

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
嶋根 哲 (歯科口腔 外科学)	甲第949号	25. 3.31	Clinical Significance of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain in Oral Squamous Cell Carcinoma (ASCの口腔扁平上皮癌における臨床的有用性について)	本田 孝行	宇佐美真一 小泉 知展
江口 隆 (外科学(2))	甲第950号	24. 9.30	Sivelestat Prevents Cytoskeletal Rearrangements in Neutrophils Resulting from Lung Re-expansion following One-Lung Ventilation during Thoracic Surgery (シベレスタットは胸部外科手術における片肺換気後の再膨張による好中球の細胞骨格変化を抑制する)	天野 純	川真田樹人 本田 孝行
伴 碧 (形成再建 外科学)	甲第951号	26. 3.31	Developed Lower-Positioned Transverse Ligament Restricts Eyelid Opening and Folding and Determines Japanese as Being With or Without Visible Superior Palpebral Crease (発達した下位横走靭帯は開瞼と上眼瞼の折れたたみの抵抗となり, 日本人の瞼を一重と二重に分ける)	森泉 哲次	村田 敏規 多田 剛
三島 吉登 (形成再建 外科学)	甲第952号	25. 3.31	The Supraorbital Margin of Japanese Who Have No Visible Superior Palpebral Crease and Persistently Lift the Eyebrow in Primary Gaze is Higher and More Obtuse Than Those Who Do Not (正面視のとき持続的に眉毛を挙上している一重瞼の日本人は持続的に眉毛挙上しない二重瞼の人よりも眼窩上縁が高く丸い)	森泉 哲次	村田 敏規 多田 剛
花村 徹 (外科学(2))	甲第953号	25. 9.30	Androgen metabolite-dependent growth of hormone receptor-positive breast cancer as a possible aromatase inhibitor-resistance mechanism (アロマトラーゼ阻害剤耐性メカニズムとしてのホルモンレセプター陽性乳癌におけるアンドロゲン代謝産物依存性増殖機構)	天野 純	大森 栄 塩 沢 丹里
丸山 真弘 (内科学(2))	甲第954号	26. 3.31	Risk factors for pancreatic stone formation in autoimmune pancreatitis over a long-term course (自己免疫性膵炎の長期経過における膵石形成の危険因子)	田中 榮司	角谷 眞澄 駒 津 光久
小原 久典 (分子腫瘍学)	甲第955号	25. 3.31	Lipocalin2 enhances the matrix metalloproteinase-9 activity and invasion of extravillous trophoblasts under hypoxia (Lipocalin2は低酸素環境でMMP-9活性と絨毛外トロフォブラストの浸潤を亢進させる)	本田 孝行	谷口俊一郎 菅野 祐幸

審査学位論文要旨

田 耕 (加齢生物学)	甲第956号	25. 9.30	Ubiquinol - 10 Supplementation Activates Mitochondria Functions to Decelerate Senescence in Senescence Accelerated Mice (還元型コエンザイム Q10の老化促進モデルマウス (SAMP1) への投与はミトコンドリア機能を活性化し, 老化を遅延する)	谷口俊一郎	鈴木龍雄 山田充彦
渡邊貴之 (内科学(2))	甲第957号	26. 3.31	Clinical features of a new disease concept, IgG4-related thyroiditis (IgG4関連甲状腺炎の臨床的特徴)	田中榮司	本田孝行 菅野祐幸
張 雷 (泌尿器科学)	甲第958号	26. 3.31	Functional Roles of Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) Channels in the Cold Stress-Induced Detrusor Overactivity Pathways in Conscious Rats (ラット冷えストレス誘発排尿筋過活動の機序における温度感受性受容体 (TRPM8) の機能的役割の考察)	大橋俊夫	大森 栄 山田充彦
高梨哲生 (神経可 塑性学)	甲第959号	25. 3.31	Synovial deposition of wild-type transthyretin-derived amyloid in knee joint osteoarthritis patients (変形性膝関節症患者の関節滑膜には野生型トランスサイレチン由来のアミロイドが沈着する)	鈴木龍雄	加藤博之 樋口京一
岩谷勇吾 (内科学(2))	甲第960号	25. 3.31	Reduced expression of α GlcNAc in Barrett's oesophagus adjacent to Barrett's adenocarcinoma —a possible biomarker to predict the malignant potential of Barrett's oesophagus (バレット腺癌に隣接するバレット食道では α GlcNAc の発現が低下している～バレット食道の悪性化を予測するバイオマーカーとしての可能性～)	菅野祐幸	宮川眞一 森泉哲次
野口 涉 (泌尿器科学)	甲第961号	26. 3.31	The relationship between α 1-adrenergic receptors and TRPM8 channels in detrusor overactivity induced by cold stress in ovariectomized rats (卵巣摘出ラットにおける冷えストレス誘発排尿筋過活動に対する α 1アドレナリン受容体と皮膚発現する TRPM8受容体の関連についての検討)	塩沢丹里	大森 栄 菅野祐幸
白津和夫 (分子病理学)	甲第962号	25. 3.31	Loss of gastric gland mucin-specific O-glycan is associated with progression of differentiated-type adenocarcinoma of the stomach (胃腺粘液に特異的な O-グリカンの消失は分化型胃癌の進行に関与する)	谷口俊一郎	菅野祐幸 佐々木克典
北川敬之 (外科学(1))	甲第963号	25. 3.31	Downregulation of the microRNA biogenesis components and its association with poor prognosis in hepatocellular carcinoma (肝細胞癌におけるマイクロ RNA 生合成因子の制御と予後との関連)	田中榮司	塩沢丹里 中山 淳

審査学位論文要旨

平山周一 (脳神経 外科学)	甲第964号	26. 3.31	Regenerative capacity of bulbar projection neurons during development : a quantitative neuronal analysis with functional correlation (嗅球投射ニューロンの再生能：再生ニューロンの定量評価並びに機能解析)	多田 剛	本郷一博 田渕克彦
植竹龍一 (循環病態学 (発生再生 医学))	甲第965号	26. 3.31	Adrenomedullin-RAMP2 system suppresses ER stress-induced tubule cell death and is involved in kidney protection (アドレノメデュリン-RAMP2システムは、小胞体ストレス誘導性細胞死を抑制し、腎保護に働く)	樋口京一	谷口俊一郎 菅野祐幸
MD. ABDUS SALAM MONDOL (分子細胞 生化学)	甲第966号	26. 3.31	Nox4 redox regulation of PTP1B contributes to the proliferation and migration of glioblastoma cells by modulating tyrosine-phosphorylation of coronin-1C (Nox4-PTP1B レドックスシグナルは、coronin-1C のチロシンリン酸化を介して膠芽腫細胞の増殖と運動に寄与する)	谷口俊一郎	本郷一博 中山 淳
五味志文 (内科学(5) (循環器 病態学))	甲第967号	26. 3.31	TRPM4 Channels Mediate Hypertonicity-induced, Ca ²⁺ -impermeable, Non-selective Cation Currents in a Cervical Cancer Cell Line, HeLa Cells (TRPM4チャンネルは、子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞において高浸透圧誘発性 Ca ²⁺ 非透過性非選択的カチオン電流を生じる)	田渕克彦	塩沢丹里 川真田樹人
山崎佐枝子 (内科学(5) (循環器 病態学))	甲第968号	25. 3.31	Presence of diastolic dysfunction in patients with peripheral artery disease (閉塞性動脈硬化症患者における拡張障害の検討)	本田孝行	天野 純 岡元和文
向山啓二郎 (運動機能学)	甲第969号	25. 3.31	Factors influencing the residual rib hump after posterior spinal fusion for adolescent idiopathic scoliosis with Lenke 1 and 2 curves (Lenke type 1, 2 型思春期特発性側弯症に対する後方矯正固定術後に残存する肋骨隆起に関連する因子)	本郷一博	角谷眞澄 森泉哲次
鈴木尚徳 (泌尿器科学)	甲第970号	25. 3.31	Efficacy and safety of advanced renal cell carcinoma patients treated with sorafenib : roles of cytokine pretreatment (進行性腎癌に対するソラフェニブの有効性および安全性：サイトカイン先行投与の効果)	小泉知展	中山 淳 大森 栄
奥原禎久 (内科学(2))	甲第971号	26. 3.31	Serum Levels of Interleukin-22 and Hepatitis B Core-related Antigen Are Associated with Treatment Response to Entecavir Therapy in Chronic Hepatitis B (B型慢性肝炎のエンテカビルによる治療効果に対する血清インターロイキン22とB型肝炎コア関連抗原の影響)	竹下敏一	本田孝行 瀧 伸介

審査学位論文要旨

平林佳奈枝 (小児医学)	甲第972号	25. 3.31	Risk factors for diabetes mellitus and impaired glucose tolerance following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients with hematological malignancies (小児血液腫瘍患者における同種造血幹細胞移植後の糖尿病および耐糖能異常の発症危険因子)	駒津光久	本田孝行 菅野祐幸
竹内崇博 (内科学(5) (循環器 病態学))	甲第973号	26. 3.31	Electrocardiographic J waves are associated with right ventricular morphology and function: evaluation by cardiac magnetic resonance imaging (心電図上のJ波は右室の形態と機能に関係している: 心臓MRIを用いた評価)	山田充彦	天野純 岡元和文
平賀理佐子 (分子細胞 生化学)	甲第974号	26. 3.31	Nox4-derived ROS Signaling Contributes to TGF- β -induced Epithelial-mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells (膵癌細胞のEMTにおける活性酸素産生遺伝子Nox4の機能的役割)	谷口俊一郎	竹下敏一 奥山隆平
酒井康弘 (分子病理学)	甲第975号	26. 3.31	High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in testicular seminoma (精巣セミノーマにおける高内皮細静脈様血管とリンパ球の動員)	中山淳	塩沢丹里 本田孝行
原山雄太 (法医学)	甲第976号	26. 3.31	Analysis of Y chromosome haplogroups in Japanese population using short amplicons and its application in forensic analysis (短鎖増幅産物を応用した日本人集団のY染色体ハプログループの解析と法医学試料の解析への応用)	花岡正幸	中山淳 野見山哲生
藤原麻衣子 (分子病理学)	甲第978号	26. 3.31	Expression of long-form <i>N</i> -acetylglucosamine-6- <i>O</i> -sulfotransferase 1 in human high endothelial venules (ヒト高内皮細静脈における長鎖型 <i>N</i> -アセチルグルコサミン6- <i>O</i> 硫酸転移酵素1の発現)	樋口京一	森泉哲次 佐々木克典
小林信光 (法医学)	甲第979号	25. 3.31	Polymorphisms of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 Gene Are Associated with Resistance to High-Altitude Pulmonary Edema (HAPE) in a Japanese Population: A Case Control Study Using Polymorphic Microsatellite Markers (日本人における高地肺水腫に対する疾患抵抗性とTIMP3遺伝子多型との関連について: マイクロサテライトマーカーを用いた症例対照研究)	浅村英樹	菅野祐幸 野見山哲生
清水健司 (遺伝医学・ 予防医学 (社会予防 医学))	甲第980号	26. 3.31	Microarray and FISH-based Genotype-Phenotype Analysis of 22 Japanese Patients with Wolf-Hirschhorn Syndrome (Wolf-Hirschhorn症候群の日本人患者22名におけるマイクロアレイとFISH解析を用いた遺伝型-表現型相関の検討)	小池健一	池田修一 宇佐美真一

審査学位論文要旨

駒津和宜 (外科学(2))	甲第981号	26. 3.31	Surgical Outcomes of Acute Type A Aortic Dissection in Elderly Patients (高齢者急性A型大動脈解離の手術成績)	池田宇一	岡元和文 川真田樹人
倉石修吾 (運動機能学)	甲第982号	26. 3.31	Pedicle Morphology Using Computed Tomography-based Navigation System in Adolescent Idiopathic Scoliosis (特発性思春期側弯症におけるCT-based navigation systemによる椎弓根径, 長さの計測)	角谷真澄	本郷一博 森泉哲次
森田進 (内科学(2))	甲第983号	25. 3.31	Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B (慢性B型肝炎患者のHBe抗原のセロコンバージョン後のHBe抗原陰性肝炎の特色と発症の予想)	宮川真一	竹下敏一 本田孝行
小林実喜子 (病態解析 診断学)	甲第984号	26. 3.31	Reappraisal of the immunophenotype of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) —gastric pyloric and small intestinal immunophenotype expression in gastric and intestinal type IPMNs— (膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) の免疫染色に基づいた表現型の再評価—胃型IPMNと腸型IPMNにおける胃幽門粘膜および小腸粘膜の形質発現)	本田孝行	菅野祐幸 角谷真澄
吉川健太郎 (小児医学)	甲第985号	25. 3.31	Safety, tolerability, and feasibility of antifungal prophylaxis with micafungin at 2 mg/kg daily in pediatric patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (小児同種造血幹細胞移植患者におけるミカファンギン2 mg/kgの連日投与による真菌感染症予防の安全性, 忍容性および実施可能性)	山田充彦	大森 栄 花岡正幸
野沢祐一 (内科学(2))	甲第986号	26. 3.31	<i>KIR</i> , <i>HLA</i> , and <i>IL28B</i> Variant Predict Response to Antiviral Therapy in Genotype 1 Chronic Hepatitis C Patients in Japan (日本人ジェノタイプ1型C型慢性肝炎患者に対する抗ウイルス療法治療効果予測に <i>KIR</i> , <i>HLA</i> , <i>IL28B</i> 遺伝子多型が与える影響について)	樋口京一	宮川真一 花岡正幸
古澤徳彦 (外科学(1))	甲第987号	25. 3.31	Surgical Treatment of 144 Cases of Hilar Cholangiocarcinoma Without Liver-Related Mortality (肝門部胆管癌切除例144例の検討—術後肝不全死0%—)	天野 純	西澤 理 田中榮司
岩佐陽一郎 (耳鼻咽喉 科学)	甲第988号	25. 3.31	<i>OTOF</i> mutation screening in Japanese severe to profound recessive hearing loss patients (常染色体劣性遺伝形式をとる日本人高度～重度難聴患者における <i>OTOF</i> 遺伝子変異スクリーニング)	福嶋義光	小池健一 村田敏規

審査学位論文要旨

吉村 豪兼 (耳鼻咽喉科学)	甲第989号	25. 3.31	Massively parallel DNA sequencing facilitates diagnosis of patients with Usher syndrome type 1 (Usher 症候群タイプ1 症例の遺伝子解析における次世代シーケンサーの有用性)	福嶋 義光	小池 健一 村田 敏規
羅 宏敏 (加齢生物学)	甲第990号	26. 3.31	An interleukin-33 gene polymorphism is a modifier for eosinophilia in rats (インターロイキン33遺伝子多型はラットにおける好酸球増多症の修飾因子である)	谷口俊一郎	鈴木 龍雄 田 渕 克彦
安出 卓司 (加齢生物学)	甲第991号	25. 3.31	Long-term trial of corticosteroid therapy for the recurrence of cerebral amyloid angiopathy-related hemorrhages: a case study using [11C] BF-227 amyloid-PET (脳アミロイドアンギオパチー関連再発性脳出血に対する長期副腎皮質ステロイド治療の試み：[11C] BF-227アミロイド PET を用いた症例検討)	樋口 京一	天野 直二 角谷 眞澄

氏名 (所属)	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
村田 和也 (保健学専攻 医療生命科学分野 医療生命科学領域)	甲第7号	26. 3.20	Hydrogen Peroxide Content and pH of Expired Breath Condensate from Patients with Asthma and COPD (喘息およびCOPD患者における呼気凝集液中の過酸化水素濃度とpHの検討)	高 昌星	相良 淳二 藤本 圭作
小林 路子 (保健学専攻 医療生命科学分野 医療生命科学領域)	甲第8号	26. 3.20	Incidence of <i>Legionella</i> and heterotrophic bacteria in household rainwater tanks in Azumino, Nagano prefecture, Japan (日本の地方都市長野県安曇野市における家庭用雨水貯留槽水中のレジオネラおよび従属栄養細菌の挙動)	奥村 伸生	寺田 克 川上 由行
竹澤 由夏 (保健学専攻 医療生命科学分野 医療生命科学領域)	甲第9号	26. 3.20	siRNA down-regulation of <i>FGA</i> mRNA in HepG2 cells demonstrated that heterozygous abnormality of the $A\alpha$ -chain gene does not affect the plasma fibrinogen level (siRNAを用いたHepG2細胞の <i>FGA</i> mRNA発現抑制実験は、フィブリノゲン $A\alpha$ 鎖遺伝子のヘテロ型異常では血漿フィブリノゲン濃度を低下させないことを明らかにした)	石田 文宏	寺田 克 奥村 伸生

Clinical Significance of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain in Oral Squamous Cell Carcinoma (ASCの口腔扁平上皮癌における臨床的有用性について)

嶋 根 哲

(論文の内容の要旨)

【背景】口腔扁平上皮癌 (OSCC) は2008年には世界的に263,900人が新規に罹患し128,000人が死亡したことが報告された。診断や治療の改善にもかかわらず5年生存率は依然として60%を下回る状況である。予後の改善には、OSCCの進展や転移を正確に診断するための分子マーカーが重要である。apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) はMasumotoらによりHL-60細胞にアポトーシスを誘導する際に細胞質に形成されるタンパク質として同定され、炎症と細胞死に関係していることが示唆された。ASCは癌抑制遺伝子様に作用することも報告され、大腸癌、前立腺癌と悪性黒色腫ではASC領域のDNAのメチル化が報告された。これらの所見から、ASC発現と癌の予後との関連も示唆されている。そこでわれわれはOSCCにおけるASC発現とその臨床的意義について検討を行った。また、ASC発現とアポトーシスおよび分化との関連について検討を加えた。

【方法】1. In vivo 対象は1990~2005年に信州大学医学部附属病院特殊歯科・口腔外科にてOSCCと診断された未治療例119例。抗ASC抗体により免疫組織化学的手法 (IHC) により病理組織切片上のASC陽性細胞数を算出し、同症例の臨床病理学的所見 (性別、年齢、T分類、N分類、病期、原発部位、病理学的分化度、リンパ細胞浸潤、浸潤様式) および予後 (5年生存率) との関連を統計学的に解析 (単変量および多変量解析) した。また、ASC発現と上皮細胞の分化との関連を明らかにするため、ASCおよび粘膜上皮細胞の分化マーカーであるinvolucrin (IVL) 発現をIHCと蛍光抗体法により染色し、比較検討を行った。加えて、ASCとアポトーシスとの関連を検討するため、アポトーシス発現状況をTUNEL染色で調べ、ASC発現状況との比較検討を行った。

2. In vitro ASCと分化との関連を検討するために以下の実験を行った。正常細胞における分化前後でのASCの変化を検討するために正常ヒト角化細胞 (NHEK) と不死化ヒト角化細胞 (HaCaT) を用い

分化誘導を行った。NHEKとHaCaTの分化前、分化後1日目と2日目のmRNAとタンパク質を採集し、ASCとIVLのmRNA発現を定量的PCRでタンパク質発現とをwestern blot法でそれぞれ検討した。また正常細胞と口腔癌細胞株での比較を行うためNHEK、HaCaTと口腔癌細胞株のASCとIVLのmRNA発現を定量的PCRでタンパク質発現とをwestern blot法で同様に検討した。

【結果】1. In vivo IHCにより正常口腔粘膜ではASCは分化が進行した顆粒層から有棘細胞層に多く発現していた。OSCCではcancer pearl周囲に多く発現しており、低分化OSCCでは発現はほとんど認められなかった。単変量解析の結果ではASCは原発部位、T分類、病期、病理学的分化度、浸潤様式とリンパ細胞浸潤と統計学的有意な相関が認められた。Kaplan-meier法ではASC発現レベルの違いは5年生存率で統計学的有意差が認められた。疾患特異的生存率をend-pointとした多変量解析ではASC発現は独立した予後因子でありASC高発現群は生存率が高いこと統計学的に認められた。IHCと蛍光抗体法によりASCとIVLの共在が観察された。TUNEL法の結果からはASCの発現が多いOSCCはアポトーシスが多いことが認められた。

2. In vitro NHEKとHaCaTを用いた分化誘導実験からはASCとIVLは共に分化後ではmRNA量もタンパク量も増加することが認められた。NHEK、HaCaTと口腔癌細胞株を使用した定量的PCRとwestern blot法ではNHEK、HaCaTでASCとIVLが口腔癌細胞株に比較し発現が高かった。

【考察】本研究において正常口腔粘膜では分化進行に伴いASCの発現が増加することが認められた。OSCCにおいてASCはcancer pearl周辺に発現していた。正常な大腸と皮膚では表層でASC発現が認められたことが報告されている。皮膚の癌化の過程でASCは癌抑制遺伝子として作用することが報告されており、大腸癌、前立腺癌と悪性黒色腫ではDNAメチル化により発現低下し結果としてアポトーシスに対し抵抗する可能性が示唆されている。本研究では

ASC 発現減少は病理学的悪性度と相関し、予後不良とも相関していた。ASC 発現は細胞分化とアポトーシスと関連していることが示され、なんらかの役割を果たしている可能性が考えられた。ASC 発現は OSCC のアポトーシスを誘導する可能性が考えられ ASC は OSCC において予後や悪性度の指標として有用であることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

ASC は癌抑制遺伝子様に作用することも報告され、種々の悪性腫瘍では ASC 領域の DNA のメチル化が報告された。これらの所見から、ASC 発現と癌の予後との関連も示唆されている。そこでわれわれは口腔扁平上皮癌 (OSCC) における ASC 発現とその臨床的意義について検討を行った。また、ASC 発現とアポトーシスおよび分化との関連について検討を加えた。

In vivo : OSCC と診断された119例を対象とし、抗 ASC 抗体により免疫組織化学的手法により ASC の発現量を評価し、同症例の臨床病理学的所見および予後との関連を統計学的に解析した。また ASC と分化との関連を検討するため、分化マーカーである involucrin (IVL) 発現との比較検討を行った。加えて、ASC とアポトーシスとの関連を検討するため、アポトーシスの発現状況を TUNEL 染色で調べ、ASC 発現状況との比較検討を行った。

In vitro : ASC と分化との関連を検討するために以下の実験を行った。分化前後での ASC の変化を検討するために正常ヒト角化細胞 (NHEK) と不死化ヒト角化細胞 (HaCaT) を用い分化誘導を行った。NHEK

と HaCaT の分化前、分化後 1 日目と 2 日目の ASC と IVL の mRNA 発現を定量的 PCR でタンパク発現とを western blot 法で検討した。また正常細胞と口腔癌細胞株での ASC と IVL について同様に検討した。

その結果、嶋根らは次の結果を得た。

1. 疾患特異的生存率を end-point とした多変量解析では、ASC 発現は独立した予後因子であり ASC 高発現群は生存率が有意に高いことが確認された。
2. IHC と蛍光抗体法により ASC と IVL の共在が観察された。細胞株を用いた研究では分化が進むにつれ ASC のタンパク・mRNA 発現が増加することが示唆された。
3. ASC 発現はアポトーシスが起きている周囲に発現していた。また、TUNEL 法の結果からは ASC の発現が多い OSCC はアポトーシスが多いことが認められた。

これらの結果より ASC 発現は OSCC で独立した予後因子であり、ASC 低発現な OSCC は予後不良であることが示唆された。また ASC は分化やアポトーシスと関連していることが示され、なんらかの役割を果たしている可能性が考えられた。ASC 発現は OSCC のアポトーシスを誘導する可能性が考えられ、ASC は OSCC において予後や悪性度の指標として有用であることが示唆された。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Sivelestat Prevents Cytoskeletal Rearrangements in Neutrophils Resulting from Lung Re-expansion following One-Lung Ventilation during Thoracic Surgery (シベレスタットは胸部外科手術における片肺換気後の再膨張による好中球の細胞骨格変化を抑制する)

江 口 隆

(論文の内容の要旨)

【背景】術中片肺換気は胸部外科手術後に生じる肺障害の原因として知られる。また、好中球は肺障害の発生において重要な役割を果たしている。循環血液中の好中球は、その活性化により細胞骨格に変化が生じ、変形能が低下して微小血管の通過が困難となり、肺毛細血管に停滞すると考えられている。好中球の細胞骨格変化が胸部手術における片肺換気とどのように関わっているか明らかにはされていない。一方、好中球エラストアーゼ阻害剤であるシベレスタットが急性肺障

害の治療に用いられているが、シベレスタットが好中球による肺微小循環障害を改善したという報告がある。これらから、我々は2つの仮説を立てた。第1は、術中片肺換気により好中球細胞骨格変化が生じるという仮説で、第2は、シベレスタット投与により好中球の変形能が改善するという仮説である。これらの仮説を証明するために、肺葉切除を施行する症例において前向き無作為化研究を施行した。

【方法】2006年10月から2008年2月にかけて、原発性肺癌あるいは転移性肺腫瘍に対し、当科で肺葉切除が

予定され、本試験への同意が得られた16名の症例を対象とした。症例は無作為にコントロール群（8名）とシベレスタット群（8名）に割り当て、コントロール群では生理食塩水10 ml/h、シベレスタット群ではシベレスタット溶解液10 ml/h（投与薬剂量0.2 mg/kg/h）をそれぞれ手術開始から手術終了まで投与した。片肺換気開始直後（point 1）、再膨張直前（point 2）、および再膨張後30分（point 3）において末梢動脈血を採取した。好中球の細胞骨格変化はFアクチンの局在によって評価した。蛍光染色によりFアクチンが細胞膜直下に存在するFアクチンリム形成を有する好中球の全好中球に占める割合を測定し、これを自動血球計数器により測定した全好中球数にかけ、Fアクチンリム形成を有する好中球数を測定した。他に、酸素化を評価するためにPaO₂、好中球走化因子として血漿インターロイキン8（IL-8）、活性酸素としてマロンジアルデヒド（MDA）についても測定した。PaO₂/FiO₂（P/F）比はpoint 1とpoint 3で測定し、結果はその変化率で示した。

【結果】男女比（男性/女性）は7/9で、平均年齢は71.4歳であった。術後に重篤な合併症を発生した症例は認めなかった。コントロール群とシベレスタット群の比較において、年齢、性別、手術部位、喫煙歴、術前呼吸機能、片肺換気時間、出血量、切除肺の容量に有意差を認めなかった。

全好中球数は両群ともに、point 1と比較して、point 2で増加しpoint 3でさらに増加する傾向を認めた。両群の時系列データに有意差は認めなかった。

Fアクチンリム形成を有する好中球数においても、全好中球数と同様に、point 1と比較して、point 2で増加しpoint 3でさらに増加する傾向を認めた。シベレスタット群はコントロール群と比較してpoint 2、point 3において低値であり、両群の時系列データに有意差を認めた。

PaO₂の変化率はコントロール群0.81±0.07、シベレスタット群0.98±0.05であり、シベレスタット群で有意に高かった。

血漿IL-8は増加を認めず、両群間の時系列データに有意差を認めなかった。血漿MDAは、コントロール群においてpoint 1と比較してpoint 3で有意に高値であったが、両群間の時系列データに有意差を認めなかった。

【結論】片肺換気後の再膨張は循環血液中の好中球の細胞骨格変化を生じるが、シベレスタットはこの変化

を抑制し、肺葉切除を施行した症例において酸素化を改善した。好中球の細胞骨格変化は片肺換気後の肺障害を惹起し、これに対して周術期にシベレスタットを投与することで術後合併症を抑制できる可能性がある。

（論文審査の結果の要旨）

術中片肺換気は胸部外科手術後に生じる肺障害の原因として知られ、好中球は肺障害の発生において重要な役割を果たしている。循環血液中の好中球は、その活性化により細胞骨格に変化が生じ、変形能が低下して微小血管の通過が困難となり、肺毛細血管に停滞すると考えられている。一方、好中球エラストアーゼ阻害剤であるシベレスタットが好中球による肺微小循環障害を改善したという報告がある。これらから、我々は術中片肺換気による好中球細胞骨格変化、および、この細胞骨格変化に対するシベレスタットの効果を明らかにするため、肺葉切除を施行する症例において前向き無作為化研究を施行した。

原発性肺癌あるいは転移性肺腫瘍に対し、当科で肺葉切除が予定された16名の症例を対象とした。症例は無作為にコントロール群（8名）とシベレスタット群（8名）に割り当てられ、コントロール群では生理食塩水10 ml/h、シベレスタット群ではシベレスタット溶解液10 ml/h（投与薬剂量0.2 mg/kg/h）をそれぞれ手術開始から手術終了まで投与した。片肺換気開始直後（point 1）、再膨張直前（point 2）、および再膨張後30分（point 3）において末梢動脈血を採取し、全好中球数、Fアクチンリム形成を有する好中球数、PaO₂/FiO₂（P/F）比、血漿インターロイキン8（IL-8）、マロンジアルデヒド（MDA）について測定した。P/F比はpoint 1とpoint 3で測定し、結果はその変化率で示した。

そして、江口らは次の結果を得た。

1. 術中片肺換気中、およびその後の再膨張により、Fアクチンリム形成を伴う好中球数が増加した。
2. シベレスタット投与群ではFアクチンリム形成を伴う好中球数が、コントロール群に比べ低値であった。
3. シベレスタット投与群ではP/F比の変化率が、コントロール群に比べ高値であった。
4. IL-8は両群で上昇を認めなかった。
5. MDAはコントロール群で再膨張後に上昇を認めたものの、両群間の時系列データに有意差を認めなかった。

これらの結果より、片肺換気後の再膨張は循環血液

中の好中球の細胞骨格変化を生じ、シベレスタットはこの変化を抑制し、肺葉切除を施行した症例において酸素化を改善すると考えられた。好中球の細胞骨格変化は片肺換気後の肺障害を惹起し、これに対して周術

期にシベレスタットを投与することで術後合併症を抑制できる可能性があることを示唆している。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Developed Lower-Positioned Transverse Ligament Restricts Eyelid Opening and Folding and Determines Japanese as Being With or Without Visible Superior Palpebral Crease (発達した下位横走靭帯は開瞼と上眼瞼の折れたたみの抵抗となり、日本人の瞼を一重と二重に分ける)

伴 碧

(論文の内容の要旨)

【目的】人類学によると、日本人は、土着の縄文人と、東アジアから移住してきた弥生人に分類される。弥生人は、狭い瞼裂、一重瞼の厚い耐寒性のある構造の眼瞼を持ち、高い位置に丸い構造の眼窩上縁があった。一方で、縄文人は、大きな瞼裂の二重瞼で、眼窩上縁は平らで低い位置にあったと報告されている。また、内側眼窩縁と外側眼窩縁の間の眼窩脂肪下端のスペースに下位横走靭帯（以下 LTL）が存在し、それにより狭い瞼裂、一重瞼、重たい瞼が形作られることが報告されている。それらの形態は、弥生人の顔貌の特徴でもある。現代日本人は、縄文人と弥生人の特徴を持っている。一重瞼であるということは、眼瞼前葉が折れたたまれないこと、視野を保つために眉毛挙上する必要があることを示しており、このことにより弥生人の子孫であるかどうかを見極めることができるのではないかと考え、我々は今回の検証を行った。一方で我々は、縄文人の子孫の日本人には生まれつき重瞼線があり、眼瞼前葉が重瞼線で折りたたみ可能なので、眉毛挙上しなくても十分に視野が得られるのではないかと推測した。先天性眼瞼下垂症患者の診察の際には、開瞼時に前頭筋収縮で代償的に眼瞼前葉を持ち上げないように、指で眉毛を固定した上で眼瞼挙筋機能を評価する方法を用いるが、今回我々は、この方法を、LTL がどのように開瞼の抵抗となっているかを調べるために用いた。我々の仮説を明らかにするために、(1) 指で眉毛挙上をおさえることが開瞼の抵抗となるか (2) 発達した LTL が開瞼と瞼の折れたたみを制限しているかどうかを日本人の一重瞼群と二重瞼群で検証した。

【方法】検証は66名の日本人（一重瞼群33名、二重瞼群33名）手術患者を対象に行った。(1) 指で眉毛を動かなくすると開瞼が制限を受けるか、(2) LTL の発達程度により日本人を一重瞼と二重瞼に分類できるか

について調べた。

【結果】(1) 眉毛を押さえると、一重瞼群は33人全てが開瞼できなかったが、二重瞼群は後天性眼瞼下垂症であっても開瞼できた。(2) 眼窩隔膜の背側にある LTL は、33人の一重瞼群中23人で1本であり、10人が2本かそれ以上だった。二重瞼群では、33人中18人で1本で、13人は2本かそれ以上、2人ははっきりしたものがなかった。一重瞼群では、眼窩隔膜下部の背側にある LTL の中で最も尾側のものの太さの平均は 1.15 ± 0.44 mm で、これは二重瞼群の平均 0.88 ± 0.45 mm より $p=0.0136$ で有意に太かった。顕微鏡下に組織学的検証を行ったところ、一重瞼群の LTL の膠原線維は二重瞼群より太かった。

【考察】重瞼群は眼窩隔膜下部の背側に、太さも数も多い LTL を持っているが、二重瞼群の LTL は発達していなかった。さらに、眉毛の動きをおさえた検証の結果、発達した LTL を持つ一重瞼群では、開瞼と瞼の折れたたみが強く制限されたが、LTL の発達していない二重瞼群では、強い開瞼の制限はなかった。LTL の発達程度の違いが、日本人において、弥生人系か縄文人系かの顔貌の違いを決定すると考えられた。発達した LTL は開瞼と眼瞼の折れたたみを制限するだけでなく、眼窩脂肪を低い位置に保つ。そしてその結果として狭い瞼裂、一重の厚ぼったい上眼瞼となり、それは弥生人の顔貌の特徴を示している。一方で、LTL が発達していない人は、開瞼も瞼の折れたたみも制限されないので二重瞼の大きな瞼裂となる。発達していない LTL は、眼窩脂肪を西洋人のように上眼窩に入り込ませるのかもしれない。そしてそれらは縄文人の顔貌の特徴を示している。

(論文審査の結果の要旨)

人類学によると、日本人は、土着の縄文人と、東アジアから移住してきた弥生人に分類される。弥生人は、狭い瞼裂、一重瞼の厚い耐寒性のある構造の眼瞼を持

ち、高い位置に丸い構造の眼窩上縁があった。一方で、縄文人は、大きな瞼裂の二重瞼で、眼窩上縁は平らで低い位置にあったと報告されている。また、内側眼窩縁と外側眼窩縁の間の眼窩脂肪下端のスペースに下位横走靭帯（以下LTL）が存在し、それにより狭い瞼裂、一重瞼、重たい瞼が形作られることが報告されている。それらの形態は、弥生人の顔貌の特徴でもある。現代日本人は、縄文人と弥生人の特徴を持っている。一重瞼であるということは、眼瞼前葉が折れたたまれないこと、視野を保つために眉毛挙上する必要があることを示しており、二重瞼であるということは眼瞼前葉が重瞼線で折りたたみ可能なので、眉毛挙上しなくても十分に視野が得られるということを示しているのではないかと伴らは考えた。このことにより弥生人の子孫か縄文人の子孫であるかどうかを見極めることができるのではないかと考え、伴らは今回の検証を行った。

検証は66名の日本人（典型的な一重瞼群33名、二重瞼群33名）手術患者を対象に行った。まず、指で眉毛を動かなくすると開瞼が制限を受けるか、次に、LTLの発達程度により日本人を一重瞼と二重瞼に分類できるかについて伴らは調べた。

The Supraorbital Margin of Japanese Who Have No Visible Superior Palpebral Crease and Persistently Lift the Eyebrow in Primary Gaze is Higher and More Obtuse Than Those Who Do Not（正面視のとき持続的に眉毛を挙上している一重瞼の日本人は持続的に眉毛挙上しない二重瞼の人よりも眼窩上縁が高く丸い）

三 島 吉 登

（論文の内容の要旨）

【背景と目的】人類学的研究から、日本人の起源は弥生人と縄文人に分けて考えられており、移民系の弥生人は寒冷への耐性のため瞼裂が狭く、はっきりした重瞼線がなく、丸く高い眼窩上縁をもち、原住民である縄文人は瞼裂が広く、重瞼線が明らかで、平らで低い眼窩上縁をもつのが特徴とされている。

これらの特徴のなかで、瞼裂縦径が狭い（目が小さい）と眼窩上縁は高く、瞼裂縦径が広い（目が大きい）と眼窩上縁が低いという点は、解剖学的矛盾がある。この矛盾に対し、重瞼線がなく目が小さい日本人は、前頭筋の持続的収縮で眉毛と上眼瞼前葉を挙上して開瞼しているため、正面視で持続的に眉毛挙上する際の機械力によって眼窩上縁が丸く高くりモデリングされるという仮説を検証した。

その結果、以下の成績を得た。

1. 眉毛を押さえると、一重瞼群は33人全てが開瞼できなかったが、二重瞼群は後天性眼瞼下垂症であっても開瞼できた。
2. 眼窩隔膜の背側にあるLTLは、33人の一重瞼群中23人で1本であり、10人が2本かそれ以上だった。二重瞼群では、33人中18人で1本で、13人は2本かそれ以上、2人ははっきりしたものがなかった。一重瞼群では、眼窩隔膜下部の背側にあるLTLの中で最も尾側のものの太さの平均は 1.15 ± 0.44 mmで、これは二重瞼群の平均 0.88 ± 0.45 mmより $p = 0.0136$ で有意に太かった。顕微鏡下に組織学的検証を行ったところ、一重瞼群のLTLの膠原線維は二重瞼群より太かった。

