

信州大学において審査された医学博士論文要旨

氏名 (所属教室)	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
GAUTAM MILAN (内科学(5))	甲第977号	26. 9.30	The Traditional Japanese Medicine (Kampo) Boiogito has a Dual Benefit in Cardiorenal Syndrome: A Pilot Observational Study (和漢医薬(漢方薬)防己黄耆湯は心腎症候群の両面への効果を有する: 試験的観察研究)	大森 栄	山田充彦 花岡正幸
毛原 啓 (外科学(2))	甲第992号	26. 3.31	Platelet Function during Cardiopulmonary Bypass using Multiple Electrode Aggregometry: Comparison of Centrifugal and Roller Pumps (Multiple Electrode Aggregometry を用いた人工心肺中の血小板機能の検討: 遠心ポンプとローラーポンプの比較)	川真田樹人	池田宇一 本田孝行
劉 俊 俊 (老化制御学)	甲第993号	26. 3.31	Differential effects of angiotensin II receptor blockers on A β generation (アミロイド β 産生におけるアンジオテンシン阻害剤の異なる作用)	樋口京一	谷口俊一郎 鈴木龍雄
劉 姝 余 (老化制御学)	甲第994号	26. 3.31	Conversion of A β 43 to A β 40 by the successive action of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-converting enzyme (アンジオテンシン変換酵素 II (ACE2) およびアンジオテンシン変換酵素 (ACE) による A β 43 から A β 40 への変換機構解析)	樋口京一	鈴木龍雄 谷口俊一郎
皆川 茜 (皮膚科学)	甲第995号	26. 9.30	Dermoscopic features of nonpigmented eccrine poromas in association with their histopathological features (無色素性エクリン汗孔腫のダーモスコピー像と関連する病理組織像)	森泉哲次	角谷眞澄 菅野祐幸
岡本正則 (運動機能学 (整形))	甲第996号	26. 3.31	Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ β -catenin signaling during osteoblastogenesis (骨芽細胞分化において, 非古典的Wntリガンドである Wnt5a は Wnt/ β -catenin 経路を促進する)	本田孝行	栗田 浩 中山 淳
木下通亨 (内科学(3))	甲第997号	26. 3.31	Corpus Callosum Atrophy in Patients with Hereditary Diffuse Leukoencephalopathy with Neuroaxonal Spheroids: An MRI-based Study (神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症における脳梁萎縮に関する画像的検討)	天野直二	角谷眞澄 田淵克彦
岡田敏宏 (外科学(2))	甲第998号	26. 9.30	Coexpression of EpCAM, CD44 variant isoforms and claudin-7 in anaplastic thyroid carcinoma (甲状腺未分化癌において EpCAM, CD44 variant Isoforms と claudin-7 は共発現する)	谷口俊一郎	中山 淳 菅野祐幸

審査学位論文要旨

上條のぞみ (内科学(2))	甲第999号	26. 3.31	Mutations of Pre-core and BCP Before and After HBeAg Seroconversion (HBe 抗原セロコンバージョン前後におけるプレコア・コアプロモーター変異の臨床的意義)	本田孝行	宮川真一 竹下敏一
平野隆雄 (眼科学)	甲第1000号	26. 3.31	Physiological significance of Rag1 in neuronal death, especially optic neuropathy (神経, 特に視神経の細胞死における Rag1の生理的重要性)	宇佐美真一	新藤隆行 中山 淳
岸田 大 (代謝制御学)	甲第1001号	26. 3.31	Genotype-phenotype correlation in Japanese patients with familial Mediterranean fever: differences in genotype and clinical features between Japanese and Mediterranean populations (本邦の家族性地中海熱患者における遺伝型と表現型の関連—地中海地方との遺伝型や臨床像の違いについて—)	福嶋義光	田中榮司 樋口京一
高梨誠司 (運動機能学 (整形))	甲第1002号	26. 3.31	Carcinogenicity evaluation for the application of carbon nanotubes as biomaterials in rasH2 mice (カーボンナノチューブを生体材料に応用するための rasH2マウスを用いた発がん性評価)	谷口俊一郎	小泉知展 菅野祐幸
五十嵐恭子 (循環病態学 (発生再生 医学))	甲第1003号	27. 3.31	Pathophysiological roles of adrenomedullin-RAMP2 system in acute and chronic cerebral ischemia (急性および慢性脳虚血におけるアドレノメデュリン-RAMP2システムの病態生理学的意義)	菅野祐幸	多田 剛 田 潤 克彦
山内啓弘 (循環病態学 (発生再生 医学))	甲第1004号	27. 3.31	Functional differentiation of RAMP2 and RAMP3 in their regulation of the vascular system (脈管系制御におけるRAMP2とRAMP3の機能分化)	菅野祐幸	多田 剛 田 潤 克彦
望月勝徳 (救急集中 治療医学)	甲第1005号	26. 3.31	Neurological outcomes after extracorporeal cardiopulmonary resuscitation in patients with out-of-hospital cardiac arrest: a retrospective observational study in a rural tertiary care center (院外心停止患者における体外式心肺蘇生後の神経予後: 地方都市の高次医療機関における後方視的観察研究)	池田 宇一	川真田樹人 本田孝行
平林耕一 (小児医学)	甲第1006号	26. 3.31	Reduced-toxicity myeloablative conditioning consisting of 8-Gy total body irradiation, cyclophosphamide and fludarabine for pediatric hematological malignancies (小児血液悪性腫瘍に対する, 8-Gy 全身放射線照射, フルダラビン, シクロフォスファミドから成る毒性を低減した骨髄破壊的前処置)	田中榮司	角谷真澄 菅野祐幸
岡田綾子 (内科学(5) (循環器 病態学))	甲第1007号	26. 9.30	Characterization of cardiac oxidative stress levels in patients with atrial fibrillation (心房細動症例における血中酸化ストレスの検討)	山田充彦	今村 浩 岡田健次

審査学位論文要旨

末木 茜 (病態解析 診断学)	甲第1008号	27. 3.31	Epithelial-mesenchymal transition of A549 cells is enhanced by co-cultured with THP-1 macrophages under hypoxia conditions (低酸素環境下において THP-1マクロファージとの共培養は A549細胞の EMT を誘導する)	花岡正幸	多田 剛 大森 栄
原 洋助 (脳神経 外科学)	甲第1009号	26. 3.31	An Armrest is Effective for Reducing Hand Tremble in Neurosurgeons (アームレストは脳神経外科医の手のぶれを軽減する)	加藤博之	宇佐美真一 多田 剛
黄 玉哲 (代謝制御学 (加生))	甲第1010号	26. 9.30	Serum sulfatide abnormality is associated with increased oxidative stress in hemodialysis patients (血液透析患者における血清スルファチド異常は酸化ストレスの増加と関連する)	山田充彦	樋口京一 多田 剛
張 玉根 (分子腫瘍学 (環境))	甲第1011号	26. 3.31	NF κ B2 gene as a novel candidate that epigenetically responds to interval walking training (インターバル速歩トレーニングに対しエピジェネティックに応じる新候補遺伝子, NF κ B2)	本田孝行	竹下敏一 駒津光久
岡村卓磨 (内科学(2))	甲第1012号	27. 3.31	Superficially located enlarged lymphoid follicles characterise nodular gastritis (表在性腫大リンパ濾胞は鳥肌胃炎の特徴である)	中山 淳	佐々木克典 森泉哲次
小口智彦 (泌尿器科学)	甲第1013号	27. 3.31	Effect of herpes simplex virus vector-mediated interleukin-4 gene therapy on bladder overactivity and nociception (単純ヘルペスウイルスベクターを用いた IL-4遺伝子治療における排尿筋過活動と疼痛への効果)	石塚 修	菅野祐幸 本田孝行
松木寛之 (運動機能学 (整形))	甲第1014号	27. 3.31	Elastic modulus of the femoral trochanteric region measured by scanning acoustic microscopy in elderly women (超音波顕微鏡を用いて測定した高齢女性の大腿骨転子部における弾性率)	佐々木克典	角谷 眞澄 樋口京一
山岸貴裕 (泌尿器科学)	甲第1015号	27. 3.31	Alpha ₁ -Adrenergic Receptors Mediate Bladder Overactivity Induced by Cold Stress in Rats with Bladder Outlet Obstruction (下部尿路閉塞モデルラットの冷えストレス誘発排尿筋過活動における α_1 受容体の機能的役割の考察)	田中榮司	花岡正幸 大森 栄
竹内大輔 (外科学(1))	甲第1016号	27. 3.31	Relationships of obesity and diabetes mellitus to other primary cancers in surgically treated gastric cancer patients (胃癌切除症例における, 肥満もしくは糖尿病と, 他臓器重複癌との関連性)	伊藤研一	田中榮司 塩沢丹里
三枝達也 (臓器発生 制御医学 (循環器 病態学))	甲第1017号	26. 3.31	Low levels of high-density lipoprotein cholesterol predict the presence of coronary artery disease in patients with aortic aneurysms (大動脈瘤患者において低 HDL コレステロールは冠動脈疾患の合併予測因子である)	駒津光久	今村 浩 岡田健次

審査学位論文要旨

木村岳史 (代謝制御学 (加生))	甲第1018号	26. 3.31	Steatogenesis in adult-onset type II citrullinemia is associated with down-regulation of PPAR α (成人発症II型シトルリン血症における脂肪肝は PPAR α の発現低下に由来する)	小池健一	小泉知展 佐々木克典
趙麗穎 (神経可 塑性学)	甲第1019号	26. 3.31	Detergent-dependent separation of post-synaptic density, membrane rafts and other subsynaptic structures from the synaptic plasma membrane of rat forebrain (シナプス後肥厚部, 膜ラフト及び他のシナプス内構造の分離・精製過程の系統的解析)	田渕克彦	天野直二 樋口京一
石井宏明 (加齢病態 制御学 (老医))	甲第1020号	26. 3.31	The ratio of plasma aldosterone concentration to potassium in adrenocorticotropin stimulation test is a possible new index for diagnosis of aldosterone-producing adenoma in patients with primary aldosteronism (原発性アルドステロン症患者において, ACTH 負荷試験による血漿アルドステロン値/血清カリウム値比がアルドステロン産生腺腫の診断に有用な可能性がある)	池田宇一	角谷眞澄 石塚修
村杉謙次 (精神医学)	甲第1021号	27. 3.31	The Development and Trial of a Medication Discontinuation Program in the Department of Forensic Psychiatry (医療観察法病棟における服薬中断プログラムの開発と試用に関する研究)	天野直二	野見山哲生 浅村英樹
堀内俊道 (内科学(1))	甲第1022号	27. 3.31	Gene-gene interaction between EPAS1 and EGLN1 in patients with high-altitude pulmonary edema (高地性肺水腫患者におけるEPAS1とEGLN1の遺伝子相互関係)	浅村英樹	今村浩 小泉知展
鳥山佑一 (循環病態学 (発生再生 医学))	甲第1023号	27. 3.31	Pathophysiological function of endogenous calcitonin gene-related peptide in ocular vascular diseases (眼内血管関連疾患における内因性カルシトニン遺伝子関連ペプチドの病態生理的作用)	菅野祐幸	田渕克彦 多田剛
平千明 (病態解析 診断学)	甲第1024号	26. 3.31	Rapid single nucleotide polymorphism based method for hematopoietic chimerism analysis and monitoring using high-speed droplet-allele-specific PCR and allele-specific quantitative PCR (液滴型塩基特異的高速 PCR および塩基特異的定量 PCR を用いた造血幹細胞移植における一塩基多型を使用したキメリズム解析)	菅野祐幸	栗田浩 多田剛

審査学位論文要旨

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
滝沢 章 (保険学専攻 医療生命 化学分野 医療生命 科学領域)	甲第10号	27. 3.20	Role of the Programmed Death-1 (PD-1) pathway in regulation of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease (タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス誘導による免疫性脱髄疾患におけるPD-1 pathway を介した炎症制御機構)	相良 淳二	市川 元基 高 昌星

The Traditional Japanese Medicine (Kampo) Boiogito has a Dual Benefit in Cardiorenal Syndrome : A Pilot Observational Study (和漢医薬 (漢方薬) 防己黄耆湯は心腎症候群の両面への効果を有する : 試験的観察研究)

Gautam Milan

(論文の内容の要旨)

【Introduction】 Cardiorenal syndrome (CRS), a concomitant status of cardiac and renal insufficiency is evolving ; however, the consensus to the appropriate management of CRS has not been achieved. This prospective observational study explored a new approach utilizing Boiogito (TJ-20), a traditional Japanese medicine (Kampo), in combination with standard treatment for patients with CRS.

【Methods】 We enrolled patients with chronic heart failure (CHF): New York Heart Association (NYHA) functional class I-III, Stage B or Stage C heart failure, along with renal insufficiency (estimated glomerular filtration rate, eGFR < 65 mL•min⁻¹•1.73 m⁻²). TJ-20 treatment was started at the dose of 2.5 g, 5.0 g, or 7.5 g per day on each patient's standard medications and the dose of TJ-20 was modified within the standard dose according to the patient's acceptance and adherence. To evaluate TJ-20 effects on renal function and heart failure status, laboratory parameters were averaged from 2-3 outpatient visits for each 3 points as follows: 1) before initiation of the treatment (3±1.8 months), and followed at mean intervals of 2) 3.5±1.8 and 3) 9.4±2.3 months after starting the treatment.

【Results】 In total, 26 patients (18 men ; mean age, 77±8.4 years) were studied. TJ-20 treatment was

started at the average dose of 4.6±1.5 g/day, which was increased to 5.2±1.2 g/day at 3.5 months and to 5.9±1.5 g/day at 9.4 months. Mean eGFR levels were significantly increased from 40.02±10.54 to 44.60±10.76 at 3.5 months (P=0.001), and to 45.93±11.57 at 9.4 months (P=0.0004). Brain natriuretic peptide (BNP) levels declined significantly from 241.5 ± 196.6 to 195.5±145.7 pg/mL at 3.5 months (P=0.008), and to 163.3±130.2 pg/mL at 9.4 months (P=0.007). Statistically significant improvement in the NYHA functional class was observed after TJ-20 treatment (P=0.019). The increase in eGFR had no correlation with the decrease in BNP level, indicating independent effects on both renal function and heart failure status.

【Discussion】 Our study demonstrates that addition of TJ-20 on standard treatment improved renal function, decreased BNP levels, and improved NYHA functional class from the baseline. No significant adverse events were observed that resulted in discontinuation of TJ-20 treatment at the end of our study.

Standard treatment for CRS with diuretics and inotropes are frequently associated with drug resistance and limited clinical success. Therefore, alternative therapeutic approaches are of major clinical importance. It is widely known that many heart

failure medications may also worsen renal function. As a result, it is difficult to maintain optimal fluid balance in CHF patients, while preserving renal function. Importantly, patients with renal dysfunction are often excluded from clinical heart failure trials; therefore, evidence based therapies for CRS patients are lacking.

Interesting fluid control effect of TJ-20 has been described previously. TJ-20 elicits moderate diuretic effects in patients with excess body water but not in euvoletic patients. Therefore, addition of TJ-20 has the potential to optimize diuresis and prevent renal dysfunction. In this study, we propose that the moderate diuretic effects of TJ-20 adding on standard treatment for heart failure may benefit CRS patients, who require maintaining optimal fluid balance.

Furthermore, we measured changes in eGFR and BNP levels at baseline, 3.5 and 9.4 months between patients with and without receiving angiotensin II receptor blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, β -blockers, or diuretics to determine effects of these background treatment agents on eGFR and BNP levels. No significant changes in eGFR and BNP levels were observed, in the presence or absence of these background agents. These results suggest that addition of TJ-20 on standard medication benefited both renal function and heart failure status in CRS patients.

In conclusion, the observations of this study, utilizing traditional Japanese medicine (TJ-20), may provide a novel and useful strategy for the difficult management of CRS patients.

(論文審査の結果の要旨)

In this study, we have reported the findings of a preliminary observational study that evaluated the effects of Boiogito in combination with the standard treatment for chronic heart failure (CHF) in patients with CRS. We enrolled 26 patients (77 ± 8.5 years, 18 males) with CHF: New York Heart Association (NYHA) functional class I-III, Stage B or Stage C heart failure, along with renal insufficiency (estimated glomerular filtration rate, $eGFR < 65 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73 \text{ m}^{-2}$). The conventional

dose of Boiogito (2.5 g, 5.0 g, or 7.5 g per day), added on standard medications of each patient was determined according to the patient's acceptance and adherence to the treatment. To evaluate Boiogito's effects on renal function and heart failure status, laboratory parameters were averaged from 2-3 outpatient visits for each 3 points as follows: 1) before initiation of the treatment (baseline), and followed at mean intervals of 2) 3.5 and 3) 9.4 months after starting the treatment.

Results from our study:

1. Boiogito treatment significantly improved mean eGFR levels from 40.02 ± 10.54 to 44.60 ± 10.76 at 3.5 months ($P=0.001$), and to 45.93 ± 11.57 at 9.4 months ($P=0.0004$): and sCr and BUN levels decreased significantly ($P < 0.05$).
2. There were no significant interval changes observed in levels of serum sodium, chloride, or potassium in patients treated with Boiogito ($P > 0.05$).
3. BNP levels (pg/mL) declined significantly with Boiogito treatment from 241.5 ± 196.6 to 195.5 ± 145.7 at 3.5 months ($P=0.008$), and to 163.3 ± 130.2 at 9.4 months ($P=0.007$). Six out of 26 patients (23%) demonstrated improvement in NYHA functional class ($P=0.019$) from the baseline.
4. There were no significant correlations between the changes in eGFR and BNP levels after Boiogito treatment at both 3.5 and 9.4 months ($P > 0.05$), suggesting that the decrease in BNP levels could be distinct from the increase in eGFR levels.
5. No significant changes in eGFR and BNP levels in the presence or absence of background treatment agents (angiotensin II receptor blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, β -blockers, or diuretics) were observed at 3.5 and 9.4 months ($P > 0.05$).
6. No significant adverse events were observed that resulted in discontinuation of Boiogito treatment at the end of the study.

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Platelet Function during Cardiopulmonary Bypass using Multiple Electrode Aggregometry : Comparison of Centrifugal and Roller Pumps (Multiple Electrode Aggregometry を用いた人工心肺中の血小板機能の検討：遠心ポンプとローラーポンプの比較)

毛 原 啓

(論文の内容の要旨)

【背景】体外循環において遠心ポンプはローラーポンプと比べ血球成分の破壊が少ないと言われているが、血小板機能について検討した報告は少ない。Multiple electrode aggregometry (MEA) は全血での血小板凝集能検査で、人工心肺下での血小板機能の検討に用いられてきている。今回我々はブタを用いて、遠心ポンプとローラーポンプの2群間で体外循環における血小板機能をMEAにより検討した。

【方法】生後約2カ月、体重約50kgのWhite-Landrace×Durocブタ5匹に遠心ポンプ(CP group)、5匹にローラーポンプ(RP group)を送血ポンプとした人工心肺を装着した。遠心ポンプにはGyro pump (Medtronic Japan)、ローラーポンプはHeart Assist System (泉工医科工業)、人工肺はAffinity (Medtronic Japan)を使用した。人工心肺は流量2l/minで3時間駆動し、人工心肺終了後1時間で実験終了とした。MEA、ヘモグロビン(Hb)、血小板数(PLT)は胸骨切開前、ヘパリン注入後、人工心肺開始30分後、人工心肺終了時、プロタミン注入後、人工心肺終了1時間後に測定した。フィブリノーゲン(Fib)、血小板因子4(PF4)、beta-thromboglobulin(beta-TG)は胸骨切開前と人工心肺終了1時間後に測定した。血小板機能測定にはMultiplate® (Dynabyte, Germany)を用い、血小板凝集の試薬にアデノシン二リン酸(ADP test)、アラキドン酸(ASPI test)、Thrombin receptor activation protein(TRAP test)を使用した。

【結果】ADP testでは、人工心肺開始30分後でCP group 55.4 ± 9.6 U ($p=0.019$)、RP group 53.8 ± 17.8 U ($p=0.007$)と両群共に最も低下し、その後人工心肺時間の長さと共に低下し続けることはなかった。ASPI testも同様に人工心肺30分後でCP group 53.6 ± 10.8 U ($p=0.012$)、RP group 56.8 ± 20.9 U ($p=0.016$)と最も低値となった。TRAP testもASPI test、ASPI testと同様な時間経過であったが変化は有意ではなかった。3種類の試薬の全測定ポイントにおいて両群間で有意差を認めなかった。PLTは実験

を通じて両群間で有意差を認めなかった。Fib、PF4、B-TGは人工心肺前後で有意差なく、また両群間においても有意差は認めなかった。Hbは両群で人工心肺終了時から胸骨切開前と比較して有意に低値となった。

【考察】血小板アゴニストとしてADP、アラキドン酸、TRAPを用いたが、活性化にプロテアーゼを介さないADP、アラキドン酸とプロテアーゼを介するTRAPに分けられる。今回、プロテアーゼを介さないADP test、ASPI testで有意差を認めており、この経路が人工心肺中の血小板凝集能低下に関係している可能性がある。

両群において人工心肺開始後30分で血小板凝集能は最も低値となり、その後は改善傾向であった。これより、人工心肺中の血小板凝集能の低下はポンプ開始直後の血液の希釈や異物面との接触が主要な要因であると考えられる。今回同時に施行したHbの推移では同測定ポイントで有意な低下はなく、またHbとMEAの結果に関連性は見いだせなかった。以上より、人工心肺中の血小板凝集能低下には血液希釈よりも異物面との接触が大きく関与していると考えられ、遠心ポンプと人工心肺チューブの原材料であるポリカーボネイト、ポリビニルクロライドが血液との接触により血小板を活性化することが報告されている。

血小板凝集能に遠心ポンプとローラーポンプで有意差を認めなかった。従来両ポンプ間の血小板機能の検討はその多くがCABG症例であり、他の要素(血液リザーバーや吸引回路)の影響を無視することはできない。本症例はブタを用い、送血ポンプ以外の要素はできる限り排除した。現在ヨーロッパでは高価な遠心ポンプの使用は10%のみと言われており、我々の結果もこれを支持する。

【結語】MEAを用いた血小板機能測定では遠心ポンプとローラーポンプ間で有意差を認めなかった。また、人工心肺開始30分後で最も低下し、人工心肺時間とともに低下し続けることはなかった。人工心肺中の血小板機能低下は送血ポンプの種類に関係なく、人工心肺開始直後の異物面との接触の影響が大きいと考えら

れた。

(論文審査の結果の要旨)

体外循環において遠心ポンプはローラーポンプと比べ血球成分の破壊が少ないと言われているが、血小板機能について検討した報告は少ない。Multiple electrode aggregometry (MEA) は全血での血小板凝集能検査で、人工心肺下での血小板機能の検討に用いられてきている。今回我々はブタを用いて、遠心ポンプとローラーポンプの2群間で体外循環における血小板機能を MEA により検討した。

生後約2カ月、体重約50 kg の White-Landrace×Duroc ブタ 5 匹に遠心ポンプ (CP group), 5 匹にローラーポンプ (RP group) を送血ポンプとした人工心肺を装着した。遠心ポンプには Gyro pump (Medtronic Japan), ローラーポンプは Heart Assist System (泉工医科工業), 人工肺は Affinity (Medtronic Japan) を使用した。人工心肺は流量 2 l/min で3時間駆動し、人工心肺終了後1時間で実験終了とした。MEA, ヘモグロビン (Hb), 血小板数 (PLT) は胸骨切開前, ヘパリン注入後, 人工心肺開始30分後, 人工心肺終了時, プロタミン注入後, 人工心肺終了1時

間後に測定した。フィブリノーゲン (Fib), 血小板因子 4 (PF4), beta-thromboglobulin (beta-TG) は胸骨切開前と人工心肺終了1時間後に測定した。血小板機能測定には Multiplate® (Dynabyte, Germany) を用い, 血小板凝集の試薬にアデノシン二リン酸 (ADP test), アラキドン酸 (ASPI test), Thrombin receptor activation protein (TRAP test) を使用した。

その結果, 毛原は次の結論を得た。

1. 遠心ポンプとローラーポンプ間で有意差を認めなかった。
2. 血小板機能は人工心肺開始30分後で最も低下し, 人工心肺時間とともに低下し続けることはなかった。
3. Hb は両群で人工心肺終了時から胸骨切開前と比較して有意に低値となった。

これらの結果より, 人工心肺中の血小板機能低下は送血ポンプの種類に関係なく, 人工心肺開始直後の異物面との接触の影響が大きいと考えられた。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。

Differential effects of angiotensin II receptor blockers on A β generation (アミロイド β 産生におけるアンジオテンシン阻害剤の異なる作用)

劉 俊 俊

(論文の内容の要旨)

【Background and Purpose】 Angiotensin II receptor blockers (ARBs) are widely prescribed for the medication of systemic hypertension and congestive heart failure. It has been reported that ARBs can reduce the risk for the onset of Alzheimer's disease (AD) and have beneficial effects on dementia. Neurotoxic amyloid β -protein (A β) is believed to play a causative role in the development of AD. However, whether ARBs regulate A β generation remains largely unknown. Here, we studied the effect of ARBs on A β generation.

【Materials and Methods】 We infected C57BL/6 mouse embryonic fibroblasts (MEFs) with human 695-amino acid amyloid precursor protein (hAPP695) cDNA by a retrovirus-mediated method to generate constant hAPP695 overexpression fibroblasts (APP fibroblasts). And we treated APP

fibroblasts separately with telmisartan, losartan, valsartan, olmesartan and candesartan for 72 h to determine the effect of ARBs on A β generation. We measured A β 40 and A β 42 levels in the conditioned media by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the A β levels. To investigate whether telmisartan increase A β generation via angiotensin type 1a receptor (AT1a), we isolated *Agtr1a* deficient MEFs from 13.5-day-old embryos of *Agtr1a* deficient mice and infected the MEFs with hAPP695. We treated *Agtr1a* deficient hAPP-expressing MEFs with telmisartan. To explore which pathway telmisartan depends on to increase A β generation, we pre-treated APP fibroblasts with pathway inhibitors and then treated with telmisartan.

【Results】 We found that telmisartan increased A β 40 and A β 42 generation markedly, about 6- and

3.2-fold, respectively, compared to the controls, while olmesartan increased A β 40 generation about 2-fold at the concentration of 5 μ M and A β 42 generation about 3.2-fold at the concentration of 10 μ M. However, losartan, valsartan and candesartan did not show any clear increase in the A β generation. The A β 42/A β 40 ratio in serum increased in familial AD patients and is considered as a causal factor of AD. Among the ARBs examined, telmisartan significantly decreased the A β 42/A β 40 ratio and had the lowest A β 42/A β 40 ratio, whereas, olmesartan had the highest A β 42/A β 40 ratio which was significantly higher than that of telmisartan. Losartan, valsartan and candesartan did not show any clear effect on A β 42/A β 40 ratio. We also found that telmisartan did not increase the A β 40 and A β 42 generation in the AT1a deficient fibroblasts. Administration of the PI3K pathway inhibitor, wortmannin, and γ -secretase inhibitor, DAPT, markedly blocked the increase A β generation by telmisartan.

【Conclusions】 Telmisartan significantly increased A β generation, however, did not increase A β generation in AT1a deficient fibroblasts. And PI3K pathway inhibitor, wortmannin, markedly blocked telmisartan-induced A β generation. These results suggest that telmisartan increased the A β generation through AT1a and the receptor-related PI3K pathway. Our findings revealed the different effects of ARBs on A β generation and provide new evidence for the relationship between antihypertensive treatment and AD pathogenesis.

(論文審査の結果の要旨)

Angiotensin II receptor blockers (ARBs) are widely prescribed for the medication of systemic hypertension and congestive heart failure. It has been reported that ARBs can reduce the risk for the onset of Alzheimer's disease (AD) and have beneficial effects on dementia. Neurotoxic amyloid β -protein (A β) is believed to play a causative role in the development of AD. However, whether ARBs regulate A β generation remains largely unknown. Here, we studied the effect of ARBs on A β generation.

We infected C57BL/6 mouse embryonic fibroblasts (MEFs) with human 695-amino acid amyloid precursor protein (hAPP695) cDNA by a retrovirus-mediated method to generate constant hAPP695 overexpression fibroblasts (APP fibroblasts). And we treated APP fibroblasts separately with telmisartan, losartan, valsartan, olmesartan and candesartan for 72 h to determine the effect of ARBs on A β generation. We measured A β 40 and A β 42 levels in the conditioned media by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the A β levels. To investigate whether telmisartan increase A β generation via angiotensin type 1a receptor (AT1a), we isolated *Agtr1a* deficient MEFs from 13.5-day-old embryos of *Agtr1a* deficient mice and infected the MEFs with hAPP695. We treated *Agtr1a* deficient hAPP-expressing MEFs with telmisartan. To explore which pathway telmisartan depends on to increase A β generation, we pre-treated APP fibroblasts with pathway inhibitors and then treated with telmisartan.

