

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
川上 徹 (内科学(2))	甲第1178号	H31. 3.31	STAT3 mutations in natural killer cells are associated with cytopenia in patients with chronic lymphoproliferative disorder of natural killer cells (NK細胞におけるSTAT3変異はNK細胞慢性リンパ増殖異常症患者の血球減少と関連する)	中沢洋三	駒津光久 古庄知己
代 健 (加齢生物学)	甲第1179号	H31. 3.31	Suppression of mouse AApoAII amyloidosis progression by daily supplementation with oxidative stress inhibitors (酸化ストレス抑制剤の継続摂取によるマウスAApoAIIアミロイドーシスの進行抑制)	関島良樹	山田充彦 竹下敏一
池村憲明 (分子薬理学)	甲第1180号	H31. 3.31	Inhibitory effects of antihypertensive drugs on human cytochrome P450 2J2 activity: potent inhibition by azelnidipine and manidipine (シトクロムP450 2J2に対する降圧薬の阻害効果: アゼルニジピンとマニジピンによる強力な阻害)	小泉知展	山田充彦 桑原宏一郎
横田 陽 (耳鼻咽喉 科学)	甲第1181号	H31. 3.31	Frequency and clinical features of hearing loss caused by STRC deletions (STRC遺伝子欠失による難聴の頻度と臨床像の検討)	関島良樹	塩沢丹里 中沢洋三
西岡 宏 (形成再建 外科学)	甲第1182号	R 1. 9.30	Convex Bone Deformity after Closed Reduction of Nasal Bone Fracture (鼻骨骨折整復術後の変形治癒は突出側に残りやすい)	宇佐美真一	栗田 浩 福島菜奈恵
西牧史洋 (歯科口腔 外科学)	甲第1183号	H31. 3.31	Relationship Between the Quantity of Oral Candida and Systemic Condition/Diseases of the Host: Oral Candida Increases with Advancing Age and Anemia (口腔カンジダ菌量と宿主の全身状態/疾患との関係: 口腔カンジダ菌は加齢および貧血の進行とともに増加する)	野見山哲生	杠 俊介 中沢洋三
杉浦亜弓 (内科学(2))	甲第1184号	R 2. 3.31	Past history of hepatocellular carcinoma is an independent risk factor of treatment failure in patients with chronic hepatitis C virus infection receiving direct-acting antivirals (肝細胞癌既往は、C型慢性肝炎に対する直接作用型抗ウイルス剤治療の不成功に関連する独立因子である)	竹下敏一	山田充彦 伊藤研一

審査学位論文要旨

王 暁 経 (代謝制御学)	甲第1185号	R 2. 3.31	A high-cholesterol diet promotes steatohepatitis and liver tumorigenesis in HCV core gene transgenic mice (高コレステロール食はHCVコア遺伝子トランスジェニックマウスにおける脂肪性肝炎と肝腫瘍の発生を促進させる)	平塚佐千枝	駒津光久 菅野祐幸
小澤真希子 (内科学(2))	甲第1186号	R 2. 3.31	Clinical features of IgG4-related periaortitis/periarteritis based on the analysis of 179 patients with IgG4-related disease: a case-control study (IgG4関連疾患179名の解析によるIgG4関連動脈周囲炎の臨床的特徴の解明)	桑原宏一郎	花岡正幸 菅野祐幸
五味大輔 (包括的がん治療学)	甲第1187号	R 2. 3.31	Fluorine-18-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography evaluation in metastatic bone lesions in lung cancer: Possible prediction of pain and skeletal-related events (肺癌骨転移症例のFDG-PET検査における骨関連疼痛の有無および骨関連事象の予測)	花岡正幸	栗田 浩 藤永康成
上 條 泰 (救急集中治療医学)	甲第1188号	H30. 9.30	Do the efficacy and safety of treatment with landiolol, an ultra-short-acting β 1-selective blocker, differ in the urgent management of rapid atrial fibrillation between patients complicated with cardiac versus non-cardiac disease (非心疾患に合併した頻脈性心房細動に対するランジオロール塩酸塩の有効性および安全性の検討)	柴 祐 司	川真田樹人 瀬戸達一郎
竹内 勇 介 (小児医学)	甲第1189号	H31. 3.31	Clinical features and new diagnostic criteria for the syndrome of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (PFAPA) (周期性発熱・アフタ性口内炎・咽頭炎・頸部リンパ節炎症候群 (PFAPA) の臨床学的特徴と新診断基準)	中 沢 洋 三	古 庄 知 己 竹 下 敏 一
古川 聖 美 (病態解析診断学)	甲第1190号	R 2. 3.31	NLRP3 upregulation in A549 cells co-cultured with THP-1 macrophages under hypoxia via deregulated TGF- β signaling (低酸素環境下でTHP-1マクロファージと共培養したA549細胞におけるTGF- β 経路を介したNLRP3発現増加)	樋口京一	花岡正幸 瀬戸達一郎
傍 島 淳 (運動機能学)	甲第1191号	R 2. 3.31	Organ accumulation and carcinogenicity of highly dispersed multi-walled carbon nanotubes administered intravenously in transgenic rasH2 mice (遺伝子改変 rasH2マウスを用いた高分散した多層カーボンナノチューブの静脈内投与による臓器集積と発癌性評価)	瀧 伸 介	小泉知展 菅野祐幸

審査学位論文要旨

的場久典 (分子病理学)	甲第1192号	H31. 3.31	Cecal tumorigenesis in AhR-deficient mice depends on cecum-specific MAPK pathway activation and inflammation (AhR ノックアウトマウスの回盲部における腫瘍発生は回盲部に特異的な MAPK 経路の活性化と炎症反応に依存する)	小泉知展	竹下敏一 平塚佐千枝
鴨居史樹 (運動機能学)	甲第1193号	R 2. 3.31	A new technique to determine the tension in extensor pollicis longus reconstruction (長母指伸筋腱再建における, 緊張度決定の新たな手法)	杠 俊介	福島菜奈恵 藤永康成
松井周平 (麻酔蘇生学)	甲第1194号	R 2. 3.31	Endogenous calcitonin gene-related peptide deficiency exacerbates postoperative lymphedema by suppressing lymphatic capillary formation and M2 macrophage accumulation (内因性カルシトニン遺伝子関連ペプチド欠乏は, リンパ管形成とM2マクロファージ集積を抑制することで, 術後リンパ浮腫を悪化させる)	菅野祐幸	多田 剛 田 洵克彦
近藤恭史 (加齢生物学)	甲第1195号	H31. 3.31	Factors predictive of the presence of a CSF1R mutation in patients with leukoencephalopathy (白質異常症における CSF1R 遺伝子変異陽性を予測する患者要因の検討)	鷲塚伸介	古庄知己 藤永康成
杉山健二郎 (耳鼻咽喉科学)	甲第1196号	R 2. 3.31	Mid-Frequency Hearing Loss Is Characteristic Clinical Feature of OTOA-Associated Hearing Loss (OTOA 遺伝子変異による難聴の臨床的特徴は中音域の難聴である)	関島良樹	中沢洋三 田 洵克彦
鈴木都史郎 (泌尿器科学)	甲第1197号	H31. 3.31	Intestinal Injury by Heat Conduction from Surgical Sealing Devices (シーリングデバイスからの熱伝導による腸管損傷)	塩沢丹里	清水公裕 瀬戸達一郎
戴 昆 (循環病態学)	甲第1198号	R 2. 3.31	Deficiency of the adrenomedullin-RAMP3 system suppresses metastasis through modification of cancer-associated fibroblasts (アドレノメデュリン (AM)-RAMP3系の欠損は, 癌関連線維芽細胞の性質を変化させ, 臓器間転移を抑制する)	菅野祐幸	多田 剛 田 洵克彦
佐藤充人 (内科学(3))	甲第1199号	H31. 3.31	Amelioration of intracellular Ca ²⁺ regulation by exon-45 skipping in Duchenne muscular dystrophy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (デュシェンヌ型筋ジストロフィーiPS細胞由来心筋細胞におけるエクソン45スキッピングによる細胞内Ca ²⁺ 動態の改善)	関島良樹	桑原宏一郎 古庄知己
枝光智大 (皮膚科学)	甲第1200号	R 2. 3.31	Aryl Hydrocarbon Receptor Directly Regulates Artemin Gene Expression (芳香族炭化水素受容体は神経栄養因子アルテミン遺伝子を直接制御する)	関島良樹	竹下敏一 菅野祐幸

審査学位論文要旨

生山 裕一 (内科学(1))	甲第1201号	R 2. 3.31	Comparison of clinical characteristics of patients with Mycobacterium avium complex disease by gender (肺 MAC 疾患患者の性別による臨床的特徴の比較)	藤 永 康 成	本田 孝行 清水 公裕
御子柴 飛鳥 (皮膚科学)	甲第1202号	H31. 3.31	Detecting copy number alterations of oncogenes in cell-free DNA to monitor treatment response in acral and mucosal melanoma (末梢血中の Cell-free DNA のコピー数異常を用いた肢端型・粘膜型メラノーマ患者での治療効果の評価)	柴 祐 司	竹下 敏一 菅野 祐幸
小沢 陽子 (内科学(1))	甲第1203号	H31. 3.31	A comparison of the features of fluorine-18 fluorodeoxyglucose-positron emission tomography (FDG-PET) between IgG4-related disease with bilateral hilar lymphadenopathy and sarcoidosis (両側肺門リンパ節腫脹を伴う IgG4 関連疾患とサルコイドーシスの PET-CT 所見の比較検討)	小泉 知展	菅野 祐幸 関島 良樹
井田 耕一 (産科婦人科学)	甲第1204号	H31. 3.31	Effectiveness of a genetic test panel designed for gynecological cancer: an exploratory study (婦人科癌用に設計された遺伝子検査パネルの有用性: 探索的研究)	伊藤 研一	小泉 知展 古庄 知己
橋本 瞬 (運動機能学)	甲第1205号	R 2. 3.31	Prevalence and Risk Factors of Carpal Tunnel Syndrome in Japanese Aged 50 to 89 Years (日本における50~89歳の手根管症候群の罹患率と危険因子)	関島 良樹	野見山 哲生 田 渕 克彦
栗原 大河 (分子細胞生理学)	甲第1206号	R 2. 3.31	DNA repair protein RAD51 enhances the CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency in brain neurons (DNA 修復タンパク質 RAD51 は脳の神経細胞での CRISPR/Cas9 を介した遺伝子ノックイン効率を上昇させる)	樋口 京一	沢村 達也 新藤 隆行
上野 学 (泌尿器科学)	甲第1207号	H31. 3.31	Therapeutic effects of Choroito, a traditional Japanese (Kampo) medicine, on detrusor overactivity induced by acetic acid in rats (酢酸誘発性排尿筋過活動ラットにおける猪苓湯の治療効果)	柴 祐 司	小泉 知展 駒津 光久
渡辺 宏晃 (分子薬理学)	甲第1208号	H31. 3.31	In vitro inhibitory effects of sesamin on CYP4F2 activity (In vitro におけるセサミンの CYP4F2 活性に対する阻害効果)	山田 充彦	桑原 宏一郎 小泉 知展
山鹿 隆義 (包括的がん治療学)	甲第1209号	H31. 3.31	Relationship between Physical Activity and Health-related Quality of Life in Hospitalized and Terminally Ill Cancer Patients (入院中終末期がん患者の身体活動と健康関連 QOL の関係)	伊藤 研一	増木 静江 高橋 淳

審査学位論文要旨

北原順一郎 (内科学(4))	甲第1210号	H31. 3.31	Aldosterone to Potassium Ratio after Adrenocorticotropin stimulation in Unilateral Primary Aldosteronism Diagnosis (片側性原発性アルドステロン症の診断における ACTH 負荷後のアルドステロン/カリウム比)	桑原宏一郎	藤永康成 石塚 修
正印 航 (内科学(5))	甲第1211号	H31. 3.31	Prognostic Impact of Cardio-renal-anemia Syndrome in Patients at Risk for Heart Failure from the IMPACT-ABI study (心不全リスクを有する患者における予後予測因子としての心腎貧血症候群: IMPACT-ABI サブ解析)	山田充彦	駒津光久 柴 祐司
品川 潤 (耳鼻咽喉科学)	甲第1212号	H31. 3.31	Prevalence and clinical features of hearing loss caused by EYA4 variants (EYA4遺伝子変異による難聴の有病率と臨床像の検討)	古庄知己	関島良樹 沢村達也
岡 晋一郎 (耳鼻咽喉科学)	甲第1213号	H31. 3.31	Clinical characteristics and in vitro analysis of MYO6 variants causing late-onset progressive hearing loss (MYO6遺伝子変異による遅発性進行性難聴の臨床的特徴と in vitro 解析)	古庄知己	関島良樹 沢村達也
加藤太門 (内科学(5))	甲第1214号	H31. 3.31	Impact of Ambulation Status in Patients with End-stage Renal Disease on Hemodialysis due to Diabetic Nephropathy: The PREDICT Study (糖尿病性腎症による血液透析患者における歩行状態の影響)	柴 祐司	駒津光久 増木静江

審査学位論文要旨

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
岩波 潤 (成人保健学)	甲第31号	H31. 3.31	Brake Operation and Palmar Perspiration Reflect Older Adult Drivers' Ability to Predict Hazards: Driving Simulation Research (高齢ドライバーの危険予測能力を反映するブレーキ操作と手掌部発汗: ドライビングシミュレータを用いた研究)	杉山 暢 宏	上村 智子 小林 正義
堀 敦 詞 (医療生命 科学)	甲第32号	H31. 3.31	Characterization of galactosyl and lactosyl sulfatide species in human serum by MALDI-TOF mass spectrometry (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量分析によるヒト血清中ガラクトシルスルファチド分子種とラクトシルスルファチド分子種の特徴付け)	矢崎 正 英	松田 和 之 日高 宏 哉
高 枝 果 奈 (老年保健学)	甲第33号	R 2. 3.20	Reliability and acceptability of using a social robot to carry out cognitive tests for community-dwelling older adults (地域在住高齢者へのコミュニケーションロボットによる認知機能検査の信頼性と受容性)	小 林 正 義	杉山 暢 宏 上村 智子
植 松 明 和 (医療生命 科学)	甲第34号	R 2. 3.20	Relationship between Sympathetic Nerve Activity Evaluated by Pulse Rate Variability and Blood Pressure Early in the Morning in Sleep Disordered Breathing (脈拍変動によって評価した交感神経活動と睡眠呼吸障害における早朝血圧との関係)	伊 澤 淳	矢崎 正 英 藤本 圭作
山 口 大 輔 (成人保健学)	甲第35号	R 2. 3.20	Assessment of Depressive Tendency, Coping Strategies, and Type D Personality in Japanese Patients with Coronary Artery Disease (日本人の冠状動脈疾患患者における抑うつ傾向, コーピング方略, およびタイプDパーソナリティに関する検討)	市 川 元 基	下里 誠 二 松 永 保 子
齋 門 良 紀 (成人保健学)	甲第36号	R 2. 3.20	Correlation between radiographic sagittal alignment, range of motion, muscle strength and quality of life in adults with spinal deformities (成人脊柱変形患者の単純レントゲンにおける矢状面アライメント, 関節可動域, 筋力, 生活の質の相関関係)	木 村 貞 治	横 川 吉 晴 百 瀬 公 人
武 市 尚 也 (医療生命 科学)	甲第37号	R 2. 3.20	Comparison of impedance measured by the forced oscillation technique and pulmonary functions, including static lung compliance, in obstructive and interstitial lung disease (閉塞性肺疾患及び間質性肺疾患における肺コンプライアンスと多周波強制オシレーション法を用いた呼吸インピーダンスとの関係)	矢崎 正 英	石 田 文 宏 藤本 圭作

STAT3 mutations in natural killer cells are associated with cytopenia in patients with chronic lymphoproliferative disorder of natural killer cells (NK 細胞における *STAT3* 変異は NK 細胞慢性リンパ増殖異常症患者の血球減少と関連する)

川 上 徹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】NK 細胞慢性リンパ増殖異常症 (CLPD-NK) は NK 細胞の形質をもった大顆粒リンパ球の持続的な増加を特徴とする稀な疾患である。CLPD-NK 患者は緩徐な臨床経過をたどり、一部では血球減少や神経症状、自己免疫性疾患を合併する。最近、CLPD-NK 症例の一部にシグナル伝達分子の *STAT3* の活性化型変異が認められることが報告され、血球減少との関連も示唆されているが、詳細な変異プロファイルや臨床像との関連については不明である。また、T 細胞顆粒リンパ球白血病では、*STAT3* 以外に *STAT5B* や *TNFAIP3* の変異が認められるとされるが、CLPD-NK での変異頻度は分かっていない。今回、CLPD-NK の遺伝子変異プロファイルと臨床像との関連を明らかにするため、CLPD-NK 患者を対象として *STAT3*, *STAT5B*, *TNFAIP3* について遺伝子解析を行った。

【対象と方法】CLPD-NK 17例を対象とした。末梢血あるいは骨髓液から単核球を分離し、DNA を抽出した。まず、全例を対象として、アリアル特異的 PCR (AsPCR) で *STAT3* と *STAT5B* のホットスポット変異 (*STAT3*; Y640F, D661Y, *STAT5B*; N642H, Y665F) の解析を行った。また、アンプリコンシーケンス法で *STAT3*, *STAT5B*, *TNFAIP3* の解析を行った。アンプリコンシーケンス法に用いるプライマーは各遺伝子の全コーディング領域をカバーするように設計し、Ion Torrent システムで解析を行った。一部の例ではセルソータを用いて T 細胞 (CD2陽性, CD3陽性) と NK 細胞 (CD2陽性, CD3陰性, CD16または CD56陽性) を分取し、それぞれ DNA を抽出してアンプリコンシーケンス法を行った。検出した変異はダイレクトシーケンス法、AsPCR あるいはライブラリ再作成後のアンプリコンシーケンス法で確認した。臨床データを収集し、変異の有無により比較を行った。統計ソフトは EZR を用いた。

【結果】CLPD-NK の合併症は好中球減少 4 例、赤芽球低形成を伴う貧血 3 例、自己免疫性溶血性貧血 2 例、神経症状 4 例であった。AsPCR では、3 例で *STAT3* の D661Y 変異が陽性であった。そのうち 1 例では

STAT3 Y640F も陽性だった。*STAT5B* のホットスポット変異は 1 例も認めなかった。アンプリコンシーケンス法では、5 例で *STAT3* 変異を認め、1 例で *TNFAIP3* 変異を認めた。*STAT5B* 変異は認めなかった。*STAT3* 変異陽性例のうち、セルソーティングが可能だった 3 例では、変異は T 細胞の分画ではなく、NK 細胞の分画で認められた。*STAT3* 変異は全て SH2 ドメインに分布していた。*STAT3* 変異陽性例と陰性例の間で臨床像を比較すると、変異陽性例は有意に貧血を合併しやすく (5 例中 5 例; 100% 対 12 例中 0 例; 0%; $P=0.00016$), 有意にヘモグロビン値が低く (中央値 6.6 g/dL 対 13.9 g/dL; $P=0.0044$), 好中球数が低い傾向にあった (中央値 1,220/ μ L 対 3,100/ μ L; $P=0.070$)。17 例を合併症により、血球減少を有する群 (5 例), 神経症状を有する群 (4 例), 合併症を有しない群 (8 例) に分類すると、血球減少を有する群でのみ *STAT3* 変異は認められた。

【考察と結論】CLPD-NK を *STAT3* 変異と臨床像によって 3 群に分類可能であることを初めて示した。*STAT3* 解析は CLPD-NK の病態解析や診療に分子マーカーとして有用な情報となりうることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

NK 細胞慢性リンパ増殖異常症 (CLPD-NK) は NK 細胞の形質をもった大顆粒リンパ球の持続的な増加を特徴とする稀な疾患である。一部に *STAT3* の活性化型変異が認められることが報告されているが、詳細な変異プロファイルや臨床像との関連は不明である。また、T 細胞顆粒リンパ球白血病では、*STAT3* 以外に *STAT5B* や *TNFAIP3* の変異が認められるとされるが、CLPD-NK での変異頻度は不明である。今回、CLPD-NK 患者を対象として *STAT3*, *STAT5B*, *TNFAIP3* について遺伝子解析を行った。

CLPD-NK 17 例を対象とした。末梢血あるいは骨髓液の単核球から DNA を抽出し、アリアル特異的 PCR (AsPCR) で *STAT3* と *STAT5B* のホットスポット変異の解析を行った。また、アンプリコンシーケンス法で *STAT3*, *STAT5B*, *TNFAIP3* の解析を

行った。一部の例ではセルソータでT細胞とNK細胞を分取し、それぞれ解析に用いた。臨床データを収集し、変異の有無により比較を行った。

その結果、川上は次の結論を得た。

1. AsPCRでは、3例で *STAT3* の D661Y 変異が陽性、うち1例では *STAT3* Y640F も陽性だった。*STAT5B* のホットスポット変異は認めなかった。
2. アンプリコンシーケンス法では、5例で *STAT3* 変異を認め、1例で *TNFAIP3* 変異を認めた。*STAT5B* 変異は認めなかった。
3. *STAT3* 変異陽性例のうち、セルソーティングが可能だった3例では、変異はNK細胞の分画でのみ認められた。
4. *STAT3* 変異陽性例と陰性例の間で臨床像を比較

すると、変異陽性例は有意にヘモグロビン値が低く(中央値 6.6 g/dL 対 13.9 g/dL; $P=0.0044$)、好中球数が低い傾向にあった(中央値 1,220/L 対 3,100/L; $P=0.070$)。

5. 血球減少を有する群(5例)、神経症状を有する群(4例)、合併症を有しない群(8例)に分類すると、血球減少を有する群でのみ *STAT3* 変異は認められた。

これらの結果より、CLPD-NK を *STAT3* 変異と臨床像によって3群に分類可能であることが示された。*STAT3* 解析は CLPD-NK の診療において有用な情報となりうることを示唆された。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。

Suppression of mouse AApoAII amyloidosis progression by daily supplementation with oxidative stress inhibitors (酸化ストレス抑制剤の継続摂取によるマウス AApoAII アミロイドーシスの進行抑制)

代 健

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】マウス AApoAII アミロイドーシスは、老化に伴い ApoA-II タンパク質がアミロイド線維(AApoAII)を形成し、脳以外の全身に沈着する全身性アミロイドーシスの一種である。これまでに、アルツハイマー病や脳アミロイドアンギオパチーなどの研究で酸化ストレスがアミロイド沈着に関連することが報告されており、我々もアミロイド線維の沈着は小胞体ストレス応答とアポトーシスを惹起すること(Luo et al Lab Invest 2015)、摂取カロリー制限は酸化ストレス等を改善し、アミロイド沈着も軽減すること(Li & Sawashita et al PLoS One 2017)を報告してきた。しかし、酸化ストレス抑制がアミロイドーシスの進展に及ぼす効果とメカニズムについては十分には明らかになっていない。本研究では AApoAII アミロイドーシスを誘発したマウスに酸化ストレス抑制剤を摂取させて、AApoAII アミロイドーシス抑制効果とそのメカニズムについて検討した。

【方法】8週齢 R1.P1-*Apoa2*^c 雌マウスに AApoAII 線維(1μg/匹)を投与してアミロイドーシスを誘発し、無添加水(A-NT群)、活性酸素除去剤である tempol 1mM 添加水(Tem群)あるいは NADPH 酸化酵素抑制剤である apocynin 1.5mM 添加水(Apo群)を自由摂取させ、それぞれ8週間、12週間後に屠殺した。

基本的な酸化ストレスレベルを確認するため、線維を投与せず、普通水を摂取した Control (Con群)を設置した。実験期間中のマウスの体重、飲水量と摂食量を測定し、解剖後には病理組織切片を作成し、アミロイド沈着程度と酸化ストレスレベルを評価した。また血漿中の ApoA-I, ApoA-II, ApoE タンパク質と血清高密度リポタンパク(HDL)濃度を測定した。肝臓での酸化ストレスやアミロイド沈着に関連する遺伝子の発現量を real-time PCR 法で測定した。酸化ストレス抑制剤の用量がアミロイドーシス抑制効果に及ぼす影響を解析するために、2倍濃度(2mM tempol と 3mM apocynin) 添加水の投与実験を行った。

【結果と考察】アミロイドーシス誘発8週間後では、A-NT, Tem, Apo のいずれの群もアミロイド沈着程度が低く、3群間に有意差は無かった。12週間後では A-NT 群と比較して、Tem, Apo 両群でアミロイド沈着が有意に軽減していた。特に、酸化ストレス抑制剤の摂取により胃、皮膚と肝臓のアミロイド沈着が明らかに軽減した。過酸化脂質の指標である4-HNE 染色と MDA 量の測定から、他の臓器に比較して酸化ストレスのレベルが比較的高い肝臓、胃及び皮膚では、Con群, A-NT群と比較して Tem群, Apo群では軽減が認められた。肝臓の *Apoa1*, *Apoa2* 遺伝子の発現量、血漿中の ApoA-I, ApoA-II タンパク質濃

度と HDL 濃度はいずれの群間にも有意差は認められなかった。酸化ストレス抑制剤は小胞体ストレス関連遺伝子 (*Hspa5*と *Atf4*) と酸化ストレス関連遺伝子 (*Sod2*) の発現を抑制し, Tem 摂取群でミトコンドリア調節遺伝子 (*Ppargc1a*) の発現を促進した。高用量酸化ストレス抑制剤の摂取ではアミロイド沈着抑制効果の増大は認められなかった。酸化ストレス抑制剤の摂取が酸化ストレスを軽減させた臓器 (胃, 皮膚, 肝臓) で, 有意なアミロイドーシス抑制効果を示したことは, 酸化ストレスがアミロイドーシスの発症や進展に関与することを示唆している。また, 抑制剤の摂取が ApoA-II や HDL の代謝には影響しないことが明らかになり, アミロイドーシス抑制のメカニズム解明には, さらなる研究が必要である。

【結論】 酸化ストレスの抑制が AApoAII アミロイドーシスの抑制に有効であることが明らかになった。この結果はアミロイドーシスの治療方法として酸化ストレスを抑制する処方が有効であることを示唆している。

(論文審査の結果の要旨)

マウス AApoAII アミロイドーシスは, 老化に伴い ApoA-II タンパク質がアミロイド線維 (AApoAII) を形成し, 脳以外の全身に沈着する全身性アミロイドーシスの一種である。これまでに, アルツハイマー病や脳アミロイドアンギオパチーなどの研究で酸化ストレスがアミロイド沈着に関連することが報告されており, 我々もアミロイド線維の沈着は小胞体ストレス応答やアポトーシスを惹起すること (Luo et al Lab Invest 2015), 摂取カロリー制限は酸化ストレス等を改善し, アミロイド沈着も軽減すること (Li & Sawashita et al PLoS One 2017) を報告してきた。しかし, 酸化ストレス抑制がアミロイドーシスの進展に及ぼす効果とメカニズムは十分には明らかになっていない。本研究では AApoAII アミロイドーシスを誘発したマウスに酸化ストレス抑制剤を摂取させて, AApoAII アミロイドーシス抑制効果とそのメカニズムについて検討した。

8 週齢 R1.P1-*Apoa2*^c 雌マウスに AApoAII 線維 (1 μg/匹) を投与してアミロイドーシスを誘発し, 無添加水 (A-NT 群), 活性酸素除去剤である tempol 1 mM 添加水 (Tem 群) あるいは NADPH 酸化酵素抑制剤である apocynin 1.5 mM 添加水 (Apo 群) を自由摂取させ, それぞれ 8 週間, 12 週間後で屠殺した。基本的な酸化ストレスレベルを確認するため, 線維を

投与せず, 普通水を摂取した Control (Con 群) を設置した。実験期間中のマウスの体重, 飲水量と摂食量を測定し, 解剖後には病理組織切片を作成し, アミロイド沈着程度と酸化ストレスレベルを評価した。また血漿中の ApoA-I, ApoA-II, ApoE タンパク質と血清高密度リポタンパク (HDL) 濃度を測定した。肝臓での酸化ストレスやアミロイド沈着に関連する遺伝子の発現量を real-time PCR 法で測定した。酸化ストレス抑制剤の用量がアミロイドーシス抑制効果に及ぼす影響を解析するために, 2 倍濃度 (2 mM tempol と 3 mM apocynin) 添加水の投与実験を行った。

その結果, 代健は次の結論を得た。

1. 酸化ストレス抑制剤の摂取による AApoAII アミロイドーシス抑制効果を証明した。
2. 抑制効果は臓器によって異なり, 酸化ストレスレベルが高い臓器で有意な沈着減少が見られた。
3. 酸化ストレス抑制剤は血中 ApoA-II, ApoA-I 濃度と HDL コレステロール濃度, 肝臓での mRNA 発現量には影響しなかった。
4. 酸化ストレス抑制剤は小胞体ストレス関連遺伝子発現の抑制とミトコンドリア調節遺伝子の発現を促進した。
5. 酸化ストレス抑制剤の用量を増やしても効果の増強は認められなかった。

酸化ストレスがアミロイドーシスの発症や進展に関与することが明らかになった。更に, 臓器の基礎的酸化ストレスレベルや小胞体ストレスが抑制効果と関係することが示唆されたが, 詳細なメカニズムについては更に検討する必要がある。

これらの結果はアミロイドーシスの治療方法として酸化ストレスを抑制する処方が有効であることを示唆している。

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

Inhibitory effects of antihypertensive drugs on human cytochrome P450 2J2 activity : potent inhibition by azelnidipine and manidipine (シトクロム P450 2J2に対する降圧薬の阻害効果：アゼルニジピンとマニジピンによる強力な阻害)

池 村 憲 明

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】シトクロム P450 2J2 (CYP2J2) は主に心臓に発現しており、肝臓や小腸にも存在する。加えて、様々な腫瘍の細胞内にも高発現している。腫瘍細胞内の CYP2J2はアラキドン酸を代謝しエポキシエイコサトリエン酸を生成することで腫瘍の増殖や転移を促進することが示唆されている。したがって、腫瘍細胞内の CYP2J2の機能を強く阻害する化合物は、がん治療の新たな戦略として期待される。一方、CYP2J2は生体内物質の他、多くの薬物の代謝にも関与している。最近では、ソラフェニブ、スニチニブなどの分子標的薬を腫瘍細胞内で代謝することが報告されている。これらの分子標的薬は血管内皮増殖因子受容体のチロシンキナーゼ活性を阻害することで抗腫瘍効果を示すが、主な副作用として高血圧を生じる。そのため、高血圧が生じた患者には降圧薬の投与が推奨されている。もし併用される降圧薬の中に強力な CYP2J2阻害作用を示すものがあれば、副作用の軽減のみでなく分子標的薬の有効性を高める可能性があると考えられる。しかし、降圧薬の CYP2J2活性に対する阻害作用は詳細に検討されていない。そこで本研究では、降圧薬の CYP2J2阻害作用とその機構を *in vitro* の系で明らかにすることを目的とした。

【方法】CYP2J2組換え酵素を用いて、ルシフェリン-2J2/4F12 O-脱アルキル化酵素活性に対する降圧薬(37化合物)の阻害効果を検討した。阻害が認められた場合、50%阻害濃度 IC₅₀値の他、阻害様式および阻害定数 K_i値を算出した。次いで、代謝依存的阻害が認められた場合、不活性化の速度論的解析を行い、最大不活性化速度定数 k_{inactivation} 値および半値阻害剤濃度 K_i値を算出した。CYP2J2のホモロジーモデルを用いて降圧薬のドッキングシミュレーション解析を行った。

【結果】検討した全てのジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬(DCCBs)、テルミサルタン、デラプリルおよびキナプリルはCYP2J2活性を濃度依存的に阻害した(IC₅₀=0.116~9.19 μM)。アゼルニジピン、バルニジピン、ベニジピン、シルニジピン、エホニジピン、

マニジピン、ニカルジピン、テルミサルタン、デラプリル、キナプリルの阻害様式は競合型を示し、一方、アムロジピン、フェロジピン、ニフェジピン、ニルバジピン、ニソルジピンおよびニトレンジピンの阻害様式は混合型を示した。最も強力な阻害作用を示した降圧薬はマニジピンであった(K_i=0.0294 μM)。ドッキングシミュレーション解析の結果、酵素とリガンドの結合安定性を示す相互作用エネルギーU値はマニジピンおよびニトレンジピンで最も低かった(-56.9 kcal/mol)。降圧薬による阻害の代謝依存性について検討した。NADPH存在下でCYP2J2と降圧薬を20分間プレインキュベートした後、基質を添加して酵素活性を測定したところ、アゼルニジピンおよびフェロジピンのみIC₅₀値の低下が認められた。そこで、両薬物を用いて不活性化の速度論的解析を行った結果、アゼルニジピンのみCYP2J2活性を濃度依存的かつプレインキュベーション時間依存的に阻害した(k_{inactivation}/K_i=105 l/mmol/min)。アゼルニジピンによる不活性化はNADPH依存性を示した。

【考察】検討した降圧薬のうち、マニジピンがCYP2J2の最も強力な可逆的阻害剤であることが明らかとなった。マニジピンが最も強く阻害する要因として、CYP2J2の触媒活性部位への結合安定性が他のDCCBsに比べて高いことが示唆された。また、マニジピンは他のDCCBsと異なり、構造内に嵩高く疎水性の高いジフェニルメチルアミノ基を有していることから、この官能基の存在が強力な阻害作用を示す要因であることも推察された。これまでに、CYP2J2の最も強力な可逆的阻害剤としてダナゾール(K_i=0.02 μM)が報告されているが、マニジピンはダナゾールに匹敵する強力な阻害作用を示すことが明らかとなった。アゼルニジピンはCYP2J2を不活性化することが明らかとなった。この不活性化はNADPH依存性を示すことから、CYP2J2による代謝を介して生成されたアゼルニジピンの活性代謝物がCYP2J2活性を不可逆的に阻害(代謝機構依存的阻害)する可能性が示唆された。アゼルニジピンのような不活性化剤は酵素が新たに生合成されるまで阻害作用が持続することから、可逆的

阻害剤よりも阻害作用が強かつ持続することが考えられた。

【結論】 マンジピンは CYP2J2 の強力な可逆的阻害剤であり、アゼルニジピンは強力な代謝機構依存的阻害剤であることを明らかにした。これらの降圧薬は分子標的薬の有効性を高める薬剤とし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)

腫瘍細胞内の CYP2J2 はアラキドン酸を代謝しエポキシエイコサトリエン酸を生成することで腫瘍の増殖や転移を促進することが示唆されている。したがって、腫瘍細胞内の CYP2J2 の機能を強く阻害する化合物は、がん治療の新たな戦略として期待される。一方、CYP2J2 は生体内物質の他、多くの薬物代謝に関与する。最近では、ソラフェニブ、スニチニブなどの分子標的薬を腫瘍細胞内で代謝することが報告されている。これらの分子標的薬は、主な副作用として高血圧を生じる。そのため、高血圧が生じた患者には降圧薬の投与が推奨されている。もし併用される降圧薬の中に強力な CYP2J2 阻害作用を示すものがあれば、副作用の軽減のみでなく分子標的薬の有効性を高める可能性がある。そこで本研究では、降圧薬の CYP2J2 阻害作用とその機構を *in vitro* の系で明らかにした。

CYP2J2 組換え酵素を用いて、ルシフェリン-2J2/4F12 O-脱アルキル化酵素活性に対する降圧薬 (37 化合物) の阻害効果を検討した。阻害が認められた場合、50 % 阻害濃度 IC_{50} 値の他、阻害様式および阻害定数 K_i 値を算出した。次いで、代謝依存的阻害が認められた場合、不活性化の速度論的解析を行い、最大不活

性化速度定数 $k_{inactivation}$ 値および半値阻害剤濃度 K_i 値を算出した。また CYP2J2 のホモロジーモデルを用いて降圧薬のドッキングシミュレーション解析を行った。その結果、池村憲明は次の結論を得た。

