

浜松医科大学学報

(学位授与記録 第27号)

平成22年5月

国立大学法人
浜松医科大学

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

次の者に博士(医学)の学位を授与したので、学位規則(昭和28年文部省令第9号)第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

(大学院医学系研究科博士課程修了によるもの)

学位記番号	氏名	学位授与年月日	学位論文題目	頁
医博第551号	河島 広 貴	平成21年4月17日	Protein phosphatase inhibitor-1 augments a protein kinase A-dependent increase in the SR Ca ²⁺ loading without changing the SR Ca ²⁺ release (Protein phosphatase inhibitor-1は、筋小胞体のCa ²⁺ 放出を変化させることなく、プロテインキナーゼA依存性に筋小胞体のCa ²⁺ 取り込みを増加させる)	6
医博第552号	浅井 正 嘉	平成21年7月17日	Extracellular acidosis suppresses endothelial function by inhibiting store-operated Ca ²⁺ entry via non-selective cation channels (細胞外アシドーシスは非特異的陽イオンチャネルを介したストア応答性Ca ²⁺ 流入を抑制することにより内皮機能を低下させる)	10
医博第553号	Min Thura	平成21年9月18日	GIF-0173 protects against cerebral infarction through DP1 receptor activation (GIF-0173は脳梗塞に対し、DP1受容体を介し脳保護作用を示す)	14
医博第554号	三崎 太 郎	平成21年9月18日	Decrease in TRADD resulted from ubiquitin-dependent degradation in the obstructive renal injury in rats (閉塞性障害ラット腎におけるユビキチン依存性分解によるTRADDの減少)	17
医博第555号	島村 隆 浩	平成21年10月16日	Overexpression of MUC13 is associated with intestinal-type gastric cancer (MUC13の発現亢進は腸型胃癌に関連する)	21
医博第556号	高井 哲 成	平成21年11月20日	Fecal cyclooxygenase 2 plus matrix metalloproteinase 7 mRNA assays as a marker for colorectal cancer screening (大腸癌スクリーニングのマーカーとして糞便中シクロオキシゲナーゼ2にマトリックスメタロプロテアーゼ7 mRNAを加えた分析)	24
医博第557号	川田 一 仁	平成22年3月9日	Enhanced hepatic Nrf2 activation after ursodeoxycholic acid treatment in patients with primary biliary cirrhosis (原発性胆汁性肝硬変症においてウルソデオキシコール酸は肝Nrf2を活性化する)	27
医博第558号	王 天 英	平成22年3月15日	Temporal increase in ambient GABA during organization of freeze lesion-induced microgyrus in mouse neocortex (凍結損傷で引き起こしたマウス大脳皮質の微小脳回の形成過程における一過性の細胞外GABA濃度の上昇)	30

学位記番号	氏名	学位授与年月日	学位論文題目	頁
医博第559号	川端俊貴	平成22年3月15日	Optical diagnosis of gastric cancer using near-infrared multichannel Raman spectroscopy with a 1064-nm excitation wavelength (1064 nmの励起波長による近赤外マルチチャンネルラマン分光法を用いた胃癌の光学的診断)	33
医博第560号	中西啓	平成22年3月15日	Identification of 11 novel mutations in <i>USH2A</i> among Japanese patients with Usher syndrome type 2 (日本人アッシャー症候群タイプ2患者の <i>USH2A</i> 遺伝子における11種の新規遺伝子変異の同定)	36
医博第561号	梶塚正誠	平成22年3月15日	Serum levels of platelet-derived growth factor BB homodimers are increased in male children with autism (血清中の血小板由来増殖因子BBホモ二量体濃度は自閉症男児において上昇する)	39
医博第562号	藤田梓	平成22年3月15日	Decreased serum levels of adiponectin in subjects with autism (自閉症患者における血清アディポネクチン濃度の低下)	41
医博第563号	天野慎士	平成22年3月15日	Use of genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells for glioma gene therapy (遺伝子導入骨髄間葉系幹細胞を用いた神経膠腫に対する遺伝子治療)	44
医博第564号	孫焯	平成22年3月15日	Different striatal D ₂ receptor function in an early stage after unilateral striatal lesion and medial forebrain bundle lesion in rats (ラット片側パーキンソンモデル後早期におけるドパミンD ₂ 受容体機能：線条体破壊モデルと内側前脳束破壊モデルの違い)	47
医博第565号	谷春雨	平成22年3月15日	Therapeutic effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in rat experimental leptomenigeal glioma model (遺伝子導入間葉系幹細胞を用いたラットグリオーマ髄腔内播種モデルの治療効果)	50
医博第566号	小林祥	平成22年3月15日	Temporal-spatial expression of presenilin 1 and the production of amyloid- β after acute spinal cord injury in adult rat (成熟ラット急性脊髄損傷におけるプレセニリン1とその生成物アミロイド β の経時的部位的発現)	53
医博第567号	猿川潤一郎	平成22年3月15日	A longitudinal analysis of urinary biochemical markers and bone mineral density in STR/Ort mice as a model of spontaneous osteoarthritis (自然発症変形性膝関節症モデルであるSTR/Ortマウスにおける尿中生化学マーカー及び骨密度の縦断的検討)	55
医博第568号	浦岡雅博	平成22年3月15日	Landirolol, an ultra short acting β 1-blocker, improves pulmonary edema after cardiopulmonary resuscitation with epinephrine in rats (超短時間作用型 β 1遮断薬ランジオロールはエピネフリンを用いたラットの心肺蘇生において肺水腫を改善する)	58

学位記番号	氏名	学位授与年月日	学位論文題目	頁
医博第569号	佐野 秀樹	平成22年3月15日	Evaluation of the hypnotic and hemodynamic effects of dexmedetomidine on propofol-sedated swine (プロポフォール鎮静下のブタにおけるデクスメドトミジン投与の鎮静、血行動態への影響)	61
医博第570号	劉 寧	平成22年3月15日	Chk1-mediated phosphorylation of Mig-6 is involved in regulation of EGF signaling (Chk1を介するMig-6のリン酸化は、EGFシグナル伝達経路の制御に関与する)	64
医博第571号	後藤 正憲	平成22年3月15日	Altered expression of the human base excision repair gene <i>NTH1</i> in gastric cancer (胃がんにおけるヒト塩基除去修復遺伝子 <i>NTH1</i> の発現異常)	67
医博第572号	阿久澤 聡	平成22年3月15日	Interleukin-1 receptor antagonist attenuates the severity of spinal cord ischemic injury in rabbits (インターロイキン-1受容体拮抗薬はウサギ脊髄虚血傷害の重症度を軽減させる)	70
医博第573号	田中 晶	平成22年3月15日	Inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by activated factor XII plays a role in the enhancement of fibrinolysis by contact factors in-vitro (活性化XII因子によるプラスミノゲンアクチベーターインヒビタータイプ1の不活性化はin-vitroにおける接触因子による線溶活性の増強に寄与する)	72
医博第574号	村上 浩雄	平成22年3月15日	Antitumor effect of photodynamic therapy in mice using direct application of Photofrin dissolved in lidocaine jelly (マウスにおけるリドカインゼリー溶解フォトフリンの局所投与による光線力学療法の抗腫瘍効果)	75
医博第575号	柴田 陽介	平成22年3月15日	Physical activity and cardiovascular disease in Japan (日本における身体活動と循環器疾患)	78
医博第576号	Walid Husein Ali Ahmed	平成22年3月15日	Simultaneous analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析法による毒キノコ中の α -アマニチン、 β -アマニチンならびにファロイジンの同時分析に関する研究)	81
医博第577号	相良 大輔	平成22年3月15日	Trans-serosal leakage of proinflammatory mediators into a bowel bag during abdominal aortic aneurysm repair: Role of phospholipase A_2 in activating leukocytes (腹部大動脈瘤手術中の腸バッグへの炎症性メディエーターの経漿膜的漏出: 好中球を活性化させるホスホリパーゼ A_2 の役割)	84
医博第578号	高橋 典男	平成22年3月15日	Effects of thyroid hormone on the activity of CYP3A enzyme in humans (甲状腺ホルモンがヒトのCYP3A酵素活性に及ぼす影響について)	87

博士(医学) 河島 広 貴

論文題目

Protein phosphatase inhibitor-1 augments a protein kinase A-dependent increase in the SR Ca^{2+} loading without changing the SR Ca^{2+} release

(Protein phosphatase inhibitor-1 は、筋小胞体の Ca^{2+} 放出を変化させることなく、プロテインキナーゼ A 依存性に筋小胞体の Ca^{2+} 取り込みを増加させる)

論文の内容の要旨

[はじめに]

心筋細胞内 Ca^{2+} 調節の異常は、心不全の病態において重要な役割を有する。不全心筋においては筋小胞体 (SR) の Ca^{2+} 含有量の低下と細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇が認められるが、これらの変化は SR への Ca^{2+} 取り込みを担う SR Ca^{2+} ATPase (SERCA) 機能の低下および SR からの Ca^{2+} 放出を担うリアノジン受容体 (RyR) からの Ca^{2+} 漏出の増加が原因と考えられている。従って、不全心筋の Ca^{2+} 代謝を改善させるためには、RyR からの Ca^{2+} 漏出を増加させることなく SR への Ca^{2+} 取り込みを促進することが求められる。心筋細胞における SERCA の機能は、その調節蛋白であるホスホランパン (PLB) のリン酸化により調節されており、交感神経刺激時には、 β 受容体とその細胞内伝達物質であるプロテインキナーゼ A (PKA) やカルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) により PLB がリン酸化されて機能が促進する一方、蛋白脱リン酸化酵素 (PP: protein phosphatase) 1, 2A により PLB が脱リン酸化を受けると機能は低下する。実際、心不全では PP1, PP2A 活性の促進と PLB の脱リン酸化が報告されている。一方、SR からの Ca^{2+} 漏出の増加は、PKA, CaMKII により RyR が過剰にリン酸化を受けることが原因と考えられている。PP 阻害薬は、PLB のリン酸化を促進して SR への Ca^{2+} 取り込みを増加させると期待されるが、反面、RyR のリン酸化により Ca^{2+} 漏出を増加させることも予想される。細胞内脱リン酸化抑制蛋白である inhibitor-1 (I-1) は、PP1 に選択的な阻害作用を持つことが報告されている。しかし、これまで I-1 の SR 機能への影響を検討した研究は行われていない。本研究は、心不全治療における PP 阻害薬の可能性を探る目的で、(1) 非選択的 PP 阻害薬である calyculin A (Caly A) の電気刺激時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化 (Ca^{2+} transient) と細胞収縮に及ぼす効果、(2) I-1 が、SR の Ca^{2+} 含有量と Ca^{2+} 放出に及ぼす効果を検討した。

[材料と方法]

正常細胞: コラゲナーゼによりラット心室筋細胞を分離した後、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素の fluo-3/AM (20 μM) を 30 分間室温で負荷した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、共焦点レーザー顕微鏡の line scan mode を使用して fluo-3 の蛍光強度の変化を測定し、pseudo-ratio 法により算出した。また、細胞収縮は、line scan 画像上の細胞長径の変化より求めた。細胞を 1 mM の Ca^{2+} を含有する HEPES 液にて灌流し、 Ca^{2+} transient と細胞収縮を測定した。スキンド細胞: 単離心筋細胞に対しサポニンにより化学的に細胞膜除去を行った。細胞内液の灌流により細胞内 Ca^{2+} 濃度を 50 nM に固定した。SR の Ca^{2+} 含有量は caffeine 投与時の Ca^{2+} transient (CaffCaT) より、SR からの Ca^{2+} 放出は Ca^{2+} spark の動態より評価した。

[実験結果]

(1) イソプロテレノール (ISO; 10 nM) と Caly A の Ca^{2+} 動態と細胞収縮に及ぼす効果: ISO の灌流

により Ca^{2+} transient のピーク値、細胞収縮、 Ca^{2+} 濃度減衰速度は増加し、拡張期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は低下した。ISO に Caly A を追加投与することにより Ca^{2+} transient の peak 値と細胞収縮はさらに増加したが、拡張期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と Ca^{2+} 濃度減衰速度は変化しなかった。

- (2) PKA catalytic subunit (PKA_{cat}) および I-1 の SR Ca^{2+} 含有量に及ぼす効果: PKA_{cat} 5-50 U/ml 灌流により、CaffCaT は用量依存性に増加した。 PKA_{cat} 5-10 U/ml 灌流後に I-1 (1.6 nM) を追加投与することにより、CaffCaT はさらに増加したが、I-1 単独あるいは、 PKA_{cat} 50 U/ml 灌流後の I-1 投与では CaffCaT は変化しなかった。
- (3) PKA_{cat} 及び I-1 の Ca^{2+} spark に及ぼす効果: PKA_{cat} (10, 50 U/ml) の灌流により Ca^{2+} spark の頻度は増加した。 PKA_{cat} (50 U/ml) の灌流では Ca^{2+} spark のピーク値は上昇し、減衰時間が延長した。I-1 の追加投与により Ca^{2+} spark の頻度はさらに増加したが、 Ca^{2+} spark のピーク値、減衰時間は影響を受けなかった。
- (4) SR の Ca^{2+} 取り込み阻害時の Ca^{2+} spark の頻度および CaffCaT の減衰と両者の関係: PKA_{cat} 灌流後の Ca^{2+} spark の頻度および CaffCaT は、SERCA を阻害する cyclopiazonic acid (CPA: 10 μM) 投与により時間依存性に減少したが、I-1 存在下でもそれらの減衰速度に差はなかった。また、CPA 投与後の経過時間ごとの Ca^{2+} spark の頻度と CaffCaT の関係は、 PKA_{cat} 単独と I-1 存在下で差を認めなかった。

[考察]

正常細胞において Caly A は、拡張期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させることなく、ISO の陽性変力作用を増強した。しかし、Caly A は PP の非選択的阻害薬であり、かつ非特異的作用を有する可能性があるため、スキンド細胞において選択的 PP1 阻害薬である I-1 の効果を検討した。 PKA_{cat} の灌流は SR の Ca^{2+} 含有量および Ca^{2+} 放出をともに増加させた。SR の Ca^{2+} 放出の増加は、SR の Ca^{2+} 含有量の増加によることが考えられるが、高濃度 PKA_{cat} の灌流は Ca^{2+} spark の特徴も変化させたため、RyR への直接作用が考慮される。一方、I-1 の追加投与は、SR の Ca^{2+} 含有量をさらに増加させ、 Ca^{2+} 放出を促進した。しかし、 Ca^{2+} spark の特徴を変化させず、また SERCA 阻害後の Ca^{2+} spark の頻度および CaffCaT の減衰とその関係に影響しなかったことから、I-1 は、RyR に対して大きな作用をしないと考えられた。

[結論]

心不全治療において、 β 受容体刺激は、PKA を介して一過性には収縮能および拡張能を改善させるが、SR からの Ca^{2+} 漏出を増加させて Ca^{2+} 過負荷をきたすため、慢性的には心毒性作用がある。一方、PP1 の選択的阻害は、PLB をリン酸化することにより SERCA の機能を促進して SR の Ca^{2+} 含有量を増加させるが、SR からの Ca^{2+} 漏出を大きくは増加させないことが示された。今後、I-1 の細胞内発現の増加や選択的 PP1 阻害薬の開発が、細胞内 Ca^{2+} 代謝の改善により新たな心不全治療となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

不全心筋においては筋小胞体 (SR) の Ca^{2+} 含有量の低下と細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇が認められるが、これらの変化は SR への Ca^{2+} 取り込みを担う SR Ca^{2+} ATPase (SERCA) 機能の低

下および SR からの Ca^{2+} 放出を担うリアノジン受容体 (RyR) からの Ca^{2+} 漏出の増加が原因と考えられている。心筋細胞における SERCA の機能は、ホスホランパン (PLB) のリン酸化による取り込み促進と蛋白脱リン酸化酵素 (PP: protein phosphatase) 1, 2A による抑制作用により調節されている。一方、SR からの Ca^{2+} 漏出は、RyR のリン酸化による排出作用により調節されている。そこで、申請者は非選択的 PP 阻害薬である calyculin A (Caly A) および PP1 の選択的阻害薬である inhibitor-1 (I-1) の SR 機能への影響を検討した。

正常細胞: コラゲナーゼによりラット心室筋細胞を分離した後、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素の fluo-3/AM を 30 分間室温で負荷した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、共焦点レーザー顕微鏡の line scan mode を使用して fluo-3 の蛍光強度の変化を測定し、pseudo-ratio 法により算出した。また、細胞収縮は、line scan 画像上の細胞長径の変化より求めた。細胞を 1 mM の Ca^{2+} を含有する HEPES 液にて灌流し、 Ca^{2+} transient と細胞収縮を測定した。

スキンド細胞: 単離心筋細胞に対しサポニンにより化学的に細胞膜除去を行った。細胞内液の灌流により細胞内 Ca^{2+} 濃度を 50 nM に固定した。SR の Ca^{2+} 含有量は caffeine 投与時の Ca^{2+} transient (CaffCaT) より、SR からの Ca^{2+} 放出は Ca^{2+} spark の動態より評価した。

以下の結果を得た。

- 1) イソプロテレノール (ISO) の灌流により Ca^{2+} transient のピーク値、細胞収縮、 Ca^{2+} 濃度減衰速度は増加し、拡張期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は低下した。ISO に Caly A を追加投与することにより Ca^{2+} transient の peak 値と細胞収縮はさらに増加したが、拡張期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と Ca^{2+} 濃度減衰速度は変化しなかった。
- 2) PKA catalytic subunit (PKA_{cat}) 灌流により、CaffCaT は用量依存性に増加し、 PKA_{cat} 灌流後に I-1 を追加投与することにより、CaffCaT はさらに増加した。
- 3) PKA_{cat} の灌流により Ca^{2+} spark の頻度は増加した。 PKA_{cat} の灌流では Ca^{2+} spark のピーク値は上昇し、減衰時間が延長した。I-1 の追加投与により Ca^{2+} spark の頻度はさらに増加したが、 Ca^{2+} spark のピーク値、減衰時間は影響を受けなかった。

以上の結果から、PP1 の阻害薬は PLB をリン酸化することにより SERCA の機能を促進して SR の Ca^{2+} 含有量を増加させるが、SR からの Ca^{2+} 漏出を増加させなかった。

審査委員会では、細胞内 Ca^{2+} 代謝の改善作用を有した PPI 阻害薬が新たな心不全治療の候補となることを示したものであることを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 細胞内カルシウム濃度測定法について
- 2) Inhibitor-1 の作用について
- 3) Inhibitor-1 の組織分布について
- 4) PKA と PP1 関係について
- 5) PP1 のホスホランパンおよびリアノジンへの作用について
- 6) 不全心筋におけるリアノジン受容体の感受性について
- 7) カテコラミン関連薬物とリアノジン受容体の感受性との関係について
- 8) Calyculin A を実験に使用した理由について
- 9) Cyclopiazonic acid の作用について
- 10) 単離心室細胞の処理方法と収縮能について

- 11) Calyculin A による拡張期 $[Ca^{2+}]_i$ への影響について
- 12) 不全心筋における inhibitor-1 の効果について
- 13) 心不全時の PKA 活性の変化について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梅村 和夫
副査 佐藤 重仁 副査 山本 清二

博士(医学) 浅井正嘉

論文題目

Extracellular acidosis suppresses endothelial function by inhibiting store-operated Ca^{2+} entry via non-selective cation channels

(細胞外アシドーシスは非特異的陽イオンチャネルを介したストア応答性 Ca^{2+} 流入を抑制することにより内皮機能を低下させる)

論文の内容の要旨

[目的]

血管内皮は臓器血流や透過性の調節、血栓形成や白血球浸潤の防御など、血管や組織の恒常性の維持に重要であることが報告されている。これらの血管内皮機能は、血管内皮で産生される一酸化窒素 (nitric oxide: NO)、プロスタグランジン I_2 (prostaglandin I_2 : PG I_2) といった内皮由来血管弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF) によって制御され、EDRF は内皮細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化によって調節されている。

アシドーシスは、低酸素、虚血、代謝異常などの様々病態により引き起こされる。このような病態下において、血液と絶えず接する血管内皮は酸性環境に最も曝露されやすいが、アシドーシスにおける血管内皮機能については、未だ不明な点が多い。本研究では、アシドーシス下の血管内皮機能を明らかにするため、酸性下における血管内皮 Ca^{2+} 応答と EDRF 産生について検討することを目的とした。

[方法]

対象として初代培養ブタ大動脈血管内皮細胞を使用した。血管内皮細胞 Ca^{2+} 応答のアゴニストとして G 蛋白共役型受容体依存性のブラジキニン (BK) と細胞内 Ca^{2+} ストア部位の Ca^{2+} ATPase 阻害剤のタブシガルギン (TG) を用いた。細胞内 pH (pH_i) は蛍光色素である BCECM/AM を、細胞内 Ca^{2+} 濃度は蛍光色素 fura-2/AM を用いて測定した。NO の測定には蛍光色素の DAF-FM/DA を用い、 PGI_2 の測定には、その代謝産物である 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ を酵素免疫測定法により測定した。細胞外 pH (pH_o) の変化には pH 6.4、6.9 および 7.4 に調整した HEPES 溶液を使用し、細胞内 pH (pH_i) の変化にはプロピオン酸 (20 mmol/L) を用いた。

[結果]

- (1) BK (10 nmol/L) 刺激による内皮細胞内 Ca^{2+} 応答は、 pH_o 6.9、6.4 において $30 \pm 15\%$ 、 $80 \pm 4\%$ 減弱した ($P < 0.001$ vs. pH_o 7.4)。また、TG (1 $\mu\text{mol/L}$) 刺激による内皮細胞内 Ca^{2+} 応答は、 pH_o 6.9、6.4 において $23 \pm 9\%$ 、 $97 \pm 1\%$ 減弱した ($P < 0.001$ vs. pH_o 7.4)。また、これら酸性下における内皮細胞内 Ca 応答抑制作用は pH_o 7.4 により直ちに解除された。
- (2) BK 刺激による NO 産生は、 pH_o 6.9、6.4 において $38 \pm 3\%$ 、 $91 \pm 2\%$ 抑制された ($P < 0.001$ vs. pH_o 7.4) PGI_2 産生は、 pH_o 6.9、6.4 において $55 \pm 15\%$ 、 $77 \pm 29\%$ 抑制された ($P < 0.001$ vs. pH_o 7.4) また、これら酸性下における NO 産生抑制作用は pH_o 7.4 により直ちに解除された。
- (3) 細胞外 Ca^{2+} free 溶液においては、BK および TG によって惹起される細胞内 Ca^{2+} ストア部位からの Ca^{2+} 放出は、 pH_o 6.4、6.9 の影響を受けなかった。
- (4) pH_o 7.4 のプロピオン酸は、 pH_i を 7.3 から 6.9 まで低下させた。しかし、この細胞内アシドーシス

は、BK と TG による Ca^{2+} 応答、および NO 産生に影響を与えなかった。

[考察]

血管内皮細胞内 Ca^{2+} 応答はストア応答性 Ca^{2+} 流入と呼ばれる機序によって調節されている。これは、細胞内 Ca^{2+} ストア部位から細胞質への Ca^{2+} 放出によって生じたストア内の Ca^{2+} 枯渇が、細胞外からの Ca^{2+} 流入を惹起すると考えられている。本実験において、細胞外アシドーシスが、細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出に影響せず、細胞外からの Ca^{2+} 流入のみを可逆的に抑制することが確認された。また、細胞外アシドーシスによる血管内皮 Ca^{2+} 応答抑制により、NO、 PGI_2 といった EDRF 産生も抑制されることが示された。

血管内皮細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇は、細胞間結合を変化させ血管透過性を亢進させる。本実験結果から、心筋梗塞などの虚血部位で生ずる局所的アシドーシスは、血管内皮細胞内 Ca^{2+} 応答の低下により血管透過性を抑制し、隣接する組織に対し保護的に作用していることが予想された。また、虚血からの再灌流において、アシドーシスからの急激な回復は、血管内皮細胞内への急峻な Ca^{2+} 濃度の上昇とそれに伴う EDRF の過剰産生により、組織血流の過灌流や血管透過性の亢進が生じ、組織再灌流障害の誘引となり得ることが考えられた。

細胞外アシドーシスがストア応答性 Ca^{2+} 流入を抑制する機序については、今回明らかにされなかった。 Na^+/H^+ 交換機構を介して、細胞外 H^+ によって惹起される細胞内 Na^+ 濃度の減少が、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) を介した外向きの Ca^{2+} 電流を刺激していることが考えられる。これがアシドーシスにおける細胞内への Ca^{2+} 流入抑制の一因となる可能性が考えられた。しかし、本実験で、細胞外アシドーシスで細胞内 pH が影響を受けなかったことを確認しており、 Na^+/H^+ 交換機構が作動しているとは言い難い。さらに、我々は、 Na^+ を Li^+ に置換えた細胞外溶液下で、TG による細胞内 Ca^{2+} 応答に影響されないことを以前に報告しており、血管内皮細胞 Ca^{2+} 応答に NCX が関与する可能性は極めて少ないと考えている。これらのことから、アシドーシスにおける Ca^{2+} 応答抑制においても NCX が関与している可能性は少ないと考えられた。

[結論]

細胞内でなく細胞外のアシドーシスは、ストア応答性 Ca^{2+} 流入を抑制することにより、血管内皮機能を抑制することが明らかにされた。これらの結果は、アシドーシスを生じる様々な病態の解明に有用であると思われる。

論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞は様々な機構により、血管の透過性、血流量を積極的に調節し、臓器や生体の恒常性の維持に関わる。一酸化窒素 (nitric oxide: NO) とプロスタグランジン I_2 (prostaglandin I_2 : PGI_2) も血管内皮で産生される血管弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF) として血流量の調節に関わるが、その合成はいずれも内皮細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) により調節されている。血管内皮 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 応答は、刺激に応じて細胞内 Ca^{2+} ストア部位から細胞質へ Ca^{2+} が放出されることにより生じたストア内の Ca^{2+} 枯渇が、非特異的二価陽イオンチャネルを通じた細胞外からの Ca^{2+} 流入を惹起する (store-operated Ca^{2+} entry: SOCE) ことによると考えられている。血管閉塞時には、末梢組織と共に血管内皮も酸性環境に曝露されやすいが、アシドーシスにおける血

管内皮機能については詳細な検討がない。本研究では、アシドーシス下の血管内皮機能を明らかにするため、酸性下における血管内皮 Ca^{2+} 応答とEDRF 産生について検討した。

[材料ならびに方法]

初代培養ブタ大動脈血管内皮細胞を使用した。血管内皮細胞 Ca^{2+} 応答のアゴニストとして G 蛋白共役型受容体依存性のブラジキニン (BK) と細胞内 Ca^{2+} ストア部位の Ca^{2+} ATPase 阻害剤のタプシガルギン (TG) を用いた。細胞内 pH (pH_i) は蛍光色素である BCECM/AM を、 $[\text{Ca}^{++}]_i$ は蛍光色素 fura-2/AM を用いて測定した。NO 産生量は蛍光色素の DAF-FM/DA を用いて測定した。PGI₂ 産生量は、その代謝産物である 6-ketoPGF_{1 α} を酵素免疫測定法により測定することにより推定した。細胞外 pH (pH_o) は pH 6.4、6.9 および 7.4 に調整した HEPES/NaOH 緩衝液を使用し変化させ、細胞内 pH (pH_i) はプロピオン酸 (20 mM) を用いて変化させた。

[結果と考察]

- (1) BK (10 nM) 刺激による内皮 $[\text{Ca}^{++}]_i$ 応答は、 pH_o 6.9、6.4 においては、 pH_o 7.4 に比し $30 \pm 15\%$ 、 $80 \pm 4\%$ 減弱した ($P < 0.001$)。また TG (1 μM) 刺激による内皮 $[\text{Ca}^{++}]_i$ 応答は、 pH_o 6.9、6.4 において pH_o 7.4 に比し、 $23 \pm 9\%$ 、 $97 \pm 1\%$ 減弱した ($P < 0.001$)。これら酸性下における内皮細胞内 Ca 応答抑制作用は pH_o 7.4 に戻すことにより直ちに解除された。
- (2) BK 刺激による NO 産生は、 pH_o 6.9、6.4 において pH_o 7.4 に比し、 $38 \pm 3\%$ 、 $91 \pm 2\%$ 抑制された ($P < 0.001$)。PGI₂ 産生は、 pH_o 6.9、6.4 において pH_o 7.4 に比し、 $55 \pm 15\%$ 、 $77 \pm 29\%$ 抑制された ($P < 0.001$)。また、これら酸性下における NO 産生抑制作用は pH_o 7.0 に戻すことにより直ちに解除された。
- (3) 細胞外 Ca^{2+} free 下に BK および TG により刺激すると、細胞内 Ca^{2+} ストア部位からの Ca^{2+} 放出による内皮 $[\text{Ca}^{++}]_i$ 応答のみが認められ、これは、 pH_o 6.4、6.9 の影響を受けなかった。
- (4) 上記細胞外 pH の変動時には細胞内 pH の変動は認められなかったが、 pH_o 7.4 のプロピオン酸処理により、 pH_i は 7.3 から 6.9 まで低下した。しかしこの細胞内アシドーシスは、BK と TG による Ca^{2+} 応答、および NO 産生に影響を与えなかった。

