

## 信州大学において審査された医学博士論文要旨

氏名	学位授与番号	授与年月日	博士論文名	学位審査委員	
				主査	副査
GUO QI	甲第1342号	R 4. 9.30	Structural Analysis Implicates CASK-Liprin- $\alpha$ 2 Interaction in Cerebellar Granular Cell Death in MICPCH Syndrome (構造解析により明らかになった MICPCH 症候群に伴う小脳顆粒細胞死における CASK-Liprin $\alpha$ 2相互作用)	新藤隆行	平塚佐千枝 田渕克彦 杉田修三
LI YING	甲第1343号	R 5. 3.31	Renal function in aged C57BL/6J mice is impaired by deposition of age-related apolipoprotein A-II amyloid independent of kidney-aging (老齢 C57BL/6J マウスの腎機能は、腎臓の老化とは独立して加齢性アポリポ蛋白質 A-II アミロイドの沈着によって障害される)	関島良樹	新藤隆行 増木静江 植田光晴
KANG XIAOJING	甲第1344号	R 5. 9.30	BALB.NCT- <i>Cpox</i> <sup>net</sup> is a unique mouse model of hereditary coproporphyrria (BALB.NCT- <i>Cpox</i> <sup>net</sup> は遺伝性コプロポルフィン症の優れたマウスモデルである)	田中直樹	古庄知己 森政之 横井伯英
高松良太	甲第1345号	R 5. 3.31	The impact of normal serum complement levels on the disease classification and clinical characteristics in systemic lupus erythematosus (正常補体価の全身性エリテマトーデス患者における臨床背景と分類基準への影響)	駒津光久	菅野祐幸 矢崎正英 一瀬邦弘
磯部文洋	甲第1346号	R 6. 3.31	Clinical Presentation and Characteristics of the Upper Extremity in Patients with Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome (筋拘縮型 Ehlers-Danlos syndrome 患者の上肢運動機能および骨関節の調査)	杠俊介	藤永康成 古庄知己 岩崎倫政
中嶋郁美	甲第1347号	R 6. 3.31	Non-viral inducible caspase 9 mRNA delivery using lipid nanoparticles against breast cancer: An in vitro study (脂質ナノ粒子を使用した非ウイルス誘導性カスパーゼ9 mRNA の乳がんに対する送達: in vitro 研究)	平塚佐千枝	伊藤研一 上原剛 今井千速
村上徹	甲第1348号	R 5. 9.30	Inflammation and subsequent nociceptor sensitization in the bone marrow are involved in an animal model of osteoarthritis pain (変形性関節症モデルの痛みには骨髄での炎症と侵害受容器の感作が関与している)	高橋淳	山田充彦 藤永康成
YIN CHENXUE	甲第1349号	R 5. 9.30	Suppression of CEBP $\delta$ recovers exhaustion in anti-metastatic immune cells (CEBP $\delta$ 抑制により抗転移免疫細胞の機能低下を回復する)	中沢洋三	梅村武司 平塚佐千枝 高村祥子

審査学位論文要旨

小林 優也	甲第1350号	R 6. 3.31	Scattered cerebral infarction in the corona radiata predicts worse outcomes (放線冠に散在する脳梗塞は予後不良を予測する因子である)	堀内 哲吉	藤永康成 矢崎正英 板橋 亮
小松 正樹	甲第1351号	R 5. 9.30	Central extracorporeal membrane oxygenation with left-ventricular vent for fulminant myocarditis: a retrospective study (劇症型心筋炎に対する左室ベント併用による中心性体外式膜型人工肺の後方視的検討)	桑原宏一郎	今村 浩 山田 充彦
岩 浅 智哉	甲第1352号	R 6. 3.31	Suture Augmentation Does Not Change Biomechanical Properties and Histological Remodeling of Tendon Graft in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Study in a Porcine Model (前十字靭帯再建術における高強度補強糸が移植腱の生体力学的構造特性および組織学的リモデリングに与える影響 (ブタモデルを用いた検討))	菅野 祐幸	福島菜奈恵 高橋 淳 石橋 恭之
大野 晃一	甲第1353号	R 5. 3.31	Epidermal growth factor receptor activation confers resistance to lenvatinib in thyroid cancer cells (上皮成長因子受容体の活性化は、甲状腺癌細胞のレンバチニブに対する耐性を付与する)	塩 沢 丹里	中 沢 洋三 片 岡 正和 和 泉 弘人
新 井 成 明	甲第1354号	R 6. 3.31	Cell surface ATP synthase-released H <sup>+</sup> and ATP plays key roles in cocoa butter intake-mediated regulation of gut immunity through releases of cytokines in rat (ラットのココアバター摂取による腸管免疫制御において、細胞表面 ATP 合成酵素から放出される H <sup>+</sup> と ATP がサイトカインの分泌を介して重要な役割を果たしている)	田 中 直 樹	副 島 雄二 川 眞 田 樹人 川 股 知 之
松 野 淳 洋	甲第1355号	R 5. 3.31	Quantitative assessment of the gait improvement effect of LSVT BIG <sup>®</sup> using a wearable sensor in patients with Parkinson's disease (パーキンソン病における LSVT-BIG <sup>®</sup> の歩行機能改善効果に対する定量的評価)	増 木 静 江	高 橋 淳 矢 崎 正 英 西 川 典 子
岩 測 良 平	甲第1356号	R 5. 3.31	Anti-SARS-CoV-2 IgG antibody titer after BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination in Japanese patients who underwent renal replacement therapy, hemodialysis, peritoneal dialysis, and kidney transplantation (血液透析、腹膜透析、腎移植を受けている日本人の腎代替療法患者の COVID-19 mRNA ワクチン接種後の抗体価)	梅 村 武 司	上 原 剛 山 田 充 彦 今 田 恒 夫

審査学位論文要旨

本藤 奈緒	甲第1357号	R 6. 3.31	MEK inhibitor and anti-EGFR antibody overcome sotorasib resistance signals and enhance its antitumor effect in colorectal cancer cells (MEK 阻害薬と抗 EGFR 抗体薬はソトラシブの大腸がん細胞に対する耐性シグナルを克服し抗腫瘍効果を増強させる)	伊藤 研一	梅村 武司 平塚佐千枝 肥田 重明
蜜澤 邦洋	甲第1358号	R 5. 9.30	Effects of anesthetics on nociceptive sensory evoked potentials by intraepidermal noxious electrical stimulation of A- $\delta$ fibers (表皮内刺激電極による A デルタ線維の痛覚誘発電位に対する麻酔薬の影響)	関島 良樹	鷺塚 伸介 田 潤 克彦
雄山 一樹	甲第1359号	R 6. 3.31	Optimal Temporal Resolution to Achieve Good Image Quality and Perform Pharmacokinetic Analysis in Free-breathing Dynamic Contrast-enhanced MR Imaging of the Pancreas (膵臓の自由呼吸下ダイナミック造影 MRI における最適な時間分解能：画質および薬物動態解析の両立)	田中 直樹	梅村 武司 福島菜奈恵 小林 聡
加古 里子	甲第1360号	R 6. 3.31	Clinicopathological features of nodular gastritis in three classes of age (三世代間における鳥肌胃炎の臨床病理学的特徴)	田中 直樹	太田 浩良 梅村 武司 清水 俊明
金井 将史	甲第1361号	R 5. 3.31	Prognostic Impact of Hyperpolypharmacy due to Noncardiovascular Medications in Patients After Acute Decompensated Heart Failure: Insights from the Clue of Risk Stratification in the Elderly Patients with Heart Failure (CURE-HF) Registry (急性心不全退院後患者における非心血管系薬剤による多剤併用の予後への影響 (CURE-HF レジストリーより))	伊澤 淳	山田 充彦 柴 祐司 高間 典明
北島 浩平	甲第1362号	R 5. 3.31	Interval walking training in type 2 diabetes: A pilot study to evaluate the applicability as exercise therapy (2型糖尿病患者におけるインターバル速歩トレーニング：運動療法としての適用性を評価するパイロットスタディ)	関島 良樹	川真田樹人 増木 静江 櫻井 晃洋
田中 夕祈	甲第1363号	R 6. 3.31	Mature human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes promote angiogenesis through alpha-B crystallin (成熟したヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞は、 $\alpha$ B-crystallin を介して移植グラフトの血管新生を促進する)	菅野 祐幸	清水 公裕 伊藤 研一 高橋 将文
北村 陽	甲第1364号	R 5. 9.30	Prevalence and associated factors for primary osteoarthritis of the scaphotrapeziotrapezoidal, radiocarpal, and distal radioulnar joints in the Japanese general elderly population (日本人高齢者における舟状大菱形小菱形骨関節、橈骨手根関節、遠位橈尺関節の一次性関節症の有病率と関連因子)	野見山 哲生	杠 俊介 高橋 淳 岩崎 倫政

審査学位論文要旨

笠原智貴	甲第1365号	R 6. 3.31	Receptor activity-modifying proteins of adrenomedullin (RAMP2/3): Roles in the pathogenesis of ARDS (ARDSにおけるアドレノメデュリン受容体活性調節タンパク RAMP2, RAMP3の役割)	菅野祐幸	花岡正幸 川真田樹人 今井 靖
荒木太亮	甲第1366号	R 6. 3.31	Antiplatelet drugs may increase the risk for checkpoint inhibitor-related pneumonitis in advanced cancer patients (抗血小板薬は進行がん患者における免疫関連肺臓炎のリスクを高める可能性がある)	清水公裕	内藤隆文 伊澤 淳 解良恭一
奥村太規	甲第1367号	R 6. 3.31	Kinetics of serum O-glycosylated M-hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma history and nucleos(t)ide analogue therapy in hepatitis B patients (O型糖鎖修飾 M-HBs 抗原の核酸アナログ治療における動態と肝細胞癌既往例との関連)	副島雄二	内藤隆文 梅村武司 伊藤清顕
増尾仁志	甲第1368号	R 6. 3.31	Increased mitochondria are responsible for the acquisition of gemcitabine resistance in pancreatic cancer cell lines (降癌細胞株におけるミトコンドリア増加はゲムシタビン耐性獲得に寄与する)	平塚佐千枝	内藤隆文 伊藤研一 河田健司
能見英智	甲第1369号	R 5. 3.31	Short-term Clinical Outcomes of Transcatheter Edge-to-edge Repair using MitraClip for Mitral Regurgitation: Experience from a Single Center (経皮的僧帽弁接合不全修復術の短期成績)	今村 浩	瀬戸達一郎 柴 祐司 高間典明
西岡 誠	甲第1370号	R 6. 3.31	Risk factors for post-encephalopathic epilepsy in patients with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion (二相性発作と遅発性拡散能低下を呈する急性脳症患者における脳症後てんかんの危険因子)	古庄知己	中沢洋三 関島良樹 山中 岳
山本高照	甲第1371号	R 5. 3.31	Mechanism of sac expansion without evident endoleak analyzed with X-ray phase-contrast tomography (位相差X線CT法によるステントグラフト留置後瘤径拡大の病因解明)	桑原宏一郎	菅野祐幸 柴 祐司
清水忠史	甲第1372号	R 6. 3.31	Eribulin promotes proliferation of CD8 <sup>+</sup> T cells and potentiates T cell-mediated anti-tumor activity against triple-negative breast cancer cells (エリブリンはCD8 <sup>+</sup> T細胞の増殖を促進し、トリプルネガティブ乳癌細胞に対するT細胞介在性の抗腫瘍活性を増強する)	中沢洋三	平塚佐千枝 片岡正和 石川 孝

審査学位論文要旨

MA CHUANG	甲第1373号	R 6. 3.31	Three-Dimensional Modeling with Osteoblast-Like Cells under External Magnetic Field Conditions Using Magnetic Nano-Ferrite Particles for the Development of Cell-Derived Artificial Bone (細胞由来人工骨開発に向けた外部磁界条件下の磁性ナノフェライト粒子による骨芽様細胞の3次元モデリング)	柴 祐 司	平塚佐千枝 竹内あかり 松田佳和
THANYAVI CHINSUWAN	甲第1374号	R 5. 3.31	Ligand-based, piggyBac-engineered CAR-T cells targeting EGFR are safe and effective against non-small cell lung cancers (piggyBac法で作製したEGFRを標的とするリガンド型CAR-T細胞は、安全で、非小細胞肺癌に対して有効である)	菅野祐幸	塩沢丹里 中沢洋三 今井千速
若林俊一	甲第1375号	R 6. 3.31	Symptom-based portopulmonary hypertension screening questionnaire in Japanese patients with chronic liver disease (日本人慢性肝疾患患者における症状ベースの門脈圧亢進症性肺高血圧症のスクリーニング)	柴 祐 司	山田充彦 梅村武司 川口 巧
小田切智海	甲第1376号	R 6. 3.31	An optimal skeletal element for DNA testing: Evaluation of DNA quantity and quality from various bone types in routine forensic practice (DNA鑑定のための最適な骨組織の部位の探索: 法医実務において採取した、複数の種類の骨組織から抽出したDNAの質および量に基づいた検証)	古庄知己	野見山哲生 栗田 浩 山田良広
QIU WEN	甲第1377号	R 5. 3.31	Deep-Learning-Based Analysis Reveals a Social Behavior Deficit in Mice Exposed Prenatally to Nicotine (深層学習を用いた解析による胎生期ニコチン暴露マウスモデルの社会行動の異常の発見)	植村 健	関島良樹 田渕克彦 杉田修三
田中友之	甲第1378号	R 6. 3.31	Predictive Insights into Exocrine Pancreatic Insufficiency in Chronic Pancreatitis and Autoimmune Pancreatitis: A Decision Tree Approach (慢性膵炎と自己免疫性膵炎における膵外分泌機能不全の予測: 決定木分析)	駒津光久	平塚佐千枝 梅村武司 入澤篤志
斎藤勝仁	甲第1379号	R 5. 3.31	Comparative empirical analysis of challenging inpatients under the Medical Treatment and Supervision Act and the Mental Health and Welfare Act (医療観察法入院医療における治療困難事例の実証的研究, 長期措置入院事例との比較を踏まえて)	野見山哲生	古庄知己 杉山暢宏 松尾幸治
星野優美	甲第1380号	R 5. 3.31	Analysis of Distal Compound Muscle Action Potential Duration in Hereditary Transthyretin Amyloidosis with Polyneuropathy (多発神経障害を呈する遺伝性トランスサイレチン型アミロイドーシスにおける遠位部複合筋活動電位持続時間の解析)	高橋 淳	田渕克彦 矢崎正英 植田光晴

審査学位論文要旨

橋上 遣太	甲第1381号	R 6. 3.31	Relationship between Helicobacter pylori eradication and Barrett's esophagus elongation (Helicobacter pylori 除菌とバレット食道伸長との関係)	藤永康成	上原 剛 梅村 武司 郷田 憲一
松岡峻一郎	甲第1382号	R 5. 3.31	Segmentectomy-oriented anatomical model for enhanced precision surgery of the left upper lobe (左上葉における精密肺区域切除のための区域解剖モデル)	伊藤 研一	花岡 正幸 藤永康成
福田 浩信	甲第1383号	R 6. 3.31	A preliminary study of IgG4 expression and its prognostic significance in oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌における IgG4 発現の予後的意義に関する予備的研究)	田中 直樹	野見山 哲生 上原 剛 宇田川 信之

審査学位論文要旨

氏名	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
黒部恭史	甲第53号	R 6. 3.20	Use of force-velocity relationship to estimate the one-repetition maximum leg press exercise among young females (若年女性における力-速度関係を用いたレッグプレスの最大挙上重量の推定)	木村貞治	横川吉晴 百瀬公人
上條途夢	甲第54号	R 6. 3.20	Recombinant $\gamma$ Y278H Fibrinogen Showd Normal Secretion from CHO Cells, but a Corresponding Heterozygous Patient Showd Hypofibrinogenemia (患者の表現型と CHO 細胞の産生能に乖離を認めた変異フィブリノゲン $\gamma$ Y278H の解析)	松田和之	石田文宏 山内一由 井上克枝
河埜康二郎	甲第55号	R 6. 3.20	Factors Associated with Continued Employment Among Persons with Mental Disorders : A Retrospective Cohort Study (精神障害者の就労継続に関連する因子：後ろ向きコホート研究)	杉山暢宏	上村智子 小林正義 田中悟郎
山中英士	甲第56号	R 6. 3.20	Intermuscular coherence during quiet standing in sub-acute patients after stroke : an exploratory study (亜急性期脳卒中患者の静止立位における筋間コヒーレンス：探索的研究)	横川吉晴	百瀬公人 西澤公美 鈴木誠

Structural Analysis Implicates CASK-Liprin- $\alpha$ 2 Interaction in Cerebellar Granular Cell Death in MICPCH Syndrome (構造解析により明らかになった, MICPCH 症候群に伴う小脳顆粒細胞死における, CASK-Liprin $\alpha$ 2相互作用)

GUO QI

(論文の内容の要旨)

**【Background and Aims】** Microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH) syndrome is an X-linked neurodevelopmental disorder characterized by massive cerebellar hypoplasia accompanied by microcephaly, intellectual disability, social deficits, and epilepsy. The X-chromosomal gene calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) has been identified as a single causative gene for this syndrome. Since CASK deficiency in males will be lethal before birth, most of the MICPCH patients are females. Cerebellar hypoplasia is the severest symptom of MICPCH syndrome, but there is no method to prevent this symptom at present since the pathophysiology of this syndrome remains elusive.

**【Materials & Methods】** To elucidate the molecular mechanism underlying MICPCH syndrome, we utilized CASK +/− mice to investigate whether CASK deficiency causes cerebellar hypoplasia. And we established the cerebellar granule cell (CG cell) culture from CASK floxed mice and examined the effect of deleting part of the domain and missense mutations of CASK discovered in human patients by infection with iCre or co-infection experiments. Finally, we performed a machine learning-based structural analysis using AlphaFold 2.2. And confirmed these changes with co-immunoprecipitation experiments.

**【Results】** The density of CG cells was decreased in the cerebellum of CASK +/− mice. CASK KO CG cells in culture exhibited progressive cell death that was rescued by co-infection with lentivirus expressing wild-type CASK. CaMK, PDZ, and SH3 domains of CASK were required for the survival of CG cells, demonstrated by co-infection rescue experiments with domain deletion mutants of CASK. Four mutations from human patients within CaMK domain failed to rescue the CG cell death in CASK KO culture. Three of these mutations were located in the binding

interface between Liprin- $\alpha$ 2 while the remaining affected CASK expression itself, demonstrated by amino acid mapping on the 3D crystallography of the CASK CaMK domain. These mutations were turned out to disrupt the salt bridge or hydrogen bonds of the binding interface between CASK with Liprin- $\alpha$ 2 by machine-learning based structural prediction using AlphaFold2.2. These mutations indeed decreased binding affinity with Liprin- $\alpha$ 2, demonstrated by co-immunoprecipitation experiment.

**【Conclusion】** CASK is involved in MICPCH syndrome through apoptosis of cerebellar granule cells. Liprin- $\alpha$ 2 through binding with CASK is involved in the pathological mechanism underlying CG cell death in MICPCH syndrome.

(論文審査の結果の要旨)

In this study, we investigated the molecular mechanism by which CASK deficiency induces cerebellar hypoplasia in MICPCH syndrome. For this, we used CASK KO mice as disease models. We confirmed that female CASK heterozygote KO mice replicate progressive cerebellar hypoplasia observed in MICPCH syndrome. CG cells in the CASK KO dissociated culture exhibited cell death by an apoptotic mechanism. The application of BDNF failed to rescue the CG cell death in CASK KO culture neurons, suggesting that the CG cell death is independent of Neurexin-mediated BDNF secretion. Deletion mutants lacking either the CaMK, PDZ, or SH3 domain failed to rescue the CG cell death in the CASK KO culture. Missense mutations in the CaMK domain from human patients that affect CG cell survival in dissociate culture are located at the binding interface between the CASK-CaMK domain and Liprin- $\alpha$ 2, and the mutations disrupt the structure of the binding interface predicted by the AlphaFold 2.2 program.

1. The CASK KO mice replicated cerebellar hypoplasia in MICPCH syndrome. CASK is essential for



- cerebellum granule cell survival in vitro and in vivo. CASK caused the CG cell death via the apoptotic pathway.
2. The CG cell death in CASK KO is due to a different mechanism from that of Nrnx TKO. The caspase-3 pathway might be involved in the apoptosis of CG cell death in CASK KO.
  3. CaMK, PDZ, or SH3 domains are responsible for CG cell survival.
  4. Mutation in the CaMK domain is critical for CG cell survival via affecting protein interaction.
  5. AI based 3D-structure prediction and biochemi-

cal study show that R106P, R255C and Y268H mutants disrupted the CASK/Liprin- $\alpha$ 2 interaction.

We found that missense mutations in the CaMK domains identified from human patients affect CG cell survival in the dissociated culture system. These mutations are located at the binding interface with Liprin- $\alpha$ 2, suggesting that the CASK-Liprin- $\alpha$ 2 interaction may be involved in the pathophysiology of cerebellar hypoplasia in MICPCH syndrome.

The committee chair and vice chair s evaluated that the thesis deserved a doctoral dissertation.

Renal function in aged C57BL/6J mice is impaired by deposition of age-related apolipoprotein A-II amyloid independent of kidney aging (老齢 C57BL/6J マウスの腎機能は、腎臓の老化とは独立して加齢性アポリポ蛋白質 A-II アミロイドの沈着によって障害される)

## LI YING

### (論文の内容の要旨)

【背景・目的】 アミロイドーシスは疾患特異的な病因タンパク質が線維状構造に凝集し、アミロイドと呼ばれる不溶性の構造物として臓器に沈着する疾患群の総称である。現在、ヒトでは40種類の病型が報告されており、その中で老人性（加齢性）アミロイドーシスと分類される病型は、前駆タンパク質の遺伝子変異や過剰産生を病因とせず加齢に伴って自然発症する病態を特徴とする。これと類似して、実験飼育下のマウスも加齢に伴ってマウス老化アミロイドーシスを自然発症する。申請者らはこれまでに老化促進モデルマウスで、アポリポ蛋白質 A-II (ApoA-II) に由来するアミロイド (AApoAII) が脳を除く全身臓器に沈着することを報告している。

C57BL/6J 系統などの近交系マウスは実験動物の標準系統として幅広い研究分野で利用されている。高齢の C57BL/6J マウスにおける老化アミロイドの沈着は臓器の様々な解析指標に影響すると考えられるが、これまで老化アミロイドーシスの病態特性に関係する研究は不十分であった。そこで本研究では、C57BL/6J マウスにおける老化アミロイドーシスの病理学的特徴の横断的な解析と、若い時期に AApoAII 沈着を誘発させることでアミロイドに起因する臓器の障害程度を明らかにすることを目的とした。

【方法】 ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン (ジャクソン) から C57BL/6J 雄マウスを導入し、12-86週

齢個体のアミロイドーシス病態の解析を行った。また、東京都健康長寿医療センター動物実験施設 (TMIG) および日本 SLC (SLC) から導入したマウスを用いて、飼育施設間で発症率を比較した。病理組織切片でコンゴレッド染色および抗 ApoA-II 抗体で免疫染色を行い、アミロイドーシス病態の評点付けや画像解析ソフトウェア (ImageJ) を用いて沈着量の定量解析を行った。病理組織切片上からレーザーダイセクション法 (LMD) により採取したアミロイド試料や組織試料から採取したアミロイド分画のプロテオーム解析、および定量 PCR やウェスタンブロッティングによる分子生物学的解析を行った。血漿および尿サンプルを用いた腎機能指標 (総蛋白質、アルブミン、クレアチニン、尿素窒素) の測定は外部委託した (オリエンタル酵母工業)。

【結果】 ジャクソンから導入したマウスでは40週齢から小腸や胃などの消化器系でアミロイド沈着が開始し、その後、62週齢以降の全ての個体の全身臓器で沈着が認められた。28週齢と86週齢個体の腎臓 (糸球体)、心臓 (心筋細胞および間質)、小腸 (粘膜固有層)、肺 (肺胞) の LMD サンプルのプロテオーム解析により、ApoA-II が全ての臓器のアミロイドで最も含有量の高い蛋白質として同定された。ApoE, ApoA-IV, clusterin, vitronectin は全ての臓器でアミロイドとの共沈着が認められ、補体因子や免疫グロブリンは腎臓で特異的に同定された。アミロイド分画のウェスタ

ンブロットにより ApoA-II が検出され、血清アミロイド A などの他のアミロイド蛋白質は検出されなかったことから、アミロイドとして AApoAII が沈着することが示された。他の施設では、TMIG 由来のマウスはジャクソンと類似した加齢に伴う病態像が観察された一方で、SLC 由来のマウスでは80週齢においても発症しなかった。全ての施設のマウスに *Apoa2* 遺伝子のコード領域内に遺伝子変異は認められず、野生型の *Apoa2* 遺伝子型を有していた。腎臓の AApoAII 病態は高齢マウスにおいて急速に進展した。86週齢ではほぼ全ての腎糸球体で高度なアミロイド沈着と糸球体硬化の所見が見られ、血中の尿素窒素量や尿中のアルブミン量が有意に増加し腎機能の低下が認められた。次に、高齢個体の小腸から抽出した AApoAII を8-10週齢のマウスへ尾静脈注射で投与し早期の病態発症を誘発させることで、腎機能低下の原因から加齢による影響を排除して解析を行った。誘発群では40週齢の時点で自然発症群の86週齢相当の病態が再現され、高齢群と同様のアルブミン尿を呈したことから、高齢マウスの腎機能低下には AApoAII 沈着による影響が含まれることが示された。また、AApoAII による腎病変の病理学的特徴として、糸球体のメサンギウム領域へのアミロイド沈着、ポドサイト密度の減少や足突起の異常、および糸球体における Nephron の低下や Fibroblast growth factor 2 の蓄積が高齢群と誘発群の両方で認められた。

【考察・結論】 C57BL/6J 系統は現代の医学研究において広く利用されている動物モデルである。本研究でユニークなアミロイド早期誘発モデルを採用することで、C57BL/6J を用いる場合にはアミロイド沈着による障害を考慮した上でデータを解釈することの必要性が示された。特に、腎臓で加齢の影響を単独で評価したい場合には、老化アミロイド抵抗性のマウス系統の採用が一つの研究戦略として期待できる。本研究成果は、C57BL/6J 系統の発祥コロニーとして主要な供給元であるジャクソンにおいて AApoAII 沈着が老齢マウスの general pathology であることを示すと同時に、マウス AApoAII アミロイドーシスが糸球体のポドサイト障害メカニズムの新たな研究モデルとなり得る可能性を示すものである。

(論文審査の結果の要旨)

実験飼育下のマウスは加齢に伴いマウス老化アミロイドーシスを自然発症する。高齢マウスでは老化アミロイドの沈着によって全身の臓器機能が障害されると

考えられるが、これまで老化アミロイドーシスの病態特性や病因タンパク質に関係する研究は不十分であった。また高齢個体の老化形質とされる臓器機能の低下が、加齢とアミロイド沈着のどちらが原因であるかを判別することは困難であった。そこで本研究では、医学研究で広く利用される C57BL/6J 系統の老化アミロイドーシスの発症頻度やアミロイドタンパク質を解析し、アミロイドーシス誘発モデルを用いてアミロイド沈着に起因する腎障害程度を明らかとすることを目的とした。

ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン (ジャクソン) から C57BL/6J 雄マウスを導入し、12-86週齢個体のアミロイドーシス病態の解析を行った。また、東京都健康長寿医療センター動物実験施設 (TMIG) および日本エスエルシー (SLC) から導入したマウスを用いて、飼育施設間で発症率を比較した。レーザーダイセクション法 (LMD) により病理組織切片から採取したアミロイド試料 (コンゴレッド陽性) の LC-MS/MS 解析で沈着タンパク質を同定し、免疫染色やウェスタンブロット法で確認した。血漿および尿サンプル中の腎機能指標 (総タンパク質, アルブミン, クレアチニン, 尿素窒素) の測定は外部委託した。

その結果、LI YING は次の結論を得た。

1. ジャクソンの C57BL/6J マウスは40週齢から消化器系 (舌, 胃, 小腸) でアミロイドの沈着が開始し加齢とともに脳を除く全身組織で進行した。62週齢以降では全ての解析個体において全身的なアミロイド沈着が認められた。
2. 病理組織切片上から採取した腎臓, 心臓, 小腸, 肺のアミロイドの LC-MS/MS 解析によって Apolipoprotein A-II (ApoA-II) をアミロイドタンパク質 (AApoAII) として同定した。Apolipoprotein E, Apolipoprotein A-IV, Clusterin, Vitronectin は全ての臓器でアミロイドと共沈着していた。
3. TMIG のマウスはジャクソンと類似した発症時期・頻度であったが、SLC のマウスでは86週齢の個体であってもアミロイドーシス発症は認められなかった。全ての施設のマウスで *Apoa2* 遺伝子のコーディング領域に変異は認められず、血漿中の ApoA-II 量にも変化は認められなかった。
4. 腎臓では70週齢以降でアミロイドーシス病態が急速に進行し、86週齢の個体では血中の尿素窒素量や尿中のクレアチニン量の増加が認められた。
5. 高齢群の小腸から精製したアミロイド分画を10-

12週齢の個体に投与することで、40週齢の時点で自然発症群の86週齢に相当する腎アミロイドーシス病態を再現した（誘発群）。誘発群では高齢群と同様のアルブミン尿を呈したことから、高齢マウスの腎機能低下には AApoAII 沈着が関与することが示された。

6. メサンギウム領域にアミロイドが沈着した糸球体では、ポドサイト密度の減少や足突起の異常、および Nephrin の低下や Fibroblast growth factor 2 の蓄積が病理学的特徴として観察された。

BALB.NCT-*Cpox*<sup>nct</sup> is a unique mouse model of hereditary coproporphyrria (BALB.NCT-*Cpox*<sup>nct</sup> は遺伝性コプロポルフィリン症の優れたマウスモデルである)

## KANG XIAOJING

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】 遺伝性コプロポルフィリン症（以下 HCP）は、ヘム生合成経路で働くコプロポルフィリノーゲン酸化酵素（以下 CPOX）をコードする遺伝子の変異に起因し、尿および糞便中へのコプロポルフィリンの過剰排泄、急性神経内臓症状、肝障害、原発性肝がんのリスク、および慢性皮膚症状などの病態を発現する疾患である。病態の発現機序には不明な点が多く、治療法も限られているが、これらの研究に有用なモデル動物は無かった。*Cpox* 遺伝子に活性低下型変異を有する BALB.NCT-*Cpox*<sup>nct</sup> マウス（以下 *Cpox*<sup>nct</sup> マウス）は、雌雄ともに若齢時から劇的に高い血清および肝臓中コプロポルフィリンレベルを有することが報告されていた。そこで、*Cpox*<sup>nct</sup> マウスの臨床的、組織病理学的、および生化学的特性を明らかとし、HCP モデルとしての有用性を検証した。

【方法】 3か月齢の *Cpox*<sup>nct</sup> マウスとコントロール BALB/c から新鮮尿を、また麻酔下で心臓から血液を採取した。尿中および血中のポルフィリン含量を HPLC 法で、尿中の  $\delta$ -アミノレブリン酸 ( $\delta$ -ALA) 含量、およびポルフォビリノーゲン (PBG) 含量をそれぞれ UFLC 法、および比色法で定量した。心拍数と血圧を tail-cuff 法により、前肢握力をデジタルフォースゲージで、運動協調性をロータロッド装置で、多項目自動血球分析装置を用いて血液学的パラメーターを測定した。1~18か月齢のマウスから採取した肝臓、および皮膚をホルマリン固定、パラフィン包埋して組織切片を作製し、HE 染色法、およびマッソン-ゴールドナートリクローム染色を行い、光学顕微鏡で観察し

AApoAII アミロイドーシスが高齢 C57BL/6J マウスの general pathology であり、老化研究において高齢マウスを用いる際にはアミロイド沈着による影響を考慮する必要があることが示唆された。また副次的成果として、マウス AApoAII アミロイドーシスが腎臓のポドサイト障害メカニズムの新たな研究モデルとなり得る可能性を示した。

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。

た。また、肝臓の一部をグルタルアルデヒド/四酸化オスミウムで固定後、樹脂に埋め込み、透過型電子顕微鏡で観察した。抗ケラチン 8 抗体および抗 p62/SQSTM1 抗体を使用した二重免疫蛍光染色法により肝細胞封入体の一種であるマロリー小体を検出した。免疫蛍光染色法により肝臓腫瘍における細胞増殖マーカー Ki-67 を検出した。抗ケラチン 8 抗体と抗ラミン A/C 抗体を使用したイムノブロットング法により肝細胞内タンパク質凝集を検出した。

【結果】 雄および雌の *Cpox*<sup>nct</sup> マウスの血中コプロポルフィリン量は、同性の BALB/c のそれぞれ >68 倍と >18 倍と有意に高かった。また、*Cpox*<sup>nct</sup> マウスの尿中コプロポルフィリン量は、同性の BALB/c のそれぞれ 385 倍と 219 倍と有意に高かった。また、尿中の  $\delta$ -ALA, PBG, およびウロポルフィリン量も雌雄ともに有意に高かった。これらの含有量は *Cpox*<sup>nct</sup> マウスでは雌よりも雄で有意に高かった。収縮期血圧は雌では *Cpox*<sup>nct</sup> マウスが BALB/c よりも有意に高かった。拡張期血圧、および心拍数は両性で系統差は無かった。前肢握力と運動協調性は、雌雄ともに BALB/c よりも有意に低かった。肝臓と皮膚の病態が *Cpox*<sup>nct</sup> マウスの雄に限定的に認められた。肝臓に関しては、3か月齢から中心静脈領域において、肝細胞と細胞核の肥大、脂肪滴の貯留、マロリー小体の形成、および線維化などの NASH 様の病理像が認められた。9か月齢以降の一部の雄マウスに肝臓腫瘍が認められた。腫瘍内には多数の Ki-67 陽性細胞が検出された。雄の肝臓ではケラチン 8、およびラミン A/C の高分子凝集体が確認され、この異常が肝臓病態の一因である可能性

が示唆された。皮膚に関しては、3か月齢以降の一部の雄マウスに真皮層の線維化と肥厚、皮下脂肪の薄化などの強皮症様の病理像が認められた。また、血液学的データでは *Cpox<sup>nct</sup>* マウスが雌雄ともに小球性貧血を呈していることが示唆された。

【考察】以上の結果は、*Cpox<sup>nct</sup>* マウスが HCP 患者と類似した病態を発現していることを示唆した。一方、肝・皮膚病態の病理像やそれが雄に限局的であることなど、HCP 患者との相違も明らかとなった。遺伝性コプロポルフィリン症様病態を自然発症する BALB.NCT-*Cpox<sup>nct</sup>* マウスは、病態発現の分子基盤を正確に理解し、本症の治療法を開発していく上で極めて有用なモデルであり、その病態の発症機序、および雌での抑制機序の解明は、HCP の医療に寄与すると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

BALB.NCT-*Cpox<sup>nct</sup>* マウス (以下 *Cpox<sup>nct</sup>* マウス) は、コプロポルフィリンノーゲンオキシダーゼ (*Cpox*) 遺伝子の変異により雌雄ともに若齢時から劇的に高い血清および肝臓中コプロポルフィリンレベルを有することが報告されていた。そこで、*Cpox<sup>nct</sup>* マウスの臨床的、組織病理学的、および生化学的特性を明らかとし、ヒト遺伝性コプロポルフィリン症 (以下 HCP) モデルとしての有用性を検証した。

*Cpox<sup>nct</sup>* マウスと BALB/c マウスから採取した尿中および血中のポルフィリン含量を HPLC 法で定量した。前肢握力をデジタルフォースゲージで、運動協調性をロータロッド装置で、多項目自動血球分析装置を用いて血液学的パラメーターを測定した。マウスから採取した肝臓、および皮膚をホルマリン固定、パラフィン包埋して組織切片を作製し、HE 染色法、およ

びマッソン-ゴールドナートリクローム染色を行い、光学顕微鏡で観察した。また、肝臓の一部をグルタルアルデヒド/四酸化オスミウムで固定後、樹脂に埋め込み、透過型電子顕微鏡で観察した。抗ケラチン 8 抗体および抗 p62/SQSTM1 抗体を使用した二重免疫蛍光染色法により肝細胞のマロリー小体を検出した。免疫蛍光染色法により肝臓腫瘍における細胞増殖マーカー Ki-67 を検出した。抗ケラチン 8 抗体と抗ラミン A/C 抗体を使用したイムノプロットティング法により肝細胞内タンパク質凝集を検出した。

その結果、充暁静は次の結論を得た。

1. *Cpox<sup>nct</sup>* マウスの血中、および尿中のコプロポルフィリン量は雌雄ともに BALB/c よりも有意に高かった。
2. *Cpox<sup>nct</sup>* マウスの前肢握力と運動協調性は雌雄ともに BALB/c よりも有意に低かった。
3. 3か月齢以降の *Cpox<sup>nct</sup>* 雄マウスの肝臓には NASH 様の病理像が、また、9か月齢以降の一部の雄マウスには肝臓腫瘍が認められた。雄の肝臓ではケラチン 8、およびラミン A/C の高分子凝集体が確認された。
4. 3か月齢以降の一部の雄マウスには強皮症様の病理像が認められた。
5. *Cpox<sup>nct</sup>* マウスは雌雄ともに小球性貧血を呈していた。

これらの結果より、*Cpox<sup>nct</sup>* マウスは HCP 様病態を自然発症しており、したがってその病態発現の分子基盤を正確に理解し、本症の治療法を開発していく上で極めて有用なモデルであることが示された。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

The impact of normal serum complement levels on the disease classification and clinical characteristics in systemic lupus erythematosus (正常補体価の全身性エリテマトーデス患者における臨床背景と疾患分類への影響)

高松良太

(論文の内容の要旨)

【背景】全身性エリテマトーデス (SLE) は、遺伝的要因、環境因子、免疫系の調節障害、ホルモンバランスの不均衡、エピジェネティックな変化など、多面的な病態を原因として全身の臓器に障害が生じる炎症性・自己免疫疾患である。補体系は外部から侵入してきた病原体に対する防御を直接的に行い、自然免疫や

獲得免疫反応を間接的に制御する免疫システムであり、SLE の病態形成に関与している。SLE の活動期に補体が消費されることは一般的な特徴であるが、発症時に血清補体価が正常である SLE 患者も経験される。発症時の血清補体価が正常である SLE 患者の臨床的特徴や予後、SLE の分類に与える影響に関して、未だ十分な検討は行われていない。

【目的】本研究では発症時の血清補体価が正常であった SLE 患者の臨床的特徴、予後、SLE の分類に与える影響に関して検討を行った。

【方法】2010年1月から2021年6月の期間に、当科で SLE の診断と治療を受け、継続的に診療を受けている患者を対象とした。1997年 American College of Rheumatology 改訂 (ACR) 分類基準または2012年 Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) 分類基準のいずれかもしくは両方を満たした SLE 患者 197名について、診療録を後方視的に調査。SLE 発症時の血清 C3・C4・CH50の値が全て基準値以上 (C3 $\geq$ 73 mg/dl, C4 $\geq$ 11 mg/dl, CH50 $\geq$ 30 mg/dl) を補体正常 (N-com) 群、いずれかが基準値未満の場合を補体低値 (H-com) 群と定義した。C3と C4は免疫比濁法、CH50はリボソーム免疫測定法にて測定し、本研究遂行のために必要な臨床情報が不十分な患者、また感染症や悪性腫瘍の合併がある患者は対象から除外した。N-com 群と H-com 群間にて、ACR, SLICC および2019年 European League Against Rheumatism (EULAR) /ACR の各分類基準の充足率、治療開始前の疾患活動性 (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000: SLEDAI-2K), 臨床および免疫学的項目を比較検討した。治療開始から60か月を上限とする観察期間内で、SLICC damage index (SDI)  $\geq$  1 を臓器障害の指標、Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment-SLEDAI Flare Index (SFI) を再燃の指標とし、臓器障害と再燃の出現時期およびその推移を比較した。

【結果】N-com 群は21名 (平均年齢 31.6歳, 女性割合 85.7%), H-com 群は96名 (平均年齢 37.2歳, 女性割合 86.5%)。ACR, SLICC および EULAR/ACR 各分類基準の充足率は、N-com 群と H-com 群の間で有意差を認めなかった (ACR: 95.2% vs. 91.7%,  $p=1.000$ , SLICC: 95.2% vs. 100%,  $p=0.180$ , EULAR/ACR: 95.2% vs. 96.9%,  $p=0.552$ )。両群間で、3つ全ての分類基準をみたす割合も有意差を認めなかった (85.7% vs. 88.5%,  $p=0.715$ )。H-com 群では、ACR 分類基準と3つ全ての分類基準を充足する割合が、SLICC 分類基準の充足率に比して有意に低値であった (vs. ACR:  $p=0.021$ , vs. 3分類全て:  $p=0.004$ )。N-com 群では H-com 群に比して、腎障害の合併率および抗 dsDNA 抗体の陽性率が有意に低く (4.8% vs. 40.6%,  $p=0.002$ , 61.9% vs. 84.4%,  $p=0.031$ )、EULAR/ACR 分類基準におけるト

