

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
白川晴章	甲第801号	20. 9.30	Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients using viral and host factors (C型慢性肝炎のペグインターフェロンとリバビリン併用療法におけるウイルス及び宿主因子を用いた治療開始前効果予測)	宮川真一	竹下敏一 本田孝行
武居俊輔	甲第802号	21. 3.31	Bone morphogenetic protein-4 promotes induction of cardiomyocytes from human embryonic stem cells in serum-based embryoid body development (ヒトES細胞由来の心筋細胞誘導は血清依存性の胚様体形成において, BMP-4によって促進される)	山田充彦	森泉哲次 竹下敏一
成田伸代	甲第803号	22. 3.31	Multiwalled Carbon Nanotubes Specifically Inhibit Osteoclast Differentiation and Function (多層カーボンナノチューブは破骨細胞の分化と機能を抑制する)	中山 淳	本郷一博 佐々木克典
稲垣 毅	甲第804号	21. 3.31	The retinoic acid-responsive proline-rich protein is identified in promyeloleukemic HL-60 cells (前骨髄性白血病細胞 HL-60におけるレチノイン酸応答蛋白 RARP1 (Retinoic Acid Response Proline-rich Protein 1) の同定)	谷口俊一郎	瀧 伸介 新藤隆行
逢坂和昌	甲第805号	21. 3.31	Possibility as monosaccharide laxative of rare sugar alcohols (希少糖アルコール類が糖類下剤となりうる可能性)	小山省三	山田充彦 田中榮司
田中洋平	甲第806号	22. 3.31	A transverse ligament located anterosuperiorly in the lower orbital fat space restricts lower eyelid retraction in the Mongoloid eye (モンゴロイドの下眼窩脂肪腔の前上方にある横走靭帯が下眼瞼の退縮を制限している)	宇佐美真一	佐々木克典 村田敏規
岡田芳幸	甲第807号	21. 3.31	Pressor responses to isometric biting are evoked by somatosensory receptors in periodontal tissue in humans (ヒト静的咬合時の昇圧応答は歯周組織内の感覚受容器刺激によって誘発される)	倉科憲治	松尾 清 川真田樹人
李 向軍	甲第808号	22. 3.31	Glucose and glucose transporters regulate lymphatic pump activity through activation of the mitochondrial ATP-sensitive K ⁺ channel (グルコース及びグルコース担体はミトコンドリア ATP 感受性カリウムイオンチャンネルの活性化を介するリンパ管ポンプの制御)	倉科憲治	山田充彦 大森 栄

審査学位論文要旨

本山博章	甲第809号	21. 3.31	<i>In vitro</i> reprogramming of adult hepatocytes into insulin-producing cells without viral vectors (成熟肝細胞を用いた, 非ウイルス性遺伝子導入によるインスリン産生細胞へのリプログラミング誘導性の検討)	谷口俊一郎	橋爪潔志 田中榮司
林景栄	甲第810号	21. 9.30	Dermoscopy of pigmented lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane (粘膜皮膚移行部と粘膜部における色素性病変のダーマスコピー所見)	倉科憲治	森泉哲次 本田孝行
張国紅	甲第811号	21. 9.30	Dysfunction in the ABCB1A has only a weak effect on susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in SAM strains (ABCB1Aの機能障害はSAM系マウスのデキストラン硫酸による誘発大腸炎に対する感受性には大きく影響しない)	谷口俊一郎	中山淳 鈴木龍雄
山田幸一郎	甲第812号	20. 9.30	Identification of a high incidence region for retroviral vector integration near exon 1 of the LMO2 locus (LMO2遺伝子座 Exon1近傍における retroviral vector integration の高頻度領域の同定)	谷口俊一郎	中山淳 鎌田徹
吉田順子	甲第813号	21. 3.31	Changes in the expression of E-cadherin repressors, Snail, Slug, SIP1 and Twist, in the development and progression of ovarian carcinoma: the important role of Snail in ovarian tumorigenesis and progression (卵巣癌の発生と進展過程における E-cadherin 転写抑制因子 Snail, Slug, SIP1および Twist の発現変化: 卵巣癌の発生と進展において Snail は重要な役割を果たす)	谷口俊一郎	天野純 加藤博之
阿部秀年	甲第814号	21. 3.31	Valve Repair Improves Central Sleep Apnea in Heart Failure Patients With Valvular Heart Diseases (心不全を伴う重症弁膜症患者における弁置換による中枢性無呼吸の改善)	天野純	久保惠嗣 岡元和文
加藤修明	甲第815号	21. 3.31	Primary AL amyloid polyneuropathy successfully treated with high-dose melphalan followed by autologous stem cell transplantation (自己末梢血幹細胞移植併用大量メルファラン療法が有効であった原発性 AL アミロイドポリニューロパチー症例)	本田孝行	中山淳 樋口京一
森川真悠子	甲第816号	21. 3.31	Physical fitness and indices of lifestyle-related diseases before and after interval walking training in middle-aged and older males and females(中高年者におけるインターバル速歩トレーニングの体力・生活習慣病指標改善効果)	樋口京一	池田宇一 田中榮司

審査学位論文要旨

BEKALE NGUEMA BENOIT	甲第817号	22. 3.31	Role of ASC in the mouse model of <i>helicobacter pylori</i> infection (ヘリコバクターピロリ感染マウスモデルにおける ASC の役割)	田中 榮 司	竹下 敏 一 本田 孝 行
小林 聡	甲第818号	22. 3.31	Surface coating of bone marrow cells with <i>N</i> -acetylglucosamine for bone marrow implantation therapy (骨髄細胞移植療法のための <i>N</i> -アセチルグルコサミンの骨髄細胞表面へのコーティング)	中山 淳	天野 純 田中 榮 司
皆川 倫 範	甲第819号	22. 3.31	Differentiation of smooth muscle cells from human amniotic mesenchymal cells implanted in the freeze-injured mouse urinary bladder (凍結障害マウス膀胱におけるヒト羊膜間葉系細胞の平滑筋への分化)	佐々木克典	大森 栄 加藤 博之
元木 博彦	甲第820号	22. 3.31	Coagulation Activity is Increased in the Left Atria of Patients With Paroxysmal Atrial Fibrillation During the Non-Paroxysmal Period - Comparison With Chronic Atrial Fibrillation - (発作性心房細動症例の非発作時における左房内凝固亢進—慢性心房細動症例との比較検討—)	田中 榮 司	天野 純 本田 孝 行
飯沼 伸佳	甲第821号	22. 3.31	Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver (肝類洞内皮細胞においてアドレノメデュリンは、肝臓の冷傷害に対して保護的に働く)	樋口 京 一	中山 淳 能 勢 博
青柳 大 樹	甲第822号	22. 3.31	Granulomatous transformation of capillary lesions in pulmonary - renal syndrome autologously induced anti-glomerular basement membrane disease in Wistar-Kyoto rats (Wistar-Kyoto ラットにおける抗 GBM 抗体病により惹起される肺腎症候群の毛細血管肉芽腫性病変)	中山 淳	佐々木克典 樋口 京 一
前澤佳代子	甲第823号	21. 3.31	Cytochrome P450 3As Gene Expression and Testosterone 6 β -Hydroxylase Activity in Human Fetal Membranes and Placenta at Full Term (ヒト卵膜および胎盤における CYP3As 遺伝子の発現とテストステロン6 β -水酸化活性)	本田 孝 行	久保 惠 嗣 塩 沢 丹 里
北口 良 晃	甲第824号	22. 3.31	Clinical characteristics of combined pulmonary fibrosis and emphysema (肺線維症合併肺気腫症例の臨床的特徴)	池田 修 一	角谷 眞 澄 田中 榮 司
三村 裕 次	甲第825号	21. 3.31	Rat Bladders Augmented with a Novel Bovine Pericardium-Derived Biomaterial Reconstruct Functional Tissue Structures (ウシ心膜由来生体材料を用いたラット膀胱拡大術における機能的組織の再構築)	天野 純	加藤 博之 大森 栄

審査学位論文要旨

城下 智	甲第826号	22. 3.31	<i>A2BPI</i> as a Novel Susceptible Gene for Primary Biliary Cirrhosis in Japanese Patients (<i>A2BPI</i> 遺伝子は日本人 PBC 患者の疾患感受性と相関する)	樋口京一	福嶋義光 本田孝行
及川尚人	甲第827号	22. 3.31	Alzheimer-type tau pathology in advanced aged nonhuman primate brains harboring substantial amyloid deposition (高度のアミロイド沈着を伴う超高齢カニクイザル脳におけるアルツハイマー病型タウ病変の形成)	谷口俊一郎	樋口京一 鈴木龍雄
金井敏晴	甲第828号	21. 3.31	Evaluation of a new method for the diagnosis of alterations of Lens culinaris agglutinin binding of thyroglobulin molecules in thyroid carcinoma (サイログロブリン糖鎖異常の検出による甲状腺癌診断の可能性)	中山 淳	谷口俊一郎 本田孝行
今井弘毅	甲第829号	21. 3.31	μ -Crystallin, New Candidate Protein in Endotoxin-Induced Uveitis (エンドトキシン誘発ぶどう膜炎における新しいミュークリスタリンの機能解析)	村田敏規	池田修一 瀧 伸介
塚田景大	甲第830号	21. 3.31	A Large Cohort Study Of <i>GJB2</i> Mutations In Japanese Hearing Loss Patients (日本人難聴患者における <i>GJB2</i> 遺伝子変異の大規模研究)	本田孝行	小池健一 福嶋義光
山崎和子	甲第831号	21. 3.31	Potentiation of TLR9 responses for human naïve B-cell growth through RP105 signaling (RP105シグナルはTLR9と相乗的にヒト ナイーブ細胞の増殖を促進する)	小池健一	谷口俊一郎 奥山隆平
小林幸弘	甲第832号	21. 3.31	Liquid-based thin-layer cytology can be routinely used in samples obtained via fiberoptic bronchoscope (液状固定による薄層塗抹細胞診法は気管支鏡で得られた検体に使用可能)	本田孝行	樋口京一 中山 淳
鶴田悟郎	甲第833号	22. 3.31	Nonalcoholic fatty liver disease in Japanese junior high school students: its prevalence and relationship to lifestyle habits (日本の中学生における非アルコール性脂肪肝疾患：その有病率と生活習慣との関係)	小池健一	角谷眞澄 宮川眞一
張 鵬堯	甲第834号	21. 3.31	Mouse model to study human $A\beta_2M$ amyloidosis: Generation of a transgenic mouse with excessive expression of human β_2 -microglobulin(ヒト透析アミロイドーシス研究のためのモデルマウス：ヒト β_2 ミクログロブリン過剰発現トランスジェニックマウスの作製)	谷口俊一郎	鈴木龍雄 能勢 博
友澤 寛	甲第835号	21. 3.31	BN.MES- <i>Cyba</i> ^{mes} congenic rats manifest focal necrosis with eosinophilic infiltration in the liver without blood eosinophilia (BN.MES- <i>Cyba</i> ^{mes} コンジェニックラットは血中の好酸球増多を発症することなく、肝臓への好酸球浸潤による壊死像を呈する)	鈴木龍雄	田中榮司 瀧 伸介

中山 剛	甲第836号	21. 3.31	Expression of $\alpha 1$ -Adrenergic Receptor Subtypes and Angiotensin II Type 1 Receptor in the Prostate of Spontaneously Hypertensive Rats (自然発症高血圧ラット前立腺におけるアドレナリン $\alpha 1$ 受容体サブタイプおよびアンジオテンシンIIタイプ1受容体の発現)	中山 淳	田中 榮司 大森 栄
中島 弘毅	甲第837号	22. 3.31	Exercise Effects on Methylation of ASC Gene (ASC 遺伝子のメチル化に関する運動効果)	竹下 敏一	小池 健一 加藤 博之
姜 英松	甲第838号	22. 3.31	Trypsin digestion on paraffin sections is a useful tool for diagnosis of Alport syndrome (トリプシン消化はパラフィン切片でのアルポート症候群の診断に有用である)	中山 淳	本田 孝行 青山 俊文

Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients using viral and host factors (C型慢性肝炎のペグインターフェロンとリバビリン併用療法におけるウイルス及び宿主因子を用いた治療開始前効果予測)

白 川 晴 章

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 C型慢性肝炎は長年の経過で肝硬変へ進行し肝細胞癌を合併するため臨床的に重要な疾患である。治療はC型肝炎ウイルス(HCV)を排除することが最も効果的であり、これにより肝発癌率は大幅に低下する。HCV 遺伝子型とウイルス量はインターフェロン(IFN)治療効果を規定する大きな因子であり、1型で高ウイルス量の症例は最も難治とされている。この治療困難例では、最も効果的であるとされるペグインターフェロン(PegIFN)とリバビリン(RBV)併用療法を用いてもウイルスが完全に排除されるSVR(sustained virologic response)率は約50%である。PegIFN+RBV併用療法は48週間またはこれ以上の長期間を要し、副作用が多く、高額であることから、治療開始前に治療効果を予測し、個々の患者に適した治療選択を行うことは非常に有益であると考えられる。これまで、難治とされる1型で高ウイルス量の症例の中でさらに治療効果を予測することは困難と考えられていた。今回我々は、種々のウイルス因

子に免疫応答を加味した宿主因子を加え、1型で高ウイルス量症例のPegIFN+RBV併用療法における治療開始前効果予測の可能性を検討した。

【対象と方法】 2004~2005年の間にPegIFN+RBV併用療法を行った120例(男性65例,年齢中央値61歳)を対象とした。ウイルス因子としてHCV RNA量, ISDR(interferon sensitivity determining region)変異を,宿主因子として年齢,性別,体重などにTh1/Th2比を加え,SVRとの関連で多変量解析を行った。

【結果】 120例中54例(45%)でSVRが得られた。SVRと有意に関連した治療前項目は,男性,若年,高体重,Cr高値,WBC高値,Hb高値,好中球数高値,Th1/Th2比低値,HCV RNA量低値,ISDR変異有りであった。また,治療中の因子としては2週目HCV RNA量低値,早期の血中HCV RNA陰性化であった。また,治療因子としては,総PegIFN投与量,総RBV投与量が多いこと,および実際の投与量を予定投与量で割ったPegIFN投与率とRBV投与率が高いことであった。これらの因子について多変量解析を行いSVRに寄与する因子を抽出すると,治療前因子として,体重>59 kg (OR6.4, P=0.0106), ISDR変異>2 (OR86, P=0.0008),好中球数>2300/ μ l (OR5.5, p=0.0031), Th1/Th2比<15.5 (OR9.6, P=0.0021)が抽出された。選択された治療前因子を用いてロジスティックモデルを構築し,各症例の予測SVR率を求めた。予測SVR率が33%未満を低反応群,33%以上66%未満を中反応群,66%以上を高反応群とすると,各群の実際のSVR率は15%,41%,91%であった(P<0.001)。また,低反応群

ではPegIFNおよびRBVの投与率が高くてもSVRが得られにくく、高反応群では投与率が低くてもSVRが得られ、中間群では投与率が高い程SVRが得られた。【結論】C型慢性肝炎1b型高ウイルス量患者に対するPegIFN+RBV併用療法において、治療開始前因子であるISDR変異あり、体重>59 kg、好中球数>2300/ μ lおよびTh1/Th2比<15.5が独立にSVRと関連していた。これら因子を用いて算出した予測SVR率は、高反応群および低反応群において90%以上の正診率があり、各患者個人の反応性に合わせた治療方針の決定が可能であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

C型慢性肝炎の治療はC型肝炎ウイルス(HCV)を排除することが最も効果的であり、これにより肝発癌率は大幅に低下する。インターフェロン(IFN)治療の効果にはHCV遺伝子型とウイルス量が大きく影響しており、1型で高ウイルス量の症例は最も治療困難で、ペグインターフェロン(PegIFN)とリバビリン(RBV)併用療法を用いてもウイルスが完全に排除されるSVR(sustained virologic response)率は約50%である。よって治療開始前に治療効果を予測し、個々の患者に適した治療選択を行うことは非常に有益であると考えられる。今回我々は、種々のウイルス因子に免疫応答を加味した宿主因子を加え、1型で高ウイルス量症例のPegIFN+RBV併用療法における治療開始前効果予測の可能性を検討した。

その結果、白川は以下の結論を得た。

1. 120例中54例(45%)でSVRが得られた。SVRと有意に関連した治療前項目は、男性、若年、高体重、Cr高値、WBC高値、Hb高値、好中球数高値、Th1/Th2比低値、HCV RNA量低値、ISDR変異有りであった。
2. 治療中の因子でSVRと有意に関連したものは2週目HCV RNA量低値、早期の血中HCV RNA陰性化であった。
3. 治療因子でSVRと有意に関連したものは、総PegIFN投与量、総RBV投与量が多いこと、PegIFN投与率とRBV投与率が高いことであった。
4. これらの因子について多変量解析を行いSVRに寄与する因子を抽出すると、治療前因子として、体重>59 kg、ISDR変異>2、好中球数>2300/ μ l、Th1/Th2比<15.5が抽出された。
5. 選択された治療前因子を用いてロジスティックモデルを構築して予測SVR率を求め、予測SVR率

によって低反応群、中反応群、高反応群としたところ、各群の実際のSVR率は15%、41%、91%($P<0.001$)、予測SVR率は実際のSVR率と非常に相関した。また、低反応群ではPegIFNおよびRBVの投与率が高くてもSVRが得られにくく、高反応群では投与率が低くてもSVRが得られ、中間群では投与率が高い程SVRが得られた。

今回の研究ではC型肝炎1b型高ウイルス量患者に対するPegIFN+RBV併用療法において、治療開始前因子であるISDR変異あり、体重>59 kg、好中球数>2300/ μ lおよびTh1/Th2比<15.5が独立にSVRと関連しており、これら因子を用いて算出した予測SVR率は、実際のSVR率と非常に良く相関していた。これにより、1b型高ウイルス量患者に対するPegIFN+RBV併用療法の治療前予測は可能であることが示された。将来的には各患者の治療選択および治療継続の方針決定に応用できる可能性があり、臨床的に意義のある研究である。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。

Bone morphogenetic protein-4 promotes induction of cardiomyocytes from human embryonic stem cells in serum-based embryoid body development (ヒトES細胞由来の心筋細胞誘導は血清依存性の胚様体形成においてBMP-4によって促進される)

武居 俊 輔

(論文の内容の要旨)

現在、幹細胞の多能性が示され、それらを用いた再生医療への応用が期待されているが、幹細胞による明らかな組織修復はこれまで証明できていない。重度の心筋梗塞に幹細胞の臨床応用を考える際、細胞供給源として、ES細胞のような増殖能が高く、細胞量を確保しやすい細胞を利用することが現実的である。従って今回計画したES細胞から心筋細胞を選択的に誘導する研究は有意義である。

ヒトES細胞由来の心筋細胞は心疾患の治療において、細胞ソースとして直接的で潜在的な可能性を持っている。この研究ではbone morphogenetic protein(BMP)-4を用いた新しい分化誘導法の確立を試みた。BMPsは、トランスフォーミング成長因子- β (TGF- β)スーパーファミリーに属している多機能性サイトカインであり、そのシグナルは、脊椎骨中胚葉誘導

と同様に心臓発生においても中心的な役割を果たす。これまでマウス ES 細胞の心筋細胞誘導に関わる BMP シグナルの効果について多くの研究がなされてきたが、心筋細胞分化機序に種間差があるため、ヒト ES 細胞に動物モデルで確立されている誘導法をそのまま応用することに無理がある。そこで本研究において、BMP-4の発生上の役割を考慮し、ヒト ES 細胞でこのサイトカインの有効性を証明しようと試みた。

FBS (牛胎児血清) の条件検討の結果、20 % FBS による 4 日間の浮遊培養が初期中胚葉や心筋細胞の分化のためには最適であるということが分かった。さらに BMP のアンタゴニストである Noggin の添加により、拍動 EB の発生率が 23.6 % から 5.3 % まで低下した。このことは通常に見られる心筋細胞分化に BMP シグナリングが深く関与していることを示している。そこで様々な濃度の BMP-4 を添加しその効果を検証した結果、4 日間の浮遊培養の間 12.5-25 ng/ml の BMP-4 を添加する処置がもっとも効率よく心筋細胞分化を促進した。BMP-4 25 ng/ml 添加の拍動 EB 発生率は、接着後 6 日目において 95.8 % に達し、20 日目までにプラトーを維持した。

EB 形成過程の BMP シグナリングの活性化は、Smad1/5/8 のリン酸化の増加および phospho-Smad 1/5/8 と Smad4 の核局在化により確認された。また real-time PCR 解析により、25 ng/ml の BMP-4 による処置は心筋細胞関連遺伝子である Mesp1 と Nkx2.5 の発現を有意に上昇させることが分かった。誘導された心筋細胞はイソプロテレノールの添加により機能的に反応した。また心筋細胞タンパク質である atrial natriuretic peptide (ANP), cardiac troponin I (cTnI) の発現は時間の経過とともに増加し、心筋細胞の成熟が示唆された。さらに免疫染色によりこれらの心筋細胞にカドヘリンとコネキシン 43 の発現が確認され、細胞間構造が適切に形成されていることが分かった。

これらのことから BMP-4 の濃度および添加すべき時期は、ヒト胚性幹細胞から心筋細胞へ効果的に誘導を行うために決定的に重要なファクターであることが明らかになった。同時に BMP-4 と FBS を組み合わせることでヒト ES 細胞から心筋細胞への分化を有意に促進するための誘導法を確立できた。

(論文審査の結果の要旨)

現在、幹細胞の多能性が示され、それらを用いた再生医療への応用が期待されているが、幹細胞による明らかな組織修復はこれまで証明できていない。重度の

心筋梗塞に幹細胞の臨床応用を考える際、細胞供給源として、ES 細胞のような増殖能が高く、細胞量を確保しやすい細胞を利用することが現実的である。従って今回計画した ES 細胞から心筋細胞を選択的に誘導する研究は有意義である。

ヒト ES 細胞由来の心筋細胞は心疾患の治療において、細胞ソースとして直接的で潜在的な可能性を持っている。この研究では bone morphogenetic protein (BMP) -4 を用いた新しい分化誘導法の確立を試みた。BMPs は、トランスフォーミング成長因子- β (TGF- β) スーパーファミリーに属している多機能性サイトカインであり、そのシグナルは、脊椎骨中胚葉誘導と同様に心臓発生においても中心的な役割を果たす。これまでマウス ES 細胞の心筋細胞誘導に関わる BMP シグナルの効果について多くの研究がなされてきたが、心筋細胞分化機序に種間差があるため、ヒト ES 細胞に動物モデルで確立されている誘導法をそのまま応用することに無理がある。そこで本研究において、BMP-4 の発生上の役割を考慮し、ヒト ES 細胞でこのサイトカインの有効性を証明しようと試みた。

その結果、武居俊輔は次の結論を得た。

1. FBS (牛胎児血清) の条件検討の結果、20 % FBS による 4 日間の浮遊培養が初期中胚葉や心筋細胞の分化のためには最適であるということが分かった。
2. BMP-4 の条件検討の結果、4 日間の浮遊培養の間 12.5-25 ng/ml の BMP-4 を添加する処置がもっとも効率よく心筋細胞分化を促進した。BMP-4 25 ng/ml 添加の拍動 EB 発生率は、接着後 6 日目において 95.8 % に達し、20 日目までにプラトーを維持した。
3. real-time PCR 解析により、25 ng/ml の BMP-4 による処置は心筋細胞関連遺伝子である Mesp1 と Nkx2.5 の発現を有意に上昇させることが分かった。
4. 誘導された心筋細胞は機能的な細胞であり、心筋細胞としての特徴を有していた。
5. 誘導された心筋細胞は培養を経るにしたがい、増殖、成熟していった。

これらのことから BMP-4 の濃度および添加すべき時期は、ヒト胚性幹細胞から心筋細胞へ効果的に誘導を行うために決定的に重要なファクターであることが明らかになった。同時に BMP-4 と FBS を組み合わせることでヒト ES 細胞から心筋細胞への分化を有意に促進するための誘導法を確立できた。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のあるものと認めた。

Multiwalled Carbon Nanotubes Specifically Inhibit Osteoclast Differentiation and Function (多層カーボンナノチューブは破骨細胞の分化と機能を抑制する)

成 田 伸 代

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 近年、多層カーボンナノチューブ (Multiwalled Carbon Nanotubes; MWCNTs) を人工関節等の生体材料や再生医療の scaffold として利用する研究が進んでいる。現在整形外科領域で、人工関節に使用されているポリエチレンは、その磨耗粉が炎症性サイトカイン産生を促し、破骨細胞を誘導して骨融解を起こすことが知られている。そのため、今後 MWCNTs を骨組織と接して使用する場合、骨組織への反応を検討する必要がある。骨組織内では骨芽細胞と破骨細胞が、骨形成と骨吸収をそれぞれ担いカップリングして働いている。破骨細胞の分化には、骨芽細胞が産生する RANKL と M-CSF が必要であり、骨髄細胞由来の骨髄マクロファージから分化することが知られている。また $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 等の骨吸収促進因子は RANKL の発現を促す。われわれは、MWCNTs が骨吸収を司る破骨細胞に対して与える影響について研究した。

【方法と結果】 材料は、MWCNTs (径80 nm, 150 nm の2種。長さ8~10 μm) と、対象として顔料等で生体に以前より使用されているカーボンブラック (Carbon Black; CB, 粒子径80 nm) を用いた。

① 骨形成蛋白 (rhBMP-2) を染み込ませてフリーズドライした MWCNTs (80 nm) および I 型コラーゲンのインプラントをマウス背部皮下に埋め込み、術後2週、3週と3カ月で形成された異所性骨を採取した。2週目の異所性骨の組織切片を TRAP 染色し陽性細胞数を評価したところ、MWCNTs 群では破骨細胞数は有意に少なかった。また3カ月後の異所性骨の骨密度は MWCNTs 群が高かった。

② 仔マウスの頭蓋骨から採取した骨芽細胞と、6週齢マウス脛骨から採取した骨髄細胞をそれぞれ培養して、MWCNTs を添加し、細胞増殖に対する影響をアラマーブルーアッセイで調べた。その結果、骨芽細胞の増殖は抑制されなかった。また、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下

の MWCNTs は骨髄マクロファージの増殖を抑制しなかった。次に、骨髄マクロファージの増殖に影響しない 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の MWCNTs を用いて、骨芽細胞と骨髄細胞を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下に培養して破骨細胞を形成する系 (共存培養系) に対する影響を TRAP 染色を行い調べた。その結果、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MWCNTs は破骨細胞の分化を抑制した。そこで、骨芽細胞が産生する破骨細胞の分化に関与するサイトカイン (RANKL, OPG, M-CSF) に対する MWCNTs の影響を、RT-PCR で調べたところ、MWCNTs は影響を与えなかった。

③ 骨髄マクロファージを単独で培養し、RANKL と M-CSF 存在下で破骨細胞へ分化させる系において、MWCNTs を RANKL と同時に添加すると破骨細胞形成を抑制しないが、RANKL 投与24時間前に添加すると 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MWCNTs は破骨細胞形成を抑制した。またこのとき光学顕微鏡で、骨髄マクロファージ内に MWCNTs が取り込まれている像が観察された。

④ MWCNTs の破骨細胞分化抑制効果が、骨髄マクロファージから破骨細胞へ分化する過程の細胞内シグナル伝達のどこに影響して起きているかを、ウェスタンブロット法を用いて調べた。その結果、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ の分解、p38MAPK のリン酸化、NFATc1 の発現には影響を与えていなかった。破骨細胞の分化に必須といわれる転写因子 NFATc1 は発現すると細胞質から核へ移行して働くため、NFATc1 の核移行について、免疫蛍光染色法を用いて調べたところ、MWCNTs は NFATc1 の核移行を抑制していた。

⑤ 形成された破骨細胞の骨吸収機能に MWCNTs が与える影響を調べた。象牙切片上に成熟破骨細胞を培養し、MWCNTs を添加して36時間後に、形成されている吸収窩をマイヤーヘマトキシリン染色して検討したところ、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MWCNTs は破骨細胞の骨吸収機能を抑制した。また RANKL 存在下で培養中の成熟破骨細胞に MWCNTs を添加して36時間後に TRAP 染色したところ、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MWCNTs は RANKL による破骨細胞の延命を抑制した。このときの破骨細胞を透過型電子顕微鏡で観察すると、破骨細胞内に MWCNTs が取り込まれている像が観察された。

【結論】 MWCNTs は骨芽細胞には影響を及ぼさず、破骨細胞特異的に分化と機能を抑制した。その結果、形成された異所性骨において、骨密度が高く保たれた

と考えられた。また破骨細胞分化抑制の機序として、骨髄マクロファージ内に取り込まれた MWCNTs が転写因子 NFATc1 の核移行を抑制していることが示唆された。MWCNTs は、生体材料として骨組織の周囲で使用する場合に、破骨細胞の分化と機能を抑制し骨量を保つ利点を有すると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

近年、多層カーボンナノチューブ (MWCNTs) を人工関節等の生体材料や再生医療の scaffold として利用する研究が進んでいる。現在整形外科領域で、人工関節に使用されているポリエチレンは、その磨耗粉が炎症性サイトカイン産生を促し、破骨細胞を誘導して骨融解を起こすことが知られている。そのため、今後を骨組織と接して使用する場合、骨組織への反応を検討する必要がある。骨組織内では骨芽細胞と破骨細胞が、骨形成と骨吸収をそれぞれ担いカップリングして働いている。破骨細胞の分化には、骨芽細胞が産生する RANKL と M-CSF が必要であり、骨髄細胞由来の骨髄マクロファージから分化することが知られている。また $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 等の骨吸収促進因子は RANKL の発現を促す。われわれは、MWCNTs が骨吸収を司る破骨細胞に対して与える影響について研究した。

材料は、多層カーボンナノチューブ (径 80 nm, 150 nm の 2 種。長さ 8~10 μm) と、対象として顔料等で生体に以前より使用されているカーボンブラック (Carbon Black ; CB. 粒子径 80 nm) を用いた。骨形成蛋白 (rhBMP-2) を染み込ませてフリーズドライした MWCNTs (80 nm) および I 型コラーゲンのインプラントをマウス背部皮下に埋め込み、術後 2 週、3 週と 3 カ月で形成された異所性骨を採取した。術後 2 週の異所性骨組織を、破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色を行い評価した。術後 3 週、3 カ月の異所性骨の骨密度を調べた。次に、仔マウスの頭蓋骨から採取した骨芽細胞と、6 週齢マウス脛骨から採取した骨髄細胞をそれぞれ培養して、MWCNTs を添加し、細胞増殖に対する影響をアラマーブルーアッセイで調べた。次に、骨芽細胞と骨髄細胞を $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下に培養して破骨細胞を形成する系 (共存培養系) に MWCNTs を添加して TRAP 染色を行った。また、骨芽細胞が産生する破骨細胞の分化に関与するサイトカイン (RANKL, OPG, M-CSF) に対する MWCNTs の影響を、RT-PCR で調べた。次に、骨髄マクロファ-

