

## 信州大学において審査された医学博士論文要旨

氏名	学位授与番号	学位授与年月日	学位論文題目	学位審査委員	
				主査	副査
林 宏一	乙第1108号	21. 5.13	High-frequency 30-MHz sonography in preoperative assessment of tumor thickness of primary melanoma: Usefulness in determination of surgical margin and indication for sentinel lymph node biopsy (30 MHz 高周波超音波診断装置を用いた悪性黒色原発巣の厚さの術前評価: 切除範囲の決定ならびにセンチネルリンパ節生検における有用性)	角谷真澄	倉科憲治 中山 淳
沖山 洋	乙第1109号	21. 5.27	Polyenephosphatidylcholine prevents alcoholic liver disease in PPAR $\alpha$ -null mice through attenuation of increases in oxidative stress (ポリエンフォスファチジルコリンは酸化ストレスの増大を緩和することにより $\alpha$ 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体欠損マウスにおけるアルコール性肝障害を予防する)	福嶋義光	山田充彦 中山 淳
柳沢 龍	乙第1110号	21. 5.27	Low toxicity of a conditioning with 8-Gy total body irradiation, fludarabine and cyclophosphamide as preparative regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric hematological malignancies (小児血液悪性疾患における8-Gy 全身放射線照射, フルダラビン, シクロフォスファミドを前処置とした同種造血幹細胞移植の低毒性)	宮川真一	角谷真澄 田中榮司
山崎敏明	乙第1111号	21. 5.27	A New Device to Estimate $\dot{V}O_2$ during Incline Walking by Accelerometry and Barometry (加速度計と気圧計による傾斜地歩行時の $\dot{V}O_2$ 計測機器の開発)	谷口俊一郎	久保惠嗣 川真田樹人
草野義和	乙第1112号	21. 6.24	Prediction of functional outcome in acute cerebral hemorrhage using diffusion tensor imaging at 3T: A prospective study (3ステラ拡散テンソル画像を用いた急性期脳内出血患者の予後予測に関する前向き研究)	角谷真澄	池田修一 森泉哲次
河野啓一	乙第1113号	21. 9. 9	PPAR $\alpha$ attenuates the proinflammatory response in activated mesangial cells (ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 $\alpha$ 型は活性化メサンギウム細胞の炎症反応を抑制する)	田中榮司	西澤 理 山田充彦

審査学位論文要旨

鹿島大靖	乙第1114号	21. 9. 9	Autocrine stimulation of IGF1 in estrogen-induced growth of endometrial carcinoma cells: involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway followed by up-regulation of cyclin D1 and cyclin E (子宮内膜癌細胞のエストロゲン依存性増殖には IGF1 のオートクリン刺激を介した, サイクリン D1 とサイクリン E の発現増強を引き起こす MAP kinase 経路が関与する)	橋爪潔志	谷口俊一郎 中山 淳
胡 弼	乙第1115号	21. 9.30	IFN- $\gamma$ deficiency worsen <i>Pneumocystis</i> pneumonia with Th17 development in nude mice (ヌードマウスにおける IFN- $\gamma$ 欠損は Th17 を誘導しニューモシスチス肺炎を悪化させる)	瀧 伸介	本田孝行 竹下敏一
小野晃市	乙第1116号	21.11.25	Increased isoprostane levels in oleic acid-induced lung injury (オレイン酸肺障害モデルにおけるイソプロスタニン値の増加)	川眞田樹人	久保惠嗣 岡元和文
木藤健治	乙第1117号	21.12.22	Simultaneous Suppression of MITF and BRAF <sup>V600E</sup> Enhanced Inhibition of Melanoma Cell Proliferation (MITF と BRAF <sup>V600E</sup> の同時抑制は悪性黒色腫細胞の増殖抑制を強化する)	谷口俊一郎	鎌田 徹 塩沢丹里
松浦宏樹	乙第1118号	21.12.22	Elevation of Plasma Eotaxin Levels in Children with Food Allergy (食物アレルギーを持つ小児では血中のエオタキシン値は上昇する)	小池健一	宇佐美真一 瀧 伸介
中村 勝	乙第1119号	22. 1.13	Cisplatin and weekly docetaxel with concurrent thoracic radiotherapy for locally advanced stage III non-small-cell lung cancer (局所進行第III期非小細胞肺癌に対するシスプラチン併用ドセタキセル週分割投与化学療法と同時胸部放射線療法の併用療法)	塩沢丹里	宮川真一 田中榮司
赤石江太郎	乙第1120号	22. 1.13	Antigen p57/Kip2 as a potential negative regulator of human astrocytoma growth (p57/Kip2 が持つヒト星状細胞腫に対する腫瘍増殖抑制効果の可能性)	本郷一博	天野直二 鎌田 徹
小松万喜子	乙第1121号	22. 2.24	Multiple roles of PPAR $\alpha$ in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions (褐色脂肪組織における $\alpha$ 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の新機能の解明)	田中榮司	佐々木克典 野見山哲生

High-frequency 30-MHz sonography in preoperative assessment of tumor thickness of primary melanoma: Usefulness in determination of surgical margin and indication of sentinel lymph node biopsy (30 MHz 高周波超音波診断装置を用いた悪性黒色腫原発巣の厚さの術前評価: 切除範囲の決定ならびにセンチネルリンパ節生検における有用性)

林 宏 一

(論文の内容の要旨)

【背景】悪性黒色腫の原発巣の厚さの術前評価は治療方針の決定にきわめて重要である。本研究では、30 MHz 高周波超音波診断装置を用いて悪性黒色腫原発巣の厚さを測定し、組織学的な厚さとの相関について検討を行い、高周波超音波診断装置が原発巣の切除範囲の決定ならびにセンチネルリンパ節生検の適応の決定に有用か否かを検討した。

【方法】1998年から2006年の信州大学における74症例につき、15 MHz ならびに30 MHz のプローブを持つ高周波超音波診断装置を用い術前に画像上で原発巣の厚さを測定した。すべての切除標本において、組織学的な原発巣の厚さ (Breslow's tumor thickness) を測定した。

【結果】74例のうち腫瘍像が明確に捉えられなかった4例および悪性黒色腫表皮内病変 (melanoma in situ) の2例を除いた68例において、超音波装置で測定した厚さと組織学的な厚さの間には相関係数0.887と良好な相関がみられた。特に足底の26例では相関係数0.95と非常に良好な相関がみられた。腫瘍の厚さ1, 2, 4 mm で分類される UICC の T 分類 (T1~T4) のカテゴリーにそれぞれの症例を分類すると、超音波診断装置による T 分類と組織学的な T 分類がよく一致していた。特に1 mm 前後の比較的薄い厚さの病変で非常によく一致していた。ほぼ全症例についてこの超音波診断装置上での厚さをもとに原発巣の切除範囲を決定した。センチネルリンパ節生検については原発巣の組織学的な厚さが1 mm 以上の場合適応とされている。今回超音波診断装置上の厚さが1 mm を超える22症例においてセンチネルリンパ節生検あるいは根治的リンパ節郭清を行った。

【結論】30 MHz 高周波超音波診断装置を用いた悪性黒

色腫原発巣の厚さの測定は、切除範囲の決定ならびにセンチネルリンパ節生検の適応を決定するための術前診断として大変有用であることが示され、特に薄い病変における有用性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

悪性黒色腫の原発巣の厚さの術前評価は治療方針の決定にきわめて重要である。悪性黒色腫の staging には原発巣の組織学的厚さ (Breslow's tumor thickness) が必須とされ、推奨される外科的切除範囲はこの staging により規定されている。またセンチネルリンパ節生検は組織学的厚さが1 mm 以上の症例に対し推奨されている。この組織学的厚さを知るためには術前に全切除生検を行う必要がある。しかしながら、この全切除生検は侵襲を伴い、周囲の正常組織を障害する。この侵襲によってリンパ流が変化しセンチネルリンパ節の同定に問題を生じうる可能性がある。したがって、術前に全切除生検を行うことなしに無侵襲で原発巣の厚さを計測することが可能であれば、原発巣の切除範囲の決定ならびにセンチネルリンパ節生検の適応の決定ならびにより正確なセンチネルリンパ節の同定に有用であると考えられる。そこで林らは、1998年から2006年の信州大学における74症例につき、15 MHz ならびに30 MHz のプローブを持つ高周波超音波診断装置を用い術前に画像上で原発巣の厚さを計測したうえで、切除病変の組織標本にて組織学的な厚さ (Breslow's tumor thickness) を測定し、高周波超音波診断装置上の厚さと組織学的な厚さとの相関を検索した。そして、高周波超音波診断装置が原発巣の切除範囲の決定ならびにセンチネルリンパ節生検の適応の決定に有用か否かを検討した。

その結果林は次の成績を得た。

1. 74例のうち腫瘍像が明確に捉えられなかった4例および悪性黒色腫表皮内病変 (melanoma in situ) の2例を除いた68例において、超音波装置で測定した厚さと組織学的な厚さの間には相関係数0.887と良好な相関がみられた。
2. 日本人に多い足底の症例26例では、相関係数0.95と非常に良好な相関がみられた。
3. 腫瘍の厚さ1, 2, 4 mm で分類される UICC の T 分類 (T1~T4) のカテゴリーにそれぞれの症例を分類すると、超音波診断装置による T 分類と組織学的な T 分類がよく一致していた。
4. このうち特に1 mm 前後の比較的薄い厚さの病変で特によく一致していた。

5. ほぼ全症例について、この超音波診断装置上での厚さをもとに原発巣の切除範囲を決定した。
6. センチネルリンパ節生検については原発巣の組織学的な厚さが1 mm 以上の場合適応とされているが、今回超音波診断装置上の厚さが1 mm を超える22症例においてセンチネルリンパ節生検あるいは根治的リンパ節郭清を行った。

これらの結果より、30 MHz 高周波超音波診断装置を用いた悪性黒色腫原発巣の厚さの測定は、切除範囲の決定ならびにセンチネルリンパ節生検の適応を決定するための術前診断として大変有用であることが示され、特に薄い病変における有用性が示された。本研究は、従来臨床所見や侵襲を伴う切除生検をもとに外科的な治療方針が決定されていたことに対し、高周波超音波診断装置を用いることにより無侵襲で術前に外科的な治療方針を決定できる可能性を示したものであり、臨床的意義はきわめて大きい。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Polyenephosphatidylcholine prevents alcoholic liver disease in PPAR $\alpha$  -null mice through attenuation of increases in oxidative stress (ポリエンフォスファチジルコリンは酸化ストレスの増大を緩和することにより  $\alpha$  型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体欠損マウスにおけるアルコール性肝障害を予防する)

沖 山 洋

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】アルコール性肝障害 (alcoholic liver disease ; ALD) は肝硬変の原因となりうる慢性肝疾患の一つであるが、その治療戦略は未だ確立されていない。ポリエンフォスファチジルコリン (polyenephosphatidylcholine ; PPC) は必須不飽和脂肪酸を有するリン脂質の一種で、大豆や卵黄に豊富に含まれている。PPC がヒヒのアルコール性肝線維症を抑制することが過去に報告されているが、その詳細な分子機構は不明であった。以前我々は、 $\alpha$  型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  ; PPAR $\alpha$ ) 欠損マウスに4 %エタノール含有 Lieber-DeCarli 食を6 カ月間投与し、肝腫大や肝炎、肝細胞のアポトーシス、ミトコ

