

信州大学において審査された医学博士論文要旨

氏名 (所属教室)	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
唐澤未佳 (人体構造学)	甲第1057号	29. 3.31	Effect of graded nerve pressure injuries on motor function (圧迫による神経損傷の程度と運動機能の関係)	加藤博之	山田充彦 多田剛
楊 沐 (加齢生物学)	甲第1058号	28. 9.30	Serum amyloid A expression in the breast cancer tissue is associated with poor prognosis (乳がん組織での血清アミロイドAの発現は予後不良に関連する)	伊藤研一	中山 淳 菅野祐幸
山田 靖 (産科婦人 科学)	甲第1059号	28. 3.31	Lipocalin 2 attenuates iron-related oxidative stress and prolongs the survival of ovarian clear cell carcinoma cells by up-regulating the CD44 variant (リポカリン2は変異型CD44の発現亢進を介して卵巣明細胞癌細胞の鉄関連酸化ストレスを減弱し, 生存を促進する)	中山 淳	田中榮司 石塚 修
下平浩揮 (運動機能学)	甲第1060号	28. 3.31	Remnant-Preserving Tibial Tunnel Positioning Using Anatomic Landmarks in Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction (二重束ACL再建術における解剖学的ランドマークを用いたレムナント温存脛骨骨孔作成法)	角谷真澄	本郷一博 栗田 浩
田中 愛 (循環病態学)	甲第1061号	28. 3.31	The endothelial adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular integrity and suppresses tumor metastasis (内皮アドレノメデュリン-RAMP2系は血管恒常性を維持し, 腫瘍転移を抑制する)	菅野祐幸	多田 剛 田淵克彦
丸山康弘 (内科学(2))	甲第1062号	29. 3.31	Clinicopathological characterisation of duodenal adenocarcinoma with high CD44 variant 9 expression (十二指腸癌におけるCD44v9陽性細胞の臨床病理学的特徴)	中山 淳	宮川眞一 伊藤研一
道傳 整 (内科学(3))	甲第1063号	29. 3.31	Clinico-Radiological Characteristics and Pathological Diagnosis of Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Intracerebral Hemorrhage (脳アミロイド血管症関連脳内出血の臨床的・放射線学的特徴と病理学的診断に関する検討)	池田修一	中山 淳 樋口京一
封 玉瑤 (代謝制御学)	甲第1064号	28. 3.31	Activation of PPAR α by Fatty Acid Accumulation Enhances Fatty Acid Degradation and Sulfatide Synthesis (脂肪酸蓄積によるPPAR α 活性化は脂肪酸分解とスルファチド合成を促進する)	山田充彦	樋口京一 菅野祐幸

審査学位論文要旨

井戸 芳和 (運動機能学)	甲第1065号	28. 9.30	Postoperative improvement in DASH score, clinical findings, and nerve conduction velocity in patients with cubital tunnel syndrome (肘部管症候群患者における DASH スコア, 身体所見, および神経伝導速度の術後回復)	川眞田樹人	野見山哲生 池田修一
市川 雪 (内科学(2))	甲第1066号	27. 9.30	Serum Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2 binding protein may predict liver fibrosis and progression to hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection (血清中の WFA 陽性 Mac-2結合タンパクはB型肝炎ウイルス慢性感染患者において, 肝線維化および肝細胞癌の発症予測に有用な可能性がある)	本田孝行	竹下敏一 宮川眞一
岡田なぎさ (分子腫瘍学)	甲第1067号	28. 3.31	Novel role of ASC as a regulator of metastatic phenotype (癌細胞の転移形質制御における ASC の役割)	竹下敏一	伊藤研一 石塚修
小林千夏 (内科学(3))	甲第1068号	28. 3.31	Increasing Incidence and Age at Onset of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Nagano Prefecture, Japan (長野県における ALS の発症者数の増加と発症年齢の高齢化)	池田修一	加藤博之 中山淳
黒岩正文 (脳神経 外科学)	甲第1069号	29. 3.31	Morphological analysis of regenerated bulbar fibers in relation to neonatal olfaction (新生児ラットの嗅覚機能発現に必要な嗅球由来の再生神経線維の形態解析)	多田剛	本郷一博 山田充彦
田 洋洋 (代謝制御学)	甲第1070号	28. 3.31	Age-dependent PPAR α activation induces hepatic sulfatide accumulation in transgenic mice carrying the hepatitis C virus core gene (HCV コア遺伝子トランスジェニックマウスにおけるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α 型の加齢依存的活性化は肝臓におけるスルファチド蓄積を誘発する)	山田充彦	樋口京一 佐々木克典
大場崇旦 (外科学(2))	甲第1071号	29. 3.31	ABCB1 and ABCC11 confer resistance to eribulin in breast cancer cell lines (ABCB1, ABCC11は乳癌細胞のエリプリン耐性に関与する)	山田充彦	大森 栄 小泉知展
LE THANH NHA UYEN (小児医学)	甲第1072号	28. 3.31	Aberrant methylation of protocadherin 17 and its prognostic value in pediatric acute lymphoblastic leukemia (小児急性リンパ性白血病におけるプロトカドヘリン17遺伝子の異常メチル化と予後因子としての有用性の検討)	伊藤研一	小泉知展 竹下敏一
浅野純平 (内科学(2))	甲第1073号	29. 3.31	Association Between Immunoglobulin G4-related Disease and Malignancy within 12 Years after Diagnosis: An Analysis after Longterm Followup (IgG4関連疾患の診断12年以内における悪性腫瘍との関連性: 長期経過での解析)	田中榮司	宮川眞一 小泉知展

審査学位論文要旨

金谷 康平 (脳神経 外科学)	甲第1074号	29. 3.31	High expression of ADAM10 predicts a poor prognosis for patients with glioblastoma (ADAM10高発現は膠芽腫予後不良因子となる)	多田 剛	菅野 祐幸 小泉 知展
林 清永 (歯科口腔 外科学)	甲第1075号	28. 3.31	Relationship between the quantity of oral Candida and immunological vigor (口腔カンジダ菌数と免疫力との関連性)	本田 孝行	竹下 敏一 小泉 知展
原田美貴子 (内科学(5))	甲第1076号	28. 3.31	Importance of cystatin C and uric acid levels in the association of cardiometabolic risk factors in Japanese junior high school students (日本人中学生の心血管代謝危険因子との関連における血清シスタチンCおよび尿酸値の重要性)	駒津 光久	今村 浩 桑原宏一郎
小川 雄 (スポーツ 医科学)	甲第1077号	29. 3.31	Effects of postural change from supine to head-up tilt on the skin sympathetic nerve activity component synchronised with the cardiac cycle in warmed men. (ヒト暑熱負荷における30°ヘッドアップティルトが皮膚交感神経活動・心周期同期成分に与える影響)	川真田樹人	山田 充彦 桑原宏一郎
二木 俊匡 (運動機能学)	甲第1078号	28. 3.31	Early Postoperative Magnetic Resonance Imaging in Detecting Radicular Pain After Lumbar Decompression Surgery Retrospective Study of the Relationship Between Dural Sac Cross-sectional Area and Postoperative Radicular Pain (腰椎除圧術後の神経根痛を検出する術後早期 MRI 画像硬膜管横断面積と術後神経根通の関連についての後ろ向き研究)	川真田樹人	本郷 一博 角谷 眞澄
小沢 岳澄 (画像医学)	甲第1079号	28. 3.31	Dosimetric Comparisons of Volumetric Modulated Arc Therapy with Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy for Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (局所進行非小細胞肺癌に対する強度変調回転放射線治療と三次元原体放射線治療の線量分布比較)	小泉 知展	花岡 正幸 伊藤 研一
浅香 志穂 (病態解析 診断学)	甲第1080号	29. 3.31	A novel, rapid point-of-care test for lung cancer patients to detect epidermal growth factor receptor gene mutations by using real-time droplet-PCR and fresh liquid cytology specimens (肺癌患者における上皮成長因子受容体遺伝子変異検出のための液滴型高速 PCR 装置と新鮮液状細胞診検体を用いた新規迅速ポイント・オブ・ケア・テスト)	花岡 正幸	小泉 知展 栗田 浩
安藤 大史 (産科婦人 科学)	甲第1081号	29. 3.31	Usefulness of a management protocol for patients with cervical multicystic lesions: A retrospective analysis of 94 cases and the significance of GNAS mutation (子宮頸部多嚢胞性病変に対する当科の対応と転帰: 94例の後方視的検討と GNAS 遺伝子変異の意義)	菅野 祐幸	本田 孝行 伊藤 研一

審査学位論文要旨

劉 甜 (循環病態学)	甲第1082号	29. 3.31	Endogenous calcitonin gene-related peptide regulates lipid metabolism and energy homeostasis in male mice (内因性カルシトニン遺伝子関連ペプチドは、雄マウスの脂質代謝およびエネルギー恒常性を調節する)	菅野 祐幸	多田 剛 田 渕 克彦
池川香代子 (内科学(1))	甲第1083号	28. 3.31	Lack of association of serotonin 2A receptor gene in Japanese patients with obstructive sleep apnea syndrome (日本人における閉塞性睡眠時無呼吸症候群とセロトニン2Aレセプター遺伝子の関連)	本田 孝行	宇佐美真一 野見山哲生
堀内 一樹 (病態解析 診断学)	甲第1084号	29. 3.31	Addition of thymidine to culture media for accurate examination of thymidine-dependent small-colony variants of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> : A pilot study (メチシリン耐性 <i>Staphylococcus aureus</i> チミジン依存性変異株の正確な検査を行うために培地へチミジンを添加する試験的研究)	竹下 敏一	中沢 洋三 石塚 修
羨 鮮 (循環病態学)	甲第1085号	29. 3.31	Vasoprotective activities of the adrenomedullin-RAMP2 system in endothelial cells (血管内皮細胞のアドレノメデュリン-RAMP2系による血管保護作用)	菅野 祐幸	多田 剛 田 渕 克彦
今井 章 (循環病態学)	甲第1086号	29. 3.31	Adrenomedullin suppresses VEGF-induced vascular hyperpermeability and inflammation in retinopathy (アドレノメデュリンは、網膜症において、VEGFにより誘発される血管透過性亢進と炎症を抑制する)	菅野 祐幸	多田 剛 田 渕 克彦
吉長 恒明 (内科学(3))	甲第1087号	29. 3.31	Marked biochemical difference in amyloid proportion between intra- and extraocular tissues in a liver-transplanted patient with hereditary ATTR amyloidosis (肝移植後FAP患者の眼内・眼外沈着アミロイドにおけるアミロイド蛋白組成の顕著な生化学的相違)	宮川 眞一	中山 淳 村田 敏規
重藤 翔平 (病態解析 診断学)	甲第1088号	29. 3.31	Rapid diagnosis of acute promyelocytic leukemia with the PML-RARA fusion gene using a combination of droplet-reverse transcription-polymerase chain reaction and instant-quality fluorescence in situ hybridization (液滴型高速PCRとinstant-quality FISHを用いたPML-RARA融合遺伝子を伴う急性前骨髄性白血病の迅速診断)	中沢 洋三	石塚 修 竹下 敏一
北 畠 央之 (代謝制御学)	甲第1089号	29. 3.31	Association between endotoxemia and histological features of nonalcoholic fatty liver disease (非アルコール性脂肪性肝疾患における組織像とエンドトキシン血症との関連)	本田 孝行	中山 淳 駒 津 光久

審査学位論文要旨

新井慎平 (病態解析 診断学)	甲第1090号	29. 3.31	The fibrous form of intracellular inclusion bodies in recombinant variant fibrinogen-producing cells is specific to the hepatic fibrinogen storage disease-inducible variant fibrinogen (異常フィブリノゲン産生細胞における繊維状の細胞内封入体は、フィブリノゲン蓄積病を引き起こす異常フィブリノゲンに特異的である)	樋口京一	田中榮司 青山俊文
北沢将人 (分子腫瘍学)	甲第1091号	28. 3.31	ASC Induces Apoptosis via Activation of Caspase-9 by Enhancing Gap Junction-Mediated Intercellular Communication (ASCはギャップジャンクションを介した細胞間相互作用によりカスパーゼ9を活性化し、アポトーシスを誘導する)	小泉知展	塩沢丹里 伊藤研一
佐藤勇樹 (皮膚科学)	甲第1092号	28. 3.31	Bach2 Controls Homeostasis of Eosinophils by Restricting the Type-2 Helper Function of T Cells. (転写因子 Bach2によるヘルパー T 細胞を介した好酸球制御機構の解明)	竹下敏一	菅野祐幸 駒津光久
田中 学 (運動機能学)	甲第1093号	29. 3.31	Physico-Chemical, In Vitro, and In Vivo Evaluation of a 3D Unidirectional Porous Hydroxyapatite Scaffold for Bone Regeneration (三次元配向連通孔ハイドロキシアパタイト製骨再生用スキャフォールドの物理化学・生体外・生体内的評価)	佐々木克典	栗田 浩 森泉哲次
永松清志郎 (内科学(3))	甲第1094号	28. 3.31	Prevalence of Fabry Disease and GLA c.196G>C Variant in Japanese Stroke Patients (日本人脳卒中患者における Fabry 病および GLA c.196G>C 変異の頻度)	福嶋義光	樋口京一 多田 剛
張 萌 (外科学(2))	甲第1095号	29. 3.31	The histological characteristics and clinical outcomes of lung cancer in patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE (気腫合併肺線維症) 合併肺癌患者の組織学的特徴及び予後)	小泉知展	栗田 浩 花岡正幸

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
松清あゆみ (保健学専攻 生涯保健 学分野 成人保健 学領域)	甲第15号	28. 3.31	Relationship between muscle-tendon length, range of motion, and resistance to passive movement in children with normal and increased tone (筋過緊張を呈する児と定型発達児における MAS (Modified Ashworth Scale) と 5 kg の伸張刺激前後での筋・腱長と関節可動域の変化との関連性)	木村 貞治	百瀬 公人 横川 吉晴
阿部 裕一 (保健学専攻 生涯保健 学分野 成人保健 学領域)	甲第16号	29. 3.20	Availability, usage, and factors affecting usage of electrophysical agents by physical therapists: a regional cross-sectional survey (物理療法機器の保有状況, 使用状況, および使用に影響を与える要因: 理学療法士に対する調査研究)	横川 吉晴	木村 貞治 百瀬 公人
小宅 一彰 (保健学専攻 生涯保健 学分野 成人保健 学領域)	甲第17号	29. 3.20	Validity of gait asymmetry estimation by using an accelerometer in individuals with hemiparetic stroke (脳卒中片麻痺患者における小型無線加速度計を用いた歩行非対称性評価の妥当性)	木村 貞治	GOH AH CHENG 横川 吉晴

Effect of graded nerve pressure injuries on motor function (圧迫による神経損傷の程度と運動機能の関係)

唐澤 未佳

(論文の内容の要旨)

【目的】 成熟ラットの坐骨神経に強い圧迫損傷を加えると下肢の運動機能は高度に障害されるが、時間の経過とともに軸索が再生し運動機能は徐々に回復する。受傷後の運動機能障害は神経損傷程度に影響されると考えられることから、損傷の程度を変えることによって、残存する軸索数と運動機能の関係について明らかにすることを目的として本研究を行った。

【方法】

[1] 脛骨神経と総腓骨神経の切除による運動機能への影響

坐骨神経は膝窩の近位で脛骨神経と総腓骨神経に分岐する。成熟ラットの脛骨神経または総腓骨神経を 1 cm の幅で切除し、損傷の24時間後と48時間後に下肢の運動機能評価を行った。運動機能は採取した footprint から static sciatic index (SSI) 値を算出して評

価した。

[2] 様々な程度の神経損傷と運動機能

下肢の運動機能により大きな影響を与えることが確認された総腓骨神経に、杉田クリップまたは止血クリップを用いて圧迫損傷を加えた。損傷の程度は圧迫時間を変えることによって調節し、control 群は神経露出のみとした。損傷の48時間後に SSI による運動機能評価および傾斜歩行試験を行った。傾斜歩行試験では30度と45度の傾斜での歩行が可能かどうかを評価した。その後灌流固定を行い、総腓骨神経支配筋である前脛骨筋を採取後、縦断で連続凍結切片 (50 μm 厚, 600 μm 間隔) を作成した。切片は軸索終末を検出するための抗 β III-tubulin 抗体とアセチルコリン受容体を検出するための α-bungarotoxin を用いた蛍光二重染色を行い、蛍光顕微鏡下で神経筋接合部における β III-tubulin 陽性軸索終末が α-bungarotoxin 陽性

アセチルコリン受容体に占める割合（陽性率）を計測した。

【結果】

[1] 運動機能への影響

脛骨神経切除ラットの SSI 値は24時間後で-34.2, -35.9, 48時間後で-32.2, -47.1でいずれも軽度な運動機能障害が認められた。一方, 総腓骨神経切除ラットの SSI 値は24時間後, 48時間後ともに-100.0, -100.0で高度な運動機能障害が生じていた。

[2] 神経損傷程度と SSI 値の関係

Control 群の SSI 値はすべて-20以上で運動機能は正常であった。Control 群の神経筋接合部における陽性率 (β III-tubulin 陽性軸索 / α -bungarotoxin 陽性受容体) は $91.9\% \pm 2.7\%$ であった。神経損傷群は SSI 値が-20以上の機能正常群, SSI 値が-20~-50の軽度機能障害群, SSI 値が-50~-80の中等度機能障害群, SSI 値が-80以下の高度機能障害群に分類された。Control 群の陽性率を100としたときの相対値(軸索残存率)は, 機能正常群で $67.6\% \pm 14.2\%$ ($36.5\% \sim 88.7\%$), 軽度機能障害群で $58.6\% \pm 14.8\%$ ($45.9\% \sim 81.7\%$), 中等度機能障害群で $51.2\% \pm 13.6\%$ ($35.7\% \sim 61.2\%$), 高度機能障害群で $10.2\% \pm 4.1\%$ ($3.7\% \sim 14.7\%$) であり, SSI 値と軸索残存率には正の相関が認められた ($r_s = 0.68, p < 0.01$)。

[3] 神経損傷程度と傾斜歩行の関係

Control 群はすべて30度と45度での傾斜歩行が可能であった。神経損傷群は傾斜歩行可能群と不可能群に分類された。軸索残存率は, 30度の傾斜歩行可能群で $62.7\% \pm 16.9\%$ ($14.7\% \sim 88.7\%$), 不可能群で $14.4\% \pm 12.4\%$ ($3.7\% \sim 35.7\%$) であり, 45度の傾斜歩行可能群で $66.2\% \pm 13.6\%$ ($39.8\% \sim 88.7\%$), 不可能群で $26.8\% \pm 21.6\%$ ($3.7\% \sim 62.7\%$) であった。30度と45度のどちらにおいても, 傾斜歩行可能群と不可能群の軸索残存率には有意差が認められた ($p < 0.01$)。

【結論】

[1] SSI で評価される下肢の運動機能には脛骨神経と総腓骨神経のどちらも関係するが, 神経切除実験から総腓骨神経の損傷がより大きな影響を与えることが明らかとなった。

[2] 下肢の運動機能は総腓骨神経の損傷程度と相関することが確認された。また, 総腓骨神経が損傷されても約40%以上の軸索終末が残存していれば正常な運動機能を維持できることが明らかとなった。

以上の結果から, 形態的かつ機能的に圧迫損傷を免れた残存する軸索数と運動機能の関係性が明らかにされた。

(論文審査の結果の要旨)

本研究で唐澤は, ラットにおける坐骨神経への損傷の程度が下肢の運動機能に与える影響に関して, SSI で評価される運動機能に対する脛骨神経切除と総腓骨神経切除の影響の違い, 損傷後に残存する軸索数, 軸索残存率と運動機能の関係を明らかにすることを目的とし, 神経切除後の SSI による運動機能評価, および様々な程度の圧迫損傷後に残存する軸索数の計測と SSI・傾斜歩行による2種類の運動機能評価を行った。

その結果, 唐澤は次の結果を得た。

1. 運動機能への影響に関しては, 脛骨神経切除ラットの SSI 値は24時間後で-34.2, -35.9, 48時間後で-32.2, -47.1でいずれも軽度な運動機能障害が認められた。一方, 総腓骨神経切除ラットの SSI 値は24時間後, 48時間後ともに-100.0, -100.0で高度な運動機能障害が生じていたことから, SSI で評価される運動機能には総腓骨神経の損傷がより大きな影響を与えることが明らかとなった。
2. 神経損傷程度と SSI 値の関係については, control 群の SSI 値はすべて-20以上で運動機能は正常であった。Control 群の神経筋接合部における陽性率 (β III-tubulin 陽性軸索 / α -bungarotoxin 陽性受容体) は $91.9\% \pm 2.7\%$ であった。神経損傷群は SSI 値が-20以上の機能正常群, SSI 値が-20~-50の軽度機能障害群, SSI 値が-50~-80の中等度機能障害群, SSI 値が-80以下の高度機能障害群に分類された。Control 群の陽性率を100としたときの相対値(軸索残存率)は, 機能正常群で $67.6\% \pm 14.2\%$ ($36.5\% \sim 88.7\%$), 軽度機能障害群で $58.6\% \pm 14.8\%$ ($45.9\% \sim 81.7\%$), 中等度機能障害群で $51.2\% \pm 13.6\%$ ($35.7\% \sim 61.2\%$), 高度機能障害群で $10.2\% \pm 4.1\%$ ($3.7\% \sim 14.7\%$) であり, SSI 値と軸索残存率には正の相関が認められ ($r_s = 0.68, p < 0.01$), 神経損傷後に正常機能を有するラットではおよそ40%以上の軸索が残存していることが明らかとなった。
3. 神経損傷程度と傾斜歩行の関係については, control 群はすべて30度と45度での傾斜歩行が可能であった。神経損傷群は傾斜歩行可能群と不可能群に分類された。軸索残存率は, 30度の傾斜歩行可能群で $62.7\% \pm 16.9\%$ ($14.7\% \sim 88.7\%$), 不可能群

で14.4%±12.4% (3.7%~35.7%)であり、45度の傾斜歩行可能群で66.2%±13.6% (39.8%~88.7%)、不可能群で26.8%±21.6% (3.7%~62.7%)であった。30度と45度のどちらにおいても、傾斜歩行可能群と不可能群の軸索残存率には有意差が認められ (p<0.01)、神経損傷後に傾斜歩行可能なラットではおよそ40%以上の軸索終末が残存していることが確認された。

以上により、ラットにおける坐骨神経損傷後の下肢の運動機能には総腓骨神経がより大きな影響を与えることが明らかにされた。また、損傷程度の違いによる運動機能障害と軸索残存率の関係からおよそ40%以上の軸索終末が残存していれば正常な運動機能を維持できることが明らかにされ、形態的かつ機能的に圧迫損傷を免れた残存する軸索数と運動機能の関係性が証明され、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。

Serum amyloid A expression in the breast cancer tissue is associated with poor prognosis
(乳がん組織での血清アミロイドAの発現は予後不良に関連する)

楊 沐

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】慢性炎症に伴うAAアミロイドーシスの血中前駆タンパク質であるSerum amyloid A (SAA)は炎症刺激で増加する、最も増大率の高い急性期タンパク質である。主に肝細胞で産生されるが、血管内皮細胞や白血球でも産生され、特にマクロファージは中心的な肝臓外産生細胞である。SAAが高値を示す病態は多数あるが、各種のがん(食道、肺、膵臓、卵巣など)での発現も報告されている。しかし、SAAの乳がん組織での発現、病理学的分析及び予後との関連については未だ明らかにされていない。この研究では乳がん患者の病理切片を用いてSAAの発現と予後との関連を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】中国天津医科大学腫瘍医院で2011年に浸潤性乳がんと診断された患者208症例の乳がん組織切片を用いて、SAA1とSAA2を認識できる抗体による免疫組織染色(IHC)でタンパク質発現レベルの評価を行った。また、連続切片を用いて腫瘍部分での腫瘍関連マクロファージ(TAM)同定のためにCD68染色を行った。2) SAAの主な産生細胞の分布を明らかにするために、208症例中の25症例の連続切片を用いて、Fluorescent in situ hybridization (FISH)を行った。SAA1とSAA2のmRNAを同時に認識できるプローブを使用した。3) がん細胞およびTAMのSAAタンパク質発現レベルと患者の生存率及び臨床情報との関連を統計学的に解析した。

【結果】1) SAAタンパク質は、がん細胞では47.6% (99/208)の症例で、TAMでは62.5% (130/208)の症例で、IHC陽性であった。さらにCD68染色によりがん組織微小環境でのマクロファージの浸潤が確認

された。がん細胞でのSAAタンパク質の発現程度はTAMでのSAA発現程度と高度に有意な相関を示した(rs=0.603, p<0.001) 2) FISH解析では、SAA mRNAは主にTAMで発現されており、がん細胞での陽性率は有意に低いことが観察された(76% TAM vs 12% がん細胞: p<0.001)。IHCでがん細胞がSAA陽性の症例でもFISHでは主にTAMにmRNAが発現していた。またTAMのSAA mRNAの発現程度はIHCでのSAA発現程度と相関していた。これらの結果から、がん組織で検出されたSAAは肝臓から産生されたものだけではなく、がん組織微小環境にあるTAMがSAAの主な産生源であることが明らかになった。微小環境でのTAMによるSAAの過剰産生が、がん細胞のSAAタンパク質の発現程度の増加に関連すると考えられた。3) 統計解析ではがん細胞及びTAMのIHCでのSAA陽性レベルと、リンパ管浸潤及びリンパ節転移が有意に相関していた。これらの指標に加えて、TAMのSAA陽性率はより大きな腫瘍サイズ、高い組織学的異型度、エストロゲンレセプター及びプロゲステロンレセプターの陰性度、HER-2の過剰発現とも相関していた。SAAが乳がん組織中のTAMによって過剰産生され、がんの進行及び転移をもたらす新たな可能性が示唆された。また、TAMのSAA陽性率は、単独で不良な無再発生存期間と相関することが、多変量回帰モデルで示された。これらの結果からSAA陽性のTAMは乳がんの不良予後因子になる可能性が示唆された。

【結論】以上の結果からTAMが乳がんを含む微小環境において、SAAの最も重要で主要な産生細胞である、という新たな知見が得られた。さらにSAA陽性

の TAM が患者の無再発生存率の低下に関係していることが明らかになった。これらの知見から、SAA 陽性 TAM は、乳がん患者の予後不良や再発を予測するマーカー候補であること、あるいは、乳がん組織での SAA の発現抑制が治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

慢性炎症に伴う AA アミロイドーシスの血中前駆タンパク質である Serum amyloid A (SAA) は炎症刺激で増加する、最も増大率の高い急性期タンパク質である。SAA は主に肝細胞で産生されるほか、マクロファージを中心に白血球などでも産出される。近年、SAA が高値を示す病態として、各種のがん(食道、肺、膵臓、卵巣など)での発現も報告され、予後との関連が示唆されている。

これらの知見に基づき、乳がん患者(中国天津医科大学腫瘍医院の208症例)の病理切片を用いて、SAA の乳がん組織での発現、病理学的分析及び予後との関連について解析した。

その結果、楊 沐は次の結論を得た。

1. 免疫組織染色 (IHC) 解析では、SAA タンパク質の発現は、がん細胞よりも腫瘍関連マクロファージ (TAM) での陽性症例が多かった (47.6 % vs 62.5 %)。CD68染色により TAM のがん組織への浸潤が確認された。がん細胞での SAA タンパク質の発現程度は TAM での SAA 発現程度と高度に有意な相関を示した (rs=0603, p<0.001)。
2. Fluorescent in situ hybridization (FISH) 解析では、SAA mRNA は主に TAM で発現され、がん細胞では陽性率が有意に低いことが観察された (76 %

vs 12 % : p<0.001)。IHC でがん細胞が SAA 陽性の症例でも、FISH では主に TAM に mRNA が発現していた。また TAM の SAA mRNA の発現程度は IHC での SAA 発現程度と相関していた。

3. 統計解析では、がん細胞及び TAM の IHC での SAA 陽性レベルと、リンパ管浸潤及びリンパ節転移が有意に相関していた。これらの指標に加えて、TAM の SAA 陽性率は、腫瘍サイズ、組織学的異型度、エストロゲンレセプター及びプロゲステロンレセプターの陰性度、HER-2の過剰発現とも相関していた。また、TAM の SAA 陽性率は単独で、不良な無再発生存期間と相関することが、多変量回帰モデルで示された。

以上の結果により、急性期タンパク質である SAA が乳がん組織中の TAM によって過剰産生され、がんの発達及び転移、さらに再発を引き起こす可能性が明らかになった。また、SAA 陽性 TAM は、乳がん患者の予後不良や再発を予測するマーカー候補であり、乳がん組織での SAA の発現抑制が治療のターゲットとなる可能性が示された。

近年、炎症ががんの発生、進行や転移に関するという報告がされてきている。がんの進行・転移のメカニズムの解明と再発予防のためには、急性期タンパク質であり、コレステロールの運搬体でもある SAA の作用メカニズムを明らかにすることは重要である。

これらの点から、楊 沐の研究成果は乳がんの基礎医学および臨床研究として、十分に意義があることと考えられた。

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。

Lipocalin 2 attenuates iron-related oxidative stress and prolongs the survival of ovarian clear cell carcinoma cells by up-regulating the CD44 variant (リポカリン 2 は変異型 CD44 の発現亢進を介して卵巣明細胞癌細胞の鉄関連酸化ストレスを減弱し、生存を促進する)

山 田 靖

(論文の内容の要旨)

【目的】 子宮内膜症は子宮外に子宮内膜が増殖する疾患で、卵巣の子宮内膜症では内部に血液が貯留した子宮内膜症性嚢胞 (OEM) がしばしば形成される。OEM の約0.7%は癌化し明細胞癌 (CCC) や類内膜癌 (EC) が発生するが、特に日本人では、抗癌剤抵抗性で予後不良である CCC の発生頻度が高いことが問題である。OEM の癌化では鉄イオンの関与が注目

されている。すなわち、ヘモグロビンから遊離し OEM 内に豊富に蓄積した鉄イオンは、フェントン反応から活性酸素種 (ROS : reactive oxygen species) を発生させ、酸化ストレスを誘導することで発癌に寄与すると考えられている。

Lipocalin 2 (LCN2) は鉄輸送蛋白の1つで、炎症や種々の癌で高発現が報告されており、細胞内鉄濃度の調節から様々な機能を発現すると考えられている。

LCN2はその機能上と OEM との関連が強く示唆されたため、OEM や卵巣癌における LCN2 の関与を免疫組織染色にて検討したところ、LCN2 は OEM や OEM から発生する CCC や EC において高発現し、LCN2 高発現卵巣癌症例は有意に予後不良であった。そこで今回我々は、LCN2 の機能解析を行うために、卵巣 CCC 細胞株を用いて LCN2 と特に鉄イオン、ROS や酸化ストレスとの関係を検討した。

【方法】卵巣 CCC 細胞株である ES2, TOV21G, RMG1, OVISe を用いた。LCN2 低発現株である ES2, TOV21G に LCN2 cDNA を導入して LCN2 強制発現株 (ES2-LCN2, TOV21G-LCN2) を樹立した。LCN2 高発現株である RMG1, OVISe に特異的 shRNA, siRNA 導入により LCN2 発現抑制 (RMG1-shRNA, OVISe-siRNA) を行った。細胞内の鉄濃度をカルセイン蛍光で、細胞内の ROS を DCFH-DA 蛍光で、酸化ストレスを 8OHdG 染色, apoptosis を flowcytometry, 酸化ストレス耐性, 抗癌剤耐性を WST1 assay により評価した。また LCN2 による各種の抗酸化酵素発現を real-time RT-PCR, Western blot (WB) で比較した。さらに抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) 量を Luciferin-NT を用いた発光アッセイで評価し、CD44 variant isoform (以下 CD44v), xCT 発現を WB にて評価した。酸化ストレスとして過酸化水素 (H_2O_2) を用いた。

【結果】ES2 細胞のカルセイン蛍光ではコントロール細胞 (ES2-mock) と比べ遺伝子組み換え LCN2 (rLCN2) 添加や ES2-LCN2 では蛍光量が減弱し、LCN2 は細胞内鉄濃度を上昇させると考えられた。一方 ROS 産生では、 H_2O_2 添加による DCFH-DA 蛍光量増加が ES2-mock の 3.33 倍に対し、rLCN2 添加や ES2-LCN2 ではそれぞれ 1.06 倍 ($P < 0.05$), 1.25 倍 ($P < 0.05$) であり、8OHdG 染色でも ES2-mock に比べ、rLCN2 添加や ES2-LCN2 で減弱が認められ、予想に反して LCN2 は ROS 産生および酸化ストレスを軽減すると考えられた。ES2-mock においては H_2O_2 による apoptosis の増加を認めたが、ES2-LCN2 では認めなかった。 H_2O_2 添加による酸化ストレスに対する耐性の WST-1 アッセイによる評価では、ES2-mock に比し ES2-LCN2 では耐性の増強を認めた。抗癌剤 (シスプラチン, パクリタキセル) に対しては、ES2 細胞と TOV21G 細胞とも LCN2 発現増強により耐性が増強し、RMG1 細胞では LCN2 発現抑制により耐性が減弱した。

ROS の産生抑制機序として細胞内の GSH 濃度に注目した。ES2, TOV21G 細胞とも LCN2 発現増強により GSH 濃度が上昇し、RMG1, OVISe 細胞では LCN2 発現抑制により GSH 濃度が低下することが判明した。そこで GSH 産生促進に作用する CD44v および xCT の蛋白発現を検討したところ、ES2 細胞において rLCN2 添加および LCN2 強制発現により発現が亢進し、また RMG1 細胞においては LCN2 発現抑制により発現が低下し、rLCN2 添加により発現が回復した。この結果から LCN2 は CD44v と xCT の発現亢進を介して細胞内 GSH 濃度を上昇させ、これが ROS の産生を低下させたと考えられた。

【結論】LCN2 は卵巣 CCC 細胞において細胞内鉄濃度を上昇させたが ROS 産生はむしろ抑制した。LCN2 は CD44v および xCT の発現上昇を介して細胞内 GSH 濃度を上昇させ ROS 産生を抑制することにより、酸化ストレス耐性増強や抗癌剤耐性増強に関与すると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

子宮内膜症性嚢胞 (OEM) の約 0.7 % は癌化し明細胞癌 (CCC) や類内膜癌 (EC) が発生する。OEM の癌化では、ヘモグロビンから遊離し OEM 内に豊富に蓄積した鉄イオンが、フェントン反応から活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) を発生させ、酸化ストレスを誘導することで発癌に寄与すると考えられている。

