

## 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
森島 優 (スポーツ 医科学)	甲第1025号	27. 3. 31	Effects of home-based interval walking training on thigh muscle strength and aerobic capacity in female total hip arthroplasty patients: a randomized, controlled pilot study (女性人工股関節全置換術後患者に対する在宅におけるインターバル歩行トレーニングが大腿筋力, 有酸素運動能に与える効果: 無作為比較対照パイロット試験)	加藤博之	本田孝行 今村 浩
本林光雄 (小児医学)	甲第1026号	28. 3. 31	An increase in circulating B cell-activating factor in childhood-onset ocular myasthenia gravis (小児眼筋型重症筋無力症患者における血清B細胞活性化因子の上昇)	池田修一	本田孝行 鈴木龍雄
樋口佳代子 (加齢生物学)	甲第1027号	28. 3. 31	Cytological Features of Mammary Analogue Secretory Carcinoma of Salivary Gland: Fine-Needle Aspiration of Seven Cases (唾液腺乳癌類似分泌癌の細胞学的特徴—7例の穿刺吸引細胞診の報告)	中山 淳	菅野祐幸 宇佐美真一
原 洋祐 (分子腫瘍学)	甲第1028号	27. 3. 31	Analysis of mutations in the <i>IL2RG</i> gene in 2 Asian infants with X-linked severe combined immunodeficiency (X連鎖重症複合免疫不全症のアジア人2症例における <i>IL2RG</i> 遺伝子の変異の解析)	塩沢丹里	宇佐美真一 竹下敏一
高沢裕子 (皮膚科学)	甲第1029号	27. 9. 30	Notch down-regulation in regenerated epidermis contributes to enhanced expression of interleukin-36 $\alpha$ and suppression of keratinocyte differentiation during wound healing (創傷治癒過程において, 再生表皮でのNotchの低下はIL-36 $\alpha$ の発現の増加と表皮細胞の分化抑制に寄与する)	駒津光久	佐々木克典 伊藤研一
劉 婷婷 (小児医学)	甲第1030号	27. 3. 31	A novel surfactant protein C L55F mutation associated with interstitial lung disease alters subcellular localization of proSP-C in A549 cells (間質性肺病変患者に認められたサーファクタント蛋白質C遺伝子の新規変異L55Fは, A549細胞においてproSP-Cの細胞質内での局在を変化させる)	小池健一	花岡正幸 本田孝行
野村博紀 (運動機能学)	甲第1031号	28. 3. 31	Specific biological responses of the synovial membrane to carbon nanotubes (カーボンナノチューブに対する滑膜の特異的な生物学的反応)	森泉哲次	中山 淳 菅野祐幸

審査学位論文要旨

木下朋実 (内科学(3))	甲第1032号	28. 3.31	Peripheral sympathetic nerve dysfunction in adolescent Japanese girls following immunization with the human papillomavirus vaccine (子宮頸がんワクチン接種後の日本人女児に出現した, 末梢性交感神経障害の検討)	塩沢丹里	川真田樹人 田 渕 克 彦
神 應 太 朗 (内科学(2))	甲第1033号	28. 3.31	Outcomes of blood flow suppression methods of treating high flow access in hemodialysis patients with arteriovenous fistula (血液透析患者における内シャント過剰血流に対する血流抑制術の効果)	石 塚 修	田 中 榮 司 岡 田 健 次
小 口 貴 也 (内科学(2))	甲第1034号	28. 3.31	Investigation of Susceptibility Genes Triggering Lachrymal/Salivary Gland Lesion Complications in Japanese Patients with Type 1 Autoimmune Pancreatitis (自己免疫性膵炎1型の日本患者における涙腺唾液腺病変の合併を引き起こす感受性遺伝子の研究)	田 中 榮 司	瀧 伸 介 浅 村 英 樹
関 口 智 裕 (内科学(2))	甲第1035号	28. 3.31	Serum Cell Death Biomarkers for Prediction of Liver Fibrosis and Poor Prognosis in Primary Biliary Cirrhosis (原発性胆汁性肝硬変における肝線維化と予後不良の予測のための血清細胞死マーカー)	宮 川 真 一	本 田 孝 行 菅 野 祐 幸
西 恵 理 子 (遺伝医学・ 予防医学)	甲第1036号	28. 3.31	Surgical intervention for Esophageal atresia in Patients with trisomy 18 (18トリソミー症候群の食道閉鎖症に対する外科的介入について)	小 池 健 一	塩 沢 丹 里 野 見 山 哲 生
福 嶋 敏 郎 (内科学(1))	甲第1037号	27. 3.31	Clinical outcomes in patients with small cell lung cancer in a single institute: comparative analysis of radiographic screening with symptom-prompted patients (当施設における小細胞肺癌患者の臨床的特徴—画像検査発見例と有症状発見例の比較検討—)	本 田 孝 行	伊 藤 研 一 野 見 山 哲 生
鬼 頭 宗 久 (運動機能学)	甲第1038号	28. 3.31	Clinical Outcome of Deep-seated Atypical Lipomatous Tumor of the Extremities with Median-term Follow-up Study (四肢深部に発生した異型脂肪腫様腫瘍の中期臨床成績)	中 山 淳	角 谷 眞 澄 小 泉 知 展
所 博 和 (画像医学)	甲第1039号	28. 3.31	Usefulness of free-breathing readout-segmented echo-planar imaging (RESOLVE) for detection of malignant liver tumors: Comparison with single-shot echo-planar imaging (SS-EPI) (肝悪性腫瘍の検出における, 自由呼吸下Readout-segmented echo planar imaging (RESOLVE)の有用性:呼吸同期下Single-shot echo planar imaging (SS-EPI) との比較)	本 郷 一 博	宮 川 真 一 田 中 榮 司

審査学位論文要旨

南澤 匡 俊 (内科学(5))	甲第1040号	28. 3.31	Prognostic Significance of Neuroadrenergic Dysfunction for Cardiovascular Events in Patients with Acute Myocardial Infarction (急性心筋梗塞患者における自律神経異常は心血管イベントの予後予測因子である)	今村 浩	本田孝行 岡田健次
代田 智 樹 (外科学(1))	甲第1041号	28. 3.31	Heat Shock Protein 90 Is a Potential Therapeutic Target in Cholangiocarcinoma (胆管癌における Heat Shock Protein 90発現の治療標的としての可能性)	田中 榮 司	奥山隆平 伊藤研一
中川 道 隆 (加齢生物学)	甲第1042号	28. 3.31	Carpal tunnel syndrome: a common initial symptom of systemic wild-type ATTR (ATTRwt) amyloidosis (手根管症候群は全身性野生型トランスサイレチンアミロイドーシスの初発症状として好発する)	樋口 京 一	池田宇一 加藤博之
百瀬 能 成 (運動機能学)	甲第1043号	27. 3.31	Chondroitin sulfate synthase 1 expression is associated with malignant potential of soft tissue sarcomas with myxoid substance (コンドロイチン硫酸転移酵素1の発現は粘液産生軟部肉腫の悪性度と関連する)	菅野 祐 幸	小泉知展 森泉哲次
石田 高 志 (麻酔蘇生学)	甲第1044号	27. 3.31	Spinal nociceptive transmission by mechanical stimulation of bone marrow (骨髄内機械刺激による痛覚刺激の脊髄への伝達)	山田 充 彦	加藤博之 田 渕 克 彦
柴 直 子 (小児医学)	甲第1045号	27. 3.31	Differential roles of MMP-9 in early and late stages of dystrophic muscles in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy (デュシャンヌ型筋ジストロフィーにおけるMMP-9の役割)	池田 修 一	福嶋義光 沢村達也
小林 伸 輔 (運動機能学)	甲第1046号	27. 3.31	An advanced in situ imaging method using heavy metal-doped hollow tubes to evaluate the biokinetics of carbon nanotubes in vivo (中空に重金属を内包したカーボンナノチューブの in vivo における体内分布評価に対する新しい in situ イメージング法)	菅野 祐 幸	角谷 眞 澄 佐々木克典
阿部 直 之 (内科学(5))	甲第1047号	28. 3.31	A 2-year follow-up of oxidative stress levels in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: a subanalysis of the ALPS-AMI study (ST 上昇型急性心筋梗塞患者における酸化ストレスの2年間の追跡調査)	駒津光久	山田 充 彦 岡田健次
小野里知哉 (神経難病学)	甲第1048号	28. 3.31	Axonal TDP-43 aggregates in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (孤発性筋萎縮性側索硬化症における軸索内 TDP-43凝集体)	池田 修 一	鈴木龍雄 田 渕 克 彦
原 田 真 (内科学(2))	甲第1049号	27. 3.31	The Optimal Cut-off Value of Ankle Brachial Index for Screening Cardiovascular Disease Risk in Hemodialysis Patients (血液透析患者の心血管病リスクをスクリーニングするための足関節上腕収縮期血圧比 (ABI) カットオフ値の検討)	石 塚 修	駒津光久 田中 榮 司

審査学位論文要旨

濱 峰 幸 (内科学(1))	甲第1050号	27. 3.31	Health-related Quality of Life in Patients with Pulmonary Infection with Nontuberculous Mycobacterium (肺非結核性抗酸菌症患者における健康関連 QOL の評価)	本田 孝行	竹下 敏一 駒津 光久
斉 芳 芳 (歯科口腔 外科学)	甲第1051号	28. 3.31	Construction and characterization of human oral mucosa equivalent using hyper-dry Amniotic membrane as a matrix (ヒト乾燥羊膜を用いた培養口腔粘膜上皮シートの臨床応用に関する研究)	本田 孝行	塩沢 丹里 宇佐美 真一
劉 穎 業 (加齢生物学)	甲第1052号	27. 3.31	Distribution of Transmissible Amyloid Proteins in the Liver with Apolipoprotein A-II Amyloidosis (マウス ApoA-II アミロイドーシス肝臓における伝播力を持ったアミロイド蛋白質の分布)	谷口 俊一郎	鈴木 龍雄 竹下 敏一
百 武 愛 子 (衛生学公衆 衛生学)	甲第1053号	28. 3.31	Cross-sectional Observation of the Relationship of Depressive Symptoms with Lifestyles and Parents' Status among Japanese Junior High School Students (中学生の抑うつ症状と生活習慣・保護者の状態との関連に関する横断研究)	福嶋 義光	駒津 光久 小池 健一
城 甲 泰 亮 (精神医学)	甲第1054号	28. 3.31	Patterns of hippocampal atrophy differ among Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and late-life depression (アルツハイマー病と健忘型軽度認知障害と老年期うつ病の海馬萎縮の形態の比較)	池田 修一	本郷 一博 角谷 眞澄
大工原誠一 (内科学(2))	甲第1055号	27. 3.31	Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3) as a useful immunohistochemical marker for the diagnosis of adenocarcinoma of small intestine (小腸癌の診断に有用な免疫染色マーカーとしてのIMP3)	中山 淳	宮川 眞一 奥山 隆平
金 井 圭 太 (内科学(2))	甲第1056号	28. 3.31	Autoimmune pancreatitis can transform into chronic features similar to advanced chronic pancreatitis with functional insufficiency following severe calcification (自己免疫性膵炎は、石灰化を呈した後に機能障害を伴う慢性膵炎へ移行しうる)	田中 榮司	宮川 眞一 駒津 光久

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
大江 厚 (保健学専攻 生涯保健 学分野 成人保健 学領域)	甲第11号	27. 3.31	Characteristics of Trunk Control During Crook-lying Unilateral Leg Raising in Different Types of Chronic Low Back Pain Patients (慢性腰痛患者のタイプの違いにおける片脚下肢挙上時の体幹制御様式の特徴)	百瀬 公人	横川 吉晴 GOH AH CHENG
田中佐千恵 (保健学専攻 生涯保健 学分野 成人保健 学領域)	甲第12号	28. 3.20	Effects of Early-Stage Group Psychoeducation Programme for Patients with Depression (うつ病患者に対する早期集団心理教育プログラムの効果)	埴原 秋児	上村 智子 小林 正義
上 條 明 生 (保健学専攻 医療生命 科学分野 医療生命 科学領域)	甲第13号	28. 3.20	Immunohistochemical study of the membrane skeletal protein, membrane protein palmitoylated 6 (MPP6), in the mouse small intestine (マウス小腸における膜骨格蛋白MPP6の免疫組織化学的検討)	奥村 伸生	相良 淳二 寺田 信生
向 井 早 紀 (保健学専攻 医療生命 科学分野 医療生命 科学領域)	甲第14号	28. 3.20	Differences in the function and secretion of congenital aberrant fibrinogenemia between heterozygous $\gamma$ D320G (Okayama II) and $\gamma$ $\Delta$ N319- $\Delta$ D320 (Otsu I) (先天性異常フィブリノゲン血症ヘテロ接合体 $\gamma$ D320G (OkayamaII) と $\gamma$ $\Delta$ N319- $\Delta$ D320 (Otsu I) の機能および分泌の違い)	石田 文宏	相良 淳二 奥村 伸生

Effects of home-based interval walking training on thigh muscle strength and aerobic capacity in female total hip arthroplasty patients : a randomized, controlled pilot study (女性人工股関節全置換術後患者に対する在宅におけるインターバル歩行トレーニングが大腿筋力, 有酸素運動能に与える効果 : 無作為比較対照パイロット試験)

森 島 優

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】人工股関節全置換術後患者 (THA) は, その手術侵襲から筋力, 身体活動量が低下し, その結果有酸素運動能の低下を引き起こすことが指摘されている。しかし, これらを改善させることを目的とした在宅ベースでのトレーニング効果を示した研究はない。そこで, 我々は「インターバル速歩トレーニング (IWT) は THA 患者の筋力および有酸素運動能を改善させる」という仮説を立て, 検証した。

【方法】術後 2 カ月以上経過した 28 名の女性 THA 患者を対象とした。彼女らを実験的に IWT 群 14 名, コントロール (CNT) 群 14 名の 2 群に割り付けた。IWT 群には, 最高酸素摂取量 ( $\dot{V}O_{2peak}$ ) の 70% 強度以上の速歩と普通歩行を交互に 3 分ずつ繰り返す IWT を, 12 週間, 速歩時間が週あたり 60 分以上として実施させた。一方, CNT 群には同期間中は通常通りの生活を送るように指導した。両群とも運動量計測機器を用いて, 身体活動量としてエネルギー消費量を

継続測定した。トレーニング前後で等尺性膝伸展筋力 ( $F_{EXT}$ )、膝屈曲筋力 ( $F_{FLX}$ )、 $\dot{V}O_{2peak}$ 、無酸素性作業閾値 ( $\dot{V}O_{2AT}$ )、股関節痛、歩行満足度、健康関連 QOL (SF-36) を測定し、その効果を判定した。

【結果】IWT 群で13名、CNT 群14名がプロトコルを完了した。IWT 群で1名の解析除外者(最終評価欠損)を認めたが、同者を含めてトレーニングアドヒアランスは100%であった。トレーニング期間中の転倒や筋骨格系の異常等の有害事象の発生は認めなかった。トレーニング前後でIWT 群は、術側の  $F_{FLX}$  が23% ( $P=0.03$ )、非術側の  $F_{FLX}$  が14% ( $P=0.006$ ) 有意に増加したが、CNT 群は術側の  $F_{FLX}$  のみ向上を認めた ( $P=0.03$ )。  $\dot{V}O_{2peak}$  はIWT 群で8% ( $P=0.08$ )、  $\dot{V}O_{2AT}$  は13% ( $P=0.002$ ) の増加を認めたが、CNT 群では変化を認めなかった。さらに、これらの変化量はIWT 群がCNT 群と比較して有意に高かった ( $P<0.05$ )。一方、股関節痛は両群ともに変化を認めなかった。歩行満足度はIWT 群でのみ有意に向上した ( $P=0.047$ )。健康関連 QOL はSF-36の活力スコアがIWT 群で有意に向上した ( $P=0.005$ )。しかし、両群ともにその他の尺度に変化を認めなかった。【結論】IWT はTHA 患者の筋力および有酸素運動能を改善させる在宅トレーニングとして有効である可能性が明らかになった。

#### (論文審査の結果の要旨)

人工股関節全置換術後患者 (THA) は、その手術侵襲から筋力、身体活動量が低下し、その結果有酸素運動能の低下を引き起こすことが指摘されている。しかし、これらを改善させることを目的とした在宅ベースでのトレーニング効果を示した研究はない。今回、インターバル速歩トレーニング (IWT) のTHA 患者における筋力および有酸素運動能へ与える効果について検証した。

### An increase in circulating B cell-activating factor in childhood-onset ocular myasthenia gravis (小児眼筋型重症筋無力症患者における血清B細胞活性化因子の上昇)

本 林 光 雄

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】B cell-activating factor (BAFF) は tumor necrosis factor superfamily の一員で、マクロファージ、樹状細胞、および好中球等の骨髄系細胞から分泌され、B細胞のホメオスタシスを保つ上で中心的な役割を担っている。BAFF の上昇はB細胞のア

術後2カ月以上経過した28名の女性THA 患者を対象とした。彼女らをして無作為にIWT群14名、コントロール (CNT) 群14名の2群に割り付けた。IWT 群には、最高酸素摂取量 ( $\dot{V}O_{2peak}$ ) の70%強度以上の速歩と普通歩行を交互に3分ずつ繰り返すIWT を、12週間、速歩時間が週あたり60分以上として実施させた。一方、CNT 群には同期間中は通常通りの生活を送るように指導した。両群とも運動量計測機器を用いて、身体活動量としてエネルギー消費量を継続測定した。トレーニング前後で等尺性膝伸展筋力 ( $F_{EXT}$ )、膝屈曲筋力 ( $F_{FLX}$ )、 $\dot{V}O_{2peak}$ 、無酸素性作業閾値 ( $\dot{V}O_{2AT}$ )、股関節痛、歩行満足度、健康関連 QOL (SF-36) を測定し、その効果を判定した。

その結果、森島 優は次の結論を得た。

1. IWT 群に有害事象の発生はなく、またトレーニングアドヒアランスは100%であった。
2. トレーニング前後でCNT 群では術側  $F_{FLX}$  のみ増加したのに対し、IWT 群は、術側・非術側ともに  $F_{FLX}$  が有意に増加した。
3.  $\dot{V}O_{2AT}$  はCNT 群では変化を認めなかったのに対し、IWT 群は有意に増加を認めた。
4.  $\dot{V}O_{2peak}$ 、 $\dot{V}O_{2AT}$  の変化量はIWT 群がCNT 群と比較して有意に高かった。
5. 股関節痛は両群ともに変化を認めなかった。
6. 歩行満足度はIWT 群でのみ有意に向上した。
7. 健康関連 QOL はSF-36の活力スコアがIWT 群で有意に向上した。

これらの結果より、THA 患者に対するIWT は股関節痛を悪化させることなく、筋力、有酸素運動能を改善させる在宅トレーニングとして有効である可能性が示唆された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

ポトースに対して抑制的に働くため、様々な自己免疫疾患の病態に関連していると考えられている。全身性エリテマトーデスではBAFF を標的とした分子標的療法も臨床応用されている。

重症筋無力症 (MG) は神経筋接合部のアセチルコリン受容体 (AChR) に対する自己抗体の産生に基づ

く自己免疫疾患で、成人 MG 患者では血清 BAFF 値が上昇することが報告されている。小児 MG は、①眼筋型 (OMG) が多い、②抗 AChR 抗体陰性例が多い、③性差がない、④胸腺腫が少ない、⑤自然寛解が多い、といった成人 MG と異なる臨床的な特徴があるものの、成人 MG との免疫学的背景の相違はほとんど明らかになっていない。

本研究では、小児 OMG 患者における正確な病態の評価および合併症の少ない治療の開発に寄与することを目的として、血清 BAFF 値を含めた小児 OMG 患者の免疫学的プロフィールを解析した。

【対象と方法】1999年4月から2014年4月までに信州大学医学部附属病院小児科を受診し、保護者から書面で同意が得られた小児を対象とした。以下の4項目、すなわち①日内変動を有する眼筋の筋力低下を認める、②眼筋以外の筋力低下を認めない、③塩酸エドロホニウム試験陽性、④僧帽筋における反復刺激試験でM波の減衰なし、の全ての項目を満たした患者を OMG と診断した。OMG 患者のうち、免疫抑制療法 (IST) を開始する前の患者を Pre-IST OMG 群とした。Pre-IST 群の中で、IST 後も評価できた患者を Post-IST OMG 群とした。炎症性疾患の合併がないてんかんおよび発達障害患者を対照とした (Control 群)。血清 BAFF 値は enzyme-linked immune-sorbent assay で、血清サイトカイン値 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) は cytometric beads array で解析した。統計学的解析には PASW statistics ver 18 を用いた。関連のない2群間の有意差検定には、正規分布に従う場合は unpaired *t* test を、正規分布に従わない場合は Mann-Whitney *U* test を用いた。Pre-IST OMG 群における2つの項目間の相関の評価には、Spearman's correlation coefficient using the rank test を用いた。 $P < 0.05$  を統計学的に有意とした。本研究は信州大学医学部医倫理委員会の承認を得て行った。

【結果】Pre-IST OMG 群9名 (男:女=3:6) およびControl群20名 (男:女=7:13) を対象とした両群間の臨床所見および検査所見には有意差は認めなかった。Pre-IST OMG 群の血清 BAFF 値は、Control 群に比べて有意に高値であった。Post-IST OMG 群の4名 (男:女=1:3) では、血清 BAFF 値は全例で低下し、統計学的に有意差を認めた。Pre-IST OMG 群の血清 BAFF 値と抗 AChR 抗体価との間には、統計学的に有意な正の相関を認めた。Pre-IST

OMG 群において、血清 BAFF 値と CD4+細胞、CD8+細胞、CD4+/8+比、および CD19+細胞との間に統計学的に有意な相関は認めなかった。IL-17A を含む血清サイトカイン値は、Pre-IST OMG 群と Control 群との間で有意差を認めなかった。

【考察】BAFF は小児 OMG 患者の病態に重要な役割を果たしており、血清 BAFF 値は病勢の有用な指標になると考えられた。これは成人での既報告と同様の結果であった。一方、血清 IL-17A 値は Pre-IST OMG 群と Control 群との間で有意差はなく、小児 OMG 患者の末梢血リンパ球中の Th17細胞の割合が上昇しないとの既報告の結果も合わせると、小児 OMG の病態に Th17細胞は関与していないと思われる。これは成人と異なる結果であり、小児期発症と成人期発症の違いに関連していることが示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

B cell-activating factor (BAFF) はB細胞のアポトーシスに対して抑制的に働き、様々な自己免疫疾患の病態に関連している。重症筋無力症 (MG) は神経筋接合部のアセチルコリン受容体 (AChR) に対する自己抗体の産生に基づく自己免疫疾患で、成人 MG では血清 BAFF 値が上昇することが報告されている。小児 MG は成人 MG と異なる臨床的な特徴があるものの、成人 MG との免疫学的背景の相違は明らかになっていない。小児眼筋型 MG (OMG) 患者における正確な病態の評価および合併症の少ない治療の開発に寄与することを目的として、血清 BAFF 値を含めた小児 OMG 患者の免疫学的プロフィールを解析した。

1999年4月から2014年4月までに信州大学医学部附属病院小児科を受診し、保護者から書面で同意が得られた小児を対象とした。①日内変動を有する眼筋の筋力低下を認める、②眼筋以外の筋力低下なし、③塩酸エドロホニウム試験陽性、④僧帽筋における反復刺激試験でM波の減衰なし、の4項目を満たした患者を OMG と診断した。OMG 患者のうち免疫抑制療法 (IST) 開始前の患者を Pre-IST OMG 群 (9名) とし、IST 後の患者を Post-IST OMG 群 (4名) とした。炎症性疾患の合併がないてんかんおよび発達障害患者を対照とした (Control 群, 20名)。

その結果、本林光雄は次の結論を得た。

1. Pre-IST OMG 群の血清 BAFF 値は、Control 群に比べて統計学的に有意に高値であった。
2. Post-IST OMG 群の血清 BAFF 値は、IST 前と比べて全例で低下し、統計学的に有意差を認めた。

3. Pre-IST OMG 群の血清 BAFF 値と抗 AChR 抗体価との間には、統計学的に有意な正の相関を認めた。

4. 血清 IL-17A 値は、Pre-IST OMG 群と Control 群との間で有意差を認めなかった。

これらの結果より、BAFF は小児 OMG 患者の病態に重要な役割を果たしており、血清 BAFF 値は病

勢の有用な指標になると考えられた。一方、血清 IL-17A 値は Pre-IST OMG 群と Control 群との間で有意差はなく、小児 OMG の病態に関与していないと思われた。これは成人と異なる結果であり、小児と成人の違いに関連していることが示唆された。主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### Cytological Features of Mammary Analogue Secretory Carcinoma of Salivary Gland: Fine-Needle Aspiration of Seven Cases (唾液腺乳腺類似分泌癌の細胞学的特徴—7例の穿刺吸引細胞診の報)

樋口 佳代子

#### (論文の内容の要旨)

【背景】唾液腺の Mammary analogue secretory carcinoma (MASC, 乳腺相似分泌癌) は2010年に Skálová によって提唱されたあらたな唾液腺腫瘍分類で、乳腺の分泌癌類似の組織像を示すとともに、乳腺の分泌癌と同じ遺伝子変異-t (12;15) (p13;q25) *ETLV6-NTRK3* 転座により形成される融合遺伝子を有することが特徴である。一方これまで唾液腺の腺房細胞癌として分類されてきた腫瘍の中には、漿液性顆粒に乏しく腺房細胞への分化が明らかでないものがあり、その中に乳腺の分泌癌類似の組織像を示すものがあることが指摘されていた。Skálová らが MASC として再分類した症例について最も重要な形態的鑑別診断は腺房細胞癌であった。以上より従来腺房細胞癌と分類されてきた腫瘍の一部が MASC に相当する可能性があると考えられるが、MASC の穿刺吸引細胞像に関する報告は未だ少ない。

【方法】過去に腺房細胞癌と診断された症例のホルマリン固定パラフィンブロック (FFPE) を用いた RT-PCR 法により *ETLV6-NTRK3* 融合遺伝子の検索を行った。15例に融合遺伝子の存在が認められ MASC と考えられた。そのうち7例で穿刺吸引検体が得られたので、それらについて細胞像を解析した。

#### 【結果】

臨床病理学的所見：症例の男女比は3：4、年齢は39歳から68歳で、平均年齢は51.6歳であった。腫瘍の部位は5例が耳下腺、1例が顎下腺、1例が副耳下腺、腫瘍径は0.8 cm～3.5 cm で平均1.8 cm であった。治療および予後については、6例で手術のみが、1例で手術に加え放射線療法が実施されたが、全例とも病期 I で、12か月から90か月の経過観察期間内には再発は

みられていない。

細胞学的所見：すべての症例において、細胞検体は細胞成分に富み、結合性の低下した合胞体様細胞集団が出現し、背景には多くの組織球が認められ、ヘモジデリンを貪食したものも多くみられた。また6例では背景あるいは集団内に粘液様物質を、4例では背景に小型リンパ球を認めた。また組織で乳頭嚢胞型パターンを示した2例では血管間質を伴った乳頭状集塊がめだち、5例では小型から中型の小濾胞状集団が出現し、管腔内に分泌物をいれていた。また全例で孤立性細胞が認められた。細胞は小型から中形で、細胞の形は立方形、紡錘形、有尾状、多辺形等多様で、核形不整は目立たず、1例を除いて核小体は不明瞭あるいは小型であった。細胞質は大小の空胞状を示し、1例では粘液をいれた signet ring cell 様の腫瘍細胞がみられた。いずれの症例も zymogen 顆粒はあきらかでなく腺房細胞への分化を積極的に示唆する所見はみられなかった。

組織学的所見：従来腺房細胞癌の増生パターンのうち、小嚢胞型増生がすべての症例にみられ、濾胞型増生は4例に、乳頭嚢胞型増生は2例に、充実性増生は1例に認められた。腫瘍細胞は空胞状の細胞質を有し、加えて4例では好酸性細胞質を示すものも混在した。核異型や核小体は概してめだたず核分裂像はほとんどみられない。diastase-PAS および Alcian blue 陽性の粘液物質が濾胞様あるいは小嚢胞様の管腔内に認められた。しかし diastase-PAS 陽性の明らかな zymogen 顆粒はいずれにも認められなかった。免疫組織化学では腫瘍細胞は mammaglobin, S-100 protein, vimentin, MUC1 がいずれの症例でも陽性であったが、amylase は陰性で、筋上皮マーカーの p63 は 2

例で一部に陽性, ki67 index は 5%~12.5%, 平均値は7.8%であった。

分子遺伝子学的所見: FFPE 検体を用いた PT-PCR では全例に *ETLV6-NTRK3* 融合遺伝子が確認された。

【考察】MASC の細胞像では背景の組織球や粘液, 結合性の低下した合胞体様細胞集団, 血管間質, 孤在細胞, 濾胞状集団などが高頻度に認められる。腫瘍細胞は小型から中型で多様な形態を示し核異型に乏しい。細胞質は空胞状で, 淡明, 時に粘液をいれている。鑑別診断としては, 腺房細胞癌の他, 粘液産生を伴う低異型の腫瘍—嚢胞腺癌や粘液腺癌, 粘表皮癌, 筋上皮関連腫瘍や化生ワルチン腫瘍などがあげられるが, 今回確認された細胞学的特徴が鑑別に役立つと考えられる。また今回の解析により従来腺房細胞癌と分類されてきた腫瘍の一部が MASC に相当することが明らかになった。

【結論】MASC の細胞像では, ヘモジデリンを含む組織球や粘液を背景に, 異型に乏しく空胞状の細胞質を有する腫瘍細胞が濾胞状あるいは乳頭状集団で出現し, zymogen 顆粒はあきらかではない。

(論文審査の結果の要旨)

唾液腺の Mammary analogue secretory carcinoma (MASC, 乳腺相似分泌癌) は2010年に Skálová により提唱され, 乳腺分泌癌同様の組織像と遺伝子変異-t(12;15)(p13;q25) *ETLV6-NTRK3* 転座により形成される融合遺伝子を有するが, 従来腺房細胞癌の一部が MASC に相当する可能性が示唆されている。しかし細胞像に関する知見は確立されていない。

そこで過去に腺房細胞癌と診断された症例のホルマリン固定パラフィンブロック (FFPE) を用いて RT-PCR 法により *ETLV6-NTRK3* 融合遺伝子の検索を

行い, 融合遺伝子陽性で MASC と考えられた 7 例について細胞像を解析した。

その結果, 樋口は以下の結果を得た。

1. 臨床病理学的所見: 症例の男女比は 3:4, 平均年齢は51.6歳, 5例が耳下腺, 1例が顎下腺, 1例が副耳下腺, 腫瘍径は平均1.8 cm であった。全例とも病期 I, 経過観察期間内無再発。
2. 細胞学的所見: 検体は細胞成分に富み, 結合性の低下した合胞体様細胞集団とヘモジデリンを貪食した組織球, 粘液様物質を認めた。また分泌物をいれた濾胞状集団, 孤在性細胞が多くみられ, 乳頭状集塊も認められた。細胞は小型から中型, 核形不整, 核小体はめだたなかった。細胞質は空胞状で zymogen 顆粒は明らかでなかった。
3. 組織学的所見: 従来腺房細胞癌の増生パターンのうち, 小嚢胞型増生が全例, 濾胞型増生は 4 例, 乳頭嚢胞型増生は 2 例, 充実性増生は 1 例にみられた。Diastase-PAS, Alcian blue 陽性の粘液が管腔内にみられ, diastase-PAS 陽性の zymogen 顆粒は明らかでない。免疫組織化学では mammaglobin, S-100 protein, vimentin, MUC1 が全例陽性, amylase 陰性, p63 は 2 例で一部に陽性, ki67 index は平均値7.8%であった。
4. 分子遺伝子学的所見: PT-PCR では全例に *ETLV6-NTRK3* 融合遺伝子が確認された。