メイン比較において N-com 群では発熱のスコアが有意に高かった (1.0 $\pm$ 1.0 vs. 0.46 $\pm$ 0.84,  $p=0.007$ )。60か月までの観察期間で、臓器障害 (SDI  $\geq$  1) の出現は二群間に有意差を認めず ( $p=0.741$ )、12か月毎の平均 SDI の推移も有意差は認めなかった (12か月: 0.12 $\pm$ 0.47 vs. 0.13 $\pm$ 0.37,  $p=0.509$ , 24か月: 0.20 $\pm$ 0.54 vs. 0.16 $\pm$ 0.40,  $p=0.986$ , 36か月: 0.21 $\pm$ 0.56 vs. 0.23 $\pm$ 0.61,  $p=0.846$ , 48か月: 0.29 $\pm$ 0.59 vs. 0.25 $\pm$ 0.64,  $p=0.741$ , 60か月: 0.38 $\pm$ 0.74 vs. 0.24 $\pm$ 0.47,  $p=0.737$ )。再燃までの期間も、N-com 群と H-com 群で有意な差は認めなかった ( $p=0.770$ )。N-com 群の患者において、経過中に低補体血症を呈した患者は、血清補体価基準値を保った患者に比して、臓器障害の出現割合が有意に高かった ( $p=0.028$ )。

【結論】N-com 群では H-com 群と比較して、腎障害の合併や抗 dsDNA 抗体陽性の割合が有意に低く、発熱の割合が有意に高い臨床的特徴を認めた。N-com 群と H-com 群の間で、SLE の分類に有意な差は示されなかった。N-com 群と H-com 群で臓器障害や再燃に有意差は認めず、初発時の血清補体価は予後予測に影響しない可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

補体系は全身性エリテマトーデス (SLE) の病態形成に深く関わっており、SLE の活動期に補体が消費されることは一般的な特徴である。しかし、発症時の血清補体価が正常である SLE 患者の臨床的特徴や予後、SLE の分類に与える影響に関しては、十分な検討が行われておらず、本研究にて解析を行った。

当科で SLE の診断と治療を受け、1997年 American College of Rheumatology 改訂 (ACR) 分類基準または2012年 Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) 分類基準のいずれかもしくは両方を満たした SLE 患者197名を対象とし、解析に必要な臨床情報が不十分あるいは感染症、悪性腫瘍の合併を認める患者は除外した。C3と C4は免疫比濁法、CH50はリボソーム免疫測定法にて測定し、SLE 発症時の血清 C3・C4・CH50の値が全て基準値以上 (C3 $\geq$ 73 mg/dl, C4 $\geq$ 11 mg/dl, CH50 $\geq$ 30 mg/dl) を補体正常 (N-com) 群、いずれかが基準値未満を補体低値 (H-com) 群と定義。N-com 群21名、H-com 群96名の間で、ACR, SLICC および2019年 European League Against Rheumatism (EULAR)/ACR の各分類基準の充足率、治療開始前の疾患活動性 (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000: SLEDAI-

2K), SLICC, EULAR/ACR 各分類基準における臨床および免疫学的項目を比較した。また SLICC damage index (SDI)  $\geq 1$  を臓器障害の指標, Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment-SLEDAI Flare Index (SFI) を再燃の指標とし、臓器障害と再燃の出現時期およびその推移を比較した。

その結果、高松は次の結論を得た。

1. N-com 群および H-com 群の間で、SLE 分類基準の充足率に有意差は認めない。
2. N-com 群は H-com 群と比較して、診断時の SLEDAI-2K, 腎障害の合併率, 抗 dsDNA 抗体の陽性率が有意に低く、発熱が有意に多い臨床的特徴

がある。

3. SLE 発症時の血清補体価は予後の予測に寄与しない。

これらの結果により、診断時の血清補体価に関わらず、既存の基準にて適切に SLE の分類が可能であることが示された。

また診断時の血清補体価により、臨床的特徴の違いを認めるものの、予後に有意な差は認めず、診断時の血清補体価は予後を予測するバイオマーカーにはなり得ないことが示された。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Clinical Presentation and Characteristics of the Upper Extremity in Patients with Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome (筋拘縮型 Ehlers-Danlos syndrome 患者の上肢運動機能および骨関節の調査)

磯 部 文 洋

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Ehlers-Danlos syndrome (EDS) は、結合組織であるコラーゲンやコラーゲン修飾酵素などの先天的な異常により発症する疾患群の総称であり、皮膚・関節の過伸展性、各種組織の脆弱性を特徴とする。臨床的特徴、遺伝形式、および分子遺伝学的評価に基づいて13のサブタイプに分類されている。そのうちの1つが、近年、信州大学医学部遺伝医学教室古庄知己教授が発見した筋拘縮型(古庄型) EDS (musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome: mcEDS) である。CHST14遺伝子またはDSE遺伝子の病的バリエーションに基づく全身性のデルマタン硫酸欠乏により発症する<sup>1)</sup>。同疾患は顔貌上の特徴、先天性多発関節拘縮、進行性の結合組織脆弱性(皮膚過伸展性・脆弱性、関節可動性亢進・易脱臼性および脊椎・手足の変形、巨大皮下血腫等)を認める。上肢を含めた関節異常に起因する全身の運動器障害は、患者のQOL/ADLに影響を与える深刻な合併症(または健康上の問題)であるが、上肢の運動機能および骨関節の形態について詳細に調査した報告はこれまでにない。本研究の目的は、mcEDSにおける世界最大の患者コホートを有する信州大学医学部附属病院に通院するmcEDS患者を対象に、問診、上肢診察所見、画像所見を基にmcEDSの上肢運動機能および脱臼を主体とする障害の特徴を明らかにすることである。

【対象と方法】 信州大学医学部附属病院遺伝子医療研

究センターに定期通院中で本研究の同意が得られたmcEDS患者13例(4-45歳、男6例、女7例)を対象とし、以下の項目の評価を行った。(1)問診:脱臼歴、患者立脚型機能評価質問表(Quick Disability of the Arm, Shoulder, and Hand: Quick DASH) (2)診察:上肢の形態学的異常の有無、上肢関節可動域、関節不安定性の有無、握力 (3)単純X線検査:肘関節・前腕・手関節・手指の撮影、肘関節適合性パラメーター、滑車深さ指数(Trochlear Depth Index: TDI)、前方被覆指数(Anterior Coverage Index: ACI)、開口角(Radiographic Opening Angle: ROA)および手関節パラメーター、橈骨遠位端掌側傾斜(Volar Tilt: VT)、尺骨変異(Ulnar Variance: UV)を測定。

【結果】 12例13関節に脱臼歴があり、うち肩関節脱臼11例、肘関節脱臼2例であった。4例(31%)に手指スワンネック変形、8例(62%)に中手指節関節の伸筋腱脱臼を認めた。成人群では肘関節屈曲143°、伸展-4°と伸展制限を認め、未成年群では肘関節屈曲145°、伸展11°と過伸展を認めた。肘関節の側方不安定性は認めなかった。手関節平均可動域は、屈曲87°、伸展71°と全年齢で良好であった。成人患者の平均握力は8.2kg、未成年群では測定は困難であった。平均QuickDASH scoreは34.5点、未成年群43.8点、成人群26.6点であった。肘関節変形性関節症(Osteoarthritis: OA)は4例、遠位橈尺関節OAは3例、橈骨頭脱臼は6例に認めた。健常者と比較し、TDI、

ACIは減少し、ROAは増加していた。浅い尺骨滑車切痕は12例に認めた。手関節パラメーターは未成年群ではすべて正常範囲であったが、成人群ではVT 21.7°、UV 2.6 mmと増加を認めた。

【考察】mcEDS患者では、肩、肘関節の脱臼が好発した。QuickDASHスコアは未成年群43.8点から成人群26.6点と改善し、上肢運動機能は成長し筋力が増強し改善する傾向にあると言える。一般に反復性肘関節脱臼の病態は、(1)側副靭帯の弛緩または損傷、(2)関節包の弛緩または断裂、(3)浅い滑車切痕などによるとされている。mcEDS患者においては肘関節に明らかな側方不安定性は認めず、関節包の弛緩や浅い滑車切痕が亜脱臼や脱臼を誘発した可能性がある。浅い滑車切痕は、通常先天性形成不全と尺骨鉤状突起骨折に続発するものの2つに分類される。本研究では、尺骨鉤状突起骨折の見落としを防ぐために計測される、肘関節パラメーターTDI、ACI、ROAを計測し、浅い滑車切痕を定量化した。その結果、mcEDS患者では健常者と比較しTDI、ACIは低く、ROAが高い、浅い滑車切痕を12例に認めており、骨関節の形態異常が易脱臼性に影響していると考えられた。

【結論】mcEDS患者は筋力低下が顕著であり、肘関節脱臼は、先天的な関節包・靭帯の弛緩や浅い尺骨滑車切痕により不安定性を生じ発症した可能性がある。

1) Kosho T., Miyake N., Yamamoto N., et al. A response to: loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 (D4ST1/CHST14) function represents the first dermatan sulfate biosynthesis defect, “dermatan sulfate-deficient Adducted Thumb-Clubfoot Syndrome”. Which name is appropriate, “Adducted Thumb-Clubfoot Syndrome” or “Ehlers-Danlos syndrome”? Hum Mutat. 2011; 32(12): 1507-9.

(論文審査の結果の要旨)

Ehlers-Danlos syndrome (EDS)は、結合組織であるコラーゲンなどの先天的な異常により発症する疾患群の総称であり、皮膚・関節の過伸展性、各種組織の脆弱性を特徴とする。臨床的特徴、遺伝形式、および分子遺伝学的評価に基づいて13のサブタイプに分類されている。そのうちの1つが、近年、信州大学医学部遺伝医学教室古庄知己教授が発見した筋拘縮型(古庄)EDS(musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome: mcEDS)である。CHST14遺伝子またはDSE遺伝子の病的バリエーションに基づく全身性のデルマタン硫酸欠乏により発症する。同疾患は顔貌上の特徴、先天性多発関節拘縮、進行性の結合組織脆弱性(皮膚過

伸展性・脆弱性、関節可動性亢進・易脱臼性および脊椎、巨大皮下血腫等)を認める。上肢を含めた関節異常に起因する全身の運動器障害は、患者のQOL/ADLに影響を与える深刻な合併症(または健康上の問題)であるが、上肢の運動機能および骨関節の形態について詳細に調査した報告はない。本研究は、mcEDSにおける世界最大の患者コホートを有する信州大学医学部附属病院に通院するmcEDS患者を対象に、問診、上肢診察所見、画像所見を基にmcEDSの上肢運動機能および脱臼を主体とする障害の特徴を明らかにすることを目的とした。

mcEDS患者13例(4-45歳、男6例、女7例)を対象とし、以下の項目の評価を行った。(1)問診:脱臼歴、患者立脚型機能評価質問表(Quick Disability of the Arm, Shoulder, and Hand: QuickDASH)(2)診察:上肢関節可動域、握力(3)単純X線検査:肘関節・手関節・手指を読影、肘関節適合性パラメーター、滑車深さ指数(Trochlear Depth Index: TDI)、前方被覆指数(Anterior Coverage Index: ACI)、開口角(Radiographic Opening Angle: ROA)および手関節パラメーター、橈骨遠位端掌側傾斜(Volar Tilt: VT)、尺骨変異(Ulnar Variance: UV)を測定した。

調査結果は以下の通りである。

1. 12例13関節に脱臼歴があり、うち肩関節脱臼11例、肘関節脱臼2例、平均QuickDASH scoreは34.5点、未成年群43.8点、成人群26.6点であった。
2. 成人群では肘関節屈曲143°、伸展-4°と伸展制限を認め、未成年群では肘関節屈曲145°、伸展11°と過伸展を認めた。手関節平均可動域は屈曲87°、伸展71°と全年齢で良好であった。成人患者群の平均握力は8.2 kg、未成年群では測定は困難であった。
3. 肘関節変形性関節症(Osteoarthritis: OA)を4例、遠位橈尺関節OAを3例に認めた。健常者と比較し、TDI、ACIは減少し、ROAが増加した、浅い尺骨滑車切痕を12例に認めた。手関節パラメーターは未成年群ではすべて正常範囲であったが、成人群ではVT 21.7°、UV 2.6 mmと増加を認めた。本研究結果よりmcEDS患者では、肩、肘関節の脱臼が好発し、QuickDASHスコアは未成年群43.8点に対して成人群26.6点と良好であったことから、上肢運動機能は成長し筋力が増強し改善する傾向にあると言える。また、肘関節脱臼は、先天的な関節包・靭帯の弛緩に加えて浅い尺骨滑車切痕により不安定性を生じ発症した可能性も明らかとなった。小児から成人まで

の mcEDS 患者の上肢運動機能について初めて包括的に報告しており、本研究結果をもとに小児の患者さんとその保護者に長期予後と日常生活で気を付けることとお話できるとともに、予防方策を考える基礎デー

タになり得ることが臨床上で大きな価値があると思われる。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。

Non-viral inducible caspase 9 mRNA delivery using lipid nanoparticles against breast cancer: An in vitro study (脂質ナノ粒子を使用した非ウイルス誘導性カスパーゼ9 mRNA の乳がんに対する送達: in vitro 研究)

中 嶋 郁 美

(論文の内容の要旨)

**【背景と目的】** 乳がんの従来の治療戦略において、高度な乳がんは抗原の喪失又は標的抗原の欠如によって耐性を示すほか、治療期間中に化学療法に対する多剤耐性を獲得する。したがって、乳がんに対し幅広く効果をもたらす新規治療法の開発が切望されている。免疫調節遺伝子または自殺遺伝子の使用を含む遺伝子治療は、進行/難治性がんの有望な治療法として期待されている。誘導性カスパーゼ9 (iC9) は、元来 CART 療法の安全性スイッチとして開発されたが、がん遺伝子治療に対しても応用研究が行われている。本研究では、最適化された脂質組成により腫瘍指向性を示す脂質ナノ粒子 (LNP) を用いて、がん細胞に iC9 mRNA を選択的に送達することで抗腫瘍効果をもたらす、安全で新しい難治性乳がんの治療戦略の開発を目指した。

**【材料および方法】** MDA-MB231 (TNBC), SKBR3 (HER2+), および MCF-7 (ER+) の3つの乳がん細胞株を用いて iC9 mRNA 内包 LNP および CID を用いてアポトーシス細胞死誘発作用を検証した。LNP は、乳がん腫瘍株に発現しやすい組成を GFP mRNA 内包 LNP を用いて選択した。iC9 mRNA は、コーディング領域に mFKBP-ΔCaspase9 を組み込んで作製した。アポトーシスによる細胞死であることを確認するためにカスパーゼ阻害剤である qVD-Oph を用いて、生細胞率、カスパーゼ9 活性およびカスパーゼ3/7 活性を測定した。また、各乳がん細胞株におけるアポトーシス関連遺伝子 (BAX, Bcl-2, Apaf-1, CASP9, CASP3, XIAP) の発現を qPCR にて定量解析した。最後に、iC9-CID の効果が弱かった MCF-7 に対して Bortezomib を併用したときの iC9-CID による細胞傷害活性を検証した。

**【結果】** iC9 mRNA 内包 LNP (iC9-LNP) と CID の添加により、乳がん細胞株に対して細胞傷害活性を示したが、本治療法の感受性は細胞株毎に違いが認めら

れた。iC9-LNP 低用量において最も感受性の良い細胞は SKBR3 (HER2+) であった。SKBR3 (HER2+) は、抗アポトーシス因子である Bcl-2 が最も低値で、BAX/Bcl-2 比が高かった。MDA-MB231 (TNBC) においては低用量で SKBR3 (HER2+) より効果が弱かったが、高用量においては SKBR3 と同等の効果と CID 添加なしに細胞死が起きた。MDA-MB231 においては、iC9 発現量が最も高かった。また、アポトーシス促進因子である BAX が最も高く、内因性カスパーゼ因子である Apaf-1, CASP9, CASP3 値が最も高かった。MCF-7 (ER+) においては、iC9-LNP 低用量では細胞死は示さず、iC9-LNP 高用量において細胞死を示したがその効果は弱かった。iC9-LNP 高用量添加による iC9 発現は SKBR3 と同程度であったが、Caspase9 活性が誘導されていなかった。MCF-7 は、抗アポトーシス因子 Bcl-2 が高値であり、内因性カスパーゼ阻害因子である XIAP も高値傾向であった。Bortezomib を併用すると Bcl-2 が低下し、BAX/Bcl-2 値が上昇した。Bortezomib 併用により、iC9-CID による細胞死誘発が回復し、Caspase-9 活性および Caspase-3/7 活性が誘発された。

**【結論】** 本研究において、iC9 mRNA-LNP および CID によって各乳がん細胞のアポトーシス細胞死を誘導できることが示された。各乳がん細胞に対する iC9-CID の効果の違いが見られたが、この違いは、アポトーシス関連遺伝子の BAX/Bcl-2 比と関連している可能性が示された。さらに、抗アポトーシス因子 Bcl-2 が高い腫瘍細胞においては iC9-CID の効果が弱い可能性があるが、Bortezomib を併用することによって効果が回復する可能性が示唆された。また、難治性乳がんであるトリプルネガティブ乳がん (TNBC) 細胞株である MDA-MB231 に対して、強い抗腫瘍効果が示された。したがって、iC9 mRNA 搭載 LNP を用いたがん遺伝子治療は、乳がん、特に悪性度が高い難治性乳



がんの治療に有望な代替手段となる可能性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

脂質ナノ粒子 (LNPs) を用いて、がん細胞に自殺遺伝子 (iC9 mRNA) を送達することで抗腫瘍効果をもたらす新しい乳がんの治療戦略の開発を目指した。

MDA-MB231 (TNBC), SKBR3 (HER2+), および MCF-7 (ER+) の3つの乳がん細胞株を用いて iC9 mRNA 内包 LNPs および CID を用いてアポトーシス細胞死誘発作用を検証した。アポトーシスによる細胞死であることを確認するためにカスパーゼ阻害剤である qVD-Oph を用いて、生細胞率、カスパーゼ9活性およびカスパーゼ3/7活性を測定した。また、各乳がん細胞株におけるアポトーシス関連遺伝子 (BAX, Bcl-2, Apaf-1, CASP9, CASP3, XIAP) の発現を qPCR にて定量解析した。最後に、iC9-CID の効果が弱かった MCF-7 に対して Bortezomib を併用したときの iC9-CID による細胞傷害活性を検証した。

1. iC9 mRNA 内包 LNPs (iC9-LNPs) と CID の添加により細胞傷害活性を示したが、その効果は各細胞株間で違いがあった。
2. iC9-CID の最も感受性の良い細胞は SKBR3 であった。SKBR3 は、Bcl-2 が最も低値で、BAX/Bcl-2 比が高かった。
3. MDA-MB231 においても良好なアポトーシス細胞死を誘導したが、iC9-LNPs 高用量において CID

添加なしに細胞死が起きた。MDA-MB231 においては、iC9 発現量が最も高かった。また、BAX, Apaf-1, CASP9, CASP3 値が最も高かった。

4. MCF-7 においては、iC9-LNPs 低用量では細胞死は示さず、iC9-LNPs 高用量において細胞死を示したがその効果は弱かった。iC9-LNPs 高用量添加による iC9 発現は SKBR3 と同程度であったが、Caspase9 活性が誘導されていなかった。MCF-7 は、Bcl-2 が高値であり、XIAP も高値傾向であった。Bortezomib を併用すると Bcl-2 が低下し、BAX/Bcl-2 比が上昇した。Bortezomib 併用により、iC9-CID による細胞死誘発が回復し、Caspase-9 活性および Caspase-3/7 活性が誘発された。

これらの結果より、iC9mRNA-LNPs-CID は、乳がん細胞に対してアポトーシス細胞死を誘導する細胞傷害活性を示したが、各乳がん細胞に対して効果の違いがあった。iC9-CID の効果の差は、BAX/Bcl-2 比と関連している可能性が示唆された。さらに、抗アポトーシス因子 Bcl-2 が高い腫瘍細胞においては iC9-CID の効果が弱い可能性があるが、Bortezomib を併用することによって効果が回復する可能性が示唆された。iC9mRNA 搭載 LNPs を用いたがん遺伝子治療は、乳がんの治療に有望な代替手段となる可能性が示された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Inflammation and subsequent nociceptor sensitization in the bone marrow are involved in an animal model of osteoarthritis pain (変形性関節症モデルの痛みには骨髄での炎症と侵害受容器の感作が関与している)

村上 徹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 関節炎患者の MRI 画像では骨髄内病変 (bone marrow lesions: BMLs) が認められ、関節炎の進行や痛みの程度と強く相関することが報告されている。一方、骨髄には A $\delta$  線維や C 線維などの痛覚受容神経が豊富に存在しており、骨髄内圧の上昇、骨髄内 pH の低下、骨髄内の機械的刺激により痛みが生じることが示されている。そこで本研究では、関節炎において関節内の炎症が骨髄内へと波及し BMLs を生じ、その結果、骨髄内の痛覚線維 (侵害受容器) が感作され、関節痛を生じるとの仮説を立て、その検証を行った。

【方法】 本研究は本学動物実験委員会の承認後 (No.

290024) に行った。セボフルラン麻酔下に 6-8 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット膝関節内へ 150 $\mu$ l の complete Freund's Adjuvant (CFA) もしくは生理食塩水を投与し、adjuvant-induced arthritis (AIA) モデルとコントロールモデルを作成した。行動生理学的実験として、モデル作成翌日から 14 日後までの痛みを患肢荷重負荷 (weight bearing: WB) と足底への機械刺激に対する逃避閾値 (mechanical withdrawal threshold: MWT) で評価した。また、AIA モデル作成 3 日後に CFA 投与側脛骨骨髄内に 1% リドカインあるいは生理食塩水 50 $\mu$ l を投与し、患肢 WB と MWT の変化を評価した。また、MRI 画像および免疫組織学的手法を用いて AIA による骨髄内変化をモデル作成前、3 日

後、14日後に評価した。電気生理学的実験としてモデル作成3-7日後に、AIAモデルとコントロールモデルで、骨髄内への機械刺激（バルーン拡張）に応答する、脳への痛覚投射ニューロンである脊髄後角V層の単一ニューロン活動のin vivo細胞外記録を行った。

**【結果】** AIAモデル作成翌日から14日後まで患肢WBとMWTが有意に低下した。AIAモデルの脛骨骨髄内へのリドカイン投与により、投与5分後に患肢WBとMWTが有意に増加し鎮痛効果を示した。MRI T2強調画像でモデル作成3日後、14日後に膝関節周囲と脛骨近位端骨髄に高信号領域を認めた。また同部位のヘマトキシリン・エオジン染色ではモデル作成3日後、14日後に浮腫と充血を認め、myeloperoxidase染色ではモデル作成3日後、14日後に骨髄内で好中球の有意な増加を認め、MRI変化と相関した。脊髄後角V層ニューロン活動は、AIAモデルでは自発発火の頻度が増加しており、足底への機械刺激（触覚、痛覚）による応答が増強し、脛骨骨髄内機械刺激（バルーン拡張）に応答する発火頻度が増強した。

**【結論】** 本研究の結果から、関節炎により骨髄内に組織学的な炎症が波及し、MRIにおけるBMLsが生じ、その結果、骨髄内の侵害受容器が感作され、関節痛の発生に関与することが示された。また、局所麻酔薬により骨髄内神経を遮断することで鎮痛効果を発揮することから、骨髄を標的とした新規鎮痛薬・法により関節痛を緩和できる可能性が示唆された。

#### （論文審査の結果の要旨）

関節炎患者のMRI画像では骨髄内病変（bone marrow lesions: BMLs）が認められ、関節炎の進行や痛みの程度と強く相関することが報告されている。一方、骨髄には痛みを受容しうる神経が豊富に存在しており、様々な刺激により痛みが生じることが示されている。本研究では、関節炎において関節内の炎症が骨髄内へと波及しBMLsを生じ、その結果、骨髄内の侵害受容器が感作され、関節痛を生じるとの仮説を立て、その検証を行った。

6-8週齢の雄性Sprague-Dawleyラット膝関節内へ150 $\mu$ lのcomplete Freund's Adjuvant (CFA)もしくは生理食塩水を投与し、adjuvant-induced arthritis (AIA)モデルとコントロールモデルを作成した。行動生理学的実験として、モデル作成翌日から14日後までの痛みを患肢荷重負荷（weight bearing: WB）と足底への機械刺激に対する逃避閾値（mechanical withdrawal threshold: MWT）で評価した。また、

AIAモデル作成3日後にCFA投与側脛骨骨髄内に1%リドカインあるいは生理食塩水50 $\mu$ lを投与し、患肢WBとMWTの変化を評価した。また、MRI画像および免疫組織学的手法を用いてAIAによる骨髄内変化をモデル作成前、3日後、14日後に評価した。電気生理学的実験としてモデル作成3-7日後に、骨髄内への機械刺激（バルーン拡張）に応答する脳への痛覚投射ニューロンである脊髄後角V層の単一ニューロン活動のin vivo細胞外記録を行った。

その結果、村上徹は次の結論を得た。

1. AIAモデル作成翌日から14日後まで患肢WBとMWTが有意に低下した。
2. AIAモデルの脛骨骨髄内へのリドカイン投与により、投与5分後に患肢WBとMWTが有意に増加し鎮痛効果を示した。
3. MRI T2強調画像でモデル作成3日後、14日後に膝関節周囲と脛骨近位端骨髄に高信号領域を認めた。
4. モデル作成3日後、14日後のMRI高信号領域における組織評価では、H&E染色で浮腫と充血を認め、myeloperoxidase染色では好中球の有意な増加を認めた。
5. 脊髄後角V層ニューロン活動は、AIAモデルでは自発発火の頻度が増加しており、足底への機械刺激（触覚、痛覚）による応答が増強し、脛骨骨髄内機械刺激に応答する発火頻度が増強した。

これらの結果より、関節炎により骨髄内に組織学的な炎症が波及し、MRIにおいてBMLsが生じ、その結果、骨髄内の侵害受容器が感作され、関節痛の発生に関与することが示された。また、局所麻酔薬により骨髄内神経を遮断することで鎮痛効果を発揮することから、骨髄を標的とした新規鎮痛薬により関節痛を緩和でき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。

Suppression of CEBP $\delta$  recovers exhaustion in anti-metastatic immune cells (CEBP $\delta$  抑制により抗転移免疫細胞の機能低下を回復する)

YIN CHENXUE

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 The pre-metastatic microenvironment consists of pro-metastatic and anti-metastatic immune cells in the early stages of cancer, when the primary tumor begins to proliferate. Redundantly, pro-inflammatory immune cells predominated during tumor growth. Although it is well known that pre-metastatic innate immune cells and immune cells fighting primary tumor cells become exhausted, the mechanism by which this occurs is unknown. We discovered that anti-metastatic NK cells were mobilized from the liver to the lung during primary tumor progression and that the transcription factor CEBP $\delta$ , which was upregulated in a tumor-stimulated liver environment, inhibited cell attachment to the fibrinogen-rich bed in pulmonary vessels and sensitization to the environmental mRNA activator. CEBP $\delta$ -siRNA treated anti-metastatic NK cells regenerated the binding proteins that support sitting in fibrinogen-rich soil, such as vitronectin and thrombospondin, increasing fibrinogen attachment. Furthermore, CEBP $\delta$  knockdown restored an RNA-binding protein, ZC3H12D, which captured extracellular mRNA to increase tumoricidal activity. Refreshed NK cells using CEBP $\delta$ -siRNA with anti-metastatic abilities would work at metastatic risk areas in the pre-metastatic phase, resulting in a reduction in lung metastasis. Furthermore, tissue-specific siRNA-based therapy in lymphocyte exhaustion may be beneficial in the treatment of early metastases.

(論文審査の結果の要旨)

CEBP $\delta$ -siRNA treated anti-metastatic NK cells regenerated the binding proteins that support sitting in fibrinogen-rich soil, such as vitronectin and thrombospondin, increasing fibrinogen attachment. Furthermore, CEBP $\delta$  knockdown recover an RNA-binding protein, ZC3H12D, which captured extracellular mRNA to increase tumoricidal activity. Refreshed NK cells using CEBP $\delta$ -siRNA with anti-metastatic abilities would work at metastatic risk areas in the pre-metastatic phase, resulting in a reduction in lung metastasis.

This is the result. Next, this is the conclusion.

1. During the progression of the primary tumor, there is an upregulation of fibrinogen binding protein expression of Vtn in the liver, followed by a down-regulation. At the same time in the lungs, the expression of Tsp is upregulated.
2. Vtn and CEBP $\delta$  showed inverse expression patterns in tumor-bearing liver
3. CD45<sup>+</sup> cells in the pre-metastatic phase. CEBP $\delta$ , a critical transcription factor, regulates the expression of Vtn and Tsp as well as the migration of liver CD45<sup>+</sup> cells to the lungs in mice with tumors.
4. B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> NK cells suppress lung metastasis in a CEBP $\delta$  dependent manner.

Therefore, based on these results, it indicates that CEBP $\delta$ -siRNA can activate exhausted NK cells and thereby inhibit tumor metastasis. So both the primary and secondary reviewers unanimously agree that this study has a certain value as a thesis.

Scattered cerebral infarction in the corona radiata predicts worse outcomes (放線冠に散在する脳梗塞は予後不良を予測する因子である)

小林 優也

(論文の内容の要旨)

【背景】 Branch atheromatous disease (BAD) は、主幹動脈から枝分かれした穿通枝の起始部に生じた狭窄、もしくは閉塞により脳梗塞が発症する、ラクナ梗塞の

1つの病態である。錐体路を含む穿通枝領域に徐々に脳梗塞巣が出現するため、治療開始後でも症状が進行し、時に重篤な麻痺を生じることがあるが、脳梗塞の代表的な病型分類である NINDS III, TOAST 分類に

はその病型の規程はない。このBADの症状の悪化に関連する因子として、糖尿病、運動麻痺の程度、脳梗塞巣の位置や体積、血圧が報告されている。MRIの発達と普及に伴い、脳梗塞の画像的診断技術が向上してきた。我々は、レンズ核線条体動脈 (lenticulostriate artery; LSA) 領域におけるBADの中に、MRIでLSAの起始部は単一の脳梗塞巣となるが、遠位部に向かうにつれ脳梗塞巣が散在する一群があることに注目した。このような脳梗塞巣となる病態の臨床的特徴や予後に関して、未だに検討された報告はない。

**【目的】** 散在する脳梗塞巣を呈するBADの臨床的特徴や予後を明らかにする。

**【方法】** 研究対象：本研究は単施設の後方視的研究であり、2010年1月から2020年12月に脳梗塞の診断で伊那中央病院に入院した連続患者1,840例を対象とした。このうち、LSA領域のラクナ梗塞患者は270例で、MRI拡散強調画像で5mm幅のスライスの3スライス以上に広がる脳梗塞巣を呈しBADと判定されたのは177例であった。発症から5日以降に来院した8例、中大脳動脈に50%以上の狭窄がある7例、入院中に新たに脳卒中を発症した3例、入院中に感染症で死亡した3例、脳腫瘍を併発していた1例、偽痛風を生じた1例を除外し、最終的に154例の患者が研究に組み込まれた。MRI拡散強調画像で、LSA起始部から梗塞巣が一塊になっている患者を“single group”に、LSA起始部の梗塞巣が一塊であるが頭側へ向かうに従いMRIのaxial像で互いに独立した複数の梗塞巣となる患者を“scattered group”に分類し、2群間の臨床的な特徴を比較検討した。本研究は、伊那中央病院倫理委員会の承認を得た（承認番号：20-5）。

データ収集と定義：年齢、性別、喫煙、高血圧症、脂質異常症、糖尿病の有無、脳卒中患者の身体機能的な指標であるmodified Rankin Scale (mRS)、また神経学的重症度を評価するNational Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS)、脳梗塞巣の位置、治療内容の情報を収集した。入院後24時間以上継続するNIHSS 1以上の変化を症状の悪化とした。梗塞巣の位置に関しては、MRIでの放線冠のスライスで側脳室の前角と後角に接線を引き、その正中線によって前方と後方の2つに分類した。梗塞巣が正中線上に位置する場合は、面積の半分以上が前方に観察された場合は前方、後方に観察された場合は後方と定義した。

**【結果】** 患者の特徴：single groupに119例（中央値77歳、男性割合57.1%）、scattered groupに35例（中

央値71歳、男性割合57.1%）が分類された。年齢、性別、喫煙（40.2% vs. 36.4%,  $p=0.93$ ）、高血圧症（88.2% vs. 88.6%,  $p=1$ ）、脂質異常症（48.7% vs. 54.3%,  $p=0.7$ ）、糖尿病（21.4% vs. 28.6%,  $p=0.51$ ）、病前mRS（中央値0 vs. 0,  $p=0.35$ ）、退院時mRS（中央値4 vs. 3,  $p=0.89$ ）、入院時NIHSS（中央値2 vs. 2,  $p=0.44$ ）、梗塞病巣部位（前方の割合42.0% vs. 40.0%,  $p=0.99$ ）に有意差はなかった。rt-PAの投与（5% vs. 2.9%,  $p=0.93$ ）、抗血小板療法（95.8% vs. 100%,  $p=1$ ）、エダラボンの使用（73.1% vs. 71.4%,  $p=1$ ）に差はなかった。

悪化の予測に関する多変量回帰モデル：多変量解析では、group (singleまたはscattered) (odds ratio, 2.5 [95% CI, 1.11-5.74],  $p<0.03$ )、前方か後方による梗塞巣の位置 (odds ratio, 3.98 [95% CI, 1.87-9.09],  $p=0.0006$ ) が入院後の症状悪化の独立予測因子であった。

**【結論】** 年齢、性別、喫煙、高血圧症、脂質異常症、糖尿病の有無、発症前と退院時のmRS、NIHSSの経過、脳梗塞巣の位置、治療内容に関してsingle group, scattered groupの間には差がなかった。Scattered groupであること、つまり散在性の脳梗塞巣となるLSA領域のBADは、既知の脳梗塞巣の位置と独立した入院後症状が悪化する因子である。

#### （論文審査の結果の要旨）

Branch atheromatous disease (BAD) はアテローム性の病態を主体とした分枝血管の狭窄・閉塞による、脳梗塞の一群である。主要な脳梗塞の病型分類には記載がなく、病態や治療方法については明らかになっていない。本研究では、lenticulostriate artery (LSA) の閉塞、狭窄を原因として発症するBADの脳梗塞の病変が一塊になる患者と、散在性になる患者が存在するに注目し、これらの患者の背景、臨床的経過の特徴について解析した。

伊那中央病院に2010年1月から2020年12月までに脳梗塞で入院した連続患者1,840人を対象とした単施設後方視的研究である。一塊の梗塞巣となる患者群をsingle group、散在性の梗塞巣となる患者群をscattered groupに分類した。LSA領域のBAD患者154名のうち、single groupには119名、scattered groupには35名に振り分けられた。両群の患者背景の比較、また入院後の症状増悪の有無と散在性の脳梗塞巣との関連について多変量解析を用いて検討した。

その結果は以下の通りであった。

1. single group, scattered group の比較では、年齢、性別、喫煙の有無、高血圧症、脂質異常症、糖尿病、脳梗塞患者の生活レベルの指標となる入院時 mRS、脳梗塞の重症度評価である入院時 NIHSS、梗塞巣の位置、治療内容に差はなかった。
2. 入院後の症状増悪の有無に関する多変量解析では、既報告にある梗塞巣が放線冠のスライスで後方に位置することに加え、散在性の梗塞巣であることが症状の増悪に関連する独立した因子であった。  
散在性の脳梗塞巣となる LSA の BAD は、入院後も症状が悪化する可能性がある。散在性の梗塞となる

一部の患者では、再撮像された MRI 画像で梗塞巣が増大し、それぞれの脳梗塞巣が癒合する画像所見がみられた。悪化する原因として、散在する梗塞巣周囲に存在するペナンプラが経過で虚血に陥ることが予想された。また、散在性の脳梗塞となる機序として、起始部の狭窄・閉塞によるアテローム性の機序や、LSA と他血管との競合、吻合による血流の不均一な分布の領域が虚血に陥るためと考えられた。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Central extracorporeal membrane oxygenation with left-ventricular vent for fulminant myocarditis: a retrospective study (劇症型心筋炎に対する左室ベント併用による中心性体外式膜型人工肺の後方視的検討)

小 松 正 樹

### (論文の内容の要旨)

【目的】劇症型心筋炎は急性重症心不全を呈し、機械的心循環補助を必要とする状態と定義される。このような患者の治療には左室の減圧が必要である。この後方視的研究では、難治性劇症型心筋炎の治療において、左室減圧を伴う中心性体外式膜型人工肺療法 (Central ECMO with LV vent) の転機を評価することを目的としている。

【対象と方法】2015年1月から2021年2月にかけて、7人の連続した劇症型心筋炎患者 (平均年齢:  $41.1 \pm 26.1$  歳) に、左室減圧用の18Fr カニューレをECMO回路にY字型に組み込まれたCentral ECMO with LV ventを用いた患者のベースライン特性および術後転帰を収集した。

【結果】入院時、全例がVA-ECMOを先行しており、85.7% (6/7) がIABPを導入していた。しかし、そういった補助循環の使用を行っていても全例が難治性心原性ショックの状態であった。6人の患者は平均  $20.0 \pm 11.5$  日のCentral ECMO with LV ventサポート後に心機能が正常に回復し、5人の患者は心不全の再発を認めなかった。平均ICU滞在日数は  $36.7 \pm 23.5$  日、平均入院日数は  $60.6 \pm 24.9$  日であった。病院での死亡率は28.6% (2/7) であった。入院中に敗血症と脳卒中により2名の患者が死亡した。

【結語】従来の補助循環療法を行ったにもかかわらず、状態悪化を認める劇症心筋炎に対しては左室ベントを用いた中心性ECMOは有効であった。

### (論文審査の結果の要旨)

劇症型心筋炎は心筋炎の中でも予後が不良で、稀な疾患とされている。心原性ショックによりV-A ECMOを装着した患者に対して左室減圧を行うことにより予後が改善するとの報告がある。しかし、劇症型心筋炎における左室減圧の意義に関するデータは限られている。今回2015年1月から2021年2月にかけて劇症型心筋炎に対してCentral ECMO with LV ventを導入した7例を後方視的に検討した。

その結果次の結論を得た。

1. 患者は全例がVA-ECMOを先行しており、中等度から重度の肺水腫を伴う呼吸不全を認めており、6例85.7%が挿管管理となっていた。
2. リンパ球性心筋炎が6例85.7%、好酸球性心筋炎は1例14.3%であった。
3. Central ECMO with LV vent導入後にCO, CIは改善した。central ECMOに変更することで送血管、脱血管が太くなり、ECMO回転数は  $2674 \pm 632$  rpm から  $2181 \pm 262$  rpm に減ったにもかかわらずECMO流量は  $2.3 \pm 0.6$  l/min から  $3.8 \pm 0.8$  l/min に増加した。
4. 6人の患者は平均  $20.0 \pm 11.5$  日のCentral ECMO with LV ventサポート後に心機能が正常に回復した。
5. 合併症は出血再開胸が4例57.1%と最多であった。
6. 病院での死亡率は28.6% (2/7) であった。入院中に敗血症と脳卒中により2名の患者が死亡した。

循環補助装置を要する劇症型心筋炎の生存率は50～80%程度と報告されており、当院での患者群はVA-ECMOによる治療が困難な症例であり、5例71.4%の生存率は満足のいく結果であった。Central ECMO with LV ventの欠点は出血性合併症と血栓が知られており今回も出血再開胸を高率に認めたが血栓に関してはLV ventの血栓形成は認めず、18Frの小口径カニューレを選択したことにより、血流速度を高速で維

持したことが血栓形成を予防した可能性がある。LV ventの流量は400～800 ml/minであったが、十分に左室の減圧を得られた。VA-ECMOで改善が得られず、呼吸器不全を伴った劇症型心筋炎に対してCentral ECMO with LV ventは有効な治療であった。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Suture Augmentation Does Not Change Biomechanical Properties and Histological Remodeling of Tendon Graft in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Study in a Porcine Model (前十字靭帯再建術における高強度補強糸が移植腱の生体力学的構造特性および組織学的リモデリングに与える影響 (ブタモデルを用いた検討))