[考察]

血管内皮細胞におけるストア応答性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) と呼ばれる細胞内 Ca^{2+} 応答において、細胞外アシドーシスは、細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出に影響せず、細胞外からの Ca^{2+} 流入のみを可逆的に抑制することが確認された。また、同機序による NO 及び PGI₂ の EDRF 産生も細胞外アシドーシスにより抑制されることが示された。その詳細な機構は今回明らかにされなかったが、細胞外アシドーシス時に細胞内 pH が影響を受けなかったことから、細胞外 H^+ によって惹起される Na^+/H^+ 交換機構を介した細胞内 Na^+ 濃度の減少が、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) を介した外向きの Ca^{2+} 電流を刺激し、アシドーシス時の細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制するという従来の仮説は否定的であった。

以上より申請者らは、細胞外のアシドーシスはストア応答性 Ca^{2+} 流入を抑制することにより、血管内皮機能を抑制するとし、これらの結果は、アシドーシスを生じる様々な病態の解明に有用であるとしている。

審査委員会は、アシドーシス時の血管内皮細胞の応答性の変化を詳細に検討し、ストア応答性

Ca²⁺ 流入が抑制されることにより血管内皮機能が抑制されるという新規の現象を、申請者らが初めて明らかにした点を高く評価した。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

- 1) 使用した蛍光色素の蛍光強度に及ぼす pH の影響
- 2) 信号伝達に関わる細胞内酵素に対する pH の影響
- 3) プロピオン酸の作用機序
- 4) ブタ大動脈血管内皮細胞の継代に伴う機能変化について
- 5) 血管内皮細胞の細胞内 Ca²⁺ ストアの特徴について
- 6) BK と TG 刺激時の [Ca²⁺]_i 変動パターンの相違とその理由
- 7) TG 刺激下に pH_o 6.4 にすると [Ca²⁺]_i が低下する理由
- 8) 実験の N 数はどのように決めたか
- 9) SOCE と、心筋細胞における Ca²⁺ -induced Ca²⁺ release との相違
- 10) 本機構の生理的意味合いについて

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 浦野 哲盟
副査 川上 純一 副査 海野 直樹

博士(医学) Min Thura

論文題目

GIF-0173 protects against cerebral infarction through DP1 receptor activation

(GIF-0173 は脳梗塞に対し、DP1 受容体を介し脳保護作用を示す)

論文の内容の要旨

[はじめに]

シクロペンテンン構造を持つプロスタグランジン PGI_2 の誘導体である GIF-0173 は、*in vitro* の実験において強い神経突起伸張作用を有し、さらに GIF-0173 は抗アポトーシス作用も持った化合物であるということが報告されている。しかし脳梗塞急性期における効果について検討はされておらず、そこで今回の研究で GIF-0173 の脳梗塞急性期への影響を検討するとともに、そのメカニズム解明を行った。

[材料ならびに方法]

in vivo の実験には Sprague-Dawley 雄性ラット 8 週齢を供した。脳梗塞モデルには photochemical induced thrombosis (PIT) モデルを用いた。脳梗塞モデル作製直後に左大腿静脈に留置したカニューレより GIF-0173 を投与した。投与後 24 時間目に神経症状をスコア化し、麻痺症状を評価した。その後に 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride で染色し、コンピュータ解析により脳梗塞サイズを計測した。

GIF-0173 の脳血流に対する影響は、ペナンプラ領域に留置したレーザードップラー血流計にて脳血流を測定することで評価を行った。PIT モデル作製直後 GIF-0173 を投与し、連続的に 1 時間目まで脳血流、血圧および心拍数を測定した。

in vitro の実験では Wistar 雄性ラット 1 日齢を供した。エーテル麻酔下に大脳を摘出し、ホモジナイズした大脳皮質神経細胞を培養した。培養開始から 10~14 日目に初代培養神経細胞を実験に用いた。

神経細胞の形態学的変化は微分干渉顕微鏡を用いて検討を行った。観察開始 20 分前に GIF-0173 (最終濃度 $0.03\sim 0.3 \mu\text{mol/L}$) を滴下し、 37°C 、二酸化炭素濃度 5 % の条件下にて培養を行った。そしてグルタミン酸滴下による神経細胞の変化を、4 分間隔で 20 分間観察した。

細胞死率は propidium iodide (PI) 染色により観察を行った。グルタミン酸刺激の 20 分前に GIF-0173 を滴下し、6 時間培養を行い、核内に取り込まれた PI を指標に細胞死率を算出した。

細胞内カルシウムイオン濃度の測定には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。実験開始 20 分前に GIF-0173 を滴下し、カルシウム指示薬である Fluo-3 AM により染色される神経細胞内のカルシウムを実験前と比較し、検討を行った。

[結果]

脳梗塞モデルを用いた *in vivo* の実験では、GIF-0173 の投与により用量依存的に 24 時間目における神経症状および脳梗塞サイズの改善を認めた。しかし、GIF-0173 は投与から 1 時間目までペナンプラ領域の脳血流に影響をおよぼさなかった。

in vitro の実験では、神経細胞に対し GIF-0173 は細胞腫脹および細胞死を用量依存的に抑制した。また、GIF-0173 はグルタミン酸刺激による細胞内カルシウム流入を用量依存的に抑制した。

しかし GIF-0173 は N-メチル-D-アスパラギン酸およびカイニン酸刺激による細胞内カルシウム流入を抑制しなかった。GIF-0173 が持つ細胞内へのカルシウム流入抑制作用はプロスタグランジン D2 受容体拮抗薬、BWA868C により減じた。また、プロスタグランジン D1 受容体作動薬である BW245C は GIF-0173 同様に、グルタミン酸による細胞内カルシウム流入を抑制した。小胞体の SERCA ポンプ阻害薬であるタプシガルジンを併用することにより GIF-0173 が持つ細胞内へのカルシウム流入抑制作用を減じた。

[考察]

GIF-0173 はプロスタグランジン J₂ 誘導体であることから、プロスタグランジン D 受容体への影響を検討したところ、GIF-0173 はプロスタグランジン D2 受容体拮抗薬により細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑えられ、またプロスタグランジン D1 受容体作動薬は GIF-0173 同様、グルタミン酸刺激によるカルシウム流入を抑制した。また SERCA ポンプの阻害薬を用いることで GIF-0173 のカルシウム流入抑制作用が減じた。このことから GIF-0173 はプロスタグランジン D1 受容体を介し、小胞体に存在する SERCA ポンプの機能を増強することで、細胞内のカルシウム上昇を抑えていることが示唆された。

[結論]

本研究においてプロスタグランジン J₂ 誘導体である GIF-0173 が脳梗塞急性期において脳保護作用を持つ化合物であることが初めて明らかとなった。またこの作用はプロスタグランジン D1 を介することで神経細胞を直接的に保護しており、今後 GIF-0173 が脳梗塞急性期における治療薬となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

プロスタグランジン J₂ の誘導体である GIF-0173 は、*in vitro* の実験において強い神経突起伸展作用を有することが知られている。GIF-0173 には神経細胞のアポトーシス抑制作用も報告されている。しかし、脳梗塞急性期におこるネクローシスへの効果について検討はされていない。そこで申請者は、GIF-0173 の脳梗塞急性期への影響を検討し、そのメカニズムの解析を行った。

脳梗塞モデルは Sprague-Dawley 雄性ラット 8 週齢を用いて、photochemical induced thrombosis (PIT) により作製し、脳梗塞モデル作製直後に左大腿静脈に留置したカニューレより GIF-0173 を投与した。

24 時間後に神経症状をスコア化して定量的に評価し、脳梗塞サイズは、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色法を用い、非染色部位の面積をコンピュータ計測して評価した。また、脳血流に対する影響は、血圧、心拍数に加えて、ペナンプラ領域に留置したレーザードップラー血流計にて脳血流を測定して評価を行った。その結果、GIF-0173 の投与により用量依存的に 24 時間後の神経症状および脳梗塞サイズの改善を認めた。しかし、1 時間後のペナンプラ領域の脳血流には影響をおよぼさなかった。

GIF-0173 の脳梗塞急性期での保護効果のメカニズムを解析するため、グルタミン酸神経毒性による細胞ネクローシスへの作用を検討した。Wistar 雄性ラット 1 日齢から大脳を摘出して培養し、培養開始後 10-14 日の初代培養神経細胞を実験に用いた。グルタミン酸添加 20 分前に GIF-0173 (最終濃度 0.03-0.3 μ mol/L) を添加し、37°C、二酸化炭素濃度 5% の条件下において細胞ネクローシスへの作用を観察した。

グルタミン酸滴下による神経細胞の形態学的変化を微分干渉顕微鏡を用いて 4 分間隔で 20

分間観察し、細胞死は6時間後に核内に取り込まれた propidium iodide (PI) を指標にして細胞死率を算出した。GIF-0173 はネクロシスに認められる細胞腫脹および PI の核内取り込みを用量依存的に抑制した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いカルシウム指示薬である fluo-3 を負荷した細胞の細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化を測定した。GIF-0173 はグルタミン酸刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を用量依存的に抑制したが、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) およびカイニン酸刺激による細胞外からの Ca^{2+} 流入は抑制しなかった。プロスタグランジン D_2 受容体 (DP1 および DP2) の非選択的拮抗薬、BWA868C 存在下では GIF-0173 はグルタミン酸刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制しなかった。一方、DP1 受容体選択的作動薬である BW245C は GIF-0173 同様に、グルタミン酸による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制した。また、小胞体の Ca^{2+} ポンプ阻害薬であるタプシガルジンはグルタミン酸神経毒性に対する GIF-0173 の抑制作用を減弱した。

以上からプロスタグランジン J_2 誘導体である GIF-0173 は、プロスタグランジン D_2 の DP1 受容体を介し、小胞体に存在する Ca^{2+} ポンプの機能を増強することで、グルタミン酸による $[Ca^{2+}]_i$ 過剰の結果として起こるネクロシス性の神経毒性を抑制することが示唆された。

審査委員会では、申請者がプロスタグランジン J_2 誘導体である GIF-0173 が脳梗塞急性期において脳保護作用を持つことを初めて示し、さらに、この作用が DP1 受容体を介した神経細胞への直接作用であることを明らかにしたことにより、今後 GIF-0173 が脳梗塞急性期における治療薬となる可能性に示唆を与えた点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) GIF-0173 の体内動態・代謝経路について
- 2) 脳梗塞モデルにおける GIF-0173 の作用は他の脳保護剤と比較してどうか
- 3) 線条体の梗塞巣に対しての GIF-0173 の効果は皮質より弱かったか
- 4) ペナンプラ領域はどのように決めたか、脳血流は他部位と差があったか
- 5) GIF-0173 による脳血流変化で平均値が同等のコントロールより SD 値が小さい意味は何か
- 6) プロスタグランジン J_2 や D_2 に脳血管拡張作用はないのか
- 7) GIF-0173 の有効濃度が細胞死率と細胞腫脹で異なるのはなぜか
- 8) 細胞浮腫と $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の因果関係は
- 9) ネクロシスと判断できる根拠は
- 10) NMDA 誘発の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が fluo-3 の Ca^{2+} 解離定数では測定できない可能性は
- 11) DP1 受容体の選択的阻害薬は使えなかったのか
- 12) BW245C と GIF-0173 を同時に投与した場合の結果をどう予測するか
- 13) BW245C は細胞死率と細胞腫脹にも保護的作用があったか
- 14) グルタミン酸神経毒性の刺激条件をもう少し弱めたほうが良いのではないか
- 15) グルタミン酸誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の経路としてメタボトロピック受容体はあるか
- 16) グルタミン酸誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の時間経過が実験条件により異なるのはなぜか
- 17) タプシガルジンは GIF-0173 のグルタミン酸誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇抑制に影響したか
- 18) タプシガルジン単独での細胞死率に対する効果はどうだったか
- 19) タプシガルジンは小胞体の貯蔵 Ca^{2+} を枯渇させたか
- 20) NMDA 誘発の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には小胞体 Ca^{2+} ポンプの作用は関与しないのか
- 21) PKA 促進/抑制剤の効果は調べたか

これらの質問の対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 福田 敦夫
副査 浦野 哲盟 副査 川上 純一

博士(医学) 三 崎 太 郎

論文題目

Decrease in TRADD resulted from ubiquitin-dependent degradation in the obstructive renal injury in rats

(閉塞性障害ラット腎におけるユビキチン依存性分解による TRADD の減少)

論文の内容の要旨

[はじめに]

Tumor necrosis factor (TNF) α の信号伝達のカスケードは、TNF receptor (TNFR)1、TNFR2 を介し信号伝達が行われることが知られている。TNFR1 の信号伝達は、1) TNFR associated death domain (TRADD) から TNF receptor associated factor 2 (TRAF2)、Receptor interacting protein (RIP) を介して Nuclear Factor kappa B (NFkB) を活性化させ、cell survival、細胞増殖や線維化をきたす経路と、2) TRADD から Fas-associated death domain (FADD) 、カスパーゼ 8、カスパーゼ 3 を介してアポトーシスを惹起するという2つの経路が主に知られているが、これらは相反する作用であり、それらのバランスがどのように制御されているかは明らかではない。また、TNFR2 の信号伝達に関しては、TRAF2 を介する NFkB 活性化の報告以外には、その伝達経路と作用発現の詳細はほとんど解明されていない。TNF α の信号伝達因子については、従来 TRAF2 や RIP のユビキチン化を介した細胞内信号伝達制御系の関与が報告されているが、TRADD を介する信号伝達がどのような細胞内伝達制御を受けているかは不明である。本研究は、腎線維化のモデルである片側尿管結紮 (unilateral ureteral obstruction; UUO) ラット腎において、UUO による閉塞性腎障害早期の尿細管、間質の細胞増殖と、後期の腎線維化とアポトーシスの進行過程において、TNFR1、TNFR2、TRADD の蛋白と mRNA 発現レベルの経時的変化と、TRADD 蛋白のユビキチン依存性プロテアソーム分解制御の関与を検討した。

[材料ならびに方法]

1) UUO モデルの作成

生後 7 週令(約 200 g)の雄性ラットを用い、エーテル麻酔下にて背部より切開を加え、腎臓を露出し、片側尿管を 3-0 絹糸で結紮した。コントロール群においては sham operation を施行した。Day0、1、3、7、14 にラットを屠殺して腎臓を摘出し、経時的な腎臓の組織変化を検討した。腎臓は一部組織切片用に 4%パラホルムアルデヒドで固定し、残りを液体窒素にて凍結後-80°C で保存し、mRNA の発現定量や、蛋白発現定量 (Western blot)、TRADD のユビキチン依存性蛋白分解の検討に使用した。

2) 尿細管間質病変の進行と TNF α 信号伝達因子の発現の検討

腎病理所見、免疫組織化学と Western blot による TNF α 、TNFR1、TNFR2、TRADD の蛋白量と、定量的 RT-PCR による mRNA 発現量を検討した。さらに、それらと Ki67 を用いた細胞増殖、TUNEL によるアポトーシス、マッソントリクローム染色による間質線維化のレベルとを経時的に比較検討して、UUO 腎病変の進行に伴う細胞増殖期からアポトーシス、線維化の進行期に至る経過での TNF α の生理活性の変化とその信号伝達系の変化の関連を検討した。

3) TNF α 阻害薬による検討

UUO において TNF α 、TNFR1、TNFR2、TRADD の発現の変化を確認後、次に TNF α の阻害

薬である *etanercept* (可溶性 TNFtype2 レセプター) の投与を行い、TNF α を抑制することで細胞増殖、アポトーシス、線維化が改善するかどうかを検討した。

4) 尿細管間質病変の進行における TRADD のユビキチン化とプロテアソーム蛋白分解制御の検討

Degradation assay やプロテアソーム阻害薬を用いた分解阻害実験を行った。

5) In vivo でのユビキチン化の証明

HEK293 細胞に Flag-TRADD、HA-ユビキチンをトランスフェクションし、免疫沈降することで TRADD のユビキチン化を検討した。

6) TNF α 投与による TRADD の分解活性の亢進の検討

HK-2 細胞を TNF α で細胞を刺激することで、TRADD の減少がおきているかどうかを検討した。

[結果]

UUO においては、尿細管間質の線維化の進行とともに、細胞増殖 (Ki67) は day3 をピークに起こり、アポトーシス (TUNEL) は day14 にピークを認めた。TNF α 、TNFR1、TNFR2、TRADD の mRNA は、経時的に増加するが、蛋白に関しては、TNFR2 は増加するが、TNFR1 は軽度減少、TRADD は day1 より有意に減少した。そこで TRADD は mRNA が増加するにもかかわらず、蛋白は減少することに注目し、TRADD のユビキチン依存性プロテアソーム分解を検討した。Degradation assay にて、UUO 腎において TRADD 蛋白の分解が亢進しており、その分解はプロテアソーム阻害薬により抑制されることが確認された。また、Flag-TRADD を用いたユビキチン化アッセイにて、UUO 腎における TRADD のユビキチン化の亢進が確認された。HEK293 細胞に Flag-TRADD と HA-ユビキチンをトランスフェクションし、Flag で 2 回免疫沈降を行い、Western blot を行うことで、in vivo でも TRADD がユビキチン化されていることが示された。HK-2 細胞を TNF α で刺激すると TRADD は経時的に減少した。また、UUO ラットに TNF α 阻害薬である *etanercept* を投与すると腎障害は軽減 (線維化の抑制、Ki67 の減少、アポトーシスの減少) し、TRADD の分解も有意に抑制された。

[考察]

UUO 腎における尿細管間質障害の進行には TNF α が関与し、その信号伝達因子 TRADD は UUO1 日後からユビキチン依存性プロテアソーム分解を受けて減少していること、また、この TRADD のユビキチン依存性分解は TNF α 刺激により惹起されることが確認された。TRADD は TNFR2 を介する信号伝達系には関与しないので、UUO 腎での TRADD の減少は、その腎病変の進行過程において TNFR1 を介する信号伝達を抑制して TNFR2 を介する信号系を優位に働かせている可能性が示唆された。

[結論]

UUO 腎における尿細管間質障害の進行には TNF α が関与し、その信号伝達因子 TRADD は減少する。

TRADD はユビキチン依存性プロテアソーム分解により減少する。

論文審査の結果の要旨

[はじめに]

申請者のグループは長年尿管結紮モデルを用いた尿細管障害の細胞生物学的機構を検索している。今回、同モデルによる腎障害において重要な働きをされるといわれる Tumor necrosis factor (TNF) α の信号伝達のカスケードについて詳細な機構を解析したものである。TNF α のシグナルは TNF receptor (TNFR) 1、TNFR2 を介する。TNF α の信号伝達因子については、従来 TRAF2 や RIP のユビキチン化を介した細胞内信号伝達制御系の関与が報告されているが、TRADD を介する信号伝達がどのような細胞内伝達制御を受けているかは不明である。本研究は、腎線維化のモデルである片側尿管結紮 (unilateral ureteral obstruction; UUU) ラット腎において、UUU による閉塞性腎障害早期の尿細管、間質の細胞増殖と、後期の腎線維化とアポトーシスの進行過程において、TNFR1、TNFR2、TRADD の蛋白と mRNA 発現レベルの経時的变化と、TRADD 蛋白のユビキチン依存性プロテアソーム分解制御の関与を検討した。

[材料ならびに方法]

- 1) 申請者は、まず、生後 7 週令 (約 200 g) の雄性ラットを用い、片側尿管を 3-0 絹糸で結紮した。コントロール群においては sham operation を施行した。Day0、1、3、7、14 にラットを屠殺して腎臓を摘出し、経時的な腎臓の組織変化を検討すると同時に、mRNA の発現定量や、蛋白発現定量 (Western blot)、TRADD のユビキチン依存性蛋白分解の検討に使用した。
- 2) 次に、検討事項としたのは、腎病理所見、免疫組織化学と Western blot による TNF α 、TNFR1、TNFR2、TRADD の蛋白量と、定量的 RT-PCR による mRNA 発現量である。さらに、それらと Ki67 を用いた細胞増殖、TUNEL によるアポトーシス、マッソントリクローム染色による間質線維化のレベルとを経時的に比較検討して、UUU 腎病変の進行に伴う細胞増殖期からアポトーシス、線維化の進行期に至る経過での TNF α の生理活性の変化を検討した。
- 3) さらに申請者は、以下のように TNF α 阻害薬による検討を行った。つまり、UUU において TNF α 、TNFR1、TNFR2、TRADD の発現の変化を確認後、次に TNF α の阻害薬である Etanercept (可溶性 TNFtype2 レセプター) の投与し、TNF α を抑制することで細胞増殖、アポトーシス、線維化が改善するかどうかをみたのである。
- 4) Degradation assay やプロテアソーム阻害薬を用いた分解阻害実験を行った。
- 5) HEK293 細胞に Flag-TRADD、HA-ユビキチンをトランスフェクションし、免疫沈降することで TRADD のユビキチン化を検討した。
- 6) HK-2 細胞を TNF α で細胞を刺激することで、TRADD の減少がおきているかどうかを検討した。

[結果]

申請者は、UUU において、尿細管間質の線維化の進行とともに、細胞増殖 (Ki67) は day3 をピークに起こり、アポトーシス (TUNEL) は day14 にピークを認めた。TNF α 、TNFR1、TNFR2、TRADD の mRNA は、経時的に増加するが、蛋白に関しては、TNFR2 は増加するが、TNFR1 は軽度減少、TRADD は day1 より有意に減少したという観察結果をもとに、TRADD は mRNA が増加するにもかかわらず、蛋白は減少することの原因として TRADD のユビキチン依存性プロテアソーム分解を想定して、実験をすすめた。Degradation assay にて、UUU 腎において TRADD 蛋白

の分解が亢進しており、その分解はプロテアソーム阻害薬により抑制された。また、Flag-TRADDを用いたユビキチン化アッセイにて、UUO 腎における TRADD のユビキチン化の亢進が確認された。HEK293 細胞に Flag-TRADD と HA-ユビキチンをトランスフェクションし、Flag で 2 回免疫沈降を行い、Western blot を行うことで、in vivo でも TRADD がユビキチン化されていることが示された。HK-2 細胞を TNF α で刺激すると TRADD は経時的に減少した。また、UUO ラットに TNF α 阻害薬である Etanercept を投与すると腎障害は軽減し、TRADD の分解も有意に抑制された。

[考察]

申請者は以上の結果から、UUO 腎における尿細管間質障害の進行には TNF α が関与し、その信号伝達因子 TRADD は UUO1 日後からユビキチン依存性プロテアソーム分解を受けて減少していると結論し、この TRADD のユビキチン依存性分解は TNF α 刺激により惹起されるとした。

[結論]

申請者は結論として、UUO 腎での TRADD の減少は、その腎病変の進行過程において TNFR1 を介する信号伝達を抑制して TNFR2 を介する信号系を優位に働かせているという考え方を提示した。

審査委員会は申請者の詳細な機能的解析を高く評価した。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

- 1) Sham operation の検体は 14 日目だけで良いのか
- 2) 結紮とクリップによる緩やかな操作との差異について
- 3) 尿管の伸展刺激がこの現象の機転なのか
- 4) 腎間質線維化のときの線維細胞の起源について
- 5) 可逆性の変化はいつまでか
- 6) 間質の細胞にもアポトーシスをおこすのか
- 7) マウスモデルとラットモデルの差異について
- 8) この実験系で TNF β はどういう動きをするか
- 9) Western blot の各バンドの分子量について
- 10) TRADD の細胞内局在について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梶村 春彦
副査 大園 誠一郎 副査 上里 忠良

博士(医学) 島村 隆浩

論文題目

Overexpression of MUC13 is associated with intestinal-type gastric cancer

(MUC13 の発現亢進は腸型胃癌に関連する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ムチンは、主に消化管などに発現する分泌型と膜結合型の糖タンパクであり、特に膜結合型ムチンは発癌に関係するとされ、診断や治療のターゲットとされている。また、ムチンファミリーの *MUC13* は大腸癌において発現亢進することは報告されているが、我々は、オリゴヌクレオチドマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、胃癌においても *MUC13* が発現亢進することを認めた。そこで、本論文では胃癌での *MUC13* のタンパク発現と臨床病理学的特徴について検討した。

[材料ならびに方法]

定量的PCR法で、胃癌臨床検体での*MUC13*遺伝子発現を検討した。*MUC13*を特異的に認識する抗*MUC13*モノクローナル抗体 (ppz0020、ppz0025) とポリクローナル抗体 (ST0751) を作成し、各々の抗体の抗体結合部位を特定した。この3抗体を用いて、強制発現細胞株と癌細胞株でのppz0020抗体の*MUC13*タンパク特異性を検討した。ppz0020抗体を用いたウエスタンブロット法で胃癌臨床検体での*MUC13*タンパク発現を検討し、共焦点顕微鏡を用いて癌細胞株での*MUC13*タンパクの細胞局在を検討した。ppz0020抗体を用いた組織アレイの免疫組織染色法で、胃癌臨床検体114例での*MUC13*の発現頻度と臨床病理学的特徴を検討し、さらに既存の胃癌粘液形質マーカーである*MUC2*、*MUC5AC*、*MUC6*、*CD10*の染色動態と比較検討した。

[結果]

胃癌臨床検体の定量的PCR法で、*MUC13*遺伝子は5/10例 (50%) で癌部が非癌部に対して2倍以上の発現亢進をしていた。*MUC13*タンパクがO型糖鎖を含む分泌部分と膜貫通部分に分離することは報告されているが、作成した3抗体の抗体結合部位はppz0020抗体が膜貫通部分、ppz0025抗体が分泌部分、ST0751抗体が細胞内部分であった。ウエスタンブロット法においては、ppz0020抗体は強制発現細胞株の*MUC13*タンパクを認識し、癌細胞株でも内在性*MUC13*タンパクを認識することより、ppz0020抗体が内在性*MUC13*タンパクを特異的に認識することを確認した。ppz0020抗体を用いたウエスタンブロット法での胃癌臨床検体の*MUC13*タンパクは5/6例 (83%) で発現亢進した。また、ppz0020抗体を用いた共焦点顕微鏡での癌細胞株における*MUC13*タンパクの局在解析では、*MUC13*タンパクは細胞膜に局在していた。さらに、ppz0020抗体を用いた組織アレイによる免疫組織染色では、正常胃粘膜は染色陰性だが腸上皮化生では9/10例で陽性、胃癌では74/114例 (64.9%) で陽性であった。*MUC13*発現と臨床病理学的特徴との関連を検討したところ、*MUC13*陽性率は分化型胃癌で有意に高かった ($p < 0.001$)。また、*MUC13*の染色部位は、分化型胃癌では細胞膜が染色され、未分化型胃癌では細胞質が染色された。さらに、*MUC13*の免疫組織学的な存在は既存の胃癌粘液形質マーカーである*MUC2*、*MUC5AC*、*MUC6*、*CD10*の存在のいずれとも相関しなかった。

[考察]

内在性 MUC13 タンパクを認識する ppz0020 抗体の特異性を検証するために、抗体結合部位の異なる 3 つの抗 MUC13 抗体 (ppz0020、ppz0025、ST0751) を各々作成し比較検討したところ、ppz0020 抗体が膜貫通部分を主に認識する特異性の高い抗体であることがわかった。この抗体による免疫染色で、MUC13 が分化型胃癌と胃癌の前癌病変とされる腸上皮化生で陽性であるが、既知の腸上皮化生マーカーである MUC2 や CD10 の染色部位とは異なっていたことが特筆される。さらに、細胞局在について、MUC13 は分化型胃癌では細胞膜に局在し、未分化型胃癌では細胞質に局在している。これは、未分化型胃癌における MUC13 局在の極性が喪失していると考えられ、MUC13 局在の極性喪失が未分化型胃癌の生物学的性質に関連している可能性も示唆された。

[結論]