ージを単独で培養し、RANKL と M-CSF 存在下で破骨細胞へ分化させる系において、RANKL 投与 24 時間前と 1 時間前に MWCNTs を添加して影響を調べた。ウェスタンブロット法で、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ の分解、p38 MAPK のリン酸化、NFATc1 の発現に対する MWCNTs の影響を調べた。また NFATc1 の核移行について、免疫蛍光染色法を用いて調べた。最後に成熟破骨細胞に対する MWCNTs の影響を観察するため、象牙切片上に成熟破骨細胞を培養し、MWCNTs を添加して 36 時間後に、形成されている吸収窩をマイヤーヘマトキシリン染色した。また RANKL 存在下で培養中の成熟破骨細胞に MWCNTs を添加して 36 時間後に TRAP 染色を行った。

その結果、成田は次の結論を得た。

1. 形成された異所性骨術後 2 週の組織切片を TRAP 染色した結果、MWCNTs 群では破骨細胞数は有意に少なかった。また術後 3 カ月の異所性骨骨密度は MWCNTs 群が高かった。
2. 骨芽細胞の増殖は、MWCNTs により抑制されなかった。また 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の MWCNTs は、骨髄マクロファージの増殖を抑制しなかった。5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MWCNTs は、共存培養系において $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が誘導する破骨細胞の分化を抑制した。また RT-PCR の結果、骨芽細胞が産生する破骨細胞の分化に関与するサイトカイン (RANKL, OPG, M-CSF) に、MWCNTs は影響を与えなかった。
3. 骨髄マクロファージを単独で培養し、RANKL と M-CSF 存在下で破骨細胞へ分化させる系において、RANKL 投与 24 時間前に添加すると 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MWCNTs は破骨細胞形成を抑制した。またこのとき光学顕微鏡で、骨髄マクロファージ内に MWCNTs が取り込まれている像が観察された。
4. ウェスタンブロット法の結果、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ の分解、p38MAPK のリン酸化、NFATc1 の発現には、MWCNTs は影響を与えていなかった。免疫蛍光染色法の結果、MWCNTs は NFATc1 の核移行を抑制した。
5. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MWCNTs は破骨細胞の骨吸収機能を抑制した。また、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MWCNTs は RANKL による破骨細胞の延命を抑制した。このときの破骨細胞を透過型電子顕微鏡で観察すると、細胞内に MWCNTs が取り込まれていた。

これらの結果により、MWCNTs は骨芽細胞には影響を与えず、破骨細胞特異的に分化と機能を抑制し

ていることが明らかとなった。破骨細胞分化抑制の機序として、骨髄マクロファージ内に取り込まれたMWCNTsが転写因子NFATc1の核移行を抑制していることが示唆された。またそれらの結果、形成された異所性骨において骨密度が高く保たれたと考えられ、MWCNTsは、生体材料として骨組織の周囲で使用する場合に、破骨細胞の分化と機能を抑制し骨量を保つ利点を有すると考えられた。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。

The retinoic acid-responsive proline-rich protein is identified in promyeloleukemic HL-60 cells (前骨髄性白血病細胞HL-60におけるレチノイン酸応答蛋白RARP1 (Retinoic Acid Response Proline-rich Protein 1) の同定)

稲垣 毅

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】レチノイン酸をはじめとするレチノイドとその代謝活性物質は、分化や形態形成のほか、生体のホメオスタシス維持において重要な役割を果たす。また臨床的に、レチノイン酸は急性前骨髄性白血病の治療薬として用いられている。しかしながら、その作用機序は未だ不明な点が多い。今回、レチノイン酸による前骨髄性白血病細胞 HL-60の分化誘導の作用機序を検討する目的で、我々は、レチノイン酸によって活性化される遺伝子を単離し検討した。

【材料と方法】前骨髄性白血病細胞 HL-60細胞をオール・トランス・レチノイン酸 (ATRA) で処理したのち、mRNA ディファレンシャルディスプレイ法を行った。その結果、得られた遺伝子断片をもとにして、胸腺 cDNA ライブラリーから ATRA 標的遺伝子をクローニングし、5'-RACE 法を駆使して全長遺伝子をクローニングした。つぎに、この遺伝子の発現特性を Northern blotting 法、Western blotting 法、免疫組織化学法を用いて検討した。さらに、得られた遺伝子の配列がシグナル伝達に関連するドメインを持っていたことから、レポーターアッセイを行い、シグナル伝達への影響を検討した。

【結果】ATRA で処理した HL-60細胞を用いて行った mRNA ディファレンシャルディスプレイ法の結果、レチノイン酸によって誘導される遺伝子を発見し、ヒ

トの胸腺ライブラリーからクローニングした。この遺伝子は、マウスのプロリンリッチ蛋白76と高い相同性をもつ、ヒトの666アミノ酸をコードしていたため、我々は retinoic acid response proline-rich protein 1 (RARP1) と名づけた。RARP1の転写は ATRA によって誘導され、その誘導はサイクロヘキサマイドによって抑制された。RARP1の mRNA は約2.4 kbp であり、胸腺や脾臓、末梢白血球といった免疫に関わる臓器で強く発現していたほか、巨核球系のヒト赤白血病細胞 HEL 細胞で高発現を示す一方、ヒト Tリンパ芽球系の Jurkat 細胞では発現が低かった。また、HL-60細胞を ATRA で処理すると、110 kDa の RARP1 蛋白質が蓄積することを、特異的な抗体を作製して確認した。この RARP1抗体を用いた免疫組織化学染色では、骨髄と脾臓の巨核球に強い染色を認めたほか、胸腺に heterogeneous な染色を認めた。RARP1の機能に関しては、RARP1のタンパク配列が Proline-rich domain, Ras-associated domain および PH domain を含んでいたことから、シグナル伝達や転写調節に関わる可能性が考えられた。そこで、CHO-K1細胞、Jurkat細胞およびCHO-IR細胞を用いて、リポーターアッセイを行った。これらの細胞系において、RARP1は activator protein 1 (AP1) と serum response element (SRE) を介する転写活性を抑制していた。一方、cAMP response element (CRE) を介する転写活性には影響しなかった。より詳しい分析の結果、RARP1の proline-rich 領域は、AP1の転写活性の抑制に関わる機能領域であることが分かった。

【結論】以上の結果は、ATRA によって誘導される RARP1が、選択的に細胞内のシグナル伝達を調節すること示しており、RARP1が骨髄球や巨核球の分化に関わる可能性を示唆している。

(論文審査の結果の要旨)

レチノイン酸は、急性前骨髄性白血病の分化誘導療法の治療薬として用いられている。しかしながら、その作用機序は未だ不明な点が多い。今回、前骨髄性白血病細胞 HL-60におけるレチノイン酸の作用機序を検討するために、レチノイン酸によって活性化される新規遺伝子を検討した。

オール・トランス・レチノイン酸 (ATRA) で処理した前骨髄性白血病細胞 HL-60細胞を用いて、mRNA ディファレンシャルディスプレイ法を行い、ATRA の標的遺伝子を検索した。その結果得られた遺伝子断片をもとに、全長遺伝子をクローニングした。

つづいて、遺伝子発現の特徴や分布を Northern blotting 法, Western blotting 法, 免疫組織化学法を用いて検討した。さらに、得られた遺伝子の配列の中にシグナル伝達に関連するドメインが認められたことから、レポーターアッセイを行い、シグナル伝達への影響を検討した。

その結果、稲垣は次の結論を得た。

1. 前骨髄性白血病細胞 HL-60細胞におけるレチノイン酸応答蛋白 RARP1 (Retinoic Acid Response Proline-rich Protein 1) を同定した。RARP1遺伝子は ATRA による濃度依存的かつ経時的な発現調節を受けていた。
2. RARP1は、免疫および造血に関連する臓器(胸腺・骨髄・脾臓)において強い発現を認めた。
3. RARP1の配列には、シグナル伝達に関与するドメイン (proline-rich domain, ras associated domain, PH domain) が含まれていた。このうち、血清応答配列 (SRE), 活性化蛋白質1 (AP-1) を介するレポーターの発現は RARP1によって抑制された一方で、cAMP 応答配列 (CRE) を介するレポーターの発現は RARP1による抑制を受けなかった。さらに AP-1の発現抑制は proline-rich domain に依存性であった。

これらの結果より、ATRA による発現調節を受ける新規遺伝子 RARP1が、免疫および造血に関連する臓器に発現することが明らかになった。さらに、RARP1は、ドメイン特異的にシグナル伝達を制御する因子であることが明らかになった。このことは、新規遺伝子 RARP1がシグナル伝達を調節することで、細胞現象をコントロールすることを示唆している。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。

Possibility as monosaccharide laxative of rare sugar alcohols (希少糖アルコールが糖類下剤となりうる可能性)

逢坂和昌

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】ソルビトールは、自然界に多量に存在する糖アルコールであり、便秘を治療する糖類下剤として用いられている。一方、アリトール、タリトール、イデイトールは、自然界に微量にしか存在しない糖アルコールであり、その希少さゆえに、物性や生理活性

は調べられていない。今回、上記3種類の希少な糖アルコールが、ソルビトールのような糖類下剤となりえるのかどうか、緩下作用を比較検討した。

【材料および方法】3.3~9.9 g/kgまでの5用量の希少糖アルコールをマウスに経口投与し、その後に下痢を呈する動物数および便の状態を3時間まで観察することで緩下作用を評価した。また便通を促進させる浸透圧作用を検討するため、各糖アルコールの摂取1.8時間後の着色物質(炭素末)の小腸移行率を小腸の輸送能として算出した。その後、小腸、盲腸および大腸内の水分含量も測定した。値は、対照群と比較した。対照群には、溶媒(蒸留水およびカルボキシメチルセルロース)とソルビトールを用いた。緩下作用の比較は、フィッシャーの直接確立検定を用い、2群間の比較には対応のあるt-検定を用いた。どちらも有意水準は、0.05以下とした。

【結果】マウスにおいて下痢を発現させる用量は、各糖アルコールとも4.95 g/kgからであり、用量の増加とともに下痢を呈するマウスは増え、泥状便から水様便に悪化する。9.9 g/kgの用量では、イデイトールの緩下作用が最も強く、マウス全匹が下痢を呈し、溶媒と比較して有意な差が生じた。一方、ソルビトールの9.9 g/kg摂取群では、下痢を呈するマウスは全体の半数以下と少なかったが、イデイトールとソルビトールの間に有意な差は認められなかった。

さらに小腸での炭素末の輸送能は、希少糖アルコール9.9 g/kgの投与量で、溶媒と比較して有意に増加した。また、水分含量も小腸、盲腸において、溶媒と比較して有意に増加した。なお、輸送能および水分含量ともに、イデイトールが顕著な増加を示した。しかし、ソルビトールも同様に輸送能を亢進させ、腸内水分量を増加させており、両者に有意な差は認められなかった。

【考察】希少糖アルコールの投与後、小腸と盲腸内の水分含量が増加し、これに伴い小腸の輸送能も亢進しており、浸透圧作用が示された。希少糖アルコールの中でも、イデイトールが強い効果を示す傾向にあった。この効果の違いは、物性または大腸での輸送能などが他の糖アルコールと異なると推測され、今後の研究課題である。

【結論】今回の実験から、希少糖アルコール、特にイデイトールは、十分な浸透圧作用を示し、ソルビトールと同等以上の緩下作用を有していた。この点から将来強固な便秘症に適用される有用な単糖下剤になり得

ると結論付けた。

(論文審査の結果の要旨)

糖類下剤のソルビトールやラクツロースは、浸透圧性下剤として便秘の症状に応じて使用されている。一方、希少糖アルコールと呼ばれる糖アルコールは、その希少性ゆえに緩下作用などの研究は進んでいない。今回、アリトール、タリトール、イデイトールの3種類の希少糖アルコールをマウスに経口投与し、緩下作用などを調べた。

マウスは5週齢のICR雄30匹を用いた。実験は投与物質ごとに六群に分類し、一群を5匹とした。なお、六群の内訳は次のとおりである。①アリトール②タリトール③イデイトール④ソルビトール(対照)⑤カルボキシメチルセルロース(溶媒)⑥蒸留水(溶媒)。緩下作用では、3.3~9.9 g/kgまでの5用量の各液体0.2 mlを経口投与し、3時間までに下痢を呈するマウス数および排出される便の状態を観察した。また、糖アルコールの浸透圧作用を確認するため、投与1.8時間後にマウスを屠殺し、小腸内の着色物質の移動距離から輸送能を算出した。さらに屠殺したマウスの小腸、盲腸、大腸内の腸内水分量も計測した。

その結果、逢坂は次の結論を得た。

1. 希少糖アルコールにおいて、3.3 g/kgの用量では下痢を呈さず、下痢を誘発させる用量は4.95 g/kgであり、ソルビトールも同じであった。
2. 下痢を呈するマウス数は、用量の増加とともに増加し、便の性状は、泥状便から水様便に悪化した。
3. タリトールとイデイトールの9.9 g/kgの用量では、溶媒と比較し、下痢を呈するマウスは有意に増加したが、ソルビトールでは差を認めなかった。
4. イデイトールの9.9 g/kgの用量では、試験したマウス全匹が下痢を起こしたが、ソルビトールでは半数以下のマウスしか下痢を起こさず、差を示す傾向が見られた。しかし、両者間で有意差は認められなかった。
5. 小腸および盲腸内の腸内水分量は、すべての糖アルコールで、溶媒と比較し有意に増加したため、希少糖アルコールとソルビトールの間に差は認められなかった。
6. 小腸輸送能も、すべての糖アルコールで、溶媒と比較し有意に増加したため、希少糖アルコールとソルビトールの間に差は認められなかった。

これらの結果より、希少糖アルコール類は、腸内の水分を増加させ、小腸の輸送能も亢進させる浸透圧作

用を有しており、緩下作用を示した。この作用は、ソルビトールと同等程度であった。ただし、イデイトールは、ソルビトールより強い浸透圧作用および緩下効果を示す傾向にあり、強固な便秘症の治療などに用いられる可能性を示唆している。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。

A transverse ligament located anterosuperiorly in the lower orbital fat space restricts lower eyelid retraction in the Mongoloid eye (モンゴロイドの下眼窩脂肪腔の前上方にある横走靭帯が下眼瞼の退縮を制限している)

田 中 洋 平

(論文の内容の要旨)

【目的】モンゴロイドの眼瞼はコーカソイドの眼瞼に比べて、瞼裂が細く腫れぼったいとされている。上眼瞼については杠らが、下位横走靭帯が上眼瞼挙筋の可動域を制限し、挙筋前脂肪を上眼瞼挙上時に低い位置に留め、上眼瞼を厚く瞼裂を狭くしていると報告している。そこで我々は上眼瞼と同様に下眼瞼にも横走靭帯が存在し、下眼瞼の退縮を制限していると考え、一般日本人と献体において、この解剖学的構造を調査した。

【方法】開瞼時の上下眼瞼の退縮を分析するため、20歳代の眼瞼の手術を受けていない日本人volunteer101人のdominant eyeについて調査した。内眦外眦を結んだ直線より最も上眼瞼が退縮した距離をUERD (upper eyelid retraction distance)、最も下眼瞼が退縮した距離をLERD (lower eyelid retraction distance)、瞼裂縦径をUERD+LERDとした。また、どのような形で退縮が制限されているかを瞼縁の形状で評価するため、UERD、LERDの偏位を測定した。下眼瞼の横走靭帯の存在位置、走行を確認するため、下眼瞼疾患で手術を行った患者10人の術中所見、献体23体の右下眼瞼の解剖所見、献体9体から採取した組織標本において調査を行った。

【結果】瞼裂縦径と上下眼瞼の退縮量に関して、瞼裂縦径が大きい程、上下眼瞼の退縮量も大きく、正の相関が認められた。上眼瞼と下眼瞼の退縮量には正の相関は認められなかった。最も退縮した位置は下眼瞼のほうが上眼瞼よりも正中からの偏位が大きく、上眼瞼

では101人中74人で内側に偏位し、下眼瞼では101人全例で外側に偏位していた。また、この横走靭帯のために生じると考えられる下眼瞼皮膚の斜めの線状陥凹は101人中20人で目視され、上方視でさらに強調された。術中所見の10人全例および献体23体の右下眼瞼の解剖所見全例で横走靭帯が認められた。解剖所見において、この横走靭帯の内側は内眦の後下方の眼窩縁の内側より生じ、眼窩隔膜の後上方の面に沿って走行し、外側は眼窩縁の下外側の骨膜の内側の表面に融合し、上内側から下外側に傾斜していた。さらに、組織標本において眼窩部中央標本の矢状断切片でこの横走靭帯を鮮明に確認できた。

【考察】臨床的および解剖学的に上眼瞼と同様に、下眼瞼にも横走靭帯が存在することが確認できた。Lockwood靭帯が眼球を前下方より支持しているのに対して、この横走靭帯は眼球を前上方より支持し、下眼瞼の重要な支持組織となっている。最も退縮した位置の正中からの偏位は上眼瞼では内側に偏位し、下眼瞼では外側に偏位していたが、これは上下眼瞼にある横走靭帯の外下がりの走行が瞼裂と眼瞼縁の形態に影響を及ぼしているためと考えられた。この横走靭帯は下眼瞼の退縮を制限し、瞼縁の形態を決定し、眼窩脂肪腔の位置を前上方に維持している。モンゴロイドに特徴的な細く腫れぼったい外観は上下眼瞼の横走靭帯によって引き起こされていると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

モンゴロイドの眼瞼はコーカソイドの眼瞼に比べて、瞼裂が細く腫れぼったいとされている。上眼瞼については枉らだが、下位横走靭帯が上眼瞼挙筋の可動域を制限し、挙筋前脂肪を上眼瞼挙上時に低い位置に留め、上眼瞼を厚く瞼裂を狭くしていると報告している。そこで我々は上眼瞼と同様に下眼瞼にも横走靭帯が存在し、下眼瞼の退縮を制限していると考え、一般日本人と献体において、この解剖学的構造を調査した。

開瞼時の上下眼瞼の退縮を分析するため、20歳代の眼瞼の手術を受けていない日本人 volunteer 101人の dominant eye について調査した。内眦外眦を結んだ直線より最も上眼瞼が退縮した距離を UERD (upper eyelid retraction distance)、最も下眼瞼が退縮した距離を LERD (lower eyelid retraction distance)、瞼裂縦径を UERD+LERD とした。また、どのような形で退縮が制限されているかを瞼縁の形状で評価するため、UERD、LERD の偏位を測定した。下眼瞼の横走靭帯の存在位置、走行を確認するため、下眼瞼疾

患で手術を行った患者10人の術中所見、献体23体の右下眼瞼の解剖所見、献体9体から採取した組織標本において調査を行った。

瞼裂縦径すなわち UERD+LERD と上下眼瞼の退縮量 UERD、LERD に関して、瞼裂縦径が大きい程、上下眼瞼の退縮量も大きく、正の相関が認められた。上眼瞼と下眼瞼の退縮量には正の相関は認められなかった。最も退縮した位置は下眼瞼のほうが上眼瞼よりも正中からの偏位が大きく、上眼瞼では101人中74人で内側に偏位し、下眼瞼では101人全例で外側に偏位していた。また、この横走靭帯のために生じると考えられる下眼瞼皮膚の斜めの線状陥凹は101人中20人で目視され、上方視でさらに強調された。術中所見の10人全例および献体23体の右下眼瞼の解剖所見全例で capsulopalpebral fascia から眼窩隔膜に移行する部位に横走靭帯が認められた。解剖所見において、この横走靭帯の内側は内眦の後下方の眼窩縁の内側より生じ、眼窩隔膜の後上方の面に沿って走行し、外側は眼窩縁の下外側の骨膜の内側の表面に融合し、上内側から下外側に傾斜していた。さらに、組織標本において眼窩部中央標本の矢状断切片でこの横走靭帯を鮮明に確認できた。

臨床的および解剖学的に上眼瞼と同様に、下眼瞼にも横走靭帯が存在することが確認できた。Lockwood靭帯が眼球を前下方より支持しているのに対して、この横走靭帯は眼球を前上方より支持し、下眼瞼の重要な支持組織となっている。最も退縮した位置の正中からの偏位は上眼瞼では内側に偏位し、下眼瞼では外側に偏位していたが、これは上下眼瞼にある横走靭帯の外下がりの走行が瞼裂と眼瞼縁の形態に影響を及ぼしているためと考えられた。この横走靭帯は下眼瞼の退縮を制限し、瞼縁の形態を決定し、眼窩脂肪腔の位置を前上方に維持している。モンゴロイドに特徴的な細く腫れぼったい外観は上下眼瞼の横走靭帯によって引き起こされていると考えられた。

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。

Pressor responses to isometric biting are evoked by somatosensory receptors in periodontal tissue in humans (ヒト静的咬合時の昇圧応答は歯周組織内の感覚受容器刺激によって誘発される)

岡田 芳幸

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】従来、咬合時の昇圧反応は咀嚼筋内の機械および化学受容器を介すると考えられてきた。しかし、歯周組織にも多くの受容器が存在し咬合運動の調節に関与することが示唆されている。そこで、我々は「咬合時の昇圧反応には、活動筋内の受容器より歯周組織内の受容器が関与しているのではないか」という実験仮説をもち、それを検証した。

【方法】正常咬合 (Angle class I) を有する健康な成人男性 (23±5歳 (平均±SD)) 8名を対象とした。〔実験1〕歯周組織からの求心神経である上・下歯槽神経を遮断する (咀嚼筋からの求心神経は正常) 場合 (BLK) と、しない場合 (No-BLK) の2条件について、最大咬合力の50%の強度 (50% MVC) で咬合を2分間持続させ、その間の咬合力、咬筋筋電図 (EMG)、平均血圧 (MAP)、心拍数 (HR)、筋交感神経活動 (MSNA)、指尖部皮膚血管コンダクタンス (FCVC)、歯肉血管コンダクタンス (GVC) を測定した。MSNAは腓骨神経より微小電極法により測定し、10秒間当たりのバースト頻度と平均振幅で評価した。また、FCVC、GVCはレーザードップラー法により測定した血流量をMAPで除して求めた。それぞれの項目を咬合前5分間の平均値に対する変化量で表した。〔実験2〕上記の2条件それぞれについて、さらに30% MVCにて咬合する場合 (BT) と、しない場合 (No-BT) に分け、ニトロプルシッド (100 μg) およびフェニレフリン (150 μg) の投与によって薬理的な血圧変動に対する血圧反射感受性 (HR/収縮期血圧 (SBP)、MSNA/拡張期血圧 (DBP)) を測定し、比較した。

【結果】〔実験1〕MAPは両条件で上昇したが、その上昇はNo-BLKの13.3±2.2 mmHg (平均値±SE) に対し、BLKでは3.9±1.5 mmHgと抑制された (P<0.01)。また、HR、Total MSNA (バースト頻度×バースト振幅) も咬合時に両条件とも増加したが、その上昇はNo-BLKの9.8±3.4 beats/min、19.7±

6.0 units/beat に対し BLK では5.0±2.4 beats/min、7.5±3.3 units/beat と抑制された (ともに P<0.01)。FCVC、GVCは両条件とも咬合時に低下したが、FCVCは低下度がNo-BLKの-41.8±9.3% に対し BLKで-13.1±8.5% と抑制された (P<0.01) 一方で、GVCの低下度には差がなかった (P=0.414)。このとき、EMG・咬合力の上昇にはBLK、No-BLKの両条件間で差がなかった (それぞれP=0.944、P=0.664)。〔実験2〕No-BLKでは、No-BTの血圧反射ゲイン (HR/SBP, beats/min・mmHg; MSNA/DBP, units/beat/mmHg) がそれぞれ-0.74±0.05; -16.8±1.4であったに対し、BTで-0.53±0.04; -11.2±1.6と低下した (P<0.01)。一方、BLKでは、No-BTで-0.72±0.09; -16.6±2.2であったのに対し、BTで-0.68±0.10; -16.4±2.4と差はなかった。

【結論】咬合運動による昇圧反応は歯周組織内の受容器が本体であり、MSNAの増加、末梢血管抵抗の上昇に起因すること、また、同時に血圧反射ゲインの低下が起きることが明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

咬合時には昇圧反応が生ずるが、それは咀嚼筋内の機械および化学受容器を介すると考えられる。しかし、動物実験から歯周組織にも咬合運動を調節する受容器が存在し、同求心神経を遮断すると咬合時の腎交感神経活動増加が抑制されるという報告もある。そこで、岡田は「咬合時の昇圧反応には、(1)歯周組織内の受容器が関与している(2)筋交感神経活動の増加を伴う(3)圧受容器反射の低下を伴う」という実験仮説を検証した。

健康な成人男性8名を対象とし、上・下歯槽神経を遮断する場合と、しない場合の2条件で、2分間持続咬合をさせ、その間の咬合力、咬筋筋電図、血圧、心拍数、筋交感神経活動、指尖部皮膚血管コンダクタンス、歯肉血管コンダクタンスを測定した。さらに、上記2条件それぞれで、咬合する場合と、しない場合に分け、ニトロプルシッド (100 μg) およびフェニレフリン (150 μg) の投与 (オックスフォード法変法) によって血圧変動に対する血圧反射感受性 (HR/収縮期血圧 (SBP)、MSNA/拡張期血圧 (DBP)) を測定した。

その結果、岡田は次の結果を得た。

1. 咬合時の昇圧反応は歯周組織感覚をブロックすると、咬筋筋電図および咬合力が同等であるにもかかわらず、有意に抑制された。

2. 咬合時の昇圧反応には筋交感神経活動の上昇、血管コンダクタンスの低下を伴ったが、これらの変化は歯周組織感覚をブロックすると有意に抑制された。
3. 咬合時には圧受容器反射の感受性が有意に低下したが、歯周組織感覚をブロックするとその低下は消失した。

これらの結果より、ヒト咬合時の昇圧反応は、歯周組織内の感覚受容器が咬合によって、筋交感神経活動を上昇、血管コンダクタンスを低下させるによって引き起こされることが示唆された。さらに、それには、圧受容器反射の感受性の低下を伴うことが示唆された。

よって、歯周組織内感覚受容器を健全に保持することは、循環器ホメオスタシスにとって、大きな意義をもつことを示しており、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。

Glucose and glucose transporters regulate lymphatic pump activity through activation of the mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel (グルコース及びグルコース担体によるミトコンドリア ATP 感受性カリウムイオンチャネルの活性化を介するリンパ管ポンプ機能の制御)

李 向 軍

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】リンパ系は微小血管壁から漏出した水溶性物質やアルブミンを回収し、リンパ節を介してリンパ液を血管系に戻す脈管系である。リンパ管平滑筋には自発的に収縮する機能があり、リンパ液を能動的に輸送している。このリンパ管の自発性収縮はリンパ管平滑筋細胞にあるATP感受性 K^+ チャネルによって制御されていることが知られているが、外液グルコースとグルコース担体 (Glucose Transporter) およびミトコンドリアのATP感受性 K^+ チャネル (mito K_{ATP}) がどう制御しているかについては不明である。そこで本研究では、まずグルコースと2種類のグルコース担体 (促進型グルコース輸送体 GLUT とナトリウム依存型グルコース共輸送体 SGLT) がリンパ管の自発性収縮にどんな影響を及ぼすかを調べた。次に、mito K_{ATP} がリンパ管の自発性収縮にどんな影響を及ぼすかについて検討した。

【材料および方法】Wistarラット (雄・7~8週齢) をペントバルビタール麻酔・屠殺後、摘出リンパ管灌流

標本を作製した。標本の内腔に7 cmH₂Oの内圧を負荷して安定した自発性収縮を誘起させ、径変化はビデオマイクロスコープシステムとビデオキャリパーを用いて計測した。5% CO₂-95% N₂で通気したクレブス液 (pH7.4, 37°C) を保生液として、任意のグルコース濃度 (0, 0.1, 0.5, 1, 3, 5 mM) の等張クレブス液を外腔側から灌流した。

まずはじめに0 mMグルコースを灌流し、リンパ管自発性収縮の影響を調べた上で、グルコース-6-ホスファターゼ阻害剤である chlorogenic acid を投与し、リンパ管自発性収縮に平滑筋細胞内のグリコーゲンが関与するかどうかを検討した。次に、クレブス液のグルコース濃度を0, 0.1, 0.5, 1, 3, 5 mMと漸増させてその影響を調べた。さらに GLUT の阻害剤である cytochalasin B (CCB) と SGLT の阻害剤である phlorizin を用いて、それぞれの自発性収縮に対する影響を0.1, 1, 3 mMグルコース存在下で検討した。次に、mito K_{ATP} の阻害剤である5-hydroxy-decanoate (5-HD) の自発性収縮に対する影響を0.1, 1, 3 mMグルコース存在下で調べた。mito K_{ATP} がミトコンドリアのカルシウムイオン取り込みに関与しているかについて調べるため、ミトコンドリアのカルシウムイオン輸送の特異的な抑制剤である ruthenium red 存在下で5-HDの自発性収縮に対する影響を調べた。さらに mito K_{ATP} の opener である diazoxide を用いて自発性収縮に対する影響を調べた。最後には、ミトコンドリア内のATPが自発性収縮に関与するか否かについて調べるため、ミトコンドリアプロトンポンプ作用のプロトン輸送担体である carbonyl cyanide 4- (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) を用いて、自発性収縮に対する影響を検討した。

【結果】外液グルコースを0 mMのまま120分間維持したところ、自発性収縮は完全に消失することなく、~5回/分の自発性収縮を持続させた。chlorogenic acid 存在下で0 mMグルコースで90~120分灌流すると、自発性収縮は完全に消失した。細胞外グルコースを0, 0.1, 0.5, 1, 3, 5 mMまで漸増すると、ポンプ作用の収縮頻度と収縮力を濃度依存性に増加した。CCB (10⁻⁶M), phlorizin (3x10⁻⁴M) は自発性収縮の頻度を有意に減少させ、胸管を拡張させた。5-HD (3x10⁻⁵M) は自発性収縮の頻度を抑制し、5-HD による収縮頻度減少作用は ruthenium red (2x10⁻⁷M) により完全に抑制された。Diazoxide (10⁻⁷M) は1 mMグルコース存在下で自発性収縮の頻度を有意に

増加させた。FCCP (10^{-7} M) は、ポンプ作用の頻度を有意に減少させ、振幅も減少させた。

【結論】以上の事実から、リンパ管平滑筋の細胞内のグリコーゲンから転化したグルコース、あるいは、GLUT と SGLT による細胞外から、リンパ管平滑筋細胞に流入したグルコースがリンパ管の自発性収縮を制御していることが示された。さらに、ミトコンドリア膜の KATP チャネルがミトコンドリアのカルシウムの取り込みを介してリンパ管の自発性収縮の制御に一部関与していることも判明した。

(論文審査の結果の要旨)