岩 浅 智 哉

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】前十字靭帯 (ACL) は膝関節における重要な支持機構であり、損傷した場合には自家腱移植による ACL 再建が広く行われている。しかし ACL 再建においては腱のリモデリングにかなりの期間を要するため、スポーツ復帰までに長期のリハビリテーションが必要であることが課題である。近年、超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) 縫合糸/テープが開発され、移植腱に併用して補強に用いる方法、Suture augmentation (SA) 法が ACL 再建にも応用されている。この補強術は移植腱の構造特性が低下する初期の再血行期に移植腱を保護することをコンセプトとしており、術後の早期スポーツ復帰を可能にする効果に期待されている。本研究の目的は、ブタ ACL 再建モデルにおいて、SA として UHMWPE 縫合糸を併用することの初期安全性を評価し、この方法が膝前方安定性や移植腱自体の構造特性に影響を与えるか、組織学的リモデリングに影響するか、異物による炎症を引き起こすかを検討することであった。

【方法】10頭のブタを無作為に2群に分け、全身麻酔下に5頭の右膝にSAを用いた自家腱ACL再建 (SA群)、残りの5頭の右膝にSAを用いない自家腱ACL再建 (SAなし群) を施行した。全ブタの左膝に正中縦皮膚切開を行い、直ちに閉創し sham 手術とした。術後12週目に全頭を安楽死させ、膝関節を取り出して移植腱・SAの脛骨側固定を除去し引張試験機に固定した。力学的試験として、脛骨前方引き出しの繰り返し負荷試験により膝前方安定性を評価した後、引張破断試験により移植腱の構造特性 (最大破断荷重、降伏

荷重、剛性、破断伸び) を評価した。力学試験の直後に、破断した移植腱の脛骨側を採取しグラフの長軸に沿って4μm厚の矢状断面を作成しHE染色にて靭帯組織成熟度指数 (LTMI) スコアおよび異物反応の有無を評価した。

【結果】膝前方安定性はSA群・SAなし群の間に有意差を認めなかった (SA群 $1.19 \pm 0.78$  mm, SAなし群 $1.08 \pm 0.42$  mm,  $P=1$ )。最大破断荷重、降伏荷重、剛性、破断伸びはSA群・SAなし群の間に有意差を認めなかった (それぞれ $P=0.31, 1, 1, 1$ )。LTMIスコアはSA群・SAなし群の間に有意差を認めなかった (SA群 $26.6 \pm 0.5$ , SAなし群 $26.2 \pm 0.4$ ,  $P=0.24$ )。すべての移植腱に異物反応は認めなかった。

【考察】本研究の結果からブタACL再建後12週においてSA法が膝前方安定性や移植腱の構造特性に影響を与えず、組織学的リモデリングを妨げず、異物反応を引き起こさないことが明らかとなった。ACL再建における人工靭帯と自家移植腱の併用は過去にも試みられたが、動物実験でストレスシールドによる移植腱の構造特性低下、臨床研究で移植腱のリモデリング不良、異物反応による滑膜炎や移植腱の断裂が頻発したため、ACL再建において人工靭帯の併用は激減した。それに対し、SA法は臨床研究で元の活動レベルへの復帰率を改善し、バイオメカ・in vivo 研究では移植腱保護作用が報告されているが、SA法が移植腱自体の構造特性や初期リモデリングに与える影響や、異物反応の有無について評価した基礎研究はなかった。

本研究において、SA法が移植腱の構造特性の低下や組織学的リモデリング不良を起こさなかった原因と

しては、UHMWPE 縫合糸は破断荷重が従来の人工靭帯よりも低く、また SA を移植腱よりもやや緩い独立した張力で固定しているので、ストレスシールドが起きにくかった可能性が有る。また、UHMWPE 縫合糸は直径が小さく破断荷重が高いので、インピンジメントによる人工靭帯破断の摩耗粉が発生しにくいいため異物反応がみられなかった可能性が考えられた。

【結論】 ACL 再建において UHMWPE 縫合糸による補強は、膝前方安定性や移植腱の構造特性に影響を与えず、組織学的リモデリングを妨げず、異物反応を引き起こさない。本研究の結果は、SA 法を用いた ACL 再建術の有用性を検証するための更なる臨床研究の基礎となる。

(論文審査の結果の要旨)

前十字靭帯 (ACL) は膝関節における重要な支持機構であり、損傷した場合には自家腱移植による ACL 再建が広く行われている。しかし ACL 再建においては腱のリモデリングにかなりの期間を要するため、スポーツ復帰までに長期のリハビリテーションが必要であることが課題である。近年、超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) 縫合糸/テープが開発され、移植腱に併用して補強に用いる方法、Suture augmentation (SA) 法が ACL 再建にも応用されている。この補強術は移植腱の構造特性が低下する初期の再血行期に移植腱を保護することをコンセプトとしており、術後の早期スポーツ復帰を可能にする効果に期待されている。本研究は、ブタ ACL 再建モデルにおいて、SA として UHMWPE 縫合糸を併用することの初期安全性を評価し、この方法が膝前方安定性や移植腱自体の構造特性に影響を与えるか、組織学的リモデリングに影響するか、異物による炎症を引き起こすかを検討することを目的とした。

10頭のブタを無作為に2群に分け、全身麻酔下に5頭の右膝に SA を用いた自家腱 ACL 再建 (SA 群)、残りの5頭の右膝に SA を用いない自家腱 ACL 再建 (SA なし群) を施行した。全ブタの左膝に正中縦皮膚切開を行い、直ちに閉創し sham 手術とした。術後12週目に全頭を安楽死させ、膝関節を取り出して移植腱・SA の脛骨側固定を除去し引張試験機に固定した。力学的試験として、脛骨前方引き出しの繰り返し負荷試験により膝前方安定性を評価した後、引張破断試験により移植腱の構造特性 (最大破断荷重、降伏荷重、剛性、破断伸び) を評価した。力学試験の直後に、破断した移植腱の脛骨側を採取しグラフトの長軸に沿って4 $\mu$ m 厚の矢状断面を作成し HE 染色にて靭帯組織成熟度指数 (LTMI) スコアおよび異物反応の有無を評価し、以下の結果を得た。

1. 膝前方安定性は SA 群・SA なし群の間に有意差を認めなかった (SA 群 $1.19\pm 0.78$  mm, SA なし群 $1.08\pm 0.42$  mm,  $P=1$ )。最大破断荷重、降伏荷重、剛性、破断伸びは SA 群・SA なし群の間に有意差を認めなかった (それぞれ  $P=0.31, 1, 1, 1$ )。
2. LTMI スコアは SA 群・SA なし群の間に有意差を認めなかった (SA 群 $26.6\pm 0.5$ , SA なし群 $26.2\pm 0.4$ ,  $P=0.24$ )。
3. すべての移植腱に異物反応は認めなかった。

本研究の結果からブタ ACL 再建後12週において UHMWPE 縫合糸による補強が膝前方安定性や移植腱の構造特性に影響を与えず、組織学的リモデリングを妨げず、異物反応を引き起こさないことが明らかとなり、UHMWPE 縫合糸による補強を用いた ACL 再建術の有用性を検証するための更なる臨床研究の基礎となるデータを得た。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。

Epidermal growth factor receptor activation confers resistance to lenvatinib in thyroid cancer cells (上皮成長因子受容体の活性化は、甲状腺癌細胞のレンバチニブに対する耐性を付与する)

大野 晃一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 進行甲状腺癌の治療は外科的切除と分化癌では放射性ヨウ素内用療法が第一選択であるが近年、根治切除不能な甲状腺癌に対しては、チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) が用いられるようになり、進行再発甲状腺癌の予後は改善している。甲状腺癌では高頻度に *BRAF* や *RAS*, *RET* などのドライバー遺伝

子変異が認められ、MAPK シグナル伝達経路の活性化が認められるため、このシグナル伝達経路の分子標的薬であるレンバチニブ (LEN) が治療に用いられている。しかし、最初から LEN に感受性を示さない甲状腺癌もあり、また、治療の継続による耐性癌の出現も認められ、予後の改善が得られない症例も多い。そのため、LEN に対する耐性を獲得した後の適切な

治療選択が今後の課題である。そこで、本研究では、LENの耐性メカニズムを明らかにし、耐性を克服する新規治療法を創出することを目的とした。

【方法】乳頭癌由来細胞株であるTPC-1と未分化癌由来細胞株FROで、長期間LENに暴露し耐性株（TPC-1/LR, FRO/LR）を樹立した。分子標的薬の感受性をWST法で評価し、シグナル伝達経路の分子発現やリン酸化、また、各種分子標的薬投与による変化をWestern blot法で解析した。さらに、BALB/Cヌードマウスでマウス異種移植モデルを作成し、*in vivo*での薬剤の腫瘍増殖抑制効果を、腫瘍体積の変化と腫瘍組織のTUNEL法およびKi67免疫染色で解析した。

【結果】LENによる50%阻害濃度（IC<sub>50</sub>, μM）はTPC-1 0.2±0.1, TPC-1/LR 28±2.9, FRO 14±1.5, FRO/LR 74±4.3で親株に比べ、TPC-1は140倍、FRO/LRは5.3倍の耐性を認めた。TPC-1/LRでは親株に比し有意にEGFR, ERKのリン酸化亢進を認め（*p*<0.05）、EGFR阻害剤ラパチニブ（LAP）のIC<sub>50</sub>（μM）はTPC-1 4.1±0.7, TPC-1/LR 1.6±0.1とLEN耐性株で有意な感受性増加を認め（*p*<0.05）、LAPによりTPC-1/LRではEGFRと共にERKのリン酸化抑制を認めた。また、LENとLAP併用により、TPC-1/LRのLEN単剤に対する有意な感受性増加を認め（*p*<0.05）、両剤併用は単剤に比しERKの有意なリン酸化抑制を誘導した（*p*<0.05）。TPC-1/LRのマウス異種移植モデルでも、両剤併用は単剤に比し有意な腫瘍縮小効果とアポトーシス誘導、およびKi67の低下を認めた（*p*<0.05）。さらに、LEN処理によるEGFRのリン酸化亢進はTPC-1以外の複数の甲状腺癌細胞株でも認められた。

【考察】甲状腺癌細胞でEGFR活性化がLEN耐性に関与しており、LENとEGFR阻害剤の併用がLEN耐性克服に有用な可能性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

甲状腺癌では分子標的薬であるレンパチニブ（LEN）が進行再発症例の治療に用いられるが、LENに感受性を示さない例や薬剤耐性癌の出現も認められ、予後の改善が得られない症例も多い。そのため、LENに対する耐性を獲得した後の適切な治療選択が今後の課題である。本研究ではLENの耐性メカニズムを明らかにし、耐性を克服する新規治療法を創出することを目的とした。

乳頭癌由来細胞株TPC-1と未分化癌由来細胞株FROで、LENの耐性株（TPC-1/LR, FRO/LR）を樹立

した。薬剤の感受性をWST法で評価し、シグナル伝達経路の分子発現やリン酸化をWestern blot法で解析した。BALB/Cヌードマウスでマウス異種移植モデルを作成し、*in vivo*での薬剤の腫瘍増殖抑制効果を腫瘍体積の変化と腫瘍組織のTUNEL法およびKi67免疫染色で解析した。

その結果、大野は次の結論を得た。

1. LENの50%阻害濃度（IC<sub>50</sub>, μM）はTPC-1 0.2±0.1, TPC-1/LR 28±2.9, FRO 14±1.5, FRO/LR 74±4.3で親株に比べ、TPC-1は140倍、FRO/LRは5.3倍の耐性を認めた。TPC-1/LRでは親株に比し有意にEGFR, ERKのリン酸化亢進を認めた（*p*<0.05）。
2. EGFR阻害剤ラパチニブ（LAP）のIC<sub>50</sub>（μM）はTPC-1 4.1±0.7, TPC-1/LR 1.6±0.1とLEN耐性株で有意な感受性増加を認め（*p*<0.05）、LAPによりTPC-1/LRではEGFRと共にERKのリン酸化抑制を認めた。
3. LENとLAP併用はTPC-1/LRのLEN単剤に対する有意な感受性増加を認め（*p*<0.05）、両剤併用は単剤に比しERKの有意なリン酸化抑制を誘導した（*p*<0.05）。
4. TPC-1/LRのマウス異種移植モデルでも、両剤併用は単剤に比し有意な腫瘍縮小効果とアポトーシス誘導、およびKi67の低下を認めた（*p*<0.05）。さらに、LEN処理によるEGFRのリン酸化亢進はTPC-1以外の複数の甲状腺癌細胞株でも認められた。

これらの結果より、甲状腺癌細胞でEGFR活性化がLEN耐性に関与しており、LENとEGFR阻害剤の併用がLEN耐性克服に有用な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。



Cell surface ATP synthase-released  $H^+$  and ATP play key roles in cocoa butter intake-mediated regulation of gut immunity through releases of cytokines in rat (ラットのココアバター摂取による腸管免疫制御において、細胞表面 ATP 合成酵素から放出される  $H^+$  と ATP がサイトカインの分泌を介して重要な役割を果たしている)

## 新井成明

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】適切な食事摂取は人間の健康維持に重要とされており、チョコレートは健康を維持するための抗炎症作用があることが知られているが、その詳細なメカニズムについてはまだ十分なデータが得られていない。我々はこれまでの研究で、水分摂取によって腸間膜リンパ流量、リンパ液内の細胞数、IL-22が増加し、併せて空腸上皮細胞層に分布する筋線維芽細胞から ATP が放出されることを報告した。この ATP は筋線維芽細胞表面に存在する F1/F0 ATP 合成酵素が水分摂取によるずり応力刺激によって放出することも証明した。ATP は、空腸の上皮細胞層と固有層におけるポドプラニンと IL-22 の産生を上昇させ空腸壁における粘膜免疫の制御に寄与していることを証明した。

そこで今回我々は、ココアバターを摂取したラットの空腸から採取したリンパ液のサイトカイン濃度と、サイトカイン放出のメカニズム解明に向けた実験を実施して腸管免疫と健康維持におけるチョコレートの作用を解析した。

【方法】ココアバターを摂取したラットの腸間膜リンパ管からリンパ液を1時間毎に採取し、リンパ流量、リンパ液内の細胞数、IL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-10濃度を測定した。さらに、生体内で選択的にマクロファージ枯渇を誘導するクロドロン酸処置群と、ATP 合成酵素のアンタゴニストであるピセアタンノール投与群においてもココアバター投与とリンパ液採取を実施し、同様の測定を実施した。

またココアバターを摂取したウサギの門脈血液中の ATP、pH、 $P_{V_{CO_2}}$ を測定し、ピセアタンノール投与群との比較を行った。

さらに、ラット空腸絨毛から分離したリンパ球、マクロファージ、樹状細胞、粒状白血球を含む上皮細胞層を除いた細胞群への pH、ATP 濃度の影響と、ラット空腸絨毛の筋線維芽細胞へのずり応力刺激の影響を評価した。

【結果】ココアバターの摂取によりラットの腸間膜リンパ流量とリンパ液内の細胞数が増加し、リンパ液内

への IL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-10の有意な放出が確認された。しかし、IL-10についてその結果に標準差が見られた。クロドロン酸処理によって誘導されたマクロファージ枯渇群では腸間膜リンパ流量とリンパ内の細胞濃度が有意に減少し、IL-6の分泌が認められた。ココアバター摂取によりIL-6濃度は有意に上昇したが、IL-1 $\beta$ およびIL-10濃度の増加は見られなかった。一方、ピセアタンノール処置群では、ココアバター投与による腸間膜リンパ流量の変化は無かったが、IL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-10濃度の上昇は有意に抑制された。さらにクロドロン酸処置したラットの空腸絨毛固有層ではCD68およびF4/80陽性細胞数の大幅な減少が認められた。

ココアバター摂取によりウサギの門脈血液中の pH は低下し、ATP、 $P_{V_{CO_2}}$ 濃度は上昇した。ピセアタンノール処置群では、ココアバター摂取による pH の低下、ATP、 $P_{V_{CO_2}}$ 濃度の上昇がいずれも抑制された。

ラット空腸より摘出した筋線維芽細胞へのずり応力刺激によって、培養液中の ATP、 $P_{CO_2}$ 濃度は上昇したが、これらの反応はピセアタンノール処置によって抑制された。

摘出した筋線維芽細胞の細胞表面と空腸上皮間細胞層および固有層で F1/F0 ATP 合成酵素が免疫染色で確認された。ラット空腸絨毛の固有層より分離した細胞群に pH3、pH5 による刺激を行うと IL-1 $\beta$ 、IL-6濃度が上昇し、ATP による刺激を行うと IL-10濃度が上昇した。

【結論】本研究では、ココアバター摂取によってラットの腸間膜リンパ内に IL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-10の放出の急性効果を実証した。さらに、空腸絨毛に存在するマクロファージが主に IL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-10の放出に寄与する可能性を示した。

さらに空腸絨毛の細胞表面 F1/F0 ATP 合成酵素の刺激により放出される  $H^+$  と ATP はココアバター摂取を介した IL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-10の放出において重要な役割を果たすことが示唆された。

以上より、ココアバター摂取による腸管免疫制御に

において、ATP合成酵素から放出される $H^+$ とATPはサイトカイン分泌に重要な役割を担うと結論した。

(論文審査の結果の要旨)

チョコレートは抗炎症作用があることが知られているが、詳細なメカニズムについては十分なデータが得られていない。そこで我々は腸管免疫におけるチョコレートの作用を解析した。

本研究では、ココアバターを摂取したラットの腸間膜リンパ管からリンパ液を採取し、リンパ流量、リンパ液内の細胞数、IL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-10濃度を測定した。さらに、マクロファージ枯渇を誘導するクロドロン酸処置群と、ATP合成酵素のアンタゴニストであるピセアタンノール投与群においてもココアバター投与とリンパ液採取を実施し、同様の測定を実施した。またココアバターを摂取したウサギの門脈血液中のATP、pH、 $P_{VCO_2}$ を測定し、ピセアタンノール投与群との比較を行った。さらに、ラット空腸絨毛から分離した上皮細胞層を除いた細胞群へのpH、ATP濃度の影響と、ラット空腸絨毛の筋線維芽細胞へのずり応力刺激の影響を評価した。

その結果、新井は次の結果を得た。

1. ココアバターの摂取によりラットの腸間膜リンパ流量と細胞数が増加し、リンパ液内へのIL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-10濃度は増加した。
2. クロドロン酸処置で、空腸粘膜固有層のマクロファージマーカーの免疫反応性は低下した。
3. クロドロン酸処置でIL-6およびIL-10濃度は増加

し、IL-1 $\beta$ 濃度は増加しなかった。またクロドロン酸処置後のココアバター摂取により、IL-6濃度は上昇したが、IL-1 $\beta$ およびIL-10濃度の増加は抑制された。

4. ATP合成酵素はラット空腸上皮および筋線維芽細胞で観察された。
5. 筋線維芽細胞に対するずり応力刺激はATPおよび $P_{CO_2}$ を増加させたが、いずれもピセアタンノールで抑制された。
6. ココアバター投与は、ウサギの門脈血中のATPを増加し、pHを低下させたが、いずれもピセアタンノールで抑制された。
7. ピセアタンノール投与は、ココアバター投与によるIL-1 $\beta$ 、IL-6、およびIL-10濃度の増加を抑制した。
8. ラット空腸絨毛の固有層より分離した細胞群に対するpHの低下刺激でIL-1 $\beta$ 、IL-6濃度が上昇し、ATP刺激でIL-10濃度が上昇した。

これらの結果より、本研究はココアバター摂取によるラットの腸間膜リンパ内にIL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-10の放出の急性効果を実証し、空腸絨毛に存在するマクロファージがIL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-10の放出に寄与する可能性を示した。さらに $H^+$ とATPはIL-1 $\beta$ 、IL-6およびIL-10の放出において重要な役割を果たすことが示唆した。

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。

Quantitative assessment of the gait improvement effect of LSVT BIG<sup>®</sup> using a wearable sensor in patients with Parkinson's disease (パーキンソン病におけるLSVT-BIG<sup>®</sup>の歩行機能改善効果に対する定量的評価)

松野 淳 洋

(論文の内容の要旨)

【背景】パーキンソン病は動作緩慢、安静時振戦、筋強剛、姿勢保持障害等の兆候を特徴とする神経変性疾患である。歩行障害も主要な症状の一つであり、その改善のために様々なリハビリテーションが試みられてきた。中でもLSVT BIG<sup>®</sup> (Lee Silvermann Voice Treatment-BIG<sup>®</sup>) は、2005年に米国で開発されたパーキンソン病患者の運動症状改善に特化したリハビリテーションプログラムで、パーキンソン病において縮小しがちな動作の拡大化 (high-amplitude movements) に焦点を当てたトレーニングとなっている。トレーニ

ングの内容は標準化されており、専門の資格を有するリハビリスタッフの元、頭部から四肢末端に至るまで全身の動作の拡大化を意識した訓練を行う。繰り返し大きな動作を意識することで身体動作の認識から改善を図り、身体動作の適正化に繋げるという点で従来には類を見ない、疾患の特徴に沿ったリハビリテーションとなっている。LSVT BIG<sup>®</sup> による歩行機能改善効果として、歩行速度やストライド長の改善が複数の既報で報告されているが、その背景となる運動メカニズムについて追及した研究は乏しい。

【目的】歩行計測システム (RehaGait<sup>®</sup>) を用いてパー

キンソン病患者における LSVT BIG® の歩行機能改善効果を定量的に評価し、下肢関節運動の変化を含め、歩行改善の背景となるバイオメカニズムの解明を主な目的とした。

【方法】 JA 長野厚生連鹿教湯三才山リハビリテーションセンター鹿教湯病院において、明らかな認知機能低下がなく、ADLは自立しており、LSVT BIG®を予定通り実施できたパーキンソン病患者を対象とした。LSVT BIG®は、1回1時間のプログラムを週4～5回、4週間にわたり実施した。LSVT BIG®前後で測定した評価項目は以下の通り：MDS-Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS), Functional Independence Measure (FIM), timed up and go test (TUG), 歩行計測システム (RehaGait®) により得られた各種歩行パラメータ。具体的な歩行パラメータは歩行速度、ストライド長とその標準偏差、ストライド時間とその標準偏差、ケイデンス、股関節・膝関節・足関節の最大屈曲/伸展角度、各歩行周期 (過重応答期・立脚中期・立脚終期・前遊脚期・遊脚期)。さらに股関節・膝関節・足関節において、各関節最大屈曲角度と最大伸展角度の差から各関節可動角度 (ROM) を算出した。RehaGait® 計測では7機のウェアラブルセンサー (腰部に1機、両膝関節周囲に2機、両足関節に4機) を用い、10 m歩行を3回繰り返し、その計測値の平均値を採用した。各計測値を対応のあるt検定ならびに効果量の推定値とその95%信頼区間を用いて統計学的に検討した。統計解析にはRを用い、有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】 LSVT BIG®を完遂した24人のパーキンソン病患者 (男性12人、女性12人) が対象となり、うち1人がHoehn-Yahr重症度分類Grade I、1人がGrade II、残る22人はすべてGrade IIIであった。年齢、罹病期間、内服薬のlevodopa当量の平均値 (及び標準偏差) はそれぞれ $68.8 \pm 7.6$ 歳、 $6.1 \pm 3.6$ 年、 $743 \pm 343$  mg/日であった。LSVT BIG® 開始前と比較し終了時には、時空間パラメータとして歩行速度とストライド長が有意に改善した (歩行速度： $p = 0.003$ 、ストライド長： $p < 0.001$ ) が、ストライド時間、ケイデンス (1分当たりの歩数)、歩行周期には有意差を認めなかった。下肢関節については、股関節・膝関節・足関節各々の屈曲角度、伸展角度及びROMのうち、股関節屈曲角度及びROMのみ有意差を認めた (それぞれ $p = 0.004$ 、 $p = 0.002$ )。股関節のROM変化量は、歩行速度及びストライド長の変化量と強い相関関係を認めた ( $r =$

$0.755$ ,  $r = 0.804$ )。

臨床評価項目として、MDS-UPDRS part I からIII、FIM運動スコア、Timed Up and Go test (以下TUG) が有意に改善した (part I： $p = 0.003$ 、part II： $p < 0.001$ 、part III： $p < 0.001$ 、FIM： $p = 0.001$ 、TUG： $p = 0.025$ )。有意差を認めたMDS-UPDRS part I からIIIの下位項目については、運動機能項目のpart IIIでは両下肢固縮の有意な改善を認め、右下肢と左下肢における効果量及び95%信頼区間はそれぞれ $d = 0.40$  [0.10, 0.64]、 $d = 0.35$  [0.05, 0.59]であった。また、非運動症状としてpart I (精神・行動・気分) における不安感の改善を認め、効果量及び95%信頼区間は $d = 0.46$  [0.20, 0.66]であった。Part II (日常生活動作) の各下位項目については、有意な改善項目はなかった。

【結論】 ウェアラブルセンサーによる歩行解析によって、股関節ROM改善が、LSVT BIG®における歩行速度、及びストライド長改善の主たる要因であることが明らかになった。また、歩行速度やストライド長の改善、UPDRS part IIIの改善は既報と同様の結果であったが、下肢固縮の改善や、不安感といった精神症状・非運動症状に対しても効果が示唆され、LSVT BIG®の副次的効果と考えられた。

#### (論文審査の結果の要旨)

パーキンソン病 (以下PD) について従来様々なリハビリテーションが試みられてきたが、中でもLSVT BIG® (Lee Silvermann Voice Treatment-BIG® therapy) は、PDの運動症状改善に特化して開発され、動作の拡大化 (high-amplitude movements) を目的の一つとしたリハビリテーションプログラムである。LSVT BIG®による歩行速度やストライド長など、歩行機能改善効果が複数の論文で報告されているが、その背景となる運動メカニズムについては十分に解明されていない。本研究では歩行解析システムRehaGait®を用いて、PD患者におけるLSVT BIG®の歩行機能改善効果、及びその背景となる運動メカニズムにつき下肢関節運動を含め解析した。

JA 長野厚生連 鹿教湯三才山リハビリテーションセンター鹿教湯病院で診療を行った、Hoehn-Yahr重症度分類1～3の明らかな認知症のない、ADL自立のPD患者24名を対象に、1回1時間のプログラムを週4～5回、4週間にわたりLSVT BIG®を実施した。LSVT BIG®期間の前後1週間以内に歩行解析を実施した。歩行解析では、7機のウェアラブルセンサーから

構成される歩行解析システム RehaGait<sup>®</sup>を用いて10 m歩行を3回実施、計測値の平均値を採用し、LSVT BIG<sup>®</sup>前後の変化を検討した。

その結果、松野は次の結論を得た。

1. 歩行機能の時空間パラメータとして、歩行速度、ストライド長が有意に改善した。一方、ストライド時間、ケイデンス（1歩あたりの時間）、歩行周期に有意差を認めなかった。
2. 股関節・膝関節・足関節各々の屈曲角度、伸展角度及び関節可動角度（ROM）のうち、股関節屈曲角度、伸展角度及びROMのみ有意に改善した。
3. 股関節ROM変化量と歩行速度の変化量、及び股関節ROM変化量とストライド長の変化量に、強い相関を認めた。
4. 臨床評価項目として、MDS-UPDRS part I から

Ⅲ、FIM 運動スコア、Timed Up and Go test が有意に改善した。

MDS-UPDRS part I からⅢの下位項目については、part I（精神・行動・気分）における不安感、part Ⅲ（運動機能）における両下肢固縮で有意な改善を認めた。

これらの結果より、股関節ROM改善が、LSVT BIG<sup>®</sup>における歩行速度、及びストライド長改善の主たる要因であることが明らかになった。また、歩行速度やストライド長の改善、UPDRS part Ⅲの改善は既報と同様の結果であったが、下肢固縮の改善や、不安感などの精神症状・非運動症状に対しても一定の効果を認め、LSVT BIG<sup>®</sup>の副次的効果が示唆された。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Anti-SARS-CoV-2 IgG antibody titer after BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination in Japanese patients who underwent renal replacement therapy, hemodialysis, peritoneal dialysis, and kidney transplantation（血液透析、腹膜透析、腎移植を受けている日本人の腎代替療法患者のCOVID-19 mRNA ワクチン接種後の抗体価）

岩 淵 良 平

（論文の内容の要旨）

【背景と目的】血液透析（HD）、腹膜透析（PD）、腎移植（KT）等の腎代替療法（RRT）を受けている患者に対してCovid-19 Vaccine 接種は推奨されている。しかし、mRNA ワクチン接種後のRRT患者と健常者間の免疫応答の違いは依然として不明である。本研究では、本邦の透析、腎移植患者におけるCOVID-19 ワクチン接種後の抗体獲得、抗体価、抗体価推移について明らかにするとともに、オミクロン株の流行も考慮し、十分な抗体価の獲得（normal response）状況およびその獲得に関連する因子の検討を行った。

【対象患者および方法】2021年1月1日～12月31日の間に当院に通院治療している腎移植患者、腹膜透析患者、Aクリニックの外来維持血液透析患者の中で、COVID-19に対するmRNA ワクチン（ファイザー社製：BNT 162b2 mRNA Covid-19 Vaccine）を2回接種した患者を対象にした。健常者コントロールは当院医療従事者47人とした。上記対象者のワクチン接種後の抗体獲得率（カットオフ値50 AU/mL）、抗体価、抗体価推移、normal response（健常者レベルの抗体価獲得をnormal response と定義）を示す割合とnormal response の関連因子、および3回目のブースター接種の効果を

評価した。

【結果】2回ワクチン接種3か月後と6か月後の抗体獲得率と抗体価の推移は、健常者で抗体獲得率100→100%，抗体価中央値（範囲）4,970（474-27,800）→1,164（218-3,320）AU/mL、HD群（N=80）で抗体獲得率98.8→96.6%，抗体価935（7.7-37,100）→332（6.8-3,260）AU/mL、PD群（N=21）で抗体獲得率95.2→89.5%，抗体価569（6.8-7,290）→214（6.8-2,570）AU/mL、KT群（N=39）で抗体獲得率61.5→58.3%，抗体価97（6.8-2,380）→119（6.8-1,110）AU/mLであった。2回接種3か月後の健常者の最低抗体価474 AU/mL（normal response）に至らない患者は40人存在し、各患者群における割合は、HD群25.0%，PD群38.1%，KT群77.0%であった。Normal response の獲得関連因子について多変量ロジスティック回帰分析を施行したところ、若い年齢、高い血清アルブミン値、RRT（non-KT）の種類が独立した関連因子であることが判明した。Normal response に至らない患者群を対象に3回目のブースター接種の効果を検討したところ、3か月後にHD/PD群では93%がnormal response に到達したが、KT群では58%と低値のままであった。

【結論】“腎移植後”が RRT 患者における抗体獲得不良の非常に強い関連因子である。腎移植患者では抗体未獲得が有意に多く、抗体獲得されたとしても抗体価としては大多数が健常者レベルに届かず有意に低いため、ワクチン接種の臨床的意義が低い集団である可能性がある。リスクのある腎移植患者においては、ワクチン主体の予防対策では不十分な可能性があり、濃厚接触時の抗ウイルス薬の予防内服や、感染時における積極的な抗ウイルス療法や抗体製剤投与が必要な可能性があり今後の課題と考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

血液透析 (HD)、腹膜透析 (PD)、腎移植 (KT) 等の腎代替療法 (RRT) を受けている患者に対して Covid-19 Vaccine 接種は推奨されている。しかし、mRNA ワクチン接種後の RRT 患者と健常者間の免疫応答の違いは依然として不明である。本研究では、本邦の透析、腎移植患者における COVID-19 ワクチン接種後の抗体獲得、抗体価、抗体価推移について明らかにするとともに、オミクロン株の流行も考慮し、十分な抗体価の獲得 (normal response) 状況およびその獲得に関連する因子の検討を行った。2021年1月1日~12月31日の間に当院に通院治療している腎移植患者、腹膜透析患者、Aクリニックの外来維持血液透析患者の中で、COVID-19に対する mRNA ワクチン (ファイザー社製: BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine) を2回接種した患者157症例を対象にした。健常者コントロールは当院医療従事者47人とした。上記対象者のワクチン接種後の抗体獲得率 (カットオフ値 50 AU/mL)、抗体価、抗体価推移、normal response (健常者レベルの抗体価獲得を normal response と定義) を示す割合と normal response の関連因子、およ

び3回目のブースター接種の効果を評価した。

その結果、岩淵良平は次の結論を得た。

1. 2回のワクチン接種後他の RRT 群の抗体獲得率が約9割であるのに比べて KT 群は約6割のみしか抗体価を獲得しない。
2. 2回接種3か月後の健常者の最低抗体価474AU/mL (normal response) に至らない患者は40人存在し、各患者群における割合は、HD 群25.0%、PD 群38.1%、KT 群77.0%であった。
3. Normal response の獲得関連因子について多変量ロジスティック回帰分析を施行したところ、若い年齢、高い血清アルブミン値、RRT (non-KT) の種類が独立した関連因子であることが判明した。
4. Normal response に至らない患者群を対象に3回目のブースター接種の効果を検討したところ、3か月後に HD/PD 群では93%が normal response に到達したが、KT 群では58%と低値のままであった。

“腎移植後”が RRT 患者における抗体獲得不良の非常に強い関連因子である。腎移植患者では抗体未獲得が有意に多く、抗体獲得されたとしても抗体価としては大多数が健常者レベルに届かず有意に低いため、ワクチン接種の臨床的意義が低い集団である可能性がある。リスクのある腎移植患者においては、ワクチン主体の予防対策では不十分な可能性があり、濃厚接触時の抗ウイルス薬の予防内服や、感染時における積極的な抗ウイルス療法や抗体製剤投与が必要な可能性があり今後の課題と考えられる。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。

MEK inhibitor and anti-EGFR antibody overcome sotorasib resistance signals and enhance its antitumor effect in colorectal cancer cells (MEK 阻害薬と抗 EGFR 抗体薬はソトラシブの大腸がん細胞に対する耐性シグナルを克服し抗腫瘍効果を増強させる)

本 藤 奈 緒

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】KRAS は最も頻度の高い癌原遺伝子の一つだが、変異型 KRAS を標的とした治療薬の開発は難渋し、30年以上もの間、「undruggable gene」とされてきた。近年、KRAS G12C 変異を標的とする新規阻害剤が開発され、臨床応用されているが、臨床試験では非小細胞肺癌に比して大腸癌では効果が乏しい。

大腸癌では以前から単剤の分子標的治療に対して再活性化シグナルによる耐性が指摘されている。今回、我々は再活性化シグナルを標的とした併用療法が、大腸癌における KRAS G12C 阻害薬への耐性を克服できると仮説を立て実験を行った。

【方法】まず始めに KRAS 野生型と種々の KRAS 変異の大腸癌細胞株、非小細胞肺癌細胞株に KRAS G12C

阻害薬ソトラシブを投与して細胞増殖能と MAPK 経路, AKT 経路のタンパク発現と活性化をウエスタンブロットティングで評価した。続いて, KRAS 野生型大腸癌細胞株に KRAS 遺伝子を導入し, KRAS 導入細胞株を作成し, 同様に MAPK 経路, AKT 経路を評価した。

続いて先行研究で我々が考案したミックスカルチャーアッセイでソトラシブと併用効果のある薬剤のスクリーニングを行った。ミックスカルチャーアッセイの概要を以下に示す。KRAS 野生型大腸癌細胞株に GFP+KRAS 遺伝子を導入した。親細胞 (GFP 陰性) と遺伝子導入細胞 (KRAS 遺伝子+GFP 陽性) を 1 : 1 の比率で混合し, 薬剤を投与する。初日と12日目に, フローサイトメーターを用いて GFP 陽性率を測定し, 相対増殖率 (RPR) を以下の式で算出した。RPR =  $B(100-A)/A(100-B)$ , A : 初日の GFP 陽性率, B : 12日目の GFP 陽性率。RPR 低値は感受性が高く, RPR 高値は耐性であることを示す。

さらに, 本スクリーニング法で効果ありと判断された薬剤を KRAS 導入細胞株に投与して増殖抑制効果を評価した。また, 同薬剤投与時の MAPK 経路のタンパク発現と活性化をウエスタンブロットティングで評価した。

最後にヌードマウスへの皮下移植モデルを用いて併用療法の効果を評価した。KRAS 導入細胞株を皮下に移植し, 各薬剤を投与して腫瘍径を計測した。また安全性は体重の変化で評価した。

**【結果】** ソトラシブは, KRAS G12C 変異細胞株の増殖を特異的に抑制したが, 高濃度では大腸癌細胞株で増殖抑制効果が減弱していた。また, ウエスタンブロットティングの結果, ソトラシブ投与後4時間では非小細胞肺癌, 大腸癌双方で pERK, pAKT が抑制されていたが, 24時間後では大腸癌細胞株で pERK の発現上昇を認めた。KRAS G12C を導入した細胞でも同様にソトラシブ投与4時間で MAPK 経路が抑制され, 24時間後に再活性化を認めた。

ミックスカルチャーアッセイの結果, ソトラシブは G12C 変異でのみ RPR を有意に低下させ, MEK 阻害剤との併用でさらなる RPR の低下を示した。抗 EGFR 抗体は, 単剤では KRAS 変異細胞で用量依存的に RPR が高くなり, 抵抗性を示したが, ソトラシブとの併用で RPR は上昇せず, 抗 EGFR 抗体への耐性を改善した。これらの結果に基づき, ソトラシブ, MEK 阻害剤, 抗 EGFR 抗体の併用療法の有効性を検討した。

KRAS G12C 導入細胞に, ソトラシブ, トラメチニブ (MEK 阻害剤), セツキシマブ (抗 EGFR 抗体) を投与して EGFR および MAPK 経路のタンパク発現を評価した。ウエスタンブロットティングの結果, ソトラシブ単剤では pERK の発現再上昇を示したが, トラメチニブの併用で pERK は抑制され, pEGFR の発現が上昇した。セツキシマブを加えると, EGFR の再活性化は抑制された。細胞増殖能について, ソトラシブ単独とソトラシブ+トラメチニブ, ソトラシブ+セツキシマブの比較では, 2剤併用でより増殖が抑制されたが, 有意差はなかった。一方, 3剤併用ではソトラシブ単独と比較して有意な増殖抑制効果が認められた。

最後に, *in vivo* でソトラシブの有効性および併用療法を評価した。ソトラシブの単剤使用は, KRAS G12C 変異腫瘍に選択的な抗腫瘍効果を示した。ソトラシブ+トラメチニブおよびソトラシブ+セツキシマブの2剤併用療法は, ソトラシブ単独療法と比較して有意な腫瘍形成の抑制効果を示し, 3剤併用療法はこれらの2剤併用療法と比較して更なる腫瘍形成の抑制効果を示した。また, 3剤併用療法を含めてマウスの体重変動はすべて10%以内であった。

**【結語】** 我々は, KRAS G12C 大腸癌細胞株において, ソトラシブの耐性化に MAPK 経路と EGFR の再活性化シグナルが重要な役割を果たしていることを明らかにした。また, MEK 阻害剤と抗 EGFR 抗体はこの耐性を克服し, 大腸癌細胞におけるソトラシブの抗腫瘍効果を増強することを証明した。この3剤併用療法は, KRAS G12C 変異大腸癌患者に対する有望な治療戦略となり得ることが示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

近年, KRAS G12C 変異を標的とする新規阻害剤が開発され, 臨床応用されているが, 臨床試験では非小細胞肺癌に比して大腸癌では効果が乏しい。大腸癌では以前から単剤の分子標的治療に対して再活性化シグナルによる耐性が報告されている。申請者は KRAS G12C 変異大腸癌において, KRAS G12C 阻害剤の耐性が再活性化シグナルに起因していると仮説を立てた。この仮説に基づき, 再活性化シグナルをターゲットとした併用療法が, 大腸癌における KRAS G12C 阻害剤の耐性を克服し得ると考え実験を行った。

まず, 大腸癌・肺癌の細胞株に KRAS G12C 阻害剤を投与し, 細胞増殖能および MAPK 経路のタンパク発現・活性化を評価した。続いて, KRAS 野生型大腸癌細胞株に KRAS 変異遺伝子を導入し, KRAS G12C

阻害剤の細胞増殖能抑制効果と MAPK 経路のタンパク発現・活性化を解析した。更に、KRAS 阻害剤との併用が有効な薬剤についてスクリーニングし、その併用効果について *in vitro* および *in vivo* で評価した。

その結果、次の結果を得た。

- ① 大腸癌細胞では KRAS 阻害剤投与後24時間で MAPK 経路の再活性化が起きた。
- ② KRAS 阻害剤と MEK 阻害剤の併用で MAPK 経路の再活性化は抑制されるが、その際 EGFR が活性化した。抗 EGFR 抗体を更に併用することで EGFR、MAPK 経路双方を抑制できた。
- ③ KRAS 阻害剤、MEK 阻害剤、抗 EGFR 抗体薬の