MUC13 は、既存の胃癌粘液形質マーカーとは独立して、分化型胃癌で発現亢進するので、新たな胃癌の診断マーカーとなり得る。さらに、MUC13 が胃癌の治療のターゲットになる可能性があることも示唆している。

論文審査の結果の要旨

ムチンは、主に消化管や気道などに発現する糖蛋白である。コア蛋白となる MUC は 21 種類知られており、分泌型と膜結合型とに大別できる。今回の研究対象とした MUC13 は膜結合型ムチンであり、膜貫通ドメインを有している。これら膜結合型ムチンは癌における生物学的意義について多数の報告があるが、MUC13 は大腸癌で発現亢進することは最近報告されたに過ぎない。申請者らはオリゴヌクレオチドマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、胃癌においても *MUC13* が発現亢進することを認めたので、MUC13 のタンパク発現と臨床病理学的特徴について検討した。

まず、DNA マイクロアレイによって判明した MUC13 の胃癌における発現亢進を確認するために定量的 RT-PCR 法を施行した。次いで、蛋白レベルでの MUC13 の動態を調べるために、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を作製し、ウェスタンブロット法、免疫組織染色を実施した。抗体の反応性を検討するためのエピトープマッピング、癌細胞株を使用した MUC13 の細胞内局在の検討、さらに組織アレイの免疫組織染色による胃癌臨床検体を用いた MUC13 発現の臨床病理学的検討へと研究を進めた。

胃癌臨床検体の定量的 PCR 法で、*MUC13* は 5/10 例 (50%) で癌部が非癌部に対して 2 倍以上の発現亢進をしていた。蛋白レベルでの MUC13 の発現をウェスタンブロット法で調べた結果、複数のバンドが認められたため、作製抗体のエピトープマッピングを行った。その結果、2 種のモノクローナル抗体のうち、ppz0020 抗体は膜貫通部分、ppz0025 抗体は分泌部分、ポリクローナル抗体の ST0751 抗体は細胞内部分を認識していることが判明した。

ppz0020 抗体を用いたウェスタンブロット法により、癌細胞株・胃癌臨床検体で MUC13 蛋白が 5/6 例 (83%) で発現亢進していた。また、ppz0020 抗体を用いて共焦点顕微鏡で癌細胞株を解析したところ、MUC13 タンパクは細胞膜に局在していた。さらに、ppz0020 抗体を用いた組織アレイによる免疫組織染色では、正常胃粘膜は染色陰性だが腸上皮化生では 9/10 例で陽性、胃癌では 74/114 例 (65%) で陽性であった。MUC13 発現と臨床病理学的特徴との関連を検討したところ、MUC13 陽

性率は分化型胃癌で有意に高かった($p < 0.001$)。また、MUC13の染色部位は、分化型胃癌では管腔側細胞膜が染色され、未分化型胃癌では細胞質が染色された。これは、既存の胃癌粘液形質マーカーであるMUC2、MUC5AC、MUC6、CD10とは異なる染色態度であり、新規な意義が期待された。

以上のことから、MUC13 が分化型胃癌と胃癌の前癌病変とされる腸上皮化生で陽性であることが明らかとなった。さらに、MUC13 は分化型胃癌では管腔側細胞膜に局在し、未分化型胃癌では細胞質に局在していた。この細胞内局在は、未分化型胃癌におけるMUC13局在の極性喪失などの生物学的性質との関連も示唆された。

審査委員会では、胃癌における新規な分子である MUC13 の研究を推し進め、分化型胃癌と胃癌の前癌病変とされる腸上皮化生で発現亢進しており、従来の MUC 蛋白とは異なる意義が推察されたこと、さらに新たな分子マーカーとしても期待されることを明らかにしたことを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) ムチンの役割について
- 2) MUC 遺伝子について
- 3) DNA マイクロアレイについて
- 4) 抗体のエピトープマッピングについて
- 5) ウェスタンブロットの結果解釈について
- 6) mRNA と蛋白の発現について
- 7) MUC13 の機能解析について
- 8) 糖鎖の生物学的意義について
- 9) 胃癌の組織型と MUC13 発現について
- 10) 免疫組織染色による細胞内局在の意味について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 前川 真人
副査 今野 弘之 副査 杉原 一廣

博士(医学) 高井 哲成

論文題目

Fecal cyclooxygenase 2 plus matrix metalloproteinase 7 mRNA assays as a marker for colorectal cancer screening

(大腸癌スクリーニングのマーカールとして糞便中シクロオキシゲナーゼ 2 にマトリックス メタロプロテアーゼ 7 mRNA を加えた分析)

論文の内容の要旨

[はじめに]

欧米諸国やわが国において大腸癌罹患率は高く、死亡原因の上位に挙げられている。既に我々は糞便中のシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) mRNA の発現を指標にした診断法 (fecal COX-2 mRNA assay) で大腸癌患者に対し高感度・高特異度が得られることを報告しているが、今回、COX-2 とは発現様式が異なる一方で大腸癌の進展において重要な役割を果たしている、と言われるマトリックス メタロプロテアーゼ 7 (MMP-7) mRNA の発現を指標にした診断法 (fecal MMP-7 mRNA assay) に着目し、両者の組み合わせの有用性を検討した。

[患者ならびに方法]

62 人の大腸癌患者と 29 人の大腸に疾患のない患者から糞便 0.5-1.0 g を採取し、RNA 抽出後予備実験として nested reverse transcription-PCR で carcinoembryonic antigen (CEA) の mRNA の発現を確認した。その後、同 PCR で COX-2 及び MMP-7 の mRNA の発現レベルも確認した。尚、COX-2, MMP-7 いずれの検査においても特異度が 100% になる様に PCR の条件を設定した。また、同一検体を用いて免疫学的便潜血検査を実施した。

[結果]

大腸癌患者では全例、非大腸疾患患者では 1 例以外全ての糞便から CEA mRNA の発現が確認され fecal CEA mRNA assay は大腸癌スクリーニングには適していないが、糞便から RNA を抽出できていることの指標になることが示唆された。

大腸癌に対する fecal COX-2 mRNA assay の感度は 87% [95%信頼区間 (95% CI), 76-94%]、fecal MMP-7 mRNA assay の感度は 65% (95% CI, 51-76%) であった。どちらかが検出されれば陽性とする fecal RNA test では感度が 90% (95% CI, 80-96%) に上昇した。更に治癒切除が期待できる II 期までの大腸癌患者を対象をしぼると、fecal RNA test の感度は 93% (95% CI, 80-98%) であった。大きさごとに分類すると 10-29 mm の小さな大腸癌においても fecal RNA test は 86% (95% CI, 57-98%) と良好な感度が得られた。

免疫学的便潜血法では全ての大腸癌、II 期までの大腸癌、10-29 mm までの小さな大腸癌に対する感度はそれぞれ 73% (95% CI, 60-83%)、77% (95% CI, 46-95%)、29% (95% CI, 8-58%) であった。免疫学的便潜血検査では偽陽性を 3 例で認め特異度は 90% (95% CI, 73-98%) であった。

糞便中の COX-2 mRNA、MMP-7 mRNA の発現レベルをそれぞれ(-), (+), (++)、(+++)に分類すると、両者の相関係数 (r) は 0.58 ($p < 0.01$) であった。

[考察]

免疫学的便潜血法は便潜血グアヤック法より感度が高く大腸癌スクリーニングに強く推奨されているが、浸潤大腸癌における感度は1回法で65.8%と報告されている。大腸癌において出血は間欠的事象であり、また出血を伴う大腸疾患は癌以外にも多数存在する。特異度を保ちながら、感度を更に上げるためにはマーカーとなる mRNA の発現上昇といった、大腸癌に直接関係した持続的事象を捉える必要がある。

今回の研究では fecal COX-2 mRNA assay の大腸癌に対する感度は免疫学的便潜血1回法より有意に高く、fecal MMP-7 mRNA assay の感度は免疫学的便潜血1回法に及ばなかったものの、fecal COX-2 mRNA assay に組み合わせることで感度を上げることができた。特にII期までの大腸癌、10-29 mm の大腸癌を対象をしぼっても fecal RNA test は免疫学的便潜血1回法より有意に高い感度であり、早期大腸癌、小さな大腸癌に対するスクリーニングでも期待できることが示唆された。

関連の低いマーカー同士を組み合わせると、感度の上昇が期待できる。Fecal COX-2 mRNA assay と fecal MMP-7 mRNA assay の大腸癌に対する発現の相関係数 (r) = 0.58 は高いとも低いとも言えない結果だった。

今回 fecal RNA test では6例の大腸癌患者で陰性の結果であったがその6例では CEA mRNA が検出されており、偽陰性の原因として RNA の抽出に問題があるというよりも、COX-2 や MMP-7 の mRNA 発現が弱いという様な腫瘍自体の性質によると考えられた。今後適切なマーカーを加えることで更に感度が上がる可能性が示唆された。

今回の fecal RNA test は特異度100%になる様にPCR条件を設定したが、コントロールの症例数を更に増やした検討が必要である。また大腸内視鏡の2-4週間後に糞便を採取しアッセイを施行したが、COX-2 mRNA や MMP-7 mRNA の発現に対する内視鏡時生検の影響については明らかでなく更なる検討が必要である。

[結論]

COX-2 と MMP-7 の mRNA 発現を指標にした fecal RNA test は大腸癌全体だけでなく治癒切除が期待できるII期までの大腸癌、10-29 mm という小さなサイズの大腸癌の検出においても免疫学的便潜血1回法に比べ有意に高い感度が得られた。Fecal RNA test は大腸癌スクリーニングに有用な可能性を持つと考えられるが、実用化のためには更に大規模な前向き試験が必要と考えられた。

論文審査の結果の要旨

本邦でも食生活の欧米化とともに大腸癌罹患率が増加してきている。便潜血検査が大腸癌のスクリーニング法として有用であるが、偽陽性、偽陰性の割合も多い。それに代わる検査法として Fecal DNA test が検討されているが、未だ満足できる成果は得られていない。申請者が所属する研究グループでは、シクロオキシゲナーゼ2 (COX-2) の mRNA 発現をみる Fecal RNA test を提唱し検討してきた。

申請者は COX-2 と同様に大腸癌の進展に重要と考えられるマトリックスメタロプロテアーゼ7 (MMP7) に着目し、その大腸癌診断の有効性、および両者の組合せの有用性を検討した。大腸

癌患者 62 名と非大腸癌患者 29 名から糞便 0.5 g 採取し、RNA 抽出、逆転写後 nested PCR によって COX-2 と MMP7 の mRNA 発現量を定性的にアガロースゲル電気泳動にて調べた。このとき、非大腸癌患者群で 1 例も陽性にならないように nested PCR のサイクル数などの条件を調整した。これにより、特異度は 100%となる。対照として免疫学的便潜血検査を施行した。

その結果、大腸癌患者群において、COX-2 発現は 87%、MMP-7 は 65%の感度であった。両者は必ずしも相関が良くはなく、両者を組み合わせることで感度の上昇が期待できた。実際、2 種のいずれかが陽性となる頻度は 90%に上昇した。また、治癒切除が期待できる II 期までの大腸癌、小さな大腸癌に絞ると、免疫学的便潜血検査ではそれぞれ 77%、29%の感度であるが、COX-2 と MMP-7 の組合せではそれぞれ 93%、86%と高い感度が得られた。すなわち、申請者らの開発した 2 種の組合せによる Fecal RNA test は大腸癌のスクリーニング検査として有用であり、大腸癌検診の改良に向けて大きく前進したと考えられる。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 前川 真人
副査 峯田 周幸 副査 中村 利夫

博士(医学) 川田 一 仁

論文題目

Enhanced hepatic Nrf2 activation after ursodeoxycholic acid treatment in patients with primary biliary cirrhosis

(原発性胆汁性肝硬変症においてウルソデオキシコール酸は肝 Nrf2 を活性化する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

原発性胆汁性肝硬変症 (PBC) は慢性に経過する肝内胆汁うっ滞症であり、肝硬変、肝不全へ進行する肝特異的自己免疫性肝疾患であるが、病態形成機序の詳細は未だ不明である。現在、病態進展抑制のための第一選択薬はウルソデオキシコール酸 (UDCA) であり、特に早期 PBC において血液検査所見、肝組織所見や生存率を改善させると報告されている。しかし、UDCA が PBC の進展を抑制する機序については未だ明確にされていない。最近、UDCA の抗酸化作用について報告される一方で、PBC における肝細胞や胆管細胞の傷害に酸化ストレスが関与していることが明らかとなった。また、酸化ストレスに対する生体防御系の転写因子として、酸化ストレス応答転写因子 nuclear factor-E2-related factor-2 (NRF2) がある。酸化ストレスに侵されると NRF2 の活性化が誘導され、NRF2 の標的遺伝子群 [γ -glutamylcysteine synthetase (γ GCS)、heme oxygenase 1 (HO-1)、peroxiredoxin (PRX)、glutathione peroxidase 2 (GPX2)、thioredoxin (TRX)、thioredoxin reductase 1 (TRXR1)] を統一的に転写誘導することで、酸化ストレスに対して防御能を発揮している。最近、UDCA が NRF2 を活性化させることが培養細胞や実験動物で報告されている。そこで、PBC における UDCA の抗酸化作用と NRF2 の活性化に関して検討をした。

[材料と方法]

UDCA (600 mg/日) 投与前後で肝生検を施行した 13 例 (男性 1 例、女性 12 例; 治療期間 36 ± 4 ヵ月; Ludwig 分類 stage I 9 例、stage II 4 例) の早期 PBC 症例を対象として、UDCA 投与前後における血液検査所見、肝組織所見、肝組織の酸化ストレス [8-hydroxy deoxyguanosine (8OHdG) の免疫組織染色]、肝 NRF2 およびリン酸化 NRF2 の蛋白発現 (ウェスタンブロット法と免疫組織染色)、肝 NRF2 標的遺伝子群の蛋白発現 (ウェスタンブロット法) を比較検討した。なお、正常肝として、UDCA 投与の既往のない 4 例の転移性肝腫瘍症例の背景肝の一部を手術的に採取して用いた。また、UDCA 投与前後の血清総胆汁酸量と血清胆汁性分画を測定し比較検討した。

[結果]

UDCA 投与後、血中肝・胆道系酵素は有意に低下し、肝組織所見では小葉内壊死炎症反応の改善を認めた。

UDCA 投与前の肝細胞および胆管細胞の 8OHdG 陽性率は、正常肝と比較して有意に高く (肝細胞: UDCA 前 73% vs 正常肝 19%、 $p < 0.01$ 、胆管細胞: UDCA 前 66% vs 正常肝 11%、 $p < 0.01$)、UDCA 投与後、肝細胞および胆管細胞の 8OHdG 陽性率は有意に低下した (肝細胞: UDCA 前 73% vs UDCA 後 37%、 $p < 0.01$ 、胆管細胞: UDCA 前 66% vs UDCA 後 48%、 $p < 0.01$)。

UDCA 投与前の NRF2 とリン酸化 NRF2 の蛋白発現は、ウェスタンブロット法において、正常肝と同程度であり、UDCA 投与後、共に有意な増加を認めた ($p < 0.01$)。また、免疫組織染色法におい

ては、リン酸化 NRF2 を発現している胆管細胞が、UDCA 投与後、明らかに増加した(胆管細胞: UDCA 前 62% vs UDCA 後 69%, $p<0.05$)。

NRF2 の標的遺伝子群の蛋白発現では、TRX および TRXR1 において、UDCA 投与後、有意な増加を認めたと ($p<0.01$)、 γ GCS、HO-1、PRX、GPX2 においては、正常肝および UDCA 投与前後で変化を認めなかった。また、TRX および TRXR1 の増加率は、それぞれ NRF2 蛋白の増加率と正の相関を示した (TRX: $r=0.92$, $p<0.001$ 、TRXR1: $r=0.69$, $p<0.05$)。

血清総胆汁酸量と UDCA 濃度は、UDCA 投与後、有意に増加した($p<0.01$)。

[考察]

今回の検討では、早期 PBC に対する UDCA 療法が効果的であることを確認しつつ、UDCA の PBC に対する作用機序の解明として UDCA の抗酸化作用に注目した。

PBC においては、8OHdG 陽性肝細胞および胆管細胞が正常肝と比べて著明に増加していることから、すでに報告されているように肝組織における酸化ストレスの亢進が認められた。UDCA 投与後、8OHdG 陽性細胞が明らかに減少したことから、UDCA による酸化ストレスの軽減が考えられた。また、UDCA 投与後、肝細胞における NRF2 およびリン酸化 NRF2 の発現が増強したことから、UDCA による NRF2 の活性化が考えられた。さらに、NRF2 の活性化により誘導される酸化ストレス防御分子の TRX および TRXR1 の発現も、UDCA 投与後に増強したことから、TRX および TRXR1 が UDCA による抗酸化作用として働いている可能性が示唆された。

[結論]

PBC において、UDCA は、NRF2 を活性化し TRX と TRXR1 を誘導することにより、酸化ストレスを軽減し病態進展を抑制する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

原発性胆汁性肝硬変は慢性に進行する原因不明の疾患であるが、臨床的にはウルソデオキシコール酸 (UDCA) により改善する例があり、実際に第一選択薬として用いられている。一方、UDCA の生物学的影響については、試験管内での研究があり、nuclear factor-E2-related factor-2 (Nrf2) という細胞の酸化ストレスへの防御的反応の中心的役割を果たす転写制御分子が、upregulate されるという知見が知られている。

申請者は3年間にわたる臨床例13例を解析し、UDCAの効果とその作用機序について、肝生検材料を用いて以下の点を明らかにした。肝組織所見は治療の前後で、小葉内の炎症細胞浸潤の改善をみとめた。また、酸化ストレスの指標である8-ヒドロキシグアニンの免疫組織化学的検討では、肝細胞、胆管上皮細胞いずれでもこれらの陽性率は治療により低下した。一方、Nrf2 タンパクおよびそのリン酸化タンパクはウエスタンブロットでも、胆管上皮における発現でも UDCA 投与後に増加していた。Nrf2 の標的遺伝子群では thioredoxin (TRX)、thioredoxin reductase 1 (TrxR1)、 γ -glutamylcysteine, heme oxygenase-1, peroxiredoxin, glutathione peroxidase 2 について検索したうち、TRX と TrxR1 が増加し、その増加率は Nrf2 の増加率と相関していた。血清総胆汁酸量と UDCA 濃度も治療後増加していた。

申請者は酸化ストレスの反応機構が、Nrf2 という分子を中心として、実際のヒトの病気である原

発性胆汁性肝硬変とその治療機序に深く関わっていることを見だし、さらに慢性肝疾患一般に本機序が関係する仮説を検証したことを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	梶村 春彦			
	副査	三浦 直行	副査	坂口 孝宣	

博士(医学) 王 天 英

論文題目

Temporal increase in ambient GABA during organization of freeze lesion-induced microgyrus in mouse neocortex

(凍結損傷で引き起こしたマウス大脳皮質の微小脳回の形成過程における一過性の細胞外 GABA 濃度の上昇)

論文の内容の要旨

[はじめに]

てんかんの原因となる大脳皮質の皮質形成異常は、神経細胞の移動の障害が関与する。新生仔ラットの大脳皮質に凍結損傷させると限局的な皮質形成異常(微小脳回)が生じる。この成体ラットは、てんかん様の電気活動の発生機序を生理学的・解剖学的に調べる病態モデルとして解析されてきたが、微小脳回を形成する過程については未だ十分に解明されていない。近年、当研究室では、このモデルの微小脳回形成期に異常皮質の構成細胞が一過性の KCC2 発現低下と NKCC1 発現上昇を起こすことを見出し、移動時に $[Cl^-]_i$ 上昇による興奮性 GABA_A 受容体作用を再獲得する可能性を示唆した。

グルタミン酸作動性投射ニューロンと GABA 作動性介在ニューロンは大脳皮質を構成する主要なニューロンであり、正常な大脳皮質形成期では、それぞれのニューロンは、脳の異なる場所で産生され、異なる様式で大脳皮質内に移動・定着する。そこで、本研究では、将来グルタミン酸作動性投射ニューロンとなる皮質板細胞や GABA 作動性介在ニューロンとなる GABA 細胞が、どのように移動して微小脳回を形成するのかを調べるために、GABA 細胞の同定が可能な GAD67-EGFP ノックインマウスに皮質凍結損傷を施行した限局的皮質形成異常モデルを確立した。このモデルを用いて、各々の細胞の分布の変遷と異常皮質内の細胞外 GABA 濃度やその GABA の作用を興奮-抑制に切り替えられる内在的な Cl⁻ホメオスタシスの変化との関連について検討した。

[材料ならびに方法]

1. 皮質凍結損傷による限局的皮質形成異常モデルマウスの作成

新生仔(生後 0 日齢)の GAD67-EGFP ノックインマウスの片側頭骸骨上に液体窒素で冷却した銅棒を置くことで限局的に大脳皮質に凍結損傷を施行した。

2. BrdU ラベリング実験と免疫組織化学による細胞の同定・特徴づけ

妊娠 14.5 あるいは 17.5 日目に BrdU (50 mg/kg)を腹腔内投与した。脳標本中における各種細胞の同定は、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した脳から作製した凍結切片で、抗 BrdU 抗体、抗 GFP 抗体、抗 Cux-1 抗体、抗 Tbr1 抗体を用いた蛍光免疫組織化学法により行った。

3. *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学二重染色

PCR クローニングした KCC2, cxcl12, cxcr4 cDNA 断片から *in vitro* 転写反応により DIG 標識した cRNA プローブを作成した。このプローブで *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、脳組織における各遺伝子の発現レベルを調べた。また KCC2 の発現レベルが低下した細胞を同定するために、KCC2 の *in situ* ハイブリダイゼーションと抗 BrdU 抗体、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学染色を組み合わせた二重染色を行った。

4. 細胞外 GABA と細胞外グルタミン酸イメージング

GABA の分解酵素 GABase あるいはグルタミン酸の分解酵素 GDH を担持させた石英ガラス上に急性脳スライス標本を置いた。酵素の分解反応時に生成する NADPH を 340nm の表面 UV 光で励起させて、ガラス表面上の NADPH の蛍光輝度を測定することで、脳の各部位から放出される細胞外 GABA と細胞外グルタミン酸濃度を定量化した。

[結果]

凍結損傷を施行した GAD67-EGFP ノックインマウスでもラットモデルと形態的に類似する微小脳回が観察された。微小脳回の形成過程で GABA 細胞は生後 4 日齢で障害部位の表層と、障害部位の周囲に集積していた。一方、胎生 17.5 日に産生(標識)された BrdU 陽性細胞は、GABA 細胞の周囲に集まっていたが、胎生 14.5 日に産生された BrdU 陽性細胞の集積は認められなかった。これらの胎生 17.5 日に産生された BrdU 陽性細胞は、大脳皮質の浅層に位置するグルタミン酸作動性投射ニューロンに運命づけられた細胞のマーカーである Cux1 を発現していた。GABA 細胞の移動に関与することが知られるケモカインとその受容体 Cxcl12/Cxcr4 の発現や分布の変化は認められなかったが、脳スライスにおける細胞外 GABA を可視化したところ、細胞外 GABA 濃度が生後 4 日目に GABA 細胞が集積する傷害部位に顕著に上昇することが観察された。これに対しグルタミン酸の上昇は傷害部位に認められなかった。*in situ hybridization* 法と免疫組織化学染色の二重染色法により、胎生 14.5 日に産生された BrdU 陽性細胞には KCC2 の発現が認められるが、異常皮質の特定の部位に集積した GABA 細胞と胎生 17.5 日に産生された BrdU 陽性細胞には、その発現が見られなかった。

[考察]

微小脳回の初期形成過程では傷害部位への細胞の集積のパターンから、GABA 細胞が皮質板細胞に先行して移動して、細胞外へ GABA を放出していることが示唆された。GABA は、高い $[Cl^-]_i$ を有する未熟な神経細胞に対しては、脱分極性の作用を持ち、細胞の移動に関与することが報告されている。このモデルでは、GABA 細胞と遅く生まれた皮質板細胞が密集する領域で KCC2 の発現低下が認められることから、皮質凍結損傷は、これらの細胞に対して Cl^- ホメオスタシスの未熟型への回帰を引き起こし、細胞外 GABA の作用による細胞移動を誘導している可能性がある。一方、この未熟型への回帰は、深層に定着した早生まれの細胞には認められなかったことから、細胞移動による回路再編は本来の移動終了直後までが臨界期と考えられる。

[結論]

凍結損傷は、特定の皮質板細胞と GABA 細胞に対して KCC2 遺伝子の発現低下という内在的な変化と、異常皮質形成領域に GABA の放出を引き起こす外因性的な変化を起こすことで、細胞移動に異常をきたし、微小脳回を形成させる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

てんかんの原因となる大脳皮質の皮質形成異常は、神経細胞の移動の障害が関与する。しかし、皮質形成異常を形成する過程については未だ十分に解明されていない。そこで、申請者は、

GAD67-EGFP ノックインマウスに皮質凍結損傷を施行した限局的皮質形成異常(微小脳回)モデルを確立し、皮質形成に関与する神経細胞の分布の変遷と異常皮質内の細胞外 GABA 濃度やその GABA の作用を興奮-抑制に切り替えられる内在的な Cl^- ホメオスタシスの変化との関連について検討した。

微小脳回の初期形成過程では傷害部位への細胞の集積のパターンから、GABA 細胞が皮質板細胞に先行して移動して、細胞外へ GABA を放出していることが示唆された。GABA は、高い $[\text{Cl}^-]_i$ を有する未熟な神経細胞に対しては、脱分極性の作用を持ち、細胞の移動に関与することが報告されている。このモデルでは、GABA 細胞と遅く生まれた皮質板細胞が密集する領域で KCC2 の発現低下が認められることから、皮質凍結損傷は、これらの細胞に対して Cl^- ホメオスタシスの未熟型への回帰を引き起こし、細胞外 GABA の作用による細胞移動を誘導している可能性が示された。

審査委員会は、凍結損傷が、特定の皮質板細胞と GABA 細胞に対して KCC2 遺伝子の発現低下という内在的な変化と、異常皮質形成領域に GABA の放出を引き起こす外因性的変化を起こすことで、細胞移動に異常をきたし、微小脳回を形成させる可能性を世界で初めて報告したことを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 佐藤 康二
副査 中原 大一郎 副査 難波 宏樹

博士(医学) 川 端 俊 貴

論文題目

Optical diagnosis of gastric cancer using near-infrared multichannel Raman spectroscopy with a 1064-nm excitation wavelength

(1064 nm の励起波長による近赤外マルチチャンネルラマン分光法を用いた胃癌の光学的診断)

論文の内容の要旨

[はじめに]

胃癌は日本において最も頻度の高い癌の一つである。近年の光学的内視鏡診断技術の進歩により早期発見が可能となっているが、さらなる予後の改善のために新規診断技術の開発が期待されている。ラマン分光法 (Raman spectroscopy: RAS) は 1928 年に Raman により確立され、近年の技術発達により光学的診断に応用できる技術の一つとなった。RAS の原理は、物質に光が入射されると波長に小さな変化(ラマンシフト)を起こした光が散乱(ラマン散乱)される現象に基づいている。検体を前処理する必要がないためリアルタイムでの測定が可能である。また「分子の指紋」と呼ばれ、組織特異的な化学的情報の取得ができる。RAS を胃癌診断に応用できれば、胃癌の早期発見に寄与し、さらなる予後の改善が期待できる。

RAS において最も必要なことはラマン散乱光の取得であるが、ラマン散乱光は微弱で組織からの蛍光に妨害される。このため長波長励起により蛍光の影響を除外することが試みられているが、長波長励起のラマン散乱光は通常の CCD では検出できないため、我々は 1400 nm までの長波長に感度をもつ近赤外マルチチャンネル RAS 装置を開発した。本研究では、この新しく開発した RAS が胃癌の診断に応用できるかどうかの基礎的な検討を行った。

[材料と方法]

倫理委員会の承認と、すべての患者からのインフォームド・コンセントを得た。2005 年から 2006 年までに浜松医科大学第二外科で内視鏡検査を受けた胃癌 49 症例を対象に胃癌と正常粘膜から計 6 個の生検検体を採取した。検体は無処理で測定点を変えて数回測定し、測定後 HE 染色し組織学的に評価した。また胃癌切除検体は無処理で癌部と正常粘膜部のいくつかの点を測定した後、病理組織学的に診断した。

