

(論文提出によるもの)

学位記番号	氏名	学位授与年月日	学位論文題目	頁
医博論第464号	三澤 清	平成21年4月17日	Epigenetic inactivation of galanin receptor 1 in head and neck cancer (頭頸部癌におけるギャラニンレセプター1のエピジェネティックな抑制)	90
医博論第465号	永房 鉄之	平成21年6月19日	Mechanical fragmentation and transportation of calcium phosphate substrate by filopodia and lamellipodia in a mature osteoclast (成熟破骨細胞におけるフィロポディアおよびラメリポディアによるリン酸カルシウム基質の力学的破壊および運搬)	94
医博論第466号	東川 佳靖	平成21年6月19日	Arsenic speciation of arsine-exposed blood samples by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and As-adduct, a possible indicator of As ₂ H ₃ exposure (アルシン曝露血液試料の高速液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析計によるヒ素化学形態別分析とアルシン曝露の指標物質となるヒ素付加体)	98
医博論第467号	東 隆一	平成21年7月17日	Detection of skin perforators by indocyanine green fluorescence nearly infrared angiography (インドシアニングリーン蛍光近赤外血管造影法を用いた皮膚穿通枝の検出)	102
医博論第468号	鈴木 一有	平成21年7月17日	Chorangiosis and placental oxygenation (胎盤血管腫症における胎盤酸素化)	105
医博論第469号	諏訪 大八郎	平成21年9月18日	Intraperitoneal infusion of recombinant plasminogen activator inhibitor type 2 induced apoptosis in implanted human colon cancer and inhibited its growth and liver metastasis (遺伝子組み換えプラスミノゲンアクチベーターインヒビタータイプ2はヒト大腸がん移植モデルにおいて腹腔内投与によりアポトーシスを誘導し腫瘍増殖と肝転移を抑制した)	109
医博論第470号	古瀬 洋	平成21年10月16日	Significance of 5-fluorouracil-related enzyme activities in predicting sensitivity to 5-fluorouracil in bladder carcinoma (膀胱癌の5-FU感受性予測における5-FU代謝関連酵素活性の意義)	113
医博論第471号	安部 正和	平成21年11月20日	The use of non-three-layer ultrasound in biopsy recommendation for premenopausal women (閉経前女性の子宮内膜組織診時に推奨される非3層性超音波所見の有用性)	117
医博論第472号	足守 直樹	平成21年12月11日	TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, mediates S-phase cell cycle arrest and suppresses head and neck tumor angiogenesis (低分子Bcl-2阻害剤、TW-37は細胞周期においてS期の停止を介在し、頭頸部腫瘍における血管新生を抑制する)	120

学位記番号	氏名	学位授与年月日	学位論文題目	頁
医博論第473号	中山 禎 司	平成21年12月11日	Striatal D ₂ receptor availability after shunting in idiopathic normal pressure hydrocephalus (特発性正常圧水頭症患者におけるシャント術後の線条体D ₂ 受容体測定の有用性)	123
医博論第474号	細川 誠 二	平成21年12月11日	Ultrastructural localization of cochlin in the rat cochlear duct (ラット蝸牛管におけるコクリンの超微細構造的な局在)	126
医博論第475号	原田 英 幸	平成22年2月10日	Radiological response and clinical outcome in patients with femoral bone metastases after radiotherapy (転移性大腿骨腫瘍患者における放射線治療後の画像上の治療効果ならびに臨床成績)	128
医博論第476号	中村 徹	平成22年3月9日	Prognostic significance and possibility in guiding adjuvant therapy of the pleural lavage cytology in patients with non-small cell lung cancer (非小細胞肺癌患者における洗浄胸水細胞診の予後因子としての意義と補助療法決定の可能性)	131
医博論第477号	毛 謙	平成22年3月9日	A small molecule that blocks fat synthesis by inhibiting the activation of SREBP (SREBPの活性化を阻害して脂肪合成を抑制する小分子化合物)	133

博士(医学) 三澤 清

論文題目

Epigenetic inactivation of galanin receptor 1 in head and neck cancer
(頭頸部癌におけるギャラニンレセプター1のエピジェネティックな抑制)

論文の内容の要旨

[はじめに]

頭頸部癌において、18qのLoss of heterozygosity (LOH)は腫瘍進行度・生存率に関連し、もっとも高頻度のLOH部位は18q23であることをわれわれは以前報告した。18q23に位置するギャラニンレセプター1 (*GALR1*)は、G-protein-coupled receptor (GPCR)の一つである。リガンドにはGalaninとGalanin-like peptideが知られ、レセプターには*GALR1*以外に*GALR2* (17q25.3), *GALR3* (22q13.1)が知られている。*Galanin*と*Galanin-like peptide*と、そのレセプターは中枢、末梢神経系に広く発現し、多くの生理活性作用を有すると報告されている。腫瘍細胞では、神経芽細胞腫で*GALR2*が細胞増殖抑制作用を有しアポトーシスを誘導すると最近報告されている。今回われわれは、*GALR1*が頭頸部癌において癌抑制遺伝子候補になるのではと考え、*GALR1*のエピジェネティックな抑制について調べ、*GALR1*がプロモーター領域の高メチル化によって発現抑制された細胞に*GALR1*遺伝子を導入し細胞増殖抑制作用を有することを示した。

[材料ならびに方法]

細胞株はミシガン大学、トルク大学でそれぞれ樹立された頭頸部扁平上皮癌細胞株(UM-SCC; 62例、UT-SCC; 10例)を使用した。臨床検体は浜松医科大学附属病院耳鼻咽喉科で治療を受けた頭頸部扁平上皮癌100例を使用した。バイサルファイト処理は1 μ gのDNAにsodium bisulfite (3 mol/L; pH 5.0)とhydroquinone (10 mmol/L)を加えて55 $^{\circ}$ C 16時間行った。メチル化解析は、バイサルファイト処理したDNAを使って、メチル化特異的PCR (MSP)法とバイサルファイトシーケンス (BS)法を使って行った。mRNA発現解析は従来のRT-PCR法と、定量PCR法を使ってUM-SCC13例と臨床検体12例に対して行った。プライマーの位置をエキソン2とエキソン3におき*GALR1*の発現を調べた。*GALR1* mRNA低発現であった細胞株 (UM-SCC-1,-2,-23)を5-azacytidineとtrichostatin A (TSA)を使って再発現を試みた。*GALR1*遺伝子導入はUM-SCC-23細胞株に、pCMVGALR1/HAiresGFPを使用し、リガンドであるGalaninを加え細胞数を測定した。臨床統計学的検討は各種臨床データと*GALR1*のメチル化について行った。

[結果]

UM-SCC13例のメチル化度をMSP法にて検討したところ、UM-SCC-1, 2, 23に高度なメチル化を認め、UM-SCC-6, 10B, 14B, 22B, 74Bに部分的なメチル化、UM-SCC-10A, 22A, 56, 81Bに、低メチル化を認めた。細胞株全体 (UM-SCC; 62例、UT-SCC; 10例)では、38 (52.7%)例に高度ないし部分的メチル化を認めた。臨床検体のメチル化度をMSP法にて検討したところ、H-27, 40, 52, 63, 72, 74が高メチル化例、H-88, 96, 97, 98, 99, 111が低メチル化例であり、臨床検体100例では、38 (38%)例に高メチル化度を認めた。

GALR1 mRNA発現をRT-PCR法にて解析したところ、UM-SCC-1, 2, 23が高度に低発現であり、UM-SCC-10B, 14Bは中程度低発現であった。正常細胞は、発現が正常に保たれていた。*GALR1*

mRNA 低発現であった UM-SCC-1,-2,-23 を 5-azacytidine と TSA で処理し *GALRI* mRNA の再発現を確認した。

UM-SCC13 例の BS 法と定量-PCR 法の結果を比較したところ、top strand, bottom strand のいずれも *GALRI* mRNA が低発現の細胞株はプロモーター領域全体に高メチル化を認めた。特に、転写因子 Ap-2, Sp1 結合部位の CpG メチル化度が *GALRI* mRNA の発現に影響を与えていることがわかった。BS 法によるメチル化度は定量-PCR 法による *GALRI* mRNA の発現と関連することがわかった。臨床検体の MSP 法と定量-PCR 法の結果を比較したところ、メチル化を認めた検体 (H-27, 40, 52, 63, 72, 74) は低発現、メチル化を認めなかった検体 (H-88, 96, 97, 98, 99, 111) は高発現であり関連することがわかった。

GALRI 遺伝子導入と細胞増殖測定では、UM-SCC-23 に遺伝子導入し *GALRI* 蛋白再発現をウエスタンブロット法で確認した。遺伝子導入後の細胞に *Galanin* を加え細胞数の減少を確認した。*GALRI* 遺伝子が癌抑制遺伝子としての性質を持ち合わせていることを確認できた。

臨床統計学的検討では、*GALRI* のメチル化は、T 進行度 (P=0.0036)、リンパ節転移 (P=0.0414)、Stage 進行度 (P=0.0037)、*cycline D1* 発現 (P=0.042)、p16 メチル化 (P=0.0494)、Over-all 生存率 (P=0.0448) に有意に相関していた。Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析では、他の因子に比べ、*GALRI* のメチル化と Stage 進行度に有意に生存率への関与を認めた。

[考察]

MSP 法により細胞株では 38/72 (52.7%)、臨床検体では、38/100 (38%) にメチル化を認めた。BS 法により *GALRI* プロモーター領域の、転写因子 AP-2 と Sp1 結合部位の CpG メチル化度が mRNA の発現に影響していることがわかった。臨床統計学的検討から、*GALRI* 遺伝子のメチル化は有意に Over-all 生存率に相関することがわかった。また、*GALRI* 遺伝子を再発現させた細胞で細胞増殖抑制されることも確認した。

[結論]

今回、頭頸部癌において *GALRI* 遺伝子にエピジェネティックな抑制がおこり、mRNA の発現が抑制されていることがわかった。

頭頸部癌において *GALRI* 遺伝子が重要な癌抑制遺伝子であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

頭頸部扁平上皮癌において、染色体 18q のヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity; LOH) が生命予後に強く関連していることが、申請者らの研究チームによって明らかにされた。頭頸部扁平上皮癌の臨床材料を用いたマイクロサテライト解析で欠失を調べた結果、高頻度に欠失を認められる領域に座位する遺伝子として、*Galanin* 遺伝子、*GALRI* 遺伝子が見出された。これらはリガンドと受容体の関係にあり、脳・腸管ペプチドの機能を有するものである。

申請者らは、頭頸部扁平上皮癌の細胞株および臨床材料を用いた実験で、*GALRI* 遺伝子 mRNA 発現量の減少とその遺伝子プロモーター領域のメチル化とが強く関連していることを見出し、*GALRI* 遺伝子のエピジェネティックな遺伝子発現抑制、*GALRI* の有する細胞増殖抑制作用、生命予後との関連について検討し、興味深い知見を得た。

ミシガン大学、トルク大学で樹立された頭頸部扁平上皮癌細胞株 72 例、浜松医科大学附属病院耳鼻咽喉科で治療を受けた頭頸部扁平上皮癌 100 例を使用した。細胞株と臨床材料から抽出した DNA を重亜硫酸処理し、メチル化特異的 PCR (MSP) 法と塩基配列決定法を使ってメチル化解析を行った。*GALRI* mRNA 発現解析は定性的な RT-PCR 法と定量 PCR 法で行った。*GALRI* mRNA 低発現であった細胞株を 5-azacytidine と trichostatin A (TSA) を使って発現の回復を確認した。*GALRI* の機能を調べるために、*GALRI* 遺伝子導入実験を施行した。各種臨床成績と *GALRI* のメチル化について臨床統計学的検討を行った。

MSP 法による検討の結果、72 種の細胞株のうち 38 種 (52.7%) に高度ないし部分的メチル化を認めた。また、臨床検体 100 例では、38(38%) 例に強いメチル化を認めた。RT-PCR 法にて *GALRI* mRNA 発現を解析したところ、DNA メチル化の認められた試料にて発現低下が確認された。*GALRI* mRNA 低発現であった細胞株を 5-azacytidine と TSA で処理したところ、*GALRI* mRNA 発現の回復を認めたため、DNA メチル化による発現低下と考えられた。特に、転写因子 Ap-2, Sp1 結合部位の CpG メチル化度が *GALRI* mRNA 発現に影響を与えていることがわかった。また、塩基配列を調べメチル化度と定量-PCR 法による *GALRI* mRNA 発現量を調べたところ、メチル化度の高い方が *GALRI* mRNA の発現が低いという相関性が認められた。臨床検体においても、メチル化度と *GALRI* mRNA の発現に逆相関を認めた。

頭頸部扁平上皮癌の細胞株に *GALRI* 遺伝子を導入したところ、*GALRI* 蛋白の再発現がウエスタンブロット法により確認された。また、遺伝子導入後の細胞に Galanin を加えたところ、細胞数の減少が確認された。すなわち、*GALRI* 遺伝子が癌抑制遺伝子としての性質を有していることが判明した。

臨床統計学的検討では、*GALRI* のメチル化は、T 進行度(P=0.0036)、リンパ節転移(P=0.0414)、Stage 進行度(P=0.0037)、cyclin D1 発現(P=0.042)、*p16* メチル化(P=0.0494)、Over-all 生存率(P=0.0448)と有意に相関していた。Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析では、他の因子に比べ、*GALRI* のメチル化と Stage 進行度に有意に生存率への関与を認めた。

以上の結果から、頭頸部癌の細胞株と臨床検体に、*GALRI* の DNA メチル化が生じており、そのため mRNA の発現が抑制されていること、それが転写因子の結合を阻害するためであろうこと、*GALRI* の増殖抑制効果の減弱による発癌が考えられること、*GALRI* のメチル化が生存率を予測する上で有意義であることが示された。審査委員会では、頭頸部癌において *GALRI* 遺伝子が重要な癌抑制遺伝子であり、予後診断にもつながることを初めて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) Galanin について
- 2) Galanin receptor について
- 3) DNA メチル化の機構について
- 4) 遺伝子発現消失の原因について
- 5) メチル化特異的 PCR について
- 6) DNA メチル化解析の方法について
- 7) 頭頸部扁平上皮癌の臨床材料における腫瘍細胞の割合について
- 8) 頭頸部扁平上皮癌における遺伝子異常について
- 9) Galanin, GALR の遺伝子変異について

10) N-グリコシダーゼ F 処理について

11) *GALR* 遺伝子メチル化と喫煙、ウイルス感染、治療との関係について

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 梶村 春彦

副査 橋本 賢二

博士(医学) 永房鉄之

論文題目

Mechanical fragmentation and transportation of calcium phosphate substrate by filopodia and lamellipodia in a mature osteoclast

(成熟破骨細胞におけるフィロポディアおよびラメリポディアによるリン酸カルシウム基質の力学的破壊および運搬)

論文の内容の要旨

[はじめに]

破骨細胞は骨吸収機能を有する多核細胞である。この細胞において、偽足と称されるフィロポディアおよびラメリポディアは細胞移動においては重要な機能を果たすが、骨吸収過程における機能については不明である。そこで本研究では、リン酸カルシウム(CP)をコートしたカバースリップ上に破骨細胞を培養し、ビデオ強化型微分干渉顕微鏡法(VEC-DIC マイクロスコーピー)を用いて、骨吸収活動中である成熟破骨細胞のフィロポディアおよびラメリポディアの動態および機能について解析した。

