

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
大平 哲史 (産科婦人 科学)	乙第1162号	25. 4.10	Predicting the route of delivery in women with low-lying placenta using transvaginal ultrasonography: significance of placental migration and marginal sinus (低置胎盤症例における経膈超音波を用いた分娩方法の予測: 胎盤移動と辺縁静脈洞の意義)	小池 健一	西澤 理 川真田樹人
三橋 祐布子 (分子腫瘍学)	乙第1163号	25. 4.24	Prognostic significance of Notch signaling molecules and their involvement in the invasiveness of endometrial carcinoma cells (子宮内膜癌における Notch シグナル分子発現の意義と内膜癌細胞の浸潤能への関与)	本田 孝行	西澤 理 菅野 祐幸
嘉嶋 勇一郎 (内科学(5))	乙第1164号	25. 7.24	Crucial Role of Hyaluronan in Neointimal Formation after Vascular Injury (血管障害後新生内膜肥厚におけるヒアルロン酸の重要性)	菅野 祐幸	天野 純 瀧 伸介
内藤 武彦 (耳鼻咽喉 科学)	乙第1165号	25. 7.24	Comprehensive genetic screening of <i>KCNQ4</i> in a large autosomal dominant nonsyndromic hearing loss cohort: Genotype-phenotype correlations and a founder mutation (常染色体優性遺伝形式を呈する難聴患者における <i>KCNQ4</i> 遺伝子変異に関するスクリーニング: 遺伝子型-表現型の相関と創始者効果突然変異)	福嶋 義光	小池 健一 村田 敏規
伊東 清志 (脳神経 外科学)	乙第1166号	25.10. 9	Comparative study of fibrin and chemical synthetic sealant on dural regeneration and brain damage (フィブリングルーおよび人工合成被覆剤の, 硬膜の再生および神経障害に対する影響の比較検討)	加藤 博之	池田 修一 多田 剛
横山 仁 (泌尿器科学)	乙第1167号	25.10.30	Effects of Herpes Simplex Virus Vector-Mediated Enkephalin Gene Therapy on Bladder Overactivity and Nociception (排尿筋過活動・膀胱痛に対する, 単純ヘルペスウイルスベクターを用いたエンケファリン遺伝子治療の効果の検討)	田中 榮司	池田 修一 菅野 祐幸
望月 靖弘 (外科学(2))	乙第1168号	25.12.25	Expression of Polypeptide N-acetylgalactosaminyl Transferase-3 and Its Association with Clinicopathological Factors in Thyroid Carcinomas (甲状腺癌における Polypeptide N-acetylgalactosaminyl Transferase-3の発現と臨床病理学的因子の関連の検討)	中山 淳	奥山 隆平 宮川 眞一

審査学位論文要旨

井上博夫 (泌尿器科学)	乙第1169号	26. 2.12	Relationship between Toe Temperature and Lower Urinary Tract Symptoms (足指の温度と下部尿路症状との関係)	能勢 博	花岡正幸 駒津光久
神戸宏樹 (代謝制御学)	乙第1170号	26. 2.12	Chronic ethanol consumption decreases serum sulfatide levels by suppressing hepatic cerebroside sulfotransferase expression in mice (マウスにおける慢性的なエタノール投与は肝臓中セレブロシドスルホトランスフェラーゼの発現を低下させることにより血清中サルファタイド濃度を減少させる)	田中榮司	大森 栄 多田 剛
寺崎貴光 (外科学(2))	乙第1171号	26. 2.27	Clinical Results and Pump Analysis of the Gyro Pump for Long-term Extracorporeal Life Support (ジャイロポンプを用いた長期体外循環の臨床成績とポンプの解析)	池田宇一	岡元和文 川真田樹人
兵庫谷 章 (外科学(2))	乙第1172号	26. 2.27	Association of nuclear YB-1 localization with lung resistance-related protein and epidermal growth factor receptor expression in lung cancer (肺癌におけるYB-1の核内局在とLRP, EGFRの発現との関連)	小泉知展	本田孝行 花岡正幸
上垣内崇行 (泌尿器科学)	乙第1173号	26. 2.27	Overexpression of O-GlcNAc by prostate cancer cells is significantly associated with poor prognosis of patients (前立腺癌細胞におけるO-GlcNAcの過剰発現は前立腺患者の予後不良と密接に関連している)	本田孝行	天野 純 菅野祐幸
秋田真吾 (外科学(1))	乙第1174号	26. 3.13	Role of bone marrow cells in the development of pancreatic fibrosis in a rat model of pancreatitis induced by a choline-deficient/ethionine-supplemented diet (choline-deficient/ethionine-supplemented dietによるラット膵炎モデルを用いた、膵線維化における骨髄細胞の役割に関する研究)	駒津光久	天野 純 菅野祐幸
中村恒一 (運動機能学)	乙第1175号	26. 3.26	The effect of vascular pedicle preservation on blood flow and clinical outcome following ulnar nerve transposition (尺骨神経前方移動術において、伴走血管の温存が血流と術後成績におよぼす影響)	大橋俊夫	池田修一 松尾 清
矢野卓也 (耳鼻咽喉科学)	乙第1176号	26. 3.26	Frequency of mitochondrial mutations in non-syndromic hearing loss as well as possibly responsible variants found by whole mitochondrial genome screening (非症候群性難聴患者における難聴関連遺伝子変異について：全ミトコンドリア遺伝子スクリーニングを用いた検討)	福嶋義光	駒津光久 浅村英樹

Predicting the route of delivery in women with low-lying placenta using transvaginal ultrasonography : significance of placental migration and marginal sinus (低置胎盤症例における経膈超音波を用いた分娩方法の予測：胎盤移動と辺縁静脈洞の意義)

大 平 哲 史

(論文の内容の要旨)

【緒言】前置胎盤の分娩方法は帝王切開として確立されているが、低置胎盤症例における管理・分娩方法はいまだ確立されていない。低置胎盤は「胎盤が正常より低い部位の子宮壁に付着するが、組織学的内子宮口を覆っていない状態をいう。超音波断層法で診断する場合、「同子宮口とそれに最も近い胎盤辺縁との距離が2 cm 以内の状態を目安とする。」とされているが、どの妊娠時期に胎盤辺縁が内子宮口から2 cm 以内ならば低置胎盤なのかについて明確な定義はなく、診断基準はあいまいである。日常の診療では多量の性器出血が出現して緊急帝王切開となる症例がある一方、超音波による観察で、妊娠経過とともにあたかも胎盤が移動するかのようになり子宮口から離れていき (placental migration), 経膈分娩となる症例も経験される。1991年のOppenheimerの報告によると、胎盤辺縁から内子宮口までの距離が2 cm以内であった8例中7例が前置胎盤様の出血により帝王切開となった。ただしこの報告では2 cm 以内と最終的に判断した時期が症例により大きく異なり、妊娠28週の症例から37週のものまでかなりばらつきがあった。しかし、このOppenheimerの報告が元となって2001年にRoyal College of Obstetricians and Gynaecologists から「低置胎盤では胎盤辺縁から内子宮口までの距離が2 cm を超える場合に経膈分娩を試みるべき」という提言が出され、以後現在に至るまで多くの産科医が指標としている。他にもこれまでに低置胎盤の分娩方法に関するいくつかの論文が出されているが、いずれも出血以外の産科適応で帝王切開となったものが多く含まれている。またMatsubaraらの検討では、胎盤辺縁～内子宮口距離が0-20 mm 群と21-40 mm 群では、出血が理由での緊急帝王切開率に有意差はなかったとされている。このように、「胎盤辺縁～内子宮口距離2 cm」を指標として低置胎盤の分娩方法を選択することには、検討の余地が残されている。

【目的】今回我々は、経膈超音波で観察し得たplacental migration (胎盤移動) に着目し、胎盤の移動距離を観察した期間 (週) で除して算出した rate of placental

migration (胎盤移動速度) をパラメータとして設定し、「胎盤移動」の程度とその後の分娩方法について検討した。また、しばしば胎盤辺縁に認められる placental marginal sinus (辺縁静脈洞) にも着目し、辺縁静脈洞の有無と分娩方法の相関を検討した。それにより、低置胎盤症例の分娩管理において有益となる指針を導き出すことを目的とした。

【方法】2005年4月から2009年11月までの期間における当科の総分娩数は2,518例で、低置胎盤を「妊娠30週以降に経膈超音波で内子宮口から胎盤辺縁までの距離が30 mm 以内」と定義した。64例 (2.54%) がこれに該当した。低置胎盤64例のうち、前回帝王切開や子宮下部巨大筋腫が理由で帝王切開となった症例と出血以外の理由で緊急帝王切開となった症例の計15例は対象から除外し、49例を研究対象とした。すなわち全対象症例は、経膈分娩を目的として管理した症例であり、緊急帝王切開となった症例は全て多量出血が適応であったことになる。対象49例において妊娠37週の時点までの胎盤移動速度を算出し、胎盤移動速度が0-2.0 mm/week であった群を“slow migration group”, > 2.0 mm/week であった群を“fast migration group”としてその後の分娩方法を group ごとに検討した。また、辺縁静脈洞あり群となし群とで同様に分娩方法を検討した。

【結果】“slow migration group”では帝王切開率は56.3% (9/16) であったのに対して“fast migration group”の帝王切開率は0% (0/33) であった。すなわち胎盤移動速度が2.0 mm/week 以下である症例が多量出血で帝王切開となることの感度は100%であり、特異度は82.5%であった (尤度比5.71)。また、辺縁静脈洞あり群の帝王切開率は71.4% (5/7) であったのに対して、辺縁静脈洞なし群の帝王切開率は9.5% (4/42) であった。すなわち辺縁静脈洞がある症例で帝王切開となることの感度は55.6%であり、特異度は95.0%であった (尤度比11.1)。さらに、“slow migration group”かつ辺縁静脈洞ありの症例では帝王切開率が100% (5/5) であって、それ以外では帝王切開率は9.1% (4/44) であった (感度55.6%, 特

異度100%)。

【結論】低置胎盤症例では、妊娠37週までの胎盤移動速度が小さく、かつ辺縁静脈洞を認める例では、分娩前に多量出血が出現して緊急帝王切開となる可能性が高く、胎盤移動速度と辺縁静脈洞の有無といった二つのパラメータが分娩管理の指標となる可能性が示唆された。今後は、妊娠37週までの胎盤移動速度が2.0 mm/week 以下であり、かつ辺縁静脈洞を認める低置胎盤症例では、帝王切開が選択され得るという管理指針が検討されるべきと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

低置胎盤は「内子宮口と胎盤辺縁との距離が2 cm 以内の状態を目安とする。」と定義される胎盤の位置異常である。胎盤が内子宮口を覆う前置胎盤の分娩方法は帝王切開として確立されているが、低置胎盤症例における管理・分娩方法はいまだ確立されていない。低置胎盤は「内子宮口と胎盤辺縁との距離が2 cm 以内」とされているが、どの妊娠時期に胎盤辺縁が内子宮口から2 cm 以内ならば低置胎盤なのかについて明確な定義はなく、診断基準はあいまいである。2001年に「低置胎盤では胎盤辺縁から内子宮口までの距離が2 cm を超える場合に経膈分娩を試みるべき」という提言が出され、以後現在に至るまで多くの産科医が指標としている。これまでに低置胎盤の分娩方法に関するいくつかの論文が出されているが、「胎盤辺縁～内子宮口距離2 cm」を指標として低置胎盤の分娩方法を選択することには、検討の余地が残されている。今回我々は、経膈超音波で観察し得た placental migration (胎盤移動)に着目した。Placental migration とは、妊娠週数の進行に従い子宮下部の筋層が進展するため、胎盤が内子宮口からあらかも移動して離れていくようにみられる現象である。今回の検討では、placental migration を定量的に評価するために、胎盤の移動距離を観察した期間(週)で除して算出したrate of placental migration (胎盤移動速度)をパラメータとして設定し、「胎盤移動」の程度とその後の分娩方

法について検討した。また、しばしば胎盤辺縁に認められる辺縁静脈洞にも着目し、辺縁静脈洞の有無と分娩方法の相関を検討した。今回、低置胎盤を「妊娠30週以降に経膈超音波で内子宮口から胎盤辺縁までの距離が30 mm 以内」と定義し、出血以外の理由で緊急帝王切開となった例は対象から除外し、49例を研究対象とした。対象49例において妊娠37週の時点までの胎盤移動速度を算出し、胎盤移動速度が0-2.0 mm/weekであった群を“slow migration group”, >2.0 mm/weekであった群を“fast migration group”としてその後の分娩方法をgroupごとに検討した。また、辺縁静脈洞あり群となし群とで同様に分娩方法を検討した。