測定には 1064 nm 励起近赤外マルチチャンネル RAS 装置を使用した。Nd:YAG laser (1064 nm) で励起し、後方散乱光を近赤外光に感度のあるイメージインテンシファイア(浜松ホトニクス製)を用いて採光した。ラマンスペクトルは白色光による感度補正とインデンのラマンスペクトルによる波長補正を行い、 1027.5 cm^{-1} から 1794 cm^{-1} の合計強度で標準化した。これを検体毎に平均化し解析した。

主成分分析(PCA)によりスペクトルの特徴を抽出し、判別分析により胃癌の判別能を評価した。胃癌と正常粘膜の単一ラマンシフト(1644 cm^{-1})の強度の比較は、t 検定により検討した。

[結果]

ヒトの血液と脂肪組織を 1064 nm 励起により測定した結果、高シグナル/ノイズ(S/N) 比のラマンスペクトルが得られた。また、785 nm 励起にて正常胃粘膜を測定すると強い自家蛍光に妨害されたが、我々の装置での 1064 nm 励起では高 S/N 比の胃粘膜ラマンスペクトルを得ることができ、

本装置は物質診断に有用であることが確認された。

この結果に基づき胃癌 49 症例から 251 (123 の癌組織と 128 の正常粘膜) の生検検体を採取し、1064 nm 励起によるラマンスペクトルを測定した。癌と正常粘膜から得たラマンスペクトルの全体的な形状は似ていたが、それぞれの平均スペクトルには違いが見られた。さらに 251 のラマンスペクトルに対し PCA および判別分析を施行したところ、感度 66%、特異度 73%、正診率 70% で癌と正常粘膜を判別できた。PCA で得られた第一主成分の最も高いピークの波数は 1644 cm^{-1} であり、この波数が特徴的な性質を示していると考えた。 1644 cm^{-1} における強度を比較すると、癌と正常粘膜で有意な差を認め (t 検定、 $P<0.001$)、 1644 cm^{-1} における単一ラマンシフトの強度を用いた判別分析では、感度 70%、特異度 70%、正診率 70% で癌と正常粘膜を判別できた。

次に切除検体の癌部 5 点、正常部 5 点からラマンスペクトルを取得したところ癌部のラマンスペクトルは正常部のラマンスペクトルと区別できた。 1644 cm^{-1} におけるラマンシフトの強度は癌部と正常部で有意差があった (t 検定、 $P<0.05$)。

[考察]

胃癌に対する RAS はこれまで *in vitro* でのみ研究されており、今回初めて新鮮な臨床検体を *ex vivo* として用いた。RAS はこれまで、乳腺や、肺、食道、その他の悪性疾患に対して用いられている。中でも乳癌においては、RAS を用いた判別で高い感度と特異度をもつことが報告されているが、胃癌研究の報告は少ない。RAS による胃癌診断が困難である理由として、1. 胃癌は、乳癌の様に高密度で硬くなることがない、2. 胃癌には種々の組織型がある、3. 胃癌患者の正常胃粘膜にはほとんど慢性炎症が存在する、などが考えられる。これらの問題を克服し、正診率を上げるために、我々はヘリコバクター・ピロリ感染と炎症がない健常人正常胃粘膜の RAS による研究を開始した。また胃癌に対する胃切除検体の直接測定を始めた。癌部のラマンスペクトルは正常部のものと区別できたが、今後生検検体のラマンスペクトルと比較するとともに、より精細な研究が必要と考えられた。

今回の研究では 1644 cm^{-1} にピークが存在した。 1644 cm^{-1} は 1650 cm^{-1} と同様に蛋白/アミド結合のピークと考えられた。癌組織において 1644 cm^{-1} の強度が大きいことは、高い蛋白合成のために大きな N/C 比となる癌細胞の数が増加している可能性を示唆している。単一波数 (1644 cm^{-1}) の強度を用いた正診率は、スペクトルに含まれるすべての情報を利用した PCA と同程度であり、単一波数における強度の使用でラマン診断法を簡易化できる可能性が示された。

今回の研究により初めて、1064 nm 励起近赤外マルチチャンネル RAS 装置を用いた胃癌診断の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

ラマン分光法は、前処理なしで物質特異的なスペクトルを観測可能であり、癌診断への応用が期待されている。申請者は、49 例の胃癌患者から内視鏡下で採取された胃癌組織と正常粘膜組織に対して 1064 nm 励起近赤外マルチチャンネルラマン分光装置を用い、ラマン散乱光を解析した。その結果、胃癌組織と正常粘膜ではラマン散乱光のスペクトルに相違がみられ、主成分分析では感度 66%、特異度 73%、正診率 70% で癌と正常粘膜を判別できた。第一主成分の最も高いピークの波数は 1644 cm^{-1} であり、 1644 cm^{-1} の単一ラマンシフトの強度の比較でも 70% の正診率が

得られ、ラマン診断法を簡易化できることを示した。また切除標本でも癌部と非癌部で 1644 cm^{-1} のラマンシフトの強度に有意差を認めた。 1644 cm^{-1} のピークは蛋白/ペプチドのアミド結合に由来し、癌組織の活発なタンパク合成を反映していると考えられている。以上の結果から、申請者は 1064 nm 励起ラマン分光法により、簡便で迅速な胃癌診断ができることを示した。

審査委員会では、申請者が開発したラマン分光法を用いる診断法が胃癌の迅速診断法として有望であり、生検材料、切除標本を用いた本研究が将来の内視鏡下でのインビボ胃癌診断への応用の基礎になる研究であると高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した

論文審査担当者 主査 阪原 晴海
副査 間賀田 泰寛 副査 古田 隆久

博士(医学) 中西 啓

論文題目

Identification of 11 novel mutations in *USH2A* among Japanese patients with Usher syndrome type 2 (日本人アッシャー症候群タイプ 2 患者の *USH2A* 遺伝子における 11 種の新規遺伝子変異の同定)

論文の内容の要旨

[はじめに]

アッシャー症候群 (USH) は、網膜色素変性症に難聴を合併する常染色体劣性遺伝性疾患である。USH は、難聴の程度と前庭機能障害の有無などの臨床症状により、タイプ 1~3 の 3 つのタイプに分類されている。

タイプ 2 は、3 つのタイプの中で最も頻度が高く、網膜色素変性症に中等度〜高度難聴を合併し前庭機能障害を認めないことが特徴である。現在までに、タイプ 2 の原因遺伝子として、*USH2A*、*USH2C* (*GPR98*)、*USH2D* (*DFNB31*) が同定されているが、欧米等の症例では *USH2A* 変異がタイプ 2 患者の 74~90% に認められ最も頻度が高いことが報告されている。

欧米で行われた *USH2A* 遺伝子解析では、1 種の欠失変異 p.Glu767fs (c.2299delG) が複数の患者で同定され、創始者効果による高頻度変異であると考えられている。一方、本邦症例では *USH* 遺伝子解析の報告が全くなく、原因遺伝子の頻度、高頻度変異の有無等に関して不明である。これらの点を明らかにするために、本邦で初めてタイプ 2 患者を対象として *USH2A* 遺伝子解析を行った。

[患者ならびに方法]

1. *USH2A* 遺伝子解析

臨床症状よりタイプ 2 と診断した日本人患者 10 人を対象として遺伝子解析を行った。末梢血よりゲノム DNA を抽出し、*USH2A* の全エキソン 1~73 を PCR ダイレクトシーケンス法にて解析した。現在までに世界で報告されていない塩基変化については、視覚障害や難聴を認めない日本人正常対照群 135 人の検体を用いて、当該塩基変化の存否の解析を行った。

2. 患者の臨床症状

眼科的検査および耳鼻科的検査を行い、網膜色素変性症、難聴、前庭機能障害の有無について評価した。また、*USH2A* 遺伝子変異例では、難聴は進行しないことが多いと報告されているため、過去 5 年以上に渡って経過を追跡できた患者では、聴力悪化の有無についても評価した。

[結果]

1. *USH2A* 遺伝子解析

10 人の患者において *USH2A* の遺伝子解析を行い、8 人の患者で 14 種の疾患原因と考えられる変異を同定した。変異の内訳は、ナンセンス変異 1 種、欠失変異 4 種、スプライシング変異 2 種、ミスセンス変異 7 種であり、11 種は現在までに報告されていない新規の変異であった。これらの変異は、エキソン 3~64 に広範囲に分布しており、明らかな変異ホットスポットは認められなかった。しかし、1 種のスプライシング変異 c.8559-2A>G は 4 人の患者において同定され、日本人のタイプ 2 患者における高頻度変異と考えられた。疾患原因変異は、いずれも日本人正常対照群では全く認

められなかった。

2. 患者の臨床症状

疾患原因変異を同定することができた 8 人の患者は、網膜色素変性症に中等度～高度感音難聴を合併していた。網膜色素変性症は、年齢とともに症状が悪化する傾向を示していたが、患者 C237 は年齢に比較して視野狭窄が極めて高度であった。難聴の進行について評価することができた 5 人の患者の中で、患者 C152 は右耳に軽度の進行を、患者 C237 は両耳に高度の進行を認めた。前庭機能は、全患者において正常であった。

[考察]

1. *USH2A* 遺伝子解析

10 人中 8 人の患者において *USH2A* に疾患原因変異を同定した。このことより、日本人においても欧米人と同様に、*USH2A* 遺伝子変異によりタイプ 2 を発症する患者が多いと考えられた。しかし、14 種の変異の中で 11 種は新規であり、欧米人における高頻度変異である p.Glu767fs が 1 人にも認められなかったことは、日本人と欧米人では変異スペクトラムが全く異なることを示唆していると思われた。

スプライシング変異 c.8559-2A>G は、10 人中 4 人の患者において同定され、日本人のタイプ 2 患者における高頻度変異である可能性が高い。本変異に重点をおいて解析することにより、効率的にタイプ 2 患者の遺伝子診断を行うことが可能であると思われた。

2. 患者の臨床症状

患者 C237 は、高度の視野狭窄に加えて、高度の聴力悪化を認め、非典型的臨床症状を示す *USH2A* 遺伝子変異例であった。本症例では、環境因子や修飾遺伝子の変異が臨床症状に影響を与えている可能性が高い。

[結論]

日本人においても欧米人と同様に、*USH2A* 遺伝子変異によりタイプ 2 を発症する患者が多かった。しかし、日本人と欧米人では、*USH2A* の変異スペクトラムが全く異なっていた。スプライシング変異 c.8559-2A>G は日本人タイプ 2 患者における高頻度変異である可能性が高く、遺伝子診断に有効である。

論文審査の結果の要旨

網膜色素変性症に難聴を伴うアッシャー症候群 (USH) は常染色体劣性に遺伝することが知られ、聴力や前庭機能から 3 つの亜型に分類されている。このうちタイプ 2 は前庭機能障害を認めないことを特徴とする、最も頻度の高い中心的病型であり、usherin をコードする *USH2A* の変異が欧米例の 74 ~ 90% に認められる。その他に *USH2C*、*USH2D* などの変異が報告されているが、本邦例では未だ解析がされていない。

申請者はわが国におけるアッシャー症候群の症例についての遺伝子解析を行い、新たな遺伝子変異の有無や欧米報告例との比較を行った。

対象は眼科的および耳鼻科的検査により網膜色素変性症、難聴、前庭機能障害を評価しアッシャー症候群のタイプ 2 と臨床診断された日本人患者 10 人である。末梢血よりゲノム DNA を抽出

し、USH2A の全エクソン 1 ~ 73 につき PCR ダイレクトシーケンスを行い、視覚障害や難聴を認めない日本人 135 人を対照群として検討した。

遺伝子解析により 8 人の患者でナンセンス変異 1 種、欠失変異 4 種、スプライシング変異 2 種、ミスセンス変異 7 種の計 14 種の疾患原因と考えられる変異が認められた。このうち 11 種は現在までに報告のない新規変異であった。変異はエクソン 3 ~ 64 に広範に分布し、明らかなホットスポットは見られなかったが、対照群では全く認められなかった。スプライシング変異 c.8559-2A>G は 4 人に見られ日本人患者の高頻度変異の可能性が考えられた。

疾患原因変異を同定することのできた 8 人の患者は中等度～高度の感音性難聴を合併したが、前庭機能は正常であった。網膜色素変性症は年齢とともに悪化する傾向を示した。1 例で高度の視野狭窄と聴力の悪化を示し、他の修飾因子の関与も考えられた。

審査委員会では聴力や視力に障害を呈する遺伝性疾患であるアッシャー症候群のうち、特に臨床上重要なタイプ 2 の本邦例について初めて遺伝子解析を行い、我が国の症例の遺伝子的特質と新規の変異の存在を明らかにしたことを高く評価した。

論文審査担当者 主査 大関 武彦
副査 前川 真人 副査 佐藤 美保

博士(医学) 梶 塚 正 誠

論文題目

Serum levels of platelet-derived growth factor BB homodimers are increased in male children with autism

(血清中の血小板由来増殖因子 BB ホモ二量体濃度は自閉症男児において上昇する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

自閉症は社会的相互作用や言語性コミュニケーションの障害、および限定された興味と行動様式によって特徴付けられる重篤な発達障害である。その病態生理はいまだ不明であるが、少なくともその一部にはセロトニン系の機能異常が関与すると考えられている。また、自閉症の死後脳研究において proinflammatory cytokine が高値を示すことから、免疫系にも異常があると考えられている。血小板由来増殖因子 (PDGF) と血管内皮増殖因子 (VEGF) は、いずれもセロトニン神経の発達、分化に重要な役割を担う増殖因子であると共に、炎症や免疫反応に関与していることが知られている。そこで、本研究において我々は自閉症男児を対象として、これらの増殖因子の血清中の濃度を測定し、臨床所見との関連性を調べた。

[対象と方法]

対象は自閉症男児 31 名 (平均年齢 12.3 ± 3.2 歳、6~19 歳)、および、同年齢の健常男児 31 名 (平均年齢 12.4 ± 2.4 歳、6~19 歳) である。自閉症群のすべてが自閉症のみを有し、他の精神疾患や神経疾患に罹患していないことを確認した。自閉症群 31 名のうち、1 名は採血の 6 か月前の短期間、抗不安薬の投与を受けていたが、残りの 30 名はこれまで薬物治療を受けたことがない。自閉症群については、16 歳未満の対象者ではウェクスラー児童用知能検査第 3 版 (WISC-III) によって、また、16 歳以上の対象者ではウェクスラー成人用知能検査改訂版 (WAIS-R) によって知能指数を測定した。また、自閉症診断面接改訂版 (ADI-R) にて自閉症の臨床症状を評価した。

末梢血清中の PDGF の 3 種のサブタイプ (AA、AB、BB) と VEGF の濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定した。自閉症群と健常群との比較には、two-tailed Student's t-test を用いた。PDGF や VEGF の濃度と ADI-R の評価スコア、知能指数との相関は Pearson の相関係数を用いて検討した。

本研究は浜松医科大学の医の倫理委員会の承認を得ており、すべての対象者に研究の目的と意義・内容について文書と口頭で十分な説明をし、本人および保護者より書面での同意を得た。

[結果]

PDGF-AA、PDGF-AB、VEGF の濃度は、自閉症群と健常群の間に有意差はなかった。しかし、血清 PDGF-BB の濃度は、健常者群に比し自閉症群が有意に高い値を示した。すなわち、自閉症群では 5624.5 ± 1651.8 pg/ml (mean \pm SD)、健常群では 4758.2 ± 1521.5 pg/ml (mean \pm SD) であり、両者の間に有意差が認められた ($p=0.0188$)。また、自閉症群の血清 PDGF-BB の濃度は ADI-R の症状のうち、同じ行動を繰り返すという、常同的行動パターンと正の相関を示した ($r=0.5320, p=0.0010$)。知能指数との間には有意な相関はなかった。

[考察]

自閉症では免疫系に異常があることが繰り返し指摘されてきた。例えば、自閉症の死後脳では複数の proinflammatory cytokine が上昇していることが報告され、また、自閉症ではクローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患が多いことが知られている。このことから、自閉症における免疫系の異常は中枢のみならず末梢においてもみられることが示唆される。自閉症では末梢 PDGF-BB が上昇しているという本研究の結果は、この従来の考えと矛盾しない。

本研究では、自閉症の血清 PDGF-BB 濃度は常同的行動パターンと相関していた。したがって、血清 PDGF-BB は自閉症の臨床症状の末梢マーカーになりえることが示唆される。現在のところ、血清 PDGF-BB が脳内 PDGF-BB をどの程度反映するのかなどについては不明である。しかし、セロトニン再取り込み阻害薬は自閉症の常同的行動パターンの改善に有効であり、また、PDGF-BB はセロトニン神経の発達、分化に関わっている。このことから、PDGF-BB は脳内においても自閉症の病態生理に関与しており、血清 PDGF-BB はそれを反映していることが推測される。しかし、この推論の検証には今後の検討が必要である。

[結論]

本研究の結果から、PDGF-BB が自閉症の病態生理の一部に関与していることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

自閉症の病態生理はいまだ不明であるが、少なくともその一部にはセロトニン系の機能異常が関与すると考えられている。血小板由来増殖因子 (PDGF) は、セロトニン神経の発達、分化に重要な役割を担う増殖因子であると共に、炎症や免疫反応に関与していることが知られている。そこで、申請者は、自閉症男児を対象として、これらの増殖因子の血清中の濃度を測定し、臨床所見との関連性を調べた。

対象は自閉症男児 31 名 (平均年齢 12.3 ± 3.2 歳、6 ~ 19 歳)、および、同年齢の健常男児 31 名 (平均年齢 12.4 ± 2.4 歳、6 ~ 19 歳) である。自閉症診断面接改訂版 (ADI-R) にて自閉症の臨床症状を評価した。末梢血清中の PDGF の 3 種のサブタイプ (AA、AB、BB) を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定した。

血清 PDGF-BB の濃度は、健常者群に比し自閉症群が有意に高い値を示した。また、自閉症群の血清 PDGF-BB の濃度は ADI-R の症状のうち、同じ行動を繰り返すという、常同的行動パターンと正の相関を示した ($r=0.5320, p=0.0010$)。

審査委員会は、本研究は自閉症群の血清 PDGF-BB の濃度の変化とその症状との相関を初めて報告したことを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 佐藤 康二
副査 中原 大一郎 副査 福田 敦夫

博士(医学) 藤田 梓

論文題目

Decreased serum levels of adiponectin in subjects with autism

(自閉症患者における血清アディポネクチン濃度の低下)

論文の内容の要旨

[はじめに]

自閉症は社会的相互作用や言語性コミュニケーションの障害、および、限定された興味と行動様式によって特徴付けられる重篤な発達障害である。その病態生理はいまだ不明であるが、少なくともその一部にはセロトニン系の機能異常が関与すると考えられている。一方、アディポネクチンは近年発見された、脂肪組織で産生されるタンパクである。末梢血において高濃度で循環し、エネルギー代謝のコントロールを行い、インスリン抵抗性とBMIなどの肥満のパラメーターに関係している。さらに、近年の研究により、アディポネクチンはセロトニンの調整を受けていることが明らかにされている。そこで、本研究において我々は自閉症男児を対象としてアディポネクチンの血清中の濃度を測定し、臨床所見との関連性を調べた。

[対象と方法]

対象は自閉症男児 31 名 (平均年齢 12.1 ± 2.4 歳、6~19 歳)、および、同年齢の健常男児 31 名 (平均年齢 11.6 ± 2.9 歳、6~19 歳) である。自閉症群のすべてが自閉症のみを有し、他の精神疾患や神経疾患に罹患していないことを確認した。自閉症群 31 名のうち 2 名は採血の 6 ヶ月以上前に抗精神病薬の投与を受けていたが、残りの 29 名はこれまで薬物治療を受けたことがない。自閉症群について、16 歳未満の対象者ではウェクスラー児童用知能検査第 3 版 (WISC-III) によって、また、16 歳以上の対象者ではウェクスラー成人用知能検査改訂版 (WAIS-R) によって知能指数を測定した。また、自閉症診断面接改訂版 (ADI-R) にて自閉症の臨床症状を評価した。

対象者について、体重、身長、腹囲を測定し、Body Mass Index (BMI) を求めた。血液採取は午前 11 時~正午の空腹時に採血し、室温で 30 分間静置した後、遠心分離を行い、200 μ l に分注し-80°Cで保存した。アディポネクチンの濃度は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定した。結果の統計解析として、血清アディポネクチン濃度の比較には Unpaired t-test を 1%の有意水準で用い、血清アディポネクチン濃度と症状評価との相関には Pearson の相関係数を 5%の有意水準で用いた。

本研究は浜松医科大学の医の倫理委員会の承認を得ており、すべての対象者に研究の目的と意義・内容について文書と口頭で十分な説明をし、本人および保護者より書面での同意を得た。

[結果]

自閉症群と健常群の 2 群間において知能指数、並びに、体重、身長、腹囲、BMI に有意差はなかった。血清アディポネクチン濃度は自閉症群で 11.0 ± 4.0 μ g/ml (mean \pm SD)、健常群で 14.5 ± 5.3 μ g/ml (mean \pm SD) であり、自閉症群で有意に低下していた ($p=0.005$)。自閉症群の血清アディポネクチン濃度は ADI-R の症状のうち、対人的相互理解を示すスコアと負の相関を示した ($r = -0.542$, $p = 0.014$)。

[考察]

自閉症児では、健常児に比し、血清アディポネクチン濃度が有意に低下していることが示された。しかし、血清アディポネクチンは血液脳関門を通過しないことから、血清アディポネクチン濃度の低下が自閉症の病態生理に直接的影響を及ぼしているとは考えられない。従って、自閉症児の血清アディポネクチン濃度と対人的相互理解を示すスコアとの間の負の相関関係についても、病態生理の視点から考察することはできない。しかしながら、この結果は、血清アディポネクチン濃度が低下すればするほど、自閉症の中核症状である対人的相互理解の障害が重度になることを示しており、血清アディポネクチン濃度が自閉症の臨床症状の有用な末梢生物学的マーカーになりえることを示唆している。

さて、セロトニン 2A レセプター拮抗薬であるサルポグレラートを投与すると、血清アディポネクチン濃度が上昇することが報告されている。これらから、セロトニン濃度の上昇はアディポネクチン濃度の低下をもたらす可能性が推測される。自閉症では血中セロトニン濃度が上昇傾向にあることから、一部このことが関係して血清アディポネクチン濃度の低下をもたらしているのかもしれない。しかしながら、本研究では、血中セロトニン濃度は測定しておらず、この推論の証明には今後の検討が必要である。

[結論]

本研究の結果から、血清アディポネクチン濃度が自閉症の末梢生物学的マーカーとなりうる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

自閉症は男児に多い精神疾患であり、その有病率は 1.57%と報告されている。病態についてはセロトニン仮説、炎症仮説、脂質代謝異常仮説などが提唱されているが、未だ明らかでない。近年、脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインと自閉症との関連も報告されているが、抗炎症性アディポサイトカインであるアディポネクチンについては先行研究が見られない。そこで申請者らは自閉症患者血清中のアディポネクチン値を測定し、自閉症の臨床症状を反映する自閉症診断面接改訂版 (ADI-R) の値との相関などを検討した。

対象は 6 ~ 19 歳の自閉症男児 31 名および健常男児 31 名であるが、両者間に体重、身長、腹囲、BMI の差はなかった。知能指数は 16 歳未満ではウェクスラー児童用知能検査第 3 版 (WISC-III)、16 歳以上の対象者ではウェクスラー成人用知能検査改訂版 (WAIS-R) によって測定したが、自閉症患者 (平均±標準偏差: 85.3 ± 6.2) では健常者 (103.8 ± 2.7) より有意に低かった ($p < 0.01$)。午前 11 時～正午の空腹時に採血し、enzyme-linked immunosorbent assay 法により測定したアディポネクチンの濃度は、自閉症群 ($11.0 \pm 4.0 \mu\text{g/ml}$) で健常群 (14.5 ± 5.3) に比し有意に低下していた ($p < 0.01$)。自閉症群の血清アディポネクチン濃度は ADI-R の症状のうち、自閉症の中核症状である対人的相互理解を示すスコアと負の相関を示した ($r = -0.542$, $p = 0.014$)。

本研究により自閉症では血清アディポネクチン濃度が低下していることが初めて示され、またこの低下と対人的相互理解の障害が相関することがわかった。血清アディポネクチン濃度と自閉症の病態の関係は不明であるが、血清アディポネクチン濃度はセロトニンにより影響を受けることが知られており、前述の 3 つ仮説をつなぐ要因の一つである可能性もある。以上のような点を、審査委

員会では高く評価した。本研究の臨床的位置づけや前述の仮説との関連についてのさらなる研究が期待される。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	難波 宏樹		
	副査	佐藤 康二	副査	中原 大一郎

博士(医学) 天野 慎 士

論文題目

Use of genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells for glioma gene therapy

(遺伝子導入骨髄間葉系幹細胞を用いた神経膠腫に対する遺伝子治療)

論文の内容の要旨

[はじめに]

悪性神経膠腫の治療成績は、近年の治療技術の発達にもかかわらず、過去 30 年間ほとんど改善されていない。最も悪性の膠芽腫では現在も多くの患者が約 1 年で命を落としており、新たな治療法の開発が切望されている。1990 年代に単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSVtk) 遺伝子を腫瘍細胞へ導入させた後、抗ウイルス剤であるガンシクロビル (GCV) を全身投与する遺伝子治療が開発された。遺伝子治療では遺伝子導入効率が常に問題になるが、HSVtk/GCV 遺伝子治療では遺伝子非導入細胞に対しても殺細胞効果がおよぶバイスタンダー効果と呼ばれる現象が起こることが分かり注目をあびた。欧米ではレトロウイルスを用いて腫瘍細胞に直接遺伝子導入を行う方法にて第3相臨床試験まで進められたが、この方法では脳内を浸潤性に広がる神経膠腫を根治させることは困難であった。我々の研究室ではこれまで、腫瘍へ向けての遊走能が知られている神経幹細胞 (NSC) に遺伝子導入を行い、バイスタンダー効果を利用して抗腫瘍効果を発現させるモデルの動物実験を行い、良好な結果を得てきた。しかしながら成人において十分量の NSC を得ることは容易でない。近年、成人骨髄から得られる間葉系幹細胞(MSC)にも NSC 同様の腫瘍集積性があることが分かってきた。本研究では、採取が容易でより臨床応用に適している MSC を用いた HSVtk/GCV 遺伝子治療の効果について検討を行った。

[材料ならびに方法]

1. HSVtk 遺伝子導入 MSC (MSCtk)の作製

Sprague-Dawley (SD) ラットの下肢長管骨より MSC を採取し、専用培養液にて培養を行った。HSVtk 遺伝子の導入は、マウスの繊維芽細胞に HSVtk 遺伝子を組み込んだレトロウイルス産生細胞である PA317 を用いて行った。その後、G418 にて選別した細胞 (MSCtk) を以下の実験に用いた。

2. In vitro バイスタンダー効果

MSCtk とラット神経膠芽腫細胞 C6 を様々な比率で混合し培養した(細胞数 5×10^3 、MSCtk/C6 比を 1/1~1/128)。最初の 7 日間は GCV 存在下 ($1 \mu\text{g/ml}$) で培養、その後は通常の培養を行い、7 日目、14 日目の細胞数を計測した。また、GFP ラットより採取、遺伝子導入した GFP-MSCtk を用い、培養顕微鏡にてリアルタイムにバイスタンダー効果の様子を観察した。

3. In vivo 脳腫瘍治療実験

体重約 300 g の SD ラット脳内に C6 細胞 (1×10^5) を移植した。この脳腫瘍モデルでは全例約 3 週間で腫瘍死する。その 3 日後に MSCtk (1×10^5) を腫瘍部に注入し、その翌日より 7 日間 GCV (30 mg/kg/day) または生理的食塩水の腹腔内投与を行った。腫瘍移植より 20 日目に脳を摘出し、組織学的に検討を行った(各群 $n=6$)。別の動物で生存期間を調査した($n=6$)。

[結果]

1. In vitro バイスタンダー効果

MSCtk/C6 比が 1/1～1/32 までは完全な腫瘍死滅効果が得られた。1/64 および 1/128 でも有意な腫瘍増殖抑制効果が見られた。(p<0.001)培養顕微鏡を用いた実験では、腫瘍細胞が MSCtk に接した時に死滅していくバイスタンダー効果の様子をリアルタイムに観察できた。MSCtk は GCV 存在下でも 48 時間以上生存し、バイスタンダー効果が続いていた。