Lipocalin 2 (LCN2) は鉄輸送蛋白の 1 つで、先行実験として OEM や卵巣癌における LCN2 の関与を免疫組織染色にて検討したところ、LCN2 は OEM や OEM から発生する CCC や EC において高発現し、LCN2 高発現卵巣癌症例は有意に予後不良であった。そこで今回我々は、LCN2 の機能解析を行うために、卵巣 CCC 細胞株を用いて LCN2 と特に鉄イオン、ROS や酸化ストレスとの関係を検討した。

卵巣 CCC 細胞株において、LCN2 低発現株では LCN2 cDNA を導入して LCN2 強制発現株を樹立し、LCN2 高発現株では特異的 shRNA, siRNA 導入により LCN2 発現抑制を行った。細胞内の鉄濃度をカルセイン蛍光で、細胞内の ROS を DCFH-DA 蛍光で、酸化ストレスを 8OHdG 染色, apoptosis を flowcytometry, 酸化ストレス耐性, 抗癌剤耐性を WST1 assay により評価した。さらに抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) 量を Luciferin-NT を用いた発光アッセイで評価し、CD44 variant isoform (以下 CD44v),

xCT 発現を WB にて評価した。

その結果, 山田 靖は次の結果を得た。

1. LCN2は細胞内の鉄濃度を上昇させた。
2. LCN2は ROS や酸化ストレスを軽減し, 酸化ストレスによるアポトーシスを抑制した。
3. LCN2は CD44v, xCT 発現増強を介して, 細胞内の GSH 濃度を上昇させた。
4. LCN2は酸化ストレスや抗癌剤耐性を増強した。

これらの結果より, LCN2は卵巣 CCC 細胞において細胞内鉄濃度を上昇させたが, ROS 産生はむしろ抑制した。LCN2は CD44v および xCT の発現上昇を介して細胞内 GSH 濃度を上昇させることで ROS 産生を抑制し, 卵巣 CCC 細胞の酸化ストレス耐性増強や抗癌剤耐性増強させ, 悪性度上昇に関与すると考えられた。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。

Remnant-Preserving Tibial Tunnel Positioning Using Anatomic Landmarks in Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction (二重束 ACL 再建術における解剖学的ランドマークを用いたレムナント温存脛骨骨孔作成法)

下 平 浩 揮

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】前十字靭帯再建術 (ACL reconstruction) において, 大腿骨及び脛骨骨孔の位置は術後の膝関節の安定性に寄与する重要な因子である。近年の研究では解剖学的位置に骨孔を作成することが膝の前後及び回旋の安定性をもたらす, 臨床的にも優れることを報告している。それゆえに解剖学的な位置に再現性をもって骨孔を作成するための landmark が必要である。脛骨については骨孔を作成するための標準的な landmark は確立されていない。また脛骨側は陳旧例でも ACL のレムナントが残っていることがほとんどであり, 近年ではレムナントを温存した再建術も報告されてきていることから, 今後はレムナントを温存した状態でも確認可能な landmark を用いた骨孔作成法が理想的である。

以前に我々は脛骨付着部周囲の bony/anatomical landmark に関する詳細な報告を行った。ACL 脛骨付着部は5つの landmark (前方—Parsons' knob, 内側—medial intercondylar ridge, 外側—anterior horn of lateral meniscus, 後方—anterior borders of the medial and lateral tubercles) に囲まれる狭い範囲内に存在し, この5つの landmark で形成される四辺形内に1つもしくは2つの骨孔を作成する方法は, 再現性をもって解剖学的な位置に骨孔を作成できる可能性があることを述べた。加えて, medial intercondylar ridge と Parsons' knob は前内側で結合し1つの構造体を形成しており, これを L-shaped ridge と名付け, 脛骨骨孔の前内側位置を決定する有用な6つ目の landmark に成り得ることも報告した。しかしながら, これらの landmark が鏡視下にどの程度確認できるか,

またこれらの landmark を指標とした骨孔作成法は正確で再現性があるか, そしてそれはレムナントを温存した上でも可能なかどうかの検証はなされていない。

本研究の目的は, 二重束 ACL 再建術において(1) 6つの landmark が鏡視下にレムナントを温存した状態でも十分に確認できるかどうか, (2) これらの landmark を指標とする脛骨骨孔作成が個体間のばらつきが少なく再現性があるかどうかを検討することである。【方法】2009年12月から2014年2月までに1人の術者が施行した二重束 ACL 再建術の患者を対象とした。2012年3月までは脛骨付着部の ACL レムナントは切除し ACL footprint を指標に骨孔を作成し (non-AL 群), 2012年4月以降はレムナントを温存した状態で6つの landmark を指標に骨孔を作成した (AL 群)。

Non-AL 群では footprint 内に AM 骨孔は前内側部に PL 骨孔は後外側部に作成した。AL 群では AM 骨孔は L-shaped ridge の corner からグラフト半径分離した点を中心に, PL 骨孔は内外側の intercondylar tubercle の中点からグラフト半径分前方に離れた点を中心に作成した。

以下の2つの評価を行った。

1. landmark 鏡視評価

AL 群からランダムに選択した20膝において, 術中に ACL 脛骨付着部を撮影した動画を基に, 6つの landmark がレムナントを温存した状態でも確認できるかどうかを3人の検者が2回に分けて判定した。

2. 骨孔位置画像評価

Non-AL 群と AL 群の骨孔位置を術後2週で撮影した CT 画像を用いて評価した。脛骨関節面を上から見下ろす形の3D 画像において, AM 骨孔, PL 骨孔と

も脛骨前縁から骨孔中心までの距離と脛骨内側縁から骨孔中心までの距離をそれぞれ脛骨前後長と脛骨内外側長で除し、百分率として算出した。

【結果】 研究期間中に104例の患者が含まれた (non-AL 群54例, AL 群50例)。手術時年齢, 性別, 身長, 体重, グラフトサイズに2群間に差はなかった。

1. landmark 鏡視評価

6つの landmark は検者内, 検者間とも高い信頼性をもって確認できた。

2. 骨孔位置画像評価

骨孔位置は前後方向において AL 群は AM 骨孔 $30.7 \pm 4.5\%$, PL 骨孔 $45.2 \pm 4.5\%$, non-AL 群は AM 骨孔 $27.8 \pm 6.6\%$, PL 骨孔 $41.4 \pm 7.3\%$ であり, 内外側方向において AL 群は AM 骨孔 $45.7 \pm 2.2\%$, PL 骨孔 $46.9 \pm 2.1\%$, non-AL 群は AM 骨孔 $46.7 \pm 2.8\%$, PL 骨孔 $46.1 \pm 2.6\%$ であった。平均値に差は認めなかったが, ばらつきは AL 群の方が有意に少なかった。

【考察】 今回の研究により6つの landmark はレムナントを温存した状態でも十分に確認でき, これらを指標として作成した骨孔位置は個体間のばらつきが少なく再現性があることが明らかとなった。6つの landmark で形成される四辺形内に AM 骨孔と PL 骨孔を作成するという方法は, landmark からの距離による作成ではなく, これらの landmark との位置関係による新しい作成方法である。これは個々人のサイズの違いや形態的 variation にも対応できる, 再現性が高い作成方法であると考えられる。また, 作成された AM 骨孔は ACL 脛骨付着部内のより前内側に位置していた。これは前内側縁を形成する L-shaped ridge を指標に AM 骨孔がこの ridge に接するように作成された結果である。近年, 術後の膝の安定性には脛骨骨孔を前内側に作成してグラフトに傾斜をつけることが重要とされている。また ACL 脛骨 footprint と外側半月板前角は近接しており, footprint の中央に骨孔を作成すると半月板前角損傷を引き起こす可能性があることを報告している研究もいくつかある。これらのことから, 我々の L-shaped ridge を指標に作成した骨孔位置はグラフトの傾斜が得られ膝の安定性に繋がる位置であり, 前外側の半月板損傷のリスクを減らすことができる理想的な位置であると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

前十字靭帯再建術 (ACL reconstruction) において骨孔を解剖学的位置に作成することは, 膝の安定性と

良好な治療成績を生む上で重要である。解剖学的な位置に再現性をもって骨孔を作成するためには術中に確認が可能な landmark が必要であるが, 脛骨側については標準的な landmark は未だに確立されていない。また脛骨側は陳旧例でも ACL の遺残組織であるレムナントが残っていることがほとんどであり, 近年ではレムナントを温存した再建術も報告されてきていることから, 今後はレムナントを温存した状態でも確認可能な landmark を用いた骨孔作成法が理想的である。先行研究にて, ACL 脛骨付着部は6つの anatomical landmark (前方—Parsons' knob, 内側—medial intercondylar ridge, 前内側—L-shaped ridge, 外側—anterior horn of lateral meniscus, 後方—anterior borders of the medial and lateral intercondylar tubercles) で囲まれる狭い範囲内に存在することを明らかにした。下平らは, 6つの anatomical landmark が鏡視下にレムナントを温存した状態でも十分に確認できるかどうかを検討し, これらの landmark を指標とする脛骨骨孔作成が個体間のばらつきが少なく再現性があるかどうかを検討した。

その結果, 下平は次の結論を得た。

1. 6つの anatomical landmark は鏡視下にレムナントを温存した状態でも十分に確認が可能であった。
2. これらの landmark を指標に作成した骨孔位置は, レムナントを切除して ACL footprint を指標に作成した骨孔位置と比較して平均値に差はなかったが, ばらつきは有意に少なかった。
3. 6つの anatomical landmark を指標に作成した骨孔位置は, ACL 脛骨付着部内のより前内側に位置しており, これは半月板前角損傷のリスクを下げ, 膝の安定性に繋がる理想的な位置であった。

今回の結果から, 6つの anatomical landmark を用いた脛骨骨孔作成法は, レムナントを温存した状態でも理想的な位置に再現性をもって骨孔が作成できる, 有用な作成法であると思われた。

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。

The endothelial adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular integrity and suppresses tumor metastasis (内皮アドレノメデュリン-RAMP2系は血管恒常性を維持し、腫瘍転移を抑制する)

田 中 愛

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 アドレノメデュリン (AM) は、血管をはじめ全身で広く産生され、多彩な生理活性を有する生理活性ペプチドである。我々は AM ノックアウトマウス (AM^{-/-}) と、AM 受容体活性調節タンパクである RAMP2 (receptor activity-modifying protein 2) のノックアウトマウス (RAMP2^{-/-}) が、共に血管の発生異常により胎生致死となることから、AM-RAMP2系が、血管新生にも必須であることを報告してきた。一方、AM は、様々な癌においても産生される。本研究では、腫瘍の増殖と転移における AM-RAMP2系の意義の検討を行った。

【材料及び方法】 RAMP2^{-/-}は胎生致死のため、成体での解析が不可能である。そこで本研究では、RAMP2^{fllox} マウスを VE カドヘリン MerCreMer マウスと交配することにより、誘導型の血管内皮細胞特異的 RAMP2ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2^{-/-}) ラインを樹立し、成体になってから血管の RAMP2遺伝子欠損を誘導することを試みた。DI-E-RAMP2^{-/-}では、タモキシフェン 5 日間の投与後、2 週間後に、血管における RAMP2発現が 20 % 以下に低下することが確認された。

【結果】 DI-E-RAMP2^{-/-}を用いて Sarcoma180 肉腫と B16F10メラノーマ細胞の皮下移植実験を行うと、コントロールマウスに比較して、腫瘍内血管新生は減弱し、腫瘍増殖は抑制された。その一方で、B16BL6メラノーマ細胞を用いて、原発巣から遠隔臓器への自然転移モデルの検討を行ったところ、DI-E-RAMP2^{-/-}では肺への転移率が亢進した。

DI-E-RAMP2^{-/-}において転移が亢進するメカニズムを明らかとするため、血管の RAMP2欠損誘導後に転移予定先臓器である肺に生じる変化を時系列的に観察した。腫瘍の転移前の早期の段階において、血管壁におけるマクロファージの接着や浸潤、それに伴い、TNF- α 、IL-6などの炎症性サイトカインが上昇していた。炎症は RAMP2欠損後も持続し、その結果、腫瘍細胞を転移巣へ誘導するとされる S100A8/A9とその下流因子である SAA3の発現亢進が確認された。

次に、原発巣内の腫瘍血管について検討を進めると、DI-E-RAMP2^{-/-}では、腫瘍内血管内腔に CD31 (血管内皮細胞マーカー) 陽性細胞が減少し、 α SMA (間葉系マーカー) 陽性細胞が多数存在していた。このことから、DI-E-RAMP2^{-/-}の腫瘍血管では、内皮間葉系転換 (EndMT) が生じていると推測した。これを検証するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対し、TGF- β を添加し、EndMT 誘導実験を行った。その結果、HUVEC に予め AM を投与しておくことで、EndMT 様変化が抑制され、内皮細胞の接着因子である VE-カドヘリンの発現が亢進し、細胞間接着が強固になることが明らかとなった。そこで、肺血管内皮細胞の初代培養を行い、TGF- β 添加による EndMT 誘導実験を行うと、DI-E-RAMP2^{-/-}の内皮細胞では、間葉系マーカーである FSP-1陽性細胞が野生型マウスと比較し、有意に増加していた。

逆に AM-RAMP2系を活性化することで、これらの変化が抑制できるか検討した。RAMP2を過剰発現させた内皮細胞 (RAMP2O/E) を樹立し、血管透過性アッセイを行うと RAMP2O/E では、血管透過性が抑制されていた。さらに DsRed を導入した B16F10メラノーマ細胞を用いて、内皮細胞と重層培養法にて接着の評価を行うと、RAMP2O/E では腫瘍細胞の接着が抑制されていた。最後に血管内皮細胞特異的に RAMP2を過剰発現させたトランスジェニックマウス (E-RAMP2 Tg) を樹立した。B16BL6細胞を移植し、自然肺転移を観察したところ、E-RAMP2 Tg では、野生型マウスと比較して、腫瘍の転移が抑制され、生存率の改善を認めた。

【結論】 以上の結果から、血管内皮細胞の RAMP2欠損は、腫瘍血管新生を抑制する一方で、転移を促進することが明らかとなった。AM-RAMP2系による血管恒常性維持機構に着目することで、癌転移を抑制する新しい治療法への展開が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

アドレノメデュリン (AM) は、多彩な生理活性を有するペプチドである。我々は、AM と、受容体活性調節タンパクの 1 つである RAMP2のノックアウト

トマウス (AM^{-/-}・RAMP2^{-/-}) が、共に血管の発生異常により胎性致死となることから、AM-RAMP2系の血管新生、血管恒常性制御作用を明らかとした。一方、AMやRAMP2は様々な癌との関連性が報告されている。本研究では、誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2^{-/-} (DI-E-RAMP2^{-/-}) を樹立し、腫瘍の増殖と転移における AM-RAMP2 系の意義を検討した。

その結果、田中愛は次の結論を得た。

1. DI-E-RAMP2^{-/-}の腫瘍細胞皮下移植モデルでは、原発巣の血管新生が減弱し、腫瘍増殖が抑制されることが明らかとなった。DI-E-RAMP2^{-/-}では、血管先端部の tip 細胞の形成不全による血管新生の低下が認められた。
2. 一方、メラノーマ細胞の自然肺転移モデルでは、DI-E-RAMP2^{-/-}において、肺への転移率が有意に亢進した。
3. DI-E-RAMP2^{-/-}の原発巣内の血管は細く、コイル状になっていた。腫瘍血管内皮細胞間の結合が脆く、血管構造が不安定化していた。
4. DI-E-RAMP2^{-/-}の腫瘍内血管で内皮間葉系転換 (EndMT) 様の所見が認められた。初代培養肺血管内皮細胞に TGF- β を添加し、EndMT 誘導を行うと、DI-E-RAMP2^{-/-}では EndMT が有意に増加した。

5. 血管の RAMP2 遺伝子欠損により、転移予定先となる肺では、肺血管内皮細胞の形態異常が引き起こされ、VE-カドヘリンやアクチンの発現も低下していた。更に、早期の段階から肺内に炎症細胞の集積を認め、それに伴い、腫瘍細胞遊走因子とされる S100A8/A9 の発現亢進と共に、その下流標的となる SAA3 の発現も著明に亢進していた。
6. AM を持続投与すると、原発巣内の血管を太く、安定化させ、EndMT 様の変化が抑制された。
7. 血管内皮細胞において RAMP2 を過剰発現させると細胞間接着が強固になり、血管透過性を抑制した。更に、RAMP2 過剰発現内皮細胞は腫瘍細胞の接着を抑制した。
8. 血管内皮細胞特異的に RAMP2 を過剰発現したトランスジェニックマウス (E-RAMP2 Tg) を樹立した。E-RAMP2 Tg では自然肺転移が抑制され、生存率の改善を認めた。

これらの結果から、血管内皮細胞の RAMP2 欠損は、腫瘍血管新生を抑制する一方で、転移を促進することが明らかとなった。AM-RAMP2系による血管恒常性維持機構に着目することで、癌転移を抑制する新しい治療法への展開が期待される。

以上の結果から、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。

Clinicopathological characterisation of duodenal adenocarcinoma with high CD44 variant 9 expression (十二指腸癌における CD44v9陽性細胞の臨床病理学的特徴)

丸 山 康 弘

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】ヒアルロン酸をリガンドとする接着因子の CD44 は様々な悪性腫瘍において癌幹細胞のバイオマーカーとされており、本研究ではそのバリエーションのひとつである CD44v9 に着目した。臨床的には、CD44v9 陽性細胞数は癌患者の生命予後と関連することが報告されている。今回我々は、消化管悪性腫瘍の中でも比較的まれな疾患である十二指腸癌を対象に、臨床および病理学組織学的な検討を行った。同疾患の癌幹細胞に関する報告は稀少であることから、特に、十二指腸癌における CD44v9 陽性細胞の癌幹細胞としての特徴に注目した。

【材料および方法】長野県内の施設にて診断された十二指腸癌 29 症例を対象とした。十二指腸癌の臨床お

よび病理組織学的特徴を評価するために、CD44v9、MUC2、MUC5AC、および MUC6 の免疫組織化学的な解析を行った。さらに、CD44v9 と Ki67 (核分裂能の評価)、cleaved caspase 3 (CC3、自己融解能の評価) との 2 重免疫蛍光染色法による解析を行った。この解析では、癌組織の CD44v9 陽性細胞が高い割合の領域と低い割合の領域を、それぞれ CD44v9 陽性領域および陰性領域として設定した。統計学的な解析にはカイ 2 乗検定およびスピアマン解析を用いた。また、十二指腸癌術後の生存期間の比較に関しては Kaplan-Meier 法を用いて評価を行った。

【結果】CD44v9 陽性細胞は弱いながらも炎症細胞浸潤 ($r=0.431$ と $p=0.020$) と MUC6 ($r=0.425$ と $p=0.022$) との関連があることが示された。CD44v9

陽性細胞では、Ki67陽性細胞の比率はCD44v9陰性細胞より低値であった ($p=0.002$)。またCD44v9陽性細胞ではCC3陽性細胞の比率は、CD44v9陰性細胞より低値であった ($p<0.0001$)。生存期間の解析においては、TNM分類によるstageのみが予後因子として有意差を認めた。(ハザード比:22.02, 95%信頼区間:2.795-450.6, および $p=0.0032$)

【結論】CD44v9は十二指腸癌において炎症細胞浸潤と粘液形質(MUC6)と関係があると考えられた。CD44v9陽性細胞は核分裂能が低く、自己融解能も乏しいことが示唆された。これらの特徴は、十二指腸癌においてCD44v9陽性細胞が癌幹細胞である可能性を示唆するものである。

(論文審査の結果の要旨)

ヒアルロン酸をリガンドとする接着因子のCD44は様々な悪性腫瘍において癌幹細胞のバイオマーカーとされており、本研究ではそのバリエーションのひとつであるCD44v9に着目した。臨床的には、CD44v9陽性細胞数は癌患者の生命予後と関連することが報告されている。今回我々は、消化管悪性腫瘍の中でも比較的まれな疾患である十二指腸癌を対象に、臨床および病理学組織学的な検討を行った。同疾患の癌幹細胞に関する報告は稀少であることから、特に、十二指腸癌におけるCD44v9陽性細胞の癌幹細胞としての特徴に注目した。

【対象と方法】長野県内の施設にて診断された十二指腸癌29症例を対象とした。十二指腸癌の臨床および病

理組織学的特徴を評価するために、CD44v9, MUC2, MUC5AC, およびMUC6の免疫組織化学的な解析を行った。さらに、CD44v9とKi67(核分裂能の評価)、cleaved caspase 3(CC3, 自己融解能の評価)との2重免疫蛍光染色法による解析を行った。この解析では、癌組織のCD44v9陽性細胞が高い割合の領域と低い割合の領域を、それぞれCD44v9陽性領域および陰性領域として設定した。統計学的な解析にはカイ2乗検定およびスピアマン解析を用いた。また、十二指腸癌術後の生存期間の比較に関してはKaplan-Meier法を用いて評価を行った。

その結果、丸山は次の結論を得た。

1. CD44v9は十二指腸癌において炎症細胞浸潤と粘液形質(MUC6)と関連していた。また単核細胞はCD44v9陽性細胞周囲に集簇していた。
2. CD44v9陽性細胞は核分裂能が低く、自己融解能も乏しいことから、十二指腸癌における癌幹細胞である可能性が示唆された。
3. 十二指腸癌の術後の生命予後は病理学的stageおよびgradeと関連したが、CD44v9陽性細胞の有無との関連性は明らかではなかった。

本研究において、CD44v9陽性細胞が十二指腸癌における癌幹細胞である可能性を示唆した点は新発見であり、今後、十二指腸癌の病態解明や治療法の開発に役立つ可能性がある。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。

Clinico-Radiological Characteristics and Pathological Diagnosis of Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Intracerebral Hemorrhage (脳アミロイド血管症関連脳内出血の臨床的・放射線学的特徴と病理学的診断に関する検討)

道 傳 整

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】脳アミロイド血管症(Cerebral amyloid angiopathy, CAA)は脳血管、特に髄膜、皮質血管の中膜・外膜にアミロイド沈着を呈する疾患で、脳皮質下出血、脳血管炎、認知症などの原因として重要である。特に高齢者において高血圧によらず多発性の脳皮質下出血を引き起こし、CAA関連脳内出血(cerebral amyloid angiopathy-related intracerebral hemorrhage, CAA-ICH)と呼ばれる。また、CAAでは大脳皮質に微小出血(microbleeds, MBs)など微細な無症候性の出血性変化が頭部MRIのT2*強調

画像等で高率に検出され、症候性の脳内出血発症前にCAAを疑う契機となりうる。高齢化社会の到来とMRIの高い普及率を背景に、今後CAAの早期診断方法の確立が重要になると考えられる。CAA-ICHの臨床診断にはBoston基準が用いられ、確実な診断は剖検による全脳の病理学的検討によってなされる。一方、脳実質または血腫の生検による診断の精度について詳細な報告は少ない。今回、我々はCAAをより高い精度で診断するためにCAA-ICHと臨床診断した症例の臨床的・放射線学的特徴と、生検によって得られた病理学的診断について検討した。

【対象と方法】 対象は2006年1月から2013年7月までに相澤病院で診療した連続253例の脳皮質下出血症例のうち、開頭血腫除去術を施行された48例である。そのうち血腫、血腫近傍の脳実質、または両者の生検による病理学的検討がなされた44例を病理学的診断に基づいてCAA陽性群22例とCAA陰性群22例に分類した。また、両群をBoston基準に基づいてProbable CAA群、Possible CAA群、除外群に分類し、各群における臨床的・放射線学的特徴（年齢、性別、高血圧症・認知症・抗血栓薬内服の有無、MBsの分布、白質病変の程度、再出血の有無など）を比較した。また、生検検体の種類によるCAA検出率の違いについても検討した。

【結果】 CAA陽性群はProbable CAA群7例、Possible CAA群15例に分類され、CAA陰性群はProbable CAA群2例、Possible CAA群7例、除外群13例に分類された。Boston基準に基づきCAA-ICHと臨床診断したCAA陽性群22例とCAA陰性群9例を比較したところ、CAA陰性群においてT2*強調画像で確認された脳深部および小脳テント下のMBsの個数はCAA陽性群に比して有意に多かった ($p < 0.05$)。大脳皮質領域のMBsの個数や高血圧症の有病率等に両群間で有意差はなかった。生検検体の種類毎のCAA検出率は血腫のみで50%、脳実質のみで61.5%、血腫と脳実質の両者で91.7%であった。また、Probable CAA群における血腫と脳実質の両者の生検によるCAA検出率は100%であった。CAA陽性群において術後再出血による死亡は2例(9.1%)で、いずれも血腫量の多い高齢者であった。

【考察・結論】 脳深部および小脳テント下のMBsとCAA-ICHの関連は乏しく、高血圧性が主と考えられた。一方、大脳皮質領域のMBsへの関与は高血圧とCAAとで差はなかった。本研究ではCAA陽性群とCAA陰性群の間で高血圧症の有病率に有意差がなかったことから、CAA-ICHの発症に高血圧が関与する可能性が示唆された。生検によるCAAの診断精度を高めるには大脳皮質と血腫双方の生検が有用で、かつ既報告と比較し生検の比較的高い安全性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

脳アミロイド血管症 (Cerebral amyloid angiopathy, CAA) は脳血管、特に髄膜、皮質血管の中膜・外膜にアミロイド沈着を呈する疾患で、脳皮質下出血、脳血管炎、認知症などの原因として重要である。特に高齢者において高血圧によらず多発性の脳皮質下出血

を引き起こし、CAA関連脳内出血 (cerebral amyloid angiopathy-related intracerebral hemorrhage, CAA-ICH) と呼ばれる。また、CAAでは大脳皮質に微小出血 (microbleeds, MBs) など微細な無症候性の出血性変化が頭部MRIのT2*強調画像等で高率に検出され、症候性の脳内出血発症前にCAAを疑う契機となりうる。高齢化社会の到来とMRIの高い普及率を背景に、今後CAAの早期診断方法の確立が重要になると考えられる。CAA-ICHの臨床診断にはBoston基準が用いられ、確実な診断は剖検による全脳の病理学的検討によってなされる。一方、脳実質または血腫の生検による診断の精度について詳細な報告は少ない。本研究ではCAAをより高い精度で診断するためにCAA-ICHと臨床診断した症例の臨床的・放射線学的特徴と、生検によって得られた病理学的診断について検討した。

対象は2006年1月から2013年7月までに相澤病院で診療した連続253例の脳皮質下出血症例のうち、開頭血腫除去術を施行された48例である。そのうち血腫、血腫近傍の脳実質、または両者の生検による病理学的検討がなされた44例を病理学的診断に基づいてCAA陽性群22例とCAA陰性群22例に分類した。また、両群をBoston基準に基づいてProbable CAA群、Possible CAA群、除外群に分類し、各群における臨床的・放射線学的特徴（年齢、性別、高血圧症・認知症・抗血栓薬内服の有無、MBsの分布、白質病変の程度、再出血の有無など）を比較した。また、生検検体の種類によるCAA検出率の違いについても検討した。

結果、CAA陽性群はProbable CAA群7例、Possible CAA群15例に分類され、CAA陰性群はProbable CAA群2例、Possible CAA群7例、除外群13例に分類された。Boston基準に基づきCAA-ICHと臨床診断したCAA陽性群22例とCAA陰性群9例を比較したところ、CAA陰性群においてT2*強調画像で確認された脳深部および小脳テント下のMBsの個数はCAA陽性群に比して有意に多かった ($p < 0.05$)。大脳皮質領域のMBsの個数や高血圧症の有病率等に両群間で有意差はなかった。生検検体の種類毎のCAA検出率は血腫のみで50%、脳実質のみで61.5%、血腫と脳実質の両者で91.7%であった。また、Probable CAA群における血腫と脳実質の両者の生検によるCAA検出率は100%であった。CAA陽性群において術後再出血による死亡は2例(9.1%)で、いずれ

れも血腫量の多い高齢者であった。

結論として脳深部および小脳テント下の MBs と CAA-ICH の関連は乏しく、高血圧性が主と考えられた。一方、大脳皮質領域の MBs への関与は高血圧と CAA とで差は無かった。本研究では CAA 陽性群と CAA 陰性群の間で高血圧症の有病率に有意差がな

かったことから、CAA-ICH の発症に高血圧が関与する可能性が示唆された。生検による CAA の診断精度を高めるには大脳皮質と血腫双方の生検が有用で、かつ既報告と比較し生検の比較的高い安全性が示された。

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。

Activation of PPAR α by fatty acid accumulation enhances fatty acid degradation and sulfatide synthesis (脂肪酸蓄積による PPAR α 活性化は脂肪酸分解とスルファチド合成を促進する)

封 玉 瑤

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 極長鎖脂肪酸アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) はミトコンドリア局在の脂肪酸・酸化反応系の初反応を触媒する 4 種のアイソザイムのひとつである。我々の研究グループは、VLCAD 欠損症の存在および遺伝子変異の同定を報告するとともに、治療法の開発を試みてきた。本研究は核内受容体 PPAR の機能変化を探索することを介して、VLCAD 欠損症における脂質代謝制御をより深く理解し、治療法のきっかけを見出すことを目的とした。

【材料および方法】 6 名の severe type VLCAD 欠損症患者の各々の皮膚から調製された繊維芽細胞試料と 3 名の健常男性の皮膚から調製された繊維芽細胞試料を用い、遊離脂肪酸含量・PPAR 活性化レベル・脂肪酸代謝関連酵素の発現レベル・スルファチド代謝関連酵素の発現変動・スルファチド含量およびスフィンゴイド組成を測定した。

【結果】 VLCAD 欠損症患者由来の細胞において、3 種の PPAR のうち PPAR α のみが活性化を生じ、その活性化は内在性リガンドである中鎖・長鎖脂肪酸量の増加に基づくことが示された。PPAR α 標的遺伝子産物であることが知られている脂肪酸代謝関連酵素 3 種の発現が PPAR α 依存的に増加することが明らかにされた。また、PPAR α 標的遺伝子産物であることが知られているスルファチド合成酵素 2 種の発現およびスルファチド含量が PPAR α 依存的に増加することが示された。スルファチドのスフィンゴイド組成は血清における組成と全く異なり、PPAR α 活性化との関連は見られなかった。

【結論】 機能的 PPAR α 活性化による長鎖脂肪酸アシル CoA 合成酵素 (LACS) の発現増加および脂肪酸分解能の増加は脂肪酸毒性の減少をもたらすことが示

唆された。さらに、機能的 PPAR α 活性化によるスルファチド合成の増加は硫酸毒性の減少をもたらすことが示唆された。機能的 PPAR α 活性化は VLCAD 欠損細胞における代償的・防衛的対応であると思われた。フィブラート製剤投与による継続的 PPAR α 活性化は severe type VLCAD 欠損症患者に対する簡便な治療法となりうることを提示された。また、VLCAD 欠損細胞において中鎖脂肪酸代謝機能が保全されていることに基づき、長鎖脂肪酸含量の少ない食品を継続的に摂取することが発症予防になりうることも提示された。

(論文審査の結果の要旨)

極長鎖脂肪酸アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症は常染色体劣性遺伝疾患である。VLCAD 蛋白がほとんど存在しない severe type では多種の臓器や組織における脂肪蓄積・肝機能障害・心機能障害・横紋筋機能低下・意識消失発作などを高頻度に呈する特徴がある。蓄積した中性脂肪に混在する長鎖脂肪酸由来の毒性 (カルボン酸毒性・界面活性剤作用) による細胞死により障害が惹起されると想定されてきた。核内受容体 PPAR は脂肪消費臓器における中性脂肪代謝のマスターレギュレーターの一つであり、VLCAD 欠損症の病態変化との関連を研究する発想に至った。VLCAD 欠損症患者 6 名の皮膚由来繊維芽細胞を継代培養し、細胞内の遊離脂肪酸含量・PPAR 活性化・PPAR 標的遺伝子産物 (脂肪酸代謝関連酵素) の蛋白および mRNA 発現変化・オクタノイル CoA 脱水素反応活性などを定法に従って測定した。また、スフィンゴ脂質合成系へのパルミトイル CoA 供給の増加が想定され、かつ、2 種の PPAR 標的遺伝子産物が律速酵素と考えられるスルファチド代謝関連酵素群の mRNA 発現変化を RT-PCR 法にて測定した。スルファチド含量およびスフィンゴイド組成を MALDI-

TOF MS 法にて調べた。

その結果、以下の成績を得た。

1. VLCAD 欠損細胞に遊離脂肪酸蓄積が検出された。
2. VLCAD 欠損細胞において PPAR α 活性化が生じ、PPAR α 標的遺伝子産物である 3 種の脂肪酸代謝系酵素の発現増加が認められた。
3. VLCAD 欠損細胞において、PPAR α 標的遺伝子産物である 2 種のスルファチド合成酵素の発現増加が認められた。
4. VLCAD 欠損細胞において、スルファチド含量が

有意に増加した。

以上より、VLCAD 欠損細胞において、PPAR α 活性化を介する脂肪酸分解能の増加は脂肪酸毒性の減少をもたらすことが示唆された。また、PPAR α 活性化を介するスルファチド合成の増加は硫酸毒性の減少をもたらすことが示唆された。これらの結果から、簡便な治療法の可能性が提示された。従って、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Postoperative improvement in DASH score, clinical findings, and nerve conduction velocity in patients with cubital tunnel syndrome (肘部管症候群患者における DASH スコア, 身体所見, および神経伝導速度の術後回復)

井 戸 芳 和

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 上肢において 2 番目に頻度の高い絞扼性神経障害である肘部管症候群に対する治療として、多くの手術手技がある。しかし信頼性、妥当性のある方法を用いた術後長期、かつ複数回評価の報告はほとんどなく、各手技後の回復には不明な点が多いのが現状である。今回、術後回復の予測に役立てるため、尺骨神経皮下前方移動術後 2 年以上に渡り患者の主観的および客観的臨床評価値を追跡し、それらの回復過程を明らかにした。

【方法】 尺骨神経皮下前方移動術が行われた、変形性肘関節症を合併する肘部管症候群 52 例の術前、術後経時的臨床評価値を retrospective に収集した。手術時年齢は 67.3 ± 8.8 歳、男性 44 例、女性 8 例、術前尺骨神経麻痺重症度 (McGowan 分類) は Grade II (Intermediate) 25 例、Grade III (Severe) 27 例であった。

【術前、術後臨床評価】 術前、術後 1, 3, 6, 12 カ月、および 24 カ月以上の最終観察時 (24~78 カ月、平均 34.8 カ月) の 6 時期に、以下の項目を評価した。

1) 患者立脚型上肢機能評価法である The Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand (DASH) スコア、2) Visual Analogue Scale (VAS) によるしびれの程度、3) 握力、4) ピンチ力、5) 小指の圧感覚である Semmes-Weinstein (SW) monofilament test 分類、6) 小指の 2 点識別距離 (2PD) による感覚機能分類、7) 尺骨神経の運動神経伝導速度分類 (MCV)。