その結果、以下の成績を得た。

1. “Slow migration group”では帝王切開率は56.3% (9/16)であったのに対して“fast migration group”の帝王切開率は0% (0/33)であった。
2. 辺縁静脈洞あり群の帝王切開率は71.4% (5/7)であったのに対して、辺縁静脈洞なし群の帝王切開率は9.5% (4/42)であった。
3. “Slow migration group”かつ辺縁静脈洞ありの症例では帝王切開率が100% (5/5)であって、それ以外では帝王切開率は9.1% (4/44)であった。

以上より、低置胎盤症例では、妊娠37週までの胎盤移動速度が小さく、かつ辺縁静脈洞を認める例では、分娩前に多量出血が出現して緊急帝王切開となる可能性が高く、胎盤移動速度と辺縁静脈洞の有無といった二つのパラメータが分娩管理の指標となる可能性が示唆された。今後は、妊娠37週までの胎盤移動速度が2.0 mm/week 以下であり、かつ辺縁静脈洞を認める低置胎盤症例では、帝王切開が選択され得るという管理指針の検討が必要であると考えられた。本論文は低置胎盤に対する新たな管理法を提案する研究として、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Prognostic significance of Notch signaling molecules and their involvement in the invasiveness of endometrial carcinoma cells (子宮内膜癌における Notch シグナル分子発現の意義と内膜癌細胞の浸潤能への関与)

三 橋 祐布子

(論文の内容の要旨)

【背景】子宮内膜癌は婦人科癌で最も頻度が高い悪性

腫瘍であるが、近年、欧米諸国や本邦においての発生頻度は著増している。また、子宮内膜癌は比較的予後

良好とされているが、進行例や再発例の増加により抗癌剤を含む既存治療への抵抗性を示す症例の増加が問題となっている。このような背景から子宮内膜癌における予後不良因子の同定および新たな治療戦略が求められている。

Notch シグナル伝達経路は胚発達に必須で、組織の自己複製制御に重要な役割を果たすことが知られている。Notch シグナルは、細胞-細胞間接着による細胞表面の Notch リガンドが Notch 受容体に結合することにより賦活化され、 γ -secretase の Notch 受容体切断により遊離する細胞内ドメイン (NICD) が核に移行し、標的遺伝子の発現調節が行われる。

近年、悪性腫瘍において Notch シグナル分子の発現異常や活性化遺伝子変異が報告されており、悪性腫瘍の増殖、浸潤、血管新生等に関与することが示唆されている。更に、Notch シグナル経路阻害剤の臨床応用が検討され始めているが、婦人科癌における知見は乏しい。

【目的】 正常子宮内膜、子宮内膜癌における Notch シグナル経路の役割に着目し、その Notch シグナル関連分子 (Notch リガンド、Notch 受容体) 発現の有無、発現の臨床病理学的検討を行う。また、子宮内膜癌細胞での Notch シグナル経路の機能を解析するため、Notch シグナル阻害剤の効果について検討することを目的とする。

【方法】

① 患者の同意を得て採取した正常子宮内膜37例 (増殖期19例、分泌期18例) および子宮内膜癌 (類内膜腺癌) 76例に対し、Notch 受容体 (Notch1, Notch3)、Notch リガンド (Jagged1, DELTA-4) 発現を免疫染色にて検討した。

② 子宮内膜癌細胞株を用い Notch シグナル経路阻害剤 (γ -secretase inhibitor : DAPT) の増殖能への影響を WST-1 assay にて検討した。また接着能、浸潤能および遊走能への影響をそれぞれ adhesion assay, matrigel invasion assay および scratch assay にて検討した。

【結果】

① 正常内膜腺上皮において Notch 受容体 (Notch1, Notch3) および Notch リガンド (Jagged1, DELTA-4) 発現は月経周期に伴う変化を認めなかった。Notch 受容体、Notch リガンドともに正常子宮内膜腺上皮細胞に比し内膜癌細胞で有意に発現が亢進していた。単変量解析において Notch1 発現は臨床病期、リンパ

管侵襲および筋層浸潤と有意に関連し、多変量解析でも臨床病期と正の相関を認めた。また、Notch1 高発現症例では低発現症例に比べ有意に予後不良であった。更に、Notch1, Jagged1 ともに高発現症例では最も予後不良であった。

② 子宮内膜癌細胞株において DAPT (1 μ M) 添加による有意な増殖能変化を認めなかった。KLE 細胞への DAPT (1 μ M) 添加により、接着能に変化はなかったが、matrigel invasion assay において有意な浸潤能抑制が認められた。また、scratch assay にて遊走能は有意に低下した。

【結論】 正常内膜と比較し子宮内膜癌において Notch シグナル関連タンパクの発現は亢進しており、特に Notch1-Jagged1 が患者予後不良に関与していた。また、その機序に関しては子宮内膜癌の浸潤能亢進を介しており、Notch シグナル阻害剤が今後子宮内膜癌の新たな治療薬となる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

子宮内膜癌における予後不良因子の検索や新たな治療戦略が求められている背景から、三橋は子宮内膜癌における Notch シグナル分子の発現に着目した。その発現意義および子宮内膜癌細胞での Notch シグナル経路の機能を検討するため、

(1) 患者の同意を得て採取した正常子宮内膜37例 (増殖期19例、分泌期18例) および子宮内膜癌 (類内膜腺癌) 76例に対し、Notch 受容体 (Notch1, Notch3)、Notch リガンド (Jagged1, DELTA-4) 発現を免疫染色にて検討し、また(2) 子宮内膜癌細胞株を用い Notch シグナル経路阻害剤 (γ -secretase inhibitor : DAPT) の増殖能への影響を WST-1 assay にて、また接着能、浸潤能および遊走能への影響をそれぞれ adhesion assay, matrigel invasion assay および scratch assay にて検討した。

その結果以下の成績を得た。

1. 正常内膜腺上皮において Notch 受容体 (Notch1, Notch3) および Notch リガンド (Jagged1, DELTA-4) 発現は月経周期に伴う変化は認めなかった。
2. Notch 受容体、Notch リガンドともに正常子宮内膜腺上皮細胞と比し内膜癌細胞で有意に発現が亢進していた。
3. 単変量解析において Notch1 発現は臨床病期、脈管侵襲および筋層浸潤等と有意に関連し、多変量解析でも臨床病期と正の相関を認めた。また、Notch1 高発現症例では低発現症例に比べ有意に予後不良で

あった。更に Notch1, Jagged1の両者を高発現した症例では、最も予後が不良であった。

4. 子宮内膜癌細胞株において DAPT (1 μ M) 添加による有意な増殖能の変化は認められなかった。
5. KLE 細胞への DAPT (1 μ M) 添加により接着能の変化はなかったが、matrigel invasion assayにおいて有意な浸潤能抑制が認められた。また、scratch assayにて遊走能は有意に低下した。

以上より、子宮内膜癌において Notch シグナル関連タンパクの発現は亢進しており、子宮内膜癌の浸潤能亢進を介し予後不良に関与する可能性が示唆された。Notch シグナル阻害剤は子宮内膜癌細胞の浸潤能・遊走能を阻害し、今後子宮内膜癌の新たな治療薬となる可能性も示唆された。したがって主査、副査は一致して本論文を学位論文としての価値があるものと認めた。

Crucial Role of Hyaluronan in Neointimal Formation after Vascular Injury (血管傷害後新生内膜肥厚におけるヒアルロン酸の重要性)

嘉 嶋 勇一郎

(論文の内容の要旨)

【目的】ヒアルロン酸 (HA : hyaluronan) は、グリコサミノグリカンの一種であり、我々の身体を構成する細胞外マトリックスの主成分として、細胞の基本的な働きである増殖や移動などを調節し、様々な疾患において重要な役割を果たすことが知られている。循環器領域においては、動脈硬化血管の新生内膜肥厚部位や血管治療後のステント再狭窄部位に HA が過剰に蓄積することが知られる。しかしながら、HA が動脈硬化や冠動脈形成術後ステント再狭窄の進展に関与する機序は、現在のところほとんど解明されていない。そこで、マウス血管傷害モデルにおける新生内膜肥厚部位の主要細胞成分である血管平滑筋細胞 (VSMCs : vascular smooth muscle cells) と、VSMCs より産生された HA が血管傷害後の新生内膜肥厚形成に関与する機序について研究を行った。

【方法と結果】まず、ヒト動脈硬化血管およびマウス血管傷害モデルのいずれにおいても、新生内膜肥厚部位に HA が産生されていることを確認した。さらに、HA の特異的合成阻害剤である4-methylumbelliferone (4-MU) を経口投与し、血管傷害モデルを作製すると、新生内膜肥厚が著明に抑制された (内膜/中膜比 : 2.10 \pm 0.08 (非内服群) vs. 0.63 \pm 0.03 (内服群), $p < 0.001$)。次に、野生型マウス (C57BL/6) の大動脈より血管平滑筋細胞を採取し、HA が VSMCs の遊走能に与える作用を、Trans-well chamber system およびスクラッチ・アッセイにて検討すると、HA 刺激により VSMCs の遊走能に著明な増加が見られた。CD44に対する siRNA (CD44-siRNA) を使用し、VSMCs の CD44発現を knock down させると、HA 刺激による VSMCs 遊走能増加は有意に抑制された。

また、HA 刺激により VSMCs の RhoA 活性化が見られ、RhoA 活性化の特異的阻害剤である Y27632 使用により、HA 刺激による遊走能増加が抑制された。これらの結果より、HA は CD44-RhoA シグナル活性化により、VSMCs の遊走能を高めることが示された。引き続き、HA が VSMCs の増殖能に与える作用について検討した。HA 刺激により、VSMCs の ERK-1/2 の活性化が見られ、また、ERK-1/2 活性化の特異的阻害剤である U0126 使用すると、HA 刺激による VSMCs の増殖能が抑制された。さらに、HA 刺激による VSMCs の ERK-1/2 活性化は、CD44-siRNA 使用にて抑制された。以上より、HA は CD44-ERK-1/2 シグナル活性化により、VSMCs の増殖能を高めることを確認した。また、野生型マウス由来の VSMCs に対し HA により刺激を行うと、炎症性サイトカイン (IL-6, MCP-1) および酸化ストレス産生能が有意に増加した。HA は HA 合成酵素 (HA synthase : HAS) により合成され、3 種類の isoform が知られている (HAS1, 2, 3)。血管傷害部位から採取した VSMCs では、HAS2 の発現が他の isoform より有意に増加していたため、最後に、HAS2 cre-lox conditional transgenic strategy により、VSMCs 特異的に HA 過剰産生モデル (cHAS/CreSM22 α) を作製し、血管傷害後の新生内膜肥厚の作用について検討したところ、著明な新生内膜肥厚形成が見られた (内膜/中膜比 : 1.45 \pm 0.03 (cHAS/CreSM22 α) vs. 0.54 \pm 0.07 (cHAS2) and 0.50 \pm 0.04 (CreSM22 α), $p < 0.001$)。また、cHAS/CreSM22 α の大動脈より採取した VSMCs は、コントロールのマウス (cHAS2, CreSM22 α) に比して、IL-6, MCP-1, 酸化ストレス産生能が有意に高いことが確認された。

【考察】本研究は、血管傷害モデルにおける新生内膜

肥厚形成に HA が深く関与することを示した。その機序として、HA は CD44 を介し VSMCs に作用し、RhoA 活性化により遊走能を高め、ERK-1/2 活性化により増殖能を高め、炎症性サイトカインや酸化ストレスの産生能を増加させることが考えられた。今回の基礎的検討の結果をふまえ、さらなる HA の動脈硬化進展に関わる機序や、4-MU による動脈硬化進展の抑制の詳細な機序の検討を進めることで、HA 糖鎖合成を作用点とする新たな抗動脈硬化治療薬、ステント再狭窄予防法を開発できる可能性が考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

ヒアルロン酸 (hyaluronan : HA) は、ヒアルロン酸合成酵素 (hyaluronan synthase : HAS) により合成されるグリコサミノグリカンの一種であるが、ヒト動脈硬化性病変における内膜肥厚部位に過剰発現が見られ、動脈硬化進展の機序に深く関与することが示唆されている。そこで嘉嶋は HAS2 conditional transgenic mice を作成し、新生内膜肥厚部位の主要細胞成分である血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells : VSMC) 由来のヒアルロン酸が血管傷害後の新生内膜肥厚に関わる機序を検討した。