[材料ならびに方法]

生後 2-8 日齢の日本白色家兔の四肢長管骨を破砕し、得られた細胞を CP コートカバースリップ上で 5% CO₂、37 °C 下で 90 分間培養を行い、非接着細胞を除去し成熟破骨細胞を単離した。成熟破骨細胞は核が 3 個以上あるものとし、実験終了後に酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)染色にて確認した。全ての実験は細胞単離後 4-24 時間で行い、観察には VEC-DIC マイクロスコーピーを用いた。40 倍および 100 倍の対物レンズを備えた倒立型微分干渉顕微鏡により細胞の観察を行い、その微分干渉画像を CCD カメラで取得し、デジタル画像処理装置によりリアルタイムにコントラスト強調を行った。一連の画像はビデオモニターで観察しながら、画像取得解析装置で記録および解析を行った。画像記録間隔は 3 秒で、35 °C の条件下に行い、破骨細胞の形態学的変化、特にフィロポディアおよびラメリポディアの動態について観察を行った。また CP 消失領域の面積計測およびその時間的变化、CP 粒子の移動軌跡とフィロポディアおよびラメリポディアの動態との関連について解析した。

[結果]

40 倍の対物レンズによる観察にて CP 消失領域に近接した多核の破骨細胞が鮮明に確認でき、多くの細い線維状のフィロポディアが細胞体部より CP 残存領域および消失領域に放射状に伸びているのが記録できた。また CP 消失領域近くの細胞内に液胞がみられ、その反体側に細胞核がみられた。フィロポディアの観察では細胞体部より伸びたフィロポディアの先端が CP 基質に接着しており、基質より CP 粒子をはがし、先端に粒子を捕らえたまま細胞体部まで移動させる様子が記録できた。3 個の細胞につきその移動距離と移動時間を計測したが、それぞれ 9.2 μm / 10 min、11.0 μm / 6 min、7.0 μm / 8 min であり、いずれもほぼ時間に比例して移動距離が増加した。また 100 倍の対物レンズを用い細胞下も含めて CP 消失領域を計測した結果、記録開始時に 195 μm²であった CP 消失領域は 30 分後には 279 μm²、60 分後には 417 μm²、120 分後には 647 μm²まで増加した。なおこの過程において、画面右方向への細胞移動がみられた。また同細胞におけるラメ

リポディアの観察ではCP消失領域外のCP基質まで広がったラメリポディアは基質を細かな粒子に破壊し、またラメリポディアが収縮することによりCP粒子を一塊として細胞体表面まで移動させる様子が記録できた。

[考察]

本研究において VEC-DIC マイクロスコープを用いることにより、CP コートカバースリップ上に培養した成熟破骨細胞のフィロポディアおよびラメリポディアの動態および CP 消失領域の形成を観察できた。VEC-DIC マイクロスコープは生細胞のダイナミックな形態変化の評価や、生理学的反応を明らかにできる手法である。この手法により破骨細胞におけるフィロポディアおよびラメリポディアは CP 基質の力学的破壊と運搬機能を有するという新しい知見が得られた。象牙片上での観察では移動中の破骨細胞は骨吸収を行わないとの報告があるが、CP コートカバースリップ上での本研究では移動中においてもCP消失領域は増加しており、基質の違いが影響している可能性がある。なお骨吸収により生じた分解産物は偽足様形態を示す波状縁よりエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれるとされるが、本実験では波状縁の存在は確認できず、波状縁での骨吸収活動におけるフィロポディアおよびラメリポディアの機能は解明できなかった。また 100 倍レンズを用いて細胞下の CP 基質部に焦点を合わせることで、細胞周辺のみならず細胞下の CP 消失領域も解析できた。この手法を使えば生細胞のまま破骨細胞の活動性を定量的に解析することが可能であり、骨粗鬆症治療薬に対する破骨細胞の形態学的反応を評価できる可能性がある。

[結論]

本研究により、CP コートカバースリップ上に培養した成熟破骨細胞における、フィロポディアおよびラメリポディアの細胞移動以外の機能である CP 基質の力学的破壊および運搬機能が明らかになった。また VEC-DIC マイクロスコープを用いることにより、破骨細胞の活動性を定量解析できる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

破骨細胞は骨吸収機能を有する多核細胞である。この細胞において、偽足と称されるフィロポディアおよびラメリポディアは細胞移動においては重要な機能を果たすが、骨吸収過程における機能については不明である。そこで本研究において申請者は、リン酸カルシウム(CP)をコートしたカバースリップ上に破骨細胞を培養し、ビデオ強化型微分干渉顕微鏡法(VEC-DIC マイクロスコープ)を用いて、骨吸収活動中である成熟破骨細胞のフィロポディアおよびラメリポディアの動態および機能について解析した。

生後 2-8 日齢の日本白色家兎の四肢長管骨を破砕し、得られた細胞を CP コートカバースリップ上で 5% CO₂、37 °C 下で 90 分間培養を行い、非接着細胞を除去し成熟破骨細胞を単離した。成熟破骨細胞は核が 3 個以上あるものとし、実験終了後に酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)染色にて確認した。全ての実験は細胞単離後 4-24 時間で行い、観察には VEC-DIC マイクロスコープを用いた。40 倍および 100 倍の対物レンズを備えた倒立型微分干渉顕微鏡により細胞の観察を行い、その微分干渉画像を CCD カメラで取得し、デジタル画像処理装置によりリアルタイムにコントラスト強調を行った。一連の画像はビデオモニターで観察しながら、画像取得解析装置で記録

および解析を行った。画像記録間隔は3秒で、35 °Cの条件下に行い、破骨細胞の形態学的変化、特にフィロポディアおよびラメリポディアの動態について観察を行った。また CP 消失領域の面積計測およびその時間的变化、CP 粒子の移動軌跡とフィロポディアおよびラメリポディアの動態との関連について解析した。

40倍の対物レンズによる観察にてCP消失領域に近接した多核の破骨細胞が鮮明に確認でき、多くの細い線維状のフィロポディアが細胞体部より CP 残存領域および消失領域に放射状に伸びているのが記録できた。また CP 消失領域近くの細胞内に液胞がみられ、その反体側に細胞核がみられた。フィロポディアの観察では細胞体部より伸びたフィロポディアの先端が CP 基質に接着しており、基質より CP 粒子をはがし、先端に粒子を捕らえたまま細胞体部まで移動させる様子が記録できた。3個の細胞につきその移動距離と移動時間を計測したが、それぞれ 9.2 μm / 10 min、11.0 μm / 6 min、7.0 μm / 8 min であり、いずれもほぼ時間に比例して移動距離が増加した。また100倍の対物レンズを用い細胞下も含めて CP 消失領域を計測した結果、記録開始時に 195 μm^2 であった CP 消失領域は30分後には 279 μm^2 、60分後には 417 μm^2 、120分後には 647 μm^2 まで増加した。なおこの過程において、画面右方向への細胞移動がみられた。また同細胞におけるラメリポディアの観察ではCP消失領域外のCP基質まで広がったラメリポディアは基質を細かな粒子に破壊し、またラメリポディアが収縮することにより CP 粒子を一塊として細胞体表面まで移動させる様子が記録できた。

VEC-DIC マイクロスコピーは生細胞のダイナミックな形態変化の評価や、生理学的反応を明らかにできる手法である。この手法により破骨細胞におけるフィロポディアおよびラメリポディアは CP 基質の力学的破壊と運搬機能を有するという新しい知見が得られた。この手法を使えば生細胞のまま破骨細胞の活動性を定量的に解析することが可能であり、骨粗鬆症治療薬に対する破骨細胞の形態学的反応を評価できる可能性がある。本研究により、CP コートカバースリップ上に培養した成熟破骨細胞において、フィロポディアおよびラメリポディアが CP 基質の力学的破壊および運搬機能に関与することが明らかになった。また VEC-DIC マイクロスコピーを用いることにより、破骨細胞の活動性を定量解析できる可能性が示された。

審査委員会では、破骨細胞機能の新しい解析システムを確立した点、またフィロポディアおよびラメリポディアの機能に関して新しい知見を報告し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) 破骨細胞はなぜ多核なのか
- 2) 破骨細胞は分裂するのか
- 3) リン酸カルシウムコートカバースリップについて
- 4) matrix protein について
- 5) 微分干渉顕微鏡の原理について
- 6) TRAP 染色について
- 7) フィロポディアとラメリポディアの定義について
- 8) 破骨細胞の動く方向性を規定する因子について
- 9) 破骨細胞が接着するメカニズムについて
- 10) 当該領域の先行研究について

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	佐藤 康二		
	副査	金山 尚裕	副査	橋本 賢二

博士(医学) 東川佳靖

論文題目

Arsenic speciation of arsine-exposed blood samples by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and As-adduct, a possible indicator of AsH₃ exposure

(アルシン曝露血液試料の高速液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析計によるヒ素化学形態別分析とアルシン曝露の指標物質となるヒ素付加体)

論文の内容の要旨

[はじめに]

アルシン(AsH₃)は、毒物及び劇物取締法により毒物に指定される無色の気体である。金属の酸処理または精錬時に不純物であるヒ素から発生する AsH₃ ガスを吸引するといった中毒事故が散見されている。吸引後数時間以内にかかる溶血は、AsH₃ 中毒症状の特徴となっているものの、そのメカニズムについては完全には解明されていない。また、AsH₃ 吸引後の尿中代謝物に関する報告はあるが、ヒトの血液中ヒ素化合物の化学形態に関しては、十分な検討はなされていない。

ヒ素化合物は、自然界においても広く存在し、その化学形態により毒性が大きく異なる。食餌を介して毒性の低いヒ素化合物を日常的に摂取する場合もあるため、生体試料から中毒状態の判定を行うには、ヒ素の化学形態別分析が不可欠である。

本研究では、急性中毒状況を想定した AsH₃ 添加血液を作製し、高速液体クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析装置(HPLC-ICP-MS)を用いて血液中ヒ素化合物の化学形態別分析を行った。

[実験材料ならびに方法]

試薬:モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸、トリメチルアルシンオキシド及びテトラメチルアルソニウムは、トリケミカル研究所製のものを用い、ヒ素標準液(1,000 mgAs/L)には、和光純薬工業の JCSS 認定品を用いた。三酸化二ヒ素、ヒ酸水素二ナトリウム七水和物、その他の試薬については、いずれも和光純薬工業の特級品及び特級相当品を用いた。

添加実験用の血液は、AsH₃ や亜ヒ酸に曝露されていない健常人から採取し、ヘパリン処理したものをを用いた。

操作:AsH₃ 添加血液試料の作製は、日本工業規格 K0102-1998 の 61.1 ジエチルジチオカルバミド酸銀吸光光度法に記載する装置及び操作法を参考にして行った。すなわち、水素化ヒ素発生瓶から発生する AsH₃ ガスで血液 5 mL を 10 分間バブリングし、室温(23 °C)下で 90 分間静置させたものを添加血液試料とした。

血球成分と血漿成分との分離は、約 1,600×g で 10 分間遠心分離して行った。

試料の除タンパク操作には、東ソー製 ULTRACENT-10(分画分子量:10 kDa) 限外ろ過カートリッジを用いた。ろ液及び試料溶液は、Milli-Q 水で適宜希釈して分析に供した。

ヒ素の化学形態別分析には、アジレントテクノロジー社製の Agilent 1100 型 HPLC と Agilent 4500 plus 型 ICP-MS をオンラインで接続した装置を用いた。

[結果及び考察]

血液は、AsH₃ 添加直後では溶血を認めなかったが、室温下 90 分間静置後には、一部溶血を認めた。これは、急性中毒患者の症状と一致した現象であった。AsH₃ の水に対する溶解度は約 0.7 g/L と低く、血液に対する AsH₃ の吸収量は不明であるが、吸収された AsH₃ が赤血球に作用して溶血を引き起こしたものと考えられる。

AsH₃ 添加血液試料の血漿画分について、ヒ素の化学形態別分析を行った結果、亜ヒ酸(As^{III})のほかに保持時間 1.1 分付近で未同定ヒ素化合物が検出された。この血漿画分を限外ろ過したところ、未同定ヒ素化合物は消失し、As^{III}のみが検出された。このことから、未同定ヒ素化合物は分子量 1 万程度以上の物質であると推定された。ここで検出された As^{III}は、AsH₃ の酸化分解物であると考えられる。

次に、未同定ヒ素化合物の由来を検討するために、ブランク血液の血漿画分について、同様に AsH₃ を添加して化学形態別分析を行った。その結果、未同定ヒ素化合物は検出されなかった。このことから、未同定ヒ素化合物は血漿成分ではなく、血球成分に由来することが示された。

さらに、As^{III}が未同定ヒ素化合物の生成に関与するかを検討するため、ブランク血液に As^{III}を添加し、室温下 90 分放置後の血漿画分について分析を行った。その結果、溶血は認められず、As^{III}のみを検出し未同定ヒ素化合物は検出されなかった。このことから、血漿成分及び As^{III}は未同定ヒ素化合物の生成に関与しないものと考えられた。

また、蒸留水で予め溶血させたブランク血液に As^{III}を添加し、血漿画分を分析した結果、As^{III}のみが検出された。このことから、未同定ヒ素化合物は As^{III}と血球由来成分とが反応したものではないことが示された。

以上の結果を総合すると、AsH₃ 添加により生じた未同定ヒ素化合物は、血球に由来する分子量 1 万程度以上の成分にヒ素化合物が付加したものであり、血漿成分及び AsH₃ の分解物である As^{III}は、未同定ヒ素化合物の生成に関与しないことが示唆された。最近、AsH₃ を *in vitro* で添加してもヘモグロビン及びグロビン鎖とはヒ素付加体を生じないとの報告がある。今回検出された未同定ヒ素化合物の由来を特定するにはさらに検討する必要があるが、本化合物は血液試料から急性 AsH₃ 中毒を判定する際の指標の一つになると思われる。

[結論]

AsH₃ 添加血液試料を作製し、その血漿画分に含まれるヒ素化合物を HPLC-ICP-MS により分析したところ、未同定ヒ素化合物が検出された。これは、分子量 1 万以上の血球由来成分にヒ素化合物が付加したものであり、血液試料から急性 AsH₃ 中毒を判定する指標の一つになると考えられた。

論文審査の結果の要旨

アルシン(AsH₃)は毒物及び劇物取締法により毒物に指定される無色の気体であり、亜鉛、銅、カドミウムなどの非鉄金属の精錬時に、これらの金属に不純物として含まれる微量のヒ素が酸との反応によって危険量の AsH₃ を生成することがあり、AsH₃ 中毒を予測できない場合が多い。実際、工場における作業従事者の AsH₃ ガス吸入による死亡事故が報告されている。AsH₃ 中毒では吸入後数時間以内に起こる溶血が特徴的であるが、そのメカニズムについては解明されていない。

これまで、AsH₃ 吸入後の尿中代謝物の分析に関して幾つかの報告があるが、ヒト血液中のヒ素化合物の分析、特に化学形態別分析に関する報告はない。ヒ素化合物は様々な化学形態で自然界に広く存在し、その毒性も化学形態に依存する。食餌を介してヒ素化合物を摂取することもあるため、生体試料から中毒状態の判定を行うにはヒ素化合物の化学形態別分析が不可欠である。