1. 検討した全てのジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬、テルミサルタン、デラプリルおよびキナプリルは CYP2J2 活性を濃度依存的に阻害した ($IC_{50} = 0.116 \sim 9.19 \mu M$)。
2. アゼルニジピン、バルニジピン、ベニジピン、シルニジピン、エホニジピン、マンジピン、ニカルジピン、テルミサルタン、デラプリル、キナプリルの阻害様式は競合型を示し、一方、アムロジピン、フェロジピン、ニフェジピン、ニルバジピン、ニソルジピンおよびニトレンジピンの阻害様式は混合型を示した。
3. CYP2J2 活性に対する最も強力な可逆的阻害剤はマンジピンであった ($K_i = 0.0294 \mu M$)。
4. アゼルニジピンおよびフェロジピンは CYP2J2 活性に対して代謝依存的な阻害作用を示した。さらに、アゼルニジピンは CYP2J2 活性を不活性化することが示唆された。

これらの結果より、分子標的薬治療によって高血圧が生じた際に、マンジピンおよびアゼルニジピンを選択することで副作用軽減のみではなく抗腫瘍効果を高める可能性が示唆された。今後、がん治療における CYP2J2 活性を阻害する降圧薬の役割を明らかにするため、さらなる研究に期待する。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。

Frequency and clinical features of hearing loss caused by *STRC* deletions (*STRC* 遺伝子欠失による難聴の頻度と臨床像の検討)

横 田 陽

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 先天性難聴のうち、50~70 % は遺伝的な原因が関与している。現在、非症候群性難聴の原因として約 100 種類の遺伝子が同定されており、これら遺伝子上の 1~数塩基の変異による先天性難聴が数多く報告されている。これらの変異に関しては、現在、本邦では次世代シーケンサーを用いた難聴の遺伝学的検査が保険収載され、診断が可能になってきている。一方、このような小さな領域の遺伝子変異と異なり、コピー数変化 (CNV: Copy number variation) と呼

ばれる、イントロン領域まで含んだ数十~数万塩基にわたる大きなゲノムの構造変化が、遺伝性疾患の原因として注目されている。

CNV による難聴の報告は 30 程度と少ないが、ひとつに *STRC* 遺伝子の欠失がある。*STRC* 遺伝子は常染色体劣性遺伝形式の非症候群性難聴 (DFNB16) の原因遺伝子である。*STRC* 遺伝子は蝸牛内の外有毛細胞の stereocilia に発現しており、*STRC* 遺伝子による難聴は蝸牛増幅の障害で起きると考えられる。本研究では、日本人難聴者における *STRC* 遺伝子欠失

による難聴の頻度と臨床像を検討した。その中で、現在保険診療で行われている次世代シーケンサーのリードデータを用いて、*STRC* 遺伝子の CNV を検出できるか、難聴の遺伝学的検査の診断率を向上させられるかについても検討した。

【対象と方法】日本人難聴者1,025名、健聴者コントロール152名を対象に、難聴の原因遺伝子68遺伝子をターゲットにした次世代シーケンサーによる網羅的解析を行った。CNV 検出方法については、次世代シーケンサーのリードデータから解析し、CNV が検出されたものに対して、アレイ CGH にてその結果の整合性を確認した。

【結果】難聴者1,025名において17名 (1.7%) が *STRC* 遺伝子欠失 (2 copy loss) による難聴であった。難聴者1,025名において 1 copy loss は26名 (2.63%) であった。これは健聴者集団における頻度 ($4/152=2.63\%$) と同じであった。3 copy の頻度は難聴者で 1.85% であり、健聴者からも 3 copy は検出された。また、難聴の原因別では難聴者全体で第6位、軽中等度難聴者においては *GJB2* 遺伝子について第2位の割合であった。

臨床像では、先天性難聴を呈し、新生児聴覚スクリーニングでも検出可能であった。また難聴の程度は中等度で進行しないことを示した。常染色体劣性遺伝形式をとるが、見かけ上、常染色体優性遺伝形式をとる家系でも見られることがある (pseudodominant)。*STRC* 遺伝子のほか、*CATSPER2* 遺伝子も同時に欠失する症例が多く ($88.2\%=15/17$)、難聴のほか男性不妊も合併する可能性が高い。

【結論】軽中等度の先天性難聴の原因として *STRC* 遺伝子は重要である。*STRC* 遺伝子欠失による難聴は非進行性で、男性不妊を合併する可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

STRC 遺伝子は常染色体劣性遺伝形式の非症候群性難聴 (DFNB16) の原因遺伝子である。*STRC* 遺伝子を含む領域では非常に相同性の高い pseudogene が存在するため、ゲノム再構成が生じやすいと考えられている。*STRC* 遺伝子は蝸牛内の外有毛細胞の stereocilia に発現しており、*STRC* 遺伝子による難聴は蝸牛増幅の障害で起きると考えられる。本研究では、日本人難聴者における *STRC* 遺伝子欠失による難聴の頻度と臨床像を検討した。その中で、現在、保険診療で行なった次世代シーケンサーのリードデータを用いて、*STRC* 遺伝子の CNV を検出できるか、難聴の

遺伝学的検査の診断率を向上させられるかを検討した。

日本人難聴者1,025名、健聴者コントロール152名を対象に、難聴の原因遺伝子68遺伝子をターゲットにした次世代シーケンサーによる網羅的解析を行った。CNV 検出方法については、次世代シーケンサーのリードデータから解析し、CNV が検出されたものに対して、アレイ CGH にてその結果の整合性を確認した。

その結果、横田は次の結論を得た。

1. 難聴者1,025名において17名 (1.7%) が *STRC* 遺伝子欠失 (2 copy loss) による難聴と考えられた。
2. 難聴者1,025名において 1 copy loss は26名 (2.63%) であった。これは健聴者集団における頻度 ($4/152=2.63\%$) と同じであった。
3. 難聴者1,025名において 3 copy (1 copy gain) は19名 (1.85%) で検出された。健聴者コントロールにおいても検出されており、難聴という phenotype には関係がないと考えられた。
4. 難聴の原因別では難聴者全体で第6位、軽中等度難聴者においては *GJB2* 遺伝子について第2位の割合であった。
5. 臨床像では、先天性難聴を呈し、新生児聴覚スクリーニングでも検出可能であった。また難聴の程度は中等度で進行しないことを示した。
6. 常染色体劣性遺伝形式をとるが、見かけ上、常染色体優性遺伝形式をとる家系でも見られることがある (pseudodominant)。
7. *STRC* 遺伝子のほか、*CATSPER2* 遺伝子も同時に欠失する症例が多く ($88.2\%=15/17$)、難聴のほか男性不妊も合併する可能性が高い。
8. 次世代シーケンサーで 2 copy loss と検出された 18例うち、17例はアレイ CGH でも同様の結果であったが、1例はアレイ CGH で CNV を検出できず、偽陽性であった。

以上より、*STRC* 遺伝子欠失による難聴は頻度が高く、特に軽中等度難聴の原因遺伝子として重要であると思われた。今回明らかになった詳細な臨床像は *STRC* 遺伝子欠失症例の予後の予測や介入を選択する上で重要な情報として活用可能である。また、*STRC* 遺伝子欠失の検出に関して現在の保険診療においても応用できる可能性が示された。

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

Convex Bone Deformity after Closed Reduction of Nasal Bone Fracture (鼻骨骨折整復術後の変形治癒は突出側に残りやすい)

西岡 宏

(論文の内容の要旨)

【背景】鼻骨骨折は発症頻度が高いものの、手術は比較的容易とされ、術後画像評価も行われないことが多い。一方、鼻骨骨折整復後の変形治癒症例を外来で目にすることもある。鼻骨骨折治療後の変形治癒が、どの程度の頻度で、どのような傾向で生じるかは明らかになっていない。本研究の目的は、鼻骨形態を術前後に3DCT画像を用いて、比較検討し、変形治癒の傾向を把握し、治療結果に対する患者満足度調査結果との関連を検討し、治療へのフィードバックを図るものである。

【方法】2010年5月から2016年1月までに当院を受診した鼻骨骨折新鮮例100例を対象とした。術前に骨折の形態に応じ、斜鼻型(両側)、斜鼻型(片側)、鞍鼻型、鞍鼻型+斜鼻型の混合型に分類した。手術は全身麻酔下に非観血的に行い、斜鼻型では陥没側を挙上後、突出側を潰した。鞍鼻型では挙上後に必要に応じて前頭突起の幅を狭く矯正した。混合型では先に鞍鼻型の矯正を行い、その後に斜鼻型の矯正を行った。術前と術後3か月を経過した時点で3DCTを施行し、画像上変形が残っているか、骨のずれに応じて治療効果を3段階(優・良・可)で評価した。また、患者本人による、鼻形態の満足度3段階(満足・普通・不満)評価を受けた。

【結果】術前術後に3DCTが行えたのは100例中86例(斜鼻型(両側)45例、斜鼻型(片側)8例、鞍鼻型12例、混合型21例)。術後結果が「優」が69例、「良」が17例、「可」は認めなかった。変形治癒が生じ、「良」の判定であった斜鼻型(両側)では6例全例に突出変形が残存し、陥没変形は認めなかった。「優」と評価された症例ではすべて術後鼻形態も「満足」と評価された。「良」と評価された症例では患者から一部「普通」と評価された。「不満」と患者に評価された症例は認めなかった。

【結論】鞍鼻型、斜鼻型(片側)は整復位が良好なことが多かった。混合型は変形治癒を生じやすかった。斜鼻型(両側)では全身麻酔下に整復を行っても、突出側に偏位が残りやすい。またCT上の変形治癒に応じて患者満足度も変化し、突出側部分を指摘する患者

が多かった。鼻骨突出側の治療は難しく、術者は術中に視覚的变化のみならず、超音波検査などを併用して、変形改善のための工夫が必要と考えられる。再手術の負担は大きいいため、初回の手術で正確に整復することが求められる。

(論文審査の結果の要旨)

鼻骨骨折は発症頻度が高く、手術は比較的容易とされ、術後画像評価も行われないことが多い。一方、鼻骨骨折整復後の変形治癒症例を外来で目にすることもある。鼻骨骨折治療後の変形治癒が、どの程度の頻度で、どのような傾向で生じるか、またその結果に対して患者満足度はどうなのか、鼻骨形態を術前後に3DCT画像を用いて検討した。

その結果、西岡は以下の成績を得た。

1. 術前後に3DCTを行えた86例中17例に変形治癒を認めた。
2. 変形治癒を認めた斜鼻型(Bilateral)6例全例に突出変形が残存していた。
3. 混合型は整復は困難であり、突出変形が残りやすい傾向があった。
4. 斜鼻型(Unilateral)、鞍鼻型は良好に整復されていた。
5. 変形治癒を認めなかった症例は術後患者満足度も高かったが、変形治癒を認めた一部の症例では患者満足度も低下した。

これらの結果より、鼻骨骨折の整復術では、全身麻酔下に整復しても突出変形が残りやすいことが証明された。鼻骨突出側の治療は難しく、変形改善のため、視診、触診のみではなく、超音波検査などを併用する工夫が必要である。変形が残存した場合、患者満足度も低下したが、再手術の負担は大きいいため、初回の手術で正確に整復することの重要性が示された。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Relationship Between the Quantity of Oral Candida and Systemic Condition/Diseases of the Host: Oral Candida Increases with Advancing Age and Anemia (口腔カンジダ菌量と宿主の全身状態 / 疾患との関係: 口腔カンジダ菌は加齢および貧血の進行とともに増加する)

西 牧 史 洋

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】カンジダ菌は、共生真菌生物ならびに粘膜組織の日見病原体である。カンジダ菌は習慣的に口腔内に存在し、そして多くの全身のおよび局所的要因により口腔内のカンジダ菌が増加すると言われていた。しかしながら、口腔カンジダ菌の増加に対する宿主の全身状態 / 疾患の影響は不明のままである。本研究の目的は、口腔カンジダ菌量と宿主の全身状態 / 疾患との間に関連性があるかについて調査検討することである。

【方法】長野県安曇野市および塩尻市で国保特定健診を受けた30歳以上の1,935人中から無作為に抽出された563人(261人の男性と302人の女性)が本研究の対象者となった。口腔内のカンジダ菌量はいくつかのサンプルに、カンジダマンナン抗原濃度を測定して計測した。カンジダマンナン抗原濃度と特定健診結果との関連を統計学的に分析した。

【結果】カンジダマンナン抗原濃度は、単変量解析において、年齢 ($p < 0.01$)、未処置のう蝕歯数 ($p < 0.01$)、義歯の数 ($p < 0.01$)、唾液の pH ($p < 0.01$)、HbA1c ($p < 0.05$)、および、赤血球数 ($p < 0.01$) と相関していた。多変量解析結果では、年齢 ($p < 0.01$)、未治療の虫歯の数 ($p < 0.01$)、補綴歯数 ($p < 0.01$)、唾液の pH ($p < 0.01$)、および、赤血球数 ($p < 0.01$) は、カンジダマンナン抗原濃度を左右する独立因子であった。カンジダマンナン濃度は80歳以上、未治療または補綴歯数が多い、唾液 pH が低い、赤血球数が少ない者で高かった。また、カンジダマンナン濃度は、HbA1c が上昇した者においても高い傾向を認めた。

【結論】本研究の結果より、口腔カンジダ菌量と宿主の全身状態 / 疾患との間に密接な関係があることを示唆された。口腔カンジダ菌は宿主の免疫能低下で増加する可能性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

カンジダ菌は、共生真菌生物ならびに粘膜組織の日見病原体である。カンジダ菌は習慣的に口腔内に存在し、そして多くの全身のおよび局所的要因により口腔内のカンジダ菌が増加すると言われている。しかし

ながら、口腔カンジダ菌の増加に対する宿主の全身状態 / 疾患の影響は不明のままである。本研究の目的は、口腔カンジダ菌量と宿主の全身状態 / 疾患との間に関連性があるかについて調査検討することである。

本研究では、長野県安曇野市および塩尻市で国保特定健診を受けた30歳以上の1,935人中から無作為に抽出された563人(261人の男性と302人の女性)が本研究の対象者となった。口腔内のカンジダ菌量はいくつかのサンプルに、カンジダマンナン抗原濃度を測定して計測した。カンジダマンナン抗原濃度と特定健診結果との関連を統計学的に分析した。

その結果、西牧史洋は次の結論を得た。

1. う蝕歯または欠損補綴歯が多い者、唾液 pH が低い者ほどカンジダ菌量は多かった。
2. 80歳を越える者、また、赤血球数が低い者で口腔カンジダ菌量は多かった。
3. HbA1c 値が高いもので、口腔カンジダ菌量が多い傾向を認めた。

これらの結果により、口腔カンジダ菌量と宿主の全身状態 / 疾患との関連が示唆された。

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。

Past history of hepatocellular carcinoma is an independent risk factor of treatment failure in patients with chronic hepatitis C virus infection receiving direct-acting antivirals (肝細胞癌既往は、C型慢性肝炎に対する直接作用型抗ウイルス剤治療の不成功に関連する独立因子である)

杉浦 亜弓

(論文の内容の要旨)

【目的】 C型慢性肝炎のインターフェロン (IFN) 治療は副作用が多くウイルス学的著効 (sustained virological response: SVR) 率は50%程度と十分ではなかった。2014年に登場した直接作用型抗ウイルス剤 (Direct Acting Antivirals: DAAs) 治療では95%以上のSVR率が得られるようになった。しかし、ウイルス排除に至らない症例も存在する。本研究では、肝細胞癌既往に注目し、この臨床的特徴と肝細胞癌既往がDAAs治療効果に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】 2015年4月～2017年10月にDAAs治療を導入したC型肝炎838例 (年齢中央値: 69歳, 男性: 44.1%) を対象とした。治療法別の内訳は、DCV+ASV: 288例, LDV/SOF: 267例, OBV/PTV/r: 22例, EBV+GRZ: 60例, SOF+RBV: 201例であった。肝細胞癌既往有群と既往無群に分けて、臨床的背景、各種検査値、DAAs治療効果を比較検討した。非侵襲的肝線維化マーカーとして、FIB-4 indexとAPRIは計算式を用いて、M2BPGiとAutotaxinは保存血清を用いて一括測定した。

【結果】 全体のSVR率は94.7% (794/838例) であった。肝細胞癌既往有群は79例 (9.4%) であった。既往有群 (79例) と既往無群 (759例) の比較では、既往有群は有意に高齢であり (72歳 vs. 69歳, $p=0.003$), 男性の割合が多かった (60.8% vs. 42.4%, $p=0.002$)。臨床検査値では、既往有群が既往無群に比較して、血小板数 (11.5万 vs. 15.2万/ μL , $p<0.001$), アルブミン値 (3.9 vs. 4.2 mg/dL, $p<0.001$) は低く、肝線維化マーカーであるFIB-4 index (4.7 vs. 3.0, $p<0.001$), APRI (1.1 vs. 0.7, $p=0.009$), M2BPGi (3.80 vs. 1.78 COI, $p<0.001$), Autotaxin (1.91 vs. 1.50 mg/L, $p<0.001$) はいずれも有意に高かった。また、SVR率は既往有群で有意に低かった (87.4% vs. 96.5%, $p=0.001$)。これらのことより、肝細胞癌既往有群の臨床的特徴としては、高齢で男性に多く、肝線維化がより進展していることが明らか

かになった。肝細胞癌既往有無と各種臨床検査値 (各マーカーのカットオフ値, 血小板 <15.2 万/ μL , アルブミン <4.0 g/dL, FIB-4 index ≥ 3.25 , APRI ≥ 1.0 , M2BPGi ≥ 3.0 COI, Autotaxin ≥ 2.2 mg/L) を用いて、DAAs治療不成功に関連する因子について多重ロジスティック回帰分析を行ったところ、肝細胞癌既往有はDAAs治療不成功に関する独立した因子であった (オッズ比: 3.56, 95%信頼区間: 1.32~9.57, $p=0.01$)。

【結語】 肝細胞癌既往有例の臨床的特徴としては、肝線維化進展が示された。さらに、DAAs治療不成功に関連して、肝細胞癌既往有は独立した有意の因子であった。DAAs治療は病態進展前、特に肝細胞癌を発症する前の出来るだけ早期に治療介入することが望ましいと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

C型肝炎は感染から10年の経過で慢性肝炎、20年で肝硬変へと進展し、30年で肝癌を合併するという慢性的な経過を経ていく疾患である。治療としてインターフェロン (IFN) が用いられていたが、副作用が多くウイルス学的著効 (sustained virological response: SVR) 率は50%程度と十分ではなかった。2014年に登場した直接作用型抗ウイルス剤 (Direct Acting Antivirals: DAAs) 治療では95%以上のSVR率が得られるようになった。実際に長野県におけるDAAs治療成績でも、SVR率は96%と高い治療効果を得ている。しかしながら少数例ではあるがDAAs failure症例 (治療不成功例) が存在する。肝細胞癌の併存がDAAs failureのリスク因子であることは報告されているが、肝細胞癌既往例とDAAs治療効果に関しては未だ検討されていない。2015年4月～2017年10月にDAAs治療を導入した長野県内18施設におけるC型慢性肝炎症例960名の内、データ欠損症例である122名を除外した838名を対象とし、肝細胞癌の既往有群と既往無群の2群に分け、後方視的に患者背景と臨床検査値の比較検討を行った。

その結果、杉浦亜弓は以下の結論を得た。

1. 肝細胞癌既往有例の臨床的特徴としては高齢で男性が多かった。
2. 肝細胞癌既往有例の臨床検査値では血小板低下や肝線維化マーカーの上昇を認め、肝線維化進展が示唆された。
3. 肝細胞癌既往有群は既往無群と比して有意に DAAs failure 率が高かった。
4. DAAs failure に関連する因子の多変量解析を行うと肝細胞癌の既往のみが抽出され、肝細胞癌の既往が DAAs failure に関連する独立した因子である可能性が考えられた。

多数例の検討により、C型慢性肝炎の規治療薬である DAAs 治療に対する治療不成功のリスク因子として、肝細胞癌の既往が挙げられることの報告である。肝細胞癌既往有例では、病態が進行し肝線維化進展が示唆された。また肝細胞癌既往有例では DAAs failure 率が高く、さらに肝細胞癌再発率が高いことから、DAAs 治療は病態進展前、特に肝細胞癌を発症する前の出来るだけ早期に治療介入が望ましいと考えられた。

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

A high-cholesterol diet promotes steatohepatitis and liver tumorigenesis in HCV core gene transgenic mice (高コレステロール食はHCVコア遺伝子トランスジェニックマウスにおける脂肪性肝炎と肝腫瘍の発生を促進させる)

王 暁 経

(論文の内容の要旨)

【Background and Aim】 Previous epidemiological studies have suggested a link between high-cholesterol intake and liver disease progression, including hepatocellular carcinoma (HCC). However, the precise mechanism of hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis caused by excessive cholesterol consumption remains unclear.

【Methods】 We aimed to investigate the impact of dietary cholesterol using hepatitis C virus core gene transgenic (HCVcpTg) mice, which spontaneously developed HCC with age. Male HCVcpTg mice were treated for 15 months with either a control diet or an isocaloric diet containing 1.5 % cholesterol, and liver phenotypes and tumor-associated signaling pathways were evaluated.

【Results】 The high-cholesterol diet-fed HCVcpTg mice exhibited a significantly higher incidence of liver tumors compared with the control diet mice (100 % vs. 41 %, $P < 0.001$). The diet induced steatohepatitis with pericellular fibrosis and evoked higher mRNA expression of pro-inflammatory and pro-fibrotic mediators along with greater oxidative and endoplasmic reticulum stress in the liver. Moreover, long-term consumption of cholesterol-rich diet activated nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and p62/sequestosome 1 (Sqstm1)-nuclear factor erythroid 2

(NRF2) axis, enhanced fibrogenesis, and consequently accelerated hepatic tumorigenesis.

【Conclusion】 These results demonstrate that dietary cholesterol facilitates liver tumorigenesis by inducing steatohepatitis and up-regulating cellular stress and pro-inflammatory NF- κ B and detoxifying p62/Sqstm1-NRF2 signals. Therefore, high dietary cholesterol should be avoided for HCV-infected patients to prevent development of steatohepatitis, liver fibrosis, and HCC.

(論文審査の結果の要旨)

Previous epidemiological studies have suggested a link between high-cholesterol intake and liver disease progression, including hepatocellular carcinoma (HCC). However, the precise mechanism of hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis caused by excessive cholesterol consumption remains unclear.

We aimed to investigate the impact of dietary cholesterol using hepatitis C virus core gene transgenic (HCVcpTg) mice, which spontaneously developed HCC with age. Male HCVcpTg mice were treated for 15 months with either a control diet or an isocaloric diet containing 1.5 % cholesterol, and liver phenotypes and tumor-associated signaling pathways were evaluated.

その結果、王 暁経は以下の結論を得た。

1. The high-cholesterol diet-fed HCVcpTg mice

- exhibited a significantly higher incidence of liver tumors compared with the control diet mice.
- The high-cholesterol diet induced steatohepatitis with pericellular fibrosis and evoked higher mRNA expression of pro-inflammatory and pro-fibrotic mediators along with greater oxidative and endoplasmic reticulum stress in the liver.
 - Long-term consumption of cholesterol-rich diet activated nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and p62/sequestosome 1 (Sqstm1)-nuclear factor erythroid 2 (NRF2) axis, enhanced fibrogenesis, and consequently accelerated hepatic tumorigenesis.
- The present results showed that dietary cholesterol

facilitates liver tumorigenesis by inducing steatohepatitis and up-regulating cellular stress and pro-inflammatory NF- κ B and detoxifying p62/Sqstm1-NRF2 signals. Therefore, high dietary cholesterol should be avoided for HCV-infected patients to prevent development of steatohepatitis, liver fibrosis, and HCC.

これらの結果は、高コレステロール食の長期摂取による肝腫瘍発生促進作用を明らかにし、その分子機構を理解するうえで重要な知見を提示していると考えられた。従って、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Clinical features of IgG4-related periaortitis/periarteritis based on the analysis of 179 patients with IgG4-related disease: a case-control study (IgG4関連疾患179名の解析によるIgG4関連動脈周囲炎の臨床的特徴の解明)

小澤 真希子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 IgG4関連疾患はその発症に自己免疫機序の関与が考えられる全身性の疾患であり、臨床的な特徴として血中IgG4値が上昇すること、画像所見として諸臓器の腫大や結節、肥厚性病変を呈すること、病変局所にIgG4陽性物質細胞浸潤を認めること、ステロイド治療に良好に反応することがあげられる。IgG4関連疾患で大動脈周囲に壁肥厚を認める画像所見を呈するものが指摘され、後腹膜線維症に包括されていたが、胸部大動脈、総腸骨動脈など広範な血管系に壁肥厚が分布する症例の存在も明らかになり、IgG4関連血管病変が想定された。また、2008年以後、原因不明の炎症性大動脈瘤の手術標本でIgG4陽性細胞が多数浸潤しているものがあることが報告されるようになり、病理学的にもIgG4関連動脈病変の存在が明らかになった。これらIgG4関連動脈周囲炎は一般的にステロイド治療に良好な反応を示すが、一方でIgG4関連動脈周囲炎に対するステロイド治療により動脈径の拡張が増大し、動脈瘤を形成した症例も報告されている。今回、IgG4関連動脈周囲炎の頻度、病変の分布、IgG4関連動脈周囲炎発症の危険因子、ステロイド治療後に血管内腔が拡張する危険因子などの同定を目的に本検討を行った。

【対象患者及び方法】 2003年1月1日から2015年12月31日までにIgG4関連疾患と診断された223名を対象と

した。その中で検査所見が不十分であった44名を除外し、179名を対象に解析した。検討方法としては、画像所見上IgG4関連動脈周囲炎がある群とない群で、患者背景、疾患活動性マーカー、IgG4関連疾患の他の合併について比較検討した。次に、ステロイド治療後に血管内腔が拡張した群と拡張しなかった群で、患者背景、疾患活動性マーカーを比較検討した。

【結果】 IgG4関連動脈周囲炎は179例中65例(36.3%)に認められた。動脈周囲炎の病変分布はType 1~5の5種類に分類した。この内、腹部大動脈の腎動脈分岐部以下から総腸骨動脈まで病変が連続しているType 2が29例(44.6%)で最も多かった。また、病変は腹部大動脈の腎動脈分岐部以下に最も多く認めた(>80%)。IgG4関連動脈周囲炎陽性群と陰性群の比較では、診断時の年齢は陽性群で有意に高く、活動性マーカーはIgG、IgG4、免疫複合体、sIL-2Rが陽性群で有意に高値であった。IgG4関連疾患の他臓器病変は動脈周囲炎陽性群で腎病変が有意に多かった。IgG4関連動脈周囲炎陽性群65例の中でステロイド治療を受けたのは43例(66%)であり、治療後、全患者が動脈の壁肥厚の改善を認めたが、一方、9例(21%)で血管内腔が拡張した。ステロイド治療による血管内腔拡張の増悪因子として、単変量解析と多変量解析の両方で治療前の血管内腔拡張が同定された。

【結論】 IgG4関連動脈周囲炎は、腎動脈分岐部以下の

腹部大動脈から総腸骨動脈までに病変が分布するものが多く、動脈周囲炎を伴わないIgG4関連疾患症例に比し、診断時年齢が高く、IgG、IgG4、免疫複合体、sIL-2Rが高値であった。ステロイド治療前に血管内腔が拡張している症例は治療開始後に血管内腔拡張が増悪する危険性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

IgG4関連疾患で大動脈周囲に壁肥厚を認める画像所見を呈するものが指摘され後腹膜線維症に包括されていたが胸部大動脈、総腸骨動脈など広範な血管系に壁肥厚が分布する症例の存在も明らかになり、IgG4関連血管病変が想定された。また2008年以後、原因不明の炎症性大動脈瘤の手術標本でIgG4陽性細胞が多数浸潤しているものがあることが報告されるようになり病理学的にもIgG4関連動脈病変の存在が明らかになった。これらIgG4関連動脈周囲炎は一般的にステロイド治療に良好な反応を示すが一方でIgG4関連動脈周囲炎に対するステロイド治療により動脈径の拡張が増大し動脈瘤を形成した症例も報告されている。今回IgG4関連動脈周囲炎の頻度、病変分布、発症の危険因子、ステロイド治療後の血管内腔拡張の危険因子などについて検討した。

2003年から2015年までにIgG4関連疾患と診断された223名の患者のうち詳細な検討が可能であった179名を対象に解析した。検討方法としてはIgG4関連動脈周囲炎の有無で患者背景、疾患活動性マーカー、IgG4

関連疾患の他の合併症について比較検討した。更にステロイド治療後の血管内腔拡張の有無で患者背景と疾患活動性マーカーを比較検討した。

その結果小澤は次の結論を得た。

1. IgG4関連動脈周囲炎は腹部大動脈の腎動脈分岐部以下に最も多く認められた。
2. IgG4関連動脈周囲炎の有無で比較すると単変量解析では診断時の年齢、IgG、IgG4、免疫複合体、sIL-2Rが有意に高値であり、多変量解析ではIgG高値のみが有意となった。
3. 他臓器病変合併は腎・尿路系の病変が多い傾向が見られた。
4. ステロイド治療を受けた症例全例でIgG4関連動脈周囲炎における動脈壁肥厚は改善したが21%で血管内腔の拡張を認めた。
5. 血管内腔が拡張する危険因子としてステロイド治療前の血管内腔の拡張が同定された。

これらの結果よりIgG4関連動脈周囲炎は腎動脈分岐部以下の腹部大動脈から総腸骨動脈までに病変が分布するものが多く、動脈周囲炎を伴わないIgG4関連疾患症例に比し診断時年齢が高く、IgG、IgG4、免疫複合体、sIL-2Rが高値であった。ステロイド治療前に血管内腔が拡張している症例は治療開始後に血管内腔拡張が増悪する危険性が示唆された。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。

Fluorine-18-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography evaluation in metastatic bone lesions in lung cancer: Possible prediction of pain and skeletal-related events (肺癌骨転移症例のFDG-PET検査における骨関連疼痛の有無および骨関連事象の予測)

五味大輔

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】フルオロデオキシグルコース-ポジトロン放出断層撮影(FDG-PET)検査は、癌の診断、遠隔転移の検索に有用で、病期分類および治療方針の決定のために重要な検査である。癌原発巣におけるFDG-PET検査に関する研究は多数なされているが、転移性骨病変に関するFDG-PETの臨床的意義の報告はされていない。本研究は、肺癌患者における転移性骨病変のFDG取り込みと疼痛や骨関連事象(病的骨折などで手術や放射線治療を必要とする状況)などの臨床経過との関連性を評価するために行った。

【方法】2010年4月から2015年6月までに信州大学医

学部附属病院で診断・治療を受けて、初診診断時に相澤病院ポジトロン断層撮影センターでFDG-PET検査を受けた139名の患者のうち、転移性骨病変を認められた49名の患者(男性27人、女性22人)を後方視的に評価した。肺癌の組織型は非小細胞肺癌42名、小細胞肺癌7名であった。転移性骨病変は合計185個を認め、FDGの取り込み・集積を骨病変ごとに最大標準化取り込み値(SUVmax)を計測して評価した。肺癌原発巣のSUVmaxも測定し、SUVmaxの骨病変/原発巣病変の比率(B/P比)も計算した。診療録から骨転移の疼痛の有無や骨関連事象を評価した。

【結果】骨のSUVmaxおよびB/P比は、骨関連疼痛の

ある患者で、疼痛のない患者に比し有意に高値であった。FDG-PET 検査後の臨床経過において、骨関連事象を生じた患者は、認めない患者と比較しても、同様に骨の SUVmax および B/P 比は有意に高かった。さらに、肺癌原発巣の SUVmax は、非小細胞肺癌と小細胞肺癌患者で同程度であったが、転移性骨病変における SUVmax および B/P 比は、非小細胞性肺癌患者と比較して小細胞性肺癌患者で有意に低値であった。

【結論】 転移性骨病変を有する肺癌患者における FDG-PET 検査は、転移性骨病変の疼痛の有無とその後の骨関連事象の発生を予測するのに有用であることが示唆された。加えて、非小細胞性肺癌患者と小細胞肺癌患者の間で、骨転移病変の SUVmax および B/P 比に統計学的有意差を認めたことから、骨転移部位での生物学的活性に差異がある可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

フルオロデオキシグルコース-ポジトロン放出断層撮影 (FDG-PET) 検査は、癌の診断、遠隔転移の検索に有用で、病期分類および治療方針の決定のために重要な検査である。癌原発巣における FDG-PET 検査に関する研究は多数なされているが、転移性骨病変に関する FDG-PET の臨床的意義の報告はされていない。本研究は、肺癌患者における転移性骨病変の FDG 取り込みと疼痛や骨関連事象 (病的骨折などで手術や放射線治療を必要とする状況) などの臨床経過との関連性を評価するために行った。

2010年4月から2015年6月までに信州大学医学部附属病院で診断・治療を受けて、初診診断時に相澤病院

ポジトロン断層撮影センターで FDG-PET 検査を受けた139名の患者のうち、転移性骨病変を認めた49名の患者 (男性27人, 女性22人) を後方視的に評価した。肺癌の組織型は非小細胞肺癌42名, 小細胞肺癌7名であった。転移性骨病変は合計185個を認め、FDGの取り込み・集積を骨病変ごとに最大標準化取り込み値 (SUVmax) を計測して評価した。肺癌原発巣の SUVmax も測定し、SUVmax の骨病変 / 原発巣病変の比率 (B/P 比) も計算した。診療録から骨転移の疼痛の有無や骨関連事象を評価した。

その結果、五味は次の結論を得た。

1. 有痛性骨病変は非有痛性骨病変に比し、SUVmax, B/P 比で有意に高値を示した。
2. 同様に骨関連事象を生じた骨病変の SUVmax, B/P 比も有意に高値を示した。
3. 原発巣の SUVmax に組織学的な差を認めないものの、小細胞肺癌の骨病変は非小細胞肺癌と比較して、SUVmax, B/P 比ともに有意に低値を示した。

これらの結果より、転移性骨病変を有する肺癌患者における FDG-PET 検査は、転移性骨病変の疼痛の有無とその後の骨関連事象の発生を予測するのに有用であることが示唆された。加えて、小細胞肺癌患者と非小細胞肺癌患者の間で、骨転移病変の SUVmax および B/P 比に統計学的有意差を認めたことから、骨転移部位での生物学的活性に差異があ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。

Do the efficacy and safety of treatment with landiolol, an ultra-short-acting β 1-selective blocker, differ in the urgent management of rapid atrial fibrillation between patients complicated with cardiac versus non-cardiac disease? (非心疾患に合併した頻脈性心房細動に対するランジオロール塩酸塩の有効性および安全性の検討)

上 條 泰

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 現在、頻脈性心房細動 (AF) に対する薬物治療として β 遮断薬、ジギタリス、ジルチアゼムなどが推奨されている。 β 遮断薬であるランジオロール塩酸塩は、 β 1 選択性が高く半減期が極めて短いため、特に緊急時の介入において速効性が期待できる薬剤である。しかし、頻脈性 AF に対する薬物治療のエビデンスは主に心疾患に合併した AF を対象とした研究に基づくものであり、非心疾患に合併した AF に対する

薬物治療の有効性および安全性を評価した報告は少ない。本研究の目的は、非心疾患に合併した AF に対するランジオロール塩酸塩の有効性および安全性を明らかにすることである。

【方法】 2011年1月から2016年10月に信州大学医学部附属病院へ入院し、入院中に生じた心拍数 (HR) 120/分以上の頻脈性 AF に対しランジオロール塩酸塩を使用した症例を対象とし、入院時主病名に基づき「心疾患群」および「非心疾患群」に分け比較検討を

