

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
大野康成 (外科学(1))	乙第1145号	24. 7.11	Temporary auxiliary partial orthotopic liver transplantation using a small graft for familial amyloid polyneuropathy (家族性アミロドポリニューロパチーに対する過小グラフトを用いた自己肝温存部分肝移植術)	田中榮司	角谷眞澄 西澤理
茂木英明 (耳鼻咽喉科学)	乙第1146号	24. 9.12	<i>TECTA</i> mutations in Japanese with mid frequency hearing loss affected by zona pellucida domain protein secretion (Zona pellucida ドメインタンパクの分泌障害によって引き起こされる中音域難聴: 日本人難聴者における <i>TECTA</i> 遺伝子変異の解析)	福嶋義光	小池健一 本田孝行
土屋広行 (分子薬理学 (薬剤))	乙第1147号	24. 9.12	Evaluation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers (ヒト ES 細胞由来肝細胞の CYP1A 誘導検出系としての評価)	池田宇一	久保恵嗣 山田充彦
若林雅人 (代謝制御学)	乙第1148号	24. 9.26	Fatty acid accumulation and resulting PPAR α activation in fibroblasts due to trifunctional protein deficiency (三頭酵素欠損症由来の繊維芽細胞における脂肪酸蓄積と PPAR α 活性化)	駒津光久	池田宇一 中山淳
塩澤律 (運動機能学)	乙第1149号	24. 9.26	Comparison of Splinting Versus Nonsplinting in the Treatment of Pediatric Trigger Finger (小児弾発指におけるスプリント治療と非スプリント治療の成績比較)	松尾清	小池健一 森泉哲次
関口和 (内科学(2))	乙第1150号	24.11.14	Elevated serum granulysin and its clinical relevance in mature NK-cell neoplasms (成熟 NK 細胞腫瘍における血清 granulysin と病態との関連)	小池健一	中山淳 本田孝行
山本裕香 (眼科学)	乙第1151号	25. 1.16	Age-Related Decrease of the Retinal Vasculature Area Identified with a Novel Computer-Aided Analysis System (新しいコンピュータ支援システムを用いた加齢に伴う網膜血管領域狭細化の解析)	中山淳	池田宇一 田中榮司
福島万奈 (病態解析)	乙第1152号	25. 1.30	Distinct Cytoplasmic Expression of KL-6 Mucin in Chromophobe Renal Cell Carcinoma: A Comparative Immunohistochemical Study with Other Renal Epithelial Cell Tumors (嫌色素性腎細胞癌における KL-6 の特異的な細胞質発現様式: 他の腎上皮性腫瘍との免疫組織化学的比較検討)	本田孝行	森泉哲次 菅野祐幸

審査学位論文要旨

伊坪 敏郎 (運動機能学)	乙第1153号	25. 1.30	Effects of repeated crush injuries on motor functional recovery of the sciatic nerve (坐骨神経反復損傷が運動機能に与える影響について)	多田 剛	山田充彦 本郷一博
宮川麻衣子 (耳鼻咽喉科学)	乙第1154号	25. 1.30	Prevalence and Clinical Features of Hearing Loss Patients with <i>CDH23</i> Mutations: A Large Cohort Study (<i>CDH23</i> 遺伝子変異による難聴の頻度と臨床的特徴について: 大規模コホート研究)	福嶋義光	小池健一 村田敏規
丸山 順也 (分子薬理学 (薬剤))	乙第1155号	25. 2.13	Differentiation of Monkey Embryonic Stem Cells to Hepatocytes by Feeder-free Dispersion Culture and Expression Analyses of Cytochrome P450 Enzymes Responsible for Drug Metabolism (無フィーダー分散培養によるサル胚性幹細胞の肝細胞への分化と薬物代謝に関与するチトクロムP450酵素の発現解析)	佐々木克典	本田孝行 樋口京一
児玉 亮 (分子細胞 生化学)	乙第1156号	25. 2.27	ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence (Nox1およびNox4から産生された活性酸素はRas癌遺伝子が誘導するセネセンスに寄与する)	竹下敏一	谷口俊一郎 塩沢丹里
村田 貴弘 (脳神経 外科学)	乙第1157号	25. 3.13	G protein-coupled estrogen receptor agonist improves cerebral microvascular function after hypoxia/reoxygenation injury in male and female rats (雌雄ラットにおいてG蛋白共役型エストロゲン受容体作動薬は低酸素・再酸素化障害後の脳微小血管機能を改善させる)	本郷一博	大橋俊夫 山田充彦
小林 孝至 (内科学(1))	乙第1158号	25. 3.13	A phase II trial of erlotinib in patients with EGFR wild-type advanced non-small-cell lung cancer (野生型EGFR遺伝子をもつ進行非小細胞肺癌患者におけるエルロチニブ治療の第II相試験)	本田孝行	宮川眞一 塩沢丹里
小池 剛史 (歯科口腔 外科学)	乙第1159号	25. 3.27	Cultured epithelial grafting using human amniotic membrane: The potential for using human amniotic epithelial cells as a cultured oral epithelium sheet (羊膜を用いた培養上皮移植に関する実験的研究: ヒト羊膜上皮細胞による上皮シート作成の可能性)	池田宇一	塩沢丹里 菅野祐幸
金子 智喜 (画像医学)	乙第1160号	25. 3.27	New visual rating system for medial temporal lobe atrophy: a simple diagnostic tool for routine examinations (内側側頭葉萎縮の新たな肉眼的評価方法: 日常臨床における簡便な診断手法)	天野直二	池田修一 本郷一博
岸本 恭 (外科学(2))	乙第1161号	25. 3.27	Postoperative suppression of inflammatory cytokines after distal gastrectomy in elderly patients (高齢者における幽門側胃切除後の炎症性サイトカイン産生抑制について)	天野 純	宮川眞一 田中榮司

Temporary auxiliary partial orthotopic liver transplantation using a small graft for familial amyloid polyneuropathy (家族性アミロイドポリニューロパチーに対する過小グラフトを用いた自己肝温存部分肝移植術)

大野 康成

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】肝移植ではドナー不足が大きな問題である。信州大学ではこれまでの検討により、肝移植を安全に行うためにはグラフト肝容積 (GV) がレシピエントの標準肝容積 (SLV) の30%以上必要と考えている。左葉グラフトで不十分な場合には右葉グラフトを選択することがあるが、右葉切除をするとドナーの残肝容積が小さくなるためドナーのリスクが上がると思われる。一方、家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、主として肝臓で産生される異常トランスサイレチンが変化して全身にアミロイドとして沈着する遺伝性疾患であり、疾病の進行を止めるために、現時点では肝移植が唯一の治療法と考えられている。この疾患では異常トランスサイレチンの産生以外の肝機能は正常であるので、移植の際に自己肝の一部を温存すると (自己肝温存生体部分肝移植術: APOLT), 30%以下の過小グラフトが移植された場合も、術後早期には温存した自己残肝がグラフト機能を補助することにより術後肝不全を防ぐことができる。ただし、自己肝が残存する限り異常トランスサイレチンの産生が続くので移植後一定期間を経て自己肝の摘出が必要となる。当科ではこのような考えで2000年以降、FAPに対する生体肝移植においてドナーから摘出する左葉グラフトがSLVの30%以下と過小な場合にはAPOLTを行ってきた。今回、FAPに対するAPOLT施行例と通常生体部分肝移植 (LDLT) 施行例を比較して、APOLTの有用性及び安全性を検討した。

【対象・方法】FAPの診断にて当科で生体肝移植を施行した36例を対象として、APOLTを施行したAPOLT群13例と従来のLDLTを施行したLDLT群23例に分けて比較検討した。APOLT群では移植手術の際に自己肝の門脈血流は遮断し、術後自己残肝を徐々に萎縮させ、グラフトの増大を図る。約2カ月後にCTでグラフト肝容積を測定しグラフトが十分に肥大し、アシアロシンチグラフィでグラフトの肝機能が十分であることを確認し、自己肝を摘出する。

【結果】ドナーの体格は両群間で有意差はなかったが、

APOLT群の予測GV、予測GV/SLVはLDLT群に比べ有意に小さかった。APOLT群ではドナー全肝容積に対するGVの比率は35%以下と小さく、右葉を摘出すると残肝容積が小さくなりすぎて、ドナーのリスクが高いと考えられた。また、APOLT群ではレシピエント平均身長、体重は、ともにLDLT群より有意に大きく、GV、GV/SLVはいずれもLDLT群に比して有意に小さかった。レシピエント手術時間はAPOLT群で有意に長かったが、出血量、術後合併症には有意差は認められなかった。術後総ビリルビンとプロトロンビン時間はAPOLT群がLDLT群に比して低値であり、より早期に肝機能が改善していた。APOLT手術から自己肝摘出までにFAPに関連した新たな症状の出現はなかった。1年、5年患者生存率、およびグラフト生着率は、両群間に有意差はなかった。【結語】FAPに対してAPOLTを行うことで、GV/SLV<30%の過小グラフトでも通常のLDLTと同等の有用性と安全性で肝移植を行い得ることを示した。FAPに対するこの術式はドナー選択の幅を広げるのに有用な術式であると思われた。

(論文審査の結果の要旨)

【背景・目的】信州大学ではこれまでの検討により、肝移植を安全に行うためにはグラフト肝容積 (GV) がレシピエントの標準肝容積 (SLV) の30%以上必要と考えている。左葉グラフトで不十分な場合には右葉グラフトを選択することがあるが、右葉切除をするとドナーの残肝容積が小さくなるためドナーのリスクが上がると思われる。一方、家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は主として肝臓で産生される異常トランスサイレチン (TTR) が変化して全身にアミロイドとして沈着する遺伝性疾患であり、疾病の進行を止めるために現時点では肝移植が唯一の治療法である。この疾患では異常TTRの産生以外の肝機能は正常であるので、移植の際に自己肝の一部を温存すると (自己肝温存生体部分肝移植術: APOLT), 30%以下の過小グラフトが移植された場合も、術後早期には温存した自己残肝がグラフト機能を補助することにより術後肝不全を防ぐことができる。ただし、

自己肝が残存する限り異常TTRの産生が続くので移植後一定期間を経て自己肝の摘出が必要となる。当科では2000年以降、FAPに対する生体肝移植において左葉グラフトがSLVの30%以下の過小の場合にはAPOLTを行ってきた。そこで、FAPに対するAPOLT施行例と通常の生体部分肝移植(LDLT)施行例を比較してAPOLTの有用性と安全性を検討した。

【結果】ドナーの体格は両群間で同等であったが、APOLT群の予測GV、予測GV/SLVはLDLT群に比べ有意に小さかった。また、APOLT群では、レシピエントの平均身長、体重ともにLDLT群より有意に大きく、GV、GV/SLVはいずれもLDLT群より有意に小さかった。レシピエント手術時間はAPOLT

群で有意に長かったが、出血量、術後合併症には有意差は認められなかった。術後T. BilとPT-INRはAPOLT群がLDLT群に比して低値であり、より早期に肝機能が改善していた。APOLT群では移植手術の際に自己肝の門脈を切離し、2ヵ月後に自己残肝の萎縮とグラフトの肥大を確認後、自己肝を摘出した。患者生存率およびグラフト生着率は両群間に有意差はなかった。

本研究から、FAPに対してAPOLTを行うことで、GV/SLV<30%の過小グラフトでも通常のLDLTと同等の有用性と安全性を確保し得ることが示された。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

TECTA mutations in Japanese with mid frequency hearing loss affected by zona pellucida domain protein secretion (Zona pellucida ドメインタンパクの分泌障害によって引き起こされる中音域難聴：日本人難聴者における *TECTA* 遺伝子変異の解析)

茂 木 英 明

(論文の内容の要旨)

【研究目的】*TECTA* 遺伝子は常染色体優性形式をとる感音難聴の原因遺伝子として報告されており、内耳蝸牛蓋膜を形成するタンパクのひとつである α -tectorin をコードしている。現在までに *TECTA* 遺伝子変異による難聴が複数見出されており、また遺伝子変異の部位により聴力像にバリエーションがあることが報告されている。今回、常染色体優性遺伝形式をとる感音難聴139家系に対し本遺伝子変異の解析を行い、日本人における頻度を明らかにすること、また *TECTA* 遺伝子変異に特徴的な中音域の難聴を呈するメカニズムを解析することを目的とした。

【研究方法】

1. 遺伝子解析：139家系を対象とし、直接シーケンス法にて *TECTA* 遺伝子変異の解析を行った。
2. 培養細胞系を用いた *TECTA* 遺伝子変異の機能解析：特徴的な中音域の難聴を来す zona pellucida (ZP) ドメインの変異に着目し、野生型および変異型 ZP ドメインを含むC末端領域をクローニングし GFP 融合タンパクを発現するプラスミドを構築した。これらを COS7細胞に導入して細胞内の局在をレーザー励起蛍光顕微鏡下で観察、野生型と変異型での比較を行った。

【研究結果】

1. 遺伝子解析

TECTA 遺伝子変異を3家系より見出した。既報告 (Iwasaki et al. 2002) 家系も含め139家系から4変異を同定、日本人における頻度としては2.9% (4/139家系) であることを明らかにした。また聴力別の解析において中等度難聴 (41-70 dB) では7.7% (4/52家系) に認められた。臨床情報との比較検討より、遺伝子の変異の部位により表現型が異なることが明らかとなった。これは他の人種で見出された遺伝子型/表現型の報告とも合致しており、日本人においても変異部位により難聴のパターンが異なることが確認された。

