

博士學位論文

内容の要旨および審査結果の要旨

第 26 集
(平成22年度)

金 沢 医 科 大 学

博士學位論文

内容の要旨および審査結果の要旨

第 26 集
(平成22年度)

金 沢 医 科 大 学

は し が き

本集は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 8 条による公表を目的として、本学において博士（医学）の学位を授与した者の論文内容の要旨および審査の結果の要旨を収録したものである。

— 第26集 目 次（平成22年度） —

学位授与 番 号	氏 名	論 文 題 名	頁
甲 第387号	中 島 素 子	Dietary Glycemic Index, Glycemic Load and Blood Lipid Levels in Middle-Aged Japanese Men and Women 1
甲 第388号	町 田 雄一郎	Relationship of aquaporin 1, 3, and 5 expression in lung cancer cells to cellular differentiation, invasive growth, and metastasis potential 4
甲 第389号	羽 柴 奈穂美	Phenytoin at optimum doses ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via modulation of immunoregulatory cells 7
甲 第390号	羅 賢 雯	Different responses between diploid and tetraploid H1 embryonic stem cells appeared during long-term culturing in L15F10 medium without leukemia inhibitory factor 11
甲 第391号	曾 理	Association between human metapneumovirus seroprevalence and hypertension in elderly subjects in a long-term care facility 14
甲 第392号	張 偉	Pulmonary Vasoconstrictive and Bronchoconstrictive Responses to Anaphylaxis Are Weakened <i>via</i> β_2 -adrenoceptor Activation by Endogenous Epinephrine in Anesthetized Rats 17
甲 第393号	中 島 章 夫	IgG4関連疾患のトランスクリプトーム解析 20
甲 第394号	土 田 秀 行	mTOR阻害剤による腎細胞癌のE-カドヘリン発現誘導に関する研究 23
甲 第395号	高 原 豊	骨肉腫におけるaquaporin1, 5の発現と肺転移への関与に関する研究 26
甲 第396号	木 村 庄 吾	移植腎障害におけるcirculating fibrocyteの評価 28
甲 第397号	荘 将 也	非定型抗精神病薬risperidoneとblonanserinの急性投与による家兎海馬での興奮性シナプス伝達およびdopamine, serotonin濃度に及ぼす影響 31
甲 第398号	長 田 ひろみ	Ultraviolet B-induced expression of amphiregulin and growth differentiation factor 15 in human lens epithelial cells 34

甲 第399号	岩 男 悠	IgG4関連疾患におけるプロテオミクスの解析 36
甲 第400号	山 谷 淳 代	安静呼吸時気流阻止による慢性閉塞性肺疾患患者の末梢 気道抵抗の評価 39
甲 第401号	三 木 美由貴	全身性エリテマトーデス (SLE) における血清デオキシ リボ核酸分解酵素I (DNaseI)に関する研究 43
甲 第402号	中 谷 直 喜	ゲムシタピン感受性の分子機構におけるTP53INP1の意義 45
甲 第403号	小 泉 尚 子	塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) による家兎耳介軟骨 膜細胞の増殖・分化誘導とその臨床応用に向けた基礎的 研究 48
甲 第404号	孫 珂	Establishment and Characterization of two novel B cell lines 52
甲 第405号	渥 美 三貴子	Increased Level of LDL Cholesterol in Elderly Patients with Acute Ischemic Stroke Associated with Severe Hypertension 55
乙 第272号	廣 川 涉	Mild Metabolic Abnormalities, Abdominal Obesity and the Risk of Cardiovascular Diseases in Middle-Aged Japanese Men 58
乙 第273号	小 泉 葉 月	強迫性障害患者におけるfunctional MRIを用いた前頭葉 機能を反映する認知課題施行時の脳活動に関する研究 61
乙 第274号	釘 抜 康 明	肝線維化評価における3T-MRIによる肝ADC値の有用性に 関する研究 64

氏名（生年月日）	なかしまもとこ 中島素子 （昭和28年3月6日）
本籍	石川県
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第387号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Dietary Glycemic Index, Glycemic Load and Blood Lipid Levels in Middle-Aged Japanese Men and Women （日本人中年男女におけるグリセミックインデックスと血清脂質との関連）
論文審査委員	主査 森本茂人 副査 梶波康二 本多隆文

学位論文内容の要旨

研究目的

グリセミックインデックス(GI)は、食品を摂取した際の血糖値の上昇の程度を、ブドウ糖)を100として数値化した指標である。グリセミックロード(GL)は、GIに炭水化物摂取量を乗じたもので、ブドウ糖に換算した炭水化物の食事全体に占める摂取割合を示す指標である。食事調査により求めた各食品の摂取量とその食品のGI値から、習慣的な食事のGI、GLを算出することが可能である。近年、高GI・GL食は低HDLコレステロール血症を中心とした脂質異常症と関連することが報告されている。しかしこれらの報告の多くが欧米からのものであり、白米を主食とし食習慣が欧米と大きく異なる本邦からの報告は僅かである。そこで申請者は、日本人中年男女におけるGI、GLと血清脂質との関連を明らかにすることを目的とした。

実験方法

北陸の某製造業事業所の35歳以上の男性2,257名、女性1,598名に自記式食事歴法質問票を用いた食事調査を行い、習慣的な食事のGI、GLを計算した。男女別のGI、GL各5分位における総コレステロール(TC)、中性脂肪(TG)、HDLコレステロール(HDLc)、LDLコレステロール(LDLc)、non-HDLコレステロール(nonHDLc)の平均値を比較した。平均値の調整には、共分散分析を用いて、年齢・BMIで調整、および多変量(年齢、BMI、飲酒、喫煙、身体活動量、閉経(女性)、摂取総熱量、食物繊維摂取量、飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、n-3多価不飽和脂肪酸、n-6多価不飽和脂肪酸、食事性コレステロール)で調整した平均値を算出した。中性脂肪は幾何平均を求めた。また飲酒習慣の有無別に同様に解析した。

実験成績

対象者の平均 GI は男性 69.3, 女性 68.0 とこれまでの欧米の報告よりも高く, 特に精白米の GI への寄与が男性 61.6%, 女性 54.6%と大きかった。

男女ともにおいて, GI よりも GL の方が血清脂質との関連は強かった。GL5 分位における多変量モデルにおいて, HDLc(平均値±標準誤差) は, 男性では 61.0±0.7, 59.4±0.6, 57.8±0.6, 58.1±0.6, 56.8±0.8 (p for trend = 0.001), 女性では 70.7±1.0, 70.6±0.9, 67.0±0.8, 67.0±0.8, 64.3±1.18 (p for trend <0.001)と, 男女ともに GL が高いものほど HDL-C は有意に低値であった。さらに女性では GL5 分位における多変量調整モデルにおいて, TG で 62.5(58.9-66.4), 63.8(60.5-67.3), 66.5(63.3-69.9), 68.2(64.8-71.9), 71.3(66.6-76.2) (p for trend=0.011), LDLc で 122.3±2.0, 125.0±1.8, 126.6±1.6, 129.1±1.7, 129.0±2.2 (p for trend=0.035), nonHDLc で 136.4±2.1, 139.3±1.9, 141.6±1.8, 144.7±1.9, 145.4±2.4 (p for trend=0.010)と有意に高値であった。一方, 男性では年齢・BMI 調整モデルにおいて GL は LDLc, nonHDLc と有意な正の関連を認めた。多変量, 特に飲酒で調整するとこの有意の関連は認められず, 飲酒の影響を除外するため飲酒者と非飲酒者とに分けて検討を行ったところ, 飲酒者においては全体の結果と同様であり, 非飲酒者において GL と血清脂質の有意な関連は認められなかった。

総括および結論

日本人中年男女において, GL と HDLc は負に関連していた。また女性において, GL は TG, LDLc, nonHDLc と正に関連していた。女性において高 GL 食は, 低 HDLc, 高 LDLc, 高 nonHDLc 血症と関連することから, 動脈硬化を促進させている可能性があり, GL を考慮した食事療法は, 日本人においても脂質異常症や動脈硬化の予防に有用である可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者は, 食事を摂取した際の血糖値の上昇の指標であるグリセミックインデックス (GI), グリセミックロード (GL) に着目し, 日本人中年男女における GI, GL と血清脂質との関連を検討した。

これまで GL は HDLc と負に関連することが, 欧米を中心としたいくつかの横断研究から報告されているが, 欧米と食習慣が大きく異なるアジアからの報告は少なく, 特に本邦からの報告は女性を対象とした 1 つの報告しかない。本研究は, 欧米と異なる食習慣を有し, また男性をも含む比較的大規模な日本人集団を対象とした初めての報告として評価される。

本研究において, 日本人男女では, これまでの欧米の報告と比較し GI, GL が高値であること, また GI, GL の多くは白米に由来していることなどの日本人の食習慣の特徴が明確に示された。また, 食習慣の大きく異なる日本人においても, これまでの欧米の報告と同様に GL と HDLc が負に関連すること, すなわち白米の摂取割合が高い例ほど HDLc が低値であることが示された。日本人の食習慣の特性を明確にしつつ, 食習慣の違いによらない GL と HDLc の関連の普遍性が示された点は, 重要な知見として高く評価される。

女性において, GL は中性脂肪, LDLc, nonHDLc と有意に正相関することが示された。一

方、男性において GL と LDLc, nonHDLc との関連は、飲酒習慣により大きく影響を受け、特に飲酒者で有意に正相関することが示された。GL と LDLc, nonHDLc の関連を検討した報告は少なく、本研究の結果は重要な知見として評価されるとともに、飲酒者を多く含む男性において GL, GL と血清脂質の関連を考える上での問題点を明らかにした。

これらの本研究の成果は、我が国の脂質異常症や動脈硬化性疾患の予防・非薬物療法を考える上で重要な知見を提供すると考えられ、本論文は博士（医学）の学位に値するものと認められる。

(主論文公表誌)

Journal of Atherosclerosis and Thrombosis Vol.17, No.10, 2010

氏名（生年月日）	まち だ ゆういちろう 町 田 雄一郎 （昭和 55 年 2 月 25 日）
本 籍	長 野 県
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	甲 第 3 8 8 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	Relationship of aquaporin 1, 3, and 5 expression in lung cancer cells to cellular differentiation, invasive growth, and metastasis potential (肺癌におけるアクアポリン 1, 3, 5 の発現。アクアポリンと分化・浸潤・転移との関係)
論 文 審 査 委 員	主 査 野 島 孝 之 副 査 榎 博 久 田 中 恵 子

学位論文内容の要旨

研究目的

アクアポリン aquaporin (AQPs) は、細胞膜を介した水輸送を担うチャネル分子（約 30kDa）で、現在まで哺乳類において 13 種の分子種の存在が知られている。アクアポリンは、尿濃縮力、外分泌液の分泌、脂質代謝、脳浮腫形成などに関与し、水輸送機能を有する。肺組織では AQP1, 3, 4, 5 の 4 種の発現が報告されている。水分吸収は末梢肺で、分泌は気道の粘膜下気管支腺で行われ、肺における水の動きは生命活動に必要不可欠である。近年、AQPs は水輸送に加え、細胞増殖や移動など新たな機能を有することが明らかになり、腫瘍発生や進展に重要な役割を果たしている可能性が推定されている。多くの癌組織に AQPs の過剰発現が報告されてきているが、腫瘍発生や浸潤・転移過程における詳細な役割は未だ不明である。今回、申請者は正常肺組織および肺癌における AQP1, 3, 5 の蛋白及び mRNA レベルの発現を解析し、肺癌発生と進展における AQPs の役割と臨床的意義に注目した。

実験方法

2001 年～2008 年間に金沢医科大学呼吸器外科で切除された種々の組織亜型を含む肺癌 160 症例（ホルマリン固定 115 例と凍結検体 45 例）を対象とした。検体の詳細は、125 例の腺癌（ホルマリン固定 98 例と凍結検体 27 例）、18 例の扁平上皮癌（ホルマリン固定 8 例と凍結検体 10 例）、5 例の大細胞癌（ホルマリン固定 1 例と凍結検体 4 例）、12 例の小細胞癌（ホルマリン固定 8 例、凍結検体 4 例）であった。患者の平均年齢は 65 歳（31～81 歳）で、男女比は 93 例:67 例で、喫煙歴は全体の 41.7%でみられた。臨床病期の Stage

I は 114 例, Stage II は 15 例, Stage III は 28 例, Stage IV は 3 例であった。手術後の追跡調査期間は平均 32 ヶ月 (5 ヶ月~92 ヶ月) であった。免疫組織学的に, 抗 AQP1, 5 抗体はホルマリン固定検体で, また, 抗 AQP3 抗体は凍結検体を用いた。また, 凍結検体で, laser-captured microdissection (LCMD)/Real time RT-PCR 法による AQP1, 3, 5 遺伝子の mRNA 量を定量するとともに, Western blot 法による AQP1 蛋白発現の解析を行った。

実験成績

正常肺組織において, AQP1 は血管内皮細胞, II 型肺胞上皮細胞の先端, 気管支・細気管支上皮細胞の先端, 気管支腺周囲の筋上皮細胞に, AQP3 は II 型肺胞上皮細胞の先端と気管支・細気管支上皮の側底及び基底膜に, AQP5 は I 型肺胞上皮細胞と気管支・細気管支上皮細胞と気管支粘液腺の先端に局在する発現が観察された。肺癌細胞では, AQP1, 3, 5 の陽性率はそれぞれ 71%, 44%, 56%であった。陽性率は高分化型腺癌で高く, 低分化型腺癌や未分化癌で低く, 扁平上皮癌はほとんど陰性であった。腺癌において, 非粘液性肺胞上皮癌では, AQP1, 3 は II 型肺胞上皮細胞と同様な発現局在を示す一方, AQP5 は外側基底部に限局する特異な発現パターンが観察された。また, 癌浸潤部では非浸潤部に比べて, AQP1, 5 は極性の喪失と細胞質内発現を伴う過剰発現が認められた。特に, AQP1 は線維芽細胞反応を伴う癌浸潤部と複雑な乳頭状構造をとり, 肺胞腔内増殖する癌細胞に過剰発現を示した。更に, 浸潤先端部の lamellipodia に一致した AQP1 の発現が観察された。一方, AQP3 は浸潤部で発現が低下する傾向がみられた。浸潤性肺癌組織ならびに癌細胞における AQP1, 5 の過剰発現は, Western blot ならびに LCMD/Real time RT-PCR による解析でも確認された。AQP1 の過剰発現は, 肺癌, 特に腺癌の術後再発率と有意な相関を認めるとともに, 肺癌術後の無症候性生存期間の短縮の関連性もみられた ($p=0.031$)。小乳頭状 (micropapillary) 成分を伴う腺癌では, AQP1 の過剰発現は明らかな予後不良因子であった。

総括および結論

肺癌における AQP1, 3, 5 の発現を観察した。肺胞上皮癌では細胞の分化に関連していると思われる局在性発現を認め, また, 浸潤性癌細胞では極性を喪失した過剰発現パターンが観察された。浸潤部での AQP1, 5 の発現は高度で, 特に, AQP1 の過剰発現は肺腺癌の細胞移動活性を引き起こし, 高い浸潤・転移能に関連している可能性が示唆された。AQP1, 5 の発現の解析は肺癌の浸潤・転移能の推定に寄与するとともに, 肺癌治療の新たな標的分子になる可能性が考えられる。

論文審査結果の要旨

本論文は, 肺組織で発現が報告されている 4 種の AQPs のうち, AQP1, 3, 5 の 3 種において, 正常肺組織及び肺癌で AQP の蛋白及び mRNA の発現を観察し, 肺癌発生と進展における AQPs の役割と臨床的意義について解析した報告である。

申請者は, 免疫組織学的に, 正常肺組織における AQP1, 3, 5 の発現局在部位を明らかにした。肺癌の AQP1, 3, 5 の陽性率はそれぞれ 71%, 44%, 56%であった。各組織亜型に

おける陽性率は、高分化型腺癌で高く、低分化型腺癌や未分化癌で低く、扁平上皮癌ではほとんど陰性であった。非粘液性肺胞上皮癌では AQP5 が腫瘍細胞の外側基底部に限局する特異な発現パターンを示すことを明らかにした。また、癌浸潤部では非浸潤部に比べて、AQP1, 5 は極性の喪失と細胞質内の過剰発現が認められた。一方、AQP3 は浸潤性肺癌部で発現が低下する傾向がみられた。Western blot 及び LCMD/Real time RT-PCR による解析でも AQP1, 5 の過剰発現を確認した。AQP1 の過剰発現は、肺癌、特に腺癌の術後再発率及び術後無症候性生存期間の短縮と有意な関連性が認められた。本研究により、AQP1, 5 の発現の解析は肺癌の浸潤・転移能の推定に寄与するとともに、今後の肺癌治療の新たな標的分子になる可能性が示唆された。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

Human Pathology Vol.42, No.5, 2011

氏名（生年月日）	は ^{しば} ^{な お み} 羽 柴 奈穂美 （昭和 56 年 2 月 22 日）
本 籍	石 川 県
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	甲 第 3 8 9 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	Phenytoin at optimum doses ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via modulation of immunoregulatory cells (フェニトインの至適用量は、免疫調節細胞の修飾により実験的自己免疫性脳脊髄炎を軽症化する。)
論 文 審 査 委 員	主 査 梅 原 久 範 副 査 中 村 晃 川 崎 康 弘

学位論文内容の要旨

研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis: 以下MS)は中枢神経系の慢性炎症性脱髄疾患で、髄鞘構成成分に対する自己免疫機序の関与が推定されている。標的となる中枢神経系の自己抗原としては、ミエリン塩基性蛋白、プロテオリピッド蛋白、ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein: 以下MOG)などがあり、MS動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis: 以下EAE)の感作抗原として使用される。MSやEAEの発症には、インターフェロン(IFN)- γ を産生するTh1細胞やインターロイキン(IL)-17を産生するTh17細胞が関与しており、発症を抑制するリンパ球として、CD4⁺ CD25⁺ 制御性T細胞(Treg)の存在が注目されている。近年、Tregのマスター遺伝子としてのFoxp3の位置づけが確立し、またIL-7受容体の α 鎖であるCD127がdownregulationを受けているという特徴が明らかにされた。

MSは脱髄疾患であるが、機能的予後を決定する因子として、不可逆性の変化をもたらす軸索障害の重要性が指摘されている。MS急性増悪期の障害を軽度にとどめるためには、軸索障害の予防という治療手段が有望である。軸索障害の起こる機序としては、脱髄を引き起こした炎症により、軸索細胞膜上のNa⁺/K⁺ ATPase活性が障害され、Na⁺が細胞内に流入した結果、Na⁺/Ca²⁺チャネルが作動し、Ca²⁺の恒常的な細胞内流入が生じて軸索内Ca²⁺濃度が上昇することが原因であるという仮説が提唱されている。実際に、EAEマウスにNaチャンネル阻害薬であるフェニトイン(phenytoin: 以下PHT)を経口投与すると、急性期の麻痺スコアが軽減することが確かめられている。

本研究では、MSへの臨床応用を踏まえ、PHTの至適用量や投与ルートを検討するととも

に、EAEの軽症化には軸索保護以外にどのような要因が関与するのかを追究するために、免疫学的な側面に焦点を当てて以下の実験を行った。

実験方法

C57Bl/6Jマウス7週齢の雌に対して、MOG35-55ペプチドをComplete Freund's Adjuvantと共にマウス腰背部に4ヶ所皮下注射して免疫し、さらに百日咳死菌を当日と2日後に腹腔内投与して臨床スコアの経過を記録した。PHTはEAE作製後、発症が始まるDay12から週に3回、Day 31まで計9回投与を行った。PHT 0.25mg, 0.5mg, 1mgについて、各々5匹のマウスに対して腹腔内投与および経口投与を行い、対照群は同量の蒸留水を用いた。前半の実験では、PHTの至適投与量と投与ルートを検討した。後半の実験では、前半の実験で最も効率的にEAEが抑制された1mgの腹腔内投与と0.5mgの経口投与の2つの治療法における免疫学的な変化を末梢血および脾細胞を対象に、Day 0, 6, 15, 23, 47においてフローサイトメトリーで解析した。その際、CD4細胞、CD8細胞、NK細胞、B細胞、さらにCD4⁺CD25⁺、CD4⁺Foxp3⁺、CD4⁺CD25⁺CD127⁻等のTregを多く含む分画を検索対象とした。さらに、PHT1mg腹腔内投与および0.5mg経口投与と対照群において、Day16およびDay23でマウスの病理解剖を行い、腰髄膨大部のH. E. 染色を行い細胞浸潤の程度を評価した。

実験成績

腹腔内投与の実験ではPHT1mgで、経口投与の実験では0.5mgで、投与2回後のDay15から著明に臨床スコアが抑制された。また、EAE発症早期の急性期であるDay16および極期のDay23の腰髄膨大部切片のH. E. 染色では、臨床スコアが高い(麻痺が強い)程、髄膜直下の実質に細胞浸潤が強いことが確認された。