以上より、伴らは発達した下位横走靭帯は開瞼の抵抗となり、瞼の折れたたまみを制限し、日本人の瞼を一重瞼と二重瞼にわけられると結論した。そして、一重瞼か二重瞼かというのは弥生人と縄文人の特徴でもあり、そこから現代日本人を弥生人の子孫か縄文人の子孫か見極める手がかりのひとつとなりうると考えた。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。

【対象と方法】対象は鼻骨骨折または眼窩下壁骨折で眼窩の3D-CT撮影をした男性23例（平均24.5歳±7.2）で、10例は明らかな重瞼線がなく持続的に眉毛を挙上しており、13例は重瞼線があり持続的な眉毛挙上をしていなかった。重瞼線がない群は指で眉毛が動かないようにすることで開瞼が制限されることを確認した。

重瞼線のない群はある群にくらべて眉毛を挙上しているかを評価した。瞳孔の中心を通る垂線上で眉毛の最上点を取り、内眼角と外眼角を結んだ線との距離を計測した。

次に、正面視で持続的に眉毛を挙上していることは、3D-CTの正面像での眼窩上縁の高さに影響するかを評価した。顔面の正中線と頬骨前頭縫合の中点との距離をHD（horizontal distance）とし、眼窩上縁の最

上点と HD の線との距離を VD (vertical distance) として VD/HD を各群間で比較した。

最後に、正面像での眼窩上縁の形状と矢状断での眼窩上縁の形状に関連はあるかを評価した。眼窩最上点を通る矢状断でフランクフルト平面と平行な線と眼窩上壁前方の接線との角度を計測し、上記の VD/HD との関連を検討した。

【結果】 明らかな重瞼線のない群では、重瞼線のある群に比べて眉毛が高かった。重瞼線のない群の方が、重瞼線のある群に比べて眼窩上縁が高く、眼窩上縁の矢状断像が鈍角だった。

【考察】 明らかな重瞼線をもたず、正面視で眉毛を持続的に挙上している10例は、重瞼線があり眉毛を挙上していない13例よりも目が小さいにも関わらず、眼窩上縁が高かった。眼窩上縁の高さは瞼裂縦径の大きさとは矛盾するが、眉毛の高さとは関連がみられた。正面から見た眼窩上縁の高さと矢状断での眼窩上縁の形状をみた検討では、眼窩上縁が高いと眼窩上縁の形状が鈍であった。これらの結果から、重瞼線のない群では正面視で持続的反射的な前頭筋の収縮による眉毛挙上をし、同時に眼窩上縁周囲の軟部組織を機能的に引き上げて開瞼するため、眼窩上縁に機械的圧迫が働き、高く鈍な眼窩上縁を形成すると考えられる。

2群間における目の大きさと眼窩上縁の高さの矛盾に対する説明として、馬場らは寒冷への耐性をあげている。大陸からの移民である弥生人は寒冷への耐性のために凹凸の少ない平らな顔貌が必要で、脳の肥大化・前方移動と上顎洞の拡大により縦方向に引き伸ばされた平らな顔と高く丸い眼窩上縁を獲得したと仮説しており、同じく寒冷に強い厚く目の小さい一重瞼を備えることは一見矛盾しない。しかし人類学の研究は発掘された骨格に基づいて行われるため、重瞼線や前頭筋の持続的反射的収縮による眉毛挙上など軟部組織の特徴については評価ができないとはいえ、高く丸い眼窩上縁では、眼窩内組織が広く外気にさらされるといって、寒冷環境に適応するために獲得したとする説には疑問が残る。

頭蓋顔面の骨や関節は機械刺激を受けて成長し機能する。筋収縮、咀嚼、脳の拡大、重力、歯列矯正用装置などの外力はリモデリングと呼ばれる生物学的適応の過程を通して骨の形や位置に影響を与える。正面視で前頭筋が持続的に収縮して眉毛を挙上する機械刺激により、眼窩上縁もリモデリングを受ける可能性があるといえる。

明らかな重瞼線をもたず持続的に眉毛を挙上している群において眼窩上縁が高くなると矢状断での眼窩上縁が鈍になるという関連をわれわれは証明し、その原因についての仮説を述べたが、確証には至っていない。縄文人またはコーカソイドで、片側の重度先天性眼瞼下垂があり、下垂側は強く眉毛挙上をして健側は眉毛挙上をしていない症例の眼窩上縁を評価することで証明できるだろう。

(論文審査の結果の要旨)

日本人の起源に関する人類学的研究から、渡来系の弥生人は瞼裂縦径が狭く、はっきりした重瞼線がなく、丸く高い眼窩上縁をもち、原住民である縄文人は瞼裂縦径が広く、重瞼線が明らかで、平らで低い眼窩上縁をもつのが特徴とされている。

これらの特徴のなかで、瞼裂縦径が狭いと眼窩上縁は高く、瞼裂縦径が広いと眼窩上縁が低いという点は、解剖学的矛盾がある。この矛盾に対し、重瞼線がなく瞼裂縦径が狭い日本人は、前頭筋の持続的収縮で眉毛と上眼瞼前葉を挙上して開瞼しているため、正面視で持続的に眉毛挙上する際の機械力によって眼窩上縁が丸く高くリモデリングされるという仮説を三島らはたて、それを検証した。

対象は鼻骨骨折または眼窩下壁骨折で眼窩の3D-CT撮影をした男性23例(平均24.5歳±7.2)で、10例は明らかな重瞼線がなく持続的に眉毛を挙上しており、13例は重瞼線があり持続的な眉毛挙上をしていなかった症例である。重瞼線がない群は指で眉毛が動かないようにすることで開瞼が制限されることを、三島らは確認した。

重瞼線のない群はある群にくらべて眉毛を挙上しているかを評価した。瞳孔の中心を通る垂線上で眉毛の最上点を取り、内眼角と外眼角を結んだ線との距離を計測した。

次に、正面視で持続的に眉毛を挙上していることは、3D-CTの正面像での眼窩上縁の高さに影響するかを評価した。顔面の正中線と頬骨前頭縫合の中点との距離を HD とし、眼窩上縁の最上点と HD の線との距離を VD として VD/HD を各群間で比較した。

最後に、正面像での眼窩上縁の形状と矢状断での眼窩上縁の形状に関連はあるかを評価した。眼窩最上点を通る矢状断でフランクフルト平面と平行な線と眼窩上壁前方の接線との角度を計測し、上記の VD/HD との関連を検討した。

その結果、三島らは次の結論を得た。

1. 明らかな重瞼線のない群では、重瞼線のある群に比べて眉毛が高かった。
 2. 重瞼線のない群の方が、重瞼線のある群に比べて眼窩上縁が高かった。
 3. 眼窩上縁が高いほど、眼窩上縁の矢状断像が鈍角だった。
- これらの結果から、三島らは、重瞼線のない群では

正面視で持続的反射的な前頭筋の収縮による眉毛挙上をし、同時に眼窩上縁周囲の軟部組織を機能的に引き上げて開瞼するため、眼窩上縁に機械的圧迫が働き、高く鈍な眼窩上縁を形成すると考えられると結論付けた。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。

Androgen metabolite-dependent growth of hormone receptor-positive breast cancer as a possible aromatase inhibitor-resistance mechanism (アロマターゼ阻害剤耐性メカニズムとしてのホルモンレセプター陽性乳癌におけるアンドロゲン代謝産物依存性増殖機構)

花 村 徹

(論文の内容の要旨)

閉経後ホルモン感受性乳癌において、アロマターゼ阻害剤 (AI 剤) は乳癌局所でのエストロゲン産生を抑制し、エストロゲン受容体 (ER) の活性を阻害し増殖を抑制するが、その際に相対的に過剰となったテストステロン (TS) やジヒドロテストステロン (DHT) などのアンドロゲンがアンドロゲン受容体 (Androgen receptor; AR) を介して腫瘍抑制的に働くことも作用機序のひとつと考えられている。しかしながら、AI 剤耐性機構においては、アンドロゲンがどのような役割を果たすかは十分に分かっていない。これまでの報告では、 3β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD3B1) により DHT からアロマターゼ非依存的に産生される 5α -Androstane- 3β , 17β -diol (3β -diol) が、アンドロゲン活性とエストロゲン活性も併せ持ち、ホルモン感受性乳癌の増殖に寄与することで、AI 剤耐性機構として働きうることを示されている。本研究では、ホルモン感受性乳癌においてアンドロゲン代謝産物依存性の細胞増殖機構が AI 剤治療により誘導されるか、その場合にどのような機序で誘導されるのか、この機構が AI 剤耐性機構として実際に働きうるかどうかを検証することを目的とした。

まず、個々の細胞の ER 活性を視覚的に評価するために、MCF-7 乳癌細胞株に Estrogen response element (ERE) -green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を導入した安定細胞株を作成した (E10 細胞)。AI 剤治療環境の *in vitro* モデル系としてステロイド枯渇培地に TS を添加した培養条件、すなわちエストロゲン枯渇かつアンドロゲン過剰となった培養条件を用いた。この培養条件で E10 細胞を 3 カ月間培養し、複数の AI 剤耐性クローンをピックアップした。種々

の培養条件における各クローンの GFP 発現率をモニタリングすることで、アンドロゲン代謝産物依存性の ER 活性上昇を示すクローンを選択し Variant 細胞株を樹立した。Variant 細胞株においてアンドロゲンである TS や DHT、その代謝産物である 3β -diol は、エストロゲン応答遺伝子を誘導し、親株の E10 細胞に比べ高い細胞増殖を励起することが確認された。これらの Variant 細胞株では、HSD3B1 の発現上昇、AR 発現の低下が認められ、アンドロゲンから 3β -diol への代謝促進、AR を介するシグナル伝達の減弱が、エストロゲン枯渇、アンドロゲン過剰の条件への適応を促進していると考えられた。さらに、親株である E10 細胞に HSD3B1 遺伝子を過剰発現させた場合、あるいは AR 阻害剤を作用させた場合に、Variant 細胞株同様にエストロゲン枯渇、アンドロゲン過剰条件への適応が誘導されることが確認された。次に、間質細胞のアロマターゼによりアンドロゲンから産生されたエストロゲンの乳癌細胞増殖に対する効果をみるモデルとして、ヒト乳癌組織由来の間質細胞とこれらの細胞株との共培養モデル系を構築した。この共培養モデル系を用いて Variant 細胞株が実際に AI 剤耐性を示すかどうかを検証した。この共培養モデル系で、Variant 細胞株の AI 剤感受性は親株の E10 細胞に比べ有意に低いことが確認された。

以上より、AI 治療を想定した培養条件からアンドロゲン代謝産物依存性細胞増殖機構を持つ細胞株を樹立し、HSD3B1 発現の上昇、AR 発現の低下が、アンドロゲン代謝産物依存性の ER 活性化および細胞増殖を増強することで、AI 剤感受性を低下させると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

閉経後ホルモン感受性乳癌において、アロマターゼ阻害剤 (AI 剤) は乳癌局所でのエストロゲン産生を抑制し、エストロゲン受容体 (ER) の活性を阻害し、その際に相対的に過剰となったアンドロゲンがアンドロゲン受容体 (AR) を介して腫瘍抑制的に働くことでその作用を発揮する。3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD3B1) によりジヒドロテストステロン (DHT) からアロマターゼ非依存的に産生される5 α -Androstane-3 β , 17 β -diol (3 β -diol) はエストロゲン活性を持ちホルモン感受性乳癌の増殖を促進することが報告されている。今回、ホルモン感受性乳癌細胞株を用いてこのようなアンドロゲン代謝産物依存性の細胞増殖機構が AI 剤耐性機構として働くかどうかを検証した。

まず MCF-7 乳癌細胞株に Estrogen response element (ERE) -green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を導入した E10 細胞を作成し、これをステロイド枯渇培地にテストステロン (TS) を添加した培養条件、すなわち AI 剤治療を想定した培養条件で長期培養し、5 つの耐性株クローンを得た。種々の培養条件における各クローンの GFP 発現率をモニタリングし、アンドロゲン代謝産物依存性の ER 活性上昇を示すクローンを選択し 2 つの Variant 細胞株を樹立した。得られた Variant 細胞株を用い次のような実験を行った。

1. Variant 細胞株において各種ステロイド投与時の細胞増殖、ER 活性およびエストロゲン応答遺伝子の発現について親株との比較検討を行った。
2. 各細胞株における各種ステロイド代謝酵素、ホルモンレセプターの発現量を比較検討した。
3. 親株の E10 細胞における HSD3B1 過剰発現、AR

シグナルの抑制の意義について検討した。

4. ヒト乳癌組織由来の間質細胞とこれらの細胞株との共培養モデル系を用いて Variant 細胞株が AI 剤耐性を示すかどうかを検証した。

その結果、花村は以下の結論を得た。

1. Variant 細胞株においてアンドロゲンである TS や DHT, その代謝産物である 3 β -diol は、エストロゲン応答遺伝子を誘導し、親株の E10 細胞に比べ高い ER 活性および細胞増殖をもたらすことが確認された。
2. Variant 細胞株では、HSD3B1 の発現上昇、AR 発現の低下が認められ、アンドロゲンから 3 β -diol への代謝促進、AR を介するシグナル伝達の減弱が、エストロゲン枯渇、アンドロゲン過剰の条件への適応を促進していると考えられた。
3. 親株である E10 細胞に HSD3B1 遺伝子を過剰発現させた場合、あるいは AR 阻害剤を作用させた場合に、Variant 細胞株同様にエストロゲン枯渇、アンドロゲン過剰条件への適応が誘導されることが確認された。
4. Variant 細胞株の AI 剤感受性は親株の E10 細胞に比べ有意に低いことが確認された。

これらの結果により、本研究では、AI 剤治療を想定した培養条件からアンドロゲン代謝産物依存性細胞増殖機構を持つ細胞株を樹立し、その Variant 細胞株を用いた実験から、HSD3B1 発現の上昇、AR 発現の低下が、アンドロゲン代謝産物依存性の ER 活性化および細胞増殖を増強することで、AI 剤感受性を低下させることが示唆された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Risk factors for pancreatic stone formation in autoimmune pancreatitis over a long-term course (自己免疫性膵炎の長期経過における膵石形成の危険因子)

丸 山 真 弘

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】自己免疫性膵炎 (以下 AIP) は膵腫大とびまん性膵管狭細像を呈する特異な膵炎で、膵病変局所に著明なリンパ球・形質細胞浸潤を認め、ステロイド治療に良好に反応するため、発症に自己免疫学的機序が想定されている疾患である。AIP は血中 IgG4 値の上昇と病変局所に IgG4 陽性形質細胞の浸潤とい

う特徴的な免疫異常が認められ、現在では、全身性疾患「IgG4 関連疾患」の膵病変と認識されるようになった。急性期の病態として捉えられていた AIP が長期経過で膵石灰化をきたすことが明らかとなり、通常の慢性膵炎に移行しうる可能性も示唆されている。今回の研究目的は、AIP 長期経過観察例における膵石形成の危険因子を明らかにすることである。

【対象と方法】 1998年8月から2011年7月に当科で診断・治療されたAIP患者93名の内、3年以上経過観察が可能であった69名（平均観察期間：91カ月）を対象とした。検討項目として、患者背景（観察期間、アルコール摂取量、ステロイド治療、再燃）、血液所見（Amylase, HbA1c, IgG, IgG4, C3, C4, sIL2R, CIC）、画像所見（膵石、CT検査による膵腫大、内視鏡的逆行性膵管造影検査による膵管狭細の有無）を設定し、膵石形成との関連について検討した。診断時に膵石が存在した17例のうち経過で膵石が増加・増大した8例と、新規に膵石が出現した20例を加えた28例を膵石形成群とし、経過中膵石を認めなかった32例を膵石非形成群とし、この2群間で後ろ向きに比較検討した。

【結果】 2群間での単変量解析において、患者背景は、再燃が膵石形成群に多い傾向を認めたが統計学的な有意差はなく、その他の背景も両群間で有意差を認めなかった。血液所見は、いずれも両群間で有意差を認めなかった。画像所見は、AIP診断時の膵頭部腫大（ $P=0.006$ ）と、膵頭部のWirsung管とSantorini管の両者の膵管狭細所見（ $P=0.010$ ）が、膵石形成群で有意に多く認められた。多変量解析では膵頭部のWirsung管とSantorini管の両者の狭細所見が膵石形成と有意に関連していた（odds ratio 4.4, 95% confidence interval 1.3-15.5, $P=0.019$ ）。また、ステロイド治療後においてもWirsung管とSantorini管の両者の後遺的狭細所見が膵石形成群で多く認められた。

【考察】 膵頭部腫大によるWirsung管とSantorini管の両者の狭細所見が長期に持続することによって、より上流膵管内の膵液うっ滞が生じ、結果として膵石形成にいたると考えられた。膵炎発作後の膵壊死が膵石灰化に関連している可能性も想定されたが、膵酵素やAIPの各種活動性マーカー値と膵石形成とは関連を認めず、また臨床的に強度の膵炎発作を呈する症例も認めず、このような機序は消極的と考えられた。今回の検討では、結果としてステロイド治療による膵石形成予防効果は示せなかったが、今後の検討課題と考える。

【結語】 AIPにおける膵石形成の有意な危険因子は、膵頭部のWirsung管とSantorini管の両者の狭細所見であり、主に膵液うっ滞が膵石形成を引き起こすと考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

自己免疫性膵炎（以下AIP）は、従来は急性期の病態として捉えられていたが、長期経過で膵石灰化を来すことが報告され、通常の慢性膵炎に移行しうる可能性も示唆されてきた。AIPにおける膵石形成の危険因子や機序に関しては不明である。そこで丸山らは、AIPの長期経過における膵石形成機序として、1）膵炎発作後の、膵実質に対する本症特有の障害や高度な炎症性組織障害や膵壊死、2）膵管狭窄の後遺的变化による膵液うっ滞の2つの可能性を想定し、信大病院消化器内科で3年以上経過観察が可能であったAIP 69例を対象に、膵石形成群と非形成群の2群に分け、後ろ向きに患者背景、血液検査、画像検査を比較検討した。

その結果、丸山らは以下の結果を得た。

1. AIP 69例の長期経過で、a) 膵石の新規出現は20例、b) 診断時に膵石を認め経過で増加・増大は8例、c) 診断時に膵石を認め経過で変化なしは9例であり、本症は長期経過で膵石形成する病態と考えられた。
2. 患者背景において、観察期間およびアルコール摂取は膵石形成と関連していなかった。有意差はないが、再燃は膵石形成と関連性が示唆された。
3. 血液検査において、AIPの活動性マーカーと考えられる項目（IgG, IgG4, C3, C4, sIL2-R）は膵石形成と関連性はなく、本症特有の活動性・炎症の程度と膵石形成との関連性は確認できなかった。
4. 画像検査において、膵石形成の危険因子として、単変量解析にて診断時の①膵頭部腫大、②膵頭部のWirsung管とSantorini管の両者狭細が同定され、多変量解析にて後者（OR 4.4, $p=0.006$ ）が同定された。
5. 膵石形成群では、ステロイド治療後にも後遺的な①膵頭部腫大、②膵頭部のWirsung管とSantorini管の両者狭細を認める症例が多かった。
6. ①膵頭部腫大、②膵頭部のWirsung管とSantorini管の両者狭細が、膵全体の膵液うっ滞を生じ、長期経過で膵石形成を引き起こすと考えられた。
7. AIPの長期経過において、膵石非形成例に比べ、主膵管内膵石を認める高度な膵石形成例では、血清Amylase値およびHbA1c値の変化が目立つ傾向にあったが、有意な関連性は確認できなかった。

これらの結果より、AIPは長期経過で膵石形成を来す病態であることが明らかとなった。さらに、AIP

の長期経過における臍石形成の危険因子として、①臍頭部腫大、②臍頭部の Wirsung 管と Santorini 管の両者狭細が同定され、これらは、臍頭部の臍管狭窄が臍全体に臍液うっ滞を生じさせ、臍石形成を引き起

こすという機序が考えられた。本研究は、AIP の長期経過における臍石形成の実態ならびに機序の解明に寄与した。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。

Lipocalin2 enhances the matrix metalloproteinase-9 activity and invasion of extravillous trophoblasts under hypoxia (Lipocalin2は低酸素環境で MMP-9活性と絨毛外トロフォブラストの浸潤を亢進させる)

小 原 久 典

(論文の内容の要旨)

【目的】絨毛外トロフォブラスト(以下 EVT)は、妊娠初期に脱落膜や子宮筋層に浸潤し、らせん動脈の再構築に関与し、正常な妊娠の維持に重要な役割を果たすと考えられている。一方、EVT の浸潤不良は妊娠高血圧症候群や子宮内胎児発育遅延などの疾患に関連すると考えられている。これまで EVT の浸潤調節には Matrix Metalloproteinase (以下 MMP)、酸素濃度、内分泌因子やサイトカインなどが関与していると報告されているが、その調節機序ははっきりと分かっていない。Lipocalin2 (以下 LCN2) は鉄イオン輸送、バクテリアの増殖抑制などの様々な機能が報告されている分泌タンパクであるが、MMP-9の安定化・作用増強や腫瘍細胞の浸潤能亢進にも関わることが報告されている。また LCN2は、妊娠中の血中濃度増加や妊娠後期のトロフォブラストでの発現も報告されているが、その機能や分布は不明である。そこで今回、妊娠初期絨毛での LCN2の発現や機能、特に EVT の浸潤調節への関与と、妊娠初期の子宮内に特徴的な低酸素環境・酸素濃度勾配との関連に関して検討した。

【方法】文書により同意を得て、人工妊娠中絶術により得られた合併症のない妊娠7~10週の妊娠初期絨毛組織を、以下の実験に用いた。まず、ホルマリン固定した妊娠初期絨毛での LCN2発現を免疫組織染色にて検討した。次に絨毛組織から分離培養した EVT と、EVT 様の性質を示す絨毛癌細胞株 JAR での LCN2発現を RT-PCR、蛍光免疫染色と western blot 法で確認した。さらにこれらの細胞において組み換え LCN2 (rLCN2) 添加や特異的 shRNA 導入による LCN2発現抑制を行い、LCN2の浸潤能、増殖能と MMP-9活性への影響を、matrigel invasion assay, WST-1 assay と gelatin gel zymography にてそれぞれ検討した。同様の方法を用いて、21%、5%、2%の異なる酸素環境下における LCN2の発現変化と

機能の解析を行った。

【結果】LCN2は妊娠初期絨毛において、EVT、サイトトロフォブラストと脱落膜細胞に強い発現を認めなかった。シンシチオトロフォブラストでは発現を認めなかった。分離培養した EVT と JAR 細胞において、rLCN2添加により、増殖能は変化しなかったが、浸潤能と MMP-9活性は共に用量依存的に増加し、500 ng/ml 添加で浸潤能は EVT で325% (P<0.01)、JAR 細胞で215% (P<0.01) に増加し、MMP-9活性は EVT で169%、JAR 細胞で147%に増加した。また、LCN2発現抑制により、JAR 細胞の浸潤能は26%まで、MMP-9活性は51%まで低下したが、500 ng/ml の rLCN2添加により浸潤能は61%まで回復した。酸素濃度の影響では、EVT と JAR の両細胞とも低酸素ほど LCN2 mRNA 発現、MMP-9活性は増加し、浸潤能も亢進した。特に JAR 細胞の浸潤能は、20%酸素下に比較して、2%酸素下で211% (P<0.01) に増加したが、LCN2発現抑制により逆に12%まで著明に抑制された。さらに、この2%酸素下の LCN2発現抑制 JAR 細胞に500 ng/ml の rLCN2添加を行うと、浸潤能は79%まで回復した。

【結論】本研究により、LCN2は妊娠初期絨毛において、特に EVT、サイトトロフォブラスト、脱落膜細胞で強い発現を認めることが示された。また、培養細胞の実験結果から、LCN2が EVT の浸潤能を亢進させ、その作用は MMP-9活性増強を介していることが示唆された。さらに LCN2は低酸素環境における EVT の浸潤能亢進にも関与していると考えられた。以上より、LCN2は妊娠初期の EVT の浸潤調節に重要な役割を果たしていると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

絨毛外トロフォブラスト(以下 EVT)は、妊娠初期胎盤形成過程において脱落膜や子宮筋層に浸潤し、正常な妊娠維持に重要な役割を果たすと考えられる。

一方、EVTの浸潤調節機序は十分には解明されていない。Lipocalin2 (LCN2)は、MMP-9の安定化など種々の作用が報告され、妊娠中の血中濃度増加や妊娠後期のトロフォブラストで発現も報告されているが、妊娠初期絨毛での発現や機能は不明である。そこで小原久典は、妊娠初期絨毛でのLCN2の発現や機能、特にEVTの浸潤調節への関与の検討を行った。まず、妊娠7~10週の妊娠初期絨毛組織におけるLCN2発現を免疫組織染色にて検討し、妊娠初期絨毛組織から分離培養したEVT細胞と、EVT様の性質を示す絨毛癌細胞株JARでのLCN2発現をRT-PCR, western blot法で確認した。これらの細胞で組み換えLCN2 (rLCN2)添加やshRNA法によるLCN2発現抑制を行い、LCN2の浸潤能、増殖能、MMP-9活性への影響をmatrigel invasion assay, WST-1 assayとGelatin gel zymographyにて検討した。同様の方法を用いて、21%, 5%, 2%の酸素環境下におけるLCN2発現変化と浸潤能、MMP-9活性への影響を解析した。

その結果、以下の成績を得た。

1. LCN2は、妊娠初期のEVT, サイトトロフォブラストと脱落膜細胞に強い発現を認めた。
2. LCN2はEVT細胞, JAR細胞で発現を認めた。
3. これらの細胞の増殖能にLCN2は影響しなかった。
4. 浸潤能, MMP-9活性はrLCN2添加により亢進し, LCN2発現抑制により低下した。
5. 酸素濃度低下はEVT細胞, JAR細胞でのLCN2発現, MMP-9活性, 浸潤能を亢進させた。
6. 酸素濃度低下によるJAR細胞の浸潤能亢進はLCN2発現抑制により著明に抑制され, rLCN2添加により回復した。

本研究は妊娠初期絨毛, 特にEVTでのLCN2発現を示し, LCN2がMMP-9の活性調節等を介してEVT浸潤調節に関与することを初めて示した。さらに, 妊娠初期胎盤形成過程における子宮内腔の低酸素環境・酸素濃度勾配が, LCN2発現調節を介してEVTの浸潤調節を行っている可能性を初めて示した論文である。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。

Ubiquinol-10 Supplementation Activates Mitochondria Functions to Decelerate Senescence Accelerated Mice (還元型コエンザイムQ10の老化促進モデルマウス (SAMP1) への投与はミトコンドリア機能を活性化し, 老化を遅延する)

田 耕

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】コエンザイムQ10 (CoQ10)はミトコンドリアでエネルギー生産に関与する電子伝達系の重要な因子であり, 強力な脂溶性抗酸化物質でもある。加齢に伴い血漿や組織中のCoQ濃度が減少するため, 抗老化サプリメントとして使用されてきた。しかしその作用機序についてはほとんど解明されていない。CoQ10は生体内では大部分が還元型CoQ10 (ubiquinol-10)として存在するが, 従来は酸化型CoQ10のみがサプリメントとして使用可能であった。老化促進モデルマウスSAMP1は短寿命と促進老化を特徴とするモデルマウスで, 加齢性難聴や老化アミロイドシス等の老化関連疾患を発症する。促進老化の原因として, ミトコンドリア機能の低下や加齢に伴う高酸化ストレス状態が指摘されて来た。田らは, ubiquinol-10を補給することにより, SAMP1マウスの促進老化が遅延することを既に明らかにしている (Yan J et al. Exp Gerontol 2006)。本研究では, ubiquinol-10

投与による老化や老化関連疾患の抑制メカニズムの解明をめざし, ubiquinol-10投与の効果が最も高かった肝臓と加齢性難聴に直接関連する内耳について, 分子生物学的手法により解析した。

【方法】SAMP1マウス雌 (日本エスエルシー)に1, 7, 13カ月齢から, 0.3% ubiquinol-10含有CE-2飼料を自由摂取させた (それぞれ幼若, 成熟, 高齢群)。体重, 試料摂取量, 老化度評点を毎月測定し, 2, 7, 13および19月齢でマウスを屠殺して組織を摘出した。また, HepG2細胞に3 μ Mのubiquinol-10を添加し, 48時間培養した。肝臓, 内耳, およびHepG2細胞の酸化ストレスやミトコンドリア機能に関連するマーカーや遺伝子の発現を解析した。

【結果・考察】1) 加齢性難聴: SAMP1マウスの聴性脳幹反応を測定した結果, 対照群では7月齢で高音域障害が全個体に出現したが, 幼若期ubiquinol-10開始群では障害程度が低く, 19月齢でも高音域の聴力を保持するマウスが存在した。また, 成熟期や高齢期

開始群では高音域障害を回復できなかったが、中低音域の聴力の保持が認められた。2) 酸化ストレスマーカー；加齢によって増加する酸化脂質量（マロンジアルデヒド）、酸化タンパク質（カルボニル化タンパク質）、DNA 損傷頻度（AP site）が ubiquinol-10投与群では有意に減少し、高齢期からの投与でも効果が得られた。加齢に伴い悪化する抗酸化指標 GSH/GSSG も ubiquinol-10投与群では改善していた。3) ミトコンドリア機能；Sirtuin 遺伝子群やミトコンドリア機能関連遺伝子（*Pgc1a*, *Ppara* 等）の発現量とそれらのタンパク質量の加齢に伴う有意な減少は ubiquinol-10投与によって改善された。また、脱アセチル化酵素である Sirtuin タンパク質の活性化により PGC-1 α やミトコンドリアの抗酸化関連因子 SOD2 や IDH2のアセチル化程度が減少した。さらに ubiquinol-10投与によりミトコンドリア電子伝達系の複合体 I, IVの機能改善が認められ、ミトコンドリア数、ATP 生産量、ミトコンドリアタンパク質調整因子（NRF2, TFAM）などの加齢に伴う減少が抑制された。

HepG2細胞への ubiquinol-10投与によって、ミトコンドリア量の増加、酸素消費量の増加、ROS 生産の抑制、NAD/NADH 比の上昇が認められた。

PGC-1 α , Sirt1を介した ubiquinol-10投与効果のメカニズムとして、PGC-1 α , Sirt1の上流因子である cAMP 量の増加と CREB, AMPK, LKB1のリン酸化状態の亢進が認められた。

以上の結果により、ubiquinol-10の老化や加齢疾患抑制作用として、従来の直接的な抗酸化作用だけではなく、Sirt1, Sirt3, PGC-1 α などを介したミトコンドリア機能の活性化による酸化ストレスの抑制という新しいメカニズムの重要性を示唆した。

(論文審査の結果の要旨)

コエンザイム Q10 (CoQ10) は ミトコンドリアでエネルギー生産に関与する電子伝達系の重要な因子であり、治療薬や抗老化サプリメントとして使用されてきた。しかし抗老化効果や、その作用機序についてはほとんど解明されていない。我々は、加齢に伴い減少する還元型 CoQ10 (ubiquinol-10) を補給することにより、老化促進モデルマウス SAMP1の促進老化が遅延することを明らかにしてきた。本研究では、ubiquinol-10の加齢疾患抑制メカニズムの解明をめざし、ubiquinol-10摂取によって CoQ の集積が最も高かった肝臓と聴力に直接関連する内耳について、分子生物

学的手法により解析した。

SAMP1雌マウスに 1, 7, 13カ月齢から、0.3% ubiquinol-10含有 CE-2飼料を自由摂取させた。体重、飼料摂取量、老化度評点を毎月測定し、2, 7, 13および19カ月齢でマウスを屠殺して組織を摘出した。また、HepG2細胞に 3 μ M の ubiquinol-10を添加し、48時間培養した。肝臓、内耳、および HepG2細胞の酸化ストレスやミトコンドリア機能に関連するマーカーや遺伝子の発現を解析した。

その結果、田 耕は次の結論を得た。

1. SAMP1マウスは ubiquinol-10を補給することにより
 - 1) 老化度評点の加齢に伴う上昇が抑制された。
 - 2) 加齢性難聴の進行を軽減した。
 - 3) 加齢に伴い増加する酸化脂質量、酸化タンパク質や DNA 損傷頻度が減少し、GSH/GSSG も改善していた。
 - 4) Sirtuin 遺伝子 (*Sirt1*, *Sirt3*) やミトコンドリア機能関連遺伝子 (*Pgc1a* 等) の発現量と、それらのタンパク質量の加齢に伴う減少が、改善されていた。また、PGC-1 α や、ミトコンドリアで発現する抗酸化関連因子 SOD2, IDH2のアセチル化程度が減少した。さらに ubiquinol-10投与によりミトコンドリア電子伝達系の複合体 I, IVの機能改善が認められ、ミトコンドリア数、ATP 生産量、ミトコンドリアタンパク質誘導因子 (NRF2, TFAM) などの加齢に伴う減少が抑制された。
2. HepG2細胞への ubiquinol-10投与によって、ミトコンドリア数の上昇、酸素消費量の増加、ROS 生産の抑制、NAD/NADH 比の上昇が認められた。また Sirt1や Adenylyl cyclase の阻害剤の投与は ubiquinol-10の効果を抑制した。

以上の結果により、ubiquinol-10の老化や加齢疾患抑制作用として、従来の直接的な抗酸化作用だけではなく、Sirt1, Sirt3, PGC-1 α などを介したミトコンドリア機能の活性化による酸化ストレスの抑制という新しいメカニズムの重要性を示唆した。このような田耕の研究成果は、ubiquinol-10による老化/加齢疾患抑制効果の新たなメカニズムの一端を明らかにした。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。

Clinical features of a new disease concept, IgG4-related thyroiditis (IgG4関連甲状腺炎の臨床的特徴)

渡 邊 貴 之

(論文の内容の要旨)

【目的】 IgG4関連疾患は諸臓器に炎症や線維化をきたす全身性疾患であり、代表的な病変として自己免疫性膵炎、硬化性胆管炎、涙腺唾液腺炎、尿細管間質性腎炎、後腹膜線維症がある。我々は以前、自己免疫性膵炎症例において甲状腺機能低下を有意に多く合併することを報告し、また同様の報告は他施設よりもなされている。今回 IgG4関連疾患で認められる甲状腺機能低下が IgG4関連疾患に含有されうる病態か検討した。

【方法】 対象は IgG4関連疾患症例114例であり、主診断の内訳は自己免疫性膵炎92例、Mikulicz 病15例、IgG4関連硬化性胆管炎 7 例であった。甲状腺機能低下・甲状腺自己抗体合併頻度、IgG4関連疾患活動性マーカー、ステロイド治療への反応性、甲状腺画像所見、甲状腺病理所見を後ろ向きに比較検討した。

【結果】 ① 114例中22例 (19%) に甲状腺機能低下 (TSH > 4 mIU/L) を認めた。22例中11例は顕在性甲状腺機能低下 (FT4 < 1 ng/dL) であり、11例は潜在性甲状腺機能低下 (FT4 ≥ 1 ng/dL) であった。甲状腺機能低下例では抗サイログロブリン抗体陽性または抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体陽性を半数に認めた。

② 甲状腺機能低下22例と甲状腺機能正常92例の血清学的比較では、甲状腺機能低下群において IgG, IgG4, 免疫複合体, β2ミクログロブリンは有意に高値であり、C3は低値であった。

③ ステロイド治療前後の TSH・FT4の評価が可能であった甲状腺機能低下10例において、TSHは治療後に有意に低下し ($p=0.005$), FT4は有意に上昇した ($p=0.047$)。

④ 顕在性甲状腺機能低下群, 潜在性甲状腺機能低下群, IgG4関連疾患における甲状腺機能正常群, 甲状腺機能が正常な他疾患の4群における甲状腺容積の比較では顕在性甲状腺機能低下群の甲状腺容積は他群と比較して大きいという結果であった。

⑤ IgG4関連疾患診断時に甲状腺癌が同時に診断された1例 (甲状腺機能正常) の甲状腺切除検体において、局所への IgG4陽性形質細胞浸潤 (IgG4陽性形質細胞185個/HPF, IgG4/IgG 陽性細胞比64%) と濾胞構造の消失を認めた。

【結論】 IgG4関連疾患にみられる甲状腺機能低下は

IgG4関連疾患の疾患特徴を有するものであり、IgG4関連甲状腺炎として IgG4関連疾患に含有されうる病態であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

IgG4関連疾患では甲状腺機能低下を多く合併することが報告されている。IgG4関連疾患の代表的な病変として自己免疫性膵炎、硬化性胆管炎、涙腺唾液腺炎、尿細管間質性腎炎、後腹膜線維症があるが、IgG4関連疾患で認められる甲状腺機能低下が IgG4関連疾患に含有されうる病態か検討した。

IgG4関連疾患症例114例を対象とし、甲状腺機能低下・甲状腺自己抗体合併頻度、IgG4関連疾患活動性マーカー、ステロイド治療への反応性、甲状腺画像所見、甲状腺病理所見を後ろ向きに比較検討した。

その結果、渡邊は次の結論を得た。

1. 114例中22例 (19%) に甲状腺機能低下 (TSH > 4 mIU/L) を認めた。22例中11例は顕在性甲状腺機能低下 (FT4 < 1 ng/dL) であり、11例は潜在性甲状腺機能低下 (FT4 ≥ 1 ng/dL) であった。甲状腺機能低下例では抗サイログロブリン抗体陽性または抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体陽性を半数に認めた。
2. 甲状腺機能低下22例と甲状腺機能正常92例の血清学的比較では、甲状腺機能低下群において IgG, IgG4, 免疫複合体, β2ミクログロブリンは有意に高値であり、C3は低値であった。
3. ステロイド治療前後の TSH・FT4の評価が可能であった甲状腺機能低下10例において、TSHは治療後に有意に低下し ($p=0.005$), FT4は有意に上昇した ($p=0.047$)。
4. 顕在性甲状腺機能低下群, 潜在性甲状腺機能低下群, IgG4関連疾患における甲状腺機能正常群, 甲状腺機能が正常な他疾患の4群における甲状腺容積の比較では顕在性甲状腺機能低下群の甲状腺容積は他群と比較して大きい結果であった。
5. IgG4関連疾患診断時に甲状腺癌も同時に診断された1例 (甲状腺機能正常) の甲状腺切除検体において、局所への IgG4陽性形質細胞浸潤と濾胞構造の消失を認めた。

これらの結果より IgG4 関連疾患にみられる甲状腺機能低下は IgG4 関連疾患の疾患特徴を有するものであり IgG4 関連甲状腺炎として IgG4 関連疾患に含有され

うる病態であることが示唆された。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Functional Roles of Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) Channels in the Cold Stress-Induced Detrusor Overactivity Pathways in Conscious Rats (ラット冷えストレス誘発排尿筋過活動の機序における温度感受性受容体 (TRPM8) の機能的役割の考察)

張 雷

(論文の内容の要旨)

Aims: To investigate functional roles of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels, we determined if TRPM8 channel antagonist could inhibit the detrusor overactivity induced by menthol spray and low temperature.

