

## 信州大学において審査された医学博士論文要旨

氏名 (所属講座)	学位授与 番号	授与年月日	博 士 論 文 名	学位審査委員	
				主 査	副 査
島田健太郎 (臓器発生 制御医学)	甲第923号	24. 3. 31	Hemodialysis-Induced P-Wave Signal-Averaged Electrocardiogram Alterations Are Indicative of Vulnerability to Atrial Arrhythmias (血液透析療法の催上室性不整脈性-P波加算平均心電図による検討)	山田充彦	西澤 理 天野 純
橋本幸始 (代謝制御学)	甲第924号	24. 3. 31	PPAR $\alpha$ activation protects against anti-Thy1 nephritis by suppressing glomerular NF- $\kappa$ B signaling (ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 $\alpha$ 型の活性化は、糸球体内のNF- $\kappa$ B経路を抑制することにより抗Thy1腎炎に対し保護効果を発揮する)	田中榮司	西澤 理 菅野祐幸
町田香津子 (加齢生物学)	甲第925号	25. 3. 31	Postmortem findings in a patient with cerebral amyloid angiopathy actively treated with corticosteroid (積極的な副腎皮質ステロイド治療を行った脳アミロイドアンギオパチー患者の剖検所見)	樋口京一	天野直二 本郷一博
野竹 剛 (外科学(1))	甲第926号	24. 3. 31	Differential requirements for IRF-2 in generation of CD1d-independent T cells bearing NK cell receptors (NKレセプターを発現するCD1d非依存性T細胞の発生にIRF-2は重要な役割を担っている)	奥山隆平	中山 淳 駒津光久
江口 尚 (衛生学公 衆衛生学)	甲第927号	25. 3. 31	The Effects of Workplace Occupational Mental Health and related Activities on Psychological Distress among Workers: A Multilevel Cross-sectional Analysis (職場のメンタルヘルス活動が労働者の心理的ストレスに与える影響について: マルチレベル分析を用いた横断研究)	福嶋義光	天野直二 浅村英樹
河村理恵 (遺伝医学・ 予防医学)	甲第928号	24. 3. 31	Visualization of the spatial positioning of the SNRPN, UBE3A, and GABRB3 genes in the normal human nucleus by three-color 3D-fluorescence in situ hybridization (3色3D-FISH法による正常人細胞核のSNRPN, UBE3A, GABRB3遺伝子の空間配置の解析)	中山 淳	本田孝行 樋口京一
桂 安萍 (外科学(1))	甲第929号	24. 9. 30	Impaired degradation followed by enhanced recycling of epidermal growth factor receptor caused by hypo-phosphorylation of tyrosine 1045 in RBE cells (胆管癌細胞RBEにおける, Y1045低リン酸化によるEGFRの再循環増強と分解抑制)	谷口俊一郎	鎌田 徹 塩沢丹里

審査学位論文要旨

AL - KZAYER LIKA'A FASIH YAQOUB (小児医学)	甲第930号	25. 3.31	Genetic Evaluation of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Iraq Using FTA Cards (FTA カードを用いたイラク国内発症小児急性リンパ性白血病の遺伝子解析)	菅野 祐 幸	宇佐美真一 田中 榮 司
柴 崎 利 英 (分子薬理学)	甲第931号	24. 3.31	KGA-2727, a novel selective inhibitor of a high-affinity sodium glucose cotransporter (SGLT1), exhibits antidiabetic efficacy in rodent models (高親和性ナトリウム・グルコース共輸送体 (SGLT1) の選択的阻害薬である KGA-2727 は動物モデルにおいて抗糖尿病効果を示す)	駒 津 光 久	青 山 俊 文 大 森 栄
木 下 久 慈 (精神医学)	甲第932号	25. 3.31	Not only body weight perception but also body mass index is relevant to suicidal ideation and self-harming behavior in Japanese adolescents (日本の青少年では, 体型への認知のみならず, BMI (body mass index) も希死念慮・自傷行為と関連する)	天 野 直 二	池 田 修 一 野 見 山 哲 生
吉 沢 隆 浩 (循環病態学)	甲第933号	25. 3.31	Novel Regulation of Cardiac Metabolism and Homeostasis by the Adrenomedullin-Receptor Activity-Modifying Protein 2 System (心臓におけるアドレノメデュリン-RAMP2系による代謝及び恒常性維持の新規制御機構)	樋 口 京 一	中 山 淳 大 森 栄
吉 江 進 (組織発生学)	甲第934号	25. 3.31	Establishment of novel detection system for embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells based on nongenetic manipulation with indocyanine green (インドシアニングリーンを用いた胚性幹細胞由来肝細胞の新規検出システムの開発)	青 山 俊 文	田 中 榮 司 大 森 栄
小 山 晃 英 (循環病態学)	甲第935号	25. 3.31	Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis (血管内皮細胞における adrenomedullin-RAMP2 システムは血管統合性と組織恒常性維持に必須である)	樋 口 京 一	福 嶋 義 光 中 山 淳
武 井 真 大 (内科学(4))	甲第936号	24. 3.31	A new experimental model of ATP-sensitive K <sup>+</sup> channel - independent insulinotropic action of glucose : a permissive role of cAMP for triggering of insulin release from rat pancreatic $\beta$ -cells (グルコースによる ATP 感受性カリウムチャンネル非依存性インスリン分泌刺激作用の新規実験モデル : ラット膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌惹起における cAMP の寛容的役割)	山 田 充 彦	大 橋 俊 夫 佐 々 木 克 典
茂 木 亜 希 海 (組織発生学)	甲第937号	24. 3.31	The method of mouse embryoid body establishment affects structure and developmental gene expression (マウス胚様体形成の方法はその構造と発生上の遺伝子発現に影響する)	山 田 充 彦	森 泉 哲 次 竹 下 敏 一
家 里 康 弘 (循環病態学)	甲第938号	25. 3.31	Adrenomedullin-RAMP2 system is crucially involved in retinal angiogenesis (アドレノメデュリン-RAMP2系の網膜血管新生における重要性)	樋 口 京 一	谷 口 俊 一 郎 菅 野 祐 幸

審査学位論文要旨

立石一成 (内科学(1))	甲第939号	24. 3.31	Clinical Outcomes in Elderly Patients Administered Gefitinib as First-line Treatment in Epidermal Growth Factor Receptor-mutated Non-small Cell Lung Cancer : Retrospective Analysis in a Nagano Lung Cancer Research Group Study (高齢者EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における一次治療としての Gefitinib 治療の臨床的解析:長野県肺癌研究グループにおける後方視的解析)	久保恵嗣	宮川真一 塩沢丹里
杉山大介 (麻醉蘇生学)	甲第940号	24. 3.31	<i>In vivo</i> patch-clamp recording from locus coeruleus neurones in the rat brainstem (ラット脳幹青斑核神経細胞からの <i>in vivo</i> パッチクランプ記録)	大橋俊夫	山田充彦 田渕克彦
君塚康一郎 (器官制御生理学)	甲第941号	25. 3.31	Sphingosine 1-phosphate (S1P) induces S1P2 receptor-dependent tonic contraction in murine iliac lymph vessels (S1P によるマウス腸管リンパ管における S1P2受容体を介した収縮反応の機能特性)	加藤博之	佐々木克典 田渕克彦
楊 磊 (循環病態学)	甲第942号	25. 3.31	Endogenous CGRP protects against neointimal hyperplasia following wire-induced vascular injury (内因性CGRPは, 血管傷害による新生内膜形成を抑制する)	樋口京一	谷口俊一郎 菅野祐幸
劉 茜 (神経可塑性学)	甲第943号	24. 3.31	Specific interaction of postsynaptic densities with membrane rafts isolated from synaptic plasma membranes (精製シナプス後肥厚部と膜ラフトの特異的相互作用)	田渕克彦	谷口俊一郎 樋口京一
篠山大明 (精神医学)	甲第944号	25. 3.31	Increased cerebrospinal fluid interleukin-6 levels in patients with schizophrenia and those with major depressive disorder (統合失調症患者および大うつ病性障害患者における髄液中インターロイキン-6濃度の上昇)	池田修一	駒津光久 鈴木龍雄
境澤香里 (皮膚科学)	甲第945号	25. 3.31	Mutation analysis of <i>BRAF</i> and <i>KIT</i> in circulating melanoma cells at the single cell level (血液循環メラノーマ細胞のシングルセルレベルでの <i>BRAF</i> と <i>KIT</i> の遺伝子解析)	谷口俊一郎	本田孝行 小泉知展
丸山雅史 (内科学(2))	甲第946号	24. 3.31	Periductal Induction of High Endothelial Venule-Like Vessels in Type 1 Autoimmune Pancreatitis (1型自己免疫性膵炎における高内皮細静脈様血管の出現に関する検討)	本田孝行	菅野祐幸 森泉哲次
大彌 歩 (分子病理学)	甲第947号	25. 3.31	Lymphocyte recruitment via high endothelial venules in lymphoid stroma of Warthin's tumour (ワルチン腫瘍のリンパ様間質における高内皮細静脈からのリンパ球ホーミング)	角谷真澄	宇佐美真一 栗田 浩
肖 鉄朋 (歯科口腔外科学)	甲第948号	25. 3.31	Vital staining with iodine solution in oral cancer : iodine infiltration, cell proliferation, and glucose transporter 1 (口腔がんにおけるヨード生体染色機序の解明:ヨードの浸透, 細胞増殖とグルコース トランスポーター1)	菅野祐幸	宇佐美真一 谷口俊一郎

審査学位論文要旨

氏名 (所属)	学位授与 番号	授与年月日	博士論文名	学位審査委員	
				主査	副査
赤羽貴行 (保健学専攻 医療生命 科学分野 医療生命 科学領域)	甲第1号	24. 3.20	A Case of Wound Dual Infection with <i>Pasteurella dagmatis</i> and <i>Pasteurella canis</i> Resulting from a Dog Bite —Limitations of Vitek-2 System in Exact Identification of <i>Pasteurella</i> Species—(イヌ咬傷から分離された <i>Pasteurella dagmatis</i> と <i>Pasteurella canis</i> 創部重複感染症の1例—Vitek-2システムによる <i>Pasteurella</i> 属の正確な同定の限界—)	奥村伸生	市川元基 川上由行
春日恵理子 (保健学専攻 医療生命 科学分野 医療生命 科学領域)	甲第2号	24. 3.20	Bactericidal activities of woven cotton and nonwoven polypropylene fabrics coated with hydroxyapatite-binding silver/titanium dioxide ceramic nanocomposite “Earth-plus” (アースプラス (酸化チタン, ハイドロキシアパタイト, 銀) 加工の施された綿織布とポリプロピレン不織布の医療関連感染起因性病原菌に対する殺菌活性)	奥村伸生	寺田 克 川上由行
久保田聖子 (保健学専攻 医療生命 科学分野 医療生命 科学領域)	甲第3号	24. 3.20	Pathophysiological Investigation of the Gastric Surface Mucous Gel Layer of Patients with <i>Helicobacter pylori</i> Infection by Using Immunoassays for Trefoil Factor Family 2 and Gastric Gland Mucous Cell-Type Mucin in Gastric Juice (胃液におけるTFF2と胃腺粘液細胞型ムチンのイムノアッセイを用いた <i>Helicobacter pylori</i> 感染患者の胃表層粘液ゲル層の病態生理学的研究)	奥村伸生	日高宏哉 太田浩良
青木幹昌 (保健学専攻 生涯保健 学分野成人保健学 領域)	甲第4号	25. 3.20	A descriptive study investigating the feasibility and selectivity of Current Perception Threshold in the objective assessment of post-operative sub-acute knee pain (手術後の亜急性膝痛の客観的な評価における電流知覚閾値の実現可能性と選択性を調査した記述的研究)	木村貞治	百瀬公人 ゴウアーチェン
中西康祐 (保健学専攻 生涯保健 学分野老年保健学 領域)	甲第5号	25. 3.20	Evaluating the quality of life of people with dementia in residential care facilities (施設に入所している認知症高齢者の生活の質の評価)	小林正義	上村智子 横川吉晴
務台均 (保健学専攻 生涯保健 学分野老年保健学 領域)	甲第6号	25. 3.20	Factors associated with functional recovery and home discharge in stroke patients admitted to a convalescent rehabilitation ward (回復期リハビリテーション病棟に入院した脳卒中患者における機能回復および在宅復帰に寄与する因子の検討)	上村智子	本郷 実 小林正義

Hemodialysis-induced P-wave Signal-averaged Electrocardiogram Alterations are Indicative of Vulnerability to Atrial Arrhythmias (血液透析療法の催上室性不整脈性—P波加算平均心電図による検討—)

島田 健太郎

(論文の内容の要旨)

【目的】発作性心房細動等の上室性不整脈は、血液透析中に高頻度に出現する。上室性不整脈は循環動態の変化を惹起し、しばしば血液透析の妨げとなりうる。また、心房細動自体が透析患者の予後不良を予測するとの報告もあり、透析中に生じる上室性不整脈の抑制は維持透析症例の管理における重要な主題である。上室性不整脈に対する受攻性の定量的且つ非侵襲的な評価方法として、P波加算平均心電図(P-SAECG)がある。P-SAECGの主な計測値としてP wave duration (PWD)とroot mean square voltages for the last 20ms of the P wave (RMS20)の2項目があり、PWDの延長とRMS20の短縮は将来的な心房細動の発症を予測するとされている。しかしながら、血液透析中のP-SAECG所見を調査した研究はこれまで成されていない。そのため今回我々は、血液透析の催不整脈性を電気生理学的に評価するため、透析の最中を含めて透析時のP-SAECGを計測し、その関連因子について検討した。

【方法】2008年6月から2009年7月にかけて、当院を含めた3つの関連病院において維持透析を施行している症例を対象とした。ただし、基本的に正常洞調律症例を対象とし、加えて急性冠症候群発症直後・周術期症例・重症感染症等の催不整脈要因を合併した症例は除外した。またnoise levelは $0.3\mu\text{V}$ 未満に設定した。登録された症例は全例で週2-3回の透析療法を行っていた。透析前後のそれぞれ30分を含むようにしてDigital Holter ECGを装着し、Synescope softwareを用いてDigital dataから透析前・中・後のP-SAECGを再構築した。P-SAECGについては最もnoise levelが低いものを採択した。並行して透析前・中・後の3相で血液検体を採取し、血液検査項目についても調査した。統計処理はJMP softwareを使用した。処理方法については、連続変数に対しては分散分析を、変数間の相関関係に対してはピアソンの相関分析及び重回帰分析を、それぞれ適用した。

【結果】57症例を登録した上で、基準に従い24症例を除外し、最終的に33人の維持透析患者(平均年齢

66.7±12.6歳、男性23人)を対象とした。透析前・中・後のPWDはそれぞれ135.5±14.2, 144.6±15.9, 139.5±14.1 msで、透析前と比較して透析中に有意に延長していた( $p<0.05$ )。またRMS20はそれぞれ5.51±3.87, 3.05±1.87, 5.29±5.17  $\mu\text{V}$ であり、透析前と比較して透析中は有意に短縮し( $p<0.05$ )、透析後は有意差が消失していた。これらの結果は、血液透析の開始に伴いP-SAECGの変化が生じると共に、血液透析の終了に伴いP-SAECGが回復することを示唆した。次いで、P-SAECGの変化と関連する因子を調べるために、透析中-透析前の変化量を $\Delta$ と定義した上で、 $\Delta\text{P-SAECG}$ と対象症例の固有因子・透析条件・生化学的検査所見の関係を検討した。具体的にはピアソンの相関分析で検討し相関因子を抽出した上で、重回帰分析を用いてより相関関係の強い因子を選択した。その結果、 $\Delta\text{PWD}$ は透析期間及び除水率と、 $\Delta\text{RMS20}$ は透析期間及び $\Delta\text{BUN}$ と、それぞれ有意な相関を認めた( $p<0.05$ )。これらのデータから、透析期間の長さや血液透析の強度による $\Delta\text{P-SAECG}$ への影響が示された。

【結論】今回の報告は、血液透析により劇的なP-SAECGの変化が生じることを示した初めての研究である。こうした変化は、透析中に上室性不整脈への受攻性が増大していることを示している。そして、血液透析中の上室性不整脈の抑制には透析条件の厳密なコントロールが重要と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

維持透析症例において、しばしば透析中に発作性不整脈が生じる。不整脈を評価する場合、Holter ECGで期外収縮を調べるのが一般的であるが、期外収縮は時間差・個人差が激しく、比較が困難という欠点がある。一方で定量的な評価方法として、心筋の遅延伝導を測定する加算平均心電図という手法がある。加算平均心電図はTotalの波長を示すPWDと、最後20ms部の面積を示すRMS20の2項目を評価する。PWDの延長や、RMS20の短縮は心房細動の発症を予測するとの報告がある。また、透析症例ではP波加算平均心電図の異常が生じやすく、また透析後にはPWDの

延長や RMS20の短縮が生じるとされている。しかしながら、P波加算平均心電図を透析中に応用した研究は成されていない。そのため、今回我々は透析中のP波加算平均心電図を測定し、増悪因子の検索を行った。

方法に関しては、研究の協力施設に於いて、維持透析中の連続33症例を登録した。計測機器を透析前後の30分を含め装着することで、透析前・透析中・透析後のP波加算平均心電図を測定した。また、症例の既往歴・採血データ・透析条件を調べ、関連因子を抽出した。

その結果、島田は次の結論を得た。

1. 透析中、PWDは有意に延長し、RMS20は有意に短縮した。それらの変化は透析終了後に回復する傾向を示した。
2. 透析中と透析前の数値の変化量を $\Delta$ と定義した場合、重回帰分析において、 $\Delta$ PWDは除水率・透析期間と、 $\Delta$ RMS20は $\Delta$ BUN・透析期間と、それぞれ有意な相関を示した。

PPAR $\alpha$  activation protects against anti-Thy1 nephritis by suppressing glomerular NF- $\kappa$ B signaling (ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 $\alpha$ 型の活性化は、糸球体内のNF- $\kappa$ B経路を抑制することにより抗Thy1腎炎に対し保護効果を発揮する)

## 橋本幸始

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】慢性腎臓病(CKD)は心血管病や末期腎不全、死亡の重大な危険因子であり、その対応は重要である。

メサンギウム増殖性腎炎(MsPGN)はCKDの主要原因の一つであり、レニン・アンジオテンシン系抑制薬や免疫抑制薬が治療薬として用いられているが、活動性の高い場合、治療抵抗性の症例も存在する。MsPGN患者では腎内のNF- $\kappa$ B炎症経路の活性化が指摘されており、その抑制が活動性腎炎の新たな治療手段となる可能性がある。

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 $\alpha$ 型(PPAR $\alpha$ )はリガンド依存性に転写調節を行う核内受容体の一つであり、脂質・糖質代謝調節、NF- $\kappa$ B経路の抑制による抗炎症作用など様々な生理活性をもつ。近年我々は、活性化メサンギウム細胞では細胞の形質転換が起きることによりPPAR $\alpha$ の発現が認められるようになること、PPAR $\alpha$ 作動薬が活性化メサンギウム細胞のNF- $\kappa$ B経路を抑制し抗炎症作用を発揮することを報告した。また、PPAR $\alpha$ 遺伝子の欠損により腎

除水に伴い右心系内圧の低下が報告されており、また心内圧の低下に伴う心筋の遅延伝導の増悪が観察されている。BUNの低下に関しては膠質浸透圧の変化により、細胞浮腫による機能障害が生じるとされている。また、透析はレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系を代表とした神経体液性因子を賦活化し、長期の曝露にて心筋を傷害させると報告されている。そうした要因が、P波加算平均心電図の増悪に関与したものと推定された。

今回の研究において、透析中のP波の遅延伝導の増悪が検出されており、透析という治療行為自体が催不整脈性を有するものと考えられた。また、透析強度に比例してP波加算平均心電図の変化は増大していることから、不整脈抑制における透析強度コントロールの重要性が示唆された。臨床上重要な知見であり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

炎が惹起されやすくなることも報告した。これらの知見から、PPAR $\alpha$ 作動薬によるPPAR $\alpha$ 活性化はMsPGNの治療に有益である可能性が考えられた。

ラット抗Thy1腎炎は、抗Thy1抗体がメサンギウム細胞表面の抗原に結合することにより高度の糸球体炎が惹起される、最も確立したMsPGN動物実験モデルである。過去の報告では抗Thy1腎炎発症の過程においても、ヒトMsPGNと同様にNF- $\kappa$ Bの活性化が起きることが報告されている。

本研究はPPAR $\alpha$ 作動薬であるクロフィブラートによるPPAR $\alpha$ 活性化が、NF- $\kappa$ B経路を抑制し抗Thy1腎炎の疾患活動性を軽減することができるか検証することを目的とした。

【材料及び方法】8週齢の雄Wistarラットを以下の3群に分け、5日間のクロフィブラート前投与の後にマウス抗Thy1モノクローナル抗体の単回投与により抗Thy1腎炎を誘導した。Fib(-)群：実験期間中普通食を投与(n=24)、0.02%Fib群：0.02%のクロフィブラート食を投与(n=12)、0.1%Fib群：0.1%クロフィブラート食を投与(n=24)

解析のため、day 0, 4, 7, 14にラットを屠殺、検体を採取し、腎機能評価、病理学的評価、糸球体内 PPAR $\alpha$  活性の評価、糸球体内 NF- $\kappa$ B 活性の評価を組織学的及び生化学的手法を用いて行った。

【結果】

- 抗 Thy1腎炎を惹起後、全ての群で尿蛋白の急速な増加を認めたが、Fib 群では用量依存的に尿蛋白が減少した。
- 抗 Thy1腎炎を惹起後、全ての群で高度な腎炎所見（メサンギウム増殖、メサンギウム融解、糸球体血管瘤形成、管外増殖）が認められたが、Fib 群では用量依存的に病理学的腎炎所見が抑制された。
- Fib（-）群では、抗Thy1腎炎惹起に伴い、PPAR $\alpha$  のPPRE 結合能低下および PPAR $\alpha$  標的遺伝子の発現低下を認めた。一方、Fib 群では、用量依的に PPAR $\alpha$  活性が強化され、抗 Thy1腎炎が惹起されても、PPAR $\alpha$  の PPRE 結合能・PPAR $\alpha$  標的遺伝子発現が保たれた。PPAR $\alpha$  作動薬は、腎炎進行過程における PPAR $\alpha$  の機能劣化を防いだと考えられた。
- Fib（-）群では、抗 Thy1腎炎が惹起されるに伴い、NF- $\kappa$ BのDNA結合能が亢進し、NF- $\kappa$ Bの標的遺伝子であるCOX2, TNF $\alpha$ , ICAM1のmRNA 発現が増加した。一方、Fib 群では、PPAR $\alpha$  活性化と同調し I $\kappa$ B $\alpha$  が誘導され NF- $\kappa$ B 経路が抑制された。

【結論】本研究は、MsPGN 動物モデルにおいて PPAR $\alpha$  作動薬が尿蛋白を減少させ腎炎の活動性病変を改善させることを示した。PPAR $\alpha$  作動薬は、腎炎進展の過程において生じる PPAR $\alpha$  の発現低下を防ぎ、糸球体内の PPAR $\alpha$  を活性化させた。

過去の報告では、PPAR $\alpha$  活性化は I $\kappa$ B $\alpha$  の発現を亢進させ NF- $\kappa$ B 経路を抑制する可能性が示されているが、抗 Thy1腎炎においても PPAR $\alpha$  の活性化が NF- $\kappa$ B 経路を抑制し糸球体内炎症を軽減する可能性が考えられた。この結果は PPAR $\alpha$  の活性化を介した MsPGN 治療の可能性を示唆している。

本研究では PPAR $\alpha$  活性化の知見の多いクロフィブラートをを用い腎への悪影響を生じることなく抗腎炎効果を示した。しかし、腎機能障害時にはフィブラート血中濃度上昇により尿細管毒性が起きる可能性が指摘されているため、フィブラート製剤を腎炎治療に应用するには適切な用量管理と注意深い経過観察が必要である。

将来的には、尿細管毒性がなく腎障害時でも使用可能な薬物動態の安定した PPAR $\alpha$  作動薬の開発が望まれる。

（論文審査の結果の要旨）

慢性腎臓病（CKD）は心血管病や末期腎不全の重大な危険因子であり、その対策が急務である。メサンギウム増殖性腎炎（MsPGN）はCKDの主要原因の一つであり、NF- $\kappa$ B 炎症経路の活性化が腎炎形成過程において重要であることが知られている。

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体  $\alpha$  型（PPAR $\alpha$ ）はリガンド依存性に転写調節を行う核内受容体の一つであり、脂質・糖質代謝調節、NF- $\kappa$ B 経路の抑制による抗炎症作用などの生理活性をもつ。近年、PPAR $\alpha$  作動薬がメサンギウム細胞の NF- $\kappa$ B 経路を抑制し抗炎症作用を発揮すること、また PPAR $\alpha$  遺伝子欠損により腎炎が惹起されやすくなることが報告されている。これらの知見から、PPAR $\alpha$  作動薬による PPAR $\alpha$  活性化は MsPGN 治療に有益である可能性が考えられた。

今回、橋本幸始らは、MsPGNのモデルであるラット抗 Thy1腎炎を用いて、代表的な PPAR $\alpha$  作動薬であるクロフィブラートが、PPAR $\alpha$  の活性化を通じて NF- $\kappa$ B 経路を抑制し抗 Thy1腎炎の疾患活動性を軽減しうるか検証した。

8週齢の雄 Wistar ラットをクロフィブラート非投与群（Fib（-））、0.02%クロフィブラート投与群（0.02% Fib）、0.1%クロフィブラート投与群（0.1% Fib）の3群に分け、5日間の前投与の後に抗 Thy1腎炎を誘導した。採取した尿や血液、腎組織を用いて解析を行った。

その結果、橋本幸始は次の結論を得た。

1. 抗 Thy1腎炎を惹起後、全ての群で尿蛋白の増加と病理学的活動性腎炎所見が認められたが、Fib 投与群では用量依的に尿蛋白が減少し病理学的腎炎活動性所見が抑制された。
2. 抗 Thy1腎炎惹起後、Fib（-）群では PPAR $\alpha$  発現量が低下し PPAR $\alpha$  の機能劣化が起きたが、Fib 投与群では、用量依的に PPAR $\alpha$  活性が亢進し、抗 Thy1腎炎惹起後も PPAR $\alpha$  機能が保たれた。PPAR $\alpha$  作動薬は、腎炎進行過程における PPAR $\alpha$  の機能劣化を防いだと考えられた。
3. Fib（-）群では、抗Thy1腎炎惹起に伴い、NF- $\kappa$ B 経路が著明に活性化したが、Fib 群では、PPAR $\alpha$  活性と同調し用量依的に I $\kappa$ B $\alpha$  が誘導

されNF- $\kappa$ B経路が抑制された。

本研究は、MsPGN動物モデルにおいて、PPAR $\alpha$ 作動薬が腎炎進展過程において生じるPPAR $\alpha$ の発現低下を防ぎNF- $\kappa$ B経路を抑制することで、腎炎の活動性病変を改善させることを示した。この結果から、PPAR $\alpha$ 活性化を介したMsPGN治療の可能

性が示唆された。本研究成果は、CKD患者における新たな治療法を模索する上で有用な情報を提示するものと思われた。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Postmortem findings in a patient with cerebral amyloid angiopathy actively treated with corticosteroid  
(積極的な副腎皮質ステロイド治療を行った脳アミロイドアンギオパチー患者の剖検所見)

町田 香津子

(論文の内容の要旨)

【背景】脳アミロイドアンギオパチー (Cerebral amyloid angiopathy; CAA) は脳血管へのアミロイド沈着症であり、高齢者やアルツハイマー型認知症患者でしばしば認められ、脳出血や白質脳症などの原因となる。CAAはアミロイド蛋白の種類とそれに対応する臨床病型により6つに分類される。A $\beta$ 型CAAは髄膜と皮質血管へのA $\beta$ アミロイドの沈着(A $\beta$ 1-40が主体)を特徴とする。CAA自体に対する治療は現在ないが、アルツハイマー型認知症に対するA $\beta$ ワクチン療法の臨床試験の報告では、脳実質のアミロイド沈着は除去されるが、血管壁に沈着しCAA及びCAA関連微小出血が増加することや、免疫を介するA $\beta$ アミロイドの血管壁からの除去がCAA血管の脆弱化や炎症をもたらし出血を誘発する可能性がある。一方、白質脳症の病像を呈するCAA関連血管炎では副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤が有効であったという報告が多数ある。今回、我々は白質脳症の臨床像を呈したCAA患者に、治療として積極的に副腎皮質ステロイドを投与し、生検と剖検での脳血管へのアミロイド沈着の変化について病理組織学および生化学的に検討をした。

【方法】対象は67歳時に左前頭葉皮質下出血の既往のある69歳の女性。亜急性に認知機能低下と右不全片麻痺を呈し、くも膜下出血と交通性水頭症のためV-Pシャント手術と脳生検が施行され、CAA関連血管炎と診断された患者。治療は副腎皮質ステロイドを投与し、1年間で漸減中止をした。脳出血の再発はなく、1.5年後に感染症からの敗血症で死亡し、剖検が施行された。生検と剖検でCAA病変の程度を光学顕微鏡および電子顕微鏡で病理組織学像を比較し、また、標本面積をコンピューターソフトを用い測定し、各種染色方法で染色されたアミロイド沈着血管をカウントし、

4段階のアミロイド沈着スコアに分類し、面積当たりのスコアを計算した(アミロイド沈着スコア0;なし, 1;少量, 2;中等量, 3;大量。生検標本面積7.60 mm<sup>2</sup>。剖検標本面積67.83 mm<sup>2</sup>)。さらに、剖検脳の髄膜血管からA $\beta$ アミロイドを分離・精製して、その蛋白量を蟻酸処理したLC/MS mass spectrometryで解析し、対照として、未治療のCAA関連脳出血の剖検84歳女性から分離したCAA含有髄膜組織とで比較をした。

【結果】生検では髄膜と皮質血管の全てにCongo red強陽性かつ偏光を呈するA $\beta$ アミロイド沈着(congophilic angiopathy)がみられ、血管周囲には炎症細胞浸潤もみられた。剖検脳では半球全体でごく少数の血管にcongophilic angiopathyが観察されたのみであったが、A $\beta$ 免疫反応性物質は多数の血管外膜に限局する形でみられ、血管周囲には炎症細胞はみられなかった。アミロイド沈着スコアでは、Congo red染色では生検時7.10/mm<sup>2</sup>→剖検時0.18/mm<sup>2</sup>、免疫染色では生検時9.47/mm<sup>2</sup>→剖検時2.76/mm<sup>2</sup>といずれも大きく減少した。

生化学的評価として、LC/MS mass spectrometryおよびimmunoblottingでは髄膜血管から抽出したA $\beta$ 関連蛋白は対照例では多量であったが、本患者では微量であった。

【考察】本患者において、副腎皮質ステロイド投与により脳血管アミロイドが退縮したと考えられ、作用機序としてA $\beta$ の産生抑制、排泄促進が推察される。本研究では、この副腎皮質ステロイドを一定期間少量持続的に使用することで脳血管A $\beta$ アミロイド沈着を寛解させる可能性が示唆された。しかし、脳血管A $\beta$ アミロイド沈着を減らす機序については免疫学的機序が推察されるが、確固たる機序は不明であり、解明にあたり更なる研究が必要と考えられた。



(論文審査の結果の要旨)

脳アミロイドアンギオパチー (Cerebral amyloid angiopathy ; CAA) は脳血管へのアミロイド沈着症であり、高齢者やアルツハイマー型認知症患者でしばしば認められ、脳出血や白質脳症などの原因となる。CAA 自体に対する治療は現在ない。白質脳症の病像を呈する CAA 関連血管炎では副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤が有効であったという報告が多数ある。今回、くも膜下出血および白質脳症の臨床像を呈した CAA 患者に、治療として副腎皮質ステロイドを積極的に投与し、生検と剖検で脳血管へのアミロイド沈着の変化について病理組織学および生化学的に検討をした。

対象は67歳時に左前頭葉皮質下出血の既往のある69歳の女性。亜急性に認知機能低下と右不全片麻痺を呈し、くも膜下出血と交通性水頭症のためV-Pシャント手術と脳生検が施行され、CAA 関連血管炎と診断された。治療は副腎皮質ステロイドを投与し、1年間で漸減中止をした。脳出血の再発はなかった。1.5年後に敗血症で死亡。生検と剖検でCAA 病変の程度を病理組織学的に比較検討した。また、各標本面積を測定し、各種染色方法で染色されたアミロイド沈着血管をカウントし、4段階のアミロイド沈着スコアに分類し、面積当たりのスコアを算出した。さらに、剖検脳の髄膜血管からAβアミロイドを分離・精製して、その蛋白量をLC/MS MSで解析し、対照として未治

療のCAA 関連脳出血の剖検84歳女性から分離したCAA 含有髄膜組織と比較した。

生検では髄膜と皮質血管の全てにCongo red強陽性かつ偏光を呈するAβアミロイド沈着 (congo-philic angiopathy) がみられ、血管周囲には炎症細胞浸潤もみられた。剖検脳では半球全体でごく少数の血管にcongo-philic angiopathyが観察されたのみであったが、Aβ免疫反応性物質は多数の血管外膜に局限する形でみられ、血管周囲には炎症細胞浸潤はみられなかった。アミロイド沈着スコアは、Congo red染色では生検時7.10→剖検時0.18/mm<sup>2</sup>、免疫染色では生検時9.47→剖検時2.76/mm<sup>2</sup>といずれも大きく減少した。生化学的評価として、LC/MS MSおよびimmunoblottingでは髄膜血管から抽出したAβ関連蛋白が対照例では多量であったが本患者では微量であった。本患者において、副腎皮質ステロイド投与により脳血管アミロイドが退縮したと考えられ、作用機序としてAβの産生抑制、排泄促進が推察される。本研究では、この副腎皮質ステロイドを一定期間少量持続的に使用することで脳血管Aβアミロイド沈着を寛解させる可能性が示唆された。しかし、脳血管Aβアミロイド沈着を減らす機序については免疫学的機序が推察されるが、明確な機序は不明であり、解明にあたり更なる研究が必要と考えられた。

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

Differential requirements for IRF-2 in generation of CD1d-independent T cells bearing NK cell receptors (NK レセプターを発現する CD1d 非依存性 T 細胞の発生に IRF-2は重要な役割を担っている)

野 竹 剛

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】NK レセプター (NKR) とは、特異的なリガンドと結合することによりNK細胞の機能および増殖を調節するシグナルを伝達する分子であり、NK1.1やNKG2D, Ly49などすでに多くのレセプターの存在が示されている。このように、NKR とはNK細胞の機能制御に重要な分子として発見されたものだが、NK細胞以外の細胞群においても発現していることが知られている。例えばT細胞の一部の集団においてもNKRの発現が認められており、特に、CD1d拘束性を有しT細胞受容体としてVα14Ja18 (ヒトではVα24) をもつinvariant NKT細胞 (iNKT細胞)

