

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

平成20年度

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

目 次

平成20年度

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第378号	宇都宮 智子	A novel molecular mechanism for anticancer drug-induced ovarian failure: Irinotecan HCL, an anticancer topoisomerase I inhibitor, induces specific FasL expression in granulose cells of large ovarian follicles to enhance follicular apoptosis. (抗癌剤誘発卵巣機能不全の新しい分子機序：トポイソメラーゼ I 阻害薬の塩酸イリノテカンは大卵胞顆粒膜細胞に特異的にFasLを誘導させ、卵胞アポトーシスを誘発する。) ……………	1
博(医)甲第379号	張 萍	Immunohistochemical analysis of thyroid-specific transcription factors in thyroid tumors. (甲状腺腫瘍における甲状腺特異転写因子の免疫組織化学的研究) ……………	3
博(医)甲第380号	宮 脇 正 和	The plasma angiotensin II level increases in very low-birth weight infants with neonatal chronic lung disease. (血漿中アンジオテンシンII濃度は、慢性肺疾患を合併した極低出生体重児で高値となる。) ……………	6
博(医)甲第381号	時 永 泰 行	Mechanism of the ropivacaine-induced increase in intracellular Ca ²⁺ concentration in rat aortic smooth muscle. (ラット大動脈平滑筋におけるロピバカインによる細胞内カルシウム濃度上昇の機序) ……………	8
博(医)甲第382号	葛 原 敏 樹	Protection against systemic fatal pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA). (肺炎球菌表面蛋白抗原PspAを用いた母体経鼻免疫による致死性肺炎球菌全身感染症に対する防御) ……………	10
博(医)甲第383号	田 中 亜 紀	Expression of histo-blood A type 1, 2 and 3 antigens in normal skin and extramammary Paget's disease (正常皮膚および乳房外ページェット病におけるA1型-A3型抗原の発現について) ……………	11
博(医)甲第384号	森 山 智 美	Formation of biofilm by <i>Haemophilus influenzae</i> isolated from pediatric intractable otitis media. (小児難治性中耳炎より分離されたインフルエンザ菌のバイオフィルム形成に関する研究) ……………	13
博(医)甲第385号	奥 喜 全	Identification of the molecular mechanisms for dedifferentiation at the invasion front of colorectal cancer by a gene expression analysis. (網羅的遺伝子発現解析による大腸癌先進部脱分化に関与する分子メカニズムの同定) ……………	15
博(医)甲第386号	住 岡 孝 吉	Inhibitory effect of blocking TGF- β /Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal endothelium (角膜内皮創傷治癒におけるTGF β /Smad シグナル阻害での線維化抑制の効果) ……………	18

(学位記番号)	(氏名)	(論文題目)	(頁)
博(医)甲第387号	市川 朋宏	Peroxynitrite augments fibroblast-mediated tissue remodeling via myofibroblast differentiation (パーオキシナイトライトは線維芽細胞による組織リモデリングを筋線維芽細胞への分化を介して促進する)	21
博(医)甲第388号	崔 鶴	Adrenomedullin 2 microinjection into the nucleus tractus solitarius elevates arterial pressure and heart rate in rats (ラット延髄孤束核におけるアドレノメデュリン2の中枢性循環調節作用の検討)	23
博(医)甲第389号	深井 順也	EphA4 promotes cell proliferation and migration through a novel EphA4-FGFR1 signaling pathway in the human glioma U251 cell line. (悪性グリオーマにおけるEphA4レセプターの発現と機能解析)	25
博(医)甲第390号	勝山 由來子	Butyryl-arginine as a potent virus inactivation agent (新規ウイルス不活化剤としてのブチロイルアルギニン)	27
博(医)甲第391号	戸川 寛子	Increased chymase-positive mast cells in children with crescentic glomerulonephritis (小児腎疾患におけるChymaseの発現—小児の半月体形成性腎炎におけるChymaseの関与)	29
博(医)甲第392号	柳 沢 悟	The Possible Role of Hematopoietic Cell Kinase in the Pathophysiology of COPD (慢性閉塞性肺疾患におけるHematopoietic Cell kinaseの役割について)	31
博(医)甲第393号	李 莉	Irinotecan-induced ovarian follicular apoptosis is attenuated by deleting the kinase domain of death-associated protein kinase (塩酸イリノテカン誘発卵巣顆粒膜細胞アポトーシスにおけるdeath-associated protein kinaseの意義)	33
博(医)甲第394号	三木田 直哉	The protective effects of ultraviolet A1 irradiation on spontaneous lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice (MRL/lprマウスのエリテマトーデス様皮膚症に対するUVA1照射の効果)	36
博(医)甲第395号	白 艶花	Survival impact of psammoma body, stromal calcification, and bone formation in papillary thyroid carcinoma (甲状腺乳頭癌における砂粒体、間質石灰化および骨形成と予後への影響)	38

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)乙第829号	武 田 大 輔	The activation of nicotinic acetylcholine receptors enhances the inhibitory synaptic transmission in the deep dorsal horn neurons of the adult rat spinal cord. (脊髄後角深層におけるニコチン性アセチルコリン受容体を介する抑制系増強作用)	40
博(医)乙第830号	内 海 みよ子	Brachial-Ankle Pulse Wave Velocity for the Assessment of Arterial Stiffness in Adolescents - The Influence of Obesity and Metabolic Syndrome Variables - (若年層における脈波伝播速度の進展に及ぼすメタボリック症候群の影響)	42
博(医)乙第831号	根 来 孝 明	Effects of Isoflurane and Sevoflurane Anesthesia on Arteriovenous Shunt Flow in the Lower Limb of Diabetic Patients without Autonomic Neuropathy (自律神経ニューロパシーを持たない糖尿病患者の下肢動静脈シャントに与えるイソフルランとセボフルランの影響)	45
博(医)乙第832号	森 本 善 文	TNF- α deficiency accelerates renal tubular interstitial fibrosis in the late phase of ureteral obstruction (TNF- α 欠損は尿管閉塞後期における腎尿細管間質線維化を促進する)	46
博(医)乙第833号	西 秀 人	Hypothermia suppresses excitatory synaptic transmission and neuronal death induced by experimental ischemia in spinal ventral horn neurons (低温は脊髄前角ニューロンの実験的虚血負荷による興奮性シナプス伝達及び神経細胞死を抑制する)	49
博(医)乙第834号	宮 崎 展 行	Adenosine modulates excitatory synaptic transmission and suppresses neuronal death induced by ischaemia in rat spinal motoneurons. (脊髄前角細胞におけるアデノシンの興奮性シナプス伝達の解明と実験的虚血負荷に対する神経保護作用)	50
博(医)乙第835号	津 本 智 幸	A Polyvinyl Alcohol Core Coil Containing Basic Fibroblast Growth Factor Evaluated in Rabbits with Aneurysms Induced by Elastase (Basic-fibroblast growth factor (b-FGF) 含有 polyvinyl alcohol coil を用いた動脈瘤治療に関する基礎的研究 (ウサギエラストラーゼ動脈瘤モデルを用いて))	51
博(医)乙第836号	前 北 隆 雄	High Levels of Aberrant DNA Methylation in <i>Helicobacter pylori</i> -Infected Gastric Mucosae and its Possible Association with Gastric Cancer Risk (ヘリコバクター・ピロリ感染による強力な胃粘膜DNAメチル化異常誘発、及び胃粘膜DNAメチル化異常の蓄積と胃癌リスクの関係)	53
博(医)乙第837号	田 村 学	Hearing preservation after Gamma Knife radiosurgery for vestibular schwannomas presenting with high-level hearing (聴力損失をほとんど認めない聴神経鞘腫患者に対するガンマナイフ定位放射線治療後の聴力温存について)	56

学位記番号	博(医)甲第378号
学位授与の日	平成20年4月8日
氏名	宇都宮 智子
学位論文の題目	A novel molecular mechanism for anticancer drug-induced ovarian failure: Irinotecan HCL, an anticancer topoisomerase I inhibitor, induces specific FasL expression in granulosa cells of large ovarian follicles to enhance follicular apoptosis. (抗癌剤誘発卵巣機能不全の新しい分子機序：トポイソメラーゼ I 阻害薬の塩酸イリノテカンは大卵胞顆粒膜細胞に特異的に FasL を誘導させ、卵胞アポトーシスを誘発する。)
論文審査委員	主査 教授 覚道 健一 副査 教授 梅咲 直彦 教授 岸岡 史郎

論文内容の要旨

塩酸イリノテカン(CPT-11)は、幅広く抗癌化学療法に用いられているが、閉経前期と閉経周辺期の患者に投与すると、すみやかに続発無月経や更年期障害が発症することを我々は発見した。しかしこれらの卵巣機能不全の発症機序は未解明である。そこで CPT-11 投与患者の内分泌学的検討を行ったところ、CPT-11 を投与されるたびに血清 FSH と血清 LH の上昇と、血清 estradiol の低下、続発性無月経と更年期障害様症状の出現を認めた。手術摘出された卵巣の病理組織検査では卵胞はほとんど崩壊し、残存卵胞顆粒膜細胞も細胞死を確認した。以上から CPT-11 投与に伴う更年期障害や無月経はエストロゲンの産生細胞である卵胞顆粒膜が細胞死に陥った結果と推測された。

そこで CPT-11 誘発卵巣障害の分子機序を解明するべく、マウスでの抗癌剤誘発卵巣障害モデルを確立した。まず臨床投与量に匹敵する CPT-11 を 8 週齢雌 MCH マウスに腹腔内投与し、卵巣組織の TUNEL 染色と細胞死の解析をおこなった。また免疫組織化学的に上記組織における activated caspase 3, Fas 抗原, Fas ligand (FasL) の発現を調べた。さらに正常マウス卵巣の器官培養系に recombinant FasL を添加し、機能的 Fas/FasL シグナルの有無を確認するために TUNEL 染色を行った。

CPT-11 の腹腔内投与により大卵胞顆粒膜細胞に特異的に TUNEL 陽性細胞と cleaved caspase 3 の発現を認めた。各卵巣切片で 10 細胞以上の TUNEL 陽性細胞を検出したものをアポトーシス陽性卵胞としたとき、アポトーシス陽性卵胞は大卵胞にのみ認められた。全卵胞にしめるアポトーシス卵胞率は約 30% であり、CPT-11 用量依存性に早期にアポトーシスが出現した。Fas 抗原は全卵巣細胞で発現が認められ、特に黄体細胞に強く発現を認めた。CPT-11 投与で Fas 抗原発現は増強しなかった。FasL は正常卵巣組織には発現しておらず、CPT-11 投与により顆粒膜細胞に特異的に発現が誘導された。正常マウス卵巣の器官培養系に recombinant mouse soluble FasL を添加すると、Fas 抗原が中等度に発現している顆粒膜細胞と黄体細胞に TUNEL 陽性細胞数が増加した。

結論として、CPT-11 は用量依存性に発育卵胞の顆粒膜細胞に特異的に FasL を発現させる。誘導された FasL は autocrine または paracrine 的機序で顆粒膜細胞上の Fas 抗原と反応して、顆粒膜細胞にアポトーシスを誘発する。この結果として細胞系譜特異的、細胞分化段階特異的な卵巣顆粒膜細胞アポトーシスが誘発され、卵胞崩壊をもたらす。臨床的に CPT-11 が投与された癌患者に卵巣エストロゲン産生の減少、それに続発した血清 FSH、LH の上昇を引き起こし、卵巣欠落症状を発症させている。本研究は CPT-11 誘発卵巣機能不全発症の主たるメカニズムが、卵巣顆粒膜細胞での Fas/FasL 反応であることを in vivo と in vitro で世界ではじめて実証したものである。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 20 年 3 月 17 日、審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。

抗癌剤を若い患者に投与する場合は、治療後の性腺機能障害や不妊症という後遺症を誘発する可能

性が指摘されてきたが、その分子機構や予防方法は未確立である。本学位論文は、実際の臨床での抗癌剤治療中に、特にトポイシメラーゼ I 阻害剤である塩酸イリノテカン(CPT-11)投与中に、高率に卵巣機能不全が誘発されることに着眼し、マウス動物実験でその分子機序を実証したものである。

まずマウスでの抗癌剤誘発卵巣障害モデルを確立し、CPT-11 を 8 週齢雌 MCH マウスに腹腔内投与し、卵巣組織の TUNEL 染色と細胞死の解析をおこなった。また免疫組織化学的に activated caspase 3, Fas, Fas ligand (FasL) の発現を調べた。さらに正常マウス卵巣の器官培養系に recombinant FasL を添加し、機能的 Fas/FasL シグナルの有無を確認するために TUNEL 染色を行った。

その結果、CPT-11 の腹腔内投与により大卵胞顆粒膜細胞に特異的に TUNEL 陽性細胞と cleaved caspase 3 の発現を認めた。アポトーシス陽性卵胞は大卵胞にのみ認められ、全卵胞にしめるアポトーシス卵胞率は約 30% であり、CPT-11 用量依存性に早期にアポトーシスが出現した。Fas 抗原は全卵巣細胞で発現が認められ、CPT-11 投与で Fas 抗原発現は増強しなかった。FasL は正常卵巣組織には発現せず、CPT-11 投与により顆粒膜細胞に特異的に発現が誘導された。正常マウス卵巣の器官培養系に recombinant FasL を添加すると、顆粒膜細胞と黄体細胞に TUNEL 陽性細胞数が増加した。以上より CPT-11 は発育卵胞の顆粒膜細胞に特異的に FasL を誘導させ、FasL は autocrine または paracrine 的機序で Fas 抗原と反応して、顆粒膜細胞にアポトーシスを誘発する。この結果として卵胞崩壊をもたらし、卵巣機能不全を発症させていると考えられた。

本研究は CPT-11 誘発卵巣機能不全発症の主たるメカニズムが、卵巣顆粒膜細胞での Fas/FasL 反応であることを *in vivo* と *in vitro* で世界ではじめて実証したものである。また特異分子が抗癌剤による卵巣機能不全の引き金になることを証明したことから、卵巣機能不全の分子標的予防療法の可能性を示唆し、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第379号		
学位授与の日	平成20年5月13日		
氏名	張	萍	
学位論文の題目	Immunohistochemical analysis of thyroid-specific transcription factors in thyroid tumors. (甲状腺腫瘍における甲状腺特異転写因子の免疫組織化学的研究)		
論文審査委員	主査	教授	山中 昇
	副査	教授	覚道 健一 教授 村垣 泰光

論文内容の要旨

Introduction

Loss of thyroid-specific proteins and differentiation is a common process in thyroid carcinogenesis. Abnormal expression of some development signaling molecules and some transcription factors was occasionally reported in some kinds of thyroid carcinoma. In the present study, we systematically tested the expression of three thyroid-specific transcription factors, that is thyroid transcription factor 1(TTF1), thyroid transcription factor 2(TTF2) and paired box gene 8 (Pax8), in four histological types of follicular cell tumors (anaplastic carcinoma, papillary carcinoma, follicular carcinoma and follicular adenoma) and one C cell tumor (medullary carcinoma) by immunohistochemical staining, and then focused on the most ferocious type – anaplastic carcinoma to further investigate the expression of some development related molecules.

Materials and Methods

Tumor samples and cell lines

Cases were obtained from the archival files in the Department of Pathology at Wakayama Medical University, Wakayama, Japan. A total of 68 cases were investigated, including 8 cases of anaplastic thyroid carcinoma, 14 cases of medullary thyroid carcinoma, 16 cases of papillary thyroid carcinoma, 15 cases of follicular thyroid carcinoma and 15 cases of benign follicular thyroid adenoma. Normal thyroid tissue around the tumors in each section was served as normal built-in-control. Two established anaplastic thyroid carcinoma cell lines, TTA-3 (floating) and KTA-4 (adhesive) were cultured in RPMI 1640 containing 5% fetal calf serum (FCS) at 37°C, CO₂/95% air atmosphere.

Immunohistochemical staining

Immunohistochemical staining was performed on both paraffin sections and cell culture plates. Cell culture plates were fixed with 0.5ml of 4% paraformaldehyde or acetone. 0.01 mol/L citrate buffer solution (pH6.0) was used to retrieve the antigen epitope on tissue sections. The slides were further blocked with Protein Block Serum-Free (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Primary antibodies were: mouse monoclonal anti-TTF1 antibody (clone, 8G7G3/1; Dako, dilution 1:100), goat polyclonal anti-TTF2 antibody (Abcam, Cambridge, UK; dilution 1:200), goat polyclonal anti-Pax8 (Abcam, Cambridge, UK; dilution 1:200), goat anti-Nanog (10 µg/ml, R&D System), goat anti-Oct4 antibody (10 µg/ml, R&D systems), mouse anti-Sox2 (10 µg/ml, R&D system), mouse anti-SSEA1 (10 µg/ml, R&D system), mouse anti-SSEA4 (10 µg/ml, R&D system), CD133 (1:10 dilution, Miltenyi Biotec), ABCG2 (1:30 dilution, Abcam) or same volume of PBS (as blank control) overnight at 2-8°C. Then, slides were incubated with Histofine Max PO (G) rabbit anti-goat second antibody (Nichirei Corporation, Japan), or with Alexa Fluor488 F (ab) 2 fragment IgG (Invitrogen Molecular Probe, dilution 1:200) at room temperature. The sections were further developed with 3, 3'-diaminobenzidine tetrachloride or counterstained with

Vectashield Hard*Set™ Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories). The staining intensities were graded semi quantitatively according to the staining intensity that dominated more than two-thirds of the tumor cells as follows: 0, no staining; 1, weak staining; 2, moderate staining; and 3, strong staining.

Flow cytometry analysis

The primary antibodies were PE-ABCG2 (1:10 dilution, Miltenyi Biotec), APC-CD133 (1:10 dilution, Miltenyi Biotec), anti-SSEA1 (10 μ g/ml, R&D System), anti-SSEA2 (10 μ g/ml, R&D System) and anti-Sox2 (10 μ g/ml, R&D System). Alexa Fluor488 F (ab)² fragment IgG (Invitrogen Molecular Probe, dilution 1:200) was added when necessary. Side population analysis was based on the following method. Briefly, cells were incubated with 5 μ g/ml Hoechst33342 (Sigma-Aldrich) for 90min with or without 50 μ M of verapamil (Sigma-Aldrich). 1 μ g/ml PI (Sigma-Aldrich) was added to discriminate dead cells. The Hoechst dye was excited with the UV laser at 351 to 364nm and its fluorescence measured with a 515nm side population filter and a 608 EFLP optical filter (Beckman Coulter EPICS ALTRA flow cytometry).

Reverse polymerase chain reaction

RNA was extracted from cultured cells with Trizol (Invitrogen) and reverse transcribed by using Thermoscript[®] RT-PCR system (Invitrogen). Primers were synthesized by Sigma-Proligo, and the transcripts of Oct-4, AC133, Nanog and ABCG2 were amplified.

Statistical analysis

Staining intensities in different groups were compared using Kruskal-Wallis test and Bonferroni-type multiple comparison (non-parametric). The relationship between nuclear staining and cytoplasm staining was described using non-parametric Spearman correlations.

Results

Expression of TTF1, Pax8 and TTF2 in normal thyroid cells and thyroid tumors

In normal follicular cells, staining of TTF1 and TTF2 was uniformly and exclusively localized in the nucleus. Staining for Pax8 was heterogeneous and basically confined to the nucleus except for the cytoplasm of a few normal follicular cells. In all types of thyroid tumor cells, staining for TTF1 was exclusively localized in the nucleus; staining for TTF2 and Pax8 was shown in both cytoplasm and nucleus. If the types of tumor were ranked in the order of anaplastic carcinoma, medullary carcinoma, papillary carcinoma, follicular carcinoma and follicular adenoma, then using non-parametric Spearman correlations we could observe a significant correlation between the tumor type and staining intensity of TTF1 ($R=0.761$, $P=0.000$), nuclear TTF2 ($R=0.765$, $P=0.000$) and nuclear Pax8 ($R=0.339$, $P=0.005$) respectively. Staining intensity of cytoplasm TTF2 was highest in medullary carcinoma, followed by papillary carcinoma, follicular carcinoma and anaplastic carcinoma, lowest in benign follicular adenoma.

Expression of some development related molecules in thyroid tumors

We observed a heterogeneous expression of Oct-4, ABCG2, AC133, SSEA1, SSEA4 and Sox2 in both anaplastic thyroid carcinoma cell lines. Nanog expression was not detected in both protein and mRNA level. Positive rates for Oct-4 were 27.6% in KTA-4 and 44.6% in TTA-3, for ABCG2 were 3.74% in TTA-3 and 1.3% in ABCG2. Flow cytometry revealed that staining percentages for AC133 were 0.97% in TTA-3 and 2.49% in KTA-4. The positive rate for SSEA1 was 51.27% in TTA-3 and 61.64% in KTA-4; for SSEA-4 was 16.39% in TTA-3 and 36.33% in KTA-4. Expression of Sox2 was also found in 33.11% of TTA-3 and 20.48% of KTA-4 respectively.

Presence of side population cells in anaplastic thyroid carcinoma

Over the past several years, a distinct “side population” (SP) has been defined in multiple normal tissues, certain tumors and cancer cell lines with immature, poorly differentiated, highly tumorigenic and stem cell like ability. While side population represents only a small fraction of the whole cell population, its properties confer an important place in several investigations and may play an important role in tumorigenesis and cancer therapy. In our research, a small

percentage of SP cells were also found in both TTA-3 and KTA-4 by staining them with Hoechst 33342 dye to generate a Hoechst blue-red profile. Verapamil adding led to markedly diminish the SP percentage, indicating this population was bona fide SP cells.

Conclusion

1. We observed increasing loss of nuclear expression of thyroid specific transcription factors in different thyroid tumors, from well-differentiated benign follicular adenoma, to follicular carcinoma and papillary carcinoma, and lowest in anaplastic thyroid carcinoma.
2. Nuclear expression of TTF1, TTF2 and Pax8 is physiologically important in thyrocytes and their deregulation is closely involved in thyroid tumorigenesis.
3. Heterogeneous cell populations existed in anaplastic thyroid carcinoma, and some of them expressed development related molecules, such as Oct-4, Sox2, SSEA1, SSEA4, ABCG2 and AC133.
4. Our data confirmed the existence of side population cells in anaplastic thyroid carcinoma.
5. Deregulation of developmental signaling molecules plays an important mechanism of tumorigenesis in thyroid cancer.

This work was presented in part at the ISAC XXIII International Congress which was held in Quebec, Canada on May, 2006.

