

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
木村和広 (内科学(5))	甲第1096号	29. 3.31	Early administration of tolvaptan preserves renal function in elderly patients with acute decompensated heart failure (高齢急性非代償性心不全患者へのトルバプタン早期投与は腎機能を保護する)	今村 浩	山田充彦 桑原宏一郎
郭 維恒 (神経可塑性学)	甲第1097号	29. 3.31	Protein components of the backbone structure of postsynaptic density of type I excitatory synapses (タイプ I 興奮性シナプスにおけるシナプス後肥厚部の基本骨格タンパク質成分の解析)	田 渕 克 彦	樋口京一 竹下敏一
田中厚誌 (運動機能学)	甲第1098号	30. 3.31	Knee extension strength and post-operative functional prediction in quadriceps resection for soft-tissue sarcoma of the thigh (大腿四頭筋を切除した軟部肉腫症例の膝伸展筋力と術後機能予測)	小泉知展	能勢 博 杠 俊介
西村仁志 (内科学(5))	甲第1099号	30. 3.31	Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with High Ankle-Brachial Index from the IMPACT-ABIStudy (ABI高値を呈する患者群の臨床的特徴及び予後検討)	岡田健次	駒津光久 沢村達也
鈴木健史 (画像医学)	甲第1100号	30. 3.31	Evaluation of splenic perfusion and spleen size using dynamic computed tomography: usefulness in assessing degree of liver fibrosis (ダイナミックCTによる脾臓径および脾血流動態の評価: 肝線維化評価における有用性)	中山 淳	佐々木克典 田中榮司
植村一貴 (運動機能学)	甲第1101号	29. 3.31	Myostatin promotes tenogenic differentiation of C2C12 myoblast cells through Smad3 (MyostatinはSmad3を介して筋芽細胞株C2C12の腱細胞分化を誘導する)	樋口京一	菅野祐幸 杠 俊介
松嶋 聡 (内科学(3))	甲第1102号	29. 3.31	Principal component analysis for ataxic gait using a triaxial accelerometer (3軸加速度計を用いた失調性歩行の主成分分析)	能勢 博	加藤博之 沢村達也
MVUNTA DAVID HAMISI (産科婦人科学)	甲第1103号	29. 9.30	SIRT1 regulates the chemoresistance, and invasiveness of ovarian carcinoma cells (SIRT1は卵巣癌細胞の抗がん剤耐性および浸潤能を調節する)	伊藤研一	菅野祐幸 中沢洋三

審査学位論文要旨

徐 哲 (加齢生物学)	甲第1104号	29. 9.30	Coenzyme Q10 Improves Lipid Metabolism and Ameliorates Obesity by Regulating CaMKII-Mediated PDE4 Inhibition (コエンザイムQ10はCaMKIIを介してPDE4の発現を抑制することにより, 肥満と脂質代謝を改善する)	山田充彦	竹下敏一 能勢博
小川有香 (内科学(3))	甲第1105号	30. 3.31	Survey of epidemiology, clinical picture and current treatments for elderly-onset (≥65 years) patients with myasthenia gravis in Nagano Prefecture, Japan (長野県における, 高齢発症重症筋無力症患者の疫学, 臨床像, 最新の治療に関する臨床調査)	花岡正幸	中山淳 小泉知展
北野友裕 (耳鼻咽喉科学)	甲第1106号	29. 3.31	POU4F3 mutation screening in Japanese hearing loss patients: Massively parallel DNA sequencing-based analysis identified novel variants associated with autosomal dominant hearing loss (次世代シーケンサーにより見出された日本人難聴患者におけるPOU4F3遺伝子変異)	中山淳	本田孝行 田淵克彦
市川通太郎 (救急集中治療学)	甲第1107号	29. 3.31	Influence of body position during Heimlich maneuver to relieve supralaryngeal obstruction: a manikin study (喉頭上閉塞に対するハイムリック法施行時の体位の影響: マネキン研究)	川眞田樹人	多田剛 能勢博
家里明日美 (外科学(2))	甲第1108号	29. 9.30	PATZ1 knockdown enhances malignant phenotype in thyroid epithelial follicular cells and thyroid cancer cells (PATZ1をノックダウンすると甲状腺濾胞上皮細胞および甲状腺癌細胞の悪性形質が増強される)	塩沢丹里	宮川眞一 中山淳
内田晃司 (スポーツ医学)	甲第1109号	30. 3.31	Interval walking training and nutritional intake to increase plasma volume in elderly (高齢者におけるインターバル速歩トレーニング期間中の糖質・蛋白質補助食品摂取が血漿量増加に与える効果)	駒津光久	小泉知展 今村浩
中村謙太 (皮膚科学)	甲第1110号	29. 3.31	Involvement of local renin-angiotensin system in immunosuppression of tumor microenvironment (腫瘍微小環境の免疫抑制への局所性レニン-アンジオテンシン系の関与)	竹下敏一	菅野祐幸 小泉知展
宮原大貴 (加齢生物学)	甲第1111号	29. 3.31	Comprehensive proteomic profiles of mouse AApoAII amyloid fibrils provide insights into the involvement of lipoproteins in the pathology of amyloidosis (マウスAApoAIIアミロイド線維の包括的なプロテオーム分析結果はアミロイドーシスの病理におけるリポタンパク質の関与を示唆する)	山田充彦	瀧伸介 竹下敏一

審査学位論文要旨

上野 賢一 (加齢生物学)	甲第1112号	30. 3.31	Advantage of administering tacrolimus for improving prognosis of patients with polymyositis and dermatomyositis (多発性筋炎および皮膚筋炎患者における予後改善のためのタクロリムス導入の有用性)	樋口 京一	本田 孝行 加藤 博之
滝沢 崇 (運動機能学)	甲第1113号	30. 3.31	Titanium fiber plates for bone tissue repair (骨組織修復のためのチタンファイバープレート)	佐々木 克典	本郷 一博 栗田 浩
藤井 雄 (脳神経外科学)	甲第1114号	30. 3.31	Threshold of the extent of resection for WHO grade III gliomas: retrospective volumetric analysis of 122 cases using intraoperative MR imaging (術中 MRI を使用した初発退形成性神経膠腫の摘出率と予後に関する後方視的体積分析)	多田 剛	角谷 眞澄 菅野 祐幸
翟 留玉 (循環病態学)	甲第1115号	30. 3.31	Endogenous calcitonin gene-related peptide suppresses ischemic brain injuries and progression of cognitive decline (カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、虚血性脳障害および認知機能障害の進展を抑制する)	菅野 祐幸	多田 剛 田 潤 克彦
堤 圭治 (脳神経外科学)	甲第1116号	30. 3.31	Mechanical evaluation of cerebral aneurysm clip scissoring phenomenon: comparison of titanium alloy and cobalt alloy (脳動脈瘤クリップにおけるシザリング現象の検討: チタン合金とコバルト基合金製クリップの比較)	多田 剛	加藤 博之 栗田 浩
山口 晃典 (内科学(2))	甲第1117号	30. 3.31	Identification of chronic kidney disease patient characteristics influencing the renoprotective effects of febuxostat therapy: a retrospective follow-up study. (フェブキソスタット治療の腎保護効果に影響を与える慢性腎臓病患者背景の検討—後方視的観察研究)	山田 充彦	駒津 光久 石塚 修
藤森 尚之 (内科学(2))	甲第1118号	30. 3.31	Controlled attenuation parameter is correlated with actual hepatic fat content in patients with non-alcoholic fatty liver disease with none-to-mild obesity and liver fibrosis (肥満・肝線維化が無—軽度の非アルコール性脂肪性肝疾患患者では、減衰制御パラメータが実際の肝脂肪量と相関する)	角谷 眞澄	菅野 祐幸 青山 俊文
上原 将志 (運動機能学)	甲第1119号	30. 3.31	Pedicle screw loosening after posterior spinal fusion for adolescent idiopathic scoliosis in upper and lower instrumented vertebrae having major perforation (思春期特発性側弯症手術における椎弓根スクリューの緩みは頭尾側固定端で生じやすい)	杠 俊介	角谷 眞澄 本郷 一博

審査学位論文要旨

田中宏和 (歯科口腔 外科学)	甲第1120号	29. 3.31	Mechanical Properties and Histological Evaluation of Bone Grafting Materials Containing Different Ratios of Calcium Phosphate Cement and Porous β -tricalcium Phosphate Granules (配合比を変えたリン酸カルシウムセメントと多孔質 β -リン酸三カルシウム顆粒混和骨補填材料の機械的性質と組織学的評価)	加藤博之	本郷一博 中山淳
小坂 充 (内科学(1))	甲第1121号	30. 3.31	A Four-Center Retrospective Study of the Efficacy and Toxicity of Low-Dose Trimethoprim-Sulfamethoxazole for the Treatment of Pneumocystis Pneumonia in Patients without HIV Infection (非 HIV 感染症患者に発症したニューモシスチス肺炎に対する低用量 ST 合剤による治療の効果と毒性～4施設における後方視的研究～)	本田孝行	中沢洋三 大森 栄
深澤 歩 (画像医学)	甲第1122号	30. 3.31	Predictive Factors for Deterioration of Lower Urinary Tract Symptoms After Iodine-125 Brachytherapy in Prostate Cancer Patients (前立腺癌に対する密封小線源永久挿入療法における下部尿路症状増悪因子の検討)	石塚 修	塩沢丹里 小泉知展
平山敦大 (内科学(2))	甲第1123号	30. 3.31	<i>Lymphocyte Antigen 75</i> Polymorphisms Are Associated with Disease Susceptibility and Phenotype in Japanese Patients with Inflammatory Bowel Disease (日本人炎症性腸疾患患者における <i>Lymphocyte Antigen 75</i> 多型と疾患感受性および表現型との関連)	宇佐美真一	竹下敏一 宮川真一
平島寛司 (組織発生学)	甲第1124号	30. 3.31	Earlobe-like peritoneal appendage near the angle of His: a useful landmark for demarcating the lateral margin of the gastric cardia (His角近傍の耳垂様構造が噴門部外側縁を識別する有用なランドマークとなる)	菅野祐幸	宮川真一 栗田 浩
郭 暁光 (代謝制御学)	甲第1125号	29. 3.31	PDGF-induced migration of synthetic vascular smooth muscle cells through c-Src-activated L-type Ca^{2+} channels with full-length $Ca_v1.2$ C-terminus (血小板由来増殖因子による合成型血管平滑筋細胞の遊走は、c-Srcで活性化された全長型 $Ca_v1.2$ C末端を有するL型 Ca^{2+} チャネルを介する)	沢村達也	樋口京一 桑原宏一郎
尾澤一樹 (内科学(3))	甲第1126号	30. 3.31	Suspected Adverse Effects After Human Papillomavirus Vaccination: A Temporal Relationship Between Vaccine Administration and the Appearance of Symptoms in Japan (子宮頸がん予防のためのヒトパピローウイルスワクチン接種後の副反応について: 本邦におけるワクチン接種と症状発現の時間的経緯)	田中榮司	加藤博之 川真田樹人

審査学位論文要旨

村中 太 (外科学(1))	甲第1127号	30. 3.31	A Comparative Immunohistochemical Study of Anal Canal Epithelium in Humans and Swine, Focusing on the Anal Transitional Zone Epithelium and the Anal Glands (ヒトおよびブタにおける, 肛門移行帯上皮および肛門腺を中心とした肛門管上皮の比較免疫組織化学的研究)	菅野 祐幸	佐々木克典 田中 榮司
横井 謙太 (外科学(1))	甲第1128号	30. 3.31	Survival pathway of cholangiocarcinoma via AKT/mTOR signaling to escape RAF/MEK/ERK pathway inhibition by sorafenib (胆管癌におけるソラフェニブによる RAF/MEK/ERK 抑制機序からの AKT/mTOR シグナル伝達を介した細胞死回避機序)	伊藤 研一	田中 榮司 塩沢 丹里
JUNAIDI (病理組織学)	甲第1129号	30. 3.31	Induction of interleukin-10 in the stable transformants of human T-cell line expressing Epstein-Barr virus encoded small RNAs (エプスタイン・バーウイルスのコードする小RNAを安定発現するヒトT細胞株でのインターロイキン10発現誘導)	竹下 敏一	中山 淳 中沢 洋三
盛田 大介 (小児医学)	甲第1130号	29. 3.31	Enhanced expression of anti-CD19 chimeric antigen receptor in piggyBac transposon-engineered T cells (抗CD19キメラ抗原受容体の発現を増強させた piggyBac トランスポゾン遺伝子改変T細胞)	小泉 知展	伊藤 研一 菅野 祐幸
小松 大祐 (画像医学)	甲第1131号	29. 3.31	Compartment model analysis of intravenous contrast-enhanced dynamic computed tomography in hepatic hemodynamics: a validation study using intra-arterial contrast-enhanced computed tomography (肝血流動態における静注ダイナミックCTのコンパートメントモデル解析: 動注CTを用いた検証研究)	中山 淳	山田 充彦 杠 俊介
酒井 均 (内科学(2))	甲第1132号	29. 3.31	A novel genetic and morphologic phenotype of <i>ARID2</i> -mediated myelodysplasia (<i>ARID2</i> 異常を伴う骨髄異形成症候群の新規病型の解析)	中沢 洋三	宇佐美真一 伊藤 研一
松村 富穂 (加齢生物学)	甲第1133号	30. 3.31	Fascin1 suppresses RIG-I-like receptor signaling and interferon- β production by associating with I κ B kinase ϵ (IKK ϵ) in colon cancer (RIG-I 経路を介した fascin1 による IFN- β 抑制制御)	瀧 伸介	樋口 京一 竹下 敏一

審査学位論文要旨

氏名 (所属)	学位授与 番号	授与年月日	博士論文名	学位審査委員	
				主査	副査
西澤公美 (保健学専攻)	甲第18号	29. 3.31	Enhancement of motor skill learning by a combination of ideal model-observation and self-observation (理想的なモデルの動きと自身の動きの同時観察に基づく動作練習による巧緻的運動学習の効果)	百瀬公人	GOH AH CHENG 横川吉晴
牛山直子 (保健学専攻)	甲第19号	30. 3.20	Validity of maximal isometric knee extension strength measurements obtained via belt-stabilized hand-held dynamometry in healthy adults (健常成人におけるベルト固定ハンドヘルドダイナモメータによる最大等尺性膝伸展筋力測定の妥当性)	横川吉晴	木村貞治 GOH AH CHENG
高橋理沙 (保健学専攻)	甲第20号	30. 3.20	Driving simulation test for evaluating hazard perception: Elderly driver response characteristics (危険認知を評価する模擬運転テスト: 高齢ドライバーの応答特性)	市川元基	下里誠二 小林正義
中村慶佑 (保健学専攻)	甲第21号	30. 3.20	Development of an Incremental Sit-to-Stand Exercise for Aerobic Fitness Evaluation (有酸素能力評価のための漸増起立運動負荷試験の開発)	百瀬公人	木村貞治 GOH AH CHENG
根岸達哉 (保健学専攻)	甲第22号	30. 3.20	Characterization of clinically isolated thymidine-dependent small-colony variants of <i>Escherichia coli</i> producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL) (臨床検体より分離された基質拡張型 β -ラクタマーゼ産生性 <i>Escherichia coli</i> のチミジン要求性 small-colony variants の特徴)	奥村伸生	長野則之 小穴こず枝

Early administration of tolvaptan preserves renal function in elderly patients with acute decompensated heart failure (高齢急性非代償性心不全患者へのトルバプタン早期投与は腎機能を保護する)

木村和広

(論文の内容の要旨)

【目的】人口の高齢化に伴い心不全患者は増加の一途にある。心不全治療においてループ利尿薬の使用は不可欠であるが、しばしば腎障害を引き起こし、用量依存性の予後悪化との関連も報告されている。水利尿薬トルバプタンの腎保護効果の可能性が注目されているが、それを前向き無作為比較試験で示したデータはない。本研究の目的は、実際の臨床現場における高齢者

急性非代償性心不全患者の治療で、トルバプタンの追加投与が、従来のループ利尿薬フロセミドを中心とした治療と比較し、腎機能にどのような影響を与えるかを明らかにすることである。

【方法】対象は急性非代償性心不全で入院した連続52症例(平均 83.4 ± 9.6 歳)で、急性冠症候群や透析患者は除外とした。対象患者は入院順に交互割付で、トルバプタン追加群(n=26)とフロセミド増量群(n

=26) に割付した。トルバプタン群のループ利尿薬投与はフロセミド20 mg/日で固定し、トルバプタンは入院後24時間以内に投与、用量は主治医の判断とした。フロセミド群は主治医の判断で適宜追加投与とした。主要評価項目は入院後7日間の worsening renal function (WRF: 血清クレアチニンのベースラインから0.3 mg/dL 以上の上昇) 発現率とした。

【結果】 トルバプタン群のトルバプタン初期投与量は 8.37 ± 2.44 mg/日であった。フロセミド総投与量は、トルバプタン群124.2 mg, フロセミド群299.6 mg であった ($p < 0.001$)。主要評価項目である入院後7日以内の WRF 発現率は、トルバプタン群で有意に低かった (トルバプタン群26.9% vs. フロセミド群57.7%, $p = 0.025$)。また、持続性 WRF (退院時も継続する WRF)、遅発性 WRF (入院5日目以降に発現した WRF) とともに、トルバプタン群で発現率が低かった。持続性 WRF と一過性 WRF 発症患者における退院後90日間の心臓死および心不全再入院率を比較すると、持続性 WRF 発症患者で有意に高かった。遅発性 WRF と早発性 WRF 発症患者における退院後90日間の心臓死および心不全再入院率を比較すると、遅発性 WRF 発症患者で有意に高かった。

【考察】 本研究の大きな特徴は、平均年齢83.4歳と非常に高齢の心不全患者を対象としていることである。我々のデータは今後到来が予想される高齢者心不全パンデミック時代に重要な予見を与えるものとなる可能性がある。

このような実臨床世界の高齢非代償性心不全患者において、入院後24時間以内のトルバプタン投与は、WRF 発現率を低下させた。WRF 発現の原因の一つとして、治療初期の血圧低下が挙げられているが、本研究でも入院1日目から2日目の収縮期血圧の変化は、トルバプタン群で血圧が保持されていたのに対し、フロセミド群では有意に低下していた。また、血中尿素窒素/血清クレアチニン比 (BUN/Cr) の上昇や尿中尿素排泄分画 (FEUN) の低下が、トルバプタン群で有意に少なく、循環血漿量や腎血流が保持されていることが示唆された。水利尿薬であるトルバプタンは血行動態を変化させにくいということが、腎保護に有効に働いていると考えられた。

高齢急性非代償性心不全患者を対象とする前向き無作為比較試験を施行し、入院24時間以内のトルバプタン投与することで、ループ利尿薬投与量を減らし、WRF 発現率を有意に減らすことが示された。持続性

WRF と遅発性 WRF 発症患者では、退院後90日以内の心臓死および心不全再入院を増やすという結果が得られたが、トルバプタン群ではこれらの予後の悪い WRF 発現を有意に抑えた。

(論文審査の結果の要旨)

人口の高齢化に伴い心不全患者は増加している。心不全治療においてループ利尿薬は不可欠であるが、しばしば腎障害を引き起こし、予後悪化との関連も報告されている。水利尿薬トルバプタンの腎保護効果の可能性が注目されているが、それを前向き無作為比較試験で示したデータはなかった。

本研究は、実際の臨床現場における高齢者急性非代償性心不全患者の治療で、トルバプタンの早期追加投与 (入院後24時間以内) が、従来のループ利尿薬フロセミドを中心とした治療と比較し、腎機能にどのような影響を与えるかを前向き無作為比較試験で検討した。

その結果、以下の成績を得た。

1. 試験組み入れ患者の平均年齢は、 83.4 ± 9.6 歳であった。
2. トルバプタン群のトルバプタン初期投与量は 8.37 ± 2.44 mg/日であった。フロセミド総投与量は、トルバプタン群124.2 mg, フロセミド群299.6 mg で、トルバプタン追加投与によってフロセミド投与量は有意に減少した ($p < 0.001$)。
3. 主要評価項目である入院後7日以内の WRF (Worsening Renal Function: 血清クレアチニン0.3 mg/dL 以上の上昇) 発現率は、トルバプタン群で有意に低かった (トルバプタン群26.9% vs. フロセミド群57.7%, $p = 0.025$)。
4. 持続性 WRF (退院時も継続する WRF) 発現率は、トルバプタン群で発現率が低かった (トルバプタン群11.5% vs. フロセミド群34.6%, $p = 0.048$)。
5. 遅発性 WRF (入院5日目以降に発現した WRF) は、トルバプタン群で発現率が低かった (トルバプタン群11.5% vs. フロセミド群34.6%, $p = 0.048$)。
6. 持続性 WRF と一過性 WRF 発症患者における退院後90日間の心臓死および心不全再入院率を比較すると、持続性 WRF 発症患者で有意に高かった ($p = 0.042$)。
7. 遅発性 WRF と早発性 WRF 発症患者における退院後90日間の心臓死および心不全再入院率を比較すると、遅発性 WRF 発症患者で有意に高かった ($p = 0.048$)。

これらの結果より、高齢非代償性心不全患者におい

て、トルバプタン早期投与は腎機能を保持する可能性が示唆された。また、予後悪化との関連が議論されている心不全治療中のWRFに関して、全てのWRFが悪いわけではなく、持続性WRFおよび遅発性WRF

が予後に悪影響を与える可能性を示した。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。

Protein components of the backbone structure of postsynaptic density of type I excitatory synapses (タイプ I 興奮性シナプスにおけるシナプス後肥厚部の基本骨格タンパク質成分の解析)

郭 維 恒

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】シナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) とはシナプス膜直下にある、神経細胞に高度に分化した特殊な細胞骨格系で、極めて精巧なタンパク質複合体である。PSD はシナプス伝達とシナプス可塑性の発現と維持に必須な役割を果たす細胞内情報伝達処理の場として知られている。その分子構築については、2000年中頃より scaffold-adaptor protein モデルが提唱されている一方、1970年代から、強い界面活性剤処理により可視化される PSD lattice と呼ばれる網目構造が PSD の基本構造であるとも言われてきた。現時点において、scaffold-adaptor protein モデルと PSD lattice 構造との関係は明らかにはされていない。また、PSD lattice の主要構成タンパク質についても明らかにされていない。本研究では、上記の2点について明らかにするための最初の模索的実験を行った。

【方法】まず始めに、PSD の基本的内部構造、特に PSD lattice 様網目構造が可視化できる PSD 標本を得るための種々の条件を検討した。界面活性剤は従来から PSD 調製に用いられている代表的な Triton X-100 (TX または TX-100) と n-Octyl- β -D-glucoside を用いた。脳の採取方法に関しては、未成熟脳において PSD の基本骨格を主体とする PSD 構造が主体であると考えられたので、生後7日前脳から未成熟 PSD 標品 (7d-PSD) を調製した。さらに、liquid nitrogen (LN) を用いて採取後の前脳を30秒以内に凍結して (snap freezing 法) “thin PSD (瘦せた PSD)” を持つ LN-PSD を調製した。コントロールとして通常法により成獣前脳 (6週齢脳) から6w-PSD を調製した。これらの PSD 標品に対して、電子顕微鏡観察 (通常の薄切及び negative 染色)、質量分析によるタンパク質成分の同定、Western blotting による主要 scaffold-adaptor タンパク質と細胞骨格タンパク質成

分の定量解析を行った。

【結果と考察】通常の6w-PSD の電子顕微鏡観察では、PSD は非常に電子密度が高くほぼ均一に黒く見えるのみで PSD 内部の微細な構造は見えないが、7d-および LN-PSD においては PSD 構造内部に明瞭な網目状構造が観察された。TX-100を通常の1%から5%に引き上げて調製した PSD においても網目状の PSD 構造が観察された。この構造は deoxycholate 処理によって得られる正規の PSD lattice 構造と形態上、区別はつかなかった。次に、網目構造含有 PSD 標品 (7d-PSD, LN-PSD) においては基本骨格成分が濃縮して存在していると考えられるので、これらの PSD 標品のタンパク質成分を分析した。単純なタンパク質成分の比較では、網目構造含有 PSD 標品において actin の濃縮が顕著であった。質量分析によっては PSD 網目構造の主要成分を絞り込むことは困難であった。この結果を受けて、Western blotting を用いて主要 scaffold-adaptor タンパク質と細胞骨格タンパク質成分を定量することにより、PSD 網目構造に濃縮されるタンパク質の探索を行った。その結果まず第一に、7d-および LN-PSD とともに PSD 網目構造を有していたがその成分には違いが見られたので、全くの同一物ではないと判断された。7d-PSD においては SAP102 以外の主要 scaffold-adaptor タンパク質の濃度は非常に低く、この PSD 基本構造には SAP02 以外の scaffold-adaptor タンパク質の寄与は小さいと考えられた。変わって general cytoskeleton、特に actin と α -internexin の寄与が大きいことが示唆された。LN-PSD において、通常の PSD (6w-PSD) と比べ主要 scaffold-adaptor タンパク質と細胞骨格タンパク質成分の濃度は変わらなかった。また、一部の scaffold-adaptor タンパク質濃度は増加していた。LN-PSD においては大型構造体である CaMKII cluster が PSD に付着されなくなることで、PSD 内部構造が可視化さ

れた過程が考えられた。CaMKII は PSD 基本網目構造への寄与は大きくないことが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

シナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) とはシナプス膜直下にある, 神経細胞に高度に分化した特殊な細胞骨格系で, 極めて精巧なタンパク質複合体である。その分子構築については, 2000年中頃より scaffold-adaptor protein モデルが提唱されている一方, 1970年代から, 強い界面活性剤処理により可視化される PSD lattice と呼ばれる網目構造が PSD の基本構造であるとも言われてきた。現時点において, scaffold-adaptor protein モデルと PSD lattice 構造との関係は明らかにはされていない。また, PSD lattice の主要構成タンパク質についても明らかにされていない。本研究は, 上記の2点について明らかにするための最初の模索的実験を行った。

そこで郭維恒は, PSD の基本的内部構造, 特に PSD lattice 様網目構造を有する PSD 標本を得るための種々の条件を検討した。界面活性剤は従来から PSD 調製に用いられている代表的な Triton X-100 (TX または TX-100) と n-Octyl- β -D-glucoside を用いた。脳の採取方法に関しては, 未成熟脳において PSD の基本骨格を主体とする PSD 構造が主体であると考えられたので, 生後7日前脳から未成熟 PSD 標品 (7d-PSD) を調製した。さらに, liquid nitrogen (LN) を用いて採取後の前脳を30秒以内に凍結して (snap freezing 法) “thin PSD (瘦せた PSD)” を持

つ LN-PSD を調製した。コントロールとして通常法により成獣前脳 (6週齢脳) から6w-PSD を調製した。これらの PSD 標品に対して, まず電子顕微鏡観察により PSD lattice の有無を確認し, 次に質量分析により PSD lattice の主要タンパク質成分を同定した。次に主要 scaffold-adaptor タンパク質と細胞骨格タンパク質成分の定量解析を Western blotting を用いて行った。

その結果, 次の結論を得た。

1. 未熟な PSD 網目状構造では, 細胞骨格タンパク質, 特に actin と α -internexin, SAP102の濃度がコントロール PSD に比べ濃縮されていた。従って, これらのタンパク質が, 未熟 PSD の基本構造の形成と維持に関わっている可能性が示唆された。
2. PSD の細胞骨格タンパク質と scaffold-adaptor タンパク質 (PSD-95, PSD-93, SAP97, Shank, GKAP, Homer) 共に成熟 PSD の網目状構造において役割を果たしていると考えられた。
3. CaMKII は PSD 網目状構造において構造的な役割には関わっていないことが示唆された。

以上の様に, 郭維恒は, PSD の基本骨格成分の初期検索において価値ある所見を得ることが出来, 本研究テーマに関して今後研究を進める上で価値ある所見を得ることが出来た。

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。

Knee extension strength and post-operative functional prediction in quadriceps resection for soft-tissue sarcoma of the thigh (大腿四頭筋を切除した軟部肉腫症例の膝伸展筋力と術後機能予測)

田 中 厚 誌

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】軟部肉腫は大腿部に好発し, その中でも前方コンパートメントに発生する割合が高い。軟部肉腫では一般的に手術が治療の中心であり, 周囲の筋を含めた広範切除を行う必要がある。このため大腿前方コンパートメントに発生した軟部肉腫では, 生活動作に密接に関連する大腿四頭筋を部分切除もしくは完全切除することとなり, 切除後に膝伸展筋力低下を引き起こし, 術後機能も低下する。しかし切除範囲により膝伸展筋力低下の程度は様々であり, 残存筋力の観点から術後機能を予測した報告はほとんどない。本研

究では大腿前方コンパートメント発生軟部肉腫に対して大腿四頭筋を切除した症例の膝伸展筋力を測定し, 術後機能と膝伸展筋力の関連性を評価することで, 術前に術後機能を予測する際の指標, および良好な術後機能が見込まれる切除範囲の目安について考察することを目的とした。

【方法】2002年から2014年の間に大腿前方コンパートメント発生の軟部肉腫と診断され, 当院で手術を施行し大腿四頭筋を部分切除もしくは全切除した29例中, 1) 皮下発生, 2) 伸展機構再建術の併用, 3) 調査時に死亡もしくは terminal stage, あるいは化学療法施

行中の症例を除いた18例を対象とした。これらの症例の年齢、経過観察期間、発生高位、腫瘍最大径、切除した大腿四頭筋の数と種類、最終補助治療から測定までの期間を診療録で調査した。切除筋数は筋肉の連続性が完全に断たれた筋を1筋、筋肉の一部を切除するも連続性が保たれている筋を0.5筋とし、大腿神経本幹の切除は4筋切除と同等と扱った。

筋力は等速性筋力測定装置を用いて測定した。角速度60度/秒で膝関節屈曲90度から伸展0度の範囲で5回連続の等速性膝関節運動を行った。健側と患側をそれぞれ2回測定後、最大値を測定値とし、膝伸展筋力は得られた測定値の健側に対する患側の割合(%)にて評価した。

術後機能評価は、疾患特異的な患肢機能尺度として Musculoskeletal Tumor Society (MSTS) score, 疾患特異的 ADL 尺度として Toronto Extremity Salvage Score (TESS), 包括的 QOL 尺度として European Quality of Life-5 Dimensions (EQ-5D), Short Form 8 (SF-8) を使用した。MSTS score, TESS は80%以上, EQ-5D は0.800以上を良好な術後成績と定義し、良好な術後成績が得られる膝伸展筋力のカットオフ値を算出した。SF-8の各項目は、国民標準値50を基準として比較した。

【結果】 切除筋数別では、1筋切除が6例、1.5筋切除が7例で、2筋切除、2.5筋切除、3筋切除、4筋切除、大腿神経本幹切除がそれぞれ1例であった。切除筋数別の膝伸展筋力の中央値は、1筋切除では86.3%(80.3-90.8%)、1.5筋切除では54.4%(52.4-62.6%)、2筋切除では58.4%、2.5筋切除では53.3%、3筋切除では24.8%、4筋切除では0%であり、1筋切除と1.5筋では有意差を認めた。また切除筋数が多いほど膝伸展筋力は有意に低値であった。1筋切除例による切除筋の種類別評価では、中間広筋切除例で最も膝伸展筋力が低値であった。年齢、経過観察期間、発生高位、腫瘍最大径、最終補助治療から測定までの期間と膝伸展筋力の比較ではいずれも相関を認めなかった。

術後機能評価は、MSTS score, TESS, EQ-5Dにおいて膝伸展筋力が低いほど有意に点数が低下した。SF-8各項目の中央値は、身体尺度で国民標準値50より低値であったが、精神尺度では高値であった。またMSTS score, TESS, EQ-5Dにおいて、良好な術後成績が得られる膝伸展筋力のカットオフ値はいずれも56.2%であった。各切除群の膝伸展筋力の中央値とカットオフ値を比較すると、2.5筋切除まではカット

オフ値と同等の伸展筋力であったが、3筋切除以上ではカットオフ値以下であった。

【考察と結論】 多数筋切除例ほど膝伸展筋力は低値であり、膝伸展筋力は大腿四頭筋切除後の身体機能とQOL(特に身体尺度)に関連していた。よって術前に残存筋力と術後機能を予測する際には、切除筋数が有用な指標になる。また膝伸展筋力のカットオフ値は56.2%であり、少なくとも2筋の連続性が保たれていれば、日常生活動作において良好な機能が見込まれる。しかし、3筋切除以上では膝伸展筋力が著明に低値であり、良好な機能を得るために膝伸展機構再建術を検討する必要がある。

本研究結果により、臨床場において大腿四頭筋切除後の術後機能がより詳細に予測でき、術前 informed consent の際に具体的な術後機能の説明が可能になると考えられる。結果的に、患者の治療満足度やリハビリテーション意欲を高め、医療者にとってはゴール設定や術後リハビリテーション計画を立案しやすくすることが期待できる。

(論文審査の結果の要旨)

軟部肉腫では一般的に手術が治療の中心であり、周囲の筋を含めた広範切除を行う必要がある。このため大腿前方コンパートメントに発生した軟部肉腫では、生活動作に密接に関連する大腿四頭筋を部分切除もしくは完全切除することとなり、切除後に膝伸展筋力低下を引き起こし、術後機能も低下する。しかし切除範囲により膝伸展筋力低下の程度は様々であり、残存筋力の観点から術後機能を予測した報告はほとんどない。今回、田中は大腿前方コンパートメント発生軟部肉腫に対して大腿四頭筋を切除した症例の膝伸展筋力を測定し、術後機能と膝伸展筋力の関連性を評価することで、術前に術後機能を予測する際の指標、および良好な術後機能が見込まれる切除範囲の目安について検討した。

対象は大腿四頭筋を部分切除もしくは全切除した18例で、膝伸展筋力は等速性筋力測定装置を用いて測定した。術後機能評価は疾患特異的な患肢機能尺度として Musculoskeletal Tumor Society (MSTS) score, 疾患特異的 ADL 尺度として Toronto Extremity Salvage Score (TESS), 包括的 QOL 尺度として European Quality of Life-5 Dimensions (EQ-5D), Short Form 8 (SF-8) を使用した。