リンパ系は微小血管壁から漏出した水溶性物質やアルブミンを回収し、リンパ節を介してリンパ液を血管系に戻す脈管系である。リンパ管平滑筋には自発的に収縮する機能があり、リンパ液を能動的に輸送している。このリンパ管の自発性収縮はリンパ管平滑筋細胞にある ATP 感受性 K⁺チャネルによって制御されていることが知られているが、外液グルコースとグルコース担体 (Glucose Transporter) およびミトコンドリアの ATP 感受性 K⁺チャネル (mitoK_{ATP}) がどう制御しているかについては不明である。そこで我々は、摘出ラット胸管を用いて、リンパ管自発性収縮に対するグルコースと 2 種類のグルコース担体 (促進型グルコース輸送体 GLUT とナトリウム依存型グルコース共輸送体 SGLT) の影響、及びミトコンドリア ATP 感受性 K⁺チャネルの関与を検討した。

以下に研究結果を示す。

- (1) 外液グルコースを 0 mM で維持し、摘出ラット胸管の自発性収縮の変化を検討した。120分外液グルコース濃度を 0 mM に維持しても、胸管の自発性収縮は完全に消失することなく、～5 回/分の自発性収縮を持続させた。グルコース-6-ホスファターゼ阻害剤である chlorogenic acid 存在下で 0 mM グルコースで灌流すると、90～120分後、自発性収縮は完全に消失した。
- (2) 0 mM グルコース外液で120分灌流後、外液グルコース濃度に対する胸管自発性収縮の変化を検討した。収縮の頻度は、外液グルコース濃度 0, 0.1, 0.5, 1 mM の間で、濃度依存性の増加を示し、1, 3, 5 mM の間では頻度の変化は認められなかった。
- (3) 胸管自発性収縮における胸管平滑筋細胞にあるグルコース担体 (glucose transporter) の関与を検討した。GLUT 阻害剤である Cytochalasin B はグルコース濃度 0.1, 1, 3 mM において、収縮頻度を有

意に減少させた。最大径と最小径は有意に増加を示し、振幅についても、有意な影響を示した。SGLT 阻害剤である Phlorizin は外液グルコース 0.1 と 1 mM において、収縮の頻度を有意に減少させたが、3 mM では頻度の変化は認められなかった。

- (4) 胸管自発性収縮に対する mitoK_{ATP} の関与を検討した。mitoK_{ATP} の選択的阻害剤である 5-HD は胸管の自発性収縮頻度を有意に減少させた。ミトコンドリア内カルシウムイオン uniporter 阻害剤である Ruthenium Red 存在下で、5-HD 投与前後での胸管自発性収縮に有意な差は認められなかった。mitoK_{ATP} の開口薬である Diazoxide は 1 mM グルコース存在下で自発性収縮の頻度を有意に増加させた。
- (5) 胸管の自発性収縮におけるミトコンドリア内の ATP の関与を検討した。ミトコンドリアプロトンポンプ作用のプロトン輸送担体である carbonyl cyanide 4- (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) は 0.1, 1, 3 mM グルコースで胸管の収縮頻度と振幅を有意に減少させた。

以上の結果から、ラット胸管平滑筋の自発性収縮は、GLUT/SGLT を介した細胞外グルコース及び細胞内貯蔵グリコーゲン由来グルコースによって調節されることが分かった。または、平滑筋の mitoK_{ATP} 開閉とそれに連動した Ca²⁺ユニポーターによって調節されることが考えられた。

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。

In vitro reprogramming of adult hepatocytes into insulin-producing cells without viral vectors (成熟肝細胞を用いた、非ウイルス性遺伝子導入によるインスリン産生細胞へのリプログラミング誘導性の検討)

本 山 博 章

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】糖尿病治療への再生医学的アプローチとして、その発生学的相同性を利用し肝臓細胞へ膵臓発生関連転写因子を異所性発現させ膵島 β 細胞様細胞へのリプログラミングを図る試みがなされているが、成熟肝細胞を対象とした場合、① 非ウイルス性遺伝子導入法での誘導例がない、② インスリン分泌能を有した細胞が得られない、など解決すべき事象が存在

する。今回我々は正常マウスから分離した初代培養肝細胞に対して非ウイルス性手法により膵臓発生特異的転写因子を導入し、そのリプログラミング誘導性を検討した。

【材料及び方法】 6週齢のC57BL/6J雄マウスより分離した成熟肝細胞に対し種々の非ウイルス性遺伝子導入法（リポフェクション及びヌクレオフェクション）によるEGFP発現遺伝子の導入効率とMTSアッセイ法による遺伝子導入後のcell viabilityの推移を比較検討した。次いで、膵臓発生特異的転写因子である、Pancreas and duodenal homeobox 1 (Pdx1) 及び Neurogenin 3 (Ngn3) をそれぞれ単独、もしくは共発現させた場合のリプログラミング誘導性の指標として、①膵臓関連遺伝子発現の有無、②細胞内インスリン及びCペプチド蛋白質の定量、③細胞培地へのグルコース負荷に伴うインスリン分泌能を評価した。この際、共発現系においてはInternal ribosome entry site (IRES) を用いた単一plasmidからの共発現 (bicistronic expression)、及び2種類の発現 plasmid の co-transfection を同時に比較した。

【結果】 非ウイルス性遺伝子導入法のうち、ヌクレオフェクション法による遺伝子導入効率が有意に高く（約52%）、遺伝子導入後のcell viabilityも有意に高値だった。同手法により成熟肝細胞にPdx1及びNgn3を単独及び共発現させた場合、bicistronic expressionによる共発現群において膵島β細胞に最も近い遺伝子発現プロファイルを示し、内因性インスリン産生の指標となる細胞内Cペプチド量も有意に高値であった。また同細胞は細胞培地グルコース濃度に応じインスリン分泌を示すことを確認した。Co-transfection 群においては、Pdx1とNgn3の共発現が必ずしも担保されないことを併せて確認した。

【結論】 成熟肝細胞に膵臓発生特異的転写因子Pdx1及びNgn3を非ウイルス性手法により導入し、共発現させた場合、膵島β細胞様細胞へのリプログラミングを誘導しうることを示した。この結果は、成熟体細胞においても適切な遺伝子の導入によりリプログラミングを惹起しうることを示唆し、この応答にウイルスベクターの使用が必須ではない可能性を示している。

（論文審査の結果の要旨）

糖尿病治療への再生医学的アプローチとして、その発生的相同性を利用し肝臓細胞へ膵臓発生関連転写因子を異所性発現させ膵島β細胞様細胞へのリプログラミングを図る試みがなされているが、成熟肝細胞

を対象とした場合、①非ウイルス性遺伝子導入法での誘導例がない、②インスリン分泌能を有した細胞が得られない、など解決すべき問題が存在する。今回本山博章は正常マウスから分離した初代培養肝細胞に対して非ウイルス性手法により膵臓発生特異的転写因子を導入し、そのリプログラミング誘導性を検討した。

6週齢のC57BL/6J雄マウスを用い、分離した成熟肝細胞に対し種々の非ウイルス性遺伝子導入法（リポフェクション及びヌクレオフェクション）によるEGFP発現遺伝子の導入効率とMTSアッセイ法による遺伝子導入後のcell viabilityの推移を比較検討した。次いで、膵臓発生特異的転写因子である、Pancreas and duodenal homeobox 1 (Pdx1) 及び Neurogenin 3 (Ngn3) をそれぞれ単独、もしくは共発現させた場合のリプログラミング誘導性の指標として、①膵臓関連遺伝子発現の有無、②細胞内インスリン及びCペプチド蛋白質の定量、③細胞培地へのグルコース負荷に伴うインスリン分泌能を評価した。この際、共発現系においてはInternal ribosome entry site (IRES) を用いた単一plasmidからの共発現 (bicistronic expression)、及び2種類の発現 plasmid の co-transfection を同時に比較した。

その結果、本山博章は次の結論を得た。

1. 成熟肝細胞への遺伝子導入効率はヌクレオフェクション法において有意に高値であり（約52%）、導入後のcell viabilityも有意に高かった。
2. 同手法を用いPdx1及びNgn3を単独もしくは共発現させた結果、bicistronic expressionによる共発現群において膵島β細胞に類似した遺伝子発現プロファイルを示し、内因性インスリン産生の指標である細胞内Cペプチド量も有意に高値であった。
3. 同細胞の細胞培地内にグルコースを負荷すると、濃度依存性に培養液中インスリン濃度は増加し、細胞外グルコース濃度に応じたインスリン分泌能を有している可能性が示唆された。

これらの結果より、成熟肝細胞に対してPdx1とNgn3を共発現させることにより膵β細胞へのリプログラミングを惹起しうることを示された。この結果は、成熟体細胞においても適切な遺伝子の導入によりリプログラミングを惹起しうることを示唆し、この応答にウイルスベクターの使用が必須ではない可能性を示している。このように本論文は再生医学における臨床応用を目指すものであり、そのために有用な基礎的知見を示している。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。

Dermoscopy of pigmented lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane (粘膜皮膚移行部と粘膜部における色素性病変のダーマスコピー所見)

林 景 栄

(論文の内容の要旨)

Background and objective Pigmented lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane cover a wide range of disorders. The differentiation between benign lesions and malignant melanomas of these sites is often difficult. In recent years, the use of dermoscopy has improved diagnosis of pigmented skin lesions to great extent. However, little is known about the role of dermoscopy in the diagnosis of pigmented lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane. Here we report the dermoscopic patterns in 40 lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane, and assess the applicability of dermoscopic algorithms to these lesions.

Patients and methods The study was performed on a consecutive unselected series of 40 pigmented lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane obtained from 37 Japanese patients. All lesions were observed, dermoscopic patterns defined, and scored according to standard dermoscopic algorithms.

Results Dermoscopic analysis identified 7 patterns in our series of lesions. The benign lesions mainly presented dotted-globular pattern, homogeneous pattern, fish scale-like pattern, hyphal pattern, ringlike pattern and fingerprint-like pattern. Malignant melanomas mainly presented multicomponent pattern and homogeneous pattern. The fish scale-like pattern and hyphal pattern are frequently observed in Japanese mucosal melanotic macules, and are described here for the first time, characterized by multiple curves of semicircle mimicking the scales of fish and less regularly curved or flexed lines mimicking the fungal hyphae, respectively. The fish scale-like pattern and hyphal pattern shared almost

the same histopathologic findings as ringlike pattern, and were considered to be variants of ringlike pattern. Dermoscopic features most frequently observed in malignant melanomas were asymmetry of structure, multiple colors, blue-white veil and irregular dots or globules. The standard dermoscopic algorithms, such as ABCD rule, Menzies method, 7-point checklist, 3-point checklist and CASH algorithm showed high sensitivity (62.5%~100%) and specificity (93.8%~100%) in diagnosing melanomas on mucocutaneous junction and mucous membrane.

Conclusion The use of dermoscopy may also help in the proper management of pigmented lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane, providing additional diagnostic information invisible to the naked eye.

(論文審査の結果の要旨)

Pigmented lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane cover a wide range of disorders. The differentiation between benign lesions and malignant melanomas of these sites is often difficult. Recently, the use of dermoscopy has improved diagnosis of pigmented skin lesions greatly. The authors report the dermoscopic patterns and assess applicability of dermoscopic algorithms in 40 lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane.

Forty pigmented lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane obtained from 37 Japanese patients were observed. Dermoscopic analysis of these lesions identified 7 patterns. The benign lesions mainly presented dotted-globular pattern, homogeneous pattern, fish scale-like pattern, hyphal pattern, ringlike pattern and fingerprint-like pattern. Malignant melanomas mainly presented multicomponent pattern and homogeneous pattern. The fish scale-like pattern and hyphal pattern are described here for the first time, characterized by multiple curves of semicircle mimicking the scales of fish and less regularly curved or flexed lines mimicking the fungal hyphae, respectively. Histopathologic examination revealed that the fish scale-like pattern and hyphal pattern shared almost the same histopathologic findings as ringlike pat-

tern. Therefore, the fish scale-like pattern and hyphal pattern were considered to be variants of ringlike pattern. Furthermore, they evaluated and scored these lesions according to the standard dermoscopic algorithms, and found quite high sensitivity (62.5 %~100 %) and specificity (93.8 %~100 %), which are comparable with their sensitivity and specificity in hairy skin.

From these findings, the following conclusions were obtained.

1. The benign lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane mainly presented dotted-globular pattern, homogeneous pattern, fish scale-like pattern, hyphal pattern, ringlike pattern and fingerprint-like pattern. Malignant melanomas mainly presented multicomponent pattern and homogeneous pattern.
2. The fish scale-like pattern and hyphal pattern described here for the first time were considered to be variants of the ringlike pattern, and were frequently observed in mucosal melanotic macules in Japanese.
3. The dermoscopic algorithms defining malignant melanomas on hairy skin also apply to melanomas on mucocutaneous junction and mucous membrane, with comparable sensitivity and specificity with those on the hairy skin.

In conclusion, the results throw light on the practical usage of dermoscopy on pigmented lesions of mucocutaneous junction and mucous membrane. The use of dermoscopy may also help in the proper management of pigmented lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane, providing additional diagnostic information invisible to the naked eye.

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。

Dysfunction in the ABCB1A has only a weak effect on susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in SAM strains (ABCB1A の機能障害は SAM 系マウスのデキストラン硫酸による誘発大腸炎に対する感受性には大きく影響しない)

張 国 紅

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】潰瘍性大腸炎は大腸粘膜へのリンパ球の浸潤によるびらんや潰瘍を主徴とする大腸の炎症性疾患である。潰瘍性大腸炎には個人の遺伝子構成、および食生活や腸内細菌叢などの環境因子が複雑に組み合わせられて発症する機序が想定されているが、その詳細は不明である。潰瘍性大腸炎に対する感受性の個人差の遺伝的要因の一つとして、生体異物排出ポンプである ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A をコードする *ABCB1A* 遺伝子上の 1 塩基置換多型が同定されている。しかしながら *ABCB1A* 遺伝子の潰瘍性大腸炎発症への寄与度は不明であり、発症にはさらに未同定の遺伝的・環境的要因の関与が必要であると想定されている。申請者は老化促進モデルとして利用されている SAMR1, SAMP1, SAMP6 系マウスが、*Abcb1a* 遺伝子にレトロウイルスゲノムの挿入による機能喪失突然変異をもつことを発見した。これらのマウス系統は機能喪失型 *Abcb1a* 遺伝子をもちながらも、その他の遺伝的背景は異なっている。したがってこれらのマウスは潰瘍性大腸炎発症に対する ABCB1A、およびその他の要因の関与を検定するための有用なモデルであると考えられた。デキストラン硫酸 (DSS) は経口投与によりマウスに潰瘍性大腸炎を誘発することが知られている。そこでこれらの *Abcb1a* 変異系統および正常マウス系統を用いて、DSS 誘発大腸炎に対する感受性を比較検討した。

【材料と方法】*Abcb1a* 変異系統として SAMR1, SAMP1, SAMP6、および正常系統として C57BL/6J, C3H/He, DBA/2J の 10 週齢の雌性マウスを 1 群あたり 5 匹ずつ使用した。0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, および 3.0 % の DSS 溶液 (分子量 36,000~50,000) を給水ボトルからの飲水として 7 日間自由摂取させた。この間の体重の変化、および血便または下痢の有無を調査した。その後マウスを屠殺して大腸のヘマトキシリン/エ

オジン (H/E) 染色病理組織標本を作製し、潰瘍性大腸炎の有無を調査し、大腸炎を誘導する DSS 最低濃度を決定した。2.0 % DSS 投与群において、大腸 H/E 標本での炎症性細胞の浸潤深度、浸潤面積、潰瘍の有無、被覆上皮異常増殖の有無の 4 指標を 3 段階のスコアで評価し、これらの合計を大腸炎スコアとして、その系統差を Mann-Whitney' の U テストにより検定した。

【結果と考察】各系統のマウスに大腸炎を誘導することのできる DSS 最低濃度は、*Abcb1a* 変異系統である SAMR1, SAMP1, SAMP6 ではそれぞれ 1 %, 2 %, 2.5 % であった。また、2.0 % DSS 投与群における大腸炎スコアの平均は SAMR1, SAMP1, SAMP6 ではそれぞれ 7.0, 4.0, 0.6 であり、DSS 誘導大腸炎に対する感受性は SAMR1 > SAMP1 > SAMP6 で明らか系統差があることが判明した。一方、正常系統である C57BL/6J, C3H/He, DBA/2J における大腸炎誘導 DSS 最低濃度はそれぞれ 1 %, 2 %, 3 % であった。また、2.0 % DSS 投与群における大腸炎スコアの平均は 5.2, 1.0, 1.0 であり、いずれの指標も SAM 系統群とは差が無かった。以上の結果は、ABCBI1A の機能欠損は DSS 誘導大腸炎に対する感受性には影響を与えず、この感受性はむしろ *Abcb1a* 以外の遺伝子による影響を強く受けることを示唆した。SAMP6 系マウスは DSS 誘導大腸炎に対しては感受性が低いことが明らかとなったが、一方で SAMP6 系マウスは慢性大腸炎を SAMR1 系マウスよりも高率に自然発症することが報告されている。これらのデータを総合すると、SAM 系統群には慢性大腸炎と DSS 誘導大腸炎に対する異なる感受性/抵抗性遺伝子 (群) が保有されていることが示唆される。SAM 系マウスは、大腸炎の発症に関わる遺伝的、および環境的要因を検索するための有用なモデルであると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、老化促進モデルとして利用されている SAMR1, SAMP1, SAMP6 系マウスが、*Abcb1a* 遺伝子にレトロウイルスゲノムの挿入による機能喪失突然変異をもつことを発見した。これらのマウスは潰瘍性大腸炎発症に対する ABCBI1A, およびその他の要因の関与を検定するための有用なモデルであると考えられた。そこでこれらの *Abcb1a* 変異系統および正常マウス系統を用いて、DSS 誘導大腸炎に対する感受性を比較検討した。

Abcb1a 変異系統として SAMR1, SAMP1, SAMP6,

および正常系統として C57BL/6J, C3H/He, DBA/2J の 10 週齢の雌性マウスを 5 匹ずつ使用した。0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, および 3.0 % の DSS 溶液 (分子量 36,000~50,000) を飲水として 7 日間自由摂取させた。この間の体重の変化、および血便または下痢の有無を調査した。その後屠殺後の大腸の病理組織検査し、潰瘍性大腸炎の有無を調査し、大腸炎を誘導する DSS 最低濃度を決定した。2.0 % DSS 投与群において、大腸 H/E 標本での炎症性細胞の浸潤深度、浸潤面積、潰瘍の有無、被覆上皮異常増殖の有無の 4 指標を 3 段階のスコアで評価し、これらの合計を大腸炎スコアとして、大腸炎の重篤度を比較した。

その結果、張 国紅は次の結論を得た。

- (1) 一部の生体異物排出ポンプである ABCBI1A の機能欠損をもつ SAM 系マウスは共通して ABCBI1A 機能を欠損するにもかかわらず、大きく異なる大腸炎発症特性を示す。
- (2) DSS 誘導大腸炎に対する感受性は、ABCBI1A 機能を欠損する SAM 系マウス系統間で異なるが、正常系統マウスとは同程度である。
- (3) SAM 系マウス系統間には、*Abcb1a* 遺伝子以外に自然発症大腸炎、および DSS 誘導大腸炎に対する感受性を規定する遺伝的多型が存在する。

以上の結果より、*Abcb1a* 遺伝子に共通して機能喪失変異をもちながらも異なる遺伝的背景、および大腸炎発症特性をもつ一群の SAM 系マウスは、ヒトの潰瘍性大腸炎の研究に有用なモデルである。一群の SAM 系マウスを用いたさらなる研究により、ヒトの潰瘍性大腸炎の発症機序の解明、および予防・治療法の開発が可能であることを示唆している。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。

Identification of a high incidence region for retroviral vector integration near exon 1 of the LMO2 locus (LMO2 遺伝子座 Exon1 近傍における retroviral vector integration の高頻度領域の同定)

山田 幸一郎

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) は X 染色体に位置する IL-2 受容体 γ 鎖の突然変異が原因であり、患者は細胞性および液性免疫不全に

より生後1年以内に死亡するという致死的疾患である。2000年にパリで報告された遺伝子治療は、レトロウイルスベクターに正常なIL-2受容体 γ 鎖遺伝子を組み込み、患者造血幹細胞に導入して著明な効果を得た。しかしながら、少数の患者に白血病が発症し、解析の結果、レトロウイルスベクターによるinsertional mutagenesisが引き金となることが判明した。白血病を発症した患者のうち4症例にT-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)を発症させるoncogeneであるLMO2近傍にレトロウイルスベクターの挿入が見出され、なかでもそのうち二例はTSS (transcription start site) の近傍に挿入部位があることが明らかとなった。レトロウイルスベクターの染色体への挿入頻度を含めLMO2 Exon1近傍におけるベクター組み込みの詳細な解析は未だ行われていない。今回、我々はT細胞株およびCD34陽性造血幹細胞にマウスレトロウイルスベクターを感染させ、PCR法を用いてベクター挿入部位の詳細な解析を行った。

【方法と結果】 TPA-Mat-ecoR細胞とJurkat-ecoR細胞、HeLa細胞、そしてCD34陽性造血幹細胞にMoloney murine leukemia virus (MLV)ベクターを感染させ、PCRによりLMO2 Exon1近傍のレトロウイルスベクター挿入部位を同定した。また、Real time PCR等を用いて患者の造血幹細胞への挿入頻度を求めた。ウイルスベクター固有のprimerとgenome特異的primerと組み合わせてLMO2 Exon1を起点に上下3000塩基に渡りPCRを行い、PCR産物をクローニングして挿入部位の解析を行った結果、T細胞株であるTPA-Mat細胞においてLMO2 TSS上流域1700~3000 baseの間に高頻度なレトロウイルスベクターの挿入領域 (high incidence region: HIR) の存在を確認した。このHIRはまた、同じヒト由来のT細胞株であるJurkat細胞にも見出されたが、T細胞系ではないHeLa細胞には見出されない。さらに、遺伝子治療に使用された同じCD34陽性造血幹細胞においてもTPA-Mat細胞と同様にLMO2遺伝子座にHIRの存在が確認された。遺伝子治療後に白血病を発症したX-SCID患者の一人はこのHIR領域にウイルスベクター組み込みが見出されている。さらにレトロウイルスベクターがHIRに挿入される頻度は 4.46×10^4 細胞に一個 (TPA-Mat細胞) もしくは 1.89×10^4 細胞に一個 (CD34陽性造血幹細胞) と見積もられる。

【結語】 LMO2 TSS上流1700~3000 baseの範囲に高

頻度のウイルスベクター挿入領域 (HIR) を見出した。この領域は白血病を発症した実際の患者のベクター挿入部位を含む。患者体内にはこのHIRにベクターが組み込まれた30個以上のT細胞が存在すると算出された。レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、今回のLMO2遺伝子座近傍に見出されたHIRの解析はウイルスベクター誘導の白血病発症機構についての解明のみならず、これからのベクター開発の助けとなると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) はX染色体に位置するIL-2受容体 γ 鎖の突然変異が原因である。2000年にパリで報告された遺伝子治療は、レトロウイルスベクターに正常なIL-2受容体 γ 鎖遺伝子を組み込み、著明な効果を得た。しかしながら、少数の患者に発症した白血病はレトロウイルスベクターによるinsertional mutagenesisが引き金となることが判明し、4症例の患者の内2例はoncogeneであるLMO2近傍にレトロウイルスベクターの挿入が見出され、TSS (transcription start site) の近傍に挿入部位があることが明らかとなった。今回、T細胞株およびCD34陽性造血幹細胞にマウスレトロウイルスベクターを感染させ、PCR法を用いて挿入部位の詳細な解析を行った。

その結果、次の結論を得た。

1. T細胞株であるTPA-Mat細胞においてLMO2 TSS上流域1700~3000 baseの間に高頻度なレトロウイルスベクターの挿入領域 (high incidence region: HIR) の存在を確認した。
2. このHIRはまた、同じヒト由来のT細胞株であるJurkat細胞にも見出されたが、T細胞系ではないHeLa細胞には見出されない。
3. 遺伝子治療に使用されているCD34陽性造血幹細胞においてもTPA-Mat細胞と同様にLMO2遺伝子座にHIRの存在が確認された。
4. レトロウイルスベクターがHIRに挿入される頻度は 4.46×10^4 細胞に一個 (TPA-Mat細胞) もしくは 1.89×10^4 細胞に一個 (CD34陽性造血幹細胞) と見積もられる。

これらの結果より、LMO2 TSS上流1700~3000 baseの範囲に高頻度のウイルスベクター挿入領域 (HIR) を見出した。この領域には白血病を発症した実際の患者においてベクター挿入が見出され、患者体内にはこのHIRにベクターが組み込まれた30個以上

のT細胞が存在すると算出された。レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、今回のLMO2遺伝子座近傍に見出されたHIRの解析はウイルスベクター誘導の白血病発症機構の解明のみならず、これからのベクター開発の助けとなると考えられる。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。

Changes in the expression of E-cadherin repressors, Snail, Slug, SIP1 and Twist, in the development and progression of ovarian carcinoma: the important role of Snail in ovarian tumorigenesis and progression (卵巣癌の発生と進展過程におけるE-cadherin転写抑制因子Snail, Slug, SIP1およびTwistの発現変化: 卵巣癌の発生と進展においてSnailは重要な役割を果たす)

吉田 順子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 卵巣癌は婦人科悪性腫瘍のうちで最も予後不良の疾患であり、その最大の予後因子は播種性転移である。播種性転移の過程は、まず原発巣から腹腔内への腫瘍細胞の離脱、腹膜中皮細胞との接着、転移巣での浸潤や増殖を経て成立する。従って腹膜播種の分子機構を理解するためには細胞接着因子の発現変化およびその制御機構を解明することが重要であると考えられる。E-cadherinは上皮細胞に発現する細胞間接着分子の一つであり、ヒト悪性腫瘍において腫瘍抑制遺伝子として働く。E-cadherinの発現は遺伝子の変異、プロモーターのメチル化、翻訳後の修復、転写因子などさまざまな機序により制御されている。卵巣癌においてもE-cadherinの発現は劇的に変化していることが報告されている。しかし、卵巣癌の進展過程におけるE-cadherinの発現制御機構は明らかではない。そこで、卵巣癌の発生および進展過程におけるE-cadherin転写抑制因子であるSnail, Slug, SIP1およびTwistの発現変化をOSE(正常卵巣表層上皮)と上皮性卵巣腫瘍を用いて免疫組織染色、Western blotおよびRT-PCR法にて検討した。

【方法】 患者の同意を得て採取したOSE 11例および上皮性卵巣腫瘍95例(良性14例、境界悪性13例、悪性68例)について免疫組織染色を行い、染色強度および陽性細胞率からスコア化し3段階に分類した。手術摘

出組織から蛋白質およびRNAを抽出しこれらの発現をWestern blotおよびRT-PCRにて検討した。更に卵巣癌同一症例の原発巣と播種巣でそれらの発現を比較した。

【成績】 OSEにおいてSlug, SIP1の発現は陰性だったが、Snailは8/11例(72%), Twistは3/11例(27%)で陽性であった。上皮性卵巣腫瘍においてSnail, Slug, SIP1およびTwistの発現は良性、境界悪性、癌の順に発現が増強し、特にSlugとTwistでは癌で有意に発現が増強していた($p=0.0032$, $p=0.0026$)。Western blotおよびRT-PCRでも同様に、良性、境界悪性に比べて癌でSlugとTwistの発現が増強していた。組織型別での比較では、Twist強発現症例は漿液性腺癌で12/23例(52%)と、他の組織型に比べ有意に高頻度であった($p=0.0019$)。病期に関してはSnailおよびTwistの発現がI+II期に対しIII+IV期で有意に増強していた($p=0.041$, $p=0.047$)。原発巣と播種巣の比較ではSnailおよびTwistの発現が播種巣で16/20例, 18/20例と有意に低下し($p=0.007$, $p<0.0001$)、E-cadherin発現と逆相関していた。一方Slugの発現は11/20例で原発巣に比べて播種巣で増強していた。更に患者生存期間とこれらの発現を検討したところ、Snail陽性症例は陰性症例に比べて生存期間が短縮していた($p=0.038$)。Slug, SIP1およびTwistの発現と生存期間には有意差が認められなかった。

【考察】 E-cadherin転写抑制因子は上皮性卵巣腫瘍の悪性度とともに増強した。また、同一症例において原発巣に比べて播種巣ではE-cadherinの発現は増強し、一方、SnailおよびTwistの発現は減弱していた。このことから、卵巣癌の播種性転移の過程においてE-cadherinとその転写抑制因子の発現が大きく変化していると考えられた。特に、転写抑制因子の中でもSnailの発現はE-cadherin発現と逆相関を示し、さらに、Snail陽性症例は陰性症例に比べ生存期間の短縮していたことから、Snailの発現は卵巣癌の発生と進展において重要な役割を果たすと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍のうちで最も予後不良の疾患であり、その最大の予後因子は播種性転移である。播種性転移の過程は、まず原発巣から腹腔内への腫瘍細胞の離脱、腹膜中皮細胞との接着、転移巣での浸潤や増殖を経て成立する。従って腹膜播種の分子機構を理解するためには細胞接着因子の発現変化およびその

制御機構を解明することが重要であると考えられる。E-cadherin は上皮細胞に発現する細胞間接着分子の一つであり、ヒト悪性腫瘍において腫瘍抑制遺伝子として働く。E-cadherin の発現は遺伝子の変異、プロモーターのメチル化、翻訳後の修復、転写因子などさまざまな機序により制御されている。卵巣癌においても E-cadherin の発現は劇的に変化していることが報告されている。しかし、卵巣癌の進展過程における E-cadherin の発現制御機構は明らかではない。そこで吉田順子は、卵巣癌の発生および進展過程における E-cadherin 転写抑制因子である Snail, Slug, SIP1 および Twist の発現変化を OSE (正常卵巣表層上皮) と上皮性卵巣腫瘍を用いて免疫組織染色, Western blot および RT-PCR 法にて検討した。

患者の同意を得て採取した OSE 11例および上皮性卵巣腫瘍95例 (良性14例, 境界悪性13例, 悪性68例) について免疫組織染色を行い, 染色強度および陽性細胞率からスコア化し3段階に分類した。手術摘出組織から蛋白質および RNA を抽出しこれらの発現を Western blot および RT-PCR にて検討した。更に卵巣癌同一症例の原発巣と播種巣でそれらの発現を比較した。

その結果, 吉田は次の結論を得た。

1. OSE において Slug, SIP1の発現は陰性だったが, Snail は 8/11例 (72%), Twist は 3/11例 (27%) で陽性であった。
2. 上皮性卵巣腫瘍において Snail, Slug, SIP1 および Twist の発現は良性, 境界悪性, 癌の順に発現が増強し, 特に Slug と Twist では癌で有意に発現が増強していた ($p=0.0032$, $p=0.0026$)。
3. Western blot および RT-PCR でも同様に, 良性, 境界悪性に比べて癌で Slug と Twist の発現が増強していた。
4. 組織型別での比較では, Twist 強発現症例は漿液性腺癌で12/23例 (52%) と, 他の組織型に比べ有意に高頻度であった ($p=0.0019$)。
5. 病期に関しては Snail および Twist の発現が I + II 期に対し III + IV 期で有意に増強していた ($p=0.041$, $p=0.047$)。
6. 原発巣と播種巣の比較では Snail および Twist の発現が播種巣で16/20例, 18/20例と有意に低下し ($p=0.007$, $p<0.0001$), E-cadherin 発現と逆相関していた。一方 Slug の発現は11/20例で原発巣に比べて播種巣で増強していた。