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 20 年 4 月 10 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

甲状腺特異たんぱく質の発現欠失と、細胞の脱分化が、甲状腺発癌に共通する変化として知られている。また甲状腺濾胞上皮細胞の分化は、甲状腺特異的転写因子と甲状腺以外の発育相関分子とによる調節に依存していることが知られている。本研究では、三つの甲状腺特異的転写因子(TTF1, TTF2 および Pax8)を用い、4型の濾胞細胞腫瘍(濾胞腺腫、乳頭癌、濾胞癌と未分化癌)とC細胞腫瘍(髄様癌)計68例のホルマリン固定パラフィン切片を用い、免疫染色法による細胞局在を検索し、染色強度をスコア化した。さらに未分化癌培養細胞株を用い、甲状腺以外の特異的発育相関分子についても解析した。

結果:

1. TTF1 と TTF2 は、甲状腺正常濾胞細胞では、細胞核のみが、均一に染色された。Pax8 は、核のみならず一部細胞質にも陽性だが、基本的に細胞核に局在する。
2. 甲状腺腫瘍では、TTF2 と Pax8 では異常な細胞質の染色が見られた。
3. TTF1 の局在は、濾胞腺腫 (15/15 例)、濾胞癌 (15/15 例)、乳頭癌 (14/16 例) と未分化癌 (2/8 例) と髄様癌 (9/14 例) で、濾胞上皮腫瘍の4型では順にスコアの低下が見られた。良性腫瘍と悪性腫瘍の間に有意差が見られた。
4. TTF2 と Pax8 の核での発現は、濾胞腺腫から、濾胞癌と乳頭状癌の順に低下し、TTF2 の核での発現頻度は、良性と悪性甲状腺腫瘍の間で、有意差を認めた。
5. 未分化癌培養株では、癌幹細胞マーカー (SSEA1,SSEA4,ABCG2,AC133) 発育相関分子 (Oct-3/4,Sox2) の発現が認められ、Hoechst^{low} side population と判定できる細胞を少数認めた。

以上より本論文は、甲状腺腫瘍では、甲状腺特異転写因子の核での発現が低下し、腫瘍の脱分化、悪性度の増加と相関することを示し、転写因子の脱制御が甲状腺癌と癌進行に関わる可能性を示したものである。甲状腺未分化癌では、癌幹細胞マーカーの発現を示すなど、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第380号		
学位授与の日	平成20年5月13日		
氏名	宮脇正和		
学位論文の題目	The plasma angiotensin II level increases in very low-birth weight infants with neonatal chronic lung disease. (血漿中アンジオテンシン II 濃度は、慢性肺疾患を合併した極低出生体重児で高値となる。)		
論文審査委員	主査 教授	村垣 泰光	
	副査 教授	吉川 徳茂	教授 一ノ瀬 正和

論文内容の要旨

【緒言】

新生児から乳児期にはレニンアンジオテンシン系 (RAS) が亢進することが報告されている。しかし以前の RAS に関する検討は主に 2500g 以上の児を対象としており、低出生体重児に関する報告は少なく、その中でもアンジオテンシン II (AII) 濃度に関する報告はさらに少ない。我々は以前新生児期早期の血漿中 AII 濃度を測定し、出生体重 1500g 以上の児では日齢 0 に比べ日齢 7 に低下するのに対し、出生体重 1500g 未満の児では日齢 0 に比べ日齢 7 に上昇することを報告した。しかし現在までに新生児期を通して極低出生体重児 (VLBW) の血漿中 AII 濃度を測定した報告は無い。

慢性肺疾患 (CLD) は早産児に特有な呼吸器疾患であり、悪化因子としては胎内感染や生後早期の人工換気、高濃度酸素等が考えられている。その中でも肺線維化の進展には、人工呼吸器による換気量もしくは換気圧が深く関与しているとされている。近年 RAS の亢進が臓器の線維化に関係しているとの報告があるが、現在までに CLD に RAS が関与しているとの報告は無い。

今回我々は VLBW の新生児期における AII 濃度を測定し、VLBW の血漿中 AII 濃度に影響を与える因子について検討を行った。

対象

和歌山県立医科大学周産期部 NICU に出生当日に入院した VLBW20 例を対象とした。

方法

1. 日齢 0、7、21、35 の 4 ポイントで採血し、血漿中 AII 濃度を Angiotensin II Enzyme Immunoassay Kit を用いマイクロプレートリーダーで測定した。
2. 出生体重、アプガースコア 1 分値、アプガースコア 5 分値、平均血圧、血清カリウム濃度、血清ナトリウム濃度、体重増減率、投与水分量、呼吸器使用時間、酸素投与時間について血漿中 AII 濃度との相関を検討した。
3. 呼吸窮迫症候群 (RDS)、新生児慢性肺疾患 (CLD)、テオフィリン、フロセミドについて、有り無しの 2 群に分けて血漿中 AII 濃度を比較検討した。

結果

1. 血漿中 AII 濃度は、出生後上昇した日齢 21 をピークとしてその後低下した。経過を通じて、過去の成人血漿中 AII 濃度の報告よりも高値であった。
2. 日齢 0、7、21 では血漿中 AII 濃度といずれの項目も強い相関は無かったが、日齢 35 では出生体重 ($r=-0.82$)、酸素投与期間 ($r=0.77$) と血漿中 AII 濃度の間に強い相関を認めた。
3. 日齢 0、7 では CLD 群と非 CLD 群で血漿中 AII 濃度に有意差は認めなかったが、日齢 21、35 では CLD 群が非 CLD 群に比べて血漿中 AII 濃度が有意に高値であった ($p<0.001, p<0.0001$)。日齢 21、35 とともにフロセミド群は非投与群に比べて血漿中 AII 濃度が有意に高値であった ($p<0.05, p<0.001$)。
4. 日齢 21 の血漿中 AII 濃度を従属変数とし、CLD とフロセミド投与を独立変数として重回帰分析を行った結果、CLD のみが強く関連する因子であった ($p<0.01$)。日齢 35 の血漿中 AII 濃度を従属変数とし、出生体重、酸素投与期間、CLD、フロセミド投与を独立変数として重回帰分析を行った結果、出生体重と CLD が強く関連する因子であった ($p<0.05, p<0.01$)。

【考察】

RDS、サルコイドーシスや成人呼吸窮迫症候群では気管支肺胞洗浄液中と血中 ACE 活性が高いことが報告されている。AII は臓器の線維化に関係していることが報告されており、低出生体重児でも過剰な AII の発現は臓器線維化につながると考えられる。肺組織に RAS のコンポーネントが発現しているという報告が多数あり、さらに In vitro では過剰な AII が肺線維芽細胞の増殖と 2 型肺胞上皮細胞のアポトーシスを促進することが証明されている。これらのことから、VLBW の血漿中 AII 濃度高値が、CLD の発生と関連する可能性がある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 20 年 4 月 7 日、審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

新生児から乳児期には血漿中のレニンアンジオテンシン系（RAS）が亢進することが報告されている。しかし低出生体重児に関する報告は少なく、その中でもアンジオテンシン II（AII）濃度に関する報告はさらに少ない。現在までに新生児期を通して極低出生体重児（VLBW）の血漿中 AII 濃度を測定した報告は無い。

新生児慢性肺疾患（CLD）は早産児に特有な呼吸器疾患であり、悪化因子としては胎内感染や生後早期の人工換気、高濃度酸素等が考えられている。その中でも肺線維化の進展には、人工呼吸器による換気量もしくは換気圧が深く関与しているとされている。近年 RAS の亢進が臓器の線維化に関係しているとの報告があるが、現在までに CLD に RAS が関与しているとの報告は無い。

本論文は 2002 年 10 月から 2004 年 12 月までに和歌山県立医科大学周産期部 NICU に出生当日入院した VLBW20 例を対象とし、日齢 0、7、21、35 の 4 ポイントでの、血漿中 AII 濃度を測定し、出生体重、アプガースコア 1 分値、アプガースコア 5 分値、平均血圧、血清カリウム濃度、血清ナトリウム濃度、体重増減率、投与水分量、呼吸器使用時間、酸素投与時間について血漿中 AII 濃度との相関を検討し、更に呼吸窮迫症候群、CLD、テオフィリン、フロセミドについて、有り無しの 2 群に分けて血漿中 AII 濃度を比較検討している。そして臨床的に有意な相関があると判定した項目と 2 群間の比較で有意差が生じた項目を用いて血漿中 AII 濃度を従属変数とする重回帰分析を行ったものである。その結果、

1. 血漿中 AII 濃度は、出生後上昇した日齢 21 をピークとしてその後低下した。新生児期の経過を通じて、過去に報告されている成人血漿中 AII 濃度よりも高値であった。
2. 日齢 0、7、21 では血漿中 AII 濃度といずれの項目も強い相関は無かったが、日齢 35 では出生体重 ($r=0.82$)、酸素投与期間 ($r=0.77$) と血漿中 AII 濃度の間に強い相関を認めた。
3. 日齢 0、7 では CLD 群と非 CLD 群で血漿中 AII 濃度に有意差は認めなかったが、日齢 21、35 では CLD 群が非 CLD 群に比べて血漿中 AII 濃度が有意に高値であった ($p<0.001, p<0.0001$)。日齢 21、35 ともにフロセミド群は非投与群に比べて血漿中 AII 濃度が有意に高値であった ($p<0.05, p<0.001$)。
4. 日齢 21 の血漿中 AII 濃度を従属変数とし、CLD とフロセミド投与を独立変数として重回帰分析を行った結果、CLD のみが強く関連する因子であった ($p<0.01$)。日齢 35 の血漿中 AII 濃度を従属変数とし、出生体重、酸素投与期間、CLD、フロセミド投与を独立変数として重回帰分析を行った結果、出生体重と CLD が強く関連する因子であった ($p<0.05, p<0.01$)。

以上の結果から、極低出生体重児の CLD には血漿中 AII 濃度が強く関連する因子として重要であることが判明した。本論文は、有効な治療法が無い新生児 CLD に対する予防、および治療について重要な情報を提供するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第381号		
学位授与の日	平成20年6月10日		
氏名	時永泰行		
学位論文の題目	Mechanism of the ropivacaine-induced increase in intracellular Ca^{2+} concentration in rat aortic smooth muscle. (ラット大動脈平滑筋におけるロピバカインによる細胞内カルシウム濃度上昇の機序)		
論文審査委員	主査 教授	岸岡史郎	
	副査 教授	畑埜義雄	教授 赤阪隆史

論文内容の要旨

【背景】

ロピバカインは長時間作用性の局所麻酔薬であり、その長時間作用性の一部はロピバカインの血管平滑筋に対する収縮作用に基づくことが報告されている(1、2)。

血管平滑筋の収縮は細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存した機構と、 Ca^{2+} に依存しない機構、すなわち収縮タンパク質の Ca^{2+} 感受性により調節されている。細胞内 Ca^{2+} 濃度は細胞外からの Ca^{2+} の流入、及び、筋小胞体からの Ca^{2+} の放出により調節されている。一方、 Ca^{2+} 感受性は Protein Kinase C (PKC)、Rho kinase、及び p44/42 mitogen-activated protein kinase (p44/42 MAPK)を介した経路により調節されている。以前我々は、ロピバカインが、細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存した機構、および、PKC、Rho kinase、p44/42 MAPKを介した Ca^{2+} 感受性を増強させる機構の両方により血管収縮を引き起こすことを明らかにした(3)。このように、血管平滑筋の収縮機序に関する知見は増加しているが、ロピバカインによる血管収縮の機序に関して、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が細胞外からの Ca^{2+} の流入によりもたらされているのか、筋小胞体からの Ca^{2+} の放出により引き起こされているのかは不明である。本研究では、ロピバカインによる血管平滑筋収縮における細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇の機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】

和歌山県立医科大学動物実験倫理委員会よりこの実験に対する承認を得た。Wistar 雄性ラット(250~350g)より、胸部下行大動脈を摘出し、内皮除去標本を得た。ロピバカインを累積適用($3 \times 10^{-5}M \sim 3 \times 10^{-3}M$)し、等尺性張力変化、あるいは Fura-2 を暴露した標本を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定を行った。ロピバカイン収縮に及ぼす Ca^{2+} チャンネルブロッカー (Nicardipine)、Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)ブロッカー (2-aminoethoxydiphenyl borate (2-ABP))、細胞外 Ca^{2+} free 溶液の影響を検討した。

結果は、平均±標準偏差で示し、Mann-Whitney U test、あるいは Kruskal-Wallis test により統計処理を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】

ロピバカインは $3 \times 10^{-5}M$ から $3 \times 10^{-4}M$ までは濃度依存性にラット大動脈平滑筋を収縮させ、 $3 \times 10^{-4}M$ から $3 \times 10^{-3}M$ では、濃度依存性に収縮は減弱した (Figure 1A, 1B)。ラット大動脈におけるロピバカイン収縮は、細胞外の Ca^{2+} 濃度に依存して減弱した (Figure 1B) ($p < 0.01 \sim 0.001$, $n=6$)。

ラット大動脈におけるロピバカイン収縮は、Nicardipine、2-ABP によって抑制された (Figure 2, Figure 3) ($p < 0.001 \sim 0.05$, $n=6$)。また、Nicardipine、2-ABP 共存在下では、ロピバカイン収縮は相加的に抑制された (Figure 4) ($p < 0.01 \sim 0.05$, $n=6$)。

$3 \times 10^{-5}M$ から $3 \times 10^{-4}M$ までは濃度では、ロピバカインは濃度依存性にラット大動脈平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させ、 $3 \times 10^{-4}M$ から $3 \times 10^{-3}M$ のロピバカイン濃度では、濃度依存性に Ca^{2+} 濃度の上昇を減弱させた (Figure 5A, 5B)。ロピバカインによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、Nicardipine、2-ABP の適用、細胞外 Ca^{2+} free 溶液により有意に抑制された ($p < 0.01 \sim 0.05$, $n=6$)。

【考察】

ラット大動脈でのロピバカイン収縮は、細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存した機構が関与しているが、本研究

で、Nicardipine、あるいは、2-APB の適用、細胞外 Ca^{2+} free 溶液により収縮、カルシウム濃度の上昇が抑制されたことから、その機序は Ca^{2+} の細胞外からの流入、および、筋小胞体からの IP_3 を介した Ca^{2+} の放出の両者があることが示唆される。また、これらの抑制により、ロピバカイン収縮が完全に抑制されなかったことは、 Ca^{2+} 非依存性機構もロピバカイン収縮に関与しているという以前の我々の報告と一致する。

Nicardipine、および、2-APB を同時に適用した時に、ロピバカイン収縮はそれぞれの薬剤のみの収縮と比較して、相加的に収縮が抑制されたことから、 Ca^{2+} の細胞外からの流入、および、筋小胞体からの IP_3 を介した Ca^{2+} の放出は、どちらかが上流にある経路というよりもむしろ、両者の経路それぞれにロピバカインが作用していることが示唆された。

【結論】

ロピバカインによる血管収縮は、血管平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を伴っていた。この細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、細胞外からの Ca^{2+} 流入、および、 IP_3 を介した筋小胞体からの Ca^{2+} の放出を介している。

引用論文

- (1) Gherardini G, Samuelson U, Aberg JJB, Sjostrand N: Comparison of vascular effects of ropivacaine and lidocaine on isolated rings of human arteries. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995; 39: 765-768.
- (2) Nakamura K, Toda H, Kakuyama M, Nishiwada M, Yamamoto M, Hatano Y, Mori K: Direct vascular effect of ropivacaine in femoral artery and vein of the dog. *Acta Anaesthesiol Scand* 1993; 37: 269-273.
- (3) Yu J, Tokinaga Y, Kuriyama T, Uematsu N, Mizumoto K, Hatano Y: involvement of Ca^{2+} sensitization in ropivacaine-induced contraction of rat aortic smooth muscle. *Anesthesiology* 2005; 103: 548-55

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 20 年 5 月 29 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。

ロピバカインは長時間作用性の局所麻酔薬であり、その長時間作用の一部はロピバカインの血管収縮作用に基づくことが報告されている。血管収縮には、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇、あるいは、収縮蛋白質の Ca^{2+} 感受性の増大が必須である。以前、本申請者はロピバカインが、Protein kinase C、p44/42 Mitogen-activated protein kinase、および Rho kinase を介した Ca^{2+} 感受性の増大を招来することを証明した。本研究は、ロピバカインによる血管平滑筋収縮における細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇機構を検討したものである。

その結果、

1. ラット大動脈においてロピバカイン収縮は、カルシウム拮抗薬 (Nicardipine)、筋小胞体からの Ca^{2+} の放出に関わる Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) 受容体の拮抗薬 (2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)) によって抑制された。また、細胞外 Ca^{2+} を除去してもロピバカイン収縮は著明に抑制された。
2. Nicardipine、2-APB 共存在下では、ロピバカイン収縮は相加的に抑制された。
3. Fura-2 を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度の計測では、ロピバカインは細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた。この上昇は、Nicardipine、2-APB の適用により有意に抑制された。また、細胞外 Ca^{2+} を除去してもロピバカインによる収縮は有意に抑制された。

以上の結果より、本論文はロピバカインによる血管平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の作用が、細胞外からの Ca^{2+} 流入および IP_3 受容体を介した細胞内筋小胞体からの Ca^{2+} 放出の両方の機序を介していることを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第382号		
学位授与の日	平成20年12月9日		
氏名	葛原敏樹		
学位論文の題目	Protection against systemic fatal pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA). (肺炎球菌表面蛋白抗原 PspA を用いた母体経鼻免疫による致死性肺炎球菌全身感染症に対する防御)		
論文審査委員	主査	教授 吉川 徳 茂	
	副査	教授 秋本 茂	教授 山中 昇

論文内容の要旨

【緒言】肺炎球菌は急性中耳炎をはじめとする上・下気道感染症の重要な起炎菌であり、ワクチンによる感染予防が期待されている。今回我々は肺炎球菌表面蛋白抗原 PspA を用いた母体免疫によるマウスにおける肺炎球菌特異的免疫応答の誘導および感染予防についての検討を行った。

【方法】BALB/C マウス(4週齢、雌)に、PspA をコレラトキシン B をアジュバントとし1週間に2回3週間経鼻免疫を行った。最終免疫後、雄マウスと交配し、約3週間後に新生児マウスを得た。免疫後の母マウスの血清中の抗PspA 特異的IgG抗体価および母乳中の抗PspA 特異的IgG抗体価、新生児マウス血清中の抗PspA 特異的IgG抗体価をELISA法にて測定した。また、新生児マウスに肺炎球菌 TIGR4 株(血清型4型、PspA family 2)を腹腔内接種し、致死性肺炎球菌全身感染症に対する予防効果の検討を行った。

【結果】PspA 母体経鼻免疫により、母マウス母乳及び血清、新生児マウスの血清中に抗PspA 特異的IgG抗体が誘導された。また PspA 免疫群の新生児マウスは、非免疫群に比べて全身感染後の生存時間が延長された。

【結論】肺炎球菌感染症は2歳未満の乳幼児に好発するため、従来までの莢膜多糖体抗原ワクチンでは、効果的な免疫応答が誘導されにくい。PspA の母体経鼻免疫により、免疫能の未熟な乳幼児期に特異的免疫応答が誘導可能であり、肺炎球菌感染症の予防方法として有用と考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成20年11月19日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、論文の審査を行った。

肺炎球菌は急性中耳炎をはじめとする上・下気道感染症の重要な起炎菌であり、ワクチンによる感染予防が期待されている。とりわけ、乳幼児における肺炎球菌性中耳炎の難治化への対策は、耳鼻咽喉科臨床において大きな課題となっている。本論文は、肺炎球菌表面蛋白抗原PspAを用いた母体免疫により、新生児マウスに肺炎球菌特異的免疫応答が誘導されるとともに、肺炎球菌感染が予防されることを明らかにしたものである。BALB/cマウスにPspAとコレラトキシンBをアジュバントとして1週間に2回、3週間経鼻免疫を行った。最終免疫後、雄マウスと交配し、約3週間後に新生児マウスをえた。免疫後の母マウスの血清中の抗PspA特異的IgG抗体価および母乳中の抗PspA特異的IgG抗体価、新生児マウス血清中の抗PspA特異的IgG抗体価をELISA法にて測定した。また、新生児マウスに肺炎球菌TIGR4株(血清型4型、PspA family 2)腹腔内接種することにより、致死性肺炎球菌全身感染症を発症させ、母体免疫による予防効果について検討した。その結果、PspAの母体経鼻免疫により、母マウス母乳中および血清中、新生児マウス血清中に抗PspA特異的IgG抗体が誘導されていた。また、PspA免疫群の母マウスより生まれた新生児マウスでは、非免疫群由来の新生児マウスに比べて肺炎球菌の全身感染後の生存期間が有意に延長していた。以上のように、本論文は、免疫能の未成熟な乳幼児期における感染予防法として、母体免疫により乳幼児期に特異的な免疫応答の誘導が可能であり、肺炎球菌感染症の予防法として有用であることを明らかにした。妊娠前の母体に免疫を行うことで安全に新生児期の免疫応答が誘導され、今後のワクチンの開発および肺炎球菌感染症予防において重要な知見と考えられ、学位論文にふさわしい価値があると認めた。

学位記番号	博(医)甲第383号		
学位授与の日	平成20年12月9日		
氏名	田中 亜紀		
学位論文の題目	Expression of histo-blood A type 1, 2 and 3 antigens in normal skin and extramammary Paget's disease (正常皮膚および乳房外ペーজেット病における A1 型-A3 型抗原の発現について)		
論文審査委員	主査	教授 近藤 稔 和	
	副査	教授 村垣 泰 光	教授 古川 福 実

論文内容の要旨

【緒論】

ABH 抗原決定基の抗原性に基幹構造が影響を及ぼすことが知られている。基幹構造は、Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow R から成る 1 型、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow R から成る 2 型、Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow R から成る 3 型、Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow R から成る 4 型の 4 種類がある。1 型抗原は内胚葉系の腺上皮細胞に広く発現している。2 型抗原は主に外胚葉および中胚葉の組織に存在する。3 型および 4 型抗原は外胚葉および内胚葉の組織に存在する。正常皮膚には 2 型抗原が発現していることが報告されている。また一方で組織血液型抗原(血液型抗原)の発現が直腸癌などの上皮系悪性腫瘍の悪性度と関連することも分かっている。しかし、皮膚腫瘍、特に汗腺起源が疑われている乳房外ペーজেット病でこれら血液型抗原の発現を調べた報告は少ない。

今回我々は正常皮膚及び乳房外ペーজেット病における A1 型から A3 型抗原の発現を調べた。また血液型抗原の発現の変化が乳房外ペーজেット病の予後に関係するかどうかを検討した。

【材料と方法】

検体: 正常皮膚として 11 標本(年齢;0 から 87 歳、平均年齢;46.9 歳、男女比;3:8)、腫瘍標本として 1984 年から 2006 年までに当院皮膚科を訪れた 16 標本(年齢;59 から 88 歳、平均年齢;76.0 歳、男女比;11:5)を用いた。10%ホルマリンで固定し、ヘマトキシリンエオジン染色されたすべての標本は、3 人の病理医あるいは皮膚科医により診断された。

抗体: A3 型抗原に対するマウスモノクローナル抗体(AR-1: IgM)は本学法医学教室で樹立されたものである。Bioclon Anti-A 抗体(以下 BA)は Ortho 社(NJ, USA)から、ヒトアポクリン腺に特異的である抗 Human milk fat globule1 抗体(以下抗 HMFG1)は Abcam 社(Cambridge, MA)から購入した。

染色方法・手順: パラフィン包埋した標本を 6 μ m に薄切し、脱パラフィンした。それらを 3%過酸化水素に 5 分間浸した後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、それぞれの抗体を室温で 60 分間反応させた。その標本を PBS で洗浄し、パーオキシダーゼ標識デキストラン結合抗マウスイムノグロブリン抗体(ヤギ、EnVision+TM, Dako, Kyoto, Japan)を室温で 30 分反応させた。これらの標本をアミノエチルカルバゾールで発色させた後、ヘマトキシリン溶液で核染色した。

統計: 標本を皮膚悪性腫瘍取り扱い規約乳房外ペーজেット病の pT 分類に従い、非浸潤性(pT1)と浸潤性(pT2 から pT4)の 2 群に分けた。これら 2 群と血液型抗原の発現に相関があるか否かをフィッシャーの直接確率法を用いて検討した。

【結果および考案】

正常皮膚組織における血液型抗原の発現: BA に反応する A1、2 型抗原、AR-1 に反応する A3 型抗原ともに表皮の有棘層・顆粒層、エクリン汗管に発現していた。分泌型の場合はエクリン腺暗細胞も陽性であった。1 型抗原は分泌型のみが発現し、2 型は分泌型・非分泌型に関係なく発現することから、エクリン腺暗細胞は A1 型と A3 型、エクリン汗管は A2 型と A3 型を発現していることが推測される。アポクリン腺、脂腺、毛包にこれらの抗原の発現は見られなかった。

乳房外ペーজেット病における血液型抗原、HMFG1 の発現: 16 例の乳房外ペーজেット病のうち、7 例(43.8%)が血液型抗原を発現していた。その 7 例中 6 例は真皮内浸潤を認め、3 例はリンパ節転移を伴っていた。統計学的に血液型抗原の発現と組織学的分類による 2 群との間に有意差が見られた(p=0.041)。これら

の結果から乳房外ページェット病における血液型抗原の発現は予後不良因子となり得ることが示唆された。

アポクリン腺に特異的とされるHMFG1は血液型抗原が発現している腫瘍細胞とは違った腫瘍細胞に陽性であった。また、血液型抗原あるいはHMFG1どちらも陰性の細胞も見られた。乳房外ページェット病はアポクリン腺由来とする報告が多い。しかし、同じ腫瘍内においてもアポクリン分化を示すものと血液型抗原で識別されるエクリン分化を示すものが混在し、乳房外ページェット病の腫瘍細胞の不均一性を示していると考えられた。

【結論】

血液型抗原は正常表皮では有棘層と顆粒層、エクリン汗腺に発現していた。アポクリン腺、脂腺、毛包に血液型抗原の発現は見られなかった。また乳房外ページェット病においては16例中7例で血液型抗原を発現していた。その7例中6例で真皮内浸潤を、3例でリンパ節転移を伴っていた。血液型抗原を発現していない9例のうち、真皮内浸潤を伴っていたのは2例であった。この結果より血液型抗原の発現は乳房外ページェット病の組織学的な予後不良因子となり得ることが示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成20年11月25日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

