

## 信州大学において審査された医学博士論文要旨

氏名 (所属講座)	学位授与 番号	授与年月日	博 士 論 文 名	学位審査委員	
				主 査	副 査
天野 勇治 (免疫・微生物学)	甲第871号	23. 3.31	Hrs recognizes a hydrophobic amino acid cluster in cytokine receptors during ubiquitin-independent endosomal sorting (ユビキチン非依存的な小胞輸送において Hrs はサイトカイン受容体の疎水性アミノ酸クラスターを認識する)	鎌田 徹	谷口俊一郎 中山 淳
三澤 由佳 (小児医学)	甲第872号	23. 3.31	Vitamin D <sub>3</sub> induces expression of human cathelicidin antimicrobial peptide 18 in newborns (新生児においてビタミンD <sub>3</sub> は human cathelicidin antimicrobial peptide 18の発現を誘導する)	小池 健一	塩沢丹里 谷口俊一郎
池川 茂樹 (スポーツ 医科学)	甲第873号	23. 3.31	Effects of hypohydration on thermoregulation during exercise before and after 5-day aerobic training in a warm environment in young men (若年者における急性低体液量負荷が5日間の暑熱下トレーニング前後の運動時体温調節反応に与える影響)	岡元和文	久保 惠嗣 川真田樹人
一瀬 泰之 (器官制御 生理学)	甲第874号	23. 3.31	Prospective Randomized Comparison of Cold Snare Polypectomy and Conventional Polypectomy for Small Colorectal Polyps (大腸小ポリープに対する Cold polypectomy と Conventional polypectomy の有用性の比較)	田中 榮司	大橋 俊夫 宮川 眞一
前島 大輔 (器官制御 生理学)	甲第875号	23. 3.31	Platelet-derived-growth factor (PDGF)-BB produces NO-mediated relaxation and PDGF-receptor beta-dependent tonic contraction in murine iliac lymph vessels (PDGF-BBによるマウス腸骨リンパ管における NO 依存性の弛緩反応と PDGF- $\beta$ 受容体を介した収縮反応の機能特性)	山田 充彦	池田 宇一 奥山 隆平
川口 政徳 (循環器 病態学)	甲第876号	23. 3.31	Inflammasome Activation of Cardiac Fibroblasts Is Essential for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury (心筋虚血再灌流傷害における心線維芽細胞のインフラマソーム活性化の役割)	瀧 伸介	天野 純 山田 充彦
高橋 京子 (代謝制御学)	甲第877号	23. 3.31	Pretreatment by low-dose fibrates protects against acute free fatty acid-induced renal tubule toxicity by counteracting PPAR $\alpha$ deterioration (低用量フィブラートの前治療は、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 $\alpha$ 型の機能低下を阻止して、遊離脂肪酸による急性腎尿細管毒性に対し保護作用を発揮する)	田中 榮司	西澤 理 山田 充彦

審査学位論文要旨

渡辺智治 (画像医学)	甲第878号	23. 3.31	Infraorbital nerve swelling associated with autoimmune pancreatitis (自己免疫性膵炎に伴う眼窩下神経腫大)	田中榮司	村田敏規 中山 淳
高津亜希子 (分子腫瘍学)	甲第879号	22. 9.30	Preoperative Differential Diagnosis of Minimal Deviation Adenocarcinoma and Lobular Endocervical Glandular Hyperplasia of the Uterine Cervix A Multicenter Study of Clinicopathology and Magnetic Resonance Imaging Findings (子宮頸部最小偏倚腺癌および分葉状頸管腺過形成の術前診断に関する臨床病理学的因子およびMRI 画像による多施設研究)	中山 淳	本田孝行 西澤 理
堀込充章 (循環器 病態学)	甲第880号	23. 3.31	Risk Evaluation for Coronary Artery Disease in Patients with Impaired Glucose Tolerance after a Successful Coronary Intervention (経皮的冠動脈形成術後の耐糖能異常患者における冠動脈疾患のリスク評価)	駒津光久	天野 純 角谷真澄
NUNUNG NUR RAHMAH (脳神経 外科学)	甲第881号	23. 9.30	Correlation between squamous suture and Sylvian fissure: Osirix DICOM viewer study (鱗状縫合とシルビウス裂溝の関係—Osirix DICOM VIEWER を用いて—)	角谷真澄	森泉哲次 池田修一
王立軒 (代謝制御学)	甲第882号	23. 9.30	Kidney transplantation recovers the reduction level of serum sulfatide in ESRD patients via processes correlated to oxidative stress and platelet count (腎移植は、酸化ストレスや血小板数と関連した機構により、末期腎機能障害患者の血清スルファチド値を回復させる)	山田充彦	佐々木克典 駒津光久
張曉煒 (代謝制御学)	甲第883号	24. 3.31	Acute kidney injury induced by protein-overload nephropathy down-regulates gene expression of hepatic cerebroside sulfotransferase in mice, resulting in reduction of liver and serum sulfatides (蛋白質過負荷腎症マウスに生じる急性腎障害は、肝臓セレブロシドスルホトランスフェラーゼの遺伝子発現を抑制し、肝臓及び血清中のスルファチド量を減少させる)	山田充彦	佐々木克典 駒津光久
王耀勇 (加齢生物学)	甲第884号	23. 9.30	ApoA- I deficiency in mice is associated with redistribution of apoA-II and aggravated AApoAII amyloidosis (マウスアポリポタンパク質A-Iの欠損はアポリポタンパク質A-IIの再分配とAApoAIIアミロイドーシスの悪化を伴う)	谷口俊一郎	青山俊文 鈴木龍雄
青木哲宏 (運動機能学)	甲第885号	24. 3.31	Generation of induced pluripotent stem cells from human adipose-derived stem cells without c-MYC (c-MYCを用いないヒト脂肪組織由来幹細胞からの人工多能性幹細胞の樹立)	佐々木克典	池田宇一 西澤 理

審査学位論文要旨

齋藤章治 (小児医学)	甲第886号	23. 3.31	Genetic analysis of TP53 in childhood myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia (小児骨髄異形成症候群および若年性骨髄単球性白血病におけるTP53遺伝子の解析)	谷口俊一郎	宇佐美真一 福嶋義光
荻原裕明 (外科学(1))	甲第887号	24. 3.31	Role of Deletion Located between the Intermediate and Middle Regions of the <i>Helicobacter pylori vacA</i> Gene in Cases of Gastrointestinal Diseases ( <i>Helicobacter pylori vacA</i> 遺伝子内のintermediate region と middle region の間に存在する塩基配列欠損の胃十二指腸疾患における役割について)	宮川真一	中山 淳 竹下敏一
荒居琢磨 (発生再生 医学)	甲第888号	24. 3.31	Induction of LYVE-1/stabilin-2-positive liver sinusoidal endothelial-like cells from embryoid bodies by modulation of adrenomedullin-RAMP2 signaling (ES細胞胚様体分化系を用いた、アドレノメデュリン-RAMP2シグナル制御によるLYVE-1/stabilin-2陽性肝類洞内皮様細胞の分化誘導)	樋口京一	福嶋義光 中山 淳
横山隆秀 (外科学(1))	甲第889号	23. 3.31	Transabdominal preperitoneal repair for obturator hernia (閉鎖孔ヘルニアに対する Transabdominal preperitoneal repair (TAPP) 法による腹腔鏡下ヘルニア修復術)	西澤 理	田中榮司 塩沢丹里
日根野晃代 (内科学(3))	甲第890号	23. 3.31	Ceruloplasmin Protects Against Rotenone-Induced Oxidative Stress and Neurotoxicity (セルロプラスミンはロテノンによる酸化ストレスと神経毒性に対して防御的作用を有する)	森泉哲次	樋口京一 鈴木龍雄
牛木淳人 (内科学(1))	甲第891号	23. 3.31	Bronchoscopic Microsampling for Bacterial Colony Counting in Relevant Lesions in Patients with Pulmonary <i>Mycobacterium avium</i> Complex Infection (気管支鏡下マイクロサンプリング法を用いた肺 <i>Mycobacterium avium</i> complex 感染症患者の病変局所における菌量の検討)	本田孝行	竹下敏一 駒津光久
羽田健紀 (循環器 病態学)	甲第892号	23. 3.31	Critical role of Th17 cells in inflammation and neovascularization after ischaemia (虚血下の炎症および血管新生における Th17細胞の重要な役割)	中山 淳	山田充彦 天野 純
山田 哲 (画像医学)	甲第893号	23. 3.31	Quantitative Evaluation of Liver Function with Use of Gadoxetate Disodium-enhanced MR Imaging (ガドキシセト酸ナトリウム造影MRIを用いた定量的肝機能評価)	宮川真一	田中榮司 山田充彦
内川裕司 (外科学(1))	甲第894号	24. 3.31	Administration of dalteparin based on the activated clotting time for prophylaxis of hepatic vessel thrombosis in living donor liver transplantation (生体肝移植時の抗肝血管血栓療法としての活性化凝固時間に基づいたダルテパリン投与)	池田修一	天野 純 田中榮司

審査学位論文要旨

上 條 敦 (内科学(2))	甲第895号	24. 3.31	Cytokine profiles affecting the pathogenesis of autoimmune hepatitis in Japanese patients (日本人の自己免疫性肝炎患者におけるサイトカインの動向と病態との関連)	瀧 伸介	宮川 眞一 駒津 光久
伊 藤 哲 也 (内科学(2))	甲第896号	24. 3.31	A Novel Heterophilic Antibody Interaction Involves IgG4 (異種動物抗体に対するヒトIgG4抗体の特異な反応性)	田中 榮 司	宮川 眞一 本田 孝行
原 一 生 (運動機能学)	甲第897号	24. 3.31	Evaluation of CNT toxicity by comparison to tattoo ink (刺青用インクと比較することによるカーボンナノチューブの毒性評価)	佐々木克典	久保 惠 嗣 塩 沢 丹 里
兼 山 友 輝 (病理組織学)	甲第898号	24. 3.31	Tranilast modulates fibrosis, epithelial-mesenchymal transition and peritubular capillary injury in unilateral ureteral obstruction rats (トラニラストは、片側尿管結紮ラットにおいて、腎間質の線維化、上皮-間葉分化転換、尿管周囲毛細血管の障害を緩和する)	菅 野 祐 幸	佐々木克典 西 澤 理
石 川 雅 邦 (泌尿器科学)	甲第899号	23. 3.31	A Galenical of Traditional Chinese Herbal Mixture (THC-002) Reduces Expression of Tachykinin Peptides within Urethras of Spontaneously Hypertensive Rats (自然発症高血圧ラット (SHR) 尿道における生薬エキス (THC-002) のタヒキニン類発現の抑制効果についての検討)	川 眞 田 樹 人	天 野 純 大 森 栄
市 川 比 奈 子 (組織発生学)	甲第900号	23. 3.31	Gene pathway analysis of the mechanism by which the Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 inhibits apoptosis in isolated thawed human embryonic stem cells (単離凍結解凍後ヒトES細胞のROCK阻害剤Y-27632によるアポトーシス抑制機序の遺伝子パスウェイ解析)	山 田 充 彦	天 野 純 池 田 宇 一
堀 綾 (衛生学公衆衛生学)	甲第901号	23. 3.31	Effects of weather variability and air pollutants on emergency admissions for cardiovascular and cerebrovascular diseases (環境要因が救急外来における心血管疾患及び脳血管疾患の緊急入院数に及ぼす影響について)	福 嶋 義 光	池 田 宇 一 岡 元 和 文
横 山 俊 樹 (内科学(1))	甲第902号	23. 3.31	Potential benefits of early continuous positive pressure ventilation in patients with rapidly progressive interstitial pneumonia (急速進行性間質性肺炎に対する非侵襲的人工呼吸の早期導入の有効性)	岡 元 和 文	池 田 修 一 川 眞 田 樹 人
吾 妻 俊 彦 (内科学(1))	甲第903号	23. 3.31	Combination Chemotherapy with Doxorubicin, Vincristine, Cyclophosphamide, and Platinum Compounds for Advanced Thymic Carcinoma (手術不能進行胸腺癌に対する白金製剤、ドキソルビシン、ビクリスチン、シクロホスファミド併用化学療法の検討)	本 田 孝 行	宮川 眞一 塩 沢 丹 里

審査学位論文要旨

鈴木英二 (分子薬理学 (薬剤))	甲第904号	23. 3.31	Effects of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ Chemical Stabilizer, CoCl <sub>2</sub> and Hypoxia on Gene Expression of CYP3As in Human Fetal Liver Cells (ヒト胎児肝細胞のCYP3A遺伝子発現に対する低酸素誘導因子-1 $\alpha$ 安定化剤CoCl <sub>2</sub> と低酸素の影響)	大橋俊夫	西澤 理 能勢 博
史 峻 (加齢病態 制御学)	甲第905号	23. 3.31	American Ginseng Improves Neurocognitive Function in Senescence-Accelerated Mice: Possible Role of the Upregulated Insulin and Choline Acetyltransferase Gene Expression (アメリカ人参による老化促進マウスの認知機能改善: 脳内インスリンとChAT遺伝子の発現増加の役割)	谷口俊一郎	樋口京一 天野直二
荻原伸英 (運動機能学)	甲第906号	23. 3.31	Biocompatibility and bone tissue compatibility of alumina ceramics reinforced with carbon nanotubes (カーボンナノチューブを強化材として複合したアルミナセラミックスの生体親和性および骨親和性)	天野 純	中山 淳 奥山隆平
陳 磊 (加齢生物学)	甲第907号	24. 3.31	Cheetahs Have 4 Serum Amyloid A Genes Evolved through Repeated Duplication Events (チーターは複数回の遺伝子重複により形成された4個のserum amyloid A遺伝子をもつ)	谷口俊一郎	鈴木龍雄 竹下敏一
松澤直樹 (分子薬理学 (薬剤))	甲第908号	24. 3.31	Influence of Cytochrome P450 2C19 gene variations on pharmacokinetic parameters of thalidomide in Japanese patients (日本人におけるサリドマイドの薬物動態学パラメータとCYP2C19遺伝子多型の影響)	山田充彦	福嶋義光 田中榮司
清水政幸 (運動機能学)	甲第909号	23. 3.31	Carbon Nanotubes Induce Bone Calcification by Bidirectional Interaction with Osteoblasts (カーボンナノチューブは、骨芽細胞との双方向性の相互作用により、骨の石灰化を誘導する)	山田充彦	福嶋義光 池田宇一
好沢 克 (外科学(1))	甲第910号	24. 3.31	IL-15-High-Responder Developing NK Cells Bearing Ly49 Receptors in IL-15 <sup>-/-</sup> Mice (IL-15欠損マウスにおけるIL-15高応答性Ly49受容体陽性未熟NK細胞)	小池健一	田中榮司 竹下敏一
伊勢真美子 (循環器 病態学)	甲第911号	24. 3.31	Targeting N-acetylglucosamine-bearing polymer-coated liposomes to vascular smooth muscle cells (血管平滑筋細胞へのN-アセチルグルコサミン修飾リポソームの標的化)	大森 栄	中山 淳 天野 純
柴 将人 (形成再建 外科学)	甲第912号	23. 3.31	Evaluation of muscle hyperactivity of the grimacing muscles by unilateral tight eyelid closure and stapedius muscle tone (片側の強い閉瞼とアブミ骨筋の筋緊張による、しかめ顔筋の過緊張の評価)	池田修一	宇佐美真一 森泉哲次



審査学位論文要旨

山崎 秀 (分子腫瘍学)	甲第913号	24. 3.31	ASC plays a role in the priming phase of the immune response to type II collagen in collagen-induced arthritis (コラーゲン誘発関節炎のII型コラーゲンに対する初期免疫反応におけるASCの役割)	竹下敏一	樋口京一 池田修一
内藤康介 (内科学(3))	甲第914号	23. 3.31	Intravenous immunoglobulin (IVIg) with methylprednisolone pulse therapy for motor impairments of neuralgic amyotrophy: clinical observations in 10 cases (神経痛性筋委縮症における運動症状に対するメチルプレドニゾン大量静注療法および免疫グロブリン大量静注療法の有効性:10症例の臨床的検討)	加藤博之	森泉哲次 川真田樹人
関口泰之 (人体構造学)	甲第915号	24. 3.31	Functional correlation between olfaction and various sectioning of the lateral olfactory tract (外側嗅索切断と嗅覚機能の相関)	多田 剛	本郷一博 山田充彦
唐澤文寿 (分子病理学)	甲第916号	23. 3.31	Essential role of gastric gland mucin in preventing gastric cancer in mice (マウスの胃発癌を抑える胃腺粘液の持つ必須の役割)	瀧 伸介	森泉哲次 田中榮司
中川 幹 (代謝制御学)	甲第917号	23. 3.31	PPAR $\alpha$ is down-regulated following liver transplantation in mice (マウスにおいて $\alpha$ 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の発現は肝移植後に低下する)	田中榮司	浅村英樹 本田孝行
伊藤勅子 (外科学(2))	甲第918号	23. 3.31	Alteration of Y-box Binding Protein-1 Expression Modifies the Response to Endocrine Therapy in Estrogen Receptor Positive Breast Cancer (エストロゲン受容体陽性乳癌において、YB-1発現の変化が内分泌療法剤に対する感受性を変化させる)	塩沢丹里	谷口俊一郎 中山 淳
布施谷千穂 (分子腫瘍学)	甲第919号	23. 3.31	Involvement of pelvic inflammation-related mismatch repair abnormalities and microsatellite instability in the malignant transformation of ovarian endometriosis (卵巣子宮内膜症の悪性転化における骨盤炎症に関連するミスマッチ修復異常とマイクロサテライト不安定性の関与)	本田孝行	中山 淳 菅野祐幸
竹澤 崇 (分子薬理学 (薬剤))	甲第920号	24. 3.31	Lower expression of HNF4 $\alpha$ and PGC1 $\alpha$ might impair rifampicin-mediated CYP3A4 induction under conditions where PXR over-expressed in human fetal liver cells (HNF4 $\alpha$ およびPGC1 $\alpha$ の低発現が要因と考えられるPXR過剰発現ヒト胎児肝細胞におけるリファンピシンによるCYP3A4の誘導障害)	青山俊文	池田宇一 駒津光久
生 暁娜 (代謝制御学)	甲第921号	24. 3.31	Attenuation of kidney injuries maintains serum sulfatide levels dependent on hepatic synthetic ability: a possible involvement of oxidative stress (腎障害の軽減に伴う酸化ストレスの抑制は、肝スルファチド合成の機能維持を介して、血清スルファチド値を維持する)	佐々木克典	山田充彦 多田 剛

KAJLA SEHELI (分子細胞 生化学)	甲第922号	23. 3.31	A crucial role for Nox 1 in redox-dependent regulation of Wnt- $\beta$ -catenin signaling (Wnt- $\beta$ -カテニンシグナルのレドックス反応による制御における Nox1の重要な役割)	竹下 敏一	谷口俊一郎 宮川 真一
-------------------------------	--------	----------	--	-------	----------------

Hrs recognizes a hydrophobic amino acid cluster in cytokine receptors during ubiquitin-independent endosomal sorting (ユビキチン非依存的な小胞輸送において Hrs はサイトカイン受容体の疎水性アミノ酸クラスターを認識する)

### 天 野 勇 治

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】細胞膜上にある種々の受容体のリソソームへの輸送・分解に、ユビキチンが選別シグナルとして働くことが広く知られている。ユビキチン化された受容体はエンドサイトーシス後、ユビキチン結合モチーフを持つ Hrs により捉えられ、リソソームへと輸送される。ユビキチン化を受けていない受容体は、Hrs に認識されず細胞膜上へとリサイクルされることから、リソソームへの選別輸送にユビキチン化は必須であると考えられてきた。近年我々は IL-2 受容体  $\beta$  鎖 (IL-2R $\beta$ ) が、ユビキチン非依存的に Hrs と結合し、恒常的にリソソームへと運ばれていることを明らかにした。Hrs とのユビキチン非依存的な会合を介してリソソームへと運ばれる受容体は他に例がなく、その詳細は解っていない。本研究では、IL-2R $\beta$  と同様の輸送制御を受ける受容体として IL-4 受容体  $\alpha$  鎖 (IL-4R $\alpha$ ) を見出し、その比較検討からユビキチン非依存的な結合に関わる選別輸送シグナルの同定を試みた。

【材料及び方法】HEK293T 細胞に Hrs と IL-2R $\beta$ 、IL-4R $\alpha$  またはこれらの変異体を過剰発現させ、免疫沈降法により両者の会合を確認した。大腸菌発現系により IL-2R $\beta$ 、IL-4R $\alpha$  及び Hrs の精製タンパク質を得た後、これらの会合をプルダウンアッセイにより確認した。MEF 細胞及び BAF 細胞に IL-2R $\beta$ 、IL-4R $\alpha$  またはこれらの変異体を導入した受容体安定発現株を構築した。MEF 安定発現細胞を用いて蛍光免疫染色を行い、受容体の細胞内局在及び細胞内輸送を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。抗受容体抗体及びリガンド (IL-2, IL-4) を 125-I で放射性標識し、これらの BAF 安定発現細胞での分解を確認した。

【結果】免疫沈降及びプルダウンアッセイから、IL-2R $\beta$ 、IL-4R $\alpha$  の野生型は Hrs と結合するのにに対し、

両受容体共に疎水性アミノ酸クラスターに変異導入したものは Hrs との結合が見られなくなった。また蛍光免疫染色により、野生型受容体は恒常的に細胞内へと取り込まれ、定常状態で後期エンドソーム/リソソームマーカーである LAMP1 と共局在するのに対し、疎水性アミノ酸クラスター変異受容体は、恒常的に細胞内へと取り込まれるが LAMP1 区画への輸送は阻害され、Transferrin 受容体陽性のリサイクルエンドソームや LBPA 陽性の Multivesicularbody に観察された。また分解アッセイから、野生型に対し疎水性アミノ酸クラスター変異受容体の分解抑制が確認された。

【結論】IL-2R $\beta$  及び IL-4R $\alpha$  は、細胞内領域に保有する疎水性アミノ酸クラスターで Hrs とユビキチン非依存的に会合することが示唆された。また疎水性アミノ酸クラスター変異受容体はリソソームへの輸送・分解が阻害されたことから、疎水性アミノ酸クラスターを介した Hrs とのユビキチン非依存的な会合により、IL-2R $\beta$  及び IL-4R $\alpha$  両受容体は正確にリソソーム輸送され分解を受けると示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

細胞膜上にある種々の受容体のリソソームへの輸送に、ユビキチンが選別シグナルとして働くことが広く知られている。ユビキチン化された受容体は、ユビキチン結合モチーフを持つ Hrs により捉えられリソソームへと輸送される。従って、リソソームへの選別輸送に受容体のユビキチン化は必須であると考えられてきた。近年我々は IL-2 受容体  $\beta$  鎖 (IL-2R $\beta$ ) がユビキチン非依存的な Hrs との会合を介してリソソームへと輸送されることを明らかにした。Hrs とのユビキチン非依存的な会合によりリソソームへと運ばれる受容体は他に例がなく、その詳細は解っていない。本研究では、IL-2R $\beta$  と同輸送制御を受ける受容体として IL-4 受容体  $\alpha$  鎖 (IL-4R $\alpha$ ) を見出し、両受容体を比

較検討することにより Hrs との会合モチーフ探索を行った。また Hrs とのユビキチン非依存的な会合が IL-2R $\beta$ , IL-4R $\alpha$  の細胞内輸送に与える影響を、免疫蛍光染色及び分解アッセイにより確認した。

その結果、天野は以下の結論を得た。

1. Hrs とのユビキチン非依存的な直接的会合に必須な領域として、IL-2R $\beta$  及び IL-4R $\alpha$  両受容体の細胞内領域の疎水性アミノ酸クラスターを同定した。
2. IL-2R $\beta$ , IL-4R $\alpha$  共に野生型は恒常的に細胞内へと取り込まれ、定常状態で後期エンドソーム/リソソームマーカーである LAMP1 と共局在した。一方、疎水性アミノ酸クラスターに変異導入した受容体は恒常的に細胞内へと取り込まれるが、リソソームへの輸送が阻害され、Transferrin 受容体陽性のリサイクルエンドソームや、LBPA 陽性の Multivesicularbody に観察された。

3. 疎水性アミノ酸クラスターへの変異導入により、IL-2R $\beta$ , IL-4R $\alpha$  両受容体のリソソームにおける分解が抑制された。

4. 疎水性アミノ酸クラスター変異受容体発現細胞では、リガンドである IL-2 及び IL-4 の分解が抑制された。

これらの結果より、IL-2R $\beta$  及び IL-4R $\alpha$  は、細胞内領域に保有する疎水性アミノ酸クラスターで Hrs とユビキチン非依存的に会合し、この会合が両受容体の正常なリソソーム輸送及び分解に必須であることが示唆された。受容体の細胞内動態は、受容体を起点とするシグナル伝達と密接に関連する。従って、IL-2, IL-4 受容体の小胞輸送制御に示唆を与える本研究は、リンパ球細胞の分化増殖の新たな制御機構の解明に繋がるものである。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Vitamin D<sub>3</sub> induces expression of human cathelicidin antimicrobial peptide 18 in newborns (新生児においてビタミン D<sub>3</sub> は human cathelicidin antimicrobial peptide 18 の発現を誘導する)

### 三 澤 由 佳

#### (論文の内容の要旨)

【はじめに】新生児における細菌感染症は重症化しやすく、死亡率増加の重要な原因となる。Human cathelicidin antimicrobial peptide 18 (以下 hCAP) は好中球二次顆粒中の自然免疫を担う殺菌タンパクの一つで、hCAP 遺伝子の転写制御には、骨髓球系特異的転写因子である CCAAT/enhancer binding protein epsilon (C/EBP $\epsilon$ ) と vitamin D<sub>3</sub> receptor (以下 VDR) が関与する。hCAP は、Toll-like receptor (TLR) を介して VDR および VD 活性化酵素を誘導することが報告されている。本研究では、好中球における hCAP の新生児期の発現とその後の年齢的变化、および活性型 VD<sub>3</sub> の hCAP 発現に対する促進効果について検討した。

【対象】日齢 0～5 (平均 2 日, 男児 13 人, 女児 12 人) の新生児と、21～46 歳 (平均 28 歳, 男性 12 人, 女性 13 人) の成人を対象とした。

【方法】新生児と成人の末梢血好中球を用いて、hCAP と neutrophil gelatinase-associated lipocalin (以下 NGAL) の陽性率と発現強度 (mean fluorescence intensity, 以下 MFI) をフローサイトメトリーにより比較した。hCAP の発現に対する VD の効果は、白血病細胞株 U937 細胞を VD および VD 誘

導体 1 $\alpha$ , 25 dihydroxy-22-oxacalcitriol (以下 OCT) を 10<sup>-7</sup>M 濃度で添加し、48 時間培養することにより検討した。また、臍帯血単核球に対する VD の効果も検討した。さらに、未熟児くる病に対してアルファカルシドールが投与された 4 例において、投与前後 hCAP の発現量を比較した。

【結果】末梢血好中球の hCAP の平均陽性率は、新生児で 37.1%, 成人で 85.2% で、新生児では有意に低値であった (p<0.05)。他の好中球二次顆粒殺菌タンパクである NGAL も同様であった。hCAP, NGAL の発現強度も新生児の方が成人よりも明らかに低値であった。一方、一次顆粒タンパクである myeloperoxidase の発現には差を認めなかった。末梢血単核球における hCAP の陽性率および MFI は新生児と成人で差を認めなかった。新生児、小児および成人における hCAP と NGAL の陽性率と MFI を比較したところ、両者とも年齢依存性に発現が増強した。血漿中の hCAP, NGAL 濃度は新生児と成人の間で有意差を認めなかった。U937 細胞を VD および OCT で刺激したところ、hCAP の発現はそれぞれ 2.2 倍, 2.1 倍に増加した。臍帯血単核球においても VD 添加後に hCAP mRNA が平均 16.8 倍に増加した。未熟児くる病に対してアルファカルシドールが投与され



た4例と、ほぼ同月齢のVD非投与例5例を比較検討した。内服前にフローサイトメトリーによるhCAP陽性率が50%以下の乳児において検討したところ、アルファカルシドール内服前のhCAP陽性率は24.2%であったが、内服4週間後には83.8%に増加した。一方、非内服群はそれぞれ21.8%と43.5%であった。【考察】新生児におけるhCAPおよびNGALの発現は成人に比べ明らかに低値であり、易感染性の一因であることが示唆された。新生児期におけるhCAPの増強にVD投与が有効であることが示唆され、新生児にVDあるいはVD誘導体を投与することにより、重症感染の予防または治療的アプローチが出来る可能性があることが示された。VDと協働して働く薬剤などの投与は、hCAP18の誘導を増強する可能性が考えられた。

#### (論文審査の結果の要旨)

新生児における細菌感染症は重症化しやすく、死亡率増加の重要な原因となる。Human cathelicidin antimicrobial peptide 18 (以下hCAP) は好中球二次顆粒中の自然免疫を担う殺菌タンパクの一つで、hCAP遺伝子の転写制御には、骨髄球系特異的転写因子であるCCAAT/enhancer binding protein epsilon (C/EBP $\epsilon$ ) と vitamin D<sub>3</sub> receptor (以下VDR) が関与する。hCAPは、Toll-like receptor (TLR) を介してVDRおよびVD活性化酵素を誘導することが報告されている。今回三澤らは、好中球におけるhCAPの新生児期の発現とその後の年齢的变化、および活性型VD<sub>3</sub>のhCAP発現に対する促進効果について検討した。

日齢0～5の新生児と21～46歳の成人を対象とし、新生児と成人の末梢血好中球を用いて、hCAPとneutrophil gelatinase-associated lipocalin (以下NGAL) の陽性率と発現強度 (mean fluorescence intensity, 以下MFI) をフローサイトメトリーにより比較した。hCAPの発現に対するVDの効果は、白血病細胞株U937細胞をVDおよびVD誘導体1 $\alpha$ , 25 dihydroxy-22-oxacalcitriol (以下OCT) を10<sup>-7</sup> M濃度で添加し、48時間培養することにより検討した。また、臍帯血単核球に対するVDの効果も検討した。

さらに、未熟児くる病に対してアルファカルシドールが投与された4例において、投与前後でhCAPの発現量を比較した。

その結果、三澤らは以下の結果を得た。

1. 末梢血好中球のhCAPとNGALの平均陽性率は、いずれも新生児では有意に低値であった (p<0.05)。hCAP, NGALの発現強度も新生児の方が成人よりも明らかに低値であった。一方、一次顆粒タンパクであるmyeloperoxidaseの発現には差を認めなかった。末梢血単球におけるhCAPの陽性率およびMFIは新生児と成人で差を認めなかった。
2. 新生児、小児および成人におけるhCAPとNGALの陽性率とMFIは、年齢依存性に発現が増強した。
3. 血漿中のhCAP, NGAL濃度は新生児と成人の間で有意差を認めなかった。
4. U937細胞をVDおよびOCTで刺激したところ、hCAPの発現はそれぞれ2.2倍, 2.1倍に増加した。臍帯血単核球においてもVD添加後にhCAP mRNAが平均16.8倍に増加した。未熟児くる病に対してアルファカルシドールが投与された4例のうち、内服前にフローサイトメトリーによるhCAP陽性率が50%以下の乳児において検討したところ、アルファカルシドール内服前のhCAP陽性率は24.2%であったが、内服4週間後には83.8%に増加した。一方、非内服群はそれぞれ21.8%と43.5%であった。

以上より、新生児におけるhCAPおよびNGALの発現は成人に比べ明らかに低値であり、易感染性の一因であることが示唆された。新生児期におけるhCAPの増強にVD投与が有効であることが示唆され、新生児にVDあるいはVD誘導体を投与することにより、重症感染の予防または治療的アプローチが出来る可能性があることが示された。フローサイトメトリーによる好中球hCAP18の発現スクリーニングが、感染リスクの高い新生児の特定に利用できる可能性があると考えられた。

新生児期の自然免疫の解明と感染症治療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。

Effects of hypohydration on thermoregulation during exercise before and after 5-day aerobic training in a warm environment in young men (若年者における急性低体液量負荷が5日間の暑熱下トレーニング前後の運動時体温調節反応に与える影響)

池川茂樹

(論文の内容の要旨)

【目的】従来から、比較的短期間の暑熱環境下における運動トレーニングが皮膚血管拡張・発汗の体温調節反応を改善することが知られているが、本研究では、これが主として循環血漿量の増加に起因する、という仮説を検証することを目的とした。

【方法】7名の若年男性を被験者とし、気温30°C、相対湿度50%に設定された人工気象室において、連続5日間、最大酸素摂取量の70%の強度で30分間の有酸素トレーニングを行った。トレーニングの前後で正常体液量及び低体液量の2条件を設定し、それぞれの条件下でトレーニング前の最大酸素摂取量の65%の強度で30分間運動させ、その間の食道温、前腕皮膚血管コンダクタンス、発汗速度、循環血漿量を測定した。低体液量条件は体重の3%減を目標とし、それを測定48時間前から減塩食摂取と測定4時間前の利尿剤投与によって達成した。

【結果】運動トレーニング後に循環血漿量は10%増加し、皮膚血管拡張及び発汗反応の食道温閾値はそれぞれ0.3°C、0.2°C低下した(P=0.008, P=0.012)。トレーニング前後で利尿剤投与によって循環血漿量をトレーニング前より10%低い同等のレベルにまで低下させると、皮膚血管拡張の食道温閾値はトレーニング前後で同等の値にまで上昇した(P=0.093)が、一方、発汗反応の食道温閾値はトレーニング後では前に比べて有意に低い値を維持した(P=0.004)。すなわち、運動トレーニングによって増加した循環血漿量を急性に元に戻すとトレーニング後に亢進した皮膚血管拡張反応は元に戻ってしまうが、亢進した発汗反応は一部維持された。

【結論】以上から短期間の暑熱環境下運動トレーニングによって引き起こされる皮膚血管拡張反応の亢進は主に血漿量の増加によって引き起こされること、発汗

反応の亢進にはそれ以外のメカニズムも関与していることが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

比較的短期間の暑熱環境下における運動トレーニングが皮膚血管拡張・発汗の体温調節反応を改善することが知られているが、本研究では、これが主として循環血漿量の増加に起因する、という仮説を検証することを目的とした。

7名の若年男性を被験者とし、気温30°C、相対湿度50%に設定された人工気象室において、連続5日間、最大酸素摂取量の70%の強度で30分間の有酸素トレーニングを行った。トレーニングの前後で正常体液量及び低体液量の2条件を設定し、それぞれの条件下でトレーニング前の最大酸素摂取量の65%の強度で30分間運動させ、その間の食道温、前腕皮膚血管コンダクタンス、発汗速度、循環血漿量を測定した。低体液量条件は体重の3%減を目標とし、それを測定48時間前から減塩食摂取と測定4時間前の利尿剤投与によって達成した。

その結果、次のような結果を得た。

暑熱トレーニングにより増加した循環血漿量を急性に低下させると、

1. 皮膚血管拡張反応の亢進は消失した。
2. 発汗反応の亢進は一部維持された。
3. 一回心拍出量の増加は消失した。

これらの結果から、短期間の暑熱環境下運動トレーニングによって引き起こされる皮膚血管拡張反応の亢進は主に血漿量の増加によって引き起こされること、発汗反応の亢進にはそれ以外のメカニズムも関与していることが明らかとなった。

以上、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。

Prospective Randomized Comparison of Cold Snare Polypectomy and Conventional Polypectomy for Small Colorectal Polyps (大腸小ポリープに対する Cold polypectomy と Conventional polypectomy の有用性の比較)

一 瀬 泰 之

(論文の内容の要旨)

【背景および目的】大腸ポリペクトミーは大腸癌予防に有用な内視鏡治療法であることが立証され、世界中で広く施行されている。大腸小ポリープの除去法として、高周波装置を使用しないコールドスネアの絞扼による除去法(コールドスネアポリペクトミー)が偶発症の発症率低下をもたらすという報告があるものの、その有用性は明らかではなかった。また、通常の大腸ポリペクトミー施行後に消化器症状が出現する症例が知られていたが、その理由も明らかではなかった。これらの消化器症状は、除去された大腸ポリープ数に関連することや、ポリペクトミー後2週間以内に症状が消失することから、高周波電流による熱傷との関連が示唆されていた。そこで、本研究では、コールドスネアポリペクトミーと高周波装置を使用した通常の大腸ポリペクトミーを内視鏡治療時間、ポリープ除去率、出血、ポリペクトミー後の消化器症状について比較検討した。

【方法】最大8mmまでの大腸ポリープを有する患者をコールドスネアポリペクトミー群(コールドポリペクトミー群)と通常の大腸ポリペクトミー群(通常ポリペクトミー群)の2群に無作為に分けた。主要評価項目はポリペクトミー後2週間以内の消化器症状(下痢、便秘、腹痛、腹部不快感)、副次的評価項目は大腸ポリープの除去率および出血とした。すべての大腸ポリープについて、大きさ、形態、部位が記録され、ポリープ除去率は、病理組織学的に評価された。ポリペクトミー後の出血は、内視鏡的止血術を必要とする症例とした。

【結果】80症例がエントリー後、コールドポリペクトミー群40例、通常ポリペクトミー群40例に無作為化された。2群間に年齢、性別、検査契機、盲腸到達時間の臨床的特徴においては有意差を認めなかった。除去された大腸ポリープについては、コールドポリペクトミー群ではポリープ数101個、1症例当たり平均2.5個、ポリープの平均大きさは5.7mmであった。通常ポリペクトミー群では104個、1症例当たり平均2.6個、平均大きさ5.5mmで2群間に有意差を認めなかった。

完全ポリープ除去率は2群間で同等(96%(97/101)対96%(100/104))であったが、内視鏡治療時間では、コールドポリペクトミー群が通常ポリペクトミー群に比べて有意に短かった(18分間対25分間、 $P < 0.0001$ )。ポリペクトミー後2週間以内の消化器症状はコールドポリペクトミー群では、通常ポリペクトミー群に比べて有意に少なかった(2.5%(1/40)対20%(8/40)、 $P = 0.029$ )。

【結論】コールドポリペクトミー群は、通常ポリペクトミー群に比べて出血のリスクおよび完全ポリープ除去率については有意な差を認めないものの、内視鏡治療時間およびポリペクトミー後の消化器症状については有意に優れていた。コールドポリペクトミー群は高周波装置を使用しないために準備にかかる時間を節約でき、高周波電流により生じる熱傷が発生しないことによると考えられた。以上より、大腸小ポリープの除去法としては、コールドポリペクトミーは通常の大腸ポリペクトミーより有用な方法と思われた。

(論文審査の結果の要旨)

大腸ポリペクトミーは大腸癌予防に有用な内視鏡治療法であることが立証され広く施行されている。大腸小ポリープの除去法として、高周波装置を使用しないコールドスネアの絞扼(コールドスネアポリペクトミー)による除去法が偶発症の発症率低下をもたらすという報告があるものの、その有用性は明らかではなかった。また、通常の大腸ポリペクトミー施行後に消化器症状が発症する症例が知られているが、除去された大腸ポリープ数や高周波電流による熱傷との関連が示唆されていた。そこで、本研究では、コールドスネアポリペクトミーと高周波装置を使用した通常の大腸ポリペクトミーを内視鏡治療時間、ポリープ除去率、出血、ポリペクトミー後消化器症状について比較検討した。

その結果、一瀬泰之らは次の成績を得た。

1. コールドポリペクトミー群40例、通常ポリペクトミー群40例に無作為化した結果、2群間に年齢、性別、検査契機、盲腸到達時間の臨床的特徴において有意差を認めなかった。



2. 除去された大腸ポリープに関し、コールドポリペクトミー群ではポリープ数101個、1症例当たり平均2.5個、平均大きさは5.7 mmであった。通常ポリペクトミー群では104個、1症例当たり平均2.6個、平均大きさ5.5 mmで2群間に有意差を認めなかった。
3. 完全ポリープ除去率は2群間で同等(96% (97/101) 対96% (100/104))であったが、内視鏡治療時間ではコールドポリペクトミー群が通常ポリペクトミー群に比べて有意に短かった(18分間対25分間,  $P < 0.0001$ )。

4. ポリペクトミー後2週間以内の消化器症状はコールドポリペクトミー群では、通常ポリペクトミー群に比べて有意に少なかった(2.5% (1/40) 対20% (8/40),  $P = 0.029$ )。

これらの結果より、コールドポリペクトミー群は、内視鏡治療時間およびポリペクトミー後の消化器症状について有意に優れていた。大腸小ポリープの除去法としてコールドポリペクトミーは有用な方法であることが示唆され、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB produces NO-mediated relaxation and PDGF-receptor beta-dependent tonic contraction in murine iliac lymph vessels (PDGF-BBによるマウス腸骨リンパ管におけるNO依存性の弛緩反応とPDGF- $\beta$ 受容体を介した収縮反応の機能特性)

## 前 島 大 輔

### (論文の内容の要旨)

【目的】PDGF-BBはリンパ管の機能に重要な役割を果たしていることが知られており、PDGF-BBあるいはPDGF- $\beta$ 受容体遺伝子を欠損した遺伝子改変動物が致死を引き起こすという報告や、組織間隙内の組織液中に存在するPDGFが組織間隙の内圧調節を維持するなどの報告がみられる。近年、PDGF-BBがリンパ管内皮細胞のMAPキナーゼ活性を介して細胞の遊走を促進する働きや、マウスの線維芽細胞におけるPDGF-BBの発現亢進がリンパ管新生を誘起し、リンパ節へのガン転移を促進させることが明らかにされている。一方でPDGFは血管のトーン制御にも関わっており、血管平滑筋の収縮反応や内皮細胞におけるNO産生を介した弛緩反応を引き起こすことなどが知られている。しかしながらリンパ管におけるPDGFの急性反応については今まで明らかにできていない。そこで今回、マウス摘出腸骨リンパ管に対してPDGF-BBがどのような反応を引き起こすかを詳細に解析し、あわせてリンパ管平滑筋の収縮反応におけるCa<sup>2+</sup>の由来について検討した。

【方法】ddYマウス(雄・4~7週齢)をペントバルビタールで麻酔後脱血・屠殺し、腸骨リンパ管を摘出し、両端をガラス製マイクロピペットに挿入して灌流標本を作製した。標本内腔に4 cmH<sub>2</sub>Oの内圧を負荷し、5% CO<sub>2</sub>-95% N<sub>2</sub>を通気したクレープス液(pH7.4, 37°C)で標本外腔側を灌流しながらリンパ管の直径変化を経時的に計測した。まずはじめに

PDGF-BBのリンパ管に対する反応を解析するため、リンパ管内皮細胞の有無における反応性を比較検討した。内皮細胞の剥離は0.3% CHAPSを3.5分間内腔に灌流することで行った。次に内皮細胞剥離標本を用いて、PDGF-BBの時間依存ならびに用量依存反応を調べた。次にPDGF-BBによる収縮反応の細胞内シグナル伝達機構ならびに収縮反応に関与するCa<sup>2+</sup>の由来を調べるために、imatinib, GW5074 (Raf-1キナーゼ阻害剤), U-73122 (PLC阻害剤), xestospongine C処理によるPDGF-BBの収縮反応に及ぼす影響を比較検討した。最後に、Ca<sup>2+</sup>-freeクレープス液, 1 mM EGTA Ca<sup>2+</sup>-freeクレープス液, high-K<sup>+</sup>溶液を用いてPDGF-BBの収縮反応の発生機序を詳細に解析した。