ンドリアの腫大、肝細胞周囲の線維化など、ヒトでのアルコール性肝炎に類似した病像が出現することを報告した。本研究は、PPAR $\alpha$  欠損マウスを用いて PPC の ALD に対する作用機序を検証することを目的とした。

【方法】12週齢のオス野生型、PPAR $\alpha$  欠損マウスをそれぞれ4 群 (各群 n=6) に分け、コントロール Lieber-DeCarli 食、コントロール食+PPC (30 mg/kg/day)、4 %エタノール含有 Lieber-DeCarli 食、4 %エタノール含有食+PPC (30 mg/kg/day) をそれぞれ6 カ月間投与した。投与終了時の血液と肝臓を採取し、生化学的・組織学的解析を行った。

【結果】エタノール含有食のみを投与した全ての PPAR $\alpha$  欠損マウスにおいて肝細胞傷害、肝炎、肝細胞のアポトーシスが観察されたが、PPC はこれらの病的変化を有意に抑制した。この PPC の保護作用はエタノール投与による肝臓での酸化ストレス増加を抑制し、それに伴う炎症性サイトカイン (tumor necrosis factor- $\alpha$ , intercellular adhesion molecule-1 など)、Toll-like receptor 4  $\cdot$  CD14, アポトーシス促進蛋白 (Bax, truncated Bid など) の発現低下に起因していた。PPC の酸化ストレス軽減作用は catalase などの酸化ストレス消去酵素の発現増強ではなく、酸化ストレス産生酵素 [cytochrome P450 2E1, acyl-CoA oxidase, NADPH oxidase (NOX) -2, NOX-4 など] の発現抑制に由来していた。そして PPC はエタノール投与による transforming growth factor- $\beta$ 1 の発現増加や肝星細胞の活性化を抑制し、結果として肝線維化を抑制した。

【結論】PPC は PPAR $\alpha$  欠損マウスにおける ALD に対し、抗炎症・抗アポトーシス・抗線維化作用を呈した。このような作用は、PPC がエタノール摂取に伴う酸化ストレス産生酵素の過剰発現を著明に抑制することに起因していた。以上の結果は、PPC の肝保護作用の新規分子機構を提示するものと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

アルコール性肝障害 (alcoholic liver disease, ALD) は肝硬変の原因となりうる慢性肝疾患の一つであるが、その治療戦略は未だ確立されていない。ポリエンフォスファチジルコリン (polyenephosphatidylcholine, PPC) は必須不飽和脂肪酸を有するリン脂質の一種で、大豆や卵黄に豊富に含まれている。PPC がヒヒのアルコール性肝線維症を抑制することが過去に報告されているが、その詳細な分子機構

は不明であった。以前我々は、 $\alpha$ 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ ) 欠損マウスに4%エタノール含有 Lieber-DeCarli 食を6カ月間投与し、肝腫大や肝炎、肝細胞のアポトーシス、ミトコンドリアの腫大、肝細胞周囲の線維化など、ヒトでのアルコール性肝炎に類似した病像が出現することを報告した。本研究は、PPAR $\alpha$  欠損マウスを用いて PPC の ALD に対する作用機序を検証することを目的とした。

12週齢のオス野生型、PPAR $\alpha$  欠損マウスをそれぞれ4群 (各群 n=6) に分け、コントロール Lieber-DeCarli 食、コントロール食+PPC (30 mg/kg/day)、4%エタノール含有 Lieber-DeCarli 食、4%エタノール含有食+PPC (30 mg/kg/day) をそれぞれ6カ月間投与した。投与終了時の血液と肝臓を採取し、生化学的・組織学的解析を行った。

その結果、沖山 洋は次の結論を得た。

1. エタノール含有食のみを投与した全ての PPAR $\alpha$  欠損マウスにおいて肝炎、肝細胞の壊死・アポトーシスが観察されたが、PPC はこれらの病的変化を有意に抑制した。
2. PPC の保護作用はエタノール投与による肝臓での酸化ストレス増加を抑制すること、それに伴う炎症性サイトカイン (tumor necrosis factor- $\alpha$ , intercellular adhesion molecule-1 など), Toll-like receptor 4・CD14, アポトーシス促進蛋白 (Bax, truncated Bid など) の発現低下に起因していた。
3. PPC の酸化ストレス軽減作用は catalase などの酸化ストレス消去酵素の発現増強ではなく、酸化ストレス産生酵素 [cytochrome P450 2E1, acyl-CoA oxidase, NADPH oxidase (NOX)-2, NOX-4 など] の発現抑制に起因していた。
4. PPC は エタノール投与による transforming growth factor- $\beta$ 1 の発現増加や肝星細胞の活性化を抑制し、結果として肝線維化を抑制した。

PPC は PPAR $\alpha$  欠損マウスにおける ALD に対し、抗炎症・抗アポトーシス・抗線維化作用を呈した。このような肝庇護作用は、エタノール摂取に伴う酸化ストレス産生酵素の過剰発現の抑制に起因していた。以上の結果は、PPC の肝庇護作用の新規分子機構を提示するものと考えられた。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Low toxicity of a conditioning with 8-Gy total body irradiation, fludarabine and cyclophosphamide as preparative regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric hematological malignancies (小児血液悪性疾患における8-Gy全身放射線照射、フルダラビン、シクロフォスファミドを前処置とした同種造血幹細胞移植の低毒性)

柳 沢 龍

(論文の内容の要旨)

【背景】造血幹細胞移植 (HSCT) は化学療法抵抗性の血液悪性疾患に対する有効な治療法である。特に全身放射線照射 (TBI) は高い抗腫瘍効果と拒絶予防効果から HSCT の前処置として選択されることが多い。しかし、12 Gy の照射では移植関連死の増加が問題となる。近年、成人領域を中心に前処置を軽減した HSCT での治療関連死 (TRM) の減少が報告されている。しかし、小児例ではまだ報告は少ない。我々は TBI を 8Gy に減量し、フルダラビン、シクロフォスファミドと併用した前処置で小児血液悪性疾患の治療を行い、有効性について検討した。

【方法】対象は2002年12月以降に HSCT を行った22例で、年齢の中央値は6.5歳 (1-13歳)、男児8例、女児14例であった。診断は急性リンパ性白血病 (ALL) が10例 (第一寛解期2例、第二寛解期6例、非寛解期2例)、急性骨髄性白血病 (AML) が11例 (第一寛解期3例、第二寛解期5例、非寛解期3例)、若年性骨髄単球性白血病が1例であった。移植ドナーは HLA 完全一致同胞3例、HLA 完全一致血縁2例、HLA 不一致血縁9例 (3座不一致4例、2座不一致2例、1座不一致3例)、骨髄バンク6例、臍帯血バンク2例であった。前処置は全例 TBI (8Gy)+fludarabine (150 mg/m<sup>2</sup>)+cyclophosphamide (120 mg/kg) で行い、GVHD 予防は short term methotrexate (sMTX)+cyclosporin A, sMTX+tacrolimus (FK506), sMTX+FK506+methylprednisolone のいずれかで行った。

【結果】全例で生着が得られた。生着日の平均値は G-CSF 投与群においては15日、非投与群で22日であった。早期再発で死亡した1例を除いて血小板の生着も平均23日で達成した。また、全例で完全ドナーキメリ

ズムが確認された。Grade II以上の急性GVHDの発症は50%，extensive typeの慢性GVHDの発症率は23.8%であった。前処置を含む全ての合併症に対する評価をNCI-CTCを用いて行ったところ、grade II以上の粘膜、消化管、肝臓の毒性を9.1%，22.7%，36.4%に認めた。これらの多くは生着症候群もしくはGVHDが原因であった。また、9%にgrade II以上の膀胱毒性を認めた。Seattle Grading Systemを用いて前処置関連毒性(RRT)のみに限定して評価を行ったところ、18例では毒性を認めず、残り4例にgrade Iの消化管毒性を認めた。5例が死亡し、その死因は原疾患の再発が4例で、残りの1例は慢性GVHDによる肝不全であった。全症例における移植後2年時の粗生存率(OS)、無病生存率(LFS)、再発率(RR)はそれぞれ73.8%，59.7%，37.2%であった。ALL10例におけるOS、LFS、RRはそれぞれ57.1%，48.0%，46.0%であった。一方、骨髄性白血病ではそれぞれ91.7%，71.3%，28.7%であった。RRTによる死亡は認められず、TRMは4.8%であった。以前当科で12 Gy-TBIを含む前処置後に移植した19例の移植成績と比較したところ、OS(8 Gy：73.8%，12 Gy：42.1%， $p=0.029$ )およびTRM(8 Gy：4.8%，12 Gy：39.2%， $p=0.015$ )に有意差を認めた。

【考察】22症例中9例(41%)は非寛解期もしくはHLA2座以上の不一致ドナーからの高リスクHSCTであったにも関わらず、全例に生着が得られ、TRMは極めて低値であった。Grade Iの消化管毒性以外、大部分の症例でRRTは全く認められず、この前処置の安全性が確認された。OSおよびLFSにおいても過去の報告と比べても優れた結果であり、小児血液悪性疾患に対する有効性が確認された。特に骨髄性白血病における成績が良好であった。今後さらなる症例を蓄積するとともに、長期的合併症についてもフォローを継続する予定である。

#### (論文審査の結果の要旨)

【背景】造血幹細胞移植(HSCT)は化学療法抵抗性の血液悪性疾患に対する有効な治療法である。特に全身放射線照射(TBI)は高い抗腫瘍効果と拒絶予防効果からHSCTの前処置として選択されることが多い。しかし、12 Gyの照射では移植関連死の増加が問題となる。そこでTBIを8 Gyに減量し、フルダラビン、シクロフォスファミドと併用した前処置で小児血液悪性疾患の治療を行い、有効性について検討した。

【方法】対象は2002年12月以降にHSCTを行った22例で、年齢の中央値は6.5歳(1-13歳)、男児8例、女児14例であった。診断は急性リンパ性白血病(ALL)が10例(第一寛解期2例、第二寛解期6例、非寛解期2例)、急性骨髄性白血病(AML)が11例(第一寛解期3例、第二寛解期5例、非寛解期3例)、若年性骨髄単球性白血病が1例であった。移植ドナーはHLA完全一致同胞3例、HLA完全一致血縁2例、HLA不一致血縁9例(3座不一致4例、2座不一致2例、1座不一致3例)、骨髄バンク6例、臍帯血バンク2例であった。前処置は全例TBI(8 Gy)+fludarabine(150 mg/m<sup>2</sup>)+cyclophosphamide(120 mg/kg)で行い、GVHD予防はshort term methotrexate(sMTX)+cyclosporin A、sMTX+tacrolimus(FK506)、sMTX+FK506+methylprednisoloneのいずれかで行った。