3剤併用が大腸癌細胞に対し *in vitro*, *in vivo* 双方で有意な増殖抑制効果を示した。

これらの結果より、大腸癌の KRAS 阻害剤に対する耐性機構の一つとして、MAPK 経路および EGFR の再活性化シグナルが関与していることが示唆された。また、MEK 阻害剤、抗 EGFR 抗体薬はこの耐性を克服し、大腸癌細胞における KRAS 阻害剤の抗腫瘍効果を増強することが明らかになった。この3剤併用療法は、KRAS G12C 変異大腸癌患者に対して有望な戦略とな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。

## Effects of anesthetics on nociceptive sensory evoked potentials by intraepidermal noxious electrical stimulation of A- $\delta$ fibers (表皮内刺激電極による A デルタ線維の痛覚誘発電位に対する麻酔薬の影響)

蜜 澤 邦 洋

### (論文の内容の要旨)

**【背景と目的】** 全身麻酔中の手術侵襲による痛みの強度を直接評価するモニターはない。そのため、痛みで惹起された交感神経反応で痛みを間接的に評価し麻酔薬の調整が行われている。しかし、交感神経反応は術中に使用する循環作動薬の影響を受けやすく不確実なため、術中の痛みの強度を客観的かつ直接評価できるモニターが求められている。表皮内刺激電極は表皮に存在する痛覚神経である A $\delta$  線維・C 線維のみを選択的に刺激することができるため、これを用いることで痛覚選択的な体性感覚誘発電位 (痛覚誘発電位) を記録することが可能となった。しかし、手術に用いられる麻酔薬が痛覚誘発電位に与える影響は十分に検討されていない。そこで、レミフェンタニル、プロポフォール、セボフルランが A $\delta$  線維刺激で惹起される痛覚誘発電位に与える影響を検討した。

**【方法】** 当院で全身麻酔下に手術をうける患者を対象とした。表皮内刺激電極 (NM-980W, 日本光電社製) を手背に貼付し、A $\delta$  線維選択的の刺激を行い最小痛覚閾値の1.5倍の刺激強度で刺激した。痛覚誘発電位は脳波計 (EEG1214, 日本光電社製) を用いて頭頂-両耳朶平均誘導 (Cz-Aav 誘導) で導出し、10回の誘発電位波形を加算平均記録した。研究①では対象患者をレミフェンタニル群、プロポフォール群、セボフルラン群 (各群10名) に分けた。レミフェンタニルとプロポフォールは、それぞれの効果部位濃度 (Ce) が

1.0 ng/ml と 0.5  $\mu$ g/ml になるように持続静脈内投与し、セボフルランは最小肺泡濃度 (MAC) の0.2倍に相当する濃度 (%) を投与し、それぞれ投与前、投与15分後、投与中止後回復期の痛覚誘発電位と自覚的な痛みの強さ (Numerical Rating Scale: NRS) を記録した。研究②ではプロポフォールとセボフルランが痛覚誘発電位に与える影響の用量依存性を検討するため、対象患者をプロポフォール群とセボフルラン群 (各群10名) に分け、プロポフォール群では Ce が 0.5 と 1.0  $\mu$ g/ml になるように持続静脈内投与し、セボフルラン群では 0.2 と 0.5 MAC となる濃度を投与し、それぞれ痛覚誘発電位と NRS を記録した。

**【結果】** 研究①: レミフェンタニル投与により、痛覚誘発電位振幅と NRS は有意に低下し、投与中止によりいずれも回復傾向を示した。プロポフォール投与では、痛覚誘発電位振幅と NRS は有意な変化を認めなかった。セボフルラン投与では、痛覚誘発電位と NRS は振幅有意な変化を認めなかった。研究②: プロポフォール群では痛覚誘発電位振幅は有意な変化を認めなかった。NRS はプロポフォール増量で低下傾向を示したが有意差は認めなかった。セボフルラン群では痛覚誘発電位振幅は有意な変化を認めなかった。NRS はセボフルラン増量で低下傾向を示したが有意差は認めなかった。

**【結論】** 鎮痛が主作用であるレミフェンタニルは、表皮内 A $\delta$  線維電気刺激による痛覚誘発電位の振幅と

NRS を有意に抑制し、鎮静が主作用であるプロポフォールとセボフルランは NEP の振幅と NRS を抑制しなかった。A $\delta$  線維刺激と Cz 誘導を併用することでノイズが入りやすい手術室内でも安定して痛覚誘発電位を記録できた。本研究により、麻酔薬や麻酔関連薬の痛覚誘発電位への影響を検討することで、術中の痛覚の変容を予測できることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

全身麻酔中の痛みは交感神経反応から間接的に評価しているに過ぎず、痛みの強度を客観的かつ直接評価できる手法が求められている。表皮には神経の中でも痛みを伝達する A $\delta$  線維・C 線維のみが存在するため、表皮内刺激電極は表皮の A $\delta$  線維・C 線維を選択的に刺激し、痛覚選択的な体性感覚誘発電位(痛覚誘発電位)を記録できる。全身麻酔による手術を受ける患者を対象に麻酔薬投与前後で表皮内刺激電極を用いた痛覚誘発電位を記録し、麻酔薬が痛覚誘発電位に与える影響を評価した。

表皮内刺激電極を手背に貼付し、神経刺激装置を用いて A $\delta$  線維選択的の刺激を行った。頭頂部 - 両側耳朶平均 (Cz-Aav) 誘導で脳波を取得し、10 個の誘発電位波形を加算平均して評価した。研究①では最低投与量の麻酔薬が痛覚誘発電位に与える影響と投与中止後の変化を評価した。レミフェンタニル群、プロポフォール群、セボフルラン群の各群 10 名に分け、レミ

フェンタニルとプロポフォールは、それぞれの効果部位濃度 (Ce) が 1.0 ng/ml と 0.5  $\mu$ g/ml になるように持続静脈内投与し、セボフルランは最小肺胞濃度 (MAC) の 0.2 倍に相当する濃度 (%) を投与した。投与前、投与開始 15 分後、投与中止 15 分後の痛覚誘発電位を記録した。研究②ではプロポフォール、セボフルランが痛覚誘発電位に与える影響の用量依存性を評価した。プロポフォール群、セボフルラン群の各群 10 名に分け、プロポフォール群では Ce が 0.5 と 1.0  $\mu$ g/ml になるように持続静脈内投与し、セボフルラン群では 0.2 と 0.5 MAC となる濃度を投与し、それぞれ投与前と薬剤投与後の痛覚誘発電位を測定した。その結果、蜜澤は次の結論を得た。

1. レミフェンタニルは Ce 1.0 ng/ml で表皮内 A $\delta$  線維刺激による痛覚誘発電位の振幅を抑制した。
2. プロポフォールは Ce 0.5  $\mu$ g/ml, 1.0  $\mu$ g/ml では振幅を抑制しなかった。
3. セボフルランは 0.2 MAC, 0.5 MAC では振幅を抑制しなかった。

これらの結果より、プロポフォールとセボフルランは鎮静作用が主であり、痛覚伝達に与える影響は少ないと考えられた。本手法により麻酔薬の痛覚誘発電位への影響を検討することで、術中の痛覚の変容を予測でき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。

Optimal Temporal Resolution to Achieve Good Image Quality and Perform Pharmacokinetic Analysis in Free-breathing Dynamic Contrast-enhanced MR Imaging of the Pancreas (膵臓の自由呼吸下ダイナミック造影 MRI における最適な時間分解能：画質および薬物動態解析の両立)

雄 山 一 樹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、dynamic contrast-enhanced MRI (DCE-MRI) は形態学的評価のみならず、薬物動態解析にも広く用いられている。形態学的評価と薬物動態解析は 1 回の撮像で行うのが理想であるが、画質と薬物動態解析は相反する関係にあるため、両立は困難である。短時間分解能では詳細な薬物動態解析が可能であるが、収集されるデータ量が少なく、画質が劣化する可能性がある。対して長時間分解能では取得データ量の増加に伴い画質の向上が得られるが、正確な時間信号強度曲線が得られず、正確な薬物動態解析が困難な可能性がある。これまでの報告では画質と薬物動

態解析を両立する時間分解能は十分に検討されていない。Radial sampling と compressed sensing を応用した golden-angle radial sparse parallel (GRASP) を用いた DCE-MRI では、データ取得後に任意の時間分解能で画像を再構成することができる。したがって、同一検査において異なる時間分解能で画像解析することにより、他因子を排除し、時間分解能が画質および薬物動態解析に及ぼす影響を正確に解析することが可能である。本研究の目的は GRASP を用いた膵自由呼吸下 DCE-MRI において時間分解能が画質および薬物動態解析に及ぼす影響を解析し、良好な画質および正確な薬物動態解析を両立させる時間分解能を検討す



ることである。

【方法】2020年4月から2021年1月に当院でGRASPを用いて撮像された腓自由呼吸下DCE-MRI 16症例18検査を対象とした。画像はデータ収集後に4個の時間分解能（1.8, 3.0, 4.8, 7.8秒）で再構成された。2名の放射線科医が腹腔動脈, 総肝動脈, 脾動脈, 腓臓（頭体尾部）, artifactに関して5段階で画質評価を行った。Tissue-4Dを用いた薬物動態モデリング解析では解析エラーを生じた2検査を除く16検査に関して各時間分解能の再構成画像で腓頭体尾部に関して薬物動態パラメータを算出した。Friedman検定およびBonferroni補正で統計解析を行った。結果：画質の血管評価では、時間分解能7.8秒の腹腔動脈のスコアのみが他時間分解能より有意に低値を示した。腓頭体尾部とartifactのスコアは、時間分解能4.8秒および7.8秒に比較して1.8秒で有意に低値を示した。薬物動態解析では、腓頭尾部のK<sub>tran</sub>（血漿から血管外細胞外腔への移行速度定数）, Kep（血管外細胞外腔から血漿への移行速度定数）, iAUC（濃度曲線下面積）は全時間分解能1.8秒で4.8秒および7.8秒に比較して有意に低値を示した。腓体部のiAUCおよび腓頭部のV<sub>e</sub>（血管外細胞外腔の容積率）は時間分解能1.8秒に比較して7.8秒で有意に低値を示した。

【考察】腹腔動脈, 総肝動脈, 脾動脈のスコアは時間分解能1.8-4.8秒間に有意差はなく診断可能な画質であり、腓臓とartifactは時間分解能3.0-7.8秒間に有意差なく診断可能な画質であった。よって時間分解能3.0-4.8秒が画質評価に適すると考えられた。薬物動態解析では、短時間分解能でより正確な薬物動態解析が可能と仮定した場合、時間分解能1.8秒と3.0秒間では有意差なく、時間分解能1.8秒-3.0秒が薬物動態解析に適すると考えられた。さらに時間分解能1.8秒では顕著なstreaking artifactのため2検査の解析エラーを生じたことを踏まえ、時間分解能3.0秒が薬物動態解析に最適と考えられた。

【結語】GRASPを用いた腓自由呼吸下DCE-MRIにおいて良好な画質および正確な薬物動態解析を両立させる時間分解能は3.0秒である。

（論文審査の結果の要旨）

2020年4月から2021年1月に当院でgolden-angle radial sparse parallel (GRASP)を用いて撮像された腓自由呼吸下DCE-MRI 16症例18検査を対象とした。画像はデータ収集後に4個の時間分解能（1.8, 3.0, 4.8, 7.8秒）で再構成された。2名の放射線科医が腹

腔動脈, 総肝動脈, 脾動脈, 腓臓（頭体尾部）, artifactに関して5段階で画質評価を行った。Tissue-4Dを用いた薬物動態モデリング解析では解析エラーを生じた2検査を除く16検査に関して各時間分解能の再構成画像で腓頭体尾部に関して薬物動態パラメータを算出した。Friedman検定およびBonferroni補正で統計解析を行った。

画質の血管評価では、時間分解能7.8秒の腹腔動脈のスコアのみが他時間分解能より有意に低値を示した。腓頭体尾部とartifactのスコアは、時間分解能4.8秒および7.8秒に比較して1.8秒で有意に低値を示した。薬物動態解析では、腓頭尾部のK<sub>tran</sub>（血漿から血管外細胞外腔への移行速度定数）, Kep（血管外細胞外腔から血漿への移行速度定数）, iAUC（濃度曲線下面積）は全時間分解能1.8秒で4.8秒および7.8秒に比較して有意に低値を示した。腓体部のiAUCおよび腓頭部のV<sub>e</sub>（血管外細胞外腔の容積率）は時間分解能1.8秒に比較して7.8秒で有意に低値を示した。

その結果、雄山は次の結論を得た。

1. 画質評価において腹腔動脈, 総肝動脈, 脾動脈のスコアは時間分解能1.8-4.8秒間に有意差はなく診断可能な画質であり、腓臓とartifactは時間分解能3.0-7.8秒間で有意差なく診断可能な画質であった。よって時間分解能3.0-4.8秒が画質評価に適すると考えられた。
2. 薬物動態解析では、短時間分解能でより正確な薬物動態解析が可能と仮定した場合、時間分解能1.8秒と3.0秒間では有意差なく、時間分解能1.8秒-3.0秒が薬物動態解析に適すると考えられた。さらに時間分解能1.8秒では顕著なstreaking artifactのため2検査の解析エラーを生じたことを踏まえ、時間分解能3.0秒が薬物動態解析に適切と考えられた。これらの結果によりGRASPを用いた腓自由呼吸下DCE-MRIにおいて良好な画質および正確な薬物動態解析を両立させる時間分解能は3.0秒である。よって主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Clinicopathological features of nodular gastritis in three classes of age (三世代間における鳥肌胃炎の臨床病理学的特徴)

加古 里子

### (論文の内容の要旨)

【目的】鳥肌胃炎は *Helicobacter pylori* (HP) 感染に伴う内視鏡所見の一つであり、胃体部に強い炎症を伴う汎胃炎を呈することから低分化型腺癌発生のリスク因子とされている。しかしその自然史は不明な部分が多い。今回我々は鳥肌胃炎の各世代における病理組織学的特徴を明らかにすべく解析を行った。

【方法】2003年から2019年の間に当院にて内視鏡検査を行い、組織学的検討が可能であった患者を対象とした。15歳以下を小児群、16歳以上29歳以下を若年群、30歳以上を壮年群に分類し、Updated Sydney Systemを用いて3群間で組織学的所見を比較検討した。HP除菌後の患者および胃癌・悪性リンパ腫を合併していた患者は除外した。

【結果】対象となった患者は1,321人(女性702人)であった。1,027人がHP陽性であり、うち鳥肌胃炎を認めた患者は214人(21%)であった。世代別では、小児群で41/49人(84%)、若年群で107/158人(68%)、壮年群で66/820人(8%)であった。鳥肌胃炎における小児群、若年群、壮年群の病理組織学的比較においては、前庭部大彎における単核球浸潤平均スコアは小児群で2.00、若年群で2.07、壮年群で2.00と世代間で差はみられなかったが、胃体部大彎では小児群で1.32、若年群で1.38、壮年群で2.01と、小児群、若年群と比較して壮年群で有意に高かった(それぞれ $P < 0.001$ )。また、好中球浸潤平均スコアでも同様の傾向を認めた。固有腺萎縮、HP感染に関しては一定の傾向は認めなかったが、腸上皮化生においては前庭部・胃体部において壮年群で高度である傾向を認めた。

次に、壮年群での鳥肌胃炎の特徴をさらに明らかにすべく、30歳以上の鳥肌胃炎(NG)、萎縮性胃炎(AG)、HP未感染(HP-)患者3群間での病理組織学的所見の比較検討を行った。単核球浸潤平均スコアでは、前庭部大彎でNG群が2.00、AG群が1.80、HP-群が0.91とNG群が他の2群に比べ有意に高く、体部大彎でもNG群が2.08、AG群が1.65、HP-群が0.95とNG群が有意に高かった(それぞれ $P < 0.001$ )。好中球浸潤平均スコアでも同様の傾向を認めた。固有線萎縮は前庭部・体部において、NG群・AG群が未感染群より

優位に高度であり、腸上皮化生については前庭部・体部においてAG群がNG群、HP-群と比較し有意に高度であった。

【考察】今回の検討では、HP感染患者のうち鳥肌胃炎を呈する患者の割合は年齢が上がるにつれ低下することが明らかとなった。また30歳未満の鳥肌胃炎では体部の炎症は比較的軽度である一方、30歳以上の鳥肌胃炎では、通常の萎縮性胃炎と比較しても有意に炎症スコアが高い結果であった。これらの結果から、小児の鳥肌胃炎では炎症は比較的軽度で、多くは成人になるとともに通常の萎縮性胃炎(非鳥肌胃炎)に移行するが、一部の患者では成人以降も鳥肌胃炎が持続し、体部に高度な炎症を呈するものと考えられた。このような症例では高度な炎症の持続により、低分化型腺癌発生のハイリスクとなる可能性が示唆された。現在、HP感染診断や胃癌リスクスコア評価のために広く用いられている京都分類では、鳥肌胃炎は一概に胃癌のリスク因子としてスコア化されるが、小児・若年の鳥肌胃炎を壮年と同様に扱うべきか、今後議論が必要である。

### (論文審査の結果の要旨)

鳥肌胃炎は *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染に伴う内視鏡所見の一つであり、胃体部に強い炎症を伴う汎胃炎を呈することから低分化型腺癌発生のリスク因子とされている。しかしその自然史は不明な部分が多く、すべての年代で同等の発癌リスクを有するのかわくは明らかではない。今回我々は鳥肌胃炎の各世代における病理組織学的特徴を明らかにすべく解析を行った。信州大学医学部附属病院で、Updated Sydney System (USS)に基づき、胃より5点生検(前庭部小彎、前庭部大彎、部小彎、体部小彎、体部大彎)が施行された1,321例を解析した。15歳以下を小児群、16歳以上29歳以下を若年群、30歳以上を壮年群に分類し、USSを用いて3群間で組織学的所見を比較検討した。また、追加検討として、30歳以上の鳥肌胃炎(NG)、萎縮性胃炎(AG)、*H. pylori*未感染(HP-)患者3群での病理組織学的所見の比較検討を行った。

その結果、加古は次の結論を得た。

1. *H. pylori*陽性患者のうち、鳥肌胃炎を呈する患者

- の割合は、15歳以下の小児群で84%、16歳から29歳の若年群で68%、30歳以上の壮年群で8%であり、年代が上がるにつれ低下していた。
2. 胃前庭部大彎における単核球浸潤平均スコアは小児群、若年群、壮年群の鳥肌胃炎患者でそれぞれ2.00、2.07、2.00であり、差は見られなかった。好中球も同様の傾向であった。
  3. 胃体部大彎における単核球浸潤平均スコアは小児群、若年群、壮年群の鳥肌胃炎患者でそれぞれ1.32、1.38、2.01であり、小児・若年群と比較して壮年群で有意に高かった（それぞれ $P < 0.001$ ）。好中球も同様の傾向であった。
  4. 30歳以上の鳥肌胃炎（NG）、萎縮性胃炎（AG）、HP未感染（HP-）患者3群間での比較検討では、胃前庭部大彎における単核球浸潤平均スコアはNG群が2.00、AG群が1.80、HP-群が0.91であり、NG群

で有意に高かった。好中球も同様の傾向であった。

5. 胃体部大彎における単核球浸潤平均スコアは、NG群が2.08、AG群が1.65、HP-群が0.95であり、NG群が他の2群に比べ有意に高かった（それぞれ $P < 0.001$ ）。好中球も同様の傾向であった。

以上より、HP感染患者のうち鳥肌胃炎を呈する患者の割合は年齢が上がるにつれ低下することが明らかとなった。また、30歳以上の鳥肌胃炎は、30歳未満の鳥肌胃炎および30歳以上の萎縮性胃炎と比較して有意に胃体部の炎症スコアが高いことを示した。本研究では、鳥肌胃炎を呈する患者の中でも年代によって炎症の程度には差が認められたことから、鳥肌胃炎における胃癌のリスクも年代により異なることが示唆された。よって、主査、副査は一致して、本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Prognostic Impact of Hyperpolypharmacy Due to Noncardiovascular Medications in Patients After Acute Decompensated Heart Failure -Insights From the Clue of Risk Stratification in the Elderly Patients With Heart Failure (CURE-HF) Registry- (急性非代償性心不全退院後患者における非心血管系薬剤による多剤併用の予後への影響 (CURE-HF レジストリーより))

金 井 将 史

(論文の内容の要旨)

【目的】多剤併用（ポリファーマシー：内服薬剤が5種類以上）は高齢患者における予後に関連があるとされているが、非代償性心不全患者と心血管イベントの関連はわかっていない。本研究の目的は心不全退院後患者におけるポリファーマシーや薬剤種類と予後との関連について明らかにすることである。

【方法】2014年7月から2019年8月にかけて非代償性心不全で入院加療後の、退院患者1,036名を登録した、長野県の13施設において行った多施設前向き観察研究（CURE-HF）レジストリーを用いて事後研究を行った。20歳未満、急性冠症候群を除外基準とし、主要評価項目を「全死亡」、フォローアップ期間を2年間とし追跡した。検査データやイベントデータに欠損のある152名を除外した884名を対象として、退院時の内服薬剤種類総数、循環器関連薬剤および非循環器関連薬剤種類数を評価した。循環器関連薬剤は高血圧症、脂質異常症、慢性心不全、冠動脈疾患、脳卒中、末梢動脈疾患、心房細動との関連薬剤と定義した。

退院時内服薬剤総数を「非ポリファーマシー群（内服薬剤が5種類未満）」、「ポリファーマシー群（5-9

種類）」、「ハイパーポリファーマシー群（10種類以上）」の3つのカテゴリーに分類し評価した。

また、併存疾患についてはCharlson併存疾患指数およびElixhauser併存疾患指数をもとに、高血圧症、脂質異常症、糖尿病、高尿酸血症、心房細動、冠動脈疾患既往、脳卒中既往、末梢動脈疾患、慢性腎不全、貧血、肥満、慢性閉塞性肺疾患、認知症、悪性腫瘍既往の14項目について評価した。

【結果】対象となった884名の年齢中央値は81歳であり、退院時の内服薬剤種類総数、循環器関連薬剤、非循環器関連薬剤種類数の中央値はそれぞれ、8、5、3種類であった。非ポリファーマシー群、ポリファーマシー群、ハイパーポリファーマシー群はそれぞれ77名（8.7%）、489名（55.3%）、318名（36.0%）であり、91.3%が5種類以上（ポリファーマシー）内服していた。主要評価項目である「全死亡」は232名で観察され、平均観察期間は730日であった（発生率：15.6/人年）。 Kaplan-Meier解析ではハイパーポリファーマシー群が他2群と比較し有意に全死亡が多かった（ $P = 0.002$ ）。また、循環器関連薬剤、非循環器関連薬剤をそれぞれの中央値（5、3種類）で2分したカ

プランマイヤー解析では、非循環器関連薬剤では内服種類数が多い群で有意に全死亡が多かった ( $P < 0.001$ ) が、循環器関連薬剤では有意な全死亡の増加はみられなかった ( $P = 0.64$ )。Cox 比例ハザード分析では、前述の併存疾患14項目含む21項目を共変量とし、ハイパーポリファーマシーが有意に全死亡との関連を認めた (ハザード比 1.48,  $P = 0.008$ )。加えて内服薬剤種類総数も有意に全死亡の関連を認めた (ハザード比: 1種類増毎1.05,  $P = 0.027$ )。また、非循環器関連薬剤は有意に全死亡との関連を認めた (ハザード比: 1種類増毎1.07,  $P = 0.01$ )、一方循環器関連薬剤は全死亡との有意差を認めなかった ( $P = 0.95$ )。

**【考察】** 心不全患者はガイドラインの遵守による薬物療法や加齢に関連する多くの併存疾患に対する治療などにより、ポリファーマシーが生じやすい。ハイパーポリファーマシーと臨床結果との関連を研究した過去の研究において、KCHF レジストリーでは、ハイパーポリファーマシーと1年以内の全死亡との関連を示し、TOPCAT 研究では、ハイパーポリファーマシーと全死亡との関連は示されなかったが、再入院との関連が示された。ハイパーポリファーマシーと全死亡との関連を示した本研究と、これらの研究との結果の違いは、対象患者の年齢や死亡率が関連している可能性が高いと考えられた。

本研究では退院時内服薬剤種類総数が増加するにつれ、非循環器関連薬剤が有意に増加し、両者の分布傾向が類似していることを示した。また、循環器関連薬剤の増加が全死亡の増加に有意に関連しないことを明らかにした。心不全患者に対するガイドラインに準ずる処方、臨床現場において適切かつ安全であり、また非循環器関連薬剤含む内服薬を定期的に見直すことの重要性が示唆された。またポリファーマシーの状態を評価することが死亡リスクの高い急性心不全患者を同定するのに有用であると考えられた。

#### (論文審査の結果の要旨)

5種類以上の薬剤内服はポリファーマシー、10種類以上の薬剤内服はハイパーポリファーマシーとされる。心不全患者は多くの併存疾患を有しており、併存疾患管理のために内服薬数が増加しやすい。またガイドラインに沿った薬物療法の発展によりポリファーマシーを来しやすい。ポリファーマシーと有害事象の関連は多く報告されており、また心不全患者におけるハイパーポリファーマシーと有害事象の関連は報告されているが、限られている。本研究は長野県で行われた

CURE-HF レジストリーを用いて、急性心不全により入院し、退院した患者におけるハイパーポリファーマシーの予後への影響および薬剤分類 (循環器関連薬・非循環器関連薬) の予後への影響を明らかにすることを目的として実施された。

2014年7月から2019年8月の間に長野県内の13病院において非代償性心不全で入院となり、退院後の1,036名のうちデータ欠損などのある患者152名を除外した884名を解析対象とし、退院時の内服薬種類数を評価した。また退院時内服薬について循環器関連薬及び非循環器関連薬に分類し追加解析を行った。退院内服薬数0-4種類の非ポリファーマシー群 (77名)、5-9種類のポリファーマシー群 (489名)、10種類以上のハイパーポリファーマシー群 (318名) の3群に分類し予後を評価した。主要評価項目を全死亡とし、追跡期間を2年間とした。

その結果、以下の結論を得た。

1. ハイパーポリファーマシー群が他2群と比較し、有意に全死亡が多かった。
2. 併存疾患を含む複数の共変量を用いた多変量解析において、ハイパーポリファーマシーは予後予測因子であった。
3. 多変量解析にて、非循環器関連薬数の増加は予後と有意な関連を認めたのに対して、循環器関連薬数の増加は予後との関連を認めなかった。

本研究の臨床的意義は、非代償性心不全による入院加療後の患者においてポリファーマシーの状態が、全死亡のリスクの高い患者を同定する一つの指標となること、また非循環器関連薬を中心とした内服薬の見直しが重要である可能性が示唆されたことにある。また、ハイパーポリファーマシーのリスクに関するサブグループ解析の結果に基づいて、軽症の非虚血性心不全患者においてハイパーポリファーマシーのリスクがより高いことが確認された。

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。

Interval walking training in type 2 diabetes: A pilot study to evaluate the applicability as exercise therapy (2型糖尿病患者におけるインターバル速歩トレーニング: 運動療法としての適用性を評価するパイロットスタディ)

北 島 浩 平

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】インターバル速歩 (IWT) とは個人毎に決定した最大体力の70%以上の速歩と40%以下のゆっくりの歩行をそれぞれ3分間ずつ交互に5から10セット、週に4日以上を目標とする信州大学スポーツ医科学教室が開発した運動療法である。これまで多くのデータが同教室にて蓄積され、IWTの体力 (VO<sub>2</sub> peak) 向上効果や代謝機能改善効果が認められてきた。しかし、2型糖尿病患者 (T2D) における有効性を報告した研究では統計解析に必要な症例数の根拠が不明瞭かつ、解析対象が研究プロトコールに厳密に従うことができる少数の参加者に限定されていたため、リアルワールドでの有効性を判断するには不十分であった。今後の評価のため、我々は単群のパイロット研究でIWTのT2Dに対する有効性を検討した。

【対象】2019年7月1日から12月31日までに信州大学医学部附属病院糖尿病・内分泌代謝内科を受診し、20~80歳でHbA1cが6.5~10.0%、BMI 20~34 kg/m<sup>2</sup>の運動療法が施行可能なT2Dを対象とした。前増殖性または増殖性糖尿病網膜症やアルブミン尿 (≥300 mg/gCre) を伴う糖尿病性腎症、または推定糸球体濾過量 (eGFR) <30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>の方、他に冠動脈疾患や脳卒中の既往歴、妊娠中や授乳中の女性を含め医師が不適切と判断した症例は除外した。

【方法】IWTの開始から20週間後までの各パラメータの変化を測定し、評価した。

IWT開始前に、前データ (患者背景、体重、身長、血圧、生化学データ、腹部および大腿部の単純CT、腹部単純MRI、下肢筋力、BDHQによる食事内容調査、FGMデバイス (FreeStyle Libre Pro) による血糖関連データ、熟大メイト (加速度計と気圧計内蔵の携帯型カロリー計) によるVO<sub>2</sub>peak、日常生活での消費カロリー、基礎身体活動エネルギー消費量) を収集した。参加者は4週毎に受診し、受診時に生化学検査、受診前2週間のIWTデータの評価およびそれによる指導を受けた。また、初診および毎回の来院時に、外傷の有無・程度、上・下肢の関節痛、腰痛についてアンケート調査を実施した。18週目に、IWT後デー

タとしてFGMによる血糖関連データ、BDHQによる食事調査、日常生活での消費カロリーを収集した。介入の終了時に、体重、身長、血圧、生化学データを記録し、研究期間終了から2か月以内に、研究前と同様にVO<sub>2</sub>peak、筋力測定、画像評価を行った。

20週間後の変化は、サンプル数が十分に多かったので (n=51)、中心極限定理によりt検定を用いた。統計分析は、統計ソフトウェアRバージョン4.0.2を使用して実行されました。効果量はCohen's dを用いて計算した。

【結果】51人 (男性 56.9%) が登録でき、平均年齢とBMIは、62.3±11.5歳、27.1±3.7 kg/m<sup>2</sup>であった。総速歩時間の中央値は1,022分であり、速歩目標は60分/週であるため、20週間の時点で速歩時間が1,200分を超える参加者 (n=20、男性12名、女性8名) を達成群とした。全員が途中離脱なくIWTを完了した。

IWT前後の平均HbA1cは7.33%、7.45%であり、介入による有意な変化は認めず、他血糖データも同様であった。肝脂肪量 (PDFF)、内臓脂肪量、皮下脂肪量、および大腿筋量は、介入後に有意な改善を示さなかった。しかしPDFFは介入後に減少傾向を示し (8.73%から7.59%、p=0.051)、同様に内臓脂肪にも介入後に減少傾向が見られた (183.58 cm<sup>2</sup>から174.15 cm<sup>2</sup>、p=0.065)。HDLコレステロール (1.4 mmol/Lから1.5 mmol/L、p=0.0093、Cohen's d=0.25) およびBUN (p=0.047、Cohen's d=0.23) は介入後増加した。エフェクトサイズ分析では、中性脂肪は改善を示し、尿中アルブミンは低下を示した (Cohen's d=-0.55、0.74)。

全体ではIWT前後のVO<sub>2</sub> peakに有意差は認めなかったが、速歩達成群の分析では、健常人での先行データと同様、10%の増加を認めた (1,682 mL/minから1,827 mL/min、p=0.0374、Cohen's d=0.24)。

1日のエネルギー摂取量および熟大メイトから算出したIWT中の消費カロリーを除いた加重平均による1日の基礎身体活動エネルギー消費量も変化を認めなかった。

【議論】今回の研究では、介入後にHbA1c・血糖関連

データに有意な改善は見られなかったが、速歩時間に関係なく、HDL コレステロールの有意な上昇、中性脂肪、BMI、肝脂肪量、腹部内臓脂肪量、筋力の改善傾向が認められた。さらに目標の速歩時間を達成した参加者はVO<sub>2</sub>peakが増加した。過去の研究では、体力向上に高負荷の運動を必要としたが、IWTは速歩目標さえ達成すれば、T2Dでも効果が望めることが明らかになった。

今回の研究の制限は、第一に過去の研究と対象者の募集方法が異なるため、遵守率で単純な比較ができないこと、第二に血糖関連データを含めた生化学検査が空腹時で統一できていないこと、第三に従来の診療におけるリアルワールドでのIWTの有用性に関する単群の介入研究であるため、今回の結果は厳密にIWTの効果に起因するものではないことである。

**【結論】** 今回のパイロット研究では、日本人のT2DにおけるIWTの有効性を検討した。

全参加者がIWTを完遂し、効果量の観点から、IWTは脂質代謝と体力に有効な影響を与えることが示唆された。今後のRCT研究では、これらのパラメータに焦点を当ててIWTの詳細な効果を検討していく予定である。

(論文審査の結果の要旨)

インターバル速歩トレーニング(IWT)は個人毎に決定した最大体力の70%以上の速歩と40%以下のゆっくりの歩行をそれぞれ3分間ずつ交互に5から10セット、週に4日以上を目標とする運動療法であり、健常群において既定の速歩量を達成することにより、体力(VO<sub>2</sub> peak)の向上効果や代謝機能改善効果が認められ、継続率も90%以上と報告されてきた。しかし、2型糖尿病患者(T2D)における有効性を報告した研究では統計解析に必要な症例数の根拠が不明

瞭かつ、解析対象が研究プロトコールに厳密に従うことができる少数の参加者に限定されており、今回、リアルワールドでのIWTの効果を判断するため、単群のパイロット研究でIWTの2型糖尿病患者に対する有効性を検討した。

20~80歳でHbA1cが6.5~10.0%、BMI 20~34 kg/m<sup>2</sup>の運動療法が施行可能な51名の2型糖尿病患者を対象とし、IWTを20週間行い、血液検査、画像評価、患者背景、食事調査、体力評価など各パラメータを前後で測定し、その変化を評価した。速歩目標は60分/週であるため、20週の時点で速歩時間が1,200分を超える参加者を達成群とした。

その結果、北島は以下の結論を得た。

1. HbA1cなどの血糖関連因子はIWT前後で有意な変化は認めなかった。
2. 達成群は全体の39%だった。
3. IWT後に肝脂肪量、内臓脂肪量は改善傾向を認めた。
4. VO<sub>2</sub>peakは達成群で10%有意に上昇した。

これらの結果より2型糖尿病患者においては運動療法のアドヒアランスは健常人群での既報と比較して低下することが明らかになった。また、血糖の目標設定を行わなかったこともあり、HbA1cなどの血糖関連因子に有意な変化は認めなかった。

一方でIWTを行うことで体組成は改善傾向となり、既定の速歩量を満たしたものは健常人と同程度にVO<sub>2</sub>peakも上昇することが明らかになった。

今回のパイロット研究では、今後の比較研究のためのHbA1cや体組成などのパラメータ変化や運動療法のアドヒアランスを評価することができた。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。

Mature human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes promote angiogenesis through alpha-B crystallin (成熟したヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞は、αB-crystallinを介して移植グラフトの血管新生を促進する)

田 中 夕 祈

(論文の内容の要旨)

**【背景と目的】** 多能性幹細胞(ES・iPS細胞)由来心筋細胞を用いた心筋再生研究が、国内外の研究室で行われており、昨今の臨床治験開始とともに、心筋再生医療実現化へ向けた道筋ができてつつある。我々の研究室でも、心筋梗塞領域への心筋細胞直接注入により、

傷害心筋の瘢痕組織が置換され、周囲の心筋細胞との電氣的結合により協調して収縮し、心機能改善へつながることを報告した。しかしながら、成体心筋細胞と比べ未成熟である多能性幹細胞由来心筋細胞の移植に最適な培養期間(成熟度)については未だ定まっていない。

そこで我々は、培養期間の異なる心筋細胞をラット心筋梗塞モデルへ移植し比較することで、移植細胞としてより効果的な培養期間の検証およびその違いをもたらす因子を探索することを目的とした。

【方法と結果】ヒト iPS 細胞より二次元培養法を用いて分化誘導を行い、培養期間28日と56日の心筋細胞 (D28-CM, D56-CM) を作製した。細胞回収時に実施したフローサイトメトリーによる心筋細胞陽性率は、いずれも平均して80~90%であった。細胞増殖率は培養期間の短い D28-CM のほうが高く、また遺伝子発現解析では培養期間を延長した D56-CM において成熟サルコメア遺伝子 (MYH7, TNNI3, MYL2) の上昇を認めるとともに、他の成熟化に関わるものも上昇傾向を示した。これは過去に報告された事例と矛盾しない結果であった。

次に、これらの細胞を用いて動物への移植試験を実施した。無胸腺ラットに対して冠動脈結紮法により心筋梗塞を作製し、心筋傷害領域へ直接注射することで細胞移植を行った。移植後はエコーによる心機能の経時的変化を観察し、かつ改変型ルシフェラーゼ Akaluc を用いた生物発光イメージングにより移植グラフトの生着および増殖を比較した。移植12週後までの経時的観察では、いずれの心筋細胞移植群も細胞無し (生理食塩水) 群と比較し有意な心機能の改善がみられ、生物発光イメージングでは D56-CM 移植群は D28-CM 移植群と比較して移植早期には差が無いものの、移植後 8-12週後に高い発光強度を示した。

移植後 1, 4, 8, 12週時点で心摘出を行い、移植グラフトの組織学的評価を実施した。移植した細胞はいずれも心筋傷害領域にグラフトとして良好に生着することが確認できた。特に移植後12週目の組織学的評価では、D56-CM 移植群は D28-CM 移植群と比較し、左室に占めるグラフト面積の増加、心筋トロポニン I 陽性割合の増加、平均サルコメア長の延長を認め、D56-CM がグラフト領域の生着と成熟をより促進したことが示された。移植グラフトに関しては、移植細胞個々の大きさに差はなく、単位面積当たりの細胞数が D56-CM で多いことが判明したため、グラフト領域の増殖・アポトーシス・血管新生に関連する解析を行った。その結果、移植後の細胞増殖には両群間に差がなく、D56-CM 移植群においてグラフト内のアポトーシスの割合が少ないことが判明した。In vitro でも、D28-CM と比較して D56-CM のほうが活性酸素種 (ROS) に対する抵抗性があった。さらに D56-CM 移

植群では、移植後 1 週から12週まで一貫してグラフト領域の微小血管形成の促進が観察された。In vitro において、心筋細胞との共培養による血管内皮細胞遊走アッセイと、心筋細胞培養上清を用いた血管形成アッセイを実施した結果、D56-CM の方が血管遊走能、形成能を持つことが確認された。移植12週後のグラフト内から抽出した微量 RNA による RNA シークエンス解析を行ったところ、Gene Ontology 解析において D56-CM 内で血管形成に関わる遺伝子群の変動を認め、組織学的解析の結果が裏付けられた。

D28-CM と D56-CM における移植グラフト差をもたらす因子を探るため、RNA シークエンス、qRT-PCR による遺伝子発現解析、および western blot による蛋白発現解析を実施した。その中で、低分子熱ショックタンパク質「 $\alpha$ B-crystallin (*CRYAB*)」は、遺伝子・蛋白のいずれにおいても D56-CM で有意に発現が上昇していることを認めた。そこで、 $\alpha$ B-crystallin の影響について検証するため、*CRYAB* をノックダウンした D56-CM と *CRYAB* を過剰発現させた D28-CM を用いて実験を行った。*CRYAB* をノックダウンした D56-CM と血管内皮細胞の共培養遊走アッセイ、チューブ形成アッセイでは、通常の D56-CM と比較し、血管内皮細胞の遊走、チューブ形成ともに阻害された。さらに *CRYAB* を過剰発現させた D28-CM を動物へ移植した際には、移植グラフト内の微小血管数が対照群と比較し有意に増加したことから、血管新生の促進を認めた。

【まとめと考察】今回の実験結果より、移植用 iPS 細胞由来心筋細胞の培養期間を延長することは、移植グラフトの生着、成熟、血管新生を促進させることが明らかとなった。さらに、成熟心筋細胞に強く発現している「 $\alpha$ B-crystallin」を、血管新生因子として同定した。血管新生とそれに伴うグラフト内への血液供給の充進は、移植細胞の生存・成熟化を促進し、心筋傷害領域ならびに心臓全体の機能改善へつながると考えられる。今後さらなる研究により、ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた心臓再生治療が標準的な治療法の 1 つとなることが期待される。

#### (論文審査の結果の要旨)

ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞 (hiPSC-CM) を用いた心筋再生療法は臨床試験が開始されているが、移植用 hiPSC-CM の最適な培養期間は未だ定まっていない。今回、培養期間の異なる hiPSC-CM を移植、比較することで適切な培養期間を検証し、さらにその