の機能、分化については近年盛んに研究が行われている。iNKT細胞以外にもNKRを発現するT細胞 (NKR<sup>+</sup>T細胞) は存在し、表現型としてCD44<sup>hi</sup>のメモリー型を有するものの中にNKRを同時に発現しているものが存在することがすでに報告されている。このようなNKR<sup>+</sup>T細胞はマウスのみならずヒトにおいても存在が確認されており、様々な疾患の病態に関与している可能性が示唆されている。しかしその発生機序や具体的な機能に関しては、詳細は明らかになっていない。本研究では、NKR<sup>+</sup>T細胞 (特にLy49<sup>+</sup>T細胞) の発生メカニズムを解明する事を目的とした。【方法】遺伝子改変マウスを用いて実験を行った。

CD1d 拘束性 iNKT 細胞を除外して検討するため、コントロールとして CD1d 欠損マウスを用いた。これを IRF-2 欠損マウスと掛け合わせて double mutant mice を作成し、CD1d 非依存性 NKR<sup>+</sup>T 細胞の発生における IRF-2 の必要性について検討を行った。これらマウスの脾臓や骨髄、肝臓からリンパ球を単離し、各種細胞表面マーカーで多重染色を行い、flow cytometry により T 細胞の表現型について解析を行った。また X 線照射キメラマウスを作成し、遺伝子改変の影響が T 細胞内因性のものか否かを検討した。さらに、IL-2 培養系を用いて、in vitro における NKR<sup>+</sup>T 細胞の発生メカニズムに関して解析を行った。

**【結果】** IRF-2 欠損マウスではコントロールに比べて、NK1.1, NKG2D や Ly49 といった NKR を発現する T 細胞集団が有意に減少していた。NKR の中でも、特に Ly49<sup>+</sup>T 細胞が最も強く影響を受けていた。T 細胞を IL-2 存在下で培養すると NKR<sup>+</sup>T 細胞が増加することが知られている。コントロールとは異なり、IRF-2 欠損マウスから採取したリンパ球を同様に培養すると、NK1.1 や Ly49 を発現する T 細胞は増加しなかったが、NKG2D を発現する T 細胞はコントロール同様に増加した。このことから、発現する NKR の種類によって、NKR<sup>+</sup>T 細胞の分化に対する IRF-2 の役割が異なることが示された。続いて、X 線キメラマウスを作成し、NKR<sup>+</sup>T 細胞の発生における IRF-2 の作用が T 細胞自体に直接働いているのか、または環境や他の細胞への作用が間接的に T 細胞に影響しているのかを検討した。コントロールに移植した IRF-2 欠損マウス由来の骨髄からは NKR<sup>+</sup>T 細胞は出現しなかった。さらに、コントロール由来と IRF-2 欠損マウス由来の骨髄を mix してコントロールマウスに移植し作成した混合キメラを用いた実験でも、IRF-2 欠損マウス由来の骨髄からは NKR<sup>+</sup>T 細胞は出現しなかった。このことから、IRF-2 は T 細胞に内因性に作用していることが示された。NKR<sup>+</sup>T 細胞はメモリー細胞としての表現型を示す T 細胞 (T<sub>MP</sub> 細胞) のサブセットの一つであることがすでに知られている。興味深いことに IRF-2 欠損マウスでは、T<sub>MP</sub> 細胞の中で NKR<sup>+</sup> のサブセットは著しく減少しているが、反対に NKR<sup>-</sup> のサブセットはコントロールに比べ T 細胞全体に対する割合だけでなく絶対数においても多い結果となった。IRF-2 は T<sub>MP</sub> 細胞が最終的に NKR<sup>+</sup> になるか NKR<sup>-</sup> に分化するかという運命の決定に、重要な役割を果たしていることが示された。

IRF-2 は I 型インターフェロン (IFN) 受容体からのシグナルを負に制御する分子である。つまり IRF-2 欠損マウスの細胞内では IFN 受容体からのシグナルが亢進している。NKR<sup>+</sup>T 細胞の減少と過剰な IFN 受容体シグナルの関連について検討した。IFN 受容体からのシグナルを排除するために、インターフェロン  $\alpha/\beta$  受容体  $\alpha$  鎖 (IFNAR1) 欠損マウスと IRF-2 欠損マウスを掛け合わせて double mutant mice (IRF-2<sup>-/-</sup>AR1<sup>-/-</sup>) を作成した。すると、IRF-2<sup>-/-</sup>AR1<sup>-/-</sup> でも IRF-2 単独欠損マウスと同様に (またはそれ以上に) NKR<sup>+</sup>T 細胞が減少していた。このことから、NKR<sup>+</sup>T 細胞の分化において、IRF-2 はインターフェロン受容体からのシグナル調節とは独立した経路で作用していることが示された。

**【結論】** 以上の結果から、転写因子 IRF-2 は、インターフェロン受容体からのシグナル調節とは独立した経路で、T 細胞に内因性に作用し、NK レセプターを発現する T 細胞、特に Ly49<sup>+</sup>T 細胞、の分化に重要な役割を果たしていることが示された。IRF-2 が制御している NKR<sup>+</sup>T 細胞が生体内で担っている機能や役割に関して詳細は未だ不明であり、今後のさらなる研究に期待がもたれる。

#### (論文審査の結果の要旨)

NK レセプター (NKR) とは、特異的なリガンドと結合することにより NK 細胞の機能および増殖を調節するシグナルを伝達する分子である。このように、NKR とは NK 細胞の機能制御に重要な分子として発見されたものだが、NK 細胞以外の細胞群においても発現していることが知られている。例えば T 細胞の一部の集団においても NKR の発現が認められており、特に CD1d 拘束性を有する invariant NKT 細胞 (iNKT 細胞) の機能、分化については近年盛んに研究が行われている。iNKT 細胞以外にも、NKR を発現する T 細胞 (NKR<sup>+</sup>T 細胞) が存在することがすでに報告されている。このような NKR<sup>+</sup>T 細胞はマウスのみならずヒトにおいても存在することが確認されており、様々な疾患の病態に関与している可能性が示唆されている。しかしその発生機序や具体的な機能に関して、詳細は明らかになっていない。本研究では、遺伝子改変マウスを用い、これらの脾臓や骨髄、肝臓からリンパ球を単離し、各種細胞表面マーカーで多重染色を行い、flow cytometry により T 細胞の表現型について解析を行った。CD1d 拘束性 iNKT 細胞を除外して検討するため、コントロールとして CD1d 欠

## 信州大学において審査された医学博士論文要旨

氏名 (所属講座)	学位授与 番号	授与年月日	博 士 論 文 名	学位審査委員	
				主 査	副 査
島田健太郎 (臓器発生 制御医学)	甲第923号	24. 3. 31	Hemodialysis-Induced P-Wave Signal-Averaged Electrocardiogram Alterations Are Indicative of Vulnerability to Atrial Arrhythmias (血液透析療法の催上室性不整脈性-P波加算平均心電図による検討)	山田充彦	西澤理 天野純
橋本幸始 (代謝制御学)	甲第924号	24. 3. 31	PPAR $\alpha$ activation protects against anti-Thy1 nephritis by suppressing glomerular NF- $\kappa$ B signaling (ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 $\alpha$ 型の活性化は、糸球体内のNF- $\kappa$ B経路を抑制することにより抗Thy1腎炎に対し保護効果を発揮する)	田中榮司	西澤理 菅野祐幸
町田香津子 (加齢生物学)	甲第925号	25. 3. 31	Postmortem findings in a patient with cerebral amyloid angiopathy actively treated with corticosteroid (積極的な副腎皮質ステロイド治療を行った脳アミロイドアンギオパチー患者の剖検所見)	樋口京一	天野直二 本郷一博
野竹剛 (外科学(1))	甲第926号	24. 3. 31	Differential requirements for IRF-2 in generation of CD1d-independent T cells bearing NK cell receptors (NKレセプターを発現するCD1d非依存性T細胞の発生にIRF-2は重要な役割を担っている)	奥山隆平	中山淳 駒津光久
江口尚 (衛生学公 衆衛生学)	甲第927号	25. 3. 31	The Effects of Workplace Occupational Mental Health and related Activities on Psychological Distress among Workers: A Multilevel Cross-sectional Analysis (職場のメンタルヘルス活動が労働者の心理的ストレスに与える影響について: マルチレベル分析を用いた横断研究)	福嶋義光	天野直二 浅村英樹
河村理恵 (遺伝医学・ 予防医学)	甲第928号	24. 3. 31	Visualization of the spatial positioning of the SNRPN, UBE3A, and GABRB3 genes in the normal human nucleus by three-color 3D-fluorescence in situ hybridization (3色3D-FISH法による正常人細胞核のSNRPN, UBE3A, GABRB3遺伝子の空間配置の解析)	中山淳	本田孝行 樋口京一
桂安萍 (外科学(1))	甲第929号	24. 9. 30	Impaired degradation followed by enhanced recycling of epidermal growth factor receptor caused by hypo-phosphorylation of tyrosine 1045 in RBE cells (胆管癌細胞RBEにおける, Y1045低リン酸化によるEGFRの再循環増強と分解抑制)	谷口俊一郎	鎌田徹 塩沢丹里

審査学位論文要旨

AL - KZAYER LIKA'A FASIH YAQOUB (小児医学)	甲第930号	25. 3.31	Genetic Evaluation of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Iraq Using FTA Cards (FTA カードを用いたイラク国内発症小児急性リンパ性白血病の遺伝子解析)	菅野 祐 幸	宇佐美真一 田中 榮 司
柴 崎 利 英 (分子薬理学)	甲第931号	24. 3.31	KGA-2727, a novel selective inhibitor of a high-affinity sodium glucose cotransporter (SGLT1), exhibits antidiabetic efficacy in rodent models (高親和性ナトリウム・グルコース共輸送体 (SGLT1) の選択的阻害薬である KGA-2727 は動物モデルにおいて抗糖尿病効果を示す)	駒 津 光 久	青山 俊 文 大 森 栄
木 下 久 慈 (精神医学)	甲第932号	25. 3.31	Not only body weight perception but also body mass index is relevant to suicidal ideation and self-harming behavior in Japanese adolescents (日本の青少年では, 体型への認知のみならず, BMI (body mass index) も希死念慮・自傷行為と関連する)	天 野 直 二	池 田 修 一 野見山 哲生
吉 沢 隆 浩 (循環病態学)	甲第933号	25. 3.31	Novel Regulation of Cardiac Metabolism and Homeostasis by the Adrenomedullin-Receptor Activity-Modifying Protein 2 System (心臓におけるアドレノメデュリン-RAMP2系による代謝及び恒常性維持の新規制御機構)	樋 口 京 一	中 山 淳 大 森 栄
吉 江 進 (組織発生学)	甲第934号	25. 3.31	Establishment of novel detection system for embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells based on nongenetic manipulation with indocyanine green (インドシアニングリーンを用いた胚性幹細胞由来肝細胞の新規検出システムの開発)	青 山 俊 文	田 中 榮 司 大 森 栄
小 山 晃 英 (循環病態学)	甲第935号	25. 3.31	Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis (血管内皮細胞における adrenomedullin-RAMP2 システムは血管統合性と組織恒常性維持に必須である)	樋 口 京 一	福 嶋 義 光 中 山 淳
武 井 真 大 (内科学(4))	甲第936号	24. 3.31	A new experimental model of ATP-sensitive K <sup>+</sup> channel - independent insulinotropic action of glucose : a permissive role of cAMP for triggering of insulin release from rat pancreatic $\beta$ -cells (グルコースによる ATP 感受性カリウムチャンネル非依存性インスリン分泌刺激作用の新規実験モデル: ラット膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌惹起における cAMP の寛容的役割)	山 田 充 彦	大 橋 俊 夫 佐々木 克典
茂 木 亜 希 海 (組織発生学)	甲第937号	24. 3.31	The method of mouse embryoid body establishment affects structure and developmental gene expression (マウス胚様体形成の方法はその構造と発生上の遺伝子発現に影響する)	山 田 充 彦	森 泉 哲 次 竹 下 敏 一
家 里 康 弘 (循環病態学)	甲第938号	25. 3.31	Adrenomedullin-RAMP2 system is crucially involved in retinal angiogenesis (アドレノメデュリン-RAMP2系の網膜血管新生における重要性)	樋 口 京 一	谷 口 俊 一 郎 菅 野 祐 幸

審査学位論文要旨

立石一成 (内科学(1))	甲第939号	24. 3.31	Clinical Outcomes in Elderly Patients Administered Gefitinib as First-line Treatment in Epidermal Growth Factor Receptor-mutated Non-small Cell Lung Cancer : Retrospective Analysis in a Nagano Lung Cancer Research Group Study (高齢者EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における一次治療としての Gefitinib 治療の臨床的解析:長野県肺癌研究グループにおける後方視的解析)	久保惠嗣	宮川真一 塩沢丹里
杉山大介 (麻醉蘇生学)	甲第940号	24. 3.31	<i>In vivo</i> patch-clamp recording from locus coeruleus neurones in the rat brainstem (ラット脳幹青斑核神経細胞からの <i>in vivo</i> パッチクランプ記録)	大橋俊夫	山田充彦 田渕克彦
君塚康一郎 (器官制御生理学)	甲第941号	25. 3.31	Sphingosine 1-phosphate (S1P) induces S1P2 receptor-dependent tonic contraction in murine iliac lymph vessels (S1P によるマウス腸管リンパ管における S1P2受容体を介した収縮反応の機能特性)	加藤博之	佐々木克典 田渕克彦
楊 磊 (循環病態学)	甲第942号	25. 3.31	Endogenous CGRP protects against neointimal hyperplasia following wire-induced vascular injury (内因性CGRPは, 血管傷害による新生内膜形成を抑制する)	樋口京一	谷口俊一郎 菅野祐幸
劉 茜 (神経可塑性学)	甲第943号	24. 3.31	Specific interaction of postsynaptic densities with membrane rafts isolated from synaptic plasma membranes (精製シナプス後肥厚部と膜ラフトの特異的相互作用)	田渕克彦	谷口俊一郎 樋口京一
篠山大明 (精神医学)	甲第944号	25. 3.31	Increased cerebrospinal fluid interleukin-6 levels in patients with schizophrenia and those with major depressive disorder (統合失調症患者および大うつ病性障害患者における髄液中インターロイキン-6濃度の上昇)	池田修一	駒津光久 鈴木龍雄
境澤香里 (皮膚科学)	甲第945号	25. 3.31	Mutation analysis of <i>BRAF</i> and <i>KIT</i> in circulating melanoma cells at the single cell level (血液循環メラノーマ細胞のシングルセルレベルでの <i>BRAF</i> と <i>KIT</i> の遺伝子解析)	谷口俊一郎	本田孝行 小泉知展
丸山雅史 (内科学(2))	甲第946号	24. 3.31	Periductal Induction of High Endothelial Venule-Like Vessels in Type 1 Autoimmune Pancreatitis (1型自己免疫性膵炎における高内皮細静脈様血管の出現に関する検討)	本田孝行	菅野祐幸 森泉哲次
大彌 歩 (分子病理学)	甲第947号	25. 3.31	Lymphocyte recruitment via high endothelial venules in lymphoid stroma of Warthin's tumour (ワルチン腫瘍のリンパ様間質における高内皮細静脈からのリンパ球ホーミング)	角谷真澄	宇佐美真一 栗田 浩
肖 鉄朋 (歯科口腔外科学)	甲第948号	25. 3.31	Vital staining with iodine solution in oral cancer : iodine infiltration, cell proliferation, and glucose transporter 1 (口腔がんにおけるヨード生体染色機序の解明:ヨードの浸透, 細胞増殖とグルコース トランスポーター1)	菅野祐幸	宇佐美真一 谷口俊一郎

審査学位論文要旨

氏名 (所属)	学位授与 番号	授与年月日	博士論文名	学位審査委員	
				主査	副査
赤羽貴行 (保健学専攻 医療生命 科学分野 医療生命 科学領域)	甲第1号	24. 3.20	A Case of Wound Dual Infection with <i>Pasteurella dagmatis</i> and <i>Pasteurella canis</i> Resulting from a Dog Bite —Limitations of Vitek-2 System in Exact Identification of <i>Pasteurella</i> Species—(イヌ咬傷から分離された <i>Pasteurella dagmatis</i> と <i>Pasteurella canis</i> 創部重複感染症の1例—Vitek-2システムによる <i>Pasteurella</i> 属の正確な同定の限界—)	奥村伸生	市川元基 川上由行
春日恵理子 (保健学専攻 医療生命 科学分野 医療生命 科学領域)	甲第2号	24. 3.20	Bactericidal activities of woven cotton and nonwoven polypropylene fabrics coated with hydroxyapatite-binding silver/titanium dioxide ceramic nanocomposite “Earth-plus” (アースプラス (酸化チタン, ハイドロキシアパタイト, 銀) 加工の施された綿織布とポリプロピレン不織布の医療関連感染起因性病原菌に対する殺菌活性)	奥村伸生	寺田 克 川上由行
久保田聖子 (保健学専攻 医療生命 科学分野 医療生命 科学領域)	甲第3号	24. 3.20	Pathophysiological Investigation of the Gastric Surface Mucous Gel Layer of Patients with <i>Helicobacter pylori</i> Infection by Using Immunoassays for Trefoil Factor Family 2 and Gastric Gland Mucous Cell-Type Mucin in Gastric Juice (胃液におけるTFF2と胃腺粘液細胞型ムチンのイムノアッセイを用いた <i>Helicobacter pylori</i> 感染患者の胃表層粘液ゲル層の病態生理学的研究)	奥村伸生	日高宏哉 太田浩良
青木幹昌 (保健学専攻 生涯保健 学分野成人保健学 領域)	甲第4号	25. 3.20	A descriptive study investigating the feasibility and selectivity of Current Perception Threshold in the objective assessment of post-operative sub-acute knee pain (手術後の亜急性膝痛の客観的な評価における電流知覚閾値の実現可能性と選択性を調査した記述的研究)	木村貞治	百瀬公人 ゴウアーチェン
中西康祐 (保健学専攻 生涯保健 学分野老年保健学 領域)	甲第5号	25. 3.20	Evaluating the quality of life of people with dementia in residential care facilities (施設に入所している認知症高齢者の生活の質の評価)	小林正義	上村智子 横川吉晴
務台均 (保健学専攻 生涯保健 学分野老年保健学 領域)	甲第6号	25. 3.20	Factors associated with functional recovery and home discharge in stroke patients admitted to a convalescent rehabilitation ward (回復期リハビリテーション病棟に入院した脳卒中患者における機能回復および在宅復帰に寄与する因子の検討)	上村智子	本郷 実 小林正義

Hemodialysis-induced P-wave Signal-averaged Electrocardiogram Alterations are Indicative of Vulnerability to Atrial Arrhythmias (血液透析療法の催上室性不整脈性—P波加算平均心電図による検討—)

島田 健太郎

(論文の内容の要旨)

【目的】発作性心房細動等の上室性不整脈は、血液透析中に高頻度に出現する。上室性不整脈は循環動態の変化を惹起し、しばしば血液透析の妨げとなりうる。また、心房細動自体が透析患者の予後不良を予測するとの報告もあり、透析中に生じる上室性不整脈の抑制は維持透析症例の管理における重要な主題である。上室性不整脈に対する受攻性の定量的且つ非侵襲的な評価方法として、P波加算平均心電図(P-SAECG)がある。P-SAECGの主な計測値としてP wave duration (PWD)とroot mean square voltages for the last 20ms of the P wave (RMS20)の2項目があり、PWDの延長とRMS20の短縮は将来的な心房細動の発症を予測するとされている。しかしながら、血液透析中のP-SAECG所見を調査した研究はこれまで成されていない。そのため今回我々は、血液透析の催不整脈性を電気生理学的に評価するため、透析の最中を含めて透析時のP-SAECGを計測し、その関連因子について検討した。

【方法】2008年6月から2009年7月にかけて、当院を含めた3つの関連病院において維持透析を施行している症例を対象とした。ただし、基本的に正常洞調律症例を対象とし、加えて急性冠症候群発症直後・周術期症例・重症感染症等の催不整脈要因を合併した症例は除外した。またnoise levelは $0.3\mu\text{V}$ 未満に設定した。登録された症例は全例で週2-3回の透析療法を行っていた。透析前後のそれぞれ30分を含むようにしてDigital Holter ECGを装着し、Synescope softwareを用いてDigital dataから透析前・中・後のP-SAECGを再構築した。P-SAECGについては最もnoise levelが低いものを採択した。並行して透析前・中・後の3相で血液検体を採取し、血液検査項目についても調査した。統計処理はJMP softwareを使用した。処理方法については、連続変数に対しては分散分析を、変数間の相関関係に対してはピアソンの相関分析及び重回帰分析を、それぞれ適用した。

【結果】57症例を登録した上で、基準に従い24症例を除外し、最終的に33人の維持透析患者(平均年齢

66.7±12.6歳、男性23人)を対象とした。透析前・中・後のPWDはそれぞれ $135.5\pm 14.2$ ,  $144.6\pm 15.9$ ,  $139.5\pm 14.1\text{ms}$ で、透析前と比較して透析中に有意に延長していた( $p<0.05$ )。またRMS20はそれぞれ $5.51\pm 3.87$ ,  $3.05\pm 1.87$ ,  $5.29\pm 5.17\mu\text{V}$ であり、透析前と比較して透析中は有意に短縮し( $p<0.05$ )、透析後は有意差が消失していた。これらの結果は、血液透析の開始に伴いP-SAECGの変化が生じると共に、血液透析の終了に伴いP-SAECGが回復することを示唆した。次いで、P-SAECGの変化と関連する因子を調べるために、透析中-透析前の変化量を $\Delta$ と定義した上で、 $\Delta\text{P-SAECG}$ と対象症例の固有因子・透析条件・生化学的検査所見の関係を検討した。具体的にはピアソンの相関分析で検討し相関因子を抽出した上で、重回帰分析を用いてより相関関係の強い因子を選択した。その結果、 $\Delta\text{PWD}$ は透析期間及び除水率と、 $\Delta\text{RMS20}$ は透析期間及び $\Delta\text{BUN}$ と、それぞれ有意な相関を認めた( $p<0.05$ )。これらのデータから、透析期間の長さや血液透析の強度による $\Delta\text{P-SAECG}$ への影響が示された。

【結論】今回の報告は、血液透析により劇的なP-SAECGの変化が生じることを示した初めての研究である。こうした変化は、透析中に上室性不整脈への受攻性が増大していることを示している。そして、血液透析中の上室性不整脈の抑制には透析条件の厳密なコントロールが重要と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

維持透析症例において、しばしば透析中に発作性不整脈が生じる。不整脈を評価する場合、Holter ECGで期外収縮を調べるのが一般的であるが、期外収縮は時間差・個人差が激しく、比較が困難という欠点がある。一方で定量的な評価方法として、心筋の遅延伝導を測定する加算平均心電図という手法がある。加算平均心電図はTotalの波長を示すPWDと、最後20ms部の面積を示すRMS20の2項目を評価する。PWDの延長や、RMS20の短縮は心房細動の発症を予測するとの報告がある。また、透析症例ではP波加算平均心電図の異常が生じやすく、また透析後にはPWDの

延長や RMS20の短縮が生じるとされている。しかしながら、P波加算平均心電図を透析中に応用した研究は成されていない。そのため、今回我々は透析中のP波加算平均心電図を測定し、増悪因子の検索を行った。

方法に関しては、研究の協力施設に於いて、維持透析中の連続33症例を登録した。計測機器を透析前後の30分を含め装着することで、透析前・透析中・透析後のP波加算平均心電図を測定した。また、症例の既往歴・採血データ・透析条件を調べ、関連因子を抽出した。

その結果、島田は次の結論を得た。

1. 透析中、PWDは有意に延長し、RMS20は有意に短縮した。それらの変化は透析終了後に回復する傾向を示した。
2. 透析中と透析前の数値の変化量を $\Delta$ と定義した場合、重回帰分析において、 $\Delta$ PWDは除水率・透析期間と、 $\Delta$ RMS20は $\Delta$ BUN・透析期間と、それぞれ有意な相関を示した。

PPAR $\alpha$  activation protects against anti-Thy1 nephritis by suppressing glomerular NF- $\kappa$ B signaling (ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 $\alpha$ 型の活性化は、糸球体内のNF- $\kappa$ B経路を抑制することにより抗Thy1腎炎に対し保護効果を発揮する)

## 橋本幸始

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】慢性腎臓病(CKD)は心血管病や末期腎不全、死亡の重大な危険因子であり、その対応は重要である。

メサンギウム増殖性腎炎(MsPGN)はCKDの主要原因の一つであり、レニン・アンジオテンシン系抑制薬や免疫抑制薬が治療薬として用いられているが、活動性の高い場合、治療抵抗性の症例も存在する。MsPGN患者では腎内のNF- $\kappa$ B炎症経路の活性化が指摘されており、その抑制が活動性腎炎の新たな治療手段となる可能性がある。

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 $\alpha$ 型(PPAR $\alpha$ )はリガンド依存性に転写調節を行う核内受容体の一つであり、脂質・糖質代謝調節、NF- $\kappa$ B経路の抑制による抗炎症作用など様々な生理活性をもつ。近年我々は、活性化メサンギウム細胞では細胞の形質転換が起きることによりPPAR $\alpha$ の発現が認められるようになること、PPAR $\alpha$ 作動薬が活性化メサンギウム細胞のNF- $\kappa$ B経路を抑制し抗炎症作用を発揮することを報告した。また、PPAR $\alpha$ 遺伝子の欠損により腎

除水に伴い右心系内圧の低下が報告されており、また心内圧の低下に伴う心筋の遅延伝導の増悪が観察されている。BUNの低下に関しては膠質浸透圧の変化により、細胞浮腫による機能障害が生じるとされている。また、透析はレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系を代表とした神経体液性因子を賦活化し、長期の曝露にて心筋を傷害させると報告されている。そうした要因が、P波加算平均心電図の増悪に関与したものと推定された。

今回の研究において、透析中のP波の遅延伝導の増悪が検出されており、透析という治療行為自体が不整脈性を有するものと考えられた。また、透析強度に比例してP波加算平均心電図の変化は増大していることから、不整脈抑制における透析強度コントロールの重要性が示唆された。臨床上重要な知見であり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

炎が惹起されやすくなることも報告した。これらの知見から、PPAR $\alpha$ 作動薬によるPPAR $\alpha$ 活性化はMsPGNの治療に有益である可能性が考えられた。

ラット抗Thy1腎炎は、抗Thy1抗体がメサンギウム細胞表面の抗原に結合することにより高度の糸球体炎が惹起される、最も確立したMsPGN動物実験モデルである。過去の報告では抗Thy1腎炎発症の過程においても、ヒトMsPGNと同様にNF- $\kappa$ Bの活性化が起きることが報告されている。

本研究はPPAR $\alpha$ 作動薬であるクロフィブラートによるPPAR $\alpha$ 活性化が、NF- $\kappa$ B経路を抑制し抗Thy1腎炎の疾患活動性を軽減することができるか検証することを目的とした。

【材料及び方法】8週齢の雄Wistarラットを以下の3群に分け、5日間のクロフィブラート前投与の後にマウス抗Thy1モノクローナル抗体の単回投与により抗Thy1腎炎を誘導した。Fib(-)群：実験期間中普通食を投与(n=24)、0.02%Fib群：0.02%のクロフィブラート食を投与(n=12)、0.1%Fib群：0.1%クロフィブラート食を投与(n=24)



解析のため、day 0, 4, 7, 14にラットを屠殺、検体を採取し、腎機能評価、病理学的評価、糸球体内 PPAR $\alpha$  活性の評価、糸球体内 NF- $\kappa$ B 活性の評価を組織学的及び生化学的手法を用いて行った。

【結果】

- 抗 Thy1腎炎を惹起後、全ての群で尿蛋白の急速な増加を認めたが、Fib 群では用量依存的に尿蛋白が減少した。
- 抗 Thy1腎炎を惹起後、全ての群で高度な腎炎所見（メサンギウム増殖、メサンギウム融解、糸球体血管瘤形成、管外増殖）が認められたが、Fib 群では用量依存的に病理学的腎炎所見が抑制された。
- Fib（-）群では、抗Thy1腎炎惹起に伴い、PPAR $\alpha$  のPPRE 結合能低下および PPAR $\alpha$  標的遺伝子の発現低下を認めた。一方、Fib 群では、用量依的に PPAR $\alpha$  活性が強化され、抗 Thy1腎炎が惹起されても、PPAR $\alpha$  の PPRE 結合能・PPAR $\alpha$  標的遺伝子発現が保たれた。PPAR $\alpha$  作動薬は、腎炎進行過程における PPAR $\alpha$  の機能劣化を防いだと考えられた。
- Fib（-）群では、抗 Thy1腎炎が惹起されるに伴い、NF- $\kappa$ BのDNA結合能が亢進し、NF- $\kappa$ Bの標的遺伝子であるCOX2, TNF $\alpha$ , ICAM1のmRNA 発現が増加した。一方、Fib 群では、PPAR $\alpha$  活性化と同調し I $\kappa$ B $\alpha$  が誘導され NF- $\kappa$ B 経路が抑制された。

【結論】本研究は、MsPGN 動物モデルにおいて PPAR $\alpha$  作動薬が尿蛋白を減少させ腎炎の活動性病変を改善させることを示した。PPAR $\alpha$  作動薬は、腎炎進展の過程において生じる PPAR $\alpha$  の発現低下を防ぎ、糸球体内の PPAR $\alpha$  を活性化させた。

過去の報告では、PPAR $\alpha$  活性化は I $\kappa$ B $\alpha$  の発現を亢進させ NF- $\kappa$ B 経路を抑制する可能性が示されているが、抗 Thy1腎炎においても PPAR $\alpha$  の活性化が NF- $\kappa$ B 経路を抑制し糸球体内炎症を軽減する可能性が考えられた。この結果は PPAR $\alpha$  の活性化を介した MsPGN 治療の可能性を示唆している。

本研究では PPAR $\alpha$  活性化の知見の多いクロフィブラートをを用い腎への悪影響を生じることなく抗腎炎効果を示した。しかし、腎機能障害時にはフィブラート血中濃度上昇により尿細管毒性が起きる可能性が指摘されているため、フィブラート製剤を腎炎治療に应用するには適切な用量管理と注意深い経過観察が必要である。

将来的には、尿細管毒性がなく腎障害時でも使用可能な薬物動態の安定した PPAR $\alpha$  作動薬の開発が望まれる。

（論文審査の結果の要旨）

慢性腎臓病（CKD）は心血管病や末期腎不全の重大な危険因子であり、その対策が急務である。メサンギウム増殖性腎炎（MsPGN）は CKD の主要原因の一つであり、NF- $\kappa$ B 炎症経路の活性化が腎炎形成過程において重要であることが知られている。

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体  $\alpha$  型（PPAR $\alpha$ ）はリガンド依存性に転写調節を行う核内受容体の一つであり、脂質・糖質代謝調節、NF- $\kappa$ B 経路の抑制による抗炎症作用などの生理活性をもつ。近年、PPAR $\alpha$  作動薬がメサンギウム細胞の NF- $\kappa$ B 経路を抑制し抗炎症作用を発揮すること、また PPAR $\alpha$  遺伝子欠損により腎炎が惹起されやすくなることが報告されている。これらの知見から、PPAR $\alpha$  作動薬による PPAR $\alpha$  活性化は MsPGN 治療に有益である可能性が考えられた。

今回、橋本幸始らは、MsPGN のモデルであるラット抗 Thy1腎炎を用いて、代表的な PPAR $\alpha$  作動薬であるクロフィブラートが、PPAR $\alpha$  の活性化を通じて NF- $\kappa$ B 経路を抑制し抗 Thy1腎炎の疾患活動性を軽減しうるか検証した。

8 週齢の雄 Wistar ラットをクロフィブラート非投与群（Fib（-））、0.02%クロフィブラート投与群（0.02% Fib）、0.1%クロフィブラート投与群（0.1% Fib）の 3 群に分け、5 日間の前投与の後に抗 Thy1腎炎を誘導した。採取した尿や血液、腎組織を用いて解析を行った。

その結果、橋本幸始は次の結論を得た。

1. 抗 Thy1腎炎を惹起後、全ての群で尿蛋白の増加と病理学的活動性腎炎所見が認められたが、Fib 投与群では用量依的に尿蛋白が減少し病理学的腎炎活動性所見が抑制された。
2. 抗 Thy1腎炎惹起後、Fib（-）群では PPAR $\alpha$  発現量が低下し PPAR $\alpha$  の機能劣化が起きたが、Fib 投与群では、用量依的に PPAR $\alpha$  活性が亢進し、抗 Thy1腎炎惹起後も PPAR $\alpha$  機能が保たれた。PPAR $\alpha$  作動薬は、腎炎進行過程における PPAR $\alpha$  の機能劣化を防いだと考えられた。
3. Fib（-）群では、抗Thy1腎炎惹起に伴い、NF- $\kappa$ B 経路が著明に活性化したが、Fib 群では、PPAR $\alpha$  活性と同調し用量依的に I $\kappa$ B $\alpha$  が誘導

され NF- $\kappa$ B 経路が抑制された。

本研究は、MsPGN 動物モデルにおいて、PPAR $\alpha$  作動薬が腎炎進展過程において生じる PPAR $\alpha$  の発現低下を防ぎ NF- $\kappa$ B 経路を抑制することで、腎炎の活動性病変を改善させることを示した。この結果から、PPAR $\alpha$  活性化を介した MsPGN 治療の可能

性が示唆された。本研究成果は、CKD 患者における新たな治療法を模索する上で有用な情報を提示するものと思われた。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Postmortem findings in a patient with cerebral amyloid angiopathy actively treated with corticosteroid (積極的な副腎皮質ステロイド治療を行った脳アミロイドアンギオパチー患者の剖検所見)

町 田 香津子

### (論文の内容の要旨)

【背景】脳アミロイドアンギオパチー (Cerebral amyloid angiopathy; CAA) は脳血管へのアミロイド沈着症であり、高齢者やアルツハイマー型認知症患者でしばしば認められ、脳出血や白質脳症などの原因となる。CAA はアミロイド蛋白の種類とそれに対応する臨床病型により 6 つに分類される。A $\beta$  型 CAA は髄膜と皮質血管への A $\beta$  アミロイドの沈着 (A $\beta$ 1-40 が主体) を特徴とする。CAA 自体に対する治療は現在ないが、アルツハイマー型認知症に対する A $\beta$  ワクチン療法の臨床試験の報告では、脳実質のアミロイド沈着は除去されるが、血管壁に沈着し CAA 及び CAA 関連微小出血が増加することや、免疫を介する A $\beta$  アミロイドの血管壁からの除去が CAA 血管の脆弱化や炎症をもたらす出血を誘発する可能性がある。一方、白質脳症の病像を呈する CAA 関連血管炎では副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤が有効であったという報告が多数ある。今回、我々は白質脳症の臨床像を呈した CAA 患者に、治療として積極的に副腎皮質ステロイドを投与し、生検と剖検での脳血管へのアミロイド沈着の変化について病理組織学および生化学的に検討をした。