2. In vivo 脳腫瘍治療実験

MSCtk の腫瘍内注入と GCV の全身投与を行った群では、生食投与群に比し腫瘍の大きさは有意に縮小していた ($94.6 \pm 31.89(\text{SD})$ vs. $1.8 \pm 0.6\text{mm}^3$) (p<0.001)。生存期間も有意に延長し ($21.0 \pm 1.9(\text{SD})$ vs. 61.3 ± 38.4 日) (p<0.003)、6 例中 2 例で 100 日以上生存し治癒したものと考えられた。

[考察]

In vitro バイスタンダー効果は、MSCtk/C6 比が 1/32 まで完全な腫瘍死滅効果が得られ、NSC での実験と比べても遜色なかった。また、培養顕微鏡を用いた観察では、最初は C6 細胞が増殖していったが、MSCtk と接した腫瘍細胞はバイスタンダー効果により死滅していった。MSCtk は 48 時間以上生存し、バイスタンダー効果が続いた。バイスタンダー効果は、細胞分裂時に起こるので、分裂能の低い MSCtk は長期間生存したと考えられる。

In vivo 脳腫瘍治療実験では、明らかな脳腫瘍の縮小と生存曲線の延長が見られた。この効果も NSC と比べ遜色なかった。MSCtk と腫瘍細胞の比率により効果が変わるので、MSCtk の投与量を考慮する必要がある。MSCtk 投与後は早めに GCV を開始する方が効果的と考えられた。

悪性神経膠腫の再発は正常脳組織に浸潤した腫瘍周辺の細胞から起こってくる。腫瘍細胞に直接遺伝子導入を行う HSVtk/GCV 自殺遺伝子ではこの部分が治療できなかったと思われる。腫瘍集積性のある NSC や MSC をベクターとして用いれば、問題となってくる浸潤部にも充分に行き渡り、バイスタンダー効果により抗腫瘍効果が得られると考えられた。また NSC よりも MSC の方が採取も容易で、より臨床応用に近いと考えられた。

[結論]

MSC を用いた HSVtk/GCV 自殺遺伝子治療は、NSC を用いた場合とほぼ同等の効果がある。MSC の採取がより容易であることを考慮すると臨床応用に適した方法と考えられた。

論文審査の結果の要旨

神経膠腫は周囲の正常組織に浸潤するため、根治的手術が困難である。その中でも神経膠芽腫の平均生存期間は 1 年に過ぎないことから、新規治療法の開発が望まれてきた。申請者が所属する研究室では単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ (HSVtk) と抗ウイルス剤ガンシクロビル (GCV) の併用によって生じる bystander 効果を利用した自殺遺伝子治療の研究を行ってきた。Bystander 効果とは HSVtk によって生成された GCV 代謝産物が細胞接着装置などを介して、隣接する腫瘍細胞に拡散し、細胞分裂の際に細胞死を引き起こすことで抗腫瘍効果を発揮する現象である。しかし、従来のウイルスなどを用いた遺伝子導入法では浸潤性に広がる神経膠腫の

すべてを治療範囲に収めることができず、根治につながらないことがわかっている。

そこで、申請者は腫瘍を追跡する能力があることが知られている骨髄由来 mesenchymal stem cells (MSC) に HSVtk 遺伝子を導入した MSCtk から生じる bystander 効果の検討を行った。In vitro では、MSCtk と神経膠腫細胞を GCV 存在下で共培養すると、MSCtk に対する細胞毒性は低いが腫瘍細胞の増殖が抑制されること ($p < 0.01$) を明らかにした。In vivo では、ラット脳に作製した神経膠腫腫瘍に直接注入された MSCtk が腫瘍全体に移動するだけでなく腫瘍浸潤部にも移動すること、腫瘍径を縮小させること ($p < 0.01$) 及び生存期間を延長させること ($p < 0.01$) を明らかにした。

Neural stem cells を HSVtk のベクターとして用いた研究で同様の結果を得ているが、採取がより容易な骨髄由来 MSC を HSVtk のベクターとして用いることに申請者の研究の新規性と有用性があるものと考えられた。申請者の研究は、自殺遺伝子治療を臨床応用可能にするものとして高く評価された。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 岩下 寿秀
副査 大西 一功 副査 宮嶋 裕明

博士(医学) 孫 焯

論文題目

Different striatal D₂ receptor function in an early stage after unilateral striatal lesion and medial forebrain bundle lesion in rats

(ラット片側パーキンソンモデル後早期におけるドパミン D₂ 受容体機能:線条体破壊モデルと内側前脳束破壊モデルの違い)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ラットのパーキンソン病モデルには2つある。ひとつはドパミン神経毒である6-hydroxydopamine (6-OHDA) を線条体に注入するモデル、もうひとつは内側前頭束 (MFB) に6OHDAを注入するモデルである。しかしながら線条体破壊モデルとMFB破壊モデルにおけるpre-synapticおよびpost-synapticのドパミン神経系の機能の違いについては不明な点が多い。これらの違いを明らかにすることは、パーキンソン病の病態研究を考える上で重要である。本研究では行動学的解析に加え、pre-synaptic dopamine transporter (DAT) とpost-synaptic D₂ receptorを反映する放射性トレーサーを用いたイメージング及びtyrosine hydroxylaseの免疫染色などにより、これら2つのパーキンソン病モデルにおけるドパミン神経系の機能の違いを検討した。

[材料ならびに方法]

雄 Sprague-Dawley 系ラットを用いた。当教室の以前の研究で線条体に1~4ヶ所の6-OHDA破壊 (7 μg/lesion) をおくことによりさまざまな段階の片側パーキンソン病モデルを作ることができることを示してきた。今回の実験では1ヶ所破壊(1-lesion 群、n=15)と4ヶ所破壊(4-lesion 群、n=18)を用い、さらにMFB破壊モデル(MFB 群、n=18)とsham手術群(対照群、n=8)を設けた。

すべての動物において手術3週間後にドパミンのreuptake inhibitorであるmethamphetamine (3 mg/kg) およびD₂受容体のagonistであるbromocriptine (5 mg/kg) の腹腔内投与により誘発される回転運動とパーキンソン病モデルの重症度の指標として用いられるstepping testを施行した。一部の動物において、行動学的試験の後に黒質を含む切片を作成しtyrosine hydroxylaseによる免疫染色を行った。

行動学的試験の後に一部の動物において、放射性トレーサーの取り込みを観察した。DATを反映するトレーサーである[¹¹C]-2-beta-carbomethoxy-3beta-(4-fluorophenyl) tropane ([¹¹C]CFT) (4-lesion 群 n=7、MFB 群 n=7、対照群 n=3、10.8 ± 0.4 MBq)またはpost-synaptic D₂ receptorを反映する[¹¹C]raclopride(4-lesion 群 n=8、MFB 群 n=8、対照群 n=3、11.0 ± 0.5 MBq)を尾静脈より投与し、30分後に左右の線条体を取り出した。重量と放射能を測定し、単位重量あたりの(lesion-intact)/intactの放射能比を算出し、各群間の比較を行った。また一部の動物においては、トレーサーの取り込みを小動物用micro-positron emission tomography (PET) cameraを用いて画像化した。

[結果]

Tyrosine hydroxylase 免疫染色により、黒質におけるドパミン神経の数を対照群と比較すると、1-lesion 群では20%、4-lesion 群では85%減少しており、この結果は当教室の以前の結果と一致

していた。MFB 群では 98%減少しており、ほぼすべてのドパミン神経が破壊されるモデルと考えられた。

パーキンソン病モデルの重症度の指標として用いられる **stepping test** における各種パラメーター (**initiation time, stepping length, adjusting steps**) は、当教室の以前の報告と同様に、いずれの群でも明らかな左右差を認めたが、その障害の強さは **1-lesion, 4-lesion, MFB** の 3 群間で差を認めなかった。**methamphetamine** の投与では、いずれの群のラットも破壊と同側への回転運動がみられ、これも以前の報告と同様にその回転数において 3 群間に有意な差を認めなかった。一方、**bromocriptine** の投与による回転運動は線条体破壊群では **methamphetamine** と同様に破壊と同側に向かうが、MFB 群では破壊と反対側に向かう回転運動がみられ、**D₂** 受容体の左右のバランスが両モデルで異なることが示唆された。

線条体における [¹¹C]CFT の取り込みは **4-lesion** 群で $-23.7 \pm 5.0 \%$ ($p < 0.05$)、MFB 群で $-62.9 \pm 7.0 \%$ ($p < 0.01$) と、いずれも破壊側で有意な取り込みの減少がみられた。黒質のドパミン神経の減少を反映して、MFB 群での減少はより強く、MFB 群と **4-lesion** 群の 2 群間の差も有意であった ($p < 0.01$)。一方、[¹¹C]raclopride の取り込みは **4-lesion** 群で $-18.0 \pm 5.0 \%$ と有意な減少がみられたが ($p < 0.05$)、MFB 群では逆に $+35.0 \pm 6.0 \%$ と有意な増加がみられた ($p < 0.01$)。また PET 画像でも上記の変化が視覚的に明らかに示された。

[考察]

ドパミンの **reuptake inhibitor** である **methamphetamine** による回転運動と **DAT** を反映する [¹¹C]CFT の取り込みは線条体破壊でも MFB 破壊でもほぼ同様の変化がみられ、いずれのモデルでも強度は違うが **pre-synaptic** 機能が障害されているものと考えられた。一方、**D₂** 受容体の **agonist** である **bromocriptine** による回転運動と **D₂** 受容体トレーサーの取り込みは、線条体破壊と MFB 破壊では正反対であり、**post-synaptic D₂** 受容体機能は線条体破壊では **down-regulate** され、MFB 破壊では **up-regulate** されているものと考えられた。

パーキンソン病においては、初期には黒質のドパミン神経の脱落に伴い、線条体における **post-synaptic** 機能は **up-regulate** されていると考えられており、MFB 破壊モデルはこの状態に類似している。一方、線条体の虚血などによって引き起こされるパーキンソン症候群においては線条体の **pre-**および **post-synaptic** 機能の両方が障害されており、線条体破壊モデルはこの状態に類似する。このような違いはパーキンソン病モデルラットを用いる研究において十分に考慮される必要がある。

[結論]

線条体破壊モデルと MFB 破壊モデルは共にパーキンソン病モデルとしてよく用いられるが、その病態は大きく異なっており、これらのモデルを用いた研究結果の解釈には注意を要する。

論文審査の結果の要旨

ラットパーキンソン病モデルにおけるドパミン神経系機能について明らかにすることはパーキンソン病の病態を考える上で重要である。

申請者らは、2種類のモデルを用いドパミン神経系機能を解析した。パーキンソン病モデルはラットの線条体あるいは内側前脳束に 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を注入して作成した。ドパミントランスポータ機能を反映する [¹¹C]-2-beta-carbomethoxy-3beta-(4-fluorophenyl) tropane の線条体における取り込みは両モデルとも破壊側で減少していたが、ドパミン D₂ 受容体に結合する [¹¹C]raclopride の集積は線条体破壊モデルにおいて破壊側で減少する一方、内側前脳束破壊モデルでは破壊側で逆に増加した。これらの結果は、シナプス前機能は両モデルとも障害されているが、ドパミン D₂ 受容体発現は線条体破壊モデルにおいて低下しているのに対し、内側前脳束破壊モデルでは亢進していることを示すものである。申請者らは、内側前脳束破壊モデルはパーキンソン病、線条体破壊モデルはパーキンソン症候群に類似すると指摘している。

審査委員会では、申請者らの研究が、2種類のラットパーキンソン病モデルにおけるドパミン神経系機能の違いを明らかにし、パーキンソン病の病態解明に大きく寄与する優れた研究であると高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 阪原 晴海
副査 森 則夫 副査 宮嶋 裕明

博士(医学) 谷 春 雨

論文題目

Therapeutic effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in rat experimental leptomeningeal glioma model

(遺伝子導入間葉系幹細胞を用いたラットグリオーマ髄腔内播種モデルの治療効果)

論文の内容の要旨

[はじめに]

悪性神経膠腫の生存期間は治療法の進歩により着実に延長しているが、それに伴い髄腔内播種の頻度が増加傾向にある。治療法としては化学療法剤の髄腔内投与が用いられるが、その治療は極めて困難であり新たな治療戦略の開発が望まれている。これまで我々はラット脳腫瘍モデルにおいて、腫瘍への向けての遊走能が知られている間葉系幹細胞 (MSC) をベクターとして用いる遺伝子治療を開発してきた。単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HSVtk) 遺伝子を導入したMSC (MSCtk細胞) を腫瘍内に注入した後に、抗ウイルス剤であるガンシクロビル (GCV) を全身投与すると、MSCtk細胞と腫瘍細胞の間に生じるバイスタンダー効果により、腫瘍を縮小させることができる。今回、ラット大槽内にグリオーマ細胞を注入することにより髄腔内播種モデルを作製し、このモデルにおけるMSCを利用したHSVtk/GCV遺伝子治療の効果を検討した。

[方法]

Sprague-Dawley (SD) 系ラットより骨髓細胞を採取し、MSC を分離、培養した。レトロウイルスを用いて MSCtk 細胞を作製し、以下の実験に用いた。

SD ラットの大槽内に C6 グリオーマ細胞 (5×10^5) を注入し、髄腔内播種モデルを作製した。このモデルでは治療しないとラットは平均 18 日で腫瘍死する。まず MSCtk 細胞と C6 細胞の間に生じるバイスタンダー効果を検討する目的にて MSCtk 細胞と C6 細胞を同量 (5×10^5) 混合、髄腔内投与し、GCV (30 mg/kg/day) または生食を 10 日間腹腔内投与した。髄腔内播種モデルに対する治療としては、まず C6 細胞 (2×10^5) を、そして次の日に MSCtk 細胞 (6×10^5) を大槽より髄腔内投与し、GCV または生食を 10 日間腹腔内投与した。腫瘍移植より 2 週間後に脊髄を取り出し、腫瘍の大きさを測定し (n=5)、また別の動物では生存期間を測定した (n=6)。

MSCtk 細胞の腫瘍細胞に向けての遊走能を検討する目的にて、ラットの大槽内に C6 グリオーマ細胞 (5×10^5) を注入した 2 週間後に赤色蛍光でラベルした MSCtk 細胞 (RKH26 標識 MSCtk) を大槽内に注入し、3 日後に全脊髄を摘出し蛍光顕微鏡で観察した。

[結果]

MSCtk 細胞と C6 細胞を混合して髄腔内投与し、2 週間後に頸髄レベルで腫瘍を観察すると、GCV 投与群では生食投与群に比し、腫瘍が有意に小さかった (0.41 ± 0.22 vs 3.10 ± 0.97 mm², p<0.01)。また生存期間を比較すると、GCV 投与群では生食投与群に比し、有意に延長した (29.2 ± 3.3 vs 18.8 ± 0.8 日, p<0.001)。髄腔内播種モデルに対する MSCtk 治療実験においても、GCV 投与群では生食投与群に比し、有意に腫瘍が小さく (0.73 ± 0.29 vs 2.84 ± 0.82 mm², p<0.01)、また生存期間も有意に長かった (21.5 ± 1.5 vs 17.2 ± 0.5 日, p<0.001)。

髄腔内播種モデルにおける RKH26 標識 MSCtk 細胞の分布を観察すると、髄腔内投与 3 日

後にはたくさんの標識細胞が腫瘍表面に集積し、さらに腫瘍深部にまで移動していた。この現象は投与部位である大槽に近い頸髄で著明であったが、数は少ないが胸髄や腰髄にも認められた。

[考察]

本研究により、今まで知られていた脳内腫瘍のみならずグリオーマの髄腔内播種モデルにおいても MSC を利用した HSVtk/GCV 遺伝子治療が有効であることが示された。神経幹細胞や MSC が腫瘍への向けての遊走能を持つことはよく知られており、さまざまな遺伝子のベクターとして脳内腫瘍の治療実験が行われ、有効性が示されてきた。しかし髄腔内播種モデルでの検討は髄芽腫での研究が一つあるのみで、グリオーマでは本研究が初めてである。

HSVtk 遺伝子が導入された細胞は GCV の存在下において、周囲にある数十倍の遺伝子非導入細胞を死滅させることができ、この効果はバイスタンダー効果として知られている。この際のバイスタンダー効果は遺伝子導入細胞と非導入細胞が接触することにより生じることがわかっている。本研究室では神経幹細胞や MSC をベクターとして用い、バイスタンダー効果を利用した脳腫瘍の HSVtk/GCV 遺伝子治療研究を展開し、固形腫瘍に対してはこれまで良好な成績を得てきた。髄腔内播種モデルでは細胞同士が接触する機会が固形腫瘍に比して少ないため、効果が不十分となることが危惧された。しかしながら本研究の結果はそのような状況下でも HSVtk/GCV 遺伝子治療は効果があることが示され、現状では有効な治療がないグリオーマ髄腔内播種への臨床応用への第一歩として意義が深いと考える。

[結論]

MSC を利用した HSVtk/GCV 遺伝子治療はラット脳腫瘍モデルのみならず、グリオーマ髄腔内播種モデルにおいても有効であり、臨床への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

悪性神経膠腫は予後不良の脳腫瘍であり、髄腔内播種の頻度も高い。髄腔内播種に対する従来の治療の有効性は低く新たな治療戦略の開発が望まれている。申請者らはラット脳腫瘍モデルにおいて、間葉系幹細胞(MSC)をベクターとして用いる遺伝子治療を開発してきた。本研究は、ラット髄腔内播種モデルにおいて、単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HSVtk) 遺伝子を導入したMSC (MSCtk細胞) とガンシクロビル (GCV) 投与によるバイスタンダー効果を利用した自殺遺伝子治療の有効性の検討を目的としている。

申請者は、Sprague-Dawley (SD) 系ラット大槽内に C6 グリオーマ細胞を注入し、髄腔内播種モデルを作製し、また SD ラットの骨髄細胞から MSC を分離し、レトロウイルスを用いて MSCtk 細胞を作製した。1) バイスタンダー効果については、MSCtk 細胞と C6 細胞を同時に大槽内に注入し、その後 GCV または生食の 10 日間腹腔内投与により検討し、GCV 投与群では生食投与群に比し、2 週間後の頸髄レベルの腫瘍量は有意に少なく、生存期間も有意に延長している事を示した。2) 髄腔内播種モデルに対しては、C6 細胞の大槽内注入翌日に MSCtk 細胞を注入し、GCV または生食の腹腔内投与により検討し、GCV 投与群では有意に腫瘍が小さく、また生存期間も有意に長い事を示した。3) MSCtk 細胞の遊走能は、RKH26 標識 MSCtk 細胞の大槽内注入により検討

され、3日後の観察により、多くの標識細胞が腫瘍表面に集積し、腫瘍深部にも移動している事を確認した。以上、本研究はグリオーマの髄腔内播種モデルにおいても MSC を利用した HSVtk/GCV 遺伝子治療が有効であることを初めて示したものである。

審査委員会では、申請者の研究は、現状では有効な治療がないグリオーマ髄腔内播種に対する HSVtk/GCV 遺伝子治療の臨床応用への意義を高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 大西 一功
副査 岩下 寿秀 副査 山本 清二

博士(医学) 小林 祥

論文題目

Temporal-spatial expression of presenilin 1 and the production of amyloid- β after acute spinal cord injury in adult rat

(成熟ラット急性脊髄損傷におけるプレセニリン 1 とその生成物アミロイド β の経時的部位的発現)

論文の内容の要旨

[はじめに]

細胞外から細胞内への情報伝達経路として、regulated intramembrane proteolysis (RIP) によるシグナル伝達が近年注目されている。RIP では γ セクレターゼという複合体酵素により膜蛋白質が切断され、その細胞内断片が膜より核内に移行し遺伝子発現を制御する。 γ セクレターゼは様々な膜蛋白質を基質とし、発生や分化・細胞接着などに重要な機能を持ち、RIP の制御による悪性腫瘍や関節リウマチ、アルツハイマー病の治療が試みられている。またラット脳損傷においてもこの γ セクレターゼを制御することにより 2 次障害を抑制できたとの報告もある。プレセニリン 1 (PS1) はこの γ セクレターゼ複合体の活性中心を担い、PS1 の変異により脳や脊髄に易凝集性 Amyloid β ($A\beta$) が蓄積し、神経細胞の脱落壊死と脳や脊髄の萎縮をきたし、家族性アルツハイマー病の発症や痙性対麻痺を呈することが分かっている。しかし PS1 の脊髄における生理的意義は十分に研究されてなく、脊髄損傷との関与も明らかではない。そこで本研究では、脊髄損傷における RIP の関与を明らかにし、また脊髄損傷に対する治療法の開発に必須である基礎的知見を集積するため、ウェスタンブロット法 (WB) と免疫組織化学染色法 (IHC) を用いてラット脊髄損傷における PS1 の発現変化について検討した。

[材料ならびに方法]

雄性 Wistar 系ラット(7 週齢、n=48)の第 8 胸椎の椎弓切除を行い、脊髄の右側をメスにて半切し脊髄部分損傷モデルを作製した。切断後 1、3、7、14 日に切断部を回収し左右に分割し WB を行い、内部標準である β -actin とそれぞれの信号強度の比を解析ソフト Image J を用いて測定した。また各脊髄の切断部の冠状断面標本を作製し、抗 PS1 抗体を用いて IHC を行い切断後 1、3、7、14 日の PS1 の発現を比較した。さらに切断部より頭尾側 1 mm 毎に分け切片を作製し、PS1 陽性シグナルを Image J を用いて定量することにより部位的発現について検討した。次に抗 Amyloid precursor protein (APP) 抗体(γ セクレターゼの基質となる APP を認識)、抗 $A\beta$ 抗体、抗 Notch1 抗体(APP と別の γ セクレターゼの基質となる Notch1 を認識) と抗 PS1 抗体との二重染色を行った。また axon、astrocyte、oligodendrocyte のマーカーである抗 neurofilament (NF) 抗体、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体、抗 myelin basic protein (MBP) 抗体と抗 PS1 抗体との二重染色を行った。コントロールは正常ラット胸髄を用いて、統計解析は ANOVA を使用した。

[結果]

WB において、PS1 は損傷後 1 日に切断側でコントロールと比し有意に増加した。また APP は損傷後 1、3、7、14 日に、 $A\beta$ は損傷後 1、3 日に損傷側で有意に増加した。つまり PS1、APP、 $A\beta$ は少なくとも損傷後 1 日に発現の増加が重なった。IHC では損傷側白質の軸索腫大部に PS1 が存在し、損傷後 1、3 日に増加し、損傷後 7、14 日には減少した。また損傷後 1 日目では切断側の頭

尾側 1 mm の部位で有意に PS1 の発現が増加し、損傷部から離れるにしたがい発現は減少した。上行性、下行性経路の違いや損傷の頭尾側の違いによる PS1 の発現の差はなかった。二重染色では PS1 と APP、A β 、Notch1 は損傷側白質で共局在を示した。さらに PS1 は NF と共局在したが、GFAP や MBP との局在は一致しなかった。

[考察]

脊髄損傷において PS1 と A β が損傷軸索において発現することを、今回我々は初めて示した。PS1 が APP、A β 、Notch1 と損傷軸索部に共局在し、同様の発現上昇傾向が見られたことは、RIP によるシグナル伝達が脊髄損傷で行われている可能性を示唆する。また A β が損傷後急性期に増加していたことは、脊髄損傷部において炎症反応を引き起こし、2 次障害に関連する可能性がある。将来の脊髄再生治療を模索する上で RIP の制御は新たな可能性を与える。

[結論]

ラット脊髄損傷において、PS1 は APP、A β 、Notch1 と共に損傷軸索に集積しており、RIP によるシグナル伝達が行われている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

γ セクレターゼは様々な膜蛋白質を基質とし、発生や分化、細胞接着などに重要な機能を持ち、プレセニリン 1(PS1)はこの γ セクレターゼ複合体の活性中心を担う。PS1 の変異により脳や脊髄に易凝集性 Amyloid β (A β)が蓄積し、神経細胞の脱落と脳や脊髄の萎縮をきたし、家族性アルツハイマー病や痙性対麻痺の発症にかかわる。しかし PS1 の脊髄における生理的意義は十分に研究されておらず、脊髄損傷との関与も明らかではない。

申請者はラット脊髄損傷モデルにおける PS1 とその関連分子の発現変化について検討した。雄性 Wistar 系ラット(7 週齢)の第 8 胸椎の椎弓切除を行い、脊髄の右側をメスにて半切し脊髄部分損傷モデルを作製した。切断後 1、3、7、14 日に切断部を回収し左右に分割しウエスタンブロット法を行い、また各脊髄の切断部の冠状断面標本作製し、免疫組織化学染色法を行い、PS1 と関連蛋白質の発現を比較した。さらに、細胞特異的マーカーを用い発現変化が誘導された細胞種を同定した。

ウエスタンブロットにて PS1 は損傷後 1 日に切断側で有意に増加し、Amyloid precursor protein (APP)は損傷後 1、3、7、14 日に、A β は損傷後 1、3 日に有意に増加した。免疫組織化学染色法では損傷後 1、3 日に損傷側白質の軸索腫大部に PS1 が増加し、頭尾側の違いはなかった。二重染色では PS1 は APP、A β 、Notch1、neurofilament と共局在を示し、損傷側白質の軸索に発現していることが明らかになった。

審査委員会では、申請者がこれまで脊髄損傷モデルで PS1 についての検討がなされていない点に着目し、これを明らかにしたうえで、APP、A β 、Notch1 との共存から regulated intramembrane proteolysis の関与まで示唆し、将来の脊髄再生治療への展望を示した点を高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 福田 敦夫
副査 中原 大一郎 副査 宮嶋 裕明

博士(医学) 猿 川 潤一郎

論文題目

A longitudinal analysis of urinary biochemical markers and bone mineral density in STR/Ort mice as a model of spontaneous osteoarthritis

(自然発症変形性膝関節症モデルである STR/Ort マウスにおける尿中生化学マーカー及び骨密度の縦断的検討)

論文の内容の要旨

[はじめに]

変形性関節症(以下 OA)は関節軟骨の変性、軟骨下骨の硬化、骨棘形成を特徴とする頻度の高い疾患である。OA の評価には現在でも単純 X 線が一般的に用いられているが、発症初期の診断や病態の推移を単純 X 線のみで評価する事は困難であるため、近年では生化学マーカーを用いてこれら进行评估しようとする試みがなされている。

これまで OA に対して様々な生化学マーカーの検討がなされてきたが、軟骨の主要な構成体である II 型コラーゲンの分解産物である C-telopeptide fragments of type II collagen (CTX-II)は軟骨代謝を特異的に反映する生化学マーカーとして注目されている。一方、pyridinoline (Pyr)と deoxypyridinoline (Dpyr)はコラーゲンの主要な成熟架橋である。Pyr は軟骨、骨、滑膜に広く由来しているのに対し Dpyr はその殆どが骨に由来しており、これらの尿中代謝産物は OA の病態を反映しうると考えられている。しかし OA の発症は緩徐であり、病態の推移も比較的長期にわたるため、これらの生化学マーカーの変化と OA の進行との関連における縦断的な検討は殆どなされていない。同様の理由により OA の病因に関連すると考えられている骨密度(BMD)も縦断的な検討は殆どなされていない。

STR/Ort マウスは 35 週齢までに約 85%の個体で膝 OA を自然発症するモデル動物であり、ヒト OA に比べて短いライフスパンの間で生化学マーカーや BMD の推移と病態の進行との関連について検討する事が可能な動物モデルである。

今回、STR/Ort マウスにおける生化学マーカー及び BMD と OA の発症、進行との関連について縦断的に検討した。

[材料ならびに方法]

8 週齢の雄 STR/Ort マウス 22 匹と対照として OA を発症しない 8 週齢の雄 CBA マウス 12 匹を用いた。8 週齢から 4 週毎、麻酔下に軟 X 線装置を用いて両膝 X 線を撮影し、X 線 OA grade を用いて OA 進行度を 5 段階で評価した。20 週齢から 4 週毎、麻酔下に二重光子吸収測定法を用いて両大腿骨骨幹部 BMD を測定した。8 週齢から 4 週毎、尿中 CTX-II、Pyr、Dpyr を測定した。40 週齢で各個体の膝関節を採取後、組織切片(HE、サフラニン O 染色)を作成し Walton の分類に基づいて OA の進行度を組織学的に 5 段階で評価した。少なくとも片膝で grade 2 以上の個体を OA 発症とし、さらに STR/Ort マウスを OA 群(両膝発症、片膝発症)と非 OA 群の 2 つのサブタイプに分類した。統計解析において BMD は体重補正し共分散分析を用い、生化学マーカーは反復測定 2 要因の分散分析を用いて比較、検討した。

[結果]