血液型抗原は種々の組織に発現し、それ故に組織血液型抗原と呼ばれる。組織血液型抗原は抗原構造を担う糖鎖の基幹構造の違いにより1型から4型まで分類される。病態生理学的に、組織血液型抗原の発現が直腸癌などの上皮系悪性腫瘍の悪性度と相関することが判明している。アポクリン腺由来である乳房外ページェット病は、主に外陰部に発生する皮膚悪性腫瘍で、腫瘍細胞が表皮内に限局している場合は予後良好であるが、浸潤癌の場合には予後不良である。

本研究では、まず組織血液型抗原の正常皮膚における発現を基幹構造別に検討した。続いて、乳房外ページェット病について組織血液型抗原、及びアポクリン腺に特異的とされるHuman milk fat globule1 (HMFG1)の発現の有無、並びに組織血液型抗原の発現と腫瘍悪性度の相関の検討を病理組織学的に行った。

その結果、正常表皮上層にA1型からA3型、エクリン腺暗細胞にA1型とA3型、エクリン汗管にA2型とA3型が発現していた。アポクリン腺、脂腺、毛包では組織血液型抗原の発現が認められなかった。乳房外ページェット病の標本を、皮膚悪性腫瘍取り扱い規約pT分類に従い、非浸潤性(pT1)と浸潤性(pT2からpT4)の2群に分け、これら2群と組織血液型抗原の発現に相関があるか否かをフィッシャーの直接確率法を用いて検討した。その結果、16例の乳房外ページェット病のうち、7例(43.8%)に組織血液型抗原の発現を認め、その7例中6例では真皮内浸潤、3例ではリンパ節転移を伴っていた。統計学的に組織血液型抗原の発現と組織学的分類による2群との間に有意差を認めた。これらの結果から乳房外ページェット病における組織血液型抗原の発現は組織学的な予後不良因子の指標となり得ることを見出した。なお、HMFG1は組織血液型抗原が発現している腫瘍細胞とは異なった腫瘍細胞に発現していた。また、組織血液型抗原あるいはHMFG1どちらも発現していない細胞も見られた。同じ腫瘍内においてもアポクリン分化を示すものと組織血液型抗原で識別されるエクリン分化を示すものが混在し、乳房外ページェット病の腫瘍細胞が多様な抗原性を有していることが明らかになった。

以上、本研究は正常皮膚における組織血液型抗原の基幹構造別の発現を記し、さらに乳房外ページェット病における組織血液型抗原の発現が組織学的な予後不良因子となることを示したもので、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第384号		
学位授与の日	平成20年12月9日		
氏名	森山智美		
学位論文の題目	Formation of biofilm by <i>Haemophilus influenzae</i> isolated from pediatric intractable otitis media. (小児難治性中耳炎より分離されたインフルエンザ菌のバイオフィーム形成に関する研究)		
論文審査委員	主査	教授 秋本 茂	
	副査	教授 覚道 健一	教授 山中 昇

論文内容の要旨

【目的】 近年小児急性中耳炎の難治が日常臨床における大きな問題となっており、その原因の一つとして細菌の形成するバイオフィームの関与が指摘されている。バイオフィームとは細菌が感染病巣局所において産生する菌体外多糖からなる粘液状のマトリックスであり、その内部に菌体が存在する。多くの細菌が生体内ではバイオフィームの状態が存在しており、抗菌薬や生体の感染防御に対して抵抗性を示す。本研究では急性中耳炎の難治化における無莢膜型インフルエンザ菌のバイオフィーム形成の役割について検討した。

【方法】 急性中耳炎患児より分離された無莢膜型インフルエンザ菌を用いて、ピン付き96wellプレート上でバイオフィーム形成能を検討した。バイオフィームの定量的解析法として crystal violet 染色法を用い、画像的解析法として共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。定量における陽性株判定法としては、陽性コントロール株の OD 値に対する各菌株の OD 値の割合を biofilm formation index(BFI)と定め、 $BFI \geq 0.4$ である株をバイオフィーム形成株とした。

【結果】 小児急性中耳炎症例より採取した無莢膜型インフルエンザ菌臨床分離株において、安定したバイオフィーム測定システムを確立することができた。この測定システムにより中耳炎分離株70株のうち59株(84%)にバイオフィーム形成を認めた。薬剤感受性とバイオフィーム形成との関連を見ると、ABPCの耐性株と比較して、感受性が高い株ほどバイオフィーム形成株を多く認めた。急性中耳炎の臨床経過とバイオフィーム形成との関連について検討すると、抗菌薬治療非改善例から分離されたインフルエンザ菌では、抗菌薬治療改善例からの分離菌よりも有意に高いバイオフィーム形成能を認めた。

【結論】 本研究により、急性中耳炎患児から分離された無莢膜型インフルエンザ菌がバイオフィーム形成を行うことが明らかとなった。加えて無莢膜型インフルエンザ菌のバイオフィーム形成が、抗菌薬治療に抵抗し遷延・難治化する急性中耳炎の臨床経過に重要な役割を果たすことが示された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成20年11月27日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

近年、小児急性中耳炎の難治化が耳鼻咽喉科の日常診療において問題となっている。その原因の一つとして、細菌のバイオフィーム形成能が指摘されている。バイオフィームとは細菌が産生する菌体外多糖体で構成されたマトリックスであり、ある種の細菌が生体内でバイオフィームを形成することによって抗菌薬に対して抵抗性を示すと考えられている。本論文は、急性中耳炎の難治化と無莢膜型インフルエンザ菌のバイオフィーム形成能との関連性を検討したものである。

学位申請者は、急性中耳炎患児より分離された無莢膜型インフルエンザ菌を用いて、バイオフィームの形成能の定量的解析法(クリスタルバイオレット染色法)および定性的解析法(共焦点レーザー顕微鏡による画像解析)を確立した。この方法を用いて申請者は以下の結果を得た。小児急性中耳炎症例より分離された無莢膜型インフルエンザ菌70株のうち59株(84%)にバイオフィーム形成を認めた。アンピシリン耐性株と比較すると感受性株でより多くのバイオフィーム形成株を認めた。アモキシシリン治療による非改善例から分離さ

れた無莢膜型インフルエンザ菌では、改善例からの分離菌よりも有意に高いバイオフィルム形成を認めた。以上の結果より、急性中耳炎患児から分離された無莢膜型インフルエンザ菌の多くの菌株がバイオフィルムを形成することが明らかとなった。また、無莢膜型インフルエンザ菌がバイオフィルムを形成することによって抗菌薬に抵抗し、遷延・難治化といった急性中耳炎の臨床経過に重要な役割を果たすことが示唆された。

以上のように申請者は、耳鼻咽喉科領域で临床上問題となっている急性中耳炎の難治化において、無莢膜型インフルエンザ菌が形成するバイオフィルムが関与していることを明らかにして、急性中耳炎治療への新しい視点を導き出した点で学位論文としてふさわしい価値があると認めた。

学位記番号	博(医)甲第385号		
学位授与の日	平成21年1月13日		
氏名	奥 喜 全		
学位論文の題目	Identification of the molecular mechanisms for dedifferentiation at the invasion front of colorectal cancer by a gene expression analysis. (網羅的遺伝子発現解析による大腸癌先進部脱分化に関与する分子メカニズムの同定)		
論文審査委員	主査	教授 三家 登喜夫	
	副査	教授 一瀬 雅夫	教授 山上 裕 機

論文内容の要旨

研究着想の経緯、特色、目的

大腸癌の大部分は高分化型腺癌であるが、その先進部では、脱分化した症例がみられる。癌先進部の病理組織学的形態は budding, focal dedifferentiation と呼称され、リンパ節転移などの癌の悪性度の指標になりうるものが近年報告されている。したがって癌先進部脱分化をもたらすメカニズムを解明し、関与する遺伝子群を同定することは大腸癌の悪性度診断の進歩・治療法開発のために重要であると考えられる。今回、大腸癌の先進部高度脱分化症例と先進部非脱分化症例の組織の癌表層部と先進部のサンプルの個別採取をおこない、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、大腸癌先進部脱分化に関与する分子学的メカニズムの解明と関与する遺伝子群の同定を試みた。

対象と方法

I. 対象

和歌山県立医科大学第2外科にて2004年5月から2006年3月まで手術を施行した進行大腸癌25症例を対象とした。HE 永久標本の観察により2群の対象を決定した。癌表層部は高分化型であるが癌先進部では低分化に脱分化した脱分化群13症例と、表層部が高分化型の所見を呈し、先進部も同様に高分化である非脱分化群12症例を対象とした(計25例)。癌先進部と表層部が採取された13症例(非脱分化群7例, 脱分化群6例)で脱分化因子の同定を行い、表層部のみ採取された12症例(非脱分化群6例, 脱分化群6例)を Validation 症例とした。

II. サンプリング

独自の方法でサンプリングを施行した。まず、癌の最大断面とそこから約5mm離れた部位にて癌組織を全層にてスリット状に採取することにより、厚さ5mmの大腸癌全層スライスを作成した。大腸癌全層スライスの作成が不可能であった12症例(Validation 症例)に対し、その表層部の癌組織のみを採取した。正常粘膜を採取は計10症例の大腸癌患者からおこなった。

III. Laser Microdissection

作成した大腸癌全層スライスの形態を保持した状態で、OCT コンパウンドに包埋した。次にライカクリオスタットにて10 μ mの厚さの薄切切片を作成した。この薄切切片に対し、ライカLMDを用いてLaser Microdissection (LMD) を施行した。LMDを施行する部位は以下に定義しサンプル採取した。

癌表層部とは、採取された癌組織の潰瘍形成を認めない部位のうち癌表層部から1000 μ m以内の部位のみに限定した。脱分化群、非脱分化群のいずれの群においても同じ条件で癌表層部を採取した。

癌先進部の組織採取は、以下のごとく脱分化群と非脱分化群において異なった形態を持つ組織を採取した。

#脱分化群

腺管構造を形成しない small cluster, 索状構造, 腺管構造を形成するがその形成が乏しいものとし、その細胞集塊のみをLMDにより採取した。

#非脱分化群

腺管構造が表層部と同様に十分に保たれた高分化型であり、低分化構造を認めないものとした。正

常間質と接する腺管のみを LMD により採取した。

10 例の正常組織に対し、正常の腺管組織を LMD により採取した。

IV. t-RNA の抽出・増幅・ラベリング・ハイブリダイゼーション

癌組織の LMD サンプルから t-RNA を抽出した。4ng の t-RNA を用いて RNA の増幅と Cye-3 CTP・Cye-5 CTP によるラベリングを行い、Labelled cRNA を合成した。正常組織より採取された LMD サンプルから t-RNA を抽出し、10 症例の t-RNA を同量ずつ mix し、reference mix t-RNA を作成した。これをもとに、reference mix cRNA を合成した。癌サンプルの cRNA と reference mix cRNA を 23,000 の転写産物を搭載したカスタムアレイ上で競合ハイブリダイゼーションをおこなった。

V. マイクロアレイデータの解析

競合ハイブリダイゼーションにより Agilent DNA Microarray Scanner で読み取られた各遺伝子の発現量を Feature Extraction Software にて数値化した。各サンプル群間で有意な発現差をもつ遺伝子群の抽出を Mann-Whitney u 検定にて行った ($P < 0.05$)。有意な発現差をもつ遺伝子群によるクラスター解析を GeneSpring™ software version 6.0 を用いて施行した。

VI. 定量的 Real time RT-PCR

マイクロアレイ解析から選別された遺伝子のうち、遺伝子機能と遺伝子間の相互作用の観点から大腸癌先進部脱分化に重要であると考えた 10 遺伝子について定量的 real time RT-PCR を施行。マイクロアレイデータとの相関係数 (Pearson 係数) を求め、各遺伝子のサンプル群間での発現差の有意性を Mann-Whitney u 検定にて検定した ($p < 0.05$)。

結果

I. 遺伝子群の抽出とクラスター解析

脱分化群の表層部と非脱分化群の表層部の 2 群間には 83 個の有意な発現差のある遺伝子が抽出された。この 83 遺伝子によりクラスター解析を行ったところ、因子同定に用いた 13 例の表層部サンプルは全例が 2 つのクラスターに分類された。さらに、この 13 例の先進部サンプルも表層部のサンプルと同様にこの 83 遺伝子によって 2 つのクラスターに分類された。このことから、表層部ですでに有している遺伝子発現パターンは癌が深く浸潤し形態を変えてしまった先進部でも維持されていることが示された。さらに、この 83 遺伝子にて Validation 症例 12 例のクラスター解析を行った。結果、83 遺伝子により 12 例中 10 例が正確に分類された。

II. 脱分化に関連する遺伝子機能の推定

脱分化群の表層部、非脱分化群の表層部の間で有意な発現差のある 83 遺伝子の機能および遺伝子相互作用の検索を Entrez PubMed, Entrez Genes, OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) にて行った。遺伝子機能と遺伝子間の相互作用の観点から、TGF- β signal ネットワーク, Wnt signal ネットワーク, Hedgehog signal ネットワークおよびそれらを構成する 10 遺伝子が重要であると考えた。

III. 定量的 real time RT-PCR

因子同定に用いた 13 例の表層部サンプルから得られた t-RNA を用いて (マイクロアレイ解析と同じ t-RNA), 検索上選定された 10 遺伝子の real time RT-PCR による定量を行った結果、10 遺伝子のマイクロアレイデータの発現量と real time RT-PCR の発現量は強い相関を示し (Pearson 係数: 0.72-0.95), 今回施行したマイクロアレイデータの信頼性が示された。10 遺伝子 8 遺伝子で脱分化群と非脱分化群の間に有意な発現差を認めた ($p < 0.05$)。

次に、Validation 症例 12 例において 8 遺伝子の遺伝子発現を real time RT-PCR にて定量しクラスター解析を行ったところ、この 8 遺伝子により 11 例が正確に分類された。

結論

- I. 癌先進部での脱分化を規定する因子は、分化度に変化がない癌表層部ですでに決定されている。
- II. 今回同定した 3 ネットワークとそれを構成する 8 遺伝子は、大腸癌先進部脱分化に重要なメカニズムであり、遺伝子群である。
- III. 今回同定した 8 遺伝子の、大腸癌生検サンプルにおける発現量を測定することで、大腸癌の転移診断、予後診断を行うことができる可能性が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成20年12月10日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。本研究は大腸癌において悪性度の指標になるとされている大腸癌の癌浸潤先進部において脱分化を生じる大腸癌の分子生物学的メカニズムと原因遺伝子の同定を網羅的遺伝子発現解析の手法で行った初めての試みである。具体的には、大腸癌先進部において脱分化を生じる症例（脱分化群）と癌先進部において脱分化を生じない症例（非脱分化群）の癌表層部サンプルと癌先進部サンプルを個別に Laser Microdissection 法で採取し、それぞれのサンプルを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、クラスター解析を行った。その結果、

①脱分化群の表層部と非脱分化群の表層部の2群間には83個の有意な発現差のある遺伝子が抽出された。この83遺伝子によりクラスター解析を行ったところ、13例の表層部サンプルは全例が2つのクラスターに分類された。さらに、この13例の先進部サンプルも表層部のサンプルと同様にこの83遺伝子によって2つのクラスターに分類された。このことから、表層部ですでに有している遺伝子発現パターンは癌が深く浸潤し形態を変えてしまった先進部でも維持されていることが示された。

②83遺伝子の既知の機能情報を検索した結果、遺伝子機能と遺伝子間の相互作用の観点から、TGF- β signal ネットワーク、Wnt signal ネットワーク、Hedgehog signal ネットワークおよびそれらを構成する10遺伝子が重要であると考えた。

③検索上選定された10遺伝子の real time RT-PCR による定量を行った結果、8遺伝子で脱分化群と非脱分化群の間に有意な発現差を認めた ($p < 0.05$)。次に、Validation 症例12例において8遺伝子の遺伝子発現を real time RT-PCR にて定量しクラスター解析を行ったところ、この8遺伝子により11例が正確に分類された。

以上の結果より癌先進部での脱分化を規定する因子は、分化度に変化がない癌表層部ですでに決定されており、今回同定した3ネットワークとそれを構成する8遺伝子は癌先進部脱分化に重要なメカニズムであり、遺伝子群であることが示された。本研究から同定された8遺伝子の癌生検サンプルにおける発現量を測定することで、癌の転移診断、予後診断を行うことができる可能性が示唆され、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第386号		
学位授与の日	平成21年3月10日		
氏名	住岡孝吉		
学位論文の題目	Inhibitory effect of blocking TGF- β /Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal endothelium (角膜内皮創傷治癒における TGF β /Smad シグナル阻害での線維化抑制の効果)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 井原義人	教授 雑賀司珠也

論文内容の要旨

【緒言】

角膜内皮細胞は、そのポンプ作用による角膜浮腫の防止などの機能を持ち、角膜の透明性の維持に必要不可欠である。临床上、遭遇する機会の多い重度のアルカリ外傷では表面の上皮のみならず、実質、内皮と角膜全層にわたる障害をきたす。その際、治癒過程で内皮細胞は上皮—間葉系移行に類似した様相を呈する(内皮—間葉系移行)と言われ、最終的に癒痕治癒し機能不全に陥る。一般的に上皮—間葉系移行とは外傷や炎症などで TGF β が活性化されることにより、上皮細胞が α 平滑筋アクチンなどを発現して筋線維芽細胞様に変化することで眼では水晶体上皮起因の後発白内障や網膜色素上皮起因の増殖硝子体網膜症などがあり、眼以外でも肺線維症、肝硬変、腎硬化症など上皮を有する組織で疾患をきたしている。

TGF β の一般的なシグナル伝達経路には古典的 MAP キナーゼ系、p38MAP キナーゼ系、JNK 経路が存在するが、これらの経路以外に TGF β スーパーファミリーに特異的なシグナル伝達経路として Smad 経路がある。Smad7 は抑制性 Smad で、この TGF β /Smad 経路を阻害する。当教室においてアデノウイルスベクターによる Smad7 遺伝子導入のマウス創傷治癒角膜モデルで炎症や実質の線維化を抑制し、最終的にほぼ完全に角膜の癒痕・線維化を抑制したことを報告した。

今回、角膜内皮の創傷治癒に焦点を合わせ、治癒過程での内皮伸展と TGF β シグナルを検討し、内皮伸展における TGF β の必要性とどのシグナル伝達経路が内皮伸展により深く関与しているのかを検討した。その結果を受けて、内皮進展に影響せずに、内皮の線維化(内皮—間葉系移行)を予防する戦略を模索した。ラット角膜アルカリ外傷モデルでの内皮—間葉系移行を確認し、アデノウイルスベクターを用いた Smad7 導入による TGF β /Smad 経路阻害での、内皮—間葉系移行と内皮の線維化に対する抑制効果を検討した。

【材料および方法】

研究1 TGF β の役割と家兎角膜内皮の遊走とそのシグナリング

日本白色家兎(n=108)を用い検討した。屠殺後、角膜を採取し4mm×4mmの角膜ブロックを作製し、中央よりカバーガラスを用いて輪部側から中央へと創傷を作製した。その後、各試薬を添加し37°Cで器官培養した。24時間後、染色し内皮伸展距離を測定した。その際コントロールの伸展距離の平均値を100として各添加群を比較検討した。また内皮伸展の主体が遊走か増殖かをみるためPCNAを用い免疫組織化学的に検討した。添加試薬にはEGF(10.0ng/ml)、TGF β 1(1.0ng/ml)、EGF(10.0ng/ml)+TGF β 1(1.0ng/ml)、TGF β 2(1.0ng/ml)、EGF(10.0ng/ml)+TGF β 2(1.0ng/ml)、TGF β 中和抗体(20 μ g/ml)、p38MAPキナーゼ阻害剤(SB203580)(10.0 μ M)、MAPキナーゼ阻害剤(U0126)(10.0 μ M)、JNK阻害剤(5.0 μ M)、ALK5阻害剤(SB431542)(10.0 μ M)を用いた。Smad経路はALK5阻害剤を用いて評価した。

研究2 アルカリ外傷モデルでのラット角膜内皮線維化抑制の検討

Wistarラット(n=62)を用い検討した。CAGプロモーターを用い、Cre/LoxPシステムを使用しアデノウイルスベクターによる遺伝子導入を行った。まず、導入効率をみるため、ヒアルロン酸(オペガン[®])にGFPを混入したものをラット前房内に注入し3日後、1週間後に屠殺し、新鮮凍結切片を作製

後、蛍光顕微鏡で確認した。次に Smad7 を用い免疫染色および real-time RT-PCR を施行した。その後ヒアルロン酸に Smad7 を混入したものと Cre-Ad のみのコントロール群とに分け、3 日後、1 規定の水酸化ナトリウム 10ml を点眼し感染対策としてオフロキサシン眼軟膏(タリビット眼軟膏[®])を塗布した。そして 3 日後、1 週間後、2 週間後と経時的に屠殺し Phospho-Smad2、 α SMA、1 型コラーゲン、PCNA を用いて免疫組織化学的に検討した。また走査電子顕微鏡を用いて直接内皮面の微細構造を観察した。

【結果】

研究 1 TGF β の役割と家兎角膜内皮の遊走とそのシグナリング

角膜内皮細胞への PCNA の核内移行はみられなかった。外因性 EGF は内皮伸展を促進した。外因性 TGF β は単独では有意な変化はみられなかったが、EGF に混入すると EGF の内皮伸展促進効果を抑制した。内因性 TGF β の中和抗体を添加すると内皮伸展が抑制された。p38MAP キナーゼ阻害剤、MAP キナーゼ阻害剤添加群では内皮伸展が抑制された。JNK、ALK5 の阻害では有意な影響は観察されなかった。

研究 2 アルカリ外傷モデルでのラット角膜内皮線維化抑制の検討

GFP、Smad7 は角膜内皮で認められ、Smad7 は mRNA レベルで発現していた。コントロール群では線維芽細胞様に変化した異常な増殖物が内皮下でみられ、リン酸化 Smad2 (Phospho Smad2)、 α 平滑筋アクチン (α SMA)、1 型コラーゲンは角膜実質や角膜内皮下にみられた。Smad7 群では角膜内皮下での Phospho Smad2、 α SMA、1 型コラーゲンの発現は抑制されていた。PCNA は 1 週間後のみ Smad7 群で角膜内皮での著明な核内での発現が観察された。

【考察】

角膜内皮の創傷治癒では、24 時間という比較的創傷早期において、内皮伸展は増殖より遊走が主体であると免疫組織学的検討から判明し、このモデルは生体内でほとんど増殖しないヒト角膜内皮に臨床応用できる可能性があると考えられた。そこで眼房水内に多く含まれる EGF と TGF β における角膜内皮への影響を検討してみたが、内皮伸展において外因性 EGF は促進的であった。また外因性 TGF β は β 1、 β 2 とも単独では著明な変化をもたらさなかったものの、外因性 EGF に混入してみると外因性 EGF の内皮伸展促進効果を抑制した。そこで次に中和抗体を用いて内因性 TGF β を阻害してみると内皮の遊走は抑制された。つまり内因性 TGF β は内皮遊走に必要であることが判明した。TGF β のシグナル伝達経路には古典的 MAP キナーゼ系、p38MAP キナーゼ系、JNK 系、Smad 系経路があるため、順に阻害し内皮遊走における各シグナル系の重要性を検討してみると p38MAP キナーゼを介する経路、古典的 MAP キナーゼを介する経路の順に重要であった。JNK を介する経路、Smad を介する経路は内皮遊走における有意差をみとめず、上記 2 経路と比較しそれほど大きな重要性はないと考えられた。従って ALK5 阻害による Smad シグナルの抑制は内皮の遊走による再生にとって好ましくない効果は発揮しないと考えられた。