【方法】対象は 67 歳時に左前頭葉皮質下出血の既往のある 69 歳の女性。亜急性に認知機能低下と右不全片麻痺を呈し、くも膜下出血と交通性水頭症のため V-P シャント手術と脳生検が施行され、CAA 関連血管炎と診断された患者。治療は副腎皮質ステロイドを投与し、1 年間で漸減中止をした。脳出血の再発はなく、1.5 年後に感染症からの敗血症で死亡し、剖検が施行された。生検と剖検で CAA 病変の程度を光学顕微鏡および電子顕微鏡で病理組織学像を比較し、また、標本面積をコンピューターソフトを用い測定し、各種染色方法で染色されたアミロイド沈着血管をカウントし、

4 段階のアミロイド沈着スコアに分類し、面積当たりのスコアを計算した (アミロイド沈着スコア 0 ; なし, 1 ; 少量, 2 ; 中等量, 3 ; 大量。生検標本面積 7.60 mm<sup>2</sup>。剖検標本面積 67.83 mm<sup>2</sup>)。さらに、剖検脳の髄膜血管から A $\beta$  アミロイドを分離・精製して、その蛋白量を蟻酸処理した LC/MS mass spectrometry で解析し、対照として、未治療の CAA 関連脳出血の剖検 84 歳女性から分離した CAA 含有髄膜組織とで比較をした。

【結果】生検では髄膜と皮質血管の全てに Congo red 強陽性かつ偏光を呈する A $\beta$  アミロイド沈着 (congo-philic angiopathy) がみられ、血管周囲には炎症細胞浸潤もみられた。剖検脳では半球全体でごく少数の血管に congophilic angiopathy が観察されたのみであったが、A $\beta$  免疫反応性物質は多数の血管外膜に限局する形でみられ、血管周囲には炎症細胞はみられなかった。アミロイド沈着スコアでは、Congo red 染色では生検時 7.10/mm<sup>2</sup> → 剖検時 0.18/mm<sup>2</sup>、免疫染色では生検時 9.47/mm<sup>2</sup> → 剖検時 2.76/mm<sup>2</sup> といずれも大きく減少した。

生化学的評価として、LC/MS mass spectrometry および immunoblotting では髄膜血管から抽出した A $\beta$  関連蛋白は対照例では多量であったが、本患者では微量であった。

【考察】本患者において、副腎皮質ステロイド投与により脳血管アミロイドが退縮したと考えられ、作用機序として A $\beta$  の産生抑制、排泄促進が推察される。本研究では、この副腎皮質ステロイドを一定期間少量持続的に使用することで脳血管 A $\beta$  アミロイド沈着を寛解させる可能性が示唆された。しかし、脳血管 A $\beta$  アミロイド沈着を減らす機序については免疫学的機序が推察されるが、確固たる機序は不明であり、解明にあたり更なる研究が必要と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

脳アミロイドアンギオパチー (Cerebral amyloid angiopathy ; CAA) は脳血管へのアミロイド沈着症であり、高齢者やアルツハイマー型認知症患者でしばしば認められ、脳出血や白質脳症などの原因となる。CAA 自体に対する治療は現在ない。白質脳症の病像を呈する CAA 関連血管炎では副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤が有効であったという報告が多数ある。今回、くも膜下出血および白質脳症の臨床像を呈した CAA 患者に、治療として副腎皮質ステロイドを積極的に投与し、生検と剖検で脳血管へのアミロイド沈着の変化について病理組織学および生化学的に検討をした。

対象は67歳時に左前頭葉皮質下出血の既往のある69歳の女性。亜急性に認知機能低下と右不全片麻痺を呈し、くも膜下出血と交通性水頭症のためV-Pシャント手術と脳生検が施行され、CAA 関連血管炎と診断された。治療は副腎皮質ステロイドを投与し、1年間で漸減中止をした。脳出血の再発はなかった。1.5年後に敗血症で死亡。生検と剖検でCAA 病変の程度を病理組織学的に比較検討した。また、各標本面積を測定し、各種染色方法で染色されたアミロイド沈着血管をカウントし、4段階のアミロイド沈着スコアに分類し、面積当たりのスコアを算出した。さらに、剖検脳の髄膜血管からA $\beta$ アミロイドを分離・精製して、その蛋白量をLC/MS MSで解析し、対照として未治

療のCAA 関連脳出血の剖検84歳女性から分離したCAA 含有髄膜組織と比較した。

生検では髄膜と皮質血管の全てにCongo red強陽性かつ偏光を呈するA $\beta$ アミロイド沈着 (congo-philic angiopathy) がみられ、血管周囲には炎症細胞浸潤もみられた。剖検脳では半球全体でごく少数の血管にcongo-philic angiopathyが観察されたのみであったが、A $\beta$ 免疫反応性物質は多数の血管外膜に局限する形でみられ、血管周囲には炎症細胞浸潤はみられなかった。アミロイド沈着スコアは、Congo red染色では生検時7.10→剖検時0.18/mm<sup>2</sup>、免疫染色では生検時9.47→剖検時2.76/mm<sup>2</sup>といずれも大きく減少した。生化学的評価として、LC/MS MSおよびimmunoblottingでは髄膜血管から抽出したA $\beta$ 関連蛋白が対照例では多量であったが本患者では微量であった。本患者において、副腎皮質ステロイド投与により脳血管アミロイドが退縮したと考えられ、作用機序としてA $\beta$ の産生抑制、排泄促進が推察される。本研究では、この副腎皮質ステロイドを一定期間少量持続的に使用することで脳血管A $\beta$ アミロイド沈着を寛解させる可能性が示唆された。しかし、脳血管A $\beta$ アミロイド沈着を減らす機序については免疫学的機序が推察されるが、明確な機序は不明であり、解明にあたり更なる研究が必要と考えられた。

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

Differential requirements for IRF-2 in generation of CD1d-independent T cells bearing NK cell receptors (NK レセプターを発現する CD1d 非依存性 T 細胞の発生に IRF-2 は重要な役割を担っている)

野 竹 剛

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】NK レセプター (NKR) とは、特異的なリガンドと結合することによりNK細胞の機能および増殖を調節するシグナルを伝達する分子であり、NK1.1やNKG2D, Ly49などすでに多くのレセプターの存在が示されている。このように、NKR とはNK細胞の機能制御に重要な分子として発見されたものだが、NK細胞以外の細胞群においても発現していることが知られている。例えばT細胞の一部の集団においてもNKRの発現が認められており、特に、CD1d拘束性を有しT細胞受容体としてV $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 (ヒトではV $\alpha$ 24) をもつinvariant NKT細胞 (iNKT細胞)

の機能、分化については近年盛んに研究が行われている。iNKT細胞以外にもNKRを発現するT細胞 (NKR<sup>+</sup>T細胞) は存在し、表現型としてCD44<sup>hi</sup>のメモリー型を有するものの中にNKRを同時に発現しているものが存在することがすでに報告されている。このようなNKR<sup>+</sup>T細胞はマウスのみならずヒトにおいても存在が確認されており、様々な疾患の病態に関与している可能性が示唆されている。しかしその発生機序や具体的な機能に関しては、詳細は明らかになっていない。本研究では、NKR<sup>+</sup>T細胞 (特にLy49<sup>+</sup>T細胞) の発生メカニズムを解明する事を目的とした。【方法】遺伝子改変マウスを用いて実験を行った。

CD1d 拘束性 iNKT 細胞を除外して検討するため、コントロールとして CD1d 欠損マウスを用いた。これを IRF-2 欠損マウスと掛け合わせて double mutant mice を作成し、CD1d 非依存性 NKR<sup>+</sup>T 細胞の発生における IRF-2 の必要性について検討を行った。これらマウスの脾臓や骨髄、肝臓からリンパ球を単離し、各種細胞表面マーカーで多重染色を行い、flow cytometry により T 細胞の表現型について解析を行った。また X 線照射キメラマウスを作成し、遺伝子改変の影響が T 細胞内因性のものか否かを検討した。さらに、IL-2 培養系を用いて、in vitro における NKR<sup>+</sup>T 細胞の発生メカニズムについても解析を行った。

**【結果】** IRF-2 欠損マウスではコントロールに比べて、NK1.1, NKG2D や Ly49 といった NKR を発現する T 細胞集団が有意に減少していた。NKR の中でも、特に Ly49<sup>+</sup>T 細胞が最も強く影響を受けていた。T 細胞を IL-2 存在下で培養すると NKR<sup>+</sup>T 細胞が増加することが知られている。コントロールとは異なり、IRF-2 欠損マウスから採取したリンパ球を同様に培養すると、NK1.1 や Ly49 を発現する T 細胞は増加しなかったが、NKG2D を発現する T 細胞はコントロール同様に増加した。このことから、発現する NKR の種類によって、NKR<sup>+</sup>T 細胞の分化に対する IRF-2 の役割が異なることが示された。続いて、X 線キメラマウスを作成し、NKR<sup>+</sup>T 細胞の発生における IRF-2 の作用が T 細胞自体に直接働いているのか、または環境や他の細胞への作用が間接的に T 細胞に影響しているのかを検討した。コントロールに移植した IRF-2 欠損マウス由来の骨髄からは NKR<sup>+</sup>T 細胞は出現しなかった。さらに、コントロール由来と IRF-2 欠損マウス由来の骨髄を mix してコントロールマウスに移植し作成した混合キメラを用いた実験でも、IRF-2 欠損マウス由来の骨髄からは NKR<sup>+</sup>T 細胞は出現しなかった。このことから、IRF-2 は T 細胞に内因性に作用していることが示された。NKR<sup>+</sup>T 細胞はメモリー細胞としての表現型を示す T 細胞 (T<sub>MP</sub> 細胞) のサブセットの一つであることがすでに知られている。興味深いことに IRF-2 欠損マウスでは、T<sub>MP</sub> 細胞の中で NKR<sup>+</sup> のサブセットは著しく減少しているが、反対に NKR<sup>-</sup> のサブセットはコントロールに比べ T 細胞全体に対する割合だけでなく絶対数においても多い結果となった。IRF-2 は T<sub>MP</sub> 細胞が最終的に NKR<sup>+</sup> になるか NKR<sup>-</sup> に分化するかという運命の決定に、重要な役割を果たしていることが示された。

IRF-2 は I 型インターフェロン (IFN) 受容体からのシグナルを負に制御する分子である。つまり IRF-2 欠損マウスの細胞内では IFN 受容体からのシグナルが亢進している。NKR<sup>+</sup>T 細胞の減少と過剰な IFN 受容体シグナルの関連について検討した。IFN 受容体からのシグナルを排除するために、インターフェロン  $\alpha/\beta$  受容体  $\alpha$  鎖 (IFNAR1) 欠損マウスと IRF-2 欠損マウスを掛け合わせて double mutant mice (IRF-2<sup>-/-</sup>AR1<sup>-/-</sup>) を作成した。すると、IRF-2<sup>-/-</sup>AR1<sup>-/-</sup> でも IRF-2 単独欠損マウスと同様に (またはそれ以上に) NKR<sup>+</sup>T 細胞が減少していた。このことから、NKR<sup>+</sup>T 細胞の分化において、IRF-2 はインターフェロン受容体からのシグナル調節とは独立した経路で作用していることが示された。

**【結論】** 以上の結果から、転写因子 IRF-2 は、インターフェロン受容体からのシグナル調節とは独立した経路で、T 細胞に内因性に作用し、NK レセプターを発現する T 細胞、特に Ly49<sup>+</sup>T 細胞、の分化に重要な役割を果たしていることが示された。IRF-2 が制御している NKR<sup>+</sup>T 細胞が生体内で担っている機能や役割に関して詳細は未だ不明であり、今後のさらなる研究に期待がもたれる。

#### (論文審査の結果の要旨)

NK レセプター (NKR) とは、特異的なリガンドと結合することにより NK 細胞の機能および増殖を調節するシグナルを伝達する分子である。このように、NKR とは NK 細胞の機能制御に重要な分子として発見されたものだが、NK 細胞以外の細胞群においても発現していることが知られている。例えば T 細胞の一部の集団においても NKR の発現が認められており、特に CD1d 拘束性を有する invariant NKT 細胞 (iNKT 細胞) の機能、分化については近年盛んに研究が行われている。iNKT 細胞以外にも、NKR を発現する T 細胞 (NKR<sup>+</sup>T 細胞) が存在することがすでに報告されている。このような NKR<sup>+</sup>T 細胞はマウスのみならずヒトにおいても存在することが確認されており、様々な疾患の病態に関与している可能性が示唆されている。しかしその発生機序や具体的な機能に関して、詳細は明らかになっていない。本研究では、遺伝子改変マウスを用い、これらの脾臓や骨髄、肝臓からリンパ球を単離し、各種細胞表面マーカーで多重染色を行い、flow cytometry により T 細胞の表現型について解析を行った。CD1d 拘束性 iNKT 細胞を除外して検討するため、コントロールとして CD1d 欠

損マウスを用いた。これを IRF-2 欠損マウスと掛け合わせて double mutant mice を作成し、CD1d 非依存性 NKR<sup>+</sup>T 細胞の発生における IRF-2 の必要性について検討を行った。また X 線照射キメラマウスを作成し、遺伝子改変の影響が T 細胞内因性的なものか否かを検討した。さらに、IL-2 培養系を用いて、in vitro における NKR<sup>+</sup>T 細胞の発生メカニズムについても解析を行った。

その結果、野竹剛は今回の実験で次の結果を得た。

1. IRF-2 欠損マウスではコントロールに比べて、NK1.1, NKG2D や Ly49 といった NKR を発現する T 細胞集団が有意に減少していた。NKR の中でも、特に Ly49<sup>+</sup>T 細胞が最も強く影響を受けていた。
2. IRF-2 欠損マウスから採取したリンパ球を同様に培養すると、NK1.1 や Ly49 を発現する T 細胞は増加しなかったが、NKG2D を発現する T 細胞はコントロールと同様に増加した。
3. X 線照射キメラマウスの解析で、コントロールマウスに移植した IRF-2 欠損マウス由来の骨髄からは NKR<sup>+</sup>T 細胞は出現しなかった。さらに混合キメラを用いた実験でも、IRF-2 欠損マウス由来の骨

髄からは NKR<sup>+</sup>T 細胞は出現しなかった。

4. IRF-2 欠損マウスでは、メモリー細胞としての表現型を示す T 細胞の内 NKR<sup>+</sup> のサブセットは著しく減少しているが、反対に NKR<sup>-</sup> のサブセットはコントロールマウスに比べ T 細胞全体に対する割合だけでなく絶対数においても多かった。
5. インターフェロン  $\alpha/\beta$  受容体  $\alpha$  鎖 (IFNAR1) と IRF-2 をともに欠損した double mutant mice (IRF-2<sup>-/-</sup>AR1<sup>-/-</sup>) を用いた解析で、IRF-2<sup>-/-</sup>AR1<sup>-/-</sup> でも IRF-2 単独欠損マウスと同様に (またはそれ以上に) NKR<sup>+</sup>T 細胞が減少していた。

以上の結果から、転写因子 IRF-2 は、インターフェロン受容体からのシグナル調節とは独立した経路で、T 細胞に内因的に作用し、NK レセプターを発現する T 細胞、特に Ly49<sup>+</sup>T 細胞の分化に重要な役割を果たしているという結論を得た。本論文は、これまでまったく不明であった NKR<sup>+</sup>T 細胞の発生・分化に関する遺伝子制御を初めて明らかにし、NKR<sup>+</sup>T 細胞が生体内で担っている生理機能解明の研究へ応用される可能性を有するものであり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## The effects of Workplace Occupational Mental Health and related Activities on Psychological Distress among Workers : A Multilevel Cross-sectional Analysis (職場のメンタルヘルス活動が労働者の心理的ストレスに与える影響について：マルチレベル分析を用いた横断研究)

### 江 口 尚

#### (論文の内容の要旨)

【背景】これまでの研究では、管理職に対するメンタルヘルス教育などの一次予防、質問票によるうつ病のスクリーニングなどの二次予防、復職支援などの三次予防は、企業におけるメンタルヘルス対策として、労働者の心理的ストレス反応を軽減することに効果があることが確認されている。我が国においても、他の先進諸国と同様に、産業保健において労働者のメンタルヘルスへの関心が高まっている。しかし、多くの研究は、大企業で行われており、我が国の労働人口の 80% をしめる中小企業を対象にしたメンタルヘルス対策の有効性について調査した研究は少ない。従来の重回帰分析は、標本間の独立を仮定しているのに対して、マルチレベル分析は、組織から得られた標本は、この独立性が成立しないと仮定している。そのため、従来の重回帰分析よりも、マルチレベル分析は、より現実に近い形にモデル化した分析手法である。そのため、近年、

集団における個人の行動を検討するには、個人レベル変数と集団レベル変数の両方を考慮するマルチレベル分析を行うことが求められており、公衆衛生学分野でも重要な手法として注目されている。このマルチレベル分析を用いて、事業所レベルの要因と、従業員レベルの要因の関係について調査したメンタルヘルス研究は少ない。そこで、本研究では、中小企業を対象にして、マルチレベル分析を用いて、以下の仮説の検証を行った。

仮説①事業所レベルで実施しているメンタルヘルス対策が、従業員の心理的ストレス反応を直接軽減する。

仮説②事業所レベルで実施しているメンタルヘルス対策が、心理社会的要因と心理的ストレス反応の関係性を弱める。

【方法】対象は、諏訪労働基準協会に加盟する長野県岡谷市内の 357 事業所とその従業員を対象とし、事業

所調査と従業員調査の2段階の調査を行った。事業所調査は、257事業所（回収率72.0%）から回答を得た。事業所調査に協力をいただいた事業所のうち、121事業所から従業員調査への同意を得た。従業員調査は、4,786人に質問票を配布し、3,540人（回収率74.0%）から回答を得た。マルチレベル分析を行う上で、データの信頼性をより高めるために、回答者が20名未満の事業所は解析対象から外し、最終的に32事業所、2,123名を解析対象とした。従業員の心理的ストレス反応と心理社会的要因の測定には、職業性ストレス簡易調査票を用いた。従業員の属性は、性別と年齢を用いた。事業所のメンタルヘルス対策については、事業所の安全衛生担当者に対して、「あなたの事業所では、現在、何らかのメンタルヘルス対策が行われていますか」「あなたの事業所ではメンタルヘルスに関する情報を手に入れることができますか」「あなたの事業所ではコミュニケーションを促進するために、何か取り組みを行っていますか」について質問を行った。事業所属性として規模と業種を用いた。解析方法は、事業所レベルと従業員レベルによるマルチレベル分析を用いた。

**【結果】**事業所レベルでのコミュニケーションの促進は、従業員レベルの心理社会的要因を調整した上で、従業員レベルの心理的ストレス反応と有意に負の相関があった ( $p < 0.01$ )。また、事業所レベルでのメンタルヘルス対策の実施は、従業員レベルの心理社会的要因を調整した上で、従業員レベルの心理的ストレス反応と負の関連性を認める傾向にあった ( $p = 0.06$ )。事業所レベルでのメンタルヘルスに関する情報の入手については、有意な相関を認めなかった ( $p = 0.72$ )。以上から、仮説①は支持された。しかし、今回の調査では、仮説②については、支持されなかった。

**【考察】**本研究では、仮説①については支持された。事業所レベルのコミュニケーションの促進が、従業員レベルの心理的ストレスと負の相関を認めたことは、職場内のコミュニケーションを改善することが、仕事上のストレスを軽減するという先行研究と一致した。事業所レベルのメンタルヘルス対策が、仕事上のストレスを軽減するという先行研究があるにも関わらず、本研究で、明らかな有意差を認めなかった。その理由としては、メンタルヘルス対策の中に、管理職教育、健康診断時のストレスチェック、カウンセリングルームの設置、メンタルヘルスに関するパンフレットの配布、従業員教育、が含まれ、曖昧な概念となっていた

ことが原因としては考えられた。今後、概念をより明確にした上で、事業所レベルのメンタルヘルス対策と、従業員レベルの心理的ストレスの関係について、調査を行う必要があると考えられた。本研究では、仮説②については支持されなかった。このことは、事業所レベルの集団効力感や職場のサポートの緩衝作用や劣化作用と、従業員レベルの心理的ストレスの間に関連を認めている先行研究とは一致しなかった。これらの結果から、事業所レベルのメンタルヘルス対策は、間接的と言うよりも、より直接的に、従業員レベルの心理的ストレスと関連していることが示唆された。

**【結論】**事業所レベルのコミュニケーションの促進は、従業員レベルの心理的ストレス反応を軽減した。さらに、事業所レベルのメンタルヘルス対策は、従業員レベルの心理的ストレス反応を軽減する可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

本研究では、事業所レベルで実施されているメンタルヘルス活動が、その事業所で働く労働者レベルの心理的ストレス反応に与える影響について検討を行った。本研究の目的は、個人を取り巻くグループや部署、事業所といった集団レベルのメンタルヘルス活動や事業所規模等の要因が、個人レベルの健康状態（アウトカム）と関連するかを明らかにすることである。そのために、性、年齢といった個人レベルの要因のアウトカムとの関連も調整する必要があることから、集団レベルと個人レベルの2つの要因レベルを2層（マルチレベル）に分けて、アウトカムとの関連を分析する手法である「マルチレベル分析」を用いた調査計画を立案した。また、マルチレベル分析を行うためには、集団レベルにおいて十分なばらつき（バリエーション）が必要となる。そのため、本研究では、岡谷市全域の事業所を調査対象とすることで、マルチレベル分析を行うことができる十分なばらつきを得られる調査モデルとなるよう計画した。

本研究では、岡谷市内の中小事業所を対象に、個人レベルで労働者に対する質問票調査を行い、心理的ストレス反応、職業性ストレス要因といったアウトカムとそれに関連する可能性のある労働者の要因を調べ、また、集団レベルで事業所別にアウトカムに関連すると考えられる事業所のメンタルヘルス活動の実態（「コミュニケーションの促進」、「メンタルヘルス対策の実施」、「メンタルヘルスに関する情報の入手」）に関して質問票調査で調べた。

事業所レベルで実施されているメンタルヘルス活動が、労働者レベルの心理的ストレス反応を軽減する(仮説1)、労働者レベルの職業性ストレス要因を緩和させる(仮説2)、か否かについて、マルチレベル分析を用いて検証した。

その結果、江口は次の結論を得た。

1. 仮説1 事業所レベルの「コミュニケーションの促進」は、労働者レベルの心理的ストレス反応と有意に負の相関があった ( $p < 0.01$ )。また、事業所レベルの「メンタルヘルス対策の実施」は、労働者レベルの心理的ストレス反応と負の関連性を認める傾向にあった ( $p = 0.06$ )。
  2. 仮説2 関連を認めなかった ( $p > 0.10$ )。
- 上記の結果より、事業所レベルでコミュニケーション

ンを促進することは、労働者レベルの心理的ストレス反応を軽減することが示唆された。また、事業所レベルでメンタルヘルス対策を実施することは、労働者レベルの心理的ストレス反応を軽減する可能性が示唆された。

本論文のように、ある地域を広くとり、更に中小事業所を対象とし、マルチレベル分析を試みた研究は少ない。そのため、本論文の結果は、限られた対象に実施していた従来のメンタルヘルス活動に関する研究と比べて、より一般化することができる結果を得ることができたと考えられる。

この内容に対して、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。

Visualization of the spatial positioning of the *SNRPN*, *UBE3A*, and *GABRB3* genes in the normal human nucleus by three-color 3D-fluorescence *in situ* hybridization (3色3D-FISH法による正常人細胞核の *SNRPN*, *UBE3A*, *GABRB3* 遺伝子の空間配置の解析)

河村 理 恵

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、核内ゲノムの空間配置は遺伝子発現状態と関連し、細胞機能に重要な役割を持つと考えられるようになってきた (Egecioglu D et al. (2011) *Curr Opin Cell Biol* 23: 338-345)。しかし、クロマチンレベルでの遺伝子空間配置と遺伝子発現制御との関係についての詳細はまだ明らかにされておらず、その詳細を調べる方法として、3D-fluorescence *in situ* hybridization (3D-FISH) 法を用いた single cell レベルでの個々のアレルごとの遺伝子空間配置の解析が考慮される。

本研究では、「発現パターンが親由来アレルで異なるインプリンティング領域の空間配置は、アレル間で異なる」という、ゲノム配置とゲノム機能に関連する仮説の検証を目的として解析を行った。具体的には、ヒトにおいて片親性発現を示す遺伝子のクラスターを形成している領域のひとつである15番染色体 q11.2-q12バンド領域に座位する、発現パターンの異なる3つの遺伝子、*SNRPN* (父性発現)、*UBE3A* (組織特異的母性発現)、*GABRB3* (両親性発現) を対象遺伝子とし、正常同一個人由来の3種類の細胞を材料として、3色3D-FISH法による遺伝子空間配置の解析を行った。

【対象と方法】正常同一個人由来の末梢血から分離し

た単核球細胞 (PB)、EB virus により形質変換・樹立したBリンパ芽球様細胞株 (LCL)、および皮膚切片より樹立した線維芽細胞株 (FB) を用いてそれぞれ3D-FISH用に立体構造を維持したまま固定した。培養細胞については細胞周期による核内配置への影響を考慮し、固定前に末梢血細胞とDNA量が同じG1期の細胞が優位となるよう同調処理をした。DNAプローブとして *SNRPN*, *UBE3A*, *GABRB3* をそれぞれに含むBACクローンを準備し、それぞれ異なる蛍光色素(緑, 赤, 赤外)を用いて標識し、立体構造を維持した細胞核標本にハイブリダイズした。共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて3領域の画像スタックを取得し、各細胞種につき50細胞ずつ、3D画像解析ソフトウェアIMARIS (Carl Zeiss) を用いて、アレルごとに3遺伝子の遺伝子間距離を計測、空間配置について解析した。

【結果】3遺伝子は、用いた3細胞種のいずれも解析したほとんどの細胞において、非直線状の空間配置をとっていた。一次構造上は、*SNRPN*, *UBE3A*, *GABRB3* の順に位置しているが、三次元では *GABRB3* は *UBE3A* よりも *SNRPN* の近くに位置していた。また、3遺伝子間の三次元距離を比較した結果、*SNRPN* ~ *UBE3A* (SU) と *UBE3A* ~ *GABRB3* (UG) 領域間の距離はアレル間で異なっており、特にSU比(長い

SU距離／短いSU距離)はUG比(長いUG距離／短いUG距離)より大きかった。すなわち、SU距離は2つのアレルで距離の差が大きい結果であった。さらに、一次構造上約0.45 Mb 離れているSUと約1.3 Mb離れているUG領域間の比はSU:UG=0.35:1であるが、3細胞種とも、三次元上では片方のアレルのSU領域間距離比は0.35に近かったのに対し、もう片方のアレルは0.35より大きい値であった。

3遺伝子の遺伝子間距離は細胞種により異なる傾向も確認され、特にPBにおける3遺伝子間距離は、LCL、FBに比べて長かった。

【考察】本研究により、(1)SNRPN、UBE3A、GABRB3遺伝子領域が細胞核内で非直線に規則性のある核内配置をとっており、(2)父性発現のSNRPN遺伝子を含む領域の三次元距離は、相同染色体間および領域間で異なる傾向がある、という知見を得た。ゲノムの一次構造は同じであるにも関わらず、父親由来染色体のみ遺伝子発現を有するSNRPN遺伝子のエピジェネティックなメカニズムが核内三次元遺伝子間距離の違いに影響を与えている可能性が考えられた。また、遺伝子間距離はクロマチン凝縮に大きく影響されていると考えられるため、相同染色体間での遺伝子発現の違いはクロマチン凝縮に関連していることも推測され、父性発現SNRPNを含むSU領域は、片方のアレルの凝縮が緩んでいることを示唆していると考えられた。本研究結果は核内配置と遺伝子発現とを関連づける新たなエピジェネティックエビデンスである可能性が示唆された。また、遺伝子間距離を比較する際は、同じ細胞種を用いる必要があることも示された。

今後、SU距離の違いと染色体の親由来の関連を確認し、遺伝子間距離と遺伝子発現についての直接的検証をめざしたい。遺伝子発現と三次元核内配置の関連が証明できれば、責任遺伝子が同定されいながら、遺伝子変異のみつかっていない患者の新たな診断法の確立や、核内ゲノムの空間配置という視点から新しい疾患発症機序の提案ができる可能性、また未だに原因が明らかにされていない遺伝性疾患の病態解明に繋がる可能性などが期待できる。

#### (論文審査の結果の要旨)

核内ゲノムの空間配置は、遺伝子発現状態と関連し、細胞機能に重要な役割を持つことを示唆する研究が近年改めて注目されているが、ゲノム機能と核内配置に

関連するエビデンスはまだ十分ではない。我々は、「インプリンティング領域の空間配置は、片親性発現に伴い、父方アレルと母方アレルで異なる」という仮説を立て、三次元配置の詳細をsingle cellレベルで個々のアレルごとに調べることができる3D-FISH法を用いた解析を行い、ゲノム機能と空間配置に関する仮説の検証を試みた。

具体的には、片親性発現を示す遺伝子クラスターを形成しているインプリンティング領域のひとつであるヒトの15番染色体q11.2-q12バンド領域に座位する、発現パターン異なるSNRPN(父性発現)、UBE3A(組織特異的母性発現)、GABRB3(両親性発現)の3つの遺伝子をターゲットにした3色3D-FISH法を用いた遺伝子空間配置の解析を、正常同一個人由来のBリンパ芽球様細胞株(LCL)、末梢血から分離した単核球細胞(PB)、および皮膚線維芽細胞株(FB)を対象に行った。

その結果、河村らは次の結論を得た。

1. 3つの遺伝子は非直線状に配置しており、三次元では一次構造上の並びとは異なり、GABRB3はUBE3AよりもSNRPNの近くに位置していた。
2. 領域特異的な遺伝子間距離が見られ、SNRPN~UBE3A距離はアレル間での差が大きく、同一染色体上のUBE3A~GABRB3距離間比と比較すると、片方のアレルが緩んでいると考えられた。

今回、異なる3つの細胞種(LCL、PB、FB)で解析し、3遺伝子の空間配置の規則性については、同様の傾向を示すことを確認した。ただし、遺伝子間距離は細胞種により異なる傾向を示したので、遺伝子間距離を比較する際は、同じ細胞種を用いる必要がある。

以上の結果より、ゲノムの一次構造は同じであるにも関わらず、父性発現を有するSNRPN遺伝子のエピジェネティックなメカニズムが、アレル間の核内三次元遺伝子間距離の違いに影響を与えている可能性が考えられた。また、遺伝子間距離はクロマチン凝縮に大きく影響されていると考えられるため、相同染色体間での遺伝子発現の違いはクロマチン凝縮に関連していることも推測され、本研究結果は核内配置と遺伝子発現とを関連づける新たなエピジェネティックエビデンスに繋がる結果であると評価した。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。



Impaired degradation followed by enhanced recycling of epidermal growth factor receptor caused by hypo-phosphorylation of tyrosine 1045 in RBE cells (胆管癌細胞 RBE における, Y1045低リン酸化による EGFR の再循環増強と分解抑制)

桂 安 萍

(論文の内容の要旨)

**Background:** Cholangiocarcinoma is the second most primary malignancy of the liver with poor prognosis. For inoperable cholangiocarcinoma, systemic chemotherapy has been applied. Nowadays, anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) therapy consisting of EGFR antibody (cetuximab) and anti-tyrosine kinase small molecular inhibitor (Gefitinib) is under wide study because EGFR over-activation is related with poor prognosis. However, further understanding of the mechanisms of aberrant EGFR signaling in cholangiocarcinoma is needed to refine EGFR-targeted therapy due to the limited response rate to the therapy today. Our study put emphasis on EGFR degradation and recycling in cholangiocarcinoma cells.

**Methods:** EGFR expression and signaling were compared between cholangiocarcinoma cell line RBE cells and immortalized cholangiocyte cell line MMNK-1 cells (normal) by immunoblotting; EGFR colocalization with early endosome or late endosome/lysosome was evaluated by immunofluorescence; cell surface EGFR expression was studied by fluorescence-activated cell sorting (FACS); EGFR ubiquitination and its association with Cbl were studied by immunoprecipitation; Monensin treatment was adopted for inhibition of EGFR recycling. Rab11a depletion was also adopted in RBE cells. Myc-tagged wild type EGFR was transfected into RBE cells to examine lysosome-sorting process and EGFR degradation of exogenous wild type EGFR.

**Results:** Ligand-induced EGFR degradation was impaired (remaining EGFR ratio after 2 hr of stimulation:  $68.2 \pm 9.2$  vs.  $11.1 \pm 1.4$  %,  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ); the expression of phospho-tyrosine 1068 and phospho-p44/42 MAPK were sustained in RBE cells as compared with MMNK-1 cells (pY1068 and p-p44/42 MAPK expression after 2 hr of stimulation:  $2 \pm 0.3$  vs.  $2.6 \pm 0.4$  folds of pY1068/total EGFR and  $2.9 \pm 0.5$  vs.  $0.8 \pm 0.0$  folds of p-p44/42 MAPK/total p44/42MAPK of RBE cells before EGF stimulation,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). In RBE cells, the process of EGFR sorting for lysosomal degradation was blocked at the early endosome stage (early endosome marker EEA-1 colocalizing EGFR after 1hr of stimulation:  $14.4 \pm 2.0$  % vs.  $1.2 \pm 0.2$  % total EGFR,  $p < 0.01$ ,  $n = 10$ ), and non-degraded EGFR was recycled to the cell surface (cell surface EGFR expression of RBE cells after 1hr of EGF stimulation:  $15.1 \pm 0.8$  % vs.  $28.3 \pm 1.8$  % control with or without monensin treatment,  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ). A disrupted association between EGFR and E3 ubiquitin ligase c-Cbl, as well as hypo-phosphorylation of EGFR at tyrosine 1045, was observed in RBE cells. No mutation of EGFR was identified in RBE cells. Exogenous wild type EGFR was not sorted to lysosome neither in RBE cells.

**Conclusion:** In RBE cells, over-activation of EGFR signaling is related with defective down-regulation of EGFR. Up-regulation of EGFR Tyr1045 phosphorylation is a potentially useful molecular alteration to EGFR-targeted therapy in cholangiocarcinoma cell types resembling RBE cells.