その結果以下の成績を得た。

1. ヒト新生内膜肥厚部位と同様に、マウス血管傷害後の新生内膜肥厚部位にも HA の過剰発現が見ら

れ、HA 特異的合成阻害剤 (4-methylumbelliferone) の経口摂取により新生内膜肥厚形成が著明に抑制された。

2. マウス大動脈より採取した VSMC を用いた実験にて、HA は VSMC の CD44- ERK1/2 pathway 活性化させることにより増殖能を、CD44-RhoA pathway 活性化させることにより遊走能を高めた。また、HA は CD44 を介して VSMC の炎症性サイトカインおよび酸化ストレス産生能を高めた。
3. 血管傷害部位の VSMC では、HAS1, 2, 3 の isoform のなかで HAS2 がもっとも活性化されていた。
4. Cre-lox conditional transgenic strategy により作成した VSMC 特異的 HAS2 過剰産生モデルマウス (cHAS2/CreSM22 α mice) において、血管傷害後の新生内膜肥厚は著明に増強された。
5. cHAS2/CreSM22 α mice 大動脈より採取した VSMC は、増殖能、遊走能、炎症性サイトカインおよび酸化ストレス産生能が高かった。

以上により、VSMC 由来の HA は、血管傷害後の新生内膜肥厚形成に関与し、動脈硬化治療の標的となりえる可能性が示された。本研究は臨床に直結した新規性の高い基礎研究であり、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。

Comprehensive genetic screening of *KCNQ4* in a large autosomal dominant nonsyndromic hearing loss cohort : Genotype-phenotype correlations and a founder mutation (常染色体優性遺伝形式を呈する難聴患者における *KCNQ4* 遺伝子変異に関するスクリーニング : 遺伝子型-表現型の相関と創始者効果突然変異)

内 藤 武 彦

(論文の内容の要旨)

【研究目的】常染色体優性遺伝形式を呈する非症候群性難聴 (ADNSHL) は多くの原因遺伝子があること、また同じ遺伝子であっても家系毎に変異が異なり、同一変異の報告が殆どないため、遺伝子変異スクリーニングは難しいのが現状である。*KCNQ4* 遺伝子は ADNSHL の原因遺伝子の中では比較的変異の報告が多く、変異の分布や遺伝子型と表現型の相関を解析できる可能性がある。今回、我々は日本人における *KCNQ4* 遺伝子変異の大規模スクリーニングを行い、*KCNQ4* 遺伝子変異の分布、および遺伝子型と表現型の相関について検討を行った。また高頻度に検出される遺伝子変異を認めたため、その起源につき検討を

行った。

【対象と方法】日本人難聴遺伝子データベース (全国 33 施設より集まった難聴遺伝子 1396 家系) のうち、ADNSHL 287 家系を対象に *KCNQ4* 遺伝子をサンガーシーケンス法にてスクリーニングした。臨床情報として聴力レベル、問診票により発症年齢や難聴の進行性などを確認した。検出された代表的な 3 変異 (c. 211delC, p. V230E, p. W276S) について聴力レベル (dB) とその進行速度 (dB/年) を測定し、遺伝子型と表現型の相関につき検討した。また高頻度に認められた c. 211delC 変異に関しては、変異周囲の 48 SNPs を用いたハプロタイプ解析を行い、変異の起源について検討を行った。

【研究結果】スクリーニングの結果、19家系から7変異を認めた。いずれもコントロール群には変異は認められなかった。またそのうち5変異は新規変異であった。*KCNQ4* 遺伝子変異の頻度は6.62% (19/287) であり、特に c.211delC 変異は4.53% (13/287) と高頻度であった。*KCNQ4* 遺伝子変異による難聴の臨床的特徴としては、発症年齢が3-40歳と幅広くまた進行性の難聴が多いことが明らかとなった。c.211delC, p.V230E, p.W276S の聴力像はそれぞれ高音急墜型、中音域障害型 (皿型)、高音漸傾型の特徴的なタイプを示し、難聴レベルの進行速度 (dB/年) を比較すると c.211delC では他の変異と比較し低音域 (125, 250Hz) の聴力が有意に保持されることが示された。また c.211delC 周囲のハプロタイプ解析では、変異アレルには533 kbp と広範囲に共通するハプロタイプ (SNP 配列) が存在することを明らかにした。

【考察】日本人の ADNSHL 家系の6.62%に *KCNQ4* 遺伝子変異が同定された。ADNSHL の中で頻度が高いとされる *TECTA* 遺伝子変異の頻度2.9% (4/139) と比べても高く、*KCNQ4* 遺伝子は ADNSHL の原因遺伝子のなかで最も高頻度なものの1つであり、ADNSHL 患者の遺伝学的検索を行う場合に最初に考慮すべき遺伝子と言える。我々は既に世界で4家系に見出された hot spot 変異 (p.W276S) を報告しているが、13家系に認められた c.211delC はハプロタイプ解析結果から hot spot 変異ではなく founder 変異と推定された。頻度が高く、また特徴的な聴力像を呈するため c.211delC を中心に ADNSHL の遺伝子解析が一挙に進む可能性がある。また p.V230E の臨床的特徴である皿型の聴力像はこれまで *TECTA* 遺伝子変異に特徴的とされたが、*KCNQ4* 遺伝子変異でも同様の聴力像を呈することが今回初めて示された。今後、未説明の中音域障害型の ADNSHL の解析が進む可能性がある。治療については、c.211delC では低音域が経時的に保存されるため残存聴力活用型人工内耳 (EAS) が良い適応となることが明らかとなった。

【結論】ADNSHL では *KCNQ4* 遺伝子変異の頻度が高くまた遺伝子型と表現型の相関が認められるため、ADNSHL に対しては、まず *KCNQ4* 遺伝子変異の検索を考慮することが重要である。

(論文審査の結果の要旨)

常染色体優性遺伝形式を呈する非症候群性難聴 (ADNSHL) は遺伝性難聴の約20%を占めると報告されている (N. Hilgert et al. 2009)。ADNSHL には

多くの原因遺伝子がありまた同一変異をもつ罹患者数が少ないという特徴を有する。そのため遺伝子変異スクリーニングには広範な領域の塩基配列を決定するための相当な労力が必要で大規模集団での遺伝子変異スクリーニングが進んでおらず、また変異ごとの臨床的特徴が明確になっていない。*KCNQ4* 遺伝子は ADNSHL の原因遺伝子として比較的変異の頻度が高く、遺伝子型別の表現型の特徴を捉えられる可能性がある。

本論文において内藤武彦は、日本人難聴患者における *KCNQ4* 遺伝子変異の頻度や分布およびこれらの変異を有する症例に関する臨床像について大規模調査を行った。

まず、常染色体優性遺伝形式を呈する難聴家系の発端者287人を対象に *KCNQ4* 遺伝子の全エクソン領域における遺伝子変異検索を行った。その結果、287人中19人 (=6.62%) と高率に *KCNQ4* 遺伝子変異を確認した。検出した変異は p.V230E などの新規変異5種、p.W276S など既知変異2種の合計7種で、c.211delC 変異は13人と極めて高頻度に認めた。続いて家系内で変異を特定できる罹患者が3名以上で3世代にわたる家系のある c.211delC 変異、p.V230E 変異、p.W276S 変異について、その臨床的特徴を検討した。その結果いずれの変異でも徐々に難聴が進行するが c.211delC 変異は発症年齢が10歳代以降と比較的高齢であることが確認された。また各変異ごとに難聴の周波数特性を検討したところ、c.211delC では高音域障害型の難聴 (高音急墜型)、p.V230E 変異では中音域障害型の難聴 (皿型)、p.W276S 変異では中音高音域障害型の難聴 (高音漸傾型) といずれも特徴的な聴力像を示した。難聴の年齢変化を詳細に検討したところ、c.211delC 変異では低音域が保存され、p.V230E 変異では他の変異に比べ高音域障害が有意に軽度であることが確認された。また高頻度に認められた c.211delC 変異については変異周辺のハプロタイプ解析を行った。その結果、c.211delC 変異は特定の創始者から日本国内に広く広まった変異であることが推定された。

本論文により、日本人における優性遺伝形式を呈する非症候群性難聴 (ADNSHL) の原因遺伝子として *KCNQ4* 遺伝子は、その変異頻度が高く、また変異の種類により特徴的な臨床像を示すことが明らかとなった。またこのことより ADNSHL 集団に対してはまずは *KCNQ4* 遺伝子変異の検索を考慮することが重要であると考えられた。一定の知見が得られたことは今

後の研究の上で非常に重要な発見であると考えられる。 として価値があるものと認めた。

以上より、主査、副査は一致して本論文を学位論文

Comparative study of fibrin and chemical synthetic sealant on dural regeneration and brain damage (フィブリングルーおよび人工合成被覆剤の、硬膜の再生および神経障害に対する影響の比較検討)

伊 東 清 志

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】脳脊髄領域の外科手術の際に、硬膜切開部分からの髄液漏を予防するために、様々な医療用接着剤が使用される。従来は、ヒト血清より作成したフィブリングルーを使用する機会が多かったが、近年人工合成材料であるポリエチレングリコールのポリマーが使用される機会が多くなってきた。しかしポリエチレングリコールのポリマーを使用した後に、髄液漏や感染が生じた症例の報告が散見されるようになった。この術後合併症との関連は、まだはっきり分かっていない。今回、in vivoにおいて、フィブリングルーとポリエチレングリコールのポリマーを、家兎に使用し病理組織学的に硬膜の形成、感染および脳組織の傷害の有無を検証した。

【方法】22羽のJapanese white rabbitの頭頂部に、円形の骨欠損および硬膜欠損部を作成した。その骨欠損および硬膜欠損部を、一方はフィブリングルーで、もう一方はポリエチレングリコールのポリマーで覆い、一週間毎、四週間まで犠牲死させた。そして、硬膜の再生、脳組織への影響を、病理組織学的に評価した。

【結果】

- ① 硬膜の形成に関しては、フィブリングルーがポリエチレングリコールのポリマーに勝っていた ($p=0.014$)。
- ② 有意差は認められなかったが、フィブリングルーと比較して、ポリエチレングリコールのポリマーで、脳膿瘍を生じやすい傾向にあった。
- ③ 脳表面の傷害は、脳膿瘍の形成を伴った家兎で強く認められた ($p=0.007$)。

【結論】硬膜の形成に関しては、フィブリングルーでより早期に生じると考えられた。一方、感染である脳膿瘍は、ポリエチレングリコールのポリマーで生じやすいことが示唆された。病理組織学的な検討により、人工合成材料であるポリエチレングリコールのポリマーは、通常の創傷治癒過程が抑制されている可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

脳脊髄手術の術後結果を左右する因子の1つに、術後髄液漏の予防が挙げられる。以前よりヒト血清を用いて作成されるフィブリングルーによる、硬膜の被覆による髄液漏予防法が施行されてきた。フィブリングルーは、生体反応であるフィブリノーゲンからフィブリンを析出させ、そのフィブリンによる硬膜被覆作用を応用したものである。したがって、元来生体をもつ創治癒の過程を利用しているため、未知ウィルスの混入の危険性はあるものの、組織への侵襲度は低い。それに対して、近年、ポリエチレングリコールエステル化合物であるDuraseal® sealant system (Confluent Surgical, Waltham, USA) が本邦に導入され被覆剤として使用されるようになってきた。ポリエチレングリコールエステル溶液とトリリシンアミノ酸を混合し作成される吸収性ハイドロゲルである。2剤を混合した際に架橋構造が作成されゲル状となり、4-8週すると加水分解され腎臓より体外へ排泄される特徴を持つ。この期間に安定化した新しい硬膜が形成される。合成された原料より作成されるためウィルス感染の可能性はなく、アナフィラキシー反応は低減すると思われる。しかし、組織学的に、神経組織への影響を検討した報告は現在までない。フィブリングルーおよびDuraseal® sealant systemにおける、硬膜の形成、神経組織への影響を、組織学的に比較検討した。

その結果、伊東は次の結論を得た。

1. 硬膜形成に関して、フィブリングルーは、Duraseal® sealant system に比較して早期に硬膜が形成されることが組織学的に示された。
2. 肉芽、膿瘍形成に関して、フィブリングルーは、Duraseal® sealant system と比較して少ないことが分かった。
3. 神経組織の傷害は、肉芽形成、膿瘍形成と相関があることが分かった。

以上の結果より、未知ウィルスの混入やアナフィラキシー反応などの可能性は、残るものの創治癒の観点

よりフィブリングルーは、Duraseal® sealant system と比較してより生理的に創治癒が得られると考えられた。

本研究は、組織学的に両者の創治癒過程における相違を明確にしたことにより、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。

Effects of herpes simplex virus vector-mediated enkephalin gene therapy on bladder overactivity and nociception (排尿筋過活動・膀胱痛に対する、単純ヘルペスウイルスベクターを用いたエンケファリン遺伝子治療の効果の検討)