Results :

1. We found that telmisartan increased A β 40 and A β 42 generation markedly, about 6- and 3.2-fold, respectively, compared to the controls, while olmesartan increased A β 40 generation about 2-fold at the concentration of 5 μ M and A β 42 generation about 3.2-fold at the concentration of 10 μ M. However, losartan, valsartan and candesartan did not show any clear increase in the A β generation.
2. Among the ARBs examined, telmisartan significantly decreased the A β 42/A β 40 ratio and had the lowest A β 42/A β 40 ratio, whereas, olmesartan had the highest A β 42/A β 40 ratio which was significantly higher than that of telmisartan. Losartan, valsartan and candesartan did not show any clear effect on A β 42/A β 40 ratio.
3. We also found that telmisartan did not increase the A β 40 and A β 42 generation in the AT1a deficient fibroblasts.
4. Administration of the PI3K pathway inhibitor, wortmannin, and γ -secretase inhibitor, DAPT, markedly blocked the increase A β generation by

telmisartan.

These results suggest that telmisartan increased the $A\beta$ generation through AT1a and the receptor-related PI3K pathway. Because telmisartan decreased the $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ratio, which is considered as a causal factor of AD, it is reasonable to deduce the neuroprotective effect of telmisartan. Our

findings revealed the different effects of ARBs on $A\beta$ generation and provide new evidence for the relationship between antihypertensive treatment and AD pathogenesis.

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。

Conversion of $A\beta_{43}$ to $A\beta_{40}$ by the successive action of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-converting enzyme (アンギオテンシン変換酵素 II (ACE2) およびアンギオテンシン変換酵素 (ACE) による $A\beta_{43}$ から $A\beta_{40}$ への変換機構解析)

劉 姝 余

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 The longer and neurotoxic species of amyloid- β protein ($A\beta$), $A\beta_{42}$ and $A\beta_{43}$, contribute to $A\beta$ accumulation in Alzheimer's disease (AD) pathogenesis and are considered to be the primary cause of the disease. In contrast, the predominant secreted form of $A\beta$, $A\beta_{40}$, inhibits amyloid deposition and may have neuroprotective effects. We have reported that $A\beta_{43}$ is the earliest-depositing $A\beta$ species in the amyloid precursor protein transgenic mouse brain. Here, we studied whether there are enzymes converting $A\beta_{43}$ to $A\beta_{42}$ and converting $A\beta_{43}$ to $A\beta_{40}$.

【材料と方法】 C57BL/6J mouse brain and other tissues were homogenized in an equal volume (w/v) of lysis buffer and centrifuged. The supernatants were then collected to examine angiotensin converting enzyme (ACE) 2 activity, and then to examine the protein expression of ACE2 by Western blot and immunostaining. ACE2 activity was measured by an ACE2 activity assay kit, using Mc-Ala/Dnp fluorescence resonance energy transfer peptide. Converted $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ from $A\beta_{43}$ were analyzed by Western bolt. The primary antibodies were anti-human amyloid β (35-40) mouse monoclonal IgG, anti-human amyloid β (1-42) rabbit polyclonal IgG and anti-human amyloid β (1-43) rabbit polyclonal IgG. Angiotensin II levels in human serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

【結果】 $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ were generated from the

mixture of $A\beta_{43}$ and mouse brain lysate in a time dependent manner. The generation of converted $A\beta_{42}$ was inhibited by EDTA and an ACE2 specific inhibitor, DX600. Furthermore, the combination of ACE2 and ACE converts $A\beta_{43}$ to $A\beta_{40}$. Notably, ACE2 activity showed a tendency to decrease in the serum of AD patients compared with normal control.

【結論】 We found that ACE2 converts $A\beta_{43}$ to $A\beta_{42}$, and this activity is inhibited by DX600. Combination of ACE2 and ACE converts $A\beta_{43}$ to $A\beta_{40}$, suggesting a successive conversion of $A\beta_{43}$ to $A\beta_{40}$. ACE2 activity showed a tendency to decrease in the serum of AD patients compared with normal control, suggesting an association between lower ACE2 activity and AD. Therefore, maintaining ACE2 and ACE activities in the brain could act as a protective and defensive mechanism in the initial stages of AD to limit its pathological development.

(論文審査の結果の要旨)

The longer and neurotoxic species of amyloid- β protein ($A\beta$), $A\beta_{42}$ and $A\beta_{43}$, contribute to $A\beta$ accumulation in Alzheimer's disease (AD) pathogenesis and are considered to be the primary cause of the disease. In contrast, the predominant secreted form of $A\beta$, $A\beta_{40}$, inhibits amyloid deposition and may have neuroprotective effects. Previous study has reported that $A\beta_{43}$ is the earliest-depositing $A\beta$ species in the amyloid precursor protein transgenic mouse brain. The purpose is to study whether there are enzymes converting $A\beta_{43}$ to $A\beta_{42}$ and

converting A β 43 to A β 40.

C57BL/6J mouse brain and other tissues were homogenized in an equal volume (w/v) of lysis buffer and centrifuged. The supernatants were then collected to examine ACE2 activity, and then to examine the protein expression of ACE2 by Western blot and immunostaining. ACE2 activity was measured by an ACE2 activity assay kit, using Mc-Ala/Dnp fluorescence resonance energy transfer peptide. Converted A β 40 and A β 42 from A β 43 were analyzed by Western bolt. The primary antibodies were anti-human amyloid β (35-40) mouse monoclonal IgG, anti-human amyloid β (1-42) rabbit polyclonal IgG and anti-human amyloid β (1-43) rabbit polyclonal IgG. Angiotensin II levels in human serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Summarizing the present results, Shuyu Liu obtained four conclusions as follows :

- A β 40 and A β 42 were generated from the mixture of A β 43 and mouse brain lysate in a time dependent manner.

- The generation of converted A β 42 was inhibited by EDTA and an ACE2 specific inhibitor, DX600.
- A β 43 was converted to A β 40 by the combination of ACE2 and ACE.
- ACE2 activity showed a tendency to decrease in the serum of AD patients compared with normal control.

The present data show that ACE2 converts A β 43 to A β 42, and this activity is inhibited by DX600. Combination of ACE2 and ACE converts A β 43 to A β 40, suggesting a successive conversion of A β 43 to A β 40. ACE2 activity showed a tendency to decrease in the serum of AD patients compared with normal control, suggesting an association between lower ACE2 activity and AD. Therefore, maintaining ACE2 and ACE activities in the brain could act as a protective and defensive mechanism in the initial stages of AD to limit its pathological development.

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。

Dermoscopic features of nonpigmented eccrine poromas in association with their histopathological features (無色素性エクリン汗孔腫のダーモスコピー像と関連する病理組織像)

皆 川 茜

(論文の内容の要旨)

【背景】エクリン汗孔腫は、汗管への分化を示す皮膚付属器系良性腫瘍である。掌蹠に好発し、臨床的には広基性から有茎性の紅色結節としてみられることが多い。そのため、無色素性悪性黒色腫や脂漏性角化症、基底細胞癌など多くの疾患との鑑別を要する。近年、皮膚科領域ではダーモスコピーという、偏光フィルターやエコージェルなどで角層の乱反射を除き皮膚病変を拡大して観察する診断方法が普及している。ダーモスコブを用いると肉眼では観察しえなかった微細な血管構造やメラニンの分布様式などを検出することができ、その中のいくつかは疾患特異的な所見として診断に役立っている。しかし、エクリン汗孔腫のダーモスコピー所見については十分に解明されておらず、診断確定のためには皮膚生検が欠かせない。

【目的】エクリン汗孔腫に特徴的なダーモスコピー所見を解析し、さらに病理組織像との関連を検討する。

【方法】過去に当科で病理組織学的にエクリン汗孔腫と診断された10症例について、既知のダーモスコピー所見を調べた。ダーモスコピー及び病理組織像が典型的であった1症例の検体を用いて水平断切片を作成し、ダーモスコピー像と病理組織像との対比を行った。

【結果】症例は男8女2、平均年齢は56.3歳であった。病変部位は足5、下腿3、手1、背部1であった。10例中5例で血管所見を認めた。内訳はヘアピン血管と点状血管の組み合わせ2、ヘアピン血管と点状血管と線状不規則血管の組み合わせ1、線状不規則血管1、ヘアピン血管1であった。面皰様開大、稗粒腫様囊腫、脳回転様外観、潰瘍はそれぞれ1例で見られた。また、エクリン汗孔腫に特徴的なダーモスコピー所見を10例中9例で見出した。紅色胞巣が網ひも状の構造で区切られる所見であることから、「カエルの卵様」外観と名付けた。このダーモスコピー所見は病変の頂点から300-400 μ mの深さで作成した水平断の病理組織像に

よく相関していた。すなわち、ひも状に配列した腫瘍細胞によって囲まれた浮腫状の間質が島状に規則正しく配列する病理組織像が認められた。間質内には多くの拡張した毛細血管が含まれていた。

【考察】エクリン汗孔腫では血管所見を認める症例が少なくない。特に線状不規則血管などの多形血管である場合は、ダーモスコピーの血管所見のみでエクリン汗孔腫と無色素性悪性黒色腫を鑑別することは困難である。「カエルの卵様」外観は多くのエクリン汗孔腫で観察されるダーモスコピー所見であり、病理組織学的にはひも状に配列する腫瘍細胞とそれによって囲まれた毛細血管を含む真皮の間質である。悪性黒色腫に特徴的な所見である乳白紅色領域とは、胞巣の境界が明瞭で病変内に広く分布する点で区別できる。脂漏性角化症はヘアピン血管、面疱様開大、稗粒腫様嚢腫が特徴的である。脂漏性角化症におけるヘアピン血管は病変の辺縁に分布する傾向がある一方、エクリン汗孔腫では病変の随所に観察される点で異なる。基底細胞癌では樹枝状血管が特徴的であるが、今回検討したエクリン汗孔腫症例では1例も認められず、ダーモスコピーによる鑑別は可能であった。

【結論】多形血管を含む血管所見と「カエルの卵様」外観は、無色素性エクリン汗孔腫の診断において重要なダーモスコピー所見である。所見の感度特異度については今後の症例蓄積が待たれる。

(論文審査の結果の要旨)

皮膚には様々な腫瘍が発生する。色素を持たない紅色結節では、無色素性メラノーマやエクリン汗孔腫を含むさまざまな疾患が鑑別に挙げられるが、確定診断のために生検を行って病理組織学的検査を要する場合がある。近年、皮膚科領域ではダーモスコピーという、皮膚を拡大して観察する検査法が普及している。この検査法を用いることで生検を行う前に、より診断を絞り込むことが可能となってきた。しかし、無色素性エクリン汗孔腫のダーモスコピー所見についての報告は少ない。今回、無色素性メラノーマとの鑑別が難しい

無色素性エクリン汗孔腫についてそのダーモスコピー所見を調べ、ダーモスコピー所見と病理組織像の関連を検討した。

メラノサイト系病変、皮膚線維腫、基底細胞癌、脂漏性角化症、血管腫、非メラノサイト系病変においてこれまでに報告されてきた疾患特異的なダーモスコピー所見が、無色素性エクリン汗孔腫において認められるか、10症例を用いて検討を行った。さらに、無色素性エクリン汗孔腫に特徴的であると私が考えたダーモスコピー所見に関して、1例の病理組織で水平切片を作成して特殊染色を行い、ダーモスコピー所見と病理組織像との関連を検討した。

その結果、皆川茜は以下の結論を得た。

1. 無色素性エクリン汗孔腫のダーモスコピー所見について、メラノサイト系病変、基底細胞癌、皮膚線維腫、血管腫に特異的な所見はなかった。10例中3例で脂漏性角化症に特異的な所見を認めた。10例中5例に無色素性メラノーマと共通の血管所見があった。
2. 無色素性エクリン汗孔腫10例中9例に特徴的なダーモスコピー所見(乳白色調の粗大網目状構造と紅色胞巣状構造)を見出した。
3. 無色素性エクリン汗孔腫のダーモスコピーで見られる乳白色調の粗大網目状構造は腫瘍に置換された表皮に相当し、紅色胞巣状構造は拡張した毛細血管を多数含む浮腫性の間質に相当することが、病理組織の水平切片の検討から明らかとなった。

以上の結果より、無色素性エクリン汗孔腫のダーモスコピー所見において血管所見、さらに乳白色調の粗大網目状構造と紅色胞巣状構造は、診断を進める上で重要な所見であると判断しえた。紅色結節を呈する皮膚腫瘍のダーモスコピー診断において、無色素性エクリン汗孔腫を無色素性メラノーマと鑑別する際に、一助になると思われる。そこで主査、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。

Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ β -catenin signaling during osteoblastogenesis (骨芽細胞分化において、非古典的 Wnt リガンドである Wnt5a は Wnt/ β -catenin 経路を促進する)

岡 本 正 則

(論文の内容の要旨)

【研究の背景】Wnt は分子量約 4 万の分泌性糖蛋白質で、哺乳類では19種類が同定されている。Wnt は初

期の発生や器官形成、細胞増殖や分化などを制御する。Wnt シグナルには、 β カテニンを介する古典経路とそれを介さない非古典経路とが存在する。Wnt3a な

どの古典的 Wnt が受容体 Frizzled と共受容体 Low-density lipoprotein receptor-related protein (Lrp) 5/6の複合体に結合すると、 β カテニンが細胞内に蓄積する。その後核内に移行した β カテニンは、転写因子 T cell factor (Tcf)/lymphoid enhancer factor (Lef) とともに、標的遺伝子の発現を促進する。

骨芽細胞分化においては古典経路により Runx2の発現が促進され、骨芽細胞分化が促進し、脂肪細胞分化を抑制する。一方、非古典経路を活性化する Wnt5a は、脂肪細胞への分化を促進する Ppar γ の機能を抑制することで、脂肪細胞分化を抑制し、その結果骨芽細胞分化を促進する。これらの結果は両経路が協調し、骨芽細胞の分化を調節することを示唆する。しかし、両経路がどのように協調して骨芽細胞分化を調節するかは明らかでない。そこで本研究では、骨芽細胞分化における Wnt5a の古典経路への作用に着目し検討した。

【方法・結果】 ST2細胞を Wnt3a で刺激すると、古典経路活性を示す Tcf/Lef 転写活性が上昇するが、Wnt5a による刺激では変化がみられなかった。しかし ST2細胞を Wnt5a で前処理した後に Wnt3a で刺激すると、Wnt3a 単独刺激と比べ、Tcf/Lef 転写活性、細胞内 β カテニンの蛋白量はさらに上昇した。この結果から、Wnt5a が古典経路を促進する可能性が示唆された。

野生型マウスの頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞 (WT-POB) を石灰化培地で培養し、Wnt リガンドと受容体の発現を解析した。Wnt5a や Wnt10b の発現上昇とともに、Lrp5/6の発現は骨芽細胞分化に伴い経時的に増加した。このことは Wnt シグナルそのものが Lrp5/6の発現を制御する可能性を示唆した。しかし、古典経路特異的な阻害分子である Dkk1は Lrp5/6の発現を抑制しなかった。また、shRNA を用い Wnt5a を knockdown すると、Lrp5/6の発現が低下した。これらの結果は、Wnt5a が Lrp5/6の発現を誘導することを示唆した。

Wnt5a による Lrp5/6の発現誘導を確認するため、Wnt5a欠損マウス由来の骨芽細胞様細胞 (Wnt5aKO-POB) の解析を行った。WT-POB に比べ、Wnt5aKO-POB では、Lrp5/6の発現が有意に低く、アルカリフォスファターゼ活性、石灰化能も低下した。また、転写因子 Sp7の発現が低く、古典経路の標的遺伝子である Axin2の発現、Tcf/Lef 転写活性、細胞内の β カテニンレベルも低下した。そして Wnt5a 欠損

マウスの骨組織における、 β カテニンレベルも低下した。

次に外因性 Wnt5a の作用を検討した。Wnt5a 存在下で Wnt5aKO-POB を培養すると、低下した Lrp5/6の発現が増加し、Tcf/Lef 転写活性および石灰化能が回復した。

Lrp5の発現効果を検討するため、Wnt5aKO-POB に Lrp5を過剰発現すると、低下した Tcf/Lef 転写活性および石灰化能が回復した。また、Wnt5aKO-POB では脂肪細胞への分化が促進するが、Wnt5aKO-POB に Lrp5を過剰発現させると、その脂肪細胞分化は抑制された。

Lrp5/6のプロモーター解析を行い、Lrp5/6に共通する領域として Sp1結合サイトに着目した。Sp1結合サイトには、Sp7も結合することが報告されている。また、Wnt5aKO-POB では Sp7の発現は有意に低下する。このことは Sp7が Lrp5/6の発現を誘導することを示唆した。Wnt5a は BMP2と協調して、Sp7の発現を誘導した。そして Sp7を過剰発現すると、Lrp5の発現が上昇した。Wnt5a のシグナルには共受容体である Ror2が関与することが多く報告されているが、Ror2欠損マウス由来の骨芽細胞では Lrp5/6の発現に変化を認めなかった。

【考察・結論】 Wnt5a は Hela 細胞や HEK293細胞において、Wnt3a と Frizzledの結合に競合し古典経路を抑制する。また、Wnt5a は Ca²⁺経路を介して Tcf/Lef 転写活性を抑制することが報告されている。しかし骨芽細胞分化においては、Wnt5a は Sp7の発現を誘導し、Lrp5/6の発現を促進した。そしてその結果、古典経路による骨芽細胞分化を促進することが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

Wnt は初期の発生や形態形成、細胞の増殖・分化を制御する。Wnt 経路には β カテニンを介する古典的経路と、それを介さない非古典的経路とが存在する。両経路はそれぞれ骨芽細胞分化を促進するが、骨芽細胞分化における両経路の相互作用に関する報告は少ない。今回、岡本らは非古典的 Wnt リガンドの Wnt5a の古典的経路に対する作用に着目し解析を行った。

マウスは C57BL/6野生型マウスの他に Wnt5a 欠損 (Wnt5aKO) マウスと Ror2欠損 (Ror2KO) マウスを用いた。両マウスは胎生致死のため胎児頭蓋冠から骨芽細胞様細胞を採取し、ex vivo の実験に用いた。

その結果、岡本らは次の結論を得た。

1. 野生型マウス由来の骨芽細胞を石灰化培地で培養していくと、古典的経路の共受容体である Lrp5/6 の発現は、Wnt5a と Wnt10b とともに、経時的に上昇した。
2. 古典的経路特異的な阻害因子は、Lrp5/6 の発現を抑制しなかった。しかし、Wnt5a のノックダウンは Lrp5/6 の発現を抑制した。
3. Wnt5aKO 骨芽細胞では Lrp5/6 の発現および石灰化能が低下した。また Runx2 や Sp7 の発現も低下していた。そして古典的経路の活性を示す TCF/LEF 活性が低下した。
4. Wnt5aKO マウスの骨組織では、古典的経路の活性を示す β カテニンレベルが低下した。
5. Wnt5aKO 骨芽細胞に外因性の Wnt5a を添加すると、Lrp5/6 の発現、TCF/LEF 活性、および石灰化能が回復した。

6. Wnt5aKO 骨芽細胞に Lrp5 を過剰発現させると、TCF/LEF 活性および石灰化能が回復した。また脂肪細胞分化が抑制された。
7. Lrp5/6 のプロモーター解析を行った。Wnt5a は Sp7 の発現を誘導し、Sp7 は Lrp5/6 の Sp1 binding site に結合した。Sp7 の過剰発現により、Lrp5 の発現は促進した。
8. Ror2KO 骨芽細胞では、Lrp5/6 の発現に変化は認めなかった。

これまでの報告から Wnt5a は古典的経路に対し抑制的に作用することが知られていた。しかし今回の結果より、Wnt5a は骨芽細胞においては Lrp5/6 の発現を誘導することで、古典的 Wnt 経路による骨芽細胞分化を促進する作用も持つことが示唆された。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Corpus Callosum Atrophy in Patients with Hereditary Diffuse Leukoencephalopathy with Neuroaxonal Spheroids : An MRI-based Study (神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症における脳梁萎縮に関する画像的検討)

木 下 通 亨

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症 (HDLS : hereditary diffuse leukoencephalopathy with neuroaxonal spheroids) は、成人期に発症し、認知機能低下、精神症状、運動障害、痙攣発作を呈する大脳白質疾患である。常染色体優性遺伝形式をとり、colony stimulating factor-1 受容体遺伝子 (CSF1R) 変異が原因である。HDLS は、MRI で大脳白質病変・大脳萎縮を呈し、脳血管性認知症、遺伝性脳小血管病、前頭側頭型認知症、多発性硬化症などの様々な神経疾患との鑑別が問題となる。また、HDLS においては脳梁も病変好発部位であり、神経病理学的にも高度の萎縮を呈することが報告されている。

本研究では、HDLS 患者の脳 MRI における脳梁萎縮に関して、より詳細な定量的評価を行い、HDLS の早期診断、鑑別診断における有用性を検討した。

【対象と方法】6 例の HDLS 患者 (男性 4 例、女性 2 例、年齢 29-57 歳、平均 47.3 ± 9.3 歳 : HDLS 群) 10 画像、対照として、20 例の脳血管性認知症患者 (男性 11 例、女性 9 例、年齢 42-79 歳、平均 68.5 ± 7.9 歳 : 脳血管性認知症群) 20 画像、HDLS 群と年齢を対応さ

せた 24 例の器質的中枢神経疾患を伴わない患者 (男性 15 例、女性 9 例、年齢 29-73 歳、平均 49.9 歳 ± 13.8 歳 : 非中枢神経疾患群) 24 画像について検討した。

HDLS 群は、いずれも CSF1R 遺伝子解析により変異が確定された患者を選択した。脳血管性認知症群は、National Institute for Neurological Disorders and Stroke-Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (NINDS-AIREN) による脳血管性認知症の基準をみたす患者のうち、80 歳以下、家族歴のないものを選択した。HDLS 群および脳血管性認知症群における MRI 撮影時点での臨床病期を modified Rankin Scale (mRS) で評価した。

また、T1 強調画像正中矢状断で、picture archiving and communication system (PACS) workstation の計測ツールを用いて、画面上で、脳梁吻部、脳梁体部、脳梁傍大部、脳梁前後径、脳梁高の各径を計測し、(脳梁吻部 + 脳梁体部 + 脳梁傍大部) / 脳梁前後径 = 脳梁萎縮指標 (CCI : corpus callosum index) として算出した。他に、脳梁体部 (B : body) / 脳梁高 (H : Height) = B/H、脳梁体部 (B) / 脳梁前後径 (L : Length) = B/L を指標として算出した。計測に際しては、1 名の著者

と、年齢・性別、診断名、臨床に関する情報を与えられていない2名の測定者が、それぞれ1回、独立して行った。HDLS群と各対照群の各指標を、Mann-WhitneyのU検定により統計学的に比較した。

【結果】HDLS群では全例で前頭葉・側頭葉の白質病変、脳梁病変を認めた。HDLS群のCCI (0.210 ± 0.050)は、脳血管性認知症群 (0.289 ± 0.050 , $p < 0.01$), 年齢を対応させた非中枢性神経疾患群 (0.371 ± 0.056 , $p < 0.01$)と比較して有意な低下を認めた。HDLS群のB/H (0.093 ± 0.024)は、脳血管性認知症群 (0.169 ± 0.039 , $p < 0.01$), 年齢を対応させた非中枢性神経疾患群 (0.208 ± 0.039 , $p < 0.01$)と比較して有意な低下を認めた。また、HDLS群のB/L (0.040 ± 0.009)は、脳血管性認知症群 (0.065 ± 0.011 , $p < 0.01$), 年齢を対応させた非中枢性神経疾患群 (0.079 ± 0.014 , $p < 0.01$)と比較して有意な低下を認めた。mRSは脳血管性認知症群 (2.75 ± 0.89)とHDLS群 (3.30 ± 1.10)との間で差はなかった。

【考察・結論】本研究は、HDLS患者では発症から6-36カ月の病初期においてもMRI画像にて明らかな脳梁萎縮が見られることを示した。HDLSは、大脳白質病変を呈する他の疾患、特に脳血管性認知症とは臨床的・画像的に鑑別が困難であるが、臨床的に同程度の重症度であってもHDLSでは脳梁萎縮が有意に強いことが示唆された。MR矢状断画像にて、早期から出現する脳梁萎縮に留意することは、HDLSを診断する重要な手がかりになると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症 (HDLS: hereditary diffuse leukoencephalopathy with neuroaxonal spheroids) は、MRIで大脳白質病変を呈し、脳血管性認知症等との鑑別が問題となる。HDLSにおいては、脳梁も病変好発部位であり、神

経病理学的にも高度の萎縮を呈する。本研究では、HDLS患者の脳MRIにおける脳梁萎縮に関して、定量的評価を行い、HDLSの早期診断、鑑別診断における有用性を検討した。

6例のHDLS患者 (男性4例, 女性2例, 年齢29-57歳, 平均 47.3 ± 9.3 歳: HDLS群) 10画像, 対照として、20例の脳血管性認知症患者 (男性11例, 女性9例, 年齢42-79歳, 平均 68.5 ± 7.9 歳: 脳血管性認知症群) 20画像, 24例の器質的中枢神経疾患を伴わない患者 (男性15例, 女性9例, 年齢29-73歳, 平均 49.9 ± 13.8 歳: 非中枢性神経疾患群) 24画像について検討した。T1強調画像正中矢状断で、picture archiving and communication system (PACS) workstationの計測ツールを用いて、画面上で、脳梁吻部、脳梁体部、脳梁膨大部、脳梁前後径、脳梁高の各径を計測し、(脳梁吻部+脳梁体部+脳梁膨大部)/脳梁前後径=脳症萎縮指標 (CCI: corpus callosum index) として算出し、各群の差を統計学的に検定した。

結果、HDLS群のCCI (0.210 ± 0.050)は、脳血管性認知症群 (0.289 ± 0.050), 非中枢性神経疾患群 (0.371 ± 0.056)と比較して有意に低下していた。また、発症から6-36カ月の病初期のHDLS患者においても明らかな低値を認めた。

HDLSの脳梁と半卵円中心の神経病理像は、ほぼ同等・同質であった。脳梁は両側大脳白質の交連線維を集める部位であり、大脳白質の有髄神経線維の減少を反映する部位と考えられる。このような二次性変化に加えて、脳梁自体に出現する病変が加わり、強い脳梁萎縮を呈すると考察された。MRIにて早期から出現する脳梁萎縮に留意することは、HDLSを診断する重要な手がかりになると考えた。

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。

Coexpression of EpCAM, CD44 variant isoforms and claudin-7 in anaplastic thyroid carcinoma (甲状腺未分化癌においてEpCAM, CD44 variant isoformsとclaudin-7は共発現する)

岡田敏宏

(論文の内容の要旨)

【はじめに】甲状腺未分化癌は極めて悪性度が高い腫瘍であるが、その高い悪性度の要因や、未分化癌が分化癌から生じてくる未分化転化の機序は、未だ解明されていない。今回我々は、様々な悪性腫瘍で悪性度との相関が認められ、癌幹細胞のマーカーの一つとも考

えられているEpCAMとその関連因子であるCD44 variant isoformsおよびclaudin-7に着目し、ALDH1酵素活性との比較も加え解析した。

【方法】甲状腺乳頭癌細胞株TPC1、濾胞癌細胞株FTC133、未分化癌細胞株のFRO、ACT-1について、細胞表面マーカーであるCD44のstandard form (CD44s)

および variant isoform (CD44v3, CD44v6), EpCAM の発現, および ALDH1 酵素活性を, FACS と蛍光免疫染色で解析した。また, これらの因子と claudin-7 の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法で解析し, さらに, 臨床甲状腺癌組織の免疫組織染色で発現を解析した。

【結果】 (1) EpCAM と CD44s, CD44v3, CD44v6 の発現の比較: EpCAM は未分化癌細胞株で高発現を認め, 分化癌細胞株では発現が認められないか, 極めて低い発現が認められた。CD44s は分化癌細胞株で高発現を認めたが, 未分化癌細胞株ではその発現は低かった。一方, CD44 の variant isoform では, 未分化癌細胞株で variant 3 および 6 の発現を認めたが, 分化癌細胞株では発現を認めなかった。(2) EpCAM と CD44s の発現の比較: FACS 解析では, 未分化癌細胞株では EpCAM の高発現と CD44s の低発現を認め, 両者の発現には逆相関が認められた。蛍光二重染色の観察では, CD44s の発現は分化癌細胞株で高く, 未分化癌細胞株では低発現を示し, 一方 EpCAM の発現は, 分化癌細胞株では認められず, 未分化癌細胞株の CD44s が低発現の細胞でのみその発現が認められた。(3) EpCAM, claudin-7 の mRNA および蛋白の発現の比較: EpCAM およびこれと直接結合することにより Wnt シグナル伝達に関与する claudin-7 の発現を, RT-PCR 法およびウェスタンブロット法で解析した。未分化癌細胞株では, EpCAM, claudin-7 のいずれも, 分化癌細胞株に比し有意な発現の増加を認めた。(4) ALDH1 酵素活性と mRNA 発現解析の比較: 分化癌細胞株では ALDH1 酵素活性を有する細胞は認められず, 未分化癌細胞株では, 高い ALDH1 酵素活性を有する細胞を多く認めた。また, 未分化癌細胞株では, ALDH1 mRNA の有意な発現増加を認めた。(5) ALDH1 酵素活性と CD44s の発現の比較: FACS 解析では, ALDH1 酵素活性と CD44s の発現には逆相関を認め, 蛍光二重染色での観察では, CD44s 高発現の細胞は ALDH1 酵素活性が低く, 逆に ALDH1 酵素活性が高い細胞では CD44s の発現が低いことが観察された。未分化癌細胞株では ALDH1 酵素活性は高く, CD44s は低発現を示した。(6) ALDH1 酵素活性と EpCAM の発現の比較: 未分化癌細胞株では, ALDH1 酵素活性, EpCAM 発現ともに高く, ALDH1 酵素活性と EpCAM には強い正の相関が認められた。蛍光二重染色では, 未分化癌細胞株にのみ ALDH1 酵素活性, EpCAM 発現共に高い細胞が認め