免疫学的データでは、PTH腹腔内投与群のDay15では対照群と比較し、末梢血でCD8⁺細胞が上昇していた。治療中止後2週間以上経過したDay47では、脾臓でCD4⁺ヘルパーT細胞とB細胞が上昇していた。一方、経口投与群のDay15における末梢血では、むしろCD8⁺細胞が低下していたが、Day23においてCD4⁺細胞は低下しCD8⁺細胞は上昇傾向にあった。Tregに関しては、PHT腹腔内投与群ではDay15の末梢血でCD4⁺CD25⁺CD127⁻Tregが上昇し、CD4⁺CD25⁺CD127⁺細胞が低下していた。一方、PHT経口投与群では、Day15の脾臓でCD4⁺CD25⁺CD127⁻Tregが上昇していた。さらに、PHT経口投与群では、Day15の末梢血でCD4⁺CD25⁺TregおよびCD4⁺Foxp3⁺Tregの上昇を認め、治療中止後のDay47の末梢血では、CD4⁺CD25⁺CD127⁺細胞の上昇を認めた。

なお、詳細な臨床スコアの追跡調査の結果、PHT0.5mg経口投与よりも1mg腹腔内投与の方が、効果の発現も早く、また投与中止後の麻痺の増悪の程度も軽度であることが確認された。

総括および結論

EAE発症後の急性期にPHTを週3回1mg腹腔内投与または0.5mg経口投与することで、臨床スコアは著明な改善を示した。組織学的検討により、Day15での症状軽減は脊髄実質への炎症細胞浸潤が抑制されたことが重要な要因の一つであることが確認された。麻痺症状の発現初期であるDay15には、PHT治療群において、様々な抗体の組み合わせで同定される

Tregの上昇が見られたことから、TregによるEAE抑制効果発現が示唆された。さらに、CD8細胞も免疫制御の機能を担った分画を含んでいることが知られており、PHT腹腔内投与では早期に末梢血のCD8細胞が増加し、経口投与ではその上昇が遅れて出現していたことを併せ考えると、二者の投与経路の効果の相違に関与している可能性がある。これらの結果から、PHTは既に判明している軸索保護作用によりEAEを軽減するのみならず、TregやCD8などの免疫調節細胞を誘導して自己免疫応答を抑制した可能性が指摘できる。実際、電位依存性Naチャンネル(VGSC)は、神経軸索以外にもT細胞上にも発現していることから、PHTは障害された軸索表面のVGSCの発現調節をするのみならず、免疫細胞上のVGSCの修飾を介して末梢および中枢神経の免疫動態に影響を与えている可能性が考えられた。

従来報告されているPHTの連日投与による治療法では、投与中止後にマウスが死亡しているが、われわれの採用した週3回の投与方法では、徐々に臨床スコアが上昇するものの死亡することはなく、より安全な投与方法であると考えられた。再増悪の要因としては、PHT腹腔内投与中止後、脾臓のCD4⁺ヘルパーT細胞とB細胞の上昇が認められたこと、また、PHT経口投与中止後、炎症性細胞を含んでいる可能性があるCD4⁺CD25⁺CD127⁺細胞が末梢血中に増加したことから、一度抑制された免疫応答が再活性化した可能性が挙げられる。

最後に、MS急性増悪期患者へのPHT治療の応用の可能性については、0.25mgや0.5mgの経口投与でもEAEの改善が見られ、これは体重換算で12.5-25 mg/kgの用量であることから、今後さらに詳細に投与方法を検討することにより十分に臨床応用可能な範囲であることが判明した。

論文審査結果の要旨

本研究は、神経疾患難病である多発性硬化症(multiple sclerosis: 以下MS)の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis: 以下EAE)の実験法の確立と、同実験法を用いたNaチャンネル阻害薬であるフェニトインのMS発症抑制効果を検証したものである。さらに、MS発症機序とフェニトインの抑制効果をT細胞レポーターの一面より解析行ったものである。

申請者らは、C57Bl/6Jマウス7週齢の雌にMOG35-55ペプチドとadjuvantの投与し、百日咳死菌によるブースターにより効率よくMSを発症させている。さらに、従来の餌に沁みこませた薬剤投与方法ではなく、ゾンデによる経口投与方法と腹腔内投与という確実な手法によりフェニトインの投与を行い、MS発症の有意な抑制効果を実証している。これは、従来の実験手法に留まらず、より確実な実験法を確立したという点で評価される。さらに、この手技を用いて、Naチャンネル阻害薬であるフェニトインのMS発症阻止効果を検討した。経口投与方法および腹腔内投与された至適量のフェニトインは、有意にMSの発症を阻止し得た。フェニトインはNaチャンネルを阻害することによって細胞内カルシウムの上昇を抑え、神経軸索の傷害を阻止しうることが既に報告されているが、筆者らは、フェニトインが免疫細胞の制御を介して作用しているのではという仮説に基づき、投与前後における、制御性T細胞の変動をフローサチトメーターを用いた多重染色法により詳細に検討した。その結果、発病極期である投与後15日目で、非投与群に比べフェニト

イン投与群では、有意に制御性T細胞の割合が増加していることを示した。同時に、脊髄病変へのリンパ球浸潤が、フェニトイン投与により減少していることを示した。この結果より、末梢血中で増加した制御性T細胞が、自己免疫疾患誘発の原因である自己反応性T細胞の出現を抑制し、MS発症を阻止したものと推測される。

本研究は、多発性硬化症の解析モデルであるEAEの実験法を改善し、病因解析に寄与した。さらに、臨床的に使用されているフェニトインがその発症を阻止しうる可能性を示した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

Journal of Neuroimmunology Vol.233, No.1-2, 2011

氏名 (生年月日)	ルオ 羅	シエン 賢	ウエン 雯	(1975年10月26日)
本籍	中華人民共和国			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	甲第390号			
学位授与の日付	平成23年3月24日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
学位論文題目	Different responses between diploid and tetraploid H1 embryonic stem cells appeared during long-term culturing in L15F10 medium without leukemia inhibitory factor (白血病抑制因子不含 L15F10 培地中での長期培養中に現れた 2 倍体及び 4 倍体 H1 胚性幹細胞間の異なる応答)			
論文審査委員	主査	八田 稔 久		
	副査	牧野田 知 東海林 博 樹		

学位論文内容の要旨

研究目的

白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)は、胚性幹細胞(ES細胞)の培養に際して、多能性を維持するために用いられている。LIFを除去すると2倍体ES細胞は不可逆的に分化してゆくと言われている。染色体の重複がある多倍体細胞は2倍体細胞とは形質を異にしており、多倍体ES細胞でも2倍体と同様なLIF除去による不可逆的な分化が起こるか否かはこれまで不明であった。また、多倍体細胞のDNA含量はLIF含有培地中での長期細胞培養において変動しない場合もあるが、漸減したり、倍数単位で突然減少したりする場合もあり、多倍体細胞のDNA量減衰機構は今なお不明なままである。またLIF不含培地中での多倍体ES細胞のDNA含量の変動に関する応答はこれまで報告されていない。本研究は2倍体と4倍体ES細胞間の分化過程に関する相違を明らかにする目的で、マウスES細胞株(H-1細胞)から誘導した2倍体および4倍体H-1細胞(2H1及び4H1細胞とする)をLIF不含培地中で長期間培養し、その応答相違性を詳細に検討した。

実験方法

LIF不含L15F10培地(Leibovitz's L15:Ham's F10=7:3の混合培地で10%牛胎児血清含有)に適応した2H1及び4H1細胞を得るために、LIF濃度を漸減させながら2H1及び4H1細胞を数世代継代した。すなわち、細胞をLIF不含L15F10培地へ適応させるためにLIF濃度(U/ml)を500, 100, 20, 0と漸減させた培地中で各3日間培養を行った。さらに、LIF不含L15F10培地に適応した2H1細胞(2H1⁽⁻⁾)及び4H1細胞(4H1⁽⁻⁾)をLIF不含培

地中で約5ヶ月間培養した後、以下の項目について検討を行った。①細胞内DNA量：フローサイトメトリーにより得られるDNAヒストグラムのピーク位置から推定。②細胞周期各期の時間：自作開発した細胞周期解析ソフトウェアを用いて対数スケールDNAヒストグラムを解析することでG₁期、S期、G₂/M期の割合を求め、細胞集団倍加時間を細胞周期時間と見なして算出。③細胞体積分布：コールターカウンターにより測定。④染色体数分布：ギムザ染色された染色体分散像顕微鏡写真から計数。⑤細胞形態：位相差顕微鏡による観察。⑥アルカリファスファターゼ活性の測定。⑦奇形腫瘍形成能：ES細胞のマウス腹腔内注入後の固形腫瘍形成能の確認。また⑧固形腫瘍のDNAヒストグラム解析及び⑨組織観察も併せて行った。

実験成績

LIF含有培地からLIF不含培地への急激な変更では、ほとんど全ての細胞が細胞死を起こした。適応過程における細胞体積及び染色体数における変化は観測されなかった。2H1⁽⁻⁾細胞の比較的安定なDNA含量とは対照的に、4H1⁽⁻⁾細胞のDNA含量は培養初期段階から徐々に減少し、第2段階で突然上昇した後、そのDNA含量を保持した。これは多倍体細胞ではDNA量の漸減と単倍体単位でのDNA量変化が起こることがあることを示唆している。DNA含量の安定期にある4H1⁽⁻⁾細胞の染色体数は2H1⁽⁻⁾細胞の約2倍を示した。また4H1⁽⁻⁾細胞の細胞体積は2H1⁽⁻⁾細胞のおよそ2倍であった。4H1⁽⁻⁾細胞は2H1細胞と比べて長い倍加時間と等価な位相割合を示し、また、2H1⁽⁻⁾及び4H1⁽⁻⁾細胞のG₁期の割合は2H1細胞と比べて増加した。これはLIF不含培地中では、細胞周期のG₁期停止からの細胞死がある割合で起こっていることを示唆している。2H1⁽⁻⁾細胞は数種の細胞からなる細胞集団を示し、アルカリフォスファターゼ活性を喪失し、マウス腹腔中に奇形腫瘍を形成しなかった。これは2H1⁽⁻⁾細胞が数種の細胞に分化していることを示している。対照的に、4H1⁽⁻⁾細胞は細胞形態を保持し、アルカリフォスファターゼ活性を示した。これは4H1⁽⁻⁾細胞はLIF不含培地でも分化しないことを意味している。4H1⁽⁻⁾細胞は、マウス腹腔中に奇形腫瘍を形成したことから、4H1⁽⁻⁾細胞は*in vitro*では分化しないが、腹腔中では分化が進行したことを示している。

総括および結論

本研究では、LIF不含培地中での長期培養下では、2H1⁽⁻⁾細胞は分化するが、4H1⁽⁻⁾細胞では多分化能が保持されることが示された。LIF不含培地中で長期*in vitro*培養された4H1⁽⁻⁾細胞は奇形腫瘍形成能を有し、多分化能を維持することが示された。同一の染色体が重複する多倍体細胞の細胞形質は2倍体細胞とは異なる場合がある。培養初期において2H1細胞は球状細胞塊の増殖形態を示し、4H1細胞は敷石状細胞集団の増殖形態を示したことから、4倍体細胞と2倍体では遺伝子発現バランスが異なる可能性が示唆された。

本研究では長期培養における4H1⁽⁻⁾細胞のDNA量漸減と急速な上昇が認められた。多倍体細胞におけるDNA含量の減衰を説明するDNAフラクタル構造仮説を用いれば、4H1⁽⁻⁾細胞における単倍体単位の遷移は過剰染色体による相同染色体の非対称配置化を引き起こし、DNA安定異数倍数体になったと説明できる。

論文審査結果の要旨

本研究は、2 倍体および 4 倍体胚性幹細胞 (ES 細胞) を白血病抑制因子 (Leukemia inhibitory factor, LIF) 不含培地で長期間培養し、それらの応答の相違性を詳細に検証したものである。

申請者らは、マウス ES 細胞株 (H-1 細胞) から誘導した 2 倍体及び 4 倍体 H1 (ES) 細胞 (以下それぞれ 2H1 及び 4H1 細胞とする) を、LIF 濃度を減少させながら数世代継代し、LIF 不含 L15F10 培地に適応した 2H1 細胞 (2H1⁽⁻⁾) 及び 4H1 細胞 (4H1⁽⁻⁾) を確立し、実験に供した。LIF 不含培地への適応過程における細胞体積及び染色体数における変化は観測されなかった。2H1⁽⁻⁾細胞の比較的安定な DNA 含量とは対照的に、4H1⁽⁻⁾細胞の DNA 含量は培養初期段階から徐々に減少し、第 2 段階で突然上昇した後、その DNA 含量を保持したことから、多倍体細胞では DNA 量の漸減と単倍体単位での DNA 量変化が起こりうることを示唆している。DNA 含量の安定期にある 4H1⁽⁻⁾細胞の染色体数は 2H1⁽⁻⁾細胞の約 2 倍を示した。また 4H1⁽⁻⁾細胞の細胞体積は 2H1⁽⁻⁾細胞のおよそ 2 倍であり、4H1⁽⁻⁾細胞は 2H1 細胞と比べて長い倍加時間と等価な位相割合を示した。2H1⁽⁻⁾及び 4H1⁽⁻⁾細胞の G₁ 期の割合は 2H1 細胞と比べて増加した。これは LIF 不含培地中では細胞周期の G₁ 期停止からの細胞死がある割合で起こっていることを示唆している。2H1⁽⁻⁾細胞はヘテロな細胞により構成され、アルカリフォスファターゼ活性を喪失し、マウス腹腔中に奇形腫を形成しなかったことから、2H1⁽⁻⁾細胞が数種の細胞に分化していることが示唆された。対照的に、4H1⁽⁻⁾細胞はアルカリフォスファターゼ活性を示し、マウス腹腔中に奇形腫瘍を形成したことより、4H1⁽⁻⁾細胞は LIF 不含培地で多分化能を維持することが明らかになった。

本研究により、LIF 不含培地での長期培養では、2 倍体細胞と 4 倍体細胞で反応応答性が異なる事が明らかになった。本研究の成果は、肝臓や胎盤などに生理的に存在する多倍体細胞の性質を理解する一助となり、当該分野の研究の発展に貢献するものと期待される。

以上により、本論文は博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

Human Cell Vol. 23, No. 4, 2010

氏名（生年月日）	曾 ^{ツェン} 理 ^{リー} （1979年6月9日）
本籍	中華人民共和国
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第391号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Association between human metapneumovirus seroprevalence and hypertension in elderly subjects in a long-term care facility （長期療養型施設入所高齢者における抗ヒトメタニューモウイルス抗体保有率と高血圧の関連に関する研究）
論文審査委員	主査 中川秀昭 副査 竹上勉 梶波康二

学位論文内容の要旨

研究目的

近年、数々の病原体による感染症と高血圧との関係が報告されている。ヒトメタニューモウイルスは2001年に小児の一般感冒の原因ウイルスとして発見され、申請者の研究グループは2005年、長期療養型施設における高齢者の集団感染を報告している。その後、世界各地の高齢者施設にけるこのウイルスの集団感染が報告されている。しかし、ヒトメタニューモウイルス感染と高齢者高血圧との関係についてはいまだ報告されていない。そこで申請者は長期療養型施設入所中の高齢者において血清抗ヒトメタニューモウイルス免疫グロブリンG抗体価と高血圧の関係を検討した。

実験方法

対象は、65歳以上の高齢者高血圧例84例（男性38例、女性46例、平均年齢±標準偏差：79.9±8.4歳）、および年齢（±2歳以内）、性を一致させた正常血圧対照例84例（平均年齢80.1±8.3歳）である。血清抗ヒトメタニューモウイルス免疫グロブリンG抗体価は免疫蛍光法により測定した。まず、高血圧群および対照群間の独立有意関与因子は多重ロジスティック回帰分析により求めた。次いで、血清抗ヒトメタニューモウイルス免疫グロブリンG抗体価に対する独立有意関与因子はステップワイズ重回帰分析により求めた。

実験成績

血清抗ヒトメタニューモウイルス免疫グロブリンG抗体価はすべての対象例で陽性（10倍以上希釈）で40倍～5120倍希釈陽性の抗体価を示した。年齢および性は、Log₂（血清

抗ヒトメタニューモウイルス免疫グロブリン G 抗体価/10) 値に対し有意関与因子とはならなかった。正常血圧対照群に比し、高齢者高血圧群では Log_2 (血清抗ヒトメタニューモウイルス免疫グロブリン G 抗体価/10) 値は有意 ($p < 0.001$) の高値を示した。交絡因子補正後の正常血圧対照例群に比した高齢者高血圧例群における Log_2 (血清抗ヒトメタニューモウイルス免疫グロブリン G 抗体価/10) 値の odds 比は 1.42 (95%信頼区間 1.16-1.75, $p = 0.001$) であった。ステップワイズ重回帰分析による Log_2 (血清抗ヒトメタニューモウイルス免疫グロブリン G 抗体価/10) 値への有意関与因子は高血圧および低栄養状態 (血清アルブミン値 $< 3.0 \text{ g/dl}$) であった。

総括および結論

低栄養状態がウイルス感染に対する危険因子であることはすでに報告されているが、本研究で高血圧が血清抗ヒトメタニューモウイルス IgG 抗体価高値に対し独立有意関与因子となることを新たに見出した。この機序の詳細は不明である。考えられる第一の機序として、高血圧自体が血清抗ヒトメタニューモウイルス免疫グロブリン G 抗体価高値に関与している可能性があげられる。正常血圧例に比べ、高血圧例では血清免疫グロブリン G 値は高値を示すことが知られている。また悪性高血圧例では血清免疫グロブリン G 値が上昇していることが知られている。一方、ヒトメタニューモウイルスに対する抗体価はほぼ 10 歳で全員陽性となり、生涯を通じてこのウイルスに繰り返し感染することが知られている。ヒトメタニューモウイルスを含む各種病原体による感染前後の抗体価の変動を、正常血圧群と高血圧群間で比較した報告はないものの、繰り返すヒトメタニューモウイルス感染に対し、高血圧例ではこのウイルスに対する抗体価が上昇している可能性がある。第二の機序として、繰り返す感染症が高血圧の原因となっている可能性がある。クラミジア、単純ヘルペスウイルス 2 型、サイトメガロウイルス、コクサッキーウイルス、ヘリコバクタ・ピロリによる感染と高血圧の関連が報告されており、これらの病原体は動脈平滑筋細胞あるいは動脈内皮細胞に直接感染することが知られ、また動脈硬化症の原因となることが報告されている。一方、ヒトメタニューモウイルスが動脈平滑筋細胞あるいは動脈内皮細胞に直接感染するとの報告はない。今回見出された、高齢者高血圧例での血清抗ヒトメタニューモウイルス免疫グロブリン G 抗体価高値の詳細機序につき、今後解明が求められる。

論文審査結果の要旨

ヒトメタニューモウイルスは、2001 年に小児の一般感冒の原因ウイルスとして発見され、近年、長期療養型高齢者施設での重篤な呼吸器集団感染症の起炎ウイルスとしても知られるようになり、高齢者施設での集団感冒の 12% が本ウイルスに起因すると報告されている。また、ヒトメタニューモウイルス感染によりほぼ 10 歳で全例抗体価陽性となるが、本ウイルスに対して終生免疫を得ることは無く、小児から高齢者に至るまで繰り返し感染することが知られている。一方、種々の感染症と高血圧の関連も報告されている。

申請者は長期療養型高齢者施設において、高血圧例 84 例とコントロールとして同じ病棟から、性、年齢を一致させた正常血圧例 84 例を無作為に選び、抗メタニューモウイルス IgG 抗体価を比較した。抗ヒトメタニューモウイルス IgG 抗体価は蛍光抗体法にて測定

し、感度、再現性ともに問題なく、また全例が 40 倍～5,120 倍までの陽性値を示していた。また、臨床背景の検討から正常血圧群に比し高血圧群では脳卒中既往、慢性腎臓病の割合が多い傾向を示したが、他の臨床背景に有意差は認められなかった。本研究で正常血圧群に比し高血圧群では抗ヒトメタニューモウイルス IgG 抗体価が有意に高値を示し、多重ロジスティック回帰分析により年齢、性、脳卒中既往、慢性腎臓病などのを交絡因子を調整しても抗ヒトメタニューモウイルス IgG 抗体価高値は高血圧に対し独立有意関与性を有することを明らかにした。高血圧例に対する降圧薬投与についても調査しており、高血圧群における抗ヒトメタニューモウイルス IgG 抗体価高値に降圧薬の影響は少ないことも明らかにしている。また、全例におけるステップワイズ重回帰分析により抗ヒトメタニューモウイルス IgG 抗体価に対し独立有意に関与する臨床因子は高血圧および低アルブミン血症 (<3.0 g/dl) に定義づけられる低栄養であることも明らかにしている。

本研究は申請者が高齢者高血圧と抗ヒトメタニューモウイルス IgG 抗体価高値との関連を初めて明らかにした意義ある研究である。しかし、横断研究であるのでその関連の詳細な機序は不明である。本研究が見出した結果を基盤に、経時的な抗体価測定、高齢者における低栄養状態が本ウイルス感染を介した高血圧および動脈硬化性疾患への関与の可能性など、さらなる研究の展開が期待される。

以上より、本研究の成果は、高齢者における感染症と循環器疾患の予防・治療に重要な知見を提供すると考えられ、本論文は博士（医学）の学位に値するものと認められる。

(主論文公表誌)

Hypertension Research Vol.34, No.4, 2011

氏名 (生年月日)	チャン 張	ウエイ 偉	(1972年2月28日)
本籍	中華人民共和国		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	甲第392号		
学位授与の日付	平成23年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Pulmonary Vasoconstrictive and Bronchoconstrictive Responses to Anaphylaxis Are Weakened <i>via</i> β_2 -adrenoceptor Activation by Endogenous Epinephrine in Anesthetized Rats (麻酔下ラットのアナフィラキシーに対する肺血管収縮と気管支収縮の反応は内因性エピネフリンによる β_2 -アドレナリン受容体の活性化を介して減弱している)		
論文審査委員	主査	土田英昭	
	副査	佐久間 勉 加藤伸郎	