行った（後ろ向き研究）。選定除外基準は、20歳未満、投与中に電気学的除細動を施行または死亡、カルテ記録が不十分、非心疾患群のうち心疾患既往または左室駆出率50%未満とした。評価項目について、有効性評価項目を「ランジオロール塩酸塩の使用開始2時間の時点でHR 110/分以下かつ20%以上減少」、安全性評価項目を「ランジオロール塩酸塩投与による有害事象の発生」、臨床的評価項目を「ランジオロール塩酸塩投与開始後30日以内の全死亡」とした。なお、本研究では心疾患を「心臓に起因する疾患（虚血性心疾患、心不全、弁膜症など）、心臓が病巣となる感染症（感染性心内膜炎、急性心膜炎など）」と定義した。また、術後AFの概念に基づいた分類として、手術中または術後に生じたAFを「手術群」、その他を「非手術群」としてサブグループ解析を行った。

【結果】選択基準を満たした症例は133例（心疾患群55例、非心疾患群78例）であった。年齢、性別、体重につき両群に差はなく、心疾患群で心疾患を既往に持つ症例は35.6%であった。ランジオロール塩酸塩投与前に使用していた薬剤で、ループ利尿薬、ACE-I/ARB、硝酸剤、 β 遮断薬、ジギタリス、アミオダロン、スタチン、ドブタミンが心疾患群で多く使用されていた。

有効性の評価：全体で非心疾患群と心疾患群で有効率に有意差があり（58.2%, $n=32$ vs. 35.9%, $n=28$; $P=0.02$ ）、非手術群における有意差は特に顕著であった（58.2%, $n=23$ vs. 35.9%, $n=7$; $P<0.05$ ）。両群ともランジオロール塩酸塩の投与により心拍数は有意に低下し（心疾患群：投与前 145 ± 17 /分、投与後 103 ± 22 /分、 $P<0.001$ ；非心疾患群：投与前 145 ± 18 /分、投与後 114 ± 23 /分； $P<0.001$ ）、心疾患群は非心疾患群に比べて心拍数がより低下した（27.2 \pm 16.8% vs. 20.9 \pm 12.4%； $P=0.04$ ）。血圧は収縮期、拡張期ともにランジオロール塩酸塩投与前後で明らかな変化はなかった。ランジオロール塩酸塩投与開始2時間以内に洞調律に復帰した例、ランジオロール塩酸塩の投与量や投与時間は両群に差はなかった。頻脈性AFに対するランジオロールの有効性との関連性につきロジスティック回帰分析に基づき多変量解析を行い、独立因子として抽出された項目は心疾患（OR, 2.877；95% CI, 1.216-6.807； $P=0.02$ ）、術後（OR, 2.753；95% CI, 1.239-6.118； $P=0.02$ ）、CRP（C反応蛋白）値上昇（OR, 0.958；95% CI, 0.920-0.997； $P=0.04$ ）の3つであった。

安全性の評価：有害事象の発生は両群ともわずかであった（5.45%, $n=3$ vs. 2.17%, $n=2$ ； $P=0.288$ ）。

臨床的評価：ランジオロール塩酸塩の無効と30日死亡との関連性につき多変量Cox回帰モデルを使用し評価したところ、両者に強い関連性を認めた（ハザード比, 5.043；95% CI, 1.516-16.777； $P<0.01$ ）。

【結語】ランジオロール塩酸塩は、非心疾患を合併した頻脈性AFに対し安全かつ速やかに心拍数を低下させ、全身炎症に気をつければより効果的に心拍数を制御できるかもしれない。ランジオロール塩酸塩の無効が予後に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

現在、頻脈性心房細動（AF）に対する薬物治療として β 遮断薬、ジギタリス、ジルチアゼムなどが推奨されている。 β 遮断薬であるランジオロール塩酸塩は、 β_1 選択性が高く半減期が極めて短いため、特に緊急時の介入において速効性が期待できる薬剤である。しかし、頻脈性AFに対する薬物治療のエビデンスは主に心疾患に合併したAFを対象とした研究に基づくものであり、非心疾患に合併したAFに対する薬物治療の有効性および安全性を評価した報告は少ない。今回、非心疾患に合併したAFに対するランジオロール塩酸塩の有効性および安全性を後方視的に評価した。

2011年1月から2016年10月に信州大学医学部附属病院へ入院し、入院中に生じた心拍数（HR）120/分以上の頻脈性AFに対しランジオロール塩酸塩を使用した症例を対象とし、入院時主病名に基づき「心疾患群」および「非心疾患群」に分け比較検討を行った。有効性評価項目を「ランジオロール塩酸塩の使用開始2時間の時点でHR 110/分以下かつ20%以上減少」、安全性評価項目を「ランジオロール塩酸塩投与による有害事象の発生」、臨床的評価項目を「ランジオロール塩酸塩投与開始後30日以内の全死亡」とした。

その結果、上條 泰は以下の結果を得た。

1. 心疾患群、非心疾患群ともにランジオロール塩酸塩の投与により心拍数は有意に低下していた（心疾患群：投与前 145 ± 17 /分、投与後 103 ± 22 /分、 $P<0.001$ ；非心疾患群：投与前 145 ± 18 /分、投与後 114 ± 23 /分； $P<0.001$ ）。
2. 心疾患群と非心疾患群でランジオロール塩酸塩の有効率に有意差がみられた（58.2%, $n=32$ vs. 35.9%, $n=28$ ； $P=0.02$ ）。
3. 頻脈性AFに対するランジオロールの有効性と強い関連性が認められたものは、心疾患（OR, 2.877

- ; 95 % CI, 1.216-6.807; P=0.02), 手術後 (OR, 2.753; 95 % CI, 1.239-6.118; P=0.02), CRP (C反応蛋白) 値上昇 (OR, 0.958; 95 % CI, 0.920-0.997; P=0.04) の3項目であった。
- 有害事象の発生は両群ともわずかであった (5.45 %, n=3 vs. 2.17 %, n=2; P=0.288)。
 - ランジオロール塩酸塩の無効と30日死亡との間に強い関連性を認めた (ハザード比, 5.043; 95 % CI,

1.516-16.777; P<0.01)。

これらの結果より, ランジオロール塩酸塩は非心疾患を合併した頻脈性 AF に対し安全かつ速やかに心拍数を低下させ, 全身炎症に気をつければより効果的に心拍数を制御できる可能性があること, ランジオロール塩酸塩の無効が予後に影響を及ぼす可能性があることを示唆している。よって, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Clinical features and new diagnostic criteria for the syndrome of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (PFAPA) (周期性発熱・アフタ性口内炎・咽頭炎・頸部リンパ節炎症候群 (PFAPA) の臨床学的特徴と新診断基準)

竹内 勇介

(論文の内容の要旨)

【背景】周期性発熱・アフタ性口内炎・咽頭炎・頸部リンパ節炎症候群 (PFAPA) は, 口内炎, 頸部リンパ節炎, 扁桃炎・咽頭炎を伴う発熱発作を反復する原因不明の自己炎症性疾患である。PFAPA は1987年に Marshall らによって1987年に初めて報告され, 1989年に PFAPA と命名された。PFAPA は5歳以下に発症することが多く, 月1回1週間以内の高熱を反復し, CRP などの炎症検査所見が極めて高値になる。随伴症状も特徴的で, 白苔を伴う扁桃炎/咽頭炎, 口内炎, 圧痛を伴う頸部リンパ節炎, 咽頭痛, 嘔吐, 頭痛などを随伴する。家族歴を有する症例が約半数にみられ, 浸透率の低い常染色体優性遺伝が示唆されるが, 原因遺伝子の同定には至っておらず, なぜ周期的に発熱するのかは不明である。1999年に Thomas らによって提唱された診断基準は, スクリーニングには有用であるが, 感染症の反復などとは区別ができず, PFAPA の確定診断には不十分である。

【目的】PFAPA 患者の臨床的特徴を明らかにし, 臨床的に有用な PFAPA における新診断基準を作成する。

【対象と方法】2000年4月から2018年4月まで信州大学病院や関連施設において, Marshall らや Thomas らの診断基準を参考に, 長期的に診療した結果, PFAPA と診断した日本人257名 (男児143名, 女児114名) を対象とした。PFAPA 患者の臨床所見や検査結果は, カルテ記載を基に後方視的に検討した。PFAPA 患者の発熱時の好中球表面 CD64 の発現は, 抗 CD64 抗体を用いて FACS Calibur cytometer で測定した。血清サイトカインについては, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α ,

IFN- γ , IP-10, MIG は BD Cytometric Bead Array により, IL-18は, ELISA により測定した。

PFAPA 新診断基準については, Thomas の診断基準や我々の臨床症状, 検査結果などをもとに, 臨床において鑑別が重要となる感染症例 (n=104) と, *MEFV* の exon10 に M694I 変異を有する家族性地中海熱 (n=67) を対象として検討した。

【結果】

1. PFAPA 患者257例の平均発症年齢は 2.7 ± 1.6 歳で, 90.1% は5歳以下での発症であった。発熱周期は 1.2 ± 0.8 か月, 最高体温は 39.7 ± 0.6 °C で, 発熱期間は 4.5 ± 1.3 日であった。

2. PFAPA 患者の62% で反復性発熱や慢性扁桃炎, 扁桃摘出歴の家族歴を有した。

3. 咽頭炎/扁桃炎は238人中251人 (94.8%) にみられ, そのうち白苔を伴う扁桃炎は226人中163人 (72.1%) にみられた。圧痛を伴う頸部リンパ節炎は252人中147人 (58.3%) に, 口内炎は251人中130人 (51.8%) にみられた。また, 咽頭痛は45.4%, 嘔吐は21.4%, 頭痛は33.6% にみられた。

4. PFAPA の発作中の WBC は $12,500 \pm 4,700/\mu\text{l}$, CRP は $6.7 \pm 4.6\text{mg/dl}$, 血清アミロイド A は $669.2 \pm 449.8\mu\text{g/ml}$ であり, 非発作時には陰性化した。血清 IgD は199人中72人で上昇 (36.2%) で上昇がみられた ($23.0 \pm 12.2\text{mg/dl}$)。

5. 治療効果については, シメチジン内服では95人中49人 (51.6%) が, 発作時プレドニゾロン頓用内服は全例で, 扁桃摘出は29人中25人 (86.2%) で有効であった。

6. PFAPA 発作時には, IL-6, IL-8, IL-18,

TNF- α , IFN- γ , G-CSF, IP-10, MIG, MCP-1の上昇が認められ、特にIFN- γ は、正常コントロールや細菌感染症では検出感度未満であったが、PFAPA発作時のみ 17.8 ± 21.1 pg/mlと上昇が認められた。

7. 好中球表面CD64発現は、PFAPA発作時、正常コントロール、細菌感染症でそれぞれ $11,421.1 \pm 8421.1$, $1,384.5 \pm 642.9$, $4,455.0 \pm 1,304.9$ とPFAPA発作時に著明に亢進していた。

8. PFAPA新診断基準は、「8日未満の繰り返す発熱」を必須項目とした。発熱の回数は、感染症例との検討で、年間3回の発熱で感度99.2%・特異度67.3%、年間4回の発熱で感度98.0%・特異度80.8%であったため、「少なくとも4回」とした。副項目は、4項目該当時での感染症との比較による感度・特異度はそれぞれ93.8%・94.2%、家族性地中海熱との比較では93.8%・95.6%で、5項目該当時で、両者と感度・特異度はそれぞれ80.2%・100%であった。

9. 本研究でのThomas基準による感度・特異度は、感染症との比較で81.7%・87.0%、家族性地中海熱との比較で81.7%・100%であった。

【考察】本研究では、PFAPA患者257例における臨床像、検査結果、家族歴、治療反応性を解析し、さらに、鑑別疾患で重要となる感染症と家族性地中海熱と比較し、PFAPAの新診断基準を検討した。PFAPA患者における発作時の好中球表面CD64の高発現は、ウイルス感染症や、細菌感染症や家族性地中海熱との鑑別に有用である可能性が、また、血清IFN- γ の上昇は、T細胞やNK細胞による産生亢進によると報告されており、それらの細胞が発作の病態に関与している可能性が示唆された。PFAPAの新診断基準では、一般臨床で重要となる感染症との識別に最も適切な発作回数は4回であった。PFAPAは初期にはすべての臨床症状を満たさない例もあるため、副項目該当数については、4項目を満たした時点でPFAPAを疑い、5項目を満たした場合、PFAPAと確定診断することで、感染症と家族性地中海熱とを十分な感度・特異度で識別できることが示された。新診断基準では、従来のThomas基準と比較し、感度は副項目数が4項目で、特異度は5項目で同等ないしは優れており、本研究においてPFAPAの新診断基準として提案した。

(論文審査の結果の要旨)

周期性発熱・アフタ性口内炎・咽頭炎・頸部リンパ節炎症候群 (PFAPA) は、口内炎、頸部リンパ節炎、

扁桃炎・咽頭炎を伴う発熱発作を反復する原因不明の自己炎症性疾患である。PFAPAは5歳以下に発症することが多く、月1回1週間以内の高熱を反復し、CRPなどの炎症検査所見が極めて高値になり、白苔を伴う扁桃炎/咽頭炎、口内炎、圧痛を伴う頸部リンパ節炎、咽頭痛、嘔吐、頭痛などの特徴的な所見を随伴する。家族歴を有する症例が約半数にみられ、浸透率の低い常染色体優性遺伝が示唆されるが、原因遺伝子の同定には至っておらず、なぜ周期的に発熱するのかは不明である。1999年にThomasらによって提唱された診断基準は、スクリーニングには有用であるが、感染症の反復などとは区別ができず、PFAPAの確定診断には不十分である。

PFAPA患者の臨床的特徴を明らかにし、臨床的に有用なPFAPAにおける新診断基準を作成した。

その結果、竹内らは次の結論を得た。

1. PFAPA患者257例の平均発症年齢は 2.7 ± 1.6 歳で、90.1%は5歳以下での発症であった。発熱周期は 1.2 ± 0.8 か月、最高体温は 39.7 ± 0.6 ℃で、発熱期間は 4.5 ± 1.3 日であった。
2. PFAPA患者の62%で反復性発熱や慢性扁桃炎、扁桃摘出歴の家族歴を有した。
3. 咽頭炎/扁桃炎は238人中251人(94.8%)にみられ、そのうち白苔を伴う扁桃炎は226人中163人(72.1%)にみられた。圧痛を伴う頸部リンパ節炎は252人中147人(58.3%)に、口内炎は251人中130人(51.8%)にみられた。また、咽頭痛は45.4%、嘔吐は21.4%、頭痛は33.6%にみられた。
4. PFAPAの発作中のWBCは $12,500 \pm 4,700/\mu\text{l}$ 、CRPは 6.7 ± 4.6 mg/dl、血清アミロイドAは 669.2 ± 449.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、非発作時には陰性化した。血清IgDは199人中72人で上昇(36.2%)で上昇がみられた(23.0 ± 12.2 mg/dl)。
5. 治療効果については、シメチジン内服では95人中49人(51.6%)が、発作時プレドニゾロン頓用内服は全例で、扁桃摘出は29人中25人(86.2%)で有効であった。
6. PFAPA発作時には、IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, IP-10, MIG, MCP-1の上昇が認められ、特にIFN- γ は、正常コントロールや細菌感染症では検出感度未満であったが、PFAPA発作時のみ 17.8 ± 21.1 pg/mlと上昇が認められた。
7. 好中球表面CD64発現は、PFAPA発作時、正常コントロール、細菌感染症でそれぞれ $11,421.1$

± 8421.1 , $1,384.5 \pm 642.9$, $4,455.0 \pm 1,304.9$ と PFAPA 発作時に著明に亢進していた。

8. PFAPA 新診断基準は、「8日未満の繰り返す発熱」を必須項目とした。発熱の回数は、感染症例との検討で、年間3回の発熱で感度99.2%・特異度67.3%、年間4回の発熱で感度98.0%・特異度80.8%であったため、「少なくとも4回」とした。副項目は、4項目該当時での感染症との比較による感度・特異度はそれぞれ93.8%・94.2%、家族性地中海熱との比較では93.8%・95.6%で、5項目該当時で、両者と感度・特異度はそれぞれ80.2%・100%であった。

9. 本研究での Thomas 基準による感度・特異度は、感染症との比較で81.7%・87.0%、家族性地中海熱との比較で81.7%・100%であった。

本研究から、PFAPA 患者における発作時の好中球表面 CD64の高発現は、ウイルス感染症や、細菌感染

症や家族性地中海熱との鑑別に有用である可能性が、また、血清 IFN- γ の上昇は、T細胞やNK細胞が発作の病態に関与している可能性が示唆された。PFAPA の新診断基準では、一般臨床で重要となる感染症との識別に最も適切な発作回数は4回が適切であった。副項目該当数については、4項目を満たした時点で PFAPA を疑い、5項目を満たした場合、PFAPA と確定診断することで、感染症と家族性地中海熱とを十分な感度・特異度で識別できることが示された。新診断基準では、従来の Thomas 基準と比較し、感度は副項目数が4項目で、特異度は5項目で同等ないしは優れており、新たな PFAPA の診断基準として、広く日常臨床に利用されることが期待され、PFAPA 患者の早期診断や、PFAPA 患者の QOL を大きく改善する基準であると考え、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。

NLRP3 upregulation in A549 cells co-cultured with THP-1 macrophages under hypoxia via deregulated TGF- β signaling (低酸素環境下で THP-1マクロファージと共培養した A549細胞における TGF- β 経路を介した NLRP3発現増加)

古川 聖美

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】NLRP3は、マクロファージや線維芽細胞、上皮細胞など様々な細胞で発現が確認されており、ASC や caspase-1と共にインフラマソームを構成し、IL-1 β の成熟を介して炎症に関与する。一方で、インフラマソーム非依存的な働きとしてNLRP3がTGF- β 経路を制御し線維化に関与するという報告もある。当教室では、ヒトII型肺胞上皮細胞(A549細胞)とヒト単球由来 THP-1マクロファージを低酸素環境で共培養することで、IL-1 β やTGF- β 1を介して、A549細胞の上皮間葉転換(EMT)が促進することを報告している。本研究では、低酸素環境下でTHP-1マクロファージと共培養したA549細胞のNLRP3発現が増加する機序を解析した。

【材料および方法】ヒトII型肺胞上皮細胞由来のA549細胞とヒト単球由来のTHP-1細胞をPMAで刺激し、マクロファージに分化させた細胞を使用した。共培養は6well plateにA549細胞を播種し、上清のみが通過できる1 μ mの穴の開いたインサートにTHP-1マクロファージを播種し、普通酸素(21%)または低酸素(1%)で24時間培養した。

【結果】A549細胞を低酸素環境下でTHP-1マクロファージと24時間共培養したところ、A549細胞のNLRP3発現量が有意に増加した。しかし、IL-1 β の分泌量は通常酸素と低酸素で変化はなかった。また、IL-1 β の阻害剤であるIL-1R antagonistを用いたところ、NLRP3発現誘導にIL-1 β は関与していなかった。次にNLRP3発現へのTGF- β 経路の関与を検討した。上清中のTGF- β 1量は共培養で増加したが、通常酸素と低酸素では変化はなかった。しかし、siRNAを用いてA549細胞とTHP-1マクロファージのTGF- β 1の発現抑制したところ、低酸素環境下での共培養により増加したA549細胞のNLRP3の発現量は抑制された。A549細胞のTGF- β 1への感受性が高まっている可能性が考えられたため、TGF- β 1受容体(TGFBR1とTGFBR2)の発現量を検討したところ、TGFBR1は低酸素刺激と共培養で増加したA549細胞でより発現量が増加していた。TGFBR1の阻害剤であるSB431542を添加したA549細胞では、NLRP3の発現量が抑制された。また、TGF- β 1経路の抑制因子であるSMAD7の発現量が低酸素状況下の共培養で減少していた。TGF- β 1経路の主流はSMAD2/3のリン酸化による経路だが、

SMAD3の阻害剤である SIS3では、NLRP3の発現増加は抑制されなかった。一方で、SMAD非依存的な経路である p38 MAPK の阻害剤である SB203580によって、NLRP3の発現増加が抑制された。

【考察】本研究の結果から、低酸素環境で THP-1マクロファージと共培養した A549細胞では、TGF- β 1/p38 MAPK 経路を介して NLRP3の発現が誘導されることが示唆された。TGFBR1の増加および SMAD7の減少を伴っていることから、低酸素環境で共培養することで、A549細胞の TGF- β 1に対する感受性が増加していると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

NLRP3は、マクロファージや線維芽細胞、上皮細胞など様々な細胞で発現している。インフラマソームを構成し、IL-1 β の成熟を介して炎症に関与する。インフラマソーム非依的に、NLRP3が TGF- β 経路を制御し線維化に関与するという報告もある。病態解析診断学教室では、ヒトII型肺胞上皮細胞 (A549細胞) とヒト単球由来 THP-1マクロファージを低酸素環境で共培養することで、IL-1 β や TGF- β 1を介して、A549細胞の上皮間葉転換 (EMT) が促進することを報告している。今回、低酸素環境下で THP-1マクロファージと共培養した A549細胞の NLRP3発現が増加する機序を解析した。

ヒトII型肺胞上皮細胞由来の A549細胞と、ヒト単球由来の THP-1細胞を PMA で刺激しマクロファージに分化させた細胞を使用。共培養は6well plate に A549細胞を、上清のみが通過できる 1 μ m の穴の開いたインサートに THP-1マクロファージを播種し、普通酸素 (21%) または低酸素 (1%) で24時間培養後、A549の mRNA やタンパクおよび上清中のサイトカインについて解析した。

その結果、古川は次の結果を得た。

1. A549細胞を低酸素環境下で THP-1マクロファージと24時間共培養により、A549細胞の NLRP3発現

量が有意に増加した。

2. IL-1 β の分泌量は通常酸素と低酸素で変化はなく、IL-1 β の阻害剤では NLRP3の発現は抑制されなかった。
3. 上清中の TGF- β 1量は共培養で増加したが、通常酸素と低酸素では変化はなかった。しかし、A549細胞と THP-1マクロファージの TGF- β 1を発現抑制により、A549細胞の NLRP3の発現量は抑制された。
4. A549細胞の TGF- β 1への感受性が高まっている可能性が考えられたため、TGF- β 1受容体 (TGFBR1 と TGFBR2) の発現量を検討した。低酸素下での THP-1マクロファージとの共培養で TGFBR1 と TGFBR2発現量が上昇していたが、TGFBR2は他の条件でも同程度増加していたことから、NLRP3発現誘導への関与は否定的であった。一方で、TGFBR1は低酸素下で共培養した A549細胞でより発現量が増加していた。TGFBR1の阻害剤である SB431542を添加により、NLRP3の発現量が抑制された。
5. TGF- β 1経路の抑制因子である SMAD7の発現量が低酸素下の共培養により、減少した。
6. TGF- β 1経路の下流シグナルについて、SMAD3の阻害剤である SIS3では、NLRP3の発現増加は抑制されなかった。一方で、p38 MAPK の阻害剤である SB203580によって、NLRP3の発現増加が抑制された。

これらの結果から、低酸素環境で THP-1マクロファージと共培養した A549細胞では、SMAD7の減少および TGFBR1の増加により、TGF- β 1に対する感受性が増加し、TGF- β 1/p38 MAPK 経路を介して NLRP3の発現が誘導され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。

Organ accumulation and carcinogenicity of highly dispersed multi-walled carbon nanotubes administered intravenously in transgenic rasH2 mice (遺伝子改変 rasH2マウスを用いた高分散した多層カーボンナノチューブの静脈内投与による臓器集積と発癌性評価)

傍 島 淳

(論文の内容の要旨)

【背景】多層カーボンナノチューブ (Multi walled carbon nanotubes: MWCNTs) はその優れた機械的

特性や電気的特性から様々な製品に応用されている。MWCNTsを、drug delivery system (DDS), imaging, 再生医療の足場材などの生体材料として用いよ

うとの試みがある。しかし現時点でMWCNTsが臨床応用されていない理由は、MWCNTsがアスベストに似た繊維状ナノ粒子であり、循環系に入ったMWCNTsが他臓器に移動し腫瘍を誘導する可能性に関しての安全性が確認されていないことである。本研究ではMWCNTsを遺伝子改変発癌性rasH2マウスに静脈内投与し、内臓臓器への集積と腫瘍誘導の有無を調査した。

【方法】MWCNTsを遺伝子改変発癌性rasH2マウスに静脈内投与し、毎週死亡・衰弱の確認と体重測定を実施した。また最終評価の26週後に犠牲にして、規定された全ての臓器の組織評価と採血検査を行い、MWCNTsの存在と腫瘍の有無を調べた。評価したMWCNTsは、ThinとThickの2種類で、それぞれhigh dose（体重1kgあたり0.7mg）群、low dose（体重1kgあたり0.07mg）群の2群ずつ作製し、分散液と超音波分散機により現在の技術で最も高度に分散させて静脈内投与した。negative control群はpoly-sorbate 80単独群（Vehicle群）を用いた。

【結果】全ての群の平均体重の変化は有意差はなかった。組織学的所見で肺には全ての群で腫瘍の発生を認めたが、群間に有意差を認めなかった。Vehicle群の1例で胸膜由来と考える中皮腫を発生したがそれ以外は全て腺腫であった。次に腫瘍が多く発生していたのは脾臓で、Thick-MWCNTs（high dose）以外で腫瘍を認めた。肺と同様に、脾臓でも群間に有意差はなかった。その他には胃でVehicleとThick-MWCNTs（low dose）に1匹ずつ腫瘍が認められ、いずれも群間に有意差を認めなかった。これらの腫瘍を発生した部位にMWCNTsがあるかを観察したが、いずれの部位にも存在しなかった。Vehicle群と比較して、2種類のMWCNTsを2用量で投与した全ての群の各臓器の腫瘍発生数に、有意な差はなかった。脾臓ではThin-MWCNTs（high dose）群の2匹で、解剖時に外観からMWCNTの沈着が認められた。2匹ともMWCNTsの沈着は認めるものの、腫瘍は形成していなかった。全てのマウスのその他の臓器の組織標本にMWCNTsの沈着は認めなかった。

【考察】MWCNTsの投与量は、1kgあたりではhigh dose群で0.7mg、low dose群で0.07mgと過去の報告と比較してかなり多い量であるが、MWCNTsの集積を認めたのは2臓器と少なかった。本研究では現在の最も高度と考えられる技術を用いてMWCNTsを十分分散させたため、MWCNTsの凝集体が少なかっ

た。このため、これまでの静脈投与実験に比較して、臓器への集積が少なかったと考える。現在の技術を用いればMWCNTsを静脈内投与しても不要な臓器への集積することなく、DDSやimagingに活用できることを示すことができた。発癌性評価の結果は、2種類のMWCNTs群、Vehicle群のいずれにも、肺、胸腺、脾臓、胃、会陰に腫瘍を生じたマウスがいたが統計学的な有意差はなく、いずれの臓器においてもMWCNTsによる腫瘍発生はなかった。腫瘍を認めた組織標本は詳細に検討されたが、MWCNTsはいずれの標本にも認められなかった。高度に分散されたMWCNTsを遺伝子改変発癌性マウスに投与するという、最も過酷な評価方法で腫瘍が発生しなかったことは重要な結果である。少なくとも本研究で用いた体重1kgあたり約0.7mg以下のMWCNTsを十分に分散させて静脈内注射を行えば、体内で腫瘍を発生する可能性が極めて低いことが明らかになった。

【結論】循環系に入った高分散したMWCNTsの最も過酷な発癌性評価として、遺伝子改変発癌性rasH2マウスを用いて静脈内投与試験を初めて行った。一部の個体にMWCNTsの脾臓への集積を認めたが、全ての臓器で腫瘍の発生率は増加しなかった。高分散したMWCNTsを静脈内投与しても発癌する可能性は少ないと考える。本研究の結果は、MWCNTsの吸い込みによる循環系への移動や、癌治療薬のDDSや病変部のimagingなど生体材料として用いる際の、臓器への集積と発癌性の評価に重要な情報を提供する。

（論文審査の結果の要旨）

多層カーボンナノチューブ（Multi walled carbon nanotubes: MWCNTs）は生体材料として用いる試みがあるが、循環系に入ったMWCNTsが他臓器に移動し腫瘍を誘導する可能性に関しての安全性が確認されていない。MWCNTsを遺伝子改変発癌性rasH2マウスに静脈内投与し、臓器への蓄積と腫瘍誘導の有無、血液検査を調査した。MWCNTsを超音波分散機で分散させ、7週齢のオスのrasH2マウスの静脈内に投与した。MWCNTsの形状、濃度の違いにより、以下の4群を作成した。Thin（low dose）群、Thin（high dose）群、Thick（low dose）群、Thick（high dose）群である。negative control群として分散剤単独（Vehicle）群を用いた。術後安楽死させた後に解剖を行い、光学顕微鏡にて組織学的評価で腫瘍の有無を確認した。

その結果、傍島 淳は以下の成績を得た。

1. 肺は全ての群で腫瘍の発生を認めた。脾臓では Thick (high dose) 以外で腫瘍を認めた。胃で Vehicle 群と Thick (low dose) 群に1匹ずつ腫瘍が認められ、会陰に Thin (low dose) 群と Thick (high dose) 群で1匹ずつ腫瘍を認めた。いずれの臓器も腫瘍発生部位に MWCNTs は存在しなかった。Vehicle 群と比較して2種類の MWCNTs を2用量で投与した全ての群の各臓器の腫瘍発生数に有意差はなかった。
2. 膀胱で Thin (high dose) 群の2匹で MWCNTs の沈着は認められた。その周囲に腫瘍は形成していなかった。全てのマウスの他の臓器の組織標本で MWCNTs の沈着は認めなかった。

3. 血液検査で、MCV と MCHC の値が Vehicle 群と比較して、MWCNTs 群全てで有意に高かった。その他の血液検査では各群間で有意差はなかった。
 4. サイトカインの計測では Eotaxin が Vehicle 群と比較して、MWCNTs 群全てで有意に高値であった。その他のサイトカインでは有意差はなかった。
- 以上の結果より、本研究で用いた体重 1 kg あたり 0.7 mg 以下の MWCNTs を十分に分散させて静脈内注射を行えば、体内で腫瘍を発生する可能性が極めて低いことが明らかになった。このことは、MWCNTs を生体材料として用いる際の安全性に関して重要な示唆を与えるものであり、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。

Cecal tumorigenesis in AhR-deficient mice depends on cecum-specific MAPK pathway activation and inflammation (AhR ノックアウトマウスの回盲部における腫瘍発生は回盲部に特異的な MAPK 経路の活性化と炎症反応に依存する)

的 場 久 典

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Aryl hydrocarbon receptor (AhR) はダイオキシン受容体として知られる転写因子である。近年、AhR ノックアウトマウスの回盲部に、炎症反応と Wnt/ β -カテニン経路の活性化を伴いながら腫瘍が発生することが報告された。しかし、AhR 依存性の β -カテニンの分解に関して、いくつかのグループにより相反する結果が報告された。AhR ノックアウトマウスの回盲部における腫瘍発生に関与する Wnt/ β -カテニン経路以外の経路を明らかにするために、我々は、腫瘍の形態学的な特徴、腫瘍および腹腔マクロファージにおけるサイトカイン・ケモカインの産生などについて検討した。また我々は、ヒトの大腸癌における AhR の発現についても検討した。

【材料および方法】 C57BL/6マウスを普通飼育室で飼育した。28匹の AhR ノックアウトマウス、23匹の野生型マウス、12匹の AhR と ASC のダブルノックアウトマウス、16匹の ASC ノックアウトマウスについて、最大50週齢まで飼育して解析を行った。これらのマウスの終末回腸～直腸について、ホルマリン固定してパラフィンブロックを作成し、HE 染色標本を作製して形態学的に解析した。必要に応じて種々の免疫染色を行った。AhR ノックアウトマウスの病変部および野生型マウスの回盲部から total RNA を抽出し、種々の分子の発現について定量 PCR を用いて解析し

た。AhR ノックアウトマウスおよび野生型マウスのチオグリコレート誘導腹腔マクロファージを調製し、LPS と ATP の刺激の際のまたは種々の細菌を培養系に投与した際のサイトカイン・ケモカインの産生を測定した。ヒトの大腸癌を adenoma-carcinoma sequence と sessile serrated pathway に由来するものに分類し、それぞれの前駆病変も含めて AhR の発現について免疫染色を用いて解析した。

【結果】 50週齢までに28匹中10匹の AhR ノックアウトマウスの回盲部に病変が発生したが、発生率は先行研究と比較して大きく低下していた。病変はヒトの大腸の鋸歯状病変に類似した過形成性病変から腫瘍性病変へと進展するものであり、前者の段階から病変部にマクロファージ・好中球の浸潤を認めた。増殖能を表す Ki-67の陽性細胞は、病変部において腺管の底部から表層の方向に増加していた。先行研究と異なり、 β -カテニンの免疫染色では病変部での強染・核移行は認めなかった。AhR ノックアウトマウスの病変部では、*Il-1 β* 、*Il-6*、*Ccl2*、*Cxcl5*などのサイトカイン・ケモカインの発現が上昇していたが、*c-Myc* の発現上昇は認めなかった。興味深いことに、病変部において Erk, Src, EGF 受容体のリン酸化の亢進と *Amphiregulin* の発現上昇を認めた。AhR ノックアウトマウスの腹腔マクロファージを LPS と ATP で刺激した際には、野生型マウスのもものと比較して IL-6のみ産生の亢

進を認めた。ヒトの大腸の鋸歯状病変においては、AhR ノックアウトマウスの病変との形態学的な類似性にもかかわらず、上皮細胞における AhR の発現は上昇していた。

【結論】我々の結果は、AhR ノックアウトマウスの回盲部の病変の発生率、形態学的特徴、発生に関わるシグナル伝達経路を明らかにし、病変の発生の新たな機序を提示したものと考える。施設間の環境変化に伴う腸内細菌叢の変化が、AhR ノックアウトマウスにおける炎症反応に対する感受性やマクロファージの機能に変化をもたらし、腫瘍発生率の低下・腫瘍発生の遅延などをもたらした可能性が示唆される。

(論文審査の結果の要旨)

AhR ノックアウトマウスでは回盲部に腫瘍が自然発生し、腫瘍発生には 1) Wnt/ β -カテニン経路の活性化と IL-1 β ・IL-6 の発現上昇および Stat3 のリン酸化を伴う炎症反応の 2 つの経路が関与すること、2) 腸内細菌叢による炎症反応が腫瘍発生に重要であること、が報告されている。本研究では、腫瘍の形態学的特徴や、腸内細菌叢が腫瘍発生を促進する機序などについて解析した。

その結果、的場久典は次の結論を得た。

1. 28匹の AhR ノックアウトマウスのうち10匹に病変が発生し、先行研究と比較して発生率は低下していた。病変は過形成性病変から腫瘍性病変へと進展し、前者の段階からマクロファージ・好中球を主体とする炎症細胞浸潤を伴っていた。Ki-67 に対する免疫染色では病変の進展に伴い陽性細胞が腺管の底部から表層の方向に増加していた。 β -カテニンに対

する免疫染色では病変部で強染・核移行は認めなかった。

2. AhR ノックアウトマウスの病変部と野生型マウスの回盲部から total RNA を抽出し、定量 PCR で解析した。炎症性サイトカイン IL-1 β , IL-6 や、ケモカイン CCL2, CXCL5 などの発現が上昇していた。
3. AhR ノックアウトマウスの病変部で活性化しているシグナル伝達経路について免疫染色により解析した。病変部では、Erk, Src, EGF 受容体のリン酸化が亢進していた。定量 PCR による解析では病変部でアンフィレギュリンの発現上昇を認めた。
4. チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージ (M ϕ) におけるサイトカイン・ケモカインの産生について調べた。AhR ノックアウトマウスの M ϕ では野生型マウスの M ϕ と比較して、LPS 単独または LPS と ATP による刺激の際の IL-6 の産生が亢進していた。
5. 免疫染色によりヒトの大腸癌における AhR の発現について解析した。Adenoma-carcinoma sequence においても sessile serrated pathway においても、背景粘膜→前駆病変→大腸癌と進展するにつれて AhR の発現は亢進していた。