これらの結果より MASC の細胞像では, ヘモジデリンを含む組織球や粘液を背景に, 異型に乏しく空胞状の細胞質を有する腫瘍細胞が濾胞状あるいは乳頭状集団で出現し, zymogen 顆粒は明らかではないという特徴があることが判明した。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。

Analysis of mutation in the *IL2RG* in two Asian infants with X-linked severe combined immunodeficiency (X連鎖重症複合免疫不全症のアジア人 2 症例における *IL2RG* 遺伝子の変異の解析)

原 洋 祐

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】重症複合免疫不全症 (SCID) は最も予後不良な原発性免疫不全症である。救命するためには造血幹細胞移植 (SCT) が必要で, 近年は遺伝子治療が試みられている。しかし, 重症感染症合併後では SCT の治療成績が著明に低下するため, 重症感染を

きたす前に早期診断することが生命予後の改善に重要である。SCID は遺伝学的に heterogeneous で, 変異を認める遺伝子により異なる免疫学的特徴を示す。従って, SCID の確定診断は免疫学的特徴より推測される責任遺伝子の変異を確認することによりなされる。SCID の約半数を占める X連鎖 SCID (X-SCID) は,

サイトカイン受容体の共通  $\gamma$  鎖をコードしている *IL2RG* 遺伝子の変異が原因である。この共通  $\gamma$  鎖は CD132とも呼ばれ、IL-2, IL-4, IL-7など多種類のサイトカイン受容体のサブユニットで、一般的にT細胞およびNK細胞が欠損する。

*IL2RG* に変異を認めた SCID 2例（1例は未知の変異で、他の1例は詳細な免疫学的特徴は報告されていない）について、臨床症状、特に免疫学的特徴と mRNA および共通  $\gamma$  鎖蛋白質の発現の異常について検討した。

【結果】〈症例1〉6カ月の男児。生後まもなくから感染症を繰り返した。6カ月時の血液検査では白血球数は正常範囲内であったが、リンパ球数は著減しており、血清  $\gamma$  グロブリンも低値であった。CD3<sup>+</sup>T細胞とCD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞は減少していたが、CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>B細胞数は正常範囲内であった。〈症例2〉2カ月の男児。3人の叔父が乳児期に原因不明で死亡していた。生後2カ月時に高熱を来した。白血球数の減少、好中球とリンパ球の著明な減少を認めた。低  $\gamma$  グロブリン血症、肝機能異常を認め、サイトメガロウイルス (CMV) 抗原が陽性であった。CD3<sup>+</sup>T細胞は著明に減少しており、CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞数も減少していたが、B細胞数は正常範囲内であった。抗ウイルス薬の投与で肝機能異常は改善し、好中球数、CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞数の改善を認めたが、CMV血症は持続していた。

*IL2RG* の全エクソンについて DNA シークエンスを行った。症例1では、exon 2の3'末端にナンセンス変異 (c. 269 G>A, p. Trp90X) を認めた。症例2では新規変異である exon 3の1塩基欠失 (c. 359delA, p. Lys120ArgfsX26) を認めた。

症例1の exon 1 から8までのPCR産物は正常サイズの mRNA のバンドに加えてサイズの小さなバンドから構成されていた。また、exon 2 から3にかけての mRNA のバンドは認められなかった。正常サイズの mRNA は母由来のT細胞によるものと考えられた。mRNAの配列を解析したところ、exon 2がスキップしていることが判明し、このことが *IL2RG* mRNA 発現を低下させたと考えられた。

CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>B細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞について、症例2ではさらにCD2<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞について細胞表面のCD132の発現を検討した。その結果、末梢血のCD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>B細胞のCD132発現は2例とも著明な低下を認めた。CD4<sup>+</sup>とCD8<sup>+</sup>T細胞における発現は症例1では上昇していたが、症例2では健常

者と大きな差異を認めなかった。症例2のCD56<sup>+</sup>NK細胞のCD132発現は低下していた。

経胎盤的に混入した母体由来のリンパ球の有無について検討するため、患者末梢血単核球よりCD3<sup>+</sup>細胞とCD56<sup>+</sup>NK細胞を分画し、XY-FISH法により検討した。症例1と2のCD3<sup>+</sup>T細胞ではXXシグナルがそれぞれ64.4%と93.4%であり、CD3<sup>+</sup>T細胞は主に母体由来であった。一方、症例2のCD56<sup>+</sup>NK細胞の97.0%はXYシグナルを呈し、大部分が患児由来であった。

両例に対して臍帯血移植 (CBT) を施行した。症例1に対しては免疫学的再構築とともに、臨床的回復が得られた。一方、CMV感染をきたしていた症例2では臍帯血移植後に免疫学的再構築は得られたものの、移植後経過中にCMV脳炎を発症し下肢の運動障害を残した。

【考察】一般的にX-SCIDでは、T細胞とNK細胞が欠損し、B細胞数は正常であることが診断に有用とされる。しかし、SCIDでは獲得免疫の異常をきたしているために同種細胞を排除する能力を欠くことから、母体由来リンパ球が患者末梢血中で増加する。そのため、免疫学的特徴から診断を予測することが困難となる場合がある。今回の2症例においてもCD3<sup>+</sup>T細胞が認められたが、CD132の発現とXY-FISHの結果から母由来であると判断した。このことは、CD132発現での母由来の細胞の評価において煩雑なXY-FISH法だけでなく、CD132をflow cytometryで確認することで免疫学的特徴を容易に捉えられることを示唆している。

症例1においてはT<sup>-</sup>, B<sup>+</sup>, NK<sup>-</sup>のphenotypeを示したが、新規変異である症例2においてはT<sup>-</sup>, B<sup>+</sup>, NK<sup>+</sup> phenotypeを示した。X-SCIDではNK細胞が欠損することが多く、T<sup>-</sup>, B<sup>+</sup>, NK<sup>+</sup> phenotypeのSCID患者の多くはIL-7受容体の $\alpha$ 鎖欠損によるものと報告されている。T<sup>-</sup>, B<sup>+</sup>, NK<sup>+</sup> phenotypeのX-SCID例の報告とともに母親由来のNK細胞の混入が確認された例の報告があることから、NK細胞の由来の証明が重要である。

症例2で生後初めての感染症の際にX-SCIDと診断されCBTが施行されたがCMV脳炎による後遺症を残した。このことは感染をきたしてから診断の大きな課題である。新生児スクリーニングにより、生後早期の感染症に罹患する前に診断し、治療へつなげることが本症患者の予後の改善につながると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

重症複合免疫不全症 (SCID) は救命するためには造血幹細胞移植 (SCT) が必要である。しかし、感染症合併後では SCT の治療成績が著明に低下するため、感染をきたす前に早期診断することが重要である。SCID は遺伝学的に heterogeneous で、変異を認める遺伝子により異なる免疫学的特徴を示す。従って、SCID の確定診断は免疫学的特徴より推測される責任遺伝子の変異を確認することによりなされる。SCID の約半数を占める X連鎖 SCID (X-SCID) は、サイトカイン受容体の共通  $\gamma$  鎖 (CD132) をコードしている *IL2RG* 遺伝子の変異が原因で、一般的に T細胞および NK 細胞が欠損する。

*IL2RG* に変異を認めた SCID 2例について、免疫学的特徴と mRNA および CD132発現の異常について検討した。

その結果、原らは次の結論を得た。

1. 症例 1 は 6カ月の男児で、白血球数は正常範囲内であったがリンパ球数は著減しており、血清  $\gamma$ グロブリンも低値であった。CD3<sup>+</sup>T細胞と CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK 細胞は減少していたが、CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>B細胞数は正常範囲内であった。
2. 症例 2 は 2カ月の男児で、白血球数の減少、好中球とリンパ球の著明な減少を認めた。低  $\gamma$ グロブリン血症、CD3<sup>+</sup>T細胞の著明な減少、CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK 細胞数の減少を認めたが、B細胞数は正常範囲内であった。合併していたサイトメガロウイルス (CMV) 感染症の治療後に好中球数、CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK 細胞数の減少は改善した。
3. *IL2RG* の全エクソンについて DNA シークエンスを行った。症例 1 では、exon 2 の 3'末端にナンセンス変異 (c. 269 G>A, p. Trp90X) を認めた。

症例 2 では新規変異である exon 3 の 1塩基欠失 (c. 359delA, p. Lys120ArgfsX26) を認めた。

4. 症例 1 の exon 1 から 8 までの PCR 産物は主にサイズの小さな mRNA のバンドから構成されていた。また、exon 2 から 3 にかけてのバンドは認められなかった。mRNA の配列を解析したところ、exon 2 の skipping が判明し、このことが CD132発現を低下させたと考えられた。
  5. Flow cytometry解析では、末梢血の CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> B細胞の CD132発現は 2例とも著明な低下を認めた。CD4<sup>+</sup>と CD8<sup>+</sup>T細胞における発現は症例 1 では上昇していたが、症例 2 では健常者と大きな差異を認めなかった。症例 2 の CD56<sup>+</sup>NK細胞の CD132発現は低下していた。
  6. XY-FISH 法による検討では、症例 1 と 2 の CD3<sup>+</sup>T細胞では XX シグナルがそれぞれ 64.4% と 93.4% であり、CD3<sup>+</sup>T細胞は主に母体由来であった。一方、症例 2 の CD56<sup>+</sup>NK細胞の 97.0% は XY シグナルを呈し、大部分が患児由来であった。
  7. 両例に対して臍帯血移植を施行し、免疫学的再構築を得られた。
- 今回の研究で、c. 269 G>A 変異では exon 2 のスキップが起こることで CD132の発現低下が起こることを明らかにし、c. 359delA 変異では通常の X-SCID とは異なる T<sup>-</sup>, B<sup>+</sup>, NK<sup>+</sup> phenotype を示すことを明らかにした。CD132発現での母由来の細胞の評価は煩雑な XY-FISH 法だけでなく、CD132を flow cytometry で確認することで免疫学的特徴を容易に捉えられることが明らかになった。これらのことは X-SCID 患者の早期診断に役立つ重要な知見と思われ、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Notch down-regulation in regenerated epidermis contributes to enhanced expression of interleukin-36 $\alpha$  and suppression of keratinocyte differentiation during wound healing (創傷治癒過程において、再生表皮での Notch の低下は IL-36 $\alpha$  の発現の増加と表皮細胞の分化抑制に寄与する)

高 沢 裕 子

(論文の内容の要旨)

【背景】 Notch シグナルは、多くの多細胞生物で広く保存されたシグナル伝達系であり、細胞の運命決定、増殖、分化、細胞の生死などの調節を行っている。Notch は細胞表面に存在する一回膜貫通型のレセプタータンパク質であり、哺乳類では Notch 1 から 4

がある。リガンドも細胞表面に存在するタンパク質で、Jagged 1, 2 と Delta-like 1, 3, 4 の 5 種類が知られている。Notch にリガンドが結合すると細胞内ドメインが切り離されて核内に移行し、他の核内分子と複合体を形成して転写因子として働く。Notch は隣接する細胞間での情報伝達を担っている。表皮細胞

には Notch 1, 2, Jagged 1, 2 が発現しており, Notch は表皮細胞の増殖や分化の制御に深く関与していることが明らかになっているが, 創傷治癒過程の皮膚における Notch の役割については知られていない。

【目的】創傷治癒過程における再生表皮の Notch の役割を明らかにする。

【方法】生後 8-10週のICRマウスの背部を電動シェーバーで剃毛した後 5 mm パンチで皮膚潰瘍を作り, その 3-7 日後に潰瘍周囲の皮膚とともに採取し, 免疫染色を行った。生後一日目の ICR マウスから表皮細胞の初代培養を行い, Notch シグナルのインヒビターである DAPT や siRNA を用いて Notch を抑制したり, アデノウイルスベクターを用いて Notch を過剰発現させ, mRNA, タンパクを回収し解析した。生後 8-10週 ICR マウス背部に DAPT を塗布し, 採取して免疫染色を行った。

【結果】免疫染色にて再生表皮の Notch 1, Notch 2 に加え, Notch の標的遺伝子である Hes 1 の発現も低下しており, 再生表皮では Notch シグナルが低下していることがわかった。再生表皮での Notch の発現低下の意義について, 炎症, 分化, 増殖の 3 つの観点から検証した。〈炎症について〉創傷部位では表皮欠損がおこり組織が外界に直接さらされるため, 生体防御を行う必要がある。そのため表皮から産生される炎症性サイトカインに変化が生じる可能性を考えた。初代培養細胞に DAPT を添加し IL-1ファミリーサイトカインの mRNA 発現を調べたところ, IL-36 $\alpha$  のみが上昇した。タンパクレベルでも IL-36 $\alpha$  の発現が高まっており, IL-36 $\alpha$  に着目することとした。siRNA にて Notch 1, Notch 2 のそれぞれをノックダウンさせるといずれも IL-36 $\alpha$  の mRNA とタンパク発現が高まった。逆にアデノウイルスベクターを用いて Notch を過剰発現させると IL-36 $\alpha$  の発現は低下した。また免疫染色にて再生表皮の IL-36 $\alpha$  発現は上昇していることがわかった。次に Notch と IL-36 $\alpha$  の因果関係を調べるため, マウスの背部皮膚に DAPT 塗布し, 免疫染色を行った。DAPT を塗布した皮膚ではコントロールに比べ IL-36 $\alpha$  の発現は高まっていた。この結果から再生表皮では Notch が低下することにより IL-36 $\alpha$  の発現が高まると考えられた。〈増殖について〉初代培養細胞にアデノウイルスベクターを用いて Notch を過剰発現させると Brd-U 取り込みの陽性率は低下したが, DAPT 添加にて Notch

シグナルを抑制しても陽性率に有意な変化を認めなかった。また再生表皮の Ki67 発現は正常表皮に比較し高まっていなかったことから, 再生表皮における Notch の発現低下は増殖の制御には関与していないと考えられた。〈分化について〉初代培養細胞に DAPT を添加し Notch シグナルを抑制すると keratin 1 (K1), keratin10 (K10) の mRNA, タンパク発現が低下した。次に siRNA を用いて Notch 1, Notch 2 をノックダウンさせると K1, K10 の発現が低下した。また免疫染色にて再生表皮の K1, K10 発現は低下していることがわかった。DAPT を塗布したマウスの皮膚では K10 については明らかな低下はみられなかったが K1 の発現は低下していた。以上の結果より再生表皮では Notch の低下により K1, K10 の発現が低下すると考えられた。

【結論】創傷治癒過程における再生表皮では Notch シグナルが低下しており, それにより IL-36 $\alpha$  の発現が高まり, K1, K10 の発現が低下すると考えられた。

【考察】IL-36 $\alpha$  は外界にさらされた組織が外的病原体から身を守る生体防御に役立っていると考えられ, K1, K10 の減少は細胞強度を低下させるが細胞の形態を変化させやすくなり, 組織の再構築に有利となっているのではないかと考えられた。

#### (論文審査の結果の要旨)

Notch シグナルは細胞の運命決定, 増殖, 分化などの調節を行うシグナル伝達系である。表皮細胞の増殖や分化の制御に深く関与していることが明らかになっているが, 創傷治癒過程の皮膚における Notch の役割について明らかになっていない。そこで高沢は, 創傷治癒過程における再生表皮での Notch の役割を明らかにするため, マウスの皮膚や細胞を用いて解析した。

その結果, 高沢は次の結果を得た。

#### 1. 再生上皮における Notch の発現

再生表皮の Notch 1, Notch 2, Hes 1 の発現が低下しており, 再生表皮では Notch シグナル活性が低下している。

#### 2. Notch と炎症

初代培養細胞で Notch を抑制すると IL-36 $\alpha$  の発現が高まり, Notch を過剰発現させると IL-36 $\alpha$  の発現は低下した。

再生上皮では IL-36 $\alpha$  の発現が上昇していた。

DAPT を塗布したマウス皮膚では IL-36 $\alpha$  の発現は高まった。

以上より、再生表皮では、Notchの低下に伴いIL-36 $\alpha$ の発現が誘導される。

### 3. Notchと増殖

初代培養細胞でNotchを抑制してもBrd-U取り込みの陽性率に有意な変化を認めなかった。

再生表皮のKi67発現は、正常表皮に比較し変化はみられなかった。

以上より、再生表皮におけるNotchの発現低下は増殖の制御には関与していないと考えられた。

### 4. Notchと分化

初代培養細胞でNotchを抑制するとkeratin 1 (K1), keratin10 (K10)の発現が低下し、Notchを過剰発現させるとK1, K10の発現が増加した。

再生表皮のK1, K10発現は低下してした。

DAPTを塗布したマウスの皮膚ではK1の発現が

低下した。

以上より、再生表皮ではNotchの低下によってK1, K10の発現が低下する。

以上のように、再生表皮ではNotchが低下することによりIL-36 $\alpha$ の発現が高まり、K1, K10の発現が低下することが明らかにされた。IL-36 $\alpha$ は外的病原体からの生体防御に役立っていると考えられ、K1, K10の減少は形態を変化させやすくすることに役立つであろうと考察が述べられた。

本研究により、創傷治癒過程における再生上皮でのNotchの発現や役割が明らかとなり、創傷治癒における一つの分子メカニズムが解明された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

A novel surfactant protein C L55F mutation associated with interstitial lung disease alters subcellular localization of proSP-C in A549 cells (間質性肺病変患者に認められたサーファクタント蛋白質C遺伝子の新規変異L55Fは、A549細胞においてproSP-Cの細胞質内での局在を変化させる)

## 劉 婷 婷

### (論文の内容の要旨)

【Background】 Surfactant protein C (SP-C) is a hydrophobic protein produced exclusively by type II alveolar epithelial cells (AECs) and plays an important role in the modulation of lung mechanics by its direct effects on alveolar surface tension. The SP-C gene (*SFTPC*) encodes precursor SP-C (proSP-C) containing four distinct structural and functional domains, a short cytoplasmic N-terminal domain (residues 1-23), a mature domain (residues 24-58), a non-BRICHOS region (residues 59-89), and a BRICHOS domain (residues 90-197).

Interstitial lung disease (ILD) in infants and children are mostly chronic and associated with high morbidity and mortality. Mutations in the *SFTPC* have recently been linked to ILD associated with abnormal expression of SP-C. Previous studies showed that mutations involving non-BRICHOS and BRICHOS domains of proSP-C may represent different pathogenesis of ILD. However, the pathway and mechanism of mutations located within mature domain of proSP-C remain unclear.

In the present study, we described a novel heterozygous *SFTPC* mutation located in the mature domain of proSP-C in a Japanese girl associated with ILD, and investigated whether the novel proSP-C<sup>L55F</sup> showed alteration of subcellular localization in human type II lung epithelial cell line (A549).

【Patient and methods】 A Japanese young girl patient diagnosed as ILD, patient's parents, and 61 healthy Japanese volunteers participated in this study. Sequencing of *SFTPC* was employed on the patient, patient's parents, and all healthy volunteers. Histopathology and transmission electron microscopy (TEM) of lung tissue from the patient were assessed. We constructed a model of A549 cells stably transfected with GFP/proSP-C<sup>WT</sup>, GFP/proSP-C<sup>L55F</sup> located in the mature domain, GFP/proSP-C<sup>I73T</sup> in the non-BRICHOS, and GFP/proSP-C<sup>A116D</sup> in the BRICHOS domains of proSP-C. The differences of the wild type and mutant proSP-C isoforms were evaluated by Western blotting, immunofluorescence, and TEM.

【Results】 *SFTPC* genetic analysis revealed that

only this patient had a novel c. 163C>T in exon 2 located in the mature transmembrane domain, resulting in a leucine to phenylalanine substitution (p. L55F). First, we examined proSP-C on the patient's lung tissue by immunohistochemistry and found abnormal localization as compared with normal control. Additionally, TEM findings of her lung tissue and the A549 cellsexpressing proSP-C<sup>L55F</sup> stably displayed abnormal cytoplasmic organelles. Although proSP-C<sup>L55F</sup> exhibited a band pattern similar to that of proSP-C<sup>WT</sup> for processed intermediates by Western blotting, the two lower molecular weight intermediates were observed at a reduced expression level as compared with those of proSP-C<sup>WT</sup>, proSP-C<sup>I73T</sup>, and proSP-C<sup>A116D</sup>, indicating a loss in proSP-C<sup>L55F</sup> expression in the processing pathway. Interestingly, in contrast to proSP-C<sup>WT</sup>, immunofluorescence studies demonstrated that proSP-C<sup>L55F</sup> partially colocalized in CD63-positive cytoplasmic vesicles of A549 cells, and partially trafficked towards the plasma membrane, suggesting that this novel mutation induced abnormal trafficking of proSP-C.

**【Conclusion】** (1) We uncovered a novel mutation in *SFTPC* located in the mature domain of proSP-C in a Japanese girl with ILD. (2) We characterized the alteration of subcellular localization of proSP-C<sup>L55F</sup> in A549 cells in comparison with wild type and the mutations in other domains. Thus, in addition to previously reported *SFTPC* mutations in non-BRICHOS, and BRICHOS domains associated with ILD, our findings may provide a new insight into the pathogenesis of ILD caused by the mutation in mature domain of proSP-C.

(論文審査の結果の要旨)

Mutations in the surfactant protein C (SP-C) gene (*SFTPC*) have recently been linked to ILD. The SP-C encodes precursor SP-C (proSP-C) containing four distinct structural and functional domains, a short cytoplasmic N-terminal domain, a mature domain, a non-BRICHOS region, and a BRICHOS domain. The pathway and mechanism of mutations located within mature domain of proSP-C remain unclear. In the present study, we investigated the

alteration of subcellular localization of proSP-C in human type II lung epithelial cell line (A549), which was associated with a novel heterozygous *SFTPC* mutation located in the mature domain of proSP-C in a Japanese girl with interstitial lung disease (ILD).

We found as follows:

1. Sequencing of *SFTPC* revealed a novel heterozygous mutation (c. 163C>T) in mature domain of proSP-C, resulting in a leucine to phenylalanine substitution (p. L55F) in a Japanese girl associated with ILD. This mutation was not detected in her parents and 61 healthy volunteers.
2. Immunohistochemistry for proSP-C exhibited abnormal distribution in the patient's lung tissue.
3. Abnormal lamellar bodies were characterized in type II alveolar epithelial cell (AECs) by transmission electron microscopy (TEM) in the patient's lung tissue.
4. A549 cells stably expressing GFP/proSP-C<sup>WT</sup>, GFP/proSP-C<sup>L55F</sup>, GFP/proSP-C<sup>I73T</sup>, or GFP/proSP-C<sup>A116D</sup> were successfully generated, respectively. *In vitro* assay, decreased band intensity of processing intermediate was displayed for proSP-C<sup>L55F</sup> by Western blotting as compared with those of proSP-C<sup>WT</sup>, proSP-C<sup>I73T</sup>, and proSP-C<sup>A116D</sup>.
5. In A549 cells expressing proSP-C<sup>L55F</sup>, abnormal subcellular organelles were observed as compared with proSP-C<sup>WT</sup> by TEM.
6. Subcellular localization of proSP-C<sup>L55F</sup> was altered in A549 cells. ProSP-C<sup>L55F</sup> partially colocalized in CD63-positive cytoplasmic vesicles, and partially trafficked towards the plasma membrane as compared with proSP-C<sup>WT</sup> by immunofluorescence assay.

**【In conclusion】** A novel mutation in *SFTPC* located in the mature domain of proSP-C was uncovered in a Japanese girl with ILD. The alteration of subcellular localization of proSP-C<sup>L55F</sup> in A549 cells in comparison with wild type and the mutations in other domains was characterized. Thus, our findings may provide a new insight into the pathogenesis of ILD caused by the mutation in mature domain of proSP-C.

間質性肺疾患患者に認められたサーファクタント蛋白質C遺伝子の新規変異L55Fは、A549細胞においてproSP-Cの細胞質内での局在を変化させた本研究

は、間質性肺疾患の病態解明と診断の向上に大きく役立つことから、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Specific biological response of the synovial membrane to carbon nanotubes (カーボンナノチューブに対する滑膜の特異的な生物学的反応)

野村博紀

### (論文の内容の要旨)

【研究の背景】これまでカーボンナノチューブ (Carbon nanotubes, 以下CNTs) に対する生物学的反応の評価は、吸い込みを対象として肺や腹腔にある組織や細胞で行われることがほとんどであった。しかし、CNTsを生体材料に応用する場合には、使用する部位の組織や細胞によって、その生物学的反応が大きく異なると考えられる。近年CNTsを骨再生医療の足場材に用いる研究、人工関節の強化剤fillerに用いる研究、関節リウマチの薬剤伝達系に用いる研究等が進んでおり、これらの場合には、CNTsを応用した生体材料を関節内に使用する可能性が高い。本研究は、関節内の主たる生物学的反応の場である滑膜組織の多層カーボンナノチューブ (Multi-walled CNTs, 以下MWCNTs) に対する反応を評価した。

### 【研究の方法】

(動物実験) 10週雄のウィスターラットの片側膝関節内にMWCNTsを注射し滑膜組織を評価した。MWCNTs投与量は0.003 mg, 0.03 mg, 0.3 mgの3群に分け、分散剤には生体安全性が証明されているポリソルベートを用いた。コントロール群として生食、ネガティブコントロール群としてのナノサイズ比較炭素材料には刺青に使われているカーボンブラック (Carbon Black, 以下CB) を用いた。投与後1週, 4週, 12週と経時的に評価した。さらにMWCNTsが関節内に単回ではなく複数回にわたり断続的に暴露された状況を考慮して、0.003 mgを1週間隔で3回に分けて分割投与し最終投与日から1週後, 4週後と経時的に評価した。さらにその組織を単回投与の1週, 4週後とそれぞれ比較した。

(細胞実験) ヒト正常滑膜線維芽細胞 (Human Fibroblast Like Synoviocytes, 以下HFLS) に10 µg/mlのMWCNTsとCBを暴露後24時間での形態観察を行った。比較対象として、これまでMWCNTsの細胞試験で一般的に使用されているマウスマクロファージであるRAW264を用いた。核、ライソソームを染

色してMWCNTsとCBの取り込み状態を比較した。細胞毒性評価にはAlamar blue法、炎症性サイトカイン、ケモカイン分泌量測定にはCytometric Bead Array Systemを用いて0.1, 1, 10, 100 µg/mlの濃度で測定した。

### 【結果】

(動物実験) コントロール群では投与後1週, 4週, 12週後と全てに時期において、正常な滑膜組織が認められた。CB群では、投与後1週で滑膜表層にCBが浸潤してマクロファージ内に取り込まれ、リンパ球を中心とした軽度の炎症反応が認められた。4週後には、CBがマクロファージに取り込まれたまま炎症反応は軽快し12週後に炎症反応は鎮静化していた。MWCNTs 0.003 mg群では、投与後1週で滑膜表層にMWCNTsが浸潤しており、軽度の肥厚を認めたが最表層には正常な滑膜線維芽細胞が認められた。4週後、MWCNTsがマクロファージに取り込まれたまま炎症反応は軽快し、12週の時点でも明らかな炎症反応の増悪は認められなかった。MWCNTs 0.03 mg, 0.3 mg群では投与後1週でMWCNTsが滑膜深層に浸潤してマクロファージ、リンパ球などの炎症細胞が認められ、脂肪組織の一部と置き換わっておりその反応領域の大きさは濃度依存性であった。

4週後には、炎症反応を示す領域は徐々に軽快しており、周辺には線維化が認められ、経時的に炎症反応は収束傾向であった。12週の時点でも明らかな炎症反応の増悪は認められなかった。

(細胞実験) MWCNTsとCBそれぞれの取り込み状態に関しては、線維芽細胞であるHFLSよりも貪食細胞であるRAW264の方が多かった。細胞毒性試験においてHFLSはCB群では全ての濃度において毒性は認められなかったが、MWCNTs群では10 µg/ml, 100 µg/mlで濃度依存性に細胞毒性が認められた。RAW264も同様にMWCNTs群の100 µg/mlでのみ細胞毒性が認められた。サイトカイン、ケモカイン分泌量に関してHFLSはIL-6, IL-8, MCP-1,

RAW264はTNF- $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTESを測定した。HFLSで有意に増加したサイトカイン, ケモカインはなかった。RAW264ではMIP-1 $\alpha$ 以外はMWCNTs群で濃度依存性に増加し, その増加量はCB群より大きかった。

【考察】中等度から多量のMWCNTsを関節内投与した場合に滑膜深層部への浸潤したことによりやや強い炎症反応が引き起こされた原因としては滑膜組織が柔らかい絨毛構造であり個々の細胞間結合が非常にゆるいことから粒子状で表面が滑らかであるCBと比べて繊維状であるMWCNTsは非常に引っかかりやすく, さらには関節運動による外的ストレスなどにより深層部へ浸潤したと推測される。高濃度のMWCNTs暴露で強い細胞毒性が引き起こされた原因としては, 完全にライソソームに吸収されないことによる frustrated phagocytosisなどが挙げられ, それによってサイトカイン, ケモカイン分泌量が増加したと推測される。

【結語】本研究結果よりMWCNTsに対して滑膜が特異的な生物学的反応を示すこと, MWCNTsを関節内に使用する際には, 少量であればCBと同等に滑膜組織に対して大きな炎症反応を引き起こさないことが明らかになった。中等度以上のMWCNTsは一過性に強い炎症反応を引き起こすため, その安全性確認にはさらなる長期的な評価が必要である。今後CNTsを生体材料として臨床応用するためには, 使用する部位に合致した生物学的反応評価が必要であると結論する。

#### (論文審査の結果の要旨)

これまでカーボンナノチューブ (Carbon nanotubes, 以下CNTs) に対する生物学的反応の評価は, 吸い込みを対象として肺や腹腔にある組織や細胞で行われることがほとんどであった。しかし, CNTsを生体材料に応用する場合には, 使用する部位の組織や細胞によって, その生物学的反応が大きく異なると考えられる。近年CNTsを人工関節の強化剤 filler に用いる研究, 関節リウマチの薬剤伝達系に用いる研究等が進んでおり, これらの場合には, CNTsを応用した生体材料を関節内に使用する可能性が高い。今回野村は動物実験にて多層CNTs (Multi-walled CNTs, 以下MWCNTs) をラットの膝関節内に投与し, 主たる生物学的反応の場である滑膜組織の反応を評価した。MWCNTs投与量は0.003 mg, 0.03 mg, 0.3 mgの3群に分けた。ネガティブコントロール群としてナノサイズ比較炭素材料に生体安全性が証明されており,

刺青に使われているカーボンブラック (Carbon Black, 以下CB) を用いて, 0.3 mgのみ投与した。投与後1週, 4週, 12週と経時的に評価した。また細胞実験にてヒト正常滑膜線維芽細胞 (Human Fibroblast Like Synoviocytes, 以下HFLS) とマウスマクロファージであるRAW264に対する毒性をAlamar blue法にて, 炎症性サイトカイン, ケモカイン分泌量の変化をCytometric Bead Array System法にて評価した。