その結果、柳沢は次の結論を得た。

1. 生着不全は1例も認めず、全例で生着が得られた。また、全例で完全ドナーキメラリズムが確認された。
2. Seattle Grading Systemを用いて前処置関連毒性(RRT)のみに限定した評価を行ったところ、4例にgrade Iの消化管毒性を認めたものの残り18例では毒性を全く認めなかった。
3. Grade II以上の急性GVHDの発症は50%，extensive typeの慢性GVHDの発症率は23.8%であった。
4. 5例が死亡した。死因は原疾患の再発が4例で(ALL 3例、AML 1例)、残りの1例は慢性GVHDによる肝不全で死亡した。全症例における移植後2年時の粗生存率(OS)、無病生存率(LFS)、再発率(RR)をKaplan-Meier法にて検討したところ、それぞれ73.8%，59.7%，37.2%であった。ALL 10例におけるOS、LFS、RRはそれぞれ57.1%，48.0%，46.0%であった。一方、骨髄性白血病におけるOS、LFS、RRはそれぞれ91.7%，71.3%，28.7%であった。TRM(治療関連死)は4.8%であった。
5. 以前当科で12 Gy-TBIを含む前処置後に移植した19例のOS、LFS、RR、TRMはそれぞれ42.1%，36.8%，37.8%，39.2%であった。8 Gy-TBIによる成績と比較したところ、OS( $P=0.029$ )およびTRM( $p=0.015$ )に有意差を認めた。

このことから、8 Gy-TBIを含む前処置は小児血液悪性疾患に対し有効性および安全性の高い治療方法で

あることが証明された。よって、主査・副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

A New Device to Estimate  $\dot{V}O_2$  during Incline Walking by Accelerometry and Barometry (加速度計と気圧計による傾斜地歩行時の $\dot{V}O_2$ 計測機器の開発)

山崎 敏明

(論文の内容の要旨)

【目的】歩行時の酸素摂取量 ( $\dot{V}O_2$ , mL · kg<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>) を推定する従来の加速度計は傾斜地における歩行時には誤差を生じる。そこで加速度計に気圧計を組み込んだ機器を開発し、これにより正確な $\dot{V}O_2$ を推定できることを検証する。

【方法】男女同数の計42人 (63 ± 7 (SD) 歳) の健常者に対して、-15%, -10%, -5%, 0%, +5%, +10%, +15%の傾斜のトレッドミル上を歩かせ、呼気ガス分析装置により $\dot{V}O_2$ を、腰に装着した3軸加速度計で加速度ベクトルの累積値 (VM) を計測した。被験者には各傾斜のトレッドミル上を「ゆっくり」、「普通」、「速い」と感じる速度でそれぞれ3分ずつ歩かせた。ただし、0% (平地) では、これらに加えて「最も速い」速度の設定も加えた。また、下りの設定ではトレッドミルの仕様上の制限から5 km · h<sup>-1</sup>を最速とした。各3分のトライアルのうち、最後の1分間の $\dot{V}O_2$ 、およびトレッドミルの傾斜角度と歩行速度から求めた理論上の鉛直上下方向の速度 ( $H_u$ ,  $H_d$ , m · min<sup>-1</sup>)、から $\dot{V}O_2$ の推定式を重回帰分析により求めた。この推定式の精度を検証するために、新たに開発した気圧計内蔵型加速度計と呼気ガス分析装置を装着した11名の被験者にアップダウンのある屋外を約1時間歩かせた。

【結果】トレッドミル実験の結果から導いた $\dot{V}O_2$  (安静時代謝量を除く) の推定式は、 $\dot{V}O_2 = 0.044 VM + 1.365 H_u + 0.553 H_d$  ( $r = 0.93$ ,  $P < 0.001$ ) であった。この推定式を組み込んだ新しい機器による $\dot{V}O_2$ の推定値 (x) と、呼気ガス分析装置による実測値 (y) はほぼ一致し ( $y = 0.97x$ ,  $r = 0.88$ ,  $P < 0.001$ )、Bland-Altmanプロットによる解析では、2.0-33.0 mL · kg<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>の範囲で、 $\dot{V}O_2$ の実測値と推定値の差は、 $-0.20 \pm 3.47$  (mean ± SD) であった。なお、屋外実験における鉛直上下方向の速度は気圧計の計測値の変化量から算出した。

【結論】傾斜地における歩行時の $\dot{V}O_2$ は、気圧計を内蔵した3軸加速度計で正確に推定できる。

(論文審査の結果の要旨)

歩行時の酸素摂取量 ( $\dot{V}O_2$ , mL · kg<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>) は加速度計により推定できるが、従来の加速度計は平地歩行を前提としており、傾斜地における歩行時の $\dot{V}O_2$ 推定に誤差を生じる。そこで山崎は、(1) 傾斜可変トレッドミル歩行実験の結果より平地および傾斜地における歩行時 $\dot{V}O_2$ の推定式を決定し、(2) 加速度計にその推定式と気圧計を組み込んだ新しい機器を開発し、(3) フィールドにおいてその機器の精度を検証した。

その結果以下の成績を得た。

1) 歩行時の $\dot{V}O_2$ 推定式は重回帰分析により

$$\dot{V}O_2 = 0.044 VM + 1.365 H_u + 0.553 H_d \quad (r = 0.93, P < 0.001)$$

と決定した。ただし、VMは加速度累積値、 $H_u$ は鉛直上方向の速度、 $H_d$ は鉛直下方向の速度である。

2) フィールド実験における精度検証の結果、 $\dot{V}O_2$ の推定値 (x) と、呼気ガス分析装置による実測値 (y) はほぼ一致した ( $y = 0.97x$ ,  $r = 0.88$ ,  $P < 0.001$ )。

3) フィールド実験における $\dot{V}O_2$ の実測値と推定値の差はBland-Altman法により $-0.20 \pm 3.47$  (mean ± SD, mL · kg<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>) であった。

以上より、気圧計を内蔵した3軸加速度計は、平地および傾斜地における歩行時の $\dot{V}O_2$ の推定に有用であると考えられた。また、本研究により開発された機器は、フィールドにおける歩行トレーニング量のモニター機器として従来機器以上に正確な計測が可能であると共に、新しい環境における効果的なトレーニング方法の開発にも有効である。したがって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Prediction of functional outcome in acute cerebral hemorrhage using diffusion tensor imaging at 3T: A prospective study (3テスラ拡散テンソル画像を用いた急性期脳内出血患者の予後予測に関する前向き研究)

草野 義和

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】脳出血患者において発症早期に神経運動機能を予測することは、治療方針の決定あるいはリ

ハビリ計画の策定において極めて有用な情報をもたらす。拡散テンソル画像 (DTI) を用いた研究では、慢性期から亜急性期脳梗塞および亜急性期脳内出血症例について検討が行われ、錐体路における Fractional Anisotropy (FA) 値の低下が機能予後不良の因子となることが明らかになっている。しかし、急性期脳内出血症例で FA 値がどのように変化するか、あるいは FA 値と機能予後との関係についての研究は行われていない。そこで本研究では、脳内出血症例に対して発症後 2 日以内に DTI を撮像し、運動および機能予後を予測する検討を行った。

【対象と方法】本研究に先立ち、大脳脚前半部での FA 値の左右差の有無、最適な Motion Probing Gradient (MPG) を求めるための予備実験を行った。両側大脳脚での FA 値は、MPG6では右側で $0.79 \pm 0.09$ 、左側で $0.08 \pm 0.02$ 、MPG13では右側で $0.81 \pm 0.03$ 、左側で $0.80 \pm 0.04$ であった。MPG6 ( $P=0.85$ ) と MPG13 ( $P=0.75$ ) では有意差はなく、左右差についても MPG6 と MPG13 で有意な差は認めなかった (右:  $P=0.79$ , 左:  $P=0.86$ )。これに撮像時間も考慮して MPG6 を用いることとした。急性期脳内出血患者のうち、以下の条件を満たす患者を対象とした。1. CT スキャンでテント上脳内出血を認める, 2. 入院時に運動麻痺を呈する, 3. 脳卒中の既往がなく、脳内に器質的異常を認めない, 4. 保存的に治療された, 5. 拡散テンソル画像が発症後 2 日以内に施行された。

(1) 神経症状の評価: 神経症状は第 0 病日および第 28 病日に運動麻痺の評価を、第 28 病日に日常生活の機能評価をそれぞれ行った。運動麻痺は modified National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) に基づいて測定し、上下肢のスコアを加えたものを Paresis Grading とした。日常生活の機能評価は modified Rankin Scale および Barthel Index を用いた。全ての患者は、第 28 病日の Paresis Grading に基づき運動機能良好群 (0 から 3 点) と不良群 (4 から 8 点) に分けた。

(2) MRI 撮像条件: MRI は GE 横河メディカル社製 MRI 装置 (Signa3 テスラ) を用いた。DTI は single-shot echo-planar 法で撮影し、撮像条件は以下の通りである。TR, 10,000 ms; TE, 75 ms; NEX, 2; matrix size, 128×128; FOV, 260 mm; voxel size of 2.0×1.4×4.0 mm; section thickness, 4 mm。使用した MPG の数は 6, b 値は 1,000 s/mm<sup>2</sup> に設定した。

(3) データ処理: 2 次元 FA カラーマップ上の両側大脳脚前半部に 6 個の関心領域を置き FA 値および Mean Diffusivity をそれぞれの関心領域で測定し、その平均値を測定値とした。患側の FA 値を健側のそれで除したものを FA 比とした。(FA 比 = FA 値<sub>患側</sub> / FA 値<sub>健側</sub>)

全ての測定値は、平均値 ± SD で表示した。  $P < 0.05$  を統計学的な有意差とした。

【結果と考察】急性期脳内出血患者 18 例 (男性 11 例, 女性 7 例) に DTI を撮影した。患者の内訳は表 2 の通りであった。年齢は、30 歳から 99 歳 ( $67.8 \pm 16.2$  歳), 血腫の局在は、被殻 7 例, 視床 6 例, 皮質下 5 例であった。DTI は発症から  $0.72 \pm 0.89$  日で撮像された。FA 値は、患側で有意に低下 ( $0.60 \pm 0.63$ ,  $0.68 \pm 0.046$ ,  $P=0.001$ ) したが、Mean Diffusivity に有意差は認めなかった ( $P=0.50$ )。さらに、FA 比は第 0 病日および第 28 病日の麻痺の程度 (Paresis Grading) とそれぞれ負の相関を示した ( $P=0.002$ ,  $r=-0.674$ ,  $P < 0.001$ ,  $r=-0.767$ )。機能予後については、FA 比は第 28 病日に計測した modified Rankin Scale と負の相関を示した ( $P=0.002$ ,  $r=-0.676$ ) が、Barthel Index との相関関係は認めなかった。第 28 病日の時点での運動機能良好群と不良群を分ける FA 比の平均値は有意に異なり ( $P < 0.001$ )、両者を分けるカットオフポイントは 0.85 であった。我々は脳内出血の発症後 2 日以内に撮影された DTI が、運動障害を定量化することが可能であり、機能予後を予測し得ることを示した。DTI は、片麻痺を有する脳内出血患者について極めて有用な情報を提供し、運動予後を予測することに利用可能であると考えられた。

#### (論文審査の結果の要旨)

脳内出血患者において発症早期に運動機能の予後を予測することは、患者の治療方針の策定において極めて有用な情報をもたらす。一方、MRI 拡散テンソル画像 (DTI) は、パラメーターの一つである Fractional Anisotropy (FA) を測定することにより神経線維の障害度を評価することができると言われている。そこで草野は片麻痺を有するテント上脳内出血患者に対し、発症から 2 日以内に DTI を撮像し大脳脚前半部で FA を測定することにより以下の検討を行った。(1) FA と入院時および 28 病日の麻痺の程度との関係について、(2) FA と 28 病日の機能予後との関係について、(3) MRI 撮像時に 28 病日の運動機能良好群と不良群を予測するための FA のカットオフポイントを算出した。