2. 培養細胞系を用いた *TECTA* 遺伝子変異の機能解析

野生型ではタンパクは細胞膜に局在するのに対し、変異型では、細胞質に凝集した状態で局在し細胞膜に移行しないことが明らかとなった。

【考察】日本人における *TECTA* 遺伝子変異による難聴の頻度を初めて明らかにした。特に中等度難聴では7.7%と高頻度に認められ、常染色体優性遺伝形式をとる難聴者に対する本遺伝子解析の重要性を示した。また難聴のメカニズムに関する検討では、野生型と変異型で細胞内局在に違いがあることを明らかにした。 α -tectorinは細胞外へ分泌、重合し内耳蓋膜として機能を果たすタンパクであり、野生型が細胞膜に移行す

るのに対し変異型では細胞質に凝集し膜へ移行しないことから、 α -tectorin タンパクが分泌されないことにより機能が損なわれ難聴となることが推測された。

(論文審査の結果の要旨)

先天性難聴は1,000人に1人の割合で発症し、その60%程度に遺伝子異常が関与すると考えられている。*TECTA* 遺伝子変異は常染色体優性遺伝形式を取る難聴の中で比較的頻度が高い原因遺伝子変異として報告されている。また遺伝子変異の部位により高音域または中音域に難聴を来す特徴があることが知られている。特に臨床上、比較的稀な中音域の難聴を来す遺伝子変異として注目されている。

本論文において茂木英明は、日本人における *TECTA* 遺伝子変異の頻度調査、遺伝子型と表現型の比較、および難聴を来す変異タンパクを細胞導入し、その局在について野生型タンパクとの違いに関する検討を行った。頻度調査を行った結果、常染色体優性遺伝形式をとる両側感音難聴患者139例のうち、以前に本学耳鼻咽喉科学教室で解析を行った既報告 (Iwasaki et al. 2002) を含め4例 (2.9%) に本遺伝子変異を認めた。特に聴力別の検討では、中等度難聴 (41~70 dB) では7.7% (4/52例) と比較的高頻度に認められたことより、常染色体優性遺伝形式をとる中等度感音難聴患者においては、まず *TECTA* 遺伝子に着目し遺伝学的検査を実施する必要があることが示唆された。また、

遺伝子変異の部位と表現型である聴力像を比較検討したところ、ZA ドメインにおける変異では高音域の難聴を呈し、ZP ドメインにおける変異では中音域の難聴を呈する傾向が見られ、今まで欧米から報告されていた遺伝型と表現型の関係が、日本人における本遺伝子変異においても成り立つことが示された。

TECTA 遺伝子がコードするアルファ・テクトリンのうち、野生型および難聴を来す変異型 ZP ドメイン部分を GFP 発現ベクターにサブクローニングし、培養細胞 (cos 7) に導入、野生型と難聴を来す変異型 ZP ドメイン-GFP 融合タンパクを発現させ、細胞内局在の違いがあるかを検討した。その結果、野生型では細胞膜への発現が認められる一方、変異型では細胞質内に凝集するパターンを示し、遺伝子変異によりタンパク分泌が障害され難聴を来す可能性が示された。

本論文は、日本人における常染色体優性遺伝形式をとる難聴者の原因遺伝子の診断として *TECTA* 遺伝子変異に着目すべきであること、また中等度難聴や特徴的な聴力像をもつ場合には特に本遺伝子の解析を行う必要性が高いことを示したことは臨床診断上、非常に有用な情報である。加えて分子生物学的な手法で難聴のメカニズム解析を行い、一定の知見が得られたことは今後の研究の上で非常に重要な発見であると考えられる。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。

Evaluation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers (ヒト ES 細胞由来肝細胞の CYP1A 誘導検出系としての評価)

土 屋 広 行

(論文の内容の要旨)

【目的】薬物治療において薬物相互作用は大きな問題の一つであり、相互作用が起きにくい医薬品の開発がなされている。薬物相互作用の中でも薬物代謝酵素の阻害作用は初代肝細胞や肝ミクロソームを利用することで予測は比較的容易である。一方、薬物代謝酵素の誘導作用は発現調節領域の遺伝子配列だけでなく、受容体や転写因子など多くの因子が関係しているため、予測が困難である。このような研究にヒト肝臓を利用する際、倫理的問題に加えて、新鮮な肝臓の入手が困難であるとともに、使用する肝臓により個体差が生じるなどの問題がある。胚性幹細胞 (ES 細胞) は、無限に増殖し、生体を構成するあらゆる細胞に分化可能であることから万能細胞とも呼ばれ、再生医療ある

いは医薬品開発における安全性試験への利用が期待されている。薬物代謝酵素の中でも CYP1A は薬物の解毒作用のみならず、発癌性物質の代謝的活性化に深く関与していることから、その酵素誘導の予測は非常に重要である。そこで、本研究ではヒト ES 細胞を肝細胞へと分化させ、薬物代謝酵素 CYP1A の誘導評価系を確立することを目的とした。

【方法】ヒト ES 細胞の肝細胞への分化誘導は Activin A, Wnt3a などの分化因子を加え、22日間培養することによって行った。分化の指標は肝細胞特異的に発現するタンパク質であるアルブミン (ALB)、薬物代謝酵素 CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4 等の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて行った。また、ヒト ES 細胞を上記の方法により肝細胞へと分化させた後、

CYP1Aの代表的な誘導剤であるオメプラゾール (OME) や3-メチルコラントレン (3-MC) を培地に添加し72時間培養することにより薬物代謝酵素を誘導した。CYP1A1, CYP1A2の mRNA 発現量をリアルタイムPCR法にて測定し, 誘導剤添加によるmRNA発現量の上昇を評価した。また, CYP1A2の典型的基質であるフェナセチンを培地に添加し, 代謝物のアセトアミノフェンの生成量を測定することにより代謝酵素活性(フェナセチンO-脱エチル化活性)を測定した。

【結果・考察】ヒトES細胞にActivin A, Wnt3aなどを加えて分化培養した細胞からはALBや α -fetoprotein (AFP)の他, CYP1A2やCYP3A4などのCYPのmRNA発現が確認された。しかしながら, CYP1A2やCYP3A4の発現量はヒト成人肝細胞の発現パターンよりも, ヒト胎児肝細胞の発現パターンに類似していた。CYP1Aの誘導剤としてOME, 3-MCを加え, CYP1A1, CYP1A2のmRNA発現量の変化, フェナセチンO-脱エチル化活性の変化に関してそれぞれ検討した結果, CYP1A1のmRNA発現量はOME処理により35倍, 3-MC処理により48倍の上昇が認められた。また, CYP1A2のmRNA発現量はOME処理により3.5倍, 3-MC処理により3.2倍の上昇が認められた。一方, フェナセチンO-脱エチル化活性はOME処理によっては2.7倍の上昇に留まった一方で, 3-MC処理により48倍の上昇が見られた。これらの結果から, ヒトES細胞由来肝細胞は, 今後成人肝細胞に近い細胞にするための効率的な分化培養条件を検討する必要があるが, CYP1Aの誘導剤評価系として使用可能であることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

薬物代謝酵素の誘導作用の研究にヒト肝臓を利用する際, 新鮮な肝臓の入手が困難であるとともに, 高価である, 使用する肝臓により個体差が生じるなどの問題がある。胚性幹細胞(ES細胞)は, あらゆる細胞に分化できる能力を有していることから, 肝細胞へと分化させ, 再生医療あるいは医薬品開発における安全性試験へ利用することが期待されている。薬物代謝酵素の中でもCYP1Aは薬物の解毒作用を有している一方で, 様々な化合物によって酵素誘導を受けやすく, また, 発癌性物質の代謝的活性化に深く関与していることから, その酵素誘導の予測は非常に重要である。そこで, 土屋はヒトES細胞を肝細胞へと分化させ, 薬物代謝酵素CYP1Aの誘導評価系を確立することを目的とした。ヒトES細胞は京都大学より提供された

khES-3細胞を使用し, Activin A, Wnt3a, オンコスタチンM (OSM), デキサメタゾン (DEX) などの分化誘導因子を用いて22日間培養し, ヒトES細胞由来肝細胞を作成した。分化の指標は, albumin (ALB), α -fetoprotein (AFP), 薬物代謝酵素のCYP1A2, CYP3A4, CYP3A7等のmRNA発現量の解析をリアルタイムPCR法により行った。また, ヒトES細胞を上記の方法により肝細胞へと分化させた後, CYP1Aの代表的な誘導剤であるオメプラゾール (OME) や3-メチルコラントレン (3-MC) を培地に添加し72時間培養することにより薬物代謝酵素を誘導した。CYP1A1, CYP1A2のmRNA発現量をリアルタイムPCR法にて測定し, 誘導剤添加によるmRNA発現量の上昇を評価した。また, CYP1A2の典型的基質であるフェナセチンを培地に添加し, 代謝物のアセトアミノフェンの生成量を測定することにより代謝酵素活性(フェナセチンO-脱エチル化活性)を測定した。その結果, 土屋は次の結論を得た。

1. ヒトES細胞から, 誘導因子を組み合わせることで用いることにより得られたヒトES細胞由来肝細胞からは, 肝細胞マーカーであるALBと胎児肝細胞で発現が見られるAFPのmRNAが認められた。
2. ヒトES細胞由来肝細胞には, 薬物代謝酵素であるCYPの各分子種であるCYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A7等のmRNAの発現が確認された。
3. ヒトES細胞由来肝細胞のCYP1A1, CYP1A2のmRNA量はOME, 3-MCの処理により上昇が見られた。
4. ヒトES細胞由来肝細胞のCYP1A2に特異的なフェナセチンO-脱エチル化活性がOME, 3-MCの処理により上昇が見られた。

土屋は, ヒトES細胞を用いて, 内胚葉組織への分化誘導因子, 形態形成因子を組み合わせることで用いることにより, 効率的に肝細胞への分化誘導に成功した。その性質を幾つかのタンパク質のmRNA量で検討した結果からは, ヒトES細胞由来肝細胞は, 成人肝細胞まで成熟していると判断することは出来なかった。次いで, 機能的な検討として, 薬物代謝酵素の誘導能について, CYP1A誘導能評価系としての有用性を検討したところ, CYP1A2特異的な反応である酵素活性の誘導が認められた。これは, ここで分化誘導されたヒトES細胞由来肝細胞は薬物代謝酵素, 特にCYP1Aに関してはmRNA量だけでなく, 機能的にもその変

動を示すことが可能であることを示唆するものである。これらのことから、ヒト ES 細胞から分化誘導した肝細胞が、CYP1A 誘導能をもつ化合物を検出する系へ

応用できる可能性があることが示唆された。以上の内容から、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。

Fatty acid accumulation and resulting PPAR α activation in fibroblasts due to trifunctional protein deficiency (三頭酵素欠損症由来の繊維芽細胞における脂肪酸蓄積と PPAR α 活性化)

若 林 雅 人

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】代謝制御学講座では、主にマウスを用いて、各臓器・組織における脂肪酸蓄積の影響について研究してきた。1例として、脂肪酸は主にアルブミンと結合して体内を循環しており、アルブミンと共に糸球体から濾過されると、近位尿細管細胞内に取り込まれ、脂肪酸 β 酸化を受け ATP 合成に利用される。マウス腎臓にアルブミン結合型脂肪酸負荷をかけた動物モデルにおいて、尿細管細胞でのアポトーシス・炎症反応などの細胞毒性が誘発されることが見出された。加えて、ミトコンドリア脂肪酸 β 酸化能を制御する核内受容体：PPAR α が近位尿細管細胞の炎症抑制の重要な因子となることがわかった (Y. Kamijo, et al., JASN, 18:3089-3100, 2007)。しかし、動物モデルの問題点として近位尿細管細胞の炎症は散在的に生じており、臓器レベルでの表現型変化の機構解明には不均一性という難点が併存することも見出された。そこで、均一な反応を期待できる培養細胞を用いて脂肪酸障害の機構解析を試みた。

【方法】脂肪酸 β 酸化三頭酵素はミトコンドリア脂肪酸 β 酸化系の第2段階から第4段階の3反応を触媒する酵素複合体であり、三頭酵素欠損症の存在が知られている。三頭酵素欠損症の病因となる遺伝子変異が同定されているが、血液検査所見や身体所見は多様であり、発症機序に関する解明は進んでいない。三頭酵素欠損症患者の皮膚由来の繊維芽細胞は、通常の培養条件下で旺盛な増殖能を示し、扱いやすい利点を有する。6名の患者から得られた増殖能の高い繊維芽細胞を用い、3名の健常人から得られた繊維芽細胞と比較する方式で、脂肪酸毒性の生化学的・分子生物学的解析を行った。

【結果・考察】三頭酵素欠損症患者の繊維芽細胞中には遊離脂肪酸が有意に蓄積し、三頭酵素欠損症の臨床症状の一つである脂肪肝との関連が示唆された。また、ミトコンドリア脂肪酸 β 酸化系の第1段階の反応であるアシル CoA 脱水素反応活性が上昇することが検出

された。この結果は、三頭酵素欠損症患者細胞において、過剰な脂肪酸を除去しようとする代償機能の存在を示唆した。さらに、三頭酵素欠損症患者細胞において、アシルCoA脱水素反応を触媒する3種のアイソザイム (VLCAD・LCAD・MCAD) は同調的に発現亢進していた。これらの3種のアイソザイムは PPAR α の標的遺伝子であることから、過剰な遊離脂肪酸をリガンドとした PPAR α 活性化が生じていることが推察された。ペルオキシソーム増殖剤応答因子 (PPRE) への結合解析や培養細胞に対する MK886 (PPAR α アンタゴニスト) とフェノフィブラート (PPAR α アゴニスト) 投与の結果から、PPAR α 活性化が生じていることが確認された。PPAR α 活性化を介するアシル CoA 脱水素反応活性の上昇は、PPAR α の生体保護的作用の現出と推察された。一方、PPAR α 活性化を介する細胞増殖の促進や酸化ストレスの増加が見出され、三頭酵素欠損症の特徴的臨床症状である肥大性心筋症・軽度肝肥大・肝機能障害・骨格筋機能低下・肝性脳症の発症原因と推察された。以上の結果から三頭酵素欠損症の新たな治療法の可能性が考えられた。すなわち、MK886 (PPAR α アンタゴニスト) の投与は、細胞増殖促進や酸化ストレス増大を抑制することで、三頭酵素欠損症の臨床症状改善に繋がる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