横 山 仁

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】泌尿器科領域において慢性疼痛を呈する代表的な疾患に間質性膀胱炎がある。膀胱充満に伴う恥骨上の痛みが特徴である。正確な病因は不明で疼痛対策が治療の中心である。慢性疼痛に対してオピオイドが使用されることがあるが、中枢性に作用することでしばしば副作用が問題となる。副作用を避けながらかつ目的臓器に限定したオピオイドの投与方法が確立された場合、間質性膀胱炎を代表とする慢性疼痛疾患の治療の礎となりうる。そのような観点から単純ヘルペスウイルスベクター (HSV) を用いた遺伝子治療は理想的と言える。HSV のターゲットは一次求心性神経であり、取り込まれた神経細胞体において遺伝子産物の発現を行う。HSV の genome は大きくかつその半分は増殖に不要なため、多くのターゲット遺伝子を組み込むことが可能である。Immediate-early (IE) gene を削除することで複製能力を失くした HSV に、 δ オピオイド受容体アゴニストであるエンケファリンの前駆体プレプロエンケファリン (hPPE) 遺伝子を組み込み作成されたベクターを使い、炎症性、神経性、内臓痛に対する疼痛モデルにおいてその有効性が報告されている。われわれも排尿筋過活動や膀胱痛に対する HSV の効果について報告した。さらに複数の IE gene を削除し、より細胞毒性を弱めた新しいベクターが作成され、臨床試験にて重大な副作用がなく鎮痛効果を示したことが報告された。しかし、この新しい HSV が膀胱痛や排尿筋過活動に対して同様に有効かどうかの検討はなされていない。今回、ラット膀胱痛モデル、排尿筋過活動モデルにおける有効性について検討した。

【方法】IE gene である ICP4, ICP27 を削除することで複製能力を失活させた HSV を用いた (PPE gene を組み込んだ vHPPE と、コントロールベクターとして、代わりに GFP gene を組み込んだ vHG)。すべての実験は雌 SD 系ラット (250-300 g) を用いた。

HSV は、5 μ L ずつ計 4 カ所膀胱壁に注入した。2 週間後に以下の実験を行った。

1. L6 dorsal root ganglion (DRG), L4 DRG における hPPE mRNA の発現を RT-PCR にて確認した。
2. Resiniferatoxin (RTx) を膀胱内注入し、痛み行動 (なめ, すくみ) の回数を比較検討した。
3. RTx を膀胱内注入後に L6 の c-Fos 陽性細胞数を免疫組織染色にて比較検討した。
4. RTx を膀胱内注入後に尿中サイトカインの量を ELISA にて比較検討した。
5. ウレタン麻酔下、膀胱内圧測定を施行し排尿筋過活動について検討を行った。

【結果】

1. hPPE mRNA は、vHPPE 投与群 L6 にのみ発現が認められた。L4 には発現は認められなかった。vHG 投与群では L6, L4 ともに発現は認められなかった。
2. vHPPE 投与群において、すくみ行動が有意に減少した。
3. vHPPE 投与群において、c-Fos 陽性細胞数が有意に少なかった。
4. vHPPE 投与群において尿中 IL-1 β , IL-6 レベルが有意に少なかった。
5. 生食から RTx に還流を切り換えると、膀胱収縮間隔 intercontraction interval (ICI) は vHPPE 投与群、vHG 投与群共に減少する。しかし、vHPPE 投与群において ICI の減少率は有意に少なかった。vHPPE の効果は naloxone hydrochloride にて拮抗されたが、naloxone methiodide では変化なかった。

【考察】上記の結果から HSV の感染、効果が、膀胱からの求心性神経 (骨盤神経) に限局されていることが分かった。この効果は血液脳関門を通過する naloxone hydrochloride においてのみ拮抗されたことから、

HSV の効果が末梢では無く中枢神経系（脊髄）で発揮されていることが示唆された。また、尿中 IL-1 β , IL-6が治療に対する効果判定のターゲットとして使用可能であることも示された。

【結論】 HSV によるエンケファリン遺伝子治療は、目的臓器の求心性神経に局限しながらオピオイドの効果を発揮するため、理想的な慢性疼痛治療となる可能性がある。

（論文審査の結果の要旨）

膀胱充満時に生じる恥骨上の痛みを特徴とする慢性疼痛疾患として間質性膀胱炎という疾患がある。正確な病因は不明である。主な治療は疼痛に対するコントロールであり、オピオイドが用いられることがあるが、しばしば副作用が問題となる。上位中枢にあるオピオイドレセプターに作用することなく、かつ目的臓器に局限したオピオイドの投与方法が確立された場合、間質性膀胱炎を始めとした慢性疼痛疾患に対して理想的な治療法となりうる。単純ヘルペスウイルス（HSV）をベクターとして使う遺伝子治療は上記の条件を満たす可能性がある。HSV のターゲットは一次求心性神経であり、取り込まれた神経細胞体において遺伝子産物の発現を行う。HSV の genome は大きくかつその半分は増殖に不要なため、多くのターゲット遺伝子を組み込むことが可能である。オピオイドであるエンケファリンの前駆体プレプロエンケファリン（hPPE）遺伝子を組み込み作成されたベクターを使い、炎症性、神経性、内臓痛に対する疼痛モデルにおいてその有効

性が報告されている。われわれも排尿筋過活動や膀胱痛に対する HSV ベクターの効果について報告した。今回、より細胞毒性を弱めた新しい HSV ベクター（vHPPE）が作成され、臨床試験にて重大な副作用がなく鎮痛効果を示したことが報告された。そこで、排尿筋過活動や膀胱痛に対する vHPPE の効果について検討した。

hPPE mRNA は、vHPPE 投与群の脊髄 L6にのみ発現が認められた。L4には発現は認められなかった。コントロールベクター投与群ではL6, L4ともにhPPE mRNA の発現は認められなかった。vHPPE 投与群において膀胱刺激後の、痛み行動、L6 c-Fos 陽性細胞数、尿中サイトカイン量（IL-1 β , IL-6）、膀胱収縮期間の短縮程度、は有意に減少した。

上記の結果から vHPPE が排尿筋過活動、膀胱痛に対して有効であり、かつその効果が膀胱からの求心性神経（骨盤神経）に局限されていることが分かった。また、血液脳関門を通過する naloxone hydrochloride においてのみ拮抗されたことから、vHPPE が末梢ではなく中枢神経系にて効果を発揮することが示唆された。

HSV ベクターによるエンケファリン遺伝子治療は、目的臓器の求心性神経に局限しながらオピオイドの効果を発揮するため、理想的な慢性疼痛治療となる可能性がある。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Expression of Polypeptide N-acetylgalactosaminyl Transferase-3 and Its association with Clinicopathological Factors in Thyroid Carcinomas (甲状腺癌における Polypeptide N-acetylgalactosaminyl Transferase-3 の発現と臨床病理学的因子の関連の検討)

望 月 靖 弘

（論文の内容の要旨）

【目的】 甲状腺癌は組織型により臨床像が大きく異なり、また、緩徐に進行する分化癌（乳頭癌および濾胞癌）から極めて悪性度の高い未分化癌が生じてくるが、この未分化転化の機序も解明されていない。細胞の癌化に伴う膜蛋白の構造や分布の変化が、癌の浸潤・転移に関与していることが報告されている。この膜蛋白の多くが糖蛋白であり、癌の種類により糖鎖構造に特異性があることが明らかとなっている。N-アセチルガラクトサミン転移酵素（GalNAc-T）は細胞質のゴルジ装置に存在シムチン型糖蛋白の glycosylation

に最初に作用する糖転移酵素である。特に GalNAc-T3の発現は組織特異性が高く、正常組織では脾臓、卵巣等に著明に発現し、胃癌、大腸癌、肺癌などの腺癌においては、その発現が分化度や浸潤・転移等との相関が報告されてきた。そこで、本研究では、甲状腺癌における GalNAc-T3発現と臨床病理学的因子との相関について検討した。

【対象と方法】 1997年から2005年に当科で切除した甲状腺癌169例（乳頭癌135例、濾胞癌12例、髄様癌7例、未分化癌15例）の手術検体を用いた。パラフィン包埋切片を、抗ヒトGalNAc-T3ポリクローナル抗体と

抗ヒト thyroglobulin モノクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行い、光学顕微鏡にて細胞質内に GalNAc-T3, thyroglobulin の発現を認めた場合をそれぞれ陽性とし、各症例の臨床病理学的因子と免疫組織染色との結果を解析した。

【結果】正常甲状腺の GalNAc-T3陽性率は85.8%であった。年齢、性別による統計学的な有意差は認めなかった。甲状腺癌における GalNAc-T3陽性率は、乳頭癌73.7%、濾胞癌45.5%、未分化癌13.3%、髄様癌0%であり、分化癌（乳頭癌、濾胞癌）において有意に高発現していた ($p < 0.001$)。乳頭癌における臨床病理学的因子との検討では、高分化型に分類される乳頭状構造、濾胞状構造では GalNAc-T3陽性率は70.7%であり、低分化型に分類される索状・充実性構造は14.6%であり、高分化の構造において有意に GalNAc-T3発現の増加を認めた ($p < 0.01$)。そのほかの臨床病理学的因子に関しては、GalNAc-T3の発現と組織学的腺外浸潤との間に有意な相関を認めた ($p < 0.05$)。濾胞癌においては濾胞状構造の陽性率が40.0%、索状・充実性構造が20.0%であり、高分化の構造において発現が増加する傾向が認められたが、統計学的な有意差は認められなかった。未分化癌においては15例中13例が GalNAc-T3の発現を認めなかった。未分化癌の検体で、同一検体内に乳頭癌部を含む検体が7例あり、6例は乳頭癌部では GalNAc-T3および thyroglobulin (Tg) がともに陽性であったが、未分化癌部では両者の発現ともに陰性であった。

【考察】甲状腺癌における GalNAc-T3の発現は、乳頭癌においては高分化型の構造でより高率に発現しており、未分化癌においてはほとんど発現が認められなかった。甲状腺癌においては、浸潤傾向が強いほど GalNAc-T3の発現が増加していた。胃癌および食道癌での検討では GalNAc-T3の発現は腫瘍の浸潤と相関することが、一方、膵臓癌、胆嚢癌では進行癌ほど GalNAc-T3の発現が低下していることが報告されている。さらに胆嚢癌と肝外胆管癌では、GalNAc-T3現は非浸潤癌や微小浸潤癌で高く、進行癌の浸潤部において発現が低下していることが報告されている。今回の結果と合わせて考察すると、GalNAc-T3の発現は内・外分泌腺組織と他の臓器では異なると考えられた。髄様癌では GalNAc-T3の発現が認められず、髄様癌が濾胞上皮細胞ではなくC細胞由来であることによると考えられる。

今回の未分化癌における検討で、GalNAc-T3の発

現と Tg の間に正の相関が認められた。Tg は甲状腺分化癌の腫瘍マーカーとしての役割を持つが、甲状腺癌由来の Tg は糖鎖の heterogeneity を有することが示された。また、未分化癌での Tg の陽性率は10%未満であり、甲状腺癌が低分化になり浸潤能が高まるにつれて Tg の産生能が失われていくものと考えられた。甲状腺組織における GalNAc-T3と Tg の直接の関連は明らかではないが、今回のわれわれの結果から GalNAc-T3の発現の低下には、分化型甲状腺癌の未分化転化に伴う、糖鎖の翻訳後修飾の変化が関与している可能性が考えられた。

【結論】本研究より、GalNAc-T3の発現は、甲状腺癌の分化度の有用な指標となりうることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

甲状腺癌は組織型により臨床像が大きく異なり、緩徐に進行する分化癌（乳頭癌および濾胞癌）から極めて悪性の高い未分化癌が生じてくるが、その機序は解明されていない。N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (GalNAc-T) は細胞質のゴルジ装置に存在しムチン型糖蛋白の glycosylation に最初に作用する糖転移酵素である。特に GalNAc-T3の発現は組織特異性が高く、胃癌、大腸癌、肺癌などの腺癌においてその発現と分化度や浸潤・転移等との相関が報告されてきた。

そこで、本研究では、1997年から2005年に信州大学医学部附属病院で切除した甲状腺癌169例（乳頭癌135例、濾胞癌12例、髄様癌7例、未分化癌15例）の手術検体を用い、免疫組織化学的検討し、甲状腺癌における GalNAc-T3の発現と臨床病理学的因子との相関を検討した結果以下の成績を得た。

1. 正常甲状腺のGalNAc-T3陽性率は85.8%であった。
2. 甲状腺癌における GalNAc-T3陽性率は、乳頭癌73.7%、濾胞癌45.5%、未分化癌13.3%、髄様癌0%であり、分化癌（乳頭癌、濾胞癌）において有意に高発現していた ($p < 0.001$)。
3. 乳頭癌における臨床病理学的因子との検討では、高分化型に分類される乳頭状構造・濾胞状構造では GalNAc-T3陽性率は70.7%であり、低分化型に分類される索状・充実性構造は14.6%であり、高分化の構造において有意に GalNAc-T3の発現の増加を認めた ($p < 0.01$)。そのほか、組織学的腺外浸潤との間に有意な相関を認めた ($p < 0.05$)
4. 濾胞癌においては濾胞状構造の陽性率が40.0%、

