073* Intron 2 : *rs2241716*, *rs4803455* 3'UTR : *rs6957*, *rs2241618*) について遺伝子型タイプピングを行い、各 SNPs について両群の遺伝子頻度を比較した。連鎖不平衡をもとに haplotype を想定し、両群でその頻度を比較した。肺気腫群において肺気腫に関連する可能性のある % 1 秒量、拡散能、LAA スコアと各 SNPs との相関の有無を検討し、さらに肺気腫群を % 1 秒量、すなわち気流制限の程度により 2 群に分け、SNPs との関連を検討した。

【考察】肺気腫群、対照群で各 SNPs の遺伝子頻度に有意差を認めなかった。しかし、3 番目に頻度の高い haplotype に有意差 ( $P=0.02$ ) が見られた。肺気腫群で、% 1 秒量と *rs1800469* 及び *rs1982073* との間に相関 ( $P=0.007$  及び  $P=0.032$ ) を認めたが、拡散能、LAA スコアと相関する SNPs は認められなかった。肺気腫群の % 1 秒量が 50% 未満の群では、50% 以上の群と比較すると、*rs1800469* の T アレルと *rs1982073* の C アレルをもつ頻度が有意に高かった。 ( $P=0.007$  及び  $P=0.041$ )

【結論】*TGFBI* 多型と COPD の相関について、これまでに白人種において *rs2241712*, *rs1800469*, *rs1982073* の 3 種類の SNPs で相関を示した報告と、逆に *rs1800469*, *rs1982073* の 2 種類の SNPs と全く相関を示さなかった報告が見られる。また、アジア人種については、韓国人では上記 3 種類の SNPs の何れとも相関を認めていないが、中国人では *rs1800469* と相関を示している。本研究の結果は人種的に近隣の韓国人の報告と類似していたが、過去に報告された *TGFBI* 多型と COPD との相関について一貫した類似性は認められなかった。これは、民族間による SNPs 間の連鎖不平衡の相違によるものが一因と考えられた。

本研究で % 1 秒量、すなわち気流制限と相関を認めた *rs1800469T* アレル及び *rs1982073C* アレルは、血漿中の TGF- $\beta$ 1 濃度を上昇させることが報告されている。また、動物実験では、TGF- $\beta$ 1 の活性化は傍細気管支領域の線維化をもたらすことが報告され、さらに COPD 患者では、気道上皮で TGF- $\beta$ 1 mRNA 転写が上昇しており、その程度は末梢気道狭窄と相関することが報告されている。すなわち *rs1800469T* アレル及び *rs1982073C* アレルを持つ個体では、TGF- $\beta$ 1 の活性化を通して末梢気道上皮下の線維化による気道狭窄が進行し、気流制限を来している可能性が考えられた。本研究では肺気腫に焦点をあて、*TGFBI*

多型との関連を検討し、TGF $\beta$ 1 遺伝子のハプロタイプの一つが日本人の肺気腫と関与している可能性、さらに、二つの SNPs が気道狭窄の程度と関連している可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、喫煙が主要なリスク要因であるが、重喫煙者でも COPD を発症しない者がいることから、遺伝的要因の関与が考えられる。Transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) は、免疫応答や細胞増殖・分化、組織修復、細胞外基質産生などを調節するサイトカインで、間質性肺炎など線維化を来す疾患、動脈硬化、乳癌などに関与すると報告されている。TGF- $\beta$ 1 遺伝子 (*TGFBI*) は COPD 発症の候補遺伝子であり、今回、日本人の肺気腫と *TGFBI* 多型との関連を検討した。胸部 HRCT で肺気腫を認める COPD 患者群 70 名、対照群 99 名について、*TGFBI* の 8 つの単塩基多型 (SNPs) について遺伝子型タイプピングを行い、両群で遺伝子頻度、ハプロタイプ頻度を比較した。また、肺気腫群において % 1 秒量、拡散能、low attenuation area (LAA) スコアと各 SNPs との相関を検討した。

以上の検討により、下記の結果を得た。

1. 肺気腫群、対照群間で *TGFBI* のいずれの SNPs 頻度にも有意差を認めなかったが、ハプロタイプ 3 の頻度が肺気腫群で有意に高く、そのブロック 2 について、肺気腫との関連を認めた。
2. 肺気腫群で、いずれの SNPs も LAA スコア、拡散能と相関を認めなかった。
3. 肺気腫群で、*rs1800469* と *rs1982073* で COPD の重症度である % 1 秒量との関連を認めた。
4. 肺気腫群のうち 50% 以下の重症～最重症群で、% 1 秒量 50% 以上の軽症～中等症群と比較し、*rs1800469* の T アレルと *rs1982073* の C アレルをもつ頻度が有意に高かった。

これらの結果により、*TGFBI* のハプロタイプ ブロック 2 が日本人の肺気腫の発症に関与している可能性と、*rs1800469*, *rs1982073* が COPD の重症度に関与している可能性が示唆された。*rs1800469* の T アレルと *rs1982073* の C アレルは、血漿中の TGF- $\beta$ 1 濃度を上昇させることが報告されており、*rs1800469T* アレル及び *rs1982073C* アレルを持つ個体では、TGF- $\beta$ 1 の活性化を通して末梢気道上皮下の線維化による気道狭窄が進行し、気流制限を来すという機序が考えられた。

以上をもって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Microsatellite Scan Identifies New Candidate Genes for Susceptibility to Alcoholic Chronic Pancreatitis in Japanese Patients (アルコール性慢性膵炎の疾患関連遺伝子のゲノムワイド検索)

北原 桂

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】アルコール性慢性膵炎発症にはアルコール多飲以外に環境・遺伝因子などが複合的に関与するとされている。慢性膵炎の個々の疾患関連遺伝子については PRSS1, PRSS2, CTSC, SPINK1 などのトリプシノーゲン関連遺伝子や ALDH2, ALDH3, CYP2E1 などのアルコール代謝関連遺伝子の検討も進められているが、アルコール性慢性膵炎との関係は十分に解明されていない。本研究では従来の特定の遺伝子を対象を絞る研究方法ではなく、全遺伝子のゲノムワイド検索を行い、網羅的に疾患関連遺伝子の同定を試みた。

【対象と方法】アルコール性慢性膵炎患者65人(男性63人, 女性2人, 平均年齢55.2歳)を対象とし、比較対照群として健常者99人を選び疾患関連遺伝子を比較検討した。血液よりDNAを抽出し、マイクロサテライトマーカープライマーペアを400組用いてPCRを施行した。ABI3130 Genetic AnalyzerおよびGeneMapperソフトウェアを用いてPCR産物のアリルタイピングおよび相関解析を行い疾患関連マーカートを同定した。さらに疾患関連マーカートの上下流500kb以内に存在する遺伝子をNCBI map viewerで検索し疾患関連遺伝子を同定した。

【結果】全染色体上で疾患感受性を示したマーカーはD2S125, D4S2935, D6S308, D10S547, D10S185, D10S217, D15S1007, D15S130, D18S61, D18S462で合計10個、疾患抵抗性を示したマーカーはD1S213, D2S367, D4S413, D7S516, D12S1723で合計5個であった。このうち、疾患感受性を示すD15S1007マイクロサテライトマーカーとアルコール性慢性膵炎の間にもっとも強い相関関係を認めた(70.8% vs. 35.1%, OR=4.48,  $P<0.0001$ )。さらにD15S1007マーカーの近傍にある遺伝子を検索したところ、FMN1, RYR3, AVENなどを疾患感受性候補遺伝子として

同定した。このうちRYR3は膵腺房細胞内の網内系に存在するCaイオン放出チャンネルであることが報告されており、胆汁酸による刺激やアルコール代謝の過程で起こる細胞内Caイオン伝達に関与するとされている。また膵腺房細胞内の異常なCaイオン濃度上昇が細胞壊死を起こすことも報告されている。これらのことからRYR3遺伝子変異が異常な細胞内Caイオン濃度の上昇を起こし、細胞が壊死することで慢性膵炎を起こす可能性が考察された。

【結論】アルコール性慢性膵炎のゲノムワイド検索を用いて10個の疾患感受性遺伝子座と5個の疾患抵抗性遺伝子座を同定することができた。またRYR3など関係性の高い遺伝子に変異が存在する可能性が示唆された。今後これらの遺伝子についてSNP解析を行い、遺伝子変異の有無を検討していく予定である。

(論文審査の結果の要旨)

アルコール性慢性膵炎発症にはアルコール多飲以外に環境・遺伝因子などが複合的に関与するとされている。慢性膵炎の個々の疾患関連遺伝子についてはトリプシノーゲン関連遺伝子やアルコール代謝関連遺伝子の検討も進められているが、アルコール性慢性膵炎との関係は十分に解明されていない。本研究では従来の特定の遺伝子を対象を絞る研究方法ではなく、全遺伝子のゲノムワイド検索を行い、網羅的に疾患関連遺伝子の同定を試みた。

アルコール性慢性膵炎患者65人を対象とし、比較対照群として健常者99人を選び疾患関連遺伝子を比較検討した。

その結果、北原は以下の結論を得た。

1. 全染色体上で疾患感受性を示したマーカーは合計10個、疾患抵抗性を示したマーカーは合計5個であった。
2. 疾患感受性を示すD15S1007マイクロサテライトマーカーとアルコール性慢性膵炎の間にもっとも強い相関関係を認めた。
3. D15S1007マーカーの近傍にある遺伝子を検索したところ、候補遺伝子としてRYR3を同定した。
4. RYR3は膵腺房細胞内のCaイオン放出チャンネルであることが報告されており、RYR3の遺伝子変異が異常な細胞内Caイオン濃度の上昇を起こし、慢性膵炎を起こす可能性が考えられた。

今回の研究では慢性膵炎のゲノムワイド検索を行うことで、従来指摘されていなかった疾患候補遺伝子を同定することができた。慢性膵炎の発症には複数の遺

伝子が関与していると考えられるが、その一つの遺伝子を同定できたことは病態解明に寄与するもので、将来的には分子標的治療などに応用できる可能性もあり極めて意義のあるものである。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Role of dexamethasone and oncostatin M on the formation of vacuoles in human fetal liver cells (ヒト胎児肝細胞内巨大空胞様小器官形成におけるデキサメタゾン及びオンコスタチン M の役割)

寺 元 剛

(論文の内容の要旨)

【目的】 Oncostatin M (OSM) は interleukin (IL) - 6ファミリーに属するサイトカインで、肝細胞の分化・成熟、肝再生に重要な因子であることが知られている。また、dexamethasone (DEX) はこれらサイトカイン類の効果にも影響を及ぼすことから、肝細胞成熟に重要な役割を果たすと考えられている。これまでの研究で、ヒト胎児肝 (HFL) 細胞に DEX 及び OSM を同時処理 (DEX/OSM) することにより、その細胞内に多数の巨大な空胞様小器官が形成されること、また、こうした形態変化は両薬剤の相互作用による結果であることを見出した (参考論文: Matsunaga T, Toba M, Teramoto T, Mizuya M, Aikawa K, Ohmori S. Med Mol Morphol 41: 53-58, 2008)。現在まで、グルココルチコイドとサイトカインの組み合わせによる *in vivo* でのこうした形態変化に関する報告はなく、未だ巨大空胞様小器官が形成される意義は明らかにはされていない。そこで、HFL 細胞内に出現する空胞様小器官の形成と巨大化の過程で DEX 及び OSM が果たす役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法】 HFL 細胞 (6 胎児肝混合, 平均胎齢13週) は米国 Applied Cell Biology Research Institute 社 (大日本製薬) より入手し、コラーゲン処理した 6 well-plate 上に播種し 10% FBS 含有 William's E 培地にて培養した。培養 7 日後に DEX ( $10^{-7}$ M) および OSM (10 ng/ml) を添加し、72 時間後に細胞の回収、あるいは細胞の固定を行った。なお、DEX は DMSO に溶解し、DMSO の最終濃度が 0.1% となるように添加した。mRNA 発現解析は、薬物処理 72 時

間後に抽出した総 RNA を用い RT-PCR 法により行った。空胞様小器官の定量は、6 well-plate の一定領域内に形成した数を、計数ソフトを用いて直接計数することにより行った。画像解析は Scion Image を用いて行った。

【結果】 正常 HFL 細胞は均一な形態で単層に増殖するが、DEX と OSM (DEX/OSM) を添加することにより HFL 細胞内部には、クラスター状に多数の空胞が形成された。これら空胞の数は、glucocorticoid receptor (GR) antagonist である RU-486 によって顕著に抑制された。HFL 細胞に OSM を処理することにより IL-6 mRNA の発現量が顕著に増加した。また、DEX を処理することにより、IL-6R mRNA の発現量は減少した。OSM もしくは DEX/OSM により空胞は顕著に巨大化し、gp130 antagonist である madindoline-A (MDL-A) によって約 65% まで縮小した。空胞のサイズは RU-486 による変化を受けなかった。MDL-A は IL-6, DEX/IL-6 によって形成された空胞に対しても縮小作用を示した。

【考察】 Glucocorticoid は GR を介して生理機能や、遺伝子発現の調整を行い、この効果は、RU-486 によって抑制される。HFL 細胞には、DEX/OSM, もしくは DEX/IL-6 の相互作用により、多数の巨大な空胞様小器官が出現したが、その数は RU-486 処理によって有意に減少した。このことより、HFL 細胞における巨大空胞様小器官の形成において、DEX は空胞の発生に関与しており、その効果は GR を介していることが考えられた。興味深いことに、空胞は OSM によって顕著に巨大化するが、その大きさへの RU-486 による影響はなかった。参考論文で示した電子顕微鏡解析により、空胞の巨大化は空胞同士の膜融合により起こる可能性を示唆している。この空胞の巨大化は、MDL-A によって抑制された。MDL-A は、IL-6 に代表される cytokines の受容体サブユニットである gp130 の二量化を阻害することにより、その刺激効果を抑制する。MDL-A が IL-6 選択的阻害剤であること、OSM により IL-6 mRNA が顕著に発現していることから、空胞が巨大化する一連の過程に、IL-6 が関与しているものと考えられた。同様の形態変化は、DEX/IL-6 で処理した HFL 細胞にも観察されており、形成した空胞の数は顕著に増加した。これらのことより、OSM は、IL-6 に関するシグナル伝達経路を一部介して小胞の巨大化に関与しているものと考えられる。これらの結果より、巨大空胞様小器官の形成において、

DEX は GR を介する経路を経て小胞が発現する現象に関与しており、OSM や、IL-6によってこれらの小胞が融合することにより、巨大化を促進していることが推察された。

(論文審査の結果の要旨)