申請者は、急性中毒症状を想定した AsH₃ 添加血液試料を作製し、高速液体クロマトグラフィー-誘導結合プラズマ質量分析法 (HPLC-ICPMS) を用いて血液中ヒ素化合物の化学形態別分析を行い、興味深い知見を得た。

ヒト血液に AsH₃ 発生装置を用いて AsH₃ を添加した直後では溶血が認められなかったが、90 分静置後に一部溶血が認められた。これは、急性中毒患者の症状と一致した現象である。

AsH₃ を全血試料に添加した後に遠心分離して得られた血漿画分についてヒ素化合物の HPLC-ICPMS 分析を行った結果、亜ヒ酸 (As (III)) のピークの前にヒ素化合物 (保持時間 1.1 分、以後、未同定ヒ素化合物という) のピークが検出された。この血漿画分を限外ろ過膜 (分画分子量 10 kDa) で処理すると、As (III) の前のピークは消滅し、As (III) のみが検出された。このことから、未同定ヒ素化合物は分子量 1 万程度以上の物質であると推定された。ここで検出された As (III) は AsH₃ の酸化によって生じると考えられた。

次に、血液の血漿画分のみならず AsH₃ を添加して HPLC-ICPMS により化学形態別分析を行った。その結果、全血試料に AsH₃ を添加したときに見られた未同定ヒ素化合物は検出されなかった。このことから、未同定ヒ素化合物は血漿成分ではなく、血球成分に由来することが示された。

さらに、As (III) が未同定ヒ素化合物の生成に関与しているかを調べるために、全血試料に As (III) を添加し、室温下 90 分放置後の血漿画分について分析を行った。その結果、全血試料に As (III) を添加しても溶血は認められず、HPLC-ICPMS 分析では As (III) のみが検出され、未同定ヒ素化合物は検出されなかった。このことから、血漿成分及び As (III) は未同定ヒ素化合物の生成に関与しないものと考えられた。

また、蒸留水を用いてあらかじめ溶血させた血液に As (III) を添加し、血漿画分を HPLC-ICPMS 分析した結果、As (III) のみが検出された。このことから、未同定ヒ素化合物は As (III) と血球由来成分が反応して生じたものではないことが示された。

以上の結果から、AsH₃ 添加により生じた未同定ヒ素化合物は、血球に由来する分子量 1 万程度以上の成分にヒ素化合物が付加したものであり、血漿成分及び AsH₃ の酸化物である As (III) は未同定ヒ素化合物の生成に関与しないことが示唆された。本研究で検出された未同定ヒ素化合物の由来を特定するにはさらに詳細な検討が必要であるが、審査委員会では血液試料の HPLC-ICPMS 分析により発見された未同定ヒ素化合物が不測の事故において発生した急性 AsH₃ 中毒を判定する際の重要な指標になり得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) 未同定ヒ素化合物の経時変化
- 2) 研究結果から予想される未同定ヒ素化合物の化学的性質について
- 3) 未同定ヒ素化合物を同定するために考えられる分析方法について
- 4) ヒ素化合物の HPLC 分離機構について
- 5) HPLC 溶離液の最適化と溶質の電荷について
- 6) ICPMS の *m/z* の選択について

- 7) 化学形態別分析に HPLC-MS を適用した場合との比較について
- 8) ICPMS と ICP 発光分析法の感度比較について
- 9) ICP イオン化の特徴について
- 10) AsH₃ 中毒の判定が必要とされる事態について
- 11) HPLC-ICPMS の分析値の再現性について
- 12) As(Ⅲ)が AsH₃ の酸化生成物と考えられる理由について
- 13) ヒ素化合物の化学構造と化学形態による毒性の違いについて
- 14) AsH₃ 中毒の過去の事故例について

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	藤本 忠蔵			
	副査	梅村 和夫	副査	瀬藤 光利	

博士(医学) 東 隆 一

論文題目

Detection of skin perforators by indocyanine green fluorescence nearly infrared angiography
(インドシアニングリーン蛍光近赤外血管造影法を用いた皮膚穿通枝の検出)

論文の内容の要旨

[はじめに]

皮膚軟部組織欠損の再建方法のひとつである穿通枝皮弁手術では、皮弁の栄養血管である皮膚穿通枝の位置をあらかじめ知っておくことが重要である。現在、皮下血管を検出する方法としてCT 血管造影、MRI、超音波ドップラー、サーモグラフィなどが用いられているが、検査の精度、侵襲性の点から理想的と言える検査方法はない。今回、インドシアニングリーン(ICG) 蛍光血管造影法を用いて皮膚穿通枝を検出する方法を考案し、臨床手術例においてその有効性を検証した。

[方法]

皮膚軟部組織欠損の再建が必要な 14 症例に対して、術前に蛍光血管造影を行った。再建部位の内訳は顔面 1 例、体幹 4 例、上肢 2 例、下肢 7 例である。用いた蛍光色素は ICG (25 mg / 5 ml; 第一三共株式会社)、蛍光を検知するために「赤外観察カメラシステム PDE」(浜松ホトニクス株式会社)を使用した。

検査対象部位が上腕動脈の末梢に位置する場合は上腕動脈に蛍光色素 1.0 ml を注射、大腿動脈の末梢である場合は大腿動脈に 1.5-2.0 ml を注射、その他顔面、体幹等を検査する場合は大腿静脈に 2.5-5.0 ml を注射した。注射後直ちに撮影を開始しビデオ記録を行った。ビデオを解析し得られた血管情報をもとに皮弁のデザインを行った。この研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認を経て行われた。

[結果]

14 症例全てにおいてそれぞれ 2-6 本の穿通枝が検知された。

手術中所見として、全症例で蛍光血管造影の所見に一致して、深筋膜上または深筋膜下の穿通枝の存在が肉眼的に確認された。確認された穿通枝のうち 1-2 本を栄養血管とする島状皮弁が挙上され、皮弁に良好な血流が保たれていることが確認された。全症例において術後皮弁は生着した。

[考察]

血漿タンパクと結合した ICG の蛍光特性は、吸収波長のピークが 805 nm、蛍光波長のピークが 835 nm である。800 nm 付近の近赤外領域の光は、可視光との比較において、水やヘモグロビンいずれにも吸収されにくく、組織による散乱を受けにくいいため生体の深部観察に優れており、生体の光学的観察窓とも言われている。今回の検証では体表から深さ約 2 cm までの血管を描出することができたが、この深さは深部動脈から立ち上がってきた皮膚穿通枝がおおよそ深筋膜に入る深さであり、術前穿通枝検索に最適であると考えられる。これよりも浅いと穿通枝走行の十分な観察は困難であり、逆に、これより深い血管が同時に描出されると皮膚血流に直接関係しない深部動脈や筋枝との区別が困難となり、ドップラー聴診器による検索でしばしば認められるような偽陽性が生じ

る可能性がある。

蛍光血管造影の画質に関して、もっとも重要な要素は動脈像とバックグラウンドの間のコントラストである。今回の結果では、動注投与が静注投与に比してコントラストの高い映像が得られる傾向にあった。これは、前者においては、色素が目的とする穿通枝に流入するとき、血管内色素濃度の立ち上がり急峻であることに起因すると推定される。また投与経路の違いに加えて、検査部位固有の性質も映像の鮮明度に影響する。鮮明な動脈像を得られるのは、検査部位の血流量が多い、皮下脂肪が薄い、皮膚表面の凹凸が少ない場合である。一方、皮膚に創や炎症等による紅斑があると、この部は強い蛍光を発し、より深部に存在する穿通枝の描出する上で妨げとなる。

ICG 蛍光血管造影法で得られる映像は、CT 血管造影や超音波ドップラーと異なり、皮膚の血行支配を皮膚表面から 2 次元的に把握することが出来るため、映像情報をそのまま皮弁のデザインに活かすことが出来る。検査手技としての欠点は、穿通枝を描出できる時期の短さにある。穿通枝の動脈相が観察されるのは ICG 注射後数秒間のみであるため、必要とされる穿通枝の存在する場所をあらかじめ推定し、そこにしぼって検索しなければならない。しかし、今回検証したいずれの部位でも、穿通枝皮弁を挙上するために必要な情報が得られた。穿通枝皮弁手術に先だって本法により皮膚穿通枝を同定しておくことは、手術の安全性・確実性を高めるために有用と思われる。

[結論]

ICG 蛍光血管造影によって、穿通枝の位置や走行の向き、分枝の形態などの情報が得られた。本法は、皮下動脈像を低侵襲で明瞭に得ることが出来るため皮弁術前検査として有用である。

論文審査の結果の要旨

皮膚軟部組織欠損の再建方法のひとつである穿通枝皮弁手術では、皮弁の栄養血管である皮膚穿通枝の位置をあらかじめ知っておくことが安全で確実な手術のために重要である。現在、皮膚穿通枝を同定する方法としてドブラ聴診器、CT 血管造影、超音波ドプラ断層法、サーモグラフィなどが用いられているが、一長一短がある。申請者はインドシアニングリーン (ICG) 蛍光血管造影法を用いて皮膚穿通枝を検出する方法を考案し、臨床例においてその有効性を検証した。可視光あるいは赤外光の波長領域においては、生体組織中のヘモグロビンと水による光吸収が大きい、700 nm～1,000 nm の近赤外光領域では両者の吸収が比較的弱くなっているため、生体組織に対して光学的な窓となっている。すなわちこの波長域の光はほかの波長域の光と比べて、比較的良く生体を浸透する。ICG の蛍光波長のピークは 840 nm 前後である。

皮膚軟部組織欠損の再建が必要な 14 症例を対象とした。再建部位の内訳は顔面 1 例、体幹 4 例、上肢 2 例、下肢 7 例である。研究の前半は浜松ホトニクス社製赤外観察カメラシステム (PDE) 内蔵の LED 光源を、後半は特製の LED 光源を用いて照射し、PDE で ICG の蛍光を経時的に画像化した。検査対象部位が上腕動脈の末梢に位置する場合は上腕動脈に ICG 5 mg/1 ml を注射、大腿動脈の末梢である場合は大腿動脈に 7.5 mg/1.5 ml～10 mg/2 ml を注射、その他顔面、体幹等を検査する場合は大腿静脈に 12.5 mg/2.5 ml～25 mg/5 ml を注射した。皮弁を予定している部分に対し、注射後直ちに撮影を開始しビデオで記録した。穿通枝は、直接的には放射状に広がる蛍光の中心、間接的には数カ所の蛍光出現部位の中央として同定した。こうして得られた穿通枝

の情報をもとに皮弁のデザインを行った。この研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認を経て行われた。

14 症例全てにおいてそれぞれ 2～6 本の穿通枝が直接的あるいは間接的に同定された。全症例で蛍光血管造影の所見に一致して、深筋膜上および脂肪織内の穿通枝の存在が肉眼的に確認された。また穿通枝が支配する皮膚領域の同定も可能であった。確認された穿通枝のうち 1～2 本を栄養血管とする島状皮弁が挙上され、皮弁に良好な血流が保たれていることが確認された。全症例において皮弁は生着した。

ICG 蛍光血管造影法では体表から深さ約 2 cm までの血管を描出することができるが、この深さは深部動脈から立ち上がってきた皮膚穿通枝がおおよそ深筋膜に入る深さであり、穿通枝を検索するのに最適である。穿通枝の動脈相が観察されるのは ICG 注射後数秒間のみであるため、1 秒間 60 フレームの高い時間分解能で画像を記録し何度も観察することにより、穿通枝の同定に成功している。さらに ICG 蛍光血管造影法では、血管の走行、血流の向き、皮膚の血管支配域を皮膚表面から 2 次的に把握することが出来るため、映像情報をそのまま皮弁のデザインに活かすことができる。また変異のある血管走行にも対処できるため既知の血管解剖にとらわれないテーラーメイド医療に活用しうる可能性を有する。

申請者が開発した ICG 蛍光血管造影は穿通枝皮弁手術に先だって穿通枝の位置や走行の向き、分枝の形態などの情報を低侵襲で明瞭に得ることができ、穿通枝皮弁手術のための優れた術前検査法であると、審査委員会で高く評価した。

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) LED 光源の大きさと蛍光画像の関係はどうか
- 2) 体表面の形状と検出精度の関係はどうか
- 3) 蛍光の明るさと血流量に相関があるか
- 4) 皮弁の大きさはどのように決定するのか
- 5) ICG の再投与は可能か
- 6) 皮弁の生着率は本法を用いることによりどの程度上がったのか
- 7) 皮膚が薄い場合、穿通枝が筋膜を貫く部位を確実に描出できるか
- 8) 本法が広く普及しないのはなぜか
- 9) 血圧、皮膚温で血管の描出程度が変わるか
- 10) 偽陰性はあったか
- 11) 手技にどのぐらいの時間がかかるか
- 12) ICG 以外の蛍光物質の可能性はどうか
- 13) ICG に副作用はないのか
- 14) 画像をさらに鮮明にできる可能性はあるか

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 阪原 晴海
副査 峯田 周幸 副査 深水 秀一

博士(医学) 鈴木 一 有

論文題目

Chorangiosis and placental oxygenation

(胎盤血管腫症における胎盤酸素化)

論文の内容の要旨

[はじめに]

胎盤は、胎児最大の臓器であり、着床から分娩に至るまで急速に発育する胎児に対する栄養ならびに酸素供給において中心的な役割を果たしている。したがって、胎盤機能を検討すること、とりわけ胎盤を病理組織学的に検査することは、母体および胎児の病態を理解するために極めて重要である。

酸素は母体から胎児へ供給される最も重要な物質のひとつである。母体から胎盤を介して胎児へ酸素が移行するプロセスにおいて、胎盤末端絨毛の中を走行する胎児由来血管(末端絨毛血管)は重要な役割を果たすと考えられている。生理的あるいは病的な種々の状況においてこの末端絨毛血管が過剰に増殖することが知られており chorangiosis (血管腫症)と呼ばれ、病理検査において単一の絨毛内に 10 以上の末端絨毛血管の増殖がみられるという Altshuler の基準により診断される。血管腫症は、子宮内胎児発育不全、妊娠高血圧症候群、臍帯異常、胎児奇形などの合併症を有する妊婦の胎盤に多く認められるが、これらの合併症はいずれも胎児が低酸素環境となるリスクが高いとされている。興味深いことに、ヒマラヤなどの高地において妊婦が低酸素環境に曝された場合にも血管腫症が発症すると報告されている。このように血管腫症は、周産期合併症とりわけ母体あるいは胎児の低酸素環境と密接な関連がある可能性が想定されるが、その詳細な病態は明らかにされていない。

近赤外線分光法は、1977 年に発表された生体内の酸素を測定する技術である。今回我々は、近赤外線分光法を用いて母体腹壁から胎盤組織酸素化の評価を試み、分娩された胎盤を組織学的に検討し、血管腫症発症との関連を後方視的に検討した。

[対象と方法]