上記のごとく、角膜内皮は軽度の創傷では各サイトカインの働きにより遊走し治癒するが、重度の創傷では炎症が高度となり、上皮—間葉系移行と同様の内皮—間葉系移行がおり癒治癒するため、遊走以外に組織線維化を予防することが求められる。そこでアデノウイルスベクターを用いて、Smad7 を遺伝子導入し内皮—間葉系移行の抑制を試みた。Smad7 を前房内に注入した群では著明に内皮下の異常な増殖物の形成は抑制されており、免疫組織学的検討で内皮—間葉系移行が抑制されていることが判明した。さらに TGF β /Smad シグナルの阻害は、炎症を伴っている角膜へのマクロファージの侵入を抑制するので、マクロファージ由来のサイトカインレベルを減少させ、結果的に角膜への新生血管の侵入や、侵入した結膜上皮の角膜様への形態の変化も抑制されると考えられた。

TGF β /Smad シグナルを阻害することが角膜内皮線維化抑制に効果的であり、角膜透明治癒において有効となることが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 21 年 1 月 28 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。角膜は透明な組織であるが、高度な炎症や外傷により癒治癒をきたすことがあり、その一因とし

て角膜内皮障害がある。通常、角膜内皮は軽度の損傷では遊走により再生し、角膜の透明治癒を施すが、高度の損傷では角膜内皮の線維化という形態的変化を伴い、機能不全となり角膜は混濁する。

本研究では、まず家兎角膜内皮の器官培養により、比較的創傷早期において、内皮伸展は増殖より遊走が主体であると免疫組織学的検討から判明した。また各種試薬添加の結果により、外因性 EGF は促進的であり、内因性 TGF β は内皮遊走に必要であることが判明した。なかでも p38MAP キナーゼを介する経路、古典的 MAP キナーゼを介する経路の順に重要であったが、Smad を介する経路は内皮の遊走にさほど影響はないと考えられた。そこで次に、ラット眼アルカリ外傷モデルで内皮—間葉系移行の状態を作製し、アデノウイルスベクターを用いて、角膜内皮遊走抑制の影響が比較的少ないと思われる Smad7 を角膜内皮に遺伝子導入し内皮—間葉系移行の抑制を試みた。その結果、Smad7 を遺伝子導入した群では著明に内皮下の異常な増殖物の形成は抑制されており、免疫組織学的検討では内皮細胞の増殖能を温存しつつ内皮—間葉系移行が抑制されていることが判明した。

以上のように、本論文は Smad シグナル伝達系のみを阻害することで、角膜内皮の遊走、増殖を極力温存したまま、内皮—間葉系移行を効率的に抑制したことを明らかにした初めての論文である。この経路の阻害が角膜内皮線維化抑制および角膜透明治癒に結びつくことが期待され、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第387号		
学位授与の日	平成21年3月17日		
氏名	市川朋宏		
学位論文の題目	Peroxynitrite augments fibroblast-mediated tissue remodeling via myofibroblast differentiation (パーオキシナイトライトは線維芽細胞による組織リモデリングを筋線維芽細胞への分化を介して促進する)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡史郎	
	副査	教授 畑埜義雄	教授 一ノ瀬正和

論文内容の要旨

【緒言】

気管支喘息でみられる可逆的な気道狭窄は気道リモデリングとよばれる気道構造の再構築と関連している。気道リモデリングの進展には肺線維芽細胞が肺筋線維芽細胞へと分化することが重要な役割を果たしている。一方、気管支喘息の気道においては慢性気道炎症の結果、活性窒素種 (reactive nitrogen species :RNS) が過剰に産生されていることが知られている。RNS がリモデリングに及ぼす影響については、肺線維芽細胞による3次元コラーゲンゲルの収縮や fibronectin に対する遊走能を促進することが報告されているが、肺筋線維芽細胞への分化に及ぼす影響やそのメカニズムについてはまだ検討されていない。そこで本研究では、代表的な RNS である peroxynitrite が肺線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化に与える影響について *in vitro* で検討した。

【方法】

ヒト胎児肺線維芽細胞 (human fetal lung fibroblast:HFL-1) を peroxynitrite もしくは peroxynitrite の donor である 3-morpholinopyrrolidine (SIN-1) を用いて刺激し、筋線維芽細胞への分化のマーカーである α -smooth muscle actin (α -SMA) や desmin の発現を western blotting 法にて測定した。また筋線維芽細胞への分化に関与する重要なメディエーターである transforming growth factor (TGF)- β 1 の分泌を ELISA 法にて測定した。また、細胞外マトリックス (extracellular matrix : ECM) については、気管支喘息でみられる気道リモデリングにおいて重要とされている fibronectin と collagen I の HFL-1 における産生を ELISA 法や western blotting 法にて測定した。さらに peroxynitrite がこれらの蛋白の産生に関わるメカニズムを明らかにするために、TGF- β 1 の遺伝子発現に関わる転写因子の一つである NF- κ B に着目し、peroxynitrite による NF- κ B の核内移行について蛍光染色とウエスタンブロッティング法にて検討した。また、NF- κ B の阻害剤や TGF- β の中和抗体を用いて、HFL-1 における α -SMA や ECM の産生に及ぼす影響についても検討した。

【結果】

Peroxynitrite と SIN-1 は HFL-1 における α -SMA の発現を有意に亢進した。さらに peroxynitrite は desmin と TGF- β 1 の産生も亢進した。蛍光染色法とウエスタンブロッティング法による検討では、peroxynitrite が HFL-1 における NF- κ Bp65 の核内移行を促進することが示された。また、peroxynitrite による α -SMA の発現の亢進作用は NF- κ B 阻害剤である MG132 と caffeic acid phenethyl ester (CAPE) により有意に抑制された。さらに peroxynitrite による α -SMA の発現の亢進は、TGF- β の中和抗体によっても抑制された。Fibronectin と collagen I の産生は peroxynitrite により有意に亢進し、それらは TGF- β の中和抗体により抑制された。

【考察】

以上の結果から、RNS は肺線維芽細胞において NF- κ B-TGF- β 1 の経路を介し、肺筋線維芽細胞への分化とそれに伴う ECM の産生を促進することにより、気道リモデリングの進展に関与することが示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 20 年 11 月 5 日，論文審査委員は学位申請者の出席を求め，上記学位論文について審査した。

気道リモデリングは気管支喘息の難治化の一因であるが、肺線維芽細胞が肺筋線維芽細胞へと分化することがリモデリングの進展に重要な役割を果たしている。一方、気管支喘息の気道においては慢性気道炎症の結果、活性窒素種（reactive nitrogen species：RNS）が過剰に産生されていることが知られている。しかし RNS が肺線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化に与える影響やメカニズムについては検討されていない。

本論文は、RNS とリモデリングの関連を調べるため、ヒト胎児肺線維芽細胞(HFL-1)を用いて、代表的な RNS である peroxynitrite の筋線維芽細胞への分化に与える影響とそのメカニズムを *in vitro* で検討した。

Peroxynitrite は筋線維芽細胞への分化のマーカーである α -smooth muscle actin の発現を NF- κ B と TGF- β 1 の経路を介して促進した。また、peroxynitrite はリモデリングの形成に重要な細胞外マトリックスである fibronectin と collagen I の産生も TGF- β 1 を介して促進した。

以上のように、本論文は RNS が肺線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進することでリモデリングの進展に関与すること、およびそのメカニズムを明らかにした初めての論文である。この経路の制御が気道リモデリングの治療につながる可能性を示唆するものであり、気管支喘息の治療における臨床応用に結びつくことが期待され、学位論文に値するものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第388号		
学位授与の日	平成21年3月17日		
氏名	崔 鶴		
学位論文の題目	Adrenomedullin 2 microinjection into the nucleus tractus solitarius elevates arterial pressure and heart rate in rats (ラット延髄孤束核におけるアドレノメデュリン2の中枢性循環調節作用の検討)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡史郎	
	副査	教授 赤阪隆史	教授 前田正信

論文内容の要旨

【緒言】

中枢性循環調節に関わる神経核にはさまざまな神経ペプチドが発現しているが、それらの循環調節に対する作用は分かっていないものが多い。本研究では、Calcitonin/calcitonin gene-peptide (CGRP)ファミリーの新しいメンバーであるAdrenomedullin 2 (AM2) が室傍核や延髄孤束核 (NTS: nucleus tractus solitarius) などの循環調節に関与する神経核に発現していることに着目し、その中枢性循環調節作用を検討することを目的とした。

【方法】

麻酔下にて、Wistarラット(雄)のNTSにAM2を微量注入し、血圧および心拍数の変化を観察した。AM2には、AM2特異的な受容体は知られておらず、CGRP受容体およびAM受容体のいずれかを介して作用することが報告されている。このことから、本研究では、NTSにおいてCGRP受容体あるいはAM受容体のいずれが重要な役割を果たしているのかを調べる目的で、これらの受容体に対するアンタゴニストをAM2と同時に投与した。また、AM2の作用がGABAergicな経路を介している可能性を検討するためにGABA受容体に対するアンタゴニストもAM2と同時に投与した。さらに、NTSにおけるCGRP受容体およびAM受容体の発現レベルをPCR法にて解析した。

【結果】

以下に結果を要約する

- 1) AM2のNTSへの微量注入は、ラットの血圧および心拍数を増加させた。
- 2) AM2による循環調節作用は、AM受容体に対するアンタゴニストで一部抑制された。
- 3) AM2による循環調節作用は、CGRP受容体に対するアンタゴニストでは抑制されなかった。
- 4) AM2による循環調節作用は、GABA受容体に対するアンタゴニストで一部抑制された。
- 5) NTSにおいては、AM受容体の発現レベルがCGRP受容体の発現レベルより優位に高く、これは、アンタゴニストを用いた薬理学的効果の検討結果と一致した。

【考察】

本研究は、ラットNTSにおけるAM2の中枢性循環調節作用の可能性を示した。また、薬理学的および分子生物学的な手技により、NTSにおけるAM2の循環調節作用にはCGRP受容体ではなくAM受容体が重要な役割を果たしていることを証明した。また、AM2の循環調節作用にはGABAergicな経路も一部介している可能性を示した。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成21年1月7日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

中枢性循環調節に関わる神経核には、さまざまな神経ペプチドが発現しているが、それらの循環調節に対する作用は分かっていないものが多い。本研究は、Calcitonin/calcitonin gene-related-peptide (CGRP)ファミリーの新しいメンバーであるAdrenomedullin 2 (AM2) に着目し、AM2の中枢性循環調節作用を同定することを目的とした。AM2は中枢神経系において室傍核や延髄孤束核 (NTS: nucleus tractus solitarius) などの循環調節に関与する神経核に発現しているが、循環調節に対する作用はほとんど知られていない。学位申請者は、麻酔下で、ラットのNTSにAM2を微量注入して、AM2の中枢性循環調節における役割を調べた。さらに、AM2の薬理学的な作用機序を明らかにするために、AM2が作用する受容体およびGABA受容体に対する拮抗薬をAM2と同時に投与した。AM2が作用する受容体は、現在までにCGRP受容体 calcitonin receptor-like receptor/receptor-activity modifying protein 1型(CRLR/RAMP1型)と2つのAM受容体(CRLR/RAMP2型およびCRLR/RAMP3型)が知られているが、これらのサブタイプのNTSにおける発現レベルもPCR法にて調べた。結果は以下のように要約された。

- 1) AM2のNTSへの微量注入は、血圧および心拍数を増加させた。
- 2) AM2による循環調節作用は、AM受容体に対する拮抗薬で一部抑制された。
- 3) AM2による循環調節作用は、CGRP受容体に対する拮抗薬では抑制されなかった。
- 4) AM2による循環調節作用は、GABA受容体に対する拮抗薬で一部抑制された。
- 5) NTSには、AM受容体の中でもRAMP2をシャペロンとするタイプの発現が多くみられた。

これらの結果から、本研究は、ラットのNTSにてAM2が中枢性に循環を調節している可能性を示した。また、薬理的および分子生物学的な手技により、AM2の作用は、CGRP受容体ではなく、CRLR/RAMP2型のAM受容体を介して発現することを証明した。また、AM2の循環調節作用にはGABA作動性神経も一部介している可能性を示した。

本研究は、NTSにおけるAM2の受容体レベルでの作用機序を明らかにして中枢性循環調節作用に対するAM2の役割の重要性を示した。以上により本研究は、学位論文として価値があるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第389号		
学位授与の日	平成21年3月17日		
氏名	深井順也		
学位論文の題目	EphA4 promotes cell proliferation and migration through a novel EphA4-FGFR1 signaling pathway in the human glioma U251 cell line. (悪性グリオーマにおける EphA4 レセプターの発現と機能解析)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 仙波 恵美子	教授 板倉 徹

論文内容の要旨

The Eph receptor tyrosine kinases and their ephrin ligands form a unique cell-cell contact-mediated bidirectional signaling mechanism for regulating cell localization and organization. High expression of Eph receptors in a wide variety of human tumors indicates some roles in tumor progression, which makes these proteins potential targets for anticancer therapy.

For this purpose, we performed gene expression profiling for 47 surgical specimens of brain tumors including 32 high grade glioma using a microarray technique. The analysis, focused on the receptor tyrosine kinases, showed that EphA4 mRNA in the tumors was 4-fold higher than in normal brain tissue. To investigate the biological significance of EphA4 overexpression in these tumors, we analyzed EphA4-induced phenotypic changes and the signaling mechanisms using human glioma U251 cells. EphA4 promoted FGF2-mediated cell proliferation and migration accompanied with enhancement of FGF2-triggered MAPK- and Akt-phosphorylation. In addition, active forms of Rac1 and Cdc42 increased in the EphA4-overexpressing cells. Furthermore, we found that EphA4 formed a hetero receptor complex with FGFR1 in the cells and that the EphA4-FGFR1 complex potentiated FGFR-mediated downstream signaling.

Thus, our results indicate that EphA4 plays an important role in malignant phenotypes of glioblastoma by enhancing cell proliferation and migration through accelerating a canonical FGFR signaling pathway.

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年1月19日、論文審査委員は、学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

Eph レセプターとそのリガンド ephrin は、細胞膜上で細胞間情報伝達を介して正常細胞の発生、分化や形態形成などに重要と考えられている。また、種々の癌で Eph ファミリーの発現異常とその機能的意義について議論されている。申請者は、本論文において、悪性グリオーマにおける EphA4 の発現に注目し、悪性グリオーマ細胞に EphA4 を過剰発現させることにより悪性グリオーマにおける EphA4 の機能を解析した。特に、EphA4 は FGF レセプターと相互作用することでその活性を増強するという最近の報告と、悪性グリオーマにおいて FGF レセプター1 (FGFR1) が高発現しているというこれまでの知見に基づき、FGFR1 を高発現している悪性グリオーマ U251 細胞を用いて、EphA4 遺伝子の導入を行い、EphA4 が U251 細胞増殖・遊走能に与える影響、さらに FGFR1 シグナル伝達経路に及ぼす効果について検討した。

その結果、

- ① マイクロアレイを用いた悪性グリオーマ手術サンプルの遺伝子発現解析により、EphA4 発現が正常脳組織に比べて腫瘍で約4倍亢進していた。
- ② EphA4 を U251 細胞に高発現させたところ、FGF2 刺激による細胞増殖が促進され、これらの細胞における FRS2、MAPK、Akt のリン酸化が増強された。

- ③ EphA4 高発現細胞においては、FGF2 刺激による遊走能の促進がみられ、細胞内の活性型 Rac1 と Cdc42 の増加が認められた。
- ④ 悪性グリオーマ U-251 細胞においても、EphA4 が FGFR1 と複合体を形成し、EphA4 の高発現があると、FGF2 刺激による FGFR1 リン酸化が増強された。

という事が判明した。

以上より、本論文は、悪性グリオーマにおいて EphA4 の発現が亢進しており、悪性グリオーマ細胞に EphA4 の高発現が起こると、FGFR1 とレセプター複合体を形成して、FGF2-FGFR1 シグナル伝達経路を増強し、細胞増殖および遊走を促進させる可能性を示したものである。EphA4 は FGFR1 との相互作用を介して悪性グリオーマの増殖、遊走能の亢進などの悪性化に寄与すると考えられ、この情報伝達経路は悪性グリオーマ治療のための新しい分子標的となる可能性を示唆するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第390号		
学位授与の日	平成21年3月17日		
氏名	勝山 由來子		
学位論文の題目	Butyroyl-arginine as a potent virus inactivation agent (新規ウイルス不活化剤としてのブチロイルアルギニン)		
論文審査委員	主査	教授 秋本 茂	
	副査	教授 井原 義人	教授 小山 一

論文内容の要旨

【背景】

モノクローナル抗体のなどの治療用タンパク製造では、製造原料由来のウイルス混入を回避するため、製造工程中にウイルス不活化工程が要求される。プロテイン A カラムからの抗体溶出に通常用いられる「酸処理法」では、pH 4.0 以下の酸性に短時間曝露することで極めて高いウイルス不活化作用を発揮する。しかし、短時間であっても酸性に曝露することはタンパク構造に影響し、抗体分子の一部が不可逆的な失活変性や凝集を起こすことも知られている。我々はアルギニンがタンパク質構造を緩めることを既に報告しており、これを利用してより緩和な pH でのウイルス不活化について結果を報告している。

これらの知見を踏まえ、微酸性条件においてより強力なウイルス不活化作用を持つ新規ウイルス不活化剤として、アルギニン誘導体であるブチロイルアルギニンのウイルス不活化作用を検討した。

【材料】

I. 試料溶液

ブチロイルアルギニンはアルギニンのアミノ基がブチロイル基に置換されたアルギニン誘導体である。アルギニン及びブチロイルアルギニンは 20 mM 酢酸水溶液に溶解させ、塩酸で pH を調整した。

II. ウイルスと細胞

ウイルスとしては、単純ヘルペスウイルス 1 型 F 株 (HSV-1)、ポリオウイルス 1 型セービンワクチン株、センダイウイルス Z 株、ニューカッスル病ウイルスミヤデラ株、インフルエンザウイルス A/Aichi/68 (H3N2) 株を用いた。

インフルエンザウイルスに関しては、開裂型 HA を持つ感染性ウイルスと非開裂型 HA を持つ非感染性ウイルスを用いた。

インフルエンザウイルスの増殖と定量には MDCK 細胞、それ以外のウイルスの増殖の定量には Vero 細胞を用いた。

【方法】

氷冷した各試料溶液 950 μ l にウイルス液 50 μ l (10^7 または 10^8 PFU (プラーク形成単位) / ml) を加えてよく混合した後、60 分間氷温で保温する。保温したウイルス液の一部を分取し 1 % 仔ウシ血清または 0.1 % BSA を含む PBS で適宜希釈した。プラーク法で感染性ウイルス量を測定し、各試料溶液におけるウイルス不活化作用を調べた。

非開裂型 HA を持つ非感染性のインフルエンザウイルスの定量においては、試料ウイルス液をアセチル化トリプシン (4 μ g/ml) で 37°C 10 分間処理することにより、HA スパイクタンパクを開裂・活性化してからプラーク法により残存ウイルス感染価を測定した。

【結果と考察】

- 1) センダイウイルスに対しては pH 4.0 でブチロイルアルギニン溶液のみが強いウイルス不活化作用を示し、0.1 M から 0.7 M の間では濃度依存的にウイルス不活化作用が強くなった。ウイルス不活化剤としてのブチロイルアルギニンの優位性が明白に示された。
- 2) HSV-1 に対しては pH 4.0 で 0.7 M アルギニン溶液と 0.7 M ブチロイルアルギニン溶液は共に検出限界以下までウイルス量を減らし、強いウイルス不活化作用を示した。ウイルス量を検出限界以下まで減らすブチロイルアルギニン溶液の濃度が 0.2 M であったのに対し、アルギニン溶液の濃度は 0.7 M であった。ブチロイルアルギニン溶液の方がより低濃度で強いウイルス不活化能を

- 示した。どの試料溶液も pH に依存し、pH が中性に近づくにつれてウイルス不活化は弱くなった。
- 3) インフルエンザウイルスに対しては、通常の感染性インフルエンザウイルスである開裂型 HA を持つインフルエンザウイルスにおいて実験した結果、pH 5.0 では各試料溶液のウイルス不活化作用の強さは 0.7 M アルギニン溶液 > 0.1 M クエン酸緩衝液 > 0.7 M ブチロイルアルギニン溶液 = 0.1 M クエン酸緩衝液となり、他のウイルスでの不活化作用とは異なる結果を示した。インフルエンザウイルスは、遺伝子を細胞質に移す時に微酸性 pH 条件を必要とする特殊性があるので、他のウイルスの不活化と似た条件での不活化作用を調べるため、非開裂型 HA を持つ非感染性インフルエンザウイルスにおいてウイルス不活化を調べた。このインフルエンザウイルスに対するウイルス不活化 pH に依存し、ブチロイルアルギニン溶液のみが pH 4.0 で強いウイルス不活化作用を示した。
 - 4) ポリオウイルスとニューカッスル病ウイルスは酸に対して強く、どの試料溶液でもウイルス不活化は見られなかった。
 - 5) 実用の条件を念頭に、IgG1 の精製において各試料溶液を溶媒として用いた時の抗体の回収率を調べた。強酸性 (pH 2.9) の 0.1 M クエン酸緩衝液を用いてプロテイン A カラムで溶出した時の回収率を 100 % とした時、pH 4.0 の 0.7 M アルギニン溶液を用いた時の回収率は 75 % であったが、pH 4.0 の 0.7 M ブチロイルアルギニン溶液を用いると回収率は 125 % と最も収量が多かった。強酸性のクエン酸緩衝液を溶媒として用いてもカラム内から IgG1 全てが溶出されているわけではない。タンパク質変性による抗体の不活化などの影響を考慮すると、溶媒にブチロイルアルギニン溶液を用いることが有用であると考えられる。

【まとめ】

アルギニン誘導体であるブチロイルアルギニン溶液は、センダイウイルス、HSV-1、感染性インフルエンザウイルスと非感染インフルエンザウイルス両方のインフルエンザウイルスに対してアルギニン溶液と同等または強いウイルス不活化作用を示した。しかし、ポリオウイルスとニューカッスル病ウイルスに対してウイルス不活化作用は見られなかった。ブチロイルアルギニン溶液は、一般的に用いられている酸処理法よりも緩和な pH で強いウイルス不活化作用を示しただけではなく、IgG1 の精製においても高い回収率を示した。今後、抗体精製の溶出条件として注視されると考えている。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年1月20日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

モノクローナル抗体など治療用タンパク質の製造においては、混入したウイルスの不活化が重要な工程である。この工程で現在広く用いられている酸処理法 (pH 3.0) では、タンパク質の一部が不可逆的な構造変化や凝集を起こすことが問題となっている。上記論文は、治療用蛋白を安定に効率よく得ることができるような、より強力な新規ウイルス不活化剤を探索することを目的としている。申請者は、アルギニンがタンパク分子間の相互作用を弱め、微酸性下でウイルス不活化を示したことに着目して、アルギニン誘導体であるブチロイルアルギニンが各種ウイルスに対して不活化作用を示すか否かを検討したものである。その結果、

①センダイウイルスに対して、ブチロイルアルギニン溶液 (pH 4.0) はアルギニン溶液 (pH 4.0) やクエン酸緩衝液 (pH 3.5) よりはるかに強いウイルス不活化作用を示した。②単純ヘルペスウイルス1型に対して、ブチロイルアルギニンとアルギニンは、いずれも検出限界までウイルス量を減少させたが、ブチロイルアルギニンの方がより低濃度で強い不活化を示した。③インフルエンザウイルスに対して、ブチロイルアルギニン溶液は他の試料溶液よりも強いウイルス不活化を示した。④ポリオウイルスとニューカッスル病ウイルスに対してはどの試料溶液もウイルス不活化を示さなかった。⑤実際にIgG1の精製において抗体の回収率を調べたところ、一般に用いられているクエン酸緩衝液と比較して、またアルギニン溶液と比較してもブチロイルアルギニンによる回収率が高かった。

以上より、本論文はブチロイルアルギニンによるウイルス不活法がアルギニンや従来の方法よりも優れていることを明らかにした。本論文が治療用蛋白質の精製法に新たな貢献をすることが期待できると考えられたことから、審査担当者は学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第391号		
学位授与の日	平成21年3月17日		
氏名	戸川 寛子		
学位論文の題目	Increased chymase-positive mast cells in children with crescentic glomerulonephritis (小児腎疾患における Chymase の発現—小児の半月体形成性腎炎における Chymase の関与)		
論文審査委員	主査	教授 重松	隆
	副査	教授 原	勲 教授 吉川 徳茂