脂肪酸 β 酸化三頭酵素は長鎖脂肪酸に基質特異性があり、ミトコンドリア脂肪酸 β 酸化系の第2から第4反応までの3種類の酵素活性を有する酵素複合体である。三頭酵素欠損症は遺伝子変異によりこれら3種類の酵素活性が欠如し、長鎖脂肪酸の β 酸化障害を来す。三頭酵素欠損症患者の血液検査所見や身体所見は多様であり、発症機序に関する解明は進んでいない。

本論文は、三頭酵素欠損症患者6名の皮膚由来の繊維芽細胞と健常人3名の皮膚由来の繊維芽細胞を用いて生化学的・分子生物学的解析を行い、脂肪酸毒性の発現機構解明を試みたものである。その結果、三頭酵

素欠損症患者細胞において、遊離脂肪酸の蓄積、ミトコンドリア脂肪酸 β 酸化系のアシル CoA 脱水素反応活性の上昇、アシル CoA 脱水素反応を触媒する3種のアイソザイム (VLCAD・LCAD・MCAD) の同調的な発現亢進、PPAR α のペルオキシソーム増殖剤応答因子 (PPRE) への結合活性の亢進、およびMK886 (PPAR α アンタゴニスト) 存在下でのMCADの発現低下を見出し、三頭酵素欠損症患者細胞において蓄積した遊離脂肪酸を内因性リガンドとしたPPAR α 活性化が生じていることを明らかにした。この中でPPAR α 活性化を介するアシル CoA 脱水素反応活性の上昇が生じていることは、過剰な脂肪酸を除去しようとする代償機能の存在であることを示唆した。さらに、PPAR α 活性化が細胞周期調節因子の発現亢進を介した細胞増殖促進や酸化ストレス産生系の発現亢進を介

した酸化ストレス増大に繋がっていることを見出した。このPPAR α 活性化を介した細胞増殖促進や酸化ストレス増大が、三頭酵素欠損症の特徴的臨床症状である肥大性心筋症・軽度肝肥大・肝機能障害・骨格筋機能低下・肝性脳症などの発症原因の一環であることを導出している。そして本論文では、MK886の投与によりPPAR α 活性化を低下させることで細胞増殖促進や酸化ストレス増大を抑制し、三頭酵素欠損症の臨床症状改善に繋がる可能性があると論じ、三頭酵素欠損症の新たな治療法の可能性としてMK886の投与を提唱している。

これらの研究成果は医学領域の発展に貢献するものであり、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。

Comparison of Splinting Versus Nonsplinting in the Treatment of Pediatric Trigger finger (小児弾発指におけるスプリント治療と非スプリント治療の成績比較)

塩 澤 律

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】小児における母指以外の弾発指 (pediatric trigger finger, 以下PTFと略す) の頻度は強剛母指の10~20%と稀である。本症の自然経過とスプリント治療の有効性については報告が少なく意見が一致していない。今回PTFにおける自然経過およびスプリント治療の効果を検討するために後ろ向き調査を行った。

【対象と方法】1981年から2010年までに関連施設を受診したPTF患者24例34手47指を調査した。性別は男児が10人、女児が14人であった。両手罹患が24人中11人で、複数指罹患例は14人であった。罹患指の内訳は示指が4指、中指が28指、環指が11指、小指が4指であった。初診から最終経過観察までの期間は2年から18年、平均6年2カ月であった。Static splintを用いて治療したスプリント群は24指、経過観察のみを行った非スプリント群は23指であった。治療開始6カ月後も、痛みを伴う自動弾発型 (II型)、他動弾発型 (III型) および強直型 (IV型) が残存する場合は手術を行い、II型、III型で痛みのない場合は小学校入学前後に手術を勧めた。

【結果】スプリント群では24指中16指が治癒、改善が4指、不変が4指であった。改善3指と不変の4指の合計7指に手術を行った。非スプリント群では、23指

中7指が治癒、改善が1指、不変は15指であった。4例9指で症状の再発を認めた。改善の1指と不変の14指に手術を行った。スプリント群での治癒率は非スプリント群の治癒率と比較して統計学的に有意に高かった ($P=0.01$)。

【考察】PTFの自然経過についてはいくつかの報告があるが、自然経過率は諸家により0~100%と大きく異なっている。本研究では非スプリント群の治癒率は30%であった。また、自然治癒したと考えられた者のうち3分の1で2~5年後に症状の再発があった。PTFにおけるスプリント治療については報告が少ない。工藤らは8指中3指が治癒したと報告している。本研究では、スプリント治療を行った24指中16指 (67%) に治癒が認められ、経過観察のみの非スプリント群と比較すると、有意に治癒率が良好であった。

手術治療を行った22指については、全例で深指屈筋腱、浅指屈筋腱のどちらかあるいは両方に紡錘状肥厚を認めた。従来報告されているような腱の解剖学的破格は認められなかった。A1プリーリーの切除とA2プリーリーの近位部分切開を行い、全例で治癒した。本研究の限界は、1) 後ろ向き研究であり症例が少ない、2) スプリント装着群と非装着群の分別は患者の両親の意思に委ねられているため、両群を無作為に分別化していない、3) スプリント装着をどの程度厳密に行っ

たか、スプリント装着時間などのコンプライアンスは家族からの聞き取りによるため不正確である、4) 患児全例を成長終了まで追跡調査していないので、再発例が含まれる可能性がある、などがあげられる。

本研究から PTF の治療方針を述べると、まず少なくとも 6 カ月間就寝中にスプリントを装着することでおよそ 3 分の 2 の患者は治癒すると考えられる。深刻な有害事象もなく、保存的治療における初期治療としては有効と考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

小児における母指以外の弾発指 (pediatric trigger finger, 以下 PTF と略す) は強剛母指の 10~20 % で稀である。本症の自然経過とスプリント治療の有効性については報告が少なく意見が一致していない。そこで塩澤らは今回 PTF における自然経過およびスプリント治療の効果を検討するために後ろ向き調査を行った。

その結果以下の成績を得た。

1. 全 47 指中、自動弾発型 (II 型) が 19 指、他動弾発型 (III 型) が 19 指、強直型 (IV 型) が 9 指であった。
2. スプリント群は 24 指で、16 指 (67 %) が治癒、

4 指が改善、4 指が不変であった。

3. スプリント治療開始から治癒までの期間は 5 年から 5 カ月、平均 10 カ月であった。
4. 非スプリント群は 23 指で、7 指 (30 %) が治癒、1 指が改善、15 指が不変であった。
5. 非スプリント群の初診から治癒までの期間は 3 カ月から 13 年、平均 4 年 11 カ月であった。
6. 非スプリント群で治癒と診断されたもののうち 9 指で症状の再発を認めた。
7. スプリント群での治癒率は非スプリント群の治癒率と比較して統計学的に有意に高かった ($P = 0.01$)。
8. 手術を要した指数はスプリント群 7 指と非スプリント群 15 指であった。手術を要した率はスプリント群が非スプリント群より統計学的に有意に低値であった ($P = 0.01$)。

以上より、小児弾発指の治療においては経過観察のみと比してスプリント治療が有用であると考えられた。したがって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Elevated serum granulysin and its clinical relevance in mature NK-cell neoplasms (成熟 NK 細胞腫瘍における血清 granulysin と病態との関連)

関 口 和

(論文の内容の要旨)

【目的】成熟 NK 細胞腫瘍は、WHO 分類・第 4 版では、節外性 NK 細胞リンパ腫、鼻型 (ENKL)、アグレッシブ NK 細胞白血病 (ANKL)、NK 細胞慢性リンパ増殖異常症 (CLPD-NK) の 3 疾患に分類されている。Granzymes や perforin といった細胞障害性蛋白は、細胞障害性 T 細胞や NK 細胞の細胞障害性顆粒内に存在し、NK/T 細胞性の腫瘍を診断する際に、それらの検出は有用な情報となっている。Granulysin は近年新しく認識された細胞障害性蛋白で、自然免疫において細胞障害性蛋白や炎症性蛋白として作用することが報告されている。種々の疾患との関連が示されているが、NK 細胞腫瘍における役割や他の細胞障害性蛋白との関連は不明な点が多い。本研究では、成熟 NK 細胞腫瘍における granulysin と病態との関連について検討を行った。

【方法】ENKL 18 例、ANKL 10 例、CLPD-NK 12 例を対象とした。初発時または再発時で治療前の血清

が保存されていた症例について血清 granulysin の測定を行った。測定は ELISA 法で行い、コントロールとしての健常者 34 例と比較した。また、パラフィン切片による組織学的検討では、TIA-1, granzyme B, perforin, granulysin の免疫染色を施行し、これらの発現の違いを検討した。

【成績】血清中の granulysin の測定を行い、健常者 34 例と各疾患で比較したところ、中央値は健常例 1.35 ng/ml, ENKL 2.85 ng/ml, ANKL 39.0 ng/ml, CLPD-NK 2.8 ng/ml であり、各疾患群ではコントロールに比していずれも有意に高値を示し、ANKL 群で最も高値であった。EBV 関連疾患である ANKL と ENKL において、血中の EBV ウイルス量と血清 granulysin 値は相関を認めた ($P = 0.005$)。臨床的に鑑別が時に困難な stage 4 の ENKL ($n = 5$) と ANKL ($n = 8$) の比較では、ANKL が有意差をもって高値であった ($P = 0.02$)。治療前後で血清 granulysin を測定可能であった症例では、治療前に比較し治療後に低

値を示した ($P=0.03$)。組織学的検討では、ENKL 13例、ANKL 7例、CLPD-NK 5例のパラフィン切片にて細胞障害性蛋白 (TIA-1, Granzyme B, perforin, granulysin) の発現を確認した。TIA-1に関しては全例に発現がみられ、granzyme B, perforin, granulysin では疾患ごとに発現の違いを認めた。Granulysin が陽性と陰性の症例間での検討では、各種検査で有意差は認められなかった。ENKL症例では、granulysin 陽性の症例で血管浸潤との関連が示唆された ($P=0.03$)。ENKLとANKLでgranulysin陽性の症例において、granulysinとEBERの二重染色にて腫瘍細胞は granulysin 陽性であることを確認した。CLPD-NK では、granulysin 陽性症例において合併症が多い傾向が認められた。

【考案】 今回の検討で、疾患背景が類似しているENKLとANKLにおいて血清 granulysin 値に差が認められたことは、これらの腫瘍細胞の起源や腫瘍細胞の活性化状態などの違いを示し、病勢を反映している可能性が考えられた。また、granulysin が血管浸潤や組織壊死に関連する可能性が示唆された。

【結語】 成熟 NK 細胞腫瘍において、granulysin は病態・病勢と関連し、今後 biomarker となりうる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

成熟 NK 細胞腫瘍は、WHO 分類・第 4 版では、節外性 NK 細胞リンパ腫、鼻型 (ENKL)、アグレッシブ NK 細胞白血病 (ANKL)、NK 細胞慢性リンパ増殖異常症 (CLPD-NK) の 3 疾患に分類されている。NK 細胞腫瘍における役割や他の細胞障害性蛋白との関連はまだまだ不明な点が多く、本研究では、成熟 NK 細胞腫瘍における granulysin と病態との関連について検討を行った。ENKL 18例、ANKL 10例、CLPD-NK 12例を対象とし、初発時または再発時で治療前の血清が保存されていた症例について血清 granulysin の測定を行った。測定は ELISA 法で行い、コントロールとしての健常者34例と比較した。また、パラフィン切片による組織学的検討では、TIA-1, granzyme B, perforin, granulysin の免疫染色を施

行し、それらの発現の違いを検討した。

その結果、関口は以下の結論を得た。

1. 血清中のgranulysinの中央値は、健常例1.35 ng/ml, ENKL 2.85 ng/ml, ANKL 39.0 ng/ml, CLPD-NK 2.8 ng/mlであり、各疾患群ではコントロールに比していずれも有意に高値を示し、ANKL群で最も高値であった ($P<0.001$)。
2. EBV 関連疾患である ANKL と ENKL において、血中のEBVウイルス量と血清granulysin値は相関を認めた ($P=0.005$)。
3. 臨床的に鑑別が時に困難な stage 4 の ENKL (n=5) と ANKL (n=8) の比較では、ANKLが有意差をもって高値であった ($P=0.02$)。
4. 治療前後で血清 granulysin が測定可能であった症例では、治療前に比較し治療後に低値を示した ($P=0.03$)。
5. 組織学的検討では、ENKL 13例、ANKL 7例、CLPD-NK 5例のパラフィン切片にて細胞障害性蛋白 (TIA-1, granzyme B, perforin, granulysin) の発現を確認した。TIA-1に関しては全例に発現がみられ、granzyme B, perforin, granulysin では疾患ごとに発現の違いを認めた。
6. ENKL 症例では、granulysin 陽性の症例で血管浸潤との関連が示唆された ($P=0.03$)。
7. ENKL と ANKL で granulysin 陽性の症例において、granulysin と EBER の二重染色にて腫瘍細胞は granulysin 陽性であることを確認した。
8. CLPD-NK では、granulysin 陽性症例において合併症が多い傾向が認められた。