Oncostatin M (OSM) は interleukin (IL) -6 ファミリーに属するサイトカインで、肝細胞の分化・成熟、肝再生に重要な因子であることが知られている。また、dexamethasone (DEX) はこれらサイトカイン類の効果にも影響を及ぼすことから、両者の併用は肝細胞成熟に重要な役割を果たすと考えられている。これまでの研究で、ヒト胎児肝 (HFL) 細胞に DEX 及び OSM を同時処理 (DEX/OSM) することにより、その細胞内に多数の巨大な空胞様小器官が形成されること、また、こうした形態変化は両薬剤の相互作用による結果であることを見出した (参考論文: Matsunaga T, Toba M, Teramoto T, Mizuya M, Aikawa K, Ohmori S. Med Mol Morphol 41: 53-58, 2008)。HFL 細胞でのこうした形態変化に対する意義については報告されておらず、詳細に検討する事は大変意義深いものであるとした。そこで、DEX 及び OSM について、関連の考えられる antagonist による影響を、細胞に生じる空胞数、及び空胞の径の観点から比較検討し、両薬剤の空胞形成に及ぼす役割について検討した。

その結果、寺元 剛は次の結果を得た。

1. DEX と OSM は併用することにより相乗的に空胞数が増加した。DEX 単独群及び DEX/OSM 群は glucocorticoid receptor antagonist である RU486 を添加することにより用量依存的に空胞数が有意に減少した。
  2. 空胞は OSM を添加することにより有意に巨大化した。
  3. IL-6 antagonist である MDL-A によって OSM により巨大化したと思われる空胞の大きさは有意に小さくなった。
  4. IL-6 についても、形成した空胞は優位に巨大化し、MDL-A によって、その大きさは有意に縮小した。
  5. OSM は IL-6 mRNA を強いレベルで誘導し、DEX は IL-6 mRNA の発現を抑制した。
  6. DEX と IL-6 は併用することにより相乗的に増加した。
- また、過去の報告より、空胞は各々が直接的な融合

により巨大化することがわかっており、これらの結果とあわせて、DEX は HFL 細胞内で、GR を介して空胞の発生に関与していること、OSM は一部に IL-6 を介したプロセスを経て、空胞の巨大化に関与していることを結論付けた。主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Interleukin-21 stimulates B-cell immunoglobulin E synthesis in human beings concomitantly with activation-induced cytidine deaminase expression and differentiation into plasma cells (ヒトにおいて IL-21 は AID 発現および形質細胞への分化誘導を介し B 細胞の IgE 産生を促進する)

小林 真二

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 IL-21 は、T 細胞や NK 細胞に働き、B 細胞には免疫グロブリン産生に関して重要な役割を担っていることが判明してきた。IL-21 の B 細胞に対する作用として Class Switch Recombination や形質細胞への分化誘導などが報告されている。近年、アレルギーの病態に重要な役割を担う IgE の産生調節に、IL-21 が IL-4 とともに深く関与することが示唆されている。ノックアウトマウスを用いた解析から IL-21 はマウス IgE 産生に抑制的に作用することが報告された。しかしながら IL-21 のヒト IgE 産生に関する作用は明確に分かっていない。本研究は IL-21 のヒト B 細胞 IgE 産生における作用を検討した。

【方法】 アレルギー疾患をもたない健康人から末梢血を採取しフィコール分離して末梢血単核球を得た。RosetteSep を用いて B 細胞を分離し、さらにソーティング法でナイーブ B 細胞とメモリー B 細胞を精製した。IL-4、抗 CD40 抗体/CD32-transfectants (CD32T)、IL-10 などの刺激下において、IL-21 (最適濃度 25 ng/ml) を添加し 14 日間培養後培養上清中の IgE を ELISA で測定した。形質細胞の分化誘導は抗 CD38 抗体を用いフローサイトメトリー法で検討した。また、RT-PCR を用いて germline, AID, Blimp-1, XBP1 各 mRNA の発現を検討した。

【結果】 無刺激および IL-4 刺激下では、IL-21 の添加によって IgE 産生はみられなかった。IL-4 + 抗 CD40 抗体/CD32T 刺激下に IL-21 を添加したところ IgE 産

生が著明に増強した。さらに、IL-4+抗CD40抗体/CD32T+IL-10刺激下では、IL-21によってIgE産生の劇的な増加が認められた。またナイーブB細胞、メモリーB細胞に対しても同様の結果を得た。各刺激下においてIL-21はgermline mRNA発現を増強しなかったがAID mRNA発現を増強した。またIL-21はIL-4+抗CD40抗体/CD32T刺激下でCD38陽性形質細胞への分化誘導を認め、その細胞内には高濃度にIgEが存在することが確認された。また、形質細胞分化にかかわる遺伝子発現解析ではIL-21は、無刺激およびIL4+抗CD40抗体刺激下においてBlimp-1 mRNAの発現を増強した。一方同じ刺激下でXBP1 mRNA発現には影響を与えなかった。Western blot解析でもXBP1発現に影響しないことを確認した。

【結論】IL-21はIL-4とCD40ならびにIL-10刺激下においてヒトB細胞IgE産生を劇的に増強する作用をもつサイトカインであることが判明した。その作用機序はAIDの発現増強とBlimp-1を介する形質細胞分化誘導作用の両者によるものであると結論された。

#### (論文審査の結果の要旨)

IL-21は、T細胞やNK細胞に働き、B細胞には免疫グロブリン産生に関して重要な役割を担っていることが判明してきた。IL-21のB細胞に対する作用としてClass Switch Recombinationや形質細胞への分化誘導などが報告されている。近年、アレルギーの病態に重要な役割を担うIgEの産生調節に、IL-21がIL-4とともに深く関与することが示唆されている。ノックアウトマウスを用いた解析からIL-21はマウスIgE産生に抑制的に作用することが報告された。しかしながらIL-21のヒトIgE産生に関する作用は明確に分かっていない。本研究はIL-21のヒトB細胞IgE産生における作用を検討した。

アレルギー疾患をもたない健康人から末梢血を採取しフィコール分離して末梢血単核球を得た。RosetteSepを用いてB細胞を分離し、さらにソーティング法でナイーブB細胞とメモリーB細胞を精製した。IL-4、抗CD40抗体/CD32-transfectants (CD32T)、IL-10などの刺激下において、IL-21(最適濃度25 ng/ml)を添加し14日間培養後培養上清中のIgEをELISAで測定した。形質細胞の分化誘導は抗CD38抗体を用いフローサイトメトリー法で検討した。また、RT-PCRを用いてgermline, AID, Blimp-1, XBP1各mRNAの発現を検討した。

その結果、小林は次の結論を得た。

- 1) 無刺激およびIL-4刺激下では、IL-21の添加によってIgE産生はみられなかった。IL-4+抗CD40抗体/CD32T刺激下にIL-21を添加したところIgE産生が著明に増強した。さらに、IL-4+抗CD40抗体/CD32T+IL-10刺激下では、IL-21によってIgE産生の劇的な増加が認められた。またナイーブB細胞、メモリーB細胞に対しても同様の結果を得た。
- 2) 各刺激下においてIL-21はgermline mRNA発現を増強しなかったがAID mRNA発現を増強した。
- 3) IL-21はIL-4+抗CD40抗体/CD32T刺激下でCD38陽性形質細胞への分化誘導を認め、その細胞内には高濃度にIgEが存在することが確認された。
- 4) 形質細胞分化にかかわる遺伝子発現解析ではIL-21は、無刺激およびIL4+抗CD40抗体刺激下においてBlimp-1 mRNAの発現を増強した。一方同じ刺激下でXBP1 mRNA発現には影響を与えなかった。Western blot解析でもXBP1発現に影響しないことを確認した。

IL-21はIL-4とCD40ならびにIL-10刺激下においてヒトB細胞IgE産生を劇的に増強する作用をもつサイトカインであることが判明した。その作用機序はAIDの発現増強とBlimp-1を介する形質細胞分化誘導作用の両者によるものであると結論された。今後アレルギー疾患の治療においてIL-21のIgE産生増強作用は非常に有用な知見と考えられ、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Pathological activation of KIT in metastatic tumors of acral and mucosal melanomas (肢端型・粘膜型悪性黒色腫の転移腫瘍におけるKITの活性化)

芦田 敦子

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】悪性黒色腫(MM)の好発部位には大きな人種差があり、白人では間歇露光部に生じるMMが大多数を占めるが、日本人では掌蹠、爪部に発生する肢端型と粘膜型MMが過半数を占める。一方、近年の研究でMMの遺伝子異常は発生部位により異なることが明らかにされており、間歇露光部のMMでは癌遺伝子*BRAF*および*NRAS*の変異が高頻度に認められる。これに対して、肢端型や粘膜型では*BRAF*、*NRAS*癌遺伝子変異は稀であるが、チロシンキナーゼ受容体である*KIT*の遺伝子異常(変異

やコピー数増加)が40%近くに認められる。*KIT* 遺伝子の変異は消化管の間質細胞腫瘍 (GIST) に高率に認められることはよく知られており、*KIT* の活性化を阻害する分子標的薬である imatinib と sunitinib がその治療に広く用いられている。したがって、進行期の肢端型や粘膜型の MM にもこれらの分子標的薬が有力な選択肢となる可能性が高い。しかし、日本人の肢端型および粘膜型の MM の転移巣における *KIT* 遺伝子変異の頻度やタイプは不明であり、これらの分子標的薬の適応や選択の基準は明らかではない。そこで本研究では、肢端型および粘膜型 MM の臨床検体 (主に転移巣腫瘍) について *KIT* の発現と遺伝子異常を解析し、さらに肢端型 MM の細胞株を用いてチロシンキナーゼ阻害薬である imatinib と sunitinib の細胞増殖抑制効果を検討した。

【材料及び方法】 <臨床検体> MM の切除標本28例 (転移24例, 原発4例) を用いた。内訳は、肢端型22例, 粘膜型は6例であった。これらについて *KIT* (CD117) と Stem cell factor (SCF) の免疫染色, *KIT* (exon11, 13, 17, 18), *BRAF*, *NRAS* の DNA シークエンス, real-time PCR を用いて *KIT* の, FISH を用いて *cyclinD1* の, 各々の gene amplification を検討した。また、凍結組織13例を用いて *KIT* とリン酸化 *KIT* の Western blot 解析を行った。<細胞株> 肢端型 MM の6つの細胞株を用いて imatinib と sunitinib に対する細胞増殖抑制効果を検討した。

【結果】 *KIT* の免疫染色では74%が陽性を示し、48%では中等度以上の強い発現が認められた。*KIT* のダイレクトシークエンスでは2例の転移腫瘍に K642E および D820Y 変異が検出され、K642E 変異を示す1例を含む4例に *KIT* 遺伝子のコピー数増加が認められた。さらに、凍結組織を用いた Western blot 解析では8例 (62%) に *KIT* のリン酸化が確認された。リン酸化は *KIT* の遺伝子異常を認めない5例にもみられ、これらの症例では免疫組織染色でメラノーマ細胞だけでなく線維芽細胞や血管内皮細胞などの間質細胞に *KIT* のリガンドである SCF の発現がみられたことから、autocrine または paracrine 刺激による *KIT* の活性化が示唆された。一方、肢端型 MM 細胞株6株における検討では、3株 (Mel-2, SMYM-PRGP, SM3) において *KIT* の発現を認め、SM3株には臨床検体でも検出された D820Y 変異が見出された。*KIT* が野生型を示した SMYM-PRGP では、SCF の paracrine 刺激により *KIT* のリン酸化が誘導

された。D820Y 変異を有する SM3 では SCF 刺激なしにリン酸化 *KIT* が認められた。そこで、*KIT* を発現しない SM2-1 株を対照として、SM3 と SMYM-PRGP について、imatinib と sunitinib の細胞増殖抑制効果を検討した。D820Y 変異を有する SM3 は imatinib では増殖が抑制されなかったが、sunitinib で有意の増殖抑制効果がみられた。野生型 *KIT* を発現する SMYM-PRGP では、imatinib, sunitinib とともに SCF 依存性の細胞増殖と *KIT* のリン酸化を濃度依存性に抑制したが、抑制効果は sunitinib の方が imatinib より強力であった。

【結論】 肢端型・粘膜型 MM の転移腫瘍では *KIT* の遺伝子異常または SCF/*KIT* の autocrine や paracrine 刺激により高頻度に *KIT* が活性化していることが示唆された。肢端型 MM 細胞株に対する実験では、*KIT* のゲノムタイプによってはチロシンキナーゼ阻害薬である imatinib と sunitinib は増殖抑制効果を示した。以上より、転移腫瘍の免疫組織染色や遺伝子解析により適切に症例を選択すれば、*KIT* を標的とした進行期 MM に対する分子標的治療が可能であることが強く示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

進行期の悪性黒色腫 (MM) の有効な治療法は確立されていない。近年の研究で MM の遺伝子異常は発生部位により異なることが明らかにされ、間歇露光部の MM では癌遺伝子 *BRAF* および *NRAS* の変異が高頻度に認められるのに対して、肢端型や粘膜型では *BRAF*, *NRAS* 癌遺伝子変異は稀であるが、チロシンキナーゼ受容体のひとつである *KIT* の遺伝子異常 (変異や gene amplification) が40%近くに認められる。*KIT* 遺伝子の変異は消化管の間質細胞腫瘍 (GIST) に高率に認められることはよく知られており、*KIT* の活性化を阻害する分子標的薬である imatinib と sunitinib がその治療に広く用いられている。したがって、進行期の肢端型や粘膜型の MM にもこれらの分子標的薬が有力な選択肢となる可能性が高い。また imatinib は *KIT* の juxtamembrane domain の変異には有効だが kinase domain の変異には無効であることが知られている。日本人の過半数を占める肢端型および粘膜型の MM の転移巣における *KIT* 遺伝子変異の頻度やタイプは不明であり、これらの分子標的薬の適応や選択の基準は明らかではない。そこで芦田らは、肢端型および粘膜型 MM の主に転移巣の臨床検体につき、*KIT* の発現や遺伝子異常を検討した。さらに肢

端型 MM の細胞株を用いてチロシンキナーゼ阻害薬である imatinib と sunitinib の細胞増殖抑制効果を検討した。

その結果、芦田は次の結果を得た。

<臨床検体での知見>

1. KIT のタンパク発現は74 %に認められ、48 %は中等度から強陽性を示した。
2. *KIT* の遺伝子異常は19 %に検出された。
3. 変異は2例 (K642E, D820Y) に認められた。
4. K642E 変異を示す1例を含む4例に *KIT* 遺伝子のコピー数増加が認められた。
5. Western blot 解析によるリン酸化 KIT の発現は、8/13例 (62 %) に認められた。
6. 8例のうち5例は *KIT* の遺伝子異常を伴わないが、これらの症例では免疫組織染色でメラノーマ細胞だけでなく線維芽細胞や血管内皮細胞などの間質細胞に KIT のリガンドである SCF の強発現がみられた。