学位論文内容の要旨

研究目的

β アドレナリン受容体 (β -AR) 拮抗薬を服用している患者がアナフィラキシーショックに罹患すると重篤化することは、临床上重要な問題である。しかし、 β_1 -AR と β_2 -AR のいずれがこの反応に関与するかは不明であった。申請者は、無麻酔ラットのアナフィラキシー低血圧で、 β_1 -AR 阻害時より β_2 -AR 阻害時の方が生存率を低下させることを報告した (*Eur J Pharmacol* 2011;650:303-308)。しかし、その機序は不明であった。

イヌなどの実験動物では、アナフィラキシーショック時に気道収縮ならびに肺血管収縮による顕著な肺動脈圧上昇が生じる。また、 β_2 -AR の活性化が肺動脈と気管支の平滑筋を弛緩させることも知られており、 β_2 -AR 遮断はラット肺のアナフィラキシー反応を増悪させる可能性がある。しかしながら、ラットのアナフィラキシー低血圧における肺動脈圧あるいは気道内圧の変動に関する報告はない。申請者らはこれまで、肝臓血管の収縮による門脈圧上昇も血圧低下に関与していることを報告してきた。そこで本研究では、ラットのアナフィラキシー低血圧モデルで肺循環と気道内圧、門脈圧の変化に注目し、 β -AR 拮抗薬の前投与、あるいは副腎摘除のもとに肺動脈圧、肺血管抵抗、気道内圧を体循環諸量とともに測定し、 β -AR の阻害によるアナフィラキシー重症化の機序を検討した。

実験方法

SD ラットに卵白アルブミン 1.0 mg を皮下投与して感作し、2 週後にペントバルビター

ル麻酔人工呼吸下に実験を行った。開胸して体血圧 (Psa), 中心静脈圧 (Pcv), 左房圧 (P1a) を測定し, さらに右室より肺動脈内にカテーテルを挿入して肺動脈圧 (Ppa) も測定した。上行大動脈には超音波血流計のプローブを装着して大動脈血流量 (CO) を測定し, 肺血管抵抗 [$R_p = (P_{pa} - P_{1a}) / CO$] と総末梢血管抵抗 [$R_t = (P_{sa} - P_{cv}) / CO$] を算出した。気道内圧は人工呼吸回路の吸気ラインに装着した T チューブを介して測定した。開腹後に門脈圧も測定した。

実験は選択的 β_1 -AR 拮抗薬 (atenolol : 2 mg/kg) 群, 選択的 β_2 -AR 拮抗薬 (ICI 118, 551 : 0.5 mg/kg) 群, 非選択的 β -AR 拮抗薬 (propranolol : 1 mg/kg) 群, 副腎摘除群, 感作対照群, 非感作対照群の 6 群 (各 7 匹) で行った。アナフィラキシー低血圧は抗原 0.6 mg を静脈内に投与して惹起した。なお, β -AR 拮抗薬は抗原投与の 10 分前に静脈内投与し, 副腎摘除は 30 分前に行った。また, 別の感作ラット 15 匹を選択的 β_2 -AR 拮抗薬 (ICI 118, 551), 副腎摘除, 感作対照の 3 群 (各 5 匹) に分け, 同様の麻酔開胸下で抗原投与前と投与後 2.5 分に静脈血を採血し, 血中アドレナリン値とノルアドレナリン値を測定した。

実験成績

感作対照群では抗原投与によって Ppa は増加しないだけでなく, Psa と CO とが低下するにつれて Ppa は投与前値よりも有意に低下した。 β_1 -AR 拮抗薬群でも同様の反応が見られた。一方, 非選択的 β -AR 拮抗薬群, β_2 -AR 拮抗薬群, 副腎摘除群では Ppa が 7.5 mmHg 上昇した。肺血管抵抗は抗原投与後早期に非選択的 β -AR 拮抗薬群, β_2 -AR 拮抗薬群, 副腎摘除群で 5 倍に増加した。なお, Psa はいずれの群でも 40~50 mmHg に低下した。感作されたラットでは抗原投与後 1 分に Rt が一過性に低下し, その後, 心拍出量の低下にしたがって軽度増加した。一方, 門脈圧は抗原感作したすべての群で同様に 16 mmHg 上昇し, 各群間に有意差は見られなかった。気道内圧は Ppa と同様の変化を示し, 感作対照群と β_1 -AR 拮抗薬群では抗原を投与しても有意な変化は見られなかったが, 非選択的 β -AR 拮抗薬群, β_2 -AR 拮抗薬群, 副腎摘除群では有意に 14 cmH₂O 増加した。抗原投与後 60 分まで感作対照群は全例, β_1 -AR 拮抗薬群では 2 例が生存していたが, 非選択的 β -AR 拮抗薬群, β_2 -AR 拮抗薬群, 副腎摘除群では 50 分以内に全例が死亡した。

感作対照群と β_2 -AR 拮抗薬群とでは, 血中アドレナリン値が抗原投与後に投与前の 14 倍まで増加したが, 副腎摘除群では両者とも検出限界以下だった。

総括および結論

本研究ではラットアナフィラキシー低血圧モデルにおいて肺循環と気道内圧, さらには門脈圧に注目して β -AR の役割を明らかにした。その結果, 無処置の感作対照群では抗原投与により血圧は低下するものの肺動脈圧と気道内圧の上昇は認めず, 肺動脈圧は心拍出量の低下とともに低下した。非選択的 β -AR 拮抗薬あるいは選択的 β_2 -AR 拮抗薬の前投与, および副腎摘除のもとでは, 肺動脈圧と気道内圧は有意に上昇し, 血中アドレナリン値も顕著に上昇した。これらの成績から, ラットアナフィラキシー低血圧時には, 副腎から分泌されたアドレナリンにより肺動脈と気管支に存在する平滑筋の β_2 -AR が活性化され, 肺動脈圧と気道内圧の上昇が抑制されているものと推察された。一方, アナフィラキシー

による門脈圧の上昇は β -AR の影響を受けないことが示唆された。これらの結果から、ラットのアナフィラキシー低血圧で β_2 -AR の遮断が生存率を低下させる機序として、肺動脈圧と気道内圧の上昇が関与していることが示唆された。

論文審査結果の要旨

心疾患などの治療で β -AR 拮抗薬を服用している患者にアナフィラキシーショックが生じると、重篤になることが知られている。しかしながら、 β -AR のサブタイプである β_1 -, β_2 -AR のいずれがこの反応に関与するかは不明であった。申請者は覚醒下ラットのアナフィラキシー低血圧で、 β_2 -AR の阻害がより重要であることを報告したが、その機序は不明であった。本研究の目的は β -AR の阻害によるアナフィラキシーショック重症化の機序を解明することであり、特に肺血管と気道の収縮に注目し、麻酔下ラットのアナフィラキシー低血圧に及ぼす β_1 -AR と β_2 -AR の遮断ならびに副腎摘除の影響を検討した。

実験はペントバルビタール麻酔、開胸人工呼吸下の SD ラットを用い、気道内圧、肺動脈圧、体血圧、左房圧、中心静脈圧、大動脈血流量、門脈圧を測定下に行った。対照ラットでは抗原の卵白アルブミンを2週間前に皮下投与して感作し、その抗原を静脈内投与へ再投与することによりアナフィラキシー低血圧を惹起した。他のラットでは非選択的 β -AR 拮抗薬(propranolol)、選択的 β_1 -AR 拮抗薬(atenolol)、 β_2 -AR 拮抗薬(ICI 118, 551)の前投与後、あるいは副腎摘除後に抗原を投与した。別の感作ラットにおいては、抗原投与前後の血中カテコールアミン値も測定した。

抗原投与により、対照感作ラットと β_1 -AR 拮抗薬前投与ラットでは体血圧と大動脈血流量は低下したが肺動脈圧はむしろ低下し、気道内圧は変化しなかった。一方、非選択的 β -AR 拮抗薬または選択的 β_2 -AR 拮抗薬を前投与したり、副腎を摘除したりしたラットでは、抗原投与により肺動脈圧と気道内圧が上昇したばかりでなく、生存率も他のラットに比べて有意に低下した。また、血中アドレナリン値は対照感作ラットで抗原投与後に投与前の14倍まで増加したが、副腎摘除ラットでは検出限界以下だった。

以上の成績から、ラットアナフィラキシー低血圧では副腎から分泌されるアドレナリンにより β_2 -AR が活性化され、肺血管収縮と気道収縮が抑制されるものと結論した。すなわち、 β_2 -AR の阻害が肺血管と気道の平滑筋収縮を顕在化させることにより、 β -AR 拮抗薬のアナフィラキシー増悪作用に関与していることを明らかにした。審査では β -AR 拮抗薬の投与量、気道内圧の測定法、データの解析法など実験方法についての質疑があり、申請者からは的確な回答が得られた。

本研究は、 β -AR 拮抗薬を服用する患者においてアナフィラキシーショックの重症化を予防するためには、より選択性の高い β_1 -AR 拮抗薬の服用を推奨するものである。また、現在アナフィラキシーショックの治療薬としてエピネフリンが第一選択薬として推奨されているが、本研究の結果はそのエピネフリンの重要性を裏付けるものであり、本研究はアナフィラキシーショックの病態解明と治療に寄与するものと思われる。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

Anesthesiology Vol.114, No. 3, 2011

氏名 (生年月日)	なか しま あき お 中 島 章 夫 (昭和 54 年 4 月 22 日)
本 籍	埼 玉 県
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	甲 第 3 9 3 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	IgG4 関連疾患のトランスクリプトーム解析
論 文 審 査 委 員	主 査 岩 淵 邦 芳 副 査 古 家 大 祐 中 村 晃

学位論文内容の要旨

研究目的

近年わが国において報告された新たな疾患概念である IgG4 関連疾患は、高 IgG4 血症と、組織での IgG4 形質細胞の増殖を特徴とし、全身の種々の臓器に腫瘍性、もしくはびまん性の病変を形成するリンパ増殖性疾患である。少なくとも初期にはステロイド治療が著効することが知られているが、その原因や病態はまだ十分にわかっていない。本研究では、IgG4 関連疾患の病態解明を目的に、患者の末梢血単核球における mRNA 量を網羅的に解析し、病態関連遺伝子群の検索を行なった。

実験方法

末梢血単核球における mRNA 発現量の網羅的解析には、DNA マイクロアレイ法を用いた。IgG4 関連疾患と確定診断した患者 2 人のステロイド治療前後、および健常人 4 人の末梢血単核球から RNA を採取し、これらの RNA から cDNA を合成した。cDNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行ない、患者の治療前後で発現が大きく変化する、あるいは治療前患者での発現が健常人のそれと大きく異なる遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子が IgG4 関連疾患患者で変化していることを確認 (バリデーション) するために、新たに IgG4 関連疾患患者治療前後 1 人、治療前 6 人、健常人 2 人の末梢血単核球から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を行なった。

実験成績

DNA マイクロアレイ解析にて、患者 2 人のステロイド治療前後で発現量が 3 倍以上変化していた遺伝子を 30 個抽出した。また、患者 2 人の治療前後 4 検体と健常人 4 人の間で発現量に 3 倍以上の差を認めた遺伝子を 21 個抽出した。これらの遺伝子の中から、Charcot-Leyden crystal protein (CLC), interleukin 8 receptor α (IL8RA), interleukin 8 receptor β (IL8RB), membrane-spanning 4-domains subfamily A member

3 (MS4A3), defensin α 3 (DEFA3), defensin α 4 (DEFA4) についてリアルタイム PCR によるバリデーションを行なった。MS4A3, DEFA3, DEFA4 遺伝子は、健常人群に比べ患者群で有意に発現が低く、またステロイド治療後有意に発現が増加した。CLC, IL8RA, IL8RB 遺伝子は、健常人群に比べ患者群で有意に発現が低かったが、治療前後においてその発現に有意な変化はみられなかった。

総括および結論

IgG4 関連疾患の罹患臓器は涙腺、唾液腺、膵臓をはじめとして多臓器に及び、その原因、病態については十分にわかっていないが、いくつかの臨床的特徴が知られている。そのひとつは、末梢血、罹患組織における CD4 陽性 CD25 陽性免疫機能制御性 T 細胞 (Tregs) の増加である。IgG4 関連疾患としての自己免疫性膵炎において、抗 lactoferrin 抗体や抗 carbonic anhydrase II 抗体、抗核抗体、リウマチ因子などの多彩な自己抗体の出現が報告されている。Tregs の産生を抑制した胸腺摘出マウスや Tregs の細胞膜上の Foxp3, CTLA-4 を欠損させたマウスは、多臓器におよぶリンパ増殖性病変と自己免疫病、高 IgE 血症を来すことが知られている。さらに、Tregs の産生を抑制した胸腺摘出マウスに、自己免疫性膵炎でみられる自己抗体の対応抗原である lactoferrin や carbonic anhydrase II を皮下投与することにより、膵臓や唾液腺などにリンパ球浸潤を伴う病変を誘発できることも報告されている。したがって IgG4 関連疾患の発症に Tregs の機能低下が関連している可能性があると考えられる。本研究において健常人群に比べ患者群で有意に発現が低かった CLC は、ガレクチンファミリーに属しており、ガレクチン-10 とも呼ばれる。ガレクチンは細胞内外、多種類の細胞に分布しており、免疫系における機能が推定されている。最近、Tregs において CLC 発現を抑制すると Tregs の機能が低下することが報告された。したがって IgG4 関連疾患は CLC の低発現による Tregs の機能低下がその病態に関連している可能性が示唆された。

もうひとつの IgG4 関連疾患の臨床的特徴は、約半数の患者が高 IgE 血症を伴っているという点である。IgG4 抗体は、IgE 抗体と同様に Th2 サイトカインにより産生が促進されることから、I 型アレルギーが IgG4 関連疾患の病態に関連している可能性が疑われている。本研究で抽出された MS4A3 遺伝子は、アトピー遺伝子の候補であると考えられていることから、IgG4 関連疾患の病態にアトピー素因が関連している可能性が示唆された。

さらに本研究で、IgG4 関連疾患と関連する遺伝子として α -Defensin, IL-8 受容体がみいだされた。 α -Defensin は哺乳類の代表的な抗菌ペプチドであり、好中球のアズール顆粒内に大量に存在する。IL-8 は代表的なケモカインであり、その主な作用は急性炎症における炎症部位への好中球の遊走である。したがって IgG4 関連疾患患者では、自然免疫系の機能が低下している可能性が示唆された。

IgG4 関連疾患患者の末梢血単核球を用いたトランスクリプトーム解析はこれまで報告がなされておらず、本研究が初めてである。本研究により、IgG4 関連疾患の病態には、CLC 発現低下に伴う Tregs 機能の低下、自然免疫能の低下およびアトピー素因などが関連している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

近年わが国において報告された新たな疾患概念である IgG4 関連疾患は、高 IgG4 血症と、組織での IgG4 形質細胞の増殖を特徴とし、全身種々の臓器に腫瘤性、もしくはびまん性の病変を形成するリンパ増殖性疾患である。ステロイド治療が著効することが知られているが、その原因や病態は十分にわかっていない。申請者は、本疾患の病態解明を目的に、患者および健常人の末梢血単核球における mRNA 量を網羅的に解析し、病態関連遺伝子群の検索を行なった。

申請者は、末梢血単核球から RNA を採取し、DNA マイクロアレイ法を用いて mRNA 発現量の網羅的解析を行った。ステロイド治療前後、あるいは患者と健常人の間で発現量に 3 倍以上の差を認めた遺伝子の中で、免疫機能に関与すると思われる 6 つの遺伝子に着目した。これら 6 つの遺伝子が実際に本疾患患者で変化しているかを確認（バリデーション）するために、患者治療前後 1 人、治療前 6 人、健常人 2 人の末梢血単核球から RNA を採取し、cDNA を合成した後にリアルタイム PCR を行った。その結果、健常人群に比べ患者群で有意に発現が低く、またステロイド治療後有意に発現が増加するものとして membrane-spanning 4-domains subfamily A member 3 (MS4A3) 遺伝子、Defensin- α (-3, 4) 遺伝子を、治療前後においてその発現に有意な変化はみられないものの、健常人群に比べ患者群で有意に発現が低かったものとして、Charcot-Leyden crystal protein (CLC) 遺伝子、interleukin 8 受容体 (IL-8 受容体) - α , - β 遺伝子を同定した。

これらの遺伝子と本疾患の病態との関連について、申請者は以下のように考察した。本疾患の病態に関してこれまで、CD4 陽性 CD25 陽性の免疫機能抑制性 T 細胞 (Tregs) の機能異常が報告されている。例えば、Tregs の産生あるいは機能を抑制したマウスは、多臓器におよぶリンパ増殖性病変と自己免疫病、高 IgE 血症を来す。さらにこのマウスにある種の抗原を投与すると、本疾患でみられるような自己免疫性膵炎や唾液腺炎が誘発される。最近 Tregs の CLC 発現を抑制すると Tregs の機能が低下するとの報告がなされており、本研究の結果も、Tregs の機能低下が本疾患の病態に関連しているという説を支持するものである。また本疾患の約半数が高 IgE 血症を伴うことから、I 型アレルギーが本疾患の病態に関連していると想定されている。MS4A3 遺伝子は、アトピー遺伝子の候補であると考えられていることから、本研究結果は、本疾患とアトピー素因との関連を示唆するものである。 α -Defensin は哺乳類の代表的な抗菌ペプチドであり、好中球のアズール顆粒内に大量に存在する。また IL-8 の主な作用は炎症部位への好中球の遊走である。本研究結果は、本疾患と自然免疫系の機能低下との関連を示唆するものである。

本研究は、わが国において報告された新たな疾患概念である IgG4 関連疾患に関するものである点、本疾患患者の末梢血単核球を用いた網羅的遺伝子発現解析はこれまで報告がない点で極めて独創的である。また、得られた結果は、本疾患の病態を解明するうえで示唆に富むものである。以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第 35 巻 第 3 号 平成 22 年

氏名（生年月日）	つち だ ひで ゆき 土 田 秀 行 （昭和 56 年 10 月 25 日）
本 籍	京 都 府
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	甲 第 3 9 4 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	mTOR 阻害剤による腎細胞癌の E-カドヘリン発現誘導に関する研究
論 文 審 査 委 員	主 査 小 坂 健 夫 副 査 竹 上 勉 湊 宏

学位論文内容の要旨

研究目的

腎細胞癌は、他の上皮系癌と比べ早期から転移を認めることが多いため、予後不良の癌腫の一つと考えられている (1)。一般的に、上皮系細胞では細胞間接着構造で隣接する細胞同士が接着しているが、そのなかで最も重要な E-cadherin が腎癌細胞では発現していない。近年、von-Hippel Lindau (VHL) 遺伝子を欠損している腎癌細胞の研究から、VHL の標的である hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) を介した E-cadherin 発現の制御機構が確認された (2, 3)。この VHL 遺伝子に異常が起こり HIF-1 の分解が抑制されると、その下流の血管新生促進因子や増殖因子が恒常的に産生されるようになり、癌組織の血管新生や細胞増殖が引き起こされる (4)、さらに E-cadherin 発現が低下し転移し易い状況に陥っているものと推測される。

現在、腎細胞癌治療は分子標的治療が主流であり、これらの標的の中で mTOR は、癌関連蛋白質や増殖因子やサイトカインで刺激される PI3K-AKT 系で活性化され HIF-1 の翻訳を亢進させることから (5)、mTOR 阻害薬には E-cadherin の発現を回復させる可能性が考えられる。本研究では、E-cadherin 発現が抑制されている腎細胞癌において、mTOR を阻害する分子標的薬により E-cadherin の発現を誘導し、臨床的に癌の転移を抑制する治療法となりうる可能性を検討した。

実験方法

腎細胞癌組織において E-cadherin の発現の有無を、担癌腎の正常部腎組織と腎細胞癌部組織の免疫染色を行いその発現を検討した。また、培養細胞では、上皮系癌である肺癌細胞 A549、膵癌細胞 Panc-1 を対照として、腎癌細胞 786-0 について以下の解析を行った。E-カドヘリン分子の発現は、免疫蛍光染色、real time PCR、Western blotting 法にて解析した。一方、E-cadherin の発現は、細胞の運動能に大きな影響を持っていることが知

られていることから、細胞の運動能を time lapse 顕微鏡観察にて評価した。更に、mTOR complex1 阻害薬である Rapamycin と、mTOR complex1 および complex2 の阻害薬である PP242 を使用し、E-cadherin 蛋白質発現量を western blotting, および免疫蛍光染色で確認し、E-cadherin 発現制御機構への介入による臨床治療への可能性を検討した。