以上より、AhR ノックアウトマウスの病変の形態学的特徴が明らかになり、先行研究とは異なり MAPK 経路の活性化が腫瘍発生に重要であることが示された。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

A new technique to determine the tension in extensor pollicis longus reconstruction (長母指伸筋腱再建における、緊張度決定の新たな手法)

鴨 居 史 樹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】長母指伸筋腱断裂の治療には、腱移植や腱移行が行われる。腱移植では移植した長掌筋腱を橋渡しして力源には本来の長母指伸筋が使用され、腱移行では示指伸筋腱が力源として使用される。腱移植と腱移行の臨床結果は同等であると報告されている。長母指伸筋腱再建の良好な結果を得るには、再建時の適切な腱の緊張度が重要である。我々は、長母指伸筋腱断裂に対して、新たな緊張度決定の手法を行ったので報告する。

【対象および方法】対象は2006年～2014年の間に再建術を行った長母指伸筋腱断裂患者のうち、関節症性変化を認めない症例を対象とした。3人の術者によって手術が行われた。長掌筋腱を用いた腱移植は、受傷後3か月以内で術中に長母指伸筋の断端を近位に引いてその滑走距離が1 cm 以上ある例、あるいは術前の徒手筋力検査で示指伸筋の筋力が弱い例を対象として行った。その他の例は示指伸筋腱を用いた腱移行を行った。腱移植、腱移行ともに編み込み縫合を行った。腱の緊張度の決定時に、母指爪先中央が手術台より2

cmの高さになるように挙上し、仮縫合を行った。仮縫合後、再度同肢位で確認し、母指爪先中央が手術台より2cmより低ければ、より緊張を強くして再縫合を行った。術後リハビリは、ダイナミックスプリントかギプス固定を行った。評価として母指IP関節の自動屈曲角度、母指IP関節の自動伸展角度、Total Active Motion (TAM)、Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand (DASH) score、母指の挙上距離を計測した。

【結果】長母指伸筋腱断裂を認めた25例中、関節症性変化のない20例を対象とした。男性8例、女性12例。平均年齢59歳であった。7例が腱移植、13例が腱移行を行った。術後平均観察期間は44か月であった。母指IP関節の自動伸展角度は有意に改善した。母指IP関節の自動屈曲角度に有意差は認めなかった。%TAM、DASH scoreともに有意に改善した。これらの計測において腱移植と腱移行の間では、有意差を認めなかった。術後ダイナミックスプリントとギプス固定で有意差は認めなかった。

【考察】長母指伸筋腱断裂の再建で、2cmが適切な緊張である理由として、筋の活動収縮の緊張のピークは、筋肉が伸長した最大距離から中間の位置にあると言われている。本研究で、正常な健側母指の挙上距離は平均3.9cmであった。そのため、中間値である2cmが適切かつ十分な緊張を得られる挙上距離であると推測した。この緊張度決定の手法は、3人の術者、腱再建法の違い、術後リハビリの違いがあっても、満足する結果を得た。過去に緊張度決定の手法がいくつか報告されているが、それらは適切な緊張度の決定が難しく再現性に疑問がある。本手法は、簡便で、定量的であり、術後良好な臨床成績を得ることができた。そのため、緊張度を容易に判断できる、優れた手法である。

【結論】長母指伸筋腱再建に対して新たな緊張度決定の手法を用い良好な結果を得ることができた。この方法は簡便かつ定量的であり、また術者間でも統一された方法で緊張度を決定することができる。また、腱移植、腱移行と異なった手技を用いても、術後母指の機能に良好な結果を得ることができ、長母指伸筋腱再建に対してすぐれた手法である。

(論文審査の結果の要旨)

長母指伸筋腱断裂の治療には、腱移植や腱移行が行われる。腱移植では移植した長掌筋腱を橋渡しして力源には本来の長母指伸筋が使用され、腱移行では示指

伸筋腱が力源として使用される。腱移植と腱移行の臨床結果は同等であると報告されている。長母指伸筋腱再建の良好な結果を得るには、再建時の適切な腱の緊張度が重要である。我々は、長母指伸筋腱断裂に対して、新たな緊張度決定の手法を行ったので報告する。

2006年～2014年の間に再建術を行った長母指伸筋腱断裂患者のうち、関節症性変化を認めない症例を対象とした。3人の術者によって手術が行われた。長掌筋腱を用いた腱移植は、受傷後3か月以内で術中に長母指伸筋の断端を近位に引いてその滑走距離が1cm以上ある例、あるいは術前の徒手筋力検査で示指伸筋の筋力が弱い例を対象として行った。その他の例は、示指伸筋を用いた腱移行を行った。手術は、腱移植、腱移行ともに編み込み縫合を行った。腱の緊張度の決定時に、母指爪先中央が手術台より2cmの高さになるようにし、仮縫合を行った。仮縫合後、再度同肢位で確認し、母指爪先中央が手術台より2cmより低ければ、より緊張を強くして再縫合を行った。術後リハビリは、ダイナミックスプリントかギプス固定を行った。ギプス固定は通院が困難な症例を対象とした。評価として1)母指IP関節の自動伸展角度、2)母指IP関節の自動屈曲角度、3)Total Active Motion (TAM)、4)Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand (DASH) score、5)母指の挙上距離を計測した。

その結果以下の成績を得た。

1. 自動伸展角度は術前 $-29^{\circ} \pm 16$ から術後 $8^{\circ} \pm 10$ と有意に ($p < 0.001$) 改善した。
2. 自動屈曲角度は術前 $65^{\circ} \pm 12$ から術後 $61^{\circ} \pm 13$ と有意差は認めなかった。
3. %TAMは術前 $50\% \pm 15$ から術後 90 ± 12 と有意に ($p < 0.001$) 改善した。
4. DASH scoreは術前 28.5 ± 21.0 から術後 7.7 ± 8.0 と有意に ($p < 0.001$) 改善した。
5. 母指の挙上距離は $1.2 \text{ cm} \pm 1.0$ であった。

腱移植と腱移行の術後評価は、母指の自動伸展角度、自動屈曲角度、%TAM、母指の挙上距離で有意差を認めなかった。また、術後のリハビリテーションは手術結果に影響を与えなかった。

以上より、我々は新たな緊張度決定の手法を用い、長母指伸筋腱再建に対して良好な結果を得ることができた。この方法は簡便かつ定量的であり、また術者間でも統一された方法で緊張度を決定することができる。また、腱移植、腱移行と異なった手技を用いても、術後母指の機能に良好な結果を得ることができ、長母指

伸筋腱再建に対してすぐれた手法の一つと考えられた。 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

Endogenous calcitonin gene-related peptide deficiency exacerbates postoperative lymphoedema by suppressing lymphatic capillary formation and M2 macrophage accumulation (内因性カルシトニン遺伝子関連ペプチドの欠乏は、リンパ管形成とM2マクロファージ集積を抑制することで、術後リンパ浮腫を悪化させる)

松井周平

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】リンパ浮腫は外科治療や放射線治療などの後遺症として発症し、慢性的に経過して患者のQOLを著しく低下させる病態である。我々は、リンパ管形成の分子メカニズムの解明が、リンパ浮腫の新しい治療法につながると考えた。

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、カルシトニン遺伝子の選択的スプライシングにより産生されるペプチドである。中枢、末梢神経系に広く分布し、主に感覚神経から分泌される。CGRPは主に神経伝達因子や血管拡張因子として捉えられてきたが、近年、血管形成促進、炎症やアポトーシス調節といった多彩な生理作用が報告されている。CGRPはカルシトニン、アドレノメデュリン、インターメディンなどが属するカルシトニンスーパーファミリーの一員である。これらは、7回膜貫通Gタンパク質共役受容体、カルシトニン受容体様受容体(CLR)を共有する。CLRのリガンドに対する親和性は3つの受容体活性調節タンパク(RAMP1-3)によって決定される。

KurashigeらはRAMP1ノックアウトマウスを用いた創傷治癒モデルにおいて、RAMP1発現マクロファージがリンパ管形成に重要な役割を果たすことを報告した。しかしながら、CGRPはRAMP1/CLR複合体のみではなく、RAMP2/CLR、RAMP3/CLR複合体にも結合する。さらに、RAMP1/CLR複合体には、他のカルシトニンスーパーファミリーも結合するため、CGRPがリンパ管形成に直接的に関与するかは不明である。

本研究ではCGRPノックアウトマウス(CGRP^{-/-})を用い、リンパ浮腫におけるCGRPの病態生理学的意義を検討した。

【材料および方法】8~10週齢雄の①野生型マウス(WT)とCGRP^{-/-}、②マンノシル化クロドロネート(MCLs)を尾静脈投与したWTとCGRP^{-/-}、③浸透圧ポンプを用いてCGRPを投与したWTおよび

CGRP^{-/-}を用いた。尻尾の皮膚と皮下組織を3mm幅で全周性に搔破し、大きな血管やリンパ管の損傷を避けながら、術後リンパ浮腫モデルを作成した。尻尾直径の変化を測定し、リンパ浮腫の発生と消退を評価した。①では10日目(day 10)に、尻尾の皮下にインドシアニンググリーンを投与し、造影写真を撮影してリンパ管の形態を評価した。①と②では免疫染色を行い、リンパ管と血管形成、マクロファージ動員の程度と極性、CGRP発現を評価した。さらに、①と②ではリアルタイムPCRを行い、リンパ管形成因子、リンパ管マーカー、サイトカイン、マクロファージマーカーなどの遺伝子発現を評価した。免疫染色とリアルタイムPCRは、①ではモデル導入前(day 0)、day 10、day 20、②ではday 10において行った。

【結果】

① CGRP^{-/-}ではWTと比較して浮腫が増悪した。両者の浮腫の差はday 10で最大となった。CGRP^{-/-}では整った蜂の巣状のリンパ管が観察できなかった。day 10でリンパ管形成がCGRP^{-/-}でWTに劣った。一方、血管形成に差はなかった。CGRP^{-/-}ではリンパ管形成因子およびリンパ管マーカーの遺伝子発現が低下していた一方で、炎症促進性サイトカインの遺伝子発現が亢進していた。CGRP^{-/-}ではM2マクロファージマーカーの遺伝子発現が低下していた。免疫染色でもM2マクロファージ動員が低下していた。

② MCLsを投与してM2マクロファージを枯渇させた。MCLsを投与したWTではM2マクロファージの遺伝子発現が低下し、免疫染色でもM2マクロファージ動員が低下した。MCLsを投与したWTではリンパ浮腫が増悪し、リンパ管形成が抑制され、リンパ管形成因子の遺伝子発現が低下していた。

③ CGRP^{-/-}に対してCGRPを投与したところリンパ浮腫が改善した。

【結論】CGRP欠乏によって、M2マクロファージの動員とリンパ管形成シグナルが抑制される結果、術後リ

リンパ浮腫の消退に必要なリンパ管形成が阻害され、浮腫が増悪することを明らかとした。CGRPは術後リンパ浮腫に対する新しい治療標的になると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) のリンパ管形成に対する作用の詳細は不明だった。本研究ではCGRPノックアウトマウス (CGRP^{-/-}) を用い、リンパ浮腫におけるCGRPの病態生理学的意義を検討した。

8~10週齢雄の①野生型マウス (WT) とCGRP^{-/-}、②マンノシル化クロドロネート (MCLs) を尾静脈投与したWTとCGRP^{-/-}、③浸透圧ポンプを用いてCGRPを投与したWTおよびCGRP^{-/-}を用いた。尻尾の皮膚と皮下組織を3mm幅で全周性に搔破し、大きな血管やリンパ管の損傷を避けながら、術後リンパ浮腫モデルを作成した。尻尾直径の変化を測定し、リンパ浮腫の発生と消退を評価した。①では10日目 (day 10) に、尻尾の皮下にインドシアニンググリーンを投与し、造影写真を撮影してリンパ管の形態を評価した。①と②では免疫染色を行い、リンパ管と血管形成、マクロファージ動員の程度と極性、CGRP発現を評価した。さらに、①と②ではリアルタイムPCRを行い、リンパ管形成因子、リンパ管マーカー、サイトカイン、マクロファージマーカーなどの遺伝子発現を評価した。免疫染色とリアルタイムPCRは、①ではモデル導入前 (day 0)、day 10、day 20、②ではday 10において行った。

以下の結果を得た。

1. CGRP^{-/-}ではWTと比較して浮腫が増悪した。両者の浮腫の差はday 10で最大となった。CGRP^{-/-}では整った蜂の巣状のリンパ管が観察できなかった。day 10でリンパ管形成がCGRP^{-/-}でWTに劣った。一方、血管形成に差はなかった。CGRP^{-/-}ではリンパ管形成因子およびリンパ管マーカーの遺伝子発現が低下していた一方で、炎症促進性サイトカインの遺伝子発現が亢進していた。CGRP^{-/-}ではM2マクロファージマーカーの遺伝子発現が低下していた。免疫染色でもM2マクロファージ動員が低下していた。
2. MCLsを投与してM2マクロファージを枯渇させた。MCLsを投与したWTでは、M2マクロファージの遺伝子発現が低下し、免疫染色でもM2マクロファージ動員が低下した。MCLsを投与したWTではリンパ浮腫が増悪し、リンパ管形成が抑制され、リンパ管形成因子の遺伝子発現が低下していた。
3. CGRP^{-/-}に対してCGRPを投与したところリンパ浮腫が改善した。

以上、CGRP欠乏によってM2マクロファージの動員とリンパ管形成シグナルが抑制されることで、術後リンパ浮腫の消退に必要なリンパ管形成が阻害され、浮腫が増悪することを明らかにした。これは、CGRPは術後リンパ浮腫に対する新しい治療標的になりうることを示唆する。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。

Factors predictive of the presence of a *CSF1R* mutation in patients with leukoencephalopathy (白質異常症における*CSF1R*遺伝子変異陽性を予測する患者要因の検討)

近藤 恭史

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】神経軸索スフェロイドおよび色素性グリアを伴う成人発症白質脳症 (ALSP) はコロンー刺激因子1受容体遺伝子 (*CSF1R*) 変異に起因する若年性認知症を呈する疾患である。近年、*CSF1R* 変異陰性のALSP患者においてアラニル tRNA 合成酵素2遺伝子 (*AARS2*) 変異が報告され、*CSF1R*-related leukoencephalopathy、*AARS2*-related leukoencephalopathy および *CSF1R/AARS2*-negative ALSP に分類することが提唱されている。*CSF1R*-related leukoencephalopathy の診断基準において、準確診群 (probable) もしくは疑診群 (possible) は *CSF1R* 検

査の実施は問われないが遺伝学的検査なしでは他の疾患と見分けがつかないことが多く、一方で全ての白質異常症を伴う認知症症例に対し *CSF1R* 検査を行うことは困難である。本研究では、*CSF1R* 検査が行われた白質異常症の臨床症候および脳画像所見を統計学的に解析することにより *CSF1R* 変異陽性と関連する患者要因を探索し、また現行の診断基準の正確性を再評価した。

【対象と方法】2011年12月から2019年8月の期間に、臨床的にALSPが疑われ全国の施設から *CSF1R* 検査依頼を受けた145症例のうち、依頼元の主治医から所定の臨床症候および脳画像所見を収集できた135例

を解析対象とした。CSFIR 変異陽性確率を予測するモデル式を作成するためにロジスティック回帰分析(変数増加法)を行った。135例のうち35例は CSFIR-related leukoencephalopathy の診断基準を策定した今野らの研究と重複しており、診断基準の正確性に関する検討では対象から除外した。現行の診断基準に従い各症例を振り分け、診断基準の感度および特異度を算出した。

【結果】 CSFIR 検査を行った白質異常症135例のうち、CSFIR 変異陽性が28例、CSFIR 変異陰性が107例であった。ロジスティック回帰分析の対象となった欠測データのない症例は、CSFIR 変異陽性群が20例、CSFIR 変異陰性群が72例であった。CSFIR 変異陽性確率を予測するモデル式により、CSFIR 変異陽性確率を上昇させる患者要因として、若年発症、パーキンソニズム、脳梁萎縮および拡散強調像高信号病変が見出された。60歳以下で発症し有意な要因をすべて有する症例が CSFIR 変異陽性となる確率は90%以上であった。発症が高齢になるほど CSFIR 変異陽性確率は低下し、有意な要因が一つもない症例の CSFIR 変異陽性確率は20%以下であった。また CSFIR 変異陽性確率を低下させる患者要因として不随意運動および脳幹・小脳の萎縮が見出され、どちらかを有する症例が CSFIR 変異陽性となる確率は18%以下であった。CSFIR-related leukoencephalopathy の診断基準準確診群もしくは疑診群には CSFIR 変異陽性群16例のうち13例が、CSFIR 変異陰性群84例のうち72例が該当し、現行の診断基準の感度は81%、特異度は14%であった。現行の診断基準における疑診群には一定数の他の白質異常症が含まれる可能性がある。

【結論】 CSFIR 変異陽性確率を上昇させる患者要因は若年発症、パーキンソニズム、脳梁萎縮、拡散強調像高信号病変であり、CSFIR 変異陽性確率を低下させる患者要因は不随意運動および脳幹・小脳の萎縮であった。これらの患者要因の有無は CSFIR 検査を行うかどうか判断する際や今後の診断基準の改定の際に参考となる。

(論文審査の結果の要旨)

CSFIR-related leukoencephalopathy は、コロニー刺激因子1受容体遺伝子(CSFIR)変異に起因する前頭葉機能低下を前景とした若年性認知症、白質異常症、脳梁萎縮・異常信号を呈する疾患である。本症の診断基準において準確診群(probable)もしくは疑診群(possible)は CSFIR 検査の実施は問われないが、

本症は遺伝学的検査なしでは他の疾患と見分けがつかないことが多く、一方で全ての白質異常症を伴う認知症症例に対し CSFIR 検査を行うことは困難である。本研究では、CSFIR 検査が行われた白質異常症の臨床症候および脳画像所見を統計学的に解析し、CSFIR 変異陽性と関連する患者要因を探索した。

対象は2011年12月から2019年8月の間に、臨床的に CSFIR-related leukoencephalopathy が疑われ CSFIR 検査が行われた135例。所定の臨床情報提供書を用い臨床症候および脳画像所見を収集し解析した。CSFIR 変異陽性確率を予測するモデル式を作成するために、欠測データのない92例を対象にロジスティック回帰分析を行った。

その結果、近藤恭史は次の結論を得た。

1. CSFIR 検査が行われた白質異常症135例のうち CSFIR 変異陽性例は28例(21%)であった。変異は全てチロシンキナーゼドメインにみられ、特に CSFIR のエクソン18-19に集中していた。
2. CSFIR 変異陽性確率を上昇させる患者要因として、若年発症、パーキンソニズム、脳梁萎縮および拡散強調像高信号病変が見出された。60歳以下で発症し有意な要因をすべて有する症例が CSFIR 変異陽性となる確率は90%以上であった。
3. CSFIR 変異陽性確率を低下させる患者要因として不随意運動および脳幹・小脳の萎縮が見出され、どちらかを有する症例が CSFIR 変異陽性となる確率は18%以下であった。

本研究において、CSFIR 変異陽性確率を上昇させる患者要因は若年発症、パーキンソニズム、脳梁萎縮、拡散強調像高信号病変であり、CSFIR 変異陽性確率を低下させる患者要因は不随意運動および脳幹・小脳の萎縮であった。これらの患者要因の有無は CSFIR 解析を行うかどうか判断する際に参考となる。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Mid-Frequency Hearing Loss Is Characteristic Clinical Feature of *OTOA*-Associated Hearing Loss (*OTOA* 遺伝子変異による難聴の臨床的特徴は中音域の難聴である)

杉山 健二郎

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】小児期までに発症する感音性難聴のうち、少なくとも50%は遺伝子変異が原因とされている。現在、非症候群性難聴の原因として約100種類の遺伝子が同定されており、これら遺伝子の1~数塩基の変異による先天性難聴が数多く報告されている。このような小さな遺伝子変異に加え、コピー数変化(CNVs: Copy number variations)と呼ばれる1kbpを超えるような大きなゲノムの構造変化(欠失・挿入・重複)が、遺伝性疾患の原因として注目されている。*OTOA* 遺伝子は、常染色体劣性遺伝形式をとる非症候群性難聴の原因遺伝子の1つ(DFNB22)である。*OTOA* 遺伝子にコードされている otoancorin タンパクは、内耳コルチ器に存在する蓋膜とラセン板縁の接着に関与していると考えられている。同遺伝子変異による難聴は上記のCNVs(欠失)が比較的多く関与しているといわれている。しかしながら、現在までに日本人難聴患者からの報告はなく、*OTOA* 遺伝子変異による難聴の臨床的特徴は明らかになっていない。そこで、本研究では、日本人難聴患者における *OTOA* 遺伝子変異による難聴の頻度と臨床像を明らかにすることを目的に研究を行った。

【対象と方法】常染色体劣性遺伝形式をとる日本人難聴患者2,262人を対象に、既知難聴遺伝子68遺伝子のNGS解析を行い、*OTOA* 遺伝子のSNVおよび短い欠失・挿入変異の解析を行った。またNGS解析のRead Depthデータを用いてCNVs解析も行った。CNVが検出された症例に関してはアレイCGH解析を行い、その結果の整合性を確認した。

【結果】日本人常染色体劣性遺伝形式をとる難聴患者2,262名を対象に解析を行ったところ、234人(10.3%, 234/2262)に何らかのCNVを同定した。本研究で最も高頻度に検出されたのは *STRC* 遺伝子であった。*STRC* 遺伝子に次いで2番目に高頻度にCNVが検出されたのが *OTOA* 遺伝子であり、14症例より同遺伝子のCNVが検出された(0.6%, 14/2262)。*OTOA* 遺伝子のCNVが検出された14症例のうち、*OTOA* 遺伝子の2コピー欠失2症例、また *OTOA* 遺伝子の1コピー欠失に加え対側アレルに一塩基多型(SNV)

を伴うCNV+SNVコンパウンドヘテロの4症例を同定した。さらに、同遺伝子のSNVをホモ接合体として持つ症例も1例同定された。結果として *OTOA* 遺伝子変異が原因と考えられる患者が7例同定され、常染色体劣性遺伝形式をとる日本人難聴患者における頻度は0.3%(7/2262)であることを明らかにした。また、*OTOA* 遺伝子変異による難聴の臨床的特徴として、難聴の程度が中等度から高度であり、比較的早期発症の傾向があることを明らかにした。これに加え、本研究では同遺伝子変異による難聴の新規の臨床的特徴として、中音域の閾値上昇を伴う皿形の聴力像を呈することを明らかにした。同様の聴力像を示す難聴遺伝子としては *TECTA* 遺伝子が知られているが、*TECTA* 遺伝子も *OTOA* 遺伝子と同様に蓋膜の形成に関与するとされている。これら2つの遺伝子変異に認められる聴力像の類似性は蓋膜機能低下による難聴という共通の難聴発症メカニズムを反映している可能性がある。

【結論】*OTOA* 遺伝子による難聴を日本で初めて報告した。常染色体劣性遺伝形式をとる難聴者のなかで *OTOA* 遺伝子による頻度は0.3%であり、その特徴的な臨床像は中音域の難聴であることを明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

OTOA 遺伝子は常染色体劣性遺伝形式をとる非症候群性難聴(DFNB22)の原因遺伝子である。*OTOA* 遺伝子は蝸牛内のらせん板縁に発現しており蓋膜の接着因子(GPIアンカータンパク)であるOtoancorinをコードしている。したがって、*OTOA* 遺伝子変異による難聴は蓋膜の離脱により蝸牛増幅障害が生じることが原因と考えられている。*OTOA* 遺伝子変異による難聴には遺伝子欠失(Copy number variations: CNVs)が比較的多く関与しているといわれている。現在までに日本人難聴患者からの報告はなく、また、*OTOA* 遺伝子変異による難聴の臨床的特徴は明らかになっていなかった。本研究では、常染色体劣性遺伝形式をとる日本人難聴者において *OTOA* 遺伝子変異および遺伝子欠失による難聴者の頻度と臨床像を検討した。

日本人劣性遺伝形式をとる難聴者2,262名を対象に、

難聴の原因遺伝子68遺伝子をターゲットにした次世代シーケンサーによる網羅的解析を行い点変異の検出を行った。また Read Depth データを用いて Copy number variation (CNV) 解析も行った。CNV が検出されたものに対してはアレイ CGH 解析しその結果の整合性を確認した。

その結果、杉山は次の結論を得た。

1. 難聴者2,262症例において2症例が *OTOA* 遺伝子欠失の2 copy loss を、9症例が1 copy loss であり、うち4名に対側アレルに同遺伝子の Single nucleotide variant (SNV) を、1症例に同遺伝子の homo 接合体の SNV を検出し、*OTOA* 遺伝子による難聴の頻度は0.3% (7/2262) であることを明らかにした。
2. 難聴者2,262名において3 copy (1 copy gain) も3症例検出されたが、コントロール152例からも3 copy の1例が検出されており、難聴という phenotype には関連がないと考えられた。
3. 次世代シーケンサーを用いた CNV 解析結果とアレイ CGH の解析結果はすべて一致していた。
4. *OTOA* 遺伝子変異・欠失による難聴は、先天性・幼少期発症の難聴を呈し、難聴の程度は中等度から重度で様々であった。また新しい臨床的特徴と

して中音域の難聴を呈することを明らかにした。

5. *OTOA* 遺伝子欠失症例では、全例上流に存在する2つの遺伝子も同時に欠失していた。これらの遺伝子を含む領域は前後に高い相同性を持った反復配列があるため、相同組み換えによるゲノム再構成 (CNV) が生じやすいホットスポットとして機能していることが考えられた。
6. 検出された *OTOA* 遺伝子の SNV はすべて exon16 までであった。*OTOA* 遺伝子の820kb 下流には同遺伝子の exon20以降と99%相同性をもった配列 (pseudo gene) が存在するため、その部位の SNV の検出が困難であることが考えられた。

以上より、*OTOA* 遺伝子欠失による難聴は、中音域の難聴を呈することが明らかとなった。今回明らかになった *OTOA* 遺伝子変異による難聴の臨床像は、予後の予測や治療介入を選択する上で重要な情報として活用可能と考える。また、同遺伝子に限らず、偽遺伝子などの高い相同性を持つ領域の変異検出については、CNV 解析や long read sequencing が必要となることが示唆された。

以上より主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Intestinal Injury by Heat Conduction from Surgical Sealing Devices (シーリングデバイスからの熱伝導による腸管損傷)

鈴木 都史郎

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】手術用シーリングデバイスはアクティブブレードから発熱することが知られているが、手術中、特に腹腔鏡手術中の熱伝導に伴う腸管損傷の研究はあまり行われていない。この研究は手術用シーリングデバイスの安全な使用法を確立するために、アクティブブレードからの熱伝導による小腸の損傷を物理的および組織学的に評価する目的で行われた。

【材料及び方法】腹腔鏡手術をシミュレートした動物モデル (豚) を用いて、7種類のバイポーラシーリングデバイス (ENSEAL TRIO®, ENSEAL Round®, ENSEAL G2 Articulating®, LigaSure V®, LigaSure Blunt Tip®, LigaSure Maryland Jaw®, BiClamp®) と2種類の超音波メス (HARMONIC ACE®+, THUNDERBEAT®) を比較した。第1に腹腔鏡操作で各デバイスを用いて小腸を離断した。その際アクティブブレードの背面に温度計を接触させてアクティ

ブブレードの背面温度を測定し、温度推移を観察した。第2に小腸を術野外に取り出して小腸の離断操作を行い、同時にアクティブブレードの背面に小腸の別部位の漿膜面を押し当て、小腸漿膜面に熱変性を起こさせた。熱変性が起こった小腸から病理標本を作製し、病理医により熱損傷の組織学的評価を行った。

【結果】アクティブブレード背面の最高到達温度は、LigaSure V® と BiClamp® で特に高く80℃前後まで上昇した。一方 LigaSure Maryland Jaw® は特に低く60℃前後であった。他のデバイスは多少ばらつきがあるものの、ほぼ70℃前後まで上昇した。また術野内での使用を継続した状態でアクティブブレード背面の温度が50℃以下まで冷却される時間を調べたところ、THUNDERBEAT® は特に長く平均56秒かかり、ENSEAL TRIO® は平均13.4秒と特に短かった。他のデバイスは30秒前後かかることがわかった。熱による腸管損傷の組織学的評価において、ENSEAL TRIO®

と ENSEAL Round[®], ENSEAL G2 Articulating[®], LigaSure Maryland Jaw[®], HARMONIC ACE[®]+, THUNDERBEAT[®] は熱損傷が粘膜まで到達することが確認された。LigaSure V[®]のみ粘膜下層までの熱損傷に留まっていたが、LigaSure Blunt Tip[®]と BiClamp[®]においては粘膜筋板までの熱損傷を認めた。

【結論】 今回の研究で用いられたすべてのデバイスは、アクティブブレードの背面の最高温度が60℃以上まで到達しており、これは接触した組織に蛋白変性が起こることを示す。またデバイスの使用後50℃以下まで冷却されるのに、ほぼ手術すべてのデバイスで30秒以上かかっており、デバイス使用後の接触でも周囲組織に熱損傷を引き起こす可能性があることが分かった。組織学的評価ではすべてのデバイスで粘膜下層以上の熱損傷が誘発された。アクティブブレードの背面の接触だけでも、その熱損傷は腸管の漿膜面に留まらず深部にまで達することが証明され、周囲組織に接触させながらデバイスを使用することは非常に危険であることが分かった。

(論文審査の結果の要旨)

手術用シーリングデバイスはアクティブブレードから発熱することが知られているが、手術中、特に腹腔鏡手術中の熱伝導に伴う腸管損傷の研究はあまり行われていない。この研究は手術用シーリングデバイスの安全な使用法を確立するために、アクティブブレードからの熱伝導による小腸の損傷を物理的および組織学的に評価する目的で行われた。

腹腔鏡手術をシミュレートした動物モデル(豚)を用いて、7種類のバイポーラシーリングデバイス(ENSEAL TRIO[®], ENSEAL Round[®], ENSEAL G2 Articulating[®], LigaSure V[®], LigaSure Blunt Tip[®], LigaSure Maryland Jaw[®], BiClamp[®])と2種類の超音波メス(HARMONIC ACE[®]+, THUNDERBEAT[®])を比較した。第1に腹腔鏡操作で各デバイスを用いて小腸を離断した。その際アクティブブレードの背面に

温度計を接触させてアクティブブレードの背面温度を測定し、温度推移を観察した。第2に小腸を術野外に取り出して小腸の離断操作を行い、同時にアクティブブレードの背面に小腸の別部位の漿膜面を押し当て、小腸漿膜面に熱変性を起こさせた。熱変性が起こった小腸から病理標本を作製し、病理医により熱損傷の組織学的評価を行った。

その結果、鈴木都史郎は次の結論を得た。

1. アクティブブレード背面の最高到達温度は、LigaSure V[®]と BiClamp[®]で特に高く80℃前後まで上昇した。一方 LigaSure Maryland Jaw[®]は特に低く60℃前後であった。他のデバイスは多少ばらつきがあるものの、ほぼ70℃前後まで上昇した。また術野内での使用を継続した状態でアクティブブレード背面の温度が50℃以下まで冷却される時間を調べたところ、THUNDERBEAT[®]は特に長く平均56秒かかり、ENSEAL TRIO[®]は平均13.4秒と特に短かった。他のデバイスは30秒前後かかることがわかった。

2. 熱による腸管損傷の組織学的評価において、ENSEAL TRIO[®]と ENSEAL Round[®], ENSEAL G2 Articulating[®], LigaSure Maryland Jaw[®], HARMONIC ACE[®]+, THUNDERBEAT[®] は熱損傷が粘膜まで到達することが確認された。LigaSure V[®]のみ粘膜下層までの熱損傷に留まっていたが、LigaSure Blunt Tip[®]と BiClamp[®]においては粘膜筋板までの熱損傷を認めた。

これらの結果により、手術用シーリングデバイスの種類に関係なく、アクティブブレードの背面は高温になり、腸管に接触することで熱損傷を引き起こす可能性があることが分かった。腹腔鏡手術において手術用シーリングデバイスを周囲組織に接触したまま使用することは、大変危険であり行うべきではないと考えられた。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Deficiency of the adrenomedullin-RAMP3 system suppresses metastasis through modification of cancer-associated fibroblasts (アドレノメデュリン (AM) -RAMP3系の欠損は、癌関連線維芽細胞の性質を変化させ、臓器間転移を抑制する)

戴 昆

(論文の内容の要旨)

【背景】 アdreノメデュリン (AM) は全身で広く産生され、多彩な生理活性を有するペプチドである。

AMの活性は、主として受容体活性調節タンパク RAMP2および RAMP3により制御されている。我々はこれまで、AMノックアウトマウス (AM^{-/-}) が

血管の発生異常により胎生致死となること、RAMPの中でもRAMP2のノックアウトマウス(RAMP2^{-/-})のみがAM^{-/-}と同様の表現型を示すことから、血管の発生および恒常性維持におけるAM-RAMP2系の重要性を明らかとしてきた。一方、AMは様々な癌においても産生されている。我々は成体において、血管内皮細胞のRAMP2を欠損誘導できるマウス(DI-E-RAMP2^{-/-})を樹立し、B16F10メラノーマ細胞の皮下移植実験を行った。DI-E-RAMP2^{-/-}ではコントロールマウスと比較して、皮下移植した原発巣のサイズが縮小するのに対し、原発巣摘出後の肺への転移が亢進することを見出し、AM-RAMP2系による血管恒常性維持作用が、癌の転移を抑制することを報告した(Cardiiovasc Res, 2016)。一方で膵癌は予後不良で、術後肝転移しやすいことが重要な問題点である。また、ヒト膵癌サンプルではRAMP3の発現が上昇していることも報告されている。本研究ではDI-E-RAMP2^{-/-}とRAMP3^{-/-}マウスを用いて、臓器間転移におけるAM-RAMP2, 3系の意義を検討した。

【方法と結果】 PAN02膵癌細胞を脾臓に移植し、3および4週間後、肝臓への転移を検討した。DI-E-RAMP2^{-/-}では、原発巣サイズが縮小するのに対し、肝臓への転移は亢進しており、先の実験結果の再現性が確認された。DI-E-RAMP2^{-/-}における肝臓の転移巣を観察すると、癌周囲の線維化亢進と、 α SMA陽性の癌関連線維芽細胞(CAF)の増加を認め、これらのCAFはポドプラニン(PDPN)陽性であった。临床上、PDPN陽性CAFが存在する癌は、予後不良であることが報告されている。一方、DI-E-RAMP2^{-/-}では、RAMP2発現低下と共にRAMP3発現が代償性に亢進していた。そこで次に、RAMP3^{-/-}マウスを用いて、同様の臓器間転移モデルの検討を行った。RAMP3^{-/-}マウスは、RAMP2^{-/-}と異なり正常に生まれ、成体が得られた。RAMP3^{-/-}を用いて癌転移実験を行うと、DI-E-RAMP2^{-/-}とは逆に、肝臓への転移が抑制されていた。さらに、DI-E-RAMP2^{-/-}とは異なり、癌周囲のPDPN陽性CAFが減少していた。そこで、線維芽細胞におけるRAMP3とPDPNの関係の検討を進めた。胎児由来線維芽細胞(MEF)でRAMP3をノックダウンさせると、PDPNの発現も低下した。さらにPAN02細胞の細胞上清で刺激したRAMP3^{-/-}のMEFでは、PDPN発現調節に関わるSrc, Casの活性も低下して

