

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

令和5年4月～令和6年3月

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

目 次

令和5年度（4月～3月）

(学位記番号)	(氏名)	(論文題目)	(頁)
博(医)甲第 661 号	富永 信太	Induced pluripotent stem cell-derived dendritic cell vaccine therapy genetically modified on the ubiquitin-proteasome system (ユビキチンプロテアソーム系を応用した遺伝子改変iPS樹状細胞ワクチン療法の開発)	… 1
博(医)甲第 662 号	上西 真也	Computational modeling of electric fields for prefrontal tDCS across patients with schizophrenia and mood disorders (統合失調症、双極性障害、うつ病における前頭前野経頭蓋直流電気刺激法の電界シミュレーション研究)	… 5
博(医)甲第 663 号	Musangile Yambayamba Fidele	Targeted Next-Generation Sequencing of Flat Urothelial Lesions Reveals Putative Pathobiological Pathways, Potential Biomarkers, and Rational Therapeutic Targets. (平坦状尿路上皮病変の多角的遺伝子解析に基づく発癌経路の推定とバイオマーカーの探索)	… 7
博(医)甲第 664 号	辻 郁在	Persistence of Kii amyotrophic lateral sclerosis after the 2000s and its characteristic aging-related tau astroglipathy (2000年代以降の紀伊筋萎縮性側索硬化症の持続とその特徴的な加齢に伴うタウ星膠症)	… 10
博(医)甲第 665 号	池田 奈津子	Structural connectivity between the hippocampus and cortical/subcortical area relates to cognitive impairment in schizophrenia but not in mood disorders (統合失調症及び気分障害における、海馬と大脳皮質、皮質下構造との構造学的結合性と認知機能との関係)	… 13
博(医)甲第 666 号	東野 信行	Feasibility and Safety of n-Butyl Cyanoacrylate-Lipiodol-Iopamidol as an Alternative Liquid Embolic Material (代替液体塞栓物質としてのn-ブチルシアノアクリレート-リピオドール-イオパミドールの実現可能性と安全性)	… 15
博(医)甲第 667 号	福田 耕大	Determination of the Optimal Ratio and the Relationship Between Viscosity and Adhesion of n-Butyl Cyanoacrylate-Lipiodol-Iopamidol for Balloon-Assisted Embolization of Wide-Neck Aneurysms in Swine (豚における広頸動脈瘤のバルーンアシスト下塞栓術におけるNBCA-リピオドール-イオパミドールの粘度と接着性の最適な比の決定とその関係)	… 17
博(医)甲第 668 号	坂田 真理子	Analysis of cytokine profiles in sera of single and multiple infantile hemangioma (単発性および多発性乳児血管腫の血清中サイトカインプロファイルの解析)	… 20

目 次

令和5年度（4月～3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第 669 号	藤本 幸太	A visualization system for erectile vascular dynamics (海綿体勃起制御機構の解明のための新規可視化システムの樹立) …	23
博(医)甲第 670 号	張 岩	Appendicular muscle mass index was stronger than body mass index in association with atherosclerosis in the community-dwelling elderly (地域在住高齢者において、四肢筋肉指数は体格指数より強く動脈硬化に関連していた) …	26
博(医)甲第 671 号	栗本 麻奈	Glycoprotein M6A upregulation detected by transcriptome analysis controls the proliferation of keloidal fibroblasts (ケロイド線維芽細胞におけるGPM6A発現亢進の増殖能への関与) …	29
博(医)甲第 672 号	小上 修平	Predictive value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio for treatment response in patients diagnosed with definite or probable autoimmune encephalitis/encephalopathy (自己免疫性脳炎/脳症の治療反応性に対する好中球リンパ球比率の有用性の検討) …	32
博(医)甲第 673 号	西岡 俊彦	Increased infiltration of CD4+ T cell in the complement deficient lymphedema model (補体欠損リンパ浮腫モデルにおいてCD4+T細胞の浸潤は増加する) …	34
博(医)甲第 674 号	吉田 朱里	Activation of transient receptor potential vanilloid 1 is involved in both pain and tumor growth in a mouse model of cancer pain (がん性痛モデルマウスにおいて、TRPV1の活性化はがん性痛と腫瘍増殖に関与する) …	37
博(医)甲第 675 号	田中 美奈子	Expression of collagen-related piRNA is dysregulated in cultured dermal fibroblasts de-rived from patients with scleroderma (強皮症患者から採取した培養皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン関連piRNAの発現異常) …	40
博(医)甲第 676 号	Nafisa Khamis Umar	Respiratory quinolones can eradicate amoxicillin-induced mature biofilms and nontypeable Haemophilus influenza in biofilms (レスピラトリーキノロンは、アモキシシリン誘発性成熟バイオフィームおよびバイオフィーム内の分類不能なインフルエンザ菌を根絶できる) …	44

目 次

令和5年度（4月～3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第 677 号	白川 裕二	Safety and Pitfalls of Blepharoptosis Surgery in Elderly People (高齢者における眼瞼下垂症手術の安全性と注意点)	... 47
博(医)甲第 678 号	玉井 英伸	Transient receptor potential ankyrin 1 in the knee is involved in osteoarthritis pain (膝関節内Transient receptor ankyrin1は変形性膝関節症の疼痛に關与する)	... 50
博(医)甲第 679 号	村田 顕優	A Bicortical Pedicle Screw in the Cephalad Trajectory Is the Best Option for the Fixation of an Osteoporotic Vertebra: A Finite Element Study (骨粗鬆症脊椎に椎弓根スクリューを刺入する際には椎体上位前方隅角に至るスクリューを選択すべきである：有限要素解析)	... 53
博(医)甲第 680 号	上野 健	Methylglyoxal activates transient receptor potential A1/V1 via reactive oxygen species in the spinal dorsal horn (メチルグリオキサールは脊髄後角において活性酸素種を介してtransient receptor potential A1/V1を活性化させる)	... 56
博(医)乙第 1040 号	平 一裕	Relationship of sagittal spinal alignment with low back pain and physical performance in the general population (大規模住民コホートにおける脊柱アライメント不良と腰痛・身体運動 機能との關連：The Wakayama Spine Study)	... 59
博(医)乙第 1041 号	江守 智哉	Contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasonography for predicting the efficacy of first-line gemcitabine and nab-paclitaxel chemotherapy in pancreatic cancer (切除不能膵癌患者の化学療法の効果・予後予測因子における造影ハーモニック超音波内視鏡下血流評価の有用性に関する検討)	... 62
博(医)乙第 1042 号	竹腰 信人	Analysis of Age, Sex, Lack of Response to Intravenous Immunoglobulin, and Development of Coronary Artery Abnormalities in Children With Kawasaki Disease in Japan (乳児の川崎病における冠動脈病変発生のリスクファクターについて-初回IVIG治療不応以外のリスクの可能性-)	... 65
博(医)乙第 1043 号	弘井 孝幸	An evaluation based on relative treatment intensity in older patients treated with reduced-dose R-THP-COP therapy for diffuse large B-cell lymphoma: A multicenter retrospective cohort study. (高齢びまん性大細胞型B細胞リンパ腫患者に対する減量R-THP-COP療法の相対的治療強度に基づく評価)	... 68

目 次

令和5年度（4月～3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)乙第 1044 号	平山 健太郎	Sustained lower bilirubin-binding affinity of albumin in extremely preterm infants (超早産児におけるアルブミン-ビリルビン結合親和性低下の遷延)	… 72
博(医)乙第 1045 号	植田 昇太	Retrospective study of the efficacy and safety of chemoembolization with drug-eluting microspheres combined with intra-arterial infusion of bevacizumab for unresectable hepatocellular carcinoma (切除不能肝細胞癌に対するベバシズマブ動注を併用した薬剤溶出性球状塞栓物質を用いた肝動脈化学塞栓療法の有効性と安全性に関する後方視的検討)	… 75
博(医)乙第 1046 号	安井 昌彰	Diagnostic utility of susceptibility-weighted imaging in amyotrophi lateral sclerosis (筋萎縮性側索硬化症におけるMRI SWIの診断上の有用性)	… 77
博(医)乙第 1047 号	鈴木 映美	Impaired healing in an incision wound in corneal stroma in a lumican-null mouse (ルミカン遺伝子欠損マウスにおける角膜実質の創傷治癒)	… 79
博(医)乙第 1048 号	阪田 麻友美	Japanese mucuna pruriens (Hasshou beans) showed faster and longer effects in Parkinson' s disease (日本産ムクナ豆—八升豆—はパーキンソン病患者においてより速くより長い抗パーキンソン病作用を示す)	… 81

学位記番号	博(医)甲第661号		
学位授与の日	令和5年5月16日		
氏名	富永 信太		
学位論文の題目	Induced pluripotent stem cell-derived dendritic cell vaccine therapy genetically modified on the ubiquitin-proteasome system (ユビキチンプロテアソーム系を応用した遺伝子改変 iPS 樹状細胞ワクチン療法の開発)		
論文審査委員	主査	教授 改正 恒康	
	副査	教授 川井 学	教授 橋本 真一

論文内容の要旨

【緒言】

樹状細胞 dendritic cells (DCs) は、T 細胞依存性の獲得免疫応答の始動及び増幅、さらには免疫監視機構を多方面から統御する最もプロフェッショナルな抗原提示細胞であり、抗腫瘍免疫においては中心的な役割を果たしている。ただ樹状細胞ワクチン療法を臨床応用する場合、樹状細胞を得るためには複数回のアフエーシスを要するため患者さんの負担が大きいこと、さらに担癌患者由来の樹状細胞は成熟能が低く、抗原提示能や遊走能も低いとされる。これらの問題を解決するために、安定した数と機能の DCs を供給できる新規ツールとして iPS 細胞に着目した。当教室ではこれまで、マウス iPSDCs は骨髄由来 DCs と同等の抗原提示能を有していることを報告した。また、健常人を用いた *in vitro* 系において、carcinoembryonic antigen (CEA) 遺伝子を導入した iPSDCs は CEA 特異的な cytotoxic T lymphocytes (CTLs) が誘導可能であった。さらに CEA トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 系において、CEA 遺伝子導入マウス iPSDCs ワクチンの抗腫瘍効果を認めた。また、担癌患者由来 iPSDCs に同患者の腫瘍由来 RNA を導入し、*in vitro* においてその抗腫瘍効果を示した。さらに、この腫瘍由来 RNA を導入した iPSDCs により誘導された CTLs が、neoantigen に対し免疫応答可能であることを報告した。この iPSDCs ワクチンの抗腫瘍効果をさらに増強させるべく、本研究において、より免疫原性の高い TAA として Mesothelin (MSLN) をターゲットとした。また、iPSDCs の抗原提示能を増強する工夫として、ユビキチンプロテアソーム系による抗原プロセッシングに着目した。ユビキチン (Ub) MSLN 融合遺伝子を iPSDCs に導入することで、MSLN 蛋白分解が亢進して抗原提示能が増強され、効率的に大量の MSLN 特異的 CTLs が誘導され、抗腫瘍効果も増強することを検証した。

【方法】

iPSDCs の分化誘導

3名の健常人ドナーの末梢血単核細胞 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)へ、センダイウイルスベクターにて山中4因子を遺伝子導入し、iPS細胞の樹立を行った。得られたiPS細胞をMatrigelコートしたdishでフィーダーレス培養を行い、その後5ステップ法にてiPSDCsへ分化誘導を行った。第1にbone morphogenetic protein (BMP)4を添加し4日間培養した。第2にvascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), stem cell factor (SCF)を添加したStemPro-34に置き換え2日間培養した。第3にSCF, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), thrombopoietin (TPO), Fms-related tyrosine kinase (Flt)-3 ligand, interleukin (IL)-3を添加したStemPro-34に変更し、7日間培養した。第4にM-CSF, Flt-3 ligand, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)を添加したStemPro-34に変更し、3日間培養した。浮遊してくる細胞をCD14抗体で標識し、auto MACS Proにて分離した。第5に回収した細胞をGM-CSF, IL-4を加え5日間培養した。

遺伝子組換えアデノウイルスベクターの構築とDCsへの遺伝子導入

MSLNをコードする組換えアデノウイルスベクターAxCAMSLNは、既報の通り、COS-TPC

(cosmid-terminal protein complex)法により作製した。β-gal をコードする AxCALacZ も COS-TPC 法により作製した。ユビキチン遺伝子は、PBMC ゲノム DNA から、5'プライマー (5' AGT CCG CTA GCC ACC ATG CAG ATC TTC GTG AAG ACC 3') と 3'プライマー (5' TAG TCC GTC GAC GTA TTT AAA TCG ACC CCC CCT CAA GCG CAG GAC 3') を用いて PCR により増幅させた。5'プライマーは Nhe I 制限部位、Kozak 配列 (CGCCACC), ATG 開始コドン を設けた。3'プライマーは、ユビキチンタンパク質の N 末端にリンカーとしてアルギニンを付加し、Swa I 制限部位を設けた。このモノマーユビキチン cDNA をコスミドベクター pAxCAwt に挿入し、ユビキチンを発現する遺伝子組換えコスミドを作製した。MSLN 遺伝子を Swa I 制限部位に挿入し、Ub-MSLN 遺伝子発現コスミドを作製した。Ub-MSLN をコードする AxCAubiquitin-MSLN は、COS-TPC 法により作製した。未熟な DCs に、遠心分離法を用いて、100 multiplicity of infection (MOI) で各組換えアデノウイルスベクターを感染させ、遺伝子改変 DCs を作製した。遺伝子組換え DC は、最終成熟を誘導するために rhIL-6, rhIL-1β, rhTNF-α, PGE2 の存在下で 2 日間培養した。

遺伝子改変 iPSDCs の成熟能の評価

単球由来樹状細胞 Monocyte-derived DCs (MoDCs) と iPS 細胞由来樹状細胞 (iPSDCs) の表面マーカー (CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, HLA-DR) の発現をフローサイトメトリにて評価した。遺伝子導入前、MSLN 遺伝子導入後、Ub-MSLN 融合遺伝子導入後のそれぞれの表面マーカーを比較検討した。

MSLN 特異的 CTLs の誘導と検出

PBMCs を MSLN 遺伝子導入 DCs と 20:1 の割合で 1 週毎に 3 回共培養刺激した。得られた細胞から auto MACS Pro にて CD8(+) CTLs を抽出した。CTLs は、HLA-A2 結合 MSLN エピトープペプチドの SLLFLLFSL (A2₂₀₋₂₈) および VLPLTVAEV (A2₅₃₀₋₅₃₈) のそれぞれ PE 標識ペンタマーと FITC 標識抗 CD8 抗体を組み合わせて染色し、フローサイトメトリを用いて解析した。

細胞傷害活性の評価

誘導した MSLN 特異的 CTLs と ⁵¹Cr をとりこませたターゲット細胞を用いて、⁵¹Cr-release assay にて細胞傷害活性を解析した。ターゲット細胞はそれぞれのドナーから樹立した Epstein-Barr virus (EBV)-transfected B-lymphoblastoid cell lines (LCLs) を用いた。

【結果】

MoDCs と iPSDCs の表面マーカーの発現

CD11c, CD86, HLA-ABC, HLA-DR の発現は MoDCs と iPSDCs で同等であったが、CD40, CD80, CD83 の発現は MoDCs と比べて iPSDCs では低かった。MSLN 遺伝子や Ub-MSLN 遺伝子導入前後で表面マーカー発現に変化はなかった。

MSLN 遺伝子導入 DCs により誘導した CTLs の細胞傷害活性

3 名の健常人ドナーから MSLN 遺伝子導入 MoDCs (MoDCs-MSLN) を作成した。いずれのドナーにおいても MoDCs-MSLN により誘導した CTLs は、MSLN 発現 LCLs に対する細胞傷害活性を示した。また、3 名の健常人ドナーから MSLN 遺伝子導入 iPSDCs (iPSDCs-MSLN) も作成した。いずれのドナーにおいても iPSDCs-MSLN により誘導した CTLs は、MSLN 発現 LCLs に対する細胞傷害活性を示した。

MSLN 由来ペプチドパルス LCLs に対する細胞傷害活性

iPSDCs-MSLN により誘導した CTLs が、MSLN 由来エピトープペプチドを認識していることを検証するため、これまでに同定されている複数の MSLN エピトープペプチドをそれぞれパルスした LCLs に対する細胞傷害活性を ⁵¹Cr-release assay にて評価した。HLA-A2/A24 陽性ドナー (ドナー A, B) では、HLA-A2 結合 MSLN ペプチド (A2₍₂₀₋₂₈₎, A2₍₅₃₀₋₅₃₈₎) と HLA-A24 結合 MSLN ペプチド (A24₍₄₄₂₋₄₅₁₎, A24₍₄₃₅₋₄₄₃₎, A24₍₄₇₅₋₄₈₃₎) それぞれを発現させた LCLs に対する細胞傷害活性を認めたのに対し、HLA-A2/A24 陽性ドナー (ドナー C) では、HLA-A2 結合 MSLN ペプチド (A2₍₂₀₋₂₈₎, A2₍₅₃₀₋₅₃₈₎)

を発現させた LCLs に対してのみ細胞傷害活性を認めた。

ユビキチンと MSLN の融合遺伝子を DCs に導入する効果

1. DCs 内での MSLN 蛋白分解の評価

免疫染色と FACS にて DCs 内 MSLN 蛋白発現を評価した。Ub-MSLN 融合遺伝子を導入すると MSLN 蛋白分解が亢進するため、MSLN 単独遺伝子導入 DCs と比べて DCs 内の MSLN 蛋白発現は低下した。一方、プロテアソーム阻害薬 (MG132) で処理した Ub-MSLN 融合遺伝子導入 DCs ではプロテアソームによる MSLN 蛋白分解が阻害され、DCs 内の MSLN 蛋白発現が回復した。

2. 誘導される CTLs 数の評価

MSLN 由来ペプチド発現 CTLs を認識する Pentamer により、誘導される MSLN 特異的 CTLs 数を評価した。MSLN 単独遺伝子導入 iPSDCs では検出される CTLs は 1.17% であったのに対し、Ub-MSLN 融合遺伝子導入 iPSDCs では検出される CTLs は 2.27% と約 2 倍に増加した。

3. 細胞傷害活性の評価

MSLN 単独遺伝子導入 iPSDCs で CTLs を誘導するよりも Ub-MSLN 融合遺伝子導入 iPSDCs で CTLs を誘導した方が、細胞傷害活性が上回るという結果が得られた。

【考察】

本研究の結果より、MSLN 遺伝子導入 iPSDCs により誘導された CTLs は、MSLN 特異的な細胞傷害活性を認めることを示した。また、誘導された CTLs は HLA 拘束性であることも確認した。我々はこれまでも TAA 遺伝子を導入した iPSDCs を用いたワクチン戦略を報告しており、本研究でも、MoDCs と比べて iPSDCs が抗原提示細胞として同等の能力を持つことを証明した。しかし、一部の表面マーカーの発現は MoDCs よりも iPSDCs の方が低く、分化プロトコールや成熟方法についてさらなる検討と改善が必要と考えられた。MSLN は多くの消化器癌に対する有力な腫瘍関連抗原であり、本研究の戦略は MSLN を発現する消化器癌の治療に応用されることが期待される。

本研究では iPSDCs のワクチン効果を増強する工夫として、ユビキチンプロテアソーム系による抗原のプロセッシングに着目した。Ub-MSLN 融合遺伝子を iPSDCs に導入することで、iPSDCs 内でユビキチンがあらかじめ結合した形で MSLN 蛋白が発現するため、MSLN 蛋白が効率的にプロテアソーム系へと誘導され、蛋白分解が亢進し、抗原提示能が増強されると考えた。iPSDCs 内の MSLN タンパク発現を免疫染色と FACS で評価することで、Ub-MSLN 融合遺伝子導入 iPSDCs では MSLN の蛋白分解が亢進しており、その蛋白分解はプロテアソームに依存することが示された。また Pentamer assay により、iPSDCs 内の MSLN 蛋白分解の亢進は、iPSDCs-UbMSLN における MSLN 由来エピトープペプチドの抗原提示能を高め、iPSDCs-MSLN と比べて MSLN 特異的 CTLs をより多く誘導することを示した。その結果、iPSDCs-UbMSLN は iPSDCs-MSLN と比べて細胞傷害活性も高める可能性が ^{51}Cr -release assay により示唆された。

結論として、ユビキチンと MSLN を同時に発現する遺伝子改変 iPSDCs ワクチンは、より多くの MSLN 特異的 CTLs を誘導し、より強力な細胞傷害活性をもたらすことを示した。今後 MSLN 発現腫瘍細胞株をターゲットとした検討や担癌患者の腫瘍を移植したマウスでの検討を経て、このワクチン戦略を確立していきたい。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和5年4月27日に論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。

樹状細胞dendritic cells (DCs) は、T細胞依存性の獲得免疫応答の始動及び増幅、さらには免疫監視機構を多方面から統御する最もプロフェッショナルな抗原提示細胞であり、抗腫瘍免疫においては中心的な役割を果たしている。ただ樹状細胞ワクチン療法を臨床応用する場合、樹状細胞を得るためには複数回のアフエレーシスを要するため患者さんの負担が大きいこと、さらに担癌患者由来の樹状細胞は成熟能が低く、抗原提示能や遊走能も低いとされる。これらの問題を解決するために、安定した数と機能のDCsを供給できる新規ツールとしてiPS細胞に着目した。当教室ではこれまで、マウスiPS

DCsは骨髄由来DCsと同等の抗原提示能を有していることを報告した。また、健常人を用いた*in vitro*系において、carcinoembryonic antigen (CEA)遺伝子を導入したiPSDCsはCEA特異的なcytotoxic T lymphocytes (CTLs)が誘導可能であった。さらにCEAトランスジェニックマウスを用いた*in vivo*系において、CEA遺伝子導入マウスiPSDCsワクチンの抗腫瘍効果を認めた。また、担癌患者由来iPSDCsに同患者の腫瘍由来RNAを導入し、*in vitro*においてその抗腫瘍効果を示した。さらに、この腫瘍由来RNAを導入したiPSDCsにより誘導されたCTLsが、neoantigenに対し免疫応答可能であることを報告した。このiPSDCsワクチンの抗腫瘍効果をさらに増強させるべく、本研究において、より免疫原性の高いTAAとしてMesothelin (MSLN)をターゲットとした。また、iPSDCsの抗原提示能を増強する工夫として、ユビキチンプロテアソーム系による抗原プロセッシングに着目した。ユビキチン (Ub) MSLN融合遺伝子をiPSDCsに導入することで、MSLN蛋白分解が亢進して抗原提示能が増強され、効率的に大量のMSLN特異的CTLsが誘導され、抗腫瘍効果も増強するかどうかを検証した。

その結果、(1) 3名の健常人ドナーからMSLN遺伝子導入iPSDCs (iPSDCs-MSLN)を作成し、いずれのドナーにおいてもiPSDCs-MSLNにより誘導したCTLsは、MSLN発現ターゲット細胞に対する細胞傷害活性を示したことを証明した。また、ユビキチンとMSLNの融合遺伝子をiPSDCsに導入する効果として、(2)-1 iPSDCs内のMSLNタンパク発現を免疫染色とFACSで評価することで、Ub-MSLN融合遺伝子導入iPSDCs (iPSDCs-UbMSLN)ではiPSDCs-MSLNと比較してiPSDCs内でのMSLNの蛋白分解が亢進しており、その蛋白分解はプロテアソームに依存することが示された。また、(2)-2 Pentamer assayにより、iPSDCs内のMSLN蛋白分解の亢進は、iPSDCs-UbMSLNにおけるMSLN由来エペトープペプチドの抗原提示能を高め、iPSDCs-MSLNと比べてMSLN特異的CTLsをより多く誘導することを示した。さらに、(2)-3 iPSDCs-UbMSLNはiPSDCs-MSLNと比べて細胞傷害活性も高める可能性が⁵¹Cr-release assayにより示唆された。これらの結果から、ユビキチンとMSLNを同時に発現する遺伝子改変iPSDCsワクチンは、より多くのMSLN特異的CTLsを誘導し、より強力な細胞傷害活性をもたらすことを示した。

以上により、本論文の検討の結果、ユビキチンプロテアソーム系を応用した遺伝子改変 iPS 樹状細胞ワクチン療法は、これまでの樹状細胞ワクチン療法よりも抗腫瘍効果が増強され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662号		
学位授与の日	令和5年9月26日		
氏名	上西 真也		
学位論文の題目	Computational modeling of electric fields for prefrontal tDCS across patients with schizophrenia and mood disorders (統合失調症、双極性障害、うつ病における前頭前野経頭蓋直流電気刺激法の電界シミュレーション研究)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 中尾 直之	教授 紀本 創兵

論文内容の要旨

【背景】

経頭蓋直流電気刺激 (transcranial direct current stimulation, tDCS) は、頭皮上から微量の直流電流を流すことで、大脳皮質の興奮性を調節する非侵襲的な神経刺激法である。tDCS の有効性は統合失調症 (SCZ)、双極性障害 (BP) やうつ病 (MDD) といった主要な精神疾患で報告されているが、個人ごとの構造的および機能的な神経解剖学的差異のために tDCS で生成される電界には大きな個人差が生じ、それが臨床効果の差に関連する可能性が指摘されている。近年は頭部 MRI による構造画像を用いて tDCS 施行時に脳内に生じる電界を個別にシミュレーションする技術が開発された。そこで今回我々は、SCZ、BP、MDD、健常対象者 (HC) の 4 群間で tDCS により生じる電界シミュレーション値を比較し、臨床症状との関連、電界シミュレーション値の個人差について検討した。

【方法】

対象は、SCZ 群 23 名、BP 群 24 名、MDD 群 23 名、HC 群 23 名である。精神症状の評価には陽性・陰性症状評価尺度、ヤング躁病評価尺度、ハミルトンうつ病評価尺度を用い、全般的機能の評価には機能の全体的評定 (GAF) 尺度を用いた。3 テスラの MRI で撮像した頭部 T1 強調画像を用い、電界値は SimNIBS ソフトウェア (ver.2.1.1) を用いてシミュレーションを行った。被験者の年齢、性別、診断について盲検化した上で、独立した 2 人の検査者が電解値を測定した。電極は左右の前頭前野に設置し、電流強度は 2mA、電極の大きさは 4.5cm×6.5cm、電極の厚さは 5mm、電極表面のスポンジの厚さは 6mm に設定した。導電率は SimNIBS のデフォルト設定とした。シミュレーションされた電界は、各被験者において SimNIBS ソフトウェアにより MNI 標準空間に自動的に投影された。SimNIBS で 75%、90%、95%、99%、99.5%での電界シミュレーション値を計算した。電界シミュレーション値の各パーセンタイルごとの群間比較には、分散分析と post hoc Tukey 検定、または Kruskal-Wallis H 検定と post hoc Mann-Whitney U 検定を用いた。ボクセルごとの電解シミュレーション値の年齢と性別を共変量とした群間比較には、FMRIB Software Library (FSL) の Randomise プログラムを用いた。有意差が認められたボクセルにおいて、電界シミュレーション値と精神症状、GAF 尺度、罹病期間、抗精神病薬投与量との相関を年齢と性別を共変数とした重回帰分析を行った。電界シミュレーション値の個人差については、目視での検討を行った。本研究は和歌山県立医科大学附属病院の倫理委員会によって承認され、ヘルシンキ宣言に則って行われた。

【結果】

SCZ 群と MDD 群において 99.5%の電界シミュレーション値は HC 群よりも有意に低下し、SCZ 群の両側前頭葉、小脳、脳幹の電界シミュレーション値は HC 群よりも有意に低下していた。SCZ 群において電界シミュレーション値の低下は、精神症状や GAF 尺度、罹病期間、抗精神病薬投与量に有意な相関を認めなかった。いずれの群においても、電界シミュレーション値は個人差が大きかった。以上の結果は 2 名の検査者で一致して認められた。

【考察】

本研究では、SCZ、BP、MDD、HCの4群間でtDCSにより生じる電界シミュレーション値を比較し、臨床症状との関連を検討した。SCZ群とMDD群において電界シミュレーション値の低下が認められ、前頭前野へのtDCSに対する電気生理学的反応が減弱している可能性が示唆された。SCZ患者においてtDCSの有効性に統一的な見解はないが、SCZにおいてはtDCSの刺激用量をより上げることが必要かもしれない。また、同一群内でも電界シミュレーション値には個人間の変動が大きく、実臨床での効果の差に関連する可能性を示唆した。そのため、今後はtDCSの施行前に電界値をシミュレーションし、刺激設定を個別調整していく必要があること、そして今後は、臨床的介入研究とシミュレーションを組み合わせることで、電界シミュレーション値と治療反応性の関連を検討していくことが必要と考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和5年7月3日及び7月6日に論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

経頭蓋直流電気刺激（transcranial direct current stimulation, tDCS）は頭皮上から微量の直流電流を流すことで、大脳皮質の興奮性を調節する非侵襲的な神経刺激法であり、精神疾患への有効性が示されている。しかし個人ごとの構造的および機能的な神経解剖学的差異のためにtDCSで生成される電界には大きな個人差が生じ、それが臨床効果の差に関連する可能性が指摘されている。本論文の目的は統合失調症23名、双極性障害24名、うつ病23名、健常者23名においてtDCSにより生じる電界をシミュレーションして各群間で比較し、臨床症状との関連や個人差について検討することであった。

3テスラのMRIで撮像した頭部T1強調画像を用い、電界値はSimNIBSソフトウェア（ver.2.1.1）を用いてシミュレーションを行った。被験者の年齢、性別、診断について盲検化した上で、独立した2人の検査者が電界値をシミュレーションした。電極は左右の前頭前野に設置し、電流強度は2mA、電極の大きさは4.5cm×6.5cm、電極の厚さは5mm、電極表面のスポンジの厚さは6mmに設定した。導電率はSimNIBSのデフォルト設定とした。シミュレーションされた電界は、各被験者においてSimNIBSソフトウェアによりMNI標準空間に投影された。SimNIBSで75%、90%、95%、99%、99.5%での電界シミュレーション値を計算し、電界シミュレーション値を各群間で比較検討した。

統合失調症群とうつ病群において99.5%の電界シミュレーション値は健常者群よりも有意に低下し、統合失調症群の両側前頭葉、小脳、脳幹の電界シミュレーション値は健常者群よりも有意に低下していた。統合失調症群において電界シミュレーション値の低下は、臨床症状、罹病期間、抗精神病薬投与量に有意な相関を認めなかった。いずれの群においても、電界シミュレーション値は個人差が大きかった。以上の結果は2名の検査者で一致して認められた。

本論文は統合失調症、双極性障害、うつ病、健常者の4群間でtDCSにより生じる電界シミュレーション値を疾患横断的に比較し、臨床症状との関連を検討した初めての報告である。統合失調症群とうつ病群において電界シミュレーション値の低下が認められ、前頭前野へのtDCSに対する電気生理学的反応が減弱している可能性が示唆された。同一群内でも電界シミュレーション値には個人間の変動が大きく、実臨床での効果の差に関連する可能性を示唆した。これらはtDCS施行時に刺激設定を個別に調整していく重要性を示すものであり、今後のtDCS治療において大きな意味を持つものであることから、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663号		
学位授与の日	令和5年9月26日		
氏名	Musangile Yambayamba Fidele		
学位論文の題目	Targeted Next-Generation Sequencing of Flat Urothelial Lesions Reveals Putative Pathobiological Pathways, Potential Biomarkers, and Rational Therapeutic Targets. (平坦状尿路上皮病変の多角的遺伝子解析に基づく発癌経路の推定とバイオマーカーの探索)		
論文審査委員	主査	教授 江幡 正悟	
	副査	教授 神人 正寿	教授 村田 晋一

論文内容の要旨

【背景】

尿路上皮癌(UC)は、時間的および空間的多発性を特徴としており、初期発生を考える上で平坦状尿路上皮病変の解析は重要である。平坦状尿路上皮病変は、反応性異型(RA)、意義不明の異型(AUS)、異形成(DYS)、上皮内癌(CIS)に分類されるが、臨床病理学的特徴や遺伝子異常についてはほとんど解析されていない。

【材料と方法】

対象は、83 症例より得られた正常尿路上皮(NU) (7 例) および計 119 検体の平坦状尿路上皮病変である。平坦状尿路上皮病変は、WHO 分類の基準に従い 4 群、すなわち RA (10 病変)、AUS (34 病変)、DYS (23 病変) および CIS (45 病変) に分類された。各病変について、臨床病理学的事項 (性別、年齢、喫煙歴、随伴 UC、UC の既往歴) を調べるとともに、UC に関与する 17 遺伝子 (ARID1A, CDKN2A-AS1, CREBBP, EGFR, EP300, ERBB2, ERBB3, ERCC2, FGFR3, HRAS, KDM6A, KRAS, NRAS, PIK3CA, RB1, TERT promoter, TP53) について標的次世代シーケンサー (NGS) 法を用いて解析した。また、遺伝子変異と膀胱内 bacillus Calmette-Guerin (BCG) 投与後の再発との相関を、Cox 回帰分析にて推定した。

【結果】

正常尿路上皮 NU および平坦状尿路上皮病変において、計 302 個の遺伝子異常(genetic mutation; GM)を認めた。頻度の高い GM は、TERT promoter (39%), TP53 (19%), FGFR3 (13%), PIK3CA (12%), ARID1A (9%), ERBB2 (9%)および KRAS (9%)であった。これらの GM は、AUS の 47%、DYS の 70%、CIS の 71%) のみならず、NU の 43%にも認められた。TERT promoter 変異は、AUS、DYS、CIS で高頻度に認めたが、NU や RA では認めなかった。AUS/DYS 群では ARID1A, KDM6A, EP300, CREBBP や FGFR3 の GM を、CIS 群では RB1, ERBB2(S310F/Y), KRAS(G12C)の GM を、有意に高頻度に認めた。pTaG2 腫瘍を伴い CIS を伴わない AUS/DYS-pTaG2 群(16 症例)と CIS を伴い pTaG2 腫瘍を伴わない AUS/DYS-CIS 群(16 症例)に分けた比較では、AUS/DYS-CIS 群と比較して、AUS/DYS-pTaG2 群で、FGFR3, ARID1A, PIK3CA および TP53 の GM の頻度が高かった。また、ERBB2(S310F/Y) および KRAS(G12C)変異は、CIS でのみ検出され、BCG 治療後の再発と有意に関連していた。