実験成績

腎癌の多くは尿細管由来の淡明細胞癌で、その多くはVHL遺伝子に欠損または変異を持っている。本研究で用いた腎癌細胞786-0もVHL欠損型であり、すでにE-cadherinの発現が著明に抑制されており、他の上皮系細胞癌とは異なる性状の癌細胞であった。E-cadherin 発現はトレース程度であり、肺癌や膵臓癌など他の上皮系細胞癌の1/300から1/500程度に抑制されていた。TGF- β やTNF- α でEMTが誘導された膵癌細胞Panc-1におけるE-cadherin発現の抑制程度と比較しても、それ以上の著明な発現抑制がみられ、尿細管細胞の癌化時点ですでに獲得している特性と考えられた。これは、膵癌細胞Panc-1などでEMTが誘導された際に見られるE-cadherin発現の消失状態と類似しているものといえる。一般的に、EMT現象は癌細胞転移の誘因と考えられており(6)、このE-cadherin発現の消失が淡明細胞癌の易転移性の原因となり、浸潤部位や血管腔への移動に影響しているものと推測される。これは培養腎癌細胞786-0の増殖に際して、細胞同士が接着せずに動き回る現象からも裏付けられた。

腎癌細胞786-0に対するRapamycin刺激でE-cadherinの発現に変化は見られなかったが、PP242ではE-cadherinの発現が増強していることが、蛋白質およびmRNAレベルで確認された。また、免疫蛍光染色においてもPP242刺激では細胞辺縁にE-cadherin発現の明らかな増強がみられ、臨床応用の可能性が期待された。

総括および結論

現在、mTOR 阻害薬は、シクロスポリン、タクロリムスに続く第3の免疫抑制剤として注目されており、最近ではその増殖抑制作用、p53 や PTEN の変異細胞の高感受性、HIF-1の活性化抑制、などの作用を期待して分子標的抗腫瘍薬として用いられている(7)。本研究では、新たに E-cadherin 発現を促す機序の重要性を提示することができた。腎細胞癌では mTOR 経路を介した HIF-1 が VHL の変異から蓄積され、E-cadherin の発現を著明に抑制し、結果的に EMT 様の状態に陥り細胞間接着の消失および細胞運動能の亢進を引き起こしていると考えられる。E-cadherin の発現低下は転写活性の低下によることが知られており、mTOR 活性の阻害は E-cadherin の転写抑制を解除し、E-cadherin の回復をもたらすことが明らかとなった。E-cadherin の発現促進は腎癌細胞の細胞間接着を回復させ、ひいては転移の予防を可能にすることが期待される。今回の回復程度は対象の数倍程度であったが、蛍光染色では明らかに細胞膜上に E-cadherin の発現が確認された。臨床上の有効性は今後の課題であるが、本研究結果が、E-cadherin 発現を回復させ癌転移を抑制する観点からの新たな分子標的治療法の開発につながることを期待される。

論文審査結果の要旨

腎細胞癌は癌抑制遺伝子 von-Hippel Lindau (VHL) の変異/欠損が高頻度で転移しやすく予後不良である。VHL の標的である hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) は α 鎖と β 鎖からなり、細胞接着因子 E-Cadherin 発現を制御する。本論文では、細胞接着と細胞運動能の面から、第 1 に腎細胞癌およびその他の臓器の癌細胞株での E-Cadherin の発現について比較検討し、第 2 に腎細胞癌株の 786-0 に焦点を合わせ、mammalian target of rapamycin (mTOR) を介したシグナル伝達系において mTOR の下流に位置し、E-Cadherin 発現を促進する HIF-1 α (mTORC-1 により制御) および HIF-2 α (mTORC-2 により制御) の両者の経路を阻害する PP242 の影響を観察した。

その結果、腎細胞癌株 786-0 では、他の上皮系癌細胞に比較して E-Cadherin の発現が mRNA および蛋白質レベルで低下しており、また細胞運動能が亢進していることを証明した。さらに、786-0 では、mTORC-1 および mTORC-2 の阻害薬である PP242 は E-Cadherin 発現を回復させたが、mTORC-1 のみに対する阻害薬 Rapamycin は効果がなかったことを示した。

本研究により、mTOR 活性阻害薬の研究は、E-Cadherin 発現を回復させ癌転移を抑制する観点から、難治性癌である腎癌に対する新たな分子標的薬の開発につながる可能性が示唆された。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第 35 巻 第 3 号 平成 22 年

氏名（生年月日）	たか はら ゆたか 高 原 豊 （昭和 55 年 3 月 16 日）
本 籍	広 島 県
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	甲 第 3 9 5 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	骨肉腫における aquaporin1, 5 の発現と肺転移への関与に関する研究
論 文 審 査 委 員	主 査 佐久間 勉 副 査 甲 野 裕 之 田 中 恵 子

学位論文内容の要旨

研究目的

骨肉腫が肺転移を起こす機序は不明であり、肺転移を防止する方法が確立されれば、それは有益である。近年、細胞膜水輸送チャネル分子 Aquaporin (AQP) 1, 5 は癌の発生や侵襲性に関与することが提唱され、注目されている。しかし、骨肉腫における AQP の役割は不明である。そのため、本研究では骨肉腫の発現・浸潤・肺転移に AQP1, 5 が関与するか否か、関与するなら如何に関与するかを明らかにすることを目的とした。

実験方法

研究材料としては非腫瘍性骨 5 組織、骨肉腫生検 26 組織、外科切除 18 組織とヒト骨肉腫細胞 3 株を使用した。AQP 1, 5 の蛋白発現を免疫染色と Western blot で検出し、予後因子、累積生存率との関連を解析した。腫瘍細胞以外の混入した細胞による結果への影響を研究するため、細胞株では RT-PCR による AQP1, 5 mRNA の発現解析を行った。

実験成績

非腫瘍性骨組織の免疫染色では、AQP1 は血管内皮、骨芽細胞と幼若細胞の細胞膜に、AQP5 は破骨細胞の細胞膜の一部に発現を認めた。腫瘍生検組織では、AQP1 は 23/26 例 (88%) で腫瘍細胞の細胞膜あるいは細胞質に、AQP5 は 17/26 例 (65%) で腫瘍細胞の細胞質に強発現を示した。摘出組織では浸潤先進部腫瘍細胞の細胞質と細胞突起における AQP1 の強発現が 11/18 例 (61%) で観察された。

Western blot 法により AQP1 の発現が生検組織 8/14 例 (57%)、骨肉腫細胞 3/3 株、AQP5 の発現が生検組織 13/14 例 (93%)、骨肉腫細胞 2/3 株で検出され、3 細胞株では AQP1, 5 遺伝子の mRNA 発現も確認された。AQP1 の生検組織での免疫染色における細胞質内発現と摘出組織浸潤先進部での強発現は術後肺転移発生率と関連し ($p=0.004, 0.013$)、発現により生存率が有意に低下した ($p=0.003, 0.044$)。

総括および結論

骨肉腫細胞は骨芽細胞方向への分化と関連した AQP1 の細胞膜局在性発現に加え、腫瘍発生・進展に伴う AQP1, 5 の細胞質内発現亢進を来とし、特に AQP1 の発現亢進は細胞突起形成促進を介し浸潤・転移能の亢進に関わる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

骨肉腫は予後不良の疾患で、特に肺転移が発生すると予後は悪化する。これまで骨肉腫が発生・浸潤・転移する機序に関して幾つかの研究がなされてきた。しかし、肺転移の機序はいまだ不明である。本論文では近年がんの発生や侵襲性への関与が注目されている細胞膜水輸送チャネル分子 Aquaporin (AQP) 1, 5 に着目し、骨肉腫の発生・浸潤・肺転移における AQP の役割を解明することを目的としており、その着眼点は斬新である。

本研究では研究材料としては非腫瘍性骨 5 組織、骨肉腫生検 26 組織、外科切除 18 組織とヒト骨肉腫細胞 3 株を使用した。材料数は十分とはいえないが、採集の困難さを考慮すれば学位論文研究には不足のない材料数である。実験方法としては免疫染色と Western blot 法で AQP 1, 5 の蛋白発現を検出し、骨肉腫での特異的発現を研究している。また、正常発現細胞の混入の影響を除外するため、細胞株を用いて RT-PCR による AQP1, 5 mRNA の発現解析を行っている。さらに AQP 発現が骨肉腫の悪性度と関係するか否かを検討するために、予後因子、累積生存率との関連を解析している。本研究で採用された実験方法は昨今の医学研究レベルから判断して妥当であり、解析統計処理も適切である。

実験成績は興味深いものである。まず、非腫瘍性骨組織と腫瘍生検組織ではその発現に違いを認める。特に AQP1 は腫瘍細胞の細胞膜あるいは細胞質に、AQP5 は腫瘍細胞の細胞質に強発現を示している。更に摘出組織では浸潤先進部腫瘍細胞の細胞質と細胞突起における AQP1 の強発現が観察されており、骨肉腫肺転移の浸潤と転移に関与することが示唆される。Western blot 法では蛋白発現の定量化は困難であったが、AQP1, 5 の発現が生検組織と骨肉腫細胞で確認され、AQP1, 5 mRNA の発現が 3 細胞株で確認されている。さらに興味深いことは、研究開始前には予期せぬことであったが、AQP1 の生検組織での免疫染色における細胞質内発現と摘出組織浸潤先進部での強発現は、術後肺転移発生率と唯一関連し、生存率の有意な低下を認めたことである。なお、本論文での実験成績の解釈と結果の提示方法は適切であるといえる。

以上の実験成績を踏まえて、骨肉腫細胞は骨芽細胞方向への分化と関連した AQP1 の細胞膜局在性発現に加え、腫瘍発生・進展に伴う AQP1, 5 の細胞質内発現亢進を来とし、特に AQP1 の発現亢進は細胞突起形成促進を介し浸潤・転移能の亢進に関わる可能性が示唆されたと結論している。本結論は目的に合致した結論であり、実験成績から導きだせる妥当なものである。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第 35 巻 第 3 号 平成 22 年

氏名（生年月日）	木 村 庄 吾 （昭和 53 年 6 月 23 日）
本 籍	京 都 府
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	甲 第 3 9 6 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	移植腎障害における circulating fibrocyte の評価
論 文 審 査 委 員	主 査 八 田 稔 久 副 査 伊 川 廣 道 上 田 善 道

学位論文内容の要旨

研究目的

組織線維化は傷害組織の治癒過程にみられる生体適応反応であり，臓器不全に共通の病態であることから，疾患の分野を問わず機序の解明や治療法の開発に向けて研究が進められてきた。移植腎の機能喪失の原因としても，間質線維化を伴う慢性移植腎症の重要性が指摘されている。様々な臓器の組織線維化において，病変部に集積しコラーゲン産生能を有する骨髄由来白血球系細胞として知られる circulating fibrocyte (CF) が，線維化の中心的な役割を担っていると考えられている。しかし，移植腎の腎線維化に対する CF の関与については報告がない。

本研究は，ヒト移植腎において CF の虚血後再灌流傷害による病態への関与と，急性期から慢性期に至る移植腎線維化への関与を明らかにする目的で，経時的腎生検組織の組織定量解析を中心に検討を行った。

実験方法

金沢医科大学腎臓内科において 2005 年 1 月から 2010 年 12 月までに腎生検を行った腎移植 36 例・71 検体（生体腎移植 24 例・51 検体，献腎移植 12 例・20 検体），病腎対照群 29 例・29 検体，正常対照群（手術時摘出腎）5 例・5 検体の合計 70 例・105 検体を対象とした。検討に際して 9 群（0: 血管吻合前 0 時間，1: 血流再開後 1 時間，2: 移植 2-4 週後，3: 移植 4-8 週後，4: 移植 8 週 - 1 年後，5: 移植 1 年以上，6: 糸球体疾患，7: 尿細管間質疾患，8: 対照群）に大別して評価した。移植直後から 1 年目まで組織検体の経過観察が可能であった生体腎移植 8 例と献腎移植 3 例（無機能腎 1 例を含む）を時系列群として，経時的変化の観察対象とした。尿血液生化学検査として，腎生検施行時の尿蛋白定量，尿潜血の程度，血清クレアチニン，血清総蛋白，血清アルブミン，血清コレステロール，推算糸球体濾過率（eGFR）を測定した。移植腎生検の評価については Banff05 に基づき，病変のスコア化を行った。また，組織線維化の定量的評価を目的として Masson

trichrome (MT) 染色を行い、糸球体と尿細管内円柱を除く間質の青色染色部を陽性面積率 (%) として算出した。新鮮凍結切片に対する蛍光免疫染色組織標本の画像解析により、間質内 CF 細胞数 (個数/mm²)、CD45 陽性面積率 (%), I 型コラーゲン (collagen type I, COL1) 陽性面積率 (%), α -smooth muscle actin (α SMA) 陽性面積率 (%) を算出した。

実験成績

尿血液生化学検査所見については、各群間で有意差は認められなかった。病理組織の定量的評価については、全ての項目において病腎対照群、特に尿細管間質病変で高値を示した ($p < 0.05$)。間質内 CF 数 (/mm²) は、対照群 0, 移植腎 4.0, 糸球体疾患 5.2, 間質性腎炎 57.8 であった ($p < 0.01$)。移植腎において、CF 数は α SMA 陽性面積率と正の相関 ($r = 0.63$, $p < 0.01$) を示したが、Banff 分類各スコアとは相関しなかった。経時的腎生検を行った移植腎生着 10 例の CF 数は、移植後 4 週目まで上昇傾向 ($p = 0.35$) を認め、その後低下した。 α SMA 陽性面積率は移植直後から経時的に増加した。特に 5 例 (50%) では移植 1 年後における急激な上昇 ($p < 0.05$) を認めた。CD45 陽性面積率は、移植後 4 週までは明らかな上昇は認められなかったが、移植 1 年後に 5 例 (50%) で上昇傾向 ($p = 0.09$) が認められた。移植 1 年後に α SMA と CD45 陽性面積率の急激な上昇を認めた症例は一致しており、この α SMA \cdot CD45 陽性面積率を散布図で示すと 2 群に分類できた (CD45 陽性面積率の判別係数 4.8, α SMA 陽性面積率の判別係数 2.9)。このうち、 α SMA \cdot CD45 両陽性面積率高値群では、eGFR の低下 ($p < 0.05$) と COL1 陽性面積率の増加 ($p < 0.05$) を認めたが、Banff 分類各スコアとの有意な関連は認められなかった。

総括および結論

CF 数と α SMA 陽性面積率に正の相関関係を認めたことから、急性期虚血後再灌流刺激により誘導された CF が α SMA 陽性細胞へ分化することが示唆された。移植 1 年後において α SMA および CD45 陽性面積率の上昇と移植腎機能低下および間質線維化 (COL1 陽性面積率) とが関連する一方で、CF 細胞数の低下を認めたことは、慢性移植腎症における α SMA 陽性細胞の出現に CF 以外の細胞が関与している可能性も否定できない。移植 1 年後以降の α SMA 陽性細胞の由来に関して、今後更なる検討が必要であると考えられた。

論文審査結果の要旨

組織線維化は臓器不全に共通の病態である。移植腎の機能喪失の原因としても、間質線維化を伴う慢性移植腎症の重要性が指摘されている。様々な臓器における組織線維化の過程で、病変部に集積し細胞外基質を産生する CF が重要な役割を担っていると考えられているが、慢性移植腎症における腎間質線維化と CF の関係はいまだに不明である。

本論文は、CF の慢性移植腎症における間質線維化への関与について、ヒト移植腎を対象として、経時的腎生検組織の組織定量解析を中心に検討したものである。申請者は、金沢医科大学腎臓内科において腎生検を行った腎移植 36 例・71 検体、病腎対照群 29 例・29 検体、正常対照群 5 例・5 検体の合計 70 例・105 検体を研究対象とした。移植直後から 1 年目まで組織検体の経過観察が可能であった生体腎移植 8 例と献腎移植 3 例を時系列

群として設定した。尿・血液生化学検査所見については、各群間で有意差は認められなかったが、腎生検組織に対して、組織線維化を描出する Masson trichrome 染色，CF を選択的に検出する CD45 と COL1 の蛍光二重免疫染色，および α SMA に対する蛍光免疫染色を駆使した画像解析を行い，病理学的変化を客観的かつ定量的に評価することに成功した。申請者は，この定量的画像解析により，移植腎において CF 数が α SMA 陽性面積率と正の相関を示すことを明らかにした。また，経時的腎生検を行った移植腎生着 10 例では，CF 数は移植後 4 週目まで上昇傾向を認め，その後低下することを明らかにした。さらに，移植一年後における α SMA および CD45 陽性面積率をパラメータとして，移植腎生着 10 例を二次元の散布図に展開して解析することで，これらを明確な 2 群に判別することに成功した。この 2 群の判別結果をもとに eGFR および COL1 陽性面積率を改めて検討することによって， α SMA ・ CD45 両陽性面積率高値群で eGFR の低下と COL1 陽性面積率が有意に増加していることを明確に示した。これは，2 群の判別をしないまま統計処理を行った場合，有意差を見出すことはできないものである。

このように，申請者は，組織の定量解析手法を駆使することによって，移植腎の病理学的変化を客観的かつ定量的に評価し，またそのようにして得られたデータを詳細に吟味・解析することで，大量のデータに隠れた重要な知見を明らかにすることに成功した。本研究はまた，CF から α SMA 陽性細胞が分化する可能性について，ヒト移植腎症において初めて示した独自性の高い研究と位置付けられ，研究成果は移植腎における腎間質線維化の成立機序の解明に大いに貢献することが期待される。

以上により，本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第 35 巻 第 3 号 平成 22 年

氏名（生年月日）	しょう 莊	まさ 将	や 也	（昭和 54 年 4 月 28 日）
本 籍	京 都 府			
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)			
学 位 記 番 号	甲 第 3 9 7 号			
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
学 位 論 文 題 目	非定型抗精神病薬 risperidone と blonanserin の急性投与 による家兎海馬での興奮性シナプス伝達および dopamine, serotonin 濃度に及ぼす影響			
論 文 審 査 委 員	主 査	加 藤 伸 郎		
	副 査	松 井 真		
		飯 塚 秀 明		

学位論文内容の要旨

研究目的

Haloperidol などの定型抗精神病薬は、総合的に見て優れた抗精神病作用を有している。しかし、陰性症状(無為自閉, 感情鈍麻, 意欲低下, 認知機能低下など)への効果は不十分である。また, 大脳基底核ドパミン伝達系の阻害による副作用出現という問題点があった。その後に登場した clozapine は, 基底核起因の副作用がより軽度であり, 陰性症状の改善にも効果的であることがわかった。Clozapine のこうした薬理作用は, dopamine (DA) D2 受容体遮断作用に加えて, 相対的に強い serotonin(5-HT) 2A 受容体遮断作用によって説明された (Meltzer, 1989)。その後 clozapine をプロトタイプとして種々の薬剤が開発され, 従来の定型抗精神病薬に対して, 非定型抗精神病薬と呼ばれた。こうして, 統合失調症の治療では, 非定型抗精神病薬を第一選択とすることが主流となった。

非定型抗精神病薬 risperidone は serotonin-dopamine antagonist (SDA) の代表薬であるが, 実際には dopamine (DA) D2 受容体遮断作用よりも 5-HT2A 受容体遮断作用のほうが強力である。SDA は DA 過剰状態にある中脳-大脳辺縁系投射システムでは antagonist 作用により陽性症状(幻覚妄想など)を抑制し, DA 活動低下状態の大脳皮質前頭前野では DA 系活動を賦活するように働き, 陰性症状を改善すると言われている。また, 定型抗精神病薬に比べ, 基底核症状の出現程度は低い。一方本邦創薬の非定型抗精神病薬である blonanserin は risperidone などの SDA とは異なり, D2 受容体遮断作用の方が 5-HT2A 受容体遮断作用よりも強力であり, 定型抗精神病薬のような強い抗精神病作用を有している。さらに risperidone に比べ, 高 PRL 血症や過鎮静の出現は低いとされている。本研究では, これら 2 つの異なるモノアミン系阻害特性を持つ 2 薬剤を使用し, 特に認知機能と関係の深い海馬における興奮性シナプス伝達および DA, 5-HT 濃度の用量依存的な変化について微小透析法を用いて測定し, 比較検討することを目的とした。

実験方法

体重 2.5-3.5kg の家兎 35 羽を用いて一側海馬歯状回に、ガイドカニューレに記録電極を組み合わせたものを、同側貫通路に刺激電極を植え込み、慢性条件下で実験を行った。脳内微小透析用のマイクロプローブをガイドカニューレに挿入し、人工脳脊髄液を灌流しながら、まず対照記録として一定速度の単発電気刺激を行い、集合 spike (PS) と集合 EPSP からなる貫通路-歯状回反応波を記録した。次に溶媒のみを投与した、コントロール群、risperidone 0.5, 1.0, 2.0mg/kg, blonanserin 2.0, 4.0, 8.0mg/kg をそれぞれ投与した群で反応波をそれぞれ記録後、貫通路にテタヌス刺激を加え、さらに長期増強現象 (LTP) の発現を観察した。実験開始から終了までの 180 分間、細胞外灌流液を 5 分ごとに 15 μ l ずつ採取し、経時的に DA, 5-HT の濃度を測定した。実験は「金沢医科大学動物実験指針」に基づいて行った。反応波の PS, EPSP と DA, 5-HT 濃度の統計学的解析は、それぞれの値の時間経過とそれぞれの群間での有意差について repeated measure ANOVA とそれに続く Scheffe 法による多重比較を用いて検討した。

実験成績

Risperidone 投与後どの用量の投与群でも投与後で単発刺激による貫通路-歯状回反応波の興奮性シナプス伝達は変化がなく、テタヌス刺激後の LTP の発現は抑制された。DA 濃度は用量依存性に増大を示したが、5-HT 濃度は有意な変化を認めなかった。一方 blonanserin 投与後は同様にどの用量でも投与後の興奮性シナプス伝達に変化はなく、テタヌス刺激後の LTP も抑制された。また、DA, 5-HT 濃度もどの用量でも有意な変化を認めなかった。