いたことから、RAMP3の下流にSrc-Cas-PDPN系が存在することが明らかとなった。

次に、転移巣周辺からCAFを初代培養して検討を進めた。PAN02細胞の培養上清刺激下において、RAMP3^{-/-}由来CAFでは α SMAの発現低下を認めた。またRAMP3^{-/-}CAFでは、細胞質内ストレスファイバーの形成が抑制されている一方で、細胞膜直下のアクチン形成が亢進しており、間葉上皮移行(MET)を生じていると考えられた。さらにRAMP3^{-/-}CAFでは、PAN02細胞との共培養系において、細胞の遊走、増殖が抑制されていた。アレー解析において、RAMP3^{-/-}CAFでは癌増殖因子の発現低下と共に、抑制因子の発現亢進を認めた。そこで、RAMP3^{-/-}CAFの細胞上清をPAN02細胞に添加すると、間葉系マーカーであるVimentinの発現低下が認められ、PAN02細胞の増殖、遊走も抑制された。実際にRAMP3^{-/-}CAFとPAN02細胞を混合してマウスに移植すると、癌のサイズは抑制され、肝転移も減少したことから、RAMP3^{-/-}CAFは癌増殖や転移を抑制する、いわば良性のCAFとなっていると考えられた。最後に、RAMP3^{-/-}に対してAMを持続投与し、AM-RAMP3系を阻害した状態で、AM-RAMP2系を選択的に活性化したところ、癌転移はRAMP3^{-/-}よりもさらに抑制された。

【結論】 以上から、DI-E-RAMP2^{-/-}では、AM-RAMP3系の代償性亢進が、PDPNの発現亢進を生じ、癌の悪性度が増強したと考えられた。一方、RAMP3^{-/-}では悪性度の高いPDPN陽性CAFが減少した結果、癌転移が抑制されたと考えられた。選択的なRAMP2活性化とRAMP3阻害が癌転移抑制の新たな治療法になることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

膵癌は予後不良で、術後肝転移しやすいことが重要な問題点である。アドレノメデュリン(AM)は多彩な作用を有するペプチドであり、その活性は受容体活性調節タンパクRAMP2, 3により制御される。これまで、AM-RAMP2系が癌転移を抑制することを明らかとしたが、癌転移におけるAM-RAMP3系の詳細は不明である。本研究ではDI-E-RAMP2^{-/-}とRAMP3^{-/-}を用いて、臓器間転移におけるAM-RAMP2, 3系の意義を検討した。

その結果、戴 昆は次の結論を得た。

1. DI-E-RAMP2^{-/-}では、原発巣サイズが縮小するのに対し、肝転移は亢進していた。DI-E-

- RAMP2^{-/-}における肝臓の転移巣を観察すると、癌周囲の線維化亢進と、代償性のRAMP3や筋線維芽細胞マーカーであるポドプラニン (PDPN) 陽性癌関連線維芽細胞 (CAF) の増加を認めた。
2. RAMP3^{-/-}では、DI-E-RAMP2^{-/-}とは逆に、肝転移が抑制されていた。さらに、DI-E-RAMP2^{-/-}とは逆に、癌周囲のPDPN陽性CAFが減少していた。
 3. AM-RAMP3の下流にSrc-Cas-PDPN系が存在することが明らかとなった。
 4. RAMP3^{-/-}由来CAFでは α SMAの発現低下を認め、またRAMP3^{-/-}CAFでは、細胞質内ストレスファイバーの形成が抑制されている一方で、細胞膜直下のアクチン形成が亢進しており、間葉上皮移行 (MET) を生じていると考えられた。
 5. RAMP3^{-/-}CAFでは、PAN02細胞との共培養系において、細胞の遊走、増殖が抑制されていた。アレー解析において、RAMP3^{-/-}CAFでは癌促進因子の発現低下と共に、抑制因子の発現亢進を認

めた。

6. RAMP3^{-/-}CAFとPAN02細胞を混合してマウスに移植すると、癌サイズは抑制され、肝転移も減少したことから、RAMP3^{-/-}CAFは癌増殖や転移を抑制する、いわば良性のCAFとなっていると考えられた。
7. RAMP3^{-/-}に対してAMを持続投与し、AM-RAMP3系が遮断された状態で、AM-RAMP2系を選択的に活性化したところ、癌転移はRAMP3^{-/-}よりもさらに抑制された

これらの結果より、DI-E-RAMP2^{-/-}では、癌の悪性度が増強する一方、RAMP3^{-/-}では悪性度の高いPDPN陽性CAFが減少し、癌転移が抑制されることが明らかとなった。選択的なRAMP2活性化とRAMP3阻害が癌転移抑制の新たな治療法になることが期待される。

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。

Amelioration of intracellular Ca²⁺ regulation by exon-45 skipping in Duchenne muscular dystrophy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (デュシェンヌ型筋ジストロフィーiPS細胞由来心筋細胞におけるエクソン45スキッピングによる細胞内Ca²⁺動態の改善)

佐藤 充 人

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) はジストロフィン (*DMD*) 遺伝子の変異により筋筋質膜に局在するジストロフィンが欠損し、進行性に骨格筋や心筋が侵されるX連鎖性疾患である。幼少期より全身の筋萎縮・筋力低下のみならず拡張型心筋症を来し、進行に伴い呼吸筋にも障害が加わるが、近年の人工呼吸管理技術の向上により呼吸不全での死亡が減少し、最大の死因は心不全となっている。DMDでは*DMD*遺伝子の欠失/重複などの変異により、アミノ酸の読み取り枠にずれが生じる (アウト・オブ・フレーム変異) ことでジストロフィンが産生されない。一方、読み取り枠が維持されるイン・フレーム変異では不完全ながらも機能を有するジストロフィンが産生され、より軽症なベッカー型筋ジストロフィー (BMD) の病型をとる。DMDに対する最も有望な治療方法はアンチセンス・オリゴヌクレオチド (AO) を用いてアウト・オブ・フレームをイン・フ

レームに変換させるエクソン・スキップ治療であり、近年、臨床応用が始まっている。本研究ではDMD患者から作成したiPS細胞を心筋細胞へと分化誘導し、AO薬によりイン・フレーム化することで、ジストロフィンの発現回復、細胞内Ca²⁺動態の改善が得られるかについて検討した。

【対象と方法】DMD遺伝子エクソン46-55欠失を有する24歳日本人男性の末梢血Tリンパ球から、*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*をエンコーディングしたベクターをエレクトロポレーションによりトランスフェクションし、iPS細胞株を樹立した。分化誘導因子 (CHIR99021, Activin A, BMP-4, XAV939) を用い心筋細胞へ分化誘導を行った (Day 0)。分化誘導後Day 13にAO薬 (phosphorodiamidate morpholino oligomers; PMO) を用いてエクソン45スキッピングを行い、エクソン45-55欠失のイン・フレーム変異型に変換した。Day 20でRT-PCR法によりエクソン・スキップ効率を検討した (PMOの容量は5

μMと10μMを用いた)。次にDay 40でウェスタンブロットリングおよび免疫細胞染色によりジストロフィンの発現回復について評価した。Day 60でFluo-4を用いた細胞内Ca²⁺イメージングにより細胞内Ca²⁺動態の改善が得られるかについて検討した。

【結果】 正常なKaryotypeの保持、多能性幹細胞マーカーの発現、細胞移植によるテラトーマ形成を確認し、iPS細胞株の樹立を確認した。心筋への分化誘導を行い、分化誘導Day 7以降で自発的な細胞の収縮が認められ、免疫染色およびFACS解析でトロポニンTの発現が認められた。RT-PCRによるエクソン・スキップ効率を評価したところ、統計学的有意差は得られなかったがPMO容量依存性にエクソン45スキップが行われる傾向が認められた(PMO 5μM 40%, 10μM 55%, p=0.25)。また、ウェスタンブロットリングおよび免疫細胞染色にてジストロフィンの発現回復を確認し得た。Fluo-4を用いたCa²⁺イメージングでは、エクソン・スキップ前後で不規則な自発性細胞質内Ca²⁺上昇の頻度低下、すなわち不規則な収縮を呈する心筋細胞の減少が認められた(PMO非投与群 69.0%, PMO投与群 32.0%, p<0.01)。次に細胞内Ca²⁺トランジェントに関連するパラメータについて評価した結果、エクソン・スキップ後の心筋細胞ではtime to peak, full duration at half-maximal amplitudeおよびdecay time (Tau)の短縮(p<0.01)、Fluo-4の蛍光強度変化(F/F₀)の上昇(p<0.01)が認められた。これらのパラメーターの変化の結果は、主に筋小胞体に存在するリアノジン受容体2およびSERCA2の細胞質内Ca²⁺放出および再取り込み機能の改善を示唆するものであり、ジストロフィン回復により細胞内Ca²⁺動態の改善が示唆された。

【考察】 DMDエクソン46-55欠失iPS細胞由来心筋に対してエクソン45スキップを行い、エクソン45-55欠失へと誘導することでジストロフィンの発現を回復し、心筋細胞内のCa²⁺動態の改善が得られることを示した。機序については明らかではないが、ジストロフィン回復が筋小胞体におけるCa²⁺動態の改善に寄与していることが考えられる。筋小胞体が関与した細胞内Ca²⁺濃度上昇は心室性不整脈の原因となることが報告されており、ジストロフィン回復によりそれらの致死性不整脈発生の抑制効果が期待される。DMD患者の約60%がエクソン45-55領域内に変異を有しており、またエクソン45-55を全て欠失したBMDは非常に症状の軽い臨床像を呈することが明らかとなっているこ

とから、エクソン45-55領域全てを対象としたマルチエクソン・スキップ治療は多くの患者に適応され、かつ高い治療効果を得られる可能性がある。我々の結果はエクソン45-55領域のマルチエクソン・スキッピング治療がDMDの心筋障害に対しても有用である可能性を示唆し、得られたDMD患者iPS細胞由来心筋はエクソン・スキップ治療の細胞モデルとして有用であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)はジストロフィン(DMD)遺伝子の変異によりジストロフィンが欠損し、進行性に骨格筋や心筋が侵されるX連鎖性疾患である。以前は呼吸筋障害による呼吸不全が最大の予後因子であったが、近年の人工呼吸管理技術の向上により、最大の死因は心不全や致死性不整脈となっている。現時点において、DMDに対する最も有望な治療方法はアンチセンス・オリゴヌクレオチド(AO)を用いたエクソン・スキップ治療であり、臨床応用が始まっている。本研究ではDMD患者から作成したiPS細胞を心筋細胞へと分化誘導し、AO薬によりイン・フレーム化することでジストロフィンの発現回復および細胞内Ca²⁺動態の改善が得られるかについて検討した。

DMD遺伝子エクソン46-55欠失を有する24歳日本人男性のTリンパ球からiPS細胞株を樹立した。分化誘導因子(CHIR99021, Activin A, BMP-4, XAV939)を用い心筋細胞へ分化誘導を行い、エクソン45をスキップするAO薬(PMO)を用いてエクソン45-55欠失のイン・フレーム変異型に変換した。RT-PCR法によりエクソン・スキップ効率を検討し、ウェスタンブロットリングおよび免疫細胞染色によりジストロフィンの発現回復を評価した。またFluo-4を用いた細胞内Ca²⁺イメージングにより細胞内Ca²⁺動態の改善が得られるかを検討した。

その結果、佐藤充人は次の結論を得た。

1. DMD患者iPS細胞由来心筋細胞へのPMO投与によるエクソン45スキップによりジストロフィンの発現回復が得られ、用量依存性にエクソン・スキップが起こる傾向を認めた。
2. エクソン・スキップ前後で不規則な自発性細胞内Ca²⁺上昇の頻度低下(不整な収縮を呈する心筋細胞の減少)が認められた。
3. エクソン・スキップ後の心筋細胞では、リアノジン受容体2, SERCA2による筋小胞体からのCa²⁺

放出・再取り込み機構に由来する細胞内 Ca^{2+} トランジェントの改善が認められた。

これらの結果よりエクソン・スキップ治療は心筋細胞に対しても有効と考えられ、心室性不整脈の予防、心機能改善に寄与する可能性があることが示唆された。

また本研究結果はエクソン45スキップ治療の有効性を支持し、得られた DMD 患者 iPS 細胞由来心筋はエクソン・スキップ治療の細胞モデルとして有用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。

Aryl Hydrocarbon Receptor Directly Regulates Artemin Gene Expression (芳香族炭化水素受容体は神経栄養因子アルテミン遺伝子を直接制御する)

枝 光 智 大

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】芳香族炭化水素受容体 (AhR; Aryl hydrocarbon Receptor) は、環境汚染物質であるダイオキシン類や多環芳香族炭化水素を主なりガンドとして認識し活性化する転写因子である。恒常的活性化型 AhR (AhR-CA) を表皮特異的に発現させた AhR-CA マウスは、アトピー性皮膚炎に類似した痒みの激しい皮膚炎を発症する。AhR-CA マウスの表皮では、神経栄養因子アルテミン (Artn) が高発現する結果、表皮内に末梢神経が伸長し痒み過敏状態が形成されている。先行研究でのクロマチン免疫沈降シーケンスで、Artn 遺伝子上流の AhR 結合配列 (XRE; Xenobiotic Responsive Element) を含む領域に AhR-CA が結合することが明らかにされた。しかしながら、この AhR-CA 結合領域は Artn 遺伝子の約 52 kb 上流と、一般的に知られている AhR 結合領域と比較して遠く離れているため、エンハンサーとして機能し Artn 遺伝子を直接制御しているのか不明であった。そこで、本研究では CRISPR/Cas により XRE を含む AhR-CA 結合領域を欠失させた Artn^{ΔXRE} マウスを作製し、AhR が Artn 遺伝子を直接制御するか否か調べた。さらに、皮膚炎や搔破行動に対する AhR-Artn 経路の寄与を調べた。

【結果】初めに、AhR の活性化により Artn の発現が誘導されるか確かめるために、AhR アゴニストである 3-メチルコランズレン (3-MC) をマウス皮膚に塗り表皮における Artn の発現誘導を調べた。その結果、Keratin5-Cre マウス (コントロール) で Artn の発現が誘導される一方、Keratin5-Cre::AhR^{fllox/fllox} マウス (表皮特異的 AhR 欠失マウス) ではその誘導が有意に抑制された。このことから、3-MC は AhR 依存的に Artn 遺伝子の発現を誘導することが確認された。次に、AhR が Artn 遺伝子上流の XRE を介して Artn 遺伝子を直接制御するか明らかにするために、

Artn^{ΔXRE} マウスと野生型マウスに 3-MC を外用し発現を調べた結果、野生型マウスに比較して Artn^{ΔXRE} マウスの表皮で誘導される Artn の発現は有意に抑制された。さらに、AhR-CA マウスの表皮で高発現する Artn の発現も、AhR-CA::Artn^{ΔXRE} マウスでは抑制された。これらの結果から、Artn 遺伝子の 52 kb 上流に位置する XRE はエンハンサーとして機能しており、AhR が Artn 遺伝子の発現を直接制御することが証明された。次に、AhR-CA マウスの病態への AhR-Artn 経路の寄与を調べるために、AhR-CA::Artn^{ΔXRE} マウスの皮膚炎や搔破行動を観察した。アトピー性皮膚炎患者に特徴的な痒み過敏状態を評価するために、マウスの皮膚に微弱な触覚刺激を加えて誘導される搔破行動を観察したところ、AhR-CA マウスにおいて高頻度で誘導される搔破行動は AhR-CA::Artn^{ΔXRE} マウスで有意に抑制された。また、Artn 中和抗体を投与することで、AhR-CA マウスにおいて観察される連続的な搔破行動は抑制された。一方、AhR-CA::Artn^{ΔXRE} マウスや Artn 中和抗体投与マウスのいずれも、皮膚炎は有意な改善には至らなかったことから、AhR-CA マウスの皮膚炎発症には AhR により誘導される他の経路が関与することも示唆された。これらの結果から、AhR による Artn の直接的な発現誘導が痒み過敏に寄与することが示され、AhR-Artn 経路を抑制する薬剤がアトピー性皮膚炎の痒みに対する新しい治療薬になることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

恒常活性化型 AhR を表皮特異的に発現させた AhR-CA マウスは、アトピー性皮膚炎に類似した表現型を発症する。先行研究により、AhR-CA マウスの表皮では神経栄養因子 Artemin (Artn) が高発現しており、Artn 中和抗体によって痒み過敏が改善することが示された。Artn 遺伝子上流の DNA には AhR-CA 蛋白質が結合する領域があることが ChIP-seq より明

らかにされているが、この場所は *Artn* 遺伝子から 52 kb と遠く離れた場所に位置するため、エンハンサーとして機能しているのか不明だった。

本研究では、CRISPR/Cas によるゲノム編集技術を用いて、AhR-CA 結合領域の XRE を含む配列を欠失した *Artn*^{ΔXRE} マウスを作製し、*Artn* 遺伝子が AhR によって直接制御されるか調べた。また、*Artn*^{ΔXRE} マウスを用いて AhR-CA マウスの病態に対する *Artn* の寄与を調べた。

その結果、枝光は次の結論を得た。

1. AhR アゴニストをマウス皮膚に塗ることで AhR 依存的に表皮において *Artn* の発現が誘導された。
2. *Artn* 遺伝子上流の XRE を欠失することで、AhR アゴニストによる *Artn* の発現誘導は抑制された。

3. AhR-CA マウスと比較して、AhR-CA::*Artn*^{ΔXRE} マウスの表皮における *Artn* の発現誘導は抑制された。

4. AhR-CA マウスと比較して、AhR-CA::*Artn*^{ΔXRE} マウスでは機械刺激により誘導される搔破行動が減少した。

5. AhR-CA マウスで観察される連続搔破行動は、アルテミン中和抗体の投与により減少した。

これらの結果より、*Artn* 遺伝子52 kb 上流の XRE は機能しており、AhR は *Artn* 遺伝子を直接制御していることが明らかにされた。AhR により誘導される *Artn* は痒み過敏状態の形成に寄与しており、AhR-*Artn* 経路がアトピー性皮膚炎に対する新しい治療薬になることが期待された。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。

Comparison of clinical characteristics of patients with *Mycobacterium avium complex* disease by gender (肺 MAC 症患者の性別による臨床的特徴の比較)

生 山 裕 一

(論文の内容の要旨)

【背景/目的】肺 MAC 症 (*Mycobacterium avium complex*: MAC) は肺非結核性抗酸菌症 (non-tuberculous mycobacteria: NTM) の最も多い原因で、本邦においては NTM のうち 89 % を占める。日本では近年肺 MAC 症患者は中年女性患者において増加している。これらの患者では、特に画像上の分類で結節気管支拡張型 (Nodular bronchiectasis type: NB 型) が多くとされている。一方、男性の肺 MAC 症患者では、線維空洞型 (Fibro-cavitary type: FC 型) が多く予後も悪いとされているが、一遍のみの報告で、男女差を比較した報告はない。本研究の目的は、肺 MAC 症の男性患者の臨床的特徴を明らかにすることである。

【方法】2003年から2016年の間に信州大学医学部附属病院外来を受診した患者を診療録より後方視的に抽出した。本研究では、肺 MAC 症は、米国胸部疾患学会 (ATS) と米国感染症学会 (IDSA) から合同で発表された statement によって診断した。臨床データは診断時から 1 か月以内に得られた。画像は、HRCT にて NB 型、FC 型、その他に分類された。病勢の悪化は、症状の増悪、画像の増悪、または微生物学的な増悪として判断された。

【結果】研究期間中、対象患者は234名 (男性68名、女

性166名)であった。診断時の平均年齢は、女性患者よりも男性の方が高かった ($P < 0.001$)。画像所見に関して、男性では57名 (83.8%) は NB 型、6名 (8.8%) は FC 型 (7.4%) であった。女性では155名 (93.4%) が NB 型、7名 (4.2%) は FC 型であった。男性、女性の間有意差を認めなかった ($P = 0.067$)。BMI でも有意な差を認めなかった。男性の方が女性より多剤併用療法が施行された患者は少なく ($P < 0.001$)、喫煙歴、アルコール摂取量は有意に多かった ($P < 0.001$)。血液検査では、診断時のリンパ球数、TP、ALB は男性の方が女性より有意に低値であった (それぞれ $P = 0.034$, $P = 0.01$, $P < 0.001$)。さらに、男性の方が女性より有意に悪性腫瘍、COPD の合併が多かった ($P = 0.002$, $P < 0.01$)。結核歴や関節リウマチ、糖尿病、間質性肺炎については、両者で有意な差を認めなかった。

カプランマイヤー曲線にて増悪までの期間を両者で比較した。男女で有意な差を認めなかった ($P = 0.67$)。

【結論】本研究期間における男性肺 MAC 症における NB 型の割合は、既報と比較し増加していた。病勢の増悪までの期間は男女で有意な差を認めなかった。

(論文審査の結果の要旨)

肺 MAC 症 (*Mycobacterium avium complex*: MAC)

は肺非結核性抗酸菌症 (non-tuberculous mycobacteria:NTM) の最も多い原因で、本邦において肺 MAC 症は NTM のうち 89 % を占め、近年肺 MAC 症患者は中年女性患者において増加している。これらの患者では、特に画像上の分類で結節気管支拡張型 (Nodular bronchiectasis type:NB 型) が多いとされている。一方、男性の肺 MAC 症患者では、線維空洞型 (Fibrocavitary type:FC 型) が多く予後も悪いとされているが、男女差を比較した報告はない。本研究の目的は、肺 MAC 症の男性患者の臨床的特徴を明らかにすることである。

2003年から2016年の間に信州大学医学部附属病院外来を受診した患者を診療録より後方視的に抽出した。本研究では、肺 MAC 症は、米国胸部疾患学会 (ATS) と米国感染症学会 (IDSA) から合同で発表された statement によって診断した。臨床データは診断時から 1 か月以内の結果を用いた。画像は、HRCT にて NB 型、FC 型、その他に分類した。病勢の悪化は、症状の増悪、画像の増悪、または微生物学的な増悪などより総合的に判断した。

その結果、生山は次の結論を得た。

1. 研究期間中、対象患者は234名 (男性68名, 女性166名) であった。診断時の平均年齢は、女性より

も男性の方が高かった ($P < 0.001$)。

2. 画像所見に関して、男性では57名 (83.8 %) が NB 型, 6名 (8.8 %) が FC 型 (7.4 %) であった。女性では155名 (93.4 %) が NB 型, 7名 (4.2 %) が FC 型であった。男性, 女性の間有意差を認めなかった ($P = 0.067$)。
3. 男女で BMI に有意な差を認めなかった。男性の方が女性より多剤併用療法が施行された患者は少なく ($P < 0.001$), 喫煙歴, アルコール摂取量は有意に多かった ($P < 0.001$)。診断時のリンパ球数, TP, ALB は男性の方が女性より有意に低値であった (それぞれ $P = 0.034$, $P = 0.01$, $P < 0.001$)。
4. 男性の方が女性より有意に悪性腫瘍, COPD の合併が多かった ($P = 0.002$, $P < 0.01$)。
5. カプランマイヤー法にて比較し、増悪までの期間に男女で有意な差を認めなかった ($P = 0.67$)。

これらの結果より、本研究期間における男性肺 MAC 症における NB 型の割合は、既報と比較し増加していること、および、病勢の増悪までの期間は男女で有意な差を認めないことが明らかとなった。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。

Detecting copy number alterations of oncogenes in cell-free DNA to monitor treatment response in acral and mucosal melanoma (末梢血中の Cell-free DNA のコピー数異常を用いた肢端型・粘膜型メラノーマ患者での治療効果の評価)

御子柴 飛鳥

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 進行期メラノーマの治療はここ数年で目覚ましく進歩した。個々人にあった治療を進めていく上で、治療効果を正確に反映するバイオマーカーが必要である。現在、Lactate Dehydrogenase (LDH) が広く使われているが、非特異的なことも多く、病勢を反映するマーカーが必要とされている。Circulating tumor DNA (ctDNA) は、末梢血中の腫瘍由来の DNA であり腫瘍細胞と同様の遺伝子異常を有している。メラノーマでは、*BRAF* や *NRAS* の変異 DNA をターゲットとして、ctDNA が解析されている。メラノーマはサブタイプごとに、遺伝子変異に特徴を有しており、表在拡大型では *BRAF* 変異の頻度が高い。しかし、黄色人種に多い肢端型、粘膜型では特異的な遺伝子変異が少なく、ctDNA の解析が進んでいない。

一方で肢端型、粘膜型メラノーマでは、Copy number alterations (CNA) の頻度が高いとされ、癌遺伝子である *KIT*, *CDK4*, *CCND1* でもしばしばコピー数が増加し、メラノーマの増殖との関連が指摘されている。そこで、肢端型、粘膜型メラノーマにおいて、*KIT*, *CDK4*, *CCND1* の CNA の頻度を調べた。さらに、末梢血中から DNA を分離し *KIT*, *CDK4*, *CCND1* の Copy number ratio (CN ratio) を定量し、メラノーマの病勢を反映するバイオマーカーになりうるか検討することとした。

【材料及び方法】 本研究では、メラノーマ患者37人 (肢端型27人, 粘膜型10人) を対象とした。Droplet digital PCR を用いて CN ratio を解析し、CN ratio は標的遺伝子 / *APOB* 遺伝子 (reference gene) $\times 2$ で計算した。Copy number gain (CN gain) は、カット

オフ値より大きい値と定義した。

【結果】対象患者の腫瘍組織を用いて遺伝子変異 (*BRAF*, *NRAS*, *KIT*) の頻度を調べた。いずれの遺伝子変異も有しない症例が肢端型では55.6%, 粘膜型では90%と半数以上であり, 変異型 ctDNA はバイオマーカーとして不適であった。一方, *KIT*, *CDK4*, *CCND1* の CN ratio を定量すると, 1つ以上の遺伝子で CN gain を認める症例は肢端型では62.9%, 粘膜型では70%と高頻度であった。また免疫染色の結果から, CN ratio が高いことがタンパク質の高発現に関与していると思われた。これらの結果から *KIT*, *CDK4*, *CCND1* の CN ratio を肢端型, 粘膜型のメラノーマ患者の末梢血でモニタリングできないか検討することとした。腫瘍組織の CN ratio が上昇していた患者24人を対象とし, 末梢血の DNA を用いて腫瘍由来の CN gain を検出できるか調べた。*KIT* と *CCND1* では末梢血の CN ratio は健常人と比較してメラノーマ患者で有意に上昇していた。また, 臓器転移 (リンパ節転移を除く) がある患者は, ない患者と比較し血漿の CN ratio が有意に上昇しており, その中でも腫瘍組織の CN ratio が高い患者では特に末梢血の CN ratio が高かった。以上より, 組織の CN ratio が高かつ全身の腫瘍量が多い患者では末梢血の CN ratio が上昇しており, *KIT*, *CDK4*, *CCND1* の CN ratio がバイオマーカーになり得ると考えた。実際に, 腫瘍組織の CN ratio が高く臓器転移がある場合, 病勢の変化に応じての末梢血の CN ratio が変化した。ただし, 腫瘍組織の CN ratio が高い点, 臓器転移がある点の両者を満たさない場合, 末梢血の CN ratio は病勢に応じて変化せず感度は高いと言えなかった。

【結論】肢端型, 粘膜型のメラノーマでは *KIT*, *CDK4*, *CCND1* の CN gain を高頻度に認め, これらの CN gain はタンパク質発現を介して腫瘍の病態に関わると思われた。また, 腫瘍組織の CN ratio が高く, 臓器転移 (リンパ節転移を除く) がある患者においては, 末梢血の CN ratio が病勢に応じて変化した。LDH は簡便かつ頻回に採取でき汎用性あるマーカーであるが, 非特異的に上昇することがある。画像検査は正確だが頻繁な実施は困難である。肢端型, 粘膜型のメラノーマでは, 末梢血の CN ratio を LDH や画像検査とともに用いることでより正確な病勢の評価が可能になると考えた。

(論文審査の結果の要旨)

進行期メラノーマの診療において, 治療効果を正確

に反映するバイオマーカーが求められている。現在, Lactate Dehydrogenase (LDH) が広く使われているが, 腫瘍と非特異的に上昇することがある。画像評価は正確であるが頻回に施行できない。Circulating tumor DNA (ctDNA) は末梢血中の腫瘍由来 DNA であり腫瘍細胞と同様の遺伝子異常を有する。メラノーマでは, *BRAF* や *NRAS* の変異 ctDNA が解析されている。メラノーマは病型ごとに遺伝子異常が異なり黄色人種に多い肢端型, 粘膜型では特異的な遺伝子変異が少なく, ctDNA に焦点をあてた解析が進んでいない。一方で, これらの病型は Copy number alterations (CNA) の頻度が高い。癌遺伝子である *KIT*, *CDK4*, *CCND1* でもコピー数の増加が報告されている。そこで, 腫瘍組織を用いて *KIT*, *CDK4*, *CCND1* の Copy number ratio (CN ratio) を調べた。さらに, 末梢血中から DNA を抽出し *KIT*, *CDK4*, *CCND1* の CN ratio を定量し, メラノーマの病勢を反映するバイオマーカーになりうるかを検討した。

本研究では, メラノーマ患者37人 (肢端型27人, 粘膜型10人) を対象とした。腫瘍組織と血漿について Droplet digital PCR を用いて CN ratio を解析した。「CN ratio = 標的遺伝子 / APOB 遺伝子 (reference gene) × 2」と計算して求めた。カットオフ値以上の値を Copy number gain (CN gain) と定義した。腫瘍組織の免疫染色を行った。

その結果, 御子柴は次の結果を得た。

1. 肢端型の62.9%, 粘膜型の70%に *KIT*, *CDK4*, *CCND1* の CN gain を認めた。
2. *KIT*, *CDK4* において CN gain は蛋白質発現に関与していた。
3. 腫瘍組織の CN ratio > 5 かつ臓器転移がある患者において末梢血の CN ratio は上昇しており, モニタリングが可能であった。

これらの結果より, 肢端型, 粘膜型のメラノーマでは *KIT*, *CDK4*, *CCND1* の CN gain を高頻度に認め, 組織の CN ratio > 5 かつ臓器転移がある症例では末梢血の CN ratio は有用なバイオマーカーになりうると思われた。

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

A comparison of the features of fluorine-18 fluorodeoxyglucose-positron emission tomography (FDG-PET) between IgG4-related disease with bilateral hilar lymphadenopathy and sarcoidosis (両側肺門リンパ節腫脹を伴う IgG4関連疾患とサルコイドーシスの PET-CT 所見の比較検討)

小 沢 陽 子

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】 IgG4関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) とサルコイドーシス (サ症) はいずれも様々な臓器に病変を呈する全身疾患であり、両疾患とも胸部 Computed Tomography (CT) では両側肺門リンパ節腫脹 (bilateral hilar lymphadenopathy: BHL) を呈することが多く、肺病変はリンパ路沿いに進展する。また、fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) では高率に肺門リンパ節に FDG 集積を認める。両疾患とも呼吸器症状が軽微で炎症反応を伴わない症例が多いことから、臨床的には鑑別が難しく、画像的にサ症が疑われていた症例のなかに未診断の IgG4-RD が含まれていることも報告されている。BHL を伴う IgG4-RD とサ症において、FDG-PET における FDG 集積の分布と程度の違いを明らかにする目的で本研究を行った。

【方法】 対象は2004年1月から2015年12月の期間に当院を受診し、BHL を伴う IgG4-RD と診断された25例と、病理学的にサ症 (病期 I-II) と診断された15例である。全例が相澤病院で FDG-PET 検査を施行された。臨床情報は電子カルテから抽出し、後方視的に解析した。3人の放射線科医が臨床情報なしに FDG 集積の有無を判定し、肺門リンパ節の FDG 最大標準化取り込み値 (SUVmax) は相澤病院で定量し、2群間で FDG の集積分布と SUVmax を比較検討した。データの解析は、性差、FDG 集積の有無にはカイ2乗検定を、血液検査データ、SUVmax の比較には Mann-Whitney の U 検定を用い、 p 値 <0.05 を有意とした。

【結果】 IgG4-RD 群 (男性21人、女性4人、年齢中央値69歳) はサ症群 (男性3人、女性12人、年齢中央値55.4歳) に比して有意に男性が多く高齢であった。血液検査では、血清 Cr、CRP、IgG、可溶性 IL-2レセプター、白血球数、好酸球分画 (数) が IgG4-RD 群で有意に高値であった。また、サ症群では ACE が有意に高値であった。FDG 集積を両群で比較すると、IgG4-RD 群では涙腺、顎下腺、膵臓、前立腺、尿道

周囲および動脈周囲領域で有意に高率な FDG 集積を、サ症群では、鎖骨上および腹部のリンパ節、筋肉や軟部組織において有意に高率な FDG 集積を認めた。さらに、肺門リンパ節の SUVmax は IgG4-RD 群 (中央値4.20) よりもサ症群 (中央値7.20) で有意に高値であった ($p=0.002$)。

【考察】 両群の FDG 集積に有意な差が認められた理由について考察する。最近、IgG4-RD においては、細胞外マトリックスタンパク質の一種である Laminin511-E8 に対する自己免疫反応が関与していることが報告されており、自己抗体が病因であると認識されるようになってきた。この自己抗体およびその他の抗原となるタンパクの分布が病変に影響を与えていると考えた。一方、サ症は *P. acnes* の感染を背景に、宿主側の素因が関与して Th1 タイプの過剰な免疫反応が生じ、*P. acnes* が潜伏感染する部位へ肉芽腫形成を来す機序が考えられている。最近、我々は気管支肺泡洗浄液を解析し、病変部位で IgG4-RD が Th2 優位、サ症が Th1 優位であることを報告した。詳細な機序は不明であるが、両疾患の病因や病態の違いが FDG の集積に影響していると考えた。また、SUVmax の差には、両疾患におけるグルコーストランスポーター (GLUT) の発現の違いが関与している可能性があると考えた。さらに、両疾患の臨床において FDG-PET は悪性腫瘍の発見と疾患活動性の評価に有用と考えられる。本研究で示した両疾患の典型的な FDG 集積を認識することで、異常集積を的確に検出し、悪性腫瘍の診断に寄与できる。また、サ症では突然死のリスクになる活動性心病変の評価に有用である。一方、IgG4-RD においては、CT で検出が困難であった血管病変の活動性を FDG 集積で初めて指摘できた症例があり、血管破裂のリスク回避も期待される。

【結論】 両疾患は肺のリンパ路沿いに病変が進展し、高率に BHL を呈するが、FDG の集積分布と肺門リンパ節の SUVmax には有意な違いが認められた。両疾患の病因と病態の違いが、FDG の集積分布と強度に影響していると考えた。

(論文審査の結果の要旨)

IgG4関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) とサルコイドーシス (サ症) はいずれも様々な臓器に病変を呈する全身疾患であり, 両疾患とも胸部 Computed Tomography (CT) では両側肺門リンパ節腫脹 (bilateral hilar lymphadenopathy: BHL) を呈することが多く, 肺病変はリンパ路沿いに進展する。また, fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) では高率に肺門リンパ節に FDG 集積を認める。両疾患において, BHL を呈し, FDG-PET を施行した症例を集め, FDG 集積の程度と分布に関して比較検討を行った。

対象は当院で診断された IgG4-RD で BHL を伴う 25 例と, 病理学的にサ症 (病期 I-II) と診断された 15 例である。全例が相澤病院で FDG-PET 検査を施行された。臨床情報, FDG 集積分布, 肺門リンパ節の FDG 最大標準化取り込み値 (SUVmax) について比較検討した。

その結果, 下記の結果を得た。

1. IgG4-RD 群はサ症群に比して有意に男性が多く高

齢であった。血液検査では, 血清 Cr, CRP, IgG, 可溶性 IL-2 レセプター, 白血球数, 好酸球分画 (数) が IgG4-RD 群で有意に高値, サ症群では ACE が有意に高値であった。

2. IgG4-RD 群では涙腺, 顎下腺, 脾臓, 前立腺, 尿道周囲および動脈周囲領域で有意に高率な FDG 集積を, サ症群では, 鎖骨上および腹部のリンパ節, 筋肉や軟部組織において有意に高率な FDG 集積を認めた。

3. 肺門リンパ節の SUVmax は IgG4-RD 群 (中央値 4.20) よりもサ症群 (中央値 7.20) で有意に高値であった。

これらの結果により, 両疾患は肺のリンパ路沿いに病変が進展し, 高率に BHL を呈するが, FDG の集積分布と肺門リンパ節の SUVmax には有意な違いが認められた。両疾患の病因と病態の違いが, FDG の集積分布と強度に影響していると考えられた。