組織学的評価において OA 発症は 16 匹 (両膝発症 7 匹、片膝発症 9 匹)、OA 非発症は 6 匹であった。STR/Ort マウスの X 線 OA grade は 28 週齢以降で CBA マウスより有意に高値であった。OA 群の X 線 OA grade は 28 週齢以降で非 OA 群より有意に高値であった。しかし、STR/Ort マウスと CBA マウスの間で全測定期間を通じ、BMD と全ての生化学マーカー値において有意差はなかった。一方、OA 群の BMD は 28 週齢以降で非 OA 群より高値であった。OA 群の尿中 CTX-II は X 線 OA grade の上昇に先立って 20、24 週齢で非 OA 群より高値であった。また、OA 群の尿中 Pyr は 32 週齢以降において非 OA 群より高値であった。尿中 Dpyr は両群間で有意差はなかった。

[考察]

本研究では OA を発症しないマウスとして最もよく用いられている CBA マウスを対照群に選択した。しかし、STR/Ort マウスとの間で各測定項目において有意差がなく、両マウス間における体重や成長速度などの系統差に影響されていると考えた。

OA 群の尿中 CTX-II は OA 発症早期に高値を示した。CTX-II はその殆どが軟骨由来であるため、軟骨代謝を鋭敏に反映するマーカーと考えられている。従って、尿中 CTX-II は X 線学的に OA が明らかとなる以前における早期診断及び進行の予測に有用であると考えられた。一方、OA 進行期の尿中 CTX-II において有意差を認めず、進行に伴うマーカーの由来となる残存軟骨量の減少が一因であると考えられた。OA 群の尿中 Pyr は OA の進行期で高値を示した。これは Pyr が関節構成体の大部分を占める軟骨、骨、滑膜に広く由来し、OA 進行期の組織代謝を良く反映しているためであると考えられた。一方、その殆どが骨由来である Dpyr や軟骨由来である CTX-II は進行期 OA の病態を反映するには不十分であったと考えられた。

本研究では高 BMD と OA の発症や進行との関連が示唆された。しかし、骨吸収マーカーである Dpyr に有意差はなく、両者間における関連の解明には更なる研究が必要である。

[結論]

尿中 CTX-II は OA の早期診断及び進行の予測に、尿中 Pyr は進行期 OA における進行度の評価に有用である可能性が示唆された。また、骨量の増加が OA の発症や進行に関連することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

変形性膝関節症 (OA) は、最も一般的な整形外科疾患である。その病態は、関節軟骨の変性、軟骨下骨の硬化、骨棘形成である。現在まで、これらの病態をとらえるために、レントゲンが一般的に用いられてきた。しかし、画像上で OA の変化を早期にとらえることは難しい。現在、骨密度 (BMD) に着目し、OA との関連性を検討した研究はあるが、それらのデータは BMD の計測点の違いや、関節群の違いにより値が異なる。申請者らは、OA と BMD との関連性だけでなく、OA の発病・進行と生化学的マーカーとの関連性について縦断的に検討することが、OA の早期診断とモニターリングに有用であると考え、研究を行った。

8 週齢の STR/Ort マウス (n=22)、コントロールとして 8 週齢の CBA マウス (n=12) を用い、放射線学的解析、骨密度計測、組織学的解析、尿の生化学的解析 [C-telopeptide of type II collagen

(CTX-II)、pyridinoline (Pyr)、deoxypyridinoline (Dpyr)]を行った。それぞれの項目について、OA 発症マウス、OA 非発症マウス、CBA マウスで比較検討した。OA 発症マウスグループにおける、CTX-IIとBMDの上昇は、画像上の変化に先立っておこるが、Pyrの上昇は、進行したOAに認められるので、申請者らは、CTX-IIとPyrの値の上昇はOAの病期を反映し、高BMDはOAの発症・進行に関係することを見いだした。

OAの進行に伴う、CTX-II、Pyr、Dpyrが軟骨代謝や骨代謝を反映し、同時にOAのステージをも反映することを証明し、また、それらとBMD値、画像所見、組織学的所見との相関を検討することで、OAの早期診断・モニターリング法を提示した点を審査委員会は高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 橋本 賢二
副査 堀内 健太郎 副査 小川 法良

博士(医学) 浦岡 雅博

論文題目

Landiolol, an ultra short acting β 1-blocker, improves pulmonary edema after cardiopulmonary resuscitation with epinephrine in rats

(超短時間作用型 β 1 遮断薬 ランジオロールはエピネフリンを用いたラットの心肺蘇生において肺水腫を改善する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

現在、心肺蘇生(CPR)における第 1 選択薬はエピネフリンである。しかし、エピネフリンを使用すると CPR 後に高血圧、頻脈、心筋障害、肺水腫等の副作用が発生することが知られている。近年、 β 遮断薬が心保護作用を持つことが報告されている。また、エピネフリンを用いた CPR 中に β 遮断薬を併用することで、予後を改善するという報告がある。本邦では、頻脈性不整脈の治療に超短時間作用型 β 1 遮断薬であるランジオロールが使用されている。ランジオロールは他の β 遮断薬と比較して、 β 1 選択性が高く、作用時間が短い。さらに抗酸化作用に関する複数の報告がある。

我々は、エピネフリンを用いた CPR にランジオロールを併用することは、蘇生率を改善し、肺水腫等のエピネフリンの副作用を軽減するのではないかと仮定し、ラット窒息モデルを用いて実験を行った。

[材料ならびに方法]

オス Sprague-Dawley ラット、体重 410-480 g、25 匹を実験に使用した。ペントバルビタールの腹腔内投与後に気管切開を行い、挿管して人工呼吸器で換気を行った。右大腿動静脈、左外頸静脈よりカテーテルを挿入し、平均動脈圧、右心房圧を経時的に測定した。心電図、直腸温プローブを装着し、心拍数、体温を経時的に測定した。大動脈の拡張期圧と右心房圧の差を冠動脈灌流圧とした。血液ガスおよびヘマトクリット(Ht)を測定した後、さらに 15 分観察した。

25 匹のラットを E 群(エピネフリン 0.02 mg/kg)12 匹、EL 群(エピネフリン 0.02 mg/kg、ランジオロール 0.5 mg/kg)13 匹と 2 群に分けた。気管チューブを閉塞させ、心停止が起こるまでの時間を測定した。心停止から 1 分後に、人工呼吸、胸部圧迫を開始し、それぞれの薬液を投与した。平均血圧 50 mmHg 以上で循環再開と判断し、胸部圧迫を中止した。5 分間で循環再開がみられない場合は、CPR を中止した。

循環再開 10、30、60、120 分後に血液ガス、Ht を測定した。窒息前の Ht に対する、循環再開 10 分後の Ht の変化率を計算した。120 分後に血清トロポニン I 濃度(T-I)を測定するための採血後、肺乾湿重量比を測定した。

2 群とは別に 8 匹のラット(R 群)を用いて、窒息前の T-I や肺乾湿重量比の値(正常値)を調べた。

[結果]

E 群では 12 匹中 8 匹、EL 群では 13 匹中 9 匹で循環再開を確認した。蘇生率、窒息時間、循環再開に要した時間に両群で差は無かった。心拍数、血圧、冠動脈灌流圧に両群で差は無かった。E 群の肺乾湿重量比(6.4±1.06)は EL 群(4.9±0.80, $p < 0.01$)、R 群(4.6±0.35, $p < 0.01$)よりも

有意に高かった。EL 群と R 群の肺乾湿重量比に有意な差は無かった。循環再開 10 分後の Ht の変化率では、E 群 ($10.2 \pm 3.1 \%$) は EL 群 ($5.2 \pm 3.5 \%$, $p < 0.05$) よりも有意に高かった。T-I は、E 群 ($2.62 \pm 0.51 \text{ ng/ml}$)、EL 群 ($3.43 \pm 2.72 \text{ ng/ml}$) とともに、有意に R 群よりも高かった ($0.11 \pm 0.01 \text{ ng/ml}$, $p < 0.01$)。EL 群では CPR 中に心室細動 (VF)、心室粗動 (VT) をきたしたラットが 2 匹含まれたが、これらの T-I は 6.74 、 8.55 ng/ml と高値であった。一方、E 群では VF、VT をきたしたラットはすべて循環再開しなかった。CPR 中に VF、VT をきたしたラットを除外した EL 群の T-I は $2.62 \pm 0.51 \text{ ng/ml}$ と、E 群よりも有意に低かった。

[考察]

エピネフリンを使用した CPR に対するランジオロールの併用で、肺乾湿重量比、および Ht の上昇を抑制することが本実験で示された。エピネフリンで発生する肺水腫の程度を軽減したと考えられる。機序としてランジオロールの抗酸化作用により、虚血後の再酸素化で生じる活性酸素による障害が抑制され、肺水腫の程度を軽減したと考えられる。

VF、VT を起こしたラットを除いた場合、T-I が EL 群で有意に低かったことから、心筋障害が軽減されたと考えられた。 β 遮断薬は、心拍数を低下させて心筋酸素消費量を減少させ、虚血に対して心保護的に作用すると言われている。しかし本実験では、心拍数の有意な減少は認めなかった。本実験で使用したランジオロールはエピネフリンを投与したラットの心拍数を減少させるには不十分であった可能性がある。心筋障害の軽減はランジオロールの抗酸化作用が主ではないかと考えられる。

本実験の結果では E 群、EL 群間に蘇生率に有意差は無かった。本実験は循環再開後 2 時間で観察期間を終了しているが、観察期間をより長くすることで生存結果が異なった可能性がある。

[結論]

エピネフリンを使用した CPR におけるランジオロールの併用は、肺乾湿重量比、および Ht の上昇を抑制した。ランジオロールが肺水腫を抑制するメカニズムの解明にはさらなる研究が必要であろう。

論文審査の結果の要旨

本研究の目的は、心肺蘇生において、アドレナリンと同時に超短時間作用型 $\beta 1$ 遮断薬ランジオロールを投与することにより、自己心拍再開後の心筋障害および肺水腫を軽減し、蘇生後の生存率を改善させようとするものである。SD ラットを用いた気道閉塞型心停止モデル(約 5 分間の窒息)を対象に、平均血圧 10 mmHg 以下を心停止と判断し、蘇生を開始した。生存率に有意差は見られなかったが、アドレナリン単独投与群は、アドレナリン・ランジオロール併用群に比較して、肺乾湿重量比、Ht 値、T-I 値の有意の高値を認めた。ランジオロール投与により心拍数低下は見られず、肺水腫の軽減は、本剤の抗酸化作用によるものと考察した。

審査会では、非選択的 α 作用薬のアドレナリンが第一選択になっている理由、肺水腫の有無で P/F 比に差が出ず肺の酸素化能が維持された理由、切除肺の病理所見、心筋障害の指標としてヒト心臓由来脂肪酸結合蛋白の選択、半減期の短い本剤が自己心拍再開後の虚血再灌流障害を抑制できたか、肺水腫軽減は本剤の抗酸化作用だけではなく心筋保護効果も関与した可能性、

などを質問し、これに対し、申請者から概ね適切な解答が得られた。アドレナリンと超短時間作用型 $\beta 1$ 遮断薬を蘇生時に併用することで、自己心拍再開後の肺水腫を軽減できるという新知見を高く評価し、今後、本研究を発展させ、心肺蘇生に関する国際コンセンサスに貢献できるエビデンスの集積を要望した。

論文審査担当者 主査 青木 克憲
副査 椎谷 紀彦 副査 千田 金吾

博士(医学) 佐野 秀樹

論文題目

Evaluation of the hypnotic and hemodynamic effects of dexmedetomidine on propofol-sedated swine

(プロポフォール鎮静下のブタにおけるデクスメドミジン投与の鎮静、血行動態への影響)

論文の内容の要旨

[はじめに]

プロポフォールは調節性に優れる静脈麻酔薬であるが、鎮痛作用を有さないため、他の鎮静、鎮痛薬との併用が一般的である。

α_2 アドレナリン受容体作動薬であるデクスメドミジンは、呼吸抑制がない、鎮静の質が高い、麻酔薬、鎮痛薬の節約効果などの長所があるが、循環系への作用は一定ではない。また、デクスメドミジンを麻酔補助薬として使用したほとんどの研究ではボーラス投与であり、持続投与時の他薬との相互作用については知られていない。

本研究では、プロポフォール鎮静下のブタにデクスメドミジンを投与し、以下の点について両薬の相互作用を調べた。

1. 鎮静効果
2. 血行動態
3. 酸素需給バランス

[材料ならびに方法]

16匹の家畜ブタ(体重 36.4 ± 1.4 kg)を用いた。5%イソフルランで麻酔導入を行い、気管切開後、人工呼吸器で管理した。麻酔維持として、2.5-3.0%のイソフルランを酸素 3 L/min、空気 3 L/min とともに投与した。中心静脈カテーテルと肺動脈カテーテルを右外頸静脈から挿入し、動脈カテーテルを左大腿動脈に留置した。Bispectral index (BIS) モニタの電極を前額部に装着し、鎮静深度を調べた。

前処置後、プロポフォール 2 mg/kg ボーラス投与し、20 mg/kg/hr で持続投与を開始した。同時にイソフルランの投与を終了した。BIS 値 55-65 を目標に、プロポフォールの投与量を調節し、BIS 値が安定したところで、プロポフォールの投与速度を固定した。30 分後、BIS 値、平均動脈圧 (mABP)、中心静脈圧 (CVP)、平均肺動脈圧 (mPAP)、肺動脈楔入圧 (PAWP)、心拍数 (HR)、心拍出量 (CO)、混合静脈血酸素飽和度 (SvO₂) を測定、記録した。この時点で血液サンプルを採取した。これらのベースライン値の測定後、プロポフォールの投与速度は変えずに、デクスメドミジン 1 μ g/kg を 10 分かけて投与した。その後、以下の投与速度でそれぞれ 1 時間ずつ投与し、BIS、血行動態について記録し、血液サンプルを採取した。

- ① デクスメドミジン 0.2 μ g/kg/hr (D1)
- ② デクスメドミジン 0.4 μ g/kg/hr (D2)
- ③ デクスメドミジン 0.7 μ g/kg/hr (D3)

また、一回心拍出量 (SV)、体血管抵抗 (SVR)、肺血管抵抗 (PVR)、酸素供給量 (DO₂)、酸素消費量 (VO₂) を計算し、血液サンプルからプロポフォール、デクスメドミジンの血漿濃度を測定した。

[結果]

ベースライン値測定時のプロポフォール投与速度は 18.5 ± 2.1 mg/kg/hr であった。プロポフォール投与開始からベースライン値測定までの時間は 148 ± 25 分であった。BIS のベースライン値は 57 ± 2 であった。

1. 鎮静効果: D1、D2、D3 における BIS 値はそれぞれ、 18 ± 8 、 14 ± 3 、 11 ± 7 で、用量依存性に低下した。
2. 血行動態: デクスメデトミジン投与により mABP、HR は有意に低下した。用量依存性に CO、SvO₂ は低下し、SV は D2、D3 で有意に低かった。デクスメデトミジン投与により SVR は変化しなかったが、PVR は D2、D3 で有意に高かった。
3. 酸素需給: デクスメデトミジン投与により DO₂、VO₂ は低下し、酸素摂取率は用量依存性に上昇した。

[考察]

デクスメデトミジン 0.2 μg/kg/hr の投与により、BIS 値は大きく低下したことから、少量でもプロポフォールの鎮静効果を十分に増強させうることを示した。しかしながら、投与量を 0.4 μg/kg/hr、 0.7 μg/kg/hr まで増加させても、BIS 値の低下は大きくなく、デクスメデトミジンの鎮静作用に天井効果があることが推測された。

デクスメデトミジン投与により PVR が上昇したのに対し、SVR は変化しなかったが、本研究結果からは、この差を生じたメカニズムははっきりしなかった。PVR の上昇の原因として、麻酔により既に交感神経の活動性が低下した後では、デクスメデトミジンによる α_{2B} アドレナリン受容体を介した血管収縮が優位になる可能性が考えられた。

CO 低下の主な原因は HR の減少であったが、デクスメデトミジンの投与量が 0.4 μg/kg/hr 以上では SV も低下した。プロポフォールとともにデクスメデトミジンを投与する場合、中等量でも心収縮性を低下させることを示唆している。

デクスメデトミジン投与により用量依存性に SvO₂ は低下し、酸素需給バランスは悪化したが、臨床では臓器の機能障害といった副作用をもたらす可能性がある。

[結論]

少量 (0.2 μg/kg/hr) のデクスメデトミジンは、血行動態や酸素需給バランスへの影響が小さく、プロポフォールの鎮静効果を大きく増強し、プロポフォール投与量を減らすのに有用であることが示唆される。デクスメデトミジン 0.4 μg/kg/hr では心収縮性が低下し、 0.7 μg/kg/hr では血行動態の不安定化や酸素需給バランスのさらなる悪化がもたらされ、鎮静効果に天井効果がみられる。プロポフォールと併用する場合、デクスメデトミジンは、少量投与が勧められる。

論文審査の結果の要旨

静脈催眠薬であるプロポフォールと静脈鎮静薬であるデクスメデトミジンの併用は臨床でよく行われるが、それら併用による鎮静効果、血行動態、酸素供給バランスにおける相互作用は報告されていない。そこで、申請者は、プロポフォール鎮静下のブタにデクスメデトミジンを投与し、相互作用を調べた。16 匹の家畜ブタを用い、プロポフォール 2 mg/kg ボーラス投与し、 20 mg/kg/hr で

持続投与を開始した。鎮静深度の指標として Bispectral index 値を用い、55-65 を目標にプロポフォールの投与速度を固定した。デクスメトミジン 1 μ g/kg を 10 分かけて投与し、その後 0.2 μ g/kg/hr、0.4 μ g/kg/hr、0.7 μ g/kg/hr の投与速度でそれぞれ 1 時間ずつ投与した。鎮静効果は、デクスメトミジンの投与により増強した。血行動態では、平均動脈圧、心拍数、心拍出量、混合静脈血酸素飽和度、一回心拍出量は低下した。また、体血管抵抗は変化しなかったが、肺血管抵抗は上昇した。酸素需給では、酸素供給量、酸素消費量は低下し、酸素摂取率は上昇した。

0.2 μ g/kg/hr のデクスメトミジンは、プロポフォールの鎮静効果を大きく増強したが、血行動態や酸素需給バランスへの影響は少なかった。しかし、0.4 および 0.7 μ g/kg/hr 投与では血行動態や酸素供給バランスへの影響が大きくなったが、鎮静作用のさらなる増強は見られなかった。

審査委員会では、プロポフォール鎮静下にデクスメトミジンを投与する際には鎮静作用、血行動態や酸素供給バランスへの影響を考慮し、少量投与が推奨される根拠となる詳細なデータを提示し、臨床における麻酔薬の使用への重要な情報を提供した研究であることを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	梅村 和夫		
	副査	林 秀晴	副査	望月 利昭

博士(医学) 劉 寧

論文題目

Chk1-mediated phosphorylation of Mig-6 is involved in regulation of EGF signaling
(Chk1 を介する Mig-6 のリン酸化は、EGF シグナル伝達経路の制御に関与する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

Mitogen-inducibile gene-6 (Mig-6) (別名 ErbB receptor feedback inhibitor 1 (Erff1), Gene33) は、上皮増殖因子 (EGF) のシグナル伝達経路において、EGF 受容体 (EGFR) と結合して阻害する活性を持ち、EGF シグナルの負のフィードバック因子として働いている。Mig-6^{-/-}マウスではさまざまな器官に腫瘍が自然発生し、皮膚において化学物質誘発性の腫瘍形成が著明に亢進する。また種々のヒトのがんで発現量の低下が報告されており、Mig-6 はがん抑制遺伝子の有力な候補の一つと考えられている。Mig-6 の低下/欠失により、内因性の EGFR の過剰な活性化と MAP キナーゼ経路を介する持続的な増殖シグナル伝達が細胞の過剰増殖と分化異常を引き起こすと考えられている。Mig-6 はある種の刺激により転写レベルで発現亢進することも報告されているが、Mig-6 の翻訳後修飾や機能制御機構についてほとんど不明である。そこで私は Mig-6 のリン酸化と機能制御の分子機構の解明を目指し以下の研究を行った。

[材料ならびに方法]

1. Mig-6 をリン酸化する酵素の同定: 多種のプロテインキナーゼ阻害剤を細胞に処理し、Mig-6 を免疫沈降し、SDS-PAGE 後、リン酸化タンパク質を認識する Phos-tag-biotin と反応させ avidin-HRP を用いて Mig-6 のリン酸化を解析した。また、リン酸化タンパク質は支持体との親和性により遅く泳動される Phos-tag ゲルでも検討した。
2. Mig-6 の *in vitro* リン酸化: Mig-6 タンパク質を大腸菌で産生/精製し、候補プロテインキナーゼの組み換えタンパク質、 γ -³²P-ATP を加えて 37°C で反応させ、オートラジオグラフィーにより Mig-6 のリン酸化を解析した。
3. Mig-6 の *in vivo* リン酸化と EGF 刺激の影響: 細胞に 16 時間の血清飢餓を与え、100 ng/ μ l の EGF で刺激して 15 分後に細胞を回収し、Phos-tag ゲルで Mig-6 のリン酸化を解析した。また、候補のキナーゼに対する siRNA をトランスフェクトした時の Mig-6 のリン酸化の変動を調べた。
4. Mig-6 のリン酸化部位の解析: Mig-6 上にあるリン酸化が予想される部位のセリンおよびスレオニンをアラニンに置換した種々の変異型 Mig-6 を作製した。大腸菌でこれらタンパク質を調整し、*in vitro* キナーゼアッセイでリン酸化部位を解析した。さらに、野生および変異型 Mig-6 を HEK 293 細胞に発現させ、EGF 刺激 15 分後に細胞回収し、リン酸化抗体によるウエスタンブロットティングで EGFR の活性状態を解析して、Mig-6 による EGF シグナル伝達経路の制御を調べた。

[結果]

1. HEK293 細胞に Mig-6 を過剰発現させるとリン酸化されることがわかった。一方、用いたリン酸化酵素阻害剤のうち、Chk1 阻害剤である SB218078 により Mig-6 リン酸化が著明に阻害され

た。乳がん細胞株 MDAMB231 における内因性 Mig-6 のリン酸化も SB218078 により阻害された。さらに HEK293 細胞において Mig-6 と Chk1 は結合することが判明し、Chk1 は Mig-6 のキナーゼである可能性が示唆された。

2. 組み換え Mig-6 タンパク質と γ -³²P-ATP を用いた *in vitro* キナーゼアッセイで、Chk1 は Mig-6 をリン酸化する能力を持っていることが確認された。
3. EGF 刺激で Mig-6 のリン酸化が亢進することを見出した。そのリン酸化は Chk1 阻害剤 SB218078 で阻害された。また Chk1 siRNA のトランスフェクションにより Mig-6 のセリンリン酸化が抑制された。EGF 刺激により Chk1 を介して Mig-6 がリン酸化修飾を受けることが示唆された。
4. 変異体を用いた解析により、Chk1 による Mig-6 のリン酸化が変異型 Mig-6 S249/251A において低下したことからリン酸化部位は S249/251 であることが判明した。一方、野生型 Mig-6 の発現により EGFR シグナル伝達経路の活性は顕著に抑制されたが、S249/251A 変異体では EGFR シグナル伝達経路に対する抑制能が低下していた。この結果より EGF 刺激により Chk1 による Mig-6 の S249/251 でリン酸化が起こり、このリン酸化型 Mig-6 が EGFR を阻害すると考えられた。

[考察]

Mig-6 は EGFR と結合し EGF シグナル伝達を阻害するタンパク質とされ、そのノックアウトマウスは高発がん形質を示すことから Mig-6 はがん抑制遺伝子とされる。しかしながらこれまで Mig-6 の翻訳後修飾と機能制御機構についてはほとんど不明であった。本研究において、Mig-6 のリン酸化とそのキナーゼ、さらにリン酸化の意義を明らかにした。EGF シグナル伝達経路においては、EGF 刺激によって EGFR は活性化しシグナルを下流に伝達するが、一方で Mig-6 は Chk1 を介した S249/251 のリン酸化を受け、そのリン酸化型 Mig-6 が EGFR を阻害してネガティブフィードバック機構が作動し、EGF シグナルが行き過ぎないように調節されると考えられた。本研究は EGF シグナル伝達の制御機構全容の解明に繋がり、上皮細胞のがん化メカニズムの解明にも寄与することが期待される。

[結論]

EGF シグナル伝達経路の阻害因子である Mig-6 は EGF 刺激によりリン酸化される。そのリン酸化は Chk1 を介して Mig-6 の S249/251 で起こり、EGF シグナル伝達経路に対する Mig-6 の抑制機能発揮に関与している。

論文審査の結果の要旨

Mitogen-inducible gene 6 (Mig-6) は Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 、 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (erbB2) の kinase domain に結合して、これらを阻害する。染色体の 1p36 領域にあり、腫瘍での脱落が良く認められる部位でもあり、腫瘍抑制遺伝子の候補としても注目されている。しかしこのタンパクレベルでの制御については解明されていない。

申請者は Mig-6 を導入した HEK293 細胞で、この分子がリン酸化を受けることを発見し、Check

point kinase (Chk1) inhibitor を含む13種の薬剤をsurveyして、このリン酸化を抑制するSB218078を同定した。さらに *in vitro* の実験で用量依存効果、細胞種を変えて、内在性 Mig-6 のリン酸化が Chk1 inhibitor で抑制されることを明らかにした。また、Chk1 が Mig-6 に直接結合することでリン酸化 (Ser249/251 のどちらか) すること、Chk1 の knock down 実験でリン酸化が抑制されることを明らかにした。

以上から EGF および DNA damage で Mig-6 が Chk1 によりリン酸化され EGFR を抑制することが示唆された。Mig-6 は EGFR の下流シグナルの feedback loop に介在する。一方、Chk1 の DNA damage シグナル上での位置を勘案した。

これらから、申請者は EGFR 経路、DNA damage シグナル経路両者を含むシグナル経路上に Mig-6 の新しい生理的位置づけを提案している。また本研究は Chk1 の新たな基質と機能を提唱するものでもある。

審査委員会は Mig-6 と Chk1 の生理的意義について精緻な分子生物学的機構を明らかにしつつある点を高く評価し、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	梶村 春彦		
	副査	岩下 寿秀	副査	上里 忠良

博士(医学) 後藤正憲

論文題目

Altered expression of the human base excision repair gene *NTH1* in gastric cancer

(胃がんにおけるヒト塩基除去修復遺伝子 *NTH1* の発現異常)

論文の内容の要旨

[はじめに]

活性酸素により生成される酸化損傷塩基は突然変異の誘発や細胞周期の停止を引き起こすため、発がんの原因となると考えられている。このような酸化損傷塩基はDNA中に蓄積されないよう塩基除去修復酵素の働きにより除去される。大腸菌エンドヌクレアーゼ III ヒトホモログ (*NTH1*) は塩基除去修復酵素の一つであり、チングリコール、5-ヒドロキシシトシン、ホルムアミドピリミジンを含む酸化ピリミジン類を除去する働きを持っている。

胃の組織では喫煙やピロリ菌感染により炎症が誘導され、酸化ストレスにさらされるため、塩基除去修復活性の低下は胃の発がんに関与するものと考えられる。そこで *NTH1* の発現低下と胃発がんの関連について研究を行った。

[材料ならびに方法]

はじめに、8種の胃がん細胞株 MKN28、TMK1、MKN74、KATOIII、AGS、MKN1、MKN45、HSC39の *NTH1* 発現量を調べるために、定量的PCRとウエスタンブロットを行った。次に発現低下が認められた胃がん細胞株のひとつ AGS を用いて *NTH1* 安定発現株を樹立し、ベクターのみを導入した細胞株(モック細胞株)と共にチングリコールに対する修復活性を比較した。病理検体の *NTH1* 発現量を調べるため、50例の胃がん患者検体の腫瘍部と同一例の非腫瘍部の定量的PCRを行った。さらに免疫染色により腫瘍部の *NTH1* タンパク質の局在を調べた。

さらに詳細な *NTH1* の発現検討を行うため、ルシフェラーゼアッセイにより *NTH1* プロモーター活性領域を調べた。80例の胃がん患者検体正常部から抽出したDNAを用いてPCR一本鎖コンフォメーション多型解析 (SSCP) を行うことで、*NTH1* プロモーター領域の遺伝的多型を検索した。同定されたプロモーター領域の多型の活性を調べるため、変異型を含むルシフェラーゼポータープラスミドを作製し、野生型と活性の比較を行った。次に長野県の148例の胃がん患者と292人の健常者の血液から抽出したDNAを用いて症例対照研究を行った。