なお、本研究ではFAの絶対値は年齢などにより患者間でばらつきが見られるため、患者間の比較には患側のFAを健側のそれで除したFA比を用いた。

(FA比=FA値<sub>患側</sub>/FA値<sub>健側</sub>)。

これにより以下の結果を得た。

- 1) 脳内出血患者18例(男性11,女性7,平均年齢67.8歳)に対し、発症から平均0.72±0.89日にDTIを撮像した。
- 2) FA値は、健側と比較して患側で有意に低下していた。
- 3) FA比は0病日および28病日の麻痺の程度とそれぞれ有意に負の相関を示した。
- 4) 機能予後について、FA比は28病日に計測した日常生活の自立度の評価スコアの一つであるmodified Rankin Scaleと有意に負の相関を示した。
- 5) 28病日での運動機能良好群と不良群を分けるFA比の平均値は有意に異なり、両者を分けるカットオフポイントは0.85であった。

以上より、脳内出血の発症後2日以内に撮影されたDTIが、運動障害を定量化することが可能であり、機能予後を予測し得ることを示した。本研究により、DTIは片麻痺を有する脳内出血患者について極めて有用な情報を提供し、運動予後を予測することに利用可能であると考えられ、脳内出血患者の治療上有用であると考えられた。したがって、主査・副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

PPAR $\alpha$  attenuates the proinflammatory response in activated mesangial cells (ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 $\alpha$ 型は活性化メサンギウム細胞の炎症反応を抑制する)

河野 啓一

(論文の内容の要旨)

【目的】メサンギウム細胞は高分化間葉系細胞であり、非活性時は糸球体構造の支持と糸球体血流調節などを行っている。しかし、炎症刺激で活性化すると、細胞増殖能、サイトカイン分泌能を獲得し糸球体腎炎の進展に関連する。ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 $\alpha$ 型(peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; PPAR $\alpha$ )は、リガンド依存性に転写調節を行う核内受容体であり、炎症反応、脂質代謝など様々な生理機能に関わっている。糸球体内発現は非常に少なくそ

の機能については不明だったが、近年メサンギウム細胞でPPAR $\alpha$ の発現や腎炎抑制作用が報告された。本研究はその機能解明のため、野生型およびPPAR $\alpha$ 遺伝子欠損型メサンギウム細胞を利用し、LPS刺激で惹起される炎症反応の差異を解析した。

【方法】

- ① 野生型およびPPAR $\alpha$ 遺伝子欠損型マウスの腎からsieving法により得られた単離糸球体を継代培養し、自然純化された3継代以降のメサンギウム細胞を使用した。10%FBS含有培養液にてconfluenceになるまで培養し、1%FBS含有培養液で6時間培養後、各濃度のLPSやリガンド等を加えた培養液でさらに6時間培養し以下の項目を比較した。
- ② 両群の比較項目：
  - (1) IL-6濃度：培養液上清をELISA法で測定。
  - (2) DNA合成能： $^3\text{H}$ -Thymidineを培養最後の3時間に加え細胞内取り込みを測定。
  - (3) LPSレセプター、各種サイトカイン、PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ のmRNA発現量：刺激後の細胞からtotal RNAを抽出、oligo(dT)法にて逆転写を行いmRNAをcDNAとした。得られたcDNAはABI PRISM 7700 Sequence Detection systemでreal-time PCRにて定量した。
  - (4) 刺激後の細胞を溶解し総蛋白を抽出、ImmunoblotにてPPAR $\alpha$ とPPAR $\gamma$ 蛋白の半定量を行った。
  - (5) p65蛋白の核内移行・p38およびSAPK/JNK蛋白のリン酸化：刺激後回収した細胞から、総蛋白・核分画蛋白を抽出し、Immunoblotにて各蛋白の半定量を行った。
  - (6) PPAR $\alpha$ リガンドによる炎症反応の変化と活性：培養液中にfenofibric acidを加え同様の培養を行い、各種サイトカイン、PPAR $\alpha$ , PPAR $\alpha$ の標的遺伝子であるACOXのmRNA発現を調べた。
- ③ PPAR $\alpha$ の発現のメカニズムを調べるため細胞の $\alpha$ SMA mRNA発現を調べた。また生体内での、PPAR $\alpha$ 応答を検討するため、10週齢の野性型マウスにLPS溶液を腹腔内投与し18時間後に腎組織を得、連続切片の免疫染色にてPPAR $\alpha$ と $\alpha$ SMAの発現変化を検討した。

【結果・考察】

- ① PPAR $\alpha$ 遺伝子欠損メサンギウム細胞は、野性型と比較し培養液上清中のIL-6濃度、DNA合成能、

核分画内の p65 蛋白および NF $\kappa$ B 経路の標的遺伝子である COX2, ICAM-1, TNF $\alpha$  の mRNA 発現が有意に増加していた。一方, I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA 遺伝子発現は有意に低かった。なお, 両群間で LPS レセプターの発現レベル, MAPK 経路の活性化は有意差がなかった。PPAR $\alpha$  は I $\kappa$ B $\alpha$  の発現を通じて NF $\kappa$ B 経路を抑制し, 抗炎症性に機能することが示唆された。

- ② PPAR $\alpha$  の mRNA および蛋白発現は, 定常状態では両群とも極めて低かったが, 野性型では LPS 刺激により有意に誘導された。PPAR $\alpha$  誘導に伴い, PPAR $\alpha$  の標的遺伝子である ACOX 発現が増加し, さらに PPAR $\alpha$  リガンド投与でその発現が増強された。また, リガンド投与により, 炎症反応が低下し, I $\kappa$ B $\alpha$  発現が増加した。PPAR $\alpha$  の発現誘導は, IL-1 $\beta$  刺激でも起き, 形質転換マーカーである  $\alpha$ -SMA と同調して発現した。野性型では, LPS 刺激により PPAR $\alpha$  が高度に誘導され, 誘導された PPAR $\alpha$  は転写調節機能を保持し抗炎症作用を示すことが示唆された。PPAR $\alpha$  の発現誘導は, メサンギウム細胞の形質転換と関連する可能性が示唆された。
- ③ マウス腎組織では, 同じメサンギウム領域に PPAR $\alpha$  と  $\alpha$ -SMA 陽性細胞を認めた。形質転換に関連する PPAR $\alpha$  誘導は, *in vivo* でも生じることが示唆された。

【結論】 定常状態のメサンギウム細胞では, PPAR $\alpha$  はほとんど発現していないが, 炎症刺激により PPAR $\alpha$  が誘導される。この PPAR $\alpha$  は転写活性を持ち, I $\kappa$ B $\alpha$  を増加させることで NF $\kappa$ B 経路を抑制, 炎症性サイトカインの産生やメサンギウム細胞増殖能を低下させると考えられた。PPAR $\alpha$  の発現誘導は, メサンギウム細胞の形質転換に関連している可能性が考えられ, *in vivo* でも確認することができた。メサンギウム細胞の PPAR $\alpha$  は, 新たな腎炎治療因子となる可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

メサンギウム細胞は, 炎症刺激で活性化すると細胞増殖能, サイトカイン分泌能を獲得し糸球体腎炎の進展に関連すると考えられている。ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体  $\alpha$  型 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$ : PPAR  $\alpha$ ) はリガンド依存性に転写調節を行う核内受容体であり, 炎症反応など様々な生理機能に関わっている。メサンギウム細胞に

おける PPAR  $\alpha$  の抗炎症作用を明らかにするため, 河野らは培養メサンギウム細胞を用いた実験を試みた。野性型および PPAR $\alpha$  遺伝子欠損型メサンギウム細胞に LPS 刺激を加え惹起される炎症反応の差異を検討した。

その結果以下の成績を得た。

- ① PPAR $\alpha$  遺伝子欠損メサンギウム細胞は, 野性型と比較し IL-6 分泌と DNA 合成能が有意に増加, LPS 刺激に対する応答反応が増強していた。
- ② 両群間で LPS レセプターの発現に有意差はなかった。PPAR $\alpha$  遺伝子欠損群で核分画内の NF $\kappa$ B 蛋白や NF $\kappa$ B 標的遺伝子 mRNA 発現は有意に増加し, また NF $\kappa$ B 抑制因子 I $\kappa$ B $\alpha$  の mRNA 発現は有意に低下した。
- ③ PPAR $\alpha$  の mRNA および蛋白発現は, 定常状態では両群とも極めて低かったが, 野性型は LPS 刺激により有意に誘導された。
- ④ PPAR $\alpha$  誘導に伴い, PPAR $\alpha$  の標的遺伝子である ACOX 発現が増加, さらに PPAR $\alpha$  リガンド投与で発現が増強されることから, 誘導された PPAR $\alpha$  は転写調節機能を保持していることが判明した。また, リガンド投与により炎症反応が低下, I $\kappa$ B $\alpha$  発現が増加した。
- ⑤ PPAR $\alpha$  の発現誘導は, 他の炎症刺激物質である IL-1 $\beta$  刺激でも生じ, 形質転換マーカーである  $\alpha$ -SMA と同調した発現を示していた。
- ⑥ LPS 溶液を腹腔内注射したマウス腎組織で, 同じメサンギウム領域に PPAR $\alpha$  と  $\alpha$ -SMA 陽性細胞を認め, 炎症性刺激による PPAR $\alpha$  誘導は, *in vivo* でも生じた。

以上より, 定常状態のメサンギウム細胞では, PPAR $\alpha$  はほとんど発現していないが, 炎症刺激により PPAR $\alpha$  が誘導されると, PPAR $\alpha$  は転写活性を発揮し I $\kappa$ B $\alpha$  を増加させることで NF $\kappa$ B 経路を抑制し, 炎症性サイトカインの産生やメサンギウム細胞増殖能を低下させると考えられた。PPAR $\alpha$  の発現誘導は, メサンギウム細胞の形質転換に関連する可能性が考えられ, *in vivo* でも確認出来た。これらは, PPAR $\alpha$  の活性調節を利用した新たな腎疾患治療法の開発に寄与する結果であると考えられた。

よって主査, 副査は一致して本論文が学位論文として価値のあるものと認めた。

Autocrine stimulation of IGF1 in estrogen-induced growth of endometrial carcinoma cells: involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway followed by upregulation of cyclin D1 and cyclin E (子宮内膜癌細胞のエストロゲン依存性増殖には IGF1のオートクリン刺激を介した, サイクリン D1とサイクリン E の発現増強を引き起こす MAP kinase 経路が関与する)

鹿島大靖

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】正常子宮内膜や一部の子宮内膜癌はエストロゲン受容体 (ER) を発現し, エストロゲンにより細胞増殖が促進されることが知られているが, この増殖機序の細胞内分子学的メカニズムは未だ十分に解明されていない。一般に細胞増殖は増殖因子やサイトカインなどの細胞外刺激により促進されることが知られている。これら細胞外の刺激に対し適切な細胞応答を引き起こすための主要な細胞内シグナル伝達経路, MAPK 経路がある。現在までに古典的 MAPK, ERK5, JNK/SAPK, p38の4つのカスケードが明らかになっており, 増殖因子, ホルモン, サイトカイン, ストレスなどの細胞外刺激を構成分子の連続的なリン酸化によりシグナル伝達し, 増殖, 分化, アポトーシス, ストレス応答などの細胞応答を引き起こす。その中で, 古典的 MAPK 経路と呼ばれる RAS/RAF/MAP2K/MAPK3/1経路は, 特に細胞の増殖に関わる重要なシグナル伝達経路と考えられている。MAPK3/1経路の活性化は, 細胞外刺激を受けた細胞膜上の受容体からのシグナルが RAS から下流の RAF, MAP2K, MAPK3/1を連続的にリン酸化することで引き起こされる。活性化されたリン酸化 MAPK3/1は核内へ移行し転写因子によりサイクリンなどの細胞周期調節因子を発現させることで細胞周期を進行させる。