### 【結果】

1. リンパ管内皮細胞健常標本では、PDGF-BBは弛緩反応を引き起こした。同一の標本に5 × 10<sup>-5</sup> M L-NAME処理を行うと、弛緩反応は収縮反応に逆転した。内皮細胞剥離標本では、PDGF-BBは収縮反応を惹起した。
2. PDGF-BBは90分の間隔で投与すれば、反応の減弱化は生じないことを確認した。0.1~5 ng/mlの範囲においてPDGF-BBは内皮剥離標本で用量依存的な収縮反応を誘起した。
3. 10<sup>-6</sup>または10<sup>-5</sup> Mのimatinib前処理によって、0.5 ng/mlのPDGF-BB収縮反応は有意に抑制された。



4.  $10^{-6}$ M の GW5074 前処理によって, 1 ng/ml の PDGF-BB 収縮反応は完全に抑制された。 $10^{-7}$ M の U-73122 前処理で 1 ng/ml の収縮反応は有意に抑制された。
5.  $10^{-7}$ M の xestospongine C 前処理で, 1 ng/ml の PDGF-BB 収縮反応は有意に抑制された。
6.  $5 \times 10^{-6}$ M の nifedipine 前処理で, 1 ng/ml の PDGF-BB 収縮反応は有意に抑制された。
7. 5 分間の  $\text{Ca}^{2+}$ -free クレブス液の前処理によって, 1 ng/ml の PDGF-BB 収縮反応は完全に抑制された。
8. High- $\text{K}^+$  溶液で細胞膜を完全に脱分極させた条件においても, 高濃度 (3 ng/ml) の PDGF-BB は収縮反応を誘起した。
9. 1 mM EGTA  $\text{Ca}^{2+}$ -free high- $\text{K}^+$  溶液環境下においても, 高濃度 (5 ng/ml) の PDGF-BB は収縮反応を誘起した。

【結論】以上から, PDGF-BB はマウス腸骨リンパ管管内皮細胞に作用し内因性 NO を産生・放出してリンパ管平滑筋の弛緩反応を引き起こすことが明らかとなった。また PDGF-BB はリンパ管平滑筋に存在する PDGF- $\beta$  受容体に直接作用し細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  の流入と細胞膜結合型の  $\text{Ca}^{2+}$  ならびに細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出によってリンパ管平滑筋収縮を誘起することが証明された。

#### (論文審査の結果の要旨)

PDGF-BB はリンパ管の機能に重要な役割を果たすという報告が見られるが, リンパ管における PDGF の急性反応については今まで明らかにされていない。そこで前島らは, マウス摘出腸骨リンパ管に対する PDGF-BB の反応を詳細に解析し, リンパ管平滑筋収縮反応の  $\text{Ca}^{2+}$  の由来について検討した。

以下に研究結果を示す。

1. リンパ管管内皮細胞健常標本では, PDGF-BB は弛緩反応を引き起こし,  $5 \times 10^{-5}$ M L-NAME 処理

を行うと, 弛緩反応は収縮反応に転じた。内皮細胞剥離標本では, PDGF-BB は収縮反応のみを引き起こした。

2. PDGF-BB は 90 分間隔で投与すれば, 反応の減弱化は生じなかった。0.1~5 ng/ml の範囲において PDGF-BB は用量依存的な収縮反応を誘起した。
3.  $10^{-6}$  または  $10^{-5}$ M の imatinib 前処理によって, 0.5 ng/ml の PDGF-BB 収縮反応は有意に抑制された。
4.  $10^{-6}$ M の GW5074 前処理によって, 1 ng/ml の PDGF-BB 収縮反応は完全に抑制された。 $10^{-7}$ M の U-73122 前処理で 1 ng/ml の収縮反応は有意に抑制された。
5.  $10^{-7}$ M の xestospongine C 前処理で, 1 ng/ml の PDGF-BB 収縮反応は有意に抑制された。
6.  $5 \times 10^{-6}$ M の nifedipine 前処理で, 1 ng/ml の PDGF-BB 収縮反応は有意に抑制された。
7. 5 分間の  $\text{Ca}^{2+}$ -free クレブス液の前処理によって, 1 ng/ml の PDGF-BB 収縮反応が抑制された。
8. High- $\text{K}^+$  溶液で細胞膜を完全に脱分極させた条件においても, 高濃度 (3 ng/ml) の PDGF-BB は収縮反応を誘起した。
9. 1 mM EGTA  $\text{Ca}^{2+}$ -free high- $\text{K}^+$  溶液環境下においても, 高濃度 (5 ng/ml) の PDGF-BB は収縮反応を誘起した。

以上の結果から, PDGF-BB はマウス腸骨リンパ管管内皮細胞に作用し, 内因性の NO を産生してリンパ管平滑筋の弛緩反応を引き起こすことが明らかとなった。また, PDGF-BB はリンパ管平滑筋に存在する PDGF- $\beta$  受容体に作用し, 細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入と細胞膜結合型の  $\text{Ca}^{2+}$  ならびに細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出によってリンパ管平滑筋収縮を誘起することが証明された。

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。

## Inflammasome Activation of Cardiac Fibroblasts Is Essential for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury (心筋虚血再灌流傷害における心線維芽細胞のインフラマソーム活性化の役割)

川口 政徳

#### (論文の内容の要旨)

【目的】組織の虚血再灌流時において誘導される炎症反応は, 虚血再灌流傷害の発生において重要な役割を果たしている。しかし, 虚血再灌流時にどのような機

序で炎症反応が誘導されるのかは未だよく解明されていない。近年, 組織傷害後に起こる無菌性の炎症反応は, インフラマソームと呼ばれる多重蛋白複合体を介して誘導されることが示されている。これは, 自然免

疫機構の一つであり、生体に加わるさまざまな danger signal を細胞内の Nod-like receptors が感知し、アダプター蛋白である Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) を介して Caspase-1 をリクルートし重合体 (=インフラマソーム) を形成する。ここで Caspase-1 が活性化され、炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL)  $-1\beta$ , IL-18 の前駆体をプロセッシングし、活性型 IL- $1\beta$ , IL-18 を産生・分泌する。IL- $1\beta$  は、心筋虚血再灌流傷害時の初期の重要な炎症メディエーターであり、その抑制により心筋虚血再灌流傷害は軽減されることが報告されている。そこで本研究は、IL- $1\beta$  の産生の際に必須であるインフラマソームに着目し、心筋虚血再灌流傷害におけるその役割を明らかにすることを目的とした。

**【方法】** インフラマソームの構成蛋白である ASC と Caspase-1 のノックアウトマウスを用い心筋虚血再灌流モデルを作製し、その傷害に対する影響を評価した。また、野生型マウスの心筋組織でインフラマソームの局在を調べ、炎症性サイトカインの産生量、炎症細胞浸潤、組織障害、心筋リモデリングの程度等を ASC<sup>-/-</sup>マウスと比較した。最後に、どの細胞でインフラマソームの活性化が起きているのか、またそのインフラマソーム活性化の機序を解明するため、ASC<sup>-/-</sup>の骨髄移植マウスを用いた虚血再灌流モデルの作製、*in vitro* 実験では心筋細胞、心線維芽細胞を用い低酸素/再酸素化実験などを行い評価した。

**【結果】** ASC<sup>-/-</sup>と Caspase-1<sup>-/-</sup>マウスでは、野生型に比べて48時間後の心筋虚血再灌流傷害が有意に抑制されており、心筋組織における IL- $1\beta$  をはじめとする種々の炎症性サイトカイン産生量、炎症細胞浸潤、慢性期の心筋リモデリングも有意に抑制されていた。ASC<sup>-/-</sup>の骨髄移植マウスを用いた虚血再灌流実験によって、心筋組織における虚血再灌流後超初期のインフラマソームの活性化と IL- $1\beta$  の産生は、骨髄由来の炎症細胞だけでなく、心筋組織構成細胞でも起こることが明らかとなった。*In vitro* 実験では、低酸素/再酸素化刺激により、心筋細胞ではなく心線維芽細胞のインフラマソームが活性化されることが示され、その活性化の機序には活性酸素と細胞内カリウム濃度低下が関与していることが示唆された。

**【考察】** これらの実験結果より、心筋虚血再灌流傷害の発症には、心線維芽細胞のインフラマソームの活性化が虚血再灌流傷害の初期の炎症反応の誘導に重要な

役割を果たしていることが示され、インフラマソームが心筋虚血再灌流傷害を抑制する新たな治療の標的となる可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

組織の虚血再灌流時において誘導される炎症反応は、虚血再灌流傷害の発生において重要な役割を果たしている。近年、組織傷害後に起こる無菌性の炎症反応は、インフラマソームと呼ばれる多重蛋白複合体を介して誘導されることが示されている。また、インターロイキン (IL)  $-1\beta$  は、心筋虚血再灌流傷害時の初期の重要な炎症メディエーターであり、その抑制により心筋虚血再灌流傷害は軽減されることが報告されている。今回川口は、IL- $1\beta$  の産生の際に必須であるインフラマソームに着目し、心筋虚血再灌流傷害におけるその役割を明らかにすることを目的とした。インフラマソームの構成蛋白の Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) と Caspase-1 のノックアウトマウス、および野生型のマウスを用い心筋虚血再灌流モデルを作製し、その傷害に対する影響、炎症性サイトカインの産生量の変化、炎症細胞浸潤、組織障害、心筋リモデリングの程度等を比較検討した。また、どの細胞でインフラマソームの活性化が起きているのか、またそのインフラマソーム活性化の機序を解明するため、ASC<sup>-/-</sup>の骨髄移植マウスを用いた虚血再灌流モデルの作製、*in vitro* 実験では心筋細胞、心線維芽細胞を用い低酸素/再酸素化実験などを行い評価した。

その結果、川口は次の結論を得た。

1. ヒト、及び野生型マウスの心筋梗塞後心筋組織では、浸潤炎症細胞 (好中球とマクロファージ) と心筋間質細胞で ASC と Caspase-1 の明らかな発現を認めており、同細胞群におけるインフラマソームの局在が示唆された。
2. ASC<sup>-/-</sup>と Caspase-1<sup>-/-</sup>マウスでは、野生型に比べて心筋虚血再灌流傷害が有意に抑制されており、心筋組織における IL- $1\beta$  をはじめとする種々の炎症性サイトカイン産生量、炎症細胞浸潤、慢性期の心筋リモデリングも有意に抑制されていたことより、インフラマソームは虚血再灌流傷害の発生に関与していることが示唆された。
3. ASC<sup>-/-</sup>の骨髄移植マウスを用いた虚血再灌流実験によって、骨髄由来の浸潤炎症細胞におけるインフラマソームが重要であることが示されたが、同様に心筋組織構成細胞におけるインフラマソームも虚

血再灌流傷害に影響を与えることが示された。

4. 培養心筋細胞と心線維芽細胞を用いた *in vitro* 実験より、低酸素/再酸素化刺激によるインフラマソームの活性化と IL-1 $\beta$  の産生は、主に心線維芽細胞で起こり、その活性化の機序には活性酸素と細胞内カリウム濃度低下が一部関与していることが示された。

これらの実験結果より、心筋虚血再灌流傷害の発生には骨髄由来の浸潤した炎症細胞と心線維芽細胞のイ

ンフラマソームの活性化が重要であり、とくに虚血再灌流超初期の炎症反応の誘導には心線維芽細胞が重要な役割を果たしていることが示された。これらの細胞におけるインフラマソームが、心筋虚血再灌流傷害を抑制する新たな治療の標的となる可能性があることを示唆した臨床的にも有用な論文であり、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。

Pretreatment by low-dose fibrates protects against acute free fatty acid-induced renal tubule toxicity by counteracting PPAR $\alpha$  deterioration (低用量フィブラートの前治療は、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体  $\alpha$  型の機能低下を阻止して、遊離脂肪酸による急性腎尿細管毒性に対し保護作用を発揮する)

## 高橋京子

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、腎機能低下と密接に関連する尿細管間質障害の原因として、尿蛋白に伴う遊離脂肪酸尿細管毒性が注目されている。ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体  $\alpha$  型 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$ : PPAR $\alpha$ ) は脂肪酸代謝を支配する主要な核内転写調節因子である。以前我々は、PPAR $\alpha$  遺伝子欠損マウスで大量の外來性蛋白尿を誘導し遊離脂肪酸尿細管負荷モデルを作成した場合、近位尿細管における脂肪酸代謝障害から強い近位尿細管障害が出現することを報告した。この結果は、PPAR $\alpha$  が尿蛋白に伴う遊離脂肪酸尿細管毒性の解除に必須であることを示すとともに、PPAR $\alpha$  作動薬による PPAR $\alpha$  の活性化が脂肪酸代謝の強化を通して尿細管保護的に機能する可能性を示唆している。今回、この仮説を検証するため、PPAR $\alpha$  作動薬であるクロフィブラートを用いて遊離脂肪酸負荷モデルマウスにおける尿細管保護作用について検討した。予備実験では、高用量クロフィブラート投与では、クロフィブラートの血中濃度が異常上昇し、尿細管障害が増悪することが観察されたため、今回の研究では低用量クロフィブラートの前投与による腎保護効果について検討した。

【材料および方法】野生型マウスと PPAR $\alpha$  欠損マウスを用いて、低用量クロフィブラート含有食 (0.1% w/w) を遊離脂肪酸負荷の2週間前より開始し観察期間中継続した。通常食群とクロフィブラート食群 (Fib 群) の2群に、脂肪酸含有ウシ血清アルブミン

溶液 (BSA 溶液) を連日腹腔内投与し蛋白尿を誘導することで、尿細管に遊離脂肪酸負荷を行った。尿量変化、尿蛋白量変化、腎機能変化、腎病理変化 (光顕像における糸球体病変・尿細管病変の半定量) について評価し、さらにクロフィブラートの薬効機序の解明のために、①脂肪酸代謝の変化 (血清中および腎内遊離脂肪酸量変化、腎  $\beta$  酸化能および  $\beta$  酸化関連酵素群の蛋白量変化) ②腎における酸化ストレス変化 (過酸化脂質マーカーの定量変化、酸化ストレス防御酵素群の蛋白変化) ③アポトーシス変化 (TUNEL 染色性変化、Bcl 酵素群の蛋白変化) ④炎症性反応変化 (腎皮質のマクロファージ染色による量的変化、NF $\kappa$ B 経路の抑制因子である IkB $\alpha$  および標的遺伝子である COX2, TNF $\alpha$ , ICAM1 の mRNA 変化) について解析した。

【結果】野生型マウス Fib 群では通常食群と比較し、遊離脂肪酸の大量負荷に伴う急性尿細管障害が軽減した。Fib 群では、PPAR $\alpha$  の発現量や腎脂肪酸  $\beta$  酸化能力が補強され、大量の遊離脂肪酸負荷によって引き起こされる PPAR $\alpha$  の腎内発現量の減少、尿細管への脂肪酸流入量の増大、腎脂肪酸  $\beta$  酸化能の低下、および過剰遊離脂肪酸の細胞内蓄積が軽減した。またクロフィブラートの前投与は、酸化ストレス防御酵素群 (カタラーゼ, SOD, グルタチオンペルオキシダーゼ), アポトーシス抑制蛋白群 (Bcl2, Bcl-xL), NF $\kappa$ B 抑制蛋白 (IkB $\alpha$ ) の腎内発現を上昇させ、抗酸化ストレス作用、抗アポトーシス作用、抗炎症作用を発揮し、尿細管障害を軽減している可能性が考えら



れた。これらの一連の効果は、PPAR $\alpha$  遺伝子欠損マウスでは認められないことから、クロフィブラートのPPAR $\alpha$  転写活性亢進によるPPAR $\alpha$  依存性の尿細管保護作用と考えられた。同様の効果は、ベザフィブラートおよびフェノフィブラートでも認められ、フィブラート系薬剤に共通の効果であることが判明した。興味深いことに、PPAR $\alpha$  欠損マウスFib群では、逆に尿細管病変が悪化することも判明した。これは、クロフィブラートのPPAR $\alpha$  非依存性尿細管障害作用を示す可能性がある。

【結論】以上の結果から、低用量のクロフィブラートは、尿蛋白によって引き起こされる遊離脂肪酸尿細管毒性とPPAR $\alpha$  機能の低下に対し、PPAR $\alpha$  の転写活性を亢進させることで脂肪酸代謝の恒常性の維持作用、抗酸化ストレス作用、抗アポトーシス作用、抗炎症作用を発揮し、PPAR $\alpha$  依存性の尿細管保護作用を表出させることが判明した。しかし、フィブラート製剤には、尿細管に対する保護作用と毒性作用の二面性がある可能性があり、有益な薬理効果を得るためには、PPAR $\alpha$  依存性の尿細管保護効果がPPAR $\alpha$  非依存性の尿細管毒性効果を上回る必要がある。この微妙なバランスはフィブラートの投与量や血中濃度により影響される可能性がある。フィブラートは腎排泄性であり腎障害時には血中濃度が高くなりやすいため、実用化には腎障害時のフィブラートの適切な用量を設定することが必要である。一方、腎障害下であっても血清中の薬物濃度が安定するような、新たなPPAR $\alpha$  作動薬を検討することも有用と思われた。

#### (論文審査の結果の要旨)

腎機能低下は、尿細管、間質障害と強く相関するため、その対策は重要である。近年、尿蛋白に伴う遊離脂肪酸尿細管毒性が注目されているが、本研究ではフィブラートによるPPAR $\alpha$  の活性化が、脂肪酸代謝の強化を通して尿細管保護的に働くか検討した。野生型マウスに通常食と0.1%クロフィブラート食を2週間与えた後、遊離脂肪酸負荷腎症を作成した。各群間の血清検査、腎病理変化を検討し、クロフィブラートによる腎保護効果を確認後、機序の解明のため腎脂肪酸代謝、酸化ストレス、アポトーシス、炎症反応変化について解析を行った。また、他のタイプのフィブ

ラートも尿細管保護的に機能するか検討するため、野生型マウスにフェノフィブラートとベザフィブラートを投与後、遊離脂肪酸負荷腎症を作成し比較した。PPAR $\alpha$  欠損マウスに遊離脂肪酸負荷腎症を作成し、フィブラートの腎保護効果がPPAR $\alpha$  依存性であるかの検討も行った。

その結果、高橋は以下の結論を得た。

1. フィブラート食群では、通常食群と比較し遊離脂肪酸負荷によるBUN蓄積が抑えられ、尿細管障害を示す病理所見が軽減していた。
2. フィブラート食群では、通常食群と比較し遊離脂肪酸負荷に伴う血中および腎内の脂肪酸増加が抑制され、脂肪酸代謝能力が保持されていた。
3. フィブラート食群では、通常食群と比較し遊離脂肪酸負荷に伴う脂質過酸化マーカーの増加が抑えられ、酸化ストレス防御酵素群（カタラーゼ、SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ）の腎内発現の上昇を認めた。
4. フィブラート食群では、通常食群と比較しアポトーシス抑制蛋白群（Bcl2, Bcl-xL）の腎内発現の上昇を認めた。
5. フィブラート食群では、通常食群と比較してNF $\kappa$ B抑制蛋白（I $\kappa$ B $\alpha$ ）の腎内発現の上昇を認めた。
6. フェノフィブラートおよびベザフィブラートも同様に、尿細管保護効果が用量依存性に認められた。
7. PPAR $\alpha$  欠損マウスのフィブラート投与群では、遊離脂肪酸負荷により、改善効果を認めず、逆に尿細管病変が悪化した。

低用量クロフィブラートの尿蛋白に付随する遊離脂肪酸尿細管毒性に対する保護作用を示した。フィブラートは、脂肪酸代謝の恒常性の維持、抗酸化ストレス、抗アポトーシス、抗炎症作用を発揮して尿細管保護作用を表出させることを解明した。また、フィブラートには尿細管保護作用だけでなく、毒性作用の二面性がある可能性が示唆された。低用量フィブラートは腎疾患治療薬となりう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。



Infraorbital nerve swelling associated with autoimmune pancreatitis (自己免疫性膵炎に伴う眼窩下神経腫大)

渡 辺 智 治

(論文の内容の要旨)

【背景】自己免疫性膵炎は様々な膵外病変を合併することが知られており、現在はIgG4関連全身性疾患の一つとして捉えられているが、三叉神経腫大を伴った報告はない。

【目的】自己免疫性膵炎と、三叉神経の分枝である眼窩下神経の腫大との関連を調べる。

【対象と方法】1999年7月から2008年8月までに当院で自己免疫性膵炎と診断された71症例中、12例で臨床的に涙腺や唾液腺の腫大、あるいは慢性副鼻腔炎が疑われ、頭頸部のMRIが施行された。このうちMRI冠状断で眼窩下神経が全長にわたり描出されていた11例(男性10例、女性1例、平均年齢61.2歳)を対象とした。また、2008年6月から2008年7月までに頭頸部のMRIが施行された自己免疫性膵炎以外の連続した20例(男性10例、女性10例、平均年齢63.3歳)をコントロール群とした。画像評価にはT1強調像、T2強調像、脂肪抑制T2強調像、STIRいずれかの冠状断を用い、自己免疫性膵炎群およびコントロール群の眼窩下神経の厚みを左右それぞれ計測した。自己免疫性膵炎のうち9例はステロイド治療後も頭頸部のMRIが施行され、治療後の画像でも神経の厚みを計測した。また、自己免疫性膵炎群では眼窩下神経支配領域の疼痛や異常感覚といった神経学的所見の有無も調べた。

【結果】自己免疫性膵炎群では11例中5例(眼窩下神経22本中8本)に厚み5mm以上の腫大を認めた。両側性の腫大は3例、片側性は2例であった。一方、コントロール群ではいずれも厚みは5mm未満であった。ステロイド治療前後の比較では、治療前に9例中3例(18本中5本)で厚み5mm以上の腫大が認められ、いずれも治療後に腫大が軽減した( $P < 0.05$ )。眼窩下神経以外では、2例に両側前頭神経腫大、2例に片側性の下歯槽神経腫大、1例に両側耳下腺腫大、7例に両側顎下腺腫大、1例に片側性の外眼筋腫大が認められた。いずれの症例も眼窩下神経支配領域に神経学的異常は認められなかった。

【考察】近年、自己免疫性膵炎に伴う涙腺や唾液腺の腫大はミクリッツ病と同様の病態として認識されているが、頭頸部領域における神経腫大の報告は今回が初

めてである。今回の結果では涙腺や唾液腺は両側性の腫大を呈し、これらはミクリッツ病として矛盾しない。一方、眼窩下神経や下歯槽神経、外眼筋については片側性の腫大例も存在したが、自己免疫性膵炎に伴う神経や筋の腫大が腺組織とは異なり左右非対称な理由は不明である。頭頸部領域の神経腫大の鑑別として、悪性リンパ腫、癌の神経周囲進展、神経鞘腫、CIDP、炎症性偽腫瘍、神経線維腫症などが挙げられるが、自己免疫性膵炎に伴う眼窩下神経腫大はその支配域に神経学的異常を認めない点が、他のニューロパチーと比し特徴的と思われる。眼窩下神経の腫大は涙腺や唾液腺など他の頭頸部病変に比し、病変として目立ちにくい。したがって、涙腺や唾液腺の腫大を呈する症例には眼窩下神経にも注意を払い、腫大している場合には自己免疫性膵炎やIgG4関連疾患を考慮し、膵精査や血清IgG4の測定が望まれる。逆に、自己免疫性膵炎と診断されている症例に眼窩下神経腫大を認めた場合には、非腫瘍性病変の可能性が高いと言える。

【結論】自己免疫性膵炎ではコントロール群に比し眼窩下神経腫大を伴う頻度が高く、膵外病変の一つと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

自己免疫性膵炎は様々な膵外病変を合併することが知られており、現在はIgG4関連全身性疾患の一つとして捉えられている。自己免疫性膵炎に伴う涙腺や唾液腺の腫大はミクリッツ病と同様の病態と考えられているが、三叉神経腫大を伴った報告はない。したがって今回、自己免疫性膵炎と三叉神経の分枝である眼窩下神経腫大との関連を調べた。

対象は自己免疫性膵炎症例のうち臨床的に涙腺や唾液腺腫大、あるいは慢性副鼻腔炎が疑われ、頭頸部領域のMRIが撮像された11例とし、コントロール群として自己免疫性膵炎以外で頭頸部のMRIを施行された連続した20例を選んだ。眼窩下神経の評価としてMRI冠状断における神経の頭尾方向の厚みを計測し、自己免疫性膵炎群とコントロール群との差異、自己免疫性膵炎群における眼窩下神経の左右差、およびステロイド治療前後での変化についてそれぞれ検討した。また、自己免疫性膵炎群では眼窩下神経以外の臓器

(涙腺, 耳下腺, 顎下腺, 前頭神経, 下歯槽神経, 外眼筋) についても腫大の有無, およびステロイド治療前後での変化について調べた。

その結果, 渡辺は次の結論を得た。

1. 自己免疫性膵炎では11例中5例に眼窩下神経腫大を認めた。一方, コントロール群では腫大例は認められなかった。
2. 眼窩下神経腫大を呈した5例中, 3例は両側性, 2例は片側性であった。
3. 涙腺や唾液腺, 前頭神経の腫大はいずれも両側性, 下歯槽神経および外眼筋の腫大はいずれも片側性であった。

4. ステロイド治療後はいずれも眼窩下神経腫大が軽減した。

5. 眼窩下神経以外の臓器についても, 下歯槽神経の除き, いずれもステロイド治療後に腫大が軽減した。

これらの結果より, 涙腺や唾液腺の両側性腫大(ミクリッツ病)とは異なり, 眼窩下神経腫大には片側例も存在した点は解釈困難であったが, いずれもステロイド治療に反応しており, 同神経の腫大は自己免疫性膵炎の膵外病変と考えられた。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。

Preoperative Differential Diagnosis of Minimal Deviation Adenocarcinoma and Lobular Endocervical Glandular Hyperplasia of the Uterine Cervix  
A Multicenter Study of Clinicopathology and Magnetic Resonance Imaging Findings (子宮頸部最小偏倚腺癌および分葉状頸管腺過形成の術前診断に関する臨床病理学的因子およびMRI画像による多施設研究)

高 津 亜希子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 子宮頸部最小偏倚腺癌または悪性腺腫(minimal deviation adenocarcinoma, MDA)は超高分化型の粘液性腺癌で頸部腺癌全体の1~3%を占める。組織学的には良性の病変に類似するにもかかわらず, 早期にリンパ節転移や播種をきたす予後不良な疾患である。臨床的には大量の水様帯下や子宮頸部の腫大, 嚢胞性病変を特徴とするが, 組織学的に正常頸管腺に類似し, 細胞異型に乏しいため, 細胞診や組織診による術前診断は困難であると考えられてきた。さらに近年形態学的にMDAに類似した良性病変として分葉状頸管腺過形成(lobular endocervical glandular hyperplasia, LEGH)が提唱されたが, LEGHもMDAに類似した臨床病理学的特徴を有するため, より正確な治療前の診断と適切な対応が必要となってきた。しかしMDAやLEGHは比較的にまれな疾患であるため, 単一施設の検討では限界がある。MDAとLEGHの術前診断および治療方針を確立するため, 後方視的多施設研究を行った。

【方法】 MDAを疑われ円錐切除術もしくは子宮摘出術を施行された症例を全国24施設から112症例集積し, まずこれらの症例に対してcentral pathological review(CPR)を施行した。さらに各症例のMRI検査, 子宮頸部細胞診および組織診, 頸管粘液中の胃型粘液

検出結果を含む臨床病理学的特徴を解析し, 各検査の診断上の意義を検討した。また治療法と治療成績について解析し, 診断と治療に関する指針を提案した。

【結果】 全国の研究参加施設から集積された112例の病理組織をCPRで検討した結果, ナボット嚢胞(NC)37例, LEGH54例, MDA6例, 腺癌11例, その他の良性疾患4例と診断された。LEGHはしばしば子宮頸部上皮内腺癌やMDA, 粘液性腺癌と合併していた。CPRでの診断と各参加施設での診断を比較すると, CPRでMDA, 腺癌と診断された症例の各施設での診断はほぼ一致していたが, CPRでLEGHとされた症例には各施設でMDAと診断されていた症例が26例含まれていた。臨床経過では3例のMDA症例で再発がみられたのに対し, LEGH症例では手術術式にかかわらず再発は見られなかった。MRI検査において, LEGHでは中心部に充実性部位, 周辺部に嚢胞部位が存在する特徴的な所見がみられたが, MDAは主に充実性腫瘍を呈した。MRI検査の正診率は, NCやLEGH等の良性疾患では86.7%, MDAや腺癌では66.7%, 全体では81.7%であったが, LEGHの一部にMDAや腺癌が存在する症例では画像診断が困難であった。子宮頸部細胞診, 胃型粘液検出の単独での診断能は限定されていたが, MRI検査とこれらの検査を組み合わせることが術前診断に有用と考えら

れた。MRI 上内部に充実部をともなう嚢胞構造を呈し、腺細胞に軽度の異形と胃型粘液をともなっている場合はLEGHが強く疑われ (24/26, 92%), MRI上充実性で細胞診陽性の場合にはMDA や腺癌の可能性が高くなると考えられた (5/5, 100%)。

【結論】各施設でMDA と診断され拡大手術を施行された症例には、LEGH だった症例が多く存在したことから、病理診断の標準化が期待された。またMRI 検査、頸部細胞診、胃型粘液を組み合わせることで、MDA およびLEGH の術前診断の正診率を改善できる可能性が示された。LEGH が予想される症例では拡大手術は必要ない可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

子宮頸部最小偏倚腺癌 (minimal deviation adenocarcinoma, MDA) は超高分化型の粘液性腺癌で予後不良な疾患である。組織学的に正常頸管腺に類似し、細胞異型に乏しいため、細胞診や組織診による術前診断は困難であると考えられてきた。さらに近年形態学的にMDA に類似した良性病変として分葉状頸管腺過形成 (lobular endocervical glandular hyperplasia, LEGH) が提唱されたが、LEGH もMDA に類似した臨床病理学的特徴を有するため、より正確な治療前の診断と適切な対応が必要となってきた。今回MDA とLEGH の術前診断および治療方針を確立するため、後方視的多施設研究を行った。

全国24施設から112症例を集積し、まずこれらの症例に対してcentral pathological review (CPR) を施行した。さらに各症例のMRI 検査、子宮頸部細胞診および組織診、頸管粘液中の胃型粘液検出結果など臨床病理学的特徴を解析し、各検査の診断上の意義を検討した。また治療法と治療成績について解析し、術前診断と治療の方向性の指針を提案した。

その結果、高津は次の結論を得た。

1. 全国の研究参加施設から集積された112例の病理

組織をCPR で検討した結果、ナボット嚢胞 (NC) 37例, LEGH54例, MDA 6 例, 腺癌11例, その他の良性疾患4 例と診断された。CPR でLEGH と診断された症例には参加施設でMDA と診断されている症例が多数見られた。

2. 細胞診単独、あるいは胃型粘液の同定だけでは術前診断に不十分であった。
3. MRI 検査において、LEGH では中心部に充実性部位、周辺部に嚢胞部位が存在する特徴的な所見がみられることを見出した。一方、MDA は主に充実性腫瘍を呈した。MRI 検査の正診率は、NC やLEGH 等の良性疾患では86.7%, MDA や腺癌では66.7%, 全体では81.7%と良好であったが、LEGH の一部にMDA や腺癌が存在する症例では画像診断が困難であった。
4. LEGH はパンチ生検では術前診断が困難であったが、円錐切除による診断は最終診断との一致率が高かった。
5. 単独の検査による診断能は限定されていたが、MRI 検査とこれらの検査を組み合わせることにより術前診断の精度が向上すると考えられた。
6. 治療成績ではMDA には拡大手術が施行されていたにも拘わらず3 例で再発がみられた。一方、LEGH 症例では拡大術式を含む各種の手術術式が施行されていたが、術式にかかわらず再発や死亡例は見られなかった。

これらの結果より、MDA およびLEGH の病理診断の標準化が期待された。またMRI 検査、頸部細胞診、胃型粘液などを組み合わせることで、MDA およびLEGH の術前診断の正診率を改善でき、不要な拡大手術が回避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。

Risk Evaluation for Coronary Artery Disease in Patients with Impaired Glucose Tolerance after a Successful Coronary Intervention (経皮的冠動脈形成術後の耐糖能異常患者における冠動脈疾患のリスク評価)

堀 込 充 章

(論文の内容の要旨)

【序論】内皮機能障害は明らかな動脈硬化性変化がない時期から冠危険因子と関連が強く、進行した動脈硬化症を示す部位ではより顕著であると考えられる。こ

の内皮機能の評価法として寒冷昇圧試験 (CPT) に対する血管の反応を測定する方法が確立されており、N-13アンモニアを使用したポジトロン断層撮影 (PET) は、心筋血流の定量測定が可能であることが



ら、安静時とCPTによる負荷時の心筋血流量を計測することで内皮機能を定量的に評価できる。内皮機能の評価は、今まで主にごく早期の動脈硬化性変化が研究対象とされており、既に進行した冠動脈疾患を有する患者においてはほとんど研究されていない。実際、冠危険因子の修正は、冠動脈疾患を有する患者の予後を改善することが明らかにされている。そこで、既知の冠動脈疾患を有する患者の内皮機能を調査し、冠危険因子が内皮機能に及ぼす影響を評価することが冠危険因子管理に有効であると考えられる。本研究の目的は、既知の冠動脈疾患を有する耐糖能異常患者に対しN-13アンモニアPETを行い、冠動脈内皮機能を定量的に測定し、内皮機能と冠危険因子間の相関を評価することで、冠危険因子管理の有効性を示すことにある。

**【方法】**対象として2005年11月から2007年11月の間に信州大学病院で耐糖能障害を有し冠動脈疾患の治療を受けた狭心症患者から14人を登録した。冠動脈造影検査にて75%以上の冠動脈狭窄を有意狭窄とし責任病変に経皮的冠動脈形成術(PCI)を行った。PCI施行後約1カ月でPET撮影を行い、撮影当日全患者に冠危険因子の評価目的の採血を行った。PET撮影のプロトコルは、まず安静時にN-13アンモニア400MBqを静注し心筋血流量を測定、50分の休憩後にCPTを行いCPT開始1分後にN-13アンモニア400MBqを静注し負荷時の心筋血流量を測定した。測定結果は、16分割された左室心筋の分画をポラマップに要約(総分画224分画)し、冠動脈造影と照合しながらこの16分画をそれぞれ、75%以上の残存狭窄血管の灌流域を狭窄部、バルーンやStentによるPCI施行血管の灌流域をPCI部、その他の部位を正常部に分類し、各部の心筋血流量の平均値を解析に使用した。冠動脈の内皮機能は、心筋血流量の%増加率として定義し、各灌流域での%増加率と冠危険因子(総コレステロール、LDLおよびHDLコレステロール、中性脂肪、HbA1c、空腹時インスリン、インスリン抵抗性指数、空腹時血糖など)との相関を検討した。

**【結果】**冠動脈造影検査の結果、1枝病変は3人、2枝病変は9人、3枝病変は2人で、責任病変以外に有意狭窄が残存した患者が8人であった。各灌流域の分画数は各々PCI部76/224分画(PCI群)、狭窄部38/224分画(狭窄群)、正常部110/224分画(正常群)であった。CPTは全ての群で有意に心筋血流量を増加させ、群間で安静時、負荷時、%増加率の心筋血流量に

有意差は認めなかった。正常群、狭窄群、PCI群の%増加率は、それぞれ $33\pm 22\%$ 、 $21\pm 23\%$ 、および $26\pm 23\%$ であった。冠危険因子と%増加率との間には狭窄群でのみ、%増加率対空腹時血糖( $r=-0.64$ ,  $p<0.05$ )、HbA1c( $r=-0.74$ ,  $p<0.05$ )、総コレステロール( $r=-0.87$ ,  $p<0.05$ )、中性脂肪( $r=-0.71$ ,  $p<0.05$ )およびLDLコレステロール( $r=-0.92$ ,  $p<0.005$ )と有意な負の相関が認められた。

**【考察】**N-13アンモニアとPETを用いた心筋血流の定量評価は、1型糖尿病、2型糖尿病、耐糖能障害、高脂血症、喫煙などと内皮機能障害と関連しているという報告が既にされている。本研究では、狭窄群においてのみ冠動脈危険因子と心筋血流の%増加率との間に有意な負の相関が認められ、特にLDLコレステロール値と内皮機能の間に強い負の相関が認められた。これは、狭窄部において、将来更に動脈硬化性変化が進展することを予防するために脂質コントロールが非常に重要であることを示唆している。この狭窄部はPCIはせず保存的に加療されているため、潜在的な組織虚血を来していると考えられる。組織虚血は活性酸素類の産生を加速させ、内皮由来の一酸化窒素がその解消に使用されるため血管拡張作用が低下すると報告されていることから、狭窄部群のみでこのような結果が得られた可能性が高いと考える。

**【結語】**耐糖能異常を有し冠動脈狭窄に対しPCIを受けた患者ではCPTに対する反応が保たれていたが、有意狭窄が残存する部位ではその内皮機能と冠動脈危険因子との間に負の相関関係が認められた。従って冠動脈危険因子はPCIが施行された患者における残存する冠動脈病変の進展に影響すると推測される。

#### (論文審査の結果の要旨)

血管内皮細胞は、血管のホメオスタシスの調整に重要な役割を果たしているが、冠危険因子はこの内皮機能を低下させ、動脈硬化の進展や心血管イベントを誘発する。従って内皮機能評価は、冠動脈疾患のリスク評価や冠動脈硬化症の進展などを予測する上で有用である。冠動脈の内皮機能は寒冷負荷試験(CPT)前後の心筋血流量(MBF)を、陽電子断層撮影法(PET)を利用して測定し、その増加率から定量評価可能である。今回、堀込充章は耐糖能異常(IGT)を有する狭心症に対して経皮的冠動脈形成術(PCI)を施行した14名を対象とし、冠動脈内皮機能と冠危険因子との関係について検討した。

冠動脈造影にて75%以上の冠動脈狭窄を有意狭窄



とし責任病変に PCI を行った。PCI 施行後約 1 カ月後に PET を行い、撮影当日に冠危険因子の評価目的に採血を行った。PET では安静時と CPT 負荷時で各々に MBF を測定し、測定結果は 16 分画のポラマップ上に集約した。各分画は 75 % 以上の残存狭窄血管の灌流域 (狭窄部), バルーンや Stent による PCI 施行血管の灌流域 (PCI 部), その他の部位 (正常部) に分類し、各部の MBF の平均値で解析した。冠動脈の内皮機能は、安静時から負荷時の MBF の増加率として定義し、各灌流域の増加率と冠危険因子との相関を検討した。

その結果、堀込充章は次の結論を得た。

1. すべての群で内皮機能は保たれており、CPT 後心筋血流量は有意に増加し、安静時、負荷時ともに 3 群間で有意な差は認めなかった。
2. 狭窄群の安静時 MBF は他群より高い傾向にあったが、CPT 後の MBF の増加率は他群より低い傾向であった。

向であった。

3. 冠危険因子と MBF の増加率の関係については、狭窄群でのみ認められ、HbA1c, 空腹時血糖, および中性脂肪値との間で負の相関を認め、LDL および総コレステロールとの間では特に強い負の相関が認められた。

これらの結果より、冠動脈狭窄に対し PCI を受けた耐糖能異常を有する患者では PCI 部や正常部は CPT に対する反応が保たれていたが、有意狭窄が残存する部位ではその内皮機能は低下しており、冠動脈危険因子との間に負の相関関係があることが明らかとなった。従って冠動脈危険因子は PCI が施行された患者における残存する冠動脈病変の進展に影響すると推測される。冠動脈疾患患者の管理上重要な知見であり、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。

#### Correlation between squamous suture and Sylvian fissure : Osirix DICOM viewer study (鱗状縫合とシルビウス裂溝の関係—Osirix DICOM VIEWER を用いて—)

ヌヌン ヌル ラーマー

(論文の内容の要旨)

**Objective:** Sylvian fissure (SF) is an important corridor in neurosurgery, and the end of Sylvian fissure (eSF) represents the optimal target area to expose suitable recipient artery in STA-MCA bypass. Unfortunately little have been addressed concerning its relationship with external cranial surface. Correlation between squamous suture (SS) and SF was investigated.

**Methods:** 50-adult 3D-CTA images were studied using OSIRIX DICOM viewer. The measurement points were determined from the external auditory meatus 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 and 4-cm anteriorly, perpendicular from the orbitomeatal (OM) line. The distance of SF was compared with the one of SS. The results were also applied in actual STA-MCA bypass cases.

**Results:** SSs were all located below SF at 0 cm. At a distance of 0 to 1.5 cm, SSs were located above SF, then started to merge and went side by side from 2 cm anteriorly. Anterior sylvian point, the most anterior part of SF, was found at 4 cm from

OM line. Inferior Rolandic point, which corresponds to the central sulcus inferior extent, was found to be at 2 cm from OM line. The eSF was identified at 0 cm anteriorly from OM, and perpendicularly 1.5 cm above SS. 50 % patients had Chater's point (CP) above eSF. Average value for CP was 0.01 below eSF, giving a significantly closer value compared to the one of SS ( $p < 0.01$ ). However, SS showed consistent value of 1.5 below SF. Furthermore, SS is a bony landmark, which has no shifting effect during surgery, therefore drawing a 1.5-cm line upward from SS could lead to exact location of eSF.

**Conclusion:** The course of SF and its correlation to SS have been identified, and this is also the first study to investigate the relationship of SS and eSF using OSIRIX DICOM viewer. SS is also comparable to CP, therefore it is usable for a simple landmark of eSF.

**Keywords:** Sylvian fissure, Squamous suture, Chater's point, Osirix dicom viewer

(論文審査の結果の要旨)

The Sylvian fissure (SF) became microneurosurgical

gical corridor to the base of the brain. Careful technique of its dissection is the real key to successful operations, and well-planned surgical orientation is a prerequisite. Several authors have mentioned detailed descriptions of the SF anatomy and opening technique, however, little attentions have been addressed concerning its relationship with the external cranial surface. Therefore in this study we are aiming at finding out the actual correlation between the two from patient's images.

Fifty consecutive adult patients from Shinshu University Hospital who underwent three-dimensional computed tomography angiography (3D-CTA) and showed no mass-effect intracranial lesion were included in the study. The study group included 25 men and 25 women with a mean age of 59 years (range 22-82 years). Images were acquired on a General Electric 64-row scanner (GE Yokogawa Medical systems, Tokyo, Japan). Osirix 3.3.2-DICOM viewer for Mac OS X was used. Images were viewed using two-dimensional (2D) multiplanar reconstruction (MPR). The length of squamous suture (SS) was created by drawing a perpendicular line from OM to the point of SS observed on coronal view. The length of SF was also created in a similar fashion. The length of both SS and SF was measured at 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, and 4 cm from EAM, respectively. Region of interest (ROI) was saved as distance value (in centimeter). Measurement was performed on right and left sides. Statistical analysis was performed using SPSS 14 for windows. T test was used to compare means between two independent variables. The level of significance (p) was set at a probability value of less than 0.05.

eSF has been used widely to find the suitable donor artery in STA-MCA bypass. Several techniques to point the exact location have been employed, ranging from superficial landmarks to image-guided landmark. First skin-marking study was described in 1976 by Norman Chater et al. However, the study was based on cadaveric study using skin marking, therefore there might have been bias of results. Other authors also designed marking

templates employed together with MRI during presurgical planning. These procedures did give a proper location of eSF, however, the use of template was not an affordable method in all centers. Our study was based on this consideration. The use of bone marking is reliable and is easily employed in all centers. In this study, we found that CP was located within 1 cm above and below SF, and SS was located within 0.5 to 2 cm below SF. Therefore drawing a line 1.5 cm from SS in perpendicular direction to OM line is a reliable option to find eSF. Interestingly in our present study, we found out that SF intersects with SS from 2-4 cm in front of EAM. Our result confirmed the other studies regarding the Anterior Sylvian Point (ASP), and it gives more details concerning the course of SF along SS in actual patients. Our clinical application also proved its efficacy. By placing the SS as the center of the craniotomy, SF was clearly viewed at the center of the operative field without any necessary advanced guidance system. eSF and its adjacent arteries were also successfully identified in all 5 patients within the distance of 1.5 cm above SS perpendicular to OM line.