総括および結論

Risperidone は海馬歯状回において、用量依存性に DA 濃度を上昇させ、一方で 5-HT 濃度は変化させない。よって、この DA 濃度上昇が統合失調症における陰性症状や認知機能低下を改善する可能性がある。ところが、blonanserin は risperidone と同様の臨床効果を有するにもかかわらず、DA 濃度も 5-HT 濃度も上昇させない。これは、Risperidone の薬効が DA 濃度上昇に依存する可能性を否定してしまう。ここでは、(1)それにも関わらず risperidone が薬効を持つ理由と、(2)blonanserin の薬効が DA, 5-HT 伝達系への作用とは異なるメカニズムで発揮されている可能性を ad hoc に指摘した。たとえば、他の受容体への結合親和性の低さが関与している可能性などを試論した。

論文審査結果の要旨

申請者の研究グループでは、ウサギを用い、シナプス伝達に対する非定型向精神薬の作用を次々と解析して来た。本申請者による実験は、この研究グループが一貫して採用してきた手法を使い、これまで全く、または充分には、解析が試みられていなかった薬物、すなわち blonanserin と risperidone, にその手法を適用したものである。この点において新規性が認められる。

慢性に留置された電極およびマイクロダイアリシスプローブを使って、電気生理学的ならびに生化学的解析が行われた。Blonanserin と risperidon では、ドパミン濃度への影響が異なること、シナプス伝達への作用は同じであることなどが判明した。実験結果は、伝達物質濃度・通常シナプス伝達・LTP 誘導性を薬物投与群とコントロール群とで比較して得られたものであり、明瞭に記述された。統計的手法が適切に駆使され、実験結果は整然と提示された。

本研究の考察においては、当該実験グループがこれまでに調べた 5 種の非定型向精神薬について、海馬歯状回における作用をまとめて比較検討している。検討されたデータは、ドパミン濃度、セロトニン濃度、興奮性シナプス電位および貫通枝-顆粒細胞シナプスにおけるシナプス伝達長期増強の 4 種である。この比較によれば、これら 4 種の神経生物学的パラメーター（あるいは endophenotype）に及ぼされる 5 種の向精神薬の作用にはほとんど一貫性がない。唯一、セロトニン濃度が不変なことだけが 5 種薬剤の神経生物学的作用の共通点となっている。しかし、病状が向精神薬で改善するにも関わらず、セロトニン濃度が不変であるのなら、このパラメーターは薬効とあまり関わりを持たないと解釈せざるを得ない。他の 3 パラメーターについては一貫性がないので、これも薬効を説明するには不十分である。何よりも、非定型向精神薬の特徴である DA 受容体遮断作用および 5-HT 受容体遮断作用と、4 つのパラメーターとの関連が本研究では解析されていない。それゆえ、今回の実験が非定型向精神薬の作用の神経生物学的解明にいかほど寄与しているのかは、簡単には推し量れない。しかも、実験は海馬歯状回のみで実行されたものであり、この部位は向精神薬作用の責任部位としては一部に過ぎない。この部位での結果が、前頭前野や腹側基底核など他に想定される責任部位へと、直ちに一般化できる保障もない。そのなかにあつて、申請者は薬効の ad hoc な説明に終始せざるを得ない。しかし、このような種々の弱点は、向精神薬作用の神経生物学的説明が研究目標として遠大かつ達成容易ならざることの反映でもある。本研究は、その目標達成過程における一つの歩みとして意義あるものとみなせる。本研究により blonanserin と risperidon による海馬歯状回での LTP 抑制などが詳細に検討され、神経薬理学的な新知見が得られた。臨床で使用されている 2 種の非定型向精神薬 blonanserin と risperidon の薬理作用を、他の向精神薬のそれとの比較検討を試みた点において、本研究には新規性があり、この観点から高く評価される。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第 35 巻 第 2 号 平成 22 年

氏名（生年月日）	おさ だ 長 田 ひろみ （昭和 43 年 11 月 30 日）
本 籍	長 野 県
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	甲 第 3 9 8 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	Ultraviolet B-induced expression of amphiregulin and growth differentiation factor 15 in human lens epithelial cells (UVB曝露によるヒト水晶体上皮細胞でのアンフィレグ リンおよびGDF-15の遺伝子発現変化)
論 文 審 査 委 員	主 査 望 月 隆 副 査 岩 淵 邦 芳 東海林 博 樹

学位論文内容の要旨

研究目的

紫外線曝露が白内障の誘因となることはよく知られている。このメカニズムとして水晶体上皮により保たれていたホメオスタシスが紫外線曝露により攪乱され、水晶体の皮質線維の遊走・腫脹，細胞内 β -クリスタリンの凝固が起こって混濁が生じると考えられている。本研究はUVBによるヒト水晶体上皮細胞の遺伝子発現変化を分析し，UVB誘発白内障の発症メカニズムを解明することを目的としたものである。

実験方法

SV40 T抗原遺伝子導入ヒト水晶体上皮細胞株SRA01/04を用いた実験では，照射後も約90%の細胞が生存する30mJ/cm²のUVBを照射し，UVB照射12時間後，24時間後および未照射細胞からmRNAを抽出しマイクロアレイ解析を行った。発現変化を認めたmRNAの中から分泌タンパク質をコードし，UVB照射により遺伝子発現の増加が著明であったAmphiregulin(AREG)，Growth differentiation factor 15(GDF15)を選択し，RT-PCR，リアルタイムPCRを行った。AREG，GDF15の蛋白質レベルでの上昇について，培養上清中に分泌されたタンパク量をELISA法により定量した。さらにヒト白内障手術時に摘出した水晶体前囊に付着する水晶体上皮細胞の初代培養細胞について，UVB照射後のAREG，GDF15遺伝子の発現を検討した。

AREG，GDF15の生物学的作用はSRA01/04細胞を用いて検討した。AREG，GDF15の組み換えタンパクを培養液に添加し，SRA01/04細胞へのトリチウム・チミジンとトリチウム・ロイシンの取り込みを解析した。

実験成績

SRA01/04細胞では、RT-PCR、リアルタイムPCRでUVB照射後にAREG、GDF15遺伝子発現の増加が確認された。培養上清中に分泌されたAREG、GDF15タンパクについてもUVB照射24時間後に明らかな増加を認めた。UVB照射初代培養ヒト水晶体上皮細胞においてもAREG、GDF15のmRNAは同様に増加した。またSRA01/04細胞を用いた生物学的作用の検討ではコントロールとして使用したEGFと同様に、AREGはトリチウム・チミジン、トリチウム・ロイシンの取り込みを促進し、DNA合成、タンパク合成の両方を促進した。GDF15はトリチウム・ロイシンの取り込みのみを促進し、タンパク合成を促進した。

総括および結論

UVB曝露後の水晶体上皮細胞におけるAREG、GDF15の遺伝子発現上昇が明らかになった。AREG、GDF15は水晶体上皮細胞の増殖とタンパク合成に関与することが示され、水晶体線維細胞の代謝に関与して白内障の発症に繋がる可能性が考えられた。

論文審査結果の要旨

本研究は、地表に到達する紫外線によるUVB誘発白内障発症のメカニズムの解明を目的としてヒト水晶体上皮細胞の紫外線照射後の遺伝子発現変化を分析したものである。

申請者はAREGおよびGDF15の遺伝子発現が上昇すること、またAREGはDNA合成、タンパク合成の両方を促進し、GDF15はタンパク合成を促進することを明らかにした。以上より、UVBにより水晶体上皮細胞の増殖とタンパク合成が亢進することがUVB誘発白内障の発症のメカニズムの、少なくとも一部を担うものであることを示したと考えられる。今回同定された遺伝子の過剰発現やノックアウト動物モデルによる解析、あるいは同様の方法による他の遺伝子の解析を通じてUVB誘発白内障発症のメカニズムが一層明らかになると期待され、本論文はその契機となるものとしても評価できる。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

Molecular Vision Vol.17, 2011

氏名（生年月日）	いわ 岩 男	はるか 悠	（昭和 56 年 3 月 17 日）
本 籍	大 分 県		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	甲 第 3 9 9 号		
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学 位 論 文 題 目	IgG4 関連疾患におけるプロテオミクスの解析		
論 文 審 査 委 員	主 査	岩 淵 邦 芳	
	副 査	中 村 晃	
		横 山 仁	

学位論文内容の要旨

研究目的

IgG4 関連疾患は、近年報告された新たな疾患単位であり、血清 IgG4 の上昇と、IgG4 陽性形質細胞の多臓器への浸潤、腫瘍形成を特徴とする全身の慢性炎症性疾患である。本疾患の病因はいまだ不明であるが、いずれの臓器に発生しても共通の病理学的特徴を示しており、発生臓器にかかわらず、共通の免疫応答が病態形成に関与していると考えられる。本研究では、全身性の慢性炎症疾患という観点から、IgG4 関連疾患治療前後および健常人の血清を用い、疾患で特異的に変化するタンパク質群を網羅的に解析し、IgG4 関連疾患の病因病態に関連するタンパク質の同定を行った。

実験方法

インフォームドコンセントを得た IgG4 関連疾患の治療前・治療後、および健常人の血清を実験に用いた。除蛋白処理のため、5.0 μ L の患者血清中に 10 倍量のアセトンを加え、 -20°C で静置し、遠心分離で上清を除去した。得られたペレットを 2 次元電気泳動 (pH3-10) により展開し、銀染色により呈色した。治療前後で発現が変動したスポットを切り出し、ゲル内消化処理したタンパク質を ESI-MS/MS (nano-Frontier-LD ((株)日立ハイテクノロジーズ)) にて解析した。得られたペプチド情報は、Swiss プロットデータベースを用い MASCOT 検索を行い、タンパク質の同定を行った。治療前後、また健常人と患者間で有意に発現が変動するタンパク質群を特定し、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いてバリデーションを行った。

実験成績

IgG4 関連疾患 2 症例で、ステロイド治療後に低下もしくは増加した 136 個のタンパク質を同定した。重複を除き、タンパク質同定の信頼度が高い Score 35 以上、検出できたペプチド数 2 以上、Cover 率 1%以上のものを選別し、治療前後で有意に発現が変動する

90 個のタンパク質群を抽出した。IgG4 関連疾患治療前の血清では、IgG1, IgG4, Ig lambda, Ig kappa の増加, Alpha-1 antitrypsin, Apolipoprotein-L1, Complement 4, C1q, Serum amyloid A protein precursor などの炎症性因子の増加, 免疫システム調節に関連する Clusterin, IgG4 関連疾患と同様に血清 IgG4 値が上昇する自己免疫疾患として報告されている天疱瘡の病因因子である Desmoglein の増加がみられた。抽出されたタンパク質群が, IgG4 関連疾患特異的に発現が変動しているかを検討するため, 治療前後各 7 人と健常人 6 人の検体を用い, Alpha-1 antitrypsin と Clusterin について ELISA を行い, その発現動態の検討を行った。Alpha-1 antitrypsin は, 治療前後において, 治療前で発現が有意に高く, 健常人に比べ患者群で発現が有意に高かった。Clusterin は, 患者群で発現が有意に高かったが, 患者治療前後においては発現に有意差は認められなかった。

総括および結論

IgG4 関連疾患で認められる特異的な免疫異常は, 血清 IgG4 の上昇と病変局所への IgG4 陽性形質細胞の著明な浸潤である。IgG4 が病態に関与していることが推測されるが, 障害因子あるいは防御因子として働いているのか, もしくは単にこれらの因子とパラレルに動いているのかは未だ不明である。今回, プロテオミクスの手法を用い IgG4 関連疾患治療前後および健常人の血清を解析し, 疾患で特異的に変動するタンパク質群の同定を行った。治療前に発現が有意に高く, 患者健常人間の比較においても患者群で発現が有意に高かった Alpha-1 antitrypsin は, B cell の IgE, IgG4 への分化誘導を増強させる機能を有することが報告されている。これは IL-4 や CD40 刺激による, B cell の IgE, IgG4 へのクラススイッチを選択的に, また容量依存的に増強させる co-stimulate factor としての機能によるものである。IgG4 関連疾患では, Alpha-1 antitrypsin により AID(activation-induced cytidine deaminase)の転写が増強され, 恒常的にクラススイッチの誘導が亢進している状態なのかもしれない。

Alpha-1 antitrypsin は, 好中球の活性化時に放出される好中球エラスターゼなど, セリンプロテアーゼと複合体を形成し, これらタンパク質分解酵素の活性を阻害する相反物質としての生物活性を有している。しかしその反面, 活性酸素種(ROS)により酸化され, その阻害活性は消失する。今回, 患者健常人間の比較において, 患者群で発現が有意に高かった Clusterin は, 補体活性化の調節, 免疫システム調節, アポトーシスの調節, DNA 修復, 細胞周期調節など多面的な機能を持つが, その機能の一つとして, ROS の除去による酸化ストレスからの細胞保護作用が報告されている。Clusterin により, ROS が抑制されることで, Alpha-1 antitrypsin は ROS による酸化を受けることなく, より B cell の IgE, IgG4 への分化誘導が亢進される病態が考えられる。

IgG4 関連疾患特異的に変動するタンパク質の網羅解析は, これまでに報告がなされておらず, 本研究が初めてである。本研究により, IgG4 関連疾患の病態には, プロテアーゼ/プロテアーゼ阻害剤の均衡がクラススイッチの誘導に関与し, IgG4 合成の制御に関連している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

IgG4 関連疾患は、近年わが国で報告された新たな疾患概念であり、血清 IgG4 の上昇と、IgG4 陽性形質細胞の多臓器への浸潤、腫瘤形成を特徴とする全身の慢性炎症性疾患である。本研究で申請者は、本疾患の病態解明を目的に、患者治療前後および健常人の血清タンパク質群を網羅的に解析し、本疾患特異的に血清濃度が変化するタンパク質の検索を行った。

申請者は、患者の治療前後、および健常人の血清を 2 次元電気泳動 (pH3-10) で展開し、治療前後の比較、または健常人と患者間の比較において有意に濃度に差があるタンパク質のスポットを切り出し、スポット内のタンパク質を質量分析法で同定した。同定されたタンパク質群の中から 2 つのタンパク質、Alpha-1 antitrypsin と Clusterin とに着目した。これら 2 つのタンパク質が実際に患者血清で濃度が変化しているかを確認 (バリデーション) するために、7 人の治療前後と 6 人の健常人の血清を用い、ELISA 法でタンパク濃度を定量した。その結果、Alpha-1 antitrypsin 濃度は、治療前後において治療前に有意に高く、また健常人に比べ患者群で有意に高いこと、Clusterin 濃度は、治療前後において有意差は認められなかったものの、健常人に比べ患者群で有意に高いことを見出した。

Alpha-1 antitrypsin は、好中球エラスターゼなど様々なタンパク質分解酵素の活性を抑える機能の他に、IgE, IgG4 への B 細胞クラススイッチを特異的に増強させる機能を持っていると報告されている。しかし Alpha-1 antitrypsin は、活性酸素種により酸化されると、これらの機能を失ってしまう。一方、Clusterin もその機能は多彩であるが、その中で、活性酸素種を除去するという機能が報告されている。申請者は、本疾患においては Clusterin の血清濃度上昇により活性酸素種が除去され、その結果 Alpha-1 antitrypsin が活性酸素種による酸化を受けることなく、より B 細胞の IgE, IgG4 へのクラススイッチを亢進させているのではないかと考察した。

本研究は、わが国において報告された新たな疾患概念である IgG4 関連疾患に関するものである点、本疾患患者の血清を用いたプロテオミクス解析はこれまで報告がない点で極めて独創的である。また、得られた結果は、本疾患の病態を解明するうえで示唆に富むものである。以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第 35 巻 第 3 号 平成 22 年

氏名（生年月日）	やま や あつ よ 山 谷 淳 代 （昭和 53 年 5 月 25 日）
本 籍	岡 山 県
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	甲 第 4 0 0 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	安静呼吸時気流阻止による慢性閉塞性肺疾患患者の末梢気道抵抗の評価
論 文 審 査 委 員	主 査 芝 本 利 重 副 査 佐久間 勉 土 田 英 昭

学位論文内容の要旨

研究目的

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は末梢気道の狭小化と肺胞の気腫化のため、著しい閉塞性換気障害を示す。従来より、その重症度の評価と薬剤の効果判定にはスパイロメトリの 1 秒量を用いることが一般的である。しかし、この検査は最大努力呼気をする必要があり、高齢者では測定が困難であることが少なくない。さらにスパイロメトリは末梢気道と肺胞の病態を分けて評価することができない欠点がある。一方、近年、COPD 患者の末梢気道の病態を評価する方法としてインパルスオシロメトリ (IOS) 法が注目されている。しかし、本法は末梢気道抵抗を定性的に評価できるが、定量的な評価には問題がある。

申請者は、安静呼吸時気流阻止法 (Rint 法) を用いて中枢気道抵抗と末梢気道抵抗の定量的測定を試みた。そのため、申請者は気流阻止後の口腔内圧の速い変化をシミュレーションできる Mead の肺モデルに基づいて解析した。はじめに、この肺モデルが健常者と COPD 患者の気流阻止波形をどの程度正確に表現できるかをみるため、コンピュータシミュレーションにより検討した。つぎに、気流阻止口腔内圧波形から推定した末梢気道抵抗と COPD の重症度との関係を検討した。最後に、末梢気道閉塞の評価法として普及している IOS 法と Rint 法を比較した。

実験方法

金沢医科大学病院呼吸器内科を受診した男性 COPD 患者 45 名と男性健常者 10 名を対象とした。座位でマウスピースにより安静口呼吸をさせ、また、気流阻止時に頬が膨らまないよう被検者自身が頬を押さえて測定した。安静呼気中に 1 回換気量の 50% の肺気量位で 0.2 秒間気流阻止し、その間の口腔内圧と口腔フローを測定した。また、気流阻止と再開放のタイミングは電磁バルブとコンピュータを用いて自動的に行った。後述のモデル解析の結果から、気流阻止直後の口腔内圧の急激な圧上昇量 (第 1 相) を気流阻止直前のフロ

一で除して中枢気道抵抗を推定し、その後の指数関数的圧上昇量（第2相）を気流阻止直前のフローで除して末梢気道抵抗を推定した。さらに、指数関数的変化の時定数は末梢気道抵抗と気道コンプライアンスの積であることがモデル解析で示されたことから、測定した時定数を末梢気道抵抗で除して気道コンプライアンスを推定した。実験は主として以下の3項目を検討した。1. Meadの肺モデルを用いてコンピュータシミュレーションで得られた気流阻止口腔内圧波形と気流再開放フロー波形が健常者とCOPD患者からのものを再現性できるか否か。2. Rint法で推定した中枢気道抵抗、末梢気道抵抗、及び気道コンプライアンスとCOPDの重症度との関係。3. 既に末梢気道抵抗の評価法として普及しているIOS法ならびにボディプレチスモグラフ法とRint法の比較。

実験成績

COPD患者の年齢は74±7歳であった。COPDの重症度はステージI 8名、ステージII 19名、ステージIII 13名、ステージIV 5名であった。健常者の口腔内圧は気流阻止直後急激に上昇し（第1相）、その後漸増するパターンを示した。それに対して、COPD患者の口腔内圧は第1相の後、健常者ではみられなかった指数関数的な増加（第2相）を示した。また、気流再開放後のフローはCOPD患者では一過性に著しく増加するオーバーシュートのパターンを示したのに対して、健常者ではフローのオーバーシュートは起きなかった。COPD患者の気流阻止口腔内圧と気流再開放フローのパターンはMeadの肺モデルにおいて末梢気道抵抗を増加させることにより再現できた。Rint法で推定した末梢気道抵抗は健常者群 0.5±0.3 cmH₂O/L/s、ステージI 1.4±0.5、ステージII 2.0±0.8、ステージIII 4.4±2.2、ステージIV 6.9±2.8であり、COPDの重症度依存性にステージIIから有意に増加した。一方、中枢気道抵抗はCOPDの重症度の増加とともに増加する傾向を示すが、有意差は無かった。また、Rint法で推定した気道コンプライアンスはCOPDの重症度とともに減少し、気道は硬くなることが示された。次に、Rint法とIOS法による末梢気道抵抗は正相関するが（ $r=0.75$, $p<0.01$ ）、IOS法の方が小さい値を示した。最後に、Rint法で推定した中枢気道抵抗と末梢気道抵抗の和である全気道抵抗はボディプレチスモグラフ法で測定した気道抵抗と有意な差を示さないが、IOS法の全気道抵抗はボディプレチスモグラフ法による気道抵抗よりも有意に小さいことを示している。

総括および結論

本研究は、気流阻止時の口腔内圧の変動をMeadの肺モデルを用いてシミュレーション解析することにより、その圧波形から末梢気道抵抗を測定する方法を考案し、COPD患者と健常者において応用した。その結果、Meadの肺モデルのパラメータのうち、末梢気道抵抗を変化させることで健常者とCOPD患者の気流阻止時の口腔内圧と気流再開放時のフロー波形を再現できることが明らかになった。また、重症度の異なるCOPD患者で推定した末梢気道抵抗は重症患者ほど大きいことが示され、この方法でCOPDの病態を評価できることが示唆された。さらに、末梢気道抵抗の評価法として確立しているIOS法とRint法による末梢気道抵抗が高い正相関を示したことから、Rint法から末梢気道抵抗を推定できることが示唆された。一方、Rint法による中枢気道抵抗と末梢気道抵抗の和として計算した全気道抵抗はボディプレチスモグラフ法による気道抵抗と差を示さなかったこと、