7. 患者生存期間とこれらの発現を検討したところ, Snail 陽性症例は陰性症例に比べて生存期間が短縮していた ($p=0.038$)。Slug, SIP1 および Twist の発現と生存期間には有意差が認められなかった。

これらの結果より, 卵巣癌の播種性転移の過程において E-cadherin とその転写抑制因子の発現が大きく変化していると考えられた。特に, 転写抑制因子の中でも Snail の発現は E-cadherin 発現と逆相関を示し, さらに, Snail 陽性症例は陰性症例に比べ生存期間の短縮していたことから, Snail の発現は卵巣癌の発生と進展において重要な役割を果たすと考えられた。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。

Valve Repair Improves Central Sleep Apnea in Heart Failure Patients With Valvular Heart Diseases (心不全を伴う重症弁膜症患者における弁置換による中枢性無呼吸の改善)

阿部 秀年

(論文の内容の要旨)

【緒言】睡眠時無呼吸症候群 (Sleep apnea syndrome : SAS) は, 睡眠中の呼吸停止と日中過眠などを特徴とする睡眠障害を基盤とする症候群である。SAS には, 上気道閉塞を原因とする閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (Obstructive sleep apnea syndrome : OSA) と脳幹呼吸中枢の一過性活動停止を原因とする中枢性睡眠時無呼吸症候群 (Central sleep apnea syndrome : CSA) とに分けられる。SAS の様々な循環器疾患との関連は, 心不全との関連を含め既知となっているが, 心不全をもつ心疾患への外科的治療により SAS が改善したという報告はなく, 今回手術適応の重症弁膜症をもつ心不全患者を対象に, 外科弁治療の SAS への効果について検討した。

【方法】2005年12月から2008年3月までに, 重症僧帽弁, または大動脈弁の弁膜症が主因で心不全をきたし, 入院となった150名 (年齢 68.7 ± 9.7 歳, 男性92名) を対象とした。基礎弁膜症に関して, 僧帽弁疾患では閉鎖不全症が50名, 狭窄症が5名, 狭窄兼閉鎖不全症が1名であった。大動脈弁疾患では閉鎖不全症が52名, 狭窄症が20名, 狭窄兼閉鎖不全症が6名であった。その他, 16名であった。心不全は急性期加療後の状態において New York Heart Association (NYHA) II

度、またはIII度で、睡眠時ポリグラフィー (PSG)、心臓超音波、右心カテーテル検査を行い、PSGでの、無呼吸・低呼吸の睡眠1時間あたりの回数を apnea hypopnea index (AHI) として測定した。AHIが20回/時間未満を M-NSA (Mild to no sleep apnea) 群 (n=47)、20回/時間以上を SAS 群 (n=103) に分類した。まず、心不全と SAS (OSA および CSA) との関連を OSA-apnea index (OSA-AI) と CSA-apnea index (CSA-AI) を用いて調査を行った。つづいて、重症 SAS (AHI \geq 20) で外科的弁治療を行った74名 (69.2 \pm 8.3歳、男性55名) に対し、術後の再検査の結果との比較を行い、弁への外科的加療の OSA および CSA への効果を検討した。施行術式は、僧帽弁には形成術が15名、弁置換術が5名、大動脈弁置換術が41名、両弁置換術が9名、大動脈弁置換術かつ僧帽弁形成術が4名であった。

【結果】 CSA-AI は左室駆出率 (LVEF, $r=-0.317$; $p=0.004$), 左房径 (LAD, $r=0.361$; $p=0.041$), 肺動脈楔入圧 (PCWP, $r=0.632$; $p<0.001$), 肺動脈圧 (PAP, $r=0.423$, $p=0.006$) との相関を認めたが、OSA-AI は相関がなかった。また、術後に PCWP (14.8 \pm 7.9 to 9.7 \pm 5.3mmHg, $p<0.001$), PAP (21.4 \pm 8.4 to 15.8 \pm 5.2mmHg, $p<0.001$), AHI (40.3 \pm 14.4 to 31.9 \pm 21.1, $p=0.002$), および CSA-AI (9.0 \pm 12.0 to 1.0 \pm 2.9, $p<0.001$) は有意に改善したが、OSA-AI は改善がなかった (11.0 \pm 9.2 vs. 11.9 \pm 12.1, $p=0.712$)。心不全を伴う重症弁膜症症例への外科的弁加療により、心機能の改善とともに CSA のみに改善がみられた。

【考察】 本研究では、心不全を伴う重症弁膜症患者に対し、PSG、心臓超音波検査、および右心カテーテル検査を施行し、OSA および CSA との関係について調査し、さらに、弁への外科治療の OSA および CSA への影響を検討した。心不全と OSA および CSA との関係では、心機能低下のパラメーターと CSA との関連を認めたが、OSA とは認められなかった。このことは心不全により生じる circulation delay や cardiac filling pressure の増大、CO₂ sensitivity の増加などから呼吸の制御が不安定化し、チェーンストークス呼吸を特徴とする CSA の出現につながるものと考えられる。また、外科的弁治療によって上記の機序が影響を受け、心不全の改善とともに CSA が改善したものと推測される。

【結論】 本研究により、重症弁膜症を持つ患者の心機

能と CSA との関連が確認された。更に、外科的弁治療にて心機能の改善に伴って CSA のみ有意に改善することが明らかにされた。

(論文審査の結果の要旨)

睡眠時無呼吸症候群 (Sleep apnea syndrome : SAS) は、睡眠中の呼吸停止と日中過眠などを特徴とする睡眠障害を基盤とする症候群である。SAS には、閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (Obstructive sleep apnea syndrome : OSA) と中枢性睡眠時無呼吸症候群 (Central sleep apnea syndrome : CSA) とに分けられる。SAS の様々な循環器疾患との関連は既知ではあるが、心不全への外科的治療により SAS が改善したという報告はなく、阿部らは重症弁膜症をもつ心不全患者を対象に、外科弁治療の SAS への効果を検討した。

僧帽弁、または、大動脈弁の弁膜症による心不全患者 (New York Heart Association II度、またはIII度) 150名を対象に睡眠時ポリグラフィー (PSG)、心臓超音波、右心内圧検査を行い、PSG は、無呼吸・低呼吸の睡眠1時間あたりの回数を apnea hypopnea index (AHI) として測定した。まず、心不全と SAS (OSA および CSA) との関連を調査し、つづいて重症 SAS (AHI > 20) で外科的弁治療を行った74名において術後検査を行い、OSA および CSA への効果を解析した。

1. CSA-apnea index (AI) は左室駆出率、左房径、肺動脈楔入圧 (PCWP)、肺動脈圧 (PAP) と相関を認めたが、OSA-AI は相関がなかった。心機能低下を示すパラメーターと CSA-AI とに関連が認められた。
2. 手術により、PCWP、PAP、AHI、および CSA-AI は有意に改善したが、OSA-AI は改善がなかった。以上の結果より、心不全患者では circulation delay や cardiac filling pressure の増大、CO₂ sensitivity の増加などから呼吸の制御が不安定化し、チェーンストークス呼吸を特徴とする CSA の出現につながると考えられた。また、外科的弁治療によって上記の機序が影響を受け、心不全の改善とともに CSA のみ改善した結果が得られたと推測される。

本研究により、阿部らは重症弁膜症を持つ患者の心機能と CSA との関連を確認し、更に、外科的弁治療にて心機能の改善に伴って CSA のみ有意に改善することを示した。これまで、心不全と SAS の関連についてはいくつか報告はあるが、心不全をもつ心疾患へ

の外科的治療のSASの影響を検討した報告はない。阿部らの研究により心不全が改善すればCSAも改善することが明らかになり、臨床的にも重要な知見であると考えられる。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。

Primary AL amyloid polyneuropathy successfully treated with high-dose melphalan followed by autologous stem cell transplantation (自己末梢血幹細胞移植併用大量メルファラン療法が有効であった原発性ALアミロイドポリニューロパチー症例)

加藤修明

(論文の内容の要旨)

【背景、目的】 原発性全身性ALアミロイドーシスは、plasma cell dyscrasia (形質細胞異常症)に伴う全身性疾患で、異常形質細胞クローンの産生する免疫グロブリン軽鎖がアミロイドとして全身に沈着することにより発症する。ネフローゼ症候群、うっ血性心不全、肝障害等の多臓器障害を呈し、無治療の場合、診断後余命は1～2年と予後不良な疾患である。原発性ALアミロイドポリニューロパチーは、原発性全身性ALアミロイドーシスの約17%に見られ、耐えがたい四肢のしびれや筋力低下に伴う歩行障害に加え、自律神経ニューロパチーに伴う便秘・下痢や起立性低血圧などを呈し、患者の生命予後はもとよりQOLも大きく損なう病態である。原発性全身性ALアミロイドーシスに対する治療と同様に、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 (high-dose melphalan followed by stem cell transplantation : HDM/SCT) が有効であり、2例の有効例の報告や、37%のニューロパチー患者で臨床的改善が見られたとする報告がある。しかしいずれも血液内科領域からの報告であって、神経生理学的側面まで含めて検討された報告はこれまでにない。そこで今回我々は原発性ALアミロイドポリニューロパチー患者2名に対してHDM/SCT治療を施行し、その臨床的、血液学的評価に加えて、初めて詳細な神経生理学的検討も行い、報告した。

【対象と方法】 対象は当科にて原発性全身性ALアミロイドーシスと診断された患者のうちポリニューロパチーを主症状とし、臓器障害評価の結果HDM/SCT治療の適応と判断された原発性ALアミロイドポリニューロパチー患者2名。メルファランの用量は、世界的

標準であり、当科でも標準としている140～200 mg/m²を、患者の臓器障害の程度に基づいて選択して用いた。治療の前後で、アミロイド前駆蛋白である血清中の遊離免疫グロブリン軽鎖 (free light chain : FLC) の濃度、臨床症状、多発ニューロパチー重症度スコア、神経生理検査所見、生検組織上のアミロイド沈着量等を経時的に比較検討した。重症度スコアは当科で家族性アミロイドポリニューロパチー患者の評価に用いているScoring scale for the symptoms of ATTR Val30Met FAP patientsを用いた。

【結果】 患者1は女性。40歳時に足底のしびれ感が出現し、42歳時より交代性の便秘・下痢症状と歩行困難が出現。しびれの範囲も大腿部まで拡大し、43歳時に当科受診。沈着アミロイドは通常免疫染色に陰性で当初診断が困難であったが、神経生検組織検体よりアミロイド蛋白を抽出後、アミノ酸分析を行うことによりAL λ の沈着を証明し、原発性全身性ALアミロイドーシスと診断し得た。神経学的には自律神経障害に伴う便秘・下痢症状、および下肢の感覚障害と筋力低下、およびそれに伴う歩行障害を認め、杖歩行であった。メルファラン140 mg/m²を用いたHDM/SCT治療を施行したが蛋白が残存したため、メルファラン200 mg/m²を用いた再治療を行った。その結果、M蛋白は微量に残存しているものの血清FLCは基準値内まで減少して推移し、治療後2年現在まで臓器障害の悪化を認めていない。減少した体重も回復し、全身状態は改善している。神経学的には、下肢のしびれ感はやや減弱したのち残存しているものの筋力は改善傾向で、杖なし歩行が可能となり、便秘・下痢症状は消失している。胃粘膜生検上もアミロイド沈着の減少を認めている。重症度スコアはtotal 14点から8点に改善した。神経生理学的には、神経伝導検査において正中神経の振幅、伝導速度ともに改善傾向を認めている。患者2は米国人男性。46歳時に足底のしびれ感が出現し、47歳時に同症状の範囲が大腿部まで拡大した。上肢先端のしびれ感と腎機能低下も出現し、48歳時に当科受診。原発性全身性ALアミロイドーシスと診断された。神経学的には上下肢の耐えがたいしびれ感を認め、麻薬性鎮痛薬を要した。感覚障害も強く、下肢の温度覚は高度に低下していた。メルファラン140 mg/m²を用いたHDM/SCT治療を施行したところM蛋白は消失 (完全寛解) し、血清FLCも基準値内まで減少して推移し、現在まで臓器障害の悪化なく経過している。神経学的には下肢のしびれ感および温度覚障害

の改善傾向を認めている。重症度スコアは total 10点から4点に改善した。神経生理学的には、神経伝導検査において正中神経の振幅の悪化の停止および伝導速度の改善傾向を認めている。

【考察、結語】 原発性 AL アミロイドポリニューロパチー患者2名に対して HDM/SCT 治療を施行し、1名で完全寛解（M蛋白の消失）を得て、両名で FLC の正常化を認めた。いずれの患者でも重症度スコアおよび神経症状の改善傾向を認めている。患者1では、M蛋白が消失していないにも関わらず臨床的改善が得られている。これは血清中の FLC そのものが臓器に対して toxic に作用しているという過去の報告や、一度沈着した AL アミロイドも治療により turn over し得るという当科からの報告に合致しており、M蛋白の消失と同様に FLC を正常域に保つことが AL アミロイドーシスの進行抑制あるいは改善に重要であることを示している。また、2例と少数であるため有意差を証明することはできないが、神経伝導検査という客観的な指標において、両症例で悪化の停止あるいは改善傾向を示し得たことは、本来進行性であるはずの原発性 AL アミロイドーシスにおいて非常に意義のあることであり、今後さらに多数例で検討される必要がある。

（論文審査の結果の要旨）

原発性全身性 AL アミロイドーシスは、plasma cell dyscrasia（形質細胞異常症）に伴う全身性疾患で、異常形質細胞クローンの産生する免疫グロブリン軽鎖がアミロイドとして全身に沈着することにより多臓器障害を呈し、余命1～2年と予後不良な疾患である。原発性 AL アミロイドポリニューロパチーは、原発性全身性 AL アミロイドーシスの約17%に見られ、耐えがたい四肢のしびれや筋力低下に伴う歩行障害に加え、自律神経ニューロパチーに伴う便秘・下痢や起立性低血圧などを呈し、患者の生命予後はもとより QOL も大きく損なう病態である。原発性全身性 AL アミロイドーシスに対する治療と同様に、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（high-dose melphalan followed by stem cell transplantation：HDM/SCT）が有効であるが、神経生理学的側面まで含めて検討された報告はこれまでにない。そこで原発性 AL アミロイドポリニューロパチー患者2名に対して HDM/SCT 治療を施行し、その臨床的、血液学的評価に加えて、初めて詳細な神経生理学的検討を行った。

患者1は43歳女性。沈着アミロイドは通常の免疫染

色に陰性で当初診断が困難であったが、生検組織よりアミロイドを抽出後、アミノ酸分析を行うことにより AL λ の沈着を証明し、原発性全身性ALアミロイドーシスと診断し得た。神経学的には自律神経障害に伴う便秘・下痢症状、および下肢の感覚障害と筋力低下、およびそれに伴う歩行障害を認め、杖歩行であった。2回の HDM/SCT 治療の結果、M蛋白は微量に残存したが血清 FLC は基準値内まで減少した。神経症状は改善して杖なし歩行が可能となり、体重も回復した。胃粘膜生検上もアミロイド沈着の減少傾向を確認。重症度スコアは total 14点から8点に改善し、神経伝導検査では正中神経の振幅、伝導速度ともに改善傾向を認めた。患者2は48歳男性。上下肢の耐えがたいしびれ感を認め麻薬性鎮痛薬を要し、感覚障害も強く下肢の温度覚は高度に低下していたが、1回の HDM/SCT 治療にてM蛋白は消失（完全寛解）し、血清 FLC も基準値内まで低下した。神経症状は改善して重症度スコアは total 10点から4点となり体重も回復し、神経伝導検査では正中神経の振幅の悪化の停止および伝導速度の改善傾向が得られた。

以上、原発性 AL アミロイドポリニューロパチーに対する HDM/SCT 治療において、臨床症状と重症度スコアの改善とともに、初めて神経生理学的検査においても悪化の停止あるいは改善が認められることを明らかにした。特に患者1では血清中のM蛋白消失が得られずとも臨床的な改善が得られることを明らかにし、これにより、ゼロでなくともM蛋白の産生を一定量以下に抑えることで沈着したアミロイドが代謝回転により消退し得る可能性や、血清中の FLC そのものも神経に対して toxic に作用している可能性を、初めて電気生理学的検査という客観的指標をもって示唆した。

これらの結果は原発性 AL アミロイドポリニューロパチーの病態解明に寄与する新しい知見であり、学位論文として十分価値のあるものと主査、副査は一致して認めた。

Physical fitness and indices of lifestyle-related diseases before and after interval walking training in middle-aged and older males and females (中高年者におけるインターバル速歩トレーニングの体力・生活習慣病指標改善効果)

森川 真悠子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】従来、体力と生活習慣病 (LSD) との因果関係が指摘されている。しかし、これらの研究は横断的研究にとどまり、実際、大勢の中高年者を対象に一定期間運動トレーニング介入を行い、その際の体力の増加量と生活習慣病指標 (LSD スコア) 改善度との関係を明らかにした研究はほとんどない。そこで、我々は、「中高年者におけるインターバル速歩トレーニングによる最高酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2peak}$) の増加と生活習慣病指標改善に密接な関係があるのではないか」という仮説を立て、検証した。

【方法】2005または2006年の4～9月の期間で、松本市熟年体育大学に参加した826名 (男性246名, 女性580名, 平均年齢65歳) を対象とした。まず、トレーニング前に彼らの体重, 体脂肪率, 血圧, $\dot{V}O_{2peak}$, 等尺性脚伸展・屈曲筋力, 血液成分を測定し, その後、彼らに $\dot{V}O_{2peak}$ の70%強度以上の速歩と普通歩行を交互に3分ずつ繰り返す「インターバル速歩」を, 週4日以上を目標に実施させた。 $\dot{V}O_{2peak}$ は, 運動量計測器 (熟大メイト) を用いて計測し, その70%を目標運動強度とした。トレーニング後に再度トレーニング前と同じ項目について測定を行い, その効果を判定した。解析対象は, トレーニング前後ですべての項目について測定を実施した男性198名, 女性468名の計666名とした。仮説を検証するために, 男女別に, 初期の $\dot{V}O_{2peak}$ の値の低い方から低値群, 中値群, 高値群の3群にそれぞれ人数が等しくなるように分けた。また, LSD スコアを評価するために, 厚労省の「特定健康診査・特定保健指導のガイドライン」にしたがって, 1) 最高血圧 (SBP) $130 \geq \text{mmHg}$ あるいは最低血圧 (DBP) $\geq 85 \text{ mmHg}$, 2) 血糖値 (BG) $\geq 100 \text{ mg/dl}$, 3) BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$, 4) 中性脂肪 (TG) $\geq 150 \text{ mg/dl}$ あるいは HDL コレステロール (HDL-C) $\leq 40 \text{ mg/dl}$ の条件のどれかに該当すれば1点加算とし, 計4点満点として, トレーニング前後で比較した。

【結果】4カ月間のインターバル速歩トレーニング中, 脱落者は43名 (男性11名, 女性32名) であり, 残りの783名は4カ月間のトレーニングを完遂した。したがって, 継続率は94%と高比率であった。トレーニングの実施状況は, 男女ともに1日の平均速歩時間は25分で, 4日/週であった。トレーニング前では, 男女ともに $\dot{V}O_{2peak}$ の低値群で高値群に比べ脚伸展・屈曲筋力, HDL コレステロールが低かったが ($P < 0.05$), 逆に, BMI, 体脂肪率, 血圧, BG は高かった ($P < 0.05$)。トレーニング後では, 男女共すべての群で, $\dot{V}O_{2peak}$, 脚伸展・屈曲筋力が上昇し ($P < 0.05$), 逆に, 体脂肪率, SBP, DBP, BG が低下した ($P < 0.05$)。しかし, これらの変化量は, 男女とも $\dot{V}O_{2peak}$ の低値群で最も大きかった。さらに, トレーニング前後の $\dot{V}O_{2peak}$ と LSD スコアを男女別にプールすると, $\dot{V}O_{2peak}$ と LSD スコアとの間に負の相関関係を認め (男女とも, $P < 0.001$)。すなわち, トレーニング前の LSD スコアは $\dot{V}O_{2peak}$ の低い被験者ほど高く, さらにトレーニングによって $\dot{V}O_{2peak}$ の低い被験者ほど $\dot{V}O_{2peak}$ が増加し, その増加量に比例して LSD スコアが低下した。

【結論】中高年者において, 4カ月間のインターバル速歩トレーニングによる $\dot{V}O_{2peak}$ の増加と生活習慣病指標改善度との間に密接な関係があることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

従来、体力と生活習慣病 (LSD) との因果関係が指摘されている。しかし、これらの研究は横断的研究にとどまり、実際、大勢の中高年者を対象に一定期間運動トレーニング介入を行い、その際の体力の増加量と生活習慣病指標 (LSD スコア) 改善度との関係を明らかにした研究はほとんどない。そこで、我々は、「中高年者におけるインターバル速歩トレーニングによる最高酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2peak}$) の増加と生活習慣病指標改善に密接な関係があるのではないか」という仮説を立て、検証した。

松本市熟年体育大学に参加した男性198名, 女性468名の計666名を解析対象とした。トレーニング前に彼らの体重, 体脂肪率, 血圧, $\dot{V}O_{2peak}$, 等尺性脚伸展・屈曲筋力, 血液成分を測定し, その後, 4カ月間の「インターバル速歩」を, 週4日以上を目標に実施させた。トレーニング後に再度トレーニング前と同じ項目について測定を行い, その効果を判定した。仮説を検証するために, 男女別に, 初期の $\dot{V}O_{2peak}$ の値の

低い方から低値群, 中値群, 高値群の3群にそれぞれ人数が等しくなるように分けた。また, LSDスコアを評価するために, 厚労省の「特定健康診査・特定保健指導のガイドライン」にしたがって, 1) 最高血圧 (SBP) $130 \geq \text{mmHg}$ あるいは最低血圧 (DBP) $\geq 85 \text{ mmHg}$, 2) 血糖値 (BG) $\geq 100 \text{ mg/dl}$, 3) BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$, 4) 中性脂肪 (TG) $\geq 150 \text{ mg/dl}$ あるいはHDLコレステロール (HDL-C) $\leq 40 \text{ mg/dl}$, の条件のどれかに該当すれば1点加算とし, 計4点満点として, トレーニング前後で比較した。

その結果, 森川は次の結果を得た。

1. トレーニング前のLSDスコアは, $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ の低い被験者ほど, 高かった。
2. トレーニングによって, $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ の低い被験者ほど $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ が増加し, その増加量に比例して, LSDスコアが低下した。

これらの結果より, 中高年者において, 4カ月間のインターバル速歩トレーニングによる $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ の増加と生活習慣病指標改善度との間に密接な関係があることが示唆された。

よって, 最高酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2\text{peak}}$) を指標とした体力の増加は, 生活習慣病予防には大きな意義をもつことを示しており, 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。

Role of ASC in the mouse model of *Helicobacter pylori* infection (へリコバクターピロリ感染マウスモデルにおけるASCの役割)

BEKALE NGUEMA Benoit

(論文の内容の要旨)

BACKGROUND: Apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain (ASC) is an adaptor molecule activating caspase-1 that stimulates pro-IL-1 β and pro-IL-18, two proinflammatory cytokines with critical functions in host defense against a variety of pathogens.

PURPOSE: In the present study, we investigated the role of ASC in the host defense against *Helicobacter pylori* utilizing ASC-deficient mice.

MATERIAL AND METHODS: In three independent experiments, ASC-deficient mice were orally

inoculated with *H. pylori* isolate (Sydney strain); sacrificed 2, 10, and 16 weeks after inoculation, bacterial load, degree of gastritis, and mucosal levels of inflammatory cytokines were analyzed and compared with those obtained from wild-type mice.

RESULTS: We found more prominent *H. pylori* colonization in ASC-deficient mice, as revealed by colony-forming unit (CFU) counts, 16 weeks after inoculation. Both groups of mice developed gastritis; however, ASC-deficient mice showed significant attenuation of inflammation despite high *H. pylori* colonization. ELISA, immunohistochemistry and quantitative RT-PCR analysis revealed complete suppression of IL-1 β and IL-18, and substantial reduction of IFN- γ expression, in ASC-deficient mice without apparent upregulation of other cytokines including IL-10 and TNF- α .

CONCLUSION: These results as a whole indicate that ASC exerts considerable influence on the host defense acting through IL-1 β /IL-18 and subsequent IFN- γ production, which in turn contributes to continuous chronic inflammatory response and consequent reduction of *H. pylori* colonization.

(論文審査の結果の要旨)

Apoptosis associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain (ASC) is an adaptor molecule activating caspase-1 that stimulates pro-IL-1 β and pro-IL-18, two proinflammatory cytokines with critical functions in host defense against a variety of pathogens. In this study, BEKALE NGUEMA analyzed in details for the first time, the in vivo role of ASC protein in the host defense mechanisms against *H. pylori* infection using ASC-deficient mice.

The results from his study showed that :

- 1- There was a defect in bacterial clearance in ASC-deficient mice.
- 2- *H. pylori*-induced gastritis was attenuated in ASC-deficient mice, and score for activity was significantly lower compared with ASC wild type mice.
- 3- ELISA, immunohistochemistry and quantitative RT-PCR analysis revealed complete suppression of IL-1 β and IL-18, and substantial reduction of

IFN- γ expression, in ASC-deficient mice without apparent upregulation of other cytokines.

This study demonstrated that ASC exerts considerable influence on the host defense acting through IL-1 β /IL-18 and subsequent IFN- γ production, which in turn contributes to continuous chronic inflammatory response and consequent reduction of *H. pylori* colonization.

This study seems to be valuable to understand the molecular mechanism with reference to infection and inflammation in the future, thus this paper is qualified as a thesis of academic degree.

Surface coating of bone marrow cells with *N*-acetylglucosamine for bone marrow implantation therapy (骨髄細胞移植療法のための *N*-アセチルグルコサミンの骨髄細胞表面へのコーティング)

小林 聡

(論文の内容の要旨)

【目的】近年、難治性心疾患に対する新たな治療法として、骨髄幹細胞を用いた細胞移植治療が注目され、既に一部臨床応用が始まっている。分離した骨髄細胞をそのまま心筋に注入するという現在の移植法は、簡便ではあるが、移植した細胞の心筋組織への生着率が低いことが欠点である。以前我々は、細胞骨格タンパク質のデスミン、ビメンチンが心筋細胞表面に発現し、GlcNAc (*N*-アセチルグルコサミン) 糖鎖を認識する機能を持つことを報告している。そこで本研究では、骨髄細胞を効率良く心筋組織へ集積させることを目的に、骨髄細胞表面にGlcNAc糖鎖を修飾することにより、骨髄幹細胞と心筋細胞との接着を始めとする相互作用が増強するかについて検討した。

【方法および結果】今回使用した骨髄細胞はラット大腿骨より採取した。この骨髄細胞と糖鎖高分子 PV (poly *N*-p-vinylbenzyl) -GlcNAc にアルキル基を導入したポリマー (GlcNAc 導入試薬) とを混合して反応させ、細胞表面への人工的な糖鎖修飾を行った。そして、これらの骨髄細胞を GlcNAc 結合レクチンである sWGA (succinylated wheat germ agglutinin) を用いて染色し、フローサイトメトリーにて骨髄細胞表面の GlcNAc 修飾を解析したところ、骨髄細胞表面に対して人工的に GlcNAc 糖鎖を修飾できること

が示された。さらに、トリパンブルー染色により糖鎖修飾に伴う細胞傷害性について検討したところ、GlcNAc 糖鎖の修飾を行った濃度において、細胞傷害性がないことが示された。次に、糖鎖修飾を行った骨髄細胞のラット心筋細胞への接着能を両細胞の共培養系により検討したところ、糖鎖修飾をしていない骨髄細胞および Maltose 糖鎖を修飾した骨髄細胞と比し、GlcNAc 糖鎖を修飾した骨髄細胞は高い接着能を示した。さらに GFP (Green Fluorescent Protein) 発現ラットから骨髄細胞を採取し、GlcNAc 糖鎖を修飾して心筋細胞と 1 週間共培養を行い、心筋様となる骨髄細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析し、同時に共焦点レーザー顕微鏡を用いた、心筋細胞マーカーの免疫染色および GFP との観察による心筋様となる骨髄細胞の確認を行ったところ、GFP 陽性 (骨髄細胞由来) の心筋様となる細胞が GlcNAc 糖鎖を修飾した骨髄細胞に多く発現しており、共焦点レーザー顕微鏡観察により、その存在が実際に確認された。

【考察】糖鎖導入試薬を用いることにより、安全かつ簡便に骨髄細胞表面への GlcNAc 糖鎖修飾が可能であることが明らかとなった。さらに骨髄細胞表面に対して GlcNAc 糖鎖を修飾することにより、心筋細胞への接着が亢進し、それによってその骨髄細胞の一部は心筋様の細胞となることが示された。このとき、心筋細胞へ生着した骨髄細胞が心筋様となるメカニズムが、細胞融合であるか分化であるかという点においては更なる検討が必要であり、議論の余地がある。本研究から、骨髄細胞への GlcNAc 糖鎖修飾により、難治性心疾患の細胞移植効果が向上することが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

近年、難治性心疾患に対する新たな治療法として、骨髄幹細胞を用いた細胞移植治療が注目され、既に一部臨床応用が始まっている。分離した骨髄細胞をそのまま心筋に注入するという現在の移植法は、簡便ではあるが、移植した細胞の心筋組織への生着率が低いことが欠点である。以前小林聡らのグループは、細胞骨格タンパク質のデスミン、ビメンチンが心筋細胞表面に発現し、GlcNAc (*N*-アセチルグルコサミン) 糖鎖を認識する機能を持つことを報告している。そこで本研究では、骨髄細胞を効率良く心筋組織へ集積させることを目的に、骨髄細胞表面に GlcNAc 糖鎖を修飾することにより、骨髄幹細胞と心筋細胞との接着を始めとする相互作用が増強するかについて検討した。

今回使用した骨髄細胞はラット大腿骨より採取した。この骨髄細胞と糖鎖高分子 PV (poly N-p-vinylbenzyl) -GlcNAc にアルキル基を導入したポリマー (GlcNAc 導入試薬) とを混合して反応させ、細胞表面への人工的な糖鎖修飾を行った。そして、これらの骨髄細胞を GlcNAc 結合レクチンである sWGA (succinylated wheat germ agglutinin) を用いて染色し、フローサイトメトリーにて骨髄細胞表面の GlcNAc 修飾を解析した。このとき、トリパンブルー染色により糖鎖修飾に伴う細胞傷害性についても検討した。次に、糖鎖修飾を行った骨髄細胞のラット心筋細胞への接着能を両細胞の共培養系により検討した。さらに GFP (Green Fluorescent Protein) 発現ラットから骨髄細胞を採取し、GlcNAc 糖鎖を修飾して心筋細胞と 1 週間共培養を行い、心筋様となる骨髄細胞の割合の解析を行った。