【考察】

本研究では UC の既往歴や喫煙歴のない正常尿路上皮にも GM を認めたことから加齢に伴う遺伝子異常の発癌への関与が示唆された。TERT promoter 変異は、NU や RA では認められず、AUS、DYS、CIS において高頻度に認められたことから、UC 発癌の重要なドライバー変異であると考えられた。AUS と DYS は、類似した遺伝子異常プロファイルを示し、CIS よりも予後が良いにも関わらず、FGFR3 を含めて多くの遺伝子に GM を認めた。一方、CIS では RB1, ERBB2(S310F/Y)と KRAS (G12C)の GM が有意に高頻度に認められた。

pTaG2 あるいは CIS のいずれかを伴う AUS/DYS の 2 群の比較から、TERT promoter や p53 の変異が関与する AUS/DYS から CIS への悪性転化(DYS-CIS pathway)と、多彩な遺伝子変異、特に FGFR3, ARID1A, PIK3CA の変異が関与する pTaG2 腫瘍への悪性転化(hyperplasia-related pathway)という異なった発癌経路の存在が推察された。一方、pTaG3 腫瘍では、AUS/DYS よりも CIS の併存が多いことや CIS の遺伝子異常プロファイルへの類似性を指摘する過去の報告を考えると、CIS と類似した発癌経路の関与が示唆された。

CIS における ERBB2(S310F/Y)と KRAS(G12C)は CIS の高い再発率と関連を示した報告は過去にない。これらの遺伝子異常には新規分子標的薬の開発が行われており、この新しい知見は予後予測のみならず、新しい治療戦略の観点からも、臨床的意義が高いと思われる。

以上、本研究は、多角的遺伝子解析を元に、平坦状尿路上皮病変が複数の異なった発癌機構を経て悪性転化することを明らかにするとともに、一部の遺伝子異常が CIS の予後推定や治療バイオマーカーとなり得ることを示した。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和5年7月24日、26日、28日に、学位申請者に対し、上記論文に関し、口頭試問による審査を行った。

【背景】

尿路上皮癌(UC)は、時間的および空間的多発性を特徴としており、発癌を考える上で平坦状尿路上皮病変の臨床病理学的特徴や遺伝子異常の解析は非常に重要である。

【材料と方法】対象は、83症例より得られた正常尿路上皮(NU) (7例) および計119検体の平坦状尿路上皮病変で、WHO分類に従い、RA (10病変)、AUS (34病変)、DYS (23病変) およびCIS (45病変) に分類された。各病変について、臨床病理学的事項 (性別、年齢、喫煙歴、随伴UC、UCの既往歴) を調べるとともに、UCに関与する17遺伝子 (ARID1A, CDKN2A-AS1, CREBBP, EGFR, EP300, ERBB2, ERBB3, ERCC2, FGFR3, HRAS, KDM6A, KRAS, NRAS, PIK3CA, RB1, TERT promoter, TP53) について標的次世代シーケンサー (NGS) 法を用いて解析した。また、CISの膀胱内BCG投与後の再発と遺伝子変異の相関を解析した。

【結果】

正常尿路上皮NUおよび平坦状尿路上皮病変において、計302個の遺伝子異常(genetic mutation; GM)を認めた。頻度の高いGMは、TERT promoter (39%), TP53 (19%), FGFR3 (13%), PIK3CA (12%)であった。これらのGMは、AUSの47%、DYSの70%、CISの71%のみならず、NUの43%にも認められた。TERT promoter変異は、AUS、DYS、CISで高頻度に認められたが、NUやRAでは認めなかった。AUS/DYS群ではARID1A, KDM6A, EP300, CREBBP やFGFR3のGMを、CIS群ではRB1, ERBB2(S310F/Y), KRAS(G12C)のGMを、有意に高頻度に認めた。次にCISを伴ったAUS/DYS群と比較して、AUS/DYS-pTaG2群では、FGFR3, ARID1A, PIK3CAおよびTP53のGMの頻度が高かった。また、ERBB2(S310F/Y) およびKRAS(G12C)変異は、CISでのみ検出され、BCG治療後の再発と有意に相関していた。

【考察】

本研究ではUCの既往歴や喫煙歴のない正常尿路上皮にもGMを認めたことから加齢に伴う遺伝子異常の発癌への関与が示唆された。特にTERT promoter変異は、UC発癌の重要なドライバー変異であると考えられた。AUSとDYSには、類似した遺伝子に多数のGMを認めた。また、TERT promoterやp53の変異が関与するAUS/DYSからCISへの悪性転化(DYS-CIS pathway)と、FGFR3, ARID1A, PIK3CAなどの多彩な遺伝子変異が関与するpTaG2腫瘍への悪性転化(hyperplasia-related pathway)という異なった発癌経路の存在が推察された。また、CISでは、ERBB2(S310F/Y)とKRAS (G12C)のGMが有意に高く、CISの高い再発率と相関を示した。これらの遺伝子異常には新規分子標的薬の開発が行われており、この新しい知見は予後予測のみならず、新しい治療戦略の観点からも、臨床的意義が高いと思われる。

以上、本論文は、多角的遺伝子解析を元に、平坦状尿路上皮病変が複数の異なった発癌機構を経て悪性転化することを明らかにするとともに、一部の遺伝子異常が CIS の予後推定や治療バイオマーカーとなり得ることを示したものであり、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664号		
学位授与の日	令和6年2月13日		
氏名	辻 郁在		
学位論文の題目	Persistence of Kii amyotrophic lateral sclerosis after the 2000s and its characteristic aging-related tau astroglialopathy (2000年代以降の紀伊筋萎縮性側索硬化症の持続とその特徴的な加齢に伴うタウ星膠症)		
論文審査委員	主査	教授 廣西 昌也	
	副査	教授 村田 晋一	教授 伊東 秀文

論文内容の要旨

【緒言】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、上位および下位運動ニューロン変性を特徴とする神経変性疾患であり、その病因は未だ解明されておらず、根本的な治療法も開発されていない。

ALSは神経病理学的所見として、神経細胞質内にTDP-43陽性神経細胞質内封入体が認められることから、TDP-43プロテインオパチーのひとつと考えられている。

本学の位置する紀伊半島南部では1960年代よりALSの多発が確認されてきた。とりわけ高集積地である古座地区においては、当時の有病率は本邦他地域の10倍程度に及んだ。さらに、同地域のALSは病理学的に通常のALSとは異なり、通常のALS病理に加え、タウ蛋白の病的な蓄積が認められることが明らかとなった。このため同疾患は紀伊ALSとよばれ、通常のALSとは異なる希少疾患として区別されることとなった。

その後時代が下り、紀南地域におけるALSの有病率は1980年代にかけて減少を示した。しかし2000年代に入ると、新たにかつての高集積地である古座の南方に位置する大島において、ALSの増加が報告された。

これまで紀伊ALSの剖検所見については、1960年代に古座地域を中心として発生した症例のものが報告されているが、このような時代の変遷および高集積地の移動に伴って、その病理学的特徴が変化したかどうかは不明である。

今回我々は、1970年代に発症した紀伊ALS症例と、2010年代以降に紀伊半島の南部およびそれ以外で発症したALS症例の病理所見を比較検討し、紀伊ALSが2000年代以降も発生し続けているのか、またその特徴的な病理像に変化が生じているかについて調査した。

さらに、近年、神経疾患のアストロサイトタウ病理をsystematicに評価する方法としてARTAGと呼ばれる概念が提唱され、各種タウオパチーについてその進展様式などが報告されている。我々は紀伊ALSについて初めて、ARTAGに基づいてアストロサイトタウ病理を検討した。

【対象と方法】

1. 対象

1970年代に発症し病理学的に診断された紀伊ALS症例4例(E-1~4)と、1999年以降に紀伊半島で発症したALS症例12例の神経病理学的所見を解析した。1999年以降に発症した症例のうち、紀伊ALSの多発地域である紀伊半島南部にて出生、以後在住していた5例をLS症例(LS-1~5)とし、紀伊半島北部にて出生、以後在住していた7例をLN症例(LN-1~7)とした。

2. 神経病理学的解析

10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した脳と脊髄をパラフィンに包埋し、探索部位を6 μ mで薄切し、切片を作製した。その後、HE染色、KB染色、および抗リン酸化タウ(pTau)抗体、抗リン酸化TDP-43(pTDP)抗体、抗アミロイド β 抗体を用いた免疫染色を行った。

pTDP病理の分析は、検索部位におけるpTDP陽性神経細胞質内封入体(NCI)(pTDP-NCI)の分布と量を評価した。評価方法は、200倍視野でpTDP-NCIの数(x)を数え、半定量化した(‘-’: x=0, ‘+’: 0<x \le 1, ‘++’: 1<x \le 5, ‘+++’: 5<x)。

pTau 病理の分析は、pTau 陽性神経細胞質内封入体 (pTau-NCI) および ARTAG の分布と量を評価した。pTau-NCI の評価方法は、過去の報告を踏襲し、100 倍視野で pTau-NCI の数(y)を数え、半定量化した ('-' : $y = 0$, '±' : $0 < y \leq 5$, '+' : $5 < y \leq 10$, '++' : $10 < y$ with scattered distribution, '+++': $10 < y$ with locally dense distribution, '++++': $10 < y$ with diffusely dense distribution)。さらに、'-' = 0, '±' = 1, '+' = 2, '++' = 3, '+++ = 4, '++++' = 5 とスコア化し、各症例ごとに全解析領域のスコアの平均値 (Average score(A))を算出し、E、LS、LN の各症例群ごとに(A)の平均値を求め、Wilcoxon の順位和検定にて有意差がないか検討した。ARTAG の分析は、Kovacs らにより定義された手法を用いた。軟膜下 (SP)、血管周囲 (PV)、白質 (WM)、上衣下 (SE)、灰白質 (GM) における分布を半定量化し、先行論文の分布パターンと比較した。

【結果】

1. pTDP 病理

全症例の脊髄およびほぼ全ての症例の運動野にて pTDP-NCI が認められ、ALS の診断に合致する所見であった。ただ、LS 症例では E 症例、LN 症例と比較し、出現範囲が広い傾向にあり、また内側・外側側頭葉においてより NCI の出現数が多い傾向であった。

2. pTau 病理

2-1. pTau-NCI

E 症例と LS 症例はいずれも pTau-NCI が脳全体から脊髄まで広範囲に出現しており、特に内側および外側側頭葉に出現量が多かった。大脳皮質において pTau-NCI は浅層優位に出現する特徴がある一方で、脳溝直下への集積はなく、また pTau 陽性 neuropil thread の出現は乏しかった。これらの特徴は以前より Kii ALS の pTau 病理の特徴とされるもので、アルツハイマー病、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、慢性外傷性脳症といった他のタウオパチーとは異なる所見であった。一方 LN 症例の pTau-NCI は限られた領域に少量出現するのみであった。半定量解析を行うと、各症例群ごとの pTau-NCI 出現量 ((A)の平均値)は E 症例と LS 症例では有意差がなかったが、LN 症例はこれらと比較し有意に少ない出現量であった。

2-2.ARTAG

SP、PV、WM、SE ARTAG は E 症例および LS 症例で出現が確認されたが、LN 症例ではこれらの ARTAG が認められなかった。GM ARTAG は、E 症例および LS 症例において一定量認められたが、LN 症例ではごく少量しか認められなかった。E 症例、LS 症例ともに GM ARTAG が脳幹に出現しているという共通点があった。Kovacs らによれば、non-FTLD tauopathy における GM ARTAG の出現は扁桃体もしくは線状体から始まるとされ、また FTLD tauopathy においても GM ARTAG の脳幹への出現は最後期であるとされる。我々の検討では E 症例全例および LS-5 症例において、GM ARTAG が扁桃体、線状体には認められないにも関わらず脳幹へ出現しており、これはこれまでに提唱されているいずれの疾患のパターンにも合致しておらず、Kii ALS の特徴的所見ではないかと考えられた。

【考察】

今回の検討では、pTDP-NCI は、E 症例、LS 症例、LN 症例の全てにおいて脊髄に出現しており、また多くの症例においては運動野にも認められ、通常の ALS に合致する所見であった。LS 症例では、E および LN 症例と比較し、より pTDP-NCI が特に内側・外側側頭葉を中心としてより広範囲、高密度に出現する傾向にあったが、通常の ALS においてもこのような pTDP-NCI 分布を示す症例が存在することは既知の事項であり、いずれの症例においても通常の ALS と明らかに異なるまで言える pTDP-NCI 病理は認められなかった。

一方 pTau-NCI 病理は、E 症例および LS 症例において同様の特徴が認められ、これは他の tauopathy の所見とは明確に異なり、以前より Kii ALS のタウ病理として報告されているものに合致した。このことから、LS 症例は病理学的には Kii ALS と診断するのが妥当と考えられた。すなわち、紀伊半島南部では 2010 年代以降も Kii ALS が発生し続けており、時代や高集積地の変遷に関わらず、疾患特有のタウ病理像は変化していないと考えられた。

さらに我々は初めて、ARTAG 分類法にて Kii および非 Kii ALS のグリアタウ病理を評価した。結果、E 症例および LS 症例(Kii ALS 症例)においては、他の tauopathy では出現しにくいとされる脳幹に

GM ARTAG が出現しているという特徴を明らかにし、これが Kii ALS の ARTAG 病理の特徴である可能性が示された。GM 以外の ARTAG も、Kii ALS 症例のみに出現していた。

ARTAG が形成されるメカニズムはまだ完全には明らかになっていないが、そのうち SP ARTAG については brain barrier dysfunction が形成に関与していると考えられており、これは脳震盪後にも生じると推定されている。興味深いことに、最近、Kii ALS 脳で検出される pTau-NCI の strain が慢性外傷性脳症のものと同様であることが報告された。このことより、Kii ALS と慢性外傷性脳症の間には、brain barrier dysfunction という共通の分子機構が存在し、それが Kii ALS の pTau-NCI や ARTAG 病理を形成している可能性も推測される。本疾患の病態解明のため、今後のさらなる研究継続が必要である。

【結論】

紀伊半島南部においては、2000 年以降も疾患特異的なタウ病理像を呈する Kii ALS が発生し続けていることが確認された。脳幹に優先的に GM ARTAG が出現する所見は、同疾患の病理学的特徴である可能性が考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和6年1月29日、論文審査委員は学位請求者の出席者を求め、上記論文についての審査を行った。

本論文の目的は、紀伊筋萎縮性側索硬化症(Kii ALS)が2000年代以降も発生し、時代の変遷に伴って特徴的な病理像に変化が生じているのか、また、近年提唱されたaging-related tau astrogliaopathy(ARTAG)の概念を用いてKii ALSのアストロサイトタウ病理に特徴を見出せるかどうかを明らかにすることである。

1970年代に発症し、神経病理学的にKii ALSと診断された4例(E症例)と、1999年代以降に発症した筋萎縮性側索硬化症(ALS)で、紀伊半島南部出身の5例(LS症例)、同年代に剖検した紀伊半島非南部出身の7例(LN症例)を対象とした。方法は、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した脳と脊髄をパラフィンに包埋し、探索部位を6 μ mで薄切し、切片を作製した。その後、HE染色、KB染色、免疫組織化学にて、病理像の比較検討をした。

リン酸化TDP-43(pTDP-43)病理では、全症例の脊髄にpTDP-43陽性神経細胞質内封入体(pTDP-NCI)を認め、ALSに合致する診断であった。また、LS症例では、EおよびLN症例と比較するとpTDP-NCIの出現範囲が広く、内側・外側側頭葉に出現量が多かった。リン酸化Tau(pTau)病理では、EおよびLS症例においてpTau陽性神経細胞質内封入体(pTau-NCI)が大脳から脊髄まで広範に認められ、内側・外側側頭葉に出現量が多かった。大脳皮質ではpTau-NCIが浅層優位に分布し、脳溝直下の集積はなく、threadの出現は乏しかった。これは、他のtauopathyとは異なる所見であり、以前よりKii ALSで報告されているpTau病理の特徴と同じであった。一方、LN症例のpTau-NCIは限られた領域のみで、EおよびLS症例と比較すると有意に少ない出現量であった。ARTAGは、EおよびLS症例では、subpial、perivascular、white matter、subependymalに認めたが、LN症例では認めなかった。Gray matter(GM) ARTAGは、E症例およびLS症例において一定量認めたが、LN症例ではごく少量しか認めなかった。また、GM ARTAGは、EおよびLS症例では全例の脳幹に出現しているにも関わらず、扁桃体や線条体を関与しない特徴的な分布を呈した。これはこれまでに提唱されているいずれの疾患のパターンにも合致しておらず、Kii ALSの特徴的所見ではないかと考えられた。

本論文は、Kii ALS が 2000 年代以降も紀伊半島南部に発生し続け、その病理像が変化していないこと、また、脳幹に優先的に GM ARTAG が出現する所見が同疾患の神経病理学的特徴である可能性を初めて示した報告であり、Kii ALS の病態解明や治療法につながる可能性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)甲第665号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	池田 奈津子		
学位論文の題目	Structural connectivity between the hippocampus and cortical/subcortical area relates to cognitive impairment in schizophrenia but not in mood disorders (統合失調症及び気分障害における、海馬と大脳皮質、皮質下構造との構造学的結合性と認知機能との関係)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 紀本 創兵

論文内容の要旨

【緒言】

統合失調症と気分障害において、白質微細構造異常や、海馬体積の減少、及び海馬の脳内ネットワークの構造異常が認知機能障害と関連することが明らかになりつつある。本研究では、統合失調症と気分障害において、海馬と大脳皮質及び皮質下領域との構造学的結合性と認知機能との関連を検討した。

【方法】

統合失調症群 19 名、双極性障害群 20 名、大うつ病性障害群 18 名、健常対照群 21 名を対象とした。海馬の構造学的結合性指標は、3 テスラ拡散テンソル画像を用いて、解析ソフトウェア FreeSurfer Ver.6.0 を用いて構造部位を同定し、FSL の ProbtrackX2 プログラムを用いて海馬と大脳皮質及び皮質下領域間の白質路を描出し、その構造学的結合性指標 (hippocampal structural connectivity) を算出した。認知機能の評価は、統合失調症認知機能評価簡易尺度の全般認知機能 (composite score) を用いた。精神症状は、統合失調症群は陽性・陰性評価尺度、双極性障害群はヤング躁病評価尺度、大うつ病性障害群はハミルトンうつ病評価尺度を用いた。4 群間での hippocampal structural connectivity の群間差、hippocampal structural connectivity と composite score、各疾患に対応する臨床症状評価尺度との相関をそれぞれ評価した。

【結果】

統合失調症群において、左右の海馬の構造学的結合性と composite score が正の相関を認めた。他の 3 群においては、海馬の構造学的結合性と composite score に有意な相関は認めなかった。4 群間において、海馬の構造学的結合性の有意な差は認めなかった。疾患群において、海馬の構造学的結合性と臨床評価尺度に有意な相関は認めなかった。いずれの疾患群も海馬の構造学的結合性と精神症状の重症度に相関を認めなかった。統合失調症群において、海馬の構造学的結合性と抗精神病薬のクロルプロマジン等価換算量に有意な相関は認めなかった。

【考察】

本研究では、統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害において、海馬と大脳皮質及び皮質下構造の構造学的結合性と認知機能との関連を疾患横断的に検討した。統合失調症において、海馬の構造学的結合性と認知機能との関連が示唆された。統合失調症において、海馬の構造学的結合性が認知機能の神経基盤の一つとなる可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 5 年 8 月 21 日及び 8 月 29 日に、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

統合失調症と気分障害において認知機能障害は共通する特徴であり、その病態生理は重要な研究対象である。先行研究では、統合失調症や気分障害で、白質微細構造異常や、海馬体積の減少と認知機

能との関連が報告されている。本論文では、統合失調症と気分障害において、海馬と大脳皮質及び皮質下領域との構造学的結合性と認知機能、精神症状との関連を、疾患横断的に比較検討することを目的とした。

統合失調症群 19 名、双極性障害群 20 名、大うつ病性障害群 18 名、健常対照群 21 名を対象とした。画像は、MRI で撮像した拡散テンソル画像を用いて、解析ソフトウェア FreeSurfer Ver.6.0 及び、FSL の ProbtrackX2 プログラムを用いて海馬と大脳皮質及び皮質下領域間の白質路における海馬の構造学的結合性指標を算出した。認知機能の評価は、統合失調症認知機能評価簡易尺度の全般認知機能を表す composite score を用いた。統合失調症群において、左右の海馬の構造学的結合性と composite score が正の相関を認めた。他の 3 群においては、海馬の構造学的結合性と composite score に有意な相関は認めなかった。4 群間において、海馬の構造学的結合性に有意差は認めなかった。

本論文は、統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害において、海馬と大脳皮質及び皮質下構造の構造学的結合性と認知機能との関連を疾患横断的に検討した貴重な報告である。統合失調症において、左右の海馬の構造学的結合性と認知機能との関連が示唆された。これは、統合失調症をはじめとした精神疾患における認知機能障害の病態生理の解明の一助となる報告であり、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)甲第666号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	東野 信行		
学位論文の題目	Feasibility and Safety of n-Butyl Cyanoacrylate-Lipiodol-Iopamidol as an Alternative Liquid Embolic Material (代替液体塞栓物質としての n-ブチル シアノアクリレート - リピオドール - イオパミドールの実現可能性と安全性)		
論文審査委員	主査	教授 西村 好晴	
	副査	教授 中尾 直之	教授 園村 哲郎

論文内容の要旨

【緒言】

n-butyl cyanoacrylate (NBCA)は活動性出血や血管奇形などの経カテーテル的治療に使用される液体塞栓物質である。X線透視下で見えるように油性造影剤の Lipiodol と混和し、NBCA-Lipiodol 混和液 (NL) として使用される。NL を用いた治療は低コストで手技時間が短く、凝固能に依存することなく塞栓が可能であるという利点がある。しかし、NL は接着性が強いため、カテーテルと血管壁の固着を生じることがある。そこで、我々は NL に非イオン性水溶性造影剤 (イオパミロン) を混和することで NBCA-Lipiodol-Iopamidol 混和液 (NLI) を開発した。NLI は接着性が低く、動脈瘤のバルーン併用下塞栓術が可能であると考えられた。本研究では基礎実験で動脈瘤塞栓術に適した NLI の混合比を決定し、豚の動物実験で NLI を用いた動脈瘤のバルーン併用下塞栓術の実現可能性と安全性を検討した。

【方法】

■基礎実験

NLI は NL にイオパミロンを加え 2.5mL シリンジと 3 方活栓を用いたポンピング法で作製された。NLI 混合比は NBCA:Lipiodol:Iopamidol=1:1:1 (NLI 111), 1:2:1 (NLI 121), 1:3:1 (NLI 131), 2:2:1 (NLI 221), 2:3:1 (NLI 231), 2:4:1 (NLI 241), 1:2:0 (NL 12) の 7 種類とした。各混合比の NLI を生理食塩水内に滴下し、形状を肉眼的に観察した。

■動物実験

豚 4 頭の両側総頸動脈と外腸骨動脈に 14 個の広頸動脈瘤を作製した。12 個の動脈瘤を NLI 231、試験群として 2 つの動脈瘤を NL12 を用いてをバルーン併用下で塞栓した。試験群として NL 12 を用いて 2 つの動脈瘤モデルをバルーン閉塞下で塞栓した。動脈造影で塞栓物質の移動、塞栓物質とバルーンやカテーテルの接着の有無および塞栓術の成否を評価した。

【結果】

■基礎実験

NLI の肉眼的形状は noodle-type (NT)、single large droplet (SLD)、medium droplets (MD)、small droplets (SD) に分類した (図 1)。NLI 111 は NT、NLI 121 は SLD、NLI 131 は MD、NLI 221 は SLD、NLI 231 は SLD/MD、NLI 241 は MD、NL12 は SD の形状であった (表 1)。

■動物実験

NLI 231 を用いた塞栓術では、12 個全ての動脈瘤で NLI の移動や NLI とバルーンやカテーテルの接着はなく、完全な塞栓術が達成された (図 2)。一方、NL12 を用いた塞栓術では 2 個の動脈瘤で NL が親動脈に漏出し、バルーンやカテーテルが血管壁に接着した (図 3)。

【考察】

基礎実験では NLI は混合比によって形状が変化することが明らかとなった。この変化はイオパミロンが NBCA の重合に影響を及ぼしているためと考えられた。NL にイオパミロンを加えると徐々に重合が始まり、イオパミロンの比率が高くなるにつれて重合速度が速くなった。イオパミロンの比率が最も高い NLI 111 では NT の形状となり、イオパミロンの比率が下がるにつれて SLD、MD、SD の順に形状が変化した。動脈瘤の治療では SLD のような形状が適していると考えられるが、MD や SD などの形状は末梢の血管塞栓術で有用である可能性がある。動物実験では 12 個すべての動脈瘤で NLI 231 を用いたバルーン併用下塞栓術は成功したが、NL12 を用いた塞栓術では注入直後に塞栓物質がバルーンと血管壁の間に漏出した。これは NLI 231 と NL12 の形状の差が関係していると考えられ、SD の形状は動脈瘤の塞栓に適していないと考えられた。また、NLI 231 はバルーンやカテーテルと接着しなかったが、NL12 はバルーンやカテーテルに接着した。つまり、NLI 231 は接着性が低減された液体塞栓物質であると考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和 5 年 9 月 1 日と 4 日に論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

n-butyl cyanoacrylate (NBCA) は活動性出血や血管奇形などの経カテーテル的治療に使用される液体塞栓物質である。X 線透視下で見えるように油性造影剤の Lipiodol と混和し、NBCA-Lipiodol 混和液 (NL) として使用される。NL を用いた治療は低コストで手技時間が短く、凝固能に依存することなく塞栓が可能であるという利点がある。しかし、NL は接着性が強いため、カテーテルと血管壁の固着を生じることがある。そこで、我々は NL に非イオン性水溶性造影剤 (イオパミロン) を混和することで NBCA-Lipiodol-Iopamidol 混和液 (NLI) を開発した。NLI は接着性が低く、動脈瘤のバルーン併用下塞栓術が可能であると考えられた。本研究では基礎実験で動脈瘤塞栓術に適した NLI の混合比を決定し、豚の動物実験で NLI を用いた動脈瘤のバルーン併用下塞栓術の実現可能性と安全性を検討した。NLI は NL にイオパミロンを加え 2.5mL シリンジと 3 方活栓を用いたポンピング法で作製された。NLI 混和比は NBCA:Lipiodol:Iopamidol=1:1:1 (NLI 111), 1:2:1 (NLI 121), 1:3:1 (NLI 131), 2:2:1 (NLI 221), 2:3:1 (NLI 231), 2:4:1 (NLI 241), 1:2:0 (NL 12) の 7 種類とした。各混合比の NLI を生理食塩水内に滴下し、形状を肉眼的に観察した。豚 4 頭の両側総頸動脈と外腸骨動脈に 14 個の広頸動脈瘤を作製した。12 個の動脈瘤を NLI 231、試験群として 2 つの動脈瘤を NL12 を用いて用いてバルーン併用下で塞栓した。試験群として NL 12 を用いて 2 つの動脈瘤モデルをバルーン閉塞下で塞栓した。動脈造影で塞栓物質の移動、塞栓物質とバルーンやカテーテルの接着の有無および塞栓術の成否を評価した。NLI の肉眼的形状は noodle-type (NT)、single large droplet (SLD)、medium droplets (MD)、small droplets (SD) に分類した。NLI 111 は NT、NLI 121 は SLD、NLI 131 は MD、NLI 221 は SLD、NLI 231 は SLD/MD、NLI 241 は MD、NL12 は SD の形状であった。この変化はイオパミロンが NBCA の重合に影響を及ぼしているためと考えられた。イオパミロンの比率が最も高い NLI 111 では NT の形状となり、イオパミロンの比率が下がるにつれて SLD、MD、SD の順に形状が変化した。動脈瘤の治療では SLD のような形状が適していると考えられるが、MD や SD などの形状は末梢の血管塞栓術で有用である可能性がある。NLI 231 を用いた塞栓術では、12 個全ての動脈瘤で NLI の移動や NLI とバルーンやカテーテルの接着はなく、完全な塞栓術が達成された。一方、NL12 を用いた塞栓術では 2 個の動脈瘤で NL が親動脈に漏出し、バルーンやカテーテルが血管壁に接着した。これは NLI 231 と NL12 の形状の差が関係していると考えられ、SD の形状は動脈瘤の塞栓に適していないと考えられた。また、NLI 231 はバルーンやカテーテルと接着しなかったが、NL12 はバルーンやカテーテルに接着した。つまり、NLI 231 は接着性が低減された液体塞栓物質であると考えられた。NLI 231 は豚の広頸動脈瘤のバルーン併用下塞栓術において実現可能で安全な液体塞栓物質である。

本論文は NBCA の接着性が低減された新しい液体塞栓物質であり、学位論文として価値あるものと認められた。

学位記番号	博(医)甲第667号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	福田 耕大		
学位論文の題目	Determination of the Optimal Ratio and the Relationship Between Viscosity and Adhesion of n-Butyl Cyanoacrylate-Lipiodol-Iopamidol for Balloon-Assisted Embolization of Wide-Neck Aneurysms in Swine (豚における広頸動脈瘤のバルーンアシスト下塞栓術におけるNBCA-リピオドール-イオパミドールの粘度と接着性の最適な比の決定とその関係)		
論文審査委員	主査	教授 西村 好晴	
	副査	教授 中尾 直之	教授 園村 哲郎

論文内容の要旨

【はじめに】

NBCA-Lipiodol (NL)は、経カテーテル的動脈塞栓術における塞栓物質として広く使用されている。しかし、NLは強い接着性を有し、カテーテルに接着する危険性がある。このため、NLを用いたバルーン併用下での動脈塞栓術は難しい。最近、NLにIopamidolを加えたNBCA-Lipiodol-Iopamidol (NLI)の有用性が報告された。NLIでは、カテーテルから注入する直前にNLにIopamidolを加えることで、NBCAの重合が緩徐に始まる。したがって、NLIはカテーテルから血管内に注入された直後に高速で重合する。NLIは血管内で速やかに固形化するために接着性が低く、バルーン併用下で動脈瘤の塞栓術が可能である。しかし、NLIの混合比については十分な検討が行われていない。NLIの重合が過度に促進されれば、マイクロカテーテルからの注入ができなくなる。反対に、重合の促進が軽度であれば、接着性が残存すると考えられる。そこで、NLIの各混合比における重合変化や接着性を基礎的に検討し、各混合比の特性を把握することが重要である。本研究の目的は、基礎実験で各混合比のNLIの重合や接着性の変化を検討し、豚を用いた動物実験で動脈瘤のバルーン併用下塞栓術におけるNLIの最適な混合比を決定することである。

【対象と方法】

■基礎実験

NLIの作製

NLIはNLにIopamidol (370mg)を加えて作製された。NLIの混合比は1:1:1、1:2:1、1:3:1、1:4:1、2:1:1、2:2:1、2:3:1、2:4:1、3:1:1、3:2:1、3:3:1、3:4:1、4:1:1、4:2:1、4:3:1、4:4:1の16通りとした。

NLIの重合の経時的変化

粘度計を用いて粘稠度を計測することで重合状態を評価した。

NLIのマイクロカテーテルからの注入

マイクロカテーテルから各混合比のNLIを注入し、注入の可否を5回評価した。

NLIの接着性

豚の血液を満たしたシリコンチューブ内に各混合比のNLIを注入し、マイクロカテーテル先端をチューブ内に放置した。その後、マイクロカテーテルが抜去可能であるか否かによって、NLIの接着性を5回評価した。

■動物実験

雌豚4頭の両側総頸動脈および外腸骨動脈に広頸動脈瘤が作製された(n=16)。動脈瘤作製後すぐに基礎実験で動脈瘤の塞栓術に適していると考えられた混合比のNLIを用いて動脈瘤の塞栓術が行われた。動脈瘤内にマイクロカテーテルを挿入し、バルーンカテーテルを動脈瘤の頸部まで進めた。バル

ーンの拡張後に各混合比の NLI がマイクロカテーテルから透視下で注入された。NLI の注入後、マイクロカテーテルは抜去され、3 分間バルーン拡張を継続した。バルーンカテーテルを抜去し、塞栓術後の動脈造影が行われた。NLI とバルーンやカテーテルの接着の有無、NLI の親動脈への migration の有無および動脈瘤塞栓術の成否を評価した。動脈瘤と親動脈を摘出し、病理組織学的な検討を行った。

【結果】

■基礎実験

NLI の重合の経時的变化

Iopamidol の比率が 1/6 より大きい NLI では、粘稠度の上昇が認められた。比率が 1/6 未満の NLI では、粘稠度の上昇が認められなかった。比率が 1/6 の NLI では、NLI141 と 231 で粘稠度の上昇が見られ、NLI321 と 411 で粘稠度の上昇が認められなかった。

NLI のマイクロカテーテルからの注入

Iopamidol の比率が 1/6 より大きい NLI では、NLI のマイクロカテーテルからの注入が不可能であった。比率が 1/6 以下の NLI では、NLI のマイクロカテーテルからの注入が可能であった。

NLI の接着性

NLI141 と 231 ではマイクロカテーテルとシリコンチューブの接着が認められなかった。

■動物実験

基礎実験でマイクロカテーテルからの注入が可能で接着性が低い NLI141 と 231 が塞栓物質として用いられた。NLI141 を用いた塞栓術では 7 個中 6 個の動脈瘤でバルーンのデフレーション直後に親動脈への NLI の migration が認められ、塞栓術は不成功であった。NLI231 を用いた塞栓術では 8 個全ての動脈瘤で NLI の migration がなく、完全な塞栓術が確認された。病理組織学的には、NLI は動脈瘤内に充満し、動脈瘤壁に炎症性細胞浸潤が見られた。