本研究ではエストロゲン刺激による子宮内膜癌細胞の増殖における MAPK3/1経路の関与および細胞周期調節因子の発現について検討した。

【方法と結果】ER 陽性子宮内膜癌 Ishikawa 細胞に estradiol (E2) を添加し, 24時間後の細胞増殖は濃度依存性に促進されること, また S 期分画の増加を確認した。さらにサイクリン D1とサイクリン E の発現を検討したところ, サイクリン D1の蛋白と mRNA

発現は E2添加約 2 時間後から増加し, 12時間後にピークを呈した。サイクリン E の蛋白質, mRNA 発現はともに添加 6 時間後から増加し 24時間後まで増加した。以上より, E2刺激により細胞増殖が促進されること, サイクリン D1および E 発現が増強することが明らかとなった。Ishikawa細胞の E2刺激増殖における MAPK3/1経路の関与の有無を検討したところ, E2刺激 2 時間後よりリン酸化 MAPK3/1が出現し 24時間まで増加した。また, この MAPK3/1のリン酸化は ER アンタゴニストと MAP2K 阻害剤により著明に抑制されたことから, E2により MAPK3/1経路が活性化されることが明らかとなった。次に, E2により誘導される増殖因子をスクリーニングし, E2刺激により Insulin-like growth factor 1 (IGF1) mRNA 発現が増強するとともに, IGF1蛋白質が培養液中に分泌されることを見出した。Ishikawa細胞に IGF1受容体の発現を確認し, IGF1刺激 24時間後の細胞増殖は濃度依存性に促進され, IGF1刺激後 15分で MAPK3/1のリン酸化を認めた。E2による MAPK3/1のリン酸化は抗 IGF1受容体抗体により抑制されることから, E2による MAPK3/1経路の活性化には IGF1を介したオートクリン機構が関与していることが示された。IGF1刺激による細胞周期調節因子の検討ではサイクリン D1とサイクリン E mRNA 発現がそれぞれ 2 時間後, 4 時間後から増強し, またその発現は MAP2K 阻害剤により著明に抑制されたことから, IGF1は MAPK3/1経路を介しサイクリン発現を制御していることが明らかとなった。さらに E2刺激 24時間後の細胞増殖は, ER アンタゴニスト, MAP2K 阻害剤および抗 IGF1受容体中和抗体により有意に抑制されたこと, また IGF1刺激による細胞増殖は MAP2K 阻害剤により有意に抑制され, E2刺激による細胞増殖には IGF1のオートクリン機構を介した MAPK3/1経路の活性化が関与することが確認された。

次に免疫染色によって子宮内膜組織 (正常内膜 30例, 内膜癌組織 48例) における MAPK3/1発現と活性化について検討した。正常内膜では MAPK3/1は増殖期, 分泌期の両者に発現していたが, リン酸化 MAPK3/1は分泌期に比べ増殖期に有意に高頻度に観察された。また子宮内膜癌組織でもリン酸化 MAPK3/1を分泌期に比べ有意に高頻度に認め, 増殖の活発な子宮内膜組織では MAPK3/1が活性化されており, 増殖への関与が示唆された。

【結論】以上より, 子宮内膜癌細胞の E2刺激増殖には,



【結果】感染後の体重減少はWTヌードマウスにおいて著明であったが、感染9週後の肺におけるシスト数はWTヌードよりGKOヌードマウスの方が多かった。肺の病理組織の比較により、GKOヌードマウスでは肺の炎症が強く肉芽腫様病変が多く見られた。肺胞洗浄液 (BALF) 中のIL-17産生量はGKOヌードマウスの方が高く、感染マウス肺より得られた細胞のIL-17産生量もWTヌードよりGKOヌードマウスの方が多かった。肺細胞内染色の結果では、主にCD4<sup>+</sup>T細胞がIL-17の産生に関与していることが判明した。WTヌードマウスと比べ、GKOヌードマウスのほうがCD4<sup>+</sup>T細胞中のIL-17産生細胞の割合が高かった。【結論】ヌードマウスにおいてはIFN- $\gamma$ 欠損により重いニューモシスチス肺炎を発症した。これはIFN- $\gamma$ 欠損によりTh17細胞の増殖が誘導され、Th17により産生されるIL-17により重篤なニューモシスチス肺炎が引き起こされたためであると考えられた。また、Th17応答は*Pneumocystis*の排除に関与していないことが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

ニューモシスチス肺炎に対する研究は臨床的知見や動物モデルをもちいた研究結果から、ニューモシスチス肺炎の症状は宿主免疫応答と関係していることが示唆されてきた。ところが、ニューモシスチス感染時において宿主免疫系は抑制されているため、ニューモシスチス肺炎発症の詳細な免疫学的メカニズムには不明な点が多い。そこで、ニューモシスチス肺炎発症におけるIFN- $\gamma$ の役割について明らかにするためIFN- $\gamma$ ノックアウト (GKO)ヌードマウスを作成し野生型 (WT)ヌードマウスと比較検討を行った。

その結果以下の成績を得た。

- 1) 感染後の体重減少はWTヌードマウスにおいて著明であった。
- 2) 感染9週後の肺におけるシスト数はWTヌードよりGKOヌードマウスの方が多かった。
- 3) 肺の病理組織の比較により、GKOヌードマウスでは肺の炎症が強く肉芽腫様病変が多く見られた。
- 4) 肺胞洗浄液 (BALF) 中のIL-17はGKOヌードマウスの方が高かった。
- 5) 肺より得られた細胞のIL-17産生量もWTヌードよりGKOヌードマウスの方が多かった。
- 6) 肺細胞内染色の結果では、主にCD4<sup>+</sup>T細胞がIL-17の産生に関与していることが判明した。WTヌードマウスと比べ、GKOヌードマウスのほうが

CD4<sup>+</sup>T細胞中のIL-17産生細胞の割合が高かった。

以上より、ヌードマウスにおいてはIFN- $\gamma$ 欠損により重いニューモシスチス肺炎を発症した。これはIFN- $\gamma$ 欠損によりTh17細胞の増殖が誘導され、Th17により産生されるIL-17により重篤なニューモシスチス肺炎が引き起こされたためであると考えられた。また、Th17応答は*Pneumocystis*の排除に関与していないことが示唆された。したがって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Increased isoprostane levels in oleic acid-induced lung injury (オレイン酸肺障害モデルにおけるイソプロスタン値の増加)

小野晃市

(論文の内容の要旨)

【背景】酸化ストレスは、脂質およびリン脂質の過酸化の一因であり、種々の疾患や病態との因果関係が注目されている。8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$ は、アラキドン酸の過酸化反応産物であるイソプロスタン類の一種で、酸化ストレスによる脂質過酸化の特異的かつ高感度のマーカーの1つであることが明らかになっている。呼吸器疾患では、慢性閉塞性肺炎の発症、病因に酸化ストレスは重要な役割を果たし、急性疾患ではAcute respiratory distress syndrome (ARDS)患者の尿中イソプロスタン値が著明に上昇していることが報告されている。さらに、その中でも8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$ には生物活性が認められ、肺や腎において血管収縮因子として働く可能性が示唆される。ARDS/ALIの代表的な動物病態モデルである、オレイン酸誘発肺障害の病態メカニズムに活性酸素の関与が示唆されているが、8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$ 値を検証した報告はない。今回我々は麻酔下綿羊を用い、急性肺塞栓症およびその後誘発される急性肺障害の実験的モデルとされるオレイン酸により惹起される急性肺障害における8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$ 濃度に注目し、本病態における酸化ストレスの関与について検討した。

【方法および実験】本実験はすでに共同研究者により報告された研究結果 (Nakagawa R et al, Lung 186 ; 225-232, 2008) に追加・補充して行われた。綿羊 (体重35-44 kg) 15匹を用いた。ハローセン麻酔下で70%酸素吸入下に人工呼吸器管理し、右開胸下に慢

性肺リンパ瘻を作成した。右内頸動・静脈にそれぞれカテーテルと Swan-Ganz カテーテルを挿入した。さらに気管切開を施行し, conventional mechanical ventilation (以下 CMV) (一回換気量10 ml/kg, 呼吸回数20/min, 呼吸終末陽圧換気圧 5 cmH<sub>2</sub>O) 維持下にて, 安定した baseline を1時間以上観察した後, オレイン酸0.08 ml/kg を内頸静脈より投与した。実験は, 以下の2群を行い比較した。CMV 群 (n=8) ではオレイン酸投与後同じ呼吸条件のまま4時間観察した。また High-frequency oscillation ventilation (HFOV 群, n=7) ではオレイン酸投与後 HFOV (平均気道内圧15 cmH<sub>2</sub>O, 一回駆出量150 ml, frequency 15 Hz) に切り替え4時間観察した。測定項目は, 2時間ごとに体血圧, 肺動脈圧, 肺動脈閉塞圧, 動脈血酸素分圧, 血漿中および肺リンパ中の8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  濃度を測定した。8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  濃度は, ガスクロマトグラフィにて測定した。

【結果】 Baseline に比し, オレイン酸投与後, 動脈血酸素分圧の有意な減少が認められたが, 両実験群間に有意差は認められなかった。血漿中および肺リンパ液中の8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  濃度は, オレイン酸投与後, 2時間で有意に上昇し, 4時間で減少したが, 両実験群間に有意差を認められなかった。8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  濃度と各種のパラメータとの相関を検討した。肺リンパ流量などの肺水腫の重症度や肺動脈圧上昇とは相関を示さなかったが, オレイン酸投与後2時間の, 血漿中および肺リンパ液中の8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  濃度の上昇率と, 動脈血酸素分圧の減少率に相関を認めた。

【結語】 緬羊のオレイン酸による肺障害において, 8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  値は血漿中および肺リンパ液中で上昇し, 低酸素血症の重症度と相関した。以上より, 8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  は急性肺塞栓症の実験モデルにおいて, 特にその低酸素血症の病態に関与している可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  は, アラキドン酸の過酸化反応産物であるイソプロスタン類の一種で, 酸化ストレスによる脂質過酸化の特異的かつ高感度のマーカーの1つとして注目されている。オレイン酸誘発肺障害モデルでは過酸化ストレスの関与を指摘する報告があるが, 8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  濃度を実測した報告はない。また, 高頻度換気および Conventional Mechanical Ventilation (以下 CMV) の肺損傷の程

度の有意な差に, この8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  濃度が関与する可能性がある。そこで小野は, オレイン酸誘発肺障害モデルにおける8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  の意義を, 麻酔下緬羊を用い, 急性肺塞栓症およびその後誘発される急性肺障害の実験的モデルとされるオレイン酸誘発肺障害モデルで, 高頻度換気または CMV で人工呼吸管理し, 体血圧, 肺動脈圧, 肺動脈閉塞圧, 動脈血酸素分圧, 血漿中および肺リンパ中の8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$ 濃度をガスクロマトグラフィにて測定し, 検討した。