IOS 法による全気道抵抗はボディプレチスモグラフ法による気道抵抗よりも有意に小さい値を示したことから、IOS 法は末梢気道抵抗を過小評価しているものと推察された。以上の結果から、IOS 法は末梢気道抵抗の定性的評価法であるのに対して、申請者が新たに提案した Rint 法は末梢気道抵抗の定量的評価法となりうることが示された。Rint 法は安静呼吸でしかも簡単な装置で検査でき、努力呼吸を要するスパイロメトリ検査を施行することができない高齢患者の検査法として有用である。

論文審査結果の要旨

COPD 患者の重症度の評価と薬剤の効果の判定方法は、これまでスパイロメトリが施行されている。この検査は最大努力呼吸をする必要があり、高齢患者や重症患者では検査の施行そのものが困難である。また、重症 COPD 患者では末梢気道の線維化と肺胞の気腫化が同時に進行しており、スパイロメトリで気道と肺胞の病態を分けて評価することは不可能である。近年、末梢気道のみを病態を分けて検査する方法としてインパルスオシロメトリ (IOS) 法が普及しているが、末梢気道抵抗の定性的評価法であるという欠点がある。そこで、申請者は、安静呼吸中に気流阻止したときの口腔内圧から末梢気道抵抗を定量的に測定する方法を考案した。この気流阻止法は喘息小児の気道抵抗を簡便に測定する方法として普及しているが、末梢気道病態を検討した報告はみられない。申請者は、これまで提案されている肺モデルのうち、Mead の肺モデルが最もよく気流阻止口腔内圧波形を再現することを示し、このモデルを理論解析して末梢気道抵抗を推定する方法を考案し、COPD 患者でその有用性を検討した。

本研究では次の事を明らかにしている。

1. 安静呼吸時に気流を短時間阻止したとき、COPD 患者の口腔内圧波形には健常者ではみられない指数関数的上昇がみられること、また、COPD 患者の気流再開時のフロー波形には一過性のオーバーシュートが観察されることを示した。
2. Mead の肺モデルの末梢気道抵抗のパラメータを増加させるだけで COPD 患者の気流阻止時口腔内圧と気流再開時フローを再現できることを示した。
3. 肺モデルの理論解析により、気流阻止口腔内圧から中枢気道抵抗、末梢気道抵抗、及び気道コンプライアンスを推定する方法を提示した。
4. 推定した末梢気道抵抗は健常者では小さく、COPD 患者では重症度に依存して増加した。一方、中枢気道抵抗は重症患者で増加する傾向を示すが、有意差は認められなかった。また、気道コンプライアンスは重症患者ほど減少することを示した。
5. 本法 (Rint 法) と IOS 法による末梢気道抵抗は高い正相関を示したが、IOS 法の末梢気道抵抗の方が小さいことを明らかにした。
6. Rint 法で推定した中枢気道抵抗と末梢気道抵抗の和である全気道抵抗はボディプレチスモグラフ法で測定した気道抵抗と差がなかった。一方、IOS 法で推定した全気道抵抗はボディプレチスモグラフ法による気道抵抗よりも有意に小さい値を示し、IOS 法は末梢気道抵抗を過小評価して測定することを示唆した。

本研究は、安静呼吸時気流阻止法という従来からある気道抵抗測定法を新しい視点から解析し、末梢気道抵抗を評価する方法として発展させた初めての報告である。申請者はこ

の方法で推定した末梢気道抵抗は、すでに確立されている IOS 法による末梢気道抵抗と相関して、COPD の重症度とともに増加すること、気道コンプライアンスは逆に減少することを示した。これらの結果は従来考えられている病態と一致しており、新しい病態検査法として臨床応用可能と思われる。特に本法は、努力呼気する必要がないため、小児、高齢者、重症患者に適した検査法であり、診断学的に非常に有用と考えられる。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第 35 巻 第 4 号 平成 22 年

氏名（生年月日）	三 木 美由貴 ^{み き み ゆ き} （昭和 54 年 1 月 28 日）
本 籍	長 野 県
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	甲 第 4 0 1 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	全身性エリテマトーデス（SLE）における血清デオキシリボ核酸分解酵素 I（DNaseI）に関する研究
論 文 審 査 委 員	主 査 中 村 晃 副 査 米 倉 秀 人 横 山 仁

学位論文内容の要旨

研究目的

全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ（RA）、シェーグレン症候群（SjS）など全身性自己免疫疾患は、多様な臓器障害による多彩な臨床症状を呈し、迅速かつ適切な診断・治療が予後を左右する。また、これらの患者に対する長期ステロイド治療は様々な合併症を引き起こし、患者のQOLを低下させる。既存の血清学的活動マーカーによる、同疾患の活動性評価およびステロイド減量のための治療効果判定は、病態によっては適応できない場合があり、より有用なマーカーが望まれる。本研究では、全身性自己免疫疾患患者における血清 DNaseI 活性と疾患活動性や様々な臓器症状との相関を検討し、診断マーカーとしての DNaseI 測定が有用であるか、また、DNaseI の多型が特定の全身性自己免疫疾患患者の遺伝的危険因子となり得るか検討した。

実験方法

血清 DNaseI 活性は、single radial enzyme-diffusion(SRED)法により測定した。また、DNaseI には Single-nucleotide polymorphism (SNP) があり、2つの共優性対立遺伝子 *DNASE1*1* および **2* として存在している。この遺伝子型により 1 型（ホモ）、1-2 型（ヘテロ）、2 型（ホモ）の 3 つ表現型に分類される。それぞれの pI 値（等電点）が異なるため、等電点電気泳動法により遺伝子多型を同定した。試料は、血液免疫科にて SLE、RA および SjS と診断された患者の保存血清を用いた。また DNaseI 多型については SLE 患者において検討した。

実験成績

SLE、RA および SjS 患者の血清 DNaseI 活性を測定し、健常人 (mean±SD : 11.7±3.6 U/L) と各患者群を比較した。SLE (8.5±2.7 U/L)、RA (12.2±2.8 U/L)、SjS (10.8±2.8 U/L) で、SLE 患者群では血清 DNaseI 活性が有意に低値であったが、RA および SjS 患者群

では有意差は認められなかった。SLE と診断された患者で、SLE 活動性指数(SLEDAI;SLE disease activity index)と血清 DNaseI 活性との関連を検討した。非活動性の SLE 患者群では健常人と比較して有意差は認められなかったが、活動性が高くなるに従って DNaseI 活性は低くなる傾向がみられ、有意差が認められた。また、SLE 患者 2 症例において治療経過による SLEDAI と血清 DNaseI 活性の変動を検討したところ、DNaseI 活性との相関性があると考えられた。さらに DNaseI 遺伝子多型については、SLE 患者において *DNASE1*2* 有する 2 型が有意に多いことが明らかになった。

総括および結論

SLE の活動性は臨床所見や抗 DNA 抗体等の血清学的マーカーにより評価されるが、病態によっては活動性や治療効果判定が困難な場合がある。本研究結果において、SLEDAI と血清 DNaseI 活性との間に有意な相関を認め、SLE の病態との関連が明らかになった。また、DNaseI 遺伝子多型の解析からは、SLE 患者において *DNASE1*2* を有する患者が有意に多かった。以上の結果から、血清 DNaseI 活性の測定は、疾患活動性の評価と治療の指標に有用であり、また DNaseI が SLE の発症にも関与している可能性があると考えられた。

論文審査結果の要旨

全身性自己免疫疾患は原因不明の疾患で、多彩な臨床症状を呈し、治療が困難な疾患である。今回、申請者は全身性自己免疫疾患のなかでも全身性ループスエリテマトーデス (SLE)、関節リウマチ (RA)、シェーグレン症候群においてより有用な診断・治療効果判定マーカーを検討する目的で、血清 DNase I 活性について検討した。その結果、RA およびシェーグレン症候群の患者との相関は認められなかったが、SLE 患者において血清 DNase I 活性が有意に低値であることを明らかにした。また SLE 活動性指数との関連を検討したところ、活動性の高い患者において DNaseI 活性が低値であることを明らかにした。さらに DNase I はその遺伝子多型性から活性の強い 1 型と弱い 2 型が存在しているが、SLE 患者において DNaseI-2 型と関連することを明らかにした。上記の研究結果は、血清 DNase I 活性が、SLE において新たな治療効果判定マーカーとして有用である可能性を強く示唆している。また、その多型が、日本人の SLE 患者との相関性を示した点で極めて重要な研究結果と考えられる。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第 35 巻 第 4 号 平成 22 年

氏名（生年月日）	なか や なお き 中 谷 直 喜 （昭和 49 年 8 月 28 日）
本 籍	富 山 県
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	甲 第 4 0 2 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	ゲムシタピン感受性の分子機構における TP53INP1 の意義
論 文 審 査 委 員	主 査 米 倉 秀 人 副 査 岩 淵 邦 芳 佐 川 元 保

学位論文内容の要旨

研究目的

膵癌は難治癌の代表格であり、多くの場合発見時に既に他臓器への浸潤・転移が見られる。そのため治療では、化学療法が重要な位置を占めており、標準的化学療法が塩酸ゲムシタピン(GEM)の単剤投与である。GEM はヌクレオシドアナログで、その作用機序は GEM が DNA 鎖に取り込まれて DNA 合成が停止し、腫瘍細胞のアポトーシスが誘導されることとされている。しかしながら、膵癌に対する GEM の奏効率は 10~20%程度であり、膵癌の根治のためには効果的な併用療法の開発が必要であり、そのために GEM 感受性の分子機構を解明する必要がある。

TP53INP1 (tumor protein 53-induced nuclear protein 1)は p53 関連遺伝子で、p53 依存性と非依存性の作用により細胞のアポトーシスを促進することが報告されている。TP53INP1 は膵癌細胞で GEM によって発現が誘導されることが明らかにされ、GEM 感受性に関与していることが示唆されている。本研究では、GEM 感受性の分子機構を解明することを目的として、GEM 感受性における TP53INP1 の役割を解析した。

実験方法

TP53INP1 をノックアウトしたマウス胎児線維芽細胞 (TP53INP1 欠失細胞)と TP53INP1 野生型細胞を用い、コロニー形成法により GEM に対する感受性、フローサイトメトリー (FACS)により GEM 処理後の細胞周期チェックポイント機能を比較した。また細胞周期関連因子である p21 の mRNA・蛋白発現をリアルタイム RT-PCR および Western blotting 法にて解析した。p53 蛋白発現は Western blotting 法にて解析した。

実験成績

- (1) 野生型細胞に比し、TP53INP1 欠失細胞の GEM 感受性は有意に高かった。
- (2) 野生型細胞では GEM 処理時に G2/M 期チェックポイント機能により細胞周期が停止し

たのに対し、TP53INP1 欠失細胞の G2/M 期チェックポイントは正常に働いていないことが示された。以上より、TP53INP1 欠失細胞では DNA 修復が行われずまま細胞周期が進行したため、アポトーシスが誘導されたと考えられた。

(3) p21 の mRNA と蛋白発現を解析したところ、TP53INP1 欠失細胞では野生型細胞に比較して、GEM 処理前から処理後のすべての時点で有意に発現が低下していた。

(4) p21 の上流に位置する p53 の蛋白発現を解析したところ、TP53INP1 欠失細胞、野生型細胞とも GEM の投与、非投与に関わらず発現が認められた。

総括および結論

本研究は、GEM 感受性における TP53INP1 の役割を解析した初めての報告である。本研究で、TP53INP1 欠失細胞が GEM に対し高い感受性を有することが初めて明らかにされた。TP53INP1 欠失細胞では、細胞周期の G2/M 期でのチェックポイント機能が破綻していることが示された。以上の知見より、TP53INP1 欠失細胞では G2/M 期でのチェックポイント機能が破綻しているため、DNA 損傷が生じたまま有糸分裂に進むことで細胞死(アポトーシス)に至っていると考えられた。TP53INP1 欠失細胞では細胞周期制御に重要な p21 の発現が mRNA 及び蛋白レベルで低下していることが明らかとなり、チェックポイント機能の破綻に p21 発現の低下が関与することが推定された。p21 発現を制御する p53 は、TP53INP1 欠失細胞でも発現されており、p53 経路とは異なる p21 発現制御経路が存在することが示唆された。

以上、TP53INP1 が GEM 感受性に重要な役割を持つことが本研究で初めて明らかにされた。本研究は、TP53INP1 を標的とした薬剤を開発して GEM との併用療法を行うことで、膵癌に対するより効果的な治療法開発できる可能性を示した重要な成果である。

論文審査結果の要旨

膵癌は難治癌の代表格であり、塩酸ゲムシダビン(GEM)の単剤投与が標準的化学療法として行われる。しかしながら、膵癌に対する GEM の奏効率は 10~20%程度であり、膵癌の根治のためには効果的な併用療法の開発が必要であり、そのために GEM 感受性の分子機構を解明する必要がある。本研究で申請者は、GEM 処理により膵癌細胞で TP53INP1 (tumor protein 53-induced nuclear protein 1)が発現誘導されることに注目し、GEM 感受性における TP53INP1 の役割を解析した。

TP53INP1 をノックアウトしたマウス胎児線維芽細胞と野生型細胞を用い、GEM に対する感受性、GEM 処理後の細胞周期チェックポイント機能を比較した。また細胞周期関連因子である p21 と p21 の上流に位置する p53 の発現を解析した。

その結果、本研究で申請者は以下の知見を得た。

(1) TP53INP1 欠失細胞の GEM 感受性は野生型細胞と比較して有意に高かった。

(2) TP53INP1 欠失細胞では GEM 処理時に G2/M 期チェックポイントは正常に働いていないことが示され、TP53INP1 欠失細胞では DNA 修復が行われずまま細胞周期が進行したため、アポトーシスが誘導されたと考えられた。

(4) TP53INP1 欠失細胞では p21 の発現が有意に発現低下していた。

(5) p21 の上流に位置する p53 の発現は、TP53INP1 欠失細胞、野生型細胞ともに GEM の投与、非投与に関わらず保たれていた。

本研究により、TP53INP1 欠失細胞が GEM に対し高い感受性を有することが初めて明らかにされた。さらにそのメカニズムとして、TP53INP1 欠失細胞では p21 発現の低下により G2/M 期でのチェックポイント機能が破綻し、DNA 損傷が生じたまま有糸分裂に進むことで細胞死(アポトーシス)に至っているという機構が推測された。

以上、申請者は TP53INP1 が GEM 感受性に重要な役割を持つことを本研究で初めて明らかにした。本研究は、TP53INP1 を標的とした薬剤を開発して GEM との併用療法を行うことで、膀胱癌に対するより効果的な治療法が開発できる可能性を示した重要な成果である。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第 35 巻 第 4 号 平成 22 年

氏名（生年月日）	こ いずみ なお こ 小 泉 尚 子 （昭和 53 年 6 月 6 日）
本 籍	福 井 県
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	甲 第 4 0 3 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）による家兎耳介軟骨膜細胞の増殖・分化誘導とその臨床応用に向けた基礎的研究
論 文 審 査 委 員	主 査 瀬 上 夏 樹 副 査 松 本 忠 美 吉 竹 佳 の

学位論文内容の要旨

研究目的

軟骨は再生能力が低く、一旦損傷を受けると線維性組織で置換されるという特性がある。そのため、小耳症や外傷性の耳介弾性軟骨欠損の再建においては自家肋軟骨移植が一般的に行われている。しかし、移植軟骨採取に伴う問題もあり、培養軟骨細胞を用いた再生医療に関する研究も行われているが臨床応用には未だ遠く、新たな耳介軟骨再建法の確立は形成外科領域の重要課題の一つとなっている。

塩基性線維芽細胞増殖因子 basic fibroblast growth factor（以下 bFGF）は、ウシ脳の抽出液中の線維芽細胞に対する増殖因子として Gospodarowicz により発見され、2001 年に遺伝子組み換え bFGF が製品化され、難治性潰瘍や熱傷潰瘍の治療薬として臨床応用されている。bFGF は軟骨中にも豊富に存在することが明らかとなり、関節軟骨細胞に加え耳介弾性軟骨細胞に対する増殖促進効果も報告されているが、軟骨膜細胞、特に耳介軟骨膜細胞に関してはこれまでほとんど知られていない。本研究では、組織幹細胞を含有することが想定されている軟骨膜細胞に注目し、bFGF による増殖・分化誘導とその機序を *in vivo* で解析するとともに、将来の臨床応用に向け bFGF 含有充填基材を用いて軟骨膜細胞の増殖と分化の誘導による耳介軟骨欠損治療モデルの作製を試みた。

実験方法

1. 実験動物・材料

雄性日本白色家兎（14～16 週，体重 2.5～3.5kg）の耳介を用いた。

2. 実験方法

1) bFGF 製剤による家兎耳介軟骨膜細胞の増殖促進と分化誘導に関する *in vivo* における検討

bFGF 製剤（科研製薬，100 μ g/ml）を家兎耳介面の軟骨膜上に注入し，1 週間後，1 ヶ月

後、3 ヶ月後に組織を採取し標本を作成した。hematoxylin eosin (HE)染色, elastica van Gieson (EVG) 染色, Alcian blue 染色と, S100 蛋白, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)に対する免疫染色を行った。軟骨新生の評価は S100 蛋白に対する免疫染色切片を用いた顕微鏡を用い新生軟骨, 既存軟骨部の厚さを1視野5点, 複数視野計測し, 新生軟骨形成率 = 新生軟骨層厚 / (既存軟骨層厚 + 新生軟骨層厚) を算出した。

2) 急性炎症が軟骨新生に及ぼす影響に関する検討

急性炎症惹起には大腸菌 (Competent high E. coli DH5 α , Toyobo) を用いた。原液, 10 倍, 100 倍, 1000 倍希釈大腸菌液 0.1ml 注入群を作製し, 接種部の急性反応の有無と程度を肉眼的に観察するとともに, 注入2週間後, 1 ヶ月後に1)と同様の方法で組織を採取し, HE 染色により軟骨新生の有無を評価した。

3) bFGF 濃度が耳介軟骨新生に及ぼす影響に関する検討

bFGF 製剤 (100 μ g/ml) を生理食塩水で希釈し, それぞれ 1, 5, 10, 25, 50, 100 μ g/ml とし, 注入1ヶ月後に組織を採取し, 1)と同様に組織染色と免疫染色を行った。

4) 耳介軟骨膜組織中の FGF receptor (FGFR) 2 遺伝子発現と bFGF 投与後の経時的変化

耳介軟骨膜細胞における FGFR2 の bFGF 刺激に伴う経時的発現を real-time PCR 法で解析した。

5) 異なる時相における抗 bFGF 中和抗体投与による bFGF の軟骨新生の阻止

bFGF (5 μ g/ml) 0.1ml を実験1)と同様に耳介軟骨膜上に注入し, 注入した bFGF の50%が中和される IgG 量を含む抗 bFGF 中和抗体 (Cosmo Bio, 1mg/ml) を異なる時相で注入し, 1)と同様に軟骨新生を評価した。

6) bFGF の臨床応用にむけた基礎的検討: 耳介軟骨欠損モデルに対する bFGF 含有充填基材による治療的効果

2 mm大の耳介軟骨全層欠損モデルを作製し, 生食水あるいは bFGF を含有した基材 (ゼラチンハイドロゲル) を欠損部に充填し, 1 ヶ月後に採取のうえ組織染色 (HE, Alcian blue 染色) を行った。

3. 統計学的検定

ソフトウェア StatView 5.0 (Cary, NC) を用い, パラメトリック検定は ANOVA による多重比較検討を, ノンパラメトリック検定には Kruskal Wallis 法を用いた。p<0.05 を有意水準とした。

実験成績

bFGF 注入1週間後から耳介軟骨膜細胞の増殖が始まり, 3 ヶ月後まで増殖は持続した。1 ヶ月以降では増殖軟骨膜組織の弾性軟骨への分化が観察された。この変化は, bFGF 濃度が 5 μ g/ml 以上で濃度依存的であった。炎症惹起モデルでは, 軟骨細胞増殖は認めなかった。FGF 受容体に関しては, FGFR2 遺伝子発現が bFGF 注入前と注入後1週間までの軟骨膜で検出された。抗 bFGF 中和抗体による軟骨新生阻止には注入直後の中和が必須であった。耳介軟骨欠損モデルでは, 欠損周辺部軟骨膜細胞への bFGF 刺激による軟骨修復効果が認められたが, 新生軟骨による完全修復には至らなかった。