今回の研究は成熟 NK 細胞腫瘍における血清 granulysin 値の検討と、各疾患における細胞障害性蛋白の発現の相違を確認した最初の研究である。血清 granulysin 値は病勢との関連があると考えられ、また組織学的には細胞障害性蛋白が疾患ごとに異なる発現であることを発見し、今後の成熟 NK 細胞腫瘍の病態や予後の解明につながると考えられる。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。

Age-Related Decrease of the Retinal Vasculature Area Identified with a Novel Computer-Aided Analysis System (新しいコンピュータ支援システムを用いた加齢に伴う網膜血管領域狭細化の解析)

山本 裕香

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】眼底写真では、非侵襲で網膜血管を観察し、網膜微小循環の状態を観察する事が可能である。網膜血管の局所的な動脈の狭窄や、口径不同、血管壁の反射亢進、その他出血や硬性白斑などの所見は動脈硬化や高血圧に伴う所見として、以前から Wagener や Scheie らに代表される眼底所見分類が報告されており一般に使用されている。しかし、経験豊富な眼科医であっても、高い再現性をもってこれらの所見を評価するのは困難である。

近年、コンピュータ支援解析 (CAD: computer-aided diagnosis) システムの技術の向上により、分析と診断について定量的なアプローチが可能となってきた。特にここ20年程度でCADは高画素にもなりソフトも進歩している。心循環器系疾患と脳卒中は網膜の動静脈血管径から推測が可能であるという報告もあり、網膜血管の評価はアメリカの ARIC (The Atherosclerosis Risk in Communities study) グループでも解析が行われている。しかし、網膜血管の変化は、高血圧のない高齢者でも観察されることが知られている。今回の研究で我々は、眼底写真に占める網膜血管の面積を、独自に作成したCADシステムで解析し、加齢の眼底所見における影響を明らかにした。

【対象と方法】249人のボランティア (18歳から87歳 53.2 ± 19.8 歳) を対象として研究を行った。

眼底写真は、デジタル、カラーで黄斑部を中心とした画角45度の範囲を撮影し、画素は 2048×1536 pixel で、JPEG形式で保存した。対象者の写真を確認し、網膜出血や硬性白斑、微小動脈瘤や進行した白内障、脈絡膜萎縮などの患者は今回の解析対象から除外した。1枚の写真に撮影されたすべての網膜血管をCADで認識・解析した。血管の抽出については様々なアルゴリズムがあり、光量とキャプチャー時の状態・検者の技術に影響されやすいため、それらを補正できるようにプログラムを作成した。血圧は、自動血圧計を用いて測定した。平均血圧 (MABP) は、最高血圧 $\times 0.33 +$ 最低血圧 $\times 0.67$ で求めた。最高血圧が140以上または最低血圧が90以上のグループを高血圧グループ

とした。

【結果】条件を満たした161名 (18歳~87歳, 男56名女105名, 49.5 ± 18.7 歳) の眼底写真で、総血管面積と加齢およびMABPとの相関を分析した。総血管面積と加齢 ($R = -0.63$), 総血管面積とMABP ($R = -0.44$) はそれぞれ相関を認めた。この両者の関係性を評価するため、重回帰分析に基づくパス解析を行ったところ、標準 (偏) 回帰係数: SPR が、総血管面積と加齢では $SPR = -0.54$ であり、総血管面積とMABPでは $SPR = -0.20$ であったため、血管面積は加齢に、より依存して変化していることが分かった。我々はまた、最高血圧が140以上または最低血圧が120以上となるグループを高血圧群として、これを除外した群128人のみで相関を解析したところ、 $R = -0.64$ と強い相関が認められた。さらに条件をしばって最高血圧120以上または最低血圧を80以上という条件の群を除外した残りのグループ72人においても、 $R = -0.58$ という相関が認められた。また、回帰直線の傾斜を比較したところ、60歳以下の群での相関の方が、60歳以上の群での相関よりも有意差をもって急峻であった。更に我々は、動脈と静脈を分けて各年代別3グループ (30歳未満・40-50歳・60歳以上) からランダムで抽出した計27名の解析を行った。結果、総動脈面積については $R = -0.82$, 総静脈面積については $R = -0.78$ という加齢との相関が認められた。一方、各血管面積と平均血圧の相関は認められなかった (動脈: $R = -0.34$ 静脈: $R = -0.26$)。

【考察】眼底写真の全範囲の血管面積をCADシステムで測定した所、総血管面積は加齢と強く相関して減少し、この相関は血圧とは独立していた。また、高齢者であるほど血管面積は少ない=血管が狭窄している傾向があった。一方、60歳以下の群については、血圧と血管面積の相関が有意であり、血圧の影響が眼底所見に現れやすいと考えられた。このことは、75歳以上の高齢者は、眼底所見から全身疾患や心循環系疾患を予測する点で劣るという近年された報告と矛盾しない。網膜血管は、ある程度全身的な高血圧や循環疾患を反映すると考えられるが、加齢に伴って、他の全身疾患

がなくとも血管径は細くなっていくという傾向がある。私たちは、網膜血管が加齢と相関して有意に細くなるということ、独自のCADシステムを用いて見出した。高齢者の眼底検査を行う場合に、加齢による血管変化を高血圧のためであると安易に評価しないように配慮すべきである。

(論文審査の結果の要旨)

眼底写真は、非侵襲で網膜血管を観察する事が可能である。動脈硬化や高血圧に伴う所見として、以前からWagenerやScheieらに代表される眼底所見分類が検診など一般に使用されているが、近年、コンピュータ支援解析(CAD: computer-aided diagnosis)システムの技術の向上により、分析と診断について定量的なアプローチが可能となってきた。近年、網膜血管の変化は、高血圧のない高齢者でも観察されることが報告されている。今回の研究で我々は、眼底写真に占める網膜血管の面積を、独自に作成したCADシステムで解析し、加齢の眼底所見における影響を明らかにした。

249人のボランティア(18歳から87歳 53.2 ± 19.8 歳)を対象として、眼底写真は、デジタル・カラーで黄斑部を中心とした画角45度の範囲を撮影し、画素は 2048×1536 pixelで、JPEG形式で保存し新しいプログラムで作成したCADソフトを用いて解析した。血圧は、自動血圧計を用いて測定し、平均血圧(MABP)は、

最高血圧 $\times 0.33$ + 最低血圧 $\times 0.67$ で求めた。最高血圧が140以上または最低血圧が90以上のグループを高血圧グループとし、比較検討した。結果を以下に示す。

1. 総血管面積と加齢、総血管面積とMABPはそれぞれ相関を認めた。
2. 両者の関係を評価するため、多重回帰分析に基づくパス解析を行ったところ、血管面積は加齢により依存して変化していることが分かった。
3. 血圧の低い群のみで相関を検討しても、加齢と総血管面積との相関を認めた。
4. 60歳未満の群ではMABPと総血管面積との相関が認められたが、60歳以上ではこの両者の相関が認められなかった。
5. 動静脈別での検討を行い、動脈・静脈ともに加齢と総血管面積に高い相関を認めた。

これらの結果より、総血管面積と血圧・加齢は互いに影響因子となるが、総血管面積は、加齢と強く相関して減少していることが考えられた。また、高齢者であるほど血管面積は少ない=血管が狭窄していることが考えられた。網膜血管は、全身的な高血圧や循環疾患を反映するが、加齢とも相関して有意に細くなるということが示唆された。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Distinct Cytoplasmic Expression of KL-6 Mucin in Chromophobe Renal Cell Carcinoma: A Comparative Immunohistochemical Study with Other Renal Epithelial Cell Tumors (嫌色素性腎細胞癌におけるKL-6の特異的な細胞質発現様式: 他の腎上皮性腫瘍との免疫組織化学的比較検討)

福 島 万 奈

(論文の内容の要旨)

I. はじめに

嫌色素性腎癌は腎上皮性腫瘍の一つで、大型で微細網状の細胞質を有する細胞より成る通常型と、主として細胞質が好酸性の細胞より成る好酸性型に亜分類される。嫌色素性腎癌の細胞質はコロイド鉄染色に陽性で、細胞質内のシアル化糖蛋白の存在を反映しているとされる。形態的、免疫組織化学的に嫌色素性腎癌は遠位尿細管、集合管や集合管介在細胞との、オンコサイトーマは集合管介在細胞との、また淡明細胞癌は近位尿細管との類似性を示す腫瘍とされている。本研究では、これらの腎腫瘍組織、正常腎組織および未熟腎組織におけるシアル化糖蛋白の発現を免疫組織化学的

に比較、検討した。

II. 材料と方法

嫌色素性腎癌14例(通常型10例, 好酸性型4例), オンコサイトーマ7例, 淡明細胞癌9例, 未熟腎4例(未熟児剖検例)について、ホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用い、KL-6とsialyl-MUC1の免疫染色を施行した。これらの免疫染色に対するシアリダーゼ消化の影響も検討した。正常腎組織を免疫染色の陽性コントロールとした。

III. 結果

正常成人腎組織では、KL-6とsialyl-MUC1の発現は近位尿細管や糸球体には認められず、遠位尿細管と集合管に強く認めた。多くは上皮の管腔面に発現して

いるが、集合管介在細胞では細胞質がびまん性に染色された。未熟な腎組織は、成人と異なり、近位尿細管の管腔面にも KL-6 と sialyl-MUC-1 の発現がみられた。

腎腫瘍においては、嫌色素性腎癌の通常型と好酸性型で、KL-6 および sialyl-MUC1 は細胞質にびまん性に、また管状構造を示す部分では管腔面にも発現していた。オンコサイトーマでは KL-6 および sialyl-MUC1 はしばしば細胞質が顆粒状に染色され、核近くに分布する傾向がみられた。淡明細胞癌では KL-6 および sialyl-MUC1 は細胞膜の一部に発現していた。

シアリダーゼ消化後、sialyl-MUC1 の染色性はほぼ消失したが、正常の集合管介在細胞や嫌色素性腎癌の通常型、好酸性型、オンコサイトーマでは、KL-6 の細胞質の染色性が残存した。

IV. 考察

以上の結果から、シアル化糖蛋白の発現様式の点から嫌色素性腎癌とオンコサイトーマには集合管介在細胞との類似性が確認された。シアリダーゼ消化により sialyl-MUC1 の染色性はほぼ消失したが、KL-6 は抵抗性であった。その理由として、KL-6 はシアル化糖蛋白以外にも O グリコシド型糖鎖と反応する可能性が報告されている。シアリダーゼ消化後の KL-6 の細胞質の染色性は、嫌色素性腎癌の通常型よりも好酸性型やオンコサイトーマでより目立つことから、後者はより集合管介在細胞に類似した表現型を示しているものと考えられた。また、淡明腎細胞癌における KL-6 発現は腫瘍胎児性発現と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

嫌色素性腎癌の細胞質は組織化学的にコロイド鉄染色に陽性で、細胞質内のシアル化糖蛋白の存在を反映しているとされる。本研究では、シアル化糖蛋白の発現に着目して、嫌色素性腎癌(通常型、好酸性型)、淡明細胞癌、正常腎組織および未熟腎組織を免疫組織化学的に比較、検討した。

嫌色素性腎癌14例(通常型10例、好酸性型4例)、オンコサイトーマ7例、淡明細胞癌9例、未熟腎4例

(未熟児剖検例)について、ホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用い、シアル化糖蛋白である KL-6 と sialyl-MUC1 の免疫染色を施行した。これらの免疫染色に対するシアリダーゼ消化による効果も検討した。正常腎組織を免疫染色の陽性コントロールとした。

その結果、以下の結論を得た。

1. KL-6 と sialyl-MUC1 は、正常集合管介在細胞、嫌色素性腎癌の通常型と好酸性型では細胞質にびまん性に染色され、一方、オンコサイトーマでは核周囲の細胞質に局在して陽性像が観察されたことから、シアル化糖蛋白の発現の点からこれらの類似性が確認された。
2. シアリダーゼ消化により、sialyl-MUC1 の染色性はほぼ消失したが、KL-6 は抵抗性であった。シアリダーゼ消化後の KL-6 の細胞質の染色性は、嫌色素性腎癌の通常型よりも正常集合管介在細胞、好酸性型やオンコサイトーマでより目立つことから、嫌色素性腎癌好酸性型やオンコサイトーマはより集合管介在細胞に類似した表現型を示しているものと考えられた。
3. 淡明細胞癌では、KL-6 と sialyl-MUC1 が細胞膜の一部に発現していた。KL-6 と sialyl-MUC1 は成人の近位尿細管には発現していないが、未熟腎組織では近位尿細管の内腔面に発現が認められることから、淡明細胞癌における KL-6 と sialyl-MUC1 の発現は腫瘍胎児性発現と考えられた。

本研究により、嫌色素性腎癌の通常型と好酸性型、オンコサイトーマは、シアル化糖蛋白の発現様式から集合管介在細胞との類似性が示され、特にシアリダーゼ消化後の KL-6 の染色性は、より集合管介在細胞に類似した表現型を示していると考えられた。これらの結果は、KL-6 と sialyl-MUC1 の免疫染色が腎上皮性腫瘍の病理組織学的分類や病理診断に役立つのみでなく、KL-6 が腎腫瘍の腫瘍マーカーとなりうる可能性を示唆するものである。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。

Effects of repeated crush injuries on motor functional recovery of the sciatic nerve (坐骨神経反復損傷が運動機能に与える影響について)

伊 坪 敏 郎

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】末梢神経損傷に対するこれまでの圧迫

損傷実験モデルでは、1回の強い圧迫を神経に加えているものが多く、反復圧迫損傷後の病態を分析した研

究は少ない。本研究では、ラット坐骨神経に複数回の圧迫を加え、この反復損傷が運動機能の回復と神経線維の再生に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