<細胞株での知見>

7. D820Y変異を有するSM3はimatinibでは増殖が抑制されなかったが、sunitinib で有意の増殖抑制効果が見られた。
8. 野生型 *KIT* を発現する SMMY-PRGP では、imatinib, sunitinib とも SCF 依存性の細胞増殖と *KIT* のリン酸化を濃度依存性に抑制したが、抑制効果は sunitinib の方が imatinib より強力であった。これらの結果より、肢端型・粘膜型MMの転移腫瘍では、*KIT* の遺伝子異常またはSCF/*KIT* のautocrine や paracrine 刺激により高頻度に *KIT* が活性化していることが示された。肢端型 MM 細胞株に対する実験では、*KIT* のゲノムタイプによってはチロシンキナーゼ阻害薬である imatinib や sunitinib は増殖抑制効果があることが示された。以上の結果は、肢端型・粘膜型 MM の転移腫瘍の免疫組織染色や遺伝子解析により適切に症例を選択すれば、*KIT* を標的とした進行期 MM に対する分子標的治療が可能であることを示唆している。本研究は *KIT* を標的とした分子標的治療が本邦のメラノーマ患者に行える可能性を初めて具体的に示したものであり、その臨床的意義は極めて大きい。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

NADPH oxidase (Nox) 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression (活性酸素産生遺伝子NOX4のG2/M期の細胞周期進行の制御による悪性黒色腫の発癌への関与)

山 浦 麻 貴

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】悪性黒色腫の発癌、増殖過程において活性酸素の産生が関与すると考えられているが、この活性酸素の発生源および発癌、増殖のシグナル伝達にどのように関与するか、いまだ解明されていない。そこで悪性腫瘍の増殖に関与すると報告されており、活性酸素を産生するNADPH oxidase (NOX) 4のヒト悪性黒色腫における発現と機能を解析した。

【方法、結果および考察】悪性黒色腫の培養細胞において NOX4の mRNA レベルでの発現を Real-time RT-PCR にて検討したところ、20検体中13検体に発現の上昇が認められた。そこで NOX4の発現の上昇が見られた培養細胞 (MM-BP) において NOX4の mRNA を small interfering RNAs (siRNAs) により抑制すると、液体培地での増殖が抑制され、足場非依存性の腫瘍増殖の抑制やヌードマウスでの腫瘍形成の抑制も認められた。この結果に一致し抗酸化剤 (vitamine E) やフラボ蛋白抑制剤である Diphenyleneiodonium chloride (DPI) によっても同細胞の液体培地での増殖の抑制を認めた。さらに NOX4がどのように増殖に関与するかを解明するため、フローサイトメトリーの解析を行ったところ、siRNAs と DPI が G2/M 細胞周期進行の抑制を誘導することが確かめられた。この細胞周期の抑制は別の悪性黒色腫の培養細胞 (928mel) でも観察された。さらに siRNAs と DPI は G2/M 細胞周期チェックポイントで重要な Cyclin Dependent Kinase1 (CDK1) の Tyr15のリン酸化による不活性化状態に導き、またこの不活性化を導く cdc25c の高リン酸化を引き起こすことも確認された。これらの結果から NOX4の発現を抑制すると cdc25c の高リン酸化による CDK1の不活性化を介して、G2-M 細胞周期の制止が引き起こされ細胞増殖を抑制していることが示唆された。また活性酸素のスカベンジャーであるカタラーゼを発現させた際にも G2/M 細胞周期の制止を認めたことから、NOX4の産生

する活性酸素がメディエーターとなってG2-M細胞周期進行を制御していることが示唆された。さらに悪性黒色腫の手術検体の免疫組織化学染色によりNOX4の発現は13検体中31.0%に認められ、NOX4の発現と悪性黒色腫の発癌過程との関連が示唆された。【結論】NOX4により産生された活性酸素は悪性黒色腫の発癌過程に必要であり、G2/M期の細胞周期進行を制御することにより悪性黒色腫の増殖に寄与していると考えられた。今後、NOX4が悪性黒色腫の治療と診断の分子標的になりうると期待される。

(論文審査の結果の要旨)

悪性黒色腫の発癌、増殖過程において活性酸素の産生が関与すると考えられているが、この活性酸素の発生源および発癌、増殖のシグナル伝達にどのように関与するか、解明されていない。本論文において山浦は活性酸素を産生するNADPH oxidase (NOX) 4のヒト悪性黒色腫における発現と機能を解析し、次のような結果を得た。

- 1) 悪性黒色腫の培養細胞においてNOX4のmRNAレベルでの発現をReal-time RT-PCRにて検討したところ、20検体中13検体に発現の上昇が認められた。
- 2) 培養細胞 (MM-BP) においてNOX4のmRNAをsmall interfering RNAs (siRNAs) により抑制すると液体培地での増殖が抑制され、足場非依存性の腫瘍増殖の抑制やヌードマウスでの腫瘍形成の抑制も認められた。この結果に一致し抗酸化剤 (vitamine E) やフラボ蛋白抑制剤であるDiphenyleneiodonium chloride (DPI) によっても液体培地での増殖の抑制を認めた。
- 3) NOX4が産生する活性酸素はcdc25cの脱リン酸化を介して、G2/M細胞周期チェックポイントで重要なCyclin Dependent Kinase1 (CDK1) のTyr15を脱リン酸化して活性化状態に導き、G2/M細胞周期を促進することが示唆された。
- 4) 悪性黒色腫の手術検体の免疫組織化学染色によりNOX4の発現は13検体中31.0%に認められ、NOX4の発現と悪性黒色腫の発癌過程との関連が示唆された。

本研究により、NOX4により産生された活性酸素は悪性黒色腫の発癌過程に必要であり、G2/M期の細胞周期進行を制御することにより悪性黒色腫の増殖に寄与していると考えられた。NOX4の機能解析は、悪性黒色腫の分子生物学的特徴の解明に重要な発見であり、

今後治療と診断の分子標的への応用の可能性を示すものであると考えられ、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Airway hyper-responsiveness in young adults with asthma that remitted either during or before adolescence (若年成人における小児喘息既往者の気道過敏性の検討)

小 松 佳 道

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】

小児喘息患者は、思春期までに約50%以上が寛解するが、そのうち約40-50%は成人になって再び発症するといわれている。小児喘息が寛解した後の気道過敏性は30~80%が陽性であり、思春期以降の寛解していく時期に気道過敏性が残存している人は再発する可能性が高いと報告されている。しかし、成人になって喘息が再発するメカニズムは解明されていない。小児喘息から寛解した後も気道炎症や気道過敏性が残存し、これらが再発に関連する可能性がある。我々は、小児喘息から寛解したという若年成人において、気道過敏性亢進やアレルギー性気道炎症が寛解しているかどうかを検討した。

【対象・方法】

信州大学医学部の学生約400名に小児喘息、アレルギーの既往、喫煙歴をアンケート調査した。返答のあった学生の中で、非喫煙者で本研究に同意した学生を寛解群 (remission group)、アトピー群 (atopy group)、コントロール群 (control group) の3群に分けた。小児喘息の既往があり無治療で5年以上症状の無い群24名 (年齢: 26±0.7歳) を寛解群、小児喘息の既往がないがアレルギー疾患 (アレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎など) を持ち、総Ig-E値上昇、特異的Ig-E抗体CAP-radioallergosorbent test (RAST) scoreが6種の抗原 (Dermatophagoides farinae, Aspergillus fumigatus, Candida albicans, canine and feline dander and Japanese cedar Cryptomeria japonica) いずれかの項目で陽性 (score ≥ 1) を示す群25名 (年齢: 25.4±0.6歳) をアトピー群、アレルギー疾患を持たない、総Ig-E値正常、CAP-RAST 6種の項目のscoreがすべて正常の群19名 (年齢: 25.2±0.5歳) をコントロール群とした。方法は、血清総Ig-E抗体、特異的Ig-E抗体CAP-RASTを測定し、



スパイロメトリーによる呼吸機能検査, 呼気中 NO 濃度の測定, アストグラフ法を用いて気道過敏性試験を施行した。さらに, 高張食塩水吸入による誘発喀痰検査を施行した。

【結果】

寛解群は気道過敏性亢進 ( $P < 0.01$ ), 喀痰中の好酸球数増多 ( $P < 0.05$ ), ダニに対する特異的 IgE 抗体陽性 ( $P < 0.01$ ) がアトピー群, コントロール群に比べて有意に高値を示した。血清総 Ig-E 抗体値は寛解群 ( $P < 0.01$ ) とアトピー群 ( $P < 0.01$ ) でコントロール群に比べて有意に高値を示した。呼吸機能検査は, いずれの群も % VC, FEV<sub>1</sub>% は正常範囲内を示した。% FEF<sub>25-75</sub>% と % FEF<sub>75</sub>% ( $P < 0.01$ ) は寛解群が, アトピー群, コントロール群に比べて有意に低値を示した。呼気中 NO 濃度は, 寛解群 ( $P < 0.01$ ) とアトピー群 ( $P < 0.05$ ) でコントロール群に比べて有意に高値であったが, 寛解群とアトピー群で有意差は認めなかった。寛解群は気道過敏性亢進を持つものが 50% (24名中12名), 喀痰中の好酸球数が 3% 以上示したものが 33% (24名中 8名), どちらか一方が陽性のものは 62.5% (24名中15名) に認められた。寛解群24名中に気道過敏性も好酸球性炎症もいずれも持たないものは 9名であった。寛解群の中で気道過敏性亢進を持つ群 (12名) と持たない群 (12名) に分けて検討した。年齢, 性差, 喘息の発症年齢に有意差は認められなかったが, 気道過敏性亢進を持つ群は持たない群に比べて有意に喘息の罹病期間が長く ( $P < 0.05$ ), 寛解している期間が有意に短かった ( $P < 0.05$ )。さらに気道過敏性亢進を持つ群は, 持たない群に比べて有意に喀痰中好酸球数, 呼気中 NO 濃度が高値を示した ( $P < 0.05$ )。

【考案】

小児喘息を既往に持ち寛解したと判断された若年成人の中で約半数に気道過敏性亢進, 好酸球性の気道炎症, 軽度の気流閉塞を示すことが分かった。このことは, 将来の喘息発症の危険因子となることが考えられ, 注意深い経過観察が必要と思われた。

(論文審査の結果の要旨)

小児喘息は, 思春期までに約 50% 以上が寛解するが, 約 40-50% は成人になって再び発症するといわれている。しかし喘息が再発するメカニズムは解明されていない。我々は, 小児喘息から寛解したという若年成人の気道過敏性亢進や気道炎症が寛解しているかどうかを検討した。

信州大学医学部生 400 名に小児喘息, アレルギーの既往, 喫煙歴をアンケート調査し, 非喫煙者で本研究に同意した学生を 3 群に分けた。小児喘息の既往があり無治療で 5 年以上症状のない 24 名を寛解群, 小児喘息の既往がなくアレルギー疾患を持ち, 総 IgE 値上昇, 特異的 IgE 抗体 CAP-RAST 6 種の抗原 (Dermatophagoides farinae, Aspergillus fumigatus, Candida albicans, canine and feline dander and Japanese cedar Cryptomeria japonica) いずれかの項目で陽性を示す 25 名をアトピー群, アレルギー疾患を持たない, 総 IgE 値, CAP-RAST 6 種の項目が正常の 19 名をコントロール群とした。方法は, 血清総 IgE 抗体, 特異的 IgE 抗体 CAP-RAST を測定し, 呼吸機能検査, 呼気 NO 濃度, 気道過敏性試験, 誘発喀痰検査を施行した。

その結果, 小松佳道は次の結論を得た。

1. 寛解群は, コントロール群およびアトピー群に比べて喀痰中好酸球数上昇を示し, 呼吸機能検査において % FEF<sub>25-75</sub>% , % FEF<sub>75</sub>% は有意に低値, 気道過敏性亢進を示した。
2. 寛解群とアトピー群は, コントロール群に比べて有意に呼気 NO 濃度, 総 IgE 値の高値を示した。寛解群とアトピー群の間に有意差は認めなかった。
3. 寛解群において, 気道過敏性亢進の陽性群は, 陰性群に比べて小児喘息の罹病期間が長く, 寛解期間が短い, 喀痰中好酸球数や呼気 NO 濃度が高値を示した。

これらの結果より, 小児喘息を既往に持ち寛解したと判断された若年成人の約半数に気道過敏性亢進, 好酸球性の気道炎症, 軽度の気流閉塞を示すことが分かった。また, 気道過敏性亢進には罹病期間が密接に関係していた。小児喘息寛解後もアレルギー性気道炎症や気道過敏性が残存する者があり, 将来の喘息再発の危険因子となる可能性が示唆された。これらの事実は臨床的に重要と判断し, よって, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Differentiation of Monkey Embryonic Stem Cells into Hepatocytes and mRNA Expression of Cytochrome P450 Enzymes Responsible for Drug Metabolism: Comparison of Embryoid Body Formation Conditions and Matrices (サル胚性幹細胞の肝細胞への分化と薬物代謝に関与するシトクロム P450 の mRNA 発現: 胚様体作成条件および細胞外マトリックスの比較)

百瀬 泰行

(論文の内容の要旨)

【目的】

ヒトの肝細胞を用いた薬物代謝試験は、医薬品開発の初期段階において重要である。しかし、ヒト初代肝細胞は短命で、長期間培養による維持は不可能である。ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) は生体を構成するあらゆる細胞に分化可能であることから、初代肝細胞に代る薬物スクリーニングの有力な候補であるが、その使用には倫理的に限りがある。ヒト ES 細胞の表現型はサル ES 細胞とよく類似していることが知られている。したがって、サル ES 細胞は霊長類 ES 細胞の分化機構の研究やヒト ES 細胞のモデルとして有用であると考えられる。近年、サル ES 細胞は分化誘導因子を用いることで、神経細胞、血液細胞、膵細胞など種々の細胞に分化可能であることが示された。サル ES 細胞由来肝細胞は薬物代謝酵素の誘導や医薬品候補化合物の相互作用のような薬物動態試験に利用可能と思われる。しかしながら、これまでサル ES 細胞の肝細胞への分化に言及した研究はほとんど報告されていない。一般に、ES 細胞の分化は胚様体 (EB) を形成後、細胞外マトリックス (ECM) で処理したプレートに接着培養することにより行う。ECM の性質は、培養する細胞の表現型の多くに大きな影響を及ぼすことが知られている。本研究は、サル ES 細胞の肝細胞への分化及びシトクロム P450 (CYP) の mRNA 発現に及ぼす EB 形成条件並びに ECM の影響を明らかにすることを目的として検討を行った。

【方法】

剥離したカニクイザル ES 細胞 (cmES 細胞) のコロニーは、ピペッティングにて段階的に断片化した。EB はコロニー断片をコニカルチューブにて 2 または 5 日間培養することにより作成し、コラーゲン I、

Matrigel reduced あるいは Matrigel をコートしたプレートに接着させ、さらに培養することにより分化した。CYP 発現に対する酵素誘導の影響を明らかにするために、回収前 72 時間 3-メチルコラントレン (MC) またはリファンピシン (RIF) を培地に添加した。