Methods: Two days prior to cystometric investigation, the bladder of 10-week-old Spague-Dawley rats were cannulated. After 20 min of baseline cystometry period at room temperature (RT: $27 \pm 2^\circ\text{C}$), the TRPM8 channel antagonist, N-(4-tert-butylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)pi-perazine-1-carboxamide (BCTC), or vehicle, was administered through a jugular vein catheter (n=6). A 90% menthol solution, which was TRPM8 channel agonist, was sprayed onto rump to leg skin once every 5 min for 20 min, and then cystometric measurements were repeated. After a 30-min recovery period, the rats were intravenously administered $0.1 \mu\text{mol/kg}$ BCTC. Five minutes later, they were again sprayed, and then cystometric measurements were recorded. In separate experiments, cannulated rats were intravenously administered 0.001, 0.01, or $0.1 \mu\text{mol/kg}$ BCTC (n=6 each dose) at RT. Five minutes later, they were transferred to expose low temperature (LT: $4 \pm 2^\circ\text{C}$). During LT exposure, the cystometric measurements were recorded for 20 min.

Results: The rats sprayed with menthol exhibited the decrease of the voiding interval, micturition volume, and bladder capacity. After treatment of BCTC, the rats did not show these decreases. Exposure to LT elicited detrusor overactivity characterized with decreased voiding interval, micturition volume, and bladder capacity. However, at 0.01 and

$0.1 \mu\text{mol/kg}$, BCTC inhibited the cold stress-induced detrusor overactivity.

Conclusions: TRPM8 channels antagonist, BCTC, inhibited detrusor overactivity in rats sprayed with menthol. Furthermore, the BCTC inhibited the cold stress-induced detrusor overactivity. Therefore, TRPM8 channels expressing within the skin mediate detrusor overactivity elicited by menthol spray and exposure to low temperature.

(論文審査の結果の要旨)

Previous studies showed that both cold stress (Imamura, NeuroUrol Urodyn, 2008) and menthol stimulation (Chen Z, NeuroUrol Urodyn, 2010) elicited detrusor overactivity in conscious rats. It is reported that transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels in skin and/or sensory neurons are activated by menthol and low temperature ($< 25 \sim 28^\circ\text{C}$) stimulation (Mckemy DD, Nature, 2002; Reid G, Nature, 2001).

In this study, to investigate functional roles of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) in the cold stress- and menthol spray-induced detrusor overactivity, we determined if TRPM8 channel antagonist could inhibit the both stimuli-induced responses.

Two days prior to cystometric investigation, the bladder of 10-week-old Spague-Dawley rats were cannulated. After 20 min of baseline cystometry period at room temperature (RT: $27 \pm 2^\circ\text{C}$), the TRPM8 channel antagonist, N-(4-tert-butylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)pi-perazine-1-carboxamide (BCTC), or vehicle, was administered through a jugular vein catheter.

1. A 90% menthol solution was sprayed onto rump to leg skin once every 5 min for 20 min, and

then cystometric measurements were repeated. After a 30-min recovery period, the rats were intravenously administered 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ BCTC. Five minutes later, they were again sprayed and cystometry recorded.

2. The cannulated rats were intravenously administered 0.001, 0.01, or 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ BCTC. Five minutes later, they were exposed to low temperature (LT: $4\pm 2^\circ\text{C}$) for 20 min of cystometric measurements.

Results from these study :

1. The rats sprayed with menthol exhibited the decrease of the voiding interval, micturition volume, and bladder capacity. After treatment of BCTC, the rats did not show these decreases.
2. Both the BCTC-free and 0.001 $\mu\text{mol/kg}$ BCTC-treated rats exhibited cold stress-induced

detrusor overactivity that characterized with decreases of voiding interval, micturition volume, and bladder capacity during LT exposure. However, the high dose, 0.01 and 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ BCTC-treated rats partially inhibited the cold stress-induced detrusor overactivity.

3. TRPM8 channel antagonist, BCTC inhibited the detrusor overactivity induced by menthol-spray on the skin. BCTC also inhibited the cold stress-induced detrusor overactivity.

This study concluded that TRPM8 channels expressing within the skin mediate detrusor overactivity elicited by menthol spray and exposure to low temperature.

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。

Synovial deposition of wild-type transthyretin-derived amyloid in knee joint osteoarthritis patients (変形性膝関節症患者の関節滑膜には野生型トランスサイレチン由来のアミロイドが沈着する)

高 梨 哲 生

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】野生型トランスサイレチン (transthyretin:TTR)は老人性全身性アミロイドーシス (senile systemic amyloidosis : SSA) の原因となり、高齢者において心臓の障害による緩徐進行性心不全を呈する。野生型 TTR 由来アミロイドは内臓器官への沈着が起らない場合でも腱や靭帯といった軟部組織への沈着が見られ、手関節では正中神経を圧迫し手根管症候群を引き起こすとされる。この野生型 TTR 由来のアミロイドが軟部組織に優先的に沈着する明確な理由は不明だが、関節滑膜も常に機械的ストレスに曝されている軟部組織の1つであり、機械的ストレスが重要な役割を果たしているかもしれない。老いたサバンナモンキーにおいて、関節滑膜への TTR アミロイド沈着による膝関節での出血性関節炎の報告がある。加齢に関連して関節軟骨と軟骨下骨の変性が起こっている変形性膝関節症患者の手術で得られたヒト検体において、滑膜への TTR アミロイド沈着の有無と組織学的所見、また臨床所見との関連性の有無を調べた。

【方法】丸の内病院で変形性膝関節症に対して関節形成術または人工関節置換術を行った患者232名 (男性31名, 女性201名, 平均73.0 \pm 9.1歳) を連続的に前向

きに登録し調べた。手術で得られたおよそ直径1cmの滑膜組織をコンゴレッド染色と免疫組織化学染色を施行した。TTR 由来のアミロイド陽性の場合には、TTR 遺伝子の4つ全てのエクソンについて直接DNA シークエンス法で塩基配列から変異の有無を調べた。術中の肉眼的な関節内所見や合併症、急性期反応蛋白や心電図・胸部X線の異常所見といった対象患者の臨床情報は診療録から検索した。本研究は丸の内病院の倫理委員会で承認され (No. 10-01)、各患者にインフォームドコンセントを得て行われた。

【結果】232名から得た322の検体を解析した。21名 (男性5名, 女性16名, 平均79.0 \pm 4.6歳) から得た26検体 (8.1%) でアミロイド沈着を認め、これらは抗TTR抗体で染色された。18名は不均一なアミロイドの蓄積を滑膜上皮下の疎性結合織に認め、時に結節を形成していた。残りの3名では脂肪織内の小血管壁への沈着が見られた。これらの患者は臨床経過も検査データも術中の関節内所見にも特記すべきことはなかった。TTR 遺伝子の解析では変異を認めなかった。TTR アミロイド陽性群と陰性群では患者年齢において有意差が見られた (79.0 \pm 4.6歳 vs. 72.4 \pm 9.3歳, $p<0.001$)。ロジスティック回帰分析では加齢が膝関

節へのアミロイド沈着に関して独立した危険因子(オッズ比71.02, 95%信頼区間4.25-1831.08)であった。

【結論】野生型 TTR 由来アミロイドの滑膜組織への沈着は長期間の機械的ストレスや SSA の部分症状と考えられ, 変形性膝関節症患者のおよそ 8%に認められた。滑膜へのアミロイド沈着による明らかな臨床経過の特徴は認められず, このタイプのアミロイドーシスが変形性膝関節症の進行を加速するか否かは不明であった。

(論文審査の結果の要旨)

野生型トランスサイレチン (transthyretin : TTR) は老人性全身性アミロイドーシス (senile systemic amyloidosis : SSA) の原因となり, 高齢者において心臓の障害による緩徐進行性心不全を呈する。野生型 TTR 由来アミロイドは内臓器官への沈着が見られない場合でも腱や靭帯といった軟部組織への沈着を生じ, 手関節では正中神経を圧迫し手根管症候群を引き起こすとされる。また老いたサバンナモンキーにおいては, 関節滑膜への TTR アミロイド沈着による膝関節での出血性関節炎の報告がある。加齢に関連して関節軟骨と軟骨下骨の変性が起こっている変形性膝関節症患者の手術で得られたヒト検体において, 滑膜への TTR アミロイド沈着の有無と組織学的所見, また臨床所見との関連性の有無を調べた。

その結果, 高梨は次の結論を得た。

1. 232名から得た322の検体を解析した結果, 21名(男性5名, 女性16名, 平均79.0±4.6歳)から得た

26検体 (8.1%) でアミロイド沈着を認め, これらは全て抗 TTR 抗体で染色された。

2. 18名は不均一なアミロイドの蓄積を滑膜上皮下の疎性結合織に認め, 時に結節を形成した。残りの3名では脂肪織内の小血管壁への沈着が見られた。
3. これらの患者では臨床経過, 検査データ, 術中の関節内所見の全てにおいて特記すべきことがなかった。
4. TTR 遺伝子の解析では変異を認めず, 野生型 TTR 由来のアミロイドが沈着していると考えられた。
5. TTR アミロイド陽性群と陰性群では患者年齢において有意差が見られた (79.0±4.6歳 vs. 72.4±9.3歳, p<0.001)。ロジスティック回帰分析では, 加齢が膝関節へのアミロイド沈着に関して独立した危険因子であった (オッズ比71.02, 95%信頼区間4.25-1831.08)。

これらの結果より野生型 TTR 由来アミロイドの滑膜組織への沈着は長期間の機械的ストレスや SSA の部分症状と考えられ, 変形性膝関節症患者のおよそ 8%に認められた。滑膜へのアミロイド沈着による明らかな臨床経過の特徴は認められず, このタイプのアミロイドーシスが変形性膝関節症の進行を加速するか否かは不明であった。

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。

Reduced expression of α GlcNAc in Barrett's oesophagus adjacent to Barrett's adenocarcinoma—a possible biomarker to predict the malignant potential of Barrett's oesophagus (バレット腺癌に隣接するバレット食道では α GlcNAc の発現が低下している～バレット食道の悪性化を予測するバイオマーカーとしての可能性)

岩谷 勇 吾

(論文の内容の要旨)

【目的】バレット食道の悪性化を予測する有効なバイオマーカーに関しては定まったものはない。非還元末端に α 1, 4 結合した N-アセチルグルコサミンを有する O-グリカン (α GlcNAc) は胃粘膜の腺粘液細胞から分泌されるユニークな糖鎖で, バレット食道の腺粘液細胞内にも存在する。 α GlcNAc の生合成に関わる糖転移酵素である α 1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (α 4GnT) を欠損した α 4GnT ノックアウトマウスでは胃腺癌が自然発生することから, こ

の糖鎖は胃癌の tumor suppressor として機能することが示唆されている (Karasawa et al. J. Clin. Invest. 2012; 122; 923-934)。しかしながら, バレット食道における α GlcNAc の働きに関しては未だ明らかになっていない。今回我々はバレット食道における α GlcNAc の発現低下がバレット腺癌の発癌に関わっているのか検討を行った。

【方法と結果】35例のバレット腺癌の病理標本に対し, α GlcNAc とそのコア蛋白である MUC6, さらに腸型化マーカーである CDX2 の免疫染色を行った。コン

トロール群として、バレット腺癌を有さないバレット食道35例（食道扁平上皮癌で食道摘出が施行された症例）の病理標本に対し、同様の染色を行った。正常胃粘膜では α GlcNAcとMUC6は同じ細胞で陽性となるが、バレット腺癌に隣接するバレット食道ではMUC6の発現に対し α GlcNAcの発現が有意に低下しており（ $P=0.0025$ ）、 α GlcNAcの発現低下がバレット食道の発癌に関与している可能性が示唆された。特にその傾向は腫瘍径の小さい症例（20 mm以下）、腫瘍の深達度の浅い症例（M癌）に強く見られ、 α GlcNAcは発癌の比較的早期の段階に関与していると推測された。また、癌の粘液形質が腸型である症例、背景粘膜に腸上皮化生を伴う症例においても α GlcNAcの発現低下は顕著であり、 α GlcNAcの発現低下とバレット食道・腫瘍の腸型化には関連があると考えられた。さらに、バレット腺癌に隣接する粘膜において、 α GlcNAcと腸型マーカーであるCDX2の発現には負の相関がみられた。

【考察】バレット腺癌に隣接するバレット食道では α GlcNAcの発現が低下しており、 α GlcNAcがバレット腺癌の発癌を予測するバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。胃酸や胆汁酸の逆流によってもたらされる食道の炎症がバレット食道の発癌に深く関与することは広く知られている。 α 4GnTノックアウトマウスではIL-1 β などの炎症性サイトカインやCCL2などのケモカインの発現が上昇することが報告されているが、炎症を伴うバレット食道でもCCL2などのケモカインが上昇しており、 α GlcNAcはこれらの炎症に対して抑制的に働くことで発癌を予防しているものと推測された。また、バレット食道の腸型化は発癌に深く関与すると考えられているが、腸型化マーカーであるCDX2はIL-1 β ・NF- κ Bを介する経路で発現することが知られている。同様に α 4GnTノックアウトマウスでもIL-1 β の発現が亢進しており、 α GlcNAcが発現低下することで腸型化が促進され、発癌が促進される可能性も示唆された。 α GlcNAcがバレット腺癌の予測因子となりうるか、今後の前向き検討が必要である。

（論文審査の結果の要旨）

バレット食道の悪性化を予測する有効なバイオマーカーに関しては定まったものはない。非還元末端に α 1, 4結合したN-アセチルグルコサミンを有するO-グリカン（ α GlcNAc）は胃粘膜の腺粘液細胞から分泌されるユニークな糖鎖で、バレット食道の腺粘液細

胞内にも存在する。 α GlcNAcの生合成に関わる糖転移酵素である α 1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素（ α 4GnT）を欠損した α 4GnTノックアウトマウスでは胃腺癌が自然発生することから、この糖鎖は胃癌のtumor suppressorとして機能することが示唆されている（Karasawa et al. J. Clin. Invest. 2012；122；923-934）。しかしながら、バレット食道における α GlcNAcの働きに関しては未だ明らかになっていない。本研究ではバレット食道における α GlcNAcの発現低下がバレット腺癌の発癌に関与しているのか検討を行った。

35例のバレット腺癌の病理標本に対し、 α GlcNAcとそのコア蛋白であるMUC6、さらに腸型化マーカーであるCDX2の免疫染色を行った。コントロール群として、バレット腺癌を有さないバレット食道35例（食道扁平上皮癌で食道摘出が施行された症例）の病理標本に対し、同様の染色を行った。

その結果、岩谷は次の結論を得た。

1. バレット腺癌の背景上皮では、本来MUC6と同等に染色される α GlcNAcの発現低下が見られた。
2. 特にその傾向は腫瘍径の小さい症例（20 mm以下）、腫瘍の深達度の浅い症例（M癌）に強く見られた。
3. 癌の粘液形質が腸型である症例、癌の背景粘膜に腸上皮化生を伴う症例においても同様の傾向がみられた。
4. バレット腺癌に隣接する粘膜において、 α GlcNAcと腸型マーカーであるCDX2の発現には負の相関がみられた。

これらの結果より、 α GlcNAcはバレット食道の発癌に関与している可能性が示唆された。特に発癌の早期の段階に、バレット食道の腸型化の経路と関係することによって関与している可能性が考えられる。また、 α GlcNAcがバレット腺癌の発癌を予測するバイオマーカー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。

The relationship between $\alpha 1$ -adrenergic receptors and TRPM8 channels in detrusor overactivity induced by cold stress in ovariectomized rats (卵巣摘出ラットにおける冷えストレス誘発排尿筋過活動に対する $\alpha 1$ アドレナリン受容体と皮膚発現する TRPM8受容体の関連についての検討)

野 口 涉

(論文の内容の要旨)

【目的】 临床上、閉経後の女性が頻尿や尿意切迫感などの過活動膀胱様症状を訴え受診することを経験する。エストロゲン欠乏と排尿機能の関連について諸家の報告があるが、現時点では不明な点が多い。また寒冷季節や急激な冷えなどの冷えストレスにより過活動膀胱症状が増悪することを日常生活で経験することがある。我々は以前の研究で、ラットにおいて冷えストレスにより排尿筋過活動が引き起こされる実験モデルを確立している。今回、閉経後の冷えストレスによる過活動膀胱の機序解明を目的とし、卵巣摘出ラットを用いて検討した。

【方法】 30週齢雌 SD ラットを、卵巣摘出群 (OVX, $n=16$) と偽手術群 (sham, $n=8$) に分け、卵巣摘出術あるいは偽手術を施行し、5週間後、両群とも室温下 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) で20分間の無拘束無麻酔膀胱内圧測定を行い、basal pressure, micturation pressure, 排尿間隔, 排尿量, 膀胱容量について評価を行った。その後、OVX群 ($n=8$) と sham群 ($n=8$) に生食を静注後低温下 ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) に移行し、冷えストレスを与え20分間膀胱機能を評価した。また OVX 群のうち8匹に、ナフトピジル (1.0 mg/kg) を静注し、5分後に低温下に移行し20分間膀胱機能を評価した。その後、皮膚を摘出し、thermosensitive transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) の発現をタンパクおよび mRNA レベルで測定し、OVX群と sham群間で比較を行った。

【結果】 皮膚の mRNA レベルの TRPM8受容体の発現は OVX群 (2.36 ± 0.61) が sham群 (0.83 ± 0.12 , $P < 0.01$) と比較し有意に増加していた。また皮膚組織に免疫染色を行い TRPM8受容体陽性の面積の割合を画像解析した。OVX群 (0.0063 ± 0.0011) が sham群 (0.0031 ± 0.0005 , $P < 0.01$) と比較し mRNA と同様有意に増加していた。膀胱機能において室温下、低温下とも sham群、OVX群間の basal pressure, micturation pressure に有意な差は認められなかった。室温下：低温下の排尿間隔 (分) は sham群が $4.16 \pm 0.36 : 2.98 \pm 0.48$ ($P < 0.05$), OVX群が

$4.30 \pm 0.54 : 2.02 \pm 0.26$ ($P < 0.01$) であった。室温下：低温下の膀胱容量 (ml) は sham群 $0.83 \pm 0.08 : 0.63 \pm 0.10$ ($P < 0.05$), OVX群が $0.76 \pm 0.11 : 0.43 \pm 0.07$ ($P < 0.01$) であった。Sham群, OVX群とも室温下と比較し低温下では有意に排尿間隔の短縮および膀胱容量の縮小が認められ、特に OVX群では顕著であった。ナフトピジル投与の OVX群の低温下での排尿間隔は 4.30 ± 0.79 , 膀胱容量は 0.75 ± 0.14 で、生食投与の OVX群と比較し冷えストレス誘発排尿筋過活動の抑制を認めた。

【考察】 エストロゲンは下部尿路症状に関与しており、閉経後は排尿機能に変化が生じると言われている。われわれは今回冷えストレスを与え OVX群と sham群に膀胱機能で差がないか検討した。室温下では OVX群では sham群と比較し膀胱容量の縮小傾向は認められたが、有意差は認められなかった。しかし、冷えストレスを与えると sham群と比較し OVX群では排尿筋過活動を生じ有意な排尿間隔の短縮、膀胱容量の縮小を認めた。TRPM8は $25-28^\circ\text{C}$ で賦活化される温度感受性チャンネルであり、OVX群では sham群と比較し mRNA およびタンパク質レベルで皮膚の TRPM8が増加しており、OVX群の冷えストレスによる著明な排尿筋過活動の一因と考えられた。皮膚はエストロゲンによって影響を受けやすい臓器と考えられており、エストロゲンの欠乏が何らかの経路で TRPM8の増加につながったと考えられる。またナフトピジルを投与することにより冷えストレスによる排尿筋過活動が抑制された。このことから、冷えストレスによる排尿筋過活動の機序に α アドレナリン受容体が一部関与していると考えられた。

【結論】 OVX群では皮膚の TRPM8受容体の発現が増加した。OVX群が sham群と比較し冷えストレスによる排尿筋過活動が著明である一因として考えられた。またその機序の一部に、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体が関与していると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

エストロゲン欠乏と排尿機能の関連について諸家の報告があるが、現時点では不明な点が多い。泌尿器科

学講座では冷えストレスによりラットが排尿筋過活動を生じることを報告し、病態モデルについて研究を重ねている。今回、閉経後の冷えストレスによる過活動膀胱の機序解明を目的とし、卵巣摘出ラット (OVX 群) を用い、健常ラット (sham 群) と比較し冷えストレスを与えると排尿機能にどのような影響を認めるか測定した。また温度感受性チャンネルの1つである TRPM8の皮膚における発現の変化について、そして $\alpha 1$ アドレナリン受容体拮抗薬であるナフトピジルを投与することで排尿機能にどのような影響を及ぼすか検討した。その結果以下の結果を得た。

1. 排尿機能は Sham 群, OVX 群とも室温下と比較し低温下では有意に排尿間隔の短縮および膀胱容量の縮小が認められ、特に OVX 群では顕著であった。ナフトピジル投与の OVX 群の低温下での排尿は、生食投与の OVX 群と比較し冷えストレス誘発排尿筋過活動の抑制を認めた。

2. 皮膚の mRNA レベルの TRPM8受容体の発現は OVX 群が sham 群と比較し有意に増加していた。また皮膚組織に免疫染色を行い TRPM8受容体陽性の面積の割合を画像解析し、OVX 群が sham 群と比較し mRNA と同様に有意な増加を認めた。

以上より、卵巣摘出ラットの冷えストレスによる排尿筋過活動は皮膚の TRPM8の増加が一因であると考えられた。またナフトピジルの投与により排尿筋過活動が抑制されたため、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体が冷えストレスによる排尿筋過活動に何らかの経路で関与していることが示唆された。この卵巣摘出ラットの冷えストレスによる排尿筋過活動と、皮膚の TRPM8受容体増加の関連性を示し、今後 TRPM8受容体拮抗薬が冷えストレスによる過活動膀胱治療薬になりうる可能性を示唆した論文を主査、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。

Loss of gastric gland mucin-specific O-glycan is associated with progression of differentiated-type adenocarcinoma of the stomach (胃腺粘液に特異的な O-グリカンの消失は分化型胃癌の進行に関与する)

白 津 和 夫

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】免疫組織化学的手法の進歩により粘液形質による胃癌の分類が可能となり、胃癌の粘液形質と臨床病理学的パラメータや生存率との相関についての検討がなされている。特に胃型粘液細胞のマーカーとして MUC5AC および MUC6を、また腸型粘液細胞のマーカーとして MUC2および CD10を対象に、これらマーカーの発現の有無と腫瘍の進行や生存率との相関が報告されており、粘液形質の分析は胃癌の進行や予後を予測する上で重要な手法の一つであると考えられる。一方、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 (α GlcNAc) 残基を有するユニークな O-グリカンが存在し、それらの大部分はそのコアタンパクである MUC6に結合している。 α GlcNAc は *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の成長と運動能を抑制することが示されているが、 α GlcNAc の生合成を触媒する糖転移酵素、 $\alpha 1, 4$ -N-acetylglucosaminyltransferase ($\alpha 4$ GnT) をコードする A4gnt遺伝子のノックアウトマウスでは、*H. pylori*感染がない状況でも hyperplasia-dysplasia-carcinoma sequence により分化型胃癌が

生じることが明らかとなり、 α GlcNAc の消失が胃癌発生のトリガーとなっている可能性が示唆された。これまでヒトの胃癌における α GlcNAc 消失の有無と臨床病理学的因子との相関を検討した報告はない。そこで本研究では、胃癌の病理標本において、従来用いられている粘液形質のマーカーである MUC5AC, MUC6, MUC2, CD10に対する抗体を用いた免疫組織化学的分析に加え、 α GlcNAc に対する特異抗体である HIK1083抗体を用いた免疫組織化学的分析を行うことで、 α GlcNAc の消失と臨床病理学的パラメータおよび生存率との相関を検討した。

【方法】2002年から2005年に相澤病院外科で胃癌に対する手術を行われた214例の病理標本につき、MUC5AC, MUC6, MUC2, CD10および α GlcNAc の発現を免疫組織化学的に分析し、臨床病理学的パラメータおよび癌特異的5年生存率との関連を検討した。

【結果】MUC6を発現した102症例のうち55症例 (53.9%) で α GlcNAc の発現を認めなかった。分化型胃癌では MUC6を発現した54症例のうち33症例 (61.1%) において α GlcNAc が陰性であり、 α GlcNAc の消失は分化型癌において壁深達度 ($P=0.009$), 病期

($P=0.009$), 静脈侵襲 ($P=0.009$) と有意に相関していた。また MUC6陽性の分化型胃癌患者のうち、 α GlcNAc 陰性の腫瘍を有する患者は α GlcNAc 陽性の腫瘍を有する患者と比較して、有意に低い癌特異的5年生存率を示した ($P=0.048$)。一方、未分化型胃癌では、MUC6を発現した48症例中22症例 (45.8%) で α GlcNAc の発現が認められなかったが、 α GlcNAc の消失と臨床病理学的パラメータおよび生存率との相関は認められなかった。粘液マーカーでの分析では、分化型胃癌において MUC6陰性の腫瘍は MUC6陽性の腫瘍と比較して有意に壁深達度が深く ($P<0.001$), リンパ節転移の頻度が高く ($P=0.03$), 病期が進行しており ($P=0.014$), リンパ管侵襲 ($P<0.001$) と静脈侵襲 ($P<0.001$) の頻度が高く、腫瘍径が大きい ($P=0.01$) 傾向が認められた。また MUC2陰性の分化型胃癌は MUC2陽性の癌と比較して有意に静脈侵襲の頻度が高かった ($P=0.03$)。しかし分化型癌において、MUC6 および MUC2 を含む粘液マーカーの発現の有無は癌特異的5年生存率と有意には相関していなかった。未分化型癌では粘液マーカーの発現と臨床病理学的パラメータおよび生存率との相関は認められなかった。

【結論】 MUC6陽性の癌細胞における α GlcNAc の消失が、分化型胃癌の進行と予後に有意に相関していることが示された。粘液マーカーのうち MUC6 の発現低下は腫瘍の進行と有意に相関すると考えられたが、予後との相関は明らかでなかった。よって、分化型胃癌患者においては、MUC6に加えて α GlcNAc の発現を免疫組織化学的に分析することが、腫瘍の進行や予後を予測する上で重要であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

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 (α GlcNAc) 残基を有する *O*-グリカンが存在し、それらの大部分はそのコアタンパクである MUC6 に結合している。 α GlcNAc の生合成を触媒する糖転移酵素 $\alpha 1, 4$ -*N*-acetylglucosaminyltransferase ($\alpha 4$ GnT) をコードする *A4gnt* 遺伝子のノックアウトマウスでは分化型

胃癌が生じることが明らかとなり、 α GlcNAc の消失が胃癌発生のトリガーとなっている可能性が示唆された。本研究では、胃癌の病理標本において、従来用いられている粘液形質のマーカーである MUC5AC, MUC6, MUC2, CD10に加え、 α GlcNAc に対し免疫組織化学的分析を行うことで、 α GlcNAc の消失と臨床病理学的パラメータおよび生存率との相関を検討した。

その結果、白津は次の結論を得た。

1. 分化型胃癌ではMUC6を発現した54症例のうち33症例において α GlcNAc が陰性であり、 α GlcNAc の消失は分化型癌において壁深達度、病期、静脈侵襲と有意に相関していた。また MUC6陽性の分化型胃癌患者のうち、 α GlcNAc 陰性の腫瘍を有する患者は α GlcNAc 陽性の腫瘍を有する患者と比較して、有意に低い癌特異的5年生存率を示した。
2. 未分化型胃癌では、MUC6を発現した48症例中22症例で α GlcNAc の発現が認められなかったが、 α GlcNAc の消失と臨床病理学的パラメータおよび生存率との相関は認められなかった。
3. 分化型胃癌においてMUC6およびMUC2の発現はいくつかの臨床病理学的パラメータと相関を認めた。しかし分化型癌において、MUC6およびMUC2を含む粘液マーカーの発現の有無は癌特異的5年生存率と有意には相関していなかった。
4. 未分化型癌では粘液マーカーの発現と臨床病理学的パラメータおよび生存率との相関は認められなかった。

以上の結果より、MUC6陽性の癌細胞における α GlcNAc の消失が、分化型胃癌の進行と予後に有意に相関していることが示された。分化型胃癌患者においては、MUC6に加えて α GlcNAc の発現を免疫組織化学的に分析することが、腫瘍の進行や予後を予測する上で重要であると考えられた。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Downregulation of the microRNA biogenesis components and its association with poor prognosis in hepatocellular carcinoma (肝細胞癌におけるマイクロRNA生合成因子の制御と予後との関連)

北川 敬之

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 肝癌は本邦あるいは世界的にも癌死亡

者数の上位を占め、肝炎ウイルス感染・飲酒・肥満といった背景因子が知られている。しかしその発生や悪

性化の詳細な分子機構は完全には解明されていない。本研究では肝癌における miRNA 生合成に関わる遺伝子 (miRNA 生合成因子 (miRNA-biogenesis-related (miRBir) gene)) の発現変化とその分子機構, 更に肝癌発症に関わる背景因子・臨床病理像・予後との関連について検討を行った。

【方法】1998年12月から2010年3月までの期間に国立がん研究センター中央病院で切除された肝癌検体47例 (腫瘍部および背景肝) (HBV 感染: 11例, HCV 感染: 16例, 非ウイルス性 (NBNC): 18例, HBV 既往: 2例) を対象とし, 14種類の miRBir gene (Drosha, Dgcr8, p68, p72, Xpo-5, Dicer, Ago1-4 and Piwil1-4) の発現を quantitative real time-PCR にて測定し, 臨床病理因子, 予後との関連を解析した。更に肝癌細胞株 (KYN2, HepG2) を用いて, 定量 RT-PCR による 5-Aza-deoxycytidine 処理後の miRBir gene の発現変化, miRBir gene のプロモーター領域での bisulfite sequencing による CpG islands の DNA メチル化および chromatin-immunoprecipitation-PCR (CHIP-PCR) による histone H3 Lysin 27 のトリメチル化 (H3K27me3) について解析した。

【結果】14種類の miRBir gene のうち 7 遺伝子 (Dgcr8, p68, p72, Dicer, Ago3, Ago4, Piwil4) が背景肝に比し腫瘍部で発現が有意に低下 ($p < 0.05$) していた。この 7 遺伝子は HCV 感染検体では有意差を認めず, HBV 感染検体では 3 遺伝子 (p68, p72, Dicer, Ago3) のみで低下を認めたが, NBNC 検体では 6 遺伝子 (Dgcr8, p68, p72, Dicer, Ago3, Ago4) で有意な低下を認めた。NBNC で miRBir gene の発現低下が多く見られたため, ウイルス以外の背景因子が miRBir gene の発現異常に関わる可能性を考え, 背景肝における肝癌発症のリスク因子と miRBir gene の関連を検討した。その結果, 飲酒 (Piwil1, 2 and 3)・喫煙 (Ago1, Ago2, Ago3 Exportin-5, Dgcr8)・糖尿病 (Ago1), 多中心性腫瘍 (Ago1, Ago3, Ago4, Dicer, Piwil1, Piwil2 and p72) での発現低下が見られた。腫瘍部では p68 と p72 の発現が腫瘍の分化度が下がる程低下していた ($p < 0.01$)。また Dicer, p68 の発現低下は腫瘍再発との関連が示された。miRBir gene の発現低下にエピジェネティックな制御が関与している可能性を考え, 肝癌細胞株 (HepG2, KYN2) を用いて検討したところ, CpG islands の DNA メチル化による直接的な制御ではなく, miRNA 生合成に関わる遺伝子の一部が H3K27me3 によりエ

ピジェネティックな制御を受けていることが示された。**【結論】** miRNA 生合成因子は非ウイルス性の肝癌においてしばしば低下しており, 患者の予後に関連するだけでなく, 肝癌発症のリスク因子がヒストンのメチル化といったエピジェネティックなメカニズムにより miRNA 発現低下に影響を及ぼす可能性が示唆された。この新しいメカニズムの発見は, 今後の肝癌における診断や予防, 予後の評価につながる事が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

肝癌は本邦あるいは世界的にも癌死亡者数の上位を占めているが, その発生や悪性化の詳細な分子機構は完全には解明されていない。近年 18~22塩基の短い小分子 RNA (miRNA) の発現異常が, 癌の発生や進展に関わることが報告され, また miRNA 生合成に関わる遺伝子異常の発癌への関与も示されている。本研究では肝癌における miRNA 生合成に関わる遺伝子 (miRNA 生合成因子 (miRNA-biogenesis-related (miRBir) gene)) の発現変化とその分子機構, 更に発症に関わる背景因子・臨床病理像・予後との関連について検討を行った。

肝癌検体47例 (腫瘍部および背景肝) を対象とし, 14種類の miRBir gene (Drosha, Dgcr8, p68, p72, Xpo-5, Dicer, Ago1-4 and Piwil1-4) の発現を quantitative real time-PCR にて測定し, 臨床病理因子ならびに予後との関連を解析した。さらに細胞株 (KYN2, HepG2) を用いて, 定量 RT-PCR による CpG islands の DNA メチル化および CHIP-PCR による histone H3 Lysin 27 のトリメチル化 (H3K27me3) について解析した。

その結果, 北川らは次の結論を得た。

1. 14種類の miRBir gene のうち 7 遺伝子 (Dgcr8, p68, p72, Dicer, Ago3, Ago4, Piwil4) が背景肝に比し腫瘍部で発現が有意に低下 ($p < 0.05$) していた。特に NBNC HCC での発現低下が顕著であった。
2. 背景肝での miRBir gene の発現低下には, 肝癌の危険因子であるタバコ, アルコール, 糖尿病の関連が示唆された。また, 腫瘍の多発性との関連が示唆された。
3. p68 と p72 の発現が, 腫瘍の分化度が下がる程低下することを認めた ($p < 0.01$)。また Dicer, p68 の発現低下は腫瘍再発との関連が示された。
4. 肝癌細胞株を用いた検討で, これら 7 つの遺伝子

は epigenetic な制御（プロモーター領域のメチル化の関与は乏しく H3K27 のトリメチル化の制御が関連している）を受けていることを示した。

以上のことから、miRNA 生合成因子が特に非ウイルス性の肝癌においてしばしば低下していることを示し、その発現低下は肝癌発症のリスク因子に特に関係が深く、また予後にも関連することを示した。さらに、

miRNA 生合成因子の制御にヒストンのメチル化といったエピジェネティックな制御の関与を示した。この新しい機構の発見は、今後の肝癌における診断や予防、予後の評価につながることを期待される。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。

Regenerative capacity of bulbar projection neurons during development: a quantitative neuronal analysis with functional correlation (嗅球投射ニューロンの再生能：再生ニューロンの定量評価並びに機能解析)

平 山 周 一

(論文の内容の要旨)