その結果は, 野村は次の結論を得た。

1. 関節内への0.003 mgのMWCNTs投与による滑膜炎症反応はCBと同様に滑膜表層のみであり軽度であった。
2. 関節内への0.03 mgのMWCNTs投与による滑膜炎症反応は一過性に滑膜深層部へ浸潤したやや強い炎症反応を引き起こすが経時的に改善傾向を示した。
3. 関節内への0.3 mgのMWCNTs投与による滑膜炎症反応は滑膜全体に及ぶ非常に強い炎症反応であったが, 投与後12週の時点で明らかな増悪はなく, 正常な滑膜細胞も認められた。
4. 高濃度のMWCNTs暴露ではHFLS, RAW264ともに強い毒性を示した。
5. MWCNTs暴露によるサイトカイン, ケモカイン分泌量はHFLSでは減少したが, RAW264では上昇した。

今回の結果からMWCNTsに対して滑膜が特異的な生物学的反応を示すこと, MWCNTsを関節内に使用する際には, 中等度量以下であれば人体への安全性が証明されているCBとほぼ同等に滑膜組織に対して大きな炎症反応を引き起こさないことが明らかになった。今後CNTsを生体材料として臨床応用するためには, 使用する部位に合致した生物学的反応評価が必要である。これらの評価が蓄積されCNTsを用いた生体材料が臨床応用されれば, 医療のさらなる発展が期待できる。

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。

Peripheral sympathetic nerve dysfunction in adolescent Japanese girls following immunization with the human papillomavirus vaccine (子宮頸がんワクチン接種後の日本人女兒に出現した、末梢性交感神経障害の検討)

木下朋実

(論文の内容の要旨)

【背景】本邦では子宮頸がん予防のHPV (human papilloma virus) ワクチンが2010年から任意接種として開始された。さらに2013年4月から国の予防接種改正法に伴い、小学6年生から高校1年生を対象に HPV ワクチンが定期接種化された。その後、ワクチン接種後から原因不明の四肢の疼痛・頭痛等の強い症状が多数の女兒に出現し、社会問題となった。HPV ワクチンの副反応が疑われ当院を受診した女兒を診察すると手足の冷感、指尖容積脈波で波高の減高を認めた。これらの所見から末梢の循環不全、交感神経障害を疑い、起立性調節障害 (OD: orthostatic dysregulation), 複合性局所疼痛症候群 (CRPS: complex regional pain syndrome) のような自律神経障害を背景とする疾患の概念に当てはまるのではないかと推察し、本研究を開始した。

【目的】HPV ワクチン接種後の女兒に認める原因不明の多彩な症状の原因を解明する。

【対象】2013年6月から2014年3月に至る期間にHPV ワクチンの副反応が疑われ、当院を受診した女兒44名 (Cervarix®31名, Gardasil®13名) 中、明らかに他の疾患と考えられた4名を除外した40名。

【方法】皮膚温、指尖容積脈波の測定、NA (noradrenaline) の測定を併用した起立試験、抗 ganglionicACh 受容体抗体の測定をした。3名には指尖容積脈波・皮膚温を測定した手指と足趾から皮膚生検を施行し、皮内神経を顕微鏡・電顕で観察した。

【結果】40名の年齢は11歳~17歳 (平均年齢は13.7±1.6歳), 初回のワクチン接種から症状出現までの期間は約5.47±5.00カ月であった。多彩な症状の中で頻度が高かったものは頭痛70% (28名), 全身倦怠感53% (21名), 下肢の冷感53% (18名), 手足の疼痛50% (20名), 四肢の筋力低下48% (19名), 朝の起床困難48% (19名), 立ちくらみ43% (17名), 学習障害43% (17名), 関節痛43% (17名), 手足の振え40% (16名), であった。

皮膚温・指尖容積脈波は28人に、手は右第2指、足は右第1足趾で測定を行った。手の平均皮膚温は30.4±2.6°C, 足は27.1±3.7°Cと特に下肢で低い傾

向があった。指尖容積脈波は手では13名、足では19名で波高が減っていた。ODの診断基準を満たした24名中、21名で起立試験を施行した。その結果、起立性低血圧 (OH: orthostatic hypotension) が8名、体位性頻脈症候群 (POTS: postural orthostatic tachycardia) は4名と診断した。血漿中のNAの増加率不足を10名で認め、その内4名はOHと診断されていた。

手足の疼痛を訴える患者は、国際疼痛学会の診断基準を用いて検討した結果、14名でCRPSと診断した。そのうち3名で皮膚生検を行い、皮内神経を観察した。顕微鏡では神経周膜下、神経束内の浮腫像をみとめ、電顕では無髄神経内部にエレクトロニデンシな顆粒状の異常構造物を認めた。また、足の皮膚では神経束内部に無髄神経線維の密度の低下を認め、膠原線維の増殖を認めた。この結果からは、皮内の無髄神経線維の変性所見を捉えられたと考えた。抗 ganglionicACh 受容体抗体は14名測定し、全例で陰性であった。

【考察】多彩な症状の中でも頭痛、倦怠感、朝の起床困難からはODを疑い、起立試験の結果からはそのサブタイプであるOH、POTSと診断した。脈波の波高の減弱、皮膚温の低下、起立試験でのNEの増加率の不良からは末梢の血流不全、交感神経末からのカテコラミンの分泌不足を示唆する所見と考えた。さらに皮内神経の変性所見から病態として末梢性の交感神経障害を考えた。過去のCRPSに関する文献で、皮内の無髄神経の密度の低下、脱落所見の報告があり、本研究のCRPSの臨床診断、病理像を支持するものと考えた。また、振えはCRPSの運動症状の一つであり、本研究の手足の疼痛・振えの症状としてCRPSの一症状として説明可能と考えた。対象40名の診断はCRPS単独が5名、CRPS+OHが5名、CRPS+ODが5名、CRPS+POTSが3名、OH単独が3名、OD単独が7名、POTS単独が1名、その他、分類不能な患者は11名であった。よって、ODとCRPSの両者を合併している例が多いことが特徴と考えた。

【結論】HPV ワクチン接種後に生じる多彩な症状の中でも頭痛、全身倦怠感、四肢の疼痛、振えはCRPSとして自律神経障害を背景とする疾患で説明

可能と考えた。また自律神経機能検査と皮内神経の異常所見から、末梢性の交感神経障害が存在すると推察した。しかしながら、HPV ワクチンとの直接的な因果関係は不明である。

(論文審査の結果の要旨)

本邦では子宮頸がん予防の HPV ワクチン接種後から原因不明の四肢の疼痛・頭痛等の強い症状が多数の女兒に出現し、社会問題となった。2013年6月から2014年3月の期間に HPV ワクチンの副反応が疑われ当院を受診した女兒44名 (Cervarix®31名, Gardasil®13名) 中、明らかに他の疾患と考えられた4名を除外した40名を対象として、原因不明の多彩な症状は起立性調節障害 (OD)、複合性局所疼痛症候群 (CRPS) のような自律神経障害を背景とする疾患の概念に当てはまるのではないかと推察し、症状を解明する目的で本研究を開始した。

40名の年齢は11歳~17歳 (平均年齢は13.7±1.6歳)、初回のワクチン接種から症状出現までの期間は5.47±5.00カ月であった。頻度の高い症状は頭痛70% (28名)、全身倦怠感53% (21名)、下肢の冷感53% (18名)、手足の疼痛50% (20名)、四肢の筋力低下48% (19名)、朝の起床困難48% (19名)、立ちくらみ43% (17名)、学習障害43% (17名)、関節痛43% (17名)、手足の振え40% (16名)、であった。皮膚温・指尖容積脈波は28人に、手は右第2指、足は右第1足趾で測定を行った。手の平均皮膚温は30.4±2.6°C、足は27.1±3.7°Cと特に下肢で低い傾向があった。指尖容積脈波は手では13名、足では19名で波高が減っていた。ODの診断基準を満たした24名中、21名で起立試験を施行した。その結果、起立性低血圧 (OH) が8名、体位性頻脈症候群 (POTS) は4名と診断した。血漿中のNAの増加率不足を10名で認め、その内4名はOHと診断されていた。手足の疼痛を訴える患者は、

国際疼痛学会の診断基準を用いて検討した結果、14名でCRPSと診断した。そのうち3名で皮膚生検を行い、皮内神経を観察した。光顕では神経周膜下、神経束内の浮腫像をみとめ、電顕では無髄神経内部にエレクトロデンシな顆粒状の異常構造物を認めた。また、足の皮膚では神経束内部に無髄神経線維の密度の低下を認め、膠原線維の増殖を認めた。この結果からは、皮内の無髄神経線維の変性所見を捉えられたと考えた。抗ganglionicACh受容体抗体は14名測定し、全例で陰性であった。

多彩な症状の中でも頭痛、倦怠感、朝の起床困難はODと診断し、さらに起立試験からOH、POTSと診断した。脈波の波高の減弱、皮膚温の低下、起立試験でのNEの増加率の不良からは末梢の血流不全、交感神経末からのカテコラミンの分泌不足を示唆する所見と考えた。さらに皮内神経の変性所見から病態として末梢性の交感神経障害を考えたと考えた。過去のCRPSに関する文献で、皮内の無髄神経の密度の低下、脱落所見の報告があり、本研究のCRPSの臨床診断、病理像を支持するものと考えた。また、本研究の手足の疼痛・振えの症状としてCRPSの一症状として説明可能と考えた。対象40名の診断はCRPS単独が5名、CRPS+OHが5名、CRPS+ODが5名、CRPS+POTSが3名、OH単独が3名、OD単独が7名、POTS単独が1名、その他、分類不能な患者は11名であった。よって、ODとCRPSの両者を合併している例が多いことが特徴と考えた。

多彩な症状は自律神経障害を背景とする疾患で説明可能と考えた。しかしながら、現時点でこれらの症状とHPV ワクチン接種との直接的な因果関係は不明であり、さらなる検討・調査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。

Outcomes of blood flow suppression methods of treating high flow access in hemodialysis patients with arteriovenous fistula (血液透析患者における内シャント過剰血流に対する血流抑制術の効果)

神 應 太 朗

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】動静脈内シャントは血液透析を行うために必要なバスキュラーアクセスであるが、シャント血流は非生理的な血流であるため、シャント血流が過剰になった場合に血行動態や心機能に大きく影響を与えることが知られている。動静脈内シャントによって

引き起こされる過剰血流は、透析患者における高拍出性心不全の原因の一つであり、生命予後にも関連する。動静脈内シャントによる過剰血流の治療としては、様々な血流抑制術が考案されているが、その治療成績については明らかでない。

【対象及び方法】信州大学附属病院関連施設において、

過剰シャント血流と診断した血液透析患者74人に対して、3種類の血流抑制術（①内シャント吻合部中枢側動脈バンディング+吻合部末梢側動脈結紮術（12例）、②内シャント吻合部流出静脈バンディング（37例）、③内シャント吻合部隔壁形成術（25例））を行い、各血流抑制術の治療成績を術式毎に明らかにすることを試みた。

血流抑制術の各術式：

術式①：内シャント吻合部中枢側動脈と末梢側動脈を剥離、露出させた後に、吻合部中枢側をバンディングし、末梢側動脈を結紮する。

術式②：内シャント吻合部流出静脈を露出させた後に、流出静脈部をバンディングする。

術式①②のバンディング方法には2～4cmの長さの人工血管（ePTFE）を利用した。過剰シャント血流再発の原因となる人工血管のスリップ防止のために、人工血管を裏返しにして血管に外側から巻きつけて使用し、人工血管の両端を中枢側、末梢側ともに自己血管の外膜と縫合し固定した。超音波診断装置（TOSHIBA社製 APLIO500TSU-A500）を用いて、術中に目標血流量（350～1000 ml/min）になるように、バンディングする強さを調整した。

術式③：内シャント吻合部の中枢側および末梢側の動脈、さらに流出静脈を全て露出させ、血流遮断後に、動静脈吻合部直上の流出静脈を1cm程横切開し、血管縫合糸を内糸化した後、末梢側から中枢側に向かって吻合部を内側から縫縮し隔壁を形成する。隔壁形成後の血流量微調整のためにあらかじめ吻合部の外側から調節糸を2～3本かけておき、血流再開後のシャント血流量に応じて、その糸を外すことで血流を微調整する。

各術式は内シャント設置部位とシャント血管の性状により術者の判断で選択された。各血流抑制術前後でシャント血流量と心機能を比較し治療効果を評価した。

#### ・統計解析

グループ間の連続変数の有意差はKruskal-Wallis検定を用い、二値変数の有意差には $\chi^2$ 乗検定を用いた。統計解析にはSPSS version 18.0（SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA）を用いた。統計的有意差は $P < 0.05$ とした。

【結果】患者背景として、術式間で年齢、性別、透析年数、原疾患割合、症状の出現頻度、心不全状態に差を認めなかった。動静脈内シャントの設置位置により術式選択に差が認められた。内シャント吻合部中枢側

動脈バンディング+吻合部末梢側動脈結紮術は、主に前腕中位までの症例に選択された。流出静脈バンディングはあらゆる部位に対して選択されていた。内シャント吻合部隔壁形成術は腕のあらゆる部位に対して選択されていたが肘部の症例が多かった。シャント血流量とFlow volume/cardiac output（Flow/CO）は、いずれの術式でも目標値まで低下し、それぞれの減少率は各術式間で有意差を認めなかった。過剰血流再燃率と縫縮血管血栓閉塞率はそれぞれ再燃率18.9%、閉塞率24.3%と他の術式と比較して静脈バンディングで頻度が高かった。術後に感染を起こした症例はいずれの術式も少数であった。心不全症状の改善は、いずれの術式でも全症例で改善が確認された。

【結論】いずれの血流抑制術も十分な血流抑制を得ることができ、臨床症状の改善を認めた。過剰血流に対して、どの血流抑制術を用いるかは内シャント形成位置、シャント血管の形態（瘤化、石灰化など）、術式の難易度により選択すべきであるが、過剰血流の再燃率や閉塞率の低さから内シャント吻合部中枢側動脈バンディング+内シャント吻合部末梢側動脈結紮術や内シャント吻合部隔壁形成術が有用である可能性が示唆された。

#### （論文審査の結果の要旨）

動静脈内シャントは血液透析を行うために必要なバスキュラーアクセスであるが、シャント血流が過剰になった場合に血行動態や心機能、さらには生命予後に大きく影響を与える。過剰血流の治療として様々な血流抑制術が考案されているが、その治療成績については明らかでない。本論文では、信州大学腎臓内科関連病院で過剰血流と診断された患者74名を対象とし3種類の血流抑制術（①内シャント吻合部中枢側動脈バンディング+吻合部末梢側動脈結紮術、②流出静脈バンディング、③内シャント吻合部隔壁形成術）の治療成績を比較検討することを目的とした。3種類の血流抑制術は、患者のシャント血管の状態や位置により、個々の症例に応じて術者の判断で選択された。治療成績は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、神應は以下の結論を得た。

1. 患者背景において、術式間で年齢、性別、透析年数、原疾患割合、心不全症状の程度に差を認めなかった。
2. シャント血流量とFlow volume/cardiac outputは、いずれの術式でも目標値まで低下し、それぞれ

の減少率は各術式間で有意差を認めなかった。

3. 動静脈内シャントの設置位置により術式選択に差が認められた。内シャント吻合部中枢側動脈バンディング+吻合部末梢側動脈結紮術は、主に前腕中位までの症例に選択された。流出静脈バンディングはあらゆる部位に対して選択されていた。内シャント吻合部隔壁形成術は腕のあらゆる部位に対して選択されていたが肘部の症例が多かった。
4. 過剰血流再燃率と血栓閉塞率は静脈バンディング施行例で他の術式と比較して頻度が高かった。術後の感染例はいずれの術式も少数であった。
5. 心不全症状は、いずれの術式でも全症例で改善が確認された。

これらの結果により、いずれの血流抑制術も十分な血流抑制と臨床症状の改善を得ることができることが明らかとなった。どの血流抑制術を用いるかは内シャント形成位置、シャント血管の形態、術式の難易度により選択すべきであるが、再燃率や閉塞率の低さから内シャント吻合部中枢側動脈バンディング+内シャント吻合部末梢側動脈結紮術や内シャント吻合部隔壁形成術が有用である可能性が示唆された。本研究は、動静脈内シャント過剰血流に対して、治療戦略を立てる上で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。

## Investigation of Susceptibility Genes Triggering Lachrymal/Salivary Gland Lesion Complications in Japanese Patients with Type 1 Autoimmune Pancreatitis (自己免疫性膵炎1型の日本患者における涙腺唾液腺病変の合併を引き起こす感受性遺伝子の研究)

小 口 貴 也

### (論文の内容の要旨)

自己免疫性膵炎は血清IgG4高値によって特徴づけられる特異な慢性膵炎で、種々の膵外病変を合併する。特に涙腺唾液腺病変は活動性の高い自己免疫性膵炎(AIP)の病態に合併する傾向があり、この合併には多様な遺伝的背景が関連していると推測されている。本研究では、Affymetrix社のHuman Mapping 500K SNPsセットを用いて全ゲノムワイドで相関解析(GWAS)を行い、涙腺唾液腺病変発症に影響を及ぼす遺伝子の候補を検索した。その後、これら候補について、GWASに用いたセットに含まれていない新たなSNPsを用いた詳細マッピングを行い、疾患感受性遺伝子を同定した。涙腺唾液腺病変合併AIP群(A群)50人と非合併AIP群(B群)53人を対象とし、静脈血から抽出したDNAをゲノム解析に用いた。活動性マーカーであるIgG、IgG4値はA群で有意に高値であった。両群間で有意差( $P < 0.0001$ )を認めたSNPsによって同定される遺伝子を候補遺伝子とした。その結果、涙腺唾液腺病変合併と正の相関を示した5つのSNPs(特にrs2284932 [ $P = 0.0000021$ ])を含む5種類の感受性遺伝子と、合併と負の相関を示した5つのSNPs(特にrs9371942 [ $P = 0.00000039$ ])を含む5種類の抵抗性遺伝子が同定された。これらの内、機能的な関連が推測される*KLF7*、*FRMD4B*、*LOC101928923*、および*MPPED2*の4つの遺伝子

について詳細マッピングを行った。その結果、*KLF7*遺伝子内のrs2284932はminor allele Cの頻度( $P = 0.00062$ ,  $P_c = 0.003$ , OR=2.98, 95% CI=1.58-5.65)、*FRMD4*遺伝子内のrs4473559のminor allele Tの頻度( $P = 0.00015$ ,  $P_c = 0.0006$ , OR=3.38, 95% CI=1.77-7.65)、および*MPPED2*遺伝子内のrs514644のminor allele Cの頻度がA群で有意に高く( $P = 0.0075$ ,  $P_c = 0.045$ , OR=2.14, 95% CI=2.14 (1.22-3.75))、*LOC101928923*遺伝子ではrs4379306のminor allele Tの頻度が有意にA群で低かった。本研究で検出した新たな4つの遺伝子は、1型AIP患者の涙腺唾液腺病変合併と関連する候補遺伝子と考えられた。今後、異なるコホートでの検討で関連遺伝子の特異性を確認することや、関連遺伝子の機能的関連性についての検討が必要と考えられる。

### (論文審査の結果の要旨)

自己免疫性膵炎(AIP)は血清IgG4高値によって特徴づけられる特異な慢性膵炎で、種々の膵外病変を合併する。特に涙腺唾液腺病変は活動性の高いAIPに合併する傾向があり、この合併には多様な遺伝的背景が関連していると推測されている。GWAS(genome-wide association study)は、全ゲノムを通して、共通のシーケンスバリエーションと疾患感受性あるいは抵抗性との関連を明らかにするために幅広く行われている手法である。しかし、AIPの涙腺唾液腺病変合

併に関する解析はこれまで行われていない。そこで今回、type 1 AIP の涙腺唾液腺病変合併に関連する遺伝的背景を明らかにする目的で GWAS 解析を行った。

その結果、小口は次の結論を得た。

1. 涙腺・唾液腺病変合併群は非合併群と比較して活動性マーカーである IgG, IgG4 が有意に高値であり、腺外病変である腎病変と後腹膜線維症の合併率も有意に高率であった。
2. GWAS 解析により type 1 AIP で、涙腺唾液腺病変合併に有意な相関を示した SNPs は、5 つの感受性遺伝子 (*KLF7*, *FRMD4B*, *SNCAIP*, *MATN2*, *MPPED2*) と 5 つの抵抗遺伝子 (*COL12A1*, *LOC101928923*, *SH3GL2*, *FLJ45537*, *NTRK3*) 内に存在している可能性が示唆された。
3. GWAS での各 SNP の *P* 値と odds 比を元に選定し、機能的な関連が推測される *KLF7*, *FRMD4B*, *LOC101928923*, および *MPPED2* の 4 つの遺伝子について詳細マッピングを行った。その結果、*KLF7* 遺伝子内の rs2284932 は minor allele C の頻

度 ( $P=0.00062$ ,  $P_c=0.003$ ,  $OR=2.98$ , 95 %  $CI=1.58-5.65$ ), *FRMD4B* 遺伝子内の rs4473559 の minor allele T の頻度 ( $P=0.00015$ ,  $P_c=0.0006$ ,  $OR=3.38$ , 95 %  $CI=1.77-7.65$ ), および *MPPED2* 遺伝子内の rs514644 の minor allele C の頻度が A 群で有意に高く ( $P=0.0075$ ,  $P_c=0.045$ ,  $OR=2.14$ , 95 %  $CI=2.14 (1.22-3.75)$ ), *LOC101928923* 遺伝子では rs4379306 の minor allele T の頻度が有意に A 群で低かった。

4. *LOC101928923* は *NOX3* と *MIR1202* との間に関連すること、および *NOX3* が多数の生物学的機能に関連していることより、*NOX3* が機能的に疾患の涙腺唾液腺病変合併に関連している可能性が考慮された。

これらの結果より type 1 AIP の涙腺唾液腺病変合併に関連する遺伝子として 4 つの候補遺伝子 (*KLF7*, *FRMD4B*, *NOX3*, *MPPED2*) が明らかになった。

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 Cell Death Biomarkers for Prediction of Liver Fibrosis and Poor Prognosis in Primary Biliary Cirrhosis (原発性胆汁性肝硬変における肝線維化と予後不良の予測のための血清細胞死マーカー)

#### 関 口 智 裕

##### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は中高年の女性に好発し、慢性肝内胆汁うっ滞を主徴とする疾患で、肝内小葉間胆管を標的とする自己免疫性疾患と考えられている。ウルソデオキシコール酸 (UDCA) の治療により PBC の予後は改善したとされているが、治療抵抗性で、肝硬変から肝不全に至る症例が少なからず存在する。このため、肝硬変の診断やその予後を予測することは臨床的に重要である。本研究では血清細胞死マーカーに注目し、PBC における線維化進行度や予後との関連を検討した。

【対象と方法】 肝生検で肝線維化を評価することが可能であった PBC 患者 130 人を対象とし、UDCA 投与前の血清を用いて細胞死マーカーを測定した。また、比較対照として、健常者 90 人の血清を用いた。細胞死マーカーは、カスパーゼにより切断されたサイトケラチン 18 (CK-18) の断片のみを捕捉し、アポトーシスによる細胞死を検出する M30 と、CK-18 と切断された断片の両者を捕捉し、すべての細胞死を検出する M65

を ELISA 法で測定した。また M65 の測定については、既存の ELISA 法に加え、高感度測定系として新しく開発された M65 Epideath (M65ED) ELISA も加えて評価した。肝線維化は Metavir スコアで F0 から 4 (肝硬変) の 5 段階で評価した。PBC 患者 130 人の観察期間中央値は 8.1 年であり、この間の肝不全発症と関連する因子を Cox 比例ハザード回帰分析で検討した。

【結果】 M30, M65, M65ED はいずれも PBC 患者群で健常者群よりも有意に高値であり、さらに肝線維化ステージと有意な相関を示した。M65 と M65ED を用い、F0-1, F2-3, F4 の 3 つの線維化ステージの予測について ROC 解析を行うと、AUC はそれぞれ 0.66 と 0.76, 0.66 と 0.73, 0.74 と 0.82 となり、特に F4 の識別に有用であることが示された。さらに肝不全発症の危険因子を Cox 比例ハザード回帰分析で解析すると、M65ED が 672 U/L 以上 (ハザード比 6.13; 95 % 信頼区間 1.18-31.69;  $P=0.031$ ), 肝線維化が F3 or F4 (ハザード比 7.45; 95 % 信頼区間 1.82-30.51;

$P=0.005$ ) であることが独立した危険因子であった。Kaplan-Meier 法による解析では、M65ED が 672 U/L 以上の症例では未満の症例と比較して有意に累積生存率が低かった (log-rank test ;  $P=0.001$ )。

【結論】細胞死マーカーは PBC の肝線維化ステージの予測に有用であった。また、M65ED は肝不全に至る予後不良群を特定する血清マーカーになりうる可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は中年の女性に多く、自己免疫学的機序が想定される慢性進行性の胆汁うっ滞性肝疾患である。病理組織学的に慢性非化膿性破壊性胆管炎と肉芽腫の形成を特徴とし、胆管上皮細胞の変性・壊死によって小葉間胆管が破壊されることにより慢性進行性に胆汁うっ滞を呈し、無治療の場合は肝不全に至る。

上皮系細胞でアポトーシスやネクローシスが起きるとサイトケラチン 18 (CK-18) が細胞から放出される。またアポトーシスの場合カスパーゼ 3 により CK-18 が 3 つに切断される。M65 と M65 Epideath (M65 ED) は M5 または M6 抗体により CK-18 およびその断片を捕捉するためアポトーシスとネクローシスをともに検出する。M30 では M5 または M6 抗体で捕捉し、カスパーゼ 3 により切断された epitope を M30 抗体で特異的に認識するためアポトーシスのみを検出する。これら細胞死マーカーは非アルコール性脂肪性肝炎や急性肝不全などの病態評価に有用と報告されている。

慢性肝疾患の線維化の評価は肝生検によって行われるが、侵襲を伴うことやサンプルエラーなどの問題点があり、肝生検に代わる非侵襲的肝線維化診断法の開

発が試みられている。本研究では細胞死マーカー (M30, M65, M65ED) が PBC における肝線維化の非侵襲的マーカーとして有用であるか、さらには肝不全進行といった予後と関連があるか検討を行った。肝生検で肝線維化ステージを評価することが可能であった 130 例 (年齢中央値 57 歳、女性 111 例) と健常者 90 例で検討した。

その結果、関口は次の結果を得た。

1. 細胞死マーカーはいずれも PBC 患者群で健常者群よりも有意に高値であった。
2. 細胞死マーカーはいずれも肝線維化ステージと有意な相関を示した。
3. 多変量解析では、低アルブミン血症と M65ED 高値は肝線維化において独立した危険因子であった。
4. ROC 解析では、細胞死マーカーは特に F4 の識別に有用であった。
5. 肝不全発症の危険因子を Cox 比例ハザード回帰分析で解析すると、M65ED が 672 U/L 以上と肝線維化が F3 または 4 であることが独立した危険因子であった。
6. Kaplan-Meier 法による解析では、M65ED が 672 U/L 以上の症例では未満の症例と比較して有意に累積生存率が低かった。

これらの結果より細胞死マーカーと PBC における肝線維化と関連が示され、中でも M65ED は肝線維化の非侵襲的マーカーとして有用であり、さらに肝不全発症の予測因子となりうることを明らかにした。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。

### Surgical intervention for esophageal atresia in patients with trisomy 18 (18トリソミー症候群の食道閉鎖症に対する外科的介入について)

## 西 恵 理 子

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】18トリソミー症候群 (T18) は比較的頻度の多い常染色体異常症で、胎児期からの成長障害、重度精神運動発達遅滞、先天性心疾患、肺高血圧、呼吸器疾患、消化器疾患、泌尿器疾患、骨格系合併症、難聴、悪性腫瘍などの合併症、および手指の重なりなどの身体的特徴を認める。生命予後不良の先天性疾患の代表とされ、現在、最も引用される米国疾病予防センターの Rasmussen らの 2 つの大規模データベース

からの検討では、1 年生存率 5.6-8.4%、生存期間の中央値 10-14.5 日と報告された。欧米では従来気管内挿管による人工呼吸管理や外科的治療を含む侵襲的治療の適応はないと考えられ、日本でも侵襲的治療を控えるべき疾患とされ、多くの施設で治療制限が考慮されてきた。しかし、T18 児の自然歴が蓄積し臨床的多様性が判明してきたこと、小児医療において両親の意思決定を重視する流れの影響を背景に、T18 という疾患名の独り歩きによる医療現場の思考停止や、医療者

のパターナリズムによる治療方針決定が問題視され、2004年の“重篤な疾患を持つ新生児の家族と医療スタッフ話し合いのガイドライン”では『子どもの最善の利益にかなう医療をめざして、その一人ひとりの子どもの状況を考慮して医療スタッフと両親が話し合うことが必要である』ことがと示された。近年、日本を中心にT18の標準的 newborn 集中治療の有用性、心疾患に対する外科治療等の有用性、瘻管治療や療育的支援の有用性についてのエビデンスが蓄積されている。

食道閉鎖症 (esophageal atresia ; EA) は出生児の3,000~4,000人に1人に合併する疾患で、約90%を占めるC型は、気管食道瘻 (tracheoesophageal fistula ; TEF) を伴い、上部食道内に貯留した唾液の誤嚥、胃内容物の気管内流入による誤嚥性肺炎、陽圧換気時の換気不全による呼吸不全のため、救命には外科的治療が必須である。外科手術は胃瘻造設および根治術を他の重症合併症がない場合には一期的に、呼吸循環状態が安定しない児には段階的に行われる。EAはT18の合併症として比較的多いが、ほとんどの施設で手術適応外とされ、T18児のEAに対する外科的介入の有用性についてのエビデンスはなかった。

【対象と方法】 T18児のEAに対する外科的介入の有用性を明らかにすることを目的とし、長野県立こども病院 (1993-2008年) と愛知県心身障害者コロニー中央病院 (1982-2009年) で外科治療を受けた、C型EAを有するT18児 (フルトリソミー) 24例を対象とし、診療録より後方視的に検討した。

【結果】 24例中9例には姑息術 (Group 1 [6例] : 胃瘻造設のみ、または胃瘻+回腸瘻, Group 2 [3例] : 胃瘻+TEF切離), 15例には根治術 (Group 3 [10例] : 一期的根治術, Group 4 [5例] : 胃瘻造設を経て二期的に根治術) を施行した。手術合併症として乳び胸2例、出血、気胸、縦隔炎、気道感染、縫合不全をそれぞれ1例認めたが、EAの手術に一般的なもので、術中死亡例や麻酔合併症例はなかった。術後に経腸栄養を18例 (全体の71%), 経口栄養を3例 (全て根治術群) で開始でき、3例 (全て根治術群) が自宅退院できた。調査時には全例が死亡しており、死亡の背景要因は先天性心疾患に伴う心不全が96%, 肺高血圧が78%と先天性心疾患関連が多くを占めた。主な最終死因は心不全58%, 呼吸不全・肺出血20%であった。全体の生存率は1日100%, 1週間92%, 1カ月58%, 1年17%, 根治術群 (Group 3, 4) では1年27%であった。生存期間の中央値は全体で44日、な