索状・充実性構造の陽性率が20.0%であり、高分化の構造において発現が増加する傾向が認められたが、統計学的な有意差は認めなかった。

5. 未分化癌においては15例中13例がGalNAc-T3の発現を認めなかった。未分化癌の検体で、同一検体内に乳頭癌部を含む検体が7例あり、このうち6例は乳頭癌部ではGalNAc-T3およびthyroglobulin

がともに陽性であったが、未分化癌部では両者の発現ともに陰性であった。

これらの結果より、甲状腺癌において、GalNAc-T3の発現が、分化度の有用な指標となりう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。

Relationship between toe temperature and lower urinary tract symptoms (足指の温度と下部尿路症状との関係)

井上博夫

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】環境温度の低温への変化は、循環器系、神経系などに作用し、さまざまな生理学的反応をもたらす。泌尿器科領域においては、手足が冷えることで尿意切迫感や頻尿などの下部尿路症状が生じることが、経験的に知られている。しかし、冷えによる下部尿路症状の発症機序は、不明な点が多い。これまで、冷え性の自覚と下部尿路症状の関連に対する疫学的調査は、ほとんどされていない。本研究は、冷え性と下部尿路症状の関連性を明らかにするとともに、生活習慣改善指導、および、末梢循環改善体操によって、冷え性の改善、あるいは、下部尿路症状の改善が認められるか検討した。

【方法】2011年10月松本市の健康管理セミナーに参加した50名(男性7名女性43名、平均年齢66.3歳)を対象とした。問診によって、冷え性を自覚する群と冷え性を自覚しない群に分けた。冷え性を自覚しない群(cold non-sensitive: CNS)は、男性3名、女性20名、平均年齢66.9歳であった。冷え性を自覚する群(cold sensitive: CS)は、男性4名、女性23名、平均年齢65.8歳であった。評価項目には、BMI値、安静時座位血圧、国際前立腺症状スコア(IPSS)、過活動膀胱症状質問票(OABSS)を用いた。さらに、被験者の手指、および、足指の温度をサーモグラフィーにて測定した。生活習慣改善指導として、水やコーヒーなどの水分制限、飲酒の制限・膀胱訓練・辛い食事の制限・便秘を避ける・長時間の座位を避けるなどの講演を行った。末梢循環改善体操は、1)つま先立ち10から20回、2)手首回転10から20回、3)スクワット10回を1セットとして、就寝前に15から20分間行い、2週間繰り返しとした。

最初に、血圧測定、問診にて、BMI値、IPSS、OAB

スコアを記録し、手指、および、足指の温度をサーモグラフィーにて測定した。生活習慣改善指導、および、末梢循環改善体操指導を行った。末梢循環改善体操を2週間実施した後、再度、血圧測定、IPSS、OABSS、QOLスコアを記録し、手指、および、足指の温度を測定した。

【結果】冷えを自覚するCS群のBMI値(22.6±2.6)、収縮期血圧(123.4±14.6 mmHg)、拡張期血圧(73.4±7.3 mmHg)は、冷えを自覚しないCNS群のBMI値(23.6±2.6)、収縮期血圧(120.0±13.7 mmHg)、拡張期血圧(74.5±15.4 mmHg)と有意な差を認めなかった。末梢循環改善体操の実施前において、CS群の手指の温度は、CNS群と比較して、差がなかった。しかし、体操実施前のCS群の足指の温度(左28.7±3.7°C、右28.8±3.9°C)は、CNS群における足指の温度(左30.7±4.2°C、右30.8±4.3°C)と比較して、有意に低かった。また、体操実施前のIPSS、OABスコアにおいて、CS群とCNS群との比較では、有意な差が認められなかった。

2週間の末梢循環改善体操実施後、CNS群において、手指の温度変化は認められなかったが、CS群の左手指において、有意な上昇が認められた。体操実施後の足指の温度変化において、両群ともに、有意に上昇した。また、CS群の足指の温度上昇は、CNS群と比較して、有意に上昇した。体操実施後、OABSSスコアにおいて、CS群の改善傾向が認められた。2週間体操実施後、両群のIPSSのトータルスコア、QOLスコア、蓄尿症状スコアにおいて、有意な改善を認めた。

【考察】本研究は、10月に行われ、寒さに敏感な冷え性を伴う過活動膀胱の患者に対する、生活習慣指導と体操実施の効果を評価するには、最適な時期であった

と考える。CS群とCNS群を比較すると、年齢・BMI・血圧に差がなく、下部尿路症状についても統計的な差を認めなかった。しかし、冷え性を自覚する人での足指の温度は、自覚しない人と比較すると、有意に低かった。

本研究において、末梢循環の改善と基礎代謝の改善を目的とした体操を実施することによって両群ともに、足指の温度の上昇を認めた。特に、CS群においては、CNS群と比較して、上昇する傾向が認められた。これらの結果から、冷え性を自覚する人における末梢循環と基礎代謝は、冷え性を自覚しない人よりも低下しているものと考えられる。しかし、体操実施により末梢循環と基礎代謝が改善し、足指の温度が大きく上昇したと考えられる。年齢や身体状況により体操の実施や継続が制限される場合があるかもしれないが、末梢循環と基礎代謝を改善する体操は、冷え性を自覚する人の手足の温度を改善するのに有用であることが示された。

日本泌尿器科学会からの過活動膀胱、男性の下部尿路症状と前立腺肥大症の診療ガイドラインでは、過活動膀胱の症状改善には、過剰な水分摂取の制限、膀胱訓練や適切な排尿などの指導による生活習慣の改善が勧められている。本研究は、これらのガイドラインに沿った指導を行うとともに、末梢循環改善効果を目的とした体操を2週間実施した。その結果、下部尿路症状、特に、蓄尿症状の改善効果を認めた。生活習慣指導や体操などは、下部尿路症状の改善や予防において、有用であることが示された。本研究では、冷え性を自覚する人の足指の温度の低下、あるいは、末梢循環改善体操による下部尿路症状改善における機序についての解明には至っておらず、今後さらなる研究が必要であると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

東洋医学における“冷え”は、重要な症状とされている。手足が冷えることで尿意切迫感や頻尿などの下部尿路症状を生じる、あるいは悪化することが経験的に知られている。しかし、西洋医学では、“冷え”という概念は、重要視されておらず、冷えと下部尿路症状に関する疫学調査は少ない。本研究は、冷え性の有無における、冷えストレスと下部尿路症状の関係を明らかにし、生活習慣改善指導、および、2週間の末梢循環改善体操の実施により、下部尿路症状の変化を評価した。

対象は健康管理セミナーに参加した50名（男性7

名女性43名）で、問診により冷え性を自覚している被験者と冷え性を自覚していない被験者の2群に分けた。評価項目には、BMI値、安静時座位血圧、国際前立腺症状スコア（IPSS）、過活動膀胱症状質問票（OABSS）、QOLスコアを用いた。さらに、被験者の手指、および、足指の温度をサーモグラフィーにて測定した。問診により生活習慣改善指導、末梢循環改善体操指導前の評価を行い、両手中指と両足中指の温度を測定した。生活習慣改善指導を行うとともに、就寝前に末梢循環改善体操を2週間続けるよう指導した。2週間後、両手中指と両足中指の温度を再度測定し、IPSS、OABSS、QOLスコアを用いて再評価した。

その結果以下の成績を得た。

1. BMIと血圧は、冷え性自覚群と自覚なし群との両群で有意な差はなかった。
2. 末梢循環改善体操体前、両群における足指の温度は、手指の温度より有意に低かった。
3. 体操実施後、手指の温度は変化しなかったが、両群における足指の温度は高くなった。
4. 体操実施後、冷え性を自覚する群の足指の温度上昇は、冷え性を自覚しない群よりも高くなる傾向があった。
5. 生活週間改善指導と末梢循環改善体操実施2週間後、冷え性を自覚する群のOABSSは、冷え性を自覚しない群と比較して改善傾向が認められた。
6. 生活週間改善指導と末梢循環改善体操実施2週間後、冷え性を自覚する群のIPSSトータルスコア、IPSS蓄尿症状スコア、QOLスコアは、冷え性を自覚しない群と比較して有意な改善が認められた。

冷え性を自覚する群では、足指の温度低下が認められた。末梢循環の改善と基礎代謝の改善を目的とした体操を行うことにより、足指の温度の上昇を認めた。特に、冷え性を自覚する群の足指の温度は、冷え性を自覚しない群よりも有意に上昇した。2週間の生活習慣改善と末梢循環改善体操により、蓄尿症状の改善が認められた。また、冷え性を自覚する群では、その改善効果が大きい傾向にあった。末梢循環改善体操は、冷え性を自覚し、下部尿路症状を有する患者において、症状の改善、あるいは、予防に有用であると考えられた。

以上より主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Chronic ethanol consumption decreases serum sulfatide levels by suppressing hepatic cerebroside sulfotransferase expression in mice (マウスにおける慢性的なエタノール投与は肝臓中セレブロシドスルホトランスフェラーゼの発現を低下させることにより血清中サルファタイド濃度を減少させる)

神戸宏樹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】過去の疫学調査から慢性的なアルコール大量摂取と血栓症との関連が示唆されているが、両者の関連を説明するメカニズムは未だ不明である。サルファタイドはセラミド、ガラクトース及び硫酸基から構成される内因性スフィンゴ糖脂質であり、血清中サルファタイドは抗血栓作用を有することが知られているが、アルコール摂取が血清中サルファタイドに与える影響は今まで調べられていない。本研究では、慢性的なアルコール大量摂取と血栓症との関連について調べるため、マウスを用いて抗血栓作用を有することが知られている血清及び肝臓中サルファタイドに影響を与えるかどうか、またその分子機構の解明を試みた。【方法】野生型メスマウス(26週齢, Sv/129系統)をコントロール群, 低用量(0.5 g/kg/day), 中用量(1.5 g/kg/day), 及び高用量エタノール投与群(3.0 g/kg/day)に分類し(各群6匹), エタノールを21日間腹腔内投与した。最終投与2時間後に血清及び肝臓を採取した。血清及び肝臓を用いて, 中性脂肪, サルファタイド濃度を測定した。血清を用いてリポタンパク質分布, ALT, AST, エタノール濃度及びtissue factorを測定した。肝臓を用いてコレステロール定量, 過酸化脂質マーカーの解析, 病理組織学的解析, real-time PCR法によるmRNAの分析, イムノブロット法によるタンパク発現量解析を実施した。【結果】エタノール投与により血清ALT, AST値の上昇, 血清及び肝臓中のコレステロール及びトリグリセライド量の有意な変化は認められず, 肝臓の病理学的検索でも肝細胞変性や炎症, 脂肪化などの病的変化は観察されなかった。一方, 血清及び肝臓中サルファタイドは中及び高用量エタノール投与群で有意に減少した。サルファタイド合成酵素の一つである肝臓セレブロシドスルホトランスフェラーゼ(CST)の発現がmRNA及びタンパクレベルで減少しており, これが血清サルファタイドの減少に関連していると考えられた。さらにCSTの低下は肝臓での過酸化脂質量と逆相関しており, CSTの発現低下における酸化スト

レスの関与が示唆された。さらに, 典型的凝固促進因子の一つである血清中tissue factorレベルは中及び高用量エタノール投与群で有意に増大し, 血清サルファタイドレベルの減少に逆相関していた。

【結論】慢性的なアルコール大量摂取では血清中サルファタイドが減少した。これは肝臓での酸化ストレス増加, CSTの発現低下に関連していると考えられた。これらの結果は, 慢性的なアルコール多飲者における心血管系及び脳血管イベントの発症率の増加を説明する新たな知見を提示している。

(論文審査の結果の要旨)

過去の疫学調査から, 慢性的なアルコール大量摂取と血栓症, 例えば心筋梗塞や脳血管障害との相関が示唆されているが, 両者の関連を説明するメカニズムは未だ不明である。サルファタイドは内因性スフィンゴ糖脂質であり, 抗血栓作用を有することが知られているが, アルコール摂取が血清中サルファタイドに与える影響は今まで調べられていない。本研究では, アルコール摂取が血清及び肝臓中サルファタイドに影響を与えるかどうか, そしてその分子機構の解明を試みた。

野生型メスマウスに低, 中及び高用量(それぞれ0.5, 1.5及び3.0 g/kg/day)のエタノールを21日間腹腔内投与した後に血清・肝臓を採取し, サルファタイド濃度, エタノール濃度, tissue factor及び生化学パラメータの分析, 過酸化脂質マーカーの解析, 病理組織学的解析, real-time PCR法によるmRNAの分析, タンパク発現量解析を実施した。