(論文審査の結果の要旨)

Cholangiocarcinoma is the second most primary malignancy of the liver with poor prognosis. For inoperable cholangiocarcinoma, systemic chemotherapy has been applied. Nowadays, anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) therapy consisting of EGFR antibody (cetuximab) and anti-tyrosine kinase small molecular inhibitor (Gefitinib) is under wide study because EGFR over-activation is related with poor prognosis. However, further understanding of the mechanisms of aberrant EGFR signaling in cholangiocarcinoma is needed to refine EGFR-targeted therapy due to the limited response

rate to the therapy today. Our study put emphasis on EGFR degradation and recycling in cholangiocarcinoma cells. EGFR expression and signaling were compared between RBE cells and immortalized cholangiocyte cell line MMNK-1 cells (normal) by immunoblotting; EGFR colocalization with early endosome or late endosome/lysosome was evaluated by immunofluorescence; cell surface EGFR expression was studied by fluorescence-activated cell sorting (FACS); EGFR ubiquitination and its association with Cbl were studied by immunoprecipitation; Monensin treatment was adopted for inhibition of EGFR recycling. Rab11a protein depletion was also adopted in RBE cells. Myc-tagged wild type EGFR was transfected into RBE cells to examine lysosome-sorting process and EGFR degradation of exogenous wild type EGFR.

その結果、桂 安萍は今回の実験で次の結果を得た。

1. EGFR degradation was impaired and its downstream MAPK signaling was sustained in RBE cells.
2. Impaired EGFR degradation was caused by defective sorting into late endosome/lysosome in

RBE cells.

3. EGFR was recycled back plasma membrane through endocytic recycling compartment after trafficking delay at early endosome in RBE cells.
4. Recycling inhibition did not facilitate EGFR degradation in RBE cells.
5. Poor EGFR ubiquitination and EGFR-Cbl association might be the mechanism of impaired EGFR degradation in RBE cells.
6. Hypo-phosphorylation of tyrosine 1045 of EGFR might be the reason of poor EGFR-Cbl association in RBE cells.

According to the results listed above, in RBE cells, over-activation of EGFR signaling is related with defective down-regulation of EGFR. Up-regulating EGFR Tyr1045 phosphorylation and accelerating EGFR degradation may be potentially useful molecular alteration to EGFR-targeted therapy consisting of EGFR antibody and anti-tyrosine kinase small molecular inhibitor in cholangiocarcinoma cell types resembling RBE cells.

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。

## Genetic Evaluation of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Iraq Using FTA Cards (FTA カードを用いたイラク国内発症小児急性リンパ性白血病の遺伝子解析)

Lika'a Fasih Yaqoub Al-Kzayer

(論文の内容の要旨)

**Background:** Genetic examination of childhood leukemia has not been available in Iraq. The presence of specific chromosomal aberrations can be used to stratify patients, decide treatment protocol, and reveal prognosis. The common risk-stratifying translocations of pediatric ALL include t(12; 21)(p13; q22), t(1; 19)(q23; p13), t(4; 11)(q21; q23), and t(9; 22)(q34; q11). These translocations encode fusion transcripts of TEL-AML1 (also termed ETV6-RUNX1), E2A-PBX1 (also termed TCF3-PBX1), MLL-AF4, and BCR-ABL (p190), respectively. In the present study, we used Flinders Technology Associates (FTA) filter papers for genetic analysis of Iraqi children with ALL. The filter paper matrix of the FTA card is impregnated with

chaotropic agent that denatures infectious agents, and thus samples are no longer considered a biohazard. Because of the small size of the FTA cards, they are convenient for storage in a limited space and transport of specimens. We examined the frequency of TEL-AML1, E2A-PBX1, MLL-AF4, and BCR-ABL chimeric transcripts in 264 Iraqi children newly diagnosed with acute lymphoblastic leukemia (ALL), using FTA cards impregnated with bone marrow aspirate or whole blood.

**Methods:** Five hospitals participated in this study: the Children's Welfare Teaching Hospital (CWTH) in Baghdad (a major referral center for childhood cancers in the country), Central Teaching Hospital for Children (CTH) in Baghdad, Basra Children's Specialty Hospital (BCSH) in Basra, Ibn Al Atheer

Hospital for Children (IAH) in Mosul, and Nana-Kali Hospital for Hemato-Oncology (NKH) in Erbil. BM and/or peripheral blood (PB) samples were collected from 269 Iraqi patients aged  $\leq 15$  years (the peak was at 3 years), newly diagnosed with ALL from October 2009 to June 2011. Of a total of 269 patients, 132 cases were from CWTH, 69 cases from CTH, 31 cases from BCSH, 28 cases from IAH, and 9 cases from NKH. Since 5 cases were excluded because of difficulty in proving the diagnosis owing to the poor quality of their slides, 264 patients were enrolled in the study. The diagnosis of ALL was made according to standard French-American-British morphologic criteria. Based on the results of storage temperature and duration, most of the FTA samples were preserved at 4 °C for up to 6 weeks in 5 Iraqi hospitals and then transferred to Japan for molecular analysis. Nested reverse transcription-polymerase chain reaction was adopted for the analysis. All Iraqi BM and/or PB samples on FTA filter papers were analyzed and reevaluated at least once, together with REH cell line for t(12; 21)/TEL-AML1, RCH-ACV cell line for t(1; 19)/E2A-PBX1, MV4-11 cell line for t(4; 11)/MLL-AF4, or TOM-1 cell line for t(9; 22)/BCR-ABL as positive control cells, and normal healthy PB cells were used as negative controls.

**Results :** Since it has been demonstrated that FTA cards provide an easy way to prepare total RNA from a variety of samples stored in the short term at room temperature and in the longer term at -20 °C or -80 °C, we conceived of using the cards for genetic analysis of Iraqi children with ALL. First, we examined storage temperature and duration by which extraction of RNA was possible from REH cells carrying TEL-AML1 fusion mRNA that were infiltrated into the FTA matrix. GAPDH mRNA was detectable when at least 500 cells per  $\mu\text{l}$  were infiltrated into the FTA matrix and kept at either -30 °C or 4 °C for up to 6 weeks. On the other hand, 37 °C was not suitable for RNA storage.

Interestingly, the TEL-AML1 transcript, as well as GAPDH mRNA, was detectable in the FTA samples that were kept at 4 °C for up to 40 weeks. TEL-

AML1 chimeric transcript product was found in 32 (12.1 %) of 264 ALL patients. Eleven (4.2 %) patients, 4 (1.5 %) patients, and 11 (4.2 %) patients had E2A-PBX1 mRNA, MLL-AF4 mRNA, and BCR-ABL mRNA, respectively. One patient had both TEL-AML1 and E2A-PBX1 fusion genes. The incidence of TEL-AML1 in Iraqi ALL children appears to be similar to or slightly higher than those of Jordan (12 %) and Kuwait (7 %). More than 90 % of cases with TEL-AML1 rearrangement in Iraq belonged to a favorable age group, with 71.9 % of these cases diagnosed in patients aged between 2 and 6 years. The prevalence and clinical findings of ALL patients with either E2A-PBX1 or BCR-ABL were comparable to the data reported elsewhere.

**Conclusion :** The use of FTA chemically treated paper may be an attractive alternative to the collection of blood in tubes for obtaining genetic information of hematologic malignancies in the underdeveloped countries, where international collaboration via FTA is helpful. In developed countries, it has been demonstrated that patients with TEL-AML1 translocation have a superior clinical outcome, with relapse-free survival rates approaching 90 % upon testing a variety of drug regimens. Thus, disclosure of Iraqi ALL children with TEL-AML1 may provide important information to persuade the patients not to abandon treatment and to undergo chemotherapy with sufficiently assorted effective medicines.

(論文審査の結果の要旨)

The common risk-stratifying translocations of pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) include t(12; 21)(p13; q22), t(1; 19)(q23; p13), t(4; 11)(q21; q23), and t(9; 22)(q34; q11). These translocations encode fusion transcripts of TEL-AML1, E2A-PBX1, MLL-AF4, and BCR-ABL (p190), respectively. Flinders Technology Associates (FTA) cards are convenient for samples storage and transfer as well as nucleic acids protection for further genetic analysis. In the present study we examined the frequency of TEL-AML1, E2A-PBX1, MLL-AF4, and BCR-ABL chimeric transcripts in 264 Iraqi children newly diagnosed with acute lymphoblastic

leukemia, using FTA cards impregnated with bone marrow aspirate or whole blood.

We found as follow :

1. GAPDH mRNA was detectable when at least 500 REH cells/ $\mu$ l or 2.5 % of REH mixture with normal peripheral blood were infiltrated into the FTA matrix and kept at either  $-30^{\circ}\text{C}$  or  $4^{\circ}\text{C}$  for up to 6 weeks.
2. TEL-AML1 was detectable by nested RT-PCR from all the 4 different cell concentrations and 4 different percentages of REH cells that were saved at either  $-30^{\circ}\text{C}$  or  $4^{\circ}\text{C}$  for up to 6 weeks.
3. TEL-AML1 and BCR-ABL chimeric transcripts were detectable by nested RT-PCR from 4 Japanese patients: 2 harbored t(12; 21) and 2 were positive for t(9; 22) diagnosed by FISH and G-banding previously, respectively.
4. GAPDH mRNA was successfully amplified from all 264 samples. Four chromosomal fusion transcripts were detectable by RT-PCR from the examined cohort of cases, with a frequency comparable to others except for TEL-AML1 which was lower than frequencies reported in Western countries. TEL-AML1 mRNA was found in 32 (12.1 %) patients. FISH study in 4 cases confirmed our results. E2A-PBX1 mRNA was detected in 11 (4.2 %) patients. MLL-AF4 mRNA was detected in 4 (1.5 %) patients. BCR-ABL mRNA (190 bp)

was found in 11 (4.2 %) patients.

5. Lower TEL-AML1 frequency in Iraqi childhood ALL was comparable to Arab countries close to Iraq such as Jordan and Kuwait as well as to other Asian countries such as Japan and Korea. Many studies reported a significant difference in the frequency of t(12; 21) in pediatric B-precursor ALL between Western countries and Asian countries.

**In conclusion :** The use of FTA chemically treated paper may be an attractive alternative to the collection of blood in tubes for obtaining genetic information of hematologic malignancies in low-income and underdeveloped countries. In developed countries, it has been demonstrated that patients with this translocation have a superior clinical outcome. Thus, disclosure of Iraqi ALL children with TEL-AML1 may provide important information to persuade the patients not to abandon treatment and to undergo chemotherapy with sufficiently assorted effective medicines.

FTAカードを用いてイラクの小児急性リンパ性白血病患者の初発時の遺伝子異常を国際協力により明らかにした本研究は、開発途上国における悪性腫瘍患者の診断と治療の向上に大きく役立つことから、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

KGA-2727, a novel selective inhibitor of a high-affinity sodium glucose cotransporter (SGLT1), exhibits antidiabetic efficacy in rodent models (高親和性ナトリウム・グルコース共輸送体 (SGLT1) の選択的阻害薬である KGA-2727は動物モデルにおいて抗糖尿病効果を示す)

## 柴 崎 利 英

### (論文の内容の要旨)

近年、糖尿病治療薬の新しいターゲットとしてナトリウム依存性グルコース共輸送体 (以下, SGLT) 阻害薬の開発が進んでいる。SGLT には主に消化管に発現してグルコース吸収を担っている SGLT1と、腎臓の尿細管に発現して尿からのグルコース再吸収を担っている SGLT2が知られている。開発が進んでいる多くの SGLT 阻害薬は過剰な糖を尿排泄することにより高血糖を是正するメカニズムを有しており、その主なターゲットは尿細管に発現する SGLT2である。一

方, SGLT1は糖尿病モデルラット及び糖尿病患者において小腸 SGLT1の発現量が亢進していることが報告されており, これが食後過血糖を助長する1つの要因とも考えられている。したがって, SGLT1阻害は食後過血糖の是正につながると考えられるが, SGLT1を選択的に阻害する化合物は報告されていない。そこで, 我々は SGLT1を選択的に阻害する化合物 KGA-2727を創製し, 動物実験モデルを用いて糖尿病治療薬としての効果を評価した。

まず, SGLT1または SGLT2を発現させた培養細

胞を用いて糖取込み阻害実験を行った。その結果、KGA-2727がSGLT1による糖取込みを強く阻害し、その阻害はSGLT1に対して高い選択性を有していた。次に、ラット小腸 in situ ループ法を用いた糖吸収実験を行った結果、KGA-2727はフルクトース吸収を阻害せずにグルコース吸収のみを阻害した。消化管におけるフルクトース吸収はGLUT5が担っていることから、KGA-2727がGLUT5を阻害せずにSGLT1のみを阻害した結果であると考えられた。消化管からの炭水化物の吸収を抑制する薬として $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬が知られているが、これは消化管での炭水化物の分解を阻害することにより、その吸収を抑制・遅延させる糖尿病治療薬である。そこで、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬の一つであるアカルボースとKGA-2727の作用を比較する実験を行った。スターチ経口負荷後の消化管内に残存する炭水化物の量を評価した結果、アカルボース及びKGA-2727処置群において消化管内に残存する炭水化物量の増加が認められた。アカルボース処置群において残存炭水化物のほとんどが多糖として存在するのに対し、KGA-2727処置群において、そのほとんどが単糖のグルコースとして存在していた。これらの違いは、アカルボースが多糖の分解を抑制しているのに対し、KGA-2727はグルコースの吸収を抑制しているという作用メカニズムの違いによるものと考えられた。

次に、ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルラットにおいて、グルコース経口負荷後の血糖値上昇に対する効果を検討した。KGA-2727は用量依存的にグルコース経口負荷後の血糖値上昇を抑制しており、KGA-2727が食後高血糖を抑制すると考えられた。さらに、肥満2型糖尿病モデルラットであるZDFラットを用いてKGA-2727長期投与の効果を検討した。48日間混餌による投与を行った結果、KGA-2727は用量依存的に血糖値および糖化ヘモグロビン値の上昇を抑制した。またKGA-2727処置群において、膵臓インスリン分泌の保護、尿量及び尿糖増加の抑制作用が確認された。これらの結果から、KGA-2727が糖尿病の悪化を抑制することが示された。さらに、処置後の門脈血中GLP-1濃度の上昇が確認されており、KGA-2727の抗糖尿病作用の一部にGLP-1が関与している可能性が示された。

これらの結果から、SGLT1選択的阻害薬であるKGA-2727が糖尿病治療薬の候補となりうると考えられた。

#### (論文審査の結果の要旨)

糖尿病治療において、合併症の進展を抑制するためには、血糖値の厳格なコントロールが必要であり、臨床研究の結果などから、食後高血糖の是正も重要であると考えられている。体内への糖質吸収には消化管に発現するSGLT1が重要な役割を担っており、糖尿病患者の小腸においてSGLT1の発現量が増加しているとの報告も存在することから、消化管のSGLT1阻害は、食後高血糖を抑制するのに有効なアプローチの一つであると考え、本研究が進められた。

腎臓尿細管に発現するSGLT2を阻害して尿糖排泄を促進することにより高血糖を是正するSGLT2阻害薬が数多く開発されている一方、SGLT1を選択的に阻害する化合物は知られておらず、本論文のKGA-2727はSGLT1選択的阻害薬という点で、新規性のある化合物である。この新規SGLT1阻害薬KGA-2727を用いて各種動物実験を行い、消化管のSGLT1阻害が消化管からの糖吸収を抑制した結果、糖尿病病態の悪化が抑制されており、その糖尿病治療薬としての可能性を本論文で示している。論文の概要は以下に示す通りである。

- KGA-2727は新規SGLT1阻害薬である。
- SGLT 発現培養細胞を用いた検討において、KGA-2727はSGLT1に対して高い阻害活性及び高い選択性を示した。
- 消化管からの糖吸収実験において、KGA-2727はフルクトース吸収を抑制せずに、グルコース吸収のみを抑制した。
- KGA-2727は消化管内にグルコースをとどめ、吸収抑制されたグルコースが消化管下部へ移行していた。
- KGA-2727は、グルコース負荷後の血糖値上昇を抑制した。
- ZDFラットを用いた長期投与試験においては、KGA-2727が血糖値の上昇及び糖化ヘモグロビン値の上昇を抑制しており、膵臓 $\beta$ 細胞の保護作用、尿糖排泄量及び尿量増加の抑制を示すなど、糖尿病病態の進展を抑制した。
- KGA-2727処置によって血中GLP-1濃度が上昇しており、その抗糖尿病作用の一部にGLP-1が関与している可能性が考えられた。
- 上記の実験結果より、新規SGLT1選択的阻害薬KGA-2727は糖尿病治療薬としての可能性を有していると結論づけた。

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。

Not only body weight perception but also body mass index is relevant to suicidal ideation and self-harming behavior in Japanese adolescents (日本の青少年では、体型への認知のみならず、BMI (body mass index) も希死念慮・自傷行為と関連する)

## 木下久慈

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】2010年の日本人口動態統計によると、自殺は15歳～19歳の死因の第一位、10歳～14歳の死因の第3位である。青少年の自殺のリスクファクターとして、うつ病などの精神障害・薬物乱用・友人関係などが報告されている。さらに近年、low body mass index (BMI) が希死念慮と関連しているという研究結果が複数報告されている。例えば、Kaplanらによる大規模疫学研究では、BMIが5 kg/m<sup>2</sup>減少するごとに自殺のリスクは男性で18%、女性で24%上昇することが分かった。しかし、青少年のBMIと希死念慮や自傷行為の関係では、体型への認知 (body weight perception; BWP) が影響することが示唆されている。例えば、Orbachらによって行われた研究では、自傷行為の既往がある青年はそうでない者に比べて、自分の体に対してより否定的な態度を示すことが報告された。またEatonらはアメリカの高校生における、BWP・BMIと希死念慮や自傷行為との関連について調べ、体型と希死念慮・自傷行為との関係にはBWPが影響していることを報告した。つまり現在のところ、青少年において、痩せていること自体が希死念慮や自傷行為と直接関連しているかどうかは、いまだに結論が得られていない。そこで本研究では、日本の青少年において、BWPなどの交絡因子の影響を取り除いた場合、BMIと希死念慮や自傷行為との関連が見られるかどうかを調べることを目的とした。

【方法】本研究は、日本の青少年における精神病様体験と精神衛生の関係について調査した研究の一環として行われた。2008年から2009年の間、三重県津市の公立中学校45校、高知県の高校28校の生徒18,104人に対して調査を行った。自記式の質問票を先生から生徒に配布し、無記名で回答を得た。その際、調査への参加は任意であり、調査結果等のデータは、匿名化されたまま保管され、個人情報外部に漏れないよう厳重に管理されることを先生から生徒に伝えるようにした。

本研究では、質問票中の以下の5項目に関して解析した。

① BMI (Table 2) ; 回答から得た身長と体重よりBMIを算出し、BMIパーセンタイルより5つに分類した。② BWP (Table 3) ; “現在の体重についてどう感じていますか?”と質問した。③ 自傷行為と希死念慮; 希死念慮に関しては、“現在、「生きていても仕方がない」と考えていますか?”と問い、自傷行為に関しては、“この1年以内に自分で自分を故意に傷つけてしまったことはありましたか?”と質問した。④ 薬物使用の有無、性別、年齢。⑤ the 12-item General Health Questionnaire (GHQ-12); 健康な人における、精神症状をスクリーニングするための自記式評価尺度であり、特に不安とうつ症状を評価するのに優れている。

解析は重回帰分析によって行われた。

【結果・考察】日本の青少年において、BMIが希死念慮や自傷行為と独立に関連するリスクファクターであることが、本研究で示された。すなわち、性別・年齢・薬物の乱用・精神的苦痛・BWPを交絡因子としてコントロールした後も、low BMIと希死念慮や自傷行為の間には有意な関連が認められた。

アメリカで行われた先行研究では、BMIと希死念慮・自傷行為との関係にBWPが影響を与えていることが示唆された。しかし、本研究では、BMIとBWPの両者が、独立に希死念慮や自傷行為と関連していることが明らかになった。BMIの分布の相違 (日本におけるlow BMIの割合は15%以上だが、アメリカにおいては10%以下) や文化の差異が影響して、このような違いが出現している可能性もあり、さらなる検討が必要と思われる。low BMIと希死念慮・自傷行為との関連に関しては、血清コレステロールの低下 (先行研究により自殺企図との相関が示唆されている) や、低栄養状態 (被刺激性を亢進させることが示唆されている) が媒介因子となっている可能性もある。

本研究のリミテーションとして以下の5つが挙げられる。まず、本研究は横断研究であり、実際の因果関係を説明することは困難である。第2に本研究では、

希死念慮より自殺企図の方が自殺の重要な予測因子であるにも関わらず、自殺企図に関しては評価していない。第3に、本研究は学校で行われた調査であるため、欠席者からは回答が得られなかった。第4に本研究は、日本人の青少年における精神病様体験と精神衛生との関係について調べた調査の2次解析であるため、体重コントロールを行うための方法や友人関係などの重要な交絡因子についても調査することができていない。第5に、体型の認知を評価するための質問の信頼性と妥当性は確立されていない。

(論文審査の結果の要旨)

体型への認知 (body weight perception ; BWP) が青少年の自殺のリスクファクターの一つであることが、多くの研究で示されている。さらに近年、low body mass index (BMI) が自殺企図や自傷行為と関連しているという研究結果が報告されている。しかし現在のところ、青少年において、痩せていること自体が希死念慮や自傷行為と直接関連しているかどうかは、いまだにはっきりした結論が得られていない。そこで本研究では、日本の青少年において、BWPなどの交絡因子の影響を取り除いた場合、BMIと希死念慮・自傷行為との間に関連が認められるかどうかを調べた。

日本の公立中学・高校の生徒18,104人に対して調査を行った。自記式の質問票を先生から生徒に配布し、無記名で回答を得た。得られた回答を解析して、BMI・BWPと自傷行為・希死念慮の関係について

調べた。その際、交絡因子として、BWP・薬物の使用の有無・性別・年齢・the 12-item General Health Questionnaire (GHQ-12; 健康な人における、精神症状をスクリーニングするための自記式評価尺度であり、特に不安とうつ症状を評価するのに優れている) などの影響を除去した。

その結果、木下は次の結論を得た。

1. low BMI は、自傷行為・希死念慮と有意に関連している。
2. 太りすぎているとの体型への認知は、自傷行為・希死念慮と有意に関連している。
3. 交絡因子の影響を除去しても、上記の関連は有意であった。

これらの結果より、日本の青少年において、BMIが希死念慮や自傷行為と独立に関連するリスクファクターであることが、示された。すなわち、性別・年齢・薬物の使用・精神的苦痛・BWPを交絡因子としてコントロールした後にも、low BMIと希死念慮や自傷行為との間には有意な関連が認められた。痩せていること自体が、自傷行為・希死念慮と関連していると考えられ、BMI $\leq$ 18.5の青少年に対しては、保健室での早期介入やスクールカウンセラー・精神科医の介入などが必要であることを示唆している。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Novel Regulation of Cardiac Metabolism and Homeostasis by the Adrenomedullin-Receptor Activity-Modifying Protein 2 System (心臓におけるアドレノメデュリン-RAMP2系による代謝及び恒常性維持の新規制御機構)

吉 沢 隆 浩

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】アドレノメデュリン (AM) は、全身の様々な臓器で産生・分泌される生理活性ペプチドであり、血管拡張や降圧、臓器保護など多彩な生理活性を有することが知られている。また、高血圧や心不全といった病態では、血中AM濃度が上昇することから、循環器疾患におけるAMの重要性が示唆されている。AMの受容体はGタンパク共役型受容体であるCLRであるが、CLRに受容体調節タンパクRAMP2又はRAMP3が結合することで、受容体の機能及び特異性が規定される。我々はこれまでに、AMやRAMPの遺伝子改変マウスを樹立・解析し、報告してきた。

AM遺伝子ホモ接合体欠損マウス (AM<sup>-/-</sup>) は、胎生中期に心血管系の発生異常により致死となるが、RAMPの各アイソフォームの遺伝子欠損マウスの中で、AM<sup>-/-</sup>と同様に胎生致死となるのは、RAMP2遺伝子ホモ接合体欠損マウス (RAMP2<sup>-/-</sup>) のみであった。このことから、AM-RAMP2系の心血管系における重要性が示唆された。AM及びRAMP2は心臓においても高発現を認めるが、これらの遺伝子欠損マウスは胎生致死となるために、成体におけるAM-RAMP2系の機能解析にはこれまで限界があった。そこで我々は、成体の心臓におけるAM-RAMP2系の病態生理学的意義を解明するために、薬剤誘導

型心筋細胞特異的 RAMP2 遺伝子欠損マウス (C-RAMP2<sup>-/-</sup>) を樹立し、解析を行った。

【材料及び方法】  $\alpha$ MHC-MerCreMer Tg マウスと RAMP2 flox マウスを交配させ、C-RAMP2<sup>-/-</sup>を樹立し、薬剤誘導型 Cre-loxP システムを用い、心筋細胞特異的に RAMP2 遺伝子を欠損誘導し、各種解析を行った。

【結果】 C-RAMP2<sup>-/-</sup>では、心機能低下や心室の拡大を認め、拡張型心筋症様所見の自然発症を認めた。また C-RAMP2<sup>-/-</sup>の心臓では、酸化ストレスの亢進を認めた。そこで、C-RAMP2<sup>-/-</sup>に対して抗酸化剤である TEMPOL の投与を行ったところ、酸化ストレスは軽減し、心臓リモデリングは抑制されるものの、心不全改善には至らなかった。このことから、酸化ストレスの他にも心不全発症に重要な因子の関与が示唆された。そこで、心不全発症の原因を探索するために、C-RAMP2<sup>-/-</sup>の心臓のメタボローム解析を行い、代謝物の包括的解析を行った。その結果、C-RAMP2<sup>-/-</sup>の心臓では、ミトコンドリア内膜特異的脂質であり、ミトコンドリア機能に重要であるカルジオリピンの含有量低下が特異的に認められた。さらに、電子顕微鏡でもミトコンドリアの構造異常が認められた。遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法で検討したところ、ミトコンドリア制御因子である PGC-1をはじめ、様々なミトコンドリア関連因子の遺伝子発現低下が認められた。さらに、心不全発症までの遺伝子発現を経時的に解析したところ、ミトコンドリア制御因子である PGC-1 $\alpha$  の遺伝子発現の変動が、その他の遺伝子の変動に先行して認められることから、ミトコンドリア機能障害が、心不全のプライマリーな原因であると考えられた。初代培養心筋細胞における検討では、C-RAMP2<sup>-/-</sup>でミトコンドリア膜電位低下や、ミトコンドリア由来活性酸素種産生亢進が確認された。C-RAMP2<sup>-/-</sup>では、PGC-1の制御因子の1つであり、Gタンパク共役型受容体による制御を受けることが知られている CREB の活性化低下が認められた。そこで、アデニル酸シクラーゼの活性化を介して cAMP 産生を亢進させ、CREB を活性化することが知られているフォルスコリンを C-RAMP2<sup>-/-</sup>に投与したところ、ミトコンドリア関連因子の遺伝子発現の回復と心不全の改善が見られた。

【結論】 従来、AM は NADPH オキシダーゼからの活性酸素種産生を抑制することで臓器保護作用を発揮すると考えられていたが、今回の我々の研究から、心

臓における RAMP2 遺伝子欠損が、心筋細胞のミトコンドリア機能の低下を誘発することが明らかになった。このことから、AM-RAMP2系は酸化ストレス抑制だけでなく ATP 産生や脂質代謝などのミトコンドリア機能の制御・維持を介して、心臓における恒常性維持に重要な役割を果たすことが示された。

#### (論文審査の結果の要旨)

アドレノメデュリン (AM) は、血管拡張や酸化ストレス作用等の様々な生理活性を有する。AM 受容体システムは、Gタンパク共役型受容体 CLR と受容体活性調節タンパク RAMP2又は RAMP3が結合することで、その機能と特異性が規定される。AM や RAMP2のホモ接合体遺伝子欠損マウスでは、心血管系の発生異常により胎生致死となることから AM-RAMP2系の重要性が示唆されるが、成体における解析には限界があった。そこで吉沢隆浩は、薬剤誘導型心筋細胞特異的 RAMP2 遺伝子欠損マウス (C-RAMP2<sup>-/-</sup>) を新たに樹立し、解析を行った。

その結果、吉沢隆浩は次の結論を得た。

1. C-RAMP2<sup>-/-</sup>では、心室の拡大や心機能低下といった拡張型心筋症様症状の自然発症を認めた。
2. 心機能低下は RAMP2 遺伝子欠損誘導後 7 日目から 28 日目まで持続して観察された。
3. C-RAMP2<sup>-/-</sup>の心室組織では酸化ストレス亢進が認められ、抗酸化剤である TEMPOL による治療効果を検討したが、酸化ストレスの軽減だけでは心不全の改善には至らなかった。
4. 脂質メタボローム解析では、C-RAMP2<sup>-/-</sup>の心室においてミトコンドリア特異的脂質であるカルジオリピンの含有量低下が認められた。
5. 遺伝子発現の変動を経時的に検討したところ、心不全関連因子の変動に先行して、ミトコンドリア制御因子の変動が認められた。
6. C-RAMP2<sup>-/-</sup>ではミトコンドリア構造の異常や、ミトコンドリア関連因子の遺伝子発現の低下が認められた。
7. C-RAMP2<sup>-/-</sup>の初代培養心筋細胞では、ミトコンドリア膜電位低下や、ミトコンドリア由来活性酸素種の産生亢進が認められ、ミトコンドリア機能低下が示唆された。
8. C-RAMP2<sup>-/-</sup>ではミトコンドリア制御因子 PGC-1の上流因子である CREB の活性化の低下が認められた。
9. C-RAMP2<sup>-/-</sup>の初代培養心筋細胞で CREB を活



性化すると、ミトコンドリア膜電位の回復を認めた。  
 10. C-RAMP2<sup>-/-</sup>マウスにおいて CREB を活性化すると、ミトコンドリア関連因子の遺伝子発現が回復し、心不全の改善傾向が認められた。  
 以上の結果より、吉沢隆浩は、AM-RAMP2系が

ミトコンドリア機能の制御・維持を介して、心臓における代謝や恒常性維持に重要な役割を果たす事を初めて明らかとした。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Establishment of novel detection system for embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells based on nongenetic manipulation with indocyanine green (インドシアニングリーンを用いた胚性幹細胞由来肝細胞の新規検出システムの開発)

吉 江 進

(論文の内容の要旨)

【背景】現在、重症肝不全及び各種代謝性肝疾患の根治療法は肝臓移植であるが、我国においては慢性的なドナー不足を抱え苦慮しているため、臓器移植の代替となる新しい治療方法の開発が急務とされている。また、現在の創薬開発過程における動物実験の問題として、ヒトの生体内反応を予測した、新規開発物質の薬物動態評価・薬効薬理評価を充分におこなうことができている。これらの解決策の一つとして、ヒト ES/iPS 細胞を用いて肝細胞を誘導させそれらを用いることで、新規移植治療法の開発や、創薬開発過程における代替試験法が可能になると考えられる。しかし、これまでに報告されている肝細胞分化誘導方法は肝細胞以外の多種多様な細胞も誘導されてしまい、目的とする肝細胞を効率よく分化誘導させるまでには至っていない。そのため、肝細胞をレポーター遺伝子で標識することや肝細胞膜表面に存在する複数の抗原を捉えることで、セルソーターを用いて肝細胞を分離している。しかしながら、遺伝子操作は操作が煩雑であり且つ細胞の安全性が懸念され、また、抗体は高価であり活性もロットにより異なるなど結果に安定性を欠く欠点がある。さらには、肝細胞で発現している遺伝子は他の組織の細胞でも発現しているため、肝細胞に特異性の高いマーカーが欠如しているのが現状である。  
 【研究内容、結果】そこで、本研究では安価で安全性が高く、簡便な肝細胞特異的な細胞検出・分離システムを開発するために、肝機能検査の一つとして使用されていた ICG (インドシアニングリーン) に着目した。コスト的にも安価な ICG は緑色を呈する無害な色素であり、特定波長で励起させると長波長付近に蛍光を発する特性を持っている。さらに、培養上清中に添加し、短時間の染色をするだけで肝細胞に選択的に取り込まれる。これらの性質を利用して、特定波長を

発するレーザーとその蛍光を検出できるフィルターを搭載したフローサイトメーターを開発し、まずは、初代肝細胞を用いて染色時における ICG の適切な染色濃度から検討した。その結果、高濃度で染色すると ICG が大量に肝細胞に取り込まれ、細胞内で ICG が凝集することでその吸収スペクトルが変化し、僅かな細胞しか検出することができなかった。また、染色時間を長くすると肝細胞以外の細胞も非特異的な取り込みや細胞膜表面に付着する等が原因で検出されてしまうため、非肝細胞では検出せず、肝細胞においては検出できるような最適な染色条件を検討した。その結果、染色濃度 5 μg/ml、染色時間 30 min において、初代肝細胞では 90 % 以上の ICG 陽性細胞を検出することが可能となり、この条件で非肝細胞では ICG 陽性とはならなかった。次に、マウス ES 細胞から肝細胞へ誘導させ (参考論文)、検討した至適な染色条件下で解析を行った。培養の時間経過と共に肝細胞マーカーである AFP や ALB の発現量が増加し、それに伴い、ICG 陽性細胞を検出することができた。さらには、ICG 陽性細胞が AFP、ALB 陽性細胞と同程度の割合であることが確認され、また、肝細胞の分化段階によって ICG の取り込み能力が異なり、蛍光強度に差が生じることも明らかになった。  
 【結論】以上の結果から、ICG を用いて肝細胞を安全且つ簡便に検出し、分離できることが示唆された。さらに、肝細胞へ分化した細胞数の定量や、これまでに困難であった分化した肝細胞の成熟度を解析するための迅速で簡便な新規評価方法になることも明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

ES 細胞をはじめとする多能性幹細胞から作製した肝細胞を、新規細胞移植治療方法の開発や創薬開発過程において利用するために、本研究では多能性幹細胞

から分化誘導させた肝細胞を検出・分離するためのシステムを開発した。本研究で注目した ICG は緑色を呈する無害な色素であり、特定波長で励起させると長波長付近に蛍光を発する特性を持っている。さらに、培養上清中に添加し、短時間の染色をすることで肝細胞に選択的に取り込まれる。これらの性質を利用して、特定波長を発するレーザーとその蛍光を検出できるフィルターを搭載したフローサイトメーターを開発し、以下の検討をおこなった。

- ① ICG 陽性細胞を検出することを目的に初代肝細胞を用いて染色時における ICG の濃度を検討した。
- ② 非肝細胞系の細胞を用いて ICG の取り込みの特性を解析すると共に、染色時間を検討した。
- ③ ①, ②で得られた結果をもとに ES 細胞から分化誘導させた肝細胞において染色を行い、同様な解析をおこなった。
- ④ 本研究で開発したフローサイトメーターは細胞を分採するためのソーティングモードがないため、ES 細胞由来 ICG 陽細胞の性質を確認するために高濃度での ICG 染色で細胞を可視化させ、その後、PAS 染色や RT-PCR で解析した。
- ⑤ ICG 陽性細胞の機能性を調べるために CYP の発現をリアルタイム PCR で検討した。  
得られた結果は以下のとおりである。
- ① ICG の染色濃度を検討した結果、高濃度 (1 mg/ml) で染色をすると ICG が大量に取り込まれ、細胞内で ICG が凝集することでその吸収スペクトルが変化し、フローサイトメーターでは僅かな細胞しか検出することができなかったが、5 ug/ml で添加した際に 90 % 以上の肝細胞を検出できることを確認した。