【統計解析】 各評価値の術後回復の傾向を明らかにす

るために、連続変数 (1, 2, 3, 4) については線形混合効果モデル、およびカテゴリ変数 (5, 6, 7) については累積ロジスティック回帰モデルを用いて解析した。いずれのモデルにおいても、共変量として年齢、性別、術前重症度 (McGowan 分類) を投入し、危険率 5% 未満を有意とした。

【結果】 24 カ月以上の最終観察時まで評価できた症例は 39 例であった。術後、すべての評価値は有意に改善していた。DASH スコアは術後 6 カ月で有意に改善した。しびれおよび SW 分類は術後 1 カ月、握力、ピンチ力、2PD 分類および MCV 分類は術後 3 カ月で有意に改善した。主観的評価である DASH およびしびれの値は、年齢、性別、術前重症度の影響を受けていなかった。一方、客観的な筋力、感覚、神経機能評価である握力、ピンチ力、SW 分類、2PD 分類および MCV 分類は、いずれも術前重症度の影響を受けていた。術後 12 カ月以降、有意に改善した評価項目はなかった。最終観察時においてしびれが完全に消失した症例は 33.3%、正常域まで回復した症例は SW 分類、2PD 分類、および MCV 分類において、それぞれ 20.5%、35.9%、および 44.8% であった。

【考察】 変形性肘関節症を合併する肘部管症候群に対する尺骨神経皮下前方移動術後においては、しびれおよび小指の圧感覚が早期に回復し、次いで運動機能である握力、ピンチ力、運動神経伝導速度が回復した。この要因として、術前重症度に関わらず術後早期に神経内の虚血が改善すること、変性した軸索 (萎縮した筋肉) の回復には時間を要することなどが考えられた。

最終観察時まで追跡できた症例数減少による統計学的検出力低下のため、各評価値の術後12カ月以降の有意な回復の有無については明らかにできなかった。なお本研究の結果は、術後回復の予測、術前患者への説明に有用であるが、他の術式、病態および人種にあてはめることはできない。

(論文審査の結果の要旨)

肘部管症候群の術後回復過程には不明な点が多い。今回、術後回復の予測に役立てるため、尺骨神経皮下前方移動術が行われた変形性肘関節症を合併する肘部管症候群52例に対し、術前、術後1, 3, 6, 12カ月、および24カ月以上の最終観察時(24~78カ月、平均34.8カ月)に、以下の項目を評価した。1) 患者立脚型上肢機能評価法である The Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand (DASH) スコア, 2) Visual Analogue Scale (VAS) によるしびれの程度, 3) 握力, 4) ピンチ力, 5) 小指の圧感覚である Semmes-Weinstein (SW) monofilament test 分類, 6) 小指の2点識別距離(2PD)による感覚機能分類, 7) 尺骨神経の運動神経伝導速度分類(MCV)。連続変数(1, 2, 3, 4)については線形混合効果モデル、およびカテゴリ変数(5, 6, 7)については累積ロジスティック回帰モデルを用いて解析した。いずれのモデルにおいても、共変量として年齢、性別、術前重症度(McGowan 分類)を投入し、危険率5%未満を有意とした。

その結果、次の結論を得た。

1. 術後、すべての評価値は有意に改善していた

(DASH スコアは術後6カ月、しびれおよびSW 分類は術後1カ月、握力、ピンチ力、2PD 分類および尺骨神経の MCV 分類は術後3カ月で有意に改善していた)。

2. 術後12カ月以降、有意に改善した評価値はなかった。
3. 主観的評価である DASH およびしびれの値は、年齢、性別、術前重症度の影響を受けていなかった。
4. 客観的な筋力、感覚、神経機能評価である握力、ピンチ力、SW 分類、2PD 分類および MCV 分類は、いずれも術前重症度の影響を受けていた。

以上より、変形性肘関節症を合併する肘部管症候群に対する尺骨神経皮下前方移動術後においては、しびれおよび小指の圧感覚が早期に回復し、次いで運動機能である握力、ピンチ力、運動神経伝導速度が回復することがわかった。この要因として、本研究において証明はできていないが、変性した軸索(萎縮した筋肉)の回復には時間を要することが考えられた。最終観察時まで追跡できた症例数減少による統計学的検出力低下のため、各評価値の術後12カ月以降の有意な回復の有無については断定できないが、本研究の結果は術後回復の予測および術前患者への説明に有用である。

変形性肘関節症を合併する肘部管症候群術後における回復過程を詳細に調査した論文は他になく、本研究内容は極めて意義深いものである。したがって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Serum *Wisteria floribunda* agglutinin-positive human Mac-2 binding protein may predict liver fibrosis and progression to hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection (血清中の WFA 陽性 Mac-2結合タンパクはB型肝炎ウイルス慢性感染患者において、肝線維化および肝細胞癌の発症予測に有用な可能性がある)

市川 雪

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 WFA 陽性 Mac-2結合タンパクは、C型慢性肝炎や原発性胆汁性胆管炎などの慢性肝疾患において非侵襲的線維化マーカーとして有用であることが報告されている。本研究では、肝生検を施行したB型慢性肝炎および肝硬変患者を対象とし、WFA 陽性 Mac-2タンパクの肝線維化ステージ診断能を他の線維化マーカーと比較検討した。さらに、同コホートを対象として肝細胞癌の発症予測マーカーとしての有用性を検討した。

を検討した。

【方法】 当院で肝生検を行い、その後経過観察が可能であったB型慢性肝炎および肝硬変患者112人を対象とした。全例、肝生検施行時に抗ウイルス療法は受けていなかった。WFA 陽性 Mac-2タンパクと肝線維化ステージとの関連を検討するとともに、各種肝線維化マーカー(ヒアルロン酸、IV型コラーゲン7S、APRI、FIB4インデックス、PLT)との関連も解析した。さらに、経過観察期間中の肝細胞癌発症と関連する経過

観察開始時の因子を、WFA 陽性 Mac-2タンパクを含めて検討した。

【結果】血清中 WFA 陽性 Mac-2結合タンパク濃度は、肝線維化ステージが進行するに伴い上昇し、有意の ($r=0.325$, $P=0.001$) 相関がみられた。ROC 解析によると、 $F > 2$ 以上の AUROC は0.713であり、他の線維化マーカーと比較して非劣性が証明された。肝細胞癌発症を予測する因子の単変量解析では、年齢、線維化ステージ、WFA+ -M2BP, ALT, ヒアルロン酸, FIB4インデックス, 血小板数, AFP, 核酸アナログ治療の有無が有意な因子であった。また、多変量解析では、性別 (男性), WFA 陽性 Mac-2タンパク (0.71 COI 以上), ALT (80 IU/ml) 以下), 血小板 (14.5万以下) が独立した危険因子として抽出された。WFA 陽性 Mac-2結合タンパクの血中濃度0.71以上、未満の2群に分け、 Kaplan-Meier法で肝細胞癌の発生率を比較したところ、WFA-M2BP 0.71以下の群で発症率が有意に低かった (log-rank $P=0.020$)。

【結論】 B型肝炎患者において、WFA 陽性 Mac-2結合タンパクは非侵襲的肝線維化マーカーとして有用であった。さらに、肝細胞癌の発症予測マーカーとしても有用である可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

WFA 陽性 Mac-2結合タンパク (WFA⁺-M2BP) は、C型慢性肝炎や原発性胆汁性胆管炎などの慢性肝疾患において、非侵襲的線維化マーカーとして有用であることが報告されている。本研究では、当院で1998~2013年に肝生検を施行したB型慢性肝炎および

肝硬変患者112例を対象とし、WFA+ -M2BPの肝線維化ステージ診断能を他の線維化マーカーと比較検討した。さらに、同コホートを対象として肝細胞癌の発症予測マーカーとしての有用性を検討した。その結果、次の結論を得た。

1. 肝線維化進展にともない WFA+ -M2BP 値は上昇し、肝線維化ステージと正の相関を認めた。
2. 肝線維化ステージ予測能を ROC で解析すると既存の線維化マーカーであるヒアルロン酸、IV型コラーゲン7S, APRI, FIB4インデックス, 血小板数と比較して同等の有用性を認めた。
3. 肝細胞癌発症を予測する因子の単変量解析では、年齢、線維化ステージ、WFA⁺-M2BP, ALT, ヒアルロン酸, FIB4インデックス, 血小板数, AFP, 核酸アナログ治療の有無に有意差を認めた。一方、多変量解析では、性別 (男性), WFA 陽性 Mac-2タンパク (0.71 COI 以上), ALT (80 IU/ml) 以下), 血小板数 (14.5万以下) が独立した危険因子として抽出された。WFA⁺-M2BP をカットオフ値 0.71 で2群に分け、 Kaplan-Meier法にて累積肝細胞癌発症率を比較したところ、0.71以上群で有意に高い発症率であった。

以上の結果より、WFA⁺-M2BP はB型肝炎の肝線維化マーカーとして有用であると考えられた。さらに、肝細胞癌発症の予測因子として有用である可能性が示唆された。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Novel role of ASC as a regulator of metastatic phenotype (癌細胞の転移形質制御における ASC の役割)

岡田 なぎさ

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD (ASC) は、抗がん剤でアポトーシスを誘導した白血病細胞で凝集塊を形成する細胞質たんぱく質として発見され、カスパーゼ1の活性化に必須の因子であることが明らかにされた。ASC はN末端側に Pyrin と相同な領域 PYD とC末端側に CARD を有し、PYD と LRR を有する細胞質病原体センサーNOD-like receptors (NLRs) とカスパーゼ1をリクルートし、インフラマゾームを形成する。これによりカスパーゼ1が活性化され、活性 IL-18,

IL-1 β が産生される。一方、種々の悪性腫瘍細胞において ASC 遺伝子はメチル化され、がんの進展との関連が示唆されているが、浸潤転移における ASC の役割については不明である。我々は、マウス悪性黒色腫の細胞株の ASC 発現を抑制し、ASC ががんの進展にどのように働いているのかを調べた。

【材料および方法】 マウス悪性黒色腫 BL16BL6細胞に shASC を導入し ASC ノックダウン細胞 (以下 shASC 細胞) を作成し、細胞増殖アッセイ及び実験的肺転移モデルによる転移実験を行った。転移形質を調べるために、スクラッチアッセイ、マトリゲルを用

いた浸潤アッセイ, ECM 接着アッセイ, 浸潤突起形成アッセイを行った。マウス悪性黒色腫の別の細胞株である B16F10細胞, チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージでも同様の実験を行った。また, 細胞の形態を調べるために F-アクチン染色を行った。細胞運動, 浸潤での重要なシグナル伝達分子である Src との関係について調べた。また, Src によりカスパーゼ 8 の Tyr380 がリン酸化されると細胞運動に関与するとされること, カスパーゼ 8 の DED 領域は PYD を介して ASC と結合するということが報告されているので, カスパーゼ 8 との関係性を調べた。Src, カスパーゼ 8 のリン酸化を調べ, それぞれの阻害剤を使い同様の実験を行った。

【結果】 shASC 細胞は, コントロール細胞と比較し, 増殖には差が見られなかったが, 肺転移能は亢進した。スクラッチアッセイでは, コントロール細胞に比べ, shASC 細胞の運動性が亢進した。浸潤アッセイでも, shASC 細胞は浸潤能が亢進していた。ECM 細胞接着アッセイでは, 接着能に差は見られなかった。shASC 細胞はコントロール細胞とは細胞形態が異なっており, F-アクチン染色でラメラポディア様構造やアクチンのドット様構造が目立って見られた。浸潤突起形成アッセイでは, shASC 細胞で浸潤突起が多く観察された。B16F10細胞, チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージにおいても同様に, shASC 細胞で浸潤突起/ポドソーム形成が亢進していた。shASC 細胞では, Src のリン酸化が増強しており, 下流のシグナル分子である FAK, Erk1/2 のリン酸化も増強していた。Src 阻害剤であるダサチニブを作用させると, shASC 細胞で細胞運動能, 浸潤突起形成がより強く阻害された。カスパーゼ 8 の阻害剤である z-VAD-fmk, z-IETD-fmk は shASC 細胞の細胞運動を阻害した。また, shASC 細胞では, カスパーゼ 8 の Tyr380 のリン酸化がコントロール細胞に比べ増強したが, 阻害剤を用いるとリン酸化が抑制された。

【結論】 ASC 発現が抑制されると, 細胞骨格が変化し, Src, FAK, Erk, カスパーゼ 8 を介し, 細胞運動能, 浸潤突起形成, 浸潤能が亢進し, その結果, 転移性が増強しがんの悪性度が増すということが分かった。ASC の発現抑制はがんの予後因子として重要であると考えた。

(論文審査の結果の要旨)

ASC は, アポトーシス, 自然免疫において重要な

役割がある。一方, 種々の悪性腫瘍細胞において ASC 遺伝子はメチル化され, がんの進展との関連が示唆されているが, 浸潤転移における ASC の役割については不明である。今回, マウス悪性黒色腫細胞株の ASC 発現を抑制し, ASC ががんの進展にどのように働いているのかを調べた。

1. BL16BL6細胞に shASC を導入し作成した ASC ノックダウン細胞 (以下 shASC 細胞) は, コントロール細胞と比較し細胞増殖には差が見られなかったが, 肺転移能は亢進した。このため転移形質に着目し実験を行った。
2. shASC 細胞は, コントロール細胞に比べ, 運動性が亢進した。液性因子の関与は低いと考えられた。浸潤アッセイでも, shASC 細胞は浸潤能が亢進していた。接着能に差は見られなかった。
3. shASC 細胞はコントロール細胞とは細胞形態が異なっており, アクチンのドット様構造が目立って見られた。
4. 浸潤突起形成アッセイでは, shASC 細胞で浸潤突起が多く観察された。B16F10細胞, チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージにおいても同様であった。以上より, ASC 発現抑制は, 細胞運動能, 浸潤突起形成, 浸潤能を亢進することが分かった。
5. 細胞運動, 浸潤での重要なシグナル伝達分子である Src との関係について調べた。shASC 細胞では, Src のリン酸化が増強しており, FAK, Erk1/2 のリン酸化も増強していた。Src 阻害剤を作用させると, shASC 細胞で細胞運動能, 浸潤突起形成がより強く阻害された。以上より, ASC の発現が抑制されると, Src, FAK, Erk のリン酸化を介し, 細胞運動能や浸潤能が亢進することが分かった。
6. カスパーゼ 8 は Src により Tyr380 がリン酸化されると細胞運動に関与すると報告されており, また, カスパーゼ 8 の DED は PYD を介して ASC と結合することが報告されているため, カスパーゼ 8 との関連性について調べた。カスパーゼ 8 阻害剤は shASC 細胞の細胞運動を阻害した。また, shASC 細胞では, Tyr380 のリン酸化がコントロール細胞に比べ増強したが, 阻害剤により抑制された。以上より, ASC 存在下では ASC とカスパーゼ 8 が結合することで Src のカスパーゼ 8 への接近を抑制し, 逆に, ASC が欠損すると Src のカスパーゼ 8 への接近を容易にし Tyr380 がリン酸化され, 細胞運動

が亢進することが示唆された。

以上より、ASC 発現が抑制されると、細胞骨格が変化し、Src, FAK, Erk, カスパーゼ8を介し、細胞運動能、浸潤突起形成、浸潤能が亢進し、がんの悪

性度が増すということが明らかとなった。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。

Increasing Incidence and Age at Onset of Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Nagano Prefecture of Japan (長野県における ALS の発症者数の増加と発症年齢の高齢化)

小林 千 夏

(論文の内容の要旨)

【背景】筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、一次・二次運動ニューロンが進行性に変性する疾患であり、上下肢体幹の筋力低下の進行とともに呼吸筋や嚥下筋の能力が低下し、発症から3～5年で死に至る。症状は重篤であり、栄養管理や気道管理が必須となるため、患者家族の介護負担や必要医療資源も大きく、本疾患が地域医療に与える影響は甚大である。近年、複数の国・地域から本疾患の患者数の増加が散発的に報告されている。今回我々は信州大学医学部附属病院での患者数の推移を検討し、同様の傾向がみられるのか否かについて検討した。また患者数増加に関連する要因についてもあわせて検討した。

【対象】1984年から2014年の約30年間に当院を受診し確定診断された ALS 患者連続症例232名の診断時診療録を参照し、現在広く用いられている revised El Escorial 診断基準を満たす199名を対象とした。

【方法】対象30年間を5年間ごと6区間に分け、患者数、発症年齢、性比、病型について推移を検討した。

【結果】199名のうち、115名が男性、84名が女性であった。発症年齢は64.6±12.2歳であった。149名は四肢脱力が初発症状 (limb-onset type) であり、残り50名は球麻痺症状が初発症状 (bulbar-onset type) であった。

1984-89年で18名 (男性/女性 6/12名, limb/bulbar 12/6名), 1990-1994年で22名 (男性/女性 14/8名, limb/bulbar 17/5名), 1995-1999年で26名 (男性/女性 15/11名, limb/bulbar 20/6名), 2000-2004年で19名 (男性/女性 9/10名, limb/bulbar 13/6名), 2005-2009年で50名 (男性/女性 31/19名, limb/bulbar 40/10名), 2010-2014年で64名 (男性/女性 40/24名, limb/bulbar 47/17名) の患者を新規に診断しており、直近10年での新規患者は性別・病型にかかわらず増加を認めたが、特に女性、bulbar-onset type での増加が顕著であった。

発症年齢は1984-1989年で55.3±8.48歳、1990-1994年で58.8±12.6歳、1995-1999年で62.2±11.1歳、2000-2004年で62.7±12.9歳、2005-2009年で65.3±9.26歳、2010-2014年で66.2±11.0歳であり、徐々に上昇していた。発症年齢が65歳以降である高齢発症 ALS の割合は、1984-1989年で17%、1990-1994年で41%、1995-1999年で54%、2000-2004年で58%、2005-2009年で58%、2010-2014年で60%であり、1995年以降は新規 ALS 患者の半数以上は高齢発症者で占められていた。

患者住所を信州大学医学部附属病院が含まれる松本医療圏と、それ以外 (北信、長野、佐久、上小、諏訪、上伊那、飯伊、木曾、大北) の二次医療圏に分類したところ、松本医療圏の患者の占める割合は1984-1989年で61%、1990-1994年で36%、1995-1999年で46%、2000-2004年で37%、2005-2009年で46%、2010-2014年で47%であった。直近10年間では松本医療圏の患者比率は変化がないため、本院における患者数の増加は他医療圏からの患者流入が原因ではなく、松本医療圏内での発症者数の増加が示された。

【考察】長野県では近年主要医療圏の基幹病院に神経内科医を配置する体制を整えており、ALS の診断は当該病院で完結するようになった。松本医療圏の内でも診断能力をもった病院が整備されてきており、ALS 診断を目的として患者を当院へ紹介する必要性は低下してきていると考えられる。患者住所を検討したが松本医療圏外の患者割合の増加はなく、当地での ALS 患者数は近年明らかに増加していると考えた。また、他医療圏からの患者も同様に増加しており、発症数の増加は松本医療圏を越えた傾向であると考えた。

日本社会は急速に高齢化が進行しており、その傾向は長野県でも同一である。高齢発症 ALS 患者の増加は、発症要因の一つに加齢があることを示唆する。高齢化は今後も進行するため、発症者の増加傾向は今後も継続する可能性がある。本疾患は経過中に多大な介

護・医療資源を要求するため、地域医療の中での高齢 ALS に対する専門的体制の構築が求められる。

(論文審査の結果の要旨)

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、一次・二次運動ニューロンが進行性に変性する疾患であり、上下肢体幹の筋力低下の進行とともに呼吸筋や嚥下筋の能力が低下し、発症から3～5年で死に至る。症状は重篤であり、栄養管理や気道管理が必須となるため、患者家族の介護負担や必要医療資源も大きくなり、疾患が地域医療に与える影響は甚大である。近年、複数の国・地域から本疾患の患者数の増加が散発的に報告されている。今回信州大学医学部附属病院での患者数の推移を検討し、同様の傾向がみられるのか否かについて検討した。また患者数増加に関連する要因についてもあわせて検討した。

1984年から2014年の約30年間に当院を受診し診断された ALS 患者連続症例232名の診断時診療録を参照し、現在広く用いられている revised El Escorial 診断基準を満たす199名を抽出した。30年間で5年間ごと6区間に分け、患者数、発症年齢、性比、病型についてその推移を検討した。

199名のうち、115名が男性、84名が女性であった。発症年齢は 64.6 ± 12.2 歳であった。149名は四肢脱力が初発症状 (limb-onset type) であり、50名は球麻痺症状が初発症状 (bulbar-onset type) であった。1984-89年で18名 (男性/女性 6/12名, limb/bulbar 12/6名), 1990-1994年で22名 (男性/女性 14/8名, limb/bulbar 17/5名), 1995-1999年で26名 (男性/女性 15/11名, limb/bulbar 20/6名), 2000-2004年で19名 (男性/女性 9/10名, limb/bulbar 13/6名), 2005-2009年で50名 (男性/女性 31/19名, limb/bulbar 40/10名), 2010-2014年で64名 (男性/女性 40/24名, limb/bulbar 47/17名) の患者を新規に診断しており、直近10年での新規患者は性別・病型にかかわらず増加

を認めたが、特に女性、bulbar-onset type での増加が顕著であった。

発症年齢は1984-1989年で 55.3 ± 8.48 歳, 1990-1994年で 58.8 ± 12.6 歳, 1995-1999年で 62.2 ± 11.1 歳, 2000-2004年で 62.7 ± 12.9 歳, 2005-2009年で 65.3 ± 9.26 歳, 2010-2014年で 66.2 ± 11.0 歳であり、徐々に上昇していた。発症年齢が65歳以降である高齢発症 ALS の割合は、1984-1989年で17%, 1990-1994年で41%, 1995-1999年で54%, 2000-2004年で58%, 2005-2009年で58%, 2010-2014年で60%であり、1995年以降は新規 ALS 患者の半数以上は高齢発症者で占められていた。

患者住所を信州大学医学部附属病院が含まれる松本医療圏と、それ以外 (北信, 長野, 佐久, 上小, 諏訪, 上伊那, 飯伊, 木曾, 大北) の二次医療圏に分類したところ、松本医療圏の患者の占める割合は1984-1989年で61%, 1990-1994年で36%, 1995-1999年で46%, 2000-2004年で37%, 2005-2009年で46%, 2010-2014年で47%であり、各期間に統計学的有意差はみられなかった。患者数の増加は他医療圏からの患者流入が原因ではなく、松本医療圏内での発症者数の増加が示された。他医療圏からの患者も同様に増加しており、発症数の増加は松本医療圏を越えた傾向であると考えた。

日本社会は急速に高齢化が進行しており、その傾向は長野県でも同一である。高齢発症 ALS の増加は、発症要因の一つに加齢があることを示唆する。高齢化は今後も進行するため、発症者の増加傾向は今後も継続する可能性がある。本疾患は経過中に多大な介護・医療資源を要求するため、地域医療の中での高齢 ALS に対する特別な枠組み構築が求められる。

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。

Morphological analysis of regenerated bulbar fibers in relation to neonatal olfaction (新生児ラットの嗅覚機能発現に必要な嗅球由来の再生神経線維の形態解析)

黒岩正文

(論文の内容の要旨)

【目的】外側嗅索 (LOT) は、嗅球から嗅皮質への投射線維からなる脳内嗅覚伝導路である。我々は以前に新生児ラットで LOT 切断実験を行い、4週間後に切断された軸索が再生し嗅覚が回復することを発表した。

本研究では、新生児ラットにおける LOT 切断後の再生について、機能が回復する時期を正確に確定し、さらに機能回復に必要な再生線維量を調べることを目的として実験を行った。

【方法】

(1) 機能回復時期

生後2日(P2)の新生児ラットの左LOTを切断した。LOTの完全切断は、切断直後にLOT切断部より後方の嗅皮質に逆行性の神経トレーサーであるFast Blue (FB)を注入し、嗅球投射ニューロンがFBで標識されないことにより確認した。哺乳期のラットは嗅覚がないと哺乳できないため、LOT切断ラットの機能再生については、胃の中に存在する哺乳したミルクの有無で判定した。まず、P7, P9, P11で右嗅球を吸引除去し、24時間後(P8, P10, P12)の胃内ミルクを調べた結果、LOT完全切断例において胃内にミルクを認めたラットはP12のみであった。次に詳細な再生時期を確定するため、P2で左LOTを切断したラットの右嗅球をP11(9:00-10:00)で吸引除去し、P11の14:00, 17:00, 20:00, 23:00, P12の8:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00, P13の8:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00に胃内ミルクの有無について調べた。

(2) 機能回復に必要な再生線維量

P2ラットの左LOTを切断し、LOTの完全切断を確認するため同側嗅皮質にFBを注入した。P5で順行性の神経トレーサーであるBiotinylated dextran amine (BDA)を両側嗅球に注入した。予備実験の結果を踏まえて、機能が回復していない時期(P10)と機能回復が確認された時期(P12)における再生線維量を比較するため、P10およびP12で灌流固定を行った。脳を採取し、嗅球(矢状断)および嗅球を除いた脳(冠状断)から50 μ m厚で300 μ m間隔の凍結切片を6セット作成した。2セット目の切片を蛍光顕微鏡下で観察し、LOTの不完全切断例を除外した。LOT完全切断例において、1, 3, 5セット目の切片を用いてBDA陽性線維を検出し、LOT切断部よりも尾側にある嗅結節の4つのレベル(レベル1:嗅結節吻側端, レベル2:嗅結節吻側1/3, レベル3:嗅結節尾側1/3, レベル4:嗅結節尾側端)においてBDA陽性部位の面積および密度を計測した。計測はLOTを切断した左側(再生側)とLOTを切断していない右側(正常側)の両方で行った。

【結果】

1. 機能回復時期

P2で左LOTを切断しP11で右嗅球を吸引除去したラット(n=22)の完全切断例(n=13)において胃内ミルクを認めた時期(嗅覚が回復した時期)は、P11が0匹(0%), P12が9匹(69%), P13が4匹

(31%)であった。

2. 機能回復に必要な再生線維量

LOTの完全切断例において、機能的にまだ回復していない時期(P10, n=5)と機能回復が確認された時期(P12, n=6)のすべてのラットにおいて、切断部より尾側でBDA陽性の再生線維が検出された。P10におけるBDA陽性部位の面積(嗅結節レベル1~4の合計)および密度(嗅結節レベル1~4の平均)は、それぞれ、LOT切断側(左側)では $1.91 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および0.13, 非切断側(右側)では $8.66 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および0.34であった。P12におけるBDA陽性部位の面積(嗅結節レベル1~4の合計)および密度(嗅結節レベル1~4の平均)は、それぞれ、LOT切断側(左側)では $4.34 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および0.21, 非切断側(右側)では $11.05 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および0.35であった。

【結論】

1. LOTを切断された新生児ラットの嗅覚は、切断後10日で回復することが明らかとなった。
2. LOTを切断された新生児ラットの嗅覚機能回復には、嗅結節レベルにおいて、面積では正常の約40%, 密度では正常の約60%の再生線維が必要であることが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

本研究で黒岩は、新生児ラットでは嗅覚伝導路である外側嗅索(LOT)を切断しても自然再生することに関して、機能が回復する正確な時期を確定し、さらに、機能回復に必要な再生線維量を調べることを目的として実験を行った。

その結果、黒岩は次の結果を得た。

1. 機能回復時期

生後2日(P2)で左LOTを切断しP11で右嗅球を吸引除去したラット(n=22)のLOT完全切断例(n=13)において、胃内ミルクを認めた時期(嗅覚が回復した時期)は、P11が0匹(0%), P12が9匹(69%), P13が4匹(31%)であった。

2. 機能回復に必要な再生線維量

LOTの完全切断後、機能的にまだ回復していない時期(P10, n=5)と機能回復が確認された時期(P12, n=6)のすべてのラットにおいて、切断部より尾側でBDA陽性の再生線維が検出された。P10における嗅結節レベル1(嗅結節吻側端), レベル2(結節吻側1/3), レベル3(嗅結節尾側1/3), レベル4(嗅結節尾側端)でのBDA陽性部位の面積(嗅結節レベル1~4の合計)および密度(嗅結

節レベル1～4の平均)は、それぞれ、LOT切断側(左側)では $1.91 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および0.13、非切断側(右側)では $8.66 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および0.34であった。P12におけるBDA陽性部位の面積(嗅結節レベル1～4の合計)および密度(嗅結節レベル1～4の平均)は、それぞれ、LOT切断側(左側)では $4.34 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および0.21、非切断側(右側)では $11.05 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および0.35であった。

以上により、LOTを切断された新生児ラットの嗅覚は、切断後10日で回復することが明らかとなった。

また、LOTを切断された新生児ラットの嗅覚機能回復には、嗅結節レベルにおいて、面積では正常の約40%、密度では正常の約60%の再生線維が必要であることが明らかとなった。LOT切断後の再生に関して、機能が回復する正確な時期の確定および機能回復に必要な再生線維量の客観的評価がなされており、生物学的にも臨床医学的にも意義があるものと考えられ、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-dependent PPAR α activation induces hepatic sulfatide accumulation in transgenic mice carrying the hepatitis C virus core gene (HCV コア遺伝子トランスジェニックマウスにおけるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α 型の加齢依存的活性化は肝臓におけるスルファチド蓄積を誘発する)

田 洋 洋

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】スフィンゴ糖脂質の一種であるスルファチドは、癌組織に発現し細胞増殖や遠隔転移を促進することが報告されている。従って、スルファチド代謝に関する研究は癌の予防や治療に関する有益な情報をもたらす可能性がある。ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α 型(PPAR α)は、脂肪酸代謝や発癌に関わる核内受容体である。PPAR α の活性化は、スルファチド合成酵素の発現を誘導し、組織中のスルファチド含有量を増加させることを我々は報告した。また、HCV コア遺伝子トランスジェニック(HCVcpTg)マウスは、HCVによる肝癌発症機序を研究する有益な動物モデルである。我々は本マウスにおいて、PPAR α が加齢依存的に活性化し肝癌を発症させることを見出したが、この発癌過程におけるスルファチドの関与は不明であった。本研究では、この点を明らかにするために、HCVcpTgマウスの肝組織を用いて、PPAR α 活性化およびスルファチド代謝の加齢依存的変化を検討した。

【材料および方法】HCVcpTgおよび野生型オスマウス(C57BL/6)を各々3および16月齢で解析した。16月齢のHCVcpTgマウスでは約30%の個体が肝癌を発症したため、肝癌発症個体から採取した癌部を肝癌サンプル、肝癌非発症個体から採取した肝組織を非腫瘍肝サンプルとした。また、一部の16月齢HCVcpTgマウスに対して、PPAR α 拮抗薬であるMK886を解剖日の一週間前から1 mg/kg/dayで腹腔内に反

復投与した。肝組織中のスルファチドは、有機溶媒で抽出し、リゾスルファチドに変換後、質量分析法(MALDI-TOF MS法)で定量した。また、肝組織中のmRNAおよび蛋白発現量をreal-time PCR法およびImmunoblot法で測定した。加えて、PPAR α の特異的応答領域に対する結合能をELISA法で測定し、PPAR α の転写活性を評価した。

【結果】HCVcpTgマウスの肝組織では、スルファチド含有量は加齢依存的に増加し、肝癌サンプルではさらに増加した。また、スルファチド合成系酵素(SPT, CST)および運搬蛋白(GLTP)の発現量は加齢依存的に増加し、その中でもCST発現は肝癌サンプルで顕著な増加を認めた。加えて、PPAR α の発現量と転写活性の加齢依存的亢進が認められ、肝癌サンプルではさらなる増加が見出された。これらの変化は野生型マウスでは認められず、MK886投与により消失した。一方、酸化ストレス産生酵素群(Aox, Cyp4A, Nox2)および消去酵素(Cat)の発現量と酸化ストレスマーカーであるMDAの含有量は加齢依存的に増加したが、肝癌サンプル・非腫瘍肝サンプルの間では統計的有意差が検出されなかった。

【結論】HCV コア蛋白により誘導されるPPAR α 活性化はスルファチド合成を促進し、スルファチド蓄積をもたらすことが示唆された。肝癌サンプルでPPAR α 活性化とスルファチド蓄積が共に促進したことから、PPAR α 活性化を介した肝内スルファチド蓄積が肝癌発症機序に寄与した可能性が示唆された。本研究から、

HCV 関連肝癌の発症予防において、肝組織における PPAR α 機能およびスルファチド含量の制御が有用である可能性が示唆された。また、過去の研究において、酸化ストレスの増加はスルファチド合成を抑制することが明らかにされている。本研究から、PPAR α の活性化は酸化ストレスの増加よりスルファチド代謝制御に強く影響することが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

スフィンゴ糖脂質の一種であるスルファチドは、癌組織に発現し細胞増殖や遠隔転移を促進することが報告されている。ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α 型 (PPAR α) は、脂肪酸代謝や発癌に関わる核内受容体である。我々は、PPAR α の活性化がスルファチド合成酵素の発現を誘導し、組織中のスルファチド含有量を増加させることを報告した。一方、我々は、HCV コア遺伝子トランスジェニック (HCVcpTg) マウスの肝臓において、PPAR α が加齢依存的に活性化し肝癌を発症させることを見出したが、この発癌過程におけるスルファチドの関与は不明であった。本研究では、HCVcpTg マウスの肝組織を用いて、PPAR α 活性化およびスルファチド代謝の加齢依存的変化を検討した。

HCVcpTg および野生型オスマウス (C57BL/6) を各々 3 および 16 月齢で解析した。16 月齢の HCVcpTg マウスでは約 30 % の個体が肝癌を発症したため、肝癌発症個体から採取した癌部を肝癌サンプル、肝癌非発症個体から採取した肝組織を非腫瘍肝サンプルとした。また、一部の 16 月齢 HCVcpTg マウスに対して、PPAR α 拮抗薬である MK886 を解剖日の一週間前から 1 mg/kg/day で腹腔内に反復投与した。肝組織中のスルファチドは、有機溶媒で抽出し、リゾスルファ

チドに変換後、質量分析法 (MALDI-TOF MS 法) により定量した。また、肝組織中の mRNA および蛋白発現量を real-time PCR 法および Immunoblot 法で測定した。また、PPAR α の特異的応答領域に対する結合能を ELISA 法で測定し、PPAR α の転写活性を評価した。