その結果、小林聡は次の結論を得た。

1. GlcNAc 導入試薬を用いることで、細胞に傷害を与えることなく、骨髄細胞表面に対して人工的に GlcNAc 糖鎖を修飾出来た。
2. In vitro の検討において、人工的に GlcNAc 糖鎖を修飾した骨髄細胞は、心筋細胞に対して高い接着能を示した。
3. 骨髄細胞に GlcNAc 糖鎖を修飾することによって、心筋細胞に対する生着能と、その生着した骨髄細胞における骨髄細胞由来の心筋様細胞となる割合が上昇した。

これらの結果より、骨髄細胞に対して、人工的な GlcNAc 糖鎖修飾が可能であることが示された。骨髄細胞移植療法において、骨髄細胞表面に対する GlcNAc 糖鎖を修飾することにより、心筋組織へのターゲティングと高い生着が得られ、難治性心疾患の細胞治療効果が向上することが期待される。今後の再生医療にも非常に貢献する内容であり、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。

Differentiation of smooth muscle cells from human amniotic mesenchymal cells implanted in the freeze-injured mouse urinary bladder (凍結障害マウス膀胱におけるヒト羊膜間葉系細胞の平滑筋への分化)

皆川 倫 範

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】ヒト羊膜間葉系細胞 (HAMCs) は多分化能があり、再生材料としての可能性が報告されている。今回我々は凍結障害マウス膀胱の組織学および機能的再生における HAMCs の役割について、免疫組織学的解析及び筋条片実験による機能的解析により明らかにした。

【材料および方法】HAMCs を羊膜から分離し、培養した。凍結障害を受けた 3 日後のヌードマウスの膀胱筋層に、培養した HAMCs を注入した。凍結障害はドライアイスで冷却した金属棒を膀胱後壁に 30 秒間接することにより作成した。細胞移植群は障害部位を中心に細胞を移植した。コントロール群は培養液を注入することにより作成した。細胞移植の 1, 2, 4, 6 週間後に膀胱を摘出した。摘出した膀胱は α smooth muscle actin (SMA) を用いて免疫組織学的解析を行った。組織中の HAMCs はヒト抗核抗体 (HuNu) を用いて検出した。また、筋条片実験を行い、高濃度カリウム (124 mM) とコリン作動薬であるカルバコールによる収縮反応を解析した。

【結果】1 週間後の細胞移植群では、マウス膀胱筋層内に HuNu 陽性の HAMCs を認めた。HAMCs は培養の段階では HuNu に陽性で、SMA に陰性であった。しかし、組織中の HAMCs は SMA 陽性細胞に分化していた。2 から 4 週間かけてマウス膀胱筋層内の HAMCs はより緻密な筋層を形成するようになった。1 週間後のコントロール群では、凍結障害の部位の筋層は脆弱で、SMA 陽性細胞はわずかであった。6 週かけて徐々に膀胱筋層が回復したが、細胞移植群では早期に回復した。また、高濃度カリウム刺激による膀胱の収縮力は、正常膀胱に比較し 1 週間後の両群で著しく減弱した。しかし、細胞移植群の収縮力の減弱は、コントロール群に対して軽度であった。また、コントロール群の収縮力は 6 週までに回復したが、その回復過程は細胞移植群よりも緩徐であった。カルバコールに対する収縮力は同様に減弱したが、高濃度カ

リウムでの収縮力に対する比率はどの時点でも変化しなかった。凍結障害による収縮力の減弱は、コリン受容体の減少に伴った変化ではなく、細胞数の減少に伴ったものであり、HAMCsは膀胱平滑筋細胞数の維持に関与して収縮力の減弱を軽度にし、早期回復を促した可能性がある。

【結論】細胞移植群の凍結障害マウス膀胱は、組織学的および機能的にコントロール群より早期に回復した。HAMCsの尿路における再生材料としての可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

ヒト羊膜間葉系細胞 (HAMCs) は多分化能があり、再生材料としての可能性が報告されている。今回 HAMCs を凍結障害マウス膀胱に移植し、尿路での治療的役割に関して検討した。

凍結障害の3日後に HAMCs を移植し、移植1, 2, 4, 6週間後に免疫組織学的検討および機能的検討を行った。免疫組織学的検討では、ヒト抗核抗体 (HuNu) と α smooth muscle actin (SMA) を用いて検討した。また機能的検討においては、筋条片実験を行い、高濃度カリウム (124 mM) とコリン作動薬であるカルバコールによる収縮反応を解析した。

1週間後の細胞移植群では、マウス膀胱筋層内に HuNu 陽性の HAMCs を認めた。また、HAMCs は SMA 陽性細胞に分化していた。2から4週間かけてマウス膀胱筋層内の HAMCs はより強固な筋層を形成するようになった。1週間後のコントロール群では、凍結障害の部位の筋層は脆弱で、SMA 陽性細胞はわずかであった。6週かけて徐々に膀胱筋層が回復したが、細胞移植群では早期に回復した。また、高濃度カリウム刺激による膀胱の収縮力は、1週間後の両群で著しく減弱した。しかし、細胞移植群の収縮力の減弱は、コントロール群に対して軽度であった。また、コントロール群の収縮力は6週までに回復したが、その回復過程は細胞移植群よりも緩徐であった。カルバコールに対する収縮力は同様に減弱したが、高濃度カリウムでの収縮力に対する比率はどの時点でも変化しなかった。

その結果、皆川倫範は次のような結論を得た。

1. 凍結障害マウス膀胱に移植された HAM 細胞は、膀胱壁内に生着し移植6週間後にも残存していた。
2. 生着したHAM細胞は、マウス膀胱平滑筋細胞へと分化し、膀胱壁を構成していた。
3. 移植された HAM 細胞は障害を受けたマウス膀胱

の組織学的および機能的回復を早期に促した。

4. 凍結障害による膀胱収縮力減少の機序は、主に平滑筋細胞数減少が関与することが示された。
5. 移植された HAM 細胞は、障害後の平滑筋細胞数を維持することにより、膀胱収縮力の早期回復に寄与した。

これらの結果より、障害を受けた膀胱に対して、HAM 細胞注入療法が有効な治療とな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。

Coagulation activity is increased in the left atria of patients with paroxysmal atrial fibrillation during the non-paroxysmal period -Comparison with chronic atrial fibrillation- (発作性心房細動症例の非発作時における左房内凝固亢進-慢性心房細動症例との比較検討-)

元 木 博 彦

(論文の内容の要旨)

【目的】本研究では発作性心房細動症例の非発作時(洞調律時)における凝固活性評価を目的とし、発作性心房細動患者の左房内の凝固線溶マーカーと血小板機能を測定し、慢性心房細動症例と比較検討した。

【方法】心房細動に対するカテーテルアブレーション治療患者20例(発作性心房細動症例10例、慢性心房細動症例10例)を対象とした。入院後抗凝固療法を中止し、心臓超音波検査にて心機能を評価し、経食道超音波検査で左房内血栓を認めないことを確認した。入院5日目に右鼠径静脈アプローチにて、ブロッケンブロー針を右房内へ挿入。心臓内超音波ガイド下に心房内中隔穿刺を施行し、左房内へカテーテルを挿入後、速やかに左房内血液の採取を行った。採取された検体について、トロンビン・アンチトロンビン III 複合体、 α 2 プラスミンインヒビター・プラスミン複合体、血小板第4因子を測定し、発作性心房細動群と慢性心房細動群で凝固線溶状態、血小板機能、臨床背景を比較検討した。

【結果】左房血のトロンビン・アンチトロンビン III 複合体値は発作性心房細動群、慢性心房細動群いずれも高値を示し、両群間で有意差を認めなかった。 α 2 プラスミンインヒビター・プラスミン複合体値は両群共に正常値であり、有意差も認められなかった。血小

板第4因子活性は両群で軽度上昇傾向を認めたが、やはり両群間で有意差は認められなかった。

【考察】本研究では、発作性心房細動症例の洞調律時における左房内凝固活性亢進が初めて証明された。過去の発作性心房細動症例の凝固活性上昇を報告した研究は、末梢静脈より検体が採取されており、左房内での凝固活性を評価した研究はこれまでにない。

発作性心房細動症例においては、非発作時であっても左房内凝固活性は慢性心房細動症例と同等に亢進しており、このことから心房細動患者においてはたとえ非発作時であっても抗凝固療法が適応となることが示された。一方、血小板活性については軽度上昇にとどまっており、これら患者の血栓の予防には抗血小板薬よりも抗凝固薬が望ましいと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

心房細動は血栓塞栓症のリスク因子として広く認識されているが、血栓形成の機序は明らかでない。これまでは、心房細動後の有効な心房収縮の消失によって血栓形成が促されると考えられてきたが、一般に、血管内における血栓形成は、内皮機能異常や凝固異常の関与が認められる。過去に発作性心房細動症例で、洞調律時に虚血性脳卒中を発症したことが報告されており、AFFIRM研究においても、洞調律維持群における虚血性脳卒中の発症は少なくなかった。今回、元木らは発作性心房細動症例の非発作時(洞調律時)における左房内凝固活性、線溶活性、血小板機能を評価し、慢性心房細動症例と比較検討を行った。

症例は心房細動に対するカテーテルアブレーション予定患者20例(発作性心房細動10例、慢性心房細動10例)。心臓超音波検査にて心機能を評価し、経食道超音波検査で左房内血栓を認めないことを確認した。抗凝固療法中止後5日目に右鼠径静脈アプローチにて、ブロッケンプロー針を右房内へ挿入。心臓内超音波ガイド下に心房中隔穿刺を施行し、左房内へカテーテルを挿入後、速やかに左房内血液の採取を行った。採取された検体について、トロンビン・アンチトロンビンIII複合体(TAT)、 $\alpha 2$ プラスミンインヒビター・プラスミン複合体(PIC)、血小板第4因子(PF4)を測定し、発作性心房細動群と慢性心房細動群で凝固線溶状態、血小板機能、臨床背景を比較検討した。

その結果、元木らは以下の結果を得た。

1. 左房血のTAT値は発作性心房細動群、慢性心房細動群いずれも高値を示し、両群間で有意差を認めなかった。

2. PICは両群共に平均値が正常範囲内であり、有意差も認められなかった。

3. PF4活性は両群で軽度上昇傾向を認めたが、やはり両群間で有意差は認められなかった。

これらの結果より、発作性心房細動症例の洞調律時における左房内凝固活性亢進が証明された。本研究で示された左房内凝固亢進は、心房細動症例の血栓予防に抗凝固療法が、抗血小板薬治療より有効であるとする過去の研究データを裏付けるものであった。これまでに、左房内での凝固活性を評価した研究はなく、局所における凝固亢進が、血栓形成の一因であることが初めて示唆された。発作性心房細動症例においては、非発作時であっても左房内凝固活性は慢性心房細動症例と同等に亢進しており、非発作時であっても抗凝固療法が適応となることが示された。

心房細動に対する抗凝固療法に関する重要な知見であり、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。

Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver (肝類洞内皮細胞においてアドレノメデュリンは、肝臓の冷傷害に対して保護的に働く)

飯 沼 伸 佳

(論文の内容の要旨)

肝移植の際、ドナー肝を一時的に保存する方法として、University of Wisconsin (UW) solutionを用いた冷処理がとられている。しかしながら、根本的な、虚血再灌流障害の抑制にはなっておらず、より確実な臓器保護法の確立が待たれている。

アドレノメデュリンは、血管を始め全身の組織で広範に産生される生理活性ペプチドである。当初、AMは強力な血管拡張作用を有する血管作動性物質として注目されたが、それ以外にも多彩な生理活性を有することが報告されている。我々は、エンドトキシンショックモデルでAM過剰発現マウスが肝障害に対し強い抵抗性を示し、生存率が高いことを報告した。そこで本研究ではAMによる肝保護作用のメカニズムと、臓器冷保存への有効性について検討を進めた。

まず、マウス肝臓から、two step collagenase perfusion and centrifugation methodにより、各細胞分画の初代培養を行った。肝類洞内皮細胞(LSEC)に

特徴的なfenestration構造や、LSECの機能であるエンドサイトーシスの検討により、分離細胞の純度を検討したところ、本法での非実質細胞分画の90%以上がLSECであることが確認できた。初代培養LSECにおいて、AM関連遺伝子の発現を検討したところ、AM、及びその受容体であるCRLR、AM受容体活性調節タンパクRAMP2, 3が、極めて強く発現していることを確認した。一方、肝実質細胞(HC)では、AMとその関連因子は、殆ど発現が認められなかった。

次に、AMの外因性投与が、LSECに与える影響の検討を進めた。WST assayによる細胞生存率の評価では、冷傷害モデルにおいて、AM(0.1 μM)処理は、LSECの生存率を有意に改善させた。また内皮細胞の傷害マーカーとして、LSEC培養上清中のAnnexin V陽性のEMP(endothelial micro particle)を、FACSにて評価したところ、AM処理により、LSECからのEMP放出が有意に抑制されることが確認された。

冷処理による臓器傷害には、血球細胞接着に始まる炎症反応も大きく関与している。そこで次に、GFPトランスジェニックマウスより、Buffy coat分画(白血球+血小板分画)を採取し、GFP蛍光を利用して、培養LSECへの接着性を、FACS及び蛍光顕微鏡にて検討した。AMの投与により、白血球のLSECへの接着は有意に抑制された。更にAM投与により、冷処理したLSECのICAM-1, VCAM-1などの炎症関連接着分子の発現は抑制され、TNF-α, IL-1β, IL-6などの炎症性サイトカインの発現も抑制された。

最後に、ドナー肝の冷保存による組織傷害を想定して、マウスを麻酔下で開腹後、門脈からカニューレーションを行い、肝臓をUniversity of Wisconsin solutionで灌流処理後、肝臓を摘出して冷保存(4°C, 30 hr)を行い、病理組織所見の検討を行った。AM及び、RAMP2ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比較して肝臓のアポトーシスの増悪が認められたが、AMを灌流したものでは、アポトーシスが抑制されることが観察された。またAM灌流群では、肝臓の脈管系におけるICAM-1, VCAM-1の発現が抑制されることも観察された。

以上の結果から、AMは、肝臓類洞内皮細胞のアポトーシスや、炎症細胞接着の抑制を介して、臓器保護作用を発揮していると考えられた。肝臓類洞内皮細胞は、移植におけるドナー肝の保護のための治療標的

として重要であり、類洞内皮細胞におけるAMの有効性が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

肝移植の際、ドナー肝を一時的に保存する方法として、University of Wisconsin (UW) solutionを用いた冷処理がとられている。しかしながら、根本的な、虚血再灌流障害の抑制にはなっておらず、移植の適応拡大の可能性を含め、より確実な臓器保護法が期待されている。

以前に、飯沼らのグループは、エンドトキシンショックモデルでアドレノメデュリン(AM)過剰発現マウスが肝障害に対し強い抵抗性を示し、生存率が高いことを報告した。AMの生理活性には抗炎症作用があり、このことが上記の結果に結びついたと思われる。近年、虚血再灌流障害は免疫応答の推移として捉えられ、炎症性サイトカイン、接着分子、自然免疫などが強く関係するとされている。そのことに注目し、AMの肝冷傷害に対する保護的作用を検討した。

まず、肝臓でのAM及びレセプターの発現について確認し、類洞内皮細胞に対する作用を検討した。類洞内皮の冷処理におけるAMの保護的作用を検討し、さらに、炎症性サイトカイン、接着分子の発現を検討した。GFPマウス由来の白血球、血小板を用い、類洞内皮細胞への接着性も検討した。また、肝冷処理でのAM投与の有用性をTUNEL染色、免疫染色を用い検討した。

その結果、飯沼伸佳は次の結果を得た。

1. 肝臓でのアドレノメデュリン及びそのレセプターは類洞内皮細胞を主体とした非実質細胞で発現している。
2. アドレノメデュリンは類洞内皮細胞のアポトーシスを抑制し、冷処理での細胞減少を抑制した。
3. アドレノメデュリンは冷処理によって亢進する類洞内皮細胞での炎症性サイトカイン、接着分子の発現を抑制し、白血球、血小板の接着も抑制した。
4. 肝臓に対する冷処理でもアポトーシスや接着分子の発現を抑制した。

これらの結果より、アドレノメデュリンは肝類洞内皮細胞のアポトーシスや炎症細胞の接着の抑制を介して臓器保護作用を発揮していると考えられた。肝類洞内皮細胞は移植における肝保護のための治療標的として重要であり、肝類洞内皮細胞におけるアドレノメデュリンの有効性が示唆された。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。

Granulomatous transformation of capillary lesions in pulmonary-renal syndrome autologously induced anti-glomerular basement membrane disease in Wistar-Kyoto rats (Wistar-Kyoto ラットにおける抗 GBM 抗体病により惹起される肺腎症候群の毛細血管肉芽腫性病変)

青柳大樹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】肺腎症候群の特徴は毛細血管の障害を原因とする肺出血と急速進行性糸球体腎炎である。Goodpasture 症候群は肺腎症候群の代表的な疾患の一つであり、糸球体および肺胞の基底膜に対する抗体によって引き起こされる。Goodpasture症候群の実験モデルにおいて現在最もよく使用されている WKY ラットは細胞性免疫優位の遺伝的背景を有していると推定されているが、細胞性免疫に伴う肺腎症候群の病理組織学的な変化は十分に解析されていない。本研究の目的は、ラットに肺腎症候群を惹起して、その病理組織学的検討を行い、helper T cell サイトカインの関与について明らかにすることである。

【方法】ウシの腎臓から得られた IV 型コラーゲン NC1 領域を用いて WKY ラットと Wistar ラットを感作した。毎週尿中蛋白量を測定した。5 週間後に、ELISA 法により血清中の抗 NC1 抗体を測定し、腎臓と肺を取り出して光学顕微鏡、免疫組織化学および電子顕微鏡により組織学的検討を行った。さらにラットの腎臓組織を用いた real time RT-PCR 法により、Th1 サイトカインと Th2 サイトカインの mRNA の発現レベルを測定した。

【結果】尿中蛋白量は WKY ラットでは NC1 投与開始から 3 週間後から、Wistar ラットでは 4 週間後から増加した。ELISA 法では WKY ラットと Wistar ラットの血清で同程度の抗 NC1 抗体の上昇がみられた。蛍光抗体法では両ラットともに腎糸球体毛細血管壁、尿細管基底膜および肺胞毛細血管壁に IgG の沈着を認めた。WKY ラットの糸球体では、毛細血管内の細胞集積、毛細血管の破綻、Bowman 嚢腔へのフィブリンの析出等、種々の段階の病変が認められ、86.6 % の糸球体に細胞性ないし細胞線維性半月体の形成を認めた。細胞性半月体の一部はマクロファージ、類上皮細胞、多核巨細胞などの ED1 陽性細胞および少量

の CD8 陽性 T 細胞からなる肉芽腫性病変を形成した。Wistar ラットの糸球体にみられる主たる変化は、管内性の細胞集積とメサンギウム融解で、半月体の形成は 23.0 % の糸球体にとどまった。WKY ラットの肺では巣状の肺出血、単核球の浸潤を伴った肺胞壁の肥厚および肺胞構造の破壊を伴った肉芽腫性病変を認めた。腎臓を用いた real time RT-PCR 法では、より高度な組織傷害がみられた WKY ラットは、Wistar ラットと比較して有意に高い Th2 サイトカイン (IL-10) mRNA の発現を示した。WKY ラットの Th1 サイトカイン (IFN- γ , TNF- α) の mRNA 発現は Wistar ラットと比較して高値を示さなかった。

【結論】本研究の病理組織学的検討により、肺腎症候群の肉芽腫性病変はマクロファージの浸潤が優位な毛細血管炎から進展することが示唆された。免疫組織化学的検討では組織傷害部位に CD8 陽性 T 細胞が観察されたが、CD4 陽性 T 細胞はごくわずかししか認められなかった。CD8 陽性 T 細胞が組織傷害に重要な役割を果たすと報告されているが、我々が観察した CD8 陽性 T 細胞が糸球体傷害を直接引き起こす細胞であるのか、あるいは病変を抑制するのかが不明である。WKY ラットでは Wistar ラットと比較してより高度な腎臓と肺の組織傷害を認め、WKY ラットは Th1 優位の免疫反応性を有しているものと推定されるが、real time RT-PCR 法の結果はこの推定と矛盾するものとなった。肉芽腫性病変を伴う組織傷害が進行中の段階では、Th2 サイトカインは高度な炎症反応を抑制するために増加することが考えられた。あるいはまた、Th2 免疫反応は炎症を抑制するだけでなく、肉芽腫性病変の形成に関与している可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

肺腎症候群の代表的な疾患の一つである Goodpasture 症候群は糸球体および肺胞の基底膜を構成する IV 型コラーゲン NC1 領域の $\alpha 3$ 鎖に対する抗体によって引き起こされる。今回、ウシの腎臓から得られた NC1 領域でラットを感作して肺腎症候群を引き起こし、その病態の解析を行った。

実験では NC1 を投与した Wistar-Kyoto (WKY) ラットの群と Wistar ラットの群および WKY ラットの対照群の 3 群を作成した。毎週蛋白尿測定を行い、NC1 投与開始から 5 週間後、ELISA 法により血清中の抗 NC1 抗体を測定し、腎臓と肺を取り出して病理組織学的検討を行った。さらにラットの腎臓組織を用いた real time RT-PCR 法により、helper T cell サ

イトカインの mRNA の発現レベルを検出した。

その結果、青柳大樹は次の結論を得た。

1. 尿中蛋白量は WKY ラットでは NC1 投与開始から 3 週間後から、Wistar ラットでは 4 週間後から増加した。
2. ELISA 法では WKY ラットと Wistar ラットの血清で同程度の抗 NC1 抗体の上昇がみられた。
3. NC1 を投与された WKY ラットの糸球体では、管内性の細胞集積、毛細血管の破綻、86.6 % の糸球体の細胞性ないし細胞線維性半月体形成等、種々の段階の病変が認められた。細胞性半月体の一部はマクロファージ由来の ED1 陽性細胞主体の肉芽腫性病変を形成した。Wistar ラットの糸球体変化は軽度で、半月体の形成は 23.0 % の糸球体にとどまった。WKY ラットの肺では巣状の肺出血、肺胞壁の肥厚および肺胞構造の破壊を伴った肉芽腫性病変を認めた。
4. Real time RT-PCR 法では、NC1 を投与された WKY ラットは、Wistar ラットと比較して有意に高い Th2 サイトカイン (IL-10) mRNA の発現を示したのに対して、Th1 サイトカイン (IFN- γ , TNF- α) の mRNA 発現は高値を示さなかった。これらの結果より、肺腎症候群の肉芽腫性病変はマクロファージの浸潤が優位な毛細血管炎から進展することが示唆された。WKY ラットは Th1 優位の免疫反応性を有しているものと推定されるが、肉芽腫性病変を伴う組織傷害が進行中の段階では、Th2 サイトカインが高度な炎症反応を抑制するために増加することが考えられた。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。

Cytochrome P450 3As Gene Expression and Testosterone 6 β -Hydroxylase Activity in Human Fetal Membranes and Placenta at Full Term (ヒト卵膜および胎盤における CYP 3As 遺伝子の発現とテストステロン 6 β -水酸化活性)

前 澤 佳代子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Cytochrome P450 (CYP) は、生体内成分と共に医薬品、発癌物質、環境汚染物質など生体外異物の酸化代謝に関与する重要な酵素である。ヒト CYP3A の主要な分子種として CYP3A4, CYP3

A5 および CYP3A7 が知られている。CYP3A4 は、ヒト成人肝における総 CYP 含量の約 30 % を占めると共に、現在市販されている医薬品の半数以上の代謝に関与する最も主要な分子種である。CYP3A5 は遺伝的多型により、発現や活性に顕著な個人差があることが胎児および成人の肝臓で同定されている。また、CYP3A7 は胚、胎児および新生児の肝臓に発現している主要な分子種であり、胎児の肝臓においては総 CYP の 30 % から 50 % を占める。ヒト胎盤の栄養芽層細胞には複数の CYP 分子種が発現しており、その種類と量は妊娠時期と母体の状態に依存して大きく変化することが報告されている。たとえば、胎盤の CYP は出産期よりも妊娠初期においてより多く発現していることが一般的に知られている。これは、妊娠初期から中期の胚形成や器官形成期、すなわち最も催奇形物質に影響を受けやすい時期に異物代謝で重要な CYP の発現が最大となることから、CYP は胎児に対して保護的に働いていると推測されている。このように、ヒト胎盤では薬物動態に影響する因子に関して様々な研究が報告されているが、胎盤と同様胎児由来の組織である卵膜についてはほとんど研究がなされていなかった。近年、薬物排泄型トランスポーターである MDR1/P-gp (multidrug resistance protein 1/P-glycoprotein) と BCRP (breast cancer resistance protein) がヒト卵膜でも発現していることが報告された。しかし、我々の知る限り卵膜における CYP3A 分子種の発現については、これまで mRNA レベルでも研究がなされていない。本研究は、胎児の薬物動態に影響する因子を解明するため、卵膜における CYP3A 分子種の発現と活性を明らかにすることを目的とした。

【方法】 ヒト卵膜 (羊膜・絨毛膜/脱落膜) および胎盤は、同意の得られた正常分娩 (5 名) と帝王切開 (15 名) の産婦から提供された。各組織の CYP3A4, CYP3A5 および CYP3A7 の mRNA 発現は、リアルタイム RT-PCR 法にて解析した。また、タンパク質レベルでの発現解析は、組織ホモジネートを用い、Western blot 法にて行った。さらに、酵素活性は組織ホモジネートを用い、CYP3A のプローブ活性であるテストステロン 6 β -水酸化活性を測定した。なお、本研究は倫理委員会の承認内容を遵守して行った。

【結果】 CYP3A の mRNA 発現は、個体間で著しい差を認めるものの、胎盤だけでなく羊膜や絨毛膜/脱落膜にも発現していることを明らかにした。胎盤の CYP3A4 mRNA 発現は、羊膜と絨毛膜/脱落膜の約

2倍であった。絨毛膜/脱落膜のCYP3A5のmRNAは胎盤の約2-10倍、CYP3A7は胎盤の約3倍という高い発現を示した。また、CYP3A7の抗体と免疫学的に交差性を有するタンパク質が羊膜・絨毛膜/脱落膜および胎盤の全てにおいて検出することができた。その含量は、胎盤と絨毛膜/脱落膜に比べ羊膜で若干少ない傾向が認められた。さらに、各組織ホモジネートのテストステロン6 β -水酸化活性を測定したところ、胎盤(26.6 pmol/hr/mg protein)と比較して羊膜(3.7 pmol/hr/mg protein)および絨毛膜/脱落膜(4.6 pmol/hr/mg protein)の活性は明らかに低いものの、いずれの組織でも活性が認められた。

【考察】今回の研究でCYP3A4、CYP3A5およびCYP3A7は胎盤だけでなく、羊膜や絨毛膜/脱落膜にも発現していることが明らかになった。また、テストステロンの6 β -水酸化活性が検出されたことにより、これら組織のCYP3A分子種は異物の代謝に寄与していることが推察された。以上の結果より、ヒト卵膜にはCYP3A分子種が発現しており、その機能として母体側から胎盤を通して移行する薬物や、子宮を介して羊水へ流入する薬物などの暴露から胎児を防御する役割を担っている可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

Cytochrome P450 (CYP) は、生体内成分と共に医薬品、発癌物質、環境汚染物質など生体外異物の酸化代謝に関与する重要な酵素である。ヒトCYP3Aの主要な分子種としてCYP3A4、CYP3A5およびCYP3A7が知られている。ヒト胎盤の栄養芽層細胞には複数のCYP分子種が発現しており、その種類と量は妊娠時期と母体の状態に依存して大きく変化することが報告されている。しかし、胎盤と同様胎児由来の組織である卵膜についてはほとんど研究がなされていなかった。近年、薬物排泄型トランスポーターがヒト卵膜でも発現していることが報告されたが、CYP3A分子種が発現については、これまでmRNAレベルでも研究がなされていない。本研究は、胎児の薬物動態に影響する因子を解明するため、卵膜におけるCYP3A分子種が発現と活性を明らかにすることを目的として検討を行った。

同意の得られた正常分娩(5名)と帝王切開(15名)の産婦から提供された卵膜(羊膜・絨毛膜/脱落膜)および胎盤を用い、各組織のCYP3A4、CYP3A5およびCYP3A7のmRNA発現は、リアルタイムRT-PCR法にて解析した。また、タンパク質レベルでの発現解

析は、組織ホモジネートを用い、Western blot法にて行った。さらに、酵素活性は、CYP3Aのプロープ活性であるテストステロン6 β -水酸化活性を測定した。

その結果、前澤は次の結論を得た。

1. CYP3AのmRNAは、個体間で著しい差を認めるものの、胎盤だけでなく羊膜や絨毛膜/脱落膜にも発現していることが明らかになった。
2. 胎盤のCYP3A4 mRNA発現は、羊膜と絨毛膜/脱落膜の約2倍であった。絨毛膜/脱落膜のCYP3A5のmRNAは胎盤の約2-10倍、CYP3A7は胎盤の約3倍という高い発現を示した。
3. CYP3A7の抗体と免疫学的に交叉性を有するタンパク質が羊膜・絨毛膜/脱落膜および胎盤の全てにおいて検出できた。
4. 各組織ホモジネートのテストステロン6 β -水酸化活性を測定したところ、胎盤と比較して羊膜および絨毛膜/脱落膜の活性は低いものの、いずれの組織でも活性が認められた。

これらの結果より、胎盤だけでなく、新たに卵膜(羊膜、絨毛膜・脱落膜)でも、mRNAレベルとタンパク質レベルでCYP3Aの存在が示された。また、胎盤、羊膜、絨毛膜・脱落膜、全てにテストステロン6 β -水酸化活性が認められたことにより、発現しているタンパクが、明らかにその機能を有していることが示された。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。

Clinical characteristics of combined pulmonary fibrosis and emphysema (肺線維症合併肺気腫症例の臨床的特徴)

北口良晃

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】肺気腫を引き起こす破壊メカニズムに肺胞中隔の肥厚や線維化は含まれていない。肺気腫と特発性肺線維症を含む特発性間質性肺炎とは、臨床的および病理学的に異なった疾患と考えられている。しかし、肺気腫に肺線維症を合併する症例がしばしば見られ、国内外で報告がなされてきている。本研究は、肺線維症合併肺気腫症例の臨床的特徴を肺気腫型COPDと比較することにより明らかにすることを目的としている。