2005 年 1 月から 2008 年 10 月までに浜松医科大学医学部附属病院において妊娠から分娩まで管理した症例で、胎盤付着位置が腹壁に近く近赤外線分光法による解析が可能であり、かつ同意が得られた単胎妊娠 46 例および 2 絨毛膜性双胎妊娠 1 例を対象とした。胎盤病理の検討は分娩後施行し、血管腫症の診断は Altshuler の基準にて行った。胎盤組織酸素化の評価は母体腹壁から近赤外線分光法を用いて施行した。血液中のヘモグロビンはその酸素化状態により、近赤外線の吸光度が変化する特徴がある。浜松ホトニクス社製 NIRO100 は、波長 775、825、850 および 905 nm の 4 種類の近赤外線を入射し、その反射光を分析する近赤外線分光法装置である。この分析により、Hb(ヘモグロビン)と HbO₂(酸素化ヘモグロビン)の濃度比を測定し、組織酸素化指標 Tissue Oxygenation Index (TOI)を以下の計算式に従って算出した。TOI = [HbO₂ / HbO₂+ Hb]×100 (%)。統計解析は、3 グループ間の比較においては Friedman test ならびに post-hoc test を用い、2 グループ間の比較では Student's t-test を用いた。P-value にて 0.05 未満を有意差ありと判定した。

[結果]

単胎妊娠 46 例中 19 例が血管腫症ありと診断された。そのうち 14 例は子宮内胎児発育不全 (small for gestational age, SGA) の症例であり、5 例は正常発育児であった。他の 27 例では血管腫症を認めなかったが、うち 2 例は SGA の症例であり、25 例は正常発育児であった。血管腫症がない正常発育児 25 例の胎盤 TOI 値の平均値は $68.6 \pm 3.7\%$ であったが、血管腫症を認めかつ SGA を合併した症例ならびに血管腫症を認めたが胎児の発育は正常であった症例の胎盤 TOI 値の平均値は、それぞれ $76.3 \pm 2.8\%$ 、 $75.3 \pm 3.3\%$ と血管腫症を認めない症例に比べて有意に上昇していた。一方、2 絨毛膜性双胎の 1 症例においては、出生体重は 2096 g と 2552 g であり、1 児にのみ発育不全を認めたが、血管腫症は発育不全児の胎盤のみに認められた。興味深いことに発育不全児の胎盤 TOI は 72.0 % であり、血管腫のない正常発育児の 64.0 % よりも高値であった。

[考察]

今回の検討にて、血管腫症を合併した胎盤の組織酸素化指標は、血管腫症を合併しない胎盤よりも高値であることが判明した。

現時点での近赤外線分光法による分析では、胎児ヘモグロビンと母体ヘモグロビンを区別することはできないため、測定している胎盤組織酸素化指標は、胎児血および母体血の両方が影響していると考えられる。しかしながら、胎盤組織の構造から近赤外線によって検出される Hb (ヘモグロビン) と HbO₂ (酸素化ヘモグロビン) の大半は胎盤絨毛間腔を占める母体血であると考えられる。したがって、血管腫症を合併した胎盤では、母体から胎盤へ酸素が供給されているにもかかわらず、絨毛間腔を流れる母体血から絨毛血管を流れる胎児血への酸素拡散が何らかの機序により阻害されて十分に酸素が胎児血流へ供給されず、その結果として絨毛間腔を流れる母体血の酸素濃度が上昇している可能性が考えられる。このような胎児血流への相対的な酸素供給の低下に対して、酸素供給効率を向上させることを目的とした、いわば一種の代償作用として末端絨毛血管が過剰に増殖し血管腫症を呈する可能性が示唆された。

今回検討した血管腫症の症例の 19 例中 14 例 (73.7 %) において SGA がみられ、双胎症例においても SGA 児のみに血管腫症がみられたことから、血管腫症と SGA との間に強い関連があることが明らかとなった。血管腫症と SGA の病態形成との関連は今後の検討課題である。

今回の近赤外線分光法を利用した検討により、血管腫症の絨毛間腔の酸素濃度は正常な胎盤に比べて上昇していることが示された。すなわち、絨毛間腔を流れる母体血から末端絨毛血管を流れる胎児血流に十分に酸素が拡散しない病態により胎盤に血管腫症が形成される可能性が初めて明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

胎児・胎盤系の機能とその評価は妊娠の継続や胎児の発育と深く関連する。胎盤は胎児最大の臓器であり、着床から分娩に至るまで急速に発育する胎児に対する栄養ならびに酸素供給において中心的な役割を果たしている。母体から胎盤を介する酸素の移行において、その血管の生理的ないし病的状況における変動が注目されている。胎盤末端絨毛の中を走行する胎児由来血管 (末端絨毛血管) が過剰に増殖する chorangiomas (血管腫症) は、単一の絨毛内に 10 以上の末端絨毛血管の増殖がみられるという Altshuler の基準により病理診断される。血管腫症は、胎児の子宮内

発育不全、妊娠高血圧症候群、臍帯異常、胎児奇形などの合併症を有する妊婦の胎盤に多く認められ、胎児が低酸素環境と関連するとされている。ヒマラヤなどの高地において妊婦が低酸素環境に曝された場合にも血管腫症が発症すると報告がある。このように血管腫症は、周産期合併症とりわけ母体あるいは胎児の低酸素環境と密接に関わっている可能性が想定されるが、その詳細な病態は明らかにされていなかった。

申請者らは生体内の酸素を測定するために近赤外線分光法を用い、母体腹壁から胎盤組織酸素化を評価し、胎盤の組織学的所見をも合わせ、血管腫症発症との関連を後方視的に検討した。

対象は2005年1月から2008年10月までに浜松医科大学医学部附属病院において妊娠から分娩まで管理した症例で、胎盤付着位置が腹壁に近く近赤外線分光法による解析が可能であり、かつ同意が得られた単胎妊娠46例および2絨毛膜性双胎妊娠1例である。胎盤の病理学的検討は分娩後施行し、血管腫症の診断はAltshulerの基準にて行った。胎盤組織化の評価のため母体腹壁から浜松ホトニクス社製NIRO100により、波長775、825、850および905 nmの4種類の近赤外線を入射しその反射光を分析することによりHb(ヘモグロビン)とHbO₂(酸素化ヘモグロビン)の濃度比を測定し、組織酸素化指標 Tissue Oxygenation Index (TOI) は $TOI = [HbO_2] / (HbO_2 + Hb) \times 100 (\%)$ で算出した。統計解析にはFriedman test、post-hoc test、Student's *t*-testを用い、*p*-valueが0.05未満を有意差ありと判定した。

病理学的診断の結果では単胎妊娠46例中19例に血管腫症が認められた。そのうち14例は胎児が子宮内発育不全 (small for gestational age, SGA) の症例であり、5例の胎児発育は正常であった。他の27例では血管腫症を認めなかったが、うち2例はSGAの症例であり、25例は正常発育児であった。血管腫症がない正常発育児25例の胎盤TOI値の平均値は $68.6 \pm 3.7\%$ であった。血管腫症を認めた症例のうちSGAを合併した症例では $76.3 \pm 2.8\%$ 、胎児の発育は正常であった症例では $75.3 \pm 3.3\%$ であり、血管腫症を認めない症例に比べて有意に上昇していた。2絨毛膜性双胎の例においては、出生体重は2096 gと2552 gであり、1児にのみ発育不全を認めた。血管腫症は発育不全児の胎盤のみに認められ、胎盤TOIは72.0%であり、血管腫のない正常発育児の64.0%よりも高値であった。

今回の研究により、血管腫症を合併した胎盤の組織酸素化指標は、血管腫症を合併しない胎盤よりも高値であることが明らかとなった。近赤外線分光法による分析では、胎児ヘモグロビンと母体ヘモグロビンを区別することはできないが、胎盤組織の構造からその大半は胎盤絨毛間腔を占める母体血であると考えられる。血管腫症を合併した胎盤では、母体から胎盤へ酸素が供給されているにもかかわらず、絨毛間腔を流れる母体血から絨毛血管を流れる胎児血への酸素拡散が何らかの機序により阻害されて十分に酸素が胎児血流へ供給されず、絨毛間腔を流れる母体血の酸素濃度が上昇している可能性が考えられる。このような胎児血流への相対的な酸素供給の低下に対して、酸素供給効率を向上させることを目的とした。いわば一種の代償作用として末端絨毛血管が過剰に増殖し血管腫症を呈する可能性が示唆された。血管腫症の症例の多くにSGAがみられ、双胎症例においてもSGA児のみに血管腫症がみられたことから、血管腫症とSGAとの間に強い関連があることが示唆された。

審査委員会はこの研究が、近赤外線分光法を用いて絨毛間腔の酸素濃度を測定し、血管腫症では絨毛間腔における酸素濃度が正常な胎盤に比べて上昇していることを示し、胎児の発育との関連を検討し、母体血から末端絨毛血管を流れる胎児血流への酸素拡散の障害が生じている可能性を初めて明らかとした点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対し以下のような質問がなされた。

- 1) 血管腫症の概念について
- 2) 胎盤における血管の解剖学的構造および病理学的変化について
- 3) Altshuler の診断基準について
- 4) 近赤外線分光法による血中酸素濃度測定法について
- 5) 妊娠中の母体の管理法について
- 6) 血管における酸素拡散とその障害について
- 7) 双胎の分類やその評価法について
- 8) 子宮内発育不全の成因と併発する異常について
- 9) 絨毛間腔の血流異常と疾患発症の関連について
- 10) 対象者への倫理的配慮について

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 大関 武彦
副査 堀内 健太郎 副査 馬場 聡

博士(医学) 諏訪 大八郎

論文題目

Intraperitoneal infusion of recombinant plasminogen activator inhibitor type 2 induced apoptosis in implanted human colon cancer and inhibited its growth and liver metastasis

(遺伝子組み換えプラスミノゲンアクチベーターインヒビタータイプ 2 はヒト大腸がん移植モデルにおいて腹腔内投与によりアポトーシスを誘導し腫瘍増殖と肝転移を抑制した)

論文の内容の要旨

[はじめに]

プラスミノゲンアクチベーター (PA) -プラスミン系は腫瘍の増殖、浸潤、転移を促進するとされ、ウロキナーゼタイプ PA (uPA) は細胞表面の特異的レセプター(uPAR)と共にその中心的役割を担う。uPA の生理的インヒビターとして、PA インヒビタータイプ 1 (PAI-1) およびタイプ 2 (PAI-2) が存在し、悪性腫瘍と PAI-1、PAI-2 についての臨床的検討においては PAI-1 が高値であるほど予後不良であるとされるのに対し、PAI-2 は高値であるほど予後が良好との報告が多い。浜松医科大学外科学第二講座でも胃がん、乳がんにおいて同様の結果を報告してきた。PAI-2 の腫瘍増殖抑制効果および転移抑制効果を検討するためにマウスにおけるヒト大腸がん同所移植モデルにおいて PAI-2 の腹腔内投与を行い PAI-1 との比較を行った。

[材料ならびに方法]

遺伝子組み換え PAI-1(rPAI-1):プラスミド(pDL06)を含む大腸菌株 (SG20043) より精製。遺伝子組み換え PAI-2(rPAI-2):プラスミド(pPM7)を含む大腸菌株 (SG20043) より精製。ヒト大腸がん腫瘍 TK4 を BALB/c ノードマウスに同所移植した肝転移モデルを作成した。

対照群 (n=15)、rPAI-1 群 (n=19)、rPAI-2 群 (n=19)に無作為に分類し rPAI-1 群、rPAI-2 群はそれぞれ 300 IU/day を 6 day/week で 6 週間腹腔内投与、対照群は PBS (Phosphate-buffered saline)を投与し移植 6 週間後に評価した。

[結果]

(1) 移植腫瘍への影響

腫瘍増殖: 移植腫瘍重量は、対照群 (0.73 ± 0.24 g)、rPAI-1 群 (0.62 ± 0.29 g)、rPAI-2 群 (0.45 ± 0.13 g)と、rPAI-2 群では他の 2 群に比し有意に少なく、rPAI-2 の腫瘍増殖抑制効果を認めた。

組織学的特徴: 対照群と rPAI-1 群では組織学的な差を認めなかったが、rPAI-2 群では腫瘍がより未成熟で間質の占める割合が優勢であった。また移植部腫瘍において、アポトーシスが rPAI-2 群 (4.64 ± 2.12 %)で他の 2 群 (対照群: 1.94 ± 0.82 %, rPAI-1 群: 2.08 ± 1.07 %)に比し有意に高率に認められた。

移植腫瘍中の uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2 量: uPA 抗原量は rPAI-1 群 (4.77 ± 1.81 ng/mg)、rPAI-2 群 (4.71 ± 1.59 ng/mg)の両群において対照群 (6.43 ± 1.45 ng/mg)に比し有意に低値であった。uPAR 抗原量は各群間で差はなかった。

PAI-2 抗原量は PAI-2 投与群 (9.04 ± 2.96 ng/mg)において対照群: (3.93 ± 1.11 ng/mg)、rPAI-1 群: (3.29 ± 1.50 ng/mg)に比し有意に高値であった。PAI-1 抗原量は各群間において有意差を認めなかった。

(2) 肝転移への影響

肝転移数: 対照群では 15 例中 14 例に肝転移を認めたのに対し、rPAI-1 群においては 19 例中 5 例、rPAI-2 群では 16 例中 1 例と、共に有意な肝転移抑制効果を認めた。特に rPAI-2 は顕著な肝転移抑制効果を示した。

[考察]

悪性腫瘍における uPA の働きはいくつかの異なったメカニズムが考えられている。プラスミノーゲンの活性化により生ずるプラスミンは直接、あるいはメタロプロテアーゼの活性化を介して基質タンパク質を分解し、腫瘍の成長、浸潤、転移を促進するとされる。この働きには細胞表面の uPAR と結合した活性型 uPA が重要とされる。また uPA/uPAR は細胞内へのシグナル伝達を介し細胞増殖を促進することも報告されている。一方 PAI に関しては uPA のプロテアーゼ活性阻害に伴う転移抑制効果と、uPA/uPAR を介する細胞増殖ならびに細胞移動を修飾する効果が示されている。今回のヒト大腸がん同所移植モデルではいずれの PAI も肝転移を抑制したが、rPAI-2 の方がより効果的であり、腫瘍増殖も強く抑制した。移植した腫瘍の大きさや組織学的な特徴は 2 種類の PAI の間では大きな違いがみられた。腫瘍の大きさは rPAI-2 群で著明に縮小しアポトーシスも高率であり、rPAI-2 群では腫瘍細胞のアポトーシスを誘導し効果的に腫瘍増殖を抑制した。PAI-1 と PAI-2 の腹腔内投与が移植腫瘍内 uPA 抗原量を減少させ肝転移を抑制したことはいずれの PAI も uPA の酵素活性を阻害し細胞増殖ならびに転移を抑制したことを示した。更に組織学的所見において PAI-2 投与群ではがん病巣の形成が他の群より小さく未成熟であり、PAI-2 の腫瘍増殖抑制効果によると考えた。これには PAI-2 が uPA/uPAR の細胞増殖作用を強く抑制してアポトーシスを高率に誘導する機構が関与したと考えられた。

[結論]

ヒト大腸がん同所移植モデルにおいて PAI-1 と PAI-2 による肝転移抑制効果が示された。これにより PAI の臨床応用の可能性が示唆された。また、PAI-1 と PAI-2 投与により原発腫瘍の増殖抑制効果や組織学的変化において相違を認めた。このことは、臨床例において報告されている両者の腫瘍増殖および転移に対する異なる作用を裏付けるものであり、各々の調節機構を解明することにつながる成果として期待される。