論文内容の要旨

【緒言】

Chymase は mast cell で産生され、angiotensin I (AT I) を angiotensin II (AT II) へ変換する酵素として働く。全身に作用する angiotensin 変換酵素 (ACE) と異なり局所でのみ作用し、局所の AT II 産生系として重要な役割を果たしていることが示唆されている。AT II は水・電解質のバランスの調整や腎血管動態の制御のみではなく、メサンギウムの増殖や間質の線維化に関与し、腎炎の進行に寄与すると推測されている。Chymase は、動脈硬化や心筋梗塞などの心血管病変に関与することが報告されており、腎疾患では、成人の慢性拒絶反応腎や糖尿病性腎症、急速進行性糸球体腎炎に関与することが報告されている。しかし、小児の腎疾患における chymase の関連については検討されていない。そこで、小児腎疾患における chymase の発現を調べ、疾患との関連性について検討した。

【対象および方法】

対象は腎生検を行った各種腎疾患の小児 104 名 (平均年齢 10.6±4.9 歳) である。104 名中 3 名が急速進行性糸球体腎炎を呈し、腎組織は半月体形成性糸球体腎炎であった。腎生検時の Schwartz's による推定糸球濾過値 eGFR はそれぞれ、22.0 ml/min/1.73m²、8.8 ml/min/1.73m²、7.6ml/min/1.73m² でいずれも著明に低下していた。その他、糖尿病性腎症 2 名、移植腎 3 名、IgA 腎症 33 名、紫斑病性腎炎 23 名であった。線維化の評価は Banff 分類に基づき 4 段階に分類した。凍結切片をカノルア液で固定し、抗ヒト mast cell chymase モノクローナル抗体 (Chemicon) を用いて、免疫組織学的に chymase の発現を検討した。切片全領域の chymase 陽性細胞数をカウントし、Image J 1.37 (National Institutes of Health) を用いて、単位面積あたりの陽性細胞数を測定した。統計学的解析は、JMP 5.01J software package (SAS Institute Inc.) を用い、線維化と chymase 陽性細胞数の相関について Spearman の順位相関係数を用いて検討した。

【結果】

急速進行性糸球体腎炎では全例で、間質に chymase 陽性細胞を認め、陽性細胞数の平均値は 26.0/mm² (範囲: 19.3~36.9 mm²) と高値であった。腎組織像は、全例半月体形成性糸球体腎炎を呈し、間質の強い線維化を認めた。Chymase 陽性細胞は、成人と同様に糖尿病および移植腎で認められ、陽性細胞数はそれぞれ 2.6/mm² (最大 5.1/mm²)、2.2/mm² (最大 6.5/mm²) であった。糖尿病性腎症における chymase 陽性例は 2 名中 1 例で、陽性例では軽度の腎間質の線維化を伴っていたが、陰性群では線維化は認められなかった。移植腎での chymase 陽性例は急性尿管管壊死を伴う 1 例で腎生検時、腎機能低下を認めた。陰性群の 2 例はプロトコールバイオプシーであった。IgA 腎症では、chymase 陽性細胞数は 0.6/mm² (最大 2.2/mm²) であった。病理組織により巣状メサンギウム増殖とびまん性メサンギウム増殖に分けて検討したが、差は認められなかった。紫斑病性腎炎における chymase 陽性細胞数は、0.3/mm² (最大 6.2/mm²) であり、ISKDC のグレードとの相関は認められなかった。また膜性腎症、Alport 症候群、ループス腎炎では、chymase 陽性細胞は認められなかった。各疾患における間質の線維化の程度の平均値と chymase 陽性細胞数の平均値は有意に相関していた (p=0.0081, ρ=0.84)。

【考察】

小児の半月体形成性急速進行性糸球体腎炎では全例で間質に chymase 陽性細胞数が増加しており、陽性細胞数は 26.0/mm² と高値であった。成人正常腎における mast cell の発現は非常に少なく、chymase

陽性細胞数は、 $0.58 \pm 0.38/\text{mm}^2$ であると報告されている。間質における chymase 陽性細胞の増加は腎機能低下および腎線維化に関与すると考えられた。成人の急速進行性糸球体腎炎での検討では、chymase 陽性細胞と間質の線維化とは相関し、病態の進行に伴い陽性細胞数が増加することが報告されている。今回の小児における検討でも、同様の結果であった。成人では移植後の慢性拒絶反応腎および糖尿病性腎症において chymase と腎線維化および硬化病変との関連性が報告されている。小児でも少数ではあるが、これらの疾患で chymase の発現が認められた。Chymase は炎症や腎組織障害に伴って増加し、AT II 産生を介して腎の線維化に関与すると考えられる。また chymase は、matrix metalloproteinase (MMP)-2 や MMP-9 の活性化作用を有し直接的に腎の線維化・リモデリングに関与するとの報告もあり、腎における chymase の重要性が示唆されている。近年、経口可能な chymase 阻害薬が開発され、動物実験で心筋梗塞や動脈硬化、カテーテル治療後の再狭窄などの心血管病変に有効であると報告されており、腎疾患における腎保護効果の検討が期待される。

【結語】

小児の急速進行性糸球体腎炎では chymase 陽性細胞数が高く、腎間質の線維化に chymase が関連することが示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 21 年 1 月 21 日、審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

Renin-Angiotensin 系における angiotensin I (AT I) から angiotensin II (AT II) への変換は、全身に作用する ACE 以外に、組織では mast cell で産生される chymase も ACE 非依存性の AT II 産生系として重要な働きをしている。産生された AT II は、メサンギウムの増殖や間質の線維化を介し、腎炎の進行に寄与すると推測される。Chymase は、成人の慢性拒絶反応腎や糖尿病性腎症、急速進行性糸球体腎炎に関与することが報告されている。しかし、現在までに小児の腎疾患における chymase の発現を検討した報告はない。

本論文は、腎生検を行った各種腎疾患の小児 104 名を対象とし、免疫組織学的に chymase の発現を検討し、単位面積あたりの陽性細胞数を算出、また Banff 分類に基づき腎線維化を 4 段階に分類し、chymase 陽性細胞数と腎線維化との相関を検討したものである。その結果、半月体形成性糸球体腎炎を呈した急速進行性糸球体腎炎では 3 例全例で、間質に chymase 陽性細胞を認め、陽性細胞数の平均値は $26.0/\text{mm}^2$ (範囲: $19.3 \sim 36.9 \text{ mm}^2$) と高値であり、全例で間質の強い線維化を認めた。Chymase 陽性細胞は、成人と同様に糖尿病および移植腎で認められ、陽性細胞数の平均値はそれぞれ $2.6/\text{mm}^2$ (最大 $5.1/\text{mm}^2$)、 $2.2/\text{mm}^2$ (最大 $6.5/\text{mm}^2$) であった。また各疾患における間質の線維化の程度の平均値と chymase 陽性細胞数の平均値は有意に相関していた (Spearman の順位相関係数 $\rho=0.84$, $p=0.0081$)。

以上の結果から、小児腎疾患において chymase の発現と腎線維化が関連し、腎障害に関与していることを示した。本論文は、小児の腎疾患における chymase の発現を検討した初めての報告であり、特に急速進行性糸球体腎炎における chymase の重要性を明らかにした。現在 chymase により産生される AT II は Angiotensin 受容体拮抗薬 (ARB) で抑制可能であり、予後不良である急速進行性糸球体腎炎の治療における ARB の有用性を示唆するものである。また近年、経口可能な chymase 阻害薬も開発されており、腎疾患での臨床応用の可能性をも示唆し、学位論文として十分に価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第392号		
学位授与の日	平成21年3月17日		
氏名	柳沢 悟		
学位論文の題目	The Possible Role of Hematopoietic Cell Kinase in the Pathophysiology of COPD (慢性閉塞性肺疾患における Hematopoietic Cell kinase の役割について)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡 史郎	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 一ノ瀬 正和

論文内容の要旨

【緒言】

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は気道や肺実質の異常炎症によって特徴づけられる疾患であるが、その病態形成には好中球が重要な役割を果たすことが知られている。近年、末梢血レベルで好中球接着能や遊走能が亢進していることが明らかとなっているが、細胞内機序については不明な点が多い。本論文では、好中球に特異的な発現を示すSrc類似蛋白：Hck (Hematopoietic Cell Kinase) について、末梢血好中球が保有するHck蛋白量・活性化Hck量がCOPD患者と健常者で異なるのか、加えてHckがシグナル伝達を担う接着分子 (Mac-1 : CD11b/CD18) やケモカイン受容体 (CXCR1/2) などの対象背景因子との関連について検討を行った。

【方法】

健常者・各病期COPD患者から末梢血好中球を比重遠心法で単離し、

- ① 接着分子 (CD11b/CD18) ・ケモカイン受容体 (CXCR1/2) をFACSで、
 - ② Hck蛋白・リン酸化Hck蛋白をWestern Blotting法で各々検出し、
- 患者背景因子 (年齢・喫煙量・気道閉塞の重症度) や分子間相互の関連性について検討を行った。

【結果】

好中球発現Hck蛋白量は、健常者に比してCOPD患者群で有意に高値を示し、気道閉塞の指標である予測一秒率(%FEV1)とも有意な負の相関を示した。Hck蛋白がシグナル伝達を担うCD11bやCXCR1についてもHck蛋白量との間に有意な正の相関関係を認めた。一方で活性化Hckであるリン酸化Hck量と背景因子との間には有意な相関関係を見出すことはできなかった。

【考察および結語】

COPD患者由来の末梢血好中球ではHck蛋白発現量が有意に増加しており、Hck蛋白がCOPDにおける好中球性炎症に関与する可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年01月30日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は気道・肺実質の異常炎症によって特徴づけられる疾患であり、その病態形成には好中球が重要な役割を果たすことが知られている。近年、末梢血レベルで好中球の接着能や遊走能が亢進していることが明らかとなっているが、その細胞内機序については不明な点が多い。マウスモデルでは、骨髄系細胞に特異的に発現するSrc類似蛋白<Hck (Hematopoietic Cell Kinase)>を過剰発現させることで、肺実質に気腫様変化が生じることが示されているが、COPD患者における本分子の関与については検討されていない。

本論文では、COPD患者の末梢血好中球を単離し、COPD患者の好中球が保有するHck蛋白量・活性化Hck量が健常者のそれと異なっているのか、更にこれらHck発現量が、シグナル伝達を担う接着分子 (Mac-1 : CD11b/CD18) 、ケモカイン受容体 (CXCR1/2) 、および対象背景因子と相関するのか、について検討を行った。

その結果、好中球発現Hck蛋白量は、健常者群に比してCOPD患者群で有意に高値を示し、気

道閉塞の指標である予測一秒量 (%FEV1) と有意な負の相関を示した。Hck蛋白をシグナル伝達に用いるCD11bやCXCR1についてもHck蛋白量との間に有意な正の相関関係を認めた。一方、活性化Hck (リン酸化Hck) 量は、各種分子 (CD11bおよびCXCR1) や背景因子 (年齢・喫煙量・気道閉塞の重症度) との間に有意な相関関係を示さなかった。

以上の結果より、COPD患者の末梢血好中球ではHck蛋白発現量が有意に増加しており、Hck蛋白がCOPD患者における好中球機能亢進に関与する可能性が示唆され、HckがCOPD患者の好中球性炎症に重要であることを報告した初めての論文である。Hck阻害薬がCOPDの治療薬として臨床応用されることを示唆した論文であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第393号		
学位授与の日	平成21年3月17日		
氏名	李 莉		
学位論文の題目	Irinotecan-induced ovarian follicular apoptosis is attenuated by deleting the kinase domain of death-associated protein kinase (塩酸イリノテカン誘発卵巣顆粒膜細胞アポトーシスにおける death-associated protein kinase の意義)		
論文審査委員	主査	教授 覚 道 健 一	
	副査	教授 前 田 正 信	教授 梅 咲 直 彦

論文内容の要旨

【緒言】

Death-associated protein kinase (DAPK)は、当初、*in vitro* 実験系におけるアポトーシス制御分子として単離されたが、その生物学的機能はほとんど解明されていない。特に、DAPKの雌性生殖器における発現と*in vivo*機能については、報告は皆無である。そこで、DAPK変異導入マウス(DAPK-MT)を用いて、マウス雌性生殖器におけるDAPKの生物学的機能の解析を行った。

【研究方法および結果】

DAPKのkinase domainは、DAPK分子のアポトーシス制御に必須ドメインであることが証明されており、gene targeting法によりDAPKのkinase domainを欠損させたDAPK-MTマウスを研究に用いた(大阪大学・審良研究室から提供された)。

(1) DAPK分子の卵巣組織内発現

卵巣組織を用いたRT-PCR法では、DAPK-MTマウス(C57BL/6)と野生型C57BL/6マウス(DAPK-WTマウス)の両者に、DAPK mRNA発現を検出した。しかし、モノクローナル抗体を用いたwestern blot法では、DAPK-MT卵巣組織からは抗原を検出できなかった。

免疫組織化学的解析に利用可能な抗マウスDAPK抗体が確立されていないことから、*in situ* hybridization法で、DAPK mRNAの卵巣組織内発現分布を検討した。8週齢DAPK-MTマウスと野生型C57BL/6マウス(DAPK-WT)の卵巣を摘出し、DAPK WT mRNAとDAPK MT mRNAに共通する配列を鋳型とするsense riboprobeとantisense riboprobeを用いて、*in situ* hybridization解析を行った。その結果、DAPK mRNAはほぼ全ての卵巣細胞にわずかながらも検出されたが、中一大卵胞の顆粒膜細胞には特異的に著明な高発現を認めた。

(2) DAPK kinase domainを欠損したマウス(DAPK-MT)の卵巣表現型

DAPKがアポトーシス制御分子であること、卵巣組織内においてはDAPK mRNAが中一大卵胞の顆粒膜細胞にのみ強発現していること、等からDAPKが卵胞発育に関与している可能性、エストロゲン産生と身体発育に関与している可能性、などが推測された。そこで、DAPK-MTマウスとDAPK-WTマウスの間で、マウス体重、マウス卵巣重量、卵巣内卵胞数を比較した。しかし、どれも2種のマウス間で有意な差を認めなかった。

(3) CPT-11誘発マウス顆粒膜細胞アポトーシスにおけるDAPKの意義

CPT-11併用化学療法は卵巣卵胞を崩壊させ、抗癌剤治療中に高頻度に卵巣機能不全をもたらす。

さらに CPT-11 投与マウスでは、発育卵胞顆粒膜に特異的に FasL 発現を誘発し、顆粒膜細胞に構成的発現している Fas 抗原と反応して、特異的顆粒膜細胞アポトーシスを誘導することが証明されている。そこで、卵巣顆粒膜細胞特異的に強発現している DAPK が、CPT-11 誘発卵巣顆粒膜細胞特異的アポトーシスに関与しているか否かを検討した。実験 (2) の結果から、DAPK-MT マウスと DAPK-WT マウス の両者の間には、発育卵胞数、卵巣重量、身体発育などの点で有意の差が認められないことが証明されており、抗癌剤 CPT-11 の影響を卵巣組織で比較することが可能と考えられた。

CPT-11 注射は、DAPK-MT マウスと DAPK-WT マウス の両者において、発育卵胞の顆粒膜細胞特異的な TUNEL 陽性細胞出現を認めた。しかし、TUNEL 発現量は明らかに DAPK-MT マウスで減少しており、TUNEL 陽性細胞数も有意に減少していた。このことは、DAPK の kinase domain 欠失により、CPT-11 注射による発育卵胞の顆粒膜細胞アポトーシスが抑制されることを意味している。

(4) DAPK kinase domain を欠損したマウス (DAPK-MT) における CPT-11 刺激による顆粒膜細胞 Fas, FasL 発現誘導

DAPK-MT マウスにおける CPT-11 誘発卵巣顆粒膜細胞特異的アポトーシスの減少が、CPT-11 刺激後の顆粒膜細胞における Fas, FasL 発現レベルに起因しているかどうかを免疫組織化学的に検証した。その結果、Fas 抗原の発現レベルと発現分布は CPT-11 刺激の前後では、DAPK-MT マウスと DAPK-WT マウス の両者の間には著変を認めなかった。また、CPT-11 注射は DAPK-MT マウスの顆粒膜細胞にも特異的な FasL 発現誘導をもたらしたが、DAPK-MT マウスと DAPK-WT マウス の両者の間には有意な差を認めなかった。

【考察】

DAPK 分子の卵巣組織内発現分布を初めて証明した。DAPK 分子は卵巣顆粒膜細胞特異的に高発現しており、顆粒膜細胞特異的な機能に DAPK 分子が関与していることが推測された。顆粒膜細胞は卵子支持細胞であると同時に、雌性動物の主要エストロゲン産生細胞であることから、DAPK 分子が何らかの特異的生殖機能に関与していることが考えられる。DAPK-MT マウスと DAPK-WT マウス の比較から、DAPK 分子は正常生理内では卵胞発育や内分泌機能には大きな影響は及ぼさないことが判明した。

Topoisomerase I 阻害活性を示す抗癌剤 CPT-11 は、抗癌剤の中でも最も強力な卵巣機能障害誘発能があり、抗癌剤治療後の卵巣生殖機能の廃絶が危惧されている。DAPK はこの CPT-11 による特異的顆粒膜細胞アポトーシスの細胞内シグナルに促進的に作用していることが証明された。抗癌剤 CPT-11 による顆粒膜細胞アポトーシスについては、Fas-FasL 反応以降の細胞内アポトーシスシグナルに DAPK 分子は促進的に作用している。これは DAPK 分子が、抗癌剤で傷害された卵胞を排除することで正常な生殖系を維持するという生物学的役割を担っている、とも考えられるかもしれない。また、一方では、DAPK 分子は抗癌剤治療に伴う卵巣機能廃絶を予防するための分子標的予防法の候補分子になるかもしれない。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 21 年 2 月 26 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

Death-associated protein kinase (DAPK) はアポトーシス調節因子の一種としてクローニングされ

た分子であるが、DAPK の本来の生理機能はほとんど解明されていない。DAPK のアポトーシスシグナル伝達機能の発現には、そのキナーゼドメインが必須であることが証明されており、学位申請者はこの DAPK キナーゼドメイン欠損マウス(DAPK-変異マウス)を用いて、DAPK の卵巣における組織内発現と機能解析を行った。

(1)正常マウス卵巣組織における DAPK の mRNA およびタンパク発現を、RT-PCR 法と Western blot 法で証明した。(2) In situ hybridization 法を用いて、DAPK mRNA の卵巣組織内発現分布を調べた結果、発育卵胞内の顆粒膜細胞に極めて強い発現を証明した。(3)抗癌剤 CPT-11 が卵巣顆粒膜細胞特異的アポトーシスを誘発すること、アポトーシス調節分子の DAPK が発育卵胞顆粒膜細胞に強く発現していることなどから、DAPK-変異マウスの CPT-11 誘発顆粒膜細胞アポトーシスを調べた。その結果、DAPK-変異マウス卵巣では、野生型マウス卵巣に比べて、CPT-11 注射後の卵胞顆粒膜細胞アポトーシス (TUNEL 染色法で検出) が強く抑制されていた。(4)マウスへの CPT-11 誘発顆粒膜細胞アポトーシスは、顆粒膜細胞への Fas ligand 発現誘導が主因である。そこで、DAPK-変異マウスと野生型マウスにおける、CPT-11 投与前後の Fas 抗原および Fas ligand 発現を免疫組織化学的に比較した結果、両マウス卵巣の Fas 抗原発現は CPT-11 投与前後で影響されず、両マウス卵巣の Fas ligand 発現誘導も差を認めなかった。

本研究は、DAPK が発育卵胞顆粒膜細胞に特異的発現をすること、DAPK が Fas/Fas ligand 発現変動とは異なる機序で CPT-11 誘発卵巣顆粒膜細胞アポトーシスシグナルを調節していることを、報告したものである。顆粒膜細胞特異的な DAPK 発現分布から DAPK が卵巣生殖機能に非常に重要な役割を担っていること、DAPK が抗癌剤による卵巣傷害を予防するための分子標的候補となることを示した。以上により、本研究は、学位論文として価値があるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第394号		
学位授与の日	平成21年3月23日		
氏名	三木田直哉		
学位論文の題目	The protective effects of ultraviolet A1 irradiation of spontaneous lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice. (MRL/lpr マウスのエリテマトーデス様皮膚症に対する UVA1 照射の効果)		
論文審査委員	主査	教授 近藤稔和	
	副査	教授 三家登喜夫	教授 古川福実

論文内容の要旨

【緒言】全身性ループスエリテマトーデス (SLE) において、紫外線曝露は代表的な疾患増悪因子のひとつであり、SLE のモデルマウスであり、背部に特徴的な脱毛・痂皮形成を伴った LE 様皮膚症を自然発症する MRL/lpr マウスに短波長紫外線 (UVB) を照射すると、皮膚症の発症を促進することが報告されている。しかし近年臨床では SLE の治療に長波長紫外線(UVA1)照射が用いられており、これらの事実は照射する紫外線の波長の違いによると思われる。紫外線はその波長により、短波長側から UVC、UVB、UVA に分類され、主に UVB と UVA が我々に様々な影響を与える。UVA はさらに UVA2 と UVA1 に分類され、UVA2 の機能が UVB に類似するのに対して、UVA1 は他と異なる生物学的作用を有するとされるが、その詳細は未知な部分が多い。これまで SLE のモデルマウスに対する UVA1 照射の影響を検討した報告はなく、SLE の皮膚症状に対する UVA1 照射の影響とそのメカニズムを解明するため、MRL/lpr マウスに UVA1 を照射し、皮膚症および全身症状に対する影響に加え、皮膚において肥満細胞に注目し検討した。

【方法】LE 様皮膚症発症前の 4~6 週齢の雌の MRL/lpr マウスに UVA1 (5 または 10J/cm²) を 1 週間に 5 回、3~4 カ月間照射し、皮膚症の発症頻度と肥満細胞を含めた組織学的変化のほか、実験中の死亡率、腎病変の発症頻度と組織学的変化、血清抗核抗体価などについて、非照射群と比較検討した。

【結果】LE 様皮膚症の発症頻度に関しては、非照射群で 22 匹中 6 匹に肉眼的に皮疹を認めたのに対し、UVA1 照射群 36 匹 (5、10J/cm² 各々 18 匹ずつ) では肉眼的に皮疹の発症を 1 匹も認めず、UVA1 照射は有意に LE 様皮膚症の発症を抑制することが明らかとなった。一方、全身に対する影響として、実験期間中の死亡率、タンパク尿と腎病変の組織学的変化の程度、血清抗核抗体価について検討した。死亡率に関しては統計学的な有意差は認めないものの、非照射群と比較して UVA1 照射群で低い傾向を認めた。タンパク尿と腎病変の組織学的変化の程度、血清抗核抗体価については、群間に有意な差は認められなかった。

組織学的に、非照射群の皮疹部の HE 染色像では、過角化を伴った表皮肥厚、基底層の液状変性、真皮への炎症細胞浸潤などの所見を認めたが、肉眼的に皮膚症を認めない非照射群、照射群間では特に違いを認めなかった。一方トルイジンブルー染色では、皮疹部において真皮への多数の肥満細胞の浸潤が認められた、さらに無疹部では UVA1 照射群において、非照射群に比べて統計学的に弱い有意に多くの肥満細胞浸潤を認めた。肥満細胞に関しては近年、状況により促進的にも抑制的にも働く多彩な免疫調節機能が注目されていることから、炎症を抑制しうる肥満細胞が UVA1 照射により誘導された可能性を考え、抑制性サイトカインである IL-10 の産生について組織学的に検討したが、UVA1 照射群に IL-10 陽性肥満細胞は認められなかった。また UVA1 治療の作用機序の一つとして、真皮炎症細胞のアポトーシスが以前より報告されており、今回各群マウスの皮膚のアポトーシス細胞を TUNEL 法で検討した。UVA1 照射群の無疹部では真皮全層に TUNEL 陽性細胞を散在性に認めたのに対し、非照射群ではほとんど認められず、また皮疹部においては表皮にびまん性に TUNEL 陽性細胞が認められたものの、真皮にはほとんど認められなかった。さらに免疫組織学的検討により、UVA1 により誘導された真皮の TUNEL 陽性細胞の一部は肥満細胞であることが同定された。

【結論】今回我々の研究により、UVA1 照射は、明らかな全身に対する副作用を伴うことなく、MRL/lpr

マウスの LE 様皮膚症の発症を有意に抑制することが示され、SLE の皮膚症状に対する UVA1 治療の基礎的なエビデンスが得られた。またその作用機序の一部として、UVA1 照射による真皮の肥満細胞を含めた細胞のアポトーシス誘導が関与している可能性が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成21年3月16日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