違いをもたらす因子を探索した。ヒト多能性幹細胞より培養期間28日と56日という2種類の心筋細胞 (D28-CM, D56-CM) を作製し、それらをラットの心筋梗塞部位に直接注入することで細胞移植を行った。移植後の心機能評価、および生物発光イメージング (BLI) による移植グラフトの生着および増殖を比較した。観察期間終了後に心摘出を行い、グラフトの組織学的評価および RNA シーケンスによる遺伝子発現解析を実施した。移植グラフトにおける差をもたらした因子を探るため遺伝子発現解析および蛋白発現解析を実施した。候補因子についてノックダウン細胞および過剰発現細胞を作製し検証した。

その結果、田中は次の結果を得た。

1. 細胞増殖率は D28-CM が高く、培養期間を延長させた D56-CM では成熟化の促進および活性酸素種に対する抵抗性を持つことが認められた。
2. 心筋梗塞領域への細胞移植後、心機能は両群で改善がみられ、BLI に関しては D56-CM 移植群では D28-CM 移植群と比べ、移植後 8 週以降に特に高い発光強度を示した。
3. 移植12週後の組織学的評価では、D56-CM 移植群は D28-CM 移植群と比較し、グラフト面積の増

加、成熟化の指標である心筋トロポニン I 陽性割合の増加およびサルコメア長の延長を認めた。

4. D56-CM 移植群では、移植後 1 週から12週まで一貫してグラフト領域の微小血管形成の促進が観察された。
5. In vitro における血管内皮細胞遊走アッセイ・血管形成アッセイの比較より、D56-CM の方が血管遊走能、形成能をもたらすことが確認された。
6.  $\alpha$ B-crystallin (*CRYAB*) が、遺伝子・蛋白のいずれも D56-CM で有意に発現上昇していることを認めた。
7. In vitro の内皮細胞遊走試験では、*CRYAB* のノックダウン処理により遊走が阻害された。さらに、*CRYAB* の過剰発現細胞移植では、移植後のグラフト内の血管新生を促進した。

以上より、移植用 iPS 細胞由来心筋細胞の培養期間を延長することは、移植グラフトの生着、成熟、血管新生を促進させることが明らかとなった。さらに、成熟心筋細胞に強く発現している「 $\alpha$ B-crystallin (*CRYAB*)」を、血管新生因子として同定した。

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

Prevalence and associated factors for primary osteoarthritis of the scaphotrapeziotrapezoidal, radiocarpal, and distal radioulnar joints in the Japanese general elderly population (日本人高齢者における舟状大菱形小菱形骨間関節、橈骨手根間関節、遠位橈尺関節の一次性関節症の有病率と関連因子)

## 北 村 陽

(論文の内容の要旨)

【研究の背景と目的】 高齢化社会の進展とともに変形性関節症 (OA) の予防と治療は喫緊の課題の一つである。手関節 OA は中高年の患者においてしばしば見られ、時に慢性的な手関節の疼痛や機能障害を来す。手関節 OA の原因は外傷や関節リウマチなどに起因する二次性のものが多く、一次性手関節 OA の有病率やその関連因子についての研究は少ない。本研究の目的は横断的研究により、一次性手関節 OA の有病率と関連因子、そして症状を有する手関節 OA の有病率を評価することである。

【方法】 日本の小布施町の住民基本台帳から50~89歳の住民1,297人を無作為に抽出し、415名が調査に参加した。各対象者に両手関節の X 線写真を撮影し、舟状大菱形小菱形間骨関節 (STTJ)、橈骨手根関節 (RCJ)、

遠位橈尺関節 (DRUJ) の radiographic OA (ROA) の有無を調査した。ROA の有無については Katayama らの方法に準じて判定した。手関節正面 X 線像では三角線維軟骨複合体 (TFCC) の石灰化の有無と ulna variance, scapholunate (SL) gap の計測もを行い、手関節側面 X 線像では SL angle の計測も行った。また整形外科医による診察を行い、各関節の圧痛と運動時痛の有無を調査し、ROA がありかつ同関節の圧痛もしくは運動時痛を認めたものを symptomatic OA (SOA) とした。また両手部と両肘関節の X 線写真撮影も行い母指 CM 関節と肘関節の OA の有無を評価した。質問票にて年齢、性別、既往歴や内服歴、職業歴などを調査し、STTJ, RCJ, DRUJ ROA との関連についてロジスティック回帰分析を用いて検討した。

【結果】 関節リウマチなどの二次性関節症を来す疾



患の既往がある参加者や上肢の骨折歴がある参加者は除外し、合計338人676手関節（男性162人、女性176人、平均年齢69.0歳）を調査した。STTJ, RCJ, DRUJ ROAの有病率はそれぞれ5.3%, 1.5%, 21.2%であった。一方でSOAはSTTJ, RCJでは認めず、DRUJでは0.3%と極めて低い頻度であった。STTJ ROAの関連因子は、母指CMJ ROA, 女性, 加齢であった。DRUJ ROAの関連因子は、肘関節OA, 振動工具の使用, 加齢, ulnar positive varianceであった。RCJ ROAは有病率が低く、関連因子の統計学的検討は行えなかった。またulnar varianceの平均値は2.3 mm (SD 1.3 mm)であった。重度の肘関節OAを有する同側の手関節において、DRUJ ROAの有病率は54.4%と、肘関節OAがない群や中等度の肘関節OAを認める群に比べて頻度が高かった。また肘関節OA重症度はulnar varianceと相関し、重度の肘関節OAを認める群では肘関節OAがない群や中等度の肘関節OAの群に比べてulna varianceが有意に大きかった (Tukey-Kramer法)。

**【結論】** 本研究では50～89歳の日本人を無作為抽出した住民コホートから一次性手関節OAの有病率を、STTJ, RCJ, DRUJの各関節別に調査した。各関節の有病率はSTTJで5.1%, RCJで1.4%, DRUJで21.2%であった。STTJ, RCJ OAの有病率は、他の研究で報告されている肩関節や股関節、膝関節OAの有病率に比べて極めて少なく、DRUJ OAの有病率はそれらと同程度であった。SOAはSTTJとRCJでは認めず、DRUJでは0.3%と稀であった。手関節SOAの有病率は他の研究で報告されている肘関節や股関節、膝関節SOAの有病率に比べて極めて低い値であった。関連因子について肩関節や股関節、膝関節OAは女性と加齢が関連していると報告されている。本研究においてSTTJ, DRUJ ROAは加齢が共通した関連因子であった。一方STTJ ROAは女性が関連因子であったが、DRUJ ROAでは関連を認めなかった。STTJ ROAは母指CMJ ROAの存在が関連因子であったが、母指CMJ ROAの重症度とは関連はなかった。本研究ではulnar positive varianceと肘関節OAがDRUJ ROAの関連因子であった。加齢に伴うulnar varianceの増大についての報告がなされているが、その原因については明らかになっていない。本研究では肘関節OAが重症であるとulnar varianceが有意に増大することが示された。これらの結果から、重症の肘関節OAがpositive ulnar varianceを引き起

こし、DRUJ OAに至るという病態が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

臨床において橈骨手根骨間関節 (RCJ)、舟状大菱形小菱形骨間関節 (STTJ)、遠位橈尺関節 (DRUJ) の変形性関節症 (OA) にしばしば遭遇する。膝・股関節や肩・手指関節のOAに対する疫学研究は多く行われているが、一次性手関節OAの疫学研究は少なく、その有病率やその関連因子については明らかになっていない。そこで我々は横断研究を行い一次性手関節OAの有病率と関連因子、そして症状を有する手関節OAの有病率を明らかにした。50～89歳の415名を無作為に抽出した。二次性OAを来たす疾患の既往や外傷歴を持つ対象等を除外し、338人を対象とした。各対象者に両手関節のX線写真を撮影しSTTJ, RCJ, DRUJのradiographic OA (ROA)の有無を調査した。手関節正面X線像では三角線維軟骨複合体 (TFCC) の石灰化の有無とulna variance, scapholunate (SL) gapの計測も行い、手関節側面X線像ではSL angleの計測も行った。また整形外科医による診察を行い、各関節の圧痛と運動時痛の有無を調査し、ROAがありかつ同関節の圧痛もしくは運動時痛を認めたものをsymptomatic OA (SOA)とした。また両手部と両肘関節のX線写真撮影も行い母指CM関節と肘関節OAの有無を評価した。質問票にて年齢、性別、既往歴や内服歴、職業歴 (農作業従事歴、重労働従事歴、振動工具使用歴)などを調査し、STTJ, RCJ, DRUJ ROAとの関連についてロジスティック回帰分析を用いて検討した。

調査結果は以下の通りである。

1. 50～89歳におけるROAの有病率はSTTJ: 5.3%, RCJ: 1.5%, DRUJ: 21.2%であり、DRUJ ROAが最も有病率が高かった。一方SOAはSTTJ, RCJでは認めず、DRUJでは0.6%と極めて低い有病率であった。
2. STTJ ROAの関連因子は①加齢、②女性、③同側母指CM関節症の存在であった。
3. DRUJ ROAの関連因子は①加齢、②振動工具の使用、③positive ulnar variance、④同側変形性肘関節症の存在であった。
4. 肘関節OAが重症であるほどulnar varianceは統計学的に有意に大きかった。

本研究結果より50～89歳におけるSTTJ, RCJ, DRUJ ROAの有病率を明らかにした。DRUJ ROAの有病率は最も高い結果であったが、SOAの有病率は極

めて低いことが明らかになった。STTJ と DRUJ ROA の関連因子の中で加齢と隣接関節の OA の存在が共通する因子であった。また DRUJ ROA と同側の肘関節 OA の重症度、そして ulnar variance が互いに関連し

ていたことから、肘関節 OA の発症により ulnar variance が増大し、DRUJ OA が起こるという機序が推察された。

Receptor activity-modifying proteins of adrenomedullin (RAMP2/3): Roles in the pathogenesis of ARDS (ARDS におけるアドレノメデュリン受容体活性調節タンパク RAMP2, RAMP3 の役割)

笠原 智 貴

(論文の内容の要旨)

【背景】急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) は、広範な炎症と肺水腫を特徴とする生命を脅かす肺疾患である。アドレノメデュリン (AM) は、抗炎症作用や血管透過性抑制作用などの、様々な機能を持つ生理活性ペプチドであり、ARDS の治療への応用が期待されている。AM の活性は、AM 受容体である CLR に結合する受容体活性調節タンパク RAMP2 あるいは RAMP3 によって制御されている。しかし、ARDS における RAMP2 および RAMP3 の役割は依然として不明である。AM あるいは RAMP2 ノックアウトマウスは、心血管系の発達不全により胎生致死となるのに対し、RAMP3 ノックアウトマウスは正常に生まれ、成体が得られることから、我々は RAMP2 と RAMP3 の機能分化に注目してきた。本研究では、リポポリサッカライド (LPS) の気管内投与による ARDS モデルを作成し、薬剤誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>) と全身性の RAMP3 ノックアウトマウス (RAMP3<sup>-/-</sup>) を用いて、肺における AM-RAMP2 系、AM-RAMP3 系の病態生理学的意義を検討した。

【方法と結果】8-10週齢の C57BL/6J 雄マウスに対して、LPS を 0.5 mg/kg から 15 mg/kg の濃度の範囲で、気管内噴霧スプレーを用いて投与し、ARDS モデルを作成した。肺重量/体重量比、病理所見の重症度、炎症関連因子の遺伝子発現は、LPS の濃度依存性に上昇した。RAMP2 の発現は LPS 投与により低下したが、RAMP3 の発現は低濃度で上昇、高濃度で低下した。肺の病理所見の確認には高濃度の LPS が必要であることから、以後、LPS 15 mg/kg での投与実験を行った。

LPS 投与後、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup> では生存率の低下、肺重量の増加、肺におけるアポトーシス細胞の増加が認められた。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup> マウスでは、血管内

皮細胞のバリア機能を制御する Epac1 の発現は低下し、RAMP3 の発現は代償に上昇した。これに対し、RAMP3<sup>-/-</sup> マウスでは、LPS 投与後、RAMP2 の代償的な発現上昇は見られず、炎症後期に iNOS, TNF- $\alpha$ , NLRP3 の発現が低下したものの、生存率、肺重量、病理所見に有意な変化は認めなかった。これらの結果から、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup> マウスでは、ARDS モデルでの病態が増悪する一方、RAMP3<sup>-/-</sup> マウスでは、ARDS モデルでの炎症が抑制されることが明らかとなった。さらにトランスクリプトーム解析の結果から、RAMP2 は AM の循環調節作用に寄与し、RAMP3 は炎症調節作用に寄与することが明らかとなった。さらに浸透圧ポンプを用いて、AM を持続投与し、どちらか一方の RAMP シグナルを活性化することで、病態を改善できるのか検討を進めた。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>, RAMP3<sup>-/-</sup> ともに PBS 投与群と AM 投与群の肺の病理所見に変化はなく、ARDS モデルに対する AM の治療効果には、RAMP2 と RAMP3 の双方が必要であることが明らかとなった。

以上の結果から、RAMP2 と RAMP3 の双方が ARDS の病態に関与しているものの、その病態生理学的意義は明確に異なることが明らかとなった。RAMP2 と RAMP3 の病態生理学的意義と機能的差異をさらに解明することは、ARDS における AM の今後の治療応用に不可欠である。

(論文審査の結果の要旨)

アドレノメデュリン (AM) は多彩な作用を有する生理活性ペプチドである。AM の作用は、主として、AM の受容体 CLR に結合する 2 つの受容体活性調節タンパク、RAMP2 あるいは RAMP3 によって制御されると考えられている。RAMP2, RAMP3 は、いずれも肺において高発現している。これまでに、AM の外因性投与は、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) の病態を改善することが報告されている。一方で、ARDS

の病態における RAMP2 および RAMP3 の意義は不明であった。本研究では、誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>)、および RAMP3 ノックアウトマウス (RAMP3<sup>-/-</sup>) に対して、リポポリサッカライド (LPS) を経気道的に投与することで、ARDS の病態モデルを作成し、AM-RAMP2 系、AM-RAMP3 系、各々の病態生理学的意義を検討した。

その結果、笠原智貴は次の結論を得た。

1. C57BL/6J 野生型マウスに対して LPS を投与すると、濃度依存性に炎症、肺浮腫の病理所見が増悪し、リアルタイム PCR においては炎症関連因子の発現が亢進した。AM の発現は LPS の濃度依存性に亢進したが、CLR および RAMP2 の発現は濃度依存性に低下した。RAMP3 の発現は低用量では濃度依存性に亢進したが、高用量では逆に低下した。
2. DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup> の ARDS モデルでは、コントロールマウスと比較して有意に生存率が低下し、肺重量が増加した。さらに肺の病理所見ではアポトーシス細胞が有意に増加していた。リアルタイム PCR において、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup> の肺では、代償性の RAMP3 の発現亢進が増強していた。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup> では血管内皮細胞のバリア機能を制御する Epc1 の発現は低下していた。また DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup> では IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1、iNOS などの炎症関連因子の発現亢進を認める一方で、TNF- $\alpha$  や ICAM-1 は発現が低下していた。
3. RAMP3<sup>-/-</sup> の ARDS モデルでは、野生型マウスと比較して生存率や肺重量に差は認めなかった。リアルタイム PCR において、RAMP3<sup>-/-</sup> では、代償性の RAMP2 発現亢進は認めなかった。24 時間後の炎症後期の時点で、RAMP3<sup>-/-</sup> では、TNF- $\alpha$ 、iNOS、NLRP3 などの炎症関連因子の発現低下を認めた。
4. トランスクリプトーム解析において、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup> では循環調節関連因子の変動が最も大きく、RAMP3<sup>-/-</sup> では炎症関連因子の変動が最も大きかった。
5. FACS を用いた肺の白血球数や分画の評価において、RAMP3<sup>-/-</sup> では野生型マウスと比較して、CD4<sup>+</sup>細胞/CD8<sup>+</sup>細胞比の有意な低下を認めた。
6. DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>、RAMP3<sup>-/-</sup> 各々に対し、AM を外因性に投与しても、ARDS の病態の改善は認めなかった。

以上の結果から、AM-RAMP2 系は主として血管の透過性や循環制御に働くのに対し、AM-RAMP3 系は主として炎症の制御に働くという機能分化が明らかとなった。RAMP2 および RAMP3 は共に、AM による ARDS の病態改善効果の発揮において必須であると考えられた。笠原智貴が得た結果は、AM の今後の治療応用のための基盤となると評価された。

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。

Antiplatelet drugs may increase the risk for checkpoint inhibitor-related pneumonitis in advanced cancer patients (抗血小板薬は進行がん患者における免疫関連肺臓炎のリスクを高める可能性がある)

## 荒木太亮

### (論文の内容の要旨)

【背景】免疫チェックポイント阻害薬 (immune-checkpoint inhibitor: ICI) は様々ながん種に対する適用を取得しており、日常臨床で幅広く用いられている。ICI に特有の全身性有害事象として免疫関連有害事象があり、なかでも免疫関連肺臓炎 (ICI-related pneumonitis: CIP) は致命的経過をたどることもあり臨床的重要性が高い。近年、プロトンポンプ阻害薬や抗菌薬などの特定の併用薬剤が ICI の治療効果や有害事象の発生に影響するとの報告が複数ある。しかし、これらのベースライン併用薬と CIP 発生リスクの関係を調査した研究はなくその影響は不明である。

【目的】ICI 治療を受けた進行がん患者におけるベースライン併用薬と CIP 発生リスクの関係を明らかにすること。

【対象と方法】信州大学医学部附属病院において 2014 年 4 月 1 日から 2021 年 10 月 31 日の期間に ICI を少なくとも 1 回以上投与された進行がん患者 (悪性黒色腫、非小細胞肺癌、頭頸部がん、泌尿器がん、その他のがん) 511 人を後方視的に検討した。術後補助化学療法など地固め治療目的で ICI が投与された症例、3 か月以内の胸部放射線治療歴を有する症例、他院で ICI 治療が導入された症例は対象から除外した。ベースライン併用薬 (アンジオテンシン変換酵素阻害薬/アン

ジオテンシン受容体拮抗薬, 経口血糖降下薬, 脂質改善薬, プロトンポンプ阻害薬, 非ステロイド性抗炎症薬, 抗菌薬, 抗血小板薬, 経口ステロイド薬)や併存症を含むベースラインの患者情報と臨床転帰に関する情報を電子カルテから抽出した。まず, 単変量ロジスティック回帰分析を行いCIP発生リスクと関連する因子を調査した。次いで, CIP発生リスク因子として同定されたベースライン処方薬がCIP発生率に与える影響を調査するために傾向スコアマッチングにより背景因子を調整した。傾向スコアマッチング後のコホートにおいて多変量解析(Fine-Gray比例ハザード回帰)を行い同定された併用薬がCIP発生リスクに及ぼす影響を評価した。

**【結果】**全体で47例(9.2%)がCIPを発症し,うち20例(42.6%)がgrade 3以上であった。ベースラインで抗血小板薬が投与されていた症例ではCIP発生率が高かった(処方群対非処方群:23.4%対8.4%)。単変量解析でベースラインにおける抗血小板薬の使用がCIPリスク因子であることが示唆された(オッズ比:3.33, 95%信頼区間:1.57-7.05,  $P=0.002$ )。傾向スコアマッチング後のコホートにおいても,抗血小板薬投与群で同様にCIP発生率が高かった(処方群対非処方群:22%対6%)。Fine-Gray比例ハザード回帰の結果,ベースラインの抗血小板薬投与がCIP発生リスクを有意に上昇させることが示された(ハザード比:3.46, 95%信頼区間:1.21-9.86,  $P=0.02$ )。

**【考察】**本研究において,ベースラインでの抗血小板薬投与がCIP発生リスクを上昇させることが示された。CIP発症リスク管理において,ベースライン処方薬を評価することの重要性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

過去10年のがん薬物治療の中心を担う薬剤の1つである免疫チェックポイント阻害薬(immune checkpoint inhibitor:ICI)は2014年の本邦承認以後,急速に適応を拡大しほぼすべてのがん種に対して使用されている。ICIに特有の有害事象である免疫関連有害事象(immune related adverse event:irAE)の中で,免疫関連肺臓炎(checkpoint inhibitor-related pneumonitis:CIP)は重症度が高く,ときに致死的でありその後の薬物治療が制限されるため臨床的重要性が高い。CIP発生の危険因子として,非小細胞肺癌,男性,喫煙歴,肺気腫,肺線維化,胸部放射線治療歴,他の抗悪性腫瘍薬との併用,などがこれまで指摘されており数多くの観察研究で検討が行われている。

近年,日常診療で処方されるベースライン併用薬(降圧薬,血糖降下薬,脂質改善薬など)とICI治療の効果・毒性との関連を調査した研究成果が相次いで報告されている。有害事象との関連においては,プロトンポンプ阻害薬,抗菌薬,非ステロイド性抗炎症薬はICI投与に関連した腸炎や腎障害の発生リスクを高めることが報告されている。CIPに関して,これまでベースライン併用薬とその発生リスクを調査した研究はない。今回,信州大学医学部附属病院(以下当院)でICI治療を受けた進行がん患者を対象として,ベースライン併用薬とCIP発生リスクの関連を調査することにした。

2014年4月30日から2021年10月30日までの期間に,当院でICI治療を受けた568例の中から適格基準を満たす511例[CIP非発生群(non-CIP群)464例,CIP発生群(CIP群)47例]を抽出し解析を行った。その結果,荒木は次の結果を得た。

1. 単変量解析でベースライン併用薬の抗血小板薬の使用がCIP発生リスクを高めることが示唆された(オッズ比:3.33, 95%信頼区間:1.57-7.05)。
2. 多変量解析で交絡を調整しても,1と同様の結果が得られた(ロジスティック回帰分析 オッズ比:3.18, 95%信頼区間:1.47-6.88 Fine-Gray比例ハザード回帰 ハザード比 2.93, 95%信頼区間 1.45-5.93)。

次いで,全体コホートを抗血小板薬非併用群(461例),抗血小板薬併用群(50例)に分け,2対1の傾向スコアマッチングを用いてCIP発生の交絡となりうる背景因子を調整した。

3. マッチング後のコホートにおいても抗血小板薬併用群でCIP発生率が高く(6%対22%,標準化差=0.47),さらに多変量解析(Fine-Gray比例ハザード回帰)により抗血小板薬併用がCIP発生リスクの上昇と有意に関連していることが示された(ハザード比:3.46, 95%信頼区間 1.21-9.86)。

以上より,ICI治療を受けた進行がん患者において,ベースラインの抗血小板薬併用がその後のCIP発生リスクを高めることが示された。本研究は臨床的に重要性が高いCIPのリスク管理においてベースライン処方薬を改めて評価することの重要性を強調するものである。よって主査,副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Kinetics of serum O-glycosylated M-hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma history and nucleos(t)ide analogue therapy in hepatitis B patients (O型糖鎖修飾 M-HBs 抗原の核酸アナログ治療における動態と肝細胞癌既往例との関連)

奥村 太規

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 B型肝炎ウイルス (HBV) 感染症は世界的な健康問題の一つであり、感染者数は世界で3億5,000万人以上、さらに毎年約60万人が死亡していると推定されている。急性肝炎や慢性肝炎を引き起こす主要な原因の一つである。HBV のウイルスゲノムは、急性肝炎が治癒し、HBs 抗原の消失後も肝細胞中に cccDNA として生涯存在する。また、慢性化すると肝硬変や肝細胞癌 (HCC) に至ることがある。現在の抗ウイルス療法の主軸は、核酸アナログ治療によるウイルス制御であり、治療の長期目標は HBs 抗原の消失である。しかしながら、抗ウイルス療法では肝心の cccDNA を破壊することはできない。そのうえ、B型肝炎の臨床経過は症例によって HBs 抗原が自然排除される例から、肝硬変に至り HCC を発症する例まで様々であり、ウイルス動態も複雑である。さらに、B型肝炎の実臨床では、非肝硬変例や核酸アナログ治療例、HBs 抗原消失を達成した例においても HCC を発症することがあり、その予測は重要な課題である。B型肝炎の HCC 予測マーカーとしては、HBs 抗原や HBe 抗原がある。さらに、核酸アナログ治療例では HB コア関連抗原の有用性が報告されている。しかしこれらの HBV 関連マーカーを用いてもなお HCC 発症リスクの正確な層別化は困難であり、新規のバイオマーカーが求められている。HBs 抗原は HBV の表面を被う蛋白で pre-S1, pre-S2, S 領域から構成される。また S-, M-, L-HBs 抗原の3タイプの存在が知られており、実臨床で測定される HBs 抗原はこれら全てを検出している。pre-S1 ドメインは L-HBs 抗原にのみ存在し、pre-S2 ドメインは L-HBs 抗原と M-HBs 抗原の両方に存在する。また、S ドメインは3タイプに共通して存在する。そして、HBV 粒子には、ウイルス DNA を含む Dane 粒子と呼ばれる感染性粒子と、非感染性粒子が含まれる。HBV 粒子の大部分は非感染性粒子であり主に S-HBs 抗原で構成されている。一方、Dane 粒子は M-HBs 抗原と L-HBs 抗原を含むことが知られている。従って、Dane 粒子と非感染性粒子を区別することがウイルス動態の把握に重要であ

るが、現状の全 HBs 抗原の測定ではこれらを区別することはできない。近年、遺伝子型 C の HBV では、M-HBs 抗原の PreS2 ドメインが O 型糖鎖で高度に修飾されていることが報告された。さらに、O 型糖鎖修飾 M-HBs 抗原 (HBsAgGi) の測定システムが開発された。従って、HBsAgGi は、HBV の感染性粒子と関連することから、核酸アナログ治療中の HBV の動態把握や HCC の発症予測に有用な可能性があるが十分な検証はなされていない。そこで、本研究では B 型肝炎患者において、HBsAgGi の核酸アナログ治療中の動態と HBsAgGi と HCC との関連を検討することを目的とした。凍結保存血清中の HBsAgGi を、HBsAgGi ELISA kit (RCMG, Inc) を用いて測定し、臨床経過および HCC との関連を比較検討した。

【材料および方法】 解析①：信州大学医学部附属病院へ通院した HBV 症例124例を対象とし、HBsAgGi と HBs 抗原や HBV-DNA 等の HBV 関連マーカーとの相関と HCC 既往歴との関連を検討した。解析②：核酸アナログ使用例36例において、治療前後の HBsAgGi の変化を他の臨床的指標と比較検討した。

【結果】 解析①の結果：124例の年齢の中央値は59歳であり、男性49例 (39.5%) であった。病態別にみると、慢性肝炎：97例、肝硬変：15例、非活動性キャリア：10例、無症候性キャリア：2例であった。

また、HBe 抗原陽性：31例 (25.0%)、核酸アナログ治療中：73例 (58.9%) であった。HBsAgGi は HBs 抗原と有意に相関した ( $r=0.5857$ ,  $P<0.001$ )。HBsAgGi ( $r=0.2936$ ,  $P=0.001$ ) と HBs 抗原 ( $r=0.2798$ ,  $P=0.002$ ) は、HBV-DNA と相関していた。また核酸アナログ治療例を除いた検討においても、HBsAgGi ( $r=0.4332$ ,  $P=0.002$ ) と HBs 抗原 ( $r=0.3927$ ,  $P=0.006$ ) は HBV-DNA と相関した。いずれの場合も、HBsAgGiの方が HBs 抗原より相関係数は高かった。HBsAgGi は、HCC 既往有群と無群の間で差はなかったが、HBsAgGi/HBs 抗原は、HCC 既往有群の方が有意に高かった ( $p=0.011$ )。さらに、多変量ロジスティック回帰分析では、HBs 抗原低値かつ HBsAgGi 高値であることが、HCC 既往と関連する

独立した因子であった (OR 4.20, P=0.014)。解析②の結果：核酸アナログ治療開始前と48週治療後では、HBsAgGi (P<0.001), HBs 抗原 (P=0.005) および HBV-DNA (P<0.001) が有意に低下した。治療前、HBe 抗原陽性群では、HBsAgGi は治療開始前より48週間後に有意に低下した (P=0.005) が、HBs 抗原では有意な低下はなかった (P=0.051)。HBs 抗原に比して、HBsAgGi が高値であることは HCC 既往と関連していた。また、HBsAgGi は、核酸アナログ治療により有意に低下した。

【結論】 HBsAgGi は、核酸アナログ治療例のウイルス動態や HCC 発症と関連しており、新規の HBV 関連マーカーとしての臨床的有用性をさらに検討する必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染症は肝硬変や肝細胞癌 (HCC) の原因となる世界的な健康問題の一つである。B 型肝炎の実臨床では、非肝硬変例や核酸アナログ治療例、HBs 抗原消失を達成した例においても HCC を発症することがあり、その予測は重要な課題である。しかし HBs 抗原や HB コア関連抗原などの既存の HBV 関連マーカーを用いてもなお HCC 発症リスクの正確な層別化は困難であり、新規のバイオマーカーが求められている。

HBs 抗原は HBV の表面を被う蛋白で pre-S1, pre-S2, S 領域から構成される。また S-, M-, L-HBs 抗

原の 3 タイプの存在が知られており、実臨床で測定される HBs 抗原はこれら全てを検出し、そのほとんどは S-HBs 抗原である。しかし感染性粒子である Dane 粒子は主に M-HBs 抗原と L-HBs 抗原を含むことが知られている。従って、現状の全 HBs 抗原の測定では感染性粒子の動態を把握することはできない。近年、遺伝子型 C の HBV では、M-HBs 抗原の PreS2 ドメインが O 型糖鎖で高度に修飾されていることが報告された。さらに、O 型糖鎖修飾 M-HBs 抗原 (HBsAgGi) の測定システムが開発された。そこで、本研究では B 型肝炎患者において、HBsAgGi の核酸アナログ治療中の動態と HBsAgGi と HCC との関連を検討することを目的とした。凍結保存血清中の HBsAgGi を、HBsAgGi ELISA kit (RCMG, Inc) を用いて測定した。その結果、次のような結果が得られた。

1. HBsAgGi は全 HBs 抗原と比較して血中 HBV-DNA と強く相関する。
2. HBsAgGi/HBsAg 比は HCC 既往歴と有意に関連する。
3. HBsAgGi は核酸アナログ治療前後で有意に低下し、その傾向は HBe 抗原陽性例で顕著である。

これらの結果から、HBsAgGi は感染性粒子を反映し、HCC 発症と関連している可能性や、核酸アナログ治療中のウイルス動態評価に有用な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して認めた。

Increased mitochondria are responsible for the acquisition of Gemcitabine resistance in pancreatic cancer cell line (膵癌細胞株における Mitochondria 増加はゲムシタビン耐性獲得に寄与する)

増尾 仁志

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 膵臓癌は外科手術が唯一の根治的治療法であるが、進行した段階で発見されることが多く、Gemcitabine (Gem) を主軸とした化学療法が広く行われている。しかし、早期に Gem 耐性を獲得するため、予後改善には Gem 耐性の機序を明らかにすることが重要と考えられる。膵臓における Gem 耐性の原因として、がん代謝による周囲環境への適応が報告されている。通常、細胞のエネルギー産生は主に酸化的リン酸化と解糖系によって賄われているが、近年、がん細胞における代謝の特徴として、Mitochondria 代謝である、アミノ酸や脂質を含めた複雑な代謝ネット

ワークの関与が示された。Mitochondria は酸化的リン酸化のみならず解糖系を含めた様々な代謝生成物の利用や、オートファジー、アポトーシスなどのプロセスを通じて、細胞のエネルギー産生や代謝可塑性、細胞死の調節に関与する細胞小器官であり、がん代謝やストレス適応に寄与することで生存を促進すると考えられている。また、Mitochondria における融合と分裂、数や形態の変化は Mitochondrial dynamics と呼ばれており、化学療法耐性への関与が報告されている。しかし、膵臓における耐性獲得時の Mitochondrial dynamics と Gem 耐性の関係は明らかとなっていない。本研究では、Mitochondrial dynamics に着目し、

膵臓における Gem 耐性機序を解明することにより、新たな治療戦略を見出すことを目的とした。

【方法】 ヒト由来膵臓癌細胞株 (MIAPaCa-2, Panc1) を用いて Gem 耐性株を作成し、耐性獲得前後の各項目における変化を評価した。細胞内代謝は細胞外フラックスアナライザーにて評価した。Mitochondria 量の評価は、Mitochondria DNA と核 DNA の比率を Real-time qPCR を用いて計測し、電子顕微鏡にて観察した。呼吸鎖複合体、Mitochondria 分裂やアポトーシス、AMPK-HSF1 経路に関連するタンパク質発現を Western blotting にて評価した。各細胞株に Gem および HSF1 阻害剤もしくは BCL2-Family 阻害剤を添加し、細胞増殖抑制効果を検討した。Gem との併用効果が *in vitro* で示された HSF1 阻害剤を用いて、*nude mouse* の皮下移植モデルでの併用効果を評価した。MIAPaCa-2 の親株と耐性株を皮下に移植し、各薬剤を腹腔内投与して腫瘍径を計測した。

【結果】 耐性株において酸化的リン酸化は亢進し、解糖能に差を認めなかった。Mitochondria 画分での呼吸鎖複合体の発現に差は認めなかった。耐性株では、Mitochondria DNA コピー数が増加し、電子顕微鏡による観察では Mitochondria 面積の増加を認めた。次に、Mitochondria 分裂について評価した。Mitochondria は FIS1 により誘導される末梢分裂で、Mitophagy が誘導されると報告されているが、耐性株では FIS1 の発現が低下していた。Mitophagy 関連タンパク質の評価では、耐性株において、レセプター依存的 Mitophagy を誘導する BNIP3L/NIX や BNIP3 の発現が低下していた。アポトーシス関連タンパク質の評価では、MIA PaCa-2 で BCL2, Panc1 で BCL2 および BCL-xL の発現が耐性株で増加していた。Gem と BCL2-Family 阻害剤との併用実験では、*in vitro* で MIAPaCa-2 の耐性株ではわずかに相乗効果を認め、Panc1 では相乗効果を示さなかった。次に、細胞におけるエネルギー枯渇時には、AMP/ATP 比の上昇が AMPK を活性化し、HSF1 不活化によるストレス適応能力の低下が報告されていることから、AMP/ATP 比ならびに AMPK-HSF1 経路に関するタンパク質発現を耐性獲得前後で比較した。耐性株では AMP/ATP 比は低下し、AMPK 活性の低下を認め、下流の HSF1 と HSP の発現が亢進していた。HSF1 阻害剤は親株よりも耐性株において腫瘍増殖抑制効果を示し、Gem と HSF1 阻害剤との併用実験では、*in vitro* および *in vivo* で耐性株における相乗効果を認めた。

【結語】 ヒト膵臓癌細胞株では、耐性株における Mitochondria 増加を認めた。Mitochondria 増加は、酸化的リン酸化能力の亢進と BCL2 発現亢進に寄与すると考えられた。さらに、耐性株の酸化的リン酸化能力亢進は、AMPK-HSF1-HSP 経路を介した HSP 発現の亢進を誘導し、細胞ストレスに対する耐性を生じると考えられた。Gem と BCL2 または HSF1 阻害剤の併用は、Gem 耐性膵臓癌を治療するための新しい治療戦略となる可能性がある。

#### (論文審査の結果の要旨)

Mitochondria は細胞のエネルギー産生や細胞死の調節に関与する細胞小器官であり、がん代謝に寄与することでがん細胞の生存を促進すると考えられている。また、Mitochondria における融合と分裂、数や形態の変化は Mitochondrial dynamics と呼ばれ、化学療法耐性への関与が報告されているが、膵臓における耐性獲得時の Mitochondrial dynamics と Gem 耐性の関係は明らかではない。本研究では、Mitochondrial dynamics に着目し、膵臓における Gem 耐性機序を解明する目的で実験を行った。

まず、ヒト膵臓癌細胞株で耐性株を樹立し、耐性株における代謝を評価した。次に、Mitochondria の機能と量、分裂様式と Mitophagy について評価を行った。Gem 耐性獲得メカニズムの解明のために、アポトーシスならびに AMPK-HSF1-HSPs 経路関連タンパク質の発現を評価した。耐性に関与する分子を特定し、Gem との併用効果について *in vitro* および *in vivo* で評価した。

その結果、Gem 耐性株において次の結果を得た。

1. Mitophagy 減少により Mitochondria 量が増加し、その結果、酸化的リン酸化が亢進した。
2. Mitochondria 量の増加に伴って、抗アポトーシス BCL2 発現の増加を認めた。Gem と BCL2-Family 阻害剤の併用は、*in vitro* において一定の増殖抑制効果が得られた。
3. 酸化的リン酸化亢進により、AMPK-HSF1-HSPs 経路を介した HSP 発現の増加を認めた。Gem と HSF1 阻害剤の併用は、Gem 耐性株に対し *in vitro*, *in vivo* 双方で有意な増殖抑制効果を示した。

これらの結果より、膵臓癌の Gem に対する耐性機構として、Mitochondria 増加による BCL2 発現亢進および AMPK-HSF1-HSPs 経路を介した HSP 発現亢進の関与が示唆された。また、BCL2-Family 阻害剤、HSF1 阻害剤はこの耐性を克服し、Gem 耐性株にお

る Gem の抗腫瘍効果を増強することが明らかになった。Gem と BCL2-Family 阻害剤や HSF1阻害剤の併用療法は、Gem 耐性獲得後の膀胱癌患者に対して有

望な治療戦略とな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。

## Short-term Clinical Outcomes of Transcatheter Edge-to-edge Repair using MitraClip for Mitral Regurgitation: Experience from a Single Center (経皮的僧帽弁接合不全修復術の短期成績)

### 能見英智

#### (論文の内容の要旨)

【目的】 MitraClip を用いた経皮的僧帽弁接合不全修復術は、僧帽弁閉鎖不全症 (MR; Mitral Regurgitation) を経皮的に修復するカテーテル治療であり2017年に我が国で承認された。当院で MitraClip を導入した初年度における治療の効果と安全性を後ろ向きに評価し、過去の大規模臨床研究と比較する事を目的とした。

【方法】 信州大学医学部附属病院において、2021年10月から2022年9月までに中等度から重症、または重症 MR に対し MitraClip を用いた経皮的僧帽弁接合不全修復術を施行した患者23名の連続症例を対象とした。治療は全身麻酔、経食道心エコーガイド、右大腿静脈アプローチで行った。主要アウトカムは、術後30日時点での MR の中等度 (グレード2) 以下への低減と、NYHA クラスの改善とした。安全性の主要アウトカムは周術期合併症 (出血、血管損傷、脳卒中、デバイス塞栓症、心タンポナーデ、開心術への移行) の有無とした。

【結果】 平均年齢は83歳 (53-91歳)、平均周術期リスクスコア (STS スコア) は  $10.5 \pm 7.5\%$  と手術リスクであった。23症例の大部分 (91.2%) が NYHA クラスⅢまたはⅣの心不全症状を有しており、直近1年以内に心不全入院を経験している患者が多数 (87.0%) であった。5例 (21.7%) の患者が術前および術中に強心薬の使用を要した。背景となる心筋症は虚血性心筋症が6例 (30.7%)、拡張型心筋症が4例 (17%)、他の二次性心筋症が5例 (21.7%) であった。MR の機序は、心室性機能性が14例 (60.9%)、心房性機能性が4例 (17.4%)、器質性が5例 (21.7%) であり、有効逆流弁口面積 (EROA) は  $0.43 \pm 0.17 \text{ cm}^2$  であった。心室性機能性 MR における平均左室駆出率は  $32.7 \pm 5.6\%$ 、左室拡張末期容積は  $155.3 \pm 88.0 \text{ ml}$  であった。心房性機能性 MR、器質性 MR では中等度以上の三尖弁閉鎖不全症の合併頻度が高かった。全例で標的部位へのクリップの留置に成功し、急性期手

技成功は100%であった。大半の症例 (82.7%) で1クリップのみを使用し、他症例では2クリップを留置した。手技に関連する合併症は認めなかった。

退院時において全ての患者で、MR グレードが中等度以下に低減された。また30日時点においても、22症例 (95.7%) で MR グレードが中等度以下に維持されていたが、器質性 MR に対して治療を行った1例において MR グレードの再増悪を認めた。NYHA クラスの改善は、30日の時点で22例 (95.7%) の患者で観察された。

【考察】 当院における MitraClip を用いた経皮的僧帽弁接合不全修復術は、中等度から重度または重度の MR を有する患者において、MR の重症度と症状を改善し、また重大な合併症は認めなかった。これら当院での短期成績は以前の報告と同等であった。

また心室性機能性 MR に関する先行研究の患者群に比べ、本研究の対象患者は心不全症状が重症で、周術期リスクが高く、慢性腎臓病の合併も多かったが、一方で心筋保護薬4剤の導入率は先行研究と比べて高かった。MitraClip の有効性については、相反する結果を示した2つの大規模臨床試験 COAPT 試験と MITRA-FR 試験がある。有効性を示した前者は後者に比べ、より左室容積が小さくかつ、より重症な MR を有する患者を対象としており、我々のコホートにおける左室拡張末期容積と僧帽弁有効逆流弁口面積の関係と同様であった。また、心房性機能性 MR や器質性 MR に対する MitraClip の有効性については十分確立されていないが、短期成績は良好であった。