【結果】

EB 作成条件の検討で、肝細胞のマーカー遺伝子、特にアルブミン (ALB) の発現レベルは、EB 形成のために 2 日間培養した方が、5 日間培養の場合より明らかに高かった。しかし、cmES 細胞断片の大きさによる肝細胞マーカーの発現レベルに顕著な差は見られなかった。また、ECM としてコラーゲン I を使用した場合と比較して、肝細胞マーカーの ALB、 $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) 及び CYP7A1 の mRNA 発現レベルは、各々 Matrigel reduced で 60、36 及び 9 倍高く、Matrigel では 226、71 及び 19 倍も高かった。さらに、薬物代謝型 CYP 分子種の CYP1A1、CYP2C43、CYP2D17 及び CYP3A8 の mRNA 発現レベルは、コラーゲン I 使用と比較して各々 Matrigel reduced で 6.5、11、2 及び 3 倍高く、Matrigel で 10、23、2 及び 2.5 倍高かった。CYP1A1 mRNA の発現レベルは、CYP1A1 の誘導剤である MC 処理によりコラーゲン I、Matrigel reduced 及び Matrigel で各々 7、4 及び 4 倍に誘導されたが、CYP3A の誘導剤である RIF によっては全く誘導されなかった。一方、Matrigel reduced 及び Matrigel における CYP3A8 mRNA の発現レベルは、RIF により顕著に誘導された。しかし、CYP2C43 と CYP2D17 mRNA の発現レベルは、これら化合物によってほとんど変動が認められなかった。

【考察】

分化後の細胞における肝細胞マーカーの発現は、EB 作成のための培養を 2 日にした方が 5 日間より明らかに高かった。一方、コロニーの断片サイズは肝細胞マーカー遺伝子の発現レベルに全く影響しなかった。この結果は、肝細胞への分化は EB 形成のための培養時間に影響され、コロニー断片のサイズには影響されないことを示している。Matrigel を用いた場合、AFP、ALB、CYP7A1 及び CYP2C43 の発現レベルが Matrigel reduced やコラーゲン I より高かった。その要因として、Matrigel に含まれる増殖因子やサイトカイン類の肝細胞への分化への寄与の可能性が考えられた。また、MC 及び RIF によって各々 CYP1A1 及び CYP3A8 が有意に誘導されたことより、ES

細胞から分化した肝細胞が、成熟肝細胞様の誘導作用を示すことが明らかとなった。以上の結果より、Matrigel は ES 細胞の肝細胞への分化に有用な ECM であること、及び医薬品開発における肝細胞のモデルとしてサル ES 細胞から分化した細胞を応用可能であることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

サル ES 細胞由来肝細胞は薬物代謝酵素の誘導や医薬品候補化合物の相互作用のような薬物動態試験に利用可能と思われる。しかしながら、これまでサル ES 細胞の肝細胞への分化に言及した研究はほとんど報告されていない。本研究は、サル ES 細胞の肝細胞への分化及びシトクロム P450 (CYP) の mRNA 発現に及ぼす胚様体 (EB) 形成条件並びに細胞外マトリックス (ECM) の影響を明らかにすることを目的として検討を行った。

剥離したカニクイザル ES 細胞 (cmES 細胞) のコロニーは、ピペッティングにて段階的に断片化した。EB はコロニー断片をコニカルチューブにて 2 または 5 日間培養することにより作成し、コラーゲン I, Matrigel reduced あるいは Matrigel をコートしたプレートに接着させ、さらに培養することにより分化した。CYP 発現に対する酵素誘導の影響を明らかにするために、回収前 72 時間 3-メチルコラントレン (MC) またはリファンピシン (RIF) を培地に添加した。

その結果、百瀬は次の結論を得た。

1. EB 作成条件の検討で、2 日間培養した方が、5 日間培養の場合より明らかに肝マーカーの発現レベルは高かった。しかし、cmES 細胞断片の大きさによる肝細胞マーカーの発現レベルに顕著な差は見られなかった。
2. ECM としてコラーゲン I を使用した場合と比較して、肝細胞マーカーの mRNA 発現レベルは Matrigel で高かった。
3. 薬物代謝型 CYP 分子種の mRNA 発現レベルは、コラーゲン I 使用と比較して Matrigel で高かった。
4. 誘導実験では、CYP1A1 mRNA の発現レベルは、MC 処理によりコラーゲン I, Matrigel reduced 及び Matrigel で各々誘導された。また、RIF によって Matrigel reduced 及び Matrigel における CYP3A8 mRNA の発現レベルは、顕著に誘導された。しかし、CYP2C43 と CYP2D17 mRNA の発現レベルは、これら化合物によってほとんど変動が認められな

った。

これらの結果より、Matrigel は ES 細胞の肝細胞への分化に有用な ECM であること、及び医薬品開発における肝細胞のモデルとしてサル ES 細胞から分化した細胞を応用可能であることが示された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Prion disease causes less severe lesions in human hippocampus than other parts of brain (ヒトのプリオン病では海馬の障害が脳の他の部位に比べて少ない)

金子 稔

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】プリオン病は、羊のスクレイピーや牛の牛海綿状脳症 (BSE)、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) やゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病 (GSS) などを含む、神経変性疾患に近縁の一群である。スクレイピー感染マウスなどのプリオン病動物モデルにおいて、海馬は非常に障害を受けやすく、その終末像では、空胞形成やグリオシスによる重度の海馬硬化を認め、CA1 の錐体細胞は完全に脱落する。一方、ヒト剖検例における海馬病変の重症度について焦点を当てた研究はほとんどみられず、2~3 の研究で海馬の神経病理学的変化は大脳皮質に比して非常に軽度であると簡単に報告されている程度である。本論文では、ヒトのプリオン病の海馬を神経病理所見やプリオン沈着の観点から検討することを目的とし、孤発性 CJD と硬膜移植後の CJD、家族性 CJD、GSS を含むプリオン病 23 例の海馬について、領域ごとに神経病理学的に評価した。

【材料及び方法】孤発性 CJD 12 例、E200K タイプの家族性 CJD 7 例、2 例の P102L と 1 例の P105L からなる GSS 3 例、硬膜移植後の CJD 1 例の計 23 例を対象とした。ホルマリン固定・パラフィン包埋した剖検脳を薄切した切片に HE 染色、ルクソール・ファスト・ブルー染色、ホルツァー染色、抗プリオン抗体染色を施し、海馬の領域ごとに、プリオン沈着の分布を定性的に、病変の程度を半定量的に評価した。

【結果】海馬の病変は概して非常に軽度であった。海馬支脚で最も高度の病変がみられ、海綿状変化による小さな空胞形成の出現を認めた。CA4 ではほぼ全例に、海綿状変化を伴わない星膠細胞の反応や軽度の神経細

胞脱落を認めた。プリオン沈着は、分子層、海馬支脚、CA1-4で特に多くみられた。びまん性の沈着がCA、多形細胞層、分子層、放射線維層、網状層、海馬溝にみられ、顆粒状の沈着は分子層のみにみられた。GSSではプラーク型様のプリオン沈着が分子層に多くみられた。プリオン沈着の分布と神経病理学的変化には関連がみられなかった。

【結論】海馬は記憶や学習において重要な役割を果たし、アルツハイマー病など多くの認知症では病初期から明らかに影響を受ける部位である。プリオン病の実験モデルであるスクレイピー感染マウスにおいても海馬は非常に障害を受けやすい部位であり、空胞化に星膠細胞の反応や錐体細胞の脱落を伴い重度の海馬硬化に至る。一方、初老期の進行性の認知症として知られるヒトのプリオン病においては、末期に至っても海馬体は障害を免れている。プリオン沈着は、多くみられたため、神経病理学的損傷と関連がなかった。本研究結果から次のことが示唆される。すなわち、(i)海馬におけるプリオン沈着の生化学的特徴は、脳の他の部位でみられるものとは異なる可能性がある。あるいは、(ii)海馬はプリオン沈着の神経毒性の影響から何らかの機序で保護されている。脳の一定の部位における異常沈着との関連について、神経毒性を解釈することは慎重にすべきであり、異常プリオン蛋白とプリオン病の基本病変との分子病理学上の関係を解明することはこの研究の範囲を越える。近年、ニューロンやグリア細胞への、タウや $\alpha$ -シヌクレインなどの過リン酸化蛋白沈着が、それぞれアルツハイマー病やレビー小体型認知症の病態生理において主要な役割を果たしているということが生化学的な研究で示されている。分子遺伝学やタンパク質化学、タンパク質工学の方法が現在一般に受け入れられ、他の神経変性疾患だけでなく精神障害のモデルとしても広く用いられている。しかし生化学的な研究は、タウや $\alpha$ -シヌクレインが脳のどこから起こるかについてはわずかな洞察しかもたらさず、多くの研究がこの点について明確にしていない。脳は精巧な複合体であり、異なるタイプのニューロンが $1\mu\text{m}$ の距離で存在しながら、全く異なった物質を産生している可能性がある。海馬体ではそれぞれの領域が異なった働きをしており、大脳皮質の検体の研究と海馬の検体の研究とは全く異なった結果になることも考えられるため、脳の具体的な部位を考慮して研究を行うことが重要である。精神神経疾患の研究では、免疫組織化学と *in situ* hybridization 組織化学といっ

た、*in vitro* と *in situ* の技術は互いに補足しあうべきと思われる。

#### (論文審査の結果の要旨)

プリオン病は、ヒツジのスクレイピーやウシの狂牛病 (BSE)、ヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) やゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病 (GSS) などを含む、神経変性疾患に近似の一群である。スクレイピー感染マウスなどの確立されたプリオン病動物モデルにおいて、海馬は非常に障害を受けやすい。その終末像では、空胞形成やグリオシスによる重度の海馬硬化を認め、CA1の錐体細胞は完全に脱落するが、ヒト剖検例における海馬病変の重症度について焦点を当てた研究はあまりみられない。本論文では、ヒトのプリオン病の海馬を神経病理所見やプリオン沈着の観点から検討することを目的とし、孤発性 CJD と硬膜移植後の CJD、家族性 CJD、GSS を含むプリオン病23例の海馬について、領域ごとに神経病理学的に評価した。

孤発性 CJD12例、E200K タイプの家族性 CJD7例、2例の P102L と 1例の P105L からなる 3例の GSS、硬膜移植後の CJD1例の計23例を対象とした。ホルマリン固定しパラフィン包埋した剖検脳を薄切した切片に HE 染色、ルクソール・ファスト・ブルー染色およびホルツァー染色を施した。プリオン染色は確立・承認された手順で行った。

プリオン病海馬について、領域ごとに神経病理学的に評価した。

その結果、海馬にはプリオン沈着は多くみられたが、嗅内皮質と比べて病変は明らかに軽度であった。海馬支脚で最も病変は高度であったが、CA1からは軽微になり、網状層 (stratum lacunosum) や分子層 (stratum moleculare) には海綿状変化がみられた。海馬支脚には海綿状変化による小さな空胞形成の出現を認めた。CA4ではほぼ全例に海綿状変化を伴わない星膠細胞の反応や軽度の神経細胞脱落を認めた。プリオン沈着は、分子層、海馬支脚、CA1-4で特に多くみられた。これらの結果により、以下のことが示唆される。海馬におけるプリオン沈着の生化学的特徴は、脳の他の部位でみられるものとは異なる可能性がある。あるいは、ヒトの海馬は、プリオン沈着による神経毒性の影響から防御されている可能性がある。海馬体ではそれぞれの領域が異なった働きをしており、大脳皮質の検体の研究と海馬の検体の研究とは全く異なった結果になることも考えられるため、脳の具体的な部位を

考慮して研究を行うことが重要であると考えられた。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Bezafibrate at clinically-relevant doses decreases serum/liver triglycerides via down-regulation of SREBP-1c in mice: a novel PPAR $\alpha$ -independent mechanism  
(臨床用量でのベザフィブラートの中性脂肪低下作用は1c型ステロール調節領域結合蛋白の低下に由来する： $\alpha$ 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体に依存しない新規薬理作用の発見)

中 嶋 岳 郎

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】ベザフィブラートは脂質異常症、特に高中性脂肪血症に対する代表的治療薬である。また原発性胆汁性肝硬変やタモキシフェン誘発性非アルコール性脂肪肝炎に対する有効性も報告されている。これらのベザフィブラートの薬理作用は、核内受容体 $\alpha$ 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR $\alpha$ )の活性化に起因するものとみなされてきた。しかし、その根拠となった動物実験での投与量(約100 mg/kg/day)は日常臨床での投与量(約10 mg/kg/day)と著しい乖離がある。さらに本剤はPPAR $\beta$ 及びPPAR $\gamma$ の活性化作用も併せ持つことが報告されており、ベザフィブラートの血中脂質低下作用が本当にPPAR $\alpha$ の活性化に起因するのか不明である。今回我々は、臨床用量のベザフィブラートをマウスに投与し、その薬物動態と作用機構、特にPPAR $\alpha$ の活性化との関連を検討した。

【材料及び方法】野生型及びPPAR $\alpha$ 欠損オスマウス(16週齢, Sv/129系統)を各々コントロール群, 低用量(臨床用量)群, 高用量群に分け(各群6匹), 1%カルボキシメチルセルロース溶液に懸濁したベザフィブラート10 mg/kg/dayを低用量群に, 100 mg/kg/dayを高用量群にそれぞれ7日間経口投与した。コントロール群にはベザフィブラートを含まない同溶液を投与した。血漿中薬物濃度をLC/MS/MS法で測定し, 濃度推移曲線を作成後, 最高血漿中薬物濃度(Cmax)及び濃度時間曲線下面積(AUC)を算出した。肝臓中のmRNA及び蛋白発現量はそれぞれ定量PCR法及びイムノプロット法を用いて解析した。

【結果】Cmax及びAUC値はともに低用量群で健常人投与時の値と酷似しており, 高用量群では健常人投与時の10倍以上と著しい乖離を認めた。中性脂肪低下作用は高用量群では野生型マウスだけに見られたが, 低用量群では野生型及びPPAR $\alpha$ 欠損マウスで同様に観察された。高用量群ではPPAR $\alpha$ の著明な活性化とそれに伴う標的遺伝子群の発現誘導が認められた。一方, 低用量群では1c型ステロール調節領域結合蛋白(SREBP-1c)mRNA量の減少に伴う脂肪酸合成関連酵素群の発現低下とミクロソーム運搬蛋白の発現低下がPPAR $\alpha$ 非依存的に生じていた。低用量群ではPPAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 標的遺伝子の発現はいずれも誘導されておらず, PPARの活性化が全く生じていないことが見出された。

【結論】臨床用量でのベザフィブラートの中性脂肪低下作用は, PPAR $\alpha$ の活性化に起因していなかった。一方, 本研究ではSREBP-1c転写活性の抑制という新規薬理作用を発見するに至った。本研究はベザフィブラートの臨床での薬理作用を理解する上で, 有用な情報を提示するものと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