Despite advancement in image guidance, including real time ones, not infrequently we encountered equipment malfunction or navigational shifts and/or errors. In this situation, neurosurgeon should possess the anatomic knowledge to 'conventionally' correct or continue the scheduled surgery. In another instance, where image guidance or real time navigation tools are not available in hospitals, neurosurgeon is expected to perform efficient surgery with whatever available tools. In regards to simple and reliable landmarks, this is where SS comes in merits for clinical application. The surgeon can perform precise craniotomy without the necessity of using any advanced image guidance; and it is reliable since it is a bony landmark, therefore it is not shifted.

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。

Kidney transplantation recovers the reduction level of serum sulfatide in ESRD patients via processes correlated to oxidative stress and platelet count (腎移植は、酸化ストレスや血小板数と関連した機構により、末期腎機能障害患者の血清スルファチド値を回復させる)

## 王 立 軒

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】スルファチドは血清リポ蛋白質を構成するスフィンゴ糖脂質の主要成分である。血清スルファチドの生理的意義に関する過去の報告では、血清スルファチドは血液凝固阻害作用および血小板凝集阻害作用を持つ内因子であることが推測されている。血清スルファチド値は、血液透析患者で著しく低下しており心血管病の罹患率と強く相関することが報告され、血清スルファチドが腎機能障害患者において多発する心血管病の発症に関連する可能性が示唆されている。

しかしながら、腎機能障害患者における血清スルファチド値の動態や、ヒトの内因性血清スルファチドの機能に関しての情報は、非常に少ない。

今回の研究では、腎移植による血清スルファチドの動態変化を観察することで、腎機能の回復とスルファチド値の関連を明らかにすることを試みた。

また、血清スルファチド値に関連する因子について多変量解析を試み、血清スルファチドの体内動態機序や機能について明らかにすることを試みた。

【材料および方法】信州大学附属病院にて2007年から2009年の間に腎移植を受け、保存血清採取とスルファチド測定に同意した5人の腎移植患者を対象とした。保存血清検体を用いて、血清スルファチドを測定し、様々な臨床データとの相関解析を行った。また酸化ストレスマーカーとしてマロンジアルデヒド (MDA) の測定も行い併せて検討した。

血清スルファチド値は、血清脂質を抽出しスルファチドをリゾスルファチドに変換後、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析器 (MALDI-TOF MS) を用いて、その含有量を測定した。MDA測定は、過酸化脂質比色定量用キットを用いて測定した。統計解析ソフト (SPSS ver. 18.0J) を用い、血清スルファチド値と相関する因子をSpearman相関係数にて抽出後、重線形回帰分析を行い血清スルファチド値の関連因子を特定した。

【結果】腎移植後、すべての患者で1カ月以内に血清クレアチニンは急速に低下し、その後定常状態となった。腎機能の回復に伴い、血清スルファチド値は時間

依存性に増加するが、その回復速度は腎機能の改善より遅く腎移植1年後に健常者レベルに到達した。7種類のリゾスルファチドの構成比率には変化なく、血清スルファチド値の回復は質的变化を伴わない量的変化によるものと推定された。腎移植後に血清クレアチニンが急速に改善する急性期と血清クレアチニンが定常状態になる安定期の2つの時相を、移植後100日以降の平均クレアチニン値+19.6 SDを閾値にして分離し、それぞれの時相毎に血清スルファチド値と相関する因子を重線形回帰分析により検討した。急性期および安定期とも、最も血清スルファチド値と相関する因子は腎移植後の時間対数であった。安定期においては、血清スルファチド値は、酸化ストレスマーカーであるMDAと逆相関、そして血小板数と正相関を示した。

【結論】腎移植により腎機能が回復すると、低下していた血清スルファチド値は時間依存性に回復することが初めて明らかとなった。腎機能の改善より緩徐に回復する血清スルファチド値の体内動態からは、腎機能と血清スルファチド値の間に存在する因子の存在が考えられた。

今回の統計学的解析から、腎移植による血清スルファチド値の回復機序として、全身的な酸化的ストレスの改善を介している可能性が示唆された。以前に王らのグループは、腎機能障害マウスを用いた動物実験により「腎機能障害に伴う全身的な酸化ストレスの上昇が肝臓でのスルファチド産生を抑制し血清スルファチド値を低下させる」というメカニズムを提唱しているが、今回の腎移植患者における血清スルファチドの動態は、そのメカニズムを裏付ける可能性がある。

また、今回示された血清スルファチド値と血小板数との相関は、内因性血清スルファチドの生理的機能が血小板機能と関連する可能性を示唆している。腎移植患者では、透析患者に比較し著明に心血管病リスクが減少することが知られているが、腎移植による血清スルファチドの回復が血小板機能に影響を及ぼし腎移植患者の予後を改善させている可能性が考えられた。

### (論文審査の結果の要旨)

スルファチドは血清リポ蛋白質を構成するスフィン



ゴ糖脂質の主要成分であり、血液凝固阻害作用および血小板凝集阻害作用を持つ。血清スルファチド値は血液透析患者で著しく低下しており心血管病の罹患率と強く相関することが報告されているが、腎機能障害患者における血清スルファチド値の動態や、ヒトの内因性血清スルファチドの役割に関する情報は非常に少ない。そこで、今回、腎機能の回復による血清スルファチドの動態変化を観察することで、腎機能とスルファチド値の関連を明らかにすることを試みた。2007年～2009年の間に信州大学附属病院で腎移植を受けた患者を対象に、血清スルファチド値の変化について検討した。腎移植の過程として、腎不全状態から腎機能が安定状態に至るまでの急性期と、それ以後の安定期に分け、それぞれの時相について血清スルファチド値に関連する因子について多変量解析を試み、血清スルファチドの体内動態やその機能について明らかにすることを試みた。

その結果、主は以下の結論を得た。

1. 腎移植後、すべての患者で1カ月すると腎機能は定常状態となり、腎機能の回復に伴い血清スルファチド値は時間依存性に増加した。
2. 血清スルファチド値の回復速度は腎機能の改善より遅く腎移植1年程度かけて健常者レベルに到達し

た。

3. 7種類のリゾスルファチドの構成比率には変化なく、血清スルファチド値の量的回復は質的变化を伴わなかった。
4. 急性期および安定期とも、最も血清スルファチド値と相関する因子は腎移植後の時間対数であった。
5. 安定期においては、血清スルファチド値は、酸化ストレスマーカーであるMDAと逆相関、そして血小板数と正相関を示した。

腎機能の回復が血清スルファチド値を強力に改善させることを示したが、緩徐に回復する血清スルファチド値の体内動態からは、腎機能と血清スルファチド値の間に存在する因子の存在が考えられた。今回の統計学的解析から、腎移植による血清スルファチド値の回復は、全身的な酸化的ストレスの改善を介している可能性が考えられた。

また、今回示された血清スルファチド値と血小板数との相関は、内因性血清スルファチドの生理的機能が血小板機能と関連する可能性を支持している。腎移植による血清スルファチドの回復が血小板機能に影響を及ぼし腎移植患者の予後を改善させている可能性が考えられた。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。

Acute kidney injury induced by protein-overload nephropathy down-regulates gene expression of hepatic cerebroside sulfotransferase in mice, resulting in reduction of liver and serum sulfatides (蛋白質過負荷腎症マウスに生じる急性腎障害は、肝臓セレブロシドスルホトランスフェラーゼの遺伝子発現を抑制し、肝臓及び血清中のスルファチド量を減少させる)

## 張 暁 焯

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】スルファチドはスフィンゴ糖脂質の一種であり、セレブロシドのガラクトースC-3位に硫酸基が結合した化学構造を有する。生体内では、ミエリン構成脂質として神経伝達に関わるほか、腎臓や肝臓などに存在が認められている。また、血清リポ蛋白に含まれる主要な糖脂質としても知られている。張暁焯らのグループは、家族性高コレステロール血症の動物モデルを用いた10年以上に渡る研究成果に基づき、血清スルファチドの血栓形成阻害作用を提案してきた。そして最近、末期腎不全透析患者において、血清スルファチド値が健常者の値に比べて著しく低いこと、さらに、それが心血管障害の発症に強く関連することを報告している。この臨床試験から得られた知見に基づ

き、今回張暁焯は、マウスレベルで腎機能障害と血清スルファチド低値の関連性について検証を行った。

【材料及び方法】PPAR $\alpha$  遺伝子欠損マウスに対し、BSAを1日当たり0.4gの投与量で腹腔内投与し、蛋白質過負荷腎症を誘導した。張暁焯らのグループは過去に、同マウスに対するBSA処理が極めて短期間(4日以内)に重度の腎障害を誘導することを証明した。本研究では、過去の研究成果に基づき、BSA投与1日目及び4日目に血清、肝臓、腎臓を回収し、経時的な解析を行った。血清及び組織中のスルファチドはHIP法により抽出し、アルカリ鹼化処理により脂肪酸を除去したりゾスルファチドに変換後、MALDI-TOF MS法で分析した。7種類のリゾスルファチドの含有量を算出し、これらの総量をスルファチドの値

とした。また、各組織中の蛋白及び mRNA 発現量は、それぞれイムノブロット法及びリアルタイム PCR 法にて測定した。

【結果】BSA 処理により、血清及び肝臓のスルファチド値はいずれも時間依存的に低下した。一方、腎臓では、同処理によるスルファチド量の増加が認められた。スルファチドの組成（7種類のリゾスルファチドの含有比）は、BSA 処理の有無に関わらず、血清型と肝臓型で一致しており、腎臓型の組成とは大きく異なっていた。スルファチドの量的変化に関する分子レベルの情報を得るため、スルファチド代謝関連酵素群の発現量変化を調べた。スルファチドの生合成に働くセレブロシドスルホトランスフェラーゼの肝臓発現量は、蛋白及び mRNA レベルで共に時間依存的に減少していた。一方、腎臓では、同酵素の発現量の増加が観察された。その他の関連酵素については、いずれの組織においても有意な発現量変化は認められなかった。BSA 処理により、腎臓では炎症細胞浸潤・酸化ストレスの著増が観察された。一方、肝臓では、炎症・細胞傷害は確認されなかったが、BSA 処理に伴う過酸化脂質の増加や NADPH oxidase の発現亢進が認められ、急性腎障害に起因する全身性の酸化ストレスの増加が示唆された。

【結論】BSA 誘導性の急性腎障害を呈する本マウスでは、肝臓のスルファチド生合成の抑制が生じており、その結果、血中へのスルファチド分泌量が減少したものと考えられた。そのメカニズムとしては、腎機能障害に起因する全身的な酸化ストレスの増加が、肝臓のスルファチド合成機能に影響を及ぼした可能性が示唆された。以上の成果は、末期腎不全透析患者において血清スルファチドが低値である機構を理解する上で、有用な情報を提示するものと思われた。本研究から、スルファチド代謝に関する腎肝連関の新たな概念を提案することができた。

#### （論文審査の結果の要旨）

スルファチドは血清リポ蛋白に含まれる代表的なスフィンゴ糖脂質であり、血栓形成阻害作用を有することが指摘されている。最近張 暁焯らのグループは、末期腎不全透析患者において、血清スルファチド値が健常者の値に比べて著しく低いこと、さらに、それが心血管障害の発症に強く関連することを報告している。今回張 暁焯は、マウスレベルで腎機能障害と血清ス

ルファチド低値の関連について検証を行った。

PPAR $\alpha$  遺伝子欠損マウスに対し、BSA を 1 日当たり 0.4 g 腹腔内投与し、蛋白質過負荷腎症を誘導した。同マウスに対する BSA 投与は極めて短期間（4 日以内）に重度の腎障害を誘導するので、投与 1 日目及び 4 日目に血清、肝臓、腎臓を回収した。血清及び組織中のスルファチドは HIP 法により抽出し、脂肪酸を除去したりゾスルファチドに変換後、MALDI-TOF MS 法で分析した。7種類のリゾスルファチドの総量をスルファチドの値とした。各組織中の蛋白及び mRNA 発現量は、それぞれイムノブロット法及びリアルタイム PCR 法にて測定した。

その結果、張は次の結論を得た。

1. BSA 処理により、血清及び肝臓のスルファチド値はいずれも時間依存的に低下した。一方、腎臓では、スルファチド値の上昇が認められた。
2. スルファチドの組成は、BSA 処理の有無に関わらず、血清型と肝臓型で一致しており、腎臓型の組成とは大きく異なっていた。
3. BSA 処理により、スルファチド生合成酵素：セレブロシドスルホトランスフェラーゼの肝臓発現量は、蛋白及び mRNA レベルで共に時間依存的に減少した。一方、腎臓では、同酵素の発現量増加が観察された。
4. BSA 処理により、腎臓では炎症や酸化ストレスの著増が観察された。一方、肝臓には炎症は生じていなかったが、過酸化脂質の増加や NADPH oxidase の発現亢進が認められた。

これらの結果により、BSA 誘導性の急性腎障害を呈する本マウスでは、肝臓のスルファチド生合成の抑制が生じており、その結果、血中へのスルファチド分泌量が減少したものと考えられた。そのメカニズムとしては、腎機能障害に起因する全身的な酸化ストレスの増加が、肝臓のスルファチド合成機能に影響を及ぼした可能性が示唆された。以上の成果は、末期腎不全透析患者において血清スルファチドが低値である機構を理解する上で、有用な情報を提示するものと思われた。本研究から、スルファチド代謝に関する腎肝連関の新たな概念を提案することができた。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があるものと認めた。

ApoA-I deficiency in mice is associated with redistribution of apoA-II and aggravated AApoAII amyloidosis (マウスアポリポタンパク質 A-I の欠損はアポリポタンパク質 A-II の再分配と AApoAII アミロイドーシスの悪化を伴う)

王 耀 勇

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】血清高密度リポ蛋白質 (HDL) では、主なアポリポタンパク質は apoA-I (約70%) と apoA-II (約20%) である。ApoA-I はすべての脊椎動物に存在し、コレステロールの逆輸送の促進や、酸化ストレスの抑制により、心血管疾患に対する防御効果を持つことが報告されてきた。一方、apoA-II はヒト、マウス、ラット、魚類にのみ存在し、HDL の維持、高脂血症の誘導、炎症反応やインスリン抵抗性の促進等の重要な生理的な機能を持っていることが報告されている。また apoA-II はマウス老化アミロイドーシスのアミロイド線維 (AApoAII) の前駆蛋白である。生理的状況では apoA-II は A-I/A-II リポ蛋白質のみに存在し、A-I/A-II リポ蛋白質は密度が一番高い HDL3 に存在する。ApoA-I や apoA-II の欠損患者の心血管疾患の発症率に関しての統一的な見解はまだまだなく、ApoA-I と apoA-II の機能やその相互作用については不明点が多岐にわたって残されている。また ApoA-I の新たな機能としてアルツハイマー病での A $\beta$  アミロイド線維の形成、沈着を抑制することが報告されているが、そのメカニズムや、他のアミロイドーシスとの関係も解明されていない。本研究では、apoA-I 欠損 (*ApoA1*<sup>-/-</sup>) マウスを用いて、apoA-II やその他のアポリポタンパク質の加齢に伴う変化や、HDL などのリポタンパク質への分配を検討し、apoA-II アミロイドーシスの発症への影響を解析した。

【材料及び方法】マウス：C57BL/6J (WT) マウスは日本エスエルシーから、*ApoA1*<sup>-/-</sup> マウスは Jackson Laboratory より購入し、信州大学ヒト環境科学研究支援センター動物実験施設で繁殖/飼育した。けんかによる影響を回避するため、雌マウスを使用し、5.6% 脂肪量を含む餌を自由摂取させた。アミロイドーシスの誘発：重度にアミロイド線維が沈着した SAMR1 C (*ApoA2*<sup>c</sup>) マウス肝臓よりアミロイドーシス誘発用の AApoAII アミロイド線維を分取した。2カ月齢の WT, *ApoA1*<sup>-/-</sup> マウスの尾静脈に AApoAII アミロイド線維を投与後、2カ月と4カ月後に屠殺した。全身のアミロイド沈着程度をコンゴ赤染色、免疫染色

で解析した。HDL 及びリポタンパク質分析：水あるいは AApoAII アミロイド線維を投与後 0, 2, 4 カ月のマウス (2, 4, 6 カ月齢に相当) から絶食後に血漿を採取した。① 血漿および HPLC で分離した各リポタンパク質分画の総、及び HDL コレステロール、トリグリセリドを定量した。② Sudan Black B で染色した血漿を native-PAGE により分離して、HDL の分布を調べた。Western blot 法によってアポリポタンパク質 (apoA-I, A-II, E, A-IV, C-II) の分布を調べた。③ SDS-PAGE/western blot 法によって血漿アポリポタンパク質 (apoA-II, apoE) 濃度を調べた。*ApoA2* mRNA の発現量：2, 6 カ月齢の WT, *ApoA1*<sup>-/-</sup> マウスの肝臓と心臓から総 mRNA を分取し、RT-PCR と real-time-PCR により、*ApoA2* mRNA 発現量を調べた。

【結果】*ApoA1*<sup>-/-</sup> マウスでは、① 2 月齢で、総、及び HDL コレステロール、トリグリセリドが WT マウスより著しく減少したが、apoE は約 2 倍に増加した。その後、加齢に伴い apoA-II, 総、及び HDL コレステロール、トリグリセリドが有意に増加した。② 加齢に伴い、apoA-II, コレステロールが HDL3 から分子量の大きい HDL1 に再分配した。③ AApoAII アミロイド線維を投与後、全身の線維沈着量が有意に増加したが、特に心臓での沈着増加は顕著であった。④ 肝臓、心臓での *ApoA2* mRNA の発現量が加齢に伴い増加した。⑤ 重篤な AApoAII アミロイドーシスは血漿 apoA-II やコレステロール濃度の減少を引き起こした。

【結論】本研究では、apoA-I は血漿 apoA-II やコレステロール濃度や、各リポタンパク質分画への分配を調節する作用を持つことが示された。また ApoA-I の欠損に対して apoA-II は代償作用を持っていることも明らかになった。リポタンパク質や apoA-II の分布の変動 (再分配) は AApoAII アミロイドーシスの発症に重要な役割を果たすことが示唆されたが、そのメカニズムに関しては検討が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

血清高密度リポ蛋白質 (HDL) では、主なアポリ



ポタンパク質はapoA-I (約70%)とapoA-II (約20%)であり、apoA-I, apoA-IIとも重要な生理機能を担当すると考えられている。生理的状況ではapoA-IIは主に密度が一番高いHDL3のA-I/A-IIリポタンパク質のみに存在するが、ApoA-IとapoA-IIの機能やその相互作用については不明な点がまだ多く残されている。またApoA-Iの新たな機能としてアルツハイマー病でのA $\beta$ アミロイド線維の形成と沈着を抑制することが報告されているが、そのメカニズムや、他のアミロイドーシスでの効果は解明されていない。本研究では、apoA-I欠損 (*ApoA1*<sup>-/-</sup>) マウスを用いて、apoA-IIの代謝 (apoA-IIやその他のアポリポタンパク質の加齢に伴う量の増減やリポタンパク質への分配) と、AApoAIIアミロイドーシス発症への影響を解析した。

2, 4, 6カ月のWild-type (WT), *ApoA1*<sup>-/-</sup>マウスでの①血漿中アポリポタンパク質 (apoA-II, apoE) の濃度や総、及びHDLコレステロール、トリグリセリド濃度を解析した。②アポリポタンパク質 (apoA-I, apoA-II, apoE, apoA-IVとapoC-II) とコレステロールのリポタンパク質への分配を、Native PAGE, ゲル濾過HPLCで調べた。③2カ月のWT, *ApoA1*<sup>-/-</sup>マウスにAApoAIIアミロイド線維を投与してアミロイドーシスを誘発し、2カ月と4カ月後に屠殺して全身のアミロイド沈着程度を解析した。④2, 6カ月齢のWT, *ApoA1*<sup>-/-</sup>マウスの肝臓と心臓の*ApoA2* mRNA発現量を調べた。⑤アミロイドーシス発症がapoA-II及びHDLコレステロール濃度とリポタンパク質の分配に及ぼす影響を解析した。

その結果、王耀勇は次の結論を得た。

- ① 2, 4, 6カ月齢の *ApoA1*<sup>-/-</sup>マウスでは、2カ月齢でapoA-II, 総コレステロール, HDL コレス

テロール, トリグリセリドがWTマウスより減少したが、その後、加齢に伴い有意に増加した。ApoEは2カ月齢で約2倍に増加したが、加齢変化はなかった。WTマウスでは加齢に伴う変化は認められなかった。

- ② Native PAGE及びゲル濾過HPLC法で調べた結果、ApoA-IIとコレステロールが加齢に伴い、HDL3から分子量の大きいHDL1に再分配されたことが明らかになった。  
 ③ *ApoA1*<sup>-/-</sup>マウスでは、全身 (特に心臓) でのAApoAIIアミロイドーシスが悪化した。  
 ④ *ApoA1*<sup>-/-</sup>マウスでは、肝臓での*ApoA2* mRNAの発現量が加齢に伴い有意に増加した。*ApoA1*<sup>-/-</sup>マウスでは、心臓での*ApoA2* mRNAの発現量がWTに比較して増加した (約5倍)。このようなmRNAの増大がAApoAIIアミロイドーシス悪化に関係すると考えられる。  
 ⑤ *ApoA1*<sup>-/-</sup>マウスでの重篤なAApoAIIアミロイドーシスはapoA-II, コレステロール濃度の減少を引き起こしたが、リポタンパク質の分配は変化しなかった。

以上の結果は、apoA-Iの欠損はapoA-IIの加齢に伴う代謝とリポタンパク質への分配に影響することを示し、apoA-IIを介した新たなリポタンパク質調節機構を示唆した。またapoA-Iの欠損がAApoAIIアミロイドーシスを悪化することも示唆された。このような王耀勇の研究成果は、ApoA-IとapoA-IIの相互作用の解明や、アミロイドーシスの発症抑制機構の解明と予防法の開発に新たな視点を与えるものであり、非常に重要であり、かつ意義あることと考えられた。

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。

## Generation of induced pluripotent stem cells from human adipose-derived stem cells without *c-MYC* (*c-MYC* を用いないヒト脂肪組織由来幹細胞からの人工多能性幹細胞の樹立)

青木 哲宏

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、損傷を受けた様々な組織を再生する可能性を持つ幹細胞治療が注目されている。ヒト幹細胞には、胚性幹細胞 (ESCs) と成人幹細胞とに大別される。われわれはこれまで、骨軟骨分化能をもつヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (成人幹細胞) を骨軟骨

疾患の治療に用いてきた。間葉系幹細胞は骨髄のみならず、脂肪組織内においても存在することが分かっており、脂肪組織は有害事象が少ない脂肪吸引術により容易にかつ大量に採取され得る。実際、肥満者が増加する欧米や我が国においても脂肪吸引術は普及した術式である。脂肪組織には間葉系幹細胞、すなわちヒト脂

脂肪組織由来幹細胞 (hASCs) が存在し、hASCs もいくつかの疾患の治療に応用されている。しかし、このような間葉系幹細胞の増殖能や分化能は継代を繰り返すことにより低下することが分かっている。一方、ESCs は継代を繰り返しても低下しない増殖能と三胚葉への分化能を併せ持っているが、ESCs は受精卵から採取するという倫理的な問題があり、さらに ESCs は同種移植を行う場合に拒絶反応が生ずる可能性がある。また、ESCs は疾患特異的に樹立することが困難である。Takahashi らが最初に報告したヒト人工多能性幹細胞 (iPSCs) は、これらの ESCs が包含する問題を解決した。iPSCs は成人体細胞へ山中ファクターと呼ばれる導入因子 *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* を導入することで樹立されるが、親株細胞 (cell source) によりその樹立速度や効率に相違があることが様々な報告により知られている。また、親株細胞は、採取が容易で多量に得られるものが望ましいと考え、われわれはそのような条件を満たす hASCs に注目し、hASCs がガン遺伝子である *c-MYC* を用いずとも iPSCs の cell source に為り得るか検証した。

【方法】市販の hASCs 2 株を親株細胞として用い、山中ファクターと呼ばれる導入因子 *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* から *c-MYC* を除く 3 因子をレトロウイルスベクターにより導入し、ESCs 様のコロニーをそれぞれの親株細胞より得た。これらのコロニーをそれぞれの親株細胞より得た。これらのコロニーを拡大培養し、これらの細胞の未分化性や多分化能を検証し、さらに核型解析及び STR 分析を行った。

【結果】得られたコロニーは、20 回以上の継代を行っても形態を維持する自己複製能を示した。また、これらのコロニーは免疫染色により ESCs 特異的な表面抗原と転写因子を示し、さらにコロニーから採取した RNA は RT-PCR により ESCs 特異的未分化マーカー遺伝子の発現を示し、その未分化性が確認された。また、これらの細胞は in vitro 及び in vivo いずれにおいても三胚葉への分化を示し、ESCs と同様の多分化能を示した。核型は正常であり、STR 分析から他の iPSCs の混入がなくそれぞれの親株細胞由来であることを確認した。

【考察及び結論】皮膚線維芽細胞、ケラチノサイト、血液細胞など、様々な cell source からのヒト iPSCs の樹立がすでに報告されている。それらの報告から、cell source の違いにより導入因子数や樹立効率に違いがあることが考えられる。また、ガン遺伝子である *c-MYC* を導入因子に含めると、キメラマウスにおい

て導入された *c-MYC* の再活性化による腫瘍形成が報告されており、*c-MYC* を用いることは好ましくないと考えられる。*c-MYC* を導入しない、もしくは遺伝子を導入しない方法により樹立効率が低下しても、親株細胞数が豊富であれば iPSCs の絶対数は多く得られる為、その点で多量に採取され得る脂肪組織は cell source として好ましい。われわれは、hASCs から *c-MYC* なしでも iPSCs が樹立可能であり、この得られた iPSCs は、ESCs と同様の未分化性を持ち、in vitro/vivo において三胚葉への分化能があることを示した。

#### (論文審査の結果の要旨)

近年、損傷を受けた様々な組織を再生する可能性を持つ幹細胞治療が注目されている。ヒト幹細胞には、胚性幹細胞 (ESCs) と成人幹細胞とに大別される。われわれはこれまで、骨軟骨分化能をもつヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (成人幹細胞) を骨軟骨疾患の治療に用いてきた。間葉系幹細胞は骨髄のみならず、脂肪組織内においても存在することが分かっており、脂肪組織は有害事象が少ない脂肪吸引術により容易にかつ大量に採取され得る。実際、肥満者が増加する欧米や我が国においても脂肪吸引術は普及した術式である。脂肪組織には間葉系幹細胞、すなわちヒト脂肪組織由来幹細胞 (hASCs) が存在し、hASCs もいくつかの疾患の治療に応用されている。しかし、このような間葉系幹細胞の増殖能や分化能は継代を繰り返すことにより低下することが分かっている。一方、ESCs は継代を繰り返しても低下しない増殖能と三胚葉への分化能を併せ持っているが、ESCs は受精卵から採取するという倫理的な問題があり、さらに ESCs は同種移植を行う場合に拒絶反応が生ずる可能性がある。また、ESCs は疾患特異的に樹立することが困難である。Takahashi らが最初に報告したヒト人工多能性幹細胞 (iPSCs) は、これらの ESCs が包含する問題を解決した。iPSCs は成人体細胞へ山中ファクターと呼ばれる導入因子 *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* を導入することで樹立されるが、親株細胞 (cell source) によりその樹立速度や効率に相違があることが様々な報告により知られている。また、親株細胞は、採取が容易で多量に得られるものが望ましいと考え、われわれはそのような条件を満たす hASCs に注目し、hASCs がガン遺伝子である *c-MYC* を用いずとも iPSCs の cell source に為り得るか検証した。

得られたコロニーは、20 回以上の継代を行っても形

態を維持する自己複製能を示した。また、これらのコロニーは免疫染色により ESCs 特異的な表面抗原と転写因子を示し、さらにコロニーから採取した RNA は RT-PCR により ESCs 特異的未分化マーカー遺伝子の発現を示し、その未分化性が確認された。また、これらの細胞は in vitro 及び in vivo いずれにおいても三胚葉への分化を示し、ESCs と同様の多分化能を示した。核型は正常であり、STR 分析から他の iPSCs の混入がなくそれぞれの親株細胞由来であることを確認した。

皮膚線維芽細胞、ケラチノサイト、血液細胞など、様々な cell source からのヒト iPSCs の樹立がすでに報告されている。それらの報告から、cell source の違いにより導入因子数や樹立効率に違いがあることが

考えられる。また、がん遺伝子である *c-MYC* を導入因子に含めると、キメラマウスにおいて導入された *c-MYC* の再活性化による腫瘍形成が報告されており、*c-MYC* を用いることは好ましくないと考えられる。*c-MYC* を導入しない、もしくは遺伝子を導入しない方法により樹立効率が低下しても、親株細胞数が豊富であれば iPSCs の絶対数は多く得られる為、その点で多量に採取され得る脂肪組織は cell source として好ましい。われわれは、hASCs から *c-MYC* なしでも iPSCs が樹立可能であり、この得られた iPSCs は、ESCs と同様の未分化性を持ち、in vitro/vivo において三胚葉への分化能があることを示した。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。

## Genetic analysis of TP53 in childhood myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia (小児骨髄異形成症候群および若年性骨髄単球性白血病における TP53 遺伝子の解析)

齋藤章治

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】 癌抑制遺伝子である TP53 遺伝子は、17番染色体上に座位し、細胞増殖抑制因子として働く p53 をコードしている。成人の骨髄異形成症候群 (MDS) および急性骨髄性白血病 (AML) 患者において、TP53 変異は約 10% の症例で認められ、特に 17 番染色体短腕の欠失や複雑核型を持ち、治療抵抗性で病期が進行した例に高頻度に認められることが報告されている。しかし、小児の血液腫瘍性疾患における TP53 異常の頻度については不明な点が多い。このため、われわれは 9 例の小児 MDS と 18 例の若年性骨髄単球性白血病 (JMML) 患者について、直接シーケンス、FISH、免疫染色を用いて TP53 の変異、欠失、p53 過剰発現の有無を検討した。

【方法】 変異解析は TP53 の exon5-9 領域を PCR で増幅させた後に、直接シーケンスで変異の有無を解析した。免疫染色はマウス抗 p53 抗体を、FISH は TP53 (LSI p53)、MLL (LSI MLL) 領域を標的としたプローブを用いて行い、カットオフ値は正常コントロール +2S.D. とした。

【結果】 MDS 9 例中 1 例に TP53 遺伝子の異常を認められたが、JMML では 18 例全例 (PTPN11 変異 7 例、KRAS 変異 4 例、NRAS 変異 5 例、NF1 異常 2 例) で TP53 異常を認めなかった。

TP53 遺伝子異常を認めた Case 6 では、der (5 ;

17) (p10 ; q10) が唯一の染色体異常であった。免疫染色ではクロット標本の約 20%、骨髄単核球サイトスピン標本の約 50% の細胞に p53 の過剰発現を認めた。FISH では骨髄細胞の半数に TP53 の欠失を認めた。また、末梢血と骨髄細胞に TP53 のヘテロ点突然変異 (410 T > A) がみられた。この患者は化学療法や放射線療法に抵抗性を示し、2 度の造血幹細胞移植にもかかわらず診断後 2 年で原病死した。この患者は精神発達遅滞と低身長を合併しており、先天的な遺伝子異常が示唆された。しかし、爪から抽出した DNA では TP53 変異は認めず、既知の先天性骨髄不全症候群を支持する臨床所見や遺伝子異常は認められなかった。

この患者の末梢血細胞から各細胞系列に分離した細胞集団と、骨髄前駆細胞から作製したコロニー構成細胞を用いて TP53 異常を解析した。その結果、CD14/15 陽性細胞、顆粒球・マクロファージ (GM) および赤芽球系コロニー構成細胞ほぼすべてにおいて、シーケンスで TP53 変異アレルのみを認め、FISH 解析で 90% 以上の細胞に TP53 欠失がみられた。従って、この患者の骨髄系細胞においては、TP53 の 1 アレルが欠失し、残りの 1 アレルが変異していることから、両アレルの TP53 が不活化されていることが示唆された。一方、リンパ球系細胞では TP53 の欠失も変異も認めなかった。また、初診時から der (5 ; 17) (p10 ;



q10) が唯一の染色体異常であり、初診時から9カ月前(生後8カ月時)の末梢血ではTP53変異は認められなかった。

さらにCase 6についてFISHでMLL遺伝子のコピー数を検討したところ、MLLを3コピー持つ細胞は初診時末梢血細胞では1%であったが、初診時の骨髓細胞から作製したGMおよび赤芽球コロニー構成細胞のそれぞれ80%、65%はMLLを3コピー有していた。TP53欠失と変異に加えてMLLを3コピー有する細胞は、経過中に増加し、最終的には患者末梢血細胞中の88%に達した。

【結論】(1)小児MDS 9例中1例にTP53異常を認めた。一方、JMMLではTP53異常を認めず、病態には深く関与していないと考えられた。(2)TP53異常を認めたMDS症例(Case 6)では、先天的な異常が示唆されたが、germlineではTP53変異は認めず、既知の先天性骨髓不全症候群を示唆する所見も得られなかった。(3)この患者の両アレルでTP53が不活化されている(1アレルが欠失、1アレルが変異)白血病クローンは、骨髓球系および赤芽球系細胞への分化能を有する幹細胞に由来したと考えられた。(4)本例では後天的なTP53両アレルの不活化が、MDSの発症に重要な役割を演じたと推定された。(5)本例では発症時からTP53異常とMLLコピー数の過剰を併せ持つクローンがごく少数存在したことが示唆され、このクローンが本例における抗がん剤や放射線治療に対する抵抗性と関連していると思われた。

#### (論文審査の結果の要旨)

癌抑制遺伝子であるTP53遺伝子は、17番染色体上に座位し、細胞増殖抑制因子として働くp53をコードしている。成人の骨髓異形成症候群(MDS)および急性骨髄性白血病(AML)患者において、TP53変異は約10%の症例で認められ、特に17番染色体短腕の欠失や複雑核型を持ち、治療抵抗性で病期が進行した

例に高頻度に認められることが報告されている。しかし、小児の血液腫瘍性疾患におけるTP53異常の頻度については不明な点が多い。本研究では9例の小児MDSと18例の若年性骨髓単球性白血病(JMML)患者について、直接シーケンス、FISH、免疫染色を用いてTP53の変異、欠失、p53過剰発現の有無を検討した。

その結果、齋藤は次の結論を得た。

1. 小児MDS 9例中1例にTP53異常を認めた。一方、JMMLではTP53異常を認めず、病態には深く関与していないと考えられた。
2. TP53異常を認めたMDS症例(Case 6)では、先天的な異常が示唆されたが、germlineではTP53変異は認めず、既知の先天性骨髓不全症候群を示唆する所見を認めなかった。
3. この患者の両アレルでTP53が不活化されている(1アレルが欠失、1アレルが変異)白血病クローンは、骨髓球系および赤芽球系細胞への分化能を有する幹細胞に由来したと考えられた。
4. この患者においては後天的なTP53両アレルの不活化がMDSの発症に重要な役割を演じたと推定された。
5. この患者では発症時からTP53異常とMLLコピー数の過剰を併せ持つクローンがごく少数存在したことが示唆され、このクローンが本例における抗がん剤や放射線治療に対する抵抗性と関連していると思われた。

今回の研究で、9例の小児MDS中1例に後天的なTP53変異を認めた。一方、JMMLでは18例全例でTP53異常を認めなかった。後天的なTP53変異を持つ小児MDSについてはこれまで報告がなく重要な知見と思われ、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### Role of Deletion Located between the Intermediate and Middle Regions of the *Helicobacter pylori vacA* Gene in Cases of Gastrointestinal Diseases (*Helicobacter pylori vacA* 遺伝子内の intermediate region と middle region の間に存在する塩基配列欠損の胃十二指腸疾患における役割について)

荻原裕明

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】*Helicobacter pylori* の *vacA* 遺伝子は胃上皮粘膜細胞の空胞化を誘導することが以前より知られており、*vacA* 遺伝子内の signal 領域 (s 領域) と

middle 領域 (m 領域) の遺伝子多型により、in vitro における培養細胞の空胞形成の活性が異なることが示されている。近年、*vacA* 遺伝子内の s 領域と m 領域の中間に存在する intermediate 領域 (i 領域) が *vacA*

の活性を決定する第3の遺伝子多型として報告され、胃癌との関連性が示唆された。*vacA* 遺伝子の塩基配列を検索すると、新たに *vacA* 遺伝子内の i 領域と m 領域の間に81塩基対の塩基配列欠損 (d 領域) が存在する株が存在することが分かった。そこでこの塩基配列欠損に注目し、*H. pylori* 関連疾患および病理組織学的変化における塩基配列欠損 (d 領域) の役割を明らかにするために本研究を行った。

【材料および方法】西洋圏 (アメリカ, コロンビア) および東アジア圏 (日本, 韓国) で採取分離された *H. pylori* の *vacA* 遺伝子内における s, m, i, そして d 領域の遺伝子型を PCR 法にて検索し、その株が分離された患者の胃粘膜病理組織学的所見と比較検討した。

【結果】東アジア圏で分離された株 (東アジア株) の 92.6% (226/241) は s1-i1-m1-d1 であり、*vacA* 遺伝子の遺伝子多型と疾患および病理組織学的変化との間に関係は認められなかった。しかし、西洋圏で分離された株 (西洋株) においては s1, m1, i1, d1 (塩基配列欠損なし) の遺伝子型は、それぞれ、s2, m2, i2, d2 (塩基配列欠損あり) の遺伝子型と比較して有意に胃癌発生の危険度が高いことが示された。(adjusted odds ratios, 3.17 [95% confidence interval {CI}, 1.07 to 9.45] for s1, 10.65 [95% CI, 3.36 to 31.35] for m1, 8.57 [95% CI, 2.85 to 25.81] for i1, and 8.04 [95% CI, 2.67 to 24.16] for d1) 胃炎患者のうち、胃粘膜萎縮の軽度な OLGA 分類の stage 0 と stage I の患者と比較すると、s1, m1, i1, d1 の遺伝子型は、胃癌のみならず胃潰瘍、十二指腸潰瘍との関連性が単変量解析では示された。しかし、重回帰分析では関連性を示すことはできなかった。胃粘膜の組織学所見との比較では、s1, m1, d1, i1 の各遺伝子型は、単変量解析において優位に好中球浸潤と胃粘膜萎縮を誘導することが示されたが、重回帰分析では d1 のみ胃体部および胃前庭部の胃粘膜内の好中球浸潤および胃粘膜萎縮と関係することが示された。(好中球浸潤: partial regression coefficients,  $1.12 \pm 0.17$  in the antrum and  $0.94 \pm 0.17$  in the corpus;  $P < 0.001$  for both comparisons, 胃粘膜萎縮: partial regression coefficients,  $0.60 \pm 0.30$  in the antrum and  $0.63 \pm 0.35$  in the corpus;  $P = 0.04$  for both comparisons)

【結論】*vacA* 遺伝子の d1 遺伝子型は、西洋株において、これまで報告されてきた *vacA* 遺伝子の s-, m-,

i-領域の遺伝子多型と比較して、組織学的な炎症および粘膜萎縮に対するより優れた予測因子となる可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

*Helicobacter pylori* の病原因子として *VacA* (細胞空胞化毒素) があり、*vacA* の遺伝子多型として signal 領域 (s 領域), intermediate 領域 (i 領域), middle 領域 (m 領域) の遺伝子型が報告されてきた。今回、この i 領域と m 領域の間に81塩基対の塩基配列欠損を認める株が存在することを発見し、この領域を d 領域と定義し、d 領域の塩基配列欠損の胃十二指腸疾患における役割につき検討した。

*Helicobacter pylori* はアメリカ合衆国, コロンビア, 韓国, 日本の *Helicobacter pylori* 感染患者より採取した菌株を用いた。アメリカ合衆国, コロンビアの株を西洋株, 韓国, 日本の株を東アジア株と分類した。*Helicobacter pylori* の *vacA* の遺伝子型および *cagA* の有無につき PCR 法にて検索した。*vacA* の遺伝子型と疾患および組織学的所見との関係性につき検討した。

その結果、荻原裕明は次の結論を得た。

1. 東アジア株では、92.6% (226/241) が s1-i1-m1-d1 であり、*vacA* 遺伝子の遺伝子多型と疾患および病理組織学的変化との間に関係は認められなかった。
2. 西洋株において、s1, m1, i1, d1 の各遺伝子型はそれぞれ s2, m2, i2, d2 の遺伝子型と比較し胃癌の発生の危険度が有意に高かった。
3. 組織学的変化においては、西洋株において s1, m1, i1, d1 の各遺伝子型は有意に胃粘膜への好中球浸潤および胃粘膜萎縮を有意に引き起こすことが単変量解析にて示された。
4. 多変量解析において、d 領域のみが胃粘膜への好中球浸潤および胃粘膜萎縮との関連性が示された。

これらの結果より、西洋株において *vacA* 遺伝子の d 領域に81塩基対の塩基配列欠損を認めない d1 遺伝子型の存在は、これまでに報告されてきた s 領域, m 領域, i 領域の各遺伝子型と比較して、胃粘膜の高度の炎症および胃粘膜萎縮に関するより感度の高い予測因子となりうると考えられ、胃癌および消化性潰瘍の危険因子の一つ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あるものと認めた。

Induction of LYVE-1/stabilin-2-positive liver sinusoidal endothelial-like cells from embryoid bodies by modulation of adrenomedullin-RAMP2 signaling (ES細胞胚様体分化系を用いた、アドレノメデュリン-RAMP2シグナル制御によるLYVE-1/stabilin-2陽性肝類洞内皮様細胞の分化誘導)

荒居琢磨

(論文の内容の要旨)

ES細胞は、再生医療への応用が期待される細胞ソースである。一方で、現在、成熟した機能的肝細胞の再生およびその移植治療には限界がある。肝発生および再生において、非実質細胞、特に血管内皮細胞が重要であることは周知されており、再生医療を実現させるためには肝細胞のみならず、非実質細胞を含めた再生が必要と考えられる。今回、われわれは肝再生において肝脈管系に特徴的な、肝類洞内皮細胞を分化させることが重要ではないかと仮定した。他方、アドレノメデュリン (AM) は、多彩な生理活性を有する内因性生理活性ペプチドとして知られている。われわれは、AM およびその受容体補助タンパク RAMP2 のノックアウトマウスを作成し、いずれも胎生中期に全身の出血および著明な浮腫により致死となることを報告した。この結果から、AM-RAMP2シグナルは、血管・リンパ管の形成・成熟に必須であることが明らかとなった。更に、AM および RAMP2 ノックアウトマウスの出血性変化は肝臓の組織内でも認められるため、AM-RAMP2シグナルが肝類洞内皮細胞の発生・成熟にも関与していることが示唆された。

方法であるが、ES細胞の懸滴培養により胚様体を形成させ、4日目にこれを接着培養に移行させた。接着培養後、時期を振りAMを添加し、血管内皮および肝細胞・肝類洞内皮特異的遺伝子の発現を評価した。更にTGFβ1受容体キナーゼ阻害剤であるSB431542が、肝類洞内皮細胞の分化・成熟を促進するという報告があることから、AMとの比較および両者の併用の検討を行った。また、RAMP2ノックアウトマウスの胎仔肝における肝類洞内皮の解析も追加検討した。