【方法】12～14週齢の雌のWistar系ラットの左臀部を切開し左坐骨神経を露出後、鉗子による強い圧迫損傷を加えた。圧迫は鉗子にて180秒間行った。損傷回数の違いにより、A～D群のラットを作成した[A群(control)、B群(1回圧迫)、C群(1週間隔で2回圧迫)、D群(1週間隔で3回圧迫)]。全ての群において最終圧迫部位を大腿骨大転子の高さとし、反復損傷群(C-D群)では、回数に応じて圧迫を7.5 mm ずつ遠位から開始した。各群において最終圧迫の8週間後まで、毎週ラットの後肢両足のfoot printを採取した。採取したfoot printから第1-5指間距離と第2-4指間距離を測定し、Static Sciatic Index (SSI) 値を算出し運動機能を評価した。SSI値は-100～0で算出される数値で、-20以上を正常機能と判断した。また、1回圧迫(B群)と3回圧迫(D群)の比較を行うため、最終圧迫の2、3、4週後に採取した前脛骨筋から凍結切片を作成し、筋線維横径の計測と免疫染色(神経終末:抗シナプトフィジン抗体, アセチルコリンレセプター: α ブングアロトキシン)による神経筋接合部の再支配率(シナプトフィジン/ α ブングアロトキシン)の計測を行い、坐骨神経反復損傷による影響について評価した。

【結果】

1. SSI値: A群(control)では実験期間中に歩行障害は認められず、すべての計測においてSSI値は-20以上の正常値を示した(-15.6～-4.1)。坐骨神経損傷群(B-D群)では、最終圧迫1週後の時点ですべてのラットにおいて高度な運動機能障害を認め、SSI値は-80以下であった((B, -95.4±3.4; C, -96.1±3.9; D, -94.9±3.5)。これら3群では、次第にSSI値の回復が認められたが、B群(1回圧迫)に比較してC群(1週間隔で2回圧迫)、D群(1週間隔で3回圧迫)では回復の遅延が認められた。また、B群では4週後に、C群では6週後にSSI値が正常域に達したのに対し、D群では8週間においても正常域まで回復しなかった。
2. 筋線維横径: B群(1回圧迫)の前脛骨筋の筋線維横径は、D群(1週間隔で3回圧迫)と比較すると、最終圧迫の2、3、4週後すべてにおいて有意に大きかった。また、A群(control)と比較する

と、B群では2、3週後では有意に筋線維横径が小さいものの4週後にはA群と同程度まで回復したのに対し、D群では4週後まで有意に小さいままであった。

3. 神経筋接合部の再支配率: B群(1回圧迫)、D群(1週間隔で3回圧迫)双方において、最終圧迫の2、3、4週後のシナプトフィジン陽性神経終末数は徐々に増加し、神経筋接合部における神経の再支配率の増加が確認された。A群(control)と比較すると、B群、D群ともに2、3週後の再支配率は有意に低値であったが、4週後には有意差は確認されなかった。また、D群の再支配率は3週間においてB群と比較して有意に低かった。

【結論】坐骨神経に対する反復圧迫損傷では、1回の圧迫損傷と比較して運動機能の回復が遅く、3回以上の圧迫では筋線維径の回復遅延および神経線維の再生遅延により、最終的に正常運動機能が得られないことが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

末梢神経損傷に対するこれまでの圧迫損傷実験モデルでは、1回の強い圧迫を神経に加えているものが多く、反復圧迫損傷後の病態を分析した研究は少ない。本研究では、ラット坐骨神経に複数回の圧迫を加え、この反復損傷が運動機能の回復と神経線維の再生に及ぼす影響について検討した。ラットの左坐骨神経に鉗子による強い圧迫損傷を加え、損傷回数の違いにより、A～D群のラットを作成した[A群(control)、B群(1回圧迫)、C群(1週間隔で2回圧迫)、D群(1週間隔で3回圧迫)]。各群において最終圧迫の8週間後まで、毎週ラットの後肢両足のfoot printを採取しStatic Sciatic Index (SSI) 値を算出して運動機能を評価した。また、最終圧迫の2、3、4週後に採取した前脛骨筋から凍結切片を作成し、筋線維横径の計測と免疫染色(神経終末:抗シナプトフィジン抗体, アセチルコリンレセプター: α ブングアロトキシン)による神経筋接合部の再支配率の計測を行い、坐骨神経反復損傷による影響について評価した。

その結果、以下の結論を得た。

1. SSI値: A群(control)では実験期間中に歩行障害は認められず、すべての計測においてSSI値は-20以上の正常値を示した(-15.6～-4.1)。坐骨神経損傷群(B-D群)では、最終圧迫1週後の時点ですべてのラットにおいて高度な運動機能障害を認め、SSI値は-80以下であった。これら3群では、

次第に SSI 値の回復が認められたが、B 群（1 回圧迫）に比較して C 群（1 週間隔で 2 回圧迫）、D 群（1 週間隔で 3 回圧迫）では回復の遅延が認められた。また、B 群では 4 週後に、C 群では 6 週後に SSI 値が正常域に達したのに対し、D 群では 8 週後においても正常域まで回復しなかった。

2. 筋線維横径：B 群（1 回圧迫）の前脛骨筋の筋線維横径は、D 群（1 週間隔で 3 回圧迫）と比較すると、最終圧迫の 2, 3, 4 週後すべてにおいて有意に大きかった。また、A 群（control）と比較すると、B 群では 2, 3 週後では有意に筋線維横径が小さいものの 4 週後には A 群と同程度まで回復したのに対し、D 群では 4 週後まで有意に小さいままであった。

3. 神経筋接合部の再支配率：B 群（1 回圧迫）、D 群（1 週間隔で 3 回圧迫）双方において、最終圧迫

の 2, 3, 4 週後のシナプトフィジン陽性神経終末数は徐々に増加し、神経筋接合部における神経の再支配率の増加が確認された。A 群（control）と比較すると、B 群、D 群ともに 2, 3 週後の再支配率は有意に低値であったが、4 週後には有意差は確認されなかった。また、D 群の再支配率は 3 週後において B 群と比較して有意に低かった。

今回の研究では、坐骨神経に対する反復圧迫損傷では、1 回の圧迫損傷と比較して運動機能の回復が遅く、3 回以上の圧迫では筋線維径の回復遅延および神経線維の再生遅延により、最終的に正常運動機能が得られないことが示唆された。また、本実験モデルは軽度反復圧迫や持続圧迫モデルとして応用できる可能性がある。したがって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Prevalence and Clinical Features of Hearing Loss Patients with *CDH23* Mutations : A Large Cohort Study (*CDH23* 遺伝子変異による難聴の頻度と臨床的特徴について：大規模コホート研究)

宮 川 麻衣子

(論文の内容の要旨)

【研究目的】先天性難聴は出生児1,000人に1人に見られる頻度の高い先天性疾患である。先天性難聴には100種類以上の遺伝子が関与しているとされ、すでに様々な遺伝子について、変異の頻度、種類、表現型についての報告がなされている。

今回、宮川らは Usher 症候群と非症候群性難聴 (DFNB12) の原因遺伝子である *CDH23* 遺伝子について、日本人における遺伝子変異の頻度およびこれらの変異を有する症例の臨床像を明らかにするために大規模集団を用いた検討を行った。

【対象と方法】第一次スクリーニングとして日本人難聴遺伝子データベース（全国33施設より集められた難聴遺伝子家系発端者1396名）のうち、常染色体劣性遺伝による難聴の可能性のある304名について *CDH23* 遺伝子を直接シーケンス法による解析を行った。その結果、病的変異と考えられる26個のアミノ酸置換が同定された。次に、第二次スクリーニングとして1,396名（第一次スクリーニングの304名を含む）を対象に、Taqman SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems) により、26種類の変異の有無をスクリーニングした。この第二次スクリーニングにより検出された *CDH23* 遺伝子変異の頻度と変異が同定された症例の

臨床像（聴力レベル、難聴の進行性、めまい、耳鳴の有無）について検討を行った。

【研究結果】直接シーケンス法による第一次スクリーニングの結果、26種類の病的変異と考えられるアミノ酸置換が同定された。これには、既に報告されている p.P240L 変異, p.R301Q 変異, p.Q1716P 変異, p.R2029W 変異も含まれていた (Wagatsuma et al., 2007)。次に、第二次スクリーニング (Taqman assay による) では、1,396名中52名 (=2.1%) (ホモ接合体:10名, コンパウンドヘテロ接合体:13名, ヘテロ接合体:29名) において、*CDH23* 遺伝子変異を認めた。10種類のアミノ酸置換については変異と考えられ、残りについては病的変異かどうかの結論は得られなかった。臨床像を検討したところ、1) 発症年齢は0歳(先天性)から60歳までと幅広いこと、2) 低音部に残存聴力を認めること、3) 進行性であること、4) p.R2029W 変異の症例では成人発症であることが明らかとなった。また、補聴器や人工内耳を装着している例が多く認められた。

【考察】日本人非症候群性難聴患者において、高頻度で認められる *GJB2* 遺伝子や *SLC26A4* 遺伝子の変異に次いで、*CDH23* 遺伝子変異の頻度が高いことが明らかとなった。変異は機能上重要な部位 (DRE,

DXNDN, DXDモチーフ)に多く認められた。中でもP240L変異の頻度が高く、創始者効果が関与していることが示唆された。また、ヘテロ症例の表現型はホモ変異、コンパウンドヘテロ変異症例の表現型と類似しており、もう一方の変異の存在が示唆された。ヘテロ変異症例を含めると難聴患者の3.7%、常染色体劣性遺伝形式をとる難聴の5.7%を占める頻度の高い責任遺伝子であることが明らかとなった。

【結論】今回の大規模研究により日本人における*CDH23* 遺伝子変異の頻度および臨床像がより明確となり、この遺伝子変異を持つ患者への詳細な情報提供が可能となったと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

先天性難聴は1,000人に1人の割合で発症し、その60%程度に遺伝子変異が関与すると考えられている。比較的高頻度で認められる*GJB2* 遺伝子や*SLC26A4* 遺伝子の他に、100種類以上の遺伝子が関与しているとされている。

そのうち、*CDH23* 遺伝子は、常染色体劣性遺伝病の責任遺伝子であり、欠失挿入変異/スプライス変異/ナンセンス変異によりUsher症候群(難聴+網膜色素変性症+めまい)が起こり、またミスセンス変異により非症候群性難聴(難聴のみ)がおこることが知られている。2007年に信州大学耳鼻咽喉科学教室より*CDH23* 遺伝子による非症候群性難聴について報告している(Wagatsuma et al.)。

本論文において宮川麻衣子は、日本人における*CDH23* 遺伝子変異の頻度およびこれらの変異を有する症例に関する臨床像について大規模調査を行った。

まず、難聴患者1396家系における頻度を検討した。*CDH23* 遺伝子は、69エクソンもの巨大な遺伝子であるため、2段階スクリーニングを行った。その結果、10種類のミスセンス変異を認め、1396家系中52家系(=2.1%) (ホモ接合体10家系、コンパウンドヘテロ接合体29家系、ヘテロ接合体29家系)において*CDH23* 遺伝子による非症候群性難聴を認めた。

次に、ホモ接合体/コンパウンドヘテロ接合体23家系26症例の臨床像を検討したところ、先天性高音障害型難聴が多く、徐々に低音域聴力が低下する傾向を認めた。また、変異ごとに検討したところ、p.T1368M変異やp.R2029W変異は高齢発症であった。実験動物として最も良く用いられているC57BL6/Jマウスの加齢性難聴の原因遺伝子は*Cdh23* であり、本論文の結果により、*CDH23* 遺伝子がヒトの加齢性難聴にも関与することが明らかとなった。

また、27%の症例が人工内耳を装着していた。補聴器を装着している症例についても高音障害型難聴であることから、現在、信州大学が申請した高度医療である「残存聴力活用型人工内耳」のよい適応であることがわかった。

本論文により、日本人における非症候群性難聴者の原因遺伝子として*CDH23* 遺伝子変異の頻度が高く、特徴的な臨床像を示すことが明らかとなった。一定の知見が得られたことは今後の研究の上で非常に重要な発見であると考えられる。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。

Differentiation of Monkey Embryonic Stem Cells to Hepatocytes by Feeder-free Dispersion Culture and Expression Analyses of Cytochrome P450 Enzymes Responsible for Drug Metabolism (無フィーダー分散培養によるサル胚性幹細胞の肝細胞への分化と薬物代謝に関与するチトクロムP450酵素の発現解析)

丸 山 順 也

(論文の内容の要旨)

【目的】胚性幹細胞(ESCs)は、あらゆる細胞に分化可能な万能細胞であり、再生医療だけでなく薬物動態試験を含む創薬研究への利用にも大いに期待されている。しかし、ヒトESCs(hESCs)は受精卵を使って樹立するため、生命倫理上の問題から、国内ではhESCsを用いた研究は一部の研究機関に限られている。現在、ヒトに系統発生的に最も近い種(霊長

類)であるカニクイザルが実験用動物として広く用いられている。当研究室では、カニクイザルESCs(cmESCs)から胚様体(EB)を形成し、いくつかの因子を添加することで肝細胞に分化させることを報告している。しかしながら、EBを形成する分化培養法は、同時に多数の検体を用いる場合に効率的ではない。一方、無フィーダー分散培養法は、未分化な細胞をより効率的に得ることが可能である。また、cmESCs

を分散培養系で、Rho キナーゼ阻害薬 (Y-27632) を添加するとアノイキスを抑制することが報告されている。しかしながら、分散培養法が cmESCs の肝細胞への分化誘導に効果的であるか否かは不明である。

そこで、本研究では、cmESCs を Y-27632 存在下で、分散培養法を用いて肝細胞への分化誘導を行い、分化した細胞を用いて肝細胞マーカー遺伝子やチトクロム P 450 (CYP) 酵素の発現と P 450 の薬物代謝の応答性に関して解析を行った。