その結果、田中は次の結論を得た。

1. 大腿四頭筋の切除筋数が多いほど膝伸展筋力は有

- 意に低値であった。
2. 膝伸展筋力は大腿四頭筋切除後の身体機能と QOL (特に身体尺度) に関連していた。
 3. 機能評価表において良好な術後成績が得られる膝伸展筋力のカットオフ値は56.2%であった。
 4. 各切除群の膝伸展筋力の中央値とカットオフ値を比較すると、2.5筋切除まではカットオフ値と同等の膝伸展筋力であったが、3筋切除以上ではカット

オフ値以下であった。

今回の結果から、術前に残存筋力と術後機能を予測するには切除筋数が有用な指標になり、少なくとも2筋の連続性が保たれていれば日常生活動作において良好な機能が見込まれると考えられた。

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。

Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with High Ankle-Brachial Index from the IMPACT-ABI Study (ABI 高値を呈する患者群の臨床的特徴及び予後検討)

西村 仁志

(論文の内容の要旨)

【目的】 末梢動脈疾患は心血管死亡、全死亡の独立した予測因子である。Ankle brachial index (ABI) は末梢動脈疾患を同定する簡便で有用な確立された手法である。ABI 0.9以下は末梢動脈疾患、ABI 1.0- 1.4は正常範囲、ABI>1.4はABI 高値と定義される。これまでABI 低値の患者群の予後検討は多くされているが、ABI 高値を呈する群の臨床的特徴、長期予後については明らかではない。本研究はABI 高値を呈する患者群の臨床的特徴及び長期予後について検討した。

【方法】 本研究はIMPACT-ABI (impressive predictive value of ankle brachial index for clinical long term outcome in patients with cardiovascular disease examined by ABI) study のサブ解析である。IMPACT-ABI study は循環器疾患患者の長期予後に対するABIの有用性を検討した研究であり2005年から2012年の間に循環器疾患にて入院し、かつABIを測定した連続する3,131人を登録した単一施設、後ろ向き、観察研究である。このIMPACT-ABI study 登録症例のうちどちらか一方の下肢でABI 1.0未満を呈する712例を除外した2,419人を登録し、どちらか一方もしくは両下肢がABI 1.4を超えるABI 高値群 (N=65) 及び両下肢ともABI 1.0- 1.4を呈するABI 正常群 (N=2,354) の2群に分け患者背景及び予後を解析した。患者背景の比較はカイ2乗検定及びマン・ホイットニーのU検定を用いて行い、多変量ロジスティック回帰分析によりABI 高値に寄与する要因を解析した。予後に関する主要評価項目は主要心血管事象 [major adverse cardiovascular events: MACE (心血管死、脳卒中、心筋梗塞)], 副次的評価項目は

総死亡、心血管死亡と定義した。累積発症率の解析は Kaplan-Meier 法により生存曲線を作成しログランク検定を行った。またコックス比例ハザードモデルを用い単変量及び多変量解析を行い MACE に寄与する予後規定因子を解析した。

【結果】 ABI 高値群及びABI 正常群の臨床背景を比較すると古典的な冠危険因子である年齢、性別、高血圧、糖尿病、喫煙歴は2群間において有意な差はなくABI 高値群は正常群と比較して有意に body mass index (BMI) が低く慢性腎臓病、維持透析患者が多かった。多変量ロジスティック回帰分析を行うとABI 高値に寄与する独立した要因はBMIの低値と維持透析であった (オッズ比: 0.93; 95%信頼区間: 0.87-0.99; P=0.049, オッズ比: 6.18; 95%信頼区間: 3.05-12.52; P<0.001)。平均フォローアップ期間は4.7年、その間172例のMACEが発生していた。ログランク検定で評価したABI 高値群のMACEの累積発症率はABI 正常群と比較して有意に高値であった。総死亡、心血管死の累積発症率についてもABI 高値群がABI 正常群と比較して有意に高値であった。コックス比例ハザードモデルを用いた単変量解析及び透析を含む古典的心血管リスク因子で補正した多変量解析を施行するとABI 高値はMACEに対する独立した予後規定因子であった (ハザード比: 2.07; 95%信頼区間: 1.02-4.20; P=0.044)。

【考察】 本研究の臨床的意義はABI 高値群における患者背景及び長期予後について明らかにしたことである。これまでABI 高値群における併存疾患に関する患者背景の検討はほとんどなされていない。本研究ではABI 高値群と正常群の間で脂質異常症以外の古典的冠リスク因子に関しては有意な差はなくABI 高値群

でBMIが低く、慢性腎臓病、透析患者が有意に多かった。BMI低値、透析の施行がロジスティック回帰分析においてABI高値に対する独立した規定因子であった。糖尿病患者や維持透析患者において生じる中膜の石灰化に伴う血管のスティフネスの増強がABI高値となる機序の一因であると報告されている。本研究においても維持透析の施行はABI高値に対する強力な規定因子であった。BMIが低値であることは血管の石灰化と関係しているという報告があり、ABI高値の規定因子となる原因と推測された。

ABI高値群の長期予後についてはこれまでは相反する報告がなされている。本研究ではABI高値群はMACE、全死亡、心血管死の全てにおいて累積発症率がABI正常群と比較して有意に高く、又ABI高値は透析を含む説明変数で調整した多変量解析を行った後もMACEに対する独立した強力な予後予測因子であった。血管スティフネスは左室肥大、冠血流の減少、頸動脈硬化、肥厚に関係するとされており心血管疾患の独立した発症規定因子である事が報告されている。これらの要因によりABI高値群の心血管イベントが多く長期予後が不良であった可能性があると考えられる。ABIが高値であるということは一方の下肢のABIが正常範囲であったとしても長期予後は不良であることを留意する必要がある事が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

Ankle brachial index (ABI) が低値 (0.9以下) であることは高い感度、特異度をもって予後不良疾患である末梢動脈疾患を診断することが可能である。一方ABI異常高値 (>1.4) を呈する群の臨床的特徴、長期予後については明らかではない。

本研究は、ABI高値を呈する患者群の臨床的特徴及び長期予後について後ろ向き観察研究で検討した。

その結果、以下の成績を得た。

1. ABI高値群とABI正常群では、年齢、性別、高血圧、糖尿病、喫煙歴、冠動脈疾患、陳旧性脳梗塞、心房細動に有意な差は認めなかった。
2. ABI高値群はABI正常群と比較して有意にbody mass index (BMI) が低く、脂質異常症が少なく、慢性腎臓病、血液透析の施行が多かった (P=0.003, P=0.023, P=0.017, P<0.001)。
3. 多変量ロジスティック回帰分析で交絡因子を調整すると、ABI高値に寄与する独立した規定因子はBMIの低値と血液透析の施行であった (オッズ比: 0.93; 95%信頼区間: 0.87-0.99; P=0.049, オッズ比: 6.18; 95%信頼区間: 3.05-12.52; P<0.001)。
4. ログランク検定で評価したABI高値群における主要心血管事象 (心血管死、脳卒中、心筋梗塞の複合エンドポイント) の累積発症率は、ABI正常群と比較して有意に高値であった (P=0.005)。総死亡、心血管死の累積発症率についてもABI高値群がABI正常群と比較して有意に高値であった (P=0.026, P=0.003)。
5. コックス比例ハザードモデルを用いた多変量解析を施行すると、血液透析の施行を含む古典的心血管リスク因子で補正後も、ABI高値は主要心血管事象に対する独立した予後予測因子であった (ハザード比: 2.07; 95%信頼区間: 1.02-4.20; P=0.044)。

これらの結果から、BMI低値、血液透析の施行がABI高値に対する独立した規定因子であると考えられた。また、ABI高値群の長期予後は不良であり、ABIが高値であるという事は既存の心血管リスク因子とは独立した予後予測因子である事が示唆された。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。

Evaluation of splenic perfusion and spleen size using dynamic computed tomography: usefulness in assessing degree of liver fibrosis. (ダイナミックCTによる脾臓径および脾血流動態の評価: 肝線維化評価における有用性)

鈴木 健 史

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】肝線維化評価は慢性肝疾患の予後予測や治療方針決定において重要である。近年、肝生検などの侵襲的手法を用いずとも、血清マーカーやエラストグラフィなどの非侵襲的手法を用いて、肝線維化評

価が可能となった。しかし、これらの非侵襲的手法では結果が一致しないことがあり、その際には肝生検などの侵襲的手法が必要となる。したがって、さらなる信頼性および普及性の高い非侵襲的な肝線維化評価法があれば、侵襲的手法の施行頻度減少に寄与すること

ができると考えた。今回、我々はダイナミック CT の定量的血流解析により得られた脾血流動態および脾臓径の肝線維化評価における有用性を評価した。

【方法】 信州大学医学部附属病院において2008年から2013年の間に、肝切除術前検査としてダイナミック CT が施行された連続133症例を遡及的に検討した。肝線維化ステージ (F1: 門脈域の線維性拡大, F2: 線維性架橋形成, F3: 小葉のひずみを伴う線維性架橋形成, F4: 肝硬変) は組織学的に全例で証明された。まず、CT の各造影時相で、同一断面の大動脈および脾臓に関心領域を設定し、造影剤静注後経過時間 t における造影効果をそれぞれ計測した [腹部大動脈: $C_a(t)$, 脾臓: $C_s(t)$]。次に、以下の微分方程式で表されるコンパートメントモデルを用いて、脾血流動態のパラメータである K_1 (流入速度定数), $1/k_2$ (平均通過時間, mean transit time; MTT), および K_1/k_2 (分布容積, distribution volume; V_d) を算出した。 $dC_s(t)/dt = K_1 \cdot C_a(t - \tau) - k_2 \cdot C_s(t)$ (τ は腹部大動脈から脾臓までの血流到達に要する経過時間)。クラスカル・ウォリス検定および多重比較検定を用いて、肝線維化ステージ (F) を脾血流動態の各パラメータ (K_1 , MTT, V_d) および脾臓径 (長径; R) と比較した。その後、肝線維化評価の精度を評価するために、肝線維化ステージを目的変数、脾血流動態、脾臓径、年齢、性別、B型肝炎ウイルス感染の有無、C型肝炎ウイルス感染の有無を説明変数として、ステップワイズ回帰分析およびROC解析を行った。

【結果】 MTT においては、F0とF4, F1とF4, F2とF4で有意差 ($p < 0.05$) がみられた。R においては、F0とF4, F1とF4で有意差 ($p < 0.05$) がみられた。ステップワイズ回帰分析の結果、MTT, R, B型肝炎ウイルス感染の有無, C型肝炎ウイルス感染の有無が肝線維化ステージの有意な説明変数であり、最終的な回帰式は $F = 1.30 * [B型肝炎ウイルス感染の有無] + 1.48 * [C型肝炎ウイルス感染の有無] + 0.07 * [MTT] + 0.03 * [R] - 2.6$ で表された。ROC解析の結果、AUROCは、 $\geq F1$ で0.89, $\geq F2$ で0.83, $\geq F3$ で0.82, F4で0.82であった。

【結論】 MTT, R を用いた本検討での肝線維化評価モデルの精度は、これまで報告された超音波エラストグラフィ (AUROC は $\geq F2$ で0.78, F4で0.89) や血清マーカー (AUROC は $\geq F2$ で0.73, F4で0.90) の精度に劣っておらず、脾の MTT および脾臓径は肝線維化の評価に有用である。

(論文審査の結果の要旨)

近年、肝生検などの侵襲的手法を用いずとも、血清マーカーやエラストグラフィなどの非侵襲的手法を用いて、肝線維化評価が可能となった。しかし、これらの非侵襲的手法では結果が一致しないことがあり、その際には肝生検などの侵襲的手法が必要となる。したがって、さらなる信頼性および普及性の高い非侵襲的な肝線維化評価法があれば、侵襲的手法の施行頻度減少に寄与することができる。今回、鈴木はダイナミック CT の定量的血流解析により得られた脾血流動態および脾臓径の肝線維化評価における有用性を検討した。

対象は肝切除術前検査としてダイナミック CT が施行された連続133例で、肝線維化ステージ (F) は組織学的に全例で証明された。まず、ダイナミック CT のコンパートメントモデル解析によって、脾血流動態のパラメータである K_1 (流入速度定数), $1/k_2$ (平均通過時間, mean transit time; MTT), および K_1/k_2 (分布容積, distribution volume; V_d) を算出した。クラスカル・ウォリス検定および多重比較検定を用いて、肝線維化ステージ (F) を脾血流動態の各パラメータ (K_1 , MTT, V_d) および脾臓径 (長径; R) と比較した。その後、肝線維化評価の精度を評価するために、肝線維化ステージを目的変数、脾血流動態、脾臓径、年齢、性別、B型肝炎ウイルス感染の有無、C型肝炎ウイルス感染の有無を説明変数として、ステップワイズ回帰分析およびROC解析を行った。

その結果、鈴木は次の結果を得た。

1. MTT においては、F0とF4, F1とF4, F2とF4で有意差 ($p < 0.05$) がみられた。
2. R においては、F0とF4, F1とF4で有意差 ($p < 0.05$) がみられた。
3. ステップワイズ回帰分析の結果、MTT, R, B型肝炎ウイルス感染の有無, C型肝炎ウイルス感染の有無が肝線維化ステージの有意な説明変数であり、最終的な回帰式は $F = 1.30 * [B型肝炎ウイルス感染の有無] + 1.48 * [C型肝炎ウイルス感染の有無] + 0.07 * [MTT] + 0.03 * [R] - 2.6$ で表された。
4. ROC解析の結果、AUROCは、 $\geq F1$ で0.89, $\geq F2$ で0.83, $\geq F3$ で0.82, F4で0.82であった。

今回の結果から、MTT, R を用いた本検討での肝線維化評価モデルの精度は、これまで報告された超音波エラストグラフィ (AUROC は $\geq F2$ で0.78, F4で0.89) や血清マーカー (AUROC は $\geq F2$ で0.73, F4で0.90) の精度に劣っておらず、脾の MTT および脾

臓径は肝線維化の評価に有用であると考えられた。

して価値があるものと認めた。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文と

Myostatin promotes tenogenic differentiation of C2C12 myoblast cells through Smad3 (Myostatin は Smad3 を介して筋芽細胞株 C2C12 の腱細胞分化を誘導する)

植 村 一 貴

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 腱は細胞や血管が乏しい組織であるため、一度損傷されると修復が困難である。これまで損傷した腱を修復するために様々な研究が行われてきたが、多くの研究は生体力学的な研究が中心であり、骨や軟骨などの他の間葉系組織と比較すると分子生物学的なアプローチによる研究は少なかった。近年、腱の発生や分化に関連する転写因子や増殖因子が注目されるようになってきているが、いまだ腱細胞の分化メカニズムは明らかになっていない。そこで、腱細胞の分化メカニズムを明らかにするため、多分化能を持つマウス筋芽細胞株 (C2C12) を用いて腱細胞への分化を促進する増殖因子を同定し、さらに腱細胞への分化を誘導するシグナル伝達経路を明らかにすることを目的に研究を行った。

【方法と結果】 まず初めに C2C12 とマウス胚細胞由来線維芽細胞株 C3H10T1/2 における、腱前駆細胞のマーカー (Scleraxis) の発現量の比較を行った。その結果、C2C12 では Scleraxis の発現量が約 8 倍多く、同細胞株は腱前駆細胞と同様の性質を持つと考えられた。次に腱細胞の分化を誘導する増殖因子のスクリーニングとして、C2C12 を無血清培地で培養し、腱細胞の分化を誘導することが予想される増殖因子 (GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8 (Myostatin)) を添加、培養 5 日目に real-time PCR による腱細胞特異的マーカー (Tenomodulin) と筋細胞特異的マーカー (Myogenin, MyoD)、脂肪細胞特異的マーカー (CEBP β , PPAR γ) の定量を行った。その結果、いずれの増殖因子も Tenomodulin の発現を増加させたが、Myostatin を添加した際の発現量が最も高かった。また Myostatin の添加により、筋細胞特異的マーカー MyoD の発現は抑制され、脂肪細胞特異的マーカーの発現は増加しなかった。そこで最も Tenomodulin の発現を促進した Myostatin について、用量・時間による Tenomodulin 発現の変化の定量と、Tenomodulin と Myogenin の免疫染色を行った。経時的観察では Myostatin 添加 5 日目で Tenomodulin の発現が最高値となり、ま

た用量依存的に Tenomodulin の発現が増加することも確認された。免疫染色では無血清培地のみでの培養では筋管細胞の形成を認めたが、Myostatin の添加により Myogenin の発現は減少し筋管細胞の形成が抑制され、Tenomodulin の発現を認めた。

さらに Myostatin による腱細胞分化の誘導に関するシグナル伝達経路を明らかにするため、Myostatin と共にシグナル伝達経路の阻害剤を添加して各マーカーの定量を行った。その結果、Smad2/3 を介する伝達経路を阻害する ALK 阻害剤により Tenomodulin の発現が有意に抑制され、Smad2/3 を介する伝達経路の腱細胞分化への関与が示唆された。そこで C2C12 に同シグナルの伝達因子である Smad2, Smad3 の siRNA を導入して同様に各マーカーを定量したところ、Smad3 の siRNA 導入により、Myostatin の刺激の有無にかかわらず Tenomodulin の発現は抑制された。これらの結果から、Myostatin は Smad3 を伝達因子として筋芽細胞から腱細胞への分化を誘導していることが明らかとなった。

【考察】 本研究結果から C2C12 は腱前駆細胞の性質を持ち、さらに Myostatin の刺激により、筋細胞への分化が抑制され、腱細胞への分化が誘導される事が確認された。また Myostatin は Smad3 を介するシグナル伝達経路を活性化することにより筋芽細胞から腱細胞への分化を誘導していることも明らかとなった。また本研究により確立された腱細胞培養系は、今後腱細胞分化や腱損傷修復の分子生物学的な研究をさらに進めていく上で有用であると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

腱は細胞や血管が乏しいため、一度損傷されると修復が困難である。過去の腱に関する研究は生体力学的な研究が多く、他の間葉系組織と比較すると分子生物学的アプローチによる研究は少なかった。近年、腱の発生や分化に関連する転写因子や増殖因子が注目されているが、腱細胞の分化メカニズムは明らかになっていない。腱細胞の分化メカニズムを明らかにするため、多分化能を持つマウス筋芽細胞株 (C2C12) を用いて

腱細胞への分化を促進する増殖因子を同定し、腱細胞への分化を誘導するシグナル伝達経路を明らかにすることを目的に研究を行った。

まず C2C12 とマウス胚細胞由来線維芽細胞株 C3H10T1/2 における、腱前駆細胞のマーカー (Scleraxis) の発現量を比較した。次に腱細胞の分化を誘導する増殖因子のスクリーニングとして、C2C12 を無血清培地で培養し、腱細胞の分化を誘導することが予想される増殖因子 (GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8 (Myostatin)) を添加、培養 5 日目に real-time PCR による腱細胞特異的マーカー (Tenomodulin) と筋細胞特異的マーカー (Myogenin, MyoD)、脂肪細胞特異的マーカー (CEBP β , PPAR γ) を定量した。最も Tenomodulin の発現を促進した Myostatin について、用量・時間による Tenomodulin 発現の変化の定量と、Tenomodulin と Myogenin の免疫染色を行った。さらに Myostatin と共にシグナル伝達経路の阻害剤を添加して各マーカーの定量を行った。最後に C2C12 にシグナルの伝達因子である Smad2, Smad3 の siRNA を導入して同様に各マーカーを定量した。

その結果、植村は次の結論を得た

1. C2C12 では C3H10T1/2 よりも Scleraxis を多く発現していた。

2. 各増殖因子のうち Myostatin を添加した際の Tenomodulin の発現量が最も高かった。
3. Myostatin 添加 5 日目で Tenomodulin の発現が最高値となり、また用量依存的に Tenomodulin の発現が増加した。
4. 免疫染色では Myostatin の添加により Myogenin の発現は減少し、筋管細胞の形成が抑制され、Tenomodulin の発現を認めた。
5. Smad2/3 を介する伝達経路を阻害する ALK 阻害剤により Tenomodulin の発現が有意に抑制された。
6. Smad3 の siRNA 導入により、Tenomodulin の発現は抑制された。

これらの結果より、C2C12 は腱前駆細胞の性質を持ち、Myostatin の刺激によって、筋細胞への分化が抑制され腱細胞への分化が誘導される事が確認された。また Myostatin は Smad3 を介するシグナル伝達経路を活性化することにより筋芽細胞から腱細胞への分化を誘導していることも明らかとなった。本研究により確立された腱細胞培養系は、今後腱細胞分化や損傷腱の修復に関する分子生物学的な研究を進めていく上で有用であると考えられる。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Principal component analysis for ataxic gait using a triaxial accelerometer (3 軸加速度計を用いた失調性歩行の主成分分析)

松 嶋 聡

(論文の内容の要旨)

【背景】脊髄小脳変性症と多系統萎縮症は主に小脳や脳幹が障害される神経変性疾患であり、体幹失調による起立・歩行障害が初発、かつ主症状となることが多い。小脳失調症の評価法として、The Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) が世界で広く用いられているが、順序尺度を用いた指標のため、特に軽症例や発症初期における変化を鋭敏に捉えることが困難である。我々は 2015 年に 51 例の脊髄小脳変性症と多系統萎縮症患者を対象に 3 軸加速度計を用いた起立・歩行障害の解析結果を報告した。ここでは 3 軸加速度計が失調性歩行を評価するための有用なツールとなり得ることを示したが、具体的な評価法の提案には至らなかった。本研究では失調性歩行の新しい評価法を構築するため、より多数例のデータに対して主成分分析を行った。

【方法】61 名の患者群と 57 名の健常群に対して、3 軸加速度計を用いた歩行解析を行った。患者群の内訳は脊髄小脳失調症 (spinocerebellar ataxia type 1, SCA1) 1 名、SCA2 1 名、SCA3/MJD 2 名、SCA6 13 名、SCA31 16 名、皮質性小脳萎縮症 10 名、優性遺伝性脊髄小脳変性症ではあるが、遺伝子検査未施行、あるいは遺伝子検査により病型が確定されていない患者 9 名、多系統萎縮症 9 名であった。各被験者は腰部正中 (第 3 腰椎棘突起部に相当) に 3 軸加速度計を装着し、10 m 歩行を 6 往復・計 12 回行った。歩行パラメーターとして、歩行速度・ステップ長 (1 歩の長さ)・ケイデンス (1 分間当たりの歩数) と、規則性、対称性、動揺性を算出した。規則性は自己相関係数を用いて定義した。対称性は左右 1 歩目における自己相関係数の比を用いて定義した。いずれも 0 ~ 1 の範囲で連続的に変化する数値であり、数値が 1 に近いほど、

歩行がより規則的あるいは対称的であることを意味する。動揺性は加速度データの root mean square（二乗平均平方根）を用いて定義した。数値が大きい程、動揺の程度が大きいことを意味する。各被験者において歩行速度、ステップ長、ケイデンスと前後・上下軸の規則性と対称性、前後・左右・上下軸の動揺性の計10個のパラメーターが得られたが、これらの関係性と失調性歩行の特徴を明らかにするため、患者群・健常群それぞれに対して10個のパラメーターを用い主成分分析を行った。患者群においては歩行解析施行と同日にSARAスコアも評価した。

【結果】主成分分析の結果、患者群では10個の歩行パラメーターは2つの独立した主成分に分解された。患者群における主成分のうち、第2主成分は特異的な構造であり、その固有ベクトルにおいて歩行速度、ステップ長、規則性、対称性と左右軸の動揺性が有意に寄与していた。患者群の第2主成分の固有ベクトルと各被験者の歩行パラメーターから計算した第2主成分得点値は、患者群と健常群で有意に異なる分布を示し、患者群においてはSARA歩行スコアや罹病期間と有意な相関を示した。

【考察・結論】主成分分析により得られた患者群における2つの主成分のうち、第2主成分は失調性歩行の特徴を定量的に表していると考えられた。それにより、脊髄小脳変性症・多系統萎縮症における失調性歩行は歩行速度、ステップ長、規則性ならびに対称性ととともに、動揺性においては特に左右軸の値が重症度評価に重要であることが示された。患者群の第2主成分を用いた主成分得点値は健常群と患者群を明確に区別し、患者群のSARA歩行スコアや罹病期間との有意な相関から脊髄小脳変性症・多系統萎縮症患者における失調性歩行の重症度を表すスコアとも言える。本研究により客観的かつ直接的に被験者の歩行能力を反映した、新しい失調性歩行の評価法の構築が可能になったと考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

脊髄小脳変性症と多系統萎縮症は体幹失調による起立・歩行障害が初発、かつ主症状となることが多い。小脳失調症の評価法として、The Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) が世界で広く用いられているが、特に軽症例や発症初期における変化を鋭敏に捉えることが困難である。本研究では失調性歩行の新しい評価法を構築するため、歩行時の加速度データから算出される多数の歩行パラメーターに

対して主成分分析を行った。

61名の患者群（優性遺伝性脊髄小脳失調症 42名、皮質性小脳萎縮症 10名、多系統萎縮症 9名）と57名の健常群に対して歩行解析を行った。各被験者は腰部正中（第3棘突起部に相当）に3軸加速度計を装着し、10 m歩行を6往復・計12回行った。歩行パラメーターとして各被験者において得られた歩行速度、ステップ長、ケイデンスと前後・上下軸の規則性と対称性、前後・左右・上下軸の動揺性の計10個のパラメーターに対して主成分分析を行った。患者群においては歩行解析施行と同日にSARAスコアも評価した。

その結果、松嶋 聡は次の結果を得た。

1. 主成分分析の結果、患者群では10個の歩行パラメーターは2つの独立した主成分に分解された。
2. 患者群における主成分のうち、第2主成分は特異的な構造であり、その固有ベクトルにおいて歩行速度、ステップ長、規則性、対称性と左右軸の動揺性が有意に寄与していた。
3. 患者群の第2主成分の固有ベクトルと各被験者の歩行パラメーターから計算した第2主成分得点値は、患者群と健常群で有意に異なる分布を示し、患者群においてはSARA歩行スコアや罹病期間と有意な相関を示した。

これらの結果により、脊髄小脳変性症・多系統萎縮症における失調性歩行は歩行速度、ステップ長、規則性ならびに対称性ととともに、動揺性においては特に左右軸の値が重症度評価に重要であることが示された。患者群の第2主成分を用いた主成分得点値は健常群と患者群を明確に区別し、脊髄小脳変性症・多系統萎縮症患者における失調性歩行の重症度を表すスコアとも言える。本研究により客観的かつ直接的に被験者の歩行能力を反映した、新しい失調性歩行の評価法の構築が可能になったと考えられた。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。

SIRT1 regulates the chemoresistance, and invasiveness of ovarian carcinoma cells (SIRT1は卵巣癌細胞の抗がん剤耐性および浸潤能を調節する)

MVUNTA DAVID HAMISI

(論文の内容の要旨)

The incidence of epithelial ovarian carcinoma (OvCa) has markedly increased in Japan. Current treatment approaches for advanced OvCa including debulking surgery and adjuvant platinum-based chemotherapy have offered minimal survival benefits because of frequent recurrences and increasing drug resistance leading to treatment failures. Therefore, it is urgent to discover the new therapeutic targets overcoming the resistance to anticancer drugs.

Sirtuin 1 (SIRT1) is an NAD-dependent protein deacetylase involved in many cellular processes including the regulation of cell cycle, apoptosis, senescence, metabolism, DNA repair etc., through the suppression by deacetylation of histones and other target proteins such as p53. SIRT1 is also known as a longevity gene because it suppresses cell death and prolongs the survival under severe conditions such as low nutrition. SIRT1 was originally considered to function as a tumor suppressor gene. However, it seems to be a “double-edged sword” because its functions may act as an advantage for the survival of cancer cells as well as normal cells. We previously demonstrated that SIRT1 enhanced the chemoresistance and aggressiveness of endometrial carcinoma cells. In addition, we recently reported that the overexpression of SIRT1 in OvCa tissue was a poor prognostic factor in OvCa patients (Mvunta DH et al. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016). The present study aimed to clarify the mechanistic insights into the expression and function of SIRT1 in OvCa cells.

First, we demonstrated that the expressions of SIRT1 in a panel of human OvCa cell lines was stronger than that of immortalized ovarian surface epithelium cell line (OSE7E) by the quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) and Western blotting (WB). We then examined the effect of SIRT1 on cell

proliferation and chemoresistance in 3 CCC cell lines (RMG1, TOV21G, and ES2) and one cisplatin-resistant EC cell line (A2780CDDP) by SIRT1 overexpression (-OEX) or knockdown (-KD). The WST1 assay revealed that SIRT1-KD decreased the proliferation ($P<0.05$) and chemoresistance ($P<0.05$). The treatment with selective SIRT1 inhibitor, EX527, also attenuated the chemoresistance of RMG1 cells ($P<0.05$). In contrast, SIRT1-OEX enhanced chemoresistance ($P<0.05$). Apoptotic cells under CDDP were increased by SIRT1-KD ($P<0.05$) and decreased by SIRT1-OEX ($P<0.05$). To clarify the underlying mechanism of these effects, the expression of apoptosis-related proteins such as BAX, BCL-2 was examined; however, no difference was observed by SIRT1-OEX and -KD.

We next focused on the effect of SIRT1 on the “stemness”. Soft-agar colony formation assay, which evaluates the stemness, revealed that the number of ES2 colonies was increased by SIRT1-OEX ($P<0.05$) and decreased by the treatment with EX527 ($P<0.05$). The mRNA expression of stem cell markers (Nanog, Lin28, Sox2, Smo, and Bmi-1) was increased by SIRT1-OEX ($P<0.05$). These findings suggest that SIRT1 may act to keep the stemness, resulting in chemoresistance.

Since resistance to oxidative stress is an important mechanism of chemoresistance in cancer stem cells (CSCs), we investigated the effect of SIRT1 on oxidative stress. The dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) assay which detects the production of reactive oxygen species (ROS) revealed that SIRT1-KD increased ROS production ($P<0.05$), whereas SIRT1-OEX decreased ROS production ($P<0.05$). To elucidate the underlying mechanism, we then examined the involvement of antioxidant molecules. Glutathione, one of the important endogenous antioxidant, was decreased by SIRT1-KD in TOV21G cells ($P<0.05$). The expression of antioxidative enzymes, such as

heme oxygenase-1 (HO-1) and thioredoxin (TRDX), was decreased by SIRT1-KD in TOV21G, ES2, and A2780CDDP, and increased by SIRT1-OEX in ES2 cells. The expressions of CD44v, known as one of the major CSC marker which acts with xCT to decrease ROS, was decreased by SIRT1-KD and increased by SIRT1-OEX.

We then examined the effect of SIRT1 on cell migration and invasion. In ES2 cells, SIRT1-KD decreased the migration and invasive abilities, whereas SIRT1-OEX enhanced these abilities.

In conclusion, these results suggest that SIRT1 enriches the CSC pool and confer the chemoresistance to OvCa by counteracting oxidative stress. The targeting of SIRT1 may be a novel therapeutic strategy against CSCs, ultimately reducing the chemoresistance burden of OvCa.

(論文審査の結果の要旨)

SIRT1 is known as a longevity gene that forestalls aging and age-related diseases including cancer. However, SIRT1 has recently attracted widespread attention due to its overexpression in some cancers. We previously identified the overexpression of SIRT1 in ovarian carcinoma (OvCa) as a poor prognostic factor. Therefore, we investigated the function of SIRT1 in OvCa cells.

The cDNA, siRNA/shRNA technologies and a SIRT1 inhibitor (EX527) were utilized for the overexpression (OEX), knock-down (KD) and inhibition of SIRT1, respectively, in human OvCa cell lines.

The effect of SIRT1 on proliferation and chemoresistance was examined using a WST-1 assay. To clarify the underlying mechanisms, apoptosis (Annexin V/PI staining), tumor formation ability (soft-agar colony formation assay), the expression of antioxidants and stem cell marker including CD44v (real-time PCR and western blotting), and migration and invasion ability were examined, and glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS) were quantified. Accordingly, the present study has revealed the function of SIRT1 in OvCa cells as follows :

1. SIRT1 significantly enhanced the proliferation ($P<0.05$) and chemoresistance ($P<0.05$), and reduced apoptosis ($P<0.05$).
2. SIRT1-OEX significantly enhanced the colony formation ability in soft-agar and upregulated several stemness-associated genes, suggesting that SIRT1 might be involved in the maintenance of cancer cell "stemness".
3. SIRT1 reduced oxidative stress via upregulating multiple antioxidant pathways including antioxidant enzymes, GSH, and CD44v-xCT pathways.
4. SIRT1 enhanced the migration and invasion ability of OvCa cells.

In conclusion, our results suggest that SIRT1 plays a role in the acquisition of aggressiveness and chemoresistance of OvCa, and has a potential as a therapeutic target for OvCa.