その結果, 「神戸宏樹」は次の結論を得た。

1. エタノール投与により血清ALT, AST値の上昇, 血清及び肝臓中のコレステロール及びトリグリセライド量の有意な変化は認められず, 肝臓の病理学的検索でも肝細胞変性や炎症, 脂肪化などの病的変化は観察されなかった。
2. 血清及び肝臓中サルファタイドは中及び高用量エタノール投与群で有意に減少した。
3. 肝臓において, サルファタイド合成酵素の一つであるセレブロシドスルホトランスフェラーゼ(CST)

の発現が mRNA 及びタンパクレベルで減少しており、これが血清サルファタイドの減少に関連していると考えられた。

4. CST の低下は肝臓での過酸化脂質量と逆相関し、酸化ストレス消去酵素であるカタラーゼ及び superoxide dismutase の発現と相関しており、CST の発現低下における酸化ストレスの関与が示唆された。
5. 凝固促進因子の一つである血清中 tissue factor レベルは中及び高用量エタノール投与群で有意に増大し、血清サルファタイドレベルの減少と比較して

逆相関していた。

以上より、慢性的なアルコール大量摂取は酸化ストレスの増大と肝臓中 CST 発現を減少させることにより血清中サルファタイドレベルを減少させることが示唆された。これらの結果は、慢性的なアルコール多飲者における心血管系及び脳血管イベントの増加のメカニズムを理解する新たな知見であると考えられた。したがって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Clinical Results and Pump Analysis of the Gyro Pump for Long-term Extracorporeal Life Support (ジャイロポンプを用いた長期体外循環の臨床成績とポンプの解析)

寺 崎 貴 光

(論文の内容の要旨)

【目的】 Gyro pump は通常の開心術で、主に 6 時間以下の使用を目的として市販されている遠心ポンプであるが、抗血栓性にすぐれ長期間使用に適した構造上の特徴を有しており、当科では Gyro Pump を用いた回路で長期心肺補助を行っている。

今回、Gyro pump により 4 日以上長期心肺補助を行った症例について、その臨床成績と使用したポンプの解析を行い、Gyro pump の長期使用の可能性について検討を行った。

【対象と方法】 Gyro pump はインペラーをポリカーボネイトの外殻で覆い、ポンプ内に Double pivot bearing system を有することで完全なシールレス構造をとっている。インペラーには上下に vane を作成することで血流の停滞を防ぎ、結果として抗血栓性に優れた形態を有している遠心ポンプである。

2008 年 4 月から 2012 年 3 月の間、Gyro pump を長期補助として使用した 7 症例 15 回路を対象とし、レトロスペクティブに早期成績と回路状況、補助期間の血液検査結果を検討した。長期心肺補助導入となった原因は、開心術後の低心拍出量症候群 4 例、急性心筋梗塞 2 例、心筋炎 1 例であった。6 症例は左心補助として、1 症例は LVAD 装着時の右心補助として用いた。また、すべての回路は使用後に観察・検査を行い、内 6 回路は走査電子顕微鏡で軸と軸受け部分の観察を行った。なお、補助期間中の ACT は 180 秒以上を目標とし、人工肺出口の動脈血酸素分圧は 200 mmHg を維持するよう調節した。回路交換の理由は人工肺の酸素化不良、ポンプの異音、回路内の血栓形成とした。

【結果】 7 症例すべて心肺補助導入時は人工呼吸管理を要する状態であった。2 例は心停止を契機に、残りの 5 例はショック状態での導入であったが、全症例で心肺補助開始後に速やかにショックを脱した。2 症例は心肺補助を離脱し退院、右心補助を行った 1 例は拍動型心室補助装置に切り替えて生存したが、残りの 4 症例は心肺補助から離脱できず死亡し、死亡率は 57.1% であった。回路交換期間は平均 10.5 ± 7.2 日、平均補助期間は 22.6 ± 16.4 日であった。回路交換は症例 1 で 4 回、症例 2, 4, 6, 7 で 1 回の計 8 回で、交換理由は酸素化能低下 5 回路、その他は人工肺の血栓、追加手術、感染であった。ACT は平均 188 秒で、回転数は 2262 ± 604 回/分、流量は 2.4 ± 0.6 L/分であった。AST, LDH は重症な患者背景を反映して導入時は高値であったが心肺補助開始後はいずれも速やかに低下し、開始 4 日後には概ね $AST < 100$ IU, $LDH < 1000$ IU 以下に維持可能であった。AST, LHD の値と補助期間には相関関係は認められなかった ($AST R^2 = 0.043$, $LHD R^2 = 0.12$)。使用後の観察で 2 つのポンプの軸周辺に血栓形成を認めた。うち一方は ACT 低値 (141 ± 23 秒)、もう一方は低回転 (1143 ± 173 回/分) であった。電子顕微鏡での 6 ポンプの解析では、軸受け部の摩耗は上部で 0.02 ± 0.03 mm、下部では 0.00 ± 0.00 mm であった。軸受け部の摩耗と補助期間の相関は認めなかった ($R^2 = 0.005$)。

【考察】 心肺補助はショックに陥ったのち速やかに導入したにもかかわらず mortality は 57.1% と高かった。文献上も mortality は 54-66% と高く、長期心肺補助が必要となる症例の救命は依然困難な状況にある。

しかしながら Gyro pump の平均補助期間は10日を超え、他の遠心ポンプを使用した場合の平均期間 (2.2-3.8日) の報告を上回る結果であった。この検討から Gyro pump による長期心肺補助の有用性が示唆されたと考える。

AST, LDH 値は補助開始後4日には低下し、補助期間中やや高値にとどまったが補助期間と値の相関は認めなかった。15回路中2回路でLDHのみ再上昇を認めたが、AST 値は全症例で再上昇を認めず、LDH再上昇の原因は個々の症例の重症度によるものと判断した。このことから Gyro pump の血球障害性の低さが伺えた。

使用後ポンプの解析で血栓を2つのポンプで認めたが、軸上部に認めたポンプでは出血コントロールのためヘパリン投与が不十分でACT値が低かったことが、また下部の軸周辺に血栓を認めたポンプでは低回転であったことが原因と考えられた。走査電子顕微鏡を用いた検討で上部軸受けに 0.02 ± 0.03 mmの摩耗を認めた。摩耗の程度は大動物を用いた14-33日間の長期補助の報告と同程度で、このポンプの長期臨床使用の可能性が示唆された。

【結語】低心拍出症候群に至った症例の救命は依然困難ではあるが、Gyro pump による心肺補助は、適切な抗凝固療法下で長期補助可能な device であると考ええる。

(論文審査の結果の要旨)

Gyro pump (Medtronic) はダブルピボットベアリングを有することでシールレス構造をとっており、また上下に vane を有することで抗血栓性にすぐれ長期使用に適した構造上の特徴を有している。寺崎は Gyro Pump とメラ NHP エクセランプライム人工肺

の組み合わせで長期の心肺補助を行い、(1)長期心肺補助を行った症例の臨床成績と運用状況(2)使用した血液ポンプの解析を行った。

その結果以下の結果を得た。

1. 7 症例, 計15回路を使用し, 死亡症例は7 症例中4 例 (57.1%) であった。
2. 平均使用期間は10.5日, 補助期間は平均22.6日, 回路交換理由は酸素化能低下5 回路, その他は人工肺の血栓, 追加手術, 感染であった。
3. ACT は平均188秒で, 回転数は 2262 ± 604 回/分, 流量は 2.4 ± 0.6 L/分であった。
4. AST, LDH は重症な患者背景を反映して導入時は高値であったが心肺補助開始後はいずれも速やかに低下し, 開始4 日後には概ね $AST < 100$ IU, $LDH < 1000$ IU以下に維持可能であった。AST, LHD の値と補助期間には相関関係は認められなかった ($AST R^2 = 0.043$, $LHD R^2 = 0.12$)。
5. 使用後15回路の肉眼的観察で2つのポンプの軸周辺に血栓形成を認めた。うち一方はACT低値 (141 ± 23 秒), もう一方は低回転 (1143 ± 173 回/分) であった。
6. 走査電子顕微鏡での6ポンプの解析では, 軸受け部の摩耗は上部で 0.02 ± 0.03 mm, 下部では 0.00 ± 0.00 mm であった。軸受け部の摩耗と補助期間の相関は認めなかった ($R^2 = 0.005$)。

以上より, 低心拍出症候群に至った症例の救命は依然として困難な状況にあるといえるが, Gyro pump による心肺補助は, 適切な抗凝固療法使用下では長期補助可能な device であると考えられる。したがって主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Association of nuclear YB-1 localization with lung resistance-related protein and epidermal growth factor receptor expression in lung cancer (肺癌における YB-1の核内局在と LRP, EGFR の発現との関連)

兵庫谷 章

(論文の内容の要旨)

【背景】YB-1は, 癌細胞における細胞増殖, DNA 複製, 薬剤耐性などに重要な役割を果たす転写因子で, 抗がん剤, 紫外線などのストレスに反応して活性化されることが知られている。LRPはdoxorubicin耐性の肺癌の cell line で発現の亢進が発見された蛋白で, 細胞内の標的より薬剤を運び出すことにより, 薬

剤耐性機構に寄与すると考えられている。LRPは乳癌, 卵巣癌で予後不良因子であることが報告されている。EGFRは細胞膜に存在する糖蛋白で, epidermal growth factor などの特異的なりガンドと結合することにより活性化され, 腫瘍細胞の増殖を亢進し, アポトーシス, 血管新生, 浸潤を抑制すると言われている。また, EGFRの過剰発現は, 非小細胞肺癌の予後不

良因子であることが報告されている。最近大腸癌で、YB-1がLRPの発現を上昇させることが報告された。また、乳癌において、YB-1の欠損がEGFRの発現を抑制することが報告された。本研究の目的は、原発性肺癌において、YB-1がLRPおよびEGFRの発現と相関するか、さらにYB-1の核内局在、LRP、EGFRの発現が肺癌の予後と関連するかどうかを解明することである。

【対象と方法】 信州大学病院にて2000年から2001年に手術を行った非小細胞肺癌症例105例を対象とした。YB-1の核内発現およびLRP、EGFRの発現は免疫組織化学にて解析した。YB-1メッセンジャーRNAのノックダウンには2種類のSiRNAを用い、肺癌細胞株A549とCalu-3についてウエスタンブロッティングにてそれぞれの発現を検討した。

【結果】 YB-1の核内発現はLRP、EGFRの発現陽性と良く相関した ($P < .001$)。YB-1の核内発現とLRP、EGFRの発現陽性は、非小細胞肺癌患者において独立した予後不良因子であった ($P < .001$)。さらに、YB-1の核内発現とLRPの発現が共に陽性の腫瘍をもつ患者は、それらが共に陰性の患者に比べ、著しく予後不良であった ($P < .001$)。加えて、YB-1の核内発現とEGFRの発現が共に陽性の腫瘍をもつ患者も、それらが共に陰性の患者に比べ、著しく予後不良であった ($P < .001$)。非小細胞肺癌の細胞株A549とCalu-3を用いたin vitroでの解析では、siRNAによるYB-1の発現低下は、EGFRの発現を大幅に減少させた。一方で、siRNAによるYB-1の発現低下は、A549においてLRPの発現を著明に減少させたが、Calu-3においては、僅かな減少を引き起こしたのみであった。

【考察】 我々は、非小細胞肺癌の臨床検体においてYB-1の核内発現がLRPとEGFRの発現に相関すること、さらにYB-1の核内発現とともにLRPあるいはEGFRの発現が増加している非小細胞肺癌は予後が悪いことを証明した。また、in vitroの解析において、YB-1のSiRNAによる発現低下はEGFRとLRPの発現を減少させた。これらの結果は、YB-1の核内移行がLRPとEGFRの発現上昇を誘導し、腫瘍をより活発な性質に導くことを示唆していると考えられた。この報告では、NSCLCのcell line A549において、YB-1のsiRNAによる発現低下がLRPの発現を減少させた。これは肺癌細胞において、YB-1がLRP発現の制御機能を持つことを示唆すると考えられる。しかし今回、他のNSCLCのcell lineであるCalu-3では僅

かな発現減少しか認めなかった。これは、肺癌において、LRP発現の制御にYB-1以外の因子も関与していることを示唆していると考えられる。kashiharaらの研究では、NSCLC cell line PC-9においてYB-1の発現低下がEGFRの発現を減少させることを証明したが、A549を含む他4種のセルラインでは発現の減少を認めなかった。さらに、肺癌の臨床検体においてYB-1の核内発現とEGFRの発現に相関を認めなかった。本研究との間の矛盾は、臨床検体の患者特性の違いに起因する可能性があると考えられる。