かでも二期的根治術施行群 (Group 4) では518日であった。

【考察】 T18児のEAへの外科的介入について、麻酔合併症や手術に関連した死亡はなく、それにより生存期間が大幅に延長する傾向を認めた。その要因は誤嚥性肺炎による呼吸障害の解除および安定した経腸栄養の導入と考えられ、術式は呼吸循環動態の安定化を待つて二期的に根治術を行うのが最も有効であると示唆された。根治術を含めたT18におけるEAの治療方針は、生存期間の延長とともに経口栄養の開始や自宅退院にもつながり、両親が『児にとっての最善』を見出す時間を持てる点、児自身も家族との時間のなかで成長・発達し続けられるという点でも有用であると考えられる。

#### (論文審査の結果の要旨)

T18トリソミー症候群 (T18) は比較的頻度の高い常染色体異常症で胎児期からの成長障害、重度発達遅滯、先天性心疾患など様々な合併症を有する。生命予後不良の先天性疾患の代表とされ、最も引用される大規模調査では1年生存率5.6-8.4%, 生存期間の中央値10-14.5日であった。従来、欧米および日本でも人工呼吸管理や外科的治療を含む侵襲的治療の適応はないとされ治療制限が行われてきた。しかし、T18児の自然歴が蓄積し臨床的多様性が判明してきたことや両親の意思決定を重視する小児医療の流れより、『子どもの最善の利益にかなう医療をめざして、その一人ひとりの子どもの状況を考慮』すべきと変遷した。この動きを背景に、近年 newborn 集中治療や心臓手術など積極的治療の有用性のエビデンスが蓄積されつつある。T18に比較的頻度が高い食道閉鎖症 (EA) は、救命に外科的治療が必須の深刻な合併症であるが、これまでほとんどの施設で手術適応外とされ外科的介入の有用性についてのエビデンスはなかった。

T18児のEAに対する外科的介入の有用性を明らかにすることを目的とし、長野県立こども病院 (1993-2008年) と愛知県心身障害者コロニー中央病院 (1982-2009年) で外科的治療をした、C型EAを有するT18児 (フルトリソミー) 24例を対象とし診療録より後方視的に検討した。

その結果次の結論を得た。

1. 24例中、9例に姑息術、15例に根治術を施行した。手術合併症はEAの手術に一般的なもので、術中死亡・麻酔合併症例はなかった。全体の71%が術後に経腸栄養を開始でき、根治術群の20%が経口栄養

- 養を開始、また自宅退院できた。
2. 全体の1年生存率17% (生存期間の中央値44日)、根治術群で1年生存率27%、二期的根治術施行群では生存期間中央値518日であった。
  3. 外科治療による生存期間延長の要因は誤嚥性肺炎の回避および安定した経腸栄養の導入と考えられ、術式は呼吸循環動態の安定化を待って二期的に根治術を行うのが最も有効と示唆された。
  4. 根治術を含めたT18におけるEAの外科的介入は、

生存期間の延長とともに経口栄養の開始や自宅退院にもつながり、両親が『児にとっての最善』を見出し、児自身も家族との時間の中で成長・発達し続けられるという点でも有用と考えられる。

以上より、EAを有するT18児への外科的介入は有用であると考えられた。

上記の研究内容について、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### Clinical outcomes in patients with small cell lung cancer in a single institute : comparative analysis of radiographic screening with symptom-prompted patients (当施設における小細胞肺癌患者の臨床的特徴一画像検査発見例と有症状発見例の比較検討一)

福 嶋 敏 郎

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】小細胞肺癌は、進展が速く遠隔転移をきたしやすいため、自覚症状での発見例が多く早期発見例は少ない。そのため、定期検診の有効性は乏しいと言われている。最近無作為化比較試験で、CT検診の肺癌死亡率減少への有用性が報告されたが、その有用性は腺癌に高いとされ、小細胞肺癌における検診の意義は依然として不明である。本研究では、当施設にて入院治療を行った小細胞肺癌症例を、発見動機別に後方視的にその臨床的特徴と予後を解析した。

【方法】2000年から2011年の間に当施設で治療された小細胞肺癌患者を対象とした。対象者を発見動機別に、自覚症状なしでCT撮影 (CT群) か胸部X線 (X線群) で発見された患者、自覚症状で発見された患者 (症状群) の3群に分類し、それぞれの臨床的特徴や予後を後方視的に解析した。生存分析はKaplan-Meier法で行った。

【結果】CT群24例、X線群37例、症状群86例の合計147例 (男性127例、女性20例、平均年齢68.1歳) であった。3群間で性別、年齢、Performance status (PS) の分布はほぼ同様であった。TNM分類に基づく病期別では、症状群に比し、CT群およびX線群で、病期I、IIの早期病期の症例が多く認められる傾向にはあったが、統計学的に有意な分布の偏りは認められなかった。しかし、小細胞肺癌の臨床的病期分類の限局型と進展型で分類すると、CT群およびX線群は症状群に比し早期である限局型の頻度は有意に高かった。小細胞肺癌の中でもより早期で見つかった場合の手術施行例は、症状群と比較し、CT群で有意に多く認め

られた。生存期間中央値は、CT群17.0カ月、X線群19.0カ月、症状群12.0カ月であった。

CT群およびX線群の生存期間は、症状群に比し統計学的に有意に延長していることが示された。したがって、CTないしはX線を含む胸部画像検査で発見された小細胞肺癌患者は、症状で発見された患者よりも明らかに長期生存期間を示すことが示唆された。しかしながら、CT群とX線群の生存期間には、統計学的有意差は認められなかった。また、限局型と進展型、手術治療の有無、PS0-1と2以上、年齢74歳以下と75歳以上および性別で生存期間の比較解析を行ったところ、限局型、手術施行例、PS0-1群、74歳以下の群のほうに統計学的有意差をもって生存期間の延長が認められた。しかし性別では生存期間に有意な差を認めなかった。

【結語】CTおよびX線を含む胸部画像検査は、小細胞肺癌患者のより早期病期の発見に有用で、より良い予後に寄与する可能性が示唆された。しかしながら、胸部CT検査の胸部X線検査に対する有用性は認められなかった。

#### (論文審査の結果の要旨)

小細胞肺癌は、進展が速く遠隔転移をきたしやすいため、早期発見例は少なく、自覚症状での発見例が多い。そのため、検診の有効性は乏しいと言われている。本研究では、当施設にて入院治療を行った小細胞肺癌症例を、発見動機別に後方視的にその臨床的特徴と予後を解析した。

2000年から2011年の間に当施設で治療された小細胞肺癌患者147例を対象とした。対象者を発見動機別

に、自覚症状なしでCT撮影（CT群24例）か胸部X線（X線群37例）で発見された患者、自覚症状で発見された患者（症状群86例）の3群に分類し、それぞれの臨床的特徴や予後を後方視的に解析した。生存分析はKaplan-Meier法で行った。

その結果、福嶋敏郎は次の結論を得た。

1. TNM分類に基づく病期別では、症状群に比し、CT群およびX線群で、病期I、IIの早期病期の症例が多く認められる傾向にはあったが、3群間で統計学的に有意な分布の偏りは認められなかった。
2. 小細胞肺癌の臨床的病期分類の限局型と進展型で分類すると、CT群およびX線群は症状群に比し限局型の割合が、症状群に比し有意に高かった。

3. 限局型のなかでもより早期で手術適応であった手術施行例は、CT群で症状群に比し有意に多かった。
4. CT群およびX線群の生存期間はそれぞれ症状群に比し統計学的に有意に延長していることが示された。
5. CT群とX線群の生存期間には、統計学的有意差は認められなかった。

これらの結果より、CTないしはX線を含む胸部画像検査で発見された小細胞肺癌患者は、症状で発見された患者よりも、明らかにより限局型の頻度が高く長期生存期間を示すことが示唆された。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。

### Clinical Outcome of Deep-seated Atypical Lipomatous Tumor of the Extremities with Median-term Follow-up Study (四肢深部に発生した異型脂肪腫様腫瘍の中期臨床成績)

鬼頭 宗久

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】四肢深部発生の異型脂肪腫様腫瘍(ALT)に対する最適の手術方法については、未だにコンセンサスを得られておらず、さらに必要とする経過観察期間も不明瞭である。本研究では、初回手術を当院で施行したALTの中期の臨床的・機能的な結果を調査し、最適な手術手技・経過観察期間を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】1996年～2009年までに、四肢深部発生のALTと診断され、当院にて初回手術を施行し、5年以上経過観察が出来た41人を対象とした。手術方法の違いによる局所再発率・脱分化率・術後機能評価を検討した。機能評価にはISOLS/MSTS scoreを用いた。

【結果】広範切除群は11例（1cm以下のマージン：9例、2cm以上のマージン：2例）、辺縁切除群は30例であった。広範切除群では、重要な神経・血管を合併切除した症例はなく、合併切除は筋肉に限られていた。平均経過観察期間は9.2年であった。再発率・脱分化率は広範切除群では0%であったが、辺縁切除群では23%、3%であった。再発までの期間は、平均7.2年であった。無局所再発生存率は広範切除群で有意に高かった（ $P=0.021$ ）。辺縁切除群では、10%の症例で残存腫瘍を認め、腫瘍の局在は、すべて筋間発生であった。ISOLS/MSTS scoreは、広範切除群で98%、辺縁切除群では99%であり、有意差を認め

なかった（ $P=0.549$ ）。

【考察】四肢深部に発生したALTでは、筋肉の合併切除のみで広範切除が達成できる場合は、局所再発・脱分化を制御するために広範切除術を選択するべきである。また、切除マージンは正常組織を1cmつけたマージンで十分である。重要な神経・血管と接している場合は、ALTは再発しても脱分化をしない限りは転移をきたすことがない。従って、神経・血管の切除が大幅なADLの低下をきたす可能性が高いと判断される場合は、再発の危険性が高いとしても血管・神経に接する部位のみでの辺縁切除術を考慮しても良いと思われる。また、術後は少なくとも連続した8年以上の経過観察が必要である。

#### (論文審査の結果の要旨)

四肢深部発生の異型脂肪腫様腫瘍(ALT)に対する最適の手術方法については、未だにコンセンサスを得られておらず、さらに必要とする経過観察期間も不明瞭である。本研究では、初回手術を当院で施行したALTの中期の臨床的・機能的な結果を調査し、最適な手術手技・経過観察期間を明らかにすることを目的とした。

1996年～2009年までに、四肢深部発生のALTと診断され、当院にて初回手術を施行し、5年以上経過観察ができた41人を対象とした。手術方法の違いによる局所再発率・脱分化率・術後機能評価を検討した。機能評価にはISOLS/MSTS scoreを用いた。

その結果、鬼頭宗久は次の結論を得た。

1. 広範切除群は11例（1 cm 以下のマージン：9 例，2 cm 以上のマージン：2 例），辺縁切除群は30例であった。広範切除群では，重要な神経・血管を合併切除した症例はなく，合併切除は筋肉に限られていた。平均経過観察期間は9.2年であった。
2. 再発率・脱分化率は広範切除群では0%であったが，辺縁切除群では23%，3%であった。
3. 再発までの期間は，平均7.2年であった。
4. 無局所再発生存率は広範切除群で有意に高かった（ $P=0.021$ ）。
5. 辺縁切除群では，10%の症例で残存腫瘍を認め，腫瘍の局在は，すべて筋間発生であった。
6. ISOLS/MSTS score は，広範切除群で98%，辺縁切除群では99%であり，有意差を認めなかった

（ $P=0.549$ ）。

これらの結果により，四肢深部に発生した ALT では，筋肉の合併切除のみで広範切除が達成できる場合は，局所再発・脱分化を制御するために広範切除術を選択すべきである。また，切除マージンは正常組織を1 cm つけたマージンで十分である。重要な神経・血管と接している場合は，ALT は再発しても脱分化をしない限りは転移をきたすことがない。従って，神経・血管の切除が大幅な ADL の低下をきたす可能性が高いと判断される場合は，再発の危険性が高いとしても血管・神経に接する部位のみでの辺縁切除術を考慮しても良いと思われる。また，術後は少なくとも連続した8年以上の経過観察が必要である。よって主査，副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Usefulness of free-breathing readout-segmented echo-planar imaging (RESOLVE) for detection of malignant liver tumors : Comparison with single-shot echo-planar imaging (SS-EPI) (肝悪性腫瘍の検出における，自由呼吸下 Readout-segmented echo planar imaging (RESOLVE) の有用性：呼吸同期下 Single-shot echo planar imaging (SS-EPI) との比較)

## 所 博 和

### (論文の内容の要旨)

【背景および目的】肝悪性腫瘍の画像診断において，拡散強調画像は非侵襲的に病変の存在診断が可能な方法として広く用いられている。拡散強調像の撮像法は Single-shot echo planar imaging (SS-EPI) が一般に使用されているが，①局所磁場の乱れに敏感であるため，空気や水との境界面にゆがみが生じる，②1回の励起に対するデータ収集が長いために，画像にぼけが生じ，体動による影響が大きい，という問題点がある。さらに，これらの問題点は1.5Tから3Tと静止磁場が強くなるほど強調される傾向にある。

Readout-segmented echo planar imaging (RESOLVE) は Multi-shot echo planar imaging (MS-EPI) の一つで，k-空間を複数個に分けて撮像する方法である。k-空間を複数個に分けることで1回の励起あたりのデータ収集を減らし，局所磁場の影響や  $T_2^*$  減衰の影響を軽減することができる。これにより，磁化率アーチファクトが抑制でき，頭部領域では高分解能の拡散強調像を得ることが可能となった。さらに，RESOLVE では分割されたそれぞれの k-空間のずれを補正するためナビゲーターエコーが使用されており，体動の影響を受けにくいことが期待される。

しかしながら，腹部領域では臨床的な有用性はまだ確立されていない。今回我々は，腹部領域において呼吸同期下 SS-EPI と自由呼吸下 RESOLVE を比較し，自由呼吸下 RESOLVE の有用性について検討した。

【対象】肝悪性腫瘍に対し腹部 MRI が撮像された77症例（男性52例，女性25例，平均68.5歳）。

【検討項目】いずれの撮像法も5分程度の検査時間になるように設定し，実際にかかった検査時間を計測し比較した。磁化率アーチファクト，体動アーチファクトの程度を肝右葉，左葉に分けて視覚的に3段階（3，アーチファクトなし；1，著明なアーチファクト）で評価し比較した。肝悪性腫瘍の検出能についても同様に3段階（3，良好；1，不良）で評価し比較した。

【結果】RESOLVE と SS-EPI の撮像時間の中央値はそれぞれ6分5秒，7分3秒であった。磁化率アーチファクトに関するスコアの中央値は，肝右葉/左葉でそれぞれ3，2；3，3であった。体動アーチファクトに関するスコアの中央値は2，3；1，2であった。病変検出能に関するスコアの中央値は3，3であった。撮像時間，右葉の磁化率アーチファクト，両葉の体動アーチファクトに関しては統計学的有意差が認められた。

【考察】自由呼吸下RESOLVEでは、呼吸同期下SS-EPIに比し中央値で1分程度の時間短縮が可能であった。これは自由呼吸下と呼吸同期下との違いによるためと思われる。呼吸同期法は被験者の呼吸サイクルの特定の部分でのみデータ収集を行うため、被験者の呼吸数や呼吸変動により検査時間が一定せず、結果として撮像時間は延長し個々の検査時間にもばらつきが生じる。しかしながら、自由呼吸下では呼吸数や呼吸変動に影響されないため、撮像時間の延長が少なく撮像時間のばらつきも少ない。撮像時間が短く、かつ撮像時間のばらつきも少ないことは、ルーチン検査としての検査効率を向上させると思われる。

磁化率アーチファクトは腹部領域では主に胆嚢周囲、消化管周囲にみられる。RESOLVEでは、右葉に関しては予測通りこれらのアーチファクトは有意に軽減されていた。左葉は心拍による体動アーチファクトが強く出たため、これが前面に出る結果となり、有意差は見られなかった。

RESOLVEでは体動アーチファクトが軽減されることが期待されたが、今回の結果ではRESOLVEの方で体動アーチファクトが顕著であった。これはRESOLVEが自由呼吸下で撮影され、呼吸のような大きな動きに関しては完全には補正しきれなかったものと思われる。

RESOLVEでは体動アーチファクトが顕著であったが、小さい病変も含め病変検出能はSS-EPIと同等であった。高原らはdiffusion-weighted whole-body imaging with background body signal suppression (DWIBS) と呼ばれる全身拡散強調像を報告しており、これでは呼吸停止下や呼吸同期下でなく、自由呼吸下で撮像が行われている。RESOLVEは自由呼吸下でも呼吸同期下SS-EPIと同等の病変検出能を有しており、こうした分野にも応用可能と思われる。

【結語】自由呼吸下RESOLVEは、呼吸同期下SS-EPIと比較して体動アーチファクトの影響が大きいですが、同等の病変検出能を有した上で短時間の撮像が可能であるという利点を持つ。

#### (論文審査の結果の要旨)

肝悪性腫瘍の画像診断において、拡散強調画像は非侵襲的に病変の存在診断が可能な方法として広く用いられている。拡散強調像の撮像法はSingle-shot echo

planar imaging (SS-EPI) が一般に使用されているが、局所磁場の影響やT2\*減衰の影響を受けやすいという問題点がある。Readout-segmented echo planar imaging (RESOLVE) はMulti-shot echo planar imaging (MS-EPI) の一つで、k-空間を複数個に分けることで1回の励起あたりのデータ収集を減らし、局所磁場の影響やT2\*減衰の影響を軽減することができる方法である。これにより頭部領域では高分解能の拡散強調像を得ることが可能となったが、腹部領域では臨床的な有用性はまだ確立されていない。今回、腹部領域において呼吸同期下SS-EPIと自由呼吸下RESOLVEを比較し、自由呼吸下RESOLVEの有用性について検討した。

肝悪性腫瘍に対し腹部MRIが撮像された77症例に対し、いずれの撮像法も5分程度の検査時間になるように設定し、実際にかかった検査時間を計測し比較した。磁化率アーチファクト、体動アーチファクトの程度を肝右葉、左葉に分けて視覚的に3段階で評価し比較した。肝悪性腫瘍の検出能についても同様に3段階で評価し比較した。

その結果、所 博和は次の結論を得た。

1. RESOLVEとSS-EPIの撮像時間の中央値はそれぞれ6分5秒、7分3秒であった。
2. 磁化率アーチファクトは右葉においては有意に軽減されていた。左葉は心拍による体動アーチファクトが強く出たため、有意差は見られなかった。
3. 体動アーチファクトは、RESOLVEの方が強く出現していた。
4. 病変検出能は両群ともに同等であった。

これらの結果より、自由呼吸下RESOLVEは、呼吸同期下SS-EPIと比較して体動アーチファクトの影響が大きいですが、同等の病変検出能を有した上で短時間の撮像が可能であるという利点を持つ、ということが分かった。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。

Prognostic Significance of Neuroadrenergic Dysfunction for Cardiovascular Events in Patients with Acute Myocardial Infarction (急性心筋梗塞患者における自律神経異常は心血管イベントの予後予測因子である)

南 澤 匡 俊

(論文の内容の要旨)

【目的】夜間血圧下降を認めない血圧変動パターン (Non-dipper 型) は本態性高血圧患者における心血管イベントおよび予後の予測因子であるが、急性心筋梗塞 (AMI) 患者における意義は明らかでない。本研究の目的は24時間自由行動下血圧測定 (ABPM) による血圧変動パターンおよび Iodine-123 metaiodobenzylguanidine 心臓交感神経イメージング (MIBG 心筋イメージ) による自律神経系の異常が AMI 後の心血管イベント予測因子になりうるかを検討することである。

【方法】2008年6月～2010年12月に信州大学医学部附属病院にて AMI を発症し緊急冠動脈血行再建の4週間以内に ABPM, MIBG 心筋イメージを施行した連続63例 (67±12歳) を対象とした。血圧変動パターンにより, Dipper 群 (夜間降圧度10-20% : 正常パターン, 29例) と Non-dipper 群 (夜間降圧度 0-10%, 34例) に分類し, MIBG 心筋イメージにて後期相心縦隔比 (H/M) を計測した。全患者に対して, 心血管イベント (全死亡, 急性心筋梗塞, 脳卒中, 標的血管以外の新規冠動脈血行再建) の発症の有無につき, 前向きに2年間フォローした。

【結果】観察期間中の心血管イベントは13例 (21%) に観察された。Non-dipper 群は, Dipper 群と比較して有意に予後不良であった (イベント回避の log-rank 検定,  $p=0.013$ )。また受信者動作特性曲線 (ROC 曲線) を用いた心血管イベントを予測し得る H/M のカットオフ値は1.96で, 感度76.9%, 特異度64.0% であった ( $p=0.043$ )。H/M 比のカットオフ値による比較では, H/M 1.96未満の患者群 ( $n=28$ ) は H/M 1.96以上の患者群 ( $n=35$ ) と比較して有意に予後不良であった (log-rank 検定,  $p=0.010$ )。さらに, Non-dipper 型であり, H/M 1.96未満の患者群 ( $n=12$ ) は他の患者群と比較して最も予後不良であった (log-rank 検定,  $p=0.0020$ )。年齢で調整した比例ハザードモデル解析において, Non-dipper 型 (ハザード比4.40; 95%信頼区間1.20-16.08;  $p=0.025$ ), H/M 比 (ハザード比0.21; 95%信頼区間0.059-

0.78;  $p=0.019$ ) は独立した予後予測因子であった。

【考察】本研究では AMI 患者における ABPM および MIBG 心筋イメージの自律神経系検査の併用が, 心血管イベントのリスク層別化に有用であることを初めて報告した。これまで, 本態性高血圧, 睡眠時無呼吸症候群における Non-dipper 型血圧変動パターンと心血管イベントの関連については, 血小板凝集能の活性化や炎症性変化が関与し, 動脈硬化所見の進行が報告されている。AMI 患者においても, 同様な機序が考えられるが, 本研究では炎症性バイオマーカーなどの検討はしておらず, 今後の検討課題である。また, 心臓交感神経活性を反映する MIBG 心筋イメージの洗い出し率は AMI 患者のリスク層別化に有用と報告されているが, 今回の研究は新たに H/M 比も予後の予測に有用と示された。Non-dipper 型血圧変動パターンは降圧剤投与に伴い, Dipper 型に回復するとの報告があるが, Non-dipper 群の AMI 患者に対する薬剤介入が心血管イベントを減少させるかは不明である。大規模介入研究で, AMI 患者の血圧変動パターンの是正が, 心血管イベント発症の抑制につながるかの更なる検討が重要である。ABPM は血圧変動調節システムによる血管由来の自律神経系の異常の有無を評価できるのに対し, MIBG 心筋イメージは心臓自律神経の異常の有無を評価できる。本研究により, AMI 患者において, 心 (MIBG 心筋イメージ) 血管 (ABPM) 系の自律神経系評価に両者の併用が有用な検査であることが示唆された。今後我々は, ABPM や MIBG 心筋イメージと, 炎症性バイオマーカーとの関連を検討し, 動脈硬化進展における機序につき更なる研究を遂行し, 本研究で得られた心血管病における自律神経系評価の有用性につき, 再検証していく必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

当院で急性心筋梗塞 (AMI) を発症し4週間以内に ABPM, MIBG 心筋イメージを施行した連続63例を対象とした。血圧変動パターンにより, Dipper 群 (夜間降圧度10-20% : 正常パターン, 29例) と Non-dipper 群 (夜間降圧度 0-10%, 34例) に分類し, MIBG 心筋イメージにて後期相心縦隔比 (H/M) を

計測した。全患者に対して、心血管イベントの発症の有無につき、前向きに2年間フォローした。観察期間中の心血管イベントは13例(21%)に観察された。Non-dipper群は、Dipper群と比較して有意に予後不良であった( $p=0.013$ )。また受信者動作特性曲線(ROC曲線)を用いた心血管イベントを予測し得るH/Mのカットオフ値:1.96による比較では、H/M 1.96未満の患者群(28例)はH/M 1.96以上の患者群(35例)と比較して有意に予後不良であった( $p=0.010$ )。さらに、Non-dipper型であり、H/M 1.96未満の患者群(12例)は他の患者群と比較して最も予後不良であった( $p=0.0020$ )。

その結果、南澤匡俊は次の結論を得た。

1. 本論文はAMI患者におけるABPMおよびMIBG心筋イメージの自律神経系検査の併用が、心血管イベントのリスク層別化に有用であることを示した最初の研究である。

2. Non-dipper型血圧変動パターンに伴い血小板凝集能の活性化や炎症性変化が関与し、動脈硬化所見の進行を促し、心血管イベントを来したものと推察された。

3. MIBG心筋イメージでのH/M比の低値群は、心臓交感神経機能障害を意味し、カテコラミンによる心筋障害などの心機能低下を促し、心血管イベントを来したものと推察された。

これらの結果より、ABPMおよびMIBG心筋イメージの両検査で自律神経系の異常を相互補完的に評価することで、AMI患者における高リスク群の選別に特に有用と考えられた。

本論文はAMI患者の予後予測に対する自律神経系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。

## Heat Shock Protein 90 Is a Potential Therapeutic Target in Cholangiocarcinoma (胆管癌におけるHeat Shock Protein 90発現の治療標的としての可能性)

代 田 智 樹

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】胆管癌は本邦全がん罹患数の約3%を占め、5年生存率は膵臓癌に次いで約10%と低い。東アジアに特徴的な難治癌の一つとされ、肝内胆管から発生する肝内胆管癌と肝外胆管から発生する肝外胆管癌に分類される。根治的治療は外科的切除のみであり、有効な抗癌剤はなく、新たな治療法の開発が期待されている。Heat Shock Protein 90(以下HSP90)は細胞内分子シャペロンの一つであり、低栄養、低酸素、アシドーシスなどの細胞ストレス状況下で発現が増大する。癌細胞における細胞増殖、分化、浸潤等の重要な役割を果たすプロテインキナーゼやステロイドホルモン受容体等のシグナル伝達分子の多くがHSP90と相互作用すると言われており、近年様々な癌腫(乳癌、胃癌、非小細胞肺癌、食道癌、膵癌、口腔癌)においてHSP90発現と予後の関係、またHSP90阻害剤の有効性が報告されている。本研究では肝内胆管癌及び肝外胆管癌におけるHSP90発現の臨床病理学的検討、HSP90阻害剤(NVP-AUY922; Novartis)を用いたin vitro及びin vivoレベルでの有効性に関して検討した。

【方法】肝内胆管癌及び肝外胆管癌切除標本(肝内胆

管癌177症例、肝外胆管癌222症例))を用い、免疫染色によるHSP90発現を評価し、臨床病理学的因子との関係を検討した。胆管癌細胞株(17細胞株)に、HSP90阻害剤(NVP-AUY922)を投与し、MTS assayにより50%阻害濃度を算出、Western blotting法によりHSP90の下流シグナルを評価した。無胸腺マウスに胆管癌細胞を投与してxenograft modelを作成し、NVP-AUY922投与高用量群(50 mg/kg)、低用量群(25 mg/kg)、control群の3群に分け、腫瘍径を測定しNVP-AUY922の有効性を評価した。

【結果】HSP90発現陽性例は、肝内胆管癌で79症例(44.6%)、肝外胆管癌で73症例(32.8%)であり、HSP90発現陽性症例の全生存期間及び無再発増悪期間は、両疾患で有意に不良であった。多変量解析ではHSP90発現が、肝内胆管癌症例では術前CA19-9値、肝内転移、リンパ節転移と、肝外胆管癌症例においてはリンパ節転移とともに独立予後不良因子として規定された。胆管癌細胞株を用いた検討では、13細胞株でNVP-AUY922に対する感受性を示し、NVP-AUY922投与によりAKT/MAPK/STAT3のリン酸化が阻害されることが示された。胆管癌xenograft modelの検討では、NVP-AUY922低容量及び高容量投与群

においてcontrol群と比較して有意に腫瘍増殖を抑制されることが示された。また、腫瘍組織のKi-67 indexは、NVP-AUY922投与群で有意に減少していた。

【結論】胆管癌症例におけるHSP90の発現は予後不良因子であり、HSP90発現が予後予測のバイオマーカーとなる可能性がある。HSP90阻害剤であるNVP-AUY922の投与によりAKT/MAPK/STAT3シグナル経路のリン酸化が阻害されるとともに細胞増殖が抑制され、NVP-AUY922は胆管癌に対する有効な抗癌剤となる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

Heat Shock Protein 90 (HSP90) はシャペロン蛋白であり、ストレス条件下で発現量は増加する。癌細胞における細胞増殖、分化、浸潤等の重要な役割を果たすプロテインキナーゼやステロイドホルモン受容体等のシグナル伝達分子の多くがHSP90と相互作用する。HSP90にはATP結合部位を有し、HSP90阻害剤はこのATP結合部位を阻害し、クライアントプロテインを不活化し腫瘍細胞増殖を抑制する。腫瘍細胞は通常細胞よりHSP90への依存度が高く、乳癌、食道癌、膵癌などの固形癌においてHSP90発現と予後の相関、またHSP90阻害剤の有効性が報告されている。本研究では、胆管癌におけるHSP90発現の検討、ならびにHSP90阻害剤の胆管癌への有効性を検討するため、下記の実験を施行した。胆管癌切除検体に対しHSP90免疫染色を行い、胆管癌とHSP90発現との臨床病理学的因子との解析を施行した。胆管癌細胞株にHSP90阻害剤(NVP-AUY922)を投与し、MTS assayにより50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)を算出した。

Carpal tunnel syndrome: a common initial symptom of systemic wild-type ATTR (ATTRwt) amyloidosis (手根管症候群は全身性野生型トランスサイレチンアミロイドーシスの初発症状として好発する)

中 川 道 隆

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】全身性野生型トランスサイレチンアミロイドーシス(ATTRwt)は、野生型トランスサイレチン(TTR)由来のアミロイドが心臓を中心とする全身組織に沈着し、種々の臓器障害を呈する予後不良の疾患である。剖検例では80歳台で12~25%、90歳台で37%に心筋へのATTRアミロイド沈着が存在すると報告されており、本症は加齢に関連したcommon diseaseである。しかしATTRwtに対する有効

HSP90阻害剤によるHSP90下流のシグナル伝達分子をWestern blottingを用いて評価した。さらに無胸腺マウスに胆管癌細胞株を投与して胆管癌xenograft mouseを作成、NVP-AUY922高用量群、低用量群、コントロール群に分け、胆管癌へのNVP-AUY922の有効性を検討した。

その結果、代田は次の結果を得た。

1. 肝内胆管癌及び肝外胆管癌でHSP90発現陽性症例は全生存期間及び無再発増悪期間において有意に予後不良であった。
2. 多変量解析では、HSP90発現陽性は肝内胆管癌症例では術前CA19-9値、肝内転移、リンパ節転移とともに、肝外胆管癌症例ではリンパ節転移とともに独立予後不良因子として規定された。
3. 胆管癌細胞株において13細胞株でNVP-AUY922の感受性が示された。NVP-AUY922投与によりAKT/MAPK/STAT3のリン酸化が阻害され、抗腫瘍増殖効果を示す可能性が示唆された。
4. 胆管癌xenograft modelへのNVP-AUY922投与によりKi-67発現抑制を介した腫瘍増殖抑制効果が認められた。

これらの結果より、胆管癌症例において免疫染色によるHSP90発現が予後を予測するバイオマーカーとなり得る可能性があり、HSP90阻害剤であるNVP-AUY922は胆管癌に対する有効な抗癌剤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。