その結果以下の成績を得た。

- 1) 動脈血酸素分圧値は, オレイン酸投与後2時間で有意に低下し, 4時間まで低値を持続していた。両群間で有意差は認められなかったが, 高頻度換気群で動脈血酸素分圧値は4時間目に上昇し, CMV 群より高い傾向にあった。
- 2) 8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  濃度は, オレイン酸投与後2時間で有意に上昇し, 4時間目では低下した。HFO 群では, 血漿および肺リンパ液ともに基準値まで低下したが, CMV 群の肺リンパ液中の8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  濃度は有意に基準値より高値を維持していた。
- 3) 血漿中の8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  濃度の上昇率と, 動脈血酸素分圧の低下率に正の相関を示しその相関係数は0.54であった。
- 4) 肺リンパ液中の8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  濃度の上昇率と, 動脈血酸素分圧の低下率に正の相関を示しその相関係数は0.71であった。

以上より, 8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  は, オレイン酸投与後, 血漿および肺リンパ液中で有意に上昇し, オレイン酸誘発肺障害モデルにおける低酸素血症の程度と相関を示した。特に肺リンパ液中で低酸素血症とより強い相関を示したことから, 肺組織から産生分泌された8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$  が, 低酸素血症の機序に関与していると考えられた。したがって主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Simultaneous Suppression of MITF and BRAF<sup>V600E</sup> Enhanced Inhibition of Melanoma Cell Proliferation (MITFとBRAF<sup>V600E</sup>の同時抑制は悪性黒色腫細胞の増殖抑制を強化する)

木 藤 健 治

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】MITFは色素細胞の分化、増殖、生存を制御する最も重要な遺伝子として知られ、最近では悪性黒色腫における癌遺伝子とも考えられている。しかしながら一方で、MITFを高発現させることでも増殖抑制が引き起こされることが知られており、増殖におけるMITFの正確な機能に関しては明らかになっていない部分も多い。少なくとも内因性のMITFの機能に関して多種類の黒色腫細胞で検討した報告は存在しない。そこで本研究では、MITFの発現量の異なる悪性黒色腫細胞株8株において内因性のMITFの発現をRNA干渉により抑制し、黒色腫細胞に対する増殖抑制効果とその制御機構を検討した。また、3株の黒色腫細胞ではMITFの強制発現による効果も同時に観察し、これらの結果よりMITFの分子標的としての意義を検討した。更により強力な黒色腫細胞の増殖抑制を得るために、MITFと変異癌遺伝子BRAF<sup>V600E</sup>の同時発現抑制効果も検討した。

【方法】MITFの発現量の異なる8種類の悪性黒色腫細胞株で、内因性のMITFをRNA干渉により抑制し、増殖抑制効果を観察、その効果の制御機構検討のため各種の細胞周期調節分子の発現変化をWestern blot解析で検討した。また、MITFを強制発現させ、その効果も同様に検討した。さらに増殖抑制効果の増強を得るためにMITFとBRAF<sup>V600E</sup>の同時発現抑制の効果も検討した。

【結果と考察】MITFの発現抑制により、今回検討した全ての細胞株で増殖抑制を認めた。MITFの発現量の低い細胞株においても増殖抑制が引き起こされることから、内因性のMITFは悪性黒色腫細胞株において常に増殖を促進させていると考えられた。また、MITFの強制発現によっても同様に強い増殖抑制を認めた。これは内因性のMITFの発現量が非常に少ない株でも、大量に発現している株でも同様の結果であった。これら2つの結果より、MITFは細胞株ごとに増殖において適切な発現量があり、その適切な量

の範囲においてのみ増殖を促進すると考えられた。以上より、MITFは悪性黒色腫の治療において分子標的となりうると考えられた。MITFの発現抑制による増殖抑制制御機構に関しては、現在までにp16<sup>INK4A</sup>やp21<sup>CIP1</sup>、p27<sup>KIP1</sup>といったCDKインヒビターの発現により引き起こされるとの報告がある。しかしながら今回の結果では細胞株ごとにMITFの発現抑制によるこれらの分子の挙動は異なり、必ずしも特定のCDKインヒビターがMITFの発現抑制による増殖抑制を引き起こしているわけではないと考えられた。また、MITFの発現抑制によりCDK2の発現も抑制される傾向が強い株が存在し、これらの株はMITFの発現抑制による増殖抑制効果も強い株であることがわかった。これらの結果から、MITFの発現抑制による増殖抑制の制御機構は細胞株により異なっていると考えられ、またMITFの発現抑制による増殖抑制効果が強い株では、MITF-CDK2の経路が細胞増殖に重要である可能性が示唆された。今回の検討よりMITFの発現抑制による増殖抑制効果が弱い細胞も存在することがわかり、こういった細胞に対しては、他の戦略が必要であると考えられた。そこでまず、以前からの我々の研究で、すでに発現抑制により増殖抑制を引き起こすことを確認している変異癌遺伝子のBRAF(BRAF<sup>V600E</sup>)と、今回のMITFのそれぞれの発現抑制による遺伝子発現の変化を、マイクロアレイを用いて検討した。そのクラスター解析の結果、あるクラスターを構成する細胞株ではMITFとBRAF<sup>V600E</sup>の発現抑制により、それぞれ異なった増殖に関する分子の発現変化が共通であることがわかった。つまりMITFとBRAF<sup>V600E</sup>では、異なった経路により増殖を制御していると考えられ、これら2分子を同時に発現抑制することで、どちらかのみでの抑制では耐性を示す細胞にも効果を引き出すことが可能であると思われた。実際、MITFとBRAF<sup>V600E</sup>の発現同時抑制により、MITFとBRAF<sup>V600E</sup>の単独抑制よりも有意に強い増殖抑制を認めた。これらの結果をまとめると、内因性のMITFは、その適切な発現量が細胞ごとに異なっており、その範囲においては常に増殖を促進すると考えられる。よってMITFは、悪性黒色腫治療における分子標的としての意義を十分に持っていると考えられるが、その発現抑制による効果や、増殖抑制の制御機構に関しては細胞ごとに異なっていると思われる。こういった様々な点で異なる細胞群に対しては、MITFとBRAF<sup>V600E</sup>という2つの分子を同時に抑制すること

で、異なるバックグラウンドを持つ細胞にも対応できると考えられ、悪性黒色腫の治療において非常に有効な治療戦略となると思われる。

(論文審査の結果の要旨)

MITF は色素細胞の分化や増殖、生存を制御する必要不可欠な遺伝子とされているが、悪性黒色腫においては lineage survival oncogene とも考えられている。そこで木藤らは、MITF 発現量の異なる黒色腫細胞株 8 株を用いて内因性 MITF の発現を RNA 干渉により抑制し、黒色腫細胞の増殖抑制効果とその制御機構を検討した。また、MITF の強制発現による影響も同時に観察した。さらに、MITF の発現抑制と、黒色腫の最も重要な癌遺伝子である BRAF<sup>V600E</sup> の発現抑制の併用効果も検討した。

その結果、木藤らは以下の結果を得た。

- 1) MITF の発現抑制により、検討した細胞株 8 株全てにおいて有意な増殖抑制を認めた。ただし、増殖抑制の程度には細胞株の間で差異があり、4 株では強い抑制が見られたが、他の 4 株ではその効果は比較的弱かった。
- 2) 増殖抑制効果は G1 期停止によるものであった。
- 3) MITF の RNA 干渉による各種 CDK インヒビターの発現の変化は細胞株ごとに異なっていた。
- 4) MITF の発現抑制により、CDK2 の発現も抑制される傾向が強い株が存在し、これらの株で増殖抑制効果も顕著であった。
- 5) MITF の強制発現によっても黒色腫細胞の増殖抑制が認められた。その際の各種 CDK インヒビターの発現の変化は細胞株ごとに異なっていた。
- 6) MITF と BRAF<sup>V600E</sup> のそれぞれの発現抑制による遺伝子発現変化のマイクロアレイ検討により、あるクラスターを構成する細胞株では MITF と BRAF<sup>V600E</sup> の発現抑制により、それぞれ異なった増殖に関する分子の発現が変化していた。
- 7) RNA 干渉による MITF と BRAF<sup>V600E</sup> の同時発現抑制により、それぞれの単独抑制よりも有意に強い G1 期停止と増殖抑制を認めた。

これらの結果より MITF は悪性黒色腫治療における分子標的となりうると考えられた。ただし、その発現抑制による効果や、増殖抑制の制御機構は細胞ごとに異なっており、黒色腫細胞の多様性が示唆された。しかし、本研究の成績はこのような多様性を有する黒色腫細胞に対して、MITF と BRAF<sup>V600E</sup> という 2 つの分子の同時抑制がその増殖を顕著に抑制することを

明らかにし、将来的に悪性黒色腫に対する極めて有用な治療戦略を提示した。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものとして認めた。

Elevation of Plasma Eotaxin Levels in Children with Food Allergy (食物アレルギーを持つ小児では血中のエオタキシン値は上昇する)

松 浦 宏 樹

(論文の内容の要旨)

【背景】食物アレルギーは小児に多くみられるアレルギー性疾患で、発症には好酸球、CD4 陽性 T 細胞、肥満細胞等が関与する。血中好酸球数は、脂質メディエーター、細菌産生物やケモカイン等によっても増加するため、食物アレルギーの重症度の指標としては用いにくい。エオタキシンは好酸球の移動を促す CC ケモカインの 1 つで、CCR3 レセプターを介して作用する。本研究では、小児の食物アレルギー患者における血中エオタキシン値を測定し、好酸球数や IgE 値との関連を検討した。

【対象および方法】グレード 2 以上の症状を示した 35 名の食物アレルギー患者 (18 名はアトピー性皮膚炎あり) と、36 名のアトピー性皮膚炎患者 (18 名は食物アレルギーあり)、および 19 名の健常児の血中エオタキシン-1、-3 値、末梢血好酸球数と血清 IgE 値を測定した。

【結果】食物アレルギー患者の血中エオタキシン-1 値は  $93.6 \pm 33.4$  pg/ml で、アトピー性皮膚炎患者群 ( $78.0 \pm 31.8$  pg/ml) とは差異を認めなかったが、健常群 ( $60.4 \pm 15.7$  pg/ml) よりも有意に高値であった。血中エオタキシン-3 は食物アレルギー群、アトピー性皮膚炎群、健常群との間に有意差は認めなかった。食物アレルギー群をアトピー性皮膚炎の有無により評価した。エオタキシン-1 は、食物アレルギーにアトピー性皮膚炎を合併した群では  $90.7 \pm 29.8$  pg/ml、非合併群では  $96.6 \pm 37.5$  pg/ml で、ともに健常群よりも有意に上昇していた。エオタキシン-3 はアトピー性皮膚炎合併群、非合併群、健常群との間に差異を認めなかった。アトピー性皮膚炎群を食物アレルギーの有無で分け、エオタキシン-1、-3 値を比較したが、有意差は認めなかった。血中エオタキシン値と、好酸球数、血清 IgE 値の間に相関があるか否か検討した。