【結論】 我々の研究は、非小細胞肺癌において、YB-1の核内局在は、LRPとEGFRの発現と関連すること、さらにYB-1の核内局在とLRP、EGFRの発現が、非小細胞肺癌の予後因子として意義があることを示した。

(論文審査の結果の要旨)

YB-1は、癌細胞における細胞増殖、DNA複製、薬剤耐性などに重要な役割を果たす転写因子で、抗がん剤、紫外線などのストレスに反応して活性化されることが知られている。最近大腸癌でYB-1がLRPの発現を上昇させることが報告され、また乳癌においてYB-1の欠損がEGFRの発現を抑制することが報告された。

そこで、本研究では、信州大学病院にて2000年から2001年に手術を行った非小細胞肺癌105例の手術検体を用いた免疫組織化学的解析と、非小細胞肺癌の細胞株A549とCalu-3を用いたin vitroでの解析で検討し、YB-1がLRPおよびEGFRの発現と相関するか、さらにYB-1の核内局在、LRP、EGFRの発現が肺癌の予後と関連するかどうかを検討した結果以下の成績を得た。

1. YB-1の核内発現はLRP、EGFRの発現陽性と良く相関した ($P < .001$)。
2. YB-1の核内発現とLRP、EGFRの発現陽性は、非小細胞肺癌患者において独立した予後不良因子であった ($P < .001$)。
3. YB-1の核内発現とLRPの発現が共に陽性の腫瘍をもつ患者は、それらが共に陰性の患者に比べ著しく予後不良であった ($P < .001$)。また、YB-1の核内発現とEGFRの発現が共に陽性の腫瘍をもつ患者も、それらが共に陰性の患者に比べ著しく予後不良であった ($P < .001$)。
4. 非小細胞肺癌の細胞株A549とCalu-3を用いたin vitroでの解析では、siRNAによるYB-1の発現

低下は、EGFR の発現を大幅に減少させた。一方で、siRNA による YB-1 の発現低下は、A549 において LRP の発現を著明に減少させたが、Calu-3 においては、僅かな減少を引き起こしたのみであった。これらの結果より、非小細胞肺癌において YB-1 の

核内局在は LRP と EGFR の発現と関連すること、さらに YB-1 の核内局在と LRP, EGFR の発現が非小細胞肺癌の予後因子として意義があることを示した。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Overexpression of *O*-GlcNAc by prostate cancer cells is significantly associated with poor prognosis of patients (前立腺癌細胞における *O*-GlcNAc の過剰発現は前立腺患者の予後不良と密接に関連している)

上垣内 崇 行

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】この数年、発生、再生、増殖、分化、シグナル伝達などの細胞生物学の現象のみならず、神経筋肉疾患、感染症、生活習慣病などでも、糖鎖が直接または間接的にその発症に関わることが明らかになっており、癌領域においても糖鎖と癌の転移、浸潤、増殖などとの関係が報告されている。*O*-結合型 *N*-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) は転写、翻訳、核輸送、タンパク質の安定性、細胞質間の相互作用などの細胞活動に必須の糖鎖で、核および細胞質内に存在する種々のタンパク質のセリンあるいはスレオニン残基に、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が 1 分子結合した *O*-GlcNAc 化蛋白質として存在する。*O*-GlcNAc 化は翻訳後修飾によるタンパク質の機能制御機構の一つであり、その修飾はリン酸化と同じ部位またはその近傍で相補的または拮抗的に修飾され、酵素である *O*-GlcNAc 転移酵素 (*O*-GlcNAc transferase, OGT), *O*-GlcNAc 除去酵素 (*O*-GlcNAcase, OGA) により触媒される。近年、肺癌、乳癌、大腸癌などにおいて *O*-GlcNAc は腫瘍の進展に促進的に働くことが報告されているが、*in vitro* またはマウスを使用した報告が主であり、臨床的検討の報告は少ない。今回、我々は前立腺癌における *O*-GlcNAc の発現とその臨床的意義を明らかにするため、前立腺癌生検標本並びに前立腺癌培養細胞株である LNCaP を用いて解析した。

【方法】1996年から2002年に長野市民病院泌尿器科において前立腺針生検により病理学的に前立腺癌と診断され、年齢や病期からホルモン治療を受けた56例の病理標本につき *O*-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5年生存率との関係を検討した。また、*in vitro* の実験として前立腺癌培養細胞株 LNCaP を用いて OGT knockdown

LNCaP および control LNCaP を作成し、これら 2 種類 LNCaP の OGT mRNA の定量、*O*-GlcNAc の発現、細胞形態の変化、E-cadherin の発現、増殖能および浸潤能を比較した。

【結果】前立腺針生検標本56例すべてにおいて癌細胞は免疫染色にて *O*-GlcNAc 陽性を示し、同一標本内における正常腺管の染色性と比較して弱く発現するものを弱発現患者群、強く発現するものを強発現患者群と定義したところ、弱発現患者群34例 (60.4%)、強発現患者群22例 (39.3%) に分けられた。*O*-GlcNAc の染色と Gleason score の関係を検討すると強発現患者群のほうが有意に Gleason score が高く高悪性度であった ($P < 0.01$)。また5年生存率を比較したところ強発現患者群が有意に予後不良であった ($P < 0.01$)。コックス比例ハザードモデルを用いた単変量解析では、PSA 値、病期および *O*-GlcNAc の染色性が有意に予後に影響する因子であった ($P < 0.05$)。さらに、多変量解析では PSA 値、病期、Gleason score、*O*-GlcNAc の染色性のなかで唯一 *O*-GlcNAc の染色性のみが独立した予後予測因子であった ($P = 0.0475$)。*in vitro* の実験においては real time RT-PCR による解析で OGT knockdown LNCaP の OGT mRNA は control LNCaP に比較して12%に減少することが確認された。また、Western blot 解析により35および39 kDa 付近の *O*-GlcNAc 化蛋白質が OGT knockdown LNCaP で減少することも確認できた。さらに、OGT knockdown LNCaP の細胞形態および E-cadherin の発現は control と比較して変化は認められなかった。MTS assay による増殖能、Invasion assay による浸潤能は OGT knockdown LNCaP で有意に低下した。

【結論】病理組織学的に *O*-GlcNAc の強発現は統計学的に独立した予後不良因子であった。また *in vitro*

の実験においても *O*-GlcNAc は前立腺癌の増殖および浸潤に促進的に働くことが示された。以上より、前立腺癌組織の *O*-GlcNAc 免疫染色は予後予測に有用と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

O-結合型 *N*-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) は転写, 翻訳, 核輸送, タンパク質の安定性, 細胞質間の相互作用などの細胞活動に必須の糖鎖である。癌領域においては肺癌, 乳癌, 大腸癌で腫瘍の進展に促進的に作用することが知られているが, 前立腺癌でどのように作用するかほとんど明らかにされていない。本研究では前立腺癌の病理標本において *O*-GlcNAc の免疫組織化学的解析を行うことにより *O*-GlcNAc 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を検討, さらに前立腺癌培養細胞株である LNCaP を用いて *O*-GlcNAc が前立腺癌細胞の増殖や浸潤に対してどのように作用するかを検討した。

その結果, 上垣内は次の結論を得た。

1. 前立腺針生検組織において *O*-GlcNAc はすべての前立腺癌細胞に発現する。
2. 前立腺癌細胞における *O*-GlcNAc の発現量を正

常腺管での発現量と比較し, *O*-GlcNAc 強発現患者群と低発現患者群の二群に分類すると, 単変量解析において *O*-GlcNAc 強発現患者群は弱発現患者群に比較して有意に予後が不良である。

3. PSA値, Gleason score, 病期および *O*-GlcNAc の発現量の4つの因子の中で, *O*-GlcNAc の発現量のみが多変量解析における唯一独立した予後予測因子である。

4. LNCaP 細胞の *O*-GlcNAc 転移酵素を抑制することにより35および39 kDa付近の *O*-GlcNAc 化蛋白質が減少する。

5. LNCaP 細胞を用いた解析により, *O*-GlcNAc は腫瘍細胞の増殖能や浸潤能を促進するが, E-cadherin の発現と細胞形態には影響しない。

以上の結果より, 前立腺癌において *O*-GlcNAc は臨床的および実験的ともに腫瘍の進展に対して促進的に作用し, 予後を規定する重要な因子であることが示された。前立腺癌患者において *O*-GlcNAc の発現を免疫組織化学的に分析することが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。

Role of bone marrow cells in the development of pancreatic fibrosis in a rat model of pancreatitis induced by a choline-deficient/ethionine-supplemented diet (choline-deficient/ethionine-supplemented diet によるラット膵炎モデルを用いた, 膵線維化における骨髄細胞の役割に関する研究)

秋 田 眞 吾

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 膵星細胞 (pancreatic stellate cell, 以下PSC) は, 生理的状況下では periacinar/periductular space に存在し, 細胞質にビタミンAを含む脂質小滴が認められ, Desmin や glial fibrillary acid protein (GFAP) などの中間フィラメントタンパクを有している。膵臓の障害によりPSCは活性化され, 細胞質のビタミンAの消失とともに筋線維芽様細胞に形質転換して alpha smooth muscle actin (α SMA) や cytoskeletal protein を発現し, 細胞外基質蛋白だけでなく, PSC 自体を活性化する platelet-derived growth factor (PDGF) や, transforming growth factor β 1 (TGF β 1) などを産生し, autocrine loop を形成する。近年, マウスの慢性膵炎モデルにおいて PSC の一部は骨髄細胞 (BMC) 由来であることが確認されたが (Marrache, 2008 Gut), BMC が膵線維化において果たす役割の詳細について

は明らかではない。今回, コリン欠乏エチオニン添加 (choline deficient ethionine supplemented; CDE) 飼料ラット膵炎モデルを用いて, 骨髄細胞由来 PSC の経時的な変化について検討し, 骨髄細胞由来 PSC が PDGF や TGF β 1 を産生するか否かも検討した。

【方法】 Lewisラット・♂に, 致死量の放射線 (10 Gy) を全身照射後, Green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックラット・♀の大腿骨から採取した骨髄細胞 (5×10^7 個) を尾静注し骨髄置換を行った。骨髄置換 6 週間後に採血し, flow cytometry により骨髄置換率を確認後, CDE 飼料を 1, 3, 8 週間投与しモデルを作製した。

① 膵障害の程度を hematoxylin and eosin 染色にて, 膵の線維化の評価を Masson Trichrome 染色にて経時的に検討した。

② Desmin, α SMA の免疫染色により, PSC の出現と活性化細胞の程度, 範囲を検討した。

③ GFP の免疫染色により膵組織内における骨髄由来細胞の有無を検討した。GFP+Desmin の二重免疫染色により骨髄由来PSCの有無を、GFP+ α SMA の二重免疫染色により骨髄由来活性型PSCの有無を検討した。また、GFP+Desmin (または α SMA) 二重免疫染色により骨髄由来PSCと骨髄由来活性型PSCの割合を、無作為に選んだ400倍、5視野内の細胞数で評価した。

④ GFP+ α SMA+PDGF (またはTGF β 1) の三重免疫染色を行い、骨髄由来活性型PSCによるPDGFまたはTGF β 1産生の有無を検討した。

【結果】 CDE 飼料投与1週間から膵腺房細胞の萎縮、線維化が出現し、3週間ではtubular complexesが出現、膵腺房細胞萎縮、葉間と細胞間の線維化が進行した。8週後にはsteatosisが生じ、線維化によるbridging fibrosisやnodular appearanceが認められた。骨髄由来PSCはCDE飼料投与善意も存在し、投与後1週間で、骨髄細胞由来活性型PSCは活性型PSCの約23%となったが、その後は8-9%であった。また、骨髄細胞由来活性型PSCは、PDGFとTGF β 1を産生していることが認められた。

【結語】 骨髄細胞由来PSCは、膵臓内に常に存在していた。CDE飼料投与後1週間という早い時期に、骨髄細胞由来PSCが急増し活性型PSCの約1/4を占め、PDGFやTGF β 1を産生する事が証明された。膵炎早期の炎症と線維化に骨髄細胞由来PSCが関与している可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

膵星細胞 (pancreatic stellate cell, 以下PSC) は、生理的状況下ではperiacinar/periductular spaceに存在し、休止状態では細胞質にビタミンAを含む脂質小滴が認められ、desminやglial fibrillary acid protein (GFAP) のような中間フィラメントタンパクを有している。一旦、膵の障害がおこるとPSCは活性化され、細胞質のビタミンAの消失とともに筋線維芽様細胞に形質転換してalpha smooth muscle actin (α SMA) やcytoskeletal proteinを発現する。活性化されたPSCは線維化を促進するextracellular matrix proteinだけでなく、PSCを活性化することが知られているplatelet-derived growth factor (PDGF) などのサイトカインや、transforming growth factor β 1 (TGF β 1) などの成長因子も産生することが知られている。このようにPSCは膵線維化において重要な役割を担っている。