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

Effectiveness of a genetic test panel designed for gynecological cancer: an exploratory study (婦人科癌用に設計された遺伝子検査パネルの有用性: 探索的研究)

井 田 耕 一

(論文の内容の要旨)

【研究の背景と目的】近年, 次世代シーケンサー (NGS) の開発・普及により日常検査レベルで遺伝子の網羅的解析が可能となり, 特に癌における precision medicine にこの技術が応用され始めた。すなわち, 癌の発生や進行に関与する複数の遺伝子の変異を解析する遺伝子パネル検査により, 当該腫瘍のドライバー変異を同定し, その遺伝子変異に対する治療薬が選択される医療が, いわゆるクリニカルシーケンスとして実現しつつある。一方, 本邦で保険適応となった遺伝子パネル検査は腫瘍横断的にデザインされているため, NCC オンコパネルが 114 遺伝子, FoundationOne CDx が 324 遺伝子と, 多数の遺伝子が包括的に搭載されており, 婦人科癌に関連の乏しい遺伝子も多い。また, これら既存の遺伝子パネル検査は 56 万円と高額であり, 末期癌患者とその家族には負担が大きい上に, ここで見いだされる遺伝子変異のうち, 治療標的となる可能性のある「actionable 変異」が見いだされる患者は 30-50% であり, さらに, 標的治療薬が検

証されている「druggable 変異」から, 実際に個別医療を受ける患者は 3-13% に留まる。つまり, 既存パネルは効率, 費用対効果といった面で, 未解決の多くの問題が存在する。こうした問題に対応すべく, 当教室では婦人科癌で変異報告のある 28 の actionable かつ druggable な遺伝子に絞った新規遺伝子パネル TANRE-G (Targeted variants ANalysis RElated to Gynecological cancers) を設計して, 婦人科癌における precision medicine の効率化・コスト削減を図り, さらに自施設の NGS 解析の精度検証を目標とした。

【方法】既報の婦人科癌に関する文献や, CIViC, OncoKB, ClinicalTrials.gov などの公開データベースを参照し, 婦人科癌で変異頻度の高い actionable/druggable な 28 遺伝子を選択した。なお TP53 遺伝子には治療可能性を有する標的薬が現時点で存在しないため除外した。2016 年から 2017 年に信州大学医学部附属病院で治療した再発・難治性の婦人科癌 11 症例 (子宮体癌 4 例, 卵巣癌 4 例, 子宮頸癌 3 例) を後方視的に選択し, すべて初回手術より検体を得て, 同一症例

において適切にホルマリン固定された組織より腫瘍と正常子宮筋層（コントロール）のDNAを抽出し、ペア解析を行った。年齢の中央値は57歳（44-78歳）で、11症例中6例がⅢ-Ⅳ期の進行癌であった。シーケンス解析にはIon PGMを用い、変異抽出にはTorrent Variant Caller（5.8.0.19）とIntegrative Genomics Viewer Version 5.01（0）を用いた。遺伝子変異やコピー数変異の解析にはIonReporter Software 5.6を使用し、変異候補抽出は公開データベースであるSIFT, Polyphen-2, ClinVarを用いて行った。また抽出された遺伝子変異候補に対してはSanger法を用いて、そしてコピー数変異については免疫染色法によりそれぞれ検証を行った。

【結果】 腫瘍および正常組織DNAの標的配列領域の平均read数はそれぞれ3400×と350×であり、解析に十分であった。Actionable変異は全11症例で32か所が同定され、内訳はmissense変異22か所（69%）、nonsense変異6か所（19%）、frameshift-deletion変異1か所（3%）、amplification3か所（9%）であった。腫瘍毎のactionable変異は、子宮体癌4例に18変異（コピー数変異なし）、卵巣癌3例に5変異（うちコピー数変異2）、子宮頸癌1例に2変異（うちコピー数変異1）が同定された。それぞれの変異はSanger法でも確認され、amplificationについては免疫染色で当該分子の発現増強が確認された。このTANRE-Gにおけるactionable変異の検出率は11例中8例（73%）であり、既存のNCCオンコパネル（45%）と同等であった（ $p=0.115$ ）。またTANRE-Gの検査コストは94,000円（850USD）に削減できた。

【結論】 本探索的研究により、当科で設計した婦人科癌用の新規遺伝子パネルTANRE-Gは、大幅な検査コスト削減を達成しつつ、婦人科癌においては既存のパネルと同等のactionable変異抽出率を保持しており、既存パネルに比較して費用対効果が大きいことが示された。本パネル検査は、今後進められる婦人科癌のprecision medicineにおいて、有力なツールとなる可能性が考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

近年、患者の癌組織の遺伝子変異を網羅的に調べ、その変異に基づいて薬剤を選択する、いわゆるクリニカルシーケンスが普及してきた。しかし、既存のクリニカルシーケンスに用いられている遺伝子パネルでは、婦人科癌に関連の乏しい遺伝子が多く含まれ、検査費用が50万円以上（保険適応で約20万円）と高価である。さらに遺伝子変異を同定しても実際に治療に至る患者は数%程度に留まり、効率と費用対効果において未解決の問題が多く存在する。こうした問題に対応すべく、婦人科癌で変異報告のある28のactionable（治療の標的となりうる変異）かつdruggable（薬剤選択が可能な変異）な遺伝子に絞った新規遺伝子パネルを設計し、自施設でDNA抽出と次世代シーケンサー（NGS）による変異解析を行い、婦人科癌におけるprecision medicineの効率化とコスト削減を図った。さらに本解析の精度検証を行った。

その結果、井田耕一は以下の結論を得た。

1. Actionable変異は、全11症例の再発・難治性の婦人科癌において32か所で同定され、内訳はmissense変異22か所（69%）、nonsense変異6か所（19%）、frameshift-deletion変異1か所（3%）、amplification3か所（9%）であった。
2. 自施設のNGS解析において、一般的に必要とされる標的配列領域のリード数を十分確保できた。Actionable変異の検出率は本パネルが11症例中8例（73%）であり、保険適応のあるNCCオンコパネル（45%）と同等であった（ $p=0.115$ ）。全ての変異はサンガー法や免疫染色により再確認された。
3. DNA抽出からNGSによる変異解析までの費用を約10万円に削減できた。

以上より、本パネルには婦人科癌におけるprecision medicineの効率化とコスト削減を実現できる可能性があり、解析精度は既存のパネルとほぼ同等であることを確認できた。したがって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Prevalence and Risk Factors of Carpal Tunnel Syndrome in Japanese Aged 50 to 89 Years
（日本における50～89歳の手根管症候群の罹患率と危険因子）

橋 本 瞬

（論文の内容の要旨）

【背景】 手根管症候群（carpal tunnel syndrome:

CTS）は最も頻度の高い絞扼神経障害であるが、一般住民に対して臨床症状と神経伝導速度検査を用いて

診断を行い、罹患率を調査した報告は少ない。また東アジアにおける CTS の疫学調査は韓国からの 1 文献のみである。本研究の目的は、住民台帳より無作為に抽出したコホートに対して臨床症状と神経伝導速度検査を用いて診断を行い、CTS の疫学を調査することである。

【方法】 本研究は当教室が行っている高齢者の検診を兼ねた運動機能に関する疫学調査“おぶせスタディ”の研究の一つである。“おぶせスタディ”は、長野県小布施町の住民基本台帳から無作為に抽出した50歳から89歳の住民を対象とした。10歳毎の各年代の男女がそれぞれ約50人ずつ合計約400人になるまで参加を依頼した。既往歴、飲酒、喫煙などの生活習慣、精神状態や職業などのアンケート調査と、医師による骨密度、筋力、神経機能の測定、X線撮影などからなる。本研究では手関節周囲の骨折の既往歴がある者と、質問票にデータ欠損がある者は除外した。CTS に対して手根管開放術を行ったと答えた者は CTS の既往ありとした。正中神経領域の感覚異常があり、正中神経の神経伝導速度検査で遅延を認めた者を CTS 有病者とした。CTS の既往ありと CTS 有病者を合わせて、CTS 罹患者とした。CTS に関連する因子を単変量および多変量ロジスティック回帰分析を使用して検討した。P<0.05を有意水準とした。

【結果】 対象者数は379人で、女性14人、男性3人の計17人が CTS 罹患者であった。CTS 罹患率は女性7.4%、男性1.6%、全体で4.5%であった。50歳から89歳の日本人の人口構成に合わせて調整した年齢調整罹患率は女性7.2%、男性1.8%、全体で4.7%であった。各年代別の罹患率の違いに明確な傾向は認められなかった。統計学的に CTS 罹患と関連していた因子は女性、高い BMI、関節リウマチ、弾発指であった。女性では短い第3中手骨長も CTS 罹患の因子であった。

【考察】 本研究の利点は、被験者の無作為抽出を行ったため選択バイアスが小さい点である。このように地域住民から無作為抽出を行った一般者を対象として CTS の疫学調査を行った研究は過去にわずかである。一方、過去の研究の多くは病院受診患者を対象として調査した研究である。本研究では参加を拒否した者がおり、検診なので疾病に興味のある者が参加する可能性があるため、各疾患の罹患率が高く見積もられる可能性がある。認知症の者を除外していないので想起バイアスの危険性がある。2つの検査を共に満たす者

を手根管症候群と診断している点、手根管症候群既往の調査では手術既往のある者のみを手根管症候群と判定している点は軽症の手根管症候群を見逃している可能性がある。先行研究において CTS の関連因子として女性、肥満、糖尿病、長期血液透析、甲状腺機能異常、関節リウマチ、手の過使用、振動工具作業、手が小さいことなどが挙げられている。本研究では女性、高い BMI、関節リウマチ、弾発指、女性における短い第3中手骨長が CTS 関連因子であったが、糖尿病、甲状腺機能異常、重労働、振動工具作業などの因子は CTS と関連を認めなかった。

【結論】 本研究は50歳から89歳の日本人の年齢調整罹患率は4.7%であること、CTS 関連因子には女性、高い BMI、関節リウマチ、弾発指、女性における短い第3中手骨長があることを明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

手根管症候群 (carpal tunnel syndrome: CTS) は最も頻度の高い絞扼神経障害であるが、一般住民に対して臨床症状と神経伝導速度検査を用いて診断を行い、罹患率を調査した報告は少ない。また東アジアにおける CTS の疫学調査は韓国からの 1 文献のみである。本研究の目的は、住民台帳より無作為に抽出したコホートに対して臨床症状と神経伝導速度検査を用いて診断を行い、CTS の疫学を調査することである。

長野県小布施町の住民基本台帳から無作為に抽出した50歳から89歳の住民379人を対象とし、CTS 罹患の有無と既往歴の調査、骨密度・筋力・神経機能の測定、四肢・脊椎のX線写真撮影、血液検査を行った。本研究では手関節周囲の骨折の既往歴がある者と、質問票にデータ欠損がある者は除外した。CTS に対して手根管開放術を行ったと答えた者は CTS の既往ありとした。正中神経領域の感覚異常があり、正中神経の神経伝導速度検査で遅延を認めた者を CTS 有病者とした。CTS の既往ありと CTS 有病者を合わせて、CTS 罹患者とした。CTS に関連する因子を単変量および多変量ロジスティック回帰分析を使用して検討した。P<0.05を有意水準とした。

その結果以下の成績を得た。

1. 女性14人、男性3人の計17人が CTS 罹患者であった。CTS 罹患率は女性7.4%、男性1.6%、全体で4.5%であった。
2. 50歳から89歳の日本人の人口構成に合わせて調整した年齢調整罹患率は女性7.2%、男性1.8%、全体で4.7%であった。

3. 各年代別の罹患率の違いに明確な傾向は認められなかった。
4. 統計学的に CTS 罹患と関連していた因子は女性、高い BMI、関節リウマチ、弾発指であった。女性では短い第3中手骨長も CTS 罹患の因子であった。これらの結果より、50歳から89歳の日本人の年齢調

整罹患率は4.7%であること、CTS 関連因子には女性、高い BMI、関節リウマチ、弾発指、女性における短い第3中手骨長があ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。

DNA repair protein RAD51 enhances the CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency in brain neurons (DNA 修復タンパク質 RAD51は脳の神経細胞での CRISPR/Cas9を介した遺伝子ノックイン効率を上昇させる)

栗原大河

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 これまで遺伝子の機能を生体で解析するにはマウス ES 細胞を用いた遺伝子ターゲティングが行われていた。通常、マウス ES 細胞からマウスを作成するまでには膨大な労力と時間が必要だが、近年開発された CRISPR-Cas9 システムでは幅広い生物種で迅速なゲノム編集が可能になり、遺伝子機能の解析が盛んに行われている。

CRISPR-Cas9 システムを用いると、相同組換え修復による遺伝子ノックインも可能だが、相同組換え修復は分裂細胞においてのみ起こることから、非分裂細胞である神経細胞では、相同組換え修復による遺伝子ノックインは困難であり、これまでに神経細胞において相同組換え修復による遺伝子ノックインは報告されていなかった。

しかし、私たちは2016年に CRISPR/Cas9 システムと子宮内エレクトロポレーション法を組み合わせることにより、脳神経細胞で遺伝子をノックインすることに成功した。

この方法を用いると神経細胞への遺伝子ノックインが可能になるが、遺伝子ノックイン効率はおよそ2%だった。この効率は、単一のニューロンの形態および分子機能を解析する上では非常に適しているが、脳機能を解析するためにはより多くの神経細胞において遺伝子を改変することが必要である。そこで本研究では遺伝子ノックインの高効率化を目的とした。

【方法】 本研究では CRISPR/Cas9 システムと子宮内エレクトロポレーション法を組み合わせることにより遺伝子ノックインを行った。E15.5の子宮内胎児脳の脳室に EGFP ドナープラスミド、Cas9/gRNA の発現プラスミド、レポータープラスミドを導入し、子宮内エレクトロポレーションを用いて遺伝子導入した。

EGFP ドナーを用いた相同組換え修復が起きることにより、 β -actin 遺伝子の N 末端に EGFP cDNA がノックインされる。相同組換えのノックイン効率に関係する要因として二つのことが考えられる。一つは、ドナーベクターの持つ相同領域の長さを改良することである。相同領域の長さを長くすることで、ゲノムとの親和性が高まり、相同組換えの効率が高まることが報告されている。そこで私は、ドナーベクターの相同領域の長さを改良した3種類のベクターを作成した。一つ目は3末端を1.0 kbp に伸ばしたもの、二つ目は3末端を2.0 kb に伸ばしたもの、三つ目は二つ目のドナーベクターの5末端を1.6 kbp に伸ばしたものを作成した。もう一つは DNA 修復過程の分子メカニズムを操作することである。相同組換え修復で中心的役割を果たしている DNA 修復タンパク質 Rad51 を過剰発現させることにより、遺伝子ノックイン効率が増加することが非神経細胞で報告されている。そこで私は、DNA 修復タンパク質 Rad51 を過剰発現することにより、神経細胞においても遺伝子ノックイン効率が増加するのかを調べた。

【結果】 両端にそれぞれ0.5 kb の相同領域をもつドナーベクターを用いた場合には、ノックイン効率は2%程度であったのに対し、相同領域の長さを1.6 kb-2.0 kb に伸ばしたドナーベクターを用いると、遺伝子ノックイン効率は14%程度まで上昇した。また、子宮内エレクトロポレーション法を行う際に相同領域が1.6 kb-2.0 kb のドナーベクターと RAD51 発現ベクターを同時に導入することで、ノックイン効率が25%まで上昇することを見出した。

【結論】 今回の研究ではドナーの相同領域の長さを伸ばし、かつ RAD51 を過剰発現させることにより、ノックイン効率を10倍以上に上昇させることに成功し

た。また、RAD51過剰発現による神経細胞への影響を発生過程での神経細胞の移動やスパインの密度などの形態への影響も認められなかった。また、異なるプラスミドベクターを用いても異なる遺伝子座においてもノックイン効率を上昇させることがわかった。このことから、RAD51遺伝子の過剰発現によるノックイン効率の上昇は、特定の遺伝子だけで機能する現象ではないことが分かった。

本研究により、脳神経細胞に外来遺伝子を高効率でノックインできる技術が確立できたと考えている。今後、さらなる高効率化が可能となれば、遺伝子変異により引き起こされる神経疾患の治療法の開発や精神疾患に関連する遺伝子群の機能解析に応用できるものと考えている。

(論文審査の結果の要旨)

遺伝子ノックインの高効率化を目指すために、相同領域の長さを1.6 kb-2.0 kb に伸長したドナーベクターを用いると、以前行った相同領域が0.5 kb のドナーベクターでの遺伝子ノックイン効率が2%程度であったのに対し、14%程度まで上昇した。また、子宮内エレクトロポレーション法を行う際に相同領域が1.6 kb-2.0 kb のドナーベクターとRAD51発現ベクターを同時に導入することで、ノックイン効率が25%まで上昇することを見出した。

しかし、これまでにRAD51を神経細胞に過剰発現させた報告はなく、本技術を脳機能解析に用いるためには、RAD51過剰発現が神経細胞に悪影響を及ぼさないことを調べておくことにした。

そこで、RAD51を過剰発現させた神経細胞では細胞移動、スパイン密度に影響があるかを調べた。

この神経細胞の分布様式は、RAD51を過剰発現さ

せた場合においても変わりはなかった。また、スパインの密度も、RAD51の過剰発現の有無に関わらず同程度だった。このように、RAD51を過剰発現させた神経細胞では細胞移動、スパイン密度には異常は観察されなかった。

また、異なるベクターの組み合わせでもRAD51過剰発現によりノックイン効率は上昇するのかを検証した。

β アクチン遺伝子の別の領域を切断するガイドRNA発現ベクターとドナーベクターを用いた場合においてもRAD51過剰発現により遺伝子ノックイン効率が2倍程度上昇することが分かった。

次に、脳神経細胞に豊富に発現していることから β アクチン遺伝子とは異なるCamK2a遺伝子でもRAD51共発現によってノックイン効率は上昇するのかを調べた。その結果、RAD51共発現下ではEGFPノックイン効率がおよそ2.5倍に上昇した。

今回の研究ではドナーの相同領域の長さを伸長し、かつRAD51を過剰発現させることにより、ノックイン効率を10倍以上に上昇させることに成功した。そして、RAD51過剰発現による神経細胞の移動やスパインの密度などの形態への影響も認められなかった。また、異なるプラスミドベクターを用いても、異なる遺伝子座においてもノックイン効率を上昇させることがわかった。このことから、RAD51遺伝子の過剰発現によるノックイン効率の上昇は、特定の遺伝子だけで機能する現象ではないことが分かった。

本研究により、脳神経細胞に外来遺伝子を高効率でノックインできる技術が確立できた。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Therapeutic effects of Choreito, a traditional Japanese (Kampo) medicine, on detrusor overactivity induced by acetic acid in rats (酢酸誘発性排尿筋過活動ラットにおける猪苓湯の治療効果)

上 野 学

(論文の内容の要旨)

【目的】漢方薬である猪苓湯 (Choreito, CRT) は、過活動膀胱 (OAB) およびその他の下部尿路症状 (LUTS) の治療に広く使用されている。その薬理効果は抗炎症作用を有することで、LUTS治療に有効であると考えられている。本研究では、酢酸誘発性排尿筋過活動ラットモデルを使用して排尿筋過活動 (DO) に対す

る猪苓湯の治療効果を検討した。

【方法】10週齢雌 Sprague-Dawley ラットを、2週間の通常飼料飼育をしたあと膀胱内に生理食塩水を灌流する群 (normal group)、同様に2週間通常飼料飼育をしたあと膀胱内に酢酸 (Acetic Acid, AA) を灌流する群 (AA group)、および2週間の猪苓湯混餌飼料飼育をしたあと膀胱内に酢酸を灌流する群 (AA

with CRT group)に分けた。それぞれの群で膀胱内圧測定を行い、基底圧、排尿圧、排尿間隔、1回排尿量、膀胱容量を測定した。膀胱内圧測定後、膀胱を摘出して組織学的解析を行った。また、レーザー血流計を使用して膀胱微小循環の評価を行った。

【結果】膀胱内圧測定において normal group, AA group, AA with CRT group の排尿間隔時間はそれぞれ 7.2 ± 1.6 分, 2.1 ± 0.3 分, 4.2 ± 0.4 分であり、1回排尿量はそれぞれ 1.2 ± 0.3 ml, 0.4 ± 0.1 ml, 0.7 ± 0.1 ml であった (いずれも $p < 0.01$)。膀胱微小循環解析においては、酢酸灌流によって増加した膀胱血流が猪苓湯投与によって軽減した。膀胱組織学的解析においては、HE 染色における観察で normal group に比して AA group では尿路上皮下の間質浮腫変化が強く、AA with CRT group で浮腫性変化が軽減した。免疫染色では、HIF-1 α および UPⅢ はすべての群の尿路上皮で発現したが、群間での明らかな違いは観察されなかった。

【結論】猪苓湯は、ラット実験モデルで膀胱内酢酸灌流によって誘発された DO を緩和させた。また、猪苓湯は、尿路上皮損傷の軽減と過剰血流の調節を介して、OAB に治療効果をもたらす可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

漢方薬である猪苓湯 (Choreito, CRT) は、過活動膀胱 (OAB) およびその他の下部尿路症状 (LUTS) の治療に広く使用されている。その薬理効果は抗炎症作用を有することで、LUTS 治療に有効であると考えられている。本研究では、酢酸誘発性排尿筋過活動ラットモデルを使用して排尿筋過活動 (DO) に対する猪苓湯の治療効果を検討した。

10週齢雌 Sprague-Dawley ラットを、2週間の通常飼料飼育をしたあと膀胱内に生理食塩水を灌流する群 (normal group)、同様に2週間通常飼料飼育食をしたあと膀胱内に酢酸 (Acetic Acid, AA) を灌流す

る群 (AA group)、および2週間の猪苓湯混餌飼料飼育をしたあと膀胱内に酢酸を灌流する群 (AA with CRT group)に分けた。それぞれの群で膀胱内圧測定を行い、基底圧、排尿圧、排尿間隔、1回排尿量、膀胱容量を測定した。膀胱内圧測定後、膀胱を摘出して組織学的解析を行った。また、レーザー血流計を使用して膀胱微小循環の評価を行った。

その結果、上野 学は次の結論を得た。

1. 膀胱内圧測定において、normal group に比べて AA group で有意に排尿間隔時間の短縮、1回排尿量の減少を認めた。AA with CRT group では、AA group に比して有意に排尿間隔時間が延長、1回排尿量が増加していた。よって、酢酸に誘発される排尿筋過活動 (排尿間隔時間、1回排尿量、膀胱容量の低下) は、猪苓湯投与により抑制されたと考えられた。
2. 膀胱微小循環解析においては、酢酸灌流によって増加した膀胱血流が猪苓湯投与によって軽減した。
3. 膀胱組織学的解析においては、HE 染色における観察で normal group に比して AA group では尿路上皮下の間質浮腫変化が強く、AA with CRT group で浮腫性変化が軽減した。
4. 免疫染色では、hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) および uroplakin III (UPⅢ) はすべての群の尿路上皮で発現したが、群間での明らかな違いは観察されなかった。膀胱内0.2%酢酸灌流は、低酸素による影響は少ないことが示唆された。

これらの結果より、猪苓湯は、ラット実験モデルで膀胱内酢酸灌流によって誘発された DO を緩和させた。また、猪苓湯は、尿路上皮損傷の軽減と過剰血流の調節を介して、OAB に治療効果をもたらす可能性があると考えられた。

よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

In vitro inhibitory effects of sesamin on CYP4F2 activity (In vitro におけるセサミンの CYP4F2活性に対する阻害効果)

渡 辺 宏 晃

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】ゴマは栄養価が高く健康によいとされ、世界中で広く利用されている食品である。ゴマやその主要なリグナンであるセサミンは血圧を低下させることがメタ解析により示されている。その機序として、

セサミンが血管収縮因子である20-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (20-HETE) の産生を抑制することによって惹起される可能性が示唆されている。20-HETE は主にシトクロム P450 4F2 (CYP4F2) によってアラキドン酸から生成されるが、in vitro 実験

において、セサミンはヒト肝臓や腎臓のミクロゾームおよびCYP4F2組換え酵素による20-HETE産生を阻害することが報告されている。しかし、セサミンがCYP4F2の機能をどのような機序で阻害するのかは明らかではない。本研究では、CYP4F2活性に対するセサミンの影響をin vitroで明らかにすることを目的とした。

【方法】 ヒトCYP4F2組換え酵素を用いて、ルシフェリン-4F2/3 O-脱アルキル化酵素活性に対するセサミンの阻害効果を検討した。阻害が認められた場合、50%阻害濃度IC₅₀値の他、阻害様式および阻害定数K_i値を算出した。次いで、代謝依存的阻害が認められた場合、不活性化の速度論的解析を行い、最大不活性化速度定数k_{inactivation}値および半値阻害剤濃度K_i値を算出した。

【結果】 セサミンはCYP4F2活性を濃度依存的に阻害し、IC₅₀値(mean±S.D.)は0.381±0.031 μMであった。CYP4F2によるルシフェリン-4F2/3 O-脱アルキル化反応はsigmoid型の反応様式を示したことから、Hill式に当てはめて速度論的パラメーターを算出したところ、セサミンはV_{max}を低下させたが、S₅₀を上昇させた。一方、セサミンはHill係数nには影響を及ぼさなかった。これらの結果から、セサミンは混合型の阻害様式を示すことが示唆された。見かけのK_i値は0.272±0.041 μMであった。

セサミンがCYP4F2活性に対して代謝依存的な阻害作用を示すか否かを明らかにするため、プレインキュベーションの影響を検討した。セサミンはNADPH存在下で組換え酵素とプレインキュベーションすることによってCYP4F2阻害を顕著に増強した(プレインキュベーション時間が20分と0分のときのIC₅₀値はそれぞれ0.0634±0.0106 μM, 0.399±0.013 μM)。そこで、CYP4F2に対するセサミンの代謝依存的な阻害の様式と強さを明らかにするため、不活性化の速度論的解析を行った。セサミンはCYP4F2活性をプレインキュベーション時間依存的かつ濃度依的に阻害し、k_{inactivation}値およびK_i値はそれぞれ0.354±0.020 min⁻¹, 1.12±0.05 μMであった。セサミンによる不活性化はNADPH依存性を示した。

【考察】 本研究において、セサミンはCYP4F2組換え酵素のルシフェリン-4F2/3 O-脱アルキル化活性を効果的に阻害することが明らかとなった。先行研究において、セサミンは1 μMでCYP4F2組換え酵素によるトコフェロールのω-水酸化を強く阻害することや、

アラキドン酸のω-水酸化を濃度依的に阻害すること(IC₅₀値1.87 μM)が報告されている。これらの知見から、セサミンは用いる基質によらず、CYP4F2活性を阻害することが示された。さらに、本研究では、セサミンがCYP4F2を不活性化することを明らかにした。この不活性化はプレインキュベーション時間依存的および濃度依的であり、かつプレインキュベーション時にNADPHが必要であった。これらの結果は、セサミンによるCYP4F2の不活性化がセサミンの代謝を介して引き起こされる可能性を示唆した。また、これまでに17-オクタデシン酸やHET0016がCYP4F2を阻害することが知られているが、CYP4F2を不活性化することにより阻害作用を示す化合物はセサミンが初めてである。セサミンのCYP4F2に対する不活性化能(k_{inactivation}/K_i)は316 L/mmol/minであり、CYP2C9に対する不活性化能(138 L/mmol/min)よりも約2.3倍高かったことから、セサミンはCYP4F2に対してより強力な不活性化剤であることが明らかとなった。

【結論】 セサミンはヒトCYP4F2の不活性化剤であることが示された。セサミンの抗高血圧作用は20-HETE産生に関与するCYP4F2をセサミンが不活性化することによって惹起される可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

ゴマやその主要なリグナンであるセサミンは血圧を低下させることがメタ解析により示されている。その機序として、セサミンが血管収縮因子である20-ヒドロキシエイコサテトラエン酸(20-HETE)の産生を抑制することによって惹起される可能性が示唆されている。20-HETEは主にシトクロムP450 4F2(CYP4F2)によってアラキドン酸から生成されるが、in vitro実験において、セサミンはヒト肝臓や腎臓のミクロゾームおよびCYP4F2組換え酵素による20-HETE産生を阻害することが報告されている。しかし、セサミンがCYP4F2の機能をどのような機序で阻害するのかは明らかではない。本研究では、CYP4F2活性に対するセサミンの影響をin vitroで明らかにすることを目的とした。

ヒトCYP4F2組換え酵素を用いて、ルシフェリン-4F2/3 O-脱アルキル化酵素活性に対するセサミンの阻害効果を検討し、50%阻害濃度IC₅₀値の他、阻害様式および阻害定数K_i値を算出した。次いで、代謝依存的阻害の検討、不活性化の速度論的解析を行い、最大不活性化速度定数k_{inactivation}値および半値阻害剤

濃度 K_1 値を算出した。

その結果、渡辺は次の結果を得た。

1. セサミンは CYP4F2 活性を濃度依存的に阻害し、 IC_{50} 値 (mean \pm S.D.) は $0.381 \pm 0.031 \mu\text{M}$ であった。Hill 式に当てはめて速度論的パラメーターを算出したところ、セサミンは V_{\max} 値を低下させたが、 S_{50} 値を上昇させた。一方、セサミンは Hill 係数 n には影響を及ぼさなかったため、セサミンは競合型と非競合型が混在する混合型の阻害様式を示すことが示唆された。見かけの K_1 値は $0.272 \pm 0.041 \mu\text{M}$ であった。
2. セサミンは NADPH 存在下で組換え酵素とプレインキュベーションすることによって CYP4F2 阻害を顕著に増強した (プレインキュベーション時間

が 20 分と 0 分のときの IC_{50} 値はそれぞれ $0.0634 \pm 0.0106 \mu\text{M}$, $0.399 \pm 0.013 \mu\text{M}$)。

3. セサミンは CYP4F2 活性をプレインキュベーション時間依存的かつ濃度依存的に阻害し、 $k_{\text{inactivation}}$ 値および K_1 値はそれぞれ $0.354 \pm 0.020 \text{ min}^{-1}$, $1.12 \pm 0.05 \mu\text{M}$ であった。セサミンによる不活性化は NADPH 依存性を示した。

これらの結果より、セサミンはヒト CYP4F2 の不活性化剤であることが示された。セサミンの抗高血圧作用は 20-HETE 産生に關与する CYP4F2 をセサミンが不活性化することによって惹起され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。

Relationship between Physical Activity and Health-related Quality of Life in Hospitalized and Terminally Ill Cancer Patients (入院中終末期がん患者の身体活動と健康関連 QOL の関係)

山 鹿 隆 義

(論文の内容の要旨)

【背景】 がん治療の改善により、進行がん患者の生存期間が延長している。そうした中で終末期となっても進行がん患者の健康関連 QoL (HRQoL) を維持・向上する支援が求められている。近年、がん患者の身体活動 (PA) が ADL や HRQoL の改善に有効であるとされているが、外来患者を対象とした欧米での研究結果であり、入院中の進行がん患者の PA と HRQoL の関係は明確となっていない。本研究は本邦における入院中の進行がん患者における PA と HRQoL の関係を明らかにするために実施した。

【方法】 信州大学医学部附属病院に入院中の進行した悪性腫瘍および / または転移性悪性腫瘍の患者を対象とした。PA は一軸加速度計を使用し一週間測定した。QOL はがん疾患特異的 QOL 尺度である European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC QLQ-C30) で評価した。基本的動作能力は Revised Version of the Ability for Basic Movement Scale (ABMS)、日常生活動作能力は Functional Independence Measure の運動項目 (m-FIM) で評価をした。がん関連症状の評価は、Edmonton Symptom Assessment System Revised (ESAS) を用いた。統計学的解析は、軽度以上の負荷の PA が週 150 分以上群と週 150 分未満群の 2 群に分類し、2 群間で測定

項目を比較した。また PA に影響する因子を調査するためロジスティック回帰分析を実施した。

【結果】 本研究の最終的な解析対象は週 150 分以上群が 43 名、週 150 分未満群が 52 名の合計 95 名であった。本研究の対象者のほとんどが欧米のがんの身体活動ガイドラインで推奨されている中等度の負荷の基準値以上の PA には至っていなかった。軽度以上の負荷の PA が週 150 分以上群は、週 150 分未満群と比較し、EORTC QLQ-C30 の全体的な健康状態、身体機能、役割機能、感情機能、および社会機能が統計学的に有意に高かった。ABMS、m-FIM においても PA が週 150 分以上群で統計学的に有意に高かった。一方で、がん関連症状にはついて有意差を認めなかった。PA に影響する因子は、ABMS がもっとも有力な因子として挙げられた (OR = 2.249, 95 % CI : 1.062-4.764)。

【結語】 入院中の進行がん患者は欧米のがんの身体活動ガイドラインの推奨値の PA を得ることは困難であったが、軽度以上の負荷の PA でも QOL に関係することが明らかとなった。進行がん患者は歩行のような軽度の PA を週 150 分以上実施することが HRQoL に有効である可能性を示された。

(論文審査の結果の要旨)

がん治療の改善により、進行がん患者の生存期間が延長している。その様な背景の中で終末期となっても

進行がん患者の健康関連 QoL (HRQoL) を維持・向上する支援が求められている。近年、がん患者の身体活動 (PA) が ADL や HRQoL の改善に有効であるとされているが、外来患者を対象とした欧米での研究結果であり、入院中の進行がん患者の PA と HRQoL の関係は明確となっていない。本研究は本邦における入院中の進行がん患者における PA と HRQoL の関係を明らかにするために実施した。

信州大学医学部附属病院に入院中の進行した悪性腫瘍および/または転移性悪性腫瘍の患者を対象とした。PA は一軸加速度計を使用し一週間測定した。QOL はがん疾患特異的 QOL 尺度である European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC QLQ-C30) で評価した。基本的動作能力は Revised Version of the Ability for Basic Movement Scale (ABMS)、日常生活動作能力は Functional Independence Measure の運動項目 (m-FIM) で評価をした。がん関連症状の評価は、Edmonton Symptom Assessment System Revised (ESAS) を用いた。統計学的解析は、軽度以上の負荷の PA が週150分以上群と週150分未満群の2群に分類し、2群間で測定項目を比較した。また PA に影響する因子を調査するためロジスティック回帰分析を実施した。本研究の最

終的な解析対象は週150分以上群が43名、週150分未満群が52名の合計95名であった。

その結果、山鹿隆義は次のような結論を得た。

1. 本研究の対象者のほとんどが欧米のがんの身体活動ガイドラインで推奨されている中等度の負荷の基準値以上の PA には至っていなかった。
2. 軽度以上の負荷の PA が週150分以上群は、週150分未満群と比較し、EORTC QLQ-C30の全体的な健康状態、身体機能、役割機能、感情機能、および社会機能が統計学的に有意に高かった。
3. ABMS, m-FIM も PA が週150分以上群で統計学的に有意に高かった。
4. PA に影響する因子は、ABMS がもっとも有力な因子として挙げられた。

これらの結果より、入院中の進行がん患者は欧米のがんの身体活動ガイドラインの推奨値の PA を得ることは困難であったが、軽度以上の負荷の PA でも QOL に関係することが明らかとなった。進行がん患者では、歩行のような軽度以上の負荷の PA を週150分以上実施することが HRQoL に有効である可能性を示された。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。

Aldosterone to Potassium Ratio after Adrenocorticotropin Stimulation in Unilateral Primary Aldosteronism Diagnosis (片側性原発性アルドステロン症の診断における ACTH 負荷後のアルドステロン / カリウム比)

北原 順一郎

(論文の内容の要旨)