ヒト全身性ループスエリテマトーデス (SLE) において、紫外線 (UV) 曝露は代表的な疾患増悪因子のひとつであり、ヒト LE 様皮膚症を自然発症する SLE のモデルマウスである MRL/lpr マウスでも UVB (中波長紫外線) 照射による皮膚病変の発症促進作用が報告されている。一方で、近年紫外線治療のひとつである UVA1 (長波長紫外線) 照射のヒト SLE に対する有効性が報告されている。これらの作用の違いは、紫外線の波長に起因すると思われる。紫外線はその波長により、短波長側から UVC、UVB、UVA に分類され、UVA はさらに UVA2 と UVA1 (340-400nm) に分類される。UVA2 の機能が UVB に類似するのに対して、UVA1 はこれらと異なる生物学的作用を有するとされるが、その詳細は未知な部分が多い。またこれまでに SLE モデルマウスの皮膚病変に対する UVA1 照射の影響を検討した報告はなかった。そこで本研究では、SLE の皮膚病変に対する UVA1 照射の影響とその機序を明らかにするため、皮膚病変発症前の MRL/lpr マウスに UVA1 を照射し、皮膚病変の発症および自己免疫病態に対する効果に加え、肥満細胞を含めた皮膚に対する影響を組織学的に検討した。

LE 様皮膚症の発症頻度に関しては、非照射群の 27% に肉眼的に皮膚病変の発症を認めたのに対し、UVA1 照射群では全例において肉眼的に皮膚病変の発症を認めず、UVA1 照射は LE 様皮膚症の発症を有意に抑制する結果となった。一方、全身に対する影響として、蛋白尿と腎病変の組織学的変化の程度、血清抗核抗体価について検討したが、群間に有意な差は認められなかった。また実験期間中の死亡率に関しては、非照射群に比べ UVA1 照射群で低い傾向を認めたが統計学的に有意差は認められなかった。組織学的検討では、皮疹部では無疹部に比べ有意に多くの肥満細胞の浸潤を認めた。さらに無疹部のなかでも UVA1 照射群では非照射群に比べ多くの肥満細胞の浸潤を認めた。UVA1 治療の作用機序の一つとして、炎症細胞のアポトーシスに注目し、各群マウスの皮膚組織のアポトーシスを TUNEL 法で検討した。その結果、UVA1 照射群の無疹部では真皮全層に TUNEL 陽性細胞を散在性に認めたのに対し、非照射群ではほとんど認められず、また皮疹部においては表皮にびまん性に TUNEL 陽性細胞が認められたものの、真皮にはほとんど認められなかった。さらに免疫組織学的検討により、UVA1 により誘導された TUNEL 陽性細胞の一部は肥満細胞であることが同定され、UVA1 による浸潤肥満細胞のアポトーシス誘導が、その効果の一部に寄与している可能性が示唆された。

以上、本研究では MRL/lpr マウスに対する UVA1 照射が、全身に対する副作用を伴うことなく、LE 様皮膚症の発症を有意に抑制することが示された。MRL/lpr マウスとヒト SLE の皮膚病変の差違および UVA1 の作用機序に関してはさらなる検討を要するが、この結果は SLE の皮膚病変に対する UVA1 治療の基礎的な根拠を示すものと考えられ、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第395号		
学位授与の日	平成21年3月23日		
氏名	白 艶 花		
学位論文の題目	Survival impact of psammoma body, stromal calcification, and bone formation in papillary thyroid carcinoma (甲状腺乳頭癌における砂粒体、間質石灰化および骨形成と予後への影響)		
論文審査委員	主査	教授 村 垣 泰 光	
	副査	教授 山 中 昇	教授 覚 道 健 一

論文内容の要旨

はじめに

超音波検査で石灰化が甲状腺結節の良悪性診断に有用とされている。石灰化が良性病変より悪性腫瘍が多いからである。甲状腺悪性腫瘍の約80%を占める乳頭癌(PTC)は石灰化の多い腫瘍であるが、石灰化の発生率、臨床パラメーターとの関係、予後への関連有無は明らかにされていない。また、病的に石灰化はPSB (psammoma body, stromal calcification と bone formation) の3つに分類することができる。これらがそれぞれ甲状腺乳頭癌の病理診断に重要な特徴だが、予後への影響及び石灰化の分子機構がまだ解明されていない。

最近の報告によると、BMP-1 (bone morphogenetic protein-1) が骨形成、細胞外基質の形成及び代謝に役割を果たすことが知られている。又別に細胞の増殖、遊走及び癌細胞の浸潤に関与すると示唆されている。しかし、BMP-1 の PTC での役割はほとんど報告されていない。

本研究では PTC の HE 標本を用い、PSB の検出率、臨床パラメーターとの関係、再発予後への影響を解析した。さらに PTC の手術組織を用い、BMP-1 の発現を検討し、BMP-1 の発現と臨床病的なパラメーターとの関係、特に PSB との関係について明らかにした。

材料及び方法

症例

臨床予後データのある原発部 PTC 181 例の HE 標本と、癌部と非癌部甲状腺凍結組織が保存される症例 48 例を対象した。

定量的 Real-Time PCR

48 例甲状腺組織の癌部、非癌部から total RNA を抽出して、cDNA を合成し、Real-Time PCR で BMP-1 の発現を解析した。β-actin を internal control とした。ΔΔCT 法により、BMP-1 の発現を定量した。

統計解析

結果の比較は、Chi-square test 又は Fisher's exact test を用いた。各群の中で BMP-1 の定量的な発現の比較は、Mann-Witney U test を用いた。予後解析は Kaplan-Meier method with log rank test と Cox proportional hazards regression model を用いて解析した。P < 0.05 を有意差ありと判定した。

結果

PSB の発生と臨床病的なパラメーターとの関係

総計 229 例の PTC では、PSB の発生と臨床病的なパラメーター(年齢、性別、腫瘍大きさ、腺外浸潤、pT、リンパ節転移、病期)との関係を検討した。

- 1) psammoma body の検出率は 25.3% であった。psammoma body の発生と臨床的リンパ節転移又は病期の進行との間に有意な相関を認めた。
- 2) stromal calcification の検出率は 46.7% であった。stromal calcification の発生と年齢(≥ 60 歳)、pT 高値又は臨床的リンパ節転移との間に有意な相関を認めた。
- 3) bone formation の検出率は 12.7% であった。bone formation の発生と年齢(≥ 60 歳)又は腺外浸潤との間に有意な相関を認めた。

PSB の発生は臨床予後への影響

181 例の PTC を用い、PSB の有無と無再発生存率を比較した。さらに、単変量解析と多変量解析を行った。

- 1) psammoma body 陽性症例の無再発生存率は陰性症例より低い。stromal calcification と bone formation と予後への影響は認めなかった。psammoma body 陽性症例の 5 年、10 年無病生存率は 82.9%、75.6% であった。それに対して陰性症例は 94.5%、88.5% であった。
- 2) 単変量解析によると、有意差のあるパラメーターは psammoma body、年齢、腺外浸潤、リンパ節転移(臨床的、病理組織学的の両方)、病期、手術断端であった。
- 3) 多変量解析では、有意なパラメーターは、年齢と臨床的リンパ節転移だけであった。

BMP-1 の発現と臨床病理的なパラメーターとの関係

- 1) BMP-1 の高発現は、psammoma body の発生 ($P = 0.0464$) と、stromal calcification の発生 ($P = 0.0272$) と有意な関連を認めた。BMP-1 の発現は 2 例の bone formation 陽性症例では高かった。
- 2) BMP-1 の発現と、年齢、性別、腫瘍大きさ、pT、腺外浸潤、リンパ節転移、病期との間に有意な相関が認めなかった。

結論

以上の解析より、甲状腺乳頭癌に見られる三種の石灰化の内、psammoma body は甲状腺乳頭癌の再発予後を予測するに有用なパラメーターである。BMP-1 の高発現が、psammoma body 又は stromal calcification の発生に相関した。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年3月11日、論文審査担当者は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

石灰化が甲状腺結節の良悪性診断に超音波検査で有用とされている。この理由は石灰化が良性病変より悪性腫瘍で多いからである。甲状腺悪性腫瘍の約 80%を占める乳頭癌(PTC)は石灰化の多い腫瘍であるが、石灰化の発生率、臨床パラメーターとの関係、予後との関連の有無は明らかにされていない。また、病理学的に石灰化は psammoma body、stromal calcification と bone formation (PSB) の 3 つに分類することができる。これらがそれぞれ甲状腺乳頭癌の病理診断に重要な特徴とされているが、予後への影響及び石灰化の分子機構はまだ解明されていない。

本研究では、181 例の PTC の HE 標本を用い、PSB の検出率、臨床パラメーターとの関係、再発予後への影響を解析した。さらに 48 例の PTC の手術組織を用い、BMP-1 (bone morphogenetic protein-1) の発現を定量的に検討し、BMP-1 の発現と臨床病理的なパラメーターとの関係、特に PSB との関係を示した。

結果:

- 1) PSB の検出率はそれぞれ 25.3%、46.7%、12.7%であった。
- 2) psammoma body 陽性症例の再発率が高く、無病生存率は陰性症例より低かった。
- 3) psammoma body 陽性症例の 5 年、10 年無病生存率はそれぞれ 82.9%、75.6%であった。陰性例は 94.5%、88.5%であった。
- 4) stromal calcification と bone formation は予後との相関は認めなかった。
- 5) BMP-1 の高発現は、psammoma body ($P = 0.0464$) と、stromal calcification ($P = 0.0272$) と有意な相関を認めた。BMP-1 の発現は 2 例の bone formation 陽性症例でも高かった。

本論文は甲状腺乳頭癌に見られる三種の石灰化の内、psammoma body は甲状腺乳頭癌の再発予後を予測するのに有用なパラメーターであることを明らかにした。また BMP-1 の高発現が、psammoma body 又は stromal calcification の発生に相関することを示したことから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第829号		
学位授与の日	平成20年4月8日		
氏名	武田大輔		
学位論文の題目	The activation of nicotinic acetylcholine receptors enhances the inhibitory synaptic transmission in the deep dorsal horn neurons of the adult rat spinal cord. (脊髄後角深層におけるニコチン性アセチルコリン受容体を介する抑制系増強作用)		
論文審査委員	主査	教授	仙波恵美子
	副査	教授	前田正信 教授 吉田宗人

論文内容の要旨

【目的】

ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR: neuronal nicotinic acetylcholine receptor)は末梢神経のみならず中枢神経に広く存在し、細胞間情報伝達の修飾に重要な役割を果たしており、アルツハイマー病などの脳疾患との関連が非常に注目されている。nAChRは α サブユニットと β サブユニットから構成される5量体で、同一のサブユニットから成るホモメリック受容体と異なったサブユニットから成るヘテロメリック受容体に分類される。ホモメリック受容体は $\alpha 7 \sim 9$ サブユニットで形成され、ヘテロメリック受容体は $\alpha 2 \sim 9$ と $\beta 2 \sim 4$ サブユニットの組み合わせで形成される。ニコチンに鎮痛作用があることは約70年前から報告されていたが、近年、nAChR作動薬の脊髄髄腔内投与によって明らかな鎮痛効果が得られることが行動学的に示され、nAChRの脊髄内痛覚伝達系に対する役割が示唆された。我々は、一連の研究によりnAChRが、特異的侵害受容ニューロンが在する脊髄後角表層(後角第II層)の抑制性介在細胞に発現しており、その活性化によって抑制性伝達物質であるGABAやグリシンの遊離を増強することを明らかにした。しかしながら、侵害性のみならず非侵害性感覚情報などさまざまな感覚情報が統合する広作動域ニューロンが在する脊髄後角深層(後角第V層)でのnAChRのシナプス伝達に対する作用に違いがあるかどうかは未だ不明である。そこで今回、成熟ラット脊髄スライス標本を用いて後角深層の第V層細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、nAChRのシナプス伝達に対する作用を詳細に検討した。

【方法】

SD系ラット脊髄から横断スライス標本を作製し、酸素負荷した人工脊髄液を灌流し後角深層細胞からパッチクランプ記録を行った。

【結果】

-10mVに膜電位を固定した状態で脊髄後角深層細胞から記録を行うと、GABAもしくはグリシンを介する抑制性シナプス後電流が(以下IPSC)が記録された。ニコチンおよびRJR-2403($\alpha 4 \beta 2$ nAChR作動薬)とcholine($\alpha 7$ 作動薬)の投与によりGABAもしくはグリシンを介するIPSCの有意な増強が認められた。TTX投与下で活動電位を抑制した状態では、IPSCは、ニコチンでは有意な増強を示したが、RJR-2403とcholineでは有意な変化を認めなかった。また、-60mVに膜電位を固定した状態ではニコチンとRJR-2403の投与により内向き電流が誘発されたが、choline投与では内向き電流の誘発は認められなかった。

【考察】

本研究で我々は、数種類のnAChRのサブタイプが脊髄後角第V層のターミナル部、プレターミナル部、神経細胞体に発現し、これらのnAChRサブタイプを介して、後角第V層で抑制性介在細胞からのGABAまたはグリシンの遊離の増強が起こることを電気生理学的に解明した。これらのサブタイプは脊髄後角第II層のものとは異なるものであった。さらに脊髄内での痛覚シグナルの回路を明らかにし、痛覚のシグナルを抑制する抑制性介在細胞に発現するnAChRサブタイプを明らかにすることで、NSAIDやモルヒネの使用が難しい難治性疼痛などに対してのnAChRを標的とする新規鎮痛薬の臨床応用の可能性が示唆される。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 20 年 3 月 26 日、論文調査員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

1970 年代にヤドクガエルの皮膚より抽出される物質であるエピバチジン (Epibatidine) の髄腔内投与によって鎮痛効果が得られることが明らかになり、興味深いことに、エピバチジンの鎮痛効果はモルヒネの 100 倍以上であると報告された。また、一連の研究によって、エピバチジンはニコチン性アセチルコリン受容体に親和性が高く、末梢あるいは中枢神経系に存在するニコチン性アセチルコリン受容体を介して疼痛を抑制することが示唆された。それ以来、ニコチン様物質を用いての鎮痛効果の行動学的研究が多く行われてきたが、中枢神経系、特に、脊髄レベルでニコチン様物質がどのような機序で疼痛を抑制するのかは知られていなかった。

今回、学位請求者は、脊髄レベルにおけるニコチン性アセチルコリン受容体を介する鎮痛機序を解明するために、脊髄横断スライス標本を用いて後角深層ニューロンにホールセル・パッチクランプ法を適用し、脊髄後角深層 (第 V 層) における様々なニコチン様物質の作用を電気生理学的に検討した。その結果、ニコチン様物質は脊髄後角深層の抑制性介在ニューロンに直接的に作用して、抑制性神経伝達物質である GABA もしくはグリシンの遊離を増加することによって、脊髄において疼痛を抑制することを明らかにした。さらに、学位請求者は、 α 、 β サブユニットの 5 量体で形成されるニコチン性アセチルコリン受容体サブタイプに特異的に作用するニコチン様物質や選択的な阻害薬を用いて、脊髄後角深層の抑制性介在ニューロンには $\alpha 4 \beta 2$ の組み合わせから成るサブタイプのニコチン性アセチルコリン受容体サブタイプが発現し、脊髄浅層に発現するサブタイプとは異なっていることを明らかにした。

以上、学位請求者の論文は、成熟ラットの脊髄後角深層 (第 V 層) においてニコチン性アセチルコリン受容体の活性化によって抑制性シナプス伝達は増強し、その作用の一部は $\alpha 4 \beta 2$ サブタイプの受容体を介することを電気生理学的に証明した初めての報告である。本論文は、NSAID やモルヒネの使用が難しい神経因性疼痛や慢性炎症に伴う遷延性疼痛などに対してニコチン性アセチルコリン受容体を標的とする新規鎮痛薬の臨床応用の可能性を示唆するものであり、学位論文として十分に価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第830号
学位授与の日	平成20年5月13日
氏名	内海 みよ子
学位論文の題目	Brachial-Ankle Pulse Wave Velocity for the Assessment of Arterial Stiffness in Adolescents – The Influence of Obesity and Metabolic Syndrome Variables – (若年層における脈波伝播速度の進展に及ぼすメタボリック症候群の影響)
論文審査委員	主査 教授 竹下 達也 副査 教授 宮下 和久 教授 前田 正信

論文内容の要旨

【緒言】

近年、内臓脂肪の蓄積を基盤として、血圧高値、高血糖、リポ蛋白異常などの様々な危険因子が集積するメタボリック症候群 (MetS) と呼ばれる病態が明らかとなり、成人では心血管疾患予防のターゲットとして重要視されている。一方、我が国における小児肥満の有病率は年々増加する傾向にあるが、肥満児においては、MetS の萌芽がすでに認められ、さらに、このような病態が高い確率で成人期に移行することが明らかにされている 1)。したがって、肥満に対する適切な指導を行うことは勿論、早期から伝導血管系の性状の評価を行うことは一次予防の観点からも重要と考えられる。

ところで、複数のリスクが軽度集積する MetS では、動脈硬化性病変の初期変化を捉えることが重要であると考えられる。脈波解析の基づく動脈硬化検査法の一つである脈波伝播速度は、動脈壁の硬化に伴う機能的変化である弾力性の低下を捉えるもので、血管壁のアテローム性硬化の存在や進展と強く相関することが示されるとともに 2)、層頸動脈中膜内膜厚 (IMT) などの動脈壁の器質的病変を指標とするものに比べ、MetS の病態をより鋭敏に反映することが示唆されている。また、検査が簡便かつ非侵襲的であり汎用性が高いことから、若年者での MetS に伴う血管壁の性状の変化およびそれによる心血管リスクを評価するのに有用と考えられる。しかしながら、学齢期の若年者における脈波伝播速度に係るデータの集積は依然不十分であり 3,4)、この時期の身体発育に伴う変化も含めて、どのような性差や年齢差がみられるのか、あるいは肥満や MetS の危険因子とその集積がどのように反映されてくるかについては明確にされていない。そこで、本研究では、学齢期の若年者を対象として、MetS の個々の危険因子およびその集積が脈波伝播速度に及ぼす影響を疫学的に検討した。さらには、脈波伝播速度による心血管リスクの評価に応用するための評価基準値の作成を試みた。

【対象と方法】

対象者は、我々が 1997 年～2006 年に実施した生活習慣病予防健康調査を受診した兵庫県下の某中学校および高校に在籍した生徒であった。このうち、15～17 歳 (16.2 ± 0.8 歳) の生徒 474 例 (男子 218 例、女子 256 例) を対象に、肥満および MetS の危険因子とその集積が脈波伝播速度に及ぼす影響について検討した。

対象者には、身体計測として、身長、体重、体脂肪率、皮下脂肪厚、ウエスト周囲径を計測した。また、臥位にて安静を保った後、左上腕部より収縮期および拡張期血圧を測定し、続いて、コーリン社製 form ABI/PWV を用いて上腕一足首脈波伝播速度 (baPWV) を測定した。さらに、空腹時採血により中性脂肪 (TG)、総コレステロール (TC)、HDL コレステロール (HDL-C)、空腹時血糖 (FBS)、インスリン (IRI) を測定した。これらの測定値から、ウエスト身長比、平均血圧、TC/HDL-C 比、インスリン抵抗性の指標として HOMA 指数 ($FBS \times IRI / 405$) を産出した。

また、調査期間中の baPWV の測定を実施した者のうち、高血圧、糖尿病、脂質代謝異常、腎疾患の既往のない 12～17 歳 (14.8 ± 1.6 歳) の生徒 1,091 例 (男子 517 例、女子 574 例) の測定データを用いて、性別、年齢別の baPWV の評価基準値の作成を試みた。

【結果と考察】

1. 肥満およびメタボリック症候群の危険因子が脈波伝播速度に及ぼす影響

ウエスト身長比、baPWV、収縮期血圧、平均血圧、TC/HDL-C 比は男子、体脂肪率、皮下脂肪

厚、TC、HDL-C、IRI、HOMA 指数は女子で有意に高値を示した。

baPWV と MetS の危険因子との相関関係を性と年齢を調整して検討すると、BMI、体脂肪率、皮下脂肪厚、ウエスト身長比、収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、TG、HDL-C、TC/HDL-C 比、IRI、HOMA 指数において有意な関連が認められた。また、baPWV を従属変数、肥満および MetS の危険因子を独立変数としてステップワイズ法による重回帰分析を行ったところ、平均血圧、TC/HDL-C 比、HOMA 指数が独立した寄与因子としてモデルに採択された。

この結果をふまえ、MetS の判定指標として、ウエスト身長比、平均血圧、TC/HDL-C 比、HOMA 指数を採用した。そのうえで、この4変数について性別に 75 パーセンタイル値を求め、この値よりも高値となる場合をリスク有りとして定義し、個人内でのリスクの集積数と baPWV との関係を見たところ、リスクの集積数が多い者ほど baPWV が高くなることが示された。さらに、ウエスト身長比が高値を示し、かつ平均血圧、TC/HDL-C 比、HOMA 指数のうち2つ以上で高値となる場合を MetS と定義すると、MetS 群 (n=35) では非 MetS 群に比べて baPWV が著しく高値を示した。以上のことから、若年者においても肥満に伴って血圧高値や耐糖能およびリポ蛋白などの指標の軽度の上昇が認められ、それらの変化が集積して存在する MetS の病態が脈波伝播速度に影響を及ぼすことが明らかになった。したがって、脈波伝播速度は、MetS を基盤とする心血管リスクの評価指標として有用であり、将来の心血管疾患の予防に向けての保健指導等に活用できることが示唆された。

2. 脈波伝播速度の評価基準値の作成

baPWV は 12~17 歳まで加齢とともに上昇し、すべての年齢で男子の方が女子よりも有意に高値であった。baPWV の加齢変化を標準化するために、男女それぞれ年齢別に 50、75、90、95 パーセンタイル値を算出し、これらの値から移動平均法によるスムージング処理を行った後に3次曲線を適用して基準曲線を描いた。そのうえで、性別に各年齢における 50、75、90、95 パーセンタイルの曲線状の値を読み取り、この値をもとに baPWV の評価基準値を作成した。この性別、年齢別の基準値を用いることで、思春期の身体発育に伴う性差や年齢差を加味した評価が可能である。例えば、baPWV の値が 95 パーセンタイル値を上回れば「高度リスク」、90~95 パーセンタイル値であれば「中等度リスク」、75~90 パーセンタイル値であれば「低度リスク」、75 パーセンタイル値未満であれば、「標準レベル」とするなどの判定ができる。

【結語】

学齢期の若年者を対象に、肥満およびメタボリック症候群の危険因子とその集積が脈波伝播速度に及ぼす影響について検討した結果、以下のことが明らかになった。

1. baPWV は BMI、体脂肪率、皮下脂肪厚、ウエスト身長比、収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、TG、HDL-C、TC/HDL-C 比、IRI、HOMA 指数と有意に相関した。また、ステップワイズ法による重回帰分析の結果、ウエスト身長比、平均血圧、TC/HDL-C 比、HOMA 指数が独立した寄与因子であることが示された。
2. ウエスト身長比、平均血圧、TC/HDL-C 比、HOMA 指数の4変数について、75 パーセンタイル値を上回る場合をリスク有りとして定義し、個人内でのリスク集積数と baPWV との関係を見ると、リスクの集積数が多い者ほど baPWV が高値となり、さらに、MetS 群と非 MetS 群に分類するとその差がより顕著であったことから、若年者においても MetS の病態が baPWV に影響を及ぼすことが示された。
3. 思春期の身体発育に伴う性差や年齢差を考慮したうえで baPWV を評価するための性別、年齢別の評価基準値を作成した。これらは、心血管疾患予防のための保健指導等に脈波伝播速度を活用するにあたって有用であると考えられた。

文献

1. Weiss R, Dziura J, Burgert TS et al.: Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 50(23): 2362-74, 2004.
2. Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C et al.: Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation* 113(5): 664-70, 2006.
3. Whincup PH, Gilg JA, Donald AE et al: Arterial distensibility in adolescents: the influence of

- adiposity, the metabolic syndrome, and claaic risk factors. *Circulation* 112(12) 1789-97, 2005.
4. Raitakari OT, Juonala M, Kahonen M et al: Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *JAMA* 290(17): 2277-83, 2003.