その結果、田 洋洋は次の結論を得た。

1. HCVcpTg マウスの肝組織では、スルファチド含有量は加齢依存的に増加し、肝癌サンプルではさらに増加した。
2. HCVcpTg マウスの肝組織では、スルファチド合成系酵素 (SPT, CST) および運搬蛋白 (GLTP) の発現量は加齢依存的に増加し、CST 発現は肝癌サンプルで顕著な増加を認めた。
3. HCVcpTg マウスの肝組織では、PPAR α の発現量と転写活性の加齢依存的亢進が認められ、肝癌サンプルではさらなる増加が見出された。
4. 上記 1-3 の変化は野生型マウスでは認められず、MK886 投与により消失した。

これらの結果より、HCV コア蛋白により誘導される PPAR α 活性化はスルファチド合成を促進し、スルファチド蓄積をもたらすことが示唆された。肝癌サンプルで PPAR α 活性化とスルファチド蓄積が共に促進したことから、PPAR α 活性化を介した肝内スルファチド蓄積が肝癌発症機序に寄与した可能性が示唆された。本研究から、HCV 関連肝癌の発症予防において、肝組織における PPAR α 機能およびスルファチド含量の制御が有用である可能性が示唆された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

ABCB1 and ABCC11 confer resistance to eribulin in breast cancer cell lines (ABCB1, ABCC11は乳癌細胞のエリブリン耐性に関与する)

大 場 崇 旦

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 エリブリンは再発乳癌の key drug の 1 つであるが、その耐性機構の知見は乏しい。エリブリン耐性機構を解明するために、我々はエリブリン耐性乳癌細胞株を作成し、耐性に関与する遺伝子の同定を試みてきたが、ABC トランスポーターの ABCB1 と ABCC11 が候補遺伝子として同定された。ABC トランスポーターは薬剤排泄に働き、抗癌剤耐性に関与

していることが知られており、今回、ABCB1 と ABCC11 が乳癌細胞のエリブリン耐性に関与しているか否かについて、エリブリン耐性乳癌細胞株を作成し、検討した。

【方法】 エストロゲン受容体 (ER) 陽性/上皮細胞増殖因子受容体 2 型 (HER2) 陰性乳癌細胞株 MCF7, ZR75-1, ER 陽性/HER2 陽性細胞株 BT474, ER 陰性/HER2 陽性細胞株 SKBR3, ER 陰性/HER2 陰性細胞

株 MDA-MB-231, Hs578T, MDA-MB-157の7つの乳癌細胞株でエリブリン耐性株 (MCF7/E, BT474/E, ZR75-1/E, SKBR3/E, MDA-MB-231/E, Hs578T/E, MDA-MB-157/E) を樹立し, これらの細胞の ABCB1, ABCC11発現を RT-PCR およびウエスタンブロットにて解析し, さらに siRNA で発現を抑制した際のエリブリン感受性回復の有無, および HEK293T 細胞に強制発現させた際のエリブリン感受性の変化, さらに乳癌に対する key drug 3 剤 (エピルビシン, パクリタキセル, フルオロウラシル) に対する感受性変化の有無を WST assay にて解析した。

【結果】 マイクロアレイ解析で MCF7/E では親株と比べ, ABCB1 と ABCC11 の mRNA 発現が 56.1 倍, 17.9 倍上昇していた。そこで, 樹立した 7 つのエリブリン耐性乳癌細胞株で, RT-PCR でこれらの mRNA 発現を解析したところ, その程度は異なるものの 7 細胞株全てで ABCB1 と ABCC11 発現の上昇を認めた。ウエスタンブロット法でのタンパク発現解析でも, 7 つのエリブリン耐性株全てで ABCB1, ABCC11 の発現増加を認めた。MCF7/E, BT474/E, MDA-MB-231/E で siRNA により ABCB1, ABCC11 発現をそれぞれ抑制すると, エリブリン感受性の部分的な回復が認められた。また, HEK293T 細胞にプラスミドベクターを用いて ABCB1, ABCC11 をそれぞれ強制発現させるとエリブリン耐性が誘導された。これらの結果から, ABCB1 と ABCC11 がエリブリン耐性に関与していると考えられた。HEK293T 細胞に ABCB1, ABCC11 をそれぞれ強制発現させると, エピルビシン, パクリタキセル, フルオロウラシルに対する感受性も低下していたが, MCF7/E と MDA-MB-231/E においてもこれらの薬剤に対する交差耐性が認められた。これらの細胞で, ABCB1 を抑制するとエピルビシン, パクリタキセルの, ABCC11 の抑制によりフルオロウラシルの感受性が回復したことから, エピルビシン, パクリタキセルとの交差耐性には ABCB1 が, フルオロウラシルとの交差耐性には ABCC11 が関与していると考えられた。

【考察】 ABCB1 と ABCC11 は乳癌の subtype によらずエリブリン耐性に関与しており, ABCB1 や ABCC11 がエリブリンの効果予測に有用な指標となり, これらを抑制することで, エリブリンの感受性を増強できる可能性が示唆される。

(論文審査の結果の要旨)

エリブリンは再発乳癌の key drug の 1 つであるが,

その耐性機構の知見は乏しい。エリブリン耐性機構を解明するために, 我々はエリブリン耐性乳癌細胞株を作成し, 耐性に関与する遺伝子の同定を試みてきたが, ABC トランスポーターの ABCB1 と ABCC11 が候補遺伝子として同定された。ABC トランスポーターは薬剤排泄に働き, 抗癌剤耐性に関与していることが知られており, 今回, ABCB1 と ABCC11 が乳癌細胞のエリブリン耐性に関与しているか否かについて, エリブリン耐性乳癌細胞株を作成し, 検討した。

エストロゲン受容体 (ER) 陽性/上皮細胞増殖因子受容体 2 型 (HER2) 陰性乳癌細胞株 MCF7, ZR75-1, ER 陽性 /HER2 陽性細胞株 BT474, ER 陰性 /HER2 陽性細胞株 SKBR3, ER 陰性 /HER2 陰性細胞株 MDA-MB-231, Hs578T, MDA-MB-157 の 7 つの乳癌細胞株でエリブリン耐性株 (MCF7/E, BT474/E, ZR75-1/E, SKBR3/E, MDA-MB-231/E, Hs578T/E, MDA-MB-157/E) を樹立し, これらの細胞の ABCB1, ABCC11 発現を RT-PCR およびウエスタンブロットにて解析し, さらに siRNA で発現を抑制した際のエリブリン感受性回復の有無, および HEK293T 細胞に強制発現させた際のエリブリン感受性の変化, さらに乳癌に対する key drug 3 剤 (エピルビシン, パクリタキセル, フルオロウラシル) に対する感受性変化の有無を WST assay にて解析した。

その結果, 大場は次の結論を得た。

1. 樹立した 7 つのエリブリン耐性乳癌細胞株で, RT-PCR でこれらの mRNA 発現を解析したところ, その程度は異なるものの 7 細胞株全てで ABCB1 と ABCC11 発現の上昇を認めた。ウエスタンブロット法でのタンパク発現解析でも, 7 つのエリブリン耐性株全てで ABCB1, ABCC11 の発現増加を認めた。
2. MCF7/E, BT474/E, MDA-MB-231/E で siRNA により ABCB1, ABCC11 発現をそれぞれ抑制すると, エリブリン感受性の部分的な回復が認められた。
3. HEK293T 細胞にプラスミドベクターを用いて ABCB1, ABCC11 をそれぞれ強制発現させるとエリブリン耐性が誘導された。
4. HEK293T 細胞に ABCB1 を強制発現させると, エピルビシン, パクリタキセルの ABCC11 を強制発現させるとフルオロウラシルの感受性も低下し, MCF7/E と MDA-MB-231/E においてもこれらの薬剤に対する交差耐性が認められた。
5. MCF7/E と MDA-MB-231/E において ABCB1

を抑制するとエピルピシン、パクリタキセルの、ABCC11の抑制によりフルオロウラシルの感受性が回復した。

これらの結果より、ABCB1とABCC11は乳癌のsubtypeによらずエリブリン耐性に関与しており、エリブリン耐性乳癌細胞株におけるエピルピシン、パクリタキセルとの交差耐性にはABCB1が、フルオロウ

ラシルとの交差耐性にはABCC11が関与していると考えられた。ABCB1やABCC11がエリブリンの効果予測に有用な指標となり、これらを抑制することで、エリブリンの感受性を増強できる可能性が示唆される結果と考えられた。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。

Aberrant methylation of protocadherin 17 and its prognostic value in pediatric acute lymphoblastic leukemia. (小児急性リンパ性白血病におけるプロトカドヘリン17遺伝子の異常メチル化と予後因子としての有用性の検討)

Le Thanh Nha Uyen

(論文の内容の要旨)

【Background】 The cure rate of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) has improved over the past four decades. However, the prognosis of approximately 20 % of patients with ALL remains poor because of disease recurrence. In recent years, many studies have attempted to identify new clinical biomarkers that can predict high-risk patients and serve as targets for novel therapeutic interventions using gene-expression microarrays, DNA-methylation arrays, and next-generation sequencing. DNA methylation and histone modifications are two major epigenetic mechanisms regulating gene expression. Hypermethylation of CpG islands in the promoter region of tumor suppressor genes that results in transcriptional silencing plays an important role in lymphoid-lineage leukemogenesis and may be an important contributor toward relapse. In addition, DNA methylation profiling is useful for subtype classification of newly diagnosed ALL patients and prediction of outcome and relapse risk. This study was aimed at examination of the methylation status of cadherin superfamily genes and its prognostic value for ALL relapse.

【Patient and methods】 Bone marrow (BM) cells were aspirated from 40 children with B-cell precursor (BCP) ALL diagnosed between 1995 and 2008 at Shinshu University. Six ALL cell lines were used. Peripheral blood (PB) mononuclear cells (MNCs) from healthy adult volunteers and BM MNCs from ALL patients at complete remission (CR) were used

as controls. We used Infinium Methylation 450K Array to assess the genome-wide DNA methylation status. Methylation status of each individual gene was then determined by combine bisulfite restriction analysis (COBRA) and genome bisulfite sequencing. mRNA expression was evaluated by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and quantitative real-time PCR.

【Results】 Cadherin superfamily genes including *cadherin (CDH)1*, *protocadherin (PCDH)8*, and *PCDH17* were selected for analyzing methylation status. In 40 B-cell precursor (BCP) ALL samples at onset, the methylation frequencies of *CDH1*, *PCDH8*, and *PCDH17* were 62.5 %, 55 %, and 30 %, respectively. *CDH1* and *PCDH8* methylation was observed in all leukemic cell lines whereas *PCDH17* methylation was detected in 4 of them. *CDH1* and *PCDH8* methylation was also detected in 80 % and 20 % of control BM samples, respectively. On the contrary, *PCDH17* was unmethylated in all control BM samples. The correlation between methylation status and event-free survival (EFS) or overall survival (OS) was evaluated. *PCDH17* methylation-positive group was profoundly inferior to that of *PCDH17* methylation-negative group : 33 % (95 % CI, 10-59) vs. 75 % (95 % CI, 55-87); $P=0.005$. A significant difference in the OS was also found between the two groups : 50 % (95 % CI, 21-73) vs. 82 % (95 % CI, 62-92); $P=0.016$. Conversely, there were no substantial correlations between neither the methylation status of *CDH1* and EFS or OS, nor the methylation status of *PCDH8* and

EFS or OS. By multivariate analyses, only *PCDH17* methylation was associated with increased risk for relapse and mortality in patients with BCP ALL [HR, 5.23; $P=0.016$ for relapse and HR, 8.22; $P=0.016$ for mortality]. *CDH1* and *PCDH8* methylation did not influence ALL outcomes.

【Conclusion】 *PCDH17* methylation at onset was closely related to poor prognosis, and thus it could be used as a new biomarker to predict relapse in BCP ALL.

(論文審査の結果の要旨)

The cure rate of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) has improved over the past four decades. However, the prognosis of approximately 20 % of patients with ALL remains poor because of disease recurrence. In recent years, many studies have attempted to identify new clinical biomarkers that can predict high-risk patients and serve as targets for novel therapeutic interventions using gene-expression microarrays, DNA-methylation arrays, and next-generation sequencing. DNA methylation and histone modifications are two major epigenetic mechanisms regulating gene expression. Hypermethylation of CpG islands in the promoter region of tumor suppressor genes that results in transcriptional silencing plays an important role in lymphoid-lineage leukemogenesis and may be an important contributor toward relapse. In addition, DNA methylation profiling is useful for subtype classification of newly diagnosed ALL patients and prediction of outcome and relapse risk.

In this study, we present the results as follows:

1. According to genome wide methylation of analysis of a patient with relapsed B-cell precursor ALL, cadherin superfamily genes were hypermethylated at relapse, showing the genes as the top candidate genes with aberrant methylation at relapse.
2. Methylation status of cadherin superfamily genes in B-cell precursor ALL: *Cadherin (CDH)1* and *protocadherin (PCDH)8* methylation was observed in all 6 leukemic cell lines, whereas *PCDH17* methylation was detected in 4 of them. In 40 B-cell precursor (BCP) ALL samples at onset, the

methylation frequencies of *CDH1*, *PCDH8*, and *PCDH17* were 62.5 %, 55 %, and 30 %, respectively. However, *CDH1* and *PCDH8* methylation was also detected in 80 % and 20 % of control BM samples, respectively. On the contrary, *PCDH17* was unmethylated in all control BM samples.

3. The relationship between methylation status of cadherin superfamily genes at diagnosis and clinical characteristics of patients with B-cell precursor ALL: Event-free survival (EFS) of *PCDH17* methylation-positive group was profoundly inferior to that of *PCDH17* methylation-negative group: 33 % (95 % CI, 10-59) vs. 75 % (95 % CI, 55-87); $P=0.005$. A significant difference in the overall survival (OS) was also found between the two groups: 50 % (95 % CI, 21-73) vs. 82 % (95 % CI, 62-92); $P=0.016$. Conversely, there were no substantial correlations between the methylation status of *CDH1* and EFS or OS, and between the methylation status of *PCDH8* and EFS or OS. By univariate and multivariate analyses, only *PCDH17* methylation was associated with increased risk for relapse and mortality in patients with BCP ALL [HR, 5.23; $P=0.016$ for relapse and HR, 8.22; $P=0.016$ for mortality]. However, *CDH1* and *PCDH8* methylation did not influence ALL outcomes.

4. There was no correlation between *PCDH17* methylation and mRNA expression levels in ALL samples and cell lines.

【Conclusion】 *PCDH17* methylation at onset was closely related to poor prognosis, and thus it could be used as a new biomarker to predict relapse in BCP ALL.

以上の内容により、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。

Association Between Immunoglobulin G4-related Disease and Malignancy within 12 years after Diagnosis: An Analysis after Longterm Followup (IgG4関連疾患診断12年以内における悪性腫瘍発生との関連性: 長期経過での解析)

浅野 純平

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 IgG4関連疾患は血清 IgG4高値と罹患臓器組織における IgG4形質細胞浸潤が特徴的な全身疾患である。IgG4関連疾患の概念は自己免疫性膵炎に併発した膵外病変の検索の過程で確立され、その構成疾患は自己免疫性膵炎をはじめ、ミクリッツ病、呼吸器病変、硬化性胆管炎、後腹膜線維症、間質性腎炎、前立腺炎と多岐に渡る。近年、IgG4関連疾患における悪性腫瘍発症との関連性が論議となっている。Yamamoto らは105名の IgG4関連疾患患者が一般人口と比べ悪性腫瘍を有意に多く発症することを示した。また、Shiokawa らは108名の自己免疫性膵炎を対象に同様の結果を得た。一方、Hirano らは113名の IgG4関連疾患患者を対象に一般人口と比べ有意に多く悪性腫瘍を発症しないことを示した。従って、IgG4関連疾患と悪性腫瘍の関連については結論が出ていない。以上を踏まえ、本研究では IgG4関連疾患患者に悪性腫瘍が有意に多く発症するかどうかを検討した。

【材料及び方法】 当院で1992年から2012年の期間に IgG4関連疾患と診断された158名(男性119名, 女性39名, 年齢中央値72歳)を対象とし、診断時から2013年12月までの期間に悪性腫瘍を合併したかどうかを検索し、悪性腫瘍における標準化罹患比を算出した。IgG4関連疾患と悪性腫瘍の同時診断例は選択バイアスが影響するため、同時診断例を除外した場合の標準化罹患比も算出した。悪性腫瘍を発症した臓器を明らかにし、各種臓器毎における標準化罹患比を算出した。以上までの検討を自己免疫性膵炎においてサブグループ解析を行った。発症年齢、性別、血清活動性マーカー値等を悪性腫瘍発症群と非発症群において比較し、悪性腫瘍合併の危険因子を検索した。カプランマイヤー曲線を用い、IgG4関連疾患患者と日本の一般人口における悪性腫瘍累積罹患率を算出し、悪性腫瘍がどの経過の時点で有意に多く発症するかを検討した。

【結果】 平均フォローアップ期間 5.95 ± 4.48 年において IgG4関連疾患158名のうち、34名(21.5%)に36個の悪性腫瘍発生がみられた。発生臓器の内訳は肺・大腸・前立腺が5例であり、胃・膵が4例であった。

全体での標準化罹患比は2.01(95%信頼区間: 1.34-2.69)となり、IgG4関連疾患は悪性腫瘍合併と有意に関連していた。IgG4関連疾患と悪性腫瘍を同時に診断された症例であった7例を除外した場合の解析でも標準化罹患比は1.60(95%信頼区間: 1.07-2.13)と有意な結果が得られた。自己免疫性膵炎におけるサブグループ解析では膵癌発症における標準化罹患比が有意ではないものの6.81(95%信頼区間: 0.13-13.5)と他臓器癌と比べ高値を示した。悪性腫瘍発症累積率について日本の一般人口とカプランマイヤー曲線を用いて比較すると IgG4関連疾患は診断12年以内に有意に悪性腫瘍を発症し得るとの結果が得られた。悪性腫瘍発症群は非発症群と比べ診断時において血清活動性マーカーである IgG4, 可溶性 IL-2受容体, 免疫複合体が有意に高値であった。

【結論】 本研究では IgG4関連疾患は一般人口と比べ悪性腫瘍を有意に多く発症することを示した。また悪性腫瘍の発症は IgG4関連疾患診断12年以内において有意に多かった。自己免疫性膵炎においては膵癌が多く発症する可能性が示唆された。IgG4関連疾患の活動性が悪性腫瘍発症と強く関連していると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

IgG4関連疾患は様々な臓器に腫大や肥厚などの炎症性変化を来す慢性炎症性疾患と考えられる。慢性炎症と発癌の関連は以前より指摘されているが IgG4関連疾患と発癌の関連に関しては一定のコンセンサスが得られていない。したがって今回、IgG4関連疾患が一般人口と比べて悪性腫瘍を有意に多く合併するかを検討した。

対象は IgG4関連疾患158名であり年齢中央値は72歳、フォローアップ期間中央値は5年であった。IgG4関連疾患の悪性腫瘍発症における標準化罹患比を算出した。IgG4関連疾患診断3カ月以内に悪性腫瘍と診断された症例を同時診断例と定義し同症例を除外した場合の標準化罹患比も算出した。カプランマイヤー曲線を用い IgG4関連疾患と一般人口の悪性腫瘍累積罹患率を比較した。悪性腫瘍発症に関連するリスク因子を抽出するために各種パラメーターを悪性腫瘍発症群と

非発症群で比較検討した。自己免疫性膵炎は IgG4 関連疾患における膵病変と位置づけられており、自己免疫性膵炎に限定してのサブグループ解析を行った。

その結果、浅野は次の結論を得た。

1. IgG4 関連疾患の悪性腫瘍における標準化罹患比は 2.01 (95 % 信頼区間: 1.34-2.69) であり一般人口と比べ有意に多く悪性腫瘍を発症した。
2. 同時診断例を除外した場合でも標準化罹患比は 1.60 (95 % 信頼区間: 1.07-2.13) となり一般人口と比べ有意に多く悪性腫瘍を発症した。
3. カプランマイヤー曲線を用いた累積悪性腫瘍発症率での比較検討では IgG4 関連疾患は診断 12 年以内で一般人口と比べ有意に多く悪性腫瘍を発症した。

4. 悪性腫瘍の発症例においては血清 IgG4, 免疫複合体, 可溶性 IL-2 レセプターといった疾患活動性マーカーが診断時に高値であった。

5. 自己免疫性膵炎においては有意ではないものの膵癌における標準化罹患比が 6.81 と高値であった。

これらの結果より、IgG4 関連疾患は悪性腫瘍発症の危険群であると考えられた。診断から 12 年以内に診断時の活動性マーカーが高値である症例については悪性腫瘍発症をより警戒すべきである。自己免疫性膵炎の膵癌リスクに関しては関連の可能性はあるが、より大規模な検討が必要である。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られた。

High expression of ADAM10 predicts a poor prognosis for patients with glioblastoma (ADAM10 高発現は膠芽腫予後不良因子となる)

金 谷 康 平

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 膠芽腫は手術や放射線療法などを行っても再発を起しやすく、予後の悪い腫瘍である。A disintegrin and metalloprotease (ADAM) は膜貫通蛋白質を切断して細胞外に ectodomain を遊離するプロテアーゼの一種であり、中でも ADAM10 は Notch1 シグナルを活性化させる働きがある。Notch1 は胎生発達や癌、血管新生に関与している。また Notch1 は glioma 細胞の遊走や浸潤に関わっており、glioma との関連があるという報告がある。ADAM10 は Notch1 のみだけでなく、cadherin や L1 の活性にも関わっている多機能分子であり、培養細胞実験では ADAM10 を抑制すると glioma 腫瘍形成が阻害される。ADAM10 発現は他の癌腫において腫瘍浸潤や予後との関連が見られるという臨床報告があるが、膠芽腫での報告は少ない。本研究では、膠芽腫における ADAM10 の役割を解明するため、膠芽腫の病理検体を用いて ADAM10 の発現と予後との相関、また ADAM10 の発現と Notch1 発現との相関について検討を行った。

【症例と方法】 1989 年から 2012 年まで信州大学医学部附属病院で治療を行った膠芽腫の連続 50 症例を対象とした。膠芽腫はすべて IDH1 wild-type であることを免疫組織化学的に確認した。なお正常脳を対照とした。ADAM10 と Notch1 発現を免疫染色で検討し、発現の割合と強度で高発現か低発現の 2 群にそれぞれに分けた。発現割合は 0 : 発現なし, 1 : 33 % 未満の発現,

2 : 34-66 % の発現, 3 : 67 % 以上の発現とし、発現強度は 0 : 発現なし, 1 : 弱陽性, 2 : 中等度陽性, 3 : 強陽性とした。発現割合と発現強度をかけた値が 6 以上のものを高発現, 6 未満のものを低発現と定義した。

【結果】 膠芽腫 50 症例の中で ADAM10 高発現は 11 例に見られ, 39 例は ADAM10 低発現であった。ADAM10 高発現例では ADAM10 は腫瘍細胞質と核に発現が見られ, また腫瘍血管内皮にも弱い発現が見られた。なお正常脳では ADAM10 発現は見られなかった。Notch1 高発現は 12 例で, 38 例は Notch1 低発現であった。Notch1 高発現例では Notch1 は主に腫瘍細胞質に発現が見られた。Notch1 は正常脳において neuron の細胞質にわずかに発現が見られた。

ADAM10 発現を年齢, 性別, 術前 KPS, 腫瘍サイズ, Notch1 発現でそれぞれ検討を行うと, ADAM10 発現は Notch1 発現においてのみ有意な関連が見られた (Fisher 正確検定, $p=0.002$)。

ADAM10 発現と全生存期間を Kaplan-Meier 法で検討すると, 全生存期間は ADAM10 高発現で 478 日, 低発現で 633 日と ADAM10 高発現の方が有意に予後が悪いことがわかった (Log-rank test, $p=0.033$)。次に手術摘出率で全摘出または亜全摘出された膠芽腫 26 例について検討すると, 全生存期間は ADAM10 高発現で 319 日, 低発現で 725 日と ADAM10 高発現群において有意に予後不良であることがわかった (Log-

rank test, $p=0.006$).

また年齢, 術前 KPS, 手術摘出, ADAM10発現, Notch1発現において単変量解析, 多変量解析を行うと, ADAM10低発現はいずれの解析でも有意差を持って全生存期間の危険率を下げる事がわかった。

【結論】本研究では ADAM10は膠芽腫において22 %が高発現, Notch1は24 %が高発現を呈し, ADAM10と Notch1の有意な関連が見られた。また膠芽腫において ADAM10の高発現は予後悪化因子であり, 正常脳に ADAM10発現が無いことから, ADAM10を阻害することによる膠芽腫治療の可能性があると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10は Notch1シグナルを活性化させる働きがある。Notch1は胎生発達や癌, 血管新生に関与していると言われていいる。ADAM10の発現は他の癌腫において, 腫瘍の浸潤や予後と関連があるという臨床報告があるが, 膠芽腫での報告は少ないため, 膠芽腫の病理検体を用いて ADAM10の発現と予後との相関並びに ADAM10の発現と Notch1発現との相関について検討した。

1989年から2012年まで信州大学医学部附属病院で治療を行った IDH1 wild-type 膠芽腫連続50症例を対象とし, ADAM10と Notch1発現を免疫染色で発現割合と強度の評価を行った。正常脳を正常対照とした。発現割合は 0 : 発現なし, 1 : 33 %未満の発現, 2 : 34-66 %の発現, 3 : 67 %以上の発現とし, 発現強度は 0 : 発現なし, 1 : 弱陽性, 2 : 中等度陽性, 3 :

強陽性とした。発現割合と発現強度をかけた値が6以上のものを高発現, 6未満のものを低発現と定義した。

その結果, 金谷は次の結論を得た。

1. ADAM10は腫瘍細胞質と核, 腫瘍血管内皮に発現が見られた。ADAM10高発現は11例に見られ, 39例は ADAM10低発現であった。正常脳では ADAM10発現は見られなかった。Notch1は主に腫瘍細胞質に発現が見られ, Notch1高発現は12例で, 38例は Notch1低発現であった。Notch1は正常脳において neuronの細胞質にわずかに発現が見られた。
2. ADAM10発現は Notch1発現と有意な相関が得られた。
3. 全生存期間は ADAM10高発現群の方が有意に予後が悪かった。次に手術摘出率で全摘出または亜全摘出された膠芽腫26例について検討すると, ADAM10高発現群は低発現群よりも有意に予後不良であった。
4. 年齢, 術前 KPS, 手術摘出, ADAM10発現, Notch1発現において単変量解析, 多変量解析を行うと, ADAM10低発現はいずれの解析でも有意差を持って全生存期間の危険率を下げる事がわかった。

これらの結果より ADAM10は膠芽腫において Notch1シグナル伝達に関与しており, また ADAM10高発現は膠芽腫の予後悪化因子となり得ることが結論づけられた。

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。

Relationship between the quantity of oral *Candida* and immunological vigor (口腔カンジダ菌数と免疫力との関連性)

林 清 永

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】口腔内のカンジダ菌は免疫力と密接に関連すると推察されてはいるが, 関連性を証明した報告はない。理由として, 口腔カンジダ菌の検出精度が低いことや, 全身の免疫力を数量として評価する検査法が存在していなかったことが考えられた。今回, 遠山らが報告した通常の培養法よりも高い検出率を認める培養法を用いてカンジダ菌量の測定を行い, 全身の免疫力については東京医科歯科大学難治疾患研究所内, 株式会社健康ライフサイエンスの免疫力スコア (Scoring of Immunological Vigor, 東京医科歯科大学 特

許第4608704号, 第5030109号)を用いて評価し, 口腔内のカンジダ菌量と全身の免疫力との関係を調べることとした。

【材料および方法】本研究に対し同意を得られた38名(患者として信州大学附属病院特殊歯科口腔外科外来, 相澤病院口腔病センターを受診した24名と, 14名の健康者)よりうがい液, 静脈血を採取した。カンジダ菌量の測定(濃縮法)は以下の通り行った。5 mlの滅菌生理食塩水を口腔内に含み, 30秒間含嗽後に全量を回収した。3,200 Gで20分間遠心分離, 上澄み液を廃棄し, スピッツ底部に残留した残渣に滅菌水250 μ l

を追加し再混濁した。再混濁液50 μ lをクレモアガー寒天培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養し、コロニー数をカウントした。免疫力の検査は静脈血を5ml採取し、健康ライフサイエンス社へ送付して解析を委託した。T細胞数、B細胞数、ナチュラルキラー細胞数、ナイーブT細胞数、CD8 $^{+}$ CD28 $^{+}$ T細胞数、CD4 $^{+}$ T細胞数・CD8 $^{+}$ 陽性T細胞数比、ナイーブT細胞・メモリーT細胞比の7項目の検査結果に対して1~3点の点数が付与され、合計点数(最低7点最高21点)が免疫スコアとして報告された。

【結果】血液検査においてCRP値0.30mg/dl以上であった6名を除外して検討を行った。カンジダ菌はすべての検体で検出され、1~3,480CFU(中央値6.5CFU)であった。性別によりカンジダ菌量の差は認められなかったが、年齢が高いほどカンジダ菌量が多くなっていた。口腔カンジダ症、義歯の装着、基礎疾患の有無の3項目について、有りの群が無しの群と比べカンジダ菌量が有意に多かった。免疫スコアは10~21点(中央値17点)であった。性別による差は認められなかったが、年齢が高くなるほど免疫スコアは減少した。口腔内灼熱感、口腔カンジダ症、義歯装着、基礎疾患の有無の4項目について、有りの群が無しの群と比べ免疫スコアが有意に低かった。口腔内のカンジダ菌量と免疫力の関係は負の相関を認め(相関係数 $r=0.520$, $P<0.05$)、口腔内のカンジダ菌量が増えるほど免疫力が低下することが確認された。免疫スコア算出のための各検査項目と、カンジダ菌量との関係を検討したところ、T細胞数、ナイーブT細胞数、CD8 $^{+}$ CD28 $^{+}$ T細胞数、ナイーブT細胞・メモリーT細胞比の4項目にカンジダ菌量との間に負の相関、ナチュラルキラー細胞数とカンジダ菌量との間に正の相関が認められた($P<0.05$)。

【結論】口腔内のカンジダ菌量と免疫スコアとの間に負の相関を認め、このことより口腔内のカンジダ菌量と全身の免疫力との間に関連性があることが示唆された。そのことより口腔内のカンジダ菌量の測定することにより、全身の免疫力を推察することが可能になることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

口腔内のカンジダ菌は免疫力と密接に関連すると推察されているが、関連性を証明した報告はない。口腔カンジダ菌の検出精度が低い、全身の免疫力を数量として評価する検査法が存在していなかったことが原因と考えられた。今回、遠山らが報告した高い検出率

を認める培養法を用いて口腔カンジダ菌量の測定を行い、全身の免疫力は東京医科歯科大学難治疾患研究所内、株式会社健康ライフサイエンスの免疫スコアを用いて評価し、口腔内のカンジダ菌量と全身の免疫力との関係を調べることにした。

本研究に対し同意を得られた38名(患者24名と、14名の健常者)よりうがい液、静脈血を採取した。血液検査においてCRP値0.30mg/dl以上であった6名を除外して検討を行った。カンジダ菌量の測定はうがい液にて口腔内より検体を回収、33,500rpm、20分間遠心分離を行い、スピッツ底部の残渣を再混濁してカンジダ選択培地に塗抹、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養し、培地1プレート当たりのコロニー数(CFU)を測定した。免疫スコアは静脈血を5ml採取し、健康ライフサイエンス社へ解析を委託し報告された。

その結果、林清永は次の結論を得た。

1. カンジダ菌はすべての検体で検出され、1-3,480CFU、中央値6.5CFUであった。
2. 口腔カンジダ菌量と年齢との間に正の相関を認めた(相関係数 $r=0.640$, $P<0.001$)。
3. 口腔カンジダ症、義歯装着、基礎疾患の3項目について有りの群の口腔カンジダ菌量が優位に多かった。
4. 免疫スコアは10-21点、中央値17点であった。
5. 免疫スコアと年齢との間に負の相関を認めた(相関係数 $r=-0.510$, $P<0.001$)。
6. 口腔カンジダ症、口腔内灼熱感、義歯の装着、基礎疾患の4項目について、有りの群の免疫スコアが優位に低かった。
7. 口腔カンジダ菌量と免疫スコアとの間に負の相関を認めた(相関係数 $r=-0.520$, $P<0.05$)。
8. T細胞数、ナイーブT細胞数、CD8 $^{+}$ CD28 $^{+}$ T細胞数、ナイーブT細胞・メモリーT細胞比の4項目にカンジダ菌量との間に負の相関、ナチュラルキラー細胞数とカンジダ菌量との間に正の相関が認められた。

これらの結果より、口腔カンジダ菌数と免疫スコアとの間に関連性があることが示唆され、口腔カンジダ菌数を測定することにより、免疫力を推察することが可能になることが示唆された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Importance of cystatin C and uric acid levels in the association of cardiometabolic risk factors in Japanese junior high school students (日本人中学生の心血管代謝危険因子との関連における血清シスタチンCおよび尿酸値の重要性)

原 田 美貴子

(論文の内容の要旨)

【目的】 動脈硬化の早期病変は10歳未満の小児の組織でも観察されている。将来心血管イベントを発症するリスクの高い若年者を同定することは重要である。成人ならびに小児においても腎機能低下は心血管疾患との関連が示されているが、成長期の小児において腎機能低下を早期に診断することは容易ではない。シスタチンC (CysC) は腎機能障害の早期診断に有用であり、成人では血清CysC値とメタボリックシンドロームや心血管疾患との関連が報告されている。本研究では、日本の中学生を対象として血清CysC値およびその他の心血管代謝危険因子を評価し、それぞれの関連を解析することにより若年者の疾患スクリーニングにおける有用性を検討することを目的とした。

【方法】 長野県内3地域の中学校において2012年4月～2014年4月に実施された健診データによる横断研究として、454名(男子216名, 女子238名, 12.1-15.0歳)を対象とした。身体測定・血圧測定を行い、血液検査ではCysC・尿素窒素(BUN)・クレアチニン(Cr)・尿酸(SUA)・グルコース・脂質〔中性脂肪(TG)・総コレステロール・HDLコレステロール(HDL-C)・LDLコレステロール(LDL-C)〕を測定した。単変量解析により血清CysC値と関連する因子を検討した。多変量解析では性別, 身長, BUN, グルコース, HDL-C, LDL-C, TGで調整し, 血清CysCと関連する因子を検討した。また, 血清CysC, SUAの男女別中央値(血清CysC: 男子0.93 mg/L, 女子0.78 mg/L; SUA: 男子5.8 mg/dL, 女子4.5 mg/dL)により4群(共に高値, 共に低値, いずれかが高値)に分類し, 4群間の因子の相違を一元配置分散分析により解析した。 $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】 血清CysCは女子と比較し男子で有意に高値であった(0.92 ± 0.10 vs. 0.77 ± 0.08 mg/L, $p < 0.001$)。血清Crと比較して, CysCの分布はより男女差が明確であり, ばらつきが少なかった。CysCは血清Cr(相関係数 $r = 0.47$, $p < 0.001$), SUA($r = 0.55$, $p < 0.001$)と有意な正の相関を認めた。多変量解析では, 被験者全体(標準化偏回帰係数 $\beta = 0.24$,