以上の論文審査の結果, 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。

Coenzyme Q10 Improves Lipid Metabolism and Ameliorates Obesity by Regulating CaMKII-Mediated PDE4 Inhibition (コエンザイム Q10は CaMKII を介して PDE4の発現を抑制することにより, 肥満と脂質代謝を改善する)

徐 哲

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】加齢生物学教室では, 還元型 CoQ10 (CoQ₁₀H₂) の補給が老化促進モデルマウス (SAMP1) の促進老化を遅延することを報告し (Yan et al, Exp Gerontol 2006), CoQ₁₀H₂の抗老化効果には酸化ストレス抑制やミトコンドリア機能活性化が関与することを示唆した (Tian et al, Antioxid Redox Signal 2013)。しかし, CoQ₁₀H₂の抗肥満効果については, これまで

注目されてこなかった。本研究では, CoQ₁₀H₂の抗肥満効果とその作用機構を明らかにすることを目的に, II型糖尿病及び肥満のモデルマウス (KKAy マウス), マウス線維芽細胞 (3T3L1細胞) とヒト肝癌由来細胞株 (HepG2) を用い, CoQ₁₀H₂による脂質代謝制御を検討した。

【方法】1) KKAy マウス (メス) に, 8週齢から普通餌 (CE-2) と CoQ₁₀H₂餌 (0.3 %w/w 含有 CE-2)

の投与を開始し、それぞれ12, 16, 20週齢で解析に供した。体重、摂餌量を継続的に測定し、解剖時には糖及び脂質代謝関連血液生化学パラメータを測定し、また、脂肪組織及び肝臓の脂質代謝関連タンパク質／遺伝子の量的変化を測定した。2) 3T3L1細胞を用いて、CoQ₁₀H₂の脂質代謝への影響を確認した。3) HepG2細胞にCoQ₁₀H₂を添加し、細胞内cAMP濃度変化やcAMP分解酵素ホスホジエステラーゼ4 (PDE4)の遺伝子発現量とタンパク質量を測定した。また、CoQ₁₀H₂添加後のPDE4発現調節因子C-FOSの遺伝子発現量と転写活性を測定した。さらに、C-FOS上流のカルシウムシグナル関連因子及び細胞内Ca²⁺濃度変化を解析した。

【結果・考察】1) CoQ₁₀H₂の摂取により、KKAYマウスの体重及び白色脂肪(WAT)量は有意に減少した。また、CoQ₁₀H₂は耐糖能を改善し、血清トリグリセリドやコレステロール濃度を有意に減少した。WATでは、脂肪細胞への分化(*Pparγ*など)と脂肪酸合成(*Srebp1c*など)に関与するマーカー遺伝子の発現量を抑制した。一方、褐色脂肪(BAT)では、CoQ₁₀H₂は熱産生(*Ucp1*など)とミトコンドリア機能(*Pgc1α*など)のマーカー遺伝子の発現量が増加した。また、肝臓では、脂肪酸分解酵素遺伝子(*Ppara*など)の発現亢進、及び脂肪酸合成酵素遺伝子(*Fas*など)の発現抑制が認められた。また、SIRT1タンパク質量の増加、AMPKやACCのリン酸化の促進が認められ、AMPKやSIRT1の上流因子であるcAMPの有意な増加が確認された。2) 3T3L1細胞へのCoQ₁₀H₂添加により、3T3L1細胞の脂肪細胞への分化及び分化後の脂肪蓄積が抑制された。3) HepG2細胞を用いた解析により、CoQ₁₀H₂はPDE4の遺伝子発現量やタンパク質量を減少させ、細胞内cAMP量を増加させることを明らかにした。また、ERK1/2を介したC-FOSの発現とリン酸化が抑制され、C-FOS結合配列を持つPDE4遺伝子の発現が抑制された。さらに、CoQ₁₀H₂は小胞体カルシウムポンプ(SERCA2)の遺伝子発現量を増加させ、細胞質内Ca²⁺濃度を減少させた。Ca²⁺濃度の減少に伴い、Ca²⁺依存性シグナル分子CaMKIIとMEK1/2の活性化が抑制され、ERK1/2の活性化を抑制された。PDE4の減少とSERCA2の増加は、CoQ₁₀H₂摂取KKAYマウスの肝臓でも確認した。

以上の結果から、CoQ₁₀H₂はSERCA2の発現を促進して細胞質内Ca²⁺濃度を減少させ、下流のシグナルの抑制を招き、PDE4の発現を減少させた結果、cAMP

量を増加させることを明らかにした。cAMP量の増加によりAMPKのリン酸化／活性化が促進され、脂肪酸合成を抑制し、さらにAMPK-SIRT1シグナルを介して脂肪酸分解を増加させ、肥満に伴う脂質代謝異常症を改善すると考えられる。本研究は、抗肥満・脂質代謝改善をめざした新たな分子標的を提示し、効果的な治療・予防法の構築に貢献するものと考えている。

(論文審査の結果の要旨)

コエンザイムQ10 (CoQ10)はミトコンドリアでエネルギー生産に関与する電子伝達系の重要な因子であり、疾患や加齢に伴い、組織含有量が減少することから治療薬や抗老化サプリメントとして使用されてきた。加齢生物学教室では、還元型CoQ10 (CoQ₁₀H₂)の補給が老化促進モデルマウス(SAMP1)の促進老化を遅延することを報告し(Yan et al, Exp Gerontol 2006)、CoQ₁₀H₂の抗老化効果には酸化ストレスの抑制やミトコンドリア機能の活性化が関与することを示唆した(Tian et al, Antioxid Redox Signal 2013)。しかし、CoQ₁₀H₂の抗肥満効果については、これまで注目されてこなかった。

本研究では、CoQ₁₀H₂の抗肥満効果とその作用機構を明らかにすることを目的に、II型糖尿病及び肥満のモデルマウス(KKAYマウス)、マウス線維芽細胞(3T3L1細胞)とヒト肝癌由来細胞株(HepG2細胞)を用い、CoQ₁₀H₂による脂質代謝制御を検討した。

その結果、徐哲は次の結論を得た。

1. KKAYマウスはCoQ₁₀H₂を補給することにより
 - 1) 体重増加を抑制した。
 - 2) 肥満に伴うインスリン抵抗性及び糖・脂質代謝異常を改善した。
 - 3) 白色脂肪組織(WAT)量は有意に減少し、脂肪細胞への分化(*Pparγ*など)と脂肪酸合成(*Srebp1c*など)に関与するマーカー遺伝子の発現量を抑制した。
 - 4) 褐色脂肪組織(BAT)中の熱産生(*Ucp1*など)とミトコンドリア機能(*Pgc1α*など)のマーカー遺伝子の発現量を増加した。
 - 5) 肝臓中の脂肪酸分解酵素遺伝子(*Ppara*など)の発現亢進、及び脂肪酸合成酵素遺伝子(*Fas*など)の発現量が抑制された。また、SIRT1タンパク質量の増加、AMPKやACCのリン酸化の促進が認められ、AMPKやSIRT1の上流因子であるcAMPが有意に増加した。
2. 3T3L1細胞へのCoQ₁₀H₂添加により、3T3L1細胞

の脂肪細胞への分化及び分化後の脂肪蓄積が抑制された。

3. HepG2細胞への CoQ₁₀H₂添加により

- 1) PDE4の遺伝子発現量やタンパク質量が減少し、細胞内 cAMP 濃度が増加した。
- 2) ERK1/2を介した C-FOS の発現とリン酸化を抑制し、C-FOS 結合配列を持つ PDE4遺伝子の発現が抑制した。
- 3) Ca²⁺依存性シグナル分子 CaMKII と MEK1/2 の活性化（リン酸化）及び ERK1/2の活性化（リン酸化）を抑制した。
- 4) 小胞体カルシウムポンプ（SERCA2）の遺伝子発現量が増加した。

以上の結果から、CoQ₁₀H₂はSERCA2の発現を促進して細胞質内Ca²⁺濃度を減少させ、下流のシグナルの抑制を招き、PDE4の発現を減少させた結果、cAMP量を増加させることを明らかにした。cAMP量の増加によりAMPKのリン酸化/活性化が促進され、脂肪酸合成を抑制し、さらにAMPK-SIRT1シグナルを介して脂肪酸分解を増加させ、肥満に伴う脂質代謝異常症を改善すると考えられる。本研究は、抗肥満・脂質代謝改善をめざした新たな分子標的を提示し、効果的な治療・予防法の構築に貢献するものと考えている。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Survey of epidemiology, clinical picture and current treatments for elderly-onset (≥ 65 years) patients with myasthenia gravis in Nagano Prefecture, Japan (長野県における、高齢発症重症筋無力症患者の疫学、臨床像、治療の現状に関する臨床調査)

小川 有香

(論文の内容の要旨)

【背景】重症筋無力症(MG)は小児期や比較的若年の成人に発症し、高齢発症MGは稀であると考えられていた。しかし我々は実臨床の中で、高齢発症MGが多く存在する印象があり、1982年から2001年の間に長野県内のMG患者を対象に疫学調査を行い、elderly-onset MG(65歳以上発症)が増加している事を明らかにした。後に本邦の全国調査でも、elderly-onset MGは1987年9%から2006年19.2%と増加している事が明らかとなった。近年、prednisolone(PSL)、calcineurin inhibitors(CNI)、免疫グロブリン、血液浄化療法など様々な治療が行われているが、elderly-onset MGの臨床像や治療反応性は十分に検討されていない。我々は2002年から2012年の間に、長野県内で新規発症したMG患者を対象に、疫学、臨床像、治療について後方視的に検討した。

【方法】信州大学医学部附属病院および関連病院23施設にアンケート調査を実施した。15歳以上で発症(成人発症)し、テンシロンテスト陽性、あるいはAchR抗体、Musk抗体陽性の患者を対象とした。Non-elderly-onset(65歳未満)、elderly-onset(65歳以上)の2群に分け、発症年齢、性別、初発症状、MGFA分類(最重症時の重症度分類)、胸腺腫の有無、治療内容を調査した。診療録を確認できた患者(non-elderly n=51, elderly n=31)では、MGFA post

intervention status, PSL最大投与量とPSL維持量(2012年現在)を確認し、PSL 5 mg以下で良好なQOLを維持できる患者(MM or better with PSL ≤ 5 mg)の割合を検討した。発症年齢と胸腺腫合併については、我々の前回調査と比較検討した。

【結果】19施設(82.6%)から回答を得た、214例のMG(non-elderly n=136, elderly n=78)を対象とした。全例で抗AchR抗体が測定され84.6%で陽性であったが、同抗体の陽性率は両群で有意差はなかった。最高齢は85歳、最年少は16歳であり、elderly-onset MGの割合は、1982年~1991年が7.8%、1992年~2001年が28.3%、2002年~2012年が36.4%であった。また各年代における高齢者MGの割合を比較する目的で、1985年、1995年、2005年の長野県内高齢者人口割合を用いて1982年~1991年を基準に他の年代の高齢者MGの割合を補正したところ、1992年~2001年は20.3%、2002年~2012年は29.1%となった。各症状出現率や重症度の検討では、眼瞼下垂: non-elderly 82%、elderly 90%。複視: 63%、51%と眼症状は両群とも多い一方、四肢筋力低下はelderly-onset群で有意に少なかった(18% vs 47%, P<0.001)。また同群ではMGFA Iが多くIIbが少なかった(I: 55% vs 39%, IIb: 12% vs 23%)。胸腺腫合併率は、non-elderly 35%、elderly 25%、MG全体 32%で、この20年で著変なかった。治療状

況の検討では、免疫治療 (PSL, CNI) 施行率は両群とも差はないが (non-elderly 65 %, elderly 67 %), elderly-onset 群では PSL 単独使用率が高かった (42 % vs 25 %)。同群では PSL 平均最大投与量は低く (20.89 ± 15.37 mg vs 26.54 ± 15.48 mg), MM with PSL ≤ 5 mg 達成/維持率が高かった (68.2 % vs 60.3 %)。胸腺腫非合併の全身型 MG の比較では, elderly-onset 群の胸腺摘除率が低かった (25.8 % vs 41.2 %)。免疫グロブリン, 血液浄化療法の施行率は両群とも約 17 % と有意差はなかった。

【考察】 この30年で高齢者人口の中の MG 発症率が増加している。高齢発症 MG の認知向上, 抗体測定的一般化を背景に診断率が高まったためと考えられた。Elderly-onset MG 患者の多くは眼症状が主体で, 全経過を通じ重度の四肢脱力や球症状を呈することはなく, 少量～中等量 PSL で治療可能である事が示唆された。胸腺腫非合併全身型 MG の胸腺摘除率が elderly-onset MG で低かったが, 高齢者 MG への手術が第一選択として推奨されておらずリスクを懸念し回避された可能性, 内科的治療で十分な治療効果が得られ手術は行われなかった可能性が考えられた。

【結語】 Elderly-onset MG 発症/診断率は年々増加している。本調査では, elderly-onset MG の多くは眼症状が主体で, 低用量～中等量 PSL で治療可能である事が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

高齢発症の重症筋無力症 (MG) は稀であると考えられていた。しかし我々は実臨床の中で, 高齢発症 MG が多く存在する印象があり, 1982年から2001年の間に長野県内の MG 患者を対象に疫学調査を行い, elderly-onset MG (65歳以上発症) が増加している事を明らかにした。elderly-onset MG の臨床像や治療反応性は十分に検討されていない。我々は2002年から2012年の間に, 長野県内で新規発症した MG 患者を対象に, 疫学, 臨床像, 治療について後方視的に検討した。

信州大学医学部附属病院および関連病院23施設にアンケート調査を実施した。15歳以上発症 (成人発症), テンシロンテスト陽性, あるいは抗 AchR, 抗 Musk 抗体陽性の患者を対象とした。Non-elderly-onset (65歳未満), elderly-onset (65歳以上) の2群に分け, 患者背景, 臨床像, 治療状況を調査した。診療録を確認できた患者では, MGFA post intervention status, PSL 最大投与量と PSL 維持量 (2012年現在) を確認

し, PSL 5 mg 以下で良好な QOL を維持できる患者 (MM or better status with PSL ≤ 5 mg) の割合を検討した。発症年齢と胸腺腫合併については, 前回調査と比較した。

214例の MG 患者 (non-elderly n=136, elderly n=78) を対象とした。抗 AchR 抗体は84.6 % で陽性で, 陽性率は両群で差はなかった。最高齢は85歳だった。Elderly-onset MG の割合は, 1982年～1991年が7.8 %, 1992年～2001年が28.3 %, 2002年～2012年が36.4 % であった。各年代における高齢発症 MG の割合を比較する目的で, 1985年, 1995年, 2005年の長野県内高齢者人口割合を用いて, 1982年～1991年を基準に他の年代の高齢発症 MG の割合を補正したところ1992年～2001年は20.3 %, 2002年～2012年は29.1 % となった。

眼症状は両群とも初発症状として多くみられる一方, 四肢筋力低下は elderly-onset 群で有意に少なかった (18 % vs 47 %, P<0.001)。同群では MGFA I が多く II b が少なかった (I : 55 % vs 39 %, II b : 12 % vs 23 %)。胸腺腫合併率は, non-elderly 35 %, elderly 25 %, MG 全体 32 % で, この20年で著変はなかった。

免疫治療 (PSL, CNI) 施行率は両群とも差はないが (non-elderly 65 %, elderly 67 %), elderly-onset 群では PSL 単独使用率が高かった (42 % vs 25 %)。同群では PSL 平均最大投与量は低く (20.89 ± 15.37 mg vs 26.54 ± 15.48 mg), MM with PSL ≤ 5 mg 達成/維持率が高かった (68.2 % vs 60.3 %)。Elderly-onset 群では胸腺腫非合併 MG における胸腺摘除率が低かった (25.8 % vs 41.2 %)。

この30年で高齢発症 MG の発症率が増加している。高齢発症 MG の認知向上, 抗体測定的一般化を背景に診断率が高まったこと, 高齢者人口が増加し, 免疫調節機能の変化等から MG を発症する高齢者が増加した可能性が考えられた。高齢発症 MG の多くは眼症状が主体で, 重度の四肢脱力や球症状を呈することはなく, 少量～中等量 PSL で治療可能であった。ごく近年, 高齢者においても胸腺腫非合併全身型 MG の胸腺摘除を推奨する報告を認めるが, 本調査では elderly-onset 群での手術施行率は低かった。高齢者 MG への手術が現在治療の第一選択として推奨されていないこと, 内科的治療で十分な治療効果が得られたことから手術は行われなかった可能性が考えられた。本調査より, elderly-onset MG の多くは眼症状が主体で, 低用量～中等量 PSL で治療可能である事が示

唆された。

として価値があるものと認めた。

以上から、主査、副査は一致して本論文を学位論文

POU4F3 mutation screening in Japanese hearing loss patients: Massively parallel DNA sequencing-based analysis identified novel variants associated with autosomal dominant hearing loss (次世代シーケンサーにより見出された日本人難聴患者における *POU4F3* 遺伝子変異)

北野友裕

(論文の内容の要旨)

感音難聴は先天性障害の中で最も頻度の高い疾患の一つであり、新生児500-1,000人に1人に認める。また、そのうち少なくとも60%は遺伝子の関与する遺伝性難聴である。遺伝性難聴の原因遺伝子は約100種類報告されており、そのうち優性遺伝形式をとるものは約30種類報告されている。優性遺伝形式をとる難聴は罹患者頻度が低く、また家系ごとに変異が異なることより、従来の手法では解析困難であった。近年、次世代シーケンサーの登場により、多数の難聴原因遺伝子を高速かつ網羅的に解析することが可能となり、今まで見出すことが困難であった原因遺伝子変異を検出することが可能となってきた。

POU4F3 遺伝子は、常染色体優性遺伝形式をとる非症候群性難聴の原因遺伝子 (DFNA15) である。内耳の有毛細胞特異的に発現する転写因子であり、有毛細胞の分化や維持に関与することが報告されている。これまでにアジアや中東などから14家系14変異が報告されているが、臨床像についての詳細な報告は少ない。今回、我々は日本人難聴患者2549例を対象に、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子変異の解析を行った。その結果、優性遺伝家系602例中15例より12種類の新規 *POU4F3* 遺伝子変異を検出し、日本人常染色体優性遺伝性難聴患者における頻度は2.5% (15/602人) であることを明らかにした。

またその *POU4F3* 遺伝子変異の検出された15家系24例の臨床症状について検討を行った。その結果、難聴の進行性については、全例で難聴の進行を認めたものの、発症年齢や難聴の程度、めまいの有無については様々であった。さらに聴力像について年齢との相関を検討すると、主に中音域が障害される皿形難聴で始まり、その後高音域の聴取が悪化し、高音漸傾型難聴を経て全聾に至る傾向を認めた。また、20%の症例において聴力の左右差を認めた。遺伝子変異の種類と年齢・聴力の相関について検討を行うと、Truncat-

ing 変異症例では Non-truncating 変異症例と比べて比較的若年で発症し緩徐に進行することを見出した。18%の症例においてめまいの訴えがあり、前庭機能低下症例が多い可能性が示された。

本研究により *POU4F3* 遺伝子は常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性難聴の原因遺伝子としては比較的高頻度であり、診療において留意する必要がある重要な原因遺伝子であることが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

POU4F3 遺伝子は、常染色体優性遺伝形式をとる非症候群性難聴の原因遺伝子 (DFNA15) である。内耳の有毛細胞に発現し聴覚や平衡機能に関わる。これまでにアジアや中東などから14家系14変異が報告されているが、臨床像についての詳細な報告は少なく、不明な点が多かった。今回北野は日本人難聴患者2,549例を対象に、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子変異の解析を行い、*POU4F3* 遺伝子変異の頻度やその臨床像について詳細に検討した。

その結果は以下の通りであった。

1. 優性遺伝家系602例中15例より12種類の新規 *POU4F3* 遺伝子変異を検出した。日本人常染色体優性遺伝性難聴患者における頻度は2.5% (15/602例) であった。また15家系より24人の臨床症状を得た。
2. ほとんどの変異がタンパク質のドメインに関わることを示した。
3. 全例で難聴の進行を認めたものの、発症年齢や難聴の程度については様々であった。
4. 聴力型は皿型 (中音域の難聴) から高音漸傾型を経て全聾に至ることを見出した。
5. 20%の症例において聴力の左右差を認めた。
6. Truncating 変異症例と Non-truncating 変異症例を比較すると、Truncating 変異症例では若年発症とゆっくりとした進行、Non-truncating 変異症例ではより遅い発症と速い進行を来すことを明らかに

- した。
7. 平衡機能について検討すると、18% (4/22例) にめまい症状を認め、33% (1/3例) に平衡機能検査異常を認めた。これは過去の報告と同様の傾向であった。
8. *POU4F3*変異症例に対する初めての人工内耳装用例を見出し、良好な装用効果が期待できる可能性を示した。

以上より、常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴患者における *POU4F3*変異症例の頻度は比較的高く、臨床的重要な遺伝子と思われた。また、今回明らかになった詳細な臨床像は *POU3F4*変異症例の予後の予測や介入を選択する上で重要な情報として活用可能である。

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。

Influence of body position during Heimlich maneuver to relieve supralaryngeal obstruction : a manikin study (喉頭上閉塞に対するハイムリック法施行時の体位の影響：マネキン研究)

市川 通太郎

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 食品による窒息事故は小児、高齢者の死亡原因の上位に入り、社会的な問題となっている。ハイムリック法は1974年に窒息に対する応急処置として報告され、翌年には162人が救われた。この方法の原理は臍上部を上方に圧迫することで横隔膜を人為的に拳上させ肺から空気を呼出することである。窒息は鼻と口、中咽頭、喉頭、気管と様々な部位で起こり得るが、鼻と口以外は実際にどの部位で閉塞しているかを確認することは困難である。故に喉頭上完全閉塞状況でのハイムリック法の有効性や体位による効果の差は明らかではない。我々は「立位によるハイムリック法が常に効果的であるとは言えないのではないか」という仮説を立てた。成人及び小児の喉頭モデルとハイムリック法練習用マネキンをを用いて喉頭上完全閉塞を再現し、ハイムリック法の効果を立位、背臥位、腹臥位で比較した。

【方法】・実験装置：ハイムリック法練習用マネキンに小児もしくは成人の喉頭モデルを接続した。ハイムリック法施行中の気道内圧と圧波形を測定するための差圧トランスデューサー及び解析用ソフトをインストールしたノートパソコンもマネキンに接続した。

・窒息再現に用いた食品：半個体食品は窒息リスクが高く特にこんにゃく入りゼリーは窒息の危険があると国際的にも注意喚起されている。こんにゃく入りゼリーの特徴は口腔内ですぐに溶けず、表面が滑らかになり、滑りやすくなることである。こんにゃく入りゼリーによる死亡者数は1995年から2008年の間で17人いる。このような事実を踏まえ、本実験では喉頭完全閉塞を再現しやすい、こんにゃく入りゼリーを選択した。実験で使用したゼリーは日本で市

販されているものを (4.3×3.0×3.0 cm) を使用した。

・実験参加者：実験に参加した5人の救急医師は全員 ICLS (Immediate Cardiac Life Support) のプロバイダー資格を有しておりハイムリック法に習熟していた。

・実験手順：まずマネキンの各体位での呼気量を測定した。その後、実際に窒息状態を再現したマネキンにハイムリック法を行った。立位、背臥位 (小児は背枕を入れた体位を追加)、腹臥位で行なった。5回連続圧迫を1セットとし、1人の救急医が各体位毎に6セット施行した。圧迫時の気道内圧と圧波形を測定した。5回連続圧迫が終了時に閉塞が解除されている場合を opened case、解除されていない場合を unopened case と定義した。

【結果】 マネキンの呼気量は立位で 0.66 ± 0.44 L、背臥位で 1.15 ± 0.10 L、腹臥位は 0.82 ± 0.09 L であり、背臥位で有意に多く ($p < 0.001$)、立位で有意に少なかった ($p < 0.001$)。ハイムリック法施行中の圧波形は3パターンあった。opened case の場合は1回の圧迫が終わる毎に気道内圧は $0 \text{ cmH}_2\text{O}$ に戻っていた。unopened case は圧迫終了時に気道内が陰圧であった。再閉塞した例もあり、1回目の圧迫後気道内が $0 \text{ cmH}_2\text{O}$ となった (閉塞解除) が、2回目以降の圧迫後は気道内が陰圧になっていた (再閉塞)。成人喉頭モデルでの opened case の割合は背臥位 (97%)、腹臥位 (80%) で有意に多く ($p < 0.001$)、立位 (0%) で有意に少なかった ($p < 0.001$)。成人喉頭モデルでの気道内圧は立位の unopened case で圧迫回数を重ねる毎に有意に陰圧が増す傾向にあった ($p < 0.001$)。小児喉頭モデルでの opened case の数は枕あり背臥位

(77%)と腹臥位(93%)で有意に多く($p < 0.001$), 立位(0%)で有意に少なかった($p < 0.001$)。枕無し背臥位の opened case の割合は63%であり, 有意差はなかった。小児喉頭モデルでの気道内圧は, 立位と枕あり背臥位の unopened case では圧迫回数を重ねる毎に有意に陰圧が増す傾向にあった(立位: $p < 0.001$, 枕あり背臥位: $p = 0.002$)。枕無し背臥位では回数を重ねる毎に陰圧にはなるものの, 有意な低下ではなかった($p = 0.839$)。

【結論】マネキン研究の結果では, 喉頭完全閉塞において小児・成人共にハイムリック法は背臥位・腹臥位で行う方が効果的である可能性がある。1回目の圧迫で閉塞解除されない場合, 連続で行うハイムリック法は気道内の陰圧が増すため有害な可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

ハイムリック法は窒息解除に対する救命処置として指導される手技である。この方法の原理は膈上部を上方に圧迫することで横隔膜を人為的に挙上させ肺から空気を呼出することである。American Heart Association の心肺蘇生と救急血管治療のためのガイドライン(2015年度版)ではこの手技を連続して行うことが推奨されている。実際の窒息では咽頭, 喉頭, 気管のどの部位で閉塞が起きているかを確認することは困難である。故に喉頭完全閉塞状態でのハイムリック法の有効性や体位による効果の差は明らかではない。喉頭完全閉塞状態を再現したマネキンを用いてハイムリック法の効果を立位, 背臥位, 腹臥位で比較した。

マネキンに小児または成人の喉頭モデルと気道内圧測定用の差圧トランスデューサーを接続した実験装置を作成した。5人の救急医が実験に参加した。まず, 体位によるマネキンの呼気量を測定した。その後1人

の救急医が5回連続圧迫を1セットとしたハイムリック法を立位, 背臥位(小児には枕ありの体位も追加), 腹臥位で6セットずつ行った。手技施行中の気道内圧と気道内圧波形を測定した。1セットの手技が終了した時に窒息が解除成功したかどうかを確認した。

その結果, 市川らは以下の結果を得た。

1. 呼気量は立位 0.66 ± 0.44 L, 背臥位 1.15 ± 0.10 L, 腹臥位 0.82 ± 0.09 Lと背臥位で有意に多く($p < 0.001$), 立位で有意に少なかった($p < 0.001$)。
2. 成人喉頭モデルの解除成功例の割合は背臥位(97%), 腹臥位(80%)で有意に多く($p < 0.001$), 立位(0%)で有意に少なかった($p < 0.001$)。気道内圧は立位の解除不成功例で圧迫回数を重ねる毎に有意に陰圧が増していた($p < 0.001$)。
3. 小児喉頭モデルの解除成功例の数は枕あり背臥位(77%)と腹臥位(93%)で有意に多く($p < 0.001$), 立位(0%)で有意に少なかった($p < 0.001$)。枕無し背臥位の解除成功例の割合は63%であり, 有意差はなかった。気道内圧は, 立位と枕あり背臥位の解除不成功例では圧迫回数を重ねる毎に有意に陰圧が増していた(立位: $p < 0.001$, 枕あり背臥位: $p = 0.002$)。枕無し背臥位では解除不成功例は回数を重ねる毎に陰圧にはなるが, 有意な低下ではなかった($p = 0.839$)。

これらの結果より, ハイムリック法は喉頭完全閉塞において小児・成人共に背臥位・腹臥位で行う方が効果的である可能性があること, 1回目の圧迫で閉塞解除されない場合, 連続で手技を行うと気道内の陰圧が増すため有害な可能性があることが示された。よって主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

PATZ1 knockdown enhances malignant phenotype in thyroid epithelial follicular cells and thyroid cancer cells (PATZ1をノックダウンすると甲状腺濾胞上皮細胞および甲状腺癌細胞の悪性形質が増強される)

家 里 明日美

(論文の内容の要旨)

【はじめに】甲状腺濾胞上皮細胞由来の癌は, 緩徐に進行する分化癌が, より悪性度の高い低分化癌, 未分化癌へと進行していくことが知られているが, この変化の機序は十分には解明されていない。我々は, 同一症例の甲状腺癌臨床検体中の分化癌と未分化癌成分の遺伝子発現をマイクロアレイ法を用いて比較し, 未分

化転化の過程で発現が大きく変動する遺伝子として転写調節因子 PATZ1 (POZ (BTB) and AT hook containing zinc finger 1, ZNF278) を見出した。PATZ1 は癌化に促進的に働くという報告と, p53 と相互に作用して癌抑制遺伝子として機能するという報告があり, 甲状腺癌では癌の進行に抑制的に働くことが報告されている。今回, 甲状腺濾胞上皮細胞からの発癌や, 甲

甲状腺癌の悪性度の進行に PATZ1 がどの様に関与するか解析した。

【対象と方法】 当科で甲状腺の手術を施行した 82 症例・160 検体を用いて、PATZ1 発現を免疫染色で評価した。核が陽性の細胞の割合 30 % 以上を陽性とした。*in vitro* では不死化正常甲状腺濾胞上皮細胞株 (Nthy-ori 3-1), 分化癌細胞株 (TPC-1, FTC-133), 未分化癌細胞株 (ACT-1, FRO) を用いて、siRNA による PATZ1 の抑制, または PATZ1 遺伝子導入により PATZ1 を強制発現させた際の, 増殖・遊走・浸潤能や, 遊走・浸潤に関わる uPA や MMP2, MMP9, MMP11 の発現を解析した。さらに臨床検体で, uPA, MMP2, MMP9, p53 の発現を免疫染色で評価し, PATZ1 との相関を解析した。

【結果】 臨床検体の免疫染色では, PATZ1 の核発現は非癌部甲状腺組織と腺腫様甲状腺腫で全例陽性であり, 濾胞腺腫 (80 %), 乳頭癌 (89.7 %), 濾胞癌 (62.5 %) でも高い陽性率であったが, 低分化癌 (58.3 %), 未分化癌 (10.7 %) と, 分化度の低下に伴い PATZ1 の核発現の低下が認められ, 未分化癌では非癌部甲状腺組織, 分化癌, 低分化癌のそれぞれと比較して, いずれも有意に PATZ1 発現が低下していた。

in vitro で用いる細胞株の PATZ1 発現を蛍光抗体法で解析すると, Nthy-ori 3-1 では核に強い発現を認め, TPC-1, FTC-133 では核発現は減弱し, ACT-1, FRO では極めて弱い発現が認められ, 臨床甲状腺癌と同じ傾向が認められた。uPA の発現は甲状腺癌細胞 4 株で Nthy-ori 3-1 より強く, MMP2, MMP9, MMP11 は, いずれも ACT-1 において最も強い発現を認めた。Nthy-ori 3-1, TPC-1, ACT-1 は野生型 p53, FTC-133 は変異 p53 を有し, FRO は p53 を発現していないと報告されているが, Western blot (WB) と蛍光抗体法では, FTC-133 で p53 の強い発現, ACT-1 では弱い発現を認め, TPC-1, FRO では発現を認めず, 報告と一致する結果であった。SV40 により不死化された Nthy-ori 3-1 では p53 の強い発現を認めた。

次に, Nthy-ori 3-1 で PATZ1 を抑制すると, 細胞の形態変化と増殖・遊走・浸潤能の増加が認められた。WB では, uPA や MMPs の発現上昇が, さらにサイモグラフィでは, uPA, MMP2, MMP9 の活性上昇が認められた。続いて, TPC-1, FTC-133 で PATZ1 を抑制すると, 増殖・遊走・浸潤能の増加が認められ, uPA や MMPs の発現上昇が認められた。さらに,

ACT-1, FRO で PATZ1 を強制発現させると, 増殖・遊走・浸潤能の低下と, uPA, MMPs の発現低下が認められた。さらに臨床検体の免疫染色では, uPA, MMP2, MMP9 は脱分化の進行とともに陽性症例の割合が高くなり, uPA, MMP2, MMP9 発現はいずれも PATZ1 発現と負の相関が認められた。また p53 status に関わらず, PATZ1 の発現は脱分化の進行とともに低下しており, PATZ1 の腫瘍抑制作用は p53 には依存しないと考えられた。

【結論】 甲状腺濾胞上皮細胞の癌化と甲状腺癌の脱分化の進行の両方に, PATZ1 が抑制因子として機能しており, PATZ1 による uPA や MMPs の制御が腫瘍促進に関与していると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

甲状腺濾胞上皮細胞由来の癌は緩徐に進行する分化癌が, より悪性度の高い低分化癌, 未分化癌へと進行していくことが知られているが, この変化の機序は十分には解明されていない。我々は, 同一症例の甲状腺癌臨床検体中の分化癌と未分化癌成分の遺伝子発現をマイクロアレイ法を用いて比較し, 未分化転化の過程で発現が大きく変動する遺伝子として転写調節因子 PATZ1 (POZ (BTB) and AT hook containing zinc finger 1, ZNF278) を見出した。今回, 甲状腺濾胞上皮細胞からの発癌や, 甲状腺癌の悪性度の進行に PATZ1 がどの様に関与するか解析した。

その結果, 家里明日美は次の結論を得た。

1. 臨床検体の免疫染色で, 脱分化の進展に伴い PATZ1 の核発現の低下が認められ, 未分化癌では有意に PATZ1 発現が低下していた。
2. 正常濾胞上皮細胞株で PATZ1 を抑制すると, 増殖, 遊走, 浸潤能が増加し, uPA, MMP の発現と活性の上昇が認められた。
3. 分化癌細胞株で PATZ1 を抑制すると, 増殖, 遊走, 浸潤能が増加し, uPA, MMP の発現増加が認められた。
4. 未分化癌細胞株で PATZ1 を強制発現すると, 増殖, 遊走, 浸潤能が低下し, uPA, MMP の発現低下が認められた。
5. PATZ1 と uPA, MMPs の発現の間に, 有意な負の相関を認めた。
6. PATZ1 の核での発現は, p53 status に関わらず, 脱分化の進行とともに低下した。

以上の結果から, 家里明日美は, PATZ1 が正常濾胞上皮の癌化に抑制的に関与している可能性があるこ

と、PATZ1の機能には uPA や MMPs が重要な因子であることを初めて示した。また甲状腺濾胞上皮由来の癌においても、悪性形質を抑制的に制御している可能性を示した。さらに、PATZ1の機能は p53 status

非依存性である可能性を示した。

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。

Interval walking training and nutritional intake to increase plasma volume in elderly (高齢者におけるインターバル速歩トレーニング期間中の糖質・蛋白質補助食品摂取が血漿量増加に与える効果)

内 田 晃 司

(論文の内容の要旨)

【目的】有酸素運動トレーニングによる血漿量増加は体温調節能を改善するが、我々は、高齢者において糖質・タンパク質サプリメントはその効果を増強することを報告した。しかし、これらの結果はトレーニングジムにおいて自転車エルゴメータを用いたトレーニングの結果であり、家庭で実行可能なインターバル速歩トレーニング (IWT) における結果は検証されていない。さらに、長期間にわたる IWT が血漿量に与える影響も明らかにされていない。

【方法】すでに、24か月以上 IWT を行っている17名の高齢男性と10名の高齢女性 (平均年齢69歳) を被験者とした。介入前 (PRE) に、血漿量、血漿アルブミン量、空腹時血糖とヘモグロビン A1c (HbA1c) を測定し、その後、被験者を無作為に糖質群 (CHO) と糖質・タンパク質群 (PRO-CHO) の2群に振り分けた。その後2009年5月から11月の5か月間のトレーニング中に、各々のサプリメントを日々の運動後に摂取させた。5か月間の運動トレーニング後に、再度トレーニング前と同じ項目を測定した (介入後測定, POST)。