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 20 年 4 月 15 日、審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

内臓脂肪の蓄積を基盤として、血圧高値、高血糖、リポ蛋白異常などの様々な危険因子が集積するメタボリック症候群 (MetS) と呼ばれる病態が明らかとなり、成人では心血管疾患予防のターゲットとして重要視されている。一方、わが国における小児肥満の有病率は増加傾向にあるが、肥満児においては、MetS の萌芽がすでに認められ、さらに、このような病態が高い確率で成人期に移行することが明らかにされている。よって、肥満に対する適切な指導を行うことは勿論、早期から伝導血管系の性状の評価を行うことは一次予防の観点からも重要と考えられる。本論文は、学齢期の若年者を対象として、MetS の個々の危険因子およびその集積が脈波伝播速度に及ぼす影響を疫学的に検証し、心血管リスクの評価に応用するための評価基準値の作成を試みたものである。その結果、

1. 学齢期の若年者 474 名 (15~17 歳) における上腕一足首間脈波伝播速度 (baPWV) は加齢とともに値が上昇し、いずれの年齢においても男子で高く、その差は徐々に大きくなった。
2. 性と年齢の影響を調整した回帰分析の結果、baPWV は BMI、体脂肪率、皮下脂肪厚、ウエスト周囲径、ウエスト身長比などの肥満関連指標、および収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、TG、TC/HDL-C 比、IRI、HOMA 指数と有意に相関した。また、ステップワイズ法による重回帰分析の結果、平均血圧、TC/HDL-C 比、HOMA 指数が baPWV に対する独立した寄与因子であることが示された。
3. 重回帰分析の結果から、ウエスト身長比、平均血圧、TC/HDL-C 比、HOMA 指数を MetS における内臓肥満、血圧、脂質代謝、耐糖能の指標として用いた。そのうえで、個人における各指標の測定値が 75 パーセンタイル値を上回って高値となる場合をリスク有りとして定義し、個人内でのリスク集積数と baPWV との関係を見た結果、baPWV はリスクの集積数に比例して高値となった。ウエスト身長比が高値を示し、かつ平均血圧、TC/HDL-C 比、HOMA 指数の 2 つ以上で高値となる場合を MetS と定義すると、MetS 群では非 MetS 群に比べて baPWV が著しく高値を示した。
4. 若年者 1091 名 (12~17 歳) において身体発育の影響による性差や年齢差を考慮したうえで個人の測定値を評価するために、性別・年齢別の 50、75、90、95 パーセンタイル値に基づいて baPWV の評価基準値を作成した。

以上、本論文は、学齢期の若年者を対象に、メタボリック症候群の危険因子とその集積による血管壁の弾力性の低下および心血管リスクの評価において、脈波伝播速度が有用であることを示すとともに、身体発育に伴う性差や年齢差を考慮した評価基準値を示したものであり、これらの知見は若年者の心血管系疾患予防に寄与しうるものであり、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)乙第831号		
学位授与の日	平成20年9月9日		
氏名	根来孝明		
学位論文の題目	Effects of Isoflurane and Sevoflurane Anesthesia on Arteriovenous Shunt Flow in the Lower Limb of Diabetic Patients without Autonomic Neuropathy (自律神経ニューロパシーを持たない糖尿病患者の下肢動静脈シャントに与えるイソフルランとセボフルランの影響)		
論文審査委員	主査	教授 南 條 輝志男	
	副査	教授 三 家 登喜夫	教授 畑 埜 義 雄

論文内容の要旨

【緒言】ヒトの石趾や踵部には体温調節に関与する動静脈吻合と呼ばれる血管系が存在する。ニューロパシーを合併した糖尿病患者では、下肢の動静脈吻合の収縮機能が障害されており、シャント血流の増加から下肢の皮膚の血流障害を生じている。しかしながら明らかなニューロパシーの症状を呈さない軽症の糖尿病患者の下肢動静脈吻合の機能については明らかではない。吸入麻酔薬は動静脈吻合を拡張させ、麻酔中の体温低下に寄与することが知られている。本研究では健常者と糖尿病性ニューロパシー症状のない糖尿病患者との下肢動静脈シャントを比較検討した。

【方法】糖尿病ではない健常者41名（非糖尿病群）と明らかなニューロパシーの症状を呈さない糖尿病患者41名（糖尿病群）に対し、揮発性吸入麻酔薬であるイソフルラン、セボフルランを用いた全身麻酔導入前後で大腿動・静脈の酸素含量を測定し、シャント量の変化を検討した。さらに全身麻酔導入前後でサーモグラフィによる下肢の温度変化を測定し、動静脈吻合が多く分布する足部の皮膚温の変化を観察した。以上の方法により動静脈吻合の機能を間接的に評価した。

【結果】(1) 麻酔前の大腿静脈血酸素分圧と大腿動脈血酸素分圧の比は非糖尿病群に比べ糖尿病群で有意に高かった。(2) イソフルラン、セボフルランによる麻酔導入後、大腿静脈血酸素含量は非糖尿病群で有意に増加したが、糖尿病群では有意な変化を認めなかった。(3) サーモグラフィでの解析では、麻酔導入前の糖尿病群の足部皮膚温は非糖尿病群のそれに比べ有意に高かった。(4) 全身麻酔導入後は非糖尿病群では糖尿病群に比べ、足部の皮膚温は有意に上昇した。

【考察】以上の結果より、糖尿病患者では下肢の動静脈吻合は麻酔導入前から拡張した状態であり、全身麻酔導入による大腿静脈血酸素含量の増加は非糖尿病患者よりも少なく、また足部の皮膚温上昇も非糖尿病患者よりも小さいことが明らかになった。明らかなニューロパシー症状が認められなくとも、体温調節に関与する動静脈吻合の血流を支配する交感神経機能に潜在的な異常が生じていると考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成20年8月6日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。本論文は糖尿病患者では明らかなニューロパシー症状を呈さなくとも下肢動静脈シャントに異常があること、揮発性吸入麻酔薬による下肢動静脈シャントに与える作用は糖尿病患者では健常者より小さいことを初めて明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第832号		
学位授与の日	平成20年12月9日		
氏名	森本善文		
学位論文の題目	TNF- α deficiency accelerates renal tubular interstitial fibrosis in the late phase of ureteral obstruction (TNF- α 欠損は尿管閉塞後期における腎尿細管間質線維化を促進する)		
論文審査委員	主査	教授 雑賀 司珠也	
	副査	教授 鶴尾 吉宏	教授 村垣 泰光

論文内容の要旨

緒言

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) は、実験関節炎の動物モデルや関節リウマチ患者への抗 TNF- α 抗体の治療効果などに見られる炎症を促進させる作用を持つ一方、TNF- α レセプターノックアウトマウスで wild-type マウスより bleomycin 誘導性肺線維化が強く誘導されるなど炎症を抑制する作用を持つことが報告されている。このように TNF- α は炎症に関して二面性の機能を持つサイトカインであるが、組織障害時における炎症と線維化の制御に関するその役割は今なお完全には解明されていない。

腎尿細管間質線維化は腎不全に至る様々な腎疾患時におこる終末期に共通して見られる組織病変であり、その病態において Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) は慢性の間質の炎症と細胞外マトリックス成分の蓄積に中心的な役割を果たしているが、TNF- α と TGF- β 1 はその線維化の過程において相補的な関係にあることが知られている。

本研究では TNF- α ノックアウトマウス (TNF- $\alpha^{-/-}$ マウス) を用い、unilateral ureteral obstruction (UUO) により惹起される腎尿細管間質線維化における TNF- α の役割及び TGF- β 1 に及ぼす影響について検討した。

材料及び方法

6~8 週齢、体重 20~30g の雄性の TNF- $\alpha^{-/-}$ マウスを用い UUO を作製した。コントロールには C57BL wild-type マウスを用いた。

UUO 後経時的に摘出した腎組織切片を 4% paraformaldehyde/PBS で固定、パラフィン包埋後 H-E 染色を施し、病理組織学的検討を行った。さらに凍結切片で、抗 I、IV 型コラーゲン抗体、抗 α -smooth muscle actin (α SMA) 抗体、抗 F4/80 抗体を用い、間接免疫蛍光染色による検討を行った。同様に摘出した腎組織から total RNA を抽出、cDNA を作製し、これを用い real-time PCR を行い、TGF- β 1、I 型コラーゲン、 α SMA、Snail、TNF- α type1 receptor (Tnfr1)、TNF- α type2 receptor (Tnfr2)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) の mRNA の発現を検討した。また同組織より蛋白を抽出し、ELISA kit により TNF- α 、TGF- β 1 の蛋白量を測定した。

全ての数値は平均 \pm 標準偏差で表示し、student's unpaired t-test および Scheffe's method を用いて統計学的解析を行った。P < 0.05 を有意な差とした。

結果

1) TNF- $\alpha^{-/-}$ マウスにおいて UUO 後 4 週で腎の線維化が亢進していた
UUO 後 2 週では、TNF- $\alpha^{-/-}$ マウス、wild-type マウスともに H-E 染色にて尿細管腔の拡張、間質の拡大及び炎症性細胞の浸潤が認められたが、両者間に有意な差は見られなかった。しかし 4 週後では TNF- $\alpha^{-/-}$ マウスの腎実質は、wild-type マウスの約 1/3 程度に菲薄化し、尿細管はほぼ消失、間質に置き換わっていた。抗 I 型コラーゲン抗体、抗 α SMA 抗体で免疫組織染色を行い、間質線維化の程度の検討を行ったところ、UUO 後 2 週では、両者間に差は見られなかったが、4 週では TNF- $\alpha^{-/-}$ マウスで wild-type マウスに比べ I 型コラーゲン、 α SMA の免疫反応は著明に強くなっていた。尿細管構造を見るため IV 型コラーゲンを染色したが、4 週後 TNF- $\alpha^{-/-}$ マウスではほぼ完全に

破壊されていた。

2) TNF- α ⁺マウスにおいて UUO 後 4 週で TGF- β 1 の発現が増加していた

UUO 後、腎組織中の TNF- α 、TGF- β 1 のタンパク量を ELISA にて測定した。TNF- α の発現は Sham-operated マウスに比べ wild-type マウスで UUO 後 3 日より増加していたが、TNF- α ⁺マウスでは TNF- α は検出できなかった。TGF- β 1 の発現は wild-type マウス、TNF- α ⁺マウス両者で Sham-operated マウスに比べ増加していた。2 週までは両者間に差は見られなかったが、4 週では TNF- α ⁺マウスで wild-type マウスに比べ約 1.6 倍に増加していた。Real-time PCR においても TGF- β 1 mRNA は蛋白量と同様に増加していた。

3) TNF- α ⁺マウスにおいて UUO 後 4 週で I 型コラーゲン、 α SMA、Snail mRNA の発現は増加していた

I 型コラーゲン、 α SMA mRNA は UUO 後 2 週までは wild-type マウス、TNF- α ⁺マウス両者ともに徐々に増加していた。4 週後では免疫組織染色による検討と同様に wild-type マウスに比べ TNF- α ⁺マウスで各々約 2、3 倍に増加していた。さらに間質中の筋線維芽細胞が epithelial-mesenchymal transition (EMT) による腎尿細管上皮細胞由来であるかどうか検討するため EMT の key molecule である Snail mRNA の発現を検討したが、I 型コラーゲン、 α SMA と同様に 4 週で wild-type マウスに比べ TNF- α ⁺マウスで約 2 倍に増加していた。

4) UUO 後 4 週で Tnfr2 mRNA の発現が増加するが、Tnfr1 mRNA には発現量の変化は見られなかった

Tnfr1 mRNA の発現は UUO 3 日後から Sham-operated マウス、wild-type マウス、TNF- α ⁺マウスに見られ UUO の期間に影響を受けなかった。興味深いことに Tnfr2 mRNA の発現は wild-type マウス、TNF- α ⁺マウスともに UUO 後 2 週までには見られず、4 週になり初めて UUO 群に見られるようになった。

5) TNF- α ⁺マウスにおいて UUO 後 4 週に浸潤マクロファージが増加していた

Tnfr2 の発現の増加は UUO 後 4 週の wild-type マウスの腎への炎症性細胞の浸潤を減少させる可能性がある。マクロファージは TGF- β 1 や TNF- α 等の主要な産生源であることから、UUO 後 4 週の腎への浸潤マクロファージを抗 F4/80 抗体を用い免疫組織染色により検討した。予測されたとおり wild-type マウスでは TNF- α ⁺マウスに比べ浸潤マクロファージが約 50%に減少していた。

考 察

TNF- α は炎症や自己免疫疾患など様々な病態に関与する多機能なサイトカインであるが、本研究では TNF- α の持つ TGF- β 1 に対する阻害効果に焦点を当て検討した。UUO 後 4 週 TNF- α ⁺マウスにおいて TGF- β 1 の上昇と線維化の増加を認めたが、これは TGF- β 1 に対する TNF- α の抑制効果が喪失したことによる可能性がある。

興味深いことに、Tnfr1 は wild-type マウス、TNF- α ⁺マウス、Sham-operated マウスともに UUO 後 3 日から同レベルで発現しており、UUO の期間に影響されることはなかったが、Tnfr2 は UUO 後 2 週までには発現が見られず 4 週になり初めて wild-type マウス、TNF- α ⁺マウスの UUO 群のみに発現が見られた。Tnfr1 の発現はほぼ全ての細胞に見られるが Tnfr2 は高度に制御された免疫系の細胞に限定され発現する。さらに Tnfr2 は TRAF2 を変性させ NF- κ B 依存性の抗アポトーシス機能を阻害し Tnfr1 によるアポトーシスの誘導を増強する。UUO における腎線維化の early phase では Tnfr1 を介する TNF- α と TGF- β 1 の効果が中心的な役割を果たしていると推測される。TNF- α は炎症の初期より産生されるが、Tnfr2 は遅れて発現するため、このレセプターを介する TNF- α の作用は遅れて現れる。これらのことより TNF- α は UUO の late stage に Tnfr2 signaling を介して TGF- β 1 の産生細胞である浸潤マクロファージのアポトーシスを誘導し、尿細管間質の炎症と線維化を阻害していると考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 20 年 11 月 17 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。腎尿細管間質線維化は腎不全に至る様々な腎疾患の終末期に共通して見られる組織病変であり、そ

の病態において Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) は間質の慢性炎症と細胞外マトリックス成分の蓄積に中心的な役割を果たしている。Tumor necrosis factor- α (TNF- α) はその線維化の過程において TGF- β 1 と相補的な関係にあることが知られている。TNF- α は炎症の促進と抑制機能の二面性を持つサイトカインであるが、組織障害時における炎症と線維化の制御に関するその役割は今なお完全には解明されていない。

本研究は TNF- α ノックアウトマウス (TNF- $\alpha^{-/-}$ マウス) を用い、片側尿管結紮 (UUO) により惹起される腎尿細管間質線維化における TNF- α の役割及び TGF- β 1 に及ぼす影響について検討したものである。その結果、

- 1) UUO 後 4 週において TNF- $\alpha^{-/-}$ マウスは wild-type マウスに比較して上皮間葉分化転換 (EMT) によるより強い線維化をおこした。
 - 2) UUO 後 4 週において TGF- β 1 の発現量および浸潤マクロファージ数が wild-type マウスに比較して TNF- $\alpha^{-/-}$ マウスで増加した。
 - 3) UUO 後 2 週で見られなかった TNF- α type 2 receptor (Tnfr2) mRNA が UUO 後 4 週で初めて UUO 群に発現が見られた。一方、TNF- α type 1 receptor (Tnfr1) mRNA は early stage より全ての群に発現が見られ、UUO の経過中において、発現量の変化は見られなかった。
 - 4) TNF- α は UUO の late stage において、Tnfr2 を介するマクロファージの apoptosis を誘導し、腎組織に浸潤したマクロファージ数を減少させることにより腎線維化を抑制する。
- という知見が得られ、TNF- α の腎尿細管間質線維化に及ぼす役割の一端が明らかになった。

以上、本論文は TNF- α が UUO の late stage において腎間質の炎症、線維化の進行を阻害すること、そしてその機序として Tnfr2 を介するマクロファージのアポトーシスが関与することを初めて明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第833号		
学位授与の日	平成21年1月13日		
氏名	西 秀 人		
学位論文の題目	Hypothermia suppresses excitatory synaptic transmission and neuronal death induced by experimental ischemia in spinal ventral horn neurons (低温は脊髄前角ニューロンの実験的虚血負荷による興奮性シナプス伝達及び神経細胞死を抑制する)		
論文審査委員	主査	教授 板 倉 徹	
	副査	教授 仙 波 恵美子	教授 吉 田 宗 人

論文内容の要旨

脊髄損傷の進行過程の病態は、直接外力による機械的な一次損傷とその結果招来される血管系損傷を主因とする組織障害である二次損傷とに大別される。急性期における二次損傷の進展阻止を図る方法として、脊髄低温療法が臨床的に試みられた報告があるが、全身合併症や手技の煩雑さなどから未だ一般化するにはいたっておらず、その有効性は確立されていない。また、脊髄の単一細胞レベルで電気生理学的に低温の有効性を示した報告は過去にない。そこで今回、学位請求者はその作用機序の一端を明らかにするために、以下の研究を行った。

ラット脊髄から薄切横断スライス標本を作製し、酸素負荷した人工脳脊髄液を灌流し、脊髄前角細胞からパッチクランプ記録を行った。1) 低温時におけるグルタミン酸を介する興奮性シナプス応答の変化、2) 虚血負荷（還流液を無酸素・無グルコースにする実験的虚血負荷）によって生じる興奮性応答に対する低温程度の影響、3) グルタミン酸拮抗薬存在下での虚血負荷による興奮性応答の変化について検討した。

その結果、脊髄前角細胞における自発性興奮性シナプス後電流（sEPSC）の発生頻度は低温に相関して有意に減少した。一方、振幅は24℃でのみ、有意に減少した。虚血負荷を与えると全ての記録細胞において緩徐及び急峻な内向き電流が発生した。その発生潜時は低温に相関して有意に減少し、また、緩徐な内向き電流の傾きは低温下で有意に減少した。また36℃の常温において、グルタミン酸受容体拮抗薬存在下では虚血負荷時の膜電流の緩徐及び急峻な内向き電流が発生するまでの潜時は有意に増加し、それらの傾きは有意に減少した。

以上の研究により、低温下における脊髄前角細胞における興奮性シナプス伝達の抑制機構として、軽度の低温下ではシナプス前部からのグルタミン酸の遊離が抑制されることに起因し、一方、十分な低温下ではシナプス後細胞に発現するグルタミン酸受容体の活性が抑制されることに起因する可能性が示唆された。更に、グルタミン酸受容体拮抗薬下では、虚血負荷による内向き電流の発生までの潜時及び傾きは増加したことから、低温による神経保護作用機序の一因には、虚血によって誘起されるグルタミン酸を介する興奮性シナプス応答の抑制（興奮毒性の抑制）が関与していることが明らかとなった。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成20年11月13日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。本論文は、単一の脊髄前角細胞レベルにおける低温による神経保護作用機序を電気生理学的に示した最初の報告で、今後、低温療法ならびにグルタミン酸受容体拮抗薬が脊髄損傷急性期における治療戦略のターゲットとなる可能性を示したものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第834号		
学位授与の日	平成21年1月13日		
氏名	宮崎展行		
学位論文の題目	Adenosine modulates excitatory synaptic transmission and suppresses neuronal death induced by ischaemia in rat spinal motoneurons. (脊髄前角細胞におけるアデノシンの興奮性シナプス伝達の解明と実験的虚血負荷に対する神経保護作用)		
論文審査委員	主査	教授 板倉 徹	
	副査	教授 前田 正信	教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

急性期脊髄損傷の薬物療法としては、副腎皮質ステロイドホルモンの大量療法が唯一であるが、その有効性は乏しい上に、重篤な副作用をきたすこともあり、新しい作用機序を有する治療薬の登場が待ち望まれる。脳分野では神経保護作用を有する内因性神経伝達物質としてアデノシンが注目されている。アデノシンは脊髄においてもその免疫活性および受容体の存在が報告されており、アデノシンが脊髄損傷の治療にも有効であると期待されている。しかしながら、脊髄前角の細胞レベルにおけるアデノシン受容体の機能的役割は不明であり、我々は脊髄前角細胞に対するアデノシンの神経保護作用機序を細胞レベルで明らかにするために、脊髄前角細胞からホールセル・パッチクランプ記録を適用し、アデノシンおよび各種受容体作動薬の作用、さらに実験的虚血負荷に対する神経保護作用について検討した。その結果、

- 1) 脊髄前角細胞において、グルタミン酸を介する sEPSC の発生頻度はアデノシンおよびアデノシン A₁ 受容体作動薬によって著明に減少し、アデノシン A_{2A} 受容体作動薬は sEPSC の発生頻度を増加させた。したがって、アデノシンはアデノシン A₁ 受容体に作用してシナプス前性に興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の遊離を抑制し、逆に A_{2A} 受容体は増加させるという、相反する二つのシナプス前性作用を有していた。
- 2) シナプス後性作用の検討では、アデノシンおよびアデノシン A₁ 受容体作動薬により脊髄前角細胞に外向き電流（過分極応答）が発生し、アデノシン A_{2A} 受容体作動薬により内向き電流（脱分極）が発生した。すなわち、アデノシンが脊髄前角細胞の A₁ 受容体に直接的に作用して過分極させるが、アデノシン A_{2A} 受容体は脱分極させることが明らかとなった。脊髄前角細胞においてアデノシンには相反する二つのシナプス後性作用を有していることが明らかとなった。
- 3) 実験的虚血負荷では、アデノシンおよびアデノシン A₁ 受容体作動薬は細胞死までの潜時を延長させ、脊髄前角細胞単一レベルにおいて虚血負荷に耐性を有することが明らかとなったが、アデノシン A_{2A} 受容体作動薬はコントロール群と比較して潜時の延長は観察されず、虚血負荷に対する神経保護作用は観察されなかった。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成20年12月25日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

本研究において、脊髄前角細胞に対してアデノシンおよびアデノシン A₁ 受容体作動薬は虚血負荷に対する耐性を有することが明らかになり、今後、アデノシンならびにアデノシン A₁ 受容体作動薬が脊髄損傷治療薬として臨床応用される可能性を示唆したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第835号		
学位授与の日	平成21年2月10日		
氏名	津本智幸		
学位論文の題目	A Polyvinyl Alcohol Core Coil Containing Basic Fibroblast Growth Factor Evaluated in Rabbits with Aneurysms Induced by Elastase (Basic-fibroblast growth factor (b-FGF) 含有 polyvinyl alcohol coil を用いた動脈瘤治療に関する基礎的研究 (ウサギエラストラーゼ動脈瘤モデルを用いて))		
論文審査委員	主査	教授 赤阪隆史	
	副査	教授 前田正信	教授 板倉 徹

論文内容の要旨

緒言

脳動脈瘤の治療に関して近年動脈瘤塞栓術の占める割合が増加している。国際的な前向き臨床研究 (ISAT study) によって手術1年後の成績は、開頭手術より動脈瘤塞栓術の方が良かったという結果も出ている。しかし、動脈瘤塞栓術には長期的に動脈瘤の再開通が開頭手術よりも高いという問題が残存しており、現在、より強い器質化促進作用を有し、再開通の起こりにくいコイル (bioactive coil) の開発がさかんに行われている。

著者らは、この問題を克服すべく、bare platinum coil の中心に polyvinyl alcohol (PVA) の芯を挿入した PVA core coil を開発し、basic-fibroblast growth factor (b-FGF) を浸潤させたコイルで、ウサギ頸動脈盲端モデルにおいて有意に頸動脈の内膜増殖が促進されることを確認した。今回、これをさらに改良し、hemodynamic stress が強く、より臨床に近いウサギエラストラーゼ動脈瘤モデルにてその効果を検討した。