$p < 0.001$), 男子($\beta = 0.26$, $p < 0.001$), 女子($\beta = 0.24$, $p < 0.001$)のいずれにおいても, 血清CysCとSUAは関連した。血清CysCとSUAが共に高値をとる被験者では, 他の群と比較して, HDL-Cが最も低く, TG値が最も高値であり, TG/HDL-Cが高い傾向を認めた。特に男子においては, 血清CysC, SUAが共に高値の群では, 他の3群と比較して有意にTG/HDL-Cが高値($p = 0.010$)であった。

【考察】 日本人中学生において血清CysCは, 血清Crよりも腎機能のスクリーニングに優れた指標である可能性がある。またCysCはSUAと有意に関連した。注目すべきは, 血清CysCとSUAが共に高値をとる被験者ではTG/HDL-Cが高く, 脂質代謝異常との関連が示唆され, 中学生においても生活習慣が関連する心血管代謝危険因子が集積する傾向が示された点である。

SUAはメタボリックシンドロームや心血管疾患との関連が報告されている一方で, 成人では心血管死亡の独立した予測因子にはならないという結果も報告されており, SUAを単独でスクリーニングに用いる意義は今しばらく検討が必要である。しかしTG/HDL-Cは成人では心血管イベントや全死亡との関連, 小児ではメタボリックシンドロームや左室肥大と関連が報告されており, SUAと血清CysC双方の上昇をスクリーニングに用いることは, 将来心血管疾患発症につながる危険因子を複数有するメタボリックシンドローム予備群である小児を同定できる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

成人では, 従来の心血管危険因子に加え, 免疫や炎症を反映するバイオマーカーが無症候性動脈硬化と関係する因子として提示されている。動脈硬化の初期変化は10歳未満の小児でも観察され, 将来的に心血管イベントを起こし得る小児を早期に同定することは重要であるが, 従来の小児メタボリックシンドロームの診断基準では困難である。

血清シスタチンCは早期の腎機能障害検出に有用な低分子蛋白質であるが, 成人ではメタボリックシンドロームや心血管疾患の関連が報告されている。一方,

若年者では血清シスタチン C 値と臨床的な疾患の関連について明らかではない。

本研究は、日本の中学生において血清シスタチン C 値を測定し、若年者の疾患スクリーニングにおける臨床的有用性を評価した。

その結果以下の成績を得た。

1. 長野県の3地域の中学生454名(男子216名, 女子238名, 12.1-15.0歳)を対象とし, 2012年4月~2014年4月に横断研究を実施した。身体計測を行い, 通常の学校健診の検査項目に加えて血清シスタチン C を含むその他心血管代謝因子を測定した。
2. 血清シスタチン C は血清クレアチニンや eGFR と比較して性差が明確であり, 男子で有意に高値であった(男子 0.92 ± 0.10 mg/L, 女子 0.77 ± 0.08 mg/L, $p < 0.001$)。
3. 血清シスタチン C 値は尿酸値と有意に正の相関

(全体 $r = 0.55$, 男子 $r = 0.33$, 女子 $r = 0.26$, いずれも $p < 0.001$) を示し, 多変量解析においても, 被験者全体 ($\beta = 0.24$, $p < 0.001$), 男女とも (男子 $\beta = 0.26$, 女子 $\beta = 0.24$, いずれも $p < 0.001$) に関連性が示された。

4. 血清シスタチン C, 尿酸値ともに高値の群では, TG/HDL-C 比は高値であった。特にその傾向は男子で強かった。成人において TG/HDL-C 比は心血管イベントや全死亡と関連すると言われている。

本研究では, 中学生でも心血管危険因子の重複がある可能性が示された。血清シスタチン C と尿酸値がともに高値であることが潜在的な脂質異常を示し, 将来的に心血管疾患を発症しうるハイリスクな若年者を識別するマーカーとなる可能性があることが示唆され, 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 postural change from supine to head-up tilt on the skin sympathetic nerve activity component synchronised with the cardiac cycle in warmed men. (ヒト暑熱負荷における30°ヘッドアップティルトが皮膚交感神経活動・心周期同期成分に与える影響)

小 川 雄

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 高体温を負荷したヒトを臥位から立位に姿勢変換を行うと, 血圧維持のために圧受容器の脱伸展により皮膚血管拡張反応が抑制されることが報告されている。もし, この圧反射が正常に働かなくなると, 熱失神が起こる危険がある。しかし, その遠心路である交感神経活動の電気信号の同定が, まだ行われていなかった。

【方法】 この電気信号を同定するために, まず, 22-42歳の健康男性被験者 ($n = 12$) に環流スーツで全身を覆い, 34℃の水を流しながら, 正常体温において, 臥位から30°ヘッドアップティルト (HUT) の姿勢変換を行い, その際の, 食道温を熱電対法で ($n = 12$), 右心房容量 (RAV) を超音波ドップラー法で ($n = 6$), 皮膚血管コンダクタンス (CVC_{chest}) をレーザドップラー法で ($n = 12$), 皮膚交感神経活動 (SSNA) と筋交感神経活動 (MSNA) を腓骨神経から微小針電極法で ($n = 6$), それぞれ測定した。次に47℃の水を環流スーツに流して食道温をベースラインから ~ 0.7 ℃上昇させた後に同様の測定を行った。

【結果】 暑熱負荷により食道温が上昇し ($P < 0.0001$), それに伴い CVC_{chest} ($P < 0.0001$) と Total SSNA (P

< 0.005) も上昇した。しかし, 高体温時において, HUTを行うと RAV が低下し ($P < 0.008$), 高体温によって上昇した CVC_{chest} が低下した ($P < 0.019$) が, Total SSNA に変化を認めなかった ($P > 0.26$)。それに対して, SSNA の心周期同期成分は食道温の上昇に伴って上昇した ($P < 0.015$) が, 高体温時の HUT で減弱した ($P < 0.017$)。さらに, 暑熱負荷前後の姿勢変換時 SSNA の心周期同期成分と CVC_{chest} を全被験者でプールすると, それらの間に高い相関関係が認められた ($r = 0.817$, $P < 0.0001$)。一方, MSNA の心周期同期成分と CVC_{chest} との間には有意な相関を認めなかった ($r = 0.359$, $P = 0.085$)。

【結論】 以上のことから SSNA の心周期同期成分は, 高体温時の皮膚血管を能動的に拡張させる神経であり, 姿勢変換時に, その活動が心肺圧受容器を介して反射的に抑制され, 血圧維持に働いていることが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

高体温を負荷したヒトを臥位から立位に姿勢変換を行うと, 血圧維持のために圧受容器の脱伸展により皮膚血管拡張反応が抑制されることが報告されている。もし, この圧反射が正常に働かなくなると, 熱失神が

起こる危険がある。しかし、その遠心路である交感神経活動の電気信号がまだ同定されていなかった。

この電気信号を同定するために、まず、22-42歳の健康男性被験者 (n=12) に環流スーツで全身を覆い、34℃の水を流しながら、正常体温において、臥位から30°ヘッドアップティルト (HUT) の姿勢変換を行い、その際の、食道温を熱電対法で (n=12)、右心房容量 (RAV) を超音波ドップラー法で (n=6)、皮膚血管コンダクタンス (CVC_{chest}) をレーザドップラー法で (n=12)、皮膚交感神経活動 (SSNA) と筋交感神経活動 (MSNA) を腓骨神経から微小針電極法で (n=6)、それぞれ測定した。次に47℃の水を環流スーツに流して食道温をベースラインから~0.7℃上昇させた後に同様の測定を行った。

その結果、小川は次の結論を得た。

1. 暑熱負荷により食道温が上昇し (P<0.0001)、それに伴い CVC_{chest} (P<0.0001) と Total SSNA (P<0.005) も上昇した。
2. しかし、高体温時において、HUT を行うと RAV が低下し (P<0.008)、高体温によって上昇した

CVC_{chest} が低下した (P<0.019) が、Total SSNA に変化を認めなかった (P>0.26)。

3. それに対して、SSNA の心周期同期成分は食道温の上昇に伴って上昇した (P<0.015) が、高体温時の HUT で減弱した (P<0.017)。
4. さらに、暑熱負荷前後の姿勢変換時 SSNA の心周期同期成分と CVC_{chest} を全被験者でプールすると、それらの間に高い相関関係が認められた (r=0.817, P<0.0001)。
5. 一方、MSNA の心周期同期成分と CVC_{chest} との間には有意な相関を認めなかった (r=0.359, P=0.085)。

以上のことから SSNA の心周期同期成分は、高体温時の皮膚血管を能動的に拡張させる神経であり、姿勢変換時に、その活動が心肺圧受容器を介して反射的に抑制され、血圧維持に働いていることが明らかとなった。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として十分価値のあるものと認めた。

Early Postoperative Magnetic Resonance Imaging in Detecting Radicular Pain After Lumbar Decompression Surgery Retrospective Study of the Relationship Between Dural Sac Cross-sectional Area and Postoperative Radicular Pain (腰椎除圧術後の神経根痛を検出する術後早期 MRI 画像 硬膜管横断面積と術後神経根痛の関連についての後ろ向き研究)

二 木 俊 匡

(論文の内容の要旨)

【研究の背景と目的】 腰椎除圧術後の術後早期 MRI 所見と臨床症状との関連については議論がある。すなわち術後臨床症状がない患者においても MRI で硬膜管圧迫所見がみられるという報告がある一方で、術後硬膜外血腫により症状を呈した患者群と症状のない患者群を比較すると硬膜管横断面積 (DCSA) が有症状群でより小さかったという報告がある。典型的な術後硬膜外血腫の症状は、強い創部痛から始まり、下肢のしびれ、神経根痛を経て、両下肢の神経脱落症状に至るとされる。実臨床において、術後神経根痛は創部痛やしびれと比較的してより少数であり、より懸念される症状でもある。本研究の目的は腰椎術後早期 MRI の DCSA と神経根痛発生との関連を検討することである。また、サブ解析として MRI 撮像時のドレーン残存の有無が術後早期 DCSA に関連するかも評価した。【方法】 腰椎除圧手術後 7 日以内に撮像された MRI を

術後早期 MRI と定義した。2007年~2011年の間に腰椎除圧手術を行い、術後早期 MRI を撮像した115例について後ろ向きに調査した。男性68例、女性47例、手術時平均年齢は64.6歳であった。術前症状との一致によらず、また疼痛の強弱に関わらず、術後早期に下肢痛を訴えた場合を神経根痛発生例としたところ、46例が神経根痛を訴えていた。神経根痛を認めた症例は全例で術後数週間のうちに神経根痛の改善を認めた。術後早期 MRI で除圧範囲中 DCSA が最も小さい椎間板レベルを検討対象部位とした。全例で術後硬膜外ドレーンを留置し、廃液量が50 ml/day 以下となった時に抜去した。術後神経根痛発生に関する危険因子決定のためロジスティック回帰分析を行った。受信者動作特性 (ROC) 曲線で神経根痛発生に関する DCSA カットオフ値を求めた。撮影時ドレーン残存の有無と術後早期 DCSA の関係を調べた。

【結果】 単変量および多変量解析の結果、周術期因子

のうち術後早期 DCSA が小さいことが術後神経根痛発生と唯一有意に関連していた (-10 mm^2 あたりオッズ比1.26)。ROC 曲線で求めた神経根痛発生に関する術後早期 DCSA カットオフ値は 67.7 mm^2 であった(感度56.5%, 特異度89.9%)。便宜的にカットオフ値を $<70 \text{ mm}^2$ とした場合, DCSA $<70 \text{ mm}^2$ 患者の神経根痛発生率は74.3%, 一方 DCSA $\geq 70 \text{ mm}^2$ 患者の神経根痛発生率は25.0%であった(感度74%, 特異度75%)。術後早期 DCSA はMRI 撮像時にドレーンが留置されていた患者群で有意に大きかった (119.7 ± 10.1 v.s. $93.9 \pm 5.4 \text{ mm}^2$)。

【考察と結論】 腰椎除圧術後早期 MRI で DCSA が小さいほど神経根痛がみられ, 神経根痛発生に関しての DCSA カットオフ値は 67.7 mm^2 であった。MRI 撮像時ドレーンが留置されている症例の方が, すでに抜去されていた症例よりも術後早期 DCSA が大きかった。

腰椎除圧術後の除圧スペースのほとんどは, 拡大した硬膜管と硬膜外血腫により占められ, 双方の割合は圧バランスで変化すると考えられる。そうした観点から, 術後症状の多くは硬膜外血腫と術前症状の残存と考えられるが, 術後神経根痛の原因がどちらか判断するのは臨床難しく, また共に術後硬膜管拡張不良の結果と考えれば, それら原因を鑑別する意義は乏しい。いずれにしろ神経根痛は, 創部痛や下肢のしびれよりも重篤な術後症状である。

術後早期 MRI と術後症状に関連があるとした過去の報告は, 術後硬膜外血腫による重篤な症状に対し殆どが再手術を必要とした患者群と無症状患者群とを比較していた。しかし, 画像上の硬膜外血腫発生率は33-100%と報告されるのに対して, 術後硬膜外血腫に対する再手術率は0.1-0.2%である。過去の報告は, 下肢の痛み・しびれなどを症状有りとしなかったのだろう。それに対して, 術後神経根痛を有症状群とした本研究は新たな視点に立っている。

術後早期 DCSA のカットオフ値はすでに, Leonardiらが 75 mm^2 として報告している。しかし, そのカットオフ値の決定は, 術前 DCSA の報告から得た値を転用しただけである。本研究は術後症状の観点から ROC 曲線で術後早期 DCSA カットオフ値を求めた初めての研究である。術後神経根痛がある患者で術後早期 DCSA が $<70 \text{ mm}^2$ であれば, 疼痛の原因説明に役立つと共に, さらなる症状増悪を見逃さない警鐘となるだろう。

腰椎術後ドレーンの必要性について議論がある。

本研究は, 全例で術後ドレーンを留置しており, 留置有無の効果を比較検討しているわけではない。しかし, 本研究の結果から, ドレーンにより術後硬膜外血腫の圧が減少し, 術後早期 DCSA が増加, 術後の神経根痛軽減につながる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

腰椎除圧術後の術後早期 MRI 所見と臨床症状との関連については議論がある。典型的な術後硬膜外血腫の症状は, 強い創部痛から始まり, 下肢のしびれ, 神経根痛を経て, 両下肢の神経脱落症状に至るとされる。実臨床において, 術後神経根痛は創部痛やしびれと比較的してより少数であり, より懸念される症状でもある。二木らは, 腰椎術後早期 MRI の硬膜管横断面積 (DCSA) と神経根痛発生との関連を検討した。また, MRI 撮像時のドレーン残存の有無が術後早期 DCSA に関連するかも評価した。

腰椎除圧手術後7日以内に撮像されたMRIを術後早期MRIと定義し, 腰椎除圧手術を行って術後早期MRIを撮像した115例について後ろ向きに調査した。術前症状との一致によらず, また疼痛の強弱に関わらず, 術後早期に下肢痛を訴えた場合を神経根痛発生例としたところ, 46例が神経根痛を訴えていた。術後早期MRIで除圧範囲中 DCSA が最も小さい椎間板レベルを検討対象部位とした。術後神経根痛発生に関する危険因子決定のためロジスティック回帰分析を行った。受信者動作特性曲線で神経根痛発生に関する DCSA カットオフ値を求めた。撮影時ドレーン残存の有無と術後早期 DCSA の関係を調べた。

その結果, 二木は次の結論を得た。

1. 腰椎除圧術後早期 MRI で DCSA が小さいほど神経根痛がみられた (-10 mm^2 あたりオッズ比1.26)。
2. 神経根痛発生に関しての術後早期 DCSA カットオフ値は 67.7 mm^2 (およそ 70 mm^2) であった
3. MRI 撮像時ドレーンが留置されている症例の方が, すでに抜去されていた症例よりも術後早期 DCSA が大きかった (119.7 ± 10.1 v.s. $93.9 \pm 5.4 \text{ mm}^2$)。

これらの結果より, 術後神経根痛がある患者で術後早期 DCSA が $<70 \text{ mm}^2$ であれば, 疼痛の原因説明に役立つと共に, さらなる症状増悪を見逃さない警鐘となると思われる。また, ドレーンにより術後硬膜外血腫の圧が減少し, 術後早期 DCSA が増加, 術後の神経根痛軽減につながる可能性が示唆された。よって, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Dosimetric Comparisons of Volumetric Modulated Arc Therapy with Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy for Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (局所進行非小細胞肺癌に対する強度変調回転放射線治療と三次元原体放射線治療の線量分布比較)

小 沢 岳 澄

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】放射線治療は局所進行非小細胞肺癌の治療として標準的に行われているが、脊髄や肺、食道といった周囲のリスク臓器を避けつつ、腫瘍を含む標的体積へ処方線量を投与することはしばしば困難である。この点において強度変調放射線治療の有用性が報告されているが、実臨床に即した症例における比較・報告はほぼ無い。今回、進行期非小細胞肺癌に対する根治的放射線治療として、三次元原体放射線治療(3D-CRT)と強度変調回転放射線治療(VMAT)による治療計画を行い、線量分布を比較・検討した。

【方法】2013年1月から2014年8月までに当院で進行期非小細胞肺癌に対する根治的放射線治療を計画した17症例を対象とした。各症例においてVMATと3D-CRTによる治療計画を行った。主要目的として、原発腫瘍および転移リンパ節を含む計画標的体積の95%に60 Gy/30分割を投与し、かつ脊髄の最大線量を50 Gy未滿にする治療計画を作成することとした。副次目的として、他のリスク臓器の線量を可能な限り低減することとした。

【結果】3D-CRTでは計画標的体積と脊髄の近接していた2例で主要目的を達成できなかったが、VMATでは全例で主要目的を達成可能であった。3D-CRTとVMATの双方で許容可能な計画を作成できた15例の検討では、線量収束性や肺の20 Gy以上照射される体積および平均線量、食道の35 Gy以上照射される体積についてVMATの方が良好な治療計画を作成できた。肺の低線量が照射される体積や食道の最大線量および平均線量に有意差は認めなかった。

【結論】3D-CRTでは標的体積の線量が不十分となる症例においても、VMATでは十分な線量投与が可能であった。3D-CRTおよびVMAT共に許容される治療計画の比較では、VMATでリスク臓器の線量が低減されていた。3D-CRTに対するVMATの優位性は、局所進行期肺癌に対する根治的放射線治療におけるVMATの適切な利用を促進する可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

放射線治療は手術不能局所進行非小細胞肺癌の治療

において重要な役割を担うが、周囲臓器の耐容線量を考慮しつつ腫瘍を含む計画標的体積(PTV)へ処方線量を投与することはしばしば困難である。今回小沢岳澄らは実臨床に即した連続症例において三次元原体放射線治療(3D-CRT)と強度変調回転放射線治療(VMAT)の治療計画を直接比較し、VMATの有用性を検討した。

2013年1月から2014年8月までに進行期非小細胞肺癌に対する根治的放射線治療を計画した17症例を対象とし、各症例においてVMATと3D-CRTによる治療計画を行った。主要目的として、原発腫瘍および転移リンパ節を含む計画標的体積の95%に60 Gy/30分割を投与し、かつ脊髄の最大線量を50 Gy未滿にする治療計画を作成することとした。副次目的として、他のリスク臓器の線量を可能な限り低減することとした。統計学的解析ではウィルコクソンの符号順位検定を用いて、有意水準は0.05未滿とした。

その結果、小沢岳澄らは次の成績を得た。

1. 主要目標は、3D-CRTではPTVと脊髄の近接していた2例で達成できなかったが、VMATでは全例で達成可能であった。
2. 3D-CRTおよびVMAT双方で許容可能な計画を作成できた15例の検討では、線量収束性、肺の20 Gy以上照射される体積および平均線量、食道の35 Gy以上照射される体積についてVMATの方が有意に良好であった。
3. 肺の低線量が照射される体積、食道の最大線量および平均線量に有意差は認めなかった。

これらの結果より、局所進行非小細胞肺癌の根治的放射線治療におけるVMATの有用性が示され、特にPTVと脊髄が近接する症例ではVMATの利用を促進する可能性がある」と結論した。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 novel, rapid point-of-care test for lung cancer patients to detect epidermal growth factor receptor gene mutations by using real-time droplet-PCR and fresh liquid cytology specimens (肺癌患者における上皮成長因子受容体遺伝子変異検出のための液滴型高速 PCR 装置と新鮮液状細胞診検体を用いた新規迅速ポイント・オブ・ケア・テスト)

浅 香 志 穂

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】非小細胞肺癌に対する上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異検査は、外科的切除不能な進行期非小細胞肺癌症例に対して EGFR チロシキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) 投与の適応を決定する際に不可欠である。現在、肺癌 EGFR 遺伝子変異検査においては、癌細胞を含む生検材料や手術材料などのホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体から抽出した DNA を用いて、PCR 法をベースにした検査を行うことが一般的である。しかしながら、多くの施設で検体採取から結果報告までおよそ7日から14日間の期間を要している。今回我々は、リアルタイム液滴型高速 PCR 装置 (セイコーエプソン社) と気管支洗浄液および胸水などの新鮮液状細胞診検体を用いて、新たな迅速 EGFR 遺伝子変異検査法 (EGFR d-PCR 法) を開発し、その有用性を検討した。

【方法】対象患者は、信州大学医学部附属病院で2014年の1年間に原発性肺癌が疑われ、気管支洗浄液や胸水などの新鮮液状細胞診検体が病理検査に提出された患者245名のうち、細胞診で肺腺癌もしくは特定不能な非小細胞肺癌と診断された連続患者とした。

EGFR d-PCR 法で用いるリアルタイム液滴型高速 PCR 装置には、反応時間中一定の温度に保たれる高温と低温の2つのヒートブロックを有する。専用オイルが充填された反応チューブに PCR 反応液 (液滴) を注入し、このチューブの両端に2つのヒートブロックがくるように設置する。ヒートブロックがモーターによって回転することで、液滴は重力で高温と低温ブロック間を移動し、急速な温度変換が行われ、高速 PCR 反応が可能となる。蛍光検出器で PCR 反応産物の蛍光強度を測定する。

対象 EGFR 遺伝子変異は、最も高頻度な変異である exon21 の L858R と exon19 の E746_A750del とした。この2つの変異を併せて、肺癌関連 EGFR 遺伝子変異の90%以上を占める。加えて EGFR-TKI 耐性遺伝子変異として最も一般的な exon20 の T790M も対象とした。以上3種類の変異に対して、Amplification

Refractory Mutation System (ARMS) 法の原理に基づいて変異特異的にアニーリングするプライマーと、蛍光標識プローブを設計した。

対象患者の新鮮液状細胞診検体の残余検体から DNA を抽出し、EGFR d-PCR 法を用いてリアルタイム PCR 検査を行った。比較対照として、現在 EGFR 遺伝子変異検査の体外診断薬として米国、欧州、日本、中国などで承認されている theascreen EGFR 変異検出キット RGQ「キアゲン」(QIAGEN 社製) とリアルタイム PCR 装置である Rotor-Gene Q (QIAGEN 社製) を用いた従来法と同様に検査を行った。両検査法の判定結果と検査時間を比較した。

さらに、EGFR 遺伝子変異型と野生型の肺癌培養細胞を用いて、種々の割合の EGFR 変異型陽性細胞混合液 (0%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 50%, 100%) を作製し、EGFR d-PCR 法の検出限界を検討した。

【結果】対象患者は80名で、それぞれ検体の内訳は77名が気管支洗浄液検体、2名が胸水、1名が心嚢水であった。

EGFR d-PCR 法では、16名が L858R 陽性、8名が E746_A750del 陽性、1名が T790M 陽性と判定された。従来法では、16名が L858R 陽性、11名が exon 19 deletions 陽性 (このうち8名が E746_A750del 陽性)、1名が T790M 陽性と判定された。全80名における L858R、E746_A750del、T790M に関する EGFR d-PCR 法の結果は従来法と一致した。

リアルタイム PCR の反応時間は、EGFR d-PCR 法の8分10秒に対し、従来法は1時間45分であった。

肺癌培養細胞を用いた EGFR d-PCR 法では、L858R 検出系で0.5%、E746_A750del で0.05%、T790M で0.5%までの EGFR 遺伝子変異陽性細胞混合液で検出可能であった。いずれの変異検出系においても、EGFR d-PCR 法の検出限界は、従来法と同程度あるいはそれ以上の検出感度を有していた。

【結語】EGFR d-PCR 法では、従来法と一致する判定結果および検査時間の大幅な短縮、同程度の検出限

界が得られた。本法では DNA 抽出過程を含め 1 時間 30 分以内で判定結果を得られ、検査当日の結果報告により、早期に進行期肺癌患者の EGFR-TKI 治療を開始できる。

(論文審査の結果の要旨)

非小細胞肺癌に対する上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異検査は、外科的切除不能な進行期非小細胞肺癌症例に対して EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) 投与の適応を決定する際に不可欠である。しかしながら、多くの施設で検体採取から結果報告までおよそ 7 日から 14 日間の期間を要している。今回浅香は、リアルタイム液滴型高速 PCR 装置 (セイコーエプソン社) と気管支洗浄液および胸水などの新鮮液状細胞診検体を用いて、新たな迅速 EGFR 遺伝子変異検査法 (EGFR d-PCR 法) を開発し、その有用性を検討した。

まず、肺癌患者検体を用いて本法と従来法 [therascreen EGFR 変異検出キット (QIAGEN 社) と Rotor-Gene Q (QIAGEN 社) を使用] とで判定結果と検査時間を比較した。対象患者は、新鮮液状検体の細胞診で肺腺癌もしくは特定不能な非小細胞肺癌と診断された連続 80 名とした。対象遺伝子変異は、主要な 3 種類の

EGFR 遺伝子変異 (exon21 L858R, exon19 E746_A750del, exon20 T790M) とした。次に、肺癌培養細胞を用いて種々の割合で EGFR 変異陽性細胞混合液を作製し、EGFR d-PCR 法の検出限界を検討した。

この検討にて、浅香は次の結果を得た。

1. 対象肺癌患者 80 名における、対象 3 種類の EGFR 遺伝子変異の判定結果は、EGFR d-PCR 法と従来法で一致した。
2. リアルタイム PCR の反応時間は、EGFR d-PCR 法が 8 分 10 秒であったのに対し、従来法は 1 時間 45 分であった。
3. 肺癌培養細胞を用いて測定した EGFR d-PCR 法の検出限界は、L858R 検出系で 0.5 %、E746_A750del で 0.05 %、T790M で 0.5 % あった。

EGFR d-PCR 法では、従来法と一致する判定結果および検査時間の大幅な短縮、同程度の検出限界が得られた。EGFR d-PCR 法では DNA 抽出を含め、検体提出から 1 時間 30 分以内で判定結果を得ることができると、検査当日の結果報告により、早期に進行期肺癌患者の EGFR-TKI 治療を開始できる。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。

Usefulness of a management protocol for patients with cervical multicystic lesions: A retrospective analysis of 94 cases and the significance of GNAS mutation (子宮頸部多嚢胞性病変に対する当科の対応と転帰: 94 例の後方視的検討と GNAS 遺伝子変異の意義)

安藤 大史

(論文の内容の要旨)

【研究の背景と目的】 子宮頸部に多嚢胞性病変を呈する疾患にはナボット嚢胞、分葉状頸管線過形成 (LEGH)、悪性腺腫 (MDA) をはじめとする腺癌などがある。ナボット嚢胞は高頻度にみられる間質内に拡張した貯留嚢胞である。LEGH は、頸管内腔側に異型のない粘液産生細胞で構成された小腺腔が分葉状に分布し、その外側に嚢胞状に拡張した大型の貯留嚢胞が配列する良性腺増殖性疾患である。MDA は軽度の細胞異型を有する腺組織が浸潤性に増殖する高分化型腺癌で、化学療法に抵抗性で予後不良である。MDA と LEGH はともに胃型の粘液を産生し、さらに MDA は LEGH を高率に合併することから LEGH が MDA の前駆病変である可能性が指摘されている。日常診療において頸部に多発嚢胞が見られる際にはこれらの病変を正確に診断し適切に対応する必要があるが、

その方法は未だ確立されていない。

我々はこれまでの多施設共同研究により、頸部多嚢胞性病変の臨床診断と対応のプロトコルを提唱した。このプロトコルでは、超音波検査などで子宮頸部に多発嚢胞を認めた場合、(1) MRI、(2) 子宮頸管細胞診、(3) 胃型粘液検出 [HIK1083 ラテックス凝集反応キット、または細胞診による黄色調粘液の検出 (two color pattern, TCP) による] の 3 つの検査を行い、この結果によって臨床診断し対応する。具体的には MRI 上、辺縁明瞭で粗大な嚢胞がみられ、細胞診、胃型粘液とともに陰性の場合にはナボット嚢胞の可能性が高く経過観察とする。MRI で辺縁の不明瞭な充実部がみられる場合や細胞診で異型がみられる際には MDA や腺癌などを疑い、積極的な組織診や円錐切除を施行し、根治術を考慮する。MRI 上、粗大な嚢胞に囲まれた微小嚢胞 (コスモパターンと仮称) を認め、細胞診

は正常か AGC (軽度異常), 胃型粘液が陽性の際には LEGH 疑いと診断し, 患者の希望によりフォローアップか子宮摘出を考慮する。今回はこのプロトコルの有効性を検討するために, このプロトコルで対応した多嚢胞性病変94例の経過を後方視的に検討した。

一方GNAS 蛋白はアデニル酸シクラーゼと協調して細胞内の cyclic AMP を調節するが, GNAS 遺伝子に活性化変異がおきると細胞内の cyclic AMP の恒常的な増加から Protein kinase A-ERK シグナル伝達経路を介して増殖能が亢進する。近年膵臓や消化管の粘液産生性腫瘍や LEGH においてこの変異が報告されているが, LEGH におけるこの変異の臨床病理学的な意義はまだ不明である。今回は臨床経過が明らかになっている症例において GNAS 遺伝子の活性化変異の有無とその意義についても検討した。

【方法】 1995年から2014年までの間に当科を受診した子宮頸部多嚢胞性病変94例の臨床経過を後方視的に検討した。また GNAS の変異は LEGH 10例, LEGH with atypia 5例, MDA 2例で検討した。各症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片よりレーザーマイクロダイセクションを用いて標的組織を正確に採取し, 抽出したゲノム DNA に対し GNAS 遺伝子を PCR で増幅後に Sanger 法で配列決定した。

【結果】 子宮頸部多嚢胞性病変94症例のうち, MDA または腺癌, LEGH 疑い, ナボット嚢胞と臨床診断されたのはそれぞれ10症例, 59症例, 25症例であった。MDA または腺癌, LEGH と臨床診断された症例のうちそれぞれ10症例が子宮摘出術を受け, 正診率は95% (20症例中19例) であった。LEGH 疑いとされた症例のうち12カ月以上フォローアップしたのは42例であったが, 3症例で病変部の増大が見られたため単純子宮全摘を行ったところ, 2例が LEGH with atypia で1例はナボット嚢胞であった。GNAS 遺伝子の活性化変異は2例の LEGH with atypia でみられ, そのうち1例はフォローアップ中にサイズの増大が見られた症例であった。

【結論】 我々が考案したプロトコルは子宮頸部多嚢胞性病変の診断と対応において有用と考えられた。特に LEGH のフォローアップに際しては病変の増大が悪性化の徴候として重要である可能性が示された。また GNAS 遺伝子変異は LEGH の悪性化に関与している可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

子宮頸部多嚢胞性病変を呈する疾患には悪性腺腫

(MDA) 等の腺癌, 分葉状頸管腺過形成 (LEGH) やナボット嚢胞などが含まれ, それらを術前に正確に診断し, 適切に取り扱う方法はまだ確立されていない。これまでに信州大学産婦人科では多施設共同研究を行い, (1) MRI, (2) 子宮頸管細胞診, (3) 胃型粘液検出 [HIK1083ラテックス凝集反応キット, または細胞診による黄色調粘液の検出 (two color pattern, TCP) による] の3つの検査を行い, この結果によって臨床診断し対応するプロトコルを提唱した。今回, このプロトコルにより臨床診断と対応を行った, 1995年から2014年までの間に信州大学産婦人科を受診した子宮頸部多嚢胞性病変94例の経過を後方視的に検討した。

また, GNAS 遺伝子に活性化変異が生じると細胞内の cyclic AMP が恒常的に増加し Protein kinase A-ERK シグナル伝達経路を介して増殖能が亢進することが知られている。近年膵臓や消化管の粘液産生性腫瘍や LEGH においてこの変異が報告されているが, LEGH におけるこの変異の臨床病理学的な意義はまだ不明である。今回, 臨床経過が明らかになっている LEGH 10症例, LEGH with atypia 5症例, MDA 2症例において, ホルマリン固定パラフィン包埋切片からレーザーマイクロダイセクションで病変を切り出し, GNAS 遺伝子の変異解析を行いその意義について検討した。

その結果, 安藤大史は次の結果を得た。

1. 94症例のうち, MDA または腺癌疑い, LEGH 疑い, ナボット嚢胞と臨床診断されたのはそれぞれ10症例, 59症例, 25症例であった。MDA または腺癌疑いの全例と, LEGH 疑い症例のうち10症例が子宮摘出術を受け, 正診率は90%であった。
2. LEGH 疑いと臨床診断した症例のうち12カ月以上フォローアップしたのは42例であり多くは無変化であったが, 3症例で病変の増大が見られ手術を行ったところ, 病理所見は2例が LEGH with atypia であり, 1例はナボット嚢胞であった。
3. GNAS 遺伝子変異は2例の LEGH with atypia でみられ, そのうち1例はフォローアップ中に病変の増大が見られた症例であった。

これらの結果より, 本研究で用いているプロトコルは子宮頸部多嚢胞性病変の診断と対応において有用と考えられた。LEGH 疑い症例では病変の増大が潜在的な悪性病変や悪性化を見出す指標となりうると考えられた。GNAS 遺伝子変異と LEGH の悪性度上昇が関連している可能性が示唆された。よって, 主査,

副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Endogenous calcitonin gene-related peptide regulates lipid metabolism and energy homeostasis in male mice (内因性カルシトニン遺伝子関連ペプチドは、雄マウスの脂質代謝およびエネルギー恒常性を調節する)