【考察】

基礎実験では、Iopamidol の比率を上げると NLI の重合速度が速くなり、固化が進み、接着性が低くなることがわかった。一般的に接着剤の接着性には機械的結合が関与しており、液状であるほど接着性は高くなる。NL に Iopamidol を加えることで、重合速度が速くなり、NLI は血液内で速やかに表面が固化する。このため、機械的結合によるアンカー効果が減弱すると考えられる。しかし、Iopamidol の比率が 1/6 より大きいと NLI はマイクロカテーテル内で重合が進み、NLI をマイクロカテーテルから注入できなくなる。逆に Iopamidol の比率が 1/6 未満の NLI は重合が緩徐であり、マイクロカテーテルからの注入は可能であるが、接着性が残存し、カテーテルに接着することがわかった。そのため、バルーン併用下での NLI の注入は不可能であることがわかった。Iopamidol の比率が 1/6 の NLI については、いずれもマイクロカテーテルからの注入が可能であり、接着性の低い NLI231 と 141 は動脈瘤のバルーン併用下塞栓術に適していると考えられた。豚を用いた動物実験では、NLI141 を用いた塞栓術で 7 個中 6 個の動脈瘤で NLI の migration が見られ、NLI231 を用いた塞栓術で 8 個全ての動脈瘤で NLI の migration が認められなかった。この理由として、NLI の NBCA 濃度が関係していると思われる。NLI231 の NBCA 濃度は約 33%であるのに対し、NLI141 の NBCA 濃度は約 17%である。NBCA 濃度が 30%以上の混合液では migration が起こりにくいという報告があり、NLI141 の NBCA 濃度が低かったことが migration の原因の一つと考えられる。以上から、広頸動脈瘤のバルーン併用下塞栓術における NLI の最適な混合比は 2:3:1 であった。

【結論】

基礎実験から非接着性でマイクロカテーテルからの注入が可能な NLI の混合比は 1:4:1 と 2:3:1 であった。また、豚の広頸動脈瘤のバルーン併用下塞栓術における最適な NLI の混合比は 2:3:1 であると考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和5年9月1日と4日に論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、本論文についての審査を行った。

NBCA-Lipiodol (NL)は、血管内治療の塞栓物質として広く使用されている。しかし、NLは強い接着性を有し、カテーテルに接着する危険性がある。最近、NLにIopamidolを加えたNBCA-Lipiodol-Iopamidol (NLI) の有用性が報告された。NLIは血管内で速やかに固形化するために接着性が低い特性がある。しかし、NLIの混合比については十分な検討が行われていない。そこで、NLIの各混合比における重合変化や接着性を基礎的に検討し、各混合比の特性を把握することが重要であると考えた。基礎実験で各混合比のNLIの重合や接着性の変化を検討し、豚を用いた動物実験で動脈瘤のバルーン併用下塞栓術におけるNLIの最適な混合比を選定した。

NLIはNLにIopamidolを加えて作製された。NLIの混合比は1:1:1、1:2:1、1:3:1、1:4:1、2:1:1、2:2:1、2:3:1、2:4:1、3:1:1、3:2:1、3:3:1、3:4:1、4:1:1、4:2:1、4:3:1、4:4:1の16通りとした。まず、NLIの粘稠度を計測することで重合状態を評価した。次に、マイクロカテーテルから各混合比のNLIを注入し、注入の可否を評価した。最後に、血液を満たしたシリコンチューブ内に各混合比のNLIを注入し、マイクロカテーテルが抜去可能であるか否かによって、NLIの接着性を評価した。

動物実験は雌豚4頭を使用し、両側総頸動脈および外腸骨動脈に広頸動脈瘤が作製された(n=16)。動脈瘤作製後すぐに基礎実験で動脈瘤の塞栓術に適していると考えられた混合比のNLIを用いてバルーン閉塞下の動脈瘤の塞栓術が行われ、NLIとバルーンやカテーテルの接着の有無、NLIの親動脈へのmigrationの有無および動脈瘤塞栓術の成否を評価した。

基礎研究の結果から、Iopamidolの比率が1/6より大きいNLIでは、粘稠度の上昇が認められた。比率が1/6のNLIでは、NLI141と231で粘稠度の上昇が見られ、NLI321と411で粘稠度の上昇が認められなかった。比率が1/6以下のNLIでは、NLIのマイクロカテーテルからの注入が可能であり、接着性が低いこともわかった。そのため、動物実験では接着性が低いNLI141と231が塞栓物質として用いられた。NLI141を用いた塞栓術では7個中6個の動脈瘤で親動脈へのNLIのmigrationが認められ、塞栓術は不成功であった。NLI231を用いた塞栓術では8個全ての動脈瘤でNLIのmigrationがなく、完全な塞栓術が確認された。

本論文により基礎実験から非接着性でマイクロカテーテルからの注入が可能な NLI の混合比は 1:4:1 と 2:3:1 であることや、豚の広頸動脈瘤のバルーン併用下塞栓術における最適な NLI の混合比は 2:3:1 であると考えられたことから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第668号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	坂田 真理子		
学位論文の題目	Analysis of cytokine profiles in sera of single and multiple infantile hemangioma (単発性および多発性乳児血管腫の血清中サイトカインプロファイルの解析)		
論文審査委員	主査	教授 朝村 真一	
	副査	教授 神人 正寿	教授 川股 知之

論文内容の要旨

【はじめに】

乳児血管腫 (IH) は良性の血管性腫瘍であり、人口の約 5-10% に発生する。出生時には存在しないか、毛細血管拡張などの前駆病変として現れることがある。その後、急速に増大する増殖期を経て、数年かけて徐々に縮小する退縮期となる。増殖期の IH は部位や大きさによっては潰瘍や機能障害などの合併症を引き起こし、皮膚や眼など他の臓器に永続的な変化をもたらすことがある。そのような高リスク病変に対しては、現在 β 遮断薬が第一選択薬となっている。

IH はその成長、大きさ、部位、あるいは深度が様々であり、患者の約 5 分の 1 は多発性病変を有する。IH の危険因子は、女児、低出生体重、多胎妊娠、早産、プロゲステロン療法、家族歴などが知られているが、多発性病変を引き起こすメカニズムは不明である。

我々は最近、出生時に存在する IH と出生後に出現する IH を比較し、後者が多発する傾向があることを見出した。出生時に存在する IH は局所的な誘因によって引き起こされる可能性が高いこと、そして出生後に出現する多発性 IH は局所的な誘因に加え、全身の新血管形成や出生後の知覚神経成長に関わるサイトカインなど、全身性の要因によって引き起こされるという仮説を有している。

今回我々は、単発および多発性 IH の患者血清とメンブレンアレイを用いて、この仮説の立証を試みた。

【方法と材料】

1. 臨床評価と患者材料

血清サンプルは、治療前の増殖期の多発性 IH (n=5, 症例 1-5) および単発性 IH (n=4, 症例 6-9) の乳児から採取した。症例 1 では 4 病変、症例 3 では 3 病変、症例 2, 4, 5 では 2 病変に存在した。血清採取時の患者年齢は生後 1 ヶ月から 13 ヶ月で、全例女児で表在型であった。

2. 血清サイトカインレベルの測定

ヒト血管新生抗体 Array-Membrane (Abcam, Cambridge, UK) を用いて 20 種類のサイトカイン (angiogenin, EGF, ENA-78, bFGF, GRO, IFN-γ, IGF-I, IL-6, IL-8, leptin, MCP-1, PDGF-BB, PIGF, RANTES, TGF-β1, TIMP-1, TIMP-2, thrombopoietin, VEGF, VEGF-D) の血清中の発現量を測定した。画像は ChemDoc (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて取得した。Image J を用いて定量化を行った。

3. 統計解析

中央値の比較のために Mann-Whitney の U 検定を用い、相関はピアソンの相関係数で評価した。有意水準は 0.05 未満とした。

【結果】

患者の血清からは、様々なサイトカインが検出された。EGF、MCP-1、PDGF-BB、RANTES、TIMP-1、および TIMP-2 は多発性および単発性病変のすべての乳児に検出された。20 種類のサイトカインのうち 4 種類 (bFGF、IFN-γ、IGF-I、TGF-β1) の発現は、多発性 IH で単発性 IH より統計

学的に有意に高かった ($P < 0.05$)。特に、IFN- γ は多発例ではすべての症例で検出されたが、単発例では1例も検出されなかった。

IH 患者における4つのサイトカイン間の発現の相関をピアソンの相関係数で評価した。有意ではないが、IFN- γ と IGF-I ($r=0.64$, $P=0.065$)、IGF-I と TGF- $\beta 1$ ($r=0.63$, $P=0.066$) には緩徐な相関がみられた。

サイトカイン発現と病変数の相関の解析では、多発性 IH で発現が上昇している4つのサイトカインのうち、bFGF 値が病変数と強く有意に相関していた ($R=0.88$, $P=0.0020$)。

【考察】

IH の腫瘍形成には様々なサイトカインが関与していると考えられている。本研究で IH の全患者の血清に共通して発現したサイトカインは EGF、MCP-1、PDGF-BB、RANTES、TIMP-1、TIMP-2 の6種類で、MCP-1 を除き過去の報告と一致していた。Gordillo らは、MCP-1 が内皮細胞による血管新生を刺激して血管腫病変の成長を促進する可能性を示唆する一方で D'Arcangelo らは血清 MCP-1 レベルが退縮マーカーとして活用できる可能性に言及している。

サイトカインと IH の数との相関を確認した検討は過去に存在しない。本研究において多発性 IH の患者では、単発性 IH の患者と比較して bFGF、IFN- γ 、IGF-I、TGF- $\beta 1$ の発現が有意に高く、これらのサイトカインが多発性 IH の病態形成に関連している可能性があることが示された。また、統計学的に有意ではないが、IFN- γ と IGF-I、あるいは IGF-I と TGF- $\beta 1$ の間には緩徐な相関があり、これらのサイトカインの発現は独立しておらず、同じ上流因子によって誘導されている可能性が示唆された。

IFN- γ の発現はすべての多発性 IH の血清にのみ認められたが、このサイトカインは血管内皮細胞の増殖活性の抑制や血管腫細胞のアポトーシス促進を通じて独特な抗腫瘍効果を持つと考えられている。また、IGF は内皮細胞の遊走や管形成、血管腫幹細胞の増殖や脂肪細胞への分化を促進する。耳下腺 IH では TGF- $\beta 1$ の発現が報告されており、腫瘍増殖への寄与が示唆されている。

さらに、多発性 IH の血清中に増加するサイトカインのうち、bFGF 値は病変数と相関した。bFGF は、新生血管の形成と増殖を強く促進する。Park らは、IH 病変の最大径が VEGF、MMP-9、あるいは bFGF の血清濃度と有意に相関することを報告しており、bFGF 値は IH の大きさと数の両者に関連する可能性がある。

【結論】

本研究により、bFGF、IFN- γ 、IGF-I、さらには TGF- $\beta 1$ が多発性 IH の病態形成に関与する可能性、そして bFGF が IH の大きさと数の両者のマーカーとなる可能性があることをはじめて示した。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和5年10月3日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

乳児血管腫 (IH) は良性の血管性腫瘍であり、人口の約5-10%に発生する。出生時には存在しないか、毛細血管拡張などの前駆病変として現れることがあり、その後、急速に増大する増殖期を経て、数年かけて徐々に縮小する退縮期となる。増殖期の IH は潰瘍や機能障害などの合併症を引き起こし、皮膚や眼など他の臓器に永続的な変化をもたらすことがある。IH はその成長、大きさ、部位、あるいは深度が様々であり、患者の約5分の1は多発性病変を有するが、多発性病変を引き起こすメカニズムは不明である。我々はこれまでの検討により出生時に存在する IH と出生後に出現する IH の比較では、後者が多発する傾向があり、出生時に存在する IH は局所的な誘因によって引き起こされる可能性が高いこと、そして出生後に出現する多発性 IH は局所的な誘因に加え、全身の新生血管形成や出生後の知覚神経成長に関わるサイトカインなど、全身性の要因によって引き起こされるという仮説を有している。そこで本研究では、単発および多発性 IH の患者血清とメンブレンアレイを用いて、この仮説の立証を試みている。

血清サンプルは、治療前の増殖期の多発性 IH ($n=5$) および単発性 IH ($n=4$) の乳児から採取した。血清採取時の患者年齢は生後1ヶ月から13ヶ月で、全例女兒で表在型であった。ヒト血管新生

抗体Array-Membraneを用いて20種類のサイトカインの血清中の発現量を測定し、画像はChemDocを用いて取得し、Image Jを用いて定量化を行った。

EGF、MCP-1、PDGF-BB、RANTES、TIMP-1、およびTIMP-2は多発性および単発性病変のすべての乳児に検出された。bFGF、IFN- γ 、IGF-I、TGF- β 1の発現は、多発性IHで単発性IHより統計学的に有意に高かった ($P < 0.05$)。特に、IFN- γ は多発例ではすべての症例で検出されたが、単発例では1例も検出されなかった。さらに多発性IHで発現が上昇している4つのサイトカインのうち、bFGF値は病変数と強く有意に相関していた ($R=0.88, P=0.0020$)。

本論文は、bFGF、IFN- γ 、IGF-I、さらにはTGF- β 1が多発性IHの病態形成に関与する可能性、そしてbFGFがIHの病変数の両者のマーカーとなる可能性があることをはじめて示したものであり、学位論文として価値のあるものとして認めた。

学位記番号	博(医)甲第669号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	藤本 幸太		
学位論文の題目	A visualization system for erectile vascular dynamics (海綿体勃起制御機構の解明のための新規可視化システムの樹立)		
論文審査委員	主査	教授 中田 正範	
	副査	教授 井上 徳光	教授 朝村 真一

論文内容の要旨

【緒言】

男性器の重要な機能の一つとして勃起機能があり、その異常である勃起不全(Erectile dysfunction; ED)の患者数は、生活習慣病の増加や社会の高齢化などから近年増加している。しかしながら海綿体に関する研究は、大動物を用いた電気生理学的実験等が主体であり、その構造と勃起動態に関する研究は、乏しい状況である。正常マウスのシヌソイドの動態を解析するために青色色素(パテントブルー)を陰茎に注入する事により 細胞骨格系とシヌソイド領域の詳細な解析が可能となった。さらに本研究では、陰茎海綿体から微小な組織片(explant)を作成し実体顕微鏡によるタイムラプス撮影を行った。種々の制御因子群による反応としての勃起反応を *in vivo* の状態にさらに近似させるために、複数の外来性因子を添付し、海綿体及びシヌソイドについて動態解析を行った。外来性因子によるシヌソイドの弛緩/収縮に関する下流の制御因子の解析のために組織学的およびqPCR解析を行った。このようなシヌソイドの動態解析を受けて、勃起維持時間の解析が可能となった。さらに去勢によるシヌソイドの動態変化を解析するために去勢マウスにおいて動態解析を行い、勃起維持時間の短縮を見出した。

【材料及び方法】

実験動物

12週齢の雄ICRマウス(日本クレア)を頸椎脱臼により安楽死処分後、顕微鏡下にて陰茎海綿体を分離し、組織断片とした。去勢マウスは従来の実験方法に従い、精巣を摘出し作成した。

組織学的解析

陰茎組織を4%パラホルムアルデヒド/PBSで固定後にパラフィン組織切片を作成した。Hematoxylin Eosin (HE) 染色およびMasson trichrome 染色による組織学的解析を行った。

陰茎海綿体の組織培養及び弛緩/収縮反応の誘導

分離した陰茎海綿体をMatrigelにてガラスボトムディッシュに接着後にHanks' balanced salt solution (HBSS) 中で組織培養した。

またシヌソイドの動態解析は、分離する前に亀頭海綿体より29Gニードルで青色色素(パテントブルー(25 mg/ml))を300 μ l注入した後に陰茎海綿体を分離した。

陰茎海綿体の弛緩には、弛緩誘導複合剤(REC; Relaxation-enhancing compounds; ニトロプルシドナトリウム水和物; SNP:100 μ M、アセチルコリン:10 μ M、プロスタグランジン E1:10 μ M、以降全て最終濃度を記載)を添付し、収縮誘導には、収縮誘導複合剤(CEC; Contraction-enhancing compounds; フェニレフリン; PE:1 μ M、エンドセリン-1:0.1 μ M)を添加した。

Time-lapse 撮影

陰茎海綿体の動態解析には実体顕微鏡Leica M165FCを用いて10秒間隔で撮影を行った。弛緩完了時点から収縮完了時点までの時間間隔を勃起維持時間と定義し測定した。

定量的リアルタイムPCR

弛緩/収縮反応後の陰茎海綿体からRNAを抽出し、勃起関連マーカー遺伝子であるNos3、Pde5a、収縮弛緩のマーカー遺伝子であるRhoaを対象にPCR反応と定量化を行った。内在性コントロールとしてGapdhを用いた。

【結果】

1. シヌソイドの動態を解明する為に陰茎色素注入法実体顕微鏡下でシヌソイド内腔の観察が可能となった。
2. RECs 及び CECs による薬剤添付により陰茎海綿体およびシヌソイド内腔が *in vitro* において弛緩/収縮反応することを観察した。
3. 弛緩/収縮反応直後の組織学的解析によりシヌソイド内腔およびコラーゲン領域の変化が観察された。
4. *in vitro* における弛緩/収縮誘導後に、勃起時に発現する遺伝子である Nos3、Pde5a 遺伝子は、弛緩完了後では有意に増加した。収縮関連遺伝子である Rhoa 遺伝子は収縮完了後では有意に増加した。
5. 去勢マウスでは、勃起維持時間が短縮した。

【考察】

本研究で樹立した新規の培養系では薬剤を添加することで陰茎海綿体の弛緩/収縮が *in vitro* で誘導された。本培養系の海綿体およびシヌソイドの解析は、これまでの生理学的な実験等では検討できなかった勃起時と平常時の動的変化を解析可能とし、これまでとは違った観点から勃起を評価できる実験系である。また今回の培養系は、勃起過程に作用する薬剤の評価にも有用と期待される。本実験系において弛緩/収縮時に増減する制御因子の解析を行うために定量的 PCR 解析を行った。その結果、勃起関連遺伝子の発現が誘導されていることが判明し、*in vivo* では複数の制御因子による勃起現象を *in vitro* で近似的状態として誘導できたことを示唆していた。去勢処置を施行すると ICP（陰茎内圧）が低下し勃起不全をきたすことが報告されていた。今回の実験系による去勢マウスの解析では、勃起維持時間が減少しており、勃起不全の病態を反映していると考えられた。持続勃起症など海綿体に直接的に影響し ED に至る疾患が多く報告されている。本実験系は、そういった病態が将来的に ED に至るまでの病態解明にも応用できると推察された。

【結語】

ED は生活の質に重大な影響を及ぼし、重要な公衆衛生問題の一つである。アンドロゲン低下による陰茎海綿体における平滑筋細胞や内皮細胞の障害と勃起不全との関連は指摘されている。しかしながら、海綿体やシヌソイドの勃起制御機構の解析は、これまで十分に遂行されていなかった。本研究で樹立された陰茎海綿体組織培養系は、*in vitro* において勃起現象を近似的に誘導できたことから、勃起現象の動態解析への今後の貢献が期待される。ED 患者においては勃起維持時間の確保は、重要な QOL 因子である。本実験系は可視化による動態解析から勃起維持制御に至るまで ED を含む種々の病態の解明に応用できると期待される。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和5年9月25日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

男性器の重要な機能の一つとして勃起機能があり、その異常である勃起不全(Erectile dysfunction: ED)の患者数は、生活習慣病の増加や社会の高齢化などから近年増加している。海綿体に関する研究は、電気生理学的実験等が主体であり、その構造と勃起動態に関する研究は、乏しい状況である。また、アンドロゲン低下による陰茎海綿体における平滑筋細胞や内皮細胞の障害と勃起不全との関連は指摘されているが、海綿体やシヌソイドの勃起制御機構の解析は、これまで十分に遂行されていなかった

本研究はマウスをモデルとし、青色色素を注入した陰茎海綿体を分離し、組織断片とした。去勢マウスは従来の実験方法に従い、精巣を摘出し作成した。後述の複数の外来性因子により弛緩/収縮反応の誘導し、シヌソイドの動態解析を行った。陰茎海綿体の弛緩には、弛緩誘導複合剤(ニトロプルシドナ

トリウム水和物、アセチルコリン、プロスタグランジン E1)を添付し、収縮誘導には、収縮誘導複合剤 (フェニレフリン、エンドセリン-1)を添加した。弛緩完了時点から収縮完了時点までの時間間隔を勃起維持時間と定義し、去勢群と比較した。弛緩/収縮反応後の陰茎海綿体の組織学的解析および勃起関連遺伝子の解析を行った。

青色色素を注入することでシヌソイドの内腔を可視化でき、前述の外來性因子の薬剤を添付することでシヌソイド内腔が *in vitro* において弛緩/収縮反応することを観察できた。組織学的解析によりシヌソイド内腔が動作解析と同様の弛緩/収縮の変化が観察できた。定量的リアルタイム PCR では、勃起時に発現する遺伝子である *Nos3*、*Pde5a* 遺伝子は、弛緩完了後では有意に増加した。収縮関連遺伝子である *Rhoa* 遺伝子は収縮完了後では有意に増加した。本研究で樹立された陰茎海綿体組織培養系は、*in vitro* において勃起現象を近似的に誘導できたことが示唆された。今回の実験系による去勢マウスの解析では、勃起維持時間が減少していた。

本研究で樹立された陰茎海綿体組織培養系は、*in vitro* において勃起現象を近似的に誘導できたことを初めて示した。海綿体やシヌソイドの勃起制御機構の解析は、これまで十分に遂行されていなかったが、本研究が、勃起現象の動態解析への今後の貢献が期待される。また ED 患者においては勃起維持時間の確保は、重要な QOL 因子である。今回の実験系による去勢マウスの解析では、勃起維持時間が減少しており、勃起不全の病態を反映していると示唆された。本論文は可視化による動態解析から勃起維持制御に至るまで ED を含む種々の病態の解明に応用できると期待され、博士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670号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	張岩 (Zhang Yan)		
学位論文の題目	Appendicular muscle mass index was stronger than body mass index in association with atherosclerosis in the community-dwelling elderly (地域在住高齢者において、四肢筋肉指数は体格指数より強く動脈硬化に関連していた)		
論文審査委員	主査	教授 松岡 孝昭	
	副査	教授 藤吉 朗	教授 金桶 吉起

論文内容の要旨

【背景】

BMI(body mass index: BMI)は、簡単な体格測定であり、健康リスク予測因子として広く用いられているが、筋肉量や脂肪量を直接反映するものではない。特に高齢者では筋肉量減少・体脂肪量増加の傾向があり、両者が健康に与える影響が逆方向であるため予測指標としての BMI の限界が認識されている。筋肉量の低下は、進行している動脈硬化と関連していると報告があるが、高齢者における筋肉量と動脈硬化との量反応関係を検討した研究は少ない。さらに、高齢者における筋肉量と動脈硬化の関係が、BMI と動脈硬化の関係よりも強いかどうかも十分に検討されていない。

【目的】

本横断研究では、地域在住一般高齢者における四肢骨格筋指数(ASM 指数)と上腕・足首間脈波伝播速度(baPWV)との量反応関係を調査し、ASM 指数を BMI と比較することで、それらの関連の程度を評価することが目的である。

【方法】

対象者

和歌山県内の一般地域住民で、2016～2020年のわかやまヘルスプロモーション研究(和歌山県在住地域住民の生活習慣病発症に関わるコホート研究)の参加者のうち、年齢が65歳以上で次の除外基準に当てはまらない995名を対象とした:①心疾患・脳血管疾患・閉塞性動脈硬化症疑・慢性腎臓病・肝障害の治療歴なし、②身体機能の障害等で生活行動が著しく制限されていない、③解析に必要なデータに欠損または測定エラーがない。

調査項目

- 1) 身体計測:身長、体重、BMI(kg/m²)。
- 2) 骨格筋量:仰臥位姿勢で単周波生体電気インピーダンス法による高精度筋量計(フィジオン製 Physion MD)を使用して、身体各部(上腕部、前腕部、大腿部、下腿部、体幹部)の筋肉量を測定後、上肢と下肢を合計した四肢骨格筋量(kg)を身長(m)の2乗で除したASM指数(kg/m²)を算出した。
- 3) baPWV:フクダコーリン製BP-203 RPEを用いて測定した。左右の測定値を平均して代表値とした。
- 4) 血液生化学検査:空腹時採血にて血中脂質、血糖、HbA1cなどを測定した。
- 5) 基本属性および生活状況(性別、年齢、既往歴、服薬歴、喫煙・飲酒歴)などは自記式質問票または問診によって収集した。

統計解析

すべての解析は男女別に行った。

(1) まず、ASM指数またはBMIとbaPWVとの量反応関係を検討するために、対象者をASM指数またはBMIで5分位に分け、baPWVを従属変数、ASM指数またはBMIを独立変数とした線形回帰にて各分位の平均baPWV値を求めた(「5分位解析」)。

(2) 次に、baPWV と ASM 指数、baPWV と BMI、との関連の強さを比較するために、ASM 指数または BMI を連続変数として扱い、baPWV を従属変数として ASM 指数または BMI の 1 標準偏差 (1SD) 上昇当たりの baPWV 値を求めた (「単独指標解析」)。

(3) 最後に、ASM 指数が BMI とは独立した関連を有するかを検討するために、さらに ASM 指数・BMI (共に連続変数) を同時にモデルに投入し、(2) と同様それぞれの指標 1SD 上昇当たりの baPWV を算出した (「同時投入解析」)。

なおこれらの解析においては以下の 4 つの統計モデルを用いた。①未調整 Model、②Model 1 : 年齢調整、③Model 2 : Model 1 に加えて収縮期血圧 (SBP, mmHg) と降圧薬 (はい/いいえ)、④Model 3 : Model 2 に加えて HbA1c (%)、降血糖薬(はい/いいえ)、LDL コレステロール (mg/dl)、脂質異常症治療薬(はい/いいえ)、純アルコール換算 ≥ 20 g/日 (はい/いいえ)および生涯喫煙量 (pack-year)。両側検定で統計学的有意水準は 5% とした。

【結果】

参加者 995 名のうち、597 名 (60.0%) が女性であった。

(1) 5 分位解析 : 男性では、ASM 指数と BMI 共に、すべての Model にて baPWV と負の量反応関係を認めた (傾向 $P \leq 0.033$)。女性でも男性と同様な負の量反応関係が観察された。

(2) 単独指標解析 : ASM 指数も BMI も単独では baPWV と有意に関連していたが、男女とも ASM 指数のほうが BMI より関連が大きくなる傾向があった。

(3) 同時投入解析 : 両者を同時投入すると ASM 指数が有意に baPWV と関連した一方、BMI の関連は消失した。

【考察】

地域在住一般高齢者 (65 歳以上) を対象とした本横断研究では、ASM 指数または BMI と baPWV との男女とも負の量反応関係を認め、交絡因子で調整後も同様であった。単独指標解析では、ASM 指数のほうが BMI より baPWV との関連が強かった (1SD 上昇当たりの勾配で比較)。さらに BMI と ASM 指数を同時投入した結果、ASM 指数は baPWV と有意な負の関連を保った一方、BMI は有意ではなくなった。以上の結果は、高齢者における ASM 指数が BMI より baPWV と密接に関連し、BMI を超えた予測指標である可能性を示唆する。

筋肉量の減少、脂肪組織の増加はともに全死亡または動脈硬化性疾患などのリスクを上昇させることが報告されている。高齢者は一般的に筋肉量減少・体脂肪量増加の傾向がある。BMI は筋肉と脂肪を区別しない指標であるため、リスク予測指標としての BMI には限界があり、それは特に高齢者で大きな問題になると考えられる。例えば、BMI と総死亡率との関連が U 字型であるのは多くの報告があるが、65 歳以上の高齢者を対象とした欧米の縦断研究では、BMI でみられた U 字型の関連は除脂肪量 (筋肉量の指標) と体脂肪量に分解して観察するとそれぞれ、除脂肪量とは単調減少、体脂肪量とは単調増加の関係であることが報告されている。同様の結果は、40 歳から 75 歳の男性の心血管死亡に関する研究でも観察された。これまで筋肉と潜在性動脈硬化との関連を検討した疫学研究は多数存在するが、その多くにおいて量反応関係を十分に検討したとは言い難い。量反応関係を調査した研究においても、高齢者や性別ごとの分析が行われておらず、結果も一致していない。今回の我々の研究で初めて高齢者を男女別に解析し、ASM 指数と baPWV との負の量反応関係を示した。

筋肉量と動脈硬化との負の関連を示す生物学的機序の全容は明らかでない。動脈硬化を引き起こすインスリン抵抗性、慢性炎症は、筋肉量の低下にも影響に及ぼすことが報告されている。また、筋肉量の変化は、血管障害や動脈硬化の進行と密接に関わることが示唆されている。さらにレジスタンス・トレーニングにより PWV が低下したとする RCT のメタ解析の報告もあり、筋肉量が多いほど動脈硬化に予防的に働くことが示唆されている。

【結論】

地域在住の一般高齢男女において、ASM 指数と baPWV の負の関連は、BMI と baPWV の関連よりも強く、かつ BMI とは独立していた。この結果は、ASM 指数が BMI よりも高齢者の動脈硬化に関してより重要な情報を提供することを示唆している。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和5年10月26日、10月31日と11月8日に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。

BMI(body mass index: BMI)は、簡便な体格の指標であり、健康リスク予測因子として広く用いられている。しかし BMI は筋肉量や脂肪量を直接反映するものではない。特に高齢者では、筋肉量が減少し、体脂肪は増加する傾向があり、筋肉と脂肪組織とが健康に与える影響が逆であるため予測指標としての BMI の限界が認識されている。筋肉量の低下が動脈硬化と関連するとの報告はあるが、高齢者において筋肉量と動脈硬化との量反応関係を検討した研究は少ない。さらに、高齢者を対象に動脈硬化との関連の強さを、BMI と筋肉量とで比較した研究はほとんどない。

そこで本横断研究では、地域在住一般高齢者（65 歳以上）を対象に、（1）四肢骨格筋指数(ASM 指数)と動脈硬化指標である上腕・足首間脈波伝播速度(baPWV)との量反応関係を検討し、（2）次に、baPWV との関連において ASM 指数と BMI とを比較した。なお全ての解析は男女別に行った。まず対象者を ASM 指数または BMI で 5 分位に分け、baPWV を従属変数とした線形回帰モデルにて量反応関係を検討した。次に ASM 指数または BMI のどちらか一方の指標を説明変数として 1 標準偏差(1SD)上昇当たりの baPWV 値を求めた（「単独指標解析」）。更に ASM 指数と BMI とを同時にモデルに投入し両指数の関連の強さを比較した（「同時投入解析」）。

対象者 995 名（女性：597 名 60.0%）であった。ASM 指数および BMI いずれの指数においても男女とも baPWV とは負の量反応関係を認め（傾向 $P \leq 0.033$ ）、交絡調整後も同様であった。単独指標解析では、ASM 指数も BMI も baPWV と有意に関連していたが、男女とも ASM 指数のほうが BMI より関連が大きい傾向であった。同時投入解析では、ASM 指数が baPWV との有意な関連を保った一方、BMI の関連は減弱し統計的有意ではなくなった。

まとめると、本横断研究の結果、高齢男女において ASM 指数は baPWV と負の量反応関係を示し、その関連は BMI より強く、また BMI とは独立していたことが明らかになった。本論文により地域在住の一般高齢男女において、筋肉量の指標である ASM 指数が BMI よりも高齢者の動脈硬化に関してより重要な情報を提供することが示唆され、学位論文として価値のあるものと考えた。

学位記番号	博(医)甲第671号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	栗本 麻奈		
学位論文の題目	Glycoprotein M6A upregulation detected by transcriptome analysis controls the proliferation of keloidal fibroblasts (ケロイド線維芽細胞における GPM6A 発現亢進の増殖能への関与)		
論文審査委員	主査	教授 徳原 大介	
	副査	教授 橋本 真一	教授 神人 正寿

論文内容の要旨

【諸語】

肥厚性癬痕およびケロイドは線維増殖性疾患である。整容面の問題、拘縮などの機能的問題、さらには癢痒感や疼痛などの自覚症状により、患者の QOL、身体状態、精神状態に大きな影響を与える。両者の違いは臨床経過にあり、肥厚性癬痕はもとなつた創傷の境界内に発生し、時間の経過とともに退縮しやすいのに対し、ケロイドは制限なく増大し、退縮することはほとんどない。しかし、病理組織学的所見はほぼ同一で、区別がつかないことが多い。原因は不明だが、炎症、免疫異常、遺伝因子などによる創傷治癒過程の異常により、過剰な癬痕形成が生じているものと推定されている。これらの要因のうち遺伝因子に関しては、ケロイド関連 SNP や遺伝子変異として既にいくつかの遺伝子異常が候補として挙げられている。また、ケロイド組織の RNA シーケンスや Hi-C 解析により NT5a などの幾つかの分子が key molecule として同定されているが、培養ケロイド線維芽細胞を用いた RNA シーケンスの報告はない。

本研究において我々は初めて培養ケロイド線維芽細胞のトランスクリプトーム解析を行い、融合遺伝子と遺伝子発現異常に注目して解析を行った。

【方法と材料】

1. 患者材料

ケロイド (n=9)、肥厚性癬痕 (n=10)、さらには正常皮膚 (n=3) の組織標本を研究に使用した。患者データ (年齢、性別、病変部位) を表 1 にまとめた。

2. ケロイド融合遺伝子の同定

融合遺伝子の予測には Fusion Hunter および deFuse を使用した。結果は Sangar シーケンスと G バンド解析により検証した。

3. 遺伝子発現解析

ケロイド細胞株 (KEL FIB) および正常線維芽細胞(NFB)を用いたトランスクリプトーム解析は Riken Genesis のプロトコールにより施行した。fragments per kilobase per million map read 値 (FPKM) を算出し遺伝子発現量を推定した。検証には real-time PCR と免疫染色を用いた。

【結果】

1. ケロイド特異的融合遺伝子の同定の試み

まず、KEL FIB でのみ認められ NFB には存在しない 5 つの遺伝子融合転写産物に注目した。これらのうち、ANAPC1-RMND5A、CTBS-GNG5、GATSL2-GTF2I は、先行研究により偽融合遺伝子として報告されていた。また、AC009093.1 の配列は CDR2 に含まれていた。このことから、CNST-SCCPDH がケロイド特異的な融合遺伝子の唯一の候補であることが示唆された。そこで、CNST と SCCPDH に融合が生じたときに特異的に増幅するように設計されたプライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、KEL FIB において融合転写産物が得られた。その PCR 産物からは CNST と SCCPDH の遺伝子融合が確認された。しかし、ケロイド組織 9 例と肥厚性癬痕組織 10 例では陰性であった。またケロイド線維芽細胞の G バンド解析では染色体に異数性は認められず、主要な染色