近年、マウスの慢性膵炎モデルにおいてPSCの一部は骨髄細胞 (BMC) 由来であることが確認されたが (Marrache, 2008 Gut), BMCが膵線維化において果たす役割の詳細については明らかではない。

本研究ではCDE (Choline-deficient ethonine-supplement) によるラット膵炎モデルにおいて、BMC由来の活性化PSC数の経時的变化と、同細胞がPDGFやTGF β 1産生能を有するか否かについて検討した。
方法：雌のGFP (green fluororecencnt protein) transgenic ratのBMCを、10 Gyの全身照射を行った雄に移植。6週間後よりCDEの摂取を開始。1, 3, 8週後に犠牲死させ、①膵組織をGFPとdesmin or α SMAを用いて二重染色を行い、BMC由来の活性化PSC数をカウント、②三重染色 (GFP+ α SMA+PDGF or GFP+ α SMA+TGF β 1) にて、BMC由来の活性化PSCのPDGF or TGF β 1産生能を検討 (CDE開始後1週目のラットを使用)。BMC移植施行、CDE摂取未施行ラットをコントロール (CR) とした。

その結果、秋田真吾は今回の実験で次の結果を得た。

1. BMC由来の活性化PSC数は、CRと比較しCDE摂取後1週で有意に上昇し (全PSCの23.3 \pm 0.9%), ピークとなりその後はCRと同程度まで低下した。
2. BMC由来の活性化PSCの中に、PDGF or TGF β 1にて染色される細胞を認めた。

以上の結果から、CDEによるラット膵炎モデルにおいて、BMC由来のPSCはCDE投与開始後1週間という比較的早い段階から活性化され、PDGFやTGF β 1の産生を介して膵の線維化に関与している可能性があるという結果を得た。本論文は、CDE (Choline-deficient ethonine-supplement) によるラット膵炎モデルにおいて、BMC由来の活性化PSC数の経時的变化と、同細胞がPDGFやTGF β 1産生能を有することをはじめ、明らかにしたものであり主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

The effect of vascular pedicle preservation on blood flow and clinical outcome following ulnar nerve transposition (尺骨神経前方移動術において、伴走血管の温存が血流と術後成績におよぼす影響)

中 村 恒 一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 尺骨神経皮下前方移動術は肘部管症候群 (Cubital tunnel syndrome : CubTS) の標準的手術治療法とされている。しかし、この手術では尺骨神経を移動する際に周囲の剥離が必要で、そのため神経の血流低下が危惧される。この欠点を補うために、伴走血管を温存した尺骨神経前方移動術が考案され広く用いられている。伴走血管の温存と非温存では尺骨神経の血流にどの程度違いがあるのか、伴走血管の温存が術後尺骨神経機能回復に影響を与えるのかを明らかにする目的で、prospective randomized clinical study を行った。

【方法】 肘関節症を有する CubTS 患者を対象とした。ランダムに血管柄温存尺骨神経皮下前方移動術群 (Vascular Pedicle : VP 群) と伴走血管を凝固切離して尺骨神経皮下前方移動術を行う血管柄非温存群 (non-VP 群) に分けた。【手術方法】 肘内側の皮膚切開で進入し、肘部管近位にて尺骨神経を同定し、Osborne 靭帯と尺側手根屈筋の深部筋膜で構成される肘部管支帯を切離した。近位より superior ulnar collateral artery (SUCA), inferior ulnar collateral artery (IUCA), posterior ulnar recurrent artery (PURA) を同定した。VP 群ではこれら 3 本の伴走動脈を温存し、non-VP 群では 3 本すべてを結紮切離し、神経を前方に移動した。【レーザー Doppler による血流評価】 レーザー Doppler 血流計 (FLO-N1, Omegawave, Tokyo, Japan) を用いて尺骨神経上の血流を評価した。内上顆部のレベルを M 点、それより近位 2 cm を P 点、遠位 2 cm を D 点とし、3 点で血流を測定した。測定時期は、① 神経移動前の肘最大伸展位、② 神経移動前の肘 90 度屈曲位、③ 神経移動後の肘最大伸展位、④ 神経移動後の肘 90 度屈曲位とした。空気止血帯を解除した 10 分後に 20 秒間の血流を測定し、その平均を血流値とした。【術前、術後臨床評価】 術前と術後 3, 6, 12 カ月で以下の項目を評価した。1) 尺骨神経麻痺重症度評価の McGowan 分類、2) 患者立脚型上肢機能評価法である DASH score、3) 尺骨神経の運動神経伝導速度 (MCV 値)、

4) 握力 (GP)、5) 母指と示指の側方つまみ力 (SP)、5) 小指の 2 点識別距離 (2PD) による感覚機能分類、6) 小指の圧感覚である Semmes-Weinstein (SW) monofilament test 値。

【結果】 1) 尺骨神経血流量の比較 : VP 群は 20 例、non-VP 群は 16 例であった。2 群間において、年齢、性別、罹患側、肘の可動角度、McGowan 分類に有意差は認めなかった。尺骨神経移動前でのそれぞれの測定部位での血流は肘伸展位および肘 90 度屈曲位ともに 2 群間で有意差を認めなかった。尺骨神経移動後の各点での血流は VP 群が non-VP 群よりも肘伸展位、90 度屈曲位ともに有意に高値であった。2) 肘部管症候群の臨床成績の比較 : 術前の評価において、McGowan 分類、DASH、MCV、2PD、SW では VP 群と non-VP 群の間に有意差を認めなかった。術後 3, 6 カ月の評価でも、すべての項目において 2 群間で有意差はなかった。術後 12 カ月の評価では、DASH score で VP 群が有意に低値 (良好) であったが、DASH score を除いたすべての項目で 2 群間に有意差を認めなかった。

【考察】 今回の結果では伴走血管を温存した場合の方が神経移動直後の神経血流は有意に高値に保たれることがわかった。術後 1 年での DASH score が伴走血管を温存した群で有意に良好であったが、尺骨神経機能以外の上肢全体の機能や肘変形性関節症の程度が DASH score の差に影響したのではないかと思われた。術後 1 年までの MCV、握力、側方ピンチ力、感覚機能などの神経機能の回復には、伴走血管の温存は影響を与えず、伴走血管を結紮切離しても、温存した場合と同様の神経機能回復を示した。

(論文審査の結果の要旨)

尺骨神経皮下前方移動術は肘部管症候群 (Cubital tunnel syndrome : CubTS) の標準的手術治療法とされているが、この手術は尺骨神経を移動する際に周囲の剥離が必要で、そのため神経の血流低下が危惧される。この欠点を補うために、伴走血管を温存した尺骨神経前方移動術が考案され用いられている。伴走血管の温存と非温存では尺骨神経の血流にどの程度違いが

あるのか、伴走血管の温存が術後尺骨神経機能回復に影響を与えるのかを明らかにする目的で、prospective randomized clinical studyを行った。ランダムに血管柄温存尺骨神経皮下前方移動術群 (Vascular Pedicle: VP 群) と伴走血管を凝固切離して尺骨神経皮下前方移動術を行う血管柄非温存群 (non-VP 群) に分けて、術中のレーザードプラー血流計による尺骨神経の血流量を比較した。また、術後3, 6, および12カ月での臨床成績を比較した。

その結果以下の結果を得た。

1. 尺骨神経移動後の神経の血流は VP 群が non-VP 群よりも肘伸展位, 90°屈曲位ともに有意に高値であった。
2. 術前および術後3, 6カ月の評価において、麻痺重症度を示す McGowan 分類, 患者立脚型上肢機能評価法である DASH score, 尺骨神経の運動神経伝導速度, 握力, 母指と示指間の側方つまみ力, 小指の2点識別距離 (2PD) による感覚機能分類,

小指の圧感覚を示す Semmes-Weinstein (SW) monofilament test 評価では VP 群と non-VP 群の間に有意差を認めなかった。

3. 術後12カ月の評価では、DASH scoreでVP群が有意に低値 (良好) であったが、DASH scoreを除いたすべての項目で2群間に有意差を認めなかった。

以上より、伴走血管を温存した場合の方が神経移動直後の神経血流は有意に高値に保たれることがわかった。しかし術後1年までの McGowan 分類, 運動神経伝導速度, 握力, 側方ピンチ力, 感覚機能などの神経機能の回復には、伴走血管の温存は影響を与えず、伴走血管を結紮切離しても、温存した場合と同様の神経機能回復を示すことがわかった。

肘部管症候群に対する手術方法に関する新しい知見を提唱した本論文は極めて重要な研究であり、したがって主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Frequency of mitochondrial mutations in non-syndromic hearing loss as well as possibly responsible variants found by whole mitochondrial genome screening (非症候群性難聴患者における難聴関連遺伝子変異について: 全ミトコンドリア遺伝子スクリーニングを用いた検討)

矢野 卓也

(論文の内容の要旨)

先天性難聴は出生児1,000人に1人に見られる頻度の高い先天性疾患である。先天性難聴には100種類以上の遺伝子が関与しているとされ、すでに様々な遺伝子について、変異の頻度, 種類, 表現型についての報告がなされている。今回、我々は難聴の原因の一つであるミトコンドリア遺伝子についてスクリーニングを行い、日本人の非症候群性難聴患者における1) 既知の難聴関連遺伝子変異の頻度, および2) 新規の難聴関連遺伝子変異について検討を行った。

日本人難聴遺伝子データベース (全国33施設より集められた難聴遺伝子家系発端者) のうち、母系遺伝難聴家系群254名 (コホート1) と様々な遺伝形式をとる難聴家系群140名 (コホート2) について全ミトコンドリア遺伝子の直接シーケンス法による解析を行い、難聴の原因となる既知変異についての頻度について検討を行った。次に、検出された塩基置換のうち公表されているミトコンドリアデータベースにて多型塩基置換を除外し、新規の難聴関連遺伝子変異と思われるものについて塩基置換の哺乳類における保存性, 聴力像

の面から検討を行った。

コホート1とコホート2の直接シーケンス法による解析では19種類の既知変異が同定された。この中で病的変異として確立している4変異はコホート1において14.6% (37/254), コホート2において0.7% (1/140) に認められた。このうち1555A>G変異, 3243A>G変異が多いことが確認され、母系遺伝家系における難聴の重要な原因であることが明らかとなった。次に、10種類の新規病的変異候補のうち3595A>G, 6204A>Gの2種類においては1) 常染色体優性遺伝もしくは母系遺伝家系である, 2) 哺乳類におけるアミノ酸保存性が50%を超えて高い, 3) ミトコンドリア難聴に特徴的な高音障害型難聴像を示したことから新規病的変異の可能性が高いことが推測された。

今回の研究により日本人におけるミトコンドリア難聴変異の頻度がより明確となり、ミトコンドリア遺伝子変異を持つ患者への詳細な情報提供が可能となったと考えられる。また新規変異候補として2つの変異が同定され難聴原因究明の足がかりとなると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

先天性難聴は出生児1,000人に1人に見られる頻度の高い先天性疾患である。遺伝性難聴には100種類以上の遺伝子が関与しているとされ、すでに様々な遺伝子について、変異の頻度、種類、表現型についての報告がなされている。

本論文において矢野卓也は日本人難聴患者における1) 既知の難聴関連遺伝子変異の頻度、および2) 新規の難聴関連遺伝子変異について検討を行った。

まず、母系遺伝形式を呈する難聴家系の発端者254名(コホート1)と様々な遺伝形式をとる難聴家系群140名(コホート2)を対象に全ミトコンドリア遺伝子解析を行い、難聴の原因となる既知変異についての頻度について検討した。その結果、コホート1とコホート2の直接シーケンス法による解析では19種類の難聴に関係する既知変異を認め、この中で病的変異として確立している4変異はコホート1において14.6%(37/254)、コホート2において0.7%(1/140)に確

認された。また、このうち1555A>G変異、3243A>G変異が多いことを確認し、母系遺伝家系における難聴の重要な原因であることが明らかとなった。

次に、検出された塩基置換のうち新規難聴関連遺伝子変異について検討したところ、10種類の新規病的変異候補を認めた。そのうち3595A>G、6204A>Gの2種類においては1) 常染色体優性遺伝もしくは母系遺伝家系である、2) 哺乳類におけるアミノ酸保存性が50%を超えて高い、3) ミトコンドリア難聴に特徴的な高音障害型難聴像を示したことから新規病的変異の可能性が高いと考えられる。

本論文により、日本人難聴患者の母系遺伝形式におけるミトコンドリア遺伝子変異の既知変異の頻度が高いことが明らかになった。また新規変異候補として2つの変異が同定され、一定の知見が得られたことは今後の研究の上で非常に重要な発見であると考えられる。

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