【目的】外側嗅索 (LOT) は嗅球からの嗅覚情報を嗅皮質へ伝える重要な脳内伝導路である。生後2日 (P2) の新生児ラットの LOT を切断すると、4週後に切断部を超えて嗅球から嗅皮質へ新たな神経線維の連絡ができ、再生された嗅球投射ニューロン (僧帽細胞) により機能的にも嗅覚機能が正常に維持されることを報告した。しかし、LOT 切断の時期による嗅球投射ニューロンの軸索再生の時期や本来の標的部位 (嗅皮質) に再生軸索を伸ばすニューロンの割合さらに再生ニューロン数と嗅覚機能の関係については不明であり、これらの課題を解明することを目的として本研究を行った。

【方法】

- (1) 嗅覚投射ニューロンの再生の時期：P7, P10およびP14の新生児ラットの左 LOT を切断し、完全切断を客観的に評価する目的で、切断直後に切断部後方の左嗅皮質 (嗅結節・梨状皮質) に逆行性の蛍光神経トレーサー (FB: Fast blue) を注入した。5週間生存させた後に、別の逆行性の蛍光神経トレーサー (FG: Fluoro-Gold) を切断部から離れた後方の左嗅皮質に注入し、2日後に還流固定し、脳の凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察した。FB陽性の僧帽細胞のない完全切断例について、FG陽性の再生した僧帽細胞の有無を観察した。
- (2) 再生ニューロンのステレオロジー定量解析：再生がおこることが確認されたP2とP7の新生児ラットの左 LOT を切断し、12週間生存させ、後方の左嗅皮質に FG を注入した。12週齢の正常ラットの左嗅皮質にも FG を注入した。FG 注入2日後に還流固定し、左嗅球・左脳の連続凍結切片 (冠状断/50

μm厚/嗅球：400 μm間隔&脳：600 μm間隔) を作成し、抗 FG 抗体を用いて、FG 注入部位と FG (+) の再生した僧帽細胞を DAB 反応後に可視化し、ステレオロジー解析装置を用いて再生ニューロンを定量化した。計測は、各個体とも3回行い、実測値とニューロン総数の推定値のそれぞれの平均値を求めた。なお、不完全切断例は除外した。

- (3) 嗅覚機能検査：P7の新生児ラットの左 LOT の切断12週後に、切断側の嗅覚機能を知る目的で、非切断側の右嗅球を吸引除去し、2-3日間絶水後に、水と0.01%シクロヘキシミド溶液を用いて嗅覚機能を調べた。一部のラットは、FG を左嗅皮質に注入し、FG (+) の再生ニューロンを定量化した。

【結果】

- (1) 再生の時期：P7 LOT 切断ラットの嗅球には、切断部後方の嗅皮質に注入された FG が逆行性に軸索輸送され、切断部を越えて、多数の FG (+) 僧帽細胞が確認された。P10 LOT 切断ラットは、FG (+) 僧帽細胞が見られない群とわずかに見られる群に分かれた。P14 LOT 切断ラットでは、FG (+) 僧帽細胞はなかった。
- (2) 再生ニューロンの定量評価：正常12週齢ラットの FG (+) 僧帽細胞数は、平均実測値804±46個 (100%)、ステレオロジーによる平均推測値49,700±4,300個 (100%) であった。P2 LOT切断ラットでは、再生した FG (+) 僧帽細胞数は、それぞれ561±53個 (70%)、35,100±4,500個 (71%)、P7 LOT切断ラットでは、再生した FG (+) 僧帽細胞数は、それぞれ327±76個 (42%)、19,700±5,000個 (40%) であり、3群間で有意差 (P<0.01) を認めた。

(3) 再生ニューロンによる嗅覚機能：P7 LOT 切断ラットの78% (14/18) では、嗅覚は正常に維持されていたが (正解率：90±3%)，22% (4/18) では無嗅覚であった (正解率：50±2%)。嗅覚 (+) ラット (n=2) の再生したFG (+) 僧帽細胞数の平均実測値は、328個と294個であり、平均推測値は23,400個と21,300個であった。嗅覚 (-) ラット (n=2) の再生したFG (+) 僧帽細胞数の平均実測値は、173個と137個であり、平均推測値は13,000個と9,600個であった。

【結論】

- (1) LOT 切断後、嗅球投射ニューロンが再生可能な時期は、P0～P10の間であることが明らかとなった。
- (2) P2もしくはP7 LOT 切断ラットのFG (+) 再生ニューロン数は、正常のそれぞれ約70% & 40% に減少しており、切断時期が遅くなるほど自然再生するニューロン数が少なくなることが明らかとなった。
- (3) 再生ニューロンが正常の約40%に減少しているP7 LOT 切断ラットの多く (78%) では、嗅覚機能は正常に維持されていたが、嗅覚を失ったケースが少数存在し、その再生ニューロンは正常の約26%以下に低下していた。

以上の結果より、形態的並びに機能的両面から、嗅球投射ニューロンの再生能が明らかにされた。

(論文審査の結果の要旨)

本研究で平山は、ラットの主要な嗅覚伝導路である外側嗅索 (LOT) 切断後の嗅球投射ニューロン (僧帽細胞) の軸索再生に関して、再生する時期の特定、再生ニューロンの定量化、ニューロンの再生率と嗅覚機能の関係などの未解明な課題を明らかにすることを目的として、ラットについてLOT 切断、再生ニューロン数計測並びに嗅覚機能検査などの実験を行った。

その結果、平山は次の結果を得た。

1. 再生の時期については、P7 LOT 切断ラットの嗅球で、切断部後方の嗅皮質に注入された神経トレーサー (FG) が逆行性に軸索輸送され切断部を越えて多数のFG (+) 僧帽細胞が確認されたこと、P10 LOT 切断ラットでは、FG (+) 僧帽細胞が見られない群とわずかに見られる群に分かれたこと、およびP14 LOT切断ラットでは、FG (+) 僧帽細胞はなかったことから、P0～P10にあることが明らかになった。

2. 再生ニューロンの定量評価については、正常12週齢ラットのFG (+) 僧帽細胞数は、平均実測値804±46個 (100%)，ステレオロジーによる平均推測値49,700±4,300個 (100%) であった。P2 LOT 切断ラットでは、再生したFG (+) 僧帽細胞数は、それぞれ561±53個 (70%)，35,100±4,500個 (71%) であり、P7 LOT切断ラットでは、再生したFG (+) 僧帽細胞数は、それぞれ327±76個 (42%)，19,700±5,000個 (40%) であった。3群間で有意差 (P<0.01) が認められ、ニューロンの再生率は軸索切断時のラットの日齢とともに減少することが明らかとなった。

3. 再生ニューロンによる嗅覚機能評価を行うと、P7 LOT 切断ラットの78% (14/18) では、嗅覚は正常に維持されていたが (正解率：90±3%)，22% (4/18) では無嗅覚であった (正解率：50±2%)。嗅覚 (+) ラット (n=2) の再生したFG (+) 僧帽細胞数の平均実測値は、328個と294個であり、平均推測値は23,400個と21,300個であった。嗅覚 (-) ラット (n=2) の再生したFG (+) 僧帽細胞数の平均実測値は、173個と137個であり、平均推測値は13,000個と9,600個であった。再生ニューロンが正常の約40%に減少しているP7 LOT 切断ラットの多く (78%) では、嗅覚機能は正常に維持されていたが、嗅覚を失ったケースが少数存在し、その再生ニューロンは正常の約26%以下に低下していた。

以上により、ラットにおいて外側嗅索切断後、軸索切断された嗅球投射ニューロンが自然再生し得る時期が明らかにされた。また、切断時期の違いによる再生率の変化が、ステレオロジーによる再生ニューロン数の相対的/絶対的比較検討により明らかにされた。更に再生ニューロン数と機能との関係についても明らかにされ、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。

Adrenomedullin-RAMP2 system suppresses ER stress-induced tubule cell death and is involved in kidney protection (アドレノメデュリン-RAMP2システムは、小胞体ストレス誘導性細胞死を抑制し、腎保護に働く)

植竹 龍一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】アドレノメデュリン (AM) は、様々な生理活性を有するペプチドである。AM 受容体 CLR には、受容体活性調節タンパク質 RAMP が重合し、受容体特性を制御している。我々はこれまでに RAMP サブアイソフォームの中でも、RAMP2ノックアウトマウス (RAMP2^{-/-}) のみが、AM^{-/-}の発生異常や臓器障害を再現することを報告してきた。AM および RAMP2は、腎臓においても発現しており、血管、糸球体、尿細管などに広く分布する。また近年、血中AM濃度が慢性腎臓病の長期予後予測の上で、最も感受性の高いパラメータとなることが報告されており、腎不全の病態に AM-RAMP2系が関与していることが示唆されている。本研究では、RAMP2^{+/-}を用いて、腎臓病モデルを作成し、AM-RAMP2系の腎臓における生理作用を検討した。

【材料及び方法】① RAMP2^{+/-}を用いてストレプトゾトシン (STZ) 投与による I 型糖尿病モデルを作成し、糖尿病性腎症における AM-RAMP2系の役割を検討した。② ヒト近位尿細管上皮細胞 (RPTEC) を用いて尿細管細胞に対する STZ の直接の作用と AM の保護効果を検討した。③ RAMP2^{+/-}を用いて小胞体 (ER) ストレスを直接惹起する薬剤であるツニカマイシン (TUN) を投与して、ER ストレスに対する AM-RAMP2系の役割を検討した。④ 野生型マウスおよび RAMP2^{+/-}を用いて浸透圧ポンプにより AM を持続投与する実験を行い、TUN投与による腎障害に対する AM の治療効果を検討した。⑤ RAMP2^{+/-}を用いて尿細管障害を引き起こす薬剤であるシスプラチン (CDDP) を投与して尿細管障害に対する AM-RAMP2系の役割を検討した。

【結果】STZ モデルにおいて RAMP2^{+/-}では、野生型と比較し、糸球体病変に変化を認めなかったが、予想外に近位尿細管に刷子縁の破綻を伴う細胞死が特徴的に認められた。

RPTECを用いた検討では、RPTECには、グルコース類似物質である STZ を特異的に取り込むトランスポーターである GLUT2が発現しており、STZ 投与

により小胞体 (ER) ストレスセンサータンパク質の一つである PERK が活性化された。一方、RPTEC に AM を投与すると、PERK 下流因子である CHOP の活性化が抑制され、細胞死が抑制された。

TUN モデルにおいて RAMP2^{+/-}では、尿細管細胞の空胞化と、ER ストレスにより誘導される因子である BiP, CHOP の発現上昇を認めた。

AM による治療実験では、AM を投与した野生型マウスでは TUN により引き起こされた尿細管細胞の空胞化と BiP, CHOP の発現上昇が抑制された。一方、RAMP2^{+/-}を用いて AM による治療実験を行ったところ、野生型マウスに対し AM を投与した時に認められた腎障害の軽減効果は認められなかった。

CDDP 投与モデルにおいて RAMP2^{+/-}では、血清尿素窒素 (BUN) やクレアチニンの上昇といった腎機能の低下を示す所見が認められ、尿細管細胞の異常も確認された。また、この時の遺伝子発現を検討したところ RAMP2^{+/-}では、細胞死を誘導する因子 (p53, Bax) の発現上昇が認められ、さらに炎症性サイトカインやケモカイン (TNF- α , MCP-1) の発現上昇、酸化ストレスマーカー (NADPH オキシダーゼサブユニット: p67, p47) の発現上昇、ER ストレスマーカー (BiP, CHOP) の発現上昇も確認された。

【結論】以上の結果から、AM-RAMP2系は、腎臓において炎症、酸化ストレスおよび ER ストレスの過剰な活性化を抑制し、臓器保護的に働いていることが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

アドレノメデュリン (AM) は多彩な生理活性を有するペプチドである。AM の受容体は、Gタンパク質共役型受容体である CLR と受容体活性調節タンパク質 RAMP2または RAMP3の複合体である。AM と RAMP2のホモ型遺伝子欠損マウスは胎生致死となることから、AM-RAMP2系の重要性が示唆されている。一方で、成体の腎臓においてもAMおよびRAMP2は発現しているが、その病態生理学的意義は不明である。そこで植竹龍一は、RAMP2ヘテロノックアウトマウス (RAMP2^{+/-}) を用いて、腎障害モデルを作成し、

腎臓における AM-RAMP2系の生理学的意義を検討した。

その結果、植竹龍一は次の結論を得た。

1. ストレプトゾトシン(STZ)モデルにおいてRAMP2^{+/-}は野生型マウス(WT)と比較して、糸球体病変に差は認められなかったが、尿細管の異常が認められた。
2. 尿細管の異常は血糖値を正常化しても、改善は認められず、高血糖ストレス以外の原因により尿細管が障害されている可能性が示唆された。
3. ヒト近位尿細管細胞(RPTEC)に対しSTZを直接添加したところ、細胞死の亢進が確認され、これはAM投与により抑制された。
4. STZモデルにおいてRAMP2^{+/-}の尿細管ではオートファジーの亢進が確認された。
5. RPTECに対しSTZを添加したところ、小胞体(ER)ストレスセンサータンパク質の一つであるPERKおよびその下流シグナルの活性化が確認さ

れ、これはAM投与により抑制された。

6. ツニカマイシン(TUN)モデルにおいて、RAMP2^{+/-}は腎機能の低下と尿細管の異常が確認された。また、ERストレスの亢進も認められた。
7. WTに対してAMによる治療実験を行ったところ、TUN投与により生じた腎障害が軽減した。一方、RAMP2^{+/-}に対してAMによる治療実験を行ったところ、腎障害の軽減効果は認められなかった。
8. シスプラチンモデルにおいて、RAMP2^{+/-}は腎機能の低下と尿細管の異常が確認された。また、遺伝子発現を検討したところ、細胞死、炎症、酸化ストレス、ERストレスが亢進していた。

以上の結果から、植竹龍一は、AM-RAMP2系が、尿細管のERストレスを制御することにより細胞死を抑制し、腎保護的に働くことを初めて明らかとした。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。

Nox4 redox regulation of PTP1B contributes to the proliferation and migration of glioblastoma cells by modulating tyrosine-phosphorylation of coronin-1C (Nox4-PTP1B レドックスシグナルは、coronin-1Cのタイロシンリン酸化を介して膠芽腫細胞の増殖と運動に寄与する)

Md. Abdus Salam Mondol

(論文の内容の要旨)

Glioblastoma multiforme is a common primary brain tumor in adults and one of the most devastating human cancers. Reactive oxygen species (ROS) generated by NADPH oxidase (Nox) 4 have recently been a focus of attention in the study of glioblastomas, but the molecular mechanisms underlying the actions of Nox4 remain elusive. In this study, we demonstrated that silencing of Nox4 expression by Nox4-targeted siRNA suppressed cell growth and motility of glioblastoma U87 cells, indicating the involvement of Nox4. Furthermore, Nox4-derived ROS oxidized and inactivated protein tyrosine phosphatase (PTP): 1B: PTP1B in its active form downregulates cell proliferation and migration. By affinity purification with the substrate-trapping mutant of PTP1B, tyrosine-phosphorylated coronin-1C was identified as a substrate of PTP1B. Its tyrosine phosphorylation level was suppressed by Nox4 inhibition, suggesting that tyrosine-phosphor-

ylation of coronin-1C is regulated by the Nox4-PTP1B pathway. Finally, ablation of coronin-1C attenuated the proliferative and migratory activity of the cells. Collectively, these findings reveal that Nox4-mediated redox regulation of PTP1B serves as a modulator, in part through coronin-1C, of the growth and migration of glioblastoma cells, and provide new insight into the mechanistic aspect of glioblastoma malignancy.

(論文審査の結果の要旨)

Glioblastoma is the most aggressive brain tumor with poor prognosis. Nox4 expression was previously reported to be upregulated in glioblastoma cells and consider to play a role in cellular functions related to the malignant phenotype, but its regulatory mechanism is largely unknown. His principal aim of this study was to characterization of the regulation and function of the Nox4 and to dissect the pathway downstream of Nox4 redox signaling involved in the bioactivities of glioma

cells.

It was found that,

1. Nox4 mRNA was prominently expressed and involved in spontaneous ROS production in glioma cells.
2. Silencing of Nox4 expression by Nox4-targeted siRNA suppressed cell growth and motility of glioblastoma U87 cells.
3. Nox4-derived ROS oxidized and inactivated protein tyrosine phosphatase (PTP): 1B: PTP1B in its active form downregulates cell proliferation and migration.
4. Tyrosine-phosphorylated coronin-1C was identified as a substrate of PTP1B.
5. Ablation of coronin-1C attenuated the proliferative and migratory activity of U87 cells.

6. Coronin-1C, associated with malignancy of glioblastoma is tyrosine-phosphorylated.
7. Tyrosine phosphorylation level was suppressed by Nox4 inhibition, suggesting that tyrosine-phosphorylation of coronin-1C is regulated by the Nox4-PTP1B pathway.

In summary, his study establishes the Nox4-PTP1B-coronin 1C axis as a novel redox signaling pathway contributing to glioblastoma development. Thus, the discovery suggests a critical mediating role of Nox4 redox signaling in gliomagenesis. Nox4 may serve as a potential molecular target in the development of therapeutic agents for malignant gliomas.

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。

TRPM4 Channels Mediate Hypertonicity-induced, Ca^{2+} -impermeable, Non-selective Cation Currents in a Cervical Cancer Cell Line, HeLa Cells (TRPM4チャネルは、子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞において高浸透圧誘発性 Ca^{2+} 非透過性非選択的カチオン電流を生じる)

五 味 志 文

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】細胞外の浸透圧が細胞内の浸透圧より高くなると、細胞は一旦縮むが、regulatory volume increase (RVI) 機構によりもとの容積に戻る。RVIは生理的な状態下で常に作動しており、RVIを障害すると細胞周期が止り、アポトーシスが生じる。したがって、RVIの分子機構の解明は、腫瘍に対してアポトーシス誘発的に作用する新たな薬物の開発につながる可能性がある。そこで本研究では、子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞を用いて、RVIが生じる分子機構を明らかにすることを目的とする。

【方法】パッチクランプ法のホールセルモードで、高浸透圧の細胞外液で RVI を引き起こし、その時流れる非選択的陽イオンチャネル (I_{H_0}) 電流を測定した。さらに細胞外液に、種々のチャネルブロッカー (フルフェナム酸 (FFA), エコナゾール, アミロライド, ルテニウムレッド) を投与し、 I_{H_0} の薬物感受性を評価した。また RT-PCR を使い、非選択的陽イオンチャネルサブユニット TRP の遺伝子の発現の解析を行った。最後に、TRPM4 のドミナントネガティブ体を HeLa 細胞に発現し、 I_{H_0} を構成する分子の同定を行った。

【結果】HeLa 細胞において高浸透圧刺激は、電流電圧関係がほぼ直線的で、逆転電位が ~ 0 mV の I_{H_0} を誘発した。 I_{H_0} は、脱分極電位で時間依存性の活性化を示した。 I_{H_0} は、 Na^+ 透過性であり、 Ca^{2+} 非透過性であった。 I_{H_0} は、FFA とエコナゾールで抑制されたが、アミロライドやルテニウムレッドに非感受性だった。以上より、 I_{H_0} を構成するサブユニットは TRP である可能性が考えられた。RT-PCR による解析では、HeLa 細胞では TRPC1, C6, M3, M4, M7, M8, V1, V2 の発現が認められた。この中で上記生物物理学的特性および薬理学的特性を有するチャネルは TRPM4 チャネルであるので、HeLa 細胞に TRPM4 のドミナントネガティブ体を発現すると、 I_{H_0} は有意に減少した。最後に、HeLa 細胞内に投与する Ca^{2+} バッファーを増強すると、高浸透圧刺激は I_{H_0} を誘発しなくなった。しかしホスホリパーゼ C の阻害薬 U73122 は、 I_{H_0} を抑制しなかった。

【考察】HeLa 細胞において、高浸透圧刺激は何らかの機序で細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ TRPM4 チャネルを活性化し、 I_{H_0} を誘発し RVI を生じる。したがって、TRPM4 チャネルを抑制する FFA の子宮頸管内や腔内への投与は、新しい子宮頸がんの治療法となる

可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

細胞外の浸透圧が細胞内の浸透圧より高くなると、細胞は一旦縮むが、regulatory volume increase (RVI) 機構によりもとの容積に戻る。RVIは生理的な状態下で常に作動しており、RVIを障害すると細胞周期が止り、アポトーシスが生じる。したがって、RVIの分子機構の解明は、腫瘍に対してアポトーシス誘発的に作用する新たな薬物の開発につながる可能性がある。そこで本研究では、子宮頸がん細胞株HeLa細胞を用いて、RVIが生じる分子機構を明らかにすることを試みた。

パッチクランプ法のホールセルモードで、高浸透圧の細胞外液でRVIを引き起こし、その時流れる非選択的陽イオンチャネル (I_{Ho}) 電流を測定し、その生理的・薬理的特性と、transient receptor potential (TRPM) 4チャネルに対するドミナントネガティブ体の効果の検討から、 I_{Ho} チャネルの分子実態を探った。

その結果、以下の結果を得た。

1. I_{Ho} 電流は、 Na^+ 透過性、 Ca^{2+} 非透過性の非選択的カチオン電流であり、膜電位依存性活性化を示す。

2. I_{Ho} 電流は、アミロライドやルテニウムレッドに非感受性で、フルフェナム酸やエコナゾールに感受性である。

3. HeLa細胞には、TRPC1, C6, M3, M4, M7, M8, V1, V2が発現していたが、このうち I_{Ho} チャネルの生理特性や薬理特性に一致するのはTRPM4だけである。

4. これと一致して、ドミナントネガティブTRPM4は、 I_{Ho} 電流を有意に抑制した。

5. I_{Ho} チャネルは、細胞内 Ca^{2+} により活性化されたが、この反応にはホスホリパーゼCは関与していなかった。

これらの結果より、HeLa細胞では細胞外浸透圧が上昇すると、何らかの Ca^{2+} 透過性チャネルが開口して細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、TRPM4チャネルが開口して I_{Ho} 電流が生じ、RVIが生じると結論した。したがって、TRPM4チャネルを抑制するFFAの子宮頸管内や腔内への投与は、新しい子宮頸がんの治療法となる可能性があると考えられた。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Presence of diastolic dysfunction in patients with peripheral artery disease (閉塞性動脈硬化症患者における拡張障害の検討)

山崎 佐枝子

(論文の内容の要旨)

【目的】末梢動脈疾患 (peripheral arterial disease : PAD) と心不全は多くの危険因子を共有する。PADの5.8から13.9%に心不全が合併するという報告があるが、日本人のPAD症例における心不全の合併率は明らかでなく、その病態に関し、心エコーの指標を用いて検討したものはない。本論文ではPADに合併する心不全の病態を明らかにすることを目的とする。

【方法】当院に入院したPAD120例 (平均年齢74.3歳、男性104名) を解析対象とした。PADは足関節上腕血圧比 (ankle-brachial index : ABI) 0.9以下と定義した。透析例と心不全入院の既往例は除外した。BNP 100 pg/mL以上の群と未満の群に分け、2群間をt検定、Mann-Whitney検定で比較した。BNP高値に関わる因子について単変量解析、多変量解析を行い、オッズ比を求めた。

【結果】平均の左室駆出率は65.5±13.6%、平均brain

natriuretic peptide (BNP) は133.68±225.1 pg/mLであった。120例のうち、BNP 100 pg/mL以上の症例は36人 (30%) であった。BNP 100 pg/mL以上を予測する因子を単変量のロジスティック回帰分析で解析すると、年齢、推算糸球体濾過量 (estimated glomerular filtration ratio : eGFR)、高血圧、拡張早期の左室流入血流速度 (E) と僧帽弁輪部速度 (e') の比 (E/e') が有意であった。BNP 100 pg/mL以上と未満の群の平均E/e'はそれぞれ16.4±6.5と10.7±3.8 (p=0.001)、また平均eGFRはそれぞれ52.7±25.5と64.4±19.5 ml/分/1.73 m² (p=0.003) であった。一方、冠動脈病変の有無や左室駆出率は両群に有意差を認めなかった。E/e' (4分位) と年齢、性別、eGFR、左室駆出率を用いて、BNP 100 pg/mL以上の予測可能性を多重ロジスティック回帰分析により検討した結果、E/e'高値のみが有意な予測因子であった (オッズ比2.310、95%信頼区間1.371-

3.891, $p=0.002$).

【考察】PAD患者のBNPが高い理由として、年齢、腎機能障害、虚血性心疾患などが考えられたが、いずれも統計学的には有意ではなかった。拡張障害の指標であるE/e'が有意な因子であり、PAD患者に拡張障害が生じる原因として高血圧、心房細動の合併が多い事が考えられた。

PAD患者の管理において、動脈硬化の危険因子に介入し、心血管イベントを予防することが大変重要である。PAD患者では心不全の既往がなくてもBNPが高い、すなわち心機能障害が合併していることが明らかとなった。PAD管理に重要な運動療法や代表的な薬物療法であるシロスタゾールは、心不全を悪化させる可能性がある。そのため、PAD患者にBNPを測定し、心機能障害の有無をスクリーニングすることは、非常に重要であると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

当院に入院した末梢動脈疾患(peripheral arterial disease: PAD) 120例を解析対象とした。PADは足関節上腕血圧比(ankle brachial index: ABI) 0.9以下と定義した。透析例と心不全入院の既往のある例は除外した。brain natriuretic peptide (BNP) 高値に関わる因子について多変量解析を行い、オッズ比を求めた。

その結果、山崎佐枝子は以下の点を明らかにした。

PAD120名の平均の左室駆出率は $65.5 \pm 13.6\%$ 、平均BNPは 133.68 ± 225.1 pg/mLであった。120例のうち、BNP 100 pg/mL以上の症例は36人(30%)であった。BNP 100 pg/mL以上の群では、100 pg/mL

未満の群と比べ、有意に年齢が高く、心房細動が多く、高血圧の合併が多かった。また拡張期血圧が高く、腎機能が悪く、HDLコレステロール値が低かった。一方、冠動脈病変の有無や左室駆出率(ejection fraction: EF)は両群に有意差を認めなかった。拡張早期の左室流入血流速度(E)、Eと僧帽弁輪部速度(e')の比(E/e')、肺静脈の拡張期順行性血流速度(PVF-D)と左房径がBNP高値群で有意に高かった。BNP 100 pg/mL以上と各因子の相関係数を求めると、P値が有意かつ相関係数が0.3以上のものは、年齢、推算糸球体濾過量(estimated glomerular filtration ratio: eGFR)、E/e'であった。BNP 100 pg/mL以上を予測する因子を単変量のロジスティック回帰分析で解析すると、年齢、eGFR、E/e'が有意であった。E/e'(4分位)と年齢、性別、eGFR、EFを共変量に用いて、BNP 100 pg/mL以上の予測可能性を多重ロジスティック回帰分析により検討した結果、E/e'高値のみが有意な予測因子であった(オッズ比2.310, 95%信頼区間1.371-3.891, $p=0.002$)。

これらの結果から、PADには心不全の既往がなくてもBNPが高い症例が含まれていることが分かった。BNPが高い理由として、高血圧や心房細動を背景にした拡張障害がみられることが示唆された。本研究は、PADの管理においては、BNPを測定し、心機能障害の有無をスクリーニングすることが非常に重要であることを示した臨床的重要な研究であり、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。

Factors influencing the residual rib hump after posterior spinal fusion for adolescent idiopathic scoliosis with Lenke 1 and 2 curves (Lenke type 1, 2型思春期特発性側弯症に対する後方矯正固定術後に残存する肋骨隆起に関連する因子)

向山 啓二郎

(論文の内容の要旨)

【目的】脊柱側弯症手術において、術後のrib humpが軽減するということは整容上重要であると考えられている。しかし術後、主胸椎カーブ(main thoracic curve)のCobb角は大きく改善しているにもかかわらず、rib humpが残存している症例も多い。今回我々は、Lenke type 1, 2の思春期特発性側弯症患者に対する後方矯正固定術後、rib humpが残存する要素、またhumpの残存が患者満足度(satisfaction)に

影響するかを検討した。

【方法】対象は2005年8月から2011年3月までに、思春期特発性側弯症Lenke type 1, 2カーブに対しdirect vertebral body derotation (DVBD)を併用したskip pedicle screw fixationを施行した40例(男性2例、女性38例、平均年齢14.9歳)である。平均観察期間は21.2カ月(6-48カ月)であった。術前、術後にinclinometerを用いてapical trunk rotation (ATR)を測定し、humpの大きさの指標とした。対

象患者は術後 ATR により A 群 (ATR ≤ 10度), B 群 (ATR > 10度) の 2 群に分け, 各々のパラメータを比較した。患者満足度は SRS-22 の術後 self image, satisfaction の subscore を用い検討した。さらに術中, Ponte osteotomy を追加した症例群と追加しない症例群とにわけ, 術後の ATR 改善率を比較検討した。

【結果】 術前の ATR は A 群 12.4 ± 1.1°, B 群 18.3 ± 1.8° CT による頂椎回旋角 (Apical rotation) は術前に A 群 13.9 ± 7.8°, B 群 13.9 ± 7.8°, 術後 apical rotation は A 群 12.0 ± 1.5°, B 群 17.2 ± 2.1° であった。術前の apical translation は A 群 31.1 ± 24.0 mm, B 群 50.2 ± 19.6 で有意差が認められた (p < 0.05)。一方で術前後の Cobb 角およびその矯正率, 矯正後の apical translation には有意差を認めなかった。術後の SRS-22 における self image は A 群: 4.0 ± 0.7, B 群: 3.8 ± 0.2 であったが有意差は認められなかった。Satisfaction では A 群: 4.1 ± 0.7, B 群: 4.0 ± 0.8 で有意差は認められなかった。しかし ATR の改善率と術後 self image, satisfaction は有意に強い相関 (self image は相関係数 0.64, p < 0.01, satisfaction は相関係数 0.52, p < 0.05) を認めた。ATR の改善率は Ponte osteotomy を追加した症例, 追加しなかった症例で有意差を認めなかった。

【考察】 思春期特発性側弯症では, hump の改善のために古くから胸郭形成術が行われ, 良好な成績が報告されてきた。しかし 2004 年に Lee らによる DVBD の報告以来, さまざまなデバイスが開発され, その有効性と低侵襲性が報告されている。我々は胸郭形成術を行わない DVBD を併用した後方矯正固定術を施行し, 術後 hump 残存に関する因子について検討した。その結果, 術後 hump 残存に明らかに関与する要素は術前の ATR と術前, 術後の頂椎の回旋角であった。Cobb 角の矯正に加え, 頂椎の回旋変形を取り除くことが術後の hump を減じるために必要なことであると考えられた。また, 術後残存した hump の大きさそのものは患者の満足度や self image に有意な影響は与えず, ATR の改善率に満足度が影響されることが明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

脊柱側弯症手術においては整容面の改善が重要であり, 肋骨隆起の改善も重要な目的のひとつであるが, 術後残存する症例も多数存在する。今回胸椎に主たるカーブが存在する Lenke type 1, 2 の思春期特発性

側弯症患者に対する後方矯正固定術後肋骨隆起が残存する要素, また隆起の残存が患者満足度に影響するかを検討した。

対象は, direct vertebral body derotation (DVBD) を併用した skip pedicle screw fixation による後方矯正固定術を施行した思春期特発性側弯症 Lenke type 1, 2 患者 40 例 (男性 2 例, 女性 38 例, 平均年齢 14.9 歳) であった。術前, 術後に inclinometer を用いて apical trunk rotation (ATR) を測定し, hump の大きさの指標とした。対象患者は術後 ATR により A 群 (ATR ≤ 10度), B 群 (ATR > 10度) の 2 群に分け, 術前術後の各パラメータを比較した。患者満足度は SRS-22 の術後 self image, satisfaction の subscore を用い検討した。また, 術中より大きな矯正を得るための Ponte osteotomy の追加が肋骨隆起の改善に影響するのかが検討した。

その結果, 向山啓二郎は次の結果を得た。

1. 術後の残存肋骨隆起の大きさに影響を与える因子は術前の肋骨隆起の大きさ, 側弯の頂椎の回旋の大きさであった。カーブの大きさ, カーブの柔軟性など, 他のパラメータに有意差は認めなかった。
2. 術後残存する肋骨隆起の大きさでは術後満足度には有意な差が認められなかった。ATR 改善率と術後の患者満足度の間には有意な相関が認められた。また主胸椎カーブの Cobb 角, その改善率は術後 self image に有意な相関を認めた。
3. Ponte osteotomy は肋骨隆起の改善には影響を与えていなかった。

これらの結果より, 側弯症手術においては頂椎の回旋変形を取り除くことが術後の肋骨隆起を減じるために必要なことであると考えられた。また, 術後残存した肋骨隆起の大きさそのものは患者の満足度や self image に有意な影響は与えず, ATR の改善率に影響されることが明らかになった。満足度は肋骨隆起の軽減のみが直接影響するものではなく, 冠状面の矯正など, 複数の因子が影響を与えていることが示唆された。よって, 主査, 副査は一致して本論分を学位論文として価値があるものと認めた。

Efficacy and safety of advanced renal cell carcinoma patients treated with sorafenib : roles of cytokine pretreatment (進行性腎癌に対するソラフェニブの有効性および安全性：サイトカイン先行投与の効果)

鈴木 尚 徳

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】日本人の進行性腎細胞癌に対するサイトカイン治療後のソラフェニブ長期使用については国内Ⅱ相臨床試験で、十分に許容され予後を延長するとされた。しかし、臨床試験での患者母集団はサイトカイン治療抵抗症例のみであり、その結果を日常実臨床に直接当てはめることは出来ない。現在、ソラフェニブはサイトカイン治療後のセカンドラインとしてだけでなくファーストラインとして使われるようになっており、日常実臨床での効果を確認することは極めて重要である。進行性腎細胞癌に対するソラフェニブの使用に関する後向き、質問紙法ベースの検討を行った。

【対象と方法】長野県および山梨県における信州大学泌尿器科学教室関連12の医療施設におけるソラフェニブ治療を行った患者110例を対象とした。患者の臨床データは質問票を用い、患者背景、性別、年齢、既往歴、以前のサイトカインまたは分子標的薬の治療歴、Karnofsky の PS を含む MSKCC によるリスク分類、血液データ等を回収、解析した。全生存期間 (OS)、無増悪生存期間 (PFS)、PFS 予後不良因子、安全性の検討を行った。

【結果】全体の OS は中央値に到達しなかった。ソラフェニブ治療前にサイトカイン投与を受けた66例は、サイトカイン先行投与を受けていない44例に比べ OS は有意に長く ($p=0.002$)、また腎摘除術を受けた症例に限ってもソラフェニブ治療前にサイトカイン投与を受けた58例は、サイトカイン先行投与を受けていない28例に比べ OS は有意に長かった ($p=0.034$)。

全体の PFS 中央値は11カ月であった。ソラフェニブ治療前にサイトカイン投与を受けた66例の PFS はサイトカイン先行投与を受けていない44例に比べ PFS は有意に長かったが ($p=0.017$)、一方で腎摘除術を受けた症例に限ってみるとソラフェニブ治療前にサイトカイン投与を受けた58例は、サイトカイン先行投与を受けていない28例に比べ PFS は有意に延長しなかった。 ($p=0.091$)。

単変量解析では CRP 高値、Na 低値、肝転移などが有意な PFS に関する予後不良因子と考えられたが、

多変量解析では CRP 高値と肝転移が有意な予後不良因子として示された。

ソラフェニブ治療による有害事象の頻度は皮膚障害 (67%) が最も多く、次いで消化器症状 (26%)、高血圧 (22%)、倦怠感 (19%) 骨髄抑制 (10%)、出血 (6%) 等があったが、臨床試験等以前の報告と同様であった。

【考察】日常実臨床でのソラフェニブ治療に関する効果と安全性を確認した。生存率に関しては過去の報告より良好であったが、安全性については同等であった。この検討においてソラフェニブ治療前にサイトカイン投与が施行された症例は低リスクの症例がより多く含まれていた可能性があるが、サイトカイン先行投与が OS および PFS 延長に寄与したと考えられた。

進行性腎細胞癌日本人患者に対するソラフェニブ治療は実臨床においても効果的で十分許容されるものであった。

(論文審査の結果の要旨)

進行性腎細胞癌に対するサイトカイン治療後のソラフェニブ長期使用は臨床試験で十分に許容され予後の延長が証明されているが、実際はサイトカイン治療抵抗症例以外にも使用されることがあり、その結果を日常実臨床に直接当てはめることはできない。進行性腎細胞癌に対するソラフェニブの有効性および安全性についての日常実臨床の調査を目的とし、信州大学泌尿器科で30症例、関連施設11施設80症例における110例を対象とした後向き、質問紙法ベースの検討を行い、全生存期間および無増悪生存期間を主評価項目として、リスク因子の評価、有害事象を検討した。

その結果、鈴木は以下の結果を得た。

1. 生存期間

全生存期間は中央値に到達せず、1年生存率77.5%であった。MSKCC 分類 (Favorable risk と Intermediate and Poor risk の2群にわけた) でみると Favorable が有意に予後良好であった ($P=0.025$)。無増悪生存期間の中央値は11カ月であった。同様に MSKCC 分類でみると2群間に有意差は認めなかった ($P=0.253$)。