劉 甜

(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 から作られるペプチドであり、血管、心臓、消化管、呼吸器、腎臓、神経系などに広く分布する。CGRP はこれまで主として神経伝達因子や循環調節因子としてとらえられてきた。一方で CGRP は、肝臓、脂肪組織、骨格筋等の代謝関連臓器にも多く発現しているが、CGRP の代謝制御における意義は不明である。そこで本研究では、CGRP ノックアウトマウスを用い、内因性 CGRP と代謝制御の関係について検討した。

【材料および方法】CGRP ノックアウトマウス (CGRP^{-/-}) と野生型の 8 週齢の雄マウスに対して、高脂肪食負荷実験を行った。

【結果】CGRP^{-/-}では、野生型マウスと比較して、体重と内臓脂肪重量増加は共に有意に抑制されていた。CGRP は中枢で多く発現しているが、摂餌量や、視床下部における POMC, CART, NPY, AgRP 等の摂食調節因子の発現には変化を認めず、体重の変化は、摂餌量の変化によるものではないと考えられた。呼気ガス分析において、CGRP^{-/-}では、普通食下、高脂肪食下の双方において、野生型マウスより酸素消費量および二酸化炭素産出量が有意に亢進していた。次に糖代謝について検討するため、高脂肪食負荷を行ったマウスに対して、糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行ったところ、CGRP^{-/-}では野生型に比較して耐糖能、インスリン感受性が亢進していることが確認された。さらに、CGRP^{-/-}では血清インスリンおよびレプチンレベルが野生型に比較して有意に低値であった。高脂肪食負荷 CGRP^{-/-}では、脂肪重量、除脂肪重量共に野生型に比較して低下しており、脂肪細胞肥大および脂肪肝が抑制されていた。白色脂肪組織において、CGRP^{-/-}では、脂肪の分解に関わる β 3-アドレナリン作動性受容体、ホルモン感受性リパーゼ (HSL), CGI58, Perilipin, アディポネクチン, PPAR などの発現が野生型に比較して有意に亢進しており、さらにミトコンドリア機能に関わる

TFAM, ERR α , COXIV などの発現が有意に亢進していた。さらに白色脂肪組織における HSL, AMPK の活性化は脂肪の分解を促進し、インスリン投与により抑制されるが、CGRP^{-/-}では、インスリン投与下でもこれらが保たれていた。一方で、褐色脂肪組織における褐色脂肪細胞特異的マーカーや、白色脂肪組織におけるベージュ脂肪細胞特異的マーカーの発現には変化を認めず、褐色脂肪、ベージュ脂肪には両者の間に大きな変化はないと考えられた。次に、CGRP^{-/-}および野生型マウスの、普通食負荷時および高脂肪食負荷時の白色脂肪組織を摘出し、イソプロテレノール投与時の培養上清中へのグリセロール放出量を測定することで、実際に両者の脂肪分解能を検討したところ、野生型マウスでは、高脂肪食負荷の脂肪組織の脂肪分解は抑制されているのに対し、CGRP^{-/-}では高脂肪食負荷時での脂肪分解が保たれていることが確認された。尿中のカテコールアミン代謝物であるノルメタネフリンを計測したところ、CGRP^{-/-}において有意に亢進しており、CGRP^{-/-}では交感神経系が亢進していると考えられた。プロプラノロールの投与により、 β 受容体をブロックすると、高脂肪食負荷時の、CGRP 欠失による体重増加抑制効果はなくなり、脂肪分解関連因子やミトコンドリア関連因子の発現の亢進も認めなくなった。

【結論】以上の結果から、内因性 CGRP は、循環調節因子に留まらず、生体内の脂質代謝およびエネルギー恒常性の重要な調節因子であることが示された。

(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、主として神経伝達因子や循環調節因子としてとらえられてきたが、肝臓、脂肪組織、骨格筋等の代謝関連臓器にも多く発現しており、CGRP の代謝制御における意義は不明である。

そこで劉甜は、CGRP ノックアウトマウス (CGRP^{-/-}) を用いて、10 週間の高脂肪食負荷実験を行った。体重、内臓脂肪重量、摂餌量、視床下部における摂食調節因子発現の解析、呼気ガス分析、糖負荷試験

およびインスリン負荷試験, 白色脂肪組織と肝臓の病理解析, 白色脂肪組織における脂肪代謝とミトコンドリア機能に関わる遺伝子の発現, 白色脂肪組織におけるホルモン感受性リパーゼや AMPK の活性のウェスタンブロットリングでの解析, 普通食負荷時および高脂肪食負荷時の摘出した白色脂肪組織の脂肪分解能の解析, 尿中ノルメタネフリンと活動量の解析, β 受容体遮断薬投与による代謝への影響の解析を行った。

その結果, 劉甜は次の結論を得た。

1. CGRP^{-/-}では, 高脂肪食負荷により, 野生型マウスと比較して, 食欲が変わらずに, 体重と内臓脂肪重量増加は共に有意に抑制されていた。普通食下, 高脂肪食下の双方において, 野生型マウスより酸素消費量および二酸化炭素産出量が有意に亢進していた。
2. CGRP^{-/-}では, 高脂肪食負荷により, 野生型マウスと比較して, 耐糖能, インスリン感受性が改善していた。CGRP^{-/-}では血清インスリンおよびレプチンレベルが野生型マウスに比較して有意に低値であった。
3. 高脂肪食負荷 CGRP^{-/-}では, 脂肪重量, 除脂肪重量共に野生型マウスに比較して低下しており, 白色脂肪細胞の肥大, 炎症細胞浸潤などが抑制された。さらに CGRP^{-/-}では, 肝臓重量増加と脂肪性肝炎が抑制された。

4. CGRP^{-/-}では, 高脂肪食負荷により, 野生型マウスと比較して, 白色脂肪組織における脂肪分解系因子やミトコンドリア関連因子の発現亢進を認められた。
5. 高脂肪食負荷 CGRP^{-/-}では, 野生型マウスと比較して, インスリン投与時の白色脂肪組織におけるホルモン感受性リパーゼ, AMPK の活性低下が抑制されていた。
6. 野生型マウスでは, 高脂肪食負荷時の白色脂肪組織の脂肪分解は抑制されているのに対し, CGRP^{-/-}では高脂肪食負荷時での脂肪分解が保たれていることが確認された。
7. CGRP^{-/-}では交感神経系が亢進していた。 β 受容体をブロックすると, 高脂肪食負荷時の, CGRP 欠失による体重増加抑制効果はなくなり, 脂肪分解関連因子やミトコンドリア関連因子の発現の亢進も認めなくなった。

以上の結果から, 劉甜は, 内因性の CGRP が, 白色脂肪組織における代謝制御に関わり生体内のエネルギー出納を制御していること, CGRP が肥満およびメタボリックシンドロームに対する新たな治療標的となる可能性を示した。

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。

Lack of association of serotonin 2A receptor gene in Japanese patients with obstructive sleep apnea syndrome (日本人における閉塞性睡眠時無呼吸症候群とセロトニン 2 A レセプター遺伝子の関連)

池 川 香代子

(論文の内容の要旨)

【背景】閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (OSAS) はその発症機序において後天的な原因である環境的要素だけではなく遺伝的要素が示唆されている。遺伝的要因としては顎顔面の構造や脂肪の分布, 上気道の筋肉の調節機能などがあると考えられている。OSAS の発症機序の一因としてオトガイ舌筋の弛緩による舌根沈下がある。オトガイ舌筋は舌下神経に支配されており, 舌下神経核ではセロトニン 2 A レセプターが存在し, オトガイ舌筋はこのレセプターを介して収縮する。このため, セロトニン 2 A レセプター (*HTR2A*) 遺伝子の変異が OSAS の発症と関連する可能性があり, 単塩基多型 (SNPs) の研究がいくつかの人種で行われ

ている。我々は, 日本人における *HTR2A* 遺伝子と OSAS の関連を検証するため, 症例対照比較試験を行った。

【方法】OSAS 群は American Academy of Sleep Medicine (ASSM) の診断基準に従い, 終夜睡眠ポリソムノグラフィー (PSG) および Epworth Sleepiness Scale (ESS) による問診にて OSAS と診断され, 医療機関に通院している 145 例を選択した。対照群として, PSG および ESS にて正常と診断された 133 例の健康人を選択した。全例が日本人男性である。*HTR2A* 遺伝子中の rs3803189 (3'-UTR), rs977003, rs9567737, rs9316232, rs2224721, rs2770296, rs731779, rs9567746, rs2070036, rs6311 (5'-UTR) の 10 カ所

の SNPs を選択した。OSAS 群・コントロール群から採取した血液から DNA を抽出し、TaqMan 法により 10か所の SNPs を解析し、対立遺伝子の頻度および遺伝子型の分布を比較した。また、無呼吸低呼吸指数 (AHI) と肥満度 (BMI) および遺伝子型を用いて多重ロジスティック回帰解析を行った。さらに、OSAS 患者を重症度 (カットオフ値: AHI 40 events/h)、肥満度 (カットオフ値: BMI 25 kg/m²) で 2 群に分け、サブ解析を行った。

【結果】解析した10か所の SNPs について、OSAS 群とコントロール群で対立遺伝子の頻度および遺伝子型の分布に有意差を認めなかった。多重ロジスティック解析でも OSAS 群とコントロール群に有意差を認めなかった。今回選択した10か所の SNPs はこれら10個を含む38個の SNPs のタグ SNPs となっており、これら38個の SNPs について OSAS との関連はないと考えられた。また、OSAS 患者を重症度、肥満度でグループ分けしたサブ解析でも対立遺伝子の頻度に有意差を認めなかった。

【結論】OSAS と *HTR2A* 遺伝子変異との間に有意な関連は証明できなかった。日本人の OSAS 発症に、*HTR2A* 遺伝子変異が関与する可能性は低いと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (OSAS) はその発症機序において後天的な原因である環境的要素だけではなく遺伝的要素が示唆されている。遺伝的要因としては顎顔面の構造や脂肪の分布、上気道の筋肉の調節機能などがあると考えられている。OSAS の発症機序の一因としてオトガイ舌筋の弛緩による舌根沈下がある。オトガイ舌筋は舌下神経に支配されており、舌下神経核ではセロトニン 2 A レセプターが存在し、オトガイ舌筋はこのレセプターを介して収縮する。このため、セロトニン 2 A レセプター (*HTR2A*) 遺伝子の変異が OSAS の発症と関連する可能性があり、単塩基多型 (SNPs) の研究がいくつかの人種で行われている。我々は、日本人における *HTR2A* 遺伝子と OSAS の関連を検証するため、症例対照比較試験を行った。

OSAS 群は American Academy of Sleep Medicine (ASSM) の診断基準に従い、終夜睡眠ポリソムノグラフィー (PSG) および Epworth Sleepiness Scale (ESS) による問診にて OSAS と診断され、医療機関に通院している145例を選択した。対照群として、PSG および ESS にて正常と診断された133例の健常人

を選択した。全例が日本人男性である。*HTR2A* 遺伝子中の rs3803189 (3'-UTR), rs977003, rs9567737, rs9316232, rs2224721, rs2770296, rs731779, rs9567746, rs2070036, rs6311 (5'-UTR) の10か所の SNPs を選択した。OSAS 群・コントロール群から採取した血液から DNA を抽出し、TaqMan 法により 10か所の SNPs を解析し、対立遺伝子の頻度および遺伝子型の分布を比較した。また、無呼吸低呼吸指数 (AHI) と肥満度 (BMI) を用いて多重ロジスティック回帰解析を行った。さらに、OSAS 患者を重症度 (カットオフ値: AHI 40 events/h)、肥満度 (カットオフ値: BMI 25 kg/m²) で 2 群に分け、サブ解析を行った。

その結果、池川は次の結論を得た。

1. 解析した10か所の SNPs について、OSAS 群とコントロール群で対立遺伝子の頻度および遺伝子型の分布に有意差を認めなかった。
2. 多重ロジスティック解析でも OSAS 群とコントロール群に有意差を認めなかった。
3. 今回選択した10か所の SNPs はこれら10個を含む38個の SNPs のタグ SNPs となっており、これら38個の SNPs について OSAS との関連はないと考えられた。
4. また、OSAS 患者を重症度、肥満度でグループ分けしたサブ解析でも対立遺伝子の頻度に有意差を認めなかった。

これらの結果より、OSAS と *HTR2A* 遺伝子変異との間に有意な関連は証明できなかった。日本人の OSAS 発症に、*HTR2A* 遺伝子変異が関与する可能性は低いと考えられた。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。

Addition of thymidine to culture media for accurate examination of thymidine-dependent small-colony variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A pilot study (メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* チミジン依存性変異株の正確な検査を行うために培地へチミジンを添加する試験的研究)

掘 内 一 樹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Small-Colony Variants (SCVs) は、野生株に比較し発育が遅く、小型のコロニーを形成する細菌の変異株であり、発育に様々な栄養素を要求する。SCVs の発生には抗菌薬の長期投与が関与し、抗菌薬への感受性低下のため、持続性あるいは再発性の感染症を引き起こすとされている。SCVs のうち、DNA 合成に関わるチミジンを発育に要求する株を特に、チミジン依存性 SCVs (Thymidine dependent SCVs: TD-SCVs) としている。分離頻度の高い *Staphylococcus aureus* TD-SCVs の中には、医療関連感染でしばしば問題となるメチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) も含まれており、MRSA TD-SCVs による感染症も報告されている。ゆえに、TD-SCVs についても、正確かつ迅速な薬剤耐性菌の検出が重要となる。しかし、TD-SCVs は薬剤感受性試験用培地である Mueller-Hinton (MH) 培地など、チミジンをほとんど含まない培地には発育しないことから、臨床微生物検査で頻用される薬剤感受性試験を基本とした MRSA 検出法では判定が困難である。本研究では、チミジンを MH 培地あるいは市販の MRSA スクリーニング培地に添加する新しい MRSA 検出方法について検討した。

【材料と方法】 対象は、信州大学医学部附属病院臨床検査部で分離した SCVs 10株を用いた。16S rRNA 遺伝子解析と栄養要求性試験により、それぞれ菌種とチミジン要求性を確認し、PCR 法による薬剤耐性遺伝子 *mecA* の検出を併せて行った。検討は、① MH 培地にチミジンを最終濃度 0, 0.1, 1.0, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう添加し、発育曲線よりチミジン添加量を決定した。①で決定したチミジン添加量に従い、② 精度管理株 (*S. aureus* ATCC25923, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC25922) および臨床分離株メチシリン感性 *S. aureus* (MSSA) と MRSA10株ずつを用いて、MH 培地へのチミジン添加による MRSA 鑑別用薬剤オキサシリンおよびセフォキシチンの MIC 値の変化を検討した。また、同培地における SCVs の発育と感受性判定の検討、

さらに、③ チミジンを添加した各社 MRSA スクリーニング培地: Chrom ID MRSA (シスメックス・バイオメリュー), MS-CFX (日水製薬), CHROMagar MRSA II (日本 BD), CHROMagar MRSA (関東化学), MDRS-II (極東製薬) への発育を検討した。

【結果】 対象とした SCVs 10株は、分子生物学的に *S. aureus* と同定され、栄養要求性試験でチミジン要求性を示した。このうち、4株が *mecA* を保有する MRSA TD-SCVs であった。①の検討結果では、すべての株が最終濃度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上のチミジンの存在下で最大の発育を示し、それ以上の濃度では大きく変化しなかった。したがって、②及び③の検討はチミジンの最終濃度を10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として検討した。②の検討結果では精度管理株、野生株 MSSA および MRSA において、チミジン添加の有無でオキサシリンとセフォキシチンの感受性に有意差を認めなかった。同培地を用いて SCVs の薬剤感受性試験を行った結果、すべての株が培地へ発育し、MRSA TD-SCVs 4株はすべて、MRSA と判定できた。また、MSSA TD-SCVs もすべて MSSA と判定できた。③の検討結果では、チミジンを添加しない場合、ChromID MRSA を除く他の培地には MRSA TD-SCVs は発育せず、MRSA として検出できなかった。一方、それぞれの培地にチミジンを添加した場合は、すべての培地で MRSA TD-SCVs 4株を検出できた。

【考察】 *S. aureus* TD-SCVs はチミジン10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の存在下で十分な発育を示す。MH 培地への最終濃度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のチミジン添加は、オキサシリンおよびセフォキシチンの感受性には影響することはなく、*S. aureus* TD-SCVs の発育を支持し、従来通りの判定基準で MSSA と MRSA の鑑別が可能である。また、同様に MRSA スクリーニング培地へチミジンを添加することで、MRSA TD-SCVs のスクリーニングが可能である。したがって、TD-SCVs を見落とさないためにも、臨床微生物検査で使用される薬剤感受性用培地や MRSA スクリーニング培地にはチミジンを添加して検査する必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

Small-Colony Variants (SCVs) と呼ばれる細菌の栄養要求性変異株は、持続性あるいは再発性の感染症を引き起こす。発育にチミジンを要求する株を特にチミジン依存性 SCVs (Thymidine dependent SCVs : TD-SCVs) と呼び、*Staphylococcus aureus* TD-SCVs の中には *mecA* を保有するメチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) TD-SCVs も含まれる。一般的に薬剤感受性試験に用いられる Mueller-Hinton (MH) 培地はチミジンを可能な限り含まない組成となっており、TD-SCVs は発育不良で薬剤感受性試験ができず、耐性菌判定も困難である。本研究では、*S. aureus* TD-SCVs を対象として、チミジンを添加した培地を用いた MRSA TD-SCVs の耐性菌判定法と検出法を検討した。

チミジン濃度を変化させた発育曲線の検討により、培地に添加するチミジン濃度を決定した。野生株と薬剤感受性試験の精度管理株を対象に、チミジン添加による MRSA 判定用薬剤 (セフォキシチンおよびオキサシリン) の MIC 値への影響を検討し、同じ組成の培地で MRSA TD-SCVs を MRSA と判定できるかを確認した。また、5社から市販されている MRSA ス

クリーニング培地を用いて、チミジンを添加することで MRSA TD-SCVs が検出可能であるか検討した。

その結果、堀内一樹は次の結論を得た。

1. *S. aureus* TD-SCVs は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上のチミジンの存在下で最大の発育を示す。
2. MH 培地へのチミジン添加は、セフォキシチンおよびオキサシリンの MIC 値や MRSA 判定に影響しない。
3. MH 培地へのチミジン添加で、MRSA TD-SCVs の耐性菌判定が可能である。
4. 市販の MRSA スクリーニング培地へのチミジン添加で、MRSA TD-SCVs を検出できる。

以上の結果より、MH 培地へ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ チミジン添加で MRSA TD-SCVs の耐性菌判定が可能であり、MRSA スクリーニング培地への添加によって、これまで見逃されていた MRSA TD-SCVs を検出できると結論付けた。臨床微生物検査において一つの課題であった SCVs の耐性菌判定法と検出法に一つの方針を提示した。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Vasoprotective activities of the adrenomedullin-RAMP2 system in endothelial cells (血管内皮細胞のアドレノメデュリン-RAMP2系による血管保護作用)

羨 鮮

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 アドレノメデュリン (AM) は多彩な生理活性を有するペプチドである。AM およびそのファミリー因子はカルシトニン受容体様受容体 (CLR) を介して作用する。CLR のリガンドに対する特異性は、三つの受容体活性調節タンパク質によって決定される。RAMP2ホモノックアウトマウスは、AM $^{-/-}$ マウスと同様に血管の発達不全によって胎生中期に致死となることから、我々は、RAMP2が、AMの血管新生作用の重要な規定因子であることを明らかとしてきた。一方で、AM-RAMP2系の抗動脈硬化作用への関与は明らかではない。

【材料および方法】 本研究では、初めに RAMP2ヘテロノックアウトマウス (RAMP2 $+/-$) を用いた。野生型マウスおよび RAMP2 $+/-$ の大腿動脈に対してワイヤーを挿入することで血管内膜傷害モデルを作成し、RAMP2の発現低下による新生内膜形成におよぼす影響を検討した。次に誘導型血管内皮細胞特異的$$

RAMP2 $^{-/-}$ マウス (DI-E-RAMP2 $^{-/-}$) を用いて、血管内皮細胞の AM-RAMP2系の役割を検討した。さらに骨髓由来細胞の関与を検討するため、骨髓移植 (BMT) を行った後ワイヤー傷害モデルを作成し、新生内膜形成に与える影響を検討した。最後に我々は、内皮前駆細胞 (EPC) の増殖および遊走に対する AM-RAMP2系の意義を検討した。

【結果】 ワイヤー傷害後の新生内膜形成は、野生型マウスに比較して、RAMP2 $+/-$ において有意に亢進していた。血管内膜と中膜の面積比も RAMP2 $+/-$ において有意に高値であった。CD31と α -SMA の二重免疫染色の結果では、RAMP2 $+/-$ では傷害後の血管の平滑筋細胞増殖が亢進していたが、再内皮化は抑制されることが確認された。RAMP2 $+/-$ では傷害部位の外膜および新生内膜におけるマクロファージ浸潤が亢進しており、炎症性サイトカインの発現亢進、NADPH oxidase の発現亢進と酸化ストレスレベルの増強を認めた。$$$$

次に DI-E-RAMP2^{-/-}を用いて、ワイヤー傷害を加え、新生内膜形成を検討した。DI-E-RAMP2^{-/-}の血管では、sham 群、ワイヤー傷害群共に AM が代償性に発現亢進していた。DI-E-RAMP2^{-/-}では、新生内膜形成が亢進しており、平滑筋細胞増殖が亢進していたが、再内皮化は抑制されていた。病変部の炎症および酸化ストレスレベルも同様に亢進していた。

次に、RAMP2^{+/-}と野生型マウス、または DI-E-RAMP2^{-/-}とコントロールマウスから採取した骨髄細胞を、放射線照射したレシピエントマウスに移植し、血管傷害を加えて新生内膜形成を検討した。その結果 RAMP2^{+/-}あるいは DI-E-RAMP2^{-/-}の骨髄を移植したレシピエントマウスでは、新生内膜の形成が各々のコントロールと比較して亢進しており、平滑筋細胞の増殖亢進と、再内皮化の抑制が認められた。以上の結果から、骨髄由来細胞における RAMP2 発現低下が、RAMP2^{+/-}および DI-E-RAMP2^{-/-}における新生内膜形成亢進に重要な役割を持つことが示された。

最後に *in vitro* の系において、内皮前駆細胞 (EPC) における AM-RAMP2 系の役割を検討した。まず DI-E-RAMP2^{-/-}およびコントロールマウスの骨髄から EPC を初代培養した。EPC 初代培養28日後、DI-E-RAMP2^{-/-}ではコントロールに比較して、DiI-Ac-LDL および BS-I lectin の2重陽性を示す EPC の数が低下していた。次に末梢血由来のヒト EPC (hEPC) では、AM、RAMP2 および CLR の発現が確認された。WST 細胞増殖アッセイにおいて、AM は濃度依存性に hEPC 増殖を亢進した。さらに AM 投与によって、hEPC によるマトリゲル内での管腔形成は有意に亢進した。これらの結果から、EPC の増殖および遊走が、AM-RAMP2 系によって制御されていることが示された。

【結論】 以上の結果から、AM-RAMP2 系は血管の恒常性を制御し、血管傷害時の新生内膜形成を抑制して動脈硬化の進展を抑制していることが明らかとなった。AM-RAMP2 系は動脈硬化や再狭窄に対する新たな治療標的として期待される。

(論文審査の結果の要旨)

アドレノメデュリン (AM) は多彩な生理活性を有するペプチドである。AM およびそのファミリー因子はカルシトニン受容体様受容体 (CLR) を介して作用する。CLR のリガンドに対する特異性は、受容体活性調節タンパク質によって決定され、受容体活性修

飾タンパク質 RAMP2 が、AM の血管新生作用の重要な規定因子であることを明らかとしてきた。一方で、AM-RAMP2 系の抗動脈硬化作用への関与は明らかではない。

そこで羨 鮮は、本研究では RAMP2 ヘテロノックアウトマウス (RAMP2^{+/-}) を用い、ワイヤー血管内膜傷害モデルを作成した。AM-RAMP2 系の遺伝子発現の解析、EVG 染色で新生内膜形成を解析、CD31 と α -SMA の二重免疫染色で血管内腔再内皮化と平滑筋細胞増殖を解析、F4/80 免疫染色で傷害部位のマクロファージ浸潤を解析、炎症性サイトカインの遺伝子発現の解析、NADPH oxidase の発現と酸化ストレスレベルの解析を行った。次に誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2^{-/-}マウス (DI-E-RAMP2^{-/-}) を用いて、ワイヤー傷害を加え、新生内膜形成を解析、血管内腔再内皮化と平滑筋細胞増殖を解析、傷害部位のマクロファージ浸潤を解析、炎症性サイトカインの遺伝子発現を解析、酸化ストレスレベルの解析を行った。次に、RAMP2^{+/-}と野生型マウス、または DI-E-RAMP2^{-/-}とコントロールマウスから採取した骨髄細胞を、放射線照射したレシピエントマウスに移植し、血管傷害を加えて新生内膜形成を検討した。最後に *in vitro* の系において、DI-E-RAMP2^{-/-}およびコントロールマウスの骨髄から EPC を初代培養して、細胞の性質の解析を行った。末梢血由来のヒト EPC (hEPC) を用い、AM 投与による細胞増殖とマトリゲル内での管腔形成の解析を行った。

その結果、羨 鮮は次の結論を得た。

1. RAMP2^{+/-}マウスでは、wire injury 後の血管内膜の修復が障害されて、炎症や酸化ストレスが亢進し、平滑筋細胞増殖に関係している可能性が考えられた。
2. DI-E-RAMP2^{-/-}マウスでは、傷害後の血管内皮の修復が障害されて、炎症や酸化ストレスが亢進し、平滑筋細胞増殖に関係している可能性が考えられた。
3. 骨髄移植とワイヤー血管傷害実験の結果によって、RAMP2^{+/-}あるいは DI-E-RAMP2^{-/-}の骨髄を移植したレシピエントマウスでは、新生内膜の形成が各々のコントロールと比較して亢進しており、平滑筋細胞の増殖亢進と、再内皮化の抑制が認められた。
4. マウスの骨髄から EPC を初代培養し、28日後、DI-E-RAMP2^{-/-}はコントロールに比較して、

Dil-Ac-LDL および BS-I lectin の二重陽性を示す EPC の数が低下していた。

5. 臍帯血由来のヒト EPC (hEPC) では, AM, RAMP2 および CLR の発現が確認され, AM は濃度依存的に hEPC の増殖を亢進した。さらに AM 投与によって, hEPC のマトリゲル内での管腔形成は有意に亢進した。

以上の結果から, 羨 鮮は, AM-RAMP2系は, 抗

炎症作用, 酸化ストレス抑制により, 新生内膜形成を抑制し, 血管保護作用を持つことを示した。また, AM-RAMP2系は EPC の増殖と遊走を制御して再内皮化を改善することを示した。AM-RAMP2系は動脈硬化や再狭窄に対する新たな治療標的として期待される。

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 suppresses VEGF-induced vascular hyperpermeability and inflammation in retinopathy (アドレノメデュリンは, 網膜症において, VEGF により誘発される血管透過性亢進と炎症を抑制する)

今 井 章

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 アドレノメデュリン (AM) は様々な生理活性を有するペプチド因子である。AM には代表的な血管拡張作用の他にも, 抗炎症作用, 血管新生作用など様々な作用が報告されている。一方, 眼内でも AM の高発現が認められる。AM の発現は低酸素で誘導されることから, 我々はこれまで, 低酸素誘導性眼内血管新生モデルである未熟児網膜症 (OIR) モデルでの検討を行い, AM ヘテロノックアウトマウス, あるいは抗 AM 抗体を硝子体内投与したマウスにおいて, 病的血管新生が抑制されることを報告した。一方で, 代表的な眼内血管病である糖尿病網膜症において, AM の病態生理学的意義は不明である。糖尿病網膜症の発症, 進展においては, VEGF が重要な役割を果たすと考えられており, 現在抗 VEGF 薬が治療に用いられている。我々は, 糖尿病モデルマウスである Akita マウス, 網膜においてヒト型 VEGF を過剰発現するトランスジェニックマウス=Kimba マウス, さらに両者を交配して得られた Akimba マウス (Akita+/-・Kimba+/-) を用い, 糖尿病網膜症, 特に VEGF 誘導性網膜症の病態における AM の病態生理学的意義を検討した。

【材料および方法】 網膜血管の所見を, TEFI (Topical Endoscopic Fundal Imaging) を用いた眼底撮影, 走査型レーザー検眼鏡 (Scanning Laser Ophthalmoscope: SLO) を用いたフルオレセイン蛍光眼底血管造影, アクリジンオレンジを用いた網膜生体染色, 網膜展開標本, 電顕標本により評価した。さらに網膜の炎症や酸化ストレスの変化を, リアルタイム PCR による遺伝子発現, Western blotting によるタンパク発

現により検討した。次に Kimba マウスに対し, AM を硝子体内あるいは全身投与し, 網膜血管に与える影響を検討した。さらに培養血管内皮細胞を用いて, VEGF 単独あるいは AM との共投与を行い, 血管透過性, 電気抵抗, タイトジャンクション形成, 炎症性サイトカイン発現, NF- κ B シグナルに与える影響を検討した。最後に, Kimba マウスへの AM 投与によって網膜に生じる変化を, 包括的なリアルタイム PCR アレイ分析により検討した。

【結果】 Akita マウスでは明らかな網膜症の所見は認められなかった。一方 Akimba マウスでは重症型の増殖性変化が顕著であり, 網膜剥離が多発していた。これらに対し, Kimba マウスでは網膜出血, 漏出, 病的血管新生, 増殖性変化など, ヒトの糖尿病網膜症に類似した一連の所見が確認されたため, 以後, 糖尿病網膜症のモデルとして, 主として Kimba マウスを用いて解析した。Kimba マウスでは, 網膜毛細血管の脱落, 血管漏出に加え, 血管脆弱性や網膜内の白血球の停滞所見が認められ, 網膜における炎症性サイトカインや NADPH oxidase の発現の亢進, 酸化ストレスレベルの上昇を認めた。Kimba マウスに対し, AM の硝子体投与, あるいは浸透圧ポンプを用いた全身持続投与を行ったところ, 網膜毛細血管の脱落, 血管瘤の形成, 血管漏出が改善された。培養網膜血管内皮細胞における経内皮電気抵抗および FITC-デキストラン透過性アッセイにおいて, VEGF 投与は血管透過性を増強したが, AM の投与により抑制され, 血管内皮細胞のタイトジャンクション形成も AM 投与により, 強固となることが確認された。さらに VEGF の投与は, 網膜血管内皮細胞における NF- κ B シグ

ナルを増強し、炎症性サイトカイン発現を亢進させたが、AMの投与により抑制された。実際にKimbaマウスへのAM投与によって、網膜のNF- κ Bシグナル関連因子の発現が網羅的に抑制された。

【結論】AMは、網膜症において、VEGFによる炎症および血管透過性を抑制することから、糖尿病網膜症の病態、特に視力低下の原因となる黄斑浮腫などに対して、有用性が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

糖尿病網膜症は高血糖に引き続いて発症する網膜の血管の炎症・脱落・血管新生を病態とする疾患である。発症にはVEGF (vascular endothelial growth factor) などが関与することが知られているが、疾患モデル動物が限られていた。

アドレノメデュリン (AM) は様々な生理活性を有するペプチド因子である。AMには代表的な血管拡張作用の他にも、抗炎症作用、血管新生作用など様々な作用が報告されている。一方、眼内でもAMの高発現が認められる。AMの発現は低酸素で誘導されるものの、糖尿病網膜症において、AMの病態生理学的意義は不明である。糖尿病モデルマウスであるAkitaマウス、網膜においてヒト型VEGFを過剰発現するトランスジェニックマウス=Kimbaマウス、さらに両者を交配して得られたAkimbaマウス (Akita +/-・Kimba +/-) を用い、糖尿病網膜症、特に

VEGF誘導性網膜症の病態におけるAMの病態生理学的意義を、マウスへの全身投与、眼内局所投与を行い検討した。

その結果、今井章は次の結論を得た。

1. Akitaマウスでは顕性網膜症を来さない。Akimbaマウスでは重症の増殖糖尿病網膜症様網膜症を発症する。
2. Kimbaマウス群では重症度は様々だが、ヒト糖尿病網膜症の血管病態とされる炎症、血管脱落、血管新生を認めた。
3. Kimbaマウスの血管増殖性変化の認めない群においてAMの投与を行う事で、血管からの漏出が抑制された。
4. KimbaマウスへのAM投与によって炎症性サイトカインの広範な抑制を認めた。メカニズムとしてはIKK α のリン酸化抑制を介したNF- κ B p65のリン酸化抑制によるものと思われた。

これらの結果により、Kimbaマウスに発症するVEGF誘導網膜症においてヒト糖尿病網膜症類似の網膜症を発症することを確認し、アドレノメデュリンが網膜症の血管透過性亢進を抑制することを確認した。また、メカニズムとしてはNF- κ Bを介した炎症の抑制が示唆された。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Marked biochemical difference in amyloid proportion between intra- and extraocular tissues in a liver-transplanted patient with hereditary ATTR amyloidosis (肝移植後FAP患者の眼内・眼外沈着アミロイドにおけるアミロイド蛋白組成の顕著な生化学的相違)

吉 長 恒 明

(論文の内容の要旨)

【背景】生体内における95%以上のトランスサイレチン (TTR) は肝臓で産生されるため、家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) では、肝移植療法が極めて有効な治療法であり、多くの臓器でアミロイドーシスの進行が抑制されることが報告されている。しかしながら、生命予後が改善された反面、多くの患者で移植後に難治性のアミロイド眼症を併発することが報告されるようになり、患者QOLを著しく低下させ、臨床的に大きな問題となっている。この術後アミロイド眼症の病態機序については、硝子体切除術時に得られた数例における硝子体検体で解析されているが、詳細な分子病態機序は現在も明らかにできていない。

この理由としては、硝子体以外の眼内組織のデータがなく、同一患者での眼内・眼外組織でのアミロイド蛋白の生化学的解析がなされていないこと、また従来のアミロイド抽出法では、眼組織内部の各部位で、選択的にアミロイド蛋白を解析することが不可能であったことが考えられる。

最近我々は、参考論文で示すように、ドミノ肝移植レシピエントにおける超早期伝播性アミロイド病変の生化学的特徴について、Laser microdissection (LMD) と Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) によるプロテオーム解析法を用いて明らかにし、微量沈着アミロイド蛋白の解析法を確立した。本研究では、この解析法を応用し、肝移

植後10年経過後に角膜穿孔から片眼摘出となったFAP患者の眼内・眼外組織アミロイド蛋白を、LMDを用いて部位選択的に抽出し、LC-MS/MSにて生化学的解析を行い、肝移植後アミロイド眼症の発症機序を詳細に検討した。