論文審査の結果の要旨

腫瘍のマトリックスはフィブリンが重要な役割を担っており、これを分解するプラスミンは腫瘍の増殖、浸潤、転移に密接に関連することが知られている。プラスミンはプラスミノーゲンアクチベーター (PA) によってプラスミノーゲンが分解され産生される。PA の受容体は細胞表面の特異的レセプター (uPAR) であり、PA と uPAR が結合するとプラスミンの産生のみならず、細胞に様々なシグナルが伝達される。uPA の生理的インヒビターとして、PA インヒビタータイプ 1 (PAI-1) およびタイプ 2 (PAI-2) が存在する。悪性腫瘍患者の予後と PAI-1、PAI-2 の関連について PAI-1 が高値であるほど予後不良であるとされるのに対し、PAI-2 は高値であるほど予後が良好との報告がされている。PAI-2 が高値の担癌患者がなぜ予後が良いのかについてはほとんど検討されていない。申請者らは PAI-2 が腫瘍増殖抑制効果および転移抑制効果を有するか否かについて基礎的検討を行っ

た。

申請者らは PAI-1、PAI-2 を遺伝子組み換え PAI-1 (rPAI-1) および PAI-2 (rPAI-2) プラスミドを含む大腸菌株より精製した。ヒト大腸がん腫瘍 TK4 を BALB/c ノドマウスに移植し肝転移モデルを作製した。rPAI-1 群、rPAI-2 群、対照群に無作為に分類し rPAI-1 群、rPAI-2 群はそれぞれ 300 IU/day を 6 day/week で 6 週間腹腔内投与を行った。投与終了後、1) 移植腫瘍におけるアポトーシスの検討、2) 移植腫瘍中の uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2 量、3) 肝転移率を検討した。

申請者らは以下のような結果を得た。

1) 移植腫瘍への影響

腫瘍増殖: 移植腫瘍重量については、rPAI-2 群では他の 2 群に比し有意に少なく、rPAI-2 の腫瘍増殖抑制効果を認めた。組織学的特徴では対照群と rPAI-1 群では組織学的な差を認めなかったが、rPAI-2 群ではアポトーシスが亢進していた。uPA 抗原量は rPAI-1 群、rPAI-2 群の両群において対照群に比し有意に低値であった。uPAR 抗原量は各群間で差はなかった。PAI-2 抗原量は PAI-2 投与群において対照群および rPAI-1 群に比し有番に高値であった。PAI-1 抗原量は各群間において有意差を認めなかった

2) 肝転移への影響

対照群では 15 例中 14 例に肝転移を認めたのに対し、rPAI-1 群においては 19 例中 5 例、rPAI-2 群では 16 例中 1 例と、共に有意な肝転移抑制効果を認めた。

悪性腫瘍における uPA の働きはいくつかの異なったメカニズムが考えられている。プラスミノゲンの活性化により生ずるプラスミンは直接、あるいはメタロプロテアーゼの活性化を介して基質タンパク質を分解し、腫瘍の成長、浸潤、転移を促進するとされる。この働きには細胞表面の uPAR と結合した活性型 uPA が重要とされる。申請者らのヒト大腸がん同所移植モデルでは肝転移については PAI も肝転移を抑制したが、rPAI-2 の方がより効果的であった。腫瘍増殖に関しては rPAI-2 群で著明に縮小しアポトーシスも高率であり、rPAI-2 群では腫瘍細胞のアポトーシスを誘導し効果的に腫瘍増殖を抑制した。申請者らは PAI-2 が uPA/uPAR の細胞増殖作用を強く抑制してアポトーシスを高率に誘導する機構を指摘している。

以上より申請者らはヒト大腸がん同所移植モデルにおいて PAI-2 による移植腫瘍増殖抑制効果および PAI-2 による肝転移抑制効果を見出した。PAI-2 が移植腫瘍の増殖抑制と肝転移抑制作用を発見したのは特筆すべきことである。大腸がんは本邦でも罹患者が急激に増加しており、その制御は重要な問題である。本研究により PAI-2 の腹腔内投与が大腸がんの増殖抑制、転移抑制につながる事が明らかになった。申請者らの結果は臨床レベルにおける大腸がんの新規治療法として期待されるものであり、審査委員会では高く評価した。

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) PAI-1 と PAI-2 の精製法および純度について
- 2) PAI-1 と PAI-2 の血中濃度と組織中濃度の比較について
- 3) PAI-1 と PAI-2 活性と抗原量との関連について
- 4) PAI-1 と PAI-2 の腹腔内投与量の設定について
- 5) 盲腸に移植した大腸がん組織と肝転移の関連について
- 6) PAI-2 が PAI-1 より腫瘍増殖抑制能が強い理由について

- 7) PAI-2 の肝転移抑制能の機序について
- 8) PAI-2 のアポトーシス抑制機序について
- 9) 腫瘍血管新生における PAI-2、uPA の役割について
- 10) PAI-1、PAI-2 を同時投与したときの相乗効果について
- 11) PAI-2 将来の臨床展開について

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 金山 尚裕
副査 梶村 春彦 副査 峯田 周幸

博士(医学) 古瀬 洋

論文題目

Significance of 5-fluorouracil-related enzyme activities in predicting sensitivity to 5-fluorouracil in bladder carcinoma

(膀胱癌の 5-FU 感受性予測における 5-FU 代謝関連酵素活性の意義)

論文の内容の要旨

[はじめに]

膀胱癌の薬物治療は、筋層非浸潤性癌に対しては MMC あるいは Anthracycline 系の抗癌剤や BCG の膀胱内注薬療法が、筋層浸潤性癌に対しては CDDP を基本とした化学療法が行われる。しかし、これらの薬物治療が、超高齢、PS 不良、合併症あるいは副作用などのために実施し得ない症例では、5-FU 関連薬剤がしばしば投与されるが、膀胱癌における 5-FU 関連薬剤の効果予測因子に関する研究は少ない。

一方、他の癌種では、5-FU が抗腫瘍効果を発揮するためのリン酸化に関与する orotate phosphoribosyl transferase (OPRT) や thymidine phosphorylase (TdR-Pase) 、さらに 5-FU の分解酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) などの 5-FU 代謝関連酵素活性測定を利用した 5-FU 感受性予測が汎用されている。また、5-FU の抗腫瘍効果の増強に関する研究では、これらの酵素活性値比を測定することで 5-FU 感受性のより高い症例を選別し、さらには DPD 阻害剤の 5-chloro-2,4-dihydropyrimidine (CDHP) を添加して 5-FU 感受性の増強効果が検討されているが、膀胱癌領域においては、これらの点についてもほとんど検討されていない。

以上の背景に基づいて、今回、膀胱癌症例の 5-FU 感受性予測における癌組織内の 5-FU 代謝関連酵素活性の有用性を検討した。さらに、5-FU 感受性の高い症例を選別する手段としての酵素活性値比の有用性や、CDHP を用いた 5-FU の抗腫瘍効果の増強作用についても検討した。

[対象と方法]

1996 年 6 月から 2004 年 7 月までに、膀胱癌の診断で浜松医科大学医学部附属病院泌尿器科および関連施設で膀胱全摘除術あるいは経尿道的生検を施行した 127 例より腫瘍組織を採取した。また、膀胱全摘除術を施行した症例中、42 例では膀胱の正常組織も同時に採取した。OPRT 活性値は paper disc 法、TdR-Pase 活性値と DPD 活性値は ELISA 法を用いて、腫瘍部では各 54 例、102 例、43 例で、正常部では各 19 例、39 例、27 例で測定した。膀胱癌組織の *in vitro* での 5-FU 感受性は、histoculture drug response assay 法を用いて 99 例で検討した。統計学的検討は、癌と正常組織間での各酵素活性値の差異は Mann-Whitney test で、正常組織に対する異型度別、深達度別の各酵素活性値の差異は Kruskal-Wallis test と Scheffe test で、さらに各酵素活性値と 5-FU 感受性との関連は Spearman's rank correlation test で行った。なお、本研究の実施に際しては、各施設の倫理委員会で承認され、全症例でインフォームドコンセントを得た。

[結果]

腫瘍組織の OPRT、TdR-Pase、DPD 活性値は、いずれも正常組織より有意に高値であった。OPRT 活性値は、腫瘍の異型度、深達度とも関連を認めなかったが、TdR-Pase 活性値は、異型度が Grade (G) 3 の組織では正常部および G1-2 の組織に比べて有意に高値であり、筋層浸潤性癌

組織では正常部および非筋層浸潤性癌組織に比べて有意に高値であった。一方、膀胱腫瘍組織の OPRT 活性値と *in vitro* での 5-FU 感受性の間には有意な正の相関を認め、DPD 活性値と 5-FU 感受性の間には有意な負の相関を認めたが、TdR-Pase 活性値と 5-FU 感受性とは相関しなかった。さらに、5-FU 感受性増強に関する検討では、OPRT/DPD 活性値比が OPRT 活性値単独よりも 5-FU 感受性とより強い相関を示した。5-FU に CDHP を添加した場合、特に DPD 活性値が高い症例において膀胱腫瘍組織の 5-FU 感受性が有意に上昇する結果が得られた。

[考察]

癌細胞の約 80% では、その病理組織学的背景に関係なく OPRT を介して細胞内に取り込まれた 5-FU のリン酸化が進むことが実験的に確かめられており、臨床的にも消化器癌などでは OPRT が 5-FU 感受性を規定する重要な因子であると報告されている。同様に、今回の膀胱癌における検討でも、腫瘍組織の 5-FU 感受性予測に関して OPRT が最も重要な酵素であることが示唆された。一方で TdR-Pase は、血小板由来血管内皮細胞増殖因子と同一で、血管新生作用を有しており、腫瘍内の TdR-Pase 活性が高いことはその腫瘍自身の悪性度を反映すると推察される。事実、腫瘍の異型度や深達度と酵素活性値との関係をみた場合、OPRT と異なり、TdR-Pase では悪性度が高くなるにつれて有意に活性値が上昇した。したがって、TdR-Pase は膀胱癌において 5-FU 感受性を予測するよりも、癌の malignant potential を予測する因子のひとつであることが示唆された。

膀胱癌における 5-FU 感受性増強に関する検討では、OPRT/DPD 活性値比が OPRT 活性値単独に比してより強い相関で、5-FU 感受性予測が可能であることが確認された。OPRT 活性値が高く DPD 活性値が低い場合、理論的には癌細胞内に 5-FU の活性代謝物質が高い濃度で存在することになり、この結果が得られたものと推察された。また、5-FU に CDHP を添加すると、5-FU の分解が阻害されることにより細胞内に 5-FU が高濃度に維持され、それに伴って 5-FU の活性代謝物質も高濃度に存在することになる。現在、5-FU のプロドラッグである tegafur に CDHP、oteracil potassium を配合した S-1 が、胃癌症例などで優れた臨床効果を示し、ヒト胃癌細胞を用いた研究で特に DPD 活性が高い例において DNA 合成阻害、RNA 機能障害をより増強させることが報告されている。今回、膀胱癌の *in vitro* での検討をみる限り、5-FU に CDHP を添加すると DPD 活性が高い例で 5-FU 感受性がより増強されることから、膀胱癌症例においても S-1 に効果を有する症例の存在が示唆された。

[結論]

膀胱癌における 5-FU 感受性予測に最も重要な 5-FU 代謝関連酵素は OPRT であり、また CDHP 添加により DPD 活性が高い症例で 5-FU 感受性が増強された。以上より、膀胱癌に対する 5-FU 関連薬剤を用いた個別化治療の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

膀胱癌に対する薬物治療は原発巣の深達度により異なった治療方法が選択される。すなわち筋層非浸潤癌では膀胱内への薬物注入療法が行われるが、筋層浸潤癌に対しては CDDP を組み込んだ多剤化学療法が施行される。合併症あるいは副作用などのためにこれらの薬物治療が実施し得ない場合には、5-FU 系薬剤が投与されることが多い。5-FU 系薬剤の効果は 5-FU 代謝関

連酵素によって強く影響を受けることが知られているが、膀胱癌における 5-FU 系薬剤の効果予測に関する報告は少ない。5-FU の代謝に関する酵素としては、リン酸化に参与する orotate phosphoribosyl transferase (OPRT) や thymidine phosphorylase (TdR-Pase) 、さらに 5-FU の分解酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) などが挙げられる。これらの 5-FU 代謝関連酵素活性測定による 5-FU 感受性予測や 5-FU 感受性症例の選別などが種々の癌で行なわれている。さらに DPD 阻害剤の 5-chloro-2, 4-dihydroxypyrimidine (CDHP) を添加することによる 5-FU 感受性の増強効果も検討されている。しかし膀胱癌においては、これらの検討はほとんど報告されていない。そこで申請者は膀胱癌における 5-FU 代謝酵素と効果予測との関連を明らかにする目的で膀胱癌症例における 5-FU 代謝関連酵素値が 5-FU 感受性予測に有用か否かを検討し、さらに CDHP を添加による 5-FU 感受性の増強効果についても検討した。対象は本学附属病院および関連施設で手術を受けた膀胱癌 127 症例で、男女比は 101:26、平均年齢は 67 歳である。OPRT 活性値、TdR-Pase 活性値、DPD 活性値は、癌組織では各々 54、102、43 検体、正常組織では 19、39、27 検体が測定され、以下の結果が得られた。

- ① 腫瘍組織の OPRT、TdR-Pase、DPD 活性値は、いずれも正常組織より有意に高値であった。
- ② OPRT 活性値は、腫瘍の異型度、深達度とも関連を認めなかった。
- ③ TdR-Pase 活性値は、異型度が Grade (G) 3 の組織では正常部および G1-2 の組織に比べて有意に高値であり、筋層浸潤性癌組織では正常部および非筋層浸潤性癌組織に比べて有意に高値であった。
- ④ 膀胱腫瘍組織の OPRT 活性値と *in vitro* での 5-FU 感受性の間には有意な正の相関を認め、DPD 活性値と 5-FU 感受性の間には有意な負の相関を認めたが、TdR-Pase 活性値と 5-FU 感受性とは相関しなかった。
- ⑤ 5-FU 感受性増強に関する検討では、OPRT/DPD 活性値比が OPRT 活性値単独よりも 5-FU 感受性とより強い相関を示した。
- ⑥ 5-FU に CDHP を添加した場合、特に DPD 活性値が高い症例において膀胱腫瘍組織の 5-FU 感受性が有意に上昇した。

このことから申請者は膀胱癌の 5-FU 感受性予測において、腫瘍組織の OPRT が最も重要な酵素であり、TdR-Pase は膀胱癌の悪性度を反映しているものと推論した。さらに OPRT/DPD 活性値比が OPRT 活性値単独よりも 5-FU 感受性と強い相関を示したが、これは OPRT/DPD 活性値比が高い膀胱癌では癌細胞内に 5-FU の活性代謝物質が高濃度で存在するためと推論した。加えて 5-FU に CDHP を添加することにより高 DPD 活性例で 5-FU 感受性が増強されることから、膀胱癌症例においても S-1 が有効となる症例の存在を示唆した。

審査委員会では、申請者が膀胱癌における 5-FU 代謝酵素と効果予測との関連を明らかにし、さらに CDHP 添加した新規 5-FU 系抗癌剤の有用性を示唆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) HDRA の具体的な実施方法について
- 2) HDRA の再現性について
- 3) 抗癌剤感受性試験の臨床応用について
- 4) OPRT 活性値の測定方法について

- 5) TdR-Pase 活性値と悪性度との関連について
- 6) TdR-Pase 活性値と血管新生について
- 7) 3 酵素相互の関連性について
- 8) 3 酵素の測定数が異なる理由について
- 9) 膀胱癌における OPRT 経路の比率について
- 10) 再発症例と OPRT 活性値との関連について