この結果がソラフェニブ単独の治療効果であるのかを確認するため、サイトカイン治療の有無毎にみると、全生存期間はサイトカイン治療群が有意に予後良好であり ($P=0.002$)、無増悪生存期間はサイトカイン治療群が有意に予後良好であった ($P=0.017$)。さらに腎摘後のサイトカイン治療の有無毎でみると、全生存期間はサイトカイン治療群が有意に予後良好であり ($P=0.034$)、無増悪生存期間では有意差はなかった ($P=0.091$)。

2. リスク因子の検討, 多変量解析

$P<0.05$ 以下を示した項目 (肝転移・Na 低値・CRP 陽性), MSKCC 分類の 5 因子で多変量解析を施行し, CRP 陽性 ($P=0.004$) と肝転移 ($P<0.001$) が有意なリスク因子であった。

3. 有害事象

皮膚症状が手足症候群を含み67%と最多であった。有害事象の頻度や内容は過去の報告と概ね同様であった。

本論文は多施設共同で110例のソラフェニブ使用症例をまとめており実臨床を反映した結果であった。無増悪生存期間の中央値は過去の報告に比べ良好であったことはサイトカイン先行投与が良好な生存期間に影響を与えている可能性も考えられた。またリスク因子となったCRP陽性, 肝転移を認める症例ではソラフェニブの効果が得られにくい可能性が示唆された。

以上から主査, 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。

Serum Levels of Interleukin-22 and Hepatitis B Core-related Antigen Are Associated with Treatment Response to Entecavir Therapy in Chronic Hepatitis B (B型慢性肝炎のエンテカビルによる治療効果に対する血清インターロイキン22とB型肝炎コア関連抗原の影響)

奥原 禎久

(論文の内容の要旨)

【目的】我々はサイトカインやケモカインがB型慢性肝炎の臨床的かつウイルス学的特徴に関連があるか, また, B型慢性肝炎のエンテカビルによる治療への反応とサイトカインとケモカイン, B型肝炎表面抗原(HBsAg), B型肝炎コア関連抗原(HBcrAg), B型肝炎ウイルス(HBV) DNAとの関連について検討した。

【方法】患者群としてエンテカビルの治療を受けた48人のB型慢性肝炎患者の治療前, 治療後6カ月, 12カ月, 24カ月の保存血清とコントロール群として10人の健常人の保存血清を用いて6つのサイトカイン(IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-21, IL-22)と5つのケモカイン(CCL2, CCL3, CXCL9, CXCL10, CXCL11)を分析した。患者群では血清マーカーとしてアルブミン, AST, ALT, ビリルビン, 血小板数を, ウイルスマーカーとしてHBsAg, HBcrAg, HBV DNAの量的測定も施行した。ウイルス学的反応(VR)は, 治療後24カ月の血清HBV DNA量が $2.1 \log$ コピー/mL未満と定義した。

【結果】39人の患者(81%)は, VRを達成した。VR患者ではHBsAgとHBcrAgの中央値がnon-VR患者より有意に低値だった。IL-6 ($P=0.031$), CXCL9 ($P=0.002$), CXCL10 ($P=0.001$)は, 健常人と比

較しB型慢性肝炎患者で有意に高く, IL-6, CXCL9, CXCL10, CXCL11はAST, ALT, ビリルビンと正の相関し, HBsAgとは負の相関を示した。治療前のIL-22の上昇($P=0.031$)と, HBsAg低値($P=0.001$)およびHBcrAg低値($P=0.001$)は, 良好な治療結果と関連していたが, HBV DNAに関連は認めなかった。多変量解析では, IL-22高値(hazard ratio=13.67, $P=0.046$)とHBcrAg低値(hazard ratio=10.88, $P=0.048$)は, 独立したVRの予測因子だった。IL-22 ($P=0.001$), HBsAg ($P=0.001$), HBcrAg ($P=0.001$)は, VR患者において治療に伴い有意な減少を示した。

【結論】治療前IL-22, HBsAg, HBcrAgはVRと有意な関連性を示していた。さらに, B型慢性肝炎におけるエンテカビル治療では治療前IL-22高値, HBcrAg低値がVRの独立した予測因子であり新しい指標となりうる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

B型慢性肝炎患者では, その病態や病期の形成に宿主の免疫応答が関与していると考えられるが, 未だ不明な点が多く, 血中のサイトカインやケモカインを測定することによってB型肝炎の病態と関連することが報告されている。また, エンテカビルの投与によるウイルス抑制は肝障害の改善だけでなく肝細胞癌の発症を

抑えることが報告されている。本研究ではサイトカインやケモカインがB型慢性肝炎の臨床的かつウイルス学的特徴に関連があるか、また、B型慢性肝炎のエンテカビルによる治療への反応とサイトカイン・ケモカイン、ウイルスマーカーや血清マーカーとの関連について検討した。

エンテカビルの治療を受けた48人のB型慢性肝炎患者の治療前、治療後6カ月、12カ月、24カ月の保存血清と10人の健常人の保存血清を用いて、IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-21とIL-22, CCL2, CCL3, CXCL9, CXCL10とCXCL11をLuminex cytokine assay systemを用いて分析した。また、血清マーカーとしてアルブミン, AST, ALT, ビリルビン, 血小板数を、ウイルスマーカーとしてHBsAg, HBcrAg, HBV DNAの測定も施行した。ウイルス学的反応(VR)は、治療後24カ月の血清HBV DNA量が $2.1 \log$ コピー/mL未満と定義した

その結果、奥原は次の結論を得た。

1. IL-6, CCL2, CXCL9, CXCL10は健常人コント

ロールに比べB型慢性肝炎患者で高値だった。

2. Non-VR患者と比較してVR患者では治療前のIL-22が有意に高く、治療前のHBsAg, HBcrAgは有意に低値で、治療とともに減少した。

3. IL-6, CXCL9, CXCL10, CXCL11は、AST, ALT, ビリルビンと正に相関し、HBsAgとは負に相関した。

4. 多変量解析の結果、IL-22 27.8 pg/mL 以上、HBcrAg $5.7 \log \text{U/mL}$ 以下がVRを予測するための独立した因子だった。

これらの結果よりIL-6, CCL2, CXCL9, CXCL10は健常人と比較するとB型慢性肝炎患者で高値であり、B型、C型肝炎の炎症と相関するという既報を支持するデータであった。治療前IL-22, HBsAg, HBcrAgはVRと有意な関連性を示していた。さらに、エンテカビル治療では治療前IL-22高値, HBcrAg低値がVRの独立した予測因子であり新しい指標となりうる可能性が示唆された。主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Risk factors for diabetes mellitus and impaired glucose tolerance following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients with hematological malignancies (小児血液腫瘍患者における同種造血幹細胞移植後の糖尿病および耐糖能異常の発症危険因子)

平 林 佳奈枝

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】同種造血幹細胞移植(HSCT)の治療成績は向上しているが、小児期HSCT後患者における晩期障害が問題となっている。中でも内分泌疾患の頻度が高い。近年、小児期にHSCTを受けた患者で糖尿病(DM)の若年発症が報告されているが、その発症危険因子については明らかにされていない。本研究では、小児血液腫瘍患者における同種HSCT後のDMおよび耐糖能異常(IGT)の発症危険因子を同定することを目的とした。

【対象と方法】当科で同種HSCTを施行され、移植後2年以上が経過した小児血液腫瘍患者のうち、耐糖能検査を受けた22名(男7,女15)について診療録を用いて後方視的に検討した。初回移植時年齢,耐糖能評価時年齢,移植から耐糖能評価までの期間の中央値は、各々7.4歳(0.8-13.5歳),14.1歳(6.3-21.8歳),5.9年(2.0-14.7年)であった。3名は2回以上の血縁者間移植を受けた。残り19名は単回移植で、6名は血縁者間骨髓移植、3名は非血縁者間骨髓移植、4名

は血縁者間末梢血幹細胞移植、6名は非血縁者間臍帯血移植を受けた。21例で初回移植時の前処置には全身放射線照射を用いた。移植後急性期は連日または数日毎に早朝食前に血糖測定を行った。21例において移植後の耐糖能評価として経口ブドウ糖負荷試験を行った。耐糖能異常の診断にはアメリカ糖尿病学会の基準を用いた。発症危険因子の解析には χ^2 検定またはFisherの直接法を用い、 $p < 0.1$ を示した因子について多変量解析を行った。 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

【結果】5例がDM、5例がIGTと診断され、DM+IGTの累積発生率は移植後5年が11.6%、10年が69.3%であった。評価時に肥満者はいなかった。空腹時血糖, HbA1c, 空腹時インスリン, インスリン抵抗性の指標であるHOMA-IRとMatsuda ISIは、DM+IGT群と正常群(NGT群)で有意差を認めた。NGT群12例中、2例にHOMA-IRの高値を認めた。インスリン分泌指数はDM+IGT群とNGT群で有意差を認めなかった。多変量解析でDM+IGTの発症に関与する因子として、移植時年齢6歳以上が抽出

された。DM+IGT 群は移植後に早朝食前血糖値が有意に上昇したが、NGT 群は移植前後で有意差を認めず、移植前処置から移植後60日までの早朝食前血糖値はDM+IGT 群がNGT 群より有意に高かった。高血糖を反復する症例（移植急性期の早朝食前血糖150 mg/dl以上が4回以上）はDM+IGT群に多い傾向を認めた。糖尿病家族歴、原疾患、移植ソース、グレードII以上の急性移植片対宿主病（GVHD）、慢性GVHD、移植後の糖質コルチコイド投与期間やタクロリムス使用に関しては、有意差を認めなかった。19例で早朝空腹時の血清レプチンとアディポネクチンを測定したが、DM+IGT 群とNGT 群に有意差は認められなかった。

【考察】糖尿病は心血管病変を含む様々な慢性疾患の原因となり、患者のQOLを悪化させる。今回、移植後の耐糖能異常の発症危険因子を検討した。多変量解析の結果、移植時年齢6歳以上がDMとIGTの発症危険因子として同定された。

移植急性期の高血糖反復は統計的に有意な発症危険因子としては同定されなかったが、DM+IGT 群はNGT 群と比較して移植急性期の平均血糖値が有意に高かった。Fujiらは血糖コントロールによって移植後の感染症や臓器障害の頻度が減少すると報告しており、積極的な血糖コントロールが移植後耐糖能異常を軽減できるか今後の検討課題である。

今回、DM+IGT 群に肥満者はいなかった。Annaloroらは、メタボリックシンドロームを合併した成人HSCT後患者において、インスリン抵抗性に関するアディポサイトカインの異常を報告しているが、今回の検討ではDM+IGT 群とNGT 群で血中レプチンやアディポネクチン値に有意差を認めなかった。HSCT後の耐糖能異常には、肥満やアディポサイトカイン産生異常以外の要因が関与している可能性が示唆された。

耐糖能の評価時期がDM+IGT 群とNGT 群で異なっていたことは、思春期におけるインスリン抵抗性の影響や評価時年齢の違いによるのかもしれない。NGT 群の一部の患者でHOMA-IRが高値を示したことを踏まえると、NGT 群であってもDM+IGT に移行する可能性は否定できないため、慎重な経過観察が必要である。

（論文審査の結果の要旨）

同種造血幹細胞移植（HSCT）の治療成績は向上しているが、小児期HSCT後患者における晩期障害

が問題となっている。中でも内分泌疾患の頻度が高い。近年、小児期にHSCTを受けた患者で糖尿病（DM）の若年発症が報告されているが、その発症危険因子については明らかにされていない。今回、平林らは小児血液腫瘍患者におけるHSCT後のDMおよび耐糖能異常（IGT）の発症危険因子を同定するため、同種HSCT後2年以上が経過した小児血液腫瘍患者のうち、耐糖能検査を受けた22名（男7、女15）について診療録を用いて後方視的に検討した。

その結果、平林らは次の結論を得た。

1. 22例中、5例がDM、5例がIGTと診断され、DM+IGTの累積発生率は移植後5年が11.6%、10年が69.3%であった。
2. 空腹時血糖、HbA1c、空腹時インスリン、インスリン抵抗性の指標であるHOMA-IRとMatsuda ISIは、DM+IGT群とNGT群で有意差を認めた。正常群（NGT群）12例中、2例にHOMA-IRの高値を認めた。インスリン分泌指数はDM+IGT群とNGT群で有意差を認めなかった。
3. 多変量解析の結果、DM+IGTの発症に関与する因子として、移植時年齢6歳以上が抽出された。糖尿病家族歴、原疾患、移植ソース、グレードII以上の急性移植片対宿主病（GVHD）、慢性GVHD、移植後の糖質コルチコイド投与期間やタクロリムス使用に関しては、有意差を認めなかった。
4. DM+IGT 群は移植後に早朝食前血糖値が有意に上昇したが、NGT 群は移植前後で有意差を認めず、移植前処置から移植後60日までの早朝食前血糖値はDM+IGT 群がNGT 群より有意に高かった。高血糖を反復する症例（移植急性期の早朝食前血糖150 mg/dl以上が4回以上）はDM+IGT 群に多い傾向を認めた。
5. 19例で早朝空腹時の血清レプチンとアディポネクチンを測定したが、DM+IGT 群とNGT 群に有意差は認められなかった。

今回の研究で、小児期同種HSCT後にDMまたはIGTが高頻度に発症することが示され、発症危険因子として移植時年齢6歳以上が同定された。発症危険因子が示されたことは移植後耐糖能異常の早期発見・介入に有用であり、患者の予後改善につながる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。

Electrocardiographic J waves are associated with right ventricular morphology and function : evaluation by cardiac magnetic resonance imaging (心電図上のJ波は右室の形態と機能に関係している : 心臓MRIを用いた評価)

竹内 崇博

(論文の内容の要旨)

【目的】近年、基礎心疾患を持たない若年者の突然死(心室細動)の原因として早期再分極症候群(J波症候群)が提唱され、その原因や不整脈に至る機序に関して様々な方面から研究が進められている。当科入院時における心電図でもJ波が存在する例を少なからず認めるが、心室細動などの致死性不整脈の既往がある症例はそのごく一部であり、その意義はいまだに明らかになっていない。

J波症候群は初期にはBrugada症候群の亜型と考えられており、遺伝子の異常(SCN5A)、性差(男性に多い)、治療薬に対する反応、心室細動を生じる直前に波形が変化することなど類似点が多く指摘されている。Brugada型心電図とJ波を併存する症例においては致死性不整脈がより高率に発生するとの報告もある。またBrugada症候群ではCT・MRIを用いた研究で右室流出路に形態的な異常を認めたとの報告がなされている。

我々はこれらの研究報告からJ波を認める症例にも右室の形態的異常が関与している可能性を考えて、心臓MRIを用いたJ波の有無と右室の形態的・機能的異常との関係について研究を行った。

【方法】2008年1月から2010年9月までに当院で心臓MRIを施行した連続105例でJ波の有無と右室の形態と収縮能の関係を調べた。12誘導心電図上の関連する2誘導以上でJ点が基線から0.1 mV以上上昇しているものをJ波と定義した。

J波の陽性群(J群)と陰性群(non J群)に分類し、形態に関しては右室・左室の最大径、右室・左室の中央部での拡張期の面積、また収縮能に関しては右室・左室における中央部の面積での収縮率を計測して検討した。

またJ波の波高とこれらの計測値の相関も検討した。

【結果】不整脈源性右室心筋症(ARVC)、脚ブロックの症例、心房細動/粗動の症例はイブシロン波や脚ブロックによる伝導遅延、心電図上の基線が一定でないことによってJ点の高さに影響を及ぼすため除外し、68例において解析を行った。J群が32例、non J群が

36例であった。

右室の最大径と面積ではJ群がnon J群と比較し有意に大きいとの結果が得られた(最大径:p=0.002, 面積:p=0.022)。しかし左室の最大径と面積では両群間で有意差を認めなかった。右室の面積収縮率はJ群がnon J群に比較して有意に低値であった(p=0.013)。左室の面積収縮率は両群間で有意差を認めなかった。

またJ波の大きさと右室の最大径に関しては弱いが正の相関が認められ、J波の大きさと右室の面積収縮率に関しては弱いを負の相関が認められた。J波の大きさと左室の計測値に関してはそれぞれ相関が認められなかった。

抗不整脈薬がJ波に及ぼす影響も考慮し、抗不整脈薬を使用している症例を除外して同様の検討を行ったが結果に違いを認めなかった。

【考察】本研究ではJ波の有無は右室の形態・機能との関連を認めたが、左室の形態・機能とは関連を認めなかった。

現在、J波は主に再分極の異常と考えられている。しかし脱分極の異常を示唆する心室遅延電位とJ波の関連を報告した論文も認められる。本研究の結果ではJ波は再分極の異常のみで説明されうるものではなく、右室の形態・機能異常による右室の伝導遅延、つまり脱分極異常もJ波に関与していることを示唆する。

臨床上認められるJ波の多くは主に右室の形態・機能異常による伝導障害の存在により生じているが、その程度は様々であり、一般的には致死性不整脈を生じない症例が多く含まれていると考えられる。過去には心室細動直前にJ波が増高しているとの報告があり、J波陽性例の中で何らかの負荷の増大により更に伝導障害が増強した場合などにJ波の波高が増高し心室細動が生じやすくなるものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

特発性心室細動(Idiopathic VF)既往症例では、VF既往がない症例と比較して有意に心電図上J波陽性例が多いという論文が2008年に報告された(J波症候群)。また近年Brugada症候群症例で右室流出路の

形態異常，伝導異常を指摘する論文が多く報告されている。J波症候群はBrugada症候群との類似性が多く指摘されており，Brugada型心電図を要する症例にJ波を認めると心室性不整脈が更に高率で生じるとされている。本研究はBrugada症候群と同様にJ波症候群でも右室の形態異常がJ波の有無に関連していることを調べたものである。

心臓MRIを施行した連続105例のうち心房細動や脚ブロックなどJ波が正確に測定できない症例を除外し，68例で検討した。J波の有無によって2群（J波陽性群とJ波陰性群）に分類し，形態異常の有無を調べた。MRIでの形態異常の指標として右室と左室それぞれの最大径，面積を測定した。また機能異常の指標として面積収縮率を測定した。更にJ波の波高を測定し右室・左室それぞれの測定値との相関を調べた。

その結果，竹内崇博は次の結論を得た。

1. J波陽性群では右室の最大径，中央部の面積はJ波陰性群と比較して有意に拡大していた。また面積収縮率は有意に低下していた。
2. 左室に関しては最大径，中央部の面積，面積収縮率ともにJ波陽性群と陰性群とに有意差を認めな

かった。

3. J波の波高は右室の最大径では弱い正の相関を示し，面積収縮率では弱い負の相関を示した。J波の波高と左室の測定値の間には相関は認められなかった。

これらの結果から，J波の有無は右室の形態・機能の異常と関連していると考えられた。J波は右室の形態異常による伝導遅延を示している可能性がある。

現在J波は早期再分極が原因と考えられている。しかし脱分極異常を反映する遅延電位検査が陽性になるとの報告がある。本研究の結果からも，再分極だけではなく脱分極の異常がJ波の形成に寄与している可能性が考えられる。またVFが生じる直前にJ波の波高が増高したとの症例報告が多く発表されている。本研究の結果からは，右室への負荷の増大により右室の伝導遅延が更に著明になった際にVFが生じやすくなる可能性が考えられる。

本論文は特発性心室細動の成因について検証した臨床上有意義な研究であり，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。

Nox4-derived ROS Signaling Contributes to TGF- β -induced Epithelial-mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells (膵癌細胞のEMTにおける活性酸素産生遺伝子Nox4の機能的役割)

平 賀 理 佐 子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition 以下 EMT) は，上皮細胞が間葉系細胞に形態変化する現象であり，これにより一定の極性があり細胞同士が密に結合している上皮細胞が，間葉系細胞のように細胞間の結合が疎となり運動能を獲得する。EMTの過程では紡錘様形態の獲得，N-cadherin や vimentin など間葉系マーカーの発現上昇，E-cadherin や ZO-1 など上皮マーカーの発現抑制や Snail, Twist などの転写因子の誘導が起これり，上皮細胞が間葉系細胞様の表現型を獲得する。このEMTは初期胚発生過程や創治療過程において重要であることが明らかになっているが，上皮系癌細胞が浸潤・転移能力を獲得する際にも重要な過程である。癌細胞ではgrowth factor, cytokines, matrix proteinなどがEMTを促進しており，膵癌ではTGF- β がEMTの主要な誘導因子として知られている。TGF- β によるEMT誘導のシグナル伝達が解明されれば，膵癌の浸潤・転移に対する

新たな治療戦略を見出す可能性がある。

一方，NADPH oxidase (Nox) ファミリーから産生される活性酸素は多様な生理学的現象においてシグナル伝達物質として働くことが分かっている。NoxファミリーはNADPHを基質として活性酸素を産生する酵素であり，Nox1-5とDuox1, 2の7つの構成メンバーから成る。膵癌においては，このうちNox4由来の活性酸素が膵癌細胞の増殖に必要であることが報告されているが，Noxファミリーが果たしている多面的な役割を考えると，膵癌における発癌，癌形質の発現調節にNox4が更に関与している可能性がある。実際に転移乳癌細胞におけるEMTの誘導には，TGF- β により発現増強したNox4が関わっていることが報告されている。しかしNox4が他の癌腫におけるEMTにも同様に関与しているのか，またNox4の発現増強および産生された活性酸素が如何なる蛋白質を標的として修飾し，その活性を調節するか，そのシグナル伝達については明らかにされていない。

本研究では膵癌細胞の TGF- β 依存性 EMT における Nox4 の機能的役割について検討した。

【方法】膵癌細胞株 panc-1 細胞において、TGF- β による Nox4 発現を PCR 法にて確認し、また活性酸素産生量について luminol assay にて検討した。そして Nox4 に対する干渉 RNA (small interference RNA : siRNA) 等を用いて、TGF- β による EMT 誘導について検討した。EMT の確認は、細胞形態の観察または E-cadherin, Snail の発現を指標とした immunoblot 法、免疫蛍光染色、migration assay で行った。また手術切除標本検体を用いて免疫組織染色を行い、Nox4, TGF- β , N-cadherin の発現について検討した。

【結果】膵癌細胞株 panc-1 細胞において、TGF- β により Nox4 の発現増強および Nox4 由来活性酸素産生量の増加を認めた。Nox4 由来活性酸素は、TGF- β による細胞形態変化、E-cadherin の発現抑制および Snail の発現上昇を媒介し、TGF- β による細胞運動亢進に必要であった。TGF- β -Nox4 による EMT には p38MAPK のリン酸化亢進が伴っていた。さらに TGF- β -Nox4 を介して PTP1B の活性が抑制され、これが E-cadherin 低下 (EMT 誘導) に必要であった。またヒト膵臓がん組織では、TGF- β , Nox4 および EMT を示唆する N-cadherin の産生が亢進していた。

【結論】膵癌における TGF- β 依存性 EMT において、Nox4 は p38MAPK のリン酸化を亢進させ、また PTP1B の活性を抑制することで癌細胞内のレドックス制御を行い、EMT におけるシグナル伝達物質としての役割を果たしていることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition 以下 EMT) は上皮細胞が間葉系細胞に形態変化する現象であり、これにより上皮細胞が運動能を獲得する。この EMT は上皮系癌細胞が浸潤・転移能力を獲得する際にも重要な過程である。膵癌では TGF- β が EMT の主要な誘導因子として知られている。TGF- β による EMT 誘導のシグナル伝達が解明されれば、膵癌の浸潤・転移に対する新たな治療戦略を見出す可能性がある。

一方、NADPH oxidase (NOX) ファミリーから産生される活性酸素は多様な生理学的現象においてシグナル伝達物質として働くことが分かっている。膵癌においては Nox4 由来の活性酸素が膵癌細胞の増殖に必要であることが報告されているが、Nox ファミリーが果たしている多面的な役割を考えると、膵癌の EMT

に Nox4 が関与している可能性がある。本研究では膵癌細胞の TGF- β 依存性 EMT における Nox4 の機能的役割について検討した。

方法は、膵癌細胞株 panc-1 細胞において、TGF- β による Nox4 発現を PCR 法にて確認し、また活性酸素産生量について luminol assay にて検討した。そして Nox4 に対する干渉 RNA (small interference RNA : siRNA) 等を用いて、TGF- β による EMT 誘導について検討した。EMT の確認は、細胞形態の観察または E-cadherin, Snail の発現を指標とした immunoblot 法、免疫蛍光染色、migration assay で行った。また手術切除標本検体を用いて免疫組織染色を行い、Nox4, TGF- β , N-cadherin の発現について検討した。

その結果、平賀は次の結論を得た。

- 膵臓癌細胞において、TGF- β により Nox4 の発現増強および Nox4 由来活性酸素産生量の増加を認めた。
- Nox4 由来活性酸素は、TGF- β による細胞形態変化、E-cadherin の発現抑制および Snail の発現上昇を媒介し、TGF- β による細胞運動亢進に必要であった。
- TGF- β -Nox4 による EMT には p38MAPK のリン酸化亢進が伴っていた。
- さらに TGF- β -Nox4 を介する PTP1B の活性抑制が E-cadherin 低下 (EMT 誘導) に必要であった。
- ヒト膵臓がん組織では、TGF- β , Nox4 および EMT を示唆する N-cadherin の産生が亢進していた。

これらの結果より、膵癌細胞における TGF- β 依存性 EMT において、Nox4 が癌細胞内のレドックス制御を行うことにより、EMT におけるシグナル伝達物質として重要な役割を果たしていることが確認された。

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。

High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in testicular seminoma (精巣セミノーマにおける高内皮細静脈様血管とリンパ球の動員)

酒井 康弘

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Seminoma は精巣原発腫瘍の中で最も頻度が高く、組織学的には、腫瘍胞巣周囲に腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte; TIL) を伴うことが特徴である。TIL は seminoma をはじめ様々な腫瘍の免疫監視や生長抑制に重要である上、予後との相関を指摘している報告もあり、TIL の腫瘍組織への浸潤機序の解明は腫瘍免疫を精察する上で非常に重要な関心事であった。今回我々は、TIL は高内皮細静脈 (high endothelial venule; HEV) 様血管という特殊な血管を介して供給されている可能性を考えた。本来 HEV は二次リンパ組織に存在し、血液中からリンパ球を「ホーミング」させる役割を担う。古典的にはまず、HEV の内皮細胞上に発現する6-硫酸化シアリルルイス X がリンパ球上の L-セレクトインと結合することで互いに弱く接着し、リンパ球の“tethering and rolling”が起こる。その後ケモカインによって活性化されたリンパ球は、自身に発現するインテグリンを HEV 上に発現する細胞接着分子と結合させ、強固な接着を営むことで HEV 内皮上に“arrest”して、血管外組織への遊走が始まる。最近では、様々な炎症性疾患や腫瘍において HEV に類似した血管が炎症部位や腫瘍組織に出現し、生理的なホーミングと同様の機序でリンパ球を局所に動員していると考えられている。しかし、seminoma は TIL を豊富に伴うにも関わらずその報告がない。今回我々は、精巣 seminoma で HEV 様血管の出現とホーミング関連分子の発現やその機能性、さらに HEV 様血管を介したリンパ球動員や増殖の様式を明らかにすべく、本研究を施行した。【材料と方法】 信州大学医学部附属病院で seminoma と病理診断された精巣手術材料26例を対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を用い、extended core 1 O-glycan 上の6-硫酸化N-アセチルラクトサミンを認識するMECA-79抗体とシアリルルイス X を認識するHECA-452抗体で免疫染色を行い、seminoma の HEV 様血管に発現する糖鎖構造を調べた。リンパ球ホーミングに関する細胞接着分子である intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)・vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)・mucosal addressin

cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) に対する抗体とMECA-79抗体を用いた蛍光二重染色を行い、これらの分子の発現の有無を検討した。またL-セレクトイン・IgM キメラ・E-セレクトイン・IgM キメラを(6-硫酸化)シアリルルイス X に対する機能性プローブとして用い、*in vitro* selectin chimera binding assay を行った。加えてCD20/CD79 α (B細胞)・CD3 (T細胞)・MECA-79の免疫三重染色やCD8 (細胞傷害性T細胞)・MECA-79の免疫二重染色を行い、HEV 様血管の内腔側に接着しているリンパ球を鏡検し計測して、何れが優位のリンパ球サブセットかを統計学的に明らかにした。さらにCD8・Ki-67の免疫二重染色を施し、細胞傷害性T細胞が腫瘍組織に動員された後の増殖傾向を調べた。

【結果】 26例全例で TIL が腫瘍組織に認められ、そのうち24例 (92.3%) には TIL の集簇が顕著な部を中心に MECA-79陽性 HEV 様血管が出現していた。HEV 様血管の密度は $3.2 \pm 5.6/cm^2$ で、年齢・pT 分類・S 分類・Stage・リンパ節転移の有無との間には相関は認められなかった。これらの HEV 様血管は HECA-452抗体にも同様に陽性であり、両抗体の染色性から seminoma の HEV 様血管上には6-硫酸化シアリルルイス X が発現していることが示された。また *in vitro* selectin binding assay の結果、L-セレクトイン・IgM キメラの結合は同定に能わなかったが、E-セレクトイン・IgM キメラは HEV 様血管の内腔面に結合した。従って HEV 様血管に発現する6-硫酸化シアリルルイス X は、N-アセチルグルコサミンの6位の硫酸化が一部不全なものも含まれてはいるが、潜在的にはこの糖鎖構造はセレクトインとの結合能を有することが機能性に示された。さらに、ホーミングに関する細胞接着分子のうち VCAM-1・MAdCAM-1は陰性だったものの ICAM-1の発現がみられたことから、リンパ球の HEV 様血管を介した血管外遊走のうち“tethering and rolling”と“arrest”に必要なホーミング関連接着分子が備わっていることが証明された。実際これらの HEV 様血管には多数のリンパ球が接着している様子が顕微鏡下で確認でき、その数を計測すると CD3⁺T 細胞の方が CD20/CD79 α ⁺B 細胞より有

意に多く ($p < 0.0001$), 従って HEV 様血管を介したリンパ球動員は T 細胞が優位であると考えられた。T 細胞の密度は最もリンパ球浸潤の著しい部の強拡大 5 視野を計測したところ $780.8 \pm 318.1/\text{HPF}$ で, HEV 様血管の密度との間には相関は認められなかった。一方, CD8^+ 細胞傷害性 T 細胞は HEV 様血管内にはごく少数しか観察されないものの, 腫瘍組織に存する T 細胞はほとんどが CD8^+ 細胞傷害性 T 細胞だった。血管外に存する CD8^+ 細胞傷害性 T 細胞には Ki-67 陽性のものが目立ったため, 細胞傷害性 T 細胞は血管外に遊走された後に腫瘍抗原などによって刺激され, 局所で増殖している可能性が示唆された。

【結論】精巣 seminoma では, TIL (特に T 細胞) が HEV 様血管を介して腫瘍組織に動員され, さらに細胞傷害性 T 細胞については HEV 様血管を介して腫瘍組織に動員された後に増殖していることが本研究で示された。

(論文審査の結果の要旨)

Seminoma は腫瘍胞巣周囲に腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte; TIL) を伴う “two-cell pattern” を特徴とする病理組織像を呈する。一方, 二次リンパ組織には高内皮細静脈 (high endothelial venule; HEV) というリンパ球ホーミングを担う特殊な血管が存在する。本研究では, これに類似の形態・機能を有する HEV 様血管が seminoma にも出現し, 腫瘍免疫に重要な役割を担う TIL の腫瘍組織中への動員に寄与している可能性を検証した。

Seminoma と病理診断された精巣手術材料 26 例を対象とし, MECA-79 抗体を用いて免疫組織化学を行い HEV 様血管を同定した。またリンパ球ホーミングのうち “tethering and rolling step” に必要な 6-硫酸化シアリルルイス X や “arrest step” に必要な cell adhesion molecule (CAM) のホーミング関連分子が HEV 様血管でも発現しているか否かを HECA-452・抗 ICAM-1・抗 VCAM-1・抗 MAdCAM-1 各抗体を用いた免疫組織化学で調べるとともに, L-/E-selectin

chimera binding assay を行った。さらに抗 CD3・抗 CD20/CD79 α ・抗 CD8 各抗体と MECA-79 抗体を用いた免疫多重染色を行い, HEV 様血管内腔面に接着するリンパ球サブセットの数を計測した。

その結果, 酒井は次の結論を得た。

1. 92.3% に MECA-79 $^+$ HEV 様血管を同定した。その数は $3.2 \pm 5.6/\text{cm}^2$ で, 年齢・pT 分類・S 分類・Stage・リンパ節転移の有無とは相関を認めなかった。
2. HEV 様血管の内腔面が MECA-79・HECA-452 両抗体に陽性であり, “tethering and rolling step” に必要な 6-硫酸化シアリルルイス X が発現していることが分かった。また binding assay では L-selectin・IgM の結合は同定できなかったものの E-selectin・IgM の結合を認めたことから, 6-硫酸化シアリルルイス X のうち N-アセチルグルコサミンの 6 位の硫酸化は不完全な可能性があるものの, selectin との結合能を潜在的に有することを示した。
3. “Arrest step” に必要な CAM のうち ICAM-1 のみが HEV 様血管に発現していることが分かった。
4. HEV 様血管に接着するリンパ球は T 細胞が B 細胞より有意に多く ($p < 0.0001$), T 細胞の密度は $780.8 \pm 318.1/\text{HPF}$ で, HEV 様血管の密度との相関を認めなかった。一方, 細胞傷害性 T 細胞は HEV 様血管壁に接着しているものは少ないが, すでに浸潤している TIL の大部分は細胞傷害性 T 細胞で, これらには Ki-67 陽性像が目立った。

これらの結果より, 精巣原発 seminoma では, HEV 様血管を介して T 細胞が優位に腫瘍組織に動員される一方で, 細胞傷害性 T 細胞は HEV 様血管を介して少数が腫瘍組織に動員された後に, 腫瘍細胞近傍で増殖していることが本研究で示された。これらは腫瘍組織への炎症細胞浸潤という腫瘍免疫の初動を捉えた研究として大変有意義なものであり, 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。

Analysis of Y chromosome haplogroups in Japanese population using short amplicons and its application in forensic analysis (短鎖増幅産物を応用した日本人集団の Y 染色体ハプログループの解析と法医学試料の解析への応用)

原 山 雄 太

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】今日, DNA 型解析による個人識別は

法医学分野において極めて一般的となっている。しかしながら, 法実務では, 腐敗・変性等の影響を受け

た劣化 DNA 試料を扱うことがあり、市販されている個人識別キットでは解析が困難な場合が少なくない。加えて、検査できる DNA 量が微量であることもしばしばである。

一方、Y 染色体上にある男性特有の領域は組換えがなく、突然変異が起こりにくいことから男系血縁の身元確認に用いられる。現在 Y 染色体上の SNP 変異を用いることで、約300の系統分類としてのハプログループ分類が可能である。本研究は、日本人に特異的な Y 染色体のハプログループに着目し、法医実務試料に対応可能なハプログループ分類のためのシステムを構築することを目的とした。劣化した DNA 試料は高度に断片化されていることから、PCR 産物の短鎖化を行うとともに、微量な DNA 試料を解析し、同時に複数の SNP を解析するマルチプレックスシステムを構築し、法医実務試料に対する有効性について検討した。

【方法】日本人に変異が多いと推測される Y 染色体上の22個の SNP を、3つのマルチプレックス PCR 法により分類するシステム（システム1～3）を構築した。システム1により日本人を大別し（ハプログループ C, D, D1, D2, D3, O, O1a, O2, O3, N, Q を分類する）、システム2によりハプログループD2の細分化、システム3によりハプログループO2の細分化を行った。いずれの SNP 解析も、法医実務試料で散見される断片化した DNA の解析のため、可能な限り短い PCR 増幅産物（77～150 bp）を生成するプライマーを新たに設計して施行した。これらのシステムを用いて、血縁関係のない日本人男性432人の血液或いは口腔粘膜細胞を用いて分類を行い、その頻度を確認した。また、DNA を人工的に分解させた試料及び劣化が予想される硬組織から抽出した DNA について、現在市販されている Y 染色体の検査試薬（AmpFISTR Yfiler Kit）と、本システムの比較検討を行った。

【結果】今回新たに構築した3つのマルチプレックスシステムが良好に機能することを確認した。日本人432人の分類では、全13のハプログループに分類することができたが、0.9%（4人）には変異が認められず、分析の標的とは異なるハプログループに属すると推定された。高度に劣化している DNA 試料を用いて、本システムの有効性を検討したところ、市販の AmpFISTR Yfiler Kit を用いた解析では高分子領域で極端に PCR 増幅効率が低下し判定が困難であったのに対し、本システムではこれらの劣化試料に対して有効

な解析結果を得ることができた。

【考察】組換えや突然変異の少ない Y 染色体上の SNP を用いることは、男系の血縁関係の推定に極めて効果的であると考えられ、今回複数の SNP を迅速に解析できるシステムを構築した。現在汎用されている Y 染色体の検査試薬と本システムの劣化 DNA の解析では、検査試薬である AmpFISTR Yfiler Kit は高分子領域の解析が不良な傾向にあった。原因として、高度に劣化した DNA 試料は様々な要因により DNA の断片化が進んでいるためと考えられる。一方、今回構築したシステムは短い PCR 増幅産物を解析対照とすることで高度に断片化した DNA の解析においても有効な結果が得られ、法医学的試料に適した検査方法であることが示唆された。また、ミトコンドリア DNA などの SNP 解析を併用することにより、劣化試料において、個人識別能力が飛躍的に向上すると考えられる。