胚様体形成4日目に接着培養した直後から14日目までAMを添加した際、血管内皮マーカーであるCD31が陽性の細胞群がAM用量依存的に増加したが、リンパ管および肝類洞内皮に発現するLYVE-1の発現は認められなかった。さらに、培養後期14日目からAMおよびSB431542 (TGFβ1受容体キナーゼ阻害剤) を添加し、血管内皮および肝細胞特異的遺伝子の発現を評価した。AM単独群、SB431542単独群とも

類洞内皮細胞に発現するとされるLYVE-1, stabilin-2が有意に上昇し、同時投与群ではその効果は相乗的であった。同時投与群における免疫染色においてCD31/LYVE-1/stabilin-2陽性内皮細胞が確認でき、その一部には有窓様構造が認められた。また、Ac-LDLの取り込みが亢進しており、類洞内皮特異的遺伝子 (F8, Mrc1, Fcgr2b) の発現が有意に上昇していた。さらに、LYVE-1陽性内皮細胞とアルブミン陽性細胞集塊が近接し肝様構造が構築され、成熟肝細胞遺伝子発現が上昇していることが確認された。他方、RAMP2ノックアウトマウスの胎仔肝における肝類洞内皮細胞のLYVE-1の発現は有意に低下しており、類洞構造の破綻を示唆する所見も認められた。

ES細胞胚様体系において、類洞内皮様細胞の分化誘導が可能であった。また、類洞内皮細胞の発生および成熟化において、AMシグナル刺激およびTGFβシグナル抑制が重要であることが示唆された。近年、急性肝障害や肝硬変に対して血管前駆細胞の経門脈的移植が肝機能を改善させたとする報告や、血友病モデルマウスに類洞内皮細胞を経門脈的に移植したところ、血友病が改善したという報告がみられる。また、肝細胞および非実質細胞を含めたバイオ人工肝による透析治療の実験も進められている。本実験系で得られた知見は将来、前述したような再生医療に活用できる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

ES細胞は、再生医療への応用が期待される細胞ソースである。一方で、現在、成熟した機能的肝細胞の再生およびその移植治療には限界がある。肝発生および再生において、非実質細胞、特に血管内皮細胞が重要であることは周知されており、再生医療を実現させるためには肝細胞のみならず、非実質細胞を含めた再生が必要と考えられる。

以前に、荒居らのグループは、AM およびその受容体補助タンパク RAMP2 のノックアウトマウスを作成し、いずれも胎生中期に全身の出血および著明な浮腫により致死となることを報告した。この結果から、AM-RAMP2シグナルは、血管・リンパ管の形成・



成熟に必須であることが明らかとなった。更に、AM および RAMP2ノックアウトマウスの出血性変化は肝臓の組織内でも認められるため、AM-RAMP2シグナルが肝類洞内皮細胞の発生・成熟にも関与していることが示唆された。本研究では、ES細胞胚様体分化系を用いて、AMの内皮細胞に対する作用を検討した。

方法であるが、ES細胞の懸滴培養により胚様体を形成させ、4日目にこれを接着培養に移行させた。接着培養後、時期を振りAMを添加し、血管内皮および肝細胞・肝類洞内皮特異的遺伝子の発現を評価した。更にTGF $\beta$ 1受容体キナーゼ阻害剤であるSB431542が、肝類洞内皮細胞の分化・成熟を促進するという報告があることから、AMとの比較および両者の併用の検討を行った。

その結果、荒居琢磨は次の結果を得た。

1. 培養後期からのAMおよびSB431542添加により、肝類洞内皮細胞に発現するとされるLYVE-1, stabilin-2の発現が有意に上昇し、同時投与群では

その効果は相乗的であった。

2. 同時投与群における免疫染色にてCD31/LYVE-1/stabilin-2陽性内皮細胞が確認でき、その一部には肝類洞内皮細胞に特徴的な窓様構造が認められた。
3. 同時投与群における内皮細胞群ではAc-LDLの取り込みが亢進しており、肝類洞内皮特異的遺伝子の発現が有意に上昇していた。
4. 同時投与群におけるLYVE-1陽性内皮細胞とアルブミン陽性細胞集塊が近接し肝様構造が構築され、成熟肝細胞遺伝子発現が上昇していた。

これらの結果より、ES細胞から肝類洞様細胞の分化誘導が可能であると考えられた。また、肝類洞内皮細胞の発生および成熟化において、AMシグナル刺激およびTGF $\beta$ シグナル抑制が重要であることが示唆された。本実験系で得られた知見は将来、再生医療に活用できる可能性が示唆された。

以上の結果に対して、主査、副査は一致して、本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Transabdominal preperitoneal repair for obturator hernia (閉鎖孔ヘルニアに対する Transabdominal preperitoneal repair (TAPP) 法による腹腔鏡下ヘルニア修復術)

横山 隆 秀

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】閉鎖孔ヘルニアに対する腹腔鏡下修復術はまだ一般的に広くは行われていない。そこで、我々は閉鎖孔ヘルニアに対する Transabdominal preperitoneal repair (TAPP) 法による腹腔鏡下ヘルニア修復術の有用性を検討した。

【方法】2001年から2010年5月までに鼠径ヘルニア症例、659例に対してTAPP法による腹腔鏡下ヘルニア修復術を施行した。同期間に8例の閉鎖孔ヘルニア症例を認め、これを対象とした。

【結果】8例中3例は手術中に偶然発見された不顕性症例であり、他の5例は術前に超音波検査およびCT検査にて診断された嵌頓症例であった。両側性の閉鎖孔ヘルニアは8例中5例(63%)であり、片側または両側に鼠径部領域のヘルニアを合併していた症例は8例中7例(88%)であり、この7例は全例、大腿ヘルニアを合併していた。腸閉塞を呈していた5例の嵌頓症例中、4例は腹腔鏡にて腸管の評価を行い、腸切除不要と判断した。腸切除を必要と判断した1例はメッシュ感染を回避するために二次的ヘルニア修復術

へ変更した。二次的ヘルニア修復術について以下に示す。ファーストステージ：小開腹創を追加して、この創から壊死腸管の切除と吻合、ヘルニア門の腹膜を単純縫合閉鎖する。セカンドステージ：後日、Kugel法にて閉鎖孔ヘルニアの修復を行う。全閉鎖孔ヘルニア症例において、術後合併症、周術期死亡、再発を認めていない。

【結論】両側の鼠径部領域の評価だけでなく、同時に嵌頓腸管の評価も行えることから、不顕性や嵌頓閉鎖孔ヘルニアの治療にTAPP法によるヘルニア修復術は適切な手術法と思われる。二次的ヘルニア修復術は嵌頓腸管の切除を要する患者にとって適した手技である。

### (論文審査の結果の要旨)

閉鎖孔ヘルニアに対する腹腔鏡下修復術はまだ一般的に広くは行われおらず、閉鎖孔ヘルニアに対する Transabdominal preperitoneal repair (TAPP) 法による腹腔鏡下ヘルニア修復術の有用性を検討した。

2001年から2010年5月までに鼠径ヘルニア症例、659例に対してTAPP法による腹腔鏡下ヘルニア修復術を施行し、同期間に8例(1.2%)の閉鎖孔ヘルニ

ア症例を認め、80歳以上の女性ヘルニアの24%を占めた。

症例は全例女性であり、痩せ型、高齢であった。閉鎖孔ヘルニア8例中3例は手術中に偶然発見された不顕性症例であり、他の5例は術前に超音波検査およびCT検査にて診断された嵌頓症例であった。両側性の閉鎖孔ヘルニアは8例中5例(63%)であり、片側または両側に鼠径部領域のヘルニアを合併していた症例は8例中7例(88%)、この7例は全例、大腿ヘルニアを合併していた。腸閉塞を呈していた5例の嵌頓症例中、3例は手術施行時には自然還納していた。手術時にも嵌頓が継続していた2例中1例は嵌頓整復後、腹腔鏡下に腸管の評価を行い、腸切除不要と判断した。腸切除を必要と判断した1例はメッシュ感染を回避するために新たに考案した二期的ヘルニア修復術へ変更した。二期的ヘルニア修復術は腸管切除を必要とする嵌頓症例に対し、メッシュを使用する手術法であり、

以下に示す。ファーストステージ：嵌頓整復後、小開腹創を追加して、この創から壊死腸管の切除と吻合、ヘルニア門の腹膜を単純縫合閉鎖する。セカンドステージ：約2-3週間後、全身状態と炎症反応の改善を待つて、Kugel法にて閉鎖孔ヘルニアの修復を行う。全閉鎖孔ヘルニア症例において、術後合併症、周術期死亡、再発を認めていない。

本研究から得られた新たな知見としては以下があげられる。閉鎖孔ヘルニアは両側例が多い。また、併存ヘルニア、特に大腿ヘルニアを有することが多い。両側の鼠径部領域の評価だけでなく、同時に嵌頓腸管の評価も行えることから、不顕性や嵌頓閉鎖孔ヘルニアの治療にTAPP法によるヘルニア修復術は適切な手術法と思われる。二期的ヘルニア修復術は嵌頓腸管の切除を要する患者にとって適した手技である。

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。

## Ceruloplasmin Protects Against Rotenone-Induced Oxidative Stress and Neurotoxicity (セルロプラスミンはロテノンによる酸化ストレスと神経毒性に対して防御的作用を有する)

日根野 晃 代

### (論文の内容の要旨)

【背景】セルロプラスミン(Cp)は、銅輸送蛋白であるがフェロキシダーゼとしての鉄代謝への関与も重要な役割である。Cpは脳内では主にアストロサイトから産生され、細胞膜上に膜結合型(GPI-anchored form)として発現している。フェロキシダーゼとして二価鉄( $Fe^{2+}$ )を三価鉄( $Fe^{3+}$ )に酸化し、次いで $Fe^{3+}$ はトランスフェリンに結合し神経細胞へ取りこまれる。セルロプラスミン欠損状態では $Fe^{2+}$ が酸化されずフリーラジカルであるヒドロキシラジカル( $OH\cdot$ )が産生され、神経細胞に酸化ストレスをかける。無セルロプラスミン血症では、肝臓や脳など全身の諸臓器に鉄沈着を来し、脳における神経細胞死の要因として酸化ストレスの亢進が示されている。一方、パーキンソン病やアルツハイマー病など神経変性疾患でも鉄蓄積の関与がいわれている。パーキンソン病では過剰な鉄蓄積がミトコンドリア複合体I活性を低下させる。ロテノンはミトコンドリア複合体Iを阻害し、パーキンソン病を誘導する農薬の一種として知られており、ヒドロキシラジカル産生を介して神経毒性を誘導する。またパーキンソン病とCpの関与を示唆する報告がなされている。本研究では、Cpの酸化スト

レスに対する神経保護作用を調べるために、セルロプラスミン遺伝子(CP)欠損マウスにロテノンを投与し運動機能、脳組織における酸化ストレスマーカーを測定した。

【方法】週齢13週のCP欠損マウスと野生型マウスにおいてそれぞれ投与群/非投与群(計4群)に分け、投与群にはロテノン10 mg/kg/dayを4週間投与した。1週毎に体重、運動機能解析としてfootprint・rotarod試験を行った。4週後に脳と肝臓を取り出し、ミトコンドリア複合体I酵素活性を測定した。また脳組織において、酸化ストレスマーカーとして4-ヒドロキシ-2-ノネナール(HNE)、ヘキサノイルリジン(HEL)、カルボニル化蛋白をウェスタンブロット法やELISA法を用いて解析し、鉄沈着の有無やHNE、HELの蓄積を組織学的に検討した。

【結果】4群共に実験中死亡例はなく体重に有意差はなかった。CP欠損マウス・野生型マウスいずれにおいても脳・肝臓共にロテノン投与によるミトコンドリア複合体I酵素活性の低下は認めなかった。運動機能は野生型マウスでは明らかな変化がみられなかったが、CP欠損マウスでは歩幅は変化しないものの前肢/後肢のずれが増大する傾向を認め、ロテノン投与群で

はさらに増強していた。4週後において野生型ロテノン非投与群に比べ、CP欠損ロテノン投与群は前肢/後肢のずれが有意に増大していた。rotarod試験ではCP欠損マウスで野生型と比較し落下時間の短縮が認められたが、ロテノン投与の有無による差は認めなかった。一方、脳組織におけるウェスタンブロット法ではHNE・HEL共にCP欠損ロテノン投与群で増加し、ELISA法でもHNE・カルボニル化蛋白がCP欠損ロテノン投与群で野生型と比較し有意に増加していた。組織学的にはHE染色で脳に4群共に有意な変化は認めず、鉄染色においても脳・肝に鉄の沈着は認めなかった。HNE・HEL免疫染色では、CP欠損ロテノン非投与群で線条体ニューロンの細胞質に陽性所見を認めたが、CP欠損ロテノン投与群でより顕著であった。

【考察】CP欠損マウスはロテノン非投与群でも野生型に比べ軽度の運動機能の低下を認めたが脳組織の酸化ストレスマーカーに有意差は認めなかった。野生型ではロテノン投与による神経障害は認めなかった。また、野生型マウスもCP欠損マウスにおいてもロテノンによるミトコンドリア複合体I活性の変化は脳・肝ともに確認されなかった。これはロテノン投与量が少なく、ミトコンドリア複合体I活性の値を低下させるほどではなかったためと考えられた。しかしながらCP欠損状態では、野生型では変化が起きない程度の低用量のロテノン投与でも運動機能の低下を認め、生化学的・組織学的にも脳組織の酸化ストレスマーカーの亢進が確認された。過去にもロテノンがミトコンドリア複合体I活性低下によらず神経細胞死を惹起した報告があり、本研究でもミトコンドリア複合体I活性低下以外の経路により神経毒性が誘導された可能性が考えられた。またCP欠損マウスではロテノン投与の有無にかかわらず脳への鉄沈着を認めなかった。このことはCP欠損マウスでは鉄沈着以外の要因で酸化ストレスの亢進が生じたことを示唆していた。Cpは鉄代謝以外にもカテコラミンなどの芳香族アミンなどの基質の酸化や、スーパーオキシドラジカルの捕捉などの働きが報告されている。本研究では、Cpが酸化ストレスに対する神経保護作用を有することが確認されたが、それがフェロキシダーゼ機能を介さない抗酸化作用である可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

セルロプラスミン(Cp)は、フェロキシダーゼとして鉄代謝に関与する。Cp欠損状態では $Fe^{2+}$ が酸化

されず細胞障害性の強いフリーラジカルであるヒドロキシラジカル(OH $\cdot$ )が産生される。無セルロプラスミン血症では脳など全身諸臓器に鉄が沈着し酸化ストレスが惹起される。一方、パーキンソン病では過剰な鉄蓄積がミトコンドリア複合体I活性を低下させる。ロテノンはミトコンドリア複合体Iを阻害しパーキンソン病を誘導する農薬の一種であり、OH $\cdot$ 産生を介して神経毒性を誘導する。本研究では、Cpの酸化ストレスに対する神経保護作用を調べるために、セルロプラスミン遺伝子(CP)欠損マウスにロテノンを投与し運動機能、脳組織の酸化ストレスマーカーを測定した。

運動機能は野生型マウスではロテノン投与による変化は認めなかった。CP欠損マウスではロテノン非投与群で前肢/後肢のずれが増大し、rotarod試験で落下時間の短縮する傾向を認め、ロテノン投与群ではさらに増強していた。CP欠損ロテノン投与群では脳組織におけるウェスタンブロット法で4-ヒドロキシ-2-ノネナール(HNE)、ヘキサノイルリジン(HEL)が増加し、ELISA法でもHNE・カルボニル化蛋白が有意に増加していた。HNE・HEL免疫染色では、CP欠損ロテノン投与群で線条体ニューロンの細胞質に陽性所見を認めた。

本研究ではCP欠損、ロテノン投与それぞれ単独では明らかな神経障害はおこさないもののCP欠損にロテノン負荷を行うことで神経障害が惹起された。しかし脳・肝臓共にミトコンドリア複合体I酵素活性低下は認めず、鉄染色で鉄沈着も認めなかった。このことはミトコンドリア複合体I活性以外の経路により神経毒性が誘導された可能性や、Cpは鉄代謝以外にもカテコラミンなど芳香族アミンなどの基質の酸化やスーパーオキシドラジカルの捕捉などの働きが報告されていることから、CP欠損マウスでは鉄沈着以外の要因で酸化ストレスの亢進が生じたことが示唆された。

本研究は、CP欠損状態では低用量のロテノン投与で運動機能低下、脳組織における酸化ストレスマーカー亢進を見出し、Cpが酸化ストレスに対する神経保護作用を有することを確認した。さらにそれがフェロキシダーゼ機能を介さない抗酸化作用である可能性を示唆した。よって、主査・副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。



Bronchoscopic Microsampling for Bacterial Colony Counting in Relevant Lesions in Patients with Pulmonary *Mycobacterium avium* Complex Infection (気管支鏡下マイクロサンプリング法を用いた肺 *Mycobacterium avium* complex 感染症患者の病変局所における菌量の検討)

牛 木 淳 人

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】肺 *Mycobacterium avium* complex 感染症(肺 MAC 症)は近年その患者数の増加が指摘されている。肺 MAC 症の予後は致死的に至る症例から自然軽快するものまで様々であるが、その予後を規定する因子ははっきりとしていない。喀痰中の菌量が治療反応性と相関することは報告されているが、自然経過における予後との相関は不明である。一方、気管支鏡下マイクロサンプリング法 (bronchoscopic micro-sampling : BMS) は成人呼吸窮迫症候群症例でその病態解明のために経気管支鏡的に病変局所の気道上皮被覆液 (bronchial epithelial lining fluid : ELF) を低侵襲に採取することを目的に開発され、*in vitro* の実験では細菌の定量採取の手段としての有用性も報告されている。本研究では肺 MAC 症の病態を解明するために患者の病変局所より BMS を用いて ELF を採取し定量培養を行い、その菌量と予後および胸部 CT 所見の比較を行った。

【方法】調査対象は当院を受診した他疾患を有さない肺 MAC 症患者26名で、全員に対して自覚症状を確認し、血液検査で白血球やCRP、血沈などの炎症反応や総蛋白値やアルブミン値を測定した。肺 MAC 症の予後の評価には胸部 CT を用いた。BMS は責任気管支へ超音波プローブを挿入し病変の同定を行い、同部位へガイドシースを留置した。次いでガイドシースを通じて BMS プローブを病変へ誘導し ELF を採取した。その後ガイドシースを抜去し生理食塩水20 mL で気管支洗浄を行い、その洗浄液を回収した。ELF と洗浄液は7H11agar に塗布し37°C、5% CO<sub>2</sub>で抗酸菌を4週間培養後にコロニーカウントを行った。

【結果】胸部 CT 上、不変群11名、増悪群15名であった。年齢、性別、血液検査所見などに有意差はなかったが、増悪群で自覚症状として血痰を有する例が多かった。不変群における胸部 CT 所見は結節・気管支拡張病変8名(73%)、浸潤性病変3名(27%)であった。増悪群における胸部 CT 所見は結節・気管支拡張病変1名(7%)、浸潤性病変6名(40%)、空洞病変8名(53%)であった。増悪群では BMS を用いて採取し

た ELF 中の菌量が不変群のそれと比較して有意に多かった ( $p < 0.001$ )。ELF 中の菌量は、空洞病変が結節・気管支拡張病変のそれと比較して有意に多かった ( $p < 0.05$ )。気管支洗浄液中の菌量は不変群と比較して増悪群で有意に多かったが ( $p < 0.05$ )、結節・気管支拡張病変、浸潤性病変、空洞病変の3群間では有意差がなかった。また ELF 中の菌量と洗浄液中の菌量に相関は認めなかった。

【考察】経気管支鏡的に病変部より検体を採取する方法としては気管支肺胞洗浄やブラシによる擦過といった方法が報告されている。しかし気管支肺胞洗浄では生理食塩水注入により呼吸状態を悪化させる可能性があり、擦過による方法では細菌培養した際の定量性が劣るとされている。BMS はプローブを挿入するだけであり呼吸状態の悪化をきたす危険性が少なく、また菌の濃度を変えることなく回収できるため定量性に優れていると考えられる。本研究では増悪群で ELF 中の菌量が有意に多く、予後予測因子となりうるものが示唆された。また胸部 CT 所見で空洞病変を呈した症例は全例増悪しており、予後予測因子となりうると思われた。浸潤性病変は不変群、増悪群ともに認められたが、ELF 中の菌量が6,000 CFU/mL 以上の症例は全例増悪しており、菌量により予後が予測できると考えられた。洗浄液中の菌量も増悪群で有意に多く予後予測因子になりうると思われたが、CT 所見の違いによる有意差は認めなかった。この理由としては洗浄液が20 mL と少量であり正確に病変局所より回収できていない可能性や、注入した生理食塩水の回収率が症例により異なることなどが考えられた。

【結論】肺 MAC 症の予後は様々であり、診断後早期の治療を必要としない症例も多い。本研究結果より胸部 CT 所見で空洞病変や浸潤性病変を持つ症例(特に菌量が多い症例)では病状が増悪する可能性が高く、早期に治療を開始することが望ましいと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

肺 *Mycobacterium avium* complex 感染症(肺 MAC 症)の予後を規定する因子ははっきりとしていない。一方、気管支鏡下マイクロサンプリング法

(bronchoscopic microsampling : BMS) は経気管支鏡的に気道上皮被覆液 (bronchial epithelial lining fluid : ELF) を低侵襲に採取することが可能であり, *in vitro* の実験では細菌の定量採取の有用性も報告されている。今回は肺 MAC 症の病態を解明するために患者の病変局所より BMS を用いて ELF を採取し定量培養を行い, その菌量と予後および胸部 CT 所見の比較を行った。

調査対象は当院を受診した他疾患を有さない肺 MAC 症患者 26 名で, 全員に対して自覚症状を確認し, 血液検査で白血球や CRP, 血沈などの炎症反応や総蛋白値やアルブミン値を測定した。肺 MAC 症の予後の評価には胸部 CT を用いた。BMS は責任気管支へ超音波プローブを挿入し病変の同定を行い, 同部位へガイドシースを留置した。次いでガイドシースを通じて BMS プローブを病変へ誘導し ELF を採取した。その後ガイドシースを抜去し生理食塩水 20 mL で気管支洗浄を行い, その洗浄液を回収した。ELF と洗浄液は 7H11 agar に塗布し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で抗酸菌を 4 週間培養後にコロニーカウントを行った。

その結果, 下記の結果を得た。

1. 不変群における胸部 CT 所見は結節・気管支拡張病変 8 名 (73%), 浸潤性病変 3 名 (27%) であった。増悪群における胸部 CT 所見は結節・気管支拡張病変 1 名 (7%), 浸潤性病変 6 名 (40%), 空洞病変 8 名 (53%) であった。
2. 増悪群では BMS を用いて採取した ELF 中の菌量が不変群のそれと比較して有意に多かった。
3. 空洞病変の ELF 中の菌量は, 結節・気管支拡張病変のそれと比較して有意に多かった。
4. 気管支洗浄液中の菌量は不変群と比較して増悪群で有意に多かったが, 結節・気管支拡張病変, 浸潤性病変, 空洞病変の 3 群間では有意差がなかった。

これらの結果により胸部 CT 所見で空洞病変や浸潤性病変を持つ症例 (特に菌量が多い症例) では病状が増悪する可能性が高く, 早期に治療を開始することが望ましいと考えられた。

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

## Critical Role of Th17 Cells in Inflammation and Neovascularization After Ischaemia (虚血下の炎症および血管新生における Th17 細胞の重要な役割)

羽 田 健 紀

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】急性動脈閉塞, 慢性閉塞性動脈硬化症などの疾患では虚血後の側副血行の発達が組織の修復において重要である。虚血後の側副血行の発達においては, ケモカインや炎症性細胞浸潤など, 炎症性の反応が重要な役割を担っていることが明らかにされ, 特に単球/マクロファージやそれらのケモカインである MCP-1 が中心的な存在であることが報告されている。最近ではそれに加え虚血後の側副血行路の発達に CD4 陽性 T 細胞が関与していることが報告されており, 様々な報告がなされているが, CD4 陽性 T 細胞の中のどのサブセットが寄与しているかなどのメカニズムについてはいまだよく解明されていない。Th17 細胞は近年新たに見出された CD4 陽性 T 細胞のサブセットであり, インターロイキン-17 (IL-17) の産生細胞であるが, 今回我々はこの Th17 細胞に注目し, 虚血後の血管新生における CD4 陽性 T 細胞および Th17 細胞の役割を明らかにすることを目的とし, 下記の実験を行った。

【方法と結果】まず CD4 陽性 T 細胞の血管新生における役割について確認すべく, CD4 中和抗体を腹腔内投与したマウスに下肢虚血モデルを作製し, レーザードップラーにより下肢血流を追跡した。CD4 中和抗体投与群の下肢虚血モデルにおける血流の回復はコントロール (PBS 投与) 群に比し明らかに低下していた。CD4 陽性 T 細胞が血管新生において重要な役割を担っていることが確認され, さらにその役割について明らかにすべく CD4 陽性 T 細胞のどのサブセットが血管新生に関与しているかについて実験を行った。虚血下肢におけるサイトカイン発現について FACS を用いて検索したところ, IL-17 の inducer である IL-6 が高発現を示した。この結果から虚血下肢における IL-17 とその regulator である ROR $\gamma$ t の発現を real time PCR を用いて評価したところ, IL-17 や ROR $\gamma$ t が虚血下肢において高発現していることが見出された。このため血管新生における Th17 細胞の寄与を検討すべく, 次の実験として IL-17 ノックアウトマウスに下肢虚血モデルを作製し検討を行った。結果レーザードッ

ブラーにて IL-17ノックアウトマウスの血流回復が明らかに低下しており、その他 IL-17ノックアウトマウスの虚血下肢では免疫染色や FACS にて毛細管形成の減少、好中球、単球/マクロファージおよび CD4陽性 T細胞の浸潤の著明な減少が認められた。また ELISA では血管新生サイトカインである IL-1 $\beta$ 、VEGF の有意な発現の低下が認められた。骨髄移植モデルでも検討を行ったところ、IL-17ノックアウトマウス骨髄由来の骨髄移植モデルで有意に血流回復が低下し、骨髄由来の Th17細胞の血管新生への寄与が示唆された。さらに IL-17ノックアウトマウスの脾臓由来の CD4陽性 T細胞をヌードマウスの虚血下肢に注入したところ、野生型脾臓由来の CD4陽性 T細胞に比べ有意差をもって血流回復が低下していた。

**【結論】** これらの実験から、新たな CD4陽性 T細胞サブセットである Th17細胞は下肢虚血における血管新生に寄与し、CD4陽性 T細胞の血管新生亢進に関するメカニズム解析に新たな情報が得られた。また虚血性の心血管疾患に対する Th17細胞の治療応用への可能性も示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

虚血後の側副血行路の発達に CD4陽性 T細胞が関与していることを示すデータが報告されているが、CD4陽性 T細胞の中のどのサブセットが寄与しているかについては明らかにされていない。Th17細胞は近年新たに見出された CD4陽性 T細胞のサブセットであり、インターロイキン (IL) -17の産生細胞であるが、今回我々はこの Th17細胞に注目し、虚血後の血管新生における CD4陽性 T細胞および Th17細胞の役割を明らかにすることを目的として実験を行った。

まず 8 週齢の B6マウスに CD4中和抗体を腹腔内投与し、下肢虚血モデルを作成してその血流回復の過程をレーザードップラーで解析した。また B6マウスの

下肢虚血モデルの虚血下肢において IL-17の inducer である IL-6が高発現していることが認められたため、虚血下肢における IL-17および IL-17の regulator である ROR $\gamma$ t の発現について評価した。その結果から次に IL-17ノックアウトマウスの下肢虚血モデルにおける血流評価、および虚血下肢における炎症性細胞浸潤や血管新生サイトカインの発現などを免疫染色や ELISA, real time PCR にて評価を行った。さらに IL-17ノックアウトマウスの骨髄移植モデルにおける血流回復の検討や、ヌードマウスに作製した虚血下肢へ IL-17ノックアウトおよび野生型マウス由来の CD4陽性 T細胞を細胞移植するモデルでも検討を行った。

その結果、羽田健紀は今回の実験で以下の結論を得た。

1. CD4陽性 T細胞の中和により血管新生が抑制された。
2. B6マウスの虚血下肢において IL-17, ROR $\gamma$ t が高発現していた。
3. IL-17ノックアウトマウスでは野生型に比し血管新生が有意に減弱し、さらにその虚血下肢における炎症性細胞浸潤の低下や血管新生サイトカインの発現の低下が認められた。
4. 骨髄由来の Th17細胞の欠損により血管新生は減弱した。
5. 野生型由来の CD4陽性 T細胞に比し、IL-17ノックアウトマウス由来の CD4陽性 T細胞では虚血下肢へ移植した場合の血流回復の効果が弱いことが認められた。

これらの結果から、Th17細胞は下肢虚血における血管新生に寄与していることが示された。さらには虚血性の心血管疾患に対する Th17細胞の治療応用への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。

Quantitative Evaluation of Liver Function with Use of Gadoxetate Disodium-enhanced MR Imaging  
(ガドキセト酸ナトリウム造影 MRI を用いた定量的肝機能評価)

山 田 哲

(論文の内容の要旨)

**【背景と目的】** 肝機能の定量的評価法としてインドシアニングリーン (indocyanine green, ICG) 試験が臨床応用されているが、部分肝機能の評価できないという問題点がある。ガドキセト酸ナトリウム (一般名: gadoxetate disodium, 略号: Gd-EOB-DTPA,

以下 EOB と表記) は細胞外液性造影効果と肝細胞特異性造影効果を併せ持つ MR 造影剤であり、肝細胞への取り込みは ICG と類似のトランスポーターの関与が示唆されている。本研究の目的は EOB 造影 MRI を用いて ICG 試験によって表される肝機能を定量評価可能か検討することである。



【方法】本後ろ向き研究は本学倫理委員会の承認を受け、対象被検者への説明と同意義務は免除された。信州大学医学部附属病院において2008年6月から2009年12月までの間に術前評価として同一撮像条件によるEOB造影MRIとICG試験が施行された連続23患者をデータベースから抽出した。EOB (0.025 mmol/体重 [kg]) 投与20分後に撮像した脂肪抑制併用3Dグラジエントエコー法T1強調像上の肝体積 ( $V_L$ )、肝平均信号強度 ( $L_{20}$ )、脾平均信号強度 ( $S_{20}$ ) から Hepatocellular Uptake Index (HUI) を次の式を用いて求めた。HUI =  $V_L [(L_{20}/S_{20}) - 1]$ 。ICG 血漿消失率 (ICG plasma disappearance rate, ICG-PDR) と  $L_{20}$  および HUI の相関係数の平均値および平均値の95%信頼区間をbootstrap法にて評価した。さらにICG-PDRとMR画像から得られた様々な因子 (HUI, 肝および脾への鉄および脂肪沈着, 脾体積 ( $V_S$ ) を含む) の相関を重回帰分析 (ステップワイズ法) にて評価した。肝機能の不均一性が認められた4患者において全肝 HUI に対する残肝 HUI (rHUI) の比 (rHUI/HUI) と全肝体積に対する残肝体積 (rV) の比 ( $rV_L/V_L$ ) の差の平均値および平均値の95%信頼区間を評価した。

【結果】ICG-PDR との相関係数の平均値および平均値の95%信頼区間は  $L_{20}$  で0.634 (95%信頼区間: 0.629, 0.640), HUI で0.721 (95%信頼区間: 0.717, 0.726) であった。重回帰分析の結果, HUI と  $V_S$  のみがICG-PDR と有意に相関する因子であった ( $R=0.87$ )。rHUI/HUI- $rV_L/V_L$  の平均値は0.18, 95%信頼区間は0.01から0.34であった。

【結論】EOB造影MR画像上の肝および脾の信号強度ならびに体積を用いてICG-PDRによって表される肝機能を定量評価可能であり, 部分肝機能評価に役立つ可能性がある。

#### (論文審査の結果の要旨)

肝機能の定量的評価法としてインドシアニングリーン (indocyanine green, ICG) 試験が臨床応用されているが, 部分肝機能を評価できないという問題点

がある。ガドキセト酸ナトリウム (一般名: gadoxetate disodium, 略号: Gd-EOB-DTPA, 以下EOBと表記) は細胞外液性造影効果と肝細胞特異性造影効果を併せ持つMR造影剤であり, 肝細胞への取り込みはICGと類似のトランスポーターの関与が示唆されている。今回, EOB造影MRIを用いてICG試験によって表される肝機能を定量評価可能か検討した。

信州大学医学部附属病院において2008年6月から2009年12月までの間に術前評価として同一撮像条件によるEOB造影MRIとICG試験が施行された連続23患者を対象とした。EOB (0.025 mmol/体重 [kg]) 投与20分後に撮像した脂肪抑制併用3Dグラジエントエコー法T1強調像上の肝体積 ( $V_L$ )、肝平均信号強度 ( $L_{20}$ )、脾平均信号強度 ( $S_{20}$ ) から Hepatocellular Uptake Index (HUI) を次の式を用いて求めた。HUI =  $V_L [(L_{20}/S_{20}) - 1]$ 。ICG血漿消失率 (ICG plasma disappearance rate, ICG-PDR) とMR画像から得られた様々な因子 (HUI, 肝および脾への鉄および脂肪沈着, 脾体積 ( $V_S$ ) を含む) の相関を重回帰分析 (ステップワイズ法) にて評価した。肝機能の不均一性が認められた4患者において全肝 HUI に対する残肝 HUI (rHUI) の比 (rHUI/HUI) と全肝体積に対する残肝体積 (rV) の比 ( $rV_L/V_L$ ) の差を評価した。

その結果, 山田は次の結論を得た。

1. HUI と ICG-PDR の相関係数は,  $L_{20}$  と HUI の相関係数と比べて有意に高かった。
2. HUI と  $V_S$  のみが ICG-PDR と有意に相関する因子であった ( $R=0.87$ )。
3. rHUI/HUI は有意に  $rV_L/V_L$  より大きかった。

これらの結果より, EOB造影MR画像上の肝および脾の信号強度ならびに体積を用いてICG-PDRによって表される肝機能を定量評価可能であり, 部分肝機能評価に役立つ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。

Administration of dalteparin based on the activated clotting time for prophylaxis of hepatic vessel thrombosis in living donor liver transplantation (生体肝移植時の抗肝血管血栓療法としての活性化凝固時間に基づいたダルテパリン投与)

内 川 裕 司

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】肝移植後の再建肝動脈，門脈の血栓症は，グラフト不全に直結する重篤な合併症であり，その予防が肝移植の成績を左右する因子の一つである。しかしながら，血栓予防に至適な抗凝固療法や，ベッドサイドでの簡便なモニタリング方法に関しては一定の見解が得られていない。我々は2003年までに施行した生体肝移植症例207例の多変量解析の結果，代謝性肝疾患に対する肝移植が肝動脈血栓発症に関係する危険因子であるという結果を得た。家族性アミロイドポリニューロパチーやII型シトルリン血症などの代謝性肝疾患では肝機能自体に異常はなく，凝固能や血小板数も正常範囲内である。そこで，代謝性疾患における正常な凝固能が移植後肝動脈血栓発症に関係していると考え，生体肝移植後の抗凝固療法を強化する目的で，2004年より活性化凝固時間（ACT）が140～150秒になるようにダルテパリンを肝移植術中・術後に投与してきた。今回，このACTに基づいたダルテパリンの投与による抗凝固療法の妥当性を，以前に当施設で施行していた抗凝固療法と比較し検証した。

【対象】1993年から2003年までの症例（A群：32例）では，抗凝固療法として術直後よりダルテパリン（50 IU/kg）とメシル酸ガベキサート（1 mg/kg/hr）が投与され，抗凝固能の定期的なモニタリングはなされていなかった。また，凝固因子，抗凝固因子補給の目的で，ドレーンからの体液喪失分に見合う新鮮凍結血漿（FFP）を補充した。2004年以降の症例（B群：10例）は肝移植術中から6時間～8時間毎にACTを測定し，その値を140から150秒に保つように術中無肝期よりダルテパリンを投与し，FFP投与量はPT，APTT値を参考に凝固因子補充に必要と思われる量にとどめた。この2群において，術後凝固能，肝機能，肝動脈血栓症，門脈血栓症等の比較検討を行った。

【結果】B群はA群より有意に多量のダルテパリンが投与され，FFP投与量は少なかった。その結果，B群ではA群と比し，APTTの延長，FDP D-Dの低下，ASTの低下が有意であった。B群では肝動脈，門脈の血栓性合併症はなく，また出血性合併症も認め

られなかった。

【結論】これらの結果より，ACTに基づいた定期的なダルテパリンの投与は，生体肝移植後の再建肝動脈，門脈血栓の予防だけでなく，出血性合併症を減少させると考えられ，ベッドサイドモニタリングの可能なACT測定は，生体肝移植時のダルテパリンの抗凝固効果を評価する上で，簡便で信頼性の高い方法であると思われた。

(論文審査の結果の要旨)

肝移植後の再建肝動脈，門脈血栓症は，グラフト不全に直結する重篤な合併症であり，その予防が肝移植の成績を左右する因子の一つである。しかしながら，血栓予防に至適な抗凝固療法や，ベッドサイドでの簡便なモニタリング方法に関しては一定の見解が得られていない。我々は2003年までに施行した生体肝移植症例207例の多変量解析の結果，代謝性肝疾患に対する肝移植が肝動脈血栓発症に関係する危険因子であるという結果を得た。そこで，代謝性疾患における正常な凝固能が肝動脈血栓発症の危険因子であるという結果に関係していると考え，2004年より生体肝移植後の再建血管の血栓予防として，定期的に活性化凝固時間（ACT）を測定し，その値が140～150秒になるようにダルテパリンを肝移植術中・術後に投与してきた。今回，ACTに基づいたダルテパリン投与による抗凝固療法の妥当性を，以前に当施設で施行していた抗凝固療法と比較し検証した。

1993年から2003年までの症例（A群：32例）では，抗凝固療法としてダルテパリン（50 IU/kg）とメシル酸ガベキサート（1 mg/kg/hr）が投与され，抗凝固能の定期的なモニタリングはなされていなかった。また，凝固因子，抗凝固因子補充の目的で，ドレーンからの体液の喪失分に見合う新鮮凍結血漿（FFP）を補充した。2004年以降の症例（B群：10例）は肝移植術中から6時間～8時間毎にACTを測定，その値を140から150秒に保つようにダルテパリンを投与し，FFP投与量はPT，APTT値を参考に凝固因子補充に必要と思われる量にとどめた。この2群において，術後凝固能，肝機能，肝動脈血栓症，門脈血栓症等の

比較検討を行い、以下の結果を得た。

1. B群はA群より有意に多量のダルテパリンが投与された。
  2. B群はA群より少量のFFPが投与された。
  3. B群ではA群と比し、APTTの延長、FDP D-Dの低下、ASTの低下が有意であった。
  4. B群では肝血管血栓による合併症はなく、また出血性合併症も認められなかった。
- これらの結果より、ACTに基づいたダルテパリン

の投与は、生体肝移植後の再建肝動脈血栓、門脈血栓の予防だけでなく、出血性合併症を減少させると考えられ、ベッドサイドモニタリングの可能なACT測定は、生体肝移植時のダルテパリンの抗凝固効果を評価する上で、簡便で信頼性の高い方法であると思われた。本論文は肝移植のさらなる成績向上に寄与する価値の高い研究であると考えられ、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### Cytokine profiles affecting the pathogenesis of autoimmune hepatitis in Japanese patients (日本人の自己免疫性肝炎患者におけるサイトカインの動向と病態との関連)

## 上 條 敦

### (論文の内容の要旨)

【目的】自己免疫性肝炎(AIH)の病態にサイトカインの関与が示唆されているが、今までの報告では数種類のサイトカインの測定に限られ、十分なコンセンサスはえられていなかった。本研究では、AIH治療前および治療後寛解期におけるサイトカインを包括的に測定し、その動向よりAIHの病態とサイトカインネットワークとの関連を解明することを目的とした。

【方法】ステロイド単独治療で完全寛解に至ったAIH患者40例を対象とした。年齢の中央値は57歳、性別は女性33例、男性7例であった。また、治療前の臨床データについては、AST、ALTの中央値はそれぞれ578 IU/L、564 IU/Lであり、T-Bil、IgGの中央値はそれぞれ2.4 mg/dl、3,032 mg/dlであった。全例で抗核抗体陽性であった。AIH治療前および治療後寛解期の保存血清を用いてLuminex™ cytokine assay systemにて、28種類(IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL-17A、IL-17F、IL-18、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-31、IFN-α、IFN-γ、TNF-α、IL-8、Eotaxin、IP-10、MCP-1、MIP-1α、MIP-1β、NGF、RANTES、TGF-β)のサイトカインを同時に測定した。

【結果】急性期に上昇し、寛解期に有意に低下したサイトカインはIL-12p40、IL-17F、IL-18、IL-23、IP-10、MIP-1α、MIP-1βの7種類であった(それぞれ $P=3.79 \times 10^{-6}$ 、0.0025、 $2.104 \times 10^{-6}$ 、0.0445、 $1.868 \times 10^{-6}$ 、 $1.364 \times 10^{-5}$ 、 $2.190 \times 10^{-5}$ )。残り21種類のサイトカインは測定感度以下あるいは急性期と寛解期に有意差を認めなかった。治療前に上昇していた

サイトカインのうち、治療前の臨床データとの相関については、IP-10と相関を示したものはASTとALT(それぞれ $P=0.007$ 、 $P=0.032$ )、MIP-1αと相関を示したものはAST( $P=0.033$ )であった。T-Bil、IgGと相関を示したものはなかった。

【考察】ナイーブCD4陽性細胞が、各サイトカインによりTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞、Tregなどに分化し、それぞれAIHの病態に関与していると考えられている。本研究においては、IL-12p40、IP-10、MIP-1α、MIP-1βなどのTh1系、およびIL-17F、IL-23などのTh17系のサイトカインが急性期に上昇し、寛解期に有意に低下した。したがって、AIHの病態にTh1、Th17系の関与が強く示唆され、IP-10、MIP-1α、MIP-1βなどの炎症性ケモカイン、IL-12p40の関与が示唆される制御性T細胞の抑制、およびIL-17F、IL-23などのTh17系サイトカインなどのネットワークがAIH発症や病態形成に重要な役割を演じている可能性が示唆された。AIH発症に関わるサイトカインネットワークの更なる解明には、今後より多くのサイトカインを用いて経時的にその動向を解析する必要があると考えられた。

【結語】AIHにおける肝障害では、Th1系の活性化、炎症性ケモカインの増加、制御性T細胞の抑制とTh17細胞の活性化を中心としたサイトカインのネットワークが重要な役割を担っていると考えられた。

### (論文審査の結果の要旨)

自己免疫性肝炎(AIH)の病態にサイトカインの関与が示唆されているが、これまでの報告では数種類のサイトカインの測定に限られていた。本研究では、ステロイド単独治療で完全寛解に至ったAIH患者40



例（女性33例，男性7例，中央値は57歳）を対象とし，AIHの病態とサイトカインネットワークとの関連を解明するため，AIH治療前および治療後寛解期における28種類のサイトカインを包括的に測定し，解析を行った。

その結果，上條は以下の結論を得た。

1. 急性期に上昇し，寛解期に有意に低下したサイトカインはIL-12p40, IL-17F, IL-18, IL-23, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ の7種類であった（それぞれ $P=3.79\times 10^{-6}$ , 0.0025,  $2.104\times 10^{-6}$ , 0.0445,  $1.868\times 10^{-6}$ ,  $1.364\times 10^{-5}$ ,  $2.190\times 10^{-5}$ ）。残り21種類のサイトカインは測定感度以下，あるいは急性期と寛解期に有意差を認めなかった。
2. 治療前に上昇していたサイトカインのうち，治療前の臨床データとは，IP-10はASTとALT（それぞれ $P=0.007$ ,  $P=0.032$ ），MIP-1 $\alpha$ はAST