られ, ALDH1 酵素活性が高い細胞での EpCAM の共発現が観察された。(7) 甲状腺癌臨床検体の免疫染色での解析: 未分化癌では, EpCAM の核での発現が分化癌より有意に多く認められ, 未分化癌で CD44s の発現が低く, CD44v6 の発現が高い傾向が認められた。また, 未分化癌では CD44s 低発現かつ CD44v6 高発現を示す症例が認められたが, 分化癌では認められなかった。

【考察】 EpCAM, CD44 variant isoforms, claudin-7 が複合体を形成して腫瘍の悪性度や増殖を促進している可能性が他癌で報告されているが, 今回の我々の解析でも, 甲状腺未分化癌細胞株で, EpCAM と claudin-7 の高発現, CD44s の発現低下と variant forms の発現増加や高い ALDH1 酵素活性が認められ, 臨床検体でも EpCAM や CD44v6 では同様の傾向が認められ, 甲状腺未分化癌では EpCAM とその関連因子や高い ALDH1 酵素活性が, この癌の高い悪性度に関与している可能性が推測され, これらの因子が新規治療戦略開発に繋がる可能性が考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

甲状腺未分化癌は極めて悪性度が高い腫瘍であるが, その高い悪性度の要因や, 未分化癌が分化癌から生じてくる未分化転化の機序は, 未だ解明されていない。今回岡田は, 様々な悪性腫瘍で悪性度との相関が認められ, 癌幹細胞のマーカーの一つとも考えられている EpCAM とその関連因子である CD44 variant isoforms および claudin-7 に着目し, ALDH1 酵素活性との比較も加え解析した。

甲状腺乳頭癌細胞株 TPC1, 濾胞癌細胞株 FTC133, 未分化癌細胞株の FRO, ACT-1 について, 細胞表面マーカーである CD44 の standard form (CD44s) および variant isoform (CD44v3, CD44v6), EpCAM の発現, および ALDH1 酵素活性を, FACS と蛍光免疫染色で解析した。また, これらの因子と claudin-7 の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法で解析し, さらに, 臨床甲状腺癌組織の免疫組織染色で発現を解析した。

その結果, 岡田は以下の結論を得た。

1. EpCAM は未分化癌細胞株で高発現を認め, 分化癌細胞株では発現が認められないか, 極めて低い発現が認められた。CD44s は分化癌細胞株で高発現を認めたが, 未分化癌細胞株ではその発現は低かった。一方, CD44 の variant isoform では, 未分化癌細胞株で variant 3 および 6 の発現を認めたが, 分化

- 癌細胞株では発現を認めなかった。
2. FACS 解析では、未分化癌細胞株では EpCAM の高発現と CD44s の低発現を認め、両者の発現には逆相関が認められた。蛍光二重染色の観察では、CD44s の発現は分化癌細胞株で高く、未分化癌細胞株では低発現を示し、一方 EpCAM の発現は、分化癌細胞株では認められず、未分化癌細胞株の CD44s が低発現の細胞でのみその発現が認められた。
 3. 未分化癌細胞株では、EpCAM, claudin-7 のいずれも、分化癌細胞株に比し有意な発現の増加を認めた。
 4. 分化癌細胞株では ALDH1 酵素活性を有する細胞は認められず、未分化癌細胞株では、高い ALDH1 酵素活性を有する細胞を多く認めた。また、未分化癌細胞株では、ALDH1 mRNA の有意な発現増加を認めた。
 5. FACS 解析では、ALDH1 酵素活性と CD44s の発現には逆相関を認め、蛍光二重染色での観察では、CD44s 高発現の細胞は ALDH1 酵素活性が低く、逆に ALDH1 酵素活性が高い細胞では CD44s の発現が低いことが観察された。未分化癌細胞株では ALDH1 酵素活性は高く、CD44s は低発現を示した。

6. 未分化癌細胞株では、ALDH1 酵素活性、EpCAM 発現ともに高く、ALDH1 酵素活性と EpCAM には強い正の相関が認められた。蛍光二重染色では、未分化癌細胞株にのみ ALDH1 酵素活性、EpCAM 発現共に高い細胞が認められ、ALDH1 酵素活性が高い細胞での EpCAM の共発現が観察された。
7. 未分化癌では、EpCAM の核での発現が分化癌より有意に多く認められ、未分化癌で CD44s の発現が低く、CD44v6 の発現が高い傾向が認められた。また、未分化癌では CD44s 低発現かつ CD44v6 高発現を示す症例が認められたが、分化癌では認められなかった。

これらの結果により、本研究では、甲状腺未分化癌細胞株で、EpCAM と claudin-7 の高発現、CD44s の発現低下と variant forms の発現増加や高い ALDH1 酵素活性が認められ、臨床検体でも EpCAM や CD44v6 では同様の傾向が認められ、甲状腺未分化癌では EpCAM とその関連因子や高い ALDH1 酵素活性が、この癌の高い悪性度に関与している可能性が推測され、これらの因子が新規治療戦略開発に繋がる可能性が考えられた。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Mutations of Pre-core and BCP Before and After HBeAg Seroconversion (HBe 抗原セロコンバージョン前後におけるプレコア・コアプロモーター変異の臨床的意義)

上 條 のぞみ

(論文の内容の要旨)

【目的】HBV 持続感染者の自然経過における、HBe 抗原 (HBeAg) から HBe 抗体 (anti-HBe) の HBeAg セロコンバージョン (SC) は通常、HBV の複製や肝臓の炎症の減少などを伴う良い兆候であると受け止められている。だが SC 後でもなお高ウイルス量や強い炎症性を示す症例がある。HBV の変異のいくつかは SC と関連があると報告されており、近年特にプレコア (pre-C) ・コアプロモーター (BCP) 変異の関連性が示唆されているが、SC 前後の pre-C ・BCP 変異の正確な役割は未だ不明である。本研究では、HBV 持続感染者の自然経過における特徴を遺伝子変異と検査値から長期間に渡り捉えることを目的とし、さらに SC と pre-C ・BCP 変異との関連性について遺伝子学的に検討を行った。

【方法】HBeAg 持続陽性群18例、SC 群25例、HBeAg

持続陰性群43例 (観察期間中央値 9 年) を対象とした。自然経過中の HBeAg, anti-HBe, HBs 抗原 (HBsAg), コア関連抗原 (HBcrAg), HBV DNA の変動について調査し、HBV genotype 分類は溝上らの報告に従った。pre-C ・BCP 変異については enzyme-linked mini-sequence assay kit ・HBV core promoter detection kit を用いて検出し、SC 群の詳細な検討にはダイレクトシーケンス法にて HBV ゲノムフルシーケンス解析を行った。

【結果】観察開始時と終了時において pre-C ・BCP 変異の割合を比較したところ、HBeAg 持続陽性群と HBeAg 持続陰性群では、共に pre-C ・BCP 変異の割合に変化はなかった。SC 群では BCP 変異の割合に変化がなかったが、pre-C 変異の割合が有意に上昇した (24% to 65%, $P=0.022$)。さらに、SC 群で pre-C 変異を伴わない SC を引き起こした 6 例につい

て、SC後のHBVのフルシーケンス解析を行ったところ、岡本らの報告(1994年)にあるSCと関連する可能性のある変異は1例のみで他は認められなかった。HBVDNA、HBsAg、HBcrAgは、HBeAg陽性でpre-C・BCP変異が無い場合に有意に高く(HBV DNA: $P=0.003$; HBsAg: $P<0.001$; HBcrAg: $P=0.001$)、反対にanti-HBe陽性では、BCP変異の有無にかかわらずpre-C変異がある場合において有意に高い(HBV DNA: $P=0.012$; HBsAg: $P=0.041$)という二相性の結果を示した。

【考察】これまでpre-C・BCP変異の両方がHBeAg産生を抑制することによってSCと関連づけられてきたが、それらの結果とは異なる報告もあり、本研究ではSC群のみならずHBeAg持続陽性群やHBeAg持続陰性群をも含めた長期間追跡調査を行うことにより自然経過中のpre-C・BCP変異を捉えることができた。上記の結果より、少なくともBCP変異はSC前から存在しておりSCとの関連性が認められないが、pre-C変異の出現は明らかにSC後でありSCと直接関係している可能性が示唆された。中でも特筆すべきは、pre-C変異を伴わないSCが存在したことで、必ずしもpre-C変異がHBeAg産生を抑制する変異ではないということを示している。フルシーケンス解析の結果から、岡本らのSCに関する変異は1例のみであり、その他の変異や欠損/挿入の可能性を追求するため今後さらにSC前後での遺伝子学的解析を加えていく必要があると考える。また本研究では、HBV複製活性を評価するマーカーとして血清中のHBVDNA、HBsAg、HBcrAg値を用いた。これらの値がHBeAg陽性時とanti-HBe陽性時ではpre-C・BCP変異の有無に対応して相反する結果を示したことで、宿主免疫からのプレッシャーによるものだということが確認できた。これらの結果よりanti-HBe陽性時におけるpre-C変異の存在は臨床的に肝炎へと進行することが示唆された。

【結語】HBV感染者のSC前後において、pre-C変異はウイルス量との相反する関連性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

HBV持続感染者の自然経過における、HBe抗原(HBeAg)からHBe抗体(anti-HBe)のHBeAgセロコンバージョン(SC)は通常、HBVの複製や肝臓の炎症の減少などを伴う良い兆候であると受け止められている。本研究ではウイルスの遺伝子変異とHBe抗原のSCとの関連をより明確にするため、長

期自然経過を観察可能であったHBVキャリア86例〔観察期間中央値9年〕を対象とした。HBe抗原のstatusで3群に分け、pre-C・BCP変異やHBウイルスマーカーの検討を行い、pre-C・BCP変異の観察前後での割合を明らかにし、さらにSCとこれら変異との関連、B型肝炎の病態との関連を検討した。また一部のSC症例についてはHBVゲノム全塩基配列の比較検討を行った。

その結果、上條は以下の結論を得た。

1. BCP変異はSCのかなり前から高率に陽性であったのに対し、pre-C変異はSC前後で陽性率が急速に上昇した。この結果より、pre-C変異はSCとより直接的に関連すること、BCP変異はSCと関連するとしてもより間接的であることが示唆された。
2. SC群において、Pre-C変異を伴わずにSCした6症例があったことから、これらの症例について全塩基配列を決定したが、この6例中5例ではSCと関連することが報告されている変異が確認されず、遺伝子変異と直接的に関与しないSCの存在が示唆された。
3. Pre-C変異の有無とHBV活動性との関連性の検討において、HBe抗原陽性例とHBe抗体陽性例で、逆のパターンになることは大変興味ある結果であり、この結果よりHBe抗原のSC後にしばしばみられるHBe抗原陰性慢性肝炎は、HBVのHBe抗原非産生変異株により惹起されている可能性が示唆された。

Pre-CとBCP変異はHBe抗原の非産生変異であり、これまでSCとの直接的な関連性が示唆されていた。しかし、SC前後での両変異の出現パターンに差があることや、遺伝子変異を伴わないSCの存在も報告されており、これまで十分に解明されていないのが現状である。本研究では、SC例のみならず、HBe抗原持続陽性例やHBe抗体持続陽性例も対象として解析し、自然経過を長期間観察することにより、pre-CおよびBCP変異のSCにおける意義をより鮮明にした。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。

Physiological significance of Rag1 in neuronal death, especially optic neuropathy (神経, 特に視神経の細胞死における Rag1の生理的重要性)

平野 隆雄

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】核内転写因子 nuclear factor kappa B (NF- κ B) が細胞死あるいは細胞生存に関与していることはよく知られている。しかしながら、中枢神経系での細胞死における NF- κ B の詳細な役割については明らかとされていない。以前、我々は NF- κ B のサブタイプの 1 つである p50 欠損マウス (NF- κ Bp50 欠損マウス) における経時的な網膜神経節細胞 (RGCs) の障害について報告した。本研究では NF- κ Bp50 欠損マウスで認められる RGCs 障害を制御している因子の発現と活性化について検討を行った。

【材料及び方法】組換え活性化遺伝子 (*Rag*: *Recombination activating gene*) は *Rag1* および *Rag2* により構成されている。この 2 つの遺伝子が V(D)J 組換え酵素の *Rag1* および *Rag2* を作り、多種多様な抗体産生を可能にし、適応免疫には欠かせない。*Rag1* は中枢神経系、その中でもとくに海馬などの細胞密度が高い領域での発現が確認されているが、同領域での *Rag1* の役割については明らかとされていない。本研究では、*Rag1* が RGCs 障害に関係しているという仮説をたて、まず *Rag1* の視路での発現を 4 カ月齢の野生型マウスを用い免疫染色法、ウエスタンブロット法、PCR 法により検討した。次いで、*Rag1* の RGCs 細胞死への関与を明らかにするため、6 カ月齢の野生型マウス、NF- κ Bp50 欠損マウス、NF- κ Bp50・*Rag1* ダブル欠損マウス、*Rag1* 欠損マウスの 4 群において網膜切片・フルオレセイン逆行性染色により RGCs 数を評価した。RGCs の細胞表面マーカー CD90.2 陽性細胞において Annexin V を用いたフローサイトメトリーにより RGCs 細胞死数を検討した。*In vitro* では neuronal stem-like cells (mouse) を用いた NMDA 誘導性細胞死の実験系により、*Rag1* の発現有無と神経細胞死との関連性を検討した。また、人為的に *Rag1* を過剰発現させた HEK293 細胞での Bax, cleaved caspase-3, -8, -9 などの細胞死制御因子の発現をウエスタンブロット法により評価した。さらに、ヒト網膜における *Rag1* の発現を組織学的に検討した。

【結果】4 カ月齢の野生型マウスの網膜・視神経において免疫染色法、ウエスタンブロット法、PCR 法に

より RGCs にのみ *Rag1* が発現することが明らかとなった。6 カ月齢の NF- κ Bp50 欠損マウスでは網膜切片、フルオレセイン逆行性染色により測定した RGCs 数が野生型マウスと比較し有意な減少が認められた。しかしながら、NF- κ Bp50・*Rag1* ダブル欠損マウスでは、野生型マウスと RGCs 数において有意差が認められなかった。フローサイトメトリーの結果、6 カ月齢の NF- κ Bp50 欠損マウスの RGCs 細胞死数が野生型マウスと比較し有意に増加していた。一方、NF- κ Bp50・*Rag1* ダブル欠損マウスの RGCs 細胞死数は野生型マウスと同等であった。Murine neuronal stem-like cells を用いた NMDA 誘導性細胞死の実験系において、コントロール群に比し *Rag1* の発現を抑制した群では Live cells の割合が有意に多かった。また、*Rag1* を過剰発現させた HEK293 細胞において、細胞死関連因子 Bax, cleaved caspase-3, -8, -9 の発現はコントロール群より有意に強いことが認められた。組織学的解析により、ヒト網膜でも *Rag1* が RGCs 特異的に発現していることが確認された。

【結論】マウスの視路において *Rag1* が RGCs 特異的に発現していることが明らかとなった。また、*In vivo* および *in vitro* の結果より *Rag1* が神経細胞死に関与することが示された。さらに、ヒト網膜でも *RAG1* が RGCs に発現していることが確認されたことから今後、緑内障を代表とする RGCs 障害に対して *RAG1* が新たな治療法のターゲット候補となる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

核内転写因子 nuclear factor kappa B (NF- κ B) が細胞死あるいは細胞生存に関与していることは知られているが、中枢神経系での細胞死における NF- κ B の正確な役割については明らかとされていない。本研究では NF- κ Bp50 欠損マウスで認められる網膜神経節細胞 (RGCs) 障害を制御している因子の発現と活性化について検討を行った。

Rag1 の視路での発現を 4 カ月齢の野生型マウスを用い免疫染色法、ウエスタンブロット法、PCR 法により検討した。次いで、*Rag1* の RGCs 細胞死への関与を明らかにするため、6 カ月齢の野生型マウス、

NF- κ Bp50欠損マウス, NF- κ Bp50・Rag1ダブル欠損マウス, Rag1欠損マウスの4群において網膜切片, フルオレセイン逆行性染色, フローサイトメトリーなどの手法により各マウスのRGCs数を評価した。Murine neuronal stem-like cellsを用いたNMDA誘導性細胞死の*In vitro*実験系を用いて, Rag1の発現有無の神経細胞死への影響を検討した。また, 人為的にRag1を過剰発現させたHEK293細胞での細胞死制御因子の発現をウエスタンブロット法により評価した。さらに, ヒト網膜におけるRag1の発現を組織学的に検討した。

その結果, 平野は次の結論を得た。

1. マウスの網膜・視神経組織では, RGCsにのみにRag1が発現していた。
2. 6カ月齢のNF- κ Bp50・Rag1ダブル欠損マウスでは, NF- κ Bp50欠損マウスで特異的に認められるRGCs細胞死が減少していた。

Genotype-phenotype correlation in Japanese patients with familial Mediterranean fever : differences in genotype and clinical features between Japanese and Mediterranean populations (本邦の家族性地中海熱患者における遺伝型と表現型の関連—地中海地方との遺伝型や臨床像の違いについて—)

岸 田 大

(論文の内容の要旨)

【背景】家族性地中海熱 (Familial Mediterranean fever ; FMF) は遺伝性の自己炎症性疾患であり, 周期性発熱に加え胸膜炎や腹膜炎などの漿膜炎を特徴とする。原因遺伝子である *MEFV* 遺伝子の変異により発症し, 基本的には常染色体劣性遺伝性であるものの, 単独ヘテロ接合体でも発症することがある。典型例では12時間から3日間程度続く発熱や漿膜炎発作を繰り返し, コルヒチンの投与が発作の予防に有効である。従来地中海地方の民族に多い疾患と考えられてきたが, 近年本邦でも疾患の認知度が高まり, 遺伝学的検査が可能となったことから, 症例の報告が増加している。今回我々は, 本邦のFMF患者の臨床的特徴を明らかにするために, 遺伝型と表現型の関連について詳細な検討を行った。

【方法】2003年9月から2012年12月までに, 臨床的にFMFが疑われ遺伝学的検査の同意が得られた216例の患者 (自験例76例, 他施設からの依頼140例) に対し, *MEFV* 遺伝子の解析を行った。症状については臨床診断の指標として確立している Tel-Hashomer criteria を用いた。後に他疾患の診断がついた症例を

3. Murine neuronal stem-like cellsを用いたNMDA誘導性細胞死の*In vitro*実験系において, Rag1の発現を抑制することによりLive cellsの割合がコントロール群に比し有意に多かった。また, 培養細胞を用いた*In vitro*実験系において, Rag1を過剰発現させることにより細胞死関連因子の発現がコントロール群に比し有意に上昇していた。
4. ヒト網膜でもRAG1がRGCs特異的に発現していた。

これらの結果より, マウスの視路においてRag1がRGCs特異的に発現していて神経細胞死に関与することが示された。さらに, ヒト網膜でもRAG1がRGCsに発現していることが確認されたことから, 今後, 緑内障を代表とするRGCs障害に対してRAG1が新たな治療法のターゲット候補となる可能性が示唆された。よって, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

除外し, 何らかの遺伝子変異を有していた116例の患者を対象とし, 遺伝型と表現型との関連について検討した。

【結果】116例中, 複合ヘテロ接合体が67例と最も多く, 単独ヘテロ接合体が47例, ホモ接合体が2例だった。男女比は51:65と女性にやや多く, 発症年齢は平均23.7歳, 年間の発作頻度は平均11.7回, 1回の発作の持続期間は平均4.7日であった。臨床症状としては, 38°C以上の発熱が83.6%の患者で認められた。その他の症状は腹膜炎:62.1%, 胸膜炎:45.7%, 関節炎:41.4%, 頭痛:19.8%, 筋痛:11.2%, 紅斑:6.8%であった。反応性AAアミロイドーシスの頻度は1.7%と地中海地方(9.5-24%)より少なかった。コルヒチンは60.3%の患者で投与され, そのうち90%以上の患者で発作の軽減あるいは消失を認めた。コルヒチンの平均投与量は1日あたり0.8mgであった。

最も多く検出された変異はE148Q(全体の40.2%)で, 以下M694I(21.0%), L110P(18.8%), P369S(5.4%), R408Q(5.4%)の順であった。一方で, 地中海地方で頻度の高い変異(M694V, V726A, M680I)は検出されず, 変異の種類に人種間の差があることが

明らかになった。本邦の FMF 患者において、M694I を有する患者は発症年齢が低く、発作の頻度が高いことに加え、胸膜炎や腹膜炎の出現頻度も高く、他の変異をもつ患者と比べ重症であった。また、M694I を有する患者はコルヒチン治療に対して非常に良好な反応を示した。一方 E148Q を有する患者は、発症年齢はやや高く、発作頻度はやや低く、軽症の患者が多かった。P369S/R408Q を有する患者は、非常に多彩な表現型をとると同時に、コルヒチンの効果は限定的であり、診断にあたっては注意が必要と考えられた。

【考察】本邦の FMF 患者では、臨床的な特徴や遺伝子変異の種類が地中海地方とは異なっていた。また、本邦 FMF の患者の中でも、遺伝型によって表現型は大きく異なっていた。FMF の診断に際しては、臨床症状と遺伝学的検査の両者を組み合わせて検討することが必要と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

家族性地中海熱 (Familial Mediterranean fever ; FMF) は遺伝性の自己炎症性疾患であり、周期性発熱に加え胸膜炎や腹膜炎などの漿膜炎を特徴とする。原因遺伝子である *MEFV* 遺伝子の変異により発症し、基本的には常染色体劣性遺伝性であるものの、単独ヘテロ接合体でも発症することがある。典型例では12時間から3日間程度続く発熱や漿膜炎発作を繰り返し、コルヒチンの投与が発作の予防に有効である。従来地中海地方の民族に多い疾患と考えられてきたが、近年本邦でも疾患の認知度が高まり、遺伝学的検査が可能となったことから、症例の報告が増加している。今回、本邦の FMF 患者の臨床的特徴を明らかにするために、遺伝型と表現型の関連について詳細な検討を行った。

2003年9月から2012年12月までに、臨床的に FMF が疑われ遺伝学的検査の同意が得られた216例の患者 (自験例76例、他施設からの依頼140例) を対象とし、*MEFV* 遺伝子の解析を行った。症状については臨床診断の指標として確立している Tel-Hashomer criteria を用いた。後に他疾患の診断がついた症例を除外し、何らかの遺伝子変異を有していた116例の患者を対象とし、遺伝型と表現型との関連について検討した。

その結果、岸田は次の結論を得た。

1. 116例中、複合ヘテロ接合体が67例と最も多く、単独ヘテロ接合体が47例、ホモ接合体が2例だった。
2. 男女比は51:65と女性にやや多く、発症年齢は平均23.7歳、年間の発作頻度は平均11.7回、1回の発

作の持続期間は平均4.7日であった。

3. 臨床症状としては、38°C以上の発熱が83.6%の患者で認められた。その他の症状は腹膜炎:62.1%、胸膜炎:45.7%、関節炎:41.4%、頭痛:19.8%、筋痛:11.2%、紅斑:6.8%であった。反応性 AA アミロイドーシスの頻度は1.7%と地中海地方(9.5-24%)より少なかった。
4. コルヒチンは60.3%の患者で投与され、そのうち90%以上の患者で発作の軽減あるいは消失を認めた。コルヒチンの平均投与量は1日あたり0.8 mgであった。
5. 最も多く検出された変異は E148Q (全体の40.2%) で、以下 M694I (21.0%)、L110P (18.8%)、P369S (5.4%)、R408Q (5.4%) の順であった。一方で、地中海地方で頻度の高い変異 (M694V、V726A、M680I) は検出されず、変異の種類に人種間の差があることが明らかになった。
6. 本邦の FMF 患者において、M694I を有する患者は発症年齢が低く、発作の頻度が高いことに加え、胸膜炎や腹膜炎の出現頻度も高く、他の変異をもつ患者と比べ重症であった。同時にコルヒチン治療に対して非常に良好な反応を示した。一方 E148Q を有する患者は、発症年齢はやや高く、発作頻度はやや低く、軽症の患者が多かった。P369S/R408Q を有する患者は、非常に多彩な表現型をとると同時に、コルヒチンの効果は限定的であり、診断にあたっては注意が必要と考えられた。

これらの結果より、本邦の FMF 患者では臨床的な特徴や遺伝子変異の種類が地中海地方とは異なることが明らかとなった。また、本邦 FMF の患者の中でも、遺伝型によって表現型は大きく異なっていた。FMF の診断に際しては、臨床症状と遺伝学的検査の両者を組み合わせて検討することが必要と考えられた。

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。

Carcinogenicity evaluation for the application of carbon nanotubes as biomaterials in rasH2 mice
(カーボンナノチューブを生体材料に応用するための rasH2マウスを用いた発がん性評価)

高 梨 誠 司

(論文の内容の要旨)

【はじめに】 Carbon nanotubes (CNTs) は、直径がナノスケール、長さがマイクロスケールの繊維状粒子であり、その特徴的な物理的・化学的性質から、様々な分野で研究開発が進められている。医療の分野でも、CNTs を生体材料に応用する研究が、近年活発に行われるようになり、抗癌剤の drug delivery system や癌細胞のイメージングに利用したり、電磁波の吸収体として癌の温熱療法に用いるなど、癌治療に応用する研究が急速に進められている。また、CNTs は骨再生や神経再生の足場材料 scaffold materials として優れていることが報告されており、その他、強化材として既存の implant と複合することにより、機械的強度や耐久性を高める研究なども進んでいる。

このように様々な分野で応用が期待される CNTs は、その生体安全性についても世界的に研究が進められているが、多くが吸入に関するものである。しかし、CNTs を生体材料として用いる場合の安全性は、吸入に対する安全性とは全く異なる評価が必要である。CNTs の生体材料としての安全性試験を行わなければならない。特に、埋植した際の発癌性評価は最も重要な課題の一つである。われわれが調べた範囲では、これまでに CNTs を、遺伝子導入により発癌性を高めた実験動物の体内に埋め込んで評価した報告はない。

今回我々は遺伝子導入発癌性モデルである rasH2 マウスを用いて CNTs の発癌性試験を世界で初めて行った。その際、安全性の基準物質として、黒色の刺青に使用されているカーボンブラックを用いた。

【対象と方法】 使用した CNTs は、Multi-walled CNTs (MWCNTs) で、平均直径100 nm、平均長さ10 μ m、炭素含有率が99.9%以上であった。MWCNTs を溶液に分散させるための界面活性剤として、Tween80を使用した。黒色の刺青を乾燥して析出した固体成分を、評価のための基準物質とした。走査型電子顕微鏡で形状を観察したところ、直径約30~50 nm のほぼ均一なカーボンブラック粒子であった。エネルギー分散型X線分光法を用いて元素組成分析を行ったところ、C が99.57 wt%、Na が0.43 wt% で、その他の元素は検出されなかった。Tween80を0.1

vol%の濃度で混合した生理食塩水に、MWCNTs を3 mg/mlの濃度で加え、超音波分散器を用いて30分間 sonication を行い、CNT 浮遊液を作成した。同様の方法により、カーボンブラックの3 mg/mlの浮遊液を作成した。Tween80を0.1 vol%の濃度で混合しただけの生理食塩水を溶媒液とした。組織毒性を有することが既知である MNU を3 mg/ml で Tween80入り生理食塩水に混合し、陽性対照液とした。

ヒト由来のプロト型癌遺伝子である c-Ha-ras を導入した rasH2マウスを用いて、CNTs の皮下埋め込み試験を行った。rasH2マウスは生後34週齢まで腫瘍の自然発生は僅少であることから、生後6週齢に被験物質を投与し、26週間で腫瘍の発生を評価することで、発癌リスクを予測した。背部皮下に各被験物質を550 μ l/匹 (約75 mg/kg) 注入した。各群10匹で、合計40匹の rasH2マウスを使用した。

26週後に安楽死させて解剖を行った。26週以内に死亡もしくは極度の衰弱を認めた場合にはその時点で安楽死させ、解剖を行った。解剖の際には、まず肉眼での腫瘍形成の有無を確認し、各臓器に分けて固定、包埋、薄切した。その後 hematoxylin and eosin 染色を行い、プレパラートを作成して、光学顕微鏡で観察した。