【対象・方法】患者は49歳女性で、TTR 遺伝子変異 (Val30Met) 陽性である。37歳時に硝子体混濁と末梢神経障害で発症し、39歳で生体肝移植を施行。その後徐々に硝子体混濁が悪化し、41歳で左眼の硝子体切除術が施行された。緑内障も併発し、高度に視機能が低下したため、46歳に線維柱帯切除術も施行されている。49歳時に左眼の角膜潰瘍から角膜穿孔を生じ、左眼球摘出術が施行された。

摘出眼は10%ホルマリンで固定後、パラフィン包埋切片を作製した。組織アミロイドの沈着量に関しては、Congo red 染色標本と抗 TTR 抗体による免疫染色標本を用いて観察を行った。アミロイド線維蛋白の抽出は、LMD を用いて、眼内組織は虹彩、毛様体、網膜、脈絡膜、強膜から、眼外組織は視神経、眼球周囲に付着する外眼筋の血管と、以前上部消化管内視鏡検査で採取した十二指腸粘膜から行った。

LMD を用いて回収したアミロイド陽性組織片は、Zwittergent 緩衝液内で、加熱・超音波振盪にて可溶化した。その後トリプシン消化を37℃で24時間行った後、TTR 分子の30番目のアミノ酸残基を含むトリプシンペプチドをLC-MS/MSで解析し、アミロイド線維蛋白における野生型 TTR (Val30) と変異型 TTR (Met30) の構成比について解析した。

【結果】肉眼的病理所見では、眼球は虚脱し、角膜穿孔、ブドウ膜剥離が認められた。顕微鏡的所見では、抗 TTR 抗体陽性のアミロイド沈着が、眼内および眼球外組織に広く認められ、眼内組織では、特に虹彩、毛様体、網膜血管壁、網膜の内境界膜に、眼外組織では視神経鞘に高度なアミロイド沈着が認められた。生化学的解析においては、眼内組織のアミロイド線維は一様に変異型 TTR から構成され、その比率は80%を超えていた(84-98%)。一方、眼外組織におけるアミロイド構成蛋白は、逆に野生型 TTR が優位となり、外眼筋における野生型 TTR の比率は約71%で、十二指腸粘膜のアミロイドとほぼ同じ比率(69%)であった。強膜におけるアミロイド蛋白の変異 TTR 比率は61%であり、眼内と眼外組織のほぼ中間の値であった。

【考察・結論】肝移植後 FAP 患者における眼組織の

アミロイド蛋白組成の解析結果から、眼内と眼外組織では、異なった分子病態でアミロイド線維が構成されていることが明らかになった。肝移植後アミロイド眼症における眼内アミロイド線維形成は、網膜色素上皮細胞などの眼内局所で産生された変異型 TTR に極めて強く依存しており、循環血液中の肝臓由来の野生型 TTR の、眼内アミロイド形成に対する影響は少ないものと考えられた。これらの結果は、肝移植では移植後のアミロイド眼症の予防、進行抑制が期待できないことを明確に示している。このため今後は、眼内における変異型 TTR の局所産生を抑制、あるいは眼内アミロイド蛋白を効率よく turnover させるような新たな治療法の開発が必要と考えられた。また眼内では、網膜色素上皮で変異型だけでなく野生型 TTR も同時に産生されているにも関わらず、なぜ眼内では、野生型 TTR のアミロイド構成における関与が少ないのかという新たな問題点も、今回の研究で明らかになった。可能性として眼内組織では、眼外組織に比べて野生型 TTR がアミロイド線維になりにくい分子機序の存在も示唆され、術後アミロイド眼症に対する新規治療法開発のためにも、今後明らかにすべき課題と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) では、肝移植療法が極めて有効な治療法である一方で、多くの患者で移植後に難治性のアミロイド眼症を併発し、患者 QOL を著しく低下させる。この術後アミロイド眼症の病態機序については、詳細な分子病態機序は現在も明らかにできていない。今回、肝移植後10年経過後に角膜穿孔から片眼摘出となったFAP患者の眼内・眼外組織アミロイド蛋白を、Laser micro dissection (LMD) を用いて部位選択的に抽出し、Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) にて生化学的解析を行い、肝移植後アミロイド眼症の発症機序を詳細に検討した。

患者は49歳女性で、TTR 遺伝子変異 (Val30Met) 陽性であり、37歳時に硝子体混濁と末梢神経障害で発症し、39歳で生体肝移植を施行。その後徐々に硝子体混濁が悪化し、複数回手術を経験したが悪化し、49歳時に左眼の角膜潰瘍から角膜穿孔を生じ、左眼球摘出術が施行された。

摘出眼は10%ホルマリンで固定後、パラフィン包埋切片を作製し、組織アミロイドの沈着量に関しては、Congo red 染色標本と抗 TTR 抗体による免疫染色標

本を用いて観察を行った。アミロイド線維蛋白の抽出は、LMDを用いて、眼内外組織から採取した検体を利用した。アミロイド陽性組織片は、TTR分子の30番目のアミノ酸残基を含むトリプシンペプチドをLC-MS/MSで解析し、アミロイド線維蛋白における野生型TTR (Val30)と変異型TTR (Met30)の構成比について解析した。

その結果 吉長は次の結論を得た。

1. アミロイド沈着は、眼内および眼球外組織に広く認められ、眼内組織では、特に虹彩、毛様体、網膜血管壁、網膜の内境界膜に、眼外組織では視神経鞘に高度なアミロイド沈着が認められた。
2. 生化学的解析においては、眼内組織のアミロイド線維は一様に変異型TTRから構成され、その比率は80%を超えていた(84-98%)。一方、眼外組織におけるアミロイド構成蛋白は、逆に野生型TTRが優位となり、外眼筋における野生型TTRの比率

は約71%で、十二指腸粘膜のアミロイドとほぼ同じ比率(69%)であった。

これらの結果より肝移植後FAP患者においては眼内と眼外組織では、異なった分子病態でアミロイド線維が構成されていることが明らかとなった。特に眼内アミロイド線維形成は、網膜色素上皮細胞などの眼内局所で産生された変異型TTRに極めて強く依存しており、循環血液中の肝臓由来の野生型TTRの眼内アミロイド形成に対する影響は少なく、肝移植はアミロイド眼症の予防、進行抑制になりえないことを明確に示した。このため今後は、眼内における変異型TTRの局所産生を抑制、あるいは眼内アミロイド蛋白を効率よくturnoverさせるような新たな治療法の開発が必要と考えられた。

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。

Rapid diagnosis of acute promyelocytic leukemia with the PML-RARA fusion gene using a combination of droplet-reverse transcription-polymerase chain reaction and instant-quality fluorescence in situ hybridization (液滴型高速PCRとinstant-quality FISHを用いたPML-RARA融合遺伝子を伴う急性前骨髄性白血病の迅速診断)

重 藤 翔 平

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】急性前骨髄性白血病 (APL) は急性骨髄性白血病の5~8%を占める病型の一つである。APLは腫瘍細胞の著明な増加、高度の凝固障害と出血を呈する悪性度の高い白血病で、15番染色体と17番染色体の相互転座 t (15;17) (q22;q21)によって形成される PML-RARA 融合遺伝子が顆粒球系細胞の分化を妨げることがその発症機序となる。この融合遺伝子に対する分子標的薬オールトランス型レチノイン酸 (ATRA) と亜ヒ酸を用いた分化誘導療法は、PML-RARA 融合遺伝子を伴う APL において高い寛解導入率と治癒率をもたらす。APL においては一部の症例で ATRA 耐性を示す PML 以外の遺伝子による RARA 融合遺伝子によるものがあり、確定診断には t (15;17) (q22;q21) や PML-RARA 融合遺伝子を迅速に検出および定量を行うことが必要となる。しかしながら、t (15;17) や PML-RARA 融合遺伝子の検査に用いられる従来の fluorescence in situ hybridization (FISH) や reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) は、結果を得るま

で1日から2日を要す。本研究では、液滴型高速RT-PCRによる PML-RARA 融合遺伝子の検出と、instant-quality FISH (IQ-FISH) による腫瘍細胞定量を用いた PML-RARA 融合遺伝子を伴う APL の迅速診断法の検討を行った。

【対象と方法】PML-RARA 陽性 APL 患者5例および対照患者3例の骨髄液および末梢血より得られた RNA 試料およびカルノア固定した間期核細胞を用いた。RNA 試料では液滴型高速PCR装置 (セイコーエプソン株式会社) を用いて、1ステップ RT-PCR による増幅効率および反応時間の検討を行った。カルノア固定細胞を用いた FISH 法の検討では、IQ-FISH においては IQ-FISH Fast Hybridization Buffer (アジレントテクノロジーズ社) を用いて FISH 法を行い、融合シグナルを持つ細胞をカウントしハイブリダイゼーション時間の検討を行った。従来法として Vysis LSI Hybridization buffer (アボットモレキュラー社) を用いて IQ-FISH と比較した。

【結果】液滴型高速PCR装置を用いた1ステップ RT-PCR は、5例全ての APL 患者試料で26分以内に PML-

RARA 融合遺伝子陽性の判定が可能であった。一方、対照患者試料では PCR の増幅は認められなかった。IQ-FISH は、ハイブリダイゼーション時間を 1 時間とした場合、検査開始から 4 時間以内に結果を得ることで、従来法と同等の蛍光シグナルを示した。また、全ての APL 患者試料で、融合シグナルの陽性細胞率は従来法と一致した。

【結論】液滴型高速 RT-PCR と IQ-FISH を用いることにより、検体提出から 4 時間以内に APL 患者の *PML-RARA* 融合遺伝子の検出および腫瘍細胞の定量を行う検査法を確立した。血液塗抹標本による形態学的検査と、これらの遺伝子・染色体検査法を組み合わせれば、迅速かつ確実な *PML-RARA* 融合遺伝子を伴う APL の診断法となる。

【結語】本検査法は、従来 1 日から 2 日要していた APL の確定診断を検査当日に可能にし、的確な分化誘導療法の開始および選択に貢献すると考えられる。また液滴型高速 PCR と IQ-FISH は他の項目への応用が容易であり、作業時間の短縮により日常臨床検査業務の効率化に寄与する。

(論文審査の結果の要旨)

PML-RARA 融合遺伝子を伴う急性前骨髄性白血病 (APL) は、発病初期に高度な凝固障害および出血を呈する悪性度の高い白血病である。*PML-RARA* 融合遺伝子を伴う APL の治療にはオールトランス型レチノイン酸および亜砒酸による分化誘導療法が用いられ、高い確立で寛解が得られる。APL の診断には *PML-RARA* 融合遺伝子の検出および腫瘍細胞の定量が不可欠であるが、従来の検査では結果を得るまでに 1 日から 2 日を要す。よって、速やかに分化誘導療法を開始するために、より迅速な検査法が求められる。本研究では、液滴型高速 RT-PCR による *PML-RARA* 融合遺伝子の検出と Instant-quality FISH

(IQ-FISH) による腫瘍細胞定量を用いた検査法の検討を行った。

APL 患者 5 例および対照患者 3 例より得られた RNA 試料およびカルノア固定した間期核細胞を用いて検討した。RNA 試料では液滴型高速 PCR 装置を用いて、RT-PCR の増幅効率および反応時間を検討した。カルノア固定細胞を用いた FISH 法の検討では、IQ-FISH においては IQ-FISH Fast Hybridization Buffer を用いて、融合シグナルを持つ細胞をカウントしハイブリダイゼーション時間の検討を行い従来法と比較した。

その結果、重藤翔平は次の結論を得た。

1. 液滴型高速 RT-PCR を用いて、26 分以内に全例の APL 患者試料で *PML-RARA* 融合遺伝子の増幅が認められた。
2. 液滴型高速 RT-PCR において、対照試料 3 例は融合遺伝子の増幅を認めなかった。
3. IQ-FISH は、ハイブリダイゼーション時間を 1 時間とした場合、検査開始から 4 時間以内に結果を得ることで、従来法と同等の蛍光シグナルを示した。
4. IQ-FISH において、全例の APL 患者試料の *PML-RARA* 融合シグナル陽性細胞率は従来法と一致した。

これらの結果より、液滴型高速 RT-PCR と IQ-FISH を用いて、検体提出から 4 時間以内に APL 患者の *PML-RARA* 融合遺伝子の検出および腫瘍細胞の定量を行う検査法を確立した。血液塗抹標本による形態学的検査と、これらの遺伝子・染色体検査法を組み合わせれば、迅速かつ確実な *PML-RARA* 融合遺伝子を伴う APL の診断法となる。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。

Association between endotoxemia and histological features of nonalcoholic fatty liver disease (非アルコール性脂肪性肝疾患における組織像とエンドトキシン血症との関連)

北 島 央 之

(論文の内容の要旨)

【目的】非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は世界的に罹患率が増加している慢性肝疾患であり、なかでも肝硬変や肝癌に進展しうる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) が問題となっている。NASH の発症機構として、肝細胞への脂肪沈着 (脂肪肝) に様々な

hit が加わり、炎症・線維化が生じると推測されている。その hit の有力な候補としてエンドトキシン (LPS) が挙げられる。腸管で産生され門脈を介して肝臓に流入する LPS が NASH 発症に関与している可能性がマウスの実験で示されているが、ヒト NASH ではその関与は不明である。また LPS は半減期が短

く肝臓で処理されるので、門脈血中の濃度を直接測定するのは困難であり、LPS 結合蛋白 (LBP) や抗エンドトキシンコア抗体 (EndoCab IgG) が LPS 血症の surrogate marker として使用されている。本研究では、LBP および EndoCab IgG と NAFLD の病理組織像の間に関連があるか検討した。

【方法】2009年から2015年にかけて当院で肝生検を施行し、NAFLD と診断された126例を対象とした。肝生検当日に採取・冷凍保存した血清を用いて、ELISA 法で LBP・EndoCab IgG を測定した。生検組織は Brunt らの分類に従い脂肪沈着、肝細胞のバルーニング (風船状膨化変性)、小葉内炎症、線維化に関してスコア化し、LBP・EndoCab IgG との関連を検討した。また血液検査所見についてもその関連性を評価した。群間比較には Kruskal-Wallis test, Bonferroni 法、相関解析は Spearman 法を用いた。

【結果】LBP は脂肪沈着、バルーニングのスコアの増加に伴い上昇する傾向にあったが ($r=0.38$, $P<0.0001$; $r=0.23$, $P=0.01$), 小葉内炎症や線維化のスコアとは相関を認めなかった。EndoCab は何れの病理スコアとも相関なく、LBP との間にも相関を認めなかった。LBP は CRP, AST, ALT, フィブリノーゲンなどの炎症に関連する臨床データと有意な相関を認めた。一方、EndoCab IgG は年齢, IgG, ヒアルロン酸と正の相関、血小板数と負の相関を認めた。

【結論】本研究からは LPS が NASH 進展への強力な hit となっていることは証明できなかったが、新たな LPS surrogate marker の開発により NASH 発症への LPS の関与が今後明らかになるかもしれない。また LBP が脂肪沈着と相関することから、LBP と脂質代謝との関連が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は世界的に罹患率が増加している慢性肝疾患であり、なかでも肝硬変や肝臓に進展しうる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) が問題となっている。NASH の発症機構として、肝細胞への脂肪沈着 (脂肪肝) に様々な hit が加わり炎症・線維化が生じると推測されている。その hit の有力な候補がエンドトキシン (LPS) である。マウスの実験では腸管からの LPS への暴露が NASH の発症に関与している可能性が示されているものの、ヒト NASH における LPS の関与は不明である。

LPS の門脈中濃度を直接測定するのは困難なため、LPS 結合蛋白 (LBP) や抗エンドトキシンコア抗体

(EndoCab IgG) が LPS 血症の surrogate marker として使用されている。我々は、LPS がヒト NASH の発症に関与しているとするならば、炎症や線維化の高度な症例ほど LPS 血症の surrogate marker が高いのではないかと、この作業仮説を立てた。そこで2009年から2015年にかけて当院で肝生検を施行し NAFLD と診断された126例を対象とし、LBP・EndoCab IgG と臨床検査・肝病理所見との関連を解析した。

その結果、北畠央之は以下の結論を得た。

1. LBP は脂肪沈着、バルーニングのスコアと有意かつ正の相関を認めたが、小葉内炎症や線維化のスコアとは相関を認めなかった。
2. EndoCab は何れの病理スコアとも相関せず、LBP との間にも相関を認めなかった。
3. LBP は CRP, AST, ALT, フィブリノーゲンなどの炎症に関連する臨床データと有意な相関を認めた。
4. EndoCab IgG は年齢, IgG, ヒアルロン酸と正の相関、血小板数と負の相関を認めた。

今回の研究は、ヒト NAFLD において LPS 血症の surrogate marker と組織学的重症度との関連を検討した、最初の研究である。その結果、マウスの知見とは異なり LPS がヒト NASH 発症への強力な hit となっていることは証明できなかった。また LBP が脂肪沈着と相関することから、LBP と脂質代謝との関連が示唆された。これらの結果は、NASH と LPS・腸内細菌叢との関連を議論するうえで重要な知見であると考えられた。従って主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

The fibrous form of intracellular inclusion bodies in recombinant variant fibrinogen-producing cells is specific to the hepatic fibrinogen storage disease-inducible variant fibrinogen (異常フィブリノゲン産生細胞における繊維状の細胞内封入体は、フィブリノゲン蓄積病を引き起こす異常フィブリノゲンに特異的である)

新井慎平

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】フィブリノゲン蓄積病 (fibrinogen storage disease : FSD) は、肝細胞の小胞体内に異常フィブリノゲン (Fbg) が蓄積し肝傷害を生じる疾患である。FSD を呈する Fbg 低下症の原因として、6 種の Fbg γ 鎖の遺伝子異常 (284R, 314P, 316N, Δ G346-Q350, 366S, 375W) が報告されている。 γ 375W の Fbg 産生 CHO 細胞において、Fbg が粗大顆粒状 (large granular : LG) および繊維状 (fibrous form : F) を呈し、封入体として存在することを明らかにしている。本研究では、細胞内封入体が FSD を引き起こす異常 Fbg に特異的な現象かを検討した。

【材料と方法】FSD を呈する上記6種の遺伝子変異、および FSD 報告のない Fbg 低下症 (Non-FSD) 7 種を対象とした。正常 γ 鎖 cDNA を有するプラスミドから遺伝子改変キットを用いて変異 γ 鎖プラスミドを作製した。プラスミドを A α B β 産生 CHO 細胞に遺伝子導入して安定化発現細胞株 (stable 株) を樹立し、Fbg 分泌能 (ELISA による培養液中および細胞内 Fbg 濃度の測定) と Fbg の細胞内分布 (蛍光抗体法および電子顕微鏡による観察) を検討した。また、CHO 細胞と肝細胞癌由来 HuH-7細胞を用いた一過性発現細胞株 (transient 株) を作製し、遺伝子導入法の違いによる細胞内封入体を比較した。さらに、異常 γ 鎖を含むペプチド鎖産生 CHO 細胞 (正常 A α 鎖 + 異常 γ 鎖, 正常 B β 鎖 + 異常 γ 鎖, 異常 γ 鎖産生細胞) を作製し、封入体形成について検討した。

【結果】FSD および Non-FSD stable 株では、正常 Fbg 産生 CHO 細胞に比して、細胞内 Fbg 濃度が培養液中より有意に上昇していた。FSD の3株 (314P, 316N, Δ G346-Q350) では、 γ 375W 同様に 'LG' および 'F' 封入体を認めた。一方、FSD の2株 (284R, 366S) と Non-FSD 株では 'LG' 封入体のみ認められた。電子顕微鏡では、FSD 株において拡張した小胞体とその内部に一定の配列を有する構造物を確認した。肝細胞由来の HuH-7細胞においても同様の封入体が形成された。CHO/HuH-7の transient 株では

FSD 全例で 'F' 封入体を認めた。Non-FSD transient 株では stable 株同様に 'F' 封入体は認められなかった。ペプチド鎖産生 CHO 細胞では封入体形成は認めず、異常 Fbg 産生 CHO 細胞でのみ認めた。

【結論】繊維状封入体は、FSD を呈する6種の Fbg γ 鎖遺伝子変異を導入した培養細胞にのみ認められ、FSD 株に特徴的であった。細胞内封入体は異常 γ 鎖のみでは形成されず、正常 A α 鎖・B β 鎖とともに異常 Fbg として組み立てられることで初めて形成された。FSD は稀な疾患であるが致死的であり、先天性 Fbg 低下症を呈した患者において FSD を発症するかは患者の予後および QOL を左右する重要な因子である。本研究から、先天性 Fbg 低下症の患者において、CHO 細胞を用いて異常 Fbg 産生 transient 株を作製し蛍光抗体法で繊維状封入体をスクリーニングすれば、非侵襲的に FSD 発症の可能性を判断できる。

(論文審査の結果の要旨)

フィブリノゲン蓄積病 (fibrinogen storage disease : FSD) は、肝細胞の小胞体内に異常フィブリノゲン (Fbg) が蓄積し肝傷害を生じる疾患である。FSD を呈する Fbg 低下症の原因として、6 種の Fbg γ 鎖の遺伝子異常 (284R, 314P, 316N, Δ G346-Q350, 366S, 375W) が報告されている。 γ 375W の Fbg 産生 CHO 細胞において、Fbg が粗大顆粒状 (large granular : LG) および繊維状 (fibrous form : F) を呈し、封入体として存在することを明らかにしている。本研究では、細胞内封入体が FSD を引き起こす異常 Fbg に特異的な現象かを検討した。

FSD を呈する上記6種の遺伝子変異、および FSD 報告のない Fbg 低下症 (Non-FSD) 7 種を対象とした。正常 γ 鎖 cDNA を有するプラスミドから遺伝子改変キットを用いて変異 γ 鎖プラスミドを作製した。プラスミドを A α B β 産生 CHO 細胞に遺伝子導入して安定化発現細胞株 (stable 株) を樹立し、Fbg 分泌能 (ELISA による培養液中および細胞内 Fbg 濃度の測定) と Fbg の細胞内分布 (蛍光抗体法および電子顕微鏡による観察) を検討した。また、CHO 細胞と

肝細胞癌由来 HuH-7細胞を用いた一過性発現細胞株 (transient 株) を作製し、遺伝子導入法の違いによる細胞内封入体を比較した。さらに、異常 γ 鎖を含むペプチド鎖産生 CHO 細胞 (正常 A α 鎖 + 異常 γ 鎖, 正常 B β 鎖 + 異常 γ 鎖, 異常 γ 鎖産生細胞) を作製し、封入体形成について検討した。

その結果、新井慎平 は次の結論を得た。

1. FSD および Non-FSD stable 株では、正常 Fbg 産生 CHO 細胞に比して、細胞内 Fbg 濃度が培養液中より有意に上昇していた。
2. FSD の 3 株 (314P, 316N, Δ G346-Q350) では、 γ 375W 同様に 'LG' および 'F' 封入体を認めた。一方、FSD の 2 株 (284R, 366S) と Non-FSD 株では 'LG' 封入体のみ認められた。
3. 電子顕微鏡では、FSD 株において拡張した小胞体とその内部に一定の配列を有する構造物を確認した。
4. 肝細胞由来の HuH-7細胞においても同様の封入体が形成された。CHO/HuH-7の transient 細胞株では FSD 全例で 'F' 封入体を認めた。Non-FSD

transient 株では stable 株同様に 'F' 封入体は認められなかった。

5. ペプチド鎖産生 CHO 細胞では封入体形成は認めず、異常 Fbg 産生 CHO 細胞でのみ認めた。

これらの結果より、繊維状封入体は FSD を呈する 6 種の Fbg γ 鎖遺伝子変異を導入した培養細胞にのみ認められ、FSD 株に特徴的であった。細胞内封入体は異常 γ 鎖のみでは形成されず、正常 A α 鎖・B β 鎖とともに異常 Fbg として組み立てられることで初めて形成された。FSD は稀な疾患であるが致死的であり、先天性 Fbg 低下症を呈した患者において FSD を発症するかは、患者の予後および QOL を左右する重要な因子である。本研究から、先天性 Fbg 低下症の患者において、CHO 細胞を用いて異常 Fbg 産生 transient 株を作製し蛍光抗体法で繊維状封入体をスクリーニングすれば、非侵襲的に FSD 発症の可能性を判断できることを示した。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。

ASC Induces Apoptosis via Activation of Caspase-9 by Enhancing Gap Junction-Mediated Intercellular Communication (ASC はギャップジャンクションを介した細胞間相互作用によりカスパーゼ 9 を活性化し、アポトーシスを誘導する)

北 沢 将 人

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】ASC (apoptosis-associated speck like protein containing a CARD) は Pyrin と相同な領域 PYD と CARD を有し、炎症とアポトーシスを制御することが知られている。多くの癌において、ASC の発現はメチル化により抑制されており、ASC は癌抑制因子と考えられている。本研究では癌の細胞間相互作用を介した増殖や細胞死に ASC がどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的とした。

【方法】本研究には ASC の発現が欠失したヒト線維肉腫細胞株 HT1080 を用いた。HT1080 細胞に pcDNA3 ベクターと PMX-IRES-GFP ベクター (レトロウイルス) を用いてコントロールと ASC を遺伝子導入し、安定的遺伝子導入細胞を樹立した。また、pSINsi-hU6 と pSINsi-DK I ベクターを用いて p53, p21 およびコネキシン 43 のノックダウンを行った。pcDNA3 で遺伝子を導入したコントロール細胞と ASC 導入細胞の増殖能はセルカウントとコロニー

フォーメーションアッセイで評価した。また、同細胞をヌードマウスの皮下に移植し、12日目に腫瘍を摘出し、腫瘍の大きさと重量を測定した。摘出した腫瘍組織は Tunnel 染色と Ki-67 染色を行った。一方、PMX-IRES-GFP ベクターで遺伝子導入されたコントロール細胞と ASC 導入細胞は AnnexinV + 7-AAD で染色し、細胞死を評価した。また、細胞密度の高い状態と、低い状態で mRNA を抽出し、リアルタイム PCR で、IL-1 β , XIAP の発現量を半定量した。次に遺伝子導入細胞 (GFP 陽性) と非遺伝子導入細胞を 1 : 1 に混ぜて、GFP の陽性率をフローサイトメーターで測定し、経時の変化を解析した (Competitive assay)。Competitive assay は低細胞密度と高細胞密度の 2 つの条件で開始し、細胞密度による ASC の増殖抑制効果の差を評価した。汎カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-fmk), 選択的カスパーゼ 1 阻害剤 (Z-YVAD-fmk), カスパーゼ 9 阻害剤 (Z-LEHD-fmk), ネクロシス阻害剤 (Necrostatin-1), ギャップ結合阻害剤 (Car-

benoxolone) を用いて, ASC が誘導する細胞死の種類やメカニズムを評価した。また, p53, 21 をノックダウンした HT1080 細胞を用いて, 同様の Competitive assay を行った。カスパーゼ 9 のプロセッシング (活性化) はウエスタンブロッティングで評価した。

【結果】 ASC は HT1080 細胞の増殖を抑制した。特に ASC は細胞密度が高い環境で強力に細胞増殖を抑制したが, 低い細胞密度ではその効果は低下した。この高い細胞密度環境での増殖抑制効果は汎カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-fmk) で有意に減弱した。高い細胞密度環境において ASC の遺伝子導入によりアポトーシスが有意に増加することを AnnexinV+7-AAD 染色で確認した。また, 高い細胞密度環境では ASC 導入細胞で NF- κ B が転写制御している IL-1 β と XIAP の mRNA 量が有意に低下していた。ASC の増殖抑制はカスパーゼ 1 阻害剤 (Z-YVAD-fmk) や p53, p21 のノックダウンでは変化を認めなかったが, カスパーゼ 9 阻害剤 (Z-LEHD-fmk) で有意に減弱した。また, ウエスタンブロッティングにて高い細胞密度環境で ASC がカスパーゼ 9 を活性化することが確認された。さらに, カスパーゼ 9 の活性化はギャップ結合阻害剤やギャップ結合を形成するコネキシン 43 のノックダウンにより抑制されることも明らかとなった。

【結論】 高い細胞密度環境ではギャップ結合を介した細胞間相互作用により ASC がカスパーゼ 9 を活性化し, アポトーシスを誘導することが明らかとなった。ASC は NF- κ B を抑制することにより, XIAP の発現量を低下させ, それがカスパーゼ 9 の活性化を誘導すると考えられた。ASC は細胞密度のような細胞間相互作用や環境を認識し, 腫瘍細胞における細胞競合を担っている分子として新たな癌治療の標的分子となる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

本研究はメチル化により ASC の発現が欠失したヒト線維肉腫細胞株 HT1080 を用いた。HT1080 細胞に ASC の遺伝子導入を行い, in vitro, in vivo で増殖, 細胞死の解析を行った。ASC が高い細胞密度環境で誘導する細胞死を Annexin+7-AAD 染色で測定し, その条件下で mRNA の発現量をリアルタイム PCR で解析した。ASC が誘導する細胞死のメカニズムをカスパーゼ阻害剤, ネクローシス阻害剤, ギャップ結合阻害剤等の薬剤や p53, p21 およびコネキシン 43 のノックダウンを行い解析した。

また, ASC が誘導するカスパーゼ 9 の活性化は,

ウエスタンブロッティングで評価した。さらに, そのカスパーゼ 9 の活性化が細胞密度に依存するか, またギャップ結合阻害剤やコネキシン 43 のノックダウンで変化するかを検討した。

その結果, 北沢将人は次の結論を得た。

1. ASC は in vivo, in vitro で共に増殖抑制効果を示した。ヌードマウスの皮下移植で得られた腫瘍組織の Tunnel 染色と K-67 染色の結果, ASC は有意にアポトーシスを増加させたが, 細胞周期には有意な差を認めなかった。
2. in vitro で ASC は高い細胞密度環境で細胞死を誘導した。その細胞死はネクローシス阻害剤では抑制されず, 汎カスパーゼ阻害剤で有意に抑制された。
3. 高い細胞密度環境で ASC は NF- κ B が制御する分子である IL-1 β と XIAP の mRNA 量を低下させた。
4. 高い細胞密度環境で ASC が誘導するアポトーシスは, カスパーゼ 1 阻害剤や p53 のノックダウンでは抑制されなかったが, カスパーゼ 9 阻害剤で抑制された。
5. 高い細胞密度で ASC がカスパーゼ 9 を活性化することをウエスタンブロッティングで確認した。このカスパーゼ 9 の活性化はギャップ結合阻害剤やコネキシン 43 のノックダウンで抑制された。

これらの結果より, 高い細胞密度環境ではギャップ結合を介した細胞間相互作用により ASC がカスパーゼ 9 を活性化し, アポトーシスを誘導することが明らかとなった。ASC は NF- κ B を抑制することにより, XIAP の発現量を低下させ, カスパーゼ 9 の活性化を誘導すると考えられた。ASC は細胞密度のような細胞間相互作用や環境を認識し, 腫瘍細胞における細胞競合を担っている分子として新たな癌治療の標的分子となる可能性が示唆された。

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。

Bach2 Controls Homeostasis of Eosinophils by Restricting the Type-2 Helper Function of T Cells (転写因子 Bach2によるヘルパー T細胞を介した好酸球制御機構の解明)

佐藤 勇 樹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 転写因子 Bach2は、basic region-leucine zipper 構造を介して、二量体を形成し、Maf recognition element (MARE) を認識して結合する抑制性転写因子である。Bach2は形質細胞分化における抗体遺伝子のクラススイッチ組み換えや体細胞超変異に重要な役割を果たす。近年、Bach2はCD4陽性T細胞の分化や機能を制御しており、抑制性T細胞 (Treg 細胞) の分化に重要であることが報告されている。Bach2欠損マウスは、重篤な肺胞タンパク症を発症することから、Bach2は肺胞マクロファージの機能発現に関与していると考えられている。このような報告から Bach2は多様な免疫細胞の分化や機能の制御に重要であると考えられる。しかし、Bach2が顆粒球、特に好酸球の分化や増殖に与える影響の詳細は不明である。本研究では、Bach2欠損マウスを解析することにより、Bach2が好酸球の分化や増殖に与える影響の解明を目指す。

【材料および方法】 Bach2欠損マウスの脾臓、骨髄、末梢血の血球系細胞をフローサイトメトリーで解析した。Bach2欠損マウスで認められた好酸球の増加のメカニズムを解明するため、CD45.2陽性 Bach2欠損マウスの骨髄有核細胞と CD45.1/CD45.2野生型マウスの骨髄有核細胞を、野生型レシピエントマウスに移植した。T細胞、B細胞を欠損する Recombination-activating gene 2 (Rag2) 欠損マウスを用いて、Rag2/Bach2二重欠損 (double knock out : dKO) マウスを作成し、脾臓・骨髄の好酸球をフローサイトメトリーで解析した。野生型マウスと Bach2欠損マウスの血漿中の IL-5の濃度を ELISA 法により測定した。

【結果】 Bach2欠損マウスの組織では、野生型マウスに比較して FSCmid, SSChigh の集団が多く認められた。これらの細胞は好酸球の細胞表面マーカーである CCR3, SiglecF が陽性であり、形態学的特徴もあわせて好酸球が増加していると判断された。骨髄移植マウスの解析では、Bach2欠損マウス骨髄細胞由来の好酸球数と野生型マウス由来の好酸球数に有意差は認められなかった。Bach2欠損マウスと比較して、dKOマウスの脾臓や骨髄の好酸球数は低下しており、野生型マウスと同程度であった。さらに Bach2欠損マウス

の末梢血中の IL-5の濃度は野生型と比較して、有意に増加していた。

【結論】 フローサイトメトリーの結果から、Bach2欠損マウスは複数の臓器で好酸球の増加を示した。しかし、骨髄移植マウスの解析から、Bach2欠損マウスの好酸球の増加は細胞自律的ではないと考えられる。近年、Bach2ノックアウトマウスの CD4陽性 T細胞は、IL-4や IL-5, IL-13などのヘルパー T細胞 II型 (Th2) サイトカインの発現が強く認められると報告されており、T細胞を欠損する dKO マウスでは好酸球の増加は認められなかったことから、Bach2欠損マウスで認められた好酸球増加は、Bach2細胞自律性ではなく、Bach2を欠損した Th2細胞のサイトカイン発現の変化によるものと考えられる。Bach2はT細胞介して好酸球の増殖を制御していると考えられ、転写因子 Bach2の変異は喘息などの好酸球が病態にかかわる疾患や一部の原因不明の好酸球增多症のリスクファクターである可能性が示唆される。

(論文審査の結果の要旨)