- ② ICG の染色時間を 30 min ~ 24 hr の範囲で検討し、30 min の染色時間が最適であることがわかった。
- ③ ①, ②で得られた染色条件をもとに、ES 細胞から分化誘導させた細胞を解析した結果、10 % 前後の ICG 陽性細胞が検出され、これらは肝細胞マーカーである *AFP*, *ALB* 陽性細胞の割合と同程度であることがわかった。また、①で得られた初代肝細胞と比較すると分化させた細胞では 10 倍程蛍光強度が低かった。
- ④ 高濃度での ICG 染色を行い、ICG を取り込んだ細胞を可視化させた結果、ICG で陽性になった細胞は数時間後に ICG を排泄し、さらには PAS 陽性細胞であることを確認した。また、ICG-positive cluster は肝細胞マーカーの *AFP*, *ALB* などの発現が確認されたが、成熟マーカーの発現はほとんど確認されなかった。一方、ICG-negative cluster においては肝細胞マーカーの発現はほとんど認められなかった。
- ⑤ ICG-positive cell と ICG-negative cell を目視で pick up し、RNA 抽出後、リアルタイム PCR で解析を行った。その結果、ICG-positive cell は ICG-negative cell に比べて薬物代謝に関わる遺伝子群の発現が高く、それらの発現は胎児期 (E13.5) の肝臓と同程度の発現量を示した。

以上より、ICG を用いて多能性幹細胞由来の肝細胞を安全且つ簡便に検出し、分離できることが示唆された。さらに、肝細胞へ分化した細胞数の定量や、これまでに困難であった分化した肝細胞の成熟度を解析するための迅速で簡便な新規評価方法になることも明らかになった。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis (血管内皮細胞における adrenomedullin-RAMP2 システムは血管統合性と組織恒常性維持に必須である)

## 小山 晃 英

### (論文の内容の要旨)

アドレノメデュリン (AM) は、血管拡張作用をはじめ、多様な作用を有する内因性生理活性ペプチドである。我々は、AM、およびその受容体活性調節タンパクの一つである RAMP2 のノックアウトマウスが、共に、血管の構造異常により、浮腫や出血を来して胎生致死となることから、AM-RAMP2 系が血管新生

に必須であることを報告してきた。

本研究では、血管の AM-RAMP2 系の病態生理学的意義を解明するために、①血管内皮細胞特異的 RAMP2 コンディショナルノックアウトマウス (E-RAMP2<sup>-/-</sup>) ライン、②血管内皮細胞特異的 AM コンディショナルノックアウトマウス (E-AM<sup>-/-</sup>) ライン、③成体においてオンデマンドに血管特異的に

RAMP2を欠損させる薬剤誘導性血管内皮細胞特異的 RAMP2コンディショナルノックアウトマウス (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>) ラインを樹立し、解析を行った。

E-RAMP2<sup>-/-</sup>のほとんどは出生前後に致死であり、血管内皮細胞の構造異常と全身性の浮腫を認めた。一方で、血管のRAMP2発現が2割程度残存する一部のE-RAMP2<sup>-/-</sup>では、成体が得られた。成体のE-RAMP2<sup>-/-</sup>では、血管壁の形態異常に加え、主要臓器の血管周囲の著明な炎症細胞浸潤を認めた。さらに加齢に伴い、酸化ストレスの亢進と臓器内線維化の進展を認め、肝硬変様の所見や、水腎症、糸球体硬化症などの自然発症を認めた。一方、E-AM<sup>-/-</sup>は成体が得られた。E-RAMP2<sup>-/-</sup>同様、成体のE-AM<sup>-/-</sup>は、血管周囲の炎症細胞浸潤や糸球体硬化症の自然発症を認めた。

E-RAMP2<sup>-/-</sup>では得られる成体数が限られるため、次に成体になってからRAMP2欠損を可能とするDI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>を用いた解析を行った。RAMP2欠損誘導後早期から、血管透過性亢進に伴う全身性浮腫の発症が認められた。このときの血管内皮細胞は、細胞骨格を担うアクチンが重合不全を起こしており、cortical actin ringの形態異常が認められた。アクチン重合を制御するRhoファミリーの活性を検討したところ、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>の血管内皮細胞では、Rac1の活性が低下しており、RhoAの活性が亢進していた。一方、血管内皮細胞にAMを添加すると、cortical actin ringは増強し、その作用はRac1阻害剤により抑制された。

DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、虚血時の血管新生や、血管傷害に対する応答性の異常が確認された。そこで、下肢虚血処置を行ったDI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>の大腿部にマウスRAMP2を遺伝子導入し、RAMP2による治療実験を行った。RAMP2を導入したDI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、虚血時の血管新生が促進されており、間質の浮腫が軽減されていた。

以上から、AM-RAMP2系が、発生における血管新生だけでなく、成体の血管恒常性維持にも必須であることが初めて示された。RAMP2は慢性炎症や臓器保護に対する新たな治療標的分子として期待される。

#### (論文審査の結果の要旨)

生体内生理活性分子は、多彩な生理活性を有し、生体内恒常性維持において重要な役割を有する。生理活性分子の一つであるアドレノメデュリン (AM) は、血管新生作用、抗炎症作用、抗酸化作用などを有し、

臓器障害や動脈硬化に抵抗性を示すことが報告されている。さらに、高血圧、心不全、腎不全などで血中濃度が上昇することから、各疾患への関与も示唆されてきた。しかし、生理活性分子そのものは血中半減期が短いため、慢性疾患の治療薬として応用するには制約がある。これに対し、受容体側の調節因子である膜タンパクRAMPを標的とすれば半減期の問題はなく、慢性疾患への応用に道が拓ける。

以前に、小山らのグループは、AM、およびその受容体活性調節タンパクの一つであるRAMP2のノックアウトマウスが、共に、血管の構造異常により、浮腫や出血を来して胎生致死となることから、AM-RAMP2系が血管新生に必須であることを報告してきた。本研究では、血管のAM-RAMP2システムの病態生理学的意義を検討した。

以下の三種類のノックアウトマウスを樹立し、解析を行った。

- ① 血管内皮細胞特異的RAMP2コンディショナルノックアウトマウスライン
- ② 血管内皮細胞特異的AMコンディショナルノックアウトマウスライン
- ③ 成体においてオンデマンドに血管特異的にRAMP2を欠損させる薬剤誘導性血管内皮細胞特異的RAMP2コンディショナルノックアウトマウス (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>) ライン

その結果、小山晃英は次の結果を得た。

1. AMの発生における血管新生作用は、血管内皮細胞のRAMP2によって規定されていた。
2. AM-RAMP2システムは、Rac1, RhoAの活性調節により、血管内皮細胞のアクチン重合を制御していた。
3. RAMP2欠損によるアクチン重合の不全は、血管透過性を亢進し、血管炎症の自然発症を引き起こした。
4. RAMP2の慢性欠損により、血管内皮細胞の恒常性が破綻し、血管の老化が亢進し、最終的に全身の臓器不全が引き起こされた。
5. RAMP2遺伝子導入により、下肢虚血時のDI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>の血管新生が促進された。

これらの結果より、AM-RAMP2システムが、発生における血管新生だけでなく、成体の血管恒常性維持にも必須であることが示された。RAMP2は慢性炎症や臓器保護に対する新たな治療標的分子となる可能性がある。

以上の結果に対して、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。

A new experimental model of ATP-sensitive  $K^+$  channel independent insulinotropic action of glucose : a permissive role of cAMP for triggering of insulin release from rat pancreatic  $\beta$ -cells (グルコースによる ATP 感受性カリウムチャンネル非依存性インスリン分泌刺激作用の新規実験モデル：ラット膵  $\beta$ 細胞からのインスリン分泌惹起における cAMP の寛容的役割)

## 武井 真大

### (論文の内容の要旨)

【背景】内分泌細胞や神経内分泌細胞における細胞内遊離カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 上昇は、ホルモンまたは神経伝達物質のエクソサイトーシスにおいて重要な役割を担っている (興奮分泌連関)。膵  $\beta$ 細胞からのインスリン分泌においても  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が重要であると考えられている。生理的に重要なインスリン分泌刺激物質であるグルコースは膵  $\beta$ 細胞内で代謝を受け、細胞内 ATP/ADP 比を上昇し、ATP 感受性カリウムチャンネル ( $K_{ATP}$  チャンネル) を閉鎖し、膵  $\beta$ 細胞膜を脱分極させる。脱分極により電位依存性 L 型カルシウムチャンネル (LVDC) が活性化し、細胞外のカルシウムイオンが細胞内へ流入し  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇する。 $[Ca^{2+}]_i$  が上昇することにより、最終的にインスリン分泌顆粒が細胞膜へ癒合し、インスリンの開口放出に至る。この経路は一般に  $K_{ATP}$  チャンネル依存性経路 (惹起経路) と呼ばれている。グルコースはこの惹起経路をさらに増強させるシグナル経路も有している。この経路はジアゾキシドにより  $K_{ATP}$  チャンネルを開放した状態でもインスリンを分泌することから、 $K_{ATP}$  チャンネル非依存性経路 (増幅経路) と呼ばれている。また、インクレチンによるインスリン分泌作用のセカンドメッセンジャーである cAMP がこのグルコースによる増幅経路をさらに増強することでグルコース濃度依存性にインスリン分泌を増加させることを我々の教室がすでに報告している。本研究では、強制的に  $K_{ATP}$  チャンネルを開放し、かつ、L 型カルシウムチャンネルを抑制した条件下において、cAMP の細胞内濃度を上昇させた場合、グルコースによるインスリン分泌が惹起されるか否かを検討した。

【方法】オスのウイスターラットから膵を摘出し、コラゲナーゼ法により光学顕微鏡下で膵島を単離した。単離膵島を用いてインスリン分泌実験 (培養実験、灌流実験) を行った。KRBH バッファーで 30 分間プレインキュベーション後、インスリン分泌実験を施行した。ジアゾキシド (250  $\mu$ M) により  $K_{ATP}$  チャンネル

を開放させ、ニフェジピン (10  $\mu$ M) により LVDC を抑制した。また、フォルスコリン (10  $\mu$ M) を使用して細胞内 cAMP を上昇させた。インスリンはラジオイムノアッセイで測定した。 $[Ca^{2+}]_i$  測定では、膵  $\beta$ 細胞を Fura-2AM 蛍光プローブで 1 時間インキュベートし、340 nm/380 nm 励起蛍光強度比を測定した。

【結果】いずれの実験でも 2.8 mM グルコース刺激 (低グルコース刺激) によるインスリン分泌量を基準とし比較した。22 mM グルコース刺激 (高グルコース刺激) により、30 分間で 10 倍のインスリン分泌増加を認めた。フォルスコリン存在下での 22 mM グルコース刺激インスリン分泌量は 22 mM グルコース単独刺激の 2 倍であった。ジアゾキシド、ニフェジピン存在下では、22 mM グルコースによるインスリン分泌増加を認めなかったが、フォルスコリン存在下では約 5 倍に増加した。しかし、バッファー液中のカルシウム濃度を低下させると、フォルスコリン存在下でも細胞外カルシウム濃度依存性にインスリン分泌は低下した。灌流実験でインスリン分泌のタイムコースを検討するとジアゾキシド、ニフェジピン、フォルスコリン存在下での 22 mM グルコース刺激インスリン分泌は、2 分後に上昇開始し、6 分後にピークを認めた。その後は緩徐に上昇した。同様の条件下での  $[Ca^{2+}]_i$  は 3 分以内に低下し、その後は緩徐に上昇した。ジアゾキシド、ニフェジピン、フォルスコリン存在下で、アミノ酸代謝中間体である  $\alpha$ KIC はグルコース刺激時の 7 割程度のインスリン分泌増加を再現した。一方、ミトコンドリア呼吸鎖を阻害するアジ化ナトリウムはこの条件下のインスリン分泌を抑制した。タンパク質アシル化阻害剤であるセルレニン濃度依存性にこの条件下のインスリン分泌を抑制した。

【結論】 $K_{ATP}$  チャンネルを開放させ、LVDC を閉鎖させた条件下でも、cAMP 存在下では膵  $\beta$ 細胞からのグルコースによる急峻なインスリン分泌を認めたことから、 $K_{ATP}$  チャンネル/LVDC を介した  $[Ca^{2+}]_i$  上昇

には依存しないインスリン分泌惹起経路の存在を示す新たな実験モデルを提唱した。また、同様のインスリン分泌を  $\alpha$ KIC で再現できたことやアジ化ナトリウム、セルレニンがインスリン分泌を抑制したことから、ここで示したグルコースによるインスリン分泌機構にはミトコンドリア代謝やタンパク質のアシル化が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)

内分泌細胞や神経内分泌細胞における細胞内遊離カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 上昇は、ホルモンまたは神経伝達物質のエクソサイトosisにおいて重要な役割を担っている。グルコースは、膵  $\beta$  細胞内で代謝を受け、ATP 感受性カリウムチャネル ( $K_{ATP}$  チャネル) を閉鎖し細胞膜を脱分極させ、電位依存性 L 型カルシウムチャネル (LVDC) を介した  $[Ca^{2+}]_i$  上昇により、インスリンの開口放出に至る。この経路は一般に  $K_{ATP}$  チャネル依存性経路 (惹起経路) と呼ばれている。グルコースはこの惹起経路をさらに増強させるシグナル経路、 $K_{ATP}$  チャネル非依存性経路 (増幅経路) も有している。

本研究では、強制的に  $K_{ATP}$  チャネルを開放し、かつ、L 型カルシウムチャネルを抑制した条件下において、cAMP の細胞内濃度を上昇させた場合、グルコースによるインスリン分泌が惹起されるか否かを、インスリン分泌実験 (培養実験、灌流実験) を行い検討した。また、単離膵  $\beta$  細胞を Fura-2AM 蛍光プローブでインキュベートし、 $[Ca^{2+}]_i$  を測定した。

その結果、武井らは次の結論を得た。

1. 高グルコース刺激により、30分間で10倍のインスリン分泌増加を認めた。フォルスコリン存在下での高グルコース刺激によるインスリン分泌量は高グル

コース単独刺激の2倍であった。ジアゾキシド、ニフェジピン存在下では、高グルコースによるインスリン分泌増加を認めなかったが、フォルスコリン存在下では約5倍に増加した。

2. バッファ液中のカルシウム濃度を低下させると、フォルスコリン存在下でも細胞外カルシウム濃度依存性にインスリン分泌は低下した。
3. インスリン分泌のタイムコースを検討すると、高グルコース刺激にインスリン分泌は、2分後に上昇開始し、6分後にピークを認めた。その後は緩徐に上昇した。
4. この実験条件下での膵  $\beta$  細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  は、3分以内に低下し、その後は緩徐に上昇した。
5.  $\alpha$ KIC は、この実験条件下でのグルコース刺激時の7割程度のインスリン分泌増加を再現した。
6. アジ化ナトリウムは、この実験条件下でのインスリン分泌を抑制した。
7. セルレニンは、薬剤濃度依存性にこの条件下でのインスリン分泌を抑制した。

以上の結果より、cAMP 存在下で  $K_{ATP}$  チャネル/LVDC を介した  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に依存しないインスリン分泌惹起経路の存在を示唆する新しい実験モデルを提唱した。また、ここで示したグルコースによるインスリン分泌機構にはミトコンドリア代謝やタンパク質のアシル化が関与している可能性が示唆された。本論文で提唱された実験モデルは今後の「インスリン分泌機構の解明」にむかった新たな研究に十分に寄与すると考えられる。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

The method of mouse embryoid body establishment affects structure and developmental gene expression (マウス胚様体形成の方法はその構造と発生上の遺伝子発現に影響する)

茂 木 亜希海

(論文の内容の要旨)

【目的】EB (embryoid body : 胚様体) 形成は、ES 細胞の分化を行うために重要なステップである。また EB は外胚葉、中胚葉、内胚葉の三葉構造からなることから、形態学的にはマウス発生過程の初期段階を再現しているとみなされている。しかし EB 形成過程における微細構造の詳細はわかっていない。本研究では EB 形成のプロセスを、遺伝子発現解析に加え微細構

造的視点から検討した。同時に EB の作製方法として、ハンギングドロップ法と静置浮遊培養法とを比較検討した。ハンギングドロップ法はマウス胚様体形成で確立された一般的な方法であるが、操作が煩雑でその作製過程には技術を要する。一方静置浮遊培養法は操作が単純であり、また高度な技術を有しなくても EB 作製ができる新しい方法として本研究で開発を目指したものである。ここではハンギングドロップ法と

静置浮遊培養法で作製されたそれぞれのEBについて、分化傾向とその微細構造の特徴を明らかにし、同時に静置浮遊培養法を新しいEB形成方法として確立することを目的とした。

【方法】ハンギングドロップ法は、マウスES細胞コロニーを酵素処理によって単細胞に分散し、その細胞懸濁液(1000 cells/50  $\mu$ l drop)を培養ディッシュ蓋部の内側に等間隔で撒く。蓋を裏返しにして水滴をつくりさげ、重力により細胞が水滴の底部に沈むことを利用して細胞を凝集させ、胚様体を形成する。一方、静置浮遊培養法は、ES細胞コロニーをスクレーパーで物理的に剝離した後、細胞非接着性ディッシュにそのまま浮遊させて胚様体を形成させる。これらの方法でそれぞれ1週間、EB形成を行った。EB形成開始後、7日間毎日サンプルを回収し、遺伝子発現をRT-PCRで、超微細構造については電子顕微鏡で解析した。

【結果及び考察】RT-PCRによる解析では、どちらのEBも早期に三胚葉マーカーを発現したが、Brachyury遺伝子(中胚葉指標)のみ、ハンギングドロップ法で作製したEBにおいて5日目で見られた。形態学的解析では、EB形成がすすむにつれて、細胞骨格、接着構造の変化および微絨毛の発達、細胞間開離などの大きな変化が見られた。特にハンギングドロップ法で作成したEBでは、微細構造の変化とBrachyuryの発現時期とが深く関係していることが認められた。しかし静置浮遊培養法によるEB形成過程でも、ハンギングドロップ法と比較し多少発現が遅い傾向にはあったが、微細形態学的には類似の構造を見いだすことができた。以上の結果から、静置培養法で作成したEBは従来のハンギングドロップ法で作成したEBと比較し、変化はやや遅いものの、同様の分化傾向を示すことがわかった。静置培養法でみられる分化傾向の遅れは、この方法を応用する際、留意する必要がある。しかし分化傾向が緩徐にすすむことは、分化過程の途中経過を詳細に観察・解析できる利点もあり、静置培養法はハンギングドロップ法と同様、EB形成の一つの手段として、また初期胚発生過程の解明ツールとして、有用であると考えられる。

#### (論文審査の結果の要旨)

ES細胞とは、マウスの場合受精後3.5日目の胚盤胞から内部細胞塊を取り出して樹立されたものである。その特徴として①ほとんど無限に増殖するという高い増殖能力を持つこと、②神経や上皮に分化する外

胚葉、筋肉や軟骨に分化する中胚葉、消化管などに分化する内胚葉の三胚葉いずれにも分化できる多能性を持つことが挙げられる。

ES細胞の分化を行うために重要なステップがEB(embryoid body:胚様体)形成である。胚様体は外胚葉、中胚葉、内胚葉の三葉構造からなることから、形態学的にはマウス発生過程の初期段階に類似していると考えられている。しかしEB形成過程における形態学的変化、特に微細構造の詳細はわかっていない。そこで本研究では、EB形成のプロセスをRT-PCRによる遺伝子発現解析に加え、電子顕微鏡による微細構造学的視点から検討した。またEBを作製するために、ハンギングドロップ法と静置浮遊培養法の二種類で実施し比較検討した。ハンギングドロップ法はマウス胚様体形成で確立された一般的な方法であるが、操作が煩雑でその作製過程には技術を要し、ヒトES細胞に応用することが出来ない。一方静置浮遊培養法は操作が単純であり、また高度な技術を有しなくてもEB作製ができ、ヒトES細胞でも応用出来る新しい方法として本研究で開発を目指したものである。ここではハンギングドロップ法と静置浮遊培養法で作製されたそれぞれのEBについて、分化傾向とその微細構造の特徴を明らかにすると同時に静置浮遊培養法を新しいEB形成方法として確立することを目的とし評価を行った。

その結果、以下の結論を得た。

1. RT-PCRによる遺伝子発現解析:ハンギングドロップ法EB、静置浮遊培養法EBともに早期に三胚葉マーカーを発現したが、Brachyury遺伝子(中胚葉指標)のみ、ハンギングドロップ法で作成したEBにおいて5日目で見られた。
2. 形態学的解析:EB形成がすすむにつれて、細胞骨格、接着構造の変化および微絨毛の発達、細胞間開離などの大きな変化が見られた。特にハンギングドロップ法で作成したEBでは、微細構造の変化とBrachyuryの発現時期とが深く関係していることが認められた。しかし静置浮遊培養法によるEB形成過程でも、ハンギングドロップ法と比較し微細構造の変化は多少発現が遅い傾向にはあったが、類似の構造を見いだすことができた。

本研究の結果より、静置浮遊培養法で作成したEBは従来のハンギングドロップ法で作成したEBと比較し、変化はやや遅いものの、同様の分化傾向を示すことがわかった。静置浮遊培養法でみられる分化傾向の

遅れは、ES細胞からEBを作成する過程での細胞剥離法の違いによるものであると推測される。従ってこの方法を応用する際には、その点を留意する必要がある。しかし分化傾向が緩徐にすすむことは、分化過程の途中経過を詳細に観察・解析できる利点もあり、静

置培養法はハンギングドロップ法と同様、EB形成の一つの手段として、また初期胚発生過程の解明ツールとして、有用であると考えられる。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Adrenomedullin-RAMP2 system is crucially involved in retinal angiogenesis (アドレノメデュリン-RAMP2系の網膜血管新生における重要性)

家 里 康 弘

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】アドレノメデュリン (AM) は、血管拡張作用をはじめ、多様な生理作用を有する内因性生理活性ペプチドであり、その受容体活性調節蛋白の1つである RAMP2と共に、AM-RAMP2系が血管新生に必須であることが知られている。一方、眼内においても AM の発現が認められるが、その病態生理学的意義の詳細は不明である。AM の発現は低酸素において誘導されることから、低酸素により眼内の血管新生をきたす未熟児網膜症や糖尿病網膜症などの疾患において、AM-RAMP2系が重要な役割を果たしていることが予想される。

【材料及び方法】① AM, RAMP2ヘテロノックアウトマウス<sup>(+/-)</sup>を用いた酸素誘導網膜症 (OIR) モデルにおける real time PCR, Western blotting, 網膜標本の Isolectin 染色, Hypoxyprobe 染色, HE 染色による解析, ② 網 (脈絡) 膜血管内皮細胞 (RF/6A135, HRMEC) や RAMP2を過剰発現させた血管内皮細胞 (EAhy926) を用いた, AM-RAMP2系の Scratch assay による血管内皮細胞遊走・増殖作用の解析, ③ 薬剤誘導性血管内皮細胞特異的 RAMP2コンディショナルノックアウトマウス (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>) ラインを用いた網膜血管の発達段階における網膜標本の Isolectin 染色, Ki-67染色, TUNEL 染色による生理的網膜血管新生の解析, ④ 抗 AM 抗体の眼内投与 (OIR モデル) を行った網膜標本の Isolectin 染色による解析を行った。

【結果】OIR モデルにおいて、(相対的) 低酸素環境 (生後 (P) 13-17日) で AM の遺伝子発現の亢進が確認された。高酸素環境から大気下環境に戻された直後 (P12) には、野生型マウス (WT), AM<sup>+/-</sup>, RAMP2<sup>+/-</sup>で網膜血管網密度に違いは見られなかったが、P17において AM<sup>+/-</sup>で網膜の病的新生血管、無血管野、低酸素領域のいずれも減少していた。また P

17において、定量的 RT-PCR にて VEGF, eNOS の遺伝子発現低下を、Western blotting で VEGF 発現の低下, p-eNOS/eNOS 比の低下を認めた。一方、RAMP2<sup>+/-</sup>でも無血管野と低酸素領域の減少を認めた。

血管内皮細胞における解析では、脈絡膜血管内皮細胞ラインである RF/6A135細胞において、AM 添加は濃度依存的に遊走・増殖を増強することが確認された。RAMP2を過剰発現させた血管内皮細胞では、AM 添加時にコントロールの血管内皮細胞と比較して細胞遊走・増殖が増加していた。またヒト網膜血管内皮細胞においても AM によって内皮細胞の遊走・増殖の増強が確認された。

DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、P6で網膜血管伸長の低下と伸長血管先端部の過剰な血管網といった網膜血管発達の異常パターンを認めた。一方、P10とP11では網膜中間部の血管網分岐の減少と血管内皮細胞増殖の低下を認めた。

最後に AM をターゲットにした治療応用を検討するため、OIR モデルに対して抗 AM 抗体の眼内投与を行ったところ、網膜の病的新生血管が抑制された。

【結論】AM-RAMP2系が、網膜の低酸素による病的血管新生や、発達段階における生理的血管新生において重要な役割を果たしていることが初めて示された。AM は低酸素による眼内の病的血管新生に対する新たな治療標的分子として期待される。

### (論文審査の結果の要旨)

アドレノメデュリン (AM) は、多様な生理作用を有する内因性生理活性ペプチドであり、その受容体活性調節蛋白の1つである RAMP2と共に、AM-RAMP2系が血管新生に必須であることが知られている。一方で眼内における AM-RAMP2系の病態生理学的意義は不明である。そこで家里康弘は、AM, RAMP2ヘテロノックアウトマウス<sup>(+/-)</sup>を用いて酸素誘導網膜症 (OIR) モデルにおける解析、各種血管内

皮細胞を用いて AM 添加による遊走・増殖作用の解析、薬剤誘導性血管内皮細胞特異的 RAMP2コンディショナルノックアウトマウス (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>) を用いた発達段階における網膜血管新生の解析、抗 AM 抗体の眼内投与を行った OIR モデルの解析を行った。

その結果、家里康弘は次の結論を得た。

1. OIR モデルにおいて、低酸素状態で AM の遺伝子発現の亢進が確認された。
2. 高酸素下から、大気環境下に戻された直後では、野生型マウス (WT), AM<sup>+/-</sup>, RAMP2<sup>+/-</sup>で網膜血管に違いはなかったが、P17では AM<sup>+/-</sup>で病的新生血管、無血管野、低酸素領域のいずれも減少していた。
3. P17で、AM<sup>+/-</sup>では定量的 RT-PCR にて VEGF, eNOS の遺伝子発現の低下を、Western blotting で VEGF 蛋白発現の低下、p-eNOS/eNOS 比の低下を認めた。
4. RAMP2<sup>+/-</sup>でも無血管野と低酸素領域の減少を認めた。
5. 網脈絡膜血管内皮様細胞ラインである RF/6A135

細胞では濃度依存的に、ヒト網膜血管内皮細胞でも AM 添加で遊走・増殖の増強が確認された。RAMP2を過剰発現させた血管内皮細胞では、AM 添加下で RAMP2過剰発現細胞は遊走・増殖が亢進していた。

6. DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、発達初期で網膜血管伸長の低下と伸長先端部の過剰な血管網といった網膜血管発達の異常を認めた。一方、発達中期では網膜中間部の血管網分岐の減少と血管内皮細胞増殖の低下を認めた。
7. WT マウスの OIR モデルに抗 AM 抗体の眼内投与を行ったところ、病的新生血管が減少し、無血管野には影響しなかった。

以上の結果から、家里康弘は、AM-RAMP2系が、網膜の低酸素による病的血管新生や、発達段階における生理的血管新生において重要な役割を果たしていること、AM が、網膜の病的血管新生に対する新たな治療標的となる可能性を初めて示した。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認めた。

## Clinical Outcomes in Elderly Patients Administered Gefitinib as First-line Treatment in Epidermal Growth Factor Receptor-mutated Non-small Cell Lung Cancer : Retrospective Analysis in a Nagano Lung Cancer Research Group Study (高齢者 EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における一次治療としての Gefitinib 治療の臨床的解析：長野県肺癌研究グループにおける後方視的解析)

### 立 石 一 成

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】肺癌患者の高齢化が進み、肺癌患者の内で75歳以上の患者が約半数を占める。高齢者に対する殺細胞性の化学療法は若年者と比べ毒性が強く認められ、高齢者手術不能進行非小細胞肺癌に対する化学療法の適応には慎重を要する。一方、epidermal growth factor receptor (以下 EGFR) tyrosine kinase inhibitor (以下 TKI) の一つである gefitinib は非小細胞肺癌に対する分子標的治療薬で、腫瘍細胞の EGFR 遺伝子変異の存在が高い奏効率に關与している。75歳以下 EGFR 遺伝子変異陽性患者を対象とした比較試験で、一次治療における gefitinib 治療は、殺細胞性化学療法より有意に高い奏効率および奏功期間を示した。我々は、17例の75歳以上高齢者手術不能進行非小細胞肺癌で EGFR 遺伝子変異陽性患者を対象に前向き研究を行い、高い奏効率を示すことを報告

したが、75歳以上の高齢者での gefitinib 治療の臨床的有用性の報告は未だ少ない。そのため本試験では長野県内の関連施設の協力を得て、gefitinib 高感受性の EGFR 遺伝子変異をもつ高齢者進行非小細胞肺癌患者の臨床的有用性を後方視的に解析した。

【対象及び方法】長野県内関連施設における EGFR 遺伝子変異陽性の75歳以上未治療非小細胞肺癌患者で一次治療として gefitinib 投与が行われた患者を対象とした。気管支鏡検査等の検体採取時に PNA-LNA PCR clamp 法を用いて EGFR 遺伝子変異を検索し、感受性遺伝子変異は exon 19 delation mutation もしくは L858R とした。Performance status (PS) は Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 分類を用いた。Gefitinib は一日一回 250 mg を投与した。治療効果は RECIST version 1.0 を用いて評価し、奏効率、病勢コントロール率、無増悪生存期間、全生存期間



を求めた。有害事象は the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0 を用いて評価した。

【結果】2007年4月から2012年7月に治療を受けた55人を解析した。男性16名、女性39名、年齢中央値は81.1歳であった。PS 0-1の患者が83.7%、全例が腺癌であった。病期は、II A期3例、III A期2例、III B期4例、IV期40例、術後再発6例だった。EGFR 遺伝子変異は exon 19 delation mutation 31例、L858R 24例であった。奏効率は72.7% (95%信頼区間：59.5%-82.9%)、病勢コントロール率は92.7% (95%信頼区間：82.0%-97.6%) であった。無増悪生存期間中央値は13.8カ月 (95%信頼区間：9.9-18.8カ月)、全生存期間は29.1カ月 (95%信頼区間：22.4カ月-)、2年生存率は、59.5% (95%信頼区間：41.0%-78.8%) であった。主な有害事象は皮疹41.8%、AST・ALT上昇20.0%であり、Grade3以上の毒性の際にはgefitinibの隔日投与を行い、23.6%の患者で隔日投与が行われた。肺障害を3例に認めたが、gefitinib の中止あるいは副腎皮質ステロイドで改善した。

【考察】本試験の解析から、EGFR 遺伝子変異を有する高齢者非小細胞肺癌の患者に対して gefitinib 一次治療は高い奏効率と生存期間の延長を示すことが確認された。今回の奏効率72.7%および無増悪生存期間中央値13.8カ月、2年生存率59.5%の結果は、EGFR 遺伝子変異陽性の75歳以下の肺癌患者を対象に一次治療として gefitinib 治療が行われた試験の結果と比較し、ほぼ同様なしはやや優れた結果を示している。また高齢者に対する毒性の頻度および重症度ともに75歳以下と同等だった。本解析の対象患者は、高齢者特有の他疾患の合併症を有する患者や、PS2以上患者も16.3%に認めていることから、一次治療としての gefitinib 治療は良好な選択肢であると考えられた。実際 gefitinib 治療耐性後、24.1%の患者しか殺細胞性化学療法を受けていないことから、高感受性 EGFR 遺伝子変異を有する高齢者では EGFR-TKI の一次治療が有用な治療法に成り得ると考えられる。さらに日常診療上 EGFR 遺伝子変異を検索し、陽性患者の抽出の重要性が再確認され、さらにその陽性者では EGFR-TKI 治療を受ける機会を逸さないよう注意すべきである。

【結論】一次治療の gefitinib 治療は EGFR 遺伝子変異陽性の75歳以上進行非小細胞肺癌に対する有用な治

療に成り得る。

#### (論文審査の結果の要旨)

肺癌患者の高齢化が進み、肺癌患者の内で75歳以上の患者が約半数を占める。高齢者への殺細胞性化学療法は若年者と比べ毒性が強く、高齢者進行非小細胞肺癌に対する化学療法の適応には慎重を要する。Gefitinib は非小細胞肺癌に対する分子標的治療薬で、腫瘍細胞の epidermal growth factor receptor (以下 EGFR) 遺伝子変異の存在が高い奏効率に關与している。75歳以下 EGFR 遺伝子変異陽性患者の比較試験で、一次治療における gefitinib 治療は殺細胞性化学療法より高い奏効率・無増悪生存期間を示した。75歳以上の高齢者での gefitinib 治療の臨床的有用性は報告は少ない。本試験では長野県内の gefitinib 感受性 EGFR 遺伝子変異をもつ高齢者進行非小細胞肺癌患者の臨床的有用性を後方視的に解析した。

長野県内施設における EGFR 遺伝子変異陽性75歳以上非小細胞肺癌患者で一次治療として gefitinib 投与が行われた患者を対象とした。検体採取時に PNA-LNA PCR clamp 法を用いて EGFR 遺伝子変異を検索し、感受性遺伝子変異は exon 19 delation mutation と L858R とした。Gefitinib は一日一回250 mg を投与した。治療効果は RECIST version 1.0にて評価し、奏効率、病勢コントロール率、無増悪生存期間、全生存期間を求めた。有害事象は CTCAE Version 4.0で評価した。

その結果、立石は次の結論を得た。

1. 2007年4月から2012年7月に治療を受けた55人を解析した。男性16名、女性39名、年齢中央値は81.1歳、PS 0-1の患者が83.7%、全例が腺癌で、病期はII A期3例、III A期2例、III B期4例、IV期40例、術後再発6例であり、EGFR 遺伝子変異は exon 19 delation mutation 31例、L858R 24例であった。
2. 奏効率72.7% (95%CI：59.5%-82.9%)、病勢コントロール率92.7% (95%CI：82.0%-97.6%) であった。
3. 無増悪生存期間中央値13.8カ月 (95% CI：9.9-18.8カ月)、全生存期間29.1カ月 (95% CI：22.4カ月-)、2年生存率59.5% (95%CI：41.0%-78.8%) であった。
4. 主な有害事象は皮疹41.8%、AST・ALT上昇20.0%、肺障害を3例に認めたが、内服の中止、副腎皮質ステロイドで改善した。