【方法】2004年10月～2007年6月に信州大学医学部附属病院呼吸器・感染症内科外来を受診し、肺気腫、肺

線維症、肺癌などを疑われ胸部 CT 検査を施行した症例で、CT 上、視覚的評価法による低吸収域が25 %以上の明らかな気腫性病変と、両側肺野に原因不明の肺線維症の所見を認める肺線維症合併肺気腫症例47症例を対象とした。また、2004年10月～2005年6月に同外来を受診し、低吸収域が25 %以上の明らかな気腫性病変を認めるが、肺線維症所見を認めない COPD82症例を対照として、画像所見の解析、呼吸機能検査、6分間歩行試験を行い、肺線維症合併肺気腫症例の臨床的特徴について検討した。

【結果】肺線維症合併型肺気腫患者47人中46人は男性であった。肺線維症合併型肺気腫群において body mass index が有意に高値であった。また傍隔壁型肺気腫が多く見られた。肺線維症の所見は全例下肺野優位に認められ、蜂窩肺、スリガラス影、網状影はそれぞれ75.6 %、62.2 %、84.4 %に見られた。肺線維症合併型肺気腫患者47人中22名 (46.8 %) に肺癌を合併していた。肺癌の組織型については扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、大細胞神経内分泌癌の各種が見られたが、扁平上皮癌が12名 (54.5 %) と最も多く見られた。肺線維症の外科的肺生検により組織学的診断が得られた症例は6例あり、3例が通常型間質性肺炎、3例が非特異的間質性肺炎であった。呼吸機能検査について肺線維症合併型肺気腫群において有意に気流制限の程度は軽く、肺過膨張の所見も乏しく、肺拡散能は低かった。肺線維症合併型肺気腫群において6分間歩行試験後の SpO₂低下がより大きい傾向にあった。

【考察】肺癌合併の頻度について、Nakayama らは COPD の患者の14 %に経過中肺癌を合併したと報告した (*Chest* 2003 ; 123 : 1775-6)。Araki らは特異性肺線維症の患者の剖検例において23 %に肺癌を合併していたと報告した (*Intern. Med.* 2003 ; 42 : 483-9)。本研究において肺線維症合併肺気腫症例の46.4 %に肺癌合併を認めた。このため上記2報告と比較すると肺線維症合併肺気腫症例における肺癌の合併率は高いことが示唆された。肺癌は臨床経過に大いに影響するため厳重な経過観察が必要と考えられた。

肺線維症合併肺気腫症例が一定の割合で存在する以上、肺気腫と肺線維症に共通の発症機序が存在する可能性があると言える。1982年にNiewoehnerらは動物実験で両疾患に共通の特徴があり何らかの原因による肺損傷後の修復期の回復機序において何らかの要因で肺気腫になったり特異性肺線維症になることを報告した (*Science* 1982 ; 217 : 359-60)。肺の炎症や損傷に

対する修復機転の過程においてアポトーシスの誘導、蛋白分解、線維化のいずれが主体であるかによって、生じる病態が異なることを示唆しているのではないかと考えられた。

【結論】肺線維症合併肺気腫は線維化を伴わない肺気腫が優位な COPD とは異なった臨床的特徴を有し、特に肺癌の合併には注意を払うべきと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

肺気腫を引き起こす破壊メカニズムに肺胞中隔の肥厚や線維化は含まれていない。肺気腫と特異性肺線維症を含む特異性間質性肺炎とは、臨床的にも病理学的にも異なった疾患と考えられている。しかし、肺気腫と肺線維症を合併した症例がしばしば見られ、国内外で報告がなされてきており、その臨床的特徴を明らかにする必要があると考えられる。2004年10月～2007年6月に信州大学医学部附属病院呼吸器・感染症内科外来を受診し、肺気腫、肺線維症、肺癌などを疑われ胸部 CT 検査を施行した症例で、視覚的評価法による低吸収域が25 %以上の明らかな気腫性病変と、両側肺野に原因不明の肺線維症の所見を認める肺線維症合併肺気腫症例47症例を対象とした。また、2004年10月～2005年6月に同外来を受診し、低吸収域が25 %以上の明らかな気腫性病変を認めるが、肺線維症所見を認めない肺気腫型 COPD 82症例を対照として、画像所見の解析、呼吸機能検査、6分間歩行試験を行い、COPD と比較した肺線維症合併肺気腫症例の臨床的特徴について検討した。

その結果、北口は次の結論を得た。

1. 肺線維症合併型肺気腫患者47人中46人は男性であった。
2. 肺線維症合併型肺気腫群において body mass index が有意に高値であった。
3. 傍隔壁型肺気腫が多く見られた。
4. 肺線維症の所見は全例下肺野優位に認められ、蜂窩肺、スリガラス影、網状影はそれぞれ75.6 %、62.2 %、84.4 %に見られた。
5. 肺線維症合併型肺気腫患者47人中22名 (46.8 %) は肺癌を合併した。肺癌の組織型については扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、大細胞神経内分泌癌の各種が見られたが、扁平上皮癌が12名 (54.5 %) と最も多く見られた。
6. 肺線維症の外科的肺生検により組織学的診断が得られた症例は6例あり、3例が通常型間質性肺炎、3例が非特異的間質性肺炎であった。

7. 呼吸機能検査について肺線維症合併型肺気腫群において有意に気流制限の程度は軽く、肺過膨張の所見は乏しく、肺拡散能は低かった。肺線維症合併型肺気腫群において6分間歩行試験後のSpO₂低下がより大きい傾向にあった。

これらの結果より、肺線維症合併肺気腫は線維化を伴わない肺気腫が優位なCOPDとは異なった臨床的特徴を有し、特に肺癌の合併には注意を払うべきと考えられた。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。

Rat Bladders Augmented with a Novel Bovine Pericardium-Derived Biomaterial Reconstruct Functional Tissue Structures (ウシ心膜由来生体材料を用いたラット膀胱拡大術における機能的組織の再構築)

三 村 裕 次

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】神経因性膀胱や委縮膀胱などの疾患において、膀胱拡大術が必要となる場合がある。組織再建のためには適切な素材が必要となる。膀胱拡大術の際、一般的には腸管が広く用いられているが、腸管蠕動による尿失禁、電解質異常、結石形成、癌化などの合併症が指摘されている。腸管に代わるものとして、生体臓器を脱細胞化した小腸粘膜下層 small intestinal submucosa (SIS) や膀胱無細胞間質 bladder acellular matrix (BAM) などのコラーゲン性分解性素材が適するとされ、膀胱拡大術に SIS や BAM を利用した研究は多くの報告があるが、日本産ウシの心膜を原材料とした細胞培養基材である CardioDISC™ を膀胱拡大術に利用した研究は見受けられない。本研究では、ヒト血管内皮細胞、マウス血管平滑筋細胞などの培養に使用されおり、生体適合性に優れ、十分な強度を持ち、取り扱いが容易であるという利点を有する CardioDISC™ を膀胱拡大術に利用できないかについて、形態的、機能的に検討した。

【方法】雌性 Sprague Dawley ラット (体重: 337.9 ± 30.2 g) を用いた。①膀胱部分切除後 CardioDISC™ 利用膀胱拡大術群、②膀胱部分切除後 SIS 利用膀胱拡大術群、③膀胱部分切除単独群の3群 (それぞれ n=5) について検討を行った。

セボフルレンによる吸入麻酔下において、ラットの膀胱を約50%部分切除し、7-0非吸収糸にて4箇所を

マーキング縫合した。CardioDISC™ または SIS を切除膀胱と同じ大きさに形成し、7-0吸収糸にて連続縫合。吻合部に漏れがないことを確認して手術を終了とした。

移植前、移植後1, 2, 4, 8週目に、セボフルレンによる吸入麻酔下において、膀胱容量、膀胱コンプライアンスを測定した。4週目、8週目に膀胱を摘出し、平滑筋マーカーである smooth muscle actin (α SMA)、尿路上皮マーカーである uroplakin III (UP III)、神経組織マーカーである S-100 による免疫組織学的解析にて摘出標本を評価した。

【結果】

1. 組織学的検査 (免疫染色法)

A. CardioDISC™ 利用膀胱拡大術群

移植4週目には、拡大膀胱と正常膀胱の境界は明瞭であった。拡大膀胱上の境界部付近に、正常膀胱組織から伸びるような形で α SMA 陽性細胞が認められた。拡大膀胱頂部では、UP III 陽性細胞の下に、 α SMA 陽性細胞が薄い層として認められた。

移植8週目には拡大膀胱と正常膀胱の境界は不明瞭となっていた。拡大膀胱上に α SMA 陽性細胞が認められた。拡大膀胱頂部では、UP III 陽性細胞、 α SMA 陽性細胞が多数認められ、正常膀胱と類似した構造となっていた。

また、4, 8週目の境界部、頂部では、 α SMA 陽性細胞の間に S-100 陽性細胞が認められた。

B. SIS 利用膀胱拡大術群

4, 8週目には、CardioDISC™ 利用膀胱拡大術群とほぼ同様に、拡大膀胱上に α SMA 陽性細胞、UP III 陽性細胞、S-100 陽性細胞が認められた。

2. 膀胱機能検査

A. 膀胱容量

膀胱部分切除単独群において、観察期間中、膀胱容量に変化を認めなかった。SIS 利用膀胱拡大術群において、8週目の膀胱容量は1, 2週目と比較し有意に増加していた。4週目と比較した場合は明らかな増加は認められなかった。CardioDISC™ 利用膀胱拡大術群において、8週目の膀胱容量は1, 2, 4週目と比較して有意な増加を認めた。

B. 膀胱コンプライアンス

SIS 利用膀胱拡大術群、膀胱部分切除単独群において、観察期間中、膀胱コンプライアンスに変化を認めなかった。CardioDISC™ 利用膀胱拡大術群において、8週目の膀胱コンプライアンスは、1, 2, 4週目と

比較して有意な増加を認めた。

【考察、結論】本研究において、CardioDISC™による膀胱拡大術群は、SISによる膀胱拡大術群と同様な組織学的所見が得られた。移植膀胱上に平滑筋組織、尿路上皮組織、神経組織の再構築が認められた。4週目の組織において、境界部周辺で、正常膀胱組織からの平滑筋細胞の進展が確認できており、これらの組織は、拡大術に使用したマテリアル周囲の正常膀胱組織から進展してきたものと考えられた。

CardioDISC™利用膀胱拡大術後8週目に、膀胱容量、膀胱コンプライアンスの増加を認めた。SIS、CD移植群の膀胱容量、膀胱コンプライアンスにおいて差を認めた。SISと比較してCardioDISC™の方がより進展性、強度があり、これらの違いが影響しているのではないかと考えられた。

CardioDISC™は膀胱拡大術の1つの素材として利用できる可能性を持っていると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

神経因性膀胱や委縮膀胱などの疾患において、膀胱拡大術が必要となる場合がある。膀胱拡大術の際、一般的には腸管が広く用いられているが、腸管蠕動による尿失禁、電解質異常、結石形成、癌化などの合併症が指摘されている。日本産ウシの心膜を原材料とした細胞培養基材であるCardioDISC™は、生体適合性に優れ、十分な強度を持ち、取り扱いが容易であるという利点を有する。今回、膀胱拡大術にCardioDISC™を利用できないかについて、形態的、機能的に検討した。

雌性Sprague Dawleyラットを用いた。①膀胱部分切除後CardioDISC™利用膀胱拡大術群、②膀胱部分切除後SIS利用膀胱拡大術群、③膀胱部分切除単独群の3群(それぞれn=5)について検討を行った。

移植前、移植後1, 2, 4, 8週目に、セボフルレンによる吸入麻酔下において、膀胱容量、膀胱コンプライアンスを測定した。4週目、8週目に膀胱を摘出し、平滑筋マーカーであるsmooth muscle actin(α SMA)、尿路上皮マーカーであるuroplakin III(UP III)、神経組織マーカーであるS-100による免疫組織学的解析にて摘出標本を評価した。

その結果、三村裕次は次の結論を得た。

1. CardioDISC™利用膀胱拡大術群において、移植4週目には、拡大膀胱と正常膀胱の境界は明瞭であり、拡大膀胱上の境界部付近に、 α SMA陽性細胞

が認められた。拡大膀胱頂部では、UP III陽性細胞の下に、 α SMA陽性細胞が薄い層として認められた。

2. 移植8週目には拡大膀胱と正常膀胱の境界は不明瞭となっており、拡大膀胱上に α SMA陽性細胞が認められた。拡大膀胱頂部では、UP III陽性細胞、 α SMA陽性細胞が多数認められ、正常膀胱と類似した構造となっていた。
3. 4, 8週目の境界部、頂部では、 α SMA陽性細胞の間にS-100陽性細胞が認められた。
4. CardioDISC™利用膀胱拡大術群において、SIS利用膀胱拡大術群と同様の組織学的所見が認められた。
5. CardioDISC™利用膀胱拡大術群において、8週目の膀胱容量は1, 2, 4週目と比較して有意な増加を認めた。
6. CardioDISC™利用膀胱拡大術群において、8週目の膀胱コンプライアンスは、1, 2, 4週目と比較して有意な増加を認めた。

CardioDISC™による膀胱拡大術群では、移植膀胱上に平滑筋組織、尿路上皮組織、神経組織の再構築を認めた。また、術後8週目において、膀胱容量、膀胱コンプライアンスの増加を認めた。これらの結果より、CardioDISC™は膀胱拡大術の1つの素材として利用できる可能性を持っていると考えられた。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。

A2BP1 as a Novel Susceptible Gene for Primary Biliary Cirrhosis in Japanese Patients (*A2BP1* 遺伝子は日本人PBC患者の疾患感受性と相関する)

城 下 智

(論文の内容の要旨)

【目的】原発性胆汁性肝硬変(PBC)は、中年女性に好発する慢性進行性の胆汁うっ滞性肝疾患であり、抗ミトコンドリア抗体が本疾患特異的に血清中に検出される。また、他の自己免疫性疾患を合併する頻度が高いことからその病態に自己免疫の機序が関与していると考えられる。本研究ではマイクロサテライトマーカーを用いて全染色体を対象とした相関解析を行い、PBC疾患感受性に関与する遺伝子が存在する領域を明らかにし、さらに、これらの領域近傍に位置してい

る遺伝子について一塩基多型 (SNPs) を用いた相関解析をすることにより, PBC 疾患感受性遺伝子を検討することを目的とした。

【方法】PBC 患者126例〔男性15例, 女性111例, 中央値57歳 (範囲30-83歳)〕と健常者95例を対象とした。全染色体を5~10 cM でカバーする400のマイクロサテライトマーカーを用いて相関解析を行った。次に, 疾患感受性を呈した4領域のうち, 統計学的に最も相関の強かったD16S423マーカー近傍27 kb に位置する, *ataxin 2-binding protein 1 (A2BPI)* 遺伝子について, その遺伝子上に存在する7つのSNPs (rs17139207, rs12926282, rs17139244, rs6500742, rs4146812, rs4124065, rs889699) について, TaqMan PCR 法を用いてSNPs解析を行った。

【成績】PBC 患者と健常者を比較したところ11カ所のマーカーで有意差を認めた。患者群で頻度が高いマーカーは1p31, D1S207 ($P_c=0.042$), 12q24.2, D12S86 ($P_c=0.003$), 16p13.3, D16S423 ($P_c=0.002$), 21q21, D21S1256 ($P_c=0.006$) の4カ所であった。一方, 患者群で頻度が低いマーカーは, 1p13, D1S2726 ($P_c=0.047$), 3p14.2, D3S1300 ($P_c=0.013$), 5p13.3, D5S426 ($P_c=0.017$), 10p15, D10S249 ($P_c=0.004$), 14q12, D14S275 ($P_c=0.040$), 20p12, D20S186 ($P_c=0.012$), Xp22.3, DXS1060 ($P_c=0.012$) の7カ所であった。*A2BPI* 遺伝子多型とPBC疾患感受性について, rs17139244のSNPはadditive modelにおいて有意な相関 ($P=0.027$) を認めた。また, rs6500742のSNPはadditive modelにおいて有意な相関 ($P=0.006$) を認め, 遺伝子型頻度においても有意な相関 ($P=0.024$) を認めた。

【考案】*A2BPI* 遺伝子は calcitonin-calcitonin gene-related peptide (CGRP) との関連が報告されている。その亜型の α CGRPは腫瘍壊死因子- α (TNF- α) やインターロイキン (IL) -12産生との関連が示唆され, TNF- α やIL-12の遺伝子多型とPBC疾患感受性が報告されている。以上の報告と今回の我々の成績から, *A2BPI* 遺伝子多型がPBC疾患感受性に関与していることが示唆された。

【結語】*A2BPI* 遺伝子多型はPBC疾患感受性との関連が示唆された。今後, さらにこの遺伝子多型と疾患発症に関する機能解析が必要と考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は, 中年女性に好発

する慢性進行性の胆汁うっ滞性肝疾患であり, 他の自己免疫性疾患を合併する頻度が高いことからその病態に自己免疫的機序が関与していると考えられる。本研究ではPBC患者126例〔男性15例, 女性111例, 中央値57歳 (範囲30-83歳)〕と健常者95例を対象とし, 全染色体を5~10 cM でカバーする400のマイクロサテライトマーカーを用いて相関解析を行い, PBC疾患感受性に関与する遺伝子が存在する領域を明らかにし, さらに, これらの領域近傍に位置している遺伝子について一塩基多型 (SNPs) を用いた相関解析をすることにより, PBC疾患感受性遺伝子を検討した。

その結果, 城下は以下の結論を得た。

1. 患者群で頻度が高いマーカーは, D1S207 ($P_c=0.042$), D12S86 ($P_c=0.003$), D16S423 ($P_c=0.002$), D21S1256 ($P_c=0.006$) の4カ所であった。一方, 患者群で頻度が低いマーカーは, D1S2726 ($P_c=0.047$), D3S1300 ($P_c=0.013$), D5S426 ($P_c=0.017$), D10S249 ($P_c=0.004$), D14S275 ($P_c=0.040$), D20S186 ($P_c=0.012$), DXS1060 ($P_c=0.012$) の7カ所であった。
2. 疾患感受性を示すD16S423マイクロサテライトマーカーとPBCの間に最も強い相関関係を認めた。
3. D16S423マーカーの近傍にある遺伝子を探索し, 候補遺伝子として *ataxin 2-binding protein 1 (A2BPI)* を同定した。
4. *A2BPI* 遺伝子上に存在する7つのSNPs (rs17139207, rs12926282, rs17139244, rs6500742, rs4146812, rs4124065, rs889699) についてSNPs解析を行い, rs17139244のSNPはadditive modelにおいて有意な相関 ($P=0.027$) を認めた。また, rs6500742のSNPはadditive modelにおいて有意な相関 ($P=0.006$) を認め, 遺伝子型頻度においても有意な相関 ($P=0.024$) を認めた。
5. *A2BPI* 遺伝子は calcitonin-calcitonin gene-related peptide (CGRP) との関連が報告されている。その亜型の α CGRPは腫瘍壊死因子- α (TNF- α) やインターロイキン (IL) -12産生との関連が示唆され, TNF- α やIL-12の遺伝子多型とPBC疾患感受性が報告されている。*A2BPI* 遺伝子多型がPBC疾患感受性に関与していることが示唆された。今回の研究は日本人PBC患者において400個のマイクロサテライトマーカーを用い, 全染色体領域の解析を行った最初の研究である。PBC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、PBCの病態や予後の解明、将来的には治療法の開発にもつながると考えられる。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。

Alzheimer-type tau pathology in advanced aged nonhuman primate brains harboring substantial amyloid deposition (高度のアミロイド沈着を伴う超高齢カニクイザル脳におけるアルツハイマー病型タウ病変の形成)

及川 尚人

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】アルツハイマー病脳においては老人斑と神経原線維変化の形成、神経細胞の脱落が主な病理像として観察されているが、その形成機序については明らかにされていない。現在その機序の解析モデルとして当該分子を過剰に産生する遺伝子改変マウスが専ら用いられているが、それらの脳で形成される病理像がヒトの場合と異なる点のあることが確認されている。非遺伝子改変のモデル動物としては、老人斑の形成が確認され病理像がヒトと類似するカニクイザルが注目される。今回、カニクイザル脳におけるアルツハイマー病関連分子であるABとタウ病理の加齢依存的また部位依存的変化について検討を行った。

【材料及び方法】若齢(4歳)から超高齢(36歳)の計34頭のカニクイザルの脳試料について解析を行った。不溶性ABの脳内蓄積についてはトリス緩衝生理食塩水(TBS)不溶性画分を、可溶性ABの脳内存在量についてはTBS可溶性画分を対象にウェスタンブロット法により解析した。タウに関しては可溶性タウのリン酸化状態について、TBS可溶性画分を対象にウェスタンブロット法により解析した。タウの細胞内凝集と神経原線維変化については免疫染色とガリアス銀染色による組織染色により検討した。

【結果】側頭葉皮質と海馬において、24歳齢の個体より不溶性ABが増加し始め、32歳と36歳の超高齢個体において著しい量の不溶性ABが検出された。前頭葉と後頭葉皮質、小脳試料を含めた解析の結果、側頭葉と前頭葉において顕著な不溶性ABの蓄積が観察された。可溶性ABの存在量は、遺伝子改変マウスのそれと比較し極少量であった。可溶性リン酸化タウは19歳齢個体より増加が検出され、より高齢の個体において

リン酸化タウの増加がみられる個体が多数確認された。不溶性AB量とリン酸化タウの増加との間に相関性は確認されなかった。組織染色の結果、神経細胞とオリゴデンドロサイトにおいて、可溶性タウのリン酸化状態に連動したタウの細胞内凝集が観察された。高度の不溶性AB蓄積を伴う超高齢個体においては、神経細胞やグリア細胞、変性神経突起内にガリアス銀染色に陽性の嗜銀性構造物が確認された。また、36歳の個体では、側副溝付近の皮質領域に選択的なタウの細胞内凝集と嗜銀性構造物の形成が観察された。

【結論】カニクイザル脳においてヒト脳と同様の加齢依存的で部位特異的な不溶性ABの蓄積が確認された。リン酸化タウ量の増加も確認されそれと連動した細胞内タウ凝集が確認されたが、不溶性AB量とリン酸化タウの増加との間に相関性は認められなかった。超高齢でかつ高度のアミロイド沈着を伴う個体において神経原線維変化の形成も確認された。加えて、それら病変がヒト脳で最早期にタウ病変が出現する脳領域において選択的に観察されたことから、カニクイザル脳はアルツハイマー病関連分子であるABとタウ各々の病態発症機序だけでなく、両者の形成上の相互依存関係をも追求可能な有用なモデルであると結論した。また、不溶性AB量とリン酸化タウの増加との間に相関性が認められなかったことは、不溶性AB量の増加そのものは直接的にはタウ病変を誘導し得ない可能性を提示しており、ヒト脳における老人斑形成と神経原線維変化との因果関係を考える上での示唆を与えたと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

アルツハイマー病脳においては老人斑と神経原線維変化の形成、神経細胞の脱落が主な病理像として観察されているが、その形成機序については明らかにされていない。現在その機序の解析モデルとして当該分子を過剰に産生する遺伝子改変マウスが専ら用いられているが、それらの脳で形成される病理像がヒトの場合と異なる点のあることが確認されている。非遺伝子改変のモデル動物としては、老人斑の形成が確認され病理像がヒトと類似するカニクイザルが注目される。今回、カニクイザル脳におけるアルツハイマー病関連分子であるABとタウ病理の加齢依存的また部位依存的変化について検討を行った。

若齢(4歳)から超高齢(36歳)の計34頭のカニクイザルの脳試料について解析を行った。不溶性ABの脳内蓄積についてはトリス緩衝生理食塩水(TBS)

不溶性画分を、可溶性 AB の脳内存在量については TBS 可溶性画分を対象にウエスタンブロット法により解析した。タウに関しては可溶性タウのリン酸化状態について、TBS 可溶性画分を対象にウエスタンブロット法により解析した。タウの細胞内凝集と神経原線維変化については免疫染色とガリアス銀染色による組織染色により検討した。

その結果、及川尚人は次の結論を得た。

1. カニクイザル脳においてヒト脳と同様の加齢依存的で部位特異的な不溶性 AB の蓄積が確認された。
2. カニクイザル脳においてはリン酸化タウ量の増加も確認され、それと連動した神経細胞やオリゴデンドログリア細胞体内タウ凝集が確認された。
3. 不溶性 AB 量とリン酸化タウの増加との間に相関性は認められなかった。
4. 超高齢でなおかつ高度のアミロイド沈着を伴う個体において、嗜銀性の神経原線維変化の形成が確認された。
5. それらタウ病変が、ヒト脳で初期にかつ高頻度に出現する脳領域において顕著に観察された。

これらの結果より、カニクイザル脳はアルツハイマー病関連分子である AB とタウ各々の病態発症機序だけでなく、両者の形成上の相互依存関係をも追求可能な有用なモデルであると結論した。また、不溶性 AB 量とリン酸化タウの増加との間に相関性が認められなかったことは、不溶性 AB 量の増加そのものは直接的にはタウ病変を誘導し得ない可能性を提示しており、ヒト脳における老人斑形成と神経原線維変化との因果関係を考える上での示唆を与えたと考えられた。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。

Evaluation of a new method for the diagnosis of alterations of Lens culinaris agglutinin binding of thyroglobulin molecules in thyroid carcinoma (サイログロブリン糖鎖異常の検出による甲状腺癌診断の可能性)

金井 敏 晴

(論文の内容の要旨)

【緒言】甲状腺癌の診断法として、甲状腺超音波検査および穿刺吸引細胞診と血清サイログロブリン (Tg) 測定が有用とされている。しかし Tg は甲状腺全摘術後の再発マーカーとしては有用であるものの、甲状腺

良性疾患でも高値を示すことがあり、現在行われている検出方法では術前の Tg 値による腫瘍の良悪性の鑑別は困難であり、甲状腺癌スクリーニング検査としては不十分である。Tg は分子量33万 kD のサブユニット2つからなる複合体で、複数の糖鎖の存在が知られている。癌化に伴いこの糖鎖に変異を生ずることが知られており、すなわち通常2分枝であるものが3~5分枝となったり、ハイマンノース型から複合型などに変化することが報告されている。今回われわれはこの Tg の糖鎖変異に着目し、糖鎖変異が起きていると推測される甲状腺癌由来の Tg を、レンズ豆レクチン (LCA) との親和性の違いを用いて識別する新しい測定法の構築を試みた。さらに、この方法を利用して、甲状腺疾患罹患患者の血清や、甲状腺腫瘍の穿刺吸引細胞診 (FNA) の際に得られる穿刺針洗浄液中のレクチン親和性 Tg 測定による甲状腺癌診断の可能性を検討した。

【対象および方法】甲状腺疾患手術時に得られた組織検体49例 (甲状腺乳頭癌18例、濾胞癌6例、未分化癌1例、濾胞腺腫11例、腺腫様甲状腺腫7例、パセドウ病6例)、甲状腺疾患罹患患者の血清検体203例 (良性疾患115例、乳頭癌83例、濾胞癌5例)、および甲状腺腫瘍の FNA 検体176例 (良性143例、悪性21例、鑑別困難12例) を対象とした。FNA 検体は、超音波ガイド下に穿刺吸引した内容を細胞診検査用にプレパラートに吹き付けた後の、穿刺針の洗浄液を用いた。

まず手術検体から Tg を抽出しレクチンとの親和性の違いを解析した。さらに、マウスに Tg を免疫することで抗 Tg モノクローナル抗体を作製し、レクチンと組み合わせた ELISA 法による測定系を構築した。

この測定系を用いて、甲状腺疾患罹患患者の血清検体203例、および甲状腺疾患の FNA 時に得られた検体176例を対象に、検体中の全 Tg に対する「LCA 親和性 Tg の比 (%、LCA 親和性 Tg 比)」を算出し、これを用いての良悪性の鑑別が可能かを検討した。

【結果】

(1) LCA を含む4種類のレクチンのそれぞれを用いて解析した結果、LCA において良性疾患由来 Tg と悪性腫瘍由来 Tg 間で親和性に差が出る事が確認された。各組織由来の Tg と LCA の親和性は、悪性腫瘍由来の Tg で低く良性疾患由来の Tg で高い傾向が認められた。

(2) 上記の性質を利用した測定系で血清検体と穿刺液検体を解析したところ、血清検体の LCA 親和性 Tg

比は、良性群と悪性群との間で有意差を認めた ($p < 0.001$)。すなわち悪性群では血清中の LCA 親和性 Tg 比が低く (79.6 ± 6.0)、良性群では高い (84.9 ± 3.5) 結果となった。カットオフ値を 81.8% と定めた場合、良性群での陽性率が 11.3% であるのに対し、悪性群では 61.4% であった。比較対象として現行の方法で両者の血清 Tg 値を測定したが、現行の方法では良性群と悪性群の間に有意差は見られなかった。

(3) 穿刺液検体中の LCA 親和性 Tg 比でも、良性群と悪性群との間に有意差を認めた ($p < 0.001$)。穿刺液検体においても、悪性群では LCA 親和性 Tg 比が低く (75.8 ± 18.9)、良性群では高い (85.6 ± 3.9) 結果となった。また、良性群と鑑別困難群の間にも有意差 ($p < 0.001$) が認められたが、悪性群と鑑別困難群の間では有意差は認められなかった。カットオフ値を 80% と定めた場合、良性群での陽性率 6.3% に対し悪性群での陽性率は 42.9% であった。穿刺液検体中 18 例は同じ腫瘍に対して異時的に 2 回の FNA がされた検体であったが、同一腫瘍での測定値は 2 回の測定でほぼ同じ値が得られ、測定値の再現性が確認された。

【考察】 今回の研究から、LCA は甲状腺で産生される Tg の通常型の糖鎖には結合できるが甲状腺の癌化に伴い変異した Tg の糖鎖には結合できないことが示唆され、甲状腺癌由来の Tg と LCA との親和性の違いを用いることで、血清および FNA 時の穿刺針洗浄液中に含まれる LCA 親和性 Tg 比の値から甲状腺腫瘍の良悪性の鑑別ができる可能性が示唆された。本方法は甲状腺腫瘍の良悪性診断の補助診断法として有用と考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

甲状腺癌の診断法として、甲状腺超音波検査および穿刺吸引細胞診と血清サイログロブリン (Tg) 測定が有用とされている。しかし Tg は甲状腺全摘術後の再発マーカーとしては有用であるものの、甲状腺良性疾患でも高値を示すことがあり、現行の検出方法では Tg 値による腫瘍の良悪性の鑑別は困難である。今回 Tg の糖鎖に着目し、糖鎖変異が起きていると推測される甲状腺癌由来の Tg を、レンズ豆レクチン (LCA) との親和性の違いを用いて識別する新しい測定法の構築を試みた。さらにこの方法を利用して、甲状腺疾患罹患患者の血清や、甲状腺腫瘍の穿刺吸引細胞診 (FNA) の際に得られる穿刺針洗浄液中の LCA 親和性 Tg 測定による甲状腺癌診断の可能性を検討した。