[結果]

胃がん細胞株の *NTH1* 発現量は検討したすべての細胞株で発現が低下していた。*NTH1* 安定発現株とモック細胞株でチングリコールの修復活性を比較すると、*NTH1* 安定発現細胞株において高い除去活性を示した。一方、定量的PCRによる50例の胃がん病理検体では、腫瘍部で非腫瘍部の半分以下の発現量であった例が36%(18/50)であった。この50例の腫瘍部の *NTH1* 免疫染色では24%(12/50)において細胞質で主に発現していた。

ルシフェラーゼアッセイをすると0.4 kb 上流を含むプラスミドで最も高い活性を示した。また、この領域の変異検索によって2つの新たな多型、c.-163C>Gとc.-241_-221delが同定された。野生型とこれら2つの多型のプロモーター活性を比較すると、野生型に比べ両多型は野生型に比べ活性の低下がみられた。しかし、症例対照DNAを用いて2つの多型と胃がんのリスクの関連について検

討したところでは、特に両群での頻度の差は明らかにすることができなかった。

[考察]

NTH1 安定発現株とモック細胞株を用いた修復活性の比較解析は安定発現株でチミングリコールの高い除去活性をもつことを明らかにした。NTH1 が修復対象とする損傷塩基には変異誘発性が確認されているものがいくつか存在する。NTH1 の発現の低下は酸化的損傷を受けた DNA の修復活性を低下させ、突然変異の誘発に寄与するものと考えられる。胃癌病理検体の発現量解析は腫瘍部で非腫瘍部の半分以下の発現量を示した検体が 36%、腫瘍部の免疫染色では細胞質局在型が 24% 見つかった。細胞質局在型は従来の核局在型に比べ、核内 DNA での除去修復活性が不十分であることが予測される。胃癌腫瘍部での発現低下あるいは局在異常を示した検体は 54% で、半分以上で NTH1 の発現異常がみられた。

NTH1 プロモーター領域の中で新たに同定された c.-163C>G と c.-241_-221del はルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性の低下が認められた。しかし、本研究のケースコントロール研究では、これらの多型と胃癌リスクの間に関連を見つけることはできなかった。今後より詳細に *NTH1* プロモーター多型と胃癌リスクの関連を調べるためにはさらに多くの検体を用いて解析、検討を行っていく必要がある。

[結論]

ヒト胃癌細胞株において NTH1 発現量は低下していた。また胃癌病理検体の腫瘍部において NTH1 の発現低下あるいは局在異常が認められる検体が確認された。プロモーター解析では新たな 2 つの多型を同定し、これらの多型が *NTH1* プロモーター活性を低下させることを明らかにした。これら結果は修復酵素 NTH1 発現低下、あるいは NTH1 局在異常が胃癌発症に関わっている可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

胃は喫煙やピロリ菌感染など種々のストレスにさらされるため、塩基除去修復酵素の一つである NTH1 活性の低下が胃癌に関係しているのではという仮説をたてた。まず胃癌においては NTH1 の発現量が低下しているのではと考え、胃癌細胞株における *NTH1* 遺伝子発現量を定量的 RT-PCR によって調べたところ、全例で低下していた。ウェスタンブロット法による蛋白としての発現も同様の結果であった。そこで、脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の存在下で培養したが発現量が回復しなかったことから、エピジェネティックな発現低下ではないことを明らかにした。次に、NTH1 安定発現株を樹立し修復活性を調べたところ十分な活性が認められたが、逆に導入しないと修復活性は低下していることを示した。さらに胃癌臨床材料における NTH1 の発現量を調べたところ、腫瘍部では発現低下している症例が約 3 分の 1 で認められ、また免疫組織染色により局在が本来の核ではなく細胞質にある例も加えると半数以上となり、NTH1 の機能低下が示された。

プロモーター領域の遺伝子多型と NTH1 発現量との関連性を、ルシフェラーゼアッセイを用いて調べた。プロモーター活性を規定する領域を決定し、同領域内の遺伝子多型を探索して、見つかった多型とプロモーター活性との相関、さらに、胃癌リスクとの関係についても調べた。同定さ

れた多型はプロモーター活性の低下を示したが、症例対照研究において有意な関連性は認められなかった。

世界で初めて胃がんにおける NTH1 発現量の低下、発現の局在異常を示し、NTH1 プロモーターの解析を行い、胃がん発症との関連性に先鞭をつけたことを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 前川 真人
副査 蓑島 伸生 副査 伊熊 睦博

博士(医学) 阿久澤 聡

論文題目

Interleukin-1 receptor antagonist attenuates the severity of spinal cord ischemic injury in rabbits

(インターロイキン-1 受容体拮抗薬はウサギ脊髄虚血傷害の重症度を軽減させる)

論文の内容の要旨

[はじめに]

脊髄虚血障害に起因する対麻痺は、胸部下行大動脈や胸腹部大動脈瘤手術における重大な合併症であり、術後急性期だけでなく、亜急性期や遅発性に発症する例も散見される。炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン-1 (IL-1) β は虚血後の神経障害の拡大への関与が示唆されている。ウサギ脊髄虚血モデルにおいて、IL-1 受容体拮抗薬 (IL-1ra, anakinra) を虚血再灌流直後に投与し、2 次炎症反応抑制による脊髄保護効果を経時的に評価し検討した。

[材料ならびに方法]

ニュージーランド白ウサギ (2.5-3.0 kg) を無作為に 3 群に分け、偽手術を施行した S 群 (n=3) を除き、他の 2 群は腎動脈下大動脈を 21 分遮断して脊髄虚血モデルを作製した。I 群 (n=20) は IL-1ra (200 μ g/0.2 mL) を、C 群 (n=20) は生理食塩水 (0.2 mL) を大動脈遮断解除直後に脊髄腔内に投与した。下肢運動機能 (Tarlov score)、病理組織学的検査[生存神経細胞数、病理組織学的傷害スコア、TUNEL 陽性神経細胞比 (TUNEL 陽性神経細胞数/全生存神経細胞数)]、脊髄液中一酸化窒素 (NO)、S100 β 濃度測定により、IL-1ra の脊髄保護効果評価を経時的に再灌流後 120 時間まで行った。

[結果]

下肢運動機能評価では、Tarlov score は対照の C 群では進行性の悪化を認めたのに対し、I 群では虚血再灌流後 48 時間以降では有意差を持って運動機能悪化の軽減、維持が認められた (48, 72, 96, 120 時間、各々 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.001$)。病理組織学的評価では、C 群では著明な進行性の脊髄壊死を認めたのに対し、I 群では残存神経細胞数が有意に高く (24, 72, 120 時間、各々 $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$)、病理組織学的傷害スコアが低かった (24, 120 時間、各々 $p < 0.01$, $p < 0.05$)。また、TUNEL 陽性細胞比も I 群で有意に減少を認めた (72, 120 時間、各々 $p < 0.01$, $p < 0.05$)。脊髄液中 NO は再灌流後 72、120 時間後 ($p < 0.05$) に I 群で有意に低く、S100 β 濃度は 24 時間後 ($p < 0.05$) のみ有意に低値であった。

[考察]

炎症性サイトカインである IL-1 は虚血ストレスそのものや再灌流傷害によりその発現が促進され、持続する 2 次炎症反応により神経傷害が進行するものと考えられている。虚血脊髄において IL-1 の発現が再灌流数日後まで続くことが最近報告されたが、本研究は既に臨床応用されている IL-1ra を用い、脊髄虚血に対する保護効果を初めて報告したものである。

本研究では脊髄虚血再灌流後の進行性神経傷害に対する IL-1ra の保護効果を運動機能の維持、改善を持って示した。また、傷害程度の軽減が残存神経細胞数高値、TUNEL 陽性細胞比減少により抗壊死効果、抗アポトーシス効果として裏付けされた。

複雑なサイトカインネットワークにおける虚血後の IL-1 の機序については明らかでない点も多いが、本実験ではそのシグナルに関係する細胞傷害因子として NO と S100 β の脊髄液中濃度を測定した。IL-1 シグナルにより免疫刺激を受けたグリア細胞より産生された NO は superoxide と結合し強い細胞傷害性を持つフリーラジカル reactive nitrogen oxide radicals (ONOO \cdot) に変化することが知られている。一般的に中枢神経傷害マーカーとして知られている S100 β は、IL-1 により産生が促され、高濃度ではグリア細胞を介し炎症を促進拡大させることが知られている。本実験においては、対照群では両因子とも持続して高値を示したのに対し IL-1ra 投与により S100 β は 24 時間後に、NO は 72、120 時間後で有意に低下していた。これらは、虚血再灌流後に持続する炎症反応、酸化ストレスの抑制、軽減を間接的に示唆していると考えられる。

[結論]

脊髄虚血後の進行性神経組織傷害に対し IL-1ra の投与は保護効果を有し、神経細胞壊死およびアポトーシスを軽減させる可能性が示唆された。IL-1 を標的とした抗サイトカイン療法は、下行大動脈や胸腹部大動脈瘤手術の有用な脊髄保護手段の一つになる可能性を有すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

胸腹部大動脈瘤手術の 5~10% に合併するといわれる脊髄虚血による対麻痺は発症の予想が困難な、また患者の QOL を大きく損なう悲惨な合併症である。症状の発生は術後急性期から見られることもあるが、亜急性期や遅発性に症状が悪化する例も見られ、異なった機序が示唆されている。炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン 1 (IL-1) β は虚血後の神経障害の拡大に関与すると考えられており、申請者らは IL-1 受容体を抑制することによる脊髄保護効果についてウサギ脊髄虚血モデルを用いて検討した。

脊髄虚血モデルはウサギの大動脈を 21 分間遮断することにより作製し、遮断解除後に IL-1 受容体拮抗薬 (IL-1ra, anakinra, 200 μ g/ 0.2 mL, I 群 n=20) または生理食塩水 (0.2 mL, C 群 n=20) を髄腔内に投与した。虚血後 24 時間毎に 120 時間まで下肢運動機能を Tarlov score にて評価した。24、72、120 時間後に脊髄および脳脊髄液を採取し、病理組織学的評価 (生存神経細胞数、傷害スコア、TUNEL 陽性細胞比) および IL-1 に関連する細胞傷害因子と考えられる NO および S100 β の髄液中濃度を測定した。

C 群の Tarlov score は進行性に悪化したが、I 群では悪化が軽減され 48 時間以降での両者の差は統計学的に有意であった。それを裏付けるように、病理組織学的評価でも I 群では C 群に比し、有意な生存神経細胞数の増加、有意な傷害スコアと TUNEL 陽性細胞比の減少を認めた。また髄液中の NO および S100 β 濃度はいくつかの時間帯で I 群において C 群より有意に低下していた。

以上より申請者らは脊髄虚血再灌流後に IL-1ra を髄液内に投与することにより IL-1 シグナルに伴う二次性炎症反応を抑制し、生存神経細胞数を増加させ、ひいては神経症状の悪化を抑制できることを示した。審査委員会では申請者らが IL-1ra の髄液内投与により脊髄の虚血再灌流傷害を軽減できることを初めて示したことを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 難波 宏樹
副査 佐藤 重仁 副査 渡邊 裕司

博士(医学) 田 中 晶

論文題目

Inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by activated factor XII plays a role in the enhancement of fibrinolysis by contact factors in-vitro

(活性化 XII 因子によるプラスミノゲンアクチベーターインヒビタータイプ 1 の不活性化は in-vitro における接触因子による線溶活性の増強に寄与する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

血液凝固活性化経路には、組織因子 (TF) と凝固 VII 因子 (FVII) の結合により開始される外因系と、血液中の接触因子が陰性荷電を有するコラーゲンや人工物に接触することにより開始される内因系がある。TF や FVII の遺伝子欠損動物は出血により胎生致死に至るため外因系は胎児発育に不可欠な血液凝固系とされる。一方内因系の接触因子の欠損では凝固時間の延長を認めるものの明らかな出血傾向は認めず、逆に血栓症を引き起こすことより、内因系は線溶活性の増強や炎症反応に深く関わるとされる。実際、血漿中線溶活性を総括的に表すとされるユーグロブリン溶解時間 (euglobulin clot lysis time, ECLT) が、接触因子の活性化物質であるカオリン添加により著明に短縮する事実が報告されている。ECLT は血漿中の線溶促進因子である tissue plasminogen activator (tPA) とその阻害因子である plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) のバランスにより決まる。これまでに、白血球エラスターゼやトロンピンは PAI-1 を不活性化することによりこれを短縮することが示され、凝固に伴う線溶活性増強機構として報告された。本研究では、カオリンによって活性化された凝固 XII 因子等の接触因子が、PAI-1 を不活性化することにより線溶活性を増強する可能性について検討した。

[材料ならびに方法]

1. ECLT は、クエン酸添加血漿の pH5.2 における等電点沈査を再溶解して得られた分画であるユーグロブリン分画に、トロンピンを添加してクロットを作成し、それが自然溶解するまでの時間として測定した。正常血漿、及び接触因子である、凝固 XII 因子 (FXII)、XI 因子 (FXI)、プレカリクレイン (PK) 欠乏血漿の ECLT に対するカオリン添加の影響を解析し、トロンピン産生を介して ECLT を短縮するカルシウムイオンとの差異を検討した。

2. 上記種々血漿を用いた ECLT 時の PAI-1 の動態を、ビオチン標識 PAI-1 を用いて解析し、精製活性化 FXII (FXIIa) とビオチン標識 PAI-1 の反応と比較した。

3. sepharose に結合した抗 PAI-1 抗体で調整した PAI-1 欠乏血漿を用いて、カオリンによる ECLT 短縮における PAI-1 の役割を検討した。

[結果]

1. 正常血漿では、カオリン及びカルシウムイオンの添加により、ECLT (100%) は、それぞれ $29.9 \pm 3.1\%$ 、及び $62.1 \pm 3.1\%$ に短縮した。活性化プロテイン C (aPC) の添加によりトロンピン産生を抑制すると、カルシウムイオンによるこの短縮は回復した ($86.3 \pm 17.4\%$) が、カオリンによる短縮は回復しなかった ($31.4 \pm 2.1\%$)。これよりカオリンによる短縮にはトロンピン産生が関与していないことが示唆され、このことは Western blotting でカオリン添加したユーグロブリン分画中にはトロン

ビンを認めないことにより確認された。

2. FXII、FXI、PK の欠乏血漿では、カルシウムイオンはいずれの ECLT も短縮したが、カオリンは PK 欠乏血漿及び FXI 欠乏血漿では短縮した(6.9±1.2%, 61.8±2.3%)ものの、FXII 欠乏血漿では著明な短縮を認めなかった(83.2±2.3%)。これより、カオリンによる ECLT の短縮には接触因子の中でも FXII が最も大きく関与していることが示唆された。

3. 正常血漿における、ユーグロブリン分画中の PAI-1 の動態をビオチン標識 PAI-1 を用いた Western blotting で確認したところ、カオリン添加でもカルシウムイオン添加と同様に低分子分解 PAI-1 が確認された。aPC によりトロンビン産生を抑制するとカルシウムイオン添加時の低分子分解 PAI-1 の産生は抑えられたが、カオリン添加による産生は抑制できなかった。一方 FXII 欠乏血漿ではカルシウムイオン添加により正常コントロール血漿と同様に低分子分解 PAI-1 を認めたが、カオリン添加では認めなかった。精製系で FXIIa と PAI-1 の反応を解析したところ、両者は高分子複合体を形成すると同時に PAI-1 の一部が限定分解されることが明らかになった。

4. ECLT 短縮機構における PAI-1 の影響を確認するため、血漿を各種濃度の抗 PAI-1 中和抗体で処理し PAI-1 を除去した後に調整したユーグロブリン分画を用いて、ECLT の変化を検討した。抗 PAI-1 抗体の濃度依存的に ECLT は短縮し、また濃度依存的にカオリン並びにカルシウムイオン添加の影響は減少した。

[考察]

カオリンによる ECLT の短縮には、接触因子である FXII が不可欠であり、カルシウムイオンによる短縮と同様に PAI-1 の不活性化が関与していることが明らかになった。カルシウムイオンによる短縮では、産生されたトロンビンが PAI-1 の限定分解及び不活性化に関わっていたが、カオリンによる短縮はトロンビン産生非依存的であり、活性化接触因子の関与が示唆された。接触因子の中でも特に FXII が重要であり、FXIIa は PAI-1 と高分子複合体を形成すること及び低分子に限定分解することにより、これを不活性化して線溶活性を増強する事実が明らかになった。

[結論]

FXIIa によるプラスミノーゲンの活性化や、カリクレインを介したプロウロキナーゼの活性化が、接触因子による線溶活性増強機構として報告されている。今回、活性化接触因子、特に FXIIa が、トロンビン産生非依存的に PAI-1 を不活性化することにより線溶活性を増強する、という新たな機構を解明した。

論文審査の結果の要旨

申請者は、カオリンによって活性化された凝固 XII 因子(FVII)等の接触因子が PAI-1 を不活性化することにより線溶活性を増強するかどうかを検討した。

クエン酸添加血漿の pH5.2 における等電点沈査を再溶解して得られた分画であるユーグロブリン分画に、トロンビンを添加してクロットを作成し、それが自然溶解するまでの時間、ユーグロブリン溶解時間 (euglobulin clot lysis time, ECLT) を測定した。

正常血漿では、カオリン添加により、ECLT は短縮し、また活性化プロテイン C (aPC) 添加によりトロンビン産生を抑制しても短縮は回復しなかった。これよりカオリンによる短縮にはトロンビン産生

が関与していないことが示唆された。凝固 XI 因子 (FXI) 及びプレカリクレイン (PK) 欠乏血漿ではカオリンは ECLT を短縮したが、FXII 欠乏血漿では短縮を認めなかった。これより、カオリンによる ECLT の短縮には接触因子の中でも FXII が最も大きく関与していることが示唆された。

ECLT 測定時の PAI-1 の動態を、ビオチン標識 PAI-1 を用いて解析したところ、カオリン添加で低分子分解 PAI-1 が確認されたが、FXII 欠乏血漿では認めなかった。また、aPC 添加では産生は抑制できなかった。精製系で FXIIa と PAI-1 の反応を解析したところ、両者は高分子複合体を形成すると同時に PAI-1 の一部が限定分解された。

このことから、申請者は FXIIa が、トロンビン産生非依存的に PAI-1 を不活性化することにより線溶活性を増強することを見出した。

審査委員会では、線溶活性増強における FXIIa の重要な役割を詳細に解明し、それが不育症の原因となりうることを示したことを高く評価した。

論文審査担当者	主査	梅村 和夫		
	副査	前川 真人	副査	上里 忠良

博士(医学) 村上 浩雄

論文題目

Antitumor effect of photodynamic therapy in mice using direct application of Photofrin dissolved in lidocaine jelly

(マウスにおけるリドカインゼリー溶解フォトフリンの局所投与による光線力学療法の抗腫瘍効果)

論文の内容の要旨

[はじめに]

光線力学療法 (photodynamic therapy: PDT) は腫瘍細胞を標的とした非侵襲的治療法である。PDT で用いる光増感剤であるフォトフリンは腫瘍細胞へ蓄積し特異的な波長の可視光線を照射することにより異型細胞や悪性腫瘍を破壊する。PDT は様々な腫瘍の治療に用いられているが、普及しているとはいえないのが現状である。

子宮頸部上皮内病変 (CIN) は生殖年齢女性に増加している。その治療法に円錐切除術が選択される頻度が高い。しかしながら円錐切除術は術後出血、頸管狭窄、早産、頸管無力症などのリスクを増加させる。一方、PDT は円錐切除術と比べ治療効果はほぼ同等と報告され、妊孕性に障害となるような合併症を起こさないにもかかわらず PDT が選択される頻度は少ない。その理由は、PDT に使用するフォトフリンが引き起こす光線過敏症という重篤な副作用に起因する。この光線過敏症管理のために長期の入院が必要となり、PDT の普及を妨げる原因となっている。従来の PDT ではフォトフリンが静脈投与されるため全身に循環し、代謝排泄されるまで長時間を要するために副作用を引き起こす。そこでフォトフリンを腫瘍局所へ浸透・拡散させ、全身投与による有害事象を軽減することを目的として血管拡張剤リドカインゼリーを併用した局所投与による PDT を考案し、その有効性についてマウスを用いた動物実験により検討した。

[対象と方法]

雌ヌードマウス BALB/c nu/nu (7~8 週令、18~20 g) の右背部皮下に HeLa 細胞 (0.1ml: 5×10^6 個) を移植し 9~12 日後、腫瘍径が約 6~8 mm へ腫大した担癌マウスを対象とした。PDT に用いるフォトフリンをリドカインゼリーに 0 mg/ml、10 mg/ml 及び 20 mg/ml の濃度でそれぞれ溶解し、腫瘍に隣接した皮膚に 6 mm 切開して腫瘍へ直接 1 ml/kg 投与した。そして薬剤投与 2 時間後 YAG-dye laser (630 nm、150 mW/cm²) を 100 J/cm² 照射した。またフォトフリン単剤局所投与後 PDT を行った群を対照とした。PDT 後 24 時間で摘出された腫瘍の組織標本を HE 染色し、薬剤塗布した腫瘍表面からの壊死の深度を測定した (n=6)。同様の担癌マウスにおいてリドカインゼリーに溶解したフォトフリン 10 mg/ml を投与し PDT を施行、その後腫瘍径を 5 日毎に 30 日間測定し腫瘍体積を算出して記録した。薬剤非投与群および光照射を行わない薬剤塗布のみの群についても同様に腫瘍体積を測定し抗腫瘍効果を検討した (n=5)。

[結果]

フォトフリン単剤局所投与群の場合、溶解濃度 10 mg/ml 群、20 mg/ml 群での腫瘍表面からの腫瘍壊死平均深度はそれぞれ 3.98 ± 0.92 mm、 4.01 ± 0.64 mm であった。一方、リドカインゼリーへ溶解し局所塗布した PDT 群では溶解濃度 10 mg/ml 群と 20 mg/ml 群で腫瘍壊死平均深度はそれぞれ 6.85 ± 1.01 mm、 5.61 ± 0.90 mm であった。フォトフリン溶解濃度 10 mg/ml 群においてフォトフリン

単剤局所投与群とリドカインゼリーに溶解したフォトフリン局所投与群間では壊死平均深度で有意差が認められた($p=0.03$)。溶解濃度 20 mg/ml においてフォトフリン単剤局所投与群とリドカインゼリーに溶解したフォトフリン局所投与群間では壊死平均深度で有意差が認められなかった。

リドカインゼリーに溶解したフォトフリンを局所塗布し、光照射した群では腫瘍体積は 30 日間抑制されていた。一方、薬剤非投与群および光照射の行わない薬剤塗布のみの群では 30 日後に腫瘍体積が約 10 倍へ増大した。リドカインゼリーに溶解したフォトフリンを局所塗布し光照射した群での 30 日後の腫瘍体積は約 2 倍の増加にとどまり抗腫瘍効果の持続が認められた。

[考察]

我々はリドカインに溶解したフォトフリンを腫瘍移植マウスに局所投与しレーザー照射後の抗腫瘍効果を検討した。その結果、リドカインを併用することによりフォトフリンが腫瘍へ浸透するということが明らかになった。

フォトフリン溶解濃度 10 mg/ml において 2 群間では壊死平均深度で有意差が認められたことから、血管拡張剤による抗腫瘍効果の増強が考えられた。一方、フォトフリン溶解濃度 20 mg/ml において壊死平均深度で有意差が認められなかった。フォトフリン濃度が高いほど励起光吸収も高くなるため 20 mg/ml 群において照射された光の透過性が低下し有意差が認められなかったと考えられた。以上よりリドカインゼリーに溶解したフォトフリン局所投与における至適濃度は 10 mg/ml であると考えられた。

長期的な腫瘍抑制効果について行った実験結果よりコントロールに比べリドカインゼリーに溶解したフォトフリンを用いた局所投与による PDT 群は有意に腫瘍抑制効果を認めた。リドカインゼリーに溶解したフォトフリンを局所投与した PDT は静脈投与による PDT と同様の抗腫瘍効果が得られることが示唆された。

HeLa 細胞を移植した腫瘍移植マウスにおいて、リドカインゼリーに溶解したフォトフリンの局所投与による PDT は腫瘍を有意に縮小させた。我々の開発した、リドカインを局所投与による PDT に併用することは新しい手法になるかもしれない。

[結論]

リドカインゼリーはフォトフリン局所投与による PDT の抗腫瘍効果を増強させた。

論文審査の結果の要旨

光線力学療法(以下 PDT)は非侵襲的悪性腫瘍治療法として臨床使用されているが、静脈投与されたフォトフリンは光線過敏症の原因となり、長期の入院が必要になり患者の QOL を損なう。子宮頸部上皮内病変 (CIN) は生殖年齢女性に増加しており、治療には円錐切除術が選択されることが多いが、術後出血、頸管狭窄、早産、頸管無力症などのリスクを増加させる。一方、PDT は円錐切除術に比べ治療効果は同等とされ、妊孕性にも影響しないにも拘わらず、PDT の副作用である光線過敏症のために、PDT が選択されることは少ない。入院(遮光)を短くし、QOL を落とさないフォトフリンの新しい投与方法の開発が急務であった。

そこで申請者は担癌マウスを用い血管拡張作用を有するリドカインゼリーにフォトフリン (0 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml) を溶解し、その局所投与による PDT の抗腫瘍効果を検討した。雌ヌードマ

ウス皮下にHeLa細胞を移植し、腫瘍径が6-8 mmの時点で被覆上皮を切開、リドカインゼリー溶解フォトフリン (1 ml/kg) を直接塗布した。2時間後、波長 630 nm の YAG-dye laser を用い照射エネルギー100 J/cm² でレーザー光を照射した。抗腫瘍効果は、照射後 24 時間での腫瘍壊死深達度により、また照射後 5 日毎に 30 日までの腫瘍体積を検討した。フォトフリン濃度 10 mg/ml のリドカインゼリーでは PDT により腫瘍の大部分に壊死を認め、コントロール群と比較して壊死平均深度で有意差を認めた。また、リドカインゼリー溶解フォトフリンでの PDT により腫瘍体積の増大はコントロールと比較し有意に抑制された。

以上の結果より、申請者はリドカインゼリー溶解フォトフリンの局所投与による PDT は強い抗腫瘍効果を有し、全身投与による副作用を解消する有効な治療法であることを明らかにした。

審査委員会では、血管拡張薬とフォトフリンの混合局所投与による抗腫瘍効果の増強は新規性があり、臨床応用の可能性が高いことを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 橋本 賢二
副査 梅村 和夫 副査 中村 利夫

博士(医学) 柴田陽介

論文題目

Physical activity and cardiovascular disease in Japan

(日本における身体活動と循環器疾患)

論文の内容の要旨

[はじめに]

循環器疾患による死亡は本邦の死因上位を占める。疫学的研究により身体活動が循環器疾患の死亡リスクを低下させると報告されている。だが、その研究の多くは欧米の研究結果であり、アジアや日本の研究結果は少ない。そこで本研究は、日本人を対象として身体活動と循環器疾患の死亡との関連を明らかにすることを目的とした。

[方法]

Jichi Medical School cohort study (自治医科大学コホート研究)は全国9県12地区の一般住民12,490人(男4,911人、女7,579人)を対象とした大規模なコホート研究である。1992年から95年の健診受診者を対象にベースライン調査を行った。調査項目は年齢、身長、体重、Body Mass Index (BMI)、収縮期血圧、拡張期血圧、総コレステロール、喫煙状況、飲酒状況、教育歴、糖尿病の既往、身体活動などである。その後2005年まで循環器疾患の死亡・発症について追跡を行った。対象者の内、追跡が可能で、調査項目に不備がなく、脳卒中・心筋梗塞・がんの既往のない9,810人(男3,856人、女5,954人)を解析対象とした。身体活動はフラミンガム研究で用いられたPhysical Activity Index (PAI)を使用した。PAIとは日常の身体活動について強度と費やした時間の積を合計したものととして算出される。

解析はPAIを四分位値で4グループ(Q1からQ4)に分け、PAIと循環器疾患の死亡についてCoxの比例ハザードモデルを用いて、地域、年齢のみを調整したハザード比(Model 1)と、地域、年齢、収縮期血圧、BMI、総コレステロール、喫煙、飲酒、教育歴、糖尿病の既往を調整したハザード比(Model 2)を算出した。また、病態別(脳卒中、心筋梗塞)にも同様の解析を行った。解析はSPSS15.0Jを用いた。