な治療法が存在しないため、本症が積極的に生前診断されることは稀である。一方で、近年TTR四量体安定薬や遺伝子治療などの遺伝性ATTRアミロイドーシスに対する新規治療が開発され、これらの治療はATTRwtに対しても有効性が期待されている。このような状況下で、今後ATTRwtの早期診断が非常に重要になると考えられる。本研究ではATTRwtの早期診断を可能にする目的で、本症患者の臨床像・画像所見・組織学的所見の検討を行った。

【対象と方法】2008年2月から2015年8月の間に信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科で診断・診療した ATTRwt 患者31名（男性24例，女性7例）。診断は生検組織の免疫組織学的検討による ATTR アミロイド沈着陽性所見と DNA 解析で TTR 遺伝子に変異がないことに基づいて確定した。臨床症状および検査所見は診療録を後方視的に解析した。

【結果】対象患者の平均発症年齢は69.8±9.0歳，平均診断年齢は74.5±8.3歳で，発症から診断までの期間は5.4±4.4年であった。初発症状としては，手根管症候群（CTS）が最も高頻度（17例，55％）であり，全経過では21例（68％）に CTS を認めた。14例（45％）は心不全症状が初発であり，経過中に28例（90％）に何らかの心症状を認めた。心原性塞栓症と腎機能障害も ATTRwt 患者で高頻度に認められた。CTS 初発群と心不全初発群で比較すると，発症時年齢は CTS 群が66.5±8.6歳で，心不全群の73.9±7.9歳に比べ有意に若年であった（ $p=0.01$ ）。発症から診断に至るまでの期間は CTS 群で6.9±7.9年と心不全群の1.9±2.7年に比べ有意に長かった（ $p<0.0001$ ）。CTS 群では，手根管症状が心症状に平均6.9年先行していた。ATTR アミロイド沈着の証明は，17例（55％）が心筋生検，16例（52％）が内視鏡的胃十二指腸生検，10例（32％）が皮下脂肪を含む皮膚生検，6例（19％）が手根管開放術の際に切除された手根管組織で行われていた。 $^{99m}\text{Tc}$ 心筋シンチグラフィが24例で実施され，心症状を全く認めない2例を含む23例で陽性であった。

【考察・結論】従来，ATTRwt の臨床症状は心症状の報告が主体であったが，今回の研究で，本症患者に CTS が高頻度に認められ，初発症状として最多であることが明らかになった。これまで，本症の診断時には既に心不全が高度に進行していることが多かった。しかし，今回の研究からCTS患者におけるATTRアミロイド沈着の有無を検討することにより，ATTRwt を早期診断できる可能性が示唆された。更に， $^{99m}\text{Tc}$ 心筋シンチグラフィが感度の高い非侵襲的な心ATTRアミロイド沈着の評価方法であることが明らかになった。

#### （論文審査の結果の要旨）

全身性野生型トランスサイレチンアミロイドーシス（ATTRwt）は，野生型トランスサイレチン（TTR）由来のアミロイドが心臓を中心とする全身組織に沈着し，種々の臓器障害を呈する予後不良の疾患である。

剖検例では80歳台で12～25％，90歳台で37％に心筋へのATTRアミロイド沈着が存在すると報告されており，本症は加齢に関連した common disease である。しかしATTRwt に対する有効な治療法が存在しないため，本症が積極的に生前診断されることは稀である。一方で，近年 TTR 四量体安定薬や遺伝子治療などの遺伝性ATTRアミロイドーシスに対する新規治療が開発され，これらの治療はATTRwt に対しても有効性が期待されている。このような状況下で，今後ATTRwt の早期診断が非常に重要になると考えられる。本研究ではATTRwt の早期診断を可能にする目的で，本症患者の臨床像・画像所見・組織学的所見の検討を行った。

対象は2008年2月から2015年8月の間に信州大学脳神経内科，リウマチ・膠原病内科で診断・診療したATTRwt 患者31名（男性24例，女性7例）。診断は生検組織の免疫組織学的検討によるATTRアミロイド沈着陽性所見とDNA解析でTTR遺伝子に変異がないことに基づいて確定した。臨床症状および検査所見は診療録を後方視的に解析した。

結果，対象患者の平均発症年齢は69.8±9.0歳，平均診断年齢は74.5±8.3歳で，発症から診断までの期間は5.4±4.4年であった。初発症状としては，手根管症候群（CTS）が最も高頻度（17例，55％）であり，全経過では21例（68％）に CTS を認めた。14例（45％）は心不全症状が初発であり，経過中に28例（90％）に何らかの心症状を認めた。心原性塞栓症と腎機能障害も ATTRwt 患者で高頻度に認められた。CTS 初発群と心不全初発群で比較すると，発症時年齢は CTS 群が66.5±8.6歳で，心不全群の73.9±7.9歳に比べ有意に若年であった（ $p=0.01$ ）。発症から診断に至るまでの期間は CTS 群で6.9±7.9年と心不全群の1.9±2.7年に比べ有意に長かった（ $p<0.0001$ ）。CTS 群では，手根管症状が心症状に平均6.9年先行していた。ATTR アミロイド沈着の証明は，17例（55％）が心筋生検，16例（52％）が内視鏡的胃十二指腸生検，10例（32％）が皮下脂肪を含む皮膚生検，6例（19％）が手根管開放術の際に切除された手根管組織で行われていた。 $^{99m}\text{Tc}$ 心筋シンチグラフィが24例で実施され，心症状を全く認めない2例を含む23例で陽性であった。

従来，ATTRwt の臨床症状は心症状の報告が主体であったが，今回の研究で，本症患者に CTS が高頻度に認められ，初発症状として最多であることが明ら

かになった。これまで、本症の診断時には既に心不全が高度に進行していることが多かった。しかし、今回の研究から CTS 患者における ATTR アミロイド沈着の有無を検討することにより、ATTRwt を早期診断できる可能性が示唆された。更に、<sup>99m</sup>Tc 心筋シン

チグラフィが感度の高い非侵襲的な心 ATTR アミロイド沈着の評価方法であることが明らかになった。

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

Chondroitin sulfate synthase 1 expression is associated with malignant potential of soft tissue sarcomas with myxoid substance (コンドロイチン硫酸転移酵素 1 の発現は粘液産生軟部肉腫の悪性度と関連する)

## 百瀬 能成

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】軟部肉腫は病理組織学的に多種の腫瘍型に分類されるが、多くは中～高悪性度の腫瘍であり、5 年生存率も約半数で 50 % 未満とされている。特に、粘液産生軟部肉腫ではその病理学的診断が困難で、特異的腫瘍マーカーも少ないことから、その悪性度診断は困難である。一方、グリコサミノグリカン (GAG) は、アミノ糖とウロン酸からなる二糖の繰り返し構造をもち、構成される二糖繰り返し領域の違いによって 2 つのサブタイプ、すなわちコンドロイチン硫酸 (CS) とヘパラン硫酸 (HS) に分けられる。Chondroitin sulfate synthase-1 (CHSY1) と exostosis-like 3 (EXTL3) は、それぞれ CS と HS の合成に関わる糖転移酵素活性をもつが、軟部肉腫における糖転移酵素の発現とその臨床的意義については不明である。我々は、粘液産生軟部肉腫における CHSY1 と EXTL3 の発現量と悪性度との関連について免疫組織化学的に解析した。

【対象と方法】2000 年 1 月～2012 年 12 月までに信州大学医学部附属病院で粘液産生悪性軟部肉腫と診断され、広範切除をうけた 40 例 (粘液型脂肪肉腫 (MLS) 12 例、粘液線維肉腫 (MFS) 14 例、悪性末梢神経鞘腫 (MPNST) 12 例、低悪性度線維粘液肉腫 (LGFMS) 2 例) のホルマリン固定パラフィン包埋切片を対象とした。年齢は 10～94 歳、術後観察期間 4～133 カ月であった。これらの病理標本から、抗 CHSY1 抗体、抗 EXTL3 抗体を用いて免疫組織学的に酵素発現量を評価し、各疾患ごとに発現量を解析した。また発現量と FNCLCC 分類による病理学的悪性度と比較、さらに発現量と臨床予後との相関についても比較した。

【結果】CHSY1 と EXTL3 はそれぞれ 72.5 %、32.5 % で発現していた。CHSY1 は MLS で 25 %、MFS で 100 %、MPNST で 83.3 %、LGFMS で 100 % 発現していた。EXTL3 は MLS で 0 %、MFS で 50 %、

MPNST で 25 %、LGFMS で 50 % 発現していた。各疾患ごとの比較では、CHSY1 と EXTL3 は MFS と MPNST で有意に発現していた。FNCLCC 分類による病理学的悪性度との比較では、CHSY1 の発現は Grade1 で 23.1 %、Grade2 で 82.4 %、Grade3 で 90.0 % で Grade が高いほど有意に発現していた。EXTL3 の発現は病理学的悪性度と相関しなかった。また、CHSY1 の高発現例の 5 年生存率は 26.9 %、低発現例では 81.8 % と CHSY1 の高発現例では有意に予後が悪かった (P=0.031)。EXTL3 では発現量の違いにより 5 年生存率に有意差はなかった (P=0.284)。また、CHSY1 の発現量は AJCC stage による病分類と有意に相関していた (P=0.004)。

【結論】CHSY1 の発現量は粘液産生軟部肉腫の悪性度と関係することが明らかになった。

### (論文審査の結果の要旨)

粘液産生軟部肉腫は、組織型が多彩で特異的腫瘍マーカーが少ないため病理学的診断や悪性度診断は困難である。今回代表的なグリコサミノグリカン (GAG) であるコンドロイチン硫酸 (CS) とヘパラン硫酸 (HS) の生合成に関わる 2 つの酵素、すなわち chondroitin sulfate synthase-1 (CHSY1) と exostosis-like 3 (EXTL3) について、粘液産生軟部肉腫における発現量と悪性度との関連について免疫組織化学的に解析した。

信州大学医学部附属病院にて粘液産生悪性軟部肉腫と診断され、広範切除をうけた 40 例 (粘液型脂肪肉腫 (MLS) 12 例、粘液線維肉腫 (MFS) 14 例、悪性末梢神経鞘腫 (MPNST) 12 例、低悪性度線維粘液肉腫 (LGFMS) 2 例) のホルマリン固定パラフィン包埋切片を対象とした。これらの病理標本から、抗 CHSY1 抗体、抗 EXTL3 抗体を用いて免疫組織学的に酵素発現量を評価し、各組織型ごとに発現量を解析

した。また発現量と FNCLCC 分類による病理学的悪性度を比較し、さらに発現量を AJCC 分類に基づく病期分類、腫瘍の局在、腫瘍の大きさからなる 3 つの臨床病理学的パラメーター、5 年生存率との相関について比較した。

その結果、百瀬は次の結論を得た。

1. 粘液産生軟部肉腫では CHSY1 が 72.5 %, EXTL3 が 32.5 % に発現していた。
2. 各組織型における CHSY1 の発現量は、MFS と MPNST で高く、MLS に比べて有意に高かった。
3. 粘液産生軟部肉腫では、EXTL3 に比べて CHSY1 の発現が有意に高く、HS に比べて CS の生合成が優位である可能性が示唆される。

4. 組織学的悪性度が高いほど、CHSY1 の発現量が多く、また CHSY1 の発現量の多い症例では 5 年生存率が有意に低かった。しかし、EXTL3 の発現量は組織学的悪性度や生存率と相関しなかった。

これらの結果より、粘液産生軟部肉腫では、CHSY1 の発現量が多いほど悪性度が高くなることが明らかとなり、術前悪性度評価のために CHSY1 の発現量を調べることは有用であると考えられる。臨床的悪性度が高いほど CHSY1 の発現量は多く、また EXTL3 よりも発現量が有意に多いことは、悪性度の高い粘液産生軟部肉腫では CS 合成が優位に起きていることを示唆している。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### Spinal nociceptive transmission by mechanical stimulation of bone marrow (骨髄内機械刺激による痛覚刺激の脊髄への伝達)

石田高志

#### (論文の内容の要旨)

【背景・目的】骨折、骨髄炎、癌の骨転移など骨病変を持つ患者は骨の痛みを感じるが、骨の痛みが起こるメカニズムの詳細は未だに不明である。これまで骨膜が主に骨の痛みを受容すると考えられてきた。しかし、骨髄内にも A $\delta$  線維や C 線維が分布していることが示され、整形外科の手術の操作による骨髄内圧の上昇や骨髄の浮腫が急性痛や慢性痛を起こすとされ、骨髄内に限局した病変でも痛みが起こることが示唆されている。以上より、骨膜だけでなく骨髄内の神経も骨の痛みに関与しており、骨髄内圧の上昇により痛みを知覚しているという仮説を立てた。本研究の目的は、電気生理学的手法と行動生理学的手法を用いて骨髄内圧の上昇が痛みを惹起するか、惹起された痛みは皮膚などへの関連痛を起こすのかなど、骨髄に由来する痛みの特性を解明し、骨の痛みのメカニズムの一端を明らかにすることである。

【方法】6～8 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いて、セボフルラン麻酔下で大腿骨膝関節面を露出し、大腿骨髄内にバルーン (PTCA カテーテル RX-2, 2×15 mm, TERUMO) を挿入した。行動生理学の実験として、モルヒネ (1  $\mu$ g) のくも膜下投与前後で、大腿骨に埋め込んだバルーンを拡張させ骨髄内刺激を行い、自発痛関連行動と腰部の機械性痛覚過敏を評価した。電気生理学の実験として、ウレタン麻酔下にラットの腰部脊髄を露出し、脊髄後角 (Spinal

dorsal horn, SDH) にタングステン電極を刺入し、単一ニューロンの細胞外電位を導出し、骨髄内バルーン拡張刺激に対する応答性、腰部と大腿皮膚に対する非侵害刺激、あるいは侵害刺激への応答性を評価した。一部のニューロンでは、モルヒネの脊髄投与を行い、骨髄内刺激、非侵害あるいは侵害皮膚刺激に対する応答性の変化を調べた。また、フルオロゴールドとコレラトキシン B を用いて、脊髄後根神経節ニューロンへの皮膚・脊髄からの求心性神経繊維の入力を評価した。【結果】行動生理学の実験では大腿骨骨髄内刺激によりバルーン内圧が上昇するに従って自発痛関連行動が増加し、腰部皮膚で機械制性痛覚過敏を認めた。モルヒネのくも膜下投与により、自発痛関連行動が有意に抑制され、腰部皮膚での機械制性痛覚過敏が抑制された。電気生理学の実験では、94 個の SDH ニューロンを同定した。そのうち骨髄内バルーン拡張により活動電位の頻度が上昇する SDH ニューロンは 36 個であった。骨髄内刺激に応答するニューロンはバルーン内圧に依存して活動電位の頻度が上昇し、そのほとんどのニューロンが大腿外側皮膚に受容野を有していた。このようにバルーン拡張に反応する SDH ニューロンのうち 24 個が Wide-dynamic-range (WDR) ニューロンで、12 個が High-threshold (HT) ニューロンであった。Low-threshold (LT) ニューロン (n=41) はバルーン拡張に反応しなかった。モルヒネの脊髄投与により骨髄内刺激と侵害皮膚刺激に対する SDH ニュー

ロンの応答が抑制された。神経トレーサを用いた実験では、脊髄後根神経節ニューロンの一部が骨髄・皮膚両方からの入力を受けていることが明らかとなった。【結語】本研究により、骨髄内機械刺激は自発痛を誘発し、関連皮膚領域に関連痛としての痛覚過敏を起こすことが明らかとなった。このような痛みの発生メカニズムが骨病変による痛み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)

これまで骨膜が主に骨の痛みを受容すると考えられてきた。しかし、骨髄内にも A $\delta$  線維や C 線維が分布していることが示され、骨髄内圧の上昇や骨髄の浮腫が急性痛や慢性痛を起こることが知られており、骨髄内の神経も骨の痛みに関与している可能性がある。また、骨髄炎や骨がんなどの骨内病変が皮膚の痛覚過敏を起こすことが知られており、骨内病変も関連痛を起こす可能性がある。本研究の目的を①骨髄内刺激が痛みを誘発するか、②骨髄内刺激が関連痛を起こすかとした。

6～8週齢の SD ラットに大腿骨骨髄内に冠動脈形成術用カテーテルを留置し、骨髄刺激モデルとした。骨髄刺激モデルラットを用いて、大腿骨骨髄内刺激による自発痛関連行動と腰背部の皮膚機械性痛覚過敏を評価した。電気生理学的実験として、ウレタン麻酔下に脊髄後角 (Spinal dorsal horn, SDH) に電極を刺入し、単一ニューロンの細胞外電位を導出し、骨髄内

刺激に対する応答性、腰部と大腿皮膚に対する非侵害刺激、あるいは侵害刺激への応答性を評価した。また、神経トレーサを用いて大腿骨骨髄内と皮膚からの脊髄後根神経節への入力を評価した。

その結果、石田は次の結論を得た。

1. 行動学的実験の結果、大腿骨骨髄内刺激により、自発痛関連行動が増加し、腰背部皮膚で機械制痛覚過敏を認めた。骨髄内刺激による痛み関連行動はモルヒネの投与により抑制された。
2. 電気生理学的実験の結果、大腿骨骨髄内刺激に回答するニューロンは腰部から大腿部にかけて皮膚受容野をもち、これらのニューロンは wide-dynamic-range, high-threshold ニューロンに分類された。モルヒネの脊髄投与により、骨髄内刺激に対するニューロンの応答が抑制された。
3. 神経トレーサ実験の結果、一部の脊髄後根神経節ニューロンは骨髄内と皮膚両方から入力を受けていることが明らかとなった。

これらの結果より、骨髄内機械刺激は自発痛を誘発し、関連皮膚領域に関連痛としての痛覚過敏を起こすことが明らかとなった。このような痛みの発生メカニズムが骨病変による痛みに関与している可能性が示唆された。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Differential roles of MMP-9 in early and late stages of dystrophic muscles in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy (デュシャンヌ型筋ジストロフィーにおける MMP-9 の役割)

柴 直 子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、筋ジストロフィーの中でも最重症型であり X 連鎖遺伝性を示す。全身の骨格筋の萎縮、筋力低下が進行し小児期に歩行不能となる。さらに、呼吸筋や心筋も傷害され、20-30代で呼吸不全あるいは心不全で死亡する。骨格筋の機械的安定性を保つために必須の膜蛋白質であるジストロフィンの欠損による骨格筋の脆弱性が一次的な原因であるが、組織の再生や修復の障害も伴い、これらも組織変性の進行に大きく関与していると考えられている。しかし、その分子機構についてはまだ不明な点が多い。DMD の治療法として遺伝子治療、再生医療などの研究開発が行われているが、現

時点ではいずれも研究段階であり、根本的治療法は確立されていない。ステロイド剤は、症状の進行を緩和させる効果があり、保険治療となったが、免疫抑制作用や肥満、骨粗鬆症などの全身性の副作用が問題となるため長期間投与の有益性については課題があった。このため、病態機序に関連する標的分子に絞った副作用の少ない薬剤の開発が望まれてきた。本研究では、DMD 患者およびそのモデル動物の骨格筋や末梢血で強発現し、症状の進行に関与すると推測されている細胞外マトリックス分解酵素である MMP-9 に着目し、DMD の骨格筋における機能を解明し、MMP-9 を標的とした治療の可能性について検討した。

【対象と方法】①骨格筋における MMP-9 の機能を検

討する目的で、野生型マウスと MMP-9ノックアウトマウス (*MMP9*<sup>-/-</sup>マウス) の前脛骨筋内にカルディオトキシンを注入することにより骨格筋傷害モデルを作製し、急性炎症から組織修復までの過程における局所の細胞浸潤およびケモカイン発現の変化について解析した (N = 4-5)。②次に、ジストロフィン欠損マウスである *mdx* マウスに MMP-9を欠損させたダブルノックアウトマウス (*mdx*; *MMP9*<sup>-/-</sup>マウス) を作製し、両者の骨格筋 (前脛骨筋, 横隔膜) の炎症, 壊死, 再生, 線維化について免疫組織学および分子生物学的手法を用いて, 2, 4, 8, 14週齢および1歳齢で比較検討した (N = 3)。

【結果】①骨格筋傷害モデルの解析では, MMP-9の欠損によりマクロファージ遊走ケモカインである *MCP-1* の発現およびマクロファージの浸潤が増加し, 好中球遊走ケモカインである *MIP-2* の発現および好中球浸潤は減少していた。さらに再生促進作用を有する M2マクロファージの浸潤は増加し, DMD の表現型の軽症化に関わるとされている *osteopontin* (マクロファージや壊死筋などで産生され, 組織の炎症や再生を修飾する糖蛋白質) の発現増加を認めた。②ダブルノックアウトマウスの解析では, 4週齢の *mdx*; *MMP9*<sup>-/-</sup>マウスでは *mdx* マウスに比し *MIP-2* の発現の低下, *MCP-1* の発現の増加が認められ, 筋組織の炎症細胞浸潤はこれらに呼応する変化を示していた。さらには *osteopontin* の一過性かつ著明な発現増加が認められた。14週齢の *mdx*; *MMP9*<sup>-/-</sup>マウスの骨格筋では *mdx* マウスに比し再生線維が有意に増加し, 血清 CK 活性の低下と筋力の増加が確認された。一方, 高齢マウス (1歳齢) では, 両群間で炎症所見には大差を認めなかったが, *mdx*; *MMP9*<sup>-/-</sup>マウスでは骨格筋の間質の I 型コラーゲンの蓄積が *mdx* マウスに比し有意に増加し, 筋力も低下していた。

【考察】以上の結果から *mdx* マウスの変性骨格筋における MMP-9の主な役割は病期によって異なると考えられた。すなわち, ジストロフィー骨格筋では病初期～若年進行期には, MMP-9がケモカインや炎症細胞の遊走に対する作用を介して組織の炎症の収束を遅延させ, 組織変性・壊死を増悪させる働きを示す一方, 高齢では I 型コラーゲンなどの間質にある線維成分の分解を促進し, 組織の線維化を抑制する働きを有していることが明らかになった。以上から, MMP-9を標的分子とする治療開発では, 若年例の DMD 患者には有効となる可能性があるが, 臨床応用には治療を行う

病期や投与期間を十分に検討する必要性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は, 骨格筋の構造的安定性を保つ膜蛋白であるジストロフィンの欠損が根本的な原因であるが, 組織の再生や修復の障害も伴い筋変性を増悪させていると考えられている。本研究では, DMD 患者の骨格筋で強発現し, 症状の進行に関与すると推測されている MMP-9に着目し, 治療開発を念頭に置き動物実験を行った。

まずは, 野生型マウスと *MMP9*<sup>-/-</sup>マウスの前脛骨筋内にカルディオトキシンを注入することで骨格筋傷害モデルを作製し, 急性炎症から組織修復の過程での MMP-9の働きについて免疫組織学および分子生物学的手法を用いて解析した (N = 4-5)。次に, ジストロフィン欠損 (*mdx*) マウスに MMP-9を欠損させた *mdx*; *MMP9*<sup>-/-</sup>マウスを作製し, 骨格筋の炎症, 壊死, 再生, 線維化について, 2, 4, 8, 14週齢および1歳齢で上記と同様の手法を用いて解析した (N = 3)。その結果, 次の結論を得た。

1. 骨格筋傷害モデルの解析では, MMP-9の欠損により *MCP-1* 発現および MΦ の浸潤が増加し, *MIP-2* 発現および好中球浸潤は減少していた。さらに再生促進作用を有する M2MΦ の浸潤は増加し, DMDの表現型の軽症化に関わるとされている *osteopontin* の発現増加を認めた。
2. 4週齢の *mdx*; *MMP9*<sup>-/-</sup>マウスでは *MIP-2* 発現の低下, *MCP-1* 発現の増加を認め, 筋組織の炎症細胞浸潤はこれらに呼応する変化を示し, さらには *osteopontin* の発現は一過性に著明に増加していた。14週齢の *mdx*; *MMP9*<sup>-/-</sup>マウスの骨格筋では再生線維が増加し, 血清 CK 値の低下と筋力の増加が確認された。一方, 1歳齢の *mdx*; *MMP9*<sup>-/-</sup>マウスでは骨格筋間質の I 型コラーゲンの蓄積が増加し, 筋力は低下していた。

これらの結果から *mdx* マウスの骨格筋変性における MMP-9の主な役割は病期により異なり, 若年期には, ケモカインや炎症細胞の遊走に対する作用を介して炎症の収束を遅延させ, 組織変性を増悪させる働きを示す一方, 高齢では間質線維成分の分解を促進し, 組織の線維化を抑制する働きが主体となることが明らかになった。以上より, MMP-9を標的分子とする治療開発では, 若年 DMD 患者には有効となる可能性があるが, 臨床応用には治療を行う病期や投与期間を十分に検討する必要性が示唆された。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。

An advanced in situ imaging method using heavy metal-doped hollow tubes to evaluate the biokinetics of carbon nanotubes in vivo (中空に重金属を内包したカーボンナノチューブの in vivo における体内分布評価に対する新しい in situ イメージング法)

小林 伸 輔

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】カーボンナノチューブ (CNTs) は生体材料への応用が注目されているが、一方でサイズや形状による細胞毒性や体内分布について議論が続いている。体内分布についての報告の多くが CNTs の表面に標識を付加する方法や、放射性物質を使用するものであった。これらの方法では表面特性の変化や、時間経過において標識の脱落をする可能性がある。また、放射性物質の評価においては特殊施設が必要になる。これらの要素を解決するため、本研究では Peapod 技術の応用による体内動態評価法を考案した。

【材料および方法】本研究では MRI での使用のため塩化ガドリニウムを内包した Peapod-CNTs (Gd-Peapod) を作製し、造影効果の有無を評価するため、既存の小動物用 Gd 造影剤との比較を MRI (2D T1 強調像) 撮像によって行った。模擬臓器を想定した 1 cm 角のアガロースゲルに Gd-Peapod を 1~250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を分散させたゲルキューブを作製し、本研究における MRI 撮像 (3D-FLASH) の至適条件の検討 (可変条件: 繰り返し時間, フリップ角) を行い、至適条件に則りゲルキューブ撮像画像からコントラストノイズ比 (Contrast noise ratio; CNR) を算出して、検量線を作成し検出限界の評価を行った。7 週齢の Wistar ラットの尾静脈に生理食塩水, 未加工 CNT, 25  $\mu\text{g} \cdot 125 \cdot 250 \mu\text{g}/\text{ml}$  の Gd-Peapod をそれぞれ投与した 5 群 (n=5) を作製し、投与後 1 時間, 24 時間, 1 週間, 3 週間にラットを屠殺して肺を摘出し、MRI 撮像によって得られた画像から CNR を算出し各群間における統計評価を行った。MRI 撮像を行った肺について、光学顕微鏡, 偏光顕微鏡を用いて継時的変化における組織学的評価を行った。

【結果】既存の Gd 造影剤の MRI 撮像での検出限界は Gd 量が約 130 ng/ml であったのに対し、Gd-Peapod 濃度は 1.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Gd 濃度: 約 40 ng/ml) であった。アガロースゲルによる至適条件の検討結果では繰り返し時間は 50 ms, フリップ角は 35.7° で最も CNR が高

く検出された。Gd-Peapod を含むゲルキューブの撮像, 結果から算出した CNR で作成した検量線では約 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  が Gd-Peapod の検出限界濃度であると考えられた。尾静脈投与を行ったラットの肺では CNR が濃度依存性に上昇することを確認した。しかし、継時的評価における CNR の変化は見られなかった。さらに肝臓・脾臓・腎臓の同評価において CNR の上昇は見られなかった。組織評価では各群で肺野全体に黒色沈着物が確認され、肺動脈以降の血管内には確認されなかった。偏光顕微鏡評価では黒色沈着物に一致して高輝度に観察されており、CNTs であることが考えられた。

【結論】本法は生体組織や臓器においても、MRI 撮像することにより臓器内に集積した Gd-Peapod の評価が可能であることを実証した。薄切切片等による組織評価の手技を用いずに CNTs の体内動態評価を行う新しい手法の一つとして応用が可能であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

カーボンナノチューブ (CNTs) の体内分布についての報告の多くが CNTs の表面に標識を付加する方法や、放射性物質を使用するものであった。これらの方法では表面特性の変化や、時間経過において標識の脱落をする可能性がある。また、放射性物質の評価においては特殊施設が必要になる。これらの要素を解決するため、本研究では Peapod 技術の応用による体内動態評価法を考案した。

本研究では MRI での使用のため塩化ガドリニウムを内包した Gd-Peapod を作製し、造影効果の有無を評価するため、既存の小動物用 Gd 造影剤と比較を MRI 撮像で行った。模擬臓器を想定し、Gd-Peapod (1~250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を分散させたゲルキューブを作製し、本研究における MRI 撮像の至適条件の検討を行い、ゲルキューブ撮像画像からコントラストノイズ比 (Contrast noise ratio; CNR) を算出して、検量線を作成し検出限界の評価を行った。7 週齢の Wistar ラットの尾静脈に生理食塩水, 未加工 CNTs, 25  $\mu\text{g} \cdot$

125  $\mu\text{g}$ ・250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の Gd-Peapod をそれぞれ投与した 5 群 (n=5) を作製し、投与後 1 時間、24 時間、1 週間、3 週間にラットを屠殺して肺を摘出し、MRI 撮像によって得られた画像から CNR を算出し各群間における統計評価を行った。MRI 撮像を行った肺について、光学顕微鏡、偏光顕微鏡を用いて継時的変化における組織学的評価を行った。

その結果、小林は次の結果を得た。

1. Gd-Peapod は MRI 撮像で輝度の上昇が認められた。撮像結果で得られた検量線から想定される検出限界濃度は 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。
2. CNTs を投与した肺の肉眼的所見は濃度依存性に黒色変化を認めたが、継時的には明らかな色調変化はなかった。

3. 肺の MRI 撮像結果では濃度依存性に CNR の変化を認め、Gd-Peapod 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  投与群はコントロール群と比較して有意に上昇した。

4. 組織評価では CNTs は肺野全体に均一に分布が認められた。沈着量における継時的変化は認められず、投与後 3 週間経過しても肺内に沈着し残存していた。

これらの結果から、本研究は MRI 撮像によって臓器に集積した Gd-Peapod の検出・評価が可能であることを実証し、CNTs の体内動態評価を行う新しい手法の一つとして応用が可能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。

A 2-year follow-up of oxidative stress levels in patients with ST-segment elevation myocardial infarction : A subanalysis of the ALPS-AMI study (ST 上昇型急性心筋梗塞患者における酸化ストレスの2年間の追跡調査)

## 阿 部 直 之

### (論文の内容の要旨)

【目的】生体内において、酸化反応と抗酸化反応の均衡が酸化側へと傾いた結果生じる酸化ストレスには心血管イベントとの関連があると報告されている。しかしながら、過去の報告は研究開始時点での酸化ストレスを元にした比較的短期間での検討であり、長期に追跡調査した酸化ストレスと心血管イベントとの関連については、これまで十分に検討はなされてはいない。

そこで、本研究では経皮的冠動脈形成術 (PCI) で再血行再建に成功した急性心筋梗塞 (AMI) の患者において、治療後の心血管イベントと長期に追跡調査した酸化ストレスとの関連について検討をした。

【方法】本研究は500症例の AMI 患者を対象に脂溶性スタチン (atorvastatin) と水溶性スタチン (pravastatin) の有用性について検討した多施設共同研究 (ALPS-AMI study) のサブグループ解析である。