（論文審査の結果の要旨）

法医学実務では、腐敗・変性等の影響を受けた劣化 DNA 試料を扱うため、市販されている個人識別キットでは、解析が困難な場合が少なくない。加えて、検査できる DNA 量が微量であることもしばしばである。劣化 DNA とは、主として DNA の断片化であり、このような DNA を解析するためには、PCR 増幅産物のサイズを可能な限り短くすることが有効と考えられている。市販されている個人識別キットは、4塩基程度の繰り返し配列の違いを見る Short Tandem Repeats (STR) 型多型解析が用いられているため、PCR 増幅産物の長さが大きくなる傾向にある。そこで、SNP による個人識別法に着目し可能な限り PCR 増幅産物の短鎖化を行い、Y 染色体上の SNP を解析することで、日本人に特異的なハプログループ分類を行った。更に、微量試料に対応するため、Y 染色体上の SNP を一度に解析するマルチプレックス PCR システムを構築し、日本人集団のハプログループ分類のデータ集積とともに法医実務試料に対する解析の有効性について検討した。

その結果、原山は次の結論を得た。

1. 新たに構築したシステムで日本人集団を全13のハプログループに分類することができた。
2. 本システムで日本人集団に多いとされるハプログループD2及びO2の細分化を行い、D2については細分化することが可能であった。また、日本人集団でハプログループO2に分類された殆どがハプログループO2bに属することが判明した。

3. 本システムは SNP に着目し, PCR 産物を可能な限り短鎖化することで, 市販されている STR 型解析では分析が困難であった法医実務試料でも解析可能であった。

以上の結果より, 今回新たに開発した Y 染色体上の SNP を用いて系統分類するシステムは, 法医実務で

想定される断片化された DNA 解析にも有効な結果を得ることができ, 同様に断片化した試料に対応可能なミトコンドリア DNA 等の SNP 解析と併用することで, 法医実務上の個人識別に極めて有用であると考えられる。よって, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Expression of long-form *N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase 1 in human high endothelial venules (ヒト高内皮細静脈における長鎖型 *N*-アセチルグルコサミン 6-*O* 硫酸転移酵素 1 の発現)

藤原 麻衣子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 *N*-アセチルグルコサミンの 6 位の炭素に硫酸基を転移する *N*-アセチルグルコサミン 6-*O*-硫酸転移酵素 (GlcNAc6ST) はヒトでは 5 種類がクローニングされており, そのうち GlcNAc6ST-1 と GlcNAc6ST-2 はリンパ節, 扁桃, パイエル板などの二次性リンパ性臓器に存在する高内皮細静脈 (high endothelial venule: HEV) に発現している。この 2 つの酵素は HEV 内腔面に発現している 6-硫酸化シアリルルイス X (6-sulfo sLeX) の生合成に排他的に関与し, L-セレクトリンを介したリンパ球ホーミングにおいて重要な役割を演じている。ヒト GlcNAc6ST-1 cDNA の読み枠の長さは 1,593 bp であるが, その 5' 末端には翻訳開始メチオニンコドンが 141 bp 離れて 2 個存在している。これら 2 つの翻訳開始メチオニンコドンから転写が始まると, 長鎖型と短鎖型の 2 種類の GlcNAc6ST-1 が合成されることになる。これまでの多くの研究は短鎖型の GlcNAc6ST-1 を対象にしており, 長鎖型に対する解析は行われていない。また, 長鎖・短鎖型に拘わらず, これまでヒト GlcNAc6ST-1 の内因性蛋白発現については確認されていない。本研究の目的は, ヒト GlcNAc6ST-1 における 2 個の翻訳開始メチオニンコドンの間に存在するアミノ酸残基を認識する抗体を作製し, 長鎖型 GlcNAc6ST-1 がヒトの組織において内因性に発現しているか否かを明らかにし, さらに, 長鎖型および短鎖型 GlcNAc6ST-1 の細胞内局在や酵素活性の違いを明らかにすることである。

【対象と方法】 長鎖型ヒト GlcNAc6ST-1 を特異的に認識する抗体である Anti-GlcNAc6ST-1-N を作製し, その反応特異性を確認した。長鎖型および短鎖型 GlcNAc6ST-1 をコードする発現ベクター (それぞれ

pcDNA1-GlcNAc6ST-1 M#1, pcDNA1-GlcNAc6ST-1 M#2) およびそれぞれの C 末端に FLAG を付けたベクター (それぞれ pcDNA1-GlcNAc6ST-1 M#1-FLAG, pcDNA1-GlcNAc6ST-1 M#2-FLAG) を作製し, HeLa 細胞に遺伝子導入した。この一連の遺伝子導入 HeLa 細胞と Anti-GlcNAc6ST-1-N 抗体, 抗 FLAG 抗体である M2 抗体を用いたウェスタンブロッティングと蛍光二重免疫染色を行い, 長鎖型と短鎖型の細胞内局在の違いを調べた。さらに細胞内における長鎖型と短鎖型 GlcNAc6ST-1 の酵素活性の違いを調べるために, 発現ベクター pcDNA1-GlcNAc6ST-1 M#1 と pcDNA1-GlcNAc6ST-1 M#2 をそれぞれ HeLa 細胞に遺伝子導入し, 6-硫酸化シアリル *N*-アセチルラクトサミン (6-sulfo sialyl LacNAc) を認識する S2 単クローン抗体を用いて Cell-ELISA を行った。長鎖型および短鎖型 GlcNAc6ST-1 の蛋白の発現レベルの違いを調べるため, それぞれ FLAG 付きのベクターを遺伝子導入した HeLa 細胞とそれに対する M2 抗体を用いて FACS 解析を行った。また, mRNA の発現レベルの違いを調べるために半定量的分析 RT-PCR を行った。また, 長鎖型 GlcNAc6ST-1 がヒトの組織で内在性に発現しているか否かを調べるため, ヒトのリンパ節組織切片に Anti-GlcNAc6ST-1-N 抗体と, HEV で発現している 6-sulfo sLeX に対する特異抗体の MECA-79, ゴルジマーカーである抗 GM130・抗 GS27・抗 Rab8 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。

【結果】 遺伝子導入した HeLa 細胞のウェスタンブロッティングと蛍光免疫染色で, Anti-GlcNAc6ST-1-N 抗体は長鎖型 GlcNAc6ST-1 を特異的に認識した。また, 長鎖型 GlcNAc6ST-1 は核周囲に点状に存在し, これは短鎖型 GlcNAc6ST-1 においても同様であった。

短鎖型、長鎖型 GlcNAc6ST-1の細胞内酵素活性を Cell-ELISA により解析したところ、GlcNAc6ST-1は両者とも GlcNAc6ST-2より有意に高い酵素活性を示したが、両者間で有意差は認められなかった。また、FACS 解析では長鎖型 GlcNAc6ST-1に比べて短鎖型の方が蛋白の発現が高く、半定量的分析 RT-PCR では短鎖型の方が mRNA 発現も高かった。さらに、Anti-GlcNAc6ST-1-N抗体と各種ゴルジマーカを用いたヒトリンパ節組織の蛍光二重免疫染色では、ヒトの長鎖型 GlcNAc6ST-1は HEV を構成する内皮細胞の trans-Golgi network (TGN) に発現していた。

【結論】 Anti-GlcNAc6ST-1-N抗体は長鎖型GlcNAc6ST-1を特異的に認識し、免疫組織染色にも使用できることを示した。また、長鎖型および短鎖型のヒトGlcNAc6ST-1の細胞内における局在はほぼ同じであり、両者における細胞内酵素活性は同等であることが示唆された。さらに、ヒトリンパ組織には長鎖型 GlcNAc6ST-1が内在性に発現しており、その大部分は HEV を構成する内皮細胞の TGN に局在していることを示した。

(論文審査の結果の要旨)

N-アセチルグルコサミンの6位の炭素に硫酸基を転移するN-アセチルグルコサミン6-O-硫酸転移酵素(GlcNAc6ST)はヒトでは5種類がクローニングされており、そのうちGlcNAc6ST-1とGlcNAc6ST-2はリンパ節、扁桃、パリエル板などの二次性リンパ性臓器に存在する高内皮細静脈(high endothelial venule: HEV)に発現している。この2つの酵素はHEV内腔面に発現している6-硫酸化シアリルルイスX(6-sulfo sLeX)の生合成に排他的に関与し、L-セレクチンを介したリンパ球ホーミングにおいて重要な役割を演じている。ヒトGlcNAc6ST-1 cDNAの読み枠の長さは1,593 bpであるが、その5'末端には翻訳開始メチオニンコドンが141 bp離れて2個存在している。これら2つの翻訳開始メチオニンコドンから転写が始まると、長鎖型と短鎖型の2種類のGlcNAc6ST-1が合成されることになる。これまでの多くの研究は短鎖型のGlcNAc6ST-1を対象にしており、長鎖型に対する解析は行われていない。また、長鎖・短鎖型に拘わらず、これまでヒトGlcNAc6ST-1の内因性蛋白発現については確認されていない。そこで、ヒトGlcNAc6ST-1における2個の翻訳開始メチオニンコドンの間に存在するアミノ酸残基を認識する抗体を作製し、長鎖型GlcNAc6ST-1がヒトの組織において内因性に発現しているか否かを調べると共に、

長鎖型および短鎖型 GlcNAc6ST-1の細胞内局在や酵素活性の違いを検討した。

その結果、藤原は次の結論を得た。

1. 遺伝子導入した HeLa 細胞のウェスタンブロットティングと蛍光免疫染色で、Anti-GlcNAc6ST-1-N 抗体は長鎖型 GlcNAc6ST-1を特異的に認識した。
2. 長鎖型 GlcNAc6ST-1は核周囲に点状に存在し、これは短鎖型 GlcNAc6ST-1においても同様であった。
短鎖型、長鎖型 GlcNAc6ST-1の細胞内酵素活性を Cell-ELISA により解析したところ、GlcNAc6ST-1は両者とも GlcNAc6ST-2より有意に高い酵素活性を示したが、両者間で有意差は認められなかった。
3. FACS 解析では長鎖型 GlcNAc6ST-1に比べて短鎖型の方が蛋白の発現が高く、半定量的分析 RT-PCR では短鎖型の方が mRNA 発現も高かった。
4. Anti-GlcNAc6ST-1-N 抗体と各種ゴルジマーカを用いたヒトリンパ節組織の蛍光二重免疫染色では、ヒトの長鎖型 GlcNAc6ST-1は HEV を構成する内皮細胞の trans-Golgi network (TGN) に発現していた。

これらの結果より、Anti-GlcNAc6ST-1-N 抗体は長鎖型GlcNAc6ST-1を特異的に認識することが明らかとなった。また、長鎖型および短鎖型のヒトGlcNAc6ST-1の細胞内における局在はほぼ同じであり、両者における細胞内酵素活性は同等であることが示唆された。さらに、ヒトリンパ組織には長鎖型GlcNAc6ST-1が内在性に発現しており、その大部分は HEV を構成する内皮細胞の TGN に局在していることを示した。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Polymorphisms of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 Gene Are Associated with Resistance to High-Altitude Pulmonary Edema (HAPE) in a Japanese Population: A Case Control Study Using Polymorphic Microsatellite Markers (日本人における高地肺水腫に対する疾患抵抗性と TIMP3 遺伝子多型との関連について：マイクロサテライトマーカーを用いた症例対照研究)

小林 信光

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】高地肺水腫 (HAPE) は低酸素環境下で発症する非心原性の肺水腫である。その原因は、低酸素環境への曝露による肺血圧の亢進、肺血管透過性の亢進、肺胞上皮細胞の障害等が考えられているが、未だ未解明な部分も多い。HAPE では再発症例が多く、低酸素環境下に対する反応の個体差が原因の一つと考えられており、これまで HAPE 発症に関わる遺伝子の研究が多く報告されているが、報告の多くは本疾患発症に機能的に関与する一部の遺伝子解析である。発症原因に関わる遺伝子検索には染色体上を網羅的に検索する遺伝子解析が必要である。本研究では全ゲノムに存在する400種類のマイクロサテライト (MS) マーカーを用いて相関解析を行い、日本人の HAPE に発症に関与する可能性のある候補遺伝子を同定した。さらに候補遺伝子内に設けた一塩基多型 (SNP) を用いて詳細マッピングを行い、HAPE との関連につき検討した。

【方法】研究対象は HAPE 既往者群 53 人 (HAPE-s) と、非発症者群 67 人 (HAPE-r) が対象である。HAPE-s は登山中に 2700 m 以上で HAPE を発症し、信州大学医学部附属病院で治療を受けた患者である。HAPE-r は長野県登山協会および信州大学登山部に所属し、頻回に 3000 m 以上の登山を行い、これまで高山病や心疾患の症状を起こしたことがない者である。研究対象者からは同意を得た上で静脈血を採取し、遺伝子を抽出した。これらの検体を MS マーカーと共に PCR で増幅した後、各マーカーのアリル頻度を用いて解析を行った。その結果 9 個のマーカーで両群間に有意差を認めた。その一つである D22S280 が内在する TIMP3 遺伝子 (TIMP3) に着目し、6 つの SNPs について遺伝子型タイピングを行い、両群の遺伝子頻度を比較した。

【結果】MS 解析では 5 個のマーカーで有意に疾患感受性を、4 個のマーカーで有意に疾患抵抗性を認めた。そのうち疾患との強い関連を示した D22S280 に着目した。このマーカーとの、前後 100 kbp の範囲に存在す

る候補遺伝子を検索し、TIMP3 が検出された。また、D22S280 は TIMP3 内に局在することから TIMP3 が HAPE 発症に関連する可能性があると考え、同遺伝子の関連性を確認するために SNP を用いた詳細マッピングを行った。その結果 rs130293 が有意差をもって疾患関連性を認めた。アリル C の頻度は HAPE-s 群で有意に低く疾患抵抗性を示した (OR=0.22, 95% CI 0.09-0.55)。また、ハプロタイプ解析では 3 つの SNPs (rs738992, rs130287, rs130293) より構成されたハプロタイプにおいて、CAC が HAPE-s 群で有意に低く、このハプロタイプが HAPE への疾患抵抗性に関連があると考えられた。

【考察】今回我々は TIMP3 の肺に関する報告に着目して SNPs 研究を行った。その結果、rs130293 (T/C) のアリル C が HAPE に対して有意に疾患抵抗性であることを示した。これらの結果から、アリル C の存在が HAPE の発症に対して防御的な役割を果たしていると考えられる。TIMP3 はいくつかある TIMPs のうち唯一細胞外質 (ECM) に強く結合し、MMP の活性を制御することにより健全な組織を維持する。TIMP/MMP システムの障害は、肺においては炎症や浮腫、気腫、線維化など様々な病態を引き起こすと考えられている。HAPE では肺血管の透過性が亢進し、肺水腫を起こすとされており、TIMP3 の遺伝子多型による TIMP/MMP システムの不均衡が生じ、結果として肺血管に影響を及ぼすことにより HAPE が発症する可能性があると考えられた。

【結論】本研究により、HAPE に関連する可能性のある新しい遺伝子を明らかにした。また、TIMP3 遺伝子の SNP である rs130293 のアリル C が日本人における HAPE の発症に対して疾患抵抗性であることを示した。

(論文審査の結果の要旨)

高地肺水腫 (HAPE) は低酸素環境下で発症する非心原性の肺水腫である。HAPE は再発症例が多く、低酸素環境下に対する反応の個体差が原因の一つと考えられており、これまで HAPE 発症に関わる遺伝子

の研究が報告されているが、その多くは一部の遺伝子解析である。発症原因に関わる遺伝子検索には染色体上を網羅的に検索する遺伝子解析が必要である。今回、マイクロサテライト (MS) マーカーを用いた網羅的遺伝子解析を行ない疾患に関連する候補遺伝子を検索した。また、さらに候補遺伝子内に設けた一塩基多型 (SNP) を用いて詳細マッピングを行い、HAPE との関連につき検討した。

研究対象はこれまで HAPE を発症し、信州大学病院で治療を受けた既往者53人と、何度も高地に到達し高山病の症状を起こしたことがない非発症者群67人が対象である。研究対象者からは同意を得た上で遺伝子を抽出した。これらの検体を各 MS マーカーのアリル頻度を用いて解析を行った。その結果 9 個のマーカーで両群間に有意差を認めた。その一つである D22S280 が内在する TIMP3 遺伝子 (*TIMP3*) に着目し、6 つの SNPs について遺伝子型タイピングを行い、両群の遺伝子頻度を比較した。

その結果、小林信光は次の結論を得た。

1. MS 解析では 5 個のマーカーで有意に疾患感受性

を、4 個のマーカーで有意に疾患抵抗性を認めた。

2. 有意差を認めたマーカーのうち、D22S280 は TIMP3 遺伝子内に局在した。

3. TIMP3 遺伝子の SNP を用いた詳細マッピングを行い、その結果 *rs130293* が有意差をもって疾患関連性を認めた。

4. *rs130293* のアリル C の頻度は既往者群で有意に低く疾患抵抗性を示した

これらの結果から、TIMP 遺伝子内の *rs130293* アリル C の存在が HAPE の発症に対して防御的な役割を果たしていると考えられる。TIMP/MMP システムの障害は、肺においては肺血管の構造に影響を及ぼし、様々な病態を引き起こすと考えられている。HAPE では肺血管の透過性が亢進し、肺水腫を起こすとされており、TIMP3 の遺伝子多型により TIMP/MMP システムの不均衡が生じ、結果として肺血管に影響を及ぼし HAPE が発症する可能性を示唆している。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Microarray and FISH-based genotype-phenotype analysis of 22 Japanese patients with Wolf-Hirschhorn syndrome (Wolf-Hirschhorn 症候群の日本人患者22名におけるマイクロアレイと FISH 解析を用いた遺伝型-表現型相関の検討)

清水 健 司

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Wolf-Hirschhorn 症候群 (以下 WHS) は、4 番染色体短腕 (4p) 遠位部の欠失に起因し、特徴的顔貌所見、成長障害、精神運動発達遅滞、およびけいれんを主徴とする隣接遺伝子症候群である。解析技術の進展により、4p 欠失領域および合併する領域の重複など詳細な遺伝型が明らかにされてきたことに伴い、WHS の主要徴候の責任領域や、重症度との相関が検討されてきた。しかしながら未解明な点は多く、特に生命予後や発達予後に重要な影響を及ぼすけいれんにおいて、その責任領域の詳細や遺伝型-表現型の関連検討は重要課題と考えられている。本研究は、日本人 WHS22 症例においてマイクロアレイ法とメタフェーズ FISH 法により得た遺伝型と、けいれんを含む臨床症状との関連の詳細を検討することを目的とした。

【対象と方法】 2010年1月より2012年2月の期間、国内8病院において、顔貌所見を含む臨床所見に加え、

先行して行った G 分染法もしくは 4p 端部プローブの FISH 法にて 4p 欠失が同定され WHS と診断された日本人 22 例を対象とした。マイクロアレイ法によりゲノムコピー数異常を確定し、BAC プローブを用いたメタフェーズ FISH 法にて染色体再構成の詳細を確認した。臨床所見の詳細は各病院の臨床遺伝専門医からの情報を論文提出者が再評価した。

【結果】 対象に認めた欠失切断点は多様であり、サイズは 2.06-29.42 Mb で全例 WHS 主要徴候の責任領域である WHS critical region 2 (WHSCR2) を含んでいた。< 6 Mb: 6 例, 6-15 Mb: 11 例, > 15 Mb: 5 例で、20 例が端部欠失、2 例が中間部欠失で、端部欠失のうち 4 例はその他領域の重複を伴っていた。マイクロアレイ結果より 11q 端部重複とのモザイクが疑われた症例 20 と、G 分染法で中間部欠失と正常細胞とのモザイクと報告されていた症例 15 は、それぞれ詳細なメタフェーズ解析を実施し、4p 切断点が一致する der(4)(4;11)(p15.31;q25) [73%] と del(4)(p15.31)

[27%]の構造異常モザイクと、del(4)(p15.33)[80%]とdel(4)(p16.3)[20%]の異なる2種類の端部欠失のモザイクと判明した。

けいれんを20/21(95%)に認め、欠失サイズ<6Mbではけいれん発症年齢1歳未満の頻度が2/6(33%)、重積頻度は1/6(17%)であったのに対し、≥6Mbでは12/14(86%)、13/14(93%)と高い傾向にあった。4例の難治性けいれんを認めた例において臭化カリウム/ナトリウムが追加投与されており、全例に投与後の改善を認めた。眼の構造異常と腎臓合併症頻度に、合併頻度と欠失サイズの相関を認めた。顔貌所見は最小欠失の症例1と中間部欠失の症例13のみが非典型例であった。従来報告のなかった合併症として、高コレステロール血症を5例(36%)に、1例(5%)に多発性骨軟骨腫を認めた。

【考察】マイクロアレイ解析は詳細な欠失範囲の同定に非常に有用な染色体検査であるが、モザイク率が偏った場合は検出限界があり、染色体再構成やモザイクの最終的な判断にはメタフェーズFISH解析が有用であった。症例15のように同一個人の中で大小二種類の異なるサイズの端部欠失をもつモザイクの報告は過去に例がなく、端部欠失の不安定性を示唆する症例と考えられた。

けいれんについては、その重症度を発症年齢と重積頻度から評価したが、≥6Mbの欠失に重症度が高い傾向がみられ、結果として発達遅滞の重症度につながると考えられた。一方、けいれんのない1例は、従来のけいれん責任遺伝子である*LETMI*遺伝子を含むものの、これより遠位の領域が保たれている中間部欠失例であり、*LETMI*を含まない遠位の欠失でけいれんを認める既報告との比較より、WHSにおけるもう一つのけいれん感受性領域が0.76-1.3Mbに存在する可能性を示唆した。本領域内にはけいれんとの関連が動物モデルにおいて示唆されている*CTBPI/CPLX1*の2遺伝子を内包しており、これらの新規感受性遺伝子と*LETMI*領域を含む≥6Mb欠失においては、けいれん発症後、臭化物治療や含めた注意深い対応が望まれ、WHS健康管理における新たな進歩になりうる知見と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

Wolf-Hirschhorn症候群(以下WHS)は4番染色体短腕(4p)遠位部の欠失を含む隣接遺伝子症候群であり、近年の解析技術の進歩により遺伝型-表現型の詳細が明らかになってきたが、けいれんとの関連を

含めまだ不明な点が多い。今回、日本人WHS22症例において詳細な遺伝型-表現型の検討を行った。

診察所見とG分染法もしくはFISH法でWHSと診断された22例を対象とし、マイクロアレイ法による詳細な欠失領域の同定と、BACプローブを用いたメタフェーズFISH解析による染色体再構成の確認を実施した。各病院の臨床遺伝専門医により情報提供された臨床所見の詳細を、論文提出者が再評価した。

その結果次の結論を得た。

1. WHS症例の4p欠失範囲は2.06 Mb-29.42 Mbと多様であり、端部欠失20例、中間部欠失2例で、その他領域の端部重複の合併例4例であった。
2. 複雑な構造異常モザイクが確認された2例は、一方が不均衡転座と端部欠失、他方が欠失範囲の異なる2種類の端部欠失であった。
3. けいれん発症20例において、重症度の指標として設定した①発症年齢1歳未満の頻度②重積頻度は、共に6Mb未満の欠失サイズをもつ症例に比べ、6Mb以上の例で高い傾向にあった。また難治性けいれんを認めた4例は全例臭化カリウム/ナトリウムの追加投与により改善した。
4. 眼の構造異常と腎臓合併症の頻度に欠失サイズとの相関を認めた。また従来報告のなかった高コレステロール血症を14例中5例に認めた。

収集したWHS症例は、単純な4p欠失だけでなく他領域の重複合併や時に複雑な構造異常のモザイクを含む多様な遺伝型を呈していた。詳細な欠失サイズの同定にマイクロアレイは有用であり、最終的な染色体再構成やモザイクの判断にはメタフェーズFISH解析を組み合わせることが重要であった。また既報告例との比較により、従来想定されていたけいれんの責任遺伝子よりも遠位に存在する*CTBPI/CPLX1*が新たなけいれんの感受性遺伝子と推察され、これらを含む6Mb以上の欠失においてけいれんの重症度が高い傾向が認められ、WHS健康管理における新たな指標になりうる知見と考えられた。

上記の研究内容について、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。

Surgical Outcomes of Acute type A Aortic Dissection in Elderly Patients (高齢者急性A型大動脈解離の手術成績)

駒 津 和 宜

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】急性A型大動脈解離(aTAAD)に対する手術では高齢はrisk factorの一つと考えられ、70歳以上のaTAAD手術での死亡率は16.1-37.5%と報告されている。高齢者aTAADに対する手術戦略は議論のあるところだが、Hemiarch置換術(HAR)、部分弓部置換術(PAR)、全弓部置換術(TAR)のいずれかが術者によって選択される。2004年以降、当院では70歳以上の高齢者aTAAD症例に対してはentry切除を目的として可能な限りHARやPARを選択し低侵襲化を図った。今回、この戦略に則って治療した高齢者aTAAD症例の手術成績について検討した。

【対象と方法】2004年1月～2012年4月に当院で手術を施行したaTAAD症例156例のうち70歳以上の59例を対象として、HAR+PAR群とTAR群で患者背景、手術手技、早期・中期成績を比較検討した。また、follow up CTで弓部～下行大動脈の解離残存の有無・最大径の変化についても検討した。手術は、血栓閉塞型で偽腔の厚さ10mm以下の症例を除き、全例で緊急手術を行い、高齢者aTAAD症例ではentry切除を最重視し、上行大動脈または弓部小弯にentryを確認した場合もしくは観察可能範囲にentryを認めなかった場合にはHARを、小弯以外の弓部にentryを確認した場合にPARを、左鎖骨下動脈付近にentryを確認した場合にはTARを各々選択した。

【結果】2群間で性別・年齢など患者背景に有意差は認められなかった。手術手技はHAR 47例、PAR 4例、TAR 8例で、全体でのentry切除率は94.9%、14例で併施手術を要した。手術時間に関しては、手術時間は両群間に有意差を認めなかったが体外循環時間および脳分離体外循環時間においてHAR+PAR群で有意に短かった。早期成績は、両群合わせて4例の在院死亡があり、いずれも解離による冠動脈灌流不全に伴う急性心筋梗塞から低拍出量症候群に至ったことが原因であった。在院日数はHAR+PAR群37.0±17.9日、TAR群68.4±37.4日で、両群間に有意差は認めなかったがHAR+PAR群で短い傾向にあった。Figure 1に全生存曲線および大動脈関連イベント回避曲線を示した。Follow up CT 28例中で18例で解離

が残存しており、18例中10例で偽腔開存していた。最大径は、残存群は2.5±1.1年で+2.83±4.58mm、非残存群は2.2±0.8年で+1.00±1.25mmで、両群間に有意差は認めなかった。

【考察】高齢者aTAAD症例の手術成績は2002年に43%、2010年に38.2%と報告されており、これらと比較して当院の成績は良好であった。70歳以上の症例においては平均余命を考慮すると弓部の残存解離が予後に影響する可能性は低いと考え、我々はentry切除に主眼を置いた治療戦略で積極的にHARまたはPARを選択している。早期死亡に関する有意差はなかったが体外循環時間と脳分離体外循環時間は有意にHAR+PAR群で短く、在院期間も短い傾向にあった。今回の検討で、術中脳梗塞発症率が25.4%であり諸家の報告6.7-22.7%より高かったが、2010年以降、脳分離体外循環流量を送血圧30mmHg以上、両側前頭葉の経皮的酸素飽和度40%以上を指標に20ml/kg/分まで増量することにより2010年以降の脳梗塞発症率は4.8%と改善し、近年の報告8.9-9.8%よりも良い成績であった。また、手術時間、心停止時間、循環停止時間が術中脳梗塞のrisk factorであると報告されている。今回の検討で、脳梗塞の有無での2群比較を行うと、手術時間と心停止時間が脳梗塞発症群で有意に長く、これらの報告と合致する結果となった。

術後12カ月以上の経過でCT followした28例の検討では平均2.4年の経過中に下行大動脈が2.2mm増大しており、諸家の報告と同程度の変化であった。残存解離の有無による2群間比較では瘤の増大に有意差を認めなかった。Entry残存、偽腔開存、幅広い偽腔が瘤化に影響し遠隔期生存率を低下させると報告されており、Entryを切除し偽腔を縮小化することが重要と考えられた。

本検討では再手術率2.3%、再手術5年回避率96.36%であり、初回手術時平均年齢77歳と日本人平均余命を考慮すると満足のいく結果であり、70歳以上の症例にHAR・PARを施行することは合理的と考えられた。

【結語】高齢者aTAADに対する我々の手術戦略は死亡率が低く良好な成績であった。entry切除に主眼を

置いた手術戦略で、再手術や大動脈関連死の危険性を増すことなく死亡率を低減することができた。

(論文審査の結果の要旨)

急性A型大動脈解離(aTAAD)の手術において、手術手技や臓器保護技術の進歩をもってしても高齢は未だ危険因子の一つである。aTAADに対する術式選択は議論のあるところであるが、2004年以降、当院では高齢者aTAAD症例に対してはentry切除を基本として低侵襲化を図ることでmortality・morbidityを低減できると考え、可能な限り全弓部置換術を避けHemiarch置換術や部分弓部置換術を選択する方針とした。

2004年1月～2012年4月当院で緊急手術を受けた70歳以上のaTAAD症例59例について、患者背景、手術関連要素、早期・中期成績について検討し、低侵襲化が図られた群(HAR+PAR群)と図られなかった群(TAR群)で比較検討を行った。

その結果、駒津和宜は次の結果を得た。

1. 患者背景は、男性20名・女性39名で、平均年齢は77.0歳であった。年齢、性別、術前状態について両群間に有意差は認めなかった。
2. 手術は、Hemiarch置換術47例、部分弓部置換術4例、全弓部置換術8例であり、14例で大動脈基部置換術や冠動脈バイパス術や併施などの併施手技を要した。
3. 手術時間・心停止時間・循環停止時間・出血量で

は両群間に有意差は認めなかったが、体外循環時間・脳分離体外循環時間ではHAR+PAR群で有意に短かった。

4. 早期成績では、在院死亡は4例(6.8%)でいずれも大動脈解離に伴う冠灌流不全が関与したものであった。周術期脳梗塞を15例(25%)に認めたが、2010年1月以降の脳分離灌流のflow増量以後は4.8%と改善を認めた。合併症率で両群間に有意差は認めなかった。
5. 平均follow期間は43.9カ月で、Follow期間中に14例の死亡があり、大動脈関連死は2例に認めた。また、1例に大動脈解離関連の再手術を要したが、残存した弓部解離が原因で再手術を要した症例はなかった。大動脈関連イベント5年回避率は96%であった。
6. 術後1年以上経過したFollow up CT 28例の検討では、Entry切除+解離残存群での大動脈最大径の変化は解離非残存群と比べて有意な差を認めなかった。

これらの結果より、高齢者aTAADに対する手術でentry切除を基本としてHemiarch置換術や部分弓部置換術を選択することは大動脈関連イベントのリスクを上げることなく手術死亡を低減できると考えられた。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Pedicle Morphology Using Computed Tomography-based Navigation System in Adolescent Idiopathic Scoliosis (特発性思春期側弯症におけるCT-based navigation systemによる椎弓根径、長さの計測)

倉石修吾

(論文の内容の要旨)

【はじめに】脊柱側弯症の矯正固定に椎弓根スクリューが使用され高い矯正率を認める。しかしながら日本人小児の椎弓根は細く、スクリュー刺入にはスクリューの椎弓根からの逸脱による脊髄、神経根損傷などの危険が伴う。そこでCT-based navigation systemによる椎弓根径とスクリュー長の計測を行い、回避すべき椎体レベルについて検討した。

【目的】思春期特発性側弯症(以下AIS)患者の椎弓根の形や長さに関して3次元解析の妥当性についてnavigation CTとstandard axial CTで計測し、比較、検討した。

【対象と方法】AIS患児15例(女児14例、男児1例)、平均年齢14.1(11~17)歳を対象とした。255椎510椎弓根を測定した。平均Cobb角63.6(43~100)度、Lenke type 1:10例、Lenke type 2:2例、Lenke type 3:3例。T1からL5までの椎弓根の最大径とスクリュー刺入経路の長さをnavigation CTとstandard axial CTで測定した。

【結果】平均椎弓根径は両T11, 12, L5 左L3, 4以外でnavigationでの計測のほうが太くなった。右はT3(P=0.0009), T4(P=0.000054), T5(P=0.0013), T7(P=0.039), 左はT4(P=0.033), T5(P=0.029)で有意差を認めた。平均椎弓根長は、左

はすべて standard axial CT での計測の方が長くなった。T1 (P=0.00024), T3 (P=0.010), T4 (P=0.0043), T6 (P=0.010), L1 (P=0.0010), L2 (P=0.0009), L3 (P=0.0051) で有意差を認めた。右は胸椎レベルではT3以外は navigation CT での計測の方が長くなり, T7 (P=0.019) では有意差を認めた。腰椎レベルでは standard axial CT での計測の方が長くなり, L2 (P=0.025) で有意差を認めた。**【結論】** 胸椎の concave side で standard axial CT では椎弓根は細く長く測定される。よって, standard axial CT でプランすると胸椎の concave side でスクリュー先端が大動脈に到達する可能性が高くなる。また, CT-based navigation system を使用した方がより太いスクリューを刺入できる。よって刺入可能なレベルも多くなる。

(論文審査の結果の要旨)

脊柱側弯症の矯正固定に椎弓根スクリューが使用され高い矯正率を認める。しかしながら日本人小児の椎弓根は細く, スクリュー刺入にはスクリューの椎弓根からの逸脱による脊髄, 神経根損傷などの危険が伴う。そこでCT-based navigation system による椎弓根径とスクリュー長の計測を行い, 回避すべき椎体レベルについて検討した。

思春期特発性側弯症患児15例(女児14例, 男児1例), 平均年齢14.1(11~17)歳を対象とした。平均 Cobb 角63.6(43~100)度, Lenke type 1:10例, Lenke type 2:2例, Lenke type 3:3例。T1から

L5までの椎弓根(255椎510椎弓根)の最大径とスクリュー刺入経路の長さを navigation CT で測定した。navigation CT による3次元解析の妥当性について, standard axial CT でも計測し, navigation CT の測定値と比較, 検討した。

その結果, 倉石修吾は次の結果を得た。

1. 平均椎弓根径は両T11, 12, L5 左L3, 4以外で navigation CT での計測のほうが太くなった。
2. 平均椎弓根長は, 左はすべて standard axial CT での計測の方が長くなった。
3. navigation CT で測定し手術で選択されたスクリューの太さについて術後 standard axial CT で評価すると, 脊柱管内に2mm以上逸脱したのは6.9%であった。
4. navigation CT で測定し手術で選択されたスクリューの長さについて, standard axial CT で評価すると, 対側に逸脱するような長いスクリューは選択されていなかった。

これらの結果より, 胸椎の concave side で standard axial CT では椎弓根は細く長く測定される。よって, standard axial CT で術前に使用するスクリューの計画を立てると胸椎の concave side でスクリュー先端が大動脈に到達する可能性が高くなる。また, navigation を使用した方がより太いスクリューを刺入できる。よって刺入可能なレベルも多くなる。

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。

Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B (慢性B型肝炎患者のHBe抗原のセロコンバージョン後のHBe抗原陰性肝炎の特色と発症の予想)

森 田 進

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 B型ウイルス(HBV)キャリアの自然経過は, HBVの活動性とそれに対する宿主の免疫応答から, 免疫寛容期, 免疫排除期, 免疫監視期に分類される。免疫寛容期はHBVの活動性は高いが肝炎はない。免疫排除期になると肝炎を発症しHBVの活動性は低下傾向となる。この過程でHBe抗原陽性からHBe抗体陽性へSC(seroconversion)するとHBVの活動性が低下し肝炎が鎮静化する(免疫監視期)。しかし, 一部の症例ではSCしてもHBVの活動性が低下しないか, 一旦低下しても後に再活性化し肝炎が

継続する。このような病態はHBe抗原陰性慢性肝炎と呼ばれ, HBe抗原陽性の慢性肝炎に比較し肝炎の活動性が高く, 肝硬変への移行や肝発癌が多いことが報告されている。今回の研究では, HBe抗原のSC前後で長期経過観察可能であったB型慢性肝炎症例を対象に, HBe抗原陰性慢性肝炎の臨床的特徴を検討した。

【対象と方法】 HBe抗原のSC前3年から後3年以上経過観察可能であったB型慢性肝炎36例を対象とした。SC後の経過観察期間の中央値は11.6年(範囲:3.2~26.0年)であった。経過中, HBe抗原・抗体,

HBs抗原量, HBcr抗原量, HBV DNA量, PC (pre-core) 変異, BCP (basal core promoter) 変異を経時的に測定した。SC後のALT値の変動は積分ALT値にて評価し慢性肝炎の有無を判定した。