（ $P=0.033$ ）に相関がみられた。T-Bil, IgGと相関を示したものはなかった。

3. AIHの病態にTh1, Th17系の関与が強く示唆され，IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ などの炎症性ケモカイン，IL-12p40の関与が示唆される制御性T細胞の抑制，およびIL-17F, IL-23などのTh17系サイトカインなどのネットワークがAIH発症や病態形成に重要な役割を演じている可能性が示唆された。今回の研究は日本人AIH患者に対し，治療前および治療後寛解期におけるサイトカインの動向を包括的に測定し，解析を行った最初の研究である。AIHの発症に関わるサイトカインネットワークを明らかにすることでAIHの病態解明に寄与するもので，AIH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。

## A Novel Heterophilic Antibody Interaction Involves IgG4（異種動物抗体に対するヒトIgG4抗体の特異な反応性）

伊藤 哲也

### （論文の内容の要旨）

【背景と目的】自己免疫性膵炎（AIP）の90%で血清IgG4高値を認めるが，IgG4が果たす役割は未だ充分解明されていない。健常者の血清において，ヒトIgG4はヒトIgGに対して結合性を有し，その反応はリウマトイド因子（RF）のようにFab-Fcを介したのではなく，Fc-Fcを介したものであった。ヒトRFは異種動物IgGのFcにも結合するので，ヒトIgG4にも同様の異種動物IgGとの結合が認められるか，また，それがFc-Fc結合を介するものかを検討した。

【方法】AIP65症例，アルコール性もしくは特発性慢性膵炎111症例，膵癌96症例，自己免疫性肝炎40症例，原発性胆汁性肝硬変39症例，原発性硬化性胆管炎20症例，SLE13症例，Sjögren症候群7症例，健常人130名の血清を対象とした。Affinity chromatographyにてAIP65症例分のプール血清から純粋なIgG4（purified IgG4）を作成した。また，purified IgG4を用いIgG4 F(ab')<sub>2</sub>断片，IgG4 Fc断片，HRP標識purified IgG4を作成した。標識抗体として，ヒトIgG4 Fc領域を認識するHRP標識抗ヒトIgG4マウス抗体と，ヒトIgG4 F(ab')<sub>2</sub>領域を認識するHRP標識抗ヒト $\kappa$ 鎖ヤギ抗体を用いた。(1)ELISA法にて異種動物IgGと

ヒトIgG4の反応性を検討した。また，マウスIgGサブクラス（IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3）についても同様に検討した。(2)Western blotting法にてウサギIgGとヒトIgG4, IgG4 F(ab')<sub>2</sub>領域，IgG4 Fc領域との反応性を検討した。(3)ELISA法にてウサギIgGと各疾患群および健常者血清IgG4との反応性を検討した。また，IgG4濃度が既知であるAIP症例のプール血清を標準抗体とし，ウサギIgGに結合した各疾患群のヒトIgG4濃度を測定した。

【結果】(1)ELISA法にてヒトIgG4はマウスとウサギIgGと強い反応を示したが，モルモット，ウシ，ヤギ，イヌとは中等度の反応を呈し，ウマとラットはほとんど反応しなかった。マウスIgGサブクラスでは，IgG2aと最も強い反応を示した。(2)Western blotting法にてウサギIgGはpurified IgG4とIgG4 Fcに強く反応したが，IgG4 F(ab')<sub>2</sub>と反応しなかった。(3)ELISA法によるウサギIgGと各疾患群ヒト血清IgG4の反応性では，AIP症例で反応性が高く，他疾患群，健常人ではほとんど認められなかった。AIP症例では，血清IgG4値とウサギIgGに結合するIgG4量に強い相関を認めたが，血清RF値とは相関しなかった。

【考察】ヒトIgG4は様々な異種動物IgGと結合する

が、マウス IgG サブクラスの検討より、各動物におけるそれぞれの IgG サブクラスと異なる親和性を持つことが示唆された。ヒト IgG4は Fc 領域を介してウサギ IgG と結合していると考えられた。また、ウサギ IgG に結合するヒト IgG4値と血清 IgG4値は強い相関を示しており、ヒト IgG4が異種動物 IgG に対し結合能をもつことが示唆された。今回の研究の結果より、異種動物抗体を用いたヒト IgG4測定系では、IgG 抗体の Fc 部分を除く工夫が必要なことを示している。

【結語】ヒト IgG4は RF のように様々な異種動物の IgG と結合するが、この結合は抗原抗体反応ではなく Fc-Fc を介した相互作用によるものであった。

#### (論文審査の結果の要旨)

従来のリウマチ因子 (IgM-RF) は免疫グロブリンに対する自己抗体として知られており、ヒト IgG のみならず、異種動物 IgG にも結合する。リウマチ因子はその Fab 領域を介して IgG Fc 領域に結合することが証明されている。一方、ヒト IgG4もリウマチ因子様の作用を持つとされ、ヒト IgG4がその Fc 領域を介しヒト IgG Fc 領域と結合することが明らかにされた。今回、ヒト IgG4が異種動物 IgG に結合能を有するか、また、どの領域を介した結合であるかを、ELISA 法および Western blotting 法を用いて検討した。

自己免疫性膵炎65例、アルコール性もしくは特発性慢性膵炎111例、膵癌96例、自己免疫性肝炎40例、原発性胆汁性肝硬変39例、原発性硬化性胆管炎20例、SLE 13例、Sjögren 症候群7症例、健常人130名の血清を対象とした。また、自己免疫性膵炎65症例のプール血清からアフィニティークロマトグラフィーにて純

化 IgG4を抽出し、さらにパパイン、ペプシンで処理し IgG4 Fc 領域、IgG4 F(ab)<sub>2</sub>領域を抽出した。異種動物 IgG としてブタ、ニワトリ、ハムスター、モルモット、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ウシ、イヌ、ラット、ウサギ、マウスを用いた。ヒト IgG と異種動物 IgG の結合能の評価に ELISA 法を、ヒト IgG4およびヒト IgG4断片とウサギ IgG の反応性について Western blotting 法にて検討した。

その結果、伊藤哲也は次の結果を得た。

1. ヒト IgG4は各種異種動物 IgG と結合性を示した。
2. ヒト IgG4と各種異種動物 IgG との結合性は Fc-Fc を介するものであった。
3. ウサギ結合性 IgG4値は自己免疫性膵炎例で有意に高値であり、その他の疾患や健常人では低値であった。
4. 自己免疫性膵炎では、ウサギ結合性 IgG4値は血清 IgG4値と有意な相関を示し、RF 値とは相関を示さなかった。

これらの結果より、ヒト IgG4はその Fc 領域を介して異種動物 IgG の Fc 領域に結合することが明らかとなった。このことは、IgG4高値検体では、異種動物 IgG を用いた抗原の測定系に干渉作用を持ち得ることを示唆している。一方で、自己免疫性膵炎症例では血中 IgG4とウサギ IgG に結合した IgG4値が強い正の相関を示しており、新たな IgG4測定系の確立に寄与する可能性が示唆された。本研究の成果は、未だ不明な点の多い IgG4の性質に注目し、IgG4がリウマチ因子とは異なる機序で異種動物 IgG と結合することを明らかにした点で極めて意義のあるものである。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### Evaluation of CNT toxicity by comparison to tattoo ink (刺青用インクと比較することによるカーボンナノチューブの毒性評価)

#### 原 一 生

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】現在、様々な分野において、Carbon nanotube (CNT) を応用した高機能材料の研究開発が進んでいる。CNT の医学への応用も注目されており、CNT を癌の治療に用いる研究、生体イメージングの基材として診断に用いる研究、再生医療において足場材として用いる研究などが行われている。また、CNT を他の生体材料と複合してインプラントの機能

を向上させる取り組みもあり、CNT を臨床に応用することができれば、医学の様々な分野で進歩が期待できる。このように CNT を生体材料に用いる場合、CNT に対する組織や細胞の反応を評価し、生体安全性を明らかにすることが最も重要であるが、これまでの研究では一定の結論を導くことができなかった。その最大の理由は、生体安全性が確認されている最適なナノサイズ粒子の対照物質がなく、安全性を評価する

基準を決められなかったためである。

我々は古来より多数の人体に埋め込まれている刺青用インクを、歴史的に生体安全性が実証された生体材料ととらえ、CNTの安全性を検討するにあたり刺青用インクを対照物質として比較することが有用であると考えた。本研究の目的はCNTと刺青用インクの類似点・相違点を比較しCNTの対照物質になりうるかを検討すること、また刺青用インクを対照物質としてCNTの安全性を評価することである。

**【方法】** 走査型電子顕微鏡・透過型電子顕微鏡(TEM)にて市販の刺青用黒色インクを観察し、エネルギー分散型X線分光法による元素組成分析およびラマン分光分析を行った。またTEM・ラマン分光分析においては一般のカーボンブラックとの比較を行った。刺青用インクとCNTの安全性評価のために、マウス背部皮下に刺青用インク・CNTを注入した際の1-26週後の組織像およびハムスター由来肺線維芽細胞へ接触させた時のコロニー生成阻害の程度を評価した。骨髄由来マクロファージと刺青用インク・CNTを接触させた時の、培地中の炎症性サイトカインであるInterleukin(IL)-6・Tumor Necrosis Factor(TNF)- $\alpha$ ・IL-1bを測定した。

**【結果】** 刺青用インクを分析したところ99.5%以上を炭素成分が占める球形のカーボンブラック粒子そのもので、その直径は30-50 nmとCNTと同じくナノスケールであることが明らかとなった。安全性試験の組織像では刺青用インクとCNTは1週間にはマクロファージに貪食され、それ以降もマクロファージ内に留まり続け、短・長期どちらでも強い炎症反応は呈さなかった。CNTのコロニー生成阻害は濃度依存的で、細胞毒性は刺青と同等もしくはそれ以下であった。またCNT・刺青ともにIL-6・TNF- $\alpha$ ・IL-1bは検出されなかった。

**【考察】** 生体内分布や遺伝毒性・発癌性など様々な検討する必要があるが、CNTに対する基本的な生体反応は刺青と同等に安全性が高く生体材料に使用できる可能性がある。また、今後CNTのようなナノサイズのカーボンを生体材料に応用するための安全性試験では、刺青に使用されてきたカーボンブラックを基準として評価し議論すべきである。本論文により、CNTの生体材料としての安全性評価研究が急速に進み、臨床応用が実現すれば、様々な分野で医学が進歩する可能性がある。

#### (論文審査の結果の要旨)

現在、様々な分野において、Carbon nanotube (CNT) を応用した高機能材料の研究開発が進んでいる。CNTを他の生体材料と複合してインプラントの機能を向上させる取り組みもあり、CNTを臨床に応用することができれば、医学の様々な分野で進歩が期待できる。一方でCNTを生体材料として用いた際の安全性については、これまで一定の結論を導くことができなかった。その理由は、最適なナノサイズ粒子の対照物質がなく、安全性を評価する基準を決められなかったためである。

我々は古来より多数の人体に埋め込まれている刺青用インクを、歴史的に生体安全性が実証された生体材料ととらえ、CNTの安全性を検討するにあたり刺青用インクを対照物質として比較することが有用であると考え、CNTと刺青用インクの類似性を明らかにし、刺青用インクを対照物質としてCNTの安全性評価を行った。

その結果、原は次の結論を得た。

1. 刺青用インクは、ナノサイズの工業用カーボンブラックそのものであった。
2. 刺青用インクとCNTは1週間にはマクロファージに貪食され、それ以降もマクロファージ内に留まり続け、短・長期どちらでも強い炎症反応は呈さなかった。
3. CNTのコロニー生成阻害は濃度依存的で、細胞毒性は刺青と同等もしくはそれ以下であった。
4. 骨髄由来マクロファージにCNT・刺青用インクを貪食させた時の、培地中の炎症性サイトカインを測定したところ、CNT・刺青用インクともにIL-6・TNF- $\alpha$ ・IL-1bは検出されなかった。

これらの結果より、今後CNTのようなナノサイズのカーボンを生体材料に応用するための安全性試験では、ナノサイズのカーボンブラックを対照物質として評価し議論すべきであると考えられた。また刺青用インクを対照物質としてCNTの安全性を評価したところ、CNTと刺青用インクの安全性は同等であることが示された。本論文により、CNTの生体材料としての安全性評価研究が急速に進み、臨床応用が実現すれば、様々な分野で医学が進歩する可能性があると考えられる。

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。



Tranilast modulates fibrosis, epithelial-mesenchymal transition and peritubular capillary injury in unilateral ureteral obstruction rats (トラニラストは、片側尿管結紮ラットにおいて、腎間質の線維化、上皮-間葉分化転換、尿細管周囲毛細血管の障害を緩和する)

兼 山 友 輝

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】現在、我が国の慢性腎臓病 (CKD) 患者数は1,330万人と推定されている。これは、成人の8人に1人がCKDに罹患していることになり、CKDは新たな国民病として認識されつつある。また、国内の腎不全による透析患者数は28万人を超え、毎年1万人規模で透析患者数が増加している。その結果、医療費の増大をきたし、医療経済的な面からも腎不全への進行防止は社会的な課題であると言える。しかしながら、CKDの進行を防ぐ治療法や、腎不全へと進行する機序の解明は未だ確立されておらず、治療法の開発は急務である。

腎不全は病理組織学的に、糸球体の荒廃と腎間質の線維化で特徴付けられる。特に腎間質線維化は腎機能低下を反映すると報告されており、腎間質線維化を抑制することが、腎不全予防へ繋がると考えられている。腎間質の線維化は、主に間質に浸潤した炎症性細胞などが、TGF- $\beta$ 1を産生することで開始されると考えられている。このTGF- $\beta$ 1は筋線維芽細胞の活性化や、尿細管上皮細胞の上皮間葉分化転換 (EMT)、血管内皮細胞の内皮間葉分化転換 (EndMT) を惹起し、線維形成を促進する。一方で抗アレルギー薬として使用されているTranilastは、様々な細胞からのTGF- $\beta$ 1産生を抑制することで、ケロイドや肥厚性瘢痕に対する抗線維化薬としても使用されている。そこで本研究では、TGF- $\beta$ 1抑制作用が知られるTranilastを用いて、腎間質線維化に及ぼす効果を解析した。

【方法】腎間質線維化の動物実験モデルとして片側尿管結紮 (UUO) ラットを使用した。このUUOラットは早期段階において糸球体障害を欠き、腎間質の線維化のみが惹起されるため、腎間質線維化に対する*in vivo*の研究で頻繁に使用されている。このUUOラットに対してTranilast (400 mg/kg/day) を12時間毎に強制経口投与を行い、投与開始から7日後、14日後に解剖を行い、各種の線維化マーカーを病理組織学的、分子生物学的に解析した。

【結果】UUOラットに対しTranilastを投与することにより、① TGF- $\beta$ 1並びに下流シグナルタンパクで

あるpSmad2の発現を有意に抑制した。② 腎間質において、Fibronectinなどの細胞外基質が有意に減少し、腎間質の線維化を抑制した。③ 尿細管上皮細胞における増殖やアポトーシスが有意に減少し、尿細管上皮細胞の障害を抑制した。④ 尿細管上皮細胞において、E-cadherinの発現が保たれると共に、Vimentinの発現を抑制するに伴い、EMT様変化を緩和した。また、EMTを誘導する転写因子であるSnail1の発現も有意に抑制した。⑤ 尿細管基底膜破壊酵素であるMMP2の発現が有意に抑制されたと共に、尿細管基底膜の障害を緩和した。⑥ 腎間質における $\alpha$ SMA、S-100A4陽性細胞が有意に減少し、筋線維芽細胞の集積を抑制した。⑦ 腎間質におけるマクロファージの浸潤を有意に抑制した。⑧ 尿細管周囲毛細血管におけるVE-cadherinの発現低下を緩和すると共に、超微形態的に血管内皮細胞の障害を緩和した。

【結論】TranilastはTGF- $\beta$ 1の産生を抑制するに伴い、腎間質の線維化やEMT様変化、尿細管周囲毛細血管の障害を緩和するという結論を得た。また、腎間質線維化におけるTGF- $\beta$ 1の役割が明らかになると共に、その抑制による病態制御の可能性も示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

腎間質の線維化は、主に間質に浸潤した炎症性細胞などが、TGF- $\beta$ 1を産生することで開始されると考えられている。このTGF- $\beta$ 1は筋線維芽細胞の活性化や、尿細管上皮細胞の上皮間葉分化転換 (EMT)、血管内皮細胞の内皮間葉分化転換 (EndMT) を惹起し、線維形成を促進する。一方で抗アレルギー薬として使用されているTranilastは、様々な細胞からのTGF- $\beta$ 1産生を抑制することで、ケロイドや肥厚性瘢痕に対する抗線維化薬としても使用されている。そこで本研究では、TGF- $\beta$ 1抑制作用が知られるTranilastを用い、腎間質線維化に及ぼす効果を解析した。

腎間質線維化を呈する動物実験モデルとして、今回我々は片側尿管結紮 (UUO) ラットを作製した。UUOラットに対してTranilast (400 mg/kg/day) を12時間毎に強制経口投与を行い、投与開始から7日後、14日後に解剖を行った。解析は、各種の線維化マ-

カーやEMT様変化, 血管内皮細胞障害などに焦点を当て, 病理組織学的, 分子生物学的に解析した。その結果, 兼山友輝は今回の実験で以下の結果を得た。

UUO ラットに対し Tranilast を投与することにより,

1. TGF- $\beta$ 1並びに下流シグナルタンパクである pSmad2の発現を有意に抑制した。
2. 腎間質において, Fibronectin などの細胞外基質が有意に減少し, 腎間質の線維化を抑制した。
3. 尿細管上皮細胞における増殖やアポトーシスが有意に減少し, 尿細管上皮細胞の障害を抑制した。
4. 尿細管上皮細胞において, E-cadherin の発現が保たれると共に, Vimentin の発現を抑制するに伴い, EMT 様変化を緩和した。また, EMT を誘導する転写因子である Snail1の発現も有意に抑制した。
5. 尿細管基底膜破壊酵素である MMP2の発現が有

意に抑制されたと共に, 尿細管基底膜の障害を緩和した。

6. 腎間質における  $\alpha$ SMA, S-100A4陽性細胞が有意に減少し, 筋線維芽細胞の集積を抑制した。
7. 腎間質におけるマクロファージの浸潤を有意に抑制した。
8. 尿細管周囲毛細血管における VE-cadherin の発現低下を緩和すると共に, 超微形態的に血管内皮細胞の障害を緩和した。

これらの結果から, Tranilast は TGF- $\beta$ 1の産生を抑制するに伴い, 腎間質の線維化や EMT 様変化, 尿細管周囲毛細血管の障害を緩和するという結論を得た。本論文は TGF- $\beta$ 1を介した腎間質線維化の機序を明らかにすると共に, 薬剤によるその制御の可能性を示唆するものである。慢性腎臓病の病態改善に寄与する基礎的研究であると考えられ, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

#### A Galenical of Traditional Chinese Herbal Mixture (THC-002) Reduces Expression of Tachykinin Peptides within Urethras of Spontaneously Hypertensive Rats (自然発症高血圧ラット (SHR) 尿道における生薬エキス (THC-002) のタヒキニン類発現の抑制効果についての検討)

石川 雅 邦

##### (論文の内容の要旨)

【緒言】高齢男性における排尿後の尿滴下は八味地黄丸などの漢方製剤によって改善すると報告されている。しかし, その作用機序については不明な部分が多い。われわれは漢方製剤による排尿障害の改善機序の一つとして膀胱のC線維活性化の抑制作用を報告している。本研究は尿道にもC線維が存在することが報告されていることから, 漢方製剤による尿滴下改善の機序として尿道のC線維の活性化に関与するとされるタヒキニン類 (ニューロキニンA, ニューロキニンB, サブスタンスP) に着目し, それらの発現を八味地黄丸から抽出した生薬エキス (THC-002, ハルンケア®) が抑制するかについて検討した。

【方法】10および40週齢雄 SHR を, 無処理群, 塩分負荷群, および THC-002投与群の3群に, それぞれ12匹ずつ分けた。塩分負荷群では, 0.9%食塩含有溶液を経口投与した。THC-002投与群は, 0.9%食塩含有溶液を経口投与して1時間後に, 100 ml/5 ml/kg THC-002を経口投与した。塩分負荷, および, THC-002投与は1日1回, 1週間施行した。投与7日後, 膀胱から尿道球部までの組織を摘出した。続い

て, 尿道組織を膀胱から5-8 mm 部位の前立腺内尿道, および約10 mm 部の前立腺外尿道に分けた。採取した尿道組織のタヒキニン mRNA 発現を real-time RT-PCR によって半定量的解析を行った (n=6)。さらにタヒキニン抗体を用いて免疫組織染色を行い, タヒキニン類の発現部位についての評価, および抗体陽性部位を画像解析によって半定量的解析を行った (n=6)。また免疫組織染色においては, S100抗体を用いた神経細胞の検討も同時に行った。

【結果】前立腺内尿道において, 40週齢無処理群 SHR は, 10週齢無処理群 SHR と比較して, ニューロキニンB mRNA と蛋白, および, サブスタンスP mRNA の発現が有意に増加した。同部位の40週齢 SHR では, 無処理群と塩分負荷群の間でニューロキニンA mRNA と蛋白, および, サブスタンスP蛋白の発現が有意に増加した。前立腺外尿道においては, 40週齢無処理群 SHR のニューロキニンB蛋白発現のみが, 10週齢無処理群 SHR と比較して有意に増加した。同部位の10週齢 SHR ニューロキニンA mRNA, および, 40週齢 SHR ニューロキニンA蛋白発現が, 塩分負荷によって有意に増加した。10週齢 SHR において,

前立腺内尿道のサブスタンス P mRNA, および, 前立腺外尿道のすべてのタヒキニン類 mRNA 発現は, THC-002投与により有意に低下した。40週齢 SHR においては, 前立腺外尿道のニューロキニン A mRNA を除いて, すべてのタヒキニン類 mRNA, および, 蛋白の発現は, THC-002投与によって有意に低下した。また, THC-002の投与によって, 尿道に存在する S-100陽性神経細胞の減少は認められなかった。

【考察】40週齢 SHR において, 加齢, あるいは, 塩分負荷によって増大したタヒキニン類蛋白の発現は, THC-002により有意に抑制された。本研究では排尿後尿滴下と C線維の関与を機能生理実験によって明らかにしていないが, THC-002によるタヒキニン類の発現抑制が C線維が原因と考えられる排尿後尿滴下の改善に対して有効であることが示唆される。

【結語】SHR では加齢とともにタヒキニン類の発現が増加し, THC-002によって, タヒキニン類の発現が一部抑制された。

#### (論文審査の結果の要旨)

高齢男性における排尿後尿滴下の機序は解明されていないが, 20-50代の男性の約 1 割から 3 割で認められているとの報告がある。経験的に八味地黄丸などの漢方製剤はその症状を緩和, 改善するといわれている。本研究は漢方製剤による尿滴下改善効果の機序解明を目指し, 尿道の知覚神経である C線維に注目し, 生薬エキス (THC-002<sup>®</sup>) がタヒキニン類の発現を抑制するか検討した。タヒキニン類にはニューロキニン A, ニューロキニン B, サブスタンス P があり, タヒキニン類の発現増加は C線維活性化の指標となる。

10週齢と40週齢自然発症高血圧ラット (SHR) の尿道におけるタヒキニン類 mRNA および蛋白の発現について検討し, THC-002が尿道におけるタヒキニン類の発現を抑制するのか検討した。10週齢および40週齢の雄 SHR を無処理群, 塩分負荷群, 塩分負荷+THC-002投与群の 3 群にわけた。塩分負荷は 20 ml/kg の 0.9 %生理食塩含有溶液を毎日 1 週間投与した。その 1 時間後に塩分負荷群では THC-002を含まない 5 ml/kgの水を加え, 塩分負荷+THC-002群では THC-002を投与した。尿道は前立腺内尿道と前立腺外尿道に分け摘出した。タヒキニン類 mRNA の発現を Real-Time RT-PCR によって半定量解析を行っ

た。タヒキニン類蛋白の発現を免疫組織学的に検討し画像解析を行った。

週齢によるタヒキニン類 mRNA の発現を比較すると, 前立腺内尿道では10週齢 SHR と比較して40週齢 SHR のニューロキニン B, サブスタンス P mRNA の発現が有意に増加した。前立腺外尿道ではタヒキニン類 mRNA の発現に増加傾向はあったが有意差は認められなかった。

塩分負荷によるタヒキニン類 mRNA の発現変化をみると, 前立腺内尿道では40週齢 SHR のニューロキニン A mRNA の発現が有意に増加した。前立腺外尿道では10週齢 SHR のニューロキニン A mRNA の発現が有意に増加した。

THC-002投与によるタヒキニン類 mRNA の発現抑制効果をみると, 前立腺内尿道では10週齢 SHR のサブスタンス P mRNA の発現と40週齢 SHR のタヒキニン類すべての mRNA の発現が THC-002を投与することにより有意に減少した。前立腺外尿道では10週齢 SHR のタヒキニン類すべての mRNA の発現と40週齢 SHR のニューロキニン B, サブスタンス P mRNA の発現が有意に減少した。

蛋白の発現を画像解析により比較すると, 無処理群では10週齢より高齢である40週齢の方がニューロキニン B 蛋白の発現が有意に増加し, さらに40週齢 SHR で塩分負荷によりニューロキニン A, サブスタンス P 蛋白の発現は有意に増加し, THC-002投与によってタヒキニン類すべての蛋白の発現が有意に減少した。

本研究では排尿後尿滴下と C線維の関与を機能生理実験によって明らかにしていないが, SHR の尿道において加齢によりタヒキニン類が増加することと, SHR の尿道において塩分負荷によりタヒキニン類が増加すること, また, これに THC-002を投与すると加齢, 塩分負荷によって増加した尿道タヒキニン類が減少したことから, 排尿後尿滴下の機序には尿道の C線維活性化が一部関与していると考えられた。

排尿後尿滴下の機序として尿道 C線維の活性化という新たな視点から検討を加え, これが THC-002により抑制されるといふ臨床的に意義のある成績を得たことから, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。



Gene pathway analysis of the mechanism by which the Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 inhibits apoptosis in isolated thawed human embryonic stem cells (単離凍結解凍後ヒト ES 細胞の ROCK 阻害剤 Y-27632によるアポトーシス抑制機序の遺伝子パスウェイ解析)

市川 比奈子

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】ヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) は、多能性を持ち様々な細胞に分化できるため、基礎研究や再生医療の重要な細胞供給源として注目されている。また、ヒト ES 細胞を用いた細胞移植療法や再生医療を実現するためには、機能性の高い細胞や組織を作成する必要性とともに、細胞・組織の長期保存、目的地への運搬、緊急時の迅速な細胞供給が求められる。そのために必要な技術の一つに細胞・組織の凍結法があげられる。しかし再生医療の有力な担い手であるヒト ES 細胞は極めて凍結に弱く、凍結解凍後の生存率が極端に低い。この理由として、ヒト ES 細胞は、細胞を一個一個分離した場合、生存することが極めて難しい細胞であるため、コロニーという細胞の塊として凍結しなければならないことがあげられる。これが、ヒト ES 細胞の凍結の効率を著しく下げている要因である。最近、この単離による細胞死を抑制するのに Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor が有効であると報告された。ヒト ES 細胞の凍結保存技術は改善されてきているが、まだ十分とはいえず、安定した生存率も確保できていない。本研究では、ヒト ES 細胞の凍結解凍時に ROCK inhibitor を用いた場合、細胞死 (アポトーシス) は抑制されるのか、その際どのような機序で行われるのか、ROCK inhibitor を用いた細胞凍結は新たな凍結技法として有用であるかを検討した。

【方法】ヒト ES 細胞 (KhES -1, KhES -3) をコロニーより 0.25 % Trypsin にて単離し、ES 培地 + 10 % DMSO の凍結保護液に ROCK inhibitor Y-27632 を 10  $\mu$ M 添加しその有無で生存率、性状を比較、同様に解凍後の ES 培地についても Y-27632 添加の有無による影響について比較検討を行った。凍結方法は、凍結コンテナを用いて -80 °C まで緩徐に冷却その後液体窒素にて保存、解凍は 37 °C 恒温槽で行った。解凍後のアポトーシスの解析は、ギムザ染色、TUNEL 法、DNA microarray および Real-time PCR を用いて行った。

【結果】凍結保護液と解凍後の培地に Y-27632 添加が

最も細胞生存率が高く、増殖・コロニー形成も良好であった。解凍後のヒト ES 細胞に起きたアポトーシスは、ギムザ染色と TUNEL 法により、継時的に解析した。その結果アポトーシスは解凍後 12 時間でプラトーに達した。また、凍結解凍後に生存したヒト ES 細胞は、Y-27632 の有無に関係なく、数回の継代後においても未分化マーカーの Oct-4, Nanog の発現が見られ、未分化が保たれることが確認された。また、解凍直後のヒト ES 細胞を SCID マウスの腎被膜下に移植したところ Y-27632 添加系に奇形腫が形成された。これらは、三胚葉由来の組織から形成されており多能性も維持されていることが示された。また、解凍後の ES 細胞を用いて胚様体を形成し分化させたところ Nestin, Sox2, Brachyury の遺伝子発現が見られ、三胚葉に分化できることが確認された。DNA microarray を用いて凍結解凍における細胞死機序の解明をしたところ、Y-27632 無添加のものは MAPK 経路で IL-1 $\beta$  と TGF- $\beta$  とそれらの受容体の発現上昇がみられ、またその下流の標的である caspase-8 と 10 の活性がみられた。よって、これらの分子がヒト ES 細胞の凍結解凍後のアポトーシスに関連していることがわかった。また、TGF- $\beta$  受容体拮抗剤である SB431542 と p38MAPK inhibitor の SB203580 は、アポトーシス抑制に効果はなかったが、SB203580 と Y-27632 との組み合わせは、生存率増加につながった。これはアポトーシスの開始がサイトカインの活性に依存することを示唆した。

【結論】Y-27632 を用いた凍結保存法は、簡単で効率的な方法としてヒト ES 細胞にとって有効であり、この方法で未分化能、多分化能が失われることはなかった。また、Y-27632 を使用していない場合、凍結解凍後 12 時間以内にヒト ES 細胞は自らサイトカインを産生し、それらの受容体を活性化することで細胞内の caspase を活性化しアポトーシスを促すことが示唆された。ROCK inhibitor Y-27632 は、これらの経路を抑制して細胞死 (アポトーシス) の活性化を低下させることがわかった。

(論文審査の結果の要旨)

ヒト ES 細胞の凍結保存後の生存率は極端に低く、この問題に対して様々な試みが行われてきたが解決には至っていない。生存率が低い原因に細胞を単離することができずコロニー状態のままで凍結することが挙げられる。しかし、ROCK inhibitor を使用することで、ヒト ES 細胞の単離が可能になった。今回、ヒト ES 細胞の凍結解凍時に ROCK inhibitor を用いた場合、細胞死 (アポトーシス) は抑制されるのか、その際どのような機序で行われるのか、ROCK inhibitor を用いた細胞凍結は新たな凍結技法として有用であるかを検討した。

ヒト ES 細胞 (KhES-1, KhES-3) をコロニーより 0.25 % Trypsin にて単離し、ES 培地+10 % DMSO の凍結保護液に ROCK inhibitor Y-27632 を 10  $\mu$ M 添加しその有無で生存率、性状を比較、同様に解凍後の ES 培地についても Y-27632 添加の有無による影響について比較検討を行った。凍結方法は、凍結コンテナを用いて -80 °C まで緩徐に冷却その後液体窒素にて保存、解凍は 37 °C 恒温槽で行った。解凍後のアポ

トーシスの解析は、ギムザ染色、TUNEL 法、DNA microarray および Real-time PCR を用いて行った。その結果、市川は次の結論を得た。

1. 単離ヒト ES 細胞において凍結解凍後、サイトカインが産生され、それらの受容体を活性化することで細胞内の caspase が活性化しアポトーシスを促すことが認められた。
2. ROCK inhibitor Y-27632 は、上記の経路を抑制して細胞死を低下させることが認められた。
3. ROCK inhibitor を用いた凍結保存法は、ヒト ES 細胞特有の性質である、未分化能、多分化能に影響を及ぼさず、簡単で効率的な方法であることが認められた。

これらの結果より、ヒト ES 細胞の凍結解凍時の細胞死は一つの要因としてサイトカイン産生が関係していることが明らかになった。また、その経路を Rho kinase を抑制する阻害剤が抑えることが確認された。今後、ヒト ES 細胞の凍結保存法の改良への応用が期待される。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。

Effects of weather variability and air pollutants on emergency admissions for cardiovascular and cerebrovascular diseases (環境要因が救急外来における心血管疾患及び脳血管疾患の緊急入院数に及ぼす影響について)

堀 綾

(論文の内容の要旨)

【背景】気温などの気象要因、二酸化窒素をはじめとする大気汚染物質と死亡率、疾患の発症との関係については、近年になって研究が進んでいる。一方で、これらの個々の疾患に分類して検討した報告や、気候因子の重要な一要素である気圧の効果について分析した研究が少ない。更に、最近本邦においても重要視されている大気汚染物質の影響に関して、疾病の発症に関する研究報告が、特に本邦で少ないのが現状である。そこで、上伊那地域における気象要因、大気汚染物質と、個々の疾患における発症、特に各心血管疾患、各脳血管疾患との関連について検討した。

【方法】対象は、2006年4月から2010年3月までの、伊那中央病院における救急外来を經由した緊急入院患者とし、総緊急入院数および急性冠症候群、心肺停止、心不全、くも膜下出血、脳出血、脳梗塞、大動脈解離と大動脈瘤破裂による日毎の入院数を調査した。その上で、日平均気温、気温変化、日平均気圧、気圧変化

といった気象要因、日平均 NO<sub>2</sub>、日平均 O<sub>x</sub>、日平均 SO<sub>2</sub>、日平均 SPM といった大気汚染物質を調べ、総入院数および疾病毎の入院数と関連があるか検討した。統計解析は、年、季節、曜日、インフルエンザ、RS ウイルス流行を調整し、一般化線形モデルによる時系列分析を行った。

【結果】2006年4月から2010年3月までに4,355名の緊急入院が認められた。平均気温が 1 °C 低いと、総入院は 3.24 % (95 % CI 1.25-5.18)、急性冠症候群と心不全による入院は 7.83 % (95 % CI 2.06-13.25)、脳出血による入院は 35.57 % (95 % CI 15.59-59.02)、脳梗塞による入院は 11.71 % (95 % CI 4.1-19.89) 増加した。気圧変化では、気圧が 1 hPa 低下すると総入院は 0.95 % (95 % CI 0.37-1.52)、脳出血による入院は 3.25 % (95 % CI 0.94-5.51)、心不全による入院は 3.56 % (95 % CI 1.09-5.96)、大動脈解離と大動脈瘤破裂による入院は 6.1 % (95 % CI 2.29-9.76) 増加した。大気汚染物質では、NO<sub>2</sub> が 1 ppb 高いとくも膜

下出血による入院は6.59% (95%CI 0.79-12.73), SO<sub>2</sub>が1 ppb 高いと急性冠症候群による入院は18.9% (95%CI 4.98-34.66), O<sub>x</sub>が1 ppb 高いと大動脈解離と大動脈瘤破裂による入院は4.48% (95%CI 1.39-7.66) 増加した。総緊急入院数で検討した場合, 75歳以上のグループでは, それより若年者と比較して, 気温, 気圧変化による, 入院リスクの増加を認めた。また, 男性は女性に比べ, 気温, 気圧変化による, 入院リスクの増加を認めた。

**【考察】** 寒冷が脳血管疾患と心血管疾患による入院を増加させたことは一部の先行研究と一致した。寒冷により, 脳出血のリスクの増大が認められ, くも膜下出血のリスクの増大が認められなかったことは, 日本における先行研究と一致した。

また, 心血管疾患より脳血管疾患が寒冷の影響により強く受けていることは, 他の先行研究と一致していた。また, 総緊急入院数で検討した場合, 男性と高齢者では, 寒冷による入院リスクの上昇が認められており, これらの群では特に寒冷に注意すべきと考えられる。

気圧の変化については, 先行研究で, 気圧の低下は心筋梗塞のリスクを高めるとの報告があったが, 本研究では急性冠症候群に対する効果は認めなかった。しかし, 脳出血では, 他の先行研究と同様, 気圧低下がリスクを増大することを認めた。本研究では, 気圧そのものより, 気圧変化が脳出血の件数とより直線状に関連しており, 気圧変化が脳出血の発症により関連していることが示唆された。

大気汚染物質では, NO<sub>2</sub>がくも膜下出血, SO<sub>2</sub>が急性冠症候群, O<sub>x</sub>が大動脈解離および大動脈瘤破裂のリスクを増大することが示されたが, 先行研究ではそれぞれの物質によりリスクを増大する疾患が必ずしも一致せず, 今後のさらなる研究が必要と考えられた。

**【結論】** 寒冷と気圧の低下は心血管疾患と, 脳血管疾患を増加させた。大気汚染物質は, 心血管疾患と脳血管疾患に関連がみとめられるものがあつた。

(論文審査の結果の要旨)

気温などの気象要因, 二酸化窒素をはじめとする大気汚染物質と死亡率, 疾患の発症との関係については, 近年になって研究が進んでいるが, これらの個々の疾

患に分類して検討した報告や, 気候因子の重要な一要素である気圧の効果について分析した研究が少なく, 大気汚染物質の影響に関しても本邦における報告が特に少ないのが現状である。今回掘は, 2006年4月から2010年3月までの4年間に, 伊那中央病院における救急外来を經由した緊急入院患者4,355名において, 気象要因, 大気汚染物質と, 個々の疾患における発症, 特に各心血管疾患, 各脳血管疾患との関連を検討した。その結果, 掘は次の結論を得た。

1. 平均気温が1°C低いと, 総入院は3.24% (95%CI 1.25-5.18), 急性冠症候群と心不全による入院は7.83% (95%CI 2.06-13.25), 脳出血による入院は35.57% (95%CI 15.59-59.02), 脳梗塞による入院は11.71% (95%CI 4.1-19.89) 増加した。
2. 気圧変化では, 気圧が1 hPa 低下すると総入院は0.95% (95%CI 0.37-1.52), 脳出血による入院は3.25% (95%CI 0.94-5.51), 心不全による入院は3.56% (95%CI 1.09-5.96), 大動脈解離と大動脈瘤破裂による入院は6.1% (95%CI 2.29-9.76) 増加した。
3. 大気汚染物質では, NO<sub>2</sub>が1 ppb 高いとくも膜下出血による入院は6.59% (95%CI 0.79-12.73), SO<sub>2</sub>が1 ppb 高いと急性冠症候群による入院は18.9% (95%CI 4.98-34.66), O<sub>x</sub>が1 ppb 高いと大動脈解離と大動脈瘤破裂による入院は4.48% (95%CI 1.39-7.66) 増加した。
4. 総緊急入院数で検討した場合, 75歳以上のグループでは, それより若年者と比較して, 気温, 気圧変化による, 入院リスクの増加を認めた。また, 男性は女性に比べ, 気温, 気圧変化による, 入院リスクの増加を認めた。

これらの結果より, 寒冷と気圧の低下は心血管疾患と, 脳血管疾患を増加させることが分かった。特に男性と高齢者では, 寒冷による入院リスクの上昇が認められており, 特に寒冷に注意すべきと考えられる。大気汚染物質は, 心血管疾患と脳血管疾患に関連がみとめられるものがあつたが, 先行研究と同様に主となる有害物質および疾患が特定されず, さらなる研究が必要と考えられた。この内容に対し, 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 benefits of early continuous positive pressure ventilation in patients with rapidly progressive interstitial pneumonia (急速進行性間質性肺炎に対する非侵襲的人工呼吸の早期導入の有効性)

横山 俊樹

(論文の内容の要旨)

【背景】特発性肺線維症の急性増悪をはじめとして、急速進行性間質性肺炎 (Rapidly progressive interstitial pneumonia ; RPIP) は急性期死亡率80~90%と言われており、極めて死亡率が高いことが知られている。一部では集中治療室での管理や挿管人工呼吸管理の予後に及ぼす有効性を疑問視する報告もある。

一方、非侵襲的人工呼吸 (NIV) は、呼吸不全を呈する様々な疾患に対して幅広く使用されるようになってきており、特に免疫抑制状態にある呼吸不全において、感染の合併の防止の観点から有効性が考えられている。本研究ではRPIPを呈した患者に対する急性期人工呼吸管理としてNIVを使用し、有効性についての評価を行った。

【方法】NIVとしてBiPAP Vision®を使用した。臨床背景は診療録より後方視的に取得した。検査値、酸素化の指標は入院時及びNIV開始時のものを取得した。NIV開始後30日における生存・死亡を調査し、それぞれ生存群・死亡群として比較検討を行った。

【結果】RPIPに対して38例でNIVを使用した。生存群と死亡群の入院時PaO<sub>2</sub>/F<sub>1</sub>O<sub>2</sub>には統計学的有意差を認めなかったが、NIV開始時PaO<sub>2</sub>/F<sub>1</sub>O<sub>2</sub>が死亡群では有意に低かった (P=0.0054)。また入院からNIV開始までの期間は死亡群のほうが有意に長かった (P=0.0006)。NIV開始時の血清中KL-6及びLDHも死亡群において有意に高値を示した (KL-6, P=0.022; LDH, P=0.044)。死亡群においてNIV開始のタイミングが遅かった傾向があり、その間に呼吸不全が増悪していた可能性が考えられた。

更に、ロジスティック解析を用いた単変量解析では、NIVの早期導入、NIV開始時のPaO<sub>2</sub>/F<sub>1</sub>O<sub>2</sub>、LDH、KL-6を30日生存に影響する因子として認めた。

【結語】NIVの早期導入はRPIPにおける30日生存を高めるための呼吸管理として有効であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

経過中に急性に呼吸不全を呈する間質性肺炎は様々な集中治療管理を行っても予後不良であることが知られている。最近では、これらの疾患を急速進行性間質性肺炎 (Rapidly Progressive Interstitial Pneumo-

nia : RPIP) として報告されるようになってきている。RPIPは両側肺のびまん性の炎症から始まり、急速に肺の線維化を呈すると考えられる。一般に、治療としてステロイド療法やその他の免疫抑制剤による治療を施行されるが、重篤な急性呼吸不全を呈し、難治性であることが知られている。しかし、人工呼吸管理の有効性は確立されていない。

一方、非侵襲的人工呼吸 (Noninvasive ventilation : NIV) は挿管管理を回避できることから、免疫抑制された患者において人工呼吸器関連肺炎等の感染の合併を予防し、予後を改善する可能性が指摘されている。一般に、RPIP患者では、ステロイド等の免疫抑制治療を行うため、NIVによる呼吸管理が有効であると考えられる。今回、RPIPにおいてNIVの効果を確認し、予後に関わる因子について検討した。

2005年1月から2010年12月までの間に信州大学医学部附属病院において呼吸管理を行ったRPIP38症例を対象とした。NIV開始後、30日目における生存/死亡を調査し、生存群・死亡群に分けて比較検討を行った。更に、30日目での生存/死亡に関わる因子を検討するため、ロジスティック回帰分析を用いて単変量解析を行った。