#### (論文審査の結果の要旨)

僧帽弁閉鎖不全症 (MR; Mitral Regurgitation) は、心不全の20%程度に合併し、予後不良因子として知られる。MR は手術リスクや年齢のため、侵襲的な治療介入が見送られることが多い。MitraClip を用いた経皮的僧帽弁接合不全修復術は、MR を経皮的に制御するカテーテル治療であり2017年に我が国で承認され



た。本研究は、当院で MitraClip を導入した初年度における治療の効果と安全性を後ろ向きに評価し、過去の大規模臨床研究と比較する事を目的として実施された。

信州大学医学部附属病院において、2021年10月から2022年9月までに中等度から重症、または重症 MR に対し MitraClip を用いた経皮的僧帽弁接合不全修復術を施行した患者23名の連続症例を対象とした。MR 機序の内訳は、心室性機能性 MR が14例 (60.9%)、心房性機能性 MR が4例 (17.4%)、器質性 MR が5例 (21.7%) であった。治療は全身麻酔、経食道心エコーガイド、右大腿静脈アプローチで行った。主要アウトカムは、術後30日時点での MR の中等度 (グレード2) 以下への低減と、NYHA クラスの改善とした。安全性の主要アウトカムは周術期合併症 (出血、血管損傷、脳卒中、デバイス塞栓症、心タンポナーデ、開心術への移行) の有無とした。

その結果、以下の結論を得た。

1. 30日時点において、22症例 (95.7%) で MR グレードが有意に改善し、中等度以下に維持されていた。
2. 30日時点において、22症例 (95.7%) において NYHA クラスは有意に改善を認めた。
3. 問題となる合併症を認めなかった。

本研究の臨床的意義は、当院における MitraClip (経皮的僧帽弁接合不全修復術) の導入初年度において、治療成績、有効性と安全性を確認し、対象となる患者の特徴を報告した事にある。また、先行する大規模臨床試験の結果の考察から、左室容積の僧帽弁有効逆流弁口面積の観点において、本治療が有効である可能性の高い患者群であったことも確認された。本論文は MR に対する新しい治療法である MitraClip のリアルワールドデータとして有意義である。

よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Risk factors for post-encephalopathic epilepsy in patients with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion (二相性発作と遅発性拡散能低下を呈する急性脳症患者における脳症後てんかんの危険因子)

### 西岡 誠

#### (論文の内容の要旨)

【背景】二相性発作と遅発性拡散能低下を呈する急性脳症 (acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion; AESD) は、二相性発作と意識障害を特徴とする急性脳症であり、感染症が引き金となって発症する。AESD は日本人の小児に最も多くみられる急性脳症症候群であり、AESD を発症した患者のうち、1% が死亡し、70% が麻痺、認知障害、神経発達障害、脳症後てんかん (post-encephalopathic epilepsy; PEE) などの神経学的後遺症を発症する。AESD 患者では、急性脳症患者全体よりも PEE の頻度が高く、AESD に関連した PEE の発生率は23~45% と報告されている。先行研究では、AESD の急性期における臨床的特徴を用いた AESD 関連 PEE の危険因子分析が行われているが、検査所見を用いた解析の報告はない。本研究では、AESD 急性期の臨床検査所見を用いて、AESD 関連 PEE の危険因子を検討した。

【対象と方法】対象は、2012年6月26日から2022年8月19日までに長野県立こども病院で AESD の集中治療を受けた16歳未満の小児で、AESD 発症後1年以

上の追跡期間がある小児を週及的に本研究に登録した。患者は、AESD の標準的な基準に基づいて小児神経科医により診断された。AESD 発症前にてんかんを発症していた患者や神経発達症の既往のある患者は除外した。AESD 関連 PEE の診断は、以下の基準に基づいて確定した：1) AESD 発症後3年以内に発症したてんかん、2) 急性期病変部に近接したてんかん発作部位の証明、または急性期病変部と同じ半球から発症した焦点性てんかん発作。AESD 関連 PEE 以外の既知のてんかん症候群の診断基準を満たす患者は除外した。

20名の AESD 患者を対象とし、PEE の有無に基づいて2群 (PEE 群：6名、非 PEE 群：14名) に分け、第1発作期および第2発作期の臨床検査所見 (電位水素 (pH)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、C反応性蛋白 (CRP)、アンモニア、クレアチニン、血糖 (BS)、白血球数) について群間比較した。統計学的比較は、Mann-Whitney U 検定、Fisher の正確確率検定を用いて検定を行った。

【結果】 AESD 関連 PEE の発症率は30 %で、AESD 発症から PEE 発症までの期間中央値は2.5か月（範囲 1～32）であった。最も多かった発作の種類は、焦点発作、てんかん性スパズム、驚愕発作であり、6例中4例（66.7 %）が難治性てんかんであった。AESD の第1発作期と第2発作期の ALT と第2発作期の AST は、PEE 群が非 PEE 群より有意に高値を示した（ $p < 0.01$ ）。

【考察】 本研究において、AESD 関連 PEE の臨床的特徴は、先行研究の知見と一致していた。一方、臨床検査所見の結果から、血清 ALT および AST 値の上昇が AESD 関連 PEE 発症の予測マーカーとなる可能性が示された。ALT と AST の血清値上昇の病態生理は不明であるが、ALT と AST の血清値上昇は AESD 発症の危険因子とみなされており、有熱時発作を有する小児の AESD 発症予測のスコアリングシステムに組み込まれている。スコアリングを提唱している先行研究によれば、ALT と AST の上昇は呼吸不全と循環不全による肝障害と腎障害を示唆すると推測されている。また、AESD 急性期における血清および髄液中のインターロイキン（IL）-6、IL-10、腫瘍壊死因子などの炎症性サイトカインの上昇を示した報告や、中枢神経系での IL-6 の高濃度が興奮毒性神経細胞死につながる可能性を示した報告がある。これら既報の知見を総合すると、呼吸不全や循環不全、あるいはサイトカインプロファイルの不均衡に起因する多臓器機能障害が、興奮毒性を増悪させ、AESD の発症と ALT および AST の上昇をもたらす可能性が示された。さらに、ALT と AST の血清中濃度の上昇に代表される多臓器機能障害は、より重篤な脳障害を引き起こし、その結果、本研究で示されたように、AESD に関連した PEE の発症率が高くなる可能性があると考えた。

【結論】 本研究は、AESD 関連 PEE の危険因子として、AESD 発症時の血清 ALT および AST の高値を報告した初めての研究である。

（論文審査の結果の要旨）

二相性発作と遅発性拡散能低下を呈する急性脳症（acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion; AESD）は、二相性発作と意識障害を特徴とする急性脳症であり、感染症が引き金となって発症する。AESD は日本人の小児に最も多くみられる急性脳症症候群であり、AESD を発症した患者のうち、1 %が死亡し、70 %が麻痺、認知障害、神経発達障害、脳症後てんかん（post-encephalopathic

epilepsy; PEE）などの神経学的後遺症を発症する。AESD 患者では、急性脳症患者全体よりも PEE の頻度が高く、AESD に関連した PEE の発生率は23～45 %と報告されている。先行研究では、AESD の急性期における臨床的特徴を用いた AESD 関連 PEE の危険因子分析が行われているが、検査所見を用いた解析の報告はない。本研究では、AESD 急性期の臨床検査所見を用いて、AESD 関連 PEE の発症リスク因子の特定を目的とした。2012年6月26日から2022年8月19日までに長野県立こども病院で AESD の集中治療を受けた16歳未満の小児で、AESD 発症後1年以上の追跡期間のある小児を適時的に本研究に登録した。AESD 発症前にてんかんを発症していた患者や神経発達症の既往のある患者は除外した。20名の AESD 患者を対象とし、PEE の有無に基づいて2群（PEE 群：6名、非 PEE 群：14名）に分け、第1発作期および第2発作期の臨床検査所見）について群間比較した。統計学的比較は、Mann-Whitney U 検定、Fisher の正確確率検定を用いて検定を行った。

その結果、西岡は次の結論を得た。

1. AESD 関連 PEE の発症率は30 %で、AESD 発症から PEE 発症までの期間中央値は2.5か月（範囲 1～32）であった。
2. AESD 関連 PEE の発作の種類は、焦点発作、てんかん性スパズム、驚愕発作であり、6例中4例（66.7 %）が難治性てんかんであった。
3. AESD の第1発作期と第2発作期の ALT と第2発作期の AST は、PEE 群が非 PEE 群より有意に高値を示した（ $p < 0.01$ ）。

本研究の結果より、急性期の血清 ALT および AST 値の上昇が AESD 関連 PEE 発症の予測マーカーとなることが示唆された。ALT と AST の血清値上昇の病態は不明である。既報の知見を総合すると、呼吸不全や循環不全、あるいはサイトカインプロファイルの不均衡に起因する多臓器機能障害が、興奮毒性を増悪させ、AESD の発症と ALT および AST の上昇をもたらす可能性が示された。これらの知見は、AESD 患者の慢性期の管理に寄与すると同時に今後の急性期治療の基礎となる可能性があると考えられた。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。

Mechanism of sac expansion without evident endoleak analyzed with X-ray phase-contrast tomography (位相差X線CT法によるステントグラフト留置後瘤径拡大の病因解明)

山本高照

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】ステントグラフト内挿術は大動脈瘤に対する低侵襲な治療法として近年急速に普及していたが、遠隔期に瘤径が拡大する症例が散見されるためその病因解明と対策が急務である。瘤径拡大の要因としてはエンドリークの残存が最も重要であるが、一方でエンドリークがないにも関わらず瘤径拡大する症例もあり、ステントグラフト内挿術後に瘤径拡大する機序は未だ不明である。Spring-8における大型加速器(サイクロトロン)で得られる放射光を利用した位相差X線CT法によって大動脈瘤壁の組織構造変化や密度解析が可能である。ステントグラフト内挿術後に瘤径拡大した大動脈瘤壁を位相差X線CTにて密度解析や分子構造解析を行い、病理組織学的解析と符合させることでエンドリークがなくてもステントグラフト後に瘤径拡大を来す病因を解析する。

【方法と結果】3群のヒト腹部大動脈壁を採取した。Group-Nは剖検症例から採取した正常腹部大動脈壁5検体、Group-Aは腹部大動脈真性瘤に対する腹部人工血管置換術を施行した際に採取した7検体、Group-Eはステントグラフト内挿術後に明らかなエンドリークがないにも関わらず瘤径拡大を来した大動脈瘤に対して開腹追加治療術を施行した際に採取した7検体。それぞれ位相差X線CTを用いて外膜、中膜、内膜の密度測定を行った後、HE染色、EVG染色、CD31, vascular endothelial growth factor (VEGF)にて染色した。

中膜の厚さにおいてGroup-Nが $0.98 \pm 0.03$  mm, Group-Aが $0.31 \pm 0.01$  mm, Group-Eが $0.15 \pm 0.03$  mmと有意な差があった( $p < 0.005$ )。中膜の密度もGroup-Nが $1.087 \pm 0.004$  g/cm<sup>3</sup>, Group-Aが $1.070 \pm 0.001$  g/cm<sup>3</sup>, Group-Eが $1.062 \pm 0.007$  g/cm<sup>3</sup>と有意な差があった( $p < 0.005$ )。中膜の菲薄化と密度は弾性線維の厚さと一致していた。Group-Nでは弾性線維は均一で密度も高かった。Group-Aでは中膜の弾性線維は菲薄化しており、特にGroup-Eでは弾性線維の著明に菲薄化していた。CD31染色を行うとGroup-Nでvasa vasorumは外膜と中膜の外側1/3に分布していたが、Group-Eではvasa vasorumはVEGF陽性細胞

とともに内膜へ進展していた。

【まとめと考察】位相差X線CTを用いて大動脈壁の密度解析を行うと、ステントグラフト内挿術後に明らかなエンドリークがなくても瘤径拡大を来した大動脈瘤壁は中膜の弾性線維が著明に減少し菲薄化していた。CD31, VEGF染色にて確認すると外膜1/3分布しているvasa vasorumが中膜内膜側にまで進展しているため、ステントグラフト内挿術により中膜の虚血が引き起こされていると考えられた。ステントグラフト内挿術による中膜の虚血によって大動脈瘤壁が脆弱化し大動脈瘤径拡大の原因になっていると示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

ステントグラフト内挿術は大動脈瘤に対する低侵襲な治療法として普及したが、遠隔期にエンドリークがないにも関わらず瘤径拡大する症例もあり、ステントグラフト内挿術後に瘤径拡大する機序は未だ不明である。ステントグラフト内挿術後に瘤径拡大した大動脈瘤壁を位相差X線CTにて密度解析や分子構造解析を行い、病理組織学的解析と符合させることでエンドリークがなくてもステントグラフト後に瘤径拡大を来す病因を検討した。

腹部正常大動脈5検体(Group-N)、腹部大動脈真性瘤7検体(Group-A)、ステントグラフト内挿術後に瘤径拡大した大動脈瘤7検体(Group-E)を位相差X線CTでの密度解析および病理組織学的解析を行った。

その結果、以下の結果を得た。

1. 中膜の厚さにおいてGroup-Nが $0.98 \pm 0.03$  mm, Group-Aが $0.31 \pm 0.01$  mm, Group-Eが $0.15 \pm 0.03$  mmと有意な差があった( $p < 0.005$ )。
2. 中膜の密度においてGroup-Nが $1.087 \pm 0.004$  g/cm<sup>3</sup>, Group-Aが $1.070 \pm 0.001$  g/cm<sup>3</sup>, Group-Eが $1.062 \pm 0.007$  g/cm<sup>3</sup>と有意な差があった( $p < 0.005$ )。
3. 中膜の菲薄化と密度は弾性線維の厚さと一致していた。
4. Group-Aでは中膜の弾性線維は菲薄化しており、特にGroup-Eでは弾性線維の著明に菲薄化していた。CD31染色を行うとGroup-Nでvasa vasorumは外膜と中膜の外側1/3に分布していたが、Group-E

では vasa vasorum は VEGF 陽性細胞とともに内膜側へ進展していた。

以上より、ステントグラフト内挿術後に明らかなエンドリークがなくても瘤径拡大を来した大動脈瘤壁は中膜が菲薄化し弾性線維が著明に減少しており、中膜の密度低下と一致していた。ステントグラフト内挿術後の大動脈瘤径壁では CD31, VEGF 染色にて vasa

vasorum が中膜内膜側にまで進展しているため、ステントグラフト内挿術により中膜の虚血が引き起こされていると考えられた。ステントグラフト内挿術による中膜の虚血によって大動脈瘤壁が脆弱化し大動脈瘤径拡大の原因になっている事が示唆された。したがって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Eribulin promotes proliferation of CD8<sup>+</sup>T cells and potentiates T cell-mediated anti-tumor activity against triple-negative breast cancer cells (エリブリンは CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖を促進し、トリプルネガティブ乳癌細胞に対する T 細胞介在性の抗腫瘍活性を増強する)

清水 忠 史

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) に対して、免疫チェックポイント阻害剤 (ICIs) の使用が可能となり、臨床では ICIs は化学療法剤と併用して用いられている。これは化学療法剤による腫瘍細胞の免疫原性細胞死により腫瘍抗原が放出されることで、腫瘍内の抗腫瘍免疫が高められる、という考えに基づいている。一方、化学療法剤が宿主の免疫細胞への直接的な作用を有している可能性も考えられるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで、本研究では、進行再発乳癌に対して用いられている微小管阻害剤であるエリブリンとパクリタキセルが免疫細胞に及ぼす作用を解析することを目的とした。

【方法】健常者、および TNBC 患者の末梢血単核球 (PBMCs) とマウスの脾臓から得られた免疫細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を用いて *in vitro* で刺激し、細胞増殖と T 細胞の分化に対するエリブリンとパクリタキセルの効果をそれぞれ WST 法、およびフローサイトメトリーで解析した。また、エリブリンとパクリタキセル処理後の CD8<sup>+</sup>T 細胞の遺伝子発現の変化を解析するために、RNA シークエンスを行った。さらに、エリブリンまたはパクリタキセルを添加した際の CD3/CD28 刺激 T 細胞の TNBC 細胞株 (MDA-MB-231, Hs578T, MDA-MB-157) に対する *in vitro* での抗腫瘍効果を WST 法で解析した。

【結果】エリブリンは CD3/CD28 刺激時の T 細胞中の CD4/CD8 比を有意 ( $p < 0.05$ ) に減少させ、CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖を有意 ( $p < 0.05$ ) に促進したが、パクリタキセルは CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖に影響を与えなかった。また、パクリタキセルは CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化に影響を与えなかったが、エリブリンは分化度の低いサブセッ

トである CD45RA<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, TCF1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>T 細胞の頻度を有意 ( $p < 0.05$ ) に増加させた。これらの効果はマウスの免疫細胞でも観察された。さらに、RNA シークエンスにより、エリブリンによる健常者由来の CD8<sup>+</sup>T 細胞の細胞増殖 (E2F ターゲット, G2M チェックポイント, MYC ターゲット v1, v2) と免疫応答 (IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  応答シグナル) に関連する遺伝子発現の上昇が確認された。さらに、パクリタキセルは TNBC 細胞に対する CD3/CD28 刺激 T 細胞の抗腫瘍効果に影響を与えなかったが、エリブリンは CD3/CD28 刺激 T 細胞の抗腫瘍効果を有意 ( $p < 0.05$ ) に増強した。

【結論】エリブリンは CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖を促進し、エフェクター T 細胞への分化を抑制する。さらに細胞を介した抗腫瘍効果を増強することが示唆された。これらの作用を通じて、エリブリンは担癌宿主の免疫状態を改善している可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) に対して、免疫チェックポイント阻害剤 (ICIs) の使用が可能となり、臨床では ICIs は化学療法剤と併用して用いられている。これは化学療法剤による腫瘍細胞の免疫原性細胞死により腫瘍抗原が放出されることで、腫瘍内の抗腫瘍免疫が高められる、という考えに基づいている。一方、化学療法剤が宿主の免疫細胞への直接的な作用を有している可能性も考えられるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで、本研究では、進行再発乳癌に対して用いられている微小管阻害剤であるエリブリンとパクリタキセルが免疫細胞に及ぼす作用を解析することを目的とした。

健常者、および TNBC 患者の末梢血単核球 (PBMCs)

とマウスの脾臓から得られた免疫細胞を抗 CD3抗体と抗 CD28抗体を用いて *in vitro* で刺激し、細胞増殖と T細胞の分化に対するエリブリンとパクリタキセルの効果をそれぞれ WST 法、およびフローサイトメトリーで解析した。また、エリブリンとパクリタキセル処理後の CD8<sup>+</sup> T細胞の遺伝子発現の変化を解析するために、RNA シークエンスを行った。さらに、エリブリンまたはパクリタキセルを添加した際の CD3/CD28刺激 T細胞の TNBC 細胞株 (MDA-MB-231, Hs578T, MDA-MB-157) に対する *in vitro* での抗腫瘍効果を WST 法で解析した。

その結果、次の結論を得た。

1. エリブリンは CD3/CD28刺激時の T細胞中の CD4/CD8比を有意 ( $p < 0.05$ ) に減少させ、CD8<sup>+</sup> T細胞の増殖を有意に ( $p < 0.05$ ) 促進したが、パクリタキセルは CD8<sup>+</sup> T細胞の増殖に影響を与えなかった。
2. パクリタキセルは CD8<sup>+</sup> T細胞の分化に影響を与えなかったが、エリブリンは分化度の低いサブセットである CD45RA<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, TCF1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞

の頻度を有意 ( $p < 0.05$ ) に増加させた。これらの効果はマウスの免疫細胞でも観察された。

3. RNA シークエンスにより、エリブリンによる健康由来の CD8<sup>+</sup> T細胞の細胞増殖 (E2F ターゲット, G2M チェックポイント, MYC ターゲット v1, v2) と免疫応答 (IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  応答シグナル) に関連する遺伝子発現の上昇が確認された。
4. パクリタキセルは TNBC 細胞に対する CD3/CD28 刺激 T細胞の抗腫瘍効果に影響を与えなかったが、エリブリンは CD3/CD28刺激 T細胞の抗腫瘍効果を有意 ( $p < 0.05$ ) に増強した。

これらの結果から、エリブリンは CD8<sup>+</sup> T細胞の増殖を促進し、エフェクター T細胞への分化を抑制し、さらに細胞を介した抗腫瘍効果を増強することが示唆された。これらの作用を通じて、エリブリンは担癌宿主の免疫状態を改善している可能性がある。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値のあるものと認めた。

## Three-Dimensional Modeling with Osteoblast-Like Cells under External Magnetic Field Conditions Using Magnetic Nano-Ferrite Particles for the Development of Cell-Derived Artificial Bone (細胞由来人工骨開発に向けた外部磁界条件下の磁性ナノフェライト粒子による骨芽様細胞の 3次元モデリング)

### Ma Chuang

#### (論文の内容の要旨)

【背景・目的】現在、高齢者の増加に伴い、骨折や骨関連疾患が増加しており、その治療が社会的に大きな負担となっている。そのため、治療には人工骨研究の進歩が不可欠である。しかし、人工骨には生体適合性や構造の複雑性などの点で課題が残り、生体適合性の高い人工骨の開発が求められている。このような課題を解決する有望な手段として、ナノ材料である超常磁性のナノフェライト粒子 (NFPs) の導入が期待されている。NFPs を細胞内に取り込ませ、磁界を用いて細胞の位置を誘導することで、細胞に直接接触せず、設計した磁界形状に細胞位置誘導を行い、特定の形状を持つ細胞由来人工骨をカスタマイズできる新たな可能性が生まれる。

そこで、NFPs を取り込んだ骨芽細胞を利用し、任意の形状で 3 次元的に構築し、石灰化を誘導することで、細胞由来人工骨 (CDAB) の開発に着手した。本研究では、マウス頭蓋骨由来の骨芽様細胞 (MC3T3-

E1) に対する NFPs の影響を調べ、NFPs の潜在的な作用を解明する。また、磁場を利用して NFPs を取り込んだ MC3T3-E1細胞の位置を 3 次元的に誘導し、細胞集合体の形状を制御することで、生体適合性の高い CDAB の開発を目指した。

【方法・結果】NFP は塩化鉄 (II) 四水和物と塩化鉄 (III) 六水和物を 2M 塩酸に完全に溶解し、その後水酸化ナトリウムで pH を弱酸性に調整して作製した。非ナノスケールのフェライト粒子は遠心分離で除去された後、高速遠心分離法を用いて NFPs を分離した。分離した NFPs を超純水中で分散させた後、フィルター滅菌を施した。滅菌された NFPs 溶液は濃度が 50 mg/mL になるように、ウシ胎児血清と超純水で作製した分散剤で調整し、*in vitro* 実験で使用した。NFPs は走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡 (TEM)、および粒子径・ゼータ電位・分子量測定装置を用いて評価され、粒径サイズが  $16.5 \pm 2.4$  nm であり、ゼータ電位が  $-9.9 \pm 1.6$  mV であった。

マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1細胞に異なる濃度のNFPsを曝露し、NFPsの細胞増殖率への影響を調べた。NFPs濃度が0.07および0.14 mg/mLの場合、細胞増殖率に有意な変化は見られなかった。NFPs濃度が0.28と0.57 mg/mLの場合はMC3T3-E1細胞の細胞増殖率に与える影響はごくわずかであることが示された。

MC3T3-E1細胞において細胞増殖率に影響を与えない0.14 mg/mLのNFPs濃度で曝露後、NFPsの細胞内取り込みを調べた。ライソソームと細胞核を蛍光染色した後、光学顕微鏡とTEMを用いて観察を行った。光学顕微鏡の観察結果では、NFPsの位置がライソソームの染色信号と一致した。TEMによる観察では、NFPsが細胞内に取り込まれたことを確認した。また、フローサイトメトリ (FCM) を用いて、各NFPs濃度に曝露した細胞内部の複雑度の変化を評価するために側方散乱光 (SSC) を測定した。FCMの測定結果から、NFPsの濃度が0.14 mg/mLまで増加するとSSC強度も増加し、濃度依存性の傾向が明らかになった。ただし、0.28と0.57 mg/mLのNFPs濃度では、SSC強度に有意な変化は見られなかった。

異なる濃度のNFPsに曝露したMC3T3-E1細胞を石灰化誘導しながら4、8および12週間培養した。各培養期間の後、アリザリンレッドS (ARS) 染色を行い、石灰化領域を観察した。その後、石灰化結節を5%のギ酸に溶解し、プレートリーダーで吸光度を測定した。ARS染色の観察結果では、NFPs曝露後培養期間の増加に伴い石灰化領域が増加したことが観察された。また、吸光度の測定結果では、4週目の測定結果でNFPsに曝露されたすべての群が対照群と比較して有意に低下した。8および12週目の測定結果では、NFPs曝露群の吸光度が増加し、12週間の測定結果では、0.07-0.28 mg/mLのNFPs曝露群では対照群と比較して有意な低下は見られなかった。

5 kOeの面内外磁界が印加された後、各濃度のNFPsに曝露したMC3T3-E1細胞の移動速度を測定した。磁界が印加された後、0.14 mg/mLのNFPsに曝露された群では、磁界印加方向に1.5  $\mu\text{m/s}$ の細胞移動速度が観察され、各曝露群中で最大の移動速度となった。

磁界による細胞の3次元造形の可能性を調べるために、培養チャンバー底面に対して垂直の外部磁界を印加しながらNFPsに曝露した細胞を培養チャンバーで7日間培養した。7日間培養後、生細胞の細胞質と

細胞核を蛍光染色し、z軸方向に連続凍結切片を作製し、観察を行った。観察結果から、細胞の細胞質と細胞核が共に染色され、造形物内の細胞が正常であることを示した。さらに、NFPsを取り込んだ細胞が磁界に沿ってz軸方向のパターンで配置され、3次元的に造形されたことが観察された。

**【結論】** 磁界によってNFPsを取り込んだ細胞が3次元モデリング可能であることが示唆され、骨組織工学におけるNFPsの応用の可能性が示唆された。NFPsと細胞との相互作用を探求することは、骨組織工学や人工骨開発におけるNFPsの応用の可能性を明らかにするだけでなく、バイオメディカル分野におけるナノ材料の利用について新たな視点を提供することができる。濃度依存的な効果を包括的に理解することで、NFPsの適用条件を細かく最適化することができ、バイオメディカル分野におけるCDABの作製において、その可能性を最大限に引き出すことができる。

#### (論文審査の結果の要旨)

高齢者の骨折治療の負担軽減を目指し、超常磁性のナノフェライト粒子 (NFPs) を使用した細胞由来人工骨 (CDAB) の開発を行った。そのために本研究では、マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞 (MC3T3-E1) を用いて、NFPsの影響を検証した。具体的には、外部磁界の印加により、NFPsを取り込んだMC3T3-E1細胞の位置を3次元的に誘導し、生体適合性の高いCDABの開発を目指した。

NFPsは塩化鉄(II)四水和物と塩化鉄(III)六水和物を塩酸に溶解し、その後、水酸化ナトリウムでpHを弱酸性に調整して作製した。MC3T3-E1細胞に異なる濃度のNFPsを曝露し、細胞増殖率、NFPsの細胞内取り込み、石灰化の評価を行った。また、外部磁界印加後のNFPs曝露細胞の移動速度を測定した。さらに、培養チャンバーで培養したNFPs曝露細胞について蛍光染色を行った後z軸方向に作製した連続凍結切片の観察を行った。

その結果、Ma Chuangは次の結論を得た。

1. 作製したNFPsの粒径サイズは約16.5 nmであり、超常磁性を有する粒径サイズであった。NFPsのゼータ電位は約-9.9 mVであり、粒子間で電気的に凝集体を作らない特性であった。
2. NFPs濃度が0.07および0.14 mg/mLの場合、細胞増殖率に有意な変化は見られなかった。
3. 蛍光染色観察像では、NFPsの位置がライソソームの染色信号と一致した。

4. 電子顕微鏡観察像では、NFPs が細胞内に取り込まれたことを確認した。
5. フローサイトメトリの測定結果から、NFPs の取り込み量が濃度に依存する傾向を示した。
6. アリザリンレッド S 染色の観察結果では、NFPs 曝露後の培養期間の増加に伴い石灰化領域が増加した。また、吸光度の測定結果では、4 週目の測定結果で NFPs 曝露群が対象群と比較して有意に低下したが、12 週目の測定結果で 0.07-0.28 mg/mL の NFPs 曝露群と対照群間で有意な低下は見られなかった。
7. 磁界が印加された後、0.14 mg/mL の NFPs 曝露群の移動速度が最大となった。

8. 細胞の細胞質と細胞核が共に染色され、造形物内の細胞が正常であることを確認した。さらに、NFPs を取り込んだ細胞が磁界に沿って誘導され、3 次元的に造形された。

これらの結果は、NFPs が細胞増殖、細胞内の取り込み、石灰化に影響を与えるが、骨芽細胞における NFPs 応用の可能性を示唆する結果となった。さらに、磁界によって NFPs を取り込んだ細胞が 3 次元モデリング可能であることを確認でき、骨組織工学で NFPs 応用の可能性を後押しする結果となった。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。

Ligand-based, piggyBac-engineered CAR-T cells targeting EGFR are safe and effective against non-small cell lung cancers (piggyBac 法で作製した EGFR を標的とするリガンド型 CAR-T 細胞は、安全で、非小細胞肺癌に対して有効である)

### CHINSUWAN Thanyavi

(論文の内容の要旨)

**【Background】** Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in various cancers, including non-small cell lung cancer (NSCLC), rendering it an attractive antitumor target. Chimeric antigen receptor (CAR) T cells are engineered T cells that have been used clinically to successfully treat some hematologic malignancies; those successes have not been replicated in solid malignancies. CAR-T cells engineered with piggyBac transposon system have been shown to exhibit excellent memory phenotype, a characteristic that may allow the cells to persist and eradicate solid tumors effectively.

**【Methods】** CAR-T cells specific to EGFR were constructed from natural ligands of EGFR, connected to IgG1 hinge, CD28 costimulatory domain, and CD3 $\zeta$  signalling domain, respectively. These CAR transgenes were transfected into peripheral blood mononuclear cells using piggyBac transposon system and expanded for 13-14 days. The resultant CAR-T cells were checked for CAR expression, memory phenotype, and inhibitory phenotype. Then, the CAR-T cells were tested against NSCLC cell lines *in vitro* and *in vivo*. With their efficacy confirmed, we tested their safety in non-human primate models. Finally, we compared

our candidate CAR-T with a more conventional design based on a single-chain variable fragment, cetuximab (Cetux).

**【Results】** CAR candidates based on epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor (TGF)- $\alpha$  expressed their respective CAR molecules (CAR positivity 51.3%  $\pm$  14.1% and 52.9%  $\pm$  17.0% respectively,  $n=4$ ) and expanded favorably. Another candidate based on amphiregulin failed to express CAR and expand. Both EGF-CAR and TGF $\alpha$ -CAR were > 98% CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> when gated for CAR<sup>+</sup> subpopulation, implying they were either naïve (T<sub>N</sub>) or stem cell-like memory (T<sub>SCM</sub>) T cells. Both CARs exhibited significant and specific cytotoxicity against NSCLC of all three major subtypes *in vitro*, although cytokine assay showed EGF-CAR to be more potent than TGF $\alpha$ -CAR. In a xenograft mouse model using H1975-Luc, an NSCLC of adenocarcinoma subtype, EGF-CAR conferred significant survival benefit without overt toxicity to the mice compared to TGF $\alpha$ -CAR and CD19-CAR. When administered to lymphodepleted cynomolgus macaques, EGF-CAR and TGF $\alpha$ -CAR did not expand nor persist, demonstrating that they do not react to physiologic level of EGFR. Finally, Cetux-CAR showed better tumor suppression than

EGF-CAR in the H1975 xenograft model.

**【Conclusion】** Our results demonstrate the feasibility and safety of targeting EGFR-expressing NSCLCs using ligand-based, piggyBac-engineered CAR-T cells.

(論文審査の結果の要旨)

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a receptor tyrosine kinase that is overexpressed by various cancers of epithelial origin, including non-small cell lung cancer (NSCLC). Chimeric antigen receptor (CAR) is a synthetic receptor consisting of an antigen binding motif and a spacer on the extracellular side connected to a T cell costimulatory domain (canonically either CD28 or 4-1BB) and a T cell activating motif, CD3 $\zeta$ , on the intracellular side. CAR can be transfected into primary T cells in order to redirect them against tumor-associated antigens. piggyBac is a non-viral method of introducing transgene(s) into target cells via transposition mechanism.

In this study, we designed and tested three anti-EGFR CAR candidates, using natural ligands of EGFR (EGF, transforming growth factor [TGF]- $\alpha$ , and amphiregulin [AR]) as the antigen binding motifs connected to the CD28 costimulatory domain. CAR transgenes were transfected into primary T cells using piggyBac system and expanded using artificial autologous antigen presenting cells. The CAR-T cells were tested *in vitro* and *in vivo* in xenograft NSCLC mouse models and in non-tumor-bearing, lymphodepleted cynomolgus macaques.

As a result, CHINSUWAN Thanyavi obtained the following results:

1. EGF-CAR and TGF $\alpha$ -CAR could be expanded but not AR-CAR.
2. Artificial autologous antigen presenting cells were effective at selectively expanding CAR<sup>+</sup> cells.
3. Over 98 percent of CAR<sup>+</sup> cells were either T<sub>N</sub> or T<sub>SCM</sub>.
4. EGF-CAR demonstrated stronger antitumor potency than TGF $\alpha$ -CAR *in vitro*.
5. EGF-CAR had better potency in sequential coculture than Cetuximab-CAR, an scFv-based construct.
6. EGF-CAR showed survival benefits against NSCLC compared to TGF $\alpha$ -CAR and CD19-CAR *in vivo*.
7. Cetuximab-CAR paradoxically showed stronger tumor suppression than EGF-CAR *in vivo*.
8. EGF-CAR and TGF $\alpha$ -CAR did not elicit overt toxicity in mice despite cross-reactivity to murine EGFR.
9. EGF-CAR and TGF $\alpha$ -CAR did not elicit overt toxicity nor expand in cynomolgus macaque.

In sum, EGF-CAR and TGF $\alpha$ -CAR were safe and effective in xenograft mice with NSCLC that is resistant to both tyrosine kinase inhibitors and anti-EGFR monoclonal antibodies. In addition, they also appeared safe in non-tumour-bearing cynomolgus macaques.

Therefore, the chief examiner and the sub-chief examiners accepted the value of this paper as the thesis for a degree unanimously.