【背景】 原発性アルドステロン症 (PA) は、二次性高血圧の中で最も多い原因疾患であり頻繁に心血管合併症を引き起こす。PA の治療方針はアルドステロンを過剰分泌する副腎が片側性か両側性かによって異なるため、その判定が非常に重要である。現在はその判定に副腎静脈サンプリング (AVS) が推奨されているが、AVS の実施には技術的、侵襲的、医療経済的な問題もあることから、AVS の適応をより精密に決定する指標が求められている。生理食塩水負荷試験 (SIT) が PA の確定診断のみでなく、片側性 PA の診断にも有用であることが最近報告されているが、検査中の循環血漿量の増加や検査時間がかかることが難点である。一方、以前の研究では ACTH 負荷後の血清アルドステロン濃度 (PAC) と初回来院時の血清

カリウム値の比率が片側性 PA の診断に有用である可能性が報告されている。今回我々は ACTH 負荷前の血清カリウム値と負荷後の PAC より算出した PAC / カリウム比及び SIT の負荷後 PAC についてデータを収集しその値が片側性病変の診断に有用か評価した。【対象と方法】 2010年4月から2019年3月までに信州大学病院、長野市民病院、伊那中央病院で迅速 ACTH 負荷試験かつ/または SIT を実施後 AVS を施行した PA 患者79例のうちアルドステロン拮抗薬使用例2例と AVS で副腎静脈挿入が失敗した5例を除外した72例を評価した。日本内分泌学会及び日本高血圧学会のガイドラインに従い PA を診断した。AVS での優位側アルドステロン / コルチゾール (A/C) ÷ 対側 A/C が4を超えたものを片側性、それ以下の場合を両側性と定義した。片側性、両側性それぞれの背

景を比較した前述の検査結果の各指標について受信者動作特性曲線 (ROC) 及びその局面下面積 (AUC) を使用し診断精度を評価した。

【結果】 片側性では初診時 PAC が高値, 初診時カリウム濃度は低値, カリウム補充の症例が多かった。SIT は42例で実施され, 240分後の PAC (PAC₂₄₀) の ROC はカットオフ値133.7 pg/mL で, 感度は92.3 %, 特異度は93.1 %, AUC 0.92だった。迅速 ACTH 負荷試験は58例で実施された。0, 30, 60分の PAC の ROC の AUC はそれぞれ0.888, 0.926, 0.948だった。0, 30, 60分の PAC / コルチゾールの ROC の AUC は, それぞれ0.887, 0.888, 0.922だった。迅速 ACTH 負荷試験前にカリウム (低カリウム血症がある場合カリウム製剤を補充し補正した) は39例で測定されており, 0, 30, 60分の PAC / ACTH 負荷試験前のカリウムの ROC の AUC は, それぞれ0.979, 0.984, 0.971であった。PAC₃₀ / カリウムはカットオフ値136.8 pg/mEq で感度は100 %, 特異度は95.5 %であり, 最も有用な指標であった。初診時 PAC, ACTH 負荷試験の PAC 0分, 初期カリウム, および ACTH 刺激試験前の補正カリウムの ROC の AUC はそれぞれ0.918, 0.888, 0.907, 0.953で, 補正カリウムの AUC は初診時カリウムの AUC よりも大きかった。22例で SIT と迅速 ACTH 負荷試験及び負荷前のカリウム測定が実施されており, SIT の PAC₂₄₀ と迅速 ACTH 負荷試験の PAC₃₀ / カリウムの ROC の直接比較での AUC はそれぞれ0.929と0.964だった (p=0.627)。

【考察】 カリウム補充後実施された迅速 ACTH 負荷試験における PAC₃₀ / カリウムは, 片側性原発性アルドステロン症の診断に有用であった。SIT での PAC も同様に有用であったが SIT では迅速 ACTH 負荷試験と比較し循環血漿量増加と長時間の検査時間がデメリットとなるため迅速 ACTH 負荷試験がより臨床的には有用と考えられた。Limitation としては, 迅速 ACTH 負荷試験と SIT を両方実施した患者が少ないこと, 本研究での SIT は仰臥位で実施されたが, 座位で実施された場合に結果は異なる可能性があること, AVS のみに基づき片側性病変の判定が行われたため, 非手術例では病理学的検査ができず, 一部の APA が見逃された可能性があることが考えられた。

【結論】 迅速 ACTH 負荷試験の PAC₃₀ / カリウムは SIT と比較して, 片側性 PA の診断に臨床的に有用と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

本研究では原発性アルドステロン症 (PA) において片側性病変の可能性が高い症例を鑑別するのに有用な指標について, 迅速 ACTH 負荷試験における負荷後血清アルドステロン濃度 (PAC) / 負荷前血清カリウム値比, 及び生理食塩水負荷試験 (SIT) の負荷後 PAC についてデータを収集し評価した。2010年4月から2019年3月までに信州大学病院, 長野市民病院, 伊那中央病院で迅速 ACTH 負荷試験かつ / または SIT を実施後 AVS を施行した PA 患者79例のうちアルドステロン拮抗薬使用例2例と AVS で副腎静脈挿入が失敗した5例を除外した72例について AVS で Lateralization index > 4 を片側性, それ以下を両側性病変と定義し, 各病変の背景と, 前述の検査結果の各指標について受信者動作特性曲線 (ROC) を用いて診断精度を評価した。

その結果, 北原は以下の結果を得た。

1. 片側性では初診時 PAC が高値, 初診時カリウム濃度は低値, カリウム補充の症例が多かった。
2. SIT は42例で240分後の PAC (PAC₂₄₀) の ROC はカットオフ値133.7 pg/mL で, 感度は92.3 %, 特異度は93.1 %, AUC 0.92だった。
3. 迅速 ACTH 負荷試験は58例で実施され, カリウムは負荷試験直前または24時間以内に39例で測定された。0, 30, および60分の PAC / 負荷試験前カリウム値比の ROC の AUC は, それぞれ0.979, 0.984, および0.971であり, PAC₃₀ / カリウムはカットオフ値136.8 pg/mEq で感度100 %, 特異度95.5 %であり, 最も有用な指標であった。
4. 22例で SIT と迅速 ACTH 負荷試験及び負荷前のカリウム測定が施行され, SIT での PAC₂₄₀ と迅速 ACTH 負荷試験での PAC₃₀ / カリウムの ROC の直接比較では PAC₃₀ / カリウムの方が高値であったが有意差はなかった。

これらの結果より迅速 ACTH 負荷試験における PAC₃₀ / カリウムは, SIT での PAC₂₄₀ と同様有用で, SIT の循環血漿量増加と長時間の検査時間を考慮すると, 迅速 ACTH 負荷試験がより臨床的に有用と考えられた。

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。

Prognostic Impact of Cardio-renal-anemia Syndrome in Patients at Risk for Heart Failure from the IMPACT-ABI study (心不全リスクを有する患者における予後予測因子としての心腎貧血症候群：IMPACT-ABI サブ解析)

正 印 航

(論文の内容の要旨)

【目的】近年高齢化に伴い、心不全有病率は急激な増加を認めている。高齢者心不全は急性増悪による入院を繰り返し、予後不良であることが知られているが、それを予防するための適切な介入時期、方法については不明である。貧血、慢性腎不全は心不全の増悪要因として良く知られており、それぞれが相互に悪影響を及ぼすことで病状悪化を招くことが示されており、こうした疾患概念は心腎貧血症候群 (CRAS) と呼ばれる。CRAS は症候性心不全に関する有用な予後予測因子であることが示されてきた一方で、心不全リスクを有する、あるいは器質的心疾患を有するが心不全症候は有しない心不全リスクステージにおける意義の報告はない。本研究の目的は、慢性腎不全、貧血の合併が、心不全リスクあるいは器質的心疾患を有する無症候性患者 (心不全リスクステージ A または B) においても心血管イベントの予測因子となるかを調べることである。

【方法】2005年から2012年まで信州大学循環器内科に心血管疾患で入院し、ABI 値を測定した患者3,131人のうち、心不全リスクのみを有するが心不全症候の無い患者 (心不全リスクステージ Stage A) および器質的心疾患を有するが心不全症候の無い患者 (心不全リスクステージ Stage B) でかつ非透析患者が本試験に登録された。これらを慢性腎不全、貧血の有無でそれぞれ4群に分け、更に両疾患を有する群をRAS (Renal-anemia syndrome) 群、その他を非RAS群としてMACE (心血管死、心不全入院の複合エンドポイント) 発生との関係につき調査した。

【結果】計1,801例の患者が登録され、RAS群が217例、非RAS群が1584例であった。平均年齢は69.6±10.6歳で76%が男性であった。平均左室駆出率は66.9±12.3%で、stage A心不全が全体の73%を占めた。基本特性として、RAS群は非RAS群と比し、年齢、糖尿病、腹部大動脈瘤、陳旧性脳梗塞の有病率が高値で、脂質異常症の有病率が低値であり、stage A心不全の割合に差はなかった。Hb値はRAS群11.4±1.1対非RAS群14.3±1.5 (g/dL)、eGFR値は40.2±

12.8対68.5±17.9 (ml/min/1.73m²) であった。平均4.6年の追跡期間において、129例でMACE発生を認め、発生率はRAS群において有意に高値であった (13%対6%, P<0.001)。Kaplan-Meier分析においてもRAS群は非RAS群と比し、有意差をもって予後は不良であり (32%対14%, P<0.001)、4群間の比較においても同様の結果を示した。Cox比例ハザードモデルによる多変量解析では、年齢、性別、従来のリスク因子で調整を行った結果、RASはMACEの発生率と有意な関連性を示した (HR 1.86; 95% CI 1.20-2.89, P=0.005)。

【考察】CRASにおける各臓器障害の発生機序は複雑且つ多岐に渡るが、慢性腎不全、貧血が先行して心障害を生じる場合に主に以下の機序が考慮される。腎不全による内臓浮腫や酸化ストレス、尿毒症等により生じる慢性炎症及び、貧血による組織低酸素は交感神経、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の賦活化を招き、それにより生じる体液、塩分貯留は心負荷増大による心障害と、更なる慢性炎症を惹起する悪循環を生じる。加えて、アンジオテンシンII、アルドステロンは直接繊維化による心筋リモデリングを誘発することが知られている。

高齢化に伴う心不全患者数増大は、医療負担、経済負担共に非常に大きく、我々が直面する喫緊の課題である。重症化を防ぐための効果的な介入手段の確立が望まれるが、現状で貧血、腎不全を合併した心不全患者へ対する治療介入の有効性は定まっておらず、その一方でstage A/B心不全リスクステージ患者を対象とした研究も乏しい。本研究において、心不全症候はなく心不全リスクを有する状態のみであっても、RASの合併例は有意なMACEの予後予測因子であり、より慎重な観察が必要な患者群であることが示された。更なる調査が必要であるが、今回の結果は、より早期段階でのリスク層別化及び慢性腎不全、貧血への治療介入が、こうした患者の予後改善に繋がる手段の一つとなりうる可能性を示唆するものと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

貧血、慢性腎臓病 (CKD) は慢性心不全 (CHF)

にしばしば合併し、相互に悪影響を及ぼし互いの病状を悪化させる。こうした悪循環を形成する病態は Cardio-renal-anemia syndrome (CRAS) と呼ばれ、症候性心不全の独立した予後予測因子であることが知られている。しかしながら、心不全ステージ分類における心不全リスク段階の患者、すなわち心不全リスクのみを有するが心不全症候の無い患者（心不全リスクステージ Stage A）および器質的心疾患を有するが心不全症候の無い患者（心不全リスクステージ Stage B）の予後に対する貧血、CKD の影響については不明である。本研究は、心不全リスクステージ Stage A, B 患者において貧血、CKD の合併、即ち Renal-anemia syndrome (RAS) が心血管イベントに対する予後予測因子となりうるかを評価した。

その結果、以下の結果を得た。

1. RAS 群 (n=218) では、非 RAS 群 (n=1583) と比し有意に年齢及び、高血圧、糖尿病、脳梗塞既往、腹部大動脈瘤既往の割合が高値、脂質異常症の割合は低値であり、Stage A 心不全リスクステージの割合に差はなかった。
2. 平均4.6年間の追跡期間において、MACE（心血管死、心不全入院）は1,801人中129人（7.2%）で

認め、心血管死が78人、心不全入院が62人であった（重複有）。RAS 群における MACE、心不全入院の発症率は非 RAS 群と比し有意に高値であった。

3. Kaplan-Meier 法による累積イベント発生率は RAS 群で有意に高値であった（RAS 群 32%、非 RAS 群 14%）。貧血、CKD 単独合併例との比較でも同様に RAS 群の MACE 発生率は有意に高値であった。
4. Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析では、年齢、性別、従来のリスク因子で調整を行った結果、RAS は MACE の発生率と有意な関連性を示した（HR 1.86；95% CI 1.20-2.89, P=0.005）。

これらの結果から、RAS の合併は症候性心不全と同様に、Stage A, B 心不全リスクステージにおいても心血管イベントの有意なリスク因子であることが示された。急増する高齢化心不全に対して、より早期での心血管疾患及びリスク因子に対する適切な予防、治療介入手段の検討が望ましく、そのためにも心不全の初期段階におけるリスク層別化が必要と考えられる。本研究はその一助となることが期待され、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Prevalence and clinical features of hearing loss caused by *EYA4* variants (*EYA4*遺伝子変異による難聴の有病率と臨床像の検討)

品 川 潤

(論文の内容の要旨)

*EYA4*遺伝子は、常染色体優性遺伝形式をとる非症候性難聴 (DFNA10) の原因遺伝子である。これまでに、アメリカ、ベルギー、オランダ、ドイツ、韓国、中国等さまざまな国から難聴の原因として30変異が報告されているが、その頻度および詳細な臨床的特徴は不明であった。そこで、本研究では、DFNA10 の臨床的特徴と有病率を明らかにすることを目的に、日本人難聴患者の大規模コホートを対象に *EYA4* 遺伝子変異のスクリーニングを実施した。

対象としては、信州大学の管理する日本人難聴 DNA データベースに登録されている難聴患者7,408例中、家族歴より常染色体優性遺伝形式をとる難聴と考えられる症例1,336例を選択し、次世代シーケンサーを用いて過去に難聴の原因遺伝子として報告のある68遺伝子の網羅的解析を行った。また、次世代シーケンズ解析で得られた read depth データを用いて、Copy

Number Variant (CNV) 解析も併せて実施した。解析により候補となる *EYA4* 遺伝子変異をもつ症例に関しては詳細な臨床情報をカルテから収集し分析した。

その結果、12家系より難聴の原因と考えられる *EYA4* 遺伝子変異12種類を見出した。うち、11種類は新規変異（フレームシフト変異3種類、ミスセンス変異3種類、ナンセンス変異2種類、スプライシング変異1種類、1 copy number loss 2種類）であった。また、1種類は過去に韓国より報告のある既知変異であった。常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴患者1,336例のうち12例より候補となる変異が見つかったことより、頻度は常染色体優性遺伝形式をとる難聴患者の0.90%であることが明らかとなった。

また、本研究で見出された *EYA4* 遺伝子変異を有する症例および過去に報告のある症例の臨床情報を元に検討を行ったところ、truncating 変異を有する症例では、全ての周波数で閾値上昇を認める平坦型の難聴

を呈する傾向があるのに対し、non-truncating 変異を有する症例では高周波数において閾値上昇を示す高音漸傾型の聴力像を呈する傾向があることを明らかにし、DFNA10における新しい遺伝子型と表現型の相関関係を示すことができた。また、EYA4遺伝子変異によって引き起こされる難聴の進行は、本研究で変異の見出された症例と過去の報告の症例の臨床像の分析から、0.63 dB/年程度であるとことを明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

EYA4遺伝子は、常染色体優性遺伝形式をとる非症候群性難聴 (DFNA10) の原因遺伝子である。EYA4遺伝子はEYAファミリーのひとつで、EYA transcriptional coactivator and phosphatase 4というタンパクをコードしている遺伝子であり、SIX familyを代表とした複数の遺伝子と複合体を形成することで転写活性化因子として働く。その結果、眼の発達やコルチ器の発達・維持に関与するとされている。現在までに、さまざまな国から難聴の原因として30変異が報告されているが、その頻度および詳細な臨床的特徴は不明であった。そこで、本研究では、DFNA10の臨床的特徴と有病率を明らかにすることを目的に、日本人難聴患者の大規模コホートを対象にEYA4遺伝子変異のスクリーニングを実施した。

日本人難聴患者7,408例中、家族歴より常染色体優性遺伝形式をとる難聴と考えられる症例1,336例を選択し、次世代シーケンサーを用いて過去に難聴の原因遺伝子として報告のある68遺伝子の網羅的解析を行っ

た。また、次世代シーケンス解析で得られたread depth データを用いて、Copy Number Variant (CNV) 解析も併せて実施した。解析により候補となるEYA4遺伝子変異をもつ症例に関しては詳細な臨床情報をカルテから収集し分析した。

その結果、品川は次の結論を得た。

1. 常染色体優性遺伝形式をとる難聴患者1,336例において12例 (0.90%) がEYA4遺伝子変異による難聴と考えられた。
2. EYA4遺伝子変異による難聴は、後天発症であり、発症年齢にはバラつきがあることを明らかにした。
3. EYA4遺伝子変異による難聴は、進行性であり、その進行速度は0.63 dB/年程度であることを明らかにした。
4. EYA4遺伝子変異による難聴は、truncating 変異を有する症例では、全ての周波数で閾値上昇を認める平坦型の難聴を呈する傾向があるのに対し、non-truncating 変異を有する症例では高周波数において閾値上昇を示す高音漸傾型の聴力像を呈する傾向があることを明らかにした。

以上より、EYA4遺伝子変異による難聴は、後天発症の進行性難聴の原因のひとつであると考えられた。今回明らかになった詳細な臨床像はEYA4遺伝子変異による難聴の予後の予測や介入を選択する上で重要な情報として活用可能である。したがって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Clinical characteristics and *in vitro* analysis of MYO6 variants causing late-onset progressive hearing loss (MYO6遺伝子変異による遅発性進行性難聴の臨床的特徴と *in vitro* 解析)

岡 晋一郎

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 MYO6遺伝子は常染色体優性遺伝形式および常染色体劣性遺伝形式をとる非症候群性難聴の原因遺伝子として知られているが、その臨床的特徴や難聴の発症メカニズムに関しては不明な点も多い。今回、我々は日本人難聴患者の大規模コホートを用い、MYO6遺伝子変異による難聴の頻度と、その臨床的特徴を明らかにするとともに、*in vitro* 機能解析を行い難聴発症メカニズムを明らかにすることを目的に研究を行なった。

【対象・方法】 信州大学の管理する日本人難聴 DNA データベースに登録されている難聴患者8,074例 (常

染色体優性遺伝形式をとる難聴家系1,336例、常染色体劣性遺伝形式をとる難聴家系5,564例、遺伝形式不明の家系1,174例) を対象に、次世代シーケンサーを用いて、過去に難聴の原因遺伝子として報告のある63遺伝子の網羅的解析を行い、MYO6遺伝子変異による難聴と考えられた症例についてその臨床的特徴を検討した。また、MYO6遺伝子変異による難聴発症メカニズムを推定することを目的に、日本人難聴患者より同定されたミスセンス変異をMYO6 cDNA に導入し、espin1遺伝子発現ベクターと一緒に上皮細胞に導入し、espin1により上皮細胞表面に誘導される微絨毛形成に及ぼす影響を検討した。

【結果】日本人難聴患者8,074例の解析により、33家系より難聴の原因と考えられる *MYO6* 遺伝子変異が27種類（うち22変異は新規変異）見出された。33家系のうち家族歴が不明な1例を除き、32例は常染色体優性遺伝形式をとる難聴家系であった。したがって、常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴患者1336家系のうち32家系が *MYO6* 遺伝子変異による難聴であり、2.40%を占めることが明らかとなった。また、*MYO6* 遺伝子変異による難聴の特徴として、若年発症・進行性の難聴であることが明らかとなった。難聴の進行としては、特に40歳以降に急激な進行を来することが明らかとなった（今回検討した症例の全年齢における難聴の進行度は0.57 dB/年であったが、40歳以降に限定すると1.07 dB/年となり、40歳以降では難聴の進行が加速することが示された）。また、*MYO6* 遺伝子変異による難聴発症メカニズムを推定することを目的に実施した *in vitro* 実験では、野生型 *myosin6* と *espin1* を共発現した細胞では長い微絨毛が形成されるのに対し、難聴患者より見出された変異型 *myosin6* と *espin1* とを共発現した細胞では、短い微絨毛しか形成されないことが明らかとなった。

【結論】*MYO6* 遺伝子は常染色体優性遺伝形式をとる難聴の重要な原因遺伝子の一つであることが示された。また、上皮細胞で微絨毛の形成が阻害されたことより、蝸牛有毛細胞においては不動毛の機能維持が阻害され、不動毛の奇形をきたすことにより難聴を発症している可能性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

MYO6 遺伝子は常染色体優性遺伝形式、常染色体劣性遺伝形式をとる難聴の原因遺伝子であるが、比較的まれな原因遺伝子であることより、変異の種類や頻度、また臨床的特徴や難聴発症のメカニズムに関しては不明な点も多い。今回、日本人難聴患者8,074例を対象に次世代シーケンサーを用いた大規模スクリーニング解析を行い、日本人難聴患者より見出された *MYO6* 遺伝子変異による難聴患者の臨床的特徴を検討した。また、*MYO6* 遺伝子変異により難聴が生じるメカニズムを明らかにすることを目的に、日本人難聴患者より同定されたミスセンス変異を *MYO6* cDNA に site directed mutagenesis 法により導入し、*espin1* 遺伝子発現ベクターと一緒に上皮細胞に導入し、*espin1* により上皮細胞表面に誘導される微絨毛形成に及ぼす影響に関して *in vitro* 系を用いた検討を行った。

臨床情報としては、*MYO6* 遺伝子変異による難聴の

頻度、発症年齢、聴力像、進行性について検討した。また、野生型および変異型 *MYO6* 遺伝子と *espin1* 遺伝子を共発現させた場合に形成される微絨毛の長さや、*Myosin6* タンパク質の細胞内局在について検討した。

その結果、岡 晋一郎は次の結論を得た。

1. 常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴患者のうち、*MYO6* 遺伝子変異を原因とする症例は2.40%と比較的高頻度であり、*KCNQ4*、*TECTA*、*WFS1* などの遺伝子に次いで重要な原因となっていることを明らかにした。
2. 日本人難聴患者より見出された変異の多くはトランケートイング変異（ナンセンス変異、スプライシング変異、フレームシフト変異）であり、ハプロ不全により難聴を生じると考えられることを明らかにした。
3. *MYO6* 遺伝子変異による難聴は、遅発性・進行性難聴（特に40歳以降で難聴の進行が加速する）であることを明らかにした。
4. 細胞実験においては、野生型 *MYO6* を発現させた場合には微絨毛の形成は阻害されず長い微絨毛が形成された。一方、変異型 *MYO6* 遺伝子を発現させた場合には、細胞内での *Myosin6* タンパクの局在は変化しないものの、長い微絨毛は形成されなかった。

これらの結果より、*MYO6* 遺伝子変異による難聴症例ではハプロ不全により遅発性・進行性難聴を生じると考えられ、若年時には正常型 *MYO6* 遺伝子の発現量が多く聴力が維持されるが、加齢とともに正常型 *MYO6* 遺伝子の発現が減少することで不動毛の形成・維持に異常をきたし遅発性・進行性の難聴を呈することが示唆された。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Impact of Ambulation Status in Patients with End-stage Renal Disease on Hemodialysis due to Diabetic Nephropathy : The PREDICT Study (糖尿病性腎症による血液透析患者における歩行状態の影響)

加藤 太門

(論文の内容の要旨)

【目的】透析患者は全世界的に増加しており、本邦でも年間30,000人ほどの新規透析導入患者が存在する。また透析患者は予後が不良で、合併疾患が多いことが知られており、心血管死や末梢動脈疾患の合併が多い。一方でフレイルは近年種々の疾患の予後と関連があることが報告されており、慢性腎不全患者透析患者の予後にも影響することが報告されている。しかしながら歩行可能状態と透析患者の予後の関連については十分な報告はない。今回糖尿病性腎症を背景とする血液透析患者の重症下肢虚血回避生存と歩行状態の関連について検討した。

【方法】本研究は前向き、多施設共同、観察研究で、2012年の4月から2013年の8月までに松本市、安曇野市の10施設の透析センターから糖尿病性腎症による血液透析患者を登録し、6か月毎に臨床症状、歩行状態、Ankle-Brachial index (ABI)、血管内超音波検査を検査し2年間の死亡率、重症下肢虚血の発症を追跡したPREDICT研究のサブ解析である。全参加者には書面で研究内容を説明し、同意を得た。この研究は信州大学医学部の倫理委員会で承認された(承認番号2366)。主要評価項目は重症下肢虚血回避生存とし副次評価項目は、生存と主要下肢イベント(全死亡、大切断、再血行再建術)とした。

【結果】173名を登録し4名は他地域への転居、3名は同意の撤回、2名は診療データの欠損のため除外され最終的に164名を追跡した。重症下肢虚血回避生存患者は重症下肢・死亡患者よりも若く(65 vs 71歳 $p=0.003$)、歩行可能な患者が多かった(84% vs 48.7% $p=0.003$)。また重症下肢虚血回避生存患者は大切断、死亡患者よりもアルブミンが高く(3.8 vs 3.4 g/dL $p=0.0003$)、ヘモグロビンが高く(10.7 vs 10.2 g/dL $p=0.008$)、CRPは低く(0.1 vs 0.15 mg/L $p=0.03$)、BNPが低かった(177.1 vs 280.6 pg/mL $p=0.04$)。

主要評価項目の結果では、歩行可能グループの重症下肢回避生存は有意に歩行不能群と比較して高く(12か月 94.3% vs 84.5%, 24か月 84.9% vs 62.7% $p=0.006$)、生存についても歩行可能群は非歩行群と比較

して優位に高かった(12か月 95.1% vs 87.1%, 24か月 89.2% vs 69.8% 24か月 $p=0.01$)。また主要下肢イベント回避率も有位に高かった(12か月 92.7% vs 81.7%, 24か月 81.6% vs % 24か月 $p=0.01$)。また多変量解析の結果、歩行可能であることは重症下肢虚血もしくは死亡の独立した予測因子だった(HR 0.32, 95% CI 0.11-0.87 $p=0.03$)。

【考察】透析患者の予後とフレイルの関係については関係があることが報告されている。しかしながら歩行可能患者と歩行不可能患者とを比較したデータはあまり知られていない。筋力、認知機能、歩行スピードなどでフレイルを算出する方法などもあるが、歩行できるかできないかというのは医師間、またはコメディカルとも共通認識しやすい指標であり、またリハビリテーションやフットケアの目標としても歩行の維持というのは設定しやすい目標となることから大変有用な指標である。本研究では透析患者の歩行状態と重症下肢虚血回避生存に関連があることを示し、歩行可能であることは重症下肢回避生存の予測因子であることを明らかにした。歩行できない透析患者は予後が悪いだけでなく、下肢切断のリスクも高く、より早期の介入が必要である可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

本邦では透析患者増加しており、年間約30,000例の患者に透析が新規導入されている。一般的に透析患者は予後が不良で、合併疾患が多いことが知られており、心血管死や末梢動脈疾患の合併が多い。一方でフレイルは近年種々の疾患の予後と関連があることが報告されており、慢性腎不全患者や透析患者の予後にも影響することが報告されている。今回糖尿病性腎症を背景とする血液透析患者の重症下肢虚血回避生存と歩行状態(歩行可能もしくは歩行不可能)の関連について検討した。

本研究は多施設共同、前向き観察研究で2012年の4月から2013年の8月までに松本市と安曇野市の10施設の透析センターから糖尿病性腎症による血液透析患者を登録し、6か月毎に臨床症状、歩行状態、Ankle-Brachial index (ABI)、血管内超音波検査を検査し2年

間の重症下肢回避生存、生存と主要下肢イベント（全死亡、大切断、下肢血行再建）を評価した PREDICT study のサブ解析として、登録患者は173中164例を評価、解析した。

その結果、次の結論を得た。

1. 重症下肢虚血回避生存の患者は重症下肢虚血もしくは死亡した患者より若く、歩行可能な患者が多かった。
2. 歩行可能患者の重症下肢回避生存率は歩行不可能患者よりも有意に高かった。
3. 歩行可能患者の生存率と主要下肢イベント回避率は歩行不可能患者よりも有意に高かった。

4. 歩行可能状態は、重症下肢回避生存の独立した予測因子であった。

これらの結果より、糖尿病性腎症による透析患者の歩行状態は重症下肢回避生存と関連があると結論付けた。フレイルの評価についていくつかの報告があるが、歩行状態は評価が容易で医師間、多職種間でも共有しやすい評価項目であり大変有用な評価項目である。また歩行不可能患者は生命予後が悪いだけでなく、重症下肢虚血のリスクも高いため、より早期に介入する必要がある可能性がある。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Brake Operation and Palmar Perspiration Reflect Older Adult Drivers' Ability to Predict Hazards: Driving Simulation Research (高齢ドライバーの危険予測能力を反映するブレーキ操作と手掌部発汗: 模擬運転研究)

岩 波 潤

(論文の内容の要旨)

【背景】 高齢者による自動車運転事故が増加し社会問題となっている。高齢ドライバーの運転事故には加齢に伴う認知機能の低下が関連しているが、免許更新時の高齢者講習で使用されている認知機能検査は紙筆検査であり、認知機能を直接反映する運転技能評価の開発が望まれている。

開発中の模擬運転テストは、自動車運転認知行動評価装置(特許第5366248号, 信州大学)を用いて被験者に運転映像を提示し、映像に合わせてハンドル, アクセル, ブレーキを操作させ、被験者が危険を認知または予測した際に生じる手掌部発汗反応(Palmar sweating response; PSR)と皮膚電位反射(Skin potential reflex; SPR)を評価するものである。研究の目的は、模擬運転テストの危険場面と危険予測場面におけるブレーキ応答, PSR, SPRを高齢者と若年者と比較検討することである。

【方法】 60歳以上の高齢者群($n=43$, 平均年齢69.8歳)と若年者群($n=36$, 平均年齢21.3歳)を対象に常温環境下で模擬運転テストを行い、可変抵抗器で導出したブレーキ, アクセル, ハンドルの応答と, PSR(発汗計 SKN-2000, SKIOS), SPR(皮膚電位計 SPN-01, SKINOS)の出力信号をA/D変換し、同時記録した。運転映像は住宅地走行映像(5分)を用い、見通しの悪い丁字路の左折を「危険予測場面」、歩行者が飛び出す場面を「危険場面」と定義し、各場面5秒間のブレーキ操作, PSR, SPRを評価した。両群のブレーキ操作の有無を χ^2 検定で比較し、PSRの反応量, ブレーキの応答潜時, SPRの応答潜時をStudent's *t* testで比較した。また、ブレーキ操作と関連する要因を調べるために、ブレーキ操作の有無を目的変数、年齢、性別、PSRを説明変数とする多重ロジスティクス回帰分析を行った。統計解析の有意水準は5%とした。

【結果】 危険予測場面では若年者の全例がブレーキを操作していたが、高齢者群では20名(46.5%)がブレーキを操作しておらず、両群の度数分布に有意差を認めた($p<.001$)。危険場面では高齢者群、若年者群

ともに全例がブレーキを操作していた。PSR(M (SD), $\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$)は危険予測場面では高齢者群が0.38(0.26), 若年者群が0.20(0.22), 危険場面では高齢者群が0.40(0.24), 若年者群が0.25(0.28)で、両場面ともに高齢者のPSRが有意に大きかった($p<.05$, $p<.01$)。高齢者群のうち、危険予測場面でブレーキを操作した23名のPSRの反応量は0.48(0.23)で、ブレーキを操作しなかった20名の反応量0.31(0.25)より有意に多かった($p<.001$)。また、多重ロジスティクス回帰分析の結果、危険予測場面のブレーキ操作に関連する要因としてPSR量が抽出された($OR=484.2$, 95% CI [2.82-83066.6], $p=.02$)。

ブレーキの反応潜時(M (SD), sec.)は、危険予測場面では高齢者群が3.20(1.51), 若年者群が1.58(0.79)であり、若年者群が有意に短かった($p<.001$)。危険場面では高齢者群が1.26(0.57), 若年者群が0.83(0.34)であり、若年者群が有意に短かった($p<.001$)。ブレーキの応答潜時は両群ともに危険場面で有意に短かった($p<.000$)。SPRの反応潜時(M (SD), sec.)は、危険予測場面では高齢者群が3.22(2.22), 若年者群が4.49(2.58)であり、高齢者群が有意に短かった($p<.05$)。危険場面では高齢者群が2.23(0.87), 若年者群が1.93(1.18)であり有意差は認めなかった。また、SPRの反応潜時は両群ともに危険場面で有意に短かった($p<.001$)。

【考察】 危険場面でみられた両群の素早いブレーキ操作とPSRは、危険認知による咄嗟の(反射的)反応と考えられる。一方、危険予測場面では高齢者群の46.5%にブレーキ操作の欠如が認められ、不注意による危険の見落としや発見の遅れなど、予測機能の低下が関係していると思われた。多重ロジスティック回帰分析の結果は、危険予測場面におけるブレーキ操作とPSRの関連性を示しており、模擬運転テストにおける高齢者の危険予測能力の評価には、ブレーキ操作に加えてPSRの測定が有効と思われた。

PSRは加齢による反応量の低下が知られているが、本模擬運転テストでは、危険場面、危険予測場面ともに高齢者群のPSRが有意に多く、模擬運転テストと

いう新規課題に対する高齢者の緊張度の高さが影響した可能性がある。今後の研究では、参加者の年齢、性別、および運転経験が模擬運転テストのパフォーマンスに及ぼす影響を検討する必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

近年社会問題化している高齢者の自動車運転事故への対策として、免許更新時に認知機能検査が行われているが、認知機能をより直接的に反映する運転技能評価の開発が望まれている。

岩波潤は高齢者の模擬運転特性を検討するために、自動車運転認知行動評価装置を用いて本研究を行った。高齢者と若年者両群の被験者に住宅地走行映像（5分）を提示し、映像に合わせてハンドル、アクセル、ブレーキを操作させ、これらの応答と、被験者が危険を認知または予測した際に生じる手掌部発汗反応（Palmar sweating response; PSR）ならびに皮膚電位反射（Skin potential reflex; SPR）を同時記録した。両群のブレーキ操作の有無を χ^2 検定で比較し、PSRの反応量、ブレーキの応答潜時、SPRの応答潜時をStudent's t testで比較した。またブレーキ操作と関連する要因を調べるために、ブレーキ操作の有無を目的変数、年齢、性別、PSRを説明変数とする多重ロジスティクス回帰分析を行った。

その結果、岩波潤は以下の結論を得た。

1. 危険予測場面では若年者の全例がブレーキを操作していたが、高齢者群では46.5%がブレーキを操作しておらず有意差を認めた。危険場面では高齢者

- 群、若年者群ともに全例がブレーキを操作していた。
2. PSRは危険予測場面、危険場面ともに高齢者のPSRが有意に大きかった。
3. 高齢者群のうち、危険予測場面におけるブレーキ操作群のPSRは、非操作群より有意に大きかった。
4. 危険予測場面のブレーキ操作に関連する要因としてPSR量が抽出された。
5. ブレーキの応答潜時は、危険予測場面、危険場面ともに若年者群が有意に短かった。
6. ブレーキの応答潜時は、高齢者群、若年者群ともに危険場面では有意に短かった。
7. SPRの応答潜時は、危険予測場面では高齢者群が有意に短かった。危険場面では有意差は認めなかった。
8. SPRの反応潜時は高齢者群、若年者群ともに危険場面では有意に短かった。

これらの結果より、模擬運転テストにおける高齢者の危険予測能力の評価には、ブレーキ操作に加えてPSRの測定が有効であることが明らかとなった。本研究は、参加者の年齢、性別、および運転経験が模擬運転テストのパフォーマンスに及ぼす影響をさらに詳細に検討する必要性を示しており、より精緻な運転技能評価法の開発に寄与すると共に、高齢者における運転技能低下の病態メカニズム解明にも貢献することが期待される。したがって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Characterization of galactosyl and lactosyl sulfatide species in human serum by MALDI-TOF mass spectrometry (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量分析によるヒト血清中ガラクトシルスルファチド分子種とラクトシルスルファチド分子種の特徴付け)