甲状腺疾患手術時に得られた組織検体 49 例、甲状腺

疾患罹患患者の血清検体 203 例、および甲状腺腫瘍の FNA 検体 176 例を対象とした。まず手術検体から Tg を抽出し LCA との親和性の違いを解析した。さらに、マウスを用いて抗 Tg モノクローナル抗体を作製し、LCA と組み合わせた ELISA 法による測定系を構築した。この測定系を用いて、血清検体 203 例、および FNA 時に得られた検体 176 例を対象に、検体中の全 Tg に対する「LCA 親和性 Tg 比」を算出し、これを用いての良悪性の鑑別が可能かを検討した。

その結果、金井は次の結論を得た。

1. 各組織由来の Tg と LCA の親和性は、悪性腫瘍由来の Tg で低く良性疾患由来の Tg で高い傾向が認められた。
2. 血清検体の LCA 親和性 Tg 比は、良性群と悪性群との間で有意差を認めた。すなわち悪性群では血清中の LCA 親和性 Tg 比が低く、良性群では高い結果となった。
3. 穿刺液検体中の LCA 親和性 Tg 比でも、良性群と悪性群との間に有意差を認めた。穿刺液検体においても、悪性群では LCA 親和性 Tg 比が低く、良性群では高い結果となった。また、良性群と鑑別困難群の間にも有意差が認められたが、悪性群と鑑別困難群の間では有意差は認められなかった。穿刺液検体中 18 例は同じ腫瘍に対して異時的に 2 回の FNA がされた検体であったが、同一腫瘍での測定値は 2 回の測定でほぼ同じ値が得られ、測定値の再現性が確認された。

以上より、LCA は Tg の通常型の糖鎖には結合できるが癌化に伴い変異した Tg の糖鎖には結合できないことが示唆され、血清および FNA 時の穿刺針洗浄液中に含まれる LCA 親和性 Tg 比の値から甲状腺腫瘍の良悪性の鑑別ができ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。

μ -Crystallin, New Candidate Protein in Endotoxin-Induced Uveitis (エンドトキシン誘発ぶどう膜炎における新しいミュークリスタリンの機能解析)

今井 弘毅

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 μ -クリスタリンは種特異の水晶体タンパクである。今回我々はマウスエンドトキシン誘発ぶ

どう膜炎における μ -クリスタリンの機能について研究した。

【材料及び方法】 C57BL/6J マウスと C57BL/6J を遺伝子背景にもつ野生型マウス、 μ -クリスタリンノックアウトマウスの足底部にリポポリサッカライドを注射し、エンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデルを作成した。リポポリサッカライド投与後12時間後、1, 3, 5 日目の虹彩毛様体を採取し、ウェスタンブロット法にて μ -クリスタリントタンパクの発現変化を、リアルタイム RT-PCR 法にて mRNA の発現変化を検討した。また1, 3, 5, 7 日目に μ -クリスタリンノックアウトマウスと野生型マウスの前房への浸潤細胞数を比較した。また虹彩毛様体における IL-1 α , IL-6, TNF α , GM-CSF mRNA の発現変化を比較した。

【結果】 μ -クリスタリン mRNA はリポポリサッカライド投与後12時間後に発現が増加し、 μ -クリスタリントタンパクは3日後に発現が増加した。 μ -クリスタリンノックアウトマウスと野生型マウスにリポポリサッカライド投与後1日目の前房への浸潤細胞数に有意差はなかったが、5日目には野生型マウスと比較し、ノックアウトマウスにおいて有意に少なかった。(17.9 \pm 1.6vs.27.1 \pm 2.4cells/section)

また IL-1 α , IL-6 mRNA の5日目の発現が野生型マウスと比較しノックアウトマウスで有意に低かった。

【結論】 μ -クリスタリンはマウスエンドトキシン誘発ぶどう膜炎の後期炎症形成に関与していると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

μ -クリスタリンは有袋類の水晶体の主な構成タンパクであるが、哺乳類において水晶体以外の組織にも発現することが知られている。以前我々はエンドトキシン誘発ぶどう膜炎ラットの虹彩毛様体でマイクロアレイ解析を行い、網羅的に遺伝子の発現変化を調べた。エンドトキシン誘発ぶどう膜炎の発症に関連した因子について検討する中で、クリスタリンファミリーに着目した時に μ -クリスタリン遺伝子の発現だけが著明に増加していることを確認した。今回マウスエンドトキシン誘発ぶどう膜炎モデルの虹彩毛様体に発現する μ -クリスタリンの機能について検討した。

C57BL/6J の8-10週齢雄マウスの足底部にリポポリサッカライド140 μ g を注射し、エンドトキシン誘発ぶどう膜炎を惹起した。虹彩毛様体を採取しウェスタンブロット法により0, 1, 3, 5日目の μ -クリスタリン

の発現、リアルタイム PCR 法により0, 12時間後、1, 2, 3, 5日目の μ -クリスタリン mRNA の発現を解析した。

C57BL/6J 遺伝子背景の μ -クリスタリンノックアウトマウス8-10週齢、雄の同腹の野生型マウス、ノックアウトマウスにエンドトキシン誘発ぶどう膜炎を発症させて、1, 3, 5, 7日目の前房内へ滲出した炎症細胞数を比較した。採取した mRNA より、炎症性サイトカインである IL-1 α , IL-6, GM-CSF, TNF- α の5日目の発現レベルを測定して比較した。

1. マウスエンドトキシン誘発ぶどう膜炎の虹彩毛様体において μ -クリスタリン mRNA, タンパクの発現が増加していた。
2. リポポリサッカライド投与後5日目に野生型マウスと比較し、 μ -クリスタリンノックアウトマウスでは有意に炎症細胞の滲出が抑えられていた。
3. IL-1 α , IL-6 mRNA の発現レベルが野生型マウスと比較し μ -クリスタリンノックアウトマウスで有意に少なかった。

これらの結果より、 μ -クリスタリンはエンドトキシン誘発ぶどう膜炎における眼内炎症発症に関与していると考えられた。しかし μ -クリスタリンノックアウトマウスで早期の炎症は抑えられておらず、好中球主体の病初期炎症ではなく、主にマクロファージが関与する後期炎症の形成に関わっ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。

A Large Cohort Study Of *GJB2* Mutations In Japanese Hearing Loss Patients (日本人難聴患者における *GJB2* 遺伝子変異の大規模研究)

塚 田 景 大

(論文の内容の要旨)

【研究目的】 *GJB2* 遺伝子変異は、遺伝性難聴の中で最も頻度が高く、先天性難聴の原因としても非常に大きな位置を占めると考えられている。現在全世界で100種類以上の *GJB2* 遺伝子変異が報告されており、変異の頻度および種類の分布は人種によって大きく異なっていることが広く知られている。また、これらの多彩な遺伝子型と表現型の間にはある一定の関係性があると考えられており、今回、我々は日本人における *GJB2* 遺伝子変異の頻度およびこれらの変異をもつ症例に関

する臨床像について大規模調査により検討を行った。
【対象と方法】日本人難聴患者1511家系(3056例)に対して直接シーケンス法により *GJB2* 遺伝子変異スクリーニングを行い、遺伝子変異の頻度検索および変異症例における臨床像(聴力レベル、聴力の進行性、めまい、耳鳴、内耳奇形の有無)について検討を行った。

【結果】難聴家系発端者1511名のうち両側感音難聴患者1,343例について *GJB2* 遺伝子変異頻度を検討したところ、191例(14.2%)に遺伝子変異を認めた。難聴の発見年齢別(0~3歳, 4~5歳, 6歳~)で検討したところ、0~3歳の難聴患者の25.7%(108/420)で遺伝子変異を認めた。また、遺伝子変異の種類は26種類発見され、その中でも235delC変異の頻度が最も多く、次いでV37I, G45E/Y136X, R143W, 176-191 del16bp変異の順に多く認められた。同様に発症年齢別に検討した場合、0~3歳では235delCが58.5%と高く発見年齢が高くなるほどその頻度は減少を認めた。一方、V37Iは発見年齢が高くなるほど頻度は上昇し、V37Iは発見年齢が遅れる可能性が示唆された。日本人において235delCを持つ遺伝子型が高い頻度で認め、また、この遺伝子を持つ表現型は高度難聴になる傾向を認めた。しかし、V37IとR143Wをもう一方のアレルに持つ場合、それぞれ軽度難聴またはより高度難聴になる傾向を認め、遺伝子型と表現型にある程度傾向があることが確認された。2年以上聴力検査上経過観察ができた26例のうち両側性に進行を認めた症例は2例のみで *GJB2* 遺伝子変異による難聴は進行性を認めない可能性が考えられ、また、めまい、耳鳴、内耳奇形は両側感音難聴全体と比較し有意に頻度が低かった。

【考察】先天性または言語獲得前難聴の難聴患者の約25%に *GJB2* 変異が認められ、日本人先天性難聴患者の重要な原因の一つであることが再確認された。東アジア領域では235delC変異の頻度が最も高いと報告されており、今回、日本人においても同様に235delC変異の頻度が最も高かった。聴力像の検討では、遺伝子型と表現型に相関関係が認められ、遺伝子検査は難聴患者の聴力を予測する上で有用であると考えられた。V37I変異は軽度難聴で進行性も認めないと考えられるため、本来は先天性難聴と考えられるが、難聴が軽度であるため難聴の発見が遅れる可能性が示唆された。また、V37I変異症例は日本人における *GJB2* 遺伝子変異の中でも2番目に多い変異だが、対照(正常聴力)

群では最も頻度が高い変異である結果が得られた。これはV37I変異症例が軽度難聴および非進行性の特徴を有しているために、患者が病院を受診しないもしくは診療医が遺伝子検査まで患者に勧めない可能性があることが考えられた。*GJB2*変異症例では、耳鳴、めまい、内耳奇形の頻度が両側感音難聴患者と比較し有意に低く、*GJB2*変異による難聴の臨床的特徴と考えられた。

【結論】今回の大規模研究により日本人における *GJB2* 遺伝子変異の頻度および臨床像がより明確となり、この遺伝子変異を持つ患者への詳細な情報提供が可能となったと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

先天性難聴は1,000人に1人の割合で発症し、少なくとも半数は遺伝性難聴であると考えられている。そのなかでも *GJB2* 遺伝子変異は遺伝性難聴のなかで最も頻度が高く、先天性難聴の原因として重要な位置づけにあることは広く知られている。

本論文において塚田景大は、多施設、大規模調査により日本人における *GJB2* 遺伝子変異の頻度調査および臨床像の検討を行った。頻度調査を行った結果、両側感音難聴患者1,343例のうち191例(14.2%)に遺伝子変異を認めた。難聴の発見年齢別(0~3歳, 4~5歳, 6歳~)で検討を行ったところ、特に0~3歳の難聴患者では25.7%(108/420)と高率に遺伝子変異を認め、*GJB2* 遺伝子変異は言語獲得前または先天性難聴の原因として重要な位置づけにあることが確認された。また、遺伝子変異の種類を検討したところ日本人では多型を含め26種類発見され、その中でも235delC変異の頻度が最も多く、次いでV37I, G45E/Y136X, R143W, 176-191 del16bp変異の順に多く認められた。同様に発見年齢別に検討した場合、0~3歳では235delCが58.5%と高く発見年齢が高くなるほどその頻度は減少を認めた。一方、V37Iは発見年齢が高くなるほど頻度は上昇し、V37I症例は難聴の発見が遅れる可能性が示唆された。日本人において235delCを持つ遺伝子型が高い頻度で認め、この遺伝子を持つ表現型は高度難聴になる傾向を認めた。さらに、V37IまたはR143Wをもう一方のアレルに持つ場合、それぞれ軽度難聴またはより高度難聴になる傾向を認め、遺伝子型と聴力の表現型の間には傾向性があることが確認された。進行性について検討を行った結果、2年以上聴力検査上経過観察ができた26例のうち両側性に進行を認めた症例は2例のみで *GJB2*

遺伝子変異による難聴は進行性を認めない可能性が考えられ、また、臨床像の検討では、めまい、耳鳴、内耳奇形いづれも両側感音難聴全体と比較し有意に頻度が低く *GJB2* 遺伝子変異症例の臨床的特徴と考えられた。

本論文は、*GJB2* 遺伝子変異をもつ難聴患者およびその家族に情報提供を行う上で非常に重要な情報を得られたと考えられる。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。

Potential of TLR9 responses for human naïve B-cell growth through RP105 signaling (RP105シグナルは TLR9と相乗的にヒト ナイーブ細胞の増殖を促進する)

山崎 和子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 B細胞は自然免疫と獲得免疫をつなぐ重要な役割を担っているが、B細胞自体の自然免疫における機能は十分に解明されていない。B細胞には Toll like receptor (TLR) 9, 10が強発現し、このうち TLR9シグナルはB細胞のクラススイッチや形質細胞分化を誘導し、病原体による初期の感染防御に重要である。TLR9シグナルはメモリーB細胞を直接活性化し作用するが、ナイーブB細胞においては付加的なシグナルが必要であるといわれている。本研究ではB細胞に特異的に発現している RP105 (CD180) シグナルの TLR9シグナルに対する作用について検討した。

【方法】 健常成人末梢血よりB細胞を分離し、抗 CD27抗体付着magnetic micro-beadsを用いてCD27⁺メモリーB細胞と CD27⁻ナイーブB細胞に分画した。メモリーB細胞とナイーブB細胞を黄色ブドウ球菌 Cowan strain (SAC), 抗 CD40抗体, TLR9のリガンドである CpG DNA などの刺激に抗 RP105抗体を加えて培養し、RP105および TLR9の発現、細胞増殖、個々の細胞のサイズ、生存細胞数、免疫グロブリン産生、形質細胞分化誘導などについて検討した。更にメモリーB細胞がなく、ナイーブB細胞のみで構成されている分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency : CVID) 患者3名の末梢血B細胞について同様の検討を行った。

【結果】 CD27⁺メモリーB細胞と CD27⁻ナイーブB細胞ともに無刺激の状態では細胞表面に RP105の発現が

見られ、刺激で発現が2倍に上昇した。メモリーB細胞では、抗 RP105抗体を加えても増殖増強効果は見られなかったが、ナイーブB細胞では特に CpG DNA に抗 RP105抗体加えたところ、著明な増殖が認められた。細胞表面および細胞内 TLR9の発現は、ナイーブB細胞、メモリーB細胞ともに RP105刺激で増強した。生存細胞数を解析したところ、CpG DNA に抗 RP105抗体を加えるとナイーブB細胞の生存細胞数が有意に増加していた。細胞増殖と生存に関係する Akt のリン酸化と NF κ B の活性化を検討したところ、CpG DNA と抗 RP105抗体の刺激で Akt のリン酸化が増強した。CpG DNAおよび抗RP105抗体によって細胞質内では I κ B α がdegradationを起こし、RelA, p50 の NF κ B の核内移行がみられた。さらに CpG DNA と抗 RP105抗体の刺激では I κ B α の degradation が遷延した。TLR9シグナルは免疫グロブリン産生とナイーブB細胞の形質細胞分化を誘導するが、抗 RP105抗体刺激はその作用には影響を与えなかった。しかし IL-21を添加することで、ナイーブB細胞の形質細胞分化作用と免疫グロブリン産生が増強し、ナイーブB細胞から肺炎球菌特異抗体の産生がみられた。CVID 患者末梢血B細胞においても同様に抗 RP105抗体刺激で TLR9発現が増加し、TLR9による細胞増殖、生存が増強した。IL-21の添加によって CVID B細胞からの肺炎球菌特異 IgM の産生がみられた。

【結論】 RP105シグナルは TLR9と相乗的に作用してナイーブB細胞の増殖と生存を促した。この作用には RP105シグナルによる TLR9発現の増強と Akt-NF κ B 経路の活性化が関係していた。RP105シグナルは TLR9シグナルの免疫グロブリン産生作用には影響を与えなかったが、IL-21を加えることで、ナイーブB細胞の形質細胞分化誘導と抗体産生が増強された。成人ナイーブB細胞、臍帯血B細胞、CVID 患者B細胞はこれらの混合刺激によって肺炎球菌特異 IgM 抗体を産生した。ナイーブB細胞、CVID 患者B細胞は、細菌などの病原体の侵入に際し、germ-line encoded の抗体を産生し、急性期の感染防御を行っている可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

B細胞は自然免疫と獲得免疫をつなぐ重要な役割を担っているが、B細胞自体の自然免疫における機能は十分に解明されていない。B細胞には Toll like receptor (TLR) 9, 10が強発現し、このうち TLR9シグナルはB細胞のクラススイッチや形質細胞分化を誘

導し、病原体による初期の感染防御に重要である。TLR9シグナルはメモリーB細胞を直接活性化し作用するが、ナイーブB細胞においては付加的なシグナルが必要であるといわれている。本研究ではB細胞に特異的に発現しているRP105 (CD180) シグナルのTLR9シグナルに対する作用について検討した。

健康成人末梢血よりB細胞を分離し、抗CD27抗体付着magnetic micro-beadsを用いてCD27⁺メモリーB細胞とCD27⁻ナイーブB細胞に分画した。メモリーB細胞とナイーブB細胞を、黄色ブドウ球菌 Cowan strain (SAC), 抗CD40抗体, TLR9のリガンドであるCpG DNAなどの刺激に抗RP105抗体を加えて培養し、RP105およびTLR9の発現, 細胞増殖, 個々の細胞のサイズ, 生存細胞数, 免疫グロブリン産生, 形質細胞分化誘導などについて検討した。更にメモリーB細胞がなく, ナイーブB細胞のみで構成されている分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency: CVID) 患者3名の末梢血B細胞について同様の検討を行った。

その結果, 山崎は次の結論を得た。

- 1) RP105シグナルはTLR9と相乗的に作用してナイーブB細胞の増殖と生存を促した。
- 2) この作用にはRP105シグナルによるTLR9発現の増強とAkt-NF κ B経路の活性化が関係していた。
- 3) RP105シグナルはTLR9シグナルの免疫グロブリン産生作用には影響を与えなかったが, IL-21を加えることで, ナイーブB細胞の形質細胞分化誘導と抗体産生が増強された。成人ナイーブB細胞, 臍帯血B細胞はこれらの混合刺激によって肺炎球菌特異IgM抗体を産生した。
- 4) CVID患者B細胞においてもTLR9シグナルとRP105シグナルは相乗的に作用し, CVID B細胞の増殖, 生存が促された。IL-21の添加によってCVID B細胞からの肺炎球菌IgM抗体の産生がみられた。CVIDはB細胞が欠損する無 γ グロブリン血症に比し症状が軽い傾向があるが, この臨床上の重症度の差はナイーブB細胞の自然免疫による直接的な感染防御機構が役立っていると思われる。ナイーブB細胞の維持は重要である。RP105シグナルはTLR9シグナルと相乗的に作用してナイーブB細胞の増殖と生存を促し, ナイーブB細胞の維持に役立っている可能性がある。また, このような自然免疫刺激にIL-21を加えることによって成人ナイーブB細胞, 臍帯血B細胞, CVID患者B細胞は肺炎球菌特異抗体を産生した。ナイーブ

B細胞, CVID患者B細胞は, 細菌などの病原体の侵入に際し, germ-line encodedの抗体を産生し, 急性期の感染防御を行っていることが示唆された。

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。

Liquid-based thin-layer cytology can be routinely used in samples obtained via fiberoptic bronchoscope (液状固定による薄層塗抹細胞診法は気管支鏡で得られた検体に使用可能)

小林 幸 弘

(論文の内容の要旨)

【目的】 Liquid-based cytology (LBC) を用いたThinlayer法は婦人科腔部細胞診の見落としを防止する目的のために米国で開発された標本作製法であり, 採取された全ての細胞を専用固定保存液で固定後に薄層塗抹する方法である。従来法に比べて①乾燥変性がない, ②血性背景の影響を受けない, ③塗抹範囲が狭いため鏡検時間が短縮, ④同質かつ複数枚の標本作製が可能など様々な利点がある。一方, 気管支鏡検査において細胞診は組織診と共に腫瘍性病変の鑑別に有用である。採取材料としては擦過 (brush) が最も多く, 組織片が採取出来ない場合は経気管支的穿刺吸引 (TBNA) のみで診断を決定しなければいけない場合もある。しかし検体量過少による乾燥変性や, 出血による血性背景のために診断に至らないことも少なくない。そこで我々はThinlayer法に着目し, 気管支鏡検体に応用可能かどうかを検討した。

【対象】 信州大学医学部附属病院にて2006年1月~2007年9月の期間に気管支鏡検査を施行された62患者114件のbrush材料, および33患者34件のTBNA材料を用いて検討した。

【方法】 ①従来法にて作製されたbrush材料, およびTBNA材料についてPapanicolaou (Pap.) 染色を行い, この標本をconventional smear (CS) slideとした。②従来法で処理した後の器具をCytoRich REDにて洗浄・固定し, これをLBCとした。③LBCを用いThinlayer法 (TriPath社のSurePath法) によって標本作製しPap.染色を行い, この標本をLBP slideとした。④LBP slideとCS slideについて診断一致率の他, 細胞量, 細胞形態 (収縮, 染色性, 乾燥変性), 標本背景 (炎症細胞, 赤血球, アーチファクト) 等の

比較検討を行った。比較方法は各項目ごとに1～4段階（数字が大きいほど診断に有益）のカテゴリーを設けて評価し客観性をもたせた。

【結果】疑陽性も悪性とみなした場合のLBP slideとCS slideとの診断一致率はbrushにおいては98.4%、TBNAにおいては100%であった。brushおよびTBNA共に組織型においてもLBP slideはCS slide、あるいは生検や手術材料による組織診と殆ど一致していた。brushおよびTBNA共に細胞量はCS slideに比べLBP slideの方が少なかったが評価には十分な量であった。LBP slideは形態学的に細胞質や核が収縮したり、染色性において核の濃縮が見られるが、診断に支障はなかった。またCS slideでは診断の弊害となる乾燥変性や血性背景が多く症例で見られたが、LBP slideでは認められなかった。炎症細胞や壊死については多い少ないの差はあるが両標本間で見られた。アーチファクトについては特にTBNAではLBP slideにおいては全く見られなかった。

【考察】LBP slideはCS slideに比べて細胞同定上の弊害はなく、むしろ従来障害となっていた乾燥変性や血性背景の問題が解消された。さらに免疫細胞学的染色も利用可能であり、特に今回TBNAにおいてSynaptophysin染色が大細胞神経内分泌癌の診断に有用となった症例もあった。このことは特にTBNA材料のみで生検組織採取が困難な症例の時に診断価値が高い。以上より気管支鏡細胞診（brushやTBNA材料）においてLBP slideはCS slideに比べて極めて有益と考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

Liquid-based cytology (LBC) を利用した Thin-layer 法による LBP 標本は婦人科において既にある程度普及している。その特徴は直径13 mm の円形に均一に塗抹され鏡検時間の大幅な短縮が可能、採取された全ての細胞を回収可能、細胞集塊の重なりが少ない、乾燥変性がない、標本作製において標準化が可能といった利点がある。本研究ではその利点を生かして従来法では様々な問題があった気管支鏡検体（brush および TBNA）において利用可能かどうかを検討した。

1. 従来法に対する診断一致率はsuspiciousもmalignantとみなした場合、brushで98.4%、TBNAで100%と良好な成績であった。
2. 従来法に比べ、形態学的には一部で細胞収縮、染色性の低下傾向を認めたが細胞同呈上は大きな支障

はなかった。中には核小体の明瞭化が見られ、悪性所見が強調された症例もあった。

3. 従来法で見られた幾つかの欠点が解消され、診断に有用な標本が得られた（乾燥変性、血性背景、stick likeを示すアーチファクトの消失）。
4. 形態学的検索以外にも免疫細胞化学的染色に応用可能（大細胞神経内分泌癌の診断のための神経内分泌系マーカーの検索において有効）であった。
5. Thinlayer 法による LBP 標本は従来標本に比べて鏡検時間の短縮にもなり細胞検査士の疲労回避や業務軽減によるコスト削減が期待できる。

これらの結果より、LBP 標本は従来標本に比べて形態学的にも遜色がなくかつ標本作製上生じる様々な欠点も解消され、気管支鏡検体に利用可能と結論付けられる。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。

Nonalcoholic fatty liver disease in Japanese junior high school students: its prevalence and relationship to lifestyle habits（日本の中学生における非アルコール性脂肪肝疾患：その有病率と生活習慣との関係）

鶴田 悟 郎

（論文の内容の要旨）

【背景と目的】小児期より脂肪肝がみられ、それは肥満度と強い相関があるという報告は以前よりみられる。

すでに肝硬変にまで至っていた症例の報告もみられるが、脂肪肝から非アルコール性脂肪肝炎 NASH に至る原因は未だ全てが明らかではなく、小児肥満は年々増加しており、小児脂肪肝の早期発見・治療は大変重要な問題である。

本研究では中学生における脂肪肝の有病率、また生活習慣との関連について調査を行った。

【対象と方法】2004年と2007年の2回、中学生計537名に対し、体格の評価、血液検査、超音波検査による脂肪肝の診断を行った。超音波検査では肝腎コントラスト、深部エコー減衰、肝内脈管の不明瞭化の3項目をスコア化し脂肪肝の程度を評価した。2007年には食習慣と運動習慣についてアンケートを用いて調査し、脂肪肝との関連について検討を行った。

【結果】中学生全体の約2割の生徒が太りぎみ、もしくは肥満の体格であった。脂肪肝を認めた生徒は2004年では全体の4.4%、2007年で4.5%であった。体格

によって3群に分けそれぞれで脂肪肝の割合を比較したところ、痩せから適正体重の群の約1%に軽度の脂肪肝を認めた。2007年の太りぎみの群の12%にやはり軽度の脂肪肝を認めた。肥満の群の約3割が脂肪肝であり、中等度から重度の脂肪肝は全てこの群に含まれた。脂肪肝の有無で2群に分け比較を行ったところ、脂肪肝がある群で男子が有意に多く、肥満の体格が多かった。また生化学検査ではALT・ γ GT、中性脂肪は有意に高く、HDL-Cは有意に低かった。脂肪肝の程度により、脂肪肝を認めない・軽度の脂肪肝・中等度から重度の脂肪肝の3群に分け比較を行ったところ、脂肪肝の程度は肥満の程度と相関があり、また脂肪肝の程度が強いほどALT、 γ GT、中性脂肪は有意に高値であり、逆にHDL-Cは低値であった。肥満であることと、ALT30U/L以上であることが独立予測因子であることが証明され、学校健診にALTの項目を加えることは脂肪肝の早期発見に有用であることが示唆された。

脂肪肝の有無で2群に分け生活習慣との関連を検討したところ、食習慣では「朝の欠食が週に2回以上ある」と、「麺類の汁を半分以上飲む」に、運動習慣では運動量の減少と脂肪肝との間に有意な相関がみられた。

【考察】本研究は日本人中学生における脂肪肝の有病率と臨床的特徴、さらに脂肪肝と生活習慣との関連を検討した初めての疫学的研究である。中学生の約4%に脂肪肝が認められ、肥満と運動量の減少に相関があることが証明された。

肥満とALT 30U/L以上が脂肪肝の独立予測因子と証明され、また脂肪肝の程度とも有意な相関が認められることより、ALTの測定を学校健診に取り入れることで早期の脂肪肝の発見に有用である可能性が示唆された。また運動量の減少、朝の欠食と脂肪肝との関連も認められ、それらを改善する指導が小児の脂肪肝を予防することにつながる可能性もあわせて示唆された。相当数の小児肥満が成人肥満に移行すると考えられ、小児期の肥満と脂肪肝への適切な介入は成人期の脂肪肝の有病率低下につながるかもしれない。しかし一方ではっきりとした症状がないうちは、脂肪肝の治療の重要性を理解してもらうことは本人にとっても家族にとっても困難であることも予想される。

医療と地域社会とが連携し、生活習慣病予防と脂肪肝のスクリーニングを行っていく必要があると考える。

(論文審査の結果の要旨)

小児期より脂肪肝がみられ、それは肥満度と強い相関があるという報告は以前よりみられる。

すでに線維化や肝硬変にまで至っていた症例の報告もみられるが、脂肪肝から非アルコール性脂肪肝炎NASHに至る原因は未だ全てが明らかではなく、小児肥満は年々増加しており、小児脂肪肝の早期発見・治療は大変重要な問題である。本研究では中学生における脂肪肝の有病率、また生活習慣との関連について調査を行った。

2004年と2007年の2回、中学生計537名に対し、体格の評価、血液検査、超音波検査による脂肪肝の診断を行った。超音波検査では肝腎コントラスト、深部エコー減衰、肝内脈管の不明瞭化の3項目をスコア化し脂肪肝の程度を評価した。2007年には食習慣と運動習慣についてアンケートを用いて調査し、脂肪肝との関連について検討を行った。

その結果、鶴田は次の結論を得た。

1. 中学生全体の約2割の生徒が太りぎみ、もしくは肥満の体格であった。
2. 脂肪肝を認めた生徒は2004年では全体の4.4%、2007年では4.5%であった。
3. 痩せから適正体重の群の約1%に軽度の脂肪肝を、2007年の太りぎみの群の12%に軽度の脂肪肝を、また肥満の群の約3割に脂肪肝を認めた。中等度から重度の脂肪肝は全て肥満の群に含まれた。
4. 脂肪肝がある群には男子が有意に多く、肥満の体格が多かった。また生化学検査ではALT・ γ GT、中性脂肪は有意に高く、HDL-Cは有意に低かった。
5. 脂肪肝の程度は肥満の程度と相関があり、また脂肪肝の程度が強いほどALT、 γ GT、中性脂肪は有意に高値であり、逆にHDL-Cは低値であった。肥満であることと、ALTが30U/L以上であることが脂肪肝の独立予測因子であった。
6. 食習慣については「朝の欠食が週に2回以上ある」と、「麺類の汁を半分以上飲む」に、運動習慣については運動量の減少が、脂肪肝と有意な関連があった。

これらの結果より、中学生の約4%に脂肪肝を認め、肥満と運動量の減少との関連が証明され、学校健診にALT検査を追加することは早期の脂肪肝の発見に有用であ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。

Mouse model to study human $A\beta_2M$ amyloidosis: Generation of a transgenic mouse with excessive expression of human β_2 -microglobulin (ヒト透析アミロイドーシス研究のためのモデルマウス: ヒト β_2 ミクログロブリン過剰発現トランスジェニックマウスの作製)

張 鵬 堯

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】長期透析患者では、 β_2 -ミクログロブリン (β_2m) がアミロイド線維 ($A\beta_2M$) を形成・沈着し、全身関節症状を主症状とする透析アミロイドーシス (dialysis-related amyloidosis: DRA) が重篤な合併症である。最近の生化学的・タンパク質化学的解析の急速な進展にかかわらず、DRA患者におけるアミロイドーシス発症の機序はほとんど解明されていない。その原因の1つは有用なモデル動物が存在しないことである。DRA患者における $A\beta_2M$ アミロイド線維の形成と病態発症機構の解明のためにヒト β_2m を過剰発現し、アミロイド線維を形成しないとされるマウス内在性 β_2m を欠失したモデルマウス ($hB2MTg^{+/+}mB2m^{-/-}$) を作成し、アミロイドーシスの発症を解析した。