【結果】 CNT 群は、術後26週の時点で全て生存していた。カーボンブラック群では、経過中1匹が死亡し、26週で9匹が生存していた。溶媒群は、26週全てのマウスが生存していた。MNU 群では、経過中に4匹が死亡した。

組織学的検査では、CNT群では1匹の脾臓に inflammatory psudotumor が発生した。カーボンブラック群で死亡した1匹には新生物が認められず、死因は明らかではなかった。生存した9匹中1匹で、脾臓に血管腫を認めた。また、別の1匹は肺に腺腫が生じた。溶媒群では、いずれの臓器にも新生物形成を認めなかった。MNU 群では、死亡した4匹と生存した6匹全てに多くの新生物を認めた。

【考察と結論】 これまで CNTs の生体材料としての安全性試験がいくつか報告されているが、その評価は難しく、同じ試験でも異なる結果が報告されている。そ

の最大の理由は、生体安全性が確認されているナノ粒子の基準物質がなかったことである。我々はCNTsと同じ炭素からなり、長年にわたりヒトに埋め込まれ、歴史的にその安全性が認められている黒色の刺青がナノサイズのカーボンブラックの粒子であることに着目し、2011年にこれがCNTsの安全性評価のための最適な基準物質になることを報告した。本研究では、このカーボンブラックを基準物質として、CNTsの発癌性動物への皮下埋め込み試験を世界で初めて行った。その結果、CNTsは発癌性が認められず、カーボンブラックより低い発癌性であった。

今後本研究で用いたカーボンブラックのような生体安全性が実証されている基準物質と比較した、数多くの発癌性試験の蓄積が必要である。これにより、CNTsを生体材料に応用する研究が大きく進展すれば、癌治療、再生医療、drug delivery systemなど医学の様々な重要分野が発展することが期待できる。

(論文審査の結果の要旨)

現在、カーボンナノチューブ (CNT) の様々な生体材料への応用が注目されている。例えば、CNTを癌治療のdrug delivery systemに用いる研究、生体イメージングとして診断に用いる研究、再生医療において足場材として用いる研究、複合強化剤として用いる研究などがある。このようなCNTを用いた生体材料を臨床で実用化する際に最も重要なことは、その生体安全性である。このためには生体材料としての様々な毒性評価を行わなければならない。特に発癌性評価は最優先で行う必要があるが、これまでに遺伝子導入発癌性マウスを用いたCNTにおける発癌性試験の報告

はない。今回高梨は世界で初めて多層CNT (MWCNT) を遺伝子導入発癌性マウスであるrasH2マウスの背部皮下組織に埋め込み、その発癌性試験を行った。この試験において、人体への安全性が実証されている黒い刺青の主成分であるカーボンブラックを、安全性の基準物質として用いた。その他、陽性基準物質としてN-Methyl-N-nitrosourea (MNU)、陰性基準物質として生理食塩水を用い、各群10匹にて比較評価を行った。

その結果、高梨は次の結論を得た。

1. 経過中MWCNT群ではすべてのマウスが生存し、カーボンブラック群では1匹が死亡した。
2. MWCNT群において、inflammatory pseudotumorを1例認めたが、それ以外の新生物の発生は全く認められなかった。
3. カーボンブラック群において、肺腺腫1例、脾臓血管腫1例を認めた。
4. 以上よりMWCNTはカーボンブラックと同等またはより低い発癌性であった。

今回の結果から、CNTが人体への安全性が実証されている黒い刺青の主成分であるカーボンブラックと同等もしくはより低い発癌性であることが示唆された。今後も適切な基準物質を用いて多くの発癌性評価を実施し、その結果を蓄積して、CNTの生体材料としての安全性を確認していく必要がある。これにより、CNTを用いた生体材料が臨床応用されれば、医学が大きく発展することが期待できる。

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。

Pathophysiological roles of adrenomedullin-RAMP2 system in acute and chronic cerebral ischemia
(急性および慢性脳虚血におけるアドレノメデュリン-RAMP2システムの病態生理学的意義)

五十嵐 恭子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】脳虚血は、急性期の運動感覚障害のみならず、慢性期には血管性認知症の原因にもなる。アドレノメデュリン (AM) は、血管拡張作用を有するペプチドホルモンとして発見されたが、その後の研究から、抗炎症作用、抗酸化ストレス作用、血管新生作用など多彩な作用を有することが明らかとなり、その臨床応用も期待されている。一方でAMは血中半減期が短く、慢性疾患への応用には制限もある。さらにAMは脳内でも高発現を認めるが、その病態生理学

的意義の詳細は不明である。これまで我々は、AMおよびAM受容体の活性調節タンパクであるRAMP2のホモノックアウトマウスが、共に胎生中期に血管の発達不全により致死となることから、RAMP2がAMの血管における機能を制御する因子であることを発見し、新たな治療標的として有望と考えた。本研究では、RAMP2の遺伝子発現が、野生型マウスの半分に低下したRAMP2ヘテロノックアウトマウス (RAMP2+/-) を用い、急性および慢性脳虚血における内因性のAM-RAMP2系の病態生理学的意義を検討した。

【方法】急性脳虚血を誘発させるため、マウスの総頸動脈からシリコンコートした塞栓糸を挿入して中大脳動脈内を閉塞し、2時間後に塞栓糸を抜去し、急性脳梗塞モデルとした（中大脳動脈閉塞術（MCAOモデル））。また慢性脳虚血を誘発させるため、総頸動脈に直径0.18 mmのコイルを装着し狭窄することで、慢性脳虚血状態を作製した（両側総頸動脈狭窄術（BCASモデル））。

【結果】MCAO処置したマウスにおいて、脳血流量の回復は、野生型（WT）マウスと比較して、RAMP2^{+/-}マウスでは遅延していた。AMの遺伝子発現は、RAMP2^{+/-}マウスおよびWTマウスの双方において、梗塞後に亢進したが、その発現の亢進はRAMP2^{+/-}マウスでより顕著であった。さらにIL-1 β などの炎症性サイトカインの発現亢進は、RAMP2^{+/-}マウスでより顕著であり、病理解析では、RAMP2^{+/-}マウスでは、神経細胞の脱落および脱髄の亢進、神経細胞のアポトーシスの亢進、酸化ストレスレベルの亢進を認めた。

一方、BCAS処置したマウスにおいては、脳血流量の回復は、特に術後1日目までの急性期において、RAMP2^{+/-}マウスでは、WTマウスと比較して有意に低下していた。病理解析では、術後早期（5日目）において、RAMP2^{+/-}マウスでは神経細胞の空胞変性を認め、術後慢性期（42日目）において、神経細胞の変性や減少、酸化ストレスの亢進、血管新生の低下を認めた。8方向放射状迷路を用いた行動試験では、RAMP2^{+/-}マウスでは、WTマウスと比較して、参照記憶エラーの増加、所要時間の延長を認め、記憶力が有意に低下していた。

【結論】内因性のAM-RAMP2系は、急性脳虚血においては、脳血流の維持、炎症や酸化ストレスの抑制により、慢性脳虚血においては、血管新生作用により、急性および慢性脳虚血の双方において、神経細胞に対し保護的に働いていることが明らかとなった。AM-RAMP2系は、脳虚血に対する新たな治療標的として期待される。

（論文審査の結果の要旨）

アドレノメデュリン（AM）は多彩な作用を有するペプチドホルモンで、その臨床応用も期待されている。一方でAMは血中半減期が短く、慢性疾患への応用には制限もある。さらにAMは脳内でも高発現を認めるが、その病態生理学的意義の詳細は不明である。

本研究では、AM受容体の活性調節タンパクである

RAMP2の遺伝子発現が野生型マウスの半分に低下したRAMP2ヘテロノックアウトマウス（RAMP2^{+/-}）を用い、急性および慢性脳虚血における内因性AM-RAMP2系の病態生理学的意義を検討した。

急性脳虚血を誘発させるため、マウスの総頸動脈から塞栓糸を挿入して一時的に中大脳動脈内を閉塞することで急性脳梗塞モデルとした（中大脳動脈閉塞術（MCAOモデル））。また慢性脳虚血を誘発させるため、総頸動脈にマイクロコイルを装着し狭窄することで、慢性脳虚血状態を作製した（両側総頸動脈狭窄術（BCASモデル））。

その結果、本研究では次の結論を得た。

1. MCAO処置したマウスにおいて、脳血流量の回復は、野生型（WT）と比較してRAMP2^{+/-}では遅延していた。
2. 遺伝子発現解析において、AMの発現は両群で梗塞後に亢進したが、その発現の亢進はRAMP2^{+/-}でより顕著だった。また、炎症性サイトカインの発現亢進は、RAMP2^{+/-}でより顕著だった。
3. 病理解析では、RAMP2^{+/-}で神経細胞の変性や脱髄、アポトーシスの亢進、酸化ストレスレベルの亢進を認めた。
4. BCAS処置したマウスにおいては、脳血流量の回復は、特に術後1日目までの急性期において、RAMP2^{+/-}で有意に低下していた。
5. 病理解析では、術後早期（5日目）において、RAMP2^{+/-}では神経細胞の空胞変性を認め、術後慢性期（42日目）において、神経細胞の変性や減少、酸化ストレスの亢進、血管新生能の低下を認めた。
6. 行動解析試験では、RAMP2^{+/-}では、参照記憶エラーの増加、所要時間の延長を認め、記憶力が有意に低下していた。

以上の結果より、内因性AM-RAMP2系は、急性脳虚血においては、脳血流の維持、抗炎症作用、抗アポトーシス作用により神経細胞保護的に働き、慢性脳虚血においては、それらに加え、抗酸化ストレス作用、血管新生作用により認知機能の改善に関与していることが明らかとなった。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Functional differentiation of RAMP2 and RAMP3 in their regulation of the vascular system (脈管系制御における RAMP2と RAMP3の機能分化)

山内 啓弘

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 アドレノメデュリン (AM) は、血管拡張作用をはじめ、血管新生作用、抗酸化ストレス作用、抗炎症作用など多彩な生理活性を有する心脈管作動物質である。我々は AM の機能の多様性を制御するメカニズムを解明するため、AM の受容体システムに着目した。AM およびそのファミリーペプチドの受容体である 7 回膜貫通型 G タンパク共役型受容体 CLR には、RAMP と呼ばれる受容体補助蛋白が結合する。RAMP は 3 つの α ヘリックス構造からなる長い細胞外ドメインを有し、CLR と RAMP の細胞外ドメイン同士が結合することにより、リガンドに対するバインディングポケットが形成されると考えられている。RAMP には 1～3 までのサブアイソフォームが存在し、いずれも体内に広く分布しているが、各 RAMP の相同性は約 30 % 程度である。RAMP サブアイソフォームのうち RAMP2 または RAMP3 のいずれか 1 つが CLR に結合することにより、AM と親和性の高い受容体として機能する。しかし、これまで RAMP2 と RAMP3 の脈管系における機能的な差異は不明なままであった。本研究では、RAMP2 と RAMP3 について、胎生期から全身で遺伝子欠損させたマウス、あるいは成体において各組織特異的に遺伝子欠損を誘導できるマウスを樹立し、胎生期における脈管系の発生と、成体において遺伝子欠損誘導後の脈管系の変化を観察し、両者の機能分化を検討した。

【結果】 RAMP2 ノックアウトマウス (-/-) は、胎生期に全身の浮腫や出血により致死となったが、成体での遺伝子欠損誘導後には血管炎や臓器障害が自然発症することから、AM-RAMP2 系は血管の発生と恒常性維持双方に必須である事が示された。一方、RAMP3 -/- は胎生期の血管発生の異常は認められず、正常に出生し、成体が得られた。RAMP3 -/- 成体における腫瘍移植モデルでの腫瘍血管新生の検討では、腫瘍内血流、血管密度共に、野生型マウスと差違を認めなかった。腹部大動脈切片を用いた Aortic Ring モデルによる ex vivo での検討でも、RAMP3 -/- は野生型と同程度の血管新生能を示した。さらに下肢虚血モデルを用いて虚血性血管新生を評価した

ところ、レーザードップラーによる血流回復、病理切片における血管密度、各種血管新生因子の発現のいずれも両群の間に差は認められなかった。

次に、リンパ管について解析を進めた。術後リンパ浮腫モデルでは、血管、リンパ管特異的 RAMP2 -/- 共に、浮腫の程度に変化を認めなかったが、RAMP3 -/- のみで浮腫の増悪を認めた。RAMP3 -/- では、新生リンパ管数、血管数に変化はないものの、リンパ管の異常拡張、間質浮腫の増悪、炎症細胞浸潤の亢進が認められた。AM の持続投与による浮腫の治療実験を行ったところ、野生型では浮腫の軽減が認められるのに対し、RAMP3 -/- では浮腫の軽減は認められなかった。さらに、インドシアニグリーンを用いた耳介、尾部のリンパ管造影では、RAMP3 -/- においてリンパ管ドレナージの不良が認められた。腸管リンパ管の乳糜輸送の検討では、RAMP3 -/- において脂質の吸収遅延が認められた。腸間膜リンパ管のライブイメージングを行ったところ、RAMP3 -/- では小腸リンパ管のリンパ流速が著明に低下していた。また、RAMP3 -/- では、AM 投与によって血管の拡張反応は見られるが、リンパ管に反応が見られなかった。電子顕微鏡によるリンパ管内皮の観察では、RAMP3 -/- において、リンパ管内皮の形成不全、ミトコンドリアの空胞変性、繫留フィラメントの形成不全が特徴的に観察された。胎児リンパ管内皮細胞の初代培養を行ったところ、RAMP3 -/- では、リンパ管関連因子の発現低下が認められ、Scratch assay において、RAMP3 -/- リンパ管内皮細胞は野生型と比べ遊走能が低下していた。RAMP3 -/- リンパ管内皮細胞の遊走能の低下は、AM 添加によっても改善は認められず、AM-RAMP3 系の破綻による結果であると考えられた。さらに RAMP3 -/- リンパ管内皮細胞では、細胞生存シグナルである Akt の活性化低下が認められた。

【結論】 以上の結果から、AM-RAMP2 系が発生段階の血管新生、成体での血管恒常性を制御しているのに対し、AM-RAMP3 系は成体でのリンパ管機能を制御していることがはじめて明らかとなった。AM-RAMP 系は、RAMP2, 3 の機能分化により脈管系全

体の恒常性を制御する生体内システムであり、将来、新たな治療標的として期待される。

(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心脈管作動物質である。AM およびそのファミリーペプチドの受容体である 7 回膜貫通型 G タンパク共役型受容体 CLR には、受容体補助蛋白 RAMP が結合する。RAMP サブアイソフォームのうち RAMP2 または RAMP3 のいずれか 1 つが CLR に結合することにより、AM と親和性の高い受容体として機能する。しかし、これまで RAMP2 と RAMP3 の機能的な差異は不明なままであった。本研究では、RAMP2 と RAMP3 について、各々の遺伝子改変マウスを用い、両者の機能分化を検討した。

その結果、山内啓弘は次の結論を得た。

1. RAMP2 ノックアウトマウス (-/-) は、胎生期に全身の浮腫や出血により致死となったが、成体での遺伝子欠損誘導後には血管炎や臓器障害が自然発症することから、AM-RAMP2 系は血管の発生と恒常性維持双方に必須である事が示された。
2. RAMP3 -/- は胎生期の血管発生の異常は認められず、正常に出生した。成体での腫瘍移植モデルによる腫瘍血管新生の評価、腹部大動脈を用いた Aortic Ring assay モデルによる新生血管の評価、下肢虚血血管新生モデルを用いた虚血性血管新生の評価等を行ったところ RAMP3 -/- では異常を認めないことから、AM-RAMP3 系は、血管の発生、成体における血管新生には重要でないことが示された。

Neurological outcomes after extracorporeal cardiopulmonary resuscitation in patients with out-of-hospital cardiac arrest: a retrospective observational study in a rural tertiary care center (院外心停止患者における体外式心肺蘇生後の神経予後：地方都市の高次医療機関における後方視的観察研究)

望 月 勝 徳

(論文の内容の要旨)

【背景】院外心停止の社会復帰率はわずか 2% と報告されている。経皮的な心肺補助による体外循環を心肺蘇生に利用する体外式心肺蘇生 (extracorporeal cardiopulmonary resuscitation, ECPR) は、大都市では院外心停止の社会復帰率を 12~15% に向上させることが報告されている。心肺停止時の脳の低酸素状態は経時的に脳障害を進行させるが、ECPR は膜型人

3. 術後リンパ浮腫モデルでは、血管、リンパ管特異的 RAMP2 -/- 共に浮腫に変化を認めなかったが、RAMP3 -/- のみで浮腫の増悪を認めた。RAMP3 -/- では、新生リンパ管数、血管数に変化はないものの、リンパ管の異常拡張、間質浮腫の増悪、炎症細胞浸潤の亢進が認められた。

4. RAMP3 -/- では、耳介、尾部のリンパ管造影においてリンパ管ドレナージの不良が認められ、腸管リンパ管による乳糜輸送において脂質の吸収遅延が認められた。

5. RAMP3 -/- では、リンパ管内皮の形成不全、ミトコンドリアの空胞変性、繫留フィラメントの形成不全が特徴的に観察された。

6. RAMP3 -/- の初代培養リンパ管内皮細胞では、リンパ管関連因子発現が低下しており、この細胞を用いた Scratch assay では遊走能が低下していた。この遊走能の低下は、AM 添加によって回復しなかった。

7. RAMP3 -/- リンパ管内皮細胞では、細胞増殖に関わる Erk の活性化に変化が認められなかったのに対し、細胞生存に関わる Akt の活性化の低下が認められた。

以上の結果から、山内啓弘は、AM-RAMP2 系が発生段階の血管新生、成体での血管恒常性を制御しているのに対し、AM-RAMP3 系は成体でのリンパ管機能を制御していることをはじめて明らかとした。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。

工肺による酸素化と遠心ポンプによる強力な循環補助で、脳の低酸素状態を是正し、社会復帰率向上に寄与すると考えられている。院外心停止例はこれまで、二次救命処置のために直近病院へ搬送されるのが一般的であった。近年、救急救命士による気管挿管や薬剤投与などにより、二次救命処置の多くは病院前で行うことが可能となった。我々は医療資源の限られた地方都市では、ECPR 導入までの時間を最短時間とするた

めに、院外心停止例を ECPR が常時施行可能な高次医療機関に直接搬送することが社会復帰率向上に寄与すると考えた。そこで、地元消防機関と協力し、心肺停止例を近隣の病院への搬送を回避して、常時 ECPR を施行可能な高次医療機関へ直接搬送することを心停止バイパスシステムとして推進してきた。この研究の目的は、心停止バイパスシステムを導入した地域の高次医療機関における、ECPR 施行例の予後を明らかにすることである。

【方法】2004年4月から2013年3月までの信州大学医学部附属病院高度救命救急センターのデータベースを後方視的に解析し、通常的心肺蘇生術 (cardiopulmonary resuscitation, CPR) で蘇生できなかった院外心停止に対して ECPR を施行した10歳以上の症例を抽出した。ECPR は、

- ・偶発性低体温症による心停止
- ・来院時に心室細動/無脈性心室頻拍を呈し、目撃がありバイスタンダー CPR が行われた70歳未満の患者で、脳蘇生の可能性が残されているもの
- ・若年者の心停止

を積極的導入基準とした。重症外傷、制御不能な出血、悪性疾患の末期、不可逆性の脳障害、元々寝たきり、DNAR (do not attempt resuscitation) オーダーのあるものは適応除外とした。しかしながら、救急搬送過程で前述の要素を正確に判定することは困難なため、ECPR 導入の最終決定は担当医の判断で行った。主要評価項目は1カ月後の社会復帰 (Glasgow-Pittsburgh cerebral performance categories score 1もしくは2) とし、社会復帰群と非社会復帰群の背景、病院前・初診時所見を比較検討した。

【結果】対象期間に当センターへ救急搬送された院外心停止1,018例のうち、ECPR は50例に施行され、平均年齢は51歳 (10~83歳)、男性が33例であった。内25例は積極的導入基準に合致していた。目撃ありは36例、バイスタンダー CPR ありは32例、卒倒から胸骨圧迫開始までの平均時間は7.4±10.4分、平均 CPR 時間は84±48分であった。現場での初期心電図波形は、心室細動/無脈性心室頻拍37例、その他13例、来院時心電図波形は、心室細動/無脈性心室頻拍27例、その他23例であった。心停止の原因は、心原性が32例、偶発性低体温が7例、その他が11例であった。1カ月生存率は26%、社会復帰率は20%であった。原因別の社会復帰率は、心原性で16%、偶発性低体温で71%であった。社会復帰群 (n=10) と非社会復帰群 (n=40)

の比較では、社会復帰群において動脈血 pH (7.10 ± 0.08 VS 6.87 ± 0.25 , $P < 0.001$), base excess (-14.7 ± 3.8 VS -19.3 ± 7.7 , $P = 0.014$) が有意に高値、PaCO₂ (52 ± 21 mmHg VS 85 ± 37 mmHg, $P = 0.010$) が有意に低値であったが、ロジスティック回帰分析では独立した予後因子は明らかとならなかった。

【考察と結論】これまで、地方都市における院外心停止の生存率は大都市に比較して低いことが報告されてきた。我々の研究は、地方都市で行われたため平均 CPR 時間が長い。しかしながら、本研究の社会復帰率は、大都市で行われた研究と比し遜色のないものであった。本研究では、心停止バイパスシステムを推進している地方都市における院外心停止に対する ECPR は、大都市と同様に有用であることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

院外心停止の社会復帰率はわずか2%と報告されている。経皮的な心肺補助による体外循環を心肺蘇生に利用する体外式心肺蘇生 (extracorporeal cardiopulmonary resuscitation, ECPR) は、大都市では院外心停止の社会復帰率を12~15%に向上させることが報告されている。心肺停止時の脳の低酸素状態は経時的に脳障害を進行させるが、ECPR は膜型人工肺による酸素化と遠心ポンプによる強力な循環補助で、脳の低酸素状態を是正し、社会復帰率向上に寄与すると考えられている。院外心停止例はこれまで、二次救命処置のために直近病院へ搬送されるのが一般的であった。近年、救急救命士による気管挿管や薬剤投与などにより、二次救命処置の多くは病院前で行うことが可能となった。望月らは、医療資源の限られた地方都市では、ECPR 導入までの時間を最短時間とするために、院外心停止例を ECPR が常時施行可能な高次医療機関に直接搬送することが社会復帰率向上に寄与すると考えた。そこで、地元消防機関と協力し、心肺停止例を近隣の病院への搬送を回避して、常時 ECPR を施行可能な高次医療機関へ直接搬送することを心停止バイパスシステムとして推進してきた。今回、心停止バイパスシステムを導入した地域の高次医療機関における、ECPR 施行例の予後を検討した。

本研究では、2004年4月から2013年3月までの信州大学医学部附属病院高度救命救急センターのデータベースを後方視的に解析し、通常的心肺蘇生術 (cardiopulmonary resuscitation, CPR) で蘇生できなかった

た院外心停止に対して ECPR を施行した10歳以上の症例を抽出し、1 カ月後の社会復帰率と社会復帰群と非社会復帰群の背景、病院前・初診時所見を比較検討した。

その結果、望月らは以下の結果を得た。

1. ECPR による1 カ月生存率は26 %、社会復帰率は20 %であった。
2. 原因別の社会復帰率は、心原性で16 %、偶発性低体温で71 %であった。
3. 社会復帰群 (n=10) と非社会復帰群 (n=40) の比較では、社会復帰群において動脈血 pH (7.10±

0.08 VS 6.87±0.25, P<0.001), base excess (-14.7±3.8 VS -19.3±7.7, P=0.014) が有意に高値, PaCO₂ (52±21 mmHg VS 85±37 mmHg, P=0.010) が有意に低値であった。

4. ロジスティック回帰分析では ECPR の独立した予後因子は明らかとならなかった。

これらの結果より、心停止バイパスシステムを推進している地方都市における院外心停止に対する ECPR は、大都市と同様に有用であることが示された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Reduced-toxicity myeloablative conditioning consisting of 8-Gy total body irradiation, cyclophosphamide and fludarabine for pediatric hematological malignancies (小児血液悪性腫瘍に対する8-Gy 全身放射線照射, フルダラビン, シクロフォスファミドから成る毒性を低減した骨髄破壊的前処置)

平 林 耕 一

(論文の内容の要旨)

【背景】同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) は、小児の高リスク急性骨髄性白血病 (AML) や超高リスク急性リンパ性白血病 (ALL), 骨髄異形成症候群 (MDS) に対する標準治療法である。従来の骨髄破壊的前処置 (MAC) では、しばしは重度の治療関連毒性 (RRT) が起きることから、骨髄非破壊的前処置 (NMAC) が開始されるようになった。近年では、フルダラビン (FLU) の併用によりブスルファンを減量した骨髄破壊的前処置 (RTMAC) も報告されている。一方、小児においては現在も従来型 MAC が前処置としては主流である。しかし、従来型 MAC 後に allo-HSCT を受けた長期生存患者が増えるに依り、生活の質の低下 (特に性腺内分泌系) で苦しむ患者が増加している。このため、我々は8-Gy 全身放射線照射 (TBI), FLU, シクロフォスファミド (CY) による RTMAC を開発し、移植後早期の低毒性を報告した。平均観察期間が7年を超えたため、予後や安全性に関して検討した。

【方法】対象は2004年3月から2012年12月までに信州大学医学部附属病院小児科で8-Gy TBI/FLU/CY から成る RTMAC 後に allo-HSCT を受けた20歳以下の患者とした。2014年8月までの患者情報を収集した。生殖細胞系列に染色体異常を有する例, allo-HSCT の既往を持つ例, 放射線照射の治療歴がある例は除外した。統計解析は EZR を使用した。

【結果】対象期間中に31名が8-Gy TBI/FLU/CY から成る RTMAC 後に初回 allo-HSCT を受けた。移植時年齢の中央値は8.0歳、疾患は ALL 11名, AML 13名, MDS 4名, 若年性骨髄単球性白血病1名, 分類不能型急性白血病2名だった。移植ドナーはヒト白血球抗原 (HLA) 完全一致血縁骨髄6例, HLA 不一致血縁骨髄9例, HLA 完全一致非血縁骨髄4例, HLA 不一致非血縁骨髄2例, 臍帯血10例であった。早期再発した3名以外の28名は移植後100日以内に完全ドナーキメラリズムを達成した。RRT は, grade 1, 2, 3がそれぞれ, 21名, 6名, 10名にみられた。また、移植後寛解が維持されている患者では、観察期間中に重度の臓器障害は認めなかった。急性移植片対宿主病 (GVHD) の grade IIIを12名に認めたが, grade IVはいなかった。中等症から重症の慢性 GVHD は4名にみられた。5年全生存率は80%, 5年非再発率は71%であった。観察期間中9名が再発し, そのうち6名に再移植が行われ, 2名が観察期間中寛解を維持していた。

【結論】今回の解析結果で特に注目すべき点は, (1) 非再発死亡を認めなかった, (2) 生着不全が少なかった (特に臍帯血移植で10%), (3) 再発後に再移植可能な例が多かった (9例中6例), (4) 予後が比較的良好だったことである。(1)と(3)に関しては, TBIを12-Gyから8-Gyに減弱したために臓器障害が軽減されたためと思われる。(2)に関しては, 生着不全のリスクが高

い臍帯血移植であっても90%で生着が得られており、8-Gy TBI/FLU/CY レジメンは生着に対し十分な前処置強度を持つと考えられた。(4)に関しては、患者背景や移植ソースが多様で明確な結論を出せないが、過去の非 TBI-RTMAC レジメンの成績と同程度かそれ以上であった。以上より、8-Gy TBI/FLU/CY RTMAC レジメンは小児の血液悪性腫瘍患者に対して有用な移植前処置であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

従来の骨髄破壊的前処置 (MAC) 後に同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) を行うとしばしば重度の治療関連毒性 (RRT) が起きる。また、小児期に allo-HSCT を受けた長期生存者が増えるに従い、生活の質の低下 (特に性腺内分泌系) で苦しむ患者が増加している。今回、小児血液悪性疾患に対する全身放射線照射 (TBI) を12-Gy から8-Gy に減量し、フルダラビン (FLU) とシクロフォスファミド (CY) を組み合わせた毒性を低減した骨髄破壊的前処置 (RTMAC) の予後や安全性を検討した。

対象は2004年3月から2012年12月までに信州大学医学部附属病院小児科で8-Gy TBI/FLU/CY から成る RTMAC 後に allo-HSCT を受けた20歳以下の患者31名とした。生殖細胞系列に染色体異常を有する例、allo-HSCT の既往を持つ例、放射線照射の治療歴がある例は除外した。対象症例の移植時年齢の中央値は8歳、疾患は急性リンパ性白血病11名、急性骨髄性白

血病13名、骨髄異形成症候群4名、若年性骨髄単球性白血病1名、分類不能型急性白血病2名だった。移植ドナーはヒト白血球抗原 (HLA) 完全一致血縁骨髄6例、HLA 不一致血縁骨髄9例、HLA 完全一致非血縁骨髄4例、HLA 不一致非血縁骨髄2例、臍帯血10例であった。さらに、31名の5年全生存率、5年非再発率、生着率、治療関連毒性、予後因子を解析した。