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 今野 弘之
副査 梅村 和夫 副査 大西 一功

博士(医学) 安部 正和

論文題目

The use of non-three-layer ultrasound in biopsy recommendation for premenopausal women

(閉経前女性の子宮内膜組織診時に推奨される非3層性超音波所見の有用性)

論文の内容の要旨

[背景と目的]

閉経前女性において不正性器出血は頻度が高く、様々な原因で起こる。責任病変の診断には子宮内膜組織診が必要だが、疼痛を伴い、全員に行うには侵襲的である。従って、組織診が必要な患者を非侵襲的方法で選別できれば有用な臨床的アプローチとなる。経膈超音波は非侵襲的であり、閉経後患者では内膜厚測定が内膜異常の診断に有用な方法として認められている。しかし閉経前患者では、月経周期により内膜の厚さも所見も変化するため、内膜厚測定では診断精度が低く、有用な超音波診断法は確立していない。本研究では、閉経前不正出血患者に対する月経周期に基づいた経膈超音波診断基準を定義し、その精度および適切な診断時期を評価することを目的とした。

[症例および方法]

2005～2007年に不正出血を主訴に外来受診し、経膈超音波および子宮内膜吸引組織診を行った50歳未満の閉経前患者213人を後方視的に検討した。

増殖期の正常内膜は低輝度で、外側と正中の高輝度な3本の線に囲まれた特徴的な超音波所見を呈する (**three-layer pattern**)。分泌期になると3本の線は消失し内膜は厚く高輝度になり、正常内膜厚は15 mm未満とされる。増殖期内膜の異常所見は、背景がびまん性または部分的に高輝度、3本の線の不整、のいずれかを呈するものと定義した (**non-three-layer pattern**)。分泌期内膜は全体が高輝度になるため、背景の像は問わず内膜厚15 mm以上を異常とした。超音波は増殖期に施行し、受診日が分泌期や不正出血のため周期が特定できない場合は、次周期の増殖期にも超音波を再検した。

全ての病理診断は、婦人科専門病理医を含む2人の病理医によって超音波所見の情報なしに評価された。病理学的異常内膜は、内膜癌、内膜増殖症、内膜ポリープ、ホルモン異常とした。統計分析は、 $P < 0.05$ を有意とした。全ての患者にinformed consentがとられ、院内の倫理委員会に承認された (聖隷三方原病院、No.06-26)。

[結果]

患者の平均年齢は39歳 (38.7 ± 7 歳、17～49歳)であった。超音波検査と内膜組織診で有害事象は認めなかった。147/213人 (69%)に病理学的異常を認めた。超音波と組織診の診断結果を比較すると、超音波で異常と診断した139/154人 (90.3%)に病理学的異常を認め、感度94.6%、特異度77.2%であった。これらを診断した月経周期別に比較した。増殖期では、超音波で異常と診断した133/140人 (90.5%)に病理学的異常を認め、感度97.1%、特異度84.4%であった。分泌期では、超音波で異常と診断した6/14人 (42.9%)に病理学的異常を認め、感度60.0%、特異度61.9%であった。診断精度は増殖期と分泌期との間で有意差を認めた ($p < 0.01$)。分泌期に来院、または不正出血のため周期が特定できない患者の次周期の増

増殖期超音波診断を組合わせて、全患者の増殖期超音波所見にnon-three-layer patternの基準を適応した場合、病理学的異常の検出率は、超音波で異常患者を選別する前の69.0%から95.2%に上昇し、感度95.2%、特異度89.4%であった。

[考察および結論]

閉経後は内膜が萎縮するため、内膜厚測定による内膜異常の診断精度が高く、経膈超音波の有用性が認められている。閉経前女性においても多くの研究で内膜厚を診断基準にしているが、カットオフ値を5~12 mmに設定しても感度64~88%、特異度46~75%と低く、超音波の有用性は確立されていない。閉経前は月経周期により内膜厚も超音波像も変化するため、我々は内膜厚ではなく、特徴的な所見を呈する増殖期内膜に焦点をあてた。すなわち、背景が低輝度ではなく部分的またはびまん性に高輝度を呈すること、3本の輪郭線が不整になること、の2点が閉経前内膜異常の診断に寄与すると考えた。

この研究では病理学的診断が生検によって行われた。子宮摘出検体や、内膜全面搔爬による診断の方がより正確であると指摘されるかもしれない。しかし、外来生検と全面搔爬や摘出子宮での診断精度との間には良好な相関があると報告されている。また外来生検は簡便、低価格かつ安全で患者の認容性が大きく、入院や麻酔が必要な全面搔爬に取って代わっており、現在では外来での内膜生検がgold standardになっている。したがって今回用いた外来生検による病理学的診断は信頼性の高いものと考えられ、超音波診断との相関を見る上で妥当なものと言える。

最近では内膜異常の超音波診断に対して、子宮内へ生理食塩水を注入して超音波を行うsaline infusion sonohysterographyの有用性が多数報告され、推奨されている。この方法の問題点として子宮内に癌が存在した場合に、生理食塩水注入によって癌細胞が腹腔内へ流出する可能性が指摘されている。我々の方法では、癌細胞の腹腔内への流出の心配がなく、侵襲が少ない方法と考えられる。

以上より、non-three-layer patternの診断基準は内膜異常の診断に高い精度を有し、閉経前不正出血患者に内膜組織診を行うべきかを決定する有用な方法と考えられる。我々は、増殖期に超音波で異常所見があれば内膜組織診を行うことを推奨したい。

論文審査の結果の要旨

閉経前女性の不正性器出血の診断に行う子宮内膜組織診は、疼痛を伴う侵襲的検査のため、その有用な適応決定法が望まれている。経膈超音波の内膜厚測定は非侵襲的で、閉経後女性では内膜異常の診断に有用であるが、閉経前女性では月経周期により内膜厚が変化し診断精度が低い。

そこで、申請者は、不正出血を主訴に受診し、経膈超音波および子宮内膜組織診を施行した50歳未満閉経前女性213人を対象に、月経周期に基づく超音波診断基準を定義し、その精度と診断時期を検討した。すなわち、増殖期正常内膜所見は低輝度で、外側と正中の高輝度な3本の線に囲まれたthree-layer patternを呈し、内膜厚は15 mm未満とし、一方、増殖期異常所見は、背景がびまん性または部分的に高輝度、3本の線の不整のいずれかを呈すると定義した (non-three-layer pattern)。超音波は増殖期に施行し、分泌期や周期が特定できない場合、次周期の増殖期に再

検した。

病理所見は2人の病理医が超音波所見の情報なしに診断し、147人(69%)に異常を認めた。超音波と組織診の結果の比較では、全例で感度94.6%、特異度77.2%であり、増殖期では感度97.1%、特異度84.4%と、分泌期より有意に($p < 0.01$) 高かった。全例の増殖期超音波所見に non-three-layer pattern の基準を適応すると、感度95.2%、特異度89.4%とさらに上昇した。

閉経前女性において超音波の有用性が確立していない現在、申請者の診断基準は内膜異常の診断に高い精度を有し、内膜組織診の適応決定に有用で、今後の臨床的有用性が高いと考えられる。

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 大園 誠一郎
副査 峯田 周幸 副査 馬場 聡

博士(医学) 足守直樹

論文題目

TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, mediates S-phase cell cycle arrest and suppresses head and neck tumor angiogenesis

(低分子 Bcl-2 阻害剤、TW-37 は細胞周期において S 期の停止を介在し、頭頸部腫瘍における血管新生を抑制する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

Bcl-2 ファミリー蛋白はアポトーシスを制御し、細胞の生存を司っている。抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 や Bcl-xL は多くの癌細胞で過剰発現されており、化学療法や放射線治療の抵抗性に関与している。TW-37 は蛋白の化学構造を元に開発された分子標的薬であり、Bcl-2 の BH3 ドメインに結合することにより Bid や Bad などの向アポトーシス蛋白と競合しアポトーシスを誘導する。この低分子 Bcl-2 阻害剤である TW-37 は単剤投与で抗腫瘍効果のあることがリンパ腫や膵臓癌で認められている。我々は以前にこの TW-37 が血管内皮細胞に対しても増殖抑制効果があり、マウスを用いた *in vivo* の実験において血管新生抑制効果があることを認めた。今回我々は TW-37 とシスプラチンを用いてその抗腫瘍効果、血管新生抑制効果を調べた。

[材料ならびに方法]

ヒト血管内皮細胞株(HDMEC)は Lonza 社から購入したもの、頭頸部扁平上皮癌細胞株(OSCC-3, UM-SCC-1, UM-SCC-74A) はミシガン大学、シカゴ大学でそれぞれ樹立されたものを使用した。細胞増殖抑制はそれぞれの細胞をさまざまな濃度のシスプラチン、TW-37 単剤または併用投与にて 72 時間曝露を行い、10%トリクロロ酢酸による細胞の固定後、細胞内蛋白を Sulforhodamine B と結合させ、その吸光度をマイクロプレートリーダーで求め評価した。アポトーシス及び細胞周期は細胞を薬剤に曝露した後、DNA を Propidium iodide で染色しフローサイトメーターにて解析を行った。*in vivo* では HDMEC と OSCC-3 を混合し、免疫不全マウスの背部に移植した。腫瘍体積が約 200 mm³ になったところで 4 群に分け(コントロール、シスプラチン、TW-37、併用)、腹腔内投与により投薬を開始した。TW-37 は 10 日間連日投与、シスプラチンは 1、6 日目に投与した。腫瘍の大きさを連日計測し各群間で比較検討した。また腫瘍血管新生、アポトーシスの効果を観察するための実験では、投薬開始 7 日目にすべての群から同時に腫瘍を摘出した。腫瘍内新生血管は Factor VIII による免疫染色、アポトーシス細胞は TUNEL 法により染色し、それぞれの群間で比較検討を行った。

[結果]

血管内皮細胞、頭頸部扁平上皮癌細胞に対するシスプラチンの IC₅₀ は 2 μM、TW-37 はそれぞれ 1.1 μM、0.2~0.3 μM であり、*in vitro* では TW-37 により強い増殖抑制効果がみられた。シスプラチン、TW-37 をそれぞれ IC₅₀、IC₅₀ 以下、IC₅₀ 以上の濃度で組み合わせ、単剤投与と併用投与の比較を行ったところ、TW-37 が IC₅₀ またはそれ以上の濃度でのシスプラチンとの併用で細胞増殖抑制に相加あるいは相乗効果を認めた。フローサイトメーターではシスプラチン、TW-37 併用投与により単剤投与よりもアポトーシスの増加が認められた。特に IC₅₀ を超える濃度の TW-37 投与により

細胞周期における S 期の延長がみられ、この濃度の TW-37 とシスプラチンの併用投与により増強効果がみられた。*in vivo* ではシスプラチン、TW-37 併用投与により単剤投与よりも高い腫瘍抑制効果がみられた。また腫瘍内での血管新生抑制、アポトーシス増加も併用投与群に高い効果がみられた。

[考察]

低分子 Bcl-2 阻害剤の抗腫瘍効果は、腫瘍細胞に対する向アポトーシス作用と血管新生抑制作用によるものと推察した。血管新生を抑制するという仮説は我々が報告した (a) Bcl-2 は血管内皮細胞において NF- κ B を介し、血管新生促進物質である CXCL1 と CXCL8 をアップレギュレーションするシグナル伝達経路を開始する (b) アポトーシスを起こす濃度以下の TW-37 で血管新生を抑制する (c) 血管内皮細胞においてアポトーシスを起こす濃度以下の TW-37 の投与により CXCL1 と CXCL8 の発現を抑制する、という結果に基づいている。実際我々は gene silencing による血管内皮細胞での Bcl-2 機能抑制により腫瘍増殖抑制を認めている。これらのことから今回 TW-37 が頭頸部癌に対しても抗腫瘍効果、血管新生抑制効果がみられたと考えられた。また多剤による併用効果をみるためシスプラチンを使用したところ抗腫瘍効果、血管新生抑制効果ともに上乘せ効果がみられ、TW-37 の臨床応用が期待された。

[結論]

新しいタイプの分子標的薬、低分子 Bcl-2 阻害剤である TW-37 が頭頸部癌に対して抗腫瘍効果、血管新生抑制効果を示すことが認められた。またシスプラチンと併用することによりその効果が増強されることが分かった。併用効果増強の理由の一つとして、TW-37 は細胞周期における S 期の延長を誘導し、シスプラチンの感受性を高めていることが示唆された。将来的に頭頸部癌の臨床においてもその効果が期待される。

論文審査の結果の要旨

抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 family は多くの癌細胞で過剰発現しており、化学療法・放射線療法抵抗性に関与する。申請者は低分子 Bcl-2 阻害剤である TW-37 が血管内皮細胞の増殖を抑制することを以前の研究で確認しており、本研究では頭頸部扁平上皮癌における腫瘍血管新生抑制効果と化学療法剤との併用による抗腫瘍効果の増強作用について明らかにすることを目的とした。標的癌細胞として頭頸部扁平上皮癌細胞 3 株を、化学療法剤としては CDDP を用い、*in vitro*、*in vivo* による実験を行い、以下の結果を得た。①血管内皮細胞、頭頸部扁平上皮癌細胞に対する IC₅₀ は CDDP は 2 μ M、TW-37 はそれぞれ 1.1 μ M、0.2~0.3 μ M であった。②TW-37 が IC₅₀、IC₅₀ 以上で CDDP との併用により相加的、相乗的な増殖抑制効果を示した。③CDDP と TW-37 の併用投与によりアポトーシスの増加を認め、TW-37 を IC₅₀ を超える濃度で投与した場合に S 期の延長が見られた。④併用によりマウス移植腫瘍に対して単独よりも強い腫瘍抑制効果、血管新生抑制効果、アポトーシス誘導が見られた。

以上の結果から申請者は以前得られた結果も鑑みて、TW-37 は頭頸部癌細胞には向アポトーシス作用を示し、血管内皮には CXCL1、CXCL8 の発現を抑制することにより血管新生抑制作用を示すものと推察した。さらに TW-37 による S 期延長作用も CDDP との併用効果を高める要因であ

ると推論した。

審査委員会では頭頸部扁平上皮癌に対する分子標的療法薬 TW-37 の作用機序、および CDDP との併用効果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	今野 弘之		
	副査	北川 雅敏	副査	橋本 賢二

博士(医学) 中山 禎 司

論文題目

Striatal D₂ receptor availability after shunting in idiopathic normal pressure hydrocephalus

(特発性正常圧水頭症患者におけるシャント術後の線条体 D₂ 受容体測定の有用性)

論文の内容の要旨

[はじめに]

歩行障害、認知症、尿失禁を3徴候とする特発性正常圧水頭症 (iNPH)の病態についてはまだ不明な点が多い。我々のこれまでの PET による研究では iNPH 患者では線条体において節後 D₂ 受容体結合能の反応性低下と歩行障害に密接な関係が示唆された。

我々は脳室腹腔短絡術(シャント術)を行った iNPH 患者において術前術後の臨床症状の変化と線条体における D₂ 受容体の変化につき ¹¹C-raclopride を用いた PET を行い、iNPH の病態生理につき検討を行った。

[方法]