【方法】CAG (cytomegalovirus immediate early gene enhancer /chicken β -actin promoter and rabbit β -globin poly (A) signal) プロモーターの下流にヒト β_2m cDNA を持つコンストラクトを、C57BL/6マウス受精卵に投与し、Tgマウスを作製した。さらに β_2m ノックアウトマウスと交配し、ヒト β_2m のみを発現する交雑マウスを作製した ($hB2MTg^{+/+}mB2m^{-/-}$)。自然発症アミロイド沈着の他に、①試験管内でリコンビナントヒト β_2m から作成した $A\beta_2M$ アミロイド線維、②DRA患者組織から抽出した $A\beta_2M$ アミロイド線維、③マウス肝臓から抽出したマウス老化アミロイド線維 (AApoA II)、をTgマウスに投与してアミロイドーシスの誘発を行い、アミロイド沈着を調べた。アミロイド沈着と沈着線維の同定は、組織切片のコング赤染色後の偏光顕微鏡による観察と、ヒト β_2m 及びマウス apoA-II抗体を用いた免疫組織染色を行った。

【結果と考察】 $hB2MTg^{+/+}mB2m^{-/-}$ マウスは全身臓器でヒト β_2m を発現し、血漿中 β_2m 濃度は193mg/

Lに達し、透析患者の4倍以上であった。24カ月齢のTgマウスでアミロイド沈着を認めたが、 $A\beta_2M$ アミロイド沈着は観察されず、AApoA IIアミロイドの沈着であった。患者組織から抽出した $A\beta_2M$ 線維やAApoA II線維を投与したマウスでは、アミロイド線維を投与しなかったマウスや試験管内で合成した $A\beta_2M$ 線維を投与したマウスよりアミロイド沈着程度は重篤であったが、やはり $A\beta_2M$ アミロイド沈着は観察されず、AApoA IIアミロイド沈着のみが認められた。特に、DRAの主要な沈着部位である椎間板及び膝関節にもアミロイド沈着を観察したが、AApoA IIアミロイドの沈着であった。正常マウスでは血中 β_2m の濃度は非常に高いが、マウス β_2m はタンパク質構造的にアミロイド線維を形成し難いため、アミロイド沈着が起こらないと考えられてきた。そこでマウス β_2m 遺伝子のノックアウトマウスとヒト β_2m Tgマウスを交雑してヒト β_2m のみを高発現するマウスを作製したが、マウスの寿命である2年齢以上のマウスでも $A\beta_2M$ アミロイド沈着は観察できなかった。また試験管内での $A\beta_2M$ アミロイド線維形成では核形成依存性線維伸張反応 (seeding) が基本的反応モデルとして実証されているが、Tgマウスにアミロイド線維を投与しても $A\beta_2M$ アミロイド沈着を誘発できず、cross-seedingによってAApoA IIアミロイドの沈着が引き起こされた。これらの結果は血中 $h\beta_2m$ 濃度の上昇と seeding 効果だけではアミロイド沈着を誘発できないことを示唆している。

【結論】血清中 β_2m 濃度の上昇を示すTgマウス ($hB2MTg^{+/+}mB2m^{-/-}$) を作成して、アミロイドーシスの発症を解析した結果、持続的高 β_2m 濃度とアミロイド線維による seeding 効果は、アミロイド線維形成に十分ではないことが明らかになった。このモデルマウスはDRA発症に必要な他の要因を解析するためにも有用なモデル動物である。

(論文審査の結果の要旨)

長期透析患者では、 β_2 -ミクログロブリン (β_2m) がアミロイド線維 ($A\beta_2M$) を形成・沈着し、全身関節症状を主症状とする透析アミロイドーシス (dialysis-related amyloidosis: DRA) が重篤な合併症であるが、アミロイドーシス発症の機序はほとんど解明されていない。DRA患者における $A\beta_2M$ アミロイド線維の形成と病態発症機構の解明のためにヒト β_2m を過剰発現し、アミロイド線維を形成しないとされるマウス内在性 β_2m を欠失したモデルマウスを

作成し、アミロイドーシスの発症を解析した。全身臓器で高発現する CAG プロモーターの下流にヒト β_2m cDNA を持つコンストラクトをマウス受精卵に投与して作製した Tg マウスを β_2m ノックアウトマウスと交配し、ヒト β_2m のみを発現する交雑マウスを作製した ($hB2MTg^{+/+}mB2m^{-/-}$)。

この Tg マウスの血漿中 β_2m 濃度は 193 mg/L に達し、透析患者の 4 倍以上であった。自然発症アミロイド沈着の他に、①試験管内でリコンビナントヒト β_2m から作成した AB_2M アミロイド線維、② DRA 患者組織から抽出した AB_2M アミロイド線維、③ マウス肝臓から抽出したマウス老化アミロイド線維 (AApoA II)、を Tg マウスに投与してアミロイドーシスの誘発を行い、アミロイド沈着を調べた。

その結果、張は次の結果を得た。

1. マウスの寿命である 24 か月齢の Tg マウスで、アミロイド沈着を認めたが、 AB_2M アミロイド沈着は観察されず、AApoA II アミロイド線維の沈着であった。
2. 3 種類のアミロイド線維を投与して seeding 効果によるアミロイドーシスの誘発を試みたが、 AB_2M アミロイド沈着は観察されず、AApoA II アミロイド沈着のみが認められた。とくに DRA の主要な沈着部位である椎間板及び膝関節にもアミロイド沈着を観察したが、AApoA II アミロイドの沈着であった。

これらの結果より、持続的な血中高 β_2m 濃度とアミロイド線維による seeding 効果だけでは、アミロイド線維形成に十分でないことが明らかになった。今後このモデルマウスは DRA 発症に必要な要因を解析するために活用されることが期待でき、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。

BN.MES-*Cyba*^{mes} congenic rats manifest focal necrosis with eosinophilic infiltration in the liver without blood eosinophilia (BN.MES-*Cyba*^{mes}コンジェニックラットは血中の好酸球増多を発症することなく、肝臓への好酸球浸潤による壊死像を呈する)

友 澤 寛

(論文の内容の要旨)

【目的】好酸球は、ある種の寄生虫に対する生体防御

機能を担っているが、寄生虫感染時のみならずアレルギー反応の際にも増殖し、浸潤組織を傷害する原因ともなる。これら好酸球の関与する病態の制御には、未だ不明な好酸球の恒常性に関する分子遺伝学的メカニズムの解明が必須である。MES 系ラットは、シトクローム b (-245) α ポリペプチド (*Cyba*) 遺伝子の機能喪失型突然変異に起因する、骨髄での好酸球の異常増殖、末梢での好酸球増多、胃腸炎や大動脈炎を含む各臓器での好酸球浸潤に起因する炎症性病巣形成を自然発症する、好酸球研究に有用なラット系統である。本研究では、好酸球の動態に関して異なる表現型を有する新たなモデル動物を確立することを目的として、MES 系ラットとは異なる遺伝子背景をもつ BN 系ラットをレシピエントとするコンジェニック系ラット (BN.MES-*Cyba*^{mes}) を作製し、その血液学的、病理学的、および分子遺伝学的特性を MES 系ラットと比較検討しつつ詳細に解析した。

【材料と方法】BN 系ラットへの 8 回の連続戻し交配とその後の兄妹交配により BN.MES-*Cyba*^{mes}コンジェニック系ラットを確立した。MES 系ラットおよび BN.MES-*Cyba*^{mes}コンジェニック系ラットを 15 週齢で採血した。安楽死後に肝臓、脾臓、および肺を摘出し、ヘマトキシリン/エオジン染色病理標本作製した。骨髄および末梢血は自動セルカウンターを用いて好酸球の数を測定した。好酸球遊走に関わる因子である 3 種のエオタキシン CCL11, CCL24, および CCL26 の、好酸球の浸潤標的である骨髄、脾臓、腸間膜リンパ節、肝臓および腸管での転写発現量を RT-PCR 法により調査した。好酸球上でのエオタキシン受容体をコードするケモカインレセプター 3 (*Ccr3*) 遺伝子、および好酸球の移動や組織への接着に関与する 4 種のインテグリンをコードする遺伝子 (*Itga4*, *Itgam*, *Itgb1*, *Itgb2*) のコード領域を、骨髄からの mRNA により RT-PCR 法により増幅し、その塩基配列を比較してラット系統間の多型の有無を調査した。さらに、(MES × BN.MES-*Cyba*^{mes}) F₂ 交雑仔ラット群を作成し、*Ccr3*, および *Itga4* 遺伝子に認められた塩基配列多型と末梢血好酸球レベルとの遺伝相関解析を行った。

【結果と考察】BN.MES-*Cyba*^{mes}コンジェニック系ラットは骨髄中での好酸球比率は雌で平均 25.2%, 雄で平均 29.4% と MES 系ラットと同様に異常な好酸球増殖を呈する一方で、末梢血中好酸球レベル、および好酸球性炎症の臓器分布に関しては MES 系ラッ

トとは異なる表現型を示した。末梢血中好酸球は、雌で平均150/ μ l, 雄で平均127/ μ lと正常値を示した。また、コンジェニック系ラットにはMES系ラットには観察される好酸球性胃腸炎が認められない一方で、MES系ラットには認められない肝臓での好酸球浸潤による巣状壊死が観察された。好酸球の浸潤標的組織における3種のエオタキシンの転写発現量には、肝臓を含む全ての組織で両ラット系統間に差は認められなかった。両ラット系統間に*Ccr3*, および*Itga4* 遺伝子内でのミスセンス塩基置換多型を認めた。しかしながら、20匹の(MES \times BN.MES-*Cyba^{mes}*) F₂交雑仔ラット群においては両遺伝子多型と血中好酸球レベルとの遺伝相関は認められなかった。したがって、エオタキシンの転写発現, および2種の遺伝子多型が血中好酸球レベルの系統差の原因である可能性は棄却された。以上の結果より、本研究において確立されたBN.MES-*Cyba^{mes}*コンジェニック系ラットは、好酸球の動態に関してMES系ラットとは異なる表現型を有する新たなモデル動物であることが明らかとなった。これらの表現型の系統差は遺伝的多型に起因すると考えられた。特に、BN.MES-*Cyba^{mes}*コンジェニック系ラットには、骨髄中で異常増殖した好酸球の末梢血中への移行を強力に抑制する遺伝子(群), および好酸球の肝臓への浸潤を誘起する遺伝子(群)が存在することが示唆された。両系統のラットのさらなる解析により、好酸球の増殖, およびその後の体内動態を規定する分子遺伝学的メカニズムの解明が可能と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

申請者は好酸球増多症を自然発症するMES系ラットから、好酸球の動態に関して異なる表現型を有する新たなモデル動物を確立する目的で、MES系ラットとは異なる遺伝子背景を持つBN系ラットをレシピエントとするコンジェニック系ラット(BN.MES-*Cyba^{mes}*)を作製し、その血液学的, 病理学的, および分子遺伝学的特性をMES系ラットと比較検討しつつ詳細に解析した。

BN系ラットへの8回の戻し交配とその後の兄妹交配によりBN.MES-*Cyba^{mes}*コンジェニック系ラットを確立した。MES系ラットおよびBN.MES-*Cyba^{mes}*コンジェニック系ラットを15週齢で採血し、安楽死後に肝臓, 脾臓, 肺を摘出しヘマトキシリン/エオジン染色病理標本を作製した。骨髄および末梢血は自動血球分析器で好酸球の数量を測定した。3種の

エオタキシン(好酸球遊走因子)の, 好酸球の浸潤標的組織である, 骨髄, 脾臓, 腸間膜リンパ節, 肝臓および腸管での転写発現をRT-PCR法で調査した。好酸球上でのエオタキシン受容体をコードするケモカインレセプター3(*Ccr3*)遺伝子, および好酸球の移動や組織への接着に関与する4種のインテグリンをコードする遺伝子(*Itga4*, *Itgam*, *Itgb1*, *Itgb2*)のコード領域を, 骨髄のmRNAをRT-PCR法により増幅し, その塩基配列を両系統間で比較した。さらに, (MES \times BN.MES-*Cyba^{mes}*) F₂交雑仔ラット群を作出し*Ccr3*, および*Itga4*に認められた塩基置換多型と末梢血好酸球レベルとの遺伝相関を解析した。

その結果, 友澤寛は以下の結果を得た。

1. BN.MES-*Cyba^{mes}*コンジェニック系ラットはMES系ラット同様に骨髄中での異常な好酸球増殖を呈する一方で, 末梢血中好酸球レベルに関してはBN.MES-*Cyba^{mes}*コンジェニック系は正常値となり, MES系とは異なる表現型を示した。
2. BN.MES-*Cyba^{mes}*コンジェニック系ラットにはMES系ラットに観察された好酸球性胃腸炎が認められない一方で, MES系ラットには認められない肝臓での好酸球浸潤を伴う巣状壊死が観察された。
3. 好酸球の浸潤標的組織における3種のエオタキシンの転写発現量には両系統間での差は認められなかった。
4. 両系統間に*Ccr3*および, *Itga4*遺伝子にミスセンス塩基置換多型を認めたが, 20匹の(MES \times BN.MES-*Cyba^{mes}*) F₂交雑仔ラット群で両遺伝子多型と血中好酸球レベルとの遺伝相関は認められなかった。

以上の結果より, 本研究において確立されたBN.MES-*Cyba^{mes}*コンジェニック系ラットは, 好酸球の動態に関してMES系ラットとは異なる表現型を有する新たなモデル動物であることが明らかとなった。これら表現型の系統差は, MES系ラットとBN.MES-*Cyba^{mes}*コンジェニック系ラットとの間に存在する好酸球の体内動態に関する遺伝的多型に起因すると示唆された。両系統ラットのさらなる解析により, 好酸球の増殖, およびその後の体内動態を規定する分子遺伝学的メカニズムの解明が可能であると考えられる。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。

Expression of $\alpha 1$ -Adrenergic Receptor Subtypes and Angiotensin II Type 1 Receptor in the Prostate of Spontaneously Hypertensive Rats (自然発症高血圧ラット前立腺におけるアドレナリン $\alpha 1$ 受容体サブタイプおよびアンジオテンシンIIタイプ1受容体の発現)

中山 剛

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】前立腺肥大症 (benign prostate hyperplasia ; BPH) に伴う下部尿路症状 (lower urinary tract symptoms ; LUTS) の発生機序において高血圧症との関連は明確になっていない。本研究は自然発症高血圧ラット (spontaneously hypertensive rats ; SHR) 前立腺における, 上皮細胞の $\alpha 1$ アドレナリン受容体サブタイプ ($\alpha 1A$, $\alpha 1D$, $\alpha 1B$) とアンジオテンシンIIタイプ1受容体 (AT1) の発現に着目し検討を行った。

【対象と方法】25週齢オスSHRと25週齢オスWistar-Kyoto ラット (WKY) をそれぞれ12匹とし, 各ラットを生食投与群6匹と非投与群6匹に分けた。生食投与群は0.9%塩化ナトリウム水溶液 (生理食塩水 ; 生食) を体重1kg当たり20ml, 7日間経口投与した。投与7日後, 体重および収縮期血圧 (SBP) を測定し前立腺を摘出した。摘出した前立腺組織の重量を測定した後, 前立腺組織を ventral lobe および lateral-dorsal lobe に分け, パラフィン包埋を行った。組織標本に対して細胞増殖能, アポトーシスによる細胞死について, さらに $\alpha 1A$, $\alpha 1D$, $\alpha 1B$ および AT1 の発現を免疫組織染色で観察し, 画像解析を行った。

【結果】SHR においては, 生食投与群と非投与群では SBP は 205.5 ± 5.4 mmHg, 192.2 ± 4.6 mmHg, および前立腺重量は 1.24 ± 0.03 g, 1.18 ± 0.017 g であり, 生食投与群でそれぞれ上昇, 増加する傾向にあったが, 有意差はみられなかった。Ventral lobe では, 両群間で細胞増殖能には違いが認められず, アポトーシスによる細胞死は両群ともにほとんどなく, 有意な差も認めなかった。この部位での $\alpha 1A$, $\alpha 1D$, $\alpha 1B$ および AT1 の発現は生食投与群で有意に増加していた。一方 lateral-dorsal lobe における細胞増殖能は生食投与群で有意な増加が認められた。アポトーシスによる細胞死は両群ともにほとんどみられなかった。 $\alpha 1A$,

$\alpha 1D$, $\alpha 1B$ および AT1 の発現は生食投与群で有意に増加していた。

WKY においては生食投与群と非投与群では SBP および前立腺重量に有意差を認めなかった。また, ventral lobe および lateral-dorsal lobe ともに $\alpha 1A$, $\alpha 1D$, $\alpha 1B$ および AT1 の発現に有意な差を認めなかった。

【考察】SHR では生食投与群で ventral lobe において $\alpha 1A$, $\alpha 1D$, $\alpha 1B$ および AT1 の発現が有意に増加していた。ラットの ventral lobe はヒトでの BPH の発生部位である移行域 (transition zone) に相当し, BPH の発生機序と何らかの関係があるものと考えられた。また降圧薬である AT1 阻害薬の BPH による LUTS に対する治療薬としての可能性および血圧のコントロールや塩分摂取の制限が BPH 進行の抑制に寄与する可能性が示唆された。

【結論】SHR において認められる生食投与による $\alpha 1A$, $\alpha 1D$, $\alpha 1B$ および AT1 の増加は BPH の発症, さらに BPH にともなう LUTS の発生に関与している可能性が推察された。

(論文審査の結果の要旨)

前立腺肥大症の発症機序は明らかになっていない。臨床的に高血圧症と前立腺肥大症との関わりが注目されている。両者に影響を及ぼす因子として, 交感神経系とアンジオテンシンIIがある。これらはそれぞれ $\alpha 1$ アドレナリン受容体およびアンジオテンシンIIタイプ1受容体 (AT1) を介した経路で血圧上昇と細胞増殖に関与することが知られている。一般的に塩分の負荷により高血圧症を引き起こすことが知られているが, 今回, 25週齢オス自然発症高血圧ラット (SHR) 12匹と正常血圧コントロールである25週齢オスWistar-Kyotoラット (WKY) 12匹を用いて, それぞれ生理食塩水20ml/kgを7日間投与した群 (生食投与群) 6匹と, 非投与群6匹とに分け, 塩分負荷による前立腺の ventral lobe および lateral-dorsal lobe における $\alpha 1$ アドレナリン受容体および AT1 の発現に及ぼす影響につき検討した。SHR ではさらに細胞増殖能 (PCNA), アポトーシスについても検討した。

その結果, 中山は以下に示すような結論を得た。SHR においては

1. 両群間で収縮期血圧, 前立腺重量に有意な差を認めなかった。
2. 両群間で HE 染色における前立腺肥大症の組織

の程度に変化を認めなかった。

3. ventral lobe において、細胞増殖能は両群間で多く認めたが有意な差は認められず、アポトーシスによる細胞死は両群ともほとんどみられなかった。 $\alpha 1A$, $\alpha 1D$, $\alpha 1B$ および AT1 の発現は生食投与群で有意に増加していた。
4. lateral-dorsal lobe において、細胞増殖能は生食投与群で有意な増加が認められたが、アポトーシスによる細胞死は両群ともほとんどみられなかった。 $\alpha 1A$, $\alpha 1D$, $\alpha 1B$ および AT1 の発現は生食投与群で有意に増加していた。
5. ventral lobe と lateral-dorsal lobe との比較では、生食投与群において ventral lobe に $\alpha 1A$ が多く、lateral-dorsal lobe に $\alpha 1B$ と AT1 が有意差をもって多く発現していた。

WKY においては

6. ventral lobe および lateral-dorsal lobe において、 $\alpha 1A$, $\alpha 1D$, $\alpha 1B$ および AT1 の発現は両群間で有意差を認めなかった。

これらの結果より、SHR においては短期間の塩分の負荷によって血圧の上昇が見られない状態でも、前立腺における受容体発現が変化しており、BPH の発症機序に関わることが示唆された。

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。

Exercise Effects on Methylation of ASC Gene (ASC 遺伝子のメチル化に関する運動効果)

中 島 弘 毅

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】適度な運動は、炎症性サイトカインを低減させ、炎症を弱めることが明らかにされている。最近、Toll-like 受容体に加え、細胞質における病原体受容体を介する炎症反応の要として inflammasome が注目されているが、ASC はアダプター蛋白質として inflammasome 形成の中心的働きをする。ASC は、procaspase-1 を inflammasome にリクルートし活性化する機能もあり、caspase-1 による炎症性サイトカイン IL-1 β , IL-18 の活性化と産生の鍵分子であることが明らかになっている。一方 ASC 遺伝子は、CpG island のメチル化による発現制御が知られており、エ

ピジエネティック研究の良きプローブと考えられている。今回、ASC 遺伝子のメチル化の年齢依存性および長期間にわたる運動、すなわち 6 カ月間のインターバル速歩によって ASC 遺伝子のメチル化がどの様に影響を受けるかを検討した。また、メチル化による発現抑制が知られている癌抑制遺伝子 *p15* についても同様の検討を行った。

【材料及び方法】熟年体育大学に参加し、インターバル速歩 (40% VO_{2peak} 以下の強度で 3 分間歩行し、続けて 70% VO_{2peak} 以上の強度で 3 分間歩き、これを 1 セットとし、5 セット以上繰り返す) を 6 カ月間行った人で週 2 日以上実施した群をシニア運動群 ($n=230$, 年齢分布 41-86, 平均年齢 66.2 ± 7.1) とし、非処方シニア層 ($n=153$, 年齢分布 40-87, 平均年齢 64.8 ± 7.5) と青年層 ($n=34$, 年齢分布 18-22, 平均年齢 19.4 ± 0.9) のコントロール群と ASC のメチル化率を比較した。また、メチル化率がどの因子によって影響を受けるか多変量解析を用いて検討し、ステップワイズ重回帰分析を用いて有意な説明変数を解析した。

メチル化率の測定は被験者の末梢血より DNA を抽出し、bisulfite 処理によって非メチル化シトシンをチミンへ変換したのち、ASC 遺伝子の CpG island の中から特定した 7 つの CpG サイトについて pyrosequencing 法によって行った。

【結果】ASC のメチル化は年齢依存的に低下し、そのメチル化率に影響を及ぼす因子は、年齢のみが有意な独立変数として採用された。また、運動群 ($6.29 \pm 0.26\%$) は、シニアのコントロール群 ($5.33 \pm 0.14\%$) に比して有意に高いメチル化を示し ($P < 0.01$)、青年のコントロール群 ($6.73 \pm 0.38\%$) に近づいた。癌抑制遺伝子 *p15* のメチル化は年齢及び運動による変化は認められなかった。

【結論】適度な運動は、炎症性サイトカインを低減させ、炎症を弱めることが明らかにされている。今回、運動が ASC 遺伝子のメチル化に及ぼす影響を検討した結果、6 カ月のインターバルウォーキングによって、遺伝子レベルでもエピジエネティック効果として若年齢方向へシフトすることが分かった。長期の適度な運動による ASC 遺伝子のメチル化の増強は ASC 蛋白質の発現抑制を介し、余分な炎症性サイトカイン発現を抑制すると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

適度な運動は、炎症性サイトカインを低減させ、

炎症を弱めることが明らかにされている。ASCは、procaspase-1を inflammasome にリクルートし活性化する機能もあり、caspase-1による炎症性サイトカインIL-1 β 、IL-18の活性化と産生の鍵分子であること、CpG islandのメチル化による発現抑制が明らかになっている。今回、ASC遺伝子のメチル化の年齢依存性および長期間にわたる運動、すなわち6カ月間のインターバル速歩によってASC遺伝子のメチル化がどの様に影響を受けるかを検討した。

被験者は、熟年体育大学への参加者と大学生である。運動は、インターバル速歩(40% VO_{2peak}以下の強度で3分間歩行し、続けて70% VO_{2peak}以上の強度で3分間歩き、これを1セットとし、5セット以上繰り返す)を6カ月間行った。週2日以上実施した群をシニア運動群(n=230, 年齢分布41-86, 平均年齢66.2 \pm 7.1)とし、非処方シニア層(n=153, 年齢分布40-87, 平均年齢64.8 \pm 7.5)と青年層(n=34, 年齢分布18-22, 平均年齢19.4 \pm 0.9)のコントロール群とASCのメチル化率の比較を行った。また、メチル化率がどの因子によって影響を受けるか多変量解析を用いて検討し、ステップワイズ重回帰分析を用いて有意な説明変数を解析した。

メチル化率の測定は被験者の末梢血よりDNAを抽出し、bisulfite処理によって非メチル化シトシンをチミンへ変換したのち、CpG islandの中から特定した7つのCpGサイトについてpyrosequencing法によって行った。

その結果、中島は次の結論を得た。

1. ASCのメチル化は年齢依存的に低下し、そのメチル化率に影響を及ぼす因子は、年齢のみが有意な独立変数として採用された。
2. 運動群(6.29 \pm 0.26%)は、シニアのコントロール群(5.33 \pm 0.14%)に比して有意に高いメチル化を示し(P<0.01)、青年のコントロール群(6.73 \pm 0.38%)に近づいた。
3. 癌抑制遺伝子*p15*のメチル化は年齢及び運動による変化は認められなかった。

これらの結果より、長期の適度な運動(6カ月間のインターバル速歩)は、ASCメチル化率においてエピジェネティック効果として若年齢方向にシフトすることが分かった。長期の適度な運動によるASC遺伝子のメチル化の増強はASC蛋白質の発現抑制を介し、余分な炎症性サイトカイン発現を抑制すると考えられた。本論文は運動処方によるエピジェネティック効果

を世界で初めて示した論文であり、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。

Trypsin digestion on paraffin sections is a useful tool for diagnosis of Alport syndrome (トリプシン消化はパラフィン切片でのアルポート症候群の診断に有用である)

姜 英 松

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】アルポート症候群の診断においては、凍結切片を用いて、IV型コラーゲン α 鎖の免疫染色を行い、 α 鎖の異常が認められたならば、遺伝子の異常を確認しなくとも診断できる。しかし、凍結切片を利用できない場合は診断が困難である。腎臓糸球体基底膜とボウマン嚢基底膜 α 5鎖の染色結果から、アルポート症候群の可能性と、さらにX連鎖優性型か、常染色体劣性型かの情報が得られる。パラフィン切片で抗原賦活化によってアルポート症候群が診断できるかどうか、本研究の目的である。

【材料及び方法】抗体：アルポート症候群研究用蛍光色素標識抗体(FITC標識抗ヒトIV型コラーゲン α 5鎖抗体とTexas Red標識抗ヒトIV型コラーゲン α 2抗体)；コントロールは7例(手術例1例、微小変化群6例)；電顕所見と凍結切片での α 5鎖蛍光染色結果によりアルポート症候群確定例は12例；電顕所見のみのアルポート症候群疑い例は9例；IgA腎症は7例である。パラフィン切片での抗原賦活化の条件：1)トリプシン消化60分、90分、120分；2)マイクロウエーブ(EDTAないしクエン酸バッファー+プロテアーゼ消化5分、10分、15分；3)オートクレーブ(115 $^{\circ}$ C、121 $^{\circ}$ C)6分間加熱；4)プロテアーゼ消化40分。抗原賦活化後、バッファーで3回洗浄し、抗 α 5+ α 2標識抗体を4 $^{\circ}$ Cでovernight incubationして、レーザー顕微鏡で観察した。

【結果】トリプシン消化90分の条件が最も抗原がよく賦活化され、アルポート症候群と確診された12例では凍結切片と同じパターンでかつほぼ同程度に染色された。電顕的にアルポート症候群が疑われた10例のうち、9例はX連鎖優性型アルポート症候群で、1例だけは常染色体劣性型アルポート症候群であった。X連鎖優性型アルポート症候群の女性例では加齢につれてモザイクパターンを呈する糸球体が増加していた、そのうちの2例の40歳以上の患者では血清クレアチニン値が

高かった。IgA 腎症ではトリプシン消化90分により免疫複合体の沈着も証明できた。

【結論】1) パラフィン切片でも抗原賦活化によって凍結切片とほぼ同じ程度に蛍光染色することが可能だった。2) トリプシン90分消化が最も優れていた。3) パラフィン切片しか得られない症例でも $\alpha 5$ の蛍光パターンから遺伝形式が明らかになった。4) 女性では加齢につれてモザイクパターンを呈する糸球体が増加していた。5) 免疫複合体の沈着も証明できた。

以上のことよりトリプシン90分消化によりパラフィン切片でもアルポート症候群を診断できることが示唆される。

(論文審査の結果の要旨)

アルポート症候群の診断においては、腎生検組織の凍結切片を用いて、IV型コラーゲン α 鎖の免疫染色を行い、糸球体に α 鎖の異常が認められたならば、遺伝子の異常を確認しなくとも診断できる。しかし、凍結切片を利用できない場合は診断が困難である。腎臓糸球体基底膜とボウマン嚢基底膜 $\alpha 5$ 鎖の染色結果から、アルポート症候群の可能性と、さらにX連鎖優性型か、常染色体劣性型かの情報が得られる。パラフィン切片を抗原賦活化処理することによってアルポート症候群が診断できるかどうか、本研究の目的である。

アルポート症候群研究用蛍光色素標識抗体 (FITC 標識抗ヒトIV型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖抗体と Texas Red 標識抗ヒトIV型コラーゲン $\alpha 2$ 抗体) を用いた。コントロールは7例で手術例が1例、微小変化群の腎生検6例である。アルポート症候群は、電顕所見と凍結切

片での $\alpha 5$ 鎖蛍光染色結果によりアルポート症候群が確定した例12例、電顕所見のみのアルポート疑い例9例の計21例である。抗原賦活化の最適条件を検討するために、脱パラ後、次のような条件で抗原賦活化を行った。1) トリプシン消化60分、90分、120分；2) Microwave with EDTA or CA +プロテアーゼ消化5分、10分、15分；3) オートクレープで115°C、121°Cのいずれかの温度で6分間加熱；4) プロテアーゼ消化40分。抗原賦活化後、PBSで3回洗浄し、 $\alpha 5 + \alpha 2$ 抗体を4°Cでovernight incubationして、レーザー顕微鏡で観察した。

その結果、姜 英松は以下の結論を得た。

- 1) トリプシン90分消化の条件が一番よく、アルポート症候群と確診された12例では凍結切片と同じパターンでかつほぼ同程度に染色された。
- 2) 電顕的にアルポートが疑われた10例のうち、9例はX連鎖優性型アルポート症候群で、1例は常染色体劣性型アルポート症候群であった。
- 3) 女性では加齢につれてモザイクパターンを呈する糸球体が増加していた、そのうちの2例の40歳以上の患者では血清クレアチニン値が高かった。
- 4) IgA 腎症ではトリプシン消化90分により免疫複合体の沈着も証明できた。

これらの結果は、トリプシン90分消化によりパラフィン切片でもアルポート症候群を診断できることを示唆している。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。