体転座も観察されなかった。従って、ケロイド線維芽細胞で特異的な融合遺伝子が存在する可能性は低いと考えられた。

2. ケロイド線維芽細胞における遺伝子発現解析

続いて KEL FIB と NFB 間の遺伝子発現の差を解析するために、Cuffdiff を用いて FPKM 値と統計学的有意性を評価した。NFB1 または NFB2 と比較して KEL FIB で発現が増加または減少した遺伝子のうち、KEL FIB でのみ発現している遺伝子に注目すると、DAPP1 と GPM6A の FPKM がケロイド線維芽細胞で最も高かった。

次に、リアルタイム PCR を用いてトランスクリプトーム解析結果の検証を試みた。GPM6A の発現は NFB に比べて KEL FIB で有意に上昇していた ($p < 0.05$) が、DAPP1 はケロイド線維芽細胞では検出されなかった。GPM6A の発現は、正常皮膚組織と比較して肥厚性瘢痕やケロイドの組織でも統計学的に有意な増加を示した ($p < 0.05$)。

さらに、ケロイドおよび正常皮膚由来のパラフィン包埋皮膚切片を用いて GPM6A の免疫組織化学染色を行った。ケロイド組織では、GPM6A 陽性線維芽細胞様紡錘形細胞の数が正常皮膚に比べて有意に増加していた ($p < 0.05$)。これらのデータはトランスクリプトーム解析の結果と一致していた。

したがって、GPM6A の mRNA と蛋白の発現は、in vitro と in vivo の両方でケロイドにおいて亢進している可能性が高いと考えられる。

3. GPM6A の機能

最後に GPM6A の発現を siRNA を用いて強制的に抑制して機能解析を行った。GPM6A の knock down は、非処理およびコントロール siRNA 処理 KEL FIB と比較して、KEL FIB の細胞数を有意に減少させた ($p < 0.05$)。これらの結果から、GPM6A はケロイド線維芽細胞の増殖に必要であることが示された。

【考察】

この研究では 3 つの知見を得る事ができた。まず、トランスクリプトームを用いた発現解析の結果、ケロイド線維芽細胞で GPM6A の発現が亢進していた。この結果は、培養細胞と肥厚性瘢痕やケロイドの組織を用いた real-time PCR と免疫組織化学によって確認された。

次に、本研究でケロイドや肥厚性瘢痕における GPM6A の増加が細胞増殖に寄与している可能性を機能解析によって初めて示した。肥厚性瘢痕とケロイドには、臨床的、組織学的、さらには分子生物学的な類似点と相違点があるが、共通の特徴のひとつは線維芽細胞の増殖能の活性化である。これらの疾患は、創傷治癒過程における細胞増殖期の延長に起因している可能性がある。その分子メカニズムはまだわかっていないが、今回の研究から、GPM6A がそのような細胞増殖に中心的な役割を果たしていることが示唆された。

最後に、トランスクリプトーム解析によりケロイド線維芽細胞における融合遺伝子の同定を試みたが、融合遺伝子の存在を証明することはできなかった。ケロイドの病態においては、皮膚腫瘍というよりもむしろ炎症性疾患の性質がより前面に出ているという考え方が近年広がってきていることをさらに支持する結果と考えられる。

【結語】

本研究ではケロイド線維芽細胞において融合遺伝子は同定されなかったが、トランスクリプトーム解析によって検出された GPM6A の発現亢進は、ケロイド線維芽細胞において細胞増殖を誘導している可能性がある。GPM6A は、病態形成に関与するとともに肥厚性瘢痕およびケロイドの新規治療標的となりうる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和5年12月6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。

ケロイドと肥厚性瘢痕は線維増殖性疾患であり、肥厚性瘢痕が退縮しやすいのに対し、ケロイドは

退縮しにくいという違いがある。両疾患ともに炎症、免疫異常、遺伝因子などによる創傷治癒過程の異常により過剰な癒痕形成が生じると考えられているが、原因は特定されていない。本研究では、ケロイドの責任因子を明らかにすべく、融合遺伝子と遺伝子発現異常に注目し、培養細胞と患者組織を用いた解析を行った。

研究材料として、ケロイド細胞株 (KEL-FIB) と正常線維芽細胞(NFB)、ケロイド(n=9) と肥厚性癒痕(n=10)の患者皮膚組織、正常皮膚 (n=3)を用いた。Fusion Hunter と deFuse を用い、KEL-FIB のケロイド融合遺伝子を予測し、結果を Sangar シーケンスと G バンド解析により検証し、組織検体における融合遺伝子の発現を PCR を用いて解析した。また、KEL-FIB と NFB を用いたトランスクリプトーム解析を実施し、遺伝子発現量の比較を行い、real-time PCR と免疫染色を用いて検証した。

その結果、CNST-SCCPDH がケロイド特異的な融合遺伝子の候補であることが示唆され、KEL-FIB の RT-PCR 解析によって融合転写産物が得られ、その PCR 産物のシーケンス解析によって CNST と SCCPDH の遺伝子融合が確認された。一方、ケロイドと肥厚性癒痕の組織では融合遺伝子は認めなかった。また、ケロイド線維芽細胞の G バンド解析においても染色体に異数性は認めず、主要な染色体転座も認めなかったため、ケロイド線維芽細胞で特異的な融合遺伝子が存在する可能性は低いと考えられた。次に、KEL-FIB と NFB 間の遺伝子発現量を比較したところ、DAPP1 と GPM6A の発現が KEL-FIB で有意に高く、real-time PCR では GPM6A が NFB より KEL-FIB において有意に高い発現が認められ ($p<0.05$)、DAPP1 は KEL-FIB では認めなかった。また、GPM6A はケロイドと肥厚性癒痕の組織において、正常皮膚組織より有意に高い発現を示した ($p<0.05$)。パラフィン包埋皮膚切片を用いた GPM6A の免疫染色では、ケロイド組織において GPM6A 陽性線維芽細胞様紡錘形細胞が正常皮膚に比べ有意に増加した ($p<0.05$)。さらに、KEL-FIB における GPM6A の発現を siRNA を用いて強制的に抑制した結果、GPM6A の knock down は KEL-FIB の細胞数を有意に減少させた ($p<0.05$)。これらの結果から、GPM6A の mRNA と蛋白の発現は in vitro と in vivo の両方でケロイドにおいて亢進し、ケロイド線維芽細胞の増殖に必要であることが示された。

本研究によって、GPM6A の発現亢進がケロイド線維芽細胞において細胞増殖を誘導していることが示された。GPM6A は病態形成に関与するとともに、ケロイドと肥厚性癒痕の新規治療標的となりうる可能性があり、博士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672号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	小上 修平		
学位論文の題目	Predictive value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio for treatment response in patients diagnosed with definite or probable autoimmune encephalitis/encephalopathy (自己免疫性脳炎/脳症の治療反応性に対する好中球リンパ球比率の有用性の検討)		
論文審査委員	主査	教授 藤井 隆夫	
	副査	教授 伊東 秀文	教授 紀本 創兵

論文内容の要旨

【緒言】

自己免疫性脳炎/脳症 (autoimmune encephalitis/encephalopathy: AE) は自己免疫機序による脳の炎症性疾患である。AE の予後は一般的に不良であり、AE 全般における予後因子が検討されているが、確立されたものはない。その中で、血液中の好中球リンパ球比率 (neutrophil-to-lymphocyte ratio: NLR) が、自己抗体陽性 AE 群の治療反応性や予後に関連するという報告が散見された。NLR は血液中の好中球数をリンパ球数で除したもので、どこの病院でも簡便に評価できる利点がある。しかし、既報告は自己抗体陽性 AE 群を対象として検討することが多かった。自己抗体の測定は、施設設備・保険制度など様々な要因で困難なことがあり、一部の患者では自己抗体陰性もしくは不明の AE と診断して治療することがある。このような症例を含んだ場合でも、NLR が治療反応性や予後に関連するか検討した報告は乏しい。

そのため我々は和歌山県立医科大学脳神経内科学講座 (以下、当科) の診療記録を用いて、自己抗体陰性もしくは不明を含んだ AE 群でも NLR が治療反応性や予後に関連するか検討した。

【対象と方法】

2013 年～2022 年に当科へ入院した AE 症例で、16 歳以上、Graus らの診断基準で definite か probable に該当、初回診断で免疫治療か腫瘍摘除を施行、欠損データなしの 31 例を対象とし、当科診療記録より後ろ向きに診療情報を収集した。さらに、患者を短期的治療反応性良好群と不良群の 2 群に分けた。既報告に基づき、短期的治療反応性良好の定義は、治療開始 4 週間後に、症状の改善がある、かつ modified Rankin Scale (mRS) 3 以下とした。短期的治療反応性不良の定義は、治療開始 4 週間後に、症状の改善がない、もしくは mRS 4 以上とした。

短期的治療反応性良好群と不良群を単変量解析で比較し、さらに多変量解析を用いて短期的治療反応性不良と関連する因子を検討した。単変量解析で $p < 0.10$ を示した患者背景や症状、検査所見 (カテゴリー変数のみ) を対象として Akaike information criterion (AIC) 変数減少法を用い、多変量解析に導入する因子を選択した。入院時 mRS (連続変数) は共変数と定義し必ず多変量解析に導入した。

【結果】

31 例中、13 例が短期的治療反応性良好群、18 例が短期的治療反応性不良群に該当した。患者背景や症状では、短期的治療反応性不良群では、入院時 mRS が高く、痙攣を呈した患者も多かった。検査所見では、全症例での NLR 中央値は 3.93 だった、短期的治療反応性不良群では、NLR 値が 3.93 以上の患者割合が高い傾向にあった ($p = 0.07$)。免疫治療や腫瘍摘除では、2 群において有意差を認めなかった。入院時 mRS と、単変量解析で $p < 0.10$ を示した性別、痙攣あり、NLR 値 3.93 以上を AIC 変数減少法に導入した。AIC 変数減少法の結果から、入院時 mRS、痙攣あり、NLR 値 3.93 以上を多変量解析に導入した。結果、NLR 値のオッズ比は 11.37 (95% confidence interval: 1.12-114.68, $p = 0.04$) で、NLR は短期的治療反応性不良と有意に関連していた。また、NLR 値の短期的治療反応性不良に対する感度、特異度、カットオフ値を Receiver Operating Characteristic 曲線を用いて算出した。カットオフ値を 3.93 とすると area under the curve (AUC) 0.70、感度 0.67、特異度 0.69 だっ

た。Youden 指数を用いるとカットオフ値は 4.10 と定義され、AUC 0.70、感度 0.67、特異度 0.77 だった。

【考察】

我々は、自己抗体陰性もしくは不明を含んだ AE 群においても、NLR が短期的治療反応性不良と関連すると示した。また今回の検討では、短期的治療反応性不良に対する NLR 値の最適なカットオフ値は 4.10 だった。同様の検討をした既報告 (Graus らの基準で possible AE を多数含んでおり診断妥当性に注意が必要) では、NLR 値の最適なカットオフ値は 4.45 とされていた。これらより、NLR 値 4 前後が短期的治療反応性不良に関連するカットオフ値と考えた。

好中球と AE との関連は不明な点が多い。しかし最近では、neutrophil extracellular traps (NETs) が自己免疫疾患の炎症機序に関連するという報告がある。好中球が様々な外的要因を受けると NETs を放出し、NETs は B 細胞やマクロファージを活性化し、自己抗体、interleukin (IL)-8, IL-6, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) の産生を促す。さらに、NETs 内の酵素自体が自己抗原になりうるという報告もある。AE と同じく中枢神経の自己免疫性疾患である多発性硬化症では、好中球や NETs との関連が報告されており、好中球は NETs を介して中枢神経疾患発症に関与しているのかもしれない。AE においても、抗 N-methyl-d-Aspartate receptor 抗体関連脳炎において、NETs の産生が増加しており、NETs 産生増加と IL-8, IL-6, TNF- α 値上昇が関連したという報告がある。AE において、好中球は NETs 産生を通して免疫反応を強めている可能性があり、それゆえ、好中球数が多くなると (NLR 値が高くなると)、免疫治療への反応が不良になると考えた。

【結論】

自己抗体陰性もしくは不明を含んだ AE 群においても、NLR が短期的治療反応性不良と関連した。自己抗体の測定が困難な施設においても使用できる簡便な指標であるが、好中球と AE との関連についてさらなる検討が必要である。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 6 年 1 月 23 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

本論文の目的は、和歌山県立医科大学脳神経内科学講座 (以下、当科) の診療記録を用いて、自己抗体陰性もしくは不明を含んだ自己免疫性脳炎/脳症 (autoimmune encephalitis/encephalopathy: AE) 群における予後因子を明らかにすることである。特に、どこの施設においても評価可能な因子として、血液中の好中球/リンパ球比率 (血液中の好中球数をリンパ球数で除した値、neutrophil-to-lymphocyte ratio: NLR) に着目して検討した。

和歌山県立医科大学の倫理委員会の承認後、当科診療記録より後ろ向きに診療情報を収集した。対象症例は、2013 年~2022 年に当科へ入院した AE 症例のうち、16 歳以上、Graus らの診断基準で definite か probable に該当、初回診断で免疫治療か腫瘍摘除を施行、欠損データなしの 31 例とした。NLR 値は来院後の初回血液検査の値を用いた。患者を短期的治療反応性良好群と不良群に分類し、治療反応性と関連する独立変数を、Akaike information criterion (AIC) 変数減少法を併用した名義ロジスティック解析を用いて検討した。候補となる独立変数は、単変量解析で $p < 0.10$ を示した患者背景や症状、検査所見とした。ただし、入院時 mRS は共変数と定義し、必ず多変量解析に導入した。短期的治療反応性の定義は既報告に基づき、反応性良好は治療開始 4 週間後に症状の改善がある、かつ modified Rankin Scale (mRS) 3 以下とし、反応性不良はそれ以外とした。

31 例中、13 例が短期的治療反応性良好群、18 例が短期的治療反応性不良群に該当した。患者背景や症状では、短期的治療反応性不良群において、入院時 mRS が高く、痙攣を呈した患者が多かった。検査所見では、NLR 値 3.93 以上の患者割合が短期的治療反応性不良群において高い傾向にあった。免疫治療や腫瘍摘除については 2 群で有意差を認めなかった。入院時 mRS、単変量解析で $p < 0.10$ を示した性別、痙攣あり、NLR 値 3.93 以上を AIC 変数減少法を併用した多変量解析に導入したところ、入院時 mRS、痙攣あり、NLR 値 3.93 以上が短期的治療反応性不良と有意に関連していた。

本論文は、自己抗体陰性もしくは不明を含んだ AE 群においても NLR 値が予後因子になりうることを示した初めての報告である。AE における予後因子の研究発展、患者説明を含めた医療体制の発展につながる可能性を示したことから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第673号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	西岡 俊彦		
学位論文の題目	Increased infiltration of CD4 ⁺ T cell in the complement deficient lymphedema model (補体欠損リンパ浮腫モデルにおいて CD4 ⁺ T 細胞の浸潤は増加する)		
論文審査委員	主査	教授 橋本 真一	
	副査	教授 江楮 正悟	教授 朝村 真一

論文内容の要旨

【緒言】

リンパ浮腫は、原発性リンパ浮腫と続発性リンパ浮腫に大別される。本邦では、続発性が多くを占め、がん治療に伴うリンパ節郭清や術後放射線照射などが原因であることが多い。リンパ浮腫は一度発症すると根治が難しく、繰り返す蜂窩織炎や、浮腫による四肢の運動障害により、患者の生活の質を低下させる。

リンパ浮腫治療の軸は、保存的治療で、生活指導や用手的リンパドレナージ、圧迫療法などを組み合わせた複合的治療である。近年では、リンパ管細静脈吻合術 (LVA) などの外科治療も行われているが、完治できる症例は少ない。また、薬物治療は確立されていない。

リンパ浮腫患者の患部皮膚および皮下組織ではマクロファージ、好中球、リンパ球など様々な免疫細胞の浸潤による慢性炎症が起こっている。さまざまなリンパ浮腫動物モデルにおいて、CD4⁺T 細胞が線維化やリンパ管機能障害に関わっていることが報告されているが、詳細な分子メカニズムは未だ不明な点も多い。

“炎症細胞の浸潤や線維化” といったリンパ浮腫の進行と共通した特徴がみられる創傷治癒過程では、自然免疫の1つである補体系が活性化されることが知られている。マウス創傷モデルにおいて補体 C3、C5 および C5a 受容体 1(C5aR1) の欠失は、皮膚創傷治癒を加速させたという報告がある。また、マウス尾部リンパ浮腫モデルでは、浮腫組織で補体系に関わる遺伝子が発現上昇していたという報告があるが、補体系がリンパ浮腫の進行においてどのような役割を果たしているかは明らかではない。

補体系は、病原体だけではなく死細胞などの不要となった宿主細胞を、効率よく認識・迅速に除去することにより、宿主の常性を維持する働きをもっている。近年、補体の過剰な活性化によって引き起こされる様々な疾患に対して抗 C5 抗体などの抗補体薬が臨床応用されており、リンパ浮腫の進行における補体活性化の関与の検討は今後のリンパ浮腫治療の発展に重要と考える。

【目的】

リンパ浮腫の進行と補体活性化の関与を明らかにするために、マウス尾部リンパ浮腫モデルを用いて、浮腫組織における補体因子の発現、活性化について検討し、さらに補体 C3 または C5 欠損マウスを用いてリンパ浮腫進行における補体活性化の関与について検討した。

【方法】

9 - 10 週齢、雄の C56BL6/J マウスで、尾部リンパ浮腫モデルを作製し、尾部浮腫体積を経時的に計測した。

リンパ浮腫組織における補体因子の発現および補体の活性化を調べるために、術後 3 週の尾部リンパ浮腫組織で real-time RT-PCR および蛍光免疫組織染色を用いて検討した。

C3 欠損マウスおよび C5 欠損マウスを用いて、同様のモデルを作製し、術後尾部浮腫体積の測定や組織学的検討を行い、野生型と比較した。

【結果】

1. 尾部リンパ浮腫組織における C3 の発現上昇と活性化

C3 の発現上昇が尾部リンパ浮腫組織で検出され、さらに、C3 タンパク質はリンパ浮腫組織内の拡張したリンパ管周囲に分布がみられた。補体系がリンパ浮腫組織で活性化されているかどうかを調べるために、古典経路またはレクチン経路によって活性化される C4 を調べたところ、拡張したリンパ管周囲で C3 と共局在しており、マウス尾部モデルのリンパ浮腫領域で古典経路またはレクチン経路が活性化されている可能性が示唆された。

2. 補体欠損マウスでの術後尾部体積の検討

リンパ浮腫組織における補体活性化の役割を明らかにするために、C3 欠損マウスおよび C5 欠損マウスを用いて術後 3 週間までの尾部体積を野生型マウスと比較したところ、有意差は認められなかった。

3. 補体欠損マウスにおける CD4⁺T 細胞の浸潤の増加

リンパ浮腫の進行に関与する重要な免疫細胞である CD4⁺T 細胞の浸潤を検討した。C3 欠損マウスは野生型と比較して、リンパ管周囲およびリンパ浮腫領域全体に CD4⁺T 細胞浸潤の増加を認めた。

4. 補体欠損マウスにおける死細胞の増加

補体 C3 の欠乏はアポトーシス・ネクローシス細胞の排除の障害を引き起こし、これにより炎症が増強される可能性がある。そのため TUNEL 染色を用いてリンパ浮腫領域における死細胞の蓄積を調べたところ、C3 欠損マウスにおいて野生型と比較して、死細胞の増加を認めた。

【考察】

本研究で、マウス尾部リンパ浮腫モデルにおいて C3 の発現上昇と、C3 および C4 が拡張したリンパ管周囲で検出され、リンパ浮腫の進行による組織損傷が古典経路またはレクチン経路の活性化を誘発し、慢性炎症を引き起こしている可能性が示唆された。また C3 欠損によるリンパ浮腫組織での死細胞除去障害が、死細胞の増加を誘導し、CD4⁺T 細胞浸潤の増加の引き金となっている可能性がある。

抗補体治療中の患者や補体欠損患者のように補体の活性化が低下している場合、リンパ浮腫を誘発するリンパ郭清術や放射線治療のような治療が行われる際にはリンパ浮腫の発症や悪化に注意が必要となるかもしれない。今後、蓄積した死細胞による CD4⁺T 細胞の浸潤の分子メカニズムや、リンパ浮腫において問題となる組織の繊維化を検討するため、長期にわたるリンパ浮腫の進展に補体欠損が及ぼす影響を解析する必要がある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和6年1月26日、31日及び2月2日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の口頭審査を行った。

リンパ浮腫治療の主軸は、保存的治療で、生活指導や用手的リンパドレナージ、圧迫療法などを組み合わせた複合的治療である。現在、有効な薬物治療は確立されておらず、リンパ浮腫の進行における分子メカニズムの解明は今後の治療発展において重要である。

マウス尾部リンパ浮腫モデルでは、浮腫組織で補体系に関連する遺伝子の発現が上昇していたという報告がある。補体系は、病原体だけでなく死細胞などの不要となった宿主細胞を効率よく認識し迅速に除去することで、宿主の恒常性を維持する働きをもっている。近年、補体の過剰な活性化が引き起こす様々な疾患に対して抗C5抗体などの抗補体薬が臨床応用されている。したがって、リンパ浮腫の進行における補体活性化の関与について、マウス尾部リンパ浮腫モデルを用いた解析を行った。

本研究では、マウス尾部リンパ浮腫モデルにおいて補体C3の発現が上昇し、C3およびC4が拡張したリンパ管周囲で検出された。これは、リンパ浮腫の進行による組織損傷が古典経路またはレクチン経路の活性化を誘発し、慢性炎症を引き起こしている可能性を示唆している。またC3欠損マウスにおいては、リンパ浮腫組織で死細胞の増加とCD4⁺T細胞浸潤の増加が検出され、C3欠損が死細胞除去の障害を引き起こし、それが死細胞の増加およびCD4⁺T細胞浸潤を促進している可能性が示された。

本論文は、リンパ浮腫の進行における補体活性化との関連性を示唆し、リンパ浮腫進行の分子メカニズムの解明に寄与することが期待され、博士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674号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	吉田 朱里		
学位論文の題目	Activation of transient receptor potential vanilloid 1 is involved in both pain and tumor growth in a mouse model of cancer pain (がん性痛モデルマウスにおいて、TRPV1 の活性化はがん性痛と腫瘍増殖に関与する)		
論文審査委員	主査	教授 神人 正寿	
	副査	教授 西谷 友重	教授 川股 知之

論文内容の要旨

【緒言】

様々ながんにおいて、がんの進行と末梢神経の関連が示唆されており、腫瘍の成長や転移に対する感覚神経の寄与が報告されている。中でもカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP: calcitonin gene-related peptide) 陽性神経は大きな関心を集めており、CGRP と腫瘍の関連については、腫瘍近傍で放出された CGRP が腫瘍の血管新生を促進し腫瘍の増殖をもたらすことや、CGRP が免疫監視機構の疲弊を通じて腫瘍の成長を促進することが報告されている。このように、腫瘍微小環境における CGRP 陽性神経の活性化は、腫瘍の成長に極めて重要であることが示されている。しかしながら、CGRP 陽性神経がどのようにして活性化されるのかは解明されていない。

TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) は、腫瘍微小環境において感覚神経を活性化する候補の一つである。TRPV1 は、CGRP 陽性神経を含む無髄神経に多く発現している。また、ポリモーダルな痛覚センサーであると考えられており、TRPV1 の活性化ががん性痛に関与していることを示す報告が多数ある。

本研究の目的は、TRPV1 の活性化ががん性痛を誘発するだけでなく、腫瘍近傍の CGRP 陽性神経を活性化し、腫瘍の成長をもたらすという仮説を検証することである。

【方法】

使用動物

雄性 C57BL6J マウス (WT)、CGRP 遺伝子欠損マウス (CGRP KO)、TRPV1 遺伝子欠損マウス (TRPV1 KO) を使用した。CGRP KO マウスは CRISPR-Cas9 を用いて作製した。

がん性痛モデルの作製と腫瘍体積の評価

WT、CGRP KO、TRPV1 KO の足蹠に Lewis lung carcinoma を皮下接種し、がん性痛モデルを作製した。後肢の体積は、腫瘍接種前および接種後 7、14、21、28 日目にデジタルプレシスモーターを用いて測定した。また、WT および TRPV1 KO のがん性痛モデルにおいて、腫瘍接種後 14、21、28 日目に腫瘍を採取した。最大断面で標本を作製し、Hematoxylin-Eosin 染色を行い、顕微鏡の測定アプリケーションを用いて腫瘍の最大断面積を測定した。

CGRP 陽性神経の活性化の評価

持続的な侵害刺激は後根神経節ニューロンの亜集団において CREB (cAMP response element binding protein) のリン酸化を誘導することから、p-CREB は感覚神経活性化のマーカーとなる。そこで、WT と TRPV1 KO でがん性痛モデルを作製し、L4/5 の後根神経節で CGRP と p-CREB の二重免疫染色を行った。

行動評価

WT および TRPV1 KO のがん性痛モデルにおいて、行動評価はすべて腫瘍接種前と接種後 7、14、21、28 日目に行った。がん性痛は 2 分間のフリッチ数および歩行時の四肢使用スコアで評価した。侵

害刺激に対する反応は、von Frey filament に対する逃避閾値および侵害熱刺激に対する逃避潜時で評価した。逃避閾値および逃避潜時は腫瘍の中心部と辺縁部で評価した。

CGRP 陽性神経の定量化

腫瘍接種前および腫瘍接種後 14 日目に腫瘍の中心部と辺縁部における CGRP 陽性神経を計数した（腫瘍接種前は足蹠の中心部と辺縁部の CGRP 陽性神経を計数した）。

【結果】

1. 腫瘍体積の評価

①WT と CGRP KO の比較

両マウスともに腫瘍の接種により後肢の体積が有意に増加した。CGRP KO の後肢の体積は、接種後 14、21、28 日目において、WT よりも有意に小さかった。

②WT と TRPV1 KO の比較

両マウスともに腫瘍の接種により後肢の体積が有意に増加した。TRPV1 KO の後肢の体積は、接種後 14、21、28 日目において、WT よりも有意に小さかった。また、TRPV1 KO の腫瘍の最大断面積は、接種後 14、21、28 日目において、WT よりも有意に小さかった。

以上より、CGRP および TRPV1 が腫瘍増殖に寄与していることが示唆された。

2. CGRP 陽性神経の活性化の評価

両マウスの腫瘍接種前の CGRP 陽性神経における p-CREB 陽性の割合は同程度であった。両マウスともに腫瘍の接種により CGRP 陽性神経における p-CREB の発現が増加した。TRPV1 KO の CGRP 陽性神経における p-CREB 陽性の割合は、接種後 14、21、28 日目において、WT よりも有意に低かった。

以上より、TRPV1 は CGRP 陽性神経を活性化することが示唆された。

3. 行動評価

TRPV1 KO のフリンチ数は、接種後 14、21、28 日目において、WT マウスよりも有意に減少した。

TRPV1 KO の四肢使用スコアは、接種後 14、21 日目において、WT よりも有意に高かった。

侵害機械刺激に対する反応（逃避閾値）は、両マウスで腫瘍の中心部で徐々に増加し、辺縁部で徐々に減少した。両マウスの中心部と辺縁部の逃避閾値の経過は同等であった。

侵害熱刺激に対する反応（逃避潜時）は、両マウスで腫瘍の中心部で徐々に増加し、経過は同等であった。一方、辺縁部の TRPV1 KO の逃避潜時は、接種後 7、14、21、28 日目において、WT よりも有意に長かった。

以上より、侵害機械刺激および熱刺激に対する感受性は腫瘍の中心部で低下し、腫瘍の辺縁部で上昇すること、TRPV1 は辺縁部の熱性痛覚過敏に関与していたが、機械性痛覚過敏には関与しないことが示唆された。

4. CGRP 陽性神経の定量化

CGRP 陽性神経は腫瘍接種前や腫瘍の辺縁部に認められたが、腫瘍の中心部には認められなかった。

【考察】

本研究の結果より、腫瘍接種により腫瘍辺縁部の神経で TRPV1 の活性化が起こり、中枢神経系に痛みを伝える一方、末梢の CGRP 陽性神経の活性化により腫瘍増殖が引き起こされると考えられた。CGRP 放出の機序は、侵害刺激に対しポリモーダル受容器が興奮し、中枢神経に向かう知覚神経の軸索から CGRP が放出される「軸索反射」と考えられる。本研究は、TRPV1 を標的とした鎮痛薬はがん性痛のみならず、腫瘍増殖をも抑制する有望な治療薬となりうる可能性を示している。

【結論】

TRPV1 の活性化はがん性痛を誘発するだけでなく、CGRP 陽性神経を活性化し、腫瘍の増殖をもたらす。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和6年1月30日および1月31日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。

様々ながんにおいて、がんの進行と末梢神経の関連が示唆されており、腫瘍の成長や転移に対する感覚神経の寄与が報告されている。中でも CGRP 陽性神経は大きな関心を集めており、腫瘍微小環境における CGRP 陽性神経の活性化は腫瘍の成長に極めて重要であることが示されている。しかしながら、CGRP 陽性神経がどのようにして活性化されるのかは解明されていない。そこで、申請者は、CGRP 陽性神経を含む無髄神経に多く発現している痛覚センサーである TRPV1 に着目し、TRPV1 の活性化ががん性痛を誘発するだけでなく、腫瘍近傍の CGRP 陽性神経を活性化し、腫瘍の成長をもたらすという仮説を検証した。

雄性 C57BL6J マウス (WT)、CGRP 遺伝子欠損マウス (CGRP KO)、TRPV1 遺伝子欠損マウス (TRPV1 KO) の足蹠に Lewis lung carcinoma を皮下接種し、がん性痛モデルを作製した。腫瘍を接種した後肢の体積を経時的に測定した結果、腫瘍接種後の CGRP KO、TRPV1 KO の後肢の体積は WT よりも有意に小さく、CGRP および TRPV1 が腫瘍増殖に寄与していることが示唆された。次に申請者は、WT と TRPV1 KO でがん性痛モデルを作製し、L4/5 の後根神経節で CGRP と感覚神経活性化のマーカーとなる p-CREB の二重免疫染色を行った。TRPV1 KO の CGRP 陽性神経における p-CREB 陽性の割合は WT よりも有意に低く、TRPV1 は CGRP 陽性神経を活性化することが示唆された。また、がん性痛の程度は TRPV1 KO で有意に弱く、TRPV1 はがん性痛に関与することが示唆された。侵害刺激に対する反応を検証した結果、TRPV1 は腫瘍辺縁部の熱性痛覚過敏に関与するが、機械性痛覚過敏には関与しないことが示された。さらに、侵害刺激に対する感受性は腫瘍の中心部で低下し、腫瘍の辺縁部で上昇することが明らかとなった。腫瘍接種前および接種後に腫瘍の中心部と辺縁部における CGRP 陽性神経を計数した結果、腫瘍接種前に認められていた CGRP 陽性神経は腫瘍接種後の腫瘍の中心部には認められず腫瘍の辺縁部にのみ認められた。

以上の結果より、腫瘍接種により腫瘍辺縁部の神経で TRPV1 の活性化が起こり、中枢神経系に痛みを伝える一方、末梢の CGRP 陽性神経の活性化により腫瘍増殖が引き起こされることが示唆された。

本研究は、TRPV1 ががん性痛と腫瘍増殖に対する有望な治療標的となりうる可能性を示しており、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675号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	田中 美奈子		
学位論文の題目	Expression of collagen-related piRNA is dysregulated in cultured dermal fibroblasts de-rived from patients with scleroderma (強皮症患者から採取した培養皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン関連 piRNA の発現異常)		
論文審査委員	主査	教授 藤井 隆夫	
	副査	教授 神人 正寿	教授 村田 晋一

論文内容の要旨

【緒言】

近年の医学の進歩には目覚ましいものがあるが、未だにその発症原因が解明されていない病気も数多く存在する。その中でも、全身性強皮症 (SSc)は皮膚や肺を含む多臓器組織が線維化により硬化する病気であるが、線維化の原因としての異常なコラーゲン発現のメカニズムはまだ不明であり、この疾患の治療法は確立していない。数多くの臨床研究や基礎研究が行われているが、この疾患には症例ごとに **heterogeneity** が存在するため病態の解明が進んでいない。

膠原病では一般的に遺伝的素因と環境的素因が発症に関与していると考えられており、遺伝的に発症しやすい素因を有する個人が、環境因子の影響をうけて発症するとされている。今回我々が注目したのは最近発見された 24~31 ヌクレオチドからなる低分子 non-codingRNA の 1 つ、PIWI 相互作用 RNA (piRNA)である。piRNA はよく知られている低分子 non-codingRNA の miRNA や siRNA とは異なり、独自の生合成プロセスで生成される。そして PIWI 蛋白と複合体を形成し相補的な配列をみつけて特定の標的 RNA に結合し miRISC を動員して転写抑制を可能にする。当初 piRNA はトランスポゾンと生殖幹細胞の発生のみを制御すると考えられていたが、転写レベルと転写後レベルの両方でエピジェネティクスを制御し疾患の **heterogeneity** に関わりうるということが知られるようになった。さらに近年は PIWI 蛋白と piRNA の発現異常が一部の悪性腫瘍で報告されており、腫瘍形成腫瘍形成に関与し、癌の予後に関連していることがわかってきているが SSc 患者における発現は未だ解明されていない。したがって、我々は本研究において SSc におけるコラーゲン異常蓄積における PIWI/piRNA 経路の役割について検証した。

【方法】

1. 細胞培養

ヒト皮膚線維芽細胞は、皮膚硬化出現 2 年未満のびまん性皮膚 SSc 患者 3 名の患部 (前腕背側)から皮膚生検によって取得した。対照として正常皮膚線維芽細胞も取得した。これらの真皮線維芽細胞を、10%ウシ胎児血清および抗生物質抗真菌剤を添加したイーグル最小必須培地で培養した。異なる個体から独立して単離した単層培養物を、5%CO₂ 中で 37°C に維持した。すべての実験の前に、細胞を血清飢餓状態にした。