8名の iNPH の患者を対象とした。内訳は男性5名、女性3名。平均年齢は74.9歳。臨床症状及び MRI にて脳室の拡大と頭頂部脳溝狭小化がみられ iNPH と診断された。全例髄液圧は 20 cmH₂O 未満であり髄液排除試験で歩行障害が改善した患者である。錐体外路症状を有する患者は除外した。これらの患者に Mini Mental State Examination (MMSE)、表情読み取りテストなどの神経心理機能検査および 5 m 往復の歩行機能検査を行った。その後 3-D MRI 及び PET 検査をシャント術の術前、術後 1 ヶ月目にそれぞれ行った。術後 1 ヶ月目にも同様の神経心理機能検査及び歩行機能検査を行い術前と比較した。PET 検査は ¹¹C-raclopride を用いて行った。¹¹C-raclopride の結合能 (binding potential: BP) は Logan plot 法により解析した。関心領域は両側の側坐核、尾状核頭、被殻内側部、被殻背側部におきそれぞれの ¹¹C-raclopride BP の変化に注目した。術前術後の PET 及び MRI のパラメーターの変化は t 検定を用いて評価した。

[結果]

術前の 5 m 往復は 19.7 ± 6.4 秒、MMSE は 21.3 ± 4.7、UI (Urinary incontinence score) は 1.7 ± 0.9 であった。シャント術後 5 m 往復歩行が術前 19.7 ± 6.4 秒から術後 15.8 ± 4.7 秒と有意な改善が得られた ($P < 0.05$)。MMSE では術前 21.3 ± 4.7 から術後 21.8 ± 6.2 と軽度の改善が見られた。術前術後の PET 検査では側坐核で ¹¹C-raclopride BP が右側で 1.15 ± 0.22 から 1.31 ± 0.18、左側で 1.10 ± 0.18 から 1.25 ± 0.14 と統計学的有意 ($P < 0.05$) に上昇が見られ、被殻背側部では右側で BP が 1.41 ± 0.19 から 1.51 ± 0.20、左側で BP が 1.42 ± 0.21 から 1.62 ± 0.21 と有意な増加が見られた ($P < 0.05$)。左側側坐核における ¹¹C-raclopride BP と表情読み取りテストは有意の相関を示していた ($y = 2.76x + 0.71$, $r^2 = 0.43$)。被殻背側の ¹¹C-raclopride BP と歩行機能検査の改善もよく関連していた (右側 $y = 0.78x - 6.23$, $r^2 = 0.56$ 左側 $y = 1.23x - 8.62$, $r^2 = 0.45$)。さらに ¹¹C-raclopride BP の線条体における上昇は全般的な認知機能 (MMSE) とよく相関していた。(右側 $y = 2.51x + 1.71$, $r^2 = 0.62$, 左側 $y = 2.68x + 5.16$, $r^2 = 0.46$) 一方 MRI 上、脳室の大きさは左右の側脳室前角径及び Evans' Index で術前後を比較したところ若干減少 (6%) していたが統計学的に有意ではなかった。

[考察]

この研究で我々は iNPH 患者においてシャント術後に歩行障害や認知機能障害の改善に伴い線条体における D₂ 受容体活性が高まることを示すことが出来た。iNPH 患者の線条体における ¹¹C-raclopride BP の低下については D₂ 受容体の反応性低下と D₂ 受容体の減少という2つの機構が考えられる。¹¹C-raclopride の結合能はドーパミンと拮抗するため ¹¹C-raclopride BP 低下はドーパミンの過剰放出でも起こりえるが以前の我々の研究では iNPH 患者の線条体において節前のドーパミントランスポーターのマーカである ¹¹C-CFT は正常人と比し変化は見られなかった。また他の報告では脳室内髄液においてドーパミンの代謝産物の増加が見られなかった。これらのことより iNPH ではドーパミン分泌の増加は考えにくく D₂ 受容体の反応性低下の可能性が高いと思われた。D₂ 受容体は大脳皮質からの運動情報伝達に関わっていると考えられていることより D₂ 受容体の反応性低下が ¹¹C-raclopride BP の減少の原因と考えられる。この原因として水頭症において脳室内髄液グルタミン濃度の上昇が報告されていることにより大脳皮質において過剰のグルタミン放出が長期間の興奮状態をきたし線条体でのドーパミン放出を乱し節後 D₂ 受容体の反応性低下または D₂ 受容体の機能低下を来している可能性が考えられた。

さらに今回の研究ではシャント術後1ヶ月で iNPH 患者の D₂ 受容体の反応性低下は改善していた。今までの報告ではシャント術後大脳皮質のブドウ糖代謝が高まったというものや術後大脳皮質のグルタミン濃度の減少を報告しているものもある。このことはシャント術が大脳皮質でのグルタミン過剰分泌を抑制しグルタミンの神経毒性を抑え、これにより神経活動が高まりドーパミン放出を刺激し線条体での D₂ 受容体の活性が高まったと考えられる。術後の歩行障害や感情面の改善は線条体における D₂ 受容体の反応性の改善に相関していた。

今回の研究での限界は術後の一時点のみを PET 及び臨床症状の観察点としていることである。術後24ヶ月間は改善が見られるという報告もありまた、最初改善するものの半数近くは再び悪化するとの報告もある。今後臨床的に悪化が見られた際に ¹¹C-raclopride を用いた PET を行い D₂ 受容体の変化を明らかにすることはシャント術の再手術の可否を決定する上で非常に有用になると思われる。

[結論]

iNPH 患者においてシャント術後1ヶ月目で臨床症状の改善に伴い線条体で D₂ 受容体の反応性が改善していた。すなわち線条体における D₂ 受容体が iNPH における潜在的な治療の標的であると思われた。

論文審査の結果の要旨

申請者は脳室腹腔短絡術(シャント術)を行った特発性正常圧水頭症(iNPH)患者において術前術後の臨床症状の変化と線条体における D₂ 受容体の変化につき ¹¹C-raclopride を用いた PET 検査を行い検討した。

8名の iNPH の患者を対象とした。5m 往復歩行では術後に有意な改善が得られた(P<0.05)。¹¹C-raclopride の binding potential (BP) は術後、両側の側坐核および被殻背側部で有意(P<0.05)に上昇しており、術前術後の被殻背側の ¹¹C-raclopride BP の変化と歩行機能検査の改善はよく相関していた。一方、MRI 上、脳室の大きさは左右の側脳室前角径及び Evans' Index で術前後を比

較したところ若干減少(6%)していたが統計学的に有意ではなかった。以上の結果から、申請者はiNPH患者においてシャント術後1ヶ月目で臨床症状の改善に伴い線条体でD₂受容体の反応性が改善していることを示し、線条体におけるD₂受容体がiNPHにおける潜在的な治療の標的であることを示唆した。

審査委員会では、iNPHの病態におけるD₂受容体の関与を示唆する研究であり、治療標的となる可能性を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 梅村 和夫
副査 阪原 晴海 副査 山本 清二

博士(医学) 細川 誠二

論文題目

Ultrastructural localization of cochlin in the rat cochlear duct

(ラット蝸牛管におけるコクリンの超微細構造的な局在)

論文の内容の要旨

[はじめに]

COCH 遺伝子の変異は、非症候群性の遺伝性感音難聴を引き起こし、疾患は DFNA9 と呼ばれている。コクリンは内耳に多量に存在しながら、いまだその役割は十分わかっていない。タイプ II コラーゲンは、内耳細胞外支持組織の重要な構成要素である。コクリンとタイプ II コラーゲンの、蝸牛管における超微細構造的な局在を、免疫電顕法を用いて示し、その生理学的及び病理学的役割について考察した。

[材料ならびに方法]

コクリンの電顕レベルでの局在を明らかにするため、以下の方法を用いた(免疫電顕法:2次抗体に標識している金粒子を可視化することで目的蛋白の局在を知る方法)。

一次抗体にはラットコクリンを特異的に認識するウサギ抗体を、二次抗体には 15 nm 金コロイド標識抗ウサギ IgG 抗体を使用した。ネガティブコントロールは、一次抗体として免疫していないウサギ IgG 抗体を用いた。Wistar rat を麻酔下で、4 %パラホルムアルデヒドと 0.1 %グルタルアルデヒドの混合液を用いて経心灌流固定した後、内耳を摘出し 4 °C で 2 時間固定した。Lowicryl K4M に包埋後、超薄切片を作成し、一次抗体に 4 °C で一晩、二次抗体と室温で 1 時間反応させてウラン鉛二重染色にて観察した。

[結果]

内耳蝸牛管のらせん板縁、内らせん溝細胞下、基底板、らせん隆起、らせん靭帯のすべての線維性組織において、コクリンとタイプ II コラーゲンの染色を認めた。抗コクリン抗体による染色は、基底膜やらせん靭帯では線維束に、内らせん溝細胞の下ではわずかに散乱した線維に認めた。らせん隆起の上皮細胞下の染色された線維は散在し、方向性を持たない状態であった。ネガティブコントロールでは染色を認めなかった。

[考察]

この研究は蝸牛におけるコクリンの局在を、電顕で示した初めての報告である。ラット蝸牛管において、コクリンとタイプ II コラーゲンの共局在を、細胞外マトリックスの線維性組織において認めた。Robertson らは、我々の使用したのと同じ抗コクリン抗体を用いて DFNA9 の罹患耳で好酸性沈着物質が染色されることを発見し、沈着物質(変異コクリン)の経年的増加による関連構造破壊が難聴を引き起こすと推察した。これとは別に DFNA9 の罹患耳ではタイプ II コラーゲンが消失しているという報告があった。タイプ II コラーゲンは内耳では組織の形態を維持し、音の機械的エネルギーを柔軟に受け止める役割がある。今回の研究でコクリンとタイプ II コラーゲンの共局在が示されたことから、タイプ II コラーゲンはコクリン関連蛋白で、変異型コクリンにより障害を受ける蛋白の一候補であると考えられた。

DFNA9 難聴は成人に発症しゆっくりと進行していくことから、COCH 遺伝子の老人性難聴への関与が示唆されている。Schknecht らは、老人性難聴をいくつかのカテゴリーに分けた。それは感覚神経障害、血管条障害、蝸牛伝導性障害、それらの混合性障害そして不確定障害である。過去の報告によると、蝸牛伝導性障害では基底板の障害が老化に影響をきたすことが考えられている。Bukinova らは、血管条障害型老化モデルである Fischer 344 ラットのらせん靭帯において、タイプ II コラーゲンの免疫染色性の低下を示したが、基底板におけるコラーゲンの変化は認めなかった。しかし、両者が共局在するらせん靭帯で、タイプ II コラーゲンの変性があるとすれば、DFNA9 難聴と同じく、老化でも両者の共局在する基底板でタイプ II コラーゲンが変性している可能性があると考えられる。基底板は感覚細胞の電氣的・機械的変換のため、音により蝸牛管に発生した進行波により振動する。よってこの機械的振動性の低下は聴力低下の原因となりうる。しかし、上に述べたように老化に関して基底板の病理学はよくわかっていない。らせん靭帯の老化と同様に、基底板でのコクリンとコラーゲンの加齢変化を電顕的に解析し、COCH 遺伝子と老人性難聴の関係を証明することが今後の研究目標である。

[結論]

コクリンは内耳蝸牛管のらせん板縁、内らせん溝細胞下、基底板、らせん隆起、らせん靭帯など内耳の主要な部位に存在し、内耳の形態維持、音受容に役割のあるタイプ II コラーゲンと共局在していたことから、コクリンはタイプ II コラーゲンとともに働いて形態的機能維持に重要な役割を果たしていると考えられた。また、この共局在は DFNA9 と老人性難聴の病理解明の糸口のひとつになることが示された。

論文審査の結果の要旨

COCH 遺伝子の変異は、非症候群性の遺伝性感音難聴を引き起こし、その疾患は DFNA9 と呼ばれている。COCH 遺伝子がコードするタンパク質のコクリンは内耳に多量に存在しながら、いまだその役割は十分わかっていない。そこで、申請者はコクリンの、蝸牛管における超微細構造的な局在を、免疫電顕法を用いて検討した。

その結果、内耳蝸牛管のらせん板縁、内らせん溝細胞下、基底板、らせん隆起、らせん靭帯のすべての線維性組織において、コクリンの染色を認めた。

本研究は蝸牛におけるコクリンの局在を、電顕で示した初めての報告である。ラット蝸牛管において、コクリンとタイプ II コラーゲンの共局在を、細胞外マトリックスの線維性組織において認めた。今回の研究でコクリンとタイプ II コラーゲンの共局在が示されたことから、タイプ II コラーゲンはコクリン関連蛋白で、変異型コクリンにより障害を受ける蛋白の一候補であると考えられた。また、この共局在は DFNA9 と老人性難聴の病理解明の糸口になることが示された。

審査委員会は、本研究は蝸牛におけるコクリンの局在を、電顕で示した初めての報告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 佐藤 康二
副査 堀田 喜裕 副査 宮嶋 裕明

博士(医学) 原 田 英 幸

論文題目

Radiological response and clinical outcome in patients with femoral bone metastases after radiotherapy

(転移性大腿骨腫瘍患者における放射線治療後の画像上の治療効果ならびに臨床成績)

論文の内容の要旨

[背景]

転移性骨腫瘍に対する放射線治療の骨折予防効果や画像上の変化についての報告は少ない。本研究では、放射線治療後の大腿骨転移病変の画像上の変化や骨折予防効果について検討した。

[方法]

2002年から2005年の間に静岡がんセンターにて病的骨折のない大腿骨転移に手術あるいは放射線治療を施行した102例を対象とした。このうち12例は初回治療として手術を選択した。残りの90例102肢では初回治療として放射線治療を施行した。このうち12例では原病の進行のため照射開始後30日以内に死亡し、6例が追跡不能であったため除外し、72例84肢について診療記録ならびに画像診断結果を検討した。

症例の年齢中央値は59歳であり、58%が男性であった。化学療法、ホルモン療法、ビスフォスフォネート製剤による治療がそれぞれ51%、32%、32%の症例で併用された。原発臓器は、乳房、肺、前立腺の順に多かった。観察期間中央値は5か月であった。

放射線治療の線量分割法は、30 Gy/10回が一番多く、次いで39 Gy/13回、40 Gy/20回の順で、再照射をおこなった症例はなかった。切迫骨折であるか否かの判定は、Mirelsが提唱するスコアに従った。単純写真による治療効果判定は、独自に定めた診断基準により「完全奏功」、「部分奏功」、「不変」、「進行」の4段階に分類した。疼痛緩和効果については有痛性の77肢について評価した。疼痛が改善し必要鎮痛剤の増量がなかったものを「改善」、疼痛の悪化があったものを「進行」、どちらにも分類されなかったものを「不変」として3段階に分類した。

骨折予防効果の評価においては、病的骨折症例ならびに著明な疼痛増悪と明らかな骨溶解を示し実質的に骨折している状態と判断され手術が必要となった症例をあわせて「治療無効」と判断した。

[結果]

画像上の効果(完全奏功あるいは部分奏功)を35肢(42%)に認め、治療開始後中央値3か月を要した。化学療法あるいはホルモン療法を施行したか否か、ビスフォスフォネートを使用したか否か、および原発疾患の種類が画像上の効果に関連する因子であった。観察期間が3、6、12か月の時点で画像上の効果がみられる割合はそれぞれ30%、45%、50%であった。