食物アレルギー群、健常群ともに、エオタキシン-1と-3の間には相関は認めなかった。また、各エオタキシンと好酸球数、IgE値にも相関は認められなかった。

【考察】食物アレルギー患者、気管支喘息患者の気管支洗浄液や喀痰、アトピー性皮膚炎患者では、エオタキシン-1は健常群よりも高値であることが報告されている。われわれの検討では、食物アレルギー群の血中エオタキシン-1値は健常群よりも明らかに上昇していた。食物アレルギー群のエオタキシン-1値は、アトピー性皮膚炎の合併例と非合併例の間で差異を認めなかった。一方、アトピー性皮膚炎群のエオタキシン-1値は、食物アレルギーの有無で差異を認めなかった。このため、血中エオタキシン-1値はアトピー性皮膚炎に関係なく、食物アレルギー患者で上昇することが明らかとなった。血中エオタキシン値と好酸球数の相関は認めなかった。これは、Rothenbergらの提唱するエオタキシンは血中好酸球数維持が主な役割であるという仮説と関連しているのかもしれない。食物アレルギー患者に対する食物除去治療は、エオタキシン-1、-3値に影響を及ぼさなかった。これは、アレルゲンを完全に除去することは困難なためかもしれない。上記の結果から、食物アレルギー群では血中エオタキシン-1値は有意に上昇しており、食物アレルギーを評価するのに有用なパラメーターになりうると思われた。

#### (論文審査の結果の要旨)

【背景】食物アレルギーは小児に多くみられるアレルギー性疾患で、発症には好酸球、CD4陽性T細胞、肥満細胞等が関与する。血中好酸球数は様々なメディエーターによって増加するため、食物アレルギーの重症度の指標としては用いにくい。エオタキシンはCCR3レセプターを介して作用する好酸球の移動を促すCCケモカインの1つである。本研究では、小児の食物アレルギー患者における血中エオタキシン値を測定し、好酸球数やIgE値との関連を検討した。

【対象および方法】グレード2以上の症状を示した35名の食物アレルギー患者(18名はアトピー性皮膚炎あり)と、36名のアトピー性皮膚炎患者(18名は食物アレルギーあり)、および19名の健常児の血中エオタキシン-1、-3値、末梢血好酸球数と血清IgE値を測定した。

その結果、松浦は次の結論を得た。

1. 食物アレルギー患者の血中エオタキシン-1値は

93.6±33.4 pg/mlで、アトピー性皮膚炎患者群(78.0±31.8 pg/ml)とは差異を認めなかったが、健常群(60.4±15.7 pg/ml)よりも有意に高値であった。

2. 血中エオタキシン-3は食物アレルギー群、アトピー性皮膚炎群、健常群との間に有意差は認めなかった。

3. エオタキシン-1は、食物アレルギーにアトピー性皮膚炎を合併した群では90.7±29.8 pg/ml、非合併群では96.6±37.5 pg/mlで、ともに健常群よりも有意に上昇していた。エオタキシン-3はアトピー性皮膚炎合併群、非合併群、健常群との間に差異を認めなかった。

4. アトピー性皮膚炎群を食物アレルギーの有無で分け、エオタキシン-1、-3値を比較したが、有意差は認めなかった。

5. 血中エオタキシン値と、好酸球数、血清IgE値の間に相関があるか否か検討した。食物アレルギー群、健常群ともに、エオタキシン-1と-3の間には相関は認めなかった。また、各エオタキシンと好酸球数、IgE値にも相関は認められなかった。

これらにより血清エオタキシン-1はアトピー性皮膚炎の有無に関係なく食物アレルギー患者において有意に上昇していることが明らかとなり、食物アレルギーの診断に有用であることが示唆された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Cisplatin and weekly docetaxel with concurrent thoracic radiotherapy for locally advanced stage III non-small-cell lung cancer (局所進行第Ⅲ期非小細胞肺癌に対するシスプラチン併用ドセタキセル週分割投与化学療法と同時胸部放射線療法の併用療法)

中 村 勝

#### (論文の内容の要旨)

【目的】我々は以前、シスプラチン(CDDP)とドセタキセル(DOC)週分割投与の化学療法の第1相、第2相臨床試験を行い、CDDP80 mg/m<sup>2</sup>とDOC25 mg/m<sup>2</sup>(day 1, 8, 15)は、血液毒性の軽減が可能で、CDDP80 mg/m<sup>2</sup>とDOC60 mg/m<sup>2</sup>の一括投与と同等の奏効率と生存期間が得られることを報告してきた。今回我々は局所進行性非小細胞肺癌の患者を対象

に、このCDDPとDOCの週分割投与法に胸部放射線同時照射法を併用した治療法の安全性とその有用性を検討した。

【対象と方法】細胞診および組織学的に診断確定された75歳以下の臨床病期 stage IIIの未治療の非小細胞肺癌患者を対象とした。全身状態は Eastern Clinical Oncology Group (ECOG) performance status (PS) で0-1、測定可能な病変部位のあること、予測余命が3カ月以上、十分な骨髄機能を有し、呼吸・肝・腎機能障害を認めない患者とした。対象患者にはインフォームド・コンセントを文書で確認した。薬剤の投与は、DOC 20 mg/m<sup>2</sup>をday 1, 8, 15に、CDDP 80 mg/m<sup>2</sup>をday1に点滴静注した。4週を1コースとし、治療継続困難な有害事象の出現もしくは腫瘍の明らかな増大を認めない限り最低2コース行った。胸部放射線照射療法は、化学療法開始2日目から併用し、1回2Gyを30回、計60Gyで6週間に分けて照射を行った。毒性については National Cancer Institute Common Toxicity Criteria Ver 2.0に従い評価した。治療後90日を越える遅発性放射線毒性については Late Radiation Morbidity Scoring Scheme に従い評価した。抗腫瘍効果は、2コースの化学療法終了後に WHO 基準に従い評価した。生存期間は治療開始日から死亡日までとし、生存曲線はKaplan-Meier法で作成した。

【結果】1998年4月から2004年3月までの期間で34名の患者(男性32名、女性2名)が登録された。年齢は45歳から75歳で平均年齢は61.4歳であった。組織型は腺癌19名、扁平上皮癌14名、大細胞癌1名であった。臨床病期では、stage IIIAが3名、IIIBが31名であった。血液毒性は、grade3以上の好中球減少は8例(23.5%)に認められたが、発熱性好中球減少症の合併は認めなかった。Grade3以上の血小板減少は、3例(8.8%)に認められた。非血液毒性では、1例で虚血性腸炎のため化学療法を中止した。Grade3以上の食道炎が6名(17.7%)に、うち1名が治療終了後に食道気管支瘻を生じた。Grade3以上の放射線肺臓炎を4名(11.8%)に生じた。治療完遂率も85.3%であった。抗腫瘍効果は、21名の患者で有効と判断され、奏効率61.8%であった。生存期間中央値は26.4カ月、1年生存率は76.5%、2年生存率は52.9%であった。

#### (論文審査の結果の要旨)

局所進行性非小細胞肺癌に対する治療として、同時

胸部放射線化学療法は抗腫瘍効果が高く長期生存に寄与すると報告されているが、血液および非血液毒性、特に放射線肺臓炎、食道炎が増強することが知られている。今回中村らはシスプラチンとドセタキセルの週分割投与法に胸部放射線同時照射を加えた治療法の安全性とその有用性を検討した。

細胞診および組織学的に診断確定された75歳以下の臨床病期 stage IIIの、未治療の非小細胞肺癌患者を対象とした。ドセタキセル20 mg/m<sup>2</sup>をday 1, 8, 15に、シスプラチン80 mg/m<sup>2</sup>をday1に点滴静注した。4週を1コースとし、治療継続困難な有害事象の出現もしくは腫瘍の明らかな増大を認めない限り最低2コース行った。胸部放射線照射療法は、化学療法開始2日目から併用し、1回2Gyを30回、計60Gyで6週間に分けて照射を行った。毒性については National Cancer Institute Common Toxicity Criteria Ver 2.0に従い評価した。治療後90日を越える遅発性放射線毒性については Late Radiation Morbidity Scoring Scheme に従い評価した。抗腫瘍効果は、2コースの化学療法終了後に WHO 基準に従い評価した。生存期間は治療開始日から死亡日までとし、生存曲線はKaplan-Meier法で作成した。

1998年4月から2004年3月までの期間で34名の患者(男性32名、女性2名)が登録された。年齢は45歳から75歳で平均年齢は61.4歳であった。組織型は腺癌19名、扁平上皮癌14名、大細胞癌1名であった。臨床病期では、stage IIIAが3名、IIIBが31名であった。抗腫瘍効果は、21名の患者で有効と判断され、奏効率61.8%であった。生存期間中央値は26.4カ月、1年生存率は76.5%、2年生存率は52.9%であった。血液毒性は、grade3以上の好中球減少は8例(23.5%)に認められたが、発熱性好中球減少症の合併は認めなかった。Grade3以上の血小板減少は、3例(8.8%)に認められた。非血液毒性では、1例で虚血性腸炎のため化学療法を中止した。Grade3以上の食道炎が6名(17.7%)に、うち1名が治療終了後に食道気管支瘻を生じた。Grade3以上の放射線肺臓炎を4名(11.8%)に生じた。

これらの結果より、シスプラチン併用ドセタキセル週分割投与に同時胸部放射線照射法を併用した化学療法は、他の報告に比し毒性が少なく認容性に優れた治療法であり、また抗腫瘍効果においても他の報告と遜色なく優れた治療法のひとつとして有用であるとの結論を得た。

中村勝は、本研究において、実際の患者の治療を担当し、登録症例のデータ収集解析を中心的に行い、本論文の作成を行った。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Antigen p57/Kip2 as a potential negative regulator of human astrocytoma growth (p57/Kip2が持つヒト星状細胞腫に対する腫瘍増殖抑制効果の可能性)

赤石 江太郎

(論文の内容の要旨)

【背景】頭蓋内原発脳腫瘍のうち、神経膠腫は約26%を占める。手術療法、化学療法、放射線療法の単独もしくはその組み合わせが長い間工夫されてきたが、特に悪性度の高いものについては未だに腫瘍死は免れない。他方、様々な遺伝子が、星状細胞腫の診断治療のために研究が進められてきた。この中で、悪性神経膠腫 cell line に対して p57/Kip2 (p57) がその発育や悪性度に対して抑制的に働きうることが実験的に示された。そこで実際の臨床におけるヒト星状細胞腫において、p57が悪性度や他の因子とどのような関連があるかを検証した。

【実験の方法】1997年から2000年まで信州大学医学部附属病院にて手術的に摘出された“神経膠腫”50症例について検討を行った。8例の神経上衣腫、1例の上衣下細胞腫、2例の希突起神経膠腫例は腫瘍の持つ特殊性より、今回の分析からは除外した。その他摘出時の操作により挫滅損壊が著しい標本は対象から除外した。最終的に36例の星状細胞腫の病理検体について検討を実施した。切片は全例パラフィン包埋切片より新たに切り出し、同条件にて p57, p53, p16, Ki-67 による免疫染色を実施した。光学顕微鏡強拡大にて視野中の全細胞数と免疫染色陽性細胞数をそれぞれカウントし、陽性率=陽性細胞数/全細胞数とし、5視野の平均値をその検体の陽性率と定義した。

【結果】性別については男性23例、女性13例で有意差は認められなかった。手術時の年齢は平均43.7歳(1~72歳)であった。Grade別では、2例の症例はgrade1であり、いずれも毛様性星状細胞腫であった。6例のgrade2は平均年齢が39.8歳で、2例は原線維性星状細胞腫であり、4例は肥性星状細胞腫であった。17例のgrade3のうち、2例はPNET(未分化神経外胚葉性腫瘍)であり、15例は退形成星状細胞腫であった。