総括および結論

本研究では以下のことが明らかになった。bFGF 注入により家兎耳介軟骨膜細胞に対し増殖と分化が誘導された。bFGF 製剤注入部位では注入 24～72 時間後に強い急性炎症反応が観察され、炎症により惹起される非特異的反応の可能性も考えられたが、大腸菌注入による炎症モデルでは軟骨膜増殖や分化は誘導されず、否定的であった。また bFGF による軟骨膜細胞の増殖促進と軟骨新生作用は、bFGF 濃度依存性に活性化が上昇した。中和抗体を用いた実験では、中和抗体を bFGF 注入直後に投与した群では 1 ヶ月後の軟骨新生は高度に抑制されるのに対して、1 週間後および 2 週間後の中和抗体投与は 1 ヶ月後の軟骨新生にはほとんど影響を及ぼさなかったことから、注入した bFGF のプロテオグリカンへの結合による徐放化や軟骨膜周辺細胞からの bFGF の持続的産生の可能性は否定的であり、bFGF による家兎耳介軟骨膜細胞の増殖促進と分化誘導作用には、bFGF 注入後初期の作用が重要であると考えた。FGF 受容体に関しては、FGFR2 遺伝子は安静時の耳介軟骨膜細胞において発現を認め、bFGF 注入 24、48 時間後には一旦低下したが 1 週間後には再度発現が回復し、2 週間後には FGFR2 遺伝子の発現は顕著に低下した。bFGF 注入後の FGFR2 発現の経時的変化の解釈は困難であるが、組織学的観察から推察すると、注入 1～2 週間後の発現低下は軟骨膜細胞周辺に生じた急性炎症反応のために FGFR2 非発現炎症細胞が多数混入し、希釈効果のため軟骨膜細胞の FGFR2 / GAPDH 遺伝子発現比が見かけ上低下した可能性が推測された。耳介軟骨欠損モデルを用いた検討では、ゼラチンハイドロゲル単独充填群では欠損部は線維性癒痕組織で置換され、ハイドロゲル自身には軟骨再生誘導作用はなく、また、損傷に起因する内因性サイトカインや細胞増殖因子のみでは軟骨の再生・修復は困難であることが示された。bFGF 含有ゼラチンハイドロゲル充填群では、切断部の軟骨膜から連続性に新生軟骨が欠損部に誘導されたが、新生軟骨による欠損部の完全修復までは得られておらず、欠損部への bFGF 投与方法の更なる改善が必須であり、また、新生軟骨の長期経過に関する観察も必要と結論している。

論文審査結果の要旨

本研究は、耳介軟骨欠損に対する新規治療法の開発を目的とするもので、組織幹細胞を含有することが想定されている軟骨膜細胞に着目し、bFGF による増殖・分化誘導とその機序を *in vivo* で解析するとともに、将来の臨床応用に向け bFGF 含有充填基材を用いて軟骨膜細胞の増殖と分化の誘導による耳介軟骨欠損治療モデルの作製を試みた。その結果、bFGF の *in vivo* での軟骨膜細胞に対する増殖促進と弾性軟骨への分化誘導作用が家兎耳介軟骨膜上への注入により明らかになった。軟骨膜細胞における FGFR2 遺伝子の発現、効果の濃度依存性と中和抗体による抑制から、軟骨膜細胞に対する bFGF の直接作用であることが示された。また、中和抗体の作用時期と増殖効果の長期持続から高濃度 bFGF は軟骨膜中の組織幹細胞を刺激し活性化させる可能性が示された。さらに、耳介軟骨欠損治療モデルの成績から bFGF 含有充填基材による軟骨膜細胞の刺激を介した修復が確認され、臨床応用への可能性が示唆された。

本研究は bFGF による家兎耳介軟骨膜細胞の増殖・分化誘導を組織像から示し、その作用機序を検討したものである。また耳介軟骨欠損治療モデルの成績から bFGF 含有充填基

材による軟骨膜細胞の刺激を介した修復が組織像にて確認され、臨床応用への可能性が示されている。以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第35巻 第3号 平成22年

氏名 (生年月日)	孫 玥 (1980 年 12 月 13 日)
本 籍	中華人民共和国
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲 第 4 0 4 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Establishment and Characterization of two novel B cell lines (新規 B 細胞株 2 株の樹立と解析)
論文審査委員	主 査 犀 川 太 副 査 米 倉 秀 人 湊 宏

学位論文内容の要旨

研究目的

リンパ腫の中で, 18q21.3/BCL2 と 8q24/MYC の両遺伝子が免疫グロブリン (Ig) 遺伝子と転座した double hit lymphoma (DHL) は, 病理組織学的には Burkitt リンパ腫 (BL) とびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) の中間型の特徴を有する事が多く, 極めて予後不良の病型である。このような病型のリンパ腫の生物学的特性や治療反応性を検討するためには, 同様の遺伝子変異を有する細胞株を材料とした研究が有用である。今回我々は, BCL2 と MYC との両者の転座をもつ KM-Y 細胞と, MYC 遺伝子のみの転座をもつ KM-N 細胞を樹立しえたので, これら 2 つの新規細胞株の細胞遺伝子学的特性を検討した。

実験方法

高熱と多発リンパ節腫大, 脾腫を主徴として発症した BL と DLBCL の中間型の組織型の B 細胞性腫瘍のリンパ節細胞より KM-Y 細胞を樹立した。また, 慢性骨髄単球性白血病患者の経過中に急性増悪した症例のリンパ節より KM-N 細胞を樹立した。

これらの細胞株の細胞表面抗原 (フローサイトメトリー, サイトスピン標本を用いた免疫染色), 染色体分析 (G-banding, FISH 解析), BCL2 蛋白と P53 蛋白のウエスタンブロット解析, mRNA から RT-PCR による P53 遺伝子のダイレクト・シーケンスを行った。

実験成績

フローサイトメトリーならびに免疫染色による細胞表面解析により両細胞株はオリジナルの患者腫瘍細胞と同様のマーカーを有する細胞株である事が証明された。G-banding 法でも樹立細胞株は患者腫瘍細胞で見いだされた染色体転座と同様の異常が見いだされ, FISH 解析でも MYC および BCL2 遺伝子の転座の有無が確認された。ウエスタンブロッ

ト解析により, KM-Y 細胞は BCL2 蛋白が高発現していたが, P53 蛋白の発現は認められなかった。一方, KM-N 細胞では BCL2 蛋白発現は認めず, P53 蛋白の高発現を認めた。P53 遺伝子のシーケンスは, KM-Y では核酸位 350 で一方のアリルが G→C に変異した結果 electropherogram は double peak (N)を示し, アミノ酸の R→P への置換も認めた。KM-N では核酸位 952 で C→T への変異が認められアミノ酸も R→C にお置換を認めたが, electropherogram では single peak であった。

総括および結論

急激に悪化する経過をとった 2 症例由来の B 細胞株を樹立し, 細胞表面マーカーならびに染色体転座はオリジナルの患者細胞同様であった。特に KM-Y の如く明らかな double hit lymphoma 由来の細胞株は殆ど報告がなく, 貴重なものと考えられる。BCL2 は細胞のアポトーシスを阻害する事により不死化を起こす。一方 MYC は極めて早い細胞増殖を引き起こす。この両者が転座した double hit では細胞の不死化と急速な増加が共に起こるため, 臨床的には極めて予後不良な経過をとり, このような病型の新たな治療薬・治療法の確立が急務である。

今回の我々の検討により, 転座していた BCL2, MYC の遺伝子の他に, P53 遺伝子の変異ならびに蛋白発現異常も確認された。P53 は代表的な癌抑制遺伝子であるが, 遺伝子変異により dominant negative に働く事が知られている。KM-Y 細胞ではアミノ酸置換を伴う遺伝子変異が片方のアリルで認められ, P53 蛋白の発現は低下していた。一方, KM-N 細胞のシーケンスは, single peak のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異を示しており, これは両方のアリルが全く同じ変異を有しているか, 元々遺伝子が片方しかなかった loss of heterozygosity (LOH), あるいは変異の起こった遺伝子の反対のアリルの抑制などの可能性が考えられるが, 文献検索上でこの部位の変異は LOH によるものである事が知られている。

今回樹立した細胞株を用いて, 今後は BCL2 阻害剤や MYC 阻害剤を用いた細胞増殖阻止実験などを行う事で, 極めて予後不良の double hit lymphoma の治療戦略の確立を期待する。

論文審査結果の要旨

本研究は, リンパ腫の中でも極めて予後不良の亜群である double hit lymphoma の生物学的特性や治療反応性を検討し, 治療戦略の確立を目的に開始されている。ここで扱う double hit lymphoma とは, 染色体転座により 2 つのがん遺伝子 (アポトーシス抑制活性を持つ癌遺伝子 BCL2 と転写因子型癌遺伝子 MYC) が同一細胞内で免疫グロブリン重鎖遺伝子と再構成を起こしているリンパ腫である。申請者が目的とする研究には, この遺伝子変異を有する細胞株を材料とした解析が不可欠である。そのために, 申請者はまず, double hit lymphoma 患者から細胞株を樹立した。同時に, single hit として MYC 遺伝子の転座のみを有するリンパ腫患者からも細胞株を樹立し, 比較検討した。

【本研究の倫理性】

申請者は生前に患者から本研究のための細胞提供は文書による説明を行い, 同意を得て

いる。本例のリンパ腫診断のために行う遺伝子解析（BCL2, MYC, p53）は遺伝子解析研究倫理審査を必要としない。

【本研究の進達度】

樹立した細胞株の細胞学的特性および遺伝子学的検索は形態学的観察，フローサイトメトリーならびに免疫染色による細胞表面解析，染色体分析，およびFISH解析により，患者腫瘍とほぼ同一の性質を有することを示した。さらに，p53遺伝子変異を同定し，その蛋白発現をウエスタンブロット法により解析し，変異との関連を推定した。それぞれのデータは明確である。

【本研究の新規性】

まれなリンパ腫であるdouble hit lymphomaの細胞株を樹立した。さらに，新規のp53遺伝子変異を伴うp53蛋白発現異常を同定した。

【本研究の意義】

樹立された細胞株はサイトカインを必要としない増殖を示し，抗がん剤や新規の分子標的薬剤の感受性試験に有用である。さらに，今後，網羅的遺伝子発現解析により，double hit lymphomaの細胞特性や予後不良因子の解析が進むことが期待される。

以上により，本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第35巻 第4号 平成22年

氏名（生年月日）	あつみみきこ 渥美三貴子（昭和55年11月6日）
本籍	石川県
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第405号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Increased Level of LDL Cholesterol in Elderly Patients with Acute Ischemic Stroke Associated with Severe Hypertension (重度高血圧を伴った虚血性脳卒中後高齢者の LDL コレステロール上昇について)
論文審査委員	主査 梶波 康二 副査 中川 秀昭 松井 真

学位論文内容の要旨

研究目的

低比重リポ蛋白（LDL）コレステロールは動脈硬化性心血管系疾患の危険因子である。また悪性高血圧において HDL コレステロール低値，LDL コレステロール高値傾向などの脂質異常を示すことが報告されている。一方，高齢者脳卒中急性期に認められる重症高血圧は予後不良の徴候として知られるが，関与因子については十分調査されていない。本研究では，当院に救急搬送された高齢者虚血性脳卒中急性期における血圧高値への関与につき，血清 LDL-コレステロールおよび他血清脂質値について検討した。

実験方法

2002-2010 年に救急外来を受診し，MRI（DWI）画像診断で虚血性脳卒中とされた 162 例（男 85 例，女 77 例，71-97 歳）につき調査を行った。入院後 72 時間以内の最高血圧値により，55 例の対照群（収縮期血圧<160 mmHg かつ 拡張期血圧<100 mmHg），87 例の中等度高血圧群（収縮期高血圧 160 mmHg ～199 mmHg あるいは拡張期血圧 100 ～119 mmHg），20 例の重症高血圧群（収縮期血圧<200 mmHg あるいは拡張期血圧<120 mmHg）に分類し，3 群間で，虚血性脳卒中画像分類（アテローム血栓，再動脈閉塞，心原性脳塞栓），Body mass index（BMI），入院時 Glasgow Coma Scale（GCS），白血球数，血清 C-reactive protein（CRP）値，血清アルブミン値，既往歴（虚血性脳卒中，虚血性心疾患，心不全，慢性腎臓病，糖尿病），降圧薬治療および薬歴（アンジオテンシン-II 受容体拮抗薬，アンジオテンシン-I 変換酵素阻害薬，カルシウム拮抗薬，サイアザイド単剤，あるいは併用投与），および血清脂質値（総コレステロール，LDL コレステロール，HDL コレステロール，LDL/HDL

コレステロール比，トリグリセリド)につき比較検討した。単項目関与についてはt検定，連続変数については一元配置分散分析(ANOVA)により，カテゴリー変数については χ^2 検定を用い，関与因子($p < 0.1$)および年齢，性を交絡因子としてロジスティック回帰分析により独立関与性を求めた。

実験成績

3群間でANOVAおよび χ^2 検定で関与($p < 0.1$)を認めた項目は，GCS ($p < 0.001$)，白血球数 ($p = 0.001$)，降圧薬治療 ($p = 0.039$)であった。また3群間で関与を認めた血清脂質項目は総コレステロール ($p = 0.074$)，LDLコレステロール ($p = 0.001$)，LDL/HDL-コレステロール比 ($p = 0.046$)であった。年齢，性，GCS，白血球数，降圧薬治療により補正した，対照に比した重症高血圧には，総コレステロール (1 SD相当のodds比: 5.69, 95%信頼区間(CI): 1.97-16.5, $p = 0.001$)，LDLコレステロール (1 SD相当のodds比: 5.87, 95%CI: 2.07-16.6, $p = 0.001$)，LDL/HDL-コレステロール比 (1 SD相当のodds比: 2.05, 95%CI: 1.12-3.74, $p = 0.020$)はそれぞれいずれも独立有意関与因子となっており，また中等度高血圧に比した重症高血圧には，LDLコレステロール (1 SD相当のodds比: 1.87, 95%CI: 1.06-3.31, $p = 0.031$)は独立有意関与因子であった。対照に比し中等度高血圧には，年齢，性，GCS，白血球数，降圧薬治療により補正したこれら血清脂質値は独立有意関与因子となっていなかった。また，年齢，性，GCS，白血球数，降圧薬治療により補正したHDLコレステロールは，3群間で独立有意関与因子とならなかった。

総括および結論

本研究においては虚血性脳卒中急性期に見られる重症高血圧への関与因子を，対照群，中等度高血圧群との比較の下に検討した。血清LDLコレステロール値は，交絡因子補正後も，対照，中等度高血圧のいずれの群に比しても，高齢者虚血性脳卒中急性期の重篤高血圧への独立有意関与因子となっていることを新たに見出した。

論文審査結果の要旨

重症高血圧は虚血性脳卒中急性期にしばしば認められ，予後不良への危険因子となることが知られているが，これに関与する因子については十分明らかにされていない。今回，申請者は虚血性脳卒中急性期に認められる重症高血圧に対する血清脂質を含む臨床的因子の関与につき，高齢者虚血性脳卒中162例を対象に，発症後72時間の最高血圧を対照群，中等度高血圧群，重症高血圧群の3群に分け検討した。

本研究において，虚血性脳卒中急性期血圧高値に対する臨床因子として血中白血球数高値，Glasgow Coma Scale 低値，降圧薬服用既往高率が関与していた。年齢，性，およびこれら関与因子を交絡因子とし補正した多重ロジスティック回帰分析において，対照群と重篤高血圧群との比較では，LDLコレステロールおよび総コレステロールが1標準偏差上昇するごとに重症高血圧が出現するodds比はそれぞれ5.87および5.69と，独立有意関与因子となっていることを見出した。また中等度高血圧群と重症高血圧群との比較でも，LDLコレステロールが1標準偏差上昇するごとに重症高血圧が出現するodds比は1.87と

独立有意関与因子となっていた。

本研究において血清脂質に影響を与える脂質異常症薬服用例は当初から除外しており、また、これら虚血性脳卒中急性期血圧3群間で、血清脂質に影響を与えうる糖尿病、虚血性心疾患、慢性腎臓病などの臨床背景因子に有意な偏りはなく、また、血清脂質に影響を与えうる使用降圧薬の種類にも偏りがなかったことを確かめている。本研究においては、血清LDL コレステロール高値が高齢者虚血性脳卒中急性期に認められる重篤高血圧への独立有意関与因子となっていることを初めて示した。今後その機序の解明や血清脂質の経時的変化の検討など、研究のさらなる展開が期待される。

これらの本研究の成果は、予後不良の一因として知られる虚血性脳卒中急性期の重症高血圧の発症機序、その発症予防を考える上で重要な知見を提供すると考えられる。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第35巻 第4号 平成22年

氏名（生年月日）	ひろ ^{ひろ} ^{かわ} ^{わたる} 廣 川 渉 （昭和 32 年 12 月 1 日）
本 籍	石 川 県
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	乙 第 2 7 2 号
学位授与の日付	平成 2 2 年 9 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	Mild Metabolic Abnormalities, Abdominal Obesity and the Risk of Cardiovascular Diseases in Middle-Aged Japanese Men (中年日本人男性集団における軽度代謝異常, 腹部肥満と 循環器疾患発症のリスク)
論 文 審 査 委 員	主 査 梶 波 康 二 副 査 古 家 大 祐 本 多 隆 文

学位論文内容の要旨

研究目的

高血圧, 脂質異常, 高血糖などの因子と将来の循環器疾患の発症・死亡のリスクとの関係はほぼ段階的である。このため, 健康診断(健診)後の措置に関して, 中等度~重度の異常に対しては, 医療機関での管理(必要に応じて薬物療法)が適用されるが, 軽度の異常に対しては, 先ずは生活習慣の改善という非薬物療法が適用される。軽度な異常所見だけを有する者は, それがいくつあっても非薬物療法が適用されることが多い。これは 2008 年より開始された肥満に合併する代謝異常(高血圧, 脂質異常(高中性脂肪・低 HDL コレステロール), 高血糖)の同定・改善を主たる目的とする特定健康診断(健診)・特定保健指導においても適用されているものである。また, 特定健診・特定保健指導での優先的な介入対象は代謝異常を有する肥満者であるが, 比較的やせた集団である日本人においては, 代謝異常を有する非肥満者を看過できない。

このようなわが国の健診とその事後措置の現状などを考慮して, 健診受診者の将来の循環器疾患発症のリスクを評価することは, 現在のわが国の保健施策を考える上で重要である。特に, 非薬物療法が適用される軽度代謝異常の疾病発生への寄与を腹部肥満の有無別に評価することは公衆衛生学的見地から重要であると考えられる。しかし, これらに関連するエビデンスはないため, 本研究において検討された。

実験方法

対象者は北陸の某製造業事業所に勤務し, 1996 年の健康診断を受診した 35-59 歳の男性であった。健康診断では腹囲, 血圧, 血清脂質, 血糖などを測定した。循環器疾患の既

往を有する者や高血圧・高脂血症・糖尿病の治療中の者などを除いた 2,685 名を 11 年間追跡して、循環器疾患（虚血性心疾患と脳卒中）の発症を記録した。

日本のメタボリックシンドローム診断基準に基づいて高血圧、脂質異常、高血糖を定義し、次に特定健康診査・特定保健指導の受診勧奨判定値を用いて高血圧、脂質異常、高血糖を軽度異常と中等度～重度異常に分類した。血圧の軽度異常は、収縮期血圧 130～139mmHg または拡張期血圧 85～89mmHg、脂質の軽度異常は、中性脂肪 150～299mg/dl または HDL コレステロール 35～39mg/dl、血糖の軽度異常は、空腹時血糖 110～125mg/dl とし、各因子に関してこれを超えるレベルの異常を中等度～重度異常とした。血圧、脂質、血糖の三つのうちいずれにも異常がない場合は「代謝異常なし（正常）」、三つのうちいずれか一つ以上に軽度異常があるが、中等度～重度異常が全くない場合は「軽度代謝異常」、三つのうちいずれか一つ以上に中等度～重度異常がある場合は「中等度～重度代謝異常」と定義し、これを腹部肥満の有無で層化した六群間で、循環器疾患発症のリスクを比較した。また、腹部肥満・代謝異常が直接の原因となって発症する循環器疾患は集団全体で発症する循環器疾患の中でどれくらいの割合を占めているのか（人口寄与危険割合）についても検討した。

実験成績

「腹部肥満なし・代謝異常なし」と比べると、健診後の措置としては生活習慣の改善という非薬物療法が適用されることが多い「腹部肥満なし・軽度代謝異常」、「腹部肥満あり・代謝異常なし」および「腹部肥満あり・軽度代謝異常」の循環器疾患発症の相対危険度（95%信頼区間）は 1.49（0.63-3.52）、2.36（0.81-6.82）および 2.68（1.07-6.73）であった。また、医療機関受診を勧められる「腹部肥満なし・中等度～重度代謝異常」および「腹部肥満あり・中等度～重度代謝異常」の循環器疾患発症の相対危険度は 2.52（1.08-5.87）および 4.12（1.80-9.43）であった。

「腹部肥満なし・軽度代謝異常」の循環器疾患発症に対する人口寄与危険割合は 5.7%、「腹部肥満なし・中等度～重度代謝異常」は 11.4%、「腹部肥満あり・代謝異常なし」は 5.0%、「腹部肥満あり・軽度代謝異常」は 8.6%、「腹部肥満あり・中等度～重度代謝異常」は 17.0%であった。

総括および結論

健診後の措置として、先ず生活習慣の改善という非薬物療法が適用される軽度な代謝異常を有する者でも循環器疾患発症のリスクは高く、平均すれば腹部肥満も代謝異常もない人と比べると約 2 倍高いリスクを持っているといえる。特に肥満を伴って軽度代謝異常を有する者のリスクはより高いと思われる。

非薬物療法が適用されるような軽度な異常が直接の原因となって発症する循環器疾患は、集団から発症する循環器疾患の約 20%を占めると思われるが、生活習慣の改善によって軽度代謝異常や腹部肥満は改善される可能性があるため、理論的にはこの 20%に相当する循環器疾患は薬物療法を用いなくとも予防可能であると考えられる。このうち、腹部肥満単独および腹部肥満に伴った軽度代謝異常の寄与は約 15%であり、これは摂取カロリーの適正化や運動など肥満を解消させる非薬物療法によって予防をはかる循環器疾患である。