疼痛緩和は77肢中36肢(47%)で得られた一方、画像上の効果と疼痛緩和との間に有意な相関はなかった($P=0.166$)。経過観察期間中11例において病的骨折あるいは実質的に骨折と判断され手術が必要であった。手術が必要であったのは、画像上の効果が「進行」であった群では19肢中8肢(42%)であったのに対して、「進行」でなかった群では65肢中3肢(5%)であり有意に多かった。

($P<0.001$)。治療開始時切迫骨折であった43肢中15肢(35%)で画像上の奏功を認め、35肢(81%)では手術は不要であった。全体の生存期間中央値は、放射線治療開始後7か月であった。

[考察]

画像上の効果は、病変が修復されてくる過程を反映し治療の成功を示唆している。しかし画像上の効果判定基準には標準的なものがないため、独自の判定基準を定義して使用した。

化学療法あるいはホルモン療法併用例で効果良好であった。この理由として、化学療法あるいはホルモン療法そのものが骨転移へ効果があった可能性と、併用療法により生存期間が延長した結果、画像上の効果を捉える機会が増えた可能性とが考えられた。転移性骨腫瘍症例ではビスフォスフォネート製剤を使用することが推奨されているが、この試験でもビスフォスフォネート製剤を使用した群で効果良好であり、これを支持する結果であった。

切迫骨折でなかった症例で、その後手術が必要になった症例はほとんどなく、この群では放射線治療が治療の第一選択であると考えられた。一方、当初切迫骨折でありながら全身状態等のため放射線治療をおこなった症例でも35%では画像上の効果がみられ、実際に手術が必要であったのは19%であった。切迫骨折症例でも、手術がおこなえない場合には放射線治療が代替治療となりうると考えられた。一方で、切迫骨折病変に放射線治療を施行後、画像評価で進行を認めた場合には、骨折の危険が高くなるため、全身状態が許せば内固定の適応があると考えられた。

疼痛緩和効果と画像上の効果との間に直接の相関は認めなかった。転移性骨腫瘍に対する放射線治療の効果判定に際しては、疼痛緩和効果のみならず画像評価をおこなうことが重要であると考えられた。

[結論]

単純写真を用いた照射後の経過観察は臨床上有用であった。また放射線治療によって切迫骨折症例においても大半は手術を回避できた。しかしながら放射線治療後に画像上で進行を認める切迫骨折症例では骨折する危険が高く、結果として多くの症例で手術が必要であった。こうした症例では可能であれば内固定を考慮するべきであると考えられた。

論文審査の結果の要旨

転移性骨腫瘍に対する放射線治療の報告は疼痛緩和効果に主眼がおかれており、骨折予防効果や画像上の変化についての報告はない。本研究では、放射線治療が大腿骨転移病変へ与える効果を単純X線写真を用いて検討し、手術適応となる症例の危険因子を検討した。

病的骨折のない大腿骨転移に初回治療として放射線治療を行った72例84肢を対象とした。原発巣は乳癌、肺癌、前立腺癌の順に多かった。また55例(76%)では化学療法、ホルモン療法、ビスフォスフォネート製剤による全身療法が併用されていた。画像上の効果は42%に認め、治療開始後平均3ヶ月を要した。全身療法併用例は有意に画像上効果を認めた。しかし、腎癌または肝癌の症例は有意に手術療法が必要であった。手術療法が必要となったのは11例で、残りの61例(85%)では回避可能であった。

申請者は、放射線治療によって大腿骨転移病変の骨折を予防でき、単純X線評価を経時的に行うことで切迫骨折状態を把握し骨折予防が可能と報告した。審査委員会では、放射線治療効果

と骨折予測を簡便な単純 X 線評価で行っ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	松山 幸弘		
	副査	椎谷 紀彦	副査	美津島 隆

博士(医学) 中村 徹

論文題目

Prognostic significance and possibility in guiding adjuvant therapy of the pleural lavage cytology in patients with non-small cell lung cancer

(非小細胞肺癌患者における洗浄胸水細胞診の予後因子としての意義と補助療法決定の可能性)

論文の内容の要旨

[はじめに]

非小細胞肺癌手術症例における洗浄胸水細胞診(以下 PLC)の役割については、多くの研究がなされてきた。過去の報告から、PLC は肉眼的な胸水貯留や播種の無い患者における微小転移を捕捉している可能性があり、術後再発の良い指標であることは広く知られている。しかし非小細胞肺癌における病期分類や術後補助療法の決定における役割はいまだ議論のあるところである。そこで、当科での症例経験から PLC の予後因子としての役割と病期分類及び術後補助療法の決定に与える影響について検討した。

[患者ならびに方法]

1999年1月から2006年12月までの期間に、明らかな胸水貯留や播種の無い非小細胞肺癌手術症例 284 例に対して PLC を施行した。試験開胸症例は除外した。開胸直後に生理食塩水 20ml を胸腔内に注入し、回収して細胞診検査に提出。PLC の結果は他の臨床病理学的因子とともに評価され、細胞診結果の状況による生存の差も調査された。病理組織診断には WHO 分類を用い、病期決定は TNM 分類に基づいて行った。胸膜浸潤(P 因子)は日本肺癌学会による肺癌取り扱い規約に則って分類した。二群間の比較には Fisher の直接確率検定及び Mann-Whitney の U 検定を用いた。生存率は Kaplan-Meier 法で計算され、生存曲線の比較には log-rank 検定を用いた。単変量及び多変量解析には Cox 比例ハザードモデルを用い、 p 値が 0.05 未満を有意とした。また初回再発部位は遠隔と局所に分類し、局所再発は片側胸郭内の再発病変と定義した。

[結果]

PLC は 13 人に陽性だった(4.6%)。PLC 結果は患者の年齢、性別、術式、組織型などの臨床病理学的因子とは相関が見られなかったものの、病理病期、N 因子、P 因子と有意な相関があった。PLC 陽性症例では陰性例に比べて術後再発が多く、無病生存期間は有意に不良であった($P < 0.0001$)。この差は病期 II、III 期では明らかでなく、病期 I 期で顕著であった。再発症例において、PLC 結果による初回再発部位(局所、遠隔)の有意な差は見られなかった。

単変量解析では他の臨床病理学的因子(病理病期、組織型、T 因子、N 因子、P 因子)と同様に PLC は有意な予後因子であった。更に多変量解析では PLC は T 因子、P 因子と並んで有意な予後因子であった。

[考察]

過去にも PLC の重要性については議論がなされてきた。その多くは PLC 陽性例は陰性例に比較して予後不良であり、TNM 分類の因子とは別の予後因子であるという主張である。また、PLC 陽

性は単なる局所再発のリスクだけでなく、遠隔転移とも強い相関を示すことから、PLC は手術の時点での微小転移の指標であるとされてきた。しかしこういった認識は既になされてきたものの、PLC 結果を如何に病期分類や術後補助療法の適応決定に応用するかは未確立であった。病期 I 期症例での PLC 結果による予後曲線の乖離は過去にも報告されており、本研究でも同様の結果が得られた。すなわち比較的早期と考えられている I 期症例にも予後不良群が含まれており、その鑑別に PLC が有用である可能性が示唆された。このことから少なくとも現行の病期 I 期症例において PLC が陽性の場合には病期を II 期以上に上げるべきであると考ええる。また過去には非小細胞肺癌の術後補助化学療法の有用性は明らかでなかったが、近年はその有用性が確立しつつあり、病期 II 期以上の症例では補助化学療法が有益と考えられている。前述の通り PLC 陽性の病期 I 期症例は病期 II 期以上として扱うのが妥当であり、現在の TNM 病期分類に則った術後補助化学療法の適応の決定に加えて、PLC が新たな判断材料になる可能性がある。よって現行の TNM 病期分類に PLC を組み込む考慮が必要である。

[結論]

PLC は容易に施行可能であり、特に病期 I 期において有用な予後因子である。術後補助療法施行の決定に際しても有益と考えられることから、呼吸器外科医は非小細胞肺癌根治術の際には必ず施行すべきである。また過去の報告例も踏まえて、PLC を現行の病期分類に組み込むべく検討を重ねることが重要である。

論文審査の結果の要旨

肺癌症例において開胸直後に生理食塩水を胸腔内に注入し、回収した細胞内に腫瘍細胞の有無を調べる洗浄胸水細胞診(PLC)が、病期分類や術後補助療法の適応に反映するか、不明である。申請者は明らかな胸水貯留や胸膜播種の無い非小細胞肺癌284例についてPLCを施行し、臨床病理学的因子と予後との相関について検討した。PLC陽性は13例(4.6%)あり、病理病期、N因子、P因子と有意に相関があり、術後再発率が高く、無病生存期間は短かった。生存率について病期II、III期では有意差はなかったが、病期I期で有意差があった。多変量解析ではPLCはT因子、P因子とともに有意な予後因子であった。以上の結果から、申請者はPLCが特に病期I期症例の重要な予後因子であり、陽性例は術後再発が多いことを明らかにした。

審査委員会では、申請者が非小細胞肺癌症例について積極的にPLCを行い、陽性例には術後の追加療法を行うことで治療成績を向上させる可能性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 峯田 周幸
副査 大西 一功 副査 三浦 克敏

博士(医学) 毛 謙

論文題目

A small molecule that blocks fat synthesis by inhibiting the activation of SREBP

(SREBP の活性化を阻害して脂肪合成を抑制する小分子化合物)

論文の内容の要旨

[はじめに]

メタボリックシンドロームは、過剰な脂肪や炭水化物の摂取に主に起因する。炭水化物から脂肪酸やコレステロールへの変換には数多くの酵素が関与しているが、これらの酵素の発現レベルを制御しているのは、SREBP (sterol regulatory element-binding protein) という転写因子である。SREBP は小胞体の膜に結合した前駆体として合成される。この前駆体は、SREBP のエスコートタンパク質である SCAP (SREBP cleavage-activating protein) によって小胞体膜からゴルジ体へと輸送され、ゴルジ体膜上に存在する二つのプロテアーゼによって切断を受け、SREBP の一部が膜から解放される。この活性型の SREBP は核内に移行して、標的遺伝子の転写を活性化する。

この SREBP の活性化プロセスは、ステロールによって厳密に制御されている。細胞内のステロール濃度が高くなると、ステロールは SCAP と相互作用し、SCAP と Insig というタンパク質の複合体形成を誘導する。この SCAP と Insig の相互作用により、SREBP/SCAP 複合体の小胞体からゴルジ体への移行が抑制され、新たな脂肪合成が抑制される。

以前に、化合物ライブラリーのスクリーニングにより、細胞の脂肪油滴生成を阻害する小分子化合物が見出されている。この化合物(ファスタチンと名づけた)の細胞内での作用機序は不明であった。本研究で、ファスタチンが SREBP の活性化を阻害し、脂肪合成を抑制することを明らかにした。

[方法]

最初に、ファスタチンが作用する細胞内の経路を特定するために、DNA マイクロアレイにより、ファスタチン処理した細胞の遺伝子発現を解析した。続いて、細胞生物学的手法によりさらに詳細な作用機構を調べた。一方、ファスタチンに蛍光物質やビオチンを導入したファスタチン誘導体を合成した。これらの誘導体を用いて、ファスタチンが結合するタンパク質を探すことにした。さらに、ファスタチンを肥満のモデルである ob/ob マウスに投与し、その薬理学的な効果を調べた。

[結果]

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析などにより、ファスタチンは SREBP の経路に作用していることが推定された。さらにレポーターアッセイ、ウェスタンブロットなどの細胞生物学的解析を行った結果、ファスタチンは SCAP/SREBP 複合体の小胞体からゴルジ体への移行を抑制することが明らかになった。蛍光標識したファスタチン並びにビオチン化ファスタチンを用いた解析により、ファスタチンは SCAP に結合することが示唆された。このようにファスタチンはステロール同様、SCAP と結合し SCAP/SREBP 複合体のゴルジ体への移行を阻害することがわかった。しかしながら、免疫沈降法などによる解析から、ファスタチンはステロールとは異なり、SCAP/Insig 複合体形成を誘導しないことがわかった。

さらに、ファスタチンを肥満のモデルである ob/ob マウスに投与した。ob/ob マウスは食欲をコント

ロールすることができず、過剰な食事の摂取により肥満になる。ob/ob マウスの異常な体重増加は、ファスタチン処理によって抑制された。ファスタチン処理による食事の摂取量の減少や、顕著な毒性などは見られなかった。さらに、ob/ob マウスではインスリン抵抗性による高血糖や脂肪肝などが見られるが、これらもファスタチン処理により改善された。また、ファスタチンで処理したマウスの肝臓抽出物中の脂肪酸合成酵素、アセチル CoA カルボキシラーゼなどの脂肪合成に関わるタンパク質量は減少していた。つまり、ファスタチンは動物の肝臓中の SREBP の活性化を阻害し、脂肪合成を抑制していると考えられる。

[考察]

ファスタチンは細胞、動物の両方で、SREBP の活性化を抑制し、脂肪合成を抑制することが示唆された。また、ファスタチンはステロールと同様に SCAP に結合して SREBP の活性化プロセスを抑制するが、ファスタチンとステロールの作用機構は異なることが示唆された。ファスタチンの作用機構を完全に解明することにより、SCAP による新たな脂肪合成の制御機構が明らかになるかもしれない。

[結論]

ファスタチンは SREBP の活性化を阻害する最初の非ステロール合成化合物である。ファスタチンの誘導体が糖尿病や脂肪肝などの治療薬として将来利用される可能性もある。ファスタチンはメタボリックシンドロームの薬物療法のリード候補であり、ヒトを含む動物の脂質代謝の役割を理解するための道具となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

申請者は申請者のグループが過去に見出した脂肪合成の阻害活性を有する低分子化合物 *fatostatin* の標的分子と生理作用の解析を行った。本研究では *fatostatin* が脂肪の合成に関与する種々の遺伝子の発現を mRNA レベルで抑制し、それらの遺伝子がコレステロールや脂肪酸の合成を促進的に調節している転写因子 Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) の支配下にあることを見出した。これまでの報告から低コレステロール状態において SREBP は、その結合タンパクである SCAP とともに小胞体からゴルジへ移行し、そこでプロテアーゼによって切断を受けて活性型転写因子となり核移行後に標的遺伝子を活性化することがわかっている。申請者は SCAP に *fatostatin* が結合することを見出し、種々の方法でそれを証明した。さらに *fatostatin* は SCAP と結合することにより SREBP-SCAP 複合体の小胞体からゴルジへの移行過程を阻害することにより SREBP の活性化を抑制することが判明した。さらに申請者は肥満モデルマウスである ob/ob マウスに *fatostatin* を投与して個体レベルでの生理活性を解析した。その結果、*fatostatin* 投与により体重増加が抑制され、血中のコレステロールおよび血糖値が低下することが明らかになった。また組織レベルの解析では、肝臓のコレステロールおよび脂肪酸が低下し、脂肪肝が抑制されることがわかった。この結果から *fatostatin* あるいはその構造類似体が抗コレステロール薬や抗肥満薬として発展する可能性があることが示唆された。審査委員会では、申請者が未知であった *fatostatin* の標的分子と脂肪合成阻害の分子機構を明らかにしたこと、肥満モデルマウスを用い、脂肪蓄積を抑制する生理作用があることを実証し、*fatostatin* の治療薬としての可能性を示したことを評価した。

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 北川 雅敏
副査 瀬藤 光利 副査 中村 浩淑