【方法】サル ESCs は、田辺製薬より供与された cmESCs (CMK6) を使用した。細胞培養に関しては、Y-27632 を添加した分散培養法にて未分化細胞のみを分取した後、HGF, OSM, DEX を添加したランフォード培地にて肝細胞へ分化させた。肝細胞マーカー遺伝子および CYP 酵素の mRNA の発現解析は、real-time PCR 法にて行った。cmCYP3A4 (3A8) の酵素活性は、テストステロン 6 β -水酸化酵素活性によって評価した。酵素誘導能に関しては、cmCYP3A4 (3A8) の強力な誘導剤であるリファンピシン (RIF) を用いて、cmCYP3A4 (3A8) の mRNA および酵素活性によって評価を行った。比較対照として、BIOPREDIC 社より購入したカニクイザル初代培養肝細胞 (cmHCs) を用いた。

【結果】肝細胞への分化誘導 27 日後には、肝細胞に特徴的な形態 (多核で多角形) を示した。また、Y-27632 は、分散培養条件下 cmESCs の生存に効果的であった。cmESCs 由来肝細胞におけるアルブミン (ALB) の mRNA 発現レベルは、cmHCs の約 1/80 であったが、 α -フェトプロテイン (AFP) は cmHCs と比べて 16 倍高かった。CYP1A1, cmCYP2B6 (2B30), cmCYP2C9 (2C43), cmCYP2D6 (2D17), cmCYP3A4 (3A8) および cmCYP3A5 (3A66) はカニクイザルの肝臓における主要な CYP 分子種であり、cmESCs 由来肝細胞におけるこれら CYP 分子種の mRNA 発現レベルは cmHCs と比較して、それぞれ 386 倍, 7.4 倍, 284 倍, 1.6 倍, 136 倍, 5.9 倍低かった。cmESCs 由来肝細胞における cmCYP3A4 (3A8) のテストステロン 6 β -水酸化酵素活性は、cmHCs の約 1/6 であった。また、cmESCs 由来肝細胞における cmCYP3A4 (3A8) の酵素誘導能を解析したところ、cmCYP3A4 (3A8) の mRNA 発現および酵素活性は RIF によって有意に増強された。

【考察】本研究において、Y-27632 の添加により無フィーダー分散培養条件下で、cmESCs のアノイキ

スが抑制されることが示され、また cmESCs 由来肝細胞は、分化の最終段階において肝細胞に特有な多核な形態を示した。ALB は、成熟した肝細胞で合成されるタンパク質であり、AFP は内胚葉の分化マーカーであると同時に初期の胎児肝細胞マーカーで、肝細胞の成熟と共に発現レベルは減少する。したがって、本研究において分化誘導した cmESCs 由来肝細胞は、成熟細胞よりむしろ未成熟な細胞の可能性が示唆された。また、カニクイザルの肝臓における主要な CYP 分子種の発現は、cmHCs と比較して cmESCs 由来肝細胞では低かった。しかしながら、本研究で得られた cmESCs 由来肝細胞は、cmCYP3A4 (3A8) を mRNA および酵素活性レベルで発現していることが明らかとなり、また RIF による酵素誘導も確認された。

以上の結果より、Y-27632 存在下で分散培養法を用いて cmESCs 由来肝細胞を分化誘導する方法を確立した。今後更なる改良が必要であるが、薬物代謝研究における肝細胞の安定的な供給源となり得る可能性があると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

胚性幹細胞 (ESCs) は、あらゆる細胞に分化可能な万能細胞である。当研究室では、カニクイザル ESCs (cmESCs) から胚様体 (EB) を形成し、肝細胞に分化させることを報告している。また、無フィーダー分散培養法は、未分化な細胞をより効率的に得ることが可能であり、cmESCs を分散培養系で、Rho キナーゼ阻害薬 (Y-27632) を添加するとアノイキスを抑制することが報告されている。そこで、cmESCs を Y-27632 存在下で、分散培養法を用いて肝細胞への分化誘導を行い、分化した細胞を用いて肝細胞マーカー遺伝子やチトクロム P 450 (CYP) 酵素の発現と P 450 の薬物代謝の応答性に関して解析を行った。

1. 肝細胞への分化誘導 27 日後には、肝細胞に特徴的な形態 (多核で多角形) を示した。
2. Y-27632 は分散培養条件下 cmESCs の生存に効果的であった。
3. cmESCs 由来肝細胞におけるアルブミン (ALB) の mRNA 発現レベルは、カニクイザル初代培養肝細胞 (cmHCs) の約 1/80 であったが、 α -フェトプロテイン (AFP) は cmHCs と比べて 16 倍高かった。
4. カニクイザルの肝臓における主要な CYP 分子種について、cmESCs 由来肝細胞におけるこれら CYP

分子種の mRNA 発現レベルは cmHCs と比較して低かった。

5. cmESCs由来肝細胞におけるcmCYP3A4 (3A8) のテストステロン6 β -水酸化酵素活性は、cmHCs の約 1/6 であった。
 6. cmESCs由来肝細胞におけるcmCYP3A4 (3A8) の酵素誘導能を解析したところ、cmCYP3A4 (3A8) の mRNA発現および酵素活性はリファンピシン (RIF) によって有意に増強された。
- 本研究により、Y-27632の添加によって無フィーダー

分散培養条件下で、cmESCsのアノイキスが抑制された。また、cmESCs由来肝細胞は、cmCYP3A4 (3A8) を mRNA および酵素活性レベルで発現していることが明らかとなり、RIF による酵素誘導も確認された。以上の結果より、Y-27632存在下で分散培養法を用いて cmESCs 由来肝細胞を分化誘導する方法を確立し、薬物代謝研究における肝細胞の安定的な供給源となり得る可能性があると考えられた。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence (Nox1およびNox4から産生された活性酸素は Ras 癌遺伝子が誘導するセネセンスに寄与する)

児 玉 亮

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】齧歯類やヒトの線維芽細胞において癌遺伝子が活性化するとセネセンス、すなわち非可逆的な細胞増殖停止状態となる。最近の研究において Ras 癌遺伝子が誘導する活性酸素はセネセンスを引き起こすことが示唆された。しかしながら、この活性酸素が媒介するセネセンスを制御する分子メカニズムに関しては十分わかっていない。そこで活性酸素によるセネセンス誘導のメカニズムを解明することを目的とし、特に NADPH オキシダーゼ (以下、Nox) より産生される活性酸素に焦点をあてて研究を行った。

【方法】培養細胞にレトロウイルス感染を用いて Ras 癌遺伝子を導入し、cell growth 解析、セネセンス関連 β ガラクトシダーゼ活性試験、各種癌抑制蛋白に対する抗体を用いた Western blot 解析、および Luminol 試験を行い、セネセンスと活性酸素の関連を検討した。また、Noxの役割を確認するためにNoxに対するChemical inhibitor, Nox siRNAによるNox発現の抑制、Nox遺伝子導入、Noxノックアウトマウス由来のMEFを用いた実験を行った。さらに、Noxの下流のシグナル伝達を解明するためにp38MAPKのリン酸化やヒストンのリン酸化をWestern blot解析で検討した。

【結果と考察】Ras癌遺伝子によりMEK/ERK経路を通して活性酸素産生酵素、すなわちラット REF52細胞においてはNox1、ヒト肺 TIG-3細胞においてはNox4の発現が亢進する結果、細胞内の活性酸素レベルが上昇することを示した。siRNAによりNox1やNox4の発現を抑制したところ、 β ガラクトシダー

ゼ活性、細胞増殖停止、p53やp16^{IMK4a}といった癌抑制蛋白の増加といった、RasV12によるセネセンスに関連した現象は減少した。このことは、Noxが産生した活性酸素がp53経路やp16^{IMK4a}経路を活性化することでセネセンスのシグナルを伝達していることを示唆する。さらに、Nox1やNox4のsiRNAはRasによるDNA損傷反応とp38MAPKの活性化を抑制し、またNox1やNox4の過剰発現だけでセネセンスが誘導された。Rasが誘導するセネセンスにおいてNox1が関与していることはNox1欠損マウス由来の胎児線維芽細胞においても確認された。これらの所見はNox1やNox4が産生する活性酸素が、DNA損傷反応やp38MAPKシグナル経路を含め、Rasが誘導するセネセンスにおいて重要な役割を果たしていることを示唆する。

(論文審査の結果の要旨)

Ras癌遺伝子が誘導する活性酸素はセネセンスを引き起こすことが示唆されているが、活性酸素の由来とセネセンス誘導のメカニズムに関しては不明である。そこで児玉らは、セネセンスの現象がみられる培養細胞株3株を用いて、レトロウイルスベクターを用いて Ras 癌遺伝子を導入しセネセンスを誘導し、セネセンスと活性酸素、および Nox の関連を検討した。

その結果、児玉らは以下の結果を得た。

1. H-RasV12を導入した細胞を、Nox阻害剤であるDPIや抗酸化剤であるApocyninで処理することにより、SA- β gal陽性細胞数は減少した。
2. REF52細胞ではNox1とNox4が発現しているが、H-RasV12をtransfectionすることでNox1は発現

が増加した。一方、TIG-3細胞ではNox4が発現しており、H-RasV12によりNox4の発現が増加した。このときMEK阻害剤を処理することで、Rasにより誘導されるNoxが減弱したことからRasによりMEK/ERK pathwayを介してNoxが発現していることを示した。

3. Noxに対するsiRNAをH-RasV12が発現した細胞にtransfectionしたところ、セネセンスの誘導が抑制された。
4. H-RasV12を発現した細胞において活性酸素の増加を認めた。一方、Nox阻害剤であるDPIやApocynin, Noxに対するsiRNAにより、ROS産生は有意に減少した。
5. H-RasV12を発現した細胞においてDNA損傷を示唆する γ -H2A.Xが増加した。一方、NoxのsiRNAによりH2A.Xのリン酸化は抑制された。
6. H-RasV12を発現した細胞においてp38MAPKのリン酸化は増加した。一方、NoxのsiRNAによりp38MAPKのリン酸化は抑制された。

7. Nox1やNox4をレトロウイルス感染によりREF52とTIG-3で過剰発現させたところ、細胞内の活性酸素は増加し、p38MAPKを活性化され、p19やp16といった腫瘍抑制 pathway を介してSeneacenceが誘導された。

8. Nox1ノックアウトマウス由来のMEFにH-RasV12を発現させたところ、活性酸素の産生は減少し、セネセンスの誘導は野生型マウス由来のMEFに比べ減少した。

これらの結果より、Ras癌遺伝子はMEK/ERK pathwayを介してNox1やNox4の発現を増加させ、Nox1やNox4によるROS産生が増加した結果DNAダメージやp38MAPKの活性化を引き起こし、p19-p53-p21 pathway と p16 pathway の両方が活性化され、Seneacenceのシグナルを送っている、というモデルが想定された。本研究は、癌遺伝子によるセネセンス誘導の分子メカニズムの解明に寄与した。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものとして認めた。

G protein-coupled estrogen receptor agonist improves cerebral microvascular function after hypoxia/reoxygenation injury in male and female rats (雌雄ラットにおいてG蛋白共役型エストロゲン受容体作動薬は低酸素・再酸素化障害後の脳微小血管機能を改善させる)

村田 貴弘

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】脳血管障害は性差があり、成人女性においては閉塞性脳血管障害の危険性及びその重症度は低いものの、閉経後に急速に増加する。これはエストロゲンの神経及び脳血管保護作用によるものと考えられている。近年、特異的なG蛋白共役型エストロゲン受容体(GPER)が同定され、この受容体を介したエストロゲンの様々な調節作用が示唆されている。しかし脳細動脈におけるGPERを介したエストロゲンの血管反応やその機序は不詳である。また、GPERを介した虚血・再灌流障害後の血管保護作用も明らかでない。よって本論文では、GPER作動薬による血管運動作用及びその作用機序、そして低酸素・再酸素化障害後の細動脈機能の改善作用について調査した。

【方法】雌雄SDラット(14-20週齢, 240-450g)の中大脳動脈より分枝し脳内を穿通する細動脈(レンズ核線条体動脈)を摘出し、ガラス製のマイクロピペットを内腔に直接カニューレーションし、内圧負荷下で血管内径を顕微鏡下で測定した。GPER作動薬G-1を使

用し、各種阻害薬、GPER拮抗薬G15及び血管内皮障害血管を用いて、その作用機序を調査した。また虚血・再灌流障害における血管機能障害を調べるために、細動脈を1時間の低酸素環境下($pO_2 < 2\%$)におき、その後再酸素化($pO_2 = 21\%$)して低酸素・再酸素化障害血管を作成した。低酸素・再酸素化障害血管にGPER作動薬G-1または活性酸素捕捉剤MnTBAPを1時間投与し、血管内皮依存性のカリウムチャンネルを介した血管拡張を引き起こすアデノシン三リン酸(ATP)の血管拡張作用が改善するかどうかを調べた。【結果と考察】GPER作動薬G-1は雌雄ラット細動脈に有意の血管拡張を起こした。その血管拡張作用は血管内皮一酸化窒素合成酵素(eNOS)阻害薬と空気塞栓による内皮障害のみが部分的に有意に抑制した。またこれらの血管拡張抑制は雌ラットの細動脈で雄よりも有意に強く、性差を認めた。正常血管においてGPER拮抗薬G15はG-1による拡張作用を有意に抑制したが、内皮障害血管では抑制されなかった。以上の結果は、エストロゲンがGPERを介して脳内細動