Symptom-based portopulmonary hypertension screening questionnaire in Japanese patients with chronic liver disease (日本人慢性肝疾患患者における症状ベースの門脈圧亢進症性肺高血圧症のスクリーニング)

若 林 俊 一

(論文の内容の要旨)

**【背景と目的】** 門脈圧亢進症性肺高血圧症 (PoPH) は肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の一病型とされ慢性肝疾患患者に合併することが報告されている。PoPHはPAHの5-15%を占めると報告される一方で、門脈圧亢進症患者の2-6%、肝硬変患者の1-2%に合併すると報告されており、その有病率や実態は未だ不明である。本研究では慢性肝疾患患者にPAH症状の質問

表を用いたスクリーニング検査を行い、慢性肝疾患患者におけるPoPHの有病率とその特徴を明らかにすることを目的とした。

**【方法】** 2020年11月から2021年10月までに当院を受診した慢性肝疾患患者1,111名を対象にPAH症状8項目からなる質問表を配布した。一つでも症状がある患者を対象にUCGを行いPHリスクを評価した。PHリスクがIntermediateまたはHigh riskと診断された患者



は循環器内科医に紹介し、右心カテーテル検査 (RHC) を行うことで PoPH の最終診断を行った。

結果：年齢中央値は67歳 (男性 57 %) であった。背景肝疾患はC型慢性肝炎を背景とすることがもっとも多く320例 (28.8 %) であった。肝硬変は167例 (15.0 %) に認められ、食道胃静脈瘤と肝細胞癌はそれぞれ145例 (13 %) に認めた。PH 症状を一つ以上呈した症例は588例 (52.9 %) であった。最も多い症状は「同じ年齢・性別の人と同様のペースで動けない」であり325例 (29.3 %) で認められた。有症状者には女性が多く、HCV、肝硬変、肝細胞癌、食道胃静脈瘤の合併率が高く認められた ( $P < 0.05$ )。肝硬変患者では115例 (68.9 %) で PH 症状を呈し、非肝硬変患者と比較して息切れの症状が有意に多く認められた ( $P < 0.01$ )。UCG 検査は同意が得られた267例で施行された。267例のうち12例 (4.5 %) が Intermediate リスク、10例が High リスクと診断された。Intermediate リスク以上の患者では肝細胞癌や食道胃静脈瘤の合併率や BUN, LDH が有意に高かった一方で白血球やヘモグロビン、血小板が有意に低かった。Model of end stage liver disease (MELD) や albumin-bilirubin (ALBI) score には有意差はなく、Intermediate リスク以上の患者に特異的な症状は認められなかった。Intermediate リスク以上の患者のうちさらなる精査にすすめたのは12例であり、そのうち3例 (UCG 施行例の1.1 %) が PoPH と診断された。1例はC型肝硬変を背景としていたが、他2例は原発性胆汁性胆管炎 (PBC) の非肝硬変期であった。非肝硬変期の2例では脾腫と門脈大循環シャントを合併し、膠原病を合併していた。

【結論】本研究では PH 症状によるスクリーニングを行い慢性肝疾患患者における PH 有症状患者が半数以上であることを明らかにした。併せて PoPH が UCG 施行例の1.1 % という低率であることを明らかにした。PH では治療の遅れが予後悪化につながるとされている。PH 患者では20 % 程度で確定診断の2年以上前から症状が出現していたとの報告があり、早期発見のためにも低侵襲かつ簡便なスクリーニング方法が必要である。PH 症状は慢性肝疾患患者、とくに肝硬変患者においては一般的であるものの PH 症状の質問表は PH 疑い患者のスクリーニング方法の手がかりとなる可能性がある。また本研究においてはC型肝硬変と PBC 患者において PoPH が診断された。PBC では他の膠原病も合併することがあり、膠原病の存在が PAH

および PoPH のリスクとなる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

門脈圧亢進症性肺高血圧症 (PoPH) は肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の一病型とされ慢性肝疾患患者に合併することが報告されている。PoPH は PAH の 5-15 % を占めると報告される一方で、門脈圧亢進症患者の 2-6 %, 肝硬変患者の 1-2 % に合併すると報告されており、その有病率や実態は未だ不明である。本研究では慢性肝疾患患者に肺高血圧症 (PH) 症状の質問表を用いたスクリーニング検査を行い、慢性肝疾患患者における PoPH の有病率とその特徴を検討した。

2020年11月から2021年10月までに当院を受診した慢性肝疾患患者1,111名を対象に PH 症状8項目からなる質問表を配布した。一つでも症状がある患者を対象に心臓超音波検査 (UCG) を行い PH リスクを評価した。PH リスクが Intermediate または High risk と診断された患者は循環器内科医に紹介し、右心カテーテル検査 (RHC) を行うことで PoPH の最終診断を行った。

その結果、若林俊一は次のような結果を得た。

1. PH 症状を一つ以上呈した症例は588例 (52.9 %) であった。
2. 最も多い症状は「同じ年齢・性別の人と同様のペースで動けない」であり325例 (29.3 %) で認められた。
3. 有症状者には女性が多く、HCV、肝硬変、肝細胞癌、食道胃静脈瘤の合併率が高く認められた ( $P < 0.05$ )。
4. 肝硬変患者では115例 (68.9 %) で PH 症状を呈し、非肝硬変患者と比較して息切れの症状が有意に多く認められた ( $P < 0.01$ )。
5. UCG 施行例267例のうち12例 (4.5 %) が Intermediate リスク、10例が High リスクと診断された。
6. Intermediate リスク以上の患者では肝細胞癌や食道胃静脈瘤の合併率や BUN, LDH が有意に高かった一方で白血球やヘモグロビン、血小板が有意に低かった。Model of end stage liver disease (MELD) や albumin-bilirubin (ALBI) score には有意差はなく、Intermediate リスク以上の患者に特異的な症状は認められなかった。
7. Intermediate リスク以上の患者のうちさらなる精査にすすめたのは12例であり、そのうち3例 (UCG 施行例の1.1 %) が PoPH と診断された。1例はC型肝硬変を背景としていたが、他2例は原発性胆汁性胆管炎 (PBC) の非肝硬変期であった。

これらの結果により PH 症状によるスクリーニングを行い慢性肝疾患患者における PH 有症状患者が半数以上であることを明らかにした。併せて PoPH が UCG 施行例の 1.1 % という低率であることを明らかにした。PH 症状は慢性肝疾患患者、とくに肝硬変患者においては一般的であるものの PH 症状の質問表は PH 疑い患者

のスクリーニング方法の手がかりとなる可能性がある。また本研究においては C 型肝硬変と PBC 患者において PoPH が診断された。PBC では他の膠原病も合併することがあり、膠原病の存在が PAH および PoPH のリスクとなる可能性がある。よって主査・副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた

An optimal skeletal element for DNA testing : Evaluation of DNA quantity and quality from various bone types in routine forensic practice (DNA 鑑定のための最適な骨組織の部位の探索 : 法医実務において採取した、複数の種類の骨組織から抽出した DNA の質および量に基づいた検証)

小田切 智海

(論文の内容の要旨)

【背景】 DNA 型鑑定による個人識別では、硬組織（歯や骨）が分析試料となる場合が少なくない。その際、良好な分析結果を得るためには、断片化などの劣化の少ない十分量の鋳型 DNA が必要であり、より保存状態が良好で、且つ多くの DNA が残存している部位を試料として用いることが重要となる。現在、大腿骨などの長管骨や歯、側頭骨錐体部には多くの良質な DNA が残存していると考えられ、分析試料として一般的に用いられているが、このような試料はサイズ自体が大きく、加工に手間がかかり、コンタミネーションのリスクも高くなるといった問題がある。一方、近年、指（趾）骨などのような海綿骨の割合が大きい部位から質・量ともに良好な DNA が抽出できる可能性が報告され、前述した問題の対策にもなるため、分析試料としての期待が持たれる。しかしながら、同一個体における DNA 抽出量や保存性に関する試料間の比較検討を行った報告はほとんどなく、特に法医実務で扱うような古い試料や劣悪環境に置かれた試料に関する報告は存在しない。そこで、本研究では、法医実務で扱う様々な状態の白骨死体を対象として、大腿骨や歯などの従来から DNA 型鑑定の試料として推奨されてきた部位と、指（趾）骨を採取し、抽出された DNA の量や質などを比較検討し、指（趾）骨などの DNA 型鑑定における分析試料としての有用性を検証することを目的とした。なお、本研究は信州大学生命科学・医学系研究倫理委員会の承認のもと行った。

【試料・方法】 死後約数週間から数年経過し、白骨化した御遺体（10体）から採取した硬組織（中手骨、中足骨、基節骨 [手指および足趾]、大腿骨 [骨幹部・骨端部]、側頭骨錐体部、歯）を粉末にし、脱灰・消

化後、カラム精製し、DNA を抽出した。抽出した DNA を TaqMan 法により定量分析することで、抽出できた DNA 量と断片化の程度を算出し、同一個体における部位間での DNA 分析試料としての適性の比較を行った。また、死後経過時間・年齢と DNA 抽出量との関連性についても検討を加えた。さらに、STR (Short Tandem Repeat) 型を解析し、検出することができたアレルの数を基に、実際の個人識別に有用であるか否かの検討も行った。

【結果】 DNA 抽出量に関しては、発見時の環境（屋内、屋外など）にかかわらず、指（趾）骨は歯や大腿骨、側頭骨錐体部よりも多くの DNA が抽出される傾向が確認された。また、死後経過時間と DNA 抽出量の関係を解析したところ、指（趾）骨や歯、大腿骨のいずれの硬組織についても、死後経過時間が長期化しても DNA 抽出量が大きく減少することはなかった。さらに、検体の年齢と DNA 抽出量の関係を解析したところ、手指骨（基節骨 [手指]、中手骨、手根骨）と大腿骨骨端部、側頭骨錐体部では年齢による DNA 抽出量の違いはみられなかったが、趾骨（基節骨 [足趾]、中足骨、足根骨）や大腿骨骨端部では年齢が高いと DNA 抽出量が減少する傾向が認められた。劣化指数（DNA 断片化の程度）については、指（趾）骨は歯や大腿骨などと同等の保存状態であることが判明した。抽出した DNA について、STR 型解析を実施したところ、指（趾）骨から抽出した DNA は大腿骨などの従来推奨されてきた部位と同様に多くのマーカーでアレルを解析することができ、STR 型解析にも適した試料であることが確認できた。

【考察】 指（趾）骨などの海綿骨の割合が大きい部位から多くの DNA が抽出できる理由として、海綿骨の

骨梁間に残存する造血細胞や、海綿骨の骨基質に分布する骨芽細胞・破骨細胞が大腿骨などの皮質骨よりも多く存在していることが原因であると推定される。また、DNAの良好な保存性について、ヒトの常在菌が産生するバイオフィルムの存在が寄与している可能性も指摘されているが、特に海綿骨の割合が大きい指（趾）骨では、微生物の影響でDNAの保存性が向上していることも考えられる。

**【結論】** 本研究により、法医実務で行われるDNA型鑑定による個人識別において、指（趾）骨（中手骨、手根骨、中足骨、足根骨、基節骨）はこれまで一般的に用いられてきた部位（大腿骨などの長管骨、側頭骨錐体部、歯）と比較して、同等以上に有効であることが示唆された。DNA型分析によって白骨死体の個人識別を行う場合、採取が可能であるならば、指（趾）骨を分析試料として積極的に選択すべきであると考えられる。

（論文審査の結果の要旨）

DNA型鑑定による個人識別では、硬組織（歯や骨）が分析試料となる場合が少なくない。DNAの残存量は部位によって偏りがあることが知られていることから、十分な量のDNAを抽出するためには最適な部位を選択する必要がある。最適な部位として従来、大腿骨や側頭骨錐体部、歯などが望ましいとされてきたが、近年、指（趾）骨が注目されつつある。今回、法医実務試料からDNAを抽出する際の最適な部位として、指（趾）骨は適切であるか検討を行った。

死後数週間から数年経過し、白骨化した御遺体（10体）から採取した硬組織（中手骨、中足骨、基節骨 [手指および足趾]、大腿骨 [骨幹部・骨端部]、側頭骨錐体部、歯）からDNAを抽出後、抽出したDNAをTaqMan法により定量分析することで、抽出できたDNA量と断片化の程度を算出し、同一個体における部位間でのDNA分析試料としての適性を比較した。さらに、STR型を解析し、検出できたアレルの数を基に、実際の個人識別での有用性を検討した。

その結果、小田切智海は次の結果を得た。

1. DNA抽出量について、指（趾）骨は従来推奨されてきた大腿骨や歯などと比較して同等以上のDNAを抽出することができた。
2. DNAの質（断片化の程度）について、指（趾）骨は大腿骨や歯などと比較して同程度の良質な（断片化の少ない）DNAを抽出することができた。
3. STR型解析を実施したところ、指（趾）骨から抽出したDNAは多くのサンプルで、ほとんど全てのアレルを検出することができた。

これらの結果より、法医実務試料において、指（趾）骨から多くの良質な（断片化の少ない）DNAを抽出することができることが判明した。したがって、法医実務でDNAを用いた個人識別を行う際、分析試料として指（趾）骨は非常に適していることが示唆されている。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。

Deep-Learning-Based Analysis Reveals a Social Behavior Deficit in Mice Exposed Prenatally to Nicotine (深層学習を用いた解析による胎生期ニコチン暴露マウスモデルの社会行動の異常の発見)

QIU WEN

（論文の内容の要旨）

**【Background and Aims】** Recently, more attention has been paid to the hypothesis that exposure to nicotine during pregnancy is associated with an increased risk of fetal neurodevelopmental disorders, such as attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and autism spectrum disorder (ASD). Prenatal nicotine exposure (PNE) has been shown to cause behavioral changes in rodents, but the phenotype is variable between reports. The evaluation of animal behavior may be another reason for the inconsistency in these

results. The recently developed machine learning algorithms for analyzing animal behavior videos enable us to accurately recognize animal postures, and open-source toolkits such as DeepLabCut are widely available. These tools can label animal body parts with unlabeled videos and accurately estimate their poses using supervised machine learning techniques such as SimBA. One of the technical difficulties in using these tool kits for analysis is that human experimenters must provide accurate training data. Our experimental objective is 1. To examine which PNE

mice exhibit ADHD and ASD like behavior. 2. To develop deep learning based tools to analyze behavior in mouse models.

**【Materials & Methods】** A mouse model of prenatal exposure to nicotine was constructed by adding nicotine to drinking water. Afterwards, a cliff avoidance test CAR test was conducted to evaluate the impulsivity of mice. The Y maze tested its working memory ability. The outdoor experiment tested their level of anxiety. The adolescent interaction test assessed their social skills. We used DeepLabCut for tracking and labeling, and analyzed its simple posture using SimBA. Then, adult neurogenesis was analyzed through BrdU injection and histological analysis. Finally, manually analyze and determine the relevance of Deep Learning through comparison.

**【Results】** 1. There was no difference in weight and survival of postpartum mice exposed to nicotine before delivery. 2. Cliff Avoidance Response (CAR) tests have shown that exposure to nicotine in the later stages of embryonic development increases impulsivity in mice. 3. The Y-maze experiment showed that PNE mice had insufficient working memory. 4. In the open field experiment, the anxiety level of mice decreased 10 minutes after the open field experiment, while PNE mice preferred to stay at the edge of the outdoor arena. 5. In the adolescent interaction test, young mice did not affect the individual parameters of the test mice, and the results showed that prenatal nicotine exposure in mice affected their social ability. 6. As shown in the behavioral test of Deep Learning Analysis<sup>6</sup>, immunohistochemistry showed that PNE led to a decrease in adult hippocampal neurogenesis in the ventral hippocampus of mice.

**【Conclusion】** In this study, we analyzed the behavioral features of PNE mice using deep-learning-based algorithms such as DeepLabCut and SimBA. The machine learning methods provided a blind and unbiased analysis of the animal behaviors and revealed that PNE mice shared behavioral phenotypes featuring in ADHD. In addition to ADHD associated features, we also found a deficit in social interaction between a juvenile mouse and a PNE mouse model. A decreased number of newborn neurons in the hippo-

campus, which is a hallmark of ASD pathology, was observed in the PNE mouse model. All these results suggest that prenatal exposure to nicotine may induce comorbid ADHD and ASD, rather than ADHD alone.

(論文審査の結果の要旨)

近年、AI技術は医学分野において急速に導入され、その発展が期待されている。マウスは、その汎用性の高さから医学研究における最も重要な実験動物の一つとして広く用いられており、精神・神経科学分野においては、疾患モデルマウスの行動異常の解析の重要性が高まっている。妊娠期間中にニコチンを摂取させたマウスから生まれた子マウスが、ADHD（注意欠陥・多動性障害）様の行動異常を示すことが知られているが、未だ解明されていない側面が多く存在し、詳細な解析を行う必要がある。

本研究では、実験動物であるマウスの体の各部位の動きを捉え、これらの動きを統合して行動パターンを自動で識別するAIシステムを開発し、このシステムを利用して、妊娠期間中にニコチンを摂取させたマウスから生まれた子マウスの行動解析を行った。

その結果、次の結果を得た。

1. DeepLabCut および SimBA と呼ばれる機械学習プログラムを改良し、胎児期にニコチンに暴露されたマウスの行動異常を検出することに成功した。
2. AI解析システムを用いて、胎児期にニコチンに曝露されたマウスにおいて、ADHD（注意欠如・多動性障害）に関連する行動異常および自閉スペクトラム症（ASD）に関連する行動異常の両方が検出できた。
3. 胎生期のニコチン暴露により、自閉スペクトラム症との関係が示唆されている成熟後の海馬におけるニューロン新生の異常が観察された。
4. 妊娠期のニコチン摂取が、生まれてくる子供のADHDと自閉スペクトラム症のリスクファクターになる可能性が示された。

これらの結果から、本研究で開発されたAI解析システムは、精神疾患モデルマウスの行動パターンを分析するための有力な解析ツールになることが示された。さらに、このシステムを活用した研究により、妊娠中の喫煙が注意欠如・多動性障害（ADHD）に加えて、自閉スペクトラム症（ASD）のリスクをも増加させる可能性が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。

Predictive Insights into Exocrine Pancreatic Insufficiency in Chronic Pancreatitis and Auto-immune Pancreatitis: A Decision Tree Approach (慢性膵炎と自己免疫性膵炎における膵外分泌機能不全の予測：決定木分析)

田 中 友 之

(論文の内容の要旨)

【緒言と目的】膵外分泌機能は、膵臓が消化酵素を産生し、食物の分解と栄養素の吸収を支援する生体内機能である。膵臓では主に膵腺房細胞が炭水化物を分解するアミラーゼ、タンパク質を分解するトリプシンやキモトリプシン、脂質を分解するリパーゼなど消化に必要な酵素を作り出し、それらを膵液中に放出する。慢性膵炎(Chronic Pancreatitis:CP)や自己免疫性膵炎(Autoimmune Pancreatitis:AIP)は、膵腺房細胞を含む膵組織が慢性的に障害を受ける疾患であり、膵外分泌機能不全(Exocrine Pancreatic Insufficiency:EPI)を合併する。EPIによる栄養素の消化吸収不良はQuality of Life(QOL)の低下に繋がるため、CPやAIPの疾患管理のためには早期のEPI同定と膵消化酵素の補充が有用と考えられる。

EPIの確定診断には糞便中脂肪排泄量測定が必要となるが、3日間の蓄便を要し、かつ、肝疾患や腸疾患など他の原因による脂肪吸収障害との鑑別ができないため、EPIのスクリーニング検査としては不向きである。膵外分泌機能検査として本邦ではPancreatic Functioning Diagnostant(PFD)試験が唯一保険収載されている検査であるが、海外では糞便中の膵エラスターゼ濃度を測定する便中エラスターゼ1(Fecal Elastase 1:FE-1)検査が一般的に用いられている。1g程度の便を単回採取できれば検査可能であり、感度も高い。また、種特異性があるため、治療に使用される消化酵素製剤に含まれる主にブタ由来のエラスターゼの影響がなく、検査に際して治療を中止する必要がない。しかし少量でも便の採取が必要なことや、検査手順が複雑であるため、一般臨床への普及には限界がある。したがって、CP、AIP患者の中で、治療が適応となるEPI合併症例を検出するためには、より汎用性の高い検査法の確立が必要である。

決定木分析を含む機械学習は、予測診断やリスク評価など様々な医療用途で有望視されている方法である。本研究の目的はCPおよびAIP患者を対象に決定木分析を用いて、EPIに関連する因子を検討し、簡便にEPI合併症例を抽出することである。

【方法】本研究は、CPとAIP症例を対象とした、後ろ向きコホート研究である。主要アウトカムであるEPIはFE-1値が $200\mu\text{g/g}$ 未満と定義した。

コホートはCPとAIPの診断時期に応じて57人の訓練コホート(2015~2021年)と26人の検証コホート(2010~2014年)に分けられた。FE-1は酵素結合免疫吸着測定法(Bioserv Rostock, ドイツ)により測定した。FE-1検査のための便サンプルはCPまたはAIPの診断から2週間以内に行った。臨床データはカルテより収集しStatFlex Ver.7.0を用いて統計解析を行った。具体的には各群間の比較にはMann-Whitney U検定およびカイ二乗検定を用い、相関分析はスピアマンの検定を行った。P値が0.05未満を統計的に有意とみなした。続いて、訓練コホートを使用してPython 3.9, Scikit-learn 1.2.0を用いた決定木モデルによる機械学習分析を実施し、EPI症例を抽出するための予測モデルを開発した。最後に、この予測モデルを検証コホートで検証した。

【結果】訓練コホートでは39例(68%)にEPIを認めた。FE-1値とBody Mass Index(BMI)( $r=0.301$ ,  $P=0.023$ )および総蛋白(Total Protein:TP)( $r=0.395$ ,  $P=0.002$ )にそれぞれ正の相関を認め、空腹時血糖(Fasting Blood Sugar:FBS)( $r=-0.283$ ,  $P=0.033$ )に負の相関を認めた。EPI患者は非EPI患者と比較して、BMI( $P=0.001$ )とTP( $P=0.002$ )が有意に低く、アルコール摂取量( $P=0.006$ )とFBS( $P=0.048$ )が高かった。決定木モデルによってBMI( $\leq 21.378\text{ kg/m}^2$ )とTP( $\leq 7.15\text{ g/dL}$ )はEPIを同定するための重要な変数であることが示された。モデルの精度は5重クロスバリデーションで評価し、平均AUROCは0.782であった。この決定木分析の結果に従い、 $\text{BMI}\leq 21.4\text{ kg/m}^2$ および $\text{TP}\leq 7.2\text{ g/dL}$ をそれぞれ1点とし、合計点を0~2点としたBMI-TPスコアリングシステムを構築した。訓練コホートにおいてBMI-TPスコアが0点ではEPI症例は0例、1点では症例の15%、2点では74%がEPIと同定された。検証コホートにおいてもBMI-TPスコアが0点ではEPI症例は0例、1点では症例の33%、2点では75

%がEPIと同定され、BMI-TPスコアリングシステムの有用性が確認された。

**【結論】** CPまたはAIP患者のEPIはBMIとTPに基づいて同定できることが明らかとなった。BMIとTPを用いた決定木モデルは、EPIに対する適切な治療の実施に役立つ新規知見と考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

膵外分泌機能は、膵臓が消化酵素を産生し、食物の分解と栄養素の吸収を支援する生体内機能である。慢性膵炎(Chronic Pancreatitis: CP)や自己免疫性膵炎(Autoimmune Pancreatitis: AIP)は膵組織が慢性的に障害を受ける疾患で膵外分泌機能不全(Exocrine Pancreatic Insufficiency: EPI)を合併し、栄養素の消化吸収不良を引き起こすことが知られている。CPやAIPの疾患管理のためには早期のEPI同定と膵消化酵素の補充が有用と考えられる。本研究ではCPおよびAIP患者を対象に、臨床データから決定木分析を用いてEPIに関連する因子を検討し、簡便にEPI合併症例を抽出することを目的とした。

CPとAIPの診断時期に応じて分けられた57人の訓練コホート(2015~2021年)と26人の検証コホート(2010~2014年)を対象とした。膵外分泌機能は便中エラスターゼ1(Fecal Elastase 1: FE-1)を用いて評価した。臨床データはカルテより収集しStatFlex Ver.7.0を用いて統計解析を行った。続いて、訓練コホートを使用してPython 3.9, Scikit-learn 1.2.0を用いた決定木モデルによる機械学習分析を実施し、EPI症例を抽出するための予測モデルを開発した。最後に、この予測モデルを検証コホートで検証した。

その結果、田中友之は次のような結果を得た。

1. 訓練コホートでは39例(68%)にEPIを認めた。

2. FE-1値とBody Mass Index (BMI) ( $r=0.301$ ,  $P=0.023$ ) および総蛋白 (Total Protein: TP) ( $r=0.395$ ,  $P=0.002$ ) にそれぞれ正の相関を認め、空腹時血糖 (Fasting Blood Sugar: FBS) ( $r=-0.283$ ,  $P=0.033$ ) に負の相関を認めた。
3. EPI患者は非EPI患者と比較して、BMI ( $P=0.001$ ) とTP ( $P=0.002$ ) が有意に低く、アルコール摂取量 ( $P=0.006$ ) とFBS ( $P=0.048$ ) が高かった。
4. 決定木モデルによってBMI ( $\leq 21.378 \text{ kg/m}^2$ ) とTP ( $\leq 7.15 \text{ g/dL}$ ) はEPIを同定するための重要な変数であることが示された。
5. モデルの精度は5重クロスバリデーションで評価し、平均AUROCは0.782であった。
6. 決定木分析の結果に従い、 $\text{BMI} \leq 21.4 \text{ kg/m}^2$  および  $\text{TP} \leq 7.2 \text{ g/dL}$  をそれぞれ1点とし、合計点を0~2点としたBMI-TPスコアリングシステムを構築した。
7. 訓練コホートにおいてBMI-TPスコアが0点ではEPI症例は0例、1点では症例の15%、2点では74%がEPIと同定された。
8. 検証コホートにおいてもBMI-TPスコアが0点ではEPI症例は0例、1点では症例の33%、2点では75%がEPIと同定され、BMI-TPスコアリングシステムの有用性が確認された。

これらの結果によりCPまたはAIP患者のEPIはBMIとTPに基づいて同定できることが明らかとなった。BMIとTPを用いた決定木モデルは、EPIに対する適切な治療の実施に役立つ新規知見と考えられる。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。

Comparative empirical analysis of challenging inpatients under the Medical Treatment and Supervision Act and the Mental Health and Welfare Act (医療観察法入院医療における治療困難事例の実証的研究、長期措置入院事例との比較を踏まえて)

齋藤勝仁

(論文の内容の要旨)

**【背景と目的】** 精神科医療では幻聴や被害妄想といった精神病症状の為に、自傷他害等に及ぶ重篤な患者への対応が課題となっている。このような患者への対応について日本では、「心神喪失等の状態で重大な他害行為を行った者の医療及び観察等に関する法律」(以下、医療観察法)と、精神保健及び精神障害者福祉に

関する法律(以下、精神保健福祉法)に定められた措置入院による治療が行われている。医療観察法は、我が国で初めての触法精神障害者の医療と社会復帰に関する法律である。医療観察法による医療とは、医療観察法の対象者と複数の医療者が治療同盟を構築し、疾病やそれに基づく重大な他害行為(殺人、放火、強盗、強姦性交、強制わいせつ、重傷害の6罪種)と向き合

い、「再被害行為防止を念頭に置いた社会復帰」の達成を目指す医療である。厚生労働省の示す入院医療ガイドラインには、概ね1年6か月間の入院期間が示されている。一方、精神保健福祉法において、精神障害者に対する入院形態が定められている。措置入院は、2名以上の精神保健指定医の診察により、精神障害者で自分を傷つけたり他人に危害を加えようとするおそれがあると判断された場合に都道府県知事及び政令指定都市長の権限により精神科病院に強制入院させる制度である。措置入院となった患者は、それ以外の入院患者より精神症状が重度であることが多く、入院時に呈した自傷他害のおそれを含む種々の問題行動のために社会復帰に困難を伴う。

本研究は、医療観察法に基づく治療困難患者と、精神保健福祉法に基づく長期措置入院患者の特徴と治療方法を調査した。我が国の医療観察法医療で行われている治療が、精神科医療全般に与える影響を評価することを目的とした。

【方法】2016年から2017年にかけて日本の指定入院医療機関全33施設中26施設より医療観察法治療困難例233人（男性179人、女性44人）、2017年6月30日時点で入院期間が18か月を超過する長期措置入院患者65人（男性58人、女性7人）のデータをそれぞれ収集した。精神病性障害を有する医療観察法の入院患者102人と精神保健福祉法の措置入院患者53人の基本属性と薬物療法を比較した。

【結果と考察】医療観察法の治療困難例には対象行為別で、重傷害82例（35%）、殺人80例（34%）、放火48例（21%）、強制わいせつ12例（5%）、強盗11例（5%）の犯罪例が含まれていた。主診断は精神病性障害が最も多かった（85%）。68例（25.8%）では複数の精神疾患が併存していた。一方、長期措置入院群の主診断は統合失調症（80%）が多くの割合を占めていた。薬物療法の比較分析では、医療観察法群ではクロザピンの使用率が高く、精神保健福祉法群では抗精神病薬と抗パーキンソン病薬の使用率が高かった。

【結論】医療観察法治療困難例は統合失調症圏の患者が多数を占めていた。医療観察法入院治療では抗精神病薬の単剤化やクロザピンの積極的な導入について適切な治療戦略が重視されることを示唆する結果が得られた。より治療が困難と考えられる医療観察法治療困難例に対する介入方法を検討することは、日本の精神科医療全体の治療水準の向上に寄与するものと考えられる。特にクロザピンや電気けいれん療法の使用を促進する

ことは、重度の精神病症状を呈する患者や症状改善困難の為に長期入院を経験している患者にとっては有益である可能性が高い。

#### （論文審査の結果の要旨）

精神科医療では幻聴や被害妄想といった精神病症状の為に、自傷他害等に及ぶ重篤な患者への対応が課題となっている。このような患者への対応について日本では、「心神喪失等の状態で重大な他害行為を行った者の医療及び観察等に関する法律」（以下、医療観察法）と、精神保健及び精神障害者福祉に関する法律（以下、精神保健福祉法）に定められた措置入院による治療が行われている。本研究は、医療観察法に基づく治療困難患者と、精神保健福祉法に基づく長期措置入院患者の特徴と治療方法を調査した。我が国の医療観察法医療で行なわれている治療が、精神科医療全般に与える影響を評価することを目的とした。

2016年から2017年にかけて日本の指定入院医療機関全33施設中26施設より医療観察法治療困難例233人（男性179人、女性44人）、2017年6月30日時点で入院期間が18か月を超過する長期措置入院患者65人（男性58人、女性7人）のデータをそれぞれ収集した。精神病性障害を有する医療観察法の入院患者102人と精神保健福祉法の措置入院患者53人の基本属性と薬物療法を比較した。

その結果、次の結論を得た。

1. 医療観察法の治療困難例は、統合失調症が199例で85%を占めた。
2. 精神保健法に基づく長期措置入院群は、統合失調症が53例で82%を占めた。
3. 医療観察法の治療困難例、精神保健福祉法による長期措置入院患者では、薬物療法を比較すると、統合失調症の割合がほぼ同じにもかかわらず医療観察法群ではクロザピンの使用率が高かった。一方、精神保健福祉法群では抗精神病薬と抗パーキンソン病薬の使用率が高かった。

本研究は、2つの異なった手法で得られたデータに対して比較を行った。そのため複数のバイアスが存在し、単純にクロザピンの有効性を示して良いかという点は大きな課題が残る。一方で、医療観察法医療及び措置入院医療はその特性上症例の収集や解析は困難であり、同様の研究はこれまでに発表されていない。日本の精神科医療において、長期入院についての課題は山積しており、今回の研究内容は非常に重要な視点が盛り込まれており、更なる研究の発展が望まれると判

断する。

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。

Analysis of Distal Compound Muscle Action Potential Duration in Hereditary Transthyretin Amyloidosis with Polyneuropathy (多発神経障害を呈する遺伝性トランスサイレチン型アミロイドーシスにおける遠位部複合筋活動電位持続時間の解析)

星野 優美

(論文の内容の要旨)

【背景】 遺伝性トランスサイレチン型アミロイドーシス (ATTRv) は変異型トランスサイレチン (TTR) 由来のアミロイド線維が全身沈着し様々な臓器障害を引き起こす常染色体顕性遺伝性疾患で、多くの患者で軸索障害型多発神経障害を呈する。ATTRv は予後不良な疾患であり、従来は肝移植以外の根本的治療法はなかったが、TTR 四量体安定化薬や核酸医薬品などの疾患修飾療法の登場により予後が改善し、早期診断がますます重要となってきた。一方、家族歴のない非集積地の ATTRv 患者などでは早期診断が難しく、多発神経障害を呈する ATTRv (ATTRv-PN) 患者は脱髄性末梢神経障害である慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) としばしば誤診されることがある。末梢神経伝導検査 (NCS) は末梢神経障害の病態生理を評価できる電気生理学的手法であるが、軸索障害の高度な ATTRv-PN 患者においては CIDP の電気診断基準を満たすような伝導遅延を認めることがある。遠位部刺激複合筋活動電位 (DCMAP) の持続時間 (DCMAPD) の延長は脱髄性末梢神経障害を示唆する運動神経終末の不均一な伝導遅延の電気生理学的指標であり、CIDP 診断基準の一つの指標である。しかし、DCMAPDs は低域遮断フィルター (LFF) 設定に大きく影響を受けるとともに、LFF 設定は全世界の病院で様々である。最新の CIDP 電気診断基準である2021年 European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society (EAN/PNS) 基準では LFF 毎に DCMAPD のカットオフ値を定めているが、CIDP と誤診されることの多い ATTRv-PN においてもその妥当性の検証が必要である。

【目的】 ATTRv-PN 患者における DCMAPD を詳細に解析することを目的とした。

【方法】 50名の ATTRv-PN 患者において一側の正中、尺骨、脛骨、腓骨、腓腹神経にて NCS を行い、LFF 設定を 2、10、20 Hz と変化させて DCMAPDs を記録し、解析した。また、ATTRv-PN 患者において最

新の CIDP 電気診断基準における LFF 設定毎に規定された DCMAPD のカットオフ値の妥当性について検証した。

【結果】 正中、尺骨、腓骨神経では LFF 設定を上げるほど DCMAPD は有意に短縮した ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ )。脛骨神経でも同様の傾向を認めた ( $p = 0.08$ )。各神経において DCMAPD と他の電気生理学的パラメータの相関についても検討したが、正中神経の感覚神経伝導速度 ( $rs = -0.35$ ,  $p < 0.05$ )、尺骨神経の運動神経伝導速度 ( $rs = -0.32$ ,  $p < 0.05$ ) と弱い相関を認めたのみであった。EAN/PNS 基準における LFF 設定毎の DCMAPD のカットオフ値の妥当性については、ATTRv-PN 患者の尺骨、脛骨、腓骨神経における DCMAPD の延長者は 10% 未満であった。一方、正中神経では LFF 設定 2、10、20 Hz のすべて、もしくはいずれかで記録した DCMAPD が 10名の ATTRv-PN 患者において延長していた。この 10名のうち 9名は手根管症候群 (CTS) を合併していたが、DCMAPD 延長を認めなかった 37名のうち CTS 合併は 8名のみであった。CTS を合併していない ATTRv-PN 患者と比較し、CTS を合併した患者では有意に正中神経における DCMAPD 延長を認めた ( $p < 0.001$ )。

【考察】 ATTRv-PN 患者においても LFF 設定の変化により DCMAPD は大きく変化した一方、DCMAPD と相関した他の電気生理学的パラメータは少なく、DCMAPD の変化は各神経障害の重症度よりも LFF 設定の影響が強いことが示唆された。尺骨、脛骨、腓骨神経では CIDP 電気診断基準を満たすような DCMAPD 延長は稀であり、最新の CIDP 電気診断基準の LFF 設定毎のカットオフ値は妥当と考えられた。一方、正中神経においては CIDP 電気診断基準をみたすような DCMAPD 延長を多くの患者に認め、そのうち 90% の患者で CTS を合併していた。CTS の動物モデルでは不均一な脱髄と再髄鞘形成が確認されており、CTS が DCMAPD の延長に寄与している可能性が考えられ



たが、CTS 単独例での DCMAPD の詳細な解析は行われておらず、今後検討が必要と考えられた。

【結論】 ATTRv-PN 患者では尺骨、脛骨、腓骨神経の最新の CIDP 電気診断基準を満たすような DCMAPD の延長は稀である。一方で、ATTRv-PN 患者は CTS を高頻度で併発し、CTS 併発患者では正中神経の DCMAPD が延長することがあるため、正中神経の DCMAPD の解析には注意を要する。

(論文審査の結果の要旨)

遺伝性トランスサイレチン型アミロイドーシス (ATTRv) は変異型トランスサイレチン (TTR) 由来のアミロイド線維が全身臓器に沈着する常染色体顕性遺伝性疾患で、軸索障害型多発神経障害を呈する。近年、TTR 四量体安定化薬や核酸医薬品などの登場により本症の予後が改善し、早期診断が重要となってきた。一方、家族歴のはっきりしない ATTRv 患者では早期診断が難しく、多発神経障害を呈する ATTRv (ATTRv-PN) 患者は脱髄性末梢神経障害である慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) と誤診されることがある。遠位部刺激複合筋活動電位の持続時間 (DCMAPD) の延長は CIDP 電気診断基準の一つの指標である。しかし、DCMAPDs は低域遮断フィルター (LFF) 設定に影響を受けるとともに、LFF 設定は全世界の病院で様々である。最新の CIDP 電気診断基準では LFF 設定毎に DCMAPD のカットオフ値を定められたが、ATTRv-PN においてもその妥当性

の検証が必要である。

本研究では50名の ATTRv-PN 患者において一側の正中、尺骨、脛骨、腓骨神経にて運動神経伝導検査を行い、LFF 設定を 2, 10, 20 Hz と変化させ DCMAPDs を記録し、解析した。

その結果、星野は次の結果を確認し、結論を得た。

1. ATTRv-PN 患者においても LFF 設定を上げるほど DCMAPD は短縮する。
2. ATTRv-PN 患者の DCMAPD は神経障害の重症度よりも LFF 設定に大きく影響される。
3. 尺骨、脛骨、腓骨神経では CIDP 電気診断基準を満たす DCMAPD 延長は稀である。
4. 正中神経では DCMAPD の延長を10名の患者に認め、10名中9名 (90%) で手根管症候群 (CTS) を合併していた。

これらの結果より、ATTRv-PN 患者では LFF 設定に応じて DCMAPD は変化するが、尺骨、脛骨、腓骨神経では最新の CIDP 電気診断基準を満たすような DCMAPD の延長を来たすことは稀であることが明らかになった。一方で、ATTRv-PN 患者は CTS を高頻度で併発し、CTS 併発患者では正中神経の DCMAPD が延長することがあるため、正中神経の DCMAPD の解析には注意を要することを明らかにした。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。

Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and Barrett's esophagus elongation  
(*Helicobacter pylori* 除菌とバレット食道伸展との関係)

橋上 遣太

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 除菌療法は、胃癌の発生率を低下させることが示され、世界的に急速に普及している。一方で除菌に伴う副作用も報告されている。除菌後の胃酸分泌回復により、胃食道逆流症 (GERD) は悪化するという報告が多い。GERD はバレット食道の発生と関連しているものの、*H. pylori* 除菌後にバレット食道長が変化するか否かを検討した研究は少ない。今回我々は、*H. pylori* 除菌前後でバレット食道の有無と長さを比較し、*H. pylori* 除菌がバレット食道の発生や伸展に影響を与えるかどうかを検討した。

【材料及び方法】 2004年6月～2017年11月までに当院で

*H. pylori* 除菌を行った患者を対象とした後ろ向きコホート研究である。除菌前の上部消化管内視鏡 (EGD) から最終 EGD まで12か月未満の患者、上部消化管手術歴のある患者、適切な画像評価ができない患者、除菌時18歳未満の患者は除外した。除菌治療前後に得られた内視鏡画像から、プラハ分類を用いてバレット食道長を、ロサンゼルス分類を用いて逆流性食道炎を評価した。また、BMI や胃酸分泌抑制薬を含む内服歴の患者情報、食道裂孔ヘルニアなどの内視鏡所見の情報を収集し、検討を行った。

【結果】 対象患者は340人、男女比は男性：女性 = 159人 (47%) : 181人 (53%) で、いずれもアジア人だった。フォローアップ期間の中央値は55か月であった。BMI

の中央値は22.2 (IQR14.3-25.4) であった。106人 (31%) がPPI/PCABを、7人 (2%) がH2 Blockerを内服していた。食道裂孔ヘルニアは187人 (55%)、萎縮性胃炎は全ての患者に認めた (木村・竹本分類C0-1 : C2-3 : O1-3 = 2% : 47% : 51%)。逆流性食道炎の罹患率は除菌前が7人 (2.1%)、除菌後は21人 (6.4%) であり、有意な増加がみられた ( $P < 0.05$ )。バレット食道の罹患率は除菌前69人 (20.3%) に対し、除菌後は71人 (20.9%) とわずか2例のみの増加であり、罹患率に有意差はなかった。また、いずれも新規発症例であり、もともと除菌前にバレット食道を有する症例において除菌後に伸展した症例はなかった。プラハ分類の中央値は除菌前後でいずれもC0M1であり、こちらにも有意差は認めなかった。

【結論】 今回の検討では、340例の *H. pylori* 除菌患者のうち、中央値55か月のフォローアップ期間の中で、バレット食道の伸展を認めたのはわずか0.6%であった。また、いずれも新規のバレット食道の発生を認めた症例であり、既存のバレット食道が伸展した症例は認めなかった。これらの結果からは、*H. pylori* 除菌はバレット食道の伸展に影響を与える可能性は低い事が示唆された。今後更なる評価のためには、前向き研究が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 除菌療法は、除菌後の胃酸分泌回復により、胃食道逆流症 (GERD) は悪化するという報告が多い。GERDはバレット食道の発生と関連しているものの、*H. pylori* 除菌後にバレット食道長が変化するか否かを検討した研究は少ない。今回我々は、*H. pylori* 除菌前後でバレット食道の有無と長さを比較し、*H. pylori* 除菌がバレット食道の発生や伸展に影響を与えるかどうかを検討した。

2004年6月~2017年11月までに当院で *H. pylori* 除菌を行った患者を対象とした後ろ向きコホート研究を

行った。除菌前の上部消化管内視鏡 (EGD) から最終EGDまで12か月未満の患者、上部消化管手術歴のある患者、適切な画像評価ができない患者、除菌時18歳未満の患者は除外した。除菌治療前後に得られた内視鏡画像から、プラハ分類を用いてバレット食道長を、ロサンゼルス分類を用いて逆流性食道炎を評価した。また、BMIや胃酸分泌抑制薬を含む内服歴の患者情報、食道裂孔ヘルニアなどの内視鏡所見の情報を収集し、検討を行い、以下の結果を得た。

1. 対象患者はアジア人340人 (男性 : 女性 = 47% : 53%) で、フォローアップ期間の中央値は55か月であった。
2. BMIの中央値は22.2 (IQR14.3-25.4) であった。
3. 106人 (31%) がPPI/PCABを、7人 (2%) がH2 Blockerを内服していた。
4. 食道裂孔ヘルニアは187人 (55%) であった。
5. 萎縮性胃炎は全ての患者に認めた (木村・竹本分類C0-1 : C2-3 : O1-3 = 2% : 47% : 51%)。
6. 逆流性食道炎の罹患率は除菌前が7人 (2.1%)、除菌後は21人 (6.4%) であり、有意な増加がみられた ( $P < 0.05$ )。
7. バレット食道の罹患率は除菌前69人 (20.3%) に対し、除菌後は71人 (20.9%) とわずか2例のみの増加であり、罹患率に有意差はなかった。また、いずれも新規発症例であり、もともと除菌前にバレット食道を有する症例において除菌後に伸展した症例はなかった。
8. プラハ分類の中央値は除菌前後でいずれもC0M1であり、こちらにも有意差は認めなかった。

以上の結果は、*H. pylori* 除菌はバレット食道の伸展に影響を与える可能性は低い事を示唆している。

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。

Segmentectomy-oriented anatomical model for enhanced precision surgery of the left upper lobe (左上葉における精密肺区域切除のための区域解剖モデル)

松岡 峻一郎

(論文の内容の要旨)

【背景】 近年の小型早期肺癌の増加に伴い、肺機能温存を目的とした肺区域切除が増加している。2022年に報告された小型肺癌に対する肺葉切除と肺区域切除を比較した多施設共同第3相試験 (JCOG0802/WJOG4607L)

では、全生存率における肺区域切除の優越性が示され、現在では肺葉切除と並び区域切除が末梢小型肺癌の標準術式の一つとなった。肺区域切除では、正確な区域間の同定と切離が重要であり、区域間を走行する区域間静脈の同定は必要不可欠である。右上葉における区

域切除に特化した区域静脈モデルは既に確立されているが、左上葉の区域静脈は体系化されていない。本研究では、左上葉を  $S^{1+2}$  (肺尖後区域)/ $S^3$  (前上葉区域)/ $S^{4+5}$  (舌区域) に分け、それぞれの区域静脈 ( $V^{1+2}/V^3/V^{4+5}$ ) の解剖学的課題に焦点を当て、区域切除に特化したモデルを確立することを目的とした。

【方法】2017年5月～2021年12月に信州大学医学部附属病院呼吸器外科で術前造影CTが施行された413例のうち、除外症例を除いた395例を対象とした。次世代3D-CTソフト(レボラス)のボロノイ分割技術を用いて区域静脈(区域間/区域内静脈)の同定を行い、以下の解析を行った。

### 1. Anterior および Central vein の定義づけと $V^{1+2}$ 分岐パターンの検討

$S^{1+2}$ を還流する静脈  $V^{1+2}$ が  $B^{1+2}/B^3$ の気管支前方を走行する場合を Anterior vein,  $B^{1+2}/B^3$ の背側から  $B^3$ と  $B^{4+5}$ の間の深部を走行する静脈を Central vein と定義し、その分岐パターンと頻度を検討した。

### 2. 横断型 $S^3$ /非横断型 $S^3$ の頻度と Central vein との関連

$S^3$ が左上葉を横断するか否かによって、横断型  $S^3$ と非横断型  $S^3$ に分類し、その頻度と Central vein との関連について統計学的解析を用いて検討した。

### 3. $V^3$ 分岐パターンの検討

$S^3$ を還流する  $V^3$ を  $V^3c$ (区域内静脈)の流入先(Anterior vein, SPV:上肺静脈,  $V^3b$ : $S^3$ 前方と舌区の区域間静脈)によって分類し、その頻度を検討した。