【結果】対象の36症例はSC前には全例ALT高値であった。SC前後に、1年以上ALT正常化(<31 IU/L)した場合を肝炎鎮静化とし、最初のALT正常化を鎮静化時点とした。肝炎が沈静化しない症例(ALT \geq 31 IU/L)を肝炎例とした。SC後2年目までは肝炎鎮静化例が多く観察されたが、それ以降の鎮静化例は稀であった。そこで、SC後(HBe抗原陰性化後)2年を過ぎても肝炎が鎮静化しなかったHBe抗原陰性慢性肝炎例(n=20)とSC2年以内に鎮静化した非肝炎例(n=16)を比較検討した。両群間で年齢、性別に差はなかった。ALT値はSC以降、HBcr抗原量はSC後1年目以降に肝炎群で有意に高値であったが、HBV DNA量、PC変異率、BCP変異率は両群間で差は見られなかった。多変量解析では、SC後2年目のALT高値(\geq 31 IU/L)のみが独立したHBe抗原陰性慢性肝炎群の特徴因子であった(OR 42.0, 95% CI: 4.3~405.4, P=0.001)。一方、SC後2年目までにALT値が正常化した19例のうち4例(21%)にALT再上昇が見られ、HBe抗原陰性慢性肝炎と考えられた。両群で年齢、性別、HBs抗原量に差はなかったが、SC後2年目のHBV DNA量、HBs抗原量、HBcr抗原量の比較では、HBV DNA量(7% vs. 60%, P=0.037)とHBcr抗原量(0% vs. 44%, P=0.033%)が高値の症例が肝炎群で有意に多かった。

【結論】HBe抗原のSCに伴う肝炎の鎮静化はSC後2年目までに起こり、この時点までに肝炎が鎮静化しない場合はHBe抗原陰性慢性肝炎の可能性が高い。一方、SC後2年以内にALT値が正常化してもHBcr抗原量とHBV DNA量が高い場合は、肝炎再燃(HBeAg陰性慢性肝炎)の可能性が高いことが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

B型ウイルス(HBV)キャリアの自然経過は、HBVの活動性とそれに対する宿主の免疫応答から、免疫寛容期、免疫排除期、免疫監視期に分類される。免疫寛容期はHBVの活動性は高いが肝炎はない。免疫排除期になると肝炎を発症しHBVの活動性は低下傾向となる。この過程でHBe抗原陽性からHBe抗体陽性へSC(seroconversion)するとHBVの活動

性が低下し肝炎が鎮静化する(免疫監視期)。しかし、一部の症例ではSCしてもHBVの活動性が低下しないか、一旦低下しても後に再活性化し肝炎が継続する。このような病態はHBe抗原陰性慢性肝炎と呼ばれ、HBe抗原陽性の慢性肝炎に比較し肝炎の活動性が高く、肝硬変への移行や肝発癌が多いことが報告されている。今回の研究では、HBe抗原のSC前後で長期経過観察可能であったB型慢性肝炎症例を対象に、HBe抗原陰性慢性肝炎の臨床的特徴を検討した。

HBe抗原のSC前3年から後3年以上経過観察可能であったB型慢性肝炎例36例を対象とした。SC後の経過観察期間の中央値は11.6年(範囲:3.2~26.0年)であった。経過中、HBe抗原・抗体に加え、HBs抗原量、HBcr抗原量、HBV DNA量、PC(pre-core)変異、BCP(basal core promoter)変異を経時的に測定した。SC後のALT値の変動は積分ALT値にて評価し慢性肝炎の有無を判定した。

その結果、森田は次の結論を得た。

1. HBe抗原のSCに付随して起こる肝炎の鎮静化はSC後2年目以内に起こり、これ以降の肝炎(肝炎の継続あるいは再燃)はHBe抗原陰性慢性肝炎と考えられた。
2. SC後2年目のALT高値がHBe抗原陰性慢性肝炎例では多くみられた。
3. SC後2年目までにALT値が正常化しても、HBcr抗原量とHBV DNA量が高い場合は、肝炎再燃(HBeAg陰性慢性肝炎)の可能性が高い。

HBe抗原のSCに伴う肝炎の鎮静化はSC後2年目までに起こることが示され、これ以降もALT高値が続く場合はHBe抗原陰性慢性肝炎の可能性が高い。一方、SC後2年目までにALT値が正常化してもHBcr抗原量とHBV DNA量が高い場合は、肝炎再燃(HBeAg陰性慢性肝炎)の可能性が高いことが示唆された。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Reappraisal of the immunophenotype of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs)
—gastric pyloric and small intestinal immunophenotype expression in gastric and intestinal type
IPMNs— (膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) の免疫染色に基づいた表現型の再評価—胃型
IPMN と腸型 IPMN における胃幽門粘膜および小腸粘膜の形質発現)

小林 実喜子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) は粘液産生性の上皮性腫瘍性病変であり、主膵管や分枝膵管内に発生し、腺腫相当の軽度異型病変から上皮内癌相当の高度異型病変まで多彩な異型度の病変が含まれる。IPMN は形態およびムチンの免疫組織化学から4つの亜型 (胃型, 腸型, 胆膵型, オンコサイト型) に分類されおり、胃型と腸型が大部分を占めている。

【対象と方法】33件のIPMN手術切除材料を用いて、以下の免疫組織化学的検討により免疫表現型に基づいてIPMNを分類し、臨床的・病理組織学的特徴と組織発生について考察した。胃表層粘液細胞マーカー (MUC5AC), 胃腺粘液細胞マーカー (MUC6, GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β \rightarrow R), 胃幽門粘膜および十二指腸上皮細胞マーカー (PDX1), 腸上皮マーカー (MUC2, CDX2), 小腸上皮マーカー (CPS1), 大腸上皮マーカー (SATB2)。

【結果】MUC2の発現により、IPMNは胃型 (n=17), 腸型 (n=8), 胃腸混合型 (衝突型=7, 混成型=1) に亜分類された。亜型間に年齢および性別に違いはなかった。病理組織学的には、胃型IPMNは胃腺窩上皮に類似した上皮より構成された乳頭構造を呈し、深部に幽門腺様構造を有しているか、平坦な病変を形成していた。腸型IPMNは杯細胞より構成され、幽門腺様構造を欠いた絨毛構造を呈しているか、低乳頭状病変を形成していた。胃腸混合型IPMNは、胃型IPMNと腸型IPMNが境界をなして存在する衝突型 (7例) と両方が境界不明瞭に混在している混成型 (1例) 認められた。

以下の6項目について比較検討したところ (①病変の主座 (主膵管型か分枝膵管型か), ②膵管内結節の有無, ③幽門腺様構造の有無, ④背景膵実質における萎縮の有無, ⑤組織学的異型度, ⑥浸潤癌合併の有無), 胃型IPMNと腸型IPMNにおいて有意差がみられたのは①③④⑤であった。従来報告と同様、胃型IPMNは分枝膵管に多く、幽門腺様構造を有し、背景膵実質の萎縮は見られず、低異型度病変主体で

あった。一方、腸型IPMNは主膵管に多く、幽門腺様構造は見られず、背景膵実質の萎縮を伴い、高異型度病変主体であった。胃型IPMNと胃腸混合型IPMNはどの項目においても有意差は見られなかった。腸型IPMNと胃腸混合型IPMNにおいて有意差がみられたのは、①③④⑤であった。

免疫組織化学的には、MUC5ACとPDX1はすべてのIPMNに発現が見られた。MUC6は胃型および胃腸混合型が腸型に比べ有意に発現していた。GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β \rightarrow Rは胃型および胃腸混合型にのみ発現が見られた。MUC2とCDX2は腸型が胃型や胃腸混合型に比べ有意に発現していた。CPS1は腸型が胃型に比べ有意に発現していたが、腸型と胃腸混合型に有意差はなかった。SATB2の発現はみられなかった。

【考察】胃型IPMNは胃腺粘液細胞マーカー (MUC6およびGlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β \rightarrow R) を発現し、腸上皮マーカー (MUC2およびCDX2) をほとんど発現せず、胃幽門粘膜および十二指腸上皮細胞マーカー (PDX1) を発現していることから胃幽門粘膜上皮の特徴を有するものと考えられた。腸型IPMNにはGlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β \rightarrow Rが発現せず、腸上皮マーカー (MUC2およびCDX2) と小腸上皮マーカー (CPS1) を発現し、大腸上皮マーカー (SATB2) を発現しないことから、小腸粘膜上皮の特徴を有するものと考えられた。腸型IPMNにはPDX1が発現していることから、腸型IPMNは近位小腸 (十二指腸) 上皮の形質を有していると考えられた。

胃型IPMNと腸型IPMNの関係については、前者が後者に転換するという仮説と、それぞれが別発生であるという仮説がある。転換説の根拠は、胃型IPMNにもMUC2がわずかに発現しており、胃型、腸型ともにびまん性にMUC5ACの発現がみられるということにある。一方、別発生であるという仮説の根拠としては、病変の主座が違うことや両者にみられる遺伝子異常の異なることが報告されている。

今回の検討では、胃型と腸型において、1) 年齢の差が認められないこと、2) 病変の主座が違うこと、

3) 胃腸混合型においては衝突型が多いこと, 4) GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β \rightarrow Rの発現が腸型では確認できないこと, 5) 初期病変において両者は特徴的な免疫表現型を示していることから胃型 IPMN と腸型 IPMN は胃型が腸型に転換したのではなく, それぞれの組織発生が異なると考えられた。

【結論】MUC2の発現程度により, IPMN は胃型(胃幽門粘膜上皮の表現型)と腸型(十二指腸粘膜上皮の表現型)に2大別された。両者のIPMNは免疫表現型および臨床的・病理組織学的特徴からそれぞれ組織発生が異なっている可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)は, 形態およびムチンの免疫組織化学から, 胃型と腸型IPMNに2大別される。

IPMN33例を用いて, 各種免疫組織化学的検討からIPMNを分類し, 臨床的・病理組織学的に検討した[胃表層粘液細胞マーカー(MUC5AC), 胃腺粘液細胞(MUC6, GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β \rightarrow R), 胃幽門および十二指腸上皮(PDX1), 腸上皮(MUC2, CDX2), 小腸上皮(CPS1), 大腸上皮(SATB2)]。年齢・性別および以下6項目について検討した[①病変の主座(主膵管型か分枝膵管型か), ②膵管内結節の有無, ③幽門腺様構造の有無, ④背景膵実質における萎縮の有無, ⑤組織学的異型度, ⑥浸潤癌合併の有無]。

その結果, 小林実喜子は次の結論を得た。

1. MUC2により, 胃型(n=17), 腸型(n=8), 胃腸混合型IPMN(衝突型=7, 混成型=1)に亜分類された。

Safety, tolerability, and feasibility of antifungal prophylaxis with micafungin at 2 mg/kg daily in pediatric patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (小児同種造血幹細胞移植患者におけるミカファンギン 2 mg/kg の連日投与による真菌感染症予防の安全性, 忍容性および実施可能性)

吉川 健太郎

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】侵襲性真菌感染症(IFD)は, 致死的な転帰をとりやすい同種造血幹細胞移植(HSCT)合併症の1つである。現在, 同種HSCT患者においては, アゾール系抗真菌薬によるIFD予防が推奨されているが, 副作用や免疫抑制薬との相互作用等の問題がある。ミカファンギン(MCFG)はキャンディン系の抗真菌薬で, HSCT患者においては1 mg/kg

2. 胃型は胃腺窩上皮に類似し幽門腺様構造もしくは平坦病変を形成した。腸型は杯細胞より構成される絨毛構造もしくは低乳頭状病変を形成した。胃腸混合型は, 胃型と腸型の両者を認めた。

3. 亜型間で年齢・性別に差はなかった。

4. 胃型と腸型において①③④⑤, 腸型と胃腸混合型においても①③④⑤に有意差があった。胃型と胃腸混合型は有意差がなかった。

5. 全症例でMUC5ACとPDX1は認められ, SATB2は認められなかった。MUC6は胃型および胃腸混合型が腸型に比べ有意であった。GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β \rightarrow Rは胃型および胃腸混合型にのみ認められた。MUC2とCDX2は腸型が胃型や胃腸混合型に比べ有意であった。CPS1は腸型が胃型に比べ有意であったが, 腸型と胃腸混合型に有意差はなかった。

これらの結果より, 胃型は分枝膵管に多く, 幽門腺様構造を有し, 膵実質の萎縮は見られず, 低異型度病変主体であった。一方, 腸型は主膵管に多く, 膵実質の萎縮を伴い, 高異型度病変主体であった。

腸型は「大腸のvillous adenomaに類似」とされているが, 本研究で十二指腸への分化が新たに証明された。

本研究において, 1) 年齢差がない, 2) 病変の主座が違う, 3) 混合型においては衝突型が多い, 4) GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β \rightarrow Rが腸型にはない, 5) 初期病変において両者は特徴的な免疫表現型を示すことから, 胃型と腸型は組織発生が異なることが示唆された。

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

(上限50 mg)/日による予防投与が保険適応となっているが, 小児患者における至適投与量等は明らかでない。本研究では, 小児の同種HSCT患者に対するMCFG 2 mg/kg/日の予防投与の有効性, 安全性および移植関連合併症や薬剤のMCFG血中濃度に与える影響を評価した。

【対象と方法】当院で2003年~2011年に初回同種HSCTを施行された小児患者38例(中央値7.3歳)を対象に,

MCFG 2 mg/kg/日 (1回1時間) の点滴静注を移植 5 日以上前から開始した。投与終了は好中球数が $500/\mu\text{L}$ 以上に到達後、イトラコナゾールの経口予防内服が可能であること等を条件とした。安全性の評価には有害事象共通用語基準 (CTCAE) を用いた。IFD は, proven (確実), probable (疑い), possible (可能性あり) 例に分類した。高速液体クロマトグラフ法を用いて, 13 例の血漿中 MCFG のトラフ濃度と 10 例のピーク濃度を測定した。

【結果】 38 例の小児同種 HSCT 患者に対して, MCFG 2 mg/kg/日の予防投与を 34-196 (中央値 68) 日間行った。38 例中 25 例がグレード 2 以上の急性 GVHD を発症し, 3 例が白血病再発で死亡した。MCFG 予防投与中に, 2 例が probable または possible IFD を発症したが, 抗真菌薬の変更で改善した。IFD 発症 2 例以外は MCFG の単独投与を完遂できた (94.7%)。MCFG による急性輸注反応は認められなかった。MCFG の投与中に AST, ALT, Cr 値の上昇は認められず, T-Bil 値のみわずかに上昇した。MCFG の血漿濃度は, 平均トラフ値が $3.04 \pm 1.21 \mu\text{g}/\text{mL}$ (569 検体), 平均ピーク値が $9.63 \pm 3.62 \mu\text{g}/\text{mL}$ (44 検体) で, トラフ値とピーク値は中等度に相関した ($R^2=0.466$)。グレード 3 (肝ステージ 2) の急性移植片対宿主病 (GVHD) を発症した 1 例では, MCFG トラフ値が最高 $10.21 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで上昇したが, 副作用としての頻度の高い頭痛, 関節痛, 不眠, 発疹はみられなかった。この症例において MCFG トラフ値の上昇は T-Bil 値の上昇と強く相関した ($R^2=0.894$)。タクロリムスの血中濃度は MCFG のトラフ値に影響を及ぼさなかった ($R^2=0.040$)。また, シクロホスファミドによる移植前処置, ステロイドによる生着症候群や急性 GVHD に対する治療は MCFG のトラフ値に影響しなかった。**【考察】** MCFG 投与後に明らかな関連有害事象は認められず, probable/possible IFD を発症した 2 例を除く全例が 2 mg/kg/日の予防投与を完遂できた。2 mg/kg/日の MCFG 投与による IFD 予防の失敗率は 5.3% で, 過去の小児 HSCT の報告 (4.3~24%) と比較すると, 同等もしくは優れていた。当科で過去に行われたフルコナゾールやイトラコナゾールにより真菌症の予防投与を行った 28 例の失敗率は 8.3% で有意差はなかったが, IFD を発症した 2 例は致死あるいは重度の後遺症を残したことから, MCFG 2 mg/kg/日投与法はより有効と考えられた。肝急性 GVHD による T. Bil 値の上昇に伴って MCFG トラフ値が著明

に上昇した例においても, MCFG 関連の有害事象が発現しなかった。さらに, MCFG はタクロリムス, シクロホスファミド, ステロイドなどの HSCT 関連薬剤との明らかな相互作用はなかった。以上より, 2 mg/kg/日の MCFG 投与は小児 HSCT 患者に対して安全性および忍容性が高い有効な IFD 予防法と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

侵襲性真菌感染症 (IFD) は, 致命的な転帰をとりやすい同種造血幹細胞移植 (HSCT) 合併症の 1 つである。現在, 同種 HSCT 患者においては, アゾール系抗真菌薬による IFD 予防が推奨されているが, 副作用や免疫抑制薬との相互作用等の問題がある。ミカファンギン (MCFG) はキャンディン系の抗真菌薬で, HSCT 患者においては 1 mg/kg (上限 50 mg)/日による予防投与が保険適応となっているが, 小児患者における至適投与量等は明らかでない。本研究では, 当院で 2003 年~2011 年に初回同種 HSCT を施行された小児患者 38 例 (中央値 7.3 歳) を対象に, 小児の同種 HSCT 患者に対する MCFG 2 mg/kg/日の予防投与の有効性, 安全性および移植関連合併症や薬剤の MCFG 血中濃度に与える影響を評価した。

その結果, 吉川らは次の結論を得た。

1. MCFG 予防投与を 34-196 (中央値 68) 日間行った。
2. MCFG 予防投与中に, 2 例が probable または possible IFD を発症したが, 抗真菌薬の変更で改善した。IFD 発症 2 例以外は MCFG の単独投与を完遂できた (94.7%)。
3. MCFG による急性輸注反応は認められなかった。MCFG の投与中に AST, ALT, Cr 値の上昇は認められず, T-Bil 値のみわずかに上昇した。
4. MCFG の血漿濃度は, 平均トラフ値が $3.04 \pm 1.21 \mu\text{g}/\text{mL}$ (569 検体), 平均ピーク値が $9.63 \pm 3.62 \mu\text{g}/\text{mL}$ (44 検体) で, トラフ値とピーク値は中等度に相関した ($R^2=0.466$)。
5. 38 例中 25 例がグレード 2 以上の急性 GVHD を発症し, 3 例が白血病再発で死亡した。グレード 3 (肝ステージ 2) の急性移植片対宿主病 (GVHD) を発症した 1 例では, MCFG トラフ値が最高 $10.21 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで上昇したが, 副作用としての頻度の高い頭痛, 関節痛, 不眠, 発疹はみられなかった。この症例において MCFG トラフ値の上昇は T-Bil 値の上昇と強く相関した ($R^2=0.894$)。

6. タクロリムスの血中濃度は MCFG のトラフ値に影響を及ぼさなかった ($R^2=0.040$)。また、シクロホスファミドによる移植前処置、ステロイドによる生着症候群や急性 GVHD に対する治療は MCFG のトラフ値に影響しなかった。

今回の研究で、明らかな MCFG 関連有害事象は認められず、IFD 予防成功率は過去の報告や当科の過去の成績と比較して同等もしくは優れていた。また、

HSCT 関連薬剤との明らかな相互作用はなかった。以上より、2 mg/kg/日の MCFG 投与が小児 HSCT 患者に対して安全性および忍容性が高い有効な IFD 予防法であることを示したことは移植患者の治療成績の向上に繋がる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。

KIR, HLA, and IL28B Variant Predict Response to Antiviral Therapy in Genotype 1 Chronic Hepatitis C Patients in Japan (日本人ジェノタイプ 1 型 C 型慢性肝炎患者に対する抗ウイルス療法治療効果予測に *KIR, HLA, IL28B* 遺伝子多型が与える影響について)

野 沢 祐 一

(論文の内容の要旨)

【目的】ナチュラルキラー (NK) 細胞は自然免疫によるウイルス排除において重要な役割を担っている。killer immunoglobulin-like receptor (KIR) は、そのリガンドである特定の human leukocyte antigen (HLA) を認識することで NK 細胞活性を調節している。特に KIR2DL3 と HLA-C1 の組み合わせが白人の C 型肝炎ウイルス感染者に対する抗ウイルス療法の治療効果や自然排除に関連しているという報告があるが、日本人患者におけるこれら自然免疫遺伝子の働きは明らかになっていない。そこで今回我々は、ジェノタイプ 1 型慢性 C 型肝炎患者において、KIR 遺伝子、HLA-B, C, およびインターロイキン (IL) 28B single nucleotide polymorphism (SNP) (rs8099917) を測定し、治療効果に与える影響を検討した。

【方法】48週間のペグインターフェロンおよびリバビリン併用療法を受けた C 型慢性肝炎患者 115 名を対象とし、PCR-SSOP 法を用いて 16 種類の KIR 遺伝子および HLA-B, C を測定し、IL28B SNP と併せて治療効果に寄与する因子を解析した。

【結果】HLA-Bw4 は、治療に対する sustained virological response (SVR) と有意差を持って関連していた ($P=0.017$; odds ratio [OR]=2.50)。同様に KIR セントロメリック A/A ハプロタイプでも有意差を認めた ($P=0.015$; OR 3.37)。反対に、KIR2DL2 または KIR2DS2 遺伝子を持つ患者は有意に SVR 率が低かった ($P=0.015$; OR=0.30 $P=0.025$; OR=0.32)。多変量解析では、IL28B TT genotype ($P=0.00009$; OR=6.87, 95% confidence interval [CI] 2.62-18.01), *KIR2DL2/HLA-C1* ($P=0.014$; OR=0.24,

95% CI=0.08-0.75), *KIR3DL1/HLA-Bw4* ($P=0.008$, OR=3.32, 95% CI=1.37-8.05), 白血球数 ($P=0.009$; OR=3.32, 95% CI=1.35-8.16) が独立した SVR の予測因子であった。本検討では、IL28B TT と KIR3DL1-HLA-Bw4 が治療反応患者と関連があり ($P=0.0019$)、また一方で IL28B TT と同時に KIR2DL2-HLAC1 を持つ患者は治療抵抗性と関連していた ($P=0.0067$)。

【結論】日本人ジェノタイプ 1 型 HCV 患者において、*KIR3DL1/HLA-Bw4*, *KIR2DL2/-HLA-C1*, そして IL28B SNP はペグインターフェロン、リバビリン療法に対する治療効果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)

ナチュラルキラー (NK) 細胞は自然免疫による C 型肝炎ウイルス (HCV) などのウイルス排除において重要な役割を担っている。NK 細胞には killer immunoglobulin-like receptor (KIR) と呼ばれる受容体が発現しており、そのリガンドである HLA クラス I を認識することにより NK 細胞活性を調節している。KIR と HLA の組み合わせが白人の HCV 感染者に対する抗ウイルス療法の治療効果や自然排除に関連しているという報告があるが、日本人患者における検討はない。今回、日本人 C 型肝炎患者において KIR, HLA に加えてインターロイキン (IL) 28B single nucleotide polymorphism (SNP) を測定し、これら自然免疫遺伝子が治療効果予測に与える影響について検討した。

対象は 48 週間のペグインターフェロン・リバビリン併用療法を受けた C 型肝炎患者ジェノタイプ 1 型患者

115名である。PCR-SSOP法を用いて16種類のKIR遺伝子、HLA-B、Cを測定し、IL28B SNPと併せウイルス学的著効（SVR）に寄与する因子の解析を行った。

その結果、野沢は次の結論を得た。

1. 多変量解析では、IL28B SNP TT, KIR2DL2+/HLA-C1+, 白血球 $\geq 4410/\mu\text{L}$, KIR3DL1+/HLA-Bw4+がSVRに寄与する独立した因子として抽出された。
2. KIR3DL1+/HLA-Bw4+とKIR2DL2-/HLA-C1-を組み合わせると、有意にSVRになりやすいことが判明した。

3. KIR3DL1+/HLA-Bw4+とIL28B TTの組み合わせではSVR予測に関する特異度は75%であった。

4. KIR2DL2+/HLA-C1+とIL28B GT/GGの組み合わせではSVRとなった症例は1例もなく治療抵抗性と関連が強かった。

これらの結果より、NK細胞の活性を調節するKIR/HLAの組み合わせは日本人C型慢性肝炎治療におけるSVRに寄与する独立した因子であり、治療効果に重要な役割を果た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。

Surgical Treatment of 144 Cases of Hilar Cholangiocarcinoma Without Liver-Related Mortality (肝門部胆管癌切除例144例の検討—術後肝不全死0%—)

古澤 徳彦

(論文の内容の要旨)

【はじめに】肝門部胆管癌症例では、外科切除が長期生存を可能にする唯一の治療とされている。しかし、肝門部は肝動脈や門脈が近接するという解剖学的な特徴による胆管癌の易浸潤性や、腫瘍の胆管水平方向進展が治癒切除を困難としている。さらに、根治切除には通常、拡大肝葉切除が必要となり、術後合併症、特に術後肝不全の危険性は高い。我々は肝門部胆管癌症例に対して、必要に応じて門脈塞栓術および減黄処置を術前に行い、1990年から一貫して積極的な切除を行っている。今回、我々が経験した過去23年間の肝門部胆管癌切除症例144例を検討し、短期および長期成績の向上が得られたか否かを検証した。

【方法】1990年から2012年に診療を行った肝門部胆管癌253例のうち、外科切除を行った144例を対象とした。1990年から2000年の70症例を第一期、2001年から2012年の74症例を第二期とし、後ろ向きな検討を行った。術前に閉塞性黄疸を認める症例には予定残肝の片葉胆道ドレナージを行っている。また、腹部CTから算出される予定残肝容積が40%以下の症例には、術後肝不全のリスクを軽減するため術前に切除予定葉の門脈塞栓術を施行し、予定残肝の肥大を図っている。T. Bil < 2 mg/dl, 予定残肝容積 > 40%が実現された時点で手術適応としている。手術関連死は術後90日以内に発生した死亡（死因問わず）とし、術後重症合併症はClavien分類のグレードⅢ、Ⅳと定義した。

【結果】患者背景、病理組織学的因子、術式に両群間

で有意差を認めなかった。術中出血量（1020 ml vs 745 ml）、周術期輸血（25.7% vs 2.7%）、FFP投与量（1280 ml vs 480 ml）は第二期で有意に減少した。手術関連死亡は第一期に1名認めた（脳梗塞、術後31日）が、第二期では認めなかった（1.2% vs 0%）。術後合併症率は第二期で有意に低率であった（86% vs 61%）。重症合併症率は第二期で減少したが有意差は見られなかった（34.3% vs 24.3%）。また、多変量解析で出血量（900 ml以上）が、術後合併症の唯一の危険因子として規定された。治癒切除率（70% vs 78%）および5年生存率（33% vs 35%）は両群間で同等であった。多変量解析では術後長期生存の予後不良因子として、リンパ節転移陽性および非治癒切除が規定された。

【考察】肝門部胆管癌に対する肝切除では、最近10年間で手術関連死亡率0%を維持し、また、術後肝不全死を23年間にわたり経験していない。出血量の軽減が術後合併症率の低下に寄与したと考えられた。

【結論】近年10年間で短期手術成績、特に術中出血量および術後合併症率の改善が示された。治癒切除率の向上が、術後長期生存率の改善に必要なものである。

(論文審査の結果の要旨)

肝門部胆管癌症例では、外科切除が長期生存を可能にする唯一の治療とされている。しかし、肝門部は肝動脈や門脈が近接するという解剖学的な特徴による胆管癌の易浸潤性や、腫瘍の胆管水平方向進展が治癒切除を困難としている。さらに、根治切除には通常、拡

大肝葉切除が必要となり、術後合併症、特に術後肝不全の危険性は高い。我々は肝門部胆管癌症例に対して、必要に応じて門脈塞栓術および減黄処置を術前に行い、1990年から一貫して積極的な切除を行っている。今回、我々が経験した過去23年間の肝門部胆管癌切除症例144例を検討し、短期および長期成績の向上が得られたか否かを検証した。

1990年から2012年に診療を行った肝門部胆管癌253例のうち、外科切除を行った144例を対象とした。1990年から2000年の70症例を第一期、2001年から2012年の74症例を第二期とし、後ろ向き検討を行った。術前に閉塞性黄疸を認める症例には予定残肝の片葉胆道ドレナージを行っている。また、腹部CTから算出される予定残肝容積が40%以下の症例には、術後肝不全のリスクを軽減するため術前に切除予定葉の門脈塞栓術を施行し、予定残肝の肥大を凶っている。T. Bil < 2 mg/dl, 予定残肝容積 > 40%が実現された時点で手術適応としている。手術関連死は術後90日以内に発生した死亡（死因問わず）とした。

その結果、古澤は次の結論を得た。

1. 術中出血量 (1020 ml vs 745 ml), 周術期輸血 (25.7% vs 2.7%), FFP 投与量 (1280 ml vs 480 ml) は第二期で有意に減少した。
2. 手術関連死亡は第一期に1名である（脳梗塞, 術後31日）が, 第二期では認めなかった (1.2% vs 0%)。
3. 術後合併症率は第二期で有意に低率であった (86% vs 61%)。
4. 出血量 (900 ml 以上) は, 多変量解析で術後合併症の唯一の危険因子として規定された。
5. 治癒切除率 (70% vs 78%) および5年生存率 (33% vs 35%) は両群間で同等であった。多変量解析では術後長期生存の予後不良因子として, リンパ節転移陽性および非治癒切除が規定された。

これらの結果より、近年10年間で短期手術成績、特に術中出血量および術後合併症率の改善が示された。一方、長期予後の改善には新たな治療法の導入が必要と考えられた。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

OTOF mutation screening in Japanese severe to profound recessive hearing loss patients (常染色体男性遺伝形式をとる日本人高度～重度難聴患者における OTOF 遺伝子変異スクリーニング)

岩 佐 陽一郎

(論文の内容の要旨)

【はじめに】 Auditory neuropathy spectrum disorder (以下ANSD) は感音難聴の中でも聴性脳幹反応 (ABR) 高度異常, 耳音響放射 (OAE) 正常となる特徴的な臨床像を呈する疾患である。OTOF 遺伝子は非症候群性 ANSD の原因として初めて同定された遺伝子であり, 先天性高度・重度感音難聴を呈する例が大部分である。非症候群性難聴患者において最も高頻度に認められる遺伝子として *GJB2* が挙げられるが, 海外 (欧米, 中東, アジアなど) においてはそれに次ぐものとして OTOF 遺伝子が重要視されている。しかし, 本邦における OTOF 遺伝子変異の頻度の検討については未だなされていないのが現状である。本研究の目的は日本人高度・重度感音難聴患者における OTOF 遺伝子変異の頻度を検討することである。

【対象・方法】 本研究では, 高度～重度の非症候群性難聴症例のうち, 孤発例もしくは劣性遺伝形式をとる先天性難聴患者160名 (ただし, *GJB2*, *SLC26A4* 変異による難聴と診断されているものは除く) および

192名の正常聴力者を対象とした。末梢血より抽出された DNA を用い, OTOF 遺伝子のスプライシング部位を含む全エクソン領域を直接シークエンス法により解析した。病的変異の判断は, 変異の種類, 家系内での整合性, コントロール群における頻度などを検討して行った。

【結果】 今回変異検索を行った160名のうち, 16名に少なくとも一つの OTOF 遺伝子変異を認めた。内訳としては3名がホモ接合体, 4名がコンパウンドヘテロ接合体, 9名がヘテロ接合体であった。本研究で同定された OTOF 遺伝子変異のうち5種類は海外でも報告のある既知変異, 2種類は新規ナンセンス変異, 4種類は新規ミスセンス変異であった。

【考察・まとめ】 OTOF 遺伝子変異による難聴の場合, 生後数年は OAE が検出され ANSD の臨床像を呈するが, その後 OAE が消失し, 通常の感音難聴の臨床像をとると言われている。本研究では ANSD 患者のみならず, 通常の感音難聴患者に紛れている OTOF 遺伝子変異による難聴患者を同定することを目的とし

た。

今回変異検索を行った160人中7名(4.4%)の患者がホモ接合体もしくはコンパウンドヘテロ接合体であり、*OTOF* 遺伝子変異による難聴と考えられる。*GJB2* 遺伝子や *SLC26A4* 遺伝子変異による難聴患者の割合を考慮すると、先天性高度・重度感音難聴患者のうち少なくとも3.2%の患者が *OTOF* 遺伝子変異によるものと考えられる。これは海外の報告と比べてほぼ同等の頻度である。また、今回同定された遺伝子変異の多くが本邦独自の変異であり、他の遺伝子同様に他の人種とは異なる日本人独自の変異スペクトラムがあることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

Auditory neuropathy spectrum disorder (以下 ANSD) は感音難聴の中でも聴性脳幹反応 (ABR) 高度異常, 耳音響放射 (OAE) 正常となる特徴的な臨床像を呈する疾患である。*OTOF* 遺伝子は非症候群性 ANSD の原因として初めて同定された遺伝子であり, 先天性高度・重度感音難聴を呈する例が大部分である。非症候群性難聴患者において最も高頻度に認められる遺伝子として *GJB2* が挙げられるが, 海外において (欧米, 中東, アジアなど) はそれに次ぐものとして *OTOF* 遺伝子が重要視されている。

本論文において岩佐陽一郎は, 日本人高度・重度感音難聴患者における *OTOF* 遺伝子変異の種類および頻度に関して検討を行った。

高度～重度難聴, 非症候群性, 孤発例もしくは劣

性遺伝形式をとる先天性難聴患者160名(ただし, *GJB2*, *SLC26A4* 変異と診断されているものは除く)を対象に, 直接シーケンス法を用いて *OTOF* 遺伝子の全エクソンの解析を行ったところ, 160名のうち16名に少なくとも一つの *OTOF* 遺伝子変異を認めた。内訳としては3名がホモ接合体, 4名がコンパウンドヘテロ接合体, 9名がヘテロ接合体であった。本研究で同定された *OTOF* 遺伝子変異のうち5種類は海外でも報告のある既知変異, 2種類は新規ナンセンス変異, 4種類は新規ミスセンス変異であった。*GJB2* 遺伝子や *SLC26A4* 遺伝子変異による難聴患者の割合を考慮すると, 先天性高度・重度感音難聴患者のうち少なくとも3.2%の患者が *OTOF* 遺伝子変異によるものと考えられた。これは海外の報告と比べてほぼ同等の頻度であり, 日本人の難聴患者においても *OTOF* 遺伝子の重要性が認識された。また, 今回同定された遺伝子変異の多くが本邦独自の変異であり, 他の遺伝子同様に他の人種とは異なる日本人独自の変異スペクトラムがあることが示された。その中でも p. R1939Q 変異は founder effect によって日本人の *OTOF* 遺伝子変異の中で非常に多く認められる変異であることが明らかとなった。*OTOF* 遺伝子変異が同定されれば人工内耳の効果が良好であるとの報告がなされているため, 遺伝学的検査から治療効果に関する情報を得ることができると, 臨床的にも非常に有用であると考えられた。主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Massively parallel DNA sequencing facilitates diagnosis of patients with Usher syndrome type 1 (Usher 症候群タイプ1症例の遺伝子解析における次世代シーケンサーの有用性)

吉村 豪 兼

(論文の内容の要旨)

【はじめに】Usher 症候群は「感音難聴に網膜色素変性症を伴う疾患」の代表であり, 聴覚・視覚の重複障害を呈する。また難聴と前庭機能障害の発症時期や程度により, 臨床的に3つのタイプに分類されている。その中でもタイプ1は先天性高度感音難聴に両側前庭機能障害を伴い, さらに網膜色素変性症は思春期前に症状が出現し始めるという最も重篤な表現型を呈する。いずれのタイプも常染色体劣性遺伝形式をとるが, タイプ1は原因遺伝子として6つの遺伝子 (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G*, *CIB2*) が明らかになっており, 諸外国においてはその原因遺伝

子頻度も報告されてきている。

Usher 症候群における遺伝子解析はサンガーシーケンス法によるものや, 過去の変異報告を基にマイクロアレイ法で検出する方法が報告されてきた。しかし, 前者は費用や労力の面で, 後者は変異検出率に課題があった。そこで我々は近年実用化されている, 多数の原因遺伝子を網羅的に解析することが可能な次世代シーケンサーに注目し, Usher 症候群タイプ1症例の原因遺伝子解析を行ったので, その結果につき報告する。【方法】タイプ1症例(17症例)に対し, 次世代シーケンサーによる Usher 症候群原因遺伝子解析を施行した。検出された変異を1000人ゲノムにおけるアレル

頻度やコントロールにおける頻度などをもとに絞りこんだ上でサンガーシーケンス法にて確認した。また次世代シーケンサーで病的変異がヘテロ接合体で検出された症例に関しては、対象遺伝子の全エクソン領域をサンガーシーケンス法で再解析した。

【結果】17症例中、16症例(94.1%)に1つ以上の病的変異を同定した。また、7症例(41.2%)に*MYO7A*遺伝子変異を同定し、本邦のタイプ1症例で最も頻度の高い原因遺伝子であることが明らかとなった。また4症例において、Usher症候群の原因となるバイアレリックな変異に加えて、さらにもう一つ別のUsher症候群原因遺伝子変異が同定された。さらに*MYO7A*遺伝子と*PCDH15*遺伝子のdigenic inheritanceと考えられる症例を確認した。