脈の血管拡張を起こすことを意味している。その作用機序は、古典的なエストロゲンレセプター α 及び β が eNOS 経路や内皮由来過分極因子、アラキドン酸カスケードなどの関与を認めているのに対し、GPER は血管内皮において eNOS 経路のみの関与と考えられた。また eNOS 阻害・内皮障害では部分的な抑制であることから、脳内細動脈血管平滑筋への直接的な血管弛緩作用があると考えられ、その機序は平滑筋細胞内カルシウム貯蔵庫からのカルシウム放出抑制、protein kinase C 抑制や extracellular signal-regulated kinase 1/2 抑制など幾つかの経路が推測された。一方、低酸素・再酸素化障害後の雌ラットの細動脈は雄より血管緊張を強く来し、性差を認めた。雌雄ラットの低酸素・再酸素化障害血管において ATP による血管拡張作用は、normoxia (正常酸素 $pO_2=21\%$ 環境下) による対照群と比較して有意に抑制されていた。血管拡張を引き起こさない閾値以下の低濃度 G-1 または低濃度 MnTBAP を 1 時間投与したところ、両者とも、低酸素・再酸素化障害血管の ATP による拡張作用を著明に回復させた。以上の結果は、GPER 作動薬 G-1 の活性酸素捕捉作用を強く示唆していた。

(論文審査の結果の要旨)

エストロゲンには閉塞性脳血管障害時の神経及び脳血管保護作用があると考えられている。近年、特異的な G 蛋白共役型エストロゲン受容体 (GPER) が同定され、この受容体を介したエストロゲンの様々な調節作用が示唆されているが、脳血管における血管調節作用やその機序は不詳である。また、GPER を介した虚血・再灌流障害後の血管保護作用も明らかでない。そこで村田は(1) GPER 作動薬 G-1 による脳細動脈の血管運動作用及びその作用機序、(2) GPER 作動薬 G-1 による低酸素・再酸素化障害後の脳細動脈機能の改善作用、について調査した。

その研究により以下の結果を得た。

1. GPER 作動薬 G-1 は雌雄ラットの脳細動脈に有

意の血管拡張を起こす。

2. その拡張作用は血管内皮一酸化窒素 (NO) 産生経路に部分的に依存していた。
3. 血管内皮一酸化窒素合成酵素阻害薬と空気塞栓による内皮障害は G-1 の血管拡張を部分的に抑制するが、その抑制は雌ラットの細動脈で雄よりも有意に強く、性差を認めた。
4. その拡張作用にアラキドン酸代謝経路や血管内皮過分極因子は関与していない。
5. GPER 作動薬 G-1 は脳細動脈の血管平滑筋にも直接的に作用し血管拡張または弛緩を引き起こす。
6. この血管平滑筋における拡張作用に protein kinase A, protein kinase G やカリウムチャンネルは関与していない。
7. 低酸素・再酸素化障害後の雌ラットの細動脈は雄より血管緊張を強く来し、性差を認めた。
8. 雌雄ラットの低酸素・再酸素化障害血管においてアデノシン三リン酸 (ATP) による血管拡張作用 (血管内皮依存性のカリウムチャンネルに依存) は、normoxia (正常酸素 $pO_2=21\%$ 環境下) による対照群と比較して有意に抑制されていた。
9. 血管拡張を引き起こさない閾値以下の低濃度 G-1 または低濃度の活性酸素捕捉剤 MnTBAP を 1 時間投与したところ、両者とも、低酸素・再酸素化障害血管の ATP による拡張作用を著明に回復させた。以上より、GPER 作動薬は脳細動脈において、血管内皮 NO 依存及び血管平滑筋に依存した血管拡張作用があり、並びに低酸素・再酸素化障害後の血管内皮機能を改善させており、活性酸素捕捉作用があると考えられた。GPER はエストロゲンによる虚血・再灌流障害時の脳血管保護作用において重要な役割を果たしていると推測され、その作動薬はヒトにおける閉塞性脳血管障害時の治療薬の候補となる可能性がある。従って主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

A phase II trial of erlotinib in patients with EGFR wild-type advanced non-small-cell lung cancer (野生型 EGFR 遺伝子をもつ進行非小細胞肺癌患者におけるエルロチニブ治療の第 II 相試験)

小林 孝 至

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】エルロチニブは上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼを阻害する分子標的治療薬であり、EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌

に対して高い腫瘍縮小効果を示すが、EGFR 変異を持たない (野生型) 場合にはその奏効率は低いとされる。EGFR 遺伝子野生型の非小細胞肺癌には、プラチナ系抗癌剤を含む二剤併用化学療法が初回の標準治

療とされるが、種々の殺細胞性抗腫瘍薬に耐性となった場合の治療法は確立しておらず、日常診療でも難渋する。エルロチニブは内服薬で忍容性が高いことから、実地診療においてEGFR野生型の非小細胞肺癌患者に対しても同意の上で治療を試みられることはある。しかし、野生型EGFR遺伝子患者に対するエルロチニブの治療効果を前向きに検討した臨床研究の報告はない。今回われわれは、野生型EGFR遺伝子を有し、殺細胞性抗腫瘍薬が非適応または種々の殺細胞性抗腫瘍薬に治療耐性となった非小細胞肺癌に対する、エルロチニブの有効性および忍容性について検討する前向き研究を行った。

【対象と方法】 対象はEGFR遺伝子野生型の病期Stage III, IVの進行性および術後再発の非小細胞肺癌患者で、エルロチニブ150 mg/日の内服による治療が、病勢増悪(PD)または許容できない有害事象が生じるまで施行された。主要評価項目は病勢コントロール率(DCR)であり、副次的評価項目は奏効率(RR)、有害事象、無増悪生存期間(PFS)、生存期間(OS)である。

【結果】 2008年1月から2011年6月までの間に、当院および長野県内の関連病院において31症例が登録された。年齢中央値は71歳(31-89歳)であり、組織型では21例が腺癌、9例が扁平上皮癌、1例が大細胞癌であった。Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)のperformance statusは0が10例、1が9例、2が8例、3が4例であった。2例で高齢のため初回治療としてエルロチニブが用いられたが、他の症例は殺細胞性抗腫瘍薬による治療歴を有しており、4次治療以降となる症例が9例(29.0%)存在した。エルロチニブの投与期間中央値は70日(10-463日)であった。有害事象として皮疹が80.6%、下痢が38.7%に認められた。2例(6.5%)で間質性肺疾患(ILD)を発症したが、いずれもエルロチニブ投与の中止と副腎皮質ステロイドによって回復し、治療関連死を認めなかった。抗腫瘍効果は、評価前に投与が早期中止となった2例を除く、29症例において検討された。1例において完全奏効(CR)が得られ、4例が部分奏効(PR)、安定(SD)は8例で、RRとDCRはそれぞれ17.2%、44.8%であった。PFS中央値は2.1カ月、OS中央値は7.7カ月、1年生存率は44.2%であった。SD以上の病勢コントロールが得られた症例では、PD群に比して、有意なPFSおよびOSの延長(それぞれ4.0カ月、20.4カ月)が認められた。

【考察】 今回の前向き研究において示されたDCRや

PFS、OSは、過去の2次治療以降における殺細胞性抗腫瘍薬を用いた大規模試験の結果に匹敵するものであり、登録された症例の多くが既に多剤の殺細胞性抗腫瘍薬による化学療法を施行されていたことを考慮すると、エルロチニブ投与は有用な治療法であると考えられた。また、ILDを2例に認めたが、致命的な有害事象はなく制御可能であり、忍容性にも優れていると考えられた。

【結語】 以上の結果より、野生型EGFR遺伝子の非小細胞肺癌であっても、殺細胞性抗腫瘍薬が無効となった症例においては、エルロチニブは有用な治療選択肢の一つになると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

エルロチニブは上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼを阻害する分子標的治療薬であり、EGFR遺伝子変異を有する非小細胞肺癌に対して高い腫瘍縮小効果を示すが、野生型の場合には奏効率が低いと報告されている。しかし、野生型EGFR非小細胞肺癌に対する3次治療以降の標準治療は確立しておらず、日常診療において治療薬剤の選択に難渋することが多い。今回、野生型EGFR遺伝子を有し、殺細胞性抗腫瘍薬が非適応または種々の殺細胞性抗腫瘍薬に治療耐性となった非小細胞肺癌患者を対象として、エルロチニブによる治療の有効性と忍容性に関して前方視的に検討した。主要評価項目を病勢コントロール率(DCR)、副次的評価項目を奏効率(RR)、有害事象、無増悪生存期間(PFS)、全生存期間(OS)とし、エルロチニブ150 mg/日の内服による治療を施行した。その結果、以下の成績を得た。

1. 31症例が登録され、年齢中央値は71歳(31-89歳)、組織型では腺癌が21例、扁平上皮癌が9例、大細胞癌が1例であった。2例が初期治療でエルロチニブを用いられ、29例は殺細胞性抗腫瘍薬による治療歴を有していた。
2. エルロチニブの投与期間中央値は70日(10-463日)であった。
3. 有害事象として、皮疹が80.6%、下痢が38.7%に認められた。2例(6.5%)で間質性肺疾患を発症したが、いずれも適切な治療で回復し、治療関連死を認めなかった。
4. RRは17.2%、DCRは44.8%、PFS中央値は2.1カ月、OS中央値は7.7カ月であった。
5. 病勢コントロールが得られた症例群におけるPFSは4.0カ月、OSは20.4カ月であった。

今回の前向き試験は、登録された症例の多くが既に多剤の殺細胞性抗腫瘍薬による化学療法を施行されており、Phase IIではあるものの、過去の2次治療以降における大規模試験の結果に匹敵するものであった。有害事象に関しては、致死的なものはなく概ね制御可能であり、忍容性にも優れていると考えられた。本論文は、エルロチニブによる化学療法が野生型 EGFR

遺伝子の非小細胞肺癌に対しても、いくつかの殺細胞性抗腫瘍薬が無効となった症例においては考慮される治療法の1つであることを示唆する重要な研究と考えられる。

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

Cultured epithelial grafting using human amniotic membrane : The potential for using human amniotic epithelial cells as a cultured oral epithelium sheet (羊膜を用いた培養上皮移植に関する実験的研究 : ヒト羊膜上皮細胞による上皮シート作成の可能性)

小池 剛史

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】羊膜にはさまざまな機能細胞へ分化する潜在能や創傷治癒機構とともに免疫学的な特性が科学的に証明され、細胞移植治療や角膜移植への応用など再生医療の分野で研究が進められている。最近では骨髄、臍帯血に続く第3の組織バンクとして再生医療支援機構により「羊膜バンク」が設立された。本実験はヒト羊膜上皮細胞 (hAECs) を用いた培養重層上皮シートの作製を試み、同種移植片として口腔への移植応用の可能性について検討を行った。

【方法】本研究は信州大学医学部医倫理委員会の承認のもと、提供者に十分なインフォームドコンセントを行い各種感染症検査などで安全性が確認できた帝王切開時の羊膜を使用した (n=20)。hAECsの単離は以下の操作により行った。①羊膜を絨毛膜より剥離・洗浄、PBS (-) /ヒアルロニダーゼ/DNase I 混合溶液に浸漬し細切。②羊膜片をDMEM/Trypsin-EDTA 混合溶液中に浸漬し攪拌。③hAECsを含んだ細胞浮遊液を濾過しトリプシン非活処理後、 5.0×10^5 cells/cm²の細胞密度にて培養用ディッシュに播種。上記②~③の操作を7~8回繰り返し行いhAECsを採取した。単離させたhAECsはBoyce & Hamの方法に準じた無血清・低カルシウム MCDB153培地にて培養し、以下の項目について検討した。(1)各継代別の平均細胞総数の計測 (n=10)。(2)2継代目hAECsの細胞増殖能をMTTアッセイ法により計測 (n=4)。(3)2~3継代行ったhAECsをMillicell cell culture plate insertTM内に播種しliquid interface環境にて4日間培養。その後、無血清培地のカルシウム濃度を上げair-liquid interface環境に培養条件を変更しさらに3週間培養。それぞれのH-E染色標本を

作製し組織学的に比較検討。(4)正常口腔粘膜およびhAECs培養上皮シートの免疫組織標本<CK10/13, Ki-67, CK19, Zonula occludens protein-1 (ZO-1), occludin>を作製し比較検討した。

【結果】単離したhAECsは均一な大きさの細胞であり、1枚の羊膜から80万から500万個のhAECsが得られた。hAECsは無血清・低カルシウム培地中でも増殖を続け各継代の細胞増殖能の比較では、2継代目hAECsの倍加時間が最も早く最終的に約5継代まで培養可能であった。MTTアッセイ法によるhAECsの細胞増殖曲線分析では、計測後2~5日目に対数増殖期が認められた。

組織学的検討では、hAECsをliquid interface環境にて4日間培養を行った場合では、上皮の重層化は認められず、羊膜本来の解剖学的形態である単層上皮構造であった。しかしair-liquid interface環境に培養条件を変更し3週間培養を行うことにより多孔性セルロース膜上でほぼ均一な10層以上からなる非角化重層上皮化が認められた。

免疫組織学的検討では、differentiation markerであるCK10/13, stem-cellやproliferation markerであるCK19やKi67では、培養上皮シートの全層で陽性細胞の発現が認められた。さらに上皮のタイトジャンクション (TJ) マーカーであるZO-1およびoccludinでは、正常口腔上皮組織とほぼ同様の発現パターンが認められた。

【考察】培養上皮シート開発に関する研究では、作製時にウシ血清やマウスfeeder layerを使用するRheinwal & Greenの方法に準じた報告が散見されるが、FDAのガイドラインではプリオンや未知ウイルスの混入の可能性があるため推奨されていない。そこ