その結果、横山は以下の結論を得た。

1. 全38症例中、30日生存したのは26例 (68.4%) であり、生存退院できたのは20例 (52.6%) だった。
2. 生存群・死亡群の比較では、生存群でNIV導入直前の酸素投与濃度が低く、入院からNIV導入までの期間も短かった。
3. 入院時・NIV導入時の各パラメーターの比較では、両群の入院時の値に有意な差を認めなかったが、死亡群でNIV導入時のPaO<sub>2</sub>/F<sub>1</sub>O<sub>2</sub>、KL-6、LDHが有意に悪化していた。
4. ロジスティック解析による30日生存にかかわる予測因子の検討 (単変量解析) では、生存群の方が死亡群よりNIVの導入が有意に早く、NIV開始時のPaO<sub>2</sub>/F<sub>1</sub>O<sub>2</sub>、KL-6、LDHが有意に低かった。

これらの結果より、RPIPの呼吸管理としてNIVが有効であり、また、軽症例においてより早期に導入

することが有用性が高まると考えられた。その理由としては、NIVの早期導入によりPEEPによる有効性がより大きくなり、吸入酸素濃度を低下させるため、高濃度酸素投与による肺損傷を軽減できるためと考え

られた。以上より、本研究は臨床的に有用であり、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。

Combination Chemotherapy with Doxorubicin, Vincristine, Cyclophosphamide, and Platinum Compounds for Advanced Thymic Carcinoma(手術不能進行胸腺癌に対する白金製剤、ドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミド併用化学療法の検討)

吾妻俊彦

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】胸腺癌は稀な胸腺上皮性悪性腫瘍であり、胸腺腫と比較してより進行性で高頻度に遠隔転移を来す性質を有し、予後不良な疾患である。そのため、切除不能進行胸腺癌において全身化学療法の果たす役割は大きいと考えられるが、稀な疾患であることから標準治療は確立していない。また多数例を集積し治療成績を検討した報告もない。当教室では本疾患に対して初期治療としてシスプラチン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミド併用化学療法(ADOC療法)を行ってきた。本研究では、切除不能進行胸腺癌に対する白金製剤、ドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミド併用化学療法の有効性と忍容性に関して後方視的に検討した。

【対象と方法】1996年8月から2010年3月までに当科に入院した切除不能進行胸腺癌38例のうち、初期治療として白金製剤、ドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミド併用化学療法が施行された34例を対象とした。29例にシスプラチン50 mg/m<sup>2</sup> (Day 1) + ドキソルビシン40 mg/m<sup>2</sup> (Day 1) + ビンクリスチン0.6 mg/m<sup>2</sup> (Day 3) + シクロホスファミド700 mg/m<sup>2</sup> (Day 4) が3~4週毎に投与された(ADOC療法)。腎機能障害、高齢などの理由で、5例にはシスプラチンに代えてカルボプラチン AUC 3.0 (Day 1) が投与された。34例における化学療法の治療成績および有害事象について検討した。

【結果】男性22例、女性12例で、年齢中央値は56歳(36-82歳)であった。ECOG performance statusは0-1が28例、2が6例。組織型は扁平上皮癌25例、小細胞癌2例、大細胞神経内分泌癌1例、未分化癌6例。臨床病期は正岡分類Ⅳa期12例、Ⅳb期22例であった。化学療法は1~6サイクル施行され、抗腫瘍効果はpartial response (PR) 17例、stable disease (SD) 13例、progressive disease (PD) 4例で、奏

効率 (RR) および病勢コントロール率 (DCR) はそれぞれ50.0%, 88.2%であった。生存期間中央値 (MST) は21.3カ月で、1年および3年生存率はそれぞれ72.7%, 34.4%であった。PR群、SD群、PD群のMSTはそれぞれ25.3カ月、37.2カ月、8.1カ月で、PR群とSD群には有意差を認めなかったが、PD群とはそれぞれ有意差を認めた。シスプラチン投与群のRR、DCR、MSTはそれぞれ55.2%, 89.7%, 23.8カ月で、カルボプラチン投与群のRR、DCR、MSTはそれぞれ20.0%, 80.0%, 7.7カ月であった。有害事象としては、Grade 3以上の白血球減少、好中球減少をそれぞれ70.6%, 76.5%に認め、発熱性好中球減少症は11.8%に認めた。嘔気、食欲不振はそれぞれ20.6%, 23.5%に認めたが、いずれも治療延期や中断となる毒性には至らなかった。

【考察】進行胸腺癌に対する化学療法の報告は散見されるが、すべて少数例での検討であり本研究の症例数ほどの報告はない。今回のADOC療法の奏効率および生存期間から、本疾患に対して有用な治療法である可能性が示唆された。有害事象に関しては、消化器症状および白血球/好中球減少がみられるものの、許容範囲と考えられた。高齢者などに対するカルボプラチン投与は、病勢制御において考慮され得る可能性が示唆された。以上より、白金製剤、ドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミド併用化学療法は、切除不能進行胸腺癌に対して考慮される治療法の一つであると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

胸腺癌は稀な胸腺上皮性悪性腫瘍であり、胸腺腫と比較してより進行性で高頻度に遠隔転移を来す性質を有し、予後不良な疾患である。そのため、切除不能進行胸腺癌において全身化学療法の果たす役割は大きいと考えられるが、稀な疾患であることから標準治療は確立していない。また多数例を集積し治療成績を検討

した報告もない。今回、手術不能進行胸腺癌34例を対象として、初期治療として白金製剤、ドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミド併用化学療法を行い、その有効性と忍容性に関して後方視的に検討した。ADOC療法としてシスプラチン50 mg/m<sup>2</sup> (Day 1) + ドキソルビシン40 mg/m<sup>2</sup> (Day 1) + ビンクリスチン0.6 mg/m<sup>2</sup> (Day 3) + シクロホスファミド700 mg/m<sup>2</sup> (Day 4) を3~4週毎に投与した。高齢者・腎障害例には、シスプラチンに代えてカルボプラチンAUC3.0 (Day 1) を投与した。

その結果、以下の成績を得た。

1. 症例は男性22例、女性12例で、年齢中央値は56歳(36-82歳)であった。ECOG performance statusは0-1が28例、2が6例。組織型は扁平上皮癌25例、小細胞癌2例、大細胞神経内分泌癌1例、未分化癌6例。臨床病期は正岡分類IV a期12例、IV b期22例であった。
2. 化学療法は1~6サイクル施行され、抗腫瘍効果はpartial response (PR) 17例、stable disease (SD) 13例、progressive disease (PD) 4例で、奏効率 (RR) および病勢コントロール率 (DCR) はそれぞれ50.0%、88.2%であった。生存期間中央値 (MST) は21.3カ月で、1年および3年生存率はそれぞれ72.7%、34.4%であった。
3. PR群、SD群、PD群のMSTはそれぞれ25.3カ月、37.2カ月、8.1カ月で、PR群およびSD群は

PD群に比し、それぞれ有意差を認めた。

4. シスプラチン投与群のRR、DCR、MSTはそれぞれ55.2%、89.7%、23.8カ月で、カルボプラチン投与群のRR、DCR、MSTはそれぞれ20.0%、80.0%、7.7カ月であった。

5. 有害事象としては、Grade 3以上の白血球減少、好中球減少をそれぞれ70.6%、76.5%に認め、発熱性好中球減少症は11.8%に認めた。嘔気、食欲不振はそれぞれ20.6%、23.5%に認めたが、いずれも治療延期や中断となる毒性には至らなかった。

上記の結果よりADOC療法が胸腺癌に対して良好な抗腫瘍効果を有す可能性が示唆された。高齢者などへのカルボプラチン投与は、病勢制御において考慮され得る可能性が示唆された。有害事象に関して、消化器症状および白血球/好中球減少がみられたが、忍容性に支障はないものと考えられた。進行胸腺癌に対する化学療法の報告は散見されるが、すべて少数例での検討であり本研究の症例数を解析した報告はない。今後、前向き試験などで検証されることが望ましいものの、本論文は、白金製剤、ドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミド併用化学療法が、切除不能進行胸腺癌に対して考慮される治療法の一つであることを示唆する貴重な報告と考えられる。

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。

## Effects of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ Chemical Stabilizer, CoCl<sub>2</sub> and Hypoxia on Gene Expression of CYP3As in Human Fetal Liver Cells (ヒト胎児肝細胞のCYP3A遺伝子発現に対する低酸素誘導因子-1 $\alpha$ 安定化剤CoCl<sub>2</sub>と低酸素の影響)

鈴木 英二

### (論文の内容の要旨)

【目的】薬物代謝酵素は、薬物動態に大きな影響を及ぼす因子であり、その中でもCytochrome P450 (CYP) は酸化反応を触媒する最も重要な酵素である。肝に発現する主要な分子種のうち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。また、CYP3A7は胎児肝総CYPの約50%を占めるが、出産後2週間でピークとなった後その発現量は急速に減少し、成人肝ではほとんど検出されない。一方、低酸素状態において複数の遺伝子の転写が活性化されるが、その一つに血管内

皮増殖因子vascular endothelial growth factor (VEGF)がある。その低酸素状態で様々な遺伝子発現調節を制御する因子の一つとしてHypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )が知られている。HIF-1 $\alpha$ は通常酸素濃度下での半減期は5-8分と非常に短時間であることが知られており、HIF-1 $\alpha$ を安定化させる擬似低酸素誘導化合物として塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>)が多くの研究で用いられている。そこで、本研究では、胎児の低酸素環境に及ぼすCYP3A遺伝子発現への影響を解明するために、ヒト胎児肝細胞 (HFL細胞)を用いてCYP3A遺伝子発現に対するCoCl<sub>2</sub>と低酸素の影響を明らかにし、HIF-1 $\alpha$ の寄与について検討した。



【方法】HFL細胞は、米国 Applied Cell Biology Research Institute 社より取得したヒト胎児初代肝細胞（6胎児肝混合、胎齢約13週）を用いた。細胞を播種後、CoCl<sub>2</sub>を経時的に添加し、CYP3Aの遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。また低酸素の影響については、3%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>/92%N<sub>2</sub>条件下CO<sub>2</sub> Multi-gas Incubator 中37°Cにて経時的に培養し検討した。CYP3AおよびVEGFに対する影響は、mRNAの発現をRT-PCR法にて解析した。HIF-1 $\alpha$ のタンパク質レベルでの発現解析はWestern blot法にて行った。CYP3A遺伝子上の転写活性については、Promoter領域を含むCYP3A4の上流約10kbとCYP3A7の上流約12kbのReporter plasmidを導入したHFL細胞を用いてReporter gene assayにて測定した。

【結果】HFL細胞におけるCYP3A4とCYP3A7のmRNA発現レベルは、CoCl<sub>2</sub>処理において有意に抑制された。また3%O<sub>2</sub>条件下においては、CYP3A7のmRNA発現レベルの抑制傾向を示した。HIF-1 $\alpha$ のタンパク質含有量はCoCl<sub>2</sub>処理および3%O<sub>2</sub>条件下で有意に増加した。VEGFのmRNA発現レベルは3%O<sub>2</sub>条件下で有意に上昇した。CYP3A4とCYP3A7の転写活性は、3%O<sub>2</sub>条件下において変化しないが、CoCl<sub>2</sub>処理で有意に抑制された。

【考察】酸素濃度依存であるHIF-1 $\alpha$ の安定化には2%-3%の低酸素状態が必要になる。HIF-1 $\alpha$ の増加によるVEGFのmRNA発現誘導は、HIF-1 $\alpha$ を介する低酸素による応答反応と一致していた。しかし、CYP3A7のmRNAが、3%O<sub>2</sub>条件下において抑制傾向を示したことから、HFL細胞においてHIF-1 $\alpha$ がCYP3A7の遺伝子発現抑制には関与しないことが考えられた。またCYP3A4とCYP3A7の転写活性でCoCl<sub>2</sub>により有意に抑制された結果は、CYP3A4とCYP3A7のmRNA発現におけるCoCl<sub>2</sub>の影響と一致していた。しかし、HIF-1 $\alpha$ はCoCl<sub>2</sub>処理または低酸素条件において有意に増加した。これらの結果より、CoCl<sub>2</sub>の胎児肝細胞におけるCYP3A遺伝子発現の制御メカニズムとして、HIF-1 $\alpha$ は直接CYP3A4およびCYP3A7の遺伝子発現調節に関与していないことが示唆された。

#### （論文審査の結果の要旨）

薬物代謝酵素は、薬物動態に大きな影響を及ぼす因子であり、その中でもCytochrome P450 (CYP)は酸化反応を触媒する最も重要な酵素である。肝に発現する主要な分子種のうちCYP3A4はヒト成人肝における総CYP含量の約30%を占める。一方、CYP3A7は胎児肝総CYPの約50%を占めるが、出産後2週間でピークとなった後その発現量は急速に減少し、成人肝ではほとんど検出されない。また胎児の環境は成人に比べ顕著な低酸素状態にある。その低酸素状態では様々な遺伝子発現調節を制御する因子の一つとしてHypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )が知られている。HIF-1 $\alpha$ は通常酸素濃度下での半減期は5-8分と非常に短時間であることが知られており、HIF-1 $\alpha$ を安定化させる擬似低酸素誘導化合物として塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>)が多くの研究で用いられている。そこで、本研究では、胎児の低酸素環境に及ぼすCYP3A遺伝子発現への影響を解明するために、ヒト胎児肝細胞 (HFL細胞)を用いてCYP3A遺伝子発現に対するCoCl<sub>2</sub>と低酸素の影響を明らかにし、HIF-1 $\alpha$ の寄与について検討した。

その結果、鈴木は次の結論を得た。

1. HFL細胞におけるCYP3A4とCYP3A7のmRNA発現レベルは、CoCl<sub>2</sub>処理において有意に抑制された。
2. CYP3A7のmRNA発現レベルは3%O<sub>2</sub>条件下において抑制傾向を示した。
3. HIF-1 $\alpha$ により転写が活性化される遺伝子の一つである血管内皮増殖因子vascular endothelial growth factor (VEGF)があるが、VEGFのmRNA発現レベルは3%O<sub>2</sub>条件下で有意に上昇した。
4. HIF-1 $\alpha$ のタンパク質含有量はCoCl<sub>2</sub>処理および3%O<sub>2</sub>条件下で有意に増加した。
5. CYP3A4とCYP3A7の転写活性は、3%O<sub>2</sub>条件下において変化しないが、CoCl<sub>2</sub>処理で有意に抑制された。

これらの結果より、胎児肝細胞における低酸素およびCoCl<sub>2</sub>によるCYP3A遺伝子発現を制御するメカニズムとして、HIF-1 $\alpha$ はCYP3A4およびCYP3A7の遺伝子発現調節に直接は関与していないことが示唆された。これらの内容に対して、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

American Ginseng Improves Neurocognitive Function in Senescence-Accelerated Mice : Possible Role of the Upregulated Insulin and Choline Acetyltransferase Gene Expression (アメリカ人参による老化促進マウスの認知機能改善 : 脳内インスリンと ChAT 遺伝子の発現増加の役割)

史 峻

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 高齢化に伴う認知症の患者数が年々増加傾向にあり, 近年認知症と糖尿病の関連も新たに注目を浴びている。一方, 加齢に伴った脳内ブドウ糖利用の低下が認知症の促進因子の一つと考えられており, 我々は老化促進マウスを用いて, アメリカ人参の摂取効果をマウスの認知機能と脳内糖代謝の両面から観察し評価を試みた。

【材料及び方法】 生後6週齢雄性の老化促進モデルマウス (SAMP10) 36匹と老化促進耐性マウス (SAMR1) 24匹を用いた。実験は一群を12匹とし, 其々に満10月齢まで, アメリカ人参添加食またはコントロール食を摂取させた。毎月の体重, 空腹時血糖値 (FPG) 及び老化度をモニターし, またストレスのないポジティブキュータスクを利用した KUROBOX で, 9月齢マウスの認知機能を評価した。さらに, 脳内ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR- $\delta$ ), インスリン, コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) とアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の遺伝子発現 (mRNA) をリアルタイム定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応アッセイによって測定した。

【結果】 アメリカ人参添加食の摂取によって, 老化促進モデルマウス SAMP10で FPG は上昇し, 老化促進耐性マウス SAMR1で FPG は低下した。認知機能 (正しい訪問率) について, SAMR1マウスに比べて SAMP10マウスは低下していたが, コントロール食摂取群に比べアメリカ人参添加食摂取群は有意に上昇した。アメリカ人参添加食による認知機能の改善は SAMP10のみならず SAMR1でも観察された。脳内インスリンと ChAT 遺伝子 (mRNA) の発現は SAMP-10, SAMR1ともに, アメリカ人参添加食摂取群で有意に増加した。

【結論】 アメリカ人参の長期間摂取によって, 老化促進モデルマウスにおける認知機能低下は有意に改善されたが, その機序として脳内ブドウ糖利用の上昇が関与しているものと推測された。脳内のインスリンと ChAT 遺伝子の発現は, ブドウ糖利用を介した認知機能改善に関与していると考えられた。臨床的には,

脳内のブドウ糖利用が認知機能維持に重要な役割を果たしていると考えられた一方, アメリカ人参の摂取は高齢者の認知症治療に有用である可能性が示唆された。今後, アメリカ人参は臨床認知機能改善薬として期待できると思われる。

(論文審査の結果の要旨)

高齢化に伴う認知症の患者数が年々増加傾向にあり, 近年認知症と糖尿病の関連も新たに注目を浴びている。一方, 加齢に伴った脳内ブドウ糖利用の低下が認知症の促進因子の一つと考えられており, 史は老化促進マウスを用いて, アメリカ人参の摂取効果をマウスの認知機能と脳内糖代謝の両面から観察し評価を試みた。

実験は6週齢雄性の老化促進モデルマウス (SAMP-10) 36匹と老化促進耐性マウス (SAMR1) 24匹を用いた。一群を12匹とし, 其々に満10月齢まで, アメリカ人参添加食またはコントロール食を摂取させた。毎月の体重, 空腹時血糖値 (FPG) と老化度をモニターし, ストレスのないポジティブキュータスクを利用した KUROBOX で, 9月齢マウスの認知機能を評価した。最後に, 脳内ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR- $\delta$ ), インスリン, コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) とアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の遺伝子発現 (mRNA) をリアルタイム定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応アッセイによって測定した。

アメリカ人参の摂取効果からみて, 史は次のような結果を得た。

1. SAMP10マウスの体重増加が明らかで, SAMR1マウスに有意差はなかった。
2. SAMP10マウスの老化度は対照群より低く, 老化は有意に抑制された。SAMR1に同様な効果は見られなかった。
3. SAMP10マウスで FPG は有意に上昇し, SAMR1マウスで FPG は有意に低下した。
4. 認知機能 (正しい訪問率) は SAMP10, SAMR1ともに, アメリカ人参添加食の方が有意に高かった。
5. インスリンと ChAT の遺伝子発現は SAMP10, SAMR1ともに有意に増加した。PPAR- $\delta$ , APP に

有意差はなかった。

これらの結果から、アメリカ人参の長期間摂取によって、老化促進モデルマウスにおける認知機能低下は有意に改善されたが、その機序として脳内ブドウ糖利用の上昇が関与しているものと推測された。脳内のインスリンと ChAT 遺伝子の発現増加は、ブドウ糖利用

を介した認知機能改善に関与していると考えられた。臨床的には、脳内のブドウ糖利用が認知機能維持に重要な役割を果たしていると考えられた一方、アメリカ人参の摂取は高齢者の認知症治療に有用である可能性が示唆された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Biocompatibility and bone tissue compatibility of alumina ceramics reinforced with carbon nanotubes (カーボンナノチューブを強化材として複合したアルミナセラミックスの生体親和性および骨親和性)

荻原伸英

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】カーボンナノチューブ (CNT) は、他の材料との複合により強度が増すことから生体材料での応用が期待されている。アルミナセラミックス (アルミナ) は、耐熱性、耐摩耗性、生体親和性に優れているが脆いという欠点がある。我々は、従来のアルミナに強化材として CNT を複合した CNT/アルミナ複合体を開発し、破壊靱性の向上を得た。本研究の目的は、この CNT/アルミナ複合体の生体親和性および骨親和性をアルミナ単体と比較して明らかにすることである。

【材料および方法】CNT/アルミナ複合粉末は、0.8 wt%濃度 CNT を高圧エタノール溶液中で超微細化装置を使用しアルミナ粉末に均一分散することで作製された。CNT/アルミナ複合粉末とアルミナ粉末から、実験に使用する円盤状試料を作製した。アルミナと CNT/アルミナ複合体の力学的強度を測定した。生体内試験として皮下埋め込み試験、骨埋め込み試験を行った。皮下埋め込み試験は、6週齢マウス背部皮下に試料を埋め込み、1週と4週後に周囲の皮膚と筋組織を含めて試料を採取した。組織をパラフィン包埋し、薄切標本を HE 染色して光学顕微鏡で観察した。骨埋め込み試験は、15週齢白色兔の大腿骨に試料を埋め込み、術後12週と24週で大腿骨を採取した。樹脂包埋し、薄切標本を HE 染色して光学顕微鏡で観察した。生体外試験として細胞付着試験を行った。新生児マウス頭蓋冠から分離培養された骨芽細胞を試料上に 3,500 cells/cm<sup>2</sup>濃度で培養し、付着した細胞を DAPI 染色し蛍光顕微鏡で計数した。比較のためマウス軟骨細胞、マウス胚線維芽細胞、ヒト平滑筋細胞について同様の試験を行った。試料上の骨芽細胞を走査電子顕微鏡で観察した。また、7日間培養の骨芽細胞のアル

カリフォスファターゼ (ALP) 活性とカルシウム (Ca) 濃度を測定した。1日または5日間培養した骨芽細胞の cDNA を作製し、real-time PCR 検査を行い、Runx2, Osteocalcin の発現量を調べた。

【結果】試料の力学的強度では、CNT/アルミナ複合体の曲げ強度は向上しなかったが、破壊靱性はアルミナに比べて20%向上した。皮下組織反応において、1週後、両試料周囲にリンパ球を中心とした炎症性細胞を認め、白血球や壊死などの強い炎症性変化は示さなかった。4週後、両試料周囲に薄い線維性被膜が形成され、その周りに好中球やリンパ球などの炎症性細胞を認めず、炎症反応は消失していた。骨組織反応において、12週後、両試料周囲には新生骨が形成され、24週後に両試料とも骨組織と全周にわたり間隙なく接着し、骨の中に完全に試料が取り込まれ、骨欠損が修復されていた。細胞付着試験において、4種類の細胞とも、時間とともに付着数が増加したが、骨芽細胞が最も付着数が多かった。試料間に有意差を認めなかった。電顕では、両試料とも骨芽細胞は試料表面の溝に付着し周囲に広がっていた。ALP 活性、Ca 濃度、Runx2, Osteocalcin の発現量は、試料間に有意差を認めなかった。

【結論】CNT とセラミックスの均一分散した複合体の形成は難しく、強度はあまり向上しないとされていたが、機械的な応力を利用して高分散処理した CNT を用いることにより、均一分散した CNT/アルミナ複合体を作製した。現時点で CNT の複合率は0.4-2.5 wt%と少ないが、複合体の破壊靱性はアルミナ単体よりも、平均で20%、最大で約69%向上した。この破壊靱性の向上は、CNT/アルミナ複合体を生体材料に用いる際に大きな利点となる。CNT/アルミナ複合体を生体材料として臨床応用する場合に最も重要な



点は、生体安全性である。我々は、最も基本的な生体内、生体外試験を、ISO10993に準拠して行い、CNT/アルミナ複合体がアルミナ単体と同等の生体親和性および骨親和性をもつことを示した。CNT/アルミナ複合体を骨欠損の修復や骨接合材料に応用する場合には、アルミナの骨親和性が保たれたまま強度が向上することは、極めて重要なことである。生体外試験において、CNT/アルミナ複合体が細胞毒性を示さないことが明らかになった。細胞付着試験では、CNT/アルミナ複合体の付着能はアルミナ単体と同等という結果であった。ALP活性とCa濃度がCNT/アルミナ複合体とアルミナに差がなかったことから、CNTを複合しても骨芽細胞の石灰形成機能は保持されていた。また、Runx2とOsteocalcinの発現に差がなかったことから、CNTの複合の影響は骨芽細胞の分化に対しても少ないと考えられた。以上から、CNT/アルミナ複合体の生体安全性がアルミナ単体と同程度であれば、機械的特性が向上した新規高機能生体材料として人工関節などへの臨床に応用することが期待できる。

(論文審査の結果の要旨)

カーボンナノチューブ (CNT) は、他の材料との複合により母材の強度を増す性質をもっている。アルミナセラミックス (アルミナ) は、耐熱性、耐摩耗性、生体親和性に優れているが脆いという欠点がある。今回、アルミナに強化材としてCNTを複合したCNT/アルミナ複合体を作製し、この複合体の生体親和性と骨親和性をアルミナ単体と比較検討した。

0.8 wt%濃度 CN/アルミナ複合体とアルミナ試料の力学的強度を測定した。生体内試験としてマウス皮下埋め込み試験、兎大腿骨骨埋め込み試験を行い、試料周囲組織の組織学的検討を行った。生体外試験として骨芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞を用

いた細胞付着試験を行った。試料上の骨芽細胞を電子顕微鏡で観察した。骨芽細胞の石灰形成機能を比較するためにALP活性とCa濃度、分化機能を比較するためにRunx2、Osteocalcinの発現量を測定した。これらの試験はISO10993に準拠して行われた。

その結果、荻原は次の結論を得た。

1. 力学的強度では、CNT/アルミナ複合体の破壊靱性はアルミナに比べて20%向上した。
2. 皮下組織反応では、1週後に両試料周囲にリンパ球を中心とした炎症性細胞を認めたが、4週後には周囲の好中球やリンパ球などの炎症性細胞は認めず、炎症反応は消失していた。
3. 骨組織反応では、12週後に、両試料周囲に新生骨が形成され、24週後に骨の中に完全に試料が取り込まれていた。
4. 細胞付着試験では、4種類の細胞とも、時間とともに付着数が増加したが、骨芽細胞が最も付着数が多かったが、試料間に有意差を認めなかった。電顕では、両試料とも骨芽細胞は試料表面の溝に付着し周囲に広がっていた。ALP活性、Ca濃度、Runx2、Osteocalcinの発現量は、試料間に有意差を認めなかった。

これらの結果より、強度が向上したCNT/アルミナ複合体は従来のアルミナと同等の生体親和性と骨親和性をもつことが明らかになった。また、CNTを複合しても骨芽細胞の石灰形成機能は保持され、骨芽細胞の分化に対しても影響が少ないと考えられた。CNT/アルミナ複合体の生体安全性がアルミナ単体と同程度であれば、機械的特性が向上した新規高機能生体材料として人工関節などの臨床に応用することが期待できる。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。

Cheetahs Have 4 Serum Amyloid A Genes Evolved through Repeated Duplication Events (チーターは複数回の遺伝子重複により形成された4個のserum amyloid A遺伝子をもつ)

陳 磊

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】ある種の疾患への感受性に特定の遺伝子の特性が関与することがある。AAアミロイドーシスは慢性の炎症性疾患に続発し、急性期蛋白質であるserum amyloid A (SAA) 由来のアミロイドが全身に沈着する疾患である。AAアミロイドーシス発症の重要な要因の一つは高い血中SAAレベルが継続され

ることである。ヒトにおいてはSAA蛋白質をコードするSAA遺伝子の多型を含む特性が血中SAAレベル、さらにはAAアミロイドーシス発症に対する感受性を決定する一因であることが想定されている。AAアミロイドーシスはネコ科の哺乳動物であるチーターにおいても罹患率が急速に高まりつつあり、その主要な死因の一つとなっている。ヒトと同様、チーター

の SAA 遺伝子の特性が、この動物種が AA アミロイドーシスに高い感受性を示す一因である可能性がある。申請者はこの仮説を検証するために、チーターの SAA 遺伝子のクローニング、およびその塩基配列、多型性、転写発現プロファイルなどの特性を解析した。さらに、これらの SAA 遺伝子の進化的な形成過程に関して考察した。

【材料と方法】日本国内の動物園で死亡した51個体のチーターの臓器（肝臓、胃、腸）を入手し、ゲノム DNA、および mRNA を調製した。このうち32個体は一つの大家系に、3個体は小家系に属した。また、28個体には軽～重度の AA アミロイド沈着が認められた。ゲノム歩行法により、未知であった SAA 遺伝子の 5'上流域、および 3'下流域の塩基配列を取得した。この塩基配列情報に基づき、SAA 遺伝子のコード領域全長を PCR 増幅可能なプライマーを設計し、SAA 遺伝子を PCR クローニングした。この PCR 産物の塩基配列を決定し、チーター個体間で比較することにより、多型部位を同定した。mRNA より cDNA を逆転写調製し、RT-PCR 法により SAA 遺伝子の転写発現プロファイルを調査した。

【結果と考察】ゲノム歩行法、および PCR クローニングの結果、チーターゲノム中には4種類の SAA 遺伝子 (SAA1A, SAA1B, SAA3A, SAA3B) が存在することを明らかとした。51個体のチーターから得られた4種類の SAA 遺伝子の PCR 産物の塩基配列を比較した結果、多数の塩基多型を同定することができた。すなわち、SAA1A 遺伝子に関しては8カ所の塩基多型と、その組み合わせによる4種類の対立遺伝子を同定した。同じく SAA1B 遺伝子に関しては6カ所の塩基多型と6種類の対立遺伝子を、SAA3A 遺伝子に関しては14カ所の塩基多型と7種類の対立遺伝子を、SAA3B 遺伝子に関しては3カ所の塩基多型と4種類の対立遺伝子を同定した。SAA1A と SAA1B 遺伝子の間、および SAA3A と SAA3B 遺伝子の間では、それぞれ高度な塩基配列の相同性が認められた。また、これらの塩基多型は全てコード領域外にあり、したがって蛋白質レベルではチーターの SAA1、および SAA3 はそれぞれ単一であることが判明した。この SAA1蛋白質の単一性が、チーターが AA アミロイドーシスに高い感受性を示す一因である可能性が考えられた。4種類の SAA 遺伝子の遺伝子型を家系追跡した結果、これらの SAA 遺伝子は全て同一の染色体上に存在し、4種類の SAA 遺伝子上の遺伝子型の組み合

わせにより、51個体のチーター集団中には9種類のハプロタイプが存在する事を明らかとした。しかしながら、これらの SAA ハプロタイプ、または SAA 遺伝子型と AA アミロイドーシスの重篤度との間には明らかな相関は認められなかった。51個体のチーターにおける SAA 遺伝子の RT-PCR 解析の結果、SAA1A 遺伝子は肝臓において発現しており、特に炎症、または AA アミロイドーシスを発症したチーターの肝臓では高い転写活性が認められた。SAA1B 遺伝子は調査したいずれの臓器でも転写発現が認められなかった。SAA3A、および SAA3B 遺伝子の転写発現は肝臓、および胃において検出された。胃での転写発現レベルは炎症、または AA アミロイドーシスの重篤度とは相関していなかった。一方、肝臓での転写発現レベルは炎症、または AA アミロイドーシス発症と相関していた。これらの結果は、個々の SAA 遺伝子が独自の転写発現制御を受けていることを示唆した。さらに、上記のデータ、およびマウス、ヒトなど他の哺乳動物の SAA 遺伝子の塩基配列との比較から、チーターの4種の SAA 遺伝子は、複数回の遺伝子重複、および遺伝子変換により形成されたことが示唆された。本研究において得られたデータは、チーターにおける AA アミロイドーシスの発症機序を解明し、さらに予防法を確立する上で有用である。

#### (論文審査の結果の要旨)

チーターは高い AA アミロイドーシス発症率をもち、その発症機序の原因解明のための良いモデルであると考えられる。申請者の陳磊は、「チーターにおける高い AA アミロイドーシス発症率は、この動物種に特有の serum amyloid A (SAA) 遺伝子の特性に起因する」との仮説を立てた。そこで、チーターの SAA 遺伝子群の包括的クローニング、およびその塩基配列の調査、チーター個体間の塩基配列多型性とその遺伝性の調査、転写発現プロファイルを解析し、その検証を試みた。さらに得られたデータに基づき、チーターにおける SAA 遺伝子群の進化的な形成過程に関しても考察した。

日本国内で死亡した51個体のチーターの臓器（肝臓、胃、腸）、剖検時の病理所見データ (AA アミロイドーシス、およびその他の炎症性所見の有無)、および個体間の血縁関係 (家系図) を入手し、解析に用いた。始めに1個体のチーターに関し、ゲノム歩行法により、未知であった SAA 遺伝子の 5'上流域、および 3'下流域の塩基配列を取得した。この塩基配列情報に基づ

き、個々の SAA 遺伝子に特異的で、かつその全長を PCR 増幅可能なプライマーを新たに設計した。51個体のチーターから抽出したゲノム DNA をテンプレートとして PCR を行い、それぞれの SAA 遺伝子を含む DNA 断片を取得した。この DNA 断片を TA-クロニングし、その塩基配列を決定し、チーター個体間で比較することにより、各 SAA 遺伝子内での塩基多型部位、および対立遺伝子を同定した。これらの対立遺伝子のチーター家系内での遺伝パターンから、SAA 遺伝子群から構成されるハプロタイプを推測した。さらに、RT-PCR 法により SAA 遺伝子の転写発現プロファイルを調査した。

その結果、陳 磊は次の結論を得た。

1. チーターは 4 種類の SAA 遺伝子 (SAA1A, SAA1B, SAA3A, SAA3B) を保有する。
2. SAA1A と SAA1B, SAA3A と SAA3B の間では高度な塩基配列相同性がある。
3. チーター集団中には、4 種類の SAA 遺伝子の全

てに関して複数個の塩基多型があり、それらは全てコード領域外にある。

4. 4 種類の SAA 遺伝子は同一の染色体上に存在し、それぞれの遺伝子上の対立遺伝子の限られた組み合わせのハプロタイプとして遺伝されている。
5. 4 種類の SAA 遺伝子のうち、SAA1A 遺伝子の肝臓における転写発現パターンと、炎症性所見、および AA アミロイド-シス発症の有無に強い相関がある。
6. チーターの SAA 遺伝子群は、SAA1 と SAA3 遺伝子それぞれが重複されるという、ヒトやマウスとは異なる過程を経て形成されている。

以上の結果より、チーターは SAA 遺伝子に関してユニークな特性を有し、特に SAA1 蛋白質のアミノ酸配列レベルでの単型性が、チーターが AA アミロイド-シスの高い発症率を示す一因である可能性が示された。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。

### Influence of Cytochrome P450 2C19 gene variations on pharmacokinetic parameters of thalidomide in Japanese patients (日本人におけるサリドマイドの薬物動態学パラメータと CYP2C19 遺伝子多型の影響)

松 澤 直 樹

#### (論文の内容の要旨)

【目的】サリドマイドは、近年血管新生抑制作用や TNF- $\alpha$  阻害作用などの新しい薬理作用が見出され、通常の治療では困難とされる多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma, MM) などに対し極めて高い治療効果を示すことが明らかとなり、本邦でも 2008 年 10 月、およそ 50 年ぶりに製造が認可・承認された。サリドマイドは非酵素的に加水分解するものとされていたが、ラセミ体のサリドマイドはヒト肝ミクロソーム中の CYP2C19 により一部が水酸化を受けることが報告された。一方、CYP2C19 にはエクソン 4 とエクソン 5 に表現型に影響を及ぼす一塩基多型 (SNP) の存在が知られており、日本人の場合、この 2 つの SNP を調べることで CYP2C19 遺伝子多型をほぼ 100% 判定可能と言われている。CYP2C19 は、日本人の約 2 割が CYP2C19 の欠損した Poor Metabolizer であるため、患者間でサリドマイドの血中濃度に差が生じることが考えられるが、これまでに報告はされていない。また、サリドマイドはラセミ体であるが、抗腫瘍効果やアザラシ肢症といった副作用には S-体が関与していると

言われる。そのため、サリドマイドの光学異性体を分離し血中濃度を測定することで、サリドマイドの副作用を回避しながら治療を継続できると考えられた。本研究の目的は、① CYP2C19 遺伝子多型を簡便かつ正確に解析できるようにする、② サリドマイドの R 及び S 体を分離して測定できるように条件検討を行う、③ CYP2C19 遺伝子多型とサリドマイドの血中濃度について相関性を検討する、以上の 3 点を明らかにすることである。

【方法】従来から行われている CYP2C19 多型解析法 (PCR-RFLP) は、PCR 反応に 3 時間以上かかる上、目的のバンドが得られなかったり、不要なバンドが確認されたりと正確性に欠けていた。今回、ポリメラーゼに KOD FX を用いた新しい PCR-RFLP 法を開発し、CYP2C19 の迅速かつ正確な確認ができるか検討を行った。次に、サリドマイドの光学異性体を分離し、血中濃度を測定するため HPLC カラムに CHIRALPAK AD-RH を用い、内標準物質にフェナセチンを使用して検討を行った。以上の条件検討を確立した後、信州大学医学部附属病院に入院し、サリドマイ



ド治療された全患者（6名）から文書による同意を得た上で、CYP2C19の遺伝子多型解析とサリドマイドの血中濃度を測定した。

【結果】 Polymerase として KOD FX を用いた改良法では、前処理として血液から DNA の抽出をする必要がなくなり、かつ PCR の時間短縮（1時間程度で完了）と目的のバンドを正確に確認することができるようになった。また、サリドマイドの R 及び S-体及びフェナセチンを良好に分離できる HPLC の条件を確立することができた。サリドマイド治療を受けている入院患者から採血を行った結果、CYP2C19ヘテロ変異は4名、ホモ変異の患者は2名であり、野生型の患者はいなかった。サリドマイドの AUC ( $\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{L}$ ) は、R 及び S-体共に CYP2C19ヘテロ変異の患者よりホモ変異の患者でおよそ1.5倍上昇していた。

【考察】 本研究により、CYP2C19の遺伝子多型の迅速かつ正確な確認方法と、HPLC によるサリドマイドの光学異性体分離法を確立することができた。また、CYP2C19ホモ変異の患者はヘテロ変異の患者よりサリドマイドの血中濃度が上昇する傾向が示唆された。サリドマイド導入後より呼吸困難を副作用として認めた患者がおり、内服中止により症状の改善が認められたことから、CYP2C19ホモ変異の患者はサリドマイドの血中濃度が上昇し、副作用も発現しやすい可能性が考えられた。以上の結果より、サリドマイド治療を受ける場合は、CYP2C19の遺伝子多型を確認した上で投与量を設定することで、より副作用の少ない治療を提供できると考えられる。

#### （論文審査の結果の要旨）

サリドマイドは、近年、通常の治療では困難とされる多発性骨髄腫などに対し極めて高い治療効果を示すことが明らかとなり、本邦でもおよそ50年ぶりに製造が認可・承認された。サリドマイドは非酵素的に加水分解するものとされていたが、ヒト肝ミクロソーム中の CYP2C19により一部が水酸化を受けることが報告された。一方、CYP2C19にはエクソン4と5に表現型に影響を及ぼす一塩基多型（SNP）の存在が知ら

れており、日本人の場合、この2つのSNPを調べることでCYP2C19遺伝子多型をほぼ100%判定可能とされている。また、サリドマイドの抗腫瘍効果やアザラシ肢症といった副作用にはS-体が関与すると報告されているため、サリドマイド服用患者のCYP2C19遺伝子多型を判定し、サリドマイド光学異性体の血中濃度を測定することで、副作用を回避しながら治療を継続できると考えられた。

1. ポリメラーゼに KOD FX を用いた新しい PCR-RFLP 法を開発し、CYP2C19の迅速かつ正確な判定方法を確立した。
2. HPLC カラムに CHIRALPAK AD-RH を用い、内標準物質にフェナセチンを使用することで、サリドマイドの光学異性体を良好に分離できる測定方法を確立した。
3. サリドマイド治療を受けた全入院患者（6名）から文書による同意を得た上で、CYP2C19 遺伝子多型解析とサリドマイドの血中濃度を測定した結果、CYP2C19 ヘテロ変異は4名、ホモ変異の患者は2名であった。サリドマイドの AUC ( $\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{L}$ ) は、R 及び S-体共に CYP2C19 ヘテロ変異の患者よりホモ変異の患者でおよそ1.5倍上昇していた。

本研究により、CYP2C19 遺伝子多型の迅速かつ正確な確認方法と、HPLCによるサリドマイドの光学異性体分離法を確立することができた。また、CYP2C19 ホモ変異の患者はヘテロ変異の患者よりサリドマイドの血中濃度が上昇する傾向が示唆された。CYP2C19 ホモ変異の患者で、サリドマイド導入後より呼吸困難を副作用として認めた患者がいたことから、CYP2C19 ホモ変異の患者はサリドマイドの血中濃度が上昇し、副作用も発現しやすい可能性が考えられた。以上の結果より、サリドマイド治療を受ける場合は、CYP2C19の遺伝子多型を確認した上で投与量を設定することで、より副作用の少ない治療を提供できると考えられる。

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。

### Carbon Nanotubes Induce Bone Calcification by Bidirectional Interaction with Osteoblasts（カーボンナノチューブは、骨芽細胞との双方向性の相互作用により、骨の石灰化を誘導する）

清水 政 幸

#### （論文の内容の要旨）

【背景と目的】 近年、カーボンナノチューブ（CNTs）

の生体材料への応用が注目され、その一つに再生医療の足場材としての有用性が報告されている。我々は、

2008年に生体内で骨組織を再生する実験で、CNTsを複合した足場材料を用いると骨形成が促進されることを初めて報告した。しかしそのメカニズムは不明のままであり、本研究の目的は、CNTsが骨形成を促進するメカニズムを明らかにすることである。

**【方法】**骨形成タンパク rhBMP-2を用い、マウス背筋筋膜下における異所性骨形成実験を行い、 $\mu$ CTで骨形成を評価した。次にマウス頭蓋骨から採取した骨芽細胞様ストローマ細胞 (OB) を培養し、多層CNTs (MWCNTs) および同じナノサイズのカーボン粒子である、カーボンブラック (CB) を対照とし加えた。3週間培養し、アリザリン染色で石灰化を評価し、また電子顕微鏡で観察した。MWCNTs添加による骨芽細胞増殖に対する影響を alamar blue assay で評価した。real time RT-PCRにより、分化初期のマーカー (Runx2) と後期のマーカー (Osteocalcin) の発現を、それぞれ培養1, 5日目に定量化した。次に骨芽細胞が存在しない培養液中に MWCNTs または CB を加え、1週間後にプレート底面に集積したCaを定量した。次に培養液中のCa濃度による骨芽細胞への影響を見るため、Ca濃度が異なる培養液で骨芽細胞を培養し、5日目に alkaline phosphatase (ALP) 染色を行い、骨芽細胞の成熟に伴う機能を評価した。また培養1日と5日にそれぞれ Runx2, Osteocalcin を定量化した。最後に、骨芽細胞以外の細胞が産生するALPでも、骨芽細胞と同様に MWCNTs 周囲に石灰化を誘導できるか評価するため、線維芽細胞様細胞株の NIH3T3 と ST2 に対し MWCNTs と CB を作用させて培養し石灰化の確認をした。次に ST2 に rhBMP-2 を作用させ石灰化能を誘導し、石灰化を確認し、石灰化能が誘導されるのは、ALP を発現したことによるのかを検討した。MWCNTs を含む培養液で、rhBMP-2 で処理した ST2 に、ALP 阻害作用を持つ dehydropeptidase (DHP) 加えた時の ALP 活性および石灰化について評価した。

**【結果】**異所性骨形成実験の術後10, 21日目に3次元骨形態計測を行うと、bone volume (BV,  $\text{mm}^3$ ), BV/tissue volume (TV  $\text{mm}^3$ ) と Trabecular thickness (Tb.Th,  $\mu\text{m}$ ) の増加量は、全てMWCNT群の方が有意に高かった。OBの培養3日目では、MWCNT群は50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で有意に強い石灰化を認めた。MWCNTs の周囲を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察すると、針状構造の結晶があり、Diffraction モードでは、既知の Hydroxyapatite (HA) のピークと一致したた