2008年7月から2010年6月までに AMI に対して当院で PCI により再血行再建に成功した69例 (65 $\pm$ 7 歳, 男性78.4%) を対象とした。酸化ストレスの指標には、diacron-reactive oxygen metabolite (d-ROM) と biological antioxidant potential (BAP) を採用し、2年間の観察期間中、入院時 (PCI 前)、治療後 6 カ月、12 カ月、24 カ月と連続して測定した。全患者に対して、心血管イベント (全死亡、急性心筋梗塞、脳卒

中、入院を要する心不全、あらゆる再血行再建治療) の発症の有無につき、前向きに 2 年間追跡調査をした。

【結果】観察期間中の心血管イベントは26例 (再血行再建治療: PCI17例, 冠動脈バイパス術 (CABG) 3 例, 心血管死亡: 4 例, 入院を要する心不全: 2 例) に観察された。イベント群と非イベント群の両群間の研究開始時点の患者背景において、年齢、性別、酸化ストレスを含む各種血液検査、血管内治療内容等に有意差はなかった。長期追跡における酸化ストレスの比較では、各測定時点において酸化反応の指標である d-ROM 平均値に両群間で有意差はなかった。しかしながら、抗酸化反応の指標である BAP 平均値は、全観察期間を通じて各測定時の平均値が右肩上がりを示した非イベント群に対して、イベント群では治療後 6 カ月時に一過性に低下し、さらに同時点での平均値は非イベント群と比較し有意に低値となった (2456  $\mu\text{mol}/\text{L}$  vs. 2849.1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ,  $p < 0.001$ )。心血管イベントの大半は治療後 6 カ月から 12 カ月の間で観察された。受信者動作特性曲線 (ROC 曲線) を用いた心血管イベントを予測し得る治療後 6 カ月時の BAP 平均値のカットオフ値は 2718  $\mu\text{mol}/\text{L}$  となり、曲線下面積 0.65、感度 50.0%、特異度 75.9% であった ( $p = 0.03$ )。BAP のカットオフ値による比較では、BAP 平均値 2718  $\mu\text{mol}/\text{L}$  以下の患者群はそれを超える患

者群と比較して有意に予後不良であった (log-rank  $p=0.02$ )。年齢、腎機能で調整した Cox 比例ハザードモデル解析において、治療 6 カ月時の BAP 平均値  $2718 \mu\text{mol/L}$  以下は心血管イベントの独立した予後予測因子であった (ハザード比 2.45, 95% 信頼区間 1.10-5.78,  $p=0.04$ )。

【考察】本研究では AMI 患者における心血管イベントの予測因子を検討し、治療後 6 カ月時の BAP 低値が予測因子と考えられた。

従来、酸化ストレスと心血管イベントとの関連を示唆する報告は複数存在するが、2 年間の長期にわたり酸化ストレスを測定し、心血管イベントとの関連の検討は本研究が初めてである。酸化ストレスは年齢や高血圧、糖尿病、喫煙、腎機能障害など複数の要因によって修飾を受けるとされるが、全観察期間を通じてイベント群と非イベント群の両群間で患者背景に差を認めなかった。過去の報告とは異なり、本研究では研究開始時点での d-ROM と BAP 平均値は両群間で同等であり、AMI 患者の長期予後の予測因子としてのこれらの有用性は示されなかった。しかしながら、治療後 6 カ月時の BAP 低下と心血管イベントに有意な関連が示されて、心血管イベントを予測するうえで BAP の長期追跡の重要性が示唆された。また、酸化反応よりも抗酸化反応の減弱が心血管イベントと関連する可能性のあることが示唆された。

本研究では、心血管イベントの 73.1% は治療後 6 カ月から 12 カ月の間に観察され、さらにその 89.5% が再血行再建治療であった。ステント留置後に見られる酸化ストレスの増加が新生内膜増生を惹起し、その結果としての再狭窄が報告されている。治療後 6 カ月時の一過性の BAP 低下は心血管イベントの好発時期との一致を認めたが、これについては事象の原因であるか結果であるかについては不明である。

本研究は比較的少数の患者での検討であり、より多くの患者群において更なる研究を遂行し、本研究で得られた AMI 患者の心血管イベント予測における BAP 低下の有用性につき、再検証していく必要がある。

#### (論文審査の結果の要旨)

AMI に対して当院で PCI により再血行再建に成功した 69 例 (65 ± 7 歳, 男性 78.4%) を対象とした。PCI 直前, 治療後 6 カ月, 12 カ月, 24 カ月と連続して d-ROM と BAP を測定し、心血管イベントとの関連について検討した。

観察期間中のイベントは 26 例に観察された。イベン

ト群と非イベント群の両群間の研究開始時点における患者背景に有意差はなかった。長期追跡における酸化ストレスの比較では、各測定時点における d-ROM 平均値に両群間で有意差はなかった。一方、BAP 平均値は、全観察期間を通じて各測定時の平均値が右肩上がりを示した非イベント群に対して、イベント群では治療後 6 カ月時に一過性に低下し、さらに同時点での平均値は非イベント群と比較し有意に低値となった ( $2456 \mu\text{mol/L}$  vs.  $2849.1 \mu\text{mol/L}$ ,  $p<0.001$ )。イベントの大半は治療後 6 カ月から 12 カ月の間で観察された。ROC 曲線を用いた心血管イベントを予測し得る治療後 6 カ月時の BAP 平均値のカットオフ値は  $2718 \mu\text{mol/L}$  となり、それ以下の患者群はそれを超える患者群と比較して有意に予後不良であった。年齢、腎機能で調整した多変量解析において、治療 6 カ月時の BAP 平均値  $2718 \mu\text{mol/L}$  以下は心血管イベントの独立した予後予測因子であった。

その結果阿部直之は次の結論を得た。

1. 本研究は長期間にわたり酸化ストレスを測定し、心血管イベントとの関連を検討した最初の報告である。
2. 酸化ストレスは複数の要因によって修飾を受けるとされるが、全観察期間を通じてイベント群と非イベント群の患者背景には両群間で差を認めなかった。6 カ月時の一過性の BAP 低下はイベント好発時期と一致していることから、6 カ月時の BAP の有意差はイベントを反映した結果と推察された。
3. イベントの大半は再狭窄に対する再血行再建治療であった。今回の事象が酸化ストレス増加に関連した新生内膜増殖の結果であるのか原因であるのかについては不明である。

以上の結果より、心血管イベント、特に再血行再建治療は抗酸化ストレスの指標である BAP の低下と関連していることが示唆された。

今後 AMI 後の心血管イベント、特に再狭窄の予測において BAP の長期追跡が有用であると考えられる。

本論文は AMI 患者の心血管イベント予測における BAP 低下の有用性について検証した臨床的に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。

Axonal TDP-43 aggregates in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (孤発性筋萎縮性側索硬化症における軸索内 TDP-43凝集体)

小野里 知 哉

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 孤発性筋萎縮性側索硬化症ALS (amyotrophic lateral sclerosis) は成人発症の神経変性疾患で、上位及び下位運動ニューロンが主として傷害され、人工呼吸器を装着しなければ多くは数年以内に死亡する神経難病である。そのおよそ9割は孤発性でsALS (sporadic ALS), プリオン小体及びリン酸化 p- (phosphorylated) TDP-43 (transactive response DNA-binding protein 43 kDa) の神経細胞細胞質への沈着、皮質脊髄路の変性と脊髄前角細胞の脱落が特徴である。正常神経細胞では非リン酸化 n-p- (nonphosphorylated) TDP-43は核に存在し、RNAスプライシングなど蛋白質合成に関与している。sALS と前頭側頭葉変性症 (FTLD) 患者の脳では TDP-43はしばしば過剰にリン酸化され、細胞質内に存在している。このため TDP-43が核内から消失することによる蛋白質合成の障害による神経細胞変性が指摘されている。p-TDP-43の沈着を特徴とする疾患は TDP-43プロテインパチーと呼ばれ、ALSとFTLDが代表的な疾患である。異常蛋白沈着に基づく神経変性疾患では—sALS と FTLD, パーキンソン病と多系統萎縮症 (p-synuclein), アルツハイマー病 (Aβeta と p-tau) 等一、病変が進展する際にこれらの病的蛋白質が「正常蛋白を異常化し、プリオン様に伝播するのではないか」と提唱されている。p-TDP-43がsALS患者の神経系で異常プリオンと同じ様式で伝播するのであれば、本蛋白が軸索或いは樹状突起に存在し、且つシナプスや細胞膜を越えていると考えられるが、これらについての報告では「軸索に陽性像がみられた」2編があるのみである。また、その局在と形態、臨床症状との対比、経シナプス伝播の有無についての報告はみられない。本研究ではこれらに関する検索を実施した。

【材料と方法】 日本人のsALS患者19名(男性11名, 女性8名; 死亡時年齢59-88歳 (mean±SD; 70.2±9.1歳); 発症から死亡までの経過期間6-72カ月 (mean±SD; 24.2±16.9カ月)) と対照3名(男性3名; 死亡時年齢65-74歳 (mean±SD; 69.3±4.5歳)) の脳及び脊髄のホルマリン固定パラフィン包埋標本について免疫組織化学的に検索し、p-TDP-43から成る

細胞質内封入体や軸索、シナプスの変化に注目した。特に軸索内の p-TDP-43については、その分布と微細構造の特徴及び病理学的意義、sALS の臨床経過との相関関係を検討した。

【結果】 p-TDP-43の軸索内凝集体は顔面神経、舌下神経及び脊髄前角細胞の軸索に高い頻度で存在し、粒状網状 GRA (granuloreticular aggregate) 及び塊状 MA (massive aggregate) の2形態を示した。MAは軸索内に位置し、ほぼ楕円形でサイズは短径5 μm×長径10 μm以内で、p-ニューロフィラメントに取り囲まれていた。一方、GRAは軸索の細胞膜に近接して位置していた。p-TDP-43の軸索凝集体の有無と発症から死亡までの経過期間は検索した全sALS症例では6-72カ月 (mean±SD; 24.2±16.9カ月) であるのに対し、MAが認められた症例では6-11カ月 (mean±SD; 7.7±2.9カ月), GRAが認められた症例では6-31カ月 (mean±SD; 16.3±9.2カ月) と短かった。また、赤核神経細胞ではp-TDP-43及びp-i-TDP-43を含有したシナプスに取り囲まれている神経細胞の78個中77個で、核のp-i-TDP-43免疫反応性が失われ、そのうちの17%の神経細胞ではTDP-43の細胞質内封入体を伴っていた。細胞内のシナプス後膜にはp-TDP-43の沈着はみられなかった。

【結論】 sALSの軸索内にはp-TDP-43から成る凝集体がMAとGRAの2形態を示し、主として顔面神経、舌下神経及び脊髄前角細胞の軸索に存在した。これらの凝集体の存在は臨床経過の短縮化と相関し、またその機序としての可能性が考えられた。シナプス前要素のp-TDP-43の凝集がシナプス後細胞の核のp-i-TDP-43の消失を誘導し、神経細胞変性を惹起していることが推測された。一方、p-TDP-43のプリオン様伝播について、sALSではp-TDP-43がシナプスを直接通過していないのではないかと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (sALS) では、リン酸化 (p-) TDP-43の神経細胞の細胞質への沈着がみられ、TDP-43が核内から消失することによる蛋白質合成の障害による神経細胞変性が指摘されている。異常蛋白沈着に基づく神経変性疾患では、病変が進展する

際に病的蛋白質が「正常蛋白を異常化し、プリオン様に伝播するのではないかと提唱されている。p-TDP-43がsALS患者の神経系で異常プリオンと同じ様式で伝播するのであれば、軸索或いは樹状突起に存在し、且つシナプスや細胞膜を越えていると考えられる。しかし、これらについてのALSにおける報告では「軸索に陽性像がみられた」2編があるのみで、その局在と形態、臨床症状との対比、経シナプス伝播についての記述はみられない。sALS患者19名と対照3名の脳脊髄のホルマリン固定パラフィン包埋標本について免疫組織化学的、電顕的に検索し、p-TDP-43の細胞質内封入体、軸索、シナプスに注目し、軸索のp-TDP-43の分布と微細構造の特徴及び病理学的意義、sALSの臨床経過との相関関係を検討し、次の結果を得た。

1. p-TDP-43の軸索凝集体は粒状網状 (GRA) 及び塊状 (MA) の2形態を示した。
2. p-TDP-43の軸索凝集体は神経細胞体に近い部位にみられ、特にMA構造物で顕著であった。

3. p-TDP-43の軸索凝集体は主として顔面神経、舌下神経及び脊髄前角細胞の軸索に分布していた。
4. MAは軸索内に位置し、GRAは軸索の細胞膜に近接して存在していた。
5. p-TDP-43の軸索凝集体を有する症例は発症から死亡までの経過期間が短く、このことは特にMAを有する例で顕著であった。
6. 細胞周囲にTDP-43の凝集がみられる神経細胞では、核内TDP-43が消失していた。
7. 神経細胞周囲のp-TDP-43陽性像はシナプス前要素に存在し、シナプス後膜にはみられなかった。神経細胞周囲のp-TDP-43陽性像については、微細構造の更なる検索が必要と考えられた。軸索内p-TDP-43凝集体はその存在部位から軸索の機能障害に関与し、最終的に骨格筋機能を障害する可能性が示唆され、またこれにより、臨床経過を短縮化させている可能性が示唆された。以上の結果から主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### The Optimal Cut-off Value of Ankle Brachial Index for Screening Cardiovascular Disease Risk in Hemodialysis Patients (血液透析患者の心血管病リスクをスクリーニングするための足関節上腕収縮期血圧比 (ABI) カットオフ値の検討)

原 田 真

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】血液透析患者では冠動脈狭窄や末梢動脈閉塞症の原因となる重度の動脈硬化や血管石灰化がしばしばみられる。足関節上腕収縮期血圧比 (ABI) は末梢動脈閉塞症を発見するための有用なマーカーであるだけでなく、心血管病発症の予測マーカーにもなりうる事が報告されている。血液透析患者では慢性腎臓病に特有な石灰化を含む強い動脈硬化病変により、心血管病発症を予測するABIカットオフ値は従来非透析患者で用いられるABIカットオフ値0.9より高く設定した方がよい可能性があるが、理想的なカットオフ値は明らかではない。さらに糖尿病患者は高度な血管石灰化病変を有することが多く、ABIカットオフ値が非糖尿病患者より高い可能性があるが、透析患者において糖尿病がABIカットオフ値に与える影響は明らかではない。

したがって透析患者において糖尿病の有無により心血管病発症のリスクをスクリーニングするための適正なABIカットオフ値を明らかにすることを目的とし

た。

【対象および方法】信州大学医学部附属病院関連の透析施設で2010年1月から2013年12月の間に維持血液透析を受けた患者167人のうちADLが低い患者、臨床データが欠損している患者、同意が得られなかった患者の計57名を除外し最終的に110人を対象とした。研究方法は後ろ向き観察研究で行い、1) ABIが心血管病発症と関連する因子であるか、2) 糖尿病の有無で2群に分けて各群において心血管病発症を予測するABIカットオフ値をROC解析で求め、3) 求めたカットオフ値が心血管病発症のハイリスク患者をスクリーニングするのに有用か、検証を行った。

【結果】110人のうち心血管病を発症した患者は39人であった。心血管病の内訳は虚血性心疾患 (狭心症、心筋梗塞) 15人、脳梗塞7人、末梢動脈閉塞症17人であった。ABI中央値は1.02 (0.30-1.29) であった。

1. Cox hazard 回帰分析により、ABIは心血管病発症と有意に関連する因子として抽出された (Hazard ratio 0.131,  $p=0.010$ )。

2. 糖尿病を有する患者のABIカットオフ値は1.045 (AUC 0.735, 感度0.813, 特異度0.606), 糖尿病のない患者のABIカットオフ値は0.960 (AUC 0.773, 感度0.714, 特異度0.868) だった。Kaplan-Meier法で検討すると, 得られたABIカットオフ値よりABI値が低い群で有意に心血管病発症が多かった。
3. 心血管病発症を予測する場合, 従来ABIカットオフ値0.9と比較し, 今回得られたABIカットオフ値(糖尿病を有する患者1.045, 有さない患者0.960)の方が感度, 陰性的中率が高くなるため心血管病を予測するABIカットオフ値としてより有用と考えられた。

【結論】透析患者において心血管病発症のハイリスク患者のスクリーニングマーカーとしてABIを使用する場合のカットオフ値は糖尿病を有する場合1.045, 糖尿病のない場合では0.960と設定すべきである。

#### (論文審査の結果の要旨)

透析患者は心血管病が多く, そのハイリスク患者のスクリーニングに足関節上腕収縮期血圧比 (ABI) が有用な可能性がある。しかし透析患者の心血管病発症を予測するABIカットオフ値は石灰化を含む強い動脈硬化により非透析患者で用いられるABIカットオフ値0.9より高い可能性があり, 理想的なカットオフ値は明らかではない。さらに糖尿病患者も高度な血管石灰化病変を有することが多くABIカットオフ値が非糖尿病患者より高い可能性があるが, 透析患者において糖尿病がABI値に与える影響は明らかではない。本論文では信州大学関連透析施設の血液透析患者110人を対象に1) ABIが心血管病発症と関連する因子か, 2) 糖尿病の有無で分けられた各群の心血管病発

症を予測するABIカットオフ値, 3) 得られたカットオフ値が心血管病発症のハイリスク患者をスクリーニングする目的に有用か, といった点について統計学的に検証し, 糖尿病の有無により心血管病発症のハイリスク透析患者をスクリーニングするためのABIカットオフ値を明らかにすることを目的とした。

その結果, 原田は以下の結論を得た。

1. ABIは心血管病発症と有意に関連する因子である。
2. 糖尿病を有する患者のABIカットオフ値は1.045, 糖尿病のない患者のABIカットオフ値は0.960である。
3. 心血管病発症を予測する場合, 従来ABIカットオフ値0.9と比較し, 今回得られたABIカットオフ値(糖尿病を有する患者1.045, 有さない患者0.960)の方が感度, 陰性的中率が高くなるため心血管病を予測するABIカットオフ値としてより有用と考えられる。

これらの結果により透析患者において心血管病発症のハイリスク患者のスクリーニングマーカーとしてABIを使用する場合のカットオフ値は糖尿病を有する場合1.045, 糖尿病のない場合では0.960と設定すべきであることが明らかとなった。

本研究は心血管病ハイリスク透析患者をスクリーニングするのに有用なABIカットオフ値を糖尿病の有無によりそれぞれ具体的に数値設定しており, 今後透析患者の心血管病診療をしていく上で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。

## Health-related Quality of Life in Patients with Pulmonary Infection with Nontuberculous Mycobacterium (肺非結核性抗酸菌症患者における健康関連 QOL の評価)

濱 峰 幸

#### (論文の内容の要旨)

【背景・目的】肺非結核性抗酸菌症(肺NTM症)は, 非結核性抗酸菌による慢性感染疾患である。症状として咳嗽, 喀痰, 呼吸困難, 血痰などの呼吸器症状を認めるが, 無症状の場合も少なくない。治療に関しては, 数種類の抗微生物薬を使用する多剤併用療法が主体であるが, 治療効果に個人差があり, 再発が多い。また, 消化器症状や視力への影響などの副作用の問題も少なくない。そのため, 現時点で肺NTM症に対する治

療開始基準は明確なものがなく, 症状, 画像所見等を総合的に評価し, 増悪している症例には治療を開始しているのが現状である。近年, 慢性疾患に関して健康関連QOL(HR-QOL)を評価することの重要性が指摘されている。また, 肺NTM症の治療開始基準の1つとしてHR-QOLを評価することは重要であるが, 現在のところ肺NTM症に関してはHR-QOLを評価する基準がない。他の呼吸器疾患で使用されているHR-QOL評価票である, COPD assessment test

(CAT), St. George's Respiratory Questionnaire (SGRQ) の肺 NTM 症患者に対する有用性について、検討する。

【方法】本研究は横断研究で、信州大学医学部附属病院呼吸器内科に通院している52人の肺 NTM 症患者を対象とした。肺 NTM 症の診断基準として American Thoracic Society/Infectious Disease of America のガイドラインを用いた。肺 NTM 症患者に対する CAT, SGRQ の有用性を評価するために、同質問表の信頼性、一貫性、妥当性をそれぞれ評価した。信頼性の評価のために再テスト法（第1日目、第5日目の2回テストを受ける）を行い、また一貫性の評価のため Cronbach  $\alpha$  係数を計算した。妥当性の評価として一般の HR-QOL 評価票である Short Form-36 Health Survey (SF-36) と CAT, SGRQ との相関を検討した。SF-36は32の質問項目があり、身体サマリースコア (PCS), 精神サマリースコア (MCS) を計算できる。CAT, SGRQ の点数と PCS, MCS の相関係数を求めた。対象患者に、それぞれ第1日目に CAT, SGRQ, SF-36, 精密呼吸機能検査, 6分間歩行試験を施行し、第5日目に CAT, SGRQ, SF-36 を再度施行した。

【結果】CAT, SGRQ の総合点は、第1日目と第5日目の間にそれぞれ  $r=0.85$ ,  $r=0.91$  と強い相関を認めた。また CAT, SGRQ の総合点の Cronbach  $\alpha$  係数は、それぞれ0.879, 0.911であった。SF-36との相関に関して、CAT, SGRQ の総合点と PCS は、それぞれ-0.63, -0.57と中等度から強い相関を認めた。CAT, SGRQ の総合点と MCS は、それぞれ-0.46, -0.42と中等度の相関を認めた。呼吸機能との関連については、CAT, SGRQ とともに%DLco のみ中等度の相関を認め、6分間歩行距離とは弱い相関を認めた。

【考察】再テスト法, Cronbach  $\alpha$  係数の計算から信頼性, 一貫性を確認し、また SF-36との相関から妥当性を確認した。以上の結果から、肺 NTM 症患者に対する HR-QOL の評価票として、CAT, SGRQ は有用であると考えられる。また、QOL 評価は呼吸機能検査等の生理学的指標とは独立して評価されるべきとされており、今回の調査でも呼吸機能と強い相関は認めなかった。呼吸機能, 6分間歩行距離が比較的保たれている段階で、QOL の障害が出現している可能性があり、CAT, SGRQ による HR-QOL 評価は肺 NTM 症患者に治療を開始する基準の1つとなる可能性が示唆された。

【結論】肺 NTM 症患者に対する HR-QOL の評価として、CAT, SGRQ は有用である。肺 NTM 症患者の治療導入を判断する際の評価基準の1つとして、利用できる可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

肺非結核性抗酸菌症（肺 NTM 症）に対する治療開始基準は明確なものがなく、症状、画像所見等を総合的に評価し、増悪している症例には治療を開始しているのが現状である。近年、慢性疾患に関して健康関連 QOL (HR-QOL) を評価することの重要性が指摘されているが、現在のところ肺 NTM 症に関しては HR-QOL を評価する基準がない。他の呼吸器疾患で使用されている HR-QOL 評価票である、COPD assessment test (CAT), St. George's Respiratory Questionnaire (SGRQ) の肺 NTM 症患者に対する有用性について、検討を行った。

信州大学医学部附属病院呼吸器内科に通院している52人の肺 NTM 症患者を対象とした。肺 NTM 症の診断基準として American Thoracic Society/Infectious Disease of America のガイドラインを用いた。肺 NTM 症患者に対する CAT, SGRQ の有用性を評価するために、同質問表の信頼性、一貫性、妥当性をそれぞれ評価した。信頼性の評価のために再テスト法（第1日目、第5日目の2回テストを受ける）を行い、また一貫性の評価のため Cronbach  $\alpha$  係数を計算した。妥当性の評価として一般の HR-QOL 評価票である Short Form-36 Health Survey (SF-36) と CAT, SGRQ との相関を検討した。SF-36は32の質問項目があり、身体サマリースコア (PCS), 精神サマリースコア (MCS) を計算できる。CAT, SGRQ の点数と PCS, MCS の相関係数を求めた。対象患者に、それぞれ第1日目に CAT, SGRQ, SF-36, 精密呼吸機能検査, 6分間歩行試験を施行し、第5日目に CAT, SGRQ, SF-36 を再度施行した。

その結果、瀆は下記の結論を得た。

1. CAT, SGRQ の総合点は、第1日目と第5日目の間にそれぞれ  $r=0.85$ ,  $r=0.91$  と強い相関を認めた。
2. CAT, SGRQ の総合点の Cronbach  $\alpha$  係数は、それぞれ0.879, 0.911と一貫性は保たれていた。
3. SF-36との相関に関して、CAT, SGRQ の総合点と PCS は、それぞれ-0.63, -0.57と中等度から強い相関を認めた。CAT, SGRQ の総合点と MCS は、それぞれ-0.46, -0.42と中等度の相関を認め

た。

4. 呼吸機能とは、CAT, SGRQともに%DLcoのみ中等度の相関を認め、6分間歩行距離とは弱い相関を認めた。

これらの結果により、肺NTM症患者に対するHR-QOLの評価として、CAT, SGRQは有用であることが確認された。呼吸機能、6分間歩行距離が比較的保

たれている段階で、QOLの障害が出現している可能性があり、CAT, SGRQによるHR-QOL評価は肺NTM症患者に治療を開始する基準の1つとなる可能性が示唆された。

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

## Construction and characterization of human oral mucosa equivalent using hyper-dry Amniotic membrane as a matrix (ヒト乾燥羊膜を用いた培養口腔粘膜上皮シートの臨床応用に関する研究)

### 齊 芳 芳

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】顎口腔領域では、再生医療として口腔粘膜などの上皮欠損に用いる培養上皮の研究が進歩しており、組織培養の足場として種々の材料が使用されている。ヒト羊膜は抗原性に乏しく、また、腫瘍形成能が低く、倫理的な問題が少ないなどの利点があり、広く臨床に用いられており、基底膜としての有用性も報告されている。羊膜には、新鮮羊膜と保存羊膜の2種類があるが、保存羊膜は新鮮羊膜と比較して、サイトカイン等をよく保持していること、滅菌が可能であること、室温での保存が可能であること、容易に整形が可能であるなどの利点がある。近年、保存羊膜として乾燥(Hyper-dry)羊膜が開発され、長期間の室温保存が可能になった、さらに乾燥羊膜は種々のサイトカインや成長因子を含み、高い生体適合性と整形性を持つなど生体材料として優れた利点を有している。

今回は、このような背景に注目して、ヒト乾燥羊膜を用いた培養口腔粘膜上皮シートの作製および有用性に関する研究を計画した。

#### 【対象と方法】

##### 1. 口腔上皮角化細胞の培養

ボランティアから採取した生体歯肉組織を生理塩水で洗浄した後、トリプシン溶液に浸漬し、メスで細切し単個細胞にした後、シャーレに入れて、血清を含まない培養液で培養した。

##### 2. 粘膜上皮シートの作製

乾燥羊膜をPBSで1時間浸漬させる。その後、1.で培養した上皮角化細胞を、羊膜およびコントロールとしてのポリカーボネート(PC)膜の表面へ播種し、気相下培養条件下で2週間培養した。得られた培養上皮シートは、HE染色およびCK10,

CK16, IVL免疫染色を行い、形態学的、免疫学的な検討を行った。

##### 3. 動物実験

マウス(n=25)の背部に10×10mm大の上皮欠損を3箇所作成し、培養上皮シート(羊膜上皮シート、PC膜上皮シート)を貼付した。コントロールは移植片の無いものとした。その後、移植部のサイズ変化(萎縮率)を経時的に計測した。

移植3週間後に細胞上皮シートを含む組織を摘出し、HE染色およびCK10, CK16, IVL免疫染色による形態学的、組織学的検討を行った。

#### 【結果】

1. 血清を使用しない特殊な条件下(気相下培養)で口腔粘膜上皮の培養が行えた。乾燥羊膜上では、重層扁平上皮が形成された。一方、PC膜上では、培養細胞は数層になるが、構造は一樣ではなかった。また、羊膜上の培養上皮シートは移植可能な強度を有していたが、PC膜上の上皮シートは脆く、扱いが難しかった。

2. 組織学的には、乾燥羊膜を用いた培養上皮シートは、正常上皮組織に類似した分化を示した。免疫染色では、CK10はsuper basal layersで陽性を示し、IVLは上皮全層で陽性を示した。CK16は上皮のupper layersで陽性を示した。これらの所見は正常口腔粘膜と同様であった。

3. マウス背部における移植部のサイズ変化は、羊膜上皮シートでは $63.90 \pm 0.87 \text{ mm}^2$ ; PC膜上皮シートでは $77.13 \pm 5.75 \text{ mm}^2$ ; 移植無しでは $87.02 \pm 2.27 \text{ mm}^2$ であり、羊膜上皮シートで有意に収縮率が少なかった( $P < 0.05$ )。

4. 移植部位の組織学的観察では、羊膜上皮シートは

マウス背部に良好に生着しており、口腔粘膜の形態を示し、羊膜は消失していた。CK10はall super basal layersで陽性を示し、IVLは顆粒層で陽性を示した。またCK16はマウスの扁平上皮では染色されなかったが、移植した上皮の棘細胞層と顆粒層に陽性を示した。

【考察】

1. 乾燥羊膜上では、口腔上皮角化細胞の増殖が良好で、かつ、細胞の遊走能力も優れていた。2週間後、正常上皮組織に近い重層化した培養上皮シートが形成された。乾燥羊膜は口腔粘膜培養上皮作製の足場として有用であった。
2. 皮膚欠損部の被覆剤として、羊膜を用いた口腔粘膜上皮シートは良好な創傷治癒をもたらした。乾燥羊膜は抗菌/抗炎症作用、優れた組織再生促進機能、異物反応を生じない特徴がみられた。CK16染色において、移植部上皮では棘細胞層と顆粒層で陽性を示したのに対し、周囲のマウスの皮膚では陽性所見は認められず、培養上皮シートは本来の性質を残したままで生着していた。形態学的にも口腔粘膜上皮の形態を示していた。
3. 培養上皮シートは、歯周病により破壊された歯肉の再生や唇顎口蓋裂治療、腫瘍切除後の口腔粘膜再建、また、熱傷治療など様々な医療分野で新たな再生医療への応用が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

口腔領域では、口腔腫瘍切除の皮膚や口腔粘膜欠損の再建手段として、口腔粘膜上皮細胞由来の培養上皮を用いた再生医療の研究が行われている。細胞培養の足場として種々の材料が使用されているが、齊らは生体材料として使用されているヒト羊膜に注目した。ヒト羊膜は、抗原性が少なく、腫瘍形成能が低く、倫理的な問題が少ないなどの利点がある。また、近年開発されたヒト乾燥羊膜は、高い生体適合性と適度な吸収性を持ち、サイトカイン等をよく保持していること、滅菌が可能であること、室温での保存が可能であること、容易に整形が可能であるなどの利点がある。

齊らは、ヒト乾燥用膜を足場として口腔粘膜培養上皮シートを作製し、その有用性を検討した。

齊らは、まずin vitroで、乾燥羊膜上でボランティアから採取した培養口腔粘膜上皮を培養し、粘膜上皮シートの作製を試みた。培養には血清培地を使用せず、齊らの研究室で行っている特殊な条件下(気相下培養法)を用いた。その結果、乾燥羊膜を足場として、重