で本研究は未知因子を除外した air-liquid interface 環境による培養法を選択した。羊膜は羊水を保持している膜であり通常空気に暴露されることはないが、hAECs は air-liquid interface 環境でも細胞死することなく増殖を続け、約3週間培養を継続することにより重層上皮化し得ることが明らかになった。air-liquid interface 法による培養は、表層の細胞間隙を減少させ TJ 構造、即ち上皮バリア機能の獲得に有利な方法とされているが、免疫組織学的所見において本培養上皮シートは口腔粘膜上皮組織と類似の TJ 構造の獲得が確認された。さらに本培養上皮シートは正常口腔粘膜上皮組織と比較し、より高い細胞活性と増殖能を有していることが判明した。hAECs はクリーンな培養重層上皮シート開発における有望な細胞供給源となり得ることが示唆される結果であり、hAECs を用いた培養シートは、歯科医療のみならず熱傷治療など幅広い分野において臨床応用できる可能性を有していると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

羊膜にはさまざまな機能細胞へ分化する潜在能や創傷治癒機構とともに免疫学的な特性が科学的に証明され、再生医療の分野で研究が進められている。本実験はヒト羊膜上皮細胞 (hAECs) を用いた培養重層上皮シートの作製を試み、同種移植片として口腔への移植応用の可能性について検討を行った。

単離させたhAECsは無血清・低カルシウムMCDB 153培地にて培養し、以下の項目について検討した。(1)各継代別の平均細胞総数の計測。(2)2継代目hAECsの細胞増殖能をMTT assayにより計測。(3)2~3継代行ったhAECsをliquid interface環境にて4日間培養後、air-liquid interface環境に培養条件を交

更しさらに3週間培養。それぞれのH-E染色標本を組織学的に比較検討。(4)口腔粘膜組織およびhAECs培養上皮シートを免疫組織学的に比較検討。

その結果、小池らは次の結論を得た。

1. hAECsは無血清・低カルシウム培地中でも増殖を続け各継代の細胞増殖能の比較では、2継代目hAECsの倍加時間が最も早かった。
2. MTT assayによるhAECsの細胞増殖曲線分析では、計測後2~5日目に対数増殖期が認められた。
3. 組織学的検討では、hAECsをliquid interface環境にて4日間培養を行った場合では上皮の重層化は認められなかったが、air-liquid interface環境に培養条件を変更し3週間培養を行うことにより10層以上からなる非角化重層上皮化が認められた。
4. 免疫組織学的検討では、CK10/13・CK19・Ki67は培養上皮シートの全層で陽性細胞の発現が認められた。ZO-1・occludinは口腔粘膜上皮組織とほぼ同様の発現パターンが認められた。

hAECsはair-liquid interface環境でも細胞死することなく増殖を続け、約3週間培養を継続することにより重層上皮化し得ることが明らかになった。air-liquid interface法による培養は、タイトジャンクション (TJ) 構造の獲得に有利な方法とされているが、本培養上皮シートは口腔粘膜上皮組織と類似の TJ 構造の獲得が確認された。さらに本培養上皮シートは口腔粘膜上皮組織と比較し、より高い細胞活性と増殖能を有していた。hAECsは培養重層上皮開発における有望な細胞供給源となり得ることが示唆される結果であった。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。

New visual rating system for medial temporal lobe atrophy: a simple diagnostic tool for routine examinations (内側側頭葉萎縮の新たな肉眼的評価方法: 日常臨床における簡便な診断手法)

金子 智 喜

(論文の内容の要旨)

【目的】 STIR (short TI inversion recovery) 法で撮像された MRI (MR 画像) を利用した、内側側頭葉萎縮の簡便な肉眼的評価システムについて、有用性を評価する。

【方法】

対象: 2005年5月から2007年6月までに、信州大学医学部附属病院精神科を受診し頭部 MRI を撮像された

連続158名を対象とした。DSM-IVを診断基準として、アルツハイマー病と確定診断された55名、認知機能が正常である患者55名を抽出した。その後、MMSEが施行されていない、およびSTIR法による撮像が行われていない症例を除外し、アルツハイマー病患者34名、認知機能に異常がない19名を対象とした。

MRI: 0.3T, 0.4Tおよび1.5T磁場強度の撮像装置を利用し、機器の選択はランダムに行われた。撮像シー

ケンスは STIR 法を用い、スライス厚は 4.0 mm とした。海馬に直行する冠状断を撮像し、評価用画像とした。

評価者：2 名の放射線科医師が、患者情報を与えられない状況下で別個に評価を行い、そのうち 1 名は 2 カ月後に再評価した。

肉眼的評価方法：海馬とその周囲の脳脊髄液腔の形状を比較することで内側側頭葉の萎縮の程度を評価した。なお、本法における海馬とは、海馬台の上部に位置する灰白質構造（アンモン角、歯状回を含む）とした。海馬周囲の脳脊髄液腔を、海馬の外側、上部、内側の 3 部位に分け、それぞれ海馬と比較し以下に示す 0 - 3 の 4 段階で評価した。

0 点：脳脊髄液腔はスリット状、あるいは点状。

1 点：脳脊髄液腔は海馬より小さい。

2 点：脳脊髄液腔は海馬とほぼ同じ形状を呈する。

3 点：脳脊髄液腔は海馬と比較し明らかに広い。

【結果】評価者間の評価点数の一致率は fair から good、評価者内一致率は good から excellent であった。

アルツハイマー病患者の評価点数は、右側 5.21 ± 1.96 、左側 4.88 ± 1.61 、両側合計 10.09 ± 3.35 、コントロール群は、右側 3.26 ± 1.15 、左側 3.00 ± 1.05 、両側合計 6.26 ± 1.97 でであった。両側合計のカットオフ値を 7 点とした場合、ROC 解析では感度 88.2%/特異度 78.9%，AUC 0.883 であった。

【結論】本法は、日常臨床検査において内側側頭葉の萎縮を簡便に肉眼的に評価するシステムとして、有用である。

(論文審査の結果の要旨)

アルツハイマー病患者では、嗅内野を主体として内側側頭葉に萎縮が生じることが特徴とされる。MRI は組織コントラストが高い上に、任意方向の断面像を撮像出来るため、内側側頭葉の形態的な評価に広く用いられている。形態的な評価方法として、Voxel-based morphometry (VBM) 法、Region of interest (ROI) 法および肉眼的評価方法がある。VBM 法、ROI 法は客観性の高い評価手法であるが、撮像時間が長く画像処理にも時間がかかるため、日常臨床には

利用し難い。肉眼的な評価法として、Scheltens らが 1992 年に報告した手法が広く利用されている。しかし、評価者間、評価者内の判定にぶれが生じやすいという問題点があった。そこで、金子は MRI の撮像方法と評価画像の選別、および評価方法を明確化した新たな肉眼的評価方法を考案し、(1) 評価の一致率、(2) アルツハイマー病と診断された患者と認知機能に異常がない患者における評価点数の有意差、(3) 本法による内側側頭葉萎縮の診断能、について検討した。

その結果以下の成績を得た。

1. 評価者間の κ 統計量は右：左：両側 = $0.65 : 0.52 : 0.68$ であり moderate-good、評価者内では右：左：両側 = $0.83 : 0.76 : 0.79$ であり good-excellent であった。
2. アルツハイマー病患者の評価点数は、右側 5.21 ± 1.96 、左側 4.88 ± 1.61 、両側合計 10.09 ± 3.35 、認知機能に問題がない群は、右側 3.26 ± 1.15 、左側 3.00 ± 1.05 、両側合計 6.26 ± 1.97 でであった。いずれも $p < 0.001$ でアルツハイマー病患者において、有意に得点が高かった。
3. ROC 解析では、右側、左側ともにカットオフ値を 4 点とした場合、右側：感度 85.3%/特異度 72.7%，AUC 0.833、左側：感度 76.5%/特異度 94.7%，AUC 0.868。両側合計のカットオフ値を 7 点とした場合、感度 88.2%/特異度 78.9%，AUC 0.883 であった。両側を評価基準とした場合に最も高い感度を得ることが出来た。

以上の結果より、金子が考案した内側側頭葉の萎縮を肉眼的に評価する方法は、評価画像と評価方法の基準を明確化したことで、既存の評価方法と比較して評価の一致率は高く、既存の評価方法と比較して同程度以上の診断能を得ることが可能となった。簡便であることから臨床的にも利便性の高い評価方法であり、今後認知症に対する簡便な画像検査法の一つとして臨床応用される可能性がある。したがって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Postoperative suppression of inflammatory cytokines after distal gastrectomy in elderly patients (高齢者における幽門側胃切除後の炎症性サイトカイン産生抑制について)

岸 本 恭

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、平均寿命が延長するとともに、高齢者に対する手術件数が増加し若年者と同じように癌の手術が安全に行われる一方、高齢者においては術後合併症や死亡率が高いことが指摘されている。サイトカインは外科的侵襲に対する生体反応において重要な位置を占めているが、高齢者における外科的侵襲に対するサイトカインの反応はいまだ明らかにされていない。本研究では、幽門側胃切除後のサイトカイン動態を調べることで、高齢者と若年者の外科的侵襲に対する生体反応を比較検討した。

【患者と方法】1999年から2000年の間に147人の胃癌患者が幽門側胃切除術を受けたが、そのうち糖尿病や腎不全、心不全といった全身に影響を与えるような既往歴のある患者や、癌が進行した患者(Stage 3, 4)を除外した21人を対象とした。この21人を年齢で2つのグループに分け、75歳以上の10人を高齢者群とし、65歳以下の11人を若年者群とした。両群間で、性別、Performance status, 手術時間, 麻酔時間, 出血量といった患者背景に差は認められなかった。

血液サンプルは術前、第1, 3, 7病日に採取し、そのサンプルを2つに分け、1つは血清中の炎症性サイトカインであるIL-6, IL-8と、抗炎症性サイトカインであるIL-10, soluble TNF receptors (sTNF-R) p55/75, IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)を測定した。もう1つのサンプルは単球の活性を調べるために、全血を*E. Coli* lipopolysaccharide (LPS)で24時間、37度で刺激した後、TNF- α とIL-1 β を測定した。

【結果】炎症性サイトカインであるIL-6濃度は両群とも第1病日がピークであり、その後第7病日にかけて減少した。IL-6は両群間に有意差を認め、第1病日において高齢者群が若年者群と比較し有意に低値を示した。IL-8に関しては差を認めなかった。抗炎症性サイトカインのIL-10, sTNF-Rp55/75, IL-1raには有意差を認めなかった。LPS刺激後の前炎症性サイトカインに関してはTNF- α が、第1病日において高齢者で低値を示したが、IL-1 β は有意差を認めなかった。術後の白血球数とCRPに関しては両群間

に差はなかった。

【考察】炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインのバランスが保たれていれば生体は恒常性を維持できるが、もしこのバランスが崩れれば恒常性を維持できなくなる。炎症性サイトカインが優位な状態をSIRS (systemic inflammatory response syndrome), 抗炎症性サイトカインが優位な状態をCARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome)と呼び、SIRSはショック、多臓器不全を引き起こし、CARSは免疫抑制状態になり感染のリスクをあげる。本研究で、高齢者における幽門側胃切除後にサイトカインの動態を検討した結果、高齢者で炎症性サイトカインが低値を示す一方で、抗炎症性サイトカインに関しては差が認められず、単球の活性が抑制されていたことから、高齢者においてはよりCARSになりやすい傾向があることが明らかとなり、術後感染症や敗血症といった合併症の一因となっている可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

高齢者に対する外科的治療が増加している一方、一般的に高齢者では若年者と比較して術後合併症の頻度や死亡率が高いと言われている。サイトカインは外科的侵襲に対する生体反応において重要な位置を占めているが、高齢者における外科的侵襲に対するサイトカイン反応の研究はなされていない。本研究では幽門側胃切除後のサイトカイン反応を調べることで、高齢者と若年者の間にその反応性に違いがあるかどうかを比較検討した。

1999年から2000年の間に幽門側胃切除術を受けた患者147人のうち、糖尿病や腎不全など全身に影響を与えるような合併症や、癌が進行してその影響が出る懸念がある患者(Stage 3, 4)を除外し、最終的に21名を対象とした。これら21人を年齢で2グループに分け、75歳以上の10名を高齢者群、65歳以下11名を若年者群とした。術前、第1, 3, 7病日に血液サンプルを採取し、炎症性サイトカインであるIL-6, IL-8, 抗炎症性サイトカインであるIL-10, sTNF-R, IL-1raの血中濃度を計測した。また*E.coli* lipopolysaccharide (LPS)を用いて24時間のincubationを行ったのち、前炎症性サイトカインであるTNF- α , IL-1

β を測定，単球の新たな刺激に対する反応性がどのように変化するかを検討し，以下の結果を得た。

1. 炎症性サイトカインでは IL-6 が高齢者群では若年者群と比較し，第 1 病日において有意に低値を示した。IL-8 に関しては有意差を認めなかった。
2. 抗炎症性サイトカインに関してはすべてにおいて有意差を認めなかった。
3. 前炎症性サイトカインに関しては TNF- α で第 1 病日において高齢者群で有意に低値を示した。IL-1 β に関しては TNF- α と同様の傾向を示したものの，有意差は認められなかった。

本研究から，高齢者においては術後早期に，炎症性サイトカインが低値を示す一方で，抗炎症性サイトカ

インに関しては差が認められず，さらに単球の活性も抑制されていることが明らかとなった。一般的に，炎症性サイトカインが優位な状態を SIRS (systemic inflammatory response syndrome)，抗炎症性サイトカインが優位な状態を CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome) と呼ぶが，今回の結果は高齢者においてはより CARS になりやすい傾向があることが示され，術後感染症や敗血症といった合併症の頻度が高い一因となっている可能性が示唆された。

以上のことから，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。