【結果】PRE 測定時の血漿量、血漿アルブミン量は、測定に先立つ1年間の IWT 実施日数と有意な正の相関を示した (血漿量: $r=0.716$, $P<0.001$ 血漿アルブミン量: $r=0.671$, $P<0.001$)。POST 測定時の血漿量、血漿アルブミン量、HbA1c の値を、共分散分析法 (ANCOVA) を用いて、PRE の空腹時血糖値で補正したところ、CHO 群では血漿量と血漿アルブミン量の低下傾向と HbA1c の有意な増加がみられた (血漿量: $P=0.081$, 血漿アルブミン量: $P=0.130$, HbA1c: $P<0.001$)。しかし、これらの値は PRO-CHO 群では変化がなかった ($P>0.7$)。その結果、これらの変化量は群間で有意差を認めた (血漿量: $p=0.020$, 血漿アルブミン量: $p=0.041$, HbA1c: $p=$

0.018)。

【結論】ベースラインの血漿量はその測定に先立つ12か月間の IWT の実施日数と正の相関を示した。また、5か月間の IWT 中の糖質・蛋白質栄養補助食品摂取は、季節変動による血漿量・血漿アルブミン量の低下を抑制した。さらに、これらの機序の一部に血糖調節メカニズムが関与していることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

有酸素運動トレーニングによる血漿量増加は体温調節能を改善するが、我々は、高齢者において糖質・タンパク質サプリメントはその効果を増強することを報告した。しかし、これらの結果はトレーニングジムにおいて自転車エルゴメータを用いたトレーニングの結果であり、家庭で実行可能なインターバル速歩トレーニング (IWT) における結果は検証されていない。さらに、長期間にわたる IWT が血漿量に与える影響も明らかにされていない。

すでに、24か月以上 IWT を行っている17名の高齢男性と10名の高齢女性 (平均年齢69歳) を被験者とした。介入前 (PRE) に、血漿量、血漿アルブミン量、空腹時血糖とヘモグロビン A1c (HbA1c) を測定し、その後、被験者を無作為に糖質群 (CHO) と糖質・タンパク質群 (PRO-CHO) の2群に振り分けた。その後2009年5月から11月の5か月間のトレーニング中に、各々のサプリメントを日々の運動後に摂取させた。5か月間の運動トレーニング後に、再度トレーニング前と同じ項目を測定した (介入後測定, POST)。

その結果、内田は次の結論を得た。

1. PRE 測定時の血漿量、血漿アルブミン量は、測定に先立つ1年間の IWT 実施日数と有意な正の相関を示した。
2. POST 測定時の血漿量、血漿アルブミン量、HbA1c の値を、共分散分析法 (ANCOVA) を用いて、PRE の空腹時血糖値で補正したところ、CHO 群では血

漿量と血漿アルブミン量の低下傾向と HbA1c の有意な増加がみられた。しかし、これらの値は PRO-CHO 群では変化がなかった。その結果、これらの変化量は群間で有意差を認めた

これらの結果より、ベースラインの血漿量はその測定に先立つ12カ月間の IWT の実施日数と正の相関を

示すこと、また、5カ月間の IWT 中の糖質・蛋白質栄養補助食品摂取は、季節変動による血漿量・血漿アルブミン量の低下を抑制することが示された。さらに、これらの機序の一部に血糖調節メカニズムが関与してい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。

Involvement of local renin-angiotensin system in immunosuppression of tumor microenvironment (腫瘍微小環境の免疫抑制への局所性レニン-アンジオテンシン系の関与)

中 村 謙 太

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、PD-1/PD-L1阻害薬などの免疫チェックポイント阻害薬が、新規免疫療法として様々ながん種で適応が拡大されている。しかし、その奏効率は20~30%程度であり、治療効果の増強のために、免疫療法を抑制している、免疫抑制的な腫瘍微小環境の機序の解明と克服法の開発が重要である。

全身性の Renin-Angiotensin system (RAS) は体液保持などに関与するが、近年、腫瘍組織における局所性 RAS が血管新生などを介して、がんの生存・増殖に関与することが報告されている。一方、腫瘍組織における局所性 RAS が抗腫瘍免疫応答に与える役割を詳細に検討した報告はなく、本研究では、腫瘍微小環境での局所性 RAS として、特にマクロファージや線維芽細胞に注目して腫瘍免疫との関係について検討した。

【方法と結果】マウス大腸癌 MC38は、RAS の受容体であるアンジオテンシン受容体 (AT1R) の発現が少ないため、RAS ががん自体に影響を与えることなく、免疫応答の変化を調べることが可能と考え、実験に用いた。この MC38担瘤 C57BL/6マウスに、アンジオテンシン受容体阻害薬 (ARB) である Valsartan を 15 mg/kg/day で腹腔内投与すると、所属リンパ節での腫瘍抗原である gp70特異的 T 細胞の誘導を促進した。その機序の一つとして、腫瘍関連マクロファージ (TAM) や骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) からの免疫抑制性サイトカイン産生や Arginase 活性増強などを介した免疫抑制状態の誘導を、ARB 投与により減少させ、免疫抑制による抗腫瘍 T 細胞応答の低下を改善することが示唆された。回収したマクロファージを *in vitro* で RAS の刺激や ARB の添加することにより、RAS のシグナルの下流には、NF- κ B があることを示した。

次に、Valsartan 投与群では、AT1R を発現するがん関連線維芽細胞 (CAF) における CXCL12 (SDF-1) や NOS2 などの免疫抑制に関与する分子の発現が低下するとともに、CAF の *in vitro* での T 細胞活性化能が増強した。

Valsartan の単独投与では、免疫抑制的な腫瘍微小環境の改善が認められるものの、有意な腫瘍増殖抑制効果は認められなかったため、抗 PD-L1 抗体との併用療法を行うと、抗腫瘍 CD8陽性 T 細胞依存的な治療効果の増強がみられた。

【結論と考察】ARB は、がん組織の間質に存在する TAM や MDSC や CAF に作用し、これらの免疫抑制作用を減少させることにより、抗腫瘍 T 細胞誘導を増強させて、抗腫瘍 CD8陽性 T 細胞を主体とした抗 PD-L1 抗体の治療効果を増強させる作用があることが判明した。ARB は PD-1/PD-L1 阻害薬などの免疫チェックポイント阻害療法の併用薬として臨床応用できる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

免疫チェックポイント阻害薬である PD-1/PD-L1 阻害薬の使用は拡大しているが、奏効率は20~30%程度であり、治療効果の増強のために、免疫抑制的な腫瘍微小環境の克服が重要である。全身性の Renin-Angiotensin system (RAS) は体液保持などに関与するが、近年、腫瘍組織におけるマクロファージを中心とした局所性 RAS の存在が報告され、今回、この腫瘍微小環境の局所性 RAS が抗腫瘍免疫応答に与える影響を検討した。

RAS が直接的に腫瘍に影響を与えないように、アンジオテンシン受容体の発現が少ない、マウスの大腸がん細胞株である MC38を C57BL/6マウスに皮下移植し、アンジオテンシン受容体阻害薬 (ARB) である Valsartan を 15mg/kg/day で14日間腹腔内投与し、腫

瘍抗原特異的なT細胞応答をIFN γ 産生能で調べた。また、腫瘍内のマクロファージなどを含むCD11b陽性細胞やがん関連線維芽細胞を回収して機能を解析した。さらに、抗PD-L1抗体とARBとの併用実験を行った。

その結果、中村は次の結論を得た。

1. ARB投与群では対照群と比較して、所属リンパ節と腫瘍内の腫瘍抗原特異的なT細胞応答が増加した。
2. ARB投与群では、腫瘍内のCD11b陽性細胞からの免疫抑制因子の産生が減少し、T細胞増殖抑制能が減少した。
3. CD11b陽性細胞は、RASの刺激でNF- κ Bの活性化とIL-6の産生増加がみられた。
4. ARB投与群では、がん関連線維芽細胞のNOS

の産生が減少し、共培養でT細胞の増殖能が増加した。

5. ARBと抗PD-L1抗体との併用群のみが、対照群と比較して有意に増殖抑制がみられ、CD8陽性T細胞を除去すると増殖抑制の効果がなくなった。

これらの結果より、RASを介して腫瘍微小環境のマクロファージやがん関連線維芽細胞からの免疫抑制因子が産生され、腫瘍抗原特異的なT細胞応答が阻害されることと、ARB投与でこの免疫抑制が解除されることが示唆された。また、ARBと抗PD-L1抗体との併用にて、相乗的な腫瘍増殖抑制効果を認め、今後、免疫チェックポイント阻害薬とARBとの併用療法が期待される。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。

Comprehensive proteomic profiles of mouse AApoAII amyloid fibrils provide insights into the involvement of lipoproteins in the pathology of amyloidosis (マウスAApoAIIアミロイド線維の包括的なプロテオーム分析結果はアミロイドーシスの病理におけるリポタンパク質の関与を示唆する)

宮原大貴

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】アミロイドーシスは加齢や遺伝的な要因などにより、生体内で生じたmisfolded proteinがアミロイド線維と呼ばれる微細な線維状構造に凝集して組織に沈着する疾患である。アミロイド線維の沈着部位には線維状の凝集タンパク質の他に、アミロイド関連タンパク質として共沈着するタンパク質の存在が報告されており、その共沈着のメカニズムを解明することはアミロイドーシスの病態を理解する上で重要であると考えられている。本研究では、Apolipoprotein A-II (ApoA-II)が形成するアミロイド線維(AApoAII)が全身組織に沈着するAApoAIIアミロイドーシスモデルマウス(R1.P1-*Apoa2*^{-/-}マウス)を用いて、沈着程度の異なるアミロイドサンプルを作出し、質量分析計(LC-MS/MS)によりプロテオーム解析を行うことで関連タンパク質の同定と機能の検討を行った。

【材料及び方法】アミロイドサンプルの作出には、2カ月齢のR1.P1-*Apoa2*^{-/-}雌マウスに対してAApoAIIアミロイド線維100 μ gを尾静脈内注射により投与しAApoAIIアミロイドーシスを誘発させ、3、4、6、9、12カ月齢時に安楽死させた後、組織の採取を行った。対照群は2、6、12カ月齢の群を準備した。プロ

テオーム分析対象として、肝臓から古典的なアミロイド線維の抽出方法に則ってアミロイド線維分画を分取し、トリプシン消化した後LC-MS/MSを用いてタンパク質を網羅的に同定した。また、データマイニング的手法を用いて、同定されたタンパク質に有意に集積された機能の検討を行った。

【結果】LC-MS/MSによる分析結果から、アミロイド沈着が重度に亢進した誘発群の12カ月齢のサンプルで、対照群と比較して特異的かつメジャーであるタンパク質6個をAApoAII関連タンパク質として同定した。アミロイド沈着の亢進に伴いAApoAII関連タンパク質のアミロイド線維分画中における含有量は増加したが、一方で関連タンパク質間の相対比に変化は認められなかった。UniprotKBの機能用語の分類に基づいた生物学的機能の解析から、AApoAII関連タンパク質には分泌機能とHDL代謝関連の機能の有意な集積が認められた。まず、分泌機能に関連してAApoAII関連タンパク質の血清中の濃度変化を測定したところ、アミロイド沈着の亢進に伴いApoE、clusterinの劇的な変化を認めた。また、HDL脂質代謝関連の機能用語に着目して解析した結果、Oil red O染色または電顕での観察によりアミロイド沈着部位における脂質の

共沈着を認めた。

【結論】 これらの結果より、AApoAII 沈着初期から脂質の共沈着したことは、アミロイドの沈着過程における ApoA-II と脂質を含有リポタンパク質の関与が示唆された。いくつかの同定された AApoAII 関連タンパク質 (ApoE, clusterin, vitronectin) はアミロイドーシスのみならず、アテローム性動脈硬化症や加齢黄斑変性といった他の細胞外凝集物を伴う変性疾患の沈着物においても共沈着することが報告されている。このことから、これらの疾患で共通する内皮細胞下へのリポタンパク質の滞留とその後の代謝過程がアミロイドーシスの病態機序に関与する可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

アミロイドーシスは加齢や遺伝的な要因などにより、生体内で生じた misfolded protein がアミロイド線維と呼ばれる微細な線維状構造に凝集して組織に沈着する疾患である。アミロイド線維の沈着部位には線維状の凝集タンパク質の他に、アミロイド関連タンパク質として共沈着するタンパク質の存在が報告されており、その共沈着のメカニズムを解明することはアミロイドーシスの病態を理解する上で重要であると考えられている。本研究では、Apolipoprotein A-II (ApoA-II) が形成するアミロイド線維 (AApoAII) が全身組織に沈着する AApoAII アミロイドーシスモデルマウス (R1.P1-*Apoa2*^{-/-} マウス) を用いて、沈着程度の異なるアミロイドサンプルを作成し、質量分析計 (LC-MS/MS) によりプロテオーム解析を行うことで関連タンパク質の同定と機能の検討を行った。

アミロイドサンプルの作出には、2カ月齢の R1.P1-*Apoa2*^{-/-} 雌マウスに対して AApoAII アミロイド線維 100 μg を尾静脈内注射により投与し AApoAII アミロイドーシスを誘発させ、3, 4, 6, 9, 12カ月

齢時に安楽死させた後、組織の採取を行った。対照群は 2, 6, 12カ月齢の群を準備した。プロテオーム分析対象として、肝臓から古典的なアミロイド線維の抽出方法に則ってアミロイド線維分画を分取し、トリブシン消化した後、LC-MS/MS を用いてタンパク質を網羅的に同定した。また、データマイニングの手法を用いて、同定されたタンパク質に有意に集積された機能の検討を行った。

その結果、宮原大貴は以下の結論を得た。

1. アミロイド沈着が重度に進展したサンプルで、対照群と比較して特異的かつメジャーであるタンパク質 6 個を AApoAII 関連タンパク質として同定した。
2. アミロイド沈着に伴い AApoAII 関連タンパク質の含有量は増加したが、関連タンパク質間の相対比に変化は認められなかった。
3. 機能用語の分類に基づいた生物学的機能の解析から、AApoAII 関連タンパク質には分泌機能と HDL 代謝関連の機能の有意な集積を認めた。
4. Oil red O 染色または電顕での観察から、アミロイド沈着部位における脂質の共沈着を認めた。

これらの結果より、AApoAII 沈着初期から脂質が共沈着したことから、アミロイドの沈着過程における ApoA-II と脂質を含有リポタンパク質の関与が示唆された。いくつかの同定された AApoAII 関連タンパク質はアミロイドーシスのみならず、アテローム性動脈硬化症や加齢黄斑変性といった他の細胞外凝集物を伴う変性疾患の沈着物においても共沈着することが報告されている。これらの疾患で共通する内皮細胞下へのリポタンパク質の滞留とその後の代謝過程がアミロイドーシスの病態機序に関与す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。

Advantage of administering tacrolimus for improving prognosis of patients with polymyositis and dermatomyositis (多発性筋炎および皮膚筋炎患者における予後改善のためのタクロリムス導入の有用性)

上野賢一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 多発性筋炎 (polymyositis ; PM) および皮膚筋炎 (dermatomyositis ; DM) は、皮膚や骨格筋を病変の主座とする自己免疫疾患である。炎症性サイトカインの発現やリンパ球の活性化は疾患の発症に関わる免疫学的な要因であり、特に T 細胞を介した

免疫応答による組織障害が病態の重要な背景として示されている。治療は、第一選択薬として副腎皮質ステロイドが導入される。しかしながら、副腎皮質ステロイド単剤で治療された場合、その減量過程で再燃を呈する患者も少なくない。また、副腎皮質ステロイド長期投与に伴う骨粗鬆症や感染症などの有害事象も問題

となる。プレドニゾロン (prednisolone ; PSL) の減量効果とともに、皮膚・骨格筋症状の予後を改善させる効果を期待して、免疫抑制薬の併用療法が考慮される。タクロリムス (tacrolimus ; TAC) は、カルシニューリンの阻害を介して細胞内シグナル伝達を抑制することで、T細胞の活性化とインターロイキン2の発現を制御する免疫抑制薬である。難治性PMおよびDM患者に対してTACが有効であった報告も散見される。今回の研究では、PMおよびDM患者を対象として、PSL治療に加えてTACを導入した患者の予後改善効果を後方視的に調査し、TAC併用療法の臨床的な有用性について検討を行った。

【方法】 2003年7月から2015年10月の間に当科で治療を開始したPMおよびDM患者を対象として、その診療録を調査した。PM/DMの診断は、Bohan and Peterの基準、およびGeramiらの基準を用いて行った。悪性腫瘍、感染症、および重症間質性肺炎を合併した患者は研究対象から除外した。66名のPM/DM患者 (PM 28人, DM 38人) を研究対象とし、PSL単剤で治療した患者を“PSL単独群”、初期からTACとPSLを併用した患者を“TAC併用群”とした。また、PSL単独群で治療経過中に再発し、その後からTACを追加投与した患者は“TAC追加群”とした。血清CK値、PSL投与量、徒手筋力テストにより対象とする6箇所筋力をスコア化したMMT-6を調査し、各群間で比較を行った。また、皮膚症状および骨格筋所見の増悪をエンドポイントとして、Kaplan-Meier法を用いた治療予後の評価を行った。

【結果】 PSL単独群は39名 (PM 16名, DM 23名)、TAC併用群は27名 (PM 12名, DM 15名) であった。性別、年齢、血清CK値、MMT-6、および自己抗体の有無に関して、治療開始前の2群間に有意差は認めなかった。TAC追加群は18名で、TACの追加時期はPSL開始後 4.8 ± 7.6 カ月であった。TACの平均血中トラフ濃度は、TAC併用群とTAC追加群の間で有意差はなかった。TAC併用群ではPSL単独群に比べ、PSLの初期投与量が有意に少ない傾向であった。また、TAC併用群ではPSL単独群に比べ、再発が少なく有意に寛解が維持されていた。TAC併用群のMMT-6の評価では、DM患者で治療開始1カ月後に、PM患者で3カ月後に有意な回復が示された。特にDM患者では全例が6カ月で完全回復を示した。

TAC追加群でもDM患者では、TAC追加1カ月後にMMT-6の有意な改善を認めた。TAC追加群の

PM患者では、TAC追加3カ月の時点で、PSL開始前のMMT-6に比して有意な改善が示された。DM患者の皮膚症状は、TAC併用群で全例、治療開始1カ月後に改善した。TAC追加群でもほぼ同様の経過であったが、1名のみ皮膚症状の改善にTAC追加後約6カ月間を要した。血清CK値の推移に関しては、TAC併用群およびTAC追加群の両群で、PM患者およびDM患者ともにTAC開始後1カ月でCK値の有意な低下が示された。PSLの減量効果に関して、TAC併用群ではDM患者およびPM患者ともに、治療開始1カ月後には有意な減量効果が示された。TAC追加群では、DM患者でTAC追加1カ月後に、PM患者では8カ月後に、TAC追加時のPSL投与量に比して有意な減量効果が示された。

【考察】 DMおよびPM患者の治療において、初期からTACを併用することは、寛解率の有意な維持とともにPSLの減量効果にも寄与し、PSL単剤療法に比して明らかに有用であると考えられる。また、再発後のTAC追加投与であっても、皮膚症状や骨格筋所見の改善とともにPSL減量効果を有意に促進する効果が証明された。以上より、DM/PMの治療戦略としてTACを併用する事は、寛解導入に有用である事は勿論、有害事象を回避する一助にもなると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

多発性筋炎 (PM) および皮膚筋炎 (DM) は、皮膚および筋組織の炎症により、特徴的な皮膚症状や骨格筋障害を呈する自己免疫疾患である。T細胞を介した免疫応答による組織障害が重要な病態の背景として考えられている。治療の第一選択はプレドニゾロン (PSL) だが、その減量効果と、皮膚・筋症状の予後改善効果を期待し、免疫抑制薬の併用療法が考慮される。タクロリムス (TAC) は、カルシニューリンの阻害を介して、T細胞の活性を選択的に阻害する。今回、PMおよびDMの初期治療における、TAC併用および再発後のTAC追加に関して、臨床的有用性について後方視的に検討した。

2003年7月から2015年10月に当科で治療を開始した患者の診療録を調査し、重症間質性肺炎および悪性腫瘍併例を除外した、66名のPMおよびDM患者 (PM 28名, DM 38名) を研究対象とした。PSL単剤で治療を開始した患者群を“PSL単独群”、初期からTACを併用した患者群を“TAC併用群”とした。また、PSL単独群の中で治療経過中に再発し、TACを追加した群を“TAC追加群”とした。皮膚症状、血清

CK 値, PSL 投与量, 徒手筋力テストにより 6 箇所
の筋力をスコア化した MMT-6 を調査し, 各群間で比較
した。

その結果, 上野賢一は次の結論を得た。

1. TAC 併用群では PSL 単独群に比べ, PSL 初期投
与量と再発頻度が有意に少なかった。
2. TAC 併用群では治療開始 3 カ月, TAC 追加群
の DM 患者では TAC 追加 1 カ月で, MMT-6 の有意
な改善を認めた。TAC 追加群の PM 患者は TAC
追加 3 カ月で, PSL 開始前の MMT-6 に比し有意な
改善を認めた。
3. 血清 CK は, TAC 併用群および TAC 追加群と
もに, PM および DM 患者で TAC 開始 1 カ月後に
有意な改善を認めた。また DM 患者では, TAC 併
用群および TAC 追加群ともに, TAC 開始 1 カ月

で皮膚症状の改善が得られた。

4. TAC 併用群では治療開始 1 カ月で有意な PSL 減
量効果を認めた。TAC 追加群では DM 患者で TAC
追加 1 カ月, PM 患者では 8 カ月で有意な減量効果
を認めた。

本研究の結果から, TAC の初期併用療法は, PSL
単独療法と比較して有意差をもって, 臨床徴候を改善
させるとともに PSL の減量効果をもたらすことが示
された。また, PSL 単独療法では改善が得られな
かった患者群でも, TAC 追加 1 年の経過で, TAC
の初期併用療法と同等の治療効果が示された。以上よ
り, TAC の併用療法は, 早期寛解導入と PSL 減量に
有効な治療戦略であることが証明された。よって主査,
副査は一致して本論文を学位論文として価値があるも
のと認めた。

Titanium fiber plates for bone tissue repair (骨組織修復のためのチタンファイバープレート)

滝 沢 崇

(論文の内容の要旨)

【背景】巨大骨欠損の治療では, 自家骨移植, 同種骨
移植が行われるが, 自家骨や同種骨には採取量, 採取
部疼痛, 感染, 免疫応答のデメリットがあり, それを
補う形で, 人工的に骨伝導のための足場材 = Scaffold
が広く使われている。その Scaffold の中でもチタン
はその有効性と安全性が臨床で実証されている生体材
料である。様々な製品があるが骨に対して高強度に
拘った製品が主流であり, 従来チタン合金は強度を優
先され, 骨に応力が作用しないことによる骨脆弱化現
象であるストレスシールドは避けなかった。この
ため強度を抑えてストレスシールドに重きを
置くチタンの開発研究は極めて稀であり重要である。
我々が開発したチタンファイバープレート (Titanium
fiber plate ; TFP) はチタンを繊維状に圧縮加工
した形状で, 機械的特性が厳密に骨皮質に近い弾性率
を有する点と, 母床の骨形状に合わせて形状を自在に
制御できる利点を有する。

【目的】TFP が従来のチタンプレート (conventional
titanium plate ; CTP) と比較して骨再生の足場材と
なるか検討する。

【方法】*In vitro* ではマウス頭蓋骨骨芽細胞の接着能
と増殖能を蛍光顕微鏡と Almar blue Assay により評
価した。各 Scaffold を同サイズに揃えて比較した。*In
vivo* ではウサギ尺骨に対して 3 mm 四方の小骨片モ

デルを作製し, TFP と Empty 群で固定したものを,
4 週間後の単純 CT で骨癒合評価を行った。*In vivo*
では BMP 5 μ g を添加した各 Scaffold をマウス背筋
内に移植して 3 週後の CT 像, 骨組織像, 総骨質量に
より異所性骨化を評価した。更に *In vitro* で骨髄間葉
系幹細胞 (以下 Mesencymal Stem Cell ; MSC) を
ラット大腿骨より採取して培養し骨芽細胞分化させて
各 Scaffold に播種したものの細胞接着形態と接着遺
伝子につき評価した。同細胞を各 Scaffold に播種し
てラット頭蓋骨に 5 mm の欠損部を作製し移植し 8 週
後の骨組織標本で評価した。

【結果】*In vitro* で各 Scaffold 共にマウス骨芽細胞に
対して良好な細胞接着性及び細胞増殖性を示した。ま
た *In vivo* でウサギ尺骨に TFP を用いた骨折修復実
験で良好な骨形成を示し, マウス背筋内への移植では
各 Scaffold 共に単純 CT, 骨組織像, 総骨質量全てで
同等の異所性骨形成を示した。ラット大腿骨の MSC
を初代培養して骨芽細胞誘導後の共焦点レーザー顕
微鏡像や電子顕微鏡像で両群共に Scaffold に対して
細胞突起の形成を認め形態異常を認めなかった。各
Scaffold 上の接着遺伝子には, 両群の細胞接着遺伝子
間に違いを認めた。BMP を用いて MSC から骨芽細胞
への分化を確認したものをラット頭蓋骨に移植した。
In vivo で 8 週間後 Scaffold 単独移植した骨組織像で
は, 両群共に同所性骨組織修復を認めなかった。8 週

間後7日間分化させた骨芽細胞を播種した Scaffold を移植した骨組織像では、CTP では Scaffold 表面よりも骨膜に沿った組織修復を認めたのに対し、TFP はチタン繊維に接触した組織修復を認めた。再生組織の接触率を再生組織の接触長÷Scaffold 全長と定義し比較したところ、TFP 群が $72.0 \pm 27.1\%$ であるのに対し CTP 群は $25.4 \pm 17.7\%$ であり、TFP 群が2.8倍有意に大きかった。

【考察】TFP は CTP と異なる細胞接着遺伝子を発現していた点、TFP は CTP よりも高い組織接触率を示した点と併せると、TFP は CTP より細胞接着保持性が高く骨修復能が高いことが示唆された。これは Scaffold 表面の立体的繊維構造が大きく寄与していると考えられる。

【結論】TFP は CTP に比べて骨形成細胞及び再生組織との接着率が高く骨欠損を修復する能力が高かった。骨と密着して骨修復を促進できる TFP の用途は広く、骨疾患の臨床に大きく貢献することが期待できる。

(論文審査の結果の要旨)

チタンファイバプレート (Titanium fiber plate ; TFP) はチタンを繊維状に圧縮加工した形状である。利点は機械的特性が厳密に骨皮質に近い弾性率を有する点と、母床の骨形状に合わせて形状を自在に制御できる点である。滝沢はこの TFP が従来のチタンプレート (conventional titanium plate ; CTP) と比較して骨再生の足場材 (Scaffold) となるか比較評価した。

滝沢は、TFP と CPT の形状を同サイズに揃えて、*In vitro* の実験として、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った。*In vivo* の実験として、ウサギ尺骨に対して3 mm 四方の小骨片モデルを作製し、TFP と Empty 群で固定したものを、4週間後の単純CTで骨癒合評価を行った。更に recombinant human BMP-2

(rhBMP-2) を添加した TFP と CPT をマウス背筋部へ移植し骨形成能を評価した。更に *In vitro* で骨髄間葉系幹細胞 (Mesencymal Stem Cell ; MSC) をラット大腿骨より採取して培養し骨芽細胞分化させて各 Scaffold に播種したものの細胞接着形態と接着遺伝子につき評価した。*In vivo* で同細胞を各 Scaffold に播種してラット頭蓋骨に5 mm の欠損部を作製し移植し8週後の骨組織標本で骨形成能を評価した。その結果、滝沢は次の結論を得た。

1. CTP と TFP はどちらも Scaffold 表面の細胞接着形態に異常は認めず、細胞増殖能力も有意差は認めない。
2. TFP は円盤状や薄いプレート形状に採用することができ、ウサギ尺骨における粉碎骨折を想定した微小骨片の保持にも母床の骨形状に合わせた骨片の固定に有用であった。
3. CTP と TFP はどちらも rhBMP-2を添加してマウス背筋に移植した時に、骨形成能、骨質量に有意差は認めないが、骨形成形態においては TFP の方が繊維の中にまで再生骨が入り込んで骨形成することが判明した。
4. CTP と TFP で細胞接着遺伝子に違いを認めた。
5. マウス頭蓋骨欠損モデルでは、TFP では再生骨がチタン繊維に接触して骨形成を認めた一方で、CTP では再生骨が骨膜の方にシフトして骨形成を認め、TFP の方がより再生骨と一体化して骨形成することが判明した。

これらの結果より、TFP は CTP に比べて骨形成細胞及び再生組織との接着率が高く骨欠損を修復する能力が高かった。骨と密着して骨修復を促進できる TFP の用途は広く、骨疾患の臨床に大きく貢献することが期待できる。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。

Threshold of the extent of resection for WHO grade III gliomas : retrospective volumetric analysis of 122 cases using intraoperative MR imaging (術中MRIを使用した初発退形成性神経膠腫の摘出率と予後に関する後方視的体積分析)

藤 井 雄

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】退形成性神経膠腫 (WHO grade III glioma) は神経膠腫の中でも希少な疾患であり、外科的摘出や放射線化学療法などの集学的治療が行われるが、外科的摘出の予後への相関は一定の見解がない。また画像

所見も多様であるため、MRI でどの撮像方法が腫瘍の計測に適しているかについても一定の見解がない。本研究は単一施設で一定の後療法を行い、術中MRIを用いて摘出率を正確に測定することにより、積極的摘出の予後への相関を検討した。

【方法】2000年から2011年に東京女子医科大学で術中MRIを使用して腫瘍摘出術を施行した122例（男性76人，女性46人）の初発退形成性神経膠腫を後方視的に解析した。病理組織診断は2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous Systemに基づいて行われた。症例は病理組織診断に従って，退形成性星細胞腫（AA）と退形成性乏突起星細胞腫（AOA）からなる81人の群と，退形成性乏突起膠腫（AO）からなる41人の群に分けた。術中MRIは0.3テスラのオープン型MRI（AIRIS II，日立製作所）を使用し，腫瘍摘出の前後で少なくとも2回撮像された。腫瘍体積はLeksell GammaPlan software（Elekta）を用いてMRI画像の各スライス毎に用手的に境界を作成し，積分することで計算した。腫瘍摘出率は術中MRI T2および造影 T1強調画像を用いて測定し，それぞれを摘出率毎に二分し閾値を求めた。単変量および多変量解析を用いて摘出率の予後への相関を調べた。

【結果】全患者での5，8，10年生存率はそれぞれ74.28%，70.59%，65.88%だった。AA，AOA群の5，8，10年生存率はそれぞれ72.2%，67.2%，62.0%だった。一方でAO群の5，8，10年生存率はそれぞれ79.0%，79.0%，該当なしだった。放射線療法は119例（97.5%）に施行され，ニムスチンによる化学療法は117例（95.9%）に施行された。IDH1（R132S）変異は検査を施行した118例中82例（69.5%）に認められた。1p/19q共欠失は検査を施行した99例のうち44例（44.4%）に認められた。MRIで造影効果を認めたのは51例（41.8%）だった。T2強調画像での術前，術後腫瘍量の中央値は56.1 cm³（1.3-268 cm³），5.9 cm³（0-180 cm³）だった。T1強調画像での術前，術後造影域の中央値は4.2 cm³，0 cm³だった。T2高信号域およびT1造影域の摘出率の中央値は88.8%（0.3-100%），100%（34.0-100%）だった。AA，AOA群ではT2高信号域の53%以上の摘出で予後の改善が得られた（P=0.021）が，AO群では摘出率により予後に差はみられなかった。単変量解析ではAA，AOA群でKarnofsky Performance Status score（p=0.0019），IDH1（p=0.0008），T2高信号域の摘出率（p=0.0208）が予後に相関した。さらに多変量解析ではAA，AOA群でT2高信号域の摘出率（ハザード比3.28，95%信頼区間1.22-8.81；p=0.0192）とIDH1変異（ハザード比3.90，95%信頼区間1.53-10.75；p=0.0044）が予後に相関した。

【考察】退形成性神経膠腫に着目した論文は少なく，

さらにAAのみに絞ったものがほとんどであった。Volumetric analysisについては高悪性度の神経膠腫についてが4本，AAについては1本しかない。過去の報告で退形成性神経膠腫で摘出率76%以上かつ残存腫瘍3 cm³以下で予後に相関するというものがあるが，その報告では摘出率はT2高信号域と造影域を混合したものであった点，半数近くが悪性転化の症例を含んでいた点で我々の報告と異なる。MRIの撮像方法と摘出率の閾値について，WHO grade IIの神経膠腫ではFLAIR高信号域の90%以上で，WHO grade IVの膠芽腫では造影域周囲のFLAIR高信号域の53.21%以上で予後に相関するという報告がある。我々の報告はこれらの報告を補完するものであると考えられる。【総括】Volumetric analysisにより，AA，AOA患者ではT2強調画像での摘出率が最も予後に相関した。またその摘出閾値は53%であることが判明した。

（論文審査の結果の要旨）

退形成性神経膠腫（WHO grade III glioma）は神経膠腫の中でも希少な疾患であり，外科的摘出や放射線化学療法などの集学的治療が行われるが，外科的摘出の予後への相関は一定の見解がない。また画像所見も多様であるため，MRIでどの撮像方法が腫瘍の計測に適しているかについても一定の見解がない。本研究は単一施設で一定の後療法を行い，術中MRIを用いて摘出率を正確に測定することにより，積極的摘出の予後への相関を検討した。