ベザフィブラートは脂質異常症、特に高中性脂肪血症に対する代表的治療薬である。また原発性胆汁性肝硬変やタモキシフェン誘発性非アルコール性脂肪肝炎に対する有効性も報告されている。これらのベザフィブラートの薬理作用は、核内受容体 $\alpha$ 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR $\alpha$ )の活性化に起因するものとみなされてきた。しかし、その根拠となった動物実験での投与量(約100 mg/kg/day)は日常臨床での投与量(約10 mg/kg/day)と著しい乖離がある。さらに本剤はPPAR $\beta$ 及びPPAR $\gamma$ の活性化作用も併せ持つことが報告されており、ベザフィブラートの血中脂質低下作用が本当にPPAR $\alpha$ の活性化に起因するのか不明である。今回我々は、臨床用量のベザフィブラートをマウスに投与し、その薬物動態と作用機構、特にPPAR $\alpha$ の活性化との関連を検討した。

野生型及びPPAR $\alpha$ 欠損オスマウス(16週齢, Sv/129系統)を各々コントロール群, 低用量(臨床用量)群, 高用量群に分け(各群6匹), 1%カルボキシメチルセルロース溶液に懸濁したベザフィブラート10 mg/kg/dayを低用量群に, 100 mg/kg/dayを高用量群にそれぞれ7日間経口投与した。コントロール群にはベザフィブラートを含まない同溶液を投与した。血

漿中薬物濃度を LC/MS/MS 法で測定し、濃度推移曲線を作成後、最高血漿中薬物濃度 (Cmax) 及び濃度時間曲線下面積 (AUC) を算出した。肝臓中の mRNA 及び蛋白発現量はそれぞれ定量 PCR 法及びイムノブロット法を用いて解析した。

その結果、「中嶋岳郎」は次の結論を得た。

1. Cmax 及び AUC 値はともに低用量群で健常人投与時の値と酷似しており、高用量群では健常人投与時の10倍以上と著しい乖離を認めた。
2. 中性脂肪低下作用は、高用量群では野生型マウスだけに見られたが、低用量群では野生型及び PPAR $\alpha$  欠損マウスで同様に観察された。
3. 高用量群では PPAR $\alpha$  の著明な活性化とそれに伴う標的遺伝子群の発現誘導が認められた。
4. 低用量群では1c型ステロール調節領域結合蛋白 (SREBP-1c) mRNA 量の減少に伴う脂肪酸合成関連酵素群の発現低下とミクロソーム運搬蛋白の発現低下が PPAR $\alpha$  非依存的に生じていた。
5. 低用量群では PPAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  標的遺伝子の発現はいずれも誘導されておらず、PPAR の活性化が全く生じていないことが見出された。

これらの結果より、臨床用量でのベザフィブラートの中性脂肪低下作用は、PPAR $\alpha$  の活性化に起因していないことが示唆された。一方、本研究ではSREBP-1c 転写活性の抑制という新規薬理作用を発見するに至った。本研究はベザフィブラートの臨床での薬理作用を理解する上で、有用な情報を提示するものと考えられた。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

A Cross-Sectional Observation of Effect of Exposure to N-Methyl-2-Pyrrolidone (NMP) on Workers' Health (N-メチル-2-ピロリドン (NMP) 曝露が作業者の健康に及ぼす影響の時間断面研究)

西 村 繁

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 N-メチル-2-ピロリドン (N-methyl-2-pyrrolidone; NMP) は、従来広く用いられてきた有機溶剤 (特に有機塩素系化合物) がオゾン破壊性を理由に製造・使用が禁止されつつある中、それらの代替物質として急速に使用を広げている。NMP は皮膚からの吸収が非常に強いとされ、日本産業衛生学会

でも「皮」マークを付して注意を喚起している。しかしながら、NMP 曝露による健康影響について十分な知見はなかった。本研究では、NMP 曝露作業による健康影響について検証することを目的とした。

【対象と方法】 NMP に曝露する男性作業員15名 (曝露群)、NMP に曝露しない男性作業員15名 (対照群) を選定した (ただし1名は調査当日不参加)。これらの対象者に NMP 個人曝露濃度及び尿中代謝物濃度測定を行い曝露指標とし、健康影響指標として尿検査、血液検査 (生化学、血算)、アンケートによる自覚症状調査、神経伝導速度測定、神経行動学検査を行った。

【結果】 作業員の年齢は曝露群 (33.8 $\pm$ 10.0歳) (平均 $\pm$ 標準偏差)、対照群 (34.1 $\pm$ 9.7歳) で差はなく、学歴、飲酒喫煙習慣にも両群で差はなかった。曝露群のシフト5日間の作業後のNMP個人曝露濃度の平均値は0.14~0.26 ppm、尿中NMP濃度は0.17~0.22 mg/l だった。またシフト中のNMP個人曝露濃度の最大値は0.8 ppmで、日本産業衛生学会が勧告する曝露濃度 (occupational exposure limit; OEL) である1 ppmを下回った。対照群は曝露していなかった。NMP 以外に取り扱い溶剤に含まれていたキシレンは個人曝露濃度、尿中代謝物共に検出限界値以下だった。健康影響指標として行ったアンケートによる自覚症状調査、神経伝導速度検査、神経行動学検査は、曝露群と対照群との間に差は見られなかった。

【結論】 曝露群のシフト5日間のNMP個人曝露濃度は0.14~0.26 ppm、最大値が0.8 ppmに曝露する作業員において、アンケートによる自覚症状調査、神経伝導速度検査、神経行動学検査について曝露群と対照群との間に差が見られず、この曝露濃度で健康影響は検知できなかった。

(論文審査の結果の要旨)

N-メチル-2-ピロリドン (N-methyl-2-pyrrolidone; NMP) は、従来広く用いられてきた有機塩素系溶剤が成層圏オゾン層破壊性を理由に製造・使用が禁止されつつある中、それらの代替物質として使用を広げている。NMP は皮膚からの吸収が非常に強いとされ、日本産業衛生学会でも (皮) マークを付して注意を喚起している。しかしながら、NMP 曝露による健康影響について十分な知見は無かった。本研究では、NMP 曝露作業による健康影響について検証することを目的とした。

NMP に曝露する男性作業員15名 (曝露群)、NMP に曝露しない男性作業員15名 (対照群) を選定した。

これらの対象者にNMP個人曝露濃度及び尿中代謝物濃度測定を行い曝露指標とし、健康影響指標として血液生化学検査、尿検査、アンケートによる自覚症状調査、神経学検査を行った。今回の研究はNMPの健康影響調査の中で、1) 一般的作業環境に相当する低濃度のNMP曝露に関して曝露群と対照群を比較、2) 生活習慣のような交絡因子を調整、3) 神経学検査も含めた多くの検査項目を実施、という3点をクリアした初の疫学研究である。

その結果、西村は次の結論を得た。

1. 曝露群のシフト5日間の作業後のNMP個人曝露濃度の平均値は0.14~0.26 ppm、尿中NMP濃度は0.17~0.22 mg/lだった。またシフト中のNMP個人曝露濃度の最大値は0.8 ppmで、日本産業衛生学会が勧告する曝露濃度 (occupational exposure limit ; OEL) である1 ppmを下回った。対照群は曝露していなかった。
2. 健康影響指標として行った血液生化学検査、尿検査、神経行動学検査、神経伝導速度、アンケートによる自覚症状調査において、曝露群と対照群との間に差は認められなかった。

最大値が0.8 ppmに曝露する作業員において、アンケートによる自覚症状調査、神経学検査について曝露群と対照群との間に差が見られず、この曝露濃度で健康影響は検知できなかったことから、日本産業衛生学会が勧告している1 ppmの許容濃度の妥当性を裏付けるものと考えられる。

以上のことから、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Immunohistochemical study of hard tissue formation in the rat pulp cavity after tooth replantation (歯の再植後の歯髓腔内に形成される硬組織に関する免疫組織化学的研究)

趙 琛

(論文の内容の要旨)

Objective: While mineralized tissue is formed in the pulp cavity after tooth replantation or transplantation, little is known about this hard tissue formation. The aim of the study is to evaluate hard tissue formation in the pulp cavity after tooth replantation and to examine the differentiation process of hard tissue formative cells by histological and

immunohistochemical method.

Methods: Male wild-type or GFP-transgenic rats, 4 weeks of age, were used in this experiment. The upper first molar was extracted with a pair of dental forceps under anesthesia. The tooth was immediately rinsed in physiologic saline and then was repositioned into the original socket. At 5 and 14 days after replantation, the maxillae were dissected and after fixation, decalcification, and embedding in paraffin, sections were cut for HE stain and immunohistochemistry of OPN, BSP, DSP, BMP4, Smad4, Runx2, Osterix, alpha-SMA. To clarify the origin of hard tissue formative cells, we transplanted upper first molars of GFP-transgenic rats into the corresponding tooth sockets of wild-type rats. After fixation, decalcification, and embedding in paraffin, sections were used for immunohistochemistry of GFP.

Results: At 5 days after replantation, degenerated odontoblasts were lining the pulp cavity. At 14 days, dentin- or bone-like tissue was present in the pulp cavity. Immunoreactivity for osteopontin (OPN) and bone sialoprotein (BSP) was strong in the bone-like tissue, but weak in the dentin-like tissue. Conversely, dentin sialoprotein (DSP) was localized in the dentin-like tissue, but not in the bone-like tissue. Cells positive for BMP4, Smad4, Runx2, and Osterix were found around the blood vessels of the root apex at 5 days. At 14 days, these cells were also localized around the bone-like tissue. Cells expressing alpha-smooth muscle actin (SMA) were seen around the newly formed bone-like tissue, whereas no such cells were found around the newly formed dentin-like tissue.

At 14 days after transplantation, the bone-like tissue consisted of cells positive or negative for GFP. Almost half of these cells showed positive labeling. On the other hand, cells lining the newly formed dentin-like tissue were always immunopositive for GFP.

Conclusions: Bone- and dentin-like matrices were formed in the pulp cavity after tooth replantation. The dentin-like tissue might have been formed by pulp cells; and the bone-like tissue, by donor

pulp cells and host mesenchymal cells. Dental pulp cells may have potential application in tissue engineering, because they possess the ability to form mineralized tissue.

(論文審査の結果の要旨)

Dental pulp has the ability to form mineralized hard tissue in response to a variety of external stimuli. After tooth replantation or transplantation, mineralized tissue is formed in the pulp cavity, little is known of this hard tissue formation. Dr.Zhao conducted histological and immunohistochemical evaluations of hard tissue formed in the pulp of rat maxillary molars after tooth replantation.

The results from Dr.Zhao are as follows:

- 1) At 14 days after replantation and transplantation, two type of hard tissue were formed in the rat pulp cavity. One resembled bone matrix containing numerous structures similar to osteocyte lacunae. This tissue was bone-like tissue. The other was dentin-like tissue that formed in contact with the dentin.
- 2) At 14 days after replantation, the matrix of bone-like tissue demonstrated immunoreactivity for OPN and BSP, but not for DSP. While the dentin-like tissue demonstrated immunoreactivity for DSP, labeling for OPN and BSP was seen on the region between the newly formed dentin-like matrix and the original dentin.
- 3) At 5 days after replantation, fibroblastic cells positive for BMP4, Smad4, Runx2, and Osterix were found around blood vessels in the pulp cavity at the root apex. At 14 days, numerous cells showing immunoreactivity for antibodies against BMP4, Smad4, Runx2, and Osterix were seen around the bone-like tissue. In contrast, cells adjacent to dentin-like matrix scarcely showed immunoreactivity indicating BMP4, Smad4, and Osterix. Weakly nuclear labeling for Runx2 was seen in several odontoblast-like cells.
- 4) Prior to replantation, there was no immunoreactivity for alpha-SMA in the pulp cavity, except in smooth muscle cells and pericytes around blood vessels. At 5 days after replantation, alpha-SMA-positive reactivity was seen in

pulp cells as well as in the smooth muscle cells and pericytes. At 14 days, there were numerous alpha-SMA-positive cells around the newly formed bone-like tissue; whereas these positive cells were hardly seen adjacent to the newly formed dentin-like tissue.

- 5) At 14 days after replantation, the bone-like tissue consisted of cells positive or negative for GFP. Almost half of these cells showed positive labeling. On the other hand, cells lining the newly formed dentin-like tissue were always immunopositive for GFP.

Bone- and dentin-like matrices were formed in the pulp cavity after tooth replantation. The dentin-like tissue might have been formed by pulp cells; and the bone-like tissue, by donor pulp cells and host mesenchymal cells. Dental pulp cells may have potential application in tissue engineering, because they possess the ability to form mineralized tissue.