その結果、平林耕一は次の結論を得た。

1. 非再発死亡を認めなかった。
2. 生着不全が少なかった (特に臍帯血移植で10%)。
3. 移植後再発に対して再移植が可能な患者が多かった (9例中6例)。
4. 予後が比較的良好であった (5年全生存率80%, 5年非再発率71%)。

これらの結果より、TBI を12-Gy から8-Gy に減量することで移植後の臓器障害が軽減でき、再移植も比較的安全に行える可能性が示唆された。また、いかなるドナーソースであっても8-Gy TBI/FLU/CY レジメンは生着に対して十分な前処置強度を持つと考えられた。予後に関しても過去の非 TBI-RTMAC レジメンの成績と同程度かそれ以上であった。以上より、8-Gy TBI/FLU/CY RTMAC レジメンは小児の血液悪性腫瘍患者に対して有用な移植前処置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。

Characterization of cardiac oxidative stress levels in patients with atrial fibrillation (心房細動症例における血中酸化ストレスの検討)

岡田綾子

(論文の内容の要旨)

【目的】 高齢化に伴い心房細動 (AF: Atrial fibrillation) の罹患率は年々増加している。AF 症例において血中酸化ストレス (dROM: Diacron-reactive oxygen metabolite) と脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP: Brain natriuretic peptide) は強い相関関係を示すが、その原因は解明されていない。本研究は発作性心房細動 (PAF: Paroxysmal AF) と持続性心房細動 (PsAF: Persistent AF) 症例両群間における、心腔内の dROM と血中 dROM, BNP を測定し、AF 持続と酸化ストレスおよび心負荷の関係を解明することを目的とした。

【方法】 対象は当院で AF に対するカテーテルアブレーション治療を施行した85人 (PAF=50人, PsAF=35人, 平均年齢63歳)。

アブレーション時に右心房、左心房、冠状静脈より血液を採取し dROM を測定した。またアブレーション前と3カ月後に末梢血より血液を採取し、dROM と BNP を測定した。PAF, PsAF 両群間および各部位間の dROM を比較し、AF 持続時間と酸化ストレスとの関連性と酸化ストレス産生箇所を検討した。さらに dROM と BNP の関連性を検証した。またアブレーション前後の血中 BNP と dROM 値の変化量をアブレーション治療有効群と非有効群で比較し、AF 改善の有無と酸化ストレスの変化および心負荷との関連性を検討した。

【結果】 PAF と PsAF 両群間に左心房径と血中 BNP

値以外は患者背景には相違は認めなかった（左房径：PAF=41.6±6.8 mm, PsAF=48.5±6.4 mm, $P<0.01$, BNP PAF 52.7 [24.5-89.6] PsAF 123.8 [64.3-186.7]pg/dl)。PsAF 群の dROM は末梢血、心腔内の各部位で PAF 群と比較し有意に高値であり、特に冠状静脈でその差は顕著であった（PsAF=429.0 Carratelli units vs PAF=374.0 Carettelli units, $P<0.05$ ）。また PsAF 群においては冠状静脈の dROM が他部位に比較し高値であり、他部位より心筋の酸化ストレスの増加を反映していると考えられたため、冠状静脈内の dROM と末梢血 BNP の関連性を検証したところ相関関係が認められた。（ $r=0.436$, $P<0.001$ ）さらに、アブレーション治療有効群では 3 カ月後の末梢血 dROM と BNP は改善しており、両者の変化量に相関を認めた（ $r=0.473$, $P<0.001$ ）。

【考察】本論文は AF 症例における心腔内各部位での酸化ストレスを検討した最初の研究である。PAF と比較し PsAF において、特に冠状静脈洞内で他部位よりも dROM が有意に高値であった。冠状静脈血は左室心筋からの静脈還流が主体であることから、AF が持続することで左室が酸化ストレスに暴露されていることが推察された。また冠状静脈の dROM が BNP と強い相関を認めたことから、持続する AF が酸化ストレスを増大させ、その影響で左室機能障害を生じていると推定された。さらに、これらの結果から AF 患者における dROM の測定は AF による左室機能障害の程度や罹患期間、アブレーション効果の評価に有用であると考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

対象は当院で AF に対するカテーテルアブレーション治療を施行した 85 人（PAF=50 人, PsAF=35 人, 平均年齢 63 歳）。アブレーション時に右心房, 左心房, 冠状静脈より血液を採取し dROM を測定した。またアブレーション前と 3 カ月後に末梢血より血液を採取し, dROM と BNP を測定した。PAF, PsAF 両群間および各部位間の dROM を比較し, AF 持続時間と酸化ストレスとの関連性と酸化ストレス産生箇所を検討した。さらに dROM と BNP の関連性を検証した。またアブレーション前後の血中 BNP と dROM 値の変化量をアブレーション治療有効群と非有効群で比較し, AF 改善の有無と酸化ストレスの変化および心負荷との関連性を検討した。

PAF と PsAF 両群間に左心房径と血中 BNP 値以

外は患者背景には相違は認めなかった（左房径：PAF=41.6±6.8 mm, PsAF=48.5±6.4 mm, $P<0.01$, BNP PAF 52.7 [24.5-89.6] PsAF 123.8 [64.3-186.7]pg/dl)。PsAF 群の dROM は末梢血、心腔内の各部位で PAF 群と比較し有意に高値であり、特に冠状静脈でその差は顕著であった（PsAF=429.0 Carratelli units vs PAF=374.0 Carettelli units, $P<0.05$ ）。また PsAF 群においては冠状静脈の dROM が他部位に比較し高値であり、他部位より心筋の酸化ストレスの増加を反映していると考えられたため、冠状静脈内の dROM と末梢血 BNP の関連性を検証したところ相関関係が認められた。（ $r=0.436$, $P<0.001$ ）さらに、アブレーション治療有効群では 3 カ月後の末梢血 dROM と BNP は改善しており、両者の変化量に相関を認めた（ $r=0.473$, $P<0.001$ ）。

その結果岡田綾子は次の結論を得た。

1. 本論文は AF 症例における心腔内各部位での酸化ストレスを検討した最初の研究である。PAF と比較し PsAF において、特に冠状静脈洞内で他部位よりも dROM が有意に高値であった。冠状静脈血は左室心筋からの静脈還流が主体であることから、AF が持続することで左室が酸化ストレスに暴露されていることが推察された。
2. 冠状静脈の dROM が BNP と強い相関を認めたことから、持続する AF が酸化ストレスを増大させ、その影響で左室機能障害を生じていると推定された。
3. これらの結果から AF 患者における dROM の測定は AF による左室機能障害の程度や罹患期間、アブレーション効果の評価に有用であると考えられた。これらの結果より、心房細動持続に伴う左室の収縮障害拡張障害は酸化ストレスの上昇と相関していると考えられた。

今後心房細動に対するアブレーション治療の有効性評価、再発予測因子として有益であると考えられる。

本論文は心房細動の病態における酸化ストレスの関与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。

Epithelial-mesenchymal transition of A549 cells is enhanced by co-cultured with THP-1 macrophages under hypoxia conditions (低酸素環境下における THP-1マクロファージとの共培養は A549細胞の EMT を誘導する)

末 木 茜

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis ; IPF) は、肺胞領域に炎症が生じ、持続的に線維化が進行する原因不明の難治性疾患である。最近、肺胞上皮細胞の transforming growth factor (TGF)- β 1 を介した上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition ; EMT) が、肺線維化誘導の原因のひとつと考えられている。肺線維症は線維芽細胞増殖、炎症細胞浸潤および肺胞隔壁肥厚が特徴的な所見で、肺胞領域のまだらな局所的低酸素環境を容易に推測できる。また、低酸素環境下で肺胞マクロファージは活性化され、サイトカイン分泌が亢進する。本研究では、II型肺胞上皮細胞の EMT に注目し、低酸素環境におけるマクロファージの活性化が肺の線維化を誘導するか検討した。

【方法】THP-1細胞は500 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で4日間培養を行いマクロファージに分化させた (以下、THP-1マクロファージ)。細胞を通さないポアサイズ1.0 μ m のメンブレンを用い、下部のウェル内で A549細胞 (II型肺胞上皮細胞)、上部のインサート内で THP-1マクロファージを培養し、物質の透過量が確保された環境にて共培養を行った。A549細胞あるいは THP-1マクロファージの単培養もしくは両者の共培養を、室内気酸素濃度 (21 % O₂) あるいは低酸素濃度 (2 % O₂) 環境下で行った。EMT 確認のための分子マーカーとして、E-cadherin (上皮系蛋白マーカー)、vimentin と fibronectin (間葉系蛋白マーカー) の発現をウェスタンブロット法と蛍光免疫染色法を用いて解析した。また、A549細胞の EMT 誘導における TGF- β 1 と IL-1 β の関与を検討するため、TGF- β 1 type I receptor kinase inhibitor (SB-431542) または IL-1 β 中和抗体を用いて EMT 誘導の阻害実験を行った。TGF- β 1 と IL-1 β の mRNA の発現は、real-time PCR 法にて解析した。

【結果】THP-1マクロファージとの共培養により、A549細胞は EMT に特徴的な形態を示し、低酸素環境下ではより EMT の形態変化が鮮明となった。また、

低酸素環境下で THP-1マクロファージと共培養すると、A549細胞において E-cadherin 低下および vimentin と fibronectin 増加が蛋白発現レベルで確認された。これらの変化は、TGF- β 1 type I receptor kinase inhibitor (SB-431542) にて阻害され、A549細胞の EMT に TGF- β 1 の関与が示唆された。低酸素環境下で A549細胞と THP-1マクロファージを共培養すると、両細胞で TGF- β 1 mRNA 発現が有意に増加し、THP-1マクロファージでは TGF- β 1 の上流調節因子である IL-1 β mRNA の発現も有意に増加した。さらに、IL-1 β を中和抗体で阻害すると、低酸素環境下における共培養の培養上清中にて TGF- β 1 分泌量が有意に低下した。

【考察】低酸素環境下において THP-1マクロファージが活性化されることで、A549細胞の EMT を強く誘導した。低酸素環境下のみでは A549細胞の EMT は誘導されず、室内気酸素濃度にて THP-1マクロファージと共培養しても EMT は誘導されなかった。したがって、A549細胞の EMT には、低酸素環境およびマクロファージ活性化の2つの条件が必要であり、生体でも肺の線維化が生じる場合、この2つの条件が同時に満たされる必要性を示唆した。低酸素下にて共培養を行うことにより、両細胞の TGF- β 1 産生が有意に増加しており、A549細胞の EMT 化に TGF- β 1 の関与が示唆された。さらに、低酸素環境は THP-1マクロファージの IL-1 β の発現を増加させ、その IL-1 β が A549細胞と THP-1マクロファージ自身の TGF- β 1 の発現を増加させた。

【結語】II型肺胞上皮細胞の EMT には TGF- β 1 および IL-1 β が関与しており、低酸素環境下における II型肺胞上皮細胞とマクロファージの相互作用が必要であった。この結果は、肺線維症のメカニズム解明に大きな役割を果たすと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) の肺線維化の原因として、II型肺胞上皮細胞の epithelial mesenchymal transition (EMT) が考えられている。IPF 患者の肺胞洗浄液ではマクロファージが増加し、肺胞

領域では局所的に低酸素状態が生じていると考えられる。本研究では、低酸素環境下においてII型肺胞上皮細胞とマクロファージがどのように関連して線維化を誘導するか、II型肺胞上皮細胞のEMTに注目して検討した。

THP-1細胞はphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)でマクロファージに分化させた(THP-1マクロファージ)。下部のウェル内にA549細胞(II型肺胞上皮細胞)、上部のインサート内にTHP-1マクロファージを入れて、室内気酸素(21% O₂)あるいは低酸素(2% O₂)環境下で単培養もしくは両細胞の共培養を行った。EMT分子マーカー発現をウェスタンブロット法と蛍光免疫染色法で解析した。また、transforming growth factor (TGF)- β 1阻害剤またはIL-1 β 中和抗体を用いてA549細胞のEMT誘導を阻害した。TGF- β 1とIL-1 β のmRNA発現はreal-time PCR法で解析した。

その結果、末木茜は次の結論を得た。

1. THP-1マクロファージと共培養したA549細胞の

EMT変化は低酸素環境下で強く誘導された。

2. 低酸素環境下でA549細胞とTHP-1マクロファージのTGF- β 1 mRNAの発現が増加した。
3. 低酸素環境によって増強したA549細胞のEMT変化はTGF- β 1依存性であった。
4. 低酸素環境下でTHP-1マクロファージのIL-1 β mRNAの発現が増加した。
5. IL-1 β 中和抗体によって、THP-1マクロファージとA549細胞の共培養上清中のTGF- β 1分泌が減少した。

これらの結果より、A549細胞のEMTには、低酸素環境およびマクロファージ活性化の2つの条件が必要であり、生体でも線維化が生じる場合、この2つの条件を同時に満たす必要性を示唆した。また、A549細胞のEMTには、低酸素環境下で分泌が増加するTGF- β 1およびIL-1 β が関与しており、IPF発症のメカニズム解明に繋がると考えられた。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。

Serum sulfatide abnormality is associated with increased oxidative stress in hemodialysis patients (血液透析患者における血清スルファチド異常は酸化ストレスの増加と関連する)

黄 玉 哲

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】スルファチドは、ガラクトシルセラミドのC3位に硫酸基が結合した代表的なスフィンゴ糖脂質である。様々な臓器に広く分布するが、血清中にもリポ蛋白に含有され存在している。過去の基礎的研究によると、血清中のスルファチドは動脈硬化の進展、血液凝固、血小板凝集に関連し作用することが示唆されている。過去の横断的研究において、心血管病が多発する血液透析患者で血清スルファチドを測定してみたところ、透析患者では著しく血清スルファチド値が低下すること、また、心血管病既往のある患者では血清スルファチド値異常が顕著になることが判明した。これらの結果は、血清スルファチド値異常が心血管病発症に関連する可能性を示唆している。透析患者の血清スルファチド異常の出現機序は不明であるが、我々は透析年数とともに血清スルファチド値が低下する興味深い現象を見出した。しかし、横断研究では、個々の症例の時間依存的変化を検出することは困難であるため、本研究ではこの現象を3年間の追跡研究により確定させることを第一の目的とした。また、血清スル

ファチド値異常の機序解明を第二の目的とし、様々な臨床的データとともに統計的に解析した。

過去の動物実験や腎移植患者を対象とした研究で、我々は代表的な酸化ストレスマーカーであるmalondialdehyde (MDA)と血清スルファチド値異常との関連性を報告しているため、本研究でもMDAを含めて解析することとした。

【対象及び方法】本研究に同意した信州大学腎臓内科関連病院の外来維持血液透析患者201名の内、除外基準(担癌、感染症、同意の撤回)に抵触しない156名を3年間経過観察した。経過観察中に死亡した患者34名と臨床検査値やサンプルに欠損のある患者27名を除外し、最終的に95名を解析した。血清サンプルは、症例登録時、18カ月後、36カ月後の時点で、週初めの透析施行直前に採取した。本研究の遂行に当たっては、ヘルシンキ宣言を遵守した。また、本研究のプロトコールは信州大学医学部倫理委員会にて審議された承認されている(承認番号750)。血清スルファチド測定法としては、血清サンプルより脂質抽出を行った後に、スルファチドを可溶性のリゾスルファチドに変換し、マ

トリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析器 (MALDI-TOF MS) にて含有量を測定した。スフィンゴイド種により7種類のスルファチドが検出されるため、その総和を血清スルファチド値と定義した。MDA 測定法については、比色定量法により測定を行った。

統計解析方法について血清スルファチド値や MDA の時間依存的変化については、Wilcoxon matched-pairs signed-rank test を用いた。スルファチドと各種臨床検査値との関連性については、相関解析および多変量線形解析を用いた。

【結果】透析患者の血清スルファチド値の平均値は健常者の50%未満に低下しており、心血管病の既往がある患者では既往の無い患者に比較し有意に血清スルファチド値が低くなることが再確認された。3年間の追跡調査により、血清スルファチドは時間依存性に有意に低下し、MDA は時間依存性に有意に上昇することが確認された。多変量線形解析では、時間依存的な血清スルファチド値の推移と有意に関連するのは、MDA の推移のみであることが判明した。

【結論】本研究は、透析患者の血清スルファチド値異常が時間依存的に悪化すること、また、その時間依存性の血清スルファチド異常が酸化ストレスの上昇に関連することを初めて明らかにした。この結果から、酸化ストレスの上昇は血清スルファチド異常の増悪因子になりうる可能性が示唆された。血清スルファチド値異常や酸化ストレスは血液透析患者の心血管病発症に関連する可能性があるため、それらに対する新たな治療法の開発が必要であると思われた。

(論文審査の結果の要旨)

スルファチドは血清リポ蛋白質を構成するスフィンゴ糖脂質の主要成分であり、血清スルファチドは動脈硬化の進展、血液凝固、血小板凝集に影響することが示唆されている。血液透析患者では透析年数に従い血清スルファチド値の低下が顕著になり、心血管病と関連する可能性が報告されている。本研究では3年間の追跡研究により透析患者における時間依存性の血清ス

ルファチドの低下現象を確定させることと、血清スルファチド値の低下機序の解明を目的とした。

信州大学腎臓内科関連病院の外來維持血液透析患者で除外基準に抵触しない95名を解析した。血清サンプルは、症例登録時、18カ月後、36カ月後の時点で採取した。血清スルファチド測定法としては、血清サンプルより脂質抽出を行った後に、スルファチドを可溶性のリゾスルファチドに変換し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析器 (MALDI-TOF MS) にて含有量を測定した。スフィンゴイド種により7種類のスルファチドが検出されるため、その総和を血清スルファチド値と定義し計算した。血清スルファチド値と相関する因子の解析のため、様々な臨床データとともに統計解析を行って検討した。

その結果、黄は以下の結論を得た。

1. 透析患者の血清スルファチド値の平均値は健常者の50%未満であり、心血管病の既往がある患者では既往の無い患者に比較し有意に血清スルファチド値が低くなることが再確認された。
2. 3年間の追跡調査により、血清スルファチドは時間依存性に有意に低下し、酸化ストレスマーカーである MDA は時間依存性に有意に上昇することが明らかとなった。
3. 多変量線形解析では、時間依存的な血清スルファチド値の推移と有意に関連するのは、MDA の推移のみであることが判明した。

これらの結果により、酸化ストレスの上昇は透析患者における血清スルファチド異常の増悪因子になりうる可能性が示唆された。血清スルファチド値異常や酸化ストレスは血液透析患者の心血管病発症に関連する可能性があるため、それらに対する有用な治療法の開発が必要である。本研究は、透析患者における血清スルファチド異常に対する新たな治療法の開発のための有益な情報を提示していると考えられる。

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。

NFκB2 gene as a novel candidate that epigenetically responds to interval walking training (インターバル速歩トレーニング) に対しエピジェネティックに応じる新候補遺伝子, *NFκB2*)

張 玉 根

(論文の内容の要旨)

Physical fitness has been reported to decrease the

risk of lifestyle-related diseases. The present study evaluated genome-wide methylation under the

hypothesis that interval walking training (IWT) imparted beneficial effects on health, particularly by epigenetically ameliorating susceptibility to inflammation. We screened DNA from peripheral blood samples via genome-wide microarray for genes whose methylation was affected by IWT, paying special attention to promoter regions, and identified over 40 hyper- or hypo-methylated genes following IWT that were not witnessed in controls. We next selected genes in which the degree of methylation change in the promoter region was correlated with energy consumption following IWT. In this way, we found the *NFκB2* gene to have increased methylation in multiple regions of its promoter sequence following participation in an exercise regimen. Next, IWT-induced *NFκB2* hyper-methylation was confirmed by a quantitative PyroSequencing assessment of methylation in samples obtained from independent subjects who also underwent IWT. The increase in *NFκB2* gene promoter methylation by IWT indicates that this regimen may suppress pro-inflammatory cytokines. Thus, these results provide an additional line of evidence that IWT is advantageous in promoting health from an epigenetic perspective by ameliorating susceptibility to inflammation.

(論文審査の結果の要旨)

インターバル速歩は、体力向上、生活習慣病指標の改善、うつ改善に効果があることが明らかにされている。インターバル速歩トレーニングによって生じるゲノムの修飾に関する現象については、これまで明らかになっていない。張玉根はインターバル速歩トレーニングによりメチル化変化を示す遺伝子の同定を試みた。

熟年大学参加者13名を被験者として、インターバル速歩トレーニングを実施した。6カ月間インターバル速歩トレーニング後、合計運動日数40日を基準として、40日未満の被験者を非運動群、40日以上を運動群とした。インターバル速歩トレーニング前後の2回採血を行い、採取した血液サンプルからゲノムDNAの抽出を行った。トレーニング前のDNAをCy3、トレーニング後のDNAをCy5でラベルし、ゲノムワイドのマイクロアレイ実験でメチル化変動する遺伝子をスクリーニングした。さらに別のインターバル速歩トレーニング被験者グループについて、異なるメチル化測定法で

あるパイロシーケンス法を用い、マイクロアレイ実験からの結果を詳細に検証した。

その結果、張玉根は次の結果を得た。

1. マイクロアレイ実験では、133個の遺伝子のメチル化がインターバル速歩によって変化することが分かった。この133個の遺伝子についてオントロジー解析を行い、メチル化が変動した遺伝子を分類した。
2. メチル化変動がプロモーター領域で生じている遺伝子を約80個抽出し、メチル化の増減がエネルギー消費量に相関するか否かについて解析した。エネルギー消費量と相関してメチル化が増強した遺伝子は *HELT*, *BAT2*, と *NFκB2* であり、メチル化が減少した遺伝子は *SLIT2*, *NKX2-5*, *TBX18* と *EGR2* であった。
3. *NFκB2* のプロモーター領域に17個のプローブを作成し、メチル化変動を調べたところ、その内9個の領域でメチル化がインターバル速歩により増強した。さらに、その中で3つのプローブに対応する領域のメチル化の増強がエネルギー消費量と統計的に有意に相関することが分かった。
4. パイロシーケンス実験で詳細に解析したところ、*NFκB2* のプロモーター領域のメチル化が増強することを確認できた。

以上の結果より、インターバル速歩トレーニングによって *NFκB2* 遺伝子メチル化が増強することが分かった。*NFκB2* 遺伝子は炎症のマスター遺伝子であることと、またエピジェネティクス解析結果を鑑み、インターバル速歩は抗炎症の効果をもたらす、健康を促進すると考えられた。この成果は、運動処方効果をエピジェネティクスの側面から明らかにしたのみならず、疾患予防のための効果判定に対する簡便かつ高感度な方法を示唆するものであり、今後、予防医学に貢献すると期待される。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。

Superficially located enlarged lymphoid follicles characterise nodular gastritis (表在性腫大リンパ濾胞は鳥肌胃炎の特徴である)

岡村 卓磨

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】鳥肌胃炎は *Helicobacter pylori* 感染と関連し、上部消化管内視鏡検査で前庭部に均一な小顆粒状隆起が密集して鳥肌状の概観を呈するものである。組織学的にはリンパ濾胞の過形成によるとされているが、これを証明する定量的解析は報告されていない。一方、生体内における組織へのリンパ球の誘導は、高内皮細静脈 (high endothelial venule: HEV) を介したリンパ球ホーミングにより引き起こされる。その接着機構として、リンパ球の表面に発現する L-selectin は、HEV の血管内皮上に発現する糖鎖である 6-sulfo sialyl Lewis X と結合し、リンパ球ホーミングの最初の段階に至る。6-sulfo sialyl Lewis X の糖鎖構造は mouse endothelial cell antigen 79 (MECA-79) 抗体により認識される。また、 $\alpha 4\beta 7$ integrin をリガンドとする粘膜細胞接着分子である mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) も同様に腸管関連リンパ組織の HEV 内皮上に特異的に発現している。L-selectin リガンド糖鎖や MAdCAM-1 は関節リウマチ、慢性甲状腺炎、炎症性腸疾患、自己免疫性膵炎などの慢性炎症において組織中に発現することが報告されている。今回、リンパ濾胞過形成が鳥肌胃炎の病態形成に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とし、鳥肌胃炎の組織検体におけるリンパ濾胞の定量的評価、さらにリンパ球動員に関与する MECA-79 陽性 HEV 様血管、MAdCAM-1 陽性 HEV 様血管の発現を定量的に解析した。

【対象と方法】鳥肌胃炎患者 99 例、萎縮性胃炎患者 65 例、*H. pylori* 陰性正常コントロール 31 例より採取した組織検体を用いて、リンパ濾胞の個数、大きさ、存在部位を検討した。また、MECA-79 抗体、MAdCAM-1 抗体、血管内皮細胞を認識する CD34 抗体を用いた免疫染色を行った。さらに、鳥肌胃炎の組織検体 (凍結切片) に対して $\alpha 4\beta 7$ integrin-IgG ヘテロ二量体キメラ蛋白を用いた接着実験を行い、HEV 様血管上の MAdCAM-1 が実際に接着分子としての機能を有するかどうかを検討した。

【結果】リンパ濾胞数は鳥肌胃炎、萎縮性胃炎で差は認められなかったが、濾胞径は鳥肌胃炎で有意に大き

かった。正常コントロールではリンパ濾胞はほとんど認めなかった。さらに、鳥肌胃炎におけるリンパ濾胞は萎縮性胃炎に比較し、粘膜固有層における占拠率が高く、また有意に粘膜表層部に位置していた。 $\alpha 4\beta 7$ integrin と結合する機能的な MAdCAM-1 陽性 HEV 様血管は鳥肌胃炎、萎縮性胃炎で認められたが、その出現頻度は両者で差はなかった。一方、MECA-79 陽性 HEV 様血管は鳥肌胃炎で有意に増加していた。

【結論】表在性腫大リンパ濾胞は鳥肌胃炎の組織学的特徴であり、MECA-79 陽性 HEV 様血管は鳥肌胃炎の病態形成の一部に関与していると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

鳥肌胃炎は、上部消化管内視鏡検査で前庭部に小顆粒状隆起が密集し、鳥肌状の概観を呈するものである。組織学的にはリンパ濾胞の過形成によるとされているが、これを証明する定量的解析は報告されていない。一方、生体内における組織へのリンパ球の誘導は、高内皮細静脈 (high endothelial venule: HEV) を介したリンパ球ホーミングにより引き起こされる。そのため、本研究ではリンパ濾胞過形成が鳥肌胃炎の病態形成に関与しているかどうか、更にリンパ球動員に関与する高内皮細静脈様血管の発現に関して検討した。

リンパ球ホーミングに関しては、組織中に存在する HEV の血管内皮上にリンパ球が接着する機序が最初の段階で認められ、その相互作用として、リンパ球の表面に発現する L-selectin と HEV の血管内皮上に発現する糖鎖である 6-sulfo sialyl Lewis X が結合する。6-sulfo sialyl Lewis X の糖鎖構造は mouse endothelial cell antigen 79 (MECA-79) 抗体により認識される。また、 $\alpha 4\beta 7$ integrin をリガンドとする粘膜細胞接着分子である mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) も同様に HEV 内皮上に特異的に発現している。

鳥肌胃炎 99 例、萎縮性胃炎 65 例、*H. pylori* 陰性正常コントロール 31 例より採取した組織検体を用いて、リンパ濾胞の個数、大きさ、存在部位を検討した。また、MECA-79 抗体、MAdCAM-1 抗体、CD34 抗体 (血管内皮細胞マーカー) を用いた免疫染色を行い、HEV 様血管の発現、並びに同部における MECA-79

陽性血管と MAdCAM-1陽性血管の出現パターンを検討した。さらに、鳥肌胃炎の組織検体（凍結切片）に対して $\alpha 4\beta 7$ integrin・IgGヘテロ二量体キメラ蛋白を用いた接着実験を行い、HEV 様血管上の MAdCAM-1が実際に接着分子としての機能を有するかどうかを検討した。

その結果、岡村は次の結論を得た。

1. リンパ濾胞数は鳥肌胃炎、萎縮性胃炎で差は認めなかったが、濾胞径は鳥肌胃炎で有意に大きかった。
2. 鳥肌胃炎におけるリンパ濾胞は萎縮性胃炎に比較し、粘膜固有層における占拠率が高く、また有意に粘膜表層部に位置していた。
3. MAdCAM-1陽性 HEV 様血管は鳥肌胃炎、萎縮性胃炎で認められたが、その出現頻度は両者で差は

なかった。一方、MECA-79陽性 HEV 様血管は鳥肌胃炎で有意に増加していた。

4. 鳥肌胃炎の組織検体（凍結切片）に対する $\alpha 4\beta 7$ integrin・IgGヘテロ二量体キメラ蛋白を用いた接着実験において Ca 依存性に特異的に結合したことから、HEV 様血管上の MAdCAM-1が実際に接着分子としての機能を有していることが判明した。