2000年から2011年に東京女子医科大学で術中MRIを使用して腫瘍摘出術を施行した122例（男性76人，女性46人）の初発退形成性神経膠腫を後方視的に解析した。病理組織診断は2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous Systemに基づいて行われた。症例は病理組織診断に従って，退形成性星細胞腫（AA）と退形成性乏突起星細胞腫（AOA）からなる81人の群と，退形成性乏突起膠腫（AO）からなる41人の群に分けた。術中MRIは0.3テスラのオープン型MRI（AIRIS II，日立製作所）を使用し，腫瘍摘出の前後で少なくとも2回撮像された。腫瘍体積はLeksell GammaPlan software（Elekta）を用いてMRI画像の各スライス毎に用手的に境界を作成し，積分することで計算した。腫瘍摘出率は術中MRI T2および造影 T1強調画像を用いて測定し，それぞれを摘出率毎に二分し閾値を求めた。単変量および多変量解析を用いて摘出率の予後への相関を調べた。

その結果，藤井雄は次の結論を得た。

1. 全患者での5, 8, 10年生存率はそれぞれ74.28%, 70.59%, 65.88%だった。AA, AOA群の5, 8, 10年生存率はそれぞれ72.2%, 67.2%, 62.0%だった。一方でAO群の5, 8, 10年生存率はそれぞれ79.0%, 79.0%, 該当なしだった。
2. 放射線療法は119例(97.5%)に施行され, ニムスチンによる化学療法は117例(95.9%)に施行された。IDH1 (R132S) 変異は検査を施行した118例中82例(69.5%)に認められた。1p/19q 共欠失は検査を施行した99例のうち44例(44.4%)に認められた。MRIで造影効果を認めたのは51例(41.8%)だった。
3. T2強調画像での術前, 術後腫瘍量の中央値は 56.1 cm^3 (1.3-268 cm^3), 5.9 cm^3 (0-180 cm^3)だった。T1強調画像での術前, 術後造影域の中央値は 4.2 cm^3 , 0 cm^3 だった。T2高信号域およびT1造影域の摘出率の中央値は88.8% (0.3-100%),

100% (34.0-100%)だった。

4. AA, AOA群ではT2高信号域の53%以上の摘出で予後の改善が得られた($P=0.021$)が, AO群では摘出率により予後に差はみられなかった。単変量解析ではAA, AOA群でKarnofsky Performance Status score ($p=0.0019$), IDH1 ($p=0.0008$), T2高信号域の摘出率 ($p=0.0208$)が予後に関連した。さらに多変量解析ではAA, AOA群でT2高信号域の摘出率(ハザード比3.28, 95%信頼区間1.22-8.81; $p=0.0192$)とIDH1変異(ハザード比3.90, 95%信頼区間1.53-10.75; $p=0.0044$)が予後に関連した。

これらの結果より, Volumetric analysisにより, AA, AOA患者ではT2強調画像での摘出率が最も予後に関連した。またその摘出閾値は53%であることが判明した。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。

Endogenous calcitonin gene-related peptide suppresses ischemic brain injuries and progression of cognitive decline (カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は, 虚血性脳障害および認知機能障害の進展を抑制する)

翟 留 玉

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】CGRPは, カルシトニン遺伝子の alternative splicingにより産生される生理活性ペプチドである。CGRPは中枢および末梢神経系に多く分布し, これまで主として, 痛覚神経の神経伝達因子や, 血管拡張因子として捉えられてきた。その一方で, CGRPは, 多彩な生理活性を有するペプチド因子, アドレノメデュリン(AM)のファミリー因子と考えられており, さらに両者は受容体を共用していることも明らかとなってきた。これまで, AMノックアウトマウスにおいて, 脳虚血に対する組織障害, 機能障害が増悪することから, 内因性AMの神経保護作用が報告されてきた。一方で, CGRPの脳虚血における病態生理学的意義の詳細は不明である。本研究ではCGRPノックアウトマウス(CGRP^{-/-})を用い, 急性および慢性脳虚血における内因性CGRPの病態生理学的意義を検討した。

【方法】急性脳虚血を誘発させるため, マウスの総頸動脈からシリコンコートした塞栓糸を挿入して中大脳動脈内を閉塞し, 2時間後に塞栓糸を抜去し, 急性脳虚血モデルとした(中大脳動脈閉塞術(MCAOモデル))。

また慢性脳虚血を誘発させるため, 両側総頸動脈に直径0.18mmのコイルを装着し狭窄することで, 慢性脳虚血状態を作製した(両側総頸動脈狭窄術(BCASモデル))。さらに, マウス新生児大脳皮質より神経細胞を初代培養して検討を行った。

【結果】MCAO処置後, 野生型マウスでは大脳皮質でのCGRP発現亢進を認めた。CGRP^{-/-}では, 野生型に比べて脳血流回復遅延を認め, 炎症性サイトカイン発現と神経細胞死が亢進していた。一方, BCAS処置後, 野生型では術後28日まで, 術前の80%程度の脳血流が維持されたのに対し, CGRP^{-/-}では脳血流低下の緩徐な進展が認められた。CGRP^{-/-}では, BCAS後慢性期の体重減少, 大脳皮質および海馬での神経細胞の変性・減少, 脱髄亢進, 血管新生低下, アストロサイトの異常活性化, 酸化ストレスレベルの亢進を認めた。さらにCGRP^{-/-}は, 8方向放射状迷路において参照記憶エラーが増加しており, 認知機能低下を示した。

次に血圧の影響を排除するため, CGRP^{-/-}および野生型マウスの血圧を揃えた上でBCAS処置を行ったが, CGRP^{-/-}では, WTマウスと比較して, 脳血流量

回復遅延を認めた。また神経障害は、依然 CGRP-/- でより顕著であった。逆に CGRP を外因性に投与したところ、BCAS 後の脳血流は改善し、神経障害は抑制された。

初代培養新生児脳神経細胞の検討では、脳神経細胞において CGRP の受容体である CLR と RAMP1 の発現が確認され、CGRP の投与は TNF- α による神経細胞傷害を抑制することが確認された。

【結論】以上の結果から、内因性 CGRP は脳虚血において、血圧とは関係なく、脳血流量維持、神経細胞保護に働き、認知機能改善に寄与していることが明らかとなった。CGRP は、急性、慢性脳虚血だけでなく、血管性認知症におけ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)

超高齢化社会を迎えた現代では、脳血管疾患の患者数が年々増加している。CGRP は、カルシトニンスーパーファミリーに属し、中枢神経系および末梢神経系に多く分布し、これまで主として神経伝達因子や、血管周囲神経から分泌される血管拡張因子として捉えられてきた。これまで、CGRP のファミリー因子であるアドレノメデュリン (AM) の脳虚血における脳保護作用が報告されている。しかし、CGRP の脳虚血における病態生理学的意義の詳細は不明である。

そこで翟留玉は、脳血管疾患と CGRP の関係に着目し、脳虚血における CGRP の病態生理学的意義を検討した。CGRP ノックアウトマウス (CGRP-/-) を用い、急性脳虚血として、マウスの総頸動脈からシリコンコートした塞栓糸を挿入して中大脳動脈内を閉塞による脳虚血再灌流術 (中大脳動脈閉塞術 (MCAO モデル))。また慢性脳虚血を誘発させるため、両側総頸動脈に直径0.18 mm のコイルを装着し狭窄するこ

とで、慢性脳虚血状態を作製した (両側総頸動脈狭窄術 (BCAS モデル))。さらに血圧の変化の影響を検討するため、ヒドララジンもしくは CGRP の投与下で、血圧を低下させた状態で BCAS を行った。最後に、マウス新生児大脳皮質より神経細胞を初代培養して検討を行った。

その結果、翟留玉は次の結論を得た。

1. 急性脳虚血モデルにおいて、CGRP-/- では、野生型マウスと比較して、脳血流回復遅延、神経細胞の減少および変性、アポトーシスの亢進、炎症性サイトカインの発現亢進を認めた。
2. 慢性脳虚血モデルにおいて、CGRP-/- では、BCAS 術後脳血流回復遅延、神経細胞の減少、アストロサイトの活性化、酸化ストレスの亢進、血管新生低下、認知機能の低下を認めた。
3. 慢性脳虚血における CGRP の外因性投与は、神経細胞障害とアストロサイトの活性化を抑制し、血管新生を促進し、病態を改善した。
4. CGRP による脳血流量維持、神経細胞保護作用は、血圧の変化とは独立したものであると考えられた。
5. 大脳皮質神経細胞は CGRP の受容体を有し、CGRP の外因性投与は、神経細胞死を抑制した。
6. CGRP の脳虚血への保護作用には、CGRP の神経細胞への直接の保護作用が関係していると考えられた。

これらの結果より、CGRP は脳血流維持作用、抗炎症作用、抗酸化ストレス作用、血管新生作用などにより、脳虚血において神経細胞保護に働き、認知機能維持に寄与していることが明らかとなった。CGRP は脳虚血の新たな治療標的として期待される。

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。

Mechanical evaluation of cerebral aneurysm clip scissoring phenomenon : comparison of titanium alloy and cobalt alloy (脳動脈瘤クリップにおけるシザリング現象の検討：チタン合金とコバルト基合金製クリップの比較)

堤 圭 治

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】脳動脈瘤治療において、クリッピング術は血管内治療が進歩した現在でも重要な治療選択肢である。クリッピングの際に、クリップブレードが捻れて変位してしまう現象はシザリングとして知られており、脳動脈瘤頸部損傷の危険性がある。しかし、シ

ザリング現象についての基礎研究は少ない。現在、クリップの材料としてチタン合金が主流であるが、シザリングの報告が散見される。以前のコバルト基合金製では、シザリング現象はまれであったので、近年再び注目されている。チタンは非磁性体で非毒性の特徴を持ち、また高い比強度、耐食性、生体適合性を有して

いるが、金属剛性の問題があげられる。

本研究では、シザリング現象を解明するためにクリップの閉鎖力と疑似シザリング現象時のトルク値を測定し、コバルト基合金製とチタン合金製の脳動脈瘤クリップを比較することで、チタン合金製クリップの特性を明らかにすることを目的とした。

【方法】 クリップの閉鎖力は閉鎖力測定装置を用い、クリップのブレード先端からの距離とブレードの開き幅を変化させて計測した。具体的には、2つのブレードの開き幅（1，3mm）に対し、各々ブレード先端からの距離を3mm毎（3，6，9mm）に変化させて測定した。

シザリング現象を疑似的に再現し、クリップ回転時のトルク値をアンチシザリングトルクとして評価した。評価方法として独自のトルク測定装置を使用して測定した。具体的には、クリップブレードでシリコンシートを挟み、クリップヘッドをシザリングが生じる角度まで回転させた。クリップヘッドの回転角度毎にブレードに生じるトルク値を測定した。ブレード先端からの位置とブレードの開き幅は、閉鎖力測定に用いた条件と同様とした。

本研究にはブレード長が18mmのストレートクリップを使用し、同一タイプのチタン合金製とコバルト基合金製のクリップによる比較検討を行った。

【結果】 クリップ閉鎖力は、素材に関係なく、ブレード先端に近いほど低く、先端からの距離が長くなるほど高くなり、その増加は直線的であった。また、ブレードの開き幅が3mmの方が1mmよりも有意に閉鎖力が高かった ($p<0.05$)。

アンチシザリングトルクは、両素材とも回転角度に応じて上昇し、ブレード先端からの距離が長いほど有意に高かった ($p<0.05$)。さらに、両素材ともブレードの開き幅が3mmの方が1mmよりも有意にトルク値が高かった ($p<0.05$)。いずれの条件でもコバルト基合金製の方がチタン合金製クリップよりトルク値は高かったが、両者とも回転角度90度近傍までは、ほぼ直線的にトルク値の上昇がみられた。しかし、チタン合金製クリップにおいて、ブレードの開き幅が3mm、先端からの距離が3mmの条件では、回転角度70度前後でトルク値の急激な低下が認められた。

素材間の比較では、閉鎖力はチタン合金製がコバルト基合金製クリップより高かった。一方、アンチシザリングトルクは、コバルト基合金製クリップが有意に高かった ($p<0.05$)。

【考察】 脳動脈瘤クリッピング術においては、動脈瘤の壁の厚さ、動脈硬化性変化の有無、サイズなど動脈瘤側の要素も重要である。本研究ではブレードの開き幅を変化させることで動脈瘤側の要素を加味し、閉鎖力とアンチシザリングトルクに与える影響を検討した。

脳動脈瘤クリップに使用されているチタン合金は、6%のアルミニウムと4%のバナジウムを含む組成で、軽量で高い比強度を有する。しかし、コバルト基合金との比較では、延性はおおよそ半分であり、剛性や強度においても劣っている。

クリップの閉鎖力は主にクリップのバネ部により規定される。本研究では、剛性や強度に劣るチタン合金製の閉鎖力の方が高かった。これは、同一タイプのクリップであるが、バネ部やブレードの形状に両者で差異があることに起因すると考えられた。

本研究では、延性、剛性、強度に勝るコバルト基合金製クリップの方がシザリングを生じにくいことが示されたが、通常のクリッピングにおいては、チタン合金製クリップも機能的には同等であり、さらにMRI検査における安全性、アーチファクトの点からもチタン合金製クリップが用いられている。

【結論】 本研究の結果、脳動脈瘤クリップのシザリング現象は、クリップブレードの先端部のみを使用したクリッピングで生じやすいことが明らかになった。アテローム硬化性変化の強い動脈瘤や大型の動脈瘤に対してチタン合金製クリップでクリッピングを施行する際は、ブレードの開き幅が大きくなることから、ブレードのより深い位置でクリッピングすることが必要である。さらに、パラレルクリッピングやブースタークリッピングといったクリッピングの方法を工夫したり、コバルト基合金製クリップの使用を考慮する必要がある。

（論文審査の結果の要旨）

脳動脈瘤治療において、クリッピング術は血管内治療が進歩した現在でも重要な治療選択肢である。クリッピングの際に、クリップブレードが捻れて変位してしまう現象はシザリングとして知られており、脳動脈瘤頸部損傷の危険性がある。しかし、シザリング現象についての基礎研究は少ない。現在、クリップの材料としてチタン合金が主流であるが、シザリングの報告が散見される。以前のコバルト基合金製では、シザリング現象はまれであったので、近年再び注目されている。チタンは非磁性体で非毒性の特徴を持ち、また高い比強度、耐食性、生体適合性を有しているが、金

属剛性の問題があげられる。

本研究では、シザリング現象を解明するためにクリップの閉鎖力と疑似シザリング現象時のトルク値を測定し、コバルト基合金製とチタン合金製の脳動脈瘤クリップを比較することで、チタン合金製クリップの特性を明らかにすることを目的とした。

その結果、次の結論を得た。

1. クリップの閉鎖力は、素材に関係なく、ブレード先端に近いほど低く、先端からの距離が長くなるほど高くなり、その増加は直線的であった。また、ブレードの開き幅が3mmの方が1mmよりも有意に閉鎖力が高かった ($p < 0.05$)。
2. アンチシザリングトルクは、両素材とも回転角度に応じて上昇し、ブレード先端からの距離が長いほど有意に高かった ($p < 0.05$)。さらに、両素材ともブレードの開き幅が3mmの方が1mmよりも有意にトルク値が高かった ($p < 0.05$)。
3. いずれの条件でもコバルト基合金製の方がチタン合金製クリップよりトルク値は高かったが、両者とも回転角度90度近傍までは、ほぼ直線的にトルク値

の上昇がみられた。しかし、チタン合金製クリップにおいて、ブレードの開き幅が3mm、先端からの距離が3mmの条件では、回転角度70度前後でトルク値の急激な低下が認められた。

4. 素材間の比較では、閉鎖力はチタン合金製がコバルト基合金製クリップより高かった。一方、アンチシザリングトルクは、コバルト基合金製クリップが有意に高かった ($p < 0.05$)。

これらの結果より脳動脈瘤クリップのシザリング現象は、クリップブレードの先端部のみを使用したクリッピングで生じやすいことが明らかになった。アテローム硬化性変化の強い動脈瘤や大型の動脈瘤に対してチタン合金製クリップでクリッピングを施行する際は、ブレードの開き幅が大きくなることから、ブレードのより深い位置でクリッピングすることが必要である。さらに、パラレルクリッピングやブースタークリッピングといったクリッピングの方法を工夫したり、コバルト基合金製クリップの使用を考慮する必要がある。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。

Identification of chronic kidney disease patient characteristics influencing the renoprotective effects of febuxostat therapy : a retrospective follow-up study. (フェブキソスタット治療の腎保護効果に影響を与える慢性腎臓病患者背景の検討—後方視的観察研究)

山口 晃 典

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】高尿酸血症は様々な病態で腎機能障害のリスク因子であることが報告されている。その機序として、高尿酸血症ではキサンチンオキシダーゼ活性化を介して活性酸素産生が増加し、酸化ストレスが血管内皮障害や臓器障害を引き起こすことが考えられている。活性酸素による一酸化窒素産生抑制やレニン-アンジオテンシン系の亢進も血管内皮障害や尿細管障害を来す要因となり、尿酸塩によるインフラマソームの活性化も尿細管障害の原因になると考えられている。

臨床研究では、高尿酸血症治療薬の腎保護効果は論争的になっている。肯定的な報告も多いが、進行した慢性腎臓病患者では高尿酸血症は腎機能障害進行に影響しないとする報告や、慢性腎臓病患者に尿酸降下薬を用いても腎保護効果はなかったとする報告も存在する。

我々は、臨床現場において慢性腎臓病患者に対して尿酸降下薬としてキサンチンオキシダーゼ阻害薬であ

るフェブキソスタットを用いた場合に、腎保護効果を観察できる患者と、観察しづらい患者がいることに気付いた。本研究では、フェブキソスタット治療の腎保護効果の有無について調査するとともに、その腎保護効果に影響を与える慢性腎臓病患者背景について後方視的に検討した。

【方法】2011年から2014年に信州大学医学部附属病院腎臓内科で高尿酸血症に対してフェブキソスタットを投与した慢性腎臓病患者178例を対象とした。治療3カ月後と6カ月後の平均尿酸値 (mean uric acid: mUA) と6カ月間のeGFR変化量 (Δ eGFR)、また各患者の患者背景を電子カルテ上から収集した。

尿酸降下薬を使用した高尿酸血症患者では、尿酸6.0mg/dl未満にした患者で腎保護効果が認められたという先行研究をふまえ (Levy GD, et al. J Rheumatol. 2014;41:955-962)、本研究でもmUAが6.0mg/dl未満の患者 (mUA < 6群) と6.0mg/dl以上の患者 (mUA \geq 6群) の2群に分け、 Δ eGFRを比

較した。また、様々な患者背景により層別化し同様の検討を行った。

【結果】 フェブキソスタット治療により、他の尿酸降下薬からの変更、尿蛋白量、腎機能に関わらず、40%～50%の患者でmUA<6が達成された。mUA<6群ではmUA≥6群よりも6カ月後のeGFR低下が有意に抑制されており、血清尿酸値の低下に伴う腎保護効果が示唆された。また、加齢（年齢70歳以上）、高血圧（収縮期血圧130 mmHg以上）、コレステロール異常症、糖尿病といった血管リスク因子を持たない患者群では、血清尿酸値の低下に伴う腎保護効果が有意に認められやすいが、これらの因子を持つ患者群ではこの効果が認めにくくなった。加齢、高血圧、コレステロール異常症、糖尿病という4つの血管リスク因子の項目数で患者を0個、1個、2個、3個以上の4群に分けたところ、血管リスク因子0個群と1個群では、血清尿酸値低下に伴う有意な腎保護効果が認められたが、血管リスク因子2個群と3個以上群ではこの腎保護効果を検出できなくなることがわかった。

【考察】 本研究では、尿酸を十分に降下させた患者で腎機能低下が抑制されており、血清尿酸値低下に伴う腎保護効果が示唆された。この腎保護効果は、血管リスク因子を複数保持している患者では検出されにくくなった。高尿酸血症は血管内皮障害により腎障害を来す機序が考えられており、尿酸降下薬は尿酸を低下させることで血管内皮障害を抑制し、腎機能保護効果をもたらすと考えられる。慢性腎臓病患者では加齢、高血圧症、脂質異常症、糖尿病といった血管リスク因子を併せ持つことも多い。フェブキソスタットで十分な尿酸降下を行っても、これらの血管リスク因子を複数保持している患者ではフェブキソスタット治療による腎保護効果がマスクされ観察しづらくなると考えられる。尿酸降下薬による腎保護作用を検討した研究で一定の見解が得られないのは、研究ごとの患者背景の違いが影響している可能性がある。

本研究のLimitationとして、単施設での小規模な短期間の後方視的観察研究であることが挙げられる。また、本研究では欧米の用量よりも少量のフェブキソスタットで治療された患者が多く、人種差や体格、食事習慣などの影響があると考えられ、本研究結果が他国の患者に適応できるかはさらなる検討が必要である。**【結論】** フェブキソスタット治療を行った慢性腎臓病患者では、尿酸値が6.0 mg/dl未満となった患者で腎保護効果が有意に認められる。この効果は、加齢、高

血圧症、脂質異常症、糖尿病といった血管リスク因子の少ない患者で認められやすく、これらの血管リスク因子が重なると腎保護効果を検出しにくくなる。

(論文審査の結果の要旨)

慢性腎臓病患者に対して尿酸降下薬としてキサンチンオキシダーゼ阻害薬であるフェブキソスタットを用いた場合、腎保護効果を観察できる患者と、観察しづらい患者がいる。本研究では、フェブキソスタット治療の腎保護効果の有無について調査するとともに、その腎保護効果に影響を与える慢性腎臓病患者背景について後方視的に検討した。

高尿酸血症に対してフェブキソスタットを投与した慢性腎臓病患者178例を対象とした。治療3カ月後と6カ月後の平均尿酸値(mean uric acid:mUA)と6カ月間のeGFR変化量(ΔeGFR)、また各患者の患者背景を電子カルテ上から収集した。

尿酸降下薬を使用した高尿酸血症患者では、尿酸6.0 mg/dl未満にした患者で腎保護効果が認められたという先行研究をふまえ、本研究でもmUAが6.0 mg/dl未満の患者(mUA<6群)と6.0 mg/dl以上の患者(mUA≥6群)の2群に分け、ΔeGFRを比較した。また、様々な患者背景により層別化し同様の検討を行った。

その結果、山口は次の結果を得た。

1. mUA<6群ではmUA≥6群よりもeGFRの低下が有意に抑制されていた。
2. 加齢（年齢70歳以上）、高血圧（収縮期血圧130 mmHg以上）、コレステロール異常症、糖尿病といった血管リスク因子を持たない患者群では、血清尿酸値低下に伴うeGFR低下抑制が有意に認められるが、これらの血管リスク因子を持つ患者群ではこの腎保護効果が検出されにくくなった。
3. 加齢、高血圧、コレステロール異常症、糖尿病という4つの血管リスク因子の項目数で患者を0個、1個、2個、3個以上の4群に分けたところ、血管リスク因子0個群と1個群では、血清尿酸値低下に伴うeGFR低下抑制を有意に認めたが、血管リスク因子2個群と3個以上群ではこの関係性を検出できなくなった。

これらの結果より、フェブキソスタットは尿酸降下により腎機能低下の抑制効果を持つ可能性があるが、この効果は血管リスク因子が複数存在することで検出しづらくなる可能性が考えられた。尿酸降下薬は血管内皮障害抑制により腎保護を行うと考えられているが、

その効果は他の原因による内皮障害の影響でマスクされる可能性がある。これらの結果は慢性腎臓病治療における高尿酸血症治療の重要性を示唆している。よっ

て、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Controlled attenuation parameter is correlated with actual hepatic fat content in patients with non-alcoholic fatty liver disease with none-to-mild obesity and liver fibrosis (肥満・肝線維化が無一軽度の非アルコール性脂肪性肝疾患患者では、減衰制御パラメータが実際の肝脂肪量と相関する)

藤 森 尚 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) において、重症度や治療効果を判定するために、より正確で侵襲の少ない肝脂肪定量法が必要である。振動制御エラストグラフィを用いて算出される (または計測される) 減衰制御パラメータ (CAP) は肝脂肪化の存在を反映すると言われているが、その定量性は不明である。本研究では、NAFLD 患者において CAP が実際の肝脂肪沈着量を反映しているか、検証を行った。

【方法】NAFLD 患者82名を対象とし、肝生検の直前に FibroScan を用いて CAP を測定した。生検標本での肝細胞面積に対する肝脂肪滴面積の占める割合 (肝脂肪率) を、光学画像解析システムを用いて形態学的に定量した。CAP と肝脂肪率の相関を Spearman 順位相関係数で評価し、相関に影響を与える因子を検討した。

【結果】CAP は、BMI 28 kg/m²未満 ($r=0.579$, $P<0.0001$)、特に25 kg/m²未満 ($r=0.708$, $P<0.01$) の NAFLD 患者において肝脂肪率と良好な相関を示したが、BMI 28 kg/m²以上の患者では有意な相関は見られなかった。BMI 28 kg/m²未満の患者でも、ステージ2-4の肝線維症がある場合は CAP と肝脂肪率の有意な相関が認められなかった。一方、CAP と肝脂肪率の相関は肝細胞膨化変性および小葉炎症の程度には影響されなかった。

【結論】CAP は、無一軽度の肥満および肝線維症を有する NAFLD 患者に対して高い肝脂肪定量能を有していた。一方、BMI 28 kg/m²以上あるいは中一高度の肝線維症を有する場合は定量能が著しく低下するため、CAP 測定法のさらなる改善が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は組織あるいは画像診断で脂肪肝を認め、他の慢性肝疾患を除くことができる病態であり、メタボリックシンドロームの肝

臓での表現型と考えられている。脂肪変性に壊死・炎症や線維化を伴いより厳格な治療介入を要すると考えられる病態が非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) であるが、現状では肝生検による病理組織学的所見によってのみ確定診断される。NAFLD の本邦での有病率は20-30%と報告されており、その患者群から NASH をいかに拾い上げるかが課題となっている。一方、肝生検は侵襲的な検査であるため施行できる症例に限られ、サンプリングエラーも問題となる。また、肝脂肪量 (Steatosis) の評価は客観性・定量性・再現性に欠ける場合がある。この点を補う非侵襲的な肝脂肪定量法が発展しつつあり、我々は FibroScan で計測可能な controlled attenuation parameter (CAP) に着目した。

組織所見の肝脂肪量に客観性・定量性をもたせるために画像解析アプリケーションを用いて組織標本の肝脂肪量を数値化し、CAP との相関関係を検討した。

2013年4月から2015年12月の間に当院で肝生検を施行し、同日 CAP 計測が可能であった NAFLD 患者82例を対象とした。

その結果、藤森尚之は以下の結論を得た。

1. CAP は肝脂肪量に有意に相関する。
2. CAP と肝脂肪量の相関関係は BMI による影響を受け、中等度以上の肥満であると有意な相関が消失する。
3. CAP と肝脂肪量の相関関係は、肝組織所見の肝細胞膨化や小葉内炎症には影響を受けないが、中等度以上の肝線維化により有意な相関が消失する。
4. FibroScan で計測される肝硬度により CAP の精度を予測できる可能性がある。

今回の研究は、NAFLD において CAP と肝脂肪量の相関を厳格に検討した最初の研究である。その結果、CAP と肝脂肪量は有意に相関するが BMI や肝線維化の影響を受けることが判明した。この結果は、今後

CAP を用いた研究を行う際や臨床評価に用いる際に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。

Pedicle screw loosening after posterior spinal fusion for adolescent idiopathic scoliosis in upper and lower instrumented vertebrae having major perforation (思春期特発性側弯症手術における椎弓根スクリューの緩みは頭尾側固定端で生じやすい)

上原将志

(論文の内容の要旨)

【背景】思春期特発性側弯症 (adolescent idiopathic scoliosis; AIS) に対する椎弓根スクリュー (pedicle screw; PS) を用いた後方矯正固定術が広く行われている。しかし術後経過で PS 周囲に緩みが生じる症例があり、緩みによる矯正損失や骨癒合不全が懸念される。高齢者や骨粗鬆症患者における固定術後の PS の緩みはよく知られており、腰椎変性疾患固定術後の PS の緩みに関しては報告が散見される。一方、AIS 患者の骨質は比較的良いものの、固定範囲が長くなるため PS にかかる負担が大きく緩みが生じるリスクがあると考えられるが、AIS における PS の緩みに関する調査はほとんどなされていない。

【目的】AIS に対する後方矯正固定術における PS の緩み発生とその危険因子について検討した。

【方法】2006年3月から2016年7月の間に AIS に対して後方矯正固定術を施行した120例 (男性9例, 女性111例, 平均年齢15.0歳) を対象とした。術後6カ月の CT 冠状断・矢状断像で PS 全周性にクリアゾーンが認められるものを緩みと定義した。また術後 CT で内外側、頭尾側、前方への PS 逸脱を調査し Rao の分類に基づいて Grade 0～3 に分類した。Grade 0 : 逸脱無し, Grade 1 : 0～2 mm の逸脱, Grade 2 : 2～4 mm の逸脱, Grade 3 : 4 mm 以上の逸脱とし、Grade 2 と Grade 3 を major perforation とした。PS 緩みを反応変数、緩み関連因子候補を固定効果、個人を変量効果とした混合ロジスティックモデルを用いた単変量及び多変量解析を行い、PS 緩み関連因子を同定した。

【結果】計1624本の PS が挿入され、43本 (2.7%) に緩みを認めた。単変量解析で患者因子の年齢、性別、術前 Cobb 角は PS 緩みと有意な関連を認めなかった。PS 刺入部位別の緩み率は最頭側 : 9.6% (23/240), 最尾側 : 5.4% (13/240), 頭側から2椎体目 : 1.8% (3/170), 尾側から2椎体目 : 0.5% (1/210), 頭側から3椎体目 : 1.2% (2/172), 頭側から4椎体目 : 0.9%

(1/106) であった。PS 逸脱の Grade 別の緩み率は G0 : 1.4% (25/1723), G1 : 3.1% (11/280), G2 : 15.5% (11/97), G3 : 15.2% (6/55) であった。多重ロジスティック混合モデルで逸脱無しまたは minor perforation (G0, G1) に対して major perforation (G2, G3) における緩みのオッズ比は 17.2 (95%信頼区間 : 6.9-49.6, $p < 0.01$) で major perforation で緩みやすかった。頭尾側固定端における緩みのオッズ比は 73.4 (95%信頼区間 : 13.3-1437.6, $p < 0.01$) であった。

椎弓根スクリューの緩み率におけるサブ解析を以下に示す。固定端に隣接する椎体にスクリューが挿入の有無による比較では、隣接椎挿入無し 5.6%, 挿入あり 6.7% で有意差は認めなかった ($p = 0.73$)。側弯カーブの凹側または凸側挿入の比較では、凹側 2.1%, 凸側 3.3% で、有意差は認めなかった ($p = 0.14$)。一椎体あたりスクリュー挿入が両側または片側挿入の比較では、両側挿入 2.7%, 片側挿入 1.8% で有意差は認めなかった ($p = 0.34$)。

【考察】椎弓根スクリューの緩みに関する過去の報告では、102名の骨粗鬆症患者における椎弓根スクリュー固定術において、14.7% にスクリューの緩みが発生したと報告されている。スクリューの緩みは偽関節に続いて生じている可能性があり、スクリューの破損や引き抜けとの関連性の報告や多椎間にわたる固定術の患者で緩みが起こりやすいと報告されている。本研究の思春期特発性側弯症患者において 2.6% のスクリューに緩みが発生した。患者因子の年齢、性別、術前 Cobb 角は緩みに有意な関連を認めなかった。一方、固定端と G2 以上の逸脱が PS 緩みに関して独立した影響を及ぼす因子であることが明らかになった。この結果から、固定端の PS が 2 mm 以上の逸脱であった場合、PS の緩みが生じる可能性は非常に高く成績不良につながる可能性があるため、注意深い経過観察が必要と考えられる。

【結論】PS の緩みは固定範囲の頭尾側端および major

perforation スクリューで生じやすかった。思春期特発性側弯症手術の際、固定範囲の頭尾側端のスクリュー挿入は特に正確に行う必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

思春期特発側弯症 (adolescent idiopathic scoliosis; AIS) 術後に椎弓根スクリュー (pedicle screw; PS) 周囲に緩みが生じる症例があり、緩みによる矯正損失や骨癒合不全が懸念される。高齢者や骨粗鬆症患者における腰椎固定術後の PS の緩みに関しては報告が散見されるが、AIS 患者における PS の緩みに関する調査はほとんどなされていない。上原らは、AIS に対する後方矯正固定術における PS の緩み発生とその危険因子について検討した。

術後 6 カ月の CT 冠状断・矢状断像で PS 全周性にクリアゾーンが認められるものを緩みと定義した。また術後 CT で内外側、頭尾側、前方への PS 逸脱を調査し Rao の分類に基づいて Grade 0～3 に分類した。Grade 2 及び 3 を major perforation と定義した。PS 緩みを反応変数、緩み関連因子候補を固定効果、個人を変数効果とした混合ロジスティックモデルを用いた

単変量及び多変量解析を行い、PS 緩み関連因子を同定した。

その結果、上原は次の結論を得た。

1. AIS 手術において計 1624 本の PS が挿入され、43 本 (2.7%) に緩みを認めた。
2. 単変量解析で患者因子の年齢、性別、術前 Cobb 角は PS 緩みと有意な関連を認めなかった。
3. 多重ロジスティック混合モデルで逸脱無しまたは minor perforation (G0, G1) に対して major perforation (G2, G3) における緩みのオッズ比は 17.2 (95% 信頼区間: 6.9-49.6, $p < 0.01$) で major perforation で緩みやすかった。頭尾側固定端における緩みのオッズ比は 73.4 (95% 信頼区間: 13.3-1437.6, $p < 0.01$) であった。

これらの結果より、AIS 手術の際に固定端の PS が 2 mm 以上の逸脱であった場合、PS の緩みが生じる可能性は非常に高く成績不良につながる可能性があるため、注意深い経過観察が必要であることが示唆された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Mechanical Properties and Histological Evaluation of Bone Grafting Materials Containing Different Ratios of Calcium Phosphate Cement and Porous β -tricalcium Phosphate Granules (配合比を変えたリン酸カルシウムセメントと多孔質 β -リン酸三カルシウム顆粒混和骨補填材料の機械的性質と組織学的評価)