平均年齢は52.8歳であった。Grade4は平均52.8歳、11例全例膠芽腫であった。p57, p53, p16は悪性度が高まるほど陽性率が高まる傾向があったが、統計学的には有意差は認められなかった。良性星状細胞腫(grade1, 2)と悪性星状細胞腫(grade3, 4)のKi-67陽性率については有意に悪性群で高かった( $p < 0.05$ )。p57の陽性率が10%を超した群とそれ以下の群を比較すると、高い群でp16とp53の陽性率が有意に高かった( $p < 0.05$ )。Ki-67陽性率もp57陽性率が10%を超える群で高い傾向があったが、有意差は認められなかった。p57陽性率と、年齢、性別、生存期間については有意な関連は見られなかった。

【考察】pRB遺伝子の欠落やp53遺伝子の欠失もしくはp53の変異が種々の悪性腫瘍で見つかったことを皮切りに、悪性神経膠腫における遺伝子異常が解明されつつある。cell cycleに関連するCyclin-Dependent Kinases (CDKs), pRBの発現抑制もしくは、それら蛋白の変異、あるいはCyclin-Dependent Kinase Inhibitors (CKIs)の発現に関しては、CKIs familyのCIP/KIP familyに属するp57が他の腫瘍でも臨床的に細胞周期に対して抑制的に働きうる事が報告されているが、星状細胞腫でも増殖を抑制し、腫瘍の悪性度を減ずることが報告されている。我々の研究でもKi-67抗体と、p57の発現には逆相関があるらしいことが示唆されている。最近p57の発現消失にはp53抑制因子の発現に関連することが報告されている。しかし我々のシリーズではp57とp16の発現には正の相関が示唆されたが、p57とp53の発現には特にはっきりとした相関は認められなかった。以前p57がin vitroで星状細胞腫の増殖を抑制することが示されたが、星状細胞腫の増殖抑制は他の因子も関与していることも事実である。例えば、精巣B-cell lymphomaでは正常組織に比べてp57の発現が、強く抑制されているが、我々のシリーズの星状細胞腫では良性で弱い発現が見られていたのに対して、神経膠芽腫では核内・細胞質双方に発現を見ている例も散見された。これらは星状細胞腫の細胞周期が非常に多くの因子が複雑に絡みつつコントロールされていることを示しており、それがとりもなおさず、単一の細胞周期抑制因子のみでは星状細胞腫の増殖を抑制することが難しいこと理由の1つであろうと考えられる。

【結論】p57はp16と共に協同的にヒト星状細胞腫増殖の抑制をすることが示された。今後は、単一ではなく、複数の抑制因子を使ったより強力な増殖抑制系が試さ

れるべきであろう。

(論文審査の結果の要旨)

CDK inhibitor の CIP/KIP family の一員である p57/Kip2 は glioblastoma の cell line における実験において、その悪性度や成長を抑制する働きが示された。一方、p57 は他の癌において、発現が抑制されていることが知られている。そこで赤石は未だに治療法が確立されない非常に予後不良な脳腫瘍 glioblastoma において、実際の手術症例標本を用いて p57 が臨床診断や予後判定に有用であるか、またどんな関連があるかを他の p16, p53, Ki67 などと比較検討した。

その結果、以下の成績を得た。

- 1) p57 は核内のみならず、細胞質においても陽性を示す症例が散見された。
- 2) 検討した 36 例の内訳は、女性 13 例、男性 23 例であり、両群間に p57 の発現に有意差を認めなかった。
- 3) 年齢層は 1 歳から 72 歳までであったが、年齢と p57 の陽性率には関連がなかった。
- 4) Grade 別の p57 の発現は、悪性度が増すに連れ、発現が増強される傾向を認めたが、有意差は認めなかった。
- 5) p57 の陽性率が高い群で p16 と p53 の陽性率が高くなる傾向が認められた。Ki-67 は逆の関係を示した (p16 のみ有意差あり  $p < 0.05$ )。
- 6) p53 の陽性率が高い群で p57 も陽性率が高くなる傾向が認められたが、有意差は認められなかった。
- 7) p16 の陽性率が高い群で p57 の発現が高くなる傾向が認められた ( $p < 0.05$ )。
- 8) Ki-67 の高陽性群で p57 の発現が低くなる傾向が認められた。
- 9) p57 の陽性率が高い群で survival が延長される傾向を認めたが、有意差は認められなかった。

以上より、p57 は他の抑制系因子と関連性を持ちながら、glioma の成長を抑制している可能性が示唆された。また、将来 p57 自身のリン酸化と非リン酸化を区別して染色することにより、p57 に対する抑制系も明らかになる可能性がある。これらの考察は極めて難治性で未だに治療法が確立されていない glioblastoma の成長が何故抑制されにくいかを解明する一助になる可能性が示され、将来的には glioblastoma の予後判定あるいは治療の改善に繋がる可能性が示された。従って、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Multiple roles of PPAR $\alpha$  in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions (褐色脂肪組織における  $\alpha$  型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の新機能の解明)

小 松 万喜子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】褐色脂肪組織 (BAT) は寒冷条件下で熱産生を行い、体温の維持に貢献している。この機能を果たすため、BAT はミトコンドリア内で 2 つの経路から供給されるエネルギー源を使用するとされている。その 1 つは糖を取り込んで分解する経路、もう 1 つは脂肪酸またはトリグリセリドを分解する経路である。この両者のエネルギー産生系に關与する重要な因子の 1 つとして  $\alpha$  型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR $\alpha$ ) がある。本受容体はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する核内受容体であり、脂肪の輸送、貯蔵および代謝の制御や、細胞内における多様な生理機能に關与することが報告されている。しかし、BAT における PPAR $\alpha$  の生理的役割についてはほとんど知られていない。私たちは、PPAR $\alpha$  のノックアウトマウスを用いて、BAT の熱産生系に關与する PPAR $\alpha$  の生理機能調節機構の多様性を解析した。

【方法】ノックアウトマウスの BAT におけるタンパク質の発現を 2 次元電気泳動法 (SDS-PAGE) で解析し、異常に強く発現しているタンパク質をマトリックス支援飛行時間型マスペクトロメトリー (MALDI-TOF-MS) を用いたプロテオーム解析により同定した。BAT は寒冷暴露下で強力に活性化される組織であることを利用して、BAT 内で熱産生に使用される 2 種類のエネルギー源 (糖及び脂肪) の分解に關与する諸タンパク質や諸酵素の発現を解析した。これらの酵素またはタンパク質の発現量は定量 PCR 法もしくは酵素活性の測定によった。

【結果】ノックアウトマウスの BAT におけるタンパク質の発現を SDS-PAGE で解析した結果、異常に強く発現しているタンパク質が検出された。このタンパク質は MALDI-TOF-MS を用いたプロテオーム解析によりピルビン酸デヒドロゲナーゼの  $\beta$  サブユニット (PDH $\beta$ ) と同定された。ピルビン酸デヒドロゲナーゼは解糖系とクエン酸回路の接点にあり、アセ

チル CoA を産生する糖分解系の重要な酵素の 1 つである。このプロテオーム解析の結果は、PPAR $\alpha$  が PDH $\beta$  の発現調節に直接関与することを示唆した。そこで、BAT を寒冷暴露により活性化させ、PDH $\beta$  が関与する糖分解系の諸酵素と脂肪分解系に關する諸酵素の発現変動を解析した。糖分解系では、既に報告のあるピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ2/4の増加のほかに、ノックアウトマウスでの PDH $\beta$  の発現増加が顕著であった。また、PDH 活性は寒冷暴露によってノックアウトマウスでも野生型でも低下していた。脂肪分解系では、多くの PPAR $\alpha/\gamma$  の標的遺伝子の発現増加が寒冷処理によって引き起こされており、なかでも野生型での発現増加が特に顕著であった。【結論】BAT 内で熱産生に使われるエネルギー源として糖と脂肪が使われることは知られていたが、それらの2つのエネルギー供給源の代謝がいかんしてコントロールされるかは十分に解明されていなかった。本研究では、PPAR $\alpha$  がこの2つのエネルギー供給源の代謝を一方は抑制、他方は促進させるという双方向の制御をすることを初めて明らかにした。すなわち、BAT が活性化された状況下では、PPAR $\alpha$  は PDH $\beta$  の発現を抑制する方向に働き、一方、脂肪分解に關するタンパク質の発現を増加する方向に働くと考えられた。このことから、PPAR $\alpha$  は BAT 内においては脂肪をエネルギー源として優先的に使用し、使用用途が広範なブドウ糖の使用は極力制限して他の生命維持活動のために温存しておく方向に働くものと推定された。

#### (論文審査の結果の要旨)

本論文において小松は、PPAR $\alpha$  ノックアウトマウスを用いて BAT の熱産生系に關する PPAR $\alpha$  の生理機能調節機構の多様性を解析し、以下の新知見を得た。

- 1) 2次元電気泳動法によりノックアウトマウスで異常に強く発現しているタンパク質を見出し、このタンパク質をプロテオーム解析により PDH $\beta$  と同定した。
- 2) BAT を寒冷暴露下で強力に活性化したところ、その重量は野生型もノックアウトマウスもともに肥大した。組織学的解析では、23°Cでは野生型とノック

アウトマウスの BAT に差はないが、4°Cでは野生型マウスの脂肪滴の減少が顕著であった。トリグリセリド蓄積量の測定結果も同様の結果を示した。

- 3) PDH $\beta$  は23°Cでも4°Cでもノックアウトマウスは野生型マウスより顕著な発現がみられた。PDK2/4の mRNA 発現は、寒冷曝露によって著明に増えていた。糖分解系の PC, M-PK, HK-II の mRNA 発現量は4°Cで野生型とノックアウトマウスで差がなく、PPAR $\alpha$  が PDH $\beta$  の発現を特異的に抑制していることが明らかとなった。PDH 酵素活性の測定結果も mRNA の発現解析の結果を支持した。
- 4)  $\beta$  酸化系のタンパク質、すなわち、LACS, CPT1b, MCAD の mRNA 発現量は、寒冷曝露によって野生型もノックアウトマウスも増加していたが、23°Cでの野生型マウスで顕著であった。 $\beta$  酸化酵素活性も同様の結果を示した。
- 5) 脂肪酸取り込み系のタンパク質、すなわち、FAT, FATP, LPL の mRNA 発現量は、23°Cでは野生型とノックアウトマウスで差はなく、4°Cでは野生型マウスで3種すべて、ノックアウトマウスでは FATP と LPL の発現が増加した。
- 6) 脂肪酸合成系のタンパク質、すなわち、ACC-1, FAS の mRNA 発現量は、23°Cでも4°Cでも野生型とノックアウトマウスで差がなく、4°Cでも増加はなかった。
- 7) PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現量は4°Cで野生型もノックアウトマウスもともに顕著に増加し、寒冷暴露下での PGC-1 $\alpha$  の関与が示唆された。

以上の研究結果により小松は次の結論を得た。

BAT 内で熱産生に使われるエネルギー源となる糖と脂肪の代謝に關して、BAT が活性化された状況下では、PPAR $\alpha$  は PDH $\beta$  の発現自体を特異的に抑制する方向に働き、一方、脂肪分解に關するタンパク質の発現を増加する方向に働くと考えられた。このことから、PPAR $\alpha$  は BAT 内においては脂肪をエネルギー源として優先的に使用し、ブドウ糖の使用は制限して他の生命維持活動のために温存する方向に働くものと推定された。

以上の研究内容に対して、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。