これらの結果より、表在性腫大リンパ濾胞は鳥肌胃炎の組織学的特徴であり、MECA-79陽性 HEV 様血管は鳥肌胃炎の病態形成の一部に関与していると考えられた。

よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Effect of herpes simplex virus vector-mediated interleukin-4 gene therapy on bladder overactivity and nociception (単純ヘルペスウイルスベクターを用いた IL-4遺伝子治療における排尿筋過活動と疼痛への効果)

小 口 智 彦

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】頻尿や膀胱痛を主訴とする間質性膀胱炎や骨盤痛症候群といった疾患は難治性で、その成因は未知の部分が多い。しかし、これまでの研究で炎症性サイトカインの関与が知られるようになり、炎症を抑えることが、この病態の治療につながる可能性があることがわかってきた。一方、Interleukin(IL)-4は抗炎症サイトカインであることが知られているが、その半減期が短いため、治療として使用するには持続投与が必要となり、また、全身投与では様々な副作用が生じることから、臨床上、痛み治療には用いられていないのが現状である。

我々は、単純ヘルペスウイルスを用いてサイトカインや薬物を局所で発現させて投与する方法の有効性を報告してきた。その方法とは、増殖能を奪った単純ヘルペスウイルスを膀胱壁に注射すると、求心性線維を上行し後根神経節に感染するが、このウイルスに特定の物質を組み込むと、注射部位と後根神経節で最大4週にわたって、その物質を発現し続ける性質を利用した方法である。つまり、半減期が短い薬剤や全身投与による副作用が危惧される物質を局所に投与することが可能となる。

今回は、この方法を用いて、単純ヘルペスウイルスに IL-4を組み込み、膀胱過活動や膀胱痛に及ぼす効

果について研究を行った。

【材料および方法】雌のSDラットを用いた。マウス由来の IL-4を発現する単純ヘルペスウイルスと、コントロールとして、 β ガラクトシダーゼのみ発現する単純ヘルペスウイルスをラットの膀胱壁に注入した。免疫染色および ELISA 法にてマウス由来の IL-4がラットの膀胱と後根神経節で発現しているか確認した。膀胱の刺激には、膀胱痛覚に関与する無髄C線維を刺激するレジニフェラトキシンを用いた。各ウイルスを感染させた1週間後に、ウレタン麻醉下に膀胱内圧測定検査を行い、10 nM のレジニフェラトキシンで膀胱過活動を誘発し比較を行った。また、感染の2週間後に覚醒下の痛み行動観察研究を行った。3 μ M のレジニフェラトキシンを膀胱に1分間注入すると、ラットは下を向いてすくむが、以前の研究では、この行動は膀胱の求心性線維を含む骨盤神経を介していることが判明している。そのため、すくみ行動を観察比較した。また、レジニフェラトキシンで刺激後の膀胱での炎症性サイトカインの発現、膀胱組織像、Myeloperoxidase (MPO) 活性による好中球の活性も比較した。【結果】免疫染色では、膀胱と後根神経節の神経細胞にウイルスが感染していることが確認された。また、ELISA 法にてマウス由来の IL-4は膀胱と膀胱の求心性線維である後根神経節で有意に増加していた。IL-

4を発現する単純ヘルペスウイルスを感染させたラットではレジニフェラトキシンを灌流しても排尿間隔は短縮せず、膀胱過活動は抑制され、有意にすくみ行動が減少した。また、炎症性サイトカインであるIL-1 β とIL-2は増加しなかった。しかしながら、陰部神経を介するとされる舐め行動は両群で差がなかった。レジニフェラトキシンで膀胱を刺激すると、膀胱粘膜下の浮腫像が増悪しMPO活性も上昇することが知られているが、IL-4を発現する単純ヘルペスウイルスを感染させたラットでは膀胱浮腫があまり見られず、MPO活性も低くなっていた。

以上の結果からIL-4を発現する単純ヘルペスウイルスを感染させたラットでは、レジニフェラトキシンによる膀胱刺激後も炎症が抑制されることが確認された。

【結論】IL-4を発現する単純ヘルペスウイルスを膀胱壁に注入すると、IL-4が膀胱と膀胱の求心性線維である後根神経節で発現し、炎症性の反応を低下させ、膀胱炎ラットモデルにおける膀胱過活動と膀胱痛を抑制したと考えられた。

このことは、IL-4による遺伝子治療が、頻尿や膀胱痛の新しい治療法となる可能性が示唆するものである。

(論文審査の結果の要旨)

頻尿や膀胱痛を主訴とする間質性膀胱炎や骨盤痛症候群といった疾患は難治性で、その成因は未知の部分が多い。しかし、これまでの研究で炎症性サイトカインの関与が知られるようになり、炎症を抑えることが、この病態の治療につながる可能性があることがわかってきた。一方、Interleukin (IL)-4は抗炎症サイトカインであることが知られているが、その半減期が短いため、治療として使用するには持続投与が必要となり、また、全身投与では様々な副作用が生じることから、临床上、痛みの治療には用いられていないのが現状である。小口らは、単純ヘルペスウイルスを用いてサイトカインや薬物を局所で発現させて投与する方法の有効性を報告してきた。その方法とは、増殖能を奪った単純ヘルペスウイルスを膀胱壁に注射すると、求心性線維を上行し後根神経節に感染するが、このウイルスに特定の物質を組み込むと、注射部位と後根神経節で最大4週にわたって、その物質を発現し続ける性質を利用した方法である。つまり、半減期が短い薬剤や全身投与による副作用が危惧される物質を局所に投与することが可能となる。今回は、この方法を用いて、単

純ヘルペスウイルスにIL-4を組み込み、膀胱過活動や膀胱痛に及ぼす効果について研究を行った。

雌のSDラットを用いた。マウス由来のIL-4を発現する単純ヘルペスウイルスと、コントロールとして、 β ガラクトシダーゼのみ発現する単純ヘルペスウイルスをラットの膀胱壁に注入した。免疫染色およびELISA法にてマウス由来のIL-4がラットの膀胱と後根神経節で発現しているか確認した。膀胱の刺激には、膀胱痛覚に関与する無髄C線維を刺激するレジニフェラトキシンを用いた。各ウイルスを感染させた1週間後に、ウレタン麻酔下に膀胱内圧測定検査を行い、10 nMのレジニフェラトキシンで膀胱過活動を誘発し比較を行った。また、感染の2週間後に覚醒下の痛み行動観察研究を行った。3 μ Mのレジニフェラトキシンを膀胱に1分間注入すると、ラットは下を向いてすくむが、以前の研究では、この行動は膀胱の求心性線維を含む骨盤神経を介していることが判明している。そのため、すくみ行動を観察比較した。また、レジニフェラトキシンで刺激後の膀胱での炎症性サイトカインの発現、膀胱組織像、Myeloperoxidase (MPO) 活性による好中球の活性も比較した。

その結果、小口は次の結論を得た。

1. 免疫染色にて膀胱と後根神経節に投与したウイルスの存在が確認された。
2. IL-4を発現する単純ヘルペスウイルスに感染したラットの膀胱と後根神経節で、マウス由来のIL-4が確認された。
3. 同ラットは、レジニフェラトキシンによる膀胱刺激後も排尿間隔は短縮せず頻尿にならなかった。
4. 同ラットは、骨盤神経由来のすくみ行動が有意に減少した。
5. 同ラットでは、レジニフェラトキシンで膀胱を刺激した後も、炎症性サイトカインであるIL-1 β とIL-2は抑制された。
6. 同ラットでは、レジニフェラトキシンで刺激後も膀胱浮腫が軽減し、MPO活性が有意に抑制された。

これらの結果により、単純ヘルペス由来のIL-4が膀胱の求心性線維と膀胱で発現し、炎症性の反応を減少させ、膀胱炎ラットモデルにおける膀胱過活動と膀胱痛を抑制したと考えられた。

IL-4による遺伝子治療が、頻尿や膀胱痛の新しい治療法となる可能性を示唆した。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Elastic modulus of the femoral trochanteric region measured by scanning acoustic microscopy in elderly women (超音波顕微鏡を用いて測定した高齢女性の大腿骨転子部における弾性率)

松 木 寛 之

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】骨粗鬆症に起因する大腿骨転子部骨折は、高齢者のQOLを著しく低下させる。また同骨折の発生数は近年著しく増加しており、同骨折の予防は社会的、医療経済的に重要である。同骨折の発生割合は、高齢女性において年齢とともに著しく増加することが知られているが、その理由は不明である。今回我々は超音波顕微鏡を用いた新たな測定手法により、高齢女性の大腿骨転子部の弾性率分布に局所的な特異性がないかを調べた。

【材料及び方法】解剖用死体より摘出した大腿骨転子部7標本(女性7標本, 67~88歳)を対象とした。大腿骨転子部を精密切断機を用いて切り出し、冠状面骨幅中央で切断して低温硬化樹脂で含浸包埋した。この表面を自動研磨機を用いて研磨紙とダイヤモンド粒子で鏡面化し標本作製した。大腿骨転子部外側では4mmの測定ラインで等間隔に16ライン、転子部内側では4mmの測定ラインで等間隔に10ラインを計測高位として、超音波顕微鏡(日立建機社製H-SAM)を用いて、200MHzの周波数で弾性率、密度を算出する際に必要となる骨組織における漏洩表面波の音速、反射率などを計測した。得られた計測値から皮質骨部、海綿骨部の縦弾性率、横弾性率、密度の値を算出した。

【結果】皮質骨の縦弾性率は大腿骨転子部外側で14.26~22.53GPa、内側で23.4~35.28GPa、横弾性率は大腿骨転子部外側で5.07~8.23GPa、内側で8.52~13.38GPaであった。海綿骨の縦弾性率は大腿骨転子部外側で14.84~22.55GPa、内側で18.27~28.17GPa、横弾性率は大腿骨転子部外側で5.24~8.18GPa、内側で6.67~10.5GPaであった。皮質骨の密度は大腿骨転子部外側で0.35~0.59g/cm³、内側で0.55~0.81g/cm³であった。海綿骨の密度は大腿骨転子部外側で0.38~0.55g/cm³、内側で0.45~0.67g/cm³であった。外側皮質骨部と内側皮質骨部で弾性率値を比較した結果、70歳以上の標本において、外側皮質骨部の縦弾性率、横弾性率が内側部と比較して有意に低下していた(p<0.05)。外側海綿骨部において近位部と遠位部で弾性率値を比較した結果、80歳以上の3標本において、近位部の縦弾性率、横弾性率が

遠位部と比較して有意に低下していた(p<0.05)。

【結論】本研究の結果から、70歳以上の標本においては外側皮質骨部の弾性率は海綿骨部と同程度にまで低下しているため、外側皮質骨部における弾性率の低下には皮質骨の海綿骨化が関与している可能性が示唆された。また、80歳以上の3標本において、外側近位海綿骨部の弾性率が低下していたが、それらにはWolfの法則による骨吸収の増加が関与している可能性が示唆された。今回の研究で弾性率値が低下していた大腿骨転子部の外側皮質骨部と外側近位海綿骨部は大腿骨転子部骨折の骨折部位と一致しており、これらの骨組織部の弾性率の低下は高齢女性における大腿骨転子部骨折の発生割合の増加に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)

骨粗鬆症に起因する大腿骨転子部骨折は、高齢者のQOLを著しく低下させる。また同骨折の発生数は近年著しく増加しており、同骨折の予防は社会的、医療経済的に重要である。同骨折の発生割合は、高齢女性において年齢とともに著しく増加することが知られているが、その理由は不明である。本研究で松木は、その理由を解明することを目的として超音波顕微鏡を用いた新たな測定手法により、高齢女性の大腿骨転子部の弾性率分布に局所的な特異性がないかを調べた。本研究では解剖用死体より摘出した大腿骨転子部7標本(女性7標本, 67~88歳)を対象とした。大腿骨転子部を精密切断機を用いて切り出し、冠状面骨幅中央で切断し低温硬化樹脂で含浸包埋したのち、この表面を自動研磨機を用いて研磨紙とダイヤモンド粒子で鏡面化し標本作製した。大腿骨転子部外側では4mmの測定ラインで等間隔に16ライン、転子部内側では4mmの測定ラインで等間隔に10ラインを計測高位として、超音波顕微鏡(日立建機社製H-SAM)を用いて、200MHzの周波数で弾性率、密度を算出する際に必要となる骨組織における漏洩表面波の音速、反射率などを計測した。得られた計測値から皮質骨部、海綿骨部の縦弾性率、横弾性率、密度の値を算出した。その結果、松木は次の結論を得た。

1. 皮質骨の縦弾性率は大腿骨転子部外側で14.26~

- 22.53 GPa, 内側で23.4~35.28 GPa, 横弾性率は大腿骨転子部外側で5.07~8.23 GPa, 内側で8.52~13.38 GPaであった。
2. 海綿骨の縦弾性率は大腿骨転子部外側で14.84~22.55 GPa, 内側で18.27~28.17 GPa, 横弾性率は大腿骨転子部外側で5.24~8.18 GPa, 内側で6.67~10.5 GPaであった。
3. 70歳以上の6標本において, 大腿骨転子部の外側皮質骨部の縦弾性率, 横弾性率は内側部と比較して有意に低下していた。
4. 80歳以上の3標本において, 大腿骨転子部の外側近位部の海綿骨部の縦弾性率, 横弾性率が遠位部と比較して有意に低下していた。
- 今回の研究で弾性率値が低下していた大腿骨転子部の外側皮質骨部と外側近位海綿骨部は大腿骨転子部骨

折の骨折部位と一致しており, これらの骨組織部の弾性率の低下は高齢女性における大腿骨転子部骨折の発生割合の増加に関与している可能性が示唆された。今回の研究結果は解剖用死体より摘出した骨標本における結果であり, 生体における評価ではない。本研究の臨床的意義は, 今回の知見を加齢による脆弱性骨折の予防に応用することにより骨折の発生率を減少させ, また治療効果の新しい判定法の開発に応用できるということなどである。以上により, これまで研究が行われていなかった高齢女性の大腿骨転子部の皮質骨と海綿骨の弾性率値や弾性率分布の評価がなされており, 臨床医学的に意義があるものと考えられるため, 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。

Alpha₁-Adrenergic Receptors Mediate Bladder Overactivity Induced by Cold Stress in Rats with Bladder Outlet Obstruction (下部尿路閉塞モデルラットの冷えストレス誘発排尿筋過活動における α_1 受容体の機能的役割の考察)

山 岸 貴 裕

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】前立腺肥大症などの下部尿路閉塞による蓄尿障害, 排出障害, 排尿後症状などの下部尿路症状の治療には, 未だに多くの課題がある。下部尿路症状発症機序としては, 下部尿路閉塞による膀胱の過伸展が膀胱血流の低下を引き起こし膀胱内の排尿筋, 神経などを障害するとともに, 正常の排尿ではあまり排尿に関連しない無髄C線維が活性化されることで症状が誘発されると考えられている。その一方, 低温環境への変化, つまり寒冷刺激を受けると尿意切迫, 頻尿, 夜間頻尿などの下部尿路症状を経験することがある。しかし, 寒冷刺激によって引き起こされる下部尿路症状の機序については, 不明な点が多く, 下部尿路閉塞では, 寒冷刺激による反応が, どのように変化するのかわかっていないのが現状である。本研究は, 前立腺肥大症に伴う下部尿路症状の寒冷刺激に対する機序を解明するために, 前立腺肥大症による下部尿路閉塞を模倣したラットモデル及び $\alpha_{1D/1A}$ 交感神経受容体遮断薬のナフトピジルを用いて, α_1 交感神経受容体の機能的役割について検討した。

【材料及び方法】10週齢雌SDラットをペントバルビタール麻酔下にて下腹部を開腹し, 尿道をチューブとともに結紮した後, チューブのみを抜去し閉腹した。

その後, 4週間通常飼育し, 下部尿路閉塞(BOO)モデルとした。また, 尿道を結紮しなかった動物を偽手術ラットとした。4週間の通常飼育後, BOOモデルでは閉塞を解除し, 膀胱内圧測定のための膀胱留置カテーテルを挿入した。このとき, 膀胱容量が2-5mlを示すラットをBOO完成モデルとして膀胱内圧測定に用いた。膀胱内圧測定用カテーテルを挿入して2日後, 薬物投与用に頸静脈にカテーテルを留置し, BOOラットの膀胱内圧測定を室温下(RT, 27±2°C)で20分間行い, 基準の膀胱内圧曲線とした。続いて, 0.3mg/kg ナフトピジル(n=6), あるいは, 対照薬(n=5)を頸静脈より投与した。投与5分後, ラットを速やかに低温下(LT, 4±2°C)に移行し, 膀胱内圧測定を40分間行った。膀胱内圧測定を行ったBOOラットと正常組織としての偽手術ラット(n=8)の膀胱を摘出した。摘出した膀胱をトリミングし, 約1/3の膀胱組織から α_{1a} と α_{1d} 受容体 mRNA の発現レベルを解析し, 残りの組織に対して, α_{1A} あるいは α_{1D} 受容体抗体と, カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)抗体を用いた二重免疫組織染色を行った。

【結果】下部尿路閉塞の4週間後, BOOラット(n=11)を無作為に, ナフトピジル群(n=6), 対照群(n=5)分けて検討を行った。対照群, ナフトピジ

ル投与群ともに室温から低温に移行すると、膀胱基底圧の有意な増加、1回排尿間隔の有意な低下、及び、膀胱容量の有意な低下が認められた（それぞれ $P < 0.01$ ）。しかし、ナフトピジル投与群の低温への移行に伴うこれらの増減は、対照群と比較すると有意に抑制されていた（ $P < 0.05$ ）。下部尿路閉塞ラット膀胱における α_{1A} 受容体 mRNA の発現は、偽手術ラットと差がなかった。しかし、下部尿路閉塞ラット膀胱における α_{1D} 受容体 mRNA は、偽手術ラットと比較して、有意な高発現を示した。下部尿路閉塞ラット膀胱での CGRP 陽性求心性神経上の α_{1A} 受容体の発現は、偽手術ラット膀胱との差が認められなかった。しかし、下部尿路閉塞ラット膀胱での CGRP 陽性神経細胞上の α_{1D} 受容体発現は、偽手術ラット膀胱よりも高発現している傾向を示した。

【考察】これまでの研究から、冷えストレス誘発性排尿筋過活動には、求心性無髄C線維（レジニフェラトキシン感受性神経）の関与が報告されている。また、 α_1 交感神経受容体は、組織部位によって発現レベルには差があるものの下部尿路組織全体に発現していることも報告されている。特に、膀胱に発現する α_1 交感神経受容体は、求心性神経経路に発現していることが報告されているため、本研究では膀胱内の α_1 交感神経受容体に注目した。下部尿路閉塞では、 α_{1D} 交感神経受容体 mRNA 発現量が増加し、CGRP 陽性求心性神経細胞上の α_{1D} 交感神経受容体の発現が増加する傾向が認められた。ナフトピジルは $\alpha_{1D/1A}$ 交感神経受容体遮断薬のひとつであり、特に α_{1D} 交感神経受容体に対する親和性が高い。したがって、 $\alpha_{1D/1A}$ 交感神経受容体を介する冷えストレス誘発性排尿筋過活動がナフトピジルで抑制されたと考えられた。

これらの研究結果は、下部尿路閉塞に伴う冷えストレスによって生じる下部尿路症状の悪化の機序のひとつとして、 α_1 交感神経受容体を介した経路が存在することを示唆している。

【結論】 α_1 交感神経遮断薬は、下部尿路閉塞モデルラットにおける冷えストレス排尿筋過活動の一部を抑制した。また、下部尿路閉塞モデルラットでは α_{1D} 交感神経受容体 mRNA 発現量の増加、CGRP 陽性求心性神経細胞上での α_{1D} 交感神経受容体発現の増加傾向が認められた。これらのことより、 $\alpha_{1D/1A}$ 交感神経受容体は下部尿路閉塞における冷えストレス誘発性排尿筋過活動の制御に関与することが示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

泌尿器科領域において、前立腺肥大症などによる下部尿路閉塞により生じた下部尿路症状の治療には、未だに多くの課題がある。その一つとして、寒冷刺激によって引き起こされる下部尿路症状が挙げられる。本研究は、前立腺肥大症による下部尿路閉塞を模倣したラットモデルを用いて寒冷刺激に対する膀胱機能について検討した。さらに、 $\alpha_{1D/1A}$ 受容体遮断薬ナフトピジルを用いて下部尿路閉塞膀胱に発現する α_1 受容体の機能的役割について検討した。

10週齢雌 SD ラットの尿道を結紮し、下部尿路閉塞 (BOO) ラットを作成した。膀胱容量が 2-5 ml を示す BOO ラットを膀胱内圧測定に用いた。BOO ラットの膀胱内圧測定を室温下で 20 分間行った。続いて 0.3 mg/kg ナフトピジルあるいは対照薬を頸静脈より投与した。投与 5 分後速やかに低温下に移行し膀胱内圧測定を 40 分間行った。膀胱内圧測定を行った BOO ラットと正常組織としての偽手術ラットの膀胱を摘出した。摘出した膀胱組織から α_{1A} と α_{1D} 受容体 mRNA の発現レベルを解析し、残りの組織に対して α_{1A} あるいは α_{1D} 受容体抗体とカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 抗体を用いた二重免疫組織染色を行った。

その結果、山岸は次の結論を得た。

1. 対照群、ナフトピジル投与群ともに室温から低温に移行すると膀胱基底圧の有意な増加、1回排尿間隔の有意な低下、及び膀胱容量の有意な低下が認められた。しかし、ナフトピジル投与群の低温への移行に伴うこれらの増減は対照群と比較すると有意に抑制された。
2. BOO ラット膀胱における α_{1A} 受容体 mRNA の発現は偽手術ラットと差がなかった。しかし、BOO ラット膀胱における α_{1D} 受容体 mRNA は、偽手術ラットと比較して有意な高発現を示した。
3. BOO ラット膀胱での CGRP 陽性求心性神経上の α_{1A} 受容体の発現は偽手術ラット膀胱との差が認められなかった。しかし、BOO ラット膀胱での CGRP 陽性神経細胞上の α_{1D} 受容体発現は、偽手術ラット膀胱よりも高発現している傾向を示した。

これらの結果より、下部尿路閉塞に伴う寒冷刺激によって生じる下部尿路症状の悪化の機序のひとつとして、 α_1 受容体を介した経路があることが示唆された。

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

Relationships of obesity and diabetes mellitus to other primary cancers in surgically treated gastric cancer patients (胃癌切除症例における、肥満もしくは糖尿病と、他臓器重複癌との関連性)

竹内大輔

(論文の内容の要旨)

【背景】胃癌患者にはさまざまな他臓器重複癌が合併することが知られている。また肥満と糖尿病はさまざまな癌の発育に関連があるといわれている。胃癌患者における、肥満と糖尿病の他臓器重複癌への影響を検討した。

【対象と方法】2002年から2010年までの期間で、当科にて胃癌手術を施行された435例を対象とした。他臓器重複癌の検索としては、術前には下部消化管内視鏡検査、胸腹部CT検査が施行された。術後には、6カ月後の胸腹部CT検査、1年後のCT検査と上部消化管内視鏡検査、下部消化管内視鏡検査が施行された。その後は1年毎のCT検査、内視鏡検査が施行され、異常所見が認められれば検査の間隔が短縮された。平均フォローアップ期間は39カ月であった。肥満に関しては、Body mass indexが25 kg/m²以上の患者を肥満群とした。空腹時血糖とHbA1cは手術前に検査され、糖尿病のスクリーニングが行われた。

【結果】他臓器重複癌は109例(25.1%)に認められた。同時性重複癌を胃癌手術前後1年以内の発見と定義すると、同時性重複癌は40例(9.2%)、異時性重複癌が76例(18.2%)であった。他臓器重複癌の内訳は、消化器系が38例(34.9%)と最も多く、次いで泌尿器系が25例(22.9%)と多く認められた。単変量解析にて、他臓器重複癌は高齢者(p=0.001)、胃癌の遠隔転移陽性(p=0.02)、糖尿病患者(p=0.0022)に多く認められ、これら3因子を用いた多変量解析では糖尿病は他臓器重複癌発生の独立した危険因子であった(オッズ比 2.215; 95%信頼区間 1.2007-4.0850; p=0.011)。単変量解析にて、同時性重複癌は男性(p=0.0067)、肥満群に多く認められた(p=0.025)。これら2因子の多変量解析では、肥満は同時性重複癌発生の独立した危険因子であった(オッズ比 2.354; 95%信頼区間 1.1246-4.9279; p=0.023)。単変量解析にて異時性重複癌は高齢(p=0.038)、飲酒習慣(p=0.04)、糖尿病患者(p=0.0071)、HbA1c高値(p=0.0496)に多く認められた。これら4因子の多変量解析では、糖尿病は異時性重複癌発生の独立した危険因子であった(オッズ比 2.680; 95%信頼

区間 1.0291-6.9780; p=0.044)。術後成績に関しては、同時性重複癌を有する群は、そうでない群と比較して全生存期間において予後不良であった(p=0.04)。

【結論】胃癌患者に糖尿病もしくは肥満を伴う場合は、他臓器重複癌の存在に注意しなければならない。特に糖尿病や肥満を有する胃癌患者の手術の術前、術後には他臓器重複癌も視野に入れたスクリーニングが必要である。

(論文審査の結果の要旨)

胃癌患者にはさまざまな他臓器重複癌が合併することが知られている。また肥満と糖尿病はさまざまな癌の発育に関連があるといわれている。胃癌患者における、肥満と糖尿病の他臓器重複癌への影響を検討した。

2002年から2010年までの期間で、当科にて胃癌手術を施行された435例を対象とした。他臓器重複癌の検索としては、術前には下部消化管内視鏡検査、胸腹部CT検査が施行された。肥満に関しては、Body mass indexが25 kg/m²以上の患者を肥満群とした。空腹時血糖とHbA1cは手術前に検査され、糖尿病のスクリーニングが行われた。

その結果、竹内大輔は次の結論を得た。

1. 他臓器重複癌は109例(25.1%)に認められた。同時性重複癌が40例(9.2%)、異時性重複癌が76例(18.2%)であった。他臓器重複癌の内訳は、消化器系が38例(34.9%)と最も多く、次いで泌尿器系が25例(22.9%)と多く認められた。
2. 単変量解析にて、他臓器重複癌は高齢者(p=0.001)、胃癌の遠隔転移陽性(p=0.02)、糖尿病患者(p=0.0022)に多く認められ、これら3因子を用いた多変量解析では、糖尿病は他臓器重複癌発生の独立した危険因子であった(オッズ比 2.215; 95%信頼区間 1.2007-4.0850; p=0.011)。単変量解析にて、同時性重複癌は男性(p=0.0067)、肥満群に多く認められた(p=0.025)。これら2因子の多変量解析にて、肥満は同時性重複癌発生の独立した危険因子であった(オッズ比 2.354; 95%信頼区間 1.1246-4.9279; p=0.023)。単変量解析にて異時性重複癌は高齢(p=0.038)、飲酒習慣(p=

0.04), 糖尿病患者 ($p=0.0071$), HbA1c 高値 ($p=0.0496$) に多く認められた。これら 4 因子の多変量解析にて, 糖尿病は異時性重複癌発生の独立した危険因子であった (オッズ比 2.680; 95%信頼区間 1.0291-6.9780; $p=0.044$)。

3. 術後成績に関しては, 同時性重複癌を有する群は, そうでない群と比較して全生存期間において予後不良であった ($p=0.04$)。

これらの結果により, 胃癌患者に糖尿病もしくは肥

満を伴う場合は, 他臓器重複癌の存在に注意しなければならないと思われた。特に糖尿病や肥満を有する胃癌患者の手術の術前, 術後には他臓器重複癌も視野に入れたスクリーニングが必要であると考えられた。今回の研究は胃癌患者における他臓器重複癌のリスク因子を明らかにしたものであり, 臨床上の意義が高いと考えられ, 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。

Low levels of high-density lipoprotein cholesterol predict the presence of coronary artery disease in patients with aortic aneurysms (大動脈瘤患者において低 HDL コレステロールは冠動脈疾患の合併予測因子である)

三 枝 達 也

(論文の内容の要旨)

【目的】大動脈瘤は全身の動脈硬化や心血管病の一般的な危険因子とされている。実際に大動脈瘤を有する患者の30-70%に冠動脈疾患が合併するとの報告がある。また腹部大動脈に対する外科的手術を施行された患者では, 冠動脈疾患を有することが遠隔期の死亡率に関連があると報告されている。

したがって, 大動脈瘤の手術前に冠動脈疾患の評価をすることは意義あることと考えられるが, この集団における冠動脈疾患を合併する予測因子については, これまで検討が十分になされていない。