主査、副査は一致して本論文を学位論文として十分な価値を有するものと認めた。

Therapeutic and preventive effects of methotrexate on zymosan-induced arthritis in SKG mice (SKG マウスのザイモザン誘発関節炎に対するメトトレキサートの治療的及び予防的効果)

長 手 寿 明

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 関節リウマチは、関節の慢性炎症を特徴とする病態であり、軟骨及び骨の進行性の破壊をもたらす。罹患患者は生活の質が低下するだけでなく生命予後にも影響がある重要な病態である。関節リウマチを治療する新薬は近年盛んに開発されているが、そこで重要な役割を演ずるのは関節リウマチの疾患モデル動物である。しかしながら、これまで開発されてきた多くのモデル動物は、必ずしもヒトにおける関節リウマチの病態を完全には反映していないとの指摘も多く、よりヒトの病態に近く信頼性の高い新しいモデルの開発が、よりよい新薬開発のために望まれている。本研究の目的は、新たなヒトの関節リウマチのモデル動物である SKG マウスのザイモザン誘発関節炎の病態を検索し、新薬開発のスクリーニング系として信頼



性の高いモデルであるということを証明することであった。また対照薬として、ヒトでも標準的に用いられているメトトレキサート (MTX) を用いた。

【方法】試験はSKG マウス (メス, 7 週齢) 30匹を以下の6群 (各5匹) に群分けし, それぞれの処置を行った。

1群 無処置

2群 ザイモザン 4 mg/ml を腹腔内投与後, 翌日より毎日一回, 媒体のみを腹腔内投与

3群 ザイモザン 4 mg/ml を腹腔内投与後, 翌日より毎日一回, MTX 1 mg/kg を腹腔内投与

4群 ザイモザン 4 mg/ml を腹腔内投与後, 翌日より毎日一回, MTX 10 mg/kg を腹腔内投与

5群 ザイモザン 4 mg/ml を腹腔内投与後20日目より毎日一回, MTX 1 mg/kg を腹腔内投与

6群 ザイモザン 4 mg/ml を腹腔内投与後20日目より毎日一回, MTX 10 mg/kg を腹腔内投与

3群と4群とにおいてはMTXの予防的効果を, 5群と6群とにおいてはMTXの治療的効果の評価を目的とした。全ての動物は定法に則り毎日手根骨間関節及び足根骨間関節を臨床的に評価された。さらに, 投与開始から30日後に全ての動物に安楽死をもたらし, 病理組織学的な評価を行った。

【結果】各動物は病態の発現において均質な振る舞いを示した。臨床の評価項目において, MTXは予防的にも治療的にも有意に足関節及び手関節の関節炎の病態形成を抑制した。また病理組織学的にも, 同様の抑制が見られた。本病態は顆粒球を豊富に含む肉芽組織の存在が特徴的であった。

【結論】SKGマウスのザイモザン誘発関節炎においてMTXはヒトの関節リウマチでも示されているのと同様な病態の抑制を再現した。これらの結果から, SKGマウスは関節リウマチの病態モデル動物として信頼性の高い評価系であること, 及びその際の比較対照薬としてMTXが使用されることが示された。

#### (論文審査の結果の要旨)

関節リウマチの疾患モデル動物であるSKGマウスについて, その抗リウマチ薬のスクリーニング系としての有用性の有無を明らかにするため, ヒトの関節リウマチにおける標準薬であるメトトレキサート (MTX) をこの動物に対して予防的及び治療的に投与し, 関節炎の病態の進行と病理組織学的な評価を行った。

SKGマウスは各群5例, 6群に群分けし, それぞれ

1群:非接種, 2群媒体のみ, 3群:MTX 1 mg/kg 予防的投与, 4群:MTX 10 mg/kg 予防的投与, 5群:MTX 1 mg/kg 治療的投与, 6群:MTX 10 mg/kg 治療的の各処置を行った。1群以外の動物は全て観察開始初日にザイモザンを2 mg/body になるように腹腔内投与し, 動物の発症を惹起した。3群及び4群は接種の翌日から, 5群及び6群は病態がほぼ完全に形成された接種後20日からそれぞれの用量のMTXを投与された。その結果, 以下の結論を得た。

(1) 試験期間中, 1群の動物は発症が認められなかったのに対し, 2群, 5群及び6群の動物は接種11日目頃にほぼ均質に関節炎を発症し, それから10日前後で病態を形成した。3群及び4群の動物では病態の形成はMTXの投与量依存的に抑制され, 特に4群においてはほぼ完全に抑制した。5群及び6群の動物においても, 用量依存的な病態の抑制が認められ, 6群においては投与開始10日目にはその抑制は統計学的に有意となった。

(2) 投与開始から30日後に動物を安楽死させ, その左足関節の病理組織学的な検索を行ったところ, 1群においては特別な所見は見出されなかったが, 2群においては, 骨糜爛, 骨新生, パンヌス形成, 軟骨破壊, 滑膜細胞増殖, 炎症性細胞浸潤, 関節周囲線維化及び浮腫が著しく見られた。投与された動物においては全ての所見でほぼ用量依存的に改善が見られた。

(3) 免疫組織化学的検索を行った結果, 炎症局所に浸潤していた免疫担当細胞は顆粒球が最も多く, ついでT細胞, B細胞の順であった。単球及びマクロファージは殆ど見られなかった。

以上より, SKGマウスにおけるザイモザン誘発関節炎は, ヒトの関節リウマチの新たなモデル動物として, 特に医薬品開発におけるスクリーニング系として極めて有用である可能性が示唆された。MTXをこれまでこのモデル動物に投与したというデータは無く, MTXを対照薬として本モデルを用いた標準データを与えた本研究の意義は高いものと考えられ, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Phylogeny of a Novel “*Helicobacter heilmannii*” Organism from a Japanese Patient with Chronic Gastritis Based on DNA Sequence Analysis of 16S rRNA and Urease Genes (日本人の慢性胃炎患者から検出された新規 “*Helicobacter heilmannii*” の 16S rRNA 遺伝子と Urease 遺伝子の DNA 塩基配列解析に基づいた系統発生論)

松本竹久

(論文の内容の要旨)

【はじめに】 “*Helicobacter heilmannii*” はヒト胃粘膜に感染する人工培養不可能のグラム陰性のらせん菌であり、*Helicobacter pylori* と比較すると大型でねじれが強い *Helicobacter* 属菌である。人工培養不可能の菌であることから生化学的性状をはじめ菌が有する細胞毒性など多くが未だ解明されていない。我々は、慢性胃炎患者の胃粘膜に、これまで知られていない “*Helicobacter heilmannii*” -like organism (HHLO), SH6株を観察した。本研究では、初めて我々が観察した SH6株について、透過型電子顕微鏡による SH6株の形態学的解析に加えて、16S rRNA 遺伝子と urease 遺伝子の配列に基づいた系統解析を行い、どのような菌種に近縁であるかを明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】 SH6株を保有する患者の胃生検材料をホモジナイズし、経口的に specific-pathogen-free マウスに接種し、電子顕微鏡を用いてマウス胃粘膜への感染の有無の確認を行った。SH6株感染マウスの胃粘膜をサンプルとして人工培地（5%ヒツジ血液寒天培地、チョコレート寒天培地、ヘリコバクター寒天培地）を用いて培養を試みた。SH6株の系統解析を行うため、感染マウスの胃粘膜からDNAを抽出し、16S ribosomal RNA 遺伝子と urease (ureA と ureB) 遺伝子の PCR 増幅・シーケンス解析を行った。ほぼ全長の16S ribosomal RNA 遺伝子配列1,445 bp、部分的な urease 遺伝子配列1,483 bp を用いて、BLAST 検索による相同性解析、CLUSTAL W を用いた系統樹の作成を実施した。また SH6株と既知のヒト由来 HHLO との UreA と UreB のアミノ酸配列を比較し、相同性解析を実施した。

【結果】 透過型電子顕微鏡により大型でねじれが強い菌体が観察され、SH6株のマウス胃粘膜への感染を

確認した。人工培地による培養を試みたが、SH6株の培養は成功しなかった。16S rRNA 遺伝子配列を用いた相同性解析を行った結果、SH6株はチーター由来 HHLO C4E に対して99.4% (1,437/1,445 bp) と最も高い相同性を示し、urease 遺伝子配列においては、HHLO C4E に81.7% (1,240/1,516 bp) と最も高い相同性を示した。また ureA と ureB 間に存在する intergenic spacer region には GAA の3 bp が介在することが判明した。SH6株と既知のヒト由来 HHLO である “*H. heilmannii*” type1, “*H. heilmannii*” type2, *H. felis* との Urease アミノ酸配列に対する相同性解析では、UreA に対し、それぞれ81.8%, 86.3%, 88.5% の一致率を示し、UreB ではそれぞれ92%, 91.3%, 95% の一致率を示した。

【考察】 慢性胃炎患者から検出された HHLO である SH6株は、16S rRNA 遺伝子配列の相同性解析にてチーター由来 HHLO C4E と C2S に対し99.4% (1,437/1,445 bp) と最も高い相同性を示したが、“*H. heilmannii*” type2 (98.1%), *H. felis* (98.2%) に対しても高い相同性が示され、16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析では SH6株の分類学的位置の特定は不能であった。urease 遺伝子配列の相同性解析で、最も相同性の高いものでも HHLO C4E 81.7% (1,240/1,516 bp) であるなど、相同率が低いことから、Urease 遺伝子配列に基づく系統解析では SH6株が新しい HHLO の菌種に分類されることが示された。intergenic spacer region は *H. pylori* の3 bp と同じ塩基数であったが、*H. pylori* の構成する塩基は TGC であるのに対し、SH6株は GAA と異なっており、SH6株と一致する菌種はなかった。SH6株の UreB のアミノ酸配列には、ニッケルの結合と酵素活性に重要な役割を担うヒスチジン残基とシステイン残基の保存された部位が存在することが分かり、SH6株の UreB の酵素活性が保たれていることが推測された。本研究により得られた解析結果は、SH6株がヒト胃粘膜に感染する “*Helicobacter heilmannii*” の中でも新しい分類群に属することを示唆するものであった。

(論文審査の結果の要旨)

“*Helicobacter heilmannii*” はヒト胃粘膜に感染する人工培養不可能のグラム陰性のらせん菌であり、*Helicobacter pylori* と比較すると大型でねじれが強い *Helicobacter* 属菌である。人工培養不可能の菌であることから生化学的性状をはじめ、菌が有する細胞毒性

など多くが未だ解明されていない。本研究は、慢性胃炎患者の胃粘膜に感染していた“*Helicobacter heilmannii*”-like organism (HHLO), SH6株の透過型電子顕微鏡による形態学的解析に加えて、16S rRNA 遺伝子と urease 遺伝子の配列に基づいた系統解析を行った。

1. 透過型電子顕微鏡により、複数本の鞭毛を持ち、大型でねじれの強い“*Helicobacter heilmannii*”様の菌体が確認された。
  2. 16S rRNA 遺伝子配列を用いた相同性・系統解析を行った結果、チーター由来“*H. heilmannii*” C4E, C2Sに対し、99.4%と最も高い相同性を示し、ネコ由来 *H. felis* 98.2%, ヒト由来“*H. heilmannii*” type2 98.1%など、高い相同性が示され、これら4菌株との区別をつけられなかった。
  3. urease 遺伝子配列を用いた相同性解析を行った結果、既知の *Helicobacter* 属菌に対し、いずれも80%程度の低い相同率を示した。系統解析の結果、独立した位置に分類された。また ureA・ureB 間の intergenic spacer region は GAA の3bp であり、既知の *Helicobacter* 属菌と異なった。
  4. UreB アミノ酸配列解析では、ニッケルの結合と酵素活性に必須のアミノ酸配列を保有していた。
- これらの結果より、SH6株は今までに報告のない urease 遺伝子を保有している“*H. heilmannii*”であり、ヒト胃粘膜に感染する“*H. heilmannii*”の中でも、新しい分類群に属すると考えられた。

今後の“*H. heilmannii*”感染症研究において“*H. heilmannii*” SH6も解析する必要があることを示した。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Sialic acid moiety of apolipoprotein E and its impact on the formation of lipoprotein particles in human cerebrospinal fluid (ヒト脳脊髄液中リポ蛋白粒子の形成におけるアポリポ蛋白Eのシアル酸残基の影響)

川崎 健治

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】

脳脊髄液(髄液)中のアポリポ蛋白E(アポE)はリポ蛋白粒子の構成成分として主にアストロサイトで

合成され、血中のアポEと比べてシアル化アポEの比が高いことが知られている。シアル化は、その結合蛋白の生物学的な機能を担っていることから髄液中アポEのシアル酸(SA)残基も脂質代謝や輸送に関して何らかの機能を担っていると考えられる。髄液中アポEはアルツハイマー病(AD)の病理学的特徴の一つである老人斑の主成分である $\beta$ -アミロイドと結合して沈着することから、シアル化アポEは、生物学的機能だけでなくADの発症メカニズムを解明する上で重要と考えられる。本研究では、SA定量法を高感度化し、それを用いて髄液中のアポE含有リポ蛋白のより詳細な性状とリポ蛋白粒子の形成に及ぼすSA残基の影響について解析した。

【材料及び方法】

同時に採取された患者髄液と血清(n=14)を試料として匿名化して使用した。SAはp-アミノ安息香酸エチルエステル誘導体に変換しHPLCで測定した。本法の正確性、精密性、直線性、検出限界の検討を行い、その基礎性能を評価した。血清及び髄液中のアポE含有リポ蛋白は超遠心分離後のリポ蛋白画分をヘパリンセファロースカラムに注入し分取した。血清中、髄液中、およびアポE含有リポ蛋白中のSA、総蛋白(TP)、総コレステロール、リン脂質、各種アポ蛋白、それぞれの濃度を測定した。また、髄液を試料として等電点電気泳動と抗アポE抗体を利用したウエスタンブロット法によりアポEのフェノタイプングを行った。髄液中アポE含有リポ蛋白の粒子径は、ウラニル酢酸でネガティブ染色を行い透過型電子顕微鏡で撮影した像を計測して求めた。全てのデータは3重測定し、平均±標準誤差で表し、Welchのt検定にて有意差(p<0.05)の有無を判定した。

【結果】

今回確立した高感度SA定量法は、本研究を遂行し得る十分な性能を有していた。髄液中のSA濃度と血清中のSA濃度はそれぞれ $25.9 \pm 1.5$  mol/L,  $2209 \pm 196$  mol/Lであり、髄液中のSA濃度は血清中のおよそ1/85であったが、髄液と血清それぞれのTP濃度でSA濃度を補正すると、髄液と血清のSA濃度はそれぞれ、 $142.6 \pm 14.4$  mol/g TP,  $39.1 \pm 4.7$  mol/g TPとなり、髄液中の補正SA濃度は血清のおよそ3.6倍であった。

若年者グループ(5.4±2.3歳)と高齢者グループ(72.0±3.2歳)の髄液中の補正SA濃度は高齢者グループで低値傾向が見られた。また、性差、アポEフェ

ノタイプによる髄液中のSA濃度の違いは見られなかった。

血清に比べ髄液中のアポE含有リポ蛋白のSA濃度は、有意に高値であった ( $p < 0.002$ )。髄液中アポE含有リポ蛋白のSA濃度は、髄液中の総SA濃度の5%程度であったが、髄液中のアポE濃度と相関性が認められた ( $r = 0.924$ ,  $p < 0.001$ )。一方、髄液中のアポE含有リポ蛋白のSA/アポE濃度比 (SA/アポE) と髄液中アポE含有リポ蛋白中の総脂質濃度は逆相関を示した ( $r = 0.847$ ,  $p < 0.001$ )。さらに、SA/アポEと総脂質濃度はリポ蛋白の粒子サイズに影響しており、SA/アポEが高く総脂質濃度が低いアポE含有リポ蛋白の粒子サイズ ( $17.5 \pm 0.2$  nm) とSA/アポEが低く総脂質濃度が高いアポE含有リポ蛋白の粒子サイズ ( $12.0 \pm 0.1$  nm) には明らかな有意差が認められた ( $p < 0.001$ )。

#### 【結論】

中枢神経組織のSAは主として蛋白質に結合した状態で存在していた。その濃度は加齢によって減少する傾向が認められ、SA濃度の減少はその結合蛋白質の生物学的機能に影響を与え、加齢が病因の一つとして考えられるADなどの発症や進行に重要であると考えられた。本研究で観察されたSAに富むアポEは脂質量の少ない未成熟なりポ蛋白に含まれており、SAの少ないアポEは脂質量が多いりポ蛋白に存在していた。これらの知見からアポE含有リポ蛋白中のSAは、中枢神経組織のりポ蛋白の粒子形成およびコレステロールの排泄機構をはじめとする脂質輸送の制御に関係していることが示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