め石灰化物質はHAであることが示された。MWCNTs は増殖への影響はなかったが、分化後期のマーカーである Osteocalcin の発現は MWCNTs 群で有意に高かった。培養液中のCa濃度を高くするとALP活性は高くなり、Osteocalcin の発現が有意に増え、分化を促進する可能性が考えられた。NIH3T3 と ST2 に rhBMP-2 を作用させると、ST2 のうち MWCNTs 群のみ石灰化を認めた。この石灰化が起こる状態でALP阻害薬のDHPを作用させると、その濃度依存的にALPが低下し、石灰化も抑制された。すなわちALPはMWCNTsの石灰化を誘導する重要な因子であると考えられた。

**【考察および結論】**本研究で解明したMWCNTsが骨形成を促進するメカニズムは、骨芽細胞との相互作用であり、MWCNTsがCaを引き寄せ、骨芽細胞周囲のCa濃度を上昇させ、未分化な骨芽細胞がCa濃度の上昇を感知し、成熟骨芽細胞に分化して、骨形成を開始するが、この過程で骨芽細胞から多量のALPが周囲に放出され、ALP濃度が上昇することにより、MWCNTsの周囲に石灰化が誘導される。このようにMWCNTsと骨芽細胞の相互作用が相乗的に繰り返され、石灰化が急速に進行して、骨形成が促進されたと考えられた。このようにMWCNTsは生化学的な生体活性を有することが明らかになり、全く新しい機能性生体材料として、今後の医療を大きく変える可能性があると考えられた。

#### (論文審査の結果の要旨)

清水らは2008年に生体内でCNTsを複合した足場材料を用いると骨形成が促進されることを初めて報告した。今回CNTsが骨形成を促進するメカニズムを検討した。骨形成タンパク rhBMP-2を用いたマウス異所性骨形成実験で、 $\mu$ CTで骨形成を評価。骨芽細胞様ストローマ細胞 (OB) を培養し、多層CNTs (MWCNTs) およびカーボンブラック (CB) を加え、3週後に石灰化を評価、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。alamar blue assay で骨芽細胞増殖を、real time RT-PCR で分化初期と後期のマーカー (Runx2 と Osteocalcin) を定量し分化を評価した。骨芽細胞が存在しない培養液に MWCNTs, CB を加え、1週間後プレート底面のCaを定量した。Ca濃度が異なる培養液でOBを培養し、alkaline phosphatase (ALP) 染色し、分化も評価した。線維芽細胞様細胞株 (NIH3T3, ST2) に MWCNTs, CB を加え石灰化を評価し、さらに ST2 に rhBMP-2

を作用させ石灰化を誘導しMWCNTsとALP阻害薬(DHP) 加えた時のALP活性および石灰化を評価した。結果は異所性骨形成実験で術後10から21日目の骨量、骨量/組織量、骨梁幅の増加量は、MWCNT群で有意に高く、OB培養3週目では、MWCNT群は50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で有意に強い石灰化を認めた。TEM観察ではMWCNTsの周囲に針状構造の結晶があり、Hydroxyapatiteの結晶であった。MWCNTsは増殖への影響はなかったが、Osteocalcinの発現は有意に高かった。培養液中のCa濃度依存性にALP活性は高くなり、Osteocalcinの発現も有意に増え、分化促進した。NIH3T3とST2にrhBMP-2を作用させると、ST2のうちMWCNTs群のみ石灰化した。ここにDHPを加えると濃度依

存的にALPが低下し、石灰化も抑制され、ALPはMWCNTsの石灰化誘導の重要な因子だった。

本研究でMWCNTsが骨形成を促進するメカニズムは、骨芽細胞との相互作用であり、MWCNTsがCaを引き寄せ、Ca濃度を上昇させ、骨芽細胞を成熟骨芽細胞に分化させ、骨形成を開始した。骨芽細胞からのALPによりMWCNTs周囲に石灰化が誘導された。このようにMWCNTsと骨芽細胞の相互作用が相乗的に繰り返され、石灰化が急速に進行して、骨形成が促進されると考えられた。

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。

## IL-15-High-Responder Developing NK Cells Bearing Ly49 Receptors in IL-15<sup>-/-</sup> Mice (IL-15欠損マウスにおけるIL-15高応答性Ly49受容体陽性未熟NK細胞)

### 好 沢 克

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】NK細胞は、特異的抗原レセプターをもたず、抗原感作がなくとも腫瘍細胞やウイルス感染細胞を殺傷できることから、自然免疫系を担うリンパ球として、ウイルス感染、腫瘍の免疫監視、骨髄移植の拒絶反応などで重要な役割を果たしていると考えられている。NK細胞の分化・成熟・生存に関しては、IL-15が必須な役割を果たしているといわれているが、IL-15がNK細胞の分化過程においてどの段階でどのように作用しているか未だ不明な点が多い。今回我々は、IL-15欠損マウスを用いて、IL-15によるNK細胞の分化、増殖過程について検討した。

【方法】実験動物には野生型マウス、IL-15欠損マウスおよび両者より作製された放射線照射骨髄キメラ、RAG遺伝子欠損マウスおよびIL-15/RAG遺伝子欠損マウスを用いた。それぞれの骨髄、脾臓に存在するNK細胞についてflow cytometryにより細胞表面マーカーを解析するとともに、細胞培養系を用いて未熟NK細胞のIL-15応答性について検討した。

【結果】混合放射線照射骨髄キメラを用いた系では、IL-15欠損マウスの骨髄細胞では未熟NK細胞数が野生型マウスに比べ、およそ1/10にもかわらず、ほぼ同等の速度で成熟型NK細胞が発生した。In vitroでは、IL-15欠損マウスの骨髄、脾臓由来の未熟NK細胞は、野生型マウスの未熟NK細胞に比べ速やかにIL-15に反応し、効率よく増殖が誘導された。Tお

よびBリンパ球を欠損するRAG欠損マウスとIL-15欠損マウスを交配して作製したIL-15/RAG欠損マウスを用いてNK細胞の分化段階の検討を行ったところ、CD11b<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>DX5<sup>hi</sup>という未熟NK細胞の段階まで分化が進んでいることが認められた。これらの細胞では、成熟型NK細胞でみられるようなCD51、CD127、c-kitのdownregulationはまだ認められなかったが、Ly49分子はすでに発現されており、IL-15受容体の構成成分であるCD122が高発現していた。また、IL-15の存在下でIL-15欠損マウスの脾臓細胞を培養すると、Ly49陽性細胞が顕著に増加したが、IL-15欠損マウス脾臓由来NK細胞からLy49陽性細胞を除去した後にIL-15存在下で培養しても、Ly49G2およびLy49D発現細胞は再出現しなかった。IL-15はLy49の発現を誘導するといわれているが、IL-15はLy49を誘導するのではなく、既存のLy49陽性細胞を選択的に増殖させていることが示された。次に、IL-15がNK細胞分化過程のどの段階で作用しているのかを明らかにするために、野生型マウス脾臓NK細胞をCD11b、DX5の発現により分離し、CFSEによりラベルしIL-15に対する増殖速度について調べてみると、CD11b<sup>+</sup>NK細胞よりもCD11b<sup>-</sup>NK細胞の方が増殖速度は速かった。さらにCD11b<sup>-</sup>DX5<sup>hi</sup>NK細胞はCD11b<sup>-</sup>NK細胞全体やCD11b<sup>-</sup>DX5<sup>dim</sup>NK細胞よりも増殖が速かった。

【結論】以上の結果より、IL-15欠損マウスではNK



細胞分化は IL-15 高応答段階で停止し、IL-15 存在下では、すでに Ly49 を発現しているステージの未熟 NK 細胞に IL-15 が作用し、急速に増殖することが明らかになった。このことからウイルス感染時には IL-15 が産生され、脾臓や肝臓に存在する IL-15 高応答未熟 NK 細胞が急速に増殖し、末梢組織への NK 細胞供給が増加することによって、ウイルスにより効率よく対抗する可能性が示唆される。

(論文審査の結果の要旨)

NK 細胞は、特異的抗原レセプターをもたず、抗原感作がなくとも腫瘍細胞やウイルス感染細胞を殺傷できることから、自然免疫系を担うリンパ球として認識されてきた。現在、NK 細胞はウイルス感染、腫瘍の免疫監視、骨髄移植の拒絶反応などで重要な役割を果たしていると考えられている。造血細胞の分化には様々なサイトカインが必須な役割を果たしていることはよく知られており、NK 細胞の分化・成熟・生存に関しては、IL-15 が必須な役割を果たしている。しかし、IL-15 が NK 細胞の分化過程でどのように作用しているかについては未だ不明な点が多い。本研究では、野生型マウス、IL-15 欠損マウスおよび両者より作製された放射線照射骨髄キメラ、RAG 遺伝子欠損マウスおよび IL-15/RAG 遺伝子欠損マウスを用いて、それぞれの骨髄、脾臓に存在する NK 細胞について flow cytometry により細胞表面マーカーを解析するとともに、細胞培養系を用いて IL-15 による NK 細胞の分化、増殖過程および未熟 NK 細胞の IL-15 応答性について検討した。

その結果、好沢 克は今回の実験で次の結果を得た。

1. 放射線照射骨髄キメラの解析から、IL-15 欠損マウスの NK 細胞は細胞数が 10 分の 1 以下であるにもかかわらず、野生型と同等以上の効率で成熟 NK 細胞に分化した。

2. Flow cytometry による解析の結果、IL-15 欠損マウスの NK 細胞はステージ III (CD11b-DX5<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>CD51<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>) と IV (CD11b-DX5<sup>hi</sup>CD27<sup>-</sup>CD51<sup>-</sup>c-kit<sup>-</sup>) の間で分化が停止していることが明らかになった。また、これらの未熟な NK 細胞は骨髄だけでなく脾臓・肝臓にも存在していた。
3. In vitro の培養系においても、放射線照射骨髄キメラの解析でみられたのと同様、IL-15 欠損マウス由来の NK 細胞の方が IL-15 に対する増殖能が高いことが明らかになった。
4. In vitro の培養系では、IL-15 欠損マウスにおいて分化の停止している段階の NK 細胞は Ly49 分子をすでに発現し、IL-15 受容体  $\beta$  鎖の発現は最も高く、また増殖能も最も高いことが明らかになった。
5. IL-15 欠損マウス脾臓由来 NK 細胞から Ly49 陽性細胞を除去した後に IL-15 存在下で培養しても、Ly49G2 および Ly49D 発現細胞が再出現しなかったことから、IL-15 は既存の Ly49 陽性細胞を選択的に増殖させていることが示された。
6. 野生型マウスの脾臓 NK 細胞でも、IL-15 に対して CD11b-DX5<sup>hi</sup> NK 細胞が最も高い増殖能を示した。

以上の結果から、IL-15 欠損マウスでは、IL-15 に高応答であって Ly49 を発現している未熟ステージで NK 細胞の分化が停止しており、IL-15 存在下では、この段階の未熟 NK 細胞は他の分化段階にある NK 細胞に比べて、より急速に増殖するという結論を得た。本論文は IL-15 に反応する最も初期の NK 細胞を同定し、IL-15 の NK 細胞の分化・増殖過程における役割の一端を明らかにするとともに、ウイルス感染時の末梢に存在する未熟 NK 細胞の初期免疫応答への関与の可能性を示唆するものであり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Targeting *N*-acetylglucosamine-bearing polymer-coated liposomes to vascular smooth muscle cells  
(血管平滑筋細胞への *N*-アセチルグルコサミン修飾リポソームの標的化)

伊 勢 真美子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】経皮的冠動脈インターベンションが引き起こす血管再狭窄の治療において、血管傷害部位を選択的に標的化する薬物輸送システムが開発できれば、より平易な治療が可能になり大変有用である。近年、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を修飾したり

ポソームが、心筋細胞に特異的に取り込まれることが見出され、心筋組織を標的とした薬物輸送システムに有益であることが報告された。さらにこの心筋細胞の GlcNAc 修飾リポソームの取り込みは、細胞骨格分子であるビメンチンやデスミンが細胞表面に出現して GlcNAc 結合性のレクチン活性を有することで行われ

ることも報告された。このようなことから本研究では、血管平滑筋細胞がビメンチンを発現することを踏まえて、血管平滑筋細胞に対する GlcNAc 修飾リポソームを用いた選択的な取り込みについて解析した。さらに、血管傷害部位においては血管平滑筋細胞が内壁に露出することから、露出した細胞に対する GlcNAc 修飾リポソームを用いた選択的な薬物輸送システムの可能性について検討した。

【方法】GlcNAc 修飾リポソームは、エクストルーダーを用いて直径100 nm の大きさで、リポソーム表面に GlcNAc ポリマーをコーティングすることによって作製した。コントロールとしてグルコース (MA) を修飾したりポソームを作製した。これらのリポソームと血管平滑筋細胞の相互作用をフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡によって検討した。またマウスの右足動脈内部の血管内皮細胞を剥離した血管傷害モデルマウスを作製し、この血管傷害部位へのGlcNAc修飾リポソームの集積を確認した。さらに抗炎症性薬剤としてNF- $\kappa$ Bの活性を抑制するオリゴヌクレオチドNF- $\kappa$ B decoy を GlcNAc リポソームに封入して、血管平滑筋細胞への取り込みと炎症抑制作用を検討した。

【結果】GlcNAc 修飾リポソームおよびMA 修飾リポソームの血管平滑筋細胞への取り込みをフローサイトメトリーで検討したところ、GlcNAc 修飾リポソームの血管平滑筋細胞への高い相互作用が観察された。また血管傷害モデルマウスに GlcNAc 修飾およびMA 修飾リポソームを尾静脈より投与し、血管傷害部位への集積を組織切片により観察したところ、傷害血管壁にMA 修飾リポソームよりも GlcNAc 修飾リポソームの高い集積が観察された。正常血管では、集積は観察されなかった。NF- $\kappa$ B decoy を封入した GlcNAc 修飾リポソームの血管平滑筋細胞への取り込みをIL-6の産生抑制によって検討したところ、GlcNAc 修飾リポソームによってNF- $\kappa$ B decoy が細胞内に効率的に取り込まれることが明らかとなった。この時IL-6の産生抑制がリアルタイムPCRによって確認された。【考察】GlcNAc 修飾リポソームを用いる事で、血管平滑筋細胞を特異的に標的化できることが示された。また血管傷害部位選択的なGlcNAc 修飾リポソームの標的化の可能性も示唆され、血管傷害部位を標的化する薬物輸送システムの開発の一助となることが期待された。

#### (論文審査の結果の要旨)

経皮的冠動脈インターベンション (PCI) は、治療した血管部位に再狭窄を引き起こすことが問題となっている。近年、心筋細胞や血管平滑筋細胞などのビメンチンやデスミンを発現する細胞が、細胞表面でN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 結合レクチン活性を持つことが報告されている。また、血管傷害部位では、血管内皮細胞が剥離して中膜平滑筋細胞が表面に露出することや露出した血管平滑筋細胞ではビメンチンの発現が上昇することも報告されている。従って、血管平滑筋細胞のビメンチンやデスミンを標的とすれば、インターベンション部位への特異的な薬剤送達システム (DDS) の構築、そして再狭窄予防が期待できる。そこで、GlcNAc を修飾したりポソームを作製し、このリポソームが血管平滑筋細胞と相互作用を持ち、血管傷害部位へ集積するかについて検討した。さらにNF- $\kappa$ Bを抑制するNF- $\kappa$ B デコイを封入したりポソームを作製し、このリポソームの取り込みによる血管平滑筋細胞に対する抗炎症効果を検討した。

その結果、伊勢真美子は次の結論を得た。

1. GlcNAc 修飾リポソームは、ラット血管平滑筋細胞の GlcNAc と特異的に相互作用すること、対照のグルコース (MA) 修飾リポソームは、ほとんど血管平滑筋細胞と相互作用しないことが示された。一方、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と GlcNAc 修飾リポソームの相互作用は顕著ではなかった。
2. マウス大腿動脈にワイヤーを挿入し血管内皮細胞を剥離した血管障害モデルマウスを作製した。このマウスに尾静注にて GlcNAc 修飾リポソームを投与したところ、血管傷害部位に集積することが観察された。一方、正常な血管には GlcNAc 修飾リポソームの集積は観察されなかった。対照として用いた MA 修飾リポソームの集積は有意に少なかった。
3. GlcNAc およびMA修飾リポソームにNF- $\kappa$ B デコイを封入して、血管平滑筋細胞に取り込ませた。MA 修飾リポソームと比較して GlcNAc 修飾リポソームを取りこんだ血管平滑筋細胞において、IL-6の産生が抑制された。

これらの結果より、GlcNAc 修飾リポソームを用いることで、PCI治療後の再狭窄を抑制するためのDDS構築の可能性が示された。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Evaluation of muscle hyperactivity of the grimacing muscles by unilateral tight eyelid closure and stapedius muscle tone (片側の強い閉瞼とアブミ骨筋の筋緊張による、しかめ顔筋の過緊張の評価)

柴 将 人

(論文の内容の要旨)

【緒言】外眦の皺や眉間の縦皺は、それぞれ眼輪筋や皺眉筋の過緊張により起こると考えられている。このような眼輪筋や皺眉筋などの顔をしかめる筋(以下、しかめ顔筋)が過緊張になると、眉毛の位置は下垂する。一方で前頭筋が過緊張となると、眉毛は挙上される。前頭筋では運動皮質からの上位運動ニューロン支配は両側性であるため、左右対称性に眉毛が挙上される。しかし、しかめ顔筋については運動皮質からの支配について、これまで十分に検討されてこなかった。顔面神経支配であるアブミ骨筋の筋収縮は、これまでの報告より、しかめ顔筋の筋収縮と関連している可能性がある。

アブミ骨筋が収縮すると鼓膜のコンプライアンスは低下することから、しかめ顔筋が過緊張となった場合、アブミ骨筋も過緊張となり静的コンプライアンスが低下する可能性が考えられる。これらのことより本研究では、一側のしかめ顔筋に対する両側の運動皮質の支配の程度と、眉毛の位置に対する影響、しかめ顔筋に対する運動皮質の支配とアブミ骨筋の筋緊張の関連、さらに片側の強い閉瞼がアブミ骨筋の筋緊張に及ぼす影響を調査した。

【方法】瞼裂幅の左右差や非対称性の後天性眼瞼下垂症がなく、ティンパノグラムが正常(type A)である71名が研究に参加した。

- 1) 眉頭の高さ(以下、眉頭高)が左右対称な49名につき、一側のみ強い閉瞼(しかめ顔筋の収縮を伴う程度)を両側で行わせ、対側の眉頭高に5%以上の変化があるか調べ、両側で対側の眉頭高に5%以上の変化が認められた群と認められない群の間で、静的コンプライアンスに有意差が認められるか検討した。
- 2) 眉頭高が非対称な12名につき、1)と同様に眉頭高の変化を調べた。加えて眉頭高が高い側と低い側の間の静的コンプライアンスに有意差があるか、両者に相関が認められるか調べた。
- 3) 健常成人10名につき、音刺激なしに片側のしかめ顔筋の収縮を伴う強い閉瞼を行い、その際の鼓膜コ

ンプライアンスの変化を調べた。

【結果】

- 1) 40名は対側の眉頭高の変化が両側で認められず、9名は両側で認められた。両群間の静的コンプライアンスを比較したところ、認められた群の静的コンプライアンスは、認められなかった群と比較して有意に低下していた( $p=0.00490$ )。
- 2) 対側眉頭高の変化は、眉頭高が高い側を強く閉瞼した際には認められたが、低い側では認められなかった。静的コンプライアンスは、眉頭高が低い側が、高い側と比較して有意に低下していた( $p=0.0000557$ )。眉頭高の左右差(右-左)と静的コンプライアンスの左右差(右-左)は有意な正の相関を認めた( $r=0.9347$ ,  $p=0.00000836$ )。
- 3) 10名中6名で、強い閉瞼に伴う同側静的コンプライアンスの低下を認めた。

【考察】一側のみ強い閉瞼を行った結果から、運動皮質のしかめ顔筋に対する神経支配は3群に分類できると考えられた。

片側支配群) 対側での眉頭高の変化が両側で認められなかった40名: 対側の優位性が強い両側支配  
 両側支配群) 対側での眉頭高の変化が両側で認められた9名: 対側の優位性が弱い両側支配  
 非対称支配群) 眉頭高に左右差の認められた12名: 眉頭高の低い側が対側の優位性が弱い両側支配, 眉頭高の高い側が対側の優位性が強い両側支配

両側支配群の静的コンプライアンスは、片側支配群と比較して有意に低下していた。さらに、非対称支配群では、眉頭高の低い側が、眉頭高の高い側と比較して静的コンプライアンスが有意に低下していた。このことは、しかめ顔筋の筋緊張が高くなる程、アブミ骨筋の筋緊張が上がる可能性を示唆している。非対称支配群の静的コンプライアンスの左右差と眉頭高の左右差は正の相関を示していることから、しかめ顔筋とアブミ骨筋は同様の運動皮質支配を受けている可能性を示している。しかし、眉毛下垂の代償による前頭筋の収縮があることから、眉頭高は個人間で大きく異なるため、眉頭高の群間の比較はできなかった。しかめ顔



筋の収縮を伴う強い閉瞼を行った際、10名中6名で鼓膜コンプライアンスが低下した。これはしかめ顔筋の収縮に伴ってアブミ骨筋も収縮する可能性を示す。強大音に対してアブミ骨筋反射で間に合わないで、人はとっさに顔をしかめてアブミ骨筋を収縮させているのかも知れない。両側支配群では、しかめ顔筋は両側の運動皮質に支配され、結果として筋緊張が強くなる。片側支配群では、しかめ顔筋は主に対側の運動皮質に支配され、筋緊張が低くなると考えられる。

【結語】片側のしかめ顔筋の収縮を伴う閉瞼と静的コンプライアンスの測定により、しかめ顔筋の筋緊張を検出できる可能性が示された。さらなる研究が必要ではあるが、しかめ顔筋の過緊張は、顔面の加齢をより進めうるかも知れない。

#### (論文審査の結果の要旨)

眼輪筋や皺眉筋などの顔をしかめる筋（以下、しかめ顔筋）が過緊張になると、眉毛の位置は下垂する。しかめ顔筋については運動皮質からの支配について十分に検討されてこなかった。アブミ骨筋としかめ顔筋の収縮は関連している可能性が複数の報告により示唆されている。本研究では、しかめ顔筋の神経支配の個人間における違い、しかめ顔筋とアブミ骨筋の神経支配の関連と、その筋緊張が同期しているか調べてある。瞼裂幅の左右差や非対称性の後天性眼瞼下垂症がなく、ティンパノグラムが正常（type A）であった71名が研究に参加した。

1. 眉頭の高さ（以下、眉頭高）が左右対称な49名で、一側のみしかめ顔筋の収縮を伴う強い閉瞼を両側で行わせ、対側の眉頭高に5%以上の変化があるか調べた。9名において両側で対側の眉頭高に5%以上の変化が認められ、しかめ顔筋は対側の優位性が

弱い両側支配であると考えられた（以下、両側支配群）。40名においては変化が認められず、しかめ顔筋は対側の優位性が強い両側支配であると考えられた（以下、片側支配群）。両側支配群の静的コンプライアンスは片側支配群より低下していた。

2. 眉頭高が非対称な12名につき、1.と同様に眉頭高の変化を調べたところ、眉頭高が高い側を強く閉瞼した際には変化が認められたが、低い側では認められなかった。静的コンプライアンスは、眉頭高が低い側が、高い側と比較して有意に低下していた。眉頭高の左右差と静的コンプライアンスの左右差は有意な正の相関を認めた。これら12名のしかめ顔筋とアブミ骨筋は、眉頭高が高い側が対側の優位性が強い両側支配、低い側が対側の優位性が弱い両側支配であると考えられた。

3. 健常成人10名につき片側のしかめ顔筋の収縮を伴う強い閉瞼を行ったところ、10名中6名で強い閉瞼に伴い同側鼓膜コンプライアンスの低下を認めた。しかめ顔筋とアブミ骨筋は同一の神経支配で収縮していると考えられた。

以上の結果より、柴は以下のような結論を得た。

- 1) しかめ顔筋の神経支配の個人間における違いは、片側の強い閉瞼を行うことで検出しうる
  - 2) しかめ顔筋とアブミ骨筋の神経支配は関連し、その筋緊張は同期している可能性がある
- 片側の強い閉瞼とアブミ骨筋の筋緊張（静的コンプライアンス）測定により、しかめ顔筋の筋緊張が評価できる可能性が示された。

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

ASC plays a role in the priming phase of the immune response to type II collagen in collagen-induced arthritis (コラーゲン誘発関節炎のII型コラーゲンに対する初期免疫反応におけるASCの役割)

## 山 崎 秀

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】関節リウマチ（RA）は、持続性の関節炎を引き起こす自己免疫異常による疾患であるが、詳細な病態は解明されていない。近年、TNF $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインが、RA の病態に関与しこれらのサイトカインを阻害する生物学的製剤により RA を寛解に導くことが可能となっている。更に RA

に関わる炎症性サイトカインとして IL-1 $\beta$  や IL-18 も重要な役割を果たしていることが明らかにされている。Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruit domain (ASC) は、IL-1 $\beta$ , IL-18が活性化される際に作用する caspase-1のアダプター分子として知られていることから、RAにおけるASCの大きな役割が示唆された。本研究の目

的は、RA のモデル動物であるコラーゲン誘発関節炎において ASC が関節炎の病態に関与しているかを明らかにし、ASC の発現低下により IL-1 $\beta$ 、IL-18 の発現が抑えられ、滑膜炎、骨・軟骨破壊が抑制されるかを検討した。

【方法】 マウスに II 型コラーゲン誘発関節炎を起こし、関節内の ASC、IL-1 $\beta$  および IL-18 の発現の有無を免疫染色の手法で確認した。次に野生型および ASC 欠失マウスに対して、II 型コラーゲン誘発関節炎を起こし、IL-1 $\beta$  および IL-18 の発現量と関節炎および骨破壊の状態を、病理組織学的評価、免疫染色および ELISA の手法で検討した。さらに、ASC が II 型コラーゲン誘発関節炎の II 型コラーゲンに対する免疫反応においてどのような役割を果たしているかを確認するために、野生型および ASC 欠失マウスに対して抗 II 型コラーゲン抗体誘発関節炎を誘導し、IL-1 $\beta$  および IL-18 の発現量と関節炎および骨破壊の程度を同様の手法で検討した。

【結果】 II 型コラーゲン誘発関節炎マウスの滑膜に ASC が IL-1 $\beta$ 、IL-18 と同様に発現しており、ASC の関与が示された。II 型コラーゲン誘発関節炎は、対照マウスに比べ ASC 欠失マウスにおいて、有意に抑制され、IL-1 $\beta$ 、IL-18 の発現も低下していた。一方、抗 II 型コラーゲン抗体誘発関節炎マウスでは、ASC 欠失マウスの関節炎は抑制されず、IL-1 $\beta$ 、IL-18 の発現は対照群と同等であった。

【結論】 IL-1 $\beta$ 、IL-18 活性化に主として関わる ASC は、II 型コラーゲン誘発性関節炎に関与しているが、抗 II 型コラーゲン抗体誘発関節炎では関与が認められなかったことから、ASC は II 型コラーゲン誘発関節炎において II 型コラーゲンに対する抗体産生以前の免疫反応初期段階で関与していることが示唆された。ASC 欠失マウスにおいても IL-1 $\beta$ 、IL-18 が発現していたことは、IL-1 $\beta$ 、IL-18 の別の活性化経路の存在を示唆するものである。実際、ASC および caspase-1 の関わらない IL-1 $\beta$ 、IL-18 活性化経路の存在が報告されている。

以上より ASC の関与する IL-1 $\beta$ 、IL-18 の上流に

関わる経路を阻害することによって、RA 病態の解明と新しい治療薬の開発につながる可能性が示された。

#### (論文審査の結果の要旨)

IL-1 $\beta$ 、IL-18 が関節リウマチ (RA) の病態に深く関与していることから、それらのサイトカインの活性化に関わる Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruit domain (ASC) もまた RA の病態に深く関与している可能性が推測される。山崎は、ASC が RA の病態に関わっている可能性を検討するために RA の実験モデルである II 型コラーゲン誘発関節炎 (CIA) および抗 II 型コラーゲン抗体誘発関節炎 (CAIA) を用いて ASC の役割を検討した。

CIA マウスの膝関節における ASC、IL-1 $\beta$ 、IL-18 の発現を、免疫染色、Western blot analysis で検討した。次に ASC 欠失マウスと野生型マウスに CIA、CAIA を誘導し関節炎の程度を組織学的に評価し、関節内の IL-1 $\beta$ 、IL-18 発現を免疫染色で評価、血中 IL-1 $\beta$  を ELISA で測定、関節内 IL-18 を fluorescent intensity で評価した。その結果、以下の結論を得た。

1. CIA マウスの滑膜に ASC が IL-1 $\beta$ 、IL-18 と同様に発現しており、ASC の関与が示された。
2. CIA では、野生型マウスに比べ ASC 欠失マウスにおいて関節炎が有意に抑制され、IL-1 $\beta$ 、IL-18 の発現も低下していた。
3. CAIA では、ASC 欠失マウスの関節炎は野生型と同様に抑制されず、IL-1 $\beta$ 、IL-18 の発現は野生型と同等であった。

IL-1 $\beta$ 、IL-18 活性化に主として関わる ASC は、CIA に関与しているが、CAIA では関与が認められなかったことから、ASC は CIA において II 型コラーゲンに対する抗体産生以前の免疫反応初期段階で関与していることが示唆された。以上より ASC の関与する IL-1 $\beta$ 、IL-18 の上流に関わる経路を阻害することによって、RA 病態の解明と新しい治療薬の開発につながる可能性が示された。主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Intravenous immunoglobulin (IVIg) with methylprednisolone pulse therapy for motor impairments of neuralgic amyotrophy : clinical observations in 10 cases (神経痛性筋萎縮症における運動症状に対するメチルプレドニゾロン大量静注療法および免疫グロブリン大量静注療法の有効性：10症例の臨床的検討)

内 藤 康 介

(論文の内容の要旨)

【目的・方法】神経痛性筋萎縮症(以下NA)は一側上肢に起こる、急性の神経原性疼痛とこれに続いて起こる筋力低下、筋萎縮をもって特徴づけられる末梢神経疾患である。腕神経叢に対する免疫反応によって引き起こされるものと考えられており、特別な治療を行わなくとも機能的予後は比較的良好と考えられていた。しかし近年の報告によるとその長期的予後は必ずしも良好とはいえない。本疾患に対しプレドニゾロンの内服が罹患期間を短縮させたとの報告はあるものの、免疫療法の有効性についてはなお確立されていない。我々は自験例のうちメチルプレドニゾロン大量静注療法およびガンマグロブリン大量静注療法が施行された10例を臨床的に検討し、本疾患の運動機能障害に対する免疫療法の有効性について検証した。

【結果】NAと診断された連続15の自験例のうち、10例でメチルプレドニゾロン大量静注療法およびガンマグロブリン大量静注療法が施行されていた。1～60カ月のフォローアップ期間において、このうち9例に運動機能の臨床的改善がみられた。これらの結果は本疾患の臨床経過について近年報告されているものより良好なものであった。

【考察】限られた症例での検討ではあるが、自験例においてメチルプレドニゾロン大量静注療法およびガンマグロブリン大量静注療法がNAの運動症状に対し有効である可能性が示唆されたものと考えられた。同時に本治療の有効性の確立には、様々な重症度や罹患期間において、より確証性の高い試験が必要と思われた。

(論文審査の結果の要旨)

神経痛性筋萎縮症(以下NA)は一側上肢に起こる、急性の神経原性疼痛とこれに続いて起こる筋力低下、筋萎縮をもって特徴づけられる末梢神経疾患である。腕神経叢に対する免疫反応によって引き起こされるものと考えられており、特別な治療を行わなくとも機能的予後は比較的良好であると考えられていた。しかし近年の報告によるとその長期的予後は必ずしも良好とはいえない。本疾患に対しプレドニゾロンの内服が罹患期間を短縮させたとの報告はあるものの、免疫療法の有効性については尚、確立されていない。本論文は自験例のうちメチルプレドニゾロン大量静注療法およびガンマグロブリン大量静注療法が施行された10例を臨床的に検討し、本疾患の運動機能障害に対する免疫療法の有効性について検証したものである。

NAと診断された連続15の自験例のうち、10例でメチルプレドニゾロン大量静注療法およびガンマグロブリン大量静注療法が施行されていた。1～60カ月のフォローアップ期間において、このうち9例に治療後短期間での運動機能の臨床的改善がみられていた。これらの結果は本疾患の臨床経過について近年報告されているものより良好なものであった。

限られた症例での検討ではあるが、今回の研究においてメチルプレドニゾロン大量静注療法およびガンマグロブリン大量静注療法がNAの運動症状に対し有効である可能性が示唆されたものと考えられた。本治療の有効性の確立には、今後様々な重症度や罹患期間においてより確証性の高い試験が必要と思われたが、NAによる上肢機能の低下はADLを著しく障害するものであり、早期に本治療を施行する重要性を示唆する知見が得られたものと判断する。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。



## Functional correlation between olfaction and various sectioning of the lateral olfactory tract (外側嗅索切断と嗅覚機能の相関)

関 口 泰 之

### (論文の内容の要旨)

【目的】嗅覚情報は嗅球から外側嗅索を經由して、周辺の嗅皮質へ伝えられる。しかし、外側嗅索の傷害部位と嗅覚機能の関係に関してはこれまでに知見が得られていない。そこで、外側嗅索を様々なレベルで切断し、個々の外側嗅索切断ラットの嗅覚機能を調べ、無嗅覚をきたす外側嗅索傷害部位の同定を行った。

### 【方法】

- (1) 嗅皮質のマッピング：嗅球から入力投射を受ける脳領域を正確にマッピングするために、嗅球に順行性の神経トレーサー Biotinylated dextran amine (BDA-10000) を注入し、3日後に還流固定し、脳を採取した。嗅球・脳の連続凍結切片を作成し、DAB 反応により BDA 陽性の嗅球由来の神経線維を可視化し、嗅皮質のマッピングを行った。
- (2) 手術：成熟ラットの右側の嗅球を吸引除去し、左側の外側嗅索を嗅球後端から中大脳動脈までの様々なレベルで鋭利に切断した。
- (3) 嗅覚機能検査：3日間絶水させたのち、水と0.01% シクロヘキシミド溶液を用いて、嗅覚機能(olfactory discrimination test) を調べた。
- (4) 外側嗅索切断部の計測と神経トレーサーによる完全切断の確認：嗅覚機能検査後、外側嗅索が完全に切断されていることを確認する目的で、左嗅球に順行性の神経トレーサーを注入した。3日後に還流固定を行い、脳を採取した。0.1 mm スケールのマイクロメジャーを用いて、中大脳動脈から外側嗅索切断部までの距離を計測した。

### 【結果】

- (1) 嗅球から入力投射を受ける脳領域を正確にマッピングすることができ、前嗅核・嗅結節・梨状皮質を中心とした広汎な脳領域が同定された。
- (2) 嗅覚 (-) ラット (嗅覚識別の正解率：48% ± 1%) の外側嗅索切断部位は、中大脳動脈より前方 2.5-4.2 mm (n=10) であり、嗅覚 (+) ラット (嗅

覚識別の正解率：83% ± 1%) の外側嗅索切断部位は、中大脳動脈より前方 0.8-2.4 mm (n=8) であった。

【結論】中大脳動脈から約 2.5 mm の外側嗅索は、その近傍の傷害により嗅覚機能の有無を左右する重要な部位であると結論された。また、嗅覚機能維持に最低限必要な大脳皮質 (嗅皮質) のサイズは、1側の嗅球後端から約 2.5 mm の比較的狭い領域で十分機能するものと推定された。

### (論文審査の結果の要旨)

本研究で関口は、外側嗅索を經由して嗅球からの投射線維を受ける脳領域について、神経トレーサーを用いて詳細な解析を行った。さらに、様々なレベルで外側嗅索を切断した実験動物を作成し、外側嗅索の切断部位と嗅覚機能の関係を明らかにすることを目的として研究を行った。

その結果、関口は次の結論を得た。

1. 順行性神経トレーサーの嗅球注入により、嗅球からの入力投射を受ける広汎な脳領域 (前嗅核・嗅結節・梨状皮質) が同定され、脳表面上に正確に嗅皮質をマッピングすることができた。
2. 嗅覚 (-) ラットの外側嗅索切断部位は、中大脳動脈より前方 2.5-4.2 mm (n=10) であり、嗅覚 (+) ラットの外側嗅索切断部位は、中大脳動脈より前方 0.8-2.4 mm (n=8) であった。
3. 中大脳動脈から約 2.5 mm の外側嗅索は、その近傍の傷害により嗅覚機能の有無を左右する重要な部位であった。

以上により、ラット嗅皮質が正確に同定され、さらに嗅覚機能維持に最低限必要な大脳皮質 (嗅皮質) のサイズは、1側の嗅球後端から約 2.5 mm の比較的狭い領域で十分に機能することが明らかになった。生物学的にも臨床医学的にも意義があるものと考えられ、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Essential role of gastric gland mucin in preventing gastric cancer in mice (マウスの胃発癌を抑える胃腺粘液の持つ必須の役割)

唐 澤 文 寿

(論文の内容の要旨)

【目的と背景】胃粘膜の深層から分泌される腺粘液には非還元末端に  $\alpha 1, 4$  結合したN-アセチルグルコサミン ( $\alpha\text{GlcNAc}$ ) 残基を有するO-グリカンが含まれている。この  $\alpha\text{GlcNAc}$  残基を有するO-グリカンはピロリ菌に対して細胞壁の構成要素であるコレステリル- $\alpha$ -D-グルコピラノシドの生合成を妨げることによりピロリ菌の増殖を妨げることが明らかにされている。しかしながら、 $\alpha\text{GlcNAc}$  残基の生体内における役割は不明であった。本研究では  $\alpha\text{GlcNAc}$  の持つ生物学的機能を個体レベルで解明するため、 $\alpha\text{GlcNAc}$  の生合成に関わる糖転移酵素である  $\alpha 1, 4$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 ( $\alpha 4\text{GnT}$ ) をコードする *A4gnt* 遺伝子を破壊した *A4gnt* ノックアウトマウス (*A4gnt* KO マウス) を作出し、病理学的な検討を行った。併せてヒトの胃分化型腺癌および胃腺種の病理標本に対する組織化学的検討を行い、腫瘍における  $\alpha\text{GlcNAc}$  の発現意義について検討した。【方法】マウス *A4gnt* 遺伝子の翻訳領域は exon2 と exon3 に存在することから、exon2 から intron を含み exon3 の翻訳領域までを PGK-neo カセット置換、さらにその5'-flanking region にジフテリア毒素 A カセットを付けたターゲティングベクターを構築し、相同組み換えを行うことで、マウス *A4gnt* 遺伝子座の片側アレルが欠損した ES 細胞株を樹立した。この ES 細胞を C57BL/6 マウスの初期胚に注入した後、仮親の子宮に移植、キメラマウスを得た。さらに、キメラマウス同士を交配することで、*A4gnt* KO マウスを作出した。*A4gnt* KO マウスの胃粘膜に対して、抗  $\alpha\text{GlcNAc}$  抗体である HIK1083 による免疫染色、ならびに MALDI-TOF-MS により  $\alpha\text{GlcNAc}$  の発現の有無を解析した。*A4gnt* KO マウスと野生型マウスを対象に、5 週齢および10週齢以降10週ごとに60週齢までのマウスから胃を摘出し、病理学的検討を行った。また5 週齢、10週齢および50週齢の固体の胃粘膜から採取した total RNA より得た cDNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、この結果をもとに同週齢固体の胃粘膜パラフィン切片より得た total RNA に対する定量 PCR を行った。さらに、COX-2阻害薬投与

の影響についても検討した。一方、ヒトの胃高分化型腺癌標本54検体および胃腺種標本12検体に対して免疫組織学的手法にて  $\alpha\text{GlcNAc}$  とそのコア蛋白である MUC6 の発現を評価した。

【結果】免疫染色ならびに MALDI-TOF-MS により *A4gnt* KO マウスの胃粘膜で  $\alpha\text{GlcNAc}$  の欠損が確認され、 $\alpha 4\text{GnT}$  が  $\alpha\text{GlcNAc}$  の生合成に関わる唯一の糖転移酵素であることが示された。次に、*A4gnt* KO マウスの胃粘膜では週齢を重ねるにしたがって肉眼的に幽門部粘膜の肥厚が顕著となった。マウスの解剖1時間前に BrdU を腹腔内投与し、BrdU に対する免疫染色を行って細胞分裂 S 期の細胞数および陽性率を検討したところ、胃粘膜における BrdU 陽性細胞数は10週齢以上の固体において *A4gnt* KO マウスで有意差 ( $P < 0.01$ ) をもって増加していた。BrdU 標識率も30週齢以上で *A4gnt* KO マウスが野生型マウスを上回っており、とりわけ40・50週では有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた。組織学的には5 週齢ですでに幽門部粘膜に過形成を認め、10週齢では軽度異形成を、20週齢では高度異形成を示し、30週齢からは一部固体にて高分化型腺癌を、50週齢以上では全固体に高分化型腺癌が認められた。これら結果から  $\alpha\text{GlcNAc}$  は胃の分化型腺癌の発生に対して抑制的に作用していることが示された。一方、ヒトの胃分化型腺癌標本および胃管状腺腫の病理組織検体に対する免疫染色の結果、病変部では MUC6 の発現と比較し、 $\alpha\text{GlcNAc}$  の発現低下あるいは消失が確認され、このことから  $\alpha\text{GlcNAc}$  がヒトにおいても胃分化型腺癌の発症に対して抑制的に作用していることが示唆された。

*A4gnt* KO マウスならびに野生型マウスの胃粘膜を対象にマイクロアレイおよび定量 PCR を用いて比較分析した結果、*A4gnt* KO マウスでは野生型マウスと比較して、*Ccl2*, *Cxcl1*, *Cxcl5* などの炎症性ケモカイン、*Il-1b* や *Il-11* などのサイトカイン、さらには胃 *Hgf* や *Fgf7* などの成長因子などが有意に多く発現していることが明らかになった。実際に *A4gnt* KO マウス胃粘膜中の単核球および好中球の浸潤についてスコア化して検討したところ、週齢を重

ねるにしたがってより多くの炎症性細胞が遊走していることが確認された。また5週齢および50週齢の検体に対してCD31陽性細胞数をカウントすることで血管新生の評価を行うと、50週齢では野生型マウスに比べて*A4gnt* KOマウスで有意差 ( $P < 0.01$ ) をもってCD31陽性細胞数の増加が確認され、*A4gnt* KOマウスにおいて血管新生が亢進していることが示された。これら結果は*A4gnt* KOマウスの胃粘膜において炎症を介した発癌機序が働いていることを示していると考えられた。しかしながら、*A4gnt* KOマウスに対してCOX-2阻害薬を投与しても有意な組織像の改善は認められなかった。

【結論】*A4gnt* KOマウスでは胃において分化型腺癌の発症が確認された。マイクロアレイおよび定量PCRでの検討では、炎症を介した発癌に関与する遺伝子の発現が野生型マウスと比較して*A4gnt* KOマウスで有意に増加しており、 $\alpha$ GlcNAcの欠損が胃粘膜における炎症を介した発癌の引き金となっていることが示された。それゆえ $\alpha$ GlcNAc残基を有する胃腺粘液はピロリ菌の増殖を抑えるのみならず、胃粘膜において炎症を介した発癌を阻害することにより胃分化型腺癌の発症を抑制するという二重の役割を担っていることが明らかとなった。