Bach2は抑制性転写因子であり、Bach2はB細胞、T細胞、マクロファージなどの様々な免疫細胞の分化や機能の制御に重要であると報告されている。しかし、Bach2が顆粒球、特に好酸球の分化や増殖に与える影響の詳細は不明である。今回、Bach2欠損マウスを解析することにより、Bach2が好酸球の分化や増殖に与える影響の解明を目指した。

Bach2欠損マウスの脾臓、骨髄、末梢血の血球系細胞をフローサイトメトリーで解析した。Bach2欠損マウスで認められた好酸球の増加のメカニズムを解明するため、CD45.2陽性 Bach2欠損マウスの骨髄有核細胞と CD45.1/CD45.2野生型マウスの骨髄有核細胞を、野生型レシピエントマウスに移植した。T細胞、B細胞を欠損する Rag2欠損マウスを用いて、Rag2/Bach2二重欠損 (dKO) マウスを作成し、脾臓・骨髄の好酸球を解析した。野生型マウスと Bach2欠損マウスの血清中の IL-5の濃度を ELISA 法により測定した。

その結果、我々は次の結論を得た。

1. フローサイトメトリーの結果、Bach2欠損マウスは脾臓・骨髄・肺で好酸球の増加を認めたが、好中球

- の増加は認められなかった。また、好酸球前駆細胞の数は両者に差は認められなかった。
2. 骨髓移植16週間後のレシピエントマウスの解析の結果、各ドナー由来の好酸球数に差は認められず、Bach2が好酸球の分化や増殖に与える影響は、非細胞自律的であると考えられた。
 3. dKO マウスの解析では、Bach2単独欠損マウスで認められた好酸球の増加は、脾臓・骨髓ともに認められなかった。このことからBach2単独欠損マウスで認められた好酸球の増加はリンパ球依存的であると考えられた。

4. ELISA による血清中のIL-5の測定で、Bach2欠損マウスは野生型マウスに比較してIL-5濃度が優位に増加していた。

上記の結果とBach2ノックアウトマウスのCD4陽性T細胞は、IL-4やIL-5、IL-13などのヘルパーT細胞II型(Th2)サイトカインの発現が強く認められるという近年の報告から、Bach2欠損マウスで認められた好酸球増加は、Bach2細胞自律性ではなく、Bach2を欠損したTh2細胞のサイトカイン発現増加によるものと考えられる。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。

Physico-Chemical, In Vitro, and In Vivo Evaluation of a 3D Unidirectional Porous Hydroxyapatite Scaffold for Bone Regeneration (三次元配向連通孔ハイドロキシアパタイト製骨再生用スキャフォールドの物理化学・生体外・生体的評価)

田 中 学

(論文の内容の要旨)

【背景】配向連通孔ハイドロキシアパタイト (unidirectional porous hydroxyapatite, UDPHA_p) は、軸方向に貫通する連通孔を持った骨再生スキャフォールドである。我々はUDPHA_pを、組織工学に用いられる三次元スキャフォールドとして、現在臨床で広く用いられている非配向性の連通孔ハイドロキシアパタイト (interconnected calcium porous HA_p ceramic, IP-CHA) と比較して評価した。

【方法】我々は、UDPHA_pとIP-CHAの μ CTによる気孔率・比表面積の測定、強度試験、rhBMP-2の徐放能力の評価、SEMによる表面の観察を行った後、in vitroの実験として、接着した細胞形態の観察、蛍光顕微鏡による細胞接着様式の観察、Alamar blue assayによる細胞増殖性の評価を行い、さらにin vivoの実験として、recombinant human BMP-2 (rhBMP-2)を添加したUDPHA_pとIP-CHAをマウス頭蓋骨欠損部へ移植し、骨形成能を評価した。

【結果】IP-CHAと比較して、UDPHA_pは高い気孔率を示したが、比表面積は同程度であった。UDPHA_pの軸方向への圧縮強度はIP-CHAよりも高く(7.89±1.23 vs. 1.92±0.53 MPa, p=0.0039)、破断エネルギーは同程度であった(8.99±2.72 vs. 13.95±5.69 mJ, p=0.055)。UDPHA_pは、IP-CHAよりも緩徐にrhBMP-2を放出した。In vitroの実験において、UDPHA_p上の細胞は、足場材深部まで接着していた。細胞増殖試験でも、UDPHA_pはIP-CHAに比較

して有意に多く細胞を増殖させた(102,479±34,391 vs. 32,372±29,061 estimated cells per scaffold, p=0.0495)。マウス頭蓋骨欠損モデルでは、UDPHA_pの気孔内に骨梁構造の再生を広範囲に認め、骨梁構造は足場材の深部まで及んでいた。一視野中に再生された骨梁構造の量的な比較においても、UDPHA_pはIP-CHAに比較して有意に多くの骨再生を認めた(7.045±2.055 % vs. 2.514±1.224 %, p=0.0209)。

【結論】気孔率84%のUDPHA_pは、IP-CHAと同様の強度を持ちながら、高い細胞増殖性・細胞侵入性を持ち、より早期に、多くの骨形成を示した。UDPHA_pは、骨補てん剤としてだけでなく、再生医療にも応用可能な優れた骨形成足場材であると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

配向連通孔ハイドロキシアパタイト (unidirectional porous hydroxyapatite, UDPHA_p) は、軸方向に貫通する連通孔を持った骨再生スキャフォールドである。田中はUDPHA_pを、組織工学に用いられる三次元スキャフォールドとして、現在臨床で広く用いられている非配向性の連通孔ハイドロキシアパタイト (interconnected calcium porous HA_p ceramic, IP-CHA) と比較して評価した。

田中は、UDPHA_pとIP-CHAの μ CTによる気孔率・比表面積の測定、強度試験、rhBMP-2の徐放能力の評価、SEMによる表面の観察を行った後、in vitroの実験として、接着した細胞形態の観察、蛍光顕微鏡による細胞接着様式の観察、Alamar blue

assay による細胞増殖性の評価を行い、さらに in vivo の実験として、recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) を添加した UDPHAp と IP-CHA をマウス頭蓋骨欠損部へ移植し、骨形成能を評価した。

その結果、田中は次の結論を得た。

1. IP-CHA と比較して、UDPHAp は高い気孔率を示したが、比表面積は同程度であった。
2. UDPHAp の軸方向への圧縮強度は IP-CHA よりも高く、破断エネルギーは同程度であった。
3. UDPHAp は、IP-CHA よりも緩徐に rhBMP-2 を放出した。
4. In vitro の実験において、UDPHAp 上の細胞は、足場材深部まで接着していた。

5. 細胞増殖試験でも、UDPHAp は IP-CHA に比較して有意に多く細胞を増殖させた。

6. マウス頭蓋骨欠損モデルでは、UDPHAp の気孔内に骨梁構造の再生を広範囲に認め、骨梁構造は足場材の深部まで及んでいた。一視野中に再生された骨梁構造の量的な比較においても、UDPHAp は IP-CHA に比較して有意に多くの骨再生を認めた。

これらの結果より、気孔率84%の UDPHAp は、骨補てん剤としてだけではなく、再生医療にも応用可能な優れた骨形成足場材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。

Shinshu University Graduate School of Medicine Prevalence of Fabry Disease and *GLA* c.196G>C Variant in Japanese Stroke Patients (信州大学大学院医学研究科 日本人脳卒中患者における Fabry 病および *GLA* c.196G>C 変異の頻度)

永 松 清志郎

(論文の内容の要旨)

【背景】 Fabry 病は *GLA* 遺伝子変異により α ガラクトシダーゼ A (α -Gal A) が欠損する X連鎖性のリソソーム蓄積病で腎臓、心臓、脳、皮膚の血管内皮などにグルボトリアシルセラミド (GL-3) が蓄積する。本症は古典型、亜型、女性 Fabry 病に分類されるが、亜型や女性 Fabry 病の患者は成人発症のことが多く家族歴を認めないこともある。このため、Fabry 病と診断されず、腎不全、心肥大、脳卒中などの common disease と誤診されている可能性がある。以前に我々は、男性脳梗塞患者における *GLA* 遺伝子変異をスクリーニングし、*GLA* c.196G>C (p.E66Q) 変異が高齢日本人男性の小血管性脳梗塞の遺伝的リスクとなっていることを示した。しかし、この研究では酵素活性が低下している患者のみ遺伝子解析したため c.196G>C 変異の頻度を過小評価している可能性があった。さらに、この研究は女性や脳出血患者を対象としていなかった。本研究では女性や脳出血を含めた脳卒中患者における Fabry 病の頻度を解析するとともに、全症例で *GLA* c.196G>C 変異のスクリーニングを実施し、本変異の病的意義を検討した。

【方法】 2012年5月から2016年3月の期間に長野県内の6施設を受診した588名の脳卒中患者を対象とした (TOAST 分類で大血管性脳梗塞113名、心原性脳塞栓88名、小血管性179名、その他の分類8名、分類

不明88名、脳出血126名、重複14名)。インフォームド・コンセントを得た後、対象患者の臨床情報を調査票に記載し、血液サンプル採取した。この血液サンプルを用いて、ELISA 法による α -Gal 活性の測定および *GLA* 遺伝子の検索を行った。*GLA* 遺伝子解析は、全ての患者で c.196G>C 変異の有無を ABI TaqMan allelic discrimination kit and the ABI7500 Sequence Detection System を用いてスクリーニングし、本変異が判明した場合は *GLA* 遺伝子の全エクソンおよび隣接するイントロン領域をダイレクトシーケンス法で解析した。さらに、 α -Gal 活性が10 AgalU 以下の場合にも *GLA* 遺伝子の全エクソンと隣接領域をダイレクトシーケンス法で解析した。

【結果】 2名の女性で α -Gal 活性がカットオフ以下 (<10 AgalU) で、内1名で *GLA* 遺伝子 c.2T>C (p.M1T) 変異 (既報告の Fabry 病の病原性変異) を認めた。患者は65歳で心原性脳塞栓を発症。Fabry 病の家族歴はなかった。高血圧と左室肥大の既往があり、 α -Gal 活性は5.5 AgalU と著減していた。全患者における *GLA* c.196G>C 変異の解析では、本変異を男性5名、女性2名で認めた。男性 c.196G>C 変異陽性群の α -Gal 活性は 13.1 ± 2.6 AgalU で、変異陰性群 (25.2 ± 8.7 AgalU) と比べて有意に酵素活性が低下していた ($P=0.0005$)。一方、本変異を有する女性では酵素活性の低下は認めなかった。本変異を

有する患者の脳卒中の病型は、男性3名が小血管性脳梗塞、男性2名と女性1名が大血管性脳梗塞、女性1名が心原性脳塞栓であった。脳卒中患者における c.196G>C 変異の頻度を一般日本人集団と比較すると、男性の小血管性脳梗塞および非心原性脳塞栓患者（小血管性+大血管性）において本頻度の頻度が有意に高かった（小血管性脳梗塞：オッズ比3.94, P=0.048；非心原性脳梗塞：オッズ比4.08, P=0.012）。

一方、女性脳卒中患者における c.196G>C 変異の頻度は一般人口との間に有意差がなかった。

【考察】脳卒中は Fabry 病の主要な合併症であるが、高齢者の脳卒中患者における Fabry 病は非常に稀と考えられていた。しかし今回、脳卒中患者を対象としたスクリーニング検査で、はじめて高齢 Fabry 病患者が同定された。以上から、高齢脳卒中患者においても、特に心肥大や腎不全の合併がある場合には、Fabry 病を鑑別診断として考慮する必要があると考えられた。また、本研究では小血管性脳梗塞と非心原性脳塞栓症の男性患者において *GLA* c.196G>C 変異の頻度が高いことが判明した。本変異は低 α -Gal 活性をきたし、成人発症の亜型 Fabry 病の原因となると考えられていた。しかし最近、本変異は日本人や韓国人で比較的高頻度にみられる正常多型とも報告され、その臨床的な意義は定まっていない。本研究で、*GLA* 遺伝子 c.196G>C 変異は日本人男性の小血管性脳梗塞と非心原性脳塞栓患者における危険因子となっている可能性が示唆された。一方、女性においては、本変異は脳卒中患者の危険因子となっておらず、c.196G>C 変異のヘテロ接合は病原性がないことが示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

Fabry 病は *GLA* 遺伝子変異により α ガラクトシダーゼ A (α -Gal A) が欠損する X 連鎖性のリソソーム蓄積病で腎臓、心臓、脳、皮膚の血管内皮などに糖脂質が蓄積する。本症の亜型や女性患者は、腎不全、心肥大、脳卒中などの common disease と誤診されている可能性がある。以前に我々は、*GLA* c.196G>C

(p.E66Q) 変異が高齢日本人男性の小血管性脳梗塞の遺伝的リスクであることを示したが、c.196G>C 変異のリスクを過小評価した可能性があった。本研究では、女性や脳出血を含めた脳卒中患者における Fabry 病の頻度と、全症例で *GLA* c.196G>C 変異を解析した。

対象は588名の脳卒中患者。対象患者から血液サンプルを採取し、全例で ELISA 法による α -Gal 活性の測定および、ABI TaqMan allelic discrimination kit and the ABI7500 Sequence Detection System を用いた *GLA* c.196G>C 変異の有無の検索を行った。 α -Gal 活性が10 AgalU 以下の患者と、c.196G>C 変異を有している患者に対しては、*GLA* 遺伝子全翻訳領域のダイレクトシーケンスを行った。

その結果、永松は次の結果を得た。

1. 2名の女性で α -Gal 活性がカットオフ以下で、内1名で *GLA* 遺伝子 c.2T>C (p.M1T) 変異を認めた。
2. *GLA* c.196G>C 変異の解析では、本変異を男性5名、女性2名で認めた。c.196G>C 変異の頻度を一般日本人集団と比較すると、男性の小血管性脳梗塞および非心原性脳塞栓患者（小血管性+大血管性）において本頻度の頻度が有意に高かった（小血管性脳梗塞：オッズ比3.94, P=0.048；非心原性脳梗塞：オッズ比4.08, P=0.012）。一方、女性脳卒中患者における c.196G>C 変異の頻度は、一般人口との間に有意差がなかった。
3. 男性 c.196G>C 変異陽性群の α -Gal 活性は変異陰性群に比べて有意に酵素活性が低下していた (P=0.0005)。

これらの結果より、*GLA* 遺伝子 c.196G>C 変異は日本人男性の小血管性脳梗塞と非心原性脳塞栓患者における危険因子となっている可能性が示唆された。また脳卒中患者を対象としたスクリーニング検査で、はじめて高齢 Fabry 病患者が同定された。

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。

The histological characteristics and clinical outcomes of lung cancer in patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE (気腫合併肺線維症) 合併肺癌患者の組織学的特徴及び予後)

張 萌

（論文の内容の要旨）

【Background】 Combined pulmonary fibrosis and

emphysema (CPFE) is an important risk factor for lung cancer (LC), because most patients with CPFE

are smokers. However, the histological characteristics of LC in patients with CPFE (LC-CPFE) remain unclear. We conducted this study to explore the clinicopathological characteristics of LC-CPFE.

【Methods】 We retrospectively reviewed data from 985 patients who underwent resection for primary LC, and compared the clinicopathological characteristics of patients with LC-CPFE and non-CPFE LC.

【Results】 We identified 72 cases of LC-CPFE, which was significantly associated with squamous cell carcinoma (SqCC) histology ($n=46$, $p<0.001$) and higher tumor grade ($n=44$, $p<0.001$), compared to non-CPFE LC. Most LC-CPFE lesions were contiguous with fibrotic areas around the tumor, and this association was independent of tumor location ($n=59$, 81.9 %). Furthermore, dysplastic epithelium was identified in the fibrotic area for 31 (52.5 %) LC-CPFE lesions. Moreover, compared to patients with pulmonary fibrosis alone in the non-CPFE group ($n=31$), patients with CPFE were predominantly male ($p=0.008$) and smokers ($p<0.001$), with LC-CPFE predominantly exhibiting SqCC histology ($p=0.01$) and being contiguous with the tumor-associated fibrotic areas ($p<0.001$). Multivariate analysis revealed that CPFE was an independent predictor of overall survival (hazard ratio: 1.734; 95 % confidence interval: 1.060-2.791; $p=0.028$).

【Conclusions】 Our results indicate that LC-CPFE has a distinct histological phenotype, can arise from the dysplastic epithelium in the fibrotic area around the tumor, and is associated with poor survival outcomes.

(論文審査の結果の要旨)

Combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE) is an important risk factor for lung cancer (LC), because most patients with CPFE are smokers. However, the histological characteristics of LC in patients with CPFE (LC-CPFE) remain unclear. Therefore, we explored the clinicopathological characteris-

tics of LC-CPFE in this study.

We retrospectively reviewed data from 985 patients, which were resected for primary lung cancer at Shinshu University Hospital between December 1995 and December 2013. Then, according to Cottin et al.'s criteria of lungs with CPFE, we divided lung cancer patients into four groups (LC-CPFE, LC-PF, LC-Emp, and LC-Norm) based on their HRCT findings. To evaluate the clinicopathological significance of LC-CPFE patients after lung resection, we compared the clinicopathological characteristics and survival outcomes of four groups. To explore the histological characteristics of LC-CPFE, all histological slides from LC-CPFE and LC-PF group were histologically evaluated, and their clinicopathological characteristics were compared, especially for the changes of tumor background (including epithelium changes among tumor surrounding lesions).

The following conclusions are obtained from this study.

1. The patients with LC-CPFE were essentially smokers, and were predominantly male and older, compared to those with LC-non-CPFE.
2. The patients with LC-CPFE were diagnosed at a relatively high stage, and they exhibited poor survival outcomes.
3. Squamous cell carcinoma was a predominant histological subtype in the LC-CPFE patients.
4. In the LC-CPFE patients, most lung cancers can derived from the fibrotic area.
5. CPFE should be considered as an important background disease for patients who have undergone resection of lung cancer.

Our study indicate that LC-CPFE has a distinct histological phenotype, may arise from the dysplastic epithelium in the fibrotic area around the tumor, and is associated with poor survival outcomes.

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。

Relationship between muscle-tendon length, range of motion, and resistance to passive movement in children with normal and increased tone (筋過緊張を呈する児と定型発達児における、筋・腱の長さ、関節可動域、他動的運動に対する抵抗性の関係について)

松 清 あゆみ

(論文の内容の要旨)

【目的】 5 kg の張力を付加する前後での筋腱長と関節可動域の測定値変化から、他動的運動への抵抗性を定量化し、これらの変化と筋緊張（正常から過緊張まで）を比較し相関関係を調べる。

【対象と方法】 この観察研究はコホートデザインを採用した。脳性麻痺児（29名）と定型発達児（12名）がこの研究に参加した。右足関節底屈筋の筋緊張評価として Modified Ashworth Scale（MAS）を用いた。超音波画像装置は右腓腹筋内側頭の筋腱長変化を測定するために用いた。ゴニオメーターは右足関節可動域変化（ROM）を測定するために用いた。

【結果】 MAS との比較では、ROM 変化は筋腱複合体長の変化に続いて、高い構成概念妥当性（収束的妥当性と弁別的妥当性）を示した。したがって、これらの指標は筋過緊張を呈する患者の他動的運動の抵抗性を定量的評価する際、MAS より良いものとなる可能性がある。

【結論】 この研究では筋腱複合体の粘弾性の変化（筋長と筋腱長変化）を測定することが ROM 変化と同様に相当するもので、他動的運動の抵抗性評価のためのより良い手法となり得ることを示唆するものである。

【Purpose】 The aim of this study was to quantify the resistance to passive movement by measuring changes in muscle-tendon length and joint range of motion (ROM), before and after applying a standardized 5-kilogram tension force, and to correlate and compare these changes to muscle tone.

【Subjects and Methods】 Children with cerebral palsy (n=29) and typically developed children (n=12) participated in this observational study. The modified Ashworth scale (MAS) was used to assess tone in the right plantarflexor muscle. An ultrasound-imaging device was used to measure Δ muscle-tendon length in the right medial gastrocnemius muscle, and a goniometer was used to measure right ankle Δ ROM.

【Results】 Compared with the MAS, the results show-

ed that Δ ROM had the highest construct validity (convergent and discriminant) followed by Δ muscle-tendon unit length. Therefore, these parameters may be better alternatives to the MAS for the quantitative assessment of resistance to passive movement in patients with increased tone.

【Conclusion】 This study demonstrated that measuring the change in the passive properties of the muscle-tendon unit, as well as the corresponding change in ROM, might provide better options for assessing resistance to passive movement or muscle tone.

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、脳性麻痺患者等で認められる筋緊張亢進状態である痙性を形態学的・構造学的特性の両面から定量的に測定し、他動的運動に対する抵抗性との関係を調査することを目的としたものである。

方法として、MAS4に分類される他動的関節運動が困難な者、研究開始前1年以内に外科的手術を受けた児、研究開始前6カ月以内にボツリヌス菌毒素注射を受けた児、てんかん等の発作を頻回に呈する児、安静腹臥位姿勢を保持できない児、を除外基準とし、5～18歳までの定型発達児12名と脳性麻痺児29名を対象としている。そして、過剰に抵抗性の亢進した筋と、神経兆候の無い筋で違いを検討することを考え、研究目的は、5 kg の力で牽引する前後での筋・腱長と関節可動域（ROM）の変化から他動的関節運動の抵抗性と比較した。

その結果、収束的妥当性では、標準化した腱長変化と関節抵抗性の相関は見られず、筋長変化はやや相関があり、ROM が最も高い相関を示したとしている。また、判別的妥当性では ROM の結果で、各群間差がみられ、段階を少なくしたスケールでは、ROM だけでなく筋長変化でも有意差を認めたが、超音波画像における筋の羽状角、筋線維長については、いずれも妥当性を認めなかったとしている。以上のことから、張力を規定した状態での ROM の変化や筋長の変化は、MAS に変わる有益な定量的評価であると考察している。

本研究の結果、関節可動域の範囲内で動きがあれば、

張力を規定した状態で角度変化を測定することで、脳性麻痺患者等の痙性の定量的評価指標として活用できる可能性が示されたことは、理学療法の科学性の向上

につながる重要な知見になると考える。

以上より、主査、副査は一致して、本論文を博士後期課程の学位論文として価値があるものと認めた。

Availability, usage, and factors affecting usage of electrophysical agents by physical therapists: a regional cross-sectional survey (物理療法機器の保有状況, 使用状況, および使用に影響を与える要因: 理学療法士に対する調査研究)

阿 部 裕 一

(論文の内容の要旨)

【背景】物理療法は, “use of electrophysical and bio-physical energies for purposes of evaluation, treatment and prevention of impairments, activity limitations, and participation restrictions (電気物理学的または生物物理学的エネルギーを用い, 評価や治療, 障害や活動制限, 参加制約を予防するため, 治療手段として使用する)” と定義され, 理学療法士, 作業療法士, アスレチックトレーナー, 健康産業に関わる人などに用いられている。

物理療法が理学療法士にとって核となる治療法の一つであることは知られているが, 物理療法教育, 使用方法について, エビデンスやトレンドなどを元に再評価が必要であるという議論もある。それに関する longitudinal study は日本および海外では行われておらず, cross sectional study について, 海外では過去数十年の間に数カ国で実施されており, 物理療法は現在も用いられているものの以前ほどではないという報告がされた。日本でも実施されているが, 多くの研究が10~20年前に発表されたものであるのに加え, 不十分な報告や, 被験者の偏りなどもあり, 物理療法を使用する際に影響を与える因子については報告されていない。

本研究では, 長野県内の理学療法士に対し調査票を配布し, 物理療法機器の保有状況, 使用状況, および使用に影響を与える要因について調査を行うことを目的とした。本研究は信州大学医倫理審査会の承認を得た。【方法】2013年度長野県理学療法士会会員所属施設名簿を元に, 登録されている245施設, 1,571名の理学療法士に対し, 2014年7月所属施設宛にアンケートを送付した。22種類の機器について保有状況, 使用状況, 使用に影響を与える要因, これらを集計した。また, 使用状況と物理療法機器を使用する際の confidence との相関についても検討を行うこととした。

【結果】有効な返信数は170施設 (69%), 1099通 (70%) だった (男性655名, 女性436名)。回答者の平均

年齢31.8 (±8.4) 歳, 臨床経験年数8.6 (±7.9) 年, 県外養成校卒業者が766名 (70%) であった。

保有状況については, ホットパックが最も多く (88%), 低周波治療器 (76%), 超音波 (68%) の順であった。使用状況についてはホットパックが最も使用されており (72%), 次いで超音波 (61%), コールドパック (59%) の順であった。物理療法に対する confidence についてはホットパックが最も高く (75%), 次いでコールドスプレー (49%), 超音波 (44%) であった。物理療法機器を使用する際に影響を与える因子では機器の保有状況が最も高く (80%), 過去の経験 (79%), 研究によるエビデンス (79%) が続いた。confidence と使用状況について, 紫外線, iontophoresis, magnetic field 以外に相関がみられた。

【考察】今回調査対象の地域では, 物理療法機器は多くの病院で保有されていることが明らかとなった。20年前の報告と比較し, パラフィン, 赤外線, マイクロ波などいくつかの機器については減少傾向にあった。一方で, ホットパック, 超音波は大きな変化なく保有されていることが明らかとなった。使用に影響を与える要因について, 外的要因 (機器の保有状況, エビデンス, ガイドライン, 教科書, プロトコル, デモンストレーション) と内的要因 (過去の経験, 教育) に分類することができた。外的要因である機器の保有状況と内的要因と直接的に関係がある confidence は, 物理療法の使用に最も直接的な影響を与えているものであると考えられた。外的要因を変化させることは困難であるが, 内的要因については教育やトレーニングなどにより影響を与えることができると考える。この外的要因, 内的要因の関係性は複雑で, 物理療法の変化を理解するには更なる調査が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は理学療法士が物理療法として使用する治療機器の保有状況, 使用状況, および使用に影響を与える要因の3つについて, 横断調査を行ったものである。

これまで国内外では縦断調査がほとんどなく実態の変遷も未確認のままであった。国内では20数年前に実施されて以来、大きな規模のものとして行われた。この点からも本研究を行う社会的必要性が伺える。対象を長野県理学療法士協会に所属する県内理学療法士としているが、そのほとんどが養成教育を他県で受けてきたことから同一の教育を受けたわけではなく多様であり、教育課程に違いを持つことである程度一般化できる可能性はある。が、無作為抽出を考えるならば、厳密には日本理学療法士協会の協力なども仰いで将来的には全国的な規模での調査が望ましいと言える。調査項目は海外の先行研究による質問紙を参考に作成している。この点は、調査項目を独自に作成する手続きを予備調査でも踏襲し、先行研究の調査項目を利用していることから、ある程度の妥当性を確保したものと思われる。質問のうち Confidence（使用に対する自信）を訪ねている項目があるが、self efficacy（自己効力感）と共通する要素を含んでいると思われる。self efficacy とは行動を起こす前に感じる「遂行可能感」、自分がこのようなことができるといった考えを指す。社会心理学で用いられるこのような評価指標を用いたほうが仮説を明確にできる可能性もあることから、使

用に対する自信を測定する質問紙尺度を作成するなどを今後の研究課題としてもらいたい。

結果では、保有状況、使用状況、および使用に影響を与える要因を示している。保有状況ではパラフィンバス、赤外線、マイクロ波が減少傾向にあった。恒常的に使用されているものはホットパック、超音波があげられた。使用状況では、ホットパック、超音波、コールドパックの順に使用されていた。使用に影響を与える要因では、機器の保有状況、過去の経験、エビデンスが大きかった。機器の使用状況と Confidence は相関を認めていた。

考察では、使用状況に最も影響を及ぼす要因として confidence を論じている。横断調査では因果関係は明確にはできないことから、考察に記された意見は仮説の域を出ない。研究の限界と今後の展望に記された通り、今回の横断調査データの二次解析や縦断調査が必要といえる。何れにしても実態を明らかにすることができたので、使用状況への影響を及ぼす要因とその構造、そして、教育的な立場からの介入研究へと続けてゆくといった本研究の社会的意義があると考えられる。

以上の点から、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。

Validity of gait asymmetry estimation by using an accelerometer in individuals with hemiparetic stroke (脳卒中片麻痺患者における加速度計を用いた歩行非対称性評価の妥当性)

小 宅 一 彰

(論文の内容の要旨)

【緒言】歩行非対称性は、脳卒中片麻痺患者における代表的な歩行特性のひとつである。歩行非対称性は、運動学習や転倒リスクの評価、治療効果の予測において重要な指標である。加速度計は、床反力計など従来の歩行解析機器に比べ、動作や測定環境の制約が少なく、臨床現場でも使用しやすいという利点がある。体幹前方加速度のピークは歩行時の初期接地に一致すると報告されていることから、ステップ時間非対称性は体幹前後加速度から推定できる可能性がある。また、ステップ長の延長に伴い、体幹の上下変位が増加すると報告されている。体幹上方加速度は、荷重応答期に生じる床反力鉛直成分に相当することから、ステップ長の非対称性を反映する可能性がある。そこで本研究では、脳卒中片麻痺患者におけるステップ時間およびステップ長の非対称性について、加速度計を用いた評価の基準関連妥当性を検証した。

【方法】対象は、回復期病棟に入院中の初発脳卒中患者24名であった。対象者は、年齢が 65.8 ± 12.0 歳、男性が18名、脳卒中発症後期間が 96.5 ± 45.3 日であった(平均 \pm 標準偏差)。麻痺側下肢の運動機能は、Brunnstrom stage で stage III が3名、stage IV が5名、stage V が12名、stage VI が4名であった。測定課題は、16 m の歩行路において、杖の使用や徒手的な介助がない状態で至適速度での歩行を5回実施した。計測機器は加速度計と床反力計を用い、これらの機器は歩行中に同時にデータを計測した。加速度計は、第三腰椎棘突起部に弾性ベルトで固定し、歩行中の体幹加速度を測定した。測定された体幹加速度は、前方加速度のピークを初期接地とみなして定常歩行5周期分を加算平均した。加速度データの加算平均において、時間軸は1歩行周期が100%となるように正規化した。ステップ時間非対称性を推定するために、体幹前方加速度ピークの時間間隔を麻痺側および非麻痺側それぞれにおいて

算出した。また、ステップ長非対称性を推定するために、初期接地以降に連続して発生する体幹上方加速度の積分値を麻痺側および非麻痺側それぞれにおいて算出した。基準となるステップ時間およびステップ長は、歩行路の中央に設置された床反力計で測定した。床反力計で算出される足圧中心点を用いて、連続4歩以上のステップ時間およびステップ長を測定し、麻痺側および非麻痺側それぞれの平均値を求めた。さらに、歩行速度は床反力計を用いて測定した重複歩距離および重複歩時間から算出した。非対称性は、麻痺側の測定値を非麻痺側の測定値で除すことで算出した。

統計解析には、5回測定した平均値を代表値として用いた。正規性を検定した結果、歩行速度以外の変数は正規分布に従わなかったため、統計解析ではノンパラメトリック検定を適用した。ステップ時間およびステップ長それぞれの非対称性について、計測機器間の相関を検定するために Spearman 順位相関係数を用いた。さらに、加速度計による非対称性の推定誤差と歩行速度の相関を Spearman 順位相関係数で検定した。推定誤差は、計測機器間における誤差の絶対値を床反力計による測定値で正規化することで算出した。すべての統計解析において、有意水準は5%とした。

【結果】 対象者の歩行速度は、 0.82 ± 0.25 m/sであった。ステップ時間非対称性は、加速度計による推定値が1.22 (1.10-1.40)、床反力計による測定値が1.12 (1.04-1.31) であり (中央値 (四分位範囲)), 有意な正の相関を認めた ($\rho=0.83$, $p<0.01$)。ステップ長非対称性は、加速度計による推定値が1.17 (0.94-1.41)、床反力計による測定値が1.06 (1.02-1.19) であり、有意な正の相関を認めた ($\rho=0.64$, $p<0.01$)。ステップ時間非対称性の推定誤差は7.7 (4.9-11.2) %, ステップ長非対称性の推定誤差は14.1 (5.9-24.1) %であった。歩行速度と推定誤差の関係は、ステップ時間非対称性 ($\rho=-0.15$, $p=0.48$) とステップ長非対称性 ($\rho=-0.21$, $p=0.32$) のいずれにおいても有意な相関は認めなかった。

【考察】 本研究の結果より、加速度計を用いて脳卒中患者のステップ時間およびステップ長の非対称性を推定できる可能性が示された。また加速度計による非対称性の推定誤差は、歩行速度とは関連しないことが明らかとなった。本研究における加速度計を用いた歩行非対称性の推定方法を臨床応用するためには、今後の研究において推定誤差が生じる原因の特定と推定精度

を改善する方法の確立が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、脳卒中片麻痺患者における代表的な歩行特性のひとつである歩行非対称性を、床反力計など従来の歩行解析機器に比べ、動作や測定環境の制約が少なく、臨床現場でも使用しやすい小型で軽量の加速度計を用いて定量的に解析した研究である。

先行研究においては、体幹前方加速度のピークは、歩行時の初期接地に一致すると報告されていることから、ステップ時間非対称性は体幹前後加速度から推定できる可能性があり、また、ステップ長の延長に伴い、体幹の上下変位が増加すると報告されている。体幹上方加速度は、荷重応答期に生じる床反力鉛直成分に相当することから、ステップ長の非対称性を反映する可能性があると考えられている。そこで本研究では、脳卒中片麻痺患者におけるステップ時間およびステップ長の非対称性について、加速度計を用いた評価の基準関連妥当性を検証したものである。

対象は、回復期病棟に入院中の初発脳卒中患者24名で、年齢が 65.8 ± 12.0 歳、男性が18名、脳卒中発症後期間が 96.5 ± 45.3 日であった (平均 \pm 標準偏差)。麻痺側下肢の運動機能は、Brunnstrom stageでstage IIIが3名、stage IVが5名、stage Vが12名、stage VIが4名であった。

結果として、ステップ時間非対称性は、加速度計による推定値が1.22 (1.10-1.40)、床反力計による測定値が1.12 (1.04-1.31) であり (中央値 (四分位範囲)), 有意な正の相関を認め、ステップ長非対称性は、加速度計による推定値が1.17 (0.94-1.41)、床反力計による測定値が1.06 (1.02-1.19) であり、有意な正の相関を認めた ($\rho=0.64$, $p<0.01$) ことから、小型で軽量の加速度計を用いて、脳卒中患者のステップ時間およびステップ長の非対称性を推定できる可能性が示されたとしている。

本研究の結果、床反力計や三次元動作解析装置など的高額で大型の測定機器を用いなくても、小型で軽量の加速度計によって、脳卒中片麻痺患者の歩行時の非対称性を定量的に解析できることが示されたことは、理学療法の科学性の向上につながる重要な知見になるものと考えられる。

以上より、主査、副査は一致して、本論文を博士後期課程の学位論文として価値があるものと認めた。