脳脊髄液(髄液)中のアポリポ蛋白E(アポE)は血中のアポEと比べてシアル化アポEの存在比が高いことが知られている。本研究では、髄液アポE中のシアル酸(SA)定量法を高感度化し、本法を用いて髄液中のアポE含有リポ蛋白のより詳細な性状とリポ蛋白粒子形成に及ぼすSA残基の影響について解析した。

髄液と血清が同時に提出された患者14名の検体を匿名化して使用した。SAは $\alpha$ -アミノ安息香酸エチルエステル誘導体に変換しHPLCで測定した。本法の性能評価として正確性、精密性、直線性、検出限界の検討を行った。血清及び髄液中のアポE含有リポ蛋白は超遠心分離後のリポ蛋白画分をヘパリンセファロースカラムに注入し分取した。血清中、髄液中、およびアポE含有リポ蛋白中のSA濃度を行った。アポE含

有りポ蛋白粒子の性状解析としてSA、総コレステロール、リン脂質の各濃度、透過型電子顕微鏡によるリポ蛋白粒子の観察を行った。

その結果、川崎健治は次の結論を得た。

1. 高感度SA定量法は、本研究を遂行し得る十分な性能を有していた。
2. 血清中のSA濃度は髄液中のSA濃度よりも高値であったが、髄液と血清それぞれの総蛋白濃度でSA濃度を補正すると、髄液中の補正SA濃度は血清中よりも高値であった。
3. 若年者グループ ( $5.4 \pm 2.3$ 歳) と高齢者グループ ( $72.0 \pm 3.2$ 歳) の髄液中の補正SA濃度は高齢者グループで低値となる傾向が認められた。
4. アポE含有リポ蛋白中のSA/アポE濃度比 (SA/アポE) と総脂質濃度は逆相関を示した。SA/アポEが高く総脂質濃度が低いアポE含有リポ蛋白の粒子サイズ ( $17.5 \pm 0.2$  nm) とSA/アポEが低く総脂質濃度が高いアポE含有リポ蛋白の粒子サイズ ( $12.0 \pm 0.1$  nm) 間には明らかな有意差が認められた。

中枢神経組織のSAは主として蛋白質に結合した状態で存在している。そのSA濃度は加齢によって減少する傾向が認められ、結合蛋白質の生物学的機能に影響を与えていると考えられた。SAに富むアポEは脂質量の少ない未成熟なりポ蛋白に含まれており、SAの少ないアポEは脂質量が多いりポ蛋白に存在していたことから、アポE含有リポ蛋白中のSAは、中枢神経組織のりポ蛋白の粒子形成およびコレステロールの排泄機構をはじめとする脂質輸送の制御に関係していることが示唆された。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Characterization of cysteine and homocysteine bound to human serum transthyretin (ヒト血清トランスサイレチンに結合したシステインとホモシステインの特徴について)

羽 生 登

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】システイン(Cys)とホモシステイン(Hcy)は、側鎖に硫黄基(SH基)を有する含硫アミノ酸であり、他のアミノ酸、ペプチド、生体金属、蛋白中の含硫アミノ酸などと親和性を有している。ま

た、血中含硫アミノ酸濃度が動脈硬化症やアミロイドーシスの発症と関係していることが報告されているが、その機序の詳細は不明である。含硫アミノ酸は酸性アミノ酸であり、S-S2重結合を生成しやすい性質を持つことから、蛋白質中のCys残基に結合し蛋白質の構造や性質に変化を及ぼし、蛋白質の生理的機能に影響することが考えられる。最近、質量分析によりCysが血清トランスサイレチン(TTR)に結合していることが報告された。TTRはT3、T4やビタミンAの輸送に関与し、臨床検査としては、栄養評価の短期的な蛋白代謝の指標として用いられている。一方、TTRは老人性アミロイドーシスの原因蛋白の一つであることが知られている。近年、TTRアミロイドーシスでCys結合型TTR(Cys-TTR)が関与していることが報告されており、TTRへの含硫アミノ酸の結合意義が注目されている。今回、ヒト血清中TTRの分子多様性と含硫アミノ酸結合による性質の変化について検討した。

【方法】血液中総Cys、総Hcy(遊離型+蛋白結合型)と遊離型Cys、遊離型Hcy濃度の測定は蛍光色素標識プレカラムラベルHPLC法で分析した。TTRの分析は、分子多様性の検討を行うために、等電点電気泳動法(IEF)、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)を用い、抗TTR血清を用いたイムブロットングで検出した。また、Cys-TTRの検出はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)を用いた。

【結果】新鮮血漿および血清を4°Cで保存したところ、Cys、Hcyともに総量の変化はなかったが、経時的に遊離型が減少し結合型が増加した。新鮮血清を4°Cで保存し、経時的に抗TTR血清を加え免疫沈降を行い、沈降物のCys、Hcyの定量を行ったところ、最終的にはCysは約2倍に、Hcyは約1.5倍に増加した。IEFでは、精製TTRは等電点(pI)が4.8~5.5にかけて4本の主要なバンドを検出した。精製TTRにジチオスレイトール(DTT)、L-Cys、Cys-HClの還元剤を反応させたところ、主要バンドの一部消失などの変化が認められた。しかし、Cys-HClのみの処理では主要バンドの一部消失だけではなくバンドの陰極側にブロード状のバンドが出現し、一部は塗布点に残存した。SDS-PAGEでは、精製TTRに各種還元剤を反応させた後、分子量の変化を分析したところ、Cys-HClのみの反応ではTTRは単量体のバンド以外に、単量体より高分子側にブロードなバンドを、一部は塗

布点に残存を認めた。DTT、L-Cys処理では、TTRは2量体または単量体として検出されたが、ブロードなバンドや塗布点への残存は認めなかった。上記、各種還元剤を精製TTRに反応させ質量分析を行ったところ、還元剤未処理のTTRの質量分析は、Cys-TTRのピーク(m/z 13885)と他の小分子が結合したピークが検出された。DTT処理TTRとL-Cys処理TTRの質量分析は、Cys未結合TTRの質量であるm/z 13761のピークが増加し、Cys-TTRのピークは減少した。しかし、Cys-HCl処理TTRの質量分析は、Cys-TTRのピークは残り、還元剤未処理TTRと同様のピークを示した。

【結論】血中Cys、Hcyは4°Cの保存で、総量に変化はなく、遊離型が減少し結合型が増加した。同様に、TTRへのCys、Hcyの結合も増加した。このことから、含硫アミノ酸の蛋白への結合は非酵素的に引き起こされ、含硫アミノ酸の血中濃度に関連することが推察された。Cys-HClのみの処理では、TTRからCysが乖離することなく単量体に変化することが示唆された。他の還元剤では単量体への乖離の際にCysの結合も乖離しており、Cys-HClのみの処理ような重合体のような変性は引き起こされなかった。このことから、Cys-TTRが酸性化で単量体に乖離することが、荷電および分子量の極端な変化をもたらし、凝集しやすい性質を有することが示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

システイン(Cys)とホモシステイン(Hcy)は含硫アミノ酸であり、その血中濃度は動脈硬化症やアミロイドーシスの発症に関係していることが報告されている。また、T3、T4やビタミンAの輸送に関わる血清トランスサイレチン(TTR)は、老人性アミロイドーシスの原因蛋白の一つとして注目されており、特に、Cys結合型TTR(Cys-TTR)のアミロイドーシスへの関与が報告されている。本研究では、含硫アミノ酸の結合によるヒト血清中TTRの分子多様性と性質の変化について検討を行った。

血中総Cys、Hcyおよび遊離型Cys、Hcyを蛍光色素標識プレカラムラベルHPLC法で分析し、4°C保存下での総および遊離型のCys、Hcyの経時変化を観察した。同様に、4°C保存でのTTRへのCys、Hcyの結合の経時変化を観察した。また、血清TTRを分析するために、各種還元剤(ジチオスレイトール(DTT)、L-Cys、Cys-HCl)を加え等電点電気泳動法(IEF)、SDS-PAGEで分析を行い、その検出に

はイムノプロット法を用いた。さらに、Cys-TTR の検出にはマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) を用いた。

その結果、羽生は次の結論を得た。

1. 新鮮血漿および血清の 4°C 保存の経時変化で Cys, Hcy は総量は変化せず、遊離型が減少し結合型が増加した。
2. 血清の 4°C 保存下での TTR への Cys, Hcy の結合量は、最終的に、Cys は約 2 倍、Hcy は約 1.5 倍の増加を認めた。
3. 還元剤処理によって、TTR の IEF および SDS-PAGE の泳動パターンは変化した。特に、Cys-HCl のみの処理により IEF では主要バンドの陰極側にブロード状のバンドや塗布点への残存を、SDS-PAGE では単量体よりも高分子側や塗布点への残存を認めた
4. 質量分析より、還元剤である DTT および L-Cys の処理で Cys は TTR から乖離したが Cys-HCl のみの処理では Cys は TTR に結合していた。

これらの結果より、TTR への含硫アミノ酸の結合は、非酵素的に引き起こされ、含硫アミノ酸の血中濃度と関連することが示唆された。含硫アミノ酸 (Cys) 結合型 TTR は、単量体では荷電および分子量の極端な変化をもたらす、凝集しやすい性質を有することが示唆された。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Laboratory appraisal of optimal gaseous conditions for growth of zoonotic *Helicobacter felis* ATCC 49179 (*Helicobacter felis* ATCC 49179 株の培養における至適ガス環境に関する検討)

塩原真弓

(論文の内容の要旨)

【はじめに】*Helicobacter felis* (*H. felis*) はネコやイヌの胃に生息し、時に胃炎を引き起こす原因菌として知られていたが、ヒトへの感染は非常に稀と考えられていた。しかし、近年、ペットからヒトへの感染が報告され、現在では *H. felis* 感染症は人畜共通感染症と考えられている。今までの報告では *H. felis* 感染の証明は、病理組織的もしくは PCR 法による遺伝子学的な手法で行われており、菌を培養して診断した報告は

ない。*Helicobacter* 属菌の培養ガス環境は微好気環境が一般的であるが、好気環境でも可能という報告もあり、最適培養条件は未だ定まっていない。*Helicobacter* 属菌は培養初期にらせん形を呈するが、3~4日目から球形へと変化する。球形の菌体について詳細は不明であるが、培養不能で、感染性を持たないと考えられている。本研究では、*H. felis* の形態学的性状を考慮し、培養における至適ガス環境について検討した。

【方法】*H. felis* は ATCC 49179, ATCC 51211 の 2 株を用いた。常法に従い 3 日間培養した *H. felis* を生理食塩水にて  $10^6$  cfu/ml に調整し、その希釈液を血液寒天培地に塗布した。血液寒天培地はガス環境が調整された専用容器へ入れ、37°C のインキュベーターで培養を行った。5 つの  $O_2$  濃度、0, 1, 6, 12, 18%, および 4 つの  $CO_2$  濃度、5, 10, 15, 20% を組み合わせ 16 の条件 (condition A~P) について検討した。コロニー数、コロニー直径、および全菌数に対するらせん形の割合について、培養 5 日目と 7 日目に評価を行った。コロニー数は t-test, コロニー直径と全菌数に対するらせん形の割合には Tukey-Kramer multiple comparison test を用いて統計学的に検討した。

【結果】ATCC 51211 株は培地上を遊走する現象が認められたため評価不能であった。したがって、ATCC 49179 株のみの結果となった。 $O_2$  濃度 0% では、 $CO_2$  濃度にかかわらず *H. felis* の発育は認められなかった。それ以外の 13 条件では *H. felis* の発育が認められ、5 日間および 7 日間培養においてコロニー数に有意差は認められなかった。一方、5 日間培養から 7 日間培養にかけて、13 条件すべてにコロニー直径の増大を認めた。5 日間培養においてコロニー直径が大きかったのは、condition K ( $O_2$  12%,  $CO_2$  10%) で、2 番目にコロニー直径が大きかった condition H ( $O_2$  6%,  $CO_2$  15%) とは有意差がなかったが、他の 11 条件との間には有意差を認めた ( $P < 0.01$ )。コロニー直径が 1.0 mm 前後と比較的大きかったのは、 $O_2$  6%, 12% の条件で、コロニー直径が 0.6 mm 前後と小さい  $O_2$  1%, 18% の培養条件に対して有意差を認めた ( $P < 0.01$ )。5 日間培養において、らせん形の割合が最も高かったのは、condition N ( $O_2$  18%,  $CO_2$  5%) で、他の 12 条件に対して有意差を認めた ( $P < 0.001$ )。5 日間培養から 7 日間培養にかけて、すべてのガス条件でらせん形の割合が減少した。

【考察】5 日間培養にて、最もコロニーが大きかったのは condition K ( $O_2$  12%,  $CO_2$  10%) であった。

コロニーの大きさは菌数を反映するため、この環境では *H. felis* の増殖が速く、らせん形から球形への変化も速いと考えられた。コロニーは小さいが、らせん形の割合が高かったのは condition N ( $O_2$  18%,  $CO_2$  5%) であった。実際の感染では球形の菌体はほとんど観察されていないことから、この環境は胃での感染状態を示していると考えられた。7日間培養では、5日間培養と比較してコロニーの増大を認めるが、らせん形の割合は減少していた。これらの結果から、コロニーの大きさのみから判断すると、*H. felis* の至適培養ガス条件は condition K ( $O_2$  12%,  $CO_2$  10%) となるが、感染力の弱い菌が多く含まれる可能性が高く、感染実験のような研究には最適な条件ではないと思われる。*H. felis* の培養は目的に応じた培養条件の設定が必要で、従来、微好気環境で培養が行われてきたが、形態に注目すると  $O_2$  濃度18%,  $CO_2$  濃度5% が最適な条件であった。*H. felis* を含めた胃感染の *Helicobacter* 属菌は、もともと近縁種の *Campylobacter* 属菌と同じ条件での培養が可能であったことから微好気環境での培養がなされてきたが、本研究より得られた培養条件を試みる必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

*Helicobacter felis* (*H. felis*) はネコ、イヌ、ヒトの胃に感染を起こす人畜共通感染症と考えられている。*H. felis* のヒトへの感染は病理組織学および遺伝子学的手法で診断されており、菌の分離培養による報告はない。*Helicobacter* 属菌は培養過程で、増殖能および活動性を有するらせん形から有さない球形へと菌の形態が変化するため、2つの形態を区別して評価する必要がある。本研究は、*H. felis* の形態学的性状を考慮し、至適培養ガス環境について検討した。

*H. felis* ATCC 49179株を $10^6$ cfu/ml に調整し、希釈液をヒツジ血液寒天培地に塗布した。ガス濃度を調整し、37°Cのインキュベーターで培養を行った。ガス環境は  $O_2$  濃度 0, 1, 6, 12, 18%, および  $CO_2$  濃度 5, 10, 15, 20% を組み合わせ、16種類の条件について検討した。培養5日目と7日目に、コロニー数、コロニー直径、全菌数に対するらせん形の割合について評価を行った。