#### (論文審査の結果の要旨)

胃腺粘液には非還元末端に $\alpha$ 1, 4結合したN-アセチルグルコサミン ( $\alpha$ GlcNAc) 残基を有するO-グリカンが存在しているが、これまで $\alpha$ GlcNAcの個体レベルでの役割は不明であった。本研究ではこの点を明らかにするため、 $\alpha$ GlcNAcの生合成に関与する糖転移酵素である $\alpha$ 1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素( $\alpha$ 4GnT)をコードする*A4gnt* 遺伝子を破壊した*A4gnt* ノックアウトマウスを作出し、*A4gnt* ノックアウトマウスと野生型マウスとの間で以下の手法を用いて病理組織学的検討を加えた。すなわち、① $\alpha$ GlcNAcに特異的な抗体であるHIK1083による免疫染色ならびに質量分析による表現型の検討、②幽門腺粘膜厚測定および有意差検定と幽門腺粘膜の病理組織所見検討、③抗BrdU抗体による免疫染色を行い、細胞増殖能を評価、④DNAマイクロアレイおよび定

量PCRによる発現遺伝子の評価、⑤幽門腺粘膜における炎症性細胞浸潤および血管新生の比較検討。⑥COX-2阻害薬経口投与個体に対する幽門腺粘膜厚の検討、の6項目である。一方、ヒトの胃分化型腺癌標本および胃管状腺腫標本に対して腺粘液のコアタンパクであるMUC6ならびに $\alpha$ GlcNAcに対する免疫染色を行い、両者の発言を比較解析した。

その結果、唐澤文寿は次の結論を得た。

1. *A4gnt* ノックアウトマウスでは胃腺粘液中の $\alpha$ GlcNAcが完全に欠損しており、*A4gnt* 遺伝子がコードする $\alpha$ 4GnTが、 $\alpha$ GlcNAcの生合成に関する唯一の糖転移酵素であることが示された。
2. *A4gnt* ノックアウトマウスの胃幽門腺粘膜は週齢が同じ野生型マウスと比較し有意に厚く、病理組織学的には過形成・異形成を経て分化型腺癌が発症した。
3. *A4gnt* ノックアウトマウスの胃幽門腺粘膜では野生型マウスに比べてBrdUで標識されたS期の細胞数が有意に増加していた。
4. ヒトの胃分化型腺癌および胃管状腺腫標本でも胃腺粘液の発現と比較して $\alpha$ GlcNAcの減少ないしは消失がみられた。
5. DNAマイクロアレイおよび定量PCRの結果、*A4gnt* ノックアウトマウスの胃粘膜では*Cxcl1*, *Ccl2*, *Cxcl5*からなるケモカイン、*Il1b*, *Il11*からなる炎症性サイトカイン、および*Hgf*, *Fgf7*からなる成長因子などの発現が増加していた。
6. *A4gnt* ノックアウトマウスの幽門腺粘膜では炎症性細胞の浸潤や血管新生が亢進していた
7. *A4gnt* ノックアウトマウスの炎症性病変に対するCOX-2阻害薬の抑制効果は認められなかった。

これらの結果より、*A4gnt* ノックアウトマウスでは胃幽門腺粘膜において炎症を介して分化型腺癌が発症することが示された。 $\alpha$ GlcNAcは胃分化型腺癌の発症を抑制する作用のあることが明らかになったことから、 $\alpha$ GlcNAcに対する更なる研究は今後、胃癌の新たな予防法や治療法の開発に寄与できるものと期待される。よって、主査、副査は一致して本論分を学位論文として価値があるものと認めた。



PPAR $\alpha$  is down-regulated following liver transplantation in mice (マウスにおいて  $\alpha$ 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の発現は肝移植後に低下する)

中 川 幹

(論文の内容の要旨)

【目的】 グラフト肝の機能不全は肝移植後の重大な合併症の一つであり、その病態を理解することが肝移植成績の向上につながると考えられているが、グラフト肝で生じる移植後の様々な変化とその分子機構は未だ不明である。脂肪肝をグラフトに用いると移植後に機能不全に陥りやすいこと、そして  $\alpha$ 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ ) が肝臓における脂質代謝に重要な役割を担っていることから、PPAR $\alpha$  が肝移植後の代謝変化に影響を与えているのではないかと予想した。今回我々はマウスモデルを用いて、肝移植における PPAR $\alpha$  の役割を検証した。

【方法】 野生型および PPAR $\alpha$  欠損オスマウス (12週齢, Sv/129系統) から同系の野生型オスマウスに同所性に肝臓を移植し、移植後 1, 3, 6 日目のグラフト肝を組織学的, 生化学的手法を用いて解析した。

【結果】 肝細胞の傷害は PPAR $\alpha$  欠損マウスのグラフト肝を用いた群の方が野生型マウスのグラフト肝を用いた群よりも軽度であった。PPAR $\alpha$  欠損マウスの肝臓では、野生型に比べて移植後の過酸化脂質含量が少なかった。この理由として、PPAR $\alpha$  の標的遺伝子であり酸化ストレスの主な発生源でもある脂肪酸  $\beta$ 酸化系酵素 (acyl-CoA oxidase, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase など) の発現量が PPAR $\alpha$  欠損マウスで定常的に低いことが考えられた。実際、野生型マウスのグラフト肝において、PPAR $\alpha$  やこれらの脂肪酸  $\beta$ 酸化系酵素の発現は経時的に減少し、移植後 6 日目では移植前の 30%程度にまで減少していた。移植後の PPAR $\alpha$  の低下は、炎症反応を制御する転写因子である nuclear factor- $\kappa$ B の活性増加とそれに伴う tumor necrosis factor- $\alpha$  の発現増加に関連しているものと考えられた。これらの結果から、移植後の PPAR $\alpha$  の低下は酸化ストレスを極力減らそうとする適応反応であると予測し、PPAR $\alpha$  活性化剤であるクロフィブレートを持続投与したマウスの肝臓を移植する実験をさらに行った。クロフィブレート投与は移植後の PPAR $\alpha$  低下を阻害し、過酸化脂質量を著明に増大させ、移植後の肝細胞壊死とアポトーシスを増悪さ

せた。このようなクロフィブレートの作用は PPAR $\alpha$  依存的に観察された。

【結論】 グラフト肝では移植後数日の経過で PPAR $\alpha$  とその下流遺伝子の発現が著明に低下する。この代謝変化は肝臓での酸化ストレスを最小限にしようとする適応反応であると考えられた。さらに移植後の PPAR $\alpha$  低下を阻害する因子はグラフト肝に傷害を与えうることが示唆された。これらの結果は、移植後の肝臓で生じる代謝変化を理解する上で、重要な知見を提示するものと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

グラフト肝の機能不全は肝移植後の重大な合併症の一つであり、その病態を理解することが肝移植成績の向上につながると考えられているが、グラフト肝で生じる移植後の様々な変化とその分子機構は未だ不明である。脂肪肝をグラフトに用いると移植後に機能不全に陥りやすいこと、そして  $\alpha$ 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ ) が肝臓における脂質代謝に重要な役割を担っていることから、PPAR $\alpha$  が肝移植後の代謝変化に影響を与えているのではないかと予想した。今回我々はマウスモデルを用いて、肝移植における PPAR $\alpha$  の役割を検証した。

野生型および PPAR $\alpha$  欠損オスマウス (12週齢, Sv/129系統) から同系の野生型オスマウスに同所性に肝臓を移植し、移植後 1, 3, 6 日目のグラフト肝を組織学的, 生化学的手法を用いて解析した。

その結果、中川 幹は次の結論を得た。

1. 肝細胞の傷害は PPAR $\alpha$  欠損マウスのグラフト肝を用いた群の方が野生型マウスのグラフト肝を用いた群よりも軽度であった。
2. PPAR $\alpha$  欠損マウスの肝臓では、野生型に比べて移植後の過酸化脂質含量が少なかった。この理由として、PPAR $\alpha$  の標的遺伝子であり酸化ストレスの主な発生源でもある脂肪酸  $\beta$ 酸化系酵素 (acyl-CoA oxidase, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase など) の発現量が PPAR $\alpha$  欠損マウスで定常的に低いことが考えられた。
3. 野生型マウスのグラフト肝において、PPAR $\alpha$  や

これらの脂肪酸  $\beta$ 酸化系酵素の発現は経時的に減少し、移植後6日目では移植前の30%程度にまで減少していた。

4. 移植後の PPAR $\alpha$  の低下は、炎症反応を制御する転写因子である nuclear factor- $\kappa$ B の活性増加とそれに伴う tumor necrosis factor- $\alpha$  の発現増加に関連しているものと考えられた。
5. PPAR $\alpha$  活性化剤であるクロフィブレートを持続投与したマウスの肝臓を移植する実験をさらに行ったが、クロフィブレート投与は移植後の PPAR $\alpha$  低下を阻害し、過酸化脂質量を著明に増大させ、移植後の肝細胞壊死とアポトーシスを増悪させた。こ

のようなクロフィブレートの作用は PPAR $\alpha$  依存的に観察された。

グラフト肝では移植後数日の経過で PPAR $\alpha$  とその下流遺伝子の発現が著明に低下したが、この代謝変化は肝臓での酸化ストレスを最小限にしようとする適応反応であると考えられた。さらに移植後の PPAR $\alpha$  低下を阻害する因子はグラフト肝に傷害を与えることが示唆された。これらの結果は、移植後の肝臓で生じる代謝変化を理解する上で、重要な知見を提示するものと考えられた。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### Alteration of Y-box Binding Protein-1 Expression Modifies the Response to Endocrine Therapy in Estrogen Receptor Positive Breast Cancer (エストロゲン受容体陽性乳癌において、YB-1発現の変化が内分泌療法剤に対する感受性を変化させる)

伊藤 勅子

#### (論文の内容の要旨)

【背景】 Y-Box binding protein-1 (以下 YB-1) は、細胞に加わる様々なストレスに応答する転写因子である。YB-1は定常状態では大部分が細胞質に存在するが、抗癌剤や紫外線などの刺激により核内へ移行する。抗癌剤耐性や増殖因子発現調節など癌細胞の様々な性質や悪性度に関与していることが示されており、乳癌の臨床検体での解析でもその発現と予後との相関が最近報告されている。今回、エストロゲン受容体 (以下 ER) 陽性の乳癌細胞において、YB-1が ER や上皮細胞増殖因子受容体 (以下 EGFR) family の発現や、ER や増殖因子受容体を介するシグナル伝達に及ぼす作用を解析し、また ER 陽性乳癌で YB-1発現を変化させることで、内分泌療法剤に対する感受性に変化が誘導されるか検討した。

【方法】 ER 陽性乳癌細胞株 MCF7に YB-1遺伝子を導入した YB-1過剰発現細胞株 (YB-1-MCF7)、およびvectorのみを導入した対照細胞株 (MCF7-vector) を樹立した。これらの細胞株を用いて、YB-1導入による ER $\alpha$ 、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 型 (HER2)、シグナル伝達に関与するタンパク発現の変化を Western blot 法で、抗エストロゲン剤に対する感受性を WST 法で、さらに薬剤により誘導されるアポトーシスおよび細胞周期制御や抗エストロゲン剤投与時の MCF7-YB-1と MCF7-vector でのシグナル伝達経路のタンパク発現およびリン酸化の違いやエストロゲン

応答エレメント (以下 ERE) 活性をそれぞれ解析した。また、wild-type MCF7細胞の内因性 YB-1を siRNA を用いて抑制 (knock down) した際のタンパク発現の変化を解析した。さらに、術前化学療法を施行した症例の乳癌組織で化学療法前後でのタンパク発現を免疫染色で解析した。

#### 【結果】

- 1) MCF7-YB-1では MCF7-vector に比べ、ER $\alpha$  発現は低下し AIB1, HER2, リン酸化 Erk (p-Erk), total Akt, c-Myc の発現が増加していた。逆に siRNA を用いた wild-type MCF7の内因性 YB-1 発現抑制により、ER $\alpha$  の増加, p-Erk, c-Myc, AIB1の低下が認められた。
- 2) 選択的エストロゲン受容体 modulator である tamoxifen (TAM) と選択的エストロゲン受容体 down regulator である fulvestrant (FUL) を投与した際の増殖抑制効果は、MCF7-YB-1では MCF7-vector に比べ増殖抑制の低下を認めた。特に FUL で増殖抑制の低下が著明であった。さらに、MCF7-YB-1では TAM または FUL により誘導されるアポトーシスと G1 arrest の抑制が認められた。
- 3) TAM や FUL を投与した際の諸因子の発現は、FUL投与により ER $\alpha$  は MCF7-YB-1, MCF7-vector のどちらにおいても低下していたが、MCF7-YB-1 では、TAM または FUL 投与時も AIB1, HER2, c-Myc, p-Erk 発現の増加が持続していた。

- 4) YB-1導入によりMCF7のERE活性は約50%低下していた。TAM添加時のERE活性の低下はMCF7-YB-1とMCF7-vectorで差を認めなかったが、MCF7-YB-1はより低濃度(1nM)のFULでERE活性の有意な抑制が認められた。
- 5) 術前化学療法を行ったER陽性乳癌23例の臨床検体を用いた解析では9例で化学療法施行後に核でのYB-1発現が認められ、YB-1の核での発現とHER2発現に有意な相関が認められた。

#### 【考察】

- 1) YB-1発現の増加によりHER2やその下流の因子の発現やリン酸化の増加が、YB-1発現の抑制によりこれらの因子の低下が認められたことからYB-1が増殖因子受容体経路を介したシグナル伝達を活性化させることで細胞増殖を促進していると考えられた。
- 2) YB-1を強制発現させたMCF7では、HER2およびAIB1発現の増加と抗エストロゲン剤に対する感受性の低下(耐性)が誘導されたことからYB-1の発現がER陽性乳癌細胞の抗エストロゲン剤に対する耐性の獲得に関与している可能性が考えられた。
- 3) YB-1を強制発現させたMCF7では、ERE活性が低下しているにも関わらず抗エストロゲン剤に対する感受性が低下していた。YB-1がER陽性乳癌細胞のER経路と増殖因子受容体(HER2/EGFR)経路とのcrosstalkにおいて、増殖因子受容体経路をより活性化させることで乳癌細胞をER依存性からER非依存性に変化させ、抗エストロゲン剤に対する耐性を誘導している可能性が推測された。
- 4) 化学療法剤などのストレスでYB-1の核移行または発現が増加することによりER陽性乳癌細胞の抗エストロゲン剤に対する感受性に変化が誘導される可能性が考えられた。

#### (論文審査の結果の要旨)

Y-Box binding protein-1 (YB-1) はストレスに応答する転写因子であり、抗癌剤耐性や増殖因子発現など癌細胞の悪性度に関与しているが、乳癌内分泌療法剤の感受性との関連についてはこれまで明らかにされていない。本研究では、エストロゲン受容体(ER)陽性乳癌で、YB-1がERや上皮細胞増殖因子

受容体(EGFR) familyの発現やそれらを介するシグナル伝達に及ぼす作用、ならびに内分泌療法剤の感受性に及ぼす影響について検討した。

ER陽性乳癌細胞株MCF7にYB-1遺伝子を導入した過剰発現細胞株(YB-1-MCF7)、およびvectorを導入した対照細胞株(MCF7-vector)を樹立し、関連因子の発現や抗エストロゲン剤に対する感受性、誘導されるアポトーシスおよび細胞周期制御の変化や、エストロゲン応答エレメント(ERE)活性を解析した。また、wild-type MCF7の内因性YB-1をsiRNAで抑制した際のタンパク発現の変化を解析し、さらに、術前化学療法を施行した乳癌組織を免疫染色で解析した。

その結果、今回の研究で次の結果を得た。

1. MCF7-YB-1では、ER $\alpha$ 発現低下、AIB1、HER2、リン酸化Erk(p-Erk)、total Akt、c-Myc発現が増加していた。逆にsiRNAを用いたwild-type MCF7の内因性YB-1発現抑制により、ER $\alpha$ の増加、p-Erk、c-Myc、AIB1の低下が認められた。
2. MCF7-YB-1ではtamoxifen(TAM)とfulvestrant(FUL)による増殖抑制の低下を認めた。さらに、MCF7-YB-1ではTAMまたはFULにより誘導されるアポトーシスとG1 arrestの抑制が認められた。
3. MCF7-YB-1では、TAMまたはFUL投与時もAIB1、HER2、c-Myc、p-Erk発現の増加が持続していた。
4. YB-1導入によりMCF7のERE活性の低下が認められ、MCF7-YB-1はより低濃度のFULでERE活性の有意な抑制が認められた。
5. 術前化学療法を行ったER陽性乳癌臨床検体を用いた解析では、化学療法後のYB-1の核での発現とHER2発現に有意な相関が認められた。

これらの結果から、YB-1がER陽性乳癌で増殖因子受容体経路を活性化させることで、乳癌細胞をER依存性からER非依存性に変化させ、抗エストロゲン剤に対する耐性を誘導してい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。



Involvement of pelvic inflammation-related mismatch repair abnormalities and microsatellite instability in the malignant transformation of ovarian endometriosis (卵巣子宮内膜症の悪性転化における骨盤炎症に関連するミスマッチ修復異常とマイクロサテライト不安定性の関与)

布施谷 千穂

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】子宮内膜症は、子宮以外に子宮内膜組織が増殖する疾患で、生殖可能年齢女性の約10%に認められる。中でも、卵巣に発生する卵巣子宮内膜症は、月経様の出血がチョコレート状の液体として貯留する良性腫瘍である。しかし、これまでに卵巣子宮内膜症から発生したと考えられる卵巣癌（主に明細胞腺癌と類内膜腺癌）の症例が報告されており、卵巣子宮内膜症は癌化する可能性があるとしてされている。近年の研究で、卵巣子宮内膜症から卵巣癌への悪性転化においていくつかの分子生物学的異常（p53異常、PTEN 突然変異、K-ras 突然変異、HNF-1 $\beta$  高発現）が報告されているが、未だ詳細は不明である。

子宮内膜症は形態学的、内分泌学的特徴から、発癌過程における子宮内膜癌との類似性が示唆される。子宮内膜癌は、発生の初期に DNA 複製時のエラーを修復するミスマッチ修復 (mismatch repair; MMR) 蛋白異常が関与しており、その結果マイクロサテライト DNA リピート数が増加し、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability; MSI) 陽性となり、癌化するとされている。子宮内膜症は子宮内膜組織から構成されることから、その癌化過程に MMR 機構の異常が関与していることが推測される。また、骨盤内炎症性疾患が、卵巣癌発生に役割を果たすとされているが、卵巣子宮内膜症の癌化において、子宮内膜症によって誘導される局所炎症が、MMR 機構の異常と関与しているかはこれまで検討されていない。

そこで、卵巣子宮内膜症の悪性化の要因を MMR 機構に着目し、その発癌過程に関連する分子病理学的因子を明らかにすることを目的とした。

【方法】

① 正所性子宮内膜30例、卵巣子宮内膜症27例、子宮内膜症合併卵巣癌（子宮内膜症と癌が共存し、子宮内膜症から癌への移行像が認められた症例）25例、卵巣癌39例（明細胞腺癌14例、類内膜腺癌12例、漿液性腺癌13例）における、MMR 機能蛋白である hMLH1 と hMSH2 蛋白発現と増殖マーカーである Ki-67 蛋白発現を免疫組織染色で検討した。

- ② 免疫組織染色を行った症例のうち卵巣子宮内膜症27例、子宮内膜症合併卵巣癌12例、卵巣癌23例（明細胞腺癌10例、類内膜腺癌7例、漿液性腺癌6例）からマイクロダイゼクション法にて DNA を抽出し、MSI の有無を解析した。（MSI は5カ所のマーカーで解析し、不安定性が2カ所以上の部位で認められた場合 MSI-H (high)、不安定性が1カ所で認められた場合あるいは不安定性が認められなかった場合 MSI-S (stable) と分類した。）
- ③ MSI 検討症例で、MMR 機構異常に関連する TGF- $\beta$ RII, PTEN, BAX, hMSH6 と HNF-1 $\beta$  遺伝子 (MSI ターゲット遺伝子) におけるモノヌクレオチドリピート変異の有無を解析した。
- ④ MSI-H 症例と MSI-S 症例で、方法③のモノヌクレオチドリピートを含まない領域における PTEN 遺伝子変異の頻度を比較した。
- ⑤ MSI-H 症例と MSI-S 症例で、年齢、腫瘍径、症状出現から手術までの期間、血清 CA125 レベル、白血球数、血清 CRP レベル、MMR 蛋白発現を比較検討した。

【結果】

- ① hMLH1 と hMSH2 蛋白発現は、正所性子宮内膜、卵巣子宮内膜症、子宮内膜症合併卵巣癌の内臓部分、癌部分、卵巣癌の順に減少していた。hMLH1 および hMSH2 と Ki-67 タンパク発現は、正所性子宮内膜で強い相関関係が認められたが、卵巣子宮内膜症では相関関係が認められなかった。
- ② MSI-H の頻度は、正所性子宮内膜 0% (0/6)、卵巣子宮内膜症 14.8% (4/27)、子宮内膜症合併卵巣癌の内臓部分 16.7% (2/12)、癌部分 25% (3/12)、明細胞腺癌 40% (4/10)、類内膜腺癌 42.9% (3/7)、漿液性腺癌 0% (0/6) であり、正所性子宮内膜と比較して卵巣子宮内膜症で、卵巣子宮内膜症と比較して明細胞腺癌と類内膜腺癌で有意に高値であった。また、MSI と MMR 蛋白発現の関連を解析したところ、子宮内膜症合併卵巣癌の癌部分で MSI 陽性であった6例中2例において、内臓部分と癌部分ともに MMR 蛋白発現が低下し

ており、同じ部位で MSI が検出された。

- ③ MSIターゲット遺伝子のモノヌクレオチドリピート変異は、*TGF-βRII* 遺伝子において MSI-H 子宮内膜症合併明細胞腺癌 1 例の癌部分のみで認められた。*PTEN*, *BAX*, *hMSH6* と *HNF-1β* 遺伝子では認められなかった。
- ④ *PTEN* 遺伝子変異は、MSI-H 症例で、卵巣子宮内膜症 25% (1/4), 子宮内膜症合併卵巣癌の内臓部分 100% (2/2), 癌部分 66.7% (2/3), 明細胞腺癌 25% (1/4), 類内膜腺癌 33.3% (1/3) であった。MSI-S 症例では、卵巣子宮内膜症 8.3% (1/12), 子宮内膜症合併卵巣癌の内臓部分 0% (0/10), 癌部分 0% (0/9), 明細胞腺癌 0% (0/4), 類内膜腺癌 25% (1/4), 漿液性腺癌 0% (0/3) で、*PTEN* 遺伝子変異の頻度は、MSI-S 症例と比較して MSI-H 症例で有意に高値であった。
- ⑤ MSI と臨床病理学的背景を比較すると、年齢、腫瘍径、症状出現から手術までの期間、血清 CA125 レベルに有意差はなかったが、MSI-H 症例で白血球数と CRP レベルが有意に高値であり、hMLH1 および hMSH2 蛋白発現は有意に低値であった。

【結論】子宮内膜症において MMR 機構の異常が存在し、骨盤内炎症によって誘導される MMR 機構の異常が子宮内膜症から卵巣癌への発癌過程に関与する可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

子宮内膜症は、子宮以外に子宮内膜組織が増殖する婦人科疾患である。特に卵巣に発生する卵巣子宮内膜症は良性腫瘍であるが、近年卵巣癌（主に明細胞腺癌と類内膜腺癌）へ悪性転化すると報告されている。その分子生物学的異常がいくつか報告されているが、未だ詳細は不明である。

子宮内膜症は形態学的、内分泌学的特徴から、発癌過程における子宮内膜癌との類似性が推察される。子宮内膜癌は、発生初期にミスマッチ修復 (MMR) 蛋白異常が関与しており、その結果 microsatellite instability (MSI) 陽性となり癌化するとされている。また、骨盤内炎症が卵巣癌発生に関与するとされているが、卵巣子宮内膜症の癌化において、子宮内膜症に

よって誘導される局所炎症が、MMR 機構の異常に関与しているかは不明である。

そこで、卵巣子宮内膜症の悪性化の要因を MMR 機構に着目し、その発癌過程に関連する分子病理学的因子を明らかにするために、正所性子宮内膜 30 例、卵巣子宮内膜症 27 例、子宮内膜症合併卵巣癌 25 例、卵巣癌 39 例における、MMR 機能蛋白である hMLH1 と hMSH2 の発現と増殖マーカーである Ki-67 発現を免疫組織染色にて検討した。さらに、MSI を含む MMR 機構異常と *PTEN* 点突然変異、臨床病理学的因子との関連を解析した。(MSI-H; MSI 2 カ所以上, MSI-S; MSI 1 カ所あるいはなし)

その結果、布施谷は次の結論を得た。

1. MMR 蛋白発現は、正所性子宮内膜、卵巣子宮内膜症、子宮内膜症合併卵巣癌の内臓部分、癌部分、卵巣癌の順に減少していた。MMR と Ki-67 蛋白発現は、正所性子宮内膜で相関関係を認めたが、卵巣子宮内膜症では認めなかった。
2. MSI-H の頻度は、正所性子宮内膜と比較して卵巣子宮内膜症で、卵巣子宮内膜症と比較して明細胞腺癌と類内膜腺癌で有意に高値であった。
3. 子宮内膜症合併明細胞腺癌 2 例では、内臓部分と癌部分ともに MMR 蛋白発現が低下し、同じ部位で MSI が検出された。
4. 検討症例における MSI ターゲット遺伝子候補では、有意なモノヌクレオチドリピート変異を認めなかった。
5. *PTEN* 点突然変異は、卵巣子宮内膜症、子宮内膜症合併卵巣癌の内臓部分、癌部分で観察され、MSI-H 症例で MSI-S 症例と比較して有意に高値であった。
6. MSI と臨床病理学的背景を比較すると、MSI-H 症例で白血球数と CRP 値が有意に高く、MMR 蛋白発現は有意に低値であった。

以上の結果より、子宮内膜症では MMR 機構の異常が存在し、骨盤内炎症によって誘導される MMR 機構の異常が子宮内膜症から卵巣癌への発癌過程に関与す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。

Lower expression of HNF4 $\alpha$  and PGC1 $\alpha$  might impair rifampicin-mediated CYP3A4 induction under conditions where PXR overexpressed in human fetal liver cells (HNF4 $\alpha$  および PGC1 $\alpha$  の低発現が要因と考えられる PXR 過剰発現ヒト胎児肝細胞におけるリファンピシンによる CYP3A4 の誘導障害)

竹 澤 崇

(論文の内容の要旨)

【目的】妊婦に対して薬物療法を行う場合、薬物が胎児に与える影響の有無を予測することは重要であるが、薬物の胎児への影響を臨床試験で検討することは倫理的に不可能であり、実験動物による毒性試験等で代替されている。しかし、薬物代謝酵素の発現量や性質には種差が存在するため、酵素誘導や阻害、催奇形性の予測は動物実験のみでは不十分である。したがって、ヒト胎児に対する薬物の影響を予測し得る系の確立が必要である。その一つとして、ヒト胎児肝細胞 (HFL 細胞) を用いる試験モデルが有用と考えられるが、ヒト胎児由来の培養細胞を用いた薬物代謝研究はほとんど行われていない。Matsunagaら (*Biochem Biophys Res Commun* 318: 428-434, 2004) は、HFL 細胞の CYP3A4 はデキサメタゾンにより強く誘導されるのに対し、核内受容体 pregnane X receptor (PXR) のアゴニストであり、ヒト成人肝細胞において CYP3A4 の強力な誘導剤であるリファンピシン (RIF) では全く誘導されないことを明らかにしている。その原因として、PXR mRNA が検出されなかったことから、HFL 細胞では PXR の発現が極めて低いか未発現状態であることが推察された (Maruyama *et al*, *Biol Pharm Bull* 30: 2091-2097, 2007)。本研究は、HFL 細胞において CYP3A4 が RIF によって誘導されない原因が PXR の低発現のみにあるのかを明らかにするため、HFL 細胞に PXR を過剰発現した場合の CYP3As 誘導におよぼす影響について検討した。また、RIF による CYP3As の誘導に関与すると考えられる転写調節因子の発現量について HFL 細胞、HepG2 細胞、ヒト成人肝臓で比較検討した。

【方法】HFL 細胞は、米国 Applied Cell Biology Research Institute 社より研究用に取得されたヒト胎児初代肝細胞 (胎齢約13週, 6胎児肝混合) を用い、HFL 細胞の比較対象としてヒト肝癌由来の HepG2 細胞をポジティブコントロールとして使用した。PXR の遺伝子導入はアデノウイルスベクターを用いて行った。薬物による CYP3As の誘導はリアルタイム RT-PCR

およびレポータージーンアッセイにて、核内受容体および転写因子の発現量は RT-PCR を用いて解析した。【結果・考察】HepG2 細胞では PXR アゴニストによる CYP3A4 mRNA の発現量の顕著な増加が確認され、PXR 過剰発現によりさらに発現量は増加した。一方、HFL 細胞ではデキサメタゾン以外の PXR アゴニストによる CYP3As の誘導は認められず、PXR 過剰発現条件下においては、誘導は認められたもののその程度は HepG2 細胞に比べ明らかに小さかった。レポータージーンアッセイでも、HFL 細胞では PXR 過剰発現条件下での RIF による CYP3A4 転写活性の増加は HepG2 細胞に比べ小さいものであった。HFL 細胞における PXR の低発現が RIF で CYP3A4 が誘導されない原因であると推察してきたが、PXR 以外の他の因子も RIF による誘導に関与していることが推察された。そこで、CYP3A4 の転写活性に関与するコアクチベーターとコリプレッサーの mRNA の発現量を HFL 細胞、HepG2 細胞および成人の肝臓と比較した。その結果、HFL 細胞ではコアクチベーターである hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ), peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) が HepG2 細胞および成人の肝臓と比べ、発現量が低いことが明らかになった。さらに HNF4 $\alpha$  と PGC1 $\alpha$  によって発現が調節されている遺伝子 ApoCIII および PEPCK の発現は、HFL 細胞において RT-PCR で検出限界以下であった。以上の結果より、HNF4 $\alpha$  および PGC1 $\alpha$  の発現量の低下が PXR 過剰発現 HFL 細胞における RIF の CYP3A4 誘導を阻害している可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

我々は、ヒト成人肝細胞における CYP3A4 の強力な誘導剤であるリファンピシン (RIF) がヒト胎児肝細胞 (HFL 細胞) では全く誘導しないことを明らかにしており、原因として HFL 細胞において PXR の発現が極めて低いことが示唆された。本研究は、HFL 細胞において CYP3A4 が RIF によって誘導されない原因が PXR の低発現のみに限定されるか否かを



明らかにすることを当初の目的とした。HFL細胞にPXRを過剰発現させ、薬物によるCYP3A4誘導への影響、エピジェネティクス制御の影響、CYP3A4発現に関与する転写調節因子の発現について検討を行った。

本研究において用いたHFL細胞は胎齢約13週・6胎児肝混合のヒト胎児初代肝細胞であり、HFL細胞の比較対象として、ヒト肝癌由来HepG2細胞を使用した。転写調節因子の発現量についてはヒト成人肝臓由来のtotal RNAをポジティブコントロールとした。PXR遺伝子導入はアデノウイルスベクターを用いた。薬物によるCYP3Asの誘導はリアルタイムRT-PCRおよびレポーター遺伝子アッセイで解析した。核内受容体および転写因子の発現はRT-PCRを用いて調べた。エピジェネティクス制御の影響についてはメチル化阻害剤で処理後、RIFによるCYP3A4誘導をリアルタイムRT-PCRで検討した。

その結果、竹澤は次の結論を得た。

1. HFL細胞にPXRを過剰発現させるとRIFによ

るCYP3A4の誘導が認められた。しかし、HepG2細胞に比べ誘導が十分でないことから、PXR以外の因子の影響が考えられた。

2. メチル化阻害剤5-AzaC処理後のRIFによるCYP3A4の誘導を検討したが、RIFによる誘導は認められなかった。

3. 転写因子の発現を検討したところ、HNF4 $\alpha$ およびPGC1 $\alpha$ のmRNAが成人肝臓に比べ低発現であることを確認した。

4. HNF4 $\alpha$ およびPGC1 $\alpha$ により調節されるApoCIII、PEPCKの発現がHFL細胞で認められなかった。HFL細胞ではHNF4 $\alpha$ 、PGC1 $\alpha$ による転写調節が不十分である可能性が考えられた。

これらの結果は、RIFでCYP3A4が誘導されない原因として、PXRの低発現に加え、転写因子HNF4 $\alpha$ およびPGC1 $\alpha$ の発現量が低いことが影響している可能性を示すものであり、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。

Attenuation of kidney injuries maintains serum sulfatide levels dependent on hepatic synthetic ability : a possible involvement of oxidative stress (腎障害の軽減に伴う酸化ストレスの抑制は、肝スルファチド合成の機能維持を介して、血清スルファチド値を維持する)

生 暁 娜

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】スルファチドは血清リポ蛋白に含まれる主要なスフィンゴ糖脂質であり、主に肝臓で合成される。我々は、末期腎不全透析患者において、血清スルファチド値が著明に低下すること、また、この低下した値は腎移植後に正常レベルまで回復することを見出した。この現象に関し、代表的な腎障害マウスモデル：protein-overload nephropathyを用いて解析したところ、血清スルファチド値の低下と共に、肝臓のスルファチド合成酵素：セレブロシドスルホトランスフェラーゼ(CST)の発現低下並びに肝臓酸化ストレスの増加を検出した。これらの結果を基に、我々は、腎障害に起因する全身的な酸化ストレスの増加が、肝臓のスルファチド産生を抑制し、血清スルファチド値を低下させる機構を推察した。一方、protein-overload nephropathyでは、マウスに牛血清アルブミン(BSA)を大量投与することで腎障害が誘導されるため、同マウスに観察された現象にBSAそのものが影響している可能性が懸念された。今回我々は、BSA大量投与下でも正常レベルの腎機能が維持される処理

をマウスに施し、先行研究で見出した血清スルファチド値の低下や肝臓スルファチド代謝に生じた変化が、本当に腎障害に起因するか検証した。

【材料及び方法】26週齢のSv/129メスマウスを二群に分け、通常食と0.1%クロフィブラート食で各々飼育した。後者の飼育は、BSA投与の2週間前から実験期間終了まで行った。我々は、このクロフィブラート処理により、BSA投与に伴う腎障害がほとんど生じないことを過去に報告した。両群について、BSAを一日当たり0.375g腹腔内投与し、17日間継続投与した。投与終了後、血清、肝臓、腎臓を回収した。血清及び組織中のスルファチドはHIP法により抽出し、アルカリ処理により脂肪酸を除去したリゾスルファチドに変換後、MALDI-TOF MS法で分析した。7種類のリゾスルファチドの総量をスルファチドの値とした。また、組織中の蛋白及びmRNA発現量は、各々タイムプロット法及びリアルタイムPCR法で測定した。

【結果】通常食飼育群では、BSA大量投与に伴い、血清及び肝臓スルファチド値の低下、肝臓CSTの発現

低下, 肝臓の過酸化脂質: マロンジアルデヒドの増加が観察された。一方, クロフィブラート食飼育群では, BSA 大量投与に伴うこれらの現象は認められなかった。クロフィブラート単独投与群において, スルファチドの量的変化・代謝酵素の発現変動は確認されず, 上記の肝臓スルファチド代謝に関連する諸変化は腎機能の状態に強く関連することが示された。

【結語】 マウス protein-overload nephropathy において生じる血清スルファチド値の低下並びに肝臓 CST の発現低下は, 明らかに腎障害に起因していた。本研究から, 血清スルファチドの濃度調節に, 肝機能が重要であることが示唆された。末期腎不全透析患者では, 血清スルファチドの低値が心血管障害の発症に強く関連する。本研究成果は, 同患者における新たな治療法を模索する上で, 有用な情報を提示するものと思われた。

#### (論文審査の結果の要旨)

スルファチドは血清リポ蛋白に含まれる主要なスフィンゴ糖脂質であり, 主に肝臓で合成される。生 曉娜らのグループは, 腎機能障害に伴い血清スルファチド値が低下する機構として「腎障害に起因する全身的な酸化ストレスの増加が, 肝臓のスルファチド産生を抑制する」可能性を報告している。この機構は腎障害マウスモデル: protein-overload nephropathy を用いた試験結果に基づくが, このモデルはマウスに BSA を大量投与することで作成するため, 生じる現象に BSA が影響している可能性が懸念される。今回, 生 曉娜は, BSA 投与下でも正常レベルの腎機能が維持される処理をマウスに施し, 既述した腎障害マウスに生じる血清スルファチド値の低下が本当に腎障害に起因するか検証した。

マウスを二群に分け, 通常食と0.1%クロフィブラート (CF) 食で飼育した。後者の飼育は, BSA 投与2週間前から実験期間終了まで行った。生 曉娜らは, この CF 処理により BSA 投与に伴う腎障害がほとんど生じないことを過去に報告している。両群について, BSA を0.375 g/日で17日間継続して腹腔内投与した。投与終了後, 血清, 肝臓, 腎臓を回収した。血清及び組織中のスルファチドは, 脂肪酸を除去したりゾ体に変換後, MALDI-TOF MS 法で分析した。7種類のリゾ体の総量をスルファチドの値とした。また, 組織中の蛋白及び mRNA 発現量は, 各タイムプロット法及びリアルタイム PCR 法で測定した。

その結果, 生 曉娜は次の結論を得た。

1. 通常食群では, BSA 投与に伴い, 血清及び肝臓スルファチド値の低下, 肝臓 CST の発現低下, 肝臓 MDA 量の増加が観察された。
2. CF 食群では, BSA 投与に伴うこれらの現象は見られなかった。
3. CF 単独投与群ではスルファチドの量的変化・代謝酵素の発現変動は確認されなかった。

これらの結果により, 既述した腎障害マウスに生じる血清スルファチド値の低下は, 腎障害に起因することが明らかとなった。本研究から, 血清スルファチドの濃度調節に, 肝機能が重要であることが示唆された。末期腎不全透析患者では, 血清スルファチドの低値が心血管障害の発症に強く関連する。本研究成果は, 同患者における新たな治療法を模索する上で, 有用な情報を提示するものと思われた。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 crucial role for Nox1 in redox-dependent regulation of Wnt- $\beta$ -catenin signaling (Wnt- $\beta$ -カテニンシグナルのレドックス反応による制御における Nox1の重要な役割)

Seheli Kajla

#### (論文の内容の要旨)

【Background】 Wnt signaling pathway is evolutionally conserved from nematodes to mammals and plays an essential role in tissue homeostasis. Dysregulation of the Wnt pathway has been associated with many cancers. A recent discovery unveiled novel redox-regulation of Wnt signaling. ROS may function as positive signaling molecules in

Wnt/ $\beta$ -catenin signal transduction by modulating the redox-dependent interaction between the thiorodoxin-like protein NRX and Dvl. However, it remained unclear which ROS-generating enzymes engage the NRX-mediated Wnt action and how the intracellular level of ROS is regulated. This led the authors to investigate whether superoxide generating enzyme, Nox1 is involved in this process.

**【Materials and Methods】** Cells were transfected with different plasmids by using Lipofectamine 2000 and with siRNAs with oligofectamine. Cells were harvested 36–48 h after transfection and were lysed in Buffer A or RIPA buffer. They were then subjected to immunoprecipitation and immunoblotting. For reporter assay, luciferase assay system was used. Luminol assay determined the ROS production. The level of activated Rac1 was determined by incubating cells lysates with GST-PAK1 agarose followed by immunoblotting with anti-Rac1 antibodies.

**【Results】** It is demonstrated that Wnt3a rapidly induced superoxide generation in a dose- and time-dependent manner. Furthermore, Wnt3a-induced ROS production was inhibited by treatment of the cells with the general Nox inhibitor DPI or transfection of Nox1 siRNA into the cells. This study also showed that Nox1-derived ROS oxidatively inactivate NRX and thereby alter the interaction between NRX and Dvl. It was then tested whether NRX and Nox1 act antagonistically with regard to  $\beta$ -catenin stabilization. Immunostaining showed that over expression of GFP-NRX abolished Wnt-induced accumulation of  $\beta$ -catenin. In contrast, co-expression of Nox1 had the reverse effect. This Nox1 action is regulated by Wnt-induced activation of the Rac1-GEF Vav2 via Src kinase. It is also found that ablation of the Nox1 activity down-regulated the Wnt-induced expression of TCF/LEF target genes such as Cyclin D1 and c-Myc and concomitantly blocked Wnt-induced cell proliferation. Nox1 mediates Wnt-induced cell growth in colon cancer cells with the normal Wnt pathway.

**【Conclusions】** In conclusion, this study emphasizes the important biological function of Nox1 as a signal transducer and provides a mechanistic insight into the Nox1-dependent redox-regulation of canonical Wnt signaling cascade.

(論文審査の結果の要旨)

ROS may function as signaling molecules in Wnt/ $\beta$ -catenin signal transduction by modulating the redox-dependent interaction between NRX and Dvl. Given that high levels of ROS are frequently produced in cancer cells and that aberrant control

of Wnt signaling promotes cancer, this redox regulation may have significant implication in understanding Wnt-dependent carcinogenesis. Her principal aim in this study was to investigate whether superoxide-generating enzyme Nox1 is involved in Nucleoredoxin (NRX)-regulated Wnt signaling in intestinal and colon epithelial cells and to explore how the intracellular level of ROS is regulated.

It was found that,

1. Wnt induces Nox1-mediated ROS production, leading to accumulation of  $\beta$ -catenin in both mouse fibroblast L cells and rat intestinal epithelial IEC-6 cells.
2. Over expression of Nox1 with NOXO1 and NOXA1 markedly suppressed the 5'-IAF labeling of exogenously expressed NRX as compared with that of control vector. At the same time endogenous Dvl bound to NRX is also decreased by Nox1 overexpression. The amount of the oxidized NRX was significantly reduced in Nox1KO mice as compared with that in wild-type mice suggesting the Nox1 oxidizes NRX, suppressing the interaction of NRX with Dvl.
3. It was then examined whether Nox1 directs the transcriptional activity of TCF, a downstream effector of Wnt- $\beta$ -catenin signaling. Nox1 siRNAs abrogated Wnt3a-stimulated TCF-luciferase reporter activity in IEC-6 cells. Correlating with this, expressions of c-Myc and cyclin D1, well-characterized TCF-target genes were down-regulated in Nox1 siRNA-introduced cells.
4. When Vav2-specific siRNA was introduced into IEC-6 cells, both activation of Rac1 and accumulation of  $\beta$ -catenin were significantly down-regulated.
5. The inhibition of Src by Src inhibitor PP2 treatment markedly reduced the level of Wnt-induced tyrosine phosphorylation of Vav2 in IEC-6 cells compared with that in untreated cells, suggesting Vav2 mediates Wnt-induced activation of Rac1 and  $\beta$ -catenin through Src-dependent tyrosine phosphorylation.
6. DPI treatment significantly attenuated the Wnt induced cell proliferation in L cells. When NRX



審査学位論文要旨

was over expressed in RKO cells, Wnt-induced cell proliferation was suppressed, but restored by Nox1 co expression. Taken together, these results suggest that the Nox1-NRX axis is involved in Wnt-dependent cell proliferation.

In summary, her study emphasizes the important biological function of Nox1 as a signal transducer and provides a mechanistic insight into the Nox1-

dependent redox-regulation of canonical Wnt signaling cascade. Since Wnt-induced cell growth was inhibited by Nox1 ablation, deregulation of Nox1 could be an additional approach for treating Wnt-dependent cancers and other Wnt-related diseases.

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。