2. 皮膚サンプル

SSc 患者 (n=5)の罹患した前腕の皮膚から取得し、対照として使用するために正常な皮膚も取得した。採取後すぐにホルマリンで固定、パラフィンに包埋した。

3. 合成オリゴ

ヒト皮膚線維芽細胞に piR-32368 オリゴを人工的に導入した。Scrambled and non-targeting RNA をコントロールとして使用した。

4. RNA の単離と定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

培養線維芽細胞からの全 RNA を、RNeasy Mini Kit を使用し抽出した。パラフィン切片からの全 RNA は RNeasy FFPE Kit を用いて抽出した。PrimeScript RT 試薬キットを使用して total RNA から cDNA を合成した。COL1A1、COL1A2、およびグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ

(GAPDH)のプライマーは FASMAC から購入した。定量的リアルタイム PCR は、TB Green Premix Taq II を使用して、TaKaRa Thermal Cycle Dice で実行した。各 PCR 反応のデータは Thermal Cycle Dice リアルタイムシステムで解析した。各遺伝子の転写レベルは、GAPDH の転写レベルを用いて補正した。

5. piRNA の定量的リアルタイム PCR

piRNA からの cDNA 合成には、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit を使用した。piRNA プライマーの配列は piRNADB (<https://www.pirnadb.org>)に基づいて設計した。すべての piRNA の転写レベルは、同じサンプル内の U6 の転写レベルを用いて補正した。

6. 細胞溶解と免疫ブロッティング

線維芽細胞をコンフルエントになるまで培養し、その後培地を除去した。細胞をリン酸緩衝食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、M-PER 試薬で総可溶性蛋白の抽出を行った。その後電気泳動によって分離した。I 型コラーゲンの一次抗体は、Southern Biotechnology Associates から購入した。バンドは、Clarity Western ECL Substrate を使用して視覚化した。

7. 統計分析

棒グラフは平均値+標準偏差 (SD) とし、統計分析には Mann-Whitney U 検定を使用した。P 値 < 0.05 を有意とした。

【結果】

1. 培養 SSc 真皮線維芽細胞における PIWI 遺伝子発現

まず SSc 患者 3 名と正常被験者 3 名の培養真皮線維芽細胞から抽出した全 RNA を用いてリアルタイム PCR で遺伝子発現を比較したところ、4 種類の PIWI 遺伝子のうち、PIWIL4 のみが検出された。各サンプルの GAPDH の転写レベルで PIWIL4 の転写レベルを補正すると、SSc 線維芽細胞における PIWIL4 の発現は正常な対照線維芽細胞と同程度であり、有意差はなかった。

2. 培養 SSc 真皮線維芽細胞における piRNA の発現

次に SSc の病態に関与する重要な分子として COL1A1、COL1A2、COL3A1、KLF5、Fli1 に焦点をあて、piRNADB を使用した piRNA 標的遺伝子予測に従い 9 つの piRNA を SSc 関連 piRNA の候補として選択した。各 piRNA に特異的なプライマーを使用して定量的リアルタイム PCR 分析を行った。結果、9 つの piRNA のうち、COL1A1 を標的とする piR-32368 の発現のみが SSc 真皮線維芽細胞において有意に上昇していた。

3. 全皮膚組織における piRNA の発現

各々 5 名の SSc 患者皮膚組織、および正常皮膚組織から抽出した RNA における piR-32368 の発現も同様に解析した。SSc 皮膚では piR-32368 発現がわずかに増加していたが、統計的有意性はなかった。

4. TGF- β 1 の piR-32368 発現への影響

SSc 線維芽細胞では TGF- β 1 シグナルの恒常的な活性化が見られることが知られている。正常な線維芽細胞における外因性 TGF- β 1 刺激は piR-32368 発現を有意に誘導したため、SSc 皮膚線維芽細胞での piR-32368 発現増加の一因である可能性が示唆された。

5. piR-32368 を導入した培養真皮線維芽細胞におけるコラーゲン発現

SSc 皮膚線維芽細胞における piR-32368 の発現増加の病態に与える影響についてさらに解析した。piR32368 合成オリゴを作成し導入することで正常の線維芽細胞で強制的に piR-32368 を誘導できた。さらに、piR-32368 の正常線維芽細胞での強制発現は、mRNA レベルと蛋白質レベルの両方で COL1A1 の発現を大幅に減少させたが、一方 COL1A2 発現は影響を受けなかった。よって、COL1A1 が真皮線維芽細胞における piR-32368 の特異的標的であることが示された。

【考察】

前述の通り piRNA は、いくつかの癌の発症に関与していると考えられている。しかし、SSc 患者における PIWI/piRNA 経路の発現と役割はまだ理解されていない。本研究では PIWIL1-3 は正常な皮膚線維芽細胞では検出されなかった。PIWIL1 と PIWIL2 は精巣で発現していることが報告されているが、PIWIL3 は成人の精巣では検出できず、胎児の精巣と卵巣で発現されることが知られている。一方、PIWIL4 の組織特異性は低いようであり、本研究は真皮線維芽細胞における PIWIL4 の発現を実証した最初の研究である可能性があるものの、正常および培養 SSc 皮膚線維芽細胞における

PIWIL4 発現量に差はなかった。

一方、SSc 関連分子として COL1A1、COL1A2、COL3A1、KLF5、Fli1 に注目した。これらはいずれも SSc 患者において病態や環境的素因に関連することが報告されているためである。これらの分子を標的とすることが予測される piRNA の中で、我々は SSc 皮膚線維芽細胞における piR-32368 の有意な発現増加をはじめて発見した。真皮線維芽細胞による過剰なコラーゲン産生は、少なくとも部分的には、TGF- β の恒常的な活性化によって引き起こされると考えられているが、本研究で SSc 線維芽細胞における piR-32368 の発現増加も、内因性 TGF- β シグナル活性化に起因する可能性があることを示した。

SSc の皮膚病変に蓄積されるコラーゲンの大部分は I 型コラーゲンであり、COL1A1 と COL1A2 によるらせん構造で構成されている。我々は SSc 真皮線維芽細胞における piR-32368 の発現増加がコラーゲン発現を刺激するという仮説を立てたが予想に反して、正常線維芽細胞における piR-32368 の強制過剰発現は、COL1A1 の発現を mRNA レベルと蛋白質レベルの両方で有意に減少させたものの、COL1A2 の発現は減少させなかった。したがって、COL1A1 は piR-32368 の特異的な標的であると考えられた。

【結論】

恒常的な TGF- β シグナル伝達によるものと思われる、SSc 皮膚線維芽細胞における piR-32368 の有意な発現増加を初めて発見した。正常線維芽細胞における piR-32368 の強制過剰発現は、mRNA レベルと蛋白質レベルの両方で COL1A1 の発現を有意に減少させたが、COL1A2 は減少させなかった。したがって、SSc 線維芽細胞における piR-32368 の過剰発現は、コラーゲンの発現増加に対する負のフィードバックである可能性があり、piRNA は潜在的な治療標的となる可能性がある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和 6 年 1 月 30 日、2 月 2 日論文審査委員は学位請求者の出席を求め論文審査を行った。

膠原病では一般的に遺伝因子と環境因子が発症に関与すると考えられており、多彩な病状に影響する環境因子の 1 つとして近年 non-codingRNA が注目されている。我々は膠原病の 1 つで全身の多臓器に線維化をきたす全身性強皮症のコラーゲン異常発現メカニズムについて、non-codingRNA の 1 つである piRNA に注目した。PIWI 蛋白と piRNA の発現異常が一部の悪性腫瘍で報告されており、腫瘍形成腫瘍形成に関与し、癌の予後に関連していることがわかってきているが全身性強皮症患者における発現は未だ解明されていない。本研究では全身性強皮症患者のコラーゲン異常蓄積における PIWI/piRNA 経路の役割について検証した。研究材料として、ヒト皮膚線維芽細胞(n=3)健康人皮膚(n=3)、患者前腕皮膚(n=5)、正常皮膚(n=5)、piR32368 オリゴを人工的に導入した皮膚線維芽細胞を用いた。皮膚線維芽細胞における PIWI 発現を real-timePCR で比較し、次に piRNAab を用いて予測した全身性強皮症関連の piRNA9 つに対して定量的 real-timePCR を行った。有意であった piR32368 に対し全皮膚での発現を同様に解析した。線維化誘導として知られる外因性 TGF β 1 が piR32368 の発現を誘導するかを解析し、さらに piR32368 合成オリゴを導入した正常線維芽細胞で mRNA レベル、タンパク質での COL1A1、COL1A2 の発現について検証した。その結果、4 種類の PIWI 遺伝子のうち PIWIL4 のみが検出されたが有意差はなかった。また 9 つの piRNA のうち、COL1A1 を標的とする piR32368 の発現のみが SSc 真皮線維芽細胞において有意に上昇した。SSc 皮膚では piR32368 発現がわずかに増加していたが、統計的有意性はなかった。SSc 線維芽細胞では TGF- β 1 シグナルの恒常的な活性化が見られることが知られており、正常な線維芽細胞における外因性 TGF- β 1 刺激は piR32368 発現を有意に誘導したため、SSc 皮膚線維芽細胞での piR32368 発現増加の一因である可能性が示唆された。piR32368 の正常線維芽細胞での強制発現は、mRNA レベルと蛋白質レベルの両方で COL1A1 の発現を大幅に減少させたが、一方 COL1A2 発現は影響を受けなかった。よって、COL1A1 が真皮線維芽細胞における piR32368 の特異的な標的であることが示された。

本論文は SSc 皮膚線維芽細胞における piR32368 過剰発現が恒常的な TGF β シグナル伝達に関連し、過剰発現がコラーゲンの発現増加に対する負のフィードバックである可能性を示唆し、

piRNA がエピジェネティック治療の 1 つとして強皮症の多様な表現別に個別化治療としての潜在的な治療標的となりうる可能性があることをみとめたものであり、博士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676号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	Nafisa Khamis Umar		
学位論文の題目	Respiratory quinolones can eradicate amoxicillin-induced mature biofilms and nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i> in biofilms (レスピラトリーキノロンは、アモキシシリン誘発性成熟バイオフィームおよびバイオフィーム内の分類不能なインフルエンザ菌を根絶できる)		
論文審査委員	主査	教授	小泉 祐介
	副査	教授	徳原 大介
		教授	保富 宗城

論文内容の要旨

[緒言] Introduction:

Biofilm is considered being involved in the persistent bacterial infections caused by nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi), a common human respiratory tract commensal-turned-pathogen. Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) has the ability to form biofilm and its infection such as in AOM, rhinosinusitis, COPD, requires persistent changes to the treatment strategies.

Amoxicillin (AMPC) has been recognized as the first choice of drug for patients with AOM, rhinosinusitis, and lower respiratory tract infections. Despite that, NTHi frequently persists due to biofilms that provide resistance against host defense and antimicrobial killing. The bacteria forms biofilm from planktonic state by growing into multiple layers of aggregates, emerging as a thin layer of extracellular matrix attached to a mucosal surface or as a clump. Despite the recognition of the importance of biofilm threats and increasing resistance to AMPC, sufficient clinical guidance on successful treatments of NTHi biofilm is still lacking. Thus, antimicrobial susceptibility evaluation of NTHi in biofilms conditions is important in considering appropriate treatment options and effective control.

This study aims to elucidate the efficacies of some antibiotics in comparison with AMPC on NTHi biofilm, and alternative antibiotics for possible treatment of NTHi related infections.

【方法】 Methods:

Bacteria and condition: Third generation clinical isolates of NTHi obtained from pediatric patients with AOM were used in this study. β -lactamase non-producing ampicillin sensitive (BLNAS) strain of NTHi IH-202 was used as a representative positive standard strain.

Antimicrobial susceptibility test of the antibiotics: Microbroth dilution method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) was used to determine the minimal inhibitory concentrations (MICs) of six antibiotics, used for antimicrobial susceptibility. They are AMPC, clarithromycin (CAM), cefditoren (CDTR), cephalexin (CEX), garenoxacin (GRNX) and tosufloxacin (TFLX).

Microtiter plate biofilm formation assay, and viability test: A 96-well replicator assay with pin lids using crystal violet staining, was applied for evaluating antimicrobial efficacies against NTHi biofilms. Viable cells of NTHi in biofilms after antimicrobial exposures were also evaluated using agar culture method.

NTHi strains were grown in brain heart infusion broth supplemented with 15 μ g/ml of hemin and 15 μ g/ml of diphosphopyridinenucleotide (NAD) (sBHI), in a water bath with shaking at 180 rpm/min until OD₆₀₀=0.5 at 37°C. Bacterial suspension was diluted with fresh sBHI at 1:10, and then 200 μ l of aliquots were inoculated into 96-wells micro-titer plates with or without antibiotics, covered with 96-pin lids, and incubated at 37°C with shaking at 80 rpm/min for 24 h to 72 h. At the end of each 24 h incubation, we transferred each 96-pin lid to a

new plate with fresh sBHI for further incubation, assayed their biofilm, or used for viability test for survival after treatment.

Efficacy of antibiotics against NTHi biofilm: The efficacies of the antibiotics at Minimum Inhibitory Concentrations (MICs: 1/2xMIC, 1xMIC, and 2xMIC) and clinical concentrations_ on the inhibition of NTHi biofilm formation, the eradication of NTHi matured biofilm, and AMPC exposed matured NTHi biofilm were assayed.

Statistical analysis: All statistical analyses were performed using Prism, employing Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U test, Friedman test or Wilcoxon matched paired test. A *p* value of <0.05 was considered being statistically significant.

【結果】 Results:

1. **Inhibitory, Suppressive and Destructive effects of the antibiotics against NTHi biofilm:** As the MICs of AMPC failed to prevent biofilm formation at 24 h incubation and destroy 24 h and 48 h matured biofilm effectively, that of respiratory quinolones GRNX and TFLX successfully prevent and destroyed both NTHi biofilm formation and growth (fig.1). On the other hand, high concentration of AMPC at child clinical concentration was able to prevent the biofilm formation, suppress its growth, and destroy its 48 h matured form. Meanwhile, the adult clinical concentration of AMPC up-regulated the growth of 48 h matured biofilm while suppressing the growth of its 24 h matured with statistical significance. But, both respiratory quinolones GRNX and TFLX successfully prevent and destroy both NTHi biofilm formation and growth at all concentrations (fig.2).
2. **Efficacies of the antibiotics against AMPC exposed NTHi biofilm:** Exposure of 24 h matured biofilm to APMC at MICs and adult clinical concentration, followed by another AMPC course for 24 h resulted in growth continuation surprisingly worse than when no more APMC is administered. Conversely, child clinical concentration of AMPC and all concentrations of GRNX and TFLX successfully destroyed the biofilm mercilessly (fig.3 & fig.4).
3. **Survival of NTHi in biofilms after antimicrobial exposures:** Using 24 h matured biofilm exposed to AMPC with subsequent treatment with either no further antibiotic, AMPC, GRNX, and TFLX at MICs and clinical concentrations respectively, only the respiratory quinolones GRNX and TFLX eliminate all live bacteria at all times (fig.5).

【結論】 Conclusion:

Biofilms formed by IH-202 strain accumulated during incubation. AMPC did not reduce or inhibit biofilm formation, nor eradicate matured biofilms of NTHi. The NTHi in matured biofilm were alive after exposure to AMPC. In contrast, TFLX and GRNX inhibit NTHi biofilm formation of NTHi and eradicate matured biofilms. The respiratory quinolones but not AMPC killed the viable NTHi in biofilms, due to their ability in targeting bacterial cell's DNA gyrase and topoisomerase IV.

NTHi persists in biofilms even after antimicrobial treatments. These findings may eventually lead to a better understanding of how to use antibiotic therapy to eradicate NTHi growing as biofilms or even to the development of novel therapeutic agents that can be used to treat patients with mucosal NTHi biofilm infections. Meanwhile, respiratory quinolones are attractive agents to reduce and or inhibit both NTHi biofilm formation and destroy established biofilm.

As clinical infections are mostly found with more than one bacterium during disease onset, more elaborate findings with multiple bacteria in co-culture are necessary for better treatment and control. Hence, we are currently working on NTHi co-cultured with moraxella catarrhalis (another pathogen frequently isolated together during infection) and their biofilm susceptibility to the above antibiotics. In the prospective, we plan to

move on to test the efficacy of antibiotics on NTHi co-cultured with streptococcus pneumoniae (yet another frequently isolated pathogen with NTHi). In conclusion, with the availability of more scientific research on NTHi biofilm and effective antibiotics, a better understanding of biofilm related infection, effective treatment course as well as control could be established.

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和6年2月16日、21日、および22日、論文審査員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

バイオフィームは、急性中耳炎や鼻副鼻腔炎、COPD などに見られる無莢膜型インフルエンザ菌(NTHi)の遷延性感染に関与していると考えられている。とりわけ、肺炎球菌ワクチンが普及した現在、NTHiは急性中耳炎で最も頻繁に検出されるとともに、難治化の主な原因菌となっている。

β-ラクタム系抗菌薬であるアモキシシリン (AMPC)は、急性中耳炎や急性鼻副鼻腔炎に対する抗菌薬治療の第一選択薬とされる。一方、NTHiはバイオフィームを形成することで、AMPCによる治療に対して抵抗性を示す。AMPC治療に抵抗性を示す症例に対する治療においてバイオフィームの制御は重要な課題であるが、バイオフィームを形成するNTHiに対する抗菌薬の有効性に関する知見は少ない。

本研究の目的は、NTHiのバイオフィーム形成に対する抗菌薬の有効性を明らかにすることである。抗菌薬のNTHiのバイオフィーム形成と殺菌作用への影響を、ピン付き96ウェルプレートを用いたO'Tooleのクリスタルバイオレット染色法により評価した。抗菌薬には、AMPCとGRNX、TFLXを用いた。AMPCは、sub-MIC・MIC濃度ではバイオフィーム内のNTHiを殺菌することができなかった。副鼻腔粘膜組織濃度においても、バイオフィーム内でNTHiが生存し、AMPCへの曝露終了後にはNTHiのバイオフィームが再度形成された。一方、レスピラトリーキノロン系抗菌薬のGRNXとTFLXでは、副鼻腔粘膜組織濃度でバイオフィーム形成が阻害されるとともに、バイオフィーム内のNTHiが殺菌された。この結果から、レスピラトリーキノロン系抗菌薬は、バイオフィームを形成するNTHiに対して高い有効性を示すことが明らかとなった。また、NTHiは抗菌薬治療後も抗菌薬に対する耐性化や不応答によりバイオフィーム内に持続して残存する。低用量でのAMPCはNTHiのバイオフィーム形成を亢進させるため、高用量またはレスピラトリーキノロンの活用が有用と考える。

本研究は、NTHiの上気道感染症の難治化におけるバイオフィームの関与を明らかにし、AMPCを基本とした抗菌薬の適正使用に寄与することが期待されることから、博士學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677号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	白川 裕二		
学位論文の題目	Safety and Pitfalls of Blepharoptosis Surgery in Elderly People (高齢者における眼瞼下垂症手術の安全性と注意点)		
論文審査委員	主査	教授 川井 学	
	副査	教授 雑賀 司珠也	教授 朝村 真一

論文内容の要旨

【緒言】

眼瞼下垂症手術は、視野の拡大を目的として、年齢を問わず一般的に行われているが、多くの形成外科医は、その手術成績を評価する際、上眼瞼の輪郭や外観の左右差などの美容的な改善に焦点を当てる傾向がある。しかしながら、手術によって視野が広がり、美容的な改善が得られても、すべての患者が手術後に満足しているわけではない。特に高齢患者の場合、主観的症状だけではなく視覚障害やドライアイのような若年層とは異なる機能的な問題が手術後に生じることがある。その代表的な合併症として、点状表層角膜症 (SPK) の出現や悪化が知られている。

我々の先行研究では、術後 MRD-1 (Margin Reflex Distance-1) が 3.5mm以上を呈することが SPK の増悪因子となることを示した。しかし一方で、その様な術後症例の中には SPK の出現や悪化を呈さない症例も存在していた。したがって、本研究では、高齢者における眼瞼下垂症手術の安全性と有効性を、MRD-1 の絶対値ではなく、術前後の変化量に対する患者の主観的症状と SPK スケール測定による分類によって比較検討することを目的とした。

【方法】

1. 対象

2019年4月から2020年2月までの間に当院で眼瞼下垂手術を受けた22人(44眼)の患者であり、性別は男性8人、女性14人で、平均(±SD)年齢は75.7±8.2歳(範囲:61-89歳)であった。本研究は和歌山県立医科大学倫理委員会(承認番号2549)の承認を得て行い、ヘルシンキ宣言の原則に従って実施した。

2. 手術方法

皮膚切開を伴う眼瞼挙筋前転術又は皮膚、皮下組織、眼輪筋の切除を含む眼瞼形成術を行った。皮膚切開を伴う眼瞼挙筋前転術の場合、術中、仰臥位でのMRD-1を4.0mmに調整した。

3. 視野拡大と角膜障害に関する評価方法

評価は、手術前と手術後3か月に行い、その項目はMRD-1、目の症状質問票による調査、SPK (superficial punctate keratopathy) の分類とした。

3-1. MRD-1の測定

MRD-1は、中心瞳孔と上眼瞼縁の距離と定義され、共同研究を実施している本学の眼科医により測定を行った。

3-2. 目の症状質問票による調査

視覚障害、眼の疲労、重いまぶた、痛みやしみる目、目の乾燥感、異物感、焦点合わせの困難や複視など、眼の症状に関する10項目のアンケート調査を行った。視覚障害の程度は、1から5までのLikertスケールで評価した。

3-3. SPKの評価方法

SPKは蛍光染色液を下方嚢に投与し、検査紙(FLUORES Ocular Examination Test Paper 0.7mg; アユミ製薬、東京、日本)を添付する事によって行い、病変の面積と密度をパラメータとし、4段階で評価した(0:障害なし、1:軽度、2:中等度、3:重度)。SPKに於ける障害角膜面積の評価は、蛍光染色による点状染色がない場合はA0、角膜の1/3未満を占める場合はA1、角膜の1/3から2/3

を占める場合は A2、角膜の 2/3 以上を占める場合は A3 と評価した。集積程度の評価は、点状染色がない場合は D0、その集積が低度な場合は D1、中程度の場合は D2、密度が高いまたは病変が重複する場合は D3 と評価した。測定と検査に関しては主観的な要素を含むため、形成外科医と眼科医のものと検討した。

3-4.統計解析

Mann-Whitney U test および Wilcoxon signed-rank sum test を用いて解析した。ROC 曲線を作成し、曲線下面積を算出した。P 値<0.05 を統計的に有意とみなした。すべての統計解析は、JMP 14 ソフトウェア (SAS Institute Inc.Cary, NC) を用いた。

【結果】

1. MRD-1 の術後改善

手術前の MRD-1 の中央値 (四分位範囲) は 1 mm [0.125-1.5] であり、術後は 2.5 mm [2-3] となり、有意な改善が見られた (P<0.05)。

2. 目の症状質問票による調査で視覚評価の改善

質問票の 10 項目のスコアすべてが手術後に増加する傾向にあり、そのうち 7 項目 (視界の悪さ、眼の疲労感、重いまぶた、異物感、焦点の合わせにくさ、頭痛、肩こり) で有意な改善を認めた。

3. 術後 SPK スケールの増加

手術前の平均 SPK 面積は 0.25 ± 0.44 であり、手術後は 0.39 ± 0.58 であった。手術後の平均 SPK 密度は 0.32 ± 0.6 から 0.5 ± 0.76 となり、有意な増加が見られた (P<0.05)。

4. SPK による MRD-1 の変化のカットオフ値

MRD-1 の術後の改善値としての 2.5 mm が、SPK の改善/変化のない群と悪化群を分けるためのカットオフポイントとなり、その曲線下面積は 0.6605 となった。

5. MRD-1 の変化に基づく SPK の増悪

MRD-1 の変化が 2.5 mm 以上の群では、SPK の面積と密度が有意に悪化した。

6. 代表症例

症例 1

75 歳の女性で、手術前の MRD-1 は 1 mm であり、手術後の MRD-1 は 2.0 mm 増加し 3.0 mm であった。SPK は手術前後とも観察されなかった。

症例 2

73 歳の女性で、手術前の MRD-1 は 1 mm であり、手術後の MRD-1 は 2.5 mm 増加し 3.5 mm であった。手術前には SPK は観察されなかったが、手術後には軽度の SPK 面積と密度 (A1D1) が観察された。

【考察】

本研究では、MRD-1 の術後の変化量に対する SPK スケール測定を用いた分類比較を行った。高齢者における眼瞼下垂症手術では、MRD-1 の術後の変化量を 2.0mm 以下にすることが安全で有効であることを明らかとなった。

SPK は主に眼瞼下垂症手術後に発生することが知られており、我々の先行研究において術後の SPK の発症を防ぐためには術後の MRD-1 は 3 mm 未満である必要があると報告した。しかしながら、術後 MRD-1 が 3.5mm 以上の症例でも SPK を呈さない症例が存在することがあった為、術後の MRD-1 の絶対値だけでは手術の安全性と有効性の評価は難しいと考えた。そのため本研究では、手術による MRD-1 の変化量に対応する SPK の変化を比較したところ、術後の MRD-1 の変化量が 2.5 mm を超える場合に SPK の面積と密度のスコアが増加することが判明した。特に高齢者において MRD-1 の増加を 2.0 mm 以内に調整することが、安全かつ効果的な手術であることがわかった。

多くの形成外科医は、MRD-1 の増加が大きいほど視野の拡大が顕著であり、それが患者の術後満足につながると思っている。しかしながら上眼瞼は眼球の湾曲に沿って柔軟に可動して開閉するため、過度な MRD-1 の上昇はこの柔軟性の喪失を招き、涙液の安定性の低下や瞬目時の摩擦の増加によりドライアイ症状が悪化する。この様な状態下では SPK が発生する等によって眼症状は悪化する為、患者の不満が生じると考えられる。本研究では、術後の MRD-1 増加が 2.5 mm 以上または 2 mm 以下の群で SPK の面積と密度を評価し、MRD-1 の増加が 2.5 mm を超えることは SPK が増悪するリ

スクと関連する可能性が示唆された。

また、形成外科の分野に於いて、様々な視覚に関連する症状の改善が評価基準となる。従来の報告では、眼瞼下垂症手術によって視力や視野、生活の質が著しく改善されると結論づけられていた。本研究では、多数の患者の症状（視界の悪さ、眼の疲労感、重いまぶた、異物感、焦点の合わせにくさ、頭痛、こわばった肩）が有意に改善された。即ち、患者の主観的なドライアイ症状や健康関連の生活の多くの側面が手術によって著しく改善していた。

本研究の SPK の評価方法は、さまざまな眼瞼形成手術（眼瞼内反症を含む）の角膜表面の評価や、SPK 面積と密度の経時的な変化についての記述に於いても役立つと考えられる。一方で本研究の今後の課題点は、術後 3 か月に SPK 症状を呈する患者のみを評価した点である。高齢者に対する眼瞼下垂症手術の件数は、今後のさらなる高齢化社会が進む国内ではますます増加すると予想され、MRD-1 の増加を 2.0 mm 以内に保つことが安全かつ効果的な方法であることが判明した。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和6年2月21日 論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

眼瞼下垂症手術は、視野を広げることを目的として、若年層や高齢者の両方に対して一般的に行われている。しかしながら、その手術成績を評価する際、多くの臨床外科医は、上眼瞼の輪郭や外観の左右差などの美容的な改善に焦点を当てる傾向がある。同手術の施行により視野が広がり、美容的な改善が得られるが、すべての患者が手術後に満足しているわけではない。特に高齢者の場合、主観的症状だけではなく視覚障害やドライアイのような若年層とは異なる機能的な手術後の問題が生じる場合がある。代表的な合併症として、表在性点状角膜症（SPK）や悪化が知られているが、SPKの術前後の変化に関する報告はない。本研究では、高齢者における眼瞼下垂症手術の安全性と有効性を、主観的症状とSPKスケールの分類による検討を用いて解析を行った。

本研究で主観的症状の評価として視覚障害、眼の疲労、瞼の重たさ、痛み、目の乾燥感、異物感、焦点合わせの困難や複視など、眼の症状に関する 10 項目のアンケート調査を行った。障害の程度は、1 から 5 までの Likert スケールで評価した。アンケートの 10 項目すべてに手術後にスコアが増加する傾向にあり、そのうち 7 項目（視界の悪さ、眼の疲労感、瞼の重たさ、異物感、焦点の合わせにくさ、頭痛、肩こり）で有意な差を認めた。すなわち同手術によって、患者の主観的な乾燥眼症状や健康関連の生活の多くの側面が著しく改善した。

本研究では、SPK の評価は蛍光染色液を下方嚢に投与し、検査紙を用いて行った。SPK は、病変の面積と密度をパラメータとし、4 段階で評価した（0：なし、1：軽度、2：中等度、3：重度）。SPK の面積の評価は、点状染色がない場合は A0、角膜の 1/3 未満を染色部位が占める場合は A1、1/3 から 2/3 を占める場合は A2、2/3 以上を占める場合は A3 と評価した。染色密度の評価は、点状染色がない場合は D0、まばらな場合は D1、中程度の場合は D2、密度が高いまたは病変が重なっている場合は D3 と評価し解析した。その結果は手術による MRD-1 の増加が 2.5 mm を超える場合に SPK の面積と密度のスコアが増加することを明らかにした。特に高齢者において MRD-1 の増加を 2.0 mm 以内に調整することが、安全かつ効果的な手術であることがわかった。

本研究では、眼瞼下垂症手術の高齢者において MRD-1 の増加を 2.0 mm 以内に抑えることが安全かつ効果的な方法であることが判明した。また本研究の SPK の評価は今後の眼形成外科の分野において応用が期待され、博士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678号		
学位授与の日	令和6年3月26日		
氏名	玉井 英伸		
学位論文の題目	Transient receptor potential ankyrin 1 in the knee is involved in osteoarthritis pain (膝関節内 Transient receptor ankyrin1 は変形性膝関節症の疼痛に関与する)		
論文審査委員	主査	教授 廣西 昌也	
	副査	教授 西谷 友重	教授 山田 宏

論文内容の要旨

【緒言】

変形性膝関節症（膝 OA）は有症者数 800 万人を超える整形外科医が最も遭遇する運動器変性疾患の一つである。その痛みの原因は軟骨がすり減ったことで骨同士が当たり痛みをきたすと考えられていたが、画像上の進行度と疼痛の程度は必ずしも相関しないのが現状であり、画像所見に起因するもの以外に疼痛の原因となる様々なメカニズムが存在するとされている。

一過性受容体電位(Transient Receptor Potential)イオンチャネルは、全身に発現し、恒常性の調節に重要な役割を担っている。Subfamily である TRP ankyrin 1 (TRPA1)は主に感覚神経系に発現し、侵害受容化学センサーとして侵害受容、痛覚過敏、神経原性炎症を媒介する。また、同じく subfamily である TRP Vanilloid 1 は関節炎や炎症と関連し、TRPA1 と共発現されるとの報告もあり、治療のターゲットとして注目されているが、TRPA1 と OA との関連についての報告はまだ少ない。

今回我々は、TRPA1 と膝 OA による疼痛との関連を明らかにしたため報告する。

【目的】

膝 OA モデルラットを用いて膝 OA の疼痛と関節内 TRPA1 との関連を解明することである。

【方法】

3 週齢の Sprague - Drawley 系雄性ラットを使用し、前十字靭帯と内側半月板を切除後、6 週齢で膝 OA モデルの完成とした。Sham は関節包の切開のみとした。膝関節の軟骨変性の評価には国際関節症学会評価スケールを用い、OA の完成を確認している。

膝関節に対する侵害受容については、in vivo パッチクランプ解析を用いた。膝関節 OA の治療薬として期待される TRPA1 agonist である allyl isothiocyanate と TRPA1 antagonist である HC-030031（それぞれ 100 μ M、50 μ l）を関節内投与し、膠様質細胞の自発的興奮性シナプス電流（sEPSC）の頻度（Hz）と振幅（pA）を記録することで解析した。

続いて OA モデルを用いて歩行時の疼痛関連行動を評価するために CatWalk を、OA 膝関節の疼痛閾値の評価として、侵害受容器へ直接圧迫する Pressure application measurement (PAM)を用いて評価した。いずれも agonist 群（n=9）、antagonist 群（n=9）、生理食塩水投与群（n=10）に分け、記録は薬剤注入前、注入後 30min、1h、3h、6h、12h、24h で記録した。

【結果】

< In-vivo patch clamp >

Sham 群(n=7)では agonist 投与による sEPSC の頻度は投与前 2.3 ± 0.6 Hz、投与後 2.3 ± 0.6 Hz、sEPSC の振幅は投与前 7.6 ± 0.8 pA、投与後 7.9 ± 0.4 pA と変化をほとんど示さなかった。次に OA 群(n=7)では投与前 4.6 ± 0.9 Hz、投与後 7.1 ± 1.1 Hz で有意な増加を認めた。sEPSC の振幅は投与前 10.8 ± 0.9 pA、投与後 11.0 ± 0.8 pA と変化を示さなかった。これらの結果は、TRPA1 が膝 OA で活性化されていることが示唆された。

一方、antagonist 投与による OA 群（n=9）において sEPSC の頻度は投与前で 6.1 ± 1.4 Hz、投与

後 3.8 ± 1.0 Hz と有意に減少した。sEPSC の振幅は投与前 7.2 ± 0.9 pA、投与後 7.3 ± 0.6 pA と変化をほとんど示さなかった。膝 OA では TRPA1 が活性化されており、TRPA1 agonist の効果は副作用ではなく、TRPA1 の活性化によって誘発されることを示すものであった。

<CatWalk>

接地時間 (stand) と最大接地面積 (max contact area) を測定した。

CatWalk では Stand、Max contact area において agonist 投与群、生理食塩水群に比し antagonist 投与群で歩様の改善を認めた。また、agonist - 生理食塩水群では有意差を認めなかった。以上より TRPA1 活性の阻害が OA 膝痛を軽減できることが示唆された。