これらの結果より、EGFR 遺伝子変異陽性の75歳

以下肺癌患者に一次治療として gefitinib 治療が行われた試験と比較し同様ないしはやや優れた結果と考えた。高齢者に対する毒性の頻度・重症度ともに75歳以下と同等で、一次治療として gefitinib 治療は良好な選択肢であることが示された。gefitinib 治療耐性後、24.1%の患者しか殺細胞性化学療法を受けていない

ことから、高感受性 EGFR 遺伝子変異を有する高齢者では EGFR-TKI 治療を受ける機会を逸しないよう注意すべきであることが示された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### *In vivo* patch-clamp recording from locus coeruleus neurones in the rat brainstem (ラット脳幹青斑核神経細胞からの *in vivo* パッチクランプ記録)

杉 山 大 介

#### (論文の内容の要旨)

【目的】青斑核は脳幹に位置する生体内で最大のノルアドレナリン (NA) 作動性ニューロン群である。これらの NA 作動性ニューロンは痛みや意識など多くの生体の恒常性に寄与している。青斑核細胞は青斑核自体や青斑核周囲の細胞からの興奮性と抑制性入力を受けて活動性が調節されている。青斑核細胞の活動電位閾値下のシナプス入力については、スライスや培養細胞を使用した従来の方法ではシナプスが切断されており、得られる知見については限界があった。これらを解決するためには *in vivo* 記録が必要である。これまで *in vivo* パッチクランプ記録による解析は脊髄や小脳、大脳皮質聴覚野などでは報告されていたが、脳幹での手法は確立されていなかった。そこで、*in vivo* 標本を用いて青斑核細胞からホールセルパッチクランプ記録法を開発し確立することで、生体で青斑核細胞の活動がどのようなシナプス入力を受けてコントロールされているのかを調べることを目的として本研究を実施した。

【方法】4週齢から6週齢のSDラットをウレタンの腹腔内投与にて麻酔状態を得たのちに、気管切開・気管挿管を施行し人工呼吸にて呼吸管理を行った。ラットの頭部を定位固定装置で固定し、小脳直上にて開頭をおこない、小脳は一部摘除し脳幹部を露出した。露出した脳幹部は Krebs 液にて灌流し、顕微鏡下に脳幹青斑核の部位を直視しながら、パッチクランプ電極を青斑核へと刺入し、ブラインドパッチクランプ法を用いて *in vivo* パッチクランプ記録を行った。

【結果】*In vivo* 標本を用いて63の青斑核細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。青斑核細胞の静置膜電位は  $-55.4 \pm 8.3$  mV であった。全ての細胞での自発性活動電位 ( $6.0 \pm 2.7$  Hz) を認めた。電流固定した状態で侵害刺激により脱分極も過分極も伴わな

い二相性の反応を示した。電位固定した状態でピンチ刺激を加えても、興奮性シナプス後電流 (EPSC) の増加は認められず、単相性の内向き電流が観察された。パッチ電極内液をセシウム含有のものに変えて記録を行ったところ、EPSC と抑制性シナプス後電流 (IPSC) をそれぞれ単離して記録することができた。

【考察】*in vivo*ラット脳幹の青斑核からホールセルパッチクランプ記録に成功した。ピンチ刺激による活動電位の二相性の反応には脱分極や過分極、また EPSC の増加も伴わず、内向き電流が観察されたことは、G 蛋白活性化経路などの間接的な経路が関与していることを示唆する。また侵害刺激で活動電位が増加したが、青斑核細胞はギャップ結合により細胞同士が結合しているとされ、この結合を介したシナプス入力に関与している可能性が示唆された。

【結語】*in vivo* ラットの脳幹青斑核細胞からホールセルパッチクランプ記録に成功し、青斑核細胞の侵害刺激に対するシナプス入力の一部を明らかにした。この記録法を用いることにより生理条件下に近い状態で脳幹の細胞膜の電気的性質やシナプス電流を調べることができ、薬理学的研究も行うことが可能になる。

#### (論文審査の結果の要旨)

青斑核は脳幹に位置するノルアドレナリン作動性ニューロン群で、痛みや意識の調節に関与している。青斑核細胞は青斑核自体や青斑核周囲の細胞から興奮性と抑制性入力を受けているが、その詳細は不明である。スライス標本や培養細胞を使用した方法ではシナプスが切断されており、得られる知見については限界がある。青斑核へのシナプス入力を明らかにするためには、*in vivo* パッチクランプ記録を行う必要がある。これまで *in vivo* パッチクランプ記録による解析は脊髄や小脳、大脳皮質聴覚野などでは報告されていたが、脳の深部に位置する脳幹での手法は確立されていな

かった。そこで、in vivo 標本を用いて青斑核細胞からホールセルパッチクランプ記録法を開発し確立することで、生体で青斑核細胞の活動がどのようなシナプス入力を受けてコントロールされているのかを調べることを目的として本研究を実施した。

その結果、杉山は以下の結論を得た。

1. 青斑核細胞より in vivo パッチクランプ記録を行うために、(1)固定法や麻酔深度を調節することで記録部位の不動化を行った、(2)小脳を一部摘除することで径の太いパッチクランプ電極が青斑核へと直接アプローチできるようにした、(3)手術手技による出血を最小限にし、かつ補液を行うことで標本が安定した状態で生命維持できるようにした。これらの結果、脳幹青斑核細胞からの in vivo ホールセルパッチクランプ記録に成功し確立することができた。
2. In vivo 標本を用いて63の青斑核細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。青斑核細胞の静止膜電位は $-55.4 \pm 8.3$  mVであった。全ての細胞での自発性活動電位 ( $6.0 \pm 2.7$  Hz) を認めた。
3. 電流固定した状態で、侵害刺激により脱分極も過分極も伴わず活動電位の頻度のみが増加した後に抑制されるという二相性の反応を示した。電位固定した状態で侵害刺激を加えても、興奮性シナプス後電流 (EPSC) の増加は認められず、単相性のゆるや

かな内向き電流が観察された。この結果から、侵害刺激に際して青斑核細胞ではGタンパク質を介するなどのシグナル伝達が存在する可能性が示唆された。

4. 電位固定下に自発性の EPSC と抑制性シナプス後電流 (IPSC) をそれぞれ単離して記録することができた。自発性 EPSC は AMPA 受容体のアンタゴニストである CNQX の投与により抑制されたことより AMPA を介したシナプス入力であることが示唆された。自発性 IPSC は GABA 受容体のアンタゴニストである Bicuculline の投与により抑制されたことより、GABA を介したシナプス入力であることが示唆された。

今回の研究は、in vivo ラットの脳幹青斑核細胞からホールセルパッチクランプ記録の実験手法を確立したものである。その手法を用い、青斑核細胞の侵害刺激に対するシナプス入力の一部を明らかにした。この記録法を用いることにより、これまででは不可能であった生理条件下に近いシナプスが保たれた状態で、脳幹の細胞膜の電気的性質やシナプス電流を調べることができ、薬理学的研究も行うことが可能になる。本法によって、意識のメカニズムや生体内の鎮痛機構のメカニズムの解明、将来的には新たな鎮静薬や鎮痛薬の開発にもつながると考えられる。以上より、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Sphingosine 1-phosphate (S1P) induces S1P2 receptor-dependent tonic contraction in murine iliac lymph vessels (S1P によるマウス腸管リンパ管における S1P2受容体を介した収縮反応の機能特性)

君 塚 康一郎

(論文の内容の要旨)

【目的】 S1P は G 結合型タンパク質である S1P1~5 受容体を介して血管やリンパ管に作用しさまざまな反応を引き起こすリン脂質のケミカルメディエーターであることが知られている。その作用は主に抵抗血管の血管抵抗調整を担っておりその収縮を引き起こすという報告や、S1P はリンパや組織間隙に存在し、T 細胞および B 細胞ならびにデントリック細胞の動員を調整しているという報告がみられる。最近では自己免疫疾患である多発性硬化症の治療に FTY720 という薬剤が臨床応用されている。このように末梢循環や免疫学的な作用がわかっている一方で、リンパ平滑筋に対する S1P の直接反応については今までにあきらかに

されてきていない。そこで今回我々は、マウスより摘出した腸骨集合リンパ管に対して S1P がどのような反応を引き起こすかを詳細に解析し、リンパ管の自発性収縮への影響やリンパ管平滑筋の収縮反応における  $Ca^{2+}$  の由来とその受容体解析を免疫組織化学の手法を用いて検討した。

【方法】 ddY マウス (雄・6~9 週齢) をペントバルビタールで麻酔後脱血、屠殺し、腸骨リンパ管を摘出し、両端をガラス製マイクロピペットに挿入し、臓器槽に装着し灌流標本を作製した。標本内腔に 4 cmH<sub>2</sub>O の内圧を負荷し、標本外腔側にクレブス液 (pH7.4, 37°C) に 0.2% のウシ胎児アルブミンを付加したものを 5 ml/min で連続的に灌流しながらリンパ管の直径

変化を経時的に計測した。まず始めに、リンパ管の自発性収縮を観察するにあたり、適当なリンパ管内圧はいくらであるのかを再検討するために、内圧を変化させたことによるリンパ管自発性収縮の頻度と収縮力に対する影響を調べた。次にリンパ管に対するS1Pの時間依存ならびに用量依存反応を調べた。次にS1Pのリンパ管内皮細胞への影響を調べるためにL-NAME, aspirin 処理によるS1Pの収縮反応に及ぼす影響を調べた。次にS1Pによる収縮反応の細胞内シグナル伝達機構ならびに収縮反応に關与するCa<sup>2+</sup>の由来を調べるために、JTE013 (S1P2受容体阻害剤), VPC23019 (S1P1および3受容体阻害剤), U-73122 (PLC阻害剤), xetosponginc (1, 4, 5-IP<sub>3</sub>受容体阻害剤), nifedipine (L型Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害剤) 処理によるS1Pの収縮反応に及ぼす影響を比較検討した。また摘出したリンパ管に存在するS1P受容体の特性と存在部位を確認するために、S1P2受容体, S1P1・S1P3受容体, Actin, 核 (DAPI), リンパ管内皮細胞 (LYVE-1) の marker を用いて免疫組織学に検討した。

最後に、high-K<sup>+</sup>溶液, 1 mM EGTA 溶液処理下のCa<sup>2+</sup>free+high-K<sup>+</sup>溶液を用いてS1Pの収縮反応の発生機序を詳細に解析した。

【結果】

1. リンパ管の自発性収縮の頻度と収縮力は継時的に内圧を変化させた場合, 4 cmH<sub>2</sub>Oの条件で規則正しく自発性収縮を引き起こした。また, 4 cmH<sub>2</sub>Oで自発性収縮しているリンパ管に10<sup>-7</sup>MのS1Pを投与した場合, その収縮力と頻度には有意な変化をもたらさなかった。
2. S1Pは90分間隔で投与すれば, 反応の減弱化は生じないことを確認した。10<sup>-8</sup>-8~10<sup>-6</sup>の範囲においては, 用量依存的な収縮反応を誘起した。
3. 10<sup>-4</sup>M L-NAME, および10<sup>-5</sup>M aspirin 前処理によって5×10<sup>-7</sup>MのS1P収縮反応は抑制されなかった。
4. 10<sup>-5</sup>M JTE013前処理によって5×10<sup>-7</sup>MのS1P収縮反応は有意に抑制された。10<sup>-5</sup>M VPC23019前処理によって5×10<sup>-7</sup>MのS1P収縮反応は抑制されなかった。
5. actinの周囲にS1P2受容体が染色され, リンパ管平滑筋表面にS1P2受容体が存在することが確認された。
6. 5×10<sup>-6</sup>M U-73122前処理によって, 5×10<sup>-7</sup>M

のS1P収縮反応は有意に抑制された。また, 同濃度でのinactive U-73122前処理では5×10<sup>-7</sup>MのS1P収縮反応は有意に抑制されなかった。

7. 10<sup>-7</sup>M xetosponginc前処理によって, 5×10<sup>-7</sup>MのS1P収縮反応は有意に抑制された。また, 10<sup>-5</sup>M nifedipine 前処理では5×10<sup>-7</sup>MのS1P収縮反応は有意に抑制されなかった。

8. high-K<sup>+</sup>溶液で細胞膜を完全に脱分極させた条件でも, 5×10<sup>-7</sup>MのS1Pは収縮反応を誘起した。さらに, 1 mM EGTA Ca<sup>2+</sup> free high-K 溶液環境下においても, 5×10<sup>-7</sup>MのS1Pは収縮反応を誘起した。

【結論】以上より, S1Pの収縮反応は, 内因性NOやプロスタグランジンによるものではなく, 主にS1P2受容体および1, 4, 5-IP<sub>3</sub>受容体を介した細胞内貯蔵部位のCa<sup>2+</sup>を利用していることが証明された。

(論文審査の結果の要旨)

S1PはG結合型タンパク質であるS1P1~5受容体を介して血管やリンパ管に作用し主に末梢循環および免疫学的な調整をになうリン脂質ケミカルメディエーターであることが知られている。その一方で, リンパ平滑筋に対するS1Pの直接反応については今までに明らかにされてきていない。そこで君塚らは, マウス腸骨集合リンパ管に対するS1Pの自発性収縮への影響やリンパ管平滑筋の収縮反応におけるCa<sup>2+</sup>の由来とその受容体解析を検討した。さらに, 免疫組織化学の手法を用いて機能的にも受容体の存在も検討した。

以下に研究結果を示す。

1. リンパ管の自発性収縮の頻度と収縮力は継時的に内圧を変化させた場合, 4 cmH<sub>2</sub>Oの条件で規則正しく自発性収縮を引き起こした。また, 4 cmH<sub>2</sub>Oで自発性収縮しているリンパ管に10<sup>-7</sup>MのS1Pを投与した場合, その収縮力と頻度には有意な変化をもたらさなかった。
2. S1Pは90分間隔で投与すれば, 反応の減弱化は生じないことを確認した。10<sup>-8</sup>-8~10<sup>-6</sup>の範囲においては, 用量依存的な収縮反応を誘起した。
3. 10<sup>-4</sup>M L-NAME, および10<sup>-5</sup>M aspirin 前処理によって5×10<sup>-7</sup>MのS1P収縮反応は抑制されなかった。
4. 10<sup>-5</sup>M JTE013前処理によって5×10<sup>-7</sup>MのS1P収縮反応は有意に抑制された。10<sup>-5</sup>M VPC23019前処理によって5×10<sup>-7</sup>MのS1P収縮反応は抑制されなかった。

5. actinの周囲にS1P2受容体が染色され、リンパ管平滑筋表面にS1P2受容体が存在することが確認された。
6.  $5 \times 10^{-6}$ M U-73122前処理によって、 $5 \times 10^{-7}$ MのS1P収縮反応は有意に抑制された。また、同濃度でのinactive U-73122前処理では $5 \times 10^{-7}$ MのS1P収縮反応は有意に抑制されなかった。
7.  $10^{-7}$ M xetosponginc前処理によって、 $5 \times 10^{-7}$ MのS1P収縮反応は有意に抑制された。また、 $10^{-5}$ M nifedipine前処理では $5 \times 10^{-7}$ MのS1P収縮反応は有意に抑制されなかった。
8. high-K<sup>+</sup>溶液で細胞膜を完全に脱分極させた条件

でも、 $5 \times 10^{-7}$ MのS1Pは収縮反応を誘起した。さらに、1 mM EGTA Ca<sup>2+</sup> free high-K溶液環境下においても、 $5 \times 10^{-7}$ MのS1Pは収縮反応を誘起した。

以上の結果から、S1Pはマウス腸骨リンパ管平滑筋に作用し、内因性NOやプロスタグランジンによるものではなく、主にS1P2受容体および1, 4, 5-IP<sub>3</sub>受容体を介した細胞内貯蔵部位のCa<sup>2+</sup>放出によってリンパ管平滑筋細胞収縮を誘起していることが証明された。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### Endogenous CGRP protects against neointimal hyperplasia following wire-induced vascular injury (内因性CGRPは、血管傷害による新生内膜形成を抑制する)

#### 楊 磊

##### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、カルシトニン遺伝子のalternative splicingによって作られる37個のアミノ酸残基からなるペプチドであり、神経系、消化器系、血管などに発現が認められ、強力な血管拡張作用のほか、細胞増殖調節など多彩な生理活性を有するペプチドである。我々はCGRPのファミリー因子であるアドレノメデュリン(adrenomedullin: AM)について、その血管保護作用を報告してきたが、CGRPにもAMと同様の作用があるのか、詳細は不明である。

我々は、カルシトニン-CGRP遺伝子配列のうち、CGRPに特異的なエクソン5のみを欠損させることで、カルシトニンは正常に保たれ、CGRPのみ欠損するノックアウトマウス(CGRP<sup>-/-</sup>マウス)を樹立した。本研究では、CGRP<sup>-/-</sup>マウスを用いて、血管傷害モデルを作製し、血管傷害後の新生内膜形成におけるCGRPの役割を検討した。

【結果】マウス大腿動脈にワイヤーを挿入し血管内腔を擦過処理することで、血管に傷害を加えた。血管傷害後、野生型(WT)マウス、CGRP<sup>-/-</sup>マウス共に新生内膜形成を認めたが、傷害後4週間後の新生内膜厚は、CGRP<sup>-/-</sup>マウスで有意に亢進していた。血管傷害部位の再内皮化には、WTとCGRP<sup>-/-</sup>に有意な差を認めなかったが、CGRP<sup>-/-</sup>マウスでは、新生内膜において $\alpha$ SMA陽性細胞数が有意に増加していた。遺伝子発現や免疫組織染色の結果から、CGRP<sup>-/-</sup>マ

ウスでは、血管傷害部位の新生内膜や外膜においてマクロファージの浸潤や、酸化ストレスレベルが亢進していること示された。一方で、腹腔マクロファージにおける検討では、WT、CGRP<sup>-/-</sup>マウスともに、炎症性サイトカイン発現量に有意な差を認めなかったため、マクロファージにおけるCGRP欠損自体が、新生内膜形成の主因ではないと考えられた。これに対し、CGRP<sup>-/-</sup>マウスの新生内膜では、細胞増殖を示すPCNA陽性平滑筋細胞が有意に増加しており、平滑筋細胞の増殖亢進が、新生内膜形成亢進の主因と考えられた。

血管傷害後の新生内膜形成には、骨髄由来細胞の関与が報告されている。そこで、CGRP<sup>-/-</sup>マウスにおける新生内膜形成に骨髄由来細胞が関与しているか明らかとするため、CGRP<sup>-/-</sup>あるいはWTマウスの骨髄を、放射線照射したWTマウスに移植し、血管傷害を加えて新生内膜形成を検討した。その結果、CGRP<sup>-/-</sup>、WTマウスの骨髄細胞のどちらを移植しても、新生内膜形成に差を認めないことから、CGRP<sup>-/-</sup>マウスにおける新生内膜形成亢進は、骨髄由来細胞の関与によるものではなく、傷害部位局所の平滑筋細胞増殖が原因であることが示唆された。

次に、in vitroの系において、CGRPが、平滑筋細胞増殖、遊走に及ぼす影響を検討した。ラット平滑筋細胞増殖を、BrdU取り込み法を用いて検討したところ、CGRP添加は、濃度および時間依存性に平滑筋増殖を抑制することが示された。またScratch-

Wound アッセイにより、平滑筋細胞遊走能を検討したところ、CGRP 添加により、細胞遊走が抑制されることが示された。マウス由来平滑筋細胞でも同様の結果であった。一方、CGRP<sup>-/-</sup>マウス由来平滑筋細胞は、WTマウス由来平滑筋細胞と比較して、PDGF-BB 刺激下の細胞増殖が亢進していることが示された。最後に、CGRPによる平滑筋細胞増殖抑制のメカニズムを検討した。ウェスタンブロットの検討では、平滑筋細胞に CGRP を添加することにより、extracellular signal regulated kinase (ERK) 1/2 の活性が抑制される事が示された。

【結論】以上の結果から、内因性 CGRP は、酸化ストレスと血管平滑筋細胞の増殖を制御することにより、新生内膜形成を抑制し、動脈硬化の進展を抑制していると考えられる。CGRP による血管保護作用は、動脈硬化症の新たな治療標的となる可能性が示唆される。

(論文審査の結果の要旨)

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、カルシトニン遺伝子の alternative splicing によって作られる37個のアミノ酸残基からなるペプチドであり、神経系、消化器系、血管などに発現が認められ、強力な血管拡張作用のほか、細胞増殖調節など多彩な生理活性を有するペプチドである。CGRP のファミリー因子であるアドレノメデュリン (adrenomedullin: AM) については、これまで、その血管保護作用が報告されてきたが、CGRP にも AM と同様の作用があるのか、詳細は不明である。

楊磊は、カルシトニン-CGRP 遺伝子配列のうち、CGRP に特異的なエクソン5のみを欠損させることで、カルシトニンは正常に保たれ、CGRP のみ欠損するノックアウトマウス (CGRP<sup>-/-</sup>マウス) を用いて、血管傷害モデルを作製し、血管傷害後の新生内膜形成における内因性 CGRP の役割を検討した。

その結果、楊磊は次の結論を得た。

1. CGRP<sup>-/-</sup>マウスでは、野生型マウスと比較して、血管傷害4週間後の新生内膜形成が有意に亢進しており、内膜/中膜 (I/M) 比が有意に高値であった。このことから、内因性 CGRP は、血管傷害時における新生内膜形成を抑制し、血管保護に働いていることが示された。
2. CGRP<sup>-/-</sup>マウスでは、傷害血管部位において、酸化ストレスレベルの増強を認め、eNOS の発現が有意に低下し、NADPH サブユニットである P47phox の有意な上昇と、p67phox の上昇傾向が認められた。このことから、内因性 CGRP は、酸化ストレスを抑制し、血管傷害を抑制すると考えられた。
3. CGRP<sup>-/-</sup>マウスの骨髄細胞を野生型マウスに移植したマウスでは、新生内膜形成には有意な変化を認めなかった。CGRP は、培養血管平滑筋細胞の増殖、遊走を抑制した。一方で、CGRP<sup>-/-</sup>由来の血管平滑筋細胞は、野生型マウス由来の平滑筋細胞に比べて、増殖が亢進していた。また CGRP は平滑筋細胞において、細胞増殖、遊走に関わるタンパク質キナーゼである ERK 1/2 活性を抑制した。このことから、CGRP は、血管平滑筋細胞の ERK 1/2 活性を抑制し、平滑筋細胞の増殖、遊走を抑制し、新生内膜形成を抑制することが示された。一方、骨髄由来細胞への影響は少ないと考えられた。以上の結果から、楊磊は、内因性 CGRP は、酸化ストレスと血管平滑筋細胞の増殖を制御することにより、新生内膜形成を抑制し、動脈硬化の進展を抑制していること、更に、CGRP による血管保護作用は、動脈硬化症の新たな治療標的となる可能性を初めて示した。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認めた。

Specific interaction of postsynaptic densities with membrane rafts isolated from synaptic plasma membranes (精製シナプス後肥厚部と膜ラフトの特異的相互作用)

劉 茜

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】細胞膜上には、膜ラフトと呼ばれるコレステロールとスフィンゴ脂質に富む微小膜領域が存在している。この膜ラフトは細胞内情報伝達、細胞接着、タンパク質ソーティングなどの様々な細胞機能において重要な役割を演じることが知られている。シナ

プス後部においてもこの膜ラフトが存在していて、シナプス形成と維持、神経細胞の可塑性などに関わっていると考えられている。しかし、シナプス後部の膜ラフトについて詳細に検討した報告はほとんどない。シナプス後部にはもう一つの重要な細胞内情報処理に関わる場、シナプス後肥厚部 (Postsynaptic density,

PSD) が古くから知られているが、現在では、シナプス後部膜ラフトと PSD の関係を明らかにすることが今後の重要な研究課題と考えられている。我々は2011年の論文 (Suzuki et al, 2011, 119: 64-77. 学位申請参考論文) で、シナプス膜から界面活性剤不溶性浮遊画分 (Detergent-resistant membrane, DRM) を単離し、そのタンパク質成分をプロテオミクス解析により同定するとともに、PSD 構成タンパク質成分と比較した。その結果、両方の細胞内構造に共通して存在している分子が数多く存在していることを明らかにした。さらに、シナプス膜を0.15% Triton X-100で処理して得られた DRM 画分中に PSD-ラフト複合体が存在していることを電子顕微鏡で同定した。これらの結果から、PSD とシナプス後部膜ラフトが相互作用している可能性が示唆された。本研究では、精製 PSD とシナプス後部膜ラフトを用いて、*in vitro* でこの二つのシナプスドメインの結合を解析した。

**【実験方法】 PSD とシナプス後部膜ラフトの精製：**6週齢ラットの前脳から調製したシナプス膜を種々の濃度の Triton X-100またはオクチルグルコシド (OG) で処理した後、ショ糖密度勾配遠心 (SDG) を行い、12画分を分離・回収した。各画分のタンパク質および GM1ガングリオシドの分布は電気泳動 (銀染色) およびドットプロットで調べた。また、質量分析、ウエスタンブロットングにてタンパク質を同定した。**PSD とシナプス後部膜ラフトの *in vitro* 結合実験：**精製した PSD (OG 処理フラクション12) とシナプス後部膜ラフト (OG 処理フラクション4) を混合し、4°Cで4時間インキュベートした後、再び SDG にかけた。SDG 後、タンパク質の分布と分画内に含まれる構造を電気泳動、質量分析、ウエスタンブロットングおよび電子顕微鏡で解析した。精製ラフト画分 (DRM) への PSD タンパク質の結合は31-kDa PSD タンパク質の結合量で定量した。コントロールとしては、肝細胞膜から調製した DRM を用いた。

**【結果と考察】** OG と Triton X-100とでは PSD とシナプス後部膜ラフト (DRM) の分離のされ方に大きな違いが観察された。すなわち、Triton X-100では PSD とラフトの分離作用が弱く、一定条件下で PSD-ラフト複合体が保存されたのに対して、OG では PSD とラフトの分離は完全で、調べた限りのどの様な OG 濃度においても PSD-ラフト複合体の存在は観察されなかった。次に、精製 DRM と PSD を用いた *in vitro* で結合実験において、シナプス膜由来 DRM には肝細胞

由来 DRM に比べて有意に多くの PSD タンパク質が結合することが明らかになった。またシナプス膜由来 DRM には PSD 構造が結合していることが電子顕微鏡を用いた観察で明らかになった。この様に本実験では、*in vitro* で PSD とシナプス後部膜ラフトが特異的に結合することが明らかになった。以上の結果は、PSD とシナプス後部膜ラフトが *in vivo* においても相互作用することを強く示唆している。また、今後、PSD とシナプス後部膜ラフトの結合の仕組みや、結合に介在する分子を明らかにして行く上で、本実験で用いたアッセイシステムが有用な系として利用可能であると考えられた。

#### (論文審査の結果の要旨)

細胞膜上には、膜ラフトと呼ばれるコレステロールとスフィンゴ脂質に富む微小膜領域が存在している。この膜ラフトは細胞内情報伝達、細胞接着、タンパク質ソーティングなどの様々な細胞機能において重要な役割を演じることが知られている。シナプス後部においてもこの膜ラフトが存在していて、シナプス形成と維持、神経細胞の可塑性などに関わっていると考えられている。しかし、シナプス後部の膜ラフトについて詳細に検討した報告はほとんどない。シナプス後部にはもう一つの重要な細胞内情報処理に関わる場、シナプス後肥厚部 (Postsynaptic density, PSD) が古くから知られているが、現在では、シナプス後部膜ラフトと PSD の関係を明らかにすることが今後の重要な研究課題と考えられている。我々は2011年の論文 (Suzuki et al, 2011, 119: 64-77. 学位申請参考論文) で、シナプス膜から界面活性剤不溶性浮遊画分 (Detergent-resistant membrane, DRM) を単離し、そのタンパク質成分をプロテオミクス解析により同定するとともに、PSD 構成タンパク質成分と比較した。その結果、両方の細胞内構造に共通して存在している分子が数多く存在していることを明らかにした。さらに、シナプス膜を0.15% Triton X-100で処理して得られた DRM 画分中に PSD-ラフト複合体が存在していることを電子顕微鏡で同定した。これらの結果から、PSD とシナプス後部膜ラフトが相互作用している可能性が示唆された。本研究では、精製 PSD とシナプス後部膜ラフトを用いて、*in vitro* でこの二つのシナプスドメインの結合を解析した。

PSD とシナプス後部膜ラフトの精製：6週齢ラットの前脳から調製したシナプス膜を種々の濃度の Triton X-100またはオクチルグルコシド (OG) で処

理した後、シヨ糖密度勾配遠心 (SDG) を行い、12 画分を分離・回収した。各画分のタンパク質および GM1 ガングリオシドの分布は電気泳動 (銀染色) およびドットプロットで調べた。また、質量分析、ウエスタンブロッティングにてタンパク質を同定した。PSD とシナプス後部膜ラフトの *in vitro* 結合実験：精製した PSD (OG 処理フラクション12) とシナプス後部膜ラフト (OG 処理フラクション4) を混合し、4°C で 4 時間インキュベートした後、再び SDG にかけた。SDG 後、タンパク質の分布と分画内に含まれる構造を電気泳動、質量分析、ウエスタンブロッティングおよび電子顕微鏡で解析した。

その結果、劉茜は次の結論を得た。

1. OG と Triton X-100 とでは PSD とシナプス後部膜ラフト (DRM) の分離のされ方に大きな違いが観察された。すなわち、Triton X-100 では PSD とラフトの分離作用が弱く、一定条件下で PSD-ラフト複合体が保存されたのに対して、OG では PSD とラフトの分離は完全で、調べた限りのどの様な

OG 濃度においても PSD-ラフト複合体の存在は観察されなかった。

2. 次に、精製 DRM と PSD を用いた *in vitro* で結合実験において、シナプス膜由来 DRM には肝細胞由来 DRM に比べて有意に多くの PSD タンパク質が結合することが明らかになった。またシナプス膜由来 DRM には PSD 構造が結合していることが電子顕微鏡を用いた観察で明らかになった。この様に本実験では、*in vitro* で PSD とシナプス後部膜ラフトが特異的に結合することが明らかになった。

以上の結果は、PSD とシナプス後部膜ラフトとが *in vivo* においても相互作用することを強く示唆している。また、今後、PSD とシナプス後部膜ラフトの結合の仕組みや、結合に介在する分子を明らかにして行く上で、本実験で用いたアッセイシステムが有用な系として利用可能であると考えられた。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Increased cerebrospinal fluid interleukin-6 levels in patients with schizophrenia and those with major depressive disorder (統合失調症患者および大うつ病性障害患者における髄液中インターロイキン-6濃度の上昇)

## 篠山 大明

### (論文の内容の要旨)

【背景】統合失調症およびうつ病の病態生理には脳への過剰なインターロイキン-6 (IL-6) シグナルの関与していることが多くの研究で示唆されている。統合失調症患者と大うつ病性障害の患者では健常者と比較して血清中の IL-6 濃度が高値であることが知られているが、髄液中の IL-6 濃度を調べた研究は少ない。中枢感染症や低酸素状態では中枢神経由来の IL-6 が上昇することが知られており、さらに、髄液中と末梢血中の IL-6 濃度には相関を認めないとする報告がある。従って、統合失調症およびうつ病における中枢神経由来の IL-6 の病態への関与を解明するためには、中枢神経の変化を反映する髄液中の濃度を測定する必要がある。本研究では、統合失調症患者、大うつ病性患者、健常者における髄液中の IL-6 濃度を比較した。【方法】統合失調症患者 32 名 (平均年齢 40.8 ± 8.8, 女性 12 名)、大うつ病性患者 30 名 (平均年齢 42.7 ± 8.2, 女性 11 名)、健常者 35 名 (平均年齢 41.3 ± 16.4, 女性 14 名) より採取した髄液中の IL-6 濃度を測定した。

髄液中と末梢血中の IL-6 濃度の相関を調べるために、対象者のうち患者群全例および健常者 32 名においては、髄液検査施行時に採取した血清中の IL-6 濃度も測定した。髄液中および血清中 IL-6 濃度はサンドウィッチ ELISA 法を用いて測定した。統合失調症および大うつ病性障害の重症度の評価にはそれぞれ陽性・陰性症状評価尺度 (PANSS) およびハミルトンうつ病評価尺度 21 項目版 (HAMD-21) を用いた。抗精神病薬および抗うつ薬の 1 日服用量はそれぞれクロロプロマジン換算値およびイミプラミン換算値を用いて計算した。本研究は国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得ており、対象者には研究の内容を説明した上で文書にて同意を得た。

【結果】健常対照群と比較して患者群で有意に髄液中 IL-6 濃度が高かった (統合失調症:  $P=0.0027$ , 大うつ病性障害:  $P=0.012$ )。髄液中 IL-6 濃度は血清中 IL-6 濃度より有意に高く、両者間の相関は有意ではなかった。統合失調症患者において、PANSS の陽性症状および陰性症状の得点はいずれも髄液中 IL-6



濃度と有意な相関は示さず、抗精神病薬の1日服用量も髄液中IL-6濃度と有意な相関を示さなかった。同様に、大うつ病性患者において、HAMD-21の得点は髄液中IL-6濃度と有意な相関を示さず、抗うつ薬の1日服用量も髄液中IL-6濃度と有意な相関は示さなかった。

【結論】髄液中のIL-6が末梢血中より高い濃度であることから、統合失調症患者および大うつ病性障害患者で上昇がみられる髄液中のIL-6は、末梢組織由来IL-6の受動的な拡散によるものではなく、中枢神経にて産生されたものであることが示唆される。すでに多くの研究で統合失調症患者および大うつ病性患者の血清中のIL-6濃度が健常者と比較して高値であることが報告されているが、今回、髄液中でも同様に濃度が高いことを示すことで、統合失調症および大うつ病性障害の病態にIL-6が関与している可能性をさらに裏付ける結果が得られた。

(論文審査の結果の要旨)

中枢神経系は内分泌系や自律神経系を介して免疫系に影響を及ぼす一方で、免疫系はサイトカインを介して脳への情報伝達を行っている。インターロイキン-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインは、うつ症状や統合失調症の症状に類似した精神症状を引き起こすことが知られており、すでに多くの研究で統合失調症患者と大うつ病性障害の患者では健常者と比較して血清中のIL-6濃度が高値であることが報告されている。一方で、統合失調症および大うつ病性患者の髄液を用いて中枢神経内のIL-6濃度を調べた研究は少数存在するのみで、結果も一貫していない。髄液中と血清中のIL-6濃度には相関を認めないとする報告があり、統合失調症およびうつ病における中枢神経由来のIL-6の病態への関与を解明するためには、中枢組織の変化を反映する髄液中の濃度を測定する必要がある。従っ