[結果]

観察人年は116,844人年、平均追跡期間は 11.9 ± 2.4 年、追跡率は99.9%であった。追跡終了までに194人(男105人、女89人)の循環器疾患の死亡が確認された。登録時の平均年齢は男 55.3 ± 12.1 歳、女 55.3 ± 11.2 歳であった。

循環器疾患の死亡に関するハザード比は、男のModel 1ではPAIが最も少ない群(Q1)を1.00(基準)にすると、Q2は0.62(95%信頼区間:0.40-0.98)、Q3は0.53(0.31-0.88)、PAIが最も多い群(Q4)は0.40(0.22-0.73)、トレンド検定は $P < 0.01$ であった。Model 2ではQ1は1.00(基準)、Q2は0.66(0.41-1.06)、Q3は0.65(0.37-1.14)、Q4は0.48(0.24-0.93)、トレンド検定は $P = 0.03$ であった。女のModel 1ではQ1は1.00(基準)、Q2は0.71(0.38-1.32)、Q3は0.52(0.26-1.04)、Q4は0.48(0.22-1.05)、トレンド検定は $P = 0.03$ であった。Model 2ではQ1は1.00(基準)、Q2は0.70(0.36-1.35)、Q3は0.50(0.24-1.06)、Q4は0.49(0.21-1.15)、トレンド検定は $P = 0.05$ であった。

脳卒中の死亡は97人(男51人、女46人)確認された。脳卒中の死亡に関するハザード比は、

男の Model 2 では Q1 は 1.00 (基準)、Q2 は 0.60 (0.29-1.25)、Q3 は 0.75 (0.34-1.67)、Q4 は 0.63 (0.24-1.60)、トレンド検定は $P=0.36$ であった。女の Model 2 では Q1 は 1.00 (基準)、Q2 は 0.89 (0.38-2.12)、Q3 は 0.20 (0.04-0.91)、Q4 は 0.54 (0.17-1.74)、トレンド検定は $P=0.08$ であった。

心筋梗塞の死亡は 82 人 (男 43 人、女 39 人) 確認された。心筋梗塞の死亡に関するハザード比は、男の Model 2 では Q1 は 1.00 (基準)、Q2 は 0.77 (0.37-1.61)、Q3 は 0.75 (0.32-1.79)、Q4 は 0.57 (0.20-1.61)、トレンド検定は $P=0.30$ であった。女の Model 2 では Q1 は 1.00 (基準)、Q2 は 0.50 (0.16-1.56)、Q3 は 0.95 (0.35-2.56)、Q4 は 0.53 (0.14-2.03)、トレンド検定は $P=0.59$ であった。

[考察]

男女ともに身体活動が多いほど循環器疾患の死亡に関するハザード比は低くなった。病態別に検討したところ、身体活動が多いほど脳卒中、心筋梗塞の死亡に関するハザード比も低くなる傾向が見られたが、トレンド検定は有意ではなかった。

欧米の先行研究と同様に、本邦においても身体活動が循環器疾患の死亡に予防効果があった。身体活動によりインスリン感受性の向上、HDL コレステロールの増加、安静時血圧の低下などが報告されている。また、精神的健康状態の改善なども報告されており、それらのメカニズムによるものであると考えられる。病態別の検討では、標本数が減少し、統計学的検出力が低下したため、有意な結果が得られなかったと考えられる。

本研究の強みは、日本における大規模なコホート研究であること、交絡要因を調整して解析を行ったことである。限界は、身体活動の評価を誤分類している可能性が否めないことである。しかし、できる限りの対応として訓練された調査員により、全ての調査を実施した。

[結論]

本研究の結果から、日本でも身体活動は循環器疾患の死亡のリスクを低下させることが明らかになった。脳卒中、心筋梗塞といった病態別の結果については、さらなる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨

身体活動は循環器疾患の死亡リスクを下げると言われるが、その研究成果は欧米のコホート研究によるもので、本邦での研究は希であった。そこで、本研究では日本人における身体活動の循環器疾患死亡におけるエビデンスを得ることを目的とした。

自治医科大学コホート研究の一般住民 12,490 人 (男 4,911 人、女 7,579 人) を対象とした。このうち、1992 年から 95 年の健診受診者を対象にベースライン調査を行い、2005 年までの循環器疾患の死亡と発症について追跡を行った。身体活動は強度と時間の積を合計した Physical Activity Index (PAI) を使用した。対象群を PAI によって 4 分割し、Cox の比例ハザードモデルを用いて、地域、年齢、血圧、BMI、喫煙など各種の交絡因子で調整して解析した。

平均追跡期間は約 12 年、追跡率は 99.9% で、追跡終了までに 194 人 (男 105 人、女 89 人) の循環器疾患による死亡が確認された。PAI によって 4 分割した各群における循環器疾患による死亡のハザード比を男女別に調べたところ、男女ともに PAI の上昇とともに下降しており、トレンド検定で明らかな有意差が確認された。脳卒中、心筋梗塞による死亡でも検討したが、標本数が減少し、PAI の上昇によるハザード比の下降傾向はみられたものの有意差は認められなかった。

本研究は、身体活動の定量評価を用い交絡要因を調整して解析した大規模なコホート研究により、本邦においても身体活動は循環器疾患の死亡リスクを低下させることを初めて明らかにしたことを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 前川 真人
副査 中原 大一郎 副査 永田 年

博士(医学) Walid Husein Ali Ahmed

論文題目

Simultaneous analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry

(液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析法による毒きのこ中の α -アマニチン、 β -アマニチンならびにファロイジンの同時分析に関する研究)

論文の内容の要旨

[はじめに]

毒きのこ類には色々の種類があり、含まれる毒素の種類も様々である。最も毒性の強いものの一つとして *Amanita* 属のきのこ類で、その代表的なものとしてドクツルダケ (*Amanita virosa*) がある。このきのこ 1 本で、成人数人を中毒死させることができるといわれる。これらのきのこを食用きのこ間違え、食することによる中毒事例は毎年後を絶たない。自分で採取しさらに摂取して死亡するならば中毒事故死となるが、採取し、家族や他人に提供し、それを食して死亡した場合には過失致死罪が適用され、法的に問題となり、摂取後に残されたきのこ類や、死亡者の胃内容物・血液・尿・臓器からのきのこ毒の検出が必要となる。今回の研究では最も毒性の強いきのこ毒 α -アマニチン、 β -アマニチンならびにファロイジンについて、最新の分析機器である高速液体クロマトグラフィー (LC) —飛行時間型質量分析法 (TOFMS) を用いて、抽出から機器分析に至るまでの詳細な分析法を確立し、その方法の信頼性について検証を行った。現在までに *Amanita* 毒素を TOFMS を用いて分析した報告はない。

[材料と方法]

α -アマニチン、 β -アマニチンはシグマ社製のものを入手し、ファロイジンと IS であるマイクロシスチン RR は和光社製のものを入手した。ドクツルダケ (*Amanita virosa*) は滋賀県もしくは京都府山中にて採取し、 -80°C にて保存したものをを用いた。きのこ毒素を含まないきのこ材料として市販の生しいたけ (*Lentinula edodes*) をを用いた。

細かく切碎した 100 mg のきのこに 100 ng の内部標準 (IS) を加え、さらに 5 ml の酸性メタノール (0.1%トリフルオロ酢酸含有)を加え、ポルトロンホモジナイザーでホモジナイズした。この際、必要に応じて信頼性検証用実験では必要な量のアマニチン類とファロイジンも加えた。よく攪拌した後、遠沈除タンパク後、上清を遠沈凍結乾燥器にて溶媒類を蒸発除去した。残渣を 200 μl の純水に溶かし次の固相抽出に用いた。固相抽出には Oasis HLB 3 cc (60 mg) カートリッジ (Waters 社製) を用い、カートリッジに上述のサンプル溶液 200 μl を流し込んだ。その後 1 ml の 5%メタノールを含むクロロホルム液にてカートリッジを洗浄し、目的毒素と IS は 100%メタノールで溶出した。溶出液は凍結乾燥器で溶媒を蒸発除去して得られた残渣に 30 μl の LC 移動相 (アセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム, 50: 50, v/v) に溶解し、その 5 μl を LC-TOFMS 分析に供した。

LC-エレクトロスプレーイオン化 (ESI)-TOFMS 分析は 1200LC-SL システム (アジレント社製) を QSTAR XL TOFMS 機器 (アプライドバイオシステム社製) に連結させたものをを用いた。LC には、TSK – gel Amide-803 μm 順相カラム (150 \times 2.0 mm、東ソー社製) をを用いた。移動相の流速は 1 ml/min で勾配溶離法により分離を行った。

[結果]

最初に α -アマニチン、 β -アマニチンならびにファロイジンの TOFMS スペクトルの報告がないため、各毒素のスペクトルを直接流入法で測定した。single stage TOFMS 測定では、 α -アマニチンで m/z 919、 β -アマニチンで m/z 920、ファロイジンで m/z 789 にそれぞれ $[M+H]^+$ の基準ピークを認めた。さらに強度は低い、いずれの毒素においても $[M+H-H_2O]^+$ のピークも同時に観察された。高分解能測定を行うと、 $[M+H]^+$ ピークには必ず同位体ピークがはっきりと分離して現れ、それらの各ピークの精密質量数は、例えば α -アマニチンにおいては m/z 919. 3603、920. 3667 ならびに 921. 3610 と測定され、 α -アマニチンの分子組成 $C_{39}H_{54}N_{10}O_{14}S_1+H$ の理論値から算出される同位体各ピークの質量数とごく近似していることが判明した。 β -アマニチン、ファロイジンに関しても同様な結果が得られた。すなわち TOFMS 高分解能測定ではプロトン付加分子イオンとその同位体スペクトルのみで *Amanita* 毒素の同定が可能となることも利点であることが分かった。さらに四重極—TOFMS のタンデム MS による各毒素のタンデム MS スペクトルを測定したところ、 α -アマニチン、 β -アマニチン、共に m/z 259 に強いフラグメントイオンが出現し、ファロイジンでは m/z 330 に強いプロダクトイオンピークを認めた。

上記 3 種の *Amanita* 毒素と IS であるマイクロシスチン RR はいずれも特殊な環状ペプチドであり、抽出操作や LC カラムの最適化に時間を要したが、前記の抽出法の分析法を確立した。しいたけに IS と各濃度の *Amanita* 毒素を添加したものを用いて検量線を作成したところ 100-1000 ng/g で良好な直線性が得られた。また回収率も 53.1 - 69.6% で満足できるものであった。再現性についても良好な結果を得た。本法を用いて実際の *Amanita virosa* 毒きのこから各毒素を検出・定量できた。

[考察]

本研究では、きのこ毒の中で最も毒性の強い α -アマニチン、 β -アマニチン、ファロイジンについて LC-TOFMS 分析法の詳細を確立した。きのこ毒中毒事件では、まずきのこ自体からの毒素の検出から始まり、解剖例では胃内容に残存するきのこ片からの毒素検出も重要となる。本法はきのこ自体の分析のみならず、ヒトの尿、血液、臓器中の *Amanita* 毒素検出にも使用可能と考えられる。TOFMS の最大の特徴は高分解能で分析できることである。本法では single stage TOFMS のプロトン付加分子イオンの同位体プロフィールで毒素の同定が可能であることが分かった。

TOFMS 分析は、未知の代謝物の構造推定や、多チャンネル分析による薬毒物スクリーニングなど法医学・法中毒学での応用が可能だと考えられる。

論文審査の結果の要旨

毒キノコを摂食することによる中毒事故は毎年後を絶たない。採取した毒キノコをそれとは知らずに家族や知人に提供することによって死亡事故につながる場合には過失致死罪が適用されることになる。そのため、摂食後に残された毒キノコの分析法、あるいは死亡者の血液、尿、臓器からのキノコ毒の検出法の開発は極めて重要である。

申請者は、最も毒性の強いキノコ毒である α -アマニチン、 β -アマニチン、およびファロイジンを分析するために、ドクツルダケ (*Amanita virosa*) からこれらの *Amanita* 毒素を固相抽出する条件を確立し、液体クロマトグラフィー (LC) - 飛行時間型質量分析法 (TOFMS) による分析法について

検討した。

これまで *Amanita* 毒素の TOFMS スペクトルの報告例がないために、申請者はまず直接流入法によってこれらの毒素のスペクトルを測定した。得られたスペクトルはいずれの毒素においても $[M+H]^+$ の基準ピークに加えて $[M+H-H_2O]^+$ ピークを示し、質量スペクトルから容易にこれらの毒素を識別できた。また、各毒素について計算から得られる $[M+H]^+$ とその同位体ピークを実測した質量スペクトルと比較したところ、よく一致しており、TOFMS 高分解能測定のみで *Amanita* 毒素の同定が可能であることがわかった。さらに、四重極-TOFMS で測定されたタンデム質量スペクトルはそれぞれの毒素に特徴的な強いフラグメントイオンを示した。

Amanita 毒素の定量を行うために、内部標準としてマイクロシスチン RR を添加し、固相抽出や LC 分離条件の最適化に関する検討を行い、その分析条件を確立した。開発された分析法の検量線の直線範囲は 100-1000 ng/g、回収率は 53-70% で満足できるものがあった。本法を用いて実際のドクタツルダケから各毒素の定量分析が可能であった。

申請者が開発した分析法は毒キノコ自体の分析のみならず、ヒトの尿、血液、臓器の *Amanita* 毒素の検出・定量に適用できると考えられる。

以上により、本論文は博士(医学)の学位にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	藤本 忠蔵		
	副査	梅村 和夫	副査	瀬藤 光利

博士(医学) 相良大輔

論文題目

Trans-serosal leakage of proinflammatory mediators into a bowel bag during abdominal aortic aneurysm repair: Role of phospholipase A₂ in activating leukocytes

(腹部大動脈瘤手術中の腸バッグへの炎症性メディエーターの経漿膜的漏出: 好中球を活性化させるホスホリパーゼ A₂ の役割)

論文の内容の要旨

[はじめに]

腸管由来の炎症性メディエーターが全身循環へ入り遠隔臓器障害、多臓器不全を引き起こす経路として、門脈、腸管リンパ管の二つの経路が提唱されている。我々はこれまで動物モデルを用いて第三の経路として経腹膜経路が存在することを報告してきたが、本研究では臨床症例における炎症性メディエーターの経腹膜経路の存在を明らかにすることを目的とした。

[材料と方法]

浜松医科大学医の倫理委員会の承認と、すべての患者からのインフォームド・コンセントを得た。2007年5月から2009年9月までに浜松医科大学第二外科、血管外科で腹部大動脈瘤の待機的人工血管置換術を行った患者のうち15症例を2群に分けた。15症例のうち、グループ I (n=10)は術中、小腸をプラスチックバッグに収納し血行再建終了時にバッグ内に貯留した腸管浸出液を用い、グループ II (n=5)は術中、小腸をスポンジガーゼにより圧排し血行再建終了時に腹腔内に留置したガーゼが吸収した腹腔内浸出液を用い、それぞれの好中球活性化能について検討した。また、コントロール群として、15症例の手術開始時の腹腔内洗浄生食水を用いた。好中球活性化能は、各群で得られた浸出液および腹腔内洗浄生食水を術後2ヶ月後に採取した末梢血好中球に反応させ、好中球の偽足様突起形成率と、好中球膜表面の接着分子 CD11b の発現を flow cytometry により分析し、それぞれ3群間で比較検討した。

また、腸管由来炎症性メディエーターを同定するために、tumour necrosis factor- α (TNF- α)、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-8 (IL-8)、エンドトキシン、分泌性ホスホリパーゼ A₂ (sPL A₂)を定量し、比較検討した。さらに、ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤である quinacrine をグループ I の腸管浸出液に投与し、好中球活性化能を分析した。

グループ I (n=10)とグループ II (n=5)の患者背景は、年齢、腹部大動脈瘤の最大径、性別、手術時間、大動脈遮断時間、出血量、腹水貯留量について検討した。

すべてのデータは mean \pm SD で示し、2群間の比較には t 検定を用いた。3群間の比較および quinacrine の好中球活性化能に対する効果の分析には、対応のある一元配置分散分析(ANOVA)を用い、その後 Scheffe の方法により多重比較をした。すべての統計解析は、StatView 5.0 を用いて行った。

[結果]

グループ I (n=10)とグループ II (n=5)の患者背景の比較では、手術時間、大動脈遮断時間、出血量がいずれもグループ II で有意に高い数値を示し、グループ II の手術侵襲の程度がより高かった(t 検定、P<0.05)。

好中球活性化能を示す末梢血好中球の偽足様突起形成率はグループ I $56.5 \pm 13.5\%$ 、グループ II $10.0 \pm 2.0\%$ 、コントロール群 $1.6 \pm 0.9\%$ ($P < 0.01$ vs コントロール群) であり、flow cytometry で測定した CD11b 抗体の平均蛍光強度はグループ I 104.9 ± 28.6 、グループ II 66.5 ± 23.0 、コントロール群 31.2 ± 8.5 ($P < 0.01$ vs コントロール群) であり、ともにグループ I で有意に好中球活性化能が高かった。また、IL-6、IL-8、エンドトキシン、sPL A₂ の濃度はいずれもグループ I、グループ II、コントロール群の順で高値であった。一方、TNF- α 、IL-1 β の濃度はグループ I、グループ II の両群で差を認めなかった。さらに、グループ I の腸管浸出液による偽足様突起形成率、接着分子 CD11b の発現は quinacrine により用量依存性に抑制された (10^{-6} M ~ 10^{-4} M)。

[考察]

腹部大動脈瘤手術時に小腸をプラスチックバッグで収納した際に貯留する腸管浸出液、ならびにガーゼが吸収した腹腔内浸出液は、ともにコントロールと比較して有意に高い好中球活性化能を有していた。プラスチックバッグ内に貯留した腸管浸出液がより高い好中球活性化能を有していたことから、好中球活性化能を有する炎症性メディエーターの漏出が経漿膜的に起こることが確認され、これまでの動物モデルを用いた基礎実験の結果と同様に、臨床症例においても経漿膜的なメディエーターの伝搬経路が存在することが判明した。

さらに、腸管浸出液中の炎症性メディエーターとしては IL-6、IL-8、エンドトキシン、sPL A₂ のいずれもがコントロールと比べ有意に増加していた。また、ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤である quinacrine によって腸管浸出液による末梢血好中球の偽足様突起形成率、接着分子 CD11b の発現が、ともに用量依存性に抑制されたことから、これらのメディエーターの中で sPL A₂ が腸管浸出液中の好中球活性化能を有するメディエーターとして重要であることが判明した。

グループ II はグループ I と比べて、手術侵襲の程度が高かったと考えられるにもかかわらず、グループ I の浸出液における好中球活性化能が有意に高く、sPL A₂ も有意に高かった。このことは、腹部大動脈瘤手術における小腸プラスチックバッグの使用が、何らかの機序で腸管の経漿膜的な炎症性メディエーターの漏出を惹起していると考えられ、小腸バッグを使用しない手術術式との比較の上でも、興味深い知見と考えられた。

[結論]

腹部大動脈瘤手術中には、経漿膜的な腸管由来の炎症性メディエーターの漏出が起こり、その炎症性メディエーターの中で最も好中球活性化に影響を及ぼすのは sPL A₂ であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究の目的は、腸管由来の漏出液中に種々の炎症性メディエーターが存在し、好中球活性化能に富んでいることを明らかにすることである。腹部大動脈瘤の待機的手術 15 例を対象に、術中、小腸をプラスチックバッグに収納したもの (Gr.1)、および、小腸を腹腔内に置いたもの (Gr.2) の 2 群に分け、それぞれの漏出液について比較検討を行った結果、両群共に末梢血好中球活性化能および炎症性メディエーターは高値であった。しかし、Gr.1 の漏出液における接着分子 CD11b の発現および分泌性ホスホリパーゼ A₂ (sPLA₂) 濃度は、Gr.2 より有意に高く、さらに、Gr.1

の漏出液は、PLA₂阻害剤 (quinacrine) により好中球活性化能が抑制された。以上から、sPLA₂が、好中球活性化の主因であることを明らかにし、併せて、小腸プラスチックバッグの弊害を強調した。

審査会では、対象の無作為選択の方法、末梢血好中球の偽足様突起測定に関するバイアスの有無、各患者の好中球を使用した理由、手術終了時の小腸の肉眼的所見とくに静脈うっ血の程度、Gr.2 において炎症性メディエーターが希釈された可能性、sPLA₂ が腸管内から漿膜外へ逸脱するメカニズム、プラスチックバッグ内の漏出液が炎症性メディエーターに富んでいた理由、腸間膜リンパ節の関与の可能性、quinacrine の作用機序などを質問し、これに対し、申請者から概ね適切な解答が得られた。過大な手術侵襲後の多臓器障害症候群には、腸管由来の漏出液に含まれる炎症性メディエーターが影響している可能性を示唆した新知見を高く評価し、今後、本研究を進展させ、腹膜経路で血中に spill over する病態の解明を要望した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	青木 克憲		
	副査	浦野 哲盟	副査	椎谷 紀彦

博士(医学) 高橋 典 男

論文題目

Effects of thyroid hormone on the activity of CYP3A enzyme in humans

(甲状腺ホルモンがヒトの CYP3A 酵素活性に及ぼす影響について)

論文の内容の要旨

[はじめに]

チトクローム P450 (CYP) 3A はヒト薬物代謝酵素の中で最も発現量が多く、現在臨床応用されている薬物のうち 45 ~ 60 %が CYP3A を介して代謝されている。甲状腺ホルモンは全身のほとんど全ての細胞に作用して代謝を亢進させるが、*in vitro* でヒトの肝細胞に添加すると CYP3A4 が遺伝子および蛋白レベルで減少することが報告されている。甲状腺ホルモンの CYP3A 活性へ及ぼす影響をヒトで評価することは重要であるが、これまで臨床試験などで検討されたことはない。

ヒトの CYP3A 活性は個体間で大きく変動する。CYP3A によってミダゾラムから 1'-水酸化ミダゾラムが、また遊離コルチゾールから 6β-水酸化コルチゾールが生成することから、1'-水酸化ミダゾラム / ミダゾラム比、あるいはまた 6β-水酸化コルチゾール / 遊離コルチゾール比を用いることでヒトの CYP3A 活性を評価することが可能である。今回、甲状腺ホルモンがヒトの CYP3A 活性に及ぼす影響をこれらの指標を用いて検討した。

[患者ならびに方法]

試験は浜松医科大学倫理委員会の承認の下、文書同意が得られた健常成人 10 名(男性 10 名、29 ~ 46 歳、体重 52.5 ~ 95.0 kg)を対象にオープンラベル法で行った。臨床で用いられる T₃ 抑制試験に準じ、トリヨードサイロニン(T₃) 75 μg / 日を試験第 1 日から第 14 日まで連日 14 日間経口投与し、人為的甲状腺機能亢進状態にした。

T₃ 投与前日と投与後第 15 日にミダゾラム 15 μg / kg を経口投与し、投与前、投与後 0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10、24 時間後まで経時的に計 11 回の採血および 24 時間の蓄尿を行った。血漿中ミダゾラムと 1'-水酸化ミダゾラムは液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計を用いて、また尿中 6β-水酸化コルチゾールと遊離コルチゾールは高速液体クロマトグラフィ法で測定した。CYP3A 活性はミダゾラムの薬物動態と尿中 6β-水酸化コルチゾール / 遊離コルチゾール比で評価した。

数値は最高血漿中濃度到達時間を平均値と範囲で、他のパラメーターは平均 ± 標準偏差で表現した。

[結果]

甲状腺ホルモン投与により遊離 T₃ (pg/ml) は 3.52 ± 0.34 から 8.13 ± 2.16 に有意に上昇した ($P < 0.01$)。人為的甲状腺機能亢進状態による有害事象は認められなかった。

甲状腺ホルモン投与前後のミダゾラムの最高血漿中濃度 (ng/ml) は 7.1 ± 4.2 から 6.6 ± 1.7 、血漿中濃度-時間曲線下面積 (ng·hr/ml) は 20.0 ± 18.5 から 21.0 ± 12.7 、最高血漿中濃度到達時間 (hr) は 1.0 (0.5 ~ 1.0) から 0.5 (0.5 ~ 1.0)、血漿中濃度半減期 (hr) は 2.2 ± 0.7 から 2.2 ± 0.9 で、いずれも有意な変化ではなかった。

1'-水酸化ミダゾラムの最高血漿中濃度 (ng/ml) は甲状腺ホルモン投与後に 2.3 ± 0.9 から $1.5 \pm$

0.5 ($P < 0.05$) へと有意に減少したが、血漿中濃度-時間曲線下面積 ($\text{ng}\cdot\text{hr}/\text{ml}$) は 5.5 ± 2.2 から 4.2 ± 1.8 、最高血漿中濃度到達時間 (hr) は $0.75 (0.5 \sim 1.5)$ から $0.5 (0.5 \sim 1.0)$ 、血漿中濃度半減期 (hr) は 2.1 ± 0.7 から 1.9 ± 0.7 であり、いずれも統計学的に有意な差異ではなかった。

CYP3A 活性を示す 1'-水酸化ミダゾラム / ミダゾラムの血漿中濃度-時間曲線下面積の比は甲状腺ホルモン投与後に 0.36 ± 0.19 から 0.25 ± 0.15 ($P < 0.05$) に有意に減少した。さらに、6 β -水酸化コルチゾール / 遊離コルチゾールの尿中濃度比も甲状腺ホルモン投与後に 6.92 ± 2.22 から 5.88 ± 2.45 ($P < 0.05$) へと有意に減少した。

[考察]

ヒトにおける CYP3A 活性を良く反映する 1'-水酸化ミダゾラム / ミダゾラムの血漿中濃度-時間曲線下面積の比と、6 β -水酸化コルチゾール / 遊離コルチゾールの尿中濃度比は、共に甲状腺ホルモン投与後に有意な減少を認めた。このことは甲状腺ホルモンが CYP3A 活性を低下させる可能性を示すものであり、これまで報告された *in vitro* 試験で T_3 をヒトの肝細胞に添加すると CYP3A4 が遺伝子および蛋白レベルで減少する結果とも一致するものである。本研究での甲状腺機能亢進状態は心拍数増加や手指振戦、血清生化学的検査値の変化などまだ認められない程度であり、このような段階ですでに CYP3A 活性の低下が生じることは興味深い。

[結論]

本研究は、ヒトを対象とする臨床試験として初めて甲状腺ホルモンが CYP3A 活性を減少させることを示したものである。CYP3A 基質薬物は临床上広く用いられており、甲状腺機能亢進症の患者にこれらの薬物を投与する場合、血漿中濃度の上昇、作用の増強、副作用の出現を引き起こす可能性があり、注意が必要と考えられる。

論文審査の結果の要旨

In vitro では甲状腺ホルモンが CYP3A4 の活性と発現を減少させると報告されている。しかし、ヒトでは甲状腺ホルモンが CYP3A 活性に及ぼす影響は報告されていないため、本研究において検討された。

健康人 10 名を対象に行った。甲状腺ホルモンであるトリヨードサイロニン (T_3 , 75 $\mu\text{g}/\text{day}$) を 2 週間経口投与した。 T_3 投与前後におけるミダゾラム (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 経口投与後のミダゾラムと 1'-水酸化ミダゾラムの血漿中濃度と、遊離コルチゾールと 6 β -水酸化コルチゾールの尿中濃度を測定した。CYP3A 活性を評価するために、1'-水酸化ミダゾラム / ミダゾラムの AUC 比と 6 β -水酸化コルチゾール / 遊離コルチゾールの尿中濃度比を算出した。

甲状腺ホルモン投与により 1'-水酸化ミダゾラム / ミダゾラムの AUC 比は 0.36 から 0.25 に ($P < 0.05$)、6 β -水酸化コルチゾール / 遊離コルチゾールの尿中濃度比は 6.92 から 5.88 に ($P < 0.05$) 減少した。これらの結果より、ヒトにおいて甲状腺ホルモンは CYP3A 活性を減少させ、CYP3A の基質薬物の体内動態に影響することが示唆された。

CYP3A の基質薬物は临床上、幅広く用いられており、甲状腺機能亢進症の患者にこれらの薬物を投与する場合は、血漿中濃度の上昇や作用・有害反応の増強・発現が引き起こされる可能性が考えられた。

審査委員会では、申請者がヒトにおいて甲状腺ホルモンが CYP3A 活性を減少させることを初めて報告した点を高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 川上 純一
副査 梅村 和夫 副査 中川 祐一