掘 敦 詞

(論文の内容の要旨)

【背景】スルファチドは、さまざまな組織、血清リポタンパクに分布し、臓器特異的な組成で構成される。スルファチドは多種のスフィンゴイド塩基、脂肪酸および糖鎖から構成され、簡便かつ迅速なスルファチドの構造分析は臨床検査で重要である。

【方法】スルファチドに富む画分を血清脂質から単離し、そしてスルファチド種をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) の負イオンモードにより分析した。

【結果】ヒト血清中スルファチドは、2種類の糖鎖、8種類のスフィンゴイド塩基、ヒドロキシ脂肪酸を含む多種類の脂肪酸側鎖をもつ分子種として同定した。その結果、64種類のガラクトシルスルファチド (SM4s) と49種類のラクトシルスルファチド分子種を同定した。SM3のピーク強度はSM4sの1%以下であった。健常者血清 (n=8) のSM4sを構成する脂肪酸はC16:0やヒドロキシ化C16:0 (C16:0h) が優位であり、次いで極長鎖脂肪酸が優位であった一方で、SM3は極長鎖脂肪酸が最も優位であった。

【結論】本研究は、MALDI-TOF MSを用いたヒト血清スルファチド分析の簡単な方法を説明した。さらにSM4sとSM3の脂肪酸側鎖の違いをMALDI-TOF MSによって明らかにした。

この方法は臨床検査室に適しており、生理学的および病的状態の両方におけるスルファチド種の役割の理解を深める可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

硫酸化糖脂質の中でも、スフィンゴイド塩基と脂肪酸側鎖からなるセラミドに糖鎖と硫酸基が結合したスルファチドは、脳ミエリン鞘の主要構成脂質であり、脳・神経系細胞の他に、腎臓の尿細管細胞、消化上皮細胞、血液中リポ蛋白質など幅広く分布する脂質である。スルファチドはミエリン機能の他に、細胞表面抗原(血液型抗原など)、細菌やウイルス毒素の受容体、細胞表面から核への情報伝達過程など、重要な生理機能を有している。また、卵巣癌、肺癌などの組織への沈着や、ライソゾーム内に蓄積するスフィンゴリピドシスである異染性白質ジストロフィー、アルツハイマー病への関与など、様々な疾患との関連が報告されている。

これまで、血液中スルファチドの定量は行われてきたが、スルファチドは様々な脂肪酸側鎖からなる分子であるため、その脂肪酸側鎖の違いによる分子種の測定が、生理機能機序や疾患との関連を明らかにする上で重要である。研究的には液体クロマトグラフィー質量分析(LC MS)や薄層クロマトグラフィーを利用した質量分析などが実施されているが、いずれも操作が煩雑であり、スルファチド分析の臨床的応用ができていない。

本研究では、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)の負イオンモード分析により、血清中スルファチド分子種の簡

易分析法と高感度分析法の開発をされた。簡易分析法では、血清25 μ Lと内部標準品で、15種のガラクトシルスルファチド(SM4s)分子種を迅速にかつ定量的に測定された。さらに、血清500 μ Lの脂質分解酵素(PLA₂)による前処理後、Phenyl Sepharose疎水性相互作用クロマトグラフィーミニカラムにより部分精製し、MALDI-TOF/TOF MS(MS/MS)により、2種類の糖鎖、8種類のスフィンゴイド塩基、ヒドロキシ脂肪酸を含む多種類の脂肪酸側鎖をもつ分子種、合計64種類のSM4s分子種と49種類のラクシルスルファチド(SM3)分子種が同定された。SM4s分子種は定量的に測定され、測定精度、直線性は良好であり、SM3のピーク強度はSM4sの1%以下であった。健常者血清(大学生、女性、n=8)のSM4sを構成する脂肪酸はC16:0やヒドロキシ化C16:0(C16:0h)が優位であり、次いで極長鎖脂肪酸が優位であった。一方、SM3は極長鎖脂肪酸が最も優位であったことから、SM4s分子種とSM3分子種の脂肪酸組成の違いを明らかにした。

本研究により、MALDI-TOF MS、MALDI-TOF/TOF MSを用いた臨床検査へ応用できるヒト血清スルファチド分析法が開発された。本法は、スルファチド代謝機能や代謝異常を解析し、代謝異常症の検索に有用なツールとなる。また現在、臨床分野との共同研究が進められており、SM4s分子種とSM3分子種プロファイルの変化を捉えることが、疾患マーカーになる可能性を示しており、スルファチド臨床研究への寄与が期待される。

学位審査において、わかりやすいスライドで発表され、学位論文を補足する解説や結果を提示された。質疑応答も的確に答えており、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。

Reliability and acceptability of using a social robot to carry out cognitive tests for community-dwelling older adults (地域在住高齢者のためのロボット対話型認知機能検査における信頼性と受容性)

高 枝 果 奈

(論文の内容の要旨)

高齢者を対象に日常使用している認知機能検査の多くは専門職による対話形式で行われているが、タッチスクリーンやキーボード、マウスなどを用いたコンピュータ化された認知機能検査も増えている。しかし、

高齢者の中にはそれらの機器を使用して課題を遂行することに抵抗のある人もいる。対話型ロボットなど対話型インターフェースがコミュニティに存在し、その地域に住む高齢者が会話を楽しみながら、気軽に検査を受けることができれば、より総合的な診断評価の前

に簡単に検査を受けられる可能性がある。しかし、対話型ロボットを使用して検査を実施した研究はまだ少ないため、高齢者がロボットによる認知機能検査を受け入れてくれるかは疑問である。また、対話型ロボットによる認知機能検査の信頼性も検証されていない。そこで今回、高齢者を対象に対話型ロボットによる認知機能検査を実施し、信頼性とロボットに対する受容性を検証した。

対話型ロボットによる認知機能検査には、Telephone Interview for Cognitive Status in Japanese (以下、TICS-J) を使用した。この検査は、Mini-Mental State Examination (MMSE) を元に作られた電話による認知機能スクリーニング検査 TICS の日本語版であり、名前の呼称、時間及び場所の見当識、逆唱、単語の即時再生、7シリーズ、物の名前の想起、復唱、近時記憶、実技、反対語の11の項目からなる。41点満点であり、高得点ほど機能は良好である。口答指示のみで実施できるためロボット検査に使用した。対話型ロボットには、PaPeRo R500 (NEC 製) を使用し、発話や動作シナリオを事前にプログラムした。ロボットの動作タイミングは、対象者の反応をマイクとカメラで観察している研究者が、別室で遠隔操作した。検査は、ロボットが対象者へ自己紹介と検査の説明後、TICS-J の質問をし、対象者が回答をするとそれにロボットが対応した。

対象は、65歳以上の者で、口頭でコミュニケーションが可能な者とした。実施方法は、研究1では、ロボットによる TICS-J と人による TICS-J をそれぞれ実施し検査結果の一致度を代替検査信頼性として級内相関係数 (The interclass correlation coefficient: ICC) を算出し、内的整合性を Cronbach's α で検証した。研究2では、研究1の対象者数名に約6週後、ロボットによる TICS-J を再実施し、再検査信頼性を ICC で算出した。また、ロボット検査終了後、ロボット検査に関するアンケートを実施し、受容性を評価した。アンケートは、1) このロボット検査の結果を信頼できると思うか、2) このロボット検査を好ましいと思うか、3) 自分の物忘れを知りたい時にこのようなロボットを使いたいと思うか、4) ロボットが検査をするのと人が検査をするのでは、どちらがよいか、またその理由は何か、の4つの質問からなる。1) から3) の回答の選択肢は、1) では、4: とても信頼できる、3: 信頼できる、2: どちらともいえない、1: 信頼できない、0: とても信頼できないの5段階

評価とし、分析では、4と3を信頼できる、1と0を信頼できないとそれぞれ合わせ3段階にした。2)、3) も同様に5段階評価の回答選択肢を3段階に統合した。

本研究は、信州大学医倫理委員会と国立障害者リハビリテーションセンター倫理委員会の承認を得て実施した。

研究1では、72名が参加を申し込み、66名 (年齢 81.2 ± 5.8 歳、女性52名) が参加した。TICS-J の平均点は、ロボット検査 29.9 ± 5.6 点、人による検査 32.7 ± 5.0 、研究2では、40名 (年齢 82.0 ± 5.4 歳、女性33名) が参加し、TICS-J のロボット検査初回は 30.1 ± 5.7 点、再検査では 32.0 ± 5.6 点であった。信頼性の検証として、内的整合性は、Cronbach's α 0.691、代替検査信頼性は、ICC 0.728 (95% CI は 0.218-0.844)、研究2の再検査信頼性は ICC 0.818 (95% CI は 0.628-0.899) であった。アンケート結果では、1) ロボット検査の結果を、「信頼できる」と回答した人は、32名で全体の80%、ロボット検査を「好ましい」と回答した人は24名で全体の60%、物忘れを知りたいときにこのロボットを使いたいと思うかについては、「使いたい」と答えた人は23名で全体の57.5%であった。ロボット検査と人による検査ではどちらがよいかについては、ロボット検査15名37.5%、人による検査を選んだ人は14名35%であった。ロボットを好む理由として、「ロボットはかわいい、おもちゃやゲーム感覚だと緊張しない、わからなくてもロボットだと恥ずかしくない」などが挙げられた、人による検査では、「ロボットは緊張する、人は回答者のペースに合わせてくれる、質問ができる」などが挙げられた。

本研究より、対話型ロボットによる認知機能検査は信頼性があり、地域在住高齢者に受容できる可能性を示唆した。これは、ロボットが検査をすることで、緊張感や恥ずかしさなどの心理的障壁を減らすことが考えられる。一方、ロボットに緊張する人もいることから、本人がロボット検査を受けるかを選択できることが重要であると思われる。

今後、このような対話型ロボットによる認知機能検査が、本研究で研究者が代行していたタスクを対象者に合わせて実施する機能を搭載することができれば、対話型ロボットが検査を実施できる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

高齢社会の進展を背景に認知障害の早期発見が課題となっており、汎用可能なコンピュータ認知機能検査(CCT)の開発が検討されている。高枝は、国立障害者リハビリテーションセンターと連携し、本研究において地域在住高齢者を対象にコミュニケーションロボットをインターフェースとする認知機能検査の信頼性と受容性を検討した。

認知機能検査は信頼性と妥当性が検証されているTelephone Interview for Cognitive Status in Japanese (TICS-J) を使用し、質問項目を対話型ロボット PapeRo R500 (NEC 製) に実装した。ロボットが自己紹介、検査説明、質問、あいさつなどを行う、対話形式の検査を実施した。シナリオは事前にプログラムされ、実験では別室にいる研究者が被検者の反応を観察し、質問のタイミングなどを操作した。被検者はコミュニケーション可能な65歳以上の高齢者で、有料老人ホームなどでリクルートされた。

研究1では、66名(平均年齢81.2±5.8歳、女性52名)を対象にロボット認知機能検査の代替検査信頼性と内的整合性が検討された。その結果、信頼性を示す級内相関係数 (ICC)=0.728, 95%信頼区間 (CI)=0.218-0.844 (adequate) が得られ、内的整合性を示すCronbach α は0.691であった。また、研究2では、

40名(平均年齢82.0±5.4歳、女性33名)を対象にロボット認知機能検査の再検査信頼性と受容性が調査された。その結果、ICC=0.818, 95% CI: 0.628-0.899 (high) が得られた。受容性を調査したアンケートでは、80.0%がとても信頼できるか信頼できる、60.0%がとても好ましいか好ましい、57.5%がとても使いたいか使いたいという回答が得られた。

本研究によって、専門職が遠隔で実施する認知機能検査には及ばないものの、ロボット認知機能検査の実現可能性が示された。高齢者のロボット認知機能検査に対する受容性は高く、認知機能検査に対する心理的負担感を軽減する効果が示唆された。本研究は、認知機能検査を対話型ロボットで実施し、高齢者の受容性を報告した初めての研究である。被検者の反応に応じたロボットの発話・動作のタイミング調整や、研究者が代行したフィードバック機能を追加できれば、今後、高齢者の認知機能を簡便に評価できるコミュニケーションロボットとしての実装が可能と思われる。

本研究は、高齢社会のニーズに対応する意欲的な研究であり、認知機能を測定する対話型ロボットの実用化に向けて、今後の課題を明らかにした意義のある研究と言える。

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

Relationship between Sympathetic Nerve Activity Evaluated by Pulse Rate Variability and Blood Pressure Early in the Morning in Sleep Disordered Breathing (脈拍変動によって評価した交感神経活動と睡眠呼吸障害における早朝血圧との関係)

植松 明和

(論文の内容の要旨)

【目的と背景】本研究は、睡眠呼吸障害(SDB)が睡眠中の交感神経(SN)活動の亢進および高血圧症に寄与しているかどうかを明らかにするため実施された。

【対象と方法】153名の男性を被験者として、睡眠ポリグラフ(PSG)検査と同時に光電式容積脈波系を用いて心拍変動を記録した。心拍変動解析には complex demodulation 法を用いた。副交感神経(PN)活動は高周波成分(HF)の振幅で、交感神経活動は低周波成分(LF)とHF成分の振幅の比率(LF/HF比)で評価した。また、全被験者に対し就寝前と早朝に血圧を測定した。

【結果】被験者(n=153)は、無呼吸低呼吸指数(AHI)により、正常群(n=99)、軽度SDB群(n=28)、中～

重度SDB群(n=26)に分類した。平均LF/HF比は、全群においてREM睡眠>軽睡眠>深睡眠の順に高値であった。中～重度SDB群において、各睡眠段階のLF/HF比および就寝前と早朝の血圧は正常群および軽度SDB群と比較して有意に高値であり、覚醒反応(arousal index)と有意な正の相関がみられた。重回帰分析では、早朝収縮期血圧の独立した関連因子として年齢、BMI、睡眠中の低酸素状態の指標であるSpO₂<90%(CT90)、睡眠効率の低下であることが示された。

【結論】本研究結果からは、中～高度SDBにおける頻回の覚醒反応がSN活動の亢進に寄与し、年齢および肥満に加えて、睡眠中の低酸素血症および睡眠障害が、早朝収縮期血圧の上昇について関連していると考

えられた。

(論文審査の結果の要旨)

植松の研究は、睡眠呼吸障害 (SDB) が睡眠中の自律神経バランスの異常および高血圧症 (早朝血圧) に寄与しているかどうかを明らかにすることを目的として実施された。

1. 論文の概要

男性153名を対象とし、睡眠ポリグラフ検査 (polysomnography: PSG) と同時に光電式容積脈波計を用いて安静臥床時の脈拍変動を記録した。脈拍変動は complex demodulation (CD) 法を用いて解析し、高周波成分 (high-frequency: HF) の振幅が副交感神経活動を、低周波成分 (low-frequency: LF) と HF 成分の振幅の比率 (LF/HF 比) が交感神経活動を反映することに基づき、各睡眠段階 (睡眠ステージ 1 ~ 4, および REM 睡眠) における自律神経活動を評価した。CD 法は短時間 (30秒) の計測で脈拍変動の周波数解析が可能であり、古典的な心拍変動と良好な相関が報告されている。血圧は就寝前と早朝に測定した。

被験者 (153例) の SDB は、無呼吸低呼吸指数 (apnea hypopnea index: AHI) により、正常群 (99例, AHI < 5), 軽度 SDB 群 (28例, $5 \leq \text{AHI} < 15$), 中~重度 SDB 群 (26例, AHI ≥ 15) に分類した。平均 LF/HF 比は、全群において REM 睡眠 > 軽睡眠 > 深睡眠の順に高値であり、REM 睡眠中の交感神経活動の亢進が示された。中~重度 SDB 群において、各睡眠段階の LF/HF 比および就寝前と早朝の血圧は、正常群および軽度 SDB 群と比較して有意に高値であり、覚醒反応指数と有意な正の相関がみられた。早朝収縮期血圧は相関分析の結果、年齢、AHI、覚醒反応指数、LF/HF 比、睡眠中の末梢血酸素飽和度 (SpO₂) < 90% を呈する時間の割合 (CT90) と関連することが示された。さらに、年齢と BMI で調整した重回帰分析において、早朝収縮期血圧は CT90 と関連することが示されたが、その他の睡眠指標や自律神経指標との関連は有意ではなかった。

以上に基づき、SDB が中等度~高度である場合、頻回の覚醒反応が交感神経活動を活性化し、年齢および BMI と独立して睡眠障害に伴う低酸素血症 (CT90) が早朝収縮期血圧の上昇に関連していると考察された。

2. 審査結果

審査に先立ち、植松氏より本研究の概要について説明があった。本研究成果の新規性として、1) 時間分

解能の高い CD 法により短時間内の脈拍変動の周波数解析を実施し、睡眠段階別の自律神経機能を評価したこと、その結果、2) 交感神経活動の亢進は、覚醒反応指数と正の相関を認め、REM 睡眠中の亢進が顕著であったこと、さらに、3) 睡眠中の低酸素血症と早朝収縮期血圧には年齢および BMI と独立した関連があること、以上が挙げられた。

最終試験では、まず最初に心拍変動の周波数解析の原理と、指標 (LF/HF, HF) の測定意義に関する質問があった。心拍数の変動を心電図の R - R 間隔の変動から解析する研究が多く報告されており、本研究ではこれを脈波の変動から解析したこと、そして変動をスペクトル解析により周波数成分に分類すると、自律神経機能を反映する指標が得られ、LF/HF が交感神経活動、HF が副交感神経活動を示すことについて説明された。

続いて、CD 法による30秒間の測定について、測定中に数回含まれる呼吸が常に一定の影響を持つといえるか、測定の再現性と信頼性について質問があった。これに対し、CD 法を活用した先行研究によって再現性と信頼性が検証されていることが的確に説明された。ただし、測定の限界や誤差の生じる要因 (不整脈や呼吸状態、身体活動等) について説明があり、本研究においては総脈拍数の10%を超える不整脈を認めた例は除外されたこと、安静仰臥位の記録としたことが説明された。

早朝収縮期血圧と関連する因子を検討した重回帰分析の結果について議論となった。実際に本研究では、年齢と BMI は早朝収縮期血圧の有意な規定因子であったが、SDB や自律神経機能に関連する指標は CT90 のみが示されており、その他には有意な因子が抽出されなかった。睡眠、自律神経機能と血圧はそれぞれが互いに影響するため、因子間に多重共線性が存在すること、および解析例数が少ないために回帰分析に限界があることが考察された。

最後に、本研究成果の意義および今後の展望について活発な討論があり、短時間の脈拍変動解析の有用性を活かし、各睡眠段階それぞれにおける SDB の病態 (無呼吸低呼吸指数等) と自律神経機能の解析、治療前後の比較検討等、研究の展開が期待された。副査より、REM 睡眠期に SDB が顕著になる例において、心血管イベント (狭心症や突然死) や高血圧、糖尿病等の病態に関連したとの報告が睡眠学会で注目されている、とのコメントがあった。簡便な脈拍変動の解析

による自律神経機能解析が、SDBの病態の解明や予防および治療介入への示唆を提供する方向に今後の研究が展開するであろうと期待された。

以上から、本論文は睡眠呼吸障害と自律神経バランス異常（交感神経活動の亢進）が早朝収縮期血圧と関

連することを示し、脳心血管病の予防のための新たな視点と示唆を提供するものであり、博士論文として研究の内容と成果は高く評価された。主査および副査は全員一致で本論文が信州大学大学院医学系研究科保健学専攻の博士論文にふさわしいものであると判断した。

Assessment of Depressive Tendency, Coping Strategies and Type D Personality in Japanese Patients with Coronary Artery Disease (日本人の冠動脈疾患患者における抑うつ傾向, コーピング方略, およびタイプDパーソナリティに関する検討)

山 口 大 輔

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】 社会的抑制と否定的な感情を特徴とする性格傾向であるタイプDパーソナリティ（以下、タイプD）は、冠動脈疾患（CAD）の心理的危険因子として注目されている。タイプDのCAD例では、約76%が著しい不安と抑うつ症状を経験し、抑うつ症状があるCAD例の2年後の死亡率は、抑うつ症状のないCAD例の2倍以上との報告もある。CAD例のさらなる心血管イベントを防ぐには、抑うつに対する介入が必要である。本研究の目的は、日本のCAD例における抑うつ傾向の自己評価と、コーピング方略、タイプD、および社会人口学的または臨床的要因との関連を明らかにすることである。

【方法】 経皮的冠動脈インターベンションを受けた入院中のCAD例を対象に、無記名自記式質問紙調査を実施した。使用尺度は、Zung Self-Rating Depression Scale, Type D Personality Scale, および Tri-Axial Coping Scale 24であり、それぞれ抑うつ傾向、タイプD、およびコーピング方略を調査した。分析は、多重ロジスティック回帰分析を用いて、抑うつ傾向に関連する特性を特定した。また、タイプD例と非タイプD例のコーピング方略の下位尺度得点を Mann-Whitney のU検定で比較した。

本研究は、信州大学医学部医倫理委員会の承認を受けて実施した。

【結果】 調査用紙の回答者は108例であった。調査項目に欠損があったものを除外し、100部（有効回答率：92.6%）を分析対象とした。59例が抑うつ傾向であり、44例がタイプDであった。多変量解析の結果、抑うつ傾向は、タイプD（オッズ比 [OR]=2.78, 95%信頼区間 [CI] [1.06, 7.24], P=0.037）、常勤勤務者（OR=0.23, 95% CI [0.08, 0.64], P=0.005）と有意に関連していた。また、コーピング方略の下位

尺度の「放棄または諦め」（OR=1.33, 95% CI [1.07, 1.65], P=0.010）と有意な関連を認めた。タイプD例は非タイプD例に比し、コーピング方略の「放棄または諦め」が有意に高値（P=0.002）であり、「肯定的解釈」が有意に低値（P=0.004）であった。

【考察】 「放棄または諦め」のコーピング方略は、心理的ストレス要因からの一時的な逃避を行うことは可能であるが、現実を変化させ、心理的ストレス要因を解消することは困難である点でネガティブなコーピング方略である。CAD例は、複数の薬物治療、食事制限、特に二次的な心血管イベントのリスクに対する懸念が増しているため、退院後にさらにストレスを受ける可能性がある。これらのストレスは、生活の質を低下させ、抑うつ傾向のリスクを高めると考えられ、タイプDのCAD例で不足しているポジティブなコーピング方略の実施が必要と考える。

また、常勤勤務者へのストレスチェック等の対応が、少なからず抑うつへの傾向を予防していると考えられる。退院後のメンタルヘルスケアは、パートタイム労働者や失業者に特に焦点を当てるべきであることが示唆された。

【結論】 CAD例に高頻度で認めた抑うつ傾向は、タイプDと「放棄または諦め」のコーピング方略と関連し、常勤勤務者と負の関連を認めた。CAD例では、性格傾向を評価し、ポジティブなコーピング方略を実施できるように介入することが、抑うつ傾向の予防に有益である可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

冠動脈疾患患者では社会的抑制と否定的な感情を特徴とするタイプDパーソナリティが心理的危険因子として関連があることが知られている。またタイプDパーソナリティの冠動脈疾患患者では不安と抑うつ症状が多く見られている。山口はこれらのことに注目し、

日本人の冠動脈疾患患者におけるタイプDパーソナリティ、抑うつ症状、ストレスに対するコーピング方略について、アンケートを用いて調査した。

対象は信州大学医学部附属病院に入院して経皮的冠動脈インターベンションを受けた108名の患者であり、Zung Self-Rating Depression Scale, Type D Personality Scale, Tri-Axial Coping Scale 24を用いて無記名自記式質問紙調査を行った。そのうち100名のデータを用いて解析を行った。

冠動脈疾患患者の年齢は30~70歳代で、中央値は66歳であり、疾患は急性心筋梗塞と狭心症であった。このうち常勤の勤務者は55%、非常勤の勤務者は9%、非勤務者は36%であった。タイプDパーソナリティと判定されたのは44%、抑うつ傾向と判定されたのは59%であり、抑うつ傾向ではタイプDパーソナリティが多く(オッズ比:2.78, 95%信頼区間:1.06-

7.24), 常勤の勤務者が少なかった(オッズ比:0.23, 95%信頼区間:0.08-0.64)。コーピング方略に関しては、抑うつ傾向では「放棄・諦め」, 「責任転嫁」が多く, 「計画立案」が少なかった。またタイプDパーソナリティでも「放棄・諦め」, 「責任転嫁」が多く, 「肯定的解釈」が少なかった。これらの結果から、日本人の冠動脈疾患患者において、抑うつ傾向になりやすいパーソナリティや勤務形態が明らかになり、抑うつ傾向やタイプDパーソナリティを示す冠動脈疾患患者の取りやすいコーピング方略を明らかにすることができた。

以上より山口は日本人の冠動脈疾患患者の抑うつ傾向、タイプDパーソナリティ、コーピング方略の関連を科学的に明らかにした。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。

Correlation between radiographic sagittal alignment, range of motion, muscle strength, and quality of life in adults with spinal deformities (成人脊柱変形患者の単純レントゲンにおける矢状面アライメント、関節可動域、筋力、生活の質の相関関係)

齋 門 良 紀

(論文の内容の要旨)

【はじめに】成人脊柱変形患者において、生活の質(Quality of life: 以下, QOL)低下に影響する因子は冠状面のアライメントではなく、矢状面のアライメントであると報告されている。特に脊柱の後弯変形や骨盤の後傾、その双方を含めた体幹全体における前方へのバランス偏位がQOL低下を招くことが明らかとなっている。成人脊柱変形の病態は複雑であるが、これらの矢状面アライメント不良といくつかの脊柱・下肢の関節可動域・筋力との関連が報告されている。しかし、矢状面アライメント評価のゴールドスタンダードである単純レントゲンを用いて、脊柱・下肢の関節可動域・筋力との関連を詳細に検討した研究はない。また、脊柱変形患者において、脊柱・下肢の関節可動域・筋力とQOLとの関連を検討した報告はない。

【目的】本研究の目的は、成人脊柱変形患者を対象に、脊柱・下肢の関節可動域・筋力と1) 単純レントゲンにて評価された矢状面アライメント、2) QOLとの関連を検討し、成人脊柱変形患者に対する適切な要因を標的とした効果的な理学療法を検討する際の一助とすることとする。

【対象および方法】本研究は、横断的観察研究である。

対象は、腰痛を有する成人脊柱変形患者とした。脊柱・下肢の関節可動域・筋力、矢状面アライメントの測定およびQOLの評価を実施した。脊柱・下肢の関節可動域・筋力と矢状面アライメント、QOLの相関分析を行った。

【結果】取り込み基準に該当した対象は、26名(男性10名、女性16名、平均年齢 78.6 ± 7.5 歳)であった。矢状面アライメントに関しては、股関節伸展可動域とsagittal vertebral axisに有意な負の相関関係($n=9, r=-0.73$), occiput-to-wall distanceと胸腰椎後弯角に有意な負の相関関係($n=24, r=-0.51$), 脊柱伸展筋持久力と骨盤傾斜に有意な負の相関関係($n=25, r=-0.48$), 脊柱伸展筋持久力とpelvic incidence-腰椎前弯角(骨盤の形態と腰椎前弯とのミスマッチ)に有意な負の相関関係($n=25, r=-0.40$)をみとめた。QOLに関しては、腰椎疼痛関連障害のスコアと腰椎の可動域に有意な負の相関関係($n=6, r=-0.83$), 歩行機能障害のスコアと膝関節伸展可動域に有意な正の相関関係($n=9, r=0.83$), 歩行機能障害のスコアと股関節伸展可動域に有意な正の相関関係($n=9, r=0.77$)をみとめた。

【結論】矢状面アライメント不良には、股関節伸展可

動域低下, 脊柱伸展可動域低下, 脊柱伸展筋持久力低下が関連することが明らかとなった。また, QOL においては, 腰椎の疼痛増悪に腰椎の可動域増加, 歩行機能低下に股関節および膝関節の伸展可動域低下が関連することが明らかとなった。これらの結果は, 成人脊柱変形患者に対する評価および治療において標的とするべき要因を示唆するものである。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は, 脊柱の変形と腰痛を有する整形外科外来受診患者を対象として, レントゲン写真に基づく脊柱および骨盤の矢状面上のアライメントと, 脊柱・股関節・膝関節の関節可動域, 上肢・体幹・下肢の筋力, そして, Quality of Life (QOL) との関連性を解析することによって, 脊柱変形を呈する症例に対するより効果的な理学療法プログラムの在り方を考究することを目的として実施したものである。

結果として, 脊柱の後弯変形と, 立位で踵部と背部を壁につけた際の壁と後頭骨との距離, 股関節伸展の関節可動域, 上肢の筋力との間に関連性がみられ, QOL の指標である Japanese Orthopedic Association Back Pain Evaluation Questionnaire (JOABPEQ) と,

腰椎・膝伸展の関節可動域および腸腰筋の柔軟性との関連性がみられたことが示された。

また, 研究の限界として, 2日間に分けて測定を実施したことから, 被検者数が減少したため, 今後, さらに症例数を増やして, 脊柱・骨盤の矢状面上のアライメントや QOL と, 上肢・体幹・下肢の関節可動域や, 体幹・下肢筋力との関連性を解析していくことの必要性を掲げている。

本研究の結果は, 横断的観察研究の結果であることから, 脊柱の後弯変形と, 上肢・体幹・下肢の関節可動域の低下や, 体幹・下肢筋力の低下との時系列的因果関係については不明であるが, 今回の解析結果から, 脊柱の後弯変形を有する症例に対するより効果的な理学療法を考究するための指標を浮き彫りにすることができたものと考えられる。

また, 審査会においては, 主査および副査からの質問に対して, 的確かつ論理的な回答が示された。

以上の点から, 本論文は, 博士(保健学)の学位論文として価値あるものであることを主査, 副査が一致して認めた。

Comparison of impedance measured by the forced oscillation technique and pulmonary functions, including static lung compliance, in obstructive and interstitial lung disease (閉塞性肺疾患及び間質性肺疾患における肺コンプライアンスと多周波強制オシレーション法を用いた呼吸インピーダンスとの関係)

武市尚也

(論文の内容の要旨)

【背景】多周波オシレーション法 (multi-frequency forced oscillation technique, MF-FOT) による呼吸インピーダンスの評価は, 呼吸器の呼吸抵抗 (Rrs: respiratory resistance) と呼吸リアクタンス (Xrs: respiratory reactance) に分けて評価ができる方法である。Rrs は気道抵抗と肺および胸郭の組織抵抗の和であり, Xrs は弾性抵抗と慣性抵抗の和である。閉塞性肺疾患 (obstructive lung disease, OLD) では, その重症度に応じて Rrs は低周波数領域で高値を, Xrs はより陰性を示すことが報告されている。一方, Rrs および Xrs は, 肺の病態変化 (気腫性変化による肺弾性収縮圧の低下および肺線維症による肺の硬化など) をどの程度反映しているかは明らかでない。本研究は, 肺弾性収縮圧の影響が Rrs および Xrs にどの程度反映されているのかを明らかにするため, OLD

および間質性肺疾患 (interstitial lung disease, ILD) における静肺プライアンスと MF-FOT の結果を比較検討した。

【方法】MostGraph-01を用いて呼吸インピーダンス測定と食道バルーン法による肺コンプライアンス測定, スパイロメトリー, 体プレティスモグラフによる肺気量分画と気道抵抗, 1回呼吸法による CO 肺拡散能力, 単一呼吸法による換気不均等分布の測定検査を全て同日に行った対象の検査データを対象とした。解析対象となった症例は, 健常者 (healthy subjects, HS) 24例, OLD 18例 (COPD 16例, asthma-COPD overlap 2例), ILD は11例であった。HS と OLD, ILD の3群で比較を行った。

【結果】Rrs の指標である R5-R20は, 一秒量 (FEV1), 肺拡散能 (DLco) と負の, ΔN_2 , 気道抵抗 (Raw), 肺抵抗 (RL) とは正の相関を示した。Xrs の指標で

ある X5は、肺活量 (VC), FEV1および DLco と正の, $\Delta N2$, Raw, RL, ΔRL と負の良好な相関を示した。fres は X5の場合と同様の項目と逆の相関がみられた。RL は呼吸インピーダンスの多くの指標と良好な相関が得られたが、静肺コンプライアンス (Cst) とは良好な相関は得られなかった。さらに OLD 群のみで相関をみると、R5-R20, X5, fres は、FEV1, $\Delta N2$, Raw, RL, ΔRL と良好な相関関係を示した。ILD 群のみで相関をみると、R5-R20は、FEV1, $\Delta N2$, Raw と有意な相関をしめし、X5, fres は加えて VC, RL, ΔRL とも有意な相関関係を示した。Xrs と Cst の間に相関関係は認められなかった。

【結論】ILD における呼吸インピーダンスの各指標、特に Xrs の指標 (X5および fres) は、肺の弾性収縮力を表す Cst および肺気量分画の減少とは相関を示さず、気道抵抗、肺抵抗および換気不均等と良好な相関を示した。OLD に対しても呼吸インピーダンス各指標は、Cst や肺気量分画の増加とは相関を示さず、気道病変に影響を受ける指標と良好な相関関係が得られた。以上から MF-FOT による呼吸インピーダンスの各指標は、肺の弾性収縮圧の変化をあまり反映しにくく、気道病変を反映しやすいことが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、多周波オシレーション法 (multi-frequency forced oscillation technique, MF-FOT) における呼吸インピーダンス (呼吸抵抗と呼吸リアクタンス) が肺の病態変化をどの程度反映しているかを検討している。MF-FOT は、呼吸抵抗 (Rrs) と呼吸リアクタンス (Xrs) に分けて評価ができる方法である。閉塞性肺疾患 (OLD) では、その重症度に応じて Rrs は低周波数領域で高値を、Xrs はより陰性を示すことが報告されているが、Rrs および Xrs は肺の病態

変化 (気腫性変化による肺弾性収縮圧の低下および肺線維症による肺の硬化など) をどの程度反映しているかは明らかでない。本研究では、肺弾性収縮圧の影響が Rrs および Xrs にどの程度反映されているのかを明らかにするため、OLD および間質性肺疾患 (ILD) における静肺プライアンスと MF-FOT の結果を比較検討している。結果としては、Rrs の指標は、一秒量 (FEV1), 肺拡散能 (DLco) と負の, $\Delta N2$, 気道抵抗 (Raw), 肺抵抗 (RL) とは正の相関を示した。Xrs の指標は、肺活量 (VC), FEV1および DLco と正の, $\Delta N2$, Raw, RL, ΔRL と負の相関を示した。RL は呼吸インピーダンスの多くの指標と良好な相関が得られたが、静肺コンプライアンス (Cst) とは相関は得られなかった。さらに OLD 群のみで相関をみると、Rrs および Xrs の指標は、FEV1, $\Delta N2$, Raw, RL, ΔRL と良好な相関関係を示した。ILD 群のみで相関をみると、Rrs の指標は、FEV1, $\Delta N2$, Raw と有意な相関をしめし、Xrs の指標は加えて VC, RL, ΔRL とも有意な相関関係を示した。Xrs と Cst の間に相関関係は認められなかった。本研究の結論としては、ILD における呼吸インピーダンスの各指標、特に Xrs は、肺の弾性収縮力を表す Cst および肺気量分画の減少とは相関を示さず、気道抵抗、肺抵抗および換気不均等と良好な相関を示した。OLD に対しても呼吸インピーダンス各指標は、Cst や肺気量分画の増加とは相関を示さず、気道病変に影響を受ける指標と良好な相関関係が得られた。以上から MF-FOT による呼吸インピーダンスの各指標は、肺の弾性収縮圧の変化をあまり反映しにくく、より気道病変を反映しやすいことが示唆された。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。