【考察】本研究はUsher症候群における次世代シーケンサーによる遺伝子解析の初めての報告であり、また本邦における原因遺伝子の種類および頻度を明らかとした初の報告である。本症候群のように多数の原因遺伝子が明らかとなっている疾患では、次世代シーケンサーは非常に効率の高い手法であり、また修飾遺伝子やdigenic inheritanceのように複数の遺伝子の関与が考えられる病態の解析にも有用と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

Usher症候群は「感音難聴に網膜色素変性症を伴う疾患」の代表であり、聴覚・視覚の重複障害を呈する。また難聴と前庭機能障害の発症時期や程度により、臨床的に3つのタイプに分類されており、その中でもタイプ1は先天性高度感音難聴に両側前庭機能障害を伴い、さらに網膜色素変性症は思春期前に症状が出現し始めるという最も重篤な表現型を呈するとされている。Usher症候群タイプ1に関しては現在までに原因遺伝子として6つの遺伝子が海外で報告されてきている。

従来、遺伝学的検査手法としてサンガー法などが広く用いられてきたが、近年次世代シーケンサー(Massively parallel DNA sequencing)の登場により短時間、低コストで網羅的に解析することが可能となってきた。

本論文において吉村豪兼は多施設共同研究にて日本人におけるUsher症候群タイプ1症例17例を対象に原因遺伝子変異の種類、およびその頻度について明らかにするとともに、解析手法として次世代シーケンサーを用いることの有用性について検討を行った。その結果、17症例中、1つ以上の病的変異を16症例(94.1%)に同定し、従来法と比較しても遜色ない有効な解析手法であることを示した。また7症例(41.2%)に*MYO7A*遺伝子変異を同定し、本邦のタイプ1症例で最も頻度の高い原因遺伝子であることが明らかとなった。また4症例において、バイアレリックな2つの病的変異に加えて、他のUsher症候群原因遺伝子にも病的変異を同定した。このようにUsher症候群の原因となるバイアレリックな変異に加えて、さらにもう一つ遺伝子変異を持つ症例では夜盲の出現時期が有意に早く、modifierの可能性のあることを報告した。さらに*MYO7A*遺伝子と*PCDH15*遺伝子のdigenic inheritanceと考えられる症例を確認し、次世代シーケンサーによる解析は複数の遺伝子の関与が考えられる病態の解析にも有用と考えられた。

本論文はUsher症候群における次世代シーケンサーによる遺伝子解析の初めての報告であり、また本邦における原因遺伝子頻度を明らかとした。得られた知見は今後の研究において重要と考えられる。以上により、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

An interleukin-33 gene polymorphism is a modifier for eosinophilia in rats (インターロイキン33遺伝子多型はラットにおける好酸球増多症の修飾因子である)

羅 宏 敏

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】Matsumoto Eosinophilia Shinshu (MES)系ラットは末梢血における好酸球増多、および多くの臓器における好酸球浸潤炎症性病変を遺伝的に自然発症するモデル動物である。以前の(ACI×MES)×MES戻し交雑ラット集団を用いた解析により、好酸球増多症の主要原因遺伝子が第19染色体上に、さら

に末梢血中の好酸球数に影響する修飾遺伝子が第1染色体上に存在することが明らかとされた。その後の研究で好酸球増多症の原因はMES系ラット系統の第19染色体上のCytochrome b-245, alpha polypeptide (*Cyba*) 遺伝子の機能喪失型突然変異であることが明らかとされた。第1染色体上の修飾遺伝子に関しては、ACI型の対立遺伝子が血中好酸球数を低下させる効

果を有することが判ったが、その遺伝子は明らかとされていなかった。第1染色体上に存在するインターロイキン33 (Interleukin-33; *Il33*) 遺伝子にコードされる IL-33は、感染や傷害によって細胞死が起きた際に細胞外に放出されて炎症反応を惹起する活性をもつ、いわゆる“alarmin”であり、ヒトやマウスにおいて好酸球制御にも深く関与することが報告されていた。そこで本研究では、ラット系統間の *Il33* 遺伝子の塩基多型検索、IL-33蛋白の活性調査、および *Cyba* 遺伝子と *Il33* 遺伝子との相互作用の解析を行い、*Il33* 遺伝子が好酸球増多症に対する修飾因子である可能性を検証した。

【結果と考察】 *Il33* 遺伝子の cDNA の塩基配列を決定した結果、MES 系ラットと ACI 系ラットの間でミスセンス塩基置換が同定された。すなわち、171番目のコドンの第1塩基がMESではG (Ggt), ACIではA (Agt) であるために、171番目のアミノ酸がグリシン (MES) からセリン (ACI) へG171S置換されることが予測された。IL-33は細胞内でカスパーゼ3による切断を受けて不活性化される。G171Sアミノ酸置換はカスパーゼ3による認識部位内に存在した。他のラット系統をスクリーニングした結果、ACI系ラットと同一の塩基置換はBDIX系ラットにも見つかったことより、この塩基置換はACI系ラットに特異的な変異ではなく、ラット系統間に保有される多型であることが判明した。大腸菌強制発現系を用いてMES型、およびG171Sアミノ酸置換を含むACI型のリコンビナントIL-33蛋白を調整し、その活性を調査した。HEK293培養細胞を用いたNF- κ B依存性レポーターアッセイにおいて、ACI型IL-33により惹起されるNF- κ B活性はMES型IL-33の約50%程度にとどまることが確認された。また、マウスに腹腔内投与した場合、ACI型IL-33投与群での末梢血中好酸球数の上昇程度はMES型IL-33投与群と比較して有意に低かった。G171Sアミノ酸置換を有するACI型IL-33もカスパーゼ3により切断されることが確認された。(ACI×MES)×MES戻し交雑ラット集団において、変異型 *Cyba*^{mes} 遺伝子の *Il33* 遺伝子多型に対する epistasis 効果が確認された。すなわち、変異型 *Cyba*^{mes} 遺伝子をホモにもつ群ではACI型の *Il33* 遺伝子をヘテロでもつ個体の方がMES型のホモ個体よりも有意に低い末梢血中好酸球数をもっていた。一方、変異型 *Cyba*^{mes} 遺伝子をヘテロでもつ群ではACI型の *Il33* 遺伝子をヘテロでもつ個体とMES型のホモ個体との

間で末梢血中好酸球数に有意差は認められなかった。この結果は、*Il33* 遺伝子多型の効果が戻し交雑ラット集団において alarmin 活性の違いとして観察されたことを示唆した。

【結論】 以上の結果から、インターロイキン33遺伝子多型はラットにおける好酸球増多症の修飾因子であると結論された。

(論文審査の結果の要旨)

Matsumoto Eosinophilia Shinshu (MES) 系ラットは末梢血における好酸球増多、および多くの臓器における好酸球浸潤炎症性病変を遺伝的に自然発症するモデル動物である。以前の (ACI×MES)×MES 戻し交雑ラット集団を用いた解析により、好酸球増多症の主要原因遺伝子が第19染色体上に、さらに末梢血中の好酸球数に影響する修飾遺伝子が第1染色体上に存在することが明らかとされた。その後の研究で好酸球増多症の原因はMES系ラット系統の第19染色体上の Cytochrome b-245, alpha polypeptide (*Cyba*) 遺伝子の機能喪失型突然変異であることが明らかとされた。第1染色体上の修飾遺伝子に関しては、ACI型の対立遺伝子が血中好酸球数を低下させる効果を有することが判ったが、その遺伝子は明らかとされていなかった。第1染色体上に存在するインターロイキン33 (Interleukin-33; *Il33*) 遺伝子にコードされる IL-33 は、好酸球制御にも深く関与することが報告されていた。

これらの知見に基づき、ラット系統間の *Il33* 遺伝子の塩基多型検索、IL-33タンパク質の活性調査、および *Cyba* 遺伝子と *Il33* 遺伝子との相互作用の解析を行い、*Il33* 遺伝子が好酸球増多症に対する修飾因子である可能性を検証した。

その結果、羅 宏敏は次の結論を得た

1. *Il33* 遺伝子の cDNA の塩基配列を決定した結果、MES 系ラットと ACI 系ラットの間でミスセンス塩基置換が同定された。ACI ラット系統には IL-33 に G171S アミノ酸置換が存在する。
2. G171S アミノ酸置換を含む ACI 型リコンビナント IL-33 は活性低下型である。
 - ① HEK293培養細胞を用いたNF- κ B依存性レポーターアッセイにおいて、ACI型IL-33により惹起されるNF- κ B活性はMES型IL-33の約50%程度にとどまることが確認された。
 - ② マウスに腹腔内投与した場合、ACI型IL-33投与群での末梢血中好酸球数の上昇程度はMES型

IL-33投与群と比較して有意に低かった。

3. (ACI×MES)×MES 戻し交雑ラット集団において、ACI 型 *Il33* 遺伝子の血中好酸球数を低下させる効果は、好酸球増多症を発症したラット群においてのみ認められた。

① *Cyba*^{mes/ACI} 遺伝子型をもつ戻し交雑ラット群では *Il33*^{MES/ACI} 群と *Il33*^{MES/MES} 群との間で末梢血中好酸球数に有意差は認められなかった。

② 一方、*Cyba*^{mes/mes} 遺伝子型をもつ交雑ラット群では *Il33*^{MES/ACI} 群が *Il33*^{MES/MES} 群よりも有意に低

い末梢血中好酸球数を持っていた。

以上の結果から、インターロイキン33遺伝子多型はラットにおける好酸球増多症の修飾因子であり、その活性の強弱は好酸球関連疾患において重要な役割を持つことが示唆された。このような羅宏敏の研究成果は喘息など好酸球が関与するヒト疾患に対する、IL-33を標的とした新たな制御法の開発にもつながる重要、かつ意義あるものと考えられた。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Long-term trial of corticosteroid therapy for the recurrence of cerebral amyloid angiopathy-related hemorrhages : a case study using [11C] BF-227 amyloid-PET (脳アミロイドアンギオパチー関連再発性脳出血に対する長期副腎皮質ステロイド治療の試み : [11C] BF-227アミロイドPETを用いた症例検討)

安 出 卓 司

(論文の内容の要旨)

【目的】脳アミロイドアンギオパチー関連再発性脳出血の予防に対する副腎皮質ステロイド治療の長期効果を明らかにすることを目的とした。

【題目・方法】対象は脳アミロイドアンギオパチーのポストン診断基準において、G3からG4と診断された男性1名と女性2名の3症例である。脳のAβアミロイド沈着を評価するためにBF227アミロイドPETを用いて検査し、全3例の脳にアミロイドの沈着を認めた。G3と診断された66歳の男性例(症例1)では、プレドニゾロン(PSL)50mg/日が開始され、6カ月間で漸減中止としたが、その6カ月後には脳出血が再発した。このため、同様なステロイド治療が再開された。G3と診断された69歳の女性例(症例2)では、脳出血再発時にデキサメサゾン(DEX)16mg/日で開始し、一週間後にはPSL30mg/日へ変更、その後漸減して8mg/日で維持された。G4と診断された75歳の女性例(症例3)では、PSL30mg/日で開始され、その後漸減しPSL8mg/日で維持された。

観察期間内では、臨床像およびMRIのT2*画像での微小出血面積を画像解析で評価した。2つの症例ではステロイド治療の前後で、BF227アミロイドPETによって後頭葉におけるSUV(standardized uptake value)の評価を行った。

【結果】症例1では副腎皮質ステロイド治療の開始20カ月後に左前頭葉に小再出血を発症し、ステロイドパルス療法を施行した。その後33カ月間は再出血を認

めていない。アミロイドPETでのSUVは14カ月間で2.0から2.2へ増加し、微小出血面積も27カ月間で410.2mm²から445.5mm²へ増加していた。症例2では副腎皮質ステロイド治療の開始29カ月後に多発性の小再出血を発症し、ステロイド投与量が一時的に増量された。その後の17カ月間は再出血を認めていない。アミロイドPETでのSUVは18カ月間で1.5から1.4へ減少したが、微小出血面積は27カ月間で512.5mm²から560.8mm²へ増加していた。症例3では副腎皮質ステロイド治療を開始して22カ月間再出血を認めておらず、微小出血面積は13カ月間で152.5mm²から154.1mm²へ微増していた。

【考察】脳アミロイドアンギオパチー関連再発性脳出血に対する副腎皮質ステロイド治療の長期効果は、臨床的には有効である印象だが、検査データから有効であるとの結論を導き出すことはできなかった。本邦で開発されたBF227PETは脳アミロイドアンギオパチー関連のアミロイド沈着の可視化に有用であった。

(論文審査の結果の要旨)

脳アミロイドアンギオパチー関連再発性脳出血の予防に対する副腎皮質ステロイド治療の長期効果を明らかにすることを目的とした。対象は脳アミロイドアンギオパチーのポストン診断基準において、G3からG4と診断された男性1名と女性2名の3症例である。方法は脳のAβアミロイド沈着を評価するためにBF227アミロイドPETを用いて検査し、全3例の脳にアミロイドの沈着を認めた。臨床経過は、G3と診断された

66歳の男性例（症例1）では、プレドニゾロン（PSL）50 mg/日で開始され、6カ月間で漸減中止としたが、その6カ月後には脳出血が再発した。このため、同様にステロイド治療が再開された。G3と診断された69歳の女性例（症例2）では、脳出血再発時にデキサメサゾン（DEX）16 mg/日で開始し、一週間後にはPSL 30 mg/日へ変更・漸減し8 mg/日で維持された。G4と診断された75歳の女性例（症例3）では、PSL 30 mg/日で開始され、その後漸減しPSL 8 mg/日で維持された。また、観察期間内では、臨床像およびMRIのT2*画像での微小出血面積を画像解析で評価した。2つの症例ではステロイド治療の前後で、BF 227アミロイドPETによって後頭葉におけるSUV（standardized uptake value）の評価を行った。その結果、症例1では副腎皮質ステロイド治療の開始20カ月後に左前頭葉に小再出血を発症し、ステロイドパルス療法を施行した。その後33カ月間は再出血を認めていない。アミロイドPETでのSUVは14カ月月間で2.0から2.2へ増加し、微小出血面積も27カ月間で

410.2 mm²から445.5 mm²へ増加していた。症例2では副腎皮質ステロイド治療の開始29カ月後に多発性の小再出血を発症し、ステロイド投与量が一時的に増量された。その後の17カ月間は再出血を認めていない。アミロイドPETでのSUVは18カ月間で1.5から1.4へ減少したが、微小出血面積は27カ月間で512.5 mm²から560.8 mm²へ増加していた。症例3では副腎皮質ステロイド治療を開始して22カ月間再出血を認めておらず、微小出血面積は13カ月間で152.5 mm²から154.1 mm²へ微増していた。以上より、脳アミロイドアンジオパチー関連再発性脳出血に対する副腎皮質ステロイド治療の長期効果は、臨床的には有効である印象だが、検査データから有効であるとの結論を導き出すことはできなかった。本邦で開発されたBF227 PETは脳アミロイドアンジオパチー関連のアミロイド沈着の可視化に有用であった。

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

Hydrogen Peroxide Content and pH of Expired Breath Condensate from Patients with Asthma and COPD (喘息および COPD 患者における呼気凝集液中の過酸化水素濃度と pH の検討)

村田 和也

(論文の内容の要旨)

【背景】 COPD と気管支喘息はともに気道の炎症性疾患であり気流の閉塞を特徴とする。病態の形成にはオキシダント・アンチオキシダント不均衡が関与しており、酸化ストレスは肺障害や気道上皮等にアポトーシスを引き起こすとともに、炎症性遺伝子の活性化、アンチプロテアーゼの不活化、粘液分泌や血管透過性の亢進などにも関与しているとされている。

過酸化水素 (H_2O_2) は気管支喘息と COPD の病態形成における酸化ストレスメディエーターとして重要な役割を担う因子である。呼気凝縮液における H_2O_2 の解析では喫煙者および病期の進んだ気管支喘息・COPD 患者では健常者に比べ H_2O_2 濃度が有意に上昇していたことが報告されている。同様に呼気凝縮液中の pH は気管支喘息患者および COPD 患者で低下 (酸性化) しており気道炎症に深く関係しているとされている。しかし気管支喘息と COPD の気道炎症メカニズムは互いに異なっている上に、呼気凝縮液の取扱に関しては明確な基準が示されていないため評価の方法も一様でない。近年、呼気凝縮液中の H_2O_2 と pH の濃度を測定することが COPD および喘息患者の病態を把握するうえで有用であるとされている。しかし、これまでに酸化ストレスマーカーと疾患の活動性・重症度・表現型の関連性に関しては不明な点が多い。

【目的】 本研究では酸化ストレスマーカーと喘息の重症度および管理状態、COPD の重症度、表現型また疾患の管理状態との関連性について解析する。

【方法】 本研究では喘息 29 名、COPD 33 名、健常者 33 名を対象とし、呼気凝縮液中の pH と H_2O_2 を測定した。その後、各疾患のコントロール状態を反映する ACT (Asthma Control Test), CAT (COPD Assessment Test) score や呼吸機能検査値、呼気一酸化窒素濃度 (FeNO), COPD 患者の HRCT 画像上の低吸収域の volume (LAV%) との関連性を解析した。

【結果】 健常者群に比べ気管支喘息・COPD 患者では呼気凝集液中の H_2O_2 濃度は上昇しており ($3.42 \pm 0.66 \mu M$ vs 8.75 ± 0.88 and 7.44 ± 0.89 .), pH は低下していた (7.35 ± 0.04 vs 7.14 ± 0.07 and 6.87 ± 0.10 .).

これら酸化ストレス指標は、呼吸機能、FeNO、喘息群における ACT score、COPD 群における LAV% とは相関性は認められなかったものの、COPD 群において CAT score と H_2O_2 濃度の間には有意な相関性が確認された ($r=0.52$, $p<0.01$)。

【考察】 本研究より健常者に比べ気管支喘息および COPD 患者において H_2O_2 濃度は有意に増加しており pH は低下していた。この結果より H_2O_2 は気管支喘息および COPD の病態形成に関与していることが示唆された。

これまでに気管支喘息患者の状態を評価するツールとして ACT score や FeNO の有用性が報告されている。本研究ではこれらのマーカーと酸化ストレスマーカーとの間に相関性を確認することができなかった。今回、我々が対象とした患者群のほとんどが症状の安定しており吸入ステロイドまたは吸入ステロイド/長時間作用型 β 刺激薬合剤 (ICS/LABA) による治療介入を行った患者である。一般にこれら薬剤の薬効は 24~48 時間であるが詳細は不明な部分も多い。またこれまでの報告では比較的重症な患者群を対象としたものがほとんどであり本研究とバックグラウンド等が異なったため酸化ストレスと呼吸機能、ACT score、FeNO と相関性が確認出来なかったことが考えられる。

CAT score は COPD のコントロール状態を示す有用なマーカーである。本研究でも呼吸機能検査や LAV% と相関性が確認され、 H_2O_2 とも相関していた。近年、COPD の病態評価は呼吸機能や気腫病変のスコアリングだけでなく、患者の健康状態で重症度を評価することが重要だともされている。その点において CAT score と相関性が確認された H_2O_2 は患者の状態を評価出来る有用なマーカーであると言える。

pH に関して疾患群では健常者に比べ低下していたが呼吸機能や ACT, CAT score とは相関していなかった。これは疾患群のコントロール状態や検体の CO_2 脱気が理由に挙げられる。特に CO_2 脱気に関しては多くの報告があるが、検体に与える影響などを今後検討していく必要がある。

本研究より酸化ストレスは病態形成に関与し、 H_2

O₂濃度は COPD の疾患コントロールを反映し得るマーカーになることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は慢性閉塞性肺疾患 (COPD) および気管支喘息の病態に酸化ストレスが関与していることを示し、COPD においては患者の健康状態と密接に関連することを示した論文である。COPD および喘息の病態における酸化ストレスの関与については、すでに多くの論文が報告されているが、呼気凝集液を用いた検討は数少ない。呼気凝集液は15分間の安静呼吸のみで採取され、被検者への負担も少なく、経時的に何度も採取することが可能である。また、唾液によって希釈されることが無く、臨床的に有用性が高い。この呼気凝集液を試料として選択した点は評価に値する。次に酸化ストレスのバイオマーカーとして過酸化水素と pH を選択した点について質疑を交わしたが、呼気凝集液の最大の欠点として、バイオマーカーの濃度が希釈されて薄まっているため、蛋白やペプチドといった物質の測定には不向きである。また、揮発性のある物質の測定には有用である。これらの点を考慮して過酸化水素と pH をバイオマーカーとして選択したことも評

価に値する。

村田氏は臨床検査技師であるが、COPD と喘息の病態をよく勉強しており、バイオマーカーと病態との関係を詳しく評価している点も評価される。呼吸機能だけでなく、患者の症状、健康感、QOL を始めとして、呼気中の一酸化窒素濃度の測定、COPD については気腫病変の客観的な評価と幅広く、両疾患の病態を評価し、酸化ストレスとの関係を検討している。過去の報告では、呼吸機能や重症度との評価は行われているが、これだけ多くの評価項目で酸化ストレスとの関連を同時に検討した報告はない。特に、今回は COPD の症状をよく反映する CAT スコアと関連があることを報告し、呼気凝集液中の酸化ストレスのバイオマーカーが COPD の病勢のバイオマーカーとなり得ることを証明したことは大いに意義がある。

以上の審査の結果、本論文は信州大学大学院医学系研究科 博士後期課程 医療生命科学分野の博士論文としてふさわしく妥当であると結論された。

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。

Incidence of *Legionella* and heterotrophic bacteria in household rainwater tanks in Azumino, Nagano prefecture, Japan (日本の地方都市長野県安曇野市における家庭用雨水貯留槽水中のレジオネラおよび従属栄養細菌の挙動)

小林 路子

(論文の内容の要旨)

【研究目的】自然の恵である雨水の利用を推進するために、行政機関が、設置補助金交付による家庭用雨水貯留施設の設置を奨励している。長野県安曇野市でも既に「住宅用雨水貯留施設設置補助金」の制度を運用している。一般家庭の雨水貯蔵タンクの貯留水は飲用を前提としていないことから、健康被害の発生予防や危機管理に関する基準は示されていない。定期的な pH, COD 等の簡易な水質調査さえ実施されておらず、また、従属栄養細菌やレジオネラ等の細菌学的な汚染状況調査も皆無である。更に、定期的なタンク清掃は実施されておらず、清掃を推奨することの科学的根拠も示されていない。健康被害に対する安全性が確認されていない雨水貯留タンクの貯蔵水を安全活用するために、従属栄養細菌およびレジオネラによる汚染状況に加えて、天候、気温、降水量、pH, COD 等の変動要因との相互関係を統計学的に評価し、レジオネラの

挙動と相関する指標を探索すると同時に、臨床微生物学的観点からの検証を継続実施することにより、安曇野地域における「安全な雨水」の利用拡大へと繋げるだけでなく、健康被害の未然回避に益する実際の提言をも発信することへ結びつけることまでを視野に入れている研究である。

【研究背景】雨水利用に関する研究は、浸水被害の緩和に期待する都市型洪水防止効果の検討が主流で、一般住宅という小規模システムでは、単に雨水利用の実例が報告されているに過ぎない。安曇野地域では畑への水やりや庭の花木等のガーデニングに利用されることが多いが、ガーデニングでは、既にレジオネラ肺炎発症との関連性が指摘されている。新興感染症として記載されたレジオネラ症は、今日では報告義務を有する四類感染症に位置づけられている。レジオネラは自然界に広く棲息分布していることから、一般家庭の屋根に降った雨水を集水して蓄える貯留水が、従属栄

養細菌以外にレジオネラの汚染を受けている可能性は高いと考えられる。

【研究対象と方法】本研究は安曇野市との連携によるもので、安曇野市の家庭用雨水貯留施設設置補助金交付により設置した40家庭43個の雨水貯留槽について調査の協力を確認した。2012年6月、8月、10月の3回採水し、総計129サンプルを対象に調査した。採水日の天候、気温、降水量、pH、COD、従属栄養細菌数、レジオネラの定量培養とPCR法による遺伝学的検出、検出したレジオネラについては遺伝学的手法で鑑別した。また、従属栄養細菌数や、pH、COD等の変動要因との相互関連性を統計学的に考察し、レジオネラの挙動と相関する指標提案の可能性について評価した。

【研究成績】GVPC培地によるレジオネラ定量培養では、129サンプル中、1つのサンプルからレジオネラが検出(80 CFU/100 ml)されたのみであった。一方、PCR法による検索では全体で31.8%のサンプルからレジオネラが確認された。6月と8月は43サンプル中12サンプル(27.9%)、10月は43サンプル中17サンプル(39.5%)でレジオネラ陽性であった。レジオネラ陽性サンプルについて、2-step PCR法による鑑別から、6月は83.3%(12サンプル中10)、8月は41.6%(12サンプル中5)、10月は23.5%(17サンプル中4)が、*L. pneumophila*であった。採水日前に晴天が続いた後にレジオネラ陽性率が高く、雨天が続いた後には陽性率が低い傾向が認められた。また、陽性サンプルの45.4%がCOD値1 mg/Lを示し、COD値の増加に呼応してPCR法によるレジオネラ陽性率が低下する傾向が観察された。従属栄養細菌数は、季節的変動は有意な差が見られなかった一方、レジオネラPCR法陽性サンプルと 1.0×10^4 /ml以上の従属栄養細菌数とが高い関連性を示した。

【データの考察と展望】交通量の多い採水地点でレジオネラの高い検出率が認められ、粉塵中のレジオネラが飛散し、降雨と共に雨水貯留槽に滞留したと考えられた。雨水pHは3.6~7.0で推移し、従属栄養細菌数およびレジオネラ陽性との有意な関連性は確認できなかった。レジオネラPCR陽性サンプルの従属栄養細菌数について、対数データに対するヒストグラムを作成し、Kolmogorov-Smirnov検定、Shapiro-Wilk検定の結果、正規分布を示し、normdist関数により、 10^4 CFU/ml以下である確率は0.117であった。データを解析した結果、2012年6月から10月の期間、家庭用雨水貯留槽水のレジオネラ汚染との相互関係の統計

学的評価から、従属栄養細菌数が 10^4 CFU/ml以上であること、COD値が5 mg/L未満であることがレジオネラの汚染状況の指標になり得る可能性が示唆された。培養に長時間を要し、遺伝学的手法に依存せざるを得ない、レジオネラ汚染の有無を把握するための普遍的なindex-parameterとして位置づけるためには更なるデータ蓄積による検証が望まれる。

(論文審査の結果の要旨)

本学位論文は、家庭用雨水貯留水からレジオネラ属菌の定量培養および遺伝学的検出を行い、同時に従属栄養細菌数の計測、COD値、pH等を測定し、統計学的評価を行って、雨水貯留水中のレジオネラ属菌の存在を示唆する指標を提案した研究である。

調査は長野県安曇野市との連携により行われた。43の雨水貯留槽より、2012年6月、8月、10月の3季、計129サンプルについて解析した結果、41サンプルからPCR法によりレジオネラ属菌が検出され、検出率は31.8%であった。遺伝学的鑑別から、その内の19サンプル、46.5%がレジオネラ症の起因菌として重要視されている、*L. pneumophila*であることが確認された。従属栄養細菌数は季節変動が見られなかったものの、レジオネラ属菌が検出されたサンプルの従属栄養細菌数は、88.3%が 10^4 CFU/ml以上の菌数を計測した。COD値については41サンプル中、40サンプルが5 mg/L未満であった。pHについてはサンプル間で有意差はなかった。PCR法によるレジオネラ属菌検出率が高い傾向にあったのは、採水日以前に降雨がなかったこと、採水地点が交通量が多い場所であったことが示された。

レジオネラ属菌は環境からヒトに感染することが特徴で、細胞内寄生性という性質を持ち、自然界ではアメーバに寄生して増殖することから、レジオネラ属菌の存在を示唆する指標としてアメーバの有無が定説となっているが、細菌学的な汚染状況調査は皆無であり、健康被害の発生予防や危機管理に関する基準が示されていない。また、レジオネラ属菌の培養は特殊な培地を使用することでコストがかかり、操作が煩雑な上に判定まで長時間を要することから、一般の検査室では緊急の対応が難しく、遺伝学的手法に頼らざるを得ない現状である。

本研究において、従属栄養細菌数が 10^4 CFU/ml以上であること、COD値が5 mg/L未満であることがレジオネラ属菌の存在を示唆する指標になりうる、として提案された。この指標が、普遍的なindex-parameter

として位置づけられるためには更なるデータ蓄積による検証が望まれるものの、本論文が新たに提案したレジオネラ汚染を推定するための指標の意味は大きい。本論文で提案された指標が、今後、雨水貯留槽水がレジオネラ属菌の感染源とならないための衛生管理対策を構築していく上で、非常に意義深い。

公開学位論文審査は平成26年1月20日（保健学科211教室）17時から開催された。本審査会の冒頭、申

請者である「小林路子」に本研究の概略を述べさせたのち、主査、副査からの質疑を行ったが、質疑については別紙様式8号のようなやり取りが行われ、質疑に対する応答は概ね適切であることを確認し、本研究の遂行に十分な学力を有しているものと判断した。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。

siRNA down-regulation of *FGA* mRNA in HepG2 cells demonstrated that heterozygous abnormality of the $A\alpha$ -chain gene does not affect the plasma fibrinogen level (siRNA を用いた HepG2細胞の *FGA* mRNA 発現抑制実験は、フィブリノゲン $A\alpha$ 鎖遺伝子のヘテロ型異常では血漿フィブリノゲン濃度を低下させないことを明らかにした)

竹 澤 由 夏

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】フィブリノゲン (Fbg) は血液凝固カスケードの最終段階に働く分子量340 kDa の糖蛋白であり、肝細胞で合成され血漿中に180-350 mg/dl 程度存在する。血漿中の Fbg は $A\alpha$, $B\beta$, γ 鎖の3種のポリペプチドがN末端でS-S結合した2量体を形成している。私は、 $A\alpha$ 鎖遺伝子 (*FGA*) のホモ型遺伝子異常を示す2例の無 Fbg 血症患者、Kurashiki II と Yokkaichi を経験した。ところが予測に反して2例の患者の両親は、ヘテロ型遺伝子異常を有するにも関わらず Fbg 蛋白量は正常であった。同じ異常を持つ家系が国内で3例、中国で1例報告されており、何れの両親のFbg値も正常範囲内であった。そこで、*FGA* ヘテロ型遺伝子異常では Fbg 蛋白量を低下させないのではないかと考え、Fbg産生HepG2細胞のFbg遺伝子 (*FGA*, *FGB*, *FGG*) mRNA を定量するとともに、siRNA を導入して各遺伝子の mRNA 量を一過性に抑制し、mRNA と蛋白量を比較検討した。

【方法】始めに、ヒト正常肝細胞由来 RNA とヒト肝癌細胞株 HepG2細胞における各Fbg遺伝子発現量を TaqMan プローブを用いた real-time RT-PCR を行い定量した。次に *FGA*, *FGB*, *FGG* に対する各 siRNA を 1.0-30 nM の範囲で濃度を変えて HepG2細胞に導入し、Negative Control siRNA を導入した Negative Control, siRNA (-) の Normal Control (NC) を比較対象として一過性に mRNA 発現量を抑制した。培養後、上清中の Fbg 蛋白量を ELISA 法にて測定するとともに、培養細胞から RNA を抽出し real-time RT-PCR を行い各遺伝子の mRNA 発現量

を比較 Ct 法にて定量した。また、ヘテロ型遺伝子異常を再現するために、mRNA 発現量が50%程度となる siRNA 濃度における *FGA*, *FGB*, *FGG* mRNA 定量と Fbg 蛋白量定量の実験を3回繰り返して行った。

【結果】ヒト正常肝細胞由来RNAのmRNA量を測定した結果、*FGA*, *FGB* の発現量はほぼ等しく、*FGG* より2倍程度多く発現していた。HepG2細胞においては、*FGA* は *FGG* の2倍、*FGB* の4倍程度発現量が多かった。siRNAを導入して一過性にmRNAの発現量を抑制した結果、siRNAの濃度依存的にmRNAの発現量は低下した。ヘテロ型遺伝子異常を HepG2細胞で再現するために mRNA 発現量を50%程度に抑制した結果、NCに比べ *FGA* では mRNA 量 $46.3 \pm 4.4\%$ の時、蛋白量 $77.7 \pm 7.1\%$ 、*FGB* では mRNA 量 $53.8 \pm 1.6\%$ 、蛋白量 $48.7 \pm 3.8\%$ 、*FGG* では mRNA 量 $45.2 \pm 1.3\%$ 、蛋白量 $56.7 \pm 3.0\%$ であり、*FGA* において有意に蛋白量が多かった ($p < 0.05$)。 *FGB*, *FGG* では mRNA 量が50%程度になれば蛋白量も50%程度になるが、*FGA* では mRNA 量が50%程度でも蛋白量は80%程度存在することが明らかになった。

【考察】*FGA* mRNA 量は *FGB*, *FGG* mRNA 量より2倍程度多いため、その発現量を50%に抑制しても *FGB*, *FGG* と同程度発現しており、Fbg 合成に十分な量の $A\alpha$ 鎖ポリペプチドが産生されるために、Fbg 蛋白量が減少しないと考えられた。したがって、ヒト肝細胞における Fbg 蛋白産生量は *FGA* mRNA 量ではなく、*FGB* または *FGG* mRNA 量が律速していると考えられた。近年、HepG2細胞を用いた研究

でB β 鎖ポリペプチド産生量がFbg産生を律速していると報告されており、私の結果と一致するものであった。また、ナンセンス変異、フレームシフト、スプライシング異常により正常な mRNA が産生されない無Fbg血症患者とヘテロ型遺伝子異常を示す両親のFbg測定値を文献検索したところ、150 mg/dl 以下症例は *FGA*異常で1/16人 (6.3%)、*FGB*異常では4/8人 (50%)、*FGG*異常では11/12人 (91.7%) であり、私の研究結果を裏付けるものであった。

【結語】*FGA* のヘテロ型遺伝子異常ではFbg蛋白量が低下しないことが明らかになった。このためFbg測定値が正常であるために気づかれない *FGA* 遺伝子異常のヘテロ接合体がかなりの頻度で存在する可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

竹澤はフィブリノゲン (Fbg) が血漿中にほとんど検出できない無Fbg血症患者2例を経験した。遺伝子解析の結果1例はA α 鎖遺伝子 (*FGA*) のホモ型、もう1例は *FGA* の複合ヘテロ型の異常であった。何れの症例も mRNA 産生量が低下する遺伝子異常であった。しかし2例の患者の両親はヘテロ型遺伝子異常を有するにも関わらず、血漿Fbg量は正常であった。本学位論文は *FGA*ヘテロ型遺伝子異常者ではmRNA産生量が半減してもFbg蛋白量は半減しないという仮説を立て、実証した研究の報告である。

はじめにヒト正常肝細胞由来RNAとFbg産生肝細胞株であるHepG2細胞のFbg遺伝子 (*FGA*, *FGB*, *FGG*) mRNA量をreal-time RT-PCR法により定量した。その結果、ヒト正常肝細胞では、*FGA*-と *FGB*-mRNA量はほぼ等しく、*FGG*-mRNA量の2倍発現していた。一方、HepG2細胞では、*FGA*-mRNA

量は *FGG*-mRNA量の2倍、*FGB*-mRNA量の4倍発現していた。

次に3種のmRNAに作用するsiRNAをHepG2細胞に別々に導入して、各mRNA発現量を一過性に抑制し、30時間後にmRNA量とFbg分泌量を測定した。siRNAを1.0~2.0 nM添加し *FGA*-mRNA量が46.3 \pm 4.4%に減少した時に、Fbg量が77.7 \pm 7.1%であったのに対して、*FGB*-mRNA量が53.8 \pm 1.6%に減少した時のFbg量は48.7 \pm 3.8%、*FGG*-mRNA量が45.2 \pm 1.3%に減少した時のFbg量は56.7 \pm 3.0%であり、*FGA*においてFbg量が有意に高値であった ($p < 0.05$)。すなわち、*FGA*ではmRNA量が約50%程度に減少してもFbg量の減少は20%程度にとどまることが明らかになり、仮説を見事に立証した。

さらに、ナンセンス変異などの原因により正常量のmRNAが産生されないヘテロ患者のFbg測定値を文献検索したところ、150 mg/dl以下症例は *FGA*で6.3%、*FGB*で50%、*FGG*で91.7%であった。一方、他の原因によりmRNAが減少しない患者における150 mg/dl以下症例は、*FGA*で85.7%、*FGB*で82.4%、*FGG*で97.8%であった。このような頻度の大きな相違は、竹澤の実験結果を裏付けるものであった。

公開学位審査会は平成25年9月11日に主査・副査のほか3名の出席のもとで行われた。審査会の冒頭に「竹澤由夏」に本研究の概略を述べさせた後に、主査・副査から別紙様式第8号のような質疑を行い、応答は概ね適切であることを確認し、本研究の科学的意義とその説明に関して十分な知識を有しているものと評価した。

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。