方法

1. in vitro でのコイルの検討

PVA core coil を saline に10分間浸潤させ、コイル中心のPVAにsalineを吸収させ、重量を測定した。

2. in vivo でのコイルの検討

1) 動脈瘤作成

New Zealand white rabbit の右総頸動脈起始部に一時的にエラストラーゼを注入し、動脈瘤を作成した。

2) 動脈瘤塞栓術

4週間後、大腿動脈経路でカテーテルを動脈瘤内に誘導し、塞栓術を行った。実験群は以下の6群である。group 1 (saline 含浸PVAコイル、4週)、group 2 (500 μ g/ml b-FGF 含浸PVAコイル、4週)、group 3 (2000 μ g/ml b-FGF 含浸PVAコイル、4週)、group 4 (saline 含浸PVAコイル、8週)、group 5 (500 μ g/ml b-FGF 含浸PVAコイル、8週)、group 6 (2000 μ g/ml b-FGF 含浸PVAコイル、8週)

3) 塞栓後評価

塞栓術後4週、8週にて血管撮影を行った後、HE染色を行ない、Dai らが提唱した半定量的評価 (4項目; gross neck healing, micro neck healing, neck compaction, dome healing) を行なった。また、group 6 では、免疫組織学的検討 (alpha-SMA, CD31) 追加した。

結果

1. b-FGF 含有 PVA core coil の評価

PVA core coil は、10分間の浸潤によって直線状からヘリカル状に形状が変化した。コイル1cmあ

たり $1.21 \pm 0.58 \mu\text{l}$ の saline を吸収した。b-FGF 溶液に換算すると $500 \mu\text{g/ml}$ b-FGF 溶液で $0.60 \pm 0.29 \mu\text{g/cm}$ 、 $2000 \mu\text{g/ml}$ b-FGF 溶液で $2.41 \pm 1.16 \mu\text{g/cm}$ であった。

2. PVA core coil の使用評価

塞栓術は臨床現場と同様に行うことができ、コイルに関する技術的トラブル（コイルの断線、早期離脱など）はなかった。

3. 動脈瘤内に導入された b-FGF 量について

動脈瘤内に導入される b-FGF 量は、それぞれの動脈瘤内に挿入されたコイル長と、使用した 2 種類の b-FGF 濃度に依存した。結果的に $500 \mu\text{g/ml}$ b-FGF 溶液を用いた group 2, 5 で $6 \sim 16 \mu\text{g}$ 、 $2000 \mu\text{g/ml}$ 溶液を用いた group 3, 6 で $43 \sim 132 \mu\text{g}$ が動脈瘤内に導入された。

4. 血管撮影評価

Group 6 にて、動脈瘤頸部の膜形成が血管撮影上確認できた。これは後述する組織学的評価（gross neck healing）とも一致していた。

5. 組織学的評価

Gross neck healing については、group 6 で group 4 に比較して有意に動脈瘤頸部の治癒促進が認められた。Micro neck healing, neck compaction に関しては、各群に有意差は認められなかったが、Dome healing に関しては、group 3 で group 1 より有意に動脈瘤内の器質化の促進が認められた。免疫組織学的評価では、動脈瘤内は、主に myofibroblast が占めており、頸部では CD31 陽性の endothelial cell を認めた。

考察と結論

Bare platinum coil で動脈瘤を塞栓した場合、塞栓後 4 週では、器質化していない血栓が主体で、12 週ではじめて器質化が確認できている。また動脈瘤頸部については、12 週においても、spindle cell からなる薄い膜を認めるのみであった。

一方、今回我々が作成した b-FGF 含有 PVA core coil は、動脈瘤治癒において、

1. 早期（4 週）の動脈瘤内の器質化を促進した。
2. 動脈瘤頸部での内膜増殖を促進した。

今後、PVA core coil は、コイル中心の PVA を改良することで、より効率的な薬剤放出を行い、現在治療困難な大きな脳動脈瘤に対しても有効なコイルになる可能性があると考えられる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成21年1月7日、審査委員は学位請求者の出席を求めて論文審査を行なった。

脳動脈瘤の治療に関して近年動脈瘤塞栓術の占める割合が増加している。また国際的な前向き臨床研究では、手術1年後の成績において開頭手術より動脈瘤塞栓術の方が良かったという結果も出ている。しかし長期的には、動脈瘤塞栓術において動脈瘤の再開通が開頭手術よりも高いという問題が残存しており、現在用いられている bare platinum coil より、強い器質化促進作用を有し、再開通の起こりにくいコイル（bioactive coil）の開発がさかんに行われている。

この問題を克服すべく、bare platinum coil の中心に polyvinyl alcohol (PVA) の芯を挿入した PVA core coil を開発し、このコイルに basic-fibroblast growth factor (b-FGF) を浸潤させたもの（b-FGF 含有 PVA core coil）を作成した。本論文では、このコイルを用いて、ヒト脳動脈瘤に近いウサギエラストラーゼ動脈瘤モデルに動脈瘤塞栓術を施行し、その効果について検討した。

まず b-FGF 含有 PVA core coil に関して、動脈瘤内に導入される b-FGF 量はそれぞれの動脈瘤内に挿入されたコイル長と使用した b-FGF 濃度に依存した。b-FGF 含有 PVA core coil を用いた塞栓術は臨床現場と同様に行うことができ、コイルに関する技術的トラブルはなかった。

次に b-FGF 含有 PVA core coil で塞栓術を行った動脈瘤を観察すると、術後 4 週間において有意な動脈瘤内の器質化の促進が組織学的に認められた。また術後 8 週間では、動脈瘤頸部の膜形成を血管撮影上でも、組織学的にも確認できた。また免疫組織学的評価では、動脈瘤内に myofibroblast、動脈瘤頸部に CD31 陽性の endothelial cell を認めた。

以上より b-FGF 含有 PVA core coil は、既存の bare platinum coil に比較して早期に動脈瘤内の器質化を促進し、晩期に動脈瘤頸部の内膜増殖を促進することが明らかになった。本論文は、今回開発した PVA core coil が薬剤の放出を担うことにより、現在治療困難な脳動脈瘤に対しても有効な治療法に成りえることを示唆したものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第836号		
学位授与の日	平成21年 3月10日		
氏名	前北隆雄		
学位論文の題目	High Levels of Aberrant DNA Methylation in <i>Helicobacter pylori</i> -Infected Gastric Mucosae and its Possible Association with Gastric Cancer Risk (ヘリコバクター・ピロリ感染による強力な胃粘膜 DNA メチル化異常誘発、及び胃粘膜 DNA メチル化異常の蓄積と胃癌リスクの関係)		
論文審査委員	主査	教授 山上裕機	
	副査	教授 村垣泰光	教授 一瀬雅夫

論文内容の要旨

【緒言】

胃癌は、世界的にみて主要な癌の一つであり、特にアジア圏においては依然高い癌死亡数を誇っている。内視鏡検査等の検査方法や機器の発達により早期診断が可能となり死亡率は減少してきているが、コストや検査に伴うリスクなどといった問題がある。また早期診断したものを内視鏡的粘膜切除術を施行する症例が増加したことにより新たに異時性多発癌の問題も無視できないものとなってきている。胃粘膜の発癌リスクを評価する方法は、現在確立されておらず、臨床の場で待望されている。

メチル化異常はエピジェネティックな現象であり、DNAのCpG部位のシトシンにメチル基が付加されるメチル化状態は、体細胞ではDNA複製後もそのまま維持される。また遺伝子プロモーター領域のCpGアイランド(CpG islands ;CGIs)がメチル化されると、クロマチン構造の変化などを通じてその下流遺伝子の発現が抑制(サイレンシング)され、発癌に関与する。このようなメチル化異常は、癌の非常に早期の段階においても比較的高頻度に認められる。我々はこの性質を生かし、非癌部胃粘膜におけるDNAメチル化異常を検出し、定量化することにより胃粘膜における発癌リスク診断を試みた。

一方、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori* ;*H.pylori*) は胃癌のもっとも重要な発症因子であるが、発癌への機序は依然不明な点が多い。我々は、*H.pylori* 感染が胃粘膜において多くの CGIs のメチル化異常を誘発するのではないかと考えた。その背景として、①大腸癌を発症するリスクの高い潰瘍性大腸において、慢性的に炎症をおこしている腸粘膜では異常メチル化が誘発されている報告があること②胃癌症例の非癌部胃粘膜に異常メチル化が認められたという報告があること③胃癌において様々な腫瘍抑制遺伝子の異常メチル化が報告されていること、が挙げられる。過去に、*H.pylori* 感染が胃粘膜のいくつかの CGIs のメチル化に関与するといった報告もなされているが、全くメチル化と関与がないといった報告もあり詳細は明らかになっていない。

本研究では、*H.pylori* 感染とメチル化誘発との関係を明らかにし、胃癌症例の非癌部胃粘膜と非胃癌症例の胃粘膜とについて、蓄積した CGIs のメチル化異常を解析し、胃癌のリスクと相関するか否かを明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

1. 対象患者と検体

和歌山県立医科大学と国立がんセンター中央病院の倫理委員会において承認を得て、十分なインフォームドコンセントのもと同意の得られた方々より検体を採取した。*H.pylori* 感染の有無が判明している健常者 154 人(男性 82 人、女性 72 人：平均年齢 54.2 歳)と分化型胃癌症例 72 例(男性 60 例、女性 12 例：平均 67.2 歳)から内視鏡検査にて胃体上部小弯と前庭部小弯の 2 カ所の胃粘膜から生検を行い、-80℃で保存した。DNA は、フェノール/クロロホルム法で抽出した。

2. Bisulfite 処理

制限酵素 *Bam*H1 で処理したゲノム DNA500ng を、0.3N NaOH 水溶液中 (final volume 20μL) で 37℃ 15 分間変性し、120μL の 0.6mM hydroquinone、3.6N sodium bisulfite 水溶液(10N NaOH を用いて

pH5.0 に調整)を加え、95°C30 秒の熱変性および 50°C15 分のスルホン化反応及び脱アミノ化反応を 15 サイクル施行。脱塩し、0.1N NaOH 存在下室温で 15 分間脱スルホン化し、TE バッファー40μL に溶解した。

3. 定量的 MSP

Bisulfite 処理後の DNA を用いて、定量的 Real-time methylation specific PCR (qMSP)を行なった。検討遺伝子は、腫瘍抑制遺伝子 *p16 core* と non-core、腫瘍抑制遺伝子と推定される *LOX* と、胃癌でメチル化されていることが報告されている *THBD*、*FLNc*、*HRASLS*、*HAND1*、*p41ARC* の 5 遺伝子の計 7 遺伝子 8 CGIs を用いた。それぞれの遺伝子について、メチル化 DNA 特異的プライマー、及び非メチル化 DNA 特異的プライマーを作成した。さらに、完全メチル化 DNA と完全非メチル化 DNA から標準 DNA を作成し、アニーリング温度などの適切な PCR 条件の検討を行った。

高い再現性と精度を有する定量的解析により、メチル化分子数と非メチル化分子数を定量し、両者の分子数からメチル化 DNA 分子の全分子に体する割合(メチル化レベル(%))を算出した。胃癌症例と非胃癌症例の比較検討には、年齢と *H.pylori* 感染をマッチするよう症例をランダムに抽出した。

【結 果】

1. *H.pylori* 感染による強力な異常 DNA メチル化の誘発

H.pylori 感染による異常メチル化誘発の関関係は、*H.pylori* 感染陰性健常者 56 人(男 30・女 26 人)と *H.pylori* 感染陽性健常者 98 人(男 52・女 46)のメチル化レベルを測定、解析した。

検討した 8 つの CGIs に関して、*H.pylori* 感染群では、非感染群に比べ 5.4~303 倍と、有意に高いメチル化レベルを示すことが明らかになった。これより、*H.pylori* 感染が多くの CGIs に直接もしくは間接的に高頻度にメチル化異常を誘発するということが示された。前庭部と胃体上部での部位間で、メチル化レベルは、*H.pylori* 感染の有無に関わらず有意な差は認められなかった。

2. 年齢とメチル化指数の相関

加齢とメチル化異常の関係については、様々な報告がなされている。今回の研究では、*H.pylori* 非感染健常者群において、メチル化レベルは、*HRASLS*、*HAND1*、*p41ARC* で加齢と非常に弱い相関が認められた。

3. メチル化指数と発癌リスク

分化型胃癌 72 症例(*H.pylori* 非感染 29 例、感染 43 例)と、その患者群に年齢と *H.pylori* 感染がマッチするよう健常者よりランダムに抽出した 72 人(*H.pylori* 非感染 29 例、感染 43 例)で前庭部胃粘膜のメチル化レベルの比較検討を行った。*H.pylori* 感染陰性者において、健常者の胃粘膜に比べ胃癌患者の非癌部胃粘膜では、2.2-32 倍と有意に高いメチル化レベルを示した。*H.pylori* 感染陽性健常者の胃粘膜と *H.pylori* 感染陽性胃癌症例の非癌部胃粘膜とを比較すると、メチル化レベルは様々な値であり、*HAND1* においてのみ 1.4 倍と有意な高値を示した。

【結 語】

1、*H.pylori* 非感染健常者に比し、*H.pylori* 感染陽性健常者の胃粘膜において多くの CGIs に高度な異常メチル化(5.4~303 倍)が認められた。これにより *H.pylori* 感染が多くの CGIs における強力なメチル化誘発因子であることが示された。*H.pylori* 感染による胃癌発生メカニズムにおいて、癌抑制遺伝子のメチル化誘発が重要な役割をはたしている可能性が示唆された。

2、今回解析した 8 つの CGIs 領域では、*H.pylori* 感染陰性群どうしでの比較において、分化型胃癌症例非癌部胃粘膜のほうが健常者胃粘膜よりもメチル化レベルは有意に高かった。*H.pylori* 感染陰性の分化型胃癌患者は、ほとんどが過去に感染していた既感染者であると考えられる。除菌療法により、*H.pylori* 感染を陰性にした上で、非癌部胃粘膜の特異的な CGIs メチル化レベルを定量的に計測することにより、胃癌リスク診断が可能であると示された。

3、*HAND1* では、*H.pylori* 感染陽性群どうしでの比較において、分化型胃癌症例非癌部胃粘膜のほう

が健常者胃粘膜よりもメチル化レベルは有意に高かった。*H.pylori* 感染の有無にかかわらず、非癌部胃粘膜の *HAND1* のメチル化レベルを測定することにより、胃癌リスク診断が可能であると示された。

「一見正常と考えられる組織由来の DNA にメチル化異常が蓄積しており、その程度が発癌リスクと相関する」この知見は世界に先駆ける報告となり、論文は **Clinical Cancer Research** 12(3)Feb. 1:989-995 2006 に掲載され、**NATURE REVIEWS CANCER MARCH 2006 VOLUME 6 172-173 RESERCH HIGHLIGHT** 及び **Gastroenterology** November 2006 1647-1649 **SELECTED SUMMARIES** で紹介された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

2009年2月24日、審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。

胃癌は、世界的にみて主要な癌の一つであり、2006 年度我が国の癌死亡の第 2 位である。対胃癌戦略設定の上で発癌リスク評価法が重要であるが、個人の胃発癌リスク評価法としては、血清ペプシノーゲン値と *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) を組み合わせて用いた学位請求者らのグループによる方法が唯一の報告であり、更に洗練されたバイオマーカーによるアプローチが待望される所である。

一方、DNAメチル化は、エピジェネティックな現象であり、体細胞ではDNA複製後も維持される。また、胃癌において、遺伝子プロモーター領域のCpGアイランド(CpGs)メチル化による、複数の腫瘍抑制遺伝子発現抑制が、胃癌の発癌機序として報告されている。学位請求者らは、腫瘍抑制遺伝子 *p16* の2つのCpGsと *LOX*、胃癌でメチル化されていることが報告されている *THBD*、*FLNc*、*HRASLS*、*HAND1*、*p41ARC* の計7遺伝子8CpGsを用い、非癌部胃粘膜におけるDNAメチル化異常を検出し、定量的に解析することで胃癌のリスク診断が可能か否かを検討した。更に、*H.pylori* 感染は胃癌の主要なリスク要因の一つと認識されているが、その発癌機序の詳細については不明な点が多い。本研究では、*H.pylori* 感染とDNAメチル化誘発との関係についても併せて検討を行った。

その結果、

- (1) 今回解析した8CpGs領域すべてにおいて、*H.pylori* 感染陽性健常者の胃粘膜では、*H.pylori* 非感染健常者に比し、高度なメチル化異常の蓄積が観察された。
- (2) 今回解析した 8CpGs 領域では、*H.pylori* 感染陰性群間での比較において、分化型胃癌症例（ほとんどが *H.pylori* の自然除菌例である）の非癌部胃粘膜では、健常者胃粘膜に比して有意に高度なメチル化異常の蓄積が観察された。除菌療法後や自然除菌後の胃粘膜 DNA メチル化レベル測定により、胃癌リスク診断が可能であることが示された。
- (3) *HAND1* 遺伝子では、*H.pylori* 感染陽性群間での比較において、分化型胃癌症例非癌部胃粘膜では、健常者胃粘膜に比して有意に高度なメチル化異常の蓄積が観察された。

以上より本論文は、定量的メチル化解析により、*H.pylori* 感染に伴う癌抑制遺伝子の高度なメチル化の誘発が胃癌発生に重要な役割をはたしている可能性を示すと共に、定量的解析によって把握される胃粘膜 DNA メチル化異常誘発の程度が各個体での胃癌発生リスクを反映するという新しい知見を提供するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第837号		
学位授与の日	平成21年3月10日		
氏名	田村 学		
学位論文の題目	Hearing preservation after Gamma Knife radiosurgery for vestibular schwannomas presenting with high-level hearing (聴力損失をほとんど認めない聴神経鞘腫患者に対するガンマナイフ定位放射線治療後の聴力温存について)		
論文審査委員	主査	教授 佐藤 守 男	
	副査	教授 近藤 智 善	教授 板倉 徹

論文内容の要旨

【緒言】聴神経鞘腫患者に対する定位放射線治療において、高い腫瘍制御率と合わせて顔面神経の温存が高率で可能となり、最近ではいかに聴力を温存できるかが重要な課題となっている。聴神経鞘腫患者の中でも、定位放射線治療時に聴力が正常またはほとんど正常 (Gardner-Robertson class 1 に相当) のグループに注目し聴力温存についての臨床的研究を試みた。

【目的】聴神経鞘腫に対する定位放射線治療時に患側の聴力が正常またはほとんど正常であったグループに着目し、ガンマナイフ治療後有効聴力温存を評価すること。そして、有効聴力温存に影響すると考えられる因子を解析し評価すること。

【対象と方法】1992年以降、現在まで聴神経鞘腫の治療数が2053症例を超えるフランスマルセイユの Timone 大学附属病院ガンマナイフ治療ユニットにおいて、一度も以前に外科的摘出術を受けていない聴神経鞘腫患者を対象とした。また、Neurofibromatosis type 2 (NF2) の患者、ガンマナイフ治療 (GKS) 時の腫瘍辺縁線量が13Gyを超える症例は除外している。1992年7月から2003年1月まで治療を受け、治療前日聴力がGR1 (Gardner-Robertson class 1) であった患者のうち、3年以上の経過観察 (平均55.6ヶ月、最長11年) がなされたのは74名であった。患者の内訳は40名が女性 (54%)、43名が右側 (58.1%)、平均年齢は47.5歳 (17歳から76歳)、平均腫瘍体積は1353mm³ (64-4640 mm³) で、Koosによる形態学的分類では最も小さなStageIで8名、StageII (21名)、StageIII (43名)、脳幹を圧迫しているStageIVが2名であった。患者の初期症状として聴力低下は29名で、耳鳴り22名、平衡機能障害9名、めまい4名、無症状10名の内訳であった。GKS時すでに5名は顔面神経麻痺 (HB grade II) を来し、3名は三叉神経障害を来していた。全て治療はガンマナイフ治療機器 (201個のコバルト60線源を基にしたモデル) を使用し、CTとMRI画像を駆使して専用ソフトウェアを使用することで放射線線量、Isocenterの位置、治療時間を正確に計算されて行われた。Isocenterの中央値は8、辺縁線量の中央値は12.0Gy (9-13Gy) である。治療後は経時的にMRIと聴力、神経学的評価を行い、治療前と比較すると共に、聴力温存に関連する因子を挙げそれぞれ単変量並びに多変量解析を行った。

【結果】経過中、58名 (78.4%) が有効聴力 (GR1またはGR2) を維持した一方で5名 (6.8%) は聾となった。Kaplan-Meierによる解析では6-7年後に70%の例で有効聴力の低下が頭打ちになっていた。3名が外科的摘出を、2名は2度目のGKSを受けたため腫瘍制御率は93%であった。外科摘出された3名のうち1名が新たな顔面神経麻痺を来した (HB grade 2) 以外に新たな顔面神経麻痺の出現はなかったが、新たな三叉神経障害を7名に認めた (1名は一過性)。聴力温存に関与する因子の解析については、治療後にGR1を保っていた群とそうでない群での比較を行った。初期症状が聴力低下でなかった群 (p=0.002) で有意なGR1聴力温存が得られ、性別、腫瘍のlaterality、GKS前での顔面麻痺の有無、年齢、腫瘍体積などの因子では明らかな有意差は見いだせなかった。また、治療環境における因子解析では、蝸牛 (modiolus部分) にあたる線量が低いほど (p=0.012) 有意なGR1聴力温存が得られ、平均線量、腫瘍にあたるエネルギー、Isocenter数、内耳道内体積、コバルト線源の時間あたりエネルギーなどの因子では明らかな有意差は認めなかった。先の結果を受けた有効聴力 (GR1またはGR2) 温存に関わるKaplan-Meier解析では、蝸牛の受ける線量が4Gy以下の群 (p=0.014)、50歳以下の群 (p=0.05)、初期症状が聴力低下でない群 (p=0.008)、腫瘍局在が内耳道

から離れている群 ($p=0.045$) で有意な聴力温存を示唆した。すなわち、長期有効聴力を期待できる因子とその温存率に注目すると、蝸牛にあたる線量が 4Gy 以下 (90.9%)、初期症状が聴力低下でない (91.1%)、腫瘍局在が内耳道内になく脳幹側にある (89.5%)、Koos 分類 class I で小さい (100%)、50 歳以下の年齢 (83.7%) は長期有効聴力を予想しうる群ということがわかった。

【結語】NF2 でなく、以前に外科摘出を受けておらず、辺縁線量 13Gy 以下、GKS 時聴力 GR1 という選択された聴神経鞘腫治療群の解析ながら、定位放射線治療は高い腫瘍制御と同様、高い有効聴力温存が示唆される。より若年で、聴力低下以外での発症で小さく内耳道内から離れている腫瘍は長期 GR1 聴力温存の候補となりうる。さらに、治療時に蝸牛の受ける線量を 4Gy 以下に抑えることでより聴力温存を期待できると考えられる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成21年2月19日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、論文の審査を行った。

聴神経鞘腫 (VS) に対しての外科治療は、全摘出が根本的治療法である。しかし術後の脳神経障害の出現 (顔面神経麻痺、聴力低下を代表とする) が大きな問題であった。1968 年から定位放射線治療が行われるようになり、聴力温存という点で最近非常に注目されている。ただし、どの程度聴力維持がなされているのかについて詳細な結論には至っていない。

本論文は、定位放射線治療のうちでガンマナイフ治療に注目し、定位放射線治療時の聴力が、Gardner-Robertson class I (聴力がほぼ正常) の患者 74 名について、治療後の程度維持されるのか、またその温存に関わる因子について検討したものである。

ガンマナイフ治療時の isocenter 数 (中央値) は 8、辺縁線量 (中央値) は 12.0 Gy であった。3 年以上経過観察された上記 74 名中、58 名 (78.4%) が GR1 または GR2 の有効聴力を維持できていた。Kaplan-Meier 解析では、聴力低下以外での発症 ($p=0.008$)、4Gy 以下の蝸牛への被曝線量 ($p=0.014$) が聴力温存に関して有意な因子であった。長期有効聴力温存に関わる因子解析では、初期症状が聴力低下ではないもの (91.1%)、内耳道内に限局する小さな腫瘍 (100%) のもの、局在として脳幹側に偏在しているタイプ (89.5%) のもの、そして 50 歳以下の年齢 (83.7%) のものに聴力温存が期待できた。

治療については、蝸牛にあたる線量が 4Gy 以下である場合 (90.9%) に長期有効聴力温存を認めた。従来、この点に触れられた研究はなく、蝸牛への線量が聴神経鞘腫患者の聴力温存に関する重要な指標であることが明らかにされた。

本研究は、定位放射線治療において、有効聴力温存に影響を与える患者因子と、治療計画時の蝸牛線量限界を示し、臨床的に有意義な知見が得られており、学位論文として価値あるものと認めた。