一方、非肥満状態の軽度代謝異常の寄与は約 5%であり、これは減塩などのその他の非薬物療法によって予防をはかる循環器疾患である。健診後の適切な保健指導は循環器疾患の予防にかなり貢献する可能性があるといえる。

論文審査結果の要旨

高血圧、脂質異常（高中性脂肪・低 HDL コレステロール）、高血糖、腹部肥満が集積した状態であるメタボリックシンドロームが、循環器疾患（虚血性心疾患と脳卒中）のハイリスク状態であることは国内外の疫学研究から明らかである。しかし、これまで蓄積されてきたメタボリックシンドロームに関するエビデンスに不足しているものは、その構成要素（高血圧など）の重症度を加味した循環器疾患発症の危険度評価に関する情報である。これは、2008 年より始まった特定健康診断（健診）・特定保健指導において軽度な異常所見だけを有するために生活習慣の改善という非薬物療法が適用される者の循環器疾患発症のリスクはどれくらいであるのか、また、そのような軽度代謝異常が直接の原因となって発症する循環器疾患が集団全体で発症する循環器疾患の中でどれくらいの割合を占めているのか、というわが国の保健施策上の重要な疑問に対する回答となり得る情報でもある。本研究結果から、腹部肥満も代謝異常もない者と比べると、軽度な代謝異常だけを有する者の平均的な循環器疾患発症のリスクは約 2 倍高いと推測され、特に肥満を伴って軽度代謝異常を有する者のほうが循環器疾患発症のリスクが高い傾向であった。詳細な検討を行うには限界があったものの、軽度代謝異常と判定される肥満者の中には複数の軽度代謝異常を有する肥満者も存在し、そのような軽度異常が集積した肥満者は医療機関受診を勧められる中等度～重度代謝異常を有する非肥満者と同等（もしくはそれ以上）の循環器疾患発症のリスクを有する可能性があることが示唆された。また、非薬物療法が適用されるような軽度な異常が直接の原因となって発症する循環器疾患は、集団から発症する循環器疾患の約 20%を占めることを推定した。これは理論的には健診後の適切な保健指導によって改善される可能性がある軽度代謝異常や腹部肥満に起因した循環器疾患であり、健診後の適切な保健指導は循環器疾患の予防にかなり貢献する可能性があり、その重要性を示唆するものである。このように、メタボリックシンドロームに関する先行研究にはない視点を取り入れた本研究は、わが国の保健施策の評価に資する公衆衛生学的に重要な情報を提供するだけでなく、メタボリックシンドロームの概念に関して今後さらなる検討を要するという学術的な提言をするものでもある。

以上により、本論文は博士（医学）の学位を授与するに値するものと認められる。

（主論文公表誌）

Journal of Atherosclerosis and Thrombosis Vol.17, No.9, 2010

氏名（生年月日）	こ いずみ は つき 小 泉 葉 月 （昭和 49 年 8 月 7 日）
本 籍	石 川 県
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	乙 第 2 7 3 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 1 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	強迫性障害患者における functional MRI を用いた前頭葉機能を反映する認知課題施行時の脳活動に関する研究
論 文 審 査 委 員	主 査 松 井 真 副 査 利 波 久 雄 加 藤 伸 郎

学位論文内容の要旨

研究目的

本研究の目的は、強迫性障害（以下 OCD）患者に知能検査と前頭葉機能検査を含んだ包括的な神経心理学検査を施行することにより、OCD と前頭葉機能低下の関連性について明らかにすることである。また、前頭葉機能を鋭敏に反映すると考えられる発想の流暢性や記憶を反映する課題施行時の脳活動を functional MRI（fMRI）を用いて測定し、OCD 患者における強迫症状と前頭葉機能障害の関連性について検討した。

実験方法

対象は 2008 年～2009 年間に精神科で Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-Fourth Edition (DSM-IV)に基づき OCD の診断を受けた外来患者 11 名と、性別と年齢がマッチした健常者 11 名の計 22 名である。強迫症状の評価尺度として Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale (Y-BOCS) を施行し、神経心理学検査として Wechsler Adult Intelligence Scale-3rd edition (WAIS-III), Wisconsin Card Sorting Test (WCST), Modified Stroop Test (MST), Verbal Fluency Test (VFT), Idea Fluency Test (IFT), Rey-Auditory Verbal Learning Test (RAVLT) を施行した。また f-MRI では、タスクとして課題 1: 発想の生成 (IFT), 課題 2: 言語の生成 (VFT), 課題 3: 記銘した単語の想起 (RAVLT) を行い、レストでは何も考えずリラックスして過ごすように教示した。全課題において、タスクとレストを交互に 5 回繰り返すブロックデザインを用い、statistical parametrical mapping (SPM) を用いた Z 検定により f-MRI の測定値の差を検定した。

倫理的配慮として、本研究は金沢医科大学の倫理委員会の承認を受けており、学会や医学論文で報告・検討されることについて全ての被検者より書面で同意を得て行った。

実験成績

Y-BOCS では強迫観念・強迫行為得点ともに有意差がみられた。神経心理学検査の結果では、WAIS-III で有意差は無かったが、WCST では達成カテゴリー数 (CA) と総合エラー数 (TE) で有意差を認め、MST では PartI のみで有意差を認めた。VFT では文字流暢性と意味カテゴリー流暢性の双方において、OCD 群で生成数が少なかった。IFT の全回答数も OCD 群が少なかった。RAVLT では第 1 施行, 第 5 施行, また干渉課題後の遅延再生でも OCD 群における想起数が少なかった。

Y-BOCS 得点と神経心理学検査の間には、WCST の CA と強迫観念および強迫行為得点との間に負の相関を、また TE と強迫観念および強迫行為得点との間に正の相関を認めた。MST では、PartI と強迫行為得点との間に正の相関を認めた。VFT は文字流暢性とカテゴリー流暢性がともに強迫観念および強迫行為得点と強い負の相関を示し、IFT でも同様の結果を得た。RAVLT ではリスト B と強迫観念得点との間に負の相関を、またリスト A 第 1 施行と第 5 施行, リスト B, 遅延再生において強迫行為得点との間に負の相関を認めた。

また f-MRI による機能的脳画像では、課題 1 (IFT) 施行中に OCD 群が対照群と比較して左前部帯状回で多い賦活を認めた。また脳賦活部位の voxel 数と Y-BOCS 得点との相関係数では、両側中前頭回と強迫観念得点および強迫行為得点との間に負の相関を認めた。さらに、両側前部帯状回と強迫観念および強迫行為得点との間に正の相関を認めた。課題 2 (VFT) では両群間に有意差はみられなかった。課題 3 (RAVLT) では OCD 群の左中前頭回と右中前頭回で有意に賦活が少なかった。脳賦活部位の voxel 数と Y-BOCS 得点との相関係数では、両側中前頭回と強迫観念および強迫行為得点との間に負の相関を、両側前部帯状回と強迫観念得点との間に正の相関を認めた。

総括および結論

本研究では、言語の流暢性、遂行機能、注意機能や記憶を反映する神経心理学検査の成績低下から、OCD 群における前頭葉機能の低下が示された。また、f-MRI による機能的脳画像では、課題 1 (IFT) 施行中に OCD 群の左前部帯状回で健常者に比して有意の賦活点増加を認め、課題 3 (RAVLT) では OCD 群で両側中前頭回の賦活が有意に少なかった。さらに強迫症状の重症度は発想や言語の流暢性、遂行機能、注意機能や記憶を反映する検査の成績と相関を示し、前部帯状回や中前頭回の脳活動とも有意な相関を認めたことから、OCD 患者では前頭葉機能測定検査の点数低下、前頭葉の特定の部位の脳活動の異常、強迫症状が相互的に関与していることが推測された。

本研究の限界としては、対象の人数が少なかったことや患者の服薬状況が一定でなかったことが挙げられるが、同じ task であれば OCD 患者に対する投薬の有無に関わらず fMRI の結果は異ならなかったとする報告があり、今回の研究の validity は保たれていると判断した。

今後は対象例数を増やし、本研究で明らかにされた OCD 患者における神経心理学検査の成績低下や、機能的脳画像における脳活動の異常が、治療前後で強迫症状の改善に伴いどのように変化するかを経時的に調査し、強迫症状の発現機序の解明や新規の治療法の開発に応用していくことが必要である。

論文審査結果の要旨

本論文は、11名の強迫性障害患者と11名の健常人において、詳細な神経心理学的検査パネルを行うことにより、同検査がOCD患者診療にどのような意義を持つかを、検査パネルのtask施行時の脳機能局在をfunctional MRI (fMRI) で解析することにより明らかにしようと試みた独創性のある内容を備えている。

申請者は、知能検査では健常対照群と有意差のない強迫性障害患者において、主として前頭葉に関連した機能を評価し得ると認められている神経心理学的検査を行うと、患者群で得点が低く出る（すなわち前頭葉機能障害がある）ことを明らかにした。次に、fMRIによる解析結果との関連を追究することにより、患者群では優位側（左）前部帯状回の賦活が健常者に比して多いこと、さらに両側の中前頭回での賦活はむしろ低下していることを明らかにした。この結果は、前部帯状回は内的動機が発生する場であること、そして中前頭回は内的衝動の抑制の場であるという既に知られた研究成果と合致している。すなわち本研究は、強迫性障害患者では実際に内的衝動が起きやすく、その衝動を抑制する機能は低下しているという、いずれも前頭葉の特定の部位に由来すると考えられる機能異常に起因することを明らかにした。強迫性障害の病態機序の少なくとも一部を解明し得た研究であると評価できる。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第35巻 第4号 平成22年

氏名（生年月日）	釘 抜 康 明 （昭和 31 年 9 月 1 日）
本 籍	石 川 県
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	乙 第 2 7 4 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 1 0 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	肝線維化評価における 3T-MRI による肝 ADC 値の有用性に関する研究
論 文 審 査 委 員	主 査 有 沢 富 康 副 査 小 坂 健 夫 湊 宏

学位論文内容の要旨

研究目的

肝線維化の評価は、肝炎の重症化や発がんなどを予測する上で非常に重要である。肝生検は線維化評価の gold standard であるが合併症の危険性があり、画像診断手法を用いて肝線維化を非侵襲的に評価する試みが多く行われている。MRI diffusion weighted imaging (DWI) は組織内部にある水分子のランダムな動きを画像化する撮像法であるが、最近、肝 DWI から算出される apparent diffusion coefficient (ADC) 値が肝線維化の評価に有用であるという報告が注目されている。DWI の撮像に際し、呼吸性移動や消化管の蠕動運動による susceptibility artifact が問題となる。そのため artifact を軽減する目的で、呼吸停止下にデータを収集する multi-breath hold (MBH) 法が一般的に行われている。MBH 法では signal-to-noise-ratio (SNR) 低下による ADC 値の信頼性低下を指摘する報告もみられる。artifact を軽減する別の手法として呼吸トリガー法がある。呼吸トリガー法では SNR が向上する利点があるが、撮像時間は長くなる。最近新しい呼吸トリガー法として navigator-echo を用いて臓器の位置変動をリアルタイムに把握する prospective acquisition correction (PACE) 法が開発され、注目を集めている。

2005 年末から臨床応用が開始された 3T-MRI は従来の 1.5T-MRI に比し、SNR が約 2 倍に向上する半面、artifact が顕著になる欠点も指摘されている。ADC 値による肝線維化評価の試みは 1.5T-MRI での報告が大部分であり、3T-MRI を用いた報告はまだない。

今回の研究目的は、1) 3T-MRI を用い、MBH 法と PACE 法の 2 手法で DWI を撮像し、肝 ADC 値の測定精度を比較検討する、2) 1) の検討で ADC 値の測定精度が高かった手法を用い、臨床例を対象に肝 ADC 値と肝線維化との関連性を検討する、の 2 点である。なお、本研究は金沢医科大学臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

基礎実験-方法

健常ボランティア 10 例 (27-53 歳, 男性 7 名, 女性 3 名) を対象に, 3T-MRI による MBH 法と PACE 法の 2 手法で DWI を撮像し, 肝 ADC 値の比較検討を行った。使用した MRI 装置は静磁場強度 45mT/m であり, 受信用コイルとして 16 チャンネルコイルを用いた。DWI は single-shot echo-planar 法を用いた。MBH 法は repetition time (TR) /echo time (TE) が 1500ms/68ms であり, 5mm スライス画像を 15 秒の呼吸停止下で得た。PACE 法は横隔膜上に navigator を設置して, 5mm スライス画像を約 1 分 30 秒~2 分の安静呼吸下で得た。TR/TE は 4000-6000ms/68ms である。DWI は b 値 0, 400, 800 秒/mm² の 3 つの画像を同時に撮像した。得られた 3 つの画像を用いて ADC マップを作成した。ADC マップ上, 2 スライス面で肝内に region-of-interest (ROI) をそれぞれ 2 か所設定して ADC 値, standard deviation (SD), coefficient variation (CV) を測定し, 比較検討した。さらに両手法における b 値 0, 400, 800 秒/mm² の 3 つの DWI 画像の肝とバックグラウンドの信号強度をそれぞれ測定し, SNR を算出して比較検討した。

基礎実験-成績

ADC 値は MBH 法が $1.21 \pm 0.08 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$, PACE 法が $1.36 \pm 0.07 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$ であり, PACE 法が有意に高値であった ($p < 0.001$)。一方 SD は MBH 法が 0.51 ± 0.11 , PACE 法が 0.33 ± 0.12 , CV は MBH 法が 0.42, PACE 法が 0.24 であり, いずれも PACE 法が有意に小さかった ($p < 0.001$)。SNR は b 値 0 秒/mm² では MBH 法が 4.71 ± 2.14 , PACE 法が 6.95 ± 2.65 であり, PACE 法が有意に高かった ($p < 0.001$)。一方, b 値 400 秒/mm² では MBH 法が 4.08 ± 2.14 , PACE 法が 4.97 ± 2.37 ($p = 0.11$), b 値 800 秒/mm² では MBH 法が 3.38 ± 1.57 , PACE 法が 3.84 ± 1.88 ($p = 0.20$) であり, いずれも PACE 法の方が高い傾向がみられた。

臨床実験-方法

基礎実験でデータを収集した健常ボランティア 10 例を含む 53 例 (27-83 歳, 男性 32 名, 女性 21 名) を対象に, 肝 ADC 値と肝線維化との関連性を検討した。53 例のうち肝生検が施行された症例は 26 例である。画像所見・血液検査所見が正常であった肝血管腫 3 例, 胆石症 1 例は正常例に含めた。肝生検未施行であるが, 画像所見・血液検査所見から臨床的に肝硬変と診断された 13 例も研究対象に含めた。DWI の撮像には基礎実験で ADC 値の測定精度が高いと判定された PACE 法を用いた。肝線維化の指標には新犬山分類を用いた。

また F2 以上, F3 以上の肝線維化の予測が ADC 値で可能かどうか receiver operating characteristic (ROC) 曲線を用いて解析した。更に ADC 値と肝線維化マーカーから線維化スコアがどの程度予測・説明されるか, 単回帰及び重回帰分析を用いて検討した。

臨床実験-成績

肝生検が施行された 26 症例の肝線維化スコア (F 値) 別の内訳は F0 : 2 例, F1 : 6 例, F2 : 4 例, F3 : 5 例, F4 : 9 例である。正常例の ADC の平均値は $1.36 \pm 0.06 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$ であった。肝線維化スコア別での ADC の平均値は F1 : $1.24 \pm 0.05 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$, F2 : $1.17 \pm 0.11 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$, F3 : $1.18 \pm 0.08 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$, F4 : $1.09 \pm 0.11 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$ で

あった。ADC 値は正常-F1 間 ($p<0.001$), F1-F2 間 ($p<0.05$), F3-F4 間 ($p<0.05$) でいずれも有意差を認めた (Mann-Whitney の U 検定)。F2-F3 間では明らかな有意差は認めなかった。F 値と ADC 値の順位相関では有意な相関関係が認められた (順位相関係数= -0.823 , $p<0.001$, Spearman ランクテスト)。ROC 曲線下面積は F2 以上の識別能で 0.957 , F3 以上の識別能で 0.910 であった。ROC 曲線から求めた F2 以上の識別における ADC のカットオフ値は $1.29 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$ であり, このときの感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率はそれぞれ 72.7% , 100% , 100% , 83.8% であった。一方, F3 以上の識別における ADC のカットオフ値は $1.20 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$ であり, この場合の感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率はそれぞれ 88.5% , 85.2% , 85.2% , 88.5% であった。F 値を目的変数, ADC 値と肝線維化マーカー (血小板数, ヒアルロン酸値, IV型コラーゲン値) を説明変数として単回帰分析を行った結果, 相関係数は肝 ADC 値が -0.768 , 血小板数が -0.844 , ヒアルロン酸値が 0.533 , IV型コラーゲン値が 0.473 であった。IV型コラーゲン値を除く上位 3 因子で重回帰分析を行った結果, ADC 値と血小板数が有意な説明変数であり, $F \text{ 値} = 8.812 - 3.370 \times [\text{ADC 値}] - 0.015 \times [\text{血小板値} \times 10^{-3}]$ の重回帰予測式が得られた。

総括および結論

健常ボランティアによる MBH 法と PACE 法との比較検討では, PACE 法の方が ADC 値は有意に高値を呈した。DWI の SNR が PACE 法の方が高いこと, PACE 法の方が TR が長いことがその理由として考えられた。一方, SD, CV はともに PACE 法の方が有意に小さかった。この結果から ADC 値の測定精度は PACE 法の方が優れていることが示された。

臨床例 53 例による肝 ADC 値と線維化スコアとの比較検討では, PACE 法による DWI 画像から得られた肝 ADC 値は線維化スコアとよく相関していた。ROC 曲線から F2 以上, F3 以上を識別する ADC のカットオフ値としてそれぞれ 1.29 , 1.20 が得られた。肝 ADC 値と肝線維化マーカーを説明変数とした重回帰分析の結果, ADC 値と血小板数が有意因子であり $F \text{ 値} = 8.812 - 3.370 \times [\text{ADC 値}] - 0.015 \times [\text{血小板数} \times 10^{-3}]$ の重回帰予測式が得られた。

以上の検討の結果, 3T-MRI を用いた PACE 法による DWI から算出される肝 ADC 値は肝線維化評価に有用であることが示された。

論文審査結果の要旨

肝線維化の評価は, 肝炎の重症化や発がんなどを予測する上で非常に重要である。MRI diffusion weighted imaging (DWI) は組織内部にある水分子のランダムな動きを画像化する撮像法であるが, 肝 DWI から算出される apparent diffusion coefficient (ADC) 値が肝線維化の評価に有用であるという報告が注目されている。DWI の撮像に際し, 呼吸性移動や消化管の蠕動運動による susceptibility artifact が問題となるが artifact を軽減する目的で, 呼吸停止下にデータを収集する multi-breath hold (MBH) 法が一般的に行われている。artifact を軽減する別の手法として呼吸トリガー法がある。最近, 新しい呼吸トリガー法として navigator-echo を用いて臓器の位置変動をリアルタイムに把握する prospective acquisition correction (PACE) 法が開発された。2005 年末から臨床応用が開始された高磁場 3T-MRI は従来の 1.5T-MRI に比し, SNR が約 2 倍に向上する半面,

artifact が顕著になる欠点も指摘されている。このため ADC 値による肝線維化評価の試みは 1.5T-MRI での報告が大部分であり、3T-MRI を用いた報告はまだない。

本研究の目的は、1) 3T-MRI を用い、MBH 法と PACE 法の 2 手法で DWI を撮像し、肝 ADC 値の測定精度を比較検討する、2) 1) の検討で ADC 値の測定精度が高かった手法を用い、臨床例を対象に肝 ADC 値と肝線維化との関連性を検討する、の 2 点である。

申請者は、本研究において次のような結果を得ている。

1. 健常ボランティアによる MBH 法と PACE 法との比較検討では、PACE 法の方が ADC 値は有意に高値を呈した。DWI の SNR が PACE 法の方が高いこと、PACE 法の方 TR が長いことがその理由として考えられた。一方、SD、CV はともに PACE 法の方が有意に小さかった。この結果から ADC 値の測定精度は PACE 法の方が優れていることが示された。
2. 臨床例 53 例による肝 ADC 値と線維化スコアとの比較検討では、PACE 法による DWI 画像から得られた肝 ADC 値は線維化スコアとよく相関していた。ROC 曲線から F2 以上、F3 以上を識別する ADC のカットオフ値としてそれぞれ 1.29、1.20 が得られた。肝 ADC 値と肝線維化マーカーを説明変数とした重回帰分析の結果、ADC 値と血小板数が有意因子であり、 F 値= $8.812-3.370 \times [\text{ADC 値}]-0.015 \times [\text{血小板数} \times 10^{-3}]$ の重回帰予測式が得られた。

今回の研究により、3T-MRI を用いた PACE 法による DWI から算出される肝 ADC 値は肝線維化評価に有用であることが示された。これらの新知見は、臨床上大きな可能性を有し、きわめて有意義と考えられる。

以上により、本論文は博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められる。

(主論文公表誌)

金沢医科大学雑誌 第 35 巻 第 4 号 平成 22 年