本研究では大動脈瘤に対する外科的手術を施行する患者において, 冠動脈造影による有意狭窄病変の検索を行い, 冠動脈疾患と関連する背景因子について検討を行った。

【方法】2006年1月から2009年12月までに胸部大動脈瘤, 腹部大動脈瘤, あるいは両者を合併し, 開腹による人工血管置換術またはステントグラフト置換術の予定となっている連続191例で検討した。手術適応基準は, 短径で胸部大動脈瘤 6 cm 以上, 腹部大動脈瘤 5 cm 以上もしくは急速増大, 嚢状瘤であることとした。以前に冠動脈造影で有意狭窄を指摘されている, 冠血管再建の既往がある, 狭心症症状がある症例は除外した。術前に患者情報収集および血液検査施行し冠動脈造影を行った。冠動脈の内腔が75%以上の狭窄, 左主幹部は50%以上の狭窄を有意狭窄とした。冠血管再建は日本循環器学会の安定冠動脈疾患における待機的冠動脈インターベンション (PCI) のガイドラインに基づいて施行した。

術前に得られる各種因子と冠動脈疾患との関連について, 大動脈瘤症例全体, 胸部大動脈瘤, 腹部大動脈瘤, 胸腹部大動脈瘤の群別に統計学的に解析した。

【結果】外科的治療適応があり術前冠動脈造影を施行された大動脈瘤191例のうち, 胸部大動脈瘤は34例, 腹部大動脈瘤は137例, 胸腹部大動脈瘤は20例であった。74例 (38.7%) で冠動脈疾患の合併を認め, 特に腹部大動脈瘤137例 (40.9%), 胸腹部大動脈瘤20例 (55.0%) で多く認めた。単枝病変42例 (56.8%), 左前下行枝病変57例 (44.9%) が多く, 大動脈瘤術前に40例 (54.1%) に冠動脈の血行再建が必要であった。

大動脈瘤症例全体の検討では, 冠動脈疾患との関連で, 単変量解析で HDL-コレステロール (HDL-C) と逆相関 ($p=0.009$), 腹部大動脈瘤と正相関 ($p=0.0038$) を認めた。多重ロジスティック回帰分析では, 高血圧, LDL-コレステロール (LDL-C), HbA1c, 喫煙, スタチン服用による調整下で HDL-C (Odds ratio 0.630, $p=0.010$) と腹部大動脈瘤 (Odds ratio 3.331, $p=0.036$) が冠動脈疾患の独立した予測因子であることが示された。

胸部大動脈瘤の検討では, 単変量解析で喫煙と冠動脈疾患の関連を認めたが, 多変量解析では独立した予測因子にはなり得なかった。

腹部大動脈瘤症例の検討では, 単変量解析で HDL-C が冠動脈疾患と逆相関 ($p=0.041$) を認め, 多変量解析で唯一独立した予測因子であった (Odds ratio 0.646, $p=0.041$)。一般的な冠危険因子である高血圧, LDL-C, HbA1c, 喫煙歴は関連を示さなかった。

受信者動作特性曲線 (ROC 曲線) を用いた冠動脈疾患を予測し得る HDL-C のカットオフ値は 47.5 mg/dL で、感度 54.8 %、特異度 62.7 % であった ($p=0.018$)。【考察】本研究では外科的手術適応のある大動脈瘤症例における冠動脈疾患の予測因子を検討し、HDL-C の低値が予測因子と考えられた。

一般的に虚血性心疾患の有病率は 1,000 人あたり 8.13-11.8 人と報告されているが、今回の研究ではそれを大きく上回り、従来の報告を踏襲するものであった。細胞外基質のリモデリング過程の一形態とする胸部大動脈瘤とは異なり、腹部大動脈瘤は特に高い合併率を認めた。

従来から HDL-C と虚血性心疾患、動脈硬化所見の関連は複数報告されているが、大動脈瘤患者における検討は本研究がはじめてである。近年は HDL-C の量的影響だけではなく、末梢血管から肝臓にコレステロールを転送する HDL-C の質的影響が動脈硬化予防に重要であるとの報告があるが、本研究では検討しておらず、今後の検討課題である。

フラミンガム心臓研究では HDL-C の上昇が虚血性心疾患の減少と関連を認めたが、HDL-C 上昇薬剤等による介入で心血管イベントを減少させるか不明である。すでに大規模介入研究で検討が開始されているが、今後我々としては個々の動脈硬化病変に視点をおき血管内超音波などのイメージングを用いて HDL-C 改善による動脈硬化進展予防効果を検討し、本研究で得られた HDL-C の重要性を検証していく必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

外科的治療適応があり術前冠動脈造影を施行された大動脈瘤 191 例のうち、胸部大動脈瘤は 34 例、腹部大動脈瘤は 137 例、胸腹部大動脈瘤は 20 例であった。74 例 (38.7 %) で虚血性心疾患を認め、特に腹部大動脈瘤 137 例 (40.9 %)、胸腹部大動脈瘤 20 例 (55.0 %) で多く合併を認めた。単枝病変 42 例 (56.8 %)、左前下行枝病変 57 例 (44.9 %) が多く、術前に 40 例 (54.1 %) に冠動脈の血行再建を施行した。

Steatogenesis in adult-onset type II citrullinemia is associated with down-regulation of PPAR α (成人発症 II 型シトルリン血症における脂肪肝は PPAR α の発現低下に由来する)

木村 岳 史

(論文の内容の要旨)

【目的】成人発症 II 型シトルリン血症 (以下 CTLN2)

冠動脈病変は、大動脈瘤症例全体の検討では、単変量解析で HDL-C と逆相関 ($p=0.009$)、腹部大動脈瘤と正相関 ($p=0.038$) を認めた。多重ロジスティック回帰分析では、高血圧、LDL-C、HbA1c、喫煙、スタチン服用による調整下で HDL-C (Odd ratio 0.630, $p=0.010$) と腹部大動脈瘤 (Odd ratio 3.331, $p=0.036$) が虚血性心疾患の独立した予測因子であることが示された。

胸部大動脈瘤の検討では、単変量解析で喫煙と虚血性心疾患の関連を認めたが、多変量解析では独立した予測因子にはなり得なかった。腹部大動脈瘤症例の検討では、単変量解析で HDL-C が虚血性心疾患と逆相関 ($p=0.041$) を認め、多変量解析で唯一独立した予測因子であった (Odd ratio 0.646, $p=0.041$)。一般的な冠危険因子である高血圧、LDL-C、HbA1c、喫煙歴は関連を示さなかった。

ROC 曲線を用いた虚血性心疾患を予測し得る HDL-C のカットオフ値は 47.5 mg/dL で、感度 54.8 %、特異度 62.7 % であった ($p=0.018$)。

その結果 三枝達也は次の結論を得た。

1. 本研究は外科的手術適応のある大動脈瘤症例における虚血性心疾患の予測因子を検討した最初の研究であり、HDL-C の低値が虚血性心疾患の唯一の予測因子であった。
2. 末梢血管から肝臓にコレステロールを転送する HDL-C 作用が動脈硬化疾患予防の重要役割を担っているとの報告があり、今回の HDL-C と虚血性心疾患の関連を示唆するものである。
3. これらの結果から、大動脈瘤術前患者において HDL-C の測定は虚血性心疾患を予測する上で有用であり、術前リスクを層別化する一つの判断項目になる可能性があると考えられた。

本論文は大動脈瘤術前患者における虚血性心疾患の予測因子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。

は我が国で比較的多く見られる尿素回路異常症で、原因として *SLC25A13* 遺伝子変異が同定されている。

この疾患では肥満や飲酒に関連しない脂肪肝が合併することが報告されているが、その発症機構は不明である。本研究の目的は、通常の脂肪肝とは臨床像の異なる CTLN2 随伴性脂肪肝の発症メカニズムを明らかにすることである。

【方法】1998年から2012年の14年間で当院にて肝組織が得られた CTLN2 16例を対象とした。また生体肝移植ドナー7例の肝組織を対照として用いた。凍結肝組織から RNA・蛋白を抽出し、脂質代謝関連遺伝子の発現量を定量 PCR 法やイムノプロットなどを用いて解析した。

【結果】CTLN2では全例で肝臓に脂肪沈着を認めたものの、痩せ型であった。脂肪酸輸送・活性化に関連する CD36, FABP1 (fatty acid-binding protein 1), ACSL1 (long-chain acyl-CoA synthase 1), 脂肪酸β酸化に関連する CPT1A (carnitine palmitoyl-CoA transferase 1α), ACADM (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase), ACOX1 (acyl-CoA oxidase 1), リポ蛋白分泌に関連する MTTP (microsomal triglyceride transfer protein) の mRNA 発現は CTLN2 で有意に低下し、脂肪沈着量と負の相関を示した。脂肪酸β酸化能を反映する血中ケトン体は CTLN2 で有意に低値であった。遺伝子発現の結果とあわせて、CTLN2 では肝臓での脂肪酸β酸化が顕著に抑制されていることが示唆された。一方、脂質新規合成酵素である FASN (fatty acid synthase), ACLY (ATP citrate lyase), DGAT (diacylglycerol O-acyltransferase) 1/2 などの発現には差がなかった。脂肪酸β酸化は核内受容体α型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 PPARα (peroxisome proliferator-activated receptor α) に強力に制御されているので、PPARα に関しても検討したところ、PPARα の発現量・機能ともに CTLN2 で著明に低下しており、脂肪沈着量と逆相関を呈した。さらに CTLN2 患者の肝臓では JNK (c-Jun N-terminal kinase) のリン酸化が亢進しており、PPARα の発現を低下させる一因と推測された。

【結論】PPARα の低下とその結果として生じる脂肪酸代謝異常が、CTLN2 における脂肪肝形成の主たる分子機構であった。これらの結果は、尿素回路異常症と脂質代謝・PPARα との関連を示す新知見を提示していると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

成人発症 II 型シトルリン血症 (以下 CTLN2) は我が国で比較的多く見られる尿素回路異常症で、原因と

して *SLC25A13* 遺伝子の変異が同定されている。この疾患では肥満や飲酒に関連しない脂肪肝が合併することが報告されているが、その発症機構は不明である。本研究は、通常非アルコール性脂肪肝疾患とは臨床像の異なる CTLN2 随伴性脂肪肝の発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。1998年から2012年に当院にて肝組織が得られた CTLN2 16例を対象とし、凍結肝組織から RNA・蛋白を抽出し、脂質代謝関連遺伝子の発現量を定量 PCR 法やイムノプロットなどを用いて解析した。また生体肝移植ドナー7例の肝組織を対照として用いた。

その結果、木村岳史は以下の結論を得た。

1. CTLN2患者の肝臓では、全例で組織学的に脂肪沈着を認めた。
2. 脂肪酸輸送・活性化に関連する CD36・FABP1 (fatty acid-binding protein 1)・ACSL1 (long-chain acyl-CoA synthase 1), 脂肪酸β酸化に関連する CPT1A (carnitine palmitoyl-CoA transferase 1α)・ACADM (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase)・ACOX1 (acyl-CoA oxidase 1), リポ蛋白分泌に関連する MTTP (microsomal triglyceride transfer protein) の mRNA 発現が CTLN2患者の肝臓で有意に低下し、脂肪沈着量と負の相関を示した。
3. 脂肪酸β酸化能を反映する血中ケトン体は CTLN2患者で有意に低値であった。遺伝子発現の結果とあわせて、CTLN2患者では肝臓での脂肪酸β酸化が顕著に抑制されていることが示唆された。
4. 脂質新規合成酵素である FASN (fatty acid synthase), ACLY (ATP citrate lyase), DGAT (diacylglycerol O-acyltransferase) 1/2 などの発現には差がなかった。
5. 脂肪酸β酸化の強力な調節因子である核内受容体α型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 PPARα (peroxisome proliferator-activated receptor α) に関して検討したところ、PPARα の発現量・活性とともに CTLN2患者の肝臓で著明に低下しており、脂肪沈着量と逆相関を呈した。
6. CTLN2患者の肝臓では JNK (c-Jun N-terminal kinase) のリン酸化が亢進しており、PPARα を低下させる一因と推測された。

今回の研究は、CTLN2患者の肝臓において脂質代謝遺伝子の発現解析を行った初の研究である。PPARα の低下とその結果として生じる脂肪酸β酸化

化の低下が、CTLN2における脂肪肝形成の主たる分子機構であった。これらの結果は、尿素回路異常症と脂質代謝・PPAR α との関連を示す新知見であると考

えられた。従って主査、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。

Detergent-dependent separation of postsynaptic density, membrane rafts and other subsynaptic structures from the synaptic plasma membrane of rat forebrain (シナプス後肥厚部, 膜ラフト及び他のシナプス内構造の分離・精製過程の系統的解析)

趙 麗 穎

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】シナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) の精製法は1970年代後半に確立され、この方法により主として Type I (興奮性) PSD が精製されると言われてきた。以来、この精製 PSD は生化学的に克明に解析が進められてきた。1997年になると、脂質ラフト (後に膜ラフト) の概念が提案された。PSD と膜ラフトはともに 4°C で界面活性剤不溶性であるが、信州大学神経可塑性学研究室は、シナプスにおける Triton X-100 不溶性の PSD と膜ラフトは密度の差によりショ糖密度勾配 (SDG) 超遠心法によって分離されること、またシナプス膜 (synaptic plasma membrane) を比較的低濃度の Triton X-100 で処理した後、界面活性剤不溶性膜画分 (detergent-insoluble membrane, DRM, いわゆる膜ラフト画分) 中に PSD-膜ラフト複合体が存在することを報告した。また、シナプス膜のオクチルグルコシド (n-octyl β -D-glucoside, OG) 処理は PSD と DRM を完全に分離することも報告した。これらの結果は、シナプス膜内のサブコンポーネントの可溶化は、界面活性剤処理の条件、例えば、界面活性剤の種類、界面活性剤の濃度または界面活性剤：タンパク質比率によってかなり異なることを示唆していた。また、精製された脳シナプス画分は不均一で、前脳から調製したシナプトソームやシナプス膜は Type I と Type II (抑制性) シナプスを含む。しかし、この様にヘテロなシナプスや PSD を体系的に分離・同定する研究はまだ行われていなかった。これらのシナプスのサブ構造間の解剖学的関係および相互作用や、シナプスの分子構築は詳細には明らかにされてはいない。例えば、Type II PSD の分離法は確立されていない。PSD とシナプス後部膜ラフトの間の、より詳細な相互作用を解明するために、私たちは、3種類のマイルドな界面活性剤 Triton X-100, OG または CHAPSO を濃度を変えて用いてラット前脳から調製したシナプス膜を可溶化し、

得られたシナプス内構造を SDG にて分離して、その分離のプロセスを系統的に解析した。

【実験方法】PSD とシナプス後部膜ラフトの精製：6週齢ラットの前脳から調製したシナプス膜を様々な濃度のマイルドな界面活性剤 (Triton X-100, OG, CHAPSO) で処理した後、SDG にかけて、12画分を分離・回収した。各画分のタンパク質の分布は電気泳動/銀染色で検出した。SDG 上の Type I 及び Type II シナプスタンパク質の分布、シナプス膜ラフトマーカーの分布をウェスタンブロットティングにてそれぞれのマーカー分子を検出することにより調べた。また、主要な画分の構造を電子顕微鏡で観察し、各画分に含まれる構造とその構成分子の対応を調べた。

【実験の結論と考察】Type I と Type II タンパク質は相互に排他的な分布をしていた。Triton X-100 処理後に Type I PSD は主に沈渣 (第12画分) と不溶性画分 8 に分布していた。従来の方法で精製される PSD は、これら 2つの PSD プールの混合物であることが示唆されたが、Type II の PSD は混在していなかった。Type I PSD と膜ラフトの結合は Triton X-100 処理時には観察されたが、OG や CHAPSO での処理時には検出されなかった。一方、Type II PSD と膜ラフトの相互作用は Triton X-100 では観察されず、OG や CHAPSO の処理時には観察された。Type II シナプスのマーカーである gephyrin (scaffolding protein) と GABA 受容体は、gephyrin が容易に可溶化されるため、解離していた。また、Type I PSD タンパク質は高濃度の OG により可溶化されることが分かった。さらに、CHAPSO 処理により新規のシナプスサブ構造を含む画分が複数同定された。これらは今後の研究対象になると考えられた。GluA は PSD に結合したサイトの他に、PSD から解離したサイト (非 PSD プール) にも存在することが OG と CHAPSO 処理により明らかになった。以上の結果は、分子レベルでのシナプス構造の理解を深めるために有益で

あると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

シナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) の精製法は1970年代後半に確立され、この方法により主として Type I (興奮性) PSD が精製されると考えられてきた。この研究を行う以前の研究において、信州大神経可塑性学教室の研究によって、以下のことが明らかになっていた。つまり、シナプス膜 (synaptic plasma membrane, SPM) から Triton X-100 を用いて PSD を精製する過程で、PSD の他に、軽い Triton X-100 不溶性画分が同時に得られること。この軽い画分は、コレステロールとスフィンゴ脂質に富んでおり膜ラフトであること。シナプス膜をオクチルグルコシド (n-octyl β -D-glucoside, OG) 処理で可溶化すると、PSD と膜ラフトが完全に分離し、かつ PSD-free の膜ラフトが得られること。さらに、シナプス膜内のサブコンポーネントの可溶化は、界面活性剤処理の条件、例えば、界面活性剤の種類、界面活性剤の濃度または界面活性剤：タンパク質比率によってかなり異なること。また、精製された脳シナプス画分は不均一で、前脳から調製したシナプトソームやシナプス膜は Type I と Type II (抑制性) シナプスの両者を含有すると考えられていたが、それらを界面活性剤処理して得られる PSD の heterogeneity, 例えば Type I PSD Type II PSD のどちらを含むのか、あるいは両方を含むのか、という点についてさえ、明らかにならなかった。そこで、申請者はシナプスのサブ構造間の解剖学的関係およびそれらの相互作用や、シナプスの分子構築を詳細に知るために、ヘテロジナスなシナプスや PSD の分離生成過程を体系的に調べた。6 週齢ラットの脳から調製したシナプス膜 (SPM) を様々な濃度のマイルドな界面活性剤 (Triton X-100, Octyl β -D-glucoside [OG], CHAPSO) で処理した後、ショ糖密度勾配遠心にかけて、12画分を分離した。各画分のタンパク質の分布を電気泳動/銀染色で検出

し、Type I 及び Type II シナプスタンパク質の分布、シナプス膜ラフトマーカートの分布をウェスタンブロットティングにて検出した。また、主要な画分に含まれるシナプス膜由来の構造を電子顕微鏡で観察し、各画分に含まれる構造とその構成分子の対応を調べた。

その結果、以下のような結果を得た。

1. Type I と Type II PSD タンパク質はショ糖密度勾配遠心の後、相互に排他的な分布をしていた。
2. Triton X-100 処理後に Type I PSD は主に沈渣 (第12画分) と不溶性画分 8 に分布していた。
3. 従来に確立された方法で精製される PSD は、これら 2 つの PSD のプールの混合物であることが示唆されたが、Type II の PSD は含有していなかった。
4. Type I PSD と膜ラフトの複合体は Triton X-100 処理時には観察されたが、OG や CHAPSO での処理時には検出されなかった。一方、Type II PSD と膜ラフトの相互作用は Triton X-100 では観察されず、OG や CHAPSO 処理時には観察された。
5. Type II シナプスのマーカーである gephyrin (scaffolding protein) と GABA 受容体は、gephyrin が容易に可溶化されるため、解離していた。
6. Type I PSD タンパク質は高濃度の OG により可溶化されることが分かった。
7. CHAPSO 処理により新規のシナプスサブ構造を含む画分が複数同定された。
8. GluA は PSD に結合したサイトの他に、PSD から解離したサイト (非 PSD プール) にも存在することが OG と CHAPSO 処理により明らかになった。

以上の結果は、分子レベルでのシナプス構造の理解を深めるために有益であり、今後のシナプス可塑性の分子レベルでの研究を正しく進めていく上で不可欠な基礎情報を提供するもの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。

The ratio of plasma aldosterone concentration to potassium in adrenocorticotropin stimulation test is a possible new index for diagnosis of aldosterone-producing adenoma in patients with primary aldosteronism (原発性アルドステロン症患者において、ACTH 負荷試験による血漿アルドステロン値/血清カリウム値比がアルドステロン産生腺腫の診断に有用な可能性がある)

石井 宏 明

(論文の内容の要旨)

【目的】 原発性アルドステロン症 (PA) は、最近の報

告では全高血圧患者の約 5-10% を占めると言われており、二次性高血圧の中で最も頻度の高い疾患の 1 つ

である。疾患頻度の増加の背景として、画像診断の普及に伴い腹部超音波検査やCT検査を受ける機会が増え、偶然副腎腫瘍が見つかるといういわゆるインシデントローマの発見頻度が増えたことやARR（血漿アルドステロン濃度/血漿レニン活性比）と呼ばれる採血によるPAのスクリーニング検査が普及したことなどが影響していると考えられる。日本におけるPAの確定診断について、まずは上記スクリーニング陽性例に対してカプトプリル負荷試験、立位フロセミド負荷試験などの機能検査を行い暫定的な診断をつけた上で、局在診断目的に副腎静脈サンプリング検査（AVS）を行うことがゴールドスタンダードとなっている。この局在診断こそがPAの診断において非常に重要で、その結果により外科治療が可能となるためである。PAは通常2つのカテゴリーに分類され、アルドステロン産生腺腫（APA：aldosterone-producing adenoma）と過形成による特発性アルドステロン症（IHA：idiopathic hyperaldosteronism）である。AVSの結果、APAの可能性が高い（片側性アルドステロン過剰分泌）と診断されれば外科治療により根治が見込める可能性がある。現在、その局在診断においてAVSがゴールドスタンダードとなっているものの、その検査自体は侵襲性もあり、どこの施設でも手軽に行える検査ではない。今回当科における4年間でAVSを施行したPA患者のデータを解析し、片側性アルドステロン過剰分泌の存在をあらかじめ迅速ACTH負荷試験で予測するための因子を探索した。

【方法】2009年4月から2013年3月までの4年間に当科でPAと診断した81症例のうちAVSを施行した59症例とさらにその中で迅速ACTH負荷試験を施行した28症例について、AVSによる局在診断の結果（片側アルドステロン過剰分泌をprobable APA、両側アルドステロン過剰分泌例をprobable IHAとそれぞれ定義）をもとにROC曲線を用いて迅速ACTH負荷試験の有効性について検討した。PAの確定診断における機能検査、AVSの局在診断における評価は日本内分泌学会の診療治療ガイドラインに準じて行った。

【結果】PA診断症例のうちAVS施行症例は59例で男女比27：32、年齢は平均53歳で治療前の平均血圧144/88 mmHgであった。治療一か月後の平均血圧は131/82 mmHgと有意な低下を認め、手術例では全例降圧剤の減量もしくは中止に至った。検査データでは平均血漿アルドステロン濃度（PAC）378 pg/ml、平均血漿レニン活性（PRA）0.14 ng/ml/hr、平均血清K値

3.4 mEq/l（59症例中30例に低K血症を認めた）、平均尿中アルドステロン濃度13.4 μg/dayであった。CT画像による腫瘍局在は右側22例、左側23例、両側7例、副腎腫大なし7例であった。全81症例に対してAVS施行例は59例（73%）で、手術施行例は26例（AVS例における46%、PA例における32%）であった。AVSによる局在診断では、32症例をprobable APA、17症例をprobable IHAと診断した。手術を施行したprobable APA 26症例において、25症例は病理学的にAPAと診断され、1例のみ過形成と診断された。

AVS症例のうち迅速ACTH負荷試験の施行例は28症例で、probable APA群17例、その他の群11例であった。群間で各種パラメーターを比較したところ、血清K値とACTH負荷試験前後のPACで有意差を認め、APA群で明らかな血清K値の低下、PACの上昇を認めた。このことからPAC/血清K値（APR）の有効性を検討したところ、ACTH負荷試験後において顕著な有意差を認めた。またprobable APAの診断を予測するACTH負荷試験において、複数のパラメーターをROC解析にて評価した。ACTH負荷試験30分後のAPRにおいてcut offを102.6とすることで感度94.1%、特異度90.9%を得た。

【結語】PA患者において、迅速ACTH負荷試験による血漿アルドステロン値/血清カリウム値比がアルドステロン産生腺腫の診断に有用な可能性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

本研究では、当科で経験した原発性アルドステロン症（PA）症例のデータを解析し、アルドステロン産生腺腫（APA）を非侵襲的に予知すること、つまり副腎静脈サンプリング（AVS）検査を積極的に進めるべき症例を予知する因子を探索した。

2009年4月から2013年3月までの4年間に糖尿病・内分泌代謝内科でPAと診断した81症例のうちAVSを施行した59症例とその中で迅速ACTH負荷試験を施行した28症例について、AVSによる局在診断の結果（片側アルドステロン過剰分泌をprobable APA、両側アルドステロン過剰分泌例をprobable IHAとそれぞれ定義）をもとにROC解析を用いて迅速ACTH負荷試験の有効性について検討した。

その結果、石井は以下の結果を得た。

PA診断症例のうちAVS施行症例は59例で男女比27：32、年齢は平均53歳、治療前の平均血圧144/88 mmHgで治療1か月後の平均血圧は131/82 mmHg

と有意な低下を認めた。検査データでは平均血漿アルドステロン濃度 (PAC) 378 pg/ml, 平均血漿レニン活性 (PRA) 0.14 ng/ml/hr, 平均血清 K 値 3.4 mEq/l であった。AVS による局在診断では, 32 症例を probable APA, 17 症例を probable IHA と診断した。手術を施行した probable APA 26 症例において, 25 症例は病理学的に APA と診断され, 1 例のみ過形成と診断された。

AVS 症例のうち迅速 ACTH 負荷試験の施行例は 28 症例で, probable APA 群 17 例, その他の群 11 例であった。群間で各種パラメーターを比較したところ, 血清 K 値と ACTH 負荷試験前後の PAC で有意差を

認め, probable APA 群で明らかな血清 K 値の低下, PAC の上昇を認めた。このことから PAC/血清 K 値 (APR) の有効性を検討した結果, ACTH 負荷試験後において顕著な有意差を認めており, ACTH 負荷試験における複数のパラメーターを ROC 解析にて評価した。ACTH 負荷試験 30 分後の APR において cut off を 102.6 とすることで感度 94.1 %, 特異度 90.9 % を得た。

これらの結果より, PA 患者において, ACTH 負荷試験による APR が APA の診断に有用な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 Development and Trial of a Medication Discontinuation Program in the Department of Forensic Psychiatry (医療観察法病棟における服薬中断プログラムの開発と試用に関する研究)

村 杉 謙 次

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】病状の長期的安定や再他害行為防止といった触法精神障害者治療の目的を達成するためには, 服薬アドヒアランスの向上が必要不可欠である。日本初の触法精神障害者の医療と社会復帰に関する法律となる医療観察法の対象患者の疾病の多くは統合失調症であるが, これは各種疾病の中でもとりわけ服薬アドヒアランスの向上が得にくいと言われている。医療観察法対象患者の入院治療を行うにあたり, 服薬アドヒアランスの向上を促すために, 新規抗精神病薬の単剤治療や疾病教育をはじめとした多角的なアプローチが標準的に実施されているが, これらのアプローチによっても, 服薬アドヒアランスが向上せず, 頑なに薬物療法を含めた治療を拒否し続ける患者も存在する。そのような患者に対し, 個々の特性に合わせて構造化した方法で抗精神病薬を中断し, 精神症状の変化を主観的かつ客観的にモニタリングすることで薬効の自覚を促し, ひいては服薬アドヒアランスの向上を目指す, 服薬中断プログラム (Medication Discontinuation Program: MDP) を開発した。我々は, 精神科の治療プログラムに MDP を導入する価値があると考え, MDP に何らかの有用性があるかどうかについて調査した。

【方法】小諸高原病院医療観察法病棟において, 新規抗精神病薬の単剤治療や疾患・向精神薬に対する心理教育といった標準的な入院治療を行ったものの, 服薬アドヒアランスの向上が得られなかった 7 例の統合失

調症患者に対し MDP を実施し, 実施前後の薬に対する構えの調査票 (Drug Attitude Inventory-30: DAI-30) の評点を比較した。MDP の長期的有用性も確認するため, MDP 実施後 6~14 カ月後にも DAI-30 評定を実施した。さらに, DAI-30 の全 30 個の質問項目を, ① 服薬の必要性の認識, ② 薬効の自覚, ③ 薬に対する印象の 3 つの下位項目に分けて検討することで, 服薬アドヒアランスの向上にどのような因子が影響するのかについても調査した。また, MDP 実施中に実施されている他の治療プログラムが, 患者の服薬に対する態度に影響を及ぼしている可能性を確認するため, 介入群と基本属性を一致させた 17 例の統合失調症患者を非介入群として, 介入群と同時期に DAI-30 評定を実施し, 前後の DAI-30 評点を比較した。

【結果】介入群において, MDP 実施前後で, DAI-30 合計点が有意に上昇しており ($-2.3 \pm 13.2 \rightarrow 18.3 \pm 9.2$, $P=0.002$), 6~14 カ月後の DAI-30 合計点も 19.9 ± 8.5 との結果が得られ, 評点の下降はみられなかった。DAI-30 の 3 つの下位項目においても, MDP 実施前後で評点は有意に上昇していた (① $P=0.015$, ② $P=0.002$, ③ $P=0.014$)。また, 非介入群においては, DAI-30 評点の上昇は認められなかった。