田 中 宏 和

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】種々の疾患等により欠損・吸収した歯槽骨の補填に、骨置換可能な材料として β -tricalcium Phosphate (β -TCP) は広く臨床で用いられている。 β -TCP は生体内で吸収し骨置換するという利点があるが、賦形性や機械的強度が乏しいという欠点がある。それを補うためにチタンメッシュなどを併用する必要があるが、骨造成後にはチタンメッシュを除去する二次手術が必要である。一方、Calcium Phosphate Cement (CPC) は賦形性に優れ機械的強度が高い材料であるが、ほとんど生体内で吸収されず骨置換も起きないため、感染に弱く、口腔内手術に用いる材料として一般的でない。しかしながら、 β -TCP と CPC の混和骨補填材は、それぞれの利点欠点を補完し合うことにより優れた骨補填材としての可能性を秘めている。CPC 内に気孔を作成し骨置換型の CPC を作成する研究は、これまでにゼラチン顆粒やコラーゲンを混入する種々

の研究が報告されてきたが、機械的強度が弱いのが欠点であった。今回の研究と同様に異なる骨補填材を混合し比較、検討した報告は極めて少なく、配合比を変えた CPC と多孔性 β -TCP の混和骨補填材で物性評価および長期間における生体内組織評価を行った報告はない。そこで、本研究の目的は、多孔性 β -TCP と CPC の混和骨補填材を作製し、機械的強度を有し骨置換される骨補填材を作成することである。

【材料と方法】CPC は日本特殊陶業製のセラペースト[®]を用いた。 β -TCP は日本特殊陶業製のセラペータ[®]を用いた。CPC に β -TCP を重量比 0% (C0群, Control), 30% (C30群), 50% (C50群) の割合で添加し、3種類の混合人工骨サンプルを作成した。それぞれに対して、硬化時間、気孔率計測、圧縮強度試験、X-ray diffraction patterns (XRD) 検査、 μ -CT 画像評価、Scanning electron microscopy (SEM) 画像評価、浸透率試験を行い物性の評価を行った。In

vivo 試験として、雄ニュージーランドウサギ6匹の大腿骨にそれぞれの円筒形サンプル（直径4mm×高さ10mm）を埋入し4週間、12週間、36週間後に回収し、トルイジンブルー染色を行い骨形成状況とサンプルの生体内での吸収率を評価した。統計学的評価には、SPSS社 SPSS13.0にて気孔率計測検査、圧縮強度試験、浸透率試験に対してKruskal Wallis検定、In vivo 吸収率測定に対してWilcoxon検定を用いて統計学的検討を行った。

【結果】C0群の硬化時間は 10 ± 1.09 分であるのに対してC30で 15 ± 1.72 分、C50で 18 ± 1.41 分であり、大幅な硬化遅延は認めなかった。気孔率計測検査ではC0で気孔率27%、C30で31%、C50で36%であり、圧縮強度試験ではC0で28MPa、C30で22MPa、C50で13MPaの強度であった（Kruskal Wallis検定、 $P < 0.05$ ）。C0群と比較してC30、C50は β -TCPの混和量が増加するとともに気孔率は増加したが圧縮強度は低下した。しかしC50群でも13MPaと海綿骨程度の強度は有していた。SEM画像評価と μ CT画像評価では β -TCPのマクロ気孔にCPCセメントが陥入することはなく、マクロ気孔が保たれていることが確認された。XRD検査では β -TCPの混和量が多くなるほどハイドロキシアパタイト（HA）の検出は減少しC50のサンプルではHAがほとんど検出されなかった。浸透率試験では、C0で20.5%、C30で73.3%、C50で96.5%の浸透率であり、3群間で有意差を認めC50はサンプルの中央まで速やかに浸透し連通気孔が形成されていることが確認された（Kruskal Wallis検定、 $P < 0.05$ ）。In vivoでの評価では、36週間埋入したサンプルC30で31%、C50で83%が吸収しており、サンプル内部に骨組織が観察された。一方C0では36週間埋入したサンプルでも、ほとんど吸収や骨置換は観察できなかった。吸収率に関して、C0群に対してC50群はすべての観察期間で吸収率が有意に高かった（Wilcoxon検定、 $P < 0.05$ ）。

【結論】CPCに β -TCPを混和させると気孔率が上昇するが機械的強度は減少するといった予想通りの結果となったが、CPCにコラーゲンなどを混和させた他の研究などと比較してもC50の機械的強度は13MPaであり、海綿骨と同等といったある程度の強度があることは確認できた。硬化時間はC50でも37℃の条件下では18分で硬化することが確認でき、臨床においても耐えうる硬化時間と思われた。また、 μ CTとSEM画像では β -TCPのマクロ気孔にCPCが陥入するこ

とは無く、マクロ気孔が保たれていることが観察された。浸透率試験においてもC50では速やかに内部まで色素が浸透することが確認され、連通気孔が形成されていることが示唆された。XRD検査では β -TCPの混入量が増えると生体内で吸収されにくいHAの形成が減少することが確認できた。In vivoの組織評価でC50のサンプルは36週間後には83%が吸収されていることが確認できた。C50が吸収された要因として連通気孔が形成されていることと、HAの形成が不完全であったためと考えられた。また、サンプル表層および生体内で吸収が生じたサンプル内部にも骨形成が確認でき、このCPC/ β -TCP混和骨補填材が優れた生物活性および骨伝導能を有していることが示唆された。CPC/ β -TCP混和骨補填材は賦形性と機械的強度を有し、骨置換型の骨補填材であることが示唆され、臨床応用が期待できる材料であることが示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

種々の疾患等により種々の疾患等により欠損・吸収した歯槽骨の補填に、骨置換可能な材料として β -tricalcium Phosphate（ β -TCP）は広く臨床で用いられている。 β -TCPは生体内で吸収し骨置換するという利点があるが、賦形性や機械的強度が乏しいという欠点がある。それを補うためにチタンメッシュなどを併用する必要があり、骨造成後にはチタンメッシュを除去する二次手術が必要である。一方、Calcium Phosphate Cement（CPC）は賦形性に優れ機械的強度が高い材料であるが、ほとんど生体内で吸収されず骨置換も起きないため、感染に弱く、口腔内手術に用いる材料として一般的でない。しかしながら、 β -TCPとCPCの混和骨補填材は、それぞれの利点欠点を補完し合うことにより優れた骨補填材としての可能性を秘めている。CPC内に気孔を作成し骨置換型のCPCを作成する研究は、これまでにゼラチン顆粒やコラーゲンを混入する種々の研究が報告されてきたが、機械的強度が弱いのが欠点であった。今回の研究と同様に異なる骨補填材を混合し比較、検討した報告は極めて少なく、配合比を変えたCPCと多孔性 β -TCPの混和骨補填材で物性評価および長期間における生体内組織評価を行った報告はない。そこで今回、多孔性 β -TCPとCPCの混和骨補填材を作製し、機械的強度を有し骨置換される骨補填材を作成することが可能であるかを検討した。

CPCは日本特殊陶業製のセラペースト®を用いた。 β -TCPは日本特殊陶業製のセラベータ®を用いた。

CPCに β -TCPを重量比0%:(C0群, コントロール), 30%(C30群), 50%(C50群)の割合で添加し, 3種類の混合人工骨サンプルを作成した。それぞれに対して, 硬化時間, 気孔率計測, 圧縮強度試験, X-ray diffraction patterns (XRD) 検査, μ -CT 画像評価, Scanning electron microscopy (SEM) 画像評価, 浸透率試験を行い物性の評価を行った。In vivo 試験として, 雄ニュージーランドウサギ6匹の大腿骨にそれぞれの円筒形サンプル(直径4mm×高さ10mm)を埋入し4週間, 12週間, 36週間後に回収し, トルイジンブルー染色を行いサンプルの生体内での吸収率を評価した。統計学的評価には, SPSS社 SPSS13.0にて気孔率計測検査, 圧縮強度試験, 浸透率試験に対してKruskal Wallis検定, In vivo 吸収率測定に対してWilcoxon検定を用いて統計学的検討を行った。

その結果, 田中宏和は次の結論を得た。

1. C0群の硬化時間は 10 ± 1.09 分であるのに対してC30で 15 ± 1.72 分, C50で 18 ± 1.41 分であり, 大幅な硬化遅延は認めなかった。
2. C0群と比較してC30, C50は β -TCPの混和量が増加するとともに気孔率は増加したが圧縮強度は低下した。しかしC50群でも13MPaと海綿骨程度の強度は有していた。
3. SEM画像評価と μ CT画像評価では β -TCPのマクロ気孔にCPCセメントが陥入することはなく, マクロ気孔が保たれていることが確認された。
4. XRD検査では β -TCPの混和量が多くなるほど

ハイドロキシアパタイト(HA)の検出は減少し, C50のサンプルではHAがほとんど検出されなかった。

5. 浸透率試験では, C50はサンプルの中央まで速やかに浸透し連通気孔が形成されていることが確認された。
6. in vivoでの評価では, 36週間埋入したサンプルC30で31%, C50で83%が吸収しており, 内部に骨組織が観察された。一方C0では36週間埋入したサンプルでもほとんど吸収や骨置換は観察できなかった。
7. 気孔率計測検査ではC0で気孔率27%, C30で31%, C50で36%であり, 圧縮強度試験ではC0で28Mpa, C30で22MPa, C50で13MPaの強度であった。
8. 浸透率試験ではC0で20.5%, C30で73.3%, C50で96.5%の浸透率であり, それぞれにおいて3群間で統計学的検討を行った結果, いずれも有意差を認めた。
9. in vivoでの吸収率に対して統計学的評価を行った結果, C0群に対してC50群はすべての観察期間でサンプルの生体内での吸収率が有意に高かった。これらの結果より, CPC/ β -TCP混和骨補填材は賦形性と機械的強度を有し, 骨置換型の骨補填材であることが示唆された。また, 既に生体に使用されている材料を用いていることから臨床応用が期待できる材料と言える。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。

A Four-Center Retrospective Study of the Efficacy and Toxicity of Low-Dose Trimethoprim-Sulfamethoxazole for the Treatment of Pneumocystis Pneumonia in Patients without HIV Infection (非HIV感染症患者に発症したニューモシスチス肺炎に対する低用量ST合剤による治療の効果と毒性～4施設における後方視的研究～)

小 坂 充

(論文の内容の要旨)

【背景】ニューモシスチス肺炎(*Pneumocystis pneumonia*; PCP)は, HIV感染症患者における日和見感染症として知られてきたが, 抗レトロウイルス療法や発症予防が広く行われるようになるにつれて発症率は低下した。近年, 臓器移植, 副腎皮質ステロイド, 免疫抑制剤, 生物学的製剤, 抗癌剤を使用される患者が増えるにつれ, 非HIV感染症患者に発症するPCP(非HIV-PCP)が重要視されてきている。現在一般に推奨されているPCPの治療レジメンは, 主にHIV

感染症患者に発症したPCP(HIV-PCP)を対象として行われたランダム化比較試験をもとに作成されたものである。非HIV-PCPには確立された標準治療がなく, HIV-PCPに準じて治療されているのが現状である。HIV-PCPに対する治療の第一選択薬はST合剤であり, 標準投与量はTrimethoprim換算で15-20mg/kg/日である。しかし, 実際にこの投与量で治療を行った場合, 有害事象の発現率が高く, 減量・中止を余儀なくされることが多い。さらに, 非HIV-PCPに対してST合剤の治療用量はこれまで検証されてい

ない。本研究の目的は、非 HIV-PCP に対して低用量の ST 合剤で治療をしたときの効果と毒性を調査することである。

【方法】長野県内 4 施設（信州大学医学部附属病院、長野市民病院、篠ノ井総合病院、諏訪赤十字病院）において、2003年 1 月から 2016年 9 月までの期間に非 HIV-PCP と診断され ST 合剤で治療された患者の診療録を後方視的に調査した。本研究では、以下 (i) から (iv) 全てを満たすものを非 HIV-PCP と診断した。(i) 易感染状態である、(ii) 胸部 X 線写真あるいは CT で両側びまん性すりガラス様陰影を認める、(iii) 気道由来の検体で *Pneumocystis jirovecii* が検出される、(iv) β -D グルカンが陽性である。 β -D グルカンのカットオフ値についていくつかの報告があるが、我々は WAKO 法で 11 pg/mL 以上、MK 法で 20 pg/mL 以上を陽性と判定した。Trimethoprim 換算で 20 mg/kg/日を超える高用量で治療されていた患者は除外し、15-20 mg/kg/日を常用量群、15 mg/kg/日未満を低用量群と 2 群に分け、治療効果と毒性を比較検討した。腎機能障害のある患者では、ST 合剤の投与量が減量されていることも多い。そこで上記の群分けは、実際の投与量に腎機能に基づく補正係数を乗じた補正投与量によって行った。治療効果の評価には生存率を用い、毒性は有害事象共通用語規準 (version 4.0) の Grade 1 から 5 の 5 段階で評価した。

【結果】高用量で治療された非 HIV-PCP 患者 5 例を除外し、77 例の患者のうち常用量、低用量で治療された患者はそれぞれ 36、41 例であった。カプランマイヤー法では常用量群と低用量群とで生存率において有意差は認めなかった。90 日間の PCP 関連死亡率は常用量群と低用量群でそれぞれ 25.0 % と 19.5 % であった ($P=0.76$)。有害事象共通用語規準で grade 3 以上の有害事象は常用量群と低用量群でそれぞれ 41.7 % と 17.1 % であった ($P=0.02$)。嘔吐 ($P=0.03$) と血小板減少 ($P=0.03$) は常用量群でより高頻度に見られた。

【結論】非 HIV-PCP に対し低用量 ST 合剤で治療した場合の生存率は、常用量レジメンと比べ遜色ない。低用量レジメンは常用量レジメンと比べ有害事象が少なく、より忍容性が優れている。

(論文審査の結果の要旨)

ニューモシスチス肺炎 (*Pneumocystis pneumonia*; PCP) は、HIV 感染症患者における日和見感染症として知られてきたが、抗レトロウイルス療法や発症予

防が広く行われるようになるにつれて発現率は低下した。近年、臓器移植、ステロイド剤、免疫抑制剤、生物学的製剤、抗癌剤を使用される患者が増えるにつれ、非 HIV 感染症患者に発症する PCP (非 HIV-PCP) が重要視されてきている。現在一般に推奨されている PCP の治療レジメンは、主に HIV 感染症患者に発症した PCP (HIV-PCP) を対象として行われたランダム化比較試験をもとに作成されたものである。非 HIV-PCP には確立された標準治療がなく、HIV-PCP に準じて治療されているのが現状である。HIV-PCP に対する治療の第一選択薬は ST 合剤であり、標準投与量は Trimethomrim 換算で 15-20 mg/kg/日である。実際にこの投与量で治療を行った場合、有害事象の発現率が高く、減量・中止を余儀なくされることが多い。非 HIV-PCP に対して ST 合剤の治療用量はこれまで検証されていない。本研究の目的は、非 HIV-PCP に対して低用量の ST 合剤で治療をしたときの効果と毒性を調査することである。

長野県内 4 施設（信州大学医学部附属病院、長野市民病院、篠ノ井総合病院、諏訪赤十字病院）において、2003年 1 月から 2016年 9 月までの期間に非 HIV-PCP と診断され ST 合剤で治療された患者の診療録を後方視的に調査した。本研究では、以下 (i) から (iv) 全てを満たすものを非 HIV-PCP と診断した。(i) 易感染状態である、(ii) 胸部 X 線写真あるいは CT で両側びまん性すりガラス様陰影を認める、(iii) 気道由来の検体で *Pneumocystis jirovecii* が検出される、(iv) β -D グルカンが陽性である。 β -D グルカンのカットオフ値についていくつかの報告があるが、小坂は WAKO 法で 11 pg/ml 以上、MK 法で 20 pg/ml 以上を陽性と判定した。Trimethomrim 換算で 20 mg/kg/日以上の高用量で治療されていた患者は除外し、15-20 mg/kg/日を常用量群、15 mg/kg/日未満を低用量群と 2 群に分け、治療効果と毒性を比較検討した。腎機能障害のある患者では、ST 合剤の投与量が減量されていることも多い。そこで上記の群分けは、実際の投与量に腎機能に基づく補正係数を乗じた補正投与量によって行った。治療効果の評価には生存率を用い、毒性は有害事象共通用語規準 (version 4.0) の Grade 1 から 5 の 5 段階で評価した。

その結果、小坂は次の結論を得た。

1. 高用量で治療された非 HIV-PCP 患者 5 例を除外し、77 例の患者のうち常用量、低用量で治療された患者はそれぞれ 36、41 例であった。

2. カプランマイヤー法では常用量群と低用量群とで生存率において有意差は認めなかった。
3. 90日間のPCP関連死亡率は常用量群と低用量群でそれぞれ25.0%と19.5%であった ($P=0.76$)。
4. 有害事象共通用語規準 (version 4.0) (National Cancer Institute, 2010) で grade 3 以上の有害事象は常用量群と低用量群でそれぞれ41.7%と17.1%であった ($P=0.02$)。

5. 嘔吐 ($P=0.03$) と血小板減少 ($P=0.03$) は常用量群でより高頻度に見られた。

これらの結果より、非 HIV-PCP に対し低用量 ST 合剤で治療した場合の生存率は、常用量レジメンと比べ遜色ないこと、および低用量レジメンは常用量レジメンと比べ有害事象が少なく、より忍容性が優れ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価値があるものと認めた。

Predictive Factors for Deterioration of Lower Urinary Tract Symptoms After Iodine-125 Brachytherapy in Prostate Cancer Patients (前立腺癌に対する密封小線源永久挿入療法における下部尿路症状増悪因子の検討)

深 澤 歩

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 密封小線源永久挿入療法は限局性前立腺癌に対して有効な治療法であり、手術と比較して性機能温存率が高く、外照射と比較して治療期間が短いという利点がある。しかし、急性期に尿路合併症が高率に生じる点が問題であり、現時点においてこの合併症を予測する方法は確立されていない。今回、前立腺癌に対する密封小線源永久挿入療法における、急性期下部尿路症状 (lower urinary tract symptoms, LUTS) の増悪予測因子を検討した。

【対象と方法】 2013年1月から2014年10月の間に¹²⁵I小線源単独療法が行われた限局性前立腺癌患者42例を対象とした。処方線量は全患者において160 Gyであった。小線源療法前および3カ月後に国際前立腺症状スコア (International Prostate Symptom Score, IPSS) を用いてLUTSを調査した。IPSSにおける12点以上の増加を明らかなLUTSの増悪 (obvious deterioration of LUTS, ODL) と定義し、ODL発生と以下に挙げる因子との関係を解析した；年齢、線源の総放射能、前立腺体積、線量体積ヒストグラムにおけるパラメータである前立腺 V150 (cc, %) および尿道 D30 (Gy)。

【結果】 17例 (40.5%) においてODLが発生していた。単変量解析では前立腺 V150 (%) および前立腺 V150 (cc) と ODL 発生との間にそれぞれ有意な相関関係を認めた。多変量解析では前立腺 V150 (cc) と ODL 発生との間にのみ有意な相関関係を認めた ($P=0.039$)。

【結論】 前立腺 V150 (cc) は、限局性前立腺癌に対する¹²⁵I小線源療法におけるLUTS増悪の予測因子であると考えられる。治療計画の際には、前立腺 V150 (cc)

を可及的に低減させる必要があると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

密封小線源永久挿入療法は限局性前立腺癌に対して有効な治療法であり、手術と比較して性機能温存率が高く、外照射と比較して治療期間が短いという利点がある。しかし、急性期に尿路合併症が高率に生じる点が問題であり、現時点においてこの合併症を予測する方法は確立されていない。今回、深澤歩らは前立腺癌に対する密封小線源永久挿入療法における、急性期下部尿路症状 (lower urinary tract symptoms, LUTS) の増悪予測因子を検討した。

2013年1月から2014年10月の間に¹²⁵I小線源単独療法が行われた限局性前立腺癌患者42例を対象とした。処方線量は全患者において160 Gyであった。小線源療法前および3カ月後に国際前立腺症状スコア (International Prostate Symptom Score, IPSS) を用いてLUTSを調査した。IPSSにおける12点以上の増加を明らかなLUTSの増悪 (obvious deterioration of LUTS, ODL) と定義し、ODLと以下に挙げる因子との関係を解析した；年齢、線源の総放射能、前立腺体積、線量体積ヒストグラムにおけるパラメータである前立腺 V150 (cc, %) および尿道 D30 (Gy)。

その結果、深澤歩らは次の成績を得た。

1. 17例 (40.5%) においてODLが発生していた。
2. 単変量解析では前立腺 V150 (%) および前立腺 V150 (cc) と ODL 発生との間にそれぞれ有意な相関関係を認めた。多変量解析では前立腺 V150 (cc) と ODL 発生との間にのみ有意な相関関係を認めた ($P=0.039$)。

これらの結果より、前立腺 V150 (cc) は、限局性

前立腺癌に対する¹²⁵I小線源療法におけるLUTS増悪の予測因子であることが示唆され、治療計画の際には、前立腺V150(cc)を可及的に低減させる必要がある

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。

Lymphocyte Antigen 75 Polymorphisms Are Associated with Disease Susceptibility and Phenotype in Japanese Patients with Inflammatory Bowel Disease (日本人炎症性腸疾患患者における *Lymphocyte Antigen 75* 多型と疾患感受性および表現型との関連)

平山敦大

(論文の内容の要旨)

【緒言】炎症性腸疾患 (IBD) はクローン病 (CD) と潰瘍性大腸炎 (UC) に大別され、粘膜障害や組織損傷により消化管機能異常を来す慢性炎症性疾患である。CD は消化管のあらゆる部位に壁全層性の炎症を来すことを特徴とし、UC は主として粘膜を障害しその炎症範囲は大腸に局限している。IBD 患者数は先進国、発展途上国ともに増加傾向であり、臨床的および経済的問題を生じている。IBD の病因解明は不十分であるが、遺伝的素因を背景として腸内微生物に対する不適切な免疫応答が腸管バリア機能の喪失を引き起こすことが発症要因と推定されている。遺伝的素因については、ゲノムワイド関連研究 (GWAS) の発展により IBD の発症に至る分子経路の理解が進んでおり、様々な一塩基多型 (SNP) が IBD の疾患感受性と関連することが報告され、日本人集団の検討でも IBD の発症に関与する遺伝子座が報告されている。近年、多人種を対象とした GWAS において、IBD 疾患感受性と関連する 38 個の新たな遺伝子座が同定され、それにより、*Lymphocyte Antigen 75* (*LY75*) の近傍に位置する遺伝子座が IBD 発症と関連することが報告された。*LY75* は CD8 陽性樹状細胞や胸腺上皮細胞に高レベルに発現する C 型レクチン受容体である DEC-205 をコードしており、Th1 免疫応答と関連し T 細胞機能および恒常性において重要な役割を果たすと考えられている。これまで、日本人集団における *LY75* 多型と IBD 疾患感受性または表現型との関連を検討した報告はない。

【目的と方法】日本人における *LY75* 遺伝子多型と IBD 疾患感受性および IBD 表現型との関連を明らかにすることを目的とした。日本人の CD 患者 51 人、UC 患者 94 人、健康人 269 人を対象とした。HapMap Data から *LY75* 遺伝子上の minor allele 頻度が 5% 以上の SNPs 5 つ (rs1365798, rs13307, rs11690117, rs16822581, rs1511224) を選択し、疾患感受性およ

び表現型との関連を検討した。対象から得たゲノム DNA はフェノール法にて単離し、Applied Biosystems 社のプライマーを用いた TaqMan® PCR 法で遺伝子型を決定した。

【結果】CD および UC 群と健常対照群との間の allele 頻度に統計学的有意差はなかった。しかし、genotype 頻度では、rs16822581 で recessive model (CC+TC vs. TT) において CD 群 (76.5% vs. 23.5%) と健常対照群 (89.6% vs. 10.4%) との間に有意差を認めた ($p=0.045$, OR=2.65, 95% CI 1.24-5.64)。UC 群と健常対照群との間に有意差は検出されなかった。一方、haplotype 頻度の検討では、2 つのタグ SNP (rs1511224, rs16822581) は CD, UC および健常対照群において強い連鎖不平衡にあり、haplotype (GT) の頻度は CD 群において健常対照群と比較し有意に高かった (43% vs. 33%; $p=0.04$, OR=1.56, 95% CI 1.01-2.40)。Haplotype 頻度の検討においても、UC 群と健常対照群との間に有意差は検出されなかった。表現型における検討では、CD における小腸病変の有無、腸管切除歴の有無および肛門病変の有無で allele 頻度に統計学的有意差はなかったが、haplotype (AC) の頻度では CD における腸管切除歴の有無で有意差を認めた (28% vs. 48%; $p=0.036$)。

【考察】本研究では *LY75* 遺伝子多型と IBD 疾患感受性との関連について検討し、CD 群と健常対照群との間において特定の genotype および haplotype で統計学的有意差があることが明らかとなった。この結果より、*LY75* 多型が日本人における CD 発症と関連している可能性が示唆された。既報では、ヨーロッパ人種および中央アジア人種において *LY75* 多型が IBD 発症と関連していることが示されており、人種間で共通の IBD 発症にかかわる遺伝的素因があることが支持された。*LY75* 遺伝子変異は CD の腸管外合併症である結節性紅斑と関連するとの報告があるが、本研究では結節性紅斑を含め腸管外合併症を有する患者が少な

かったため、LY75多型と腸管外合併症の関連については評価できなかった。CDの腸管外合併症である結節性紅斑の有病率は2.3%であり、LY75多型が日本人のCD患者においても結節性紅斑と関連するかを評価するにはより大きな患者集団が必要である。本研究では、CD群において腸管切除歴がないこととLY75遺伝子の1つのhaplotypeが関連することが明らかとなった。このhaplotypeは、疾患感受性とは対立する塩基多型を有しており、LY75の機能が実際にCDの疾患活動性と関連している可能性が示唆された。本研究は患者数および健常対照者数が限られており、LY75多型とそれらの遺伝子産物の発現および機能との関係を検証するためにはより対象の大きな検討が必要である。

【結語】LY75は日本人のCD疾患感受性に関与しており、疾患活動性にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

クローン病(CD)と潰瘍性大腸炎(UC)に大別される炎症性腸疾患(IBD)は、遺伝素因と環境因子を背景とした免疫応答異常による腸管の慢性炎症を発症要因とする多因子疾患と考えられている。遺伝素因については、ゲノムワイド関連研究(GWAS)による多くの検討で200以上の疾患感受性遺伝子が同定されたが、疾患感受性には人種差があることも明らかとなっている。2015年多人種を対象としたGWASにおいて、IBD疾患感受性と関連する38個の新たな遺伝子座が同定され、それにより、*Lymphocyte Antigen 75*(LY75)の近傍に位置する遺伝子座がIBD発症と関連することが報告された。LY75はTh1免疫応答と関連しT細胞機能および恒常性において重要な役割を果たすと考えられているDEC-205をコードしている。今回、日本人のCD患者、UC患者および健常人

を対象として、LY75遺伝子多型とIBD疾患感受性および表現型との関連を検討した。HapMap DataからLY75遺伝子上のminor allele頻度が5%以上の一塩基多型(SNPs)5つ(rs1365798, rs13307, rs11690117, rs16822581, rs1511224)を選択した。TaqMan[®]PCR法でそれぞれの遺伝子型を決定し、各群のallele頻度、genotype頻度およびhaplotype頻度を比較検討した。また、CDの表現型(腸管切除歴の有無、小腸病変の有無、肛門病変の有無)についても同様に検討した。

その結果、平山敦大は次の結論を得た。

1. Genotype頻度の検討では、1つのSNP(rs16822581)においてrecessive model(CC+TC vs. TT)でCD群(76.5% vs. 23.5%)と健常対照群(89.6% vs. 10.4%)との間に有意差を認めた($p=0.045$, OR=2.65, 95%CI 1.24-5.64)。
2. Haplotype頻度の検討では、強い連鎖不平衡にある2つのタグSNP(rs1511224, rs16822581)において、haplotype(GT)はCD群において健常対照群と比較し有意に高かった(43% vs. 33%; $p=0.04$, OR=1.56, 95%CI 1.01-2.40)。
3. UC群と健常対照群との間にはいずれの検討でも有意差は検出されなかった。
4. CD表現型における検討では、haplotype(AC)の頻度が腸管切除歴の有無で有意差を認めた(28% vs. 48%; $p=0.036$)。

これらの結果より、LY75多型が日本人におけるCD発症と関連している可能性が示唆され、人種間で共通のIBD発症にかかわる遺伝素因があることが支持された。また、LY75の機能が実際にCDの疾患活動性と関連している可能性も示唆された。

以上の内容より主査、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。

Earlobe-like peritoneal appendage near the angle of His : a useful landmark for demarcating the lateral margin of the gastric cardia (His角近傍の耳垂様構造が噴門部外側縁を識別する有用なランドマークとなる)

平 島 寛 司

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】胃噴門部付近には、食道静脈や左胃動脈、迷走神経といった重要な構造が存在する。腹腔鏡下でこの部位に侵襲を加える場合、噴門部周囲構造の位置関係を十分に把握する必要がある。今回我々は、

腹腔鏡下食道腫瘍摘出術や食道下部迷走神経選択的切除術などの手技に有用と考えられるランドマークとして『胃噴門部の耳垂様構造』に注目し、構造の大きさと付着部位を観察した。また、全内臓逆位の症例および食道裂孔ヘルニアの各1例についても検討を行った。

【方法・結果】30例の解剖体のうち胃癌に対する胃全摘術既往症例と、悪性腫瘍の腹膜播種による観察困難症例を除いた28例について検討を行ったところ、22例（78.6%）において明瞭な構造として観察できた。22例中18例（81.8%）は、耳垂様構造が横隔膜と小網の双方に付着がみられ、2枚の耳垂様構造を認める1例や、厚さが4 mmにも及ぶ3例があった。全内臓逆位の1例（93歳男性、死因：肺炎）は、胸腹部内臓が正常に対して完全な鏡像を呈していた。ただし奇静脈・半奇静脈は正常の位置関係であった。なお、胃噴門部の耳垂様構造は11 mm×18 mmの薄膜状で、横隔膜と小網の双方に付着していたが、胃噴門部付近の他の構造と同様、完全逆位を呈していた。滑脱型食道裂孔ヘルニアの1例は、胸腔内に嵌入した腹部食道を腹腔内に戻して観察したところ、正常のご遺体同様に、小型で薄い（最大幅8 mm、厚さ1 mm程度）ものの明瞭な構造として認識できた。

【結語】耳垂様構造は胃横隔間膜および小網左上部由来の構造が胃噴門部に付着したものと考えられた。噴門部内側は重要な構造が密に存在するが、耳垂様構造が存在する外側は、左下横隔動脈が存在するほかは比較的疎な構造であった。この解剖学的位置関係は内臓逆位体においても同様であった。以上より、耳垂様構造を胃噴門部外側縁のランドマークとして活用することで、この領域の解剖学的構造の把握が容易になることが強く示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

胃噴門部付近には、食道静脈や左胃動脈、迷走神経といった臨床的に問題となる重要な構造が存在する。しかし、この領域は腹膜がカーテンのように被い、特に外側縁（腹部食道の左側）の縁取りがはっきりしない。腹腔鏡下でこの部位にアプローチする場合などは、噴門部周囲構造の境界を明確にしながら位置関係を十分に把握する必要がある。今回我々は、腹腔鏡下食道腫瘍摘出術や食道下部迷走神経選択的切除術、噴門形成術などに有用と考えられるランドマークとして、実習中に見出した『胃噴門部の耳垂様構造』に注目し、2015年度の信州大学医学部医学科系統解剖学実習に供した30例の解剖体のうち、胃癌に対する胃全摘術既往症例と、悪性腫瘍の腹膜播種による観察困難症例を除いた28例について、耳垂様構造の有無、大きさ、形、付着部位の範囲を数値記録、撮影記録を行った。また、実習中に遭遇した全内臓逆位の症例および食道裂孔ヘルニアの各1例の耳垂様構造についても検討を行った。

その結果、申請者は以下の結果を得た。

1. 耳垂様構造は腹部食道腹側から腹部食道外側縁（His角側）にかけて腹膜に包まれた脂肪組織を主体とする孤立的構造として存在した。
 2. 28例について検討を行ったところ、22例（78.6%）において明瞭な構造として把握できた。
 3. 22例中18例（81.8%）は、耳垂様構造が横隔膜と小網の双方に付着がみられ、2枚の耳垂様構造を認める1例や、厚さが4 mmにも及ぶ3例があった。
 4. 噴門部内側は臨床的に問題になる構造が密に存在するが、耳垂様構造が存在する噴門部の外側、His角側には、左側下横隔動脈が存在するほかは比較的疎であった。
 5. 全内臓逆位の1例は、胸腹部内臓が正常に対して完全な鏡像を呈していたが、奇静脈・半奇静脈は正常の位置関係であった。胃噴門部の耳垂様構造の存在は明確で、その大きさは11 mm×18 mmの薄膜状、横隔膜と小網の双方に付着していた。胃噴門部付近の他の構造と同様、完全逆位、すなわち右側に存在した。
 6. 滑脱型食道裂孔ヘルニアの1例は、胸腔側に嵌入した腹部食道を腹腔内に戻して観察したところ、正常ご遺体と同様に小さいがはっきりとした耳垂様構造（最大幅8 mm、厚さ1 mm程度）が存在した。
- これらの結果より、耳垂様構造は腹部食道腹側から腹部食道外側縁（His角側）にかけて恒常的に存在し、その部位には解剖学的、臨床的に問題になる構造が少なく、胃噴門部の左側、腹部食道の外側縁を識別するマーカーとして活用できることが分かり、腹腔鏡手術などへの応用の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。

PDGF-induced migration of synthetic vascular smooth muscle cells through c-Src-activated L-type Ca^{2+} channels with full-length $Ca_v1.2$ C-terminus (血小板由来増殖因子による合成型血管平滑筋細胞の遊走は、c-Src で活性化された全長型 $Ca_v1.2$ C 末端を有する L 型 Ca^{2+} チャンネルを介する)

郭 暁 光

(論文の内容の要旨)

【背景】動脈硬化では、血管内皮細胞下に侵入したマクロファージが分泌する血小板由来増殖因子 (PDGF) が、中膜の血管平滑筋細胞を収縮型から合成型に変化させ、さらに合成型血管平滑筋細胞を中膜から内皮下に移動させる。このことが、最終的には血管内腔を閉塞して種々の心血管病を誘発する。しかし、PDGF による合成型血管平滑筋細胞の遊走の分子機序は、完全には明らかになっていない。本研究の目的は、PDGF による合成型血管平滑筋細胞の遊走の分子機序を明らかにすることである。