<PAM>

antagonist 投与群で有意な疼痛閾値の改善を認めた。また、agonist - 生理食塩水群では有意差を認めなかった。膝の TRPA1 が機械的刺激によって活性化される可能性を示唆している。

【考察】

TRPA1 は後根神経節や三叉神経節に発現し、侵害受容性 C および Aδ 繊維に発現し、強い寒さや刺激性の化合物に反応する。関節軟骨は血管や神経を持たず、本来痛みを感じない組織とされているが、膝関節の滑膜組織や半月板外縁部には多くの神経終末が存在する。このような通常神経が通っていない組織では、痛みを助長する血管新生が形成され結果、肝細胞増殖因子、血管内皮増殖因子などの様々な増殖因子によって刺激される。これらの他、OA と関連するとされている活性酸素種は TRPA1 の内因性 agonist とされており、*in vivo* patch clamp の結果より、膝 OA 関節において TRPA1 が活性化していることが証明された。

また、PAM、CatWalk の結果より、antagonist 群は、agonist 投与群と比較してラット膝関節の直接圧刺激の閾値が改善し、歩様が改善することが確認された。一方、agonist 投与群と生理食塩水群の投与との間に有意な差は認められなかった。これは、TRPA1 が内因性の agonist だけでなく、歩行による負荷などの機械的ストレスの存在によって生理食塩水群にも TRPA1 が活性化された可能性が考えられる。TRPA1 は、内耳細胞、皮膚感覚ニューロン、消化器感覚ニューロンにおいて機械伝達を担うことが示唆されているが、運動器領域において機械的ストレスが外因性のアゴニストとして TRPA1 を活性化することはこれまで報告されておらず、新たな可能性を示唆されたといえる。

【結語】

OA ラットの膝関節で TRPA1 が活性化し、TRPA1 活性が膝関節 OA による痛みを増強することを明らかにした。これまでの報告とは異なり、TRPA1 は炎症だけでなく、メカノセンサーとして機械的刺激によっても活性化し、OA 膝関節痛に必須な役割を果たすことが明らかにされた。本研究により、TRPA1 が膝関節痛の治療における新たな治療戦略の鍵となり、変性疾患の治療に貢献することが期待される。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和6年2月29日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

上記論文では、近年注目されている Transient Receptor Potential (TRP) ファミリーのサブファミリーである TRPA1 に着目し、本邦において有症者数800万人を超えるものの、疼痛の起源については未だ全貌が解明されていない変形性膝関節症 (膝 OA) のメカニズムに迫り、膝 OA の痛みと TRPA1 の関連性について明らかにした。膝 OA の痛みは、軟骨がすり減ったことで骨同士が当たり痛みをきたすと考えられてきたが、画像上の進行度と疼痛の程度は必ずしも相関しないのが現状であり、画像所見に起因するもの以外に疼痛の原因となる様々なメカニズムが存在するとされていることから着想を得たものである。

本研究では3週齢のSD系ラットの前十字靭帯と内側半月板を切除後、6週齢で膝OAモデルの完成とした。電気生理学実験では *in vivo* パッチクランプ解析を、行動学実験では CatWalk と Pressure application measurement を用いて評価した。薬剤は TRPA1 agonist である allyl isothiocyanate、TRPA1 antagonist である HC-030031、生理食塩水を関節内投与した。パッチクランプ法では膠様質

細胞の自発的興奮性シナプス電流 (sEPSC) の頻度と振幅を記録することで解析した。行動学実験では薬剤投与の前後で記録をとり、後肢の患側/健側比で評価した。

電気生理学実験では OA ラットでは sEPSC の頻度は agonist 投与後に増加し、antagonist 投与により減少した。Sham では薬剤投与前後で有意差はなかった。以上より TRPA1 が膝 OA で活性化されていることが示唆された。一方、行動学実験では agonist 群、生理食塩水群に比し antagonist 群で歩様の改善を認めた。また agonist - 生理食塩水群間では有意差を認めなかった。以上より TRPA1 活性の阻害が膝 OA 痛を軽減できること、TRPA1 が機械的刺激によって活性化される可能性が示唆された。

本研究では、ラット膝関節内で TRPA1 が活性化し、TRPA1 活性が膝 OA による痛みを増強することを明らかにした。TRPA1 は炎症や様々な外因子や内因子によって活性化されることがこれまで示されてきたが、これまでの報告にはなかったメカノセンサーとしての役割を有し、機械的刺激によっても活性化され、膝 OA 由来の膝関節痛に必須な役割を果たすことが明らかにされた。

以上のことから、TRPA1 が膝関節痛の治療における新たな治療戦略の鍵となり、膝関節以外の変性疾患の治療にも貢献することが期待されることが示され、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679号		
学位授与の日	令和6年3月26日		
氏名	村田 顕優		
学位論文の題目	A Bicortical Pedicle Screw in the Cephalad Trajectory Is the Best Option for the Fixation of an Osteoporotic Vertebra: A Finite Element Study (骨粗鬆症脊椎に椎弓根スクリューを刺入する際には椎体上位前方隅角に至るスクリューを選択すべきである：有限要素解析)		
論文審査委員	主査	教授 中川 幸洋	
	副査	教授 朝村 真一	教授 山田 宏

論文内容の要旨

【背景】

椎弓根スクリュー (PS)は、変性疾患や外傷を含む様々な脊椎疾患の治療における強固な固定法として数十年にわたりゴールドスタンダードとして用いられてきた。しかしながら、近年の高齢化社会の到来に際しては骨粗鬆症を要する脊椎に対する固定術の必要性が増しているが、PSの弛みは非常に多く見られる合併症であり、獲得した脊椎アライメントの喪失や偽関節など好ましくない結果をもたらす可能性がある。この問題を解決するため、すなわちPSによる固定力を向上するために、これまでにPSの最適な刺入深度や軌道について様々な力学的研究が行われてきたが、未だに統一した見解は得られていない。その要因として、力学試験に用いる資料の特性のばらつき（個体差）が大きいことや椎骨に刺入したPSに加える力学的負荷の方向が制限されることの影響が考えられる。今回、これらの力学試験における弱点を補うために椎骨の有限要素モデルを作成し、刺入深度や方向を厳密に調整するとともにPSに様々な方向の力学的負荷を加えることによって、最適な刺入方法について検討を行うこととした。

【目的】

骨粗鬆症椎体の有限要素モデルを用いて最適なPSの刺入深度と軌道について検討することである。

【対象と方法】

研究プロトコルは、本学の倫理委員会で検討・承認された。有限要素モデルの構築と力学的解析は、有限要素解析ソフト (Mechanical Finder ソフトウェア) を用いて行った。脊椎手術を受けた骨粗鬆症患者9名 (O群) と非骨粗鬆症患者9名 (NO群) の術前CT画像からそれぞれのL3椎体の3次元有限要素モデルを構築した。その際、椎体の骨密度の不均一性を考慮して椎骨の各要素の力学的特性をCT値から計算した。その上で、実際に手術で用いているPS (7.0mm径) を高分解能マイクロCTで撮影してPSモデルを作成し、椎体モデルに刺入した。

刺入軌道は①椎体上前隅角 (上向き)、②下前隅角 (下向き)、③終板に平行に前方 (水平)、に向かう3方向とし、それぞれの刺入方向で2つの異なる長さのPS (①椎体中央までの短いPS、②椎体前壁に至る長いPS) を刺入した。椎体の上下終板の表面で全方向にモデルが完全に拘束した上で、PSの刺入点に3つの異なる方向の力学的負荷 (①PSの軸に沿った引き抜き方向、②頭尾側方向、③外内側方向) を与え、非線形解析を行ってPSの固定力を調査した。PSの固定力とCT値の相関を調べるためにはPearsonの相関係数を、最適な刺入軌道・深度の検討にはANOVA followed by the Tukey's post-hoc testを用いて統計学的解析を行った。

【結果】

椎体中央までの短いPSと椎体前壁に至る長いPSの長さは、下向き方向で $40.0 \pm 0\text{mm}$ と $62.1 \pm 3.0\text{mm}$ 水平方向で $40.0 \pm 0\text{mm}$ と $55.0 \pm 3.1\text{mm}$ 、上向き方向で $40.0 \pm 0\text{mm}$ と $55.6 \pm 3.7\text{mm}$ であった。O群とNO群ともに、長いPSは短いPSに比してすべての軌道と力学的負荷に対して固定力が大きかった。したがって、以下は長いPSについて検討を行ったところ、その固定力はそれぞれの軌

道における CT 値と相関があった。NO 群の固定力はすべての力学的負荷において軌道間で有意差はなかった。O 群でも引き抜き方向と外内側方向の力学的負荷に対しての固定力は軌道間で有意差を認めなかったが、頭尾側方向の負荷に対する固定力は、上向き軌道が下向き ($p=0.016$) および前方 ($p=0.023$) 軌道よりも有意に大きかった。また、全ての軌道において力学的負荷に対する PS 周囲の応力分布のほとんどは椎弓根に集中していたが、上向き軌道では他の軌道に比べ、すべての力学的負荷に対して PS 先端の前方皮質骨層でも比較的高い応力分布を示した。

【考察】

腰椎の運動は屈伸、回旋、側屈で構成され、PS を含む生体内に埋入されたインプラントは常に 3 次元かつ複雑な力学的負荷を被ることとなる。本研究における頭尾側方向および外内側方向の力学的負荷は、それぞれ屈伸および回旋時に生じる力学的負荷反映すると考えられる。長年にわたる PS の固定力に関する研究は屍体や動物、あるいは人工骨モデルを用いての PS の軸方向の引き抜き試験が中心で、刺入方向に関しては上向きを推奨する報告もあれば下向きを推奨する報告も存在する。また、刺入深度についても統一された見解はない。

近年の有限要素法を用いた PS のゆるみに関する研究において、引き抜き方向ではなく頭尾側方向の力学的負荷が PS のゆるみに最も関与していることが判明してきているが、刺入軌道および刺入深度とともに検討した報告はこれまでにない。本研究では 3 次元方向の力学的負荷に対して異なる軌道・深度を加味して最適な刺入方法について検討を行ったところ、骨粗鬆症を有する脊椎においては椎体の上前隅角に至る PS を刺入する、すなわち、上向きに長い PS を刺入すべきであることが判明した。しかしながら、生体内のインプラントが被る反復・持続する力学的負荷が加味されていない点が本研究の限界であり、今後の検討課題とさせていただきたい。

【結論】

骨粗鬆症を有する患者における椎弓根スクリューを用いた脊椎固定術を施行する際には、椎体上前隅角に至るスクリューを刺入すべきである。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和6年3月6日、7日、8日に論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

椎弓根スクリュー (PS) は、変性疾患や外傷を含む様々な脊椎疾患の治療における強固な固定法として数十年にわたりゴールドスタンダードとして用いられてきた。しかしながら、近年の高齢化社会の到来に際しては骨粗鬆症を要する脊椎に対する固定術の必要性が増しているが、PS の弛みは非常に多く見られる合併症であり、獲得した脊椎アライメントの喪失や偽関節など好ましくない結果をもたらす可能性がある。この問題を解決するため、すなわち PS による固定力を向上するために、これまでに PS の最適な刺入深度や軌道について様々な力学的研究が行われてきたが、未だに統一した見解は得られていない。その要因として、力学試験に用いる資料の特性のばらつき (個体差) が大きいことや椎骨に刺入した PS に加える力学的負荷の方向が制限されることの影響が考えられる。今回、これらの力学試験における弱点を補うために椎骨の有限要素モデルを作成し、刺入深度や方向を厳密に調整するとともに PS に様々な方向の力学的負荷を加えることによって、最適な刺入方法について検討を行った。有限要素モデルの構築と力学的解析は、有限要素解析ソフト (Mechanical Finder ソフトウェア) を用いて行った。脊椎手術を受けた骨粗鬆症患者 9 名 (O 群) と非骨粗鬆症患者 9 名 (NO 群) の術前 CT 画像からそれぞれの L3 椎体の 3 次元有限要素モデルを構築し、実際に手術で用いている PS (7.0mm 径) のモデルを椎体モデルに刺入した。刺入軌道は①椎体上前隅角、②下前隅角、③終板に平行に前方、に向かう 3 方向とし、それぞれの刺入方向で 2 つの異なる長さの PS を刺入した。PS の刺入点に 3 つの異なる方向の力学的負荷 (①PS の軸に沿った引き抜き方向、②頭尾側方向、③外内側方向) を与え、非線形解析を行い PS の固定力を調査した。

O 群と NO 群ともに、長い PS は短い PS に比してすべての軌道と力学的負荷に対して固定力が大きかった。したがって、以下は長い PS について検討を行ったところ、その固定力はそれぞれの軌道における CT 値と相関があった。NO 群はすべての、O 群は引き抜き方向、外内側方向の力学的負荷において軌

道間で有意差はなかった。0群の頭尾側方向の負荷に対する固定力は、上向き軌道が下向き（ $p=0.016$ ）および前方（ $p=0.023$ ）軌道よりも有意に大きかった。また、全ての軌道において力学的負荷に対するPS周囲の応力分布のほとんどは椎弓根に集中していたが、上向き軌道では他の軌道に比べ、すべての力学的負荷に対してPS先端の前方皮質骨層でも比較的高い応力分布を示した。

本研究における頭尾側方向および外内側方向の力学的負荷は、それぞれ屈伸および回旋時に生じる力学的負荷を反映すると考えられる。3次元方向の力学的負荷に対して異なる軌道・深度を加味して最適な刺入方法について検討を行ったところ、骨粗鬆症を有する脊椎においては椎体の上前隅角に至るPSを刺入すべきであることが判明した。

本論文は、骨粗鬆症を有する脊椎において椎体の上前隅角に至る固定強度の高い椎弓根スクリューの軌道と深度を明らかにした点で意義深いものであり、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)甲第680号		
学位授与の日	令和6年3月26日		
氏名	上野 健		
学位論文の題目	Methylglyoxal activates transient receptor potential A1/V1 via reactive oxygen species in the spinal dorsal horn (メチルグリオキサールは脊髄後角において活性酸素種を介して transient receptor potential A1/V1 を活性化させる)		
論文審査委員	主査	教授 中川 幸洋	
	副査	教授 山田 宏	教授 西谷 友重

論文内容の要旨

【背景】

メタボリック症候群・2型糖尿病などの生活習慣病と関連する生体内の働きとして糖化と呼ばれる反応が存在する。糖化とは、血中の還元糖が蛋白質と非酵素的に反応する経路であり、中間代謝物を経て糖化最終生成物(AGEs: advanced glycation end products)を産生する。AGEs 産生過程の中間代謝物である Methylglyoxal (MGO)は細胞毒性を有し、体内に増加することで、血管内皮の障害、サルコペニアの発症など様々な病態に関与することがわかってきた。また、MGO は疼痛と関与していることが近年報告されている。有痛性糖尿病性神経障害の発症に関わることや、腰椎椎間板ヘルニアの疼痛を増強させることなどが知られている。しかし、末梢神経からの痛覚を受容する脊髄後角における MGO の詳細な作用メカニズムについては詳細に明らかとはなっていない。

【目的】

脊髄後角における MGO の疼痛増強作用についてパッチクランプ法を用いて電気生理学的に解明することである。

【方法】

5-6 週齢の Sprague-Dawley 系のラットを使用した。ウレタンの腹腔内麻酔を行った後に脊椎の椎弓を切除し、腰膨大部を含むように脊髄を摘出し、マイクロスライサーを用いて 650 μ m の脊髄横断スライス標本作製した。脊髄スライスをチャンバー内に設置し、95%O₂、5%CO₂ で飽和した 36°C の人工脳脊髄液(NaCl 117 mM, KCL 3.6mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11 mM, NaHCO₃ 25 mM)を還流した。ガラス電極に電極内液(potassium gluconate 135 mM, KCL 5 mM, CaCl₂ 0.5 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 5 mM, ATP-Mg 5 mM, Hepes-KOH 5 mM)を充填し、顕微鏡下に脊髄後角第II層へ電極を刺入し、whole cell patch clamp 法で記録を行った。-70mV の膜電位固定下に興奮性シナプス後電流(excitatory postsynaptic currents; EPSC)を観察した。試薬は人工脳脊髄液で溶解し、一定の速度(5-7 ml/min)と温度(36 \pm 1 °C)で灌流投与した。MGO 投与前1分間の EPSC の頻度(Hz)と振幅(pA)の平均を基準とし、MGO 投与開始後に最も頻度と振幅が上昇した1分間と比較を行った。検定には t-test を用い、p<0.05 をもって有意と判断した。

【結果】

MGO(10 mM)の灌流投与により spontaneous EPSC(sEPSC)の頻度は 4.4 \pm 0.8 Hz から 21.2 \pm 3.5 Hz へ、振幅は 6.9 \pm 0.4 pA から 7.7 \pm 0.5 pA といずれも有意な上昇を認めた (p<0.05)。Na⁺チャネル拮抗薬である Tetrodotoxin(TTX 1 μ M)により軸索伝導を阻害し、神経終末部に局限した神経活動である微小 EPSC(miniature EPSC; mEPSC)を観察することが可能である。TTX 存在下における MGO の灌流投与により mEPSC の頻度は 8.4 \pm 1.5 Hz から 28.5 \pm 5.5 Hz へ、振幅は 7.4 \pm 0.2 pA から 8.8 \pm 0.6 pA といずれも有意な上昇を認めた(p<0.05)。興奮性神経伝達物質のグルタミン酸の受容体である AMPA/kainate 受容体の拮抗薬 CNQX (20 μ M)存在下においては MGO による反応性は観察されなかった。以上から MGO はシナプス前終末に作用し、グルタミン酸放出を増加させること

が示唆された。続いて、シナプス前終末に存在し疼痛に関わる受容体として transient receptor potential channel (TRP チャンネル)に着目し、以下検討を行った。非選択的 TRP チャンネル拮抗薬である ruthenium red (300 μ M)存在下ではMGOの灌流投与前のsEPSCの頻度と振幅は 3.7 ± 0.6 Hz、 6.6 ± 0.4 pA であり MGO 灌流投与後はそれぞれ 3.2 ± 0.6 Hz、 6.6 ± 0.3 pA といずれも有意な増加は見られず反応性は完全に抑制された。TRP ankyrin-1 (TRPA1)チャンネル拮抗薬である HC030031(50 μ M)存在下ではMGOの灌流投与前のsEPSCの頻度と振幅は 9.5 ± 2.8 Hzおよび 7.0 ± 0.3 pA であり MGO 灌流投与後はそれぞれ 14.9 ± 4.9 Hz、 7.0 ± 0.2 pA といずれも有意な増加は見られなかった。TRP vanilloid-1 (TRPV1)チャンネル拮抗薬である capsazepine(10 μ M)存在下ではMGOの灌流投与前のsEPSCの頻度と振幅は 3.8 ± 0.7 Hz、 7.1 ± 0.3 pA であり MGO 灌流投与後はそれぞれ 8.2 ± 1.6 Hz、 7.3 ± 0.4 pA と頻度に関しては有意な上昇を認めた($p < 0.05$)。頻度に関して、MGO 単独投与の際の増加率は 551.5 % であり、HC030031 存在下では 180.6 %、capsazepine 存在下では 234.9 % であり、TRPA1 と TRPV1 の両チャンネルが MGO の反応性に関わると想定し、HC030031 および capsazepine の両試薬存在下における検討を行った。MGO の灌流投与前のsEPSCの頻度と振幅は 4.0 ± 1.1 Hz、 7.1 ± 0.3 pA であり MGO 灌流投与後はそれぞれ 4.1 ± 1.1 Hz、 7.0 ± 0.3 pA と反応性は完全に抑制された。MGO は生体内において活性酸素(reactive oxygen species; ROS)の産生を亢進することが知られている。また、ROS は脊髄後角においては TRPA1 と TRPV1 を介して疼痛増強に寄与することも報告されている。これらの報告と我々の結果から MGO が産生した ROS が TRPA1 と TRPV1 に作用し疼痛増強に寄与すると仮定し、非選択的 ROS scavenger である PBN (1 mM)存在下における MGO の反応性を検討した。PBN 存在下において、MGO の灌流投与前のsEPSCの頻度と振幅は 5.0 ± 1.3 Hz、 $7.4 \text{ pA} \pm 0.4 \text{ pA}$ であり MGO 灌流投与後はそれぞれ 5.0 ± 1.3 Hz、 6.9 ± 0.3 pA といずれも有意な増加は見られず反応性は完全に抑制された。

【考察・結論】

本研究より MGO は脊髄後角において sEPSC の頻度・振幅の増大作用を有することが明らかとなった。TTX および CNQX を用いた実験から、MGO はシナプス前終末に作用し、グルタミン酸放出を増加させることが示唆された。過去の報告から MGO の疼痛増強作用には TRPA1 チャンネルが関与することが示されており、我々の実験においても、ruthenium red 投与により完全に反応性が消失し、HC030031 投与によっても有意に反応性を抑制した。しかし HC030031 は ruthenium red とは異なり頻度の若干の増加傾向を示した。capsazepine 存在下においては MGO 投与により EPSC の頻度は有意な増加を示すものの、MGO 単独投与と比較すると頻度の増加率は小さく、反応性を抑制する傾向がみられた。HC030031 と capsazepine 両試薬存在下において反応性が完全に消失したことから、MGO の反応性には TRPA1 と TRPV1 が関与する可能性が示唆された。また過去の報告と我々の実験から MGO は脊髄後角で、ROS を介してシナプス前終末に存在する TRPA1 と TRPV1 に作用し、グルタミン酸放出を亢進させることで興奮性シナプス伝達を増強させることが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和6年3月6日、7日、8日 論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。生体内には糖化と呼ばれる反応が存在する。血中の還元糖が蛋白質と非酵素的に反応する経路であり、最終糖化産物(AGEs: advanced glycation end products)が産生される。AGEs 産生過程の中間代謝物である Methylglyoxal (MGO)は疼痛と関わるのが近年報告されている。しかしながら MGO の疼痛修飾の詳細なメカニズムについては明らかとはなっていない。本研究ではラットの脊髄を用いた whole cell patch clamp 法により、脊髄後角における MGO の作用機序について電気生理学的に検討を行った。

5-6 週齢の Sprague-Dawley 系のラットの脊髄を摘出し、650 μ m の脊髄横断スライス標本作製した。脊髄後角第II層へ電極を刺入し、whole cell patch clamp 法で記録を行い、興奮性シナプス後電流(excitatory postsynaptic currents; EPSC)を観察した。MGO 投与前1分間の EPSC の頻度と振幅の平均を基準とし、MGO 投与開始後に最も頻度と振幅が上昇した1分間と比較を行った。検定には t-test を用い、 $p < 0.05$ をもって有意と判断した。

MGOの投与により spontaneous EPSC(sEPSC)の頻度と振幅は有意に増加した。Tetrodotoxin 存在下では、神経終末部に限局した神経活動である微小 EPSC(miniature EPSC; mEPSC)を観察することが可能である。MGOの投与により mEPSCの頻度と振幅は有意な上昇を認めた。グルタミン酸の受容体である AMPA/kainate 受容体の拮抗薬 CNQX 存在下では MGOによる反応性は観察されなかった。以上から MGOはグルタミン酸を介して神経終末部に作用することが示唆された。次に transient receptor potential channel (TRP チャンネル)に着目し、以下検討を行った。非選択的 TRP チャンネル拮抗薬である ruthenium red 存在下では MGO 投与による sEPSC の頻度と振幅の増加は認めず、反応性は完全に抑制された。TRPA1 拮抗薬である HC030031 存在下では MGO の投与による頻度と振幅の有意な増加は見られなかった。TRPV1 拮抗薬である capsazepine 存在下では MGO 投与により sEPSC の頻度のみ有意な上昇を認めた。頻度に関して、MGO 単独投与の際の増加率は 551.5 % であり、ruthenium red 存在下では 92.2%、HC030031 存在下では 180.6 %、capsazepine 存在下では 234.9 % であり、TRPA1 と TRPV1 の両者が MGO の反応性に関わると想定し、HC030031 および capsazepine 存在下に MGO を投与したところ、反応性は完全に抑制された。MGO は活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)の産生を亢進することが知られている。また、ROS は脊髄後角において TRPA1 と TRPV1 を介して疼痛増強に寄与することが報告されている。これらの報告とこれまでの結果から MGO は ROS を介して TRPA1、TRPV1 に作用すると仮定し、非選択的 ROS scavenger である PBN 存在下における MGO の反応性を検討したところ MGO の反応性は完全に抑制された。本研究より MGO は脊髄後角において ROS を介して、シナプス前終末の TRPA1,TRPV1 に作用し、グルタミン酸放出を増加させることで興奮性シナプス伝達を促進することが示唆された。生命活動を維持する上で、生体内では糖化が生じており、少なからず疼痛修飾に関与するものと想定される。本研究は、糖化関連物質である MGO の脊髄後角における作用機序について検討したものであり、既存薬では十分な鎮痛を得られていない患者に対する、これまでとは全く異なる、新しい作用機序を有する新薬の開発に繋がる可能性があり、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1040号		
学位授与の日	令和5年4月18日		
氏名	平 一裕		
学位論文の題目	Relationship of sagittal spinal alignment with low back pain and physical performance in the general population (大規模住民コホートにおける脊柱アライメント不良と腰痛・身体運動機能との関連：The Wakayama Spine Study)		
論文審査委員	主査	教授 中川 幸洋	
	副査	教授 山田 宏	教授 金井 克光

論文内容の要旨

【目的】

本研究の目的は大規模住民コホートを用いて全脊柱単純X線を含む疫学調査を実施し、脊柱アライメントと腰痛/身体運動機能との関係を明らかにすることである。

【方法】

対象は、2011-2012年に和歌山県の二地域で実施したThe Wakayama Spine Studyの第2次追跡調査時に参加した一般住民1,575名（男性513名、女性1,062名、平均年齢65.6歳）である。そのうち1,465名の立位での全脊柱単純X線側面像の撮影を行い、1名の脊椎外科医が全C7 Sagittal vertical axis(SVA)を含めた全脊柱矢状面アライメントを測定した。また最近1ヶ月の腰痛の有無、腰痛関連ADLであるOswestry disability index(ODI)、そして身体運動機能に関しては6m通常歩行速度、5回椅子立ち上がり、片脚立位（左右の平均値）を測定し、SVAとの関係を解析した。

【結果】

参加者全体のC7 SVAの平均値は 11.0 ± 42.7 mmであった。80歳以上は 46.4 ± 56.6 mmであり、高齢者ほどC7 SVAは大きかった($p < 0.001$)。C7 SVAを3群に分けた単変量解析の結果、C7 SVAが大きいほど腰痛が多く(Small群:35.7%,Intermediate群:47.3%,Large群:59.4%) ($p < 0.001$)、ODIスコアも高かった(Small群:10.0%,Intermediate群:17.5%,Large群:29.4%) ($p < 0.001$)。また身体運動機能についてはC7 SVAが大きくなるとLarge群では各項目ともに有意に低下した($p < 0.001$)。性・年齢・BMI補正した重回帰分析においても、腰痛、身体運動機能の各項目は有意にC7 SVAと関連していた($p < 0.001$)。

【考察】

本研究は大規模住民コホートにおいて、全脊椎X線を用いて全脊椎矢状面アライメント不良と腰痛と身体機能低下の関連性を明らかにした。

胸椎前弯(Thoracic Kyphosis)、骨盤傾斜(Pelvic tilt)、C7 SVAが年齢とともに増加し、腰椎前弯

角 (Lumbar Lordosis) と仙骨傾斜角 (Sacral Slope) が減少した。過去の報告では無症状の中高齢ボランティア 100 人を調査し、C7 SVA、LL、および年齢の間に相関関係があり全脊柱矢状面アライメントと年齢の関連を認め、加齢に伴う脊柱アライメントの変化に伴うものであると報告している (Gelb,D.E.Spine1995)。本研究では体幹筋の大きな減少は、加齢に伴う脊柱アライメントの変化により、日常生活における個々の筋への負荷や活性化のパターンが変化することに起因する可能性があると考えられている。また、Dubousset は「cone of economy」と呼ばれる理論を提唱しており、立位姿勢でバランスを維持するためには、全脊椎矢状面アライメントが重要であると報告している (Dubousset J.Principles and Practice 1994)。

腰椎では傍脊柱筋の脂肪変性と体積減少が、退行性後弯と関連しており、また背筋と身体能力が脊柱矢状面の維持に関与し、筋力や歩行速度の低下と転倒リスクと関連しているなどといった過去の報告があり、脊椎伸展筋の筋力と後弯との間に逆相関がある (Itoi,E.Mayo Clin.Proc 1994)。本研究においても C7 SVA と身体運動機能の低下との関連が示されたため、C7 SVA が高値になることによりバランスが維持できず転倒などのリスクが上昇することが判明した。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

2023年3月28日、4月3日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

本研究の目的は大規模住民コホートをを用いて全脊柱単純X線を含む疫学調査を実施し、脊柱アライメントと腰痛/身体運動機能との関係を明らかにすることである。

対象は、2011-2012年に和歌山県の二地域で実施したThe Wakayama Spine Studyに参加した一般住民1,575名 (男性513名、女性1,062名、平均年齢65.6歳) である。そのうち1,465名の立位での全脊柱単純X線側面像の撮影を行い、全C7 Sagittal vertical axis(SVA)を含めた全脊柱矢状面アライメントを測定した。また最近1ヶ月の腰痛の有無、腰痛関連ADLであるOswestry disability index(ODI)、そして身体運動機能に関しては6m通常歩行速度、5回椅子立ち上がり、片脚立位 (左右の平均値) を測定し、SVAとの関係を解析した。

男女間の全脊柱矢状面アライメントの差異の解析にはStudent t-testを使用した。参加者は年齢に基づいて(1)50歳未満、(2)50-59歳、(3)60-69歳、(4)70-79歳、(5)80歳以上の5グループに分け全脊柱矢状面アライメントとの関連をANOVAの分散分析を用いて検討した。C7 SVAはSchwabの分類に基づき、Small群 (<40mm)、Intermediate群 (40≤SVA<95mm)、Large群 (≥95mm) の3つのカテゴリーに分類し、一元配置分散分析を用いた。最後に、年齢、性別、肥満度を調整した上で、各身体能力の測定値を目的変数とした重回帰分析を行い関連を検討した。

参加者全体のC7 SVAの平均値は11.0±42.7mmであった。80歳以上は46.4±56.6mmであり、高齢者ほどC7 SVAは大きかった(p<0.001)。C7 SVAを3群に分けた単変量解析の結果、C7 SVAが大きいほど腰痛が多く (Small群;35.7%,Intermediate群;47.3%,Large群;59.4%) (p<0.001)、ODIスコアも高かった (Small群;10.0%,Intermediate群;17.5%,Large群;29.4%) (p<0.001)。また身体運動機能についてはC7 SVAが大きくなるとLarge群では各項目ともに有意に低下した (p<0.001)。性・年齢・BMI補正した重回帰分析においても、腰痛、身体運動機能の各項目は有意にC7 SVAと関連していた (p<0.001)。

本研究は大規模住民コホートにおいて、全脊椎X線を用いて全脊椎矢状面アライメント不良と腰痛と身体機能低下の関連性を明らかにした。本研究においてもC7 SVAと身体運動機能の低下との関連が示されたため、C7 SVAが高値になることによりバランスが維持できず転倒などのリ

スクが上昇することが判明した。

本論文は、大規模住民コホートにおいて、全脊椎 X 線を用いて全脊椎矢状面アライメント不良が腰痛と身体運動機能の低下に関連す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)乙第1041号		
学位授与の日	令和5年5月16日		
氏名	江守 智哉		
学位論文の題目	Contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasonography for predicting the efficacy of first-line gemcitabine and nab-paclitaxel chemotherapy in pancreatic cancer (切除不能膵癌患者の化学療法の効果・予後予測因子における造影ハーモニック超音波内視鏡下血流評価の有用性に関する検討)		
論文審査委員	主査	教授 山本 信之	
	副査	教授 川井 学	教授 北野 雅之

論文内容の要旨

【緒言】

本邦においては、全がんの年齢調整死亡率は男女とも 1990 年代後半から減少傾向にあるが、膵癌による年間死亡者数は年々増加傾向にあり、2013 年の人口動態統計では 3 万人を超えた。2020 年の部位別予測がん死亡数では、膵癌は男性では 4 位(8%)、女性では 3 位(12%)であり、男女共に年齢調整死亡率の増加率のトップは膵癌である。5 年・10 年相対生存率は全体で 11.1%、6.2%と予後不良な疾患であり、膵癌は現在でも発見された時点で手術不能のものが半数以上を占める。膵癌に対する治療として化学療法は重要であり、現在は一次化学療法として GEM+nab-PTX 併用療法(ゲムシタビン・ナブパクリタキセル)と FOLFIRINOX 療法(5-FU・イリノテカン・オキサリプラチン・レボホリナート)が主に用いられている。切除不能膵癌に対する化学療法としても副作用の多い FOLFIRINOX 療法と比較して副作用の少ない GEM+nab-PTX 併用療法が用いられることが多く、本研究では一次治療として GEM+nab-PTX 併用療法を用いた症例で検討した。

造影 CT 検査を用いた腫瘍病変の造影効果を確認することで化学療法の効果・予後予測の有用性が報告されている(図 1 引用元)。過去の報告では造影 CT 検査の後期相の造影効果のある膵癌は、後期相の造影効果のない膵癌と比較して無増悪生存期間(PFS)・全生存期間(OS)共に良好であった。一方、造影ハーモニック超音波内視鏡(CH-EUS)は膵実質内の微小血管内血流を反映しており、膵臓の腫瘍内血流動態をリアルタイムに評価可能である。また、超音波造影剤(ソナゾイド)による副作用は 0.5%と少なく、ヨード造影剤アレルギーの症例にも投与可能であることから、認容性が高い検査である。そこで、本研究において、化学療法開始前に CH-EUS で腫瘍性病変の血流の有無を評価することで、化学療法の効果・予後予測が可能となれば、今後の化学療法の効果を予想し治療効果の向上につながる可能性があり、化学療法開始前に CH-EUS で腫瘍性病変の血流の有無を評価した。