て、今回、統合失調症患者、大うつ病性患者、健常者における髄液中のIL-6濃度を比較した。

統合失調症患者32名(平均年齢40.8±8.8, 女性12名)、大うつ病性患者30名(平均年齢42.7±8.2, 女性11名)、健常者35名(平均年齢41.3±16.4, 女性14名)より採取した髄液中のIL-6濃度を測定した。髄液中と血清中のIL-6濃度の相関を調べるために、対象者のうち患者群全例および健常者32名においては、髄液検査施行時に採取した血清中のIL-6濃度も測定した。統合失調症および大うつ病性障害の重症度の評価にはそれぞれ陽性・陰性症状評価尺度(PANSS)およびハミルトンうつ病評価尺度21項目版(HAMD-21)を用いた。抗精神病薬および抗うつ薬の1日服用量はそれぞれクロルプロマジン換算値およびイミプラミン換算値を用いて計算した。

その結果、篠山大明は次の結論を得た。

1. 健常対照群と比較して患者群で有意に髄液中IL-6濃度が高かった。
2. 髄液中IL-6濃度は血清中IL-6濃度より有意に高く、両者間の相関は有意ではなかった。
3. 髄液中IL-6濃度と重症度との間には有意な相関を認めなかった
4. 髄液中IL-6濃度と向精神薬の1日服用量との間には有意な相関を認めなかった

これらの結果より、統合失調症患者および大うつ病性障害患者で上昇がみられる髄液中のIL-6は、末梢血由来IL-6の受動的な拡散によるものではなく、中枢神経内にて産生されたものであることが示唆された。中枢神経由来のIL-6が統合失調症および大うつ病性障害の病態生理に関与している可能性を示す結果であり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Mutation analysis of *BRAF* and *KIT* in circulating melanoma cells at the single cell level (血液循環メラノーマ細胞のシングルセルレベルでの *BRAF* と *KIT* の遺伝子解析)

境 澤 香 里

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、分子標的薬による治療は様々な癌に対して行われており、進行期メラノーマに対しては *BRAF* や *KIT* を標的にした治療が有用と考えられている。メラノーマの原発巣の60%に *BRAF* 変異が認められたと報告されており、*BRAF* 阻害剤である

vemurafenib は臨床治験が開始された。また、肢端型・粘膜型のメラノーマでは *KIT* 変異が20%近くに認められ、*KIT* 阻害剤である imatinib が有効だったと報告されている。個々の患者にこれらの治療を開始するためには腫瘍の遺伝子変異の解析が不可欠であるが、原発巣と転移巣の変異の有無は必ずしも一致しな

い。また、実際に腫瘍の切除検体が入手できない場合もある。Circulating tumour cells (CTC) は癌の患者の末梢血中を循環する腫瘍細胞で、CTC を得るためには採血が必要だが、腫瘍の切除と比べはるかに低侵襲である。繰り返し検体を得ることも可能で、CTC からリアルタイムの情報を得て、腫瘍の再発や転移の指標となりうる。本研究ではこの CTC を分離し、個々の細胞の *BRAF* と *KIT* の遺伝子変異の有無を解析し、原発巣と転移巣と比較し、分子標的治療におけるバイオマーカーとして利用可能かを検討した。

【材料及び方法】 <細胞株> 888 mel, 928 mel, MMG1 を用いて予備実験を行い、magnetic beads を用いたメラノーマ細胞分離の効率を検討した。<臨床検体> 担癌状態の stage IIIC から IV のメラノーマ患者 11 名より CTC を分離し、患者の原発巣と転移巣の切除検体と CTC の三者について *BRAF*, *KIT* の変異の有無を比較検討した。<方法> 5 ml の患者末梢血を使用し、抗 HMW-MAA 抗体を標識した magnetic beads によりメラノーマ細胞を分離した。さらに抗 CD45 抗体を標識した magnetic beads を用いて白血球を完全に除去した。得られた検体を MART-1 と gp100 で免疫染色し、陽性細胞を 1 つ 1 つずつ laser micro-dissection により分離した。その後、nested PCR とシーケンスを行った。

【結果】 培養細胞を用いた予備実験では健常人の末梢血に混じた細胞のうち 1 % から 24 % を beads 処理により分離した。11 名のメラノーマ患者の末梢血 5 ml からは 1 ~ 20 個の CTC を分離した。11 例中、原発巣の *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異をもつ症例が 3 例、転移巣の *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異を持つ症例が 2 例あり、そのうち原発巣と転移巣両方で共通して *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異であった症例は 1 例のみだった。原発巣・転移巣のいずれかの検体で *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異があった 4 例で CTC でも同じ変異があったのは 3 例で、そのうち 1 例は CTC で *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異のほか、*BRAF*<sup>V600K</sup> 変異と *BRAF*<sup>wild type</sup> が見出された。切除検体では *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異だったが、CTC では *BRAF*<sup>wild type</sup> だった例が 1 例あった。*KIT* の解析では、原発巣・転移巣いずれかの切除検体で *KIT* の変異があった症例は 3 例あったが、いずれの例でも CTC で同じ変異は示されなかった。原発巣で *KIT*<sup>wild type</sup> だったものの、CTC で *KIT*<sup>V560G</sup> を示した症例が 1 例あった。

【結論】 様々な癌で CTC の分離が行われているが、多くは上皮系の腫瘍で EpCAM や BerEP4, cytoke-

atin などの上皮系の特異抗原が用いられてきた。メラノーマでは CTC の分離に有用な抗体がなかったため、CTC は PCR 法を基本とした mRNA レベルの解析が行われてきた。しかし、近年メラノーマ細胞の細胞膜に発現している HMW-MAA に対する特異抗体を用いた CTC の分離が報告されるようになった。従来の HMW-MAA 抗体を用いた magnetic beads による CTC 分離では依然として血球細胞の混在を認めしたが、我々が行った複数のステップを介した手技では HMW-MAA<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, MART-1/GP100<sup>+</sup> の特徴を持つ細胞を分離することが可能となり、この特徴をもった細胞を CTC と判定した。このようにしてメラノーマ患者の末梢血から得られた CTC の *BRAF* の genotype は原発巣のそれと一致する傾向がみられたが、異なる例も存在した。*KIT* の genotype に至っては原発巣、転移巣、CTC の間で変異の一致はみられなかった。これらの結果はメラノーマの腫瘍が必ずしもモノクローナルな細胞で構成されているわけではないことを示していた。さらに、原発巣を切除した時点と CTC が得られた時点では変異を持つ腫瘍細胞の割合が変化している可能性も考えられた。以上より、将来、分子標的治療を行う上で非常に重要となる変異の同定に、切除検体に含まれる多くのメラノーマ細胞を一塊にして解析するとともに、1 つ 1 つの CTC を解析することが有用であることが明らかとなった。

#### (論文審査の結果の要旨)

進行期メラノーマに対する有効な治療法は確立されていない。しかし近年 *BRAF* や *KIT* を標的にした分子標的治療が有力と考えられている。メラノーマの原発巣の 60 % に変異が認められたと報告されている *BRAF* に対しては、*BRAF* 阻害剤である vemurafenib が臨床治験中である。また、肢端型・粘膜型メラノーマの 20 % 近くに変異がある *KIT* に対しては *KIT* 阻害剤である imatinib が有効だったと報告されている。個々の患者にこれらの治療を開始するためには腫瘍の遺伝子変異の解析が不可欠だが、臨床の場では原発巣が得られないこともあり、また原発巣と転移巣で変異の有無は必ずしも一致しない。そこで境澤らは癌患者の末梢血中を循環する腫瘍細胞である circulating tumor cells (CTC) をメラノーマ患者の末梢血から分離し、CTC 1 個単位で *BRAF* と *KIT* の遺伝子変異を解析した。

その結果、境澤は次の結果を得た。

1. 抗 HMW-MAA 抗体を一次抗体とした磁気ビー

- ズを用い、さらに抗 CD45 抗体と結合した磁気ビーズを使用し混じた白血球を完全に除去し、メラノーマ患者からの CTC の分離を従来と比較しより効率よく行った。
2. Stage IIIC~IV のメラノーマ患者 11 例の末梢血 5 ml から 1~20 個の CTC の分離に成功した。
  3. 11 例中、原発巣の *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異を持つ症例が 3 例、転移巣の *BRAF*<sup>V600E</sup> を持つ症例が 2 例あり、そのうち原発巣と転移巣両方で共通の *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異のあった症例は 1 例のみだった。
  4. 原発巣・転移巣のいずれかの検体で *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異があった 4 例で CTC でも同じ変異があったのは 3 例で、そのうち 1 例は CTC で *BRAF*<sup>V600E</sup> のほか、*BRAF*<sup>V600K</sup> 変異と *BRAF*<sup>wild type</sup> が見出された。
  5. *KIT* の解析では原発巣・転移巣いずれかの検体で *KIT* の変異があった 3 例で、CTC において同じ変異は示されなかった。

6. 原発巣で *KIT*<sup>wild type</sup> だったものの、CTC で *KIT*<sup>V560G</sup> を示した症例が 1 例あった。

メラノーマ患者の末梢血から得られた CTC の *BRAF* の genotype は原発巣のそれと異なる例が存在した。*KIT* の genotype に至っては、原発巣・転移巣・CTC で変異の一致は見られなかった。これらの結果はメラノーマの腫瘍が必ずしもモノクローナルな細胞で構成されているのではないことを示していた。さらに、原発巣を切除した時点と CTC が得られた時点では変異を持つ腫瘍細胞の割合が変化している可能性も考えられた。本研究はメラノーマ患者に分子標的治療を行う上で非常に重要となる変異の同定に CTC をシングルセルで解析することが有用である可能性を具体的に示したものであり、その臨床的意義は大きい。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。

## Periductal Induction of High Endothelial Venule-Like Vessels in Type 1 Autoimmune Pancreatitis (1 型自己免疫性膵炎における高内皮細静脈様血管の出現に関する検討)

丸 山 雅 史

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】 1 型自己免疫性膵炎は膵管周囲における著明なリンパ球と形質細胞浸潤を組織学的特徴とする。生体内において組織へのリンパ球の誘導はリンパ球ホーミング機序の変化により引き起こされていると考えられている。

血液中のリンパ球は末梢リンパ組織内に存在する高内皮細静脈 (High endothelial venule: HEV) の血管壁を通り抜けることで目的組織中に誘導される。リンパ球はその後、輸出リンパ管から胸管をへて再び血液中に戻ることで体内を再循環している。それが組織へのリンパ球ホーミングと呼ばれる機序である。消化管組織内におけるリンパ球の誘導については HEV の血管内皮にリンパ球が接着する機序が最初の段階で認められ、その接着機構として L-selectin をリガンドとする糖鎖 6-sulfo sialyl Lewis X 構造を有する糖蛋白質があり、それは mouse endothelial cell antigen 79 (MECA-79) 陽性血管として認識される。また、 $\alpha 4\beta 7$  integrin をリガンドとする粘膜細胞接着分子である mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) も同様に接着分子として確認されている。

本研究の目的は、リンパ球の誘導に関与する高内皮細静脈様血管 (high endothelial venule-like vessel) の出現ならびに MECA-79 陽性高内皮細静脈様血管と MAdCAM-1 陽性高内皮細静脈様血管の出現を評価することで 1 型自己免疫性膵炎の組織学的特徴を明らかにすることである。

【材料及び方法】 1 型自己免疫性膵炎、腫瘍関連慢性膵炎、正常膵の手術標本組織を用いて各抗体を用いた組織免疫染色を行った。MECA-79 抗体、MAdCAM-1 抗体、そしてすべての細血管に発現する CD34 抗体を用いて MECA-79 陽性高内皮細静脈様血管と CD34 陽性細血管の比、MAdCAM-1 陽性高内皮細静脈様血管と CD34 陽性細血管の比を各組織において比較した。【結果】 膵管周囲における MECA-79 陽性高内皮細静脈様血管の発現は腫瘍関連慢性膵炎に比し 1 型自己免疫性膵炎で有意に増加していた。それに対し MAdCAM-1 陽性高内皮細静脈様血管の発現は両者において差は認めなかった。また、MECA-79 陽性高内皮静脈様血管は膵組織のみならず、1 型自己免疫性膵炎における膵外病変である硬化性唾液腺炎の組織においても膵管周囲に多数発現していた。また、正常膵管、唾液腺管上皮にも MECA-79 陽性細胞が出現しており

6-sulfo-sialyl Lewis X が発現していることが判明した。

【結論】 腺管周囲の MECA79陽性高内皮細静脈様血管の発現増加は 1 型自己免疫性膵炎の組織学的特徴であり、腺管上皮、唾液腺管の上皮にも MECA-79 によって認識される糖鎖である 6-sulfo-sialyl Lewis X が発現していた。1 型自己免疫性膵炎または IgG4 関連疾患では L-selectin と 6-sulfo-sialyl Lewis X を持つ糖蛋白質が発症メカニズムと関与している可能性がある。

#### (論文審査の結果の要旨)

1 型自己免疫性膵炎は腺管周囲における著明なリンパ球と形質細胞浸潤を組織学的特徴とする。一方、生体内において 2 次リンパ装置へのリンパ球誘導はリンパ球ホーミングにより引き起こされる。1 型自己免疫性膵炎におけるリンパ球浸潤の分子機構については解明されていない点が多い。今回、組織標本を用いたリンパ球ホーミングに関与する高内皮細静脈様血管 (high endothelial venule-like vessel) とその細胞発現分子について解析した。

リンパ球ホーミングについては組織中に存在する高内皮細静脈の血管内皮にリンパ球が接着する機序が最初の段階で認められ、その相互作用機構として L-selectin のリガンド糖鎖である 6-sulfo sialyl Lewis X 構造を有する糖蛋白質が高内皮細静脈の血管内皮細胞に発現しており、この細胞は mouse endothelial cell antigen 79 (MECA-79) による免疫染色により同定さ

れる。また、 $\alpha 4\beta 7$  integrin をリガンドとする mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) も同様に高内皮細静脈の血管内皮に発現している。

今回、手術により摘出された 1 型自己免疫性膵炎、腫瘍関連慢性膵炎、正常膵、及び IgG4 関連硬化性唾液腺炎の組織検体を用い、CD34 陽性細静脈、MECA-79 陽性高内皮細静脈様血管、及び MAdCAM-1 陽性高内皮細静脈様血管の出現を評価した。

その結果、丸山は次の結論を得た

1. 1 型自己免疫性膵炎においても全例で MECA-79 陽性高内皮細静脈様血管が出現していた。さらには IgG4 関連硬化性唾液腺炎でも出現が確認された。
2. 腺管上皮と唾液腺管上皮では MECA-79 陽性の糖鎖が出現しており、病態との関連が示唆された。
3. 1 型自己免疫性膵炎では MECA-79 陽性高内皮細静脈様血管が高頻度で出現しており、L-selectin と 6-sulfo sialyl Lewis X 構造を有する糖鎖の結合を介したリンパ球ホーミングが起こっている可能性が示された。

これらの結果より、MECA-79 陽性高内皮細静脈様血管と 1 型自己免疫性膵炎の関連が示唆され、1 型自己免疫性膵炎における病態解明の一端となる可能性が示された。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### Lymphocyte recruitment via high endothelial venules in lymphoid stroma of Warthin's tumor (ワルチン腫瘍のリンパ様間質における高内皮細静脈からのリンパ球ホーミング)

## 大 彌 歩

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】 ワルチン腫瘍は、腺腔形成を示す上皮細胞とリンパ様間質から構成される。リンパ様間質はリンパ節に類似した特徴を有するため、ワルチン腫瘍は胎生期に耳下腺内または周囲のリンパ節内に取り込まれた異所性の唾液腺組織から発生すると考えられてきた。しかし、ワルチン腫瘍の上皮成分とリンパ濾胞との位置関係、上皮成分が IgA を分泌すること、DC-SIGN 陽性樹状細胞の分布が粘膜組織と類似している点から、リンパ様間質は mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) に類似していることが示唆されている。一方、リンパ球の表面上に発現する L-セレクトインは、二次リンパ組織内に存在する高内皮細静脈内皮

上に発現する糖鎖である 6 硫酸化シアリルルイス X と結合し、リンパ球ホーミングの最初の段階に至る。MALT では、他のリガンドである mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) が高内皮細静脈内皮上に特異的に発現している。今回、ワルチン腫瘍のリンパ様間質の特徴を明らかにすることを目的として、リンパ様間質中の高内皮細静脈内皮上に発現する糖鎖発現形式を免疫組織学的に調べた。

【材料および方法】 信州大学医学部附属病院でワルチン腫瘍と診断された 10 例を対象とした。これらホルマリン固定パラフィン包埋切片に対して、抗 CD34 抗体、抗 MAdCAM-1 抗体、6-sulfo sialyl LacNAc 抗原を認識する S1 抗体および S2 抗体、MECA-79 抗体を用

いた免疫染色を行った。次に、L-selectin・IgM キメラを用いて、組織切片中でL-selectin のリガンドとの結合実験を行った。最後に、ワルチン腫瘍のリンパ様間質内の高内皮細静脈内皮に接着しているT細胞とB細胞数を計測するため、MECA-79抗体、抗CD20抗体と抗CD79 $\alpha$ 抗体の混合抗体、抗CD3抗体による3重染色を行い、1個あたりの高内皮細静脈に接着する平均のT細胞とB細胞数をそれぞれ計測した。【結果】ワルチン腫瘍のリンパ様間質における高内皮細静脈内皮は、MECA-79抗原、6-sulfo sialyl LacNAc抗原を表出していた。10例中2例でMAdCAM-1抗原の発現が認められた。また、L-selectin・IgM キメラはいずれも高内皮細静脈内皮にCa<sup>2+</sup>依存性に結合した。高内皮細静脈内皮には、T細胞がB細胞に比べ有意に接着していた ( $p=0.0003$ )。

【結論】ワルチン腫瘍のリンパ様間質は、二次リンパ組織、特にMALTと類似する機構により高内皮細静脈を介してリンパ球がホーミングすることで、発達すると考えられた。

#### (論文審査の結果の要旨)

ワルチン腫瘍(WT)のリンパ様間質はリンパ節に類似した特徴を有するため、WTは胎生期に耳下腺内または周囲のリンパ節内に取り込まれた異所性の唾液腺組織から発生すると考えられてきた。しかし、WTの上皮成分とリンパ濾胞との位置関係、上皮成分がIgAを分泌すること、DC-SIGN陽性樹状細胞の分布が粘膜組織と類似している点から、リンパ様間質はmucosa-associated lymphoid tissue (MALT)に類似していることが示唆されている。一方、リンパ球の表面上に発現するL-セレクチンは、二次リンパ組織内に存在する高内皮細静脈内皮上に発現する糖鎖である6硫酸化シアリルルイスXと結合し、リンパ球ホーミングの最初の段階に至る。MALTでは、他のリガンドであるmucosal addressin cell adhesion

molecule 1 (MAdCAM-1)が高内皮細静脈内皮上に特異的に発現している。今回、WTのリンパ様間質の特徴を明らかにすることを目的として、リンパ様間質中の高内皮細静脈内皮上に発現する糖鎖発現形式を免疫組織学的に調べた。

信州大学医学部附属病院でWTと診断された10例を対象とした。これらホルマリン固定パラフィン包埋切片に対して、抗CD34抗体、抗MAdCAM-1抗体、6-sulfo sialyl LacNAc抗原を認識するS1抗体およびS2抗体、MECA-79抗体を用いた免疫染色を行った。次に、L-selectin・IgM キメラを用いて、組織切片中でL-selectin のリガンドとの結合実験を行った。最後に、WTのリンパ様間質内の高内皮細静脈内皮に接着しているT細胞とB細胞数を計測するため、MECA-79抗体、抗CD20抗体と抗CD79 $\alpha$ 抗体の混合抗体、抗CD3抗体による3重染色を行い、1個あたりの高内皮細静脈に接着する平均のT細胞とB細胞数をそれぞれ計測した。

その結果、大綱は次の結論を得た。

1. WTのリンパ様間質における高内皮細静脈内皮には、MECA-79抗原、6-sulfo sialyl LacNAc抗原を表出していた。
2. WTのリンパ様間質における高内皮細静脈内皮にはMAdCAM-1抗原の発現が認められた。
3. L-selectin・IgM キメラは組織切片上、いずれも高内皮細静脈内皮にCa<sup>2+</sup>依存性に結合した。
4. 高内皮細静脈内皮には、T細胞がB細胞に比べ有意に接着していた ( $p=0.0003$ )

これらの結果より、WTのリンパ様間質は、二次リンパ組織、特にMALTと類似する機構により高内皮細静脈を介してリンパ球がホーミングすることで、発達すると考えられた。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Vital staining with iodine solution in oral cancer : iodine infiltration, cell proliferation, and glucose transporter 1 (口腔がんにおけるヨード生体染色機序の解明：ヨードの浸透、細胞増殖とグルコーストランスポーター1)

## 肖 鉄 朋

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】口腔扁平上皮癌は世界的にもっとも多い10の悪性腫瘍の中の一つであり、顎顔面領域での主要な悪性腫瘍の一つである。正確に病変範囲を判断

することは術後の局所再発、リンパ転移、生存率とQOLの向上などの非常に重要である。しかし、病変範囲の判定は視診、触診、医師の経験などに影響され、簡単、正確、そして客観的に癌病変の境界を判断でき

る方法は非常に有意義だと考えている。ヨード溶液生体染色は、上消化管および婦人科領域で癌の範囲の診断に広く臨床応用されている。口腔外科領域では、ヨードグリセリン液を用いた生体染色が、口腔咽頭粘膜病変或いは口腔咽頭扁平上皮癌の範囲の診断に有用であると報告された。

一般的にヨード生体染色は、ヨードと上皮細胞中のグリコーゲンが反応し、発色することにより病変の染め分けを行っていると考えられている（正常粘膜上皮細胞はグリコーゲンを保有する vs 異型性上皮はグリコーゲンを欠き発色しない）。しかし、実際に(1)ヨードは上皮内どこまでに染みこんでいるのか？(2)ヨードが染みこんだ場所には何があるのか？など、染色機序に関しては十分な検討が行われていない。そこで今回われわれは、口腔粘膜におけるヨード呈色反応の場と糖の取り込みに関連するグルコーストランスポーター1 (GLUT-1)、癌抑制遺伝子変異 (P53)、細胞増殖能 (Ki67) との関連について検討した。

【対象と方法】2009年10月から2011年12月の期間に、原発口腔扁平上皮癌と診断され当科で手術を行った31例のうち、ヨード染色による腫瘍マージンを鑑別された15例を対象とした。年齢は30～85歳であった。性別は、男性11例、女性4例、部位は舌7例、口底1例、歯肉4例、臼後三角1例、頬部1例、軟口蓋1例であった。

1. 標本採集および処理：手術より切除された摘出物の粘膜を洗浄、軽く乾燥された後、病変部位および周囲粘膜にヨード液綿球にて10～20秒塗布し、1～2分後、非染色域の範囲を確認し、染色域と非染色域の各5mm組織を含めて切り取り、速やかに切除組織を凍結させ、-80℃で保存した。
2. 生体組織の凍結切片を作製し、顕微鏡下にヨードの呈色反応範囲（染みこんだ範囲）を観察した。同じ標本のH-E染色、PAS染色及びKi-67、P53、GLUT-1染色を行い、陽性細胞の分布とヨードの呈色反応範囲との関係について分析した。

【結果】

1. ヨード染色では、不染域として認められた異常上皮のうち、Hyperplasia 1例 (6.7%)、中等度異型性上皮5例 (33.3%)、高度異型性上皮2例 (13.3%)、上皮内癌3例 (20%)、扁平上皮癌4例 (26.7%)であった。
2. ヨードは、染色域の上皮でSuperficial layerに浸透していた。非染色域では上皮内のヨードは確認

できなかった。一方PAS染色では、ヨード染色域の上皮のSuperficial layerはPAS陽性を示したが、不染域ではPAS陽性部位は見られなかった。染色域の上皮Superficial layerを3層に分けてヨードの浸透率を見ると、上1/3で100%、中間1/3で60.0%、下1/3で13.3%であった。一方、PAS陽性率はSuperficial layerの上1/3で100%、中間1/3で93.0%、下1/3で60.0%であった。

3. GLUT-1とP53の標識率は上皮全層においてヨード不染域が染色域よりも有意に高かった。また、Ki67に関しては、表層においてヨード不染域で標識率が有意に高かった。(Wilcoxon符号付順位検定,  $p < 0.05$ )。

【結語】

1. 口腔扁平上皮癌周囲の異形成性上皮の広がりを正確に診断することは、治療結果を左右する重要な因子である。われわれは、ヨード溶液を用いた生体染色を口腔粘膜に適用し、扁平上皮癌およびその周囲の異形成性上皮の広がりの診断に有用であることを確認した。
2. ヨードの浸透部位とPAS陽性部位とは一致しており、ヨードと上皮内のグリコーゲンとは何らかの反応を起こしている可能性が示唆された。ヨードはSuperficial layerまで確実に浸透しており、ヨード呈色反応の場はSuperficial layer（特に上部1/3～1/2）であると考えられた。
3. 上皮表層において、ヨード不染域と染色域の間でKi67の発現に有意差があり、ヨード染色機序に細胞分裂能に関連している可能性が示唆された。
4. がん細胞は好気条件下でもグルコースを大量に取り込み、解糖系を利用してATPを得る現象は、提唱者の名前から「ワールブルグ効果（ワーバーグ効果）」と呼ばれる。ヨード不染域と染色域の間でGLUT-1の発現に差が見られた。この結果は、癌細胞における糖代謝の促進（糖の取り込みの増加）を意味し、癌細胞ではグリコーゲンの消費、消失がおこり、そのためヨード染色不染となる可能性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

口腔扁平上皮癌に関して正確に病変範囲を判断することは術後の局所再発、リンパ転移、生存率とQOLの向上などの非常に重要である。ヨード生体染色は、口腔粘膜扁平上皮癌および異型性上皮を不染域として、正常非角化粘膜を染色域として染め分けることができ

る。そのため、上記疾患の病変範囲の描出に有用な方法であり、この方法を用いて病変を診断し、切除を行えば局所再発率を低減できることが報告されている。

ヨード生体染色は、ヨードと上皮細胞中のグリコーゲンが反応し、発色することにより病変の染め分けを行っていると考えられている。しかし、実際に(1)ヨードは上皮内どこまでに染みこんでいるのか?(2)ヨードが染みこんだ場所には何があるのか、起こっているのか?など、染色機序に関しては十分な検討が行われていない。そこで、口腔粘膜におけるヨード呈色反応の場とその染色機序を解明すべく、口腔扁平上皮癌切除標本を用いて、病理組織学的検討を行った。

その結果、肖は次の結論を得た。

1. ヨード不染粘膜はほぼ中等度異型性上皮以上であり、染色粘膜は正常非角化粘膜および軽度異型性上皮であった。この結果からヨード生体染色は、中等度以上の異型性上皮、癌上皮を不染域として描出している。
2. ヨード染色域と不染域を含めた組織を、染色後にすぐに採取し凍結切片を作製すると、ヨード溶液が浸透している部位、つまりここが“ヨード染色の場”と考えられる、を観察することができた。
3. 染色域ではヨードは上皮内に観察できたが、非染色域では上皮内に染みこんでいなかった。染まった上皮の Superficial layer でヨードの浸透率を見ると、上 1/3 で100%、中間 1/3 で60.0%、下 1/3 で13.3%であり、Superficial layer 上 1/3 に確実にヨードが浸透しており、“ヨード生体染色の場”はこの部分であると考えられた。
4. 一般的にヨード生体染色反応は、ヨードと上皮内のグリコーゲンとの反応であると考えられている。

そこで、上皮内のグリコーゲン存在率を PAS 染色で調べると、Superficial layer 上 1/3 で100%、中間 1/3 で93.3%、下 1/3 で60%であった。ヨードの浸透する部位に確実にグリコーゲンは存在しており、Superficial layer の上 1/3～1/2 がヨード生体染色の反応の場として矛盾しない。

5. GLUT-1と P 53の標識率は上皮全層においてヨード不染域が染色域よりも有意に高かった。このことは、ヨード不染粘膜上皮では上皮全層に渡って糖の取り込み増加と癌抑制遺伝子の変異が生じていることを示している。また、Ki67に関しては、Superficial layer においてヨード不染域で標識率が有意に高かった。これらの結果から、ヨード不染粘膜では全体的に糖の取り込みが増加しており、特に Superficial layer では細胞分裂の増加に伴い糖の代謝・消費の亢進が顕著で、そのためグリコーゲンの消費・消失がおこり、ヨード染色反応(ヨード-グリコーゲン反応)が消失しているものと推察された。今回の研究は、ヨードが実際に上皮に染みこんでいることを確認し、また、どの層まで染みこんでいるかを確認できたことは、ヨード生体染色の機序を解明するための第一歩として非常に価値のある研究である。また、ヨードが染みこんでいる部位では、細胞分裂能が亢進していることや、糖の代謝(グルコースの細胞内への取り込み)が亢進していることが確認された。これらの所見はヨード生体染色反応の機序を解明するだけでなく、癌細胞にみられる糖代謝異常を解明するためにも重要な知見である。以上より、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

A Case of Wound Dual Infection with *Pasteurella dagmatis* and *Pasteurella canis* Resulting from a Dog Bite —Limitations of Vitek-2 System in Exact Identification of *Pasteurella* Species— (イヌ咬傷から分離された *Pasteurella dagmatis* と *Pasteurella canis* 創部重複感染症の1例—Vitek-2システムによる *Pasteurella* 属の正確な同定の限界—)

赤羽 貴行

(論文の内容の要旨)

*Pasteurella* 属菌は多くの野生動物や家畜等の口腔内や消化管の常在する菌として知られ、人畜共通感染症の病原菌としても重要であり、*Pasteurella* 属菌によるヒトへの感染症としては、多くの場合、動物の咬傷によって引き起こされるケースが多い。今回我々は、健康な25歳女性がイヌ咬傷によって異なる2種の *Pasteurella* 属菌による同時感染した稀な重複感染症例に遭遇した。患者のイヌ咬傷部位の開放性膿と咬んだイヌの唾液の両者の細菌検査を実施したところ、チョコレート寒天培地とヒツジ血液寒天培地に形態学的に酷似した灰白色S型の滑らかなコロニーと光沢のある灰白色のコロニーの発育を認めた。これらの発育コロニーに対して、グラム染色、GNカードを用いたVitek2自動細菌検査装置による同定、簡易同定キットであるID-Test HN-20による同定、さらに Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing/3100 DNA sequencer 機器による16S rRNA 解析による同定を行った。イヌ咬傷により患者から分離された菌種は、培養検査による形態学的特徴、同定検査による生化学的性質、16S rRNA 遺伝子配列による遺伝学的解析成績から、最終的に *Pasteurella canis* と *Pasteurella dagmatis* と同定された。この両菌種とも多くの抗菌薬に高い感受性があり、患者はセファロスポリン系第一世代である cefazolin (セファゾリン；商品名セフマゾン) と、セファロスポリン系第三世代の cefcapene pivoxil (セフカペンピボキシル；商品名フロモックス) の投与により完治した。イヌの唾液から分離された菌株は、患者から分離された株と同一菌種である *P. canis* と同定された。

今回の症例は、我々の知る限り1988年の *P. dagmatis* と *P. multocida* による第1例目の重複感染症に続き、イヌ咬傷が原因である *P. dagmatis* と *P. canis* によって引き起こされた *Pasteurella* 属菌の第2例目の重複感染症であった。今回、*P. dagmatis* と最終的に同定された菌株Aは、ID-Test HN-20では遺伝学的手法と同様な結果が得られたのに対し、Vitek2自動細菌

検査装置では *P. pnuemotropica* と誤同定され、このVitek2システムのデータベースに '*P. dagmatis*' が含まれていないことに起因していた。また、*P. canis* と最終的に同定された菌株Bや菌株Cでは、Vitek2自動細菌検査装置では遺伝学的手法と同様な結果が得られたのに対し、ID-Test HN-20では *P. multocida* と誤同定された。このことから、*P. dagmatis* の分離頻度の低さや、本菌種に起因する感染症例の稀少さは、同定機器やキット製品の同定精度の問題に起因している可能性が推測された。Vitek2自動細菌検査装置は多くの医療施設の臨床微生物検査の現場で普及・稼働している機器の1種であるため、*Pasteurella* 属、特に *P. dagmatis* のVitek2自動細菌検査装置による正確な同定の限界を認識することは、臨床微生物学検査を行う現場では重要なことであり、Vitek2システムのさらなる改善の余地があることも判明した。

(論文審査の結果の要旨)

本学位論文は、イヌ咬傷部位の感染巣より *Pasteurella dagmatis* と *Pasteurella canis* の *Pasteurella* 属菌2菌種を同時に分離同定した重複感染症例の研究報告である。本研究の特徴は、菌種の正確な同定のために複数の同定機器・装置及び同定キットパネルを用いると同時に、16S リボゾーム RNA の塩基配列解析を行い生化学的性状と合わせて最終的に菌種名を同定したことである。

本論文の重要性は大きく以下の2点である。第一に、稀少症例であることである。臨床細菌検査室の日常検査で分離同定されることが極めて稀な2菌種による感染症例であり、特に *P. dagmatis* によるヒトへの感染事例の論文としては国内第一例目(学会報告が過去1例)であること、さらに *P. dagmatis* と *P. canis* による重複感染は世界で第一例目であった。

第二に、国内・外の臨床細菌検査室で広く普及している菌種同定装置であるVitek-2において *P. dagmatis* の同定が正しく行われなかったことと、また、我が国において汎用されている菌種同定キットであるID-Test HN-20において *P. canis* の同定が正しく行



われなかったことである。

特に後者に関して本論文が提唱していることは次の点である。日常検査で分離同定されることが比較的まれな菌種の同定検査を市販の菌種同定装置や同定キットを用いて行う場合には、同定機器・装置やキットパネルで示された結果が正しくない可能性があることを常に念頭におき、必ず複数の同定装置や同定キットを使用して相互に確認することが肝要である。さらに、それらの結果が不一致であった場合には16S リボゾーム RNA の塩基配列解析などの分子遺伝学的検査を併用することが重要である。

本論文の最後に、「*P. dagmatis* による感染事例が稀であると言うことが、同定機器装置による誤同定に起因している可能性がある」と記されている一文のもつ意味は極めて重い。また、稀な *P. dagmatis* が疑われる症例に遭遇した際に識別に有用と考えられる生化学的性状を整理して提示しているが、この鑑別性状

Table に示されている項目は、日頃臨床細菌検査の担当者や感染症を専門とする研究者のみならず、同定装置や同定キットを市販している製造・販売に関わる企業に対して極めて重要な情報であり、本論文で明らかにされた問題点を、感染症学分野、臨床細菌学分野へ投げかけた意味には大きいものがある。