### 4. $V^{4+5}$ 分岐パターンの検討

$S^{4+5}$ を還流する  $V^{4+5}$ の流入する本数と流入する静脈(SPV:上肺静脈, IPV:下肺静脈)に基づく分類とその頻度についてそれぞれ検討した。

## 【結果】

### 1. Anterior および Central vein の頻度と $V^{1+2}$ 分岐パターンの検討

Central vein は計32% (126/395例)に認めた。また、 $V^{1+2}$ は Anterior type, Anterior with Central a type, Anterior with Central ab type, Central vein type に分類され、それぞれの頻度は68%, 20%, 9%, 3%であった (Figure 2)。

### 2. 横断型 $S^3$ /非横断型 $S^3$ の頻度と Central vein との関連

横断型  $S^3$ と非横断型  $S^3$ の頻度はそれぞれ27% (108/395例), 73% (287/395例)であった (Figure 3)。また、横断型  $S^3$ のうち Central vein を認める症例は4%

(4/108例)であった。一方で Central vein を有する症例で横断型  $S^3$ の頻度は4% (4/126例)であり、横断型  $S^3$ と Central vein は有意な負の相関を示した ( $P < .001$ ) (Table 1)。

### 3. $V^3$ 分岐パターンの検討

$V^3$ は  $V^3c$  into anterior vein type,  $V^3c$  into SPV type,  $V^3c$  into  $V^3b$  type の3つに分類され、それぞれの頻度は35%, 45%, 20%であった (Figure 4)。

### 4. $V^{4+5}$ 分岐パターンの検討

本数に基づく  $V^{4+5}$ 分類では One-stem type, Two-stem type, Three-stem type, Four-stem type に分けられ、それぞれ55.1%, 37%, 7.6%であった (Figure 5)。また、流入先に基づく  $V^{4+5}$ 分類では、 $V^{4+5}$  into SPV type,  $V^{4+5}$  into SPV+IPV type,  $V^{4+5}$  into IPV type に分類され、それぞれの頻度は94%, 4.5%, 1.5%であった (Figure 6)。

【討論】本研究では次世代3D-CT解析ソフトのボロノイ分割技術を用いることで客観的に正確に区域静脈を同定することが可能であった。また、従来の命名法で定義されていない左上葉背側と舌区の区域間静脈を同定し、 $V^3t$ と定義することで、左上葉の区域解剖が整理され、今回の区域静脈の体系化につながったと考える。

我々は左上葉を  $S^{1+2}/S^3/S^{4+5}$  (舌区域) に分け、それぞれの区域静脈 ( $V^{1+2}/V^3/V^{4+5}$ ) の分類を行った。 $V^{1+2}$ では Anterior vein type が最も頻度が高かったが (68%), この Anterior vein は  $S^{1+2}$ 区域切除の際に前方から容易にアプローチ可能な静脈である (Figure E3)。しかしながら、約30%の症例に認める Central vein は深部を走行するため、肺動脈と気管支を切離した後に到達することになる (Figure E4)。したがって、 $S^{1+2}$ 区域切除では Central vein の有無により手術戦略が異なるため術前に把握しておくべきである。また、今回の検討では横断型  $S^3$ を約30%の症例で認め、 $S^3$ 区域切除の際には腹側前方からに加え、上下葉間からの両方のアプローチが必要となる。一方で、非横断型  $S^3$ では腹側前方からの手術を行うことになり、手術アプローチが異なってくる。 $V^{4+5}$ に関しては、大多数は SPV に流入するが、6%の症例は IPV に流入していた (Figure E5)。この IPV に流入する  $V^{4+5}$ の存在を理解せず、上葉/下葉の解剖学的肺切除を行うと予期せぬ出血や不必要な血管処理に繋がる可能性があるため注意する必要がある。

今回我々は次世代3D-CT解析ソフトを用いて区域

解剖の検討を行い、左上葉における区域切除に特化したモデルを確立した。この分類は個々の複雑な左上葉の区域解剖を単純化し、精密で正確な区域切除を行う上で有用と考える。

(論文審査の結果の要旨)

肺区域切除では正確な区域間の同定と切離が求められるため、区域間/区域内を走行する区域静脈の理解が必要不可欠である。

しかしながら、右上葉区域静脈モデルは確立されているが、左上葉の区域静脈は体系化されていないのが現状である。本研究では、左上葉を $S^{1+2}$ (肺尖後区域)/ $S^3$ (前上葉区域)/ $S^{4+5}$ (舌区域)に分け、それぞれの区域静脈( $V^{1+2}/V^3/V^{4+5}$ )の解剖学的課題に焦点を当て、区域切除に特化したモデルを確立することを目的とした。

2017年5月~2021年12月に信州大学医学部附属病院呼吸器外科で術前造影CTが施行された413例のうち、除外症例を除いた395例を対象とした。次世代3D-CTソフト(レボラス)のボロノイ分割技術を用いて区域静脈(区域間/区域内静脈)の同定を行い、解析を行った。

その結果、松岡峻一郎は次の結論を得た。

1. Central vein を有する症例を合計32%に認めた。
2. 横断型/非横断型 $S^3$ の頻度はそれぞれ27%, 73%であった。
3. 左上葉背側と舌区における未定義の区域間静脈( $V^3t$ )を98%の症例で認めた。
4.  $V^{4+5}$ 分類で舌区静脈が下肺静脈に流入する頻度は合計6%であった。

これらの結果より、左上葉の区域解剖を整理され、区域静脈モデルの確立に至った。Central veinは左上葉の深部を走行するため、この静脈を切離する場合は手術戦略が異なるため術前に把握しておくべきである。また、横断型 $S^3$ に対して $S^3$ 区域切除を行う際には前方腹側と上下葉間の背側からの両アプローチが必要となる。そして、舌区静脈( $V^{4+5}$ )は少なからず下肺静脈に流入する異常血管を認めるため、予期せぬ出血や不必要な血管処置に繋がる可能性があるため注意する必要がある。以上より、本研究で体系化したこの分類は個々の複雑な左上葉の区域解剖を単純化し、精密で正確な区域切除を行う上で有用と考える。

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 preliminary study of IgG4 expression and its prognostic significance in oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌におけるIgG4発現の予後的意義に関する予備的研究)

福 田 浩 信

(論文の内容の要旨)

**【背景・目的】** 口腔扁平上皮癌は口腔咽頭領域で最も多い悪性腫瘍の1つであり、そのうち舌は好発部位である。臨床医にとってその予後決定は重要であるが、予後予測バイオマーカーとして日常的に実用されているものは無い。また、悪性腫瘍におけるIgG4発現に関する報告は散見されるが、発生部位や組織型によって予後に対する影響は異なっている。本研究は、舌扁平上皮癌におけるIgG4発現について調査し、臨床病理像や予後との関連を明らかにすることを目的とした。  
**【対象と方法】** 信州大学病院において外科的切除を行った舌扁平上皮癌50例を調査対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋検体を用い、免疫組織化学染色法にて腫瘍浸潤先進部におけるIgG4、制御性T細胞の発現について検討した。加えてIgG4並びに制御性T細胞の発現と各患者背景因子、予後データとの関連を調査した。また腫瘍組織内におけるIgG4の局在を

調査するため、免疫蛍光染色を行った。

**【結果】** 患者背景因子との関連について、IgG4の発現は腫瘍浸潤様式(YK分類)と有意に相関しており( $P=0.031$ )、IgG4の発現が多い群において腫瘍浸潤様式が軽度(YK-1-3)であった。加えて組織学的分化度とIgG4の発現について、統計学的有意差は認めないが、分化度が高い群においてIgG4発現が多い傾向がみられた( $P=0.077$ )。また全生存率(OS)と無再発生存率(RFS)について、IgG4発現が高い群において有意に予後良好であった(OS,  $P=0.04$ ; RFS,  $P=0.016$ )。また制御性T細胞の発現についても、高発現群において良好なOSとRFSを認めた(OS,  $P=0.035$ ; RFS,  $P=0.012$ )。OSに対する予後予測因子解析の単変量解析において、頸部リンパ節転移( $P=0.011$ )、TNM病期( $P=0.045$ )が有意にOSと関連しており、IgG4発現( $P=0.061$ )、制御性T細胞( $P=0.055$ )については相関傾向を認めた。

RFS に対する予後予測因子解析の単変量解析において、頸部リンパ節転移 ( $P=0.008$ )、腫瘍の神経周囲浸潤 ( $P=0.020$ )、IgG4発現 ( $P=0.022$ )、制御性T細胞発現 ( $P=0.018$ ) が有意な予後予測因子として抽出され、多変量解析においても頸部リンパ節転移 ( $P=0.017$ )、IgG4発現 ( $P=0.005$ )、制御性T細胞発現 ( $P=0.011$ ) が有意な予後予測因子であった。

**【考察】** 先行研究において、口腔領域はIgG4が他臓器より多く分布している事が報告されている。加えてIgG4の特異性により、抗腫瘍免疫的な機能をもつ活性型Fcγ受容体や骨髄由来抑制細胞(MDSCs)が抑制される可能性が示唆された。以上より、IgG4が口腔における抗腫瘍免疫活性化に間接的に寄与している事が示唆された。また制御性T細胞(Foxp3)について、本研究においては予後良好因子であった。口腔扁平上皮癌におけるIgG4の予後的意義は、制御性T細胞を含む多くの因子の影響を受けている可能性があると考えた。

**【結論】** 口腔という特殊環境において、IgG4の発現が舌扁平上皮癌の予後良好因子であった。

(論文審査の結果の要旨)

口腔扁平上皮癌は口腔咽頭領域で最も多い悪性腫瘍の1つであり、そのうち舌は好発部位である。臨床医にとってその予後決定は重要であるが、予後予測バイオマーカーとして日常的に実用されているものは無い。悪性腫瘍におけるIgG4発現に関する報告は散見され

るが、発生部位や組織型によって予後に対する影響は異なっている。そこで本研究は、舌扁平上皮癌におけるIgG4の発現と患者背景因子、病理像、予後との関連を明らかにすることを目的とした。

信州大学病院において外科的切除を行った舌扁平上皮癌50例を調査対象とし、ホルマリン固定パラフィン包埋検体を用い、免疫組織化学染色法にて腫瘍浸潤先進部におけるIgG4、制御性T細胞の発現について検討した。加えてIgG4並びに制御性T細胞の発現と各患者背景因子、予後データとの関連を調査した。また腫瘍組織内におけるIgG4の局在を調査するため、免疫蛍光染色を行った。

その結果、福田浩信は次の結論を得た。

1. IgG4高発現群において有意に腫瘍浸潤様式が軽度であり、また組織学的分化度が高い傾向を認めた。
2. IgG4高発現群、制御性T細胞高発現群において、全生存率と無再発生存率が有意に高く、予後が良好であった。
3. 無再発生存率に対する多変量解析において、IgG4高発現が予後予測因子の一つとして抽出された。

1の結果より、IgG4発現は腫瘍浸潤様式や組織学的分化度と関連がある事が示唆された。また2、3の結果により、IgG4高発現は舌扁平上皮癌の予後良好因子であると考えられた。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Use of force-velocity relationship to estimate the one-repetition maximum leg press exercise among young females (若年女性における力-速度関係を用いたレッグプレスの最大挙上重量の推定)

黒 部 恭 史

(論文の内容の要旨)

【はじめに】レジスタンストレーニングは健常者や高齢者、障がいがあるものまで様々な対象に実施される。レジスタンストレーニングを実施する際に、最大挙上重量 (One-repetition maximum: 以下1RM) は重要な変数であり、実施前に決定する必要がある。1RMの決定方法には直接法と間接法がある。直接法は1RM測定のゴールドスタンダードであるが、怪我のリスクや時間がかかり高齢者や運動歴のないものには実用的な方法ではない。間接法は1RMを推定する方法でありそういった欠点を克服するためにいくつかの間接法が提案されてきた。最も一般的な間接法は挙上重量と反復挙上回数を用いて1RMを推定する方法である。しかし、この方法は挙上重量が軽いと推定精度が下がることや疲労まで実施するため測定後からすぐにトレーニングを開始することができないという問題があるため、別の1RM推定方法が必要である。

近年、多関節運動における1RMの推定に力-速度関係を用いた方法が注目されている。多関節運動における力-速度関係は直線関係であり、2種類の重量を挙上することでこの関係を得ることができる。したがって、力-速度関係に基づいた推定方法は直接法に比べ時間がかからない、疲労しにくいといった特徴がある。Ramosらはベンチプレス動作において力-速度関係の力軸の切片から1RMを推定できることを報告している。一方、下肢の代表的なレジスタンストレーニングであるレッグプレスについては、1RMと力-速度関係の力軸の切片の関係や推定式とその精度についてはまだ明らかになっていない。そこで本研究の目的は1) レッグプレスの1RMと力-速度関係から得られる力軸の切片との併存的妥当性を明らかにすること、2) 力軸の切片からレッグプレスの1RMを推定する推定式とその精度を明らかにすることとした。【方法】本研究は横断研究で実施した。対象は運動習慣のない健常な女性成人とした。研究は3日間にわたって実施した。1日目は1RM測定のための練習、2日目は1RM測定の本測定、3日目には力-速度関係を得るための測定を実施した。1RMの測定は推奨

されている手順で行った。被験者は骨盤と肩を固定され、上肢で手すりを把持した状態とした。測定の開始肢位は股関節が屈曲90°、膝関節が屈曲90°とし、片脚で動作を実施した。力-速度関係を得るための測定は1RM測定と同様の肢位で行った。挙上する重量は本測定で測定された1RMの20%と70%の重量として、それぞれ3試行ずつ行った。動作はできる限り速く下肢を伸展するように行った。各重量で測定された試行で最も平均速度が速い施行を各重量の代表値として、力-速度関係を作成し力軸の切片をそれぞれ求めた。統計解析は、レッグプレスの1RMと力-速度関係から得られる力軸の切片との関係をみるために、1RMと力軸の切片にピアソンの相関係数 (r) を用いた。また、力軸の切片からレッグプレスの1RMを推定する推定式とその精度を明らかにするために、1RMと力軸の切片に直線回帰を適応して推定式を求めた。また、推定精度として決定係数 ( $R^2$ )、推定の標準誤差 (SEE) と SEE を対象者の1RMの平均で標準化した SEE% を求めた。

【結果】対象者の1RMは  $87.0 \pm 24.5$  kg であった。  $r = 0.88$  であった。また、力軸の切片から1RMを推定する推定式は  $\text{予測1RM (kg)} = 0.08 \times (\text{力軸の切片}) - 3.00$  であり、その精度は  $R^2$  が 0.77、SEE が 12.5 kg、SEE% は 14.4% であった。

【考察】本研究の結果から運動習慣のない健常女性成人を対象とした片脚レッグプレスでは、1RMと力-速度関係の力軸の切片は高い妥当性があり、力軸の切片から1RMを推定することが可能で、その推定誤差は中等度であると考えられる。

片脚レッグプレスにおける1RMと力-速度関係の力軸の切片の関連はベンチプレスで実施された Ramos らの研究と同様に高い関連を認めた。また、有意な回帰式が得られたため、レッグプレスにおいても力軸の切片から1RMを推定することが可能であると考えられる。推定式を求める際にはその精度が重要である。相関係数や決定係数は精度の指標として報告されることもある。しかし、これらの値は測定された値の範囲の影響を受けることや誤差の絶対的な精度を示さないた

め、精度の指標としては不十分である。SEEは絶対的な誤差の量を表し、推定された値がどの程度誤差を有するかの情報を示す。本研究のSEEは12.5 kgであった。ベンチプレス動作で力軸の切片から推定式を作成したRamosらはSEEの報告がないため本研究と比較できない。下肢のエクササイズであるスクワットの1RMを等尺性筋力値から推定した研究ではSEEは13.8 kgや11.2 kgであり、本研究と類似した値であった。このことから、力軸を用いた1RMの推定方法は、他の間接法と同等に中等度の精度で1RMを推定できると考える。

本研究の限界は、対象者が運動歴のない健常女性成人であり、今回作成された推定式の適応が限定されることである。今後は対象者を変えて、今回作成された推定式が適応できるかの検討が必要である。

#### (論文審査の結果の要旨)

本研究は、若年女性を対象として、レッグプレスの最大挙上重量(One-repetition maximum, 1RM)と力-速度関係から得られる力軸の切片との併存的妥当性を明らかにすること、および、力軸の切片からレッグプレスの1RMを推定する推定式とその精度を明らかにすることを目的として実施された横断研究である。

方法として、研究は3日間にわたって実施され、1日目は1RM測定のための練習、2日目は1RM測定の本測定、3日目は力-速度関係を得るための測定が行われた。被験者は骨盤と肩を固定され、上肢で手すりを把持した状態で1RMが測定され、次に力-速度関係を得るために1RMの20%と70%の重量での測定が行われ、各重量で測定された試行で最も平均速度が速

い試行を各重量の代表値として力-速度関係を作成し力軸の切片が求められた。

結果として、対象者の1RMは $87.0 \pm 24.5$  kgで、 $r = 0.88$ であったこと、また、力軸の切片から1RMを推定する推定式は予測1RM (kg) =  $0.08 \times (\text{力軸の切片}) - 3.00$ であり、精度は $R^2 = 0.77$ 、推定の標準誤差が12.5 kgであったとしている。

以上の結果から、運動習慣のない健常女性成人を対象とした片脚レッグプレスでは、1RMと力-速度関係の力軸の切片は高い妥当性があり、力軸の切片から1RMを推定することが可能で、その推定誤差は中等度であると述べている。また、研究の限界として、対象者が運動歴のない健常女性成人であることから、今回作成された推定式の適応が限定されることを挙げている。

理学療法のうち運動療法では単関節や複合関節におけるレジスタンストレーニングが日常的に行われているが、具体的な運動負荷量の目安は理学療法士の主観で設定されることが多いことから、本研究で取り組んだような1RMの推定式からの推定が可能となれば、より客観的な視点からのレジスタンストレーニングの運動負荷量の設定が可能になるものと期待される。

審査会においては、主査、副査からの質問に対して明確に回答するとともに、論文発表会においては、審査会での指摘事項を反映させた研究発表が行われた。

以上より、主査、副査は一致して、本研究は、博士の学位に相応しい研究内容であるとともに、博士論文として優秀な内容であると判断した。

## Recombinant $\gamma$ Y278H Fibrinogen Showed Normal Secretion from CHO Cells, but a Corresponding Heterozygous Patient Showed Hypofibrinogenemia (患者の表現型とCHO細胞の産生能に乖離を認めた変異フィブリノゲン $\gamma$ Y278Hの解析)

### 上 條 途 夢

#### (論文の内容の要旨)

【はじめに】フィブリノゲン(Fbg)はA $\alpha$ 鎖、B $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖から構成される血液凝固因子であり、トロンビンによって多数のFbgが重合することで不溶性のフィブリンに転換される。Fbgは肝細胞によって産生され、血液中では主にプラスミンによって分解される。

先天性Fbg異常症は遺伝子変異を原因とする疾患であり、Fbg抗原量とFbg活性値がともに低値を示すHypofibrinogenemia、Fbg抗原量は正常であるものの

Fbg活性値が低下するDysfibrinogenemia、Fbg抗原量とFbg活性値がともに測定感度以下であるAfibrinogenemiaの3つの表現型に大別される。今回、解析したHiroshima症例は、患者が $\gamma$ Y278Hヘテロ接合型変異を保有しており、Fbg活性値が112 mg/dL(基準範囲: 180~350 mg/dL)、Fbg抗原量が116 mg/dL、Fbg活性値/Fbg抗原量比は0.97であったことから、Hypofibrinogenemiaであると予想した。このFbg測定値異常を来す詳細なメカニズムを解明するために、

$\gamma$ Y278H Fbg および  $\gamma$ Y278 周辺に変異を持つ Fbg を産生する Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を確立し、CHO 細胞における Fbg 産生量・分泌量の測定および Fbg 機能の解析を行った。

【方法】 $\gamma$ L276P,  $\gamma$ T277P,  $\gamma$ T277R,  $\gamma$ Y278H,  $\gamma$ A279D,  $\gamma$ Y280C の  $\gamma$ 鎖変異プラスミドを作製し、正常 Fbg A $\alpha$ 鎖および B $\beta$ 鎖産生 CHO 細胞に導入することで、変異 Fbg 産生 CHO 細胞を確立した。Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で各 CHO 細胞の培養液および細胞溶解液の Fbg 濃度を測定し、培養液 Fbg 濃度/細胞溶解液 Fbg 濃度比 (M/C 比) を計算した。さらに、培養液から精製したりコンビナント Fbg を用いて、プラスミンによる Fbg 分解試験、トロンビンによるフィブリン重合試験、Fbg 分解抑制試験、第 XIII 因子による架橋試験を実施した。

【結果】Fbg 濃度の測定値は、 $\gamma$ Y278H Fbg 産生 CHO 細胞の培養液が 3.02 (2.23~4.60)  $\mu$ g/mL (中央値, 四分位範囲), 細胞溶解液が 4.68 (3.34~6.15)  $\mu$ g/mL であり、M/C 比は 0.75 (0.54~0.82) であった。一方、Wild-type Fbg 産生 CHO 細胞の培養液は 0.76 (0.47~0.90)  $\mu$ g/mL, 細胞溶解液は 0.64 (0.34~0.78)  $\mu$ g/mL であり、M/C 比は 1.21 (0.98~1.39) であった。すなわち、 $\gamma$ Y278H Fbg 産生 CHO 細胞の Fbg 産生は Wild-type より多く、分泌もほぼ正常であることが分かった。 $\gamma$ T277R,  $\gamma$ A279D および  $\gamma$ Y280C Fbg 産生 CHO 細胞の Fbg 産生と分泌は  $\gamma$ Y278H Fbg 産生 CHO 細胞とほぼ同じ傾向であったが、 $\gamma$ L276P および  $\gamma$ T277P Fbg 産生 CHO 細胞は Fbg 産生が低下し、産生された Fbg が分泌されにくく細胞内に蓄積する傾向を示した。

$\gamma$ Y278H Fbg 産生 CHO 細胞の Fbg 産生・分泌能は、患者血漿 Fbg 測定値から予想した表現型と矛盾するものであったため、 $\gamma$ Y278H Fbg の機能を Wild-type,  $\gamma$ R275C および  $\gamma$ T277R Fbg と比較した。プラスミンによる Fbg 分解試験の結果、 $\gamma$ Y278H Fbg は対照の  $\gamma$ R275C Fbg より分解されやすいことが明らかになった。トロンビンによるフィブリン重合試験では、 $\gamma$ Y278H Fbg は Ca イオン存在下では Wild-type Fbg と同等の重合反応を示したが、Ca イオン未添加の条件では反応が著しく低下した。さらに、Fbg 分解抑制試験では  $\gamma$ Y278H Fbg は Ca イオンによる分解抑制が著しく低下することが明らかになったが、第 XIII 因子による Fbg 架橋試験では D:D 結合能の低下を認めなかった。

【考察】これまでの経験上、CHO 細胞における Fbg

産生・分泌能は、患者表現型と一致するという印象であった。すなわち、患者が Hypofibrinogenemia を示す場合はその変異 CHO 細胞の M/C 比は著しく低下するが、Dysfibrinogenemia を示す場合は著しい低下は認めない。しかし、本症例の Fbg 活性値/Fbg 抗原量比から推定された患者表現型は Hypofibrinogenemia であるのに対し、 $\gamma$ Y278H Fbg 産生 CHO 細胞の M/C 比からは Dysfibrinogenemia と予想され、乖離が生じた。そこで、これまでに我々が確立した 33 種類の  $\gamma$ 鎖変異 Fbg 産生 CHO 細胞の M/C 比と患者の Fbg 活性値/Fbg 抗原量を比較したところ、乳児患者の 1 例および  $\gamma$ Y278H と  $\gamma$ T277R の 2 例を除くすべての症例で、CHO 細胞の Fbg 産生・分泌能と患者の表現型が一致した。このことから、CHO 細胞における Fbg 産生・分泌能は患者の肝細胞における Fbg 産生・分泌能を反映すると判断でき、 $\gamma$ Y278H 症例患者の肝細胞での Fbg 産生・分泌能は低下していないと推察された。

Fbg 機能解析の結果、 $\gamma$ Y278H Fbg はプラスミンによって分解されやすいが、血液中に近い Ca イオン濃度条件下では正常に近い重合反応を示した。よって、 $\gamma$ Y278H 症例では、肝細胞において正常に近い量の Fbg が産生されるものの、肝細胞から分泌された後に血液中でプラスミンによって分解されやすいため、Hypofibrinogenemia を呈したと推察される。なお、我々の経験症例ではないが  $\gamma$ T277R 症例では  $\gamma$ Y278H 症例よりもプラスミン分解性の程度は弱いながらも同じメカニズムで Hypofibrinogenemia を呈したと推定される。

#### (論文審査の結果の要旨)

上條は患者の血漿フィブリノゲン (Fbg) 活性値が低下した Hiroshima 症例を経験した。種々の解析によって患者の血漿 Fbg が低下するメカニズムを明らかにし、その研究成果を報告した。

まず、患者の凝固検査と遺伝子検査を行った。Fbg 活性値と Fbg 抗原量がともに低下していることから Fbg 低下症であることを疑い、遺伝子の解析結果からヘテロ接合型の  $\gamma$ Y278H 変異を有していることを明らかにした。

続いて、 $\gamma$ Y278H を含む 6 種類の変異 Fbg 産生 CHO 細胞を確立した。培養液と細胞溶解液の Fbg 濃度の測定結果より、 $\gamma$ Y278H Fbg 産生 CHO 細胞における Fbg 産生能は低下していないと考察した。さらに、培養液から精製したりコンビナント Fbg を用いて、P



ラスミンによる Fbg 分解試験, フィブリン重合試験, Ca イオンによる Fbg 分解抑制試験, D:D 結合試験を実施した。これらの Fbg 機能試験の結果より,  $\gamma$ Y278H Fbg は Wild type Fbg と比較してプラスミンによって分解されやすく, Ca 結合能は低下しているが, D:D 結合能は低下していないと考察した。

上條は, これまでの経験から患者の表現型と CHO 細胞の Fbg 産生能に矛盾が生じることを疑問に思い, これまでに確立した33種類の  $\gamma$ 鎖変異 Fbg 産生 CHO 細胞の Medium/Cell lysate 比と患者の Fbg 活性値/Fbg 抗原量比を比較した。これにより, 乳児患者の1例および  $\gamma$ Y278H と  $\gamma$ T277R の2例を除くすべての症例で, CHO 細胞の Fbg 産生能と患者の表現型が一致していることを確かめた。このことから, CHO 細胞における Fbg 産生能は患者の肝細胞における Fbg 産生能を反映すると判断し, Hiroshima 症例患者の肝細胞での Fbg 産生能は低下していないと考察した。

以上の結果を踏まえ, Hiroshima 症例では, 肝細胞において正常に近い量の Fbg が産生されるものの, 肝細胞から分泌された後に血液中でプラスミンによって分解されやすいため, 患者は Fbg 低下症を呈したと結論付けた。この結論は本研究で実施された解析と過去のデータに裏付けられるものであり, 本論文は臨床検査分野において価値のある研究成果であると評価した。

公開学位論文審査会は令和5年7月14日に主査, 副査のほか5名の出席のもとで行われた。審査会の冒頭に上條に本研究の概略を述べさせた後, 主査, 副査から別紙様式第8号に記載した質疑を行った。質疑に対する応答は概ね適切であったため, 本研究の科学的意義とその説明に関して十分な知識を有しているものと評価した。

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

## Factors Associated with Continued Employment Among Persons with Mental Disorders: A Retrospective Cohort Study (精神障害者の就労継続に関連する要因; 後ろ向きコホート研究)

河 埜 康 二 郎

### (論文の内容の要旨)

【背景】我々は精神科デイケアで実施する就労支援プログラム ESPCP (Employment Support Programme in Cooperation with the Public employment service) を開発した。ESPCP の特徴は精神科デイケアがハローワークと連携し, 就労準備プログラム, 就職活動, 就労継続支援を実施する点にある。ESPCP は国内外の研究と比較し就職率や就労継続率が高い傾向がある。本研究の目的は, ESPCP を経て就労した精神障害者の就労継続に関連する要因を検討することである。

【方法】ESPCP 開始後12か月以内に就職した60人を対象に人口統計学的データ, 認知機能 (BACS), 社会機能 (LASMI), 症状の重症度と全般的機能 (mGAF), 内発的動機づけ (QLS), 就労アウトカム (労働時間, 賃金, 継続の有無), サービス提供時間に関するデータを収集した。就労を12か月以上継続した就労継続群と, 継続しなかった退職群に分類し, 各群のデータを比較した。また, 12か月以上の就労継続の有無を従属変数, サービス提供時間 (精神科デイケア, アウトリーチ, 個別カウンセリング) を独立変数とする二項ロジスティック回帰分析を行い, 就労継続に関連する要因を検討した。

【結果】就職した60人のうち12か月を満たない11人を除外した49人が分析対象となり, 就労継続群 (n=43) と退職群 (n=6) の2群に分類された。就労継続群は79.1%が就職後に精神科デイケアを利用しており, 退職群と比較し1か月あたりの利用時間が有意に長かった ( $p=0.01$ )。ロジスティック回帰分析の結果, 就労継続を予測する因子として精神科デイケアが抽出された (オッズ比=1.02, 95%信頼区間=1.00-1.04,  $p=0.04$ )。退職群には転職を希望した者と病状悪化した者が含まれ, 病状の悪化した4人のうち2人は自己判断で服薬量を調整していた。

【考察】先行研究で報告されている就労継続率 (49.3%~66%) と比較し, ESPCP の就職12か月後の継続率は87.7%と高く, 就労継続群の79.1%が精神科デイケアを利用していた。この結果は, ESPCP が精神障害者の就労継続に貢献する可能性を示唆している。ESPCP の特徴である精神科デイケアでの就労準備プログラムは, 就労準備性を強化し, 就労継続に寄与したと考えられる。特に, 精神科デイケアへの習慣的な通所とプログラム参加は, 就労準備性の向上に加えて, スタッフや他の参加者との繋がりを強め, この関係性が就職後の精神科デイケア利用を促進させ, 就労継続

率の高さに貢献したと考えられる。離職を防ぐためには、仕事の満足度、転職希望、服薬アドヒアランス、精神科デイケアに通えない場合のフォローアップに注意を払う必要がある。本研究の限界は、就職後に提供された支援内容を詳細に分析できなかったことや、サンプル数が少なかったこと、潜在的な交絡因子を調べることができなかったことである。

(論文審査の結果の要旨)

河埜康二郎らのグループは精神科デイケアで実施する就労支援プログラム ESPCP (Employment Support Program in Cooperation with the Public employment service) を開発した。現在、海外で主流となっている就労支援は IPS (Individual Placement and Support: 個別就労支援) であるが、IPS と比較した場合の ESPCP の特徴は精神科デイケアがハローワークと連携し、就労準備プログラム、就職活動、就労継続支援を実施する点にある。ESPCP は国内外の研究と比較し就職率や就労継続率が高い傾向がある。そこで河埜康二郎は本研究において、ESPCP を経て就労した精神障害者の就労継続に関連する要因を検討した。

ESPCP 開始後12か月以内に就職した60人を対象に人口統計学的データ、認知機能 (BACS)、社会機能 (LASMI)、症状の重症度と全般的機能 (mGAF)、内発的動機づけ (QLS)、就労アウトカム (労働時間、賃金、継続の有無)、サービス提供時間に関するデータを収集した。就労を12か月以上継続した就労継続群と、継続しなかった退職群に分類し、各群のデータを比較した。また、12か月以上の就労継続の有無を従属

変数、サービス提供時間 (精神科デイケア、アウトリーチ、個別カウンセリング) を独立変数とする二項ロジスティック回帰分析を行い、就労継続に関連する要因を検討した。

その結果、河埜康二郎は以下の結論を得た。

1. 49人が分析対象となり、就労継続群 (n=43) と退職群 (n=6) の2群に分類された。
2. 就労継続群は79.1%が就職後に精神科デイケアを利用しており、退職群と比較し1か月あたりの利用時間が有意に長かった (p=0.01)。
3. ロジスティック回帰分析の結果、就労継続を予測する因子として精神科デイケアが抽出された (オッズ比=1.02, 95%信頼区間=1.00-1.04, p=0.04)。

これらの結果より、ESPCP、特に、精神科デイケアへの習慣的な通所とプログラム参加が、精神障害者の就労継続に貢献する可能性が示唆された。精神科デイケアは就労準備性の向上に加えて、スタッフや他の参加者との繋がりを強め、この関係性が就職後の精神科デイケア利用を促進させ、就労継続率の高さに貢献したと考えられる。

本研究は、ESPCP が精神障害者の就労継続に及ぼす影響をさらに詳細に検討する必要性を示しており、より精緻な支援プログラムの開発に寄与すると共に、精神障害者の就労が頓挫するメカニズムの解明にも貢献することが期待される。したがって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Intermuscular coherence during quiet standing in sub-acute patients after stroke : an exploratory study (亜急性期脳卒中患者の静止立位における筋間コヒーレンス：探索的研究)

山 中 英 士

(論文の内容の要旨)

【背景】脳卒中患者において立位の制御障害は最も頻度の高い障害の一つであり、転倒に関連することが知られている。脳卒中患者の転倒は亜急性期に多く生じることが報告されており、発症後早期からの立位評価と治療介入の重要性が指摘されている。しかしながら、脳卒中患者の立位制御障害の背景にある神経筋制御特性については十分に明らかにされていない。

近年、ヒトの立位の神経筋制御の解明を目的として、筋間コヒーレンス解析の有用性が示されている。筋間コヒーレンス解析は、表面筋電図間の相関性を周波数

帯毎に定量化する手法であり、中枢神経系による複数筋群の同期的制御特性や、それに関連する神経経路を推定できる利点がある。脳卒中患者の立位制御においては、主に麻痺肢の筋活動パターンの異常や、関連する神経経路の非対称性が予測される。そのため、筋間コヒーレンス解析は脳卒中患者の神経筋制御特性を理解するうえで有用な指標となり得る。しかしながら、脳卒中患者の立位における神経筋制御特性について、筋間コヒーレンス解析を用いて検討した報告はない。

そこで、本研究は脳卒中患者の立位における神経筋制御特性とその非対称性を、筋間コヒーレンス解析を

用いて明らかにすることを目的とした。

**【方法】** 対象は回復期リハビリテーション病棟に入院した亜急性期脳卒中患者15名とした。選択基準は初発のテント上脳卒中患者であり、補装具や身体介助なしでの立位保持が1分間以上可能な者とした。立位制御や実験の理解および遂行に影響する可能性のある高次脳機能障害や他の疾患を有する者は除外した。課題は40秒間の静止立位とし、補装具の使用は許可しなかった。立位中の両側前脛骨筋 (TA)、ヒラメ筋 (SL)、内側腓腹筋 (MG) の筋活動を無線筋電計 (Trigno EMG sensor, Delsys, Boston, MA, USA) を使用して計測した。筋活動データの前処理として、立位課題開始後と終了前の各5秒間を除いた30秒間のデータを使用し、ハイパスフィルタ (>20 Hz) を適用後に全波整流を行った。筋間コヒーレンスは、フーリエ変換を用いて得られるオートスペクトラとクロススペクトラによって算出し、 $z$ 変換したコヒーレンス値が95%信頼区間を超えた面積値をデルタ帯域 (0-5 Hz) とベータ帯域 (15-35 Hz) において求めた。なお、デルタ帯域は主に皮質下からの神経入力や脊髄回路からの神経入力を、ベータ帯域は主に皮質からの神経入力 (皮質脊髄路の活動) を反映するとされている。筋間コヒーレンスを算出する筋ペアは、麻痺側および非麻痺側の片側共同筋間 (SL-MG) と片側拮抗筋間 (TA-SL, TA-MG) とした。立位時の神経筋制御の非対称性を検証するために、麻痺側と非麻痺側の筋間コヒーレンスを対応のある  $t$  検定にて比較した。有意水準は5%とした。

**【結果】** 本研究の対象者は軽度～中等度のバランス障害 (Berg Balance Scale:  $45.9 \pm 9.1$ , Center of Pressure 動揺速度 前後方向:  $16.7 \pm 5.62$  mm/s, 左右方向:  $12.0 \pm 6.19$  mm/s) を有していた。

デルタ帯域において、片側拮抗筋間 (TA-MG) のコヒーレンスは麻痺側で非麻痺側と比較して有意に高値を示した。一方、TA-SL と片側共同筋間 (SL-MG) のコヒーレンスは麻痺側と非麻痺側で有意な差を認めなかった。

ベータ帯域において、片側共同筋間 (SL-MG) のコヒーレンスは麻痺側で非麻痺側と比較して有意に低値を示した。一方、片側拮抗筋間 (TA-SL, TA-MG) のコヒーレンスはいずれも麻痺側と非麻痺側で有意な差を認めなかった。

**【考察】** 本研究の結果より、脳卒中患者の静止立位では、麻痺側拮抗筋間の同時収縮制御が非麻痺側と比較

して高いことや、下腿三頭筋に inputs する皮質脊髄路活動に非対称性を有することが明らかとなった。

拮抗筋間の同時収縮制御は、健常者においても恐怖条件下での立位課題や難易度の高い立位課題において増強することが報告されており、関節剛性を高めて安定性を保証する代償的戦略と考えられる。このことから、亜急性期脳卒中患者においては、特に麻痺肢の同時収縮制御を高めることで立位安定性を代償している可能性が示唆された。

また、健常者の立位において、皮質脊髄路の活動を反映するベータ帯域のコヒーレンスは、課題難易度の増加に応じて増強することが報告されている。本研究に参加した亜急性期脳卒中患者は軽度～中等度の立位バランス障害を有しており、静止立位においても課題難易度が高い状態にあったことから、非病巣側大脳皮質による下腿三頭筋の代償的制御が増強していた可能性が示唆された。脳卒中患者においては、病巣側皮質脊髄路の構造的・機能的な障害を有することや、大脳皮質の半球間抑制の異常が運動障害の背景機序として報告されており、立位制御障害においても皮質脊髄路活動の非対称性がその背景機序の一因である可能性が考えられる。

本研究は比較的少ないサンプルサイズでの探索的研究であり、今後は症例を集積しての更なる検討や、リハビリテーションの過程での縦断的変化の検討が求められる。

#### (論文審査の結果の要旨)

最初に申請者から本研究論文の概要の説明が行われた。本研究の主要目的は、筋間コヒーレンスの解析を用いて、脳卒中患者における静止立位制御中の麻痺側下肢と非麻痺側下肢の間の神経筋調節を調べ、差を抽出することであった。本研究の新規アプローチは、筋間コヒーレンス解析を利用して、神経筋活性化パターンと皮質筋制御における非対称性を定量的に評価するところで、探索的研究としての位置づけであった。静止立位姿勢保持中の下肢の筋間コヒーレンス差を精査し、COPパラメータと臨床評価尺度との関連を検討するため、静止立位姿勢保持中の下肢の筋間コヒーレンスデータを収集した。脳卒中患者は機能的作業中に筋肉の皮質制御に非対称性を示すことを考慮すると、ベータ周波数帯域内の筋間コヒーレンスは麻痺肢と非麻痺肢の同期する筋間の変動として現れると仮定した。結果では、ベータ帯域で非麻痺側共同筋群の筋間コヒーレンスが高値に、デルタ帯域で麻痺側拮抗筋群の

筋間コヒーレンスが高値を示した。相関分析で、筋間コヒーレンスを有する一部の筋群と COP パラメータとの間に有意な相関が認められた。主たる成績として、麻痺側拮抗筋（前脛骨筋と腓腹筋）コヒーレンスおよびデルタ帯域内の両側同名筋群（両下肢のヒラメ筋および両下肢の腓腹筋）コヒーレンスが、運動機能尺度、バランススケール、転倒自己効力感、歩行速度などの臨床評価スコアと統計的に有意な相関を示していた。

これらの発表内容と原著論文を照らし合わせて質疑が行われた。足関節の底屈筋群のコントロールによる制御特性を認めたこと、分析にあたって周波数制御を先行研究に従って行ったことに検討の余地が考えられること、アルファ帯域の分析が行われていない理由はなぜか、ベータ帯域もトルクを発揮したときに同じ結

果が起こるのではないかといった疑問点への対応、COP の SD との関連では同時収縮かどうかわからないので考察で解釈するような強収縮ではないのではといったコメント、想定した標本数を確保できなかった理由はなにか、対照群を設定した比較が行われなかった理由等、審査において質疑に対する申請者の応答は真摯に行われ、その説明も論理的であり、本研究の中心的役割を果たして遂行されたことが伺えた。また、筋電図解析を発展させた新規の解析方法による研究であり、今後の研究成果が中枢神経障害に対する理学療法評価に大きく活用されることが期待されるものであることが理解できた。

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。