【対象】

当院で 2015 年 4 月から 2020 年 3 月の期間において、切除不能膵癌と診断され、一次化学療法として GEM+nab-PTX 併用療法開始前に CH-EUS を施行した 150 例のうち 2 コース以上継続できなかった 6 症例を除いた 144 例を対象とした。全ての患者は「病理診断で悪性所見を認める」、「画像診断で外科的切除不能な膵癌」、「化学療法開始前の CH-EUS で腫瘍の血流評価される」、「一次化学療法を GEM+nab PTX で開始」、「年齢が 20 歳以上」、「ADL が良好である症例(ECOG の performance status にて 0~2 の症例)」の条件を満たす。

【方法】

化学療法開始前に CH-EUS を施行し、早期(10~30 秒)・後期相(30 秒~120 秒)における腫瘍造影効果を 2 群(造影効果あり: iso~hyperenhancement、造影効果なし: hypo~nonenhancement)に分けて合計 4 群に分類した(図 2.3)。読影は 3 人のブラインドリーダーにより行い、意見が分かれた場合は多数決で決め、カップ値も算出した。主要評価項目は、4 群間における PFS を比較検討した。副次的評価項目は、4 群間における OS の比較検討、Stage III・IV を分けた場合の PFS・OS の比較検討、4 群間における奏効率・病勢コントロール率の比較検討、OS・PFS におけるリスク因子の検討

を行った。

【結果】

CH-EUS の血流評価分類では、Group A(早期相造影効果なし、後期相造影効果なし) : 57 人、Group B(早期相造影効果あり、後期相造影効果なし) : 64 人、Group C(早期相造影効果なし、後期相造影効果あり) : 0 人、Group D(早期相造影効果あり、後期相造影効果あり) : 22 人 (図 4)。3 群間における患者背景因子として有意差を認めたのは Group A で肝転移が多いのみであった ($P=0.012$) (表 1)。

3 群間における PFS の中央値は Group A : 3.9 ヶ月、Group B : 7.6 ヶ月、Group D : 10.8 ヶ月と Group A・B と比較して Group D が有意に長かった($P<0.001$) (図 5)。OS の中央値に関しても Group A : 9.5 ヶ月、Group B : 13.1 ヶ月、Group D : 18.6 ヶ月と Group A・B と比較して Group D が有意に長かった($P<0.001$) (図 6)。また、Stage III の PFS の中央値は Group A : 3.2 ヶ月、Group B : 7.8 ヶ月、Group D : 10.8 ヶ月、Stage IV の PFS の中央値は Group A : 4.1 ヶ月、Group B : 7.6 ヶ月、Group D : 11.2 ヶ月と Group A・B と比較して Group D が有意に長かった($P<0.001$, $P<0.001$) (図 7)。Stage III の OS の中央値は Group A : 9.2 ヶ月、Group B : 19.7 ヶ月、Group D : 17.9 ヶ月、Stage IV の OS の中央値は Group A : 9.6 ヶ月、Group B : 13.1 ヶ月、Group D : 18.6 ヶ月と Group A・B と比較して Group D が有意に長かった($P=0.031$, $P<0.001$) (図 8)。

化学療法開始 2-3 ヶ月後の RECIST 評価の奏効率(ORR)は、Group A : 9%、Group B : 19%、Group D : 42%と有意に Group D が高かった(Group A vs. Group B, $P = 0.115$; Group A vs. Group D, $P = 0.001$; Group B vs. Group D, $P = 0.009$)。また、病勢コントロール率(DCR)も Group A : 60%、Group B : 89%、Group D : 100%と Group D が有意に高かった(Group A vs. Group B, $P < 0.001$; Group A vs. Group D, $P < 0.001$; Group B vs. Group D, $P = 0.091$) (表 2)。

Stage III の PFS に関する単変量解析で有意差を認めた項目は、CA19-9 値($P = 0.008$)と持続的腫瘍内造影効果の有無(Group A, B vs. Group D, $P = 0.033$)で、多変量解析でも CA19-9 値($P = 0.006$)と持続的腫瘍内造影効果の有無(Group A, B vs. Group D, $P = 0.027$)で有意差を認めた (表 3)。また、Stage IV の PFS に関する単変量解析で有意差を認めた項目は、肝転移の有無($P = 0.003$)と持続的腫瘍内造影効果の有無(Group A, B vs. Group D, $P < 0.001$)で、多変量解析でも肝転移の有無($P = 0.019$)と持続的腫瘍内造影効果の有無(Group A, B vs. Group D, $P = 0.003$)で有意差を認めた (表 4)。Stage III の OS に関する単変量解析で有意差を認めた項目は、動脈浸潤の有無($P = 0.041$)と静脈浸潤の有無($P = 0.019$)で、多変量解析では静脈浸潤の有無($P = 0.038$)のみ有意差を認めた (表 5)。また、Stage IV の OS に関する単変量解析で有意差を認めた項目は、肝転移の有無 ($P < 0.001$)と腹膜播種の有無($P = 0.027$)、CEA 値($P = 0.001$)、持続的腫瘍内造影効果の有無(Group A, B vs. Group D, $P < 0.001$)、2 次治療の有無($p = 0.002$)で、多変量解析でも肝転移の有無($P = 0.003$)、腹膜播種の有無($p = 0.013$)、CEA 値($p = 0.001$)、持続的腫瘍内造影効果の有無(Group A, B vs. Group D, $P < 0.001$)、2 次治療の有無($P < 0.001$)であった (表 6)。

【考察】

当施設では過去の研究で、CH-EUS の早期相の造影効果のある膵癌は早期相の造影効果のない膵癌と比較して分化度が高かった。免疫染色により、早期相の造影効果の乏しい領域は、線維性組織や壊死性病変の可能性が反映された。腫瘍血流評価で造影効果の乏しい腫瘍は腫瘍内壊死または線維化が強く、抗がん剤の腫瘍到達が低下していることが考えられる。また、腫瘍内の線維性間質の増加は腫瘍内低酸素症を反映してあり、それが化学療法の抵抗性に関連があることが報告されており、血流の少ない群では抗がん剤の効果が低下していることが示唆されている。本研究においても同様の結果が得られたことから、切除不能膵癌に対する GEM+nab-PTX 併用療法における予後予測する手法として CH-EUS の腫瘍血流評価は有用であると思われる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和5年5月1日・2日、論文審査担当者は学位申請者に出席を求め、上記学位論文について審査を行った。本論文は、化学療法開始前にCH-EUSで腫瘍性病変の血流の有無を評価することで、

化学療法の効果・予後予測の有用性を評価したものである。

膵癌に対する治療として化学療法は重要であり、現在は一次化学療法としてGEM+nab-PTX併用療法（ゲムシタビン・ナブパクリタキセル）とFOLFIRINOX療法（5-FU・イリノテカン・オキサリプラチン・レボホリナート）が主に用いられている。切除不能膵癌に対する化学療法としても副作用の多いFOLFIRINOX療法と比較して副作用の少ないGEM+nab-PTX併用療法が用いられることが多く、本研究では一次治療としてGEM+nab-PTX併用療法を用いた症例で検討した。造影ハーモニック超音波内視鏡（CH-EUS）は膵実質内の微小血管内血流を反映しており、膵臓の腫瘍内血流動態をリアルタイムに評価可能であるため、化学療法開始前にCH-EUSで腫瘍性病変の血流の有無を評価することで、化学療法の効果・予後予測が可能となれば、今後の化学療法の効果を予想し治療効果の向上につながる可能性があり、化学療法開始前にCH-EUSで腫瘍性病変の血流の有無を評価した。

CH-EUSの血流評価分類では、Group A(早期相造影効果なし、後期相造影効果なし)：57人、Group B(早期相造影効果あり、後期相造影効果なし)：64人、Group C(早期相造影効果なし、後期相造影効果あり)：0人、Group D(早期相造影効果あり、後期相造影効果あり)：22人。3群間におけるPFSの中央値はGroup A：3.9ヶ月、Group B：7.6ヶ月、Group D：10.8ヶ月とGroup A・Bと比較してGroup Dが有意に長かった($P<0.001$)。OSの中央値に関してもGroup A：9.5ヶ月、Group B：13.1ヶ月、Group D：18.6ヶ月とGroup A・Bと比較してGroup Dが有意に長かった($P<0.001$)。また、Stage IIIのPFSの中央値はGroup A：3.2ヶ月、Group B：7.8ヶ月、Group D：10.8ヶ月、Stage IVのPFSの中央値はGroup A：4.1ヶ月、Group B：7.6ヶ月、Group D：11.2ヶ月とGroup A・Bと比較してGroup Dが有意に長かった($P<0.001$, $P<0.001$)。Stage IIIのOSの中央値はGroup A：9.2ヶ月、Group B：19.7ヶ月、Group D：17.9ヶ月、Stage IVのOSの中央値はGroup A：9.6ヶ月、Group B：13.1ヶ月、Group D：18.6ヶ月とGroup A・Bと比較してGroup Dが有意に長かった($P=0.031$, $P<0.001$)。化学療法開始2-3ヶ月後のRECIST評価の奏効率(ORR)は、Group A：9%、Group B：19%、Group D：42%と有意にGroup Dが高く、病勢コントロール率(DCR)もGroup A：60%、Group B：89%、Group D：100%とGroup Dが有意に高かった。

以上より、本論文の検討の結果、化学療法開始前のCH-EUSで腫瘍性病変の血流を認める膵癌患者の化学療法の効果は良好であり、PFS・OSが有意に良好であることが分かった。腫瘍血流評価で造影効果の乏しい腫瘍は腫瘍内壊死または線維化が強く、抗がん剤の腫瘍到達が低下していることが考えられる。また、腫瘍内の線維性間質の増加は腫瘍内低酸素症を反映してであり、それが化学療法の抵抗性に関連があると思われる。本論文は、そのメカニズム解明と化学療法導入の際の効果予測の一助になる可能性があると考えられ、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)乙第1042号		
学位授与の日	令和5年6月20日		
氏名	竹腰 信人		
学位論文の題目	Analysis of Age, Sex, Lack of Response to Intravenous Immunoglobulin, and Development of Coronary Artery Abnormalities in Children With Kawasaki Disease in Japan (乳児の川崎病における冠動脈病変発生のリスクファクターについて —初回 IVIG 治療不応以外のリスクの可能性—)		
論文審査委員	主査	教授 田中 篤	
	副査	教授 井上 徳光	教授 徳原 大介

論文内容の要旨

【緒言】

川崎病は4歳以下の乳幼児に好発する原因不明の血管炎症候群であり、冠動脈炎に起因する冠動脈の拡張、動脈瘤などの冠動脈後遺症（CAL）を引き起こすことが知られている。治療法として、免疫グロブリン静注（IVIG）療法やIVIGに対する治療抵抗（IVIG不応）例に対する追加療法、初期強化療法を含むアルゴリズムが確立されているが、現在でもCALは約2.5%前後にみられている。また、IVIG療法によって解熱が得られた、あるいは自然解熱した場合でもCALを形成する例が国内外で散見され、和歌山県立医科大学小児科でも自然解熱したにも関わらずCALを発生した川崎病乳児例が数例経験した。これらのことは現在の治療アルゴリズムがCAL発生を完全に抑制することができないことを示唆し、CALの形成リスクの更なる探索が必要であると示している。従って本研究では、CALの形成リスクとして知られる初期治療抵抗とCALの関連性を明らかにすべく発症時年齢を考慮した解析を行った。

【対象/方法】

和歌山川崎病研究会に集積された、1999年10月から2019年9月迄に発症した川崎病2,414例のデータを対象とした（回収率100%、除外なし）。川崎病の診断は診断の手引き改訂4-6版によって行われた（個々の症例の診断は発症当時の診断基準に基づいて行われた）。CALの判定は川崎病発症30日前後に小児循環器専門医/小児科専門医により心エコー検査を行い厚生省基準に基づいて判定された。追加治療や初期強化療法を行ったものを初期治療抵抗ありとし、標準治療（IVIG療法+アスピリン内服）で軽快した症例だけでなく自然解熱した症例やアスピリンの内服のみだった症例も初期治療抵抗なしと定義した。年齢区分に関しては好発年齢より年長の群、年少の群の母数が一定数かつ同数程度集まるように統計学的判断から年齢区分の設定を行い、1歳未満を乳児、1-3歳を好発年齢、4歳以上を年長児とした3群を設定した。ロジスティック回帰モデルを用いて、初期治療抵抗とCAL発生について1-3歳の好発年齢群を基準としたオッズ比と95%信頼区間(CI)を算出した。

【結果】

解析対象となった症例は2,414例のうち、1歳未満は550例（22.8%）、1-3歳は1,342例（55.6%）、4歳以上522例（21.6%）であった。初期治療抵抗ありと判断された例は535例（うち1歳未満は100例、1-3歳は295例、4歳以上は140例）であった（表1）。CALありと判断された例は68例（うち1歳未満は20例、1-3歳は25例、4歳以上は23例）であった。（表2）。初期治療抵抗のリスクに関しては、1-3歳の好発年齢群に対して1歳未満の乳児群のオッズ比が0.77（95%CI 0.59-0.99）、4歳以上の年長児のオッズ比が2.47（95%CI 1.05-1.67）であった。一方、CALの発生リスクに関しては、1-3歳の好発年齢群に対して1歳未満の乳児群のオッズ比が1.94（95%CI 1.07-3.52）、4歳以上の年長児群のオッズ比が2.47（95%CI 1.39-4.39）であった（図1）。つまり、好発年齢群よりも乳児群で初期治療抵抗のリスクが低いにも関わらずCALの発生リスクは好発年齢群よりも乳児群において高いことが示された。

【考察】

本研究では乳児期における初期治療抵抗と CAL 発生の傾向は一致しなかった。一般に CAL 発生リスクとして IVIG 不応が挙げられるが、本研究の結果から乳児期発症の川崎病においては IVIG 不応に加え他の CAL 発生リスク因子が存在することが示された。乳児期発症の川崎病の臨床的特徴としては、①川崎病症状が揃わない不全型が多い、②有熱期間が短い、③炎症を示す指標が上昇しない/遅れて上昇する例がある、④CAL 発症の頻度が高いことが知られている。これらの特徴から、乳児期発症の川崎病の病態として、川崎病発症のトリガーに対する全身性の免疫応答が乳児期は弱いため、発熱は目立たなくても冠動脈壁局所の炎症は持続し CAL 形成に関与している可能性が挙げられる。また乳児期の冠動脈の組織構築の未熟性が CAL 形成を助長することや乳児期と乳児期以降の川崎病発症に関わるトリガーが異なる可能性も推察される。本研究では乳児期発症の川崎病における CAL 形成に IVIG 以外の因子が重要な役割を果たしていることが明らかにされており、今後は上記に推察されるメカニズムの関与の有無に焦点を置いた研究の展開が必要である。

【結語】

乳児期発症の川崎病における CAL 発生には初期治療抵抗とは異なる因子が重要な役割を果たしていることが明らかになった。初期治療に対する抵抗性を軸にした現状の治療戦略では CAL 発生抑制には限界があり、乳児期発症の川崎病に焦点を置いた治療戦略の構築や病態解明が望まれる。

【本研究の限界】

本研究は、特定地域（和歌山県）における疫学的ならびに後方視的研究であり、研究成果の一般化には注意が必要である。また、本研究は 20 年間に及ぶ長期の疫学研究のため、初期治療とされる IVIG の投与量/期間が研究期間内で異なっている。その他、CAL の評価は厚生省基準の実測値を用いており、体表面積で算出された Z-score を CAL の定義に用いていない。

本研究の要旨は JAMA NETWORK OPEN 2022 Jun 1;5(6):e2216642. に掲載された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和5年5月30日、6月8日に学位申請者に上記論文について口頭試問で審査を行った。

川崎病 (KD) は幼小児に好発する原因不明の系統的血管炎で、冠動脈炎に起因する冠動脈の拡張、動脈瘤などの冠動脈後遺症 (CAL) を引き起こすことが知られている。1980 年代に登場した免疫グロブリン (IVIG) 大量療法は CAL の合併率を減少せしめたため、IVIG 大量療法を主軸とした初期治療への抵抗性は CAL 合併のリスクであると考えられている。しかし初期治療プロトコルがある程度確立された現在でも CAL は約 2.5% 前後残存しており、中には初期治療奏功例や自然解熱例での CAL 合併も散見される。このことは現在の治療プロトコルでは CAL 発生を完全に抑制することができないこと、治療抵抗性を主眼とした従来のものとは異なる CAL 合併リスク因子の検討が必要であると示している。この点をふまえて本研究では発症時年齢に着目し初期治療抵抗と CAL の関連性を明らかにすべく解析を行った。

和歌山川崎病研究会が中心となって集積された、1999 年 10 月から 2019 年 9 月迄に発症した川崎病 2,414 例の多施設データを対象とした（回収率 100%、除外なし）。標準治療 (IVIG 大量療法+アスピリン内服) に加え追加治療や初期強化療法を行ったものを初期治療抵抗ありと定義し、標準治療で軽快した症例、自然解熱した症例、アスピリンの内服のみ行った症例は初期治療抵抗なしと定義した。年齢区分は 1 歳未満を乳児、1-3 歳を好発年齢、4 歳以上を年長児とした 3 群を設定した。ロジスティック回帰モデルを用いて、初期治療抵抗と CAL 形成について 1-3 歳の好発年齢群を基準としたオッズ比と 95%信頼区間 (CI) を算出した。

2,414 例のうち、1 歳未満は 550 例 (22.8%)、1-3 歳は 1,342 例 (55.6%)、4 歳以上 522 例 (21.6%) であった。初期治療抵抗例は 535 例（うち 1 歳未満は 100 例、1-3 歳は 295 例、4 歳以上は 140 例）であった。CAL 合併例は 68 例（うち 1 歳未満は 20 例、1-3 歳は 25 例、4 歳以上は 23 例）であった。初期治療抵抗のリスクに関しては、1-3 歳の好発年齢群に対して乳児群のオッズ比が 0.77 (95%CI 0.59-0.99)、年長児は 2.47 (95%CI 1.05-1.67) であった。一方、CAL 合併のリスクに関しては、1-3 歳

の好発年齢群に対して乳児群のオッズ比が 1.94 (95%CI 1.07-3.52)、年長児群は 2.47 (95%CI 1.39-4.39)であった。

本研究では、乳児期では CAL 合併リスクが高い一方で初期治療抵抗リスクは低かった。このことは治療抵抗性と CAL 合併は必ず連関するわけではなく、従来の治療抵抗性を主眼とした方法では CAL 合併を予測しきれないことを示している。本研究は川崎病治療に対するこれまでの考え方に一石を投じたものであり、学位論文として価値あるものと認められる。

学位記番号	博(医)乙第1043号		
学位授与の日	令和5年7月18日		
氏名	弘井 孝幸		
学位論文の題目	An evaluation based on relative treatment intensity in older patients treated with reduced-dose R-THP-COP therapy for diffuse large B-cell lymphoma: A multicenter retrospective cohort study. (高齢びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫患者に対する減量 R-THP-COP 療法の相対的治療強度に基づく評価)		
論文審査委員	主査	教授 神人 正寿	
	副査	教授 園木 孝志	教授 園村 哲郎

論文内容の要旨

【背景】

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)は非ホジキンリンパ腫で最も多く、日本では悪性リンパ腫の 30-40%を占める造血器悪性腫瘍である。DLBCL は高齢者に多いため、社会の高齢化に伴い患者数は増加している。80 歳までの初発 DLBCL に対する標準治療は R-CHOP 療法である。80 歳以上の高齢患者では、標準量の R-CHOP 療法による治療関連合併症が増加するため、化学療法薬の投与量を減量することが一般的であるが、高齢の初発 DLBCL 患者に対する標準的な治療法は未だ確立されていない。また、実臨床では 75 歳以上でも標準量の R-CHOP 療法を完遂できる患者割合は減少するため、75 歳以上の高齢患者に対する適切な治療強度の検討が必要である。

治療強度の指標としては Relative dose intensity (RDI)を用いている研究が多い。しかし、研究によって RDI の計算方法が異なっている。また、既報の RDI による治療強度評価の問題点として、化学療法の実施コース数が考慮されないため、実際の治療強度を反映しない場合があることがあげられる。前向き臨床試験や、後向き観察研究でも実施コース数が均一である場合には既報の RDI 計算方法による治療強度評価は適切と考えられる。一方で、後向き観察研究で化学療法の実施コース数にばらつきがある場合には既報の RDI 計算方法では治療強度評価が不十分になると考えられる。そこで、今回の検討では Relative treatment intensity (RTI)という新しい治療強度の計算方法を用いて化学療法の相対治療強度を評価した。

当科では、心毒性が少ないピラルピシン(THP)でアドリアシン(ADR)を置換し、減量した R-THP-COP 療法を高齢患者に対して施行しており、その安全性と有効性について長期成績を検討した。その際に、治療強度評価の新たな指標である RTI を定義し、RTI による治療強度評価の有用性を検討した。

【対象および方法】

2008 年 4 月-2015 年 12 月において、当院および関連 3 施設で治療された初発 DLBCL 患者を後方視的に診療録から抽出し解析した。75 歳未満の患者には減量のない R-CHOP 療法(リツキシマブ: 375mg/m²、エンドキサン(CPA): 750mg/m²、ADR: 50mg/m²、ビンクリスチン(VCR): 1.4 mg/m²(最大 2.0 mg)、PSL: 100 mg/day)を 75 歳以上の患者には減量 R-THP-COP 療法 (リツキシマブ: 375mg/m²、CPA: 500mg/m²、THP: 30mg/m²、VCR: 1.0 mg/m²(最大 2.0 mg)、PSL: 60 mg/day)を施行した。なお、患者の状態に合わせて主治医判断で適宜減量した。末梢神経障害 Grade 2 (Common Toxicity Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.0)以上が出現した場合は VCR を 1.5 倍量のビンデシン(VDS)に置換した。限局期悪性リンパ腫に対し化学療法 3 コース+放射線治療を施行した症例、中枢神経原発症例、AIDS 関連症例は除外した。主要評価項目は全生存率(OS)とし、副次的評価項目は無増悪生存率(PFS)、再発率(RR)、治療関連死亡率(TRM)、有害事象発現率とした。OS・PFS の解析には Kaplan-Meier 法、RR・TRM の解析には各々を競合リスクとした Cumulative incidence 法、単変量・多変量解析には Cox 回帰ハザードモデルを用いた。解析には EZR (Easy R)を用いた。

治療強度の計算は CPA、ADR(THP)、VCR それぞれについて以下の通り計算し、3 薬剤の平均値を算出した。

- actual dose intensity(DI)= $\frac{\text{actual total dose over the entire period (mg/m}^2\text{)}}{\text{actual total duration of the chemotherapy period (weeks)}}$
- relative DI(RDI)= $\frac{\text{actual DI}}{\text{standard DI}}$
- Intended DI(IDI)= $\frac{\text{actual dose in the first course}}{\text{standard dose}}$
- relative treatment intensity(RTI)= RDI × the number of courses administered

【結果】

・患者背景

減量 R-THP-COP 療法を施行した 75 歳以上の患者は 54 名(75-79 歳: 25 名, 80 歳以上: 29 名)であった。全症例の観察期間中央値は 4.36 (0.1-11.6)年, 生存症例の観察期間中央値は 6.2 (0.1-11.6)年であった。16 人の患者 (30%) が, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status (PS) が 2 以上で, ECOG PS が不良(≥2)の患者の割合は 75-79 歳の年齢層(16%)よりも 80 歳以上の年齢層(17%)の方が高かった。治療前の心臓超音波検査では 11 人の患者(20%)の左室駆出率が 60%未満であった。併存症についてはチャールソン併存疾患指数(CCI)で評価し, スコア 0, 1, および 2 以上がそれぞれ 25 人(46%), 20 人(37%), 9 人(17%)であった。DLBCL の予後分類は改定国際予後指標(R-IPI)で評価を行い, 30 人の患者(56%)が高リスク群であった。RTI の中央値は 3.54 (0.63-6.81)であった。22 人(41%) で全てのコースが入院で施行され, 年齢別では 80 歳以上が 16 人(55%), 75~79 歳が 6 人(24%)だった($P=0.028$)。80 歳以上の患者はより低い RTI の治療を受けたが(median 4.25 [75-79 歳] vs. 3.12 [80 歳以上], $P=0.01$), これら 2 つのグループ間で $RTI \geq 2.7$ で治療された患者の割合に有意差はなかった ($P=0.13$)。

・生存率

完全寛解率は 81%で, 減量 R-THP-COP 療法群の 4 年 OS および 4 年 PFS は, それぞれ 58.0% (95%CI: 43.4-70.0)および 54.9% (95%CI: 39.4-68.0)であった。4 年での累積再発率は 42.9% (95%CI: 28.6-56.5)であった。追跡期間中に 29 人が死亡した。減量 R-THP-COP 療法群の OS は, R-CHOP 療法を受けた 60-75 歳の患者よりも低かったが, PFS に有意差はなく TRM にも有意差はなかった。

75-79 歳の患者と 80 歳以上の患者の比較では, 4 年 OS に有意差はなく(75-79 歳: 55.1% [95%CI: 33.6-72.1], 80 歳以上: 60.6% [95%CI: 40.2-75.9]; $P=0.99$), 4 年 RR は, それぞれ 38.8% (95%CI: 19.0-58.3)および 46.6% (95%CI: 26.1-64.7)であった($P=0.61$)。1 年 TRM にも有意差がなかった。

生存に関わるリスクの解析では, 減量 R-THP-COP 療法群のうち, R-IPI で高リスクに分類された患者は, 低リスクに分類された患者よりも OS が低かった($P=0.021$)。R-CHOP 療法を受けた患者を含む 65 歳以上の患者の分析では, CCI スコアが 1 以上の患者は CCI スコアが 0 の患者よりも有意に悪い OS を示したが($P=0.0097$)、減量 R-THP-COP 療法を受けた患者の間では OS に有意差はみられなかった($P=0.22$)。治療強度で比較すると, $RDI \geq 61\%$ で減量 R-THP-COP 療法を受けた患者と $RDI < 61\%$ 未満で治療を受けた患者との間で, 4 年 OS に有意差はなかった ($P=0.35$)。一方, 減量 R-THP-COP 療法で $RTI \geq 2.7$ で治療された患者の 4 年 OS は, 減量 R-THP-COP 療法で $RTI < 2.7$ で治療された患者よりも有意に高かった(68.5% [95%CI: 51.2-80.8], 28.7% [95%CI: 8.9-52.6]; $P<0.001$)。1 年 TRM は, 減量 R-THP-COP 療法群の CCI スコアが 0 または 1 の患者よりも CCI スコアが 2 以上の患者で有意に高かった($P<0.001$)。

・有害事象

最も多かった有害事象は好中球減少症であったが, Grade3-4 の好中球減少症の発生率は, R-CHOP 療法群よりも減量 R-THP-COP 療法群の方が有意に低かった($P=0.0049$)。Grade3-4 の血小板減少症は, 減量 R-THP-COP 療法群の 3 人(6%), R-CHOP 療法群の 8 人(14%)で発生した($P=0.0042$)、減量 R-THP-COP 療法群の 2 人の患者(4%)と R-CHOP 療法群の 4 人の患者(7%)が Grade2 以上の心不全を発症した。最も多い死因は, 悪性リンパ腫の進行または再発であった。

【考察】

高齢の未治療 DLBCL 患者に対して, さまざまな化学療法レジメンや治療強度での治療成績が報告されている。近年は R-mini-CHOP 療法(CPA: 400 mg/m², ADR: 25 mg/m², VCR: 1 mg/m², PSL: 40

mg/m²) が選択されることが多く、第2相試験で80歳以上の患者の2年OSは59%であると報告された。我々の研究では、80歳以上の患者の4年OSは60.6%とR-mini-CHOP療法と遜色ない結果であった。本研究ではR-mini-CHOP療法と直接比較はしていないが、減量R-THP-COP療法は高齢未治療DLBCL患者の治療選択肢であることを示唆するものである。

いくつかの研究では、より高いRDIの維持がOSを改善させることが示されている。しかし、RDIを計算するための標準的な方法がないため、研究間で計算方法が異なっている。さらに、RDIを評価した既報では、化学療法の途中中止はRDIの計算に反映されなかった。そこで我々は治療強度を評価する際に、投与されたコース数をRDIに乗じたものとしてRTIを定義した。RTIのカットオフは2.7に設定した。カットオフの2.7は減量R-THP-COP療法4コースを計画通りに実施した強度に相当する。本研究により、減量R-THP-COP療法を4コース以上受けた患者は3コース以下の患者よりも良好なOSを達成することが示唆された。既報で4コースを超えるR-CHOP療法が、80歳を超えるDLBCL患者の良好なOSと関連するとされており、本研究の結果は既報と矛盾しない。これらのことから、RTIは後方視研究で治療強度を評価する有効な手段である可能性があると考えられた。

THPはテトラヒドロピラニル誘導体である。70歳未満の未治療DLBCLに対するR-THP-COP療法とR-CHOP療法を比較した第3相試験ではR-THP-COP療法の非劣性が示されている。しかし、高齢患者、特に75歳以上の患者における減量R-THP-COP療法の有効性は検討されていない。我々の施設では75歳以上の未治療DLBCL患者に対し減量R-THP-COP療法を施行していた。本研究では、高齢患者における減量R-THP-COP療法の有効性と安全性を後方視的に評価した。R-CHOP療法を受けた若年患者と比較して、有害事象の増加は見られなかった。THPはADRよりも急性心毒性および遅発性心毒性の発生率が低いことが報告されている。本研究で減量R-THP-COP療法で治療された75歳以上の患者は、R-CHOP療法で治療された若年患者と比較してGrade2以上の心不全症状の増加は認めなかった。しかし、今回の後方視的検討では化学療法中や化学療法後の定期的な心臓超音波検査による心機能の正確な評価のデータを収集することはできなかったため、今後は心不全を含む計画的な心合併症の評価方法について検討する必要がある。

【結語】

本研究により高齢者、特に合併症が少ない患者に対する減量R-THP-COP療法の有効性が示された。また、治療強度の指標としてRTIは有効であり、RTI 2.7、すなわち減量R-THP-COP療法4コース程度の治療強度を目標に治療を行うことで予後を改善することが示唆された。今後、減量R-THP-COP療法の有効性評価について前向き試験での比較試験を行っていく必要がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

2023年5月30日、6月27日、6月30日にそれぞれ論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

びまん性大細胞型Bリンパ腫(Diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL)は悪性リンパ腫の中で最も頻度の高い疾患であり、高齢者に多くみられる疾患である。高齢者においては年齢に伴う脆弱性や併存疾患などで計画通りの抗がん剤治療を施行することが困難である。そこで、高齢DLBCL患者における至適な抗がん剤投与方法を検討した。治療強度の指標として用いられるrelative dose intensity; RDIについて、既報ではより高いRDIの維持がOSを改善させることが示されているが、RDIの計算法が研究間で異なり統一した定義がなかった。さらに、化学療法の途中中止はRDIの計算に反映されなかった。そこで治療強度を評価する際に、投与されたコース数をRDIに乗じたものとしてRTIを定義し解析を行った。75歳以上の初発DLBCL患者を後方視的に診療録から抽出し解析した。当該患者には減量R-THP-COP療法が施行された。減量R-THP-COP療法を施行した75歳以上の患者は54名であった。全症例の観察期間中央値は4.36 (0.1-11.6)年、生存症例の観察期間中央値は6.2 (0.1-11.6)年であった。RTIの中央値は3.54 (0.63-6.81)であった。80歳以上の患者はより低いRTIの治療を受けたが(median 4.25 [75-79歳] vs. 3.12 [80歳以上], P=0.01)、これら2つのグループ間でRTI \geq 2.7で治療された患者の割合に有意差はなかった (P=0.13)。完全寛解率は81%で、減量R-THP-COP療法群の4年OSおよび4年PFSは、それぞれ 58.0% (95%CI: 43.4-70.0)および54.9% (95%CI: 39.4-68.0)であった。75-79歳の患者と80歳以上の患者の比較では、4年OSに有意差は認めなかった(75-79歳: 55.1% [95%CI: 33.6-72.1], 80歳以上: 60.6% [95%CI: 40.2-75.9]; P=0.99)。1年TRMにも有意差がなかった。治療強度で比較すると、減量 R-THP-CO

P療法でRTI \geq 2.7で治療された患者の4年OSは、RTI $<$ 2.7で治療された患者よりも有意に高かった(68.5% [95%CI: 51.2–80.8], 28.7% [95%CI: 8.9–52.6]; $P<0.001$)。

本研究は、実地臨床における高齢 DLBCL 患者の抗がん剤投与計画を決めるうえで有用であることが示唆され、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)乙第1044号		
学位授与の日	令和6年7月18日		
氏名	平山 健太郎		
学位論文の題目	Sustained lower bilirubin-binding affinity of albumin in extremely preterm infants (超早産児におけるアルブミン-ビリルビン結合親和性低下の遷延)		
論文審査委員	主査	教授 井篁 一彦	
	副査	教授 井上 徳光	教授 徳原 大介

論文内容の要旨

【緒言】

新生児高ビリルビン血症(新生児黄疸)は、生後1週間以内に頻繁に観察される、総ビリルビン(TB)が上昇する良性の病態である。TBは、主にアルブミンと強固に結合して血液中に輸送されるが、アルブミンに結合していないごく一部のビリルビンは、非結合(または遊離)ビリルビン(UB)として、血液脳関門を通過して、ビリルビン脳症(BE)を引き起こす可能性がある。BEは過去の疾患と考えられていたが、近年、早産児(特に在胎28週未満の児)において乳児期にBEと診断される症例が多数報告されるようになった。ビリルビン-アルブミン結合親和性が、BEの発症に関係することは以前より指摘されているものの、早産児においては十分に検討されていない。また、UB血症の長期化はBEの発症と関連することも報告されているが、早産児の生後4週間にわたるUB値の時系列的变化を検討した報告はほとんどない。

【方法】

本研究では、超早産児のBE発症の原因を明らかにするため、以下の3つの項目を調べた。

①超早産児と、早産児の生後4週間までのビリルビンパラメータ(TB、UB、アルブミン)を週1回検査し、その推移を2群間で比較した。

②ビリルビン-アルブミン結合親和性の指標として、 K_a (結合親和力=大きいほど結合力が強い)と、海外でUBの代用として使用されるBAMR(bilirubin-albumin molar ratio= $[TB]/[アルブミン]$)を計算。UB値とBAMRの関係を評価するため、UB/BAMR比を使用し、アルブミンのビリルビン結合親和性を2群間で比較した。

③アルブミンのビリルビン結合親和性に影響を与える特定の抗生物質、インドメタシン、脂肪製剤の静脈内投与の使用頻度を2群間で比較した。

【結果】

本研究に登録した在胎22週から27週生まれの21人(超早産児)と、在胎28週から31週生まれの22人(早産児)を後方視的に調査した。在胎週数と出生体重を除く臨床的特徴は、2群間で同等であった。

①TB値は早産児で7~28日目にかけて有意に減少した(9.5(8.6-11.3)→6.0(3.4-7.5) mg/dL, $p < 0.001$)が、超早産児では有意な変化は認められなかった(5.8(4.5-6.8)→4.7(2.7-6.9) mg/dL)。同様に、UB値は早産児では経時的に有意に減少したが(0.43(0.36-0.51)→0.18(0.08-0.29) $\mu\text{g/dL}$, $p < 0.001$)、超早産児で有意な減少は認められなかった(0.34(0.27-0.48)→0.20(0.15-0.55) $\mu\text{g/dL}$)。アルブミン値は、早産児では7日目から28日目まで変化しなかったが(3.2(3.0-3.3)→3.1(2.8-3.4) g/dL)、超早産児では有意に増加(2.4(2.2-2.5)→3.0(2.5-3.0) g/dL, $p < 0.001$)した。

② K_a は、超早産児が早産児に比べ有意に低かった(14日目、56.1(46.4-66.7) vs. 70.9(67.1-82.4) $\text{L}/\mu\text{mol}$, $p < 0.001$; 21日目、55.2(50.3-70.6) vs. 74.7(64.1-79.2) $\text{L}/\mu\text{mol}$, $p < 0.001$; 28日目、53.0(38.4-62.9) vs. 86.5(77.1-95.5) $\text{L}/\mu\text{mol}$, $p < 0.001$)。同様に、UB/BAMR比は早産児と比較して超早産児で有意に高かった(14日目、1.37(1.15-1.80) vs. 1.18(1.02-1.34), $p = 0.021$;

21 日目、1.36 (1.03–1.61) vs. 1.11 (0.91–1.27) , $p = 0.022$; 28 日目、1.60 (1.10–1.96) vs. 0.83 (0.77–1.01), $p < 0.001$).