【結論】本研究によって, MDP が服薬アドヒアランスを向上させる可能性を持っていることが示唆され, MDP の効果は長期間持続することも示唆された。また, MDP が多角的に服薬アドヒアランスの向上に寄与することも示唆された。本研究は, 試験的研究であ

り、いくつかの検討課題も存在しているが、MDPが、服薬アドヒアランスを向上させることが大きな課題となる統合失調症治療において、有用な治療プログラムになりうると考えられた。また、今後、MDPを司法精神医療においてのみではなく、一般精神医療においても実施し、MDPの有用性や限界をより明確にしていくことを検討したい。

(論文審査の結果の要旨)

日本初の触法精神障害者の医療と社会復帰に関する法律となる医療観察法の主要な目的は再他害行為の防止であり、その目的を達成するためには、医療観察法対象患者の服薬アドヒアランスの向上が必要不可欠である。しかし、医療観察法対象患者の疾病の多くを占める統合失調症は、各種疾病の中でもとりわけ服薬アドヒアランスの向上が得にくい疾病と言われており、医療観察法対象患者の入院治療においては、服薬アドヒアランスの向上を促すために、新規抗精神病薬による単剤治療や疾病教育、服薬教育をはじめとした多角的なアプローチが標準的に実施されている。しかし、これらのアプローチによっても、服薬アドヒアランスが向上せず、頑なに薬物療法を含めた治療を拒否し続ける患者も存在する。そのような患者に対し、構造化した方法で抗精神病薬を中断し、精神症状の変化を主観的かつ客観的にモニタリングすることで服薬アドヒアランスの向上を目指す、服薬中断プログラム (Medication Discontinuation Program : MDP) を開発し、その有用性について調査した。

MDPの有用性を検討するために、小諸高原病院医療観察病棟において、標準的な入院治療を行ったものの、服薬アドヒアランスの向上が得られなかった7例の統合失調症患者に対しMDPを実施し、実施前後の薬に対する構えの調査票 (Drug Attitude Inven-

tory-30 : DAI-30) の評点を比較した。MDPの長期的有用性も確認するため、MDP実施後6~14カ月後にもDAI-30評定を実施した。さらに、DAI-30の全30個の質問項目を、①服薬の必要性の認識、②薬効の自覚、③薬に対する印象の3つの下位項目に分けて検討することで、服薬アドヒアランスの向上にどのような因子が影響するのかについても調査した。また、MDP実施期間中に実施されている他の治療プログラムが、患者の服薬に対する態度に影響を及ぼしている可能性を確認するため、介入群と基本属性を一致させた17例の統合失調症患者を非介入群として、介入群と同時期にDAI-30評定を実施し、前後のDAI-30評点を比較した。

その結果、村杉謙次は次の結論を得た。

1. 介入群において、MDP実施前後で、DAI-30合計点が有意に上昇していた。
2. 介入群における、MDP終了6~14カ月後のDAI-30合計点は下降していなかった。
3. 介入群において、DAI-30の3つの下位項目の評点全てが、MDP実施前後で有意に上昇していた。
4. 非介入群においては、合計点、3つの下位項目共に、DAI-30評点の上昇は認められなかった。

これらの結果より、MDPが服薬アドヒアランスを向上させる可能性を持っていることが示唆され、MDPの効果は長期間持続することも示唆された。また、MDPが多角的に服薬アドヒアランスの向上に寄与することも示唆された。本研究は、試験的研究であり、いくつかの検討課題も存在しているが、MDPが、服薬アドヒアランスの向上が大きな治療課題となる統合失調症治療において、有用な治療プログラムとなる可能性も示唆されている。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。

Gene-gene interaction between *EPAS1* and *EGLN1* in patients with high-altitude pulmonary edema (高地性肺水腫患者における *EPAS1* と *EGLN1* の遺伝子相互関係)

堀内俊道

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】高地肺水腫 (high altitude pulmonary edema : HAPE) は、心肺疾患のない健常者が急速に2,500 m以上に高度上昇した際の順応不全であり、低酸素下で肺動脈が収縮することによって非心原性の肺水腫が惹起される。低酸素環境へ適合する病態生理においては、低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor :

HIF) がさまざまな遺伝子の誘導を制御し適応を図ることが知られている。これまでにチベット族やシェルパ族など高地居住民族の低酸素環境への適応に、HIFの活性化経路に存在するさまざまな遺伝子が関与する可能性が示されている。例えば、HIF2 α として知られる endothelial PER-ARNT-SIM domain protein 1 (*EPAS1*) や、prolyl hydroxylase domain protein 2

(PHD2) として知られる *egl nine homolog 1 (EGLN1)* が挙げられる。*EPAS1* に存在する単塩基多型 (SNPs) はチベット族やシェルパ族で低酸素への耐性と関連しており、*EGLN1* に存在する SNPs はインド・イラン語族の高地適応と関連している。しかし、元来の高地居住民族の高地適応は何世代にもわたり低酸素環境に暴露され続けて自然選択の結果獲得された形質であり、低地居住者が急速に高地に移動することによって急性発症する HAPE の病態に、高地民族の HIF の遺伝生物学的な事象があてはまるかは不明である。

我々は、日本人の HAPE 発症に、HIF 経路の分子遺伝学的な変異が関与しているかどうかを検討するため、*EPAS1* と *EGLN1* に存在する SNPs を用いて、HAPE 既往者と健常登山者の 2 群間で比較検討を行った。

【方法】1971年から2013年の間に日本アルプス登山中に HAPE を発症し、信州大学医学部附属病院あるいは関連病院に入院した59人のHAPE既往者群(HAPE-s) (男性52人, 女性8人, 平均年齢34.2歳) と、対照として67人の健常登山者群 (HAPE-r) (男性58人, 女性9人, 平均年齢37.0歳) を対象とした。全ての被検者は低地に居住する日本人であり、既往に心肺疾患のないことを確認した。

EPAS1 の SNPs から 3 つ (rs13419896, rs4953354, rs4953388) と *EGLN1* の SNPs から 3 つ (rs1435166, rs7542797, rs2153364) を、国際 HapMap 計画2005の日本人の遺伝子型データから選択した。HAPE-s と HAPE-r からそれぞれ静脈血を採取し、 -70°C で凍結保存した。ゲノムDNAを白血球から抽出し、選出した 6 つの SNPs について、TaqMan[®] SNP Genotyping Assay を行い、遺伝子型と遺伝子頻度を決定した。

2 群間の比較にはカイ二乗検定を用いたが、検体数が 5 以下であった場合は Fisher の直接確率計算法を行った。両側検定の P 値は <0.05 で有意とした。次いで、*EPAS1* と *EGLN1* の 2 遺伝子の関連をみるため、遺伝子間で任意の SNPs のアレルの組み合わせを多元解析 (multi-dimensional reduction : MDR) で評価した。

【結果】両群ともに 6 つの SNPs の遺伝子型の分布は Hardy-Weinberg 平衡に合致した。アレルの発現頻度に有意差はなく、*EPAS1* と *EGLN1* の各遺伝子単独では HAPE の発症に関連しないことが示唆された。

2 遺伝子の関連を調べるための各 SNPs のアレルの

組み合わせでは、ともにホモ接合型ではない、*EGLN1*: rs2153364 (A/G) x *EPAS1*: rs13419896 (G/A) が検討に最適であった。この中で、日本人の HAPE 発症に関して、各アレルが *EGLN1*: rs2153364 AA x *EPAS1*: rs13419896 GA の組み合わせがもっともハイリスクであった (9 subjects of HAPE-s vs. 3 subjects of HAPE-r, RR=3.41 with 95 % CI from 0.97 to 11.99)。一方、*EGLN1*: rs2153364 AG x *EPAS1*: rs13419896 AA の組み合わせがもっともローリスクであった (1 subjects of HAPE-s vs. 5 subjects of HAPE-r, RR=0.23 with 95 % CI from 0.03 to 1.89)。

【結論】*EPAS1* と *EGLN1* それぞれ単独では日本人の HAPE 発症への関連を認めなかったが、これら 2 遺伝子の相互作用が発症に関与する可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

高地肺水腫 (high altitude pulmonary edema : HAPE) は、低地に住む健常者が急速に 2,500 m 以上の高度に移動した際の順応不全により発症する。低酸素環境で恒常性を維持する病態生理においては、低酸素誘導因子 (HIF) が、低酸素環境下でさまざまな遺伝子を制御し適応を図ることが知られている。*EPAS1* は HIF のサブユニットである HIF2A をコードし、その単塩基多型 (SNPs) は高地居住民族であるチベット族やシェルパ族において低酸素への耐性と関連することが報告されている。また、*EGLN1* は HIF の活性を制御する PHD2 をコードし、その SNPs はインド・イラン語族の高地適応と関連することが報告されている。しかし、高地居住民族の高地適応は何世代にもわたり低酸素環境に暴露され自然選択の結果獲得された形質であり、低地居住者が急速に高地に移動することによって発症する HAPE で、高地民族における HIF に関する遺伝生物学的な事象があてはまるかは解明されていない。HIF 経路による HAPE 発症の機序を明らかにするため、*EPAS1* で 3 個、*EGLN1* で 3 個の SNPs の解析を行った。HAPE 既往者群 (HAPE-s) 59 例と健常登山者群 (HAPE-r) 67 例を対象とし、6 つの SNPs を用いて TaqMan[®] SNP Genotyping Assay で遺伝子の発現頻度を解析した。さらに、遺伝子-遺伝子の相互関係が HAPE の発症に関与するか否かを多元解析 (MDR) 法にて検討した。

この結果、堀内は以下の結論を得た。

1. アレルの発現頻度, および遺伝子型の分布は HAPE-s 群と HAPE-r 群の 2 群間で有意差はなく, *EPASI* と *EGLNI* の各遺伝子単独では HAPE の発症には関与しないことが示唆された。
2. 2 つの遺伝子の相互作用が HAPE 発症に関与する可能性を MDR 法にて解析したところ, *EPASI* の rs13419896 と *EGLNI* の rs2153364 の組み合わせ

を持つ場合, 両群間に有意差を認めた。

これらの結果から, *EPASI*, *EGLNI* 遺伝子それぞれ単独では有意差を認めなかったが, *EPASI*, *EGLNI* の相互作用が, 日本人の HAPE 発症に関与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。

Pathophysiological function of endogenous calcitonin gene-related peptide in ocular vascular diseases (眼内血管関連疾患における内因性カルシトニン遺伝子関連ペプチドの病態生理的作用)

鳥 山 佑 一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は, カルシトニン遺伝子の alternative splicing によって作られる 37 個のアミノ酸残基からなるペプチドであり, 神経系, 消化器, 血管などに発現がみられ, 強力な血管拡張作用をはじめ多彩な生理活性を有する因子である。我々はこれまで, CGRP のファミリー因子であるアドレノメデュリンが, 眼内病的血管新生に係わることを報告してきた。近年, CGRP についても血管新生や免疫系への関与や, 眼内での分布が報告されているが, 眼内 CGRP の病態生理学的意義の詳細は解明されていない。

我々は, カルシトニン-CGRP 遺伝子配列のうち, CGRP に特異的なエクソン 5 のみを欠損させることで, カルシトニンは正常に保たれ, CGRP のみ欠損するノックアウトマウス (CGRP^{-/-}マウス) を樹立した。本研究では, CGRP^{-/-}マウスを用いて, 眼内の生理的および病的血管新生における CGRP の役割を検討した。

【材料および方法】 野生型 (WT) マウスと CGRP^{-/-}マウスにおいて, 生理的網膜血管新生, および, 酸素誘導網膜症 (OIR) モデルとレーザー誘導脈絡膜新生血管 (CNV) モデルにおける病的血管新生について解析を行った。

【結果】 出生後の生理的網膜血管新生と OIR モデルにおける病的網膜血管新生において, CGRP^{-/-}マウスと WT マウスに明らかな差はみられなかった。眼内における CGRP とその受容体の遺伝子発現を real time PCR で解析すると, 受容体遺伝子は網膜よりも色素上皮・脈絡膜でより強い発現を認めた。眼内の CGRP は網膜より脈絡膜において病態生理学的意義を有すると考え, 次に滲出型加齢黄斑変性症のモデル

である, レーザー誘導 CNV モデルにおける脈絡膜血管新生の解析を行った。CNV モデルにおいて, レーザー瘢痕の面積は両者に差を認めなかったが, レーザー処置後 14 日における脈絡膜新生血管の面積は, WT マウスに比べ, CGRP^{-/-}マウスの方が有意に大きかった。フルオレセイン蛍光眼底造影においても, CGRP^{-/-}マウスでは WT マウスに比べ, 脈絡膜新生血管からの漏出をより強く認めた。またレーザー後 7 日において CGRP^{-/-}マウスではレーザー照射部により多数のマクロファージ浸潤を認めた。Real time PCR では野生型マウス, CGRP^{-/-}マウスともにレーザー後に色素上皮・脈絡膜において TNF- α の発現上昇を認めたが, CGRP^{-/-}マウスでより発現が強かった。CGRP による CNV 抑制の機構を明らかにするため, WT マウスからチオグリコレート誘導マクロファージを採取し, リポ多糖 (LPS) 刺激による TNF- α の産生を ELISA にて定量したところ, CGRP の前投与により, マクロファージからの TNF- α の産生が有意に抑制された。さらにヒト網膜色素上皮細胞に TNF- α を投与し, ZO-1 免疫染色にて細胞間 tight junction (TJ) を評価したところ, 濃度依存性に TNF- α による TJ の破綻が認められた。CGRP の治療応用への検討のため, WT マウスの CNV モデルに対して CGRP または CGRP アンタゴニストの持続皮下投与を行ったところ, CGRP 投与による有意な CNV の抑制とアンタゴニスト投与による CNV の増大を認めた。さらに, CGRP^{-/-}マウスの CNV 増大と TNF- α の関連を明らかにするため, TNF- α 産生抑制作用を有する lenalidomide を, WT マウスと CGRP^{-/-}マウス各々に投与したところ, CGRP^{-/-}マウスでは, WT マウスと同程度まで, CNV およびマクロファージ浸潤が抑制された。

【結論】内因性 CGRP は TNF- α 産生を抑制し、網膜色素上皮を保護することで脈絡膜新生血管の進展を抑制していると考えられた。CGRP は滲出型加齢黄斑変性症における脈絡膜新生血管に対する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)

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、多彩な生理活性を有するペプチドであり、血管新生や免疫系への関与、さらに眼内での発現が報告されているが、眼内 CGRP の病態生理的作用の詳細は解明されていない。そこで鳥山佑一は、CGRP ノックアウトマウス (CGRP^{-/-}マウス) を用いて、網膜の生理的血管新生および酸素誘導網膜症 (OIR) モデルにおける病的血管新生の解析、眼内における CGRP 受容体の発現解析、レーザー誘導脈絡膜新生血管 (CNV) モデルにおける病的血管新生やマクロファージ浸潤の解析、チオグリコレート誘導マクロファージを用いた、CGRP による TNF- α 産生抑制作用の解析、ヒト網膜色素上皮細胞を用いた細胞間タイトジャンクション (TJ) への TNF- α の影響の解析、CGRP および CGRP アンタゴニストの持続皮下投与による CNV モデルへの影響の解析、TNF- α 産生抑制薬投与による CNV モデルへの影響の解析を行った。

その結果、鳥山佑一は次の結論を得た。

1. 生理的網膜血管新生および OIR モデルにおける病的血管新生では、野生型 (WT) マウスと CGRP

-/-マウスに差はみられなかった。

2. 定量的 RT-PCR にて CGRP 受容体の遺伝子は網膜よりも脈絡膜で強く発現していた。
3. CNV モデルにおいて、CGRP^{-/-}では野生型に比べ、CNV の拡大と血管漏出の増加、マクロファージ浸潤の増加を認めた。
4. CGRP 前投与により、LPS 刺激によるマクロファージの TNF- α 産生が抑制された。
5. ヒト網膜色素上皮細胞において、TNF- α は濃度依存性に、細胞間 TJ の形成を障害した。
6. WT マウスの CNV モデルにおいて、CGRP の持続皮下投与による CNV およびマクロファージ浸潤の抑制と、CGRP アンタゴニスト投与による CNV 増大を認めた。
7. WT マウスおよび CGRP^{-/-}マウスの CNV モデルにおいて、TNF- α 産生抑制薬の投与により、CGRP^{-/-}マウスでは WT マウスと同程度まで、CNV およびマクロファージ浸潤が抑制された。

以上の結果から、鳥山佑一は眼内における内因性 CGRP が TNF- α 産生を抑制し、網膜色素上皮を保護することで脈絡膜新生血管の進展を抑制していること、CGRP が加齢黄斑変性症における脈絡膜新生血管に対する新たな治療薬となる可能性を示した。

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。

Rapid single nucleotide polymorphism based method for hematopoietic chimerism analysis and monitoring using high-speed droplet-allele-specific PCR and allele-specific quantitative PCR (液滴型塩基特異的高速 PCR および塩基特異的定量 PCR を用いた造血幹細胞移植における一塩基多型を使用したキメリズム解析)

平 千 明

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】キメリズム解析は同種造血幹細胞移植においてドナー/レシピエント比率を数値定量化する方法であり、移植後の生着確認や再発予測に重要である。解析には、ゲノム DNA 上の多型領域 (特に数塩基の繰り返し配列である short tandem repeat, STR 領域) を用いた STR-PCR 法が汎用されているが、PCR 増幅の非特異産物であるスタッターピークや、STR 領域の長さに依存した増幅効率の影響を受けることが知られている。近年、より正確な定量解析法として一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms,

SNP) を利用した方法が多く報告されており、塩基特異的 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR) が有用である。本研究では、SNP を用いたキメリズム解析として、ドナー/レシピエント識別領域の移植前迅速スクリーニングのための液滴型高速 PCR による塩基特異的 droplet-AS-PCR 法と、レシピエント DNA の移植後定量解析のためのリアルタイム PCR による塩基特異的定量 PCR (AS-quantitative PCR, AS-qPCR) の開発を行った。

【方法】同種造血幹細胞移植を施行した20組のドナー/レシピエントからなる40人を対象とした。SNP は多

型頻度の高い5領域を対象とした。プライマーの3'末端を修飾することで塩基特異的プライマーを作成し、droplet-AS-PCR・AS-qPCRともに同一プライマー・プローブを使用した。ドナー/レシピエント識別率はdroplet-AS-PCRによるSNPジェノタイピングにより評価した。移植後経時変化の追跡が可能であった6名について、AS-qPCRを用いた定量解析によりレシピエント比率を算出し、STR-PCRの結果と比較した。【結果】 Droplet-AS-PCRを用いることで、5領域全てのSNPで8分以内にジェノタイピングが可能であった。20組のドナー/レシピエント識別率は、5領域単独で5-50%，5領域全てのSNPを用いると95% (19/20)であった。20組中10組では、2領域以上の識別領域が得られた。AS-qPCRによる6名の定量解析の結果、2名がSTR-PCRの結果と乖離し、患者1は2領域のSNPでレシピエント由来細胞が2.04-2.91%検出されたのに対し、STR-PCRでは検出感度以下であった。患者2は3領域のSNPでは6カ月後を除いた全ての検出点でレシピエント由来細胞が1.25-2.16%検出された。

【考察】 移植前のドナー/レシピエント識別領域選択方法として、droplet-AS-PCRを用いることで迅速で簡便にスクリーニング可能であった。識別率を100%にするために、人種を考慮した領域選択や組み合わせが必要である。移植後の定量解析で乖離した2例は、いずれもSTR-PCRのスタッターピークや増幅効率による偽陰性または偽陽性が考えられた。AS-qPCRを用いることで、より正確にレシピエントDNAを検出することが可能であった。本研究で構築したdroplet-AS-PCRとAS-qPCRを組み合わせたキメリズム解析はSTR-PCRの欠点を補う方法であり、容易に臨床応用可能である。

【結論】 同種造血幹細胞移植において、一塩基多型(SNP)を指標とした移植前迅速スクリーニング法(droplet-AS-PCR)と移植後定量法(AS-qPCR)を組み合わせることで、迅速性かつより正確な定量性を併せ持つキメリズム解析法が構築できた。解析工程も簡便であり、臨床的有用性が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

キメリズム解析で汎用されているshort tandem repeat (STR) 領域を使用したSTR-PCRは、識別率が高く定量性もあるが、PCR増幅の非特異産物であるスタッターピークや、STR領域の長さに依存した増幅効率の影響を受けることが知られている。また、

検出行程が煩雑で時間を要する。本研究において、一塩基多型(single nucleotide polymorphisms, SNP)を用いて、移植前スクリーニング法と移植後定量解析について新たなキメリズム解析手法を構築した。

プライマーの3'末端を修飾したプライマーの感度・特異性を評価し、各SNPにおける塩基特異的プライマーを作成した。また、20組のドナー/レシピエントを用いて、液滴型高速PCR装置によるdroplet-allele specific-PCR (droplet-AS-PCR)法で、移植前スクリーニングとしてSNPジェノタイピングを行った。SNP領域は事前検討により多型頻度の高い5種を用いた。さらに、移植後の定量解析として、6症例において塩基特異的定量PCR(AS-quantitative PCR, AS-qPCR)と汎用法であるSTR-PCRの経時変化を比較した。

その結果、平千明は次の結論を得た。

1. Droplet-AS-PCRにより、8分以内でSNPジェノタイピングが可能であった。
2. 5種のSNPの各識別率は5-50%で、5領域全てを用いることで95% (19/20)の識別率を得た。
3. 経時変化の追跡が可能であった6例中2例で、STR-PCRとの乖離点が見られた。
4. AS-qPCRはSTR-PCRでみられる非特異反応や増幅効率による影響が少なく、より正確な定量結果が得られた。
5. 経時変化の追跡が可能であった6例中4例で、2種以上の識別領域が得られた。
6. 本法の総解析時間が、STR-PCRを用いた汎用法より半分以下に短縮された。

これらの結果より、移植前のドナー/レシピエント識別領域選択方法として、droplet-AS-PCRを用いることで迅速で簡便にスクリーニング可能であった。識別率を100%にするためには、人種を考慮した領域選択や組み合わせが必要である。移植後の定量解析では、AS-qPCRとSTR-PCRで結果が乖離した例が見られたが、STR-PCRによるスタッターピークや増幅STR領域の長さに依存したPCR増幅効率による影響が考えられ、AS-qPCRを用いることで、より正確にレシピエントDNAを検出することが可能であった。本研究で構築したdroplet-AS-PCRとAS-qPCRを組み合わせたキメリズム解析はSTR-PCRの欠点を補う方法であり、高い臨床的有用性が示唆された。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。

Role of the Programmed Death-1 (PD-1) pathway in regulation of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease (タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス誘導による免疫性脱髄疾患における PD-1 pathway を介した炎症制御機構)

滝 沢 章

(論文の内容の要旨)

【背景および目的】多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)は中枢神経系の脱髄疾患である。MSは自己免疫疾患の一つであることが明らかとなっているが、自己免疫反応が生じる原因は未だ不明であり、根治療法も確立されていない。MSの患者は欧米に多く、欧米における有病率は人口10万人当たり約50人である。欧米では一般的によく知られた疾患であり、社会的な関心も非常に高い。一方、日本における有病率は人口10万人あたり8-9人と欧米に比べ少ないが、患者数は近年増加傾向にあり、今後さらに増加すると考えられているため、治療法の研究、開発は急務である。

本研究は、MSのウイルス誘導性動物実験モデルである「タイラー脳脊髄炎ウイルス(Theiler's murine encephalomyelitis virus:TMEV)により誘導される脱髄疾患(TMEV-induced demyelinating disease:TMEV-IDD)」を用い、MSの発症機序の解明及び、治療法確立のための解析を行った。TMEV-IDDは、中枢神経系に慢性感染したTMEVに対する免疫反応を起因とし、中枢神経系の脱髄が生じる。さらに、中枢神経系の髄鞘抗原に対する自己免疫反応による障害が生じていることも報告されている。このように、TMEV-IDDの脱髄は、ウイルス感染に対する免疫反応と、自己組織に対する免疫反応の2つの背景を有しており、脱髄の結果、下肢の麻痺症状が発現する。従って、TMEV-IDDは中枢神経系に炎症性の脱髄が生じる機序を理解する上で非常に重要な動物実験モデルである。

本研究では、TMEV-IDDにおける炎症反応を詳細に解析する上で、T細胞上に発現する抑制性の共刺激受容体として近年注目されているProgrammed Death 1 (PD-1)に着目した。PD-1は活性化したT細胞、B細胞、抗原提示細胞上に発現し、中でもT細胞上に発現するPD-1は、T細胞の活性化を抑制する役割を持つ。このPD-1のリガンドとして、PD-L1およびPD-L2の2種類が同定されている。これらのリガンドは共に炎症時や感染時に発現が増加することが知られている。PD-1 pathwayの主な機能として、

①抑制性共刺激によって、T細胞の反応を抑制し、末梢性寛容において重要な役割を果たす、②2次リンパ組織においてだけでなく、末梢臓器における自己免疫寛容の維持にも深く関わっている、③慢性ウイルス感染時における免疫系の疲弊状態にも関与している、といった点が報告されている。

以上の背景から、本研究はTMEV-IDDにおけるPD-1 pathwayの役割を解析することにより、PD-1 pathwayの治療応用への可能性を検討した。

【方法および結果】初めにTMEV感染によるPD-1、PD-L1の発現量の変化を*in vitro*レベルにて検討するため、ナイーブマウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、GM-CSFによって樹状細胞を誘導した。この樹状細胞にTMEVを感染させ、PD-1、PD-L1のmRNA発現量をリアルタイムRT-PCR法にて測定した。その結果、TMEVを感染させた樹状細胞においてPD-1発現量が約3倍、PD-L1発現量が約12倍増加した。次に、TMEV感染によるPD-1、PD-L1の発現量変化を*in vivo*においても追跡するため、TMEV-IDDマウスを作製し、TMEV-IDDの進行に伴うPD-1、PD-L1の発現量をリアルタイムRT-PCR法にて検討した。その結果、脊髄中のPD-1、PD-L1の発現量は、麻痺症状の進行に伴い、約15倍まで増加した。

さらに、TMEV-IDDにおけるPD-1 pathwayの役割を詳細に解析するため、TMEV-IDDマウスに抗PD-1抗体を投与することにより、PD-1 pathwayを阻害し、免疫反応及び麻痺症状発現への影響を検討した。抗PD-1抗体の投与期間は、TMEV-IDDの麻痺症状が発症し始める、TMEV接種後20日目まで区切り、麻痺症状発症前の期間(Induction phase)と発症後の期間(Effector phase)に分けて行った。その結果、Induction phaseに抗PD-1抗体を投与した群では、麻痺症状の発症が有意に遅延した。一方、抗PD-1抗体をEffector phaseに投与した群では、麻痺症状が有意に増悪した。さらに、対照群及び抗PD-1抗体投与群をTMEV接種から34日後に屠殺し、病理組織学的な解析を行うと共に、脾細胞、脊髄浸潤細胞にお

る細胞内炎症性サイトカインをフローサイトメトリーにて解析した。その結果、Effector phase に抗 PD-1 抗体を投与した群は、脊髄における炎症及び脱髄がより高度に進行していた。加えて、脾細胞、脊髄浸潤細胞における IFN- γ , TNF- α の産生が亢進していることが明らかとなった。

【結論】以上の結果から、TMEV-IDD において PD-1 pathway が中枢神経系の炎症反応に対して抑制的に働くことが明らかとなった。MS 治療法の確立に向け、PD-1 pathway を制御することが重要であることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

多発性硬化症は (multiple sclerosis) は中枢神経系の脱髄疾患で難病指定されている。様々な原因でおこるとされているが感染や原因不明の要因を引き金する自己反応性の免疫の成立が原因ではないかとされている。現在、根治治療法はなく原因解明による治療法開発が望まれている。タイラーウイルスをネズミ脳内に接種すると多発硬化症が発症することを利用して、当人が所属する研究室では多発硬化症における免疫と発症の関係および免疫抑制による治療法開発に鋭意取り組んでいる。

当該研究は T 細胞上に発現する抑制性の共刺激受容体として注目されている Programmed Death 1 (PD-1) とそのリガンドである PD-L1 の関与について研究した。タイラーウイルス感染による多発性硬化症の発症過程で PD-1 および PD-L1 の発現が増加すること、阻害型の PD-1 抗体投与によって多発性硬化症の進行が促進することを示した。さらに、組織化学的観察により PD-1 抗体投与群では炎症性細胞の浸潤が亢進することを示した。また、炎症性サイトカインの産生も亢進されることを示した。これらの結果は多発性硬化症の発症過程で免疫抑制性の PD-1/PD-L1 系が抑制的に作用することを示している。

従来の多発硬化症の発症機序の研究は免疫促進的に働く免疫システムの研究が中心であったが、この研究は免疫抑制的なシステムに注目しておこなわれた。結論として免疫抑制的に機能する PD-1/PD-L1 システムが抑制的に働くことを示した。この結果は発症のメカニズムとして免疫抑制系の破たんが多発性硬化症の増悪因子である可能性を示すとともに、新たな治療法開発のシードとなることが期待される。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として認めた。