公開学位論文審査は平成24年1月19日（保健学科331教室）18時から、主査、副査を含めた別紙の参加者名簿に示した10名の関係各位同席の中で開催された。本審査会での冒頭、申請者である「赤羽貴行」に本研究の概略を述べさせたのち、主査、副査からの質疑を行ったが、質疑に対しては別紙様式第8号のようなやり取りが行われ、質問に対する応答は概ね適切であることを確認し、本研究の遂行に十分な学力を有しているものと評価した。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文としての価値を十分に有するものと認めた。

Bactericidal activities of woven cotton and nonwoven polypropylene fabrics coated with hydroxyapatite-binding silver/titanium dioxide ceramic nanocomposite “Earth-Plus” (アースプラス (酸化チタン、ハイドロキシアパタイト、銀) 加工の施された綿織布とポリプロピレン不織布の医療関連感染起因性病原菌に対する殺菌活性)

春日 恵理子

(論文の内容の要旨)

【はじめに】医療施設では適切な感染管理が必要であり、医療関連感染を防ぐことは安全面ばかりではなく経済面においても重要な事象である。医療関連感染の感染経路の多くは、汚染された医療従事者の手指や環境、医療器具を介する接触感染によるものである。接触感染防止のために、Standard precautions や Maximal barrier precautions などの手法が用いられているが、感染の発生率を減らすためにはこれらの方法だけでは不十分であり、医療環境から病原微生物を減少させることが接触感染防止策の一つと考えられている。医療環境から菌を減少させるために、銀イオン等を用いた種々の抗菌材が利用されているが、用途や使用環境によってその効果は左右される。

【材料・方法】

(株)信州セラミックスから earth-plus (アースプラス) と呼ばれるセラミックス複合材が開発された。アースプラスは酸化チタン、ハイドロキシアパタイト、銀の3つの成分からなり、そのうち酸化チタンが殺菌のメカニズムの本体を担っている。

本研究では、アースプラスの抗菌効果の評価を行うために抗菌効果定量法、操作型電子顕微鏡を用いた菌体の観察および銀溶出試験を行った。尚、抗菌効果定量法は JIS L1902 に準じて行い、アースプラスは織布および不織布に加工して検討に用いた。

供試菌株は3菌種 (*Staphylococcus aureus* 3株, *Escherichia coli* 3株, *Pseudomonas aeruginosa* 3株) 計9株を用いた。9株の詳細は、標準菌株3株 (ATCC29213 *S. aureus*, ATCC25922 *E. coli*, ATCC9027 *P. aeruginosa*)、臨床分離株6株 (Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), Methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA), Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 産生 *E. coli*, ESBL非産生 *E. coli*, Metallo  $\beta$ -lactamase (MBL) 産生 *P. aeruginosa*, MBL非産生 *P. aeruginosa*) である。

【結果】

(抗菌効果定量法) アースプラス加工織布および不織布では、いずれの株においても経過時間とともに生菌数の減少が認められたが、対照として用いた未加工の織布と不織布では生菌数の減少は認められなかった。

菌種別にみると、*S. aureus* は6時間接触後には $-2 \log_{10}$ CFU/ml未満まで生菌数が減少し、18時間接触後では検出感度以下となった。同様に、*E. coli*においても6時間接触後には $-2 \log_{10}$ CFU/ml未満まで生菌数が減少し、18時間接触後では検出感度以下となった。*P. aeruginosa*においては、6時間接触後には検出感度以下まで減少したが、ATCC株とMBL非産生株では18時間接触後に菌の再増殖が認められた。

(電子顕微鏡)アースプラス加工の施された織布に6時間菌体を接触させた結果、*S. aureus*では大きな変形は認められなかったが、*E. coli*と*P. aeruginosa*においては表面が陥没している部分が認められた。しかし、菌体が潰れるなどの明らかな変化は認められなかった。

(銀溶出試験)アースプラス加工の施された織布と不織布から溶出された銀イオンの濃度は約0.2ppbであった。これは銀イオンが抗菌効果を示す50ppbよりもはるかに低い値であった。

【考察】アースプラスは即効性には劣るがいずれの株においても抗菌効果が認められた。また、医療関連感染で問題となる薬剤耐性菌においても十分な効果が得られた。

3菌種のうちグラム陰性桿菌(*E. coli*と*P. aeruginosa*)がグラム陽性菌(*S. aureus*)よりも生菌数の減少が著明であった。これは、細胞壁の構造に違いによるもので、細胞壁の構造が厚いグラム陽性菌では効果が現れるまでに、より多くの時間を要したと考えられた。

また、*P. aeruginosa*においては、薬剤感性株と薬剤耐性株でその効果に差が認められた。薬剤耐性株であるMBL産生株は18時間後でも菌の再増殖は認められなかったが、薬剤感性株であるATCC株とMBL非産生株においては18時間後に菌の再増殖が認められた。薬剤感性株ではバイオフィームが形成されたことによりアースプラスの効果が届き難くなったと考えられた。

アースプラスは種々の材質への加工が可能なセラミックス複合材であり、さらには病院関連感染で問題となる薬剤耐性菌に対しても確かな効果が認められた。今後、感染制御に係る重要なツールとなる可能性があ

る。

#### (論文審査の結果の要旨)

本研究において春日は、酸化チタン、ハイドロキシアパタイト、銀の3成分からなるセラミックス複合材「Earth-plus」を織布および不織布に加工した際に抗菌効果が得られるか評価を行った。Earth-plusは、ハイドロキシアパタイトが細菌を吸着し、銀の触媒作用を利用し酸化チタンから発生するラジカルが細菌を分解する。

検討内容は定量法を用いた抗菌効果の評価、走査型電子顕微鏡を用いた細菌の形態観察、Earth-plusからの銀溶出試験を行った。尚、検討には *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* の3菌種について、標準株(ATCC株)1株、臨床分離株(薬剤感性株、薬剤耐性株)2株、計3菌種9株を用いた。

その結果、抗菌効果の評価において効果が現れるまでには、菌種、布の種類によって数時間の差は認められたが、いずれの株において抗菌効果が認められた。その効果を菌種別に見た場合ではグラム陽性菌よりグラム陰性菌で効果が早く現れ、布別に見た場合では不織布よりも織布でその効果が早く現れた。また、*P. aeruginosa*については18時間後に薬剤感性株2株(ATCC株、臨床分離株)で僅かに再増殖が認められた。これはBiofilmが形成されたことによってEarth-plusの効果が妨げられたと推測された。

電子顕微鏡による形態観察においては、菌体が潰れるなどの明らかな形態の変化は認められなかった。これは、Earth-plusから発生するラジカルによって菌体が大きなダメージを受けると、Earth-plusから剝がれ落ちてしまい観察できなかったと推測された。

銀の溶出試験においては、Earth-plusから溶出した銀濃度は殺菌効果を現さない程度であり、Earth-plusにおける銀は、抗菌性金属として作用していないことが明らかになった。

このように、発表論文はEarth-plusの構成成分の作用について解説し、Earth-plus加工が施された布において抗菌効果があることを明らかにしているものであり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Pathophysiological investigation of the gastric surface mucous gel layer of patients with *Helicobacter pylori* infection by using immunoassays for trefoil factor family 2 and gastric gland mucous cell-type mucin in gastric juice (胃液における TFF2 と胃腺粘液細胞型ムチンの免疫アッセイを用いた *Helicobacter pylori* 感染患者の胃表層粘液ゲル層の病態生理学的研究)

久保田 聖子

(論文の内容の要旨)

【研究の背景】研究テーマは、慢性胃炎、胃十二指腸潰瘍、胃癌、MALT リンパ腫などの胃疾患の主要原因となっている *H. pylori* (HP) 感染に対する TFF (trefoil factor family) の挙動を解析することである。これまで腺粘液細胞ムチンの変動に焦点を当て進めてきた「HP 感染による胃粘膜病変に関する研究」に、新たな知見を加え、HP 感染による胃疾患の病態メカニズムを解明したいと考えている。胃粘膜では、胃の表層を覆っている表面粘液細胞 (SMCs) が産生する粘液と胃腺 (噴門腺細胞、副細胞、幽門腺細胞) における腺粘液細胞 (GMCs) 由来粘液の 2 種類の粘液が産生される。SMCs と GMCs から分泌される 2 種類の粘液は、胃粘膜の表面を覆う表層粘液ゲル層 (SMGL) を形成し、これらの粘液は混じり合うことなく交互に重なって粘膜層を構成している。腺粘液細胞ムチンは、正常あるいは非腫瘍性組織の胃粘膜において GMCs に局限して見出され、これら産生細胞では同時に TFF2 が産生・分泌されている。TFF2 は腺粘液細胞ムチンとともに胃液中に分泌されていることが想定されており、luminal surveillance peptide として、粘膜防御に関与しているペプチドである。胃液中の腺粘液細胞ムチンの測定に関して、以前我々は腺粘液細胞ムチン測定用の ELISA を報告し、その結果 HP 感染患者群では腺粘液細胞ムチンが有意に高値を示した。病理組織学的には腺粘液細胞ムチンには HP が棲息していないことが知られており、腺粘液細胞ムチンの自然抗菌機能が証明されたことから、HP 感染に伴う腺粘液細胞ムチンの分泌量の増加が反映されていると考えた。

【目的】本研究では胃粘液ゲル層内の TFF2 の局在を明らかにし、また TFF2 の高感度 ELISA を開発し、HP 感染患者の胃液中の TFF2 を腺粘液細胞ムチンと合わせて測定することにより、粘膜防御機構の解析を目指した。

【方法】胃粘液ゲル層内での TFF2 と腺粘液細胞ムチンの分布は、胃粘液ゲル層を固定した胃粘膜組織を用い

て免疫組織化学的に解析した。組織切片は、形態学的観察のため HE 染色し、また SMC 型ムチンに galactose oxidase-cold thionine Schiff reaction (GOTS)、腺粘液細胞ムチンに paradoxical Concanavalin A 染色 (PCS) を用いて二重染色した。TFF2 と腺粘液細胞ムチンの分布は、抗ヒト TFF2 抗体と抗腺粘液細胞ムチン抗体を用いて酵素免疫増感法により証明した。胃液の検討には、健常人 (n=33) および胃炎 (n=37)、胃潰瘍 (GU) (n=16)、十二指腸潰瘍患者 (DU) (n=10) の内視鏡検査時に採取した胃液を用い、胃液中の TFF2 と腺粘液細胞ムチンを ELISA で測定した。TFF2 の ELISA は、抗ヒト TFF2 ポリクローナル抗体とリコンビナント TFF2 抗原を用いて作成した。マトリックスの影響を無視できる程度胃液を希釈し、なおかつ感度よく測定するために、抗体を Biotin 標識して作成した。プレートには 1.0 μg/mL に希釈した抗体を固相し、ブロッキング後、標準物質のリコンビナント TFF2 抗原あるいは胃液を反応させ、ビオチン標識抗体ではさみ、さらに HRP 標識ストレプトアビジンを反応させ、450 nm/650 nm で吸光度を測定した。希釈液は 0.5% PBS-Tween/0.5% BSA、洗浄は ELISA 専用洗浄液を使用した。またこの抗体を用いて、胃液中の TFF2 の存在様式をウエスタンブロットで確認した。腺粘液細胞ムチンは市販キットで測定した。

【成績・結果】TFF2 と腺粘液細胞ムチンは胃の腺粘液細胞内および分泌された後も SMGL において共存していることが免疫組織化学的に確認された。ELISA で用いた抗体と胃液の反応性を確認したところ、ほとんどの胃液に 12 kDa と 19 kDa のバンドが共通して認められた。19 kDa は文献上糖化した TFF2 であるとの報告があり、胃液によってはそのほか高分子を含む TFF2 が検出された。胃液中の TFF2 の不均一性の影響を評価するために、様々な分子量が存在する 2 つの胃液を混合試験したところ、直線性は良好であり、胃液により TFF2 の存在様式は様々だが低分子も高分子も測定できていることがわかった。健常人お

よび胃炎, GU, DU 群の TFF2の平均値 (±SE) は 1.9 (±0.4), 24.8 (±0.7), 21.3 (±1.2), 18.4 (±1.5)  $\mu\text{g/ml}$  で, 健常人に対し疾患群では分泌量が有意に増加した ( $p < 0.05$ )。HP感染別平均値 (±SE) は陰性, 陽性それぞれ 3.9 (±0.4), 26.5 (±0.7)  $\mu\text{g/ml}$  で, 感染群は有意に高値を示した ( $p < 0.001$ )。また, HP の除菌により TFF2濃度の低下がみられた。同時に測定した腺粘液細胞ムチンは TFF2と同様の傾向を示した。

**【結論】** 胃粘膜粘液ゲル層内において, TFF2は胃腺粘液細胞ムチンと共局在しており, 胃液 TFF2濃度および腺粘液細胞ムチンは HP 感染症例において亢進しており, HP 除菌により低下することが証明された。組織学的検討から, HP 感染胃粘膜においては胃粘液細胞からの TFF2と腺粘液細胞ムチンの分泌亢進が推測されており, 本研究によりこの亢進が証明された。TFF2は, 上皮の再上皮化 (restitution) 促進作用に加え, 粘液ゲルの安定化作用があることから, TFF2と腺粘液細胞ムチンは胃粘膜防御機構の観点から相乗効果を発揮しているものと推測される。

#### (論文審査の結果の要旨)

本学位論文は胃粘液ゲル層内の TFF2の局在を明らかにし, また TFF2の ELISA を開発し, 胃液中の TFF2と腺粘液細胞ムチンを合わせて測定することにより, 粘膜防御機構の解析を行ったものである。

**【方法】** 胃粘液ゲル層内での TFF2と腺粘液細胞ムチンの分布は, 胃粘液ゲル層を固定したパラフィン包埋胃粘膜組織から作成した組織切片に HE 染色, galactose oxidase - cold thionine Schiff reaction (表層粘液細胞型ムチンの染色) - paradoxical Concanavalin A 染色 (腺粘液細胞ムチンの染色), 抗 TFF2免疫染色と抗腺粘液細胞ムチン免疫染色を行い解析した。胃液の検討には, 健常人 (n=33) および胃炎 (n=37), 胃潰瘍 (GU) (n=16), 十二指腸潰瘍患者 (DU) (n=10) の内視鏡検査時に採取した胃液を用い, 胃液中の TFF2と腺粘液細胞ムチンを ELISA で測定した。TFF2の ELISA は, 抗ヒト TFF2ポリクローナル抗体とリコンビナント TFF2抗原を用いて以下の様に作成した。プレートには 1.0  $\mu\text{g/mL}$  に希釈した抗体を固相し, ブロッキング後, 標準物質のリコンビナント TFF2抗原あるいは胃液を

反応させ, ビオチン標識抗体ではさみ, さらに HRP 標識ストレプトアビジンを反応させ, 450 nm/650 nm で吸光度を測定した。検体希釈液は 0.5 % PBS-Tween/0.5 % BSA, 洗浄は ELISA 専用洗浄液を使用した。また, 胃液中の TFF2の存在様式をウェスタンブロットで確認した。腺粘液細胞ムチンは市販キットで測定した。

**【成績・結果】** TFF2と腺粘液細胞ムチンは胃の腺粘液細胞内および分泌された後も SMGL において共局在していることが免疫組織化学的に確認された。ELISA で用いた抗 TFF2抗体と胃液の反応性を確認したところ, ほとんどの胃液に 12 kDa と 19 kDa (糖化した TFF2に相当) のバンドが共通して認められた。胃液によってはその他にも TFF2を含む高分子が検出された。TFF2と反応する様々な分子量の高分子が存在する 2つの胃液を混合試験したところ, TFF2測定系の直線性は良好であった。健常人, 胃炎, GU, DU 群の胃液中 TFF2値はそれぞれ 1.9 (±0.4) (平均値±SE), 24.8 (±0.7), 21.3 (±1.2), 18.4 (±1.5)  $\mu\text{g/ml}$  で, 健常人に対し疾患群では有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。H. pylori 感染別の胃液中 TFF2値は陰性群 3.9 (±0.4), 陽性群 26.5 (±0.7)  $\mu\text{g/ml}$  で, 感染群は有意に亢進していた ( $p < 0.001$ )。また, H. pylori の除菌により TFF2濃度の低下がみられた。胃液中の腺粘液細胞ムチンは TFF2と同様の傾向を示した。

**【結論】** 胃表層粘液ゲル層内で, TFF2は腺粘液細胞ムチンのゲル層内に貯留されており, TFF2は監視ペプチド (luminal surveillance peptides) として存在しているものと考ええる。H. pylori 感染胃粘膜における TFF2と腺粘液細胞ムチンの分泌亢進は, H. pylori 感染に対する胃粘膜の防御機構を反映しており, 可逆的な変化と考える。TFF2と腺粘液細胞型ムチンはそれぞれ固有の作用を持つ他に, 相互作用を持つことから, 胃表層粘液ゲル層内において, TFF2と腺粘液細胞型ムチンは相乗的に作用しているものと考ええる。

今後, 胃粘膜防御因子増強剤の評価法や TFF2産生腫瘍の分泌物を用いた早期診断法の開発の分野への応用が期待される研究として高く評価し, 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 descriptive study investigating the feasibility and selectivity of Current Perception Threshold in the objective assessment of post-operative sub-acute knee pain (手術後の亜急性膝痛の客観的な評価における電流知覚閾値の実現可能性と選択性を調査した記述的研究)

青木 幹 昌

(論文の内容の要旨)

臨床場面において、手術後の疼痛は、しばしば患者の活動性や意欲を低下させ、運動療法の進行を妨げることがある。疼痛緩和には、主に消炎鎮痛薬や麻薬性鎮痛薬が用いられるが、その施行に必要な熟練した医療者の人手は極めて不足している。そこで、患者本人が直接操作可能な経皮的電気刺激 (Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation: TENS) は、生体に非侵襲なため比較的 안전한治療法であり、術後の疼痛緩和にさらなる利用が期待できる。しかし、鎮痛効果の判定は、従来から視覚的アナログ尺度 (Visual Analogue Scale: VAS) に代表される主観的評価法が中心であり、客観的な指標に乏しいのが現状である。近年、電流知覚閾値 (Current Perception Threshold: CPT) を指標に用いた報告が増えている。CPT 検査は、皮膚に正弦波形の微弱電流刺激を加え、認知可能な最小電流値を測定する方法であり、疼痛を伝達する知覚神経を A $\beta$  線維, A $\delta$  線維, C 線維に分けてそれぞれの閾値を計測し、知覚異常の可能性を判定する方法である。

【目的】本研究の目的は、TENS で治療された亜急性術後痛を伴った被験者を対象に、CPT 検査を行い知覚神経に対する選択性を評価すること、VAS と比較して疼痛評価に対する CPT の実現可能性を調査することである。加えて、手術後患者の疼痛管理のために TENS の治療効果を、CPT を指標にして明らかにすることである。

【被験者と方法】対象は、膝前十字靭帯再建術を施行され、臨床研究への参加に同意を得られた17名 (男性11名, 女性6名, 平均年齢29.2 $\pm$ 10.8歳) とした。時間反転デザイン (A-B-A-B-A) を用い、術後5日目から連続した5日間にわたり、非介入日 (第1, 3, 5日) は TENS の出力ゼロで15分間安静, 介入日 (第2, 4日) は TENS を15分施行後に、3種類の CPT (2000 Hz, 250 Hz, 5 Hz) と VAS を測定した。CPT 測定は、Neurometer NS3000<sup>®</sup> (Neurotron 社, Baltimore, USA) を用い、TENS は、Trio300 (伊藤超短波株式会社, 東京都) を使用した。従属変数は

VAS と各 CPT とし、独立変数は実験日とした。統計解析は、SPSS 11.0J (SPSS 社) を使用した。

【結果】VAS は、TENS 介入後に明らかに減少した。CPT2000 Hz は、第2日から第4日で直線的に減少し全期間を通じて低下した。CPT250 Hz は、TENS 介入日で増加を示し、次の非介入日で減少した。CPT 5 Hz は、第3日までわずかに減少したが第5日までほぼ不変であった。

【考察】本研究では、従来式の TENS で治療された亜急性の術後痛をもつ被験者において、5日間にわたる VAS と CPT の特徴的な変化パターンを調査した。その結果、CPT2000 Hz や CPT250 Hz によって A $\beta$  線維と A $\delta$  線維の興奮性を選択的に評価できる可能性が示唆された。しかし、CPT による C 線維に対する選択性については明らかではなかった。また、従来式の TENS 治療が亜急性の術後痛を減少させることに効果的であることを示した。その理由は、TENS が A $\beta$  線維の感覚閾値を低下させ、同時に A $\delta$  線維の感覚閾値を上昇させることによって、ゲート機構メカニズムを賦活させて痛み刺激の伝達を減少させたと考えられた。すなわち、本研究で用いた設定の従来式の TENS は、緩徐なうずく痛みよりもむしろ鋭い速い痛みをもつ亜急性の術後痛を減少させるのに効果的といえる。しかしながら、本研究は時系列デザインの限界があり、RCT デザインを使用した将来の研究によって、さらに治療効果を明らかにする必要があると考えた。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、手術後の亜急性期における膝痛を呈する症例を対象として、主観的な疼痛評価法である Visual Analogue Scale (VAS) と客観的な評価法である電流知覚閾値との関連性を指標として、電流知覚閾値測定の実現可能性と選択性を調査したものである。

対象は、膝前十字靭帯再建術後の17例 (男性11例, 女性6例) で、経皮的電気刺激療法を15分間実施するフェーズと実施しないフェーズを交互に繰り返す時間反転デザイン (A-B-A-B-A) において、主観的な疼痛評価法である VAS と客観的な指標である Neur-

ometer NS3000を用いた  $A\beta$ ,  $A\delta$ , C線維の電流知覚閾値を測定した結果, 経皮的電気刺激療法実施フェーズにおいてはVASが明らか減少を示し, 電流知覚閾値では,  $A\beta$ 線維,  $A\delta$ 線維に関しては選択性が認められたが, C線維に関しては認められなかったという結果を示した。

わが国の理学療法においては, 物理療法の効果を客観的な指標に基づいて検討した報告が少ないことから, 本研究のような電気生理学的な視点から物理療法の効果を検証することは大変意義あるものと考えられる。

今後は, 症例数を増やすとともに, 経時的変化を解

析するための研究デザインにさらなる検討を加え, より信頼性のある客観的疼痛評価法についての研究成果が発表されることを期待したい。

また, 審査会や発表会における質疑応答は適切であり, The Journal of Physical Therapy Scienceにおいて査読の結果アクセプトされたことから, 本研究は博士後期課程の学位論文としての価値を有するものであるとともに, 今後の我が国の理学療法研究としても意義あるものであると, 主査, 副査の一致した見解が示された。

## Evaluating the quality of life of people with dementia in residential care facilities (施設に入所している認知症高齢者の生活の質の評価)

中西 康 祐

### (論文の内容の要旨)

【はじめに】高齢化社会の進展にともない, 認知症高齢者に対するケアの充実が急がれている。認知症疾患は慢性進行性の経過をとるため, 認知症のケアには生活の質=Quality of Life (QOL) の視点が重要である。QOLは, 身体的状態, 心理的状态, 社会的交流, 経済的状态, 本人の主観的な全体的well-beingなどが含まれる。またQOL評価には, 観察式, 自己評価式などさまざまな方法があるが, QOL評価には自己評価を重視する必要がある。これまで, 認知症高齢者の主観的QOLには関心が向けられていなかった。最近になり, 在宅や施設入所に関わらず, 認知機能障害はあっても, 多くの認知症高齢者は主観的QOLの評価が可能なことが報告されている。QOL-AD (Quality of life in Alzheimer's disease) は, 認知症の中核症状である記憶機能を含み, 対人関係, 生活状況, 生活動作機能, 身体状況, 心理状態について項目立てられた疾患特異的QOL尺度である。QOL-ADの特徴は, 同一尺度を用いて患者と代理者(家族介護者, 職業的介護者)の双方に評価できることである。現在まで, 施設介護を受けている認知症高齢者の主観的QOLに関する研究は国際的にも少ない。

【目的】本研究は, 施設介護を受けている認知症高齢者の主観的QOLと, ケアスタッフからみた認知症高齢者のQOLを同時に評価し, QOLに影響を与える日常生活動作障害, 精神症状, 認知機能, 認知症重症度などとの関連を各々検討することである。

【対象と方法】対象は, N県内の介護老人保健施設4

施設と特別養護老人ホーム1施設で, 1カ月以上施設介護を受けている認知症高齢者141名と, その施設に勤務し認知症高齢者のケアに直接従事し心身の状態をよく把握しているケアスタッフ74名である。カルテから性別, 年齢, 入所期間を調査した。認知機能はMMSE, 認知症重症度はClinical Dementia Rating (CDR), 精神症状はNeuropsychiatric Inventory (NPI), 日常生活動作はBarthel Indexを用いてそれぞれ評価した。QOL-ADは認知症高齢者とケアスタッフの双方に実施した。基本情報, MMSE, CDR, NPI, Barthel Indexの二群間の比較については, Mann-WhitneyのU検定を行った。主観的QOLとケアスタッフが評価したQOLの比較には, Pearsonの相関行列を, 主観的QOLとケアスタッフが評価したQOLそれぞれに影響する因子の検討には, 重回帰分析を用いた。

【結果】対象となった141名の認知症高齢者うち116名が主観的QOLの測定が可能であった。QOL-ADに回答可能群と回答不能群の間では, MMSEとBarthel Indexに有意差を認めた。回答できた116名はMMSEの得点は11点以上であった。対象者の主観的QOL総得点は28.9点, ケアスタッフが評価した対象者のQOL総得点は27.0点で, 両者の相関は低く( $r=0.24$ )二群間に有意差を認めた。重回帰分析の結果, 認知症高齢者の主観的QOLは, 日常生活動作障害( $\beta=0.207$ )とNPIのうつ( $\beta=0.218$ )と有意に関連した。一方, ケアスタッフが評価したQOLは, CDR( $\beta=0.218$ ), NPIの興奮( $\beta=0.193$ ), 無為無関心( $\beta=0.203$ ), 脱抑制( $\beta=0.254$ )と有意に関連し

た。

【考察】認知機能が主観的QOLの測定に強く影響することが確認されたが、主観的QOLの測定はMMSEが11点以上であれば可能であることが判る。認知症高齢者のQOLに対して、認知症高齢者自身とケアスタッフの捉え方は多くが不一致であり、認知症高齢者自身に比べてケアスタッフは得点を低く見積る傾向が認められた。慢性疾患をもつ人々は自身のQOLを高く見積もる‘disability paradox’が認知症高齢者でも認められることを本研究は示した。多変量解析の結果、認知症高齢者の主観的QOLは、日常生活動作障害とうつと相関することが示された。認知症は慢性進行性の経過をとり、経過とともに認知機能障害や重症度は進行する。しかし、先行研究は主観的QOLに認知機能や疾患重症度は関連しないことを報告している。また、主観的QOLに影響を与える重要な因子はうつであることを報告している。本研究も同様の結果を確認した。さらに、本研究は日常生活動作障害が施設入所者のQOLに関連することを示した。日常生活動作とうつはQOLの向上に関連する重要な介入目標の可能性はある。この研究は施設入所している認知症高齢者のQOLを総合的に検索した本邦で初めての研究である。(Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 32: 33-44, 2011)

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、施設に入所している認知症高齢者のQOLを探索した研究で、認知症高齢者の主観的QOL

の測定に、疾患特異的な尺度であるQOL-AD (Quality of life in Alzheimer’s disease) を用いている点が特徴的である。

認知症高齢者では、認知機能障害を理由に主観的QOLにはほとんど関心が向けられてこなかった可能性がある。本研究では141名の認知症高齢者のうち116名(82%)がQOL-ADに回答しており、MMSEが11点以上あればQOL-ADに回答可能であることが明らかになった。また、認知症高齢者の主観的QOLは日常生活動作障害とうつと関連するのに対し、ケアスタッフが評価したQOLは認知症重症度、興奮、無為無関心、脱抑制と関連し、両者の視点が一致しないことが判明した。このことは、ケアスタッフの一方的な視点では、対象者本人のQOLを捉えることができないことを示しており、認知症高齢者の生活支援のあり方を検討するにあたり重要な視点を提供している。

また、本研究によって施設に入所する認知症高齢者にとっては、日常生活動作の障害やうつ状態がQOLに関連することが明らかとなり、施設に入所する認知症高齢者の主観的QOLを向上させるための、日常生活動作やうつに対するアプローチの重要性が示唆された。

本研究は施設入所している認知症高齢者のQOLを総合的に検索した本邦で初めての研究であり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Factors associated with functional recovery and home discharge in stroke patients admitted to a convalescent rehabilitation ward (回復期リハビリテーション病棟に入院した脳卒中患者における機能回復および在宅復帰に寄与する因子の検討)

務 台 均

(論文の内容の要旨)

【目的】脳卒中患者の急性期以降のリハビリテーションにおいて、本邦では回復期リハビリテーション病棟が重要な役割を担っている。回復期のリハビリテーションにおいては、限られた入院期間の中で、いかに効果的に機能回復を行い、在宅復帰を支援していくかが課題となる。本研究の目的は、回復期リハビリテーション病棟に入院した脳卒中患者における、ADLの改善および在宅復帰をアウトカムとし、これに寄与する因子を検討することである。

【方法】対象は、2006年1月から2008年6月に安曇野赤十字病院回復期リハビリテーション病棟に入院した

脳卒中患者連続例174名(平均年齢:73.0±10.8)である。治療効果は、ADLの改善度と自宅退院とし、ADL改善度の指標として、退院時のFunctional Independence Measure (FIM)とMontebello rehabilitation factor score (MRFS: (discharge FIM-admission FIM) / (maximum possible FIM-admission FIM))を用いた。ADLの改善度および自宅退院に寄与する因子の検討には、従来報告のある因子のうち入院時の患者年齢、性別、家族構成、合併症、発症経緯、脳卒中のタイプ、発症前のADLレベル、運動麻痺の程度、視覚障害、排泄障害、半側空間無視、入院時のMotorおよびCognitive FIMを説明変数と

して選択し、FIMとMRFSについては重回帰分析、自宅退院の成否については多重ロジスティック回帰分析を行った。

【結果】FIMは入院時72.6±27.6点から退院時87.7±29.9点に改善した(P<0.001)。MRFSは0.30±0.28であった。自宅退院患者は151名で在宅復帰率が87%であった。退院時FIMの阻害因子は、高齢( $\beta=-0.12$ , P=0.003)、脳卒中のタイプが出血性( $\beta=0.09$ , P=0.005)、発症前のADLが介助( $\beta=0.16$ , P<0.001)、半側空間無視( $\beta=-0.10$ , P=0.001)、入院時のmotor FIMが低値( $\beta=0.37$ , P<0.001)、および入院時のcognitive FIMが低値( $\beta=0.46$ , P<0.001)であった。MRFSの阻害因子は、高齢( $\beta=-0.22$ , P=0.003)、発症前のADLが介助( $\beta=0.25$ , P<0.001)、入院時のmotor FIMが高値( $\beta=-0.28$ , P=0.003)、および入院時のcognitive FIMが低値( $\beta=0.56$ , P<0.001)であった。自宅退院の阻害因子は、女性(OR=0.13; 95%CI 0.03-0.50; P=0.003)、一人暮らし(OR=23.25; 95%CI 3.79-142.56; P=0.001)、発症前のADLが介助(OR=0.09; 95%CI 0.02-0.37; P=0.001)、半側空間無視(OR=0.04; 95%CI 0.01-0.27; P=0.002)、および入院時のcognitive FIMが低値(OR=1.12; 95%CI 1.03-1.22; P=0.010)であった。

【考察】回復期リハビリテーション病棟における脳卒中患者の在宅復帰率は87%と高く、MRFSで示されるリハビリテーションの効率も海外での報告とほぼ同等の数値であった。また、認知機能障害と発症前のADLが介助であることが、回復期の脳卒中患者のADL回復の程度およびリハビリテーションの効率、在宅復帰の共通の阻害因子であることが示された。入院時の認知機能障害は、しばしばリハビリテーションプログラムの理解や遂行に支障を来し回復を阻害する、あるいは認知機能障害の背景である中枢神経系の障害が、動作学習における神経ネットワークの可塑性にも影響している可能性もある。一方、脳卒中発症前におけるADL障害の存在は老年症候群をはじめとする加齢関連のさまざまな身体機能、精神および認知機能障害を示唆するものであり、新たに発症した脳卒中による障害の回復を阻害し、さらなる機能低下を引き起こす過程が推測される。自宅退院の成否には、性別や家族構成といった社会的要因が関連しており、自宅退院には適切な介護者の確保が必要とされる。これら認知機能障害や病前より機能障害のある脳卒中患者には、

より包括的な介入の必要があり、あわせて介護者の確保に向けた環境調整が重要である。(Geriatrics & Gerontology International. 12: 215-222 2012)

#### (論文審査の結果の要旨)

本学位論文は、脳卒中患者の回復期におけるリハビリテーションの阻害要因を縦断研究によって明らかにしたものである。

本研究の特徴は、リハビリテーションの帰結をADL改善と在宅復帰に分けて、各々の阻害要因を入院時の患者属性から検討した点である。回復期病棟に入院した174名の患者の退院時の帰結を分析した結果、両者に共通の阻害要因は脳卒中発症前にADL介助であったこと、認知機能低下、半側空間無視であり、ADL改善固有の阻害要因は運動機能良好、高齢であることを報告した。一方、在宅復帰固有の阻害要因は、一人暮らしと女性であり、在宅復帰には患者のADL能力に加えて、社会的要因が影響していることを報告した。

脳卒中回復期に集中的にリハビリテーションを行う回復期リハビリテーション病棟は、2000年に新設された日本独特のシステムであり、大規模に実施され、患者数などの統計が詳細に報告されている。しかし、リハビリテーション・プログラムのあり方を探究するための、因果的説明を可能にする縦断研究はほとんど行われていない。ADL改善や在宅復帰が難しいと考えられる患者条件が明らかになれば、入院当初から、それに対応したプログラムを構築することができるようになる。本研究は、その患者条件を提言している点に加えて、脳卒中回復期に実施したリハビリテーションの帰結を分析する研究手法も新たに提案している点が評価できる。このことから、本研究は効果的・効率的な回復期リハビリテーション・プログラムの発展に寄与する研究といえる。

公開学位論文審査は平成25年1月23日(保健学科212教室)16時から、主査、副査を含めた別紙の参加者名簿に示した5名の関係各位同席の中で開催された。本審査会での冒頭、申請者である「務台 均」に本研究の概要を述べさせたのち、主査、副査からの質疑応答を行ったが、質疑に対しては別紙様式第8号のようなやり取りが行われ、質問に対する応答は概ね適切であることを確認し、本研究の遂行に十分な学力を有しているものと評価した。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。