層化した扁平上皮が形成された。組織学的にも正常口腔粘膜上皮に近い構造を有していることを確認し、免疫染色を用いて、培養された重層扁平上皮が口腔粘膜と同等の分化度、性質を有している(CK10はsuper basal layersで陽性を示し、IVLは上皮全層で陽性、CK16は上皮のupper layersで陽性)ことを確認した。また、一方、比較として、生体材料として用いられているポリカーボネート(PC)膜を足場として、口腔粘膜上皮シートの作製を行ったが、PC膜上では、数層しか細胞は重層せず、構造は一樣ではなかった。形態学および組織学的にも口腔粘膜上皮と異なる上皮シートが形成されていた。また、羊膜上の培養上皮シートは移植可能な強度を有していたが、PC膜上の上皮シートは脆かった。

次に齊らは、この培養上皮の臨床的有用性を検討するため、マウスへの移植実験を行った。具体的には、マウスの背部に3箇所同サイズの皮膚欠損を形成し、羊膜上皮シート、PC膜上皮シート、移植無しの3つの条件で移植し比較検討した。

移植後、マウスの背部の移植部のサイズ変化(面積)を経時的に観察比較したところ、羊膜上皮シートで有意に収縮率が少なかった(羊膜上皮シート $63.90 \pm 0.87 \text{ mm}^2$ 、PC膜上皮シート $77.13 \pm 5.75 \text{ mm}^2$ 、移植無し $87.02 \pm 2.27 \text{ mm}^2$ ;  $P < 0.01$ )。また、移植3週後に周囲組織とともに組織を採取し組織学的検討を行ったところ、移植部位では、羊膜上皮シートはマウスの背部に良好に生着しており羊膜は消失していた。組織学的に口腔粘膜の形態を有しており、免疫染色の結果では、CK10はall super basal layersで陽性を示し、IVLは顆粒層で陽性を示した。またCK16は移植した上皮の棘細胞層と顆粒層に陽性を示した。移植周囲の皮膚上皮ではCK16陽性細胞は認めなかった。これらの結果から、羊膜上皮シートは口腔粘膜上皮の性質を残して、皮膚欠損部に良好に生着していることを確認した。

以上の結果から齊らは、ヒト乾燥羊膜は、口腔粘膜上皮細胞を用いた培養上皮作製の足場として良好な性質を有していることを確認した。また、移植実験の結果から、優れた組織再生促進機能、異物反応を生じない特徴がみられ、代用上皮としての有用性を述べている。

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

Distribution of Transmissible Amyloid Proteins in the Liver with Apolipoprotein A-II Amyloidosis  
(マウス ApoA-II アミロイドーシス肝臓における伝播力を持ったアミロイド蛋白質の分布)

劉 穎 業

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】アミロイドーシスとは本来可溶性で生理的機能を持つ蛋白質が様々な原因で変性して線維状(アミロイド線維)に集合、沈着し、細胞、組織障害を引き起こす疾患群である。現在では30種類以上のアミロイド蛋白質が報告されており、アルツハイマー病、プリオン病、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)などが代表例である。マウス老化アミロイドーシスでは、血清高密度リポ蛋白質(HDL)のアポリポ蛋白質 A-II (ApoA-II) が加齢に伴って、アミロイド線維(AApoAII)を形成し、全身臓器に沈着する。本学医学系研究科加齢生物学教室ではAApoAIIアミロイド線維が鋳型(Seed)として作用し、生理的ApoA-II蛋白質を線維状蛋白質に変換することによって、アミロイドーシスが急速に進行し、さらに個体間で伝播することを世界に先駆けて明らかにしてきた(プリオン様伝播現象)。最近では伝播(Seeding)現象が、アルツハイマー病、パーキンソン病、炎症性AAアミロイドーシスなどの病態進展の基本的メカニズムであることを多くの研究報告が明らかにしている。この様な状況の中で本研究では、マウスAApoAIIアミロイドーシスを解析システムとして用いて、伝播現象に関与するアミロイド蛋白質の分布、性質と伝播性について解析した。

【材料および方法】

1. R1.P1-*Apoa2*<sup>c</sup>マウスに100  $\mu$ g のAApoAII線維を投与しアミロイドーシスを誘発した。投与後2, 4, 7, 10, 13カ月の異なった病態進展時期のR1.P1-*Apoa2*<sup>c</sup>マウスを屠殺し、肝臓ホモジナイトを超音波処理した後、遠心分離で不溶性(3,000 g沈殿, 100,000 g沈殿)と可溶性の3分画(超音波処理の有無で全6分画)に分離した。各分画のApoA-II量、線維構造を示すチオフラビンT(ThT)蛍光量、電子顕微鏡(EM)像(ネガティブ染色)を解析し、さらに2カ月齢のR1.P1-*Apoa2*<sup>c</sup>マウスへ投与して伝播力を解析した。
2. アミロイド沈着が認められた投与4, 7, 10カ月後のマウスの肝臓よりアミロイド線維を分離した。非変性ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)によって

分離した、I(モノマー&ダイマー)、II(トリマー~ペンタマー)、III(ヘキサマー~デカマー)、IV(オリゴマー)、V(凝集体)の5分画をゲルから切り出し、蛋白質を抽出した。各分画のApoA-II量、ThT蛍光量を測定した。さらにR1.P1-*Apoa2*<sup>c</sup>マウスに10  $\mu$ gを投与し、2カ月後に屠殺して伝播力を解析した。

【結果】

1. 組織学的には投与2カ月後から肝臓でのアミロイド沈着が観察されたが、Western blot法では投与4, 7, 10および13カ月後でApoA-IIの検出が可能であった。アミロイドーシスの病態進展度に拘わらず、ApoA-IIのほとんどが3,000 g沈殿の不溶性分画に分布した。この分画では、強いThT蛍光とEMで多くの線維構造が観察されることから、ApoA-IIは沈着の初期から、大部分が線維構造を取ることが示唆された。100,000 g沈殿分画は強いThT蛍光を示したが、EMではほとんど線維構造は観察されなかった。超音波処理によって3,000 g沈殿分画から100,000 g沈殿分画にApoA-IIの移動が認められ、EMでは細断された線維状構造が観察された。3,000 gおよび100,000 g沈殿分画は強い伝播性を示した。可溶性分画にはApoA-IIは検出されず、ThT蛍光やEMでの線維構造も観察されなかったが、弱い伝播力が認められた。可溶性分画を抗ApoA-II抗血清を用いて吸収(immuno-depletion)を行うと、~25 kDaの抗体特異的な蛋白質バンドが減少し、伝播力の低下が認められた。この蛋白質についてはさらなる検討が必要である。
  2. 非変性PAGEによって分離した5分画(モノマー~凝集体)のThT蛍光は低く、それぞれの分画の伝播力も低いことが明らかになった。これらの結果から、アミロイド $\beta$ (A $\beta$ )やプリオンで報告されている伝播力が強い可溶性のオリゴマーを検出することはできなかった。
- 【結論】以上の結果から、AApoAIIアミロイドーシスでは、伝播力を持つアミロイド蛋白質は、沈着の初期からほとんどが不溶性(沈殿)分画のアミロイド線維に存在すること、またモノマー~オリゴマーまではほとんど伝播力がないことが明らかになったと結論された。

(論文審査の結果の要旨)

アミロイドーシスとは可溶性の蛋白質が変性してアミロイド線維に集合、沈着し、組織障害を引き起こす疾患群である。マウス老化アミロイドーシスでは、アポリポ蛋白質 A-II (ApoA-II) が、アミロイド線維 (AApoAII) を形成し、全身に沈着する。AApoAII 線維が鋳型 (Seed) として作用し、生理的 ApoA-II を線維状に変換することによって伝播する。最近では伝播現象が、アルツハイマー病、パーキンソン病、炎症性 AA アミロイドーシスの病態進展の基本的メカニズムであることが報告されている。

これらの知見に基づき、マウス AApoAII アミロイドーシスを解析システムとして用いて、伝播現象に関与する ApoA-II 蛋白質の分布、性質、伝播性について解析した。

その結果、劉 穎業は次の結論を得た。

1. アミロイドーシスの病態進展度に拘わらず、ApoA-II のほとんどが3,000 g 沈殿の不溶性分画に分布した。この分画では、強いチオフラビン T (ThT) 蛍光と電子顕微鏡 (EM) で線維構造が観察されることから、ApoA-II は沈着の初期から大部分が線維構造を取ることが示唆された。10<sup>5</sup> g 沈殿分画は強い ThT 蛍光を示したが、EM ではほとんど線維構造は観察されなかった。しかし、超音波

処理によって10<sup>5</sup> g 沈殿分画に含まれる ApoA-II が増加し、EM では細断された線維構造が観察された。3,000 g および10<sup>5</sup> g 沈殿分画は強い伝播性を示した。可溶性分画には ApoA-II は検出されず、ThT 蛍光や EM での線維構造も観察されなかったが、弱い伝播力が認められた。可溶性分画を抗 ApoA-II 血清を用いて吸収を行うと、~25 kDa の抗血清特異的な蛋白質バンドが減少し、伝播力の低下が認められた。

2. 非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法でアミロイド線維から分離した5分画 (モノマー~凝集体) の ThT 蛍光は低く、伝播力も低いことが明らかになった。

以上の結果により、伝播力を持つ ApoA-II 蛋白質は、沈着の初期から大部分が不溶性分画のアミロイド線維として存在すること、モノマー~オリゴマーまではほとんど伝播力がないことが明らかになった。

アミロイドーシスの病態解明と予防、治療法開発のためには伝播を担う蛋白質の性質を明らかにすることは重要であり、劉 穎業の研究成果はアミロイドーシスの基礎的研究として意義があることと考えられた。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Cross-sectional Observation of the Relationship of Depressive Symptoms with Lifestyles and Parents' Status among Japanese Junior High School Students (中学生の抑うつ症状と生活習慣・保護者の状態との関連に関する横断研究)

百 武 愛 子

(論文の内容の要旨)

【目的】中学生の抑うつ症状には中学生自身の要因と保護者の状態が関連している可能性がある。本研究は中学生の生活習慣、保護者の精神状態及び社会人口学的特徴と、中学生の抑うつ症状との関連について検討することを目的とした。

【対象と方法】対象は、ある中学校に在席する生徒477名とその保護者である。中学校の了解を得て、調査協力を依頼した。生徒へは、抑うつ傾向、身長、体重、主観的ストレス、体型への満足度、生活習慣 (睡眠時間、体育の授業以外の身体活動等)、栄養素摂取状況について、保護者へは、抑うつ、社会人口学的特徴について自記式質問紙法にて回答を得た。統計解析は IBM Statistics SPSS ver. 22.0により行った。本研究

は信州大学医学部医倫理委員会の承認を得て行った。

【結果】409名 (85.7%) の生徒と314名 (65.8%) の保護者から同意が得られた。生徒と保護者両方のデータが揃ったのは241名であった。抑うつ症状を有すると判定された生徒の割合は24.9%であった。抑うつ症状を有する生徒は、抑うつ症状のない生徒と比べ、ストレスを感じている者の割合が高く、睡眠時間が長いまたは短い者の割合が高かった。エネルギー・栄養素摂取量については、エネルギー摂取量のみ差が見られ、抑うつ症状が有る群はない群と比しエネルギー摂取量が少なかった。多重ロジスティック回帰分析の結果、性別、主観的ストレス、体育の授業以外での運動の頻度、保護者が抑うつ症状を有することが、生徒の抑うつと関連していた。

【結論】中学生のストレスを低減させること、生活習慣、特に体育の授業以外での身体活動量の頻度を増やすことが、中学生のメンタルヘルスにおいて有用である可能性がある。また、保護者のメンタルヘルスは生徒のメンタルヘルスに関連があることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

うつ病は世界的にも大変大きな健康課題のひとつであるが、思春期における大うつ病の時点有病率は3～6%であり、20%は18歳までにうつ病を経験することが報告されている。また、うつ病を経験した20%のうち、31.7%が5年以内に再度うつ病を経験することが報告されている。さらに、海外のレビューによると、女子の25%、男子の15%が抑うつ症状を有するとされている。抑うつは大うつ病のリスクファクターであり、抑うつ症状が有る者はない者と比し、神経症など健康上の問題、成績不振、違法薬物の使用など行動的な問題、将来的な雇用の問題を抱えることが報告されており、早期発見と適切なケアが重要である。

既存研究によると、抑うつに影響を与える因子は、子ども自身の要因、保護者の要因に大別される。子どもの要因ではストレス、生活習慣との関連、保護者の要因では、保護者の抑うつ、収入、職業、教育歴を代表とする社会経済的地位が関連する。しかしながら、

子どもの要因及び保護者の要因を包括的に検討した調査はない。そこで百武は、松本市の中学校1校の生徒477名とその保護者を対象に自記式アンケート調査を実施し、中学生において、ストレスおよび生活習慣、保護者の状態と生徒の抑うつとの関連について検討した。

その結果、以下の知見を得た。

1. 主観的なストレスがある生徒はない生徒と比べて抑うつのリスクが高かった。
2. 体育の授業以外で毎日運動する習慣がある生徒は、ほとんどない生徒と比べ抑うつのリスクが低い。また、運動の頻度が高いほど抑うつのリスクが低いという傾向があった。
3. 睡眠時間と抑うつとの関連はUまたはJ-shapeだった。
4. 保護者の抑うつは生徒の抑うつと関連があった。

以上より、ストレスの低減、運動の頻度の増加により、中学生のメンタルヘルス向上に寄与する可能性が示唆された。また、生徒のメンタルヘルスに保護者のメンタルヘルスも関連していた。以上の結果から、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Patterns of hippocampal atrophy differ among Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and late-life depression (アルツハイマー病と健忘型軽度認知障害と老年期うつ病の海馬萎縮の形態の比較)

城 甲 泰 亮

(論文の内容の要旨)

【背景】アルツハイマー病、健忘型軽度認知障害と老年期発症の大うつ病性障害(うつ病)の鑑別診断には臨床症状と経過が重要であるが、アルツハイマー病や健忘型軽度認知障害は初期症状として抑うつ状態を呈することがあり、うつ病との鑑別が困難なことが多い。今回我々は、海馬の萎縮部位の差が、鑑別診断の指標の一つになるのではないかと考えて、Region of Interest (ROI) 法を用いた手動測定によってMRI定量解析を行いアルツハイマー病、健忘型軽度認知障害、うつ病、健常者の海馬断面積を八つの冠状断面に分けて測定した。その結果、海馬の萎縮部位が疾患により異なることを見出したので考察を加えたうえで報告する。

【方法】撮像時60歳以上のアルツハイマー病患者58

名(平均年齢 $77.7 \pm 6.5$ 、女性45名)、健忘型軽度認知障害患者33名(平均年齢 $76.4 \pm 6.4$ 、女性18名)、うつ病患者20名(平均年齢 $75.0 \pm 6.9$ 、女性15名)、健常者22名(平均年齢 $75.4 \pm 5.9$ 、女性14名)を対象とした。アルツハイマー病、うつ病の診断はInternational Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision (ICD-10)の診断基準に従った。健忘型軽度認知障害はPetersonの診断基準に従った。うつ病はfirst-episodeの症例のみ選択した。身体的疾患に起因するものや、薬剤の副作用が原因と考えられるうつ病症例は除外した。患者群と同様の条件でMRI検査が施行された症例のうち、ICD-10で「症状性を含む器質性精神障害」、「精神作用物質使用による精神および行動の障害」、「統合失調症」、「気分障害」、「神経症性障害」、「精神遅滞」に該

当しない症例を健常者とした。MRI 検査施行時に Mini-mental state examination を実施し認知機能を評価した。さらに各症例の選別条件として以下の条件を加えた。撮像された画像上で、Fazekas らの分類に従い grade3以上の血管性病変を有する症例は除外した。また 5 mm 以上の脳梗塞のある症例、慢性硬膜下血腫など血管性病変のある症例は除外した。認知機能に影響を及ぼすアルコールや薬物の乱用、頭部外傷の既往のある症例も除外した。さらに、アルツハイマー病や健忘型軽度認知障害と診断されたもののうつ病の既往のある症例、健忘型軽度認知障害と診断されたものの 1 年間の経過を追いアルツハイマー病を発症した症例、また脳血管性認知症の合併例は除外した。MRI は信州大学医学部附属病院に設置されている磁場強度 1.5 テスラの MRI を用いて、short TI inversion recovery 法により海馬直交断面で撮像された冠状断画像を用いた。頭蓋内面積 (C) は白質、灰白質、脳脊髄液を含む硬膜内面積とし、ROI 設定は小脳下縁から頭頂までとした。海馬断面は、矢状断面にて海馬を確認し、海馬体部に直行するスライスを選択したうえで、断面が乳頭体を通る面を基準断面として、基準断面の 3 mm 前方から 3 mm ずつ 18 mm 後方までの 8 断面を選択した。8 断面で右海馬の面積 Hrn と左の海馬面積 Hln の和 Hn を頭蓋内面積 Cn で除した値、 $(Hrn+Hln)/Cn$  を計算して、これを補正值  $Hn/Cn$  と定義して ( $n=1\sim 8$ )、頭蓋内面積に対する比として area ratio (%) を算出した。4 群間において補正值  $Hn/Cn$  を比較するために、各疾患群と断面間でそれぞれ t 検定による比較を行った。統計解析には、Stat mate V for Windows® を用いた。

本研究は信州大学医学部医倫理委員会の承認を得ており、対象者と家族には研究の内容を説明した上で文書にて同意を得た。

**【結果】** 各群間の海馬断面積補正值の比較では、アルツハイマー病<健忘型軽度認知障害<うつ病<健常者の傾向がみられた。アルツハイマー病では海馬の補正值  $Hn/Cn$  が、Slice5では  $p<0.01$ 、それ以外の断面では  $P<0.001$  と全ての断面で健常者に比べて有意な萎縮がみられた。健忘型軽度認知障害でも同様に全ての断面で有意差がみられたが、海馬頭を含む slice1が最も大きな萎縮を示した ( $p<0.001$ )。うつ病では扁桃体から 12 mm の slice4の海馬体前部のみ統計学的に有意な萎縮 ( $p<0.05$ ) を示した。他の部位では健常者に比べて有意差は認められなかった。

**【結論】** 海馬の冠状断断面において、健常者と比較して、アルツハイマー病は海馬全体の萎縮がみられた。また、健忘型軽度認知障害では海馬の萎縮は軽度ではあるが海馬頭に顕著な萎縮がみられ、うつ病では海馬全体の萎縮は認めないものの海馬体前部に萎縮がみられるということが明らかになった。以上より、海馬を部位ごとに分けて比較する方法は、アルツハイマー病、健忘型軽度認知障害、うつ病の鑑別に有用である可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

アルツハイマー病、健忘型軽度認知障害と老年期発症の大うつ病性障害 (うつ病) は鑑別に海馬の萎縮部位の差が指標の一つになるのではないかと考えて、Region of Interest (ROI) 法を用いて MRI 定量解析を行った。

撮像時 60 歳以上のアルツハイマー病患者 58 名 (平均年齢  $77.7\pm 6.5$ 、女性 45 名)、健忘型軽度認知障害患者 33 名 (平均年齢  $76.4\pm 6.4$ 、女性 18 名)、first-episode のうつ病患者 20 名 (平均年齢  $75.0\pm 6.9$ 、女性 15 名)、正常群 22 名 (平均年齢  $75.4\pm 5.9$ 、女性 14 名) を対象とした。アルツハイマー病、うつ病の診断は International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision の診断基準に従った。健忘型軽度認知障害は Peterson の診断基準に従った。各症例の選別条件として認知機能に影響を及ぼす血管性病変のある症例、アルコールや薬物の乱用、頭部外傷の既往、精神疾患の重複がある症例を除外した。磁場強度 1.5 テスラの MRI を用いて、short TI inversion recovery 法により撮像された冠状断画像を用いた。頭蓋内面積 (C) は白質、灰白質、脳脊髄液を含む硬膜内面積とし、ROI 設定は小脳下縁から頭頂までとした。海馬断面は海馬体部に直行するスライスを選択したうえで断面が乳頭体を通る面を基準断面として、基準断面の 3 mm 前方から 3 mm ずつ 18 mm 後方までの 8 断面を選択した。8 断面で右海馬の面積 Hrn と左の海馬面積 Hln の和 Hn を頭蓋内面積 Cn で除した値を補正值  $Hn/Cn$  として ( $n=1\sim 8$ )、頭蓋内面積に対する比として area ratio (%) を算出した。4 群間において補正值  $Hn/Cn$  を比較するために、各疾患群と断面間でそれぞれ t 検定による比較を行った。統計解析には、Stat mate V for Windows® を用いた。

その結果、城甲泰亮は次の結論を得た。

1. 各群間の海馬断面積補正值の比較では、アルツハ

- イマー病<健忘型軽度認知障害<うつ病<健常者の傾向がみられた。
2. 海馬の冠状断面において、健常者と比較して、アルツハイマー病は海馬全体の萎縮を認めた。
  3. 健忘型軽度認知障害では海馬全体の萎縮は軽度ではあるが海馬頭のみ顕著な萎縮がみられた。

4. うつ病では海馬体前部のみに萎縮がみられた。
- これらの結果より、海馬を部位ごとに分けて比較する方法は、アルツハイマー病、健忘型軽度認知障害、うつ病の鑑別に有用である可能性が示された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3) as a useful immunohistochemical marker for the diagnosis of adenocarcinoma of small intestine (小腸癌の診断に有用な免疫染色マーカーとしてのIMP3)

大工原 誠 一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】小腸は腸管の9割を占める臓器であるが、小腸癌は比較的稀な疾患である。小腸癌の正確な診断には内視鏡検査下の生検による組織診断がゴールドスタンダードになっているが、高分化型管状腺癌と腺腫や再生変化との鑑別が困難な症例があり、客観的な診断マーカーが診断確定の一助になるものと考えられる。膵臓癌で初めて過剰発現することが発見された癌胎児性蛋白であるInsulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3)は細胞増殖、細胞分化、RNA輸送・安定化において重要な役割を担っている。IMP3は成熟した細胞では発現がほとんど認められないが、悪性腫瘍においては細胞増殖、浸潤において重要な役割を果たしていると考えられ、膵臓癌を始め、各種の癌での発現が報告されている。しかし小腸癌においてIMP3の発現に関する報告はない。今回の研究の目的は、小腸癌、小腸腺腫、炎症性疾患、正常組織におけるIMP3の発現を免疫組織化学的に検討し、小腸癌におけるIMP3の生物学的意義と小腸癌の診断におけるIMP3免疫染色の有用性を検討することである。

【対象と方法】小腸癌23例(十二指腸癌17例、空腸癌2例、回腸癌4例)、小腸腺腫23例(低異型度腺腫10例、高異型度腺腫13例)、十二指腸潰瘍6例、クローン病5例の内視鏡治療検体または手術検体を用いて、IMP3、p53、Ki-67の免疫染色を行った。また小腸癌では手術切除検体のリンパ節転移巣7例と術前の内視鏡生検検体6例の免疫染色も行った。IMP3、p53、Ki-67の免疫染色については腫瘍細胞の中で染色された細胞の割合をスコア化(5%以下を0点、5~10%を1点、11~50%を2点、50%以上を3点)した。また、IMP3の免疫染色では陽性強度もスコア化(陰

性0点、弱陽性1点、中等度陽性2点、強陽性3点)し、陽性頻度と陽性強度の両者のスコアを合計したスコアを使用した。また、抗IMP3抗体の性能評価として、肺癌培養株A549細胞を用いたウェスタンブロッティングによる抗体の特異性の検討と肺癌培養株A549細胞のセルブロック標本と正常胎盤を用いて、ホルマリン固定時間(1日、3日、7日、14日)のIMP3免疫染色に及ぼす影響を検討した。

【結果】肺癌培養株A549細胞を用いたウェスタンブロッティングにて、抗IMP3抗体にて予想される位置に単一のバンドが観察された。また、固定時間のIMP3免疫染色への影響に関しては1日、3日、7日、14日に関わらず、肺癌培養株A549細胞、正常胎盤においてIMP3の染色性に差は認められなかった。腫瘍周囲の正常小腸上皮はIMP3陰性で、十二指腸潰瘍やクローン病では炎症部の粘膜上皮や再生上皮の一部にIMP3が弱陽性であった。低異型度小腸腺腫ではIMP3は全例陰性であったが、高異型度小腸腺腫では13例中7例(53.8%)で陽性であった。小腸癌では23例中20例(87%)で陽性となり、高異型度小腸腺腫と比べて有意にスコアが高かった。また、IMP3のスコアは中分化型管状腺癌で高分化型管状腺癌と比べ有意に高くなった。さらに、より深く浸潤している病変でスコアが高くなり、pT1群とpT2以深群の間にも有意差を認め、弱いがKi67の発現と相関を認めた。一方、性別、病変部位、リンパ節転移の相違によって、IMP3のスコアに有意差は認めなかった。p53は9例(39.1%)で過剰発現を認めたが、そのうち全例でIMP3は陽性となり、p53陰性例でも14例中11例(78.6%)でIMP3は陽性となった。p53の過剰発現の有無でIMP3のスコアに有意差を認めず、p53とIMP3に相関関係は認めなかった。

生検施行例6例中5例(83.3%)でIMP3陽性となった。陰性となった1例は組織型が印環細胞癌で、手術検体もIMP3陰性であった。さらに、小腸癌症例の生存期間は1~122カ月(平均41.7カ月)で、IMP3高発現(スコア6点)群とそれ以外群で5年生存率を比較したところ、IMP3過剰発現群で5年生存率が有意に低くなった。ただし、全生存期間には有意差を認めなかった。

【結論】IMP3は小腸発癌の後期の段階に関与すると考えられた。小腸癌ではIMP3は高頻度に強陽性となり、IMP3の免疫染色は組織診断基準と併用することにより反応性変化を呈した上皮や腺腫との鑑別に有用な補助診断になりえると思われる。小腸癌ではIMP3発現の高い陽性率と強度な染色を認め、他の組織学的評価にIMP3の免疫染色を組み合わせることは小腸癌の正確な診断において有用である可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

小腸癌の正確な診断には内視鏡検査下の生検による組織診断がゴールドスタンダードになっているが、鑑別が困難な症例があり、客観的な診断マーカーが診断確定の一助になるものと思われる。Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3)は悪性腫瘍においては細胞増殖、浸潤において重要な役割を果たしている。各種の癌でIMP3の発現が報告されているが、小腸癌でのIMP3の発現に関する報告は明らかでない。今回小腸腫瘍、炎症性疾患、正常組織におけるIMP3の発現を免疫組織化学的に検討した。

小腸癌主病巣23例、小腸腺腫23例(低異型度腺腫10例、高異型度腺腫13例)、十二指腸潰瘍6例、クローン病5例の内視鏡治療検体または手術検体を用いて、IMP3、p53、Ki-67の免疫染色を行った。染色性の評価は、陽性細胞の頻度と染色強度をスコア化した。ま

た、肺癌培養株A549細胞を用いた、ウェスタンブロッティングによる抗体特異性の検討を行うと共に、肺癌培養株A549細胞のセルブロック標本と正常胎盤を用いて、ホルマリン固定時間のIMP3免疫染色に及ぼす影響を検討した。

その結果、大工原誠一は次の結論を得た。

1. ウェスタンブロッティングによる特異性の検討では、抗IMP3抗体にて、予想される位置に単一のバンドが確認された。使用した抗IMP3抗体の特異性は高いと思われた。また、ホルマリン固定時間の変化に伴ってIMP3の染色性は変化しなかった。
2. 腫瘍周囲の正常小腸上皮はIMP3陰性であった。十二指腸潰瘍やクローン病では、炎症部の粘膜上皮や再生上皮の一部にIMP3が弱陽性であった。
3. 低異型度小腸腺腫ではIMP3は全例陰性であったが、高異型度小腸腺腫では13例中7例(53.8%)で陽性であった。小腸癌では23例中20例(87%)で陽性であり、高異型度小腸腺腫と比べて有意にスコアが高かった。
4. IMP3のスコアは中分化型管状腺癌で高分化型管状腺癌と比べ有意に高かった。また、より深く浸潤している病変でスコアが高く、pT1群とpT2以深群の間にはIMP3のスコアに有意差を認めた。IMP3スコアはKi67スコアと弱い相関を認めた。

以上の結果より、IMP3発現は小腸発癌の後期の段階に関与していると考えられた。小腸癌ではIMP3が高頻度に強陽性となり、非癌病変と有意の差がみられた。以上より、IMP3の免疫染色はこれまでの組織診断基準と併用することにより、小腸癌のより正確な診断に役立つ可能性が示唆された。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Autoimmune pancreatitis can transform into chronic features similar to advanced chronic pancreatitis with functional insufficiency following severe calcification (自己免疫性膵炎は、石灰化を呈した後に関機能障害を伴う慢性膵炎へ移行しうる)

## 金井 圭太

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】自己免疫性膵炎(AIP)はステロイド治療が奏功し臨床所見、画像所見、病理組織学的所見が改善することから急性期の病態と考えられてきた。しかし長期経過において、通常の慢性膵炎(CP)と同様に膵石灰化を呈する症例が存在することが明らか

となってきた。我々はAIPの長期経過で一部の症例が膵石を合併し、再燃、診断時の膵頭部腫大、膵頭部のWirsung管とSantorini管両方の狭細所見が膵石形成と有意に関連していることを明らかにした。従って、AIPは長期経過でCPの画像所見を呈する病態に移行しうると思われる。しかし、長期経過でAIP

がCPで認められるように膵機能低下を来すか否かについては十分な検討がされていない。本研究の目的は、AIPがCPと同様に長期経過で膵機能低下を来すか否かを、膵外分泌および内分泌機能の両面から明らかにすることである。

【方法】1992年～2014年8月の間に3年以上経過観察が可能であった92例のAIPを対象とした。慢性膵炎臨床診断基準2009に準拠してAIP92例を非石灰化群75例と膵石灰化群17例の2群に分け、CP群47例と健常コントロール群30例を対照とし、膵外分泌機能について便中エラスターゼ (fecal elastase concentration:FEC), 膵内分泌機能について fasting immune-reactive insulin (IRI), fasting C-peptide reactivity (CPR), homeostatic model assessment (HOMA)-R, HOMA- $\beta$  を評価し、比較検討した。

【結果】AIP膵石灰化群は17例(18%)に認めた。AIP膵石灰化群はAIP非石灰化群に比べ有意に観察期間が長く、PSLが有意に長期にわたって投与されていた。AIP両群はCP群に比べ有意に高齢であった。飲酒喫煙歴はAIP両群に比べCP群で有意に多く認めた。FEC値はCP群がAIP非石灰化群より有意に低値であったが、AIP膵石灰化群とは有意差を認めなかった。FEC<200  $\mu$ gの高度膵外分泌機能低下を呈した症例の割合は、CP群(74%)がAIP非石灰化群(39%)に比べ有意に多く認めたが、AIP膵石灰化群(56%)とは有意差を認めなかった。IRIとCPRはAIP両群間に有意差は認めなかったが、いずれもCP群に比べ有意に保たれていた。IRIとCPRが正常値未満の症例の割合は、AIP非石灰化群はCP群より有意に少なかったが、AIP膵石灰化群はCP群との間に有意差を認めなかった。HOMA-RはAIP両群でCP群に比べ有意に高値であり、ステロイド治療に因るインスリン抵抗性の影響が示唆された。HOMA- $\beta$ はAIP非石灰化群でCP群より有意に高値であったが、AIP膵石灰化群はCP群との間に有意差を認めなかった。

【結論】AIP膵石灰化群は非石灰化群に比較し膵外分泌および内分泌機能障害が進行しており、AIPにおいてもCPと同様に、長期経過で膵機能の低下を来すと考えられた。AIP膵石灰化群の膵機能障害はCPに比較して軽度であり、AIPでは障害の進行が緩徐である可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