【方法】合成型血管平滑筋細胞であるラット動脈平滑筋細胞株 A7r5 の遊走能を、この細胞の単層培養の wound healing assay で評価した。A7r5 細胞の内因性の $Ca_v1.2$ L 型 Ca^{2+} チャンネル ($Ca_v1.2$ チャンネル) や、tsA201 細胞に発現させたりコンビナント $Ca_v1.2$ チャンネルのゲーティング電流やイオン電流は、パッチクランプ法のホールセルモードを用いて測定した。Proximity ligation assay (PLA) をはじめとする分子生物学的実験は、適切なキットを用いて、メーカーの指示通りに行った。

【結果】PDGF 誘発の A7r5 細胞の遊走は、 $Ca_v1.2$ チャンネルの阻害薬ニフェジピンと、c-Src ファミリーキナーゼ (SFK) /Abl 阻害薬ボスチニブにより濃度依存性に完全に抑制され、両者の効果に相加性はなかった。PDGF は A7r5 細胞で、 $Ca_v1.2$ チャンネルの主たるサブユニット $Ca_v1.2$ の発現量を変化させず、 $Ca_v1.2$ チャンネル電流を増加させ、この反応は SFK の特異的阻害分子である C-terminus c-Src kinase により抑制された。収縮型の血管平滑筋細胞内では、 $Ca_v1.2$ の長い細胞内 C 末端は、翻訳後に中央付近で切断され、近位 C 末端 (PCT) と、遠位 C 末端 (PDT) に分かれる。その後、DCT は PCT に非共有的に再結合して、チャンネルの活性を自己抑制する。しかし、合成型の A7r5 細胞の $Ca_v1.2$ のほとんどは、この翻訳後修飾を受けない全長型であった。異所性の発現系では、c-Src は全長型 $Ca_v1.2$ チャンネルを活性化したが、DCT を切

断した $Ca_v1.2$ ($Ca_v1.2\Delta1763$) チャンネルや、 $Ca_v1.2\Delta1763$ に DCT を加えた $Ca_v1.2$ チャンネルを活性化しなかった。さらに c-Src は、全長型 $Ca_v1.2$ チャンネルの $Ca_v1.2$ サブユニット C 末端の Tyr1709 と Tyr1758 をリン酸化して、 $Ca_v1.2$ チャンネルの膜電位センサーと活性化ゲートの連関効率を高めた。PLA や免疫沈降の結果から、c-Src は、DCT の存否に関わらず、 $Ca_v1.2\Delta1763$ に比べて全長 $Ca_v1.2$ により効率的に結合し、リン酸化することが判明した。

【考察と結論】動脈硬化における血管平滑筋細胞の収縮型から合成型への変換は、 $Ca_v1.2$ の翻訳後修飾を抑制し、PDGF による c-Src を介した遊走を促進する病態生理学的意義を持つと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

動脈硬化では、血管内皮細胞下に侵入したマクロファージが分泌する血小板由来増殖因子 (PDGF) が、中膜の血管平滑筋細胞を収縮型から合成型に変化させ、さらに合成型血管平滑筋細胞を中膜から内皮下に移動させる。このことが、最終的には血管内腔を閉塞して種々の心血管病を誘発する。しかし、PDGF による合成型血管平滑筋細胞の遊走の分子機序は、完全には明らかになっていない。本研究の目的は、PDGF による合成型血管平滑筋細胞の遊走の分子機序を明らかにすることである。

そこで、郭は合成型血管平滑筋細胞であるラット動脈平滑筋細胞株 A7r5 の遊走能を、この細胞の単層培養の wound healing assay で評価した。A7r5 細胞の内因性の $Ca_v1.2$ L 型 Ca^{2+} チャンネル ($Ca_v1.2$ チャンネル) や、tsA201 細胞に発現させたりコンビナント $Ca_v1.2$ チャンネルのゲーティング電流やイオン電流は、パッチクランプ法のホールセルモードを用いて測定した。Proximity ligation assay (PLA) をはじめとする分子生物学的実験は、適切なキットを用いて、メーカーの指示通りに行った。

その結果、郭は以下の結果を得た。

1. PDGF 誘発の A7r5 細胞の遊走は、 $Ca_v1.2$ チャンネルの阻害薬ニフェジピンと、c-Src ファミリーキ

- ナーゼ (SFK) /Abl 阻害薬ボスチニブにより濃度依存性に完全に抑制され、両者の効果に相加性はなかった。
2. PDGF は A7r5細胞で、Ca_v1.2チャンネルの主たるサブユニット Ca_v1.2の発現量を変化させず、Ca_v1.2チャンネル電流を増加させ、この反応は SFK の特異的阻害分子である C-terminus c-Src kinase により抑制された。
 3. 収縮型の血管平滑筋細胞内では、Ca_v1.2の長い細胞内C末端は、翻訳後に中央付近で切断され、近位C末端 (PCT) と、遠位C末端 (PDT) に分かれる。その後、DCT は PCT に非共有的に再結合して、チャンネルの活性を自己抑制する。しかし、合成型の A7r5細胞の Ca_v1.2のほとんどは、この翻訳後修飾を受けない全長型であった。
 4. 異所性の発現系では、c-Src は全長型 Ca_v1.2チャンネルを活性化したが、DCT を切断した Ca_v1.2

(Ca_v1.2Δ1763) チャンネルや、Ca_v1.2Δ1763に DCT を加えた Ca_v1.2チャンネルを活性化しなかった。

5. c-Src は、全長型 Ca_v1.2チャンネルの Ca_v1.2サブユニット C 末端の Tyr1709 と Tyr1758 をリン酸化して、Ca_v1.2チャンネルの膜電位センサーと活性化ゲートの連関効率を高めた。
6. PLA や免疫沈降の結果から、c-Src は、DCT の存否に関わらず、Ca_v1.2Δ1763に比べて全長 Ca_v1.2により効率的に結合し、リン酸化することが判明した。

これらの結果より、動脈硬化における血管平滑筋細胞の収縮型から合成型への変換は、Ca_v1.2の翻訳後修飾を抑制し、PDGF による c-Src を介した遊走を促進する病態生理学的意義を持つと考えられた。

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。

Suspected Adverse Effects After Human Papillomavirus Vaccination: A Temporal Relationship Between Vaccine Administration and the Appearance of Symptoms in Japan (子宮頸がん予防のためのヒトパピローマウイルスワクチン接種後の副反応について：本邦におけるワクチン接種と症状発現の時間的経緯)

尾 澤 一 樹

(論文の内容の要旨)

【背景】日本では子宮頸がん予防のためのヒトパピローマウイルスに対するワクチン (HPV ワクチン) 接種後に、一定数の思春期女性が種々の症状を訴えており、その大部分は複合性局所疼痛症候群 (CRPS)、起立性調節障害、高次脳機能障害で説明できる。しかし、HPV ワクチン接種とこうした種々な症状の発現との因果関係は不明である。

【目的】本研究では HPV ワクチン接種とワクチン接種後症状の発現との時間的経緯を明らかにする。

【方法】2013年6月から2016年12月に当施設を受診した HPV ワクチン接種後副反応疑いの163名の女児を対象に、その症状と客観的な検査所見を検索し、ワクチン接種とワクチン接種後症状の発現との時間的経緯を検討した。本研究では、HPV ワクチン接種後に副反応があった患者を正確に捉えるために、新たな診断基準を作成した。診断基準は、前提条件 (HPV ワクチン接種歴がある、接種前には異常がなく接種後に臨床症状が出現している)、主要症状10項目 (長期にわたる全身倦怠感、立位で誘発されるような慢性頭痛、

全身の疼痛、四肢のふるえ、自律神経障害による症状、運動障害、感覚異常、睡眠障害、学習障害、月経異常)、他覚所見6項目 (持続性の低血圧、シェロング試験による起立性低血圧・体位性頻脈症候群、皮膚温低下、指尖容積脈波の平坦化、認知機能検査の異常、脳血流シンチによる局所的な血流低下)、除外3項目 (通常の血液検査異常、他疾患で説明可能、30歳以後の HPV ワクチン接種) からなる。前提条件を満たし、除外項目に当てはまらないもののうち、主要症状5項目以上かつ他覚所見3項目以上を満たすと definite、主要症状5項目以上のみを満たすと probable と定義した。

【結果】163名の患者のうち43名が除外となり、残った120名のうち30名を definite、42名を probable と診断した。診断基準を満たした72名の患者の初回ワクチン接種年齢は11~19歳 (平均13.6±1.6歳)、症状を発現した年齢は12~20歳 (平均14.4±1.7歳) であった。これらの患者の初回ワクチン接種時期は2010年5月から2013年4月までであり、最初の副反応発現が2010年10月、最後に副反応が発現したのは2015年10月であっ

た。ワクチン接種から症状発現までの期間は1~1,532日であった。また、2015年10月以後、14カ月以上に渡って新たにこうした特異な症状を発症した患者は発生していない。

【考察・結論】 HPV ワクチン初回接種の時間的分布とワクチン接種後症状発現の時間的分布は、約8カ月のずれを持って類似のパターンを呈していた。また、ワクチン接種勧奨の中止により、新たに症状を発現した患者はみられない。こうした一連の時間経過から判断すると、HPV ワクチン接種が同ワクチン接種後の患者において複合局所疼痛症候群（CRPS）、起立性調節障害、高次脳機能障害を一時的に高頻度で出現させていることと関連していることが示唆される。

（論文審査の結果の要旨）

子宮頸がんワクチンに関しては、2006年に4価のガーダシルと2価のサーバリックスが海外で発売された。2010年に子宮頸がん等ワクチン接種緊急促進事業として本邦に導入され、2013年4月より小学6年生から高校1年生を対象に定期接種が開始となった。その後、本ワクチン接種後に歩行障害、手足の難治性疼痛や震えがなどの症状を訴える女児が出現し、問題となった。2013年6月から厚生労働省は子宮頸がんワクチンの勧奨を中止した。本研究ではHPV ワクチン接種後の臨床症状のスペクトラムを明らかにし、HPV ワクチン接種と接種後の特異な症状の出現との時間的な経緯を明らかにすることを目的とした。

対象は、2013年6月から2016年12月に当院を受診した163名。前提条件3項目、主要症状10項目、他覚所見6項目、除外3項目からなる新たな診断基準を作成した。前提条件を満たし、除外項目に当てはまらない

もののうち、主要症状5項目以上かつ他覚所見3項目以上を満たす患者を definite、主要症状5項目以上のみを満たす患者を probable と定義し、この診断基準を満たした例を検討した。

その結果、尾澤は次の結果を得た。

1. 163名のうち43名が除外項目に当てはまった。残りの120名のうち、48名が診断基準を満たさず、30名が definite、42名が probable と診断した。
2. 診断された72名では初回接種が11歳-19歳に及び平均13.6±1.6歳、症状が発現した年齢は12-20歳で平均14.8±1.7歳であった。初回接種から症状発現までの期間は1-1532日（平均319.7±349.3日）であった。
3. 症状発現の時期は2010年10月から2015年10月で、その後14カ月以上にわたり症状を有する新たな患者は発生していない。
4. HPV ワクチン初回接種の時間的分布とワクチン接種後症状発現の時間的分布は、約8カ月のずれを持って類似のパターンを呈しており、初回接種のピークは2011年7月から2012年9月で、症状発現のピークは2011年9月から2013年8月であった。

これらの結果から、HPV ワクチン接種が同ワクチン接種後の患者において特有の症状を一時的に高頻度で出現させていることと関連していることが示唆される。HPV ワクチン接種後の多様な症状を検討した報告は海外からも複数出されているが、本研究は、163名と多くの症例を検討したものであり、症状や発症時期の傾向を示し、診断基準の作成を試みたものである。

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。

Survival pathway of cholangiocarcinoma via AKT/mTOR signaling to escape RAF/MEK/ERK pathway inhibition by sorafenib (胆管癌におけるソラフェニブによる RAF/MEK/ERK 抑制機序からの AKT/mTOR シグナル伝達を介した細胞死回避機序)

横井 謙太

（論文の内容の要旨）

【背景と目的】 細胞起源を同じくする胆管癌（CCC）と肝細胞癌（HCC）において、HCCのみで臨床効果が認められているソラフェニブの有効性が異なる原因を模索することを目的とした。細胞内シグナル伝達を主体にソラフェニブ投与に伴う変化を検証し、その差異に対する抑制剤投与による増殖抑制効果を測定した。**【材料および方法】** CCC 細胞株、HCC 細胞株をそれ

ぞれ3種類使用し、MTT アッセイによる細胞増殖評価、ウエスタンブロッティング、およびアポトーシス分析を用いて、CCC 細胞株と HCC 細胞株との間のソラフェニブ投与によるシグナル伝達経路特性の差異を調べた。

【結果】 ソラフェニブは、in vitro において CCC、HCC ともに細胞増殖を有意に抑制したが、増殖抑制効果およびその作用点である ERK リン酸化の抑制は

CCCで弱かった。CCCでは、ソラフェニブ投与により AKT S473および mTORC2のリン酸化が有意に増強され、HCCでは AKT S473リン酸化の減弱が認められた。HCC同様の効果を期待して、AKTリン酸化阻害薬 (MK2206) をソラフェニブと併用にて投与し増殖抑制を評価したが、いずれもソラフェニブ単独投与以上の抑制効果を認めなかった。AKT S473を直接リン酸化させる mTORC2複合体の構成成分である Rictor を標的とする siRNA を用いて、mTORC2複合体の抑制を行った。これによる CCC 中の mTORC2複合体の抑制は、CCC (RBE 細胞株) の増殖を抑制したが、その要因の一つとして、AKT S473リン酸化の抑制およびその下流にあたる FOXO1の増加を介したアポトーシスの増強が考えられた。

ソラフェニブ投与における HCC のオートファジー活性化とは対照的に、mTORC1およびオートファジーの活性化は、CCCではソラフェニブの影響を受けなかった。

RBE 細胞株において、siRNA による mTORC2抑制下でソラフェニブおよび mTORC1活性化を抑制するためのエベロリムスを同時投与すると、mTORC1リン酸化の阻害に加えてソラフェニブおよびエベロリムス依存性 AKT Ser473リン酸化の抑制がおり、増殖抑制を増強することがわかった。

【結論】 CCC ではソラフェニブによる RAF/MEK/ERK 経路抑制からの細胞死に対する回避経路として AKT/mTOR 経路が存在すること示され、ソラフェニブ、エベロリムス (mTORC1活性の抑制)、mTORC2活性の抑制 (siRNA) を併用することで細胞死回避機序を抑えることができることを明らかにした。この機序は、CCC 治療に有望な、新しいアプローチにつながる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

細胞起源を同じくする胆管癌 (CCC) と肝細胞癌 (HCC) において、HCCのみで臨床効果が認められているソラフェニブの有効性が異なる原因を模索することを目的とした。細胞内シグナル伝達を主体にソラフェニブ投与に伴う変化を検証し、その差異に対する抑制剤投与による増殖抑制効果を測定した。

CCC 細胞株、HCC 細胞株を用いて、MTT アッセイによる細胞増殖評価、ウエスタンブロッティング、およびアポトーシス分析を行い、CCC と HCC との間のソラフェニブ投与によるシグナル伝達経路特性の差異を調べた。

さらに、種々のシグナル伝達物質阻害薬を用いて、CCC 細胞株の増殖抑制を試みた。

その結果、横井は次の結論を得た。

1. ソラフェニブは、in vitro において ERK リン酸化を抑制することにより、CCC, HCC 共に細胞増殖を有意に抑制したが、HCC と比較して CCC では ERK リン酸化抑制、増殖抑制効果は弱かった。
2. HCC ではソラフェニブ投与により AKT S473リン酸化の抑制が認められたが、CCC では逆に、AKT S473および mTORC2のリン酸化が有意に増強された。mTORC2の構成成分である Rictor を標的とした siRNA で抑制すると、AKT S473リン酸化を抑制し、下流にあたる FOXO1の増加を介したアポトーシスの増強を引き起こすことが示唆された。
3. CCC 細胞株 (RBE) において、siRNA による mTORC2抑制下でソラフェニブとエベロリムス (mTORC1阻害薬) を同時投与することで、ERK のリン酸化抑制、mTORC1リン酸化の阻害に加えてソラフェニブおよびエベロリムス依存性 AKT S473リン酸化の抑制がおり、細胞増殖を有意に抑制した。

これらの結果により、ソラフェニブによる RAF/MEK/ERK 経路抑制からの細胞死に対する回避経路として AKT/mTOR 経路の存在が推測された。さらに、この経路に対し、ソラフェニブ、mTORC2活性の抑制 (siRNA)、mTORC1活性の抑制 (エベロリムス) を併用することで、この細胞死回避機序を抑えることができることが示された。この機序は、CCC 治療に有望な、新しいアプローチにつながる可能性が示唆された。

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

Induction of interleukin-10 in the stable transformants of human T-cell line expressing Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (エプスタイン・バーウイルスのコードする小RNAを安定発現するヒトT細胞株でのインターロイキン10発現誘導)

Junaidi

(論文の内容の要旨)

【Background】 Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous virus in humans and latently infects B cells. In some individuals, however, EBV develops chronic active infection (CAEBV) and causes life-threatening complications due probably to cytokinemia induced by EBV-infected T or natural killer (NK) cells. The *in vitro* infection of human T-cell lines with EBV after the enforced expression of EBV receptor in B-lineage cells, CD21, causes the enhanced production of a macrophage activating cytokine, tumor necrosis factor (TNF) α . However, the responsible EBV gene for the upregulation of TNF α expression in T-lineage cells remains unclear. Profiles of EBV latent gene expression in EBV-infected T and NK cells show variations, and only EBV nuclear antigen-1 and EBV-encoded small non-polyadenylated RNAs (EBERs) are commonly expressed in non-neoplastic infected T and NK cells in CAEBV. EBERs cause interleukin (IL)-10 induction in human B-lineage Burkitt's lymphoma cell lines, however, the role of EBERs in EBV-infected T and NK cells is still unknown.

【Methods】 The plasmid coding EBERs was introduced into human T lymphocyte virus-I-negative human T-cell lines in a site-directed manner by using Flp recombinase-mediated integration kit Flp-In™ System, and stable transformants were established. The alteration of cytokine expression in EBERs-expressing transformants was examined by real-time RT-PCR analyses. The activation of the downstream signaling cascade from dsRNA were examined by Western blot analyses.

【Results】 Among three mother T-cell lines and their transformants, only the transformants of MOLT-14 cells ($\gamma\delta$ T cells) expressed EBERs. EBERs-expressing MOLT-14 cells produced the larger amount of IL-10 than that from the mother cell line. However,

mRNA expression of TNF α , interferon (IFN) γ , and IL-1 β in MOLT-14 cells did not affected by EBERs. The phosphorylation of dsRNA-dependent protein kinase (PKR) and that of I κ B α , which act in the downstream of PKR, increased in EBERs-expressing clones.

【Conclusions】 EBERs did not induce the cytokine with macrophage-activating activities, such as TNF α , IFN γ , and IL-1 β . The $\gamma\delta$ T cell-specific production of IL-10 through EBERs expression, however, might lead to the modification of function of $\gamma\delta$ T cells, and might play a role in human immune diseases.

(論文審査の結果の要旨)

Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous virus in humans and latently infects B cells. In some individuals, however, EBV develops chronic active infection (CAEBV) and causes life-threatening complications due probably to cytokinemia induced by EBV-infected T or natural killer (NK) cells. Profiles of EBV latent gene expression in EBV-infected T and NK cells show variations, and only EBV nuclear antigen-1 and EBV-encoded small non-polyadenylated RNAs (EBERs) are commonly expressed in non-neoplastic infected T and NK cells in CAEBV. Therefore, we investigated the function of EBERs in human T cell lines.

The plasmid coding EBERs was introduced into human T lymphocyte virus-I-negative human T-cell lines in a site-directed manner by using Flp recombinase-mediated integration kit Flp-In™ System, and stable transformants were established. The alteration of cytokine expression in EBERs-expressing transformants was examined by real-time RT-PCR analyses. The activation of the downstream signaling cascade from dsRNA were examined by Western blot analyses. Accordingly, the current study has revealed the function of EBERs in human

T cell lines as follows :

1. The transformants of MOLT-14 cells ($\gamma\delta$ T cells) expressed EBERs, but the transformant of Jurkat and MOLT-4 cells (both $\alpha\beta$ T cells) did not.
2. EBERs-expressing MOLT-14 cells produced the larger amount of interleukin (IL)-10 than that from the mother cell line.
3. The mRNA expression of tumor necrosis factor α , interferon γ , and IL-1 β in MOLT-14 cells was not affected by EBERs.
4. The phosphorylation of dsRNA-dependent pro-

tein kinase (PKR) and that of $I\kappa B\alpha$, which act in the downstream of PKR, increased in EBERs-expressing clones.

In conclusion, EBERs expressed in stable transformants seemed to function in T lineage cells, but, did not induce the cytokine with macrophage-activating activities. The production of IL-10 through EBERs expression, however, might initiate other human immune diseases with unknown etiology.

以上の論文審査の結果、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。

Compartment model analysis of intravenous contrast-enhanced dynamic computed tomography in hepatic hemodynamics: a validation study using intra-arterial contrast-enhanced computed tomography (肝血流動態における静注ダイナミック CT のコンパートメントモデル解析: 動注 CT を用いた検証研究)

小松大祐

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 肝は動脈血流と門脈血流の二重支配からなる特殊な臓器であり、特に動脈血流と門脈血流の評価は肝細胞癌の悪性度診断などにおいて重要である。しかしながら、動脈血流と門脈血流の分離独立した評価は、日常臨床で一般的に施行されている経静脈的造影剤投与による造影 CT (静注 CT) では困難である。一方、経動脈的造影剤投与による造影 CT (動注 CT) が肝血流動態評価の至適基準とされてきたが侵襲的であるという問題点がある。肝パーフュージョン解析は造影剤の動態をモデル化し、通常の静注 CT よりも多時相撮影を行う静注ダイナミック CT を用いて動脈血流と門脈血流を定量化する手法であり動注 CT と比べて低侵襲という利点がある。しかしながら、これまでに動注 CT を用いた肝パーフュージョン解析の検証研究は行われていない。今回、我々は、静注ダイナミック CT の 2-in-1-out コンパートメントモデル解析 (CMA) により算出された肝パーフュージョンパラメータを用いて肝動脈血流と門脈血流を分離独立して評価可能か、動注 CT を比較対象として検証を行った。**【対象と方法】** 静注ダイナミック CT が施行され、放射線学的もしくは組織学的に診断された肝悪性病変患者 49 例 (古典的肝細胞癌 51 例, 早期肝細胞癌 4 例, 細胆管細胞癌 3 例, 混合型肝癌 1 例, 胆管細胞癌 3 例) を対象とした。肝動脈造影下 CT (CTHA) および経

動脈性門脈造影下 CT (CTAP) における肝病変および周囲肝の正規化 CT 値 (nCTHA, nCTAP) を求め、肝動脈血流と門脈血流の至適基準とした。静注ダイナミック CT を用いた CMA を行い、肝病変および周囲肝の肝動脈、門脈血流の流入速度定数 (k_{1a} , k_{1p}) と流出速度定数 (k_2) を非線形最小二乗法により算出した。パラメータの算出に際しては k_2 の上限値を変化させ、nCTHA, nCTAP と k_{1a} , k_{1p} の相関に対する影響を統計学的に評価した。

【結果】 k_{1a} と nCTHA との間の最も高い相関 ($r=0.65$, $P<0.0001$) は k_2 の上限値を 0.035 s^{-1} とした場合に、 k_{1p} と nCTAP との間の最も高い相関 ($r=0.69$, $P<0.0001$) は k_2 の上限値を 0.045 s^{-1} とした場合に認められた。 k_2 の上限値を 0.03 s^{-1} 以下もしくは 0.07 s^{-1} 以上とした場合、nCTHA, nCTAP と k_{1a} , k_{1p} の相関係数は最も高い相関が得られた時と比較して有意に低下した。

【結論】 肝動脈血流と門脈血流は、適切な k_2 を定め、IV-CT の CMA を行うことにより、ある程度は定量評価が可能であり、パラメータの算出に際しては適切な k_2 の上限値設定が重要である。

(論文審査の結果の要旨)

肝は動脈血流と門脈血流の二重支配からなる特殊な臓器であるが、動脈血流と門脈血流の分離独立した評価は、経静脈的造影剤投与による造影 CT (静注 CT)

では困難である。一方、経動脈的造影剤投与による造影 CT (動注 CT) が肝血流動態評価の至適基準とされてきたが侵襲的であるという問題点がある。肝パーフュージョン解析は多時相静注ダイナミック CT を用いて動脈血流と門脈血流を定量化する手法であり動注 CT と比べて低侵襲という利点がある。しかしながら、これまでに動注 CT を用いた肝パーフュージョン解析の検証研究は行われていない。今回、小松大祐は、静注 CT の 2-in-1-out コンパートメントモデル解析 (CMA) により算出された肝パーフュージョンパラメータを用いて肝動脈血流と門脈血流を分離独立して評価可能か、動注 CT を比較対象として検証を行った。

静注ダイナミック CT が施行され放射線学的もしくは組織学的に証明された肝悪性病変患者 49 例、62 病変を対象とした。肝動脈造影下 CT (CTHA) および経動脈性門脈造影下 CT (CTAP) における肝病変および周囲肝の正規化 CT 値 (nCTHA, nCTAP) を求め、肝動脈血流と門脈血流の至適基準とした。静注 CT を用いた CMA を行い、肝病変および周囲肝の肝動脈、

門脈血流の流入速度定数 (k_{1a} , k_{1p}) と流出速度定数 (k_2) を算出した。パラメータの算出に際しては k_2 の上限値を変化させ、nCTHA, nCTAP と k_{1a} , k_{1p} の相関に対する影響を統計学的に評価した。

その結果、小松は次の結論を得た。

1. k_2 の上限値が 0.035 s^{-1} の場合、 k_{1a} と nCTHA に最も高い相関 ($r=0.65$, $P<0.0001$) が見られた。
2. k_2 の上限値が 0.045 s^{-1} の場合、 k_{1p} と nCTAP に最も高い相関 ($r=0.69$, $P<0.0001$) が見られた。
3. k_2 の上限値が 0.03 s^{-1} 以下もしくは 0.07 s^{-1} 以上の場合、nCTHA, nCTAP と k_{1a} , k_{1p} の相関係数は最も高い相関が得られた時と比較して有意に低下した。

これらの結果より、静注ダイナミック CT を用いた CMA により肝動脈血流と門脈血流をある程度定量評価可能であり、パラメータの算出に際しては適切な k_2 の上限設定が重要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。

A novel genetic and morphologic phenotype of *ARID2*-mediated myelodysplasia (*ARID2* 異常を伴う骨髓異形成症候群の新規病型の解析)

酒 井 均

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 骨髓異形成症候群 (MDS) は不均一な疾患群であり、その背景には多数の遺伝子異常とその組み合わせの多様性が知られ、これらによって形態的变化、臨床像、二次性白血病への進行速度が規定される。次世代シーケンスと SNP-A により、体細胞変異の全体像の把握が進み、病理像を形成するそれぞれの変異の役割が解明されてきた。*ARID2* 遺伝子は 12 番染色体 q12 に存在し、その蛋白は SWI/SNF 複合体の一部を形成し、クロマチンリモデリングに関与している。SWI/SNF に関連する遺伝子のうち、*ARID2* の変異又は欠失は様々な固形腫瘍で検出されている。これらの報告は *ARID2* が様々な腫瘍で癌抑制遺伝子として機能していることを示唆している。血液腫瘍では SWI/SNF-A と SWI/SNF-B の主要構成分子である *BRG1* は急性骨髄性白血病に必須の役割を担っていることが報告されている。加えて、SWI/SNF-A を構成している *ARID1A* と *ARID1B* の変異が急性前骨髄球性白血病で報告されており、*ARID1B* の欠失が分化を阻害していることを示している。今回、骨髓系腫

瘍での *ARID2* 遺伝子異常の役割について検討した。

【対象および方法】 対象は骨髓系腫瘍患者 1,473 例 (MDS 455 例、骨髓異形成/骨髓増殖性腫瘍 201 例、骨髓増殖性腫瘍 56 例、二次性急性骨髄性白血病 221 例、急性骨髄性白血病 540 例) で骨髓液又は末梢血のサンプルを用いた。生殖細胞系列の細胞として CD3 陽性細胞を免疫学的に抽出してコントロールとした。1473 例中、1080 例に対して SNP-A を用いて染色体の構造異常を検出した。残りの 393 例については全エクソンシーケンスを行い、コントロールとの比較を行って体細胞変異の同定を行った。変異の確認のため *ARID2* 領域のサンガーシーケンスを行った。また、変異アリの頻度の確認のため、*ARID2* 領域のアンプリコンディープシーケンスを行った。*ARID2* の発現解析のため定量 RT-PCR を行った。

【結果】 全エクソンシーケンスの結果から、*ARID2* 変異は 6 症例 (MDS 2 例、骨髓異形成/骨髓増殖性腫瘍 1 例、骨髓増殖性腫瘍 1 例、急性骨髄性白血病 2 例) に認められた。6 例中 5 例 (83%) はナンセンス変異又はフレームシフト変異であり、*ARID2* の機

能喪失が腫瘍形成に寄与していることを示唆していた。アンブリコンシーケンスと SNP-A による分析によると、全てヘテロ接合であった。腫瘍細胞中の *ARID2* のアレル頻度は高く (27-48 %, median = 43 %), このことは *ARID2* 変異が比較的初期の変異であることを示している。SNP-A による *ARID2* 部位の核型分析を行ったところ、8 例に *ARID2* の遺伝子座の欠失が検出された (MDS 5 例, 二次性急性骨髄性白血病 1 例, 急性骨髄性白血病 2 例)。一方でこの領域の増幅は 1 例も検出されなかった。定量 RT-PCR による *ARID2* の発現解析では *ARID2* 欠失を持つと *ARID2* 発現量が低いことが示され、ハプロ不全を示唆していると考えられた。全例を合わせると *ARID2* 異常は 1 % 未満であった (1,473 例中 14 例)。併存する遺伝子異常として頻度が最も高いものは、ヒストン修飾に関連する *EZH2* と *JARID2* であった (43 %)。

ARID2 異常を持つ 5 例について、ほとんどの場合、*ARID2* 異常のクローンサイズは併存する遺伝子異常のクローンサイズより大きかった。MDS 症例と wild type において Oncomine のデータを用いて発現を比較したところ、*ARID2* の発現は MDS で有意に低下していた ($P=0.02$)。さらに、*ARID2* 変異又は欠失を持つ 8 症例について形態学的な検討をおこなった。4 例ずつが顆粒球系と赤芽球系の異形成を示していたが、巨核球の異形成は 8 例すべてに認められ、うち 7 例は hypolobation (低分葉化) を示していた。*ARID2* 異常を持たない MDS 311 例では 41.9 % に顆粒球系の、65.0 % に赤芽球系の異形成を示し、巨核球の異形成は 51.5 % に認めた。巨核球の異形成の発生頻度は、*ARID2* 異常を持つ場合と持たない場合で有意差を認めた ($P=0.0078$)。これらのことから *ARID2* 異常は巨核球系の異形成と関連があることが示唆された。

【考察】クローンサイズの違いからは、*ARID2* の異常はしばしば骨髄異形成の初期の段階で獲得されると考えられた。*ARID2* 欠失は巨核球の低分葉化という表現型を示すと考えられた。遺伝的な欠損に加えてエピジェネティックに *ARID2* 欠損があってもこれら形態異常が起きる可能性がある。*ARID2* は SWI/SNF-B のサブユニットをコードしており、クロマチンリモデリングを行って、ヒストン修飾酵素とともに、細胞の分化に関連する遺伝子の発現を調節している。ヒストン修飾や DNA リモデリングの様々なパターンでの遺伝子発現のプロファイルを確認することで、どの遺伝

子がターゲットになって、MDS 形成に相乗的に関与しているかを解明することができるかもしれない。

【結論】MDS の原因遺伝子として新たに *ARID2* を同定した。*ARID2* の機能低下が形態異常にも関与していることを示した。

(論文審査の結果の要旨)

骨髄異形成症候群 (MDS) は主に後天的な体細胞遺伝子変異や染色体異常の蓄積を原因とする疾患で、臨床的には血球減少と将来的な急性骨髄性白血病への進行を特徴とする。MDS は不均一な疾患群であるが、その背景には多数の遺伝子異常とその組み合わせの多様性が知られている。*ARID2* 遺伝子は 12 番染色体 q12 に存在し、その蛋白はクロマチンリモデリング複合体の一種である SWI/SNF 複合体の一部を形成しており、これまで *ARID2* の変異又は欠失は様々な固形腫瘍で報告されている。今回、MDS に加えて、MDS とその他の骨髄系腫瘍 (骨髄異形成/骨髄増殖性腫瘍、骨髄増殖性腫瘍、二次性急性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病) を含む対象患者について、*ARID2* 遺伝子異常の有無と頻度、MDS 形成に及ぼす役割について検討した。

対象は骨髄系腫瘍患者 1473 例で骨髄液又は末梢血のサンプルを用いた。393 例については全エクソンシーケンスを行い、体細胞変異の同定を行った。残りの 1080 例に対して SNP-A を用いて染色体の構造異常を検出した。また、*ARID2* 領域のサンガーシーケンス、ターゲットリシーケンスを行った。*ARID2* の発現解析のため定量 RT-PCR を行った。

その結果、酒井均は次の結論を得た。

1. 全エクソンシーケンスで認めた *ARID2* 変異 6 例のうち 5 例はナンセンス変異又はフレームシフト変異であり、6 例全てヘテロ接合であった。
2. SNP-A で 8 例に *ARID2* の遺伝子座の欠失が検出されたが、この領域の増幅は一例も検出されなかった。
3. 全例を合わせると *ARID2* 異常は 1 % 未満であった (1473 例中 14 例)。
4. 腫瘍細胞中の *ARID2* のアレル頻度は高く (27-48 %, median = 43 %), ほとんどの場合、*ARID2* 異常のクローンサイズは併存する遺伝子異常のクローンサイズより大きく、*ARID2* 異常は先祖型変異を示していた。
5. 定量 RT-PCR による *ARID2* の発現解析では *ARID2* 欠失を持つと *ARID2* 発現量が低いことが示