③超早産児は早産児に比べ、生後 2、3、4 週目に抗生物質、生後 1、2 週目にインドメタシン、脂肪製剤の使用頻度が有意に高かった。加えて、超早産児は早産児に比べ、生後 1、2、3、4 週目の抗生物質の投与日数も有意に多かった。同様に、超早産児では早産児に比べ、生後 1、2 週目のインドメタシンおよび脂肪製剤の投与量も有意に多かった。

【考察】

今回の研究では、超早産児は、血清アルブミン濃度が上昇しても UB 値は低下しなかった。一方、早産児では、血清 UB 濃度が経時的に有意に減少した。超早産児の 14、21、28 日目の calculated Ka の中央値は、早産児のそれより有意に低かった。つまり、超早産児においては、アルブミンのビリルビン結合親和性の低さは生後 1 週に限らず、生後 4 週まで持続しており、特定の超早産児では、UB 血症が長期化する原因になりえることが示唆された。

同様に、本研究では、超早産児において、14 日目、21 日目、28 日目の UB/BAMR 比が有意に高かった。これは、超早産児では、早産児と比較して、BAMR 値から推測するよりも、実際は高い UB 値となっていることを示す結果である。UB 値の代用として使用されることが多い BAMR は、特に超早産児においては、UB の代用マーカーとして使用できないことが示唆された。

超早産児では、脂肪製剤や抗生物質を長期にわたり使用しており、アルブミンのビリルビン結合親和性が持続的に低下している原因の 1 つであると考えられた。

【結語】

超早産児は、早産児と比較して、アルブミンのビリルビン結合親和性が持続的に低く、UB 血症が遷延していた。超早産児の BE 発症を予防するためには、BAMR で代用することなく、少なくとも生後 4 週間にわたり、UB を測定するべきである。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 5 年 6 月 27 日、および 7 月 4 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。

新生児高ビリルビン血症 (新生児黄疸) は、総ビリルビン (TB) が上昇する良性の病態である。TB は、主にアルブミンと強固に結合して血液中に輸送されるが、アルブミンに結合していない一部のビリルビンは、非結合ビリルビン (UB) として、血液脳関門を通過し、ビリルビン脳症 (BE) を引き起こす可能性があり、特に早産児において、乳児期に BE と診断される症例が報告されている。UB 血症の長期化と、ビリルビン-アルブミン結合親和性が、BE の発症と関連することは報告されているが、早産児で生後 4 週間にわたる UB 値とビリルビン-アルブミン結合親和性の時系列的变化を検討した報告は無い。

本研究では、超早産児 (在胎 28 週未満) と、早産児 (在胎 28 週以上 32 週未満) の生後 4 週間までの TB、UB 値の推移に加え、ビリルビン-アルブミン結合親和性の指標として、結合親和力 (Ka) を算出し、2 群間で比較した。加えて、海外で UB の代用として使用される BAMR (bilirubin-albumin molar ratio) を計算し、UB 値と BAMR の関係性を評価するため、UB/BAMR 比を算出した。また、アルブミンのビリルビン結合親和性に影響を与える特定の抗生物質、インドメタシン、脂肪製剤の使用頻度をそれぞれ 2 群間で比較した。

その結果、TB・UB 値ともに、早産児で生後 4 週間にかけて有意に減少したが、超早産児では有意な変化は認められず、Ka は、超早産児が早産児に比べ有意に低かった。つまり、超早産児においては、アルブミンのビリルビン結合親和性の低さは生後 4 週まで持続しており、特定の超早産児では、UB 血症が長期化する原因になりえることが示唆された。また、UB/BAMR 比は早産児と比較して超早産児で有意に高かった。これは、超早産児では、早産児と比較して、BAMR 値から推測するよりも実際は高い UB 値となっていることを示す結果であり、BAMR は、特に超早産児において、UB の代用として使用できないことが示唆された。加えて、超早産児は早産児に比べ、抗生物質、インドメタシン、脂肪製剤の使用頻度が有意に高く、それらの薬剤の長期使用もアルブミンのビリルビン結合親

和性が持続的に低下している原因の1つであると考えられた。

本論文において、超早産児では、生後4週間にわたってUB血症が遷延するとともに、その原因として、アルブミンのビリルビン結合親和性の低下が関与している可能性を初めて示した。BAMRで代用することなく、少なくとも生後4週間にわたり、UBを測定することで、超早産児のBE発症予防に貢献できる可能性を示したものであり、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1045号		
学位授与の日	令和5年7月18日		
氏名	植田 昇太		
学位論文の題目	Retrospective study of the efficacy and safety of chemoembolization with drug-eluting microspheres combined with intra-arterial infusion of bevacizumab for unresectable hepatocellular carcinoma (切除不能肝細胞癌に対するベバシズマブ動注を併用した薬剤溶出性球状塞栓物質を用いた肝動脈化学塞栓療法の有効性と安全性に関する後方視的検討)		
論文審査委員	主査	教授 北野 雅之	
	副査	教授 川井 学	教授 園村 哲郎

論文内容の要旨

【緒言】

肝動脈化学塞栓療法(TACE)は、根治的治療の適応とならない Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)病期の intermediate stage (BCLC-B)の肝細胞癌(HCC)に対する標準治療として、世界中に広く普及している。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の出現で、BCLC-Bを中心にHCCの治療法は大きく変化している。我々は薬剤溶出性球状塞栓物質を用いた TACE(DEM-TACE)を行うことで、BCLC-BのTACE不適とされるHCCやadvanced stage(BCLC-C)のHCCにおいても肝機能を温存しながら治療継続が可能ではないかと考えた。また、TACE不応の一因と考えられる残存HCC内の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)増加を抑えるために抗VEGF抗体であるBevacizumabを経動脈的に投与することにより、TACEの効果を高めることができるのではないかと考えた。本研究の目的は、切除不能HCCに対するBevacizumab動注を併用したDEM-TACEの有効性と安全性を評価し、予後因子を調査することであった。

【方法】

対象は2014年11月～2020年12月に本治療を施行したBCLC-B(Up-to 7 out)とBCLC-CのHCC34例で、主要評価項目は全生存期間(OS)、副次評価項目は1ヶ月後の奏効率、安全性、予後因子であった。全生存曲線はカプラン・マイヤー法で作成され、予後因子はCox比例ハザードモデルを用いた単変量および多変量解析で調査された。

【結果】

全体のmedian OSは13ヶ月で、BCLCステージや門脈浸潤の有無では有意差はなかった。奏効率は14.2%、病勢制御率は100%であった。手技に関連する合併症、治療に関連した死亡、Bevacizumab動注に関連した有害事象、Grade 3以上の有害事象は認められなかった。また著明な肝予備能の低下なく、術後平均入院日数は1.7±0.7日であった。有意な予後不良因子はアルコール性肝疾患、Child-Pugh score 8点以上、Superabsorbent Polymer Microspheres 50-100µmであった。

【考察】

本治療で肝予備能を温存できたこと、有害事象の頻度が少なく程度も軽かったことは、球状塞栓物質を用いた治療が影響したと考えられる。ほとんどの症例がStable Diseaseであったが、肝予備能の有意な低下はなく、増悪時に繰り返し治療できたことで、長期の病勢制御が得られ、予後延長に寄与したと考えられる。TACEにBevacizumabの動注を併用することで、同時に投与される治療薬の腫瘍への取り込みを改善(腫瘍血管正常化作用)し、TACEによるhypoxia誘導性VEGFの放出を抑え、浸潤や転移を抑制し、TACEの効果を高めた可能性が考えられる。Bevacizumabの動脈内投与は全身投与に比べ、少ない投与量で局所濃度を上昇させることが可能で、副作用の軽減にも繋がると考えられる。

【結語】

Bevacizumab 動注を併用した DEM-TACE は有効かつ安全で、切除不能 HCC の治療の選択肢となりうる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和5年7月5日と7月6日に論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

肝動脈化学塞栓療法(TACE)は、根治的治療の適応とならない Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)病期の intermediate stage (BCLC-B)の肝細胞癌(HCC)に対する標準治療として、世界中に広く普及している。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の出現で、BCLC-B を中心に HCC の治療法は大きく変化している。我々は薬剤溶出性球状塞栓物質を用いた TACE(DEM-TACE)を行うことで、BCLC-B の TACE 不適とされる HCC や advanced stage(BCLC-C)の HCC においても肝機能を温存しながら治療継続が可能ではないかと考えた。また、TACE 不応の一因と考えられる残存 HCC 内の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)増加を抑えるために抗 VEGF 抗体である Bevacizumab を経動脈的に投与することにより、TACE の効果を高めることができるのではないかと考えた。

本研究の目的は、切除不能 HCC に対する Bevacizumab 動注を併用した DEM-TACE の有効性と安全性を評価し、予後因子を調査することであった。対象は 2014 年 11 月～2020 年 12 月に本治療を施行した BCLC-B(Up-to 7 out)と BCLC-C の HCC 34 例で、主要評価項目は全生存期間(OS)、副次評価項目は 1 ヶ月後の奏功率、安全性、予後因子であった。全生存曲線はカプラン・マイヤー法で作成され、予後因子は Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量および多変量解析で調査された。

全体の median OS は 13 ヶ月で、BCLC ステージや門脈浸潤の有無では有意差はなかった。奏功率は 14.2%、病勢制御率は 100%であった。手技に関連する合併症、治療に関連した死亡、Bevacizumab 動注に関連した有害事象、Grade 3 以上の有害事象は認められなかった。また著明な肝予備能の低下なく、術後平均入院日数は 1.7 ± 0.7 日であった。有意な予後不良因子はアルコール性肝疾患、Child-Pugh score 8 点以上、Superabsorbent Polymer Microspheres 50-100 μ m であった。

本治療で肝予備能を温存できたこと、有害事象の頻度が少なく程度も軽かったことは、球状塞栓物質を用いた治療が影響したと考えられる。ほとんどの症例が Stable Disease であったが、肝予備能の有意な低下はなく、増悪時に繰り返し治療できたことで、長期の病勢制御が得られ、予後延長に寄与したと考えられる。TACE に Bevacizumab の動注を併用することで、同時に投与される治療薬の腫瘍への取り込みを改善(腫瘍血管正常化作用)し、TACE による hypoxia 誘導性 VEGF の放出を抑え、浸潤や転移を抑制し、TACE の効果を高めた可能性が考えられる。Bevacizumab の動脈内投与は全身投与に比べ、少ない投与量で局所濃度を上昇させることが可能で、副作用の軽減にも繋がると考えられる。

本論文により Bevacizumab 動注を併用した DEM-TACE は有効かつ安全で、切除不能 HCC の治療の選択肢となりう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1046号		
学位授与の日	令和5年12月19日		
氏名	安井 昌彰		
学位論文の題目	Diagnostic utility of susceptibility-weighted imaging in amyotrophic lateral sclerosis (筋萎縮性側索硬化症における MRI SWI の診断上の有用性)		
論文審査委員	主査	教授 廣西 昌也	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 伊東 秀文

論文内容の要旨

【緒言】

筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis: ALS)は、脳・脊髄において進行性に運動ニューロン変性が生じるものであるが、その病因は完全には解明されておらず、根本的な治療法も存在していない。診断は上位運動ニューロン (Upper motor neuron: UMN) 徴候・下位運動ニューロン (Lower motor neuron: LMN) 徴候の両者を同定して初めて ALS と臨床診断できる。しかし、経験的には両者が揃わないことはまれではない。特に LMN 徴候のみが前景に出て UMN 徴候が検出できない ALS 例がしばしばある。LMN 徴候の評価には針筋電図検査による神経原生変化の検出が有用であるが、UMN 徴候に関しては痙性や腱反射の亢進、異常反射の出現などにより症候学的に判断する以外に有用な方法がなく、判断に迷う場合が少なくない。ALS に特異的なバイオマーカーが存在しない現在、その診断は病歴、症状、神経所見、電気生理学的検査、画像検査、臨床化学検査に基づき、かつ他疾患を除外して総合的に下す必要がある。

ALS 患者の一次運動野皮質に鉄沈着が生じることが示唆されている。本研究では ALS の診断マーカーとしての MRI SWI の新しい簡便な評価方法を検討した。

【対象と方法】

改訂 El Escorial 診断基準に従って診断された 36 人の ALS 患者と 19 人のコントロール患者をレトロスペクティブに調査した。一次運動野の評価は MRI SWI での半定量的画像評価の Three point scoring (TPS) に従って Motor cortex low intensity (MCLI) スコアを評価した。MCLI スコアと ALS 患者の機能評価尺度 (ALSFRS-R) や進行率 (Δ FRS)、罹病期間、UMN スコアとの関係性を評価した。

【結果】

平均 MCLI スコアは、コントロール群よりも ALS 患者で有意に高かった。コントロール群では、MCLI スコアが 1 以上の患者は 19 例中 6 例で、上肢領域の 1 点であり、年齢は 60 歳以上であった。MCLI スコアのカットオフ値を 3 に設定した場合、ALS とコントロールの間の診断精度は、感度で 0.92、特異度で 1.00 であった(AUC 0.973)。

相関分析は、MCLI スコアが Δ FRS および UMN スコアと有意に相関していたが、年齢、疾患期間、および ALSFRS-R とは相関していなかった。

各領域の MCLI スコアを UMN 徴候と見なした場合の SWI の診断的有用性も調べた。ポイントが 1 以上の MCLI スコアは、UMN 徴候と見なした。ただし、コントロール群でも認められた両方の上肢領域の 1 点の MCLI スコアは UMN 徴候としては判断しなかった。El Escorial 診断基準の診断感度 (Definite 10 例+Probable 14 例+Probable 検査陽性 4 例) は 77.8%(28/36)であったのに対し、MCLI スコアを UMN 徴候と見なした場合、臨床診断は Definite 22 例、Probable 11 例、Possible 3 例であり、診断感度は 91.7%(33/36)で 19 例で診断グレードが上昇した。

【考察】

MCLI スコアは、コントロール群よりも ALS 患者で有意に高く、コントロール群と区別すること

ができる。MCLI スコアは先行研究の TPS のように信号強度だけでなく、病変の範囲と左右も評価することで診断精度が向上した。他の MRI シーケンスやソフトウェアを使用した定量分析も有用だが、使用できる設備が限られているため、日常の臨床診療には適していない。この MCLI スコアリングは半定量的であるが、ALS とコントロールを区別する際に高い感度と特異性を示し、診断に貢献できる。特に、上位運動ニューロン徴候が乏しい場合の診断に貢献する。

MCLI スコアは、ALSFRS-R スコア、疾患期間と有意な相関は認めなかった。UMN スコアは MCLI スコアと相関していた。これは、MCLI スコアが疾患の重症度よりも、LMN 症状の影響を含む UMN の症状を反映していることを示している。さらに、UMN スコアが低い一部の患者は、MCLI スコアも高くなった。したがって、SWI は、LMN サインによって隠されている UMN サインの検出に対して有用である可能性がある。また、MCLI スコアが疾患の進行率 (Δ FRS) と有意に相関していた。ALS の疾患の進行速度はさまざまであり、疾患の進行速度を予測する単一のマーカーはない。MRI 所見で疾患の進行率を予測できれば、臨床的に有用であり、臨床試験における患者選択に利用される。ニューロン内の鉄の蓄積は、アポトーシス、オートファジー、ネクローシス、またはフェロトーシスを介して細胞死を引き起こす可能性がある。ALS では、運動皮質のミクログリア細胞に鉄が蓄積し、鉄が運動ニューロンに過剰な酸化ストレスを誘発する。SOD1 マウスモデルの *in vivo* 研究では、鉄が脊髄ニューロンとグリアに蓄積し、鉄キレート剤が疾患の進行を遅らせることが示されている。これは ALS の運動皮質における鉄沈着の程度が疾患の進行と関連しているという仮説を支持している。したがって、鉄沈着の検出は、ALS の疾患進行の予測に寄与する可能性がある。

【結論】

MRS SWI による MCLI スコアは ALS とコントロールを区別する際に高い感度と特異性を示し、上位運動ニューロン徴候が乏しい症例の診断にも貢献する。また、疾患の進行速度を予測の指標になる可能性がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和5年11月30日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。本論文の目的は、筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis: ALS)患者の一次運動野皮質に鉄沈着が生じることが示唆されていることから、ALS の上位運動ニューロン(Upper motor neuron: UMN) 徴候の診断マーカーとしての MRI SWI の新しい簡便な評価方法を検討し、その有用性を明らかにすることである。

改訂 El Escorial 診断基準に従って診断された 36 人の ALS 患者と 19 人のコントロール患者をレトロスペクティブに調査した。一次運動野の評価は MRI SWI での半定量的画像評価の Three point scoring (TPS) に従って、両側の脳幹領域・頸髄領域・腰仙髄領域における Motor cortex low intensity (MCLI) スコアを評価した。MCLI スコアと ALS 患者の機能評価尺度 (ALSFRS-R) や進行率 (Δ FRS)、罹病期間、UMN スコアとの関係を評価した。

平均 MCLI スコアは、コントロール群よりも ALS 患者で有意に高かった。コントロール群では、MCLI スコアが 1 以上の患者は 19 例中 6 例で、上肢領域の 1 点であり、年齢は 60 歳以上であった。MCLI スコアのカットオフ値を 3 に設定した場合、ALS とコントロールの間の診断精度は、感度で 0.92、特異度で 1.00 であった(AUC 0.973)。相関分析は、MCLI スコアが Δ FRS および UMN スコアと有意に相関していたが、年齢、疾患期間、および ALSFRS-R とは相関していなかった。各領域の MCLI スコアを UMN 徴候と見なした場合の SWI の診断的有用性も調べた。ポイントが 1 以上の MCLI スコアは、UMN 徴候と見なした。ただし、コントロール群でも認められた両側の上肢領域の 1 点の MCLI スコアは UMN 徴候としては判断しなかった。El Escorial 診断基準の診断感度 (Definite 10 例+Probable 14 例+Probable 検査陽性 4 例) は 77.8%(28/36)であったのに対し、MCLI スコアを UMN 徴候と見なした場合、臨床診断は Definite 22 例、Probable 11 例、Possible 3 例であり、診断感度は 91.7%(33/36)で 19 例の診断グレードが上昇した。

本論文は、MRI SWI による MCLI スコアは ALS とコントロールを区別する際に高い感度と特異性を示し、上位運動ニューロン徴候が乏しい症例の診断にも貢献すること、また疾患の進行速度を予測の指標になる可能性を示したことから、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1047号		
学位授与の日	令和6年1月16日		
氏名	鈴木 映美		
学位論文の題目	Impaired healing in an incision wound in corneal stroma in a lumican-null mouse (ルミカン遺伝子欠損マウスにおける角膜実質の創傷治癒)		
論文審査委員	主査	教授 近藤 稔和	
	副査	教授 神人 正寿	教授 雑賀 司珠也

論文内容の要旨

【緒言】

ルミカンはケラタン硫酸プロテオグリカンのコアタンパク質で、角膜の透明性を維持するコラーゲン線維間隔や線維径の制御に関与している。創傷治癒過程でトランスフォーミング成長因子 β (TGF β)が重要な役割を演じる。雑賀らは Lumican 欠失マウスを作出し角膜上皮の創傷治癒が遅延することを示した。(Saika S, et al. J Bio Chem. 2000) しかし角膜実質の創傷治癒過程や線維癒痕化における Lumican の役割は手付かずのままである。本研究では、Lumican 欠失マウスの角膜全層切開モデルと眼線維芽細胞を用いて、角膜実質創傷治癒過程における Lumican の役割やその際のシグナル伝達の変化について検討した。

【方法】

C57BL/6 マウス (野生型、WT) とルミカン遺伝子欠損 (KO) マウスを使用し角膜に全層切開創を作成した。創作成一定期間後に創間距離、免疫組織学的染色、創傷治癒関連成分発現の評価を行った。生後1日のマウス眼球から得た培養眼線維芽細胞に TGF- β 1 を添加し細胞増殖と創傷治癒関連遺伝子の発現を調査した。ゲル収縮アッセイにより細胞収縮活性を評価した。

【結果】

創作成後5日目において KO マウスでは WT マウスと比較して創間距離が大きく筋線維芽細胞の発現が抑制された。培養眼線維芽細胞におけるルミカンの欠損は筋線維芽細胞発現の抑制、細胞増殖の促進、細胞収縮活性の低下に関与していた。

【結論】

ルミカンの欠損は実質細胞の筋線維芽細胞転換の抑制を介してマウス角膜実質の創傷治癒遅延に関与している。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和5年12月22日、12月25日及び12月28日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行なった。

角膜は透明な組織であるが、高度な炎症や外傷により癒痕治癒をきたすことがある。今回着目したルミカンはロイシンリッチプロテオグリカンの一種であり、生体内の様々な臓器に存在する細胞外マトリックス蛋白として知られている。既報では *in vivo* においてルミカン遺伝子欠損マウスでは角膜上皮の治癒が遅れるとされているが、角膜実質の創傷治癒についての報告はなく、またその詳細なシグナル伝達も明らかになっていない。本研究では角膜創傷治癒の新規治療開拓として、角膜実質創傷治癒におけるルミカンの役割について検討した。

まず申請者はルミカン KO マウスを用いて角膜全層切開モデルを作成した。ルミカン KO マウスでは WT と比較して創断端間の距離は延長しており、治癒が抑制されていると考えられた。また角膜内の α SMA の mRNA 発現レベルを RT-PCR 法で評価したところ、ルミカン KO マウスの角膜では発現

が低下していた。

このことにより筋線維芽細胞の出現が低下することによりルミカン KO マウスでは角膜実質の創傷治癒が遅延したと考えた。ルミカンは角膜実質切開創の治癒に促進的に関与している可能性を想定したためその機序解明を目的として *in vitro* での検討を行った。

生後 1 日のマウス眼球を刻んで得た眼角膜線維芽細胞を培養し外因性 TGF β 1 添加に対する反応を観察した。蛍光免疫染色では TGF β 1 添加後 48 時間以降、 α SMA において WT マウス細胞と KO マウス細胞間で染色差を認め、RT-PCR による評価でも KO マウス群では α SMA 発現は有意に抑制されていた。ルミカンの欠損は細胞仲介性のゲル収縮を抑制した。

以上のように、本論文はルミカンが間葉系細胞での TGF β 1 経路を介した筋線維芽細胞発現に関与しており、KO マウスの角膜実質創傷治癒の遅延の機序にこれが含まれる可能性があることを示した初めての論文である。この経路の制御が線維瘢痕化の抑制と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)乙第1048号		
学位授与の日	令和6年3月19日		
氏名	阪田 麻友美		
学位論文の題目	Japanese <i>mucuna pruriens</i> (<i>Hasshou beans</i>) showed faster and longer effects in Parkinson's disease (日本産ムクナ豆—八升豆—はパーキンソン病患者においてより速くより長い抗パーキンソン病作用を示す)		
論文審査委員	主査	教授 廣西 昌也	
	副査	教授 井原 義人	教授 伊東 秀文

論文内容の要旨

【緒言】

パーキンソン病(Parkinson's disease; PD)は進行性の神経変性疾患で、ドパミン作動薬で治療される。その中で L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA)は PD の最も効果的な標準治療薬であるが、疾患の進行に伴い、ウェアリングオフ現象やジスキネジアなどの運動合併症が出現し、経口薬のみで症状を改善させるのは未だに容易ではない。

Mucuna pruriens varant utilis (*MP*) はトビカズラ属に属するピロードマメの変種で、インドをはじめ、中南米などの熱帯地方に生息し、日本には江戸時代初期(西暦 1600 年代)に大陸から日本に食用として伝来した。日本各地に広がり、多く収穫できるため多収穫を意味する「八升」から日本では八升豆と呼ばれている。1950 年代には日本でほとんど栽培されることはなくなったが、近年作物としての有用性が見直され、各地で栽培されるようになり、2008 年に和歌山県農業試験場で栽培が開始されている。

*MP*はアーユルヴェーダで用いられる程古くから治療薬として注目されており、その効能の1つとして *MP*に含まれる L-DOPA であることが判明している。これまで海外では少数の PD 患者を対象とした *MP*の治療研究が行われており、臨床で用いる L-DOPA 製剤と比較して、*MP*の摂取でより長い薬効が得られたと報告されているが、その作用機序は十分に解明されていない。

本研究では日本で栽培された *MP*を摂取することによって得られる治療効果や L-DOPA 薬物動態を、動物実験および臨床試験において解析し、その作用機序を検証した。

【対象と方法】

動物実験では、正常ラット(雄の Sprague-Dawley ラット)を用いて *MP*摂取による L-DOPA 薬物動態を同量の L-DOPA 投与による薬物動態と比較検討した。具体的には、経時的な血液検査のために麻酔下でラットの右頸静脈に採血用カテーテルを留置し、14-16 時間絶食後に 15 mg/kg の L-DOPA を含む *MP*粉末、または 15 mg/kg の L-DOPA を各群 3 匹に経口投与し、L-DOPA 薬物動態評価のため投与前、投与後 15、30、60、120、180、240、300、360、480、600 分に採血を行った。その血漿を用いて液体クロマトグラフィーにより L-DOPA、dopamine (DA)、3-O-methyl-dopa (3-OMD)、dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、homovanillic acid (HVA)を測定し、最大血漿濃度 (peak plasma concentration: Cmax) および最大濃度までの時間 (time to peak plasma concentration: Tmax)、曲線下面積 (area under the concentration over time curve: AUC) を算出した。3-OMD と DA の代謝比は、それぞれの AUC から L-DOPA の AUC を除算して算出した。各パラメーターについて Mann-Whitney U test を用いて 2 群間で比較検討した。

臨床試験では、運動合併症のある PD 患者を対象として *MP*と *MP*に含まれる L-DOPA と同力価の L-DOPA/carbidopa 製剤を服用し、運動症状に対する効果と L-DOPA 薬物動態を比較した。具体的には英国パーキンソン病協会ブレインバンクの基準を満たし、認知機能障害のない wearing off 現象と L-DOPA 誘発性ジスキネジアのある患者を対象とした。L-DOPA を含む抗 PD 薬を 12 時間以上中止し、空腹状態で 100/10 mg の L-DOPA/carbidopa 製剤または 11 g の *MP*粉末を単回投与した。翌週には同条件下で他方の薬剤を投与した。投与前と投与後の運動症状を日本版 UPDRS-part III、

modified Abnormal Involuntary Movements Scale (mAIMs)、患者症状日誌を用いて評価した。L-DOPA 薬物動態評価のため、採血は投与前、投与後 15、30、45、60、90、120、150、180 分に行い、血漿 L-DOPA、3-OMD、DOPAC、HVA を測定し、Cmax および Tmax、AUC、3-OMD 代謝比を算出した。運動症状および L-DOPA 薬物動態に関わる各パラメーターについて Mann-Whitney U test を用いて 2 群間で比較検討した。

動物実験および臨床試験で使用した MP は和歌山農業試験場で栽培・収穫されたもので、その L-DOPA 含有量は 4.02% であった。

【結果】

動物実験では、MP 投与群で 0-120 分の間で L-DOPA 血中濃度が L-DOPA 投与群より高値で推移し、AUC および Cmax も有意に高値であった。DA 血中濃度や DA 代謝比は MP 投与群と L-DOPA 投与群で有意差はなかったことから MP に dopa-decarboxylase (DDC) 阻害作用は無く、一方 3-OMD 代謝比は MP 投与群で低値であり、MP は COMT 阻害作用を含む物質が存在することが示唆された。

臨床研究では、7 名の患者（女性 5 名、男性 2 名）が参加した。平均年齢 66.1 歳、平均罹病期間は 11.7 年、オン時の重症度は Hoehn and Yahr 分類で平均 3.2 であった。オン時間は MP 投与群が 450 分、L-DOPA/carbidopa 投与群で 150 分と、MP 投与群で 2 倍以上延長した。オンに至るまでの時間も MP 投与群で短い傾向にあった。mAIMs スコアは両群間で差はなく、MP 投与群で重篤な有害事象も認めなかった。L-DOPA 薬物動態については、L-DOPA 血中濃度は MP 投与群の方が L-DOPA/carbidopa 投与群より有意に高値で推移した。3-OMD 代謝比は、MP 投与群が L-DOPA/carbidopa 投与群よりも低値であり、臨床試験においても MP に COMT 阻害作用を含む物質が存在することが示唆された。

【考察】

本研究は日本で栽培された MP でより速くより長い抗 PD 作用が得られることを検証し、薬物動態解析により MP の抗 PD 作用は含有される L-DOPA によるものだけでなく、COMT 阻害作用も関連していることを示した初めての報告である。COMT 阻害作用を有する物質について明らかにできなかったが、植物に含まれるポリフェノールの中には COMT 阻害作用を示すものがあり、MP にも類似の物質が含まれると推測される。

臨床研究において MP 摂取後の L-DOPA 血中濃度は高値で推移しており、通常であれば L-DOPA 誘発性ジスキネジアが悪化すると推測される状況であったが、ジスキネジアは 2 群間で変化はなかった。PD モデル動物による実験で MP が抗ジスキネジア作用を示した報告もあり、本研究の結果も MP がジスキネジアへ何らかの影響を及ぼした可能性が考えられた。

また従来 MP は食品として扱われ、容易に入手することが出来るため、PD 患者が L-DOPA 製剤と一緒に摂取する可能性がある。本研究結果から、MP と L-DOPA 製剤を併用した場合に血中 L-DOPA 濃度が著しく上昇すると推測され、ジスキネジアや精神症状等の有害事象を懸念しなければならない。その危険性を知らせる啓蒙活動が必要である。

【結論】

日本で栽培された MP は PD の治療薬として、L-DOPA と同等の有効性があり、L-DOPA よりも迅速かつ長く効果を発揮することが確認された。その効果は MP に含まれる L-DOPA だけでなく、COMT 阻害作用が関与していることが示された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和6年3月7日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め論文審査を行った。

本論文の目的は、パーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) の標準的治療薬である L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) をその質量の 3-10% 含有する *Mucuna pruriens variant utilis* (MP) の抗 PD 作用とその機序について、動物実験および臨床試験で得られた L-DOPA 薬物動態から検証することであった。

動物実験では、正常ラットを用いてMP摂取によるL-DOPA薬物動態を同量のL-DOPA投与による薬物動態と比較検討がなされた。その結果、MP投与群ではL-DOPA血中濃度は高値で推移し、曲線下面積 (area under the concentration over time curve: AUC) や最大血漿濃度 (peak plasma concentration: Cmax) もL-DOPA投与群より有意に高値であった。Dopamine (DA) 血中濃度やDA代謝比は両群で有意差はなく、MPにdopa-decarboxylase (DDC) 阻害作用は無かった。一方3-O-methyl-dopa (3-OMD) 代謝比はMP投与群で低値であり、MPにCOMT阻害作用を示す物質が存在する結果であった。

臨床試験では、wearing off現象とL-DOPA誘発性ジスキネジアのある進行期PD患者を対象としてMPとMPに含まれるL-DOPAと同力価のL-DOPA/carbidopa製剤を服用し、運動症状に対する効果とL-DOPA薬物動態が比較検討された。最終的に7名の患者 (女性5名、男性2名) が臨床試験に参加した。その結果、オン時間はMP投与群が450分、L-DOPA/carbidopa投与群で150分と、MP投与群で2倍以上延長した。オンに至るまでの時間もMP投与群で短い傾向にあった。ジスキネジアの程度は両群間で差はなく、MP投与群で重篤な有害事象も認めなかった。L-DOPA薬物動態については、L-DOPA血中濃度はMP投与群の方がL-DOPA/carbidopa投与群より有意に高値で推移し、3-OMD代謝比はMP投与群がL-DOPA/carbidopa投与群よりも低値であり、臨床試験においてもMPにCOMT阻害作用を示す物質が存在する結果であった。

本論文は、MPでより速くより長い抗PD作用が得られ、その作用機序の1つとしてMPに含まれるCOMT阻害作用が関与していることを示し、MPの臨床応用の可能性と、L-DOPA薬物動態の観点からMPとL-DOPA製剤の併用の危険性を啓蒙する必要性を示したことから、学位論文として価値あるものと認めた。