自己免疫性膵炎(AIP)はステロイド治療が奏功し

臨床所見、画像所見、病理所見が改善することから急性期の病態と考えられてきた。しかし長期経過において、通常の慢性膵炎(CP)と同様に膵石灰化を呈する症例が存在することが明らかとなり、AIPは長期経過でCPの画像所見を呈する病態に移行しうると考えられる。長期経過でAIPがCPで認められるように膵機能低下を来すか否かについては十分な検討がされていない。本研究は、AIPがCPと同様に長期経過で膵機能低下を来すか否かを、膵外分泌および内分泌機能の両面から明らかにすることを目的とした。1992年～2014年8月の間に3年以上経過観察が可能であった92例のAIPを非石灰化群75例と膵石灰化群17例の2群に分け、CP群47例と健常コントロール群30例を対照とし、膵外分泌および内分泌機能について評価し比較検討した。

その結果、「金井圭太」は以下の結論を得た。

1. AIP膵石灰化群はAIP非石灰化群に比べ有意に観察期間が長く、PSLが有意に長期にわたって投与されていた。
2. AIP両群はCP群に比べ有意に高齢であった。
3. 便中エラスターゼ(FEC)値は、膵疾患群ではAIP非石灰化群、AIP膵石灰化群、CP群の順で高値であり、AIP非石灰化群とCP群の間で有意差がみられた。
4. FEC<200  $\mu$ gの高度膵外分泌機能低下を呈した症例の割合は、CP群、AIP膵石灰化群、AIP非石灰化群の順に高く、CP群とAIP非石灰化群との間に有意差がみられた。
5. IRIおよびCPRはCP群、AIP膵石灰化群、AIP非石灰化群の順に値が低く、低値例の頻度が高い傾向がみられた。
6. HOMA- $\beta$ 値はIRIやCPRと同様の傾向を示した。
7. HOMA-RはAIP両群でCP群に比べ有意に高値であり、ステロイド治療に因るインスリン抵抗性の影響が示唆された。

今回の研究は、AIPの膵内分泌および外分泌機能を長期経過において評価した初の研究である。AIP膵石灰化群は非石灰化群に比較し膵外分泌および内分泌機能障害が進行しており、AIPにおいてもCPと同様に長期経過で膵機能の低下を来すと考えられた。AIP膵石灰化群の膵機能障害はCPに比較して軽度であり、AIPでは障害の進行が緩徐である可能性が示唆された。よって主査、副査は一致して本論文を学

位論文として価値があるものと認めた。

して価値があるものと認めた。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文と

## Characteristics of Trunk Control During Crook-lying Unilateral Leg Raising in Different Types of Chronic Low Back Pain Patients (慢性腰痛患者のタイプの違いにおける片脚下肢挙上時の体幹制御様式の特徴)

大 江 厚

### (論文の内容の要旨)

【背景】近年、非特異的慢性腰痛患者に対してより効果的な理学療法プログラムを検討するためには、多様な非特異的慢性腰痛患者をタイプ別に分類して治療を行うことの重要性が指摘されている。

理学療法の臨床場面における非特異的慢性腰痛患者の分類方法としては、腰椎を運動させることで腰椎に直接かかる負荷によって腰痛発現運動方向を確認し、その運動方向から分類する直接的分類方法と、四肢動作時の腰椎の運動方向の特徴から、間接的に腰椎にかかる負荷を推察して分類する間接的分類方法の大きく2つに大別される。この直接的分類方法と間接的分類方法の関係に関しては、直接的な腰椎の運動で確認された腰痛発現運動方向のタイプの違いによって、腰痛を増悪させる腰椎の運動方向を回避するために、四肢動作時の腰部の運動パターンにも異なる影響を及ぼす可能性が考えられる。

しかしこれまでに、直接的分類方法で確認される腰痛発現運動方向のタイプの違いにおける四肢動作時の腰部の運動パターンの特徴について定量的に解析した報告はない。さらに、このような四肢動作時の腰部の運動パターンは、体幹の表在および深部に位置する屈筋と伸筋の複合的な活動によって影響されると考えられるが、四肢動作中の腰椎の動きおよび体幹筋活動について非侵襲的に同時に測定し、定量的に解析した報告もこれまでにされていない。

そこで本研究では、非特異的慢性腰痛患者を対象に、腰椎を運動した際の腰痛発現運動方向によって分類されるタイプの違いにおける片脚下肢挙上時の腰部の動きと体幹筋活動様式の特徴について、非侵襲的かつ定量的に測定し明らかにすることで、非特異的慢性腰痛患者における四肢動作時の体幹運動制御パターンの解釈を進展させ、理学療法プログラムを検討する際の臨床推論過程に有用な指標を提供することを目的とした。

【方法】A病院の整形外科外来を受診した下肢症状を伴わない腰痛患者のうち、腰痛が3カ月以上続いていて、X線およびMRI画像上で器質的な変化を認めない慢性腰痛患者30名を、HallのLow Back Pain Classification Systemに基づいて、腰椎屈曲動作で腰痛が増悪する屈曲型腰痛群13名(男性6名、女性7名、平均年齢 $38.9 \pm 9.5$ 歳)と、腰椎伸展動作で腰痛が増悪する伸展型腰痛群17名(男性7名、女性10名、平均年齢 $32.6 \pm 9.5$ 歳)に分類した。また、体幹から下肢にかけて整形外科的疾患とその既往の無い健常者30名(男性14名、女性16名、平均年齢 $33.2 \pm 9.0$ 歳)を対照群とした。なお、本研究を実施するにあたり、全ての被験者に対して事前に文章及び口頭にて研究内容の詳細について説明し、参加の同意を得た。本研究は信州大学医学部医倫理委員会の承認を得て実施した。

全ての被験者は、背臥位で股関節60度屈曲位から、腰痛群は腰痛側、対照群は効き足側の片側下肢を股関節屈曲90度位まで3秒かけて挙上するという運動課題を行い、運動課題中の腰部の動きに伴って変化する腰部とベッド間の圧変化を、腰部の下に置いた腰部圧測定装置(エム・イー特製)で測定した。同時に、片脚下肢挙上動作時における表在及び深部の体幹筋の筋活動について、表面筋電計(NORAXON製, Tele MyoG2 EM-602)および超音波画像診断装置(GE横河メディカルシステム製, Cardio & Vasculer Ultrasound-System Vivid7)を用いて測定した。

統計解析はSPSS ver. 18.0を用い、腰部圧変化と各体幹筋の筋活動について3群間で比較した。なお、有意水準は5%未満とした。

【結果】片側下肢挙上動作開始時の腰部圧の変化に関しては、対照群および屈曲型腰痛群においては腰部圧の低下を示したのに対し、伸展型腰痛群においては腰部圧が他の群よりも有意に上昇していた( $P < 0.05$ )。また、片側下肢挙上動作開始時の体幹筋活動に関して

は、伸展型腰痛群において、両側の外腹斜筋の筋活動が対照群および屈曲型腰痛群よりも有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。

【考察】本研究の結果より、背臥位からの片側下肢挙上動作開始時においては、伸展型腰痛群は対照群および屈曲型腰痛群にくらべ、両側の外腹斜筋の筋活動量を増加させ、腰椎を屈曲運動方向に運動させていることが示された。伸展型腰痛群にとって、片側下肢挙上動作開始時の腰椎の伸展方向への運動は腰痛を増悪させる運動方向であるため、本研究で伸展型腰痛群が示した体幹の運動制御様式は、腰痛を増悪を回避するために無意識的に自己組織化された代償的な運動制御の結果である可能性が考えられる。したがって、非特異的慢性腰痛患者の四肢動作時における体幹制御様式の特徴は、腰椎の腰痛発現運動方向に基づいて分類された腰痛タイプによって異なることが示唆された。以上より、非特異的慢性腰痛患者に対する理学療法プログラムを検討する際の臨床推論過程においては、腰椎の腰痛発現運動方向の違いによる四肢動作時の体幹運動制御様式の特徴を評価することの重要性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

今回の研究は非特異的慢性腰痛患者を対象に、腰椎を運動した際の腰痛発現運動方向によって分類されるタイプの違いにおける片側下肢挙上時の腰部の動きと体幹筋活動様式の特徴の関係性を明らかにすることを目的とした。方法は下肢症状を伴わない腰痛患者のうち、腰痛が3カ月以上続いていて、X線およびMRI画像上で器質的な変化を認めない慢性腰痛患者30名を、HallのLow Back Pain Classification Systemに基づいて、腰椎屈曲動作で腰痛が増悪する屈曲型腰痛群13名と、腰椎伸展動作で腰痛が増悪する伸展型腰痛群17名に分類し、背臥位で股関節60度屈曲位から、腰痛

群は腰痛側、対照群は効き足側の片側下肢を股関節屈曲90度位まで3秒かけて挙上するという運動課題を行い、運動課題中の腰部の動きに伴って変化する腰部とベッド間の圧変化と、表在及び深部の体幹筋の筋活動について、表面筋電計および超音波画像診断装置を用いて測定した。また、体幹から下肢にかけて整形外科的疾患とその既往の無い健常者30名を対照群として同様の計測を行った。その結果、片側下肢挙上動作開始時の腰部圧の変化は対照群および屈曲型腰痛群において伸展型腰痛群より有意に低下していた。また、片側下肢挙上動作開始時の体幹筋活動に関しては、両側の外腹斜筋の筋活動が対照群および屈曲型腰痛群において伸展型腰痛群より有意に低下していた。

この研究の目的は独自性が高く、また臨床応用にも富んだ内容である。また、結果において明らかになったことは、伸展型腰痛群にとって、片側下肢挙上動作開始時の腰椎の伸展方向への運動は腰痛を増悪させる運動方向であるため、本研究で伸展型腰痛群が示した体幹の運動制御様式は、腰痛を増悪を回避するために無意識的に自己組織化された代償的な運動制御の結果である可能性が考えられる。したがって、非特異的慢性腰痛患者の四肢動作時における体幹制御様式の特徴は、腰椎の腰痛発現運動方向に基づいて分類された腰痛タイプによって異なることが示唆された。これは腰痛患者の動作には疼痛が影響して特有の運動を学習していることを示唆しており、腰痛患者の評価や治療への新しい戦略を考えるうえでも重要であると思われる。

このような新しい知見が得られたことを分かりやすく発表し、また質疑応答においても十分な説明を行っていた。

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。

### Effects of Early-Stage Group Psychoeducation Program for Patients with Depression (うつ病患者に対する早期集団心理教育プログラムの効果)

田 中 佐千恵

#### (論文の内容の要旨)

【背景】うつ病は増加が指摘されている精神疾患で、WHOは世界的に350万人以上の人々がうつ病に苦しんでいるとしている。日本でもうつ病患者は増加傾向にあり、厚生労働省の患者調査(2011年)では、12年前の1999年と比較し約2.2倍増加している。

また、うつ病は再発しやすい疾患とされ、再発を予

防する心理社会的治療として心理教育(psychoduca-tion)が注目されている。心理教育の効果については、薬物アドヒアランスの向上、うつ症状の軽減、長期予後に好影響を及ぼすことなどが報告されている。しかし、これらの報告は、地域在住の患者を対象に個別に実施した心理教育の効果を検討したもので、入院中の患者を対象に集団実施した心理教育の報告はない。そ

ここで本研究では、入院早期のうつ病患者を対象に集団心理教育プログラム (Group psychoeducation programme : GPP) を実施し、その効果について検討することを目的とした。本研究は信州大学医倫理審査会の承認を得た。

【方法】2010年4月から2012年4月の間に信州大学医学部附属病院精神科に入院し、うつ病エピソードと診断された患者147名のうち、研究への参加に同意の得られた82名 (男性22, 女性60, 平均 $56.1 \pm 15.6$ 歳, 23-88歳, 中央値63歳) を対象とした。参加者は入院後に薬物療法, 精神療法 (CBT を含む), 作業療法および m-ECT のいずれかを組み合わせた治療を通常治療として受けていた。これらの通常治療に加えて, GPP に参加した者を「参加群」, 参加しなかった者を「対照群」とし, 両群の属性, SMSF (気分と疲労のチェックリスト), 半年後の再入院率, GPP に対する参加者の感想と精神保健福祉相談の件数を調査した。なお, GPP は計 3 セッションのプログラムとし, 3 回のセッション内容はガイドライン (Katon et al ; 1995) を参考に構成した。

【結果】参加群は45名 (男性16名, 女性29名, 平均 $53.1 \pm 15.4$ 歳), 入院期間は $88.2 \pm 42.5$ 日, m-ECT の実施者は7名であった。参加群は入院後 $44.3 \pm 31.5$ 日目にGPPに参加し, 参加回数は $2.2 \pm 0.8$ 回 (1回~3回)であった。対照群は37名 (男性6名, 女性31名, 平均 $58.9 \pm 16.0$ 歳) で, 入院期間は $77.7 \pm 48.6$ 日, m-ECT 実施者は14名であった。両群ともに女性が多い傾向にあり, 参加群は対照群より年齢が6歳ほど低く, 入院期間が10日ほど長かったが, 有意差を認めるほどではなかった。対照群では m-ECT 実施者が有意に多かった ( $p = .02$ )。

SMSF (13項目) では, 両群ともに退院時には顕著なスコア変化 (症状改善) がみられた。「回復感」のスコア変化は対照群で有意に大きかったが (ANCOVA,  $p = .03$ ), 他の項目では両群間でスコア変化に有意差はなかった。参加群の SMSF スコアを入院時, GPP 開始時, 退院時で比較すると, 「緊張/不安」「抑うつ/自信喪失」「あせり」「頭/思考疲れ」「体調」「退屈感」「回復感」で有意なスコア変化 (改善) が認められた (ANOVA,  $p = .01 \sim .000$ )。スコア変化は GPP 開始時と比較し退院時で大きく, 「抑うつ/自信喪失」 ( $p = .007$ ), 「あせり」 ( $p = .009$ ), 「頭/思考疲れ」 ( $p = .000$ ), 「意欲/活力」 ( $p = .013$ ) では有意差がみられた。多重比較 (Bonferroni) の効果量 ( $d$ )

は入院時と GPP 開始時の比較 ( $d = .01 \sim .35$ ) より, GPP 開始時と退院時の比較で大きかった ( $d = .24 \sim .70$ )。

参加群の感想は, GPP によって「病気や薬・今後の生活の仕方に対する理解が深まった (36名)」, 「今後への肯定的な気持ちを持てた (20名)」, 「不安を共有でき一人じゃないと思えた (15名)」, 「話すことで発散できた (12名)」など, ポジティブなものが多かった。また, GPP 参加前に医療福祉相談を受けていた患者は8名であったが, GPP 参加後には新たに13名が医療福祉相談を希望した。

退院後6カ月以内に再入院した者は, 参加群が4名 (8.8%), 対照群が6名 (16.2%) であった。再入院に影響する要因を検討するために, 再入院を目的変数, 年齢, 入院期間, 診断名, GPP 参加, 服薬量を説明変数とするロジスティック回帰分析を行った。その結果, 診断名の「重症うつ病エピソード」が再入院に影響する因子として検出された。

【考察】対照群には m-ECT の実施者が多く, 重症例が多く含まれていた可能性があり, これらが GPP 参加に至らない要因として作用した可能性がある。参加群では GPP 開始後の SMSF スコアの変化が大きく, GPP は「緊張/不安」, 「抑うつ/自信喪失」などの気分を安定化させる集団精神療法的な効果があり, GPP によって他職種連携が促進されることが確認された。入院早期のうつ病患者を対象とする GPP の有効性が示された。

#### (論文審査の結果の要旨)

「うつ病患者に対する早期集団心理教育プログラムの効果」と題した本研究は, 集団精神療法と心理教育を組み合わせた「集団心理教育プログラム」を開発するとともに, 入院早期のうつ病患者を対象にその効果を検討したものである。本研究は, 入院中に実施する短期間のプログラム (週に1回, 入院期間中に計2~3回の参加程度) であっても, うつ病患者に対し, 混乱した思考を整理し, 疾病への理解を促し, 抑うつ感や焦りを軽減させ, 意欲・活力, 回復感の向上が得られるなど主観的症状の改善を促し, 精神療法的効果があることを明らかにした。

入院早期から, リハビリテーションプログラムとして集団心理教育を実施した報告はこれまでになく, 本研究は独創的な取り組みと言える。また, 小集団という治療構造のなかで, 患者同士の共有体験が得られやすく, メンバーの入れ替わりやグループの成熟度など

の要素が働き、抑うつ気分や自身喪失感のあるうつ病患者にとって、心理教育を集団で行うことは有効であると思われる。研究のなかで「早期」を明確に定義していない点や、うつ病の重症度を HAM-D などの疾患特異的な客観的尺度で測定していない点には課題が残る。

本研究は、短期間の集団心理教育であっても重症患

者を多く含む入院患者で治療効果が認められることを示した。本研究で行った集団心理教育プログラムは期間回数とも短期であり、外来通院中のうつ病患者に対してさらなる応用が期待できる。

以上のように、本研究の成果は、今後のうつ病治療への応用が期待できるものであり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Immunohistochemical study of the membrane skeletal protein, membrane protein palmitoylated 6 (MPP6), in the mouse small intestine (マウス小腸における膜骨格蛋白 MPP6の免疫組織化学的検討)

### 上 條 明 生

#### (論文の内容の要旨)

【研究背景と目的】 Membrane protein palmitoylated (MPP) 蛋白ファミリー (MPP1-7) は、4.1蛋白ファミリー (4.1B, 4.1G, 4.1N, 4.1R) と結合部位をもち、MPP1は赤血球膜直下でスペクトリン-アクチン-4.1Rと、さらに4.1Rは膜内蛋白に結合して「膜骨格」を形成している。この4.1-MPPによる膜骨格は、末梢神経系ではシュワン細胞の髄鞘にあるシュミット・ランターマン切痕 (SLI) に4.1G-MPP6複合体がある。4.1R欠損によって溶血性貧血になること、また4.1G欠損マウスでMPP6局在やSLI形態の変化が知られている。

まずSLIの機能を検討するために、坐骨神経に液体窒素冷却液性混合寒剤 (-193°C) を直接かけて瞬時に凍結する“生体内凍結技法”を用いて、種々伸展下マウス坐骨神経のSLI形態を4.1Gの免疫染色を指標に解析した (副論文: Immunohistochemical study of mouse sciatic nerves under various stretching conditions with “in vivo cryotechnique”; J Neuroscience Methods 227: 181-188, 2014)。この生体内凍結技法は血行動態を反映したSLIの機械的伸長に対応した形状変化を明らかにし、4.1G-MPP6を含むSLIの外力に抗する緩衝作用の役割が考えられた。さらに従来報告されていた可溶性蛋白アルブミンがSLIに浸透する現象は、生体内凍結技法による標本では観察されず、生体の神経線維内の正確な分布を明らかにした。

次に主論文 (本学位論文) の目的として、これまでマウス腸管における4.1ファミリー-4.1Bの報告はあるが、MPPファミリーについて研究がなかったので、単層円柱上皮をもち細胞局在が判別しやすいマウス小

腸を用いて検討した。その部位を明確にするために、接着結合 (adherens junction) の E-cadherin もしくは密着結合 (tight junction) の zonula occludens (ZO)-1と免疫染色によって比較した。一部の試料は、前包埋免疫電子顕微鏡法で超微形態の局在を検討した。さらに末梢神経のような4.1ファミリーのMPPファミリー局在化への関与を検討するために、4.1B欠損マウス小腸を用いてMPP6の局在と蛋白量の変化を検討した。また他の4.1ファミリーである4.1Gと4.1Nの腸管における局在と蛋白量の変化も比較した。さらに、マウス小腸上皮で知られるMPPのスーパーファミリー蛋白であるcalcium/calmodulin dependent serine protein kinase (CASK) とMPP6の結合性について検討した。

【材料と方法】 免疫染色の標本作製には、麻酔マウスの心臓からパラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液を灌流して小腸を摘出、同液で1時間浸漬固定、ショ糖水で処理、凍結切片を作製後、Diaminobenzidine (DAB) 法および蛍光抗体法で免疫染色を行い、光学顕微鏡および共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。一部のDAB法による試料はグルタルアルデヒドで再固定後、オスミウム処理、アルコール脱水、エポン包埋を経て超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。Western blotには、麻酔下でマウス小腸を摘出し、Laemmli sample bufferまたはTritonX-100で溶解後、上清の蛋白濃度を調整、電気泳動後ブロット膜に転写し、MPP6, 4.1G, 4.1N, 4.1Bに対する抗体で免疫染色した。また免疫沈降には、マウス小腸上清を抗MPP6抗体で免疫沈降して電気泳動後、ブロット膜に転写、抗CASK抗体で免疫染色した。

【結果と考察】 免疫染色により、MPP6は腸陰窩から

腸絨毛における上皮細胞側底面の細胞膜直下に局在していた。このMPP6の局在はE-cadherinとは類似するがZO-1とは異なり、電子顕微鏡による超微形態での染色部位からも、上皮細胞側面頂上部にあるtight junctionへの局在はわずかであった。マウス小腸上皮における4.1BとMPP6の局在を比較すると、腸絨毛では類似していたが、腸陰窩ではMPP6のみで染色が得られ、それらは細胞質に局在していた。免疫染色による4.1B欠損マウス小腸におけるMPP6の免疫染色性や局在部位は野生型マウスと変わらず、Western blotによる蛋白発現量でも変化は認めなかった。このことから、小腸上皮において4.1BはMPP6の局在化に必須ではないことが明らかとなった。さらに4.1ファミリーの4.1Gと4.1Nは、野生型マウス小腸で神経線維にはあるが上皮において局在を認めないことと、4.1B欠損マウス小腸における局在と発現にも変化がなかったことから、ファミリー蛋白による補填の可能性も低いと考えられた。一方、免疫沈降法によって抗MPP6抗体で得た沈降物に、CASKの分子量を示すWestern blotによるラインが得られたことから、CASKとMPP6の結合が明らかとなった。以上より、マウス小腸上皮におけるMPP6のCASKと結合した膜骨格蛋白複合体としての機能が示唆された。

【結論】膜骨格の視点から行った2つの実験によって、(1)生体内凍結技法を用いたSLIの末梢神経における役割(副論文)と(2)マウス小腸上皮におけるMPP6の局在と結合蛋白(主論文)を明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

Membrane protein palmitoylated (MPP) 蛋白ファミリー(MPP1-7)は4.1蛋白ファミリー(4.1B, 4.1G, 4.1N, 4.1R)と結合部位をもち、末梢神経系ではシュワン細胞の髄鞘内シュミット・ランターマン切痕(SLI)に4.1G-MPP6複合体があり4.1G欠損でSLI形態の変化が知られる。当人は、まずSLIの機能検討のために、坐骨神経に“生体内凍結技法”を用いて、種々伸展下マウス坐骨神経のSLI形態を4.1

G免疫染色を指標に解析し(副論文:Journal of Neuroscience Methods 227:181, 2014)、機械的伸長に対応した形状変化を明らかにした。さらに従来報告されていた可溶性蛋白アルブミンがSLIに浸透する現象は、生体内凍結技法による標本では観察されず、生体の神経線維内の正確な分布を明らかにしている。

さらに当人は、マウス腸管のMPPファミリーの局在を免疫組織化学的に検討した。MPP6の腸陰窩から腸絨毛における上皮細胞側底面の細胞膜直下の局在を示した。このMPP6の局在は接着結合(adherens junction)のE-cadherinとは類似するが密着結合(tight junction)のZO-1とは異なり、電子顕微鏡による超微形態での染色部位からも、上皮側面頂上部tight junctionへの局在はわずかであった。マウス小腸上皮における4.1BとMPP6の局在を比較すると、腸絨毛では類似したが、腸陰窩ではMPP6のみ細胞質に局在していた。当初4.1ファミリーがMPPファミリーを局在化すると考えていたが、4.1B欠損マウス小腸におけるMPP6の局在は野生型マウスと変わらず、Western blotによる蛋白発現量も変化を認めなかったことから、小腸上皮においては4.1BはMPP6の局在化に必須ではないことを明らかにした。さらに4.1ファミリーの4.1Gと4.1Nは、野生型マウス小腸上皮で局在を認めず、4.1B欠損マウス小腸での局在と発現にも変化が無いことから、ファミリーによる補填の可能性も低いと考えた。一方、免疫沈降法で抗MPP6抗体で得た沈降物に、calcium/calmodulin dependent serine protein kinase (CASK)の分子量に一致するWestern blotによるラインを得て、CASKとMPP6の結合を明らかにした。このように、マウス小腸上皮側底面におけるMPP6のCASKがもたらす膜骨格蛋白複合体を見出しHistochemistry and Cell Biology 145:81, 2016に論文発表している。

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

Differences in the function and secretion of congenital aberrant fibrinogenemia between heterozygous  $\gamma$ D320G (Okayama II) and  $\gamma\Delta$ N319- $\Delta$ D320 (Otsu I) (先天性異常フィブリノゲン血症ヘテロ接合体  $\gamma$ D320G (Okayama II) と  $\gamma\Delta$ N319- $\Delta$ D320 (Otsu I) の機能および分泌の違い)

向井早紀

(論文の内容の要旨)

【背景】血漿中のフィブリノゲン(Fbg)が低濃度であり、かつ機能異常を有するFbg異常症患者2名に遭遇

し、Okayama IIおよびOtsu Iと同定した。Okayama IIおよびOtsu Iの異常および欠失アミノ酸部位は重複していたにもかかわらず、血漿中のFbg活性濃度と、

Fbg 活性濃度とタンパク濃度の比が著しく異なっていた。

【方法】血漿 Fbg 濃度はトロンビン時間法（活性濃度）と免疫学的方法（タンパク濃度）により求めた。遺伝子解析は Fbg の全エクソンおよびエクソンとイントロン境界領域をダイレクトシーケンス法にて行った。Fbg の凝固機能解析は患者血漿中から精製した Fbg を用いて、トロンビンによるフィブリン (Fbn) 重合試験、Clottability 試験および Ca イオンあるいは GPRP ペプチドによる Fbg のプラスミン分解抑制試験を行った。また、異常リコンビナント Fbg を CHO 細胞にて合成させて、細胞培養上清および細胞破碎上清中の Fbg 濃度を ELISA にて測定して Fbg の分泌能を解析した。タンパク解析は、患者血漿中から精製した Fbg および Fbg 安定化発現 CHO 細胞を破碎した上清を用いて、SDS-PAGE およびウエスタンブロットを行った。

【結果】Okayama II の Fbg 測定値は活性量 0.41 g/L、抗原量 0.85 g/L であり（比は 0.482）、遺伝子解析では  $\gamma$ 320 番コドンに GAT → GGT のヘテロ変異が認められ、このヌクレオチド置換はアミノ酸 Asp → Gly の置換 ( $\gamma$ D320G) を引き起こす。そして Otsu I の Fbg 測定値は活性量 0.09 g/L、抗原量 1.43 g/L であり（比は 0.063）、遺伝子解析では  $\gamma$ 319 および 320 に AATGAT のヘテロ欠失が認められ、結果として  $\gamma$ Asn319 および  $\gamma$ Asp320 の欠失 ( $\gamma\Delta$ N319- $\Delta$ D320) を引き起こす。精製血漿 Fbg を用いて SDS-PAGE と CBB 染色を行ったところ、異常  $\gamma$ 鎖が Okayama II でははっきりせず、Otsu I では明瞭に存在していた。しかし、抗  $\gamma$ 鎖抗体を用いたウエスタンブロット法では Okayama II においてもわずかな異常  $\gamma$ 鎖が観察された。トロンビンによる Fbn 重合試験を行ったところ、Okayama II では lag period が正常コントロールよりもわずかに長いだけであった一方、Otsu I では 30 分以内に重合が起こらなかった。その他の Fbg 機能においては大きな差は認められなかった。両者の異常  $\gamma$ 鎖は CHO 細胞にて合成され、Fbg へ組み立てられていた。しかしながら、 $\gamma$ D320G の培養液/細胞破碎液の Fbg 濃度比は  $0.11 \pm 0.02$  であり、 $\gamma\Delta$ N319- $\Delta$ D320 の  $0.66 \pm 0.18$  よりも 6 倍低かった。

【結論】Okayama II の血漿 Fbg 中に存在する異常  $\gamma$ 鎖の割合が低いため、Fbn 重合反応はほぼ正常に行われ、一方、Otsu I では血漿 Fbg 中に存在する異常  $\gamma$ 鎖の割合が高いため、Fbn 重合反応が著しく低下したと考えられた。

#### (論文審査の結果の要旨)

向井早紀の研究は、フィブリノゲン (Fbg)  $\gamma$ 鎖の 320 番アミノ酸置換症例 (Okayama II ; Ok II) と 319・320 番アミノ酸の欠失症例 (Otsu I ; Ot I) が重複するアミノ酸の異常にもかかわらず、血漿中の Fbg 活性濃度と、活性濃度と蛋白濃度の比が著しく異なっていた原因を明らかにするために行ったものである。

遺伝子解析で  $\gamma$ 320 番コドンに GAT → GGT のヘテロ変異を認め、アミノ酸 Asp → Gly の置換 ( $\gamma$ D320G) を引き起こす Ok II の Fbg 測定値は活性量 0.41 g/L、蛋白量 0.85 g/L であり（比は 0.482）、 $\gamma$ 鎖遺伝子に AATGAT のヘテロ欠失を認め、 $\gamma$ Asn319 と  $\gamma$ Asp320 の欠失 ( $\gamma\Delta$ N319- $\Delta$ D320) を引き起こす Ot I の Fbg 測定値は活性量 0.09 g/L、蛋白量 1.43 g/L（比は 0.063）であった。

患者血漿から精製した Fbg について抗  $\gamma$ 鎖抗体を用いたウエスタンブロット法を行ったところ、Ok II において少量の異常  $\gamma$ 鎖が観察されたのに対して、Ot I では正常  $\gamma$ 鎖と同程度の異常  $\gamma$ 鎖が存在していた。この異常  $\gamma$ 鎖の濃度の違いは、Chinese Hamster Ovary 細胞に発現させたりコンビナント Fbg ( $\gamma$ D320G と  $\gamma\Delta$ N319- $\Delta$ D320) の細胞内合成量と細胞外分泌量の比の違い ( $\gamma$ D320G :  $0.11 \pm 0.02$ ,  $\gamma\Delta$ N319- $\Delta$ D320 :  $0.66 \pm 0.18$ ) により証明された。

さらに、患者精製 Fbg についてトロンビンによるフィブリン重合試験を行ったところ、Ok II では重合開始までの時間が正常コントロールよりわずかに低下しただけであったが、Ot I では 30 分以内に重合が起こらなかった。

以上の結果より、Ok II では血漿 Fbg 中に存在する異常  $\gamma$ 鎖の割合が低いため、フィブリン重合反応はほぼ正常に行われる一方で、Ot I では血漿 Fbg 中に存在する異常  $\gamma$ 鎖の割合が高いため、重合反応が著しく低下したと結論付けた。これらの原因が総合され、2 症例間で日常検査法の Fbg 活性測定値と活性濃度と蛋白濃度の比に大きな差を生じたものと推測した。なお本研究では、2 アミノ酸欠失症例；Ot I の蛋白分泌量の低下がわずかであったにもかかわらず、1 アミノ酸の置換症例；Ok II の蛋白分泌量が著しく低下した原因を明らかにすることはできなかった。

平成 27 年 12 月 25 日に開催された学位論文審査会において、向井の研究概略説明および主査・副査の質問に対する回答は適切であった。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。