された。

6. *ARID2*変異又は欠失を持つ8症例について、巨核球の異形成が8例すべてに認められ、うち7例は核の低分葉化を示していた。一方で*ARID2*異常を持たないMDS311例では巨核球の異形成は51.5%に認めた。巨核球の異形成の発生頻度は、*ARID2*

異常を持つ場合と持たない場合で有意差を認めた ($P=0.0078$)。

これらの結果より、新たに、*ARID2*の機能低下がMDS発症の原因の一つとなり得ることを指摘した。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。

Fascin1 suppresses RIG-I-like receptor signaling and interferon- β production by associating with I κ B kinase ϵ (IKK ϵ) in colon cancer (RIG-I 経路を介した fascin1による IFN- β 抑制制御)

松 村 富 穂

(論文の内容の要旨)

fascin1は癌細胞の遊走や浸潤に関与するアクチン束化タンパク質である。fascin1の発現はがん患者の予後や生存と相関しており、fascin1の阻害により転移が抑制されるという報告もあるため、癌治療の標的分子として期待されている。一方、最近 fascin1がウイルス依存性免疫細胞応答においても役割を果たすことが報告された。アクチン細胞骨格の再編成によりRIG-Iの局在が変化し、IFN- β の産生を誘導するという報告が癌細胞でなされていることと合わせて、ウイルス依存性のRIG-Iシグナル伝達に対するfascin1の役割をヒト結腸癌細胞株DLD-1細胞で検討した。

DLD-1細胞にレトロウイルスで形質導入されたshRNAを用いてfascin1の発現を欠損させ、ウイルス感染を擬する二重鎖RNA、即ちpoly(I:C)が惹起する反応に関し、細胞遊走・浸潤アッセイ、real-time PCR、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、ルシフェラーゼアッセイ及び共免疫沈降法を用いて対照細胞との間で比較検討を行った。

まず、fascin1欠損の影響は細胞増殖には見られなかったが、欠損による糸状仮足の形成の抑制、細胞遊走及び浸潤能の低下が認められた。

次にウイルスRNA感染実験として2つの受容体、TLR3とRIG-I様受容体に焦点を当てた。Poly(I:C)の細胞外投与ではIFN- β mRNAの産生にfascin1の有無による差が無かったことから、TLR3経路にはfascin1の関与が無いことが示唆された。一方、poly(I:C)を細胞内に導入すると、fascin1欠損DLD-1細胞ではRIG-1、MDA5、IFN- β 、IP-10、IRF-7の誘導が有意に増強された。また、fascin1欠損細胞にfascin1を再発現させるレスキュー実験を行ったところ、IFN- β の増強が打ち消されたことから、fascin1

はRIG-Iシグナル経路におけるIFN- β の産生を制御していることが示唆された。

そこで、IFN- β の転写因子として知られるNF- κ BとIRF-3に注目したところ、NF- κ Bに関してはfascin1の関与は見られなかったものの、IRF-3においては、リン酸化及び二量体化の亢進がfascin1欠損細胞で認められた。

以上のことから、poly(I:C)導入におけるfascin1の標的分子は、受容体であるRIG-Iから転写因子であるIRF-3の間にあると考え、ヒト胎児腎細胞株であるHEK293T細胞を用いて標的分子の探索を行った。ルシフェラーゼアッセイにて、fascin1との共発現によりRIG-I経路の下流に存在する5個の分子のIFN- β 転写活性を調べたところ、濃度依存的に活性が抑制されたRIG-I、IPS-1、TBK-1及びIKK ϵ に対し、IRF-3では抑制が認められなかった。そこで、fascin1の標的分子はTBK-1、IKK ϵ またはIRF-3の中にあると考え、更に共免疫沈降を行った所、fascin1はIKK ϵ と会合することが明らかとなった。IKK ϵ の会合ドメインはキナーゼドメインであった。

次に、RIG-Iシグナル伝達に対するfascin1欠損の抗癌作用を調べた。細胞増殖に関しては、fascin1の欠損のみでは変化が起こらなかったが、poly(I:C)導入によりfascin1欠損DLD-1細胞での顕著な抑制が生じ、これは細胞死の増大と一致していた。細胞遊走および浸潤は、fascin1欠損のみによっても抑制されたが、poly(I:C)導入によってより強い抑制が引き起こされた。siRNAを用いてRIG-Iを欠損させると、poly(I:C)導入による細胞遊走及び浸潤能の低下は認められなくなった。これらの結果は、fascin1とIKK ϵ との会合が、RIG-Iシグナル伝達を介した癌細胞の増殖、遊走及び浸潤を亢進することを示唆してい

る。

最後に、IFN- β はオートクラインまたはパラクラインによりIFN- β 自身の産生を制御していることが知られていることから、IFN- β シグナル経路におけるfascin1の関与をDLD-1細胞で検討した。IFN- β 刺激に対し、STAT1のTyr-701ではなく、Ser-727のリン酸化がfascin1欠損細胞で顕著に増強されたが、STAT1に対するfascin1/IKK ϵ 会合の役割解明には更なる研究が必要となる。

以上の結果から、fascin1は細胞遊走や浸潤の制御のみならずRIG-Iシグナル経路の下流にあるIKK ϵ と相互作用をすることでIFN- β の産生を抑制していることが明らかとなりfascin1の免疫制御システムへの関与が明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

がんの遊走や浸潤に関与するアクチン束化タンパク質であるfascin1の発現はがん患者の予後や生存と関連しており、がん治療の標的分子として期待されている。一方でfascin1がウイルス感染においても重要な役割を果たすことが報告された。アクチン細胞骨格の再編成によりウイルスセンサーであるRIG-Iの局在が変化し、IFN- β の産生を誘導するという報告ががん細胞にてなされていることと合わせ、ウイルスセンサーであるRIG-Iシグナル伝達に対するfascin1の役割をヒト結腸癌細胞株DLD-1にて検討した。

DLD-1細胞にレトロウイルスで形質導入されたshRNAを用いてfascin1の発現を欠損させウイルス感染を擬する二重鎖RNA、即ちpoly(I:C)が惹起する反応に関し、細胞遊走・浸潤アッセイ、Real-time PCR、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、ルシフェラーゼアッセイ及び共免疫沈降法を用いて対照細胞との間で比較検討を行った。

その結果、次の結論を得た。

1. fascin1を欠損したDLD-1細胞は対照細胞と比較して細胞遊走・浸潤能が有意に低下した。
2. fascin1を欠損したDLD-1細胞は対照細胞と比較して細胞内poly(I:C)投与によるIFN- β 、IP-10、RIG-I、MDA-5、IRF-7のmRNA発現増強が認められた。
3. fascin1を欠損したDLD-1細胞は対照細胞と比較してIRF-3のリン酸化及び二量体化の亢進が認められた。
4. HEK293T過剰発現系を用いたルシフェラーゼアッセイ及び共免疫沈降によりfascin1はIKK ϵ のキナーゼドメインと結合が認められ、その相互作用はRIG-Iシグナル依存的に結合した。
5. fascin1の欠損のみでは対照細胞と増殖に差は認められないが、poly(I:C)の細胞内導入により細胞増殖の顕著な抑制が生じ、これは細胞死の増大と一致していた。細胞遊走・浸潤においては、fascin1の欠損のみによっても抑制されたが、poly(I:C)によってより強い抑制が引き起こされた。
6. IFN- β 刺激によるIFNシグナルにおいて、STAT1のTyr-701のリン酸化はfascin1欠損細胞と対照細胞で差が認められなかったが、Ser-727のリン酸化の亢進がfascin1欠損細胞で増強された。しかしながら、IFNシグナルにおけるfascin1の役割については更なる研究が必要である。

これらの結果より、fascin1は細胞遊走や浸潤の制御のみならずRIG-Iシグナル経路の下流にあるIKK ϵ と相互作用をすることでIFN- β の産生を抑制していることが明らかとなりfascin1の免疫制御システムへの関与が明らかとなった。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値のあるものと認めた。

Enhancement of motor skill learning by a combination of ideal model-observation and self-observation (理想的なモデルの動きと自身の動きの同時観察に基づく動作練習による巧緻的運動学習の効果)

西澤 公美

(論文の内容の要旨)

【目的】 スポーツ理学療法の分野では、患者の動きを適切な動きに修正するために、モデルとなる動き、又は患者自身の動きを録画したビデオを用いた観察学習が行われており、それぞれの効果が報告されている。一方、患者自身が能動的にモデルの動きと自身の動きの差分を検出し、効率よく動きを修正するためには、モデルの動きと患者自身の動きの両方を同時に観察する方法が有効と考えられるが、十分に検証されていないのが現状である。そこで本研究の目的は、能動的誤差検出を強化すると考えられる、“モデルと自身の動きの両方を同時に観察する”という練習方法が、モデルだけの観察や自身の動きだけの観察での練習方法と比べて、巧緻的な運動課題の学習過程にどのような影響を及ぼすかについて検討することとした。

【対象と方法】 対象はゴルフ未経験である45名の健康女性とし、それぞれ Model-observation 群 (MO 群)、Self-observation 群 (SO 群)、Model and self-observation 群 (MSO 群) の3群にランダムに15名ずつ割り付けた。モデルはレッスンプロのビデオ映像とした。運動課題は、樹脂製のゴルフクラブを使用した30秒間の連続したハーフスイングとした。被験者は、介入直前に pre test を受けたあと、それぞれの方法でのハーフスイングの動作練習を計5日間実施し、5日目の練習直後に immediate retention test、1週間後に delayed retention test を行った。観察学習の効果を測る指標は、ハーフスイング動作中の被験者の両肩峰を結んだ線と、右橈骨茎状突起から両肩峰の midpoint へ引いた線とで作られた角度 α とし、3次元動作解析装置で解析した。角度 α は、ゴルフスイングの基本の1つであるボディーターンが習得されたかどうかを表す指標であり、モデルも90度に近い値を示したことから、運動学習効果を示す指標として解析した。

【結果】 immediate retention test では3群間に有意差が認められ、事後検定では MSO 群が SO 群に比べて有意に角度 α が90度に近い値を示した。他の比較では、有意な群間差が認められなかった。

【考察】 immediate retention test において MSO 群と

SO 群との間に有意差が認められたことから、MSO 群は SO 群より効果的にボディーターンのスキルを習得した可能性が示唆された。この結果は、比較的難易度の高い運動課題を学習する際には、モデルの動きと自身の動きの両方を同時に見比べながら練習する方法が、短期的な運動学習効果を促進する可能性があることを示唆しているものと考えられた。しかし1週間後の delayed retention test までは効果が持続されなかったことや、群内比較において有意な改善が認められなかったことから、課題特異性や練習期間が短かったことなどが研究の限界として考えられた。今後は、スポーツ理学療法にて患者の動きをより適切に修正するための観察方法を検証するために、介入期間を長くするなどの改善を加えた研究が必要と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は運動学習における、model-observation と self-observation、および model and self-observation という観察学習方法を用いた時の運動学習効果の違いを明らかにすることを目的としている。これはスポーツにおける技術力向上や患者の治療における日常生活活動能力などの改善に深く関与している運動学習に関する研究である。

運動学習場面では、正しいモデルを見せたほうが良いのか、学習者の間違っている動作を見せたほうが良いのか、あるいは正しいモデルと間違えた学習者の動作を直接比較するように観察させたほうが良いのか、いまだ明らかにはなっていない。

本研究では、この違いに着目し、ゴルフスイング動作を用いて3種類の学習方法の影響を検討したものである。結果としては、直後効果はすべての学習法に認められ、さらに、model and self-observation 群と self-observation 群に有意差がみられた。このことは、model and self-observation の方法の有用性を示唆している。一方、self-observation 群の学習効果が有意に低かったことから、初期学習においては正しいモデルは必要になるかもしれないことが示唆された。今後は言語フィードバックの効果との違いなど、複数のフィードバック方法の相乗効果などを明らかにする発

展性が考えられる。

この研究において、研究計画十分に準備されており、また、倫理に対する配慮も十分されていた。さらに、得られたデータの処理および統計学的手法には問題が無かった。結果の解釈においても論理性が十分にあり問題がなかった。

今後、臨床応用が考えられる価値のある研究であり、

博士論文に値すると考えられる。

以上のことから、本論文は博士論文としての十分な内容と非常に高いレベルの成果を示しており、優秀であると評価できる。

以上のように、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 maximal isometric knee extension strength measurements obtained via belt-stabilized hand-held dynamometry in healthy adults (健常成人におけるベルト固定ハンドヘルドダイナモメータによる最大等尺性膝伸展筋力測定の妥当性)

牛山直子

(論文の内容の要旨)

【はじめに】 下肢筋力は起立や歩行速度、階段昇降などの移動能力と関連しており、日常生活動作能力や死亡率の予測因子であることが報告され、いくつかの研究では日常生活活動や動作の遂行の判別値に膝伸展筋力を用いている。臨床においては主観的な評価である徒手筋力テストが行われることが多いが、判別値を利用するには客観的な測定が必要である。客観的な筋力測定機器にはトルクマシンや徒手保持型測定器(HHD)などがある。筋力測定のゴールドスタンダードはトルクマシンであるが、臨床においては利便的なHHDがよく使用される。HHD測定の方法はまだ定まったものがない。検者がHHDを手で把持し被験者の体は固定せずに行う方法が最も簡易的である。しかし、この方法は検者の力の影響を受けるためHHDをベルトで固定した支柱に締結する方法(BSHHD)が提案されたが、BSHHDにおいても被験者の体の固定方法は定まっていない。我々は被験者の体を十分に固定しない方法では最大筋力が測定できないと仮説をたてた。この研究の目的は、健常成人におけるBSHHDを使用した最大等尺性膝伸展筋力測定の妥当性を、被験者の体を固定した場合と固定しない場合の2条件で明らかにすることである。

【方法】 対象は信州大学在籍学生で膝関節障害の既往のある者、循環器症状、神経筋疾患、筋骨格系疾患、その他系統的な疾患をもつ者、筋収縮によって痛みを感じた者は除外した。測定日前に測定方法の説明と最大収縮の練習を1回行った。測定日には各測定前に3回の最大下収縮を行った。測定は右側の最大等尺性膝伸展筋力を、3条件(①被験者の体を固定したBSHHD測定(BSHHD固定あり)、②被験者の体を固定しな

いBSHHD測定(BSHHD固定なし)、③ゴールドスタンダードであるトルクマシン測定(GS))を行った。全ての測定は1名の検者が行った。測定姿勢は全ての条件で「座位：股関節・膝関節90度屈曲位」とした。BSHHD測定にはMobie(酒井医療社製)を2本のベルトの間に挟み張力計のモードで使用した。1本のベルトを被験者の下腿遠位に、もう1本のベルトは後方の支柱に締結し、ベルトが床と水平になるように設定した。膝関節中心からベルト中心までの距離を測定しトルクを求める際のレバー長とした。BSHHD固定ありの測定時は、被験者は椅子に座り下部体幹、骨盤、大腿をベルトで椅子に固定、上肢は椅子側方レバーを握った。BSHHD固定なしの測定時は、被験者は台の端に座り上肢は台に置いた。GS測定にはBiodex4.0(Shirley社製)を使用した。被験者は椅子に座り上部体幹、骨盤、測定側大腿をベルトで固定、上肢は椅子側方レバーを握った。各条件で5秒間の最大収縮を60秒の休憩をはさんで2回実施した。3条件の順番はランダムに行い、条件間の休憩は10分とした。データは2回測定の最大値を使用し、トルク体重比(Nm/kg)を算出した。統計はSPSSを使用しBSHHD固定ありとGS、BSHHD固定なしとGSの間で相関分析とBland-Altman分析を行った($p < 0.05$)。

【結果】 対象者は29人(男20人、女9人)であった。年齢は 21.3 ± 2.3 歳、身長 169.7 ± 7.5 cm、体重 62.1 ± 12.2 kg、BMI 21.6 ± 4.2 kg/m²であった。BSHHD固定ありとGSの間には有意な相関($\rho = 0.55$)が認められた。BSHHDが平均で 0.32 (95%CI: $0.09-0.55$) Nm/kg 低く測定される固定誤差のみがみられた。一方で、BSHHD固定なしとGSの間には有意な相関は認められず、トルク体重比が高い程GSの測定

値が高くなる比例誤差が認められた。

【考察】この研究では2条件のBSHHDとGSで得られる最大等尺性膝伸展筋力を比較した。BSHHD固定ありとGSの比較の結果、固定誤差はあるが有意な相関が認められた。BSHHDの測定値が低くなった理由としてレバー長と固定方法の影響の2つが考えられる。まずトルクに換算する際に使用したレバー長については、レバー長の遠位端を下腿ベルト中央としたがベルト遠位端まではさらに3.5 cmの幅があるため変動要因となると思われる。次に被験者の体幹の固定方法が、GSの上部体幹の固定に比べBSHHDの下部体幹の固定では不十分であったと思われる。今回の結果では、固定誤差がみられたがBSHHDの測定値はGSの測定値を反映していたため、被験者を椅子に固定したBSHHD測定法は妥当であると考えられる。次にBSHHD固定なしとGSの比較の結果、比例誤差がみられ相関もなかった。BSHHDで測定した最高値は2.52 Nm/kgでGSの中央値2.64 Nm/kgより低い値であった。被験者を固定しない場合に測定値が低くなるという結果は先行研究と同様であった。ゆえに、健常成人においては被験者を固定しないBSHHD測定法では最大筋力が測定できないことがわかった。したがって、BSHHDで健常成人の最大等尺性膝伸展筋力を測定する場合は、被験者の体を固定する必要がある、この方法はゴールドスタンダードに変わる方法として有用である。

(論文審査の結果の要旨)

2017年11月28日、午後3時30分から論文審査会を実施した。最初に牛山がパワーポイントを用いて研究論文の内容発表を行った(約30分間)。聴講者は大学院生1名(博士後期課程)だった。その後、主査が司会を務めて審査担当者からそれぞれ質疑応答を行い、午後5時過ぎに終了した。質疑内容は第8号報告書に記すとおりである。

Driving Simulation Test for Evaluating Hazard Perception: Elderly Driver Response Characteristics (危機認知を評価する模擬運転テスト: 高齢ドライバーの応答特性)

高橋理沙

(論文の内容の要旨)

【目的】近年、高齢者の自動車運転事故が増加しており事故防止に向けた対策が求められている。自動車運転認知行動評価装置(特許第5366248号)はドライバーの危険認知をPalmar sweating response (PSR)と

本論文の研究はリハビリテーション医療のなかで理学療法士が患者の膝伸展筋力を測定する方法を検証したものである。これまで徒手保持型測定器(HHD)を用いた膝伸展最大筋力値を計測する方法の妥当性を明らかにしたものはなかった。統計解析はブランドアルトマン分析を用い、比例誤差、固定誤差を示した。体幹を固定したHHD測定値と外的基準となるトルクマシン測定値と相関を認めた。また固定誤差のみ認めた。体幹固定なしHHD測定値とトルクマシン測定値と相関を認めず、比例誤差を示した。この結果から体幹と腰部を固定することが最大値を測定可能となる唯一の手段であるとしており、固定なしでは誤差の少ない真値を測定し得ないことが示唆されていた。HHDを使用する場合、正確に最大値を計測する唯一の方法が明らかになったわけで、理学療法領域の計測に関する研究として重要な報告と考えられる。

対象が健康な若年者で得られた結果なので、今後、本方法を用いて異なる年齢層や患者の検討が望まれる。また、セラピストが膝伸展筋力を想定する上で尤も妥当な方法として臨床および教育現場での普及も課題といえる。

討論では、担当者からの質問に対して論理的に説明を行い、回答内容も明解であった。

論文内容から派生した、今後の研究活動に対する質問に対しては、臨床業務と平行し行っている研究を説明し、研究の継続性を伺えるものであった。論文審査において、研究内容の妥当性(研究テーマの社会的必要性、デザイン、測定項目の再現性、倫理的配慮、統計解析の適切性、研究結果の学術的新規性)、プレゼンテーションスキル、質疑応答や討論の適切性を評価した。すべての審査項目が合格水準以上であり、いずれも研究者として必要な能力が養われていることが確認できた。以上から主査、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。

Skin potential reflex (SPR)によって評価するもので、模擬運転テストでは運転映像を被験者に提示し、模擬操作によって生じるPSRとSPR、ハンドル、アクセル、ブレーキの操作反応を同時記録する。研究の目的は、特徴の異なる危険場面を抽出し、高齢ドライ

バーの PSR, SPR, ブレーキ反応を比較検討することである。

【対象と方法】60歳以上のドライバー52名を対象に模擬運転テストを実施し、Mini-Mental State Examination (MMSE), Trail Making Test (TMT) を測定した。A：前方からランナーが走ってくる, B：対向車が接近する, C：自動車を追い越す場面を危険予測場面 (Anticipation), D：ボール飛び出しと, E：歩行者飛び出しの各場面を驚く場面 (Surprise), F：市街地の交差点右折を複雑な場面 (Complexity) とし、PSR, SPR, ブレーキの応答を比較した。また、MMSE によって認知機能の低下がみられた被験者の反応を抽出した。

【結果】PSR は A, B, C, F で多い傾向を認めた (ANOVA, $p < .04$)。SPR (陰性波) は F で最も大きかったが A-F の比較では有意差は認めなかった。ブレーキ応答は A と D で大きく A-F の比較で有意差がみられた (ANOVA, $p < .01$)。SPR の応答潜時は D で最も短く, F, E, C, B, A の順であった (ANOVA, $p < .04$)。ブレーキの応答も D で最も速く, A, E, F, B, C の順であった (ANOVA, $p < .001$)。MMSE が満点の被験者では危険予測場面や咄嗟に危険を回避する場面で SPR の陰性波と PSR が増加し、同時に Brake の踏み込みがみられたが、認知機能の低下を認めた2名の被験者では危険な場面と一致しない PSR と SPR, およびデバイスの誤操作が認められた。

【考察】Anticipation と Complexity に分類された A, B, C, F では PSR の反応量が多い傾向が示され、構えや情動変化など、被験者が危険を予測したことによる反応と思われる。Surprise に分類された D と E では、Anticipation に分類された場面より SPR とブレーキの応答潜時が短く、驚きと咄嗟のブレーキ踏み込みを表す反応と思われる。A と D を除く危険場面での応答は SPR がブレーキより速く、この発見は SPR が危険認知のタイミングを評価するのに適した指標であることを示唆する。また、ブレーキの応答潜時は場面による差が大きく、D のように咄嗟に (反射的に) ブレーキを踏む場面以外では、危険を認知したかどうかの判断は難しい。認知機能の低下を認めた2名の被験者では、危険場面と一致しない PSR, SPR, デバイスの誤操作がみられたが、認知機能の低下が危険認知と模擬運転テストに及ぼす影響については更なる検討が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

高橋は高齢者の動車運転事故が増加しており事故防止に向けた対策が求められていることに注目し、高齢者ドライバーの危険運転認知能力について、自動車運転認知行動評価装置 (特許第5366248号) を用いて評価した。自動車運転認知行動評価装置は運転映像を被験者に提示し、模擬運転テストを行い、Palmar sweating response (PSR), Skin potential reflex (SPR), ハンドル, アクセル, ブレーキの操作反応を同時記録することができる装置である。

対象は60歳以上のドライバー52名であり、模擬運転テストを実施時に運転動作と生体反応を計測し、同時に Mini-Mental State Examination (MMSE), Trail Making Test (TMT) を行った。MMSE と TMT は認知障害や注意の持続選択を測る検査である。運転映像は A：前方からランナーが走ってくる, B：対向車が接近する, C：自動車を追い越す場面を危険予測場面 (Anticipation), D：ボール飛び出しと, E：歩行者飛び出しの各場面を驚く場面 (Surprise), F：市街地の交差点右折を複雑な場面 (Complexity) であり、それぞれの場面における高齢者ドライバーの PSR, SPR, ブレーキの応答を計測して比較した。また MMSE によって認知機能の低下がみられた2名の被験者の反応についても検討を行った。

PSR は A, B, C, F で多い傾向を認めた (ANOVA, $p < 0.04$)。Anticipation と Complexity に分類された A, B, C, F では PSR の反応量が多い傾向が示され、構えや情動変化など、被験者が危険を予測したことによる反応と思われる。SPR (陰性波) は F で最も大きかったが A-F の比較では有意差は認めなかった。ブレーキ応答は A と D で大きく A-F の比較で有意差がみられた (ANOVA, $p < 0.01$)。SPR の応答潜時は D で最も短く, F, E, C, B, A の順であった (ANOVA, $p < 0.04$)。ブレーキの応答も D で最も速く, A, E, F, B, C の順であった (ANOVA, $p < 0.001$)。Surprise に分類された D と E では、Anticipation に分類された場面より SPR とブレーキの応答潜時が短く、驚きと咄嗟のブレーキ踏み込みを表す反応と思われる。A と D を除く危険場面での応答は SPR がブレーキより速く、この発見は高齢者ドライバーでは SPR が危険認知のタイミングを評価するのに適した指標であることを示唆する。認知機能の低下を認めた2名の被験者では危険な場面と一致しない PSR と SPR, およびデバイスの誤操作が認められた。

以上より高橋は高齢者ドライバーの運転時の生理学的特徴を科学的に明らかにした。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。

Development of an incremental sit-to-stand exercise for aerobic fitness evaluation (有酸素能力評価のための漸増起立運動負荷試験の開発)

中 村 慶 佑

(論文の内容の要旨)

【背景, 目的】運動療法を行う際, 運動処方や効果判定に自転車エルゴメーター(以下, CE)等による心肺運動負荷試験で有酸素能力を評価することが推奨されるが, 臨床場面において従来の方法では高齢者や運動障害を有する者に実施困難な場合が少なくない。日常動作である起立動作は起立頻度を変えることで比較的容易に運動負荷強度を調整できる。我々は, 先行研究において漸増起立運動負荷試験(以下, ISTS)のプロトコールを作成した。そこで本研究では, 地域在住の健常高齢女性を対象に, ISTSの有酸素能力評価法としての併存妥当性と再現性を検証することを目的とした。

【方法】65歳以上の地域在住の健常高齢女性16名を対象とした(平均年齢70.1±3.2歳)。ISTSと自転車エルゴメーター(CE)の施行順はランダム化した。ISTSの再現性は16名中6名で実施した。反復起立運動は, 座面を立位における床から腓骨頭上縁までの距離の1.2倍の高さとし, 上肢でストックを使用しながら実施した。ISTSは, 6回/分の起立頻度から始まり, 45秒毎に2回/分ずつ漸増し, 最大12分で終了とした。測定項目は, 酸素摂取量(以下, VO₂), 心拍数, 血圧, Borg Scaleとし, 有酸素能力として最高酸素摂取量(以下, peak VO₂)を求めた。両方法のpeak VO₂, 運動実施時間の関係はPearson積率相関係数, 平均値の差は対応のあるt検定を用いて確認した。ISTSの再現性は, 級内相関係数(ICC: 1, 1)(95%信頼区間)にて確認した。

【結果】両方法で運動負荷試験の中止基準に該当する者はいなかった。ISTSとCEのpeak VO₂(ml/min/kg), ISTSの運動実施時間(秒)の平均値±標準偏差は各々19.5±2.5, 20.0±2.9, 608.0±82.9であった。Peak VO₂はISTSとCEで有意な差はみられなかった(p=0.20)。ISTSとCEのpeak VO₂, ISTSの運動実施時間とCEのpeak VO₂の相関係数は各々r=0.80, 0.65で有意な相関がみられた。2回のISTSでのPeak VO₂と運動実施時間のICC(1, 1)(95%

信頼区間)は各々0.96(0.79-0.99), 0.91(0.57-0.98)であった。

【考察】運動負荷試験の中止基準に該当する者はなく, ISTSは安全な運動負荷強度であったと考えられる。ISTSとCEのpeak VO₂は強い相関が認められ, ISTSは健常高齢女性を対象としたpeak VO₂測定の運動負荷方法として併存妥当性が高いことが示唆された。また, 2回のISTSのpeak VO₂, 運動実施時間のICCは高い値を示し, 良好な再現性を示している。以上より, 健常高齢女性を対象とした場合, ISTSは有酸素能力測定のための運動負荷法として使用できる可能性が認められた。

(論文審査の結果の要旨)

この研究は, 有酸素能力評価のための漸増起立運動負荷試験の開発に関する研究である。

本研究に先立ち, 若年健常者において, 漸増起立運動負荷試験のプロトコール作成のための予備実験を行っている。また, プロトコール成立後は, 若年健常者を対象とした運動負荷試験としての妥当性を自転車エルゴメータとの比較研究もすでに行われている。今回の研究は, 上記を発展させ, 高齢健常女性における妥当性検証の研究である。この研究は今後疾患を有した高齢者における妥当性を検証する前段階の研究である。結果としては, 自転車エルゴメータとの間に相関が認められ, 漸増起立運動負荷試験は高齢健常女性においても妥当であることが示された。トレッドミルを用いた歩行による運動負荷試験や自転車エルゴメータを利用した運動負荷試験が行えないような患者においても, 起立が出来さえしたら運動負荷試験が行える可能性を明らかにしている。

この研究において, 研究計画十分に準備されており, また, 倫理に対する配慮も十分されていた。さらに, 得られたデータの処理および統計学的手法には問題が無かった。結果の解釈においても論理性が十分にあり問題がなかった。

今後, 臨床応用が考えられる価値のある研究であり, 博士論文に値すると考えられる。

以上のことから、本論文は博士論文としての十分な内容と非常に高いレベルの成果を示しており、優秀であると評価できる。

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

Characterization of clinically isolated thymidine-dependent small-colony variants of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL) (臨床検体より分離された基質拡張型 β -ラクタマーゼ産生性 *Escherichia coli* のチミジン要求性 small-colony variants の特徴)

根 岸 達 哉

(論文の内容の要旨)

【目的】チミジン要求性 small-colony variants (TD-SCVs) は、発育にチミジンを要求し、検出すること、薬剤感受性試験を実施することが困難な変異細菌である。今回、我々は *bla*_{CTX-M-3} を保有する株と、保有しない株の同一クローンである *Escherichia coli* TD-SCVs を同一患者より分離した。本研究では、これら分離株の性状について明らかにすることを目的とした。

【方法】分離株の *thyA* 遺伝子をシーケンス解析し、本遺伝子変異により引き起こされるコロニーと菌体の形態異常について観察を行った。さらに、TD-SCVs が薬剤耐性遺伝子保有プラスミドを水平伝播するかについて、接合伝達試験により証明を行った。

【結果】分離された TD-SCVs の *thyA* 遺伝子には、一塩基変異 c.62G>A が認められ、それに伴うミスセンス変異 p.Arg21His が確認された。また、*E. coli* TD-SCVs のコロニーは、野生型株に比べ透明がかっており、扁平であった。さらに、菌体は膨化、伸長しており、時には異常で不完全な細胞分裂を伴っていた。また、背景には多くの壊れた菌体の残骸が観察された。c.62G>A が野生型株の配列に戻ると、これらの形態異常のほとんどが消失した。接合伝達試験では、*bla*_{CTX-M-3} 保有 *E. coli* TD-SCV は *E. coli* CSH2 に *bla*_{CTX-M-3} を伝達しなかった。しかし、*bla*_{CTX-M-3} を保有しない *E. coli* TD-SCV は、*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 から *bla*_{SHV-18} を受け取り、さらにこれを *E. coli* CSH2 に接合伝達した。

【結論】*E. coli* において、*thyA* 遺伝子変異はチミジン要求性の表現型だけでなく、形態的異常を引き起こす。また、TD-SCVs は薬剤耐性遺伝子を保有するプラスミドを接合伝達により水平伝播する。TD-SCVs は伝達性薬剤耐性プラスミドのため池となりえるため、その性状を踏まえ検出することが重要である。

(論文審査の結果の要旨)

Small-colony variants (SCVs) は非定型のコロニー形態を示す遅発育型の変異株の総称であり、代謝などに関わる遺伝子に変異を有することから栄養要求性や CO₂ 要求性などを示す。

SCVs は臨床材料に由来するグラム陽性球菌の *Staphylococcus aureus* (MRSA を含む) や *Enterococcus faecalis* 等や、グラム陰性桿菌の *Escherichia coli* や *Pseudomonas aeruginosa* 等多くの菌種で報告されてきている。これらの SCVs は持続性感染症や再発性感染症に関わるため臨床感染症の観点から検査、治療上重要視すべきである。本研究は先天性胆道閉鎖症の患者から同日に採取された糞便と尿に由来する *E. coli* の SCV-4474 と SCV-4478、さらに27日後に採取された糞便由来 *E. coli* SCV-4539 の3株を対象に形態学的、遺伝学的特性解析を行った。これら3株はチミジン要求性を示し、チミジル酸合成酵素に R21H のアミノ酸置換を有していたが、SCVs の継代培養により得られた復帰変異株ではこの置換は認められなかった。形態学的解析の結果、グラム染色像及び走査電子顕微鏡像で SCVs の細胞は不均一で膨化、伸長が見られ背景に多くの細胞片が認められた。また、不完全な隔壁形成も観察された。SCV-4478 及び SCV-4539 は広域セファロsporin系薬に耐性であり、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) の産生性が示唆された。解析の結果、これら2株は *bla*_{CTX-M-3} を保有していたが、当該遺伝子をコードするプラスミドは接合伝達実験で受容菌の *E. coli* CSH2 には伝達されなかった。しかしながら、*bla*_{CTX-M-3} を保有しない SCV-4474 は、*Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 が保有するプラスミド (*bla*_{SHV-18}) を接合伝達により受容し、さらにこのプラスミドを *E. coli* CSH2 に伝達し得た。以上の知見からチミジル酸合成酵素遺伝子 *thyA* の変異は *E. coli* のコロニー及び細胞に形態異常をもたらすとともに、チミジン要求性を引き起こすこ

審査学位論文要旨

とを明らかにした。さらにチミジン要求性 SCVs が薬剤耐性遺伝子をコードするプラスミドを水平伝播することを立証した。従って、伝達性薬剤耐性プラスミドのリーザーバーとなり得るチミジン要求性 SCVs を検出することが重要である。

グラム陰性桿菌の SCVs についての詳細な研究はこれまでなされておらず、本研究は臨床上高頻度に分離

される *E. coli* での SCVs の特性解析を行った点で評価できる。研究は適正に行われており、チミジン要求性 SCVs の病原性を解明するなど今後の研究への発展が期待できる。また、学位審査においても質疑に対し適切に答えていることから、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。