その結果、塩原は以下の結果を得た。

1. *H. felis* は  $O_2$  0% の条件では発育は認められず、嫌気環境は培養に適さなかった。
2. コロニー直径が最も大きかったのは、培養5日目、7日目共に  $O_2$  12%,  $CO_2$  10% の条件であった。

3. コロニー直径は、 $O_2$  1%, 18% の条件と比較して、 $O_2$  6%, 12% の条件で有意に大きかった ( $P < 0.01$ )。コロニーの大きさは  $O_2$  濃度に依存し、 $CO_2$  濃度との関連は認められなかった。

4.  $O_2$  18% の条件は他の条件と比較して、有意にらせん菌の割合が高かった ( $P < 0.001$ )。生体内ではらせん形の菌体のみが認められており、そのらせん菌の割合が最も高い条件は  $O_2$  18%,  $CO_2$  5% であった。

従来 *H. felis* は微好気環境で培養が行われてきたが、感染にとって重要な要素である形態に注目すると好気環境である  $O_2$  18%,  $CO_2$  5% が最適な条件であることを明らかにし、*H. felis* の培養に際しては、研究目的に応じてガス環境を設定する必要性が示された。主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Reflexive contraction of the levator palpebrae superioris muscle to involuntarily sustain the effective eyelid retraction through the transverse trigeminal proprioceptive nerve on the proximal Mueller's muscle: verification with evoked electromyography (ミューラー筋近位部を横走する三叉神経固有感覚神経を介した、不随意に有効な眼瞼退縮を維持する上眼瞼挙筋の反射的収縮：誘発筋電図による検証)

伴 録 也

(論文の内容の要旨)

【目的】

開瞼は、随意的な上眼瞼挙筋の収縮で始まるが、その後の開瞼は不随意的に維持されている。そのメカニズムをわれわれは次のように仮説している。上眼瞼挙筋速筋の随意的収縮によりミューラー筋機械受容器が伸展されて三叉神経固有感覚を誘発する。生じた三叉神経固有感覚は動眼神経を介して眼瞼挙筋遅筋を反射的に収縮させる。そうして、開瞼は、上眼瞼挙筋の随意的収縮と反射的収縮で維持させている。すなわち、開瞼の不随意的な維持は、三叉神経・動眼神経反射として眼瞼挙筋遅筋の反射的収縮によると仮説している。

一般的に骨格筋では、筋紡錘の機械受容器と運動ニューロンを繋ぐ固有感覚神経の求心性な電気刺激により、いわゆるホフマン反射が生じる。そこで我々は

三叉神経・動眼神経反射の存在を確認するため、ミューラー筋近位部を横走する三叉神経固有感覚神経の求心性な電気刺激により、上眼瞼挙筋にもホフマン反射と同様な筋電図反応が生じるかどうか検証した。

【方法】

検証は重度の Meige 症候群患者12名における閉眼筋切除手術時に行った。全身麻酔下に筋弛緩薬の効果が消失した後、ミューラー筋近位部を横走する三叉神経固有感覚神経を電気刺激し、上眼瞼挙筋の電気生理学的活動性を計測した。

【結果】

三叉神経固有感覚神経の電気刺激側により被験者12人中10人に、刺激側同側の上眼瞼挙筋に short-latency response (SLR) (潜時:  $2.8 \pm 0.3$  ms) が誘発された。両側の眼瞼挙筋において long-latency response (LLR) は認められなかった。

【考察】

三叉神経固有感覚神経の電気刺激により同側上眼瞼挙筋に誘発された SLR は骨格筋におけるホフマン反射に相当し、この三叉神経・動眼神経反射が上眼瞼挙筋の反射的収縮を引き起こしていると考えられた。今回計測された上眼瞼挙筋の三叉神経・動眼神経反射の潜時は  $2.8 \pm 0.3$  ms であり、ヒト閉口筋のホフマン反射 monosynaptic SLR (6 – 8 ms), ヒト眼輪筋反射の oligosynaptic SLR (10–13 ms) より速い。よって同側上眼瞼挙筋に生じた SLR は pseudomonopolar である三叉神経固有知覚ニューロンから動眼神経ニューロンを介した monosynaptic 反射であると推察された。手術中にミューラー筋を伸展させると80%の患者において両側上眼瞼挙筋の反射的収縮が誘発され、サルにおける片側の動眼神経ニューロンが両側上眼瞼挙筋を神経支配するという報告がある。しかし、本実験において LLR は両側の上眼瞼挙筋に誘導されなかった。これらの結果を説明するには、両側で有効な開眼の際に以下の様な機序が働いているものと解釈された。随意的な開眼のため、前頭眼野の興奮は動眼神経核複合体の正中尾側核を刺激する。これは両側上眼瞼挙筋を神経支配し (Hering's law of equal innervation) 両側の上眼瞼挙筋を随意的収縮させる。この収縮は、それぞれのミューラー筋機械受容器を伸展させることにより三叉神経固有感覚を誘発し、pseudomonopolar ニューロンを介して SLR を生じ、それぞれの上眼瞼挙筋を反射的収縮させて、不随意的開眼を維持する。中脳にある三叉神経感覚神経細胞を介する、multipolar

ニューロンや介在ニューロンを介した反射は全身麻酔下では誘発されないため、今回の検証において LLR は計測されなかったものと考えられた。

手術、外傷そして腫瘍などによる生じる説明のつかない眼瞼下垂は、三叉神経固有感覚神経損傷による三叉神経・動眼神経反射の減少、消失による上眼瞼挙筋の反射的収縮の減少、消失により生じるものと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

開眼は、随意的な上眼瞼挙筋の収縮で始まるが、その後の開眼は随意的だけでなく不随意的反射的に維持され、そのメカニズムを次のように仮説している。上眼瞼挙筋速筋の随意的収縮によりミューラー筋機械受容器が伸展されて三叉神経固有感覚を誘発する。生じた三叉神経固有感覚は動眼神経を介して上眼瞼挙筋遅筋を反射的に収縮させる。そうして、開眼は、上眼瞼挙筋の随意的収縮と反射的収縮で維持されている。すなわち、開眼の不随意的反射な維持は、三叉神経・動眼神経反射として上眼瞼挙筋遅筋の反射的収縮によると仮説している。一般的に骨格筋では、筋紡錘の機械受容器と運動ニューロンを繋ぐ固有感覚神経の求心性な電気刺激により、いわゆるホフマン反射が生じる。そこで三叉神経・動眼神経反射の存在を確認するため、ミューラー筋近位部を横走する三叉神経固有感覚神経の求心性な電気刺激により、上眼瞼挙筋にもホフマン反射と同様な筋電図反応が生じるかどうか検証した。

検証は重度の Meige 症候群患者12名における閉眼筋切除手術時に行った。全身麻酔下に、ミューラー筋近位部を横走する三叉神経固有感覚神経を電気刺激し、上眼瞼挙筋の電気生理学的活動性を計測した。

その結果、三叉神経固有感覚神経の電気刺激側により被験者12人中10人に、刺激側同側の上眼瞼挙筋に short-latency response (SLR) (潜時:  $2.8 \pm 0.3$  ms) が誘発された。両側の眼瞼挙筋において long-latency response (LLR) は認められなかった。

三叉神経固有感覚神経の電気刺激により同側上眼瞼挙筋に誘発された SLR は骨格筋におけるホフマン反射に相当し、この三叉神経・動眼神経反射が上眼瞼挙筋の反射的収縮を引き起こしていると考えられた。今回計測された上眼瞼挙筋の三叉神経・動眼神経反射の潜時は  $2.8 \pm 0.3$  ms であり、ヒト閉口筋のホフマン反射 monosynaptic SLR (6 – 8 ms), ヒト眼輪筋反射の oligosynaptic SLR (10–13 ms) より速い。よって同側上眼瞼挙筋に生じた SLR は pseudomonopolar で



ある三叉神経固有知覚ニューロンから動眼神経ニューロンを介した monosynaptic 反射であると推察された。Pseudomonopolar 三叉神経固有感覚ニューロンを介したミューラー筋機械受容器と動眼神経ニューロン間の三叉神経・動眼神経反射の存在を確認した。随意的な上眼瞼挙筋の収縮により誘発されたこの反射により、上眼瞼挙筋は反射的収縮し、不随意的に開瞼を維持することができると考えられた。

本研究は以上のような新知見を明らかにしたものであり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### A Thin Carbon Fiber Web as a Scaffold for Bone Tissue Regeneration (骨再生の足場材料として機能する細いカーボンファイバー網)

青 木 薫

(論文の内容の要旨)

#### 【背景と目的】

再生医療には細胞の足場となる材料 (scaffold) が必要である。現在、scaffold としては I 型コラーゲンが広く使用されているが、生体内で分解されるため細胞や成長因子の維持が制限される。また、使用されるコラーゲンは生物由来蛋白質のためアレルギーや感染症などの副作用を生じる可能性を否定できない。

われわれは、電気紡糸法により径 1  $\mu\text{m}$  のカーボンファイバーからなる Thin Carbon Fiber Web (TCFW) を開発し、非生体分解性の骨再生の scaffold としての機能を評価した。

#### 【方法】

- ① TCFW の生体親和性；径 5 mm の TCFW のインプラントをマウス背部皮下に埋め込み、術後 1, 2, 6 週でインプラントを周囲の筋組織とともに採取し、組織像を評価した。
- ② TCFW による骨形成；組み換えヒト骨形成蛋白質 (rhBMP-2) を染み込ませてフリーズドライした TCFW および I 型コラーゲンのインプラントをマウスの背部皮下に埋め込み、術後 3 週で形成された異所性骨を採取した。採取した異所性骨のレントゲン像、骨密度、組織像を評価し比較した。
- ③ TCFW による骨欠損の修復；rhBMP-2 を染み込ませてフリーズドライした TCFW のインプラントを、ラット腸骨に作製した径 3 mm の骨欠損部に

埋め込んだ。骨欠損のみのもの、TCFW のみのものをコントロールとした。術後 4 週で腸骨を採取し、レントゲン像、組織像を評価した。

#### 【結果】

- ① TCFW の生体親和性；マウスの背筋内に埋植された TCFW のインプラントは、術後 1 週では、インプラントの周囲にマクロファージ、線維芽細胞などの炎症性細胞が浸潤していた。シートの中央では細胞成分はまばらになっていた。術後 2 週では、細胞はシート中央まで浸潤しており、異物巨細胞が観察され、異物肉芽腫を形成していた。術後 6 週ではインプラントの内部に多くの新生血管の形成を認めた。周囲の筋組織に壊死や強い炎症反応を認めず、TCFW による明らかな組織毒性を認めなかった。
- ② TCFW による骨形成；rhBMP-2 をそれぞれ 0.1, 0.5, 1.0, 5.0  $\mu\text{g}$  使用したインプラントの術後 3 週の単純レントゲン写真では、0.1  $\mu\text{g}$  使用群では TCFW 群もコントロールのコラーゲン群も骨の形成を認めなかった。rhBMP-2 を 0.5  $\mu\text{g}$  以上使用した群では TCFW 群、コラーゲン群ともに骨梁構造の形成を認めた。単純レントゲン写真では両群に明らかな差を認めなかった。形成された異所性骨の骨塩量、骨密度は両群とも rhBMP-2 の用量に応じて増加し、各用量でコラーゲン群に比し TCFW 群の方が有意に高値を示した。

rhBMP-2 を 5.0  $\mu\text{g}$  使用した群の術後 1 週の形成骨の組織標本では、インプラントの周囲に未熟な骨基質が形成されていた。コラーゲン群ではコラーゲン線維が残っており、両群ともインプラント中央では細胞成分は疎になっていた。術後 3 週では、骨基質は成熟し骨髄組織も完成していた。コラーゲンは吸収されていたが、TCFW のカーボン繊維は残存していた。カーボン繊維は骨基質と接して存在していた。術後 3 週後の TCFW 群で形成された異所性骨から凍結切断法によって作製した走査型電子顕微鏡標本では、骨基質と密に接して存在するカーボン繊維が確認された。

- ③ TCFW による骨欠損の修復；ラットの腸骨に作成した径 3 mm の骨欠損の修復実験では、Control の単純骨欠損群、TCFW 群では単純レントゲン上、骨欠損の修復を認めなかったが、BMP-TCFW 群では骨欠損は修復されていた。ラット腸骨の組織

#### 【結論】

われわれの開発した TCFW は生体親和性に優れて

おり、rhBMP-2の担体として、骨再生療法の scaffold として有用である可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

再生医療には細胞の足場となる材料 (scaffold) が必要である。現在、scaffold としては I 型コラーゲンが広く使用されているが、生体内で分解されるため細胞や成長因子の維持が制限される。また、使用されるコラーゲンは生物由来蛋白質のためアレルギーや感染症などの副作用を生じる可能性を否定できない。

われわれは、電気紡糸法により径 1 μm のカーボンファイバーからなる Thin Carbon Fiber Web (TCFW) を開発し、非生体分解性の骨再生の scaffold としての機能を評価した。

径 5 mm の TCFW のインプラントをマウスの背部皮下に埋め込み、術後 1, 2, 6 週でインプラントを周囲の筋組織とともに採取し、組織像を評価して TCFW の生体親和性を評価した。また、組み換えヒト骨形成蛋白質 (rhBMP-2) を染み込ませてフリーズドライした TCFW および I 型コラーゲンのインプラントをマウスの背部皮下に埋め込み、術後 3 週で形成された異所性骨を採取した。採取した異所性骨のレントゲン像、骨密度、組織像にて骨形成能を評価した。さらに、rhBMP-2を染み込ませてフリーズドライした TCFW のインプラントを、ラット腸骨に作製した径 3 mm の骨欠損部に埋め込んだ。骨欠損のみもの

の、TCFW のみのものをコントロールとした。術後 4 週で腸骨を採取し、レントゲン像、組織像にて骨欠損の修復を評価した。

その結果、青木は次の結論を得た。

1. マウスの背筋内に埋植された TCFW のインプラントは、異物肉芽腫を形成していたが、周囲の筋組織に壊死や強い炎症反応を認めず、TCFW による明らかな組織毒性を認めなかった。
2. rhBMP-2を用いた骨形成実験では、TCFWのカーボン繊維に密接して骨組織が形成されることを確認した。レントゲン写真では TCFW 群とコントロール群に明らかな差を認めなかったが、骨塩量、骨密度は TCFW 群の方が有意に高値を示した。
3. ラットの腸骨に作成した径 3 mm の骨欠損に rhBMP-2を含ませた TCFW のインプラントを移植することにより、作成した腸骨の骨欠損は修復された。

これらの結果により、TCFW は、生体親和性に優れており、I 型コラーゲンよりも優れた骨形成能を有していると考えられ、また、rhBMP-2を用いることによりクリティカル・サイズの骨欠損を修復することができた。以上より、TCFW は骨欠損の修復など、骨形成療法の scaffold として臨床的に